

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目： 基盤研究（B）  
 研究期間： 2006 - 2008  
 課題番号： 18350004  
 研究課題名（和文） 生体膜の物質輸送・分配に関する動的多核NMR法による研究

研究課題名（英文） Dynamic and Multinuclear NMR Studies of Molecular Transport and Distribution in Biomembrane

研究代表者

中原 勝（NAKAHARA Masaru）  
 京都大学・化学研究所・教授  
 研究者番号：20025480

研究成果の概要：

脂質膜は、生体組織の「内」と「外」を分け、呼吸・栄養補給・代謝に必要な物質の輸送と分配を司る。本研究では、生体膜およびモデル膜における物質透過・分布の非侵襲的なその場測定の方法論を確立した。動的多核 NMR 法によって物質の捕獲・透過のダイナミクスを実時間で計測し、コレステロールの膜内および溶液中での溶存状態を明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,600,000	0	4,600,000
2007年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	11,000,000	1,920,000	12,920,000

研究分野： 溶液化学

科研費の分科・細目：物理化学

キーワード：NMR、膜、拡散定数、NOESY、コレステロール、DPPC、DMPC

#### 1. 研究開始当初の背景

膜が生命現象の本質を握る以上、生体膜およびモデル膜を非侵襲的にその場測定する方法論の開発の重要性は明らかである。従来、物質の膜透過や分布に関わる研究においては、高感度の蛍光プローブ法が多用されてきた。しかしながら、蛍光法の空間分解能は $\mu\text{m}$ 以上であり、膜分子と物質の相互作用・物質透過に伴う膜の構造やダイナミクスの変化を分子レベル（ナノレベル）で定量的に解析することは不可能であった。さらに、膜が生命現象の本質を握る以上、生体膜およびモデル膜を非侵襲的にその場測定する方法論の開発の重要性は明らかである。現在の NMR 法

は、感度が数十 $\mu\text{M}$ のオーダーに到達しており、微量成分が重要な役割を果たすこともあるナノスケール構造体への優れたアプローチである。 $\mu\text{M}$ オーダーの極低濃度に対応できる高分解能溶液 NMR の手法を用いて、その場測定の方法論を開発することにより、「自然」のままの分子情報の取得が期待される状況にあった。すなわち、多核 NMR 法によって測定可能な分子種の制限を取り除くことができ、原子の選択的識別によって、分解能の高い観測が可能になるとともに、生体を構成する成分を「自然」の状態で取り扱うことができ、蛍光プローブ法のような「非自然」を導入する必要の無い手法の確立が強く望まれ

る状況にあった。イオンや膜内に捉えられた物質の動態を、分単位の時間分解能でその場観察することは、膜機能を real time で観察することであり、その意義は大きい。

## 2. 研究の目的

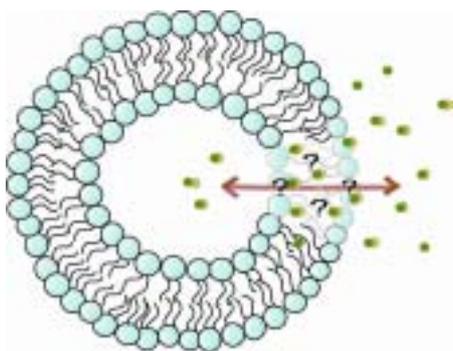
膜は、生体組織の「内」と「外」を分け、呼吸・栄養補給・代謝に必要な物質の輸送と分配を司る。本研究は、生体膜およびモデル膜における物質透過・分布の非侵襲的なその場測定の方法論を確立する。動的多核 NMR 法を展開し、イオン透過のダイナミクスとコレステロールの膜内での挙動を解析する。

(a)  $\text{Na}^+$  の膜透過の分単位の時間分解能その場測定を行う。 $^{23}\text{Na}^+$  の膜透過の定量的速度論を展開する。

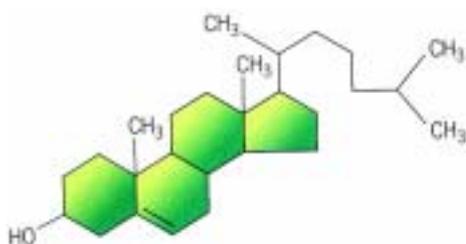
(b) 膜内に閉じ込められた機能性分子の動態解析を行う。分子としては、コレステロールを採用する。

## 3. 研究の方法

リン脂質として DPPC を用いる。膜の曲率を変えた実験により、最適な膜条件を決定する。上記(a)の概念図は、以下に示すとおりである。



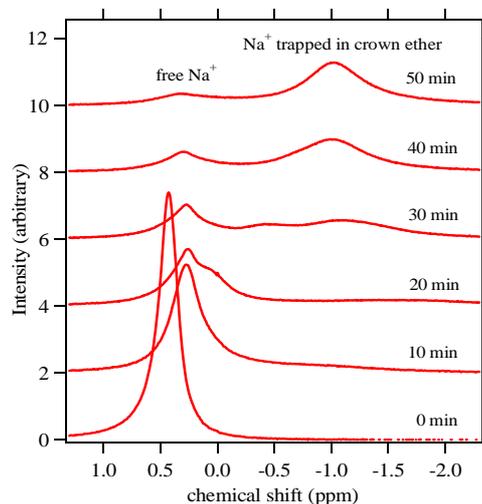
上記(a)の目的のために、クラウンエーテルをイオン捕捉剤として用いる。初期状態では、膜の外側にクラウンエーテルが存在し、クラウンエーテルに結合した  $^{23}\text{Na}$  種およびそれと早い交換をしている  $^{23}\text{Na}$  種が膜の外側にあり、膜の内側にあるのは、フリーな  $^{23}\text{Na}$  種 (フリーな  $\text{Na}^+$ ) である。膜の内側と外側の種が識別可能である。その後の  $^{23}\text{Na}$  スペクトルの変化を分単位の時間分解能で観測する。コレステロール含有系の動態解析では、NMR 線幅に基づく議論を行う。コレステロールの構造図は以下の通りである。



NMR 線幅は、分子の運動性と直結しており、運動性の定量的な尺度となる。

## 4. 研究成果

DPPC のリン脂質二分子膜 (large unilamellar vesicles: LUV; 直径 400 nm) を作成し、 $^{23}\text{Na}$ -NMR を用いて  $^{23}\text{Na}^+$  イオンの膜透過をリアルタイムで観測した。時間分解スペクトルは、下に示すとおりである。

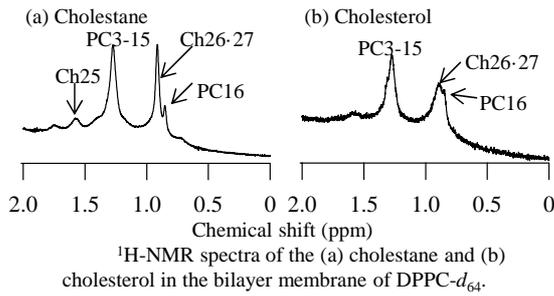


イオンチャンネルやキャリア等を介さない脂質二分子膜の熱揺らぎによるイオンの膜透過機構に焦点を絞り、温度変化に伴う  $\text{Na}^+$  イオンの膜透過性の変化を評価した。クラウンエーテルによって、膜の内外を区別する方法を確立した。初期の  $\text{Na}^+$  強度の減少からイオン透過速度定数を見積もり、脂質二分子膜の  $\text{Na}^+$  の透過係数を決定し、その温度依存性を求めた。

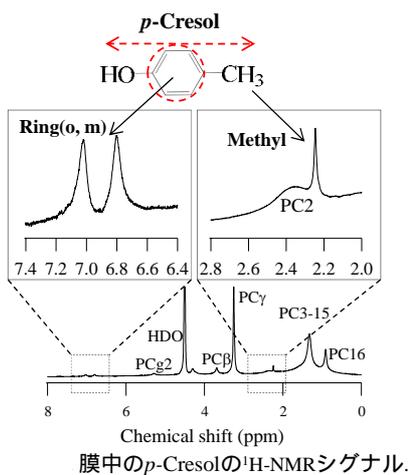
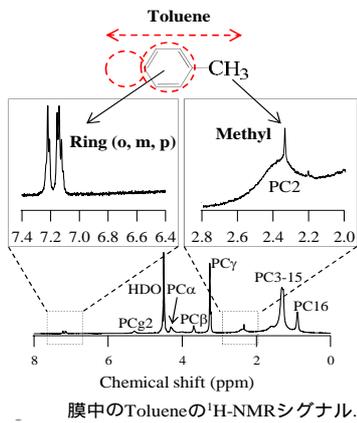
ついで、コレステロールの有機溶媒中での溶存状態を拡散 NMR および NOESY 法によって決定した。コレステロールは、*n*-オクタノール中では、単分散状態にあるが、クロロホルムやシクロヘキサン中では会合していることを、拡散 NMR 測定によって見出した。NOESY 測定によって、OH 基に近接した領域での分子間相関ピークを観測することで、会合の駆動力は水素結合であることを明らかにした。さらに、20 大口径プローブの開発によって、膜内でのコレステロールの観測に成功した。

膜内コレステロールの動態解析をさらに進め、コレステロール関連化合物の運動性の系統的な研究を行った。OH 基の存在、ステロイド骨格、分子長さの3つの因子に注目し、それぞれの効果を検討した。OH 基の存在によって、運動性が大きく変わることが見出された。OH 基が存在すると、分子配向に制限が生じて、分子の運動性は落ちる。逆に、OH 基が無いときは、配向の自由度の増大のために、NMR 信号の線幅は減少する。下に、コレステロール

とOH基を保持しない類似化合物であるコレスタンの<sup>1</sup>H-NMRシグナルを比較する。



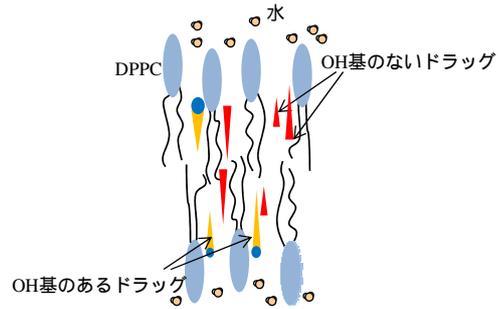
ビタミンD2などとの比較により、ステロイド骨格が存在しなくても、運動が制限されることを見出した。また、分子長が大きくなると、運動性が落ちる。その効果は、コレステロールのみならず、アルキルフェノールにおいても顕著であり、OH基の存在と分子長さの因子と内分泌攪乱作用との関連が示唆された。OH基の効果をクリアに見るために、膜中におけるTolueneと*p*-Cresolのシグナルおよびを下に示す。



Tolueneの場合、リングプロトンとメチルプロトンの両方のシグナルが非常にシャープであり、スピン-スピン結合による分裂まで観

測することが出来ている。一方、*p*-Cresolの場合には、シグナルはTolueneよりもブロードになっており、スピン-スピン結合による分裂は見られない。これは、*p*-Cresolのリングプロトンのスピン-スピン緩和時間が短くなっている、つまり運動が制限されていることを示す。同様の比較が、*n*-Nonylbenzeneと*p*-*n*-Nonylphenolの膜中のシグナルについてもなされ、OH基の効果が確認された。

さらに、化学シフトの解析によって、コレステロールおよびその類似化合物での膜内位置と配向を下図のように解釈できる。

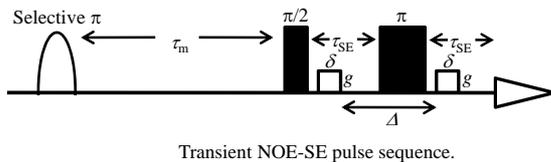


OH基をもつドラッグは、OH基がリン脂質の親水基部分（リン酸基もしくはコリン基）あるいは膜内外の水と水素結合を作ることによって、膜内における方向と、脂質に対する相対位置が固定されてしまう。一方、OH基をもたないドラッグは、比較的自由的な方向、位置で膜内に存在することが出来る。*n*-Nonylbenzeneと*p*-*n*-Nonylphenolを例にとると、*p*-*n*-Nonylphenolのノニル基の末端メチルは、全てベシクルの疎水部の中心付近に存在することになる。しかし、*n*-Nonylbenzeneではノニル基の末端であっても、ベシクルの疎水部分の中心に存在するものと、比較的親水部近くに存在するものとが分かれ、平均としては*p*-*n*-Nonylphenolのノニル基の方が疎水的環境に存在することとなる。岡村らが過去にこのような化学シフトの変化を利用して*n*-PropylbenzeneやBenzyl alcoholの膜内位置の決定を行ったが、本研究では、さらに一歩踏み込んだ解析によって膜内位置と方向の解析を行うことが出来たと言える。

膜の曲率効果についても検討を行った。膜の曲率によって、温度依存性が異なることを見出し、また、曲率依存性そのものも決して単調ではないことを明らかにした。温度上昇に伴う相関距離の減少と原子間距離の減少との競合によって生じる現象である。生体膜モデルとして、ミセルがしばしば用いられているが、曲率依存性の解析は、モデル膜の妥当性を確立する上での大きなステップである。さらに、膜中でのコレステロールについて、NOE測定を行った。膜中のコレステロールは、運動性が悪く、NMRシグナルの取得そのものが、コレステロールの研究における

大きな進展である。膜中でのコレステロールが、OH 基を水相に向けた配置にあることを見出した。

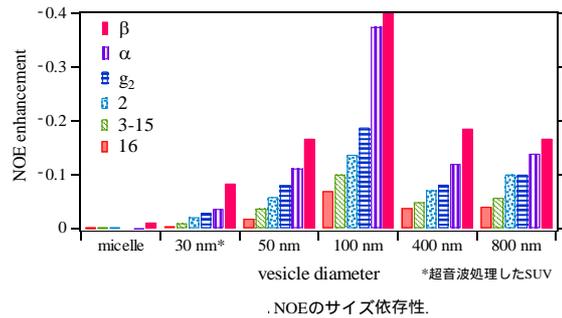
研究の進展の中で、spin-echo を用いて、幅広い膜信号の分離度を上げる新パルス系列 (transient NOE-SE 法) を案出した。直径の大きな膜に対しても適用可能であり、より現実の生体膜に近いモデル膜の研究に有力である。transient NOE-SE 法のパルス系列を下に示す。



従来の Transient NOE 法は核間の距離と相関時間の情報が得られるため、拘束された不均一な系である膜の分子機構の解明に大変有効である。しかし、上述のように直径が大きな膜であるほどそのスペクトルは非常にブロードになるため、積分値を求めるような定量的な解析は非常に困難となる。新しい transient NOE-SE 法では、選択的励起と混合時間  $\tau_m$  の後の  $2\tau_{SE}$  の間に、 $T_2$  の短いシグナルは減衰する。従って、ブロードなシグナルは  $T_2$  が短いにより早く減衰し、観測されるスペクトルはシャープに小さくなる。これによって、重なり合っているブロードなシグナルが減少し、シグナルの分割が可能になる。さらに、別の問題として、溶媒である  $D_2O$  中の残存 HDO シグナルが巨大であり、感度を下げる要因となっていることが挙げられる。この HDO シグナルを消去し感度を上げる手法としては DANTE 法が簡便でよく用いられる。DANTE 法とは、目的とするシグナルにラジオ波を照射して飽和させることで観測出来なくする手法である。しかし、これは何度も繰り返しラジオ波を照射するため、誤差が大きくなり、目的シグナル (ここでは HDO) 近辺のシグナルも巻き込んでしまう。これを解決するため Transient NOE-SE 法にさらに磁場勾配を組み込むことによって、この巨大な HDO シグナルのみを消去する Pulse sequence とした。この磁場勾配を用いる方法は、ベシクルを形成しているリン脂質と溶媒の HDO の拡散係数が大きく違うことを利用している。上記の手法によって、幅広い曲率の膜の NMR 信号が精度良く得られるようになった。

transient NOE-SE 法によって得られた曲率効果について述べる。直径の異なる 6 種類の DPPC 膜に対し、コリン基を選択的  $\pi$  パルスで照射したときの、各サイトの積分強度を測定し、比較した。下図は 60 のときのコリン基とその他のサイト間の NOE 強度を表し

ており、各サイトの平衡磁化で割った値  $\eta$  を示している。サイト毎のプロトン数の差による強度の違いはキャンセルされている。



ミセル以外のすべてのサイズのベシクルにおいて NOE 強度はコリン基から近いサイトほど大きく、核間の距離を反映した情報を取り出すことに成功していることが分かる。特に、これまで溶液  $^1H$ -NMR での研究例がほとんどない直径 800 nm という大きな膜でも数%の強度の違い、すなわち距離の違いを観測することに成功している。一方、ミセルはシグナルが非常にシャープで、NMR によってよく研究されている系である。しかし、観測された NOE 強度は非常に小さく、別の分子の膜中での位置など生体膜研究において興味もたれる情報を得ることは難しいと言える。ミセルの NOE 強度がこのように小さいということは、非常に大きな曲率をもつミセルでは、その構造が大きく揺らいでいることを示す。つまり、各分子の親水基が完全にそろった球形ではなく、疎水部分が水にさらされるような、膜面に対して垂直方向の揺らぎが存在すると言える。このような揺らぎによって、多くのサイトと双極子-双極子相互作用した結果、各サイトに磁化が分散されて全ての相関の強度は小さくなる。それぞれの NOE 強度は、5 (ミセル) - 100 nm までは増加し、100 nm から 800 nm までは減少するという傾向が見られる。5 - 100 nm までの小さいサイズにおいて、直径が小さいほど NOE 強度が小さい、という傾向については次のように解釈することが出来る。曲率が小さく、分子が垂直方向にあまり揺らいでいないときは、コリン基の磁化が移動する先は親水基近くのサイトに限られる。しかし、曲率が大きくなり脂質分子が垂直方向に大きく揺らぐと、ミセルの場合と同様に、磁化は多くのサイトに移動できるようになり、結果、各サイトに磁化が分散されて全ての相関の強度は小さくなる。また、直径 800 nm のベシクルにおいてもコリン基-末端メチル基間の NOE が観測された。NOE が現れる距離は約 5 Å 以内であるのに対し、これらのサイト間距離は約 30 Å であるので、曲率が非常に小さいベシクルでも脂質分子は垂直方向に全く揺らいでいないわけではない。これまでよく研究されてきた 100 nm 以下のベシク

ルやミセルと、より細胞に近い曲率のベシクルとでは、分子のダイナミクスと NMR 交差緩和の関連性が異なっており、生体膜のダイナミクス研究においては出来る限り曲率の近いベシクルを選択することが望ましい。

#### 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 8 件)

- (1) Self-diffusion coefficients for water and organic solvents at high-temperatures along the coexistence curve, K. Yoshida, N. Matubayasi, and M. Nakahara, *J. Chem. Phys.* **129**, 214501 (9 pages) (2008).
- (2) Free-energy analysis of the molecular binding into lipid membrane with the method of energy representation, N. Matubayasi, W. Shinoda, and M. Nakahara, *J. Chem. Phys.* **128**, 195107 (13 pages) (2008).
- (3) Cholesterol Location and Orientation in Aqueous Suspension of Large Unilamellar Vesicles of Phospholipid Revealed by Intermolecular Nuclear Overhauser Effect, C. Giordani, C. Wakai, K. Yoshida, E. Okamura, N. Matubayasi, and M. Nakahara, *J. Phys. Chem. B* **112**, 2622-2628 (2008).
- (4) Solvation shell dynamics studied by molecular dynamics simulation in relation to the translational and rotational dynamics of supercritical water and benzene, K. Yoshida, N. Matubayasi, and M. Nakahara, *J. Chem. Phys.* **127**, 174509 (13 pages) (2007).
- (5) Slowdown of H/D Exchange Reaction Rate and Water Dynamics in Ionic Liquids: Deactivation of Solitary Water Solvated by Small Anions in 1-Butyl-3-Methylimidazolium Chloride, Y. Yasaka, C. Wakai, N. Matubayasi, and M. Nakahara, *J. Phys. Chem. A* **111**, 541-543 (2007).
- (6) Kinetic and Equilibrium Study on Formic Acid Decomposition in Relation to the Water-Gas-Shift Reaction, Y. Yasaka, K. Yoshida, C. Wakai, N. Matubayasi, and M. Nakahara, *J. Phys. Chem. A* **110**, 11082-11090 (2006).
- (7) Free-energy analysis of solubilization in micelle, N. Matubayasi, K. K. Liang, and M. Nakahara, *J. Chem. Phys.* **124**, 154908 (13 pages) (2006).
- (8) Dynamic and 2D NMR Studies on Hydrogen-Bonding Aggregates of Cholesterol in Low-Polarity Organic Solvents, C. Giordani, C. Wakai, E. Okamura, N. Matubayasi, and M. Nakahara, *J. Phys. Chem.*

*B* **110**, 15205-15211 (2006).

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) T. Ikeda, T. Anai, K. Yoshida, N. Matubayasi, and M. Nakahara, "High-Temperature Multinuclear-Magnetic-Resonance Probe for the Analysis of Structure, Dynamics, and Chemical Reactions in Supercritical Water", The 15th International Conference on the Properties of Water and Steam, Berlin, Sep 7-Sep 11, 2008
- 2) N. Matubayasi, "Free energy of solvation in the energetic perspective", Multiscale Dynamics of Biomolecules 2007, Taipei (Taiwan), April 13-14, 2007.
- 3) Cristiano Giordani, 若井 千尋, 岡村 恵美子, 松林 伸幸, 中原 勝, "Diffusion and 2D NMR studies on cholesterol aggregates formed in low-polarity organic solvents mimicking the hydrophobic core of lipid bilayer", 日本化学会第 87 春季年会, 吹田, Mar 25-28, 2007
- 4) M. Nakahara, "In-situ NMR Spectroscopic Studies on Human Jurkat Cells", 9th Eurasia Conference on Chemical Science, Antalya (Turkey), September 9-13, 2006.

〔図書〕(計 1 件)

中原 勝, 岩波書店、集合体の熱力学・統計熱力学、2007、189ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 細胞・微生物の NMR 測定方法および NMR 用プローブ並びに NMR 制御装置

発明者: 池田武義、中原勝、松林伸幸、若井千尋

権利者: 同上

種類・番号: 特願 2006-235082 号

出願年月日: 平成 18 年 8 月 31 日(国内)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中原 勝 (NAKAHARA Masaru)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号: 20025480

##### (2) 研究分担者

松林 伸幸 (MATUBAYASI Nobuyuki)

京都大学・化学研究所・准教授

研究者番号: 20281107

岡村 恵美子 (OKAMURA Emiko)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号: 00160705

若井 千尋 (WAKAI Chihiro)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号: 40293948