

スフィンゴ脂質の相転移挙動に対するコレステロールの影響

木下 祥尚 (ユーザーNo. 0017450)

関西学院大学理工学研究科博士課程後期課程(D3)

課題番号; 2007A1800

利用ビームライン; BL40B2

1. 実験目的と背景

生体の内部と外部を仕切る役割を担う生体膜に関する知見は、生体機能を理解するうえで必要不可欠である。これまで生体膜は、流動的で均一な脂質二重層膜中にタンパク質が浮遊移動し、目的の部位で機能を誘起すると考えられてきた。これは流動モザイクモデルとよばれ、1972年に Singer と Nicolson により提唱されて以来、今日に至るまで最も有力な生体膜のモデルであった[1]。ところが近年、生体膜中において、特定の脂質分子が互いに集合し、密に充填することで形成する特異的ドメインの存在が注目を集めている。このドメインはラフトと呼ばれ、スフィンゴ脂質やコレステロール等、特定の生体膜構成分子が互いに引力的に集合し形成していることが示唆されている[2]。ラフトドメインの重要性は物理学、生物学の基礎的分野にとどまらず、医学的、薬学的利用の観点からも多くの注目を集めている。その理由としては、アルツハイマー病を誘起することで知られるタンパク質、アミロイド β がラフトの構成脂質を認識することや、Human immunodeficiency virus (HIV)が、ラフトドメインを通じて生体内を攻撃することが示唆されていること等があげられる。そのような観点からも、近年に到るまで、ラフトに関する知見の重要性が示唆され続けている。

スフィンゴリン脂質の一種であるスフィンゴミエリンはラフトを形成する主要成分である。スフィンゴミエリンを水中に懸濁すると単成分で脂質二重層膜を形成し、また、人工系では二重層膜が幾重にも巻いた多重層膜ベシクルを自発的に形成することが知られている。ところがこのスフィンゴミエリン単成分からなる脂質二重層膜がどのような特徴を持っているのか(例えば、温度に依存してどのような相転移挙動を示し、それに伴いどのような構造変化が生じるのか等)は未だ解明されていない。我々は、まず混合系から形成されるラフトの機能や特徴を議論する前に、スフィンゴミエリン単成分で形成される二重層膜がどのような温度相転移挙動を示すのかを調べるため本研究を行った。本研究では相転移挙動をよりクリアに検出するため、アシル鎖長が均一なより純度の高いパルミトイルスフィンゴミエリンを有機的に合成し実験に用いた[3]。我々の知る限り、パルミトイルスフィンゴミエリンを用いた X 線散乱実験は非常に稀有である。

その結果スフィンゴミエリン二重層膜は 40°C付近で主転移(アシル鎖融解転移)を生じ、40°C以上では流動相を 40°C以下では膜面が三次元的に波打っていること(リップル構造)が

特徴的な、リップル相を形成していることがわかった。さらに我々は、この波の周期(リップル周期)は温度に依存し、温度が減少するにつれリップル周期が増加する傾向にあることがわかった。

つぎに我々は、ラフトのもうひとつの主要成分であるコレステロールがスフィンゴミエリン二重層膜構造に対しどのような影響を及ぼすのかを調べた。その結果コレステロール存在下において、リップル周期が増加することがわかった。また温度依存性について調べたところ、コレステロール存在下でもコレステロール非存在下と同様に、温度が減少すると共に、リップル周期が増加することがわかった。

2. 実験方法と解析方法

本実験では有機的に合成されたパルミトイルスフィンゴミエリン(C16:0)、純度は96%(液体クロマトグラフィに基づく)を用いた[3]。コレステロールはアバンティポーラリピッドより購入したものをそのまま用いた。スフィンゴミエリンおよびコレステロールは別々にクロロホルム/メタノール(v/v 4/1)に溶解した。溶け残った脂質の塊を完全に溶解するため、脂質溶液に超音波を1分程度印加した。脂質溶液を同一バイアルビンに適量移し取り混合した後、乾燥窒素を吹きかけることで、有機溶剤を除去した。さらに、残った微量の有機溶剤を完全に除去するため試料は少なくとも24時間、真空下に放置した。この過程を通じて、スフィンゴミエリンとコレステロールが均一に混ざった脂質フィルムを形成することができる。真空から取り出した試料に、10 mM HEPES 緩衝液を適量加え、55°Cで攪拌した後1時間放置することで30wt%の脂質懸濁液を作製した。脂質の酸化を防ぐため、作製した脂質懸濁液は、測定直前まで、クーラーボックス内(5°C)で保存した。

脂質懸濁液は測定直前にアルミパン(ME-51119873 AL-PIERCING LIDS)に半分程度の体積(20 μ l)入れ、懸濁液がパンから流出しないよう円盤状に切り抜いたアルミホイルでシールした。アルミパンに封入された試料は、再度50°Cで10分インキュベーションした後、DSC装置(FP84HT-4000 Mettler-Toledo)に、中央部(X線が通過する部分)に穴が開いたアルミパン(ME-51119870 AL-CRUCIBLES WITHOUT PIN 40 μ l用)を用いて固定した。本研究では、カメラ長 $L_c=260\text{cm}$ (標準試料としてコレステロールを利用し、見積もった)、波長は $\lambda=1\text{\AA}$ を用いた。温度走査はDSC装置を利用し1°C/minで50°Cから~5°Cまで降温スキャンを行った。回折光は冷却 CCD カメラを用いて検出した($\phi\sim 16\text{cm}$)。得られた回折パターン(デバイ-シェラーリング)は、リングに沿って一周積分することで次元化した後、ピーク位置から構造周期を測定した。

3. 実験結果と考察

まず、本実験のコントロールとなるスフィンゴミエリン多重層膜ベシクルの、DSC 熱測定・小角 X 線散乱同時測定を試みた。図 1 には、層周期に対応する一次と二次のピーク (arrows in Fig. 1b)、および二重層膜の三次元的な波打ち構造(リップル構造)の周期に対応するピーク(Fig. 1a)を示した。スフィンゴミエリン多重層膜を 50°C(流動相)から降温したところ、流動相では 0.16 nm^{-1} (6.2 nm)であったピークが、40°C 付近で小角側 0.14 nm^{-1} (7.0 nm)へとシフトしている様子が分かる。DSC サーモグラム(Fig. 1c)とあわせて考えると、40°Cで生じる主転移とともにスフィンゴミエリン多重層膜ベシクルに構造変化が生じ、40°C以下の温度領域では流動相に比べて層周期が、およそ 0.8 nm 広がっていることを示唆している。注目すべきは、40°C以下の温度領域において、 0.07 nm^{-1} (15 nm)付近に出現する強度の弱いピークである(Fig. 1a)。このピーク位置を詳しく解析すると、35°Cでは 0.075 nm^{-1} (13.3nm)であったものが、温度とともに減少し、7.5°Cでは 0.063 nm^{-1} (15.7nm) 程度になることがわかった(blue circles in Fig. 3)。この小さなピークの特徴や挙動は、スフィンゴミエリンのアナログでもあるジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)二重層膜のリップル周期に対応するピーク挙動と類似している。また、層周期に対応するピークに付随する肩も(arrow head in Fig 1b)、リップル構造の形成を反映することが知られている。

これまで、スフィンゴミエリン二重層膜は主転移点(40°C)以下の温度領域で、ゲル相を形成すると考えられてきた。ところが本結果は、スフィンゴミエリン二重層膜が、主転移点以下でゲル相ではなくリップル相を形成することを示唆しており、これは興味深い新規な情報である。また、一般的に報告されているリップル相はゲル相と流動相の間の温度領域に存在する、中間的な相である。例えば、代表的リン脂質 DPPC 二重層膜の場合、は 41°Cで流動相からリップル相への転移を生じ、36°Cでリップル相からゲル相への転移を生じることが知られており、リップル相が形成される温度領域はわずか 36~41°C の 5°Cである。一方本実験では、スフィンゴミエリン二重層膜が少なくとも 40°C~0°C の幅広い温度領域でリップル相を形成していることが、示唆された。しかし、0°C以下の温度領域での相挙動や、幅広い温度領域でリップル相を形成する理由については、更なる実験考察が必要である。

次に我々はスフィンゴミエリン多重層膜ベシクルに対するコレステロールの影響を調べるため、コレステロールを含むスフィンゴミエリン多重層膜ベシクルに対し、小角 X 線散乱測定を行った。Fig. 2 は 2mol%コレステロールを含むスフィンゴミエリン多重層膜ベシクルの小角 X 線散乱プロファイルを温度ごとに並べたものである。コレステロール非存在下のプロファイルと比較して、主要な違いは二つあることがわかった。1)コレステロールを加えると主転移点が減少する。2)コレステロールを加えると、リップル周期が増加する。

まず前者について、ピークがシフトする温度に着目すると、およそ 40°C 付近で生じたスフィンゴミエリン膜の主転移が、コレステロール存在下では 36°C付近へと減少していることがわかった(Fig. 2)。我々は、コレステロール分子がスフィンゴミエリン二重層膜の疎水

部に入り込み、ゲル相(秩序相)を不安定化させるのではないかと考えた。その結果、比較的無秩序な流動相を形成する温度領域が増加する(主転移点が減少する)ことが推測できる。

一方興味深いのは、コレステロールを加えることによりリップル周期が増加していることである(red circles in Fig. 3)。コレステロールに依存したリップル周期の変化は、代表的リン脂質 DPPC において以前報告されており[4]、その原因は、リップルの畝の間にコレステロールが入り込むことで、その周期を増加させるというものである(Fig. 4)。本実験の結果はスフィンゴミエリン膜に対しても、DPPC と同様の脂質/コレステロール充填モデルが適応できることを示唆している。さらに我々は凍結切断電子顕微鏡法により、ある一定の温度下でリップル周期がコレステロール濃度に依存して増加していくことを確認している(data not shown)。しかし 20°C 以下の温度領域でラメラ周期に対応するピークが肩を持ち、リップルの存在を示唆しているのに対し(arrow head in Fig. 2)、リップル周期に対応するピークが消失する原因については(Fig. 3)、更なる実験考察が必要である。

4. 謝辞

本研究で用いたスフィンゴミエリンは、関西学院大学理工学部勝村研究室において合成されたものを、提供していただきました。合成に携わられた研究室の方々を始め、勝村重雄教授の御厚意に心より感謝いたします。本研究は、SPring-8 による萌芽的研究支援の下、ビームライン 40B2 を利用して遂行しました。

5. 参考文献

- [1] Singer, S. J. and Nicolson, G. L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
- [2] Simons, K. and Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- [3] Yamamoto, T., Hasegawa, H., Hakogi, T. and Katsumura, S., 2006. Versatile synthetic method for sphingolipids and functionalized sphingosine derivatives via olefin cross methathesis. *Org. Lett.* 8, 5569-5572.
- [4] Coopeland, B. R. and McConnell, H. M., 1982. Theory of periodic structures in lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79(12), 3918-3921.

[Figures]

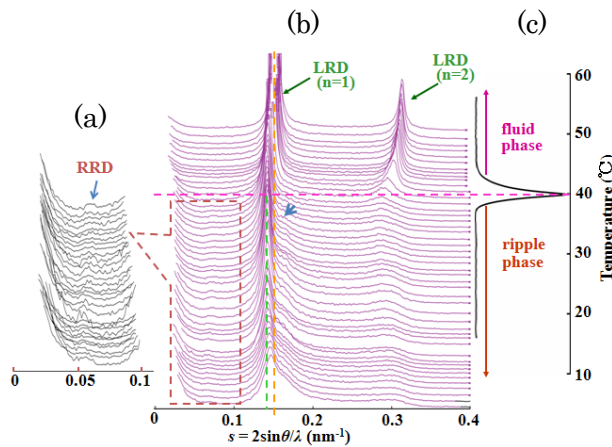


Fig. 1 スフィンゴミエリン多重層膜ベシクルの小角 X 線散乱と DSC サーモグラム。(a) リップル周期(R. R. D.)に由来するピークを温度ごとに並べたもの。(b) 小角 X 線散乱プロフィールを温度ごとに並べたもの。層周期(L. R. D.)の一次と二次に対応するピークが現れている (arrows)。40°C 以下では一次のピークに肩が現れている (arrow head)。(c) スフィンゴミエリン多重層膜ベシクルの DSC サーモグラム。40°C 付近に現れているピークは主転移ともなう熱異常。

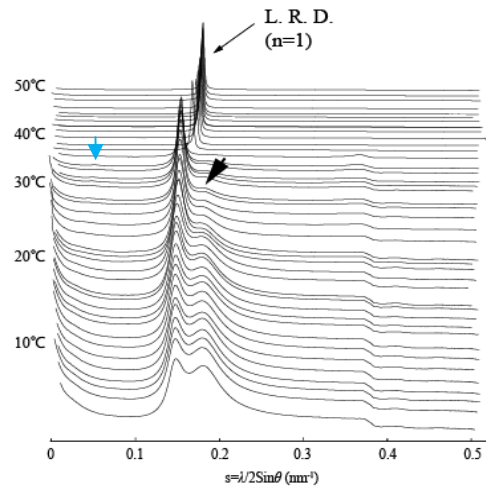


Fig. 2 スフィンゴミエリン膜に対するコレステロールの影響。2mol% コレステロール含むスフィンゴミエリン多重層膜ベシクルの小角 X 線散乱プロフィールを温度ごとに並べた。層周期(L. R. D.)に対応する一次のピーク (arrow) とリップル周期に対応するピーク (blue arrow head) が存在する。また主点移点以下の温度領域において層周期のピークに付随する肩は、リップル構造に由来する (black arrow head)。40°C 以下において、0.4 nm⁻¹ 付近に現れているピークは層周期の二次に対応している

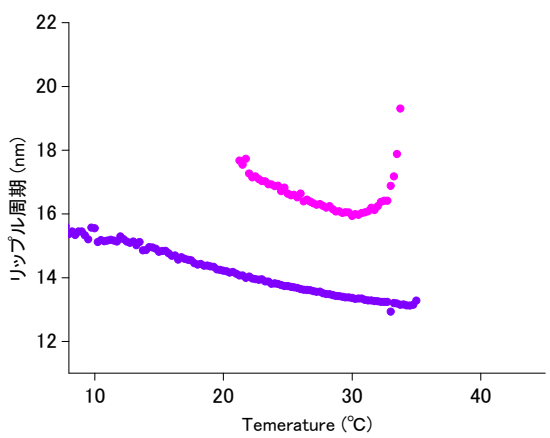


Fig. 3 Fig. 1 と 2 を基にリップル周期(R. R. D.)を温度の関数としてプロットしたもの。(blue)スフィンゴミエリン多重層膜の R. R. D.。(red) 2mol%コレステロール含むスフィンゴミエリン多重層膜の R. R. D.

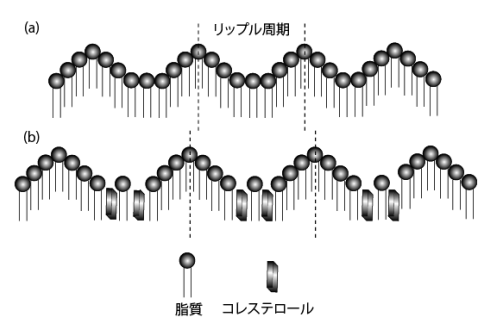


Fig. 4 脂質とコレステロールの充填。(a)コレステロール非存在下でのリップル構造。(b)コレステロール存在下でのリップル構造 (redrawn from [4])。脂質 コレステロール