

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24681045

研究課題名(和文) 脂肪酸結合タンパク質のあいまいな分子認識の構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis for fuzzy molecular recognition by fatty acid-binding protein

研究代表者

松岡 茂 (Matsuoka, Shigeru)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：60456184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,900,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪酸は、有酸素運動の燃料や炎症メディエーターの原料として、細胞内で様々な用途に利用される。しかし、水に溶けにくいため、細胞内での輸送には脂肪酸結合タンパク質が必要とされる。本研究では、心臓型脂肪酸結合タンパク質が、細胞内の様々な長さの脂肪酸から特定の一種類を選ぶのではなく、エネルギー生産の燃料となる複数種類の脂肪酸をグループとして見分ける“あいまい認識”をすることを明らかにした。また、この脂肪酸鎖長選択機構は、水分子が関与する興味深いものであることが判明した。本成果は、メタボリックシンドロームや統合失調など脂肪酸が関与する疾患の分子メカニズムの解明につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Fatty acid-binding proteins (FABPs) are small proteins for cytosolic delivery of fatty acids (FAs), which are used as fuels for aerobic exercise and/or raw materials for inflammatory mediators. We revealed that human heart-type FABP (FABP3) identifies FAs not by exact matching but by “fuzzy recognition” of fundamental structural similarities among numerous FAs, where two different type of water clusters are involved in measuring the length of string-like molecule FAs. This finding sheds light on molecular mechanism of a promiscuous lipid-protein interaction that would play key roles in FA-related diseases, such as metabolic syndrome and schizophrenic.

研究分野：生物分子化学

キーワード：分子認識 脂肪酸 タンパク質 分子機構

1. 研究開始当初の背景

脂質分子は、胞膜形成やエネルギー貯蔵、遺伝子発現制御、タンパク質輸送など、多様な生命現象に関与する。脂質代謝に関わる数多くのタンパク質は、脂質アルキル鎖の構造を厳密に見分けていると考えられるが、水素結合などの指向性相互作用が少ないため、分子選択機構に未解明な部分が多い。

これらのタンパク質の機能と、脂質の関与する生理機構を解明するには、脂質-タンパク質間の分子認識の構造基盤解明が必須である。しかしながら、水に不溶性脂質とタンパク質の親和性を精密に評価できる良い方法がなく、柔軟な脂質分子のタンパク質結合構造を高い分解能で得ることも困難であったため、これらを克服する新しい方法論の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

最も単純な脂質である脂肪酸と、それを結合する小さな可溶性蛋白質 Fatty Acid Binding Protein 3 (FABP3) の組合せに着目し、FABP3 の脂肪酸選択性とその分子機構の解明を目的とした。

FABP3 は細胞内の脂肪酸輸送に関与し、脂肪酸の鎖長や二重結合の数と位置にある程度の広い許容性をもって、“あいまい”な分子認識をすることが知られている。

本研究では、脂肪酸の親和性評価法を開発し、網羅的に親和性を明らかにすることで、あいまい認識される脂肪酸構造の範囲と限界を明らかにし、X線結晶解析や NMR、計算化学的手法を用いて、その構造要因を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 難溶性化合物の親和性測定法開発

水に溶けない脂質のタンパク質結合親和性を正確に評価するための基盤技術を開発した。生体内では脂溶性化合物は生体膜や輸送タンパク質に結合して存在する。この環境を模倣し、脂肪酸を生体膜モデルであるリポソームに結合することで、脂肪酸を可溶化した。リポソーム結合脂肪酸を用いて FABP3 との親和性解析を行うことで、沈殿・油滴として系外への析出と、疎水性相互作用による非特異吸着を防ぎ、より生体に近い環境における脂質-タンパク質結合親和性を精密に測定した。相互作用の検出には等温滴定熱量測定 (ITC) と表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いた。

(2) 計算機化学を用いた脂肪酸あいまい認識の分子機構解析

協力研究者より提供された高分解能 X線共結晶構造を元に、計算機化学的手法により幅広い脂肪酸選択性および脂肪酸取り込みの分子機構を解析した。脂肪酸選択性に関与する水分子のエネルギー計算は WaterMap プログラムを用いた。脂肪酸取り込み機構の推定

には、MARBLE を用いた。

(3) 結合脂肪酸の揺らぎ構造解析のためのブロープ分子合成

柔軟な脂肪酸の結合構造をより正確に捉えるため、重水素標識脂肪酸を合成し、固体 NMR、中性子回折、赤外分光を用いたアルキル鎖の二面角解析を可能とする。

4. 研究成果

(1) リポソーム媒介等温滴定熱量測定 (ITC) による精密親和性解析

水への溶解度が大きく異なる短鎖～長鎖の脂肪酸を、リポソームに結合することにより同一条件で可溶化し、かつ非特異吸着を抑制した。リポソーム結合脂肪酸を用いて ITC による結合親和性解析を可能とし、脂肪酸、脂肪酸誘導体の FABP3 親和性を網羅的に明らかにした。この結果から、FABP3 は C8 以上の脂肪酸に幅広い結合性を示し、特に C10～C18 にたいして強く結合することが示された。(図 1)

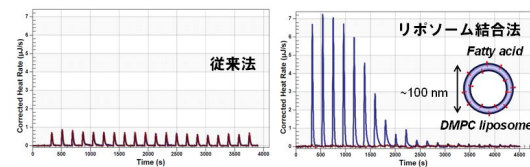


図 1 FABP3 - 脂肪酸相互作用の ITC 解析。脂肪酸を懸濁液として滴下した場合は熱が出ない(左)が、リポソームに結合して添加した場合は明確な結合熱が観測された(右)

(2) 表面プラズモン共鳴 (SPR) へのリポソーム媒介法の応用

リポソームを用いた脂肪酸の可溶化と非特異吸着の抑制法を SPR 実験にも応用した。その結果、アナライト結合リポソームを用いて、FABP3 固定化チップ上での脂肪酸 - FABP3 結合反応の速度論的解析を可能とした。

(3) 水分子を介した脂肪酸鎖長認識機構の解明

MD シミュレーション (WaterMap) を用いて、FABP3 結合ポケット内の水分子クラスターの自由エネルギーおよび熱力学パラメータの評価をおこなった。その結果、脂肪酸アルキル鎖とエネルギー損失なく置換可能な“鎖

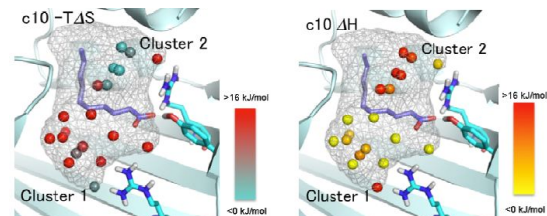


図 2 FABP3 C10:0 複合体の水和サイトの熱力学的パラメータ解析。バルクの水分子を基準としたエントロピー (-TΔS、左) とエンタルピー (ΔH、右) を示した。

長調節”水分子クラスターと、置換不可能な“鎖長制限”水分子クラスターの性質が明確に異なる2つのクラスターが存在することが明らかとなった。(図2)

(4) FABP3 の脂肪酸取り込み機構推定

MD シミュレーション (MARBLE) を用いて、生体温度における FABP3 の脂肪酸結合 / 非結合時の動的構造の違いを評価した。その結果、脂肪酸非結合時の FABP3 が結合ポケットを外部に大きく開き、脂肪酸の取り込みに有利な“完全開構造”をとることが初めて示された。(図3)

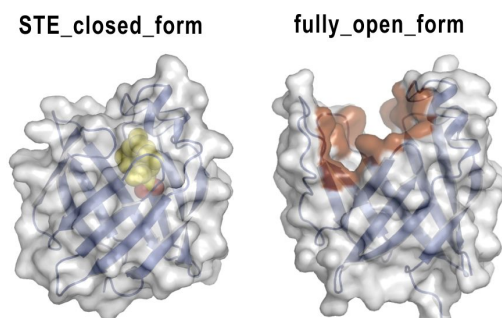


図3 MD シミュレーション中に観察された FABP3 閉構造 (左) および開構造 (右)

タンパク質は青のリボンモデルで示し、その表面は灰色で示した。結合脂肪酸は黄色のビーズモデルで示した。完全開構造における開口部を茶色で示した。

(5) 二面角解析のための重水素標識脂肪酸の合成

汎用性の高い共通中間体を設計し、アルキル鎖の望む部位を選択的に ^2H - ^{13}C - ^{13}C - ^2H 標識した脂肪酸の高効率的な合成ルートを確認した。(図4)

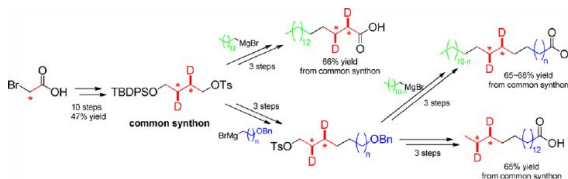


図4 スピンクラスター標識脂肪酸の合成法

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5件)

Daisuke Matsuoka, Shigeru Sugiyama, Michio Murata, Shigeru Matsuoka, “Molecular Dynamics Simulations of Heart-type Fatty Acid-binding Protein in Apo and Holo Forms, and Hydration Structure Analyses in the Binding Cavity”, *J. Phys. Chem. B*, 査読有, **2015**, *119*, 114-127; DOI: 10.1021/jp510384f.

Shigeru Matsuoka, Shigeru Sugiyama, Daisuke Matsuoka, Mika Hirose, Sebastien Lethu, Hikaru Ano, Toshiaki Hara, Osamu Ichihara, S. Roy Kimura, Satoshi Murakami, Hanako Ishida, Eiichi Mizohata, Tsuyoshi Inoue, Michio Murata, “Water-mediated recognition of simple alkyl chains by heart-type fatty acid-binding protein”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読有り, **2015**, *54*, 1508-1511; DOI: 10.1002/anie.201409830.

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 Resonance”, *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有り, **2014**, *22*, 1804-1808; DOI:10.1016/j.bmc.2014.02.001.

Sébastien Lethu, Shigeru Matsuoka, Michio Murata, “Highly efficient preparation of selectively isotope cluster-labeled long chain fatty acids via two consecutive Csp3-Csp3 cross coupling reactions”, *Org. Lett.*, 査読有り, **2014**, *16*, 844-847; DOI:10.1021/ol4036159.

Mika Hirose, Shigeru Sugiyama, Hanako Ishida, Mayumi Niiyama, Daisuke Matsuoka, Toshiaki Hara, Eiichi Mizohata, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Shigeru Matsuoka, Michio Murata, “Structure of the human-heart fatty-acid-binding protein 3 in complex with the fluorescent probe 1-anilino-naphthalene-8-sulphonic acid”, *J. Synchrotron Rad.*, 査読有り, **2013**, *20*, 923-928; DOI:10.1107/S0909049513021298.

[学会発表](計5件)

松岡 茂, “脂肪酸結合タンパク質のアルキル鎖認識機構”, 日本薬学会第135年会シンポジウム・脂質活性構造研究の最前線(神戸, 平成27年3月26日)。

松岡 茂, “脂肪酸結合タンパク質のアルキル鎖長認識機構”, 第25回創薬情報研究会・Structure Based Drug Design (SBDD) を活用したメディシナルケミストリー(京都, 平成27年3月4日)。

松岡 茂, “生物固体試料の局所構造解析”,

新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー～分子標的と活性制御～」・第6回若手研究者ワークショップ「機器分析のケミカルバイオロジーへの応用」(大阪,平成26年10月29日)。

松岡 茂, 杉山 成, 廣瀬未果, 石田英子, セバスチャン・レチュ, 阿野 光, 松岳大輔, 原 利明, 村田道雄, 溝端栄一, 井上 豪, “心臓型脂肪酸結合タンパク質の脂肪酸選択性と分子機構”, 日本ケミカルバイオロジー学会第9回年会(大阪,平成26年6月11日)

松岡 茂, 杉山 成, 松岳大輔, 廣瀬未果, 新山真由美, 大塚康平, 村田道雄, 溝端栄一, 井上 豪, “脂肪酸結合タンパク質FABP3の基質認識機構と機能”, 第55回天然有機化合物討論会(平成25年9月18日)。

〔図書〕(計1件)

Shigeru Matsuoka, Michio Murata, “Structural Studies of Small Bioactive Compounds Interacting with Membranes and Proteins” Chapter 8 in Advances in Biological Solid-State NMR: Proteins and Membrane-Active Peptides, Eds. Frances Separovic and Akira Naito, Royal Society of Chemistry, 2014, pp 133-161; Print ISBN: 978-1-84973-910-8.

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: 標的物質とリガンドとの結合親和性を測定するための方法、ならびに該方法に使用するための試薬助剤およびキット

発明者: 松岡 茂、村田道雄

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2013-171684

出願年月日: 平成25年8月21日

国内外の別: 国内

名称: 標的物質とリガンドとの結合親和性を測定するための方法、ならびに該方法に使用するための試薬助剤およびキット(SPR への応用)

発明者: 松岡 茂、村田道雄

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2014-013710

出願年月日: 平成26年1月28日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/>

2015/20150107_1

<http://www.sci.osaka-u.ac.jp/ja/topics/3480/>

<https://bio.nikkeibp.co.jp/article/news/20150107/181558/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 茂 (MATSUOKA, Shigeru)

研究者番号: 60456184