

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19550174
 研究課題名 (和文) 自然免疫系を始動するリポ多糖分子と膜脂質との相互作用の固体 NMR による解析
 研究課題名 (英文) Interaction of Lipopolysaccharide and Phospholipid in Mixed Membrane Investigated by Solid-State NMR Spectroscopy
 研究代表者
 三浦 (野村) 薫 (MIURA (NOMURA) KAORU)
 財団法人サントリー生物有機科学研究所・研究員
 研究者番号：90353515

研究成果の概要 (和文)：我々は、自然免疫反応のリガンド分子であるリポ多糖 (LPS) と生体膜がどのように関わりあっているかを固体 NMR により明らかにした。まず、LPS と種々のリン脂質成分との混和性により、膜中での LPS の分布や膜の形態が影響を受けることを明らかにした。また、リン脂質のみで構成されている二重膜や、ラフト形成膜の中での、LPS や膜脂質の運動性を解析した。さらに、ラフト形成膜において ReLPS の存在がラフト領域を拡大することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：We clarified how Lipopolysaccharide (LPS), the ligand of innate immune response, and biomembrane interact by using a solid-state NMR. First, we examined the effect of LPS on membrane morphology and LPS distribution patterns in the membrane based on the miscibility between LPS and individual phospholipid compositions. Then, molecular motions of the LPS and phospholipids were evaluated in the pure phospholipid membrane and raft-forming membrane. Further, we clarified that LPS induces expansion of the raft area in the raft-forming membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：自然免疫、リポ多糖、固体 NMR 法、脂質二重膜、会合状態、脂質ラフト

1. 研究開始当初の背景

リポ多糖 (LPS) はサルモネラ菌や大腸菌などのグラム陰性菌の細胞壁外層を埋め尽くしており、自然免疫系の代表的な鍵物質として最近注目されている。しかし、LPS を高感度に捉える Toll 様受容体が認識する際に、そ

の反応の場である動物細胞側の細胞膜がどのような働きをしているのかどうかは未だに明らかではない。そこで我々は主に固体 NMR 法を用いて、LPS と膜脂質との相互作用を解析し、自然免疫の基本的な機構を解明することを計画した。

2. 研究の目的

LPS と脂質二重膜との相互作用を解析する。具体的には、まず、LPS が存在することにより動物細胞が影響を受けるか、すなわちリポ多糖が直接的に脂質二重膜の状態に影響するかをみる。また、LPS が膜上でどのように局在しているかを観測する。膜脂質の運動性が LPS の存在によりどのように影響を受けるか、また LPS 自身の運動性が膜の構成によりどのように変化するかを解析する。さらに、LPS がラフト形成膜に与える影響を解析する。

3. 研究の方法

(1) 全ての実験には非標識の LPS とこれを ^{13}C や ^{15}N で同位体標識したものが必要である。活性部位であるリポド A の多糖の部分に 3-デオキシ-D-マンノオクトロン酸 (Kdo) が 2 残基結合した Re 型 LPS (ReLPS) は、ほとんどの LPS に含まれている基本骨格であり、ReLPS には細胞壁を形成するために必要な要素が含まれていると考えられる。そこで、大腸菌からの ReLPS を抽出、精製を試み、必要量のサンプルを準備する。

(2) リポ多糖が存在することにより脂質膜が受ける形態変化を、膜を構成するリン脂質の ^{31}P 固体 NMR スペクトルにより観測する。

(3) GU 膜や平面膜中での ReLPS の局在や、ReLPS の存在が平面膜上でのリン脂質の側方拡散速度に与える影響を、顕微鏡を用いて観測する。

(4) 純粋にリン脂質のみからできる脂質二重膜とラフトを形成している膜中での、ReLPS とリン脂質の運動の速さを固体 NMR を用いて解析した緩和時間の値から比較する。また、ReLPS がラフト形成膜に及ぼす影響を観測する。

4. 研究成果

(1) ^{31}P の固体 NMR スペクトルにより、ReLPS の一部は脂質二重膜に挿入することがわかった。また、ReLPS 存在下では、脂質膜の構造は脂質の構成に依存して大きく変化することがわかった。特に ReLPS は egg L- α -phosphatidylcholine (Egg-PC) を多く含んだ膜では膜のミセル化を起こすが、phosphatidylethanolamine (PE) を多く含んだ膜ではそのようなミセル化は起こさないことがわかった。

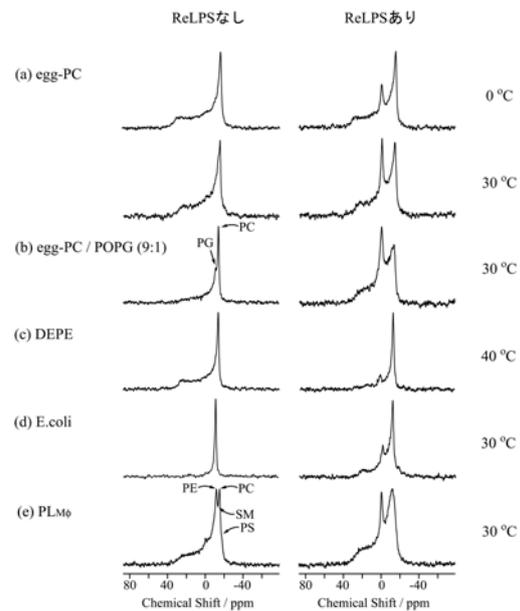


図 1 各種リン脂質からなる多重層リポソーム (MLV) の ^{31}P NMR スペクトル

(a) egg L- α -phosphatidyl-choline (egg-PC)
 (b) egg-PC / 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol-3-phosphoglycerol (POPG) (9:1)
 (c) 1, 2-Dielaidoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine (DEPE)
 (d) *E. coli* polar lipid extract
 (e) マクロファージの細胞膜を模倣した膜 PL_M.
 ([egg-PC]: [*E. coli*-PE]: [Bovine- sphingomyelin (SM)] : [Brain- phosphatidylserine (PS)] = 1 : 0.7 : 0.5 : 0.4)

(2) GU 膜や平面膜中での ReLPS の局在を顕微鏡を用いて観測をしたところ、どちらのモデル膜中でも ReLPS は Egg-PC のみから構成される脂質二重膜中に均一に挿入していた。一方、Egg-PC に負電荷を持つ 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG) を少量混ぜて作成した膜に対しては、ReLPS は部分的に挿入し、二重膜の表面に非ラメラ相の会合体が観測された。

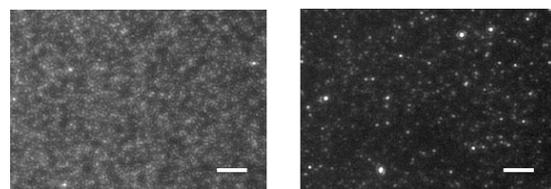


図 2 平面膜の蛍光顕微鏡画像

(左) [EggPC] : [LPS] = 10 : 1
 (右) [EggPC] : [POPG] : [LPS] = 9 : 1 : 1
 Bar = 5 μm

(3) ReLPS と EggPC と POPG をいろいろなモル比で混ぜて作成した平面膜上での、リン脂質の拡散速度を顕微鏡を用いて測定したところ、ReLPS が多いほど脂質の拡散速度は遅くなることがわかった。さらに、ReLPS 存在下では、POPG の濃度が高いほど拡散速度は遅くなることがわかった。このように、膜を構成するリン脂質の性質は ReLPS の膜中での分布や脂質膜の会合体の構造、そして物理化学的な性質に敏感に影響を及ぼすことがわかった。これは、ReLPS と個々のリン脂質成分との混和性によると思われる。

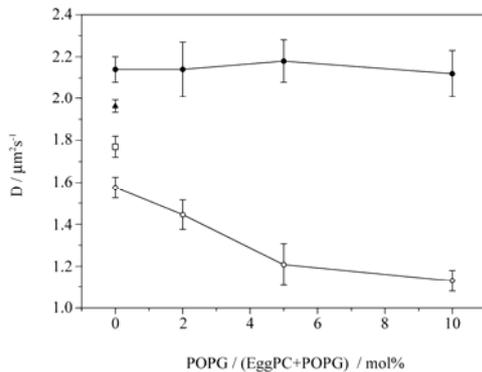


図3 リン脂質の側方拡散係数の ReLPS 濃度依存性 (25°C). [ReLPS]:[Lipid] = 0:100 (●), 1:50 (▲), 1:20 (□), 1:10 (○).

(4) 最近生体膜中のラフト領域がシグナル伝達のプラットフォームとして注目されている。そこで我々は、自然免疫反応の際には、生体膜と LPS がどのように関わりあっているかを固体 NMR により明らかにした。まず、リン脂質である phosphatidylethanolamine (PE) のみで構成されている二重膜や、リン脂質の他にスフィンゴミエリンやコレステロールを加えて作成した人工的なラフト膜の中での、ReLPS や膜脂質の運動性を固体 NMR により解析した。その結果、ReLPS の回転系におけるプロトンの縦緩和時間 $T_{1\rho}^H$ は膜脂質に比べ約 100 倍長く、膜脂質に比べて非常に遅く動いていることがわかった。ReLPS が結合した PE 二重膜では、膜脂質は結合していないものと比べると、動きの遅い ReLPS により運動が制限されていることがわかった。また、ReLPS はラフト形成膜中でも PE 二重膜中と同様にゆっくりと動いていた。

(5) さらに、DEPE のカルボニル炭素の線形や化学シフトの値から、ラフト形成膜において ReLPS の存在がラフト領域を拡大することが明らかになった。ReLPS は自分自身が飽和したアシル鎖を 6 本も持っていることより、ReLPS の存在が脂質二重膜中の周りの膜脂質のアシル鎖のオールトランス構造を誘起する効果があると思われる。このように、ReLPS

は周りの膜には影響を及ぼす一方、自分自身は周りの環境が変わろうとも同じペースで運動していた。自然免疫反応の際には、ReLPS が膜に挿入することにより、反応の場であるラフト領域を自ら拡大することで受容体である TLR4 との結合が容易になり、よりシグナルが伝達されやすくなっていることが考えられる。

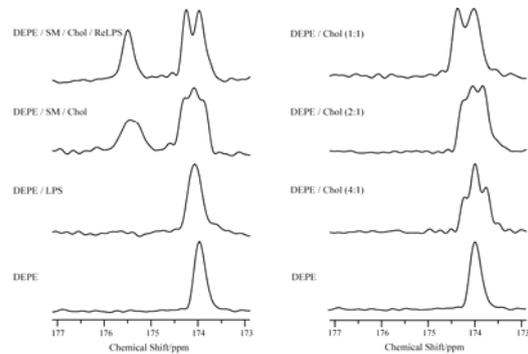


図4 ^{13}C MAS NMR スペクトルのカルボニル領域

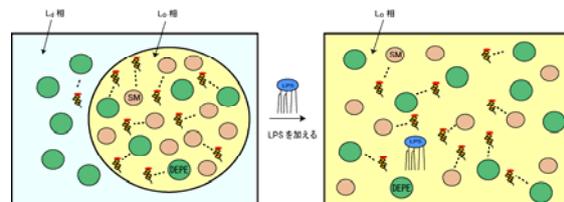


図5 ReLPS の存在による DEPE/SM/Chol 膜の相変化

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)

① Nomura K., Inaba T., Morigaki K., Brandenburg K., Seydel U., and Kusumoto S. “Interaction of Lipopolysaccharide and Phospholipid in Mixed Membranes: Solid-State ^{31}P -NMR Spectroscopic and Microscopic Investigations.” 査読有、Biophysical Journal、Vol. 95、2008、1226-1238

② Matsumori N., Kasai Y., Oishi T., Murata M., and Nomura K. “Orientation of Fluorinated Cholesterol in Lipid Bilayers Analyzed by ^{19}F Tensor Calculation and Solid-State NMR” 査読有、J. Am. Chem. Soc. Vol. 130、2008、4757-4766

③ Nomura K., Maeda M., Sugase K., and

Kusumoto S. “Lipopolysaccharide Induces Raft Domain Expansion in Membrane Composed of a Phospholipid-Cholesterol-Sphingomyelin Ternary System.” 査読有、Innate Immunity、Vol. 、2010

〔学会発表〕(計5件)

①野村 薫、「抗菌性ペプチドの膜破壊機構の解明」、分子研ナノフォーラム「—固体 NMR 研究の最前線—」、2008.2.5、分子化学研究所(愛知)

② Nomura K, 「Interaction of Lipopolysaccharide and Phospholipid in Mixed Membranes: Solid-State ^{31}P -NMR Spectroscopic and Microscopic Investigations」, 10th International Endotoxin and Innate Immunity Society (IEIIS) Meeting, 2008.7.30-8.2, Edinburgh, UK

③野村 薫、「自然免疫の鍵物質 LPS の膜中での振舞いを見る」、高分子学会 08-2NMR 研究、2008.12.16、京都会館(京都)

④野村 薫、「Induction of Morphological Changes in Model Lipid Membranes and the Mechanism of Membrane Disruption by a Large Scorpion-derived Pore-forming Peptide」、医薬基盤研セミナー 2009.6.22、医薬基盤研究所(大阪)

⑤野村 薫、「リポ多糖と膜脂質の相互作用解析」、サントリー生有研フォーラム、2009.8.20、サントリー研究センター(大阪)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sunbor.or.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 薫(ミウラ カオル)

財) サントリー生物有機科学研究所・研究員
研究者番号: 90353515

(2) 研究分担者

楠本 正一(クスモト ショウイチ)

財) サントリー生物有機科学研究所・所長
研究者番号: 30028153

(H-19→H20 : 連携研究者)