2P145

固体 NMR によるグルカゴンの生体膜の形態変化の解析

○菊池 章恵¹、辻 暁¹、斉藤 肇¹、内藤 晶^{1,2} (¹ 姫工大・理、² 横国大院・工)

グルカゴンは 29 残基からなる 1 本鎖ペプチドホルモンであり、膵臓で分泌され、主に肝臓でのグリコーゲン代謝に関与する。グルカゴンの活性コンフォメーションは生体膜と結合した後に形成され、その後受容体と結合するというモデルに基づき、膜結合状態についての知見を知る必要がある。これまでの研究報告から、水溶液中ではランダムコイルをとるがミセル存在下では部分的に α -ヘリックス構造をとることが提唱されている。本研究では、生体膜モデルとして DMPC 二重膜を用いて、グルカゴンが DMPC 二重膜の形態に及ぼす影響と、膜結合状態での高次構造解析を行った。³¹P NMR 測定により、グルカゴン濃度が高い場合 (モル比 グルカゴン : DMPC = 1:10) 40 °C から 0 °C の温度範囲で粉末線形がみられた。また相転移点以上の温度でリン酸基の動きが束縛されたことから、グルカゴンは DMPC 二重膜表面と強く相互作用していることがわかった。次にグルカゴン濃度を低下させると (モル比 グルカゴン : DMPC = 1:50) 相転移点以下で粉末線形が等方ピークに変化した。この結果は、相転移点以下でグルカゴンが膜に挿入して膜分断を起こし、ミセルまたは小さなベシクルが形成されていることを示している。さらにグルカゴン濃度を下げると (モル比 グルカゴン : DMPC = 1:200) 等方ピークが消滅し、分断は見られなくなった。また相転移点以上では配向成分がみられた。以上の結果から、分断が起こるためには一定以上のグルカゴンが必要であるが、一方グルカゴン濃度が高すぎると、グルカゴンが脂質表面を覆って DMPC 二重膜の流動性を妨げるため、相転移点付近におけるグルカゴンの膜挿入が抑制され二重膜の分断が起こりにくくなると考えられる。

A.Kikuchi, S.Tuzi, H.Saito, A.Naito : A solid-state NMR study on morphology change of lipid bilayer caused by glucagon

2P147

固体 NMR によるインフルエンザウイルス融合ペプチドの pH 依存膜融合誘起機構の解析

○虎谷 秀一¹、内藤 晶²、辻 暁¹、斉藤 肇¹ (¹ 姫路工大・理・生命科学、² 横浜国大・大学院・工学研究院)

ウイルスの融合ペプチドによって誘起される膜融合現象を明らかにすることは、ウイルスの感染機構を明らかにする上で重要である。インフルエンザウイルス粒子のエンベロープ表面には、宿主細胞に感染する際に重要な役割を担うタンパクの一つであるヘマグルチニン (以下 HA) が存在する。この HA は、ジスルフィド結合した二つのサブユニット HA1 と HA2 から構成されており、ウイルスが細胞に取り込まれた後に HA2 の N 末端側がエンドソーム膜に挿入することで膜融合が誘起されることが知られている。しかしながら、その膜融合の分子論的機構については、広い分野にわたって研究が行われているが、十分に一致した見解は得られていない。そこで本研究では、インフルエンザウイルスの感染における膜融合機構を分子論的に解明することを目的とし、化学的に合成した HA2 の初めの 27 残基から成るペプチド HA2(1-27) を DMPC 膜に結合させた状態で、中性条件 (pH 7.4) 下と酸性条件 (pH 5.0) 下で固体 ³¹P NMR を測定した。その結果、液晶相において、HA2(1-27) - DMPC 膜系の線形は DMPC 単独の膜系と比べ異方性が小さかったことから、脂質はペプチドと相互作用することで流動性が増加することが判明した。また、温度を 20 °C から 40 °C に上げることで酸性条件では異方性が増加したのに対し、中性条件においては変化がなかった。このことから、膜融合誘起条件下では、脂質の二次元拡散運動を抑制するような相互作用がペプチド-脂質間で生じることが明らかとなった。発表では、¹³C 標識したペプチドの ¹³C NMR 測定の結果をふまえて、pH に依存するペプチドの膜融合誘起機構を検討する。

S. Toraya, A. Naito, S. Tuzi, and H. Saito : pH-dependent Fusogenic Mechanism of Influenza Virus Hemagglutinin2(1-27) Using Solid-state NMR

2P146

¹³C および ³¹P NMR によるダイノルフィンの膜結合にともなう高次構造変化の解析○上園 多喜子¹、辻 暁¹、斉藤 肇¹、内藤 晶^{1,2} (¹ 姫工大・理、² 横国大院・工)

ダイノルフィンは 17 アミノ酸残基からなる内因性オピオイドペプチドであり、生体内ではモルヒネ様の鎮痛作用を示すことが知られている。これまで、我々の研究室で、ダイノルフィンは膜分断、膜融合活性を有し、磁場配向膜を形成することを明らかにしてきた。特に、ダイノルフィンの Gly³ 残基は α -ヘリックス構造をとり、DMPC 膜に垂直に挿入しており、Ile⁸ 残基付近は膜表面に位置し、特定の構造をとらないことが分かった。本研究では、新たに [¹³C]Phe⁴、[¹³C]Leu¹² 標識したダイノルフィンを DMPC 膜に組み込み、固体高分解能 NMR を用いて ¹³C-NMR 化学シフト異方性を解析した。この結果、Leu¹² は膜との相互作用が弱く、ランダムコイルに近いことが分かった。また、Phe⁴ について等方、異方および磁場配向 ¹³C-NMR スペクトルを測定した結果、低磁場側の信号強度が高い軸対称パウダーパターンが得られ、磁場配向信号の位置も低磁場エッジに一致した。この結果、N 末端側に存在する α -ヘリックスは膜の法線から大きく傾き、さらに法線まわりで速く回転している動的構造を持つことが明らかになった。

T.Uezono, S.Tuzi, H.Saito, A.Naito : Secondary structure of lipid-bound dynorphin as studied by ¹³C and ³¹P NMR

2P148

放射光 X 線小角・広角散乱法を用いたメリチン-脂質膜相互作用の研究

○野末 佳伸¹、上野 聡²、川崎 直彦³、大木 和夫⁴、雨宮 慶幸^{1,3} (¹ 東大・工・理工、² 広大・生物生産・食品物理、³ 東大・新領域・物質、⁴ 東北大・理・物理)

メリチンは、26 残基からなる両親媒性ペプチドで、蜂毒の主成分である。メリチンの両親媒性構造が膜たんぱく質の膜結合ドメインに良く見られることや、メリチンが脂質二重層膜に非常に強く相互作用することから、発見から今日まで数多くのメリチン-脂質膜系の研究がなされてきた。これまでに、メリチンと膜との相互作用は、蜂毒本来の働きである溶血作用 2), 3) のほかに、電圧依存性チャネル形成 4)、膜融合活性 5)、ディスクミセル化 6) などが報告されている。一連の多様な作用の機構を理解するためには、メリチンは膜内でのように配向・会合しているかを理解する必要がある。これまでに我々は、X 線小角散乱を用いてメリチンの添加によって生ずる膜厚変化を観測し、メリチンの配向状態を評価してきた。その結果、膜の疎水領域の厚さとメリチンのヘリックス長とのマッチングが良いほど、膜を貫通したチャネル形成が安定であることが分かった。しかし、膜融合、ゲル温度でのディスクミセル化などを含むメリチンと膜の相互作用の全体像を理解するためには、温度軸に対してメリチンと膜の相互作用がどのように変化するかを調べる必要がある。そこで今回は、メリチン-脂質系の温度を、転移温度を挟んで一定速度で上昇/下降させながら X 線小角散乱・広角散乱を測定し、その構造変化を追跡した。その結果、メリチン/DMPC 系ではディスクミセルからベシクルへの転移の第一段階でバックギアの乱れが現れ、その後に膜の厚さの変化が起こること、ベシクルからミセルへの転移の際には一旦散乱強度が減り、構造不安定な中間状態があることが観測された。本発表では、さらに、メリチン/DSPC 系での結果も合わせて議論し、メリチンと膜の疎水性マッチングの観点から考察する予定である。

Y.Nozone, S.Ueno, N.Kawasaki, K.Ohki and Y.Amamiya : Melittin-lipid interaction investigated with synchrotron small and wide angle X-ray scattering