O-17

イオンチャネル形成毒：海綿由来ペプチド polytheonamide B

老木 成稔¹⁾, 村松 郁延²⁾, 松永 茂樹³⁾, 伏谷 伸宏³⁾

生理学研究所機能協関部門¹⁾, 福井医科大学薬理学教室²⁾, 東京大学大学院農学生命科学研究科³⁾

はじめに

チャネル形成毒素として知られる多くの物質が広く生物界から抽出されている。ある生物から分泌されたチャネル物質が特定の標的細胞の細胞膜に組み込まれチャネル活性を発現する。多くの場合、チャネル毒素によってもたらされるイオン透過によって、標的細胞のイオン勾配が散逸し死に至る。

海綿（八丈島産海綿 *Theonella swinhoei*）から新しく抽出された polytheonamide B¹⁾は pM 程度の低濃度で細胞毒性を示す。このペプチドは極めてユニークな分子構造を持つ。その細胞毒性が分子のどこに書き込まれ、どのように機能しているのか。チャネル形成毒としての機能を、脂質平面膜法という単純な系で解析し、分子の構造と機能の関係を検討した。

Polytheonamide B の細胞毒性

P388 細胞に対する IC₅₀ は 70-80 pg/ml であった。

Polytheonamide B の構造

Polytheonamide B は 48 残基のペプチドである。遺伝的アミノ酸以外に異常アミノ酸残基が数多く含まれ、多くのアミノ酸残基の疎水性は高い。最も特徴的な点はアミノ酸の L 体と D 体が交互に並んでいることである²⁾。このような特徴を持つ類縁物質として細菌 (*B. brevis*) から抽出されたグラミシジンがある³⁾。これは 15 アミノ酸残基のペプチドで、L 体と D 体が

交互に並ぶと、 β -ヘリックスを形成したときにアミノ酸側鎖がすべてヘリックスの外側に分布し、中心にペプチド骨格で作られたポアが形成される。2 量体となって膜を貫通するチャネルポアの内径は 4 Å、長さは 26 Å で、一価カチオンが透過できる⁴⁾。グラミシジンとのアナロジーから Polytheonamide B がチャネルを形成することが予想される。

クロロホルム/メタノール中での 2 次元 NMR スペクトルで β -ヘリックス構造に特徴的なパターンが得られた²⁾。Polytheonamide B が全長に渡って β -ヘリックス構造を取るなら単分子で膜を貫通するに十分な長さになるであろう。

Polytheonamide B のチャネル活性

チャネル形成毒のターゲットは、チャネルに関連した膜分子ではなく、膜そのものである。水溶液から膜相に自発的に移行できるように分子デザインされている。他の分子の介在なしにこのような機能を持つかどうかを検討するために、脂質平面膜法は適している。精製された脂質分子だけからなる脂質二重層とチャネル毒との相互作用が高い精度で解析できるからである⁵⁾。

Fig. Planar lipid bilayer system

Polytheonamide B をチェンバーの一方に加えると自発的に膜に取り込まれチャネル活性を示す。pM からチャネル活性が現れた。

チャネル活性の濃度依存性から単量体で活性をもつことが示唆された。単一チャネルコンダクタンスは約 20 pS で、電流電圧特性は弱い整流性を示した。逆転電位からアニオンの透過性は極めて低いことが明らかになった。一価カチオンの選択性は $H > Cs > Rb > K > Na$ であった。ミリ秒程度の速いゲーティングを示す。開確率は電位依存性を示し、正電位で開確率が增大した。

チェンバーの一方から Polytheonamide を加えると常に同じ向きの整流性を持ったチャネルが現れた。チャネルが膜に挿入される向きは常に一定であることを示している。

結語

Polytheonamide はグラミシジン以来はじめて見つかった β -ヘリックス構造を取るペプチドである。チャネルとしての機能に β -ヘリックスが不可欠なことは言うまでもない。グラミシジンに比べ特異な点は、i) アミノ酸残基数が多いため一分子でチャネル形成できる、ii) 異常アミノ酸が多く含まれている、iii) チャネルの開閉をしめす、などである。多くの異常アミノ

酸が、高い細胞毒性、構造安定性、膜脂質との相互作用、チャネル開閉との相関、などどのように関わっているのだろうか。特に電位依存性の発現は興味深い⁶⁾。これらの点を今後検討していきたい。

文献

- 1) Hamada T, Sugawara T, Matsunaga S and Fusetani N: Polytheonamides, unprecedented highly cytotoxic polypeptides from the marine sponge *Theonella swinhoei*. 1. Isolation and component amino acids. *Tetrahedron Lett* 35, 719-720 (1994)
- 2) Hamada T, Sugawara T, Matsunaga S and Fusetani N: Polytheonamides, unprecedented highly cytotoxic polypeptides from the marine sponge *Theonella swinhoei*. 2. Structure elucidation. *Tetrahedron Lett* 35, 609-612 (1994)
- 3) Oiki S, Koeppe RE and Andersen OS: Voltage-dependent gramicidin channels. Towards Molecular Biophysics of Ion Channels. (Eds. Sokabe, M., Auerbach, A. and Sigworth, F. J.), Elsevier 189-201 (1997)
- 4) 老木成稔: モデルチャネルの構造と機能——単一チャネル記録から原子レベルの構造と素過程へ「シリーズ・ニューバイオフィジックス⑤イオンチャネル」(曾我部正博編集), 共立出版, 78-100 (1997)
- 5) 老木成稔: イオンチャネル研究のための脂質平面膜法. *日本生理学雑誌*, 57: 193-224 (1995)
- 6) Oiki S, Koeppe RE and Andersen OS: Voltage-dependent gating of an asymmetric gramicidin channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 2121-2125 (1995)

Abstract - A channel-forming peptide toxin: Polytheonamide from marine sponge (*Theonella swinhoei*). Shigetoshi OIKI¹, Ikunobu MURAMATSU², Shigeki MATSUNAGA³, and Nobuhiro FUSETANI³ (¹National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Aichi 444, Japan, ²Fukui Medical University, Matsuoka, Fukui 910-11, Japan, and ³Graduate School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan)

Folia Pharmacol. Jpn. **110**, Suppl 1, 195P~198P (1997)

A highly cytotoxic extract from marine sponge, polytheonamide B, is a linear 48-residue peptide. Alternative D- and L- forms of unusual amino acids suggest formation of β -helix that is stable in membrane and serves for ion conducting pore. The NMR study indicated that polytheonamide B forms β -helix in methanol/chloroform solution. Channel activity of polytheonamide B was examined using planar lipid bilayers. Ionic current appeared from pM concentration. Measurements of the reversal potentials revealed that the channel showed cation selectivity. Single channel current was recorded in symmetrical 1 M solutions. The selectivity sequence was: $H^+ > Cs^+ > Rb^+ > K^+ > Na^+$. Single-channel I-V curve exhibited slight inward rectification. Voltage-dependent transitions between brief openings and long closures were observed. Orientation of the peptide in the membrane was fixed when the peptide was added to one side of the chamber. The asymmetric behaviors, such as single channel rectification, voltage-dependent gating and oriented incorporation into the membrane, must be correlated to the molecular structure of polytheonamide B.

key words: ion channel, planar lipid bilayer, β -helix, ion selectivity, single-channel recording