膜融合ペプチドの機能的・構造的特徴

村 田 昌 之

京都大学 理学部 生物物理学教室 ☎ 606-01 京都市左京区北白川追分町

Functional and Structural Aspects of Fusion Peptide

Masayuki Murata

Department of Biophysics, Faculty of Science, Kyoto University
Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606-01, Japan

Membrane fusion plays a crucial role in intracellular vesicular transport, intercellular fusion and viral infectivity. The fusion reaction has been supposed to underlie the following three steps ; (i) specific docking of two membranes, (ii) perturbation of lipid bilayer at fusion point(s) and forming fusion pore(s), (iii) dilation of fusion pore(s). For the intracellular membrane fusion in membrane trafficking pathways, the recent convergence of genetic and biochemical approaches has led to the identification of a number of proteins that involved in specific docking of two membranes (step (i)). However, the details in step(ii) have not been clarified. In this review, I will focus on putative "fusion peptide" of viral fusogenic proteins as an activator of the step (ii). Through the works on the fusion of liposomes mediated by several synthetic peptides that are derived from the fusion peptide of influenza virus hemagglutinin, we found that the fusion is triggered when the peptides become more hydrophobic under fusion-competent conditions, and also found that the common structural features of the fusogenic peptides is not "amphiphilic helical structure". The amphiphilic peptides appear to require other factor(s) to cause fusion. I propose that uneven distribution of the side-chain bulkiness of peptide in ordered structure is important factor for fusion active peptide.

Key words : membrane fusion, fusion peptide, amphiphilic helical structure, hemagglutinin, fusion machinery.

1. はじめに

膜融合は、膜小胞化と並び生体膜の持つ最も drastic な構造変化であり、真核細胞のエンドサイトーシス、エクソサイトーシス過程における輸送小胞の融合、受精の際の精子と卵細胞との融合、エンベロープウイルス感染の際のウイルスエンベロープと細胞膜との融合、筋芽細胞の融合など、細胞の代謝から形態形成・維持に至るまで幅広い細胞機能に必要な不可欠の膜機能である。

Rothman¹⁾やSchekman²⁾らは、細胞内膜融合とい

う複雑な膜融合過程を巧妙に dissection したアッセイ系を確立し、それを用いてこれら細胞内膜融合に関わる一連のタンパク質分子群を生化学的、分子遺伝学的に同定し、細胞装置として、そのコンポーネントの幾つかを次々に明らかにした。この結果、細胞内の特異的膜融合は、融合する2膜上のそれぞれの膜タンパク質（これが融合の特異性を決める）と、それを架橋する細胞質タンパク質とから成るタンパク質複合体により2膜が docking することが必要である、というモデルが提唱されている³⁻⁵⁾。このモデルは、細胞内の膜融合の「特異性」

図1. 細胞内、細胞間膜融合の分子機構モデル（小孔形成モデル）

A: 形質膜と分泌小胞の膜融合をモデルにした小孔形成、拡張機構の概念図；形質膜と小胞膜上の膜タンパク質複合体による2膜のdocking (a), 2膜の接点付近での脂質膜構造の紊乱と小孔形成 (b), 続いて周囲の脂質等の流入による小孔の拡張 (c) が起こり膜融合が完了する. タンパク質複合体（膜融合装置またはdocking装置）の詳細は不明. Rothman等は、複合体として融合する2つの膜それぞれに特異的に存在する膜タンパク質とそれらを架橋する細胞質タンパク質複合体から成るものを考えている^{1, 3)}.

B: HAタンパク質による膜融合（細胞間膜融合）の場合は、HAタンパク質三量体のオリゴマーがタンパク質複合体に相当する考えられる. この場合、fusion peptide部分が膜貫通ペプチド部分と共同して2膜間に疎水性の環境（図中の影の部分）を作りhemifusion状態を作る. 膜貫通ペプチド部分はその後の小孔拡張、安定化に必要であるらしい^{9, 18)}.

をうまく説明できるように簡単に受け入れられてしまっている.

しかしその反面、膜融合が脂質二重層の劇的な再編成を伴う動的变化であることが忘れられている感がある. 膜融合反応は次の3つの素過程よりなると言われている. (i) 2つの膜小胞の特異的docking, (ii) docking点付近での脂質膜構造の紊乱と小孔(fusion pore)形成, (iii) 小孔の拡大とそれに伴う脂質二重層の再構成である(図1). つまり、今膜融合に関わる分子群の発見によって、「docking=膜融合」という等式が何の疑問もなく定着しつつある. 2つの膜の間でdocking装置(今後は敢て膜融合装置とdocking装置を区別する)が形成されるだけで膜融合反応は一気に進むかのような錯覚を与えている. はたしてdocking装置は膜融合装置と成りうるか?. 例えば、docking装置はどのようにして膜融合点の脂質二重層に紊乱を与え、小孔形成を開始さ

せるのか?.

本稿では、特に(ii)の素過程を活性化するタンパク質の構造的特徴として、エンベロープウイルスの膜融合タンパク質(特にHAタンパク質)中に保存的に存在する“fusion peptide”に注目した. この疎水性アミノ酸残基の連なるペプチド領域は、上述の素過程(ii)を活性化する因子として、ほとんど唯一知られているタンパク質の共通構造である. この“fusion peptide”を対象にした膜融合の分子機構研究は、上記のdocking装置と膜融合装置の同一性または相異性を検討する上に欠かさない多くの示唆を与えてくれる.

2. インフルエンザウイルスの膜融合 タンパク質：ヘマグルチニン

エンベロープウイルスの膜融合タンパク質は、単一の

図 2.

A: エンベロープウイルスの標的細胞への侵入経路；ウイルスエンベロープと標的細胞の形質膜との直接の融合によるウイルス遺伝物質の放出（a：paramyxovirus 等）と受容体媒介エンドサイトーシス後、エンドソーム内の弱酸性化を利用したウイルスエンベロープとエンドソーム膜との融合による放出（b：orthomyxovirus 等）がある。

B: インフルエンザウイルスのヘマグルチニンタンパク質（HA タンパク質）単量体のプロメライン処理フラグメントの立体構造⁸⁾。fusion peptide の部分を矢印で示した。

膜融合タンパク質として同定されているほとんど唯一のものである。エンベロープウイルスが標的細胞に侵入し、そのゲノムを細胞質に放出するためには、ウイルスの外膜と標的細胞膜の融合が必要不可欠である。例えば、paramyxovirus は、ウイルス膜と標的細胞の形質膜との直接の融合によりそのゲノムを放出する。これに対し、orthomyxovirus や rabdovirus など多くのウイルスは、細胞表面の受容体タンパク質に結合後、エンドサイトーシスされる。エンドサイトーシスされたウイルスは、その内部が弱酸性（pH 5.5～6.0）のエンドソーム膜と内側から融合しそのゲノムを放出する（図 2A）。ウイルスがこのどちらの経路を取るかは、それぞれのウイルスエンベロープ上の膜融合タンパク質の活性発現の至適 pH に依存している。

Orthomyxovirus であるインフルエンザウイルスのヘマグルチニンタンパク質（HA タンパク質）は、これからウイルスの膜融合タンパク質のなかでも最も分子レベルでの研究が進んでいるものである^{6, 7)}。1981 年に HA タンパク質のプロメライン処理フラグメント（BHA：エンベロープ膜より上の部分のみで膜貫通部分より C 末端側はない）の中性 pH での X 線結晶解析像が明らかにされ、HA タンパク質はウイルスエンベロープより約 14

nm の高さを持った単量体 HA タンパク質が、ホモ三量体を形成し存在していることが明らかになった⁸⁾（図 2B）。

立体構造解明以来、HA タンパク質による膜融合の分子機構の研究は、細胞間膜融合（intercellular fusion）の代表的素材として、タンパク質が誘起する生体内の膜融合反応一般の分子機構研究の最前線ともなっている。実際に現在、膜細胞生物学の分野で最もホットな研究分野となっているエクソサイトーシス経路や、神経末端での分泌顆粒に見られる細胞内膜融合（intracellular fusion）の分子機構は、HA タンパク質研究より得られた多くの知見を基にして考えられている。その結果、今では細胞間、細胞内膜融合の分子機構には多くの共通点が見いだされてきている⁹⁾。例えば、Almers ら¹⁰⁻¹²⁾ は肥満細胞（mast cell）における分泌顆粒-形質膜の融合（intracellular fusion）と、HA タンパク質を発現させた繊維芽細胞膜-赤血膜との融合（intercellular fusion）のそれぞれの膜融合素過程を、パッチクランプ法と高感度ビデオ付き顕微鏡などを用いて詳細に研究した。その結果、分泌顆粒の融合と HA タンパク質による融合において、共に融合反応初期にそれぞれ小孔（fusion pore）が形成され、その小孔が拡張して 2 膜のコンポーネントが混合し、膜融合が完了することが分かった⁷⁾。この小孔形成は形態学的にも、ウニ卵の cortical granule のエクソサイトーシス¹³⁾や、HA タンパク質によるウイルスとリポソーム膜との融合¹⁴⁾時に急速凍結レプリカ法などにより観察されていて、現在の膜融合分子機構モデルの基となっている（上述）。

2.1 HA タンパク質中の“fusion peptide”

ウイルスの膜融合タンパク質中には、疎水性アミノ酸が 20 数残基連なる疎水性ペプチド領域が存在し、ウイルス種内で非常に良く保存されているため“fusion peptide”と呼ばれ、膜融合活性との関係が盛んに研究されている^{6, 7)}。

HA タンパク質の“fusion peptide”は、HA 2 サブユニットの N 末端に存在し、酸性条件下（膜融合活性発現条件下）で HA タンパク質のコンフォメーション変化に伴いタンパク質表面より外部へ露出される。その疎水性ゆえに“fusion peptide”は標的膜またはウイルス膜に作用し活性発現に至るとされている。

この HA タンパク質の fusion peptide の重要性は多くの実験事実より示唆されている。Gething ら¹⁵⁾は部

A: HA ペプチドと HA ペプチドアナログの一次構造.
B: HA ペプチドと E5 の helical wheels 図.
C: HA ペプチドによる egg PC sonicated vesicles の pH 依存的膜融合. 参考にインフルエンザウイルスと赤血球との膜融合の pH 依存性を点線で示した. ただし, ウイルスの膜融合に関しては縦軸は任意に取った.

位特異的変異導入法を用い、HA タンパク質の fusion peptide 部分の疎水性アミノ酸が連なる配列中に、親水性の酸性アミノ酸残基を挿入した変異 HA タンパク質を細胞形質膜上に発現させた。この変異 HA タンパク質による細胞（細胞間や細胞）赤血膜間の融合を研究した結果、親水性アミノ酸残基を挿入した変異 HA タンパク質の融合活性が著しく減少したことが分かり、fusion peptide 部分の疎水性が膜融合活性に必要であることを示した。Kemble ら¹⁶⁾は同様の手法を用い、fusion peptide 部分が酸性条件下で三量体外部へ露出できない HA タンパク質を細胞に発現させ、膜融合活性が無くなることを示した。また、Bodian ら¹⁷⁾は benzoquinone や hydroquinone が、HA タンパク質のコンフォメーション変化に伴う fusion peptide の外部への露出を阻害することで膜融合活性を阻害することを示している。以上の結果を考え合わせると、疎水性が高い fusion peptide の HA タンパク質表面から外部への露出が、活性発現に必要であるらしい。

最近, Kemple ら¹⁸⁾は, fusion peptide の重要性を別の角度より再確認している。彼らは, HA タンパク質の膜貫通部分を GPI 型に換えた GPI-anchor 型 HA タンパク質 (GPI-HA) を, 遺伝子工学的手法により CHO-K1 細胞に発現させることに成功した。GPI-HA は野生株の HA タンパク質と同様にホモ三量体を形成し, 赤血球結合能をもち, 酸性条件下でコンフォメーション変化を起こし fusion peptide を露出する。彼らは

CHO-K1 細胞膜上に発現した GPI-HA を使い、それによる CHO-K1 細胞と赤血球との融合を、脂質混合 (lipid mixing) 法および内水相混合 (content mixing) 法によって研究した。その結果、GPI-HA は酸性条件下で脂質混合を誘起するものの内水相混合を誘起させないことが分かった。彼らはこれを“hemifusion”状態として、強く接着した 2 膜の outerleaflet のみが混ざり合い、内水相同士が導通していない膜融合の中間状態として位置付けし、“真の”膜融合と区別している (図 1B)。この結果は、HA タンパク質の膜貫通ペプチド領域が融合時の小孔安定化、拡張に必要な不可欠であること、そして fusion peptide は、hemifusion 状態 (つまり、2 膜を接近させ接着点付近に疎水性の環境をつくる) にするのに必要であることを示している。また、膜貫通ペプチド部位を完全に欠如した可溶化 HA タンパク質 (BHA) は、hemifusion 状態を作れないことより、hemifusion 状態は fusion peptide と膜貫通ペプチド部位とが「共同して」誘起すると考えられている。

2.2 HA タンパク質の“fusion peptide”自身に膜融合活性はあるのか？

ウイルスの fusion peptide 自身にはたして膜融合活性があるかどうかを調べるため、我々は¹⁹⁾、インフルエンザウイルス (A/PR/8/34 株) の HA タンパク質の fusion peptide と同一のアミノ酸配列を持つペプチド (HA ペプチド; 図 3A) を合成し、それによる egg yolk phosphatidylcholine (egg PC) sonicated vesicle (SUV) の膜融合活性を研究した。その結果、HA ペプチドは、酸性 (pH < 6.0) でのみ膜融合活性を持ち、かつその pH 依存性は HA タンパク質の示すそれと酷似していることが分かった (図 3C)。同じころ Lear と De-Grado ら²⁰⁾ は、インフルエンザウイルス (B/Lee/40 株) の fusion peptide と同一のペプチドによる dioleoyl-phosphatidylcholine (DOPC) SUV の膜融合活性を報告している。ただし、活性に pH 依存性は無かった。Wharton ら²¹⁾ は、同じく X31 株の fusion peptide と同一のペプチドを用い、palmitoyl-oleoyl-PC (POPC)/cholesterol (モル比 1 : 1) の SUV に対する酸性 pH 依存的膜融合を報告している。このようにその pH 依存性は、ペプチドにより、またリポソームの脂質組成により多少異なるが、ウイルス由来の fusion peptide 自身にリポソーム膜融合活性があることが直接に示された。

図4. Anionic ペプチド (D4, E5, E5L) と cationic ペプチド (K5) による DOPC LUV に対する膜融合活性の pH 依存性. Lipid mixing 法 (○) および content mixing 法 (●) により求めた.

2.3 HA ペプチドの pH 依存的膜融合活性のトリガーは何か？

CD スペクトルの測定結果より, HA ペプチドはヘリカルな ordered 構造を持つことがわかった. このとき完全な両親媒性ではないが, Glu, Asp などの親水性残基や, Gly, Ala など嵩の小さなアミノ酸残基が並んだ疎水性の弱い面と, 高高い Trp, Phe, Ile の並んだ疎水性の強い面とが, ヘリカルなペプチド表面にでき, 一種の両親媒性ヘリカル構造ができる (図 3B 参照). そこで, α ヘリカルな構造を持つ HA ペプチドの両親媒性をさらに顕著にした 3 種の anionic ペプチド (D4, E5, E5L) と 1 種の cationic ペプチド (K5) を合成 (図 3B の helical wheel 図を参照) し, これらペプチドによる膜融合の pH 依存性を調べた. E5L は, E5 のヘリカル構造をさらに安定化させるため N 末端から 3 番目の Phe, 6 番目, 10 番目, 18 番目の Ile を Leu 残基に置換した. また, K5 は, E5 の電荷的に相補的なペプチドとして合成され, E5 の 5 つの Glu 残基が全て Lys 残基に置換されているものである (図 3A).

図 4 に, 各ペプチドの膜融合活性の pH 依存性を示し

図5. E5/K5 による egg PC LUV の中性 pH での膜融合

A: E5/K5 による膜融合を content mixing 法で追跡したもの. E5 のみでは膜融合は起こらないが, 1 分後等モル量の K5 をアッセイ系に加えると融合が始まる (Aa). 同様に, K5 のみでは融合が起こらないところに E5 を加えると融合が起こり始める (Ab).

B: E5/ K5 の膜融合の効率, E5 : K5 のモル比が 1 : 1 の時最も高くなり,

C: その条件では E5/K5 複合体の疎水性が最も大きくなる. ペプチドの疎水性は TritonX-114 partitioning 法で求め, ペプチドの detergent 相への分配率を疎水性の目安とした.

た. 面白いことに, 至適 pH は多少異なるが, anionic ペプチド (D4, E5, E5L) は, pH 6.0~6.5 以下の酸性でのみ膜融合活性があるのに対し, cationic ペプチド (K5) は, pH 9.0 以上のアルカリ性でのみ膜融合活性があることが分かる. K5 による中性~酸性 pH での content mixing を伴わない lipid mixing は, K5 によるリポソーム同士の強い凝集による hemifusion 状態と考えられる. これらペプチドすべては, 膜融合活性を全く持たない中性 pH 付近でもリポソーム膜に結合している. それは, ゲル濾過, Ficoll flotation 法²⁴⁾などでリポソーム膜に結合しているペプチド量を直接定量することにより, またペプチド中の Trp 残基の蛍光スペクトルが疎水性環境 (脂質膜深くに挿入されること) で, blue shift することを指標にして間接的に確認されている.

つまり, リポソーム膜上に中性で結合しているペプチ

図6. 膜融合ペプチドによるpH依存的膜融合の分子機構の概念図

(a): anionic なペプチドは、酸性での酸性アミノ酸残基のプロトン化により、(b): cationic なペプチドはアルカリ性での Lys 残基 ϵ -アミノ基の脱プロトン化により、(c): anionic なペプチドと cationic なペプチド共存下では、中性での両ペプチドの静電的相互作用による電荷の中和により、ペプチド全体の疎水性の増加がトリガーとなり、2つの膜が凝集する。2つの膜の接合点で疎水性のペプチドが脂質二重層を乱し、fusion point (s) を作ると考えられる。

ドは、anionic, cationic を問わず膜融合を誘起しない。しかし anionic ペプチドは、酸性でそのペプチド中の Glu 残基のカルボキシル基のプロトン化により、cationic ペプチドは、アルカリ性でそのペプチド中の Lys 残基の ϵ -アミノ基の脱プロトン化により、それぞれのペプチドの疎水性を増加させることが、膜融合活性発現のトリガーとなっていると考えられた。

実際、各ペプチドごとに色々な pH における疎水性の程度を、ある条件での TritonX-114 相へのペプチドの分配率として見積る (TritonX-114 partitioning 法²³⁾) と、各ペプチドが膜融合活性を持つ pH 領域で急激な疎水性の増加を示すことが観測された。また、CD スペクトル測定の結果、このように疎水的になったペプチドが不活性時のペプチドよりも α -ヘリックス含量を増加させることも分かった。これらの結果を考え合わせると、図6に示すようなペプチドによる pH 依存的膜融合の分子機構が考えられる。つまり疎水的になったペプチドが2つのリボソーム膜を結合させ、その結合点付近でこの疎水性ペプチドが脂質二重層膜構造を乱し、fusion

point(s) を作り2つの膜を融合に導くというものである。残念ながらこの fusion point(s) でのペプチドの膜に対する配向や、複合体の詳細な構造は今後の研究を待たねばならない。

最近、電荷の相補的なペプチド E5 と K5 の共存下、egg PC LUV が“中性 pH で”効率良く膜融合することが見いだされた (図5A)²⁴⁾。もちろん E5 または K5 のみでは中性 pH での融合活性は観測されない。このような anionic なペプチド E5 と、cationic なペプチド K5 とによる“中性 pH”での膜融合反応は、図6の pH 依存的膜融合の分子機構モデルをより強く支持するものである。この E5/K5 による膜融合反応は、E5 と K5 とのモル比率が 1:1 の時に最も効率良く起こり (図5B)、高イオン強度 (800 mM NaCl 存在下) では、膜融合活性が完全に消失する。リボソーム存在下での E5/K5 の構造を CD により調べたところ、E5, K5 のみでは、ランダムに近い2次構造を取っているが、等モルの E5/K5 が共存すると 215 nm にピークを持つヘリカルな ordered 構造を持つことが分かった。おそらく、両ペプチドは静電的相互作用により、疎水性の高いヘリカルな E5/K5 複合体を形成すると思われるが、膜融合活性を引き起こす最適条件で、この複合体が最も疎水的になることも、TritonX-114 phase partitioning 法を用いて明らかとなっている (図5C)。両ペプチドは、その両親媒性によってリボソーム膜に結合し、同時にペプチドが結合した2つのリボソーム膜を、ペプチドの静電的相互作用によって凝集させる。この凝集点付近では E5/K5 の疎水的複合体が形成され、脂質二重層構造が乱され、fusion point(s) が形成され融合が開始されられると考えられている (図6C)。さらに、膜融合反応の速度論的研究により、ペプチドの疎水性複合体形成過程が、膜融合反応を促進する重要な過程であることも明らかになった。この他、cationic ペプチドの K5 が、ATP, GTP やポリリン酸 (n=4) などの anionic な低分子量の oligophosphate の存在下、DOPC リボソームを中性 pH で効率良く融合させることが見いだされている²⁵⁾。この融合反応が図6(c)タイプの融合反応であることは、容易に予想できる。

2.4 ウイルスの fusion peptide には、膜融合活性発現に必要な最小限の構造的特徴があるのか？

膜上に結合したペプチドの疎水性の増加が、膜融合のトリガーとなっているらしいことが分かった。それでは、

図 7. E5-アナログペプチドの一次構造

疎水性のペプチドが必ず膜融合活性を持つのかという問題が出て来るが、答えは“否”であろう。例えば、先に示したウイルスの膜融合タンパク質の多くは膜タンパク質であるが、前述した“fusion peptide”部分は、膜タンパク質に特徴的な他の疎水性領域（膜タンパク質のシグナルペプチド領域、膜貫通ペプチド領域）とは明らかにその性質を異にする²⁶⁾。

膜融合ペプチドの構造的特徴とはどのようなものだろうか。HA タンパク質中の“fusion peptide”は、タンパク質中ではターン構造を取っているが、活性発現時（弱酸性条件下）では、HA タンパク質の大きな構造変化に伴い、HA タンパク質三量体表面より外部へ露出し、「両親媒性ヘリカル構造」をとって標的膜または、ウイルス膜自身に作用して脂質膜の素乱、小孔の形成に関わるとされている²⁷⁾。また「両親媒性ヘリカル構造」は多くの非特異的膜融合を誘起する合成ペプチドや、タンパク質中に保存的に存在する構造的特徴として知られている。さらに、膜融合ペプチドの構造的特徴を議論するとき、例えば基質の結合部位や酵素活性部位といった「鍵と鍵穴」式の強い特異性を持つ一次構造上のモチーフとして認識できるものではなく、その相互作用部位が脂質膜という構造的特徴を持つものであるから、その一次構造上の相溶性よりも、むしろ「両親媒性ヘリカル構造」の様な二次構造以上の高次構造にその機能が結びついている可能性が強いと考えられてきた。これらの理由より「膜融合タンパク質、ペプチドの構造的特徴は両親媒性ヘリカル構造である」という盲信が漠然と受け継がれてきた。

3. 両親媒性ヘリカル構造と膜融合活性との関連の再考²⁸⁾

酸性で膜融合活性を持つ E5 の CD スペクトルを詳細に見てみると完全な α -ヘリックスとは言いがたいことに気がつく。実際、Chou & Fasman の方法^{29, 30)}に

表 1. E5-アナログペプチドの α -ヘリックス含量と膜融合活性、leak 活性、ヒト赤血球溶血活性との相関

	α -Helix #	Fusion #	Leakage #	Hemolysis
E5	++	+++	+++	++
E5NN	+++	-	+	+++
E5CC	-	-	-	-
E5P	-	-	-	-
E5CN	+++	++	+++	+++

DOPC liposomes, pH 5.0

各活性は pH 5.0 での DOPC LUV およびヒト赤血球に対する活性を比較した。

よる E5 の二次構造予測では、ペプチドの N 末端 10 残基と C 末端側 10 残基とは、明らかにその性質が異なっている。つまり、N 末端側は α -ヘリックス構造を取りやすく、C 末端側は逆に β 構造を取りやすい一次構造であることが予測された。

膜融合ペプチドに共通な構造的特徴は、本当に両親媒性ヘリカル構造だけなのかどうかを調べるため、E5 ペプチドをプロトタイプとして、図 7 に示す 4 種の E5 のアナログペプチドが設計、合成された（表 1 中の模式図も合わせて参照）。E5NN と E5CC は、N 末端と C 末端をそれぞれ繰り返し持つもの。E5P は、E5 の 11 番目 Gly 残基を、 α -ヘリックス構造の breaker である Pro 残基に置換したもの。E5CN は、E5 の N 末端側と C 末端側を入れ替えたものである。E5CN においては、N 末端から 2 番目に Glu 残基という負電荷を持つアミノ酸残基が来るため、 α -ヘリックス構造が安定化されると予想される。DOPC リポソーム存在下で、これらペプチドの CD スペクトルを測定してみると、E5NN と E5CN は典型的な両親媒性ヘリカル構造を持ち、そのヘリックス含量は元の E5 よりも大きいことが分かった。これに反し、E5CC と E5P は β 構造を取らず、むしろヘリカル構造を取ってはいるが、その含量は極端に少ないことが明らかとなった。

これら anionic なペプチドに対して、DOPC-LUV の膜融合活性、leak 活性、ヒト赤血球に対する溶血活性（hemolysis 活性）をそれぞれ測定し比較したものが表 1 である。この表より、leak 活性および溶血活性は明らかにペプチドの α -ヘリックス含量に依存していることが分かる。しかし、興味深いことに典型的な両親媒性

図8. ヘリカルな両親媒性ペプチドと脂質膜との相互作用の模式図

A: Brasseur らは多くのウイルスの fusion peptide は (b) の配向を持って膜に作用しているとし、(a) (c) よりも脂質膜のアルキル鎖部分に揺動を与えることができると考えている³¹⁾。

B: rough な表面構造を持つペプチドについて膜との相互作用を模式的に示した図。

図の斜線部分は疎水性の強いペプチド表面部分。

ヘリカル構造を持つと思われる E5NN に全く膜融合活性がないことが分かった。さらに詳しくこれらペプチドの性質を比較検討したところ、「両親媒性ヘリカル構造」は、ペプチドの膜への結合や膜構造の紊乱には必要であるが、その構造が必ずしも膜融合活性発現に必要な十分な構造でなく、 $+\alpha$ の因子が必要であることが示された。このことは、今までの「膜融合ペプチドの構造的特徴は両親媒性ヘリカル構造である」という盲信を再考せねばならないことを意味する。

この $+\alpha$ の因子とは何か。Brasseur ら³¹⁾はいろいろなウイルスの fusion peptide の一次構造より、ペプチドが標的膜に対してどのように配向して挿入されるかを理論的に解析した。その結果、それらの疎水性残基の並び方により、ヘリカルなペプチドとして膜界面に対し傾斜して挿入されるという結論を得た(図8A)。実際、界面に対し傾斜して挿入できなくなるように fusion peptide 部分の一次構造を設計し、改変した変異膜融合タンパク質(simian immunodeficiency virus の gp 32)は細胞-細胞融合活性を失活していた。彼らは「傾斜して膜に挿入された」ペプチドが、脂質のアルキル鎖の並びを乱し、膜融合に必要な新しい脂質相を作ると考えている。

我々はその $+\alpha$ の因子としてヘリカルなペプチドを構成している「アミノ酸残基側鎖の嵩高さ(side-chain

Fusion

Rough

Smooth

図9. 膜融合活性のあるペプチド(E5およびE5CN)と活性のないペプチド(E5NN)に対して、両親媒性ヘリカル構造を取った時の表面のroughさを比較したもの。ヘリカルなペプチドを構成するアミノ酸側鎖の「かさ高さ(bulkiness)」をおのおののアミノ酸の solvent-accessible surface area (Å²)で表し、各ペプチドの helical wheel 図上の相当するアミノ酸の位置にプロットした。膜融合性のあるペプチドの表面が rough であることが分かる。

bulkiness)」に注目している。Fusion-active なペプチド(E5, E5CN)は、嵩の小さな Gly, Ala 残基と、嵩の大きな Phe, Trp 残基とがヘリカル構造上に不均一に分布し、少し崩れた(rough な)両親媒性ヘリカル構造を持っている。これに対し、fusion-inactive なペプチド(E5NN)は、smooth な両親媒性ヘリカル構造を持つ。このアミノ酸側鎖の嵩高さ(bulkiness)を個々のアミノ酸の“solvent-accessible surface area (SASA)”³²⁾で現し、各ペプチドに対する helical wheel 図の各アミノ酸に対してのプロットを繋いだものが図9である。SASA は各アミノ酸の側鎖を伸張させたコンフォメーションに対して見積られたものであるが、アミ

ノ酸残基の疎水性と良く一致している。E5 と E5CN が E5NN に比べて“rough”なペプチド表面を持っていることが分かる。このような“rough”なペプチドが膜に作用すると、膜表面で“smooth”なものよりもより効果的に脂質二重層構造に揺動を与えることが予想される (図9 参照)。

E5 のアナログペプチドで β 構造を持つ膜融合ペプチド (E5b) は、E5 よりもより酸性側に至適 pH がシフトするものの、酸性での膜融合活性を持つことが分かった (村田ら、投稿準備中)。今後は、このような β 構造を持つペプチドに対して、上述の“rough さ”と膜融合活性との相関がなり立っているかどうかに興味を持たれる。最近、Nieva ら³³⁾ はヒト免疫不全ウイルス (HIV) の膜融合タンパク質 gp160 (gp120/41) の fusion peptide 部分と同一のアミノ酸配列を持つペプチド (HIV arg) が、負電荷を持つ 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylglycerol (POPG) LUV を約 5 mM の Ca^{2+} (Mg^{2+}) 依存的に膜融合させることを見つけている。このペプチドは Ca^{2+} 非存在下では α -ヘリカルな構造を取るが膜融合活性を持たない。これに対して Ca^{2+} 存在下では、むしろ antiparallel な β 構造を取って膜融合活性を持つようになる。このように、膜融合ペプチドの共通構造として「 α -ヘリックス」と「 β 構造」という2つの ordered 構造が議論の対象になってきていることは大変興味深い。逆に言えば代表的な二次構造は共通構造ではなくむしろ他の因子が活性発現に必要不可欠であるということかもしれない。例えば、我々が考えている ordered 構造を取ったときのペプチドの表面構造 (または表面の化学的性質) のペプチドによる違いは、ペプチドの膜中での会合状態に影響し、fusion pore の生成、安定化に直接影響する興味ある因子であろう。

3.1 膜融合ペプチドと生体膜との相互作用

ウイルスの fusion peptide が作用する標的膜は、HA タンパク質の場合、エンドソーム膜またはウイルス膜でありその脂質、タンパク質組成および物性は、前章までで扱ったリソソーム膜のそれよりもかなり複雑である。

最近、pH 依存的なペプチド E5 による膜融合・膜破壊活性と、細胞の受容体媒介エンドサイトーシスを利用した特異性の高い DNA トランスフェクション法が開発されている。Midoux ら³⁴⁾ は、プラスミド DNA と一部 glycosyl 化した poly-L-lysine との間に静電的に安定な複合体を形成させ、標的細胞膜上のレクチンのリ

ガンドとして用いることにより、DNA/glycosylated polylysine 複合体 (以下、D/GPL 複合体) の高効率・高特異的トランスフェクション法を開発した。この方法は、標的細胞のエンドサイトーシス経路を利用するため、細胞に取り込まれた D/GPL 複合体のリソソームでの分解をできるだけ避けることが必要である。なぜなら、リソソームに至る前のエンドソームでの D/GPL 複合体の細胞質内への移行の達成が、トランスフェクションの効率に大きく影響してくるからである。彼らは、酸性 pH 依存的 (pH < 6.0) に膜融合・膜破壊活性のある E5 ペプチドを利用することで、このエンドソーム (内部の pH が、約 5.5~6.0) での D/GPL 複合体の細胞質内への高効率の移行を試みた。その結果、10 mM の E5 の共存化で D/GPL 複合体を、HepG2 培養細胞に受容体媒介エンドサイトーシスにより取り込ませた場合、ペプチド非存在下に比べて 500 倍もの高効率のトランスフェクションが観測されたと報告している。プラスミド DNA と E5 のみでは、トランスフェクションの効率が低いことより D/GPL 複合体と E5 とのなんらかの相互作用がエンドソーム膜を leaky にし、トランスフェクションの効率に影響していることが予想される。今後は、このような「膜融合ペプチドを利用したドラッグデリバリーシステムの開発」という応用的な研究などを足がかりとして、*in vivo* での膜融合ペプチドと生体膜との相互作用を研究する手法の開発を進めることも考えられる。

おわりに

HA タンパク質からの類推によれば、生体内、とくに、細胞内膜融合に関して、docking 装置が膜融合装置になるには、何らかの生理的トリガー (局所的 pH, Ca^{2+} などの変化) による特異的な“fusion peptide”部位の露出が起こり、装置全体の疎水性を増加させ脂質膜の紊乱と小孔の形成 ((ii) の過程) を活性化し融合に導くというモデルが成り立つ。これとは別に、新たな細胞内因子を加えて docking 装置全体の 4 次構造以上の高次構造変化が起こり装置全体の疎水性が増すというモデルも考えられる。最近、細胞内の膜融合、膜小胞化に特定の phospholipase や lipid transfer protein が関与していることが報告され始め、新たな因子として特定の脂質分子の挙動が注目されている^{35, 36)}。今、脂質分子がモノマーとして装置のコンポーネントに成るのか、または、

集団としてミクロドメインを形成して装置の働く「場」を提供するのに興味ある問題である。細胞内膜融合の「高効率・高頻度性」を考慮すると、脂質分子をも含め、膜タンパク質、細胞質タンパク質から成る巨大装置が高頻度でリサイクル使用されていることになる。このような巨大分子装置がどのような「からくり」を持ってこれを成し遂げているのか？、ヘテロ系を扱うこれからの膜生物(物理)学に期待が持たれる。

本稿に関する膜融合ペプチドの研究には、大西俊一教授(京大大学院理学部、現龍谷大学)および高橋敏教授(京大大学院化学研究所)に多大な御指導、御助言を戴きました。ここに感謝いたします。また、本稿執筆の機会を与えて頂いた大木和夫教授(東北大学理学部)に感謝いたします。

参考文献

- Rothman, J. E. and Orci, L. (1992) *Nature* **355**, 409
- Pryer, N. K., Wuestenhube, L. J. and Schekman, R. (1992) *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 471
- 村田昌之 (1993) 生化学 **65** 卷11号, 1434
- Sudhof, T. C., De Camilli, P., Niemann, H. and John, R. (1993) *Cell* **75**, 1
- Hurfley, S. M. (1993) *TIBS* **18**, 453
- Ohnishi, S. (1988) *Curr. Top. Membr. Transp.* **32**, 257
- White, J. M. (1990) *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 675
- Wilson, I. A., Skehel, J. J. and Wiley, D. C. (1981) *Nature (London)* **289**, 366
- White, J. M. (1992) *Science* **258**, 917
- Spruce, A. E., Brecknridge, L. J., Lee, A. K., and Almers, W. (1990) *Neuron* **4**, 643
- Spruce, A. E., Iwata, A., White, J. M. and Almers, W. (1989) *Nature (London)* **342**, 555
- Tse, F. W., Iwata, A. and Almers, W. (1993) *J. Cell Biol.* **121**, 543
- Chandler, D. E., Whitaker, M. and Zimmerberg, J. (1989) *J. Cell Biol.* **109**, 1269
- Murata, M., Takahashi, S., Kanaseki, T. and Ohnishi, S. (1990) in "Biophysics of Cell Surfaces" (Glaser, R. and Gingell, D. eds.) p221, Springer-Verlag, Berlin
- Gething, M.-J., Doms, R. W., York, D. and White, J. M. (1980) *J. Cell Biol.* **102**, 11
- Kemble G.W., Bodian, D. L., Rose, J., Wilson, I. A. and White, J. M. (1992) *J. Vitol.* **66**, 4940
- Bodian, D. L., Yamasaki, R. B., Buswell, R. L., Steams, J. F., White, J. M. and Kuntz, I. D. (1993) *Biochemistry* **32**, 2967
- Kemble, G. W., Danieli, T. and White, J. M. (1994) *Cell* **76**, 383
- Murata, M., Sugahara, S., Takahashi, S. and Ohnishi, S. (1987) *J. Biochem. (Tokyo)* **102**, 957
- Lear, J. D. and DeGrado, W. F. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 6500
- Wharton, S. A., Martin, S. R., Ruigrok, R. W. H., Skehel, J. J. and Wiley, D. C. (1988) *J. Gen. Virol.* **69**, 1847
- Murata, M., Takahashi, S., Kagiwada, S., Suzuki, A., and Ohnishi, S. (1992) *Biochemistry* **31**, 1986
- Bordier, C. (1981) *J. Biol. Chem.* **246**, 1604
- Murata, M., Kagiwada, S., Takahashi, S., and Ohnishi, S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 14353
- Murata, M., Shirai, Y., Ishiguro, R., Kagiwada, S., Ohnishi, S., and Takahashi, S. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1152**, 99
- Paterson, R. A. and Lamb, R. A. (1987) *Cell* **48**, 441
- Harter, C., James, P., Bachi, T., Semenza, G. and Brunner, J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 6459
- Murata, M., and Takahashi, S., Shirai, Y., Kagiwada, S., Hishida, R. and Ohnishi, S. (1993) *Biophys. J.* **64**, 724
- Chou, R. Y. and Fasman, G. D. (1974) *Biochemistry* **13**, 211
- Chou, R. Y. and Fasman, G. D. (1974) *Biochemistry* **13**, 222
- Horth, M., Lambrecht, B., Chush, M., Khim, L., Bex, F., Thiriart, C., Ruyschaert, J. -M., Burny, A. and Brasseur, R. (1991) *EMBO J.* **10**, 2747
- Rose, G. D., Geselowitz, A. R., Lesser, G. J., Lee, R. H. and Zehfus, M. H. (1985) *Science (Washington DC)* **229**, 834
- Nieva, J. L., Nir, S., Muga, A., Goni, F. M. and Wilschut, J. (1994) *Biochemistry* **93**, 3201
- Midoux, P., Mendes, C., Legrand, A., Raymond, J., Mayer, R., Monsigny, M. and Roche, A. C. (1993) *Nuclei. Acids Res.* **21**, 871
- Brown, H. A., Gutowski, S., Moomaw, C. R., Slaughter, C. and Sternweis, P. C. (1993) *Cell* **75**, 1135
- McGee, T. P., Skinner, H. B., Whitlers, E. A., Henry, S. A. and Bankaitis, V. A. (1994) *J. Cell Biol.* **124**, 273

(受付 1994年5月13日)