

ERATO 村田脂質活性構造プロジェクト事後評価（予備評価）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 大学院理学研究院化学部門／教授）
小林 俊秀（理化学研究所 小林脂質生物化学研究室／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に基づく機能解明を目指している。

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でいる。

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、研究を推進している。村田道雄総括のリーダーシップのもと、構造生物学、化学合成、物理化学、計算機科学など、様々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ている。また、若手研究員に責任を持って研究を担当させており、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、人材育成にも配慮している。

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んでおり、成果の公開がはじまりつつある。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 膜関連タンパク質に結合する脂質リガンド分子の構造を決定し、それらの相互作用を明らかにしつつある。
- ③ 膜タンパク質と脂質分子複合体の構造決定により、より活性状態に近い状態の脂質活性構造の決定を行っている。
- 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について新たな研究手法の開発に成功した。

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等に関する基礎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つつある。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ることが期待される。

今後、さらに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。

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構造に基づく機能解明に取り組む挑戦的なものである。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、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ると評価できる。

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、連携して実施している。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、よく機能していると評価する。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る。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る。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ている。

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ている。主要な研究達成状況と成果は以下のとおり。

- ① 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誘導體（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。また、天然に存在するSMの挙動を模倣す

る蛍光プローブを開発した。

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。

難しいテーマであり、論文が出始めたところであるが、取得されつつあるデータが生きるようなインパクトのある成果の公表を期待する。

また、今後、生物学的に重要な知見を得る方向での実験デザインを期待したい。

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ている。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ている。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 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ている。
- ③ ラフト相に親和性をもつ蛍光 SM プローブの開発に成功し、ヒト赤血球へ応用して、局在化部位を決定した。

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。

bR と脂質との相互作用計測を試みているが、bR と本来相互作用するのはエーテル系の脂質であり、プロジェクトで取り上げているモデル系の脂質は bR の生理機能との関連性が低いことが想定される。生物学的にも意義の大きな研究進展を期待するためには系の再検討の余地があると思われる。

全体構想にある「タンパク質との相互作用を介して機能している脂質分子」といった機能発現している時の構造がまだ見えてきておらず、今後の展開に期待したい。

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ている。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、XFEL の利用や放射光での高品質結晶を用いた室温での FABP3-脂肪酸複合体の構造解析をおこない、運動性の違いに関する知見を得た。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という結

論は興味深く、生理的条件下に近い状態での観測には意味がある。

- ③ Brなどの重原子で標識化された脂質のバイセルとbRとの複合結晶を作成し、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した。解像度のさらなる改善により、脂質活性構造を明らかにすることを期待する。
- ④ 新しい凝固ゲル中結晶化法を提案し、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。今後は本手法の膜タンパク質結晶化への汎用性を確認し、特許化を進めてほしい。

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たことは評価できる。今後の膜タンパク質とその周辺脂質の構造決定例の増加が期待される。

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、2014年に成果公開が大きく進展している。さらに国際的評価の高い論文誌への発表や特許出願を行い、アウトリーチ活動を含め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。

また、今後の展開においては、何らかの形で生物活性の測定を可能にするため、生化学の研究者との共同研究を期待する。その先に「創薬研究への展開」と言った実用化に向けての道筋が開拓されることを期待する。

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となると期待される。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。

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。

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。

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る。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で開催し、研究の情報獲得だけでなく、若手研究員の研究ネットワー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ている。ホームページでは研究成果がわかりやすく公開されている。今後、さらにプレス発表等を活用し、インパクトある成果報告を広く一般に公開されることを期待する。

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く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ている。

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んでおり、成果の公開がはじまりつつある。主要な研究達成状況と成果は以下のとおり。

- ① 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ている。
- ② 膜タンパク質に結合する脂質リガンド分子の構造と相互作用を明らかにしつつある。
- ③ 膜タンパク質と脂質分子複合体の構造決定により、より活性状態に近い脂質活性構造の決定を行っている。
- 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について新たな研究手法の開発に成功した。

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ると評価する。

以上