

飽和ホスファチジルコリン二重膜の構造に及ぼすコレステロールと 2 種類の酸化コレステロールの影響の比較

Comparison of the Effects of Cholesterol and Two Different Oxysterols on the Structure of Saturated Phosphatidylcholine Bilayer Membranes

星野達也, 高橋 浩*

群馬大学 理工学府 理工学基盤部門, 〒372-8510 群馬県前橋市荒牧町 4-2

Tatsuya HOSHINO and Hiroshi TAKAHASHI*

Faculty of Science and Technology, Gunma University,

4-2 Aramaki, Maebashi, Gunma 371-8510, Japan

1 はじめに

コレステロール (Chol) は真核生物の細胞膜や細胞内膜において重要な役割を果たす。その役割の一つは、生体膜の脂質二重層部分の物性を調節することである。形質膜では 20 wt% (~40 mol%) 程度の高濃度の Chol 存在が、その膜に、機械的強度、イオン・小分子等に対しての高い透過障壁、適度な流動性などを与えている[1]。Chol はスフィンゴミエリンや飽和ホスファチジルコリン (PC) とともに液状秩序相を形成し、生体膜においては、この液状秩序相のドメインが液状無秩序相と共存していると考えられている[2]。このドメインは、脂質ラフトと呼ばれ、様々な細胞シグナル伝達プロセスに関与していると提案されている[3]。また、様々な機能に関わる各種の Chol 結合タンパク質が存在する。これらのことから、Chol が直接結合すること、または Chol が誘導する膜物性に变化させることにより、間接的に、膜タンパク質の機能を調節すると考えられている[4]。

Chol の酸化誘導体である酸化コレステロール (酸化 Chol) は、胆汁酸やステロイドホルモンの生成の中間体としての役割を果たす一方で、ある種の酸化 Chol は細胞毒性を示し、いくつかの疾患、例えば、癌、動脈硬化、神経疾患などに関与していることが指摘されている[5]。

ある種の酸化 Chol が、細胞毒性を持つことや疾病を引き起こすのは、受容体タンパク質や調節タンパク質に酸化 Chol が結合することで、それらのタンパク質の機能を変化させてしまうためとの解釈が提案されている[6,7]。それに加えて、酸化 Chol の細胞毒性は、Chol が酸化 Chol への変化によって生体膜の脂質二重膜の物理的性質が、生体機能を発揮するのに最適な状態から変わってしまうことも原因の一つであると考えられている [6,7]。

リン脂質膜の構造は、分子充填度合い、脂質の流動性、膜の弾性率といった生体膜の物性と密接に関係している。本研究では、どちらも細胞毒性を有するが、その程度は異なる 2 種の酸化 Chol、 7β ヒド

ロキシコレステロール (7β OH) と 25-ヒドロキシコレステロール (25OH) の細胞毒性発揮メカニズムの解明に寄与する基礎的な知見を得ることを目指して、この 2 種類の酸化 Chol が、飽和ホスファチジルコリン (PC) であるジパルミトイル PC (DPPC) 二重膜構造に及ぼす影響を、X 線回折測定を用いて調べることとした。また、Chol の場合と比較するために、DPPC/Chol 系でも同様の測定を行った。X 線回折強度データから、電子密度分布を再構成し、膜厚を算出した。この結果と重水を用いた中性浮沈法から求めた分子体積のデータを組み合わせ、膜表面における分子占有面積を推定し、分子充填度合を評価した[8]。

2 実験

放射光を用いた X 線回折測定は BL6A ビームラインで行った[9]。X 線の波長は 0.15 nm であった。2 次元 X 線回折パターンは、 $172\mu\text{m} \times 172\mu\text{m}$ の画素サイズを持つ X 線光子計数型ピクセルアレイ検出器 PILATUS100K、または PILATUS300K(DECTRIS、スイス)を用いて記録した。典型的な露光時間は 30 ~ 120 秒であった。サンプルの温度は、X 線回折用に改良した示差走査熱量計 (FP 84, Mettler-Toledo) を用いて制御した[9]。

脂質サンプルの質量密度値は、通常の水 (H_2O) と重水 (D_2O) の混合物を用いた中性浮沈法により求めて、分子量を考慮し、見かけの分子体積を計算した[11,12]。

3 結果および考察

$\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 混合液を用いた中性浮沈法により推定した 25°C および 50°C における分子あたりの見かけの体積を、ステロールモル分率の関数としてプロットした結果、ほぼ線形の関係であることが分かった。そのデータを基にして、DPPC 膜中における Chol、 7β OH および 25OH の見かけの分子体積の値を計算し、その結果を表 1 にまとめた。液晶相の温度である 50°C で比較してみると、Chol の場合が、見かけの部分分子体積の値が最も小さかった。この結果は、

Chol が脂質分子間の分子充填を密にさせる効果が強いことを示唆している。

表 1 : 温度 25°C および 50°C におけるステロールの部分分子体積

	25°C (nm ³)	50°C (nm ³)
Chol in DPPC bilayers	0.666	0.585
7βOH in DPPC bilayers	0.679	0.623
25OH in DPPC bilayers	0.656	0.582

本研究では、観察された X 線回折強度から電子密度分布を再構成する際に、モデル電子密度分布を仮定して解析を行い、最終的な電子密度分布を決定するという手順をとった。電子密度分布モデルは、可変なパラメーターを含んでいて、電子密度分布モデルから計算される構造因子の値と、実測の回折強度から求めた構造因子の大きさをフィッティングすることで最適なパラメーターを決定した。

図 1 には、そのように決定した最適パラメーター値を含むモデルから計算した各ステロールを 30mol% 含有する DPPC 二重層の温度 25°C および 50°C における電子密度分布を示した。

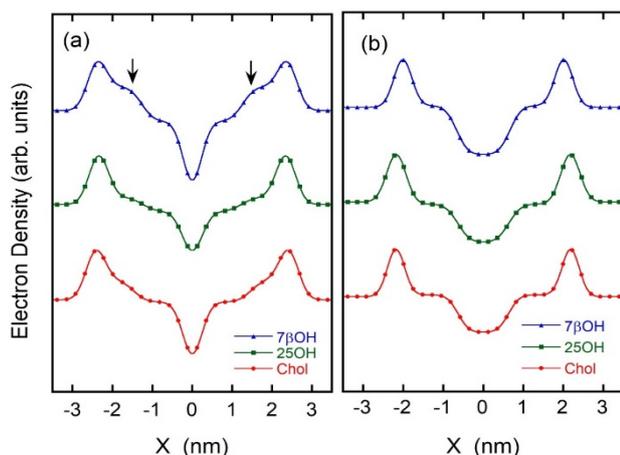


図 1: 可変パラメーターを含む電子密度分布モデルから計算される回折強度と実測の強度を比較して決定された DPPC/7βOH 系、DPPC/25OH 系および DPPC/Chol 系の最適モデル電子密度分布。(a) 25°C および (b) 50°C。

これらの分布は同じ温度では全体的に似た形状をしているが、DPPC/7βOH 系の 25°C では $Q = \sim \pm 1.5 \text{ nm}^{-1}$ で突起が明瞭に認められた。このピークは、7βOH の 2 つの水酸基が、その極性のために、二重膜表面に対してほぼ水平に配向していることを示していると解釈される。リン脂質二重層系の電子密度分布における最も高いピークの位置は、極性頭部におけるリン酸基の位置に対応する。したがって、最も高いピーク間の距離 ($dp-p$) は、リン脂質二重層膜の膜厚の指標と考えることができる。McIntosh

と Simon[13]の提案では、PC 極性頭部と水層との界面は、比較的低分解能の電子密度分布の場合、最も高いピーク位置から 0.5nm ほど先に位置するというのが適当であるとされている。本研究でも、この考え方をを用いた。この仮定に基づいて計算した膜厚の値と、中性浮沈法で求めた見かけの分子体積の値を用いて、膜表面における 1 分子あたりの見かけの占有面積を計算することができる。この占有面積は、DPPC 分子 0.7 個、ステロール分子 0.3 個からなる仮定の脂質分子 1 個が二重層膜表面で占有する面積を意味する。

計算の結果、25°C と 50°C の両温度において、占有面積の順序は、DPPC/7βOH > DPPC/25OH > DPPC/Chol であった (図 2)。つまり、充填密度の順序は、この逆の、DPPC/Chol > DPPC/25OH > DPPC/7βOH であると考えられる。以上の結果から、本研究で調べたステロール類では、Chol が最も強い凝縮効果を有しており、酸化基を添加されることで凝縮効果が低下することが示唆された。

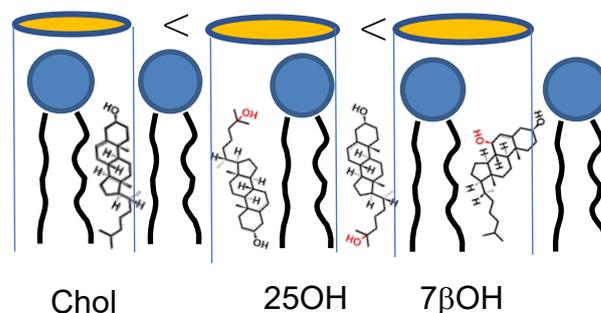


図 2: DPPC 二重膜における各ステロールの分子配向の模式図。図上の楕円板の大きさは、二重層膜表面における分子占有面積を模式的に表している。

4 まとめ

本研究では、見かけの分子体積と膜厚のデータを組み合わせて、膜表面の占有分子面積を推定した。その結果、充填密度の順序が DPPC / Chol > DPPC / 25OH > DPPC / 7βOH であることが示唆された。酸化 Chol を含む、これらの 3 種のステロールのリン脂質膜に対する凝縮効果の強さもこの順であると考えられる。さらに、電子密度プロファイルの形状も考慮すると、DPPC 二重層膜における、これらのステロールの分子配向は、図 2 に模式的に示したようになっていると推定される。この分子配向と凝縮効果の強さの違いが、同じ酸化 Chol でも、25OH と 7βOH とでは、細胞毒性の度合いに違いがあり、疾病との関わりにおいても差があることと関係している可能性がある。凝縮効果が弱ければ、膜の透過障壁としての機能は劣るものになると予想される。

謝辞

X 線回折実験実施において、多大なご支援、ご協力いただいた PF の清水伸隆教授、五十嵐教之教授、

ならびに SAXS ビームラインスタッフの皆様に感謝いたします。重水を用いた脂質質量密度測定において、ご支援、ご助言をいただいた関西学院大学の三好翼博士（現アスタミューゼ社）、木下祥尚博士（現九州大学）、加藤知先生に感謝いたします。

参考文献

- [1] O. G. Mouritsen, A. G. Bagatolli, *Life - As a matter of fat, Lipids in a membrane biophysics perspective* .2016. Springer.
- [2] T. P.W. McMullen *et al.*, *Curr. Opin. Colloid Int. Sci.* **8**, 459 (2004).
- [3] K. Simons and E. Ikonen, *Nature* **387**, 569 (1997).
- [4] J. Grouleff *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1848**, 1783 (2015).
- [5] W. Kulig *et al.*, *Chem. Phys. Lipids*, **199**, 1442 (2016).
- [6] J. B. Massey, *Curr. Opin. Lipidol.* **17**, 296 (2006).
- [7] V. M. Olkkonen and R. Hynynen, *Mol. Aspects Med.* **30**, 123 (2009).
- [8] H. Takahashi and T. Hoshino, *Chem. Phys. Lipids* **227**, 104872 (2020).
- [9] N. Shimizu *et al.*, *J. Phys.: Conf. Ser.* **425**, 202008 (2013)
- [10] H. Takahashi *et al.*, *Chem. Phys. Lipids* **76**, 115 (1995).
- [11] B. W. Koenig and K. Gawrisch, *Biochim. Biophys. Acta* **1715**, 65 (2005).
- [12] T. Miyoshi *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 3069 (2014).
- [13] T. J. McIntosh and S. A. Simon, *Biochemistry* **25**, 4058 (1986).