戦略的創造研究推進事業
ERATO
追跡評価用資料

「村田脂質活性構造」プロジェクト
(2010.10～2017.3)

研究総括：村田 道雄

2023 年 3 月

目次

要旨 1
プロジェクトの展開状況および波及効果(まとめ図)..... 2
第 1 章 プロジェクトの概要..... 3
1.1 研究期間..... 3
1.2 プロジェクト発足に至る科学技術や社会の背景..... 3
1.2.1 科学技術の背景..... 3
1.2.2 社会の背景..... 4
1.3 プロジェクトのねらい..... 5
1.4 研究体制..... 6
1.5 プロジェクト終了時点での研究成果やその意義..... 7
1.5.1 脂質ラフトのナノドメイン観察と計測..... 7
1.5.2 脂肪酸結合タンパク質 FABP3 の結合親和性の機構解明と汎用評価法の確立 10
1.5.3 難水溶性リガンドおよび膜タンパク質の構造解析へ向けた技術開発..... 13
第 2 章 プロジェクト終了から現在に至る状況..... 16
2.1 プロジェクトの終了後の状況に関する基礎データ..... 16
2.1.1 調査方法 16
2.1.2 競争的研究資金の獲得状況..... 18
2.1.3 論文の発表状況..... 19
2.1.4 特許の出願・公開・登録状況..... 24
2.1.5 受賞状況 24
2.1.6 ベンチャー企業の設立状況..... 25
2.2 プロジェクト終了後の発展状況..... 26
2.2.1 脂質ラフトの構造解明と応用..... 26
2.2.2 膜タンパク質結合脂質と膜作用天然生理活性物質の作用機構の解明..... 38
2.2.3 膜脂質、膜タンパク質の構造解析の革新的技術開発..... 51
2.3 プロジェクト参加研究者の活動状況..... 57
2.4 第 2 章まとめ..... 59
第 3 章 プロジェクト成果の波及と展望..... 62
3.1 科学技術への波及と展望..... 62
3.1.1 新規な理論や概念の提唱..... 62
3.1.2 新たな研究領域や研究の潮流への貢献..... 62
3.1.3 国際共同研究..... 63
3.1.4 科学技術への波及のまとめと展望..... 63
3.2 社会経済への波及と展望..... 65

3.2.1 社会実装の可能性. 65
3.2.2 社会経済への波及のまとめと展望. 66
【引用文献】 67

要旨

本資料は、戦略的創造研究推進事業の「村田脂質活性構造」プロジェクト(2010 年 10 月～2017 年 3 月。以後、本プロジェクトと記載)において、研究終了後一定期間を経過した後、副次的効果を含めて研究成果の発展状況や活用状況を明らかにし、国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)事業および事業運営の改善などに資するために、追跡調査を実施した結果をまとめたものである。

本プロジェクトの目標は、戦略目標「生命システムの動作原理の解明と活用のための基盤技術の創出」のもと、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礎を形成し、究極的には創薬研究において利用可能な情報と科学手法を確立することである。

第 1 章では、本プロジェクト期間中の研究成果をまとめた。本プロジェクトでは、脂質膜のマイクロドメイン、タンパク質内部脂質、膜タンパク質周辺脂質の 3 つの研究目標が設定され、3 研究グループが設置、運営され、相互に連携しながら研究が進められた。

生体膜中脂質分子グループはマイクロドメインを担当し、膜タンパク質周辺脂質について実験手法を確立し構造を解析した。位置特異的に同位体修飾した脂質の固体 NMR を測定して脂質二重膜上に形成される脂質ラフト分子基盤を解明した。

膜タンパク質リガンド構造グループは、タンパク質内部脂質および膜タンパク質周辺脂質を担当し、水に溶けない脂質がタンパク質に結合する際の親和性を測定する技術を開発して膜タンパク質－疎水性リガンドの相互作用を解析した。また、新開発の蛍光プローブを用いて、脂質ラフト特異的なタンパク質・脂質相互認識を観察した。

リガンド活性配座グループは、タンパク質内部脂質および膜タンパク質周辺脂質を担当し、極低温と室温では異なる脂質リガンドの三次元構造と運動性を評価するために、フレキシブルな脂質の構造を正確に決定する方法を、SPring-8 および SACLA を利用して結晶 X 線回折を中心に確立した。

第 2 章では、本プロジェクト終了後から現在に至るまでの研究成果の発展についてまとめた。本プロジェクト終了後も研究参加者は、科研費・挑戦的萌芽研究、科研費・基盤研究、科研費・新学術領域研究などの競争的資金を獲得し、本プロジェクトの研究成果を基に研究を発展させている。脂質ラフトでは、微細構造の研究へと発展させるとともに、膜作用分子の構造と機能の解明のために合成化学を駆使した研究を展開している。また、創薬基盤研究を意識したアンフォテリシン B、アンフィジノール 3 など脂質膜を作用部位とする生理活性物質の構造と機能の解明で成果をあげている。

第 3 章では、科学技術的および社会経済的な観点から本プロジェクトが与えた波及効果についてまとめた。科学技術的には、膜タンパク質と脂質の相互作用が重要であることを提起し、「活性脂質構造学」といえる領域を開拓し、そのための新しい技術を開発した。社会経済的には、超精密構造解析による脂質活性構造の解析が創薬などの分野に適用され、社会が求めるより高度な医薬品開発への応用技術へと発展することが期待されている。

プロジェクトの展開状況および波及効果（まとめ図）

戦略目標、達成目標/プロジェクトの目標（ねらい）

目的・目標

戦略目標：
「生命システムの動作原理の解明と活用のための基盤技術の創出」

プロジェクト背景（村田）
基盤研究(S)「分子複合体としての生体膜の構造と機能」(2006-2010)にて、脂質マイクロドメイン構造における分子認識を研究、ラフト形成の分子基盤の一部を解明した。

プロジェクトの目標
1.マイクロドメイン： 膜脂質分子などフレキシブルで疎水的な分子について、脂質二重膜における立体配座と相互作用を正確に解析し、細胞膜のドメイン形成（脂質ラフト等）の物理化学的性質とその分子基盤を解明する。

2.タンパク質内部脂質：
タンパク質に結合した脂質性リガンドの活性配座を解析し、脂質分子とタンパク質の相互作用に関して汎用的な研究手法および共通概念を創出する。

3.膜タンパク質周辺脂質：
前記で得られた知見と技術をもとに、膜タンパク質に結合することによって機能している周辺脂質や脂質性リガンド分子の立体構造および機能を解明する。

インプット

研究体制

研究総括
村田道雄(大阪大学理学研究科教授)

研究体制
1.生体膜中脂質分子グループ（村田道雄）

2.膜タンパク質リガンド構造グループ（松岡茂）

3.リガンド活性配座グループ（杉山成）

アクティビティ/アウトプット

研究成果のまとめ

論文

成果論文数	72
発展論文数	46

成果論文：期間中(2010～2017)および期間中の成果を終了後に発表

発展論文：ERATOの成果を終了後に展開・発展させた研究の論文

特許出願・登録

		期間中	終了後
出願	国内	3	5
	海外	3	2
登録	国内	3	2
	海外	0	0

アウトリーチ活動

村田、松岡は著書、教科書や総説の分担執筆、杉山は結晶化と構造解析の総説など啓発活動に取り組んだ。
大阪大学広報誌、大学祭などで研究内容をビジュアルに解説した。

マネジメント

共同研究、委託研究の活用
若手研究員の積極的採用、
研究の他に特任教員の経験もさせることによりキャリアパスを支援した。
情報交換会の定期開催で若手研究者間のネットワーク形成に努めた。

アウトカム（short/mid-term）

期間中の成果～

脂質活性構造の解明とその技術基盤の確立
1 脂質ラフトのナノドメイン観察と計測
- 固体NMRによる脂質間相互作用の解析（スフィンゴミエリン(SM)分子間水素結合の発見とラフトドメインサイズの推定）
- ラマンイメージングによるラフトモデル膜でのプローブ分子の観察
- 新規蛍光標識SMによる脂質分布の観察

2 脂肪酸結合タンパク質(FABP3)の結合親和性の機構解明と汎用評価法の確立
- 等温滴定熱量測定ITCを用いた結合親和性の評価
- 表面プラズモン共鳴SPR を用いたFABP3 結合親和性評価
- 超高分解能結晶構造解析による原子レベルでの脂肪酸の活性配座決定
- 計算科学によるFABP3の脂肪酸結合機構と取り込み機構の解明

3 難水溶性リガンドおよび膜タンパク質の構造解析に向けた技術開発
- タンパク質の凝固ゲル中結晶化技術の開発
- 膜タンパク質と周辺脂質の相互作用解析のためのNMR実験手法の開発
- 膜タンパク質のX線構造解析に関する実験手法の開発(重原子標識化合物によるX線自由電子レーザーXFELを利用して連続フェムト秒結晶構造解析)

追跡調査時点

1 脂質ラフトの構造解明と応用
- スフィンゴミエリン(SM)が形成するナノドメインの解明
- エナンチオマーを用いたナノサブドメインの観察
- 脂質二重膜の相転移現象とアシル鎖の深度依存的溶解
- 低流量走査電子線散乱法によるラフト構造の解明
- SMとの相互作用に及ぼす糖化コレステロールの影響の解明
- 古細菌の細胞膜の熱安定性の機構の解明
- 局所麻酔薬の作用発現のメカニズムはラフト破壊による
- 保湿成分セラミドの脂質膜中での挙動の観察

2 膜タンパク質結合脂質と膜作用天然生理活性物質の作用機構の解明
- 膜タンパク質CD1に結合する生理活性セラミドの構造解析
- ガングリオシドの膜タンパク質に対する作用機構の解析
- バクテリオロドプシンに結合する脂質の同定と機能の解明
- 脂質膜に作用する天然生理活性物質の作用機構の解析（アンフォテリシンB、アンフィジノール3、セオネラミド、バフィロマイシン等の誘導体合成との連携した作用機構の解析）
- ステロイド骨格サポニンOSW-1による二重膜破壊機構

3 膜脂質、膜タンパク質の構造解析の革新的技術開発
- 蛍光標識脂質合成（FRETによる脂質相互作用の評価）
- 脂質/膜タンパク質間の相互作用の解析手法および結合する物質のスクリーニング法の開発
- 透析膜を用いたヒドロゲル中でのタンパク質の結晶化
- 難水溶性化合物ータンパク質複合体の凝固ゲル中結晶化装置の開発
- 超微細バブルによるタンパク質の結晶核形成

科学技術的および社会・経済的な波及効果

科学技術の進歩への貢献： タンパク質主体の研究から、生体膜中でのタンパク質が膜脂質複合体として存在していることに注目。①脂質ラフトの分子論的解析と計算科学に貢献、②タンパク質による脂質認識機構の解明、③膜作用性天然物の機構解明、④難水溶性リガンド研究法への貢献(新規結晶化と構造解析)

社会・経済への貢献： 医薬の分子標的となる生体膜中のタンパク質脂質複合体の構造と挙動を知ることは、新しい創薬研究に基礎的な知見と方法論を提供する。
創薬に協力（松岡、狂犬病治療薬）、新しい結晶化技術（杉山）。

研究プロジェクトの実施と展開(共同研究、助成金)

委託研究：九大・大石徹、松森信明、東京工大・村上聡、阪大・井上豪、深瀬浩一、北大・前仲勝実
共同研究：九大・松森信明、京大・楠見明弘、鈴木健一、理研・袖岡幹子、岩田想、南後恵理子、阪大・溝端栄一
国際： Abo Akademi Univ・JP Slotte、Stony Brook Univ・E London

村田 ・基盤研究(S)：脂質分子の動的配座とドメイン構造(2016～20)、その他挑戦的研究(萌芽)など
・基盤研究(A)：生体の非平衡系を再現できる脂質二重膜の構築と動的脂質集合体の描像(2021～24)
松岡 ・基盤研究(B) 2件：AIMのリガンド認識(2017～2019)、ペプチド擬態化合物 (2020～22)
・AMED低分子医薬品の次世代デザイン：新規低分子ペプチドミメティクス設計法の開発と検証(2020～22)
杉山 ・基盤研究(C)2件：骨形成の脂溶性シグナル (2019～21)、FGF5阻害機序の解明(2020～23)
木下 ・基盤研究(B, C)：電子線ナノ散乱によるラフト構造(2017～19)、脂質ラフトに作用する局所麻酔薬(2020～22)

受賞・人材育成

村田道雄：2014年 英国王立化学会フェロー(Royal Society of Chemistry)
松岡GL：大阪大学特任准教授→東京大学特任准教授→大分大学特任准教授→同特任教授
杉山GL：大阪大学特任准教授→高知大学教授

アウトカム（long-term）/インパクト

今後想定される波及効果

「活性脂質構造学」の発展
- タンパク質の物理的手段が主体であったこれまでの構造生物学の分野に、脂質を含めた膜タンパク質−脂質複合体として構造および相互作用を解析すること、さらに合成化学を駆使した標識体を活用することの重要性を示した。
- 本プロジェクトをきっかけに、新しい構造生物学の分野が発展する。

学術研究への貢献
- 複数の手法を用いて多角的に生体膜にアプローチする「脂質膜統合分析プラットフォーム」の構築
- 脂質結合タンパク質の調製法、脂質タンパク質複合体の結晶化法等の提供
- 新たに合成した種々の標識体、脂質類似体は脂質ドメインの研究に有効なツールになる

創薬への利用
- 創薬精密化：AI創薬、インシリコ創薬での利用
  医薬の標的となる膜タンパク質を含む分子集合体の微細構造が解析されることにより、さらに選択的で有用な医薬が分子設計できる。
- 膜作用型天然物の結合構造と作用機作の解析

第 1 章　プロジェクトの概要

本調査の対象である ERATO「村田脂質活性構造プロジェクト(以後、本プロジェクトと記載)」(研究総括：大阪大学大学院理学研究科教授村田道雄)の概要を下記に示す。

1.1　研究期間

研究期間は 2010 年 10 月～2017 年 3 月。但し、最後の 1 年(2016 年 4 月～2017 年 3 月)は特別重点期間[1]として継続された。

1.2　プロジェクト発足に至る科学技術や社会の背景

1.2.1　科学技術の背景

ヒトもしくは動物を構成する細胞のひとつひとつは、外部と内部を隔てる細胞膜に包まれている。この膜は、図 1-1 に示したように脂質二重層と呼ばれる構造を取っており、構成成分の多くは脂質であるので、細胞膜の機能を詳細に調べるためには生体内の機能を発揮している状態の脂質の構造(活性構造)を調べる必要があった。

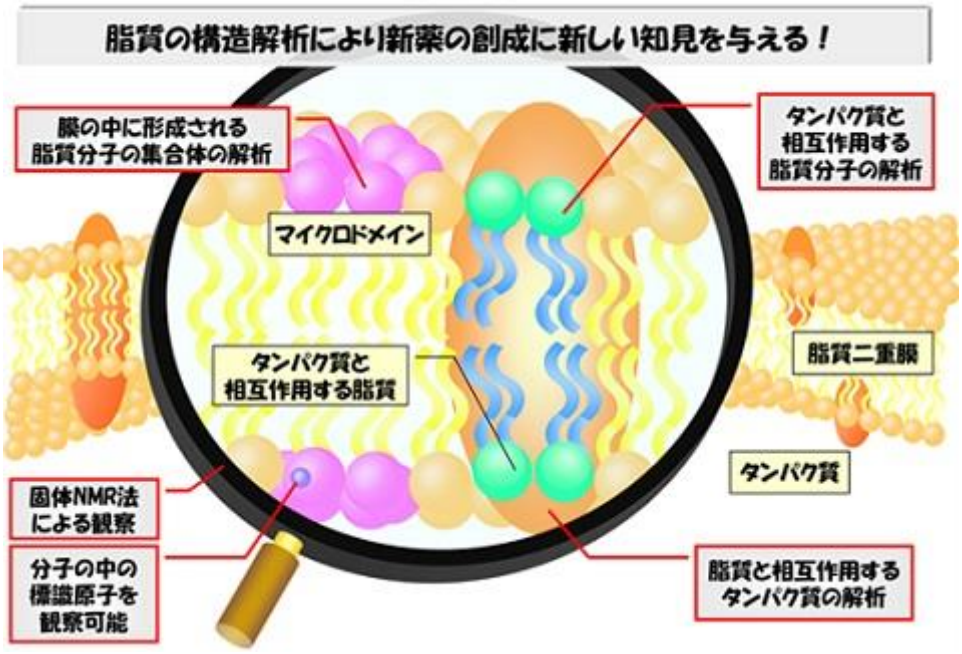


図 1-1　本プロジェクト研究内容の模式図[2]

[1] ERATO プロジェクトにおいて、約 5 年間の研究期間終了後にも、さらに優れた研究成果が得られると期待され、かつ研究主監会議が特に認めるものについて、約 1 年の特別重点期間を設けることができるようにしている。https://www.jst.go.jp/contract/kisoken/h28/h28erato303manua160401.pdf

[2] 研究終了報告書 p1 研究概要図

従来、生体膜の機能の大部分は膜タンパク質が担っており、膜脂質は二重膜の材料であると考えられてきたが、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た。なかでも、細胞膜に形成される脂質ラフト[3]は、免疫細胞応答やウイルスの侵入、シグナル伝達といった種々の細胞プロセスに関与していると考えられるようになった。脂質ラフトは、スフィンゴミエリンとコレステロールを主要成分とし、細胞膜上のマイクロドメインとして存在する。脂質ラフトは生命現象解明の新しい概念として注目を集めており、生物学的・物理的性質に関する研究が精力的に行われてきた。

一方、これら従来の研究の大部分は、イメージングによる生体膜観察もしくは物理学的実験手法を用いた巨視的な研究であり、分子構造に根ざした化学的研究は大幅に遅れている。その理由として、集合と離散を繰り返す脂質ラフトの不安定性と、有効な構造解析法の欠如が挙げられる。

脂質の活性構造を解明するにあたって、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脂質の姿を捉えられないことが従来の X 線結晶構造解析法だけでは解決できない問題となっていた。それを解決するためには、新たな手法の開発も含め、固体 NMR、超精密 X 線結晶構造解析、そして計算科学や精密有機合成化学など最先端の技術を駆使した研究が必要とされた。

1.2.2 社会の背景

創薬の分子標的の多くは、膜タンパク質や細胞内外で膜もしくは膜タンパク質と相互作用する物質であるが、従来は分子標的物質を単独に取り上げて医薬の結合対象とし、膜の介在を考慮しないままに創薬研究が行われてきた。より有効な医薬品創出のためには、膜や、膜タンパク質と脂質の相互作用を、すなわち脂質の活性構造を解析することにより明らかにし、その構造を標的とした精密な創薬研究が必要とされる。

また、医薬品開発において、標的タンパク質と化合物との複合体の X 線構造解析が、化合物の親和性および特性を最適化することで新規リード化合物を迅速に見つける手段として利用されている。しかし、開発初期の新薬候補化合物の多くは一般的に疎水性が高く、そのような脂溶性化合物と標的タンパク質複合体の結晶の作製は困難であることから、その作製法の開発が期待されていた。

[3] 脂質ラフト：スフィンゴミエリンに代表されるスフィンゴ脂質とコレステロールを主要脂質とする、細胞膜上の微小領域。脂質ラフトはゲル相と液晶相の中間的な性質を持っており、人工脂質膜では秩序液体相と呼ばれる。Simons and Ikonen, Nature, 387, 569, 1997

1.3　プロジェクトのねらい

村田は本プロジェクトの前に、研究代表者として科研費基盤研究(S)「分子複合体としての生体膜の構造と機能」(2006 年度～2010 年度)に取り組み、その研究が本プロジェクトの布石となった。

脂質ラフト構造への本格的取り組みに先立ち、1990 年代に村田と松森信明(現 九州大学教授)は天然物の鎖状部分に存在する不斉炭素の立体化学を NMR(核磁気共鳴装置)で決定する方法論について検討し、J-based configuration analysis(JBCA)を確立した[4, 5]。続いて、村田らは脂質膜に作用する天然物の膜中での複合体構造の NMR による解析を始めた。本プロジェクトに先行したいくつかの助成金プロジェクトで、同位体標識化合物の合成と、合成した同位体標識化合物を用いた固体 NMR を駆使して、抗真菌作用を示すアンフィジノール 3 やアンフォテリシン B の脂質膜中での構造解析に取り組んだ後、科研費基盤研究(S)「分子複合体としての生体膜の構造と機能」(2006 年度～2010 年度)および、科研費基盤研究(B)「バイセルを用いた脂質膜における分子複合体解析」(2008 年度～2010 年度)において、脂質ラフトを含む脂質膜内の高次の分子複合体の構造解析の研究を本格的に開始し、いくつかの予備的成果を得た後、本プロジェクトに取り組んだ。

本プロジェクトでは、これまで構造決定が困難であった膜タンパク質と周辺脂質の相互の構造と機能の解明を目標として、そのための新しい研究手法、固体 NMR、超精密 X 線結晶構造解析、そして計算科学や精密有機合成化学などの先端的技術の活用も目指した。

具体的な戦略として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観点から捉え直し、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めざした。そのためには、「脂質二重膜自体の分子基盤(マイクロドメイン)を明らかにする」ことに加えて、「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(タンパク質内部脂質)、および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(膜タンパク質周辺脂質)が関わる相互作用の解明を行う」ことが重要である。また、生命科学における従来の実験手法では取扱い困難であった脂質等の難水溶性物質を構造生物学の研究対象にするために、「新たな方法論の必要性」が指摘されていた。この点も本プロジェクトにおいて重点的に取り上げ、実際の脂質とタンパク質の相互作用を解明する研究課題を通じて解決を図った。本プロジェクトでは、JST 戦略目標「生命システムの動作原理の解明と活用のための基盤技術の創出」に資するために、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礎を形成することをめざした(図 1-2)。

---

[4] Matsumori et al, J Org Chem, 64, 866, 1999

[5] 同時期にハーバード大学の岸義人らは、天然物の部分構造に相当するモデル化合物のすべての立体異性体を化学合成し、その NMR データをデータベース化しておくことにより、あとは天然物と比較するだけで立体構造を決定する方法を確立した(universal NMR data base; UDB)。Kobayashi et al, J Am Chem Soc, 123, 2076, 2001

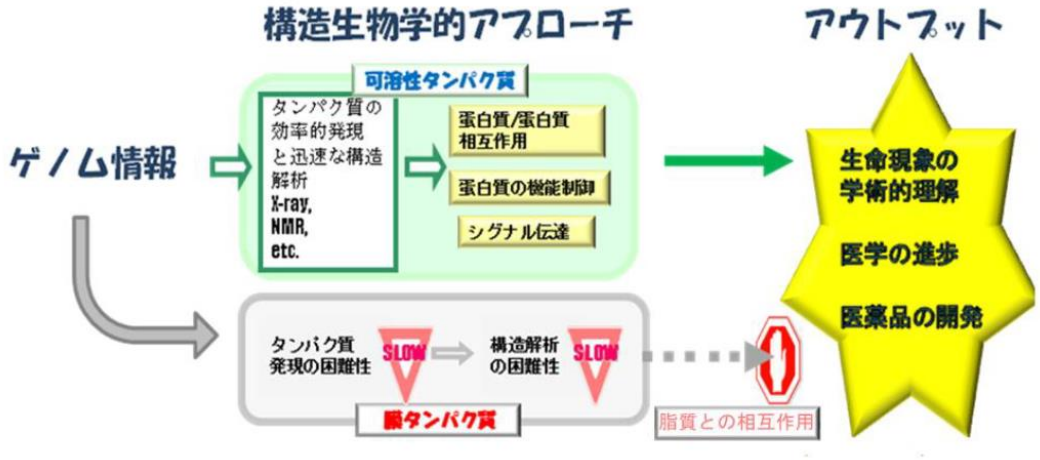


図 1-2　膜タンパク質・膜脂質研究における諸問題[6]

1.4　研究体制

本プロジェクトでは次の 3 研究グループを置き、相互に連携しながら研究を進めた。

(1) 生体膜中脂質分子グループ：マイクロドメインを担当、膜タンパク質周辺脂質について実験手法の確立を行った。

(2) 膜タンパク質リガンド構造グループ：膜タンパク質周辺脂質およびタンパク質内部脂質を担当、水に溶けない脂質がタンパク質に結合する際の親和性を測定する技術を開発した。

(3) リガンド活性配座グループ：タンパク質内部脂質および膜タンパク質周辺脂質を担当、脂質リガンドの三次元構造と運動性を評価するために、フレキシブルな脂質の構造を決定する方法を、SPing-8 および SACLA などを利用して確立した。

表 1-1　研究グループと人員および実施場所(2015 年度)

グループ名	生体膜中脂質分子グループ	膜タンパク質リガンド構造グループ	リガンド活性配座グループ(*)	事務所
実施場所	大阪大学 理学研究科	大阪大学 理学研究科	大阪大学 理学研究科	大阪大学 理学研究科
リーダー	村田 道雄	松岡 茂	杉山 成	研究推進委員 佐藤文憲主任 +1 名
研究員	2 名	2 名	0 名	
技術員	0 名	0 名	0 名	
研究補助員	1 名	1 名	0 名	
RA	2 名	2 名	0 名	
計	6 名	6 名	1 名(*)	2 名
総計	15 名			

注) グループ人員若干変動、2011 年度(開始年度)16 名、最大は 2012 年度で総計 19 名。

(*) リガンド活性配座グループには 2013 年度末までは 3～4 名が在籍していたが、その後縮小し、上記表の 2015 年度は他のグループと共同で研究を継続した。

[6] 研究終了報告書 p6 図 1

1.5　プロジェクト終了時点での研究成果やその意義

本プロジェクトの研究は、1.4 節に示した 3 つの研究グループ、生体膜中脂質分子グループ、膜タンパク質リガンド構造グループ、リガンド活性配座グループ、によって実施され、以下のような特筆すべき成果が得られた。

1.脂質ラフトのナノドメイン観察と計測

2.脂肪酸結合タンパク質 FABP3 の結合親和性の機構解明と汎用評価法の確立

3.難水溶性リガンドおよび膜タンパク質の構造解析へ向けた技術開発

1.は、生体膜中脂質分子グループが中心となり得られた成果であり、2.は、膜タンパク質リガンド構造グループとリガンド活性配座グループが中心となり得られた成果で、3.は、リガンド活性配座グループが中心となり得られた成果である。

それぞれの項目の主要な研究成果についての要約を本節にまとめた。重要な課題の発展については第 2 章で記述する。

1.5.1　脂質ラフトのナノドメイン観察と計測

スフィンゴミエリン(SM)などの特定の脂質が集まったマイクロドメインである脂質ラフトは、数 nm から数十 nm の特殊領域として多数点在しており、この脂質ラフトは、シグナル伝達、免疫細胞応答やウイルスの侵入といった種々の細胞プロセスに関与していると考えられている。脂質ラフトは、SM とコレステロール(Cho)を主成分としており、周囲の生体膜とは異なる性質を持っている(図 1-3)。この脂質ラフトの、シグナル伝達などの生理的に重要な働きには分子間の相互作用が重要であるが、本プロジェクトの第一の中心課題は、主に固体 NMR を解析手法として脂質ラフトの構造を解明するとともに、脂質ラフトの構成成分相互の分子認識機構を解明することであった。

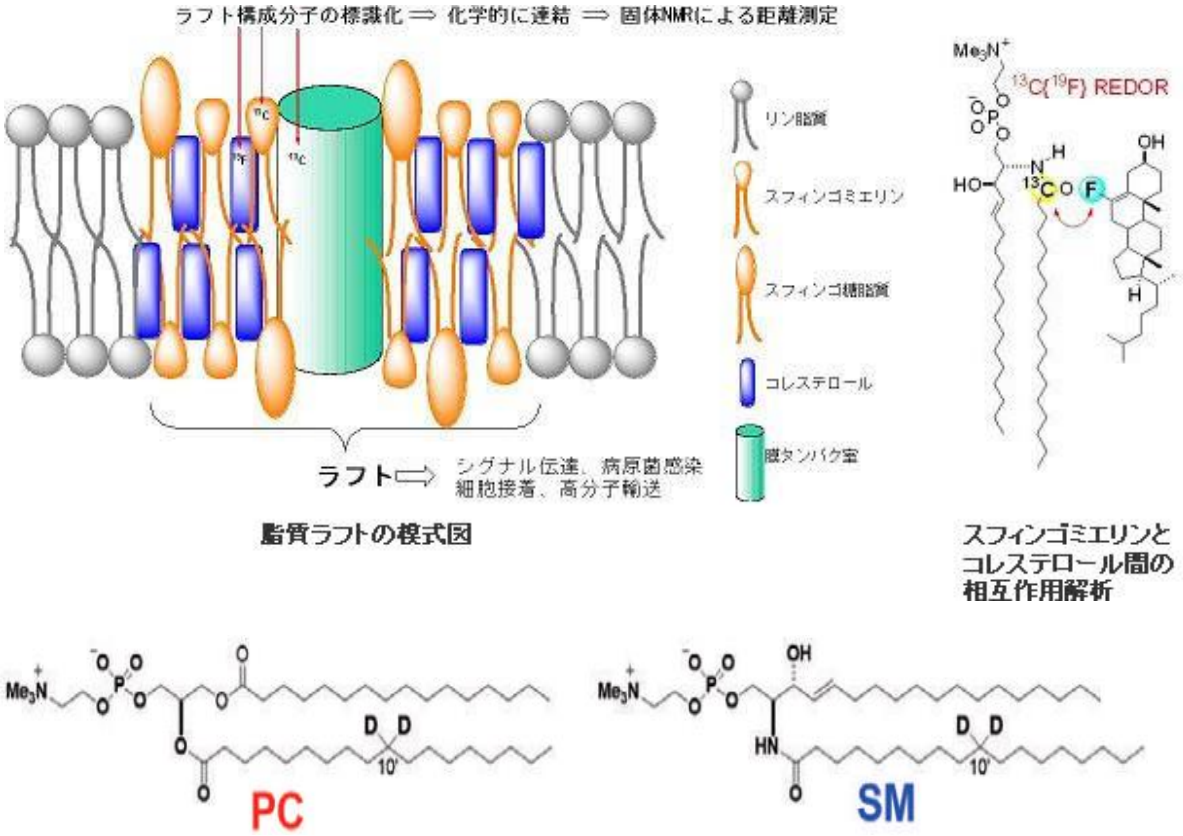


図 1-3　脂質ラフトの概念図と構成成分[7]

本研究ではマイクロドメインという相分離した脂質の状態において、脂質ラフトの主要構成脂質である SM 分子に焦点を絞り、立体配座、分子配向、分子間相互作用の解析を行うことによって、SM によるラフト形成の動的分子機構を解明することを目標とした。大きな成果として、脂質ラフトのドメイン観察と計測、固体 NMR により動的な脂質間相互作用の観測に成功し、新たなドメイン構造を提案した。

(1)固体 NMR による脂質間相互作用の解析(SM 分子間水素結合の発見とラフトドメインサイズの推定)

バイセルはアルキル鎖の長いリン脂質と短いリン脂質からなるディスク状の脂質会合体であり(図 1-4)、長鎖リン脂質が形成する平面部分は二重膜構造を有していることから、最小の脂質二重膜モデルと考えられている。村田らは、スフィンゴミエリン(SM)と DHPC(dihexanoyl phosphatidylcholine)からなるバイセルを用いて通常の溶液 NMR により SM アミド近傍の立体配座を推定した[1]。

[7] 大阪大学・村田研究室 HP　脂質ラフト説明図　http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/murata/research.html

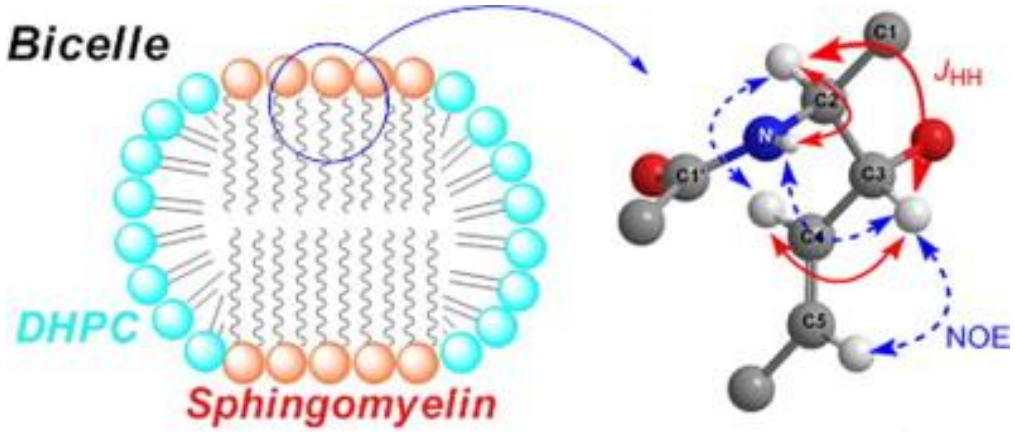


図 1-4　バイセルの概念図と構成成分[8]

次にアミド部分の膜中での配向を、SM のアミド部分の ^{13}C および ^{15}N の二重標識体を化学合成し、脂質膜環境で固体 NMR 測定を行うことで解析を試みた。その結果、アミドの回転軸方向に関しては、コレステロール(Cho)の有無による違いはほとんど見られなかった[2]。従来、Cho のヒドロキシ基は、SM のアミド部分やヒドロキシ基と相互作用することで脂質ラフトが形成されると考えられていたが、得られた結果は従来の予想を覆すものであった。

一方、アミドの秩序パラメータは Cho によって顕著に上昇しており、アミドの揺らぎが低下していることが分かった。この結果は、SM 分子間水素結合によってラフト形成が促進されていることを強く示唆していた。すなわち、Cho の存在によって、SM のアミド間の水素結合形成が促進されることで、アミドの配向自体はそれほど変化せずに揺らぎが抑制されたと考えられる。

以上より、SM 分子間相互作用は Cho 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た。また、固体 NMR の測定によってドメインサイズを推定し、SM 集合体の周りに Cho が存在するナノクラスター構造(ナノドメイン)を提唱した。

また、SM、Cho、DOPC(dioleoyl-phosphatidylcholine)それぞれの重水素標識体を用いて 3 成分からなる脂質膜でラフト様ドメインを形成し、相分離した状態での脂質組成(モル%)を求めることに成功した[3]。それによると、ラフト様ドメインにおける SM の揺らぎは、ドメインに 16%共存する DOPC の影響をほとんど受けておらず、SM や Cho、DOPC が混和しないことを示唆していた。この結果は、ナノクラスター説を支持するものである。

SM のアルキル鎖部分の解析では、SM の部位選択的に重水素標識した同位体異性体を 19 種類合成し、重水素 NMR 測定によって各部位の脂質膜中での動的挙動を見積もった。その結果、Cho が SM のアルキル鎖に与える影響を精査することができ、Cho の SM 膜中での存在位置を推定することが可能になり、ラフト形成の分子基盤を探る上で重要な情報を得ることができた[4]。

[8] 文献[1] Graphical abstract

以上、固体 NMR と化学合成による同位体標識脂質プローブを組み合わせることにより、ラフト形成のモデルとして、NMR 解析でバイセル中での SM の配座、脂質膜中の SM アミドの配向、SM アルキル鎖の動的解析等を行い、SM の脂質膜中での配座、分子間相互作用、動的挙動を明らかにした。

(2)ラマンイメージングによるラフトモデル膜でのプローブ分子の観察

ナノドメイン形成が顕微鏡的な視野に相当するマクロな相状態に与える影響を検討するために、相分離状態において秩序液体脂質相(秩序相：Lo)に分配するスフィンゴミエリン(SM)類似のプローブ分子の開発を行った。開発にあたっては、従来用いられていた蛍光イメージング観察のように、少量添加した標識プローブを観測するのではなく、脂質分子そのものを観測できるラマンイメージングに着目した(国立研究開発法人理化学研究所袖岡幹子らとの共同研究)。種々のラマンプローブを設計・合成した結果[5]、検出感度、SM との類似性において優れていた diyne-SM を用いることとし、その分布を単分子膜で観測するために、ラマン顕微鏡の高感度化を進めた。その結果、人工ラフト膜において diyne-SM の濃度は Lo 領域の中心から周辺の無秩序液体相(無秩序相：Ld)領域へと連続的に減少することがはじめて明らかになった。この結果は、これまで描かれてきた単純なラフト/非ラフト側方二相共存モデルとは異なり、新たなラフトの描像を提起している。この連続的な Lo から Ld への変化は、ナノドメインが Lo 内部に形成されており、ドメインの密度が連続的に変化していることを示唆している[6]。この成果はプレスリリースされた[9]。

以上、本 1.5.1 項では脂質ラフトを構成する脂質について、その配座および配向、動的挙動の解析し、さらに多成分系におけるラフトおよび非ラフト相への分配比の解明に成功した。これにより、脂質ラフト形成の分子基盤に迫ることができた。また、本成果は、脂質膜の分子動力学(MD)シミュレーションの進歩に必要な正確な実験パラメータを供することができた。さらに、袖岡との共同研究において、ラマンプローブを用いることで SM 濃度がラフト領域の中心から外側へと“徐々に”減少していくことを可視化することに成功した。この結果は、これまでに想像されてきたラフトモデル、すなわち二相分離とは異なる描像を提起している。

1.5.2　脂肪酸結合タンパク質 FABP3 の結合親和性の機構解明と汎用評価法の確立

脂質の生理機能に関連するタンパク質の多くが創薬の標的として注目を集めている。脂質を結合、認識するタンパク質には、幅広い基質選択性を示すものが多い一方で、脂質の中には、わずかな構造の違いにより、正反対の生理作用を示す例も多くみられる。例えば、多価不飽和脂肪酸では、アルキル鎖末端からの不飽和結合の位置ω-6/ω-3 により、炎症性/抗炎症性のように異なる生理作用が見られる。この分子機構を知るためには、脂質-タンパク質結合親和性の精密評価が不可欠である。疎水性の高い脂質では、非特異吸着によ

[9] プレスリリース　https://www.jst.go.jp/pr/announce/20150331/index.html

りタンパク質への結合親和性が過大評価される場合と、水中の実効濃度の低さから結合親和性が過小評価される場合の両極端がある。

本プロジェクトでは、発現、精製が比較的容易で、脂質複合体の構造に関する知見がある程度集積している脂肪酸結合タンパク質 FABP[10](fatty acid binding protein)を研究対象とし、新しい方法論を開発した。生体内における脂質分子の存在状態を考慮したリポソーム媒介等温滴定熱量測定(Isothermal Titration Calorimetry：ITC)を考案し、脂溶性化合物とその結合タンパク質について結合親和性の機構解明と汎用的評価法を確立した。また、同様の方法を表面プラズモン共鳴法にも応用した。これらの手法に加え、X 線結晶構造解析と計算科学により心筋型の FABP(FABP3)の脂肪酸結合選択性の解明に取り組んだ。

(1)等温滴定熱量測定を用いた FABP3 の結合評価法の確立

FABP3 は、心臓や筋肉、脳で高い発現が見られ、筋運動のエネルギー源(飽和脂肪酸)や脳内の信号伝達物質(多価不飽和脂肪酸)の細胞内輸送に関与すると考えられている。FABP3 の脂肪酸選択性に関しては、脂肪酸の鎖長・不飽和度により水への溶解性が大きく変化するため、同一条件での結合親和性の評価が不可能であり統一的な結果は得られていなかった。

等温滴定熱量測定(ITC)では、タンパク質・リガンド結合より生じる微小な熱変化を直接測定することにより、結合親和性と分子間相互作用にともなう熱力学パラメータの変化量を知ることができる。しかし、FABP3 水溶液に脂肪を酸緩衝液に懸濁して滴下しても結合熱は観察されなかった。そこで、生体内の脂肪酸は水溶液ではなく細胞膜や油滴に結合して存在することから、脂肪酸をリポソームに結合して添加することで非特異吸着や系外への析出、分離を防いだ(リポソーム媒介法)ところ、短鎖～極長鎖脂肪酸の FABP3 親和性の網羅的評価に成功した。その結果、FABP3 は C10～C18 脂肪酸に高い親和性を有し、ミトコンドリアのβ酸化基質の選択、運搬に適していることが明らかとなった[7]。

また、FABP の阻害剤リガンドのスクリーニングのために、特異的親和性評価法に用いる蛍光プローブの開発を行った。FABP3 と FABP4 の結合分子の親和性評価用プローブの開発に成功し、脂質ライブラリーを用いたスクリーニングの結果、いくつかのヒット化合物を得た[11]。

(2)表面プラズモン共鳴を用いた不飽和脂肪酸の FABP3 結合親和性評価

等温滴定熱量測定(ITC)で成功したリポソーム媒介法の、表面プラズモン共鳴(Surface plasmon resonance:SPR)への応用を試みた。SPR では、タンパク質(あるいはリガンド)をセンサーチップ上の金薄膜表面に固定化し、その上にリガンド(あるいはタンパク質)水溶

[10] FABP3 はβバレルと呼ばれるバケツ状の構造と 2 本のαヘリックスからなるフタの様な構造を持つ分子量 15kDa の水溶性タンパク質である。βバレル内の大きな空間に約 13 分子の水が存在し、その上に 1 分子の脂肪酸が結合する。

[11] 研究終了報告書 p117-126、論文未発表。

液を流す。タンパク質・リガンド相互作用による質量変化を金薄膜上の表面プラズモンの変化でモニターして結合/解離の速度を測定する。SPR で得られる反応速度論的パラメータは ITC では得られないため、ITC と相補的な相互作用解析法である。

SPR でもタンパク質かリガンドの一方を水溶液とする必要があるため、高疎水性化合物では非特異結合が問題となっていた。一方、リポソーム媒介法では、非特異結合を抑制することができ、濃度・時間依存的な結合量の増加が見られた。本研究により、リポソーム媒介法は高疎水性化合物の SPR 実験でも有用であることが示された[8]。

(3)超高分解能結晶構造解析による原子レベルでの脂肪酸の活性配座決定

FABP3 の脂肪酸分子認識の構造基盤を解明するためには、所望の脂肪酸のみを結合した FABP3-脂肪酸複合体を調製する必要がある。しかし、大腸菌で発現させ、精製した FABP3 サンプルは大腸菌由来の種々の脂肪酸を結合していた。つまり、FABP3 は組換え発現の時に一緒に結合してくる大腸菌由来の種々の内因性脂肪酸を取り除かないと、添加した脂肪酸の活性配座を観察できない。この問題を体温に近い 37℃でタンパク質の再フォールディングを行うことで解決し、鎖長の異なる脂肪酸(C10～C18)や不飽和度の異なる脂肪酸と FABP3 の複合体の結晶を作製した。

この結晶を用いて、シンクロトロン放射光(SPring-8)を用いて極低温下(100K)での X 線回折を行ったところ、ほぼ全ての複合体構造で 1.0Å を超える超高分解能の結晶構造を得ることができた。解析の結果、FABP3 の立体構造は、これまで報告されていたように、逆平行の β バレル構造を取っており、その中央にリガンド結合部位が存在していた。その結合部位に上から蓋をするように 2 個のヘリックスが位置していた。FABP3 の活性部位に注目すると、3 つの領域(Cluster1、Middle part、Cluster2)に分けることができる。Cluster1 は、極性残基/イオン性残基と 14 個の水分子によって水素結合ネットワークを形成している。Middle part は、疎水性残基が多く存在している。Cluster2 は、水分子と多様なアミノ酸残基によって形成されている。

上記の X 線回折で、6 種類の飽和脂肪酸(C8、C10、C12、C14、C16、C18)の全炭素原子のそれぞれは、非常に鮮明な電子密度を示し、ほぼ一定の活性配座をとっていることが初めて明らかとなった。これら別々の飽和脂肪酸と結合したそれぞれの FABP3 の複合体構造を重ね合わせたところ、異なる鎖長をもった脂肪酸の結合によっても、FABP3 の全体構造はほとんど変化しないことが分かった。したがって、誘導適合(Induced fit)での認識は起こっていないと考えられ、FABP3 の脂肪酸認識は、活性部位を形成しているアミノ酸側鎖と水素結合ネットワークを形成している水分子が主に関与していることが示唆された[7]。

(4)計算科学による FABP3 の脂肪酸結合機構と取り込み機構の解明

等温滴定熱量測定により明らかになった脂肪酸の鎖長選択性の分子機構を解明するために、X 線結晶構造解析のデータを基に分子動力学(MD)シミュレーションを行った。その結

果、FABP3 の結合サイト内では、高い親和性を示した C10～C18 脂肪酸のアルキル鎖が結合するべき場所に自由エネルギーの高い水分子(Cluster2)が配置されており、C10～C18 脂肪酸をエネルギーの損失無く結合する分子機構が備わっていることが明らかとなった。一方、C20 以上の脂肪酸は結合により比較的自由エネルギーが低い水分子(Cluster1)の秩序構造を乱し、これが原因となり結合親和性が低下することが示された。また、C8 以下の短鎖脂肪酸では、タンパク質の疎水性残基との接触面積が小さいため、十分な結合安定性を得られないことが示唆された[7]。

脂肪酸結合メカニズムの究明には、脂肪酸の出入口を特定する必要がある。その特定のために MD を用いて、生体温度における FABP3 の脂肪酸結合/非結合時の動的構造の違いを評価した。その結果、脂肪酸非結合時の FABP3 が結合ポケットを外部に大きく開き、脂肪酸の取り込みに有利な“完全開構造”をとることが初めて示された[9]。

以上、本 1.5.2 項で構築した疎水性化合物の精密親和性評価系は、創薬、生化学分野において広く応用可能な基盤技術になると期待される。また、超高分解の共結晶 X 線解析と MD 計算から、FABP3 の脂肪酸アルキル鎖長選択における水分子クラスターによる親和性調節機構を明らかにした。これらの知見は、幅広いリガンド選択性を有する脂質関連タンパク質の分子認識研究に、具体的なモデルを提供する。

1.5.3　難水溶性リガンドおよび膜タンパク質の構造解析へ向けた技術開発

近年、医薬品開発においてタンパク質の立体構造情報を用いた新薬創出が行われている。一般的に、標的タンパク質と化合物とのこの複合体結晶の作製には、化合物の溶けた溶液中に結晶を浸すことによって結晶中に化合物を拡散させて標的タンパク質分子と結合させる方法(浸漬法)が用いられる。しかし、開発初期の新薬候補化合物の多くは一般的に疎水性が高く、有機溶媒にしか溶けないことが多い。ところが、タンパク質結晶は脆くて軟らかいため、高濃度有機溶媒中にタンパク質結晶を浸漬させた場合、浸透圧変化による結晶の損傷によって構造解析が困難となる。そのため、標的タンパク質との複合体結晶を作製できるのは、水溶性かつ高親和性の化合物に限られていた。

(1)難水溶性リガンドのための凝固ゲル中結晶化技術の開発

上記の問題を解決するため、以前から開発を進めてきた凝固したゲル中結晶化技術を FABP3 に適用した[10]。本技術は、凝固したゲル中でタンパク質結晶を育成させる新規結晶化技術で、その特徴は、タンパク質結晶の機械的強度を向上させ、その結果として有機溶媒に対する耐性を飛躍的に向上させる点にある。この特徴を生かし、難水溶性化合物の溶解した高濃度有機溶媒中へ、凝固ゲル中タンパク質結晶を浸漬させることにより、従来法では実現できなかった、難水溶性化合物との複合体結晶を作製することのできる新規技術開発に成功した。

本研究では、難水溶性化合物として抗酸化剤 BHT(dibutylhydroxytoluene)を用いた。BHT は従来法では FABP3 との複合体結晶が得られないが、凝固ゲル中で育成させたアポ型 FABP3 結晶を BHT を含む 50%DMSO 含有水溶液に浸漬することによって、高分解能データ(1.4Å 分解能、SPring-8 にて)を収集できる共結晶を取得することに成功した。さらに、それらの回折データを用いて構造解析したところ、FABP3 の活性部位に結合した BHT 由来の電子密度を明確に観察することができた[12]。

(2)膜タンパク質と周辺脂質の相互作用解析のための NMR 実験手法の開発

バクテリオロドプシン(bR)は、高度好塩菌の一種である古細菌の細胞膜上に形成される紫膜に含まれる 7 回膜貫通型の膜タンパク質である。紫膜は約 25%の脂質と約 75%の bR で構成されており、三量体 bR が規則正しく並んだ 2 次元結晶構造を有している。bR は結晶構造解析の難しい膜タンパク質の中では、例外的に古くから分子構造が知られている。この bR を膜タンパク質のモデルとして用い、群馬大学園山正史との共同研究により、周辺脂質が bR の構造と機能に与える影響を調べた。

三量体構造を維持した部分的脱脂質 bR を調整し、脱脂質 bR とリポソームの超音波処理により再構成 bR を作製することにより、種々の脂質の bR の光サイクルに対する影響について検討した。光サイクルはレーザーフラッシュフォトリシス測定により、三量体構造は円二色性スペクトル測定と固体 NMR による化学シフト異方性(CSA)測定により評価を行った。

その結果、bR の機能的再構成の為に必要な脂質の条件として、頭部構造に酸性リン酸基を有することと、脂質膜の相状態が流動相を示すことが重要であることが示唆された[11]。

(3)膜タンパク質の X 線構造解析に関する実験手法の開発

タンパク質の構造変化を常温で損傷なく観察するためには、X 線自由電子レーザー(XFEL)を用いた連続フェムト秒結晶構造解析(SFX)が有効とされていた。しかし、従来の SFX においては膜タンパク質の絶対構造の決定が困難なことが多く、絶対構造の決定方法を確立することが強く望まれていた。

この問題を解決するために、異常散乱効果を有するヨウ素重原子を含む脂質様リガンドを合成し、これをバクテリオロドプシン(bR)の特定の位置に結合させ、その結晶を得ることに成功した。この結晶を用いて、大阪大学溝端栄一や理化学研究所の研究者らとの共同研究により、bR の絶対構造を、異常散乱法(SAD)、重原子同型置換法(SIR)、および、それらを組み合わせた方法(SIRAS)で決定できることを示した。すなわち、室温での非破壊構造の解析可能な XFEL を用いた SFX 法による膜タンパク質の結晶構造解析の位相決定を初

[12] 研究終了報告書 p47

めて実証した[13]。また、創薬ターゲットとして重要な膜タンパク質 G タンパク質共役受容体にも重原子標識界面活性剤が利用できることを示した[12]。

さらに、長年の光生物学の重要課題であった bR の光刺激のナノ秒からミリ秒間で生じる構造変化を時間分解 SFX 法によりフェムト秒の時間分解で解析することに成功し、光に起因する bR の構造変化によるプロトン輸送のメカニズムを解明した[13]。

以上、本 1.5.3 項の研究によって、従来法では実現できなかった難水溶性化合物と標的タンパク質との複合体結晶を容易に作製できた。特に凝固ゲル中の結晶を用いた浸漬法によって、従来困難視されていた難水溶性リガンドの結合構造解明や、構造からの創薬スクリーニングに大きく道を開いた。また、XFEL を用いた SFX によるタンパク質構造解析における実験上の課題の解決に本研究は重要な貢献をした。

[13] プレスリリース　https://www.jst.go.jp/pr/announce/20161101/index.html

第 2 章　プロジェクト終了から現在に至る状況

2.1　プロジェクトの終了後の状況に関する基礎データ

2.1.1　調査方法

調査は、文献調査(プロジェクト報告書、解説、原著論文など)、インターネットによる調査、各種データベースによる業績(論文・特許・受賞他)の調査からなる基礎データ調査と、プロジェクト関係者や外部有識者へのインタビュー調査を行った。これに基づき、本プロジェクト期間中の成果の調査時点での発展状況および波及効果等についてまとめた。

(1)基礎データ調査の方法

基礎データ調査については、基本的にプロジェクトメンバー[14]を対象として、プロジェクトの研究に関連した成果の発展状況について、文献による成果の把握と、論文や研究助成金の獲得状況等のデータ調査を行った。各項目について利用したデータベースと調査範囲等を下記に記す。

①競争的研究資金の獲得状況

プロジェクトメンバーを対象として、本プロジェクトの研究内容に関連している研究課題について調べ、表 2-1 に示した。プロジェクトメンバーが代表者のものについては、総額が 1 千万円以下のものも含めて示した。

データベースとしては、調査対象者の所属する研究室や本人の WEB サイトおよび KAKEN 科学研究費助成事業データベース等の競争的研究資金に関する検索サイトと、補助的に Google 等の検索サイトを利用した。

②論文

本プロジェクト期間中の成果に関する論文は、2010 年～2017 年に発表された論文の中で、プロジェクトの終了報告書に成果論文としてリストアップされている論文と、論文の著者アドレス及び助成金の情報に本プロジェクトの記載のあるものとした。研究終了報告書の成果論文リストの中で *in press*、*to be submitted* 等と表記があり、その後発表されたものについても基本的には期間中の論文とした。以下、これらの論文を「成果論文」と定義する。

本プロジェクト終了後の論文は、2018 年 1 月以降に発表され、かつ本プロジェクトメンバーが著者になっている論文を収集した(ただし、本プロジェクト期間中の論文に含むものは除く)。収集した論文の中で、本プロジェクトとの関連を Abstract、引用関係等で確

[14] 研究総括、グループリーダー

認し、関連のあるものを関連論文としてリストアップした。以下、これらの論文を「発展論文」と定義する。

データベースは、エルゼビア社の Scopus を利用した。

各論文についての評価の一つである FWCI(Field-Weighted Citation Impact)[15]、および Journal の指標となる CiteScore[16]についても収集した。

③特許の出願・登録状況

本プロジェクト期間中の特許は、プロジェクト終了報告書の成果リスト記載の特許とした。本プロジェクト終了後の特許は 2017 年 4 月以降に出願され、かつ、プロジェクトメンバーが発明者の特許とし、データベースは、主に PatentSQUARE(パナソニック(株))を利用し、補助的に特許情報プラットフォーム(工業所有権情報・研修館)と espacenet(European Patent Office)を利用した。

④受賞

プロジェクトメンバーの本プロジェクト終了後の受賞を調査対象者の所属する研究室や本人の WEB サイトの調査、Google 等の検索サイトで収集後、研究総括およびグループリーダーに確認した。

⑤ベンチャー

インターネット検索やベンチャー情報の記載のあるデータベースを用いて検索した。

⑥参加研究者の動静

研究終了報告書を元にプロジェクト参加研究者[17]を特定し、プロジェクト参加時の職位および、終了時の職位、現在の職位を検索した。

⑵インタビュー調査の方法

インタビュー調査は研究総括および、本プロジェクトの主なメンバー数名(以降、プロジェクト関係者)と、プロジェクトの成果およびその後の村田や他の研究者の研究内容について良く把握している(外部有識者とする)1 名について、実施した。インタビューを行ったプロジェクト関係者からは、基礎調査で知り得た情報の本プロジェクトとの関連や、その後の展開等についての情報を収集した。

---

[15] FWCI(Field-Weighted Citation Impact):1 文献あたりの被引用数を世界平均(年別・分野別・文献タイプ別に算出)で割った数値。

[16] ジャーナル評価指標(Web of Science の Impact Factor と同様の指標)

[17] プロジェクトメンバーに加えて、研究終了報告書に記載のある技術員、研究補助員等も含めている。

2.1.2　競争的研究資金の獲得状況

本プロジェクト期間中から現在までのプロジェクトメンバーも含めた競争的資金の獲得状況を表 2-1 に示す。

表 2-1　競争的資金の獲得状況

JST　科研費　AMED

研究期間（年度）	研究種目	研究課題	研究代表者	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	金額（億円）
2010～2016	ERATO	村田脂質活性構造	村田 道雄																	16.92
2016～2017	科研費挑戦的研究（萌芽）	脂質二重膜の相転移現象とアシル鎖の深度依存的溶解の観測	村田 道雄																	0.03
2016～2018	科研費基盤研究(C)	細胞増殖因子ポリアミンの細胞内濃度調節機構の解明	杉山 成																	0.05
2016～2020	科研費基盤研究(S)	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	村田 道雄																	1.83
2017～2019	科研費基盤研究(B)	分泌型スカベンジャー受容体 AIM のリガンド認識機構	松岡 茂																	0.18
2017～2021	科研費新学術領域研究(研究領域提案型)	天然物リガンドを利用した生体膜経由の化学シグナル伝達機構の解明	村田 道雄																	0.76
2017～2021	科研費新学術領域研究(研究領域提案型)	化学コミュニケーションのフロンティア	掛谷 秀昭（研究分担者:村田 道雄）																	1.58
2019	A-STEP 機能検証フェーズ 試験研究タイプ	難水溶性化合物ータンパク質相互作用解析に対応したゲル中結晶作製装置の開発	杉山 成																	0.03

研究期間（年度）	研究種目	研究課題	研究代表者	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	金額（億円）
2019～2020	科研費挑戦的研究(萌芽)	生体膜のドメイン形成における脂質アンカーや微量脂質の役割	村田 道雄																	0.07
2019～2021	科研費基盤研究(C)	骨形成に関与する核内受容体の脂溶性シグナル伝達分子認識機構の解明	杉山 成																	0.04
2020～2022	AMED 低分子医薬品の次世代デザイン手法に関する研究	新規低分子ペプチドミメティクス設計法の開発と検証	松岡 茂																	0.39
2020～2022	科研費基盤研究(B)	天然物様三次元骨格を持つペプチド擬態化合物の分子設計と作用機序	松岡 茂																	0.18
2021～2024	科研費基盤研究(A)	生体の非平衡系を再現できる脂質二重膜の構築と動的脂質集合体の描像	村田 道雄																	0.38

2021 年 4 月 2 日検索
2021 年 8 月 18 日更新

2.1.3 論文の発表状況

成果論文および発展論文の全論文の Field-Weighted Outputs in Top Citation Percentiles[18]の論文数を表 2-2 に示す。

本プロジェクトと直接関わると判断できる論文、成果論文は合計 72 報である。

本プロジェクトの成果の発展に関する論文(発展論文)は合計 46 報である。

[18] 出版年別の FWCI が世界全体の上位 X%に含まれる文献数/率。0.01%は、0.01%以内に含まれる論文の数を示し、0.1%は、0.01%より大きく、0.1%以内のものを示す。

表 2-2　プロジェクトの論文投稿状況一覧

	論文数	平均 FWCI 値[19]	FWCI Top%				
			0.01% 以内	0.1%以内	1%以内	10%以内	10%圏外
成果論文	72	1.02	0	0	0	5	67
発展論文	46	0.73	0	0	0	1	45

検索日：2021 年 4 月 6 日　更新日：2021 年 9 月 7 日
指標は 2021 年 11 月 1 日取得

(1) 本プロジェクト成果に直接関わる論文

成果論文の発表数を被引用数の推移と共に図 2-1 に示す。また、被引用数上位 5 報について表 2-3 に示す。

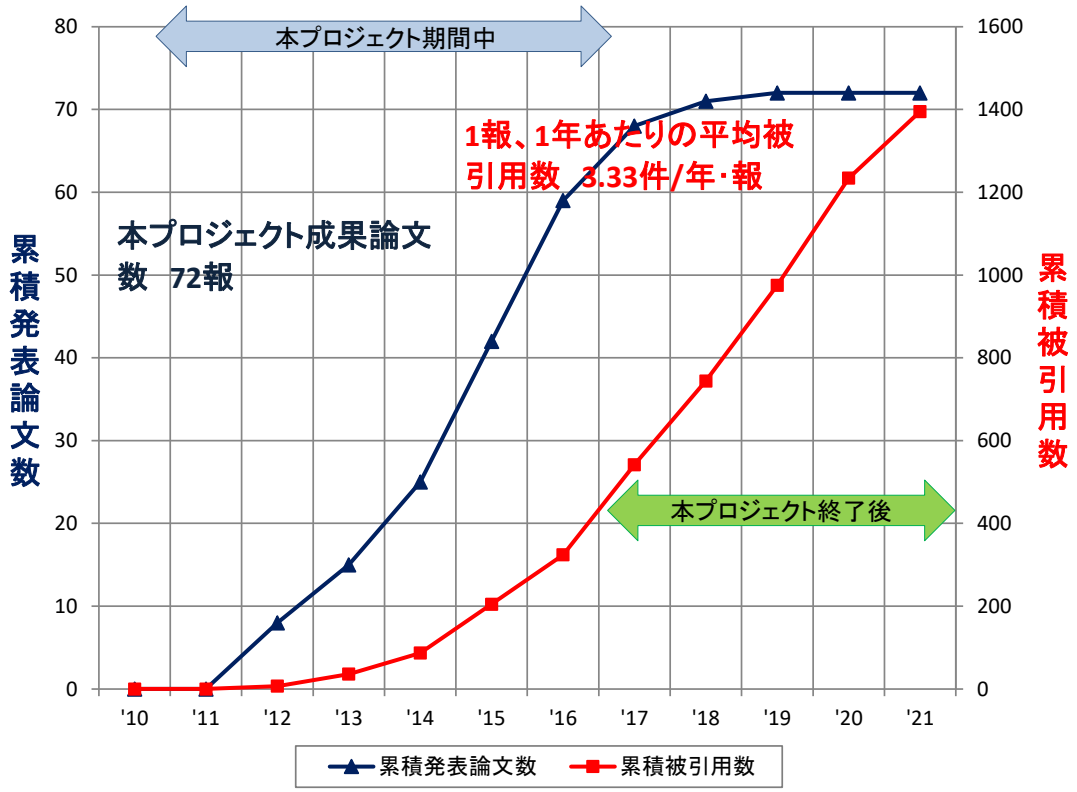


図 2-1　プロジェクトの成果論文の発表論文数と被引用数の推移[20]
（検索 DB：Scopus、検索日：2021 年 09 月 16 日）

[19] FWCI 平均値は 2020 年までに出版されたもので、FWCI 値を有するものの平均を算出した。
[20] 1 報 1 年あたりの平均被引用数は、各論文の被引用数を出版からの経過年で割った値の平均値。2021 年に出版された論文については 1 年経過していないので、被引用数（2021 年 09 月 16 日時点の値）を用いて算出。

表 2-3　成果論文の被引用数 5 位までの論文

No	著者名	タイトル	出版年	出版物名	巻	号	論文番号/開始—終了ページ	被引用数	DOI	文献タイプ	FWCI	Cite Score
1	Nango, E., Royant, A., Kubo, M., Nakane, T., Wickstrand, C., Kimura, T., Tanaka, T., Tono, K., Song, C., Tanaka, R., Arima, T., Yamashita, A., Kobayashi, J., Hosaka, T., Mizohata, E., Nogly, P., Sugahara, M., Nam, D., Nomura, T., Shimamura, T., Im, D., Fujiwara, T., Yamanaka, Y., Jeon, B., Nishizawa, T., Oda, K., Fukuda, M., Andersson, R., Båth, P., Dods, R., Davidsson, J., Matsuoka, S., Kawatake, S., Murata, M., Nureki, O., Owada, S., Kameshima, T., Hatsui, T., Joti, Y., Schertler, G., Yabashi, M., Bondar, A.-N., Standfuss, J., Neutze, R., Iwata, S.	A three-dimensionalmovie of structural changes in bacteriorhodopsin	2016	Science	354	6319	1552-1557	217 (210)	10.1126/science.aah3497	Article	7.95	49.5
2	Sugahara, M., Mizohata, E., Nango, E., Suzuki, M., Tanaka, T., Masuda, T., Tanaka, R., Shimamura, T., Tanaka, Y., Suno, C., Ihara, K., Pan, D., Kakinouchi, K., Sugiyama, S., Murata, M., Inoue, T., Tono, K., Song, C., Park, J., Kameshima, T., Hatsui, T., Joti, Y., Yabashi, M., Iwata, S.	Grease matrix as a versatile carrier of proteins for serial crystallography	2014	Nature Methods	12	1	61-63	138 (136)	10.1038/nmeth.3172	Article	7.10	29.5
3	Ando, J., Kinoshita, M., Cui, J., Yamakoshi, H., Dodo, K., Fujita, K., Murata, M., Sodeoka, M.	Sphingomyelin distribution in lipid rafts of artificial monolayer membranes visualized by Raman microscopy	2015	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	112	15	4558-4563	76 (74)	10.1073/pnas.1418088112	Article	2.40	17.8
4	Kinoshita, M., Suzuki, K.G.N., Matsumori, N., Takada, M., Ano, H., Morigaki, K., Abe, M., Makino, A., Kobayashi, T., Hirosawa, K.M., Fujiwara, T.K., Kusumi, A., Murata, M.	Raft-based sphingomyelin interactions revealed by new fluorescent sphingomyelin analogs	2017	Journal of Cell Biology	216	4	1183-1204	59 (57)	10.1083/jcb.201607086	Article	3.32	12.8

No	著者名	タイトル	出版年	出版物名	巻	号	論文番号/開始—終了ページ	被引用数	DOI	文献タイプ	FWCI	Cite Score
5	Matsumori, N., Yasuda, T., Okazaki, H., Suzuki, T., Yamaguchi, T., Tsuchikawa, H., Doi, M., Oishi, T., Murata, M.	Comprehensive molecular motion capture for sphingomyelin by site-specific deuterium labeling	2012	Biochemistry	51	42	8363-8370	46 (46)	10.1021/bi3009399	Article	1.16	6.2

検索日：2021 年 9 月 16 日、指標：2021 年 11 月 1 日
被引用数の( )内は 2021 年 9 月 16 日時点の値

(2) 本プロジェクトの成果の発展、または本プロジェクトから波及した研究内容の文献

プロジェクト終了以降の発展論文と被引用数の推移を図 2-2 に示す。また、被引用数 5 位までの論文について表 2-4 に示す。

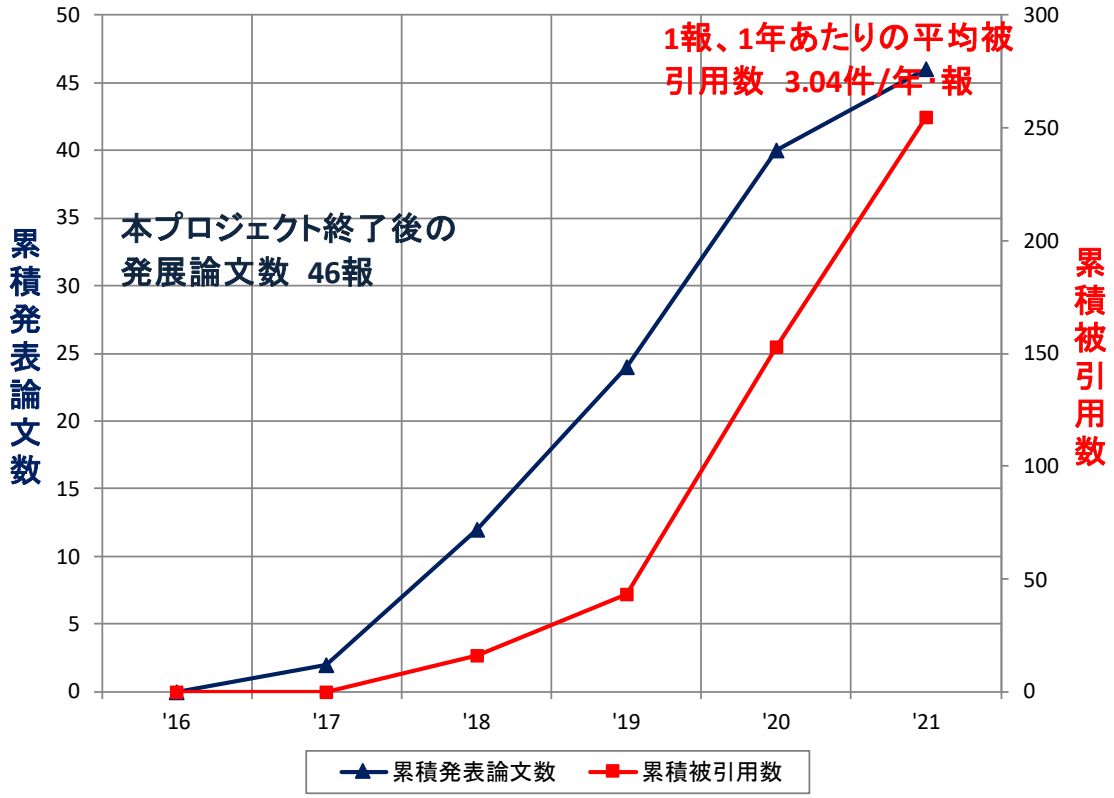


図 2-2　プロジェクト終了以降の発展論文の発表数と被引用数の推移
（検索 DB：Scopus、検索日：2021 年 09 月 16 日）

表 2-4　発展論文の被引用数 5 位までの論文

No	著者名	タイトル	出版年	出版物名	巻	号	論文番号/開始—終了ページ	被引用数	DOI	文献タイプ	FWCI	Cite Score
1	Hiramoto, E., Tsutsumi, A., Suzuki, R., Matsuoka, S., Arai, S., Kikkawa, M., Miyazaki, T.	The IgM pentamer is an asymmetric pentagon with an open groove that binds the AIM protein	2018	Science Advances	4	10	aau1199	30 (27)	10.1126/sciadv.aau1199	Article	1.70	15.0
2	Naito, A., Matsumori, N., Ramamoorthy, A.	Dynamic membrane interactions of antibacterial and antifungal biomolecules, and amyloid peptides, revealed by solid-state NMR spectroscopy	2018	Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects	1862	2	307–323	29 (29)	10.1016/j.bbagen.2017.06.004	Review	1.12	7.4
3	Kusumi, A., Fujiwara, T.K., Tsunoyama, T.A., Kasai, R.S., Liu, A.-A., Hirosawa, K.M., Kinoshita, M., Matsumori, N., Komura, N., Ando, H., Suzuki, K.G.N.	Defining raft domains in the plasma membrane	2020	Traffic	21	1	106–137	24 (24)	10.1111/tra.12718	Review	2.48	8.5
4	Yano, Y., Hanashima, S., Yasuda, T., Tsuchikawa, H., Matsumori, N., Kinoshita, M., Al Sazzad, M.A., Slotte, J.P., Murata, M.	Sphingomyelin Stereoisomers Reveal That Homophilic Interactions Cause Nanodomain Formation	2018	Biophysical Journal	115	8	1530–1540	16 (15)	10.1016/j.bpj.2018.08.042	Article	1.50	6.2
5	Wakamiya, Y., Ebine, M., Murayama, M., Omizu, H., Matsumori, N., Murata, M., Oishi, T.	Synthesis and Stereochemical Revision of the C31–C67 Fragment of Amphidinol 3	2018	Angewandte Chemie – International Edition	57	21	6060–6064	16 (15)	10.1002/anie.201712167	Article	0.87	20.2

検索日：2021 年 09 月 16 日、指標：2021 年 11 月 1 日
被引用数の( )内は 2021 年 9 月 16 日時点の値

2.1.4　特許の出願・公開・登録状況

本プロジェクトの期間中と終了後の調査時点に至るまでの特許出願状況を表 2-5 に示す。期間中の国内出願が 3 件あり、すべてが登録された。

プロジェクト終了後は、国内出願が 5 件あり、そのうち、松岡らにより狂犬病の治療のための化合物関連で 4 件の特許出願がされている。これは、1.5.2 項に記した FABP の結合親和性の研究の発展と考えられる。

表 2-5　プロジェクトの特許出願状況一覧

	出願件数		登録件数	
	国内	海外[21]	国内	海外
プロジェクト期間中	3	3	3	0
プロジェクト終了後	5	2	2	0
合計	8	5	5	0

検索日：2021 年 9 月 6 日

国内登録 5 件のうちプロジェクト期間中に出願され本プロジェクトの直接的成果と言える特許は下記の 3 件である[22]。

・「標的物質とリガンドとの結合親和性を測定するための方法、ならびに該方法に使用するための試薬助剤およびキット」特願 2015-532865、WO2015/025856、特許第 6057265 号

・「新規蛍光標識スフィンゴミエリンおよびその利用」特願 2017-506557、WO2016/148125、特許第 6398055 号

・「重原子化化合物、膜タンパク質の結晶化を促進するための組成物、および当該組成物を用いた膜タンパク質の構造解析方法」特願 2018-508813、WO2017/169445、特許第 6579560 号

2.1.5　受賞状況

プロジェクト終了後の受賞はない。プロジェクト関係者の受賞としてプロジェクト期間中の主な受賞を下に記した。

村田道雄

2013 年　第 2 回大阪大学総長顕彰(研究部門)

2014 年　英国王立化学会フェロー(Royal Society of Chemistry)

2014 年　第 3 回大阪大学総長顕彰(研究部門)

松岡茂、杉山成、原利明

2013 年　第 2 回大阪大学総長奨励賞

杉山成

2010 年　13th International Conference on the Crystallization of Biological

[21] 海外は国内出願に優先権主張をかけて、海外に出願した特許を示す。

[22] プロジェクト終了後の登録特許 2 件は、松岡らによる大分大学が出願人の特許で、狂犬病治療のための化合物に関する特許である。

Macromolecules (ICCBM13), Poster Prize Winner (2010)

2012 年　日本結晶成長学会　第 29 回論文賞

梅川雄一

2011 年　第 28 回(2011 年度)井上研究奨励賞

2.1.6　ベンチャー企業の設立状況

本プロジェクトの直接的成果からのベンチャー企業設立はない[23]。

[23] 村田・杉山らが技術移転し共同研究している「創晶」は、大阪大学発(工学部佐々木研究室)ベンチャーで、文部科学省の平成 14 年度大学等発ベンチャー創出支援制度を起点に 2005 年に設立された。

2.2　プロジェクト終了後の発展状況

プロジェクト期間中の主要な研究成果については、1.5 節に要約を記載したが、本節では本プロジェクトにおける重要な研究の発展状況について述べる。全体の流れの把握に必要な事項については期間中の成果を含めて解説する。

2.2.1　脂質ラフトの構造解明と応用

(1)脂質ラフトのナノドメイン構造のさらなる解明

脂質二重膜内のマイクロドメインの分子基盤を明らかにすることは本プロジェクトの中心課題の一つであった。

本プロジェクト期間中、脂質ラフトを構成するスフィンゴミエリン(SM)などの脂質が膜中でどのような配座や動的挙動を示すかを解析した。バイセルを用いた NMR 実験によって SM アミド近傍の立体配座を推定し、SM のアミド部分の ^{13}C および ^{15}N の二重標識体の脂質膜環境における固体 NMR 測定で、コレステロール(Cho)共存下で SM 分子間相互作用が促進されることによりラフトが形成されることを示唆した。また、固体 NMR の測定結果からドメインサイズを推定し、後述するナノクラスター説を提唱した。

プロジェクト終了後は、上記の成果をもとに、脂質ラフトの細部構造形成のメカニズムをより詳細に明らかにすることを目的に研究を続けた。科研費基盤研究(S)「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」(2016 年度～2020 年度)などを中心として研究を展開した。以下には終了後の成果について要約する。

①スフィンゴミエリンが形成するナノドメインの解析

脂質ラフト中では、スフィンゴミエリン(SM)分子同士または SM-コレステロール(Cho)間で水素結合が形成されると考えられているが、関係する官能基は未解明であった。そこで、本プロジェクト期間中の研究で、REDOR 法[24]により分子間の磁気双極子相互作用を観測するため、^{13}C および ^{15}N で標識した SM を各々合成し、これら等量と Cho を混合して調製したリポソームについて REDOR の測定を行った。

その結果、分子の運動性をある程度制限した条件下では、Cho を含む二成分系で 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た。これは、Cho 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結果であった。その結果からドメインサイズを推定し、従来考えられていた、SM と Cho が混合する図 2-3 の A や B ではなく、SM 集合体の周りに Cho が存在する新たなクラスター構造 C1(ナノクラスター)を提唱した(図 2-3)。

この SM と Cho の関係をプロジェクト終了後、SM 頭部のコリン部分のいくつかの水素を別々に重水素置換した SM を用いて SM/Cho の脂質膜を調製し、固体 NMR で解析した。^{2}H

[24] REDOR(Rotational Echo Double Resonance)法：マジックアングルスピニングで消失している異種核間の双極子相互作用を RF(ラジオ波)パルスにて復活させることによって、その双極子相互作用の大きさを求め、その値から核間距離を求める手法。

NMR と ^{13}C-^{31}P REDOR 及び、分子動力学(MD)シミュレーションから、Cho が存在すると SM の頭部の配座が変化し、頭部の表面が拡大することが示唆された[14]。

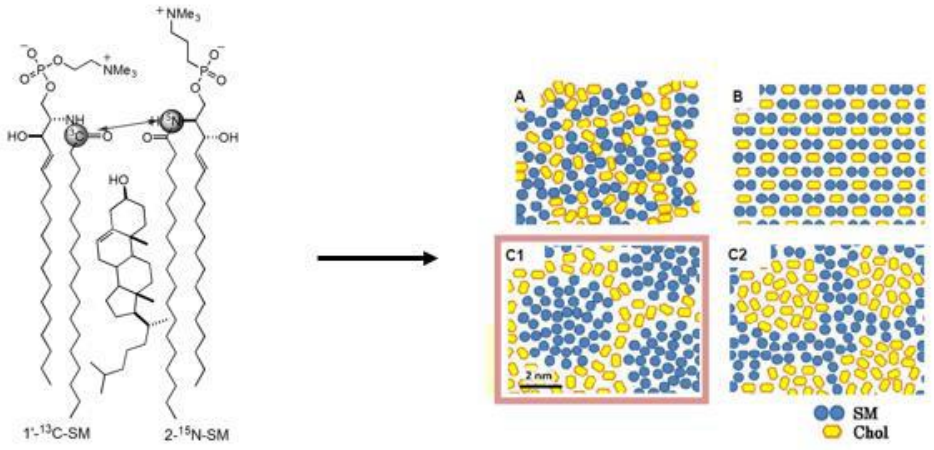


図 2-3　新たな脂質クラスター構造(ナノクラスター)[25]

固体 NMR REDOR 測定より、ラフトドメイン中で分子間水素結合が予想され、その結果から新たな脂質クラスター構造(ナノクラスター)右図 C1 を提唱

次に、SM より強い水素結合が誘起されることが知られる SM のジヒドロ体（dihydro-sphingomyelin：DHSM）[26]と SM についてその凝集性を調べた。流動的な DOPC(dioleoyl phosphatidylcholine)二重膜の中での両者の挙動を、示差走査熱量測定(differential scanning calorimetry：DSC)と ^{2}H NMR で分析した。その結果、両者は、Cho の非存在下の DOPC 二重膜中でナノサイズの凝集体を形成するが、DHSM は SM に比べて大きい凝集体を形成し、その凝集体は、SM の凝集体に比べより熱に安定であり、密であることが分かった(図 2-4)[15]。

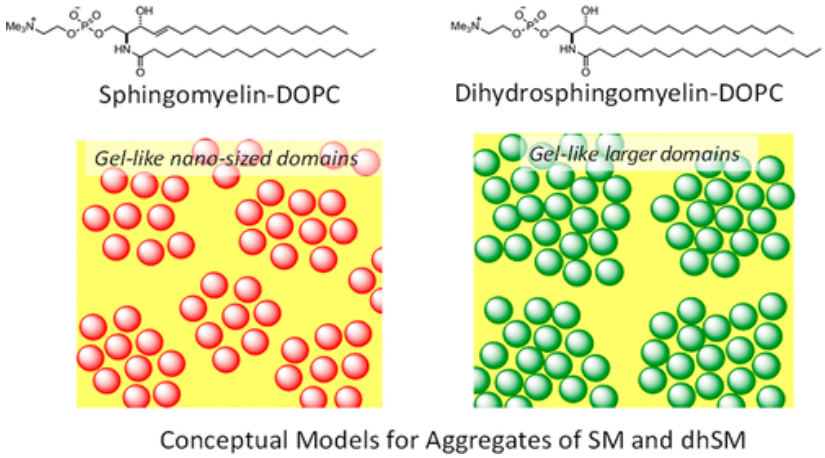


図 2-4　SM と DHSM の凝集の概念図[27]

[25] 研究終了報告書 p38 図 1

[26] 哺乳類の細胞には通常の SM とそのジヒドロ体 DHSM が存在する。DHSM は SM に比べて優れた凝集能を有することが示唆され、ラフト形成への関与が注目されている。

[27] 文献[15] Graphical abstract

この結果は、ナノサイズの凝集体の形成は SM あるいは DHSM 分子間の相互作用によって形成され、Cho の介在は必要ないことを示している。

プロジェクト特別重点期間中に蛍光標識 SM が開発され、脂質内での挙動や、結合タンパク質の解析に有用であることが明らかにされた[16], [17]。木下祥尚はこの蛍光標識 SM の研究で中心的役割を担ったが、九州大学に転出し、プロジェクト終了後九州大学松森信明とともに、蛍光標識 SM 開発で得た知見を基に、ATTO-488 または ATTO-594 の 2 種類の蛍光色素が結合した DHpSM、pSM、DPPC(dipalmitoyl phosphatidylcholine)を合成した(図 2-5)。

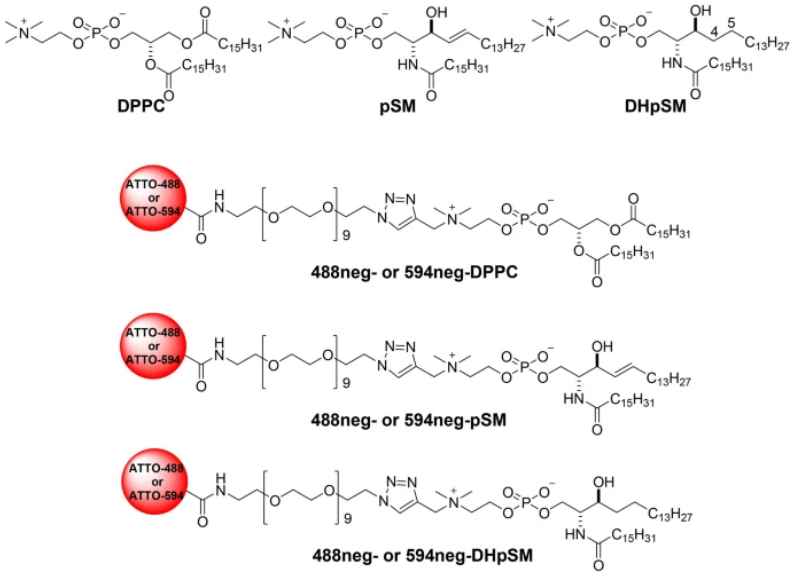


図 2-5　合成した蛍光標識脂質[28]

これらの蛍光標識脂質を用いて、DOPC と Cho から形成される脂質膜でラフト様の秩序相(Lo)と無秩序相(Ld)における分布を蛍光顕微鏡で観察することにより比較した。Lo/Ld に相分離した脂質膜で、それぞれの脂質の Lo 相への分布は、SM や PC(phosphatidylcholine)に比べ、DHSM がより優先的に分布した。SM と DHSM を含む膜で拡散計数を測定することにより、SM に富む Lo 領域で、DHSM が凝集体を形成することが示唆された(図 2-6)。

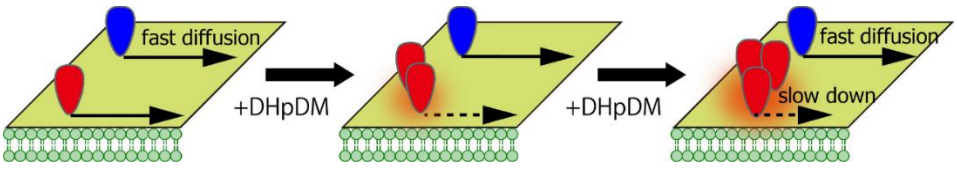


図 2-6　標識脂質と DHSM がナノレベルの凝集をしやすいことの模式図[29]
青色は pSM、赤色は DHpSM を示す。
オレンジ色の膜部分が DHpDM の添加により DHpSM が凝集していることを示す。

[28] 文献[18] Fig.1
[29] 文献[18] Fig.4

さらに、脂質間の FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer)[30]測定により SM と DHSM の凝集能を直接に比較した。二色の SM あるいは DHSM を含む SM/Cho 膜(均一な Lo 相を形成)で、DHSM の蛍光強度が小さくなり、効率的に FRET が生じた。FRET 効率は二色の蛍光物質の距離に反比例するため、Lo 相において DHSM は SM よりも高い凝集能を有していることが示された。NMR を使った解析と同様にナノレベルの凝集を観察し、DHSM がより凝集しやすいことを確認した[18]。

本研究では、生体に存在する 2 種類の SM と DHSM に着目し、FCS(Fluorescence Correlation Spectroscopy)測定や脂質間 FRET を用いてそれらの凝集状態をナノレベルで評価した。その結果 SM と DHSM のわずかな構造の違いが、それらの凝集能に大きな影響を与えることを明らかにした。

②エナンチオマーを用いたナノサブドメインの観察

村田らは、プロジェクト期間中フィンランド Åbo Akademi University, J Peter Slotte らとの共同研究で、コレステロール(Cho)を含んだスフィンゴミエリン(SM)の脂質二重膜でゲル状のナノドメインが観察されることを報告した[19]。プロジェクト終了後も引き続き Slotte らとの共同研究を続け、脂質二重層中に形成される脂質ラフト様秩序相(Lo)ドメインの形成に、構成脂質間のどのような相互作用が関与するかを検討した。

この目的のために、ステアロイルスフィンゴミエリン(stearoyl sphingomyelin：SSM)と SSM の立体異性体 enantiomer(ent-SSM)についてそれぞれの重水素化化合物を合成し(図 2-7)、固体 ^{2}H NMR で解析した。

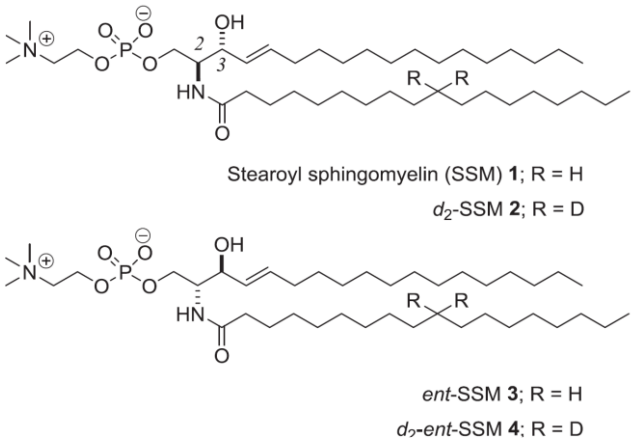


図 2-7　ステアロイルスフィンゴミエリン(SSM)、ent-SSM とその重水素化体の化学構造[31]

その結果、異種の立体異性体では相互作用が起きず、同種の立体異性体の間で水素結合が起こることが、ナノメーターサイズのゲル状の SSM の(もしくは ent-SSM の)ドメイン、

[30] FRET:二色の蛍光分子(FRET donor と acceptor)が 5nm 程度に近接した時生じる現象であり、タンパク質の会合などを評価するために用いられる手法。

[31] 文献[20] Fig.1

すなわちナノドメインの生成に寄与していることが示唆された(図 2-8)。また、この解析結果から、SM 間の相互作用は頭部近辺で起こり、SM-Cho の疎水的相互作用が脂質二重膜内部で起こることが秩序相(Lo)ドメイン形成に重要であることが示唆された[20]。

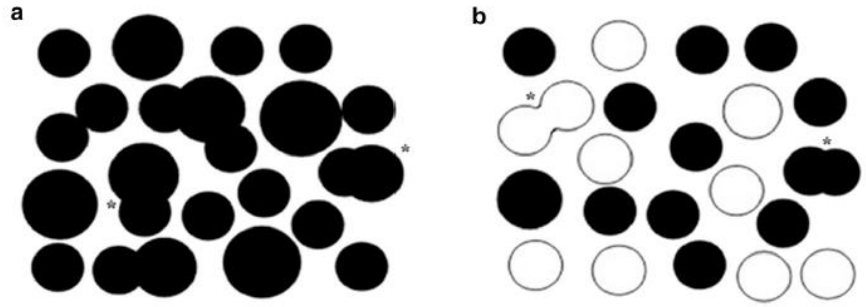


図 2-8　ナノドメインの概念図(立体異性体のみとラセミ混合物)[32]
黒い丸は天然型 SM、白い丸は ent-SM を表す。
＊はナノドメインの融合または分離の途中を表す。

また、SSM と ent-SSM の蛍光標識脂質(図 2-9)を合成し、DOPC と Cho が形成する脂質二重膜の中で、これら SSM の立体異性体 2 種が形成するサブドメインを、FRET 測定によってナノメーターレベルで解析した。

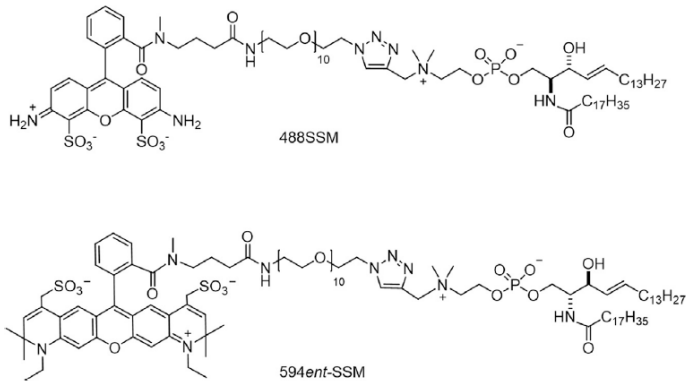


FIGURE 1 Chemical structures of ATTO488-labeled *D-erythro-N*-stearoyl sphingomyelin (488SSM) and ATTO594-labeled SSM enantiomer (594*ent*-SSM).

図 2-9　SSM と ent-SSM の蛍光標識体[33]

SM と ent-SM が 1:1 の混合物であるラセミ体と DOPC および Cho からなる脂質中で、ドナーおよびアクセプター蛍光標識した SSM の間(homo-FRET pair)では有意に高い FRET を示し、ドナー標識した SM とアクセプター蛍光標識した ent-SM の間(hetero-FRET pair)での FRET は低い値であった。この FRET の値の差は、SSM と ent-SSM がそれぞれ分かれて会合し、別々のナノドメインを形成することを示しており、重水素標識した SSM を用いた解

[32] 文献[20] Fig.7
[33] 文献[21] Fig.1

析結果と一致した。このサブドメインの平均サイズは温度の上昇とともに小さくなり、生理的な温度に近い温度では一桁のナノメーター台の直径であった(図 2-10)[21]。

以上の結果は、秩序相 Lo の中でナノサブドメインを形成するために SM-SM 相互作用が重要な役割をすること、および、生体膜においてこのようなナノサブドメインがラフト形成の鍵となることを示唆している。

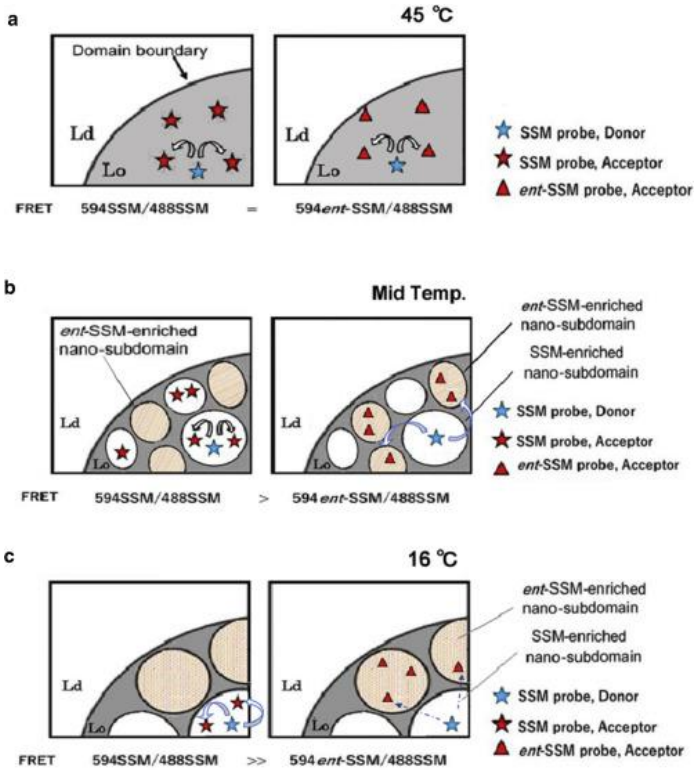


図 2-10　温度依存的ドメイン生成と FRET 強度の関係[34]
(homo-FRET pair と hetero-FRET pair)
(a)45℃、(b)中間温度、(c)16℃

③脂質二重膜の相転移現象とアシル鎖の深度依存的溶解の観測[35]

村田は、科研費挑戦的萌芽研究「脂質二重膜の相転移現象とアシル鎖の深度依存的溶解の観測」(2016 年度～2017 年度)で、炭化水素鎖(アシル鎖)の揺らぎとコレステロールとの関係を検討した。

水中で形成される脂質二重膜では、アシル鎖の疎水性相互作用が重要な働きを演じている。このような生体機能に重要なフレキシブルな分子間に働く相互作用を分子論的に理解するために、脂質二重膜中の脂質分子の相転移に伴う揺らぎ、すなわち融解現象が深度に依存して変化するかどうかを検証した。また、スフィンゴミエリン(SM)がコレステロール

[34] 文献[21] Fig. 8
[35] 村田、科研費挑戦的萌芽研究「脂質二重膜の相転移現象とアシル鎖の深度依存的溶解の観測」(2016 年度～2017 年度) (https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-16K13100/16K13100seika.pdf)

存在下に形成する特殊な相状態である脂質ラフトと、上記の深度依存的融解の関連を、通常の細胞膜脂質であるフォスファチジルコリン(PC)と比較することによって明らかにした。

脂質ラフトの代表的脂質である SM と通常の膜脂質である PC に、4 位、10 位、14 位、16 位を重水素置換した 4 種類のステアリン酸を合成して導入した。これら重水素標識脂質の NMR および IR スペクトルによって、これらの脂質の二重膜について融解温度の深度依存性を調べた結果、SM および PC の二重膜において深度依存的な融解が観測された。SM の融解は、熱測定で求められた脂質全体の相転移温度よりもアシル鎖末端側では低温側で始まること、PC では比較的同じ温度で融解することが確かめられた。これは、SM の 4 位から 10 位の間のアシル鎖において、PC の同じ位置に比べて揺らぎが顕著に増幅されていることを示しており、分子の充填状態の違いを反映している。また、SM の脂肪鎖末端付近において顕著に深度依存的な融解が観測された（末端の方が低い温度で融解し始める)。一方で、PC の末端付近では融解は SM 程大きな深度依存性は示さなかった。

次に、コレステロール(Cho)を添加して脂肪鎖融解の深度依存性がどのように変化するかを調べた。その結果、SM, PC 両者において Cho の添加によって明確な融解点が消失したことに加えて、SM と PC の深度依存性の相違についても過去の推定を支持する結果が得られた。すなわち、Cho は SM 膜において深い位置に存在し、脂肪鎖の秩序化に対する影響は比較的末端付近まで及んでいることを示唆した(図 2-11)。加えて、Cho 存在下、SM 脂肪鎖の末端部付近において屈曲型配座を取る割合が低いことが示され、脂質ラフトにおいて、SM が PC よりも強固な会合体を形成する時にこの末端付近の配座の相違が関連していると考えられた。

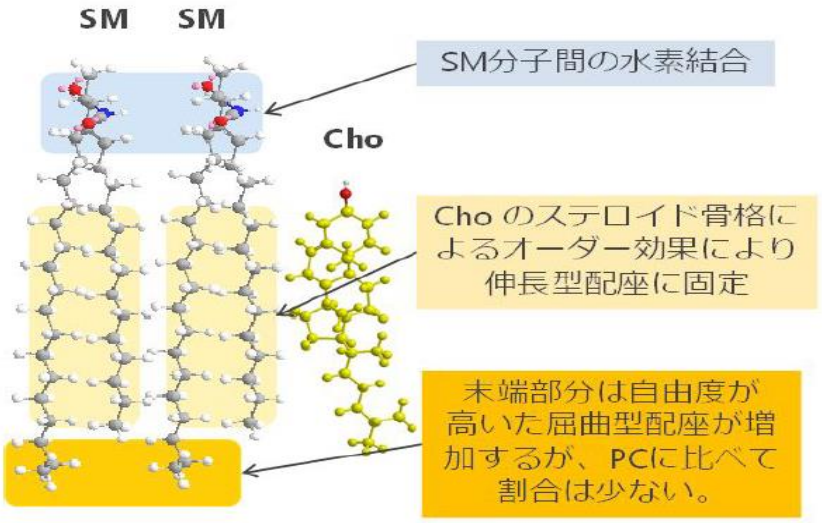


図 2-11　SM とコレステロール(Cho)の相互作用の模式図[36]
PC 膜と比べて、SM 膜では Cho が膜の深い位置(図では下方)に位置していることを位置(深度)依存的に重水素標識した SM および PC を用いて解明した。

[36] 科研費挑戦的萌芽研究「脂質二重膜の相転移現象とアシル鎖の深度依存的溶解の観測」研究成果報告書(https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-16K13100/16K13100seika.pdf)

さらに、Slotte と共同研究を行い、SM と Cho によるラフト様ドメイン形成に及ぼす周辺脂質のアシル鎖の影響について検討した。

不飽和結合を一つもつ炭素 14 個のアシル鎖を 2 つもつ PC(di-14:1-PC)、炭素 18 個のもの(di-18:1-PC)、炭素 20 個のもの(di-20:1-PC)及び、POPC(不飽和結合を一つもつ炭素 18 個のアシル鎖と不飽和結合をもたない炭素 16 個のアシル鎖をもつ PC)を用いて、SM のアシル鎖に対する影響を調べた。その結果、SM のアシル鎖の秩序パラメータは共存する PC のアシル鎖が長いほど増大し、不飽和結合がないと増大することが分かった。この SM と PC からなる二重膜に Cho を 20mol%加えると SM と Cho に富むドメインが形成され、その度合いは二重膜を形成する 2 つのリン脂質の Cho に対する親和性の違いの大きさに依存していた。以上の結果から、リン脂質間の相互作用と、それらのリン脂質の Cho に対する親和性がドメインの形成に影響することが示唆された[22]。

④脂質ラフトでは異なる向きに脂質分子が充填(電子線散乱の利用)

松森と木下らはプロジェクト終了後、低流量走査電子線散乱法(LFSED)を脂質膜に適用することで、局所的な膜構造の解析に成功した。

脂質ラフトを指向した研究では、飽和リン脂質と不飽和リン脂質の混合膜が頻繁に用いられ、飽和脂質が凝集したラフト様の固い膜ドメインが、周囲の柔らかい膜領域から相分離している。しかし、脂質膜の構造解析で汎用される X 線の直径は膜ドメインのサイズより大きく、ドメイン内部の構造解析は困難だった。本研究では収束性に優れた電子線を脂質膜に適用してラフト様ドメイン「内部」における脂質炭素鎖充填構造の解析を試みた。解析にあたっては、電子線の照射量を通常の 1/50～1/100 に低減することにより低侵襲の構造解析を可能にした。脂質膜表面で直径がわずか 2.8μm の電子線を走査することで、ドメイン内部の構造解析を行えることがわかり、その結果、ドメイン内部には異なる向きに脂質分子が充填した複数の下部構造が存在することが分かった(図 2-12)。さらに、下部構造のサイズはドメイン中央部で大きく、周辺部では小さくなることが明らかになった[23]。

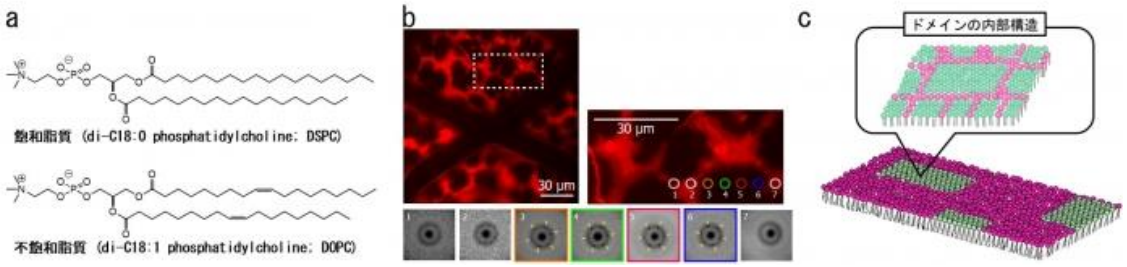


図 2-12　DSPC/DOPC と脂質膜の蛍光顕微鏡観察、脂質充填構造の模式図[37]
(a) 飽和リン脂質(DSPC)と不飽和リン脂質(DOPC)の分子構造。
(b) DSPC/DOPC 混合単分子膜の蛍光顕微鏡写真。
(c) DSPC/DOPC 混合膜で生じる相分離と、ラフト様ドメイン内部での脂質充填構造の模式図。
DSPC と DOPC 分子をそれぞれ緑色と赤色で示した。

(2)脂質ラフト研究の発展・展開・応用

細胞膜を介した情報伝達を担う脂質ラフトは特定の脂質が集合したドメインと考えられているが、脂質修飾タンパク質や糖脂質・ガングリオシド(GM1)などの脂質部位が結合することによってラフト形成が大きな影響を受ける例が知られるようになった。具体的には、タンパク質に 1～3 本の脂肪酸やファルネシル基が結合することによって、生体膜に対する結合親和性が調整されており、さらには、GPI アンカータンパク質 CD59 のように膜上のドメインへの局在性がこれらの脂質修飾によって制御されていることが明らかになった(2.2.2(1)に後述)[17]。

本プロジェクト終了後、村田は、科研費挑戦的研究(萌芽)「生体膜のドメイン形成における脂質アンカーや微量脂質の役割」(2019 年度～2020 年度)で、微量脂質がどのような機構でドメインを形成しているかについて研究を発展させた。また、天然分岐脂質を持つ古細菌の脂質膜の安定性機構解明に取り組んだ。

一方、木下、松森らは、局所麻酔薬による脂質ラフトの不安定化と麻酔作用との関連の解明に取り組んだ。また、脂質膜中でのセラミドの挙動を観察した。

①スフィンゴミエリンとの相互作用に及ぼすコレステロールのグリコシル化

村田と大阪大学花島慎弥(村田研究室)らは、生体膜に生ずるドメイン構造は、微量脂質が未知のメカニズムでその形成を誘起することがあることから、本研究ではコレステロール(Cho)にグルコースが結合した Cholesteryl-β-D-glucoside(ChoGlc)に注目した。

ChoGlc は、脳組織に発現する糖脂質であることから、脳に豊富に存在する N-ステアロイルスフィンゴミエリン(SSM)を用いて脂肪鎖に対する Cho の秩序化効果と脂質相互作用に対するグルコースの置換の影響を、SSM で構成される脂質二重膜で調べた。示差走査熱量測定により、ChoGlc は Cho と同程度に SSM と混和することが明らかになった。重水素化 SSM の固体 NMR は、Cho のグルコシル化がステロールの SSM に対する秩序化効果を大幅に低下させることを示した。重水素化およびフッ素化された ChoGlc 類似体の固体 NMR 分析によって SSM 二重膜でのステロールコアの配向を調べたところ、ChoGlc では、Cho よりも長分子軸(C3～C17)と膜法線の間の傾斜角が小さく、傾斜角の変動は、SSM アシル鎖の温度依存性移動度変化の影響をほとんど受けなかった。ChoGlc のステロールコアの配向から、ステロール部分と SSM の相互作用は弱いことが分かった。MD シミュレーションの結果から、ChoGlc の親水性グルコース部分が SSM のアミド基と同じ深度に存在するため、SSM-ステロール相互作用が阻害され、SSM のヘッドグループのアンブレラ効果が低下して

[37] 九州大学プレスリリース図 https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/541

いることが示唆された(図２-13)[24], [38]。したがって、Cho と ChoGlc の分布と局在化は、生体膜の特定の場所で短時間に発生する SM を主体としたドメインの消長を制御している可能性があると考えられる。

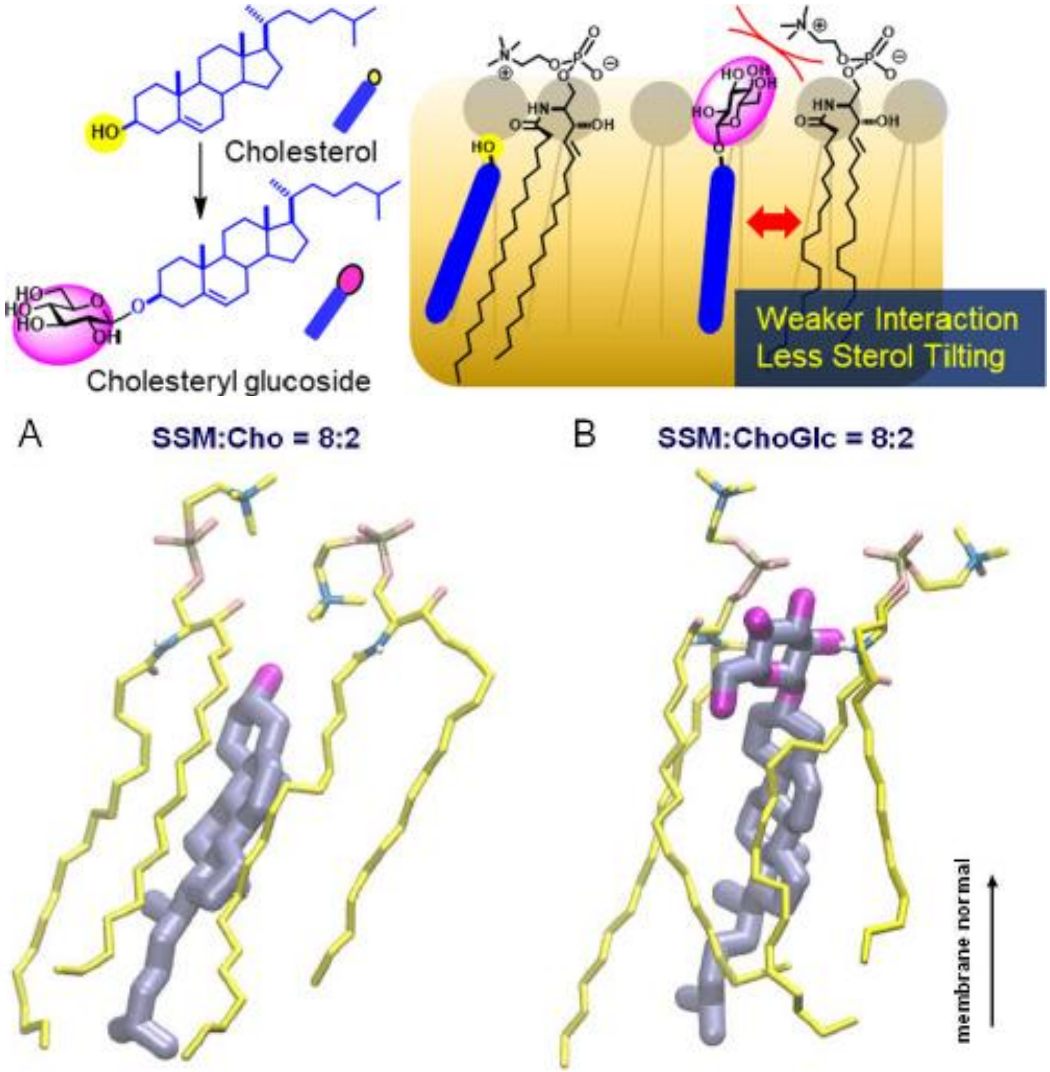


図 2-13　コレステロール(Cho)のグリコシル化による SM との相互配置の変化[39]

②古細菌の細胞膜の熱安定性の機構

本プロジェクト期間中の研究で、村田と大阪大学土川博史(村田研究室)らは、高度好塩性の古細菌の細胞膜のバクテリオロドプシン(bR)の機能的再構成の為に必要な脂質の条件を検討し、頭部構造に酸性リン酸基を有することと、脂質膜の相状態が流動相を示すことが重要であることを示した[11]。古細菌の細胞膜は熱安定性が高く、耐塩性も高いことが知られているが、本プロジェクト期間中に用いられた脂質は古細菌のものではなかったこ

[38] 関連報告：文献[20],[14]
[39] 文献[24] Graphical abstract

とから、古細菌特有の分岐鎖をもつ脂質 PGP-Me(phosphatidyl glycerophosphate methyl ester)に注目した。

本プロジェクト終了後、立体選択的に重水素標識した PGP-Me を全合成し、PGP-Me 脂質膜での炭素鎖の配向を ^{2}H NMR と MD シミュレーションで調べた。PGP-Me の炭素鎖は典型的な膜脂質である DMPC(dimyristoyl phosphatidylcholine)とは異なる状態を示し、DMPC 膜では C-C 結合の傾斜が膜に対してそろっている一方、PGP-Me 膜では膜の垂直方向に対して傾斜がそろわず交互に平行であったり、曲がったりしているため PGP-Me の炭素鎖が絡み合うようになっていることが明らかになった(図 2-14)。このために古細菌の脂質膜と膜タンパク質は熱的にも高塩濃度にも耐性があると考えられる[25]。

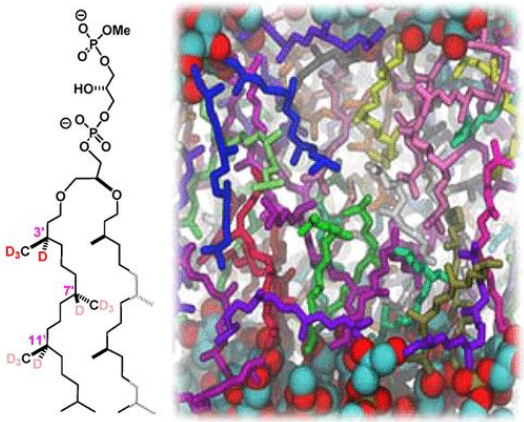


図 2-14　重水素化 PGP-Me(左)とその膜内での構造(右)[40]

また、メチル基の分岐をもつアシル鎖を含む Diphytanoyl PC(DphPC)の重水素置換体を合成して ^{2}H NMR を測定したところ、PGP-Me 炭素鎖で観察された曲がりを示す特徴的な四極子分裂が観測された。このことが DphPC 膜の安定性の重要な要因であると推察された[26]。

③局所麻酔の発現のメカニズムはラフト破壊による

前述したように、本プロジェクト期間中の研究で、ラフト相に親和性をもつ蛍光スフィンゴミエリンプローブを開発し、脂質ラフトが可視化できるようになったことから、膜作用薬剤がラフト/非ラフト相分離に与える影響を精査できるようになった。この蛍光スフィンゴミエリンプローブを用いることにより、局所麻酔薬がラフトを破壊することが見出された[41]。

木下、松森らは本プロジェクト終了後も研究を続け、人工脂質膜に形成したラフトに及ぼす局所麻酔薬の影響をさらに調べた。その結果、局所麻酔薬ジブカインやテトラカインは脂質ラフトに相当する領域を効率的に破壊するのに対し、穏やかな局所麻酔薬であるリドカインの影響は小さいことが分かった(図 2-15)。局所麻酔薬のラフト破壊の程度は麻

[40] 文献[25] Fig.9
[41] 研究終了報告書 p150-152

酔作用の強度と相関していた。また、X 線回折の解析により、ジブカインやテトラカインは膜の奥深くに侵入することで固い脂質ラフトを効率的に乱すのに対し、リドカインは膜表面付近に存在するため脂質ラフトに及ぼす影響が小さいことが分かった。以上の結果より、イオンチャネルが機能する場である脂質ラフトが局所麻酔薬によって破壊されるため、イオンチャネルの活性が抑制され、麻酔作用が発現するとの新たな仮説を提案した[27]。本研究に引き続いて、木下は科研費基盤研究(C)「脂質ラフトをターゲットとする新たな局所麻酔薬の作用機構の提唱」(2020 年度～2022 年度)で、この研究をさらに発展させている。

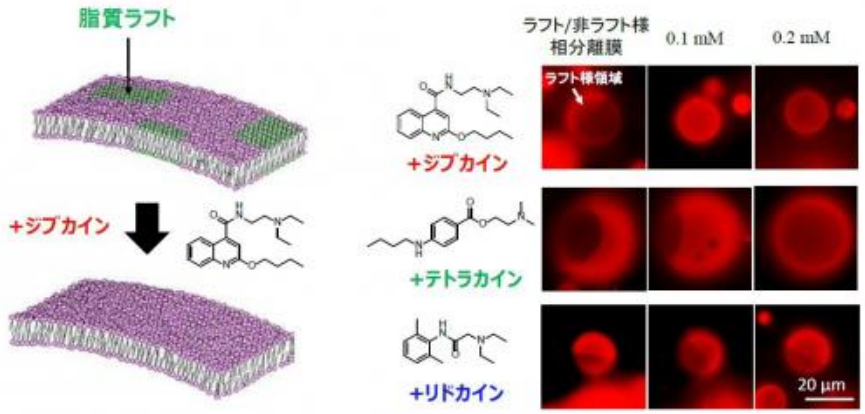


図 2-15　局所麻酔薬によるラフト破壊の模式図[42]
(左)局所麻酔薬によるラフト破壊の模式図。
(右)ラフト/非ラフト様相分離膜に対する局所麻酔薬の影響。相分離膜にジブカインやテトラカインを添加すると、ラフトが破壊され、膜全体が均一になる。リドカインを加えても相分離は解消しない。

④保湿成分セラミドの脂質膜中での挙動の観察

セラミドは脂質の一種で、肌の保湿バリア機能を示す成分として知られている。同時にセラミドは細胞膜にも存在し、シグナル伝達物質としてアポトーシスなどを制御している。さらに、脂質ラフトの形成にも関与していると考えられている。しかし、これまでセラミドの細胞膜での挙動はよくわかっておらず、そのためセラミドの詳しい役割も解析できなかった。目的の物質の挙動を調べる手段の一つは蛍光標識体を使うことであるが、市販の蛍光セラミドは、セラミドの炭素鎖の部分に蛍光基が導入されており、これが脂質膜を乱してしまい、セラミドの豊富な膜領域に分布できないことから利用できなかった。

木下、松森らは蛍光標識 SM と同じ親水性のリンカーを介してセラミドの頭部に蛍光基を導入することで、新しい蛍光標識セラミドを開発した。これによりセラミドが豊富な膜領域を可視化することに初めて成功し、セラミドとセラミドの仲間であるスフィンゴミエリンは混和せずに分離することが分かった(図 2-16)[28]。本研究で開発した蛍光セラミドを用いることで、細胞膜中でのセラミド分子の挙動をありのままに観察することが可能に

[42] 九州大学プレスリリース　図 1 https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/349

なった。今後、本研究で開発した蛍光セラミドは細胞内でのセラミドの機能解明につながる重要なツールになると期待される。

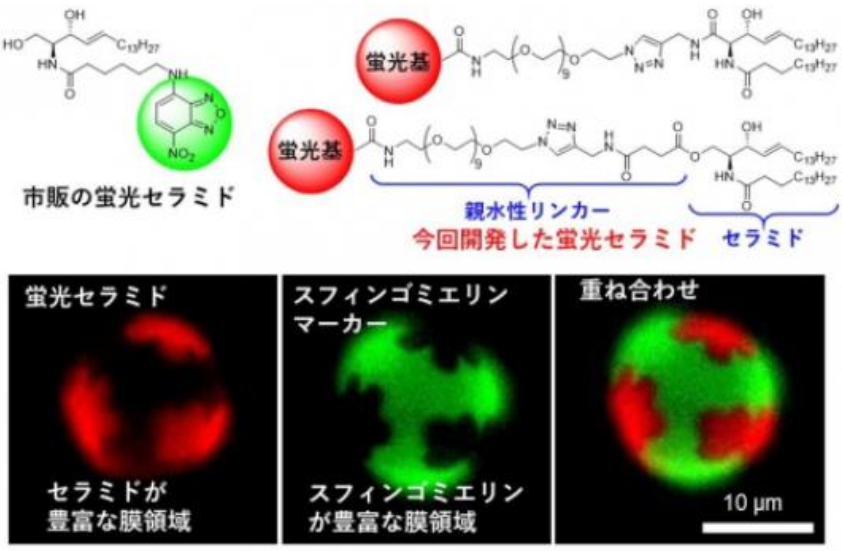


図 2-16　蛍光標識セラミドとその局在[43]

上図：市販の蛍光セラミドと今回開発した蛍光セラミド。
下図：開発した蛍光セラミドを人工細胞膜に導入して蛍光顕微鏡で観察した図。
蛍光セラミド(赤)はセラミドが豊富な膜領域に局在する。SM はセラミドの仲間であるが、セラミドと混和せずに分離する。

2.2.2　膜タンパク質結合脂質と膜作用天然生理活性物質の作用機構の解明

(1)膜タンパク質結合脂質の作用機構とスクリーニング法の開発

本プロジェクトの「脂質活性構造」における課題の一つは、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(タンパク質内部脂質)、および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(膜タンパク質周辺脂質)が関わる相互作用の解明を行うことであった。

タンパク質に関しては、本プロジェクトでは脂肪酸結合タンパク質 FABP3(前出 1.5.2 項)やバクテリオロドプシン(前出 1.5.3 項)の構造とリガンドとの相互作用について解析した。また、細胞膜受容体タンパク質と脂質の相互作用についてプロジェクト期間中に重要な発見がなされた。この研究成果は研究期間終了直前に得られたもので研究終了報告書には記載されていなかったため以下に要約する。

本プロジェクトで開発した蛍光標識スフィンゴミエリンを用いて、京都大学楠見明弘、鈴木健一らとの共同研究で、脂質膜上での 1 分子観察を行った。その結果、スフィンゴミエリンは GPI アンカー型受容体である CD59 とラフト内で結合と解離を繰り返していること、しかも、結合時間は 10 ミリ秒程度であること、さらに CD59 が活性化され、コレステロールが結合した四量体を形成すると、結合時間が延びることなど、重要な発見がなされ

[43] 九州大学プレスリリース　図 https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/317

た(図 2-17)[17]。これまでも、ラフトにはスフィンゴミエリンやコレステロールと一緒に GPI アンカー型タンパク質(GPI-AP)が局在することが予想されてきたが、本研究はそれを実証した初めての結果である。

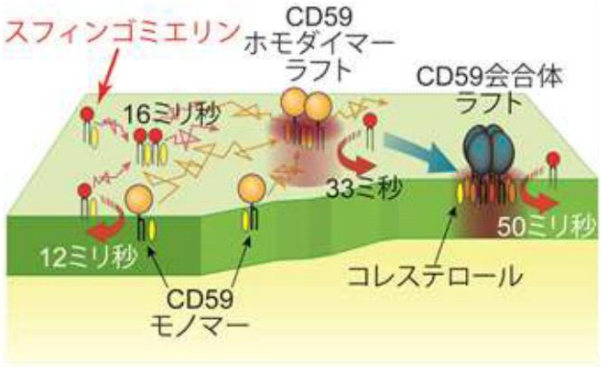


図 2-17　スフィンゴミエリン(SM)の様々な様態の CD59 への過渡的結合の模式図[44]

SMは、コレステロールがある時だけ、CD59単量体、二量化、四量体へ、12～50ミリ秒という短い時間リクルートされた。曲がった矢印とその下の数字はSMの脂質ラフトへの局在とその平均滞在時間を示す。

本プロジェクト終了後、村田は、抗原提示細胞に発現する CD1 分子に結合するガラクトシルセラミドや上皮成長因子(EGF)受容体に結合するガングリオシドに関する研究を継続・進展させた。また、松森らは膜タンパク質結合脂質のスクリーニング法を開発し、バクテリオロドプシンに結合する脂質を同定し、その機能を解析した。

①膜タンパク質 CD1 に結合する生理活性セラミドの構造解析

抗原提示細胞の細胞膜に発現する CD1d タンパク質はガラクトシルセラミド(GalCer)と結合し、これを細胞表面に提示する。これをナチュラルキラーT(NKT)細胞やγδ型 T 細胞が認識すると、これらの免疫細胞が活性化し、サイトカイン産生などを介して、強い抗癌作用などの薬理作用を発現する。

GalCer の誘導体である KRN7000[45]は、海綿より単離された天然物の構造改変により得られた強力な抗腫瘍活性物質である。作用機構として、免疫細胞表面に発現する抗原提示タンパク質 CD1d に結合し、NKT 細胞表面の TCR(T 細胞受容体)と三者複合体を形成して種々のサイトカイン産生を誘導することが明らかにされてきた。

KRN7000 と CD1d との共結晶 X 線構造解析によりその結合様式が示されている一方、共結晶構造の中でもリガンド、特にその脂質鎖の電子密度が低く GalCer の持つ非常に長い脂質がどのように CD1d 分子の疎水ポケットと相互作用しているかの詳細なメカニズムは十分に解明されていないため、さらに優れた化合物開発のための精密な分子設計ができていない状況にあった。

---

[44] JST、大阪大学、九州大学、京都大学プレスリリース　図 3 https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2017/20170309_1

[45] キリン(現 協和キリン株式会社)が合成。

GalCer を結合した CD1d 分子の高分解能での構造解析を行い、脂質の CD1d 分子認識機構を詳細に理解するために、村田は、本プロジェクト期間中に北海道大学前仲勝実らと共同で、KRN7000 のアシル基の炭素の重原子(Br, Se)置換体を合成し、この置換体が元の KRN7000 と同様に NKT 細胞を活性化できることを確認した[29]。この置換体を用いた X 線結晶構造解析により、CD1d に結合した KRN7000 のアシル基の正確な位置を決定することが可能になる。現時点での CD1d-KRN7000 の推定構造は次のようになる(図 2-18)[未発表、村田研 HP]。

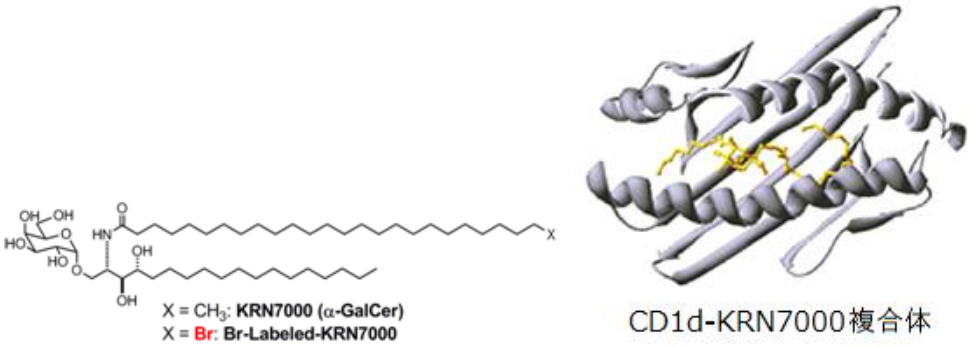


図 2-18　KRN7000(GalCer 誘導体)と CD1d との複合体モデル[46]

プロジェクト終了後は、CD1d タンパク質を大量に取得するためにバキュロウイルスでの遺伝子発現系を利用して蚕で大量調製する方法を試みた。その結果、CD1d と複合体を形成するβ2 ミクログロブリン(β2m)とリンカーで結合したかたちで発現させると大量に得られ、その複合体は安定であることが分かった[30]。

以上のように、重原子置換 KNR7000 が合成され、CD1d が大量に調整できるようになったことから、CD1d-KRN7000 の正確な構造解析が可能になった。

②ガングリオシドの膜タンパク質に対する作用機構の解析

ガングリオシドはシアル酸を有するスフィンゴ糖脂質の一種である。細胞表面の脂質ラフト構成成分として知られ、細胞間の接着や相互作用、細菌やウイルスの感染などに関連している。例えば、インフルエンザウイルスは、ヘマグルチニンが特定のガングリオシドと結合することで細胞に感染する。これらの現象をガングリオシドの脂質ラフト内での挙動に焦点を当てて解析するためには、置換基を導入したガングリオシドが必要であったが、その合成は、オリゴ糖をαシアル化することが困難であった。村田と花島は、岐阜大学安藤弘宗との共同研究により、新規に開発したシアル化法を用いて糖脂質を直接シアル化する合成法を確立した。この方法により、修飾されたシアル酸分子をもつガングリオシドを合成することが可能になった[31]。

[46] 大阪大学 村田研究室 HP　研究説明図 http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/murata/research.html

ガングリオシド GM3 は細胞膜内で EGF 受容体(EGFR)の膜貫通領域に作用することにより、自己リン酸化を阻止して細胞増殖を抑制することが知られている。GM3 の作用機構を知るためには、このペプチド・糖脂質間の相互作用を定量的に評価することは重要である。

花島、村田は、Slotte、安藤らとの共同研究で、EGFR のトランスメンブラン領域(TM)の N 末端に蛍光分子である NBD(nitrobenzoxadiazole fluorophore)を付加したペプチド(NBD-TM)と、蛍光基質 ATTO594 を上述の合成法で結合した GM3 を作製し、この NBD-TM と蛍光 GM3 を用いて、両者の脂質膜中での相互作用を FRET によって評価した。

FRET 解析の結果、これらが脂質膜中で相互作用していることが示され、GM3 と EGFR の膜中ラセン部分の相互作用が、EGFR の二量体化を妨げる役割を担っていることが示唆された(図 2-19)[32]。

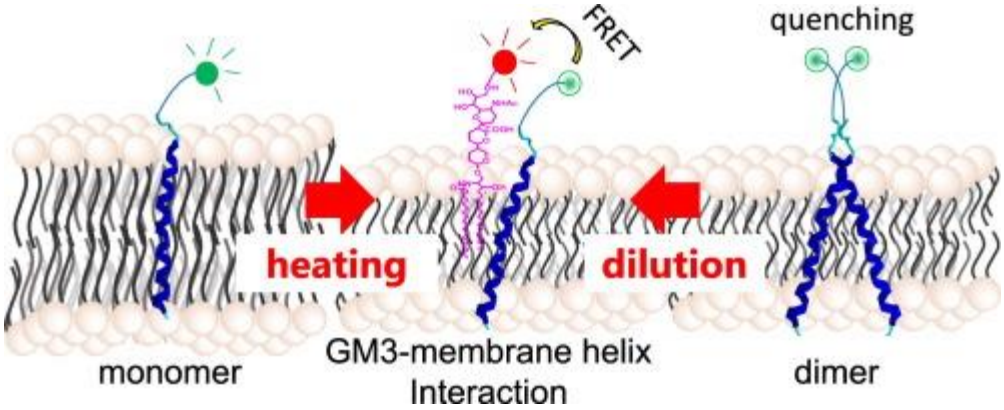


図 2-19　ガングリオシド GM3 と EGFR の脂質膜内での相互作用[47]
青のラセン構造は標識化された EGFR の膜貫通ペプチド,
ピンクの化合物は標識化ガングリオシド GM3 を示す。
高濃度では二量化する EGFR モデルが dilution(低濃度)でモノマーになり、
heating(加温)で GM3 と相互作用する模式図。

③バクテリオロドプシンに結合する脂質の同定と機能の解明

松森らは、膜タンパク質に結合する脂質のスクリーニング法を開発した。センサーチップ表面を比較的短い炭素鎖の単分子膜で覆い、ここに膜タンパク質を少し埋もれた状態で結合させる。単分子膜との疎水性相互作用によって多量の膜タンパク質をセンサー表面に結合でき、この膜タンパク質に結合する脂質などとの相互作用を高感度で検出できるシステムをつくった(2.2.3(1)③で詳述)[33]。

本手法を、古細菌の一種である高度好塩菌が産生する膜タンパク質であるバクテリオロドプシン(bR)に適用した。bR に結合する脂質を探索した結果、bR 生産菌由来の糖脂質である S-TGA-1 が bR に対して nM オーダーで強く相互作用することが示された。この S-TGA-1 は bR の三量化、光駆動サイクルのプロトンポンプ活性を促進した。光駆動サイクルの活性化は、S-TGA-1 による bR の三量化の結果であることが示唆された(図 2-20)[34]。この結果から、脂質が膜タンパク質に特異的に相互作用することにより、膜タンパク質の構造と機能に大きな影響を与えることが明らかになった。

[47] 文献[32] Graphical abstract

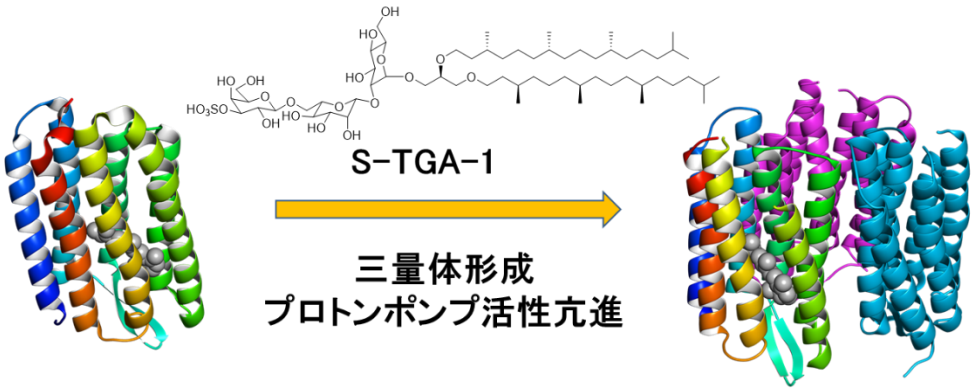


図 2-20　S-TGA-1 は bR を三量化し、プロトンポンプ活性を亢進する[48]

(2)脂質膜に作用する天然生理活性物質の作用機構の解析

前述したように、本プロジェクトの課題の一つは、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相互作用の解明であったが、これと並行して、脂質膜に作用する天然生理活性物質の作用機構の解析も行った。村田は本プロジェクトに先行するいくつかの助成金プロジェクトで、脂質膜に作用する天然物の膜中での複合体構造の NMR による解析を行っていた。この端緒となった天然物が、ステロールと相互作用して脂質膜に細孔を形成し、溶血活性や抗カビ活性を発揮するアンフィジノール 3 である。また、アンフィジノール 3 同様にステロールと相互作用して膜への細孔形成によって活性を発現するアンフォテリシン B にも着目し研究を行った。本プロジェクト期間中には、アンフィジノール 3、アンフォテリシン B に加え、やはりステロールと相互作用するセオネラミド、ステロール骨格をもつサポニンである OSW-1、および、膜タンパク質である液胞型 ATP アーゼの阻害剤、バフィロマイシンに関する研究を行った。

プロジェクト終了後は、これらの天然生理活性物質の研究を継続し、副作用がない抗真菌剤など、創薬の基盤となる知見を得ることを目的に、アンフォテリシン B、アンフィジノール 3 などが膜中の脂質と結合する状態の立体構造・動的構造、脂質との相互作用による構造の変化等についてさらに研究を進めた。

①アンフォテリシン B の脂質膜内における生理活性機構の解析

アンフォテリシン B(AmB)(図 2-21)は、放線菌 Streptomyces nodosus が生産する抗真菌剤で、現在でも重篤な真菌感染症の治療に広く用いられているが、副作用も強い。AmB は生体膜中のステロール(エルゴステロール)およびリン脂質と相互作用し、イオンチャネル複合体を形成することによって細胞障害活性を発現するとされている。その際、AmB は動物細胞膜のステロールであるコレステロールよりも、カビなどの真菌細胞膜にあるエルゴステロールと強く相互作用するため、真菌細胞膜中でイオンチャネルを形成しやすく、選択毒性が発揮されると考えられている。

[48] 文献[34] Graphical abstract

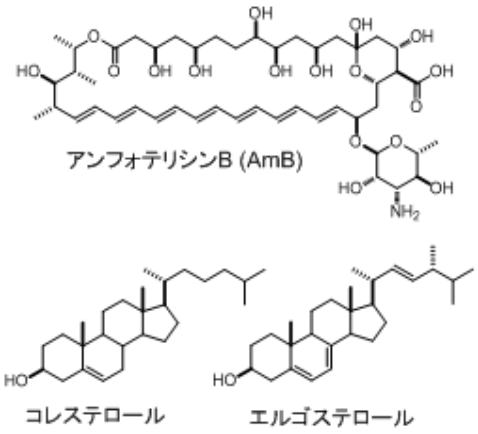


図 2-21　アンフォテリシン B(AmB)とステロール類の構造[49]

これまで AmB とエルゴステロールは head-to-head 型、つまり AmB の糖部分とエルゴステロールのヒドロキシ基が同じ方向で相互作用すると考えられてきた。この点に関し、本プロジェクト期間中の研究で、14 位に ^{19}F 標識した AmB と 26、27 位に ^{13}C 標識したエルゴステロールを化学合成し、REDOR 法により異種核間の距離測定を行い、これらの分子が膜中で近接していることを証明した。このことから、脂質膜中での AmB とエルゴステロールの相互作用は、head-to-head 型ばかりでなく head-to-tail 型も存在することが初めて明らかになった[35]。また、AmB の平面的なマクロライドとエルゴステロールのコアの四環がファンデルワールス力で接近して向き合っていることが分かった[36]。しかし、AmB がコレステロールとエルゴステロールの微妙な違いを認識するメカニズムや、AmB が形成するイオンチャネル複合体の構造は不明のままであった。

プロジェクト終了後は、AmB が形成するイオンチャネル複合体の構造を明らかにすることを目的として、AmB を ^{19}F や ^{13}C さらに ^{2}H などで標識した誘導体を合成し(図 2-22)、固体 NMR により REDOR 法で原子間の距離を推定し、AmB とエルゴステロールの相互作用の head-to-head 型と head-to-tail 型が 70%と 30%の比率で存在することなど、標識した誘導体の有用性を示した[37]。

[49] 大阪大学 村田研究室　HP http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/murata/research.html

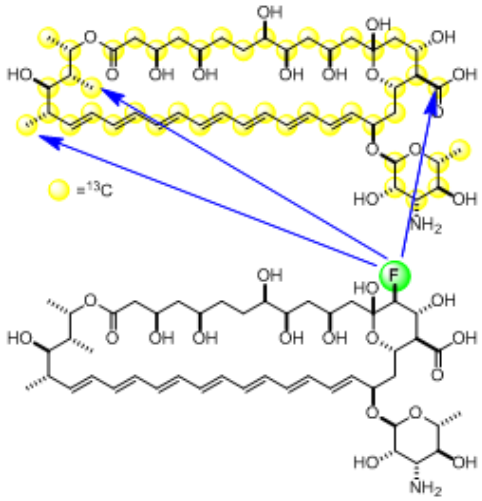


図 2-22　アンフォテリシン B(AmB)と ^{19}F 標識 AmB[50]

また、メチルエステル化した AmB(AME)のメチルを重水素置換した d_3AME とそれをフッ素(^{19}F)化したもの、および ^{13}C 化したものを合成した。これらすべての AmB 誘導体は膜中での分散など元の AmB と同様な挙動を示した。脂質膜中での固体 NMR 解析により、AmB 誘導体の挙動はその濃度と温度で変化することが分かった。また、AmB 誘導体、エルゴステロール、DMPC(dimyristoyl phosphatidylcholine)が 1:5:45 比率の脂質膜では、AmB 誘導体は十分な可動性を持っていて、^{19}F のケミカルシフト、^{2}H の四重極カップリング、^{13}C-^{19}F 二重極カップリングから、AmB 誘導体の分子軸は脂質二重膜と垂直であり、AmB はエルゴステロールと複合して樽板構造(barrel-stave model)でイオンチャネルを形成していることが推定された(図 2-23)[38]。

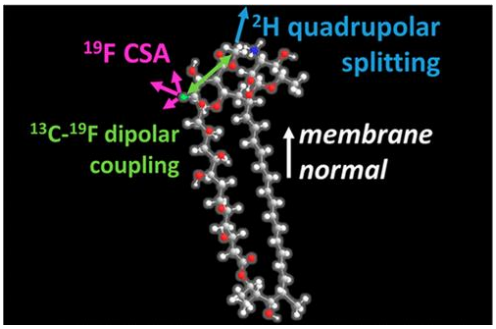


図 2-23　AmB の脂質膜中での配座[51]

さらに、膜表面近くに存在するマンガンの AmB の個々の ^{13}C に対する固体 NMR シグナルへの影響のデータから AmB 分子の末端の部分が脂質二重膜の表面に近いところに位置し、AmB とエルゴステロールの複合体が脂質二重膜に 1 分子長で伸びていることが明らかとな

[50] 大阪大学 村田研究室　HP http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/murata/research.html
[51] 文献[38] Graphical abstract

った。このことは、複合体の構造計算からも支持された(図 2-24)[39]。図 2-25 に AmB が形成するイオンチャネルのモデル図を示す。

このようにして AmB イオンチャネル複合体の構造および作用機構が明らかになれば、より副作用の少ない薬剤の開発につながると期待される。

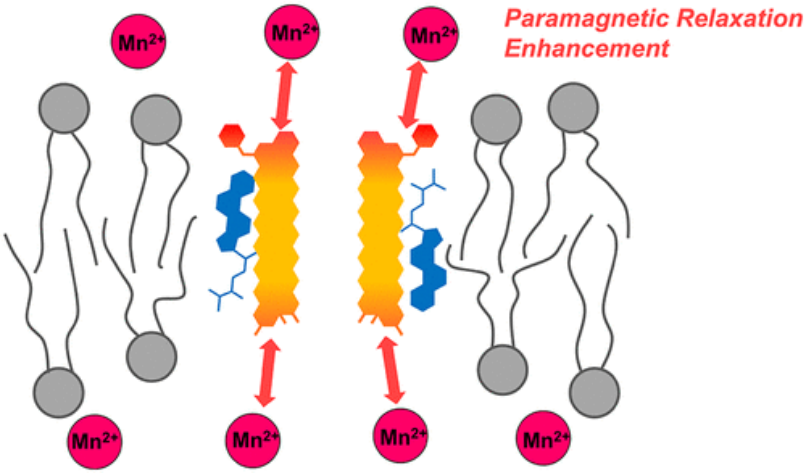


図 2-24　AmB とエルゴステロール複合体の脂質膜中での存在状態[52]

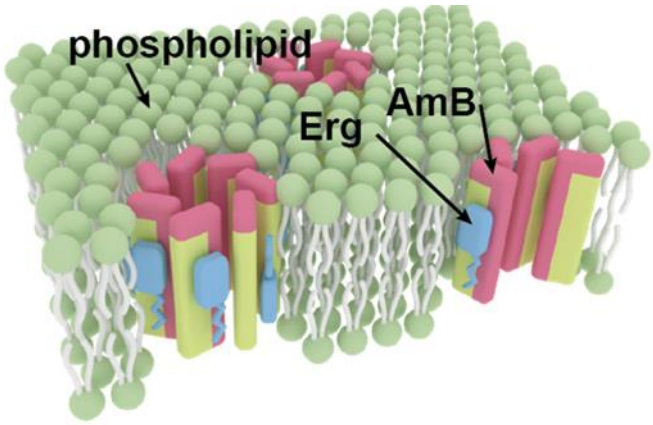


図 2-25　AmB の脂質膜中での配座とイオンチャネルのモデル図[53]

②アンフィジノール 3 の脂質膜内における生理活性発現機構の解析

アンフィジノール 3(AM3)は、植物性プランクトンである渦鞭毛藻 Amphidinium klebsii が生産するユニークな構造の化合物(図 2-26)で、前項の AmB よりも強い抗真菌活性や溶血活性を示す。村田らは、AM3 の絶対立体配置を含む全立体構造を決定しており[54]、また AM3 が脂質膜のイオン透過を促すことを確認していた[55]。

---

[52] 文献[39] Graphical abstract
[53] ChemRxiv. https://doi.org/10.33774/chemrxiv-2021-46790-v2
[54] Morsy et al, Tetrahedron 61, 8606-8610, 2005
[55] Houdai et al, Biochim. Biophys. Acta 1667, 91-100, 2004

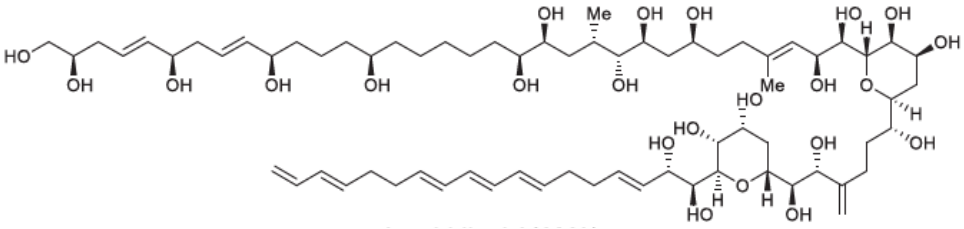


図 2-26　アンフィジノール 3(AM3)の構造[56]

本プロジェクトではリポソームを用いて膜中で AM3 と結合するステロール類の水酸基の立体配位を解析し、そのβ配位が重要であり、ββ配位のステロールがあるときのみ脂質膜から色素の漏出が起こることから、細孔が形成されることを示した[40]。

本プロジェクト終了後、九州大学大石徹と共同で、AM3 の部分構造を合成することで立体化学の訂正をした[41]。

一方、松森、木下は、福井大学老木成稔と共同研究を行い、脂質膜中の AM3 を原子間力顕微鏡(AFM)で観察した。AM3 はステロールが存在するときのみ非選択的なチャネルを形成し、それは複数の樽板からなる孔であった(図 2-27 上図)。AM3 濃度を上げると大きな伝導度の巨大なチャネルが形成され、その形状はドーナツ状であった。そのドーナツの孔は約 10nm で、ドーナツは表面が皺の寄ったラフト状で、外側と内側の膜がつながっていた(図 2-27 下図)。すなわち、AM3 は濃度に依存して異なる形状の孔を形成することが明らかになった[42]。

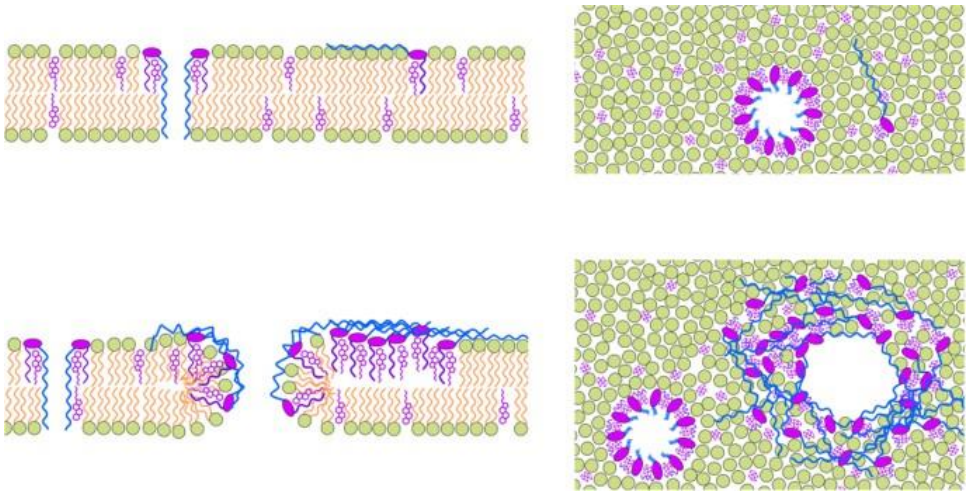


図 2-27　AM3 と脂質膜へのチャネル生成[57]
下図は AM3 濃度を上げた状態

[56] 研究終了報告書 p90
[57] 文献[42] Fig.6

また、松森と木下は、ラフト様秩序ドメイン(秩序相 Lo)と非ラフトの非秩序系ドメイン(無秩序相 Ld)に相分離した膜への AM3 の効果を調べた。その結果、AM3 の濃度が増加し、22μM になると相分離を崩すことが分かった(図 2-28)。これは脂質ラフトを破壊することが知られているメチルβシクロデキストリンに似た作用であった。表面プラズモン共鳴観測と色素漏出試験から、AM3 が秩序系脂質膜中よりも、非秩序系の脂質膜中のコレステロールを選択的に認識して相互作用していることが示された。次に、AM3 により誘導される膜の相分離の解消の原因を探るために、FCS(蛍光相関分光法)により膜の流動性を測定したところ、AM3 が非秩序系膜に秩序をもたせていることが分かった。

以上の結果から、AM3 は秩序系よりも非秩序系の脂質との相互作用の弱いコレステロールに結合して、無秩序系を秩序系の相に変換し、結果として相分離をなくすように働くことが示された[43]。

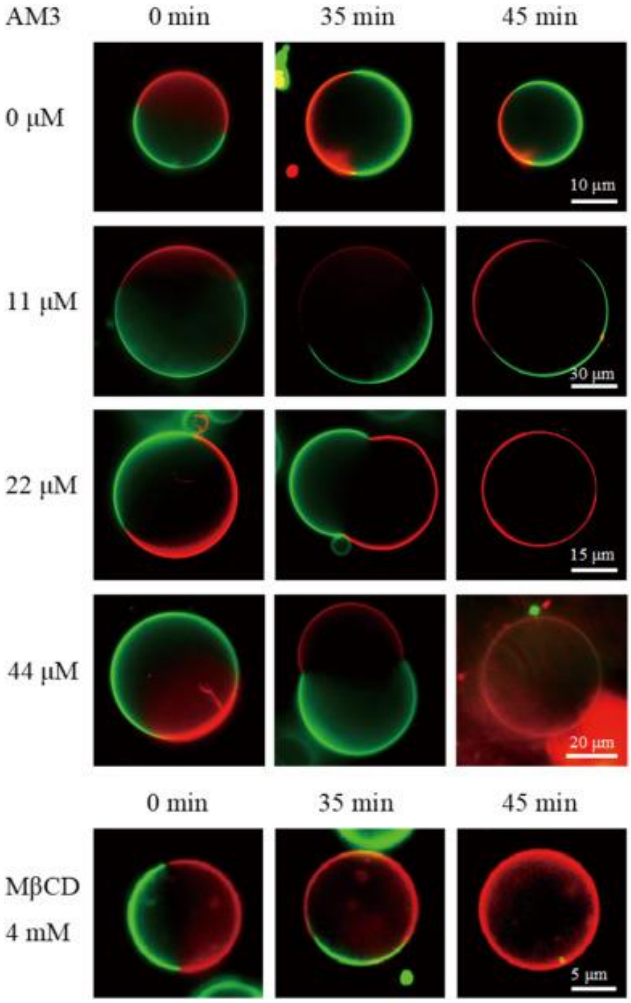


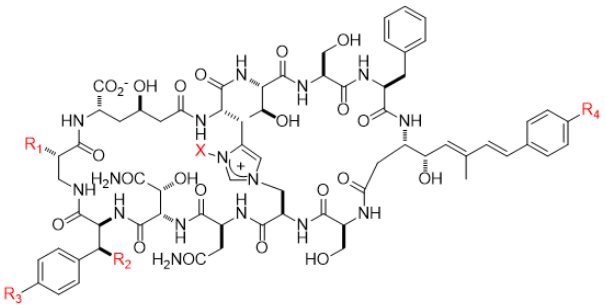
図 2-28　脂質膜 GUV の AM3 添加による非秩序相への相転換[58]
赤は非秩序系、緑は秩序系を示す。AM3 を 22μM 以上添加すると時間の経過に応じて全体が非秩序系に移行する。最下段はメチルβシクロデキストリンを添加。

[58] 文献[43] Fig.2

なお、AM3 はアンフォテリシン B 研究の端緒となったものであるが、調製や標識体合成の困難さにより、固体 NMR 解析はあまり進まなかった中、2020 年に九州大学の大石らによって AM3 全合成が達成された[44]。化学合成によって AM3 標識体の調製が可能になれば、アンフォテリシン B 同様に固体 NMR 測定によるステロール認識機構の解明につながると期待される。

③セオネラミドの脂質膜内における生理活性発現の解明

セオネラミド(TNM)は、元々強い抗真菌活性を指標に精製された 2 環性ペプチドで 1989 年に化学構造が報告された(図 2-29)。TNM-A は 3β ヒドロキシステロールを認識することが明らかとなっている。



	R_1	R_2	R_3	R_4	X
Theonellamide A	OH	Me	Br	H	β-D-Gal
Theonellamide B	OH	Me	Br	Br	H
Theonellamide C	H	H	H	Br	H
Theonellamide D	H	H	Br	Br	β-L-Ara
Theonellamide E	H	H	Br	Br	β-D-Gal
Theonellamide F	H	H	Br	Br	H

図 2-29　セオネラミド(TNM)の化学構造[59]

村田は、本プロジェクト期間中に、理化学研究所吉田稔、東京大学松永茂樹らと共同で、表面プラズモン共鳴(SPR)を用いた相互作用解析によって、TNM-A がステロール(コレステロール、エルゴステロール)を含む脂質膜に親和性を示すこと、^{2}H NMR により、脂質膜中のステロールと直接相互作用していることを明らかにした[45]。また、TNM-A は、水の中では脂質と水の界面に存在し、脂質二重膜に侵入していくことが分かった[46]。顕微鏡観察や ^{31}P NMR の結果から、TNM-A は、ステロールとの直接の相互作用で膜の表面に結合し、膜表面に蓄積した TNM-A は、濃度依存的に膜の局部を湾曲させ、膜を破壊するというモデルが提出された(図 2-30)[47]。

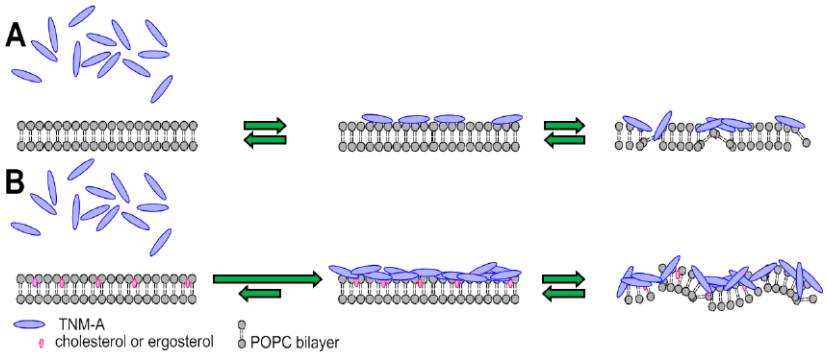


図 2-30　TNM-A の膜作用モデル[60]
A. 膜ステロール非存在下、B. 膜ステロール存在下

[59] 研究終了報告書 p87
[60] 研究終了報告書 p89

TNM-A は、DMSO(dimethyl sulfoxide)を含む液体では単量体で存在することから、本プロジェクト終了後、この DMSO 溶液に可溶な 25-ヒドロキシコレステロールを用いて液体 NMR を行い、ケミカルシフトを計測することにより、TNM-A とコレステロールとの親和性を測定した。その結果、TNM-A ペプチドの中の特定アミノ酸の疎水性部分にコレステロールが結合することにより極性が減少し、TNM-A が脂質二重膜に貯留し、膜の中に浸透していくことにより膜破壊を起こすと推定された(図 2-31)[48]。

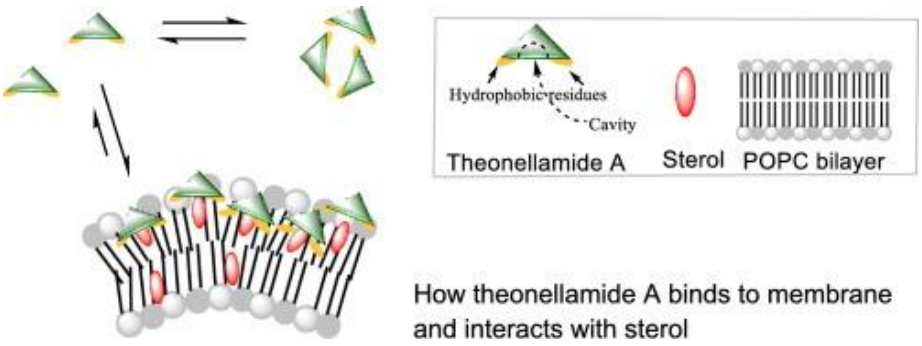


図 2-31　TNM-A の脂質膜への結合とステロールとの相互作用(模式図)[61]

④ステロイド骨格生理活性脂質の生体膜に及ぼす影響

OSW-1(Ornithogalum saponin、図 2-32)は、ユリ科植物球根から単離されたコレステロール骨格をもつサポニン[62]である。様々な種類の癌細胞に対して強力かつ選択的な抗癌活性を示すが(mean IC50=0.78nM)、分子レベルでの詳細な作用機構は未だ解明されていない。

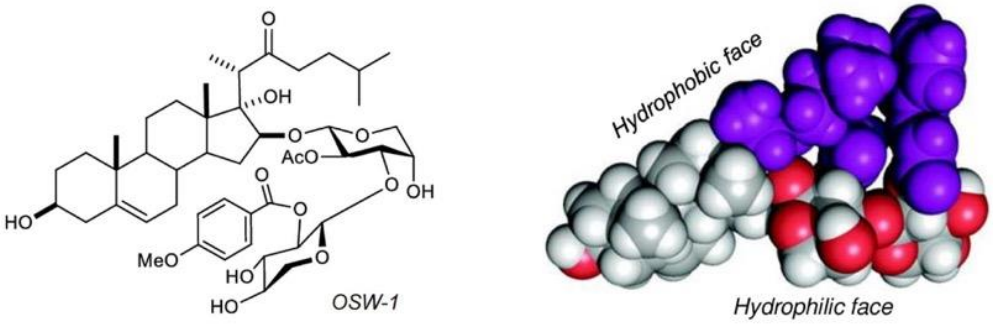


図 2-32　OSW-1 の構造[63]

村田は本プロジェクトで、OSW-1 の作用機構を、東京農工大学櫻井香里と共同で、ステロール認識(結合)と脂質膜破壊能力を調べることにより解析した。その結果、OSW-1 が脂質膜を破壊するためには、膜中にステロールが含まれていることが必要で、コレステロー

[61] 文献[48] Fig.6
[62] サポゲニンと糖から構成される配糖体の総称。界面活性作用があるため、細胞膜を破壊する性質があり、血中に入った場合には赤血球を破壊(溶血作用)することもある。
[63] 文献[49] Fig.1

ルが最も強く、エルゴステロールでも破壊はみられるが、エピコレステロールでは破壊が起きないことが分かった。赤血球膜の破壊をジギトニンと比較するとその強さは同程度であった。固体 NMR で解析した結果、OSW-1 は膜のコレステロールと大きな凝集体を作らずに結合するが、ジギトニンは凝集体を形成することが分かった。また、膜の孔の形成を調べたところ、OSW-1 では直径約 1.6nm の孔が形成されるが、ジギトニンでは孔は形成されなかった。これらの結果から図 2-33 に示すモデルを提出した[49]。

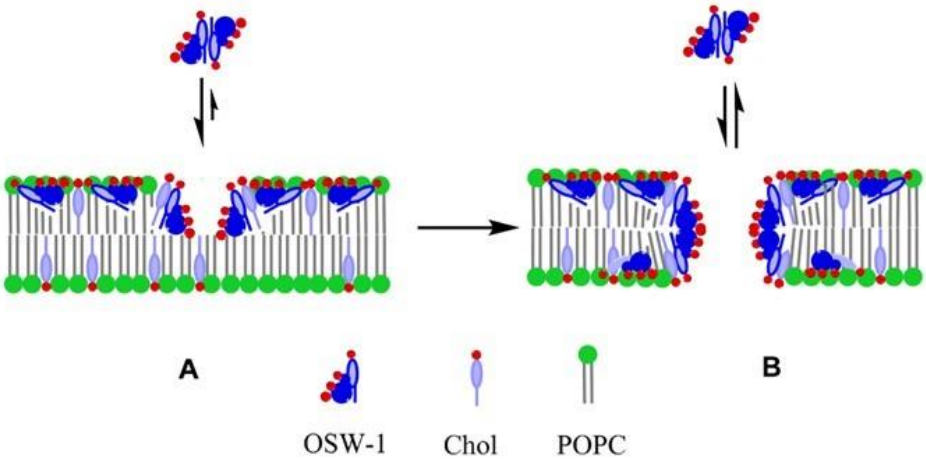


図 2-33　OSW-1 の膜透過性形成のモデル[64]
A. コレステロールを含む膜への OSW-1 の蓄積が膜の欠陥を誘発する。
B. さらなる OSW-1 のコレステロールへの結合で樽板状の構造が形成される。

また、プロジェクト終了後、コレステロールを含む脂質二重層との相互作用、膜破壊能力を、OSW-1 と他のサポニン類と比較したところ、OSW-1 はソヤサポニン(triterpenoid saponin)よりも強く、ジギトニン(steroidal saponin)より若干弱いことが分かった[50]。

⑤バフィロマイシンの脂質膜内における生理活性発現の解明

液胞型 ATP アーゼ(Vacuolar-Type ATPase：V-ATPase)は真核生物の内膜に広く存在するプロトンポンプであり、オルガネラの内部を酸性に保つ役割を担う一方で、骨粗鬆症など様々な疾患にも深く関与している。放線菌から単離されたマクロライド系抗生物質のバフィロマイシン(Baf)は代表的な V-ATPase 阻害剤であり、骨粗鬆症やがん疾患などの研究においても重用されている天然物である。また Baf は、V-ATPase が関与する様々な生理機能を解明するための分子ツールとして汎用されている。しかしながら、その阻害機構に関する詳細な知見は得られておらず、新規薬剤開発の観点からもその分子レベルでの作用機構の解明が望まれていた。

村田と土川らは本プロジェクト期間中、筑波大学臼井健郎との共同研究で、固体 NMR を用いた原子間距離測定により V-ATPase と Baf の相互作用を解析するために、位置選択的

[64] 文献[49] Fig. 9

^{19}F、^{13}C 標識 Baf 誘導体の合成法を検討し、3 つのパーツを合成したのち、それをアルドール反応と Stille カップリングによって連結することにより Baf の誘導体を合成する方法を確立した(図 2-34)。得られた標識分子は酵母由来の膜画分に存在する V-ATPase に対して Baf と同等の強力な阻害活性を示した[51], [52]。一方、6 位と 8 位にメチル基のない誘導体は活性を示さなかったことから、これらのメチル基が Baf の活性の発現に大きく寄与していることが示唆された[53]。

プロジェクト終了後は、阻害活性の異なる ^{19}F 標識 Baf 誘導体を合成し、それらの固体 NMR を測定することによって、脂質膜内の分子挙動を観察した。その結果、V-ATPase 阻害活性の強さの異なる誘導体間で、脂質膜との親和性と動態に違いがあることが分かった。これらは Baf と脂質の相互作用がその生物活性に大きく影響していることを示している。Baf の分子内の水素結合で強固な平面構造をとると膜に対する親和性が高くなることが分かった(図 2-34)[54]。

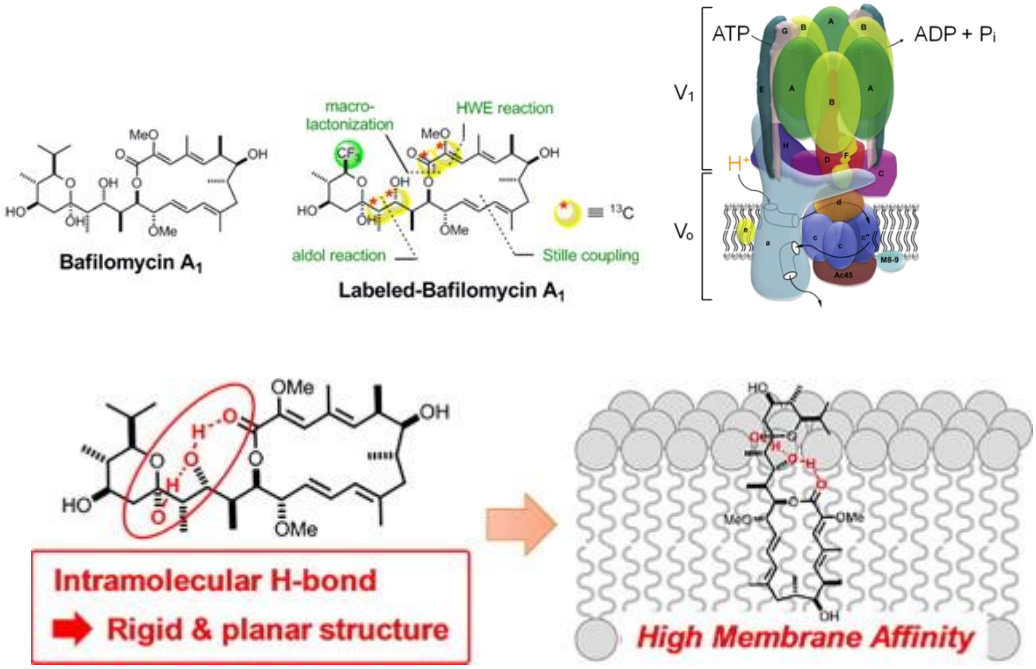


図 2-34　Baf の構造(左上)と V-ATPase モデル(右上)[65]
Baf の分子内水素結合と脂質膜への親和性(下)[66]

2.2.3　膜脂質、膜タンパク質の構造解析の革新的技術開発

(1)脂質ラフトおよび、脂質・膜タンパク質の相互作用解析技術の開発

1997 年に Vold らによって小型等方バイセルに膜作用性のペプチドを導入し、溶液 NMR で構造解析を行う研究が報告されていた[67]。そこで村田と松森らは、本プロジェクト開始

[65] 大阪大学 村田研究室　HP http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/murata/research.html
[66] 文献[54] Graphical abstract
[67] Vold and Prosser, J. Biomol. NMR, 9, 329-335. 1997

前に、小型等方バイセルの研究に着手した。バイセルをモデルとして用いて、細胞膜に作用する抗生物質エリスロマイシンなどの天然生理活性物質の膜内での構造を溶液 NMR で解析した[68]。本プロジェクト期間中の研究では、スフィンゴミエリン(SM)のアミド部分の配向をバイセルを用いて溶液 NMR で解析した[1]。また、重水素置換 SM を 19 種類合成して SM のアルキル鎖の揺らぎを固体 NMR で観察するなど、溶液および固体 NMR と標識体の有機合成を組み合わせた緻密で網羅的な構造解析手法を展開した([4]など)。

このように、本プロジェクトでは、脂質ラフトを形成する SM の脂質膜中での構造や挙動を NMR 解析を中心として多くの手法を開発して解析した。また、蛍光標識 SM の開発は、本プロジェクト期間中および、終了後のラフト研究の展開に大きく寄与した。さらに、松森らは脂質・膜タンパク質間の相互作用の新規な解析手法や、脂質ラフト阻害アッセイ法を開発した。

①固体 NMR による解析手法の確立

村田と大阪大学梅川雄一(村田研究室)らは固体 NMR を用いた流動相脂質の構造研究を行うためのツールとして以下の技術を新しく開発した。本プロジェクト期間中の成果が大半であるが、プロジェクト終了後の展開にも重要であるため、下記にまとめる。

(ⅰ) 多成分系脂質膜の ^{31}P 化学シフト異方性測定法の開発：MAS(Magic Angle Spinning)下、^{31}P ラジオ波の照射により化学シフト異方性をリカップルすることで、高分解能固体 NMR スペクトル中で多成分のリン脂質シグナルを分離し、それぞれの運動性を評価することを可能とした(centerband-only analysis of rotor-unsynchronous spin echo:COARSE 法) [55]。

(ⅱ) MAS プローブで測定可能な配向膜調製法の開発：低試料量の MAS プローブに合わせた、ガラス板支持配向脂質二重膜の調製法を開発し、従来 3mg 程度必要であった標識体の試料量を約 0.2mg 以下に削減し、貴重な合成化合物や天然物の脂質膜内の配向状態解析を可能とした[56]。

(ⅲ) 試料温度測定プローブ分子の開発：温度依存的に化学シフトが変化する常磁性金属錯体 TmDOTA[69]の ^{13}C 標識体の合成を行い、^{13}C 化学シフトを用いた試料内部温度測定プローブを開発し、固体 NMR 試料内部の正確な温度測定が可能となった[57]。

村田らは上記で独自に開発した重原子標識した脂質分子の膜内での構造や挙動を NMR によって解析することに加えて、本プロジェクト期間中に共同研究を含めて高分解能 X 線結晶構造(SACLA での XFEL 利用)[12]、ラマン分光[6]、電子線散乱[58]、分子シミュレーションなどを組み合わせた解析も行って幅広い成果を得た。

---

[68] 本プロジェクト前の成果：(a) Matsumori et al, J. Med. Chem. 49, 3501, 2006、(b) Matsumori et al, Nat. Prod. Rep. 27, 1480, 2010

[69] thulium-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetate

②膜構造解析のための新規な蛍光標識脂質の開発

本プロジェクトの特別重点期間中に村田は、九州大学松森、木下、京都大学楠見明弘(現 沖縄科学技術大学院大学)、鈴木健一(現 岐阜大学)、九州大学池ノ内順一らとの共同研究で、蛍光物質の立体障害を避けて脂質自体がラフト様 Lo 相(秩序液体相)に取り込まれるように設計した蛍光標識スフィンゴミエリン(SM)を合成した[17]。蛍光分子を水になじみやすいようにポリエチレングリコール鎖を挟んで SM に結合させることによって、ラフト様 Lo 領域に取り込まれやすくなる蛍光標識 SM を完成させた。これらは天然の SM と同様の割合で、細胞膜上においてラフトに取り込まれ、脂質ラフトの観察と標識化合物間の距離を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)で推測するのに有用な脂質プローブであることが明らかになった(図 2-35)(2.2.1(1)項参照)[16]。

この蛍光標識 SM を用いることにより、SM が集積して形成される脂質ラフトは小さく、短寿命の構造であることが分かった。さらにプローブを実際の細胞膜に適用することで、(ⅰ)SM は類似のグリセロ糖質に比べて安定なダイマーを形成すること、(ⅱ)SM ダイマーの安定化にはコレステロールが不可欠であること、(ⅲ)SM は CD59 と安定な会合体を形成することなどを明らかにした(2.2.1(1)項参照)[17]。この蛍光標識脂質は本プロジェクト終了後の発展・展開研究に使用され、多くの成果の創出に貢献した。

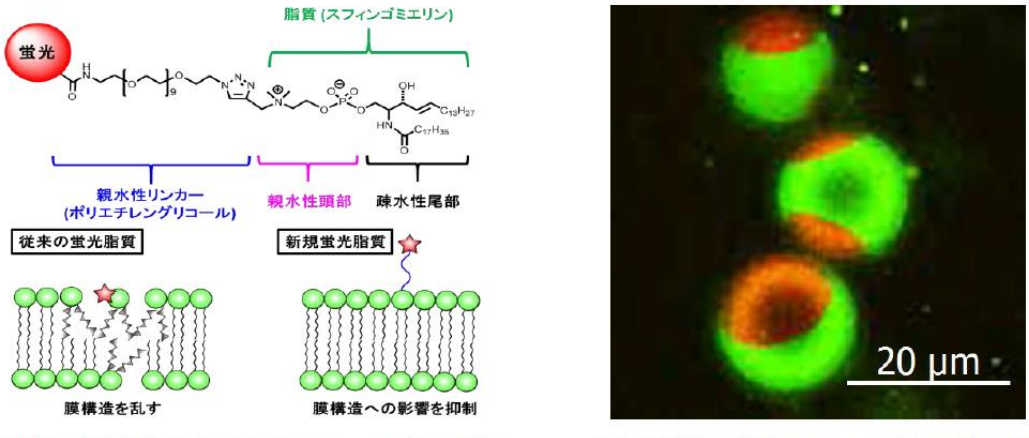


図 2-35　新規なリンカーを持つ蛍光標識 SM[70]

左上：新たに合成した SM 蛍光標識分子。
左下：従来の蛍光標識体との違い。親水性の蛍光分子とリンカーで天然脂質と同じ挙動をする。
右図：緑色の蛍光標識 SM は、人工膜のラフト様領域に局在する。赤色領域は非ラフト領域。

③脂質・膜タンパク質間の相互作用の新規な解析手法、および結合する物質のスクリーニング法の開発

松森、木下らは、膜タンパク質に相互作用する脂質を特定する方法を福井大学老木成稔と共同で開発した。まず脂質固定特異的タンパク質の取得を目指した脂質固定ビーズの開

[70] JST、大阪大学、九州大学、京都大学プレスリリース　図 1,2 https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2017/20170309_1

発を行い、脂質ラフトに特異的な脂質であるスフィンゴミエリンやセラミドを固定したビーズの開発に成功した。さらにそれらに特異的に結合するタンパク質の取得にも成功した。

一方、脂質と膜タンパク質の定量的相互作用解析に関しては、表面プラズモン共鳴法に基づく新たな手法を開発した。本手法では、センサーチップ表面を比較的短い炭素鎖の単分子膜で覆い、ここに膜タンパク質を多少埋もれた状態で結合させる。単分子膜との疎水性相互作用によって多量の膜タンパク質をセンサー表面に結合でき、脂質と膜タンパク質の相互作用を高感度で検出可能となった。また、タンパク質との疎水表面は単分子膜に完全に埋もれずに水に露出しているため、外部から添加した脂質との相互作用も検出可能となる(図 2-36)[33]。

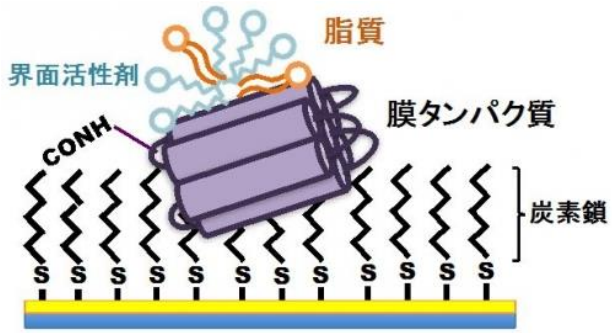


図 2-36　膜タンパク質に作用する脂質の検出(概念図)[71]

前述(2.2.2(1)③)したように、本手法を高度好塩菌が産生する膜タンパク質バクテリオロドプシン(bR)に適用して、bR に相互作用する生産菌由来糖脂質 S-TGA-1 を検出し、S-TGA-1 が bR に対して、nM オーダーで強く相互作用することを示した。この S-TGA-1 が bR の三量化や光駆動プロトンポンプ活性を促進することも明らかにした[34]。

これは特異的脂質が膜タンパク質の構造や機能を制御することを示す好例となっている。また、本手法を pH 依存性カリウムチャネル KcsA に適用し、相互作用する脂質がチャネル活性に与える影響についても明らかにした。

このように脂質・膜タンパク質間相互作用解析のプラットフォーム構築に必要な基盤技術とそれを利用した、相互に結合する未知の物質をスクリーニングする手法を確立した。

④脂質ラフト阻害アッセイ法の開発

松森は、科研費・挑戦的萌芽研究「ラフト阻害アッセイ法の開発」(2018 年度～2019 年度)にて、脂質間 FRET を利用することで 2 種類のラフト阻害アッセイ法を構築した。すなわち、(ⅰ)ラフト相に集積する蛍光スフィンゴミエリン(SM)を FRET ペアとし、ラフト阻害剤によりラフトが解消されると脂質間 FRET が減少するのでこれを観測する方法、および、(ⅱ)ラフト相に集積する蛍光 SM と非ラフト相に集積する蛍光 DOPC(dioleoyl-

[71] 九州大学プレスリリース　図 https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/320

phosphatidylcholine)を FRET ペアとし、ラフト解消によって両者が近づくことで脂質間 FRET が増加するのでこれを観測する方法である(図 2-37)。

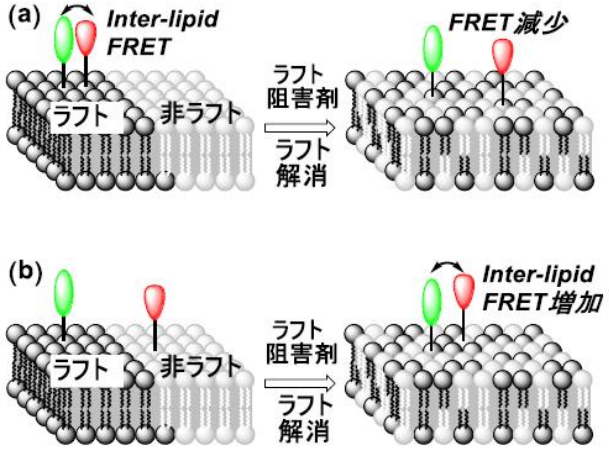


図 2-37　2 種類のラフト阻害アッセイ法[72]

具体的には、まず人工脂質膜を用いてアッセイ法を構築した。次にマイクロプレートを用いたハイスループット化、さらには生体膜(赤血球膜)を用いたアッセイ法の構築へと展開した。

既に木下、松森らは局所麻酔薬のラフトへの作用を調べる過程でジブカインが 100μM でラフトを解消する働きがあることを見出していた(前出、2.2.1(2)③)[27]。このジブカインのラフト破壊作用を、ラフトに集積する蛍光 SM および非ラフトに集積する蛍光脂質を FRET ペアとして人工脂質膜を用いたアッセイ法で検出できることを確認した。つまり、人工脂質膜を用いたラフト阻害アッセイの骨格ができた。次にこの手法をマイクロプレートリーダーに適用し、96 穴マイクロプレートでのハイスループットスクリーニングを構築した。ラフト阻害を示す化合物では脂質間 FRET が上昇した一方で、界面活性作用によりリポソームそのものを破壊する化合物では脂質間 FRET が低下したことから、化合物のラフト破壊作用の有無および膜破壊作用の有無の判定が可能になった。

(2)タンパク質および難水溶性化合物-タンパク質複合体結晶化技術の開発

NMR とともに X 線構造解析も本プロジェクトを遂行するにあたって重要な役割を担った。タンパク質の X 線構造解析を行うためには結晶作製が必須であるが、難水溶性化合物-タンパク質複合体の結晶を得ることは非常に困難であったため、この難水溶性化合物-タンパク質複合体の結晶化技術の開発に取り組んだ。

[72] 科研費挑戦的研究(萌芽)「脂質ラフト阻害アッセイ法の開発と阻害剤の探索」研究成果報告書 https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-18K19149/18K19149seika.pdf

①透析膜中の高強度ヒドロゲル中での難水溶性化合物-タンパク質複合体の結晶化

標的タンパク質と化合物との複合体結晶の作製には、化合物の溶けた溶液中に結晶を浸すことによって結晶中に化合物を拡散させて標的タンパク質分子と結合させる方法が用いられる。難水溶性化合物の場合、有機溶媒に溶かすことになるため、難水溶性化合物の溶けた有機溶媒中にタンパク質結晶を浸漬させることになり、浸透圧変化により結晶が損傷してしまい、構造解析が困難となる。杉山は、溶液中で育成させることが常識とされてきたタンパク質の結晶化を、完全に固化させたハイドロゲル中で育成させる世界で初めての結晶化技術を開発した[73]。この技術によって育成したタンパク質結晶は、結晶の周りに固化したゲルが存在するため機械的強度が向上し、高濃度の有機溶媒に浸漬しても安定であった。また、結晶に接触することなく取り出すことができるため、結晶に損傷を与えることなくマウント操作が可能となり、高精度なX線回折データを得ることができた。上記技術は本プロジェクトでも応用されているが、高温でタンパク質結晶を扱うためにタンパク質が不活性化するか凝集しやすい欠点があった。

本プロジェクト終了後も、杉山は実践的技術の開発研究を続けてきた。JST・A-STEP 機能検証フェーズ試験研究タイプ「難水溶性化合物ータンパク質相互作用解析に対応したゲル中結晶作製装置の開発」(2019 年度)[74]で株式会社創晶[75]や株式会社クニムネ[76]との共同開発で最適化を行った結果、透析膜の付いたプレートを使って、ハイドロゲルの上部からタンパク質をゲルに浸透させ、ゲルの底部で結晶を回収することにより、低温でタンパク質結晶を生成させる装置の開発に成功した[77]。これにより温度感受性タンパク質の熱による損傷を防いで結晶化することができるようになった[59]。

②超微細バブルによるタンパク質の結晶核形成

杉山らは以前に、集光フェムト秒レーザーを用いて、低過飽和溶液から強制的に結晶核を発生させることで、様々なタンパク質の高品質結晶作製に成功してきた[78]。さらに杉山らは、超微細バブル(ultra-fine bubbles)により、特にトリプシンやリゾチームなど塩基性タンパク質において結晶核形成が容易に起こることを見出した。これは結晶核生成の機構解明のきっかけにもなる知見と考えられる[60]。

---

[73] (a)Sugiyama et al, Jpn. J. Appl. Phys. 48, 75502, 2009、(b)Matsumura et al, J. Synchrotron Rad. 18, 16, 2011

[74] 現行のアガロースを用いた凝固ゲル中結晶作製装置を改良することによる、ゲル中への溶液拡散を制御し、凝固ゲル中結晶を迅速に作製できる汎用性をもった改良型装置の開発。https://researcher.jp/projects/view/1078969

[75] http://www.so-sho.jp/

[76] http://www.kunimune.co.jp/

[77] 高知大の解説記事 https://www.kochi-u.ac.jp/src/maga/Vol_15.pdf

[78] 吉川ら、「フェムト秒レーザー誘起キャビテーションバブルによるタンパク質の結晶核発生」日本結晶成長学会誌,38(3), 161, 2011

2.3　プロジェクト参加研究者の活動状況

村田は、本プロジェクト終了後も活発に研究を展開し、科研費基盤研究(S)「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」(2016 年度～2020 年度)、挑戦的研究（萌芽）「脂質二重膜の相転移現象とアシル鎖の深度依存的溶解の観測」(2016 年度～2017 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「天然物リガンドを利用した生体膜経由の化学シグナル伝達機構の解明」(2017 年度～2021 年度)、挑戦的研究(萌芽)「生体膜のドメイン形成における脂質アンカーや微量脂質の役割」(2019 年度～2020 年度)、科研費基盤研究(A)「生体の非平衡系を再現できる脂質二重膜の構築と動的脂質集合体の描像」(2021 年度～2024 年度)で研究代表者として本プロジェクトの発展を図っている。また、啓発活動として、村田は松森と共著で天然物構造解析への NMR の応用について総説にまとめている[61]。

グループリーダーの松岡茂は、2015 年東京大学医学系研究科特任研究員として(2016 年特任准教授)転出したが、本プロジェクトのグループリーダーを続けた。2017 年大分大学医学部特任准教授、2021 年同特任教授に就任して、継続して標的タンパク質(集合体)の構造から医薬を分子設計する研究を続けている。科研費基盤研究(B)「分泌型スカベンジャー受容体 AIM のリガンド認識機構」(2017 年度～2019 年度)、科研費基盤研究(B)「天然物様三次元骨格を持つペプチド擬態化合物の分子設計と作用機序」(2020 年度～2022 年度)および、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)低分子医薬品の次世代デザイン手法に関する研究「新規低分子ペプチドミメティクス設計法の開発と検証」(2020 年度～2022 年度)で研究代表者として研究に取り組んでいる。松岡は 2020 年度大分大学代表研究費ランキングで 4 位になっている。

グループリーダーの杉山成は、2017 年高知大学教育研究部教授として転出、科研費基盤研究(C)「細胞増殖因子ポリアミンの細胞内濃度調節機構の解明」(2016 年度～2018 年度)、科研費基盤研究(C)「骨形成に関与する核内受容体の脂溶性シグナル伝達分子認識機構の解明」(2019 年度～2021 年度)で研究代表者として研究に取り組んでいる。また、杉山が開発した新規なアガロースゲル中でのタンパク質の結晶化技術については、本プロジェクト終了後、JST･A-STEP 機能検証フェーズ試験研究タイプ「難水溶性化合物ータンパク質相互作用解析に対応したゲル中結晶作製装置の開発」(2019 年度)で創晶やクニムネとの共同開発で最適化を行った。X 線結晶構造解析の成果は、論文よりもむしろ PDB(タンパク質構造データバンク)に登録することで貢献している。

木下祥尚は、本プロジェクト特任研究員から 2015 年九州大学理学研究院(松森研究室)助教となり、松森と共同で本プロジェクトの発展研究に携わり、科研費若手(B)「電子線ナノ散乱法の開発と脂質ラフトの構造解明」(2017 年度～2019 年度)、科研費基盤研究(C)「脂質ラフトをターゲトとする新たな局所麻酔薬の作用機構の提唱」(2020 年度～2022 年度)で研究代表者として研究に取り組んでいる。

九州大学松森信明は実質的に本プロジェクトの重要な貢献者である。1999 年以降村田研究室の助手/助教、2009 年から 2014 年まで准教授を務めた。2006 年度～2010 年度には、村田が代表の科研費基盤研究(S)「分子複合体としての生体膜の構造と機能」の研究に従

事し、また、2008 年度～2010 年度には科研費基盤研究(B)「バイセルを用いた脂質膜における分子複合体解析」に研究代表者として取り組むなど、本プロジェクトの設立に深く関与した。本プロジェクト開始後は、大阪大学大学院理学研究科の村田研究室准教授として基盤技術的な複数の研究助成金プロジェクトに取り組みながら、本プロジェクトと共同研究を行い多数の共著論文を発表した。2014 年に九州大学教授に転出して以後は、本プロジェクトの委託共同研究先として本プロジェクトに関連する研究を進めた。本プロジェクト終了後は木下と共に、本プロジェクトからの発展的内容の研究を主として行ってきた。科研費基盤研究(B)「脂質ケミカルバイオロジーの創成」(2015 年度～2017 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「蛍光標識脂質を用いた脂質膜の動的秩序解析」(2016 年度～2017 年度)、科研費挑戦的研究(萌芽)「脂質ラフト阻害アッセイ法の開発と阻害剤の探索」(2018 年度～2019 年度)、直近では、科研費基盤研究(A)「脂質ケミカルバイオロジー研究基盤の構築」(2020 年度～2024 年度)に研究代表者として取り組んでいる。2000 年以降、松森と村田の共著論文は 87 報(うち 2014 年九州大学転出以降 38 報)に上る。

アウトリーチ活動として、村田、松岡は著書、教科書や総説の分担執筆、杉山は結晶化と構造解析の総説など啓発活動に取り組んだ。大阪大学広報誌、大学祭などで研究内容をビジュアルに解説してきた。

2.4 第2章まとめ

本プロジェクトは、脂質二重膜を単に液晶状態を示す二次元液体として捉えるのではなく、脂質分子とタンパク質が複合体となった機能性生体分子集合体という新しい観点から、複雑な膜構造の原子レベルでの可視化と、立体構造解析および分子間相互作用の精密解析に基づきその機能解明に挑戦した。脂質分子は、高い運動性を示すため、構造解析には従来の方法があまり有効でない。本プロジェクトは固体NMRを中心として各種計測技術を分野融合的に駆使しながら、さらに新規の方法を開発することで挑戦的で独創的な研究課題に取り組み、多くの成果を論文として発表した。

本プロジェクトでの成果に終了後の発展を含めた主要な成果は以下のとおりである。

①脂質ドメインについて、解析のための有効なツール、溶液および固体NMRとその活用技術、必要な標識体の合成手法を開発し、ラフトとして認識されている脂質の相分離状態について従来の二相分離とは異なる状態であることを明らかにした。本プロジェクト終了後も、様々な同位体、重原子標識スフィンゴミエリン(SM)を合成し、その固体NMRや、さらに次項の蛍光標識脂質を使って解析し、ラフトのナノドメイン、サブナノドメイン構造の存在を示した。

②本プロジェクト終了前後からは、親水性のPEGリンカーを介して蛍光標識化合物を結合したラフト相に親和性をもつ新規な蛍光標識脂質プローブ(蛍光 SM プローブなど)の開発に成功した。それに基づき、蛍光 SM と膜結合性タンパク質の共局在化部位を初めて可視化した。その後も FRET 分析を活用し、脂質ラフトの、ナノドメイン、ナノサブドメインを確認するなど、精緻に細部の構造や相互作用についての解析を行って多くの成果をあげた。

③脂質の膜中での動態、ラフト解析の発展研究として、脂質のアシル鎖の分岐の影響、コレステロールにより誘導される SM の頭部の構造変化、脂質ラフトが局所麻酔薬によって破壊されることなどを明らかにした。

④膜タンパク質について、本プロジェクトでは疎水性リガンドとの結合親和性を評価する新たな手法を開発し、結合物質のスクリーニングを行って候補化合物を得た。本プロジェクト終了後は、創薬基盤となる可能性を含めて、脂質・膜タンパク質間の相互作用の新規な解析手法、および結合する物質のスクリーニング法を開発した。

⑤タンパク質脂質複合体のNMR、高分解能X線結晶構造や分子シミュレーションを合わせて、脂質結合タンパク質FABP3やバクテリオロドプシンなどの膜タンパク質と脂質との複合体の構造解析を行い、脂質の運動性を定量的に評価し、より活性状態に近い状態の脂質の活性構造を決定した。本プロジェクト終了前後からは膜中の受容体タンパク質CD59、CD1dなどの構造変化、作用発現の解明に取り組み、興味ある結果を得た。

⑥生体膜中で働く天然生理活性物質について、本プロジェクト終了後は創薬への展開を想定した研究が増加し、アンフォテリシン B、アンフィジノール 3 などについて、膜中脂質との相互作用による構造解析を行い、天然生理活性物質が形成するチャネル構造を明らかにした。

⑦これまで結晶を得ることが難しかった難水溶性化合物-タンパク質の結晶化方法を本プロジェクトで開発した。また、X 線自由電子レーザー施設 SACLA/XFEL での結晶構造解析のための試料調製や実験手法の技術開発と合わせ、生物学的にも創薬等の産業にも重要なタンパク質の構造決定が可能となった。本プロジェクト終了後もタンパク質結晶化の技術開発を続け、装置の開発、透析膜の利用や超微細バブルを使用することでより容易に結晶化することを見出した。

以上をまとめると、本プロジェクトは膜中での脂質の立体構造・動的構造、タンパク質の脂質分子認識機構解明に関する研究手法を開発し、多くの基礎的、並びに創薬展開への応用につながる知見を得た。

本プロジェクトは特に、有機化学と NMR、さらには脂質膜の生物物理といった複数の領域の融合によってはじめて可能となった融合研究と言える。特に、脂質分子の同位体変換体や重原子置換体を合成しての固体 NMR 解析、diyne 脂質を合成してのラマン分析、あるいは蛍光標識体を合成して膜中での構造を可視化するとともに、その挙動を FRET で解析するという、化学をベースにした構造研究の有効性をより明確に実証した。本研究で有用性が実証された標識体の調製には有機合成化学が大きな役割を果たした。これらの標識脂質プローブは、さらに広範囲の解析のための有効なツールとなることが期待される。

本プロジェクトの研究推進に当たっては、複数の共同研究を行い、他大学研究者と協力して多くの共著論文を発表した。委託研究として、東京大学大学院理学研究科教授橘和夫(故人)、九州大学大学院理学研究院教授大石徹、九州大学大学院理学研究院教授松森信明(元 大阪大学大学院理学研究科准教授)、東京工業大学生命理工学院教授村上聡、大阪大学大学院薬学研究科教授井上豪、大阪大学大学院理学研究科教授深瀬浩一、北海道大学大学院薬学研究院教授前仲勝実、東北大学大学院生命科学研究科教授佐々木誠、東北大学大学院農学研究科准教授此木敬一らが挙げられる。

その他、重要な共同研究先として九州大学大学院理学研究院教授松森信明、京都大学物質-細胞統合システム拠点教授楠見明弘(現 沖縄科学技術大学院大学膜協同性ユニット教授)、京都大学物質-細胞統合システム拠点准教授鈴木健一(現 岐阜大学糖鎖生命コア研究所教授)、岐阜大学糖鎖生命コア研究所教授安藤弘宗、理化学研究所主任研究員袖岡幹子(ERATO 袖岡生細胞分子化学プロジェクト研究総括)、京都大学大学院医学研究科教授兼理化学研究所放射光科学研究センターSACLA 利用技術開拓グループ・グループディレクター岩田想、理化学研究所放射光科学総合研究センター研究員南後恵理子(現 東北大学多元物質科学研究所計測研究部門教授)、大阪大学大学院工学研究科講師溝端栄一、九州大学大学院理学研究院教授池ノ内順一、東京大学大学院農学生命科学研究科教授吉田稔、東京大学大学院農学生命科学研究科教授松永茂樹、東京農工大学工学研究科准教授櫻井香里、筑波大学生命環境系教授臼井健郎、福井大学高エネルギー医学研究センター特命教授老木成稔、名古屋大学大学院工学研究科准教授篠田渉(現 岡山大学異分野基礎科学研究所教授)らが挙げられる。

国際共同研究もフィンランドの Åbo Akademi University 教授 J Peter Slotte をはじめ活発に行った(3.1.3 に記す)。

本プロジェクト運営では、研究総括のリーダーシップのもと、構造生物学、有機合成化学、物理化学、タンパク質科学、計算機科学など、多様な分野をバックグラウンドに持つ若手メンバーが招集され、グループ間だけでなく他大学の研究グループとも相互補完的に連携しながら効果的なプロジェクト運営がなされた。また、若手研究員を積極的に採用し、重要な研究を若手研究者に責任を持たせて担当させた。研究者のキャリアパス支援として、特任教員として教育経験や科研費の申請を行えるよう配慮された。また、研究力向上を目指し、国内および海外の著名な研究者を招いてのセミナーや情報交換会を定期的に開催し、研究の情報獲得だけでなく、若手研究員の研究者間のネットワーク作りを図るなどにより、人材育成を図った。

第 3 章　プロジェクト成果の波及と展望

3.1　科学技術への波及と展望

3.1.1　新規な理論や概念の提唱

本プロジェクトは、新しい構造生物学の分野として「活性脂質構造学」を創生した[79]。タンパク質の構造解析が主体であったこれまでの構造生物学の分野に、脂質を含めた膜タンパク質-脂質複合体として、脂質相互作用を含めることが重要であることを提唱し、それを実践した。

脂質膜は均質で流動的なもの(Singer-Nicolsonの流動モザイクモデル[80]、1972年)ではなく、不均質で複合体構造をもつことが見出され、脂質ラフトの概念(Simons-Ikonen[81]、1997年)が浸透しつつあったが、欧米の研究では主に物理的な手法でのアプローチが行われていた。本プロジェクトでは、化学的な手法を取り入れて脂質膜構造の解析にアプローチした。その結果、脂質膜が相分離した場合はそれぞれの相が物理的に均質であるという描像ではなく、ある相では均質に分子が混ざっていないという概念を提唱した。その概念は広く受け入れられつつあり、細胞膜の受容体を介する情報伝達への脂質の役割に関する重要知見を提供した。例えば脂質膜のスフィンゴミエリンが、GPIアンカー型受容体CD59と結合乖離を繰り返して、ラフトの集合状態を規定し、その構造や活性が微妙に変化することを示した。

3.1.2　新たな研究領域や研究の潮流への貢献

従来の構造解析がタンパク質偏重であったところを、本プロジェクトでは脂質・タンパク質、あるいは膜タンパク質の存在する脂質膜の構造解析にチャレンジしたこと、手法としてNMR、特に、固体NMRやラマン分光解析を活用したこと、また、それらの構造解析に有機合成化学を利用したこと、さらにコンピュータシミュレーションを応用したことが特長である。

細胞膜の研究は多数あるが、多くはタンパク質や細胞間のシグナルの変化を物理的にマクロに見るという観点の研究が主流になっていた。脂質分子の標識体を合成して膜中での構造を解析するという、本プロジェクトの、化学をベースにした構造解析研究の脂質構造解明への貢献は世界的に認識されつつある。元来、細胞膜の分野で脂質分子の構造研究は主流ではなかったが、本プロジェクトが「活性脂質構造学」という新しい分野を開拓することにより学術的な貢献をした。

蛍光標識した新規なスフィンゴミエリンプローブや、diyne脂質は脂質ドメイン解析のための有効なツールとなることが期待される。本プロジェクトで開発されたリンカーを入れた蛍光脂質分子は研究者等に提供されて他の研究にも貢献している。また、新たに化学

---

[79] 事後評価報告書(最終)
https://www.jst.go.jp/erato/evaluation/posteriori/jigo/jigo2010_murata.pdf

[80] Singer and Nicolson, Science 175, 720–731, 1972

[81] 前出 (P.4、脚注2)、Simons and Ikonen, Nature, 387, 569, 1997

合成された種々の脂質類似体は、それ自身で脂質ドメインの研究に有効なツールになることが期待され、脂質膜中にタンパク質が存在する生体膜研究を大きく進展させる可能性がある。

脂質結合タンパク質の調製法、難水溶性化合物-タンパク質複合体の結晶化法等はこれまで解析が困難とされている他の脂質結合タンパク質の解析にも利用できる可能性がある。

3.1.3 国際共同研究

フィンランドの J Peter Slotte(Biochemistry, Faculty of Science and Engineering, Åbo Akademi University)とは多くの共同研究を行い、現在も継続している(共著 14 報)。

その他、米国の Erwin London(Department of Biochemistry and Cell Biology, Stony Brook University)、KC Nicolaou(Department of Chemistry, Rice University)、韓国の Lee JS(慶尚大学)と共同研究を行った。

3.1.4 科学技術への波及のまとめと展望

表 3-1 本プロジェクトでの研究成果と関連・類似研究との対比、発展

項目	本プロジェクトの研究成果	関連・類似研究
①脂質ラフトの構造解析	脂質ラフトへの注目、ナノドメイン観察と計測	脂質ラフトの提唱: Simons K, Ikonen E, Nature,1997、Lingwood D, Simons K, Science, 2010.
	プロジェクト開始前(村田ら) ・NMR による膜脂質複合体の解析の試み ・小型バイセル中の抗生物質を NMR で解析(エリスロマイシン、セオネラミド) ・アンフォテリシン B のコレステロールとの結合様式の解明	脂質ラフト ・楠見明弘 1998 年度～2003 年度 ERATO「膜組織」、2005 年度～2009 年度特定領域研究「1 分子計測・操作による細胞膜ラフト分子複合体の形成と機能の解明」、2009 年度～2011 年度基盤研究(A)「1 分子追跡による細胞膜分子ナノ集合体の動的情報交換システムの解明」など。 ＊楠見、鈴木健一(後出)らは脂質ラフト関連の膜組織で先駆的研究を行った(主に一分子追跡で構造分子の動的挙動を追跡。細胞はシグナル応答のために小さく短寿命のラフトを準備することを提示)。 その後楠見らと連携した古川鋼一らも脂質ラフトにおけるガングリオシド糖鎖の役割を研究した：基盤研究(B)「脂質ラフト構築と制御におけるスフィンゴ糖脂質の機能」(2009 年度～2011 年度)。 NMR など機器分析と解析： ・バイセルに膜作用性のペプチドを導入し、溶液 NMR で構造解析 Vold RR, J Biomol NMR, 9, 329, 1997. ・DNP(動的核分極)によるロドプシン・レチナール結合の固体 NMR による解析 Becker-Baldus J et al, PNAS,112, 9896, 2015. ・ラマン顕微鏡の進化 Palonpon, Nat Protoc,1768, 2777, 2013. ・SM の分子動力学(MD)シミュレーションに本プロジェクトの解析結果が影響を与えた MacKerell,et al, Biophys J, 107, 134, 2014. ・フィンランド Slotte 教授らはスフィンゴミエリンなどの脂質からのアプローチで脂質膜構造と機能の研究を続けている。村田 PJ で共同研究を開始し、共著論文 14 報を出すなど、相補的な関係にある。
	本プロジェクト(1.5.1) 脂質ラフトのナノドメイン観察と計測 ・固体 NMR で脂質間相互作用の解析(スフィンゴミエリン分子間水素結合の発見とラフトドメインサイズの推定) ・ラマンイメージングによるラフトモデル膜でのプローブ分子の観察 ・新規蛍光標識 SM による脂質分布の観察 ＊従来の構造解析がタンパク質偏重であったところを、本プロジェクトでは脂質・タンパク質あるいは膜タンパク質の存在する脂質膜の構造解析にチャレンジした。手法として NMR 解析やラマン分光解析を活用し、またそれらによる解析に合成化学を利用し、さらにコンピュータシミュレーションを応用して重要な成果を得た。 プロジェクト終了後(2.2.1) 脂質ラフトの構造解明と応用 ・スフィンゴミエリンが形成するナノドメインの解明 ・エナンチオマーを用いたナノサブドメインの観察	

	・脂質二重膜の相転移現象とアシル鎖の深度依存的溶解の観測 ・低流量走査電子線散乱法によるラフト構造の解明 ・スフィンゴミエリンとの相互作用に及ぼすコレステロールのグリコシル化の影響の解明 ・古細菌の細胞膜の熱安定性の機構の解明 ・局所麻酔薬の作用発現のメカニズムがラフト破壊によることを示唆 ・保湿成分セラミドの脂質膜中での挙動の観察	・鈴木健一 CREST 細胞外微粒子「高精度 1 分子観察によるエクソソーム膜動態の解明」(2018 年度-2023 年度) ＊鈴木らは、構造よりもダイナミクスを追うことで、村田教授の研究内容とは競合でなく、むしろ相補的な関係にあり、共同研究もしている。 ・村上聡 2021 年度-2023 年度基盤研究(B)「三者複合体を形成し機能する ABC 輸送体の構造機能解析」 ・吸入麻酔によるラフト破壊は TREK-1 を活性化する Pavel MA et al, Proc Natl Acad Sci USA,117, 13757-66, 2020.
②脂質膜でのタンパク質や天然物の構造解析	脂質内複合体でのタンパク質や天然化合物と脂質の結合機構の解析	
	本プロジェクト(1.5.2) 脂肪酸結合タンパク質 FABP3 の結合親和性の機構解明と汎用評価法の確立 ・等温滴定熱量測定 ITC を用いた FABP3 の結合親和性の評価 ・表面プラズモン共鳴 SPR を用いた不飽和脂肪酸の FABP3 結合親和性評価 ・超高分解能結晶構造解析による原子レベルでの脂肪酸の活性配座決定 ・計算科学による FABP3 の脂肪酸結合機構と取り込み機構の解明 終了後(2.2.2) 膜タンパク質結合脂質と膜作用天然生理活性物質の作用機構の解明 ・膜タンパク質 CD1 に結合する生理活性セラミドの構造解析 ・ガングリオシドの膜タンパク質に対する作用機構の解析 ・バクテリオロドプシンに結合する脂質の同定と機能の解明 ・脂質膜に作用する天然生理活性物質の作用機構の解析(アンフォテリシン B、アンフィジノール 3、セオネラミド、バフィロマイシン等の誘導体合成との連携した作用機構の解析) ・抗がん作用のあるステロイド骨格サポニン OSW-1 によるリン脂質二重膜破壊機構	＊FABP の脂肪酸選択性を評価する適切な系がなかった。本プロジェクトで左記の系をつくったことで、創薬や生化学における、膜中での疎水性化合物の親和性評価が一般化できることが期待できる。 ・水の介在により FABP は脂肪酸のアルキル鎖を認識 Henry LJ et al, PLoS One, 2012;7(12): e51079. ・アンフォテリシン B と、コレステロール、エルゴステロールとの相互作用に関する総説：Kamiński DM, Eur Biophys, J, 43, 453-467, 2014. ・脂質二重膜における脂質とステロールの構造が相互作用に影響する効果(総説)：Mannock DA et al, Chem Phys Lipids, 163(6), 403-448, 2、010. ・真核生物の細胞膜を標的にする海洋生理活性物質(総説)：Nishimura S, J Antibiot, 74(11), 769-785, 2021. ・京大・掛谷ら、抗生物質ヘロナミドの生物活性解析：J Am Chem Soc, 136, 5209-12, 2014、 Chemistry, 22, 8586-95, 2016、 J Nat Prod, 79, 1877-80, 2016.
③膜・膜タンパク質の構造解析の革新的技術開発	構造解析の革新的技術	
	本プロジェクト(1.5.3) 難水溶性リガンドおよび膜タンパク質の構造解析に向けた技術開発 ・タンパク質の凝固ゲル中結晶化技術の開発 ・膜タンパク質と周辺脂質の相互作用解析のための NMR 実験手法の開発 ・膜タンパク質の X 線構造解析に関する実験手法の開発(重原子標識化合物による結晶構造解析：X 線自由電子レーザーXFEL を利用して連続フェムト秒結晶構造解析に成功) 終了後(2.2.3) 膜脂質、膜タンパク質の構造解析の革新的技術開発 ・蛍光標識スフィンゴミエリンの合成と活用(FRET による脂質相互作用の評価) ・脂質/膜タンパク質間の相互作用の解析手法、および結合する物質のスクリーニング法の開発 ・透析膜を用いたヒドロゲル中でのタンパク質の結晶化 ・難水溶性化合物－タンパク質複合体の凝固ゲル中結晶化装置の開発 ・超微細バブルによるタンパク質の結晶核形成	・X 線構造解析に、J-PARC での中性子線構造解析も出現し、良質で大型のタンパク質結晶化の必要性が増加。 ・従来のタンパク質結晶化技術は溶液中で行われ、損傷を受けやすかった。 ・XFEL を利用して連続フェムト秒結晶構造解析法での膜タンパク質の構造決定の例はなかった。 ・既存の標識 SM では、ラフト様秩序相 Lo から排除される Klymchenko AS et al, Chem Biol, 21, 97, 2014. 超高分解能顕微鏡での観察 Honigmann A et al, Nature Comm, 5, 5412, 2014. ・蛍光標識脂質については鈴木健一らのガングリオシド蛍光標識があり Nature Chem Biol, 12, 402-410, 2016. 村田らは鈴木と共同研究で蛍光標識 SM を合成した。

全体	「活性脂質構造学」の新しい分野を開拓 複数の手法で多角的に生体膜にアプローチした 脂質膜統合分析プラットフォームの構築	＊世界でも、NMR、合成、標識プローブ、1 分子イメージングなど幅広い手法で膜タンパク質や脂質の構造と機能を解析することはあまり行われていない。

以上、本プロジェクトは、構造生物学の領域に、「活性脂質構造学」という新しい分野を切り拓きつつある点で国際的にも先導的であり、比肩しうる研究は多くない。また、医療・創薬分野において、重要な役割を果たしている膜タンパク質の機能構造を解明するための基盤技術を創出した[82]。

3.2 社会経済への波及と展望

3.2.1 社会実装の可能性

(1)医薬標的となる膜タンパク質の構造解析

医薬の標的の多くは細胞表面の受容体、イオンチャネル等のタンパク質分子であり、理論的医薬分子設計においては作用標的部位の 3 次元構造は不可欠な情報である。従来、タンパク質の高分解能構造は X 線結晶解析や溶液 NMR により得られてきた。しかし、医薬の標的の膜タンパク質や、薬剤が細胞上で最初に接触する細胞膜、細胞壁は、単分子でなく分子集合体として構造を形成し機能するため、集合体の分子構造を直接解析することが望ましい。本プロジェクトは、細胞膜内の分子集合体の構造解析という困難な課題にチャレンジする基盤研究であるが、本プロジェクトの要素技術が発展し、解析法が進歩して汎用されるようになれば、より選択的な医薬の創出に資することが期待される。

脂質二重膜の構造・機能の分子動力学(MD)シミュレーションによる予測は医薬品開発研究に大きく貢献することが期待される。MD による正確な予測のためには、脂質分子とその相互作用について MD のパラメータを最適化することが重要である。本プロジェクトの期間中および終了後の研究で脂質二重膜の分子構造や運動性を原子レベル、ナノ秒速度で実験的に解明することにより、重要なパラメータを得た。その結果、細胞膜を含めた脂質二重膜の構造・機能を MD でかなり正確に予測できるようになり、脂質二重膜の構造・機能の MD 予測に基づく創薬研究の端緒を開いた[83]。また、FABP サブタイプに特異的な簡易蛍光法による阻害剤スクリーニング法の開発に成功し、いくつかの FABP 阻害剤がスクリーニングされたことから、創薬研究への貢献が期待される。

具体的に企業と共同で実用化に挑戦している例として、杉山は 2.3 節に示したように、新規なアガロースゲル中でのタンパク質の結晶化技術について、創薬スクリーニングに応用すべく、創晶やクニムネとの共同開発を行っている。松岡は大分大学着任後、狂犬病の予防・治療薬の創薬に協力し、大分大学、ベンチャー企業「大分大学先端医学研究所」が出願人となって特許出願している。松岡はまた、理化学研究所脳神経科学研究センター前

[82] 事後評価報告書(最終)から一部引用
https://www.jst.go.jp/erato/evaluation/posteriori/jigo/jigo2010_murata.pdf

[83] 名古屋大学准教授篠田渉(現 岡山大学異分野基礎科学研究所教授)との共同研究。文献[14]、[25]、[26]、[39]。

川素子らの共同研究グループの統合失調症の新たな治療標的の発見(核内受容体 PPARα)[84]にも協力した[85]。

(2)AI 創薬への応用

製薬産業は人類の健康と医療に貢献し、先進国型主要産業のひとつであり、科学技術と研究開発の成果を必要とする高付加価値産業である。ただし、近年、創薬コストは高騰し、研究開発効率は過去 10 年で 8 割低下していると言われている[86]。創薬研究開発効率を高めるための手段として AI 創薬が注目を集めている。幅広い AI 創薬の概念の中でも創薬段階で重要なものは、インシリコ創薬での化合物創出であり、従来型の構造情報に加えて、いままで難しかった膜タンパク質の脂質複合体の構造情報を提供する本プロジェクトの成果は、上記 AI 創薬に有用になると考えられる。

3.2.2　社会経済への波及のまとめと展望

本プロジェクトは、これまで未解明であった脂質とタンパク質の相互作用の解明に着目したものであるため、基礎科学的な内容が中心となっている。研究過程で実施されている標識化合物の合成や、固体NMR、ラマン共鳴、蛍光高分解能電子顕微鏡等の応用による脂質ラフトの構造・物性研究やタンパク質－脂質の親和性測定技術や複合体の高品質結晶作成技術による超精密構造解析は、膜や膜タンパク質、細胞内外タンパク質を標的とした創薬に貢献できるものと期待される。

[84] https://www.riken.jp/press/2020/20201202_2/index.html
[85] 松岡茂、インタビューによる。
[86] Deloitte center for health solutions “Unlocking R&D productivity: measuring the return from pharmaceutical innovation 2018”

【引用文献】

[1]	Yamaguchi, T., Suzuki, T., Yasuda, T., Oishi, T., Matsumori, N., & Murata, M. (2012). NMR-based conformational analysis of sphingomyelin in bicelles. Bioorganic & medicinal chemistry, 20(1), 270-278. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.11.001
[2]	Matsumori, N., Yamaguchi, T., Maeta, Y., & Murata, M. (2015). Orientation and Order of the Amide Group of Sphingomyelin in Bilayers Determined by Solid-State NMR. Biophysical journal, 108(12), 2816-2824. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.05.011
[3]	Yasuda, T., Tsuchikawa, H., Murata, M., & Matsumori, N. (2015). Deuterium NMR of raft model membranes reveals domain-specific order profiles and compositional distribution. Biophysical journal, 108(10), 2502-2506. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.008
[4]	Matsumori, N., Yasuda, T., Okazaki, H., Suzuki, T., Yamaguchi, T., Tsuchikawa, H., Doi, M., Oishi, T., & Murata, M. (2012). Comprehensive molecular motion capture for sphingomyelin by site-specific deuterium labeling. Biochemistry, 51(42), 8363-8370. https://doi.org/10.1021/bi3009399
[5]	Cui, J., Matsuoka, S., Kinoshita, M., Matsumori, N., Sato, F., Murata, M., Ando, J., Yamakoshi, H., Dodo, K., & Sodeoka, M. (2015). Novel Raman-tagged sphingomyelin that closely mimics original raft-forming behavior. Bioorganic & medicinal chemistry, 23(13), 2989-2994. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.05.014
[6]	Ando, J., Kinoshita, M., Cui, J., Yamakoshi, H., Dodo, K., Fujita, K., Murata, M., & Sodeoka, M. (2015). Sphingomyelin distribution in lipid rafts of artificial monolayer membranes visualized by Raman microscopy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112(15), 4558-4563. https://doi.org/10.1073/pnas.1418088112
[7]	Matsuoka, S., Sugiyama, S., Matsuoka, D., Hirose, M., Lethu, S., Ano, H., Hara, T., Ichihara, O., Kimura, S. R., Murakami, S., Ishida, H., Mizohata, E., Inoue, T., & Murata, M. (2015). Water-mediated recognition of simple alkyl chains by heart-type fatty-acid-binding protein. Angewandte Chemie (International ed. in English), 54(5), 1508-1511. https://doi.org/10.1002/anie.201409830
[8]	Tan, M. C., Matsuoka, S., Ano, H., Ishida, H., Hirose, M., Sato, F., Sugiyama, S., & Murata, M. (2014). Interaction kinetics of liposome-incorporated unsaturated fatty acids with fatty acid-binding protein 3 by surface plasmon resonance. Bioorganic & medicinal chemistry, 22(6), 1804-1808. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.02.001
[9]	Matsuoka, D., Sugiyama, S., Murata, M., & Matsuoka, S. (2015). Molecular dynamics simulations of heart-type fatty acid binding protein in apo and holo forms, and hydration structure analyses in the binding cavity. The journal of physical chemistry. B, 119(1), 114-127. https://doi.org/10.1021/jp510384f
[10]	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., & Mori Y. (2015).

	Development of protein seed crystals reinforced with high-strength hydrogels. CrystEngComm. 17, 42, 8064-8071. https://doi.org/10.1039/c5ce00844a
[11]	Kawatake, S., Umegawa, Y., Matsuoka, S., Murata, M., & Sonoyama, M. (2016). Evaluation of diacylphospholipids as boundary lipids for bacteriorhodopsin from structural and functional aspects. Biochimica et biophysica acta, 1858(9), 2106-2115. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.06.006
[12]	Nakane, T., Hanashima, S., Suzuki, M., Saiki, H., Hayashi, T., Kakinouchi, K., Sugiyama, S., Kawatake, S., Matsuoka, S., Matsumori, N., Nango, E., Kobayashi, J., Shimamura, T., Kimura, K., Mori, C., Kunishima, N., Sugahara, M., Takakyu, Y., Inoue, S., Masuda, T., & Mizohata, E. (2016). Membrane protein structure determination by SAD, SIR, or SIRAS phasing in serial femtosecond crystallography using an iododetergent. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 113(46), 13039-13044. https://doi.org/10.1073/pnas.1602531113
[13]	Nango, E., Royant, A., Kubo, M., Nakane, T., Wickstrand, C., Kimura, T., Tanaka, T., Tono, K., Song, C., Tanaka, R., Arima, T., Yamashita, A., Kobayashi, J., Hosaka, T., Mizohata, E., Nogly, P., Sugahara, M., Nam, D., Nomura, T., Shimamura, T., & Iwata, S. (2016). A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin. Science (New York, N.Y.), 354(6319), 1552-1557. https://doi.org/10.1126/science.aah3497
[14]	Hanashima, S., Murakami, K., Yura, M., Yano, Y., Umegawa, Y., Tsuchikawa, H., Matsumori, N., Seo, S., Shinoda, W., & Murata, M. (2019). Cholesterol-Induced Conformational Change in the Sphingomyelin Headgroup. Biophysical journal, 117(2), 307-318. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.06.019
[15]	Yasuda, T., Slotte, J. P., & Murata, M. (2018). Nanosized Phase Segregation of Sphingomyelin and Dihydrosphigomyelin in Unsaturated Phosphatidylcholine Binary Membranes without Cholesterol. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids, 34(44), 13426-13437. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02637
[16]	Kinoshita, M., Ano, H., Murata, M., Shigetomi, K., Ikenouchi, J., & Matsumori, N. (2017). Emphatic visualization of sphingomyelin-rich domains by inter-lipid FRET imaging using fluorescent sphingomyelins. Scientific reports, 7(1), 16801. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16361-x
[17]	Kinoshita, M., Suzuki, K. G., Matsumori, N., Takada, M., Ano, H., Morigaki, K., Abe, M., Makino, A., Kobayashi, T., Hirosawa, K. M., Fujiwara, T. K., Kusumi, A., & Murata, M. (2017). Raft-based sphingomyelin interactions revealed by new fluorescent sphingomyelin analogs. The Journal of cell biology, 216(4), 1183-1204. https://doi.org/10.1083/jcb.201607086
[18]	Kinoshita, M., Kyo, T., & Matsumori, N. (2020). Assembly formation of minor dihydrosphingomyelin in sphingomyelin-rich ordered membrane domains. Scientific reports, 10(1), 11794. https://doi.org/10.1038/s41598-020-68688-7

[19]	Yasuda T, Matsumori N, Tsuchikawa H, Lonnfors M, Nyholm T K.M. , Slotte J. P., & Murata M. Formation of Gel-like Nanodomains in Cholesterol-Containing Sphingomyelin or Phosphatidylcholine Binary Membrane as Examined by Fluorescence Lifetimes and 2H NMR Spectra. Langmuir 31, 13783-13792 (2015). https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.langmuir.5b03566
[20]	Yano, Y., Hanashima, S., Yasuda, T., Tsuchikawa, H., Matsumori, N., Kinoshita, M., Al Sazzad, M. A., Slotte, J. P., & Murata, M. (2018). Sphingomyelin Stereoisomers Reveal That Homophilic Interactions Cause Nanodomain Formation. Biophysical journal, 115(8), 1530-1540. Erratum in 1575-76. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.08.042
[21]	Yano, Y., Hanashima, S., Tsuchikawa, H., Yasuda, T., Slotte, J. P., London, E., & Murata, M. (2020). Sphingomyelins and ent-Sphingomyelins Form Homophilic Nano-Subdomains within Liquid Ordered Domains. Biophysical journal, 119(3), 539-552. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.06.028
[22]	Nyholm, T., Engberg, O., Hautala, V., Tsuchikawa, H., Lin, K. L., Murata, M., & Slotte, J. P. (2019). Impact of Acyl Chain Mismatch on the Formation and Properties of Sphingomyelin-Cholesterol Domains. Biophysical journal, 117(9), 1577-1588. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.09.025
[23]	Kinoshita, M., Yamaguchi, S., & Matsumori, N. (2020). Low-flux scanning electron diffraction reveals substructures inside the ordered membrane domain. Scientific reports, 10(1), 22188. https://doi.org/10.1038/s41598-020-79083-7
[24]	Hanashima, S., Fukuda, N., Malabed, R., Murata, M., Kinoshita, M., Greimel, P., & Hirabayashi, Y. (2021). β-Glucosylation of cholesterol reduces sterol-sphingomyelin interactions. Biochimica et biophysica acta. Biomembranes, 1863(2), 183496. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183496
[25]	Yamagami, M., Tsuchikawa, H., Cui, J., Umegawa, Y., Miyazaki, Y., Seo, S., Shinoda, W., & Murata, M. (2019). Average Conformation of Branched Chain Lipid PGP-Me That Accounts for the Thermal Stability and High-Salinity Resistance of Archaeal Membranes. Biochemistry, 58(37), 3869-3879. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00469
[26]	Tsuchikawa, H., Ono, T., Yamagami, M., Umegawa, Y., Shinoda, W., & Murata, M. (2020). Conformation and Orientation of Branched Acyl Chains Responsible for the Physical Stability of Diphytanoylphosphatidylcholine. Biochemistry, 59(40), 3929-3938. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00589
[27]	Kinoshita, M., Chitose, T., & Matsumori, N. (2019). Mechanism of local anesthetic-induced disruption of raft-like ordered membrane domains. Biochimica et biophysica acta. General subjects, 1863(9), 1381-1389. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.06.008
[28]	Matsufuji, T., Kinoshita, M., & Matsumori, N. (2019). Preparation and Membrane Distribution of Fluorescent Derivatives of Ceramide. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids, 35(6), 2392-2398.

	https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03176
[29]	Hossain, M. I., Hanashima, S., Nomura, T., Lethu, S., Tsuchikawa, H., Murata, M., Kusaka, H., Kita, S., & Maenaka, K. (2016). Synthesis and Th1-immunostimulatory activity of α-galactosylceramide analogues bearing a halogen-containing or selenium-containing acyl chain. Bioorganic & medicinal chemistry, 24(16), 3687-3695. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.06.007
[30]	Kusaka, H., Kita, S., Tadokoro, T., Yoshida, K., Kasai, Y., Niiyama, H., Fujimoto, Y., Hanashima, S., Murata, M., Sugiyama, S., Ose, T., Kuroki, K., & Maenaka, K. (2020). Efficient preparation of human and mouse CD1d proteins using silkworm baculovirus expression system. Protein expression and purification, 172, 105631. https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105631
[31]	Takahashi, M., Shirasaki, J., Komura, N., Sasaki, K., Tanaka, H. N., Imamura, A., Ishida, H., Hanashima, S., Murata, M., & Ando, H. (2020). Efficient diversification of GM3 gangliosides via late-stage sialylation and dynamic glycan structural studies with 19F solid-state NMR. Organic & biomolecular chemistry, 18(15), 2902-2913. https://doi.org/10.1039/d0ob00437e
[32]	Nakano, M., Hanashima, S., Hara, T., Kabayama, K., Asahina, Y., Hojo, H., Komura, N., Ando, H., Nyholm, T., Slotte, J. P., & Murata, M. (2021). FRET detects lateral interaction between transmembrane domain of EGF receptor and ganglioside GM3 in lipid bilayers. Biochimica et biophysica acta. Biomembranes, 1863(8), 183623. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183623
[33]	Inada, M., Kinoshita, M., Sumino, A., Oiki, S., & Matsumori, N. (2019). A concise method for quantitative analysis of interactions between lipids and membrane proteins. Analytica chimica acta, 1059, 103-112. https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.01.042
[34]	Inada, M., Kinoshita, M., & Matsumori, N. (2020). Archaeal Glycolipid S-TGA-1 Is Crucial for Trimer Formation and Photocycle Activity of Bacteriorhodopsin. ACS chemical biology, 15(1), 197-204. https://doi.org/10.1021/acschembio.9b00756
[35]	Umegawa, Y., Nakagawa, Y., Tahara, K., Tsuchikawa, H., Matsumori, N., Oishi, T., & Murata, M. (2012). Head-to-tail interaction between amphotericin B and ergosterol occurs in hydrated phospholipid membrane. Biochemistry, 51(1), 83-89. https://doi.org/10.1021/bi2012542
[36]	Nakagawa, Y., Umegawa, Y., Matsushita, N., Yamamoto, T., Tsuchikawa, H., Hanashima, S., Oishi, T., Matsumori, N., & Murata, M. (2016). The Structure of the Bimolecular Complex between Amphotericin B and Ergosterol in Membranes Is Stabilized by Face-to-Face van der Waals Interaction with Their Rigid Cyclic Cores. Biochemistry, 55(24), 3392-3402. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00193
[37]	Tsuchikawa, H., Umegawa, Y., Murata, M., & Oishi, T. (2018). A Synthetic Approach to the Channel Complex Structure of Antibiotic in a Membrane: Backbone F-19-Labeled Amphotericin B for Solid-State NMR Analysis. JOURNAL OF SYNTHETIC ORGANIC CHEMISTRY JAPAN 76, 1197-1205.

	https://doi.org/10.5059/yukigoseikyokaishi.76.1197
[38]	Yamamoto, T., Omegala, Y., Yamagami, M., Suzuki, T., Tsuchikawa, H., Hanashima, S., Matsumori, N., & Murata, M. (2019). The Perpendicular Orientation of Amphotericin B Methyl Ester in Hydrated Lipid Bilayers Supports the Barrel-Stave Model. Biochemistry, 58(17), 2282-2291. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00180
[39]	Yamamoto, T., Umegawa, Y., Tsuchikawa, H., Hanashima, S., Matsumori, N., Funahashi, K., Seo, S., Shinoda, W., & Murata, M. (2019). The Amphotericin B-Ergosterol Complex Spans a Lipid Bilayer as a Single-Length Assembly. Biochemistry, 58(51), 5188-5196. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00835
[40]	Espiritu, R. A., Matsumori, N., Tsuda, M., & Murata, M. (2014). Direct and stereospecific interaction of amphidinol 3 with sterol in lipid bilayers. Biochemistry, 53(20), 3287-3293. https://doi.org/10.1021/bi5002932
[41]	Wakamiya, Y., Ebine, M., Murayama, M., Omizu, H., Matsumori, N., Murata, M., & Oishi, T. (2018). Synthesis and Stereochemical Revision of the C31-C67 Fragment of Amphidinol 3. Angewandte Chemie (International ed. in English), 57(21), 6060-6064. https://doi.org/10.1002/anie.201712167
[42]	Iwamoto, M., Sumino, A., Shimada, E., Kinoshita, M., Matsumori, N., & Oiki, S. (2017). Channel Formation and Membrane Deformation via Sterol-Aided Polymorphism of Amphidinol 3. Scientific reports, 7(1), 10782. https://doi.org/10.1038/s41598-017-11135-x
[43]	Hieda, M., Sorada, A., Kinoshita, M., & Matsumori, N. (2021). Amphidinol 3 preferentially binds to cholesterol in disordered domains and disrupts membrane phase separation. Biochemistry and biophysics reports, 26, 100941. https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100941
[44]	Wakamiya, Y., Ebine, M., Matsumori, N., & Oishi, T. (2020). Total Synthesis of Amphidinol 3: A General Strategy for Synthesizing Amphidinol Analogues and Structure-Activity Relationship Study. Journal of the American Chemical Society, 142(7), 3472-3478. https://doi.org/10.1021/jacs.9b11789
[45]	Espiritu, R. A., Matsumori, N., Murata, M., Nishimura, S., Kakeya, H., Matsunaga, S., & Yoshida, M. (2013). Interaction between the marine sponge cyclic peptide theonellamide A and sterols in lipid bilayers as viewed by surface plasmon resonance and solid-state (2)H nuclear magnetic resonance. Biochemistry, 52(14), 2410-2418. https://doi.org/10.1021/bi4000854
[46]	Cornelio, K., Espiritu, R. A., Todokoro, Y., Hanashima, S., Kinoshita, M., Matsumori, N., Murata, M., Nishimura, S., Kakeya, H., Yoshida, M., & Matsunaga, S. (2016). Sterol-dependent membrane association of the marine sponge-derived bicyclic peptide Theonellamide A as examined by 1H NMR. Bioorganic & medicinal chemistry, 24(21), 5235-5242. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.08.043
[47]	Espiritu, R. A., Cornelio, K., Kinoshita, M., Matsumori, N., Murata, M., Nishimura, S., Kakeya, H., Yoshida, M., & Matsunaga, S. (2016). Marine sponge cyclic peptide theonellamide A disrupts lipid bilayer integrity

	without forming distinct membrane pores. Biochimica et biophysica acta, 1858(6), 1373-1379. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.03.019
[48]	Cornelio, K., Espiritu, R. A., Hanashima, S., Todokoro, Y., Malabed, R., Kinoshita, M., Matsumori, N., Murata, M., Nishimura, S., Kakeya, H., Yoshida, M., & Matsunaga, S. (2019). Theonellamide A, a marine-sponge-derived bicyclic peptide, binds to cholesterol in aqueous DMSO: Solution NMR-based analysis of peptide-sterol interactions using hydroxylated sterol. Biochimica et biophysica acta. Biomembranes, 1861(1), 228-235. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.07.010
[49]	Malabed, R., Hanashima, S., Murata, M., & Sakurai, K. (2017). Sterol-recognition ability and membrane-disrupting activity of Ornithogalum saponin OSW-1 and usual 3-O-glycosyl saponins. Biochimica et biophysica acta. Biomembranes, 1859(12), 2516-2525. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.09.019
[50]	Malabed, R., Hanashima, S., Murata, M., & Sakurai, K. (2020). Interactions of OSW-1 with Lipid Bilayers in Comparison with Digitonin and Soyasaponin. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids, 36(13), 3600-3610. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b03957
[51]	Shibata, H., Tsuchikawa, H., Matsumori, N., Murata, M., & Usui, T. (2014). Design and Synthesis of 24-Fluorinated Bafilomycin Analogue as an NMR Probe with Potent Inhibitory Activity to Vacuolar-Type ATPase. Chem. Lett. 43, 474-476. https://doi.org/10.1246/cl.131099
[52]	Tsuchikawa, H., Hayashi, T., Shibata, H., Murata, M., Nagumo, Y., & Usui, T. (2016). Bafilomycin analogue site-specifically fluorinated at the pharmacophore macrolactone ring has potent vacuolar-type ATPase inhibitory activity. Tetrahedron Lett. 57, 2426-2429, https://doi.10.1016/j.tetlet.2016.04.075
[53]	Shibata, H., Tsuchikawa, H., Hayashi, T., Matsumori, N., Murata, M., & Usui, T. (2015). Modification of bafilomycin structure to efficiently synthesize solid-state NMR probes that selectively bind to vacuolar-type ATPase. Chemistry, an Asian journal, 10(4), 915-924. https://doi.org/10.1002/asia.201403299
[54]	Hayashi, T., Tsuchikawa, H., Umegawa, Y., & Murata, M. (2019). Small structural alterations greatly influence the membrane affinity of lipophilic ligands: Membrane interactions of bafilomycin A1 and its desmethyl derivative bearing 19F-labeling. Bioorganic & medicinal chemistry, 27(8), 1677-1682. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.03.017
[55]	Umegawa, Y., Yamaguchi, T., Murata, M., & Matsuoka, S. (2015). Centerband-only analysis of rotor-unsynchronized spin echo for measurement of lipid (31) P chemical shift anisotropy. Magnetic resonance in chemistry : MRC, 53(7), 514-519. https://doi.org/10.1002/mrc.4247
[56]	Cui, J., Lethu, S., Yasuda, T., Matsuoka, S., Matsumori, N., Sato, F., & Murata, M. (2015). Phosphatidylcholine bearing 6,6-dideuterated oleic acid: a useful solid-state (2)H NMR probe for investigating membrane properties. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 25(2), 203-206. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.11.072

[57]	Umegawa, Y., Tanaka, Y., Nobuaki, M., & Murata, M. (2016). (13) ^{13}C-TmDOTA as versatile thermometer compound for solid-state NMR of hydrated lipid bilayer membranes. Magnetic resonance in chemistry : MRC, 54(3), 227-233. https://doi.org/10.1002/mrc.4371
[58]	Kinoshita, M., Tanaka, K., & Matsumori, N. (2020). The influence of ceramide and its dihydro analog on the physico-chemical properties of sphingomyelin bilayers. Chemistry and physics of lipids, 226, 104835. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.104835
[59]	Sugiyama, S., Kakinouchi, K., Adachi, H., Nagasawa, T., Kunimune, N., Murata, M., & Mori, Y.(2021), Growth of protein crystals in high-strength hydrogels with the dialysis membrane. Japanese Journal of Applied Physics. 60,1,15506. https://doi.org/10.35848/1347-4065/abd0c7
[60]	Sugiyama, S., Kitatani, T., Naruse, T., Otsuka, Y., Adachi, H., Fujita, T., & Mori Y.(2020) Effect of ultra-fine bubble water on protein crystal nucleation Jpn. J. Appl. Phys. 59/11, No.115505 https://doi.org/10.35848/1347-4065/abc2a0
[61]	Matsumori, N., & Murata, M. (2017). NMR studies on natural product-Stereochemical determination and conformational analysis in solution and in membrane. Experimental Approaches of NMR Spectroscopy,(Springer) pp. 383-414. https://link.springer.com/book/10.1007/978-981-10-5966-7