

学 位 論 文 題 名

Study on the function of cholesterol for transition of the self assemble structures in phospholipid membranes

(リン脂質膜における自己組織化構造転移に
対するコレステロールの機能に関する研究)

学位論文内容の要旨

生体膜構成脂質は主にリン脂質とコレステロールから成り、それらが互いに相互作用して脂質二重層膜を形成している。これらの脂質は自己組織能が極めて高く、一般には水溶液中で単独では存在できず、その種類や種々の条件（pH、温度、イオン強度等）により様々な分子集合体を自動的に形成する。

一方、エレクトロニクス技術の進んだ今日において、超微細化をめざした分子エレクトロニクス素子の開発が必要とされている。この新しい素子の一つとして1979年、F.L.Carterらによって「分子素子」が提唱された。これはエレクトロニクス素子機能を分子に行わせようとするものである。この分子機能材料の概念には2つの意味があり、一つは、個々の分子自体に機能性を持たせ、それを集積して集団として働きを持たせるもので、もう一つは、個々の分子自体は機能を持たないが、各々を集積することにより分子間での相互作用が起こり、分子全体をシステム化された材料とすることである。この「分子素子」としての観点において、細胞膜中の脂質は非常に興味深い性質を持つ。

そこで本研究では細胞膜構成成分の一つである脂質の持つ自己組織能に着目し、新しい分子素子への応用の可能性を検討した。生体内でのモデルとして、神経系における情報伝達及び情報処理プロセス過程でおきる、シナプス膜での膜融合現象に注目した。シナプス膜を介した情報伝達過程は化学物質を媒体としており、この過程におけるシナプス小胞とシナプス膜との融合が、スイッチング機能を持つ点は分子素子のモデルとして興味深い。膜融合の初期過程は脂質二重層構造(L_α)から逆ヘキサゴナル(H_{II})様構造へと変化する過程で生じる中間状態を経て起こる。生体内では膜融合時に、脂質二重層内のホスファチジルイノシトールサイクル (PI cycle) が活性化され、ジアシルグリセロールの産生量が上がることで、膜融合を起こす膜の組成には、高濃度のコレステロールが存在することから、生体膜での膜融合機構を解明しそれをエレクトロニクスに応用する上で、コレステロールとジアシルグリセロールについてその機能を知ることは重要である。本研究ではこれらの膜融合過程を制御する分子について、その機能を明らかにし、自己組織能による脂質構造体の転移機構を解明する事を目的とした。本論文の構成については以下の通りである。

第1章では本研究の背景及び目的を記載した。

第2章では生体膜、及び脂質の自己集積能とその集合体の形状について、これまでの知見をまとめて記述した。

第3章では本研究で用いた ^{31}P -NMR測定と時間分解蛍光偏光解消法の原理について記述した。 ^{31}P -NMR測定からは膜融合過程での脂質膜全体の形状変化（脂質二重層から逆ヘキサゴナル相に転移）に関する情報が、また時間分解蛍光偏光解消法からは脂質膜中の脂質分子の分子運動に関する情報を得ることができる。

第4章では生体内での膜融合におけるコレステロールの役割を、3章で説明した ^{31}P -NMR法及び蛍光法により測定しその結果を示した。脂質膜組成は、生体膜類似組成であるホスファチジルコリン(PC):ホスファチジルエタノールアミン(PE)=1:1(mol比)とした。この膜にコレステロールを濃度変化させて加えたところ、コレステロール:33mol%、PH7.4、47℃及び57℃でのみ H_{II} 形成が確認された。また、膜融合を誘導するとされているジアシルグリセロール存在下でもコレステロールがないと相変化は起きなかった。このPC:PE:コレステロール=1:1:1(コレステロール:33mol%)の組成は、神経シナプス膜とほぼ同じであり、この結果から神経系における高濃度のコレステロールの存在は合目的的であることが初めて示された。次に、この脂質膜での H_{II} 相形成過程におけるリン脂質極性頭部の分子運動をN-(dimethylaminonaphthalene-5-sulphonyl)-dipalmitoyl-phosphatidylethanolamine (DNS-PE)を蛍光プローブとして測定した。分子運動のパラメータは、円錐内揺動運動モデルによる揺動角度及び揺動拡散速度で表した。この結果、リン脂質頭部の分子運動は段階的な $\text{L}_{\alpha}/\text{H}_{\text{II}}$ 相変化に伴い抑制された。このことは $\text{L}_{\alpha}/\text{H}_{\text{II}}$ 相変化において、コレステロールはリン脂質極性頭部から脂質鎖部へとその位置を変えることで、膜相変化を誘導していることを示唆するものである。

第5章では、 $\text{L}_{\alpha}/\text{H}_{\text{II}}$ 相変化過程でのコレステロールの分子運動を蛍光法により測定した。測定条件は生体条件である37℃、PH7.4を用いた。コレステロールの蛍光プローブは、構造がほぼ同じのデハイドロエルゴステロール(DHE)を用いた。また、コレステロールと同じ小さな極性頭部を持つジアシルグリセロールが、脂質膜の相変化にどのような影響を与えるかを検討した。その結果生体条件下では、PC:PE:コレステロール=1:1:1構成脂質膜において加えるジアシルグリセロール濃度を変化させると、 $\text{L}_{\alpha}/\text{H}_{\text{II}}$ 相変化を段階的に制御できることが示された。このときのコレステロールの運動は、 L_{α} 及び H_{II} 相の混在状態で最も活発になり、 L_{α} 及び H_{II} 相単独状態では運動が抑制されていた。これらの結果から、極性頭部の小さな分子容が脂質膜相変化において重要な役割を持つことが示された。

上記までの実験から、コレステロールの構造が膜融合を誘導する重要な要因となることが示された。しかしコレステロールの膜融合機能を、その構造から検討した報告はこれまでにない。そこで第6章では、膜融合を誘導するコレステロールの働きについて、コレステロールの構造を三カ所に分けて検討した。コレステロールは小さな極性頭部と堅いステロール骨格部、そして短い脂質鎖部から構成される。この極性頭部の分子容は他のリン脂質の極性頭部と比べて非常に小さい。そこで小さな分子容が膜相転移を誘導している可能性を検討するため、コレステロールの極性部の分子容が大きいDC-Chol(3 β [N-(N, N-Dimethylaminoethane) carbamoyl] Cholesterol)を用いて $\text{L}_{\alpha}/\text{H}_{\text{II}}$ 相変化を測定した。次にコレステロールの短い側鎖の働きを明確にするために、コレステロールに長い側鎖を結合させたN/Dec-Chol (26-nor-27-decylcholesterol)を新たに合成し、同様に膜相変化を解析した。その結果、PC:PE=1:1構成脂質膜においてDC-Chol及びN/Dec-Cholを用いた系では温度変化をさせても H_{II} 相は形成されなかった。また37℃、PH7.4のコレステロール存在下で H_{II} 形成を誘導できたDG濃度(5mol%)を加えても、DC-Chol及びN/Dec-Cholでは H_{II} 相は形成されなかった。これらの結果はコレステロー

ルのもつ小さな極性頭部と短い側鎖が、 L_{α}/H_{II} 相転移を誘導しさらに H_{II} 相の安定化に関与していることを示し、また両相の転移をスイッチする機能を持つことを示した。

第7章では本研究全体のまとめとして、脂質の自己組織能を制御しうる要因について、脂質の分子容と脂質膜の曲率及び形状との関係から記述した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 武 笠 幸 一

副 査 教 授 池 田 正 幸

副 査 教 授 下 澤 楯 夫

副 査 教 授 岡 田 亜紀良

副 査 教 授 加 茂 直 樹 (薬学研究科)

学 位 論 文 題 名

Study on the function of cholesterol for transition of the self assemble structures in phospholipid membranes

(リン脂質膜における自己組織化構造転移に
対するコレステロールの機能に関する研究)

エレクトロニクスの急速な進展のなかで、その基礎技術として素子の超微細化および新たな情報処理システムの構築が求められている。これら双方の視点から生物における脳神経システムに学ぶ点が多々ある。生物を特徴づける性質の一つとして構成分子の自己組織能が極めて高いことが挙げられる。神経細胞の微細な構造体形成やシグナル伝達の過程は分子の自己組織能の変化によるものが多い。

そこで本研究ではシナプス細胞膜構成成分の一つである脂質の持つ自己組織能に着目し、その自己組織構造変化の機構を究明し、新しい分子素子への応用の可能性を検討した。シナプス膜は膜融合現象を介して神経系における情報伝達および情報処理プロセスを制御している。膜融合の初期過程は脂質二重層構造(L_α)から逆ヘキサゴナル(H_{II})様構造へと変化する過程で生じる中間状態を経て起こる。膜融合を起こす膜の組成には、高濃度(～30mol%)のコレステロールが存在することから、生体膜での膜融合機構を解明しそれをエレクトロニクスに応用する上で、コレステロールの役割を知ることは重要である。本研究ではコレステロールの他、膜融合過程を制御する幾つかの分子種についてその役割を検討し、コレステロールが L_α と H_{II} 構造変化を制御することを明らかにした。これにより、10nm程度の微小領域に置ける構造変化を人為的に制御しうる可能性が示唆された。

本論文の構成については以下の通りである。

第1章では本研究の背景および目的を記載した。

第2章では生体膜、および脂質の自己組織能と分子集合体の形状について、現在迄に知られている知見をまとめて記述した。

第3章では本研究で用いた ^{31}P -NMR測定と時間分解蛍光偏光解消法の原理について記述した。 ^{31}P -NMR測定からは分子集合体の形状変化(L_α 、 H_{II} 相等)に関する情報が、また時間分解蛍光偏光解消法からは分子運動に関する情報を得ることができる。

第4章では H_{II} 形成とコレステロールの関係を、 ^{31}P -NMR法および蛍光法により測定しその結果を示した。脂質膜組成としては、シナプス膜類似組成であるホスファチジルコリン(PC):ホスファチジリエタノールアミン(PE)=1:1(mol比)を基本とし、この膜にコレステロールを加えたところ、コレステロール:33mol%、pH7.4、47°C以上で H_{II} 形成が確認された。他の濃度では H_{II} 形成が見られなかった。このPC:PE:コレステロール=1:1:1(コレステロール:33mol%)の組成は、神経シナプス膜とほぼ同じであり、この結果から神経膜に見られる30mol%のコレステロールの存在は H_{II} 形成にとって合理的であることが初めて示された。次に、この脂質膜での H_{II} 形成過程におけるリン脂質極性頭部の分子運動をDNS-PEを蛍光プローブとして測定した。この結果、リン脂質頭部の分子運動は H_{II} 形成に伴い抑制されることが見いだされた。

第5章では、 L_{α}/H_{II} 変化過程におけるコレステロールの分子運動の蛍光法による測定結果を示した。コレステロールの蛍光プローブとして、ほぼ同じ構造を持つデハイドロエルゴステロール(DHE)を用いた。PC:PE:コレステロール=1:1:1で構成された脂質膜において L_{α}/H_{II} 構造変化をジアシルグリセロール添加により段階的に制御して、コレステロールの運動を測定した結果、コレステロールは、 L_{α} および H_{II} 構造の混在状態で運動が最も活発になり、 L_{α} および H_{II} 相単独状態では運動が抑制されることが明らかとなった。

第6章では、膜融合を誘導するコレステロールの働きが、コレステロールの小さな極性頭部に由来するか、短い脂質鎖部に由来するかを検討した。コレステロールの極性部の分子容が大きいDC-Chol(3 β [N-(N, N-Dimethylaminoethane)carbamoyl] Cholesterol)をコレステロールの代わりに用いた時、 H_{II} 形成は困難であることが明らかとなった。また、ステロール骨格部に長い側鎖を結合させたN/Dec-Chol(26-nor-27-decylcholesterol)を新たに合成しコレステロールと入れ替えた膜でも H_{II} 形成は困難であった。以上の結果からコレステロールは小さな極性頭部と短い脂質鎖を持つという構造的特徴から、 L_{α} 、 H_{II} 構造を共に安定化する能力を持ち、温度変化等により L_{α}/H_{II} 構造変化を誘導することが結論づけられた。

第7章では本研究全体のまとめとして、脂質の自己組織能を制御しうる要因について、脂質の分子容と脂質膜の曲率および形状との関係から記述した。

これを要するに、本論文は分子の自己組織能に基づいた分子膜構造変化について実験的解明をはかり、有益な多くの新知見を得ており、ナノ分子素子工学ならびに電子材料の分野に貢献するところ大なものがある。

よって本論文は北海道大学博士(工学)の学位を授与される資格あるものと認める。