

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20310132

研究課題名 (和文) バイセルを用いた脂質膜における分子複合体解析

研究課題名 (英文) Analysis of molecular assemblage in lipid bilayers using bicelles

研究代表者

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

研究成果の概要 (和文) : バイセルは長鎖のリン脂質と短鎖のリン脂質から構成される会合体で、二重膜構造を有していることから生体膜モデルとして用いられている。本研究では、このバイセルに種々の生理活性物質を含有させ、NMR を用いてその構造解析を行う手法を開発した。この方法をまずは抗真菌物質アンフィジノールに適用し、その膜中での構造を明らかにするとともに、アンフィジノールの作用発現機構を推定した。また脂質ラフト形成で注目されているスフィンゴミエリンの膜中での構造解析を行い、ラフト形成の分子基盤を明らかにすることができた。

研究成果の概要 (英文) : Bicelles are lipid aggregates composed of long-chain phospholipid and short-chain one. Since bicelles have true bilayer portions, they are used as a membrane model. In this study, we developed a methodology to analyze the structure of membrane associated bioactive compounds using bicelles. We first applied the methodology to antifungal compound amphidinol, and successfully determined its structure in membrane and proposed the mechanism of its biological activity. Then we analyzed the structure of sphingomyelin, which draws a lot of attention as a component of lipid rafts, and revealed molecular basis of raft formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2009 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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：バイセル、脂質二重膜、脂質ラフト、スフィンゴミエリン、アンフィジノール、動的光散乱、立体配座

1. 研究開始当初の背景

生体膜中におけるタンパク質同士の分子間相互作用は、生命現象を理解する上で極めて重要である。また、タンパク質同士の相互作用に限らず、多くの低分子薬剤が直接または間接的に脂質膜もしくは膜タンパク質に作

用し効果を発揮することから、薬剤と生体膜系との相互作用解析の必要性も近年増してきている。しかしながら、構造生物学の発展を支えた X 線解析がこのような生体膜における相互作用解析に対して必ずしも有効でないことはすでに明らかである。このため、

膜タンパク質や脂質ラフトなど生体膜と関連する分野は、生命科学におけるボトルネックとして研究が立ち遅れているのが現状である。

我々はこれまで抗生物質アンフォテリシンBがステロールとともに生体膜中で形成するイオンチャネルについて、固体NMRを用いた解析を行ってきた。固体NMRでは脂質膜においても構造情報が取得できる利点がある一方で、複数の部位特異的同位体標識体が必須であり、試料調製に時間と労力が掛かる点は否めない。そこで、我々は本研究においてバイセルに着目した。

バイセルはアルキル鎖の長いリン脂質と短いリン脂質からなるディスク状の脂質会合体であり(図1a)、長鎖リン脂質が形成する平面部分は二重膜構造を有していることから、バイセルは最小の脂質二重膜モデルと考えられている。短鎖リン脂質に対する長鎖リン脂質の割合が多いバイセルは外部磁場に対し配向する性質を示し、短鎖リン脂質の割合が1以上になると、ディスク状の形状を保ったまま磁場に対して等方的に存在する(図1b)。この等方的バイセルに膜作用性物質を含有させることにより、脂質二重膜に結合した状態でのNMRによる構造解析が可能となると考えた。これまでこの等方バイセルを用いて膜ペプチドの構造解析を行った例がわずかにあるのみであったが、本研究ではこれをより一般化し、複雑な膜作用性抗生物質などに適用することにした。

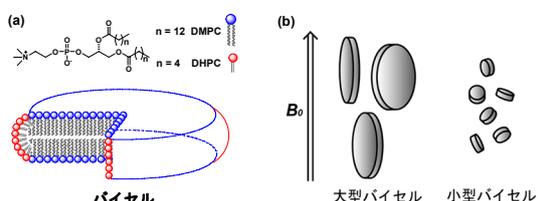


図1 バイセルの模式図 (a) 長鎖リン脂質はバイセルの平面部分で二重膜を形成し、短鎖リン脂質は縁に存在する。(b) 大型バイセルは磁場配向性を示すが、小型バイセルは等方的になる。本研究では小型等方バイセルを用いる。

2. 研究の目的

本研究では、上記のバイセルを脂質二重膜モデルとして使い、生体膜における分子間相互作用解析のための方法論を確立する。さらにそれを複雑な系へと応用し、その一般的有用性を証明することを目的とする。具体的には以下の研究内容を設定し、これを達成することを目的とした。

(1) バイセルを用いた構造解析においては、薬剤の導入によりバイセルの形状が変化する

懸念が常にある。そこで、形状に影響を与えない範囲での構造解析を行うために、薬剤の導入によるバイセルの形状変化の評価法を確立する。これにより、本方法論の適用をより確実なものとする。

(2) 本研究では、等方バイセルを用いて脂質膜における複雑な化合物の構造解析を検討する。具体的には、アンフィジノール(AM、図2)の膜中での構造解析を行う。AMは我々が渦鞭毛藻から単離構造決定したポリエーテルポリオール化合物で、強力な抗カビ活性および溶血性を有している。その効果は膜中のステロール共存下でのイオン透過性ポア形成によることが明らかとなっている。このような膜中での分子複合系における構造解析は一般に非常に困難であり、バイセルを用いた研究例もない。そこで、このような複雑な化合物においてもバイセルを適用し、脂質膜中での自己会合体の相互作用解析法を確立する。

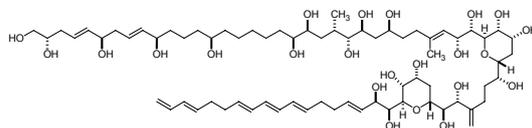


図2 アンフィジノール3 (AM3)の構造

(3) 生体膜には脂質ラフトと呼ばれる特殊なドメイン構造が形成され(図3)、細胞信号伝達において重要な働きを担っている。この脂質ラフトはスフィンゴ脂質とコレステロールに富んでおり、これらが超分子形成することで周囲の膜とは物理的に異なった領域を形成すると考えられている。この脂質ラフトは、特異的に集積した膜タンパク質を介したシグナル伝達のプラットフォームとして機能していると考えられている。しかし、このような生物学的重要性にもかかわらず、脂質ラフトは形成と離散を繰り返しているため、分子レベルでの相互作用解析はほとんど行われていない。そこで、まずスフィンゴミエリンがバイセルを形成することを確認し、次いでバイセルを用いた脂質ラフトにおける分子認識の解明を目指す。

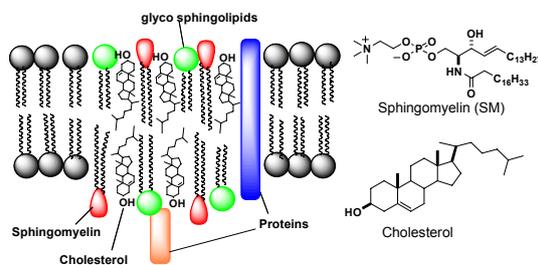


図3 脂質ラフトの模式図と、スフィンゴミエリン (SM) およびコレステロールの構造

3. 研究の方法

(1) バイセル形状変化の評価法

本研究の遂行においては、バイセルに薬剤を含有させた場合においてもその形状を保っていることが前提条件である。そこでまず薬剤を含有させた場合におけるバイセルの形状変化を動的光散乱装置を用いて詳細に検討し、薬剤がバイセルの形状に与える影響を精査する。これにより、バイセルの形状に影響を与えない薬剤の濃度範囲を簡便に決定する方法論を確立する。

(2) アンフィジノール3複合体の構造解析

次にバイセルを用いてアンフィジノール3 (AM3, 図2)の膜中の構造解析を行う。まず上記の方法により AM3 がバイセルの形状に与える影響を調べ、形状変化の生じない条件を見つける。次にバイセル膜中における AM3 の配座および存在位置を決定する。AM の立体配座は NOESY 測定やスピン結合定数から決定可能である。また Mn^{2+} やドキシリリン脂質を用いることで、緩和時間の減少から膜中での AM3 の存在位置を決定することができる。

以上の検討により脂質膜中での AM3 の配座や存在位置、分子間相互作用を明らかにする。

(3) 脂質ラフトにおける分子間相互作用

最後にバイセルを用いて脂質ラフトについて検討する。脂質ラフトの大きな特徴として、界面活性剤 TritonX-100 に対する不溶性が挙げられる。これは、脂質ラフト以外の脂質膜成分が TritonX-100 によってミセル化し可溶化するのに対し、ラフト部分は Triton 存在下でも二重膜としての形状を保っていることによる。このような不溶化したラフト成分は、その周りを TritonX によって取り囲まれた構造を取っていると予想される。同様にバイセルも脂質二重膜の周りを短鎖リン脂質もしくは界面活性剤が取り囲んだ構造をしていることから (図1)、両者は類似した形状をしていると考えられる。そこで本研究では、まず①SMを用いてバイセルが形成することを確認し、②コレステロールの有無による SM の配座変化、③ラフトにおける分子間相互作用について検討する。①のバイセル形成の確認については、上述の動的光散乱などを用いることで確認可能である。また、②については SM を用いてバイセルを形成させた後、SM のスピン結合定数や NOE を測定することによって決定可能である。一方、③の分子間相互作用については分子間 NOE の観測を予定している。これらを基にラフト形成の分子基盤に迫る。

4. 研究成果

(1) バイセル形成評価法の確立

まずは購入した動的光散乱装置を用いてバイセルの大きさについての検討を行い、

^{31}P -NMR を併用することで、バイセルの形状や配向性および会合体のサイズについての知見を同時に得ることができ、安定したバイセルの形成が可能となった。

(2) アンフィジノール3複合体の構造解析

次にアンフィジノール 3 (AM3) に対してバイセル中での構造解析を行った。その結果、バイセル中での AM3 は、ポリオール部分を膜表面に広げ、ポリエン部分を膜内部に貫入させた T 字型の構造であることが明らかとなった (図4)。

このことは、AM3 が脂質膜に作用することで膜の表面積が大きくなり、膜が正の曲率を持つことを示唆しており、その結果ポアが形成するものと推測される。このように本研究によって、分子量が 1000 を超える分子についてもバイセルを用いて膜環境での配座解析が可能であることが示された。この結果は *Organic Letters* 誌に掲載された (T. Houdai, N. Matsumori, M. Murata. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4191-4194)。

また、アンフィジノールを含む脂質膜に作用する化合物について、バイセルを用いた構造解析法をまとめて総説にした (N. Matsumori, M. Murata. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1480-1492)。

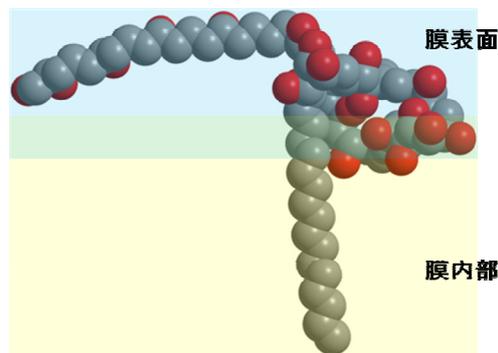


図4 アンフィジノールのバイセル中での構造。

(3) 脂質ラフトにおける分子間相互作用

つぎにバイセルを用いて脂質ラフトにおける分子相互作用解析を行った。脂質ラフトはスフィンゴミエリン (SM) およびコレステロールを主成分とする細胞膜ドメインであり、周囲の細胞膜とは異なる相状態を有している。この脂質ラフトにはシグナル伝達に関与する膜タンパク質が特異的に集積することから、シグナル伝達のプラットフォームとして機能していると考えられている。脂質ラフトの大きな特徴として、界面活性剤に対する不溶性が挙げられる。このような不溶化したラフト成分は、その周りを界面活性剤によって取り囲まれた構造を取っていると予想される。我々はまず SM に短鎖リン脂質を混ぜる

とバイセルが形成することを明らかにするために、SM バイセルの物理化学的性質を動的な光散乱や蛍光偏光消滅測定、および ^{31}P -NMR 実験等により精査し、ラフトをほぼバイセルで再現できることを明らかにした。

次いで SM を用いてバイセルを形成させ、SM のスピン結合定数や NOE を測定することによって膜環境における SM の配座を決定した (図 5、投稿準備中)。さらにコレステロールを共存させたラフトモデルバイセルを調製し、同様に配座を解析した。その結果、コレステロールの有無によらず SM の配座はほとんど変化しないことが明らかとなった。これはラフトと非ラフトの性質の違いが SM の配座変化に起因するわけではないことを示唆している。つまり、脂質ラフトにおいてコレステロールは SM と直接相互作用していないことが示唆された。

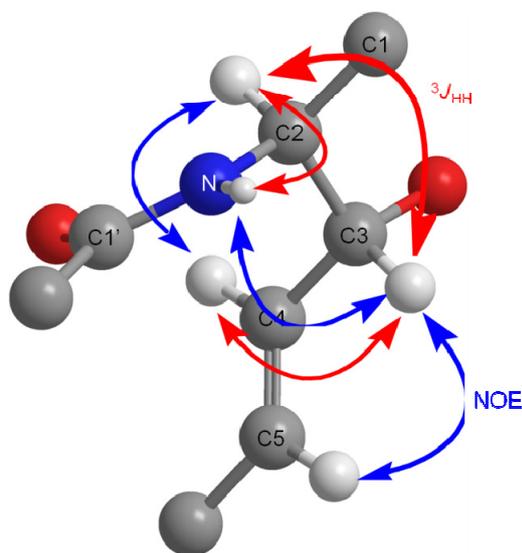


図 5 バイセルを用いて明らかになったスフィンゴミエリンの膜環境での構造。

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)

(1) Synthesis of 6-F-ergosterol and its influence on membrane-permeabilization of amphotericin B and amphidinol 3. Y. Kasai, N. Matsumori, H. Ueno, K. Nonomura, S. Yano, M. Murata, T. Oishi, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 1437-1442. 査読有。

(2) Conformations of spermine in ATP complex: the structural basis for weak bimolecular interactions of major cellular electrolytes. K. Maruyoshi, T. Yamaguchi, T. Demura, N. Matsumori, T. Oishi, M. Murata. *Chem. Eur. J.*

2011, 17, 4788-4795. 査読有。

(3) Structural reevaluations of amphidinol 3, a potent antifungal compound from dinoflagellate. R.T. Swasono, M. Kanemoto, N. Matsumori, T. Oishi, M. Murata, *Heterocycles* **2011**, 82, 1359-1369. 査読有。

(4) Channels formed by amphotericin B covalent dimers exhibit rectification. M. Hirano, Y. Takeuchi, N. Matsumori, M. Murata, T. Ide, *J. Membr. Biol.* **2011**, 240, 159-164. 査読有。

(5) Lysine proximity significantly affects glycation of lysine-containing collagen model peptides. A. Kitamura, K. Matsui, K. Konoki, N. Matsumori, M. Murata, T. Kawakami, S. Aimoto. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 2125-2129. 査読有。

(6) Sterol effect on interaction between amphidinol 3 and liposomal membrane as evidenced by surface plasmon resonance. R. T. Swasono, R. Mouri, N. A. Morsy, N. Matsumori, T. Oishi, M. Murata. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 2215-2218. 査読有。

(7) Identification of Ras Superfamily Proteins as Yessotoxin Binding Target from Blood Cell Membranes. S. Ujihara, T. Oishi, R. Mouri, R. Tamate, K. Konoki, N. Matsumori, M. Murata, Y. Oshima, N. Sugiyama, M. Tomita, Y. Ishihama. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 6643-6646. 査読有。

(8) 3D structures of membrane-associated small molecules as determined in isotropic bicelles. N. Matsumori, M. Murata. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27, 1480-1492. 査読有。

(9) Conformational change of spermidine upon interacting with ATP in aqueous solution. K. Maruyoshi, K. Nonaka, T. Sagane, T. Demura, T. Yamaguchi, N. Matsumori, T. Oishi, M. Murata. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 1618-1626. 査読有。

(10) Synthesis of 25- ^{13}C -amphotericin B methyl ester: a molecular probe for solid-state NMR measurements. N. Matsushita, Y. Matsuo, H. Tsuchikawa, N. Matsumori, M. Murata, T. Oishi. *Chem. Lett.* **2009**, 38, 114-115. 査読有。

(11) Surface plasmon resonance-based detection of ladder-shaped polyethers by competitive binding method. R. Mouri, T. Oishi, K. Torikai, S. Ujihara, N. Matsumori, M. Murata, Y. Oshima. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 2824-2828.

査読有。

(12) Direct interaction between amphotericin B and ergosterol in lipid bilayers as revealed by ^2H NMR. N. Matsumori, K. Tahara, H. Yamamoto, A. Morooka, M. Doi, T. Oishi, M. Murata. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 11855-11860. 査読有。

(13) Ion channel complex of antibiotics as viewed by NMR. M. Murata, Y. Kasai, Y. Umegawa, N. Matsushita, H. Tsuchikawa, N. Matsumori, T. Oishi. *Pure Appl. Chem.* **2009**, 81, 1123-1129. 査読有。

(14) Amphotericin B-induced ion flux is markedly attenuated in phosphatidylglycerol membrane as evidenced by a newly devised fluorometric method. T. Takano, K. Konoki, N. Matsumori, M. Murata. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 6301-6304. 査読有。

(15) Self-assembly of amphotericin B is probably surrounded by ergosterol; bimolecular interactions as evidenced by solid state NMR and CD spectra. Y. Kasai, N. Matsumori, Y. Umegawa, S. Matsuoka, H. Ueno, H. Ikeuchi, T. Oishi, M. Murata. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 1178-1185. 査読有。

(16) Structural features of dinoflagellate toxins underlying biological activity as viewed by NMR. M. Murata, N. Matsumori, K. Konoki, T. Oishi. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2008**, 81, 307-319. 査読有。

(17) Orientation of fluorinated cholesterol in lipid bilayers analyzed by ^{19}F tensor calculation and solid-state NMR. N. Matsumori, Y. Kasai, T. Oishi, M. Murata, K. Nomura. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 4757-4766. 査読有。

(18) Effects of lipid constituents on membrane-permeabilizing activating of amphidinols. N. Morsy, T. Houdai, K. Konoki, N. Matsumori, T. Oishi, M. Murata. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 3084-3090. 査読有。

(19) Roles of integral protein in membrane permeabilization by amphidinols. N. Morsy, K. Konoki, T. Houdai, N. Matsumori, T. Oishi, M. Murata, S. Aimoto. *Biochem. Biophys. Acta.* **2008**, 1778, 1453-1459. 査読有。

(20) Complex formation of amphotericin B in sterol-containing membrane as evidenced by surface plasmon resonance. R. Mouri, K. Konoki, N. Matsumori, T. Oishi, M. Murata. *Biochemistry*

2008, 47, 7807-7815. 査読有。

(21) Design and synthesis of ladder-shaped tetracyclic, heptacyclic, and decacyclic ethers and evaluation of the interaction with transmembrane proteins. K. Torikai, T. Oishi, S. Ujihara, N. Matsumori, K. Konoki, M. Murata, S. Aimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 10217-10226. 査読有。

(22) Convergent synthesis and biological activity of the WXYZA'B'C' ring system of maitotoxin. T. Oishi, F. Hasegawa, K. Torikai, K. Konoki, N. Matsumori, M. Murata. *Org. Lett.* **2008**, 10, 3599-3602. 査読有。

(23) Structure of membrane-bound amphidinol 3 in isotropic small bicelles. T. Houdai, N. Matsumori, M. Murata. *Org. Lett.* **2008**, 10, 4191-4194. 査読有。

(24) Accurate measurement of vicinal carbon-hydrogen coupling constants via ammonium nitrogen based on HMBC experiments. T. Yamaguchi, K. Maruyoshi, N. Matsumori, M. Murata. *Chem. Lett.* **2008**, 37, 1172-1173. 査読有。

(25) Interaction of ladder-shaped polyethers with transmembrane α -helix of glycoporphin A as evidenced by saturation transfer difference NMR and surface plasmon resonance. S. Ujihara, T. Oishi, K. Torikai, K. Konoki, N. Matsumori, M. Murata, Y. Oshima, S. Aimoto. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 6115-6118. 査読有。

(26) Combinatorial synthesis of the 1,5-polyol system based on cross metathesis: structure revision of amphidinol 3. T. Oishi, M. Kanemoto, R. Swasono, N. Matsumori, M. Murata. *Org. Lett.* **2008**, 10, 5203-5206. 査読有。

(27) Ergosterol increases intermolecular distance of amphotericin B in membrane-bound assembly as evidenced by solid-state NMR. Y. Umegawa, N. Matsumori, T. Oishi, M. Murata. *Biochemistry* **2008**, 47, 13463-13469. 査読有。

[学会発表] (計 12 件)

(1) 松森信明, ケミカルバイオロジー分子基盤としての脂質二重膜, 第 91 回日本化学会年会特別講演 (ケミカルバイオロジーの分子基盤) (招待講演), 神奈川大学 (横浜市), 2011 年 3 月 27 日.

(2) Matsumori Nobuaki, SSNMR investigations

on organic molecules in lipid bilayers: application to amphotericin B and lipid rafts, Pacificchem 2010, Advance in Solid-State NMR in Biological Molecules (招待講演), ハワイコンベンションセンター (ホノルル), 2010 年 12 月 16 日.

(3) 松森信明, 脂質ラフトにおける分子間相互作用の NMR 解析, 第 49 回 NMR 討論会, タワーホール船橋 (東京都江戸川区), 2010 年 11 月 17 日.

(4) Matsumori Nobuaki, Mechanism of membrane-action of amphidinols from marine dinoflagellate, 13th International Symposium on Marine Natural Products, ヒルトンブーケット (タイブーケット), 2010 年 10 月 21 日.

(5) 松森信明, 渦鞭毛藻由来アンフィジノール類の脂質膜透過化作用に関する研究, 第 57 回トキンシンポジウム (指名講演), 長浜ロイヤルホテル (滋賀県長浜市), 2010 年 7 月 16 日.

(6) 松森信明, 脂質二重膜における有機分子の固体 NMR 解析—アンフォテリシン B と脂質ラフトを中心に, 理研 NMR セミナー2010 (招待講演), 理化学研究所 (埼玉県和光市), 2010 年 6 月 29 日.

(7) 松森信明, アンフォテリシン B チャネル複合体における分子間相互作用の固体 NMR 解析, 第 48 回 NMR 討論会, 九州大学 (福岡市), 2009 年 11 月 12 日.

(8) Matsumori Nobuaki, Direct observation of intermolecular interaction between amphotericin B and ergosterol in lipid bilayers, 3rd Asia Pacific NMR Symposium, ラマダプラザホテル (韓国済州島), 2009 年 10 月 26 日.

(9) Matsumori Nobuaki, Direct observation of intermolecular interaction between amphotericin B and ergosterol in lipid bilayers, Naito Conference Chemical Biology II, シャトレーゼガトーキングダム (北海道札幌市), 2009 年 9 月 10 日.

(10) 松森信明, 脂質二重膜における有機分子の NMR 解析, サントリー生物有機科学研究所フォーラム (招待講演), サントリー生物有機科学研究所 (大阪府島本町), 2009 年 8 月 20 日.

(11) 松森信明, 化学高分子専攻における固体 NMR とその応用—脂質二重膜への応用例—, 第二回先端的分析法講習会 (招待講演), 大阪大学 (大阪府豊中市), 2009 年 2 月 24 日.

(12) 松森信明, アンフォテリシン B—ステロール複合体の固体 NMR 解析, 第 47 回 NMR 討論会, 筑波大学 (茨城県つくば市), 2008 年 11 月 14 日.

〔図書〕 (計 2 件)

(1) 松森信明 ソレル有機化学 上 13 章 (325-365 ページ) 翻訳、東京化学同人、2009 年.

(2) Sakuda Shohei, Matsumori Nobuaki, Stereochemistry Research Trends, Chapter 3 (89-106 ページ) を作田庄平准教授 (東京大学) と共同執筆, Nova Publishers, 2008 年.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/kg-portal/aspI/RX0011D.asp?UNO=10670&page=&Flg=1&DTLID=2401>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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