

令和 5 年 4 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15707

研究課題名（和文）セラミド-1-リン酸の動的挙動解析に基づくホスホリパーゼA2分子認識機構の解明

研究課題名（英文）The relevance of the membrane dynamics of ceramide 1-phosphate in the activation of cytosolic phospholipase A2

研究代表者

安田 智一（Yasuda, Tomokazu）

大阪大学・大学院理学研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：90771121

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：セラミド-1-リン酸（C1P）の類縁体の化学合成を基盤に、人工脂質膜を用いた蛍光測定やSPRによって、C1Pおよび細胞質型ホスホリパーゼA2（cPLA2）との複合体の原子レベルの動的挙動や相互作用を精密に解析した。その結果、膜中に存在するC1Pドメインの膜動態は、周辺の脂質環境やC1P親水部構造に影響を受け、ドメイン形成能が高い膜環境であるほどcPLA2との結合親和性が高くなることが示された。そして、C1PによるcPLA2活性化機構の分子基盤について、C1Pドメイン形成による膜物性の変化がcPLA2の膜への分子認識を促進していると推定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、リガンドである脂質の原子レベルの動的情報を基軸とした新たな解析アプローチによって、生体内で微量脂質として含まれる脂質メディエーターの機能にも膜動態が重要な役割を果たしていることを示すことができた。このアプローチは、多くの生理機能や疾患に関与するタンパク質の活性を調節する膜脂質分子の分子認識機構研究へも展開することが可能であり、タンパク質の脂質結合部位をターゲットとした有効な薬剤開発など医薬化学分野の応用面にも大きく寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Ceramide 1-phosphate (C1P) is a lipid mediator that specifically binds and activates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2). In this study, we prepared C1P analogues containing modifications in the hydrophilic parts of the structure and subjected them to fluorescence spectroscopy using trans-parinaric acid and SPR, to elucidate both the properties of segregated C1P domains and the affinity of cPLA2 in different lipid environments. These results indicate that the alteration of membrane properties by C1P domain formation drives the molecular recognition of the membrane, through specific binding between the C1P structure and the basic residues of cPLA2, which leads to increased membrane affinity for and activation of cPLA2. This study highlights the important role of trace lipid mediators present in biomembranes in local domain formation and their involvement in biological functions.

研究分野：生物物理化学

キーワード：セラミド-1-リン酸 細胞質型ホスホリパーゼA2 蛍光寿命測定 表面プラズモン共鳴法 動的挙動解析 分子認識機構

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「脂質生物学」の重要性が高まってきた現在、脂質分子の情報伝達分子としての機能は生理的・病理的観点から注目度が非常に高い。その機能発現の様式には、細胞膜上の脂質分子がタンパク質と相互作用することで、タンパク質の機能を制御する例がある。近年、スフィンゴ脂質に由来するセラミド-1-リン酸が、細胞質型ホスホリパーゼ A2 (cPLA₂) と特異的に結合し、細胞膜上のリン脂質からアラキドン酸を切り出す活性を促進することが明らかとなった。なぜ膜上に局所的に分布する C1P が cPLA₂ を特異的に認識するのか。その分子基盤を明らかにするためには、C1P と cPLA₂ の動的挙動と構造、そして C1P-cPLA₂ 複合体形成に働く相互作用の解明が必須である。これまで C1P-cPLA₂ 分子認識機構に対して、cPLA₂ の機能に基づく分子生物学的手法で行われ、その動的挙動と構造が明らかにされてきた。一方、リガンドである C1P は、細胞膜上で高い流動性と複雑性を示すため、分子認識に重要な構造とそれと相関する細胞膜中の動的挙動については、精密かつ化学的解析がされていない。

そこで本研究は、C1P-cPLA₂ の分子認識機構に対して、現状の手法とは全く異なる側面から、C1P の動的情報を基軸とした化学的・物理的アプローチで迫ることとした。具体的には、C1P 類縁体の化学合成を基盤に、人工脂質膜を用いた各種計測手法を分野融合的に用いて、C1P および cPLA₂ との複合体の原子レベルの動的挙動を精密に解析することを計画した。

2. 研究の目的

本研究では、細胞膜上に局所的に分布する C1P が、どのようにして cPLA₂ と特異的に結合するのか、その分子基盤を解明する。そこで、C1P の集合状態 (ドメイン) に及ぼす特異的な動態変化が、cPLA₂ を分子認識するのに重要であるとの仮説を立て、合成した C1P 類縁体を用いた蛍光分光法や表面プラズモン共鳴 (SPR) などの計測手法によって、人工脂質膜における cPLA₂ との結合が誘起する C1P ドメインの膜物性の変化、C1P と cPLA₂ 分子間の相互作用の強さと結合様式、C1P-cPLA₂ 複合体が形成する動的過程を明らかにする。これらの動的情報を統合的に解析することによって、C1P の挙動秩序と生理機能の関係を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 蛍光測定による C1P 膜ドメインの動的挙動および構造解析

cPLA₂ との結合が誘起する C1P ドメインの膜動態を明らかにするため、C1P ドメインの動的挙動や熱安定性を調べる。そのために、ホストとなる脂質の組成や Ca²⁺ や pH によって水和状態を変化させた C1P 含有リポソームや、C1P 親水部の構造を改変した類縁体を含むリポソームを調製する。そして、蛍光プローブ trans-パリナリン酸 (tPA) を導入することで、脂質膜の流動性と正確な相関がある蛍光寿命・蛍光偏光度測定を行う。

(2) 表面プラズモン共鳴 (SPR) による C1P-cPLA₂ 分子間の相互作用解析

膜構成脂質や C1P 類縁体に応じて、膜動態の異なるドメインが存在する人工膜に対して、C1P の cPLA₂ に対する親和性を定量的に求めるため SPR を行う。その結果から、C1P ドメインの膜動態と相互作用の強さの相関を明らかにし、C1P の cPLA₂ 認識部位を推定する。

4. 研究成果

(1) C1P 膜ドメインの動的挙動および構造解析

C1P 含有率に対する tPA 平均蛍光寿命の変化から、各膜環境におけるドメイン形成能を推定し、天然の C1P と比較した結果、膜構成脂質や類縁体によって異なることが明らかとなった (図 1)。膜構成脂質について、DOPC 膜では、その不飽和アシル鎖によって C1P 分子間の相互作用が促進され、C1P ドメイン形成能が高くなったが、コレステロール (Cho) 含有膜では、小さな頭部基を持つ C1P に対する Cho の親和性によって、相対的に C1P 分子間の相互作用が妨げられ、C1P ドメイン形成能が低くなった。また、カルシウムイオンが膜環境に存在すると、ドメイン形成能が上昇した。一方、各類縁体については、ヒドロキシ基を改変した類縁体では、ほぼ同程度のドメイン形成能を示したのに対し、アミド基をメチル化した類縁体やリン酸基のヒドロキシ基が 1 つのみの類縁体では低下した。

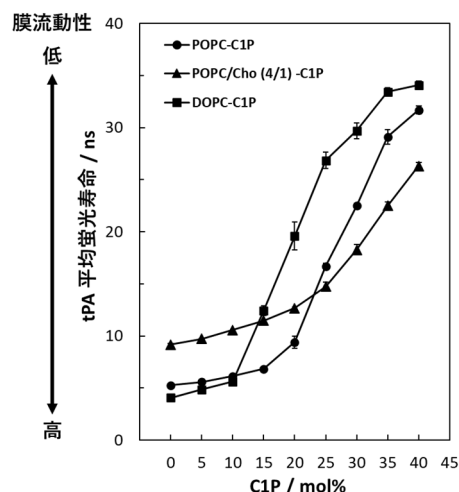


図 1 膜脂質組成による C1P ドメイン形成能の変化

これらの結果から、膜中に存在する C1P ドメインの膜動態は、周辺の脂質環境や水和環境に影響を受け、ドメイン形成に寄与する C1P 分子間相互作用には、親水基構造であるアミド基とリン酸基の水素結合能が大きく寄与すると考えられた。

(2) 表面プラズモン共鳴 (SPR) による C1P-cPLA₂ 分子間の相互作用解析

SPR 分析手法の最適条件の確立を行い、各膜脂質組成の C1P 含有・非含有膜の解離定数比を比較した結果、ドメイン形成能が低く、膜流動性の高い Cho 含有膜では、基準とした POPC 膜よりも小さい値を示した。一方で、ドメイン形成能が高く、膜流動性の低い DOPC 膜では大きい解離定数比を示した。したがって、C1P ドメイン形成能が高い膜環境であるほど cPLA₂ との結合親和性が高くなることが示された (図 2)。また、C1P 膜物性に寄与する親水基構造を改変した類縁体を用いて、天然の C1P 含有膜の解離定数と比較した結果、ドメイン形成能が高い類縁体ほど cPLA₂ との結合親和性が高くなることが示された。そして、3 位ヒドロキシ基やリン酸基を改変した類縁体はドメイン形成能が C1P と同程度であるにもかかわらず、cPLA₂ との親和性は低いことが示された。この結果は、C1P の 3 位ヒドロキシ基およびリン酸基が cPLA₂-C2 ドメインとの特異的な相互作用を安定化していると示唆している。

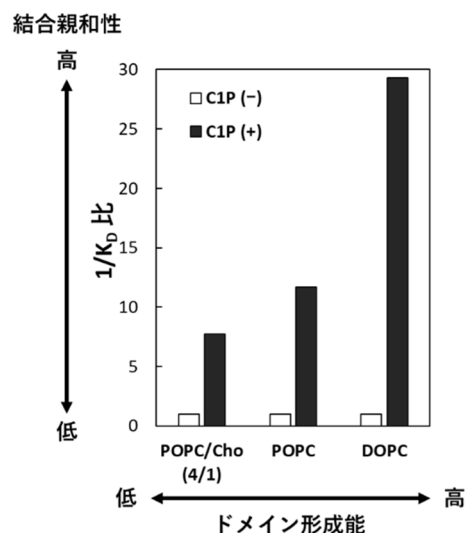


図 2 C1P-cPLA₂α結合親和性の比較
(各 C1P 非含有膜の 1/K₀ を基準とした)

これらの結果より、C1P 周辺の膜動態および C1P の集合状態が、cPLA₂ の C1P 認識に重要な要因になることが示唆された。そして、C1P による cPLA₂ 活性化機構の分子基盤について、C1P ドメイン形成による膜物性の変化が、C1P 構造と cPLA₂ の塩基性残基との間の特異的結合を介して、cPLA₂ の膜への分子認識を促進し、cPLA₂ の膜親和性の増加と活性化をもたらしていると考えられる。このように、本研究では、生体モデル膜において、C1P の動態と cPLA₂ との相互作用を相補的に解析することによって、微量脂質として含まれる脂質メディエーターの機能にも膜動態が重要な役割を果たしていることを示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Al Sazzad Md. Abdullah, Yasuda Tomokazu, Nyholm Thomas K.M., Slotte J. Peter	4. 巻 117
2. 論文標題 Lateral Segregation of Palmitoyl Ceramide-1-Phosphate in Simple and Complex Bilayers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 36 ~ 45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2019.05.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安田 智一、植浦 大貴、中込 まどか、花島 慎弥、J. P. Slotte、村田 道雄
2. 発表標題 セラミド-1-リン酸の動態解析に基づくホスホリパーゼA2 分子認識機構の解明
3. 学会等名 第15回スフィンゴセラピィ研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植浦 大貴、中込 まどか、花島 慎弥、安田 智一、村田 道雄
2. 発表標題 細胞質型ホスホリパーゼA2活性化に寄与するセラミド1-リン酸の膜動態解析
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会(2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomokazu Yasuda, J. Peter Slotte
2. 発表標題 Dynamic behavior of ceramide-1-phosphate in lipid bilayers examined by fluorescence lifetime measurement
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomokazu Yasuda, Daiki Ueura, Madoka Nakagomi, Shinya Hanashima, J. Peter Slotte, Michio Murta
2. 発表標題 Relationship between the membrane dynamics of ceramide 1-phosphate domains and the activation of cytosolic phospholipase A2
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関