

博士論文の要旨

専攻名 システム創成科学専攻

氏名(本籍) 重富 敬太(佐賀県) 印

博士論文題名

ヘリックスペプチド会合体の安定化因子とイオンチャンネル形成能に関する研究

要旨

イオンチャンネルタンパク質は細胞のイオン恒常性の維持や電気信号の形成などの生体内の様々な生理学的プロセスに加え、ウイルスのライフサイクルにも関与する膜内在性タンパク質である。イオンチャンネルの最も一般的な構造は数本の膜貫通ヘリックスが自己集合したヘリックスバンドル構造であり、このような構造は 20 残基程度のヘリックスペプチドによっても構築される。これらはイオンチャンネルペプチドと呼ばれ、複雑な構造をもつ天然のイオンチャンネルタンパク質の機能を理解するための単純化されたモデルとして利用される。また高度な機能をもつように *de novo* 設計された人工イオンチャンネルペプチドは抗菌剤、ドラッグデリバリーシステム、抗がん剤のような幅広い用途に応用できるため、機能性分子の候補化合物として近年注目されている。このような人工イオンチャンネルペプチドを設計する上で安定なイオンチャンネル構造の構築は必須であるが、チャンネル構造の安定化因子に関する知見は乏しい。一方で、ヘリックス間の会合に関する研究は盛んに行われており、近年、芳香族アミノ酸残基間の相互作用や疎水性アミノ酸残基間の相互作用がヘリックス間の会合に関与することが報告されている。ヘリックス間の会合はヘリックスバンドル構造形成の重要な要素であることから、これらの相互作用はチャンネル構造の安定化因子として働くことが期待される。

本研究では、ヘリックス間相互作用およびイオンチャンネル構造の安定化を目的として、 π - π 相互作用

やカチオン- π 相互作用のような芳香族相互作用を導入したヘリックスモデルペプチドと疎水性相互作用を導入したヘリックスモデルペプチドをそれぞれ化学合成し、構造およびイオンチャンネル特性について評価した。

本論文は全 6 章で構成されている。第 1 章では序論としてイオンチャンネルタンパク質およびイオンチャンネルペプチドの特徴を芳香族アミノ酸と関連付けて記載した後、本研究の目的を述べた。第 2 章では、これまでに報告されている人工イオンチャンネルペプチドのデザインに関する知見とヘリックス間会合における芳香族相互作用に関する知見を記述し、本研究におけるペプチドデザインのコンセプトを記載した。モデルペプチドの母体にはヘリックス構造を誘導する異常アミノ酸を含む 20 残基の両親媒性ヘリックスペプチドを使用し、ペプチド配列中の異なる位置に芳香族アミノ酸であるトリプトファン (Trp) を導入した芳香族相互作用モデルペプチドをデザインした。さらに、疎水性アミノ酸としてイソロイシン (Ile) を両親媒性ヘリックスの疎水性面に導入した疎水性相互作用モデルペプチドをデザインした。第 3 章ではモデルペプチドの水溶液中および脂質膜中での構造、脂質膜に対する相互作用と膜摂動について記載した。ペプチドの合成は樹脂上でペプチド鎖を伸長させる Fmoc 固相合成法で行った。合成したペプチドの純度と構造は逆相クロマトグラフィーおよび質量分析により確認した。モデルペプチドの構造は円二色性 (CD) スペクトルで評価した。水溶液中において、ペプチドの両末端部に Trp を導入した場合、ヘリックス間会合における Trp 残基間の π - π 相互作用が観測された。Ile を導入したモデルペプチドでは、ヘリックス間における疎水性側鎖間の効果的なパッキングによるヘリックス構造の安定化および高い会合能が観測された。また脂質小胞存在下の CD 測定および溶血活性測定から、Trp 残基による脂質膜に対するアンカリング効果とコレステロールに対する高い親和性はペプチド-脂質間相互

博士論文の要旨

専攻名 システム創成科学専攻

氏名 重富 敬太

作用を促進し、この効果はペプチドの特定部位への Trp の導入でより顕著になることが示された。第4章ではモデルペプチドのイオンチャネル形成と天然のイオンチャネル構造に対する考察について記述した。脂質平面膜の作製には tip-dip 法を用いて、ペプチドを導入する側に+80 mVの電圧を印加し、生体の膜電位に近い環境でチャネル活性を測定した。末端部および親水性面に Trp を導入したペプチドは他の Trp 含有モデルペプチドと比較して、チャネルの開口頻度と開寿命の増加が観測された。さらにこれらのモデルペプチドでは母体ペプチドよりも低い濃度でチャネルの開閉が観測されたことから、ヘリックス間におけるトリプトファン残基とリジン残基間のカチオン- π 相互作用がヘリックスバンドル構造を安定化することが示唆された。またこれらの結果から、ウイルスのイオンチャネルタンパク質である viroporin に特徴的な芳香族残基の意義を考察した。一方、水溶液中で高い会合能を示した Ile 含有モデルペプチドではチャネル形成は観測されなかった。これらの結果から、ペプチドの膜挿入とチャネル形成には疎水性面でのヘリックス間会合と解離が動的に起こる必要があり、それらのバランスが重要であることが示唆された。第5章では本研究で用いた実験手法について記述した。第6章は本研究の結果を総括した。本研究で得られた知見は天然のイオンチャネルタンパク質における芳香族残基の重要性を示すだけでなく、機能的イオンチャネルペプチドの設計において Trp 残基の位置選択的な導入が有効な方法であることを示唆した。