

# コレステロール、ラノステロール、酸化コレステロールの不飽和リン脂質膜の膜構造に対する効果の比較

## Comparison of the effects of cholesterol, lanosterol, and oxysterol on the bilayer structure of unsaturated phospholipid membrane

岡山杏由美<sup>1</sup>, 和田康平<sup>2</sup>, 星野達也<sup>1</sup>, 高橋 浩<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>群馬大学 大学院 理工学部, 〒371-8510 群馬県前橋市荒牧4-2

<sup>2</sup>群馬大学 理工学部, 〒371-8510 群馬県前橋市荒牧 4-2

Ayumi OKAYAMA<sup>1</sup>, Kohei WADA<sup>2</sup>, Tatsuya HOSHINO<sup>1</sup>, and Hiroshi TAKAHASHI<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Pure and Applied Science, Graduate School of Science and Technology, Gunma University,

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

<sup>2</sup> School of Science and Technology, Gunma University,  
14-2 Aramaki, Maebashi, Gunma 371-8510, Japan

### 1 はじめに

膜ステロールは、脂質二重膜の物理的性質を調節することにより、生体膜の機能に貢献している。哺乳類における代表的なステロールであるコレステロール (Chol) は、ラノステロール(Lan)の酸化によって生合成される。分子進化の観点からは、Lan は Chol の祖先分子と考えられている[1]。Chol の膜における役割は、膜の機械的強度の強化とバリア機能の増大である。流動的なリン脂質膜に Chol を添加すると分子パッキングは密になり、膜厚は増加することが、これまでの研究から明らかにされている。本研究では、Chol が Lan よりも脂質二重層の膜構造および物性を調節する上で優れているかどうかを、リン脂質からなるモデル生体膜への構造的影響という観点から検討した。

比較のために、Chol がさらに酸化されて生成する酸化コレステロールについても調べた。リン脂質には哺乳類の生体膜に多く含まれる、不飽和鎖と飽和鎖の両方を持つ 2 本鎖の 1-パルミトイル-2-オレオイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン (POPC) を使用しモデル膜を作製した。酸化コレステロールには細胞毒性の高い 7 $\beta$ -ヒドロキシコレステロール (7 $\beta$ OH) [2]を使用した。見かけの分子体積は、軽水 (H<sub>2</sub>O) と重水 (D<sub>2</sub>O) を用いた浮沈法により決定した質量密度から算出した。二重膜の厚さはステロール濃度 30 mol%における POPC/ステロール混合物の X 線回折強度データから電子密度分布を再構成することにより求めた[3]。

### 2 実験

#### 2.1 試料

POPC は Avanti Polar Lipids 社から、Chol と 7 $\beta$ OH とおよび平均分子量 40,000(g/mol)のポリ (ビニルピロリドン) (PVP)は、Sigma-Aldrich 社から、Lan は長良サイエンス社から、D<sub>2</sub>O は、富士フイルム和光純薬社) から購入した。それらは、精製せずにそのまま使用した。使用した純水は、ミリポア社の超純水作製装置を用いて準備した。重水の密度は、Anton Paar 社製振動式密度計 DMA-4500M を用いてチェックした。

#### 2.2 X線回折

脂質膜系の構造パラメーターを決定するために、高エネルギー加速器研究機構 (KEK) のフォトンファクトリー (PF) の小角散乱ステーション BL6A および BL10C で X 線回折測定を行った。使用した X 線の波長は、BL-6A で 0.15 nm、BL-10C で 0.10 nm であった。カメラ長距離は、BL-6A では約 900 mm、BL-10C では約 500 mm であった。正確なカメラ長は、標準サンプル:ベヘン酸銀の回折パターンから決定した。2 次元回折像を 1 次元の強度データに円周積算で変換する処理は、Fit2D (<https://www.esrf.fr/computing/scientific/FIT2D/>)を利用して行った。

#### 2.3 分子体積測定

脂質系の質量密度は、H<sub>2</sub>O と D<sub>2</sub>O の混合物を用いた浮沈法により測定した。脂質系の質量密度は H<sub>2</sub>O と D<sub>2</sub>O の中間にあるため、モル比の異なる H<sub>2</sub>O /D<sub>2</sub>O 混合液中での脂質系の沈降・浮遊挙動を観察することで、脂質系の質量密度を調べることができると考えられる。これが浮沈法の原理である。サンプルの沈殿または浮遊を迅速に行うため遠心分離処理した。

上記の浮沈法によって得られた質量密度( $\rho$ )のデータは、リン脂質/ステロール二元混合系の小胞のものである。 $X_{st}$ は、ステロールのモル分率として、 $X_{st}$ における、見かけの分子体積( $V(X_{st})$ )は、質量密度( $\rho$ )から以下のように計算した。まず、Greenwoodら[4]に従って、見かけの分子量( $M_{ap}$ )を次のように定義した：

$$M_{ap} = X_{st}M_{st} + (1 - X_{st})M_{POPC},$$

ここで、 $M_{st}$ と $M_{POPC}$ はそれぞれステロールとPOPCの分子量である。そして、分子あたりの見かけの体積 ( $V_{ap}(X_{st})$ ) は、次式で計算した。

$$V_{ap}(X_{st}) = \frac{M_{ap}}{N_A \rho},$$

ここで、 $N_A$ はアボガドロ数である。

### 3 結果および考察

#### 3.1 分子体積

算出した見かけの分子体積の $X_{st}$ 依存性を、図1に示した。測定温度は、25°Cである。その温度に、おける純粋なPOPCの見かけの分子体積は1.250 nm<sup>3</sup>と計算された。この値は、同じ方法で測定された温度25°Cの既報の値 (1.2565 nm<sup>3</sup>) [4]と、温度差を考慮するとほぼ一致している。

POPCと比較して、Lanと7 $\beta$ OHの分子体積はCholの分子体積とそれほど変わらず、POPCよりも小さい。したがって、これらのステロール分子をPOPCと混合した場合、ステロール濃度が高くなるにつれて、見かけの分子体積は減少すると考えられる。予想通り、質量密度の値から計算される1分子あたりの見かけの体積は、 $X_{st}$ の値が大きくなるにつれて減少した(図1)。

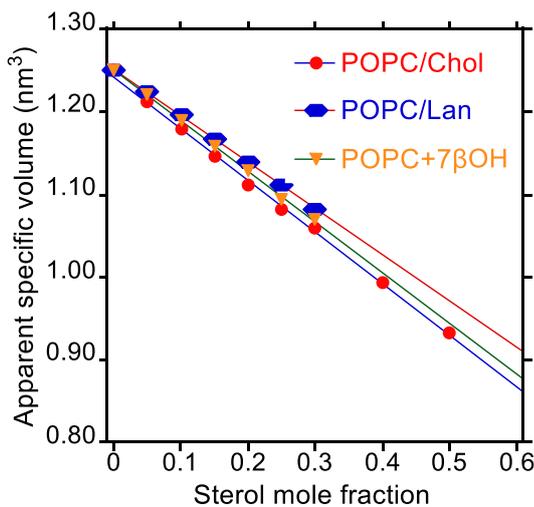


図1：ステロールのモル分率( $X_{st}$ )の関数としての見かけの1分子あたりの体積 ( $V_{ap}(X_{st})$ ) のグラフ

本実験結果では、実験誤差の範囲内で直線的に減少しているように見えるため、最小二乗法による外挿で $X_{st} = 1.0$ での値、すなわち、POPC膜中でのステロールの見かけの分子体積を求めた。その結果、Chol、7 $\beta$ OH、Lan、それぞれの体積は、0.617 nm<sup>3</sup>、0.638 nm<sup>3</sup>、0.691 nm<sup>3</sup>であった。7 $\beta$ OHとLanの分子体積は、付加的なOH基とメチル基の存在により、Cholよりも大きい分子体積の値となっている。

#### 3.2 電子密度分布

図2には、X線回折から得られたラメラ反射の強度データから計算した膜面の法線方向の電子密度分布を示した。計算に必要な位相は、PVPを用いた膨潤法により得られた強度データから、sampling定理を用いて構造因子を推定する方法[5]で決定した。温度は25°Cで、 $X_{st} = 0.30$ である。これは、動物細胞の細胞膜中のChol濃度が、膜タンパク質を除いた膜脂質成分中に約30mol%である[6]ことを考慮したためである。

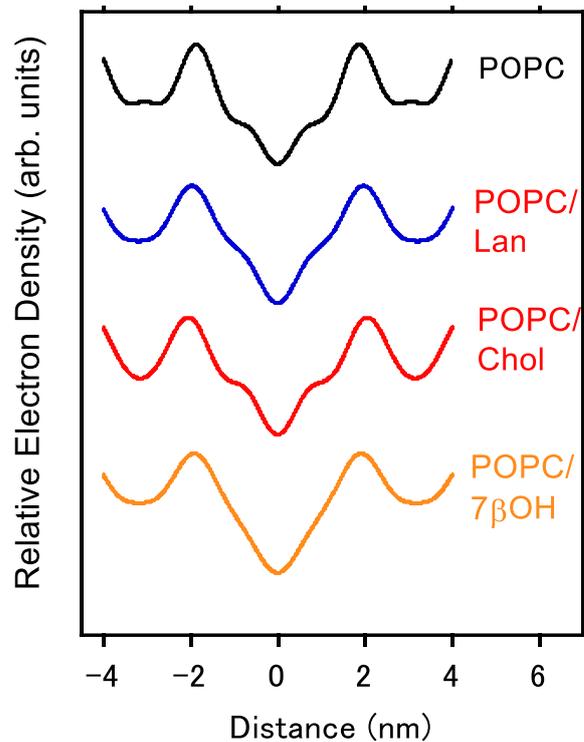


図2：ラメラ回折強度データから再構成した相対的な電子密度プロファイル。二重層膜の中心を距離0と置いた。

電子密度分布において、最も高いピークの位置は、POPCの極性頭部基のリン原子の位置に対応する。本研究では、このリン原子の位置から0.5 nmほど先がPC二重膜の端であるというMcIntoshとSimon[5]の提案を採用した。この仮定を用いて計算した二重層の厚さ( $D_B$ )は、純粋なPOPC系、POPC/Chol系、POPC/Lan系、POPC/7 $\beta$ OH系において、それぞれ、

4.71 nm、5.10 nm、4.93 nm、4.81 nmであった。今回研究した3種のステロールの中で、Cholが最も強い二重層の厚み拡大効果を持つことがわかった。

### 3.3 界面における占有面積

二重層は2つの分子層からなる。したがって、単成分系を考える場合、二重層膜における分子体積を二重層の厚さの半分で割った値が、二重層内の単独の脂質分子が占める面積となる。

これと同様に、PC-ステロールの二元系では、見かけの分子体積 ( $V_{ap}(X_{st})$ ) を  $D_B/2$  で割ることによって、0.7個分のPOPCと0.3個のステロールからなる仮想的な分子を想定して、その1分子あたりの見かけの占有面積 ( $A_o$ ) を算出することができる。占有面積 ( $A_o$ ) の大きさの順番は、POPC/7 $\beta$ OH系 (0.445nm<sup>2</sup>)、POPC/Lan系(0.438nm<sup>2</sup>)、POPC/Chol系 (0.417nm<sup>2</sup>)であった。この順は、単純にステロールのPOPC膜中での見かけの分子体積の順番とは一致していない。

### 3.4 van der Waals 分子体積との比較

オープンソースのケムインフォマティクスソフトウェアであるRDKit (<https://www.rdkit.org/>) を用いて計算したChol、7 $\beta$ OH、Lanのvan der Waals (vdW) 分子体積は、それぞれ0.414nm<sup>3</sup>、0.422nm<sup>3</sup>、0.441nm<sup>3</sup>であった。

分子のvdW体積は、各原子のvdW半径と化学結合長に基づいて計算される、真空中で分子が占める体積の尺度である。対照的に、浮沈法によって決定されるステロールの見かけの分子体積 (POPC二重層中のステロールの分子部分体積) は、脂質集合体内でステロール分子1個が占める体積を反映している。したがって、ステロールの見かけの分子体積は、当然vdW分子体積とは異なる。7 $\beta$ OHの場合、vdW分子体積はCholの1.02倍、見かけの分子体積は1.03倍である。一方、Lanの場合、これらに対応する値は、それぞれ1.07と1.12である。1.02と1.03の間にはほとんど差がないため、脂質集合体の占有体積である見かけの分子体積の増加は、Cholに比べて7 $\beta$ OH分子自体のサイズが大きくなったことで説明できる。しかし、Lanでは、vdW分子体積の増加 (1.12と1.07) 比から推定される値よりも見かけの分子体積の方が大きい。vdW分子体積がPOPC二重膜中のステロールの見かけの部分体積と一致しない理由の一つは、分子運動によるものであると考えられる。vdW分子体積は温度に依存しない。金属結晶でさえ、体積は温度の上昇とともに格子振動が大きくなるにつれて増加する。ステロールは比較的硬い分子であるのに対し、リン脂質の炭化水素鎖は柔軟で、比較的自由に変動することができる。3種のステロールについて、vdW分子体積と見かけの部分体積の差は、Lanで最も大きかった。実際、本研究で決定されたPOPC二重膜中の見かけの分子体積を

vdW分子体積で割った値は、Chol、7 $\beta$ OH、Lanでそれぞれ1.49、1.51、1.57であった。Lanだけが大きな値を示した。これは、Lanがでこぼこした分子形状をしているため、リン脂質の炭化水素鎖が大きく変動する空隙が大きくなっているためと考えられる。言い換えれば、Lanの分子形状はPOPC分子の炭化水素鎖とうまくフィットしないということであろう。

## 4 まとめ

我々は、3種類のステロールがモデル生体膜に及ぼす影響を調べるため、ステロール含有モデル生体膜系の構造解析を行った。生体膜の二重層は、その機能に適した物理的性質を持たなければならない。細胞やオルガネラの内部と外部の境界として機能するために、生体膜は物質の透過に対するバリアとして機能する必要がある。検討された3つのステロールの中で、Cholが最も効果的に膜の特性を向上させた。すなわち、Cholは、POPC二重膜の厚みを最も増加させ、横方向の占有率を減少させるのに最も大きな影響を与えた。Cholの分子進化上の前身であるLanは、Cholよりも、その効果が低かった。さらに酸化コレステロール (7 $\beta$ OH) は、膜特性 (膜厚) を効果的に増強しなかった。その分子特性は神経障害[2]に関係しているのかもしれない。

## 謝辞

本研究は、PF小角散乱ビームラインスタッフの皆様による多大な協力があってこそ出来た研究成果です。関係者に対して感謝申し上げます。

## 参考文献

- [1] A.E. Bloch, *CRC Crit. Rev. Biochem.* **14**, 47–92 (1983).
- [2] J. Y. Chang and L. Z. Lui, *Neurochem. Int.* **32**, 317–323 (1998).
- [3] A. Okayama *et al.* *Chem. Phys. Lipids.* **259**, 105376 (2024).
- [4] A. I. Greenwood *et al.* *Chem. Phys. Lipids.* **143**, 1–10 (2006).
- [5] T. J. McIntosh and S.A Simon, *Biochemistry* **25**, 4058–4066 (1986). (2011).
- [6] G. van Meer and A. I. de Kroon, *J. Cell Sci.* **124**, 5–48

\* hirotakahashi@gunma-u.ac.jp