

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651244

研究課題名(和文) 速い立体配座交換に起因する生体分子間相互作用の解明

研究課題名(英文) Rapid conformational change results in attractive interactions between biomolecules

研究代表者

村田 道雄 (Murata, Michio)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40183652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：生体分子間に働く疎水的相互作用を説明するための仮説「協奏的な分子運動は生体分子間に親和性をも生む」を検証することを目的とした。具体的には、脂肪酸と脂肪酸結合タンパク質(FABP)に着目し、これらの共結晶を脂肪酸の種類を変えて作成することによって高分解の構造解析に成功した。その結果、比較的安定に結合する炭素数が14より長い脂肪酸では温度因子の上昇が認められた。また、ステアリン酸結合体について室温での結晶構造解析を行い、炭素鎖12位以降の配座が一定でないことが明らかにした。これは、当初の仮説どおり、速い配座交換によっても分子の結合が安定に保たれていることを示唆しており、今後の研究展開に役立つ。

研究成果の概要(英文)：Hydrophobic interactions are known to be essential for biomolecular recognition. In this project, our hypothesis that concerted bimolecular movements lead to stabilization of complexation was confirmed by experimental data. Fatty acid and fatty-acid binding proteins were subjected to the structural determination by X-ray analysis. The results clearly showed that fatty acids with an alkyl chain longer than C14 have highly flexible conformation around their terminal methyl group. These movements of alkyl chains hardly prevent high affinity of fatty acids, thus supporting that a rapid movements of ligand molecules do not always decrease bimolecular affinity but stabilize the ligand binding.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：配座解析 分子運動 疎水性相互作用 脂質二重膜 リン脂質 脂肪酸 脂肪酸結合タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

生命現象の多くの部分は、生体分子間の弱い相互作用によって支えられている。代表的な例として、生体膜の脂質分子が挙げられよう。膜を構成する脂質は、一義的な化学構造を有する小分子化合物であり、また、その集合体である脂質二重膜は重要な生理的役割を担っている。しかし、膜中における脂質分子の運動速度は非常に速く、静的な構造を議論しても実態を把握することはできない。すなわち、相互作用に関わる生体分子には、1つの立体構造が存在するわけではなく、複数の配座が短時間に交換し、しかもその組み合わせのいずれもが相互作用に参与している。これらの弱い相互作用は、生命現象において強い相互作用に勝るとも劣らぬ重要な役割を果たしているが、その実態が把握できていない。特に、脂質分子と膜タンパク質の相互作用については、その親和性の発現機構をほとんど分かっていない。そこには、非常に速い分子運動(配座交換)が生じており、静的な分子間相互作用の概念の適用が困難である点がいっそう問題を複雑にしている。特に、分子の速い配座交換を構造面から観測できる手法は限られおり、現在でも実験手法の欠如が最大の問題となっている。本挑戦的萌芽研究では、このような難問に応えるための研究戦略に端緒を付けることを目指した。

### 2. 研究の目的

生体分子間に働く疎水的相互作用を説明するための仮説「協奏的な分子運動は生体分子間に親和性をも生む」を検証したい。この親和性が脂質とタンパク質界面で生じていると仮定し、これを実験的に証明することを試みる。生命現象は、鍵と鍵穴で例えられる強い特異的な相互作用のみで成り立っているのではなく、弱い相互作用がむしろ主役であるので、これらを支える分子間相互作用を知ることが特に重要である。本研究では、実験科学的アプローチによって、複雑な構造を有する生体分子に特有な分子運動とそれに起因する分子間相互作用の機構を解明することを目指した。

### 3. 研究の方法

- a) NMR, IR による動的相互作用解析: 同位体標識した膜脂質と膜結合ペプチドの固体 NMR および IR を測定することによって、タンパク質中の脂肪酸アルキル部分の立体配座を決定し、次に膜タンパク質と周辺脂質の相互作用についても検討した。また、脂質とタンパク質の協奏的相互作用を生む配座交換の速度を NMR 緩和時間から見積もった。
- b) 分子動力学計算によるモデル系の創出: 膜脂質・タンパク質複合体について配座制限下と非制限下でシミュレーションを行い、上記の分子運動を再現した。
- c) 膜タンパク質モデリングのためのパラ

メータの取得: 上記シミュレーションによって膜脂質の二分子間に働く相互作用を定量化し、膜タンパク質と膜脂質の相互作用を再現するために必要な分子動力学パラメータを求めた。

### 4. 研究成果

本萌芽研究では、生命現象を司る分子間相互作用が分子の協奏的動きによって可能となること実験的に示すことを目指した。具体的には、構成分子の有意な2つの立体配座を明らかにし、それらの関わる二分子間の親和性を生む分子の動きを実験的に捉えるために、脂肪酸と脂肪酸結合タンパク質(FABP)に着目した。共同研究者とともに、これらの共結晶を、脂肪酸の種類を変えて作成し、低温下で高分解の構造解析に成功した。その結果、当初の仮説通り、炭素数が14より長いアルキル鎖では、顕著な電子密度の低下と温度因子上昇が認められた(図1)。

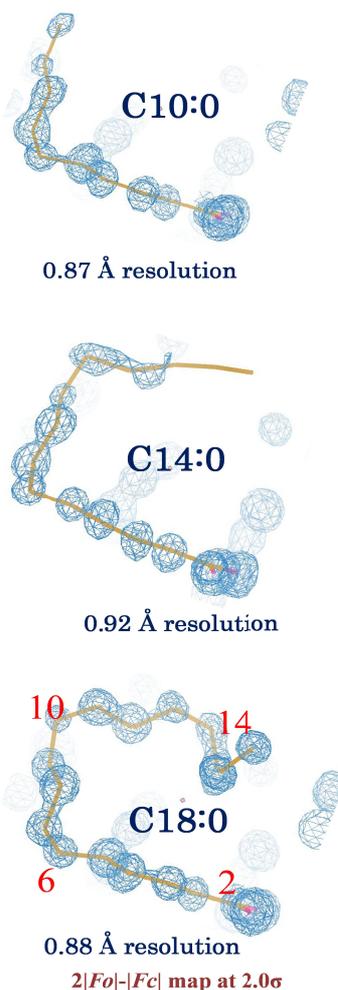


図1. FABP3に結合した脂肪酸の構造  
液体窒素温度においても、アルキル鎖長の異なる脂肪酸の結晶構造を比較すると、炭素数10までは鎖長に拘わらず同じ位置を占めているが、それ以後は脂肪酸によって位置が異なる。図中のC14:0脂肪酸(ミリスチン酸)では、末端の2つの炭素の電子密度が見えていない。

また、共同研究者とともに、ステアリン酸結合体について室温での結晶構造解析を行い、炭素鎖12位以降の配座が一定でないことが明らかになった。これは、当初の予想どおり、速い配座交換によっても分子の結合が安定に保たれていることを示唆しており、今後の研究展開に役立つ有力な知見を得られたと考えている。

次いで、膜タンパク質のモデル系として膜貫通性ペプチドとそれを取り巻く脂質分子間の相互作用に着目し、膜タンパク質モデリングのためのパラメータの取得を試みた。脂質などの疎水性分子と膜タンパク質の相互作用を動的な側面から解明できれば、比較的不明瞭な概念であった「疎水性相互作用」という概念をより正確かつ定量的に扱う研究の端緒を見出したと考えている。これらを用いれば、膜タンパク質の構造決定にも有用な計算機による分子モデリングに有用なパラメータを得ることができ、構造生物学の発展に資することができる。ひいては、新しい生体分子複合体のサイエンスが発展する契機となるように、今後も研究を継続する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)  
〔雑誌論文〕(計 6 件)

Matsumori, M., Yasuda, T., Okazaki, H., Suzuki, T., Yamaguchi, T., Tsuchikawa, H., Doi, M., Oishi, T., Murata, M., Comprehensive molecular motion capture for sphingomyelin by site-specific deuterium labeling. *Biochemistry*, 査読有、51 巻、8363-8370 (2012).

doi: 10.1021/bi3009399

Umegawa, Y., Adachi, T., Matsumori, N., Murata, M., Possible conformation of amphotericin B dimer in membrane-bound assembly as deduced from solid-state NMR. *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有、20 巻、5699-5704, (2012).

doi: 10.1016/j.bmc.2012.08.016.

Hirose, M., Sugiyama, S., Ishida, H., Niiyama, M., Matsuoka, D., Hara, T., Mizohata, E., Murakami, S., Inoue, T., Matsuoka, S. and Murata, M. Structure of the human heart fatty acid-binding protein in complex with the fluorescent probe 1-anilinonaphthalene-8- sulphonic acid, *J. Synchrotron Radiat.*, 査読有、20 巻、923-928, (2013).

doi: 10.1107/S0909049513021298.

Lethu, S., Matsuoka, S. and Murata, M. Highly Efficient Preparation of Selectively Isotope Cluster-Labeled Long Chain Fatty Acids via Two Consecutive Csp3-Csp3 Cross-Coupling Reactions, *Org. Lett.*, 査読有、16 巻、844-847 (2014).

doi: 10.1021/ol4036159.

Kinoshita, M., Matsumori, N., Murata, M.

Coexistence of two liquid crystalline phases in dihydrosphingomyelin and dioleoyl-phosphatidylcholine binary mixtures, *Biochim. Biophys. Acta*, 査読有、1838 巻、1372-1381 (2014).

doi: 10.1016/j.bbammem.2014.01.017.

Maria Carmen Tan, Shigeru Matsuoka, Hikaru Ano, Hanako Ishida, Mika Hirose, Fuminori Sato, Shigeru Sugiyama, Michio Murata, Interaction kinetics of liposome-incorporated unsaturated fatty acids with fatty acid-binding protein 3 by surface plasmon resonanc. *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有、22 巻、1804-1808 (2014).

doi: 10.1016/j.bmc.2014.02.001.

〔学会発表〕(計 9 件)

安田智一、土川博史、松森信明、村田道雄、重水素個体NMRによる脂質ラフトにおけるスフィンゴミエリンの運動性解析、日本化学第 93 春季年会、2013 年 3 月 25 日、立命館大学びわこくさつキャンパス

大塚康平、松岡茂、廣瀬末果、佐藤文憲、溝端栄一、杉山成、井上豪、村田道雄、水溶性脂肪酸ミミックの分子設計と F A B P 結合活性、日本化学会第 93 春季年会、2013 年 3 月 25 日、立命館大学びわこくさつキャンパス

山口敏幸、安田智一、前田佳子、鈴木孝、由良理陽、松岡茂、松森信明、村田道雄、脂質ラフト形成の分子機構、第 54 回天然有機化合物討論会、2012 年 9 月 19 日、東京農業大学世田谷キャンパス

松岳大輔、松岡茂、廣瀬末果、新山真由美、佐藤文憲、溝端栄一、杉山成、井上豪、村田道雄、変異導入による FABP3-脂肪酸相互作用形態の変化、第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013 年 6 月 13 日、鳥取

Hirose, M., Sugiyama, S., Ishida, H., Matsuoka, D., Hara, T., Mizohata, E., Inoue, T., Matsuoka, S., Murata, M. Structure of the human muscle fatty acid-binding protein complexed with competitive inhibitor, The International Conference on Structural Genomics 2013 (ICSG2013)、第 7 回国際構造ゲノム会議、2013 年 7 月 30 日、札幌  
梅川雄一、松岡茂、山口敏幸、村田道雄、スピンエコーMAS 法を用いた脂質二重膜の化学シフト異方性測定、第 52 回 NMR 討論会、2013 年 11 月 1 3 日、金沢

Lethu, S., Matsuoka, S., Murata, M., Design and Synthesis of Labeled Compounds for Conformation Analysis of Fatty Acids Bound to Proteins, First Osaka University - EPFL International Symposium at Osaka University、2013 年 12 月 2 日、吹田  
大塚康平・松岡茂・廣瀬末果・佐藤文憲・溝端栄一・杉山成・井上豪・村田道雄、

親水性脂肪酸類縁体と脂肪酸結合タンパク質の結合様式、日本化学会第94春季年会、2014年3月29日、名古屋

Cui, J., Kinoshita, M., Matsuoka, S., Sato, F., Ando, J., Yamagoshi, H., Dodo, K., Fujita, K., Sodeoka, M., Murata, M., Synthesis of diyne-labeled sphingomyelin and evaluation of its raft-like domain formation、日本化学会第94春季年会、2014年3月29日、名古屋

〔図書〕(計 1件)

Matsuoka, S. and Murata, M. Structural Studies of Small Bioactive Compounds Interacting with Membranes and Proteins , in Advances in Biological Solid-State NMR: Proteins and Membrane-Active Peptides, Frances Separovic and Akira Naito (Eds.), Royal Society of Chemistry, Chapter 8, 133-161, 2014年2月

〔産業財産権〕

出願状況(なし)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/murata/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

村田 道雄 (Murata, Michio)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：40183652

(2)研究分担者

なし