

熊本大・栗 ○中山 仁、國安明彦、川原浩一、吉川裕美

【目的】イオンチャネルやレセプターなどの機能性膜タンパク質と複合体を作るリガンドの結合部位を同定する方法として、光アフィニティラベル法は、通常 NMR 法や X 線結晶回折がむずかしい複合系膜タンパク質では特に有用であり、また、遺伝子点変異よりも簡便に行える点が長所である。SD3212 は元来、L 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル選択的アンタゴニストとして開発されたが、その光学異性体 SD3212 ((S)-enantiomer) は電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネルに選択性を有する興味深い薬物である。この薬物結合部位を光アフィニティラベルを用いて検索し、これを既に報告した Ca<sup>2+</sup>チャネル上の(R)-enantiomer 結合部位の結果と比較することを第一の目的とした。ところで、この結果も含め、光ラベル部位を解析していく上では、これまでのところ分解能が低い点が光アフィニティラベル法の広汎な利用を妨げている。これを克服すべく、我々は最近進歩の著しい質量分析法を導入することによって、高効率かつ高分解能のラベル部位(アミノ酸)同定法を開発することを第2の目的とした。

【実験】(1)SD3212 ((S)-enantiomer) の光アフィニティラベル用アナログ[<sup>3</sup>H](S)-D51-4700 を用い、ラット脳およびブタ心筋から調製した Na<sup>+</sup>チャネル標品をラベルした。常法通りリシルエンドプロテアーゼ (Lys-C) で消化した後、Na<sup>+</sup>チャネルの特定の配列を認識する数種の抗ペプチド抗体を用いてラベル部位を解析した。(2)ラベル部位の新しい同定法開発にあたって、SD3212/SD3211 を認識しうる抗リガンド抗体を作製した。(3)主要な薬物結合タンパクで、[<sup>3</sup>H](R)-D51-4700 も強く結合することが知られたヒト血清アルブミンを光ラベルした。Lys-C で消化後、抗リガンド抗体を用いてアフィニティ精製し、これを MALDI-TOF-MS および nanoESI-MS/MS で分析してラベル部位のアミノ酸残基の同定を行った。

【結果と考察】(1)[<sup>3</sup>H](R)-D51-4700 は、ラット脳およびブタ心筋 Na<sup>+</sup>チャネルを特異的に光ラベルし、その部位はリピート IVS6 を含む 10 kDa にあることがわかった。この領域は、抗不整脈薬 etidocaine の結合部位として点変異実験で明らかにされた部位とオーバーラップすることから、これらの薬物の結合ポケットを形成するのに重要な領域と考えられる。(R)-enantiomer を Ca<sup>2+</sup>チャネルに用いた場合もリピート IVS6 を含む部位がラベルされることから、両チャネルの IVS6 近傍のホモロジーを比較した。(2)光ラベル部位の新規同定法開発に不可欠な抗リガンド抗体を作製し、これがリガンドの化学構造を選択的に認識することを確認した。(3)この抗体を用いることによって、ラベルペプチド断片を効率的に集めることが可能となり、また、2種の質量分析法の組合わせによって、ラベルされた2つのペプチド断片の構造とラベルされたアミノ酸残基をサブピコモル・オーダーで同定できた。この手法は、光ラベル効率が低い場合においても、ラベルアミノ酸残基を同定しうる一般的方法となるものと考えられる。

【謝辞】一連の SD 化合物および D51 化合物を提供いただいた芝野俊郎博士(第一製薬)に感謝します。

名大院生命農学 中村英士、○中村光裕  
三菱化学生命科学研究所 佐藤一紀、石田行知、河野俊之

【目的】骨格筋のナトリウムチャネルを選択的に阻害するイモ貝の毒  $\mu$ -コノトキシン GIIIA (1) は、13 位の Arg ならびに他の塩基性残基がチャネルの酸性アミノ酸残基と相互作用して、ナトリウムイオンの選択的フィルター入口に結合すると考えられている。また、アミノ酸の置換実験から GIIIA の 13 位 Arg が最も結合に大きく寄与し、逆に 5 位の Thr は何ら関与していないとされており、このことは NMR による構造解析からも支持されている。この 5 位の Thr 残基を修飾したアミノ酸に置き換えて、ナトリウムチャネル開口部の構造を探り、チャネルの構造を明らかにすることを目的として検討した。

【実験】GIIIA の 5 位 Thr を Cys に置き換えた類縁体の合成を、2段階脱保護によって行った。得られた類縁体の構造を NMR、MS ならびに化学反応によって解析し、さらにいろいろなタグを導入して類縁体を合成した。得られた類縁体は、骨格筋の直接電気刺激に対する収縮作用への 50% 阻害活性濃度によって評価した。

【結果と考察】合成した Cys 類縁体は、天然体と同じ 3 次構造を持つことが明らかとなったが、活性は作用を示す速度ならびに強度が低下した。Cys の SH は各種マレイミドと容易に反応し、3 次構造を保持したまま簡便にビオチン含有タグ等を導入出来ることが分かった。タグとしてベンゼンのような小さな中性官能基を導入したときには、天然と同程度の活性を示すが、酸性あるいは塩基性の官能基や大きな官能基では活性が低下した。スペーサーを介して導入した官能基とチャネルとの相互作用を解析することによりイオン選択フィルターから細胞膜表層までのナトリウムチャネル開口部の構造を探ることが出来る可能性が示唆された。

