



Title	脂質二重膜におけるスフィンゴミエリンのNMR構造解析
Author(s)	山口, 敏幸
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/26853
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

脂質ラフトは、スフィンゴミエリン(SM)とコレステロール(Chol)を主要脂質とする細胞膜上のマイクロドメインで、周囲のグリセロリン脂質を主とする細胞膜とは異なる性質を示す。脂質ラフトは特定のタンパク質が集積することでシグナル伝達のプラットホームとして機能すると考えられているが、その詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、脂質ラフト形成の構造的基盤を明らかにすることを目的とし、膜中におけるSMの立体配座を解析した。しかし、従来構造解析に用いられてきた手法は脂質膜試料に適用困難であるので、本研究では固体NMRを用いてSMのアミド部周辺とリン酸部の構造解析を行った。またバイセルを膜モデルとして用いて、溶液NMRによるSMの膜界面領域の配座解析も行った。

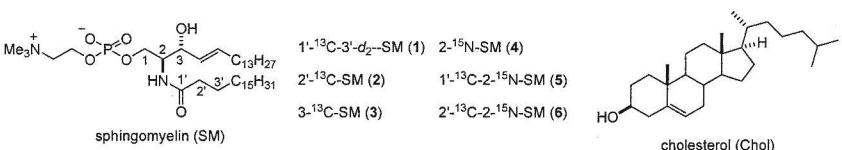


図1 同位体標識スフィンゴミエリン(SM) 1-6 およびコレステロール(Chol)の構造

1) 重水素(²H)固体NMRによるC2'-C3'結合の解析

脂質膜に対するアシル鎖の方向を決める上で重要であると考えられる C2'-C3'結合の回転配座を決定するために、C3'を ²Hで標識したSM(1)(図1)を合成し、²H固体NMRを測定した。以前に測定が行われたC2'-d₂-SMの²H NMRスペクトルでは2組の四極子分裂が観測されたのに対し(not shown)、標識SM(1)では1組の四極子分裂を示した(図2)。これは、C2'-C3'結合がゴーシュ配座であることを示している。さらに観測された四極子分裂幅から、膜法線に対するC2'-C3'結合の配向を見積もった。

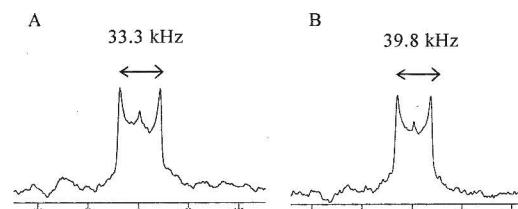


図2 ²H標識SM(1)の45 °Cにおける²H NMRスペクトル
(A)SMリポソーム、(B)SM/Chol(1/1)リポソーム

2) REDOR測定によるアミド周辺からリン酸部にかけての配座・配向解析

次に、膜法線に対するアミド平面の配向を求めるために、当研究室で合成された¹⁵N標識SM(4-6)(図1)を用いて¹³C{¹⁵N}REDOR¹⁾測定を行い、炭素-窒素間双極子相互作用を求めた。求めた双極子相互作用に基づいてアミド平面の配向を解析したところ、Cholの有無によらずアミド平面の配向はほと

【43】

氏名	山口 敏幸
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第25205号
学位授与年月日	平成24年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科化学専攻
学位論文名	脂質二重膜におけるスフィンゴミエリンのNMR構造解析
論文審査委員	(主査) 教授 村田道雄 (副査) 教授 梶原康宏 教授 藤原敏道

んど変化しないことが分かった。一方で、Cholが共存することでオーダーは増加しており、Cholによってアミド部分の揺らぎが抑制されることが示唆された。続いてリン酸部分の配向解析のために、¹³C標識SM(1)および当研究室すでに合成された標識SM(2,3)(図1)を用いて、³¹P{¹³C}REDOR測定を行った。C1'標識SM(1)の場合では、SM膜中よりもSM/Chol膜中の方が大きなREDOR減衰を示したが、C3標識SM(3)を用いた場合にはSM/Chol膜中の方がよりREDOR減衰が大きかった。これはCholの添加によってSMのリン酸部の配向が変化したことを示している。観測された双極子相互作用に基づいてリン酸部分の配座・配向を推定した(図3)。以上より、膜中のSMの構造を求め、Cholの有無による構造変化を明らかにすることに成功した。SMはCholと相互作用することで、分子全体の揺らぎ、特にアミド部分の揺らぎが顕著に減少することが示された。またリン酸部分の配向も大きく変化した。この構造変化およびアミド部分の揺らぎの減少により、アミド部位間の水素結合を通じたSM分子間の相互作用が安定化され、脂質ラフト形成が促進されることが推定された。

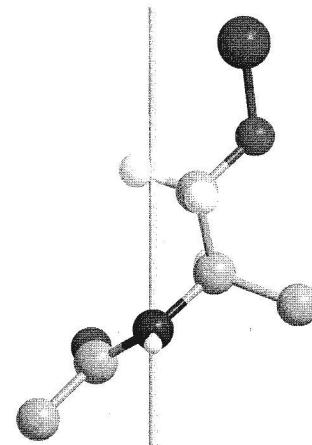


図3 固体NMR測定から推定された
SM/Chol膜中のSMの立体配座・配向

3) バイセルを用いた溶液NMRによるSMの配座解析

固体NMRの相補的手法として、溶液NMRにより膜中のSMの立体配座を推定した。固体NMR測定では標識部位の情報を選択的に得られる一方で、標識体の調製に時間と労力を要することは否めない。SM膜サンプルの高分解能¹H溶液NMRスペクトルが取得できれば、容易にSMの構造解析を行うことが可能である。そのための膜モデルとして、二重膜構造を有しながら溶液NMRにも適用可能なバイセルを用いることにした。本研究では、長鎖脂質としてSMを用いてバイセルが形成可能であることを初めて明らかにした²⁾。調製したSMバイセルを用いて¹H NMRおよび2次元NMRを測定し、スピン結合定数およびNOEを決定した。スピン結合定数から得られた構造情報およびNOE実験から得られた距離情報を考慮することで、脂質膜中のSMの骨格部分の立体配座を推定した²⁾。また10%Chol含有SMバイセルの調製にも成功し、同様にスピン結合定数測定およびNOE実験からChol含有膜中のSMの配座を推定した。両者を比較したところ、Cholの有無によりSMの骨格部の配座は変化しないことが示唆され、これは固体NMR測定の結果とも一致する。

以上のように、本研究では固体・溶液NMR測定から、脂質膜中におけるSMの立体配座・配向の推定に成功し、Cholの有無によるSMの構造変化を明らかにした。また本手法が膜構成脂質の構造解析に有用であることが示された。今後、本法を他の脂質にも適用することで、脂質二重膜中における分子間相互作用の分子基盤解明が期待される。

1) Gullion, T.; Schaefer, J. *Adv. Magn. Reson.* **1989**, 13, 57-83.

2) Yamaguchi, T. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 270-278.

論文審査の結果の要旨

脂質ラフトは細胞膜に形成される特異な部位（マイクロドメイン）であり、重要な生理機能を担っていると考えられている。脂質ラフトはスフィンゴミエリン(SM)とコ

レステロール(Chol)を主要成分としており、周囲のグリセロリン脂質を主とする細胞膜とは異なる性質を示し、特定のタンパク質が集積することでシグナル伝達のプラットホームとして機能すると考えられている。このような重要な機能にもかかわらず、脂質ラフト形成についての分子機構は明らかになっていない。山口君は、有機化学および分光学的方法によって、膜中におけるSMの立体配座を解析することで、脂質ラフト形成の構造的基盤を明らかにすること目的として博士論文研究を行った。

まず、バイセルと呼ばれる脂質二重膜断片を用いて、SMなどの膜脂質分子の高分解能の水素核NMRを測定することに成功している。これら測定結果を用いて分子配座の解明を行った。さらに、¹³Cまたは¹⁵N標識脂質二重膜を用いて固体NMRを測定し、標識原子間磁気双極子相互作用に基づいて膜中におけるSMの配座・配向解析を行った。その結果、SMの脂肪酸結合個所であるアミド部分の膜平面に対する配向と局所運動性を解析することに成功した。脂質ラフトのモデルとして用いたSM-Chol混合膜において、SMは顕著に秩序性を高めることが判明した。一方で、アミド部分の膜へ面に対する配向はほとんど変化しないことも明らかにした。これらの結果は、Cholがアミド部の揺らぎを抑制したことを示しており、Cholによってアミド部における水素結合を介したSM間の分子間相互作用が安定化され、高い秩序性を有する脂質ラフトが形成されるものと考察している。さらに、山口君は、膜界面領域からリン酸部の配座・配向を精査した。すなわち、SMを用いて固体NMRを測定した結果、Cholの有無によりリン酸部の立体配座が有意に変化することを見だし、これがCholに対する脂質極性部分の保護効果（アンブレラ効果）に対応していると推定している。

このように、水和脂質二重の固体NMR測定を中心とした、立体配座、分子配向、分子運動についての詳細な解析を通じて、脂質ラフトの分子基盤の一端を明らかにすることに成功した。これらの研究成果は、生体膜における膜タンパク質の集積やその他の分子複合体の構造解析に道を開くものであり、学術的な意義も大きいといえる。以上のように、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。