

# セラミドやジヒドロセラミドがスフィンゴミエリン二重層膜の構造に与える影響

## The impact of ceramide and its dihydro-analog on the structure of sphingomyelin bilayers

木下祥尚,\* 田中かおる, 松森信明

九州大学, 〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744

Masanao KINOSHITA,\* Kaoru TANAKA and Nobuaki MATSUMORI  
Kyusyu University, 744, Motooka, Nishi-ku, Fukuoka, 819-0395, Japan

### 1 はじめに

セラミド(Cer)はスフィンゴシン骨格とアシル鎖で構成される疎水性の高い脂質である(図 1)。通常、Cer は細胞膜のごく微量成分であるが、アポトーシス誘導などの特定の刺激下においてその濃度は急激に上昇し、シグナル伝達が活性化する[1]。また Cer は脂質膜の構造にも影響を与える。例えばリン脂質膜に Cer を混合すると、Cer に富む固い膜領域(Cer-rich 相)が周囲の膜領域(Cer-poor 相)から相分離する。いくつかのシグナル分子が Cer-rich 相に取り込まれ、そこで機能を発現することを勘案すると、Cer-rich 相に関する知見は生体機能発現の機序を理解するために不可欠である。

近年、細胞膜に存在する Cer は主として「脂質ラフト」で生成されることが推測されている[2]。脂質ラフトとはスフィンゴミエリン(SM)に代表されるスフィンゴ脂質(SL)やコレステロールが集積することで形成される秩序的膜領域である。SL の疎水部は Cer で構成されることを考慮すると、Cer が脂質ラフトに由来するという仮説はもっともらしい。事実、SM を phosphatidylcholine (PC)と Cer に分解する酵素である sphingomyelinase は、細胞刺激下で脂質ラフトに局在することは興味深い。しかし、Cer が脂質ラフトの構造に与える影響については解明されていない。本研究では哺乳類の細胞に存在する二種類の Cer (通常の Cer とそのジヒドロ体)が、脂質ラフトの主要成分である SM 膜に及ぼす影響を調査した(図 1)。

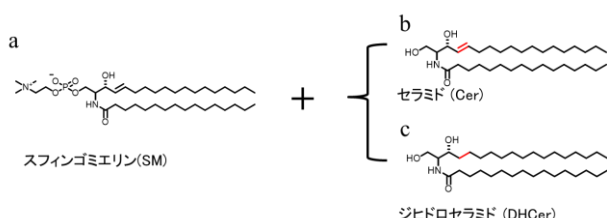


図 1 : 本研究で使用した(a)スフィンゴミエリン、(b)セラミドおよび(c)ジヒドロセラミドの分子構造

### 2 実験

SM (C16:0) に対して Cer やそのジヒドロ体 (DHCer) を加え、有機溶剤中で混合したあと、N<sub>2</sub> 気

流化で乾燥させた。その後、真空中に一晩放置することで有機溶剤を完全に除去した。この乾燥脂質フィルムを水中に懸濁することで、多重層膜ベシクルを作製した。このとき SM の最終濃度が 20wt% になるように調製した。作製した試料はカプトンフィルムを用いてワッシャー内に封入した。試料の温度は示差走査熱量計 (FP 84, Mettler-Toledo, UT) で調節した。広角 X 線散乱 (WAXD) 測定は Photon factory BL-6A で行った。X 線の波長を 1.5 Å に固定し、カメラ長はベヘン酸銀を用いて校正した。試料からの散乱は PILATUS 100 K を用いて検出し、得られた Debye-Scherrer パターンの一部は WAXD 解析ソフト Flounder (<http://pfwww.kek.jp/saxs/beamline.html>) を用いて 1 次元化した。得れた一次元化プロファイルは Origin Pro 2015 (Light Stone, Tokyo, Japan) を用いて解析した。

### 3 結果および考察

まず、Cer や DHCer (Cers と総称する) が SM 膜に与える影響を調査するため、SM/Cers 二成分リポソームの蛍光顕微鏡観察を行った(図 2)。その結果、室温において SM/Cers 混合膜は Cers-rich/Cers-poor 相分離を生じることが分かった。さらに熱測定を用いた解析により、Cer-rich 相の組成は SM/Cer=85:15 (mole/mole) であるのに対して DHCer-rich 相では SM/DHCer=82.5:17.5 (mole/mole) となり、わずかに組成が異なることも分かっている[3]。

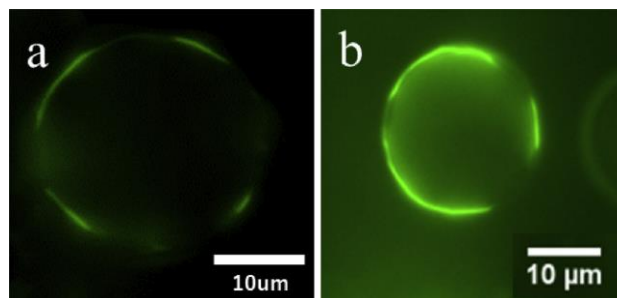


図 2 : 5 mol% Cer (a) および DHCer (b) を含む SM 単層膜巨大リポソームの蛍光顕微鏡写真。試料には Cer-poor 相に親和性を持つ蛍光物質 Bodipy-PC を混合してあるため、明るい領域が Cer-poor 相、暗い領域が Cer-rich 相に対応する。

次に、WAXD 測定により **Cers-rich** 相の脂質炭素鎖の充填構造を調査した。**Cer-rich** 相 (SM/Cer=85:15 mole/mole) と **DHCer-rich** 相 (SM/DHCer =82.5:17.5 mole/mole) の炭素鎖充填構造に由来する WAXD プロファイルを図 3a に示した。いずれの相からも単一の鋭い散乱が得られ、炭素鎖が膜面に対して垂直に配向したヘキサゴナル充填を形成することが分かった。また、ピーク位置を温度に対してプロットしたところ **Cer-rich** 相と **DHCer-rich** 相はほぼ同じ位置に散乱ピークが得られ、炭素鎖充填構造に顕著な違いはないことが分かった(図 3b)。一方、**Cer-rich** 相に比べて **DHCer-rich** 相では高温領域まで鋭い散乱パターンが検出され、**DHCer-rich** 相が高い温度安定性を有することが明らかになった。次に、ピーク幅を温度に対してプロットしたところ、**Cer-rich** 相に比べて **DHCer-rich** 相ではシャープな散乱ピークが得られることが分かった(図 3c)。この結果を基に、我々は **DHCer-rich** 相内部では大きな結晶子が形成しているのではないかと推測した(図 4)。

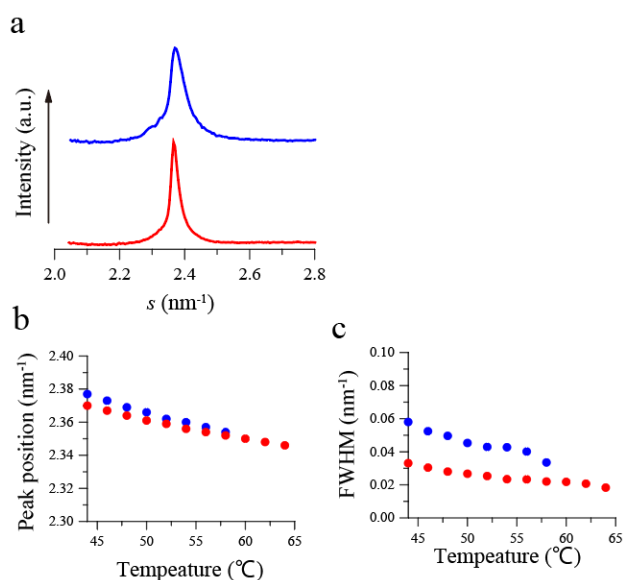


図 3 : (a) **Cer-rich** 相と **DHCer-rich** 相の WAXD プロファイルをそれぞれ青と赤で示した。(b) と(c)はそれぞれピーク位置と半値幅を温度に対してプロットしたもの。**Cer-rich** 相と **DHCer-rich** 相の値をそれぞれ青色と赤色でプロットした。

このことを確認するため、我々は **Cer-rich** 相について膜透過性試験を行った。以前より、水分子は結晶子間に生じる格子欠陥を透過することが知られている[4]。その場合、結晶子サイズが大きい **DHCer-rich** 相では、水の透過性が抑制されるはずである。実際、**Cers-rich** 相を形成する単層膜リポソームに浸透圧を印加し、そのサイズ変化を指標に水の透過性を評価したところ、**DHCer-rich** 相では **Cer-rich** 相に比べて水分子の透過性が有意に低いことが分かった[3]。

以前より、**DHCer** は **Cer** に比べて優れた水素結合能を有することが推測されている。我々は、**DHCer-rich** 相で生じる大きな結晶子の形成は、**DHCer** の高い水素結合能に起因するのではないかと推察している。

#### 4 まとめ

本研究では哺乳類の細胞に存在する二種類の **Cers** が、**SM** 膜の構造に及ぼす影響を調査した。その結果、**SM/Cers** 混合膜では **Cers-rich/Cers-poor** 相分離が生じることが分かった。また、温度走査 WAXD 測定により、**Cer-rich** 相に比べて **DHCer-rich** 相は温度安定性が高いことや、**DHCer-rich** 相内部では大きな結晶子が形成されることを示唆する結果を得た。本研究により、**Cers** のわずかな構造の違いが脂質膜の物性や構造に影響を与えることが明らかになった。

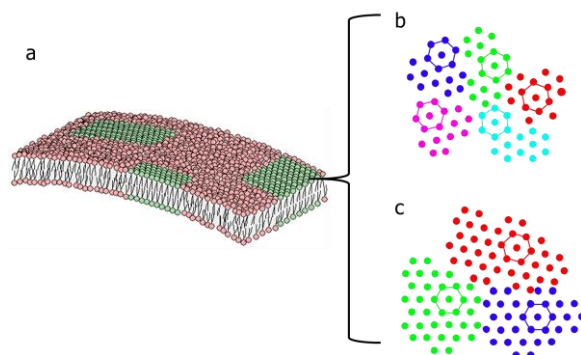


図 4 : (a) **Cers-rich/Cers-poor** 相分離膜の模式図と、(b) **Cer-rich** 相と(c) **DHCer-rich** 相の脂質炭素鎖充填構造。各プロットは脂質膜を真上から見たときの炭素鎖の位置を示す。各結晶子は色を変えて示した。

#### 謝辞

ビームラインのセットアップに関して、BL-6A ご担当のスタッフの皆様にお礼を申し上げます。

#### 参考文献

- [1] Obeid *et al.*, 1993. *Sicence* 259, 1769–1771.
- [2] Gulbins *et al.*, 2004. *J. Mol. Med.* 82, 357–363.
- [3] Kinoshita *et al.*, 2020. *Chem. Phys. Lipids* 226, 104835.
- [4] Cass and Finkelstein, 1967. *J. Gen. Physiol.* 50, 1765–1784.

#### 成果

1. Kinoshita *et al.*, 2020. *Chem. Phys. Lipids* 226, 104835.
2. 木下祥尚ら「セラミドとそのジヒドロ体がスフィンゴミエリン膜に及ぼす影響」, 日本化学会第 98 春季年会, 平成 30 年 3 月
3. 田中かおるら「スフィンゴミエリン・セラミド混合膜に各ジヒドロ体が及ぼす影響の比較」, 膜シンポジウム, 平成 29 年 11 月

\* kinoshi@chem.kyushu-univ.jp