

アンフォテリシン B - ステロール複合体の固体 NMR 解析
(阪大院理) 松森信明、梅川雄一、松下直弘、多原主哲、土川博史、
山本寛子、大石徹、 村田道雄

Membrane-bound complex of amphotericin B and sterol examined by
solid-state NMR

Nobuaki, Matsumori, Yuichi Umekawa, Naohiro Matsushita, Kazuaki
Tahara, Hiroshi Tsuchikawa, Hiroko Yamamoto, Tohru Oishi, Michio Murata
Graduate School of Science, Osaka University

To examine the interaction between AmBs in the presence and absence of ergosterol, REDOR (RDX) experiments were carried out using ^{19}F - and ^{13}C -labeled AmB. The interatomic distance among AmB molecules depended on ergosterol contents in membrane, indicating that ergosterol makes AmB assemblies more flexible, which possibly correspond to ion channels.

ある種の抗生物質は脂質二重膜中で自己組織化してイオン透過性チャネルを形成するが、これらチャネル複合体の構造はほとんど解明されていない。本研究で着目したアンフォテリシンB (AmB) は放線菌が生産する抗生物質で、発見以来 50 年を経た現在でも抗真菌剤としての地位を保っている。その生理活性は真菌類の細胞膜中で特異的に形成されるイオン透過性チャネル会合体に由来する。また、選択毒性はAmBが哺乳類のコレステロールよりも真菌の膜含有エルゴステロールに対して強い親和性を持つことに起因する。このチャネル会合体として、1970年代にAmB分子が円形に並んだ樽板モデルが提唱されて以来¹⁾、スペクトル測定、分子動力学計算をはじめ実に多くの研究がなされてきたが、いまだに自己会合体の詳細な構造は不明である。本研究では、AmBの自己会合体の精密構造解明を目指して、脂質膜系の測定に有効である固体NMRの適用を試みた。このためには、標識体を調製する必要があり、なかでも位置特異的な同位体標識が必要である。まず、ステロールとの分子認識に重要であると考えられる極性部分およびヘプタエン部分を、それぞれ ^{19}F で標識したAmB²⁾誘導体を調製し、REDORの変法であるRDX³⁾の測定を行った。その結果、図1のようにステロールの有無に関わらずAmBの2種のフッ素標識体 (14-F-AmBと28-F-AmB) および炭素-13の標識体の間にシグナルの減衰が観測され、分子親水性側同士、また、疎水性側同士が接近していることが判明した。

キーワード： アンフォテリシンB、脂質膜、REDOR、 ^2H NMR、エルゴステロール
まつもりのぶあき、うめかわゆういち、まつしたなおひろ、たはらかずあき、つちかわひろし、やまもとひろこ、おおいしとおる、むらたみちお

これらの結果は、樽板モデルを支持する。さらに、ステロールとAmBを連結した分子を調整し、同様の固体NMR測定によって、比較的短寿命のエルゴステロール-Amが形成する2分子複合体の構造解析を行った⁴⁻⁶⁾。また、ステロールと同様にイオンチャネル形成に重要な役割を担うリン脂質との相互作用も同様の手法を用いて明らかにしているのを併せて報告する⁷⁾。

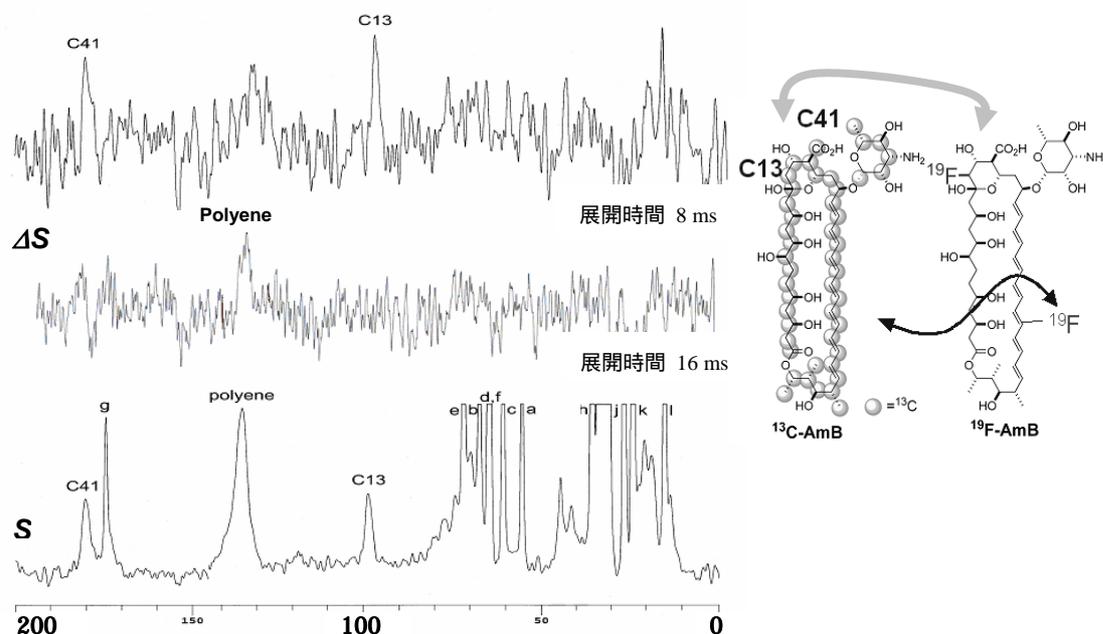


図1. リン脂質膜における標識アンフォテリシン B の RDX スペクトル
 フッ素標識アンフォテリシン B と炭素-13 全標識体の分子間相互作用をリン脂質 (ステロール非含有 DMPC) 二重膜中で固体 NMR を測定。アルファベットはリン脂質由来のシグナル。エルゴステロール存在下でも同様の REDOR 減衰がみとめられた。上段と中段のスペクトル ΔS は炭素-13 標識体を、それぞれ C14 (上部) と C28 (下部) を特異的にフッ素標識したものと混合し、フッ素を照射して測定した (RDX 差スペクトル)。C14 フッ化体では極性部分の C13 と C41 に減衰が認められ、C28 フッ化体では疎水的ポリエン部分に減衰が認められた。

参考文献

1. De-Kruiff, B.; Demel, R.A. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *339*, 57–70.
2. Tsuchikawa, H.; Matsushita, N.; Matsumori, N.; Murata, M.; Oishi, T. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6187-6191.
3. a) Gullion, T.; Schaefer, J. *J. Magn. Reson.* **1989**, *81*, 196–200; (b) Mehta, A. K.; Schaefer, J. *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*, 188-191.
4. Matsumori, N.; Eiraku, N.; Matsuoka, S.; Oishi, T.; Murata, M.; Aoki, T.; Ide, T. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 673-679.
5. Matsumori, N.; Sawada, Y.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10667-10675.
6. Kasai, Y.; Matsumori, N.; Matsuoka, S.; Umegawa, Y.; Ueno, H.; Ikeuchi, H.; Oishi, T.; Murata, M. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1178-1185.
7. Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry*, **2005**, *44*, 704-710.