

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 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：26560448

研究課題名(和文) 生体膜の機能に関する脂質分子と水分子の相互作用

研究課題名(英文) Lipid-water interactions involved in membrane biofunctions

研究代表者

村田 道雄 (Murata, Michio)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40183652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：われわれの体の中の分子のほとんどは、弱い相互作用を介して機能している。代表的な例として、生体膜の脂質分子が挙げられる。膜脂質は、一義的な化学構造を有する小分子化合物であり、また、その集合体である脂質二重膜はタンパク質と接触することによって様々な生理的役割を担っている。脂肪酸の結合タンパク質について新しい実験方法によって、今まで明らかにならなかった脂肪酸の形を解明し、さらに共同研究者とともに、タンパク質の変異体を合成し、その中の脂肪酸と水分子の構造を決定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Cell membranes consist of lipids and proteins, where lipid-lipid and lipid-protein interactions in the aqueous environment plays essential roles in various cellular events. Hydrophobic interactions are known to be essential for the molecular recognitions responsible for stabilization of membrane proteins. In this project, the role of water molecules in lipid-protein interactions was investigated using calorimetry, X-ray crystallography, and molecular simulations. The results clearly show that water molecules in the binding pocket of fatty acid is stabilized by hydrogen-bond network between water and sidechains and thus, changes in sidechain residues do not lead to the significant movement of the bound ligand and water molecules.

研究分野：複合領域 生体分子化学 ケミカルバイオロジー

キーワード：配座解析 分子運動 疎水性相互作用 脂質二重膜 脂肪酸 結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

生体内機能の多くが、生体分子間の疎水相互作用を含めた弱い相互作用を介して発現されている。代表的な例として、生体膜の脂質分子が挙げられよう。膜脂質は、一義的な化学構造を有する小分子化合物であり、また、その集合体である脂質二重膜は特殊な物性を示すことによって生理的役割を担っている。しかし、これらの弱い相互作用は、生命現象において薬物・受容体に代表される強い相互作用に勝るとも劣らぬ重要な役割を果たしているが、その実態が把握できていない。膜中における脂質分子の運動速度は非常に速く、静的な構造だけでは本質的理解は得られないのが原因の一つである。特に、脂質メディエーターに注目が集まるになかで、脂質分子と膜タンパク質の相互作用の重要性は強く認識されるようになったが、両者の親和性を担う分子機構をほとんど分かっていない。われわれは、膜タンパク質に着手する前に、可溶性の脂肪鎖結合タンパク質 (FABP3) を用いてこの問題に取り組んだ。FABP3 とミリスチン酸について分子動力学計算を行うと、脂肪酸分子の動きがタンパク質より顕著に大きく、水分子が両者のギャップを埋めているとの着想に至った。

2. 研究の目的

重要な生体機能を担っている疎水性分子の相互作用を分子論的に理解するために、逆説的に聞こえる「脂質分子と水分子の相互作用が脂質・タンパク質の親和性を強める」との仮説を実験的に検証する。膜タンパク質を含めて細胞膜における相互作用では、疎水的因子が支配的と考えられがちであるが、周囲に存在する水分子が熱力学的には重要な役割を果たしている。これを分子論的に記述することは、研究者の概念形成において重要であるにもかかわらず、ほとんど試みられてはいない。本研究では、実験科学的アプローチによって、脂質分子に特有な分子運動とそれに連動する水分子の相互作用の分子論的基盤を解明することを目指す。

3. 研究の方法

NMR, IR による動的相互作用解析: ^{13}C もしくは ^2H 等の安定同位体で選択的に標識した膜脂質を用いて脂質・水分子・結合タンパク質複合体の固体NMRおよびIRを測定することによって、タンパク質中の脂肪酸アルキル部分の分子運動をセグメント特異的に見積もる。これをもとに脂質と水分子の動的相互作用を生む脂質分子の配座群とそれらの交換速度を見積もる。

分子動力学計算によるモデル系の創出: 膜脂質・水分子・タンパク質複合体について配座制限下と非制限下でシミュレーションを行い、上記の分子運動を再現する。膜タンパク質モデリングのためのパラメー

タの取得: 上記シミュレーションによって膜脂質の二分子間に働く相互作用を定量化し、膜タンパク質と膜脂質の相互作用を再現するために必要な分子動力学パラメータを求める。

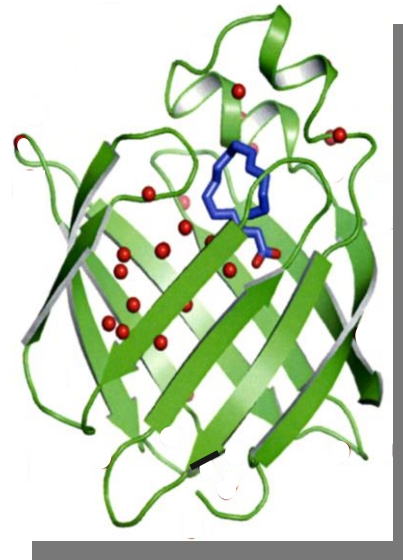


図. FABP3 の結合ポケットにある脂肪酸 (青) 水分子 (赤玉)

4. 研究成果

重要な生体機能を担っている疎水性分子の相互作用を分子論的に理解するために、逆説的に聞こえる「脂質分子と水分子の相互作用が脂質・タンパク質の親和性を強める」との仮説を実験的に検証した。これには、実験科学的アプローチによって、脂質分子に特有な分子運動とそれに連動する水分子の相互作用の分子論的基盤を解明することが重要である。GPCR におけるコレステロールやイオンチャネルにおける酸性リン脂質など、脂質が主にタンパク質の疎水表面に結合することによって、タンパク質の機能の調節を行っていることが明らかになっている。しかし、高速で配座を変化させる脂質分子との弱い相互作用で一瞬だけ形成される脂質・タンパク質複合体の構造を把握するのは非常に困難であり、熱力学的解析もしくは分子動力学計算による記述が試みられているに過ぎない。本研究では、これら複雑で極めて高速な構造変化を実際の生体分子から取得した実験データを加味して取り扱う手法を提案した。特に、脂肪酸結合タンパク質について、2つの新規実験手法を適応した。すなわち、ゲル結晶化による疎水リガンドのソーキングによる結合によって、および室温での脂質性リガンドの正確な結合構造を決定した(図)。この結果、今まで得られていなかった構造情報を取得し、さらに共同研究者とともに、脂肪酸結合タンパク質の変異体を合成し、その中の脂肪酸リガンドと水分子の構造と精

査することに成功した。水分子を加味した計算化学的手法によって、疎水性リガンドとそれを取り巻く水分子の関係を、タンパク質脂質複合体構造とカロリメーターの実験結果を精密に考察することが可能となった。

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 Matsuoka, D., Sugiyama, S., Murata, M. and Matsuoka, S. 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* 査読有り、119 巻, 114-127 (2015).
- ② Tan, M. C., Matsuoka, S., Ano, H., Ishida, H., Hirose, M., Sato, F., Sugiyama, S. and Murata, M. 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、22 巻, 1804-1808 (2014).
- ③ Lethu, S., Matsuoka, S. and Murata, M. 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、43 巻, 844-847 (2014).
- ④ Kinoshita, M., Matsumori, N. and Murata, M. Coexistence of two liquid crystalline phases in dihydrosphingomyelin and dioleoylphosphatidylcholine binary mixtures. *Biochim. Biophys. Acta*, 査読有り、1838 巻, 1372-1381 (2014).
- ⑤ Sugiyama, S., Shimizu, N., Kakinouchi, K., Hiraoka, O., Matsumura, H., Yoshikawa, H. Y., Takahashi, Y., Maruyama, M., Yoshimura, M., Adachi, H., Takano, K., Murakami, S., Inoue, T., Murata, M. and Mori, Y. Development of protein seed crystals reinforced by high-strength hydrogels *CrystEngComm*, 査読有り、17 巻, 8064-8071 (2015).
- ⑥ Hirose, M., Sugiyama, S., Ishida, H., Niiyama, M., Matsuoka, D., Hara, T., Mizohata, E., Murakami, S., Inoue, T., Matsuoka S. and Murata, M. Structure of the human heart fatty acid-binding protein in complex with the fluorescent probe 1-anilinonaphtalene-8-sulphonic acid. *J. Synch. Radiat.* 査読有り、20 巻, 923-928 (2013).

[学会発表] (計 4 件)

- ① HOSSAIN Md. Imran, HANASHIMA Shinya, TSUCHIKAWA Hiroshi, MURATA Michio, KUSAKA Hiroki, KITA Shunsuke, MAENAKA Katsumi, Design and Synthesis of CD1d Ligands for Precise Binding Mode Investigation of Ligand-Bound CD1d, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年 3 月, 京都
- ② 山本智也、梅川雄一、土川博史、松森信明、花島慎弥、村田道雄、Resul Hauser Bernard J. Rawlings、Patrick Caffrey、アンフォテリシン B のチャネル形成機構解明を目指した構造活性相関研究、日本薬学会第 136 回年会, 2016 年 3 月, 横浜
- ③ Md. Imran Hossain, Shinya Hanashima, Hiroshi Tsuchikawa, Michio Murata, Shunsuke Kita, Katsumi Maenaka, Design, Synthesis and Evaluation of Heavy Atom Labelled KRN-7000 Analogs for CD1d Mediated Cytokines Production, 16th Tetrahedron Symposium Asia Edition, 2015 年 11 月, 上海、中国
- ④ 杉山成、垣之内啓介、石田英子、松村浩由、安達宏昭、高野和文、丸山美帆子、吉川洋史、高橋義典、吉村政志、村上聡、井上 豪、村田道雄、森勇介、創薬加速に向けた難溶性低分子複合体結晶作製の革新的技術開発、第 64 回高分子討論会、2015 年 9 月、神奈川
- ⑤ 杉山成、垣之内啓介、高野和文、村上聡、安達宏昭、丸山美帆子、吉川洋史、高橋義典、吉村政志、松村浩由、井上豪、村田道雄、森勇介、広範な結晶化条件に適応した新規凝固ゲル中結晶化法、第 15 回日本蛋白質科学会年会、2015 年 6 月、徳島
- ⑥ 杉山成、齋木悠、島田真典、垣ノ内啓介、新山真由美、花島慎弥、溝端栄一、井上豪、松森信明、村田道雄、膜タンパク質研究基盤の構築に向けた合成リン脂質の利用、第 15 回日本蛋白質科学会年会、2015 年 6 月、徳島
- ⑦ 花島慎弥、野村拓人、芝田悠大、土川博史、村田道雄、前仲勝実、抗原提示タンパク質 CD1d と脂質の精密相互作用解析を目指した α -ガラクトシルセラミド標識体の合成、日本ケミカルバイオロジー学会、2014 年 6 月、大阪

〔図書〕（計 1 件）

Matsuoka, S. and Murata, M., Structural Studies of Small Bioactive Compounds Interacting with Membranes and Proteins. In “*Advances in Biological Solid-State NMR: Proteins and Membrane-Active Peptides*” Separovic F., Naito A. Eds, pp. 133-143 (2014).

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔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：40183653

(2) 研究分担者

なし