

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25242073

研究課題名(和文) 生体膜構成脂質の機能を探る小分子の再発見と作用機構の解明

研究課題名(英文) Exploration of natural products and small molecules for mode-of-action study on biomembrane lipids

研究代表者

村田 道雄 (Murata, Michio)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：40183652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 27,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果の概要(和文)：本基盤研究Aでは、1)マイクロドメインに結合することによって生体膜における情報伝達機能を改変することのできる化合物を再発見し、2)ケミカルバイオロジーの領域を生体膜に拡張すると同時に、脂質研究に有用な小分子プローブを世に送り出すことを目的とし、3年間研究を実施した。その結果、すでに26件の学術論文を発表したように、当初の目標をおおよそ達成することができた。例えば、国内研究機関との共同研究により、ステロール認識する環状ペプチド・セオネラミドAの脂質膜上における作用を解明し、アンフィジノール3やアンフォテリシンBが有するステロール認識機構についても顕著な進捗を達成した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we first explored natural products that alter the signal transduction in biological membranes by binding to lipid rafts. At the same time, these lipid-specific molecular probes help to extend the area of the chemical biology to lipid membrane area. During the research period, we were able to achieve the initial goals as already published in 26 scientific papers. For example, cyclic peptides, theonellamides, which was known to bind to sterols in joint research, was revealed to interact with membrane sterol in a different way from other sterol-associating compounds like saponins. Remarkable progress of sterol recognition mechanism have been obtained by the mechanism-of-action studies on amphidinol 3 and amphotericin B.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：コレステロール 脂質二重膜 脂質ラフト 小分子プローブ 重水素固体NMR 表面プラズモン共鳴 重水素固体NMR

1. 研究開始当初の背景

近年、脂質が重要な情報伝達分子として機能していることが明らかになり、大いに注目を集めている。生理活性脂質のうち、スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) や血小板活性化因子 (PAF) は、創薬のターゲット分子としても重要であり、すでにこれらの受容体をターゲットとした薬物が臨床応用されている。一方で、細胞膜を構成する通常の脂質 (以下、膜脂質と略称) も重要な情報伝達機能を担うことが最近わかってきた。例えば、アポトーシスにおけるイートミーシグナル (eat me signal) のように、ごく平凡なリン脂質であるフォスファチジルセリンが驚くべき役割を担う事例が発見され、膜脂質の新たな生理機能が大いに注目されている。

最近、膜構成ステロールを認識する天然物について新しい作用機構が報告されるようになった。ポリエン抗生物質として知られるタデノリドの作用が、膜ステロールと結合することによって膜中の遊離ステロールを枯渇させることに起因するという実験結果が報告されている (*PNAS*, 2011, 108, 6733-6738)。また、われわれも研究対象としている海洋天然物・セオネラミド theonellamide については、ステロールを認識することによって情報伝達タンパク質である Rho1 を活性化し、それが酵母の細胞壁多糖の合成促進につながることを報告されおり (*Nature, Chem. Biol.* 2010, 6, 519-516)、真菌膜エルゴステロールが重要な情報伝達に参与していることを強く示唆している。

ケミカルバイオロジーや分子薬理学は、生体内の複雑な相互作用を理解するための優れた方法論を提供している。特に、小分子プローブを駆使した研究手法は、タンパク質の作用解析に大きな成果を挙げてきた。過去十数年間に蓄積したこれらの研究技術を用いることによって、膜脂質を含めたタンパク質以外の生体分子の隠れた機能の解明を推進するべき時機を迎えている。

本基盤研究では、タンパク質に用いられてきたケミカルバイオロジーの手法を膜脂質に適用するために必要な小分子プローブを見出し、世に送り出すことを目指す。そのためには、膜脂質と特異的に結合する小分子プローブの作用機構を明らかにし、同時に膜脂質の隠された生理機能を解明することが必要である。

2. 研究の目的

細胞膜を主要構成成分であるリン質やステロールが持つと推定される情報伝達機能については、膜脂質が豊富に存在することが大きな障害となって、近年までほとんど注目されてこなかった。本研究では、次項で示した3つのステップを通じて、特定のマイクロドメインに局在化して膜脂質と相互作用する小分子プローブを見つけ出し、それらの分子基盤を解明することによって、膜脂質の関

わる情報伝達機能を解明するための研究試薬・小分子プローブを世に送り出すことを目的とした。

3. 研究の方法

a) 膜脂質を特異的に認識する小分子プローブの再発見：表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いて、ステロール、グリセロリン脂質、スフィンゴリン脂質、および糖脂質を含有する脂質二重膜を作成し、供試の疎水性部分を有する天然物等との親和性を測定した。同時に、培養細胞と真菌に対する増殖抑制作用、および人工膜に対する膜透過化活性を精査した。

b) 重水素固体 NMR によるラフト脂質との直接相互作用の観測：上記実験で膜脂質との相互作用が明らかとなった小分子、および既に端緒を得ているポリエン抗生物質と海洋天然物について、重水素化した脂質分子の共存下で固体 NMR 測定および熱測定を行った。これによって、ラフト等のマイクロドメイン特異的に局在化する天然物を選別した。

c) 小分子プローブ候補の作用機構の解析：上記の候補化合物と膜脂質との結合様式を調べ、マイクロドメインへの局在化機構を推定した。これらの評価から膜脂質の情報伝達機能の解明に役立つ小分子プローブとして、上記 theonellamide やアンフィジノール、各種サポニン等を見出した。

4. 研究成果

本基盤研究 A では、1) 脂質ラフトなどのマイクロドメインに結合することによって生体膜における情報伝達機能を改変することのできる化合物を再発見し、2) ケミカルバイオロジーの領域を生体膜に拡張すると同時に、脂質研究に有用な小分子プローブを見出して世に送り出すことを目的とし、3年間研究を実施した。その結果、すでに26件の学術論文として発表したように、当初の目標をおおよそ達成することができた。例えば、京大薬・東大農・理研との共同研究において、ステロール認識する環状ペプチドの脂質膜上における作用を精査して、本ペプチドの生理活性発現機構の解明につなげた。また、従来から研究を進めてきたアンフィジノール3やアンフォテリシンBが有するステロール認識機構についても顕著な進捗を達成した。さらに、本基盤研究開始後に新たに始めた2つの研究課題においても当初の想定を上回る進捗を示している。すなわち、特殊な植物性サポニンが有するステロール相互作用を、有機合成化学や固体 NMR の手法を取り入れることによって、解明することに成功した。また、標識原子 (重水素、セレン、臭素など) を脂質分子に位置特異的に脂質に導入することによって、固体 NMR や結晶 X 線回折による周辺脂質を選択的観測できる実験技術を開発した。

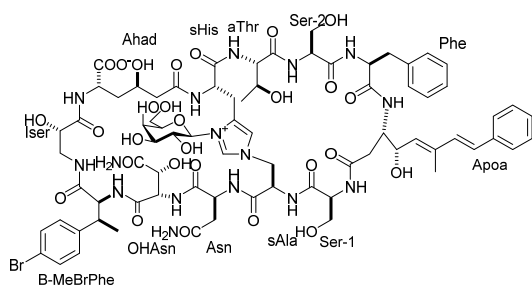


図1. 膜中のステロールを特異的に認識する海洋天然物・theonellamide A

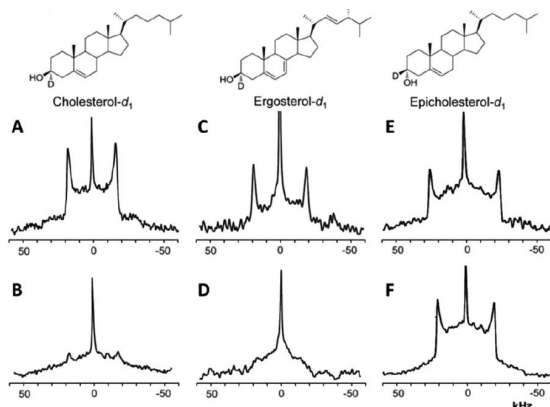


図2. Theonellamide A が結合することによってステロールの重水素のシグナルが減少する (A-B)。これは Theonellamide A が膜中でステロールに結合していることを示している。

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 27 件)

- Sphingomyelin distribution in lipid rafts of artificial monolayer membranes visualized by Raman microscopy. Ando J., Kinoshita, M., Cui, J., Yamakoshi, H., Dodo, K., Fujita K., Murata, M.* Sodeoka, M.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **112**(15), 4558-4563 (2015).
- Axial hydrogen at C7 position and bumpy tetracyclic core markedly reduce sterol's affinity to amphotericin B in membrane. Nakagawa, Y., Umegawa, Y., Nonomura, K., Matsushita N., Takano, T., Tsuchikawa, H., Hanashima, S., Oishi, T., Matsumori, N., Murata, M.* *Biochemistry* **54** (2), 303-312 (2015).
- Molecular dynamics simulations of heart-type fatty acid-binding protein in apo and holo forms, and hydration structure analyses in the binding cavity. Matsuoka, D., Sugiyama, S., Murata, M., Matsuoka, S.* *J. Phys. Chem. B* **119**(1), 114-127 (2015).
- Deuterium NMR of raft model membranes reveals domain-specific order profiles and compositional distribution. Yasuda, T., Tsuchikawa, H., Murata, M., Matsumori, N.* *Biophys. J.* **106**(3), 631-638 (2015).
- Novel Raman-tagged sphingomyelin that closely mimics original raft-forming behavior. Cui, J., Matsuoka, S., Kinoshita, M., Matsumori, N., Sato, F., Murata, M.* Ando, J., Yamakoshi, H., Dodo, K., Sodeoka, M. *Bioorg. Med. Chem.* **23**(13), 2989-2994 (2015).
- Orientation and order of the amide group of sphingomyelin in lipid bilayers determined using solid-state NMR. Matsumori, N.* Yamaguchi, T., Maeta, Y., Murata, M. *Biophys. J.* **108**(10), 2502-2506 (2015).
- Modification of bafilomycin structure to efficiently synthesize solid-state NMR probes that selectively bind to vacuolar-type ATPase. Shibata, H., Tsuchikawa, H., Hayashi, T., Matsumori, N., Murata, M.* Usui, T. *Chem. Asia. J.* **10**(4), 915-924 (2015).
- Centerband-only analysis of rotor-unsynchronized spin-echo for measurement of lipid ^{31}P chemical shift anisotropy. Umegawa, Y., Yamaguchi, T., Murata, M., Matsuoka, S.* *Magn. Res. Chem.* **53**(7), 514-519 (2015).
- Role of polyol moiety of amphotericin B in ion channel formation and sterol selectivity in bilayer membrane. Yamamoto, T., Umegawa, Y., Tsuchikawa, H., Matsumori, N., Hanashima, S., Murata, M.* Haser, R., Rawlings, B. J., Caffrey, P. *Bioorg. Med. Chem.* **23** (17), 5782-5788 (2015).
- ^{13}C -TmDOTA as versatile thermometer compound for solid-state NMR of hydrated lipid bilayer membranes. Umegawa, Y., Tanaka, Y., Matsumori, N., Murata, M.* *Magn. Reson. Chem.* in press (2015).
- Stereoselective synthesis of head group of archaeal phospholipid PGP-Me for investigating bacteriorhodopsin-lipid interactions. Cui, J., Kawatake, S., Umegawa, Y., Lethu, S., Matsuoka, S., Sato, F., Matsumori, N., Murata, M.* *Org. Biomol. Chem.* **13** (41), 10279-10284 (2015).
- Bioactive structure of membrane lipids and natural products elucidated by a chemistry-based approach. Murata, M.* Sugiyama, S., Matsuoka, S., Matsumori, N. *The Chemical Record* **15**(4), 675-690 (2015).
- Design and synthesis of 24-fluorinated bafilomycin analogue as NMR probe with potent inhibitory activity to V-type ATPase. Shibata, H., Tsuchikawa, H., Matsumori, N., Murata, M.* Usui, T. *Chem. Lett.* **43**, 474-476 (2014).
- Detailed comparison of deuterium quadrupole profiles between sphingomyelin and phosphatidylcholine bilayers. Yasuda, T., Kinoshita, M., Murata, M. and Matsumori, N.* *Biophys. J.* **106**, 631-638 (2014).
- Interaction kinetics of liposome-incorporated unsaturated fatty acids with fatty acid-binding protein 3 by surface plasmon resonance. M. C. Tan, S. Matsuoka, H. Ano, H. Ishida, M. Hirose, F. Sato, S. Sugiyama, and Murata, M.* *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 1804-1808 (2014).

16. Highly efficient preparation of selectively isotope cluster-labeled long chain fatty acids via two consecutive Csp3- Csp3 cross-coupling reactions. Lethu, S., Matsuoka, S.* and Murata, M.* *Org. Lett.* **43**, 844-847 (2014).
17. Effect of sterol side chain on channel formation by amphotericin B in lipid bilayers. Nakagawa, Y., Umegawa, Y., Takano, T., Tsuchikawa, H., Matsumori, N. and Murata, M.* *Biochemistry* **53**(19), 3088-3094 (2014).
18. Direct stereospecific interaction of amphidinol 3 with sterol in lipid bilayers. Espiritu, R., Matsumori, N.,* Tsuda, M. and Murata, M. *Biochemistry* **53**(20), 3287-3293 (2014).
19. Synthesis and biological activity of the C'D'E'F' ring system of maitotoxin. Kunitake, M., Oshima, T., Konoki, K., Ebine, M., Torikai, K., Murata, M. and Oishi, T.* *J. Org. Chem.* **79**(11), 4948-4962 (2014).
20. Coexistence of two liquid crystalline phases in dihydrosphingomyelin and dioleoylphosphatidylcholine binary mixtures. Kinoshita, M.,* Matsumori, N. and Murata, M.* *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 1372-1381 (2014).
21. Synthesis and biological evaluation of QRSTUVWXYZA' domains of maitotoxin. Nicolaou, K.C.,* Heretsch, P., Nakamura, T., Rudo, A., Murata, M. and Konoki, K. *J. Am. Chem. Soc.* **136**(46), 16444-16451 (2014).
22. Phosphatidylcholine bearing 6,6-dideuterated oleic Acid: useful solid-state ²H NMR probe for investigating membrane properties. Cui, J., Lethu, S., Yasuda, T., Matsuoka, S., Sato, F., Matsumori, N., and Murata, M.* *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**(2), 203-206 (2014).
23. A novel sperm-activating and attracting factor (SAAF) from ascidian *Ascidia sydneiensis*. Matsumori, N.,* Hiradate, Y., Shibata, H., Oishi, T., Simma, S., Toyoda, M., Hayashi, F., Yoshida, M., Murata, M. and Morisawa, M., *Org. Lett.* **15**(2), 294-297 (2013).
24. Interaction between the marine sponge cyclic peptide theonellamide A and sterols in lipid bilayers as viewed by surface plasmon resonance and solid-state ²H NMR. Espiritu, R. A., Matsumori, N.,* Murata, M. Nishimura, S., Kakeya, H., Matsunaga, S. and Yoshida, M. *Biochemistry*, **52**, 2410-2418 (2013).
25. Characterization of the ordered phase formed by sphingomyelin analogues and cholesterol binary mixtures. Kinoshita, M.,* Goretta, S., Tsuchikawa, H., Matsumori, N. and Murata, M. *Biophysics*, **9**, 37-49 (2013).
26. Synthesis and structure revision of the C43-C67 part of amphidinol 3. Ebine, M., Kanemoto, M., Manabe, Y., Konno, Y., Sakai, S., Matsumori, N., Murata, M. and Oishi, T.* *Org. Lett.* **15**, 2846-2849 (2013).
27. Structure of the human heart fatty acid-binding protein in complex with fluorescent probe 1-anilinonaphthalene-8-sulphonic acid. Hirose, M., Sugiyama, S.,* Ishida, H., Niyama, M., Matsuoka, D., Hara, T., Mizohata, E., Murakami, S., Inoue, T.,

Matsuoka S. and Murata, M. *J. Synch. Radiat.* **20**, 923-928 (2013).

[図書] (計 2 件)

1. Structural Studies of Small Bioactive Compounds Interacting with Membranes and Proteins. Matsuoka, S., Murata, M., In “*Advances in Biological Solid-State NMR: Proteins and Membrane-Active Peptides*” Separovic F., Naito A. Eds, pp.133-143 (2014).
2. 有機機分析 構造解析の達人を目指して、村田道雄著、共立出版 (2014)。

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村田道雄 (Murata, Michio)
大阪大学・理学研究科・教授
研究者番号 : 40183652

(2)研究分担者

梅川雄一 (Umegawa, Yuichi)
大阪大学・理学研究科・特任助教 (常勤)
研究者番号 : 20587779

(3)研究分担者

土川博史 (Tsuchikawa, Hiroshi)
大阪大学・理学研究科・助教
研究者番号 : 30460992

(4)研究分担者

松森信明 (Matsumori, Nobuaki)
九州大学・理学研究院・教授
研究者番号 : 50314357

(5)研究分担者

花島慎弥 (Hanashima, Shinya)
大阪大学・大学院理学研究科・講師
研究者番号 : 50373353

(6)研究分担者

松岡茂 (Matsuoka, Shigeru)
大阪大学・大学院理学研究科・特任准教授 (常勤) 研究者番号 : 60456184

(7)連携研究者 なし