

機関番号： 1 4 4 0 1

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： 4 0 1 8 3 6 5 2

研究成果の概要 (和文)：

生体膜は生命機能に重要な役割を果たすにもかかわらず、捉えどころない液体のようなものと考えられてきた。本研究はその構成分子である脂質に構造があり、それによって生体膜の機能が発現しているとの考えのもとに研究を進めた。すなわち、化学的に標識を導入した分子を用いて、固体NMRなどを測定することによって、生体膜における抗生物質や脂質などの形と動きを調べることによって、それらの構造と分子間相互作用を解明することができた。

研究成果の概要 (英文)：

Biomembrane, essential entity for life, has been regarded as an elusive liquid medium. In this project, we have examined the 3D structures of membrane lipids which are responsible for biological functions. Solid-state NMR measurements for isotope-labeled molecules allowed us to elucidate the structures and dynamics of antibiotics and phospholipids residing in bilayer membranes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	29,200,000	8,760,000	37,960,000
2007年度	20,700,000	6,210,000	26,910,000
2008年度	12,500,000	3,750,000	16,250,000
2009年度	12,500,000	3,750,000	16,250,000
2010年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
総計	85,100,000	25,530,000	110,630,000

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： 脂質二重膜、抗生物質、脂質マイクロドメイン、分子複合体、自己会合体、コレステロール、膜タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

生体膜は、生命科学のフロンティアとして近年ますます注目を集めている一方で、機能と構造の解明は遅れている。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、構造生物学で活躍した研究方法が生体膜にはあまり役に立たない。その理由として、膜タンパク質などの立体構造が膜中でのみ再現可能であること、膜脂質は運動性が高いことが挙げられる。これら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。

## 2. 研究の目的

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。これらの相互作用を解明するためには、NMR など物理化学的な測定に加えて、膜結合分子と膜脂質の両方を自在に修飾・標識できる有機化学が重要な役割を果たすと考える。本基盤研究 S では研究期間5年間に、以下の3点を重点的に解明する。具体的には以下の3つの目的を設定した。

(1) 生体膜を形成する脂質二重膜中に形成される抗生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

## 3. 研究の方法

生体膜における分子間相互作用を解明するために、主に固体NMRを用いた。そのためには、安定同位体で標識した化合物が必要であるが、有機合成的手法および生合成によって、 $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ -標識体を調製した。以下に手法な研究方法について説明する。

固体NMRにおける構造情報の取得：本研究では、生体膜中に形成される複合体の構造情報を原子間距離測定で取得しようと試みた。アンフォテリシンBの場合には分子運動速度が充分遅いことを誘導体について分子内二重標識体の固体NMRを測定することによって構造情報を得た。加えて、分子の会合情報をCD, SPR, UVで調べることによって、比較的相互作用の強いエルゴステロール含有膜中においてAmBとステロールの相互作用、膜中に高濃度で結合できるAmBメチルエステル体で分子間の相互作用を調べることによって問題点の解決を図った。

$^{13}\text{C}$ 標識化合物の調製について：固体NMR測定のためには、同位体標識化合物の調製が不可欠である。化学合成によって100%かつ位置選択的に同位体を導入するのがベストであるが、AmBのような複雑な化合物の場合には合成に長時間を要することが大きな障害であった。一方で、分子間で相互作用している部分を特定できない場合には、分子全体が標識されていた方がよい。そこで、AmBを生産する微生物を $^{13}\text{C}$ 標識グルコースやプロピオン酸の存在下で培養することによって、15-50%の炭素が $^{13}\text{C}$ で標識されたAmBを調製することに成功した。これを用いて、分子複合体のなかで隣り合う2分子の接近している部位を推定することに成功した。

## 4. 研究成果

(1) 生体膜を形成する脂質二重膜中に形成される抗生物質の分子複合体の構造

① 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(図1)。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を定量的に示すことに成功した。

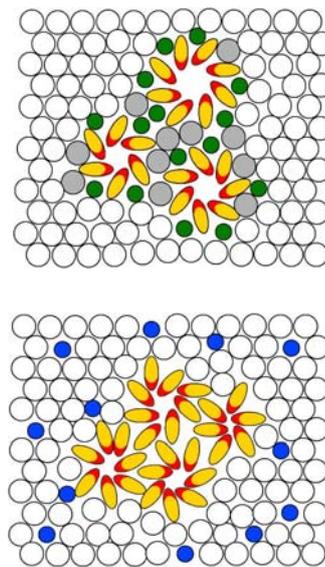


図1. エルゴステロール膜(上)とコレステロール膜(下)におけるAmB会合体のモデル。AmB(黄楕円)はエルゴステロール(●)およびリン脂質(●)と相互作用してイオンが透過できる穴を脂質二重膜に形成する。コレステロール(●)は殆ど相互作用しない。

② 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。AmBと同様に、 $^{13}\text{C}$ 標識体と $^{19}\text{F}$ 標識体を用いてメチルエステル体の複合体の構造を調べた。さらに、重水素標識体を用いて、脂質二重膜に対する配向を求めた。その結果、メチルエステル体についても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、AmB複合体を研究する上での比較対象として有用であることを示した。

(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

① 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  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  あるいは  $^{19}\text{F}$ ,  $^2\text{H}$  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固体 NMR によってリン脂質二重膜中の配向や運動性を調べた。その結果、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。また、SM の各種標識体を化学合成し、固体 NMR によって膜中の形と方向を求めた (図 2)。これによって、マイクロドメインを形成する構造的要因について明らかにすることができた。また、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。

②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し、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。

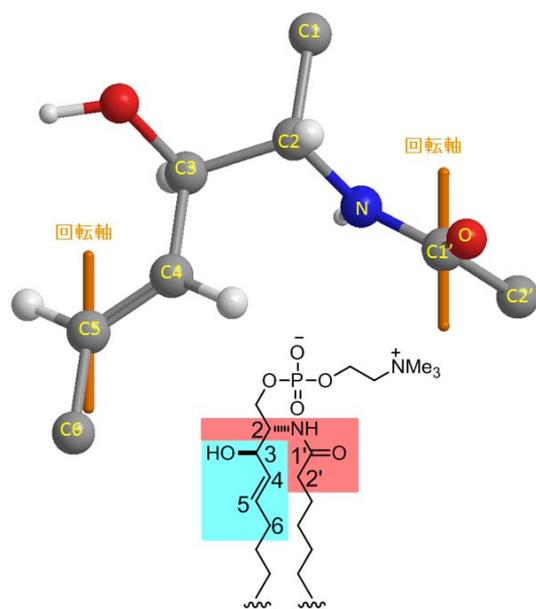


図 2. 脂質マイクロドメイン (ラフト) を形成した時のスフィンゴミエリンの立体配座。回転軸は、脂質二重膜の法線と同じと考えてよく、したがって、脂質分子の形のみならず、生体膜中でどの方向を向いているかが推定できる。

(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

上述のようにタンパク質との相互作用を解析するために必要なスジンゴシン標識体を化学的に調製した。また、予備実験では、膜貫通部分モデルとしてグリコフォリン A に着目し、その膜貫通部位のペプチド 2 種の調製を行った。これらのペプチドモデルと脂質との相互作用を 1) や 2) と同様の手法によって解析することができることを示した。

本研究の学術的価値は、有機化学的手法と NMR によって生体膜中で生ずる分子認識機構を明らかにした点である。膜中における分子認識については、その比較的速い分子運動のために従来は物理化学的な研究が主流であり、生体膜を分子複合体としてとらえ、その動的構造に着目した研究はほとんどなかった。タンパク質以外の分子、特に脂質分子の標識体を化学合成し、従来困難視されていた膜中複合体の形成に関与する分子間相互作用を磁気双極子の変化として観測に成功した点が、本研究の成果である。これら測定結果を分子構造に結びつけるためには、計算機化学的手法を含めた検討を今後継続して行く必要がある。分子運動性の高い膜結合分子に対しても、本研究で有効性を実証した方法論が適用されて行くものと考えられる。

本研究の関連分野への波及性については、構造生物学分野および有機合成化学分野において認められる。第一に、生体系におけるフレキシブルな低分子複合体の構造解析が可能であることを示した点である。これによって、脂質二重膜に限らず、生命現象で重要な中間的な分子運動速度を持つ系の構造解析が加速する可能性があると考えられる。固体 NMR を用いて膜結合分子や膜構成脂質の相互作用を観測するためには、位置特異的に同位体標識した化合物が必要である。NMR などの構造解析には、同位体標識体の調製が成否の鍵を握ることが多いので、世界でトップレベルにあるわが国有機合成化学者が融合領域研究に参画する機会が増えることを願っている。

本研究が独創性・新規性において格段の発展をもたらす可能性

固体 NMR は、膜タンパク質や膜に結合したペプチドなど構造研究に用いられており、その有効性が実証されている。一方で、本研究で取り上げた抗生物質のような化合物が膜中で形成する会合体については殆ど実験例がなかった。本研究によって、アンフォテリシン B のような膜中で自己会合する化合物の場合には、 $^{19}\text{F}$  と  $^{13}\text{C}$  などの標識化合物が調達できれば、複合体の構造や膜脂質との相互作用が解明できることを示した最初の例であり、今後の関連分野に対してインパクトを与えると考えている。また、脂質マイクロドメインのような分子運動の速い系でも、

REDOR 測定等によって分子間相互作用を検出できることを示した。これらは、タンパク質・ペプチドに限らず、膜脂質が関与する分子認識に本手法が適用できることを立証した点で意義があり、獨創性・新規性においても顕著な成果であると考えられる。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者に下線)

[雑誌論文] (計 47 件)

- ① Kasai, Y., Matsumori, N., Ueno, H., Nonomura, K., Yano, S. Murata, M., Oishi, T. Synthesis of 6-F-ergosterol and its influence on membrane-permeabilization of amphotericin B and amphidinol 3. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 1437-1442 (2011), 査読あり.
- ② Maruyoshi, M., Yamaguchi, T., Demura, T., Matsumori, N., Oishi, T. and Murata, M. Conformations of spermine in ATP complex: The structural basis for weak bimolecular interactions of major cellular electrolytes. *Chem. Eur. J.* **17**, 4788-4795 (2011), 査読あり.
- ③ Swasono, R., Mouri, R., Morsy, N., Matsumori, N., Oishi, T. and Murata, M. Sterol effect on interaction between amphidinol 3 and liposomal membrane as evidenced by surface plasmon resonance. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 2215-2218 (2010), 査読あり.
- ④ Ujihara, S., Oishi, T., Mouri, R., Tamate, R., Konoki, K., Matsumori, N., Murata, M., Oshima, Y., Sugiyama, N., Tomita, M. and Ishihama, Y. Identification of Rap1A as yessotoxin binding target from blood cell membranes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 6443-6446 (2010), 査読あり.
- ⑤ Maruyoshi, K., Nonaka, K., Sagane, T., Demura, T., Yamaguchi, T., Matsumori, N., Oishi, T. and Murata, M. Conformational change of spermidine upon interacting with ATP in aqueous solution. *Chem. Eur. J.* **15**, 1618-1626 (2009), 査読あり.
- ⑥ Matsumori, N., Tahara, K., Yamamoto, H., Morooka, A., Doi, M., Oishi, T. and Murata, M. Direct interaction between amphotericin B and ergosterol in lipid bilayers as revealed by <sup>2</sup>H NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 11855-11860 (2009), 査読あり.
- ⑦ Mouri, R., Oishi, T., Torikai, K., Ujihara, S., Matsumori, N., Murata, M. and Oshima, Y. Surface resonance-based detection of ladder-shaped polyether by competitive binding method. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 2824-2828 (2009), 査読あり.
- ⑧ Takano, T., Konoki, K., Matsumori, N. and Murata, M. Amphotericin B-induced ion flux is markedly attenuated in phosphatidylglycerol

membrane as evidenced by a newly devised fluorometric method. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 6301-6304 (2009), 査読あり.

- ⑨ Kasai, Y., Matsumori, N., Umegawa, Y., Matsuoka, S., Ueno, H., Ikeuchi, H., Oishi, T. and Murata, M. Self-assembly of amphotericin B is probably surrounded by ergosterol; bimolecular interactions as evidenced by solid state NMR and CD spectra. *Chem. Eur. J.* **14**, 1178-1185 (2008), 査読あり.
- ⑩ Morsy, N., Houdai, T., Konoki, K., Matsumori, N., Oishi, T. and Murata, M. Effects of lipid constituents on membrane-permeabilizing activity of amphidinols. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 3084-3090 (2008), 査読あり.
- ⑪ Morsy, N., Konoki, K., Houdai, T., Matsumori, N., Oishi, T., Murata, M. and Aimoto, S. Roles of integral protein in membrane permeabilization by amphidinols. *Biochim. Biophys. Acta.* **1778**, 1453-1459 (2008), 査読あり.
- ⑫ Matsumori, N., Kasai, Y., Oishi, T., Murata, M. and Nomura, K. Orientation of fluorinated cholesterol in lipid bilayers analyzed by <sup>19</sup>F tensor calculation and solid-state NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4757-4766 (2008), 査読あり.
- ⑬ Mouri, R., Konoki, K., Matsumori, N., Oishi, T. and Murata, M. Complex formation of amphotericin B in sterol-containing membrane as evidenced by surface plasmon resonance. *Biochemistry*, **47**, 7807-7815 (2008), 査読あり.
- ⑭ Torikai, K., Oishi, T., Ujihara, S., Matsumori, N., Konoki, K., Murata, M. and Aimoto, S. Design and synthesis of ladder-shaped tetracyclic, heptacyclic, and decacyclic ethers and evaluation of the interaction with transmembrane proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **30**, 10217-10226 (2008), 査読あり.
- ⑮ Houdai, T., Matsumori, N. and Murata, M. Structure of membrane-bound amphidinol 3 in isotropic small bicelles. *Org. Lett.* **10**, 4191-4194 (2008), 査読あり.
- ⑯ Ujihara, S., Oishi, T., Torikai, K., Konoki, K., Matsumori, N., Murata, M., Oshima, Y., Aimoto, S. Interaction of ladder-shaped polyethers with transmembrane  $\alpha$ -helix of glycophorin A as evidenced by saturation transfer difference NMR and surface plasmon resonance. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 6115-6118 (2008), 査読あり.
- ⑰ Umegawa, Y., Matsumori, N., Oishi, T. and Murata, M. Ergosterol increases intermolecular distance of amphotericin B in membrane-bound assembly as evidenced by solid-state NMR. *Biochemistry*, **47**, 13463-13469 (2008), 査読あり.
- ⑱ Matsumori, N., Houdai, T. and Murata, M. Conformation and position of membrane-bound amphotericin B deduced from NMR in SDS

micelles. *J. Org. Chem.* **72**, 700-704 (2007), 査読あり.

⑱ Matsumori, N., Morooka, A., and Murata, M.. Conformation and location of membrane-bound salinomycin-sodium complex deduced from NMR in isotropic bicelles. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 14889-14995 (2007), 査読あり.

⑳ Matsumori, N., Morooka, A. and Murata, M.. Detailed description on Conformation and Location of Membrane-bound Erythromycin A using Small Bicelle. *J. Med. Chem.* **49**, 3501-3508 (2006), 査読あり.

㉑ Matsuoka, S., Ikeuchi, H., Umegawa, Y., Matsumori, N. and Murata, M.. Membrane interaction of amphotericin B as single-Length assembly examined by solid state NMR for uniformly <sup>13</sup>C-enriched Agent. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 6608-6614 (2006), 査読あり.

㉒ Tsuchikawa, H., Matsushita, N., Matsumori, N., Murata, M. and Oishi, T.. Synthesis of 28-<sup>19</sup>F-amphotericin B methyl ester. *Tetrahedron Lett.* **47**, 6187-6191 (2006), 査読あり.

[学会発表] (計 50 件)

主な発表学会は、日本化学会、有機合成化学協会、天然有機化合物討論会である。以下に招待講演のみを挙げた。

- ① "Molecular Assemblies in Biomembranes as Viewed by Solid State NMR" Michio Murata Naito Conference Chemical Biology (招待講演), 2008. 9.9-11, 札幌、シャトレレーゼガトーキングダム
- ② "Synthesis of fluorine labeled natural products for solid-state NMR measurements" Tohru Oishi 236th ACS National Meeting (招待講演), 2008. 8.17-21, Philadelphia, USA
- ③ "Ion channel complex of antibiotics as viewed by NMR" Michio Murata, PAC ICOB-6& SCNP-26 (招待講演), 2008. 7. 17, Charlottetown, CANADA
- ④ "Steroids as a Key Player in Assembling Functional Membrane Complexes" Michio Murata, Nakanishi Symposium (招待講演), 2008.3.28, 立教大学
- ⑤ "Natural products forming functional assemblies in biomembrane" Michio Murata Mona Symposium (招待講演), 2008.1.7-9, Kingston, JAMAICA
- ⑥ "Synthetic studies of yessotoxin" Tohru Oishi, International Symposium on Catalysts and Fine Chemicals (招待講演), 2007, 12.17, Nanyang Tech. Univ. Singapore

⑦ "Yessotoxin and synthetic polyether models - Interactions with peptides in membrane" Michio Murata, Vth European Conference on Marine Natura Products (招待講演), 2007.9.16-21, Ischia, ITALY

⑧ "Marine cyclic polyethers-their interaction with membrane proteins" Michio Murata 日米セミナー海洋天然物 (招待講演), 2007.7.1-7, Salt Lake City, USA,

⑨ "Synthetic studies of natural and artificial ladder-shaped polyethers for exploring biological functions" Tohru Oishi, Sendai Postsymposium of ICOB-5&ISCNP-25(招待講演), 2006.7.30, 仙台国際センター

[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

大石 徹 (OISHI TOHRU)  
九州大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：90241520  
松森 信明 (MATSUMORI NOBUAKI)  
大阪大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：50314357  
土居 幹嗣 (DOI MOTOTSUGU)  
大阪大学・大学院理学研究科・技術補佐員  
研究者番号：10379307

##### (3) 連携研究者

なし