

研究種目： 基盤研究（S）

研究期間： 2006～2010

課題番号： 18101010

研究課題名（和文） 分子複合体としての生体膜の構造と機能

研究課題名（英文） Structures and Functions of Membrane-Bound Biomolecules

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

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生体膜・抗生物質・固体 NMR・脂質マイクロドメイン・自己会合体

1. 研究計画の概要

生命科学のフロンティアとして生体膜が注目されるようになって久しいが、その機能と構造の解明は、他の研究対象に比べて遅れている。生体膜中でのみ現れる膜結合分子の三次元構造、および分子間相互作用は生命現象を理解するうえで極めて重要であるが、構造生物学の発展を支えた方法論が生体膜に対しては有効ではない。この問題点を解決するためには、生体膜を二次元流体としてではなく、脂質分子を含む分子複合体として捉える必要がある。本研究では、以下の目的を設定した。

- (1) 脂質二重膜中に形成される生理活性物質の分子複合体の構造
- (2) 生体膜に形成される脂質マイクロドメイン構造における分子認識
- (3) スフィンゴ脂質を特異的に認識するタンパク質と脂質の相互作用解明

2. 研究の進捗状況

(1a) 抗生物質アンフォテリシン B (AmB) の薬理作用は、真菌類に特徴的なエルゴステロールとの特異的相互作用により説明されている。エルゴステロールが分子間相互作用に及ぼす影響を調べた結果、AmB-AmB 間の距離が増大すること、および AmB 複合体のヘプタエン部分と相互作用していることが明らかになった。さらに、膜モデルとの相互作用を表面プラズモン共鳴や溶液 NMR にて精査したところ、AmB がエルゴステロール膜中で安定な会合体を作ることの定量的に示すことに成功した。

(1b) 膜との親和性を向上させた AmB 誘導体 (メチルエステル体) を用いて、会合体の構造

解析を行った結果、従来の樽板型モデルを支持する分子間相互作用が検出された。

(2a) 脂質マイクロドメインを構成する主要成分であるスフィンゴミエリン (SM) とコレステロール (Cho) に着目した。それらの相互作用を固体 NMR によって検出するために、特定の位置に ^{13}C 、 ^{15}N あるいは ^{19}F 、 ^2H を化学的に導入した。特に、コレステロールについて、フッ素を 6 位に置換した影響を調べるためにリン脂質二重膜中の配向や運動性を調べた結果、Cho と極めて類似した挙動を示すことを明らかにし、プローブとしての有効性を確認した。これら標識体について原子間距離測定 (REDOR 法) を行った結果、SM 同士には顕著な磁気双極子相互作用が認められ、アミド間で分子間水素結合を形成していることが示唆された。一方で、Cho と SM の間には弱い相互作用しか認められなかった。以上の成果は、脂質マイクロドメインにおける弱い分子間相互作用を固体 NMR によって観測できることを示している。

(2b) スフィンゴミエリンとコレステロールを共有結合で連結したプローブを作製した。これら脂質誘導体によるラフト様マイクロドメインの形成を評価した結果、連結プローブともにラフトを形成することを明らかになり、ラフト中の脂質分子相互作用の解明に有用な分子プローブとなると期待される。(3) については、上述の脂質プローブを用いて、今後研究を本格化させる。

3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している。

アンフォテリシン B や膜貫通ペプチドについては、固体 NMR と有機合成化学的な手

法によって、実験データを会合体の構造を推定するに至っている。これらの知見・経験と、すでに調製している同位体標識リン脂質やステロールを用いることによって、研究目標の(2)と(3)について研究を加速することができる。特に、残りの期間で脂質マイクロドメインとタンパク質と相互作用の解明に効率的に取り組む予定である。計算機科学や一部機器分析など比較的長時間を要する実験は、研究期間終了後も継続する必要があるが、化学合成などを伴う実験は今後2年間でおおよそ終了することができるので、順調に進捗していると考えられる。

4. 今後の研究の推進方策

脂質マイクロドメインに関してはモデル系を用いて、脂質分子同士の相互作用解明を継続して行う。抗生物質やスフィンゴミエリンの研究を通じて確立した方法論を用いて、今後、タンパク質の膜貫通 α ヘリックスと膜脂質の相互作用を調べる予定である。特に、脂質マイクロドメインなど脂質分子とタンパク質の相互作用が生理機能発現に重要な役割を果たす例を取り上げてゆく。イソギンチャク毒の一種である、エクイナトキシンを中心に相互作用解析を進めてゆく予定である。マイクロドメインに局在化する GPI アンカータンパク質や脂肪酸結合タンパク質などが関連遺伝子産物については、単純なモデルペプチドでの知見をもとに検討を進める。

5. 代表的な研究成果

(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 20 件)

1. Self-assembly of amphotericin B is probably surrounded by ergosterol; bimolecular interactions as evidenced by solid state NMR and CD spectra. Kasai, Y., Matsumori, N., Umegawa, Y., Matsuoka, S., Ueno, H., Ikeuchi, H., Oishi, T. and Murata, M. *Chem. Eur. J.* **14**, 1178-1185 (2008).
2. Orientation of fluorinated cholesterol in lipid bilayers analyzed by ^{19}F tensor calculation and solid-state NMR. Matsumori, N., Kasai, Y., Oishi, T., Murata, M. and Nomura, K. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4757-4766 (2008).
3. Complex formation of amphotericin B in sterol-containing membrane as evidenced by surface plasmon resonance. Mouri, R., Konoki, K., Matsumori, N., Oishi, T. and Murata, M. *Biochemistry*, **47**, 7807-7815 (2008).
4. Ergosterol increases intermolecular distance of amphotericin B in membrane-bound assembly as evidenced by solid-state NMR. Umegawa, Y., Matsumori, N., Oishi, T. and Murata, M.

Biochemistry, **47**, 13463-13469 (2008).

5. Conformation and position of membrane-bound amphotericin B deduced from NMR in SDS micelles. Matsumori, N., Houdai, T. and Murata, M. *J. Org. Chem.* **72**, 700-704 (2007).

[学会発表] (計 35 件)

[図書] (計 1 件)

State-of-Art Methodology of Marine Natural Products Chemistry: Structure Determination with Extremely Small Sample Amounts. Murata, M., Oishi, T. and Yoshida, M. In “*Progress in Molecular and Subcellular Biology*” N. Fusetani and A. S. Clare Eds., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp.203-220 (2006).

[その他]

研究室 HP:

<http://www.ch.wani.osaka-u.ac.jp/lab/murata>