

2P122

生体膜への分子の結合に関する NMR および分子動力学計算による研究

(姫路獨協大・薬) 吉井 範行, 岡村 恵美子

【はじめに】薬剤分子の細胞内への取り込み現象は、その分子の持つ薬理作用の発現と密接に関係している。薬剤分子と細胞膜との相互作用に関する情報は、生理活性の発現や薬効や副作用の制御を研究する上で重要な基礎的知見となりうる。しかしながら、細胞膜、あるいはそのモデルである脂質膜と薬剤分子とが共存した系に対して、前処理なしのそのままの状態の微視的詳細を明らかにした研究はほとんどない。そこで本研究では、高分解能溶液 NMR とパルス磁場勾配 (PFG)NMR を組み合わせることにより、薬剤分子と脂質膜分子との共存系でのそれらの結合の様相や運動状態についての知見を得ることを目指した。また NMR から明らかにすることが困難な薬剤分子と脂質膜の結合部位に関する情報を得るために、分子動力学(MD)シミュレーションによる自由エネルギー解析を行った。

【実験】対象とする薬剤分子には、実際に抗がん剤として広く用いられている 5-fluorouracil(5FU 分子量 130, 2-30 mM)を採用し、また脂質二重層膜の最も単純なモデルとして、卵黄レシチンの一枚膜ベシクル (LUV, 直径 100 nm, 濃度 40-50 mM)を用いた。温度は、脂質が液晶状態にある 283-313 K の間で変化させた。

【計算】MD 計算の対象系は、実験との対応から 5FU および 1-パルミトイル-2-オレオイル-フォスファチジルコリン(POPC)からなる脂質二重層膜系を用意した。脂質膜の法線方向の位置の関数として自由エネルギーを評価するために、薬剤分子の二重層膜中心面からの距離に拘束をかけた MD 計算を行った。ポテンシャルパラメータには CHARMM を用い、5FU の F 原子に関するパラメータは、類似の分子を参考に設定した。自由エネルギー計算には熱力学的積分法を用い、分子位置について拘束をかけた温度圧力一定条件で MD 計算を行った。

【結果と考察】 ^{19}F および ^1H の PFG NMR 測定結果を、

$$\ln \frac{M(G)}{M(0)} = -D(\gamma\delta)^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) G^2 \quad (1)$$

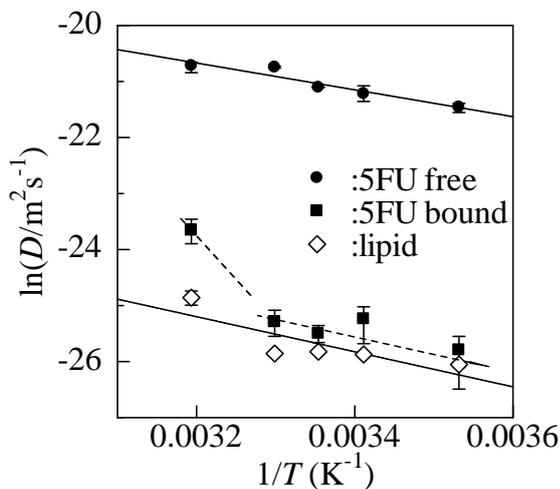


図 1 . 拡散係数のアレニウスプロット .

を用いて解析することにより、5FU と脂質分子の拡散係数を得た。 ^{19}F のシグナルから、5FU は、膜に結合した(bound)状態およびバルクの水の領域に溶解した(free)状態の 2 状態があることがわかった。膜に結合した 5FU の拡散係数は水溶液中に比べて 2 桁近く小さくなり、膜脂質分子の拡散係数と同等になる。これは膜中の 5FU の運動が膜分子と同調して運動しているためと考えられる。一方、高温では膜分子の運動に支配されず、膜より大きな拡散係数を示す。これは膜と 5FU の結合があまり強固なものではないことを示唆している。

さらに、5FU の膜法線方向の運動について

情報を得るために、PFG NMR のシグナルに対して bound と free の状態間での交換を考慮した解析を行った。

$$M_F = \left[\frac{M_{F0}}{2} - \frac{\lambda M_{F0} - k_B M_{B0}}{2\Lambda} \right] \exp[(-\sigma + \Lambda)\Delta] + \left[\frac{M_{F0}}{2} + \frac{\lambda M_{F0} - k_B M_{B0}}{2\Lambda} \right] \exp[(-\sigma - \Lambda)\Delta] \quad (2)$$

ここで、 $m = \delta\gamma G$ 、 $\sigma = (k_F + k_B + D_F m^2 + D_B m^2)/2$ 、 $\lambda = (k_F - k_B + D_F m^2 - D_B m^2)/2$ 、

$\Lambda = \sqrt{\lambda^2 + k_F k_B}$ である。添え字 F および B はそれぞれ free および bound 状態を表す。得られた

bound から free へ移る時の速度定数 k_B は、293K、303K でそれぞれ 4.2 s^{-1} 、 9.4 s^{-1} であった。よって交換に伴う半減期はそれぞれの温度で 0.22 秒、0.07 秒であり、5FU はかなり高速で交換していることが明らかとなった。

また ^{19}F の 1D NMR のシグナルから 5FU の膜への結合量を求めた。その結果、測定をおこなった温度、濃度領域いずれも結合量は 1 割程度であった。自由エネルギーに換算すると -3kJ/mol 程度となる。これは熱ゆらぎの大きさ (2.5kJ/mol) と同程度であり、拡散係数や交換速度の結果と同様、5FU と膜との結合が緩やかであることを示している。

次に MD による自由エネルギー計算の結果を密度プロファイルとともに図 3 に示す。5FU は、脂質膜の疎水部に比べて脂質膜表面付近の方がより安定化されている。またグリセロール付近(図の矢印)に小さな極小が見られ、この位置で 5FU 分子が結合可能と考えられる。その極小は強固な結合をもたらすほどではなく、数 kJ/mol 程度の緩やかな結合を生成するものである。

【まとめ】NMR 測定および MD 計算を組み合わせることにより、5FU の膜への結合の分子論的描像を得ることを試みた。その結果、5FU 分子の膜との結合部位、結合強度、膜中および膜とバルクとの交換といった構造、エネルギー、動力学についての多面的な情報を得ることができた。

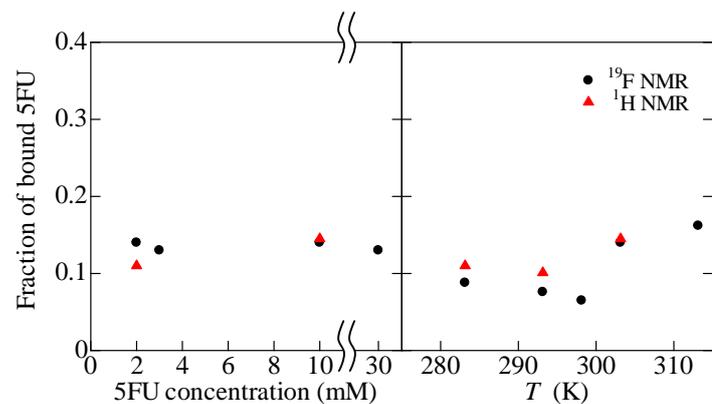


図 2. 膜へ結合する 5FU の割合の 5FU 濃度依存性 (左) および温度依存性 (右)。

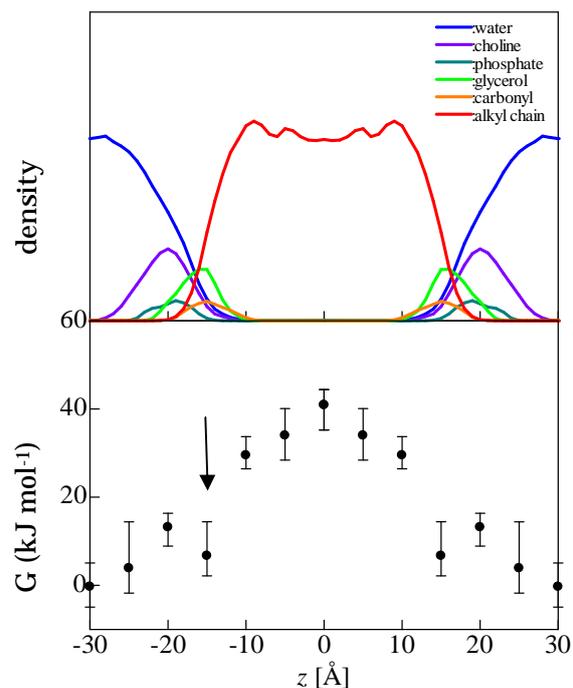


図 3. 密度プロファイル(上)および自由エネルギープロファイル(下)。