

分子複合体としての生体膜の構造と機能

Structures and Functions of Membrane-Bound Biomolecules

村田道雄 (MURATA, Michio)
大阪大学・大学院理学研究科・教授



研究の概要

生体膜中でのみ現れる分子間相互作用は大部分が未解明である。これらを解明するためには、生体膜を二次元流体としてではなく、膜脂質を含む分子複合体としてえる必要がある。本研究では、有機合成化学と分光学的方法を組み合わせることによって生体膜における生体分子の構造と機能を解明することを目指す。

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： 生体膜・抗生物質・固体 NMR・脂質マイクロドメイン・自己会合体

1. 研究開始当初の背景

生命科学のフロンティアとして生体膜が注目されるようになって久しいが、その機能と構造の解明は、他の研究対象に比べて遅れている。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、構造生物学の発展を支えた方法論が生体膜に対しては有効ではない。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

生体膜に特有の分子間相互作用の解明を目指して本研究では以下の目的を設定した。

- 1) 脂質二重膜中に形成される生理活性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、 ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F -標識体を調製した。備品として、NMR 関連設備、膜構成脂質の精製・定量に必要な設備を購入した。

4. これまでの成果、

1a) 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。

1b) 膜との親和性を向上させた AmB 誘導體 (メチルエステル体) を用いて、会合体の構造解析を行った結果、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た。

[4. これまでの成果 (続き)]

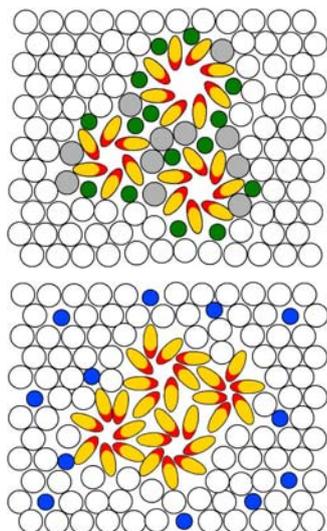


図1. エルゴステロール膜(上)とコレステロール膜(下)におけるAmB会合体のモデル。AmB(黄楕円)はエルゴステロール(●)およびリン脂質(●)と相互作用してイオンが透過できる穴を脂質二重膜に形成する。コレステロール(●)は殆ど相互作用しない。

2a) 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}C , ^{15}N あるいは ^{19}F , ^2H 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。これら標識体について原子間距離測定(REDDOR 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。

2b) 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、連結プローブとともにラフトを形成することを明らかになり、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。

3) スフィンゴ脂質を特異的に認識するタンパク質については、スフィンゴ脂質や膜貫通ペプチドの標識体の調製を進めている。

5. 今後の計画

脂質マイクロドメインに関してはモデル系を用いて、脂質分子同士の相互作用解明を継続して行う。抗生物質やスフィンゴミエリンの研究を通じて確立した方法論を用いて、今後、タンパク質の膜貫通 α -ヘリックスと膜脂質の相互作用を調べる予定である。特に、脂質マイクロドメインなど脂質分子とタンパク質の相互作用が生理機能発現に重要な役割を果たす例を取り上げてゆく。

6. これまでの発表論文等 (主要論文)

1. Self-assembly of amphotericin B is probably surrounded by ergosterol; bimolecular interactions as evidenced by solid state NMR and CD spectra. Kasai, Y., Matsumori, N., Umegawa, Y., Matsuoka, S., Ueno, H., Ikeuchi, H., Oishi, T. and **Murata, M.** *Chem. Eur. J.* **14**, 1178-1185 (2008).
 2. Orientation of fluorinated cholesterol in lipid bilayers analyzed by ^{19}F tensor calculation and solid-state NMR. Matsumori, N., Kasai, Y., Oishi, T., **Murata, M.** and Nomura, K. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4757-4766 (2008).
 3. Complex formation of amphotericin B in sterol-containing membrane as evidenced by surface plasmon resonance. Mouri, R., Konoki, K., Matsumori, N., Oishi, T. and **Murata, M.** *Biochemistry*, **47**, 7807-7815 (2008).
 4. Ergosterol increases intermolecular distance of amphotericin B in membrane-bound assembly as evidenced by solid-state NMR. Umegawa, Y., Matsumori, N., Oishi, T. and **Murata, M.** *Biochemistry*, **47**, 13463-13469 (2008).
 5. Conformation and position of membrane-bound amphotericin B deduced from NMR in SDS micelles. Matsumori, N., Houdai, T. and **Murata, M.** *J. Org. Chem.* **72**, 700-704 (2007).
- ・平成18年度日本化学会学術賞

ホームページ等

<http://www.ch.wani.osaka-u.ac.jp/lab/murata>