

擬環状エーテル結合型リン脂質の膜物性と分子パッキング Membrane Properties and Molecular Packing of Amacrocylic Ether-Linked Phospholipid

土田直之¹, 高木俊之², 高橋 浩³, 吉原利忠¹, 飛田成史¹, 園山正史^{1,4,5}

¹群馬大学大学院理工学府 分子科学部門, 〒376-8515 桐生市天神町 1-5-1

²産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門, 〒305-8565 茨城県つくば市東 1-1-1

³群馬大学大学院理工学府 理工学基盤部門, 〒371-8510 前橋市荒牧町 4-2

⁴群馬大学未来先端研究機構元素科学研究部門, 〒376-8515 桐生市天神町 1-5-1

⁵群馬大学食健康科学教育研究センター, 〒376-8515 桐生市天神町 1-5-1

Naoyuki TSUCHIDA¹, Toshiyuki TAKAGI², Hiroshi TAKAHASHI^{3*},
Toshitada YOSHIHARA¹, Seiji TOBITA¹, SONOYAMA^{1,4,5}.

¹Division of Molecular Science, Graduate School of Science and Technology, Gunma University, Kiryu, Gunma 376-8515, Japan

²Cellular and Molecular Biotechnology Research Institute, AIST, Tsukuba, Ibaraki 305-8565, Japan

³Division of Pure and Applied Science, Graduate School of Science and Technology, Gunma University, Maebashi, Gunma 371-8510, Japan

⁴Gunma University Initiative for Advanced Research (GIAR), Gunma University, Kiryu, Gunma 376-8515, Japan

⁵Gunma University Center for Food Science and Wellness (GUCFW), Gunma University, Kiryu, Gunma 376-8515, Japan

1 はじめに

生物分類学において、全生物を大きく3つのドメイン、すなわち、真核生物、真正細菌、古細菌の3つに分類する考え方が定着してきている。原核生物において、古細菌は、リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列の違いによって、真正細菌と区別される[1]。古細菌の細胞を形作る生体膜脂質がエーテル結合型脂質であることも特徴の1つである[2,3]。さらに、古細菌の膜脂質に特異な特徴として、エーテル結合型リン脂質分子がフィタニル鎖の単一または二重の中間層ブリッジを介して架橋され二量体、すなわち、1分子に2つの極性頭部を持つ大環状化合物となっている点も挙げられる[2,3]。真核生物、真正細菌の普通の膜脂質は、疎水鎖はエステル結合で繋がっており、環状にもなっていない。

古細菌は、熱水近くの高塩環境や高イオン強度の塩湖など、極限環境に生息していることが多い。上記に述べた古細菌の生体膜脂質の特徴が、古細菌の生体膜に高い熱安定性と低い膜透過性を与え、古細菌が高温や高塩濃度環境に適応できたと考えられている[2,3]

しかしながら、エーテル結合、それに環状であることが分子機構的に、どう生体膜の安定性に寄与しているかの詳細は十分には研究されていない。そこで、本研究では、環状であることの効果の詳細を調べる目的で、あえて擬環状、つまり、リン脂質の2

本の疎水鎖の内一方だけを結びつけた擬環状エーテル結合型リン脂質を合成し、その膜物性と膜における分子パッキングを調べた[4]。

生体膜の機能の直接的な担い手は、脂質膜に埋め込まれた膜タンパク質であるが、膜脂質も間接的に生体膜の機能に関与すると考えられている。実際、モデル膜系では、膜タンパク質の周囲を取り囲む脂質の分子種を変えることで、膜タンパク質の機能が調整されることが知られている[5]。

最も多くの研究が成されている膜タンパク質は、高度好塩菌の紫膜に存在する光ポンプ機能を持つバクテリオロドプシンドプシン(bR)である。膜タンパク質の膜貫通部分と脂質膜の疎水性領域の長さ是一致する必要がある[5]、そのため、bRを用いたモデル膜系の実験では、炭化水素鎖における炭素の数が14個のリン脂質を使用することが普通である。哺乳動物の細胞膜に最も多く含まれる膜リン脂質は、ホスファチジルコリン(PC)である。14個の炭素原子を含む飽和の脂肪酸側鎖を持つ2本鎖のPCは、ジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC)

(図1(a))であり、DMPCは、エステル結合で疎水鎖をグリセロ骨格に繋いでいる。DMPCのエステル結合をエーテル結合に代えたリン脂質は、1,2-di-O-tetradecyl-sn-glycero-3-phosphocholine(di-O-C14PC)

(図1(b))であり、本研究では、新たに、このdi-O-C14PCの一方の炭化水素鎖を繋げた擬環状エー

テル型リン脂質 1,1'-*O*-octacosamethylene-2,2' -di-*O*-tetradecyl-bis-(*sn*-glycero)-3,3' -diphosphocholine (AC-(di-*O*-C14PC)₂) を合成して実験を行った。

AC-(di-*O*-C14PC)₂ 膜の相転移挙動を熱測定で、膜における分子パッキングは X 線回折で調べた。さらに、界面活性剤でベシクルを不安定化させた時に、ベシクル内に閉じ込めた蛍光物質が、ベシクルからどれほどの量漏出するかを調べ、ベシクルの安定性を評価した。これらの結果を、通常のエステル型リン脂質 DMPC、エーテル型リン脂質 di-*O*-C14PC からなる膜で同じ実験を行った際に得られた結果と比較し、擬似環状構造にしたことの効果を検討する。

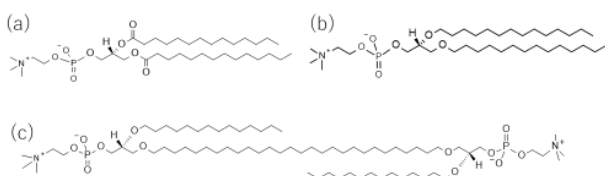


図1：本研究で使用したリン脂質の化学構造。(a) エステル型リン脂質 DMPC, (b) エーテル型リン脂質 di-*O*-C14PC, (c) 擬環状エーテル型リン脂質 AC-(di-*O*-C14PC)₂

2 実験

リン脂質 DMPC と di-*O*-C14PC は、Avanti Polar Lipids 社から購入したものを、精製せずそのまま使用した。擬似環状エーテル型リン脂質 (AC-(di-*O*-C14PC)₂) は、[4]で報告した方法で合成した。

示差走査熱量 (DSC) 測定は、SEIKO-DSC6100 装置を用いて、温度走査速度 1.0 Kmin⁻¹ で行った。放射光を用いた X 線回折測定は BL6A[6]および BL10C[7]ビームラインで行った。X 線の波長は 0.15 nm (BL-6A) と 0.10 nm (BL-10C)であった。X 線回折パターンは、X 線光子計数型ピクセルアレイ検出器 (PILATUS) を用いて記録した。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[8]。

ベシクルの安定性の評価は、水溶性蛍光色素である Carboxyfluorescein (CF) を利用して行った。CF は高濃度になると消光する性質を持つ。ベシクルに CF を内包させた後、そのベシクルに界面活性剤を作用させベシクルを不安定化させ、CF をベシクル外に漏出させる。ベシクルに内包されている時は、CF は高濃度で存在するので蛍光強度は弱い、ベシクルから漏出して、外液中に存在するようになると消光効果はなくなり、蛍光強度が増大する。実験では、DMPC と di-*O*-C14PC は、4.5 mM の濃度に、AC-(di-*O*-C14PC)₂ は、di-*O*-C14PC の二量体であることを考慮し 2.25 mM の濃度になるように CF 内包ベシクルを調製した。濃度 0.1% TritonX-100 (界面活性剤) を加えて CF 内包ベシクルを不安定化させた。日立ハイテクサイエンスの F-4500 蛍光分光計を用いて、励起波長 495 nm で、波長 520 nm の蛍光強度を測定した。

3 結果および考察

図2に、DSC 測定の結果を示した。脂質濃度は、50 から 100mM で、十分に水和し、過剰水が存在する条件で測定が行われた。この図の DMPC と di-*O*-C14PC の結果を比較すると、通常のエステルをエーテル結合に代えても、転移温度は大きくは変化しないことが分かる。エーテル化に加えて、擬環状化すると大幅に転移温度が上昇した。また、二量体化することで転移エンタルピーは 2 倍以上に増加した。これらの結果より、di-*O*-C14PC と比較すると擬環状の AC-(di-*O*-C14PC)₂ 分子の膜における分子パッキングがより秩序だっていることが推定される。

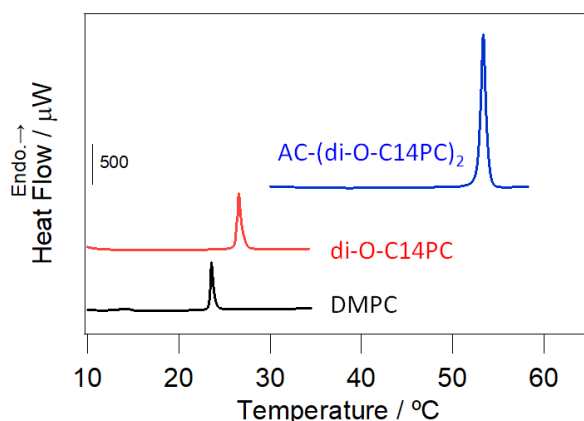


図2：DSC 測定で得られたサーモグラム。ベースラインの位置が見やすいようにシフトしてある。

上記の推定は、X 線回折により正しいことが確認された。図3に、di-*O*-C14PC 膜と AC-(di-*O*-C14PC)₂ 膜の疎水鎖のパッキング構造を反映する広角領域の X 線回折像を示した。両サンプルとも、転移温度以下で測定したもので、疎水鎖の規則格子の回折ピークが観察されている。ピーク幅を比較すると、AC-(di-*O*-C14PC)₂ の方が明らかに鋭く、分子が高い秩序度でパッキングしていることが分かった。

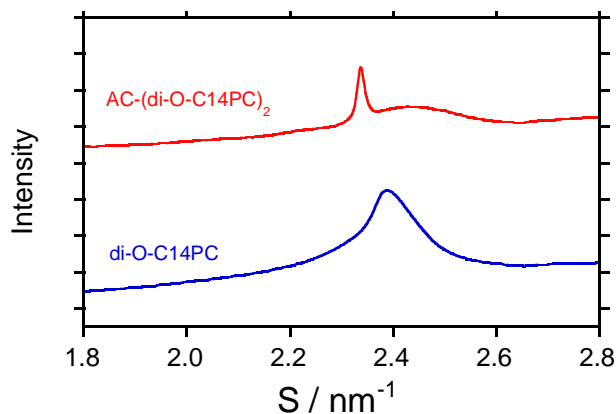


図3：AC-(di-*O*-C14PC)₂(30 °C)および di-*O*-C14PC(20 °C)の広角 X 線回折像。

図4は、界面活性剤により不安定化したベシクルから漏出した蛍光物質 CF の割合の時間変化を示したものである。実験は、すべてのベシクルが流動相の状態にある温度 60℃で行った。ここに示していないが、転移温度以下の 10℃では、調べた全てのサンプルにおいて CF の漏出率は 500 分後でも 10%程度 のほぼ同じ数値を示し、ベシクルの安定性に関して差は認められなかった。一方、図4から分かるように、転移温度以下の 10℃の場合と比較すると、CF 漏出率は全てのサンプルで増大しているが、擬環状の AC-(di-O-C14PC)₂ベシクルの CF 漏出率は、di-O-C14PC ベシクルおよび DMPC ベシクルと比較すると半分程度に抑えられていることが分かる。片側の 1 本だけでも疎水鎖を繋ぐことは、ベシクルの安定性に大きく寄与することが示された。

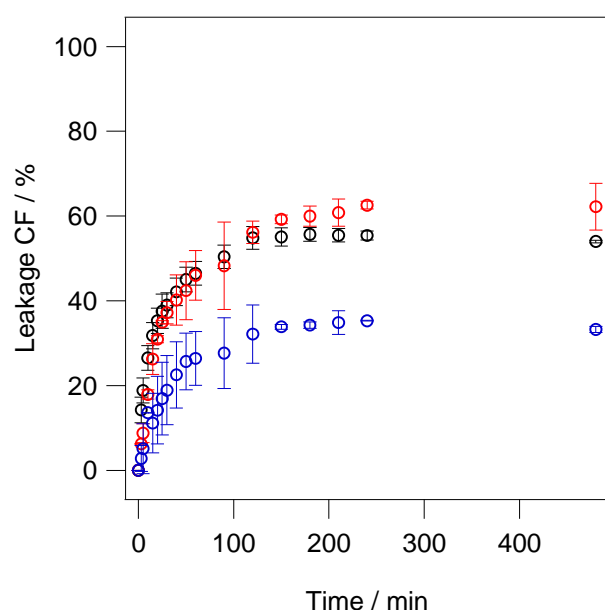


図4：温度 60℃における DMPC（黒）、di-O-C14PC（赤）、AC-(di-O-C14PC)₂（青）のそれぞれのベシクルからの CF 漏出率の時間変化。

4 まとめ

古細菌の膜脂質の多くは、他の生物と異なり、エーテル結合を持ち、連続した疎水鎖で2つの極性頭部を結ぶ環状化合物である[2,3]。このことが高温環境などの極限環境に、古細菌が適用できた要因の一つであると考えられてきている。本研究により、エーテル結合であることよりも、疎水鎖を繋ぐ効果の方が、流動相（高温相）のベシクルの安定性への貢献度が高いことが示唆された。

また、1 本鎖のみをポリメチレン鎖を介した架橋でも、転移温度は約 50℃（図2）に上昇したことから考えると、2 本の疎水鎖をこの方式で結合させて生じる大環状エーテル結合型リン脂質は、極めて高い転移温度を持ち、と同時に、極めて高い剛性を持った膜を形成すると推測される。あまりにも高い剛

直性は、生体膜の機能発揮には反って不利であると考えられる。実際古細菌の膜脂質では、疎水鎖の架橋部分に、フィタニル鎖とシクロペンタン環を含むことが多く[2,3]、それにより、分子パッキングを適度に緩め、膜の剛直性が減少し、膜タンパク質の機能に適した膜物性を提供するようになっているものと想像される。

謝辞

放射光 X 線回折実験において、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、並びに SAXS ビームラインスタッフの皆様にご感謝いたします。

参考文献

- [1] C. R. Woese and G. E. Fox, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5088 (1977).
- [2] M. De Rosa *et al.*, *Microbiol. Rev.* **50**, 70 (1986).
- [3] Y. Koga, *J. Mol. Evol.* **78**, 234 (2014).
- [4] N. Tsuchida *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1863**, 183569 (2021).
- [5] M.Ø. Jensen and O.G. Mouritsen, *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 205(2004).
- [6] N. Shimizu *et al.*, *J. Phys. Conf. Ser.* **425**, 202008 (2013).
- [7] N. Igarashi *et al.*, *J. Phys. Conf. Ser.* **272**, 012026 (2011).
- [8] H. Takahashi *et al.*, *Chem. Phys. Lipids* **76**, 115 (1995).

* hirotakahashi@gunma-u.ac.jp