

学 位 論 文 題 名

Dynamics of Phospholipid Head Group and Its Interaction with Enzyme

(リン脂質極性頭部の動的構造及び酵素との相互作用)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

細胞膜や細胞内膜系などの生体膜は基本的に脂質とタンパク質との非共有結合によって構成され、その構造としてSingerとNicolsonによる「流動モザイクモデル」が広く受け入れられている。つまり、リン脂質が厚さ4~5nmの二重層を形成し、タンパク質はその二重層を貫通するかあるいは一部埋めこまれた形で存在し、全体として流動性を持つものである。酵素や受容体などの機能タンパク質が適切な機能を発揮するには至適な膜の流動性、及び膜表面での立体構造や電荷分布が必要である。この流動性はリン脂質の分子運動によって決められる。さらにリン脂質二重層では、水と接する表面層は親水性の極性頭部からなり中央部の層は疎水性の脂質鎖によって作られるため両者の性質は大きく異なる。従って膜の機能を研究するにはこれらの両層についてその立体構造を知るとともに分子レベルでの動的過程をも知る必要がある。本研究では、極性頭部のリン酸基に直接蛍光体を結合させたリン脂質DPPU(図1)を新たに合成しピコ秒レーザーを用いた時間分解蛍光偏光解消法により表面層の分子運動並びにその流動的性質を明らかにした。中央の脂質鎖部の分子運動については脂質鎖部に蛍光体を持つリン脂質DPHppC(図1)を用いて表面層の運動性と比較、検討した。

リン脂質二重層の主要な役割の一つはタンパク質の機能を効率良く発現させる反応場を形成することにあるが、さらにリン脂質分子自身もタンパク質の特定な部位と重要な相互作用を持つなど積極的に生命現象を支える機能性物質としての働きをするものも多い。このようなリン脂質-タンパク質相互作用研究の一つとして、新たにホスホリバーゼA₂の基質となるピレン標識リン脂質を系統的に合成し、酵素活性の測定法について検討した。

【1】リン脂質二重層における極性頭部の動的構造及びコレステロール効果

二重層中のリン脂質分子は、ナノ～ピコ秒 ($10^{-9} \sim 10^{-12}$ 秒) 領域で分子運動を繰り返しているため、その動的微細構造の解析にピコ秒の時間分解能をもつ蛍光偏光解消法を用いた。蛍光異方度 $r(t)$ は、偏光した光を励起光として用いた場合、励起偏光と平行な発光成分 $I_{||}(t)$ と垂直な発光成分 $I_{\perp}(t)$ とから次式で定義される。

$$r(t) = [I_{||}(t) - I_{\perp}(t)] / [I_{||}(t) + 2I_{\perp}(t)] \quad (1)$$

この時蛍光プローブの動きが制限されていれば、 $r(t)$ の時間変化は、実験的に次のように示される。

$$r(t) = (r_0 - r_{\infty}) \exp(-t/\phi) + r_{\infty} \quad (2)$$

ここで r_0 は時間 $t=0$ での蛍光異方度、 r_{∞} は十分に時間が過ぎた時の蛍光異方度であり、 ϕ は減衰の時定数で回転相関時間と呼ばれる。Wobbling-in-cone modelを用

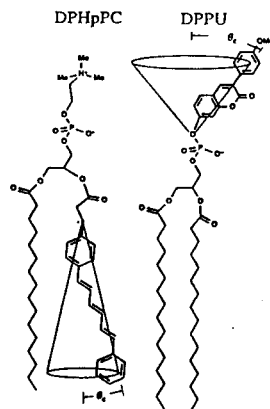


図 1

いて解析することにより蛍光プローブの揺動角 θ_c 及び揺動拡散速度 Dw を求めることができる。DPPC二重層にDPPU及びDPHpPCを導入し、ピコ秒時間分解による蛍光の偏光解消を測定した。DPPC二重層の相転移は 42°C であり測定はその前後 $15^\circ\text{C} \sim 50^\circ\text{C}$ の温度範囲で測定した。蛍光プローブの異方性初期値 r_0 、最終値 r_{∞} 、及び回転相関時間 ϕ はコンボリューション法によって求めた。DPHpPCの回転相関時間 ϕ は数 ns であるが、DPPUの回転相関時間 ϕ はDPHpPCの $1/10$ 程度で約 100 ps という小さな値を示した。また、各プローブの運動範囲の指標となる揺動角 θ_c の温度依存性は、二つのプローブで大きく異なった。DPHpPCの場合は脂質二重層の相転移をはさんで大きく変化した。DPPUの場合はそのような変化は観測されなかった。これらの事は脂質-水界面においてリン脂質極性頭部の運動速度が脂質鎖部分よりも10倍程度速いことを示している。またDPPUの揺動角 θ_c が各温度においてDPHpPCに比べ約2倍程度の大きな値を示したことから運動範囲に関しては極性頭部の方が脂質鎖部分より液晶層では約 25° 、ゲル層では約 35° 程度の大きな自由度を持つことが明らかとなった。

DPPUの揺動角はコレステロールの増加にともなって増大した。このとき揺動拡散速度 Dw もわずかに増大した。この事はリン脂質極性頭部付近の粘性 (ストークス-アインシュタインの式より評価) がわずかに減少したことを意味する。一方、DPHpPCの揺

動角 θ_c はコレステロールの増加と共に減少した。この結果は、脂質二重層内部でコレステロールが脂質鎖の動きを制限する事を示している。DPH-PCとDPPUはそれぞれ図1に示したような揺動運動をしていると考えられる。脂質鎖部分に比した極性頭部の揺動角 θ_c 及び運動速度の増大は疎水的なコレステロール環がグリセロール骨格より内部に入るため、極性頭部間の距離が広がり、その揺動拡散速度 Dw が大きくなるためであると説明される。それに対して脂質鎖部の運動はコレステロールによって制限されるものと考えられる。リン脂質分子運動に対するコレステロールの効果は以上の結果から脂質鎖より成る層と極性頭部より成る層とでは正反対であることが示された。コレステロールが表層の分子運動を活性化することは、膜表面が関与する現象、例えば膜融合やリボソームの安定性にコレステロールが関与する可能性を示唆するものである。

【2】構造の異なるリン脂質に対するホスホリパーゼ A_2 (PLA₂) の基質特異性

ジビレンブタノイルPC(DPB-PC)とジビレンデカノイルPC(DPD-PC)をホスホリパーゼD(PLDP)により、ジビレンブタノイルPE(DPB-PE)とジビレンデカノイルPE(DPD-PE)へそれぞれ変換した(図2)。PLDPを用いたPC→PEの変換は定量的に進行し、HPLCで確認しても1ピークであり、PAの生成は認められなかった。

分子内エキサイマーを形成するジビレンリン脂質を、PLA₂により2位のエステル結合を特異的に加水分解するとエキサイマーの蛍光は減少してモノマーの蛍光が増加する。この時のモノマー蛍光の増加量を測定することでPLA₂の活性を測定する。上記4種類のジビレンリン脂質 400pmolに対して、ハチ毒、ヘビ毒そしてブタ膵臓由来PLA₂の酵素量を5ng~10μgの間で変えてビレンモノマー生成の時間変化から各酵素の基質特異性を求めた。

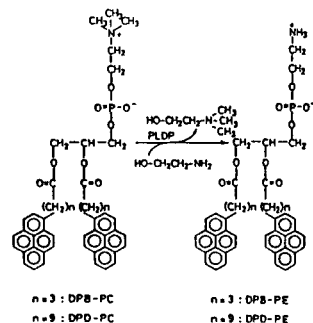


図 2

ハチ毒 PLA₂ の基質特異性は DPD-PE > DPD-PC ≧ DPB-PE > DPB-PC であり、ヘビ毒 PLA₂ では DPD-PC > DPD-PE ≧ DPB-PE > DPB-PC でありブタ膵臓では DPD-PE > DPD-PC > DPB-PE > DPB-PC であった。このように PLA₂ はリン脂質極性頭部及び脂質鎖の構造の違いに対する基質特異性を示すので、数種の基質を用いて活性を測定する必要がある。また本測定法は非常に簡便で高感度であるため、生体からの粗抽出物に対する PLA₂ の活性測定法として応用が期待される。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

主 査	教 授	田 村 守
副 査	教 授	白 濱 晴 久
副 査	教 授	谷 口 和 弥
副 査	助 教 授	荒 磯 恒 久 (医 学 研 究 科)

本論文は2章から成っており、第1章では蛍光偏光解消法を用いてピコ秒－ナノ秒領域における生体膜脂質分子の動的挙動を極性頭部及び非極性尾部で独立に測定する手法を確立し、リン脂質ベシクルの相転移及びコレステロール添加効果を解析した結果をまとめた。第2章では生体膜構成成分であるリン脂質に作用するホスホリパーゼの酵素活性を測定し得る新しい蛍光プローブを合成しその結果を種々の特異性を持つリパーゼに作用させ、本活性測定法の生化学分野での有用性を示した。以上、蛍光プローブ法の持つ動的性質と高感度性を利用した生体膜研究の新しいアプローチを示したのが本論文の主要な内容である。

細胞膜や細胞内微小器官を形作る生体膜は基本的にリン脂質二重層と蛋白質分子からできており、通常「流動モザイクモデル」が広く受け入れられている。このリン脂質二重層は水と接する外側は親水性の極性頭部から成り、一方内側は疎水性の脂質鎖から作られ、両者の性質は大きく異なる。本研究は極性頭部のリン酸基に直接クマリン誘導体の蛍光プローブを結合させたリン脂質、DPPUを合成し、ピコ秒領域での時間分解蛍光偏光解消法により分子運動と流動性を明らかにした。内部の脂質鎖部の分子運動は脂質鎖部に蛍光プローブを導入したDPHPCを合成し、同様な測定を行い表面層と比較検討した。

生体膜の主要な役割を担っている種々のリン脂質はホスホリパーゼによって加水分解される。この時酵素であるリパーゼとリン脂質との相互作用が特異性発現の基本である。このようなリン脂質－タンパク質相互作用研究のひとつとして、新たにホスホリパーゼの基質となるビレン標識リン脂質を合成し、酵素活性測定の系統的な研究を

行った。

リン脂質二重層における極性頭部の動的構造及びコレステロール効果をクマリン骨格を有するリン脂質、DPPUを用いて蛍光プローブの揺動角、揺動拡散速度、回転相関時間を脂質二重層ベシクルで求めると、特に回転相関時間は約100psで、リン脂質二重層内部に比べ1/10程度であった。このことは極性頭部の運動性は非極性脂質部より10倍以上大きいといえる。リン脂質二重層膜は42℃のところで相転移があり、非極性脂質部の蛍光プローブはこの温度の前後で流動性が大きく変化することを示すが、極性頭部の運動性は大きな変化を示さなかった。また、生体膜の流動性を変えるコレステロールを添加すると、極性頭部の運動性は増加するのに対し、非極性脂質部はむしろ運動が制限される。

以上本論文において、蛍光プローブ法を用いリン脂質二重層での極性頭部と非極性脂質部の流動性を独立に測定することが可能となり、その測定結果より生体膜表面と内部ではその動的挙動がまったく異なるという新しい知見を得た。この内容は理学博士を受けるものとして十分なものである。