

審査結果の要旨

氏名 中村 壮史

「Studies of the Interaction between Peptides and the Cell Membrane using Nuclear Magnetic Resonance Methods (核磁気共鳴法を用いたペプチドと細胞膜との相互作用解析)」と題する本論文は、ペプチドの生体内における分子認識機構を解明することを念頭に、ペプチドと細胞膜との相互作用解析における方法論、すなわち解析法を確立した成果を述べたものである。本論文においては、生体膜と膜タンパク質とを合わせて細胞膜と定義しており、主に4つの章から構成されている。すなわち、第1章には序論が述べられ、第2章にはペプチドと生体膜との相互作用解析について、第3章にはペプチドと膜タンパク質との相互作用解析についてまとめられ、第4章には結論が述べられている。

まず、第2章においては、核磁気共鳴法 (NMR) を用いてペプチドと生体膜との相互作用を直接的に解析する方法を確立することを目的としている。研究のモデルとしてマストパランと等方性バイセルの相互作用系を用いており、方法論として NMR 交差飽和法 (CS 法) を応用することから研究を開始している。タンパク質間相互作用の測定条件において CS 実験を行ったところ、ペプチドの残基にはシグナル強度の低下が観測されず、生体膜からペプチドへ飽和が移動していないことが明らかとなっている。その理由としてペプチドの構造のゆらぎと生体膜の流動性が考えられたため、ペプチドの構造のゆらぎを評価するために各残基の運動性を評価し、生体膜の流動性については飽和が移動しにくいことを考慮して、飽和時間を 1.2 秒から 3.0 秒に延長している。マストパラン各残基の運動性はプロトン交換速度の解析により評価した結果、N2~A5 の領域においてシグナルの低下が見られ、これらの残基は運動性が高く、強固なヘリックス構造を有していないことを明らかにしている。また、飽和時間を 3.0 秒に延長して改めて CS 実験を行ったところ、特定の残基においてシグナル強度が大きく低下しており、生体膜からペプチドに飽和が移動していることを確認している。そこで各残基についてシグナルの強度変化を評価したところ、N2~A5 においてはシグナルの強度変化はあまり見られず、プロトン交換速度解析における運動性の高い領域とよく一致している。つまり、この領域は生体膜とあまり相互作用していないことを明らかにしている。一方、L6~L14 においては A8 と K11 においてシグナル強度変化に差異が生じており、これらの残基はヘリックスの車輪モデルにおいて同一方向に位置している。すなわち、両残基を除く領域については、DMPC のアルキル鎖から飽和の移動の影響を受けており、マストパランが等方性バイセルに埋没するような位置で相互作用していることを示している。本章においては、CS 法により、ペプチドの生体膜との相互作用残基を直接的に解析することに成功している。また、生体膜の流動性については、飽和時間を延ばすことによって、その影響を低減すること

ができています。さらに、飽和の移動が起こりにくい領域については、運動性の高い領域と相関があることを明らかにしています。つまり、ペプチドと生体膜との相互作用解析においては、NMR を用いた CS 法と運動性評価を行うことにより、直接的な相互作用解析が可能であることを実証している。

次に、第3章においては、NMR を用いてペプチドと膜タンパク質との相互作用を高感度に解析する方法を確立することを目的としている。研究のモデルとして可溶性インスリンと Fc 融合インスリン受容体の相互作用系を用いており、方法論として NMR 転移交差飽和法 (TCS 法) を応用することから研究を開始している。高感度化を実現するために、主鎖のアミド基プロトンではなく側鎖の非交換性プロトン、具体的にはバリン、ロイシン、およびイソロイシンのメチル基プロトンと、フェニルアラニン、およびチロシンの芳香環プロトンを観測した TCS 実験を行っている。シグナル強度が大きく変化した残基を可溶性インスリンの立体構造上にマッピングしたところ Site 2 に集中しており、可溶性インスリンは Site 2 において Fc 融合インスリン受容体と解離の速い相互作用をしていることを明らかにしている。なお、LeuB6、TyrA14、ValB18 については、本研究において新たに受容体と相互作用する残基であることを明らかにしている。さらに、TCS 実験から得られた相互作用残基をもとに低分子化合物の創製を試みている。可溶性インスリンの立体構造において、TyrA14 の芳香環、LeuA13 のメチル基、LeuB17 のメチル基をファーマコフォアとして設定し、市販化合物のデータベースである 200 万化合物に対して仮想スクリーニングを行った結果、562 種類の化合物を得ている。この中から、今後の合成展開につなげるのが容易な化合物を 200 種類程度選抜し、さらにそのうちの 59 化合物を実際に入手して評価を行っている。これらの化合物についてシンチレーション近接法により評価を行った結果、低分子化合物 NT23 において、インスリンの受容体への濃度依存的な結合阻害活性を検出することができている。本章においては、芳香環プロトンを観測する TCS 実験法を確立することに成功している。また、側鎖の非交換性プロトンを観測した TCS 実験により特定の結合部位を検出することに成功している。さらに、得られた相互作用残基をもとに活性をもつ化合物を創製することに成功している。つまり、生体膜と膜タンパク質との相互作用解析においては、NMR を用いて側鎖の非交換性プロトンも観測する TCS 法を行うことにより、低分子化合物の創製につながる高感度な相互作用解析が可能であることを実証している。

つまり、本論文では、ペプチドと生体膜との相互作用解析においては、NMR を用いた CS 法と運動性評価を行うことにより、直接的な相互作用解析が可能であることを実証しており、また、ペプチドと膜タンパク質との相互作用解析においては、NMR を用いて側鎖の非交換性プロトンも観測する TCS 法を行うことにより、低分子化合物の創製につながる高感度な相互作用解析が可能であることを実証している。

以上、本研究の成果は、ペプチドと細胞膜との相互作用解析の基礎となる方法論を確立したものであり、これを行った学位申請者は博士 (薬学) の学位を得るにふさわしいと判断した。