

令和 5 年 5 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05728

研究課題名（和文）ネクロトーシス課程にて長鎖脂肪酸が膜物性に与える影響

研究課題名（英文）Effect of long-chain fatty acids on membrane properties during necrotosis

研究代表者

梅川 雄一（Umegawa, Yuichi）

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：20587779

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ネクロトーシスとの関連が指摘されている極長鎖脂肪酸(VLCFA)が脂質二重膜に与える影響を詳細に評価するため、蛍光標識VLCFAの合成を行い、種々の条件で蛍光測定実験を行った。その結果、VLCFAは脂質二重膜中央部での脂質分子の秩序を上昇させ、相転移温度を上昇させることが示された。また固体NMR、分子動力学計算を行ったところ、VLCFAのアルキル鎖末端が反対側の脂質リーフレットに挿入される、もしくは二重膜中央部で折れ曲がる構造をとるなど、膜中央部での原子密度を上昇させることが示唆され、VLCFA特有の膜物性変化を引き起こしている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本件研究によりVLCFAが脂質二重膜中央部でのオーダーを上昇させることが示された。これは脂質二重膜内外葉の相互作用（インターリーフレットカップリング）を強め、細胞膜を介したシグナル伝達に参与している可能性がある。これはネクロトーシス特有のプロセスにおいて、VLCFAが細胞膜のイオン透過能を上昇させるだけでなく、シグナル伝達においても重要な役割を担っていることが考えられる。

また本研究で合成した蛍光標識VLCFAは、他の脂質分子の研究、例えばlignoceroyl sphingomyelinの研究等にも応用可能であり、今後の脂質膜研究への展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：To evaluate in detail the effects of very long-chain fatty acids (VLCFAs), which have been implicated in necrotosis, on lipid bilayers, we synthesized fluorescent-labeled VLCFAs and performed fluorescence measurements under various conditions. The results showed that VLCFA increased the order of lipid molecules in the center of lipid bilayers and raised the phase transition temperature. Solid-state NMR and molecular dynamics simulations suggest that the alkyl chain terminus of VLCFA is inserted into the opposite lipid leaflet or folded in the center of the bilayer, increasing the atomic density in the center of the membrane and possibly causing a change in membrane properties specific to VLCFA.

研究分野：天然物化学

キーワード：極長鎖脂肪酸 ネクロトーシス 脂質二重膜 蛍光測定

1. 研究開始当初の背景

ネクロトーシスは比較的最近定義された新しいプログラムされた細胞死であり、そのメカニズムに注目が集まっている。最大の特徴はアポトーシスと異なり細胞膜が崩壊し細胞質内容物が放出されることである。従って、ネクロトーシスの過程においては細胞膜の膜物性を著しく改変する作用が必要になる。最近、リポドミクス研究により、ネクロトーシス過程において、細胞膜中に極長鎖脂肪酸(VLCFA)が蓄積されることが明らかになり、VLCFAがこの過程の、特に膜を崩壊させる作用において重要な働きをしている可能性が示唆されている¹⁾。

2. 研究の目的

VLCFAは炭素数が20以上と一般的な脂肪酸(炭素数16前後)に比べ多く、そのことに起因した特有の性質を有していることが考えられる。そこで、ネクロトーシスの過程において極長鎖脂肪酸が生体膜の流動性や脂質ドメインの形成、タンパク質との相互作用においてどのような影響を与えているかを詳細に検討することを目的とした。

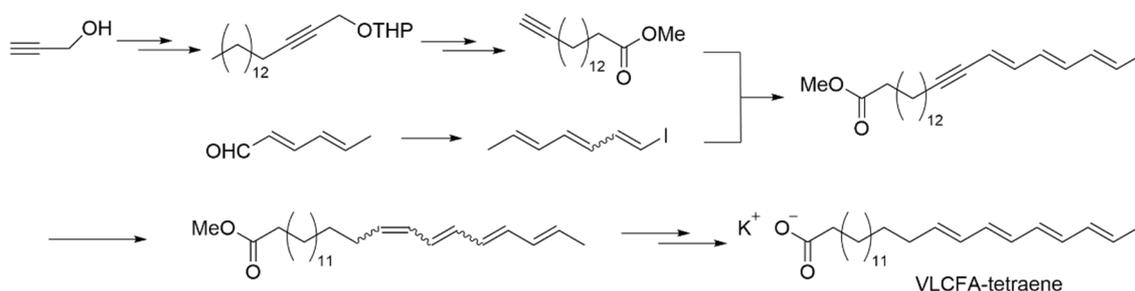
3. 研究の方法

蛍光測定は高感度であることや、脂質二重膜の膜物性を鋭敏に反映することから、脂質膜研究に良く利用されている。そこで、本研究においても蛍光測定の実験を適用することにした。また、²H 固体 NMR と分子動力学計算を用いることで、膜中における VLCFA の分子描写を検討し、蛍光実験と合わせて脂質二重膜に与える影響を考察することにした。また、本研究では VLCFA として炭素数 24 のリグノセリン酸を用いた。

4. 研究成果

(1) 蛍光標識 VLCFA の合成

まず、蛍光測定に必要な蛍光標識 VLCFA の合成を行った。蛍光標識脂肪酸としてはトランスパリナリン酸(tPA)がよく用いられている。そこで、tPA 同様、アルキル鎖末端に蛍光発色団としてテトラエンを持つ VLCFA-tetraene の合成を試みた。スキーム 1 に合成経路を示している。プロパルギルアルコールから誘導したアルキンとヘキサ-2,4-ジエナルから導いたアリルヨードとのカップリング、還元反応、二重結合の異性化を経て、目的の VLCFA-tetraene の合成に成功した。



スキーム 1 蛍光標識 VLCFA の合成ルート。

得られた VLCFA-tetraene の蛍光特性を検証したところ、tPA とほぼ同じ励起、蛍光波長を

もつことが明らかになり、tPA で行われている蛍光実験の手法をそのまま VLCFA-tetraene でも利用可能であることが分かった。

(2) 蛍光測定と VLCFA が脂質膜に与える影響

蛍光標識体が得られたので、次に蛍光異方性測定を実施した。蛍光異方性からは蛍光官能基周辺の流動性に関する情報が得られ、異方性の値(r)が大きいほど揺らぎが少なく、小さいほど揺らぎが大きい。異なる膜深度での情報を得るため、膜の深い部位の揺らぎの情報を VLCFA-tetraene から、それよりも少し浅い領域の情報を tPA を用いて取得することにした。測定には VLCFA を 1, 5, 10 mol%、蛍光色素を 1 mol% 含むパルミトイルスフィンゴミエリン(PSM)膜を用いた。また比較対象として、炭素数 18 の脂肪酸(C18-FA)についても測定を行い、VLCFA との比較を行った(図 1)。

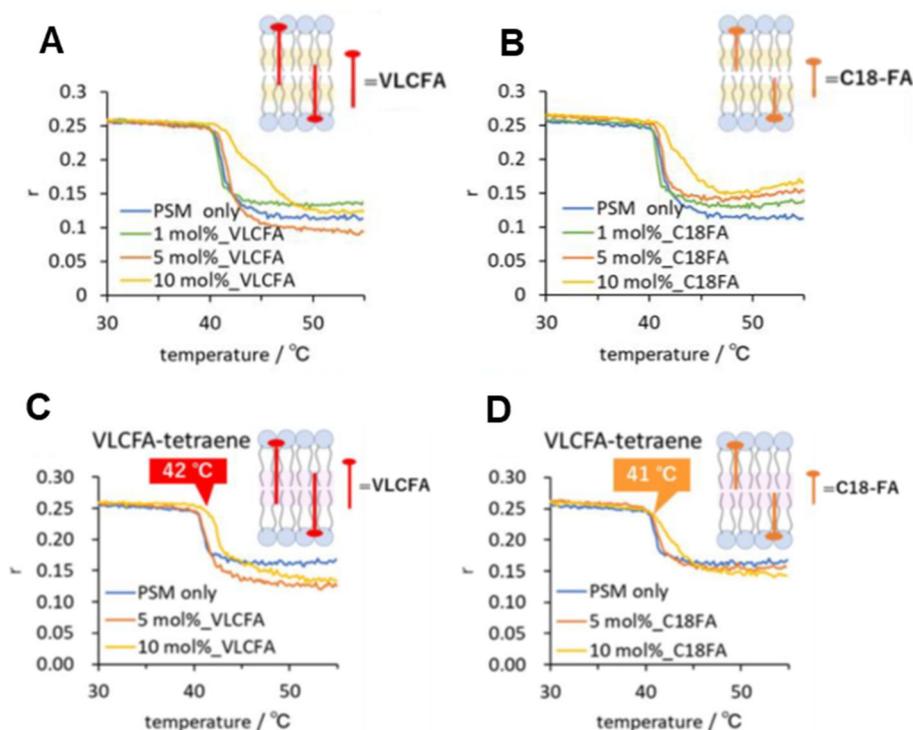


図 1 蛍光異方性の温度依存性の測定。蛍光色素として tPA を用いた場合(A, B)と VLCFA-tetraene を用いた場合(C, D)、添加の脂肪酸として VLCFA を用いた場合(A, C)と C18-FA を用いた場合(B, D)の結果。r 値が大きく変化する温度領域でゲル相から液晶相への相転移が起こっている。

蛍光色素に tPA を用いて、膜中心から少し浅い領域の変化を観測した場合(図 1A,B)、VLCFA と C18-FA 共に 10mol% 添加時に相転移温度を大きく上昇させることが確認できた。このことから、子の深度領域において、VLCFA と C18-FA は似た影響を脂質二重膜に対して与えていることが明らかになった。一方で蛍光色素に VLCFA-tetraene を用いて、二重膜の中央部への影響を観測したところ(図 1C, D)、わずかではあるが、VLCFAの方がC18-FAよりも相転移の開始温度を上昇させることが示唆された。長いアルキル鎖をもつ VLCFA は反対側のリーフレットにまで浸透していると考えられるが、C18-FA は周囲の脂質分子とほぼ同じアルキル鎖長であり、反対側のリーフレットにまで浸透できない。したがって、VLCFA-tetraene で測定できる膜中央部では、VLCFA は C18-FA よりも密度が大きいと考え

られる(図 1C, D の模式図)。このように両葉からの VLCFA の嵌入によって、膜中央付近の膜密度がより高くなることで、脂肪酸の長さによる相転移開始温度の差異が生じたと考えられる。

(3)²H 固体 NMR 測定と MD 計算

蛍光測定により観測された VLCFA の特徴をより詳細に解析し、分子描像を得るため、固体 NMR 測定と MD 計算を実施した。重水素 NMR 測定には市販の全重水素化 VLCFA を用いた。²H 固体 NMR 測定を行ったところ、VLCFA は PSM 膜と均一に混合しており、蛍光測定でも示されたように末端付近での相転移温度をわずかに上昇させることが確認できた。また、分子描像を得るため MD 計算を実施した。計算の妥当性を評価するため、MD から算出されるオーダーパラメータ(図 2)から ²H 固体 NMR スペクトルの形状を予測し、実測の固体 NMR スペクトルと比較したところ良い一致を示した。

MD 計算から VLCFA の末端は反対側へ嵌入によりオーダーが高くなることがわかった(図 2 青丸)。また、スナップショットから、VLCFA は膜中央付近で折れ曲がったり反対側の膜に嵌入したりするため、VLCFA を含む膜では膜中央付近の密度が大きくなることわかる。これらの結果から、VLCFA は生理的濃度であれば、SM のアシル鎖の間に VLCFA の疎水性部分をうまく入り込ませることで膜密度を上げる。膜密度が上がるため、流動性が低下し相転移温度の上昇などを引き起こしていると考えた。

この VLCFA によって引き起こされるインタリーフレット間の相互作用増加がネクロトーシスのような特有の生理現象の過程で働いている可能性が示唆された。

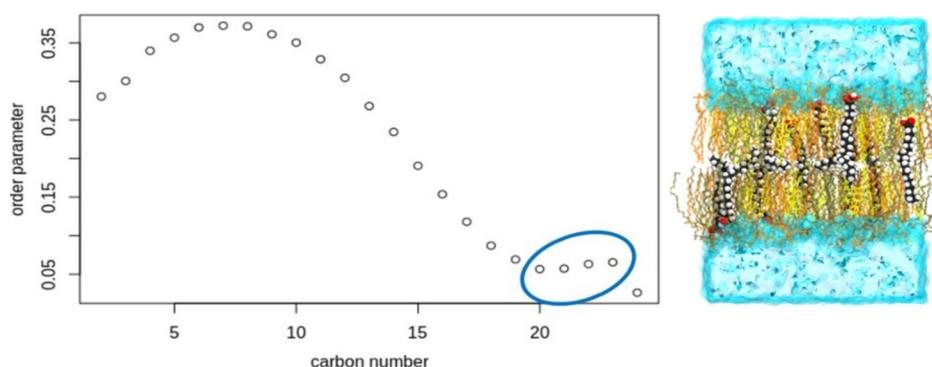


図 2 MD シミュレーション結果 (30) PSM/DOPC/Cho(1/1/1) + 5mol% VLCFA (左: オーダーパラメータ、右: スナップショット)。青色で囲んだ脂質末端付近にてオーダーパラメータの上昇が観測された。

参考文献

L. R. Parisi, N. Li, G. E. Atilla-GokcumenParisi, *Cell Chem. Biol.* **2017**, 24, 1445–1454.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福永 志穂、梅川 雄一、村田 道雄
2. 発表標題 極長鎖脂肪酸が脂質二重膜へ与える影響の解析を目指した新規蛍光プローブの合成と評価
3. 学会等名 日本化学会第102回春季年会
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
---------	---------