

平成22年 4月13日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790032

研究課題名 (和文) HDL 新生反応における脂質-アポリポタンパク質相互作用の物理化学

研究課題名 (英文) Physical Chemistry of Lipid-Apolipoprotein Interaction in HDL Biogenesis

研究代表者

中野 実 (NAKANO MINORU)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：70314226

研究成果の概要 (和文)：動脈硬化の防御機構として重要な HDL の生成機構の解明を目指し、脂質膜とアポリポタンパク質 A-I との相互作用評価を行った。脂質組成や pH などの膜環境が変化するとディスク状複合体が自発的に形成されることを見いだすとともに、ディスク状複合体の構造や構成脂質の動的挙動を観察し、この微粒子の特性を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：We investigate apolipoprotein A-I-lipid membrane interaction to elucidate mechanism of the formation of HDLs, which act as anti-atherogenic. We found discoidal lipid-apolipoprotein complexes are spontaneously formed by the change in the lipid compositions and pH at membrane's surface. Structure and lipid dynamics of the discoidal complexes were also evaluated by means of neutron scattering and fluorescence analyses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：コレステロール、アポリポタンパク質、ABCA1、HDL、両親媒性ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

HDL 新生は末梢細胞のコレステロール (Chol) の唯一の代謝経路である Chol 逆転送系の最初のステップであり、動脈硬化に対する防御機構として重要である。近年、病理学的及び細胞生物学的研究によって HDL 新生のプロセスが少しずつ解明され、HDL の構成タンパク質であるアポリポタンパク質 A-I (apoA-I) と、膜タンパク質 ABCA1 との相互作用

用によって Chol とリン脂質を含むディスク状 HDL が形成されることや、ABCA1 は ATP 依存的に脂質輸送を行うことなどが明らかにされているが、最も重要な、apoA-I と脂質との複合体形成のメカニズムについては全く不明であった。そこで、ABCA1 は脂質を直接 apoA-I に運ぶのではなく、ABCA1 の脂質トランスロカーゼ作用によって摂動を受けた膜が apoA-I の結合及び脂質搬出を受け入れる

との作業仮説に基づいて本研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

apoA-I 及びそのモデルペプチドを用い、脂質二分子膜との結合親和性、結合位置、膜構造変化、脂質可溶化能を、NMR 及び蛍光法により評価し、これらの特性の脂質依存性を定量的に評価することで、HDL 組立ての物理化学的機序を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) コール酸透析法によりアポリポタンパク質 A-I (apoA-I) とリン脂質からなるディスク状複合体を形成させ、その生成率をゲル濾過によって解析することで、ディスク状複合体の熱力学的安定性を評価した。
- (2) ベシクルに apoA-I を添加したときのディスク形成率を光散乱強度の減衰、あるいはゲル濾過法によって解析することで、ディスク状複合体形成の速度論的評価を行った。
- (3) apoA-I 及びそのモデルペプチドをベシクルと混合後、超遠心によって分離することで、ポリペプチドの膜結合量を算出した。膜結合、非結合状態の apoA-I のヘリックス含量を CD 測定により算出した。
- (4) コール酸透析法によって調製したディスク状複合体中に蛍光プローブを導入し、その蛍光寿命及び、エキシマー蛍光から膜のパッキングを評価することで粒子の形状を評価した。
- (5) リン脂質の粒子間移動速度を中性子小角散乱法によって解析した。コレステロールの移動速度は、超遠心法と酵素呈色法を組み合わせることにより評価した。

## 4. 研究成果

- (1) apoA-I とリン脂質混合物のコール酸透析によって生成するディスク状複合体とベシ

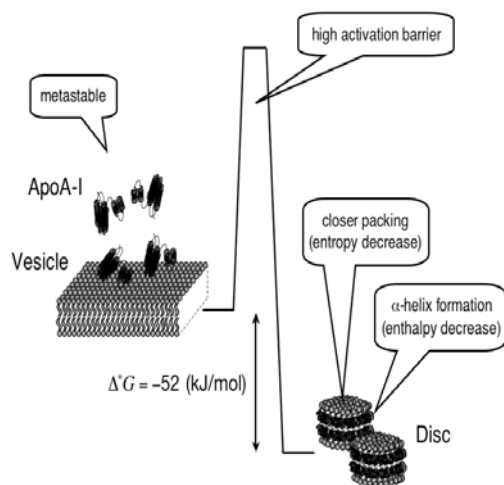


図1 脂質膜とディスク状複合体の安定性

クルの生成量をゲル濾過によって分析し、生成比の温度依存性から、ベシクルとディスク状複合体の熱力学的安定性を評価した。その結果、ディスク状複合体は同じ量の脂質膜とタンパク質（遊離状態）と比べて、ディスク1モルあたり52kJ安定であると求められ(図1)、この安定化には主に、タンパク質のヘリックス形成によるエンタルピーの低下が寄与していることが判明した。一方、脂質膜のパッキングはディスク状複合体において高まっており、エントロピー的に不利な環境にあることが明らかとなった。

- (2) ベシクルに apoA-I を添加した際のディスク状複合体の形成は非常に遅い反応であったことから、ディスク状複合体形成過程における高いエネルギー障壁の存在が示唆された。したがって、生体膜においては、膜タンパク質 ABCA1 がこのエネルギー障壁を下げることで熱力学的に安定な複合体の形成を促進していると予想された。

- (3) 物理化学的な観点から両親媒性ヘリックスのモデル膜への結合を評価した。リン脂質膜へのスフィンゴミエリンの導入は膜を硬くし、ヘリックスの結合を抑制するのに対し、負の曲率を有するフォスファチジルエタノールアミンの導入は、膜表面の疎水性水和高め、ヘリックスの結合を促進することを見いだした。

- (4) apoA-I によるモデル膜の可溶化を追跡した結果、本来安定な PC 膜に対しても、細胞内オルガネラ内の環境に近い低 pH 条件において HDL 様のディスク状複合体の形成が促進されることを見いだした。またこの現象が、apoA-I の構造変化に起因することを明らかにした。これらの結果より、HDL 新生反応における物理化学的な脂質-apoA-I 相互作用の重要性が示された。

- (5) ディスクの構造について蛍光分光法により評価を行った。その結果、粒子の構造はそれを形成する脂質の特性と脂質-タンパク質比に大きく依存し、飽和リン脂質により構成されたディスク粒子は1種類の平板状のディスクを形成するのにに対し、不飽和リン脂質では3種の異なる大きさの粒子が生成し、小さい2種類のディスクでは脂質二重層が平面ではなく鞍状曲面を形成することを発見した。

- (6) 時分割中性子小角散乱法によってリン脂質の粒子間移動速度を評価したところ、ディスク状複合体間のリン脂質移動はリポソーム間と比べ約20倍促進されていることが判明し、エントロピー的に不利な脂質環境を反映する脂質の動的特性が明らかになった。
- (7) 超遠心分離と酵素呈色法によるコレステロールの粒子間移動評価法を確立し、膜からのコレステロールの排出はラフトではなく、非ラフト領域から起こることを明らかに

した。またベシクル膜に比べ、ディスク粒子においてコレステロールの搬出が促進されることを明らかにした。これらの結果より、ディスク粒子中の脂質の密なパッキングがリン脂質やコレステロールの粒子からの解離を促進させていることを定量的に明らかにした。

#### 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 13 件)

英文: 全て査読あり

- ① K. Nishitsuji, M. Nakano, S. Morita, T. Handa, Effects of Phospholipid and Surface Pressure on Lipoprotein Lipase-Lipolysis of Triglyceride in Monolayers. *Membrane* **35** (1), 30-36 (2010).
- ② M. Miyazaki, M. Nakano, M. Fukuda, T. Handa, Smaller Discoidal High-Density Lipoprotein Particles Form Saddle Surfaces, but Not Planar Bilayers. *Biochemistry* **48** (32), 7756-7763 (2009).
- ③ M. Nakano, M. Fukuda, T. Kudo, M. Miyazaki, Y. Wada, N. Matsuzaki, H. Endo, T. Handa, Static and Dynamic Properties of Phospholipid Bilayer Nanodiscs. *J. Am. Chem. Soc.* **131** (23), 8308-8312 (2009).
- ④ M. Nakano, M. Fukuda, T. Kudo, N. Matsuzaki, T. Azuma, K. Sekine, H. Endo, T. Handa, Flip-Flop of Phospholipids in Vesicles: Kinetic Analysis with Time-Resolved Small-Angle Neutron Scattering. *J. Phys. Chem. B* **113** (19), 6745-6748 (2009).
- ⑤ M. Uyama, M. Nakano, J. Yamashita, T. Handa, Useful Modified Cellulose Polymers as New Emulsifiers of Cubosomes. *Langmuir* **25** (8), 4336-4338 (2009).
- ⑥ M. Kato, M. Abe, Y. Kuroda, M. Hirose, M. Nakano, T. Handa, Synthetic Pentapeptides Inhibiting Autophosphorylation of Insulin Receptor in a Non-ATP-Competitive Mechanism. *J. Pept. Sci.* **15** (5), 327-336 (2009).
- ⑦ S. Morita, Y. Deharu, E. Takata, M. Nakano, T. Handa, Cytotoxicity of lipid-free apolipoprotein B. *Biochim. Biophys. Acta*, **1778** (11), 2594-2603 (2008).

- ⑧ M. Fukuda, M. Nakano, M. Miyazaki, M. Tanaka, H. Saito, S. Kobayashi, M. Ueno, T. Handa, Conformational Change of Apolipoprotein A-I and HDL Formation from Model Membranes under Intracellular Acidic Conditions. *J. Lipid Res.* **49** (11), 2419-2426 (2008).
- ⑨ Y. Yamauchi, N. Deguchi, C. Takagi, M. Tanaka, P. Dhanasekaran, M. Nakano, T. Handa, M. C. Phillips, S. Lund-Katz, H. Saito, 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. *Biochemistry* **47** (25), 6702-6710 (2008).
- ⑩ M. Abe, Y. Kuroda, M. Hirose, M. Kato, M. Murakami, Y. Watanabe, M. Nakano, T. Handa, Inhibition of Autophosphorylation of Epidermal Growth Factor Receptor by a Small Peptide not Employing an ATP-Competitive Mechanism, *Biopolymers* **89** (1), 40-51 (2008).

邦文: 全て査読なし

- ⑪ 中野実、静的・動的構造評価による生体脂質複合体形成機構の解明. *Yakugaku Zasshi* **129** (9), 1033-1039 (2009).
- ⑫ 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高密度リポタンパク質形成原理の考察. *Yakugaku Zasshi* **128** (5), 687-693 (2008).
- ⑬ 中野実、SANS-U を使った脂質のベシクル間移動の研究. *波紋* **18** (2), 82-85 (2008).

[学会発表] (計 13 件)

- ① 中野実、中性子小角散乱による脂質ナノディスクの構造とダイナミクスの評価 (高分子討論会 09.9.17 熊本)
- ② 中野実、脂質の動的特性の評価とその制御 (拡大 IRT 研究会 09.8.4 東海)
- ③ 中野実、宮崎公一、福田正和、半田哲郎、ディスク状脂質/apoA-I 複合体の構造と脂質移動速度の評価 (脂質生化学会 09.7.30 名古屋)
- ④ 中野実、中性子小角散乱のリン脂質膜への適用 ~構造とダイナミクス~ (中性子バイオ・ソフトマターサイエンスワークショップ 09.7.7 東京)
- ⑤ 中野実、福田正和、工藤嵩之、松崎直哉、宮崎公一、半田哲郎、脂質ナノディスクの構造と脂質移動速度の評価 (膜学会 09.5.21 東京)

- ⑥ 中野実、脂質膜の構造と動的特性の評価  
(次世代スパコン「ナノ統合拠点」連続  
研究会 09. 2. 10 京都)
- ⑦ 中野実、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 08. 12. 2 名古屋)
- ⑧ M. Nakano, Lipid Transfer Dynamics in  
Nanoparticle Systems (2008 Jülich  
Soft Matter Days 08. 11. 12 Bonn)
- ⑨ M. Nakano, Evaluation of  
intervesicular transfer and  
flip-flop of phospholipids by  
time-resolved small-angle neutron  
scattering (ICBL 08. 8. 28 Maastricht)
- ⑩ M. Nakano, In Situ Determination of  
Interbilayer and Transbilayer Lipid  
Transfers in Liposomes (LRD2008  
08. 7. 21 Yokohama)
- ⑪ 中野実、中性子小角散乱を用いた膜脂質  
のダイナミクス評価(IAP 環境技術フォー  
ラム 08. 6. 1 京都)
- ⑫ 小澤真衣、中野実、半田哲郎、コレステ  
ロールによるエマルジョンの表面状態  
と両親媒性ヘリックス結合性の変化(膜  
学会 08. 5. 15 東京)
- ⑬ M. Nakano, Evaluation of  
Intervesicular Transfer and  
Flip-Flop of Phospholipids by  
Time-Resolved Small-Angle Neutron  
Scattering (CTC Kickoff Meeting  
08. 4. 12 Kyoto)

[図書] (計1件)

- ① 中野 実、キューボソームの調製法と応  
用. 国武豊喜監修, 超分子サイエンス&  
テクノロジー, エヌ・ティー・エス,  
pp1163-1167 (2009).

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/seizai/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし