

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21850021

研究課題名(和文) 膜中のコレステロールの動態と溶媒和に関する実験的および理論的解析

研究課題名(英文) Experimental and theoretical analysis of the dynamics and the solvation state of cholesterol in bilayer membrane

研究代表者

吉田 健 (Yoshida Ken)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・助教

研究者番号：80549171

研究成果の概要(和文)：

膜中でのコレステロールの動態は、動脈硬化をはじめとする疾病との関連から重要である。本研究では、脂質膜中の疎水的モデル分子の溶媒和と、膜と水相の界面近傍の水和のダイナミクスに注目し、観測対象とする現象の研究に適った膜のモデル実験系の確立したうえで、溶液NMRと分子動力学シミュレーションにより、コレステロールが膜のダイナミクスにおよぼす効果を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

The dynamics of cholesterol molecules in membrane is of importance in relation to various kinds of diseases such as arteriosclerosis. In this study, we focused on the solvation states of the hydrophobic model solutes in membrane and the dynamics of the hydration state at the surface between the hydrophilic portion of the membrane and the water pool. The model systems suitable for the dynamic modes of interest are explored and established, and the dynamic effects of cholesterol on membrane are elucidated by using the solution-state NMR and molecular dynamics simulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000 円	315,000 円	1,365,000 円
2010年度	1,050,000 円	315,000 円	1,365,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000 円	630,000 円	2,730,000 円

研究分野：溶液化学

科研費の分科・細目：物理化学

キーワード：脂質膜、コレステロール、溶液NMR、MDシミュレーション

1. 研究開始当初の背景

コレステロールは動脈硬化・アルツハイマー病などの成人病との関連性から注目されており、濃度に応答した生体膜の流動性変化

のメカニズムについての解明が期待されている。コレステロールの影響を受ける生体膜のダイナミクス研究には、ゆらぎや水素結合の寄与といった現象の解明が特に重要であ

る。この目的には、膜が充分水和した自然状態で原子サイトレベルの非破壊観測を可能とする溶液 NMR は理想的な手法である。近年この手法を用いて、研究代表者らは、コレステロールを含むリン脂質 2 分子膜中の分子の溶存・会合状態を解明する糸口を見つけた (C. Giordani et al. *J.Phys. Chem.* **B112**, 2622-2628 (2008).)。この背景となる研究では、膜の垂直方向 (膜透過の方向) への脂質分子の構造揺らぎと、コレステロールによる脂質分子の運動性低下を、核オーバーハウザー効果 (NOE) の観測により明らかにした。これにより、コレステロールの影響を分子のサイト-サイト間の接触寿命という空間・時間の観測に初めて成功した。しかし、膜中の分子の運動性の変化が、どのような近接分子間相互作用に支配されているのかという本質は、未だに解明されていない。

従来からの国内外の研究では、分光学的、分子生物学的、計算科学的手法の発展により、生体膜やそこに埋め込まれたイオンチャネル等の膜タンパク質の研究が新たな展開を示し、分子間の結合構造や動的構造の情報が明らかにされつつあった。本研究の開始当初には、分子科学の研究対象が生体系へと複雑化する中で、どういった分子間の親水的・疎水的相互作用が生命現象を司る重要因子であるかを解明することが課題であった。実験と計算科学の手法を組み合わせた新しい方法論の構築が求められていた。

2. 研究の目的

(1) コレステロールを可溶化する界面活性剤の探索：糖型界面活性剤との特異的親和性

コレステロールの生体膜中の溶存状態・配向・運動性は、動脈硬化をはじめとする疾病との関連や細胞生物学の視点から重要である。NMR は、原子サイトを識別して分子運動を観測できる、現代の最も強力な分光法である。しかしながら、脂質膜はコレステロールを含むと、膜を構成する脂質分子の運動性の低下し、NMR 観測においては深刻な信号の広幅化の影響が避けられない。脂質二分子膜中では、コレステロールの原子サイトで観測可能なのは、運動性の比較的高い炭化水素鎖の末端メチル基 (26, 27 位の炭素に結合) のみである。そこで、本研究では、コレステロール分子を可溶化できる界面活性剤を利用した、脂質膜を模した環境で、かつ先鋭な NMR 信号の観測できる実験系の探索を行った。

コレステロールをミセルに可溶化することは、非常に難しいということが知られている (例えば、H.Ahyayauchet al.*FEBS letters***583**, 2859-2864 (2009))。コレステロール可溶化す

るミセルとしては、タウロデオキシコール酸ナトリウムといった、コレステロール骨格に類似の構造を持つ界面活性剤によるもののみ報告例がある (例えば、K. Matsuoka et al. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **80**, 2334-2341 (2009))。これは、界面活性剤のミセルは親水基から内側に向かったの円錐形であるのに対し、コレステロール分子は逆向きの円錐型であることによる立体反発のためであると考えられている。本研究では、脂質膜環境を模した実験系の構築を目的とし、炭化水素鎖を疎水基に持つ界面活性剤について探索を行った。52 種類の界面活性剤について、コレステロールを可溶化させるか試験を行った。

(2) コレステロールを特異的に可溶化させる糖型界面活性剤の親水基周囲の水和ダイナミクス

上記の項目 (1) の研究の結果、糖型界面活性剤であるオクチルグルコシドが、コレステロールを特異的に可溶化させることが明らかとなった (4. 研究成果の(1)節参照)。可溶化・自己組織化において、水の果たす役割は大きく、また、水は生命現象に必須の溶媒であるため、生体の中心的機能を司る生体膜およびタンパク質の周囲に水和した水の構造とダイナミクスの役割は、近年注目を集めている。本研究では、生体膜の膜と水相の界面を模した分子環境として、界面活性剤の形成するミセルの親水基近傍に水和した水分子の回転運動を研究した。

親水基の分子構造の効果を観測するため、界面活性剤の種類による効果を比較した。用いた界面活性剤は、生体膜を構成するリン脂質と同じ親水基の構造を持つ *n*-dodecylphosphocoline (DPC)、糖を親水基に持つ *n*-octyl- β -D-glucoside (OG)、疎水性タンパク質の可溶化などに広く用いられる TRITON X-100 (TRITON) の 3 種類の非イオン性界面活性剤である。水-水間や水-脂質間の動的な相互作用を考察するため温度効果に注目し、30-70 °C の範囲で測定を行った。

(3) NMR 緩和測定による膜中の疎水性溶質の回転運動に対するコレステロール濃度効果の検討

生体膜のコレステロール含有量は、部位によって数%から 50% まで、幅広い値をとることが知られている。コレステロール濃度が上昇するにつれて脂質分子の運動性が低下することは、動脈硬化をはじめとした疾病との関連で注目を集めている。ゆえに、コレステロールの濃度効果に対する分子レベルでのダイナミクス研究が重要である。溶液 NMR による緩和測定は、この目的に最も適した方法の一つである。

コレステロールの濃度に応答した分子の

運動性の低下は、近年の種々の分光法の実験や分子動力学シミュレーションで明らかにされつつある。しかしながら、分子運動の緩和時間をコレステロール濃度の関数として明らかにした研究例はほとんどない。理由として、ひとつには、濃度に対する関数形を決定するためには、高精度の測定を行う必要があるが、この目的に適う実験系を選択した研究例がないためである。もう一つは、膜研究に多く用いられる NMR の場合において、コレステロールがスペクトルの深刻な広幅化を引き起こすためである。

本研究では、疎水性溶質のモデルとしてベンゼンを用い、重ベンゼンのC-D結合の再配向緩和時間 τ_{2R} をコレステロール濃度の関数として決定した。ベンゼンはコレステロールに比べ拡散係数は1桁大きく (E. Okamura et al., *Phys. Rev. Lett.* **93**, 248101 (2004).)、等価な水素核を持つため、脂質膜の疎水的な内部の分子環境をプローブする分子として今の目的に適している。

3. 研究の方法

(1) コレステロールを可溶化する界面活性剤の探索

1.0 mgのコレステロールと 10 μ lの各種界面活性剤 (Hampton Research 社、detergent screening kitを使用) に、680 μ lのD₂Oを加えた。溶解試験にはカップ型ソニケータ (Branson Sonifier) を用い、気泡がなくなるまで約 3 分間、超音波を照射した。その後、30 °Cにおいて¹H-NMR観測を行った。コレステロールを含まないミセル溶液を参照系とし、コレステロールの溶解の有無を確認した。

(2) 界面活性剤の水和ダイナミクス

NMR緩和測定により、溶媒である重水分子の重水素(²H)のスピンの格子緩和時間 T_1 を、反転回復法を用いて決定した。²H核の T_1 は水分子の回転相関時間 τ_{2R} と $1/T_1 = (3\pi^2/2)(e^2Qq/h)^2\tau_{2R}$ の関係にある。ここで、 (e^2Qq/h) は四極子結合定数(水の場合は 256 kHz)である。ミセル水溶液と純重水の τ_{2R} より、水和殻とバルクの2つの領域を考えた二状態モデルを用い、ミセルに水和した水の緩和時間(τ_{shell})を見積もった。

ミセル溶液中の回転相関時間 τ_{sol} は、二状態モデルを用いると、水和水の回転相関時間 τ_{shell} とバルク水のもの τ_{bulk} により、 $\tau_{sol} = P_{hyd}\tau_{shell} + (1 - P_{hyd})\tau_{bulk}$ と表すことができる。ここで、 P_{hyd} は溶液中の水分子のうち、界面活性剤に水和した水分子の割合である。 P_{hyd} は、界面活性剤分子1分子あたりの水相との接触断面積の文献値、水和殻の厚さ(5 Åとした)、界面活性剤の濃度から求めた。

(3) 膜中の疎水性溶質の回転運動

水に懸濁した脂質二分子膜のベシクルに溶解した重ベンゼン-d-6の τ_{2R} をスピン-格子緩和時間 T_1 の測定により決定した。ベンゼン分子の場合、四極子結合定数は 193 kHzである。

4. 研究成果

(1) コレステロールを可溶化する界面活性剤の探索

52 種類の界面活性剤についての可溶化試験の結果、コレステロールが溶解したのは *n*-octyl- β -D-glucoside (OG)だけであった(図 1)。これは、OG にコレステロールとの特異的親和性があることを示唆する。これには、OG 分子の親水基の糖型構造がかさ高く、かつ多数の OH 基を持つことが溶解性に寄与していると考えられる。また、炭化水素鎖長も、コレステロールの分子サイズにフィットしているためと推測される。コレステロールの OG のミセルへの飽和溶解度は、4.0 mol%であった。

OG のミセルに溶解する濃度領域では、コレステロールおよび界面活性剤のダイナミクスの変化は小さかった。NMRスペクトルの半値全幅および¹Hのスピン-格子緩和時間 T_1 へのコレステロール濃度の効果はほとんどなかった。この傾向は、脂質二分子膜の場合と一致している。

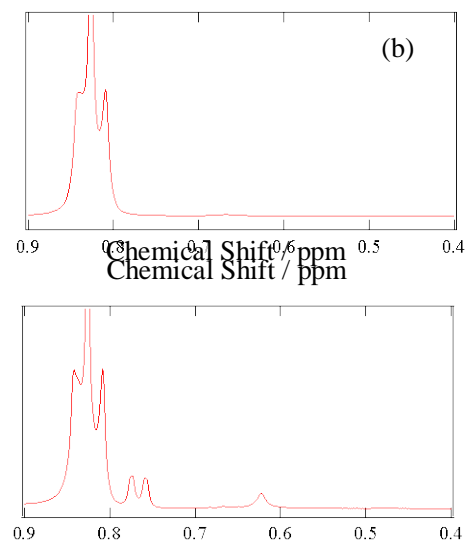


図 1. NMR による OG ミセルへのコレステロールの溶解の観測。(a)コレステロールなし、(b) コレステロール 4.0mol%.

(2) 界面活性剤の水和ダイナミクス

図 2 に、OG、TRITON、DPCの τ_{shell} および τ_{bulk}

の温度依存性を示す。温度上昇に伴い、 τ_{shell} および τ_{bulk} の値は減少する。また、OGは他と比較して値が大きく、これは、OGは特に他の2種に比較して水和水の回転運動を減速させる効果が大きいことを示している。水分子と親水基の糖との水素結合が要因と考えられる。

バルクと水和水殻内の水分子の回転緩和時間を相対的に比較するため、回転緩和時間の比 $\tau_{\text{shell}}/\tau_{\text{bulk}}$ の温度変化を考察する。図3にDPCの結果を示す。 $\tau_{\text{shell}}/\tau_{\text{bulk}}$ は温度に伴い減少する。これは、室温付近では水和水殻内のほうがバルクに比べ回転が減速しているが、温度上昇に伴い水和水殻内はバルクと同様か、バルクよりもむしろ回転が加速するというを示す。さらに分子動力学(MD)計算によって $\tau_{\text{shell}}/\tau_{\text{bulk}}$ の計算を行った。MD計算の結果も温度に伴って減少を示し、実験による結果と一致した。

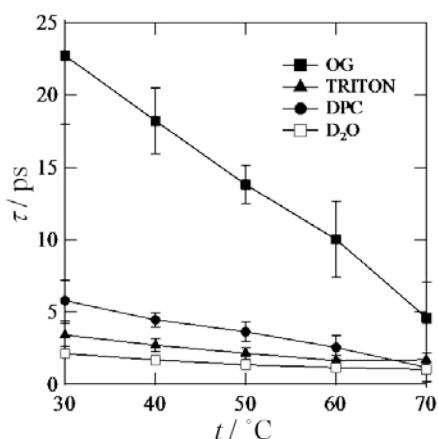


図 2. 水和水の回転緩和時間 τ_{shell} (OG, TRITON, DPC) およびバルク水の緩和時間 τ_{bulk} (D₂O) の温度依存性。

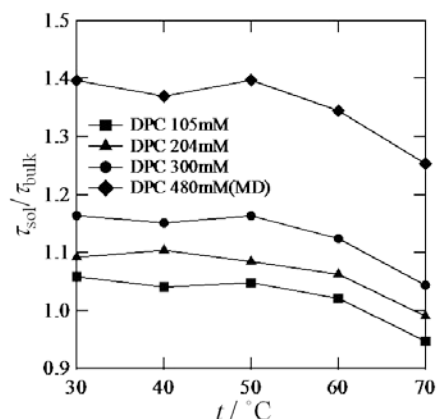


図 3. ミセル溶液中とバルクの水の回転緩和時間の相対比 $\tau_{\text{sol}}/\tau_{\text{bulk}}$ の温度依存性。

(3) 膜中の疎水性溶質の回転運動

図 4 に、ベンゼンの回転相関時間 τ_{2R} を、コ

レステロールのモル濃度の関数として示す。コレステロールの濃度が上がるにつれて、ベンゼンの回転相関時間は増加した。さらに、現段階では実験精度と統計量に改善の余地があるものの、図 4 の結果は、コレステロール濃度に対しては、下に凸の傾向があることを示唆している。これと類似の傾向は、分子間NOEを支配する原子サイト間の回転相関時間および¹Hの各原子サイトの線幅の場合にも見られた。

これらの観測結果を、膜を構成する脂質分子を溶媒、ベンゼン分子を溶質と捉えた視点に立って考察する。図 4 の下に凸の傾向は、

(1) コレステロールの溶質の回転運動を鈍化させる効果が、コレステロールの高濃度領域でコレステロール 1 分子あたりの効果が大きくなる、または (2) ベンゼンに近接するコレステロール分子数がバルクの濃度に比例ではない、すなわちベンゼン近傍の脂質の組成比に偏りがあり、かつベンゼンの回転緩和が近傍の脂質の組成の緩和時間より短い、といった可能性を考えることができる。以上のような可能性の検証には、今後、分子動力学シミュレーションによる相補的な情報が有効となるであろう。

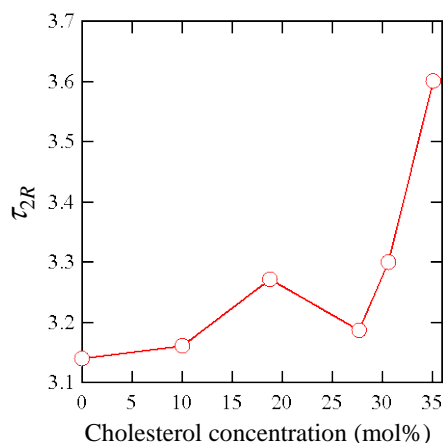


図 4. ベンゼンの回転相関時間 τ_{2R} の脂質膜中コレステロール濃度に対する依存性

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 5 件)

- (1) 高温高圧水における有機反応研究の進歩、高圧力の科学と技術; 中原勝, 辻野康夫, 八坂能郎, 吉田健, 魚崎泰弘, 若井千尋, 松林伸幸: 20, 40-49 (2010) 査読有。
- (2) 動的溶媒和殻モデルによる超臨界流体中の並進ダイナミクスの解析; 吉田健: 分

子シミュレーション研究会誌アンサンブル, 12, 79-84 (2010) 査読無.

- (3) Self-Diffusion in Supercritical Water and Benzene in High-Temperature High-Pressure Conditions Studied by NMR and Dynamic Solvation-Shell Model; Ken Yoshida, Nobuyuki Matubayasi, Yasuhiro Uosaki and Masaru Nakahara: Journal of Physics: Conference Series, 215, p.012093 (2010) 査読有.
- (4) Scaled Polynomial Expression for Self-Diffusion Coefficients for Water, Benzene, and Cyclohexane over a Wide Range of Temperature and Density; Ken Yoshida, Nobuyuki Matubayasi, Yasuhiro Uosaki and Masaru Nakahara: J. Chem. Eng. Data, 55, 2815-2823 (2010) 査読有.
- (5) Self-Diffusion Coefficients for Water and Organic Solvents in Extremely Low-Density Supercritical States; Ken Yoshida, Nobuyuki Matubayasi, and Masaru Nakahara: J. Mol. Liq., 147, 96-101 (2009) 査読有.

[学会発表] (計 10 件)

- (1) 新谷恵, 吉田健, 櫻庭俊, 中原勝, 松林伸幸, 脂質膜の曲率がダイナミクスに及ぼす効果: 溶液NMR-NOE測定と大規模MDによる研究, 第91回日本化学会春季年会, 2011年3月29日, 神奈川大学横浜キャンパス (横浜市神奈川区).
- (2) 新谷恵, 吉田健, 櫻庭俊, 中原勝, 松林伸幸, 曲率の異なる脂質膜の分子間相互作用とダイナミクス: NMR-NOE測定と大規模MDによる研究, 膜シンポジウム2010, 2010年11月19日, 京都大学薬学部記念講堂 (京都市左京区).
- (3) 中谷和斗, 吉田健, 魚崎泰弘, 超臨界・亜臨界水中のギ酸の分解速度に対する溶存塩の影響, 第33回溶液化学シンポジウム, 2010年11月17日, 京都大学百周年時計台記念館 (京都市左京区).
- (4) 新谷恵, 吉田健, 櫻庭俊, 中原勝, 松林伸幸, 脂質膜の曲率がダイナミクスに及ぼす効果: 溶液NMR-NOE測定と大規模MDによる研究, 第33回溶液化学シンポジウム, 2010年11月16日, 京都大学百周年時計台記念館 (京都市左京区).
- (5) 野間時郎, 吉田健, 魚崎泰弘, スクロースの水熱分解の反応経路および反応速度の溶液NMR解析, 第33回溶液化学シンポジウム, 2010年11月16日, 京都大学百周年時計台記念館 (京都市左京区).
- (6) 吉田健, 中原勝, 松林伸幸, 魚崎泰弘, 超臨界水中の自己拡散に対する水素結合の異方性の影響の動的溶媒和殻モデルによる解析, 第33回溶液化学シンポジウム,

2010年11月16日, 京都大学百周年時計台記念館 (京都市左京区).

- (7) 小江宏幸, 野村賢一, 吉田健, 魚崎泰弘, 超臨界二酸化炭素中でのアゾベンゼンのPMMAフィルムへの拡散, 第51回高圧討論会, 2010年10月20日, 仙台市戦災復興記念館 (仙台市青葉区).
- (8) 吉田健, 中原勝, 松林伸幸, 魚崎泰弘, 分子動力学法による超臨界水中の並進拡散に対する相互作用の異方性の影響の解析, 第51回高圧討論会, 2010年10月20日, 仙台市戦災復興記念館 (仙台市青葉区).
- (9) 吉田健, 中原勝, 松林伸幸, 魚崎泰弘, 超臨界水中の並進および溶媒和殻のダイナミクスに対して水素結合相互作用の異方性の与える影響, 第32回溶液化学シンポジウム, 2009年11月18日, 朱鷺メッセ (新潟コンベンションセンター, 新潟市中央区).
- (10) K. Yoshida, N. Matubayasi, Y. Uosaki, M. Nakahara, Self-Diffusion for Water and Organic Solvents in Sub- and Supercritical Conditions Studied by High-Temperature NMR method, Joint AIRAPT-22 & HPCJ-50, 2009年7月28日, 東京国際交流館 (東京都江東区).

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.tokushima-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 健 (Yoshida Ken)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・助教

研究者番号: 80549171

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: