

生体膜と分子集合体の化学

大阪大学 理学研究科

村田 道雄

1. はじめに

生体膜は、多種多様な膜脂質とタンパク質から構成されており、細胞や細胞内器官の環境を規定するとともに、情報伝達、物質輸送、エネルギー生成等において中心的役割を果たしている。その機能の大部分は膜タンパク質が担っており、膜脂質は単なる二重膜の材料であると考えられてきたが、近年、膜脂質がタンパク質との相互作用を介して特異的かつ多様な生理機能を担うことが明らかになってきた。なかでも、細胞膜に形成される脂質ラフト（図 1）は、シグナル伝達、免疫細胞応答やウイルスの侵入といった種々の細胞プロセスに関与しており、大部分にナノメートルサイズのドメインとして存在する^{1,2,3,4}。脂質ラフトは、スフィンゴミエリン（SM）とコレステロール（Cho）を主要脂質とし、細胞膜上のマイクロドメインとして存在する。脂質ラフトはゲル相（固体）と流動性の高い液晶相の中間的な性質を有しており、脂質分子の運動性が低いにも拘わらず、ある程度の流動性を保っており、秩序液体相（Lo 相）と呼ばれる独特の相状態を示す。このように脂質ドメインは、生命現象解明の新しい概念として注目を集めており、生物学的・物理的性質に関する研究が精力的に行われていた。一方、これらの研究の大部分は、イメージングによる生体膜の観察もしくは膜物性の研究を主としており、脂質の分子構造に根ざした構造生物学的研究は大幅に遅れていた。また、重要な役割を果たす Cho については、脂質分子間相互作用の直接的実験データを得るのが非常に困難であった。脂質ラフトを含めたドメイン形成に SM や Cho が中心的な役割を果たしていることは間違いないが、その相互作用を実験的に明らかにした例はほぼ皆無であった。このように、膜脂質の構造生物学的新知見が、より深い生命機能の理解につながる。

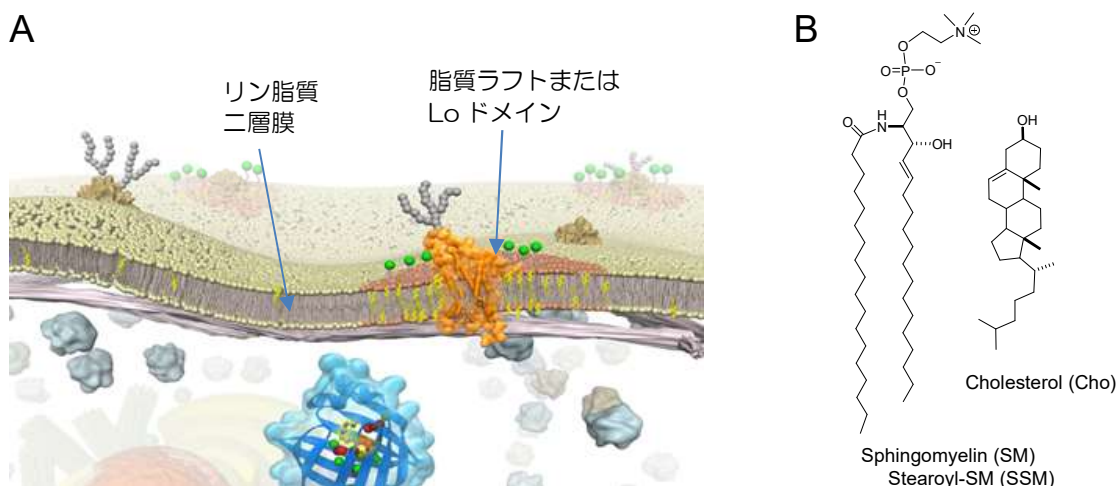


図 1. (A) 生体膜のラフト構造の模式図。(B) ラフトを形成する脂質の構造。生体膜では、SM や Cho などのラフト形成脂質同士の強い相互作用により、Lo 様ドメインが誘導される。SSM とは、SM の N-結合脂肪酸がステアリン酸ものを指す。

2. 脂質二重膜におけるスフィンゴミエリン(SM)の配座と配向

脂質ラフトにおける脂質分子間の相互作用解析は、単純な組成から成るモデル膜を用いて行われてきた。脂質二重膜の物理的不均一性を表現するために、脂質が秩序化して拡散がほぼ止まっている状態（ゲル相）、脂質が秩序化されていて拡散が速い状態（Lo 相）、脂質が無秩序で横方向の拡散が速い状態（Ld 相）に分類される。このうち、脂質ラフトの相状態を再現している Lo 相の相形成の分子機構を探るために、飽和脂肪酸を有する SM やホスファチジルコリン (PC) などの飽和リン脂質が用いられる^{5,6}。Cho の存在下、SM は飽和 PC よりも効果的に Lo ドメインを形成し、そのドメインはより高い熱安定性を有する^{7,8,9}。これらの特性は、飽和鎖のパッキング相互作用だけでなく、スフィンゴシン部分の 2-アミド基を介した分子間水素結合が Lo ドメインの形成に大きく寄与していることを示している。図 2A に示した SM の極部分の立体配座は、通常の溶液 NMR で測定できる NOE やスピン結合手数 ($^3J_{H,H}$) によって解明することができた。図 2B には、固体 NMR によって得られる情報を示した。固体 NMR では水素観測が困難なことが多いので、アミド基の炭素や窒素原子を ^{13}C や ^{14}N で標識した SM を化学合成する必要がある。これを用いて脂質二重膜を調製して固体条件で測定することで、異方的な状態（膜の場合は 1 軸について分子運動が抑えられている状態）でしか取得できない情報が得られる。例えば、磁気双極子相互作用、四極子相互作用や化学シフト異方性を用いれば、アミド平面の膜法線（図 2C の Rotation axis と同じ方向）に対する方向 β 角を決定することができる。これは、脂質分子の膜中での挙動を記述するうえで重要なパラメータとなっている。これらの手法で求めた配向（ β 角）は、隣接する SM 分子同士で分子間水素結合（図 2B の緑の点線）ネットワークを形成するのに適していることが分かった。

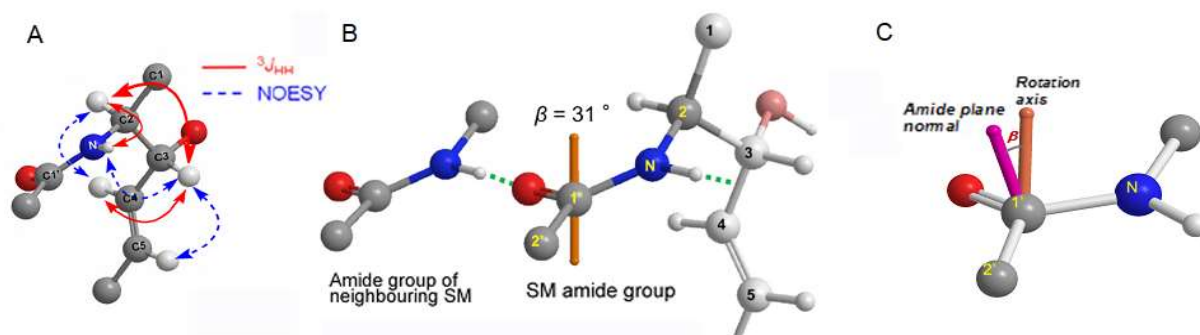


図 2. (A) ^1H NMR データから推定したバイセル中の SM のアミド部分のコンフォメーション¹⁰。(B) SSM/Cho 二重膜のアミド面に対する回転軸方向と SSM 分子の部分的な配向の実験結果。(C) 分子回転軸の方向 (Rotation axis、オレンジ色の棒) とアミド面の法線方向との間の角度を示す角度 β 。アミド面法線と二層膜の法線（分子回転軸と同じ向き）の間の極角 β は 31° と決定され、緑の点線で示すように、多分子 H 結合ネットワークに適した配座であることが明らかとなった¹¹。

3. SM によるナノドメインの形成と FRET によるサイズ測定

従来の研究の大部分は、脂質ラフトの形成機構が SM-Cho 相互作用に起因するとの前提で行われてきた。われわれは、見方を変えて SM-SM 相互作用を調べてきた。一例として、フェルスター共鳴エネルギー移動法 (FRET) の適応例を述べる。蛍光標識した SM を用いることによって、ドメイン形成をナノメートルやナノ秒の時空間分解能で正確に評価することができる。Lo ドメインには SM の蛍光プローブが集中するため、均一な膜 (図 3B の DOPC) に比べて蛍光強度が減少する。しかし、Lo ドメイン内で、水素結合の強弱によって FRET プローブが SSM 系と *ent*-SSM 系のサブドメインに分離する場合 (図 3C 右)、SSM ドナーと SSM アクセプターが同じ種類のサブドメインに局在する場合 (図 3C 左) に比べてドナーの蛍光強度 F/F_0 が増加する (F/F_0 はアクセプターが存在するときのドナー蛍光とアクセプターが存在しないときの蛍光の比であり、FRET が強くなると F/F_0 が低くなる)。天然体間と天然体-鏡像体間の F/F_0 の違いは、サブドメイン形成を示唆する。この FRET 挙動から、ドメインのサイズを見積もることができ、温度とともにサイズが小さくなる条件では、37°C 付近で約 5 nm と推定している (図 3)。

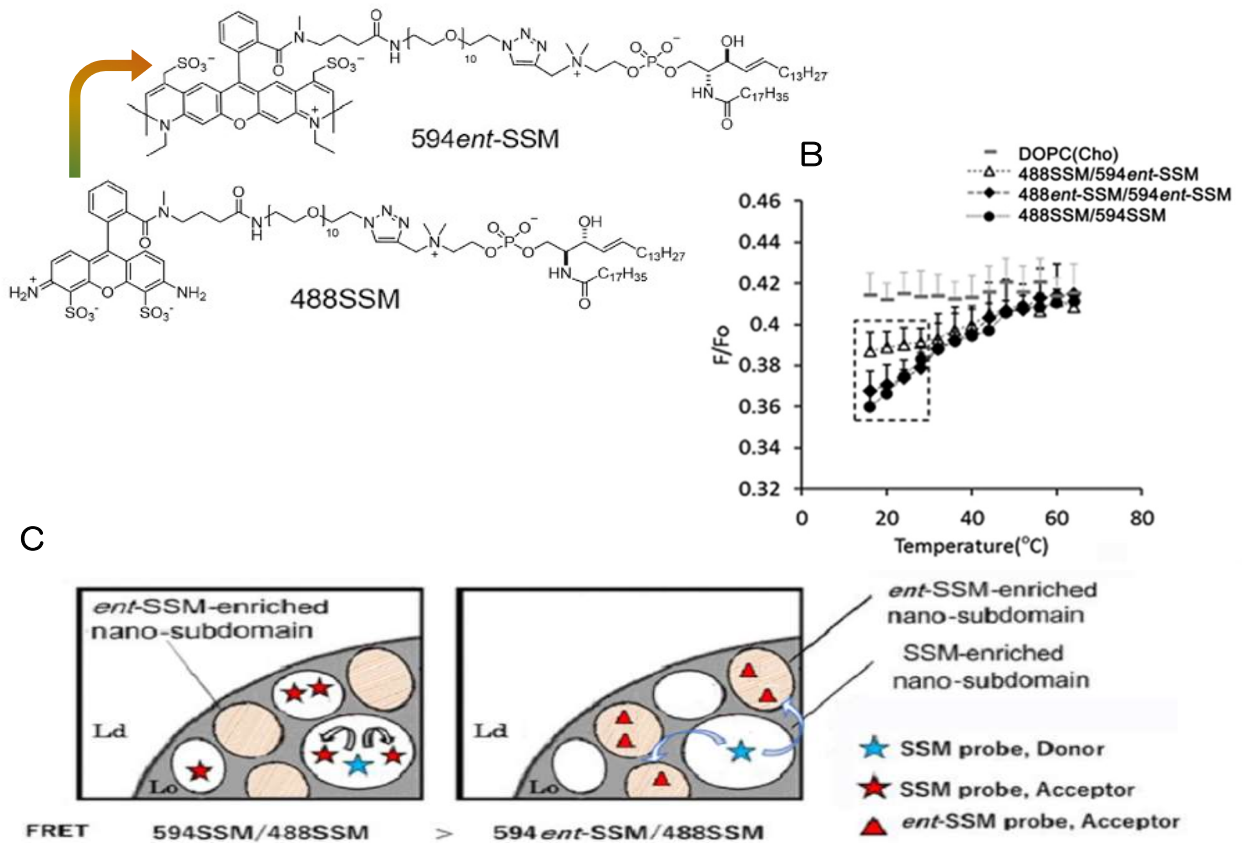


図 3. FRET は Lo ドメインとサブドメインの構造によって影響を受ける。(A) FRET ドナー-488SSM (天然体) とアクセプター-594ent-SSM (鏡像体) の構造, (B) SSM/ent-SSM/DOPC/Cho およびコントロールの同種の DOPC/Cho 小胞についての FRET データ¹²。(C) ドメイン分離と FRET 効率の関係を示す。サブドメインのサイズが FRET の到達距離 (Förster 半径) より大きいと、SSM/ent-SSM ペアの F/F_0 値は SSM/SSM ペアの値より大きくなる。

4. メチル分岐を有する古細菌膜脂質 PGP-Me

特殊な機能を有する脂質として古細菌の膜脂質が注目されている。古細菌は、その多くが高温、高塩濃度などの極限状態で生息することができ、真性細菌や真核生物とは大きく異なる生物学的特徴を有している。古細菌の一種である *Halobacterium salinarium* は、飽和食塩水においても生息可能な高度好塩菌であり、紫膜を含む膜構造が、このような特徴的な性質を可能にする要因である。紫膜は、プロトンポンプであるバクテリオロドプシン(bR)を豊富に含み、高温・高塩濃度環境に対する高い安定性を有している。さらに、紫膜の脂質成分は、bR の熱安定性や機能維持だけでなく、高塩環境下における膜自体の安定性にも大きく寄与する^{13,14}。

代表的な古細菌リン脂質である phosphatidylglycerophosphate methyl ester (PGP-Me) が作る二重膜が物理的耐性を示す構造的要因を解明すべく、固体 NMR 測定および分子動力学(MD)計算を用いて、メチル分岐側鎖の詳細な構造解析を実施した。まず、重水素固体 NMR を 3 種の標識化 PGP-Me(図 4, a, b, c)で構成した二重膜について測定し、得られた分裂幅の値からオーダーパラメータ(S_{CD})を算出した。これらの実験値を MD 計算と合わせて解析した結果、PGP-Me 膜のフィタニル鎖上部の平均配向は、通常の直鎖アルキル鎖において想定されている Linear 構造(図 4d)とは異なる Bent 構造(図 4e)であると判明した。図 4d, e に示したように、膜法線に対する C-D と C-CD₃ 結合の角度は、Linear 形の 3 つの回転配座ではほぼ同じであるが、Bent 配座ではわずか 3° であるが、3 つの配座とも異なる。この違いは、C-C-C と C-C-H の結合角が異なることに由来するが、固体 NMR でこのわずかな方向の違いを明確に検出

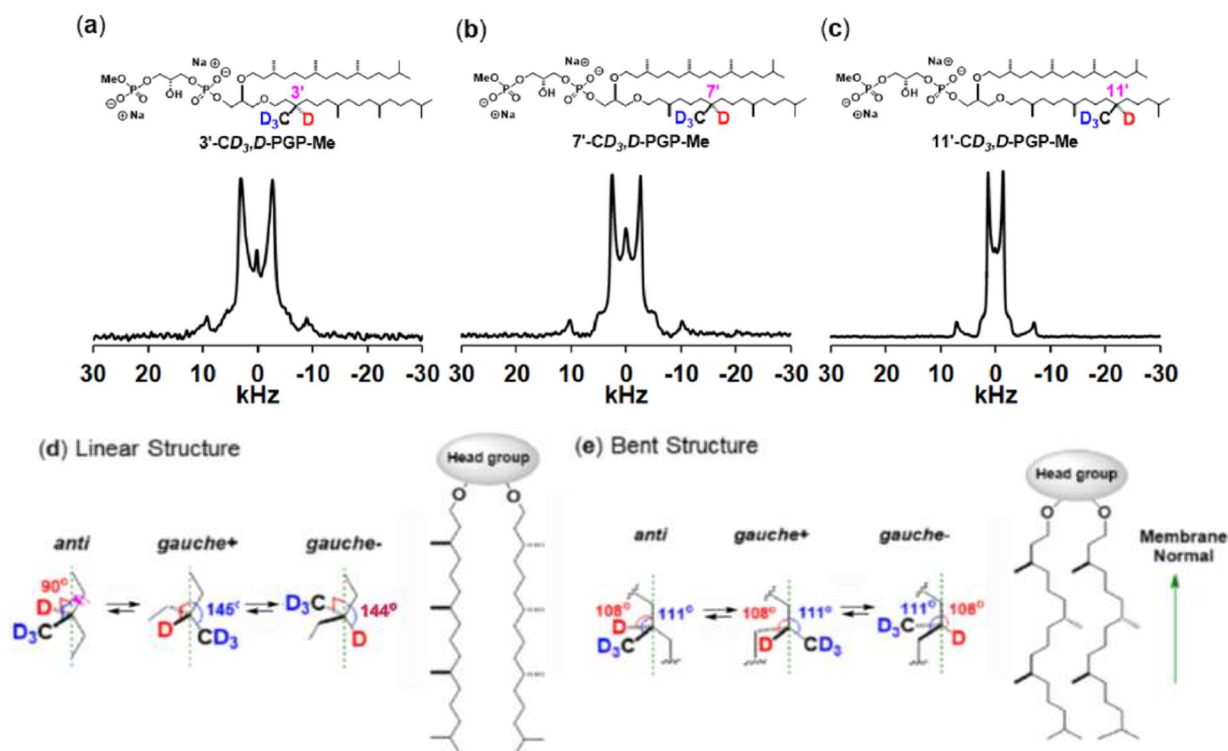


図 4. (a) 3',3'-CD₃,D-PGP-Me, (b) 7',7'-CD₃,D-PGP-Me, (c) 11',11'-CD₃,D-PGP-Me の ²H NMR スペクトル。オーダーパラメータ S_{CD} はダブルレットの分裂幅に相当する値。(d) Linear 構造では、フィタニル鎖の各 C-C 結合の平均配向は、通常の膜脂質と同様にシグザク形を取る。(e) Bent 構造では、主鎖の C-C 結合は膜法線(Membrane Normal)に対して平行と斜めの配向を交互にとり、anti-gauche の回転配座の変化は膜法線方向の長さに影響しない。

できる。さらに PGP-Me 膜の MD シミュレーションによって、フィタニル鎖の中心付近において、メチル分岐鎖同士の絡み合いが生じていることが示唆された(図 5 左)。この性質は、低温ではアルキル鎖の密なパッキング(ゲル化)を阻害するが、高温では逆に動きを制限する方向に働くため、結果広い温度範囲や塩濃度で流動性を実現している一因であると考えられる。また、Linear 配座では途中で *gauche* 形が出現すると、脂肪酸の膜法線方向の長さ(膜の厚さに相当)が顕著に短くなるが、*bent* 配座では法線平行の C-C 結合が *gauche* 形を取っても膜法線方向の長さが変わらないので(図 4)、温度変化にともなう *anti-gauche* の割合の変化が二重膜の厚み与える影響が大幅に軽減される。このような構造は直鎖の DPPC 膜では観測されなかったことから、メチル分岐を有する古細菌脂質特有の現象と言える。このように、特殊な *bent* 形の平均配向と絡み合い構造が、PGP-Me 膜の高温・高塩濃度耐性を引き起こす構造要因であることを明らかにできた。また、実際は多くの配向・配座が分布している柔軟で捉え難いアルキル鎖の挙動を、平均配向を用いて明確に定義し区別することで、その膜物性の違いを解釈できる。このように、生体膜の構造とその分子集合について、平均配向のような分子論的指標を用いて記述することができれば、現在でも解析困難な脂質の化学構造とその膜機能の関係をある程度予測することができるようになることを期待している。

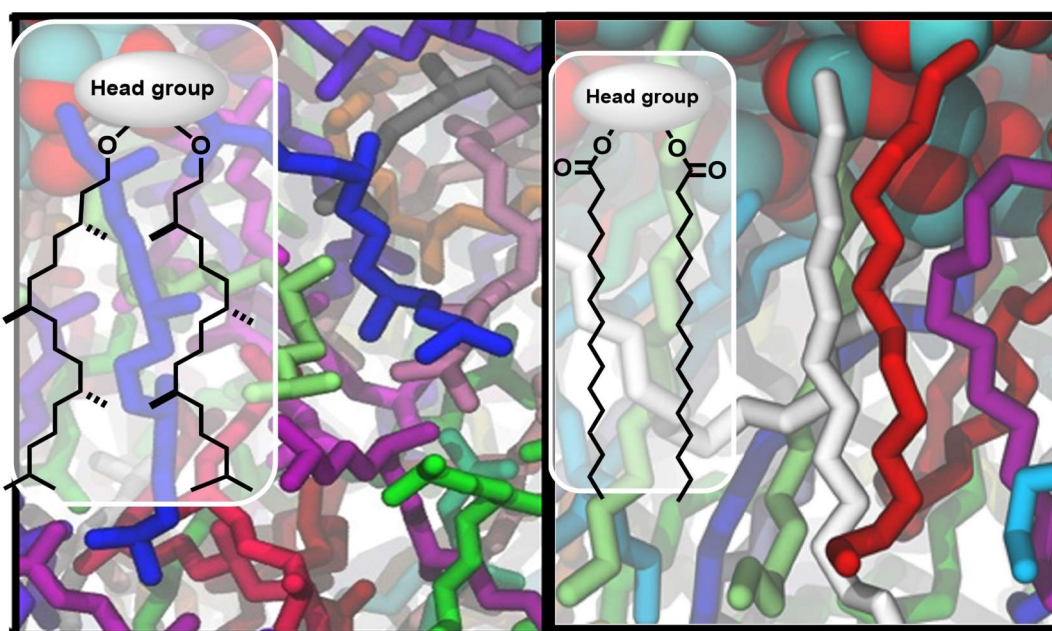


図5. 古細菌脂質のMDシミュレーション結果。左の古細菌脂質 PGPMe ではメチル分岐鎖が絡み合って *bent* 配座を取るが、右の通常のリン脂質(脂肪酸鎖 C₁₆ の phosphatidylcholine) ではアシル鎖の絡み合いが比較的少なく、通常のアンチ連続(ジグザグ)配座を主に取っている。

謝 辞： 本研究は、岡山大学異分野基礎科学研究所の篠田 渉教授、Stony Brook 大学 London 教授、Åbo Akademi 大学 Slotte 教授、大阪大学の本研究室の花島慎弥准教授、土川博史博士(現・大分大医)、梅川雄一博士とともに行いました。成果の大半はこれら共同研究者に帰するものであり、深く感謝申し上げます。

参考文献

- (1) Brown, D. A.; Rose, J. K. Sorting of GPI-Anchored Proteins to Glycolipid-Enriched Membrane Subdomains during Transport to the Apical Cell Surface. *Cell* **1992**, *68* (3), 533–544. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90189-j](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90189-j).
- (2) Lingwood, D.; Simons, K. Lipid Rafts as a Membrane-Organizing Principle. *Science (New York, N.Y.)* **2010**, *327* (5961), 46–50. <https://doi.org/10.1126/science.1174621>.
- (3) Schroeder, R.; London, E.; Brown, D. Interactions between Saturated Acyl Chains Confer Detergent Resistance on Lipids and Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anchored Proteins: GPI-Anchored Proteins in Liposomes and Cells Show Similar Behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91* (25), 12130–12134. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.25.12130>.
- (4) Simons, K.; Ikonen, E. Functional Rafts in Cell Membranes. *Nature* **1997**, *387* (6633), 569–572. <https://doi.org/10.1038/42408>.
- (5) Ahmed, S. N.; Brown, D. A.; London, E. On the Origin of Sphingolipid/Cholesterol-Rich Detergent-Insoluble Cell Membranes: Physiological Concentrations of Cholesterol and Sphingolipid Induce Formation of a Detergent-Insoluble, Liquid-Ordered Lipid Phase in Model Membranes. *Biochemistry* **1997**, *36* (36), 10944–10953. <https://doi.org/10.1021/bi971167g>.
- (6) Grönberg, L.; Ruan, Z. S.; Bittman, R.; Slotte, J. P. Interaction of Cholesterol with Synthetic Sphingomyelin Derivatives in Mixed Monolayers. *Biochemistry* **1991**, *30* (44), 10746–10754. <https://doi.org/10.1021/bi00108a020>.
- (7) Ramstedt, B.; Slotte, J. P. Sphingolipids and the Formation of Sterol-Enriched Ordered Membrane Domains. *Biochimica et biophysica acta* **2006**, *1758* (12), 1945–1956. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.020>.
- (8) Slotte, J. P. The Importance of Hydrogen Bonding in Sphingomyelin's Membrane Interactions with Co-Lipids. *Biochimica et biophysica acta* **2016**, *1858* (2), 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.12.008>.
- (9) Yasuda, T.; Kinoshita, M.; Murata, M.; Matsumori, N. Detailed Comparison of Deuterium Quadrupole Profiles between Sphingomyelin and Phosphatidylcholine Bilayers. *Biophysical Journal* **2014**, *106* (3), 631–638. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.12.034>.
- (10) Yamaguchi, T.; Suzuki, T.; Yasuda, T.; Oishi, T.; Matsumori, N.; Murata, M. NMR-Based Conformational Analysis of Sphingomyelin in Bicelles. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2012**. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.11.001>.
- (11) Matsumori, N.; Yamaguchi, T.; Maeta, Y.; Murata, M. Orientation and Order of the Amide Group of Sphingomyelin in Bilayers Determined by Solid-State NMR. *Biophysical Journal* **2015**. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.05.011>.
- (12) Yano, Y.; Hanashima, S.; Tsuchikawa, H.; Yasuda, T.; Slotte, J. P.; London, E.; Murata, M. Sphingomyelins and Ent-Sphingomyelins Form Homophilic Nano-Subdomains within Liquid Ordered Domains. *Biophysical Journal* **2020**, *119* (3), 539–552. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.06.028>.
- (13) Kawatake, S.; Umegawa, Y.; Matsuoka, S.; Murata, M.; Sonoyama, M. Evaluation of Diacylphospholipids as Boundary Lipids for Bacteriorhodopsin from Structural and Functional Aspects. *Biochimica et biophysica acta* **2016**, *1858* (9), 2106–2115. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.06.006>.
- (14) Yamagami, M.; Tsuchikawa, H.; Cui, J.; Umegawa, Y.; Miyazaki, Y.; Seo, S.; Shinoda, W.; Murata, M. Average Conformation of Branched Chain Lipid PGP-Me That Accounts for the Thermal Stability and High-Salinity Resistance of Archaeal Membranes. *Biochemistry* **58** (37), 3869–3879. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00469>.