

平成 30 年 5 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13100

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Depth-dependent melting of acyl chains and phase-transition of lipid bilayers

研究代表者

村田 道雄 (Murata, Michio)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：40183652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：重水素を置換した4種類の脂肪酸を化学的に合成し、脂質ラフトの代表的脂質であるスフィンゴミエリン(SM)とフォスファチジルコリン(PC)を作成した。これら重水素標識脂質のIRスペクトルを指標にし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。また、コレステロールの添加によって顕著な融解点が消滅したことに加えて、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。

研究成果の概要(英文)： Four kinds of deuterium-substituted fatty acids were chemically synthesized to prepare 2H-labeled sphingomyelin (SM) as a raft lipid and phosphatidylcholine (PC) as a control lipid. The results of 2H NMR and IR spectra of the labeled SM bilayer indicated that the melting temperature (mp) is depth-dependent with a lower mp for the terminal part of acyl chains while the melting of PC is less depth-dependent. Also, a clear melting point disappeared by an addition of cholesterol for both SM and PC membranes while the conformational change of SM terminal chains observed in IR spectra may account for the difference in the depth dependent melting of SM as compared with PC.

研究分野：生物有機化学

キーワード：脂質二重膜 相転移温度 スフィンゴミエリン フォスファチジルコリン 重水素NMR 赤外分光スペクトル

1. 研究開始当初の背景

生体内機能の多くが、生体分子間の疎水相互作用を含めた弱い相互作用によって担われている。代表的な例として、生体膜の脂質分子が挙げられよう。膜脂質は、一義的な化学構造を有する小分子化合物であり、また、その集合体である脂質二重膜は特殊な物性を示すことによって重要な役割を果たしている。これらの弱い相互作用は、生命現象において薬物・受容体に代表される強い相互作用に勝るとも劣らぬ重要な役割を果たしているが、その分子論的理解は意外に進んでいない。膜中における脂質分子の運動は NMR などの分光法によって補足できる速度よりなるかに速いこと、また、そのフレキシブルな配座変化を記述するためには膨大な数の配座異性体を考慮しなければならないことが原因となって、分子構造の議論が非常に困難である。膜における脂質の動的配座が把握できていないことが障害となって、脂質二重膜のみならず膜タンパク質・脂質の相互作用の実験科学的な解明が大幅に遅れており、脂質動的構造の描像は、計算科学に頼らざるを得ないのが現状である。特に、本研究課題で取り上げる脂質の温度依存的な相状態の変化は、生体膜の機能に密接に関係しており、歴史的に多くの研究が行われてきた。特に、不飽和リン脂質が膜の流動性を向上させるのに重要な働きをしていることが知られている。一方で、飽和リン脂質はコレステロールとともに「脂質ラフト」と呼ばれる比較的固い膜画分(ドメイン)を形成することが知られている。この一時的に現れる脂質ラフトが膜タンパク質の集積や会合に重要な役割を果たしていることが最近分かってきた。われわれはこの脂質ラフトを構成するリン脂質であるスフィンゴミエリンに焦点を当て研究を行っており、今回のテーマである膜の深度方向における脂質分子の運動性の違いが膜の固さを与える影響に興味を持つに至った。

2. 研究の目的

脂質二重膜の相転移現象とアシル鎖の深度依存的な溶解の観測：水中で形成される脂質二重膜では、炭化水素鎖(アシル鎖)の疎水性相互作用が重要な働きを演じている。このような生体内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が深度に依存して変化する」との仮説を実験的に検証する。すなわち、相転移温度として定義される狭い温度範囲で、単一成分膜における脂質のアシル鎖は一挙に融解するとされてきた。一方で、液晶材料などでは炭化水素鎖の末端から徐々に融解することが知られており、これら二つの現象が相矛盾するように思われた。本研究では、実験科学的アプローチによって、膜構成脂質に特有な分子運動とそれによってもたらされる相状態の変化を実験的に解明することを

目指す。また、この深度依存的な融解現象が脂質膜の物性に与える影響を調べるために、スフィンゴミエリン(SM)とファオスファチジルコリン(PC)で構成される脂質二重膜について比較を行う。すなわち、SM がコレステロール存在下に形成する特殊な相状態である脂質ラフトと深度依存的融解の関連を、通常の細胞膜脂質である PC と比較することによって明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

- 重水素化脂質の合成：脂質二重膜の深度に対応する位置に特異的に重水素を2つ置換した脂肪酸を3種類化学合成し、スフィンゴミエリン(SM)およびフォスファチジルコリン(PC)に導入してスペクトル測定に供した。すなわち、4位、10位、14位、16位に重水素標識した4種の炭素数18の脂肪酸・ステアリン酸を含有するSMおよびPCを用いて、水和二重膜を作成した。
- NMR および IR スペクトルによる溶解温度の深度依存性の測定：化学合成した膜脂質(SM と PC)を用いて水和二重膜を調整して、重水素固体 NMR および IR スペクトルを測定した。その際、測定温度を厳密に制御しながら変化させることによって、重水素 NMR 四極子分裂幅および IR の C-H の非対称伸縮振動が温度依存的に変化する様子を詳しく調べた。
- 生体膜モデリングのためのパラメータの取得：分子動力学シミュレーションによって膜脂質の深度依存的揺らぎを再現できるようにパラメータを研究協力者とともに最適し、深度依存的な融解の再現を試みた。

4. 研究成果

我々が確立した合成法に従って、重水素化脂質を合成した。深度依存的な融解を観測するために、6位、10位、14位、16位の重水素標識ステアリン酸を化学合成し、脂質ラフトモデルとしてスフィンゴミエリン(SM)と対照群としてフォスファチジルコリン(PC)を調製した。重水素NMRおよびIRスペクトルによって、これら2種の純粋脂質の二重膜について融解温度の深度依存性の測定を行った。その結果、SMにおいては、先端の16位が相転移温度より約2低温で融解し、10位が相転移温度において、4位が約1.5高温側で溶解した。一方、PCについては、16位と10位はSMと同様の融解温度を示したが、4位は10位とほぼ同じ温度で溶解した。また、IRスペクトルにおいては少し異なった傾向が観測された。すなわち、SMとPC両方とも、6位と10位においてほぼ同じ融解温度を示し、末端付近の14,16位は低温側から徐々に融解した(図1にSMの結果を示した)。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ものと考えている。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。

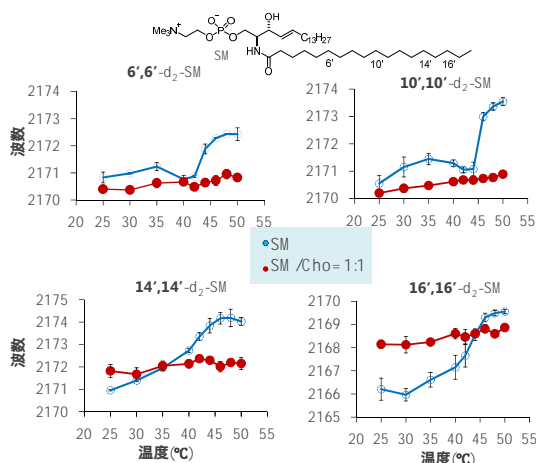


図1. 深度の異なるSM脂肪鎖の温度依存的な配座（運動性）の変化。波数が高いのは運動性が増すことによって屈曲型配座が多くなることに対応している。

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滅したことに加えて、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。

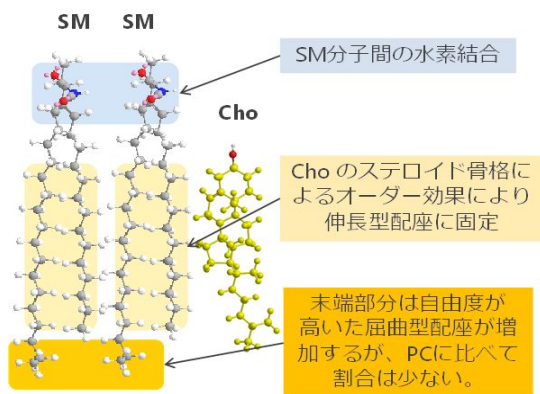


図2. スフィンゴミエリン(SM)とコレステロール(Cho)の相互作用の模式図。フォスファチジルコリン(PC)膜と比べて、SM膜ではChoが膜の深い位置（図では下方）に位置していることを位置（深度）依存的に重水素標識したSMおよびPCを用いて解明することに成功した。

すなわち、コレステロールは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)。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。なお、生体膜シミュレーションのための計算科学パラメータの取得については、現在、研究協力者とともに進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3件)すべて査読あり

Engberg, O., Yasuda, T., Hautala, V., Matsumori, N., Nyholm, T.K.M., Murata, M., and Slotte, J. P. Lipid interactions and organization in complex bilayer membranes. *Biophys. J.* **110**, 1563-1573 (2016).

Cornelio, K., Espiritu, R. A., Todokoro, Y., Hanashima, S., Kinoshita, M., Matsumori, N., Murata, M., Nishimura, S., Kakeya, H., Yoshida, M., and Matsunaga, S. Sterol-Dependent Membrane Association of the Marine Sponge-Derived Bicyclic Peptide Theonellamide A as Examined by ¹H NMR. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 5235-5242 (2016).

The long-chain sphingoid base of saturated ceramides determines their propensity to laterally segregate into a ceramide-rich phase in fluid phosphatidylcholine bilayers. Al Sazzad, M. A., Yasuda, T., Murata, M., Slotte, J. P.* *Biophys. J.* **112**(5), 976-983 (2017).

〔学会発表〕(計 6件)

森内舞・土川博史・安田智一・村田道雄・Slotte J. Peter. 脂質モデル膜における極長鎖スフィンゴミエリンの運動性と膜物性解析, 日本化学会第97春季年会, 2017年03月, 神奈川

下西剛史, 梅川雄一, 門司真美, 花島慎弥, 土川博史, 村田道雄, 固体重水素NMR測定のための化学シフト温度計の開発と水和脂質二重膜への適用, 日本化学会第97春季年会, 2017年3月, 神奈川

村田道雄, 細胞膜の情報伝達プラットフォーム・脂質ラフトを化学する, 有機化学の最前線 2017年9月神奈川大学

Michio Murata, Atomistic picture of lipid rafts in model membrane, 6th Gratama Workshop, Oct. 2017, Groningen, Netherland.

村田道雄、リン脂質二重膜の動的構造－
脂質ラフトとマイクロドメイン、蛋白研セミ
ナー、2018年3月、大阪大学

佐伯直香・土川博史・門司真美・梅川雄
一・村田道雄・J. Peter Slotte, 重水素化スフィン
ゴミエリンのアシル鎖の深度依存的な配
座の赤 外分光解析とコレステロールの添加
効果, 日本化学会第98春季年会, 2018年3
月, 千葉

〔図書〕(計 1件)

Yuichi Umegawa, Nobuaki Matsumori and
Michio Murata, *Annual Reports on NMR
Spectroscopy*, Volume 94, Elsevier, 2018.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/murata/
research.html](http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/murata/research.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

村田 道雄 (Murata, Michio)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：40183653

(2)研究分担者

なし