

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17390011
 研究課題名 (和文) スフィンゴミエリンとコレステロールの急性危険因子としての作用に関する研究

研究課題名 (英文) Studies on Sphingomyelin and Cholesterol as Acute Risk Factors

研究代表者

半田 哲郎 (HANDA TETSUROU)
 京都大学・薬学研究科・教授
 研究者番号：00025719

研究成果の概要：スフィンゴミエリン (SM) やコレステロール (Chol) が細胞に蓄積すると細胞死が誘導されるが、これらを高濃度で含有する血漿リポタンパクが過剰にあるときも細胞死が起こることを明らかにし、そのメカニズムを研究した。また、これら脂質を細胞より排出する HDL 粒子の生成を生物物理学的に調査した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	7,200,000	0	7,200,000
2006 年度	2,500,000	0	2,500,000
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
総計	14,800,000	1,530,000	16,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：スフィンゴミエリン、コレステロール、カイロミクロン、細胞死、HDL

1. 研究開始当初の背景

(1) 高脂肪食後の急性心臓障害が、欧米また日本で報告され、外因性脂質が危険因子として注目されている。コレステロール (Chol) やスフィンゴミエリン (SM) の細胞毒性については、近年、コロンビア大学の I. Tabas 等のグループが、小胞体などの細胞内オルガネラ膜に過剰の Chol などがストレスを与えるとしている。本研究者は前に、外因性脂質の血漿リポタンパク、カイロミクロンやそのレムナント粒子の SM や Chol がその表面膜構造を変化させ、血漿中に脂質を滞留させ動脈硬化を導くという機能を明らかにした。本研究では、さらに、細胞内へのリポタンパクの移

行を通じて、SM や Chol が過剰に蓄積し、急性疾患をも誘導するという作業仮説を立てた。

(2) 一方、細胞内の過剰の Chol を組織細胞から体外に排出する役割を演じている高密度リポタンパク、HDL の生成については、近年、これに関わる膜蛋白 ABCA1 が発見され、世界的な研究対象になっている。しかし、従来の分子生物学的視点からは説明できない現象が多く、生物物理学的解明の重要性が認識されている。しかし、この方面の研究は極めて少ない。

2. 研究の目的

SM や Chol がカイロミクロンやカイロミクロンレムナントや LDL 経路で細胞に蓄積し、細胞障害を引き起こす可能性を明らかにする。次に、全身の Chol などの脂質ホメオスタシスに重要な役割を果たしている HDL の生成機構を生物物理学的に明らかにする。

3. 研究の方法

(1)天然の血漿リポタンパク粒子は脂質や蛋白の組成が多様で、粒子径にも分布がある。これらの因子は細胞との相互作用に重大な影響を与える。本研究では、脂質組成やサイズの揃ったカイロミクロン、そのレムナントさらに LDL 粒子のモデルである脂質エマルジョンを人工的に調製し、肝細胞 HepG2 やマクロファージ J774 との相互作用を共焦点顕微鏡などにより調査した。このとき、種々のアポリタンパクを添加し、その機能の脂質粒子依存性を研究した。また、粒子の物理化学的性質の脂質組成依存性を蛍光異方性の時間分解、表面水和、重水素 NMR 法によるオーダーパラメーターの測定に基づき評価した。

(2)アポリタンパク A-I (apoA-I) とリン脂質(PC)によるディスク状 HDL ナノ粒子の生成を、光散乱や電子顕微鏡測定により調査した。また、生成した HDL の脂質・蛋白の組成も分析した。このナノ粒子間のあるいは脂質エマルジョンとの Chol や PC の交換・移動のダイナミクスを蛍光法や中性子散乱測定により評価した。

4. 研究成果

(1)リポタンパクのカイロミクロンモデル粒子である脂質エマルジョンは、脂質リポソームと表面脂質組成や粒子径が同じでも、アポリタンパクが約 10 倍も多く結合し、細胞にすみやかに取り込まれる。これは、両粒子表面 PC 膜の構造の差異に基づくことを明らかにした。Chol を添加すると脂質エマルジョンの細胞による取り込みは、さらに亢進した。Chol 含有脂質エマルジョン粒子の取り込みにより、細胞が障害を受け死に至ることも示された。さらに、Chol 含有脂質エマルジョンの濃度が高いときは、アポリタンパクが存在しなくても細胞取り込みと細胞死が認められた。カイロミクロンあるいはそのレムナントモデルより細胞に導入された Chol はリポソーム膜に蓄積しており、細胞内オルガネラ膜の過剰コレステロールによるストレスが細胞死を誘導すると示唆された。

(2)SM 含有脂質エマルジョンはリポタンパク LDL のモデルである。動脈硬化部位に高頻度で検出される SMase を作用させると、SM はセラミド CE に変化し、表面膜の主要成分 PC から分離、ラフト様不均一構造を形成することが共焦点顕微鏡観察により明らかになった。

この変性粒子は肝細胞やマクロファージとの親和性が著しく亢進されていることが明らかになった。これにより、CE を細胞内に蓄積、細胞障害を誘導すると考えている。

(3)ディスク状 HDL の生成は、apoA-I と天然 PC の 2 分子膜リポソームとの相互作用によっては認められない。一方、PC に SM を加えたリポソーム膜に対しては、組成や温度依存的にこれを HDL に構造変換することが示された。また、天然 PC の 2 分子膜リポソームでも、pH を酸性としたとき、速やかに HDL が生成することが認められた。SM の含有量や酸性 pH は細胞の HDL 新生が起こると考えられる部位では生理的に実現されている。これらの結果に基づき、ABCA1 膜蛋白が担うと予想される機能を考察している。

(4)このようにして生成したディスク状 HDL 間の PC や Chol の交換速度を評価したところ、生体膜モデルであるリポソームの、それぞれ、約 20 倍、2 倍であることが示された。現在、10nm 足らずのナノ粒子 HDL の早い動的性質と体内の脂質ホメオスタシス維持機能の関係を検討している。

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 23 件)

英文：全て査読あり。

1. Static and Dynamic Properties of Phospholipid Bilayer Nanodiscs. M. Nakano, M. Fukuda, T. Kudo, M. Miyazaki, Y. Wada, N. Matsuzaki, H. Endo, T. Handa, J. Am. Chem. Soc. in press (2009).
2. Flip-Flop of Phospholipids in Vesicles: Kinetic Analysis with Time-Resolved Small-Angle Neutron Scattering. M. Nakano, M. Fukuda, T. Kudo, N. Matsuzaki, T. Azuma, K. Sekine, H. Endo, T. Handa, J. Phys. Chem. B 113 (19), 6745-6748 (2009).
3. Role of the N- and C-terminal Domains in Binding of Apolipoprotein E Isoforms to Heparan Sulfate and Dermatan Sulfate: A Surface Plasmon Resonance Study. Y. Yamauchi, N. Deguchi, C. Takagi, M. Tanaka, P. Dhanasekaran, M. Nakano, T. Handa, M. C. Phillips, S. Lund-Katz, H. Saito, Biochemistry 47 (25), 6702-6710 (2008).
4. Conformational Change of Apolipoprotein A-I and HDL Formation from Model Membranes under Intracellular Acidic Conditions. M. Fukuda, M. Nakano, M. Miyazaki, M. Tanaka, H. Saito, S. Kobayashi, M. Ueno, T. Handa, J. Lipid Res.

49 (11), 2419-2426 (2008).

5. Cytotoxicity of lipid-free apolipoprotein B. S. Morita, Y. Deharu, E. Takata, M. Nakano, T. Handa, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (11), 2594-2603 (2008).

6. Spontaneous Reconstitution of Discoidal HDL from Sphingomyelin-Containing Model Membranes by Apolipoprotein A-I. M. Fukuda, M. Nakano, S. Sriwongsitanont, M. Ueno, Y. Kuroda, T. Handa, *J. Lipid Res.* 48 (4), 882-889 (2007).

7. Determination of Interbilayer and Transbilayer Lipid Transfers by Time-Resolved Small-Angle Neutron Scattering. M. Nakano, M. Fukuda, T. Kudo, H. Endo, T. Handa, *Phys. Rev. Lett.* 98 (23), 238101, 1-4 (2007).

8. Bile Salt-Dependent Efflux of Cellular Phospholipids Mediated by ATP Binding Cassette Protein B4. S. Morita, A. Kobayashi, Y. Takanezawa, N. Kioka, T. Handa, H. Arai, M. Matsuo, K. Ueda, *Hepatology* 46 (1), 188-199 (2007).

9. Novel Action of Apolipoprotein E (ApoE): ApoE Isoform Specifically Inhibits Lipid-Particle-Mediated Cholesterol Release from Neurons. J-S. Gong, S. Morita, M. Kobayashi, T. Handa, S. C. Fujita, K. Yanagisawa, M. Michikawa, *Molecular Neurodegeneration* 2, 9, 1-11 (2007).

10. Interaction of an Amphipathic Peptide with Phosphatidylcholine/Phosphatidylethanolamine Mixed Membranes. K. Shintou, M. Nakano, T. Kamo, Y. Kuroda, T. Handa, *Biophys. J.* 93 (11), 3900-3906 (2007).

11. Effects of an Amphipathic α -Helical Peptide on Lateral Pressure and Water Penetration in Phosphatidylcholine and Monoolein Mixed Membranes. T. Kamo, M. Nakano, Y. Kuroda, T. Handa, *J. Phys. Chem. B* 110 (49), 24987-24992 (2006).

12. Two-Step Mechanism of Binding of Apolipoprotein E to Heparin: Implications for the Kinetics of Apolipoprotein E-Heparan Sulfate Proteoglycan Complex Formation on Cell Surfaces. M. Futamura, P. Dhanasekaran, T. Handa, M. C. Phillips, S. Lund-Katz, H. Saito, *J. Biol. Chem.* 280 (7), 5414-5422 (2005).

13. Formation of Ceramide-Enriched Domains in Lipid Particles Enhances the Binding of Apolipoprotein E. S. Morita, M. Nakano, A. Sakurai, Y. Deharu, A. V-Doi, T. Handa, *FEBS Letters* 579 (7), 1759-1764

(2005).

14. Effects of Cholesterol in Chylomicron Remnant Models of Lipid Emulsions on ApoE-Mediated Uptake and Cytotoxicity of Macrophages, A. Sakurai, S. Morita, K. Wakita, Y. Deharu, M. Nakano, T. Handa, *J. Lipid Res.* 46 (10), 2214-2220 (2005).

15. Effects of the Core Lipid on the Energetics of Binding of ApoA-I to Model Lipoprotein Particles of Different Sizes. M. Tanaka, H. Saito, P. Dhanasekaran, S. Wehrli, T. Handa, S. Lund-Katz, M. C. Phillips, *Biochemistry* 44 (31), 10689-10695 (2005).

邦文：査読無し

1. アポリポタンパク-脂質膜相互作用によるディスク状複合体形成と高密度リポタンパク質形成原理の考察. 中野実, *Yakugaku Zasshi*, 128 (5), 687-693 (2008).

2. SANS-Uを使った脂質のベシクル間移動の研究. 中野実, *波紋* 18 (2), 82-85 (2008).

3. 脂質エンジニアリング：ものづくりプラットフォームとしての脂質膜. 半田哲郎, *膜* 32(1) 1-1 (2007)

4. 自発的HDL様粒子形成における膜構造の影響. 中野実, *膜* 32 (5), 247-252 (2007).

5. 非二分子膜構造を有する脂質微粒子の創成とその構造評価に関する研究. 中野実, *膜* 31 (4), 202-206 (2006).

6. 脂質エマルジョンの表面構造と血漿アポリポタンパクの結合. 半田哲郎, *表面* 43, 233-241 (2005).

7. セラミドと動脈硬化の発生. 森田真也, 半田哲郎, *化学* 60(10), 72-73 (2005).

8. 脂質乳化粒子の構造と機能. 半田哲郎, *フラグランスジャーナル* 19, 10-16 (2005).

〔学会発表〕(計17件)

半田哲郎：

(国際学会)

1. Tetsuro Handa, Interaction of apolipoprotein with phospholipids monolayer at emulsion surface, 48th ICBL Sep 4-8, 2007, Turku, Finland

2. Tetsuro Handa, Apolipoprotein - membrane interaction at lipid particle surface, ICOM2005, Aug 21-26, 2005, Seoul, Korea

中野実：

(国際学会)

1. Minoru Nakano, Lipid Transfer Dynamics in Nanoparticle Systems, Jülich Soft Matter Days, Nov. 11-14, 2008, Bonn,

Germany

2. Minoru Nakano, Evaluation of Interventricular Transfer and Flip-Flop of Phospholipids by Time-Resolved Small-Angle Neutron Scattering, 49th International Conference of Biochemistry of Lipids, Aug. 26-30, 2008, Maastricht, Netherlands
3. Minoru Nakano, In Situ Determination of Interbilayer and Transbilayer Lipid Transfers in Liposomes, 11th Liposome Research Days Conference, July 19-22, 2008, Yokohama
4. Minoru Nakano, Evaluation of Interbilayer Transport and Flip-Flop of Lipids in Vesicles by Time-Resolved Small-Angle Neutron Scattering, The Second Japan-Taiwan Workshop on Neutron Scattering of Bio-materials, Soft-Matters and Nano-materials, Dec. 4-7, 2007, Taipei, Taiwan
5. Minoru Nakano, An Amphipathic Class A Peptide Induces Membrane Destabilization of Phosphatidylcholine/Sphingomyelin Mixed Bilayers, 46th International Conference of Biochemistry of Lipids, Sep. 20-24, 2005, Ajaccio, France)

(国内学会)

1. 時分割中性子散乱による膜脂質のダイナミクスの評価 (中性子科学会年会 2008.12.2, 名古屋)
2. 中野実, コレステロールによるエマルションの表面状態と両親媒性ヘリックス結合性の変化 (膜学会 2008.5.15 東京)
3. 中野実, 中性子散乱を利用した膜脂質のダイナミクス評価 (膜シンポ 2007.11.15 山口)
4. 中野実, 時分割中性子小角散乱による膜脂質ダイナミクスの評価 (コロイド 2007.9.22, 松本)
5. 中野実, 自発的HDL様粒子形成における膜構造の影響 (膜学会 2007.5.10 東京)
6. 中野実, アポリポタンパク-脂質膜相互作用によるディスク状複合体形成とHDL形成原理の考察 (薬学会 2007.3.29. 富山)
7. 中野実, アポリポタンパク質と混合脂質膜との相互作用によるディスク状複合体形成 (コロイド 2006.9.14 札幌)
8. 中野実, 非ラメラ相形成脂質が及ぼす二分子膜の微細構造変化 (膜シンポ 2005.11.25, 京都)
9. 中野実, 両親媒性ペプチドによる混合リン脂質リポソームの不安定化 (コロイド 2005.9.8. 宇都宮)

10. 中野実, 蛍光法によるレシチン-モノオレイン混合脂質膜中の側方圧力の評価 (膜学会 2005.5.19, 早稲田)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

半田哲郎 (HANDA TETSUROU)
京都大学・薬学研究科・教授
研究者番号: 00025719

(2) 研究分担者

中野実 (NAKANO MINORU)
京都大学・薬学研究科・准教授
研究者番号: 70314226

(3) 連携研究者

なし