



Title	秩序液体相におけるリン脂質の動態解析による脂質ラフト形成の分子基盤解明
Author(s)	安田, 智一
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52281
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

氏 名 (安 田 智 一)

論文題名

秩序液体相におけるリン脂質の動態解析による脂質ラフト形成の分子基盤解明

論文内容の要旨

脂質ラフトは、スフィンゴミエリン (SM) およびコレステロール (Chol) を主成分とする細胞膜上のマイクロドメインである (Fig.1)。ラフトは、シグナル伝達のプラットフォームとして機能していると考えられているが、常に生成と崩壊を繰り返しているため、その形成機構は未だ解明されていない。そこで、ラフト形成の基盤となる脂質分子の動態 (ダイナミクスや分子間相互作用) を解析することが必要であると考えた。本研究では、脂質ラフトを再現した人工膜の秩序液体相における脂質分子の動態を原子・分子レベルで明らかにすることで、生体膜中のラフト形成の分子基盤を解明することを目的とした。さらに、SMと一般的な脂質であるグリセリン脂質 (PSPC) の動態を比較することで、ラフトを優位に形成するSMの特異的要因を明らかにすることを目指した (Fig.2)。

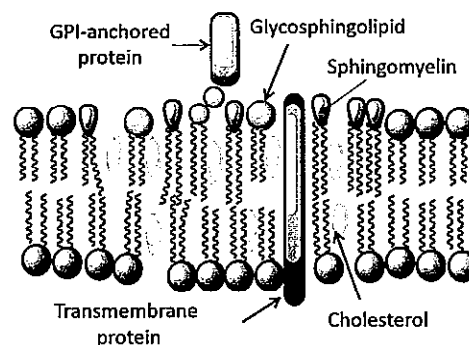


Fig. 1 Lipid Rafts

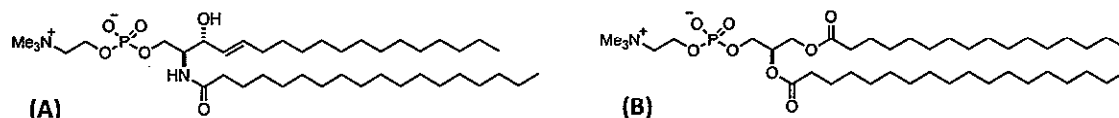


Fig.2 SM (A) とPSPC (B) の構造

まず、位置選択的に重水素標識した脂質を化学合成して重水素固体NMR (^2H NMR) を測定し、Chol含有膜における脂質の動的挙動の違いを詳細に評価した。その結果、PC膜よりもSM膜においてCholが深い位置に分布すること、また、SM膜の方が温度変化に対する安定性が高いことを示した。これらの結果より、SM膜ではCholが深い位置でオーダー効果を発揮することで、膜表面部でのSM分子間の水素結合形成が促進され、熱安定性が高くなったと推定される。

さらに、より生体膜に近い環境で脂質分子の動態情報を取得することを目指し、Chol含有膜に不飽和リン脂質DOPCを加えた3成分系膜を用いて ^2H NMRを測定し、SMとPCを比較した。これらの3成分系膜は、飽和リン脂質を豊富に含むラフト相と不飽和リン脂質を豊富に含む液晶相に相分離することが知られている。 ^2H NMR測定の結果、各相に分配したそれぞれの脂質の動的挙動を同時かつ詳細に評価することに初めて成功した。さらに、各相での脂質の分配比を見積もり、SM膜とPC膜中のラフト相の組成比の違いを明らかにすることができた。

次に、 ^2H NMRで解析した原子・分子レベルの脂質の動態情報と併せて解析するために、脂質ラフト相に対する生物物理的実験 (蛍光異方性・蛍光寿命測定や蛍光顕微鏡観察) を行い、マクロな膜レベルの脂質の動態を測定した。その結果、脂質分子の局所的な運動性と膜全体の流動性が密接に関連していることが示された。また2成分系膜においても、ナノ秒スケールでは2つのドメインが共存することが示唆され、SM膜とPC膜中のドメインの存在比の違いが明らかになった。

以上の結果で明らかとなったSMの特異的な性質が、生体膜における脂質ラフト形成時にSMが果たす重要な機能の分子基盤になっていると考えられる。このように、本研究では、脂質ラフトを再現した人工膜の秩序液体相において、時空間スケールや階層の異なる脂質分子の動態を広範に解析することによって、生体膜の脂質分子の動的過程の理解に迫ることができた。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (安 田 智 一)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	村 田 道 雄
	副 査	教 授	梶 原 康 宏
	副 査	教 授	高 尾 敏 文

論文審査の結果の要旨

細胞膜に形成される脂質ラフトは、免疫細胞応答やウィルスの侵入、シグナル伝達といった種々の細胞プロセスに関与し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)を主要脂質とし、細胞膜上のマイクロドメインとして存在する。安田氏は、ラフト形成の基盤となる秩序液体相における脂質分子の動態を解析し、生体膜中のラフト形成の分子基盤に迫ることを目的として研究を行った。具体的には、脂質二重膜の固体 NMR 測定と蛍光観測を通じて SM と通常の飽和リン脂質(コリン含有グリセロリン脂質、飽和 PC)を比較することによって、SM のラフト形成における特異性を検証する研究を行っている。

まず、位置選択的に重水素標識した脂質を化学合成して重水素固体 NMR を測定し、脂肪鎖の揺らぎを中心とする脂質の動的挙動への Chol の影響を詳細に評価した。その結果、PC 膜よりも SM 膜において Chol が深い位置に分布すること、また、SM-Chol 膜の方が温度変化に対する安定性が高いことが示された。これらより、SM 膜では Chol が深い位置でオーダーを高めることによって、膜の上部での SM 分子間の水素結合形成が促進され、熱的安定性が高くなったとの考察を導いている。

さらに、より生体膜に近い環境で脂質分子の動態情報を取得することを目指し、Chol 含有膜に不飽和リン脂質 DOPC を加えた 3 成分系膜において重水素固体 NMR を測定し、SM と PC を比較した。その結果、二相に分配したそれぞれの脂質の動的挙動を同時かつ詳細に解析することに初めて成功した。さらに、二相への脂質の分配比を見積もり、SM 膜と PC 膜中のラフト相の組成比の違いを明らかにした。次に、原子・分子レベルの脂質の動態情報と併せて解析するために、蛍光寿命を用いた生物物理的実験を行い、脂質分子の局所的な運動性は膜全体の流動性と密接な相関があることを示した。また、相転移温度以下の SM-Chol 膜で形成される特徴的なドメインの存在を突き止め、Chol 存在下で形成される運動性の低い脂質分子の集合体に関して貴重な知見を得ている。これら結果で示した特異的な SM の動態は、生体膜中で形成される脂質ラフトの分子基盤の理解につながると考えられる。

このように、本論文では、脂質ラフトを再現した人工膜の秩序液体相における時空間スケールや階層の異なる脂質分子の動態を体系的に解析することによって、生体膜の脂質分子の動的過程の理解に迫ることに成功している。

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。