

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25610120

研究課題名(和文) ナノディスクを用いた脂質膜反応場の創成

研究課題名(英文) Creation of reaction field on lipid membrane with phospholipid bilayer nanodiscs

研究代表者

中野 実 (Nakano, Minoru)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：70314226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ディスク状の脂質-ポリペプチド複合体、ナノディスクは最小の脂質二重層構造をもつナノ粒子である。本研究では物理化学的なアプローチによって、ナノディスクの形成や構造安定性に寄与する因子として、脂質組成の影響やポリペプチドの構造的な特徴を明らかにした。また、ナノディスクが自発的に生成する系や、ナノディスクが連鎖状に会合する系を構築することに成功した。これらの知見により、ナノディスクの応用展開を図る上での分子基盤を構築することができた。

研究成果の概要(英文)：Nanodisc is a discoidal lipid-polypeptide complex, which possesses a minimum unit of lipid bilayer. In this study, we clarified influence of the composition of lipids and the structural characteristics of polypeptides on the formation and stability of nanodiscs by physicochemical approaches. In addition, we succeeded in newly constructing systems of self-replication and rouleaux-formation of nanodiscs. These findings will contribute to construction of a molecular basis of these nanoparticles and to their development and application.

研究分野：生物物理化学

キーワード：ナノ粒子 脂質 アポリポタンパク質

1. 研究開始当初の背景

血漿中の高密度リポタンパク質は生成時にはディスク状を呈する。この粒子はアポリポタンパク質とリン脂質から人工的に作成することが可能で、ナノディスクとよばれる。我々はこれまでに、ナノディスクからのリン脂質の解離速度がベシクルよりも約 20 倍も速いこと、不飽和アシル鎖リン脂質を用いると、平面構造だけでなく鞍状曲面を有する粒子が得られること、アポリポタンパク質の代わりに両親媒性ペプチドを用いると、静的・動的特性の大きく異なる粒子が得られることを明らかにした。さらに、ナノディスク形成過程を評価した際、ナノディスクがスタックした透過型電子顕微鏡 (TEM) 画像が得られるが、この連鎖状構造の形成はネガティブ染色によるアーティファクトと考えられるものの、面白いことに、飽和アシル鎖リン脂質のナノディスクで見られるこの現象は不飽和リン脂質ではほとんど観察されない。このことは、脂質組成に応じて粒子の形状が決定され、それが、多価カチオンをトリガーとする高次集合体の形成を左右することを意味している。これらの結果から、ナノディスクの構造安定性に関わる因子を明らかにするとともに、ナノディスクの高度集積・離散化のスイッチングを行って新規な機能性を有する脂質二重層を創成する研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、まず、種々の脂質組成条件下でナノディスクを調製し、そのサイズ分布や生成率を評価することにより、ナノディスクの構造安定化に寄与する脂質の化学構造の因子を明らかにすることを目的とした。また、ナノディスクに対し、外的因子を加えたときの高次構造変化を検出し、脂質、タンパク質の組成、外的因子の種類の違いによる高次構造化様式の差を解析することで、脂質間の相互作用や静電相互作用を利用してナノディスクの集積・解離を制御するシステムを開発することを目指した。さらに、両親媒性ペプチドを連結させる Native Chemical Ligation (NCL) 反応をナノディスク形成に適用し、少量のナノディスク存在下においてペプチドとベシクルからナノディスクがさらに生成される、新規の自己複製系を構築するとともに、安定なナノディスクを作成する手法について検討した。

3. 研究の方法

(1) ナノディスク形成の脂質組成依存性

コール酸透析により、アポリポタンパク質 A-I (apoA-I) とリン脂質からなるナノディスクを調製した。調製時の温度やリン脂質と apoA-I のモル比 (25:1~100:1)、リン脂質の種類を変え、得られる粒子の大きさをサイズ排除クロマトグラフィーにより評価した。ナノディスクの脂質頭領域のパッキングを

dansyl-PE の蛍光寿命により評価した。また、アシル鎖領域のパッキングを DPH の時分割蛍光異方性測定により評価した。

(2) ナノディスクの高次構造化

高次構造化の検出に蛍光脂質間のエネルギー移動 (FRET) を利用するため、FRET ドナーとして NBD、アクセプターとして Rhodamine でラベルされたリン脂質を少量含むナノディスクをそれぞれ調製した。ナノディスクの溶液中でのスタッキングをこれらの蛍光脂質間のエネルギー移動 (FRET) により評価した。さらに TEM によりスタッキングの状態を観察、確認した。

(3) NCL 反応を利用したナノディスク形成

11 残基アミノ酸からなる 2 種類のペプチドを Fmoc 固相合成法により得た。これらはそれぞれ単独では脂質膜可溶性をもたないが、片方のペプチドは C 末端にチオエステル構造を、また、もう一方のペプチドは N 末端にシステインを有しており、両者が NCL 反応によって連結されるとはじめて膜可溶性をもつように設計している。これらのペプチドによるベシクルの可溶性反応を散乱光強度の減少によって評価した。また、C 末端にチオエステル、N 末端にシステインを有し、head-to-tail で逐次連結できるように設計したペプチドを合成した。このペプチドによるナノディスク形成反応を散乱光強度により追跡し、ペプチドの多重連結度を SDS PAGE により求めた。また、温度上昇に伴うナノディスク試料の CD スペクトルの変化から粒子の構造安定性を評価した。

4. 研究成果

(1) ナノディスク形成の脂質組成依存性

形成されるナノディスクの大きさや形状が、脂質組成によってどのように変化するかを明らかにするために、種々の条件下でナノディスクを調製後、サイズ排除クロマトグラフィーにより大きさの評価を行った。調製条件に依存して、流体力学的直径が 9.6nm (large disc) および 7.9nm (small disc) のナノディスクが得られた。リン脂質としてホスファチジルコリン (PC) のみを用いて調製すると、37 °C においては主として large disc が得られたが、ホスファチジルセリン (PS) やホスファチジルエタノールアミン (PE) を含む条件では small disc の生成量が増加した。蛍光寿命及び時分割蛍光異方性データから、PS は small disc の鞍状構造を安定化し、一方、PE は large disc の平面構造を不安定化することが示唆され、両脂質が異なるメカニズムで small disc 形成を促進することが明らかとなった。特に、負の自発曲率を有する PE が small disc の生成を促進する結果は、small disc が鞍状構造をもつという我々の従来の結果を支持するものである。

(2) ナノディスクの高次構造化

ナノディスクの高次構造化について検討した。apoA-I と酸性リン脂質を含むナノディスクを調製し、カルシウムイオンを添加した際の変化を観察した。FRET の観察から、イオン添加に伴い、速やかに粒子間距離が近接すること、すなわち粒子の会合が生じていることが明らかになった。また、TEM 観察により、イオン添加前に比べて添加後の試料中には連鎖状の構造体が多く含まれていることが判明した。また、EDTA の添加によって FRET が解消されたこと、ならびに TEM 画像中に見られる連鎖状構造体の数が著しく減少したことから、カルシウムイオンと EDTA を使ってナノディスクの集積・解離を制御できることが明らかになった。さらに、酸性リン脂質を含むナノディスク、およびカチオン性リン脂質を含むナノディスクを別々に調製後、両者を等量混合したところ、混合前の試料に比べ、連鎖状の構造体の割合が顕著に増加した。このことから、粒子間の静電相互作用を利用してナノディスクをスタックさせることも可能であることが判明した。

(3) NCL 反応を利用したナノディスク形成

2 種類の短鎖ペプチドを連結させる NCL 反応を利用し、脂質ベシクルと 2 種類のペプチドを含む系からナノディスクが生成する系を構築した。11 残基アミノ酸からなる 2 種類のペプチドは、それぞれ単独では脂質ベシクルを可溶化しなかったが、NCL 反応で連結された 23 残基ペプチドはベシクルを可溶化し、ナノディスクを生成した。2 種類のペプチドとベシクルを混合すると、時間と共にナノディスク形成が進行し、生成曲線はシグモイドカーブを描いた。また、このナノディスク生成反応は、あらかじめ少量のナノディスクが存在していると効率よく進行した。これらの反応速度を詳細に調査して、ナノディスクが自己複製的に生成する反応機構を明らかにした。

NCL 反応によって head-to-tail で逐次連結できるペプチドをデザインし、このペプチドを脂質膜と混合してナノディスクを調製した。得られたナノディスク中には、数分子から十分子ほど連結したペプチドが存在することを確認した。また、CD スペクトルの温度依存性から、この方法で得られたナノディスクは、連結能をもたないペプチドで調製したナノディスクに比べ、非常に高い熱安定性を示すことが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

K. Wakita, S. Morita, N. Okamoto, E. Takata, T. Handa, M. Nakano, Chylomicron Remnant Model Emulsions Induce Intracellular Cholesterol Accumulation and Cell Death Due to

Lysosomal Destabilization. *Biochim. Biophys. Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851, 598-604 (2015). 査読有
DOI:10.1016/j.bbailip.2015.01.015

K. Ikeda, M. Nakano, Self-Reproduction of Nanoparticles through Synergistic Self-Assembly. *Langmuir* 31, 17-21 (2015). 査読有
DOI: 10.1021/la503491p

H. Nakao, K. Ikeda, M. Iwamoto, H. Shimizu, S. Oiki, Y. Ishihama, M. Nakano, pH-Dependent Promotion of Phospholipid Flip-flop by the KcsA Potassium Channel. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* 1848, 145-150 (2015). 査読有
DOI: 10.1016/j.bbamem.2014.10.001

M. Miyazaki, Y. Tajima, Y. Ishihama, T. Handa, M. Nakano, Effect of Phospholipid Composition on Discoidal HDL Formation. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* 1828, 1340-1346 (2013). 査読有
DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.01.012

M. Kaihara, H. Nakao, H. Yokoyama, H. Endo, Y. Ishihama, T. Handa, M. Nakano, Control of Phospholipid Flip-Flop by Transmembrane Peptides. *Chem. Phys.* 419, 78-83 (2013). 査読有
DOI: 10.1016/j.chemphys.2012.12.041

中野 実、時分割中性子散乱法によるリン脂質のダイナミクスの評価. *Colloid Interface Commun.* 38, 22-24 (2013). 査読無

〔学会発表〕(計 31 件)

杉浦裕樹、池田恵介、中野 実、Amyloid- と脂質膜の相互作用に対する膜曲率の影響. 日本薬学会第 135 年会 2015.3. 28、兵庫医療大学(神戸)

近藤弘章、池田恵介、中野 実、安定かつサイズ調整可能なナノディスクを形成するペプチドの開発. 日本薬学会第 135 年会 2015.3. 28、神戸サンボーホール(神戸)

林 千尋、池田恵介、中野 実、リン脂質フリップフロップ誘起ペプチドの開発. 日本薬学会第 135 年会 2015.3. 28、神戸サンボーホール(神戸)

杉浦裕樹、池田恵介、中野 実、Amyloid- の結合様式に対する脂質膜物性の影

響. 膜シンポジウム 2014 2014.11.26、
神戸大学 (神戸)

林 千尋、池田恵介、中野 実、リン脂質
フリップフロップを誘起する膜貫通ペ
プチドの開発. 膜シンポジウム 2014
2014.11.26、神戸大学 (神戸)

中尾裕之、池田恵介、石濱 泰、中野 実、
親水性アミノ酸を含む小胞体膜タンパ
ク質の膜貫通配列がリン脂質のフリッ
プフロップに与える影響. 第 36 回生体
膜と薬物の相互作用シンポジウム、
2014.11.20、徳島大学 (徳島)

杉浦太一、高橋知里、池田恵介、中野 実、
リン脂質輸送タンパク質 Sec14 の膜組
成依存的な脂質輸送機能の評価. 第 36
回生体膜と薬物の相互作用シンポジウ
ム、2014.11.20、徳島大学 (徳島)

杉浦裕樹、池田恵介、中野 実、Amyloid-
の結合様式に対する脂質膜物性の影
響. 日本薬学会北陸支部第 126 回例会
2014.11.16、金沢大学 (金沢)

杉浦太一、高橋知里、池田恵介、中野 実、
リン脂質輸送タンパク質 Sec14 の膜組
成依存的な脂質輸送機構の解明. 日本
薬学会北陸支部第 126 回例会
2014.11.16、金沢大学 (金沢)

林 千尋、池田恵介、中野 実、リン脂質
フリップフロップを誘起する膜貫通ペ
プチドのデザイン. 日本薬学会北陸支
部第 126 回例会 2014.11.16、金沢大学
(金沢)

杉浦太一、高橋知里、池田恵介、中野 実、
Sec14 の膜脂質組成依存的なリン脂質
輸送メカニズムの解明. 第 87 回日本生
化学会大会 2014.10.16、京都国際会議
場 (京都)

中野 実、リン脂質の自発的およびタン
パク質を介したベシクル間移動と膜曲
率の効果. 第 87 回日本生化学会大会
2014.10.16、京都国際会議場 (京都)

池田 恵介、中野 実、協働的自己会合に
基づく脂質 ペプチドナノ微粒子の自
己複製. 第 52 回日本生物物理学会年
会 2014.9.27、札幌コンベンションセンタ
ー (札幌)

中尾 裕之、池田 恵介、石濱 泰、中野
実、ER 膜タンパク質の膜貫通配列のリン
脂質フリップフロップ誘起能の評価.
第 52 回日本生物物理学会年
会 2014.9.27、札幌コンベンションセンタ

ー (札幌)

M. Nakano, Evaluation of Interbilayer
and Transbilayer Phospholipid
Transfers by Neutron Scattering.
NSRRC - 20th Users' Meeting &
Workshops, 2014.9.10, Hsinchu,
Taiwan

M. Nakano, Evaluation of
protein-mediated intervesicular
lipid transfer by time-resolved
neutron scattering. IUPAB2014,
2014.8.5, Brisbane, Australia

杉浦太一、高橋知里、池田恵介、中野 実、
リン脂質輸送タンパク質 Sec14 の脂質
輸送機構の解明. 第 12 回次世代を担う
若手のためのフィジカル・ファーマフォ
ーラム 2014.7.14、箱根高原ホテル(箱
根)

杉浦裕樹、池田恵介、中野 実、Amyloid-
の結合様式に対する脂質膜物性の影
響. 日本膜学会第 36 年会 2014.5.12、
早稲田大学 (東京)

林 千尋、池田恵介、中野 実、膜貫通ペ
プチドの親水性度に依存したリン脂質
フリップフロップ誘起能の変化. 日本
膜学会第 36 年会 2014.5.12、早稲田大
学 (東京)

池田恵介、中野 実、ナノディスク自己複
製系の構築. 日本薬学会第 134 年会
2014.3.29、熊本市総合体育館 (熊本)

⑲ 杉浦太一、高橋知里、池田恵介、中野 実、
リン脂質輸送タンパク質 Sec14 のホスフ
ァチジルイノシトール依存的な会合挙
動の評価. 日本薬学会第 134 年会
2014.3.29、熊本市総合体育館 (熊本)

⑳ 中尾裕之、若林真樹、池田恵介、石濱 泰、
岩本真幸、清水啓史、老木成稔、中野 実、
カリウムチャネル KcsA の pH 依存的なリン
脂質 flip-flop 誘起能. 日本薬学会
第 134 年会 2014.3.28、熊本大学 (熊本)

㉑ M. Nakano, Phospholipid Transfer
Dynamics Studied by Time-Resolved
Small-Angle Neutron Scattering. Third
International Workshop SKIN2014
-Studying Kinetics with Neutrons-
2014.3.26, Grenoble, France

㉒ 中尾裕之、若林真樹、池田恵介、石濱 泰、
岩本真幸、清水啓史、老木成稔、中野 実、
リン脂質のフリップフロップに対する
カリウムチャネル KcsA の N 末ヘリック

スの影響. 膜シンポジウム 2013
2013.11. 7、京都府立大学(京都)

- ②5 中尾裕之, 若林真樹, 池田恵介, 石濱 泰, 岩本真幸, 清水啓史, 老木成稔, 中野 実, カリウムチャンネル KcsA のリン脂質フリップフロップ誘起能におけるN末ヘリックスの効果. 第 35 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2013.11.21、東京大学(東京)
- ②6 中尾裕之, 若林真樹, 池田恵介, 石濱 泰, 岩本真幸, 清水啓史, 老木成稔, 中野 実, プロテオリポソームを用いたリン脂質フリップフロップの評価. 第 64 回コロイドおよび界面化学討論会, 2013.9.20、名古屋工業大学(名古屋)
- ②7 中野 実, 膜曲率に依存したリポソーム間リン脂質交換. 第 64 回コロイドおよび界面化学討論会, 2013.9.20、名古屋工業大学(名古屋)
- ②8 中野 実, 脂質ナノディスクの構造とダイナミクスの評価. ナノバイオ若手ネットワークシンポジウム 2013.6.14、富山県民会館(富山)
- ②9 中尾裕之, 若林真樹, 池田恵介, 石濱 泰, 岩本真幸, 清水啓史, 老木成稔, 中野 実, カリウムチャンネル KcsA のリン脂質フリップフロップ誘起能の変化. 日本膜学会第 35 年会 2013.5.20、早稲田大学(東京)
- ③0 池田恵介, 江川文子, 林こころ, 中野 実, 児嶋長次郎, 藤原敏道, 固体 NMR 法によるトランスデューサー膜タンパク質 NpHtrII の構造解析. 日本膜学会第 35 年会 2013.5.20、早稲田大学(東京)
- ③1 M. Nakano, Functional evaluation of a phospholipid transfer protein by Neutron Scattering. Protein Dynamics and Function Workshop, 2013.4.15, Durham, UK

〔図書〕(計1件)

岡村 恵美子, 中野 実, 生体膜. 寺嶋正秀編, 揺らぎ・ダイナミクスと生体機能, 化学同人, pp. 212-230 (2013).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/biointerface/index-j.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 実 (NAKANO, Minoru)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・
教授

研究者番号: 70314226