

研究課題別評価

1 研究課題名:機能性分子素子の構築を目指した脂質膜の物性に関する基礎的研究

2 研究者氏名:早川 枝李

3 研究の狙い:

生体膜構成二大成分の一つである脂質分子の形と機能に焦点をあてた。膜脂質の主要成分であるリン脂質は、固有の分子構造・容積をもち、極性頭部とアシル鎖領域の分子容の比は、自己組織化した際にとり得る膜構造を決定する重要な因子となる。異なる大きさの極性頭部を持つ脂質分子を、様々な比率で混合し作成した人工脂質二重層膜(リポソーム)は、一定の直径を与えると、様々な脂質膜 curvature stress を示す。しかし、膜 curvature stress が膜の物理的性質や膜タンパク質の活性に対しどのような影響を与えるかについてはほとんど知られていない。そこで本研究では第一の研究として、脂質分子の異なる形状の組み合わせにより誘導される脂質膜 curvature stress が、脂質膜の物性と膜タンパク質の活性にどのような影響を与えるかについて、人工脂質二重層膜と G - プロテイン結合型膜タンパク質であるウシロドプシンを用いて検討した。

日本国内における狂牛病発生の影響から、ウシ関連の生体試料の入手が不可能となったことをうけ、ウシの目玉から精製していたロドプシンを用いる研究の継続が困難になり、それに変わる別の研究として、脂質膜 curvature stress や脂質分子のパッキング条件の違いが、細胞内においてどのように利用されているかについて検討した。細胞における現象モデルとしてファゴソーム - ライソソーム膜融合阻害を伴う結核菌の宿主細胞内でのサバイバル機構を取り上げ、ファゴソーム膜類似人工脂質膜の膜構造ドメイン変化について、原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscopy, AFM)と FRET を用いて解析した。

4 研究成果:

1:脂質の分子構造と組成の違いに誘導される脂質膜 Curvature stress の膜タンパク質の構造変化に対する影響

ロドプシンはウシ網膜の Rod Outer Segment から単離・精製し、あらかじめ組成を決めたリン脂質ベシクル(1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphor-choline (DOPC)、1,2-dioleoyl-*sn*-glycerol-3-phosphoethanolamine (DOPE))中に再構築させ、ロドプシンの活性に対する脂質組成の影響を検討した。DOPC と DOPE の混在比率はそれぞれ 100:0、70:30、50:50 とし、全脂質とロドプシンの混在比率は 85:1 とした。全ての測定は K2 multifrequency crosscorrelation phase fluorometer (ISS)で行った。アシル鎖領域の packing free volume (fv) は 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)の蛍光異方性(Anisotropy)の値と The Brownian rotational diffusion (BRD) model の組み合わせにより求めた。ロドプシンの MI-MII 構造変化は吸光光度計により検出、そこから平衡定数: $K_{eq} = [MII]/[MI]$ を求めた。

ウシロドプシンは光刺激により活性化され、MI MII へと構造が変化する。MI、MII 型はそれぞれ 480nm、380nm に固有の吸収波長を持つため、吸光光度計を用いて各波長における吸光度を測定する事で、どれだけの割合が活性化されたかを検出する事ができる。PC と PE の混在系において、PE の割合が増加するほど膜 curvature stress が増大することがわかっている。DOPE を 0、30、50%と段階的に増加させたときの K_{eq} の値を比較すると、DOPE 存在下では DOPC のみの膜にロドプシンを再構築させた時よりも、MII 形成の割合がおよそ 70%増大していた。次に脂質膜のアシル鎖領域のパッキング状態に対する膜 curvature stress の影響を調べた。極性頭部の分子容の小さい DOPE の増加が脂質膜表面の空間密度を変化させることで、膜 curvature stress が変わり、この結果、アシル鎖領域の free volume の変化を誘導させたことがわかった。これらの結果は、膜 curvature stress の変化が異なる脂質分子間のパッキング状態を生み出し、また、ロドプシンが光

刺激を受けた時、膜 curvature stress が大きいほど光子による活性化効率が高くなることを意味し、結果としてロドプシンの光反応能力が促進されることを示唆している。

2: 結核菌の宿主細胞内におけるサバイバルスキル

異なる相転移温度を持った脂質を混合させると、脂質ドメインが形成される。AFMはナノスケールで試料表面の高さの違いを検出できるため、脂質膜表面を AFM の探針 (プローブ) で走査することにより、脂質膜の表面構造の検出が可能となる。ファゴソーム膜類似組成である DOPC+SM+Chol の系に対し、lipoarabinomannan (LAM) の有無による膜ドメインの構造変化を室温にて検討した結果、LAM が混在すると、個々の SM+Chol ドメインが細分化し、ドメインサイズが小さくなっていることが認められた。さらに、全体の膜エリアにおけるドメイン密度も高くなっていた。

次に、同上の脂質組成により構成された large unilamellar vesicles (LUVs、直径約 100nm) に膜融合誘導剤である Polyethylene glycol (PEG) を加え、その後の融合過程について FRET を用いて観察した。これは、一方のリポソーム膜に 2 種類の蛍光プローブ (Rho-PE と NBD-PE) を加え、もう一方のリポソームに何も加えず両者を混在させ、PEG により融合が進むと、リポソームの体積の増加から蛍光分子間の距離が大きくなり、結果として自己消光 (Quenching) が解消され、エネルギー移動により Rho-PE の蛍光が検出できるようになる、という原理に基づく。この実験の結果、LAM の存在下では LAM がない系と比べて、PEG が共存するにもかかわらず膜融合が阻害されていることが、*in vitro* において初めて証明された。このように、LAM が SM-Chol ドメインのサイズと DOPC ドメインに対する密度を大きく変化させ、また PEG の存在下において脂質膜融合を阻害していたことは、結核菌のファゴソーム - ライソソーム膜融合 (P-L fusion) 阻害を伴った宿主細胞内サバイバル機構において、脂質分子のパッキング状態の違いが生み出した脂質膜内構造ドメインの変化と膜融合阻害という現象が関連している可能性を、初めて物理化学的側面から検討・報告できた。

現在、LAM が自己集合体を形成したときの物性について更なる検討をおこなうとともに、今までに得た研究成果のまとめとして、すでに論文作成を開始している。今後はできるだけ速やかに論文を完成・投稿したい。

5 自己評価:

本研究は脂質分子の形と、その異なる形の組み合わせにより生み出される脂質膜 curvature stress が、共存する膜タンパク質の活性にどのような影響を与えるかについて検討することを出発点とした。膜 curvature stress の概念はこれまでの研究において理論的には受け入れられてきたが、curvature stress の影響が脂質膜中のパッキング条件や膜タンパク質の活性を調節していることを、実験から直接示した報告例は皆無であった。しかし本研究の結果から、脂質が提供する膜環境の違いが、ロドプシンの活性・構造変化を調節することを証明できた。このことは、ロドプシンのみならず他の膜タンパク質に対する脂質分子の影響を検討する上でも、また、脂質 - タンパク質相互作用の一端を解明する上でも重要であると考えている。

第二に行った結核菌の膜融合阻害に対するメカニズムの解明についてだが、この研究は、本研究のコンセプトである脂質分子の形の違いにより生み出される膜内パッキング条件の違いが、実際の生体においてどのように利用されているか、より細胞・生物を意識して行った研究である。結核菌に対する研究・治療は、現在使用されている治療薬 (抗生物質) からみても、タンパク質に対する検討のみである。しかし多剤耐性菌などの問題もあり、より根本的な治療法の確立が必要である。本研究は、結核菌のサバイバルメカニズムに対し、P-L fusion 阻害における脂質膜の構造・物理化学的性質の違いを検討した新しいアプローチであり、結核菌由来の脂質が、宿主細胞の膜内ドメイン (コレステロール - スフィンゴミエリンドメイン) 構造を変化させ、結果として P-L fusion 阻害が引き起こされていることを、ファゴソーム膜類似モデルを用いて膜内構造を視覚化し、初めて証明した。本研究の結果は、今後、細胞レベルでの実験を経ることで、新たな薬の開発や

治療法などを検討する上で、まったく新しい可能性を示すための第一歩と考えられ、さらにインフルエンザ、HIV などの他の感染症も脂質膜を介して感染することから、結核菌に対する治療のみならず、細胞表面と菌・ウィルスとの接着・浸潤機構などのメカニズムの解明にも影響を与えうるものと考えている。

6 研究総括の見解:

脂質の機能に着目した本領域では唯一の研究である。当初脂質膜物性と牛ロドプシン活性の関係究明を目指したが、原料入手の問題から、対象を結核菌宿主細胞に変更し、脂質膜物性や脂質分子の形と結核菌生存機構の関係解明を目指した。短期間ではあったが、結核菌由来の脂質が膜ドメイン構造を変化させ融合障害を起こし生存するという仮説の端緒をモデル的に得た点は評価する。論文作成を開始したということなので、是非きちんとした論文に仕上げて欲しい。論文にして初めて当該分野の研究者に成果を問うことも、批判を受けることもできる。

7 主な論文等:

学会発表等

1. 49th Biophysical Society Annual Meeting (Feb/12-17/2005) (in USA)
2. 44th The American Society for Cell Biology (Dec/04-08/2004) (in USA)
3. 6th Congress of International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL) (Jun/27-Jul/01/2004) (in Canada)
4. 47th Biophysical Society Annual Meeting (Mar/01-05/2003) (in USA)