



Title	Study on Cholesterol-Mediated Membrane-Membrane Interaction of Liposome under Stress Condition
Author(s)	石井, 治之
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/54263">https://hdl.handle.net/11094/54263</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【6】

氏 名 石井 治之  
博士の専攻分野の名称 博士(工学)  
学位記番号 第 23307 号  
学位授与年月日 平成21年7月31日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
基礎工学研究科物質創成専攻  
学位論文名 Study on Cholesterol-Mediated Membrane-Membrane Interaction of Liposome under Stress Condition  
(ストレス条件下におけるコレステロール介在型リポソーム膜-膜間相互作用に関する研究)  
論文審査委員 (主査)  
教授 田谷 正仁  
(副査)  
教授 實川浩一郎 教授 平井 隆之 招聘教授 久保井亮一  
准教授 馬越 大

## 論文内容の要旨

### 序論

コレステロールは、リン脂質とともに生体膜の重要な構成成分であり、膜輸送からシグナル伝達まで、生体膜に関連する多種多様な機能に密接に関与している。例えば、コレステロールが単独で、あるいは特定の脂質やタンパク質と相互作用して、ミクロドメイン、ラフトと呼ばれる不均一構造を誘導し、また、ベシクル間輸送の起点となるなど、膜機能の多様性に重要な役割を果たしている。さらに、コレステロール代謝物のひとつである酸化コレステロールは、代謝系の中で重要であるだけでなく、生体膜の酸化ストレス応答の観点からも注目を集めている。本研究では、モデル生体膜としてリポソームを用いて、細胞の様々な機能の基礎となる膜-膜間相互作用を評価するための解析ツール、Membrane Chipを開発した。これにより、コレステロールが膜に与える影響および誘導する不均一な膜構造に着目して、コレステロールが膜-膜間相互作用とどのように関わり、また、ストレス条件下にどのように応答するかについて検討した。上記の知見に基づき、Membrane Chipを用いた膜-膜間相互作用の解析法・方法論の有効性を明らかにした。

### 第1章 コレステロールおよびその誘導体の膜特性・膜-膜間相互作用に及ぼす効果

コレステロールが膜に導入されることにより、膜構造の多様性が生じ、生体膜表面に種々の機能が発現する。コレステロール導入により、膜流動性やドメイン形成性を示すE/M比に変化が見られた。また、膜の水素結合安定性を示す $m_{hp}$ もコレステロールの濃度によって変化し、33mol%において最大となった。コレステロールの濃度によって種々の膜特性が変化する事、さらに、従来から報告されている相状態などの定性的知見に加えて、より定量的な検討が必要である事が示唆された。また、蛍光修飾コレステロール(NBD-Ch)の膜間移動を評価し、その挙動および構造から、NBD-Chが酸化コレステロールのアナログとして有効であり、膜-膜間相互作用を高感度で評価できるプローブとなる可能性を示した。

### 第2章 Membrane Chipの開発およびコレステロールが誘導する膜-膜間相互作用の評価

膜中のコレステロールが誘導する不均一構造に起因する膜-膜間相互作用を評価するため、Membrane Chipを開発し、種々の膜-膜間相互作用を固定化リポソームからのカルセイン漏出で評価できる事を示した。相互作用モデルに立脚した重回帰分析では、膜-膜間相互作用の指標であるカルセイン漏出に関する適切な線形予測モデルを構築できなかった。これは、膜-膜間相互作用が線形予測の困難な複合現象であることを示唆している。そこで、クラスター解析や主成分分析を併用し、膜特性と膜-膜間相互作用の関係を検討した。その結果、相互作用モデルの仮定なしに、膜の物理化学的特性や、コレステロールなどにより誘導される不均一構造に基づき、膜特性に対応して膜-膜間相互作用の分類が可能であることが示唆された。

### 第3章 熱ストレス条件下におけるコレステロール誘導体プローブの膜-膜間移動と膜-膜間相互作用の評価

膜-膜間相互作用は、ストレス条件およびストレス応答性分子などによって強く誘導される。ここでは、第1章で検討したNBD-Chと第2章で開発したMembrane Chipを用いて、ストレス応答性分子が誘導する膜-膜間相互作用の解析を試みた。その結果、フロー型センサーである固定化リポソームクロマトグラフィー(ILC)と比較し、微量のサンプルを用いてMembrane Chipで得られたパラメータで、従来法(ILC)では困難であった弱い膜-膜間相互作用の解析が可能である事を示した。

### 第4章 膜中コレステロールの酸化が膜特性に及ぼす影響および膜関連疾患との関連性

膜中コレステロールの酸化が膜構造・特性に与える影響は大きく、アルツハイマー病(AD)等の発症の機序との関連も指摘されている。そこで、前章までに得られた知見に基づいて、Membrane Chipを用いて、酸化コレステロールを含むリポソームの膜-膜間相互作用の解析を試みた。そのケーススタディとして、AD原因タンパク質とされるAmyloid  $\beta$ (A $\beta$ )が形成するA $\beta$ /Cu錯体に着目し、A $\beta$ /Cu錯体による膜中コレステロール酸化に伴う、膜特性ならびに膜-膜間相互作用の変化を解析した。Membrane Chip 解析の方法論に沿って、上記の現象の解析を試みた結果、従来法では必須の直接観察や膜特性などを測定する事なく、膜の構造変化や形態変化など動的なストレス応答を解析することができた。詳細な検討の必要はあるが、ストレス条件下における膜構造の変化、および、それに起因する膜-膜間相互作用の変化等が、AD等の膜関連疾患と深く関わっている可能性を示す事ができた。

### 結論

本研究では、生体内で生じる動的な膜-膜間相互作用に着目して、コレステロールおよび酸化コレステロールが膜特性や膜-膜間相互作用に及ぼす効果を明らかにする上で非常に有効なMembrane Chipを用いる評価手法を開発した。これによって、コレステロールを含有するリポソームの膜構造が誘導する膜-膜間相互作用を評価し、膜のダイナミクスや膜の多様性を検討する方法論の一端を示すことができた。また、本研究で示した結果および方法論は、細胞のストレス応答や細胞機能における生体膜の新たな機能の解明に貢献できると期待される。

### 論文審査の結果の要旨

細胞では、通常、膜タンパク質/レセプターによる特異的な強い膜-膜間相互作用により、生体膜に関連する機能(膜輸送/シグナル伝達など)が維持される。しかし、ストレス付与により失活した場合、膜自身のもつ弱い普遍的な膜-膜間相互作用が顕在化すると考えられる。生体膜成分であるコレステロール(Ch)は、ミクロドメインと呼ばれる不均一構造の誘導など膜構造・特性への影響が大きく、さらに、酸化Chは生体膜の酸化ストレス応答の観点からも注目されている。

本学位論文では、モデル生体膜(リポソーム)を用いて、細胞機能の基礎となる膜-膜間相互作用を解析するツールを開発し、ストレス条件下でChが関与する膜特性変化/不均一な膜構造形成と膜-膜間相互作用との関連性を検討した。第1章では、Ch膜特性評価には、相状態などの知見に加え、流動性、クラスタ形成、水素結合安定性など、定量的評価の必要性を示した。また、酸化Chと類似した蛍光修飾Ch(NBD-Ch)の膜-膜間移動を評価した。第2章では、リポソームを固定化したMembrane Chipを開発し、クラスタ解析/主成分分析の結果を、Chが誘導する不均一構造ならびに膜の局所的疎水性や膜上の水素結合安定性などについて整理し、膜-膜間相互作用を分類した。第3章では、弱い膜-膜間相互作用が、NBD-Ch利用型Membrane Chipにより高感度で解析できることを明らかにした。第4章では、アルツハイマー病関連ペプチドA $\beta$ -Cu錯体による膜中Ch酸化に着目し、上記手法を用いて膜特性と膜-膜間相互作用の酸化ストレス応答挙動を解析した。

以上、本学位論文は、生体膜機能の解析ツールとして新規なMembrane Chipを開発するとともに、ストレス条件下でのCh介在型リポソーム膜-膜間相互作用の評価に基づき、膜の局所的疎水性や膜上の水素結合の安定性などの膜特性と膜-膜間相互作用との関連性を明らかにしたものである。博士(工学)の学位論文として価値のあるものと認める。