1P205

副腎皮質刺激ホルモン ACTH(1-24) の DMPG/DMPC 単一/混合脂質二重膜上での立体構造の固体 NMR を用いた解析

○西村 勝之¹、明賀 博樹²、成田 宗外²、吉良 敦史³、内藤 晶¹ (¹横浜国大院・工学研究院、²横浜国大院・工学府、³(株)アルバック・技術開発部)

我々は受容体とホルモンの特異的相互作用に対して R. Schwyzer らによって提唱された膜触媒モデルの原子の分解能での精密化を目標に、ホルモン分子と様々なモデル生体膜との相互作用および立体構造解析を固体 NMR を用いて行っている。副腎皮質刺激ホルモン ACTH は様々な活性を持ち、主に恒常性維持のための高度な調節を行っている。これまで IR-ATR 法や溶液 NMR 法により、各々乾燥脂質膜上、および疎水性溶媒中で特定の構造を持つことが報告されているが、どの測定においても試料を取り巻く環境は生理活性条件には程遠い。そのため生理活性条件に近い試料形態での構造解析が切望されている。これまでこれら既存の報告と比較するため、DMPC 中性膜、および DMPG 酸性膜に結合した ACTH(1-24) の二次構造解析結果を報告した。本研究では QCM 測定で結合定数に極大値を示した DMPG/DMPC=1/3 の混合膜条件下で ACTH(1-24) の各部位での詳細な二次構造解析を行った。得られた局所構造と DMPG 単一膜で得られた構造とを比較し、構造の安定性に寄与する因子について検討を行った。構造解析結果に基づき、DMPG/DMPC 混合膜中の DMPG 膜の負電荷と ACTH(1-24) の塩基性残基との静電相互作用、および ACTH(1-24) 非極性部位の脂質への疎水性相互作用による結合モデルを構築した。

K.Nishimura, H.Myoga, M.Narita, A.Kira, and A.Naito : Elucidation of native structure of ACTH(1-24) bound to DMPG/DMPC mixed lipid bilayers by solid state NMR.

1P207

固体 NMR によるソマトスタチン (SS-14) と酸性リン脂質二重膜との相互作用解析

○佐々木 順也¹、西村 勝之²、吉良 敦史³、内藤 晶² (¹横浜国大院・工学府、²横浜国大院・工学研究院、³(株)アルバック・技術開発部)

成長ホルモン放出抑制因子 (ソマトスタチン-14、以下 SS-14 と略す) は 14 残基のアミノ酸からなる環状のペプチドホルモンであり、視床下部のソマトスタチン産生ニューロンで産生される。SS-14 は脳下垂体の成長ホルモン産生細胞表面に存在する受容体と結合することで成長ホルモン分泌抑制機能を発現する。一般にペプチドホルモンは一度生体膜に結合した後に特定の構造をとり、受容体に結合する膜触媒モデルが提唱されている。本研究では SS-14 と脂質二重膜との相互作用を解析し、機能発現のメカニズムを解明することを目的としている。昨年は SS-14 を DMPC 中性膜に再構成させたリポソームを調製し、³¹P 固体 NMR によるペプチドと中性リン脂質二重膜との相互作用解析を行った。本年は SS-14 の収率を上げるため試料調製条件の検討を行った。さらに SS-14 を DMPG 酸性膜に再構成させたリポソームを調製し、³¹P 固体 NMR によるペプチドと酸性リン脂質二重膜との相互作用解析を行った。SS-14/DMPC 膜の ³¹P 固体 NMR スペクトルは DMPC 膜の場合と比較して、異なる特徴的な軸対称粉末線形を示したため、SS-14 が DMPG 膜表面とより強く相互作用をしていることが判明した。一方 QCM 測定の結果から SS-14 の DMPC および DMPG 膜に対する結合定数はそれぞれ 7.75×10^4 および 3.14×10^5 [M⁻¹] と決定できた。この結果から、SS-14 は DMPC 膜より DMPG 膜と強く結合することが判明した。以上の結果は SS-14 が pH=7.5 で正電荷を持つペプチドであることから、SS-14 は中性脂質膜である DMPC 膜とは主に疎水性相互作用で結合し、酸性脂質膜である DMPG 膜は疎水性相互作用に加えて静電相互作用によってより強く結合していることを示唆している。

J.Sasaki, K.Nishimura, A.Kira, A.Naito : Analyses of interactions between somatostatin(SS-14) and neutral/cationic lipid bilayers by solid state NMR.

1P206

固体 NMR による副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) と DMPG/DMPC 混合リン脂質二重膜との相互作用の解析

○明賀 博樹¹、西村 勝之²、成田 宗外¹、吉良 敦史³、内藤 晶² (¹横浜国大院・工学府、²横浜国大院・工学研究院、³(株)アルバック・技術開発部)

39 個のアミノ酸残基からなる副腎皮質刺激ホルモンは主に脳の下垂体前葉で前駆体から産出・分泌される。副腎皮質細胞の 7 回膜貫通型 G 蛋白質共役系 ACTH 受容体に結合し、副腎皮質からのグルココルチコイドの分泌促進等の作用を促す。ACTH のような両親媒性ペプチドは膜と相互作用して特定の構造を形成し、目的受容体に結合する膜触媒モデルが提唱されている。本研究では ACTH の生理活性機構を解明するために、各動物種間で相同性の高い部位が存在する、ACTH(1-24) と生体膜との相互作用の解析を行った。モデル生体膜として酸性リン脂質 DMPG・中性リン脂質 DMPC の混合比を変えた混合膜リポソームを調製し、ペプチドを再構成させ固体 NMR 測定を行った。³¹P NMR 測定結果から、混合膜のみのリポソームにおいてもリン脂質は相分離を起こすことなく均一に混合していることが判明した。さらに、ペプチドを再構成することにより等方成分が消失したことからペプチドは脂質と強く結合し、より均一なリポソームの形成が確認された。次に [¹³C] Val13 ACTH(1-24) 試料を用いて ¹³C NMR 測定を行った。DMPG/DMPC 比の減少に伴いカルボニル炭素の化学シフト値はランダムコイルから α ヘリックスの値へ徐々に変化し、DMPG/DMPC=1/3 でヘリックス成分の信号強度が最大となった。また、QCM 測定から ACTH(1-24) は DMPG/DMPC 比が減少するにつれて結合定数が上昇し DMPG/DMPC=1/3 で極大値を持つことがわかった。このことからある特定の脂質の電荷の割合のときにペプチドは最も安定な構造をとり、膜に最も強く結合していることがわかった。

H.Myoga, K.Nishimura, M.Narita, A.Kira, and A.Naito : Analysis of interaction between adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and DMPG/DMPC lipid bilayers by solid state NMR

1P208

固体 NMR によるリン脂質二重膜に結合した β -endorphin の二次構造と運動性の解析

○原田 亜弥¹、西村 勝之²、横山 雅文¹、吉良 敦史³、内藤 晶² (¹横浜国大院・工学府、²横浜国大院・工学研究院、³(株)アルバック・技術開発部)

β -endorphin は 31 残基のアミノ酸からなり、哺乳類の中枢神経などに存在する内因性のオピオイドホルモンである。一般にペプチドホルモンは生体膜との相互作用により、特定の構造を形成してから膜表面上を拡散し、目的の受容体と結合する膜触媒モデルが提唱されている。 β -endorphin もこの過程を経てオピオイド受容体と結合し、強力な鎮痛作用など様々な生理活性を示すと考えられる。そこで本研究ではリン脂質二重膜に結合した β -endorphin の立体構造を解析し、ホルモンの生理活性機能を分子レベルで理解することを目的とした。固体高分解能 ¹³C NMR を用いた解析により、DMPC リポソーム膜に結合した β -endorphin は中央部から C 末端にかけて広い範囲で α -helix を形成することが判明した。しかしその信号強度はいずれも弱く、 β -endorphin は ¹H デカップリングと干渉する周波数 $10^4 \sim 10^5$ Hz の分子運動性を持つと考えられる。さらに DMPC のみ、DMPS のみ、ヒトの脳灰白質の脂質組成を参考にした、モル比が DMPC:DMPS=6:1、DMPC:DMPE:DMPS = 3:3:1 の混合膜との、 β -endorphin の親和性について各々 QCM 測定を行ったところ、 β -endorphin は DMPC 膜に比べて混合膜に約 100 倍強く結合することが判明した。そこでこれらの混合脂質二重膜に β -endorphin を再構成させ、固体 NMR を用いて構造と運動性を解析した。混合膜と DMPC 膜上での信号強度の変化より、脂質組成によって β -endorphin の運動性が変化することが示唆された。

A.Harada, K.Nishimura, M.Yokoyama, A.Kira, A.Naito : Structure and dynamics of beta-endorphin bound to phospholipid bilayers by solid state NMR