

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成31年度（2019年度）研究進捗評価用〕

平成28年度採択分
平成31年3月20日現在

生体モデル膜における脂質分子の動的配座とドメイン構造

Dynamic conformation and domain structure of lipid
Molecules in model membranes



課題番号：16H06315

村田 道雄 (MURATA, MICHIO)

大阪大学・理学研究科・教授

研究の概要（4行以内）

生体膜で機能している脂質ラフトの形成機構を原子分解能によって解明することを目的とした。従来とは異なる発想に基づき、脂質分子の動的立体配座とドメイン構造を化学的および計算科学的手法によって調べた結果、構成脂質（スフィンゴミエリン）の強い分子間相互作用、その発現機構、ラフトの大きさを明らかにすることに成功した。

研究分野：生物分子化学

キーワード：活性発現の分子機構

1. 研究開始当初の背景

生命科学のフロンティアと云える細胞膜は脂質二重膜を主体としており、その機能について、膜タンパク質が注目を集めていた。最近、膜脂質抜きでは議論ができないことが分かってきたが、高度に流動的な分子会合体である脂質二重膜についての本質的理解はなかなか進んでいない。特に、脂質ラフトと呼ばれる小さなドメイン構造については未だに謎が多い。

2. 研究の目的

本基盤研究Sでは、生体膜を構造生物学の研究対象とするために、細胞膜上に形成されるドメイン形成の分子機構を原子分解能で解明することを目指す。具体的には、各種同位体で位置特異的に標識した膜脂質を化学合成して固体NMRを測定する。これをもとに、膜脂質の炭化水素鎖の立体配座、脂質分子によるナノドメイン形成に関わる分子間相互作用および膜タンパク質の周辺脂質についても相互作用の分子機構を解明する。

3. 研究の方法

研究対象を実証的に解明することによって頭書の目的を達成する。

a) ラフト系におけるスフィンゴミエリン分子の立体配座. b) 原子分解能におけるラフト系の脂質分子の分子間相互作用. c) 膜タンパク質との相互作用における周辺脂質の立体配座と水和構造. これらには、動態標識脂質の化学合成、各種固体NMRの測定、膜タンパク質の調製などの多様な実験技術が必要である。

4. これまでの成果

a) ラフト系におけるスフィンゴミエリン分子の立体配座

細胞膜に形成される脂質ラフトのモデル系としてスフィンゴミエリン(SM)の膜中での立体構造について詳細に解析し、ラフト形成時の構造的特徴を明確にした。化学合成したSMの同位体標識脂質について固体重水素NMR等を測定し、また、同時に分子動力学計算(MD)を行い、両者を比較した。その結果、SMのアシル鎖とヘッドグループについて、脂質ラフト形成時における立体配座と配向の変化を解明することに成功した(図1)。また、SMとの比較のために、熱的に安定な膜脂質として知られる古細菌脂質について固体NMR測定とMD計算を行った。その結果、メチル分岐鎖の平均配向がSMなどの通常の膜脂質と異なっていることが、安定性の原因であることを明らかにした(図2)。

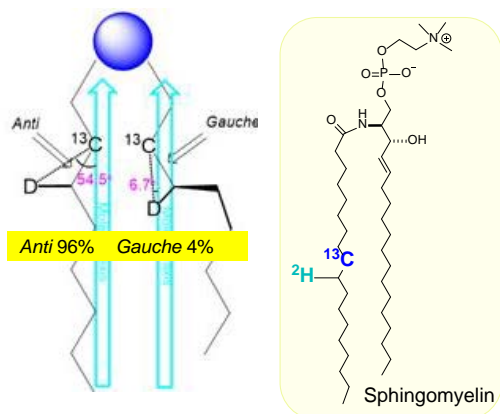


図1. 化学合成した重水素と炭素-13 の二重標識 SM とそれを使った配座解析。脂質ラフト系で、大部分の SM のアシル鎖が安定な伸長配座(anti 形)を取り、ゆらぎも非常に小さいことが判明した。

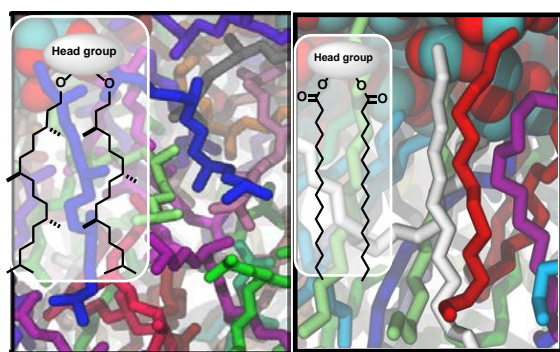


図2. MD シミュレーションの結果

左) 古細菌脂質 PGMPe ではメチル分岐鎖が絡み合っている様子が見えるが、右) 通常のリン脂質では比較的アシル鎖が重ならず並んでいる。

b) 原子分解能によるラフト系における脂質分子の分子間相互作用

脂質ラフト形成を担う脂質分子の相互作用とドメイン形成を調べる目的で、SM の天然体と鏡像体について同位体および蛍光による標識体を化学合成した。これらを用いて、ラフト様のドメイン形成には SM-コレステロール(Cho)よりも、SM-SM 間の相互作用が重要であり、また、SM 単一で形成されるドメインのサイズは非常に小さい (5-10 nm) ことを明らかにした。

c) 膜タンパク質との相互作用における周辺脂質の立体配座・配向と水和構造

膜タンパク質と周辺脂質の関係を明らかにするために、三量体タンパク質 (バクテリオロドプシン) に対する中性膜脂質 (PC) と酸性膜脂質 (PG) の親和性を評価した。その結果、PC が三量体を取り囲むように、

PG が三量体を単量体に解離させるように働くことを、相互作用の界面選択性という視点から明らかにすることができた。

5. 今後の計画

研究項目 a) と b) については、基本的な実験データの収集をほぼ終えているので、結果の公表を行う。

研究項目 c) についても、リン酸エステル部分の配座や揺らぎが膜タンパク質への結合によって変化することを利用して、タンパク質の会合状態を調べる実験を継続する。水和構造については、当初の計画を変更して、蛍光プローブを用いる実験と計算科学的方法で研究を進めている。

6. これまでの発表論文等

1. SPICA Force Field for Lipid Membranes: Domain Formation Induced by Cholesterol. Seo, S., *Shinoda, W. *J. Chem. Theory Comput.* **15**, 762-774 (2019).
2. Nanosized phase segregation of sphingomyelin and dihydrosphingomyelin in unsaturated phosphatidylcholine binary Membranes without Cholesterol. Yasuda, T., *Slotte, J. P., *Murata, M. *Langmuir* **34**, 13426-13437 (2018).
3. Sphingomyelin stereoisomers reveal that homophilic interactions cause nanodomain formation. Yano, Y., Hanashima, S., Yasuda, T., Tsuchikawa, H., Matsumori, N., Kinoshita, M., Al Sazzad, M. A., J. *Slotte, J. P., *Murata, M. *Biophys. J.* **115**, 1530-1540 (2018).
4. Sterol-Recognition Ability and Membrane-Disrupting Activity of Ornithogalum Saponin OSW-1 and Usual 3-O-Glycosyl Saponins. Malabed, R., *Hanashima, S., *Murata, M., Sakurai, K. *Biochim. Biophys. Acta* **1859**, 2516-2525 (2017).
5. Membrane protein structure determination by SAD, SIR, or SIRAS phasing in serial femtosecond crystallography using an iododetergent. Nakane, T. (1 番目), Hanashima, S. (2 番目), *Murata, M. (30 番目), (その他 27 名) *Proc. Natl. Acad. USA.* **113**, 13039-13044 (2016).
6. 総説 A synthetic approach to the channel complex structure of antibiotic in a membrane: backbone ¹⁹F-labeled amphotericin B for solid-state NMR analysis. Tsuchikawa, H., Umegawa, Y., *Murata, M. *Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan* **76**, 1197-1205 (2018).

7. ホームページ等

<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/murata/>