1G1100

固体 NMR による赤血球の磁場配向性の解析

○川村 出、西村 勝之、内藤 晶（横浜国立大院・工・機能発現）

細胞膜上で機能しているさまざまな分子の構造と機能の相関を明らかにすることにより細胞機能の解析が可能になってくる。ヒトを含む哺乳動物の赤血球は核がなく、遺伝子の発現が起こらないことから単純な天然生体膜をもつ細胞のひとつである。本研究では扁平な円盤状の細胞である赤血球の静磁場中での挙動を観察するため固体 NMR を用いてウシ、ウマそれぞれ異なるリン脂質組成の赤血球の磁場配向性の解析を行った。脂質分子は磁場に垂直に配向する性質をもつため、円盤状細胞では円盤の面を磁場に平行に向けて配向すると期待される。また磁場に配向することで、赤血球膜を構成する分子のより精密な構造情報が得られるものと考えられる。新鮮なウシ、ウマ血液から浸透圧、pH などを調節したグルコースを含む生理食塩水を使用してそれぞれを 4℃、3000g の条件で遠心分離して赤血球を調製し、濃縮した試料を用いて ³¹P NMR 測定を行った。ウシ赤血球の場合、代謝由来ピークも現れたなかで、その膜面を磁場に対して平行に向けた自発磁場配向の挙動を示すピークを観測した。また 20℃から 37℃への温度変化によっても溶血作用がほとんどなく赤血球膜の安定性も確認した。さらにこのウシ赤血球に対して p-Chloromercuribenzenesulfonate (p-CMBS) をいれたところ、赤血球の向きが 90° 反転することを確認した。この配向反転の理由はまだよくわかっていない。これに対してウマの赤血球はその生体の特異性から代謝が活発で赤血球の溶血が非常に速いため代謝由来のピークはウシの場合に比べて大きく、ほとんど磁場配向のピークは見られなかった。固体 ³¹P NMR により赤血球の磁場配向の挙動を観測することにより、動物種による赤血球の性能の違い、鮮度、形状などの情報が得られることが判明した。

I.Kawamura,K.Nishimura,A.Naito : Analysis of magnetic ordering of erythrocytes by solid-state NMR

1G1130

固体高分解能 NMR による beta-endorphin のリン脂質二重膜への結合状態の解析

○横山 雅文、西村 勝之、内藤 晶（横浜国大 院工 ）

beta-endorphin は 31 残基からなる内因性オピオイドペプチドで、ペプチドホルモンは膜に結合し、活性状態に近い構造を形成した後に受容体と結合し、鎮痛作用を示す。本研究では、beta-endorphin の活性構造と生理機能の相関を理解するために、固体高分解能 NMR を用いてリン脂質膜と結合した beta-endorphin の立体構造の解明を試みた。またサルとヒトの生物種間での C 末端残基のアミノ酸配列の差異による膜結合性の違いについても固体 NMR による検討を行った。

サル [1-¹³C]Ala26beta-endorphin(以下 beta-endorphin と略す)を固相法で化学合成し、逆相 HPLC で精製した。精製された beta-endorphin および DMPC をモル比 1:10 の割合で DMPC 二重膜に再構成し、pH7.5、100mM NaCl、20mM Tris 緩衝液で水和率 90% のリボソームを調製した。その試料を 400MHz 固体 NMR 分光器を用いて ³¹P-および ¹³C-NMR スペクトルを MAS 条件下で 50℃から 0℃の範囲で測定した。一連の ³¹P NMR の結果から、今回用いたペプチド、脂質のモル比において、50℃から 0℃の広い温度領域で beta-endorphin と DMPC 膜が脂質極性基と強く相互作用していることが分かった。特に 40℃の液晶状態では beta-endorphin は DMPC 膜表面に強く結合し、DMPC 膜の極性基の運動を制限し、膜の流動性を下げる働きがあることが判明した。また ¹³C-CPMAS NMR の等方化学シフト値の解析から、[1-¹³C]Ala26 周辺では、beta-endorphin の DMPC 二重膜との結合状態は、alpha-helix に近い構造をとり運動性の高い状態であることが判明した。

M.Yokoyama,K.Nishimura,A.Naito : The study of beta-endorphin bound to lipid bilayer by solid state NMR

1G1115

固体 NMR による HIV-1 Tat(48-60) ペプチドとリン脂質膜の相互作用の解析

○泉 博子、虎谷 秀一、西村 勝之、内藤 晶（横浜国大院・工）

HIV-1 Tat タンパク質は RNA 結合タンパク質であり、ウイルス RNA の特定の部位と特異的に結合し、プロウイルスの転写を促進する働きをもつ。Tat タンパク質の結合部位は塩基性アミノ酸残基を多く含む領域 48-61 である。この領域中のアルギニンに富む Tat(48-60) ペプチドは細胞膜を透過し、エンドサイトーシスが抑制される温度においても外因性タンパク質などを細胞内に取り込む興味深い性質が報告されている。しかしながら、このペプチドの細胞膜透過の分子機構については不明な点が多い。そこで本研究では、Tat(48-60) と DMPC 二分子膜の相互作用を固体 NMR によって解析することを試みた。

DMPC 二分子膜を pH 7.5 の Tris 緩衝液で水和して調製した後、ペプチドを加えてから ³¹P NMR スペクトルを測定した。ペプチドを添加した結果、³¹P 化学シフト異性が減少し、軸対称粉末線形の垂直成分が増加した。この傾向はペプチドの DMPC に対するモル比が増えるにしたがって増加した。このことから、ペプチドによって脂質の運動性が高まり、静磁場に対して膜面を平行にして配向する脂質成分が増加したことが明らかになった。したがって、ペプチドは DMPC 二分子膜の膜構造に影響を与える相互作用を示し、膜小胞の形態を球状から長楕円体へ変化させることがわかった。30℃においてペプチド対 DMPC モル比 1:10 のときに得られた ³¹P NMR スペクトルからその膜小胞の構造を解析した結果、短軸に対して長軸が 2.8 倍長い長楕円体小胞を形成することがわかった。この楕円体小胞の形成は磁化率の異方性によって膜面を磁場に対し平行に向けるリン脂質成分が増加した結果であり、脂質二分子膜構造がペプチドによって局所的に乱されていることを示唆している。発表では、Tat(48-60) と膜小胞の相互作用から考察されるペプチドの膜透過機構について報告する。

H. Izumi, S. Toraya, K. Nishimura, and A. Naito : Interaction of HIV-1 Tat(48-60) peptide with phospholipid membrane by solid state NMR

1G1145

固体高分解 NMR による副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) とリン脂質二重膜との相互作用の解析

○成田 宗外、西村 勝之、内藤 晶（横国大院・工）

副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) は、39 個のアミノ酸残基からなるペプチドホルモンである。主に下垂体前葉で産出、分泌され、副腎皮質細胞にある G 蛋白質共役系 ACTH 受容体に結合して、一連のステロイド系ホルモンの合成と分泌を刺激するのが主な作用である。これら生理活性ホルモンペプチドは一度生体膜へ結合して特定の構造をとり、表面を拡散し、目的の膜タンパク質受容体への結合する二段階結合モデルが一般に提唱されている。従って、ACTH の生理活性機能を分子論的に理解するためには、生体膜との相互作用を明らかにする事は重要である。

本研究では、ACTH－脂質膜の相互作用を厳密に解析するために [1-¹³C]Phe7-ACTH(1-24) フラグメントを化学合成し、DMPC 膜、DMPG 膜に再構成させた後、リボソームを調整して、固体 NMR によりペプチドと脂質二重膜の相互作用を解析した。³¹P NMR 測定において、DMPC リボソームに ACTH が結合する事により、長楕円体構造を形成する事が明らかになった。これは、ペプチドが膜構造を乱していると考えられる。しかし、¹³C NMR 測定から、その相互作用は非常に弱いものであり、ほとんどのペプチドは水相に存在している事が分かった。さらに、DMPG 膜では、³¹P、¹³C NMR 測定より、DMPC 膜に比べて ACTH(1-24) との相互作用が格段に強い事が明らかとなった。これは、ACTH と DMPG 膜表面との静電相互作用に起因していると考えられる。また、ヘリックス構造を形成すると考えられていた 7 残基目の Phe 付近は、ランダムコイルをとり、膜表面あるいは膜内部で、軸対称の運動性を保ちつつ結合している事が確認された。発表では、中性膜と酸性膜との ACTH(1-24) の結合性の違いと、ペプチドによる DMPG リボソームの膜構造変化について検討する。

M.Narita, K.Nishimura, A.Naito : Analysis of interaction between adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and phospholipid bilayer by solid state NMR