

酸化コレステロールを含有するリン脂質膜の相転移と構造変化 Phase Behavior and Structural Change of Phospholipid Bilayer Containing Oxysterol

星野達也¹, 高橋 浩^{1,2,*}

¹群馬大学大学院工学研究科, 〒371-8510 前橋市荒牧町 4-2

²群馬大学理工学研究院, 〒371-8510 前橋市荒牧町 4-2

Tatsuya Hoshino¹ and Hiroshi Takahashi^{1,2,*}

¹ Graduate School of Engineering, Gunma University, 4-2 Aramaki, Maebashi, 371-8510, Japan

² Faculty of Science and Technology, Gunma University, 4-2 Aramaki, Maebashi, 371-8510, Japan

1 はじめに

生体膜は、脂質膜と膜蛋白質からなり、コレステロール (Chol) はその脂質膜の主要成分であるリン脂質の分子間に入り込み、膜蛋白質にとって最適な膜の構造や物性になるように調整する重要な役割を担っている。体内で Chol はフリーラジカルとの反応、または代謝の過程により様々な酸化体である酸化コレステロールとなる。ステロイド骨格部分の C7 位が酸化した 7 β -hydroxycholesterol (7 β OH) と、炭化水素鎖の C25 位が酸化した 25-hydroxycholesterol (25OH) は、フリーラジカルの酸化によって産生し、細胞毒性を持つことが知られている酸化コレステロールである。前者は動脈硬化に、後者は神経病に関連すると指摘されている[1]。しかし、その細胞毒性の詳細な機構は不明で、現在その解明が求められている。

Chol が脂質膜の物性の調整を担うことを考えると、酸化コレステロールでは、脂質膜の構造や物性が変化してしまい、膜蛋白質がその機能をはたせなくなると考えるのは自然なことである。また酸化部位によって関連する疾病が違ふのは、脂質膜構造への影響の違いによると考えられる。

そこで、本研究では、リン脂質膜の相転移、および、相転移に伴う膜構造の変化に対する酸化コレステロール (7 β OH と 25OH) の効果を、通常のコレステロール(chol)と比較して調べた。

2 実験

リン脂質に Avanti Polar Lipids 社製の 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) (>99%) を用いた。コレステロール ($\geq 99\%$) と、酸化コレステロールである 7 β -hydroxycholesterol (7 β OH) ($\geq 95\%$) と 25-hydroxycholesterol (25OH) ($\geq 98\%$) には Sigma-Aldrich 社製のものを使用した。リン脂質は相転移以上の温度で水中に分散させると、球状の脂質二重層 (ベシクル) が多重に巻かれたマルチラメラベシクル (MLV) を形成する。リン脂質とステロールをクロロホルムに溶かし、それぞれ 10 mM と 5 mM の溶液を得た。それらを目的の混合比となるように混合し、窒素気流化で

乾燥させた後、真空乾燥機でさらに 12 時間以上乾燥させ、クロロホルムを除去した。その後純水を加え、DPPC の相転移温度以上である 50 °C まで加熱した状態で約 15 分間攪拌し、さらに 50°C で約 10 分間超音波処理し、MLV 試料を作製した。

相転移を調べるために、示差走査熱量 (DSC) 測定を行った。昇温速度は 1.0 °C/min とした。

相転移に伴う脂質膜の構造変化は小角 X 線回折測定により調べた。測定は放射光科学研究施設 (Photon Factory ; PF) の BL-6A, 15A, 9C で行われた。測定に用いられた X 線の波長は 0.150 nm であった。試料は径 1 mm のガラスキャピラリーに封入した。温度調節は、X 線回折用に一部改良した顕微鏡用熱量測定装置 (FP84, Mettler Toledo 社) により行った。X 線検出器には、一次元位置敏感比例計数管 (Position Sensitive Proportional Counter ; PSPC) (Rigaku, 東京) と X 線光子計数型 2 次元検出器 PILATUS 100K (Dectris, スイス) を使用した。

3 結果および考察

通常のコレステロール(Chol)は平面構造であるステロイド部分により、リン脂質の炭化水素鎖の自由な変形を制限し、逆に密な充填も阻害する。つまり、ゲル相では炭化水素鎖の充填を乱し、液晶相では炭化水素鎖の充填を促進する。DSC 測定の結果は、Chol、酸化コレステロール(7 β OH、25OH)とも、ステロール比を増加させるにつれて DPPC の主転移を表すピークがブロードになり、転移がはっきりしなくなっていく (data not shown)。Chol の場合の、この傾向は以前の DPPC/Chol の DSC 測定結果と一致する[2]。

しかし、7 β OH 系では Chol 系より小さなステロールモル比で転移ピークのブロード化が起こり、25OH 混合系では、逆の傾向を示した。転移温度は、ステロール比の増加とともに下降したが、その程度は、7 β OH > Chol > 25OH の順であった。これらの結果は、DPPC/7 β OH 系では、ステロールの影響が局在化せずに膜全体へ広がりやすく、DPPC/25OH 系では、逆に、ステロールの影響が広がりにくい、つまりは、相分離を引き起こすことを示していると解釈される。

DPPC/ステロール混合系における、一次回折ピークの位置から計算される繰り返し周期(d-spacing)の温度依存性を図1から図3に示した。図1が、DPPC/Chol系、図2が、DPPC/7βOH系、図3が、DPPC/25OH系に、それぞれ対応する。繰り返し周期の値が大きく変わり始める温度(40 °C 付近)は、先の DSC 測定による主転移温度とよく一致している。

Chol は少量の添加、つまり、3 mol%以下で、DPPC 膜を柔らかくし、それ以上では膜を堅くする性質があることが、すでに報告されている[3]。Chol のモル比が 0.05 で、繰り返し周期が、ゲル相で大きく増大するのは、膜が柔らかくなり、膜のうねり運動による反発相互作用の増大がおり、膜間距離が増大したためである。その後は、Chol を混合するほど膜が堅くなり、膜のうねりによる反発が弱くなるため、繰り返し周期が小さくなる。

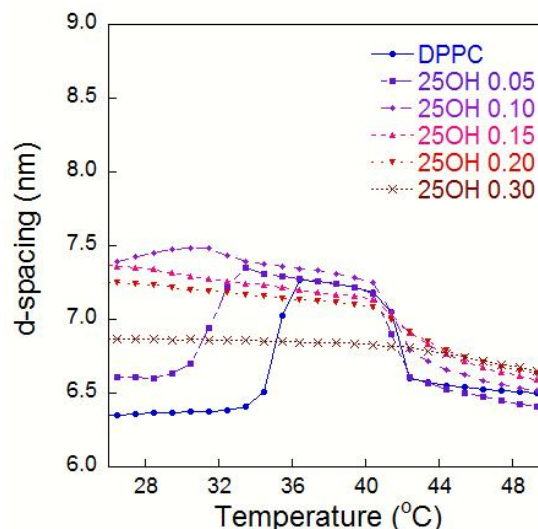


図3 : DPPC/25OH 系の繰り返し周期の温度依存性。凡例の数字は25OH のモル分率を示す。

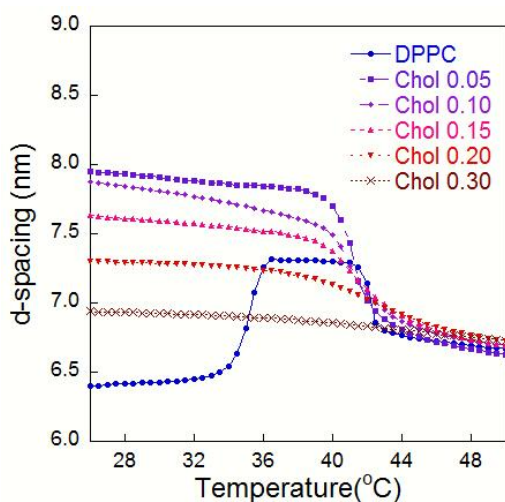


図1 : DPPC/Chol 系の繰り返し周期の温度依存性。凡例の数字は Chol のモル分率を示す。

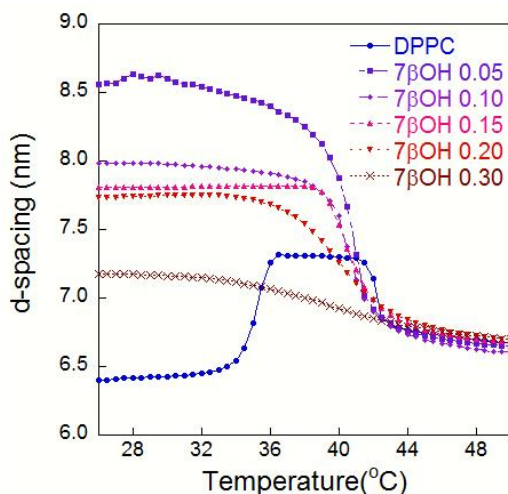


図2 : DPPC/7βOH 系の繰り返し周期の温度依存性。凡例の数字は 7βOH のモル分率を示す。

図1と図2のゲル相における繰り返し周期の変化を比較すると、7βOHは、少量でCholの場合よりも、DPPC膜をかなり柔らかくし、膜間を広げ、その後の濃度増加では、CholほどにはDPPC膜を堅くしないことが想像される。一方、図3の結果は、25OHは、その濃度上昇により、Cholや7βOHの場合よりも、液晶相のDPPC膜をかなり柔らかくすることを示唆している。

4 まとめ

リン脂質 DPPC 膜の相転移および相転移に伴う構造変化に対して、酸化コレステロールは、通常のコレステロールとは異なる影響を及ぼすことがわかった。また、同じ酸化コレステロールでも 7βOH と 25OH では、その影響が異なり、酸化部位が違えばリン脂質膜物性への影響に差があることが明確になった。電子密度分布を計算し、その結果に基づき、リン脂質膜中における酸化コレステロールの位置を探る解析が現在進行中である。

謝辞

小角 X 線回折測定に関しては、野村昌治先生、小山篤氏、清水伸隆先生、五十嵐教之先生、森丈晴氏、大田浩正氏をはじめとする PF スタッフが方々のサポートの結果、データが修得できたものです。ここに感謝致します。

参考文献

- [1] A. Jusakul et al., *Lipid in Health and Disease*, **10**, 44, (2011). doi:10.1186/1476-511X-10-44.
- [2] A. Genz et al., *Biophys. J.*, **50** 1043 (1986).
- [3] J. Lemmich et al. *Eur. Biophys. J.* **25**, 293(1997).

*hirotakahashi@gunma-u.ac.jp