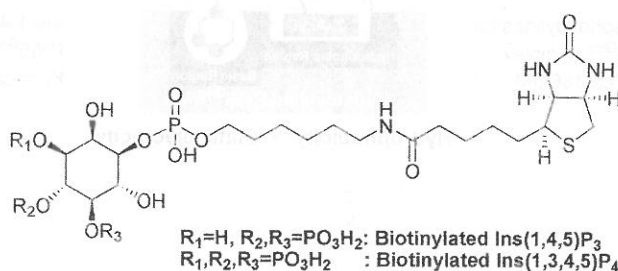


論文要旨

ビオチン化イノシトールリン酸の合成と表面プラズモン共鳴法への応用 —PH domain および HIV-1 Gag とイノシトールリン脂質との結合解析—

安楽 健作

カルシウムシグナル伝達をはじめとする種々の生体反応のセカンドメッセンジャーである *D*-*myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate (Ins(1,4,5)P₃) の構造に着目し、ビオチン化イノシトールリン酸 (biotinylated inositol phosphate) の設計と合成を行った。Ins(1,4,5)P₃ の標的蛋白質として代表的な Phospholipase C (PLC) Pleckstrin Homology (PH) domain と Ins(1,4,5)P₃ との複合体における X 線結晶解析結果をもとに、1 位もしくは 2 位のリン酸にビオチンリンカーを導入した化合物を設計した。*myo*-イノシトールを出発原料として、6 つある水酸基の保護と脱保護を繰り返すことで、目的とするイノシトール部位を得た。イノシトール部位とは別に合成したビオチンリンカー部位を、ホスホラアミダイトを用いてイノシトール部位とカップリングさせ、さらに脱保護を行うことで、ビオチン化イノシトールリン酸の合成に成功した。合成したビオチン化 *D*-Ins(1,4,5)P₃ は、PLCδ₁ PH domain との親和性において、生体内の Ins(1,4,5)P₃ と同等である ($K_D=0.25 \mu\text{M}$) ことが証明された。



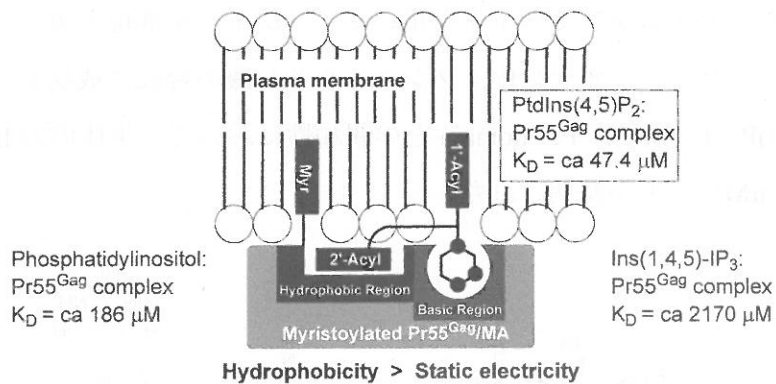
Structures of biotinylated inositol phosphate.

カルシウムシグナル伝達経路において、Ins(1,4,5)P₃ から、Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase によって生じる Ins(1,3,4,5)P₄ は、セカンドメッセンジャーとして、Ins(1,4,5)P₃ と協奏的に機能することが示唆されている。そこで、ビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄ の設計と合成を行った。Ins(1,3,4,5)P₄ の標的蛋白質 Grp1 PH domain と Ins(1,3,4,5)P₄ との複合体における X 線結晶解析結果をもとに、1 位のリン酸にビオチンリンカーを導入した化合物を設計し、ビオチン化 Ins(1,4,5)P₃ の合成法を応用してビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄ を合成した。ビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄ は、Grp1 PH domain との親和性において、生体内の Ins(1,3,4,5)P₄ の結果と同等の親和性を持つことが証明された。 ($K_D=0.14 \mu\text{M}$) さらに、合成したビオチン化イノシトールリン酸を BIACORE のセンサーチップに固定化し PH domain 類と結合解析を行ったところ、ビオチン化 *D*-Ins(1,3,4,5)P₄ 及び

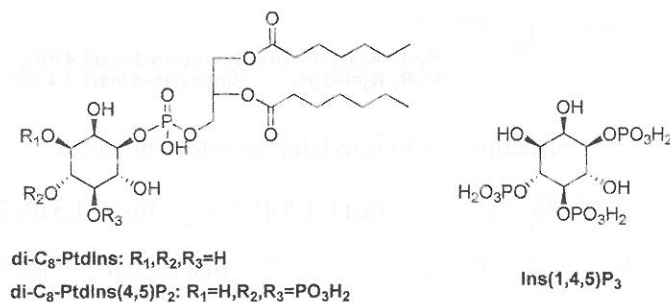
オチン化 D-Ins(1,4,5)P₃ は、それぞれ PLCδ₁ PH domain 及び Grp1 PH domain によって特異的に認識された。

イノシトールリン脂質 (phosphatidylinositol) は HIV-1 の複製に関与していることが近年明らかとなってきた。HIV-1 粒子が放出される際にはウイルス蛋白質 Gag の前駆体蛋白質 Pr55^{Gag} の脂質二重膜への移行が必須である。これには Pr55^{Gag} の MA 領域がミリスチル化を受けることに加え、脂質二重膜の構成成分であるイノシトールリン脂質分子 PtdIns(4,5)P₂ に結合することが重要であるとされている。本研究では、ビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ を用いて、BIACORE のセンサーチップに固定化し、Pr55^{Gag} もしくは、MA domain とイノシトールリン酸を含む様々なイノシトールリン脂質との結合を競合実験法により解析した。Di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ と Pr55^{Gag} との複合体において K_D=47.4 μM が得られた。また、Pr55^{Gag} と di-C₈-PtdIns とが K_D=186 μM で結合し、Pr55^{Gag} と Ins(1,4,5)P₃ が K_D=2170 μM で結合したことから、アシル部位が示す疎水性相互作用が、イノシトール部位が示す荷電的相互作用よりも Pr55^{Gag} との結合に大きく寄与していることが示された。

(A)



(B)



Binding model of the Pr55^{Gag} and PtdIns(4,5)P₂ (A).
Inositol phosphate and phosphatidylinositols (B).

本研究は、PH domain 類および HIV-1 Gag の生物学的機能を解明するためのバイオリジカルツールを提供するだけでなく、これらの蛋白質を標的とした阻害剤の開発に応用できるものと考えている。