

## 学位論文要旨

### Interaction mechanism between proteins and lipid membranes characterized by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy

(真空紫外円二色性によるタンパク質と生体膜の相互作用機構の解析)

氏名 熊代 宗弘

タンパク質と生体膜との相互作用は、膜内(細胞内)への薬物輸送や、神経細胞の軸索を覆うミエリン膜の形成、免疫系に関連する微生物細胞膜の膜構造破壊など、様々な生命現象と密接に関連する。これら生命現象のメカニズムの理解には膜に結合したタンパク質の構造解析が重要であるが、広く利用されている X 線結晶構造解析等の構造解析法では、リポソーム生体膜に結合したタンパク質の構造を調べることは困難である。本研究では、リポソーム生体膜存在下など様々な条件下での構造解析が可能な真空紫外円二色性(VUVCD)法を用いて、3つの膜結合タンパク質の構造-機能相関について調査した。以下、それぞれの研究課題について説明する。

#### 【VUVCD による薬物輸送物質 $\alpha_1$ 酸性糖タンパク質の生体膜相互作用研究】

$\alpha_1$  酸性糖タンパク質(AGP)は、細胞膜内への薬物輸送に関わるタンパク質であり、生体膜に結合し、構造変化することでその薬物輸送機能を発現する(図 1a)。一方、AGP と生体膜の相互作用機構には不明な点が多いため、AGP の構造-機能相関の理解に向け、さらなる調査が必要である。本研究では、5種類のリン脂質分子で作成された粒径 100nm のリポソーム生体膜と相互作用した AGP の構造を VUVCD により解析した。その結果、リン脂質分子の正味電荷が負であるリポソームと相互作用した AGP は、7本の  $\alpha$  ヘリックス構造を形成し、N 端と C 端の  $\alpha$  ヘリックス領域が膜結合部位であることが示唆された。また、タンパク質と生体膜との静電的相互作用を阻害する NaCl を添加した結果、C 端の  $\alpha$  ヘリックス領域が大きく減少した。これにより N 端と C 端の  $\alpha$  ヘリックスは、それぞれ疎水性と静電的相互作用で生体膜と結合していることが分かった。また N 端の  $\alpha$  ヘリックス領域は、薬物結合部位が集中しており、この領域の構造変化が薬物輸送機能に重要な部位であることが示された。

#### 【VUVCD と分子動力学によるミエリン塩基性タンパク質の膜結合構造の解析】

神経細胞の軸索周辺にあるミエリン鞘という絶縁性の組織は、細胞間の電気信号のやりとりを高速化する上で重要である。ミエリン鞘は生体膜の多層構造であり、この構造はミエリン塩基性タンパク質(MBP)が「糊」のように膜間を媒介することで形成される。ミエリン鞘の形成不全は多発性硬化症等の疾病を引き起こすが、それら疾病の発症メカニズムの理解のために MBP の膜結合構造の特徴化が必要である。本研究では、VUVCD 実験と分子動力学(MD)シミュレーションを用いて、MBP の膜結合構造を調査した。生体膜は、ミエリン内で MBP と特異的に結合するとされるホスファチジルイノシトール

類のリン脂質を用いて粒径 100 nm リポソーム生体膜を利用した。VUVCD 測定の結果、MBP は生体膜非存在下でランダムコイルが多い構造を形成し、生体膜存在下では  $\alpha$  ヘリックスが多い構造を形成することが分かった。二次構造解析の結果、MBP の膜結合構造の  $\alpha$  ヘリックスの含量は約 40%、本数は 8 本であることが分かった。MD を用いて、これら 8 本の  $\alpha$  ヘリックス断片の膜結合性を検証した結果、生体膜表面との静電的相互作用により膜結合する 3 つの非両親媒性ヘリックスと、生体膜表面との静電的相互作用と生体膜内部との疎水性相互作用により膜結合する 2 つの両親媒性ヘリックスが存在することが分かった。MBP はこれら 5 つの膜結合する  $\alpha$  ヘリックスを形成することで、ミエリン鞘の多層構造形成に寄与することが示された(図 1b)。

### 【VUVCD・直線二色性・蛍光異方性による抗菌ペプチドマガイニン 2 の膜結合に誘起された $\beta$ シート多量体構造の研究】

薬剤耐性は、世界中の医療で大きな課題である。抗菌ペプチド(AMP)は、微生物の細胞膜に結合し、膜構造を破壊することで抗菌作用を示し、薬剤耐性菌にも作用する。一方、医薬品としては副作用等により臨床応用性に限界があり、有効な AMP のデザイン戦略のため AMP の膜結合機構の更なる理解が必要である。本研究では、広く研究されてきたマガイニン 2(M2)をモデル AMP として、その膜結合機構を VUVCD 法と膜配向構造がわかる直線二色性(LD)法を用いて調査した。生体膜は、一部の細菌の細胞膜に存在する DPPG を用いて粒径 100nm のリポソーム生体膜を利用した。VUVCD 測定の結果、M2 は脂質対ペプチド(L/P)比の増加に伴い、中間状態を経由してランダムコイルから  $\alpha$  ヘリックスに構造変化することが分かった。物理モデルを用いた global fitting 解析から、M2 は膜上で  $\alpha$  ヘリックスの単量体から中間状態である  $\beta$  シートの多量体に変化することが分かり、LD 測定からこの  $\beta$  シートが生体膜表面に垂直に存在することが分かった。さらに、その多量体形成が生体膜に及ぼす影響について蛍光異方性を用いて調べた結果、多量体は膜構造を不安定化させることが分かった。以上の結果から、生体膜上での  $\beta$  シートの多量体の形成が M2 の抗菌作用の理解に重要であることが示された(図 1c)。

以上より、VUVCD 法は生体膜に結合したタンパク質の構造を調べる上で有効であり、また VUVCD と実験的(LD や蛍光異方性等)・理論的(MD 等)手法を組み合わせることで、膜結合タンパク質の構造-機能関連の理解に重要な洞察を与えることが分かった。

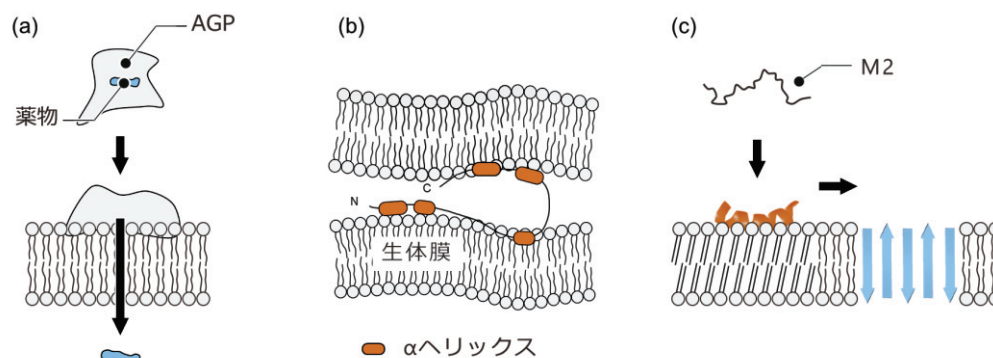


図 1 (a) AGP の薬物輸送機構の模式図、(b)ミエリン鞘内での MBP の膜結合構造の模式図、(c) M2 の抗菌作用機構の模式図。