

平成22年 3月 22日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18550161

研究課題名（和文） 海綿由来のイオンチャンネル、ポリセオドミ B の立体構造と機能

研究課題名（英文） Three-dimensional structure and function of polytheonamide B, a channel-forming polypeptide from a marine sponge

研究代表者

濱田 季之（HAMADA TOSHIYUKI）

鹿児島大学・理学部・准教授

研究者番号：40321799

研究成果の概要：

日本近海産海綿 *Theonella swinhoei* から単離した細胞毒性ポリペプチド、ポリセオナミド B は、多数の異常アミノ酸や D 型アミノ酸を含んでいる。また、生体膜においてチャンネルとして機能することが期待できる。本研究において、NMR法を用いて有機溶媒中での三次元構造を決定した。また、界面活性剤などに取り込んだポリセオナミド B について、NMR構造解析と結晶化を行った。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2004年度 | | | |
| 2005年度 | | | |
| 2006年度 | 1,500,000 | 0 | 1,500,000 |
| 2007年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2008年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 総計 | 3,700,000 | 660,000 | 4,360,000 |

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ポリセオナミド B、チャンネル、海綿、NMR、界面活性剤、三次元構造

1. 研究開始当初の背景

海綿、腔腸動物などの海洋無脊椎動物には、抗菌・抗カビ性、抗腫瘍性、あるいは病態に関与する酵素に対する阻害活性をもつ二次代謝産物が無尽蔵に含まれている。その中でも、日本近海に生息する海綿 *Theonella swinhoei* は多彩な生物活性物質の宝庫で、50 種以上の特異な新規化合物が得られている。研究代表者らは、同海綿から非常に強い細胞毒性を持つポリペプチド、ポリセオナミド B (polytheonamide B) を単離した。ポリセオナミド B は、分子量が 5,033 で既知の天然有機化合物（二次代謝産物）の中では最も

大きいものであった。また、2 次元 NMR を主体とした構造解析の結果、このポリセオナミド B は、48 残基のアミノ酸で構成され、多数の異常アミノ酸を含んでいることが分かった。しかも、構成アミノ酸の約半数が D 型という珍しい性状を示した。最近、アミノ酸残基の絶対配置を含めた、ポリセオナミド B の化学構造を決定した (Figure 1)。ポリセオナミド B は、N 末端が α - β -ケトカルボン酸で修飾され、*a*Thr, *threo*- β -hydroxyasparagine, *t*-Leu, β -methylglutamine, β -hydroxyvaline, β -methylisoleucin といった非リボソーム由来のアミノ酸を数多く

含んでいた。また、44 残基目の β, β -dimethylmethionine sulfoxide [Me₂Met(O)] は、新規アミノ酸であった。更に、*N*末端から *C*末端まで D 型と L 型アミノ酸残基が交互に配列することも分かった。

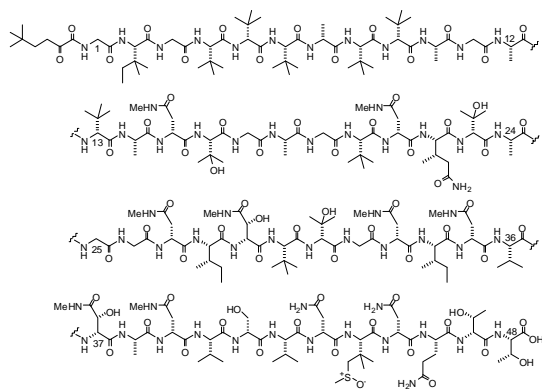


Figure 1. ポリセオナミド B の化学構造

福井大学医学部の老木成稔教授らとの共同研究において、ポリセオナミド B の脂質平面膜実験を行ない、このペプチドが単一分子レベルで、イオンチャンネルを形成することが分かった。また、興味深いことに、このチャンネルは膜電位依存性や整流性を示しており、わずか 48 残基のペプチドではあるものの Na チャンネルや K チャンネルなどの生体チャンネルに非常に近い化合物であることが分かった。

上記に示したポリセオナミド B の多様な機能が、ペプチド分子の立体的構造のどこに書き込まれているのかという点に強い興味を惹かれ、あらゆる角度から生体膜中でのポリセオナミド B の多次元(三次元または四次元)構造の解析を試みることにした。

2. 研究の目的

ポリセオナミド B チャンネル分子に書き込まれた構造原理の解明を目的とし、NMR (液体、固体) や X 線を用いて疑似生体膜である界面活性剤ミセルや脂質二重膜中のポリセオナミド B の多次元構造と機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ポリセオナミド B の大量調製

日本近海で海綿 *Theonella swinhoei* を採集し、エタノール分画、溶媒分画、フラッシュクロマトグラフィー、ゲルろ過、および逆相 HPLC により、ポリセオナミド B を単離する。

(2) 有機溶媒中での溶液 NMR 構造解析

有機溶媒中のポリセオナミド B について、高分解能 NMR 装置を用いて、2D NMR (NOESY, ROESY) スペクトルを測定・解析し、三次元構造を決定する。疑似生体膜中での三次元構造を考察するために、有機溶媒は重クロロホルムと重メタノールの混合溶媒 CDCl₃/CD₃OH (1:1) を用いる。

(3) ミセル中での溶液 NMR 構造解析

DPC ミセル中に取り込んだポリセオナミド B について、高分解能 NMR 装置を用いて、2D NMR (NOESY, ROESY) スペクトルを測定・解析し、三次元構造を決定する。ミセル中でポリセオナミド B の溶液 NMR 構造解析は、側鎖の長い界面活性剤が必要である。しかし、あまり側鎖の長い界面活性剤を使うと、より大きな直径のミセルが形成するため、ポリセオナミド B の「見かけの分子量」が増大し、T₂緩和速度が速くなるので、シグナルのブロード化が起こる危険性がある。そこで、このポリセオナミド B により適したミセルを形成する界面活性剤の探索も行う。

(4) ミセル中、脂質二重膜中における結晶化および X 線結晶構造解析

ミセル中、又は脂質二重膜中に取り込んだポリセオナミド B について、結晶化条件を検討する。結晶化条件を最適化した後、上記 1-5 で合成したセレノメチオン標識化ポリセオナミド B を用いて、結晶化する。X 線結晶構造解析が可能な良質の結晶が得られれば、MAD 法を用いた X 線結晶構造解析をし、結晶構造を決定する。

(5) ポリセオナミド B チャンネルの作用機序についての考察

得られた疑似生体膜中でのポリセオナミド B の立体構造上の知見をもとに、ポリセオナミド B のチャンネル活性の発現メカニズムを考察する。また、これらの知見をもとに、医薬として有効な機能性チャンネル分子の創製を計る。

4. 研究成果

(1) ポリセオナミド B の大量調製

鹿児島県奄美大島産海綿 *Theonella swinhoei* を採集し、エタノール分画、溶媒分画、フラッシュクロマトグラフィー、ゲルろ過、および逆相 HPLC を行い、ポリセオナミド B 約 15 mg を単離した。

(2) 有機溶媒中での溶液 NMR 構造解析

有機溶媒中のポリセオナミド B について、高分解能 NMR 装置を用いて、2D NMR (NOESY, ROESY) スペクトルを測定・解析した。得られた 501 個の距離制約条件と 48 個の二面角制

約条件をもとに、DADAS90、CYANA などを使って構造計算を行い、得られた最適構造を OPALp でエネルギー安定化し、最終構造を求めた。

以上の結果、ポリセオナミド B は、重クロロホルムと重メタノールの混合溶媒中で、6-7 残基で右巻きに一回転する大きなヘリックス構造 (right-handed $\beta^{6.3}$ helix) を形成することが分かった。この三次元構造は、チャンネル形成性ペプチド、グラミシジン A が脂質二重膜中での構造と類似していたが、グラミシジン A は 2 分子で生体膜を貫通するのに対し、ポリセオナミド B は軸方向の長さが約 45 オングストローム (45×10^{-10} m) であり、一分子で膜貫通可能である。また、グラミシジン A がトリプトファン残基で膜中の構造を安定化しているが、ポリセオナミド B にはトリプトファン残基は存在せず、分子内の側鎖の水素結合などで三次元構造を安定に保持していることが分かった。

ポリセオナミド B の三次元構造の座標は、PDB (Protein Data Bank) に登録した。投稿論文の掲載と合わせて、PDB 座標も公開される予定である。現在、論文投稿中であるため、三次元構造の詳細についての報告は割愛させていただきます。

(3) ミセル中での溶液 NMR 構造解析

CD (円二色性) スペクトルを用いて、最適な界面活性剤や諸条件を検討したところ、ポリセオナミド B を trifluoroethanol に溶解した後に dodecylphosphocholine (DPC) と 1:50 の比で混合し、55°C で 30 分超音波処理することで、三次元構造を保持したまま、安定なミセルを形成することが分かった。そこで、重水素化した DPC (DPC- d_{38}) に取り込んだポリセオナミド B の NOESY スペクトルを測定した (Figure 2)。

結果として、重クロロホルムと重メタノールの混合溶媒のものと同様に似たスペクトルを示し、このことからミセル中でも $\beta^{6.3}$ helix に近い三次元構造を取っていることが示唆された。

また、NOESY スペクトルにおいて、シグナルのシャープなものと同様にブロードなもの二種類が存在することが分かった。それらを解析すると、ポリセオナミド B の N 末端側の配列部分がブロード化していることが分かった。この結果より、N 末端のみが DPC ミセル中に挿入され、C 末端側は、溶媒中に突き出ていることが推察される。

DPC ミセル中のポリセオナミド B の三次元構造についても最終構造がほぼ決定できている状態である。2010 年度中の論文化を進めている。

(4) ミセル中、脂質二重膜中における結晶

化および X 線結晶構造解析

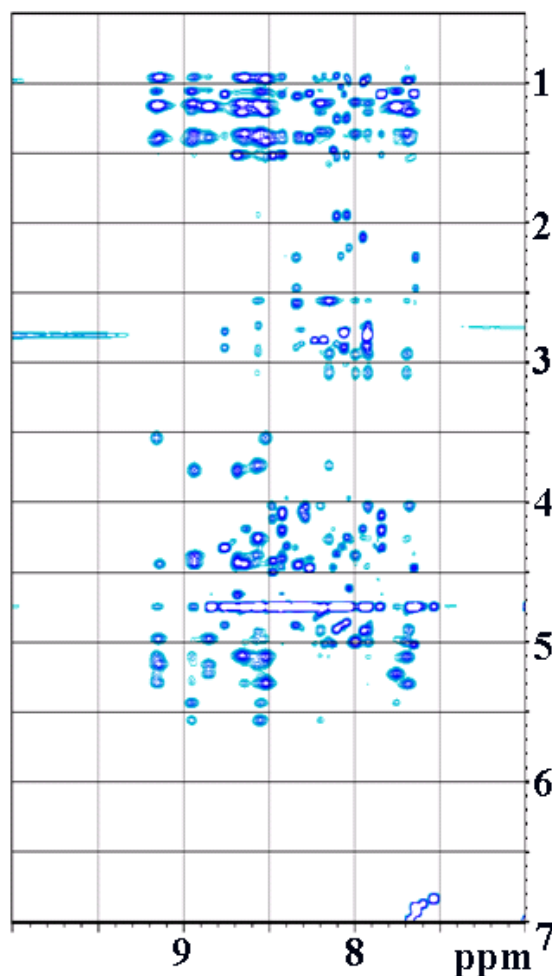


Figure 2. DPC- d_{38} ミセル中のポリセオナミド B の NOESY スペクトル

ミセル中、又は脂質二重膜中に取り込んだポリセオナミド B について、結晶化条件を検討した。いくつかの条件で結晶が出来ているものの結晶構造解析に使えるような良質の結晶は得られなかった。引き続き、結晶化を検討する予定である。

(5) ポリセオナミド B チャンネルの作用機序についての考察

ポリセオナミド B は、非常に強い細胞毒性を示す。その細胞毒性は、ポリセオナミド B の立体構造に関与することが本研究で明らかに出来た。つまり、ポリセオナミド B は、生体膜に対して 1 分子で貫通し、安定な陽イオンチャンネルを形成する。このチャンネルによって細胞のイオンバランスを崩壊させ、細胞死を導く。

今後は、これらの知見を下に、抗がん剤や新たなチャンネル分子の創製を試みていく予定である。

5. 主な発表論文等

現在、学術雑誌に投稿中である。

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 季之 (HAMADA TOSHIYUKI)

鹿児島大学・理学部・准教授

研究者番号：40321799

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し