

ERATO 村田脂質活性構造プロジェクト事後評価（最終）報告書

【研究総括】村田 道雄（大阪大学 大学院理学研究科／教授）

【評価委員】（敬称略、五十音順）

上野 裕明（田辺三菱製薬株式会社／執行役員・研究企画部長）
及川 英秋（北海道大学 大学院理学研究院／教授）
小林 俊秀（理化学研究所 小林脂質生物学研究室／主任研究員）
内藤 晶（委員長；横浜国立大学 大学院工学研究院／教授）
山縣 ゆり子（熊本大学 大学院生命科学研究部／教授）

評価の概要

ERATO 村田脂質活性構造プロジェクトは、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構造および分子間相互作用の精密解析に基づく機能解明を目指した。

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。本プロジェクトは各種計測技術を分野融合的に駆使しながら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んだ。

本プロジェクトは脂質分子の状態に応じて①マイクロドメイン、②タンパク質内部脂質、③膜タンパク質周辺脂質の原子レベル構造と機能発現機構解明について、「生体膜中脂質分子」、「膜タンパク質リガンド構造」、「リガンド活性配座」の3グループを構成し、研究を推進した。村田道雄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、若手研究員に責任を持って研究を担当させ、外部有識者を交えたセミナーでの情報交換や議論の中で研究者のネットワーク形成を促進し、教育業務を経験させることや他の競争的資金を申請させることにより、人材育成を図った。

本プロジェクトでは、これまでほとんど手が付けられていなかった難しい基礎的研究課題に取り組み、多くの成果を公表した。主要な成果は以下のとおり。

- ① 脂質ドメイン解析のための有効なツールを開発し、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違う状態であることを明らかにした。
- ② タンパク質と疎水性リガンドの親和性を評価する新たな手法を開発し、それら複合体の高分解能 X 線結晶構造や分子シミュレーションを合わせて脂肪酸分子認識における水の役割をはじめ明らかにした。
- ③ 膜タンパク質と周辺脂質の相互作用解明のため、化学合成による脂質同位体標識プローブと固体 NMR を用いた技術開発で、脂質の運動性を定量的に評価し、重原子標識脂質-バクテリオロドプシン (bR) 複合体の X 線結晶構造解析を行い、より活性状態に近い状態の脂質活性構造を決定した。
- ④ X 線自由電子レーザー施設 SACLA での XFEL 利用による結晶構造解析のための試料調製や実験手法の技術開発を行い、室温でのタンパク質—脂質複合体の結晶構造解析から相互作用様式の解明、新規膜タンパク質の構造解析のための位相決定の実証、フェムト秒のパルスを利用した時分割結晶構造解析の成功に寄与した。

特に、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的知見を得たことは重要と評価する。

以上、村田脂質活性構造プロジェクトは、構造生物学の分野として活性脂質構造学という新しい分野を創生しつつある点で国際的にも先導的・独創的といえる。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創出につながる研究成果も上げた。これらのことから、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本技術の創出」に資する成果が得られたと評価する。

1. 研究プロジェクトの設定および運営

1-1. プロジェクトの全体構想

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く機能解明に取り組む挑戦的なものであった。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。したがって、各種計測技術を分野融合的に駆使するだけでなく、新規の方法を開発する独創的な研究課題に取り組んでおり、ERATOの研究に適当な全体構想であると評価できる。

1-2. プロジェクトの目標・計画

全体構想に沿って脂質活性構造の解析を達成するため、脂質分子の状態に応じて①マイクロドメイン、②タンパク質内部脂質、③膜タンパク質周辺脂質の原子レベル構造の決定に基づく機能発現機構解明について、これまでの研究手法の高度化に加えて、新しい手法の開発などを通して行うもので、研究期間内に目標を達成するには妥当な計画であったと評価できる。

1-3. プロジェクトの運営

前述したプロジェクトの目標・計画を達成すべく、研究総括の強いリーダーシップのもと3つのグループがそれぞれの専門性を生かし、連携して実施した。国内の研究者との共同研究も含め、全体構想の実現に見合った体制ができており、研究の遂行によく機能していたと評価する。プロジェクトの研究体制は若手研究者がリーダーシップを取り、活躍できる体制になっていた。若手の育成について大学での教育経験も得られるように配慮されており、今後のステップアップに有効と評価する。装置は適切に更新し、有効に活用されていた。プロジェクトヘッドクォーターはJST本部との連絡、プロジェクトの広報、研究環境構築、特許出願や論文公表に関して適切な支援を行った。以上、さまざまな新しい試みや共同研究を通して研究総括の専門とする有機合成化学から脂質科学やタンパク質科学へと研究を発展させたことは高く評価したい。

〔研究プロジェクトの全体構想〕〔研究プロジェクトの目標・計画〕〔研究プロジェクトの運営〕
a (的確かつ効果的である)

2. 研究の達成状況および得られた研究成果

2-1. 生体膜中脂質分子グループ

本研究グループでは、マイクロドメインという相分離した脂質の状態であるラフトの主要構成

脂質であるスフィンゴミエリン（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の解明を目標として研究を行った。主要な研究達成状況と成果は以下のとおり。

- ① 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、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 の基本構造と動的知見等を明らかにした。
- ② SM とその類似体の膜物性の測定から、SM—コレステロール間の立体的相互作用（アンブレラ効果）が脂質膜の秩序化に寄与していることを明らかにした。
- ③ ラマンイメージ用 SM 誘導体（diyne 脂質）の合成とその単層膜上のラフト相におけるラマン顕微鏡観察で SM の分布をはじめて明らかにした。
- ④ 重水素標識化ステロールを用いた固体 NMR 等を駆使し、天然薬物との相互作用を直接観測することに成功した。

膜中での脂質の立体構造・動的構造、他の脂質との相互作用によるそれらの変化等の有用な基礎的知見からラフトの相分離状態は従来の二相分離とは違う状態であることを明らかにしたことは重要と評価する。

難しいテーマであったが、インパクトの高い成果が国際的に評価の高い論文誌に公表された。

また、今後、生物学的に重要な知見を得る方向で実験デザインの展開が期待できる技術開発を行ったことも高く評価できる。

2-2. 膜タンパク質リガンド構造グループ

本研究グループは膜タンパク質の構造機能制御に関わる脂質を疎水性リガンドと見なし、膜タンパク質—疎水性リガンドの相互作用を研究することを目標にした。細胞膜疎水部における分子認識の研究手段はほとんど確立していないのが現状であり、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タンパク質を研究対象とし、方法論開発に主眼をおいた研究を目標にした。主要な研究達成状況と成果は以下のとおり。

- ① 脂質は水に不溶性であるため、水溶性分子を対象とする種々の測定法をそのままでは適応できなかったが、リポソームと用いることで、熱量測定や表面プラズモン共鳴を用いた精密な親和性解析が可能になり、50 種以上の脂肪酸とヒト脂肪酸結合タンパク質 3（FABP3）の親和性を解析した。脂肪酸—FABP の超高分解能 X 線結晶構造をもとに水の MD シミュレーションを行い、脂肪酸分子認識における水の役割をはじめて明らかにした。
- ② FABP の阻害剤/リガンド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い、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。
- ③ 膜タンパク質（バクテリオロドプシン（bR））と周辺脂質の相互作用計測のために固体 NMR 法などを用いた技術開発を行った。bR の脱脂質体（dbR）をリポソームに再構成し、bR と脂質の相互作用を ^{31}P 化学シフト異方性、 ^2H 四極子分裂幅から評価した。さらに H^+ 輸送活性を保持した状態で bR を結晶化し、光反応サイクル中の構造変化を自由電子レーザー法により時間分解で検出し、 H^+ 輸送機構を明らかにした。
- ④ ラフト相に親和性を持ち、天然に存在する SM の挙動を模倣する蛍光 SM プローブの開発に成功し、ヒト赤血球へ応用して、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。さらに、蛍光 SM を用いて、脂質ラフトの可視化によるガングリオキシド GM1 の影響や局所麻酔薬のラフト/非ラフト相分離への影響と副作用の強さの関係を明らかにした。

新しい蛍光SMプローブは生体膜中脂質分子グループによって開発された diyne 脂質とともに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。生物学的にも意義の大きな研究進展として bR をモデル脂質中で結晶化し、プロトンポンプ活性を保存した状態で自由電子レーザーを用いて、時間分解でH⁺輸送機構を明らかにした研究は評価できる。

さらに、固体 NMR 法などを用いた新しく開発した研究手法は、生体膜において様々な膜タンパク質との相互作用を介して機能している周辺脂質の構造解析へと展開できる。

2-3. リガンド活性配座グループ

本研究グループでは膜タンパク質の周辺に存在する固有の脂質の構造を原子レベルで決定することを目標にした。主要な研究達成状況と成果は以下のとおり。

- ① 脂肪酸結合タンパク質である FABP3 と多数の系統的な脂肪酸の複合体の超高分解能 X 線結晶構造解析を行い、タンパク質中の脂肪酸の精密な立体構造（活性配座）を決定するとともに、脂肪酸分子認識機構の解明を行った。また、脂溶性薬剤との複合体の構造解析により、脂溶性薬剤の認識機構を解明した。多数の非常に精度の高いデータが得られており、評価に値する。
- ② 極低温での構造解析に加え、X 線自由電子レーザー（XFEL）施設 SACLA の利用における連続フェムト秒微結晶構造解析法（SFX）と、本研究で開発した結晶化法により調製した高品質結晶を用いた放射光利用による室温での FAB3-脂肪酸複合体の構造解析をいくつか行い、極低温から大きく異なる温度下でも、基本的な結合部位での脂質の構造に差異はない（一部に複数の配座の存在が示唆される）という興味深い知見を得た。
- ③ 臭素などの重原子で標識化された脂質からなるバイセルと bR との複合結晶を作成し、放射光を用いた X 線結晶構造解析により膜タンパク質による脂質結合の選択性と構造解析への有用性を明らかにするとともに、これまでの最高分解能で構造を決定した。また、重原子標識脂肪酸を用いた FABP3 との複合体の X 線結晶構造解析を行い、複数の活性配座の存在を明確に観察できた。
- ④ ヨウ素原子を含む脂質様リガンドを合成し、膜タンパク質の特定の位置に結合した結晶を得ることに成功し、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めて実証した。また、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 法により可視化することに成功した。
- ④ 新しい汎用性のある凝固ゲル中結晶化法を提案し、これまで困難であった難水溶性化合物溶液に対する浸漬技術の開発に成功した。本法を用いて 2 種のタンパク質といくつかの難水溶性薬剤との複合体の結晶構造を決定し、難水溶性薬剤の認識機構を明らかにした。

タンパク質の脂質分子認識機構の特色を明らかにするとともに、タンパク質による難水溶性を含む脂肪酸の認識機構や膜タンパク質周辺脂質分子の構造と相互作用、脂質分子の受容体への結合様式と制御（情報伝達）機構の原子レベルでの詳細な解明が可能となる成果を得て、薬物設計への展開を可能にしたことは評価できる。

また、最先端技術である SACLA の XFEL を利用した共同研究での極めてインパクトの高い成果の成취には、SFX 実験に必要な結晶化に適した膜タンパク質試料の調製法や多数の良質の微小タンパク質結晶化法の開発等で貢献し、それらの研究成果は国際的にトップクラスの論文誌に発表された。

以上に基づき研究成果を俯瞰すると、本プロジェクトはこれまでほとんど手が付けられていな

かった脂質とタンパク質の相互作用を解析するものであり、着眼点は新規性が高く、測定方法を新規に開発しながら種々の測定手段を組み合わせしており、総合的に独創性の高いものとなっている。

基礎的な研究で、成果があがるまでに時間のかかる難しいテーマではあるが、国際的評価の高い論文誌への発表が行われた。アウトリーチ活動を含めプロジェクトの成果を社会へ発信した。また、「創薬研究への展開」と言った実用化に向けての道筋も開拓された。

〔研究の達成状況および得られた研究成果〕 a（高い水準にある）

3. 研究成果の科学技術、社会・経済への貢献

3-1. 科学技術への貢献

本プロジェクトは、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必用であることを明確にすることで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つつある点で国際的にも先導的・独創的といえる。

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。新たに化学合成し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と期待される。さらに、タンパク質に結合した生体膜脂質研究を大きく進展させる可能性がある。

XFEL の利用による本成果は、これまでの放射光利用では構造決定できない微小結晶しか得られない膜タンパク質等、生物学的にも創薬等産業利用にも重要なタンパク質の構造決定が可能となり。さらに、3次元構造にナノ秒レベルの時間軸を加えた4次元構造も決定できる新しい構造生物学の時代を開く上で大いに貢献している。

3-2. 社会・経済への貢献

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開発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高く評価できる。

特に FABP サブタイプに特異的な簡易蛍光法の開発に成功し、いくつかの FABP 阻害剤がスクリーニングされたことから、創薬研究への大きな貢献が期待される。

また、精密な脂質活性構造の情報は、計算機科学における方法論開発評価のベンチマークとして利用でき、計算機科学による薬物設計の精度向上への貢献が期待される。

〔科学技術への貢献〕〔社会・経済への貢献〕 a（貢献が期待できる）

4. その他特記すべき事項

4-1. 若手研究者支援

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ている点は評価できる。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ていた。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

ク作りを図っている点も評価できる。

4-2. アウトリーチ活動

主に大学祭において研究室公開と研究紹介のアウトリーチ活動が実施された。ホームページでは研究成果がわかりやすく公開された。今後、さらに3件のプレス発表を行い、インパクトある成果報告を広く一般に公開している。

5. 総合評価

本プロジェクトは生命科学の分野で重要な構造生物学の研究において、従来は膜タンパク質、膜結合ペプチド、さらに膜結合天然物の活性構造決定が主な研究対象であったが、膜タンパク質を含めた生体分子と脂質分子で形成される機能性複合体として捉えた脂質活性構造が重要であることを提案する独創的な研究であり、構造生物学に新しい分野を切り開いた研究であると評価できる。

脂質活性構造研究を行うためには、新しい構造決定の測定法の開発も重要になってくる。その点、本プロジェクトでは、活性構造決定にはプロジェクト開始時点では確立されていなかった、固体 NMR 分光法や自由電子レーザー法の利用を積極的に導入している。また、ラマンイメージング顕微鏡、熱測定法など相互作用を解析する測定法についても積極的に導入して、新しい測定法を創出した。

本プロジェクトは、これまでほとんど手が付けられていなかった困難な基礎的研究課題に取り組み、成果の公開もインパクトの高いものとなっている。主要な成果は以下のとおり。

- ① 脂質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違うナノドメイン状態であることを固体NMRやラマンイメージング顕微鏡により明らかにした。
- ② タンパク質と疎水性リガンドの親和性を評価する新たな手法を開発し、それら複合体の高分解能 X 線結晶構造や表面プラズモン共鳴、分子シミュレーションを合わせて脂肪酸分子認識における水の役割をはじめ明らかにした。
- ③ 膜タンパク質と周辺脂質の相互作用解明のため、化学合成による同位体標識脂質プローブと固体 NMR を用いた技術開発で、脂質の運動性を定量的に評価し、重原子標識脂質-bR 複合体の X 線結晶構造解析し、より活性状態に近い脂質活性構造を決定した。
- ④ タンパク質に結合する疎水性生体分子とそれらの複合体形成や膜タンパク質の結晶化について新たな研究手法の開発に成功した。
- ⑤ 最先端大型施設 SACLA での XFEL 利用による結晶構造解析のための試料調製や実験手法の技術開発を行い、室温でのタンパク質-脂質複合体の結晶構造解析から相互作用様式の解明、新規膜タンパク質の構造解析のための位相決定の実証、フェムト秒のパルスを利用した時分割結晶構造解析の成功に寄与した。その結果、膜タンパク質 b R が光サイクルを経て H⁺を輸送するときの時間分解能構造変化の観測に成功した。

膜中での脂質の立体構造・動的構造、タンパク質の活性立体構造や脂質分子認識機構等に関する基礎的知見を得たことは重要と評価する。

今後は、これまでに独自に開発した脂質活性構造決定法を用いて、さらに精密な分子レベルでの脂質分子の動的構造解析を行い、この分野を確立すること、および国際的評価の高い論文誌への発表や特許出願を行い、プロジェクトの成果をより強力に社会へ発信することを期待する。

以上、村田脂質活性構造プロジェクトは、構造生物学の分野として活性脂質構造学という新しい分野を創生しつつある点で国際的にも先導的・独創的といえる。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創出につながる研究成果も上げつつある。このことから、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本技術の創出」に資する成果が得られたと評価する。

〔総合評価〕 A（成果が得られた）

以上