

学 位 論 文 題 名

ジアシルグリセロールにより誘導されるリポソーム膜
における液晶－逆ヘキサゴナル相転移の蛍光分光学的解析

学位論文内容の要旨

研究目的

ジアシルグリセロール (DAG) はホスホリパーゼ C の作用により生じ、プロテインキナーゼ C に結合しそれを活性化するという細胞内情報伝達のセカンドメッセンジャーとして重要な役割を果たしている。一方 DAG は二重層構造の液晶 ($L\alpha$) 相を呈している生体膜に、極性頭部を内側に向けた円筒型一重層構造である逆ヘキサゴナル (HII) 相などの非二重層構造を形成し、膜融合あるいはホスホリパーゼ A_2 やプロテインキナーゼ C の活性促進などに関与している。また HII 相の脂質は抗リン脂質抗体症候群の抗原になり得ることが最近報告されている。

本研究は DAG の HII 相誘導性とその機序をより生理的な条件で検討することを目的に、脳シナプス膜の膜融合を念頭に置き、複合天然脂質で構成される多重膜リポソームを用いて $L\alpha$ - HII 相転移開始に必要な DAG の膜内濃度を定常光蛍光分光法により求めた。また時間分解蛍光偏光解消法により、DAG により誘導される $L\alpha$ - HII 相転移時の脂質頭部と脂肪酸鎖部の運動性を解析した。

実験方法

実験材料：

蛍光脂質にはホスファチジルエタノールアミン (PE) の頭部を蛍光プローブ NBD および DNS でラベルした NBD-PE および DNS-PE, 脂肪酸鎖部を蛍光プローブ DPH でラベルした DPH-ホスファチジルコリン (DPH-PC), DPH-ホスファチジン酸 (DPH-PA) および DPH-グリセロール (DPH-G) を用いた。リポソームの構成脂質には牛脳 PC (BrPC), 牛脳 PE (BrPE), ジオレオイル PC (DOPC), ジオレオイル PC (DOPE), コレステロール (CHOL) およびジオレオイル G (DOG) を用いた。本研究では DAG として合成脂質である DOG を用いた。

リポソームの調製：

定常光蛍光分光法の測定には混合合成脂質（DOPE : DOPC : CHOL = 1 : 1 : 1, mol/mol）あるいは、混合天然脂質（BrPE : BrPC : CHOL = 1 : 1 : 1, mol/mol）で構成された 0.2mM の多重膜リポソーム（MLV）および大型一枚膜リポソーム（LUV）浮遊液を調製した。また ^3P -NMR の測定には上記の混合合成脂質による 0.1M の MLV 浮遊液を、時間分解蛍光偏光解消法の測定には上記の混合天然脂質による 0.2 mM の MLV 浮遊液を調製した。

リポソームの透過型電子顕微鏡による確認：

調製したリポソームを日立透過型電子顕微鏡で観察し、直径 0.8~2.2 μm の MLV および直径 0.2~0.5 μm の LUV を予め確認した。

定常光蛍光分光法による $\text{L}\alpha$ -HII 相転移の測定：

温度依存性の蛍光強度変化の測定には島津定常光励起蛍光光度計を用い、試料の温度を 5℃ から 65℃ まで自動昇温した時の DNS-PE を含んだリポソーム浮遊液の蛍光強度を 1℃ ごとに記録した。

^3P -NMR による $\text{L}\alpha$ -HII 相転移の測定：

測定には Bruker 社 NMR を用い、22℃ より 60℃ まで 4 - 5℃ 間隔で測定した。

時間分解蛍光偏光解消法による脂質分子の運動解析：

0.1mol の蛍光脂質と 5~15mol の DOG を導入した混合天然脂質 MLV を用い 37℃, pH 7.4 にて実験した。測定には二つのレーザーを組み合わせたピコ秒パルス発生系および時間相関単一光子計数器を用いたピコ~ナノ秒光現象検出系からなる装置を使用した。励起パルスを縦偏光として試料に照射し、発せられる蛍光を縦偏光および横偏光として測定し、それらの時間減衰曲線を得た。これより蛍光異方度の時間減衰曲線を導出し、非線形最小二乗法コンピュータープログラムによりこの曲線の初期値、収束値を求めた。この値から円錐内揺動運動モデルの理論式により円錐角の半角を表す揺動角を算出し、蛍光プローブの運動範囲の指標とした。

実験成績

昇温による $\text{L}\alpha$ -HII 相転移の定常光蛍光分光法による測定：

昇温にともなう蛍光強度の変化から LUV および MLV の相転移開始温度は各々 22℃ および 23℃、相転移終了温度は両者とも 43℃ と測定された。LUV と MLV では差がほとんど見られなかったことから、本研究の MLV を用いた実験結果を一枚膜である生体膜に応用して考えることが可能と思われた。

昇温による $L\alpha-H_{II}$ 相転移の $^3\text{P-NMR}$ による測定：

スペクトル波形の分析から、相転移開始温度は 22°C と 26°C の間、相転移終了温度は 45°C 付近と測定され、定常光蛍光分光法による結果とはほぼ一致した。これは定常光蛍光分光法の測定の信頼性を保証するものである。

DOG による $L\alpha-H_{II}$ 相転移温度の変化：

DOG を 1 から 4 mol% まで変化させた時の相転移の開始温度の低下は、DOG 1 mol% につき 5.6°C であり、 37°C における相転移開始に必要な DOG の膜内濃度は 1.6 mol% であった。この値は DAG の生理的な膜内濃度が約 0.5 mol% であり、細胞刺激により約 3 倍に増加するとの報告をあわせると、十分生理的意味を持つものと考えられた。

DOG 導入による $L\alpha-H_{II}$ 相転移におけるリン脂質頭部と脂肪酸鎖部の分子動態：

蛍光プローブの運動範囲の指標である揺動角は、加えた DOG 濃度に依存して DNS-PE および NBD-PE で減少し、DPH でラベルした脂質で増加した。これは相転移に伴いリン脂質頭部の有効運動体積が狭くなり、脂肪酸鎖部では逆に広がったことを示している。この変化は脂質曲面が平面から脂肪酸鎖部に対し凸に湾曲したことを意味しており、 $L\alpha$ 相から H_{II} 相への形状変化を分子運動の両面から明らかにしたものである。一方 DPH-G の揺動角は DPH-PA および DPH-PC のそれより常に大きく、このことは脂肪酸鎖部が同じであっても DAG は PC および PA より脂肪酸鎖部の運動性が高いことを示唆している。

結 語

- (1) 混合天然脂質 (BrPE/BrPC/CHOL = 1 : 1 : 1, mol/mol) 多重膜リボソームにおいて、 $L\alpha-H_{II}$ 相転移開始に必要な DOG の膜内濃度は pH 7.4, 37°C で 1.6 mol% であり、その濃度は生体膜において生理的に生じうる DAG 濃度にはほぼ匹敵した。
- (2) DOG による H_{II} 相の誘導にともない蛍光プローブの運動範囲はリン脂質頭部で減少し脂肪酸鎖部で増加した。このことは $L\alpha-H_{II}$ 相転移における膜の平均曲率の変化を分子運動学的に明らかにしたものである。
- (3) 脂肪酸鎖部にある DPH の運動範囲は DPH-G の方が DPH-PA および DPH-PC より大きく、DAG の脂肪酸鎖部が PC や PA よりも高い運動性を持つことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 橋 輝 雄
副 査 教 授 西 信 三
副 査 教 授 小 山 富 康

研究目的

ジアシリグリセロール (DAG) はホスホリパーゼ C の作用により生じ、プロテインキナーゼ C に結合しそれを活性化するという細胞内情報伝達のセカンドメッセンジャーとして重要な役割を果たしている。一方 DAG は二重層構造の液晶 ($L\alpha$) 相を呈している生体膜に、極性頭部を内側に向けた円筒型一重層構造である逆ヘキサゴナル (HII) 相などの非二重層構造を形成し、膜融合あるいはホスホリパーゼ A₂ やプロテインキナーゼ C の活性促進などに関与している。また HII 相の脂質は抗リン脂質抗体症候群の抗原になり得ることが最近報告されている。

本研究は DAG の HII 相誘導性とその機序をより生理的な条件で検討することを目的に、脳シナプス膜の膜融合を念頭に置き、複合天然脂質で構成される多重膜リポソームを用いて $L\alpha$ - HII 相転移開始に必要な DAG の膜内濃度を定常光蛍光分光法により求めた。また時間分解蛍光偏光解消法により、DAG により誘導される $L\alpha$ - HII 相転移時の脂質頭部と脂肪酸鎖部の運動性を解析した。

実験成績

昇温による $L\alpha$ - HII 相転移の定常光蛍光分光法による測定：

昇温にともなう蛍光強度の変化から LUV および MLV の相転移開始温度は各々 22℃ および 23℃、相転移終了温度は両者とも 43℃ と測定された。LUV と MLV では差がほとんど見られなかったことから、本研究の MLV を用いた実験結果を一枚膜である生体膜に応用して考えることが可能と思われた。

昇温による $L\alpha$ - HII 相転移の ³¹P-NMR による測定：

スペクトル波形の分析から、相転移開始温度は 22℃ と 26℃ の間、相転移終了温度は 45℃ 付近と測定され、定常光蛍光分光法による結果とほぼ一致した。これは定常光蛍光分光法の測定の信頼性を保証するものである。

ジオレオイルグリセロール (DOG) による $L\alpha$ - HII 相転移温度の変化：

DOG を 1 から 4 mol% まで変化させた時の相転移の開始温度の低下は、DOG 1 mol% につき 5.6°C であり、37°C における相転移開始に必要な DOG の膜内濃度は 1.6 mol% であった。この値は DAG の生理的な膜内濃度が約 0.5 mol% であり、細胞刺激により約 3 倍に増加するとの報告をあわせると、十分生理的意味を持つものと考えられた。

DOG 導入による L α -HII 相転移におけるリン脂質頭部と脂肪酸鎖部の分子動態：

蛍光プローブの運動範囲の指標である揺動角は、加えた DOG 濃度に依存して DNS-PE および NBD-PE で減少し、DPH でラベルした脂質で増加した。これは相転移に伴いリン脂質頭部の有効運動体積が狭くなり、脂肪酸鎖部では逆に広がったことを示している。この変化は脂質曲面が平面から脂肪酸鎖部に対し凸に湾曲したことを意味しており、L α 相から HII 相への形状変化を分子運動の両面から明らかにしたものである。一方 DPH-G の揺動角は DPH-PA および DPH-PC のそれより常に大きく、このことは脂肪酸鎖部が同じであっても DAG は PC および PA より脂肪酸鎖部の運動性が高いことを示唆している。

結 語

- (1) 混合天然脂質 (BrPE/BrPC/CHOL = 1 : 1 : 1, mol/mol) 多重膜リポソームにおいて、L α -HII 相転移開始に必要な DOG の膜内濃度は pH 7.4, 37°C で 1.6 mol% であり、その濃度は生体膜において生理的に生じうる DAG 濃度にはほぼ匹敵した。
- (2) DOG による HII 相の誘導にともない蛍光プローブの運動範囲はリン脂質頭部で減少し脂肪酸鎖部で増加した。このことは L α -HII 相転移における膜の平均曲率の変化を分子運動学的に明らかにしたものである。
- (3) 脂肪酸鎖部にある DPH の運動範囲は DPH-G の方が DPH-PA および DPH-PC より大きく、DAG の脂肪酸鎖部が PC や PA よりも高い運動性を持つことが示唆された。

以上、本研究はジアシルグリセロールによって脂質リポソーム膜の液晶から逆ヘキサゴナル相転移への相転移を蛍光分光学的に初めて明らかにしたものであり、博士（医学）の学位を授与するに値するものと認定された。