

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560436

研究課題名(和文)細胞膜表面の環境により誘起される分子の三次元構造と認識

研究課題名(英文)Molecular recognition in the interfacial environment induced by lipid membranes

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) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜は細胞と外界をしきる区切りで、主に水に溶けない脂質により形成されている。この脂質成分は均一ではなく、マイクロ～ナノメートル単位の小さな構造単位で複雑に変化して、生命活動に重要なシグナル伝達や物質移動を担っている。親油性化合物は水に溶解することができないため、生体内では細胞膜などに吸着して存在している。すなわち、生体内の親油性化合物は、水溶液としてではなく、細胞膜表面に吸着した膜結合構造として生体分子と反応する。本研究では、この膜界面でおこる反応に対する膜の脂質組成の影響を、熱分析により精査し、自由エネルギーの変化量として定量化することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The cell membrane, a separator for the interior of cells from the outside environment, is formed by lipids which are relative insoluble in water. Its lipid component is not uniform and changes in each small structural unit of the micro - nanometer scale to play key roles in the signal transduction and the mass transport across the cell membrane. Lipophilic compounds in vivo are not dissolvable in water, and are adsorbed on the surface of hydrophobic sites such as the cell membrane. Therefore, lipophilic compounds reacts with biomolecules in membrane bound structures rather than in aqueous solution structures. In this study, we succeeded in the quantification of the effect of the membrane lipid composition on the reaction between lipophilic compounds and soluble protein as free energy by using isothermal titration calorimetry.

研究分野：生体分子化学

キーワード：脂肪酸 側方相互作用 リポソーム 熱測定 脂質 - タンパク質相互作用

### 1. 研究開始当初の背景

疎水性の高い小分子リガンドは、細胞膜に非特異的に結合・分配する。この非特異的結合は実験系では排除されるが、実際の生体内では速度論的要因として、本来の標的分子との反応に影響する。非特異的結合の実態は、小分子と膜脂質の分子間相互作用であるが、生体内の反応に与える影響の大きさにもかかわらず、定量的議論がされてこなかった。理由としては、水に単分子溶解できない疎水性リガンドの挙動を水溶液中で正確に取り扱う評価系がなかったことが挙げられる。

### 2. 研究の目的

本研究の代表者らが先行研究(若手研究A 脂肪酸結合タンパク質のあいまいな分子認識 2012-2014)で開発した疎水性分子と水溶性タンパク質の精密親和性測定法を応用し、膜結合小分子の構造がタンパク質との分子認識に与える影響を定量的に評価する。本研究により、生体内における疎水性分子の実際の反応性の予測を可能とし、医薬研究に資する研究基盤を提供する。

### 3. 研究の方法

膜脂質構造と脂質二重膜環境の違いが疎水性小分子と水溶性タンパク質との分子認識に与える影響を検証する。小分子として脂肪酸、タンパク質として脂肪酸結合タンパク質(FABP3)を用いた。相互作用解析には当グループで開発したリポソーム等温滴定熱量測定(ITC)法を適用した。

リポソーム親和性測定法では、ITCを用いることで、脂肪酸がFABPに結合した状態とリポソームに結合した状態の自由エネルギー差( $G$ )を測定することができる。この

$G$ には、脂肪酸とリポソーム構成脂質の側方分子間相互作用が摂動として含まれている。異なる脂質組成のリポソームから得られる2つの $G$ 値の差をとることで、膜内の側方相互作用の相対的な大きさを計測することができる。

この着想に基づき、DMPC、DOPC、eggSMリポソームを用いて、パルミチン酸(C16:0)をリガンドとしたFABP3の結合親和性測定をおこない、PC-脂肪酸、SM-脂肪酸の側方分子間相互作用の比較および計測を試みた。

### 4. 研究成果

DMPCとDOPCでは、不飽和度、疎水性領域の長さの違いに関わらず、ほぼ同じ結合親和性と熱力学パラメータが得られた。脂肪酸-PCの相互作用にはアシル鎖の構造の影響は小さいことが示唆された。また、結合エンタルピー項( $H$ )は負の値、結合エントロピー項( $-T S$ )は正の値が観測され、PCリポソームからFABP3に脂肪酸が受け渡される反応は、エンタルピー駆動であることが示された。

$H$ が負(エンタルピー駆動)の場合、水素結合やファンデルワールス相互作用などの分子間相互作用形成によるリガンド-タンパク質複合体の構造安定化が主な駆動力と考えられる。 $-T S$ が負(エントロピー駆動)の場合は、疎水性ポケット内の不安定な結合水が疎水性リガンドにより排除されるなど、リガンド-タンパク質複合体形成による分子自由度の増加が主な駆動力と考えられる。PC膜からFABPへのC16:0受け渡し反応がエンタルピー駆動である理由としては、1)脂肪酸-FABP結合によるFABPと脂肪酸、結合ポケット内水分子の構造安定化と2)界面活性剤である脂肪酸の解離によるPC二重膜の構造安定化の寄与が大きいことが挙げられる。

一方、eggSM膜からFABPへのC16:0受け渡しでは、PC膜に比べると $G$ が約5 kJ増えており、一桁程度大きなKD値(弱いFABP-C16:0親和性)が得られた。この結果は、何らかの理由によりSM膜中のC16:0がPC膜中に比べて5 kJ安定化されていることを示す。また、熱力学的パラメータからは、SM膜では正の $H$ と負の $-T S$ が得られており、PC膜中とは逆のエントロピー駆動の分子機構になることが判明した。PC膜とSM膜では、1)のリガンド-タンパク質複合体の自由エネルギーは同じであるが、2)の脂肪酸-脂質膜の自由エネルギーが異なり、その分子機構は以下のように考察される。

SM膜からFABPへのC16:0受け渡し反応はエントロピー駆動であることから、SM膜中でC16:0-SM複合体が形成されており、FABPによりC16:0が膜中から引き抜かれることでSM分子が解放され、自由度が増加したと解釈できる。また、SM-C16:0分子間相互作用はPC-C16:0分子間相互作用に比べて約5 kJの安定化されている。この大きさは水素結合およそ一つ分に相当する。C16:0のカルボキシル基とSM分子のアミド基またはヒドロキシ基の間で形成される水素結合が、C16:0-SM複合体の安定化に寄与したものと考察される。

次に、DMPC膜、eggSM膜それぞれにおけるコレステロール(chol)分子とC16:0の相互作用を調査した。chol濃度を変えたPC膜、SM膜を調製し、FABP3を使ったりポソームITC実験を行った。PC膜とSM膜のどちらでも $G$ 値に対するchol濃度の影響は小さく、それぞれの膜におけるC16:0の自由エネルギーは、cholによりほとんど変化しないことが示された。

一方、熱力学的パラメータはそれぞれの膜でchol濃度に依存して特徴的な変化を示した。DMPC膜中ではchol濃度が脂肪酸と1:1の分子数比になるまで、連続的に $H$ が正方向に $-T S$ が負方向に変化し、それ以上のchol濃度では値の変化はみられなかった。これは、DMCP膜中ではcholとC16:0が1:1のストイキオメトリで相互作用することを示

す。しかし、G の変化は小さく、C16:0-chol 複合体形成による系の安定化はほとんど起こらなかったと言える。これは、C16:0-chol 分子間相互作用によるエンタルピー利得は、同時におこる C16:0 と chol 分子の自由度低下によるエントロピー損失で補償され、自由エネルギーは変化しなかったものと考えられる。

SM 膜では、エントロピー駆動による FABP への C16:0 受け渡しが見られたが、すべての SM 分子が chol 分子と相互作用し秩序液体相 (Lo) に変化する 30 mol% chol では、結合エンタルピーが突然負に変化し、結合エントロピーが正方向に大きく変化した。この結果は、膜中の chol 分子が 30mol% に達すると C16:0 と安定に複合体を形成できる SM 分子が減少し、C16:0 は SM-chol の Lo 膜を乱す界面活性剤としての性質が強くなることを示唆する。しかしながら、G の変化は小さく、SM 膜中でもエンタルピー・エントロピー補償により、chol 濃度は C16:0 の自由エネルギーに対してほとんど影響しなかったと考えられる。

以上の結果、1) C16:0-PC, C16:0-SM の分子間相互作用の違いを定量的に示すことに成功し、2) それぞれの膜中における chol 分子の C16:0 に対する影響の違いを熱力学的パラメータから定量的に明らかにすることに成功した。本研究により、脂肪酸-FABP3 の結合反応に対して脂質膜の構造が与える影響を検証することができた。本方法論は疎水性生理活性物質に広く応用できる期待される。

#### 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 6 件)

1. Jin Cui, Shigeru Matsuoka, Masanao Kinoshita, Nobuaki Matsumori, Fuminori Sato, Jun Ando, Hiroyuki Yamakoshi, Kosuke Dodo, Mikiko Sodeoka, Michio Murata, “Novel Raman-tagged sphingomyelin that closely mimics original raft-forming behavior”, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 2989-2994; doi:10.1016/j.bmc.2015.05.014.
2. Yuichi Umegawa, Toshiyuki Yamaguchi, Michio Murata, Shigeru Matsuoka, “Centerband-only analysis of rotor-unsynchronized spin-echo for measurement of lipid <sup>31</sup>P chemical shift anisotropy”, *Magn. Reson. Chem.* **2015**, 53, 514-519; DOI 10.1002/mrc.4247.
3. 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*, **2015**, 119, 114-127; DOI: 10.1021/jp510384f.
4. 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.* **2015**, 54, 1508-1511; DOI: 10.1002/anie.201409830.

5. Jin Cui, Sébastien Lethu, Tomokazu Yasuda, Shigeru Matsuoka, Nobuaki Matsumori, Fuminori Sato, Michio Murata, “Phosphatidylcholine bearing 6,6-dideuterated oleic acid: A useful solid-state <sup>2</sup>H NMR probe for investigating membrane properties”, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 25, 203-206; DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.11.072.

6. 松岡 茂, “脂肪酸結合タンパク質の分子認識”, *BIO Clinica*, **2015**, 30, 77-82; ISBN: 176020815.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 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」, 2014 年 10 月 29 日, 大阪.
2. 梅川雄一, 川竹悟史, 松岡 茂, 村田道雄, 化学シフト異方性測定に基づくバクテリオロドプシン-周辺脂質の親和性評価, 第 53 回 NMR 討論会, 2014 年 11 月 4~6 日, 大阪.
3. 松岡 茂, 梅川雄一, 村田道雄, 多成分脂質膜の CSA 測定, 第 53 回 NMR 討論会, 2014 年 11 月 4~6 日, 大阪.
4. 松岡 茂, 脂質-脂質分子間相互作用の固体 NMR 研究, 難治疾患完治療開発のための革新的イメージ脂質生物学の確立・研究成果中間発表会, 2015 年 4 月 14 日, 金沢.
5. 松岳大輔, 松岡 茂, 杉山 成, 村田道雄, Interplay between internal water molecules and bound fatty acid molecule in FABP3 binding cavity, 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015 年 9 月 13~15 日, 金沢.
6. Jin Cui, 川竹悟史, 梅川雄一, Sebastien Lethu, 松岡 茂, 佐藤文憲, 松森信明, 村田道雄, 脂質-タンパク質相互作用の解明を目指したバクテリオロドプシン脂質アナログの立体選択的合成, 第 57 回天然有機化合物討論会, 2015 年 9 月 9~11 日, 神奈川.
7. M. Murata, T. Yasuda, J. Cui, M. Kinoshita, S. Matsuoka, N. Matsumori, Isotop-labeled phospholipids for examining domain-specific order profiles and compositional distribution by solid-state NMR, Pacificchem 2015, 2015 年 12 月 15~20 日, Honolulu.
8. S. Matsuoka, Solid-state NMR investigations of small-molecule binding sites, Pacificchem 2015 年 12 月 15~20 日, Honolulu.
9. S. Matsuoka, Head group-selective interaction of cations and sugars with phospholipids in

multiple component bilayer systems, Pacificchem  
2015, 2015 年 12 月 15 ~ 20 日, Honolulu.

## 6. 研究組織

### (1) 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

細胞膜は細胞と外界をしきる区切りで、主に水に溶けない脂質により形成されている。この脂質成分は均一ではなく、マイクロ~ナノメートル単位の小さな構造単位で複雑に変化して、生命活動に重要なシグナル伝達や物質移動を担っている。親油性化合物は水に溶解することができないため、生体内では細胞膜などに吸着して存在している。すなわち、生体内の親油性化合物は、水溶液としてではなく、細胞膜表面に吸着した膜結合構造として生体分子と反応する。本研究では、この膜界面でおこる反応に対する膜の脂質組成の影響を、熱分析により精査し、自由エネルギーの変化量として定量化することに成功した。

The cell membrane, a separator for the interior of cells from the outside environment, is formed by lipids which are relative insoluble in water. Its lipid component is not uniform and changes in each small structural unit of the micro - nanometer scale to play key roles in the signal transduction and the mass transport across the cell membrane. Lipophilic compounds in vivo are not dissolvable in water, and are adsorbed on the surface of hydrophobic sites such as the cell membrane. Therefore, lipophilic compounds reacts with biomolecules in membrane bound structures rather than in aqueous solution structures. In this study, we succeeded in the quantification of the effect of the membrane lipid composition on the reaction between lipophilic compounds and soluble protein as free energy by using isothermal titration calorimetry.