

B 型インフルエンザウイルス BM2 タンパク質のプロトンチャンネル機構

○大友 康平¹、外山 聡²、三浦 隆史¹、竹内 英夫¹

¹東北大・院・薬、²新潟大病院

E-mail: kohei@mail2.pharm.tohoku.ac.jp

【目的】

B 型インフルエンザウイルスの BM2 タンパク質 (BM2) は 109 アミノ酸残基から成る膜貫通タンパク質であり、最近、プロトンチャンネル活性を有することが電気生理学的研究により明らかにされた。プロトンチャンネルを形成する膜貫通領域は、残基番号 7-25 であると予想されているが、チャンネルの性質や構造・機構に関しては殆ど何も分かっていない¹⁾。一方、A 型インフルエンザウイルスに存在する 97 アミノ酸残基から成る膜タンパク質である M2 タンパク質 (M2) については、多くの研究が行われている。M2 は弱酸性条件下で活性が上昇する四量体構造のプロトンチャンネルを形成するが、その活性は膜貫通領域に存在する His37 がプロトン化し、隣接するサブユニットの Trp41 とカチオン- π 相互作用することにより誘起されることが知られている²⁾。BM2 の予想膜貫通領域には M2 の His37 と Trp41 に対応する His19 と Trp23 が存在するため (図)、BM2 のプロトンチャンネルも M2 と類似の機構で働くことが予想される。本研究では、BM2 の予想膜貫通領域を含む、残基番号 3-33 に対応するペプチド BM2-TMP を合成し、それが全長タンパク質の BM2 と同様にプロトンチャンネル活性を有することを確認し、次いでそのチャンネル活性化機構を明らかにすることを目的とした。

M2 (下線部：膜貫通領域) ...SSDP²⁵LVVAASIGILH³⁷LILW⁴¹IL⁴³DRLFFKCIYR...

BM2 (下線部：予想膜貫通領域) M¹LEPFI⁷LSICSFILSALH¹⁹FMAW²³TI²⁵GHLNQILRGV...

図. M2 と BM2 の膜貫通領域のアミノ酸配列比較

【BM2-TMP のプロトンチャンネル活性の確認】

BM2-TMP を再構成したリポソームを調製し、その内部 (中性 pH) に蛍光 pH 指示薬である pyranine を封入した。このリポソームの外部 pH を種々の値に低下させ、それに伴う内部 pH の変化を、pyranine の蛍光強度を用いてモニターした。プロトンチャンネル活性を反映すると考えられる内部 pH 変化の速度定数を算出したところ、その値は外部 pH が下がるに従い大きくなり、pH 6.2 付近を転移点とするシグモイド曲線を描いた。この結果より、BM2 のプロトンチャンネル活性部位は、BM2-TMP に用いた領域に含まれること、またそのチャンネルは弱酸性 pH で活性化することが明らかとなった。一般に水溶液中の His のイミダゾール環の pK_a 値は 6.5 付近であり、BM2-TMP の活性転移点とほぼ一致している。このことから BM2

の場合も、His19のプロトン化がプロトンチャネル開口の引き金になっている可能性が示唆された。

【プロトンチャネル活性化に伴うBM2-TMPの構造変化】

まず、プロトンチャネル活性転移点を挟んだpH 5.4、7.4におけるリポソーム再構成BM2-TMPの二次構造を調べるため、円二色性(CD)スペクトルを測定した。CDスペクトルはどちらのpHにおいても α -Helixに特徴的な形状を示し、BM2の膜貫通領域は生体内pH条件下では、プロトンチャネルの開閉に関わらず、常に α -Helix構造をとっていることが分かった。

次に、プロトン化したHis19とTrp23の間のカチオン- π 相互作用がプロトンチャネル活性の引き金となっている可能性を検証するため、リポソームに再構成したBM2-TMPの229 nm励起紫外共鳴ラマンスペクトルをpH 5.3~7.0の範囲で測定した。Trpに由来するW3バンド(1552 cm^{-1})とW16バンド(1010 cm^{-1})に着目して、その強度のpH依存性を調べたところ、両バンドとも、pH 5.3~6.0の範囲ではpH低下に伴い強度が増大し、一方、pH 6.7~7.0の範囲ではpH低下に伴い強度が減弱している様子が読み取れた。Trpバンドの強度は、229 nm励起の場合、Trpのインドール環がカチオン- π 相互作用を受けた時に増大することが報告されている。プロトン化したHis19によりカチオン- π 相互作用が生じているとすると、pHの低下に伴いTrpバンド強度は増大するはずであり、pH 5.3~6.0におけるバンド強度変化の傾向は、これと一致している。このことから、His19とTrp23の間にカチオン- π 相互作用が生じているものと思われる。一方、pH 6.7~7.0においては、Trpバンドの強度がpH低下に伴い減弱していることから、この変化はカチオン- π 相互作用によるものでは無いと考えられる。Trpバンドの強度はインドール環の疎水性相互作用の強さが低下した時や、疎水性環境下で水素結合が弱くなった時にも減弱する。ここで、Trp側鎖のN₁-H位での水素結合マーカーであるW17バンド(878 cm^{-1})の波数を調べたが、pH変化に伴うシフトは観測されなかった。このことより、Trp23の水素結合状態が変化した可能性は低く、pH 6.7~7.0におけるTrpバンドの強度変化はインドール環の疎水性相互作用低下に起因するものと考えられる。BM2-TMPの配列中でHis19以外にイオン化状態が変化する可能性があるのはHis27のみであり、His27のプロトン化状態がpH 6.7~7.0におけるTrp環境の変化と関係するものと思われるが、その機構については、今後更に検討する予定である。

【参考文献】

- [1] Mould, J. A., Paterson, R. G., Takeda, M., Ohigashi, Y., Venkataraman, P., Lamb, R. A., Pinto, L. H. *Dev. Cell* 5, 175-184 (2003).
- [2] Okada, A., Miura, T., and Takeuchi, H. *Biochemistry* 40, 6053-6060 (2001).