

戦略的創造研究推進事業 (ERATO)

—村田脂質活性構造プロジェクト—



夢はバラ色

村田道雄*, 佐藤文憲**

JST ERATO Lipid Active Structure Project
—Toward the atomic-level understanding of biomembranes—

Key Words : Lipid bilayer, Sphingomyelin, Fatty acid binding protein,
Membrane proteins

1. はじめに

創造科学技術推進事業 (Exploratory Research for Advanced Technology ; ERATO) とは、日本の創造的な研究、特に基礎的な研究をより一層充実させ、科学技術イノベーションの創出を目的として、昭和56年 (1981年) に発足しました。これは、科学技術振興機構 (JST) が、戦略重点科学技術の分野における課題解決型基礎研究を推進できる研究リーダー (研究総括) を選出し、研究総括の所属する既存研究室とは別に研究実施拠点を開設し、独立した時間限的な研究組織を新たに編成します。そこに研究人材や研究設備を集め、機関・分野を超えた幅広い人材を揃えた「[人] 中心の研究システム」にて研究を実施しています (図1)。また一つの特徴として、研究者グループの他にプロジェクト企画推進機能を備えたプロジェクトヘッドクォーター (HQ) も併

設けています。研究予定期間は、約5年間で毎年5つのプロジェクトが採用され、現在28プロジェクトが進行しています。特別重点期間 (最大5年付加) として延長することも可能ですが、研究終了と同時に研究人材や研究設備ともに原則的には解散します。

我々のプロジェクトは、平成22年に採択され、大阪大学理学研究科の基礎理学プロジェクト研究センターと工学研究科附属フロンティア研究センター内に研究施設を設定し、現在約15名体制で研究を推進しています。専門領域で以下の3つのグループに分け、グループリーダーを設定し横断的に研究テーマを進めています。

- i. 生体膜中脂質分子G
グループリーダー村田教授
・タンパク質発現 (微生物培養) ・ペプチド合成・共焦点蛍光顕微鏡
- ii. 膜タンパク質リガンド構造G
グループリーダー松岡特任准教授
・NMR・同位体標識合成・MD計算・等温滴定熱量測定
- iii. リガンド活性配座G
グループリーダー杉山特任准教授
・タンパク質発現 (大腸菌) ・X線結晶構造解析



* Michio MURATA

1958年10月生
東北大学大学院農学研究科 (1982年)
現在、大阪大学 理学研究科化学専攻生体分子科学研究室 教授 農学博士
天然物化学
E-mail : murata@chem.sci.osaka-u.ac.jp



** Fuminori SATO

1954年9月生
東京大学大学院薬学研究科 博士課程
現在、大阪大学大学院理学研究科 化学専攻 研究推進主任 薬学博士 有機化学 医薬品化学
TEL : 06-6850-5845
E-mail : satou-f@office.osaka-u.ac.jp

2. 村田脂質活性構造プロジェクトの背景と目的

ヒトを構成する細胞の一つひとつは、外部と内部を隔てる膜に包まれており、この膜は脂質二重層と呼ばれる構造を形成しています (図2)。構成成分の多くは脂質とタンパク質であることが知られていますが、細胞が生きていくためには、この膜を通して物質のやり取りを行う必要があります、その重要な役割はこの膜に存在する膜貫通タンパク質が担うこと

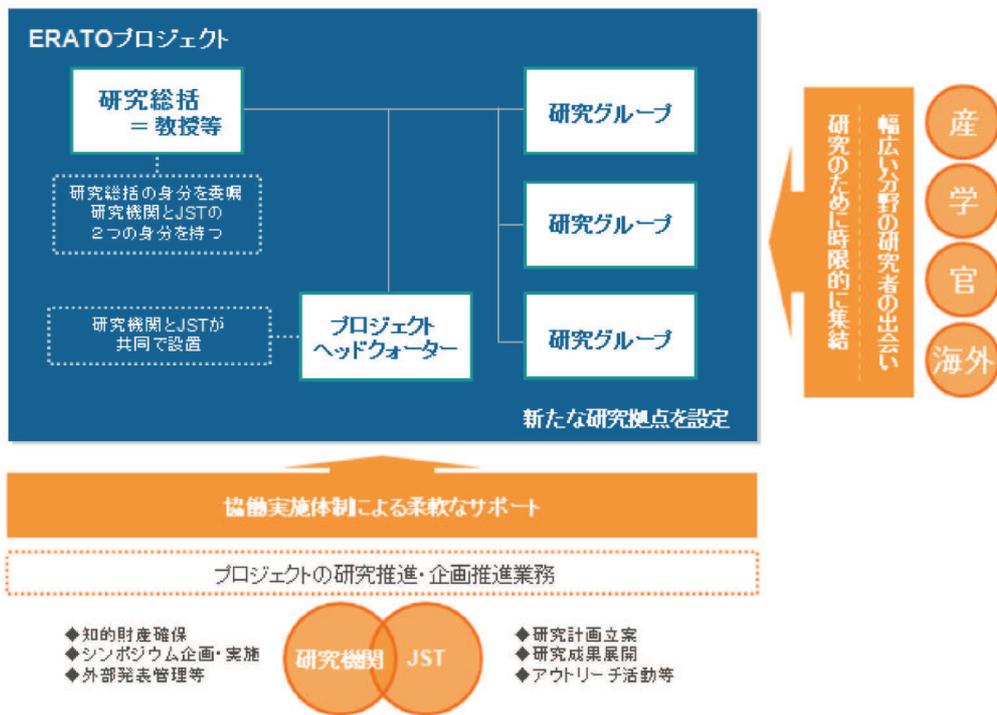


図1. ERATO プロジェクトの組織図例 (JST資料より)

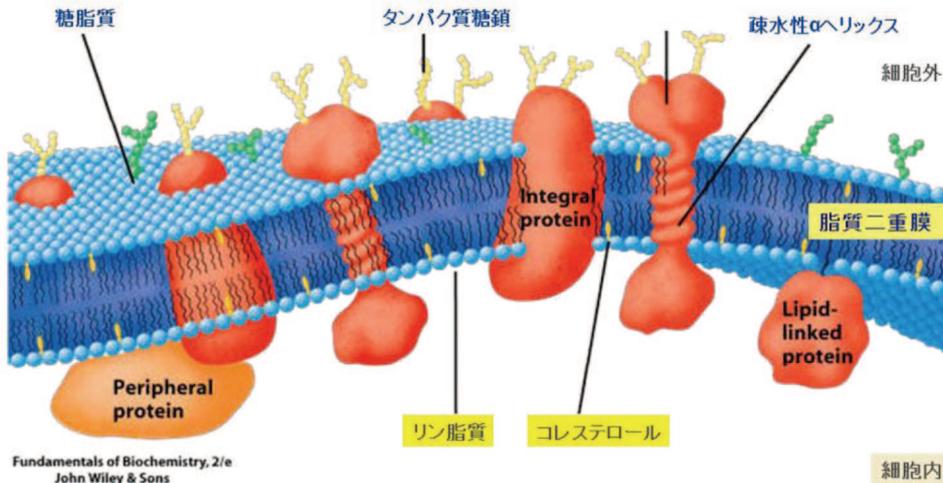


図2. 細胞膜の模式図。脂質二重膜構造に多くのタンパク質が結合している様子を示す

が研究されてきました。しかし、研究が進むにつれ、ただの材料をして膜を形成しているだけの役と思われていたリン脂質に、タンパク質と特異的に相互作用することによって、膜全体の生理機能を左右する重要な役割があるとわかってきました。そのため脂質は新薬創製のターゲット分子として注目され始めています。一方、この脂質の機能を詳細に解析するためには、生体内で活性を保った状態の脂質の構造

を調べる必要がありますが、タンパク質と相互作用している脂質の結晶化が困難であること、また極低温下での測定では常温下の姿を捉えられないことが従来のX線結晶構造解析法では解決できない問題となっています。

本プロジェクトでは、まず、脂質二重膜を溶媒のような二次元流体としてではなく、生体分子の複合

体という視点から捉え直し、立体構造と分子間相互作用の精密解析を通じて、膜脂質機能の分子基盤の解明を目的としています。そのためには、膜構成成分でタンパク質構造の安定化に寄与している脂質分子と、膜タンパク質と特異的に結合している脂質性リガンド分子の両方に関する相互作用を解明しなければなりません。これらの2種類の相互作用には、親和性の強弱の差はあるものの共通の分子基盤が存在すると考えています。ここにかかわる比較的弱い分子間相互作用と動的な立体構造を、固体NMRや超精密X線結晶構造解析そして蛍光相関分光法(FCS)等の先端的技術を用いて解明します。さらに得られた脂質の構造から、計算化学を駆使して膜タンパク質との相互作用を推定することで膜タンパク質の構造解析も目指しており、これまで構造決定が困難であった膜タンパク質の構造を知る新しい手法の創出が期待されます。

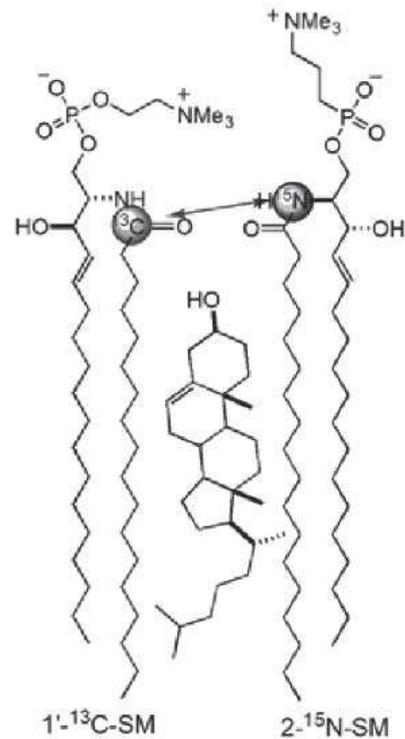


図3. ラフト相中で推定される分子間相互作用

3. 研究活動と最近の成果

a. 脂質ラフト中のスフィンゴミエリン (SM) 分子間相互作用

近年、膜脂質がタンパク質との相互作用を介して特異的かつ多様な生理機能を担うことが明らかになってきました。なかでも、脂質ラフトは、細胞膜に形成される特異なドメインで種々の細胞プロセスに関与していると考えられています。しかし、構造学的解明は、ほとんどなされていません。そこで我々は、脂質ラフトの主要構成成分であるスフィンゴミエリン (SM) とコレステロール (Chol) の構造学的相互作用を解明するため、固体NMRのREDOR法という手法を用い、分子間の磁気双極子相互作用を調べました。その結果、Chol存在下でSMのアミド部位間に弱いながらも有意な双極子相互作用が観測されました(図3)。これは、CholがSMアミド部位での分子間水素結合形成を促進することを示唆する初めての実験事実で、SM分子間相互作用はCholの共存下において強められ、これにより脂質ラフトが形成されることが示唆されました。

b. 配向試料を用いた脂質膜中の立体構造とダイナミクスの固体NMR解析

固体NMRでの測定は、測定試料を磁場に対して55°傾けて(マジック角)、高速回転で行うのが一

般的です。しかし、高速試料回転による圧力変化や熱が発生し、環境変化に敏感な生体膜試料の測定には制約が多く存在しました。そこで、これらの課題を克服するため、脂質配向膜を用い固体NMRの検討を行った結果、試料を回転しないため圧力や温度の精密制御が可能で、高分解能化により高い精度で膜結合分子の構造・運動性を観測することに成功しました(図4)。

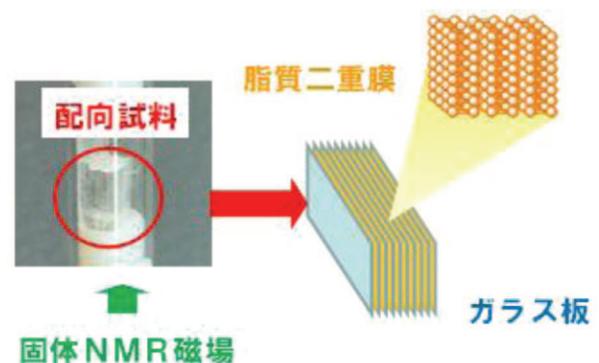


図4. ガラス膜に脂質二重膜をサンドイッチして固体NMRを測定する

c. タンパク質と脂質分子の相互作用解明

一方で、X線結晶解析においても新たな試みを始めています。その例として脂肪酸結合タンパク質 (FABP) を用いて、タンパクと脂質の相互作用の本質を解明するため研究を紹介します。FABPのサブタイプのひとつである FABP3 は広くヒトの臓器に発現しており、種々の疾患に関与しています。特に、FABP3 が示す、種々の脂肪酸に対する選択性

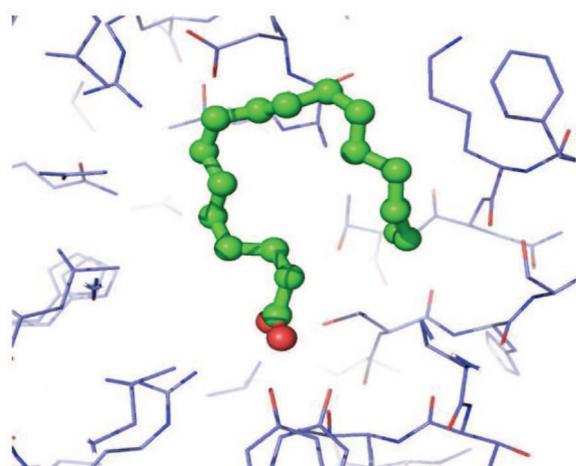


図5. 本プロジェクトによって初めて示された脂肪酸と FABP3 の超高分解 X 線結晶構造の例。中央の緑の分子が結合した脂肪酸

の機構や水分子の役割の解明に力を入れています。独自に構築した大量発現・精製法によって得られた FABP3 と約 15 種類以上の合成脂質リガンドとの複合体結晶を作製し、Spring8 において極低温下 1.0 Å 分解能を超える超高分解能 X 線結晶解析に成功しました。その結果、原子レベルでの詳細な脂質リガンド活性配座を決定し、従来報告されていた結合脂肪酸の構造を大幅に高精度することができました。これによって、真の脂肪酸-タンパク質相互作用を調べる基礎データを得ることができました。引き続き合成脂質リガンドとの X 線結晶解析のデータを構築し、同時に計算化学も取り入れた研究を進めます。

4. 将来への期待 (夢)

本プロジェクト研究では脂質分子の構造解析を通じて、機能分子である膜脂質や膜タンパク質の構造や動態を解明するための学術的基盤を作ることを目指しています。これらの研究成果は、未だ課題の多い生体膜研究での基盤技術にもなり、また疾患の原因解明や新薬の研究開発に役立つことが大いに期待されます (図6)。

脂質活性構造から展開する応用分野

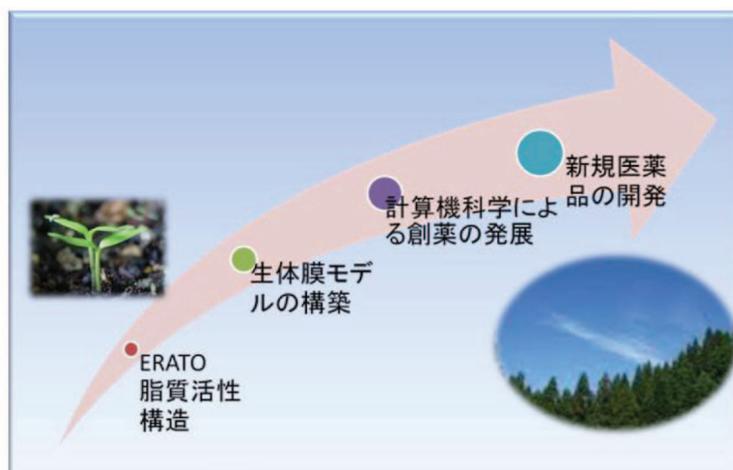


図6. 芽生えたばかりの二葉から大きな森を形成する研究開発につなげようと頑張っています