

氏 名 (本籍)	ち ば ただ ひこ 千 葉 忠 彦
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	薬 博 第 1 6 5 号
学 位 授 与 年 月 日	昭 和 6 2 年 3 月 2 5 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 門 課 程	東 北 大 学 大 学 院 薬 学 研 究 科 (博 士 課 程) 薬 学 専 攻

学 位 論 文 題 目	ヒト赤血球膜蛋白質バンド3におけるエ オシン5-イソチオシアン酸の結合部位
-------------	--

(主 査)

論 文 審 査 委 員	教 授 鈴 木 康 男	教 授 長 哲 郎
		教 授 原 田 一 誠

論文内容要旨

赤血球からの二酸化炭素の排泄は、重碳酸イオンと塩素イオンとの交換の過程を経て、極めて速やかに起こる。この交換は、赤血球膜を貫通する分子量約95,000の「バンド3」と呼ばれる蛋白質が関与する促進拡散型の交換である。しかしながら、バンド3のアニオン交換部位の構造上の特色と機能の調節に関する詳細は、いまだ明らかではない。

バンド3における機能性部位の構造解析と機能の調節の解析は、これまで蛋白質-阻害剤間の相互作用の解析を中心に行われてきている。バンド3のアニオン交換阻害剤としては、スチルベンジルスルホン酸誘導体、N-(4-azido-2-nitrophenylamino) ethanesulfonate (NAP-タウリン)、エオシン誘導体等が知られている。スチルベンジルスルホン酸誘導体はバンド3の機能中心に結合し、アニオン交換を拮抗的に阻害する。また、NAP-タウリンは、バンド3に結合することによって、そのコンフォメーション変化を阻害する。しかし、エオシン誘導体については相互作用の詳細は不明である。種々の阻害剤についてその結合部位及び阻害機構を明らかにすることによりアニオン交換の機構を説明することが可能になると考えられる。本研究は以上の観点より、アミノ基反応性のエオシン誘導体のエオシンイソチオシアン酸 (EITC) とバンド3蛋白質との相互作用について詳細に検討したものである。

まず、赤血球膜とEITCとの相互作用についてみた。膜脂質へのEITCの結合を赤血球ゴースト及びリポソームを用い、蛍光スペクトル法により検討した。その結果、EITCの膜脂質への結合は、ほとんど無視できることが明らかとなった。Cherryらは、EITCはほとんどがバンド3に結合すると報告しているが、本研究においても彼らの報告を支持する結果が得られた。次に、赤血球ゴーストに対するEITCの結合数について検討した。EITCはそれ自身光学的に不活性な物質であるが、蛋白質のように大きな不斉場を持つものと結合することにより、光学活性となる場合がある。EITC-赤血球ゴースト系においても誘起CDが観察された。この誘起CDの強度と添加EITCの濃度の関係から、結合EITC分子の数を求めたところ、細胞1個当たり 1.4×10^6 個であった。この値は、細胞1個当たりのバンド3の数、 1×10^6 、及びバンド3と1:1の化学量比で結合することが確認されている4,4'-ジイソチオシアノスチルベン2,2'-ジルスルホン酸 (DIDS) の細胞1個当たりの結合数、 1.3×10^6 個、と近いものである。

以上の結果は、EITCはバンド3蛋白質と1:1の比率で特異的に結合することを示している。

EITCはゴーストと反応すると極大吸収波長が522nmから525nm付近に移動し、強度が減少する。そのときの誘起CDスペクトルは、530nm付近に正、450nm以下に負のバンドを持つ。EITCの主吸収帯はキサnten骨格の長軸方向への遷移によるもので、これはB対称である。

したがって、このCDスペクトルのパターンよりバンド3蛋白質に固定されたEITC分子においては、キサントゲン骨格とベンゼン環とが右廻りにねじれていると考えられる。これに対応して、EITCとイオン結合するアミノ酸残基、すなわちアニオン認識に関与すると考えられる機能的アミノ酸残基は、左廻りの空間配置にあると推定される。

比較のため、代表的なスチルベンジスルホン酸誘導体DIDSをゴーストに反応させた場合のCDスペクトルを測定した。347nm付近のDIDSの吸収波長に対応した領域に、長波長側から負、正のバンドを持つ誘起CDが観察された。両者を同時に反応させた場合、すなわち、DIDS-EITC-ゴースト系の誘起CDについてみると、それぞれを単独で用いた場合とほぼ等しいCDバンドが対応する波長領域に観察された。しかし、DIDSを先に修飾したゴーストにEITCを反応させたときは、EITC由来のCDを観察することが出来なかった。DIDSは、本実験条件ではトランス型で存在する。また、CDスペクトルのパターンより、スチルベン骨格の2つのベンゼン平面はねじられていると考えられるので、結合したDIDSは C_2 対称となる。347nmの吸収は、B対称の遷移によるものである。したがって、バンド3に結合したDIDSは左廻りのねじれで固定され、DIDS結合部位での機能的アミノ酸残基は右廻りの空間配置になっていると推察される。

以上の結果より、EITC及びDIDSの結合部位はそれぞれ異なっていること、バンド3のEITC結合部位はDIDS結合部位よりも内側に存在すること、更に、両分子の結合部位における機能的アミノ酸残基の空間配置は、3点結合を考えるとお互いに反対のまわりのらせん上にあることが推察された。

EITC結合部位における機能的アミノ酸残基の同定を試みた。EITC-ゴースト系の緩衝液のpHを変えて、その吸光強度の変化による滴定曲線を作成したところ、pH3.7, 6.4, 8.0, 11.0, 及び13.1に5つの変曲点が観察された。pH6.4, 8.0及び13.1の3つの変曲点はEITC単独では観察されないもので、これらは、EITC-バンド3間の相互作用に由来するものである。pH6.4の変曲点は、 $pK_a=6.0$ のヒスチジンのイミダゾール基、また、pH13.1の変曲点は、 $pK_a=12.5$ のアルギニンのグアニジノ基に対応するものと考えられ、これらのアミノ酸残基とEITCとの相互作用が推察される。しかし、pH8.0付近の変曲点については、その由来を明らかにすることは出来なかった。

以上の結果を更に確認するために、アミノ酸修飾試薬がEITC-ゴースト系のCDに与える影響について検討した。アルギニン修飾試薬としてはフェニルグリオキサールと1,2-シクロヘキサジオンを、ヒスチジン修飾試薬としてはジエチルピロカルボン酸とp-ジアゾベンゼンスルホン酸をそれぞれ用いた。これらの修飾試薬で処理したゴーストとEITCとを反応させたときのCDを測定すると、これらのアミノ酸修飾試薬の濃度に依存してCD強度は減少した。しかし、

DTNB (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)) のようなSH試薬で処理したときは、EITCのCDは影響を受けなかった。

以上の結果より、EITC結合部位におけるイオン結合性のアミノ酸残基は、ヒスチジンとアルギニンであると結論した。この結果は、ヒスチジンが直接アニオン交換に関係している可能性を示唆している。

EITCとバンド3蛋白質との結合反応の熱力学的特徴について検討した。EITCとバンド3との共有結合反応の温度依存性についてみたところ、結合反応についてのアレニウスプロットは非直線型になった。この曲線は、指数関数的な転移を示すEb関数で良く説明できた。このことは、バンド3のコンフォメーション変化が反応に影響することを示すものである。また、このときのみかけの活性化エンタルピーの変化量は、H₂DIDS (4,4'-ジイソチオシアノジヒドロスチルベン2,2'-ジスルホン酸) について求められている値よりも小さく、スチルベンジスルホン酸誘導体と比較した場合の反応性の違い、及びEITC結合部位の特異性が示唆された。

次に、ヒスチジンの役割を明らかにすることを目的に、EITCとバンド3との相互作用のpH依存性について詳細な検討を行った。EITCとバンド3との反応は、イオン結合反応と共有結合反応から成る。一般に、イオン結合反応は瞬間的に起こるが、EITC-バンド3系では、イオン結合反応は比較的遅い反応であることが明らかになった。このイオン反応部分のpH依存性を計算したところ、pH6.4付近で最も活性であることが明らかとなった。また、イオン結合反応のpHプロファイルは、2価アニオンである硫酸イオン輸送のpHプロファイルと類似していることが見出された。これは、EITCが2価アニオンとしてバンド3と相互作用している可能性を示唆している。

様々なpHで調製したEITC-ゴースト系についてCDスペクトルを測定したところ、pH7.5~10のアルカリ性領域ではそのCD強度はほとんど変化しないが、pHが低くなるにつれてその強度は減少した。この酸性側のCD強度の減少は、蛋白に結合したEITCのコンフォメーションが変化したことによるものである。また、CD強度についてのpH滴定曲線では、およそpH6.3に変曲点が認められた。EITCの解離及び共有結合はpH5~10で影響を受けないので、この変化は蛋白質由来のものである。すなわち、ヒスチジンの解離が蛋白質のコンフォメーション変化に関係していると考えられる。

更に、赤血球の硫酸イオン輸送に対するEITCの阻害効果のpH依存性についても検討を加えた。pH8においては、 2×10^{-5} MのEITCは硫酸イオン輸送の83%まで阻害しているが、pHが低くなるにつれて阻害効果は低下し、pH6.5以下では見かけ上阻害効果が見出されなくなった。そこで、対照赤血球の硫酸イオン交換速度とEITC修飾細胞のそれとを比較した。この速度定数の比較から、阻害は可逆的であることが示唆された。そこで、それぞれのpHで時間

とアニオン輸送量の両逆数プロットあるいはLineweaver-Burkプロットを用いて阻害形式を検討したところ、pH 6～8の領域では、EITCはアニオン交換をすべて拮抗阻害と非可逆的な阻害の形で阻害していることが明らかになった。これは、EITCが構造上可逆的な阻害と非可逆的な阻害の双方に関係する可能性を持つことと矛盾しない。

以上によりEITC結合部位の性質として明らかになった点をまとめると、(1)EITC結合部位における機能性アミノ酸残基の配置はDIDS結合部位におけるものとは異なっている。(2)EITC結合部位はDIDS結合部位の内側に存在する。(3)EITC結合部位の機能性アミノ酸残基はヒスチジンとアルギニンである。(4)EITC結合反応のキネティックな性質は2価アニオン輸送のそれと類似している。(5)EITC結合部位周辺はpH依存的なコンフォメーション変化を受ける。(6)EITCは赤血球の硫酸イオン輸送を拮抗的に阻害する。

上述のような性質を持つアニオン結合部位はこれまで知られていなかったものである。既に知られているアニオン結合部位並びに本研究で明らかになったEITC結合部位の特徴に基づくと、バンド3によるアニオン交換は、蛋白質の中の幾つかのアニオン結合部位をアニオンが順送りされるモデル、すなわち、'knock on'モデルによって説明するのが適当であると考えられる。

審査結果の要旨

赤血球のアニオン輸送に関与すると考えられている蛋白質バンド3は、生理的に重要な機能を持つ膜蛋白質であるが、その機能性部分の構造については不明な点が多い。

本研究はアニオン輸送の阻害剤であるエオシンイソチオシアン酸 (EITC) の蛋白質との反応性を利用して、バンド3の構造と機能との関係を解析したものであり、次のような知見が得られている。

まず赤血球ゴーストとEITCとを反応させると、EITCは特異的に結合し、結合のモル比は1 : 1であることを示している。またこの結合の結果、EITCの吸収帯に対応する領域に誘起CDスペクトルが観察される。このスペクトルを解析すると、EITCは右廻りのねじれでバンド3に固定されていると考えられ、結合アミノ酸の立体的配置は、左廻りのねじれた構造となっていることが推察されている。

つぎにEITCの結合位置をみると、これが基質結合部位とは異なっていることが明らかとされている。他の種々のイオン透過阻害剤の結合部位とEITCの結合部位とは異なり、EITCは基質結合部位よりも内側に結合していると考えられる結果が得られている。またこの結合に関与するアミノ酸としてはヒスチジン、リジン、アルギニンの3種類が考えられ、これらのうちヒスチジンとアルギニンはイオン結合に、リジンは共有結合に関与していることを示している。

さらにEITCの結合部位の立体構造はpHによって異なるしく変化することを示し、この部位はヒスチジンのイミダゾール基の解離に関与していることを推論している。また阻害反応の速度論的解析により、アニオン阻害は拮抗的でありこの反応にもヒスチジンのイミダゾール基が役割を果たしていると結論している。一方リジン残基は共有結合に関与しているがアニオン輸送には関係が乏しく、むしろ単に反応の場を固定するように働いていると考えられている。

以上の結果は、アニオン認識部位としてのヒスチジンの役割を明らかにしたものであり、多種類のアニオン認識部位の存在を解釈するためにもknock onモデルがアニオン透過モデルとして最も妥当性が高いとしている。

本研究は膜蛋白の構造と機能の解析に誘起CDを利用している点で独創性があり、またバンド3蛋白のアニオン透過機構についても新しい解析を行っており、博士論文として価値あるものと認める。