



Title	膜ドメインの形成を司るスフィンゴリエリンによる脂質分子間相互作用の解明
Author(s)	矢野, 陽
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72658
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 (矢野 陽)

論文題名 膜ドメインの形成を司るスフィンゴミエリンによる脂質分子間相互作用の解明

論文内容の要旨
(和文)

スフィンゴミエリン(SM)(図1) は生体膜に存在するスフィンゴ脂質の一つであり、シグナル伝達などの生理機能に不可欠なマイクロドメイン(脂質ラフト)の主要成分である。これまで、SMが有するヒドロキシ基とアミド結合を介した分子間の水素結合ネットワークがドメイン形成に重要であると推測されてきた¹⁾。しかし、SM同士が水素結合を介して特異的にドメインを形成することを正確に観測するには至っておらず、脂質ラフトの基盤となっているSMとコレステロール(Cho)の会合状態の詳細については明らかになっていない。

そこで、本研究では、脂質ラフト形成に重要なSM分子間、SM-Cho間の脂質分子間相互作用を精密に評価し、水素結合を介したSMの会合状態やドメインの形成機構を解明することを目的とした。脂質ラフトを模した人工膜における脂質間相互作用を鏡像異性体と天然型のSMで比較することで、立体化学特異的なSM分子間の水素結合がラフト形成の主要因であることを明らかにする。特に、SSMと物理化学的性質が等しい*ent*-SSMでは、SMの不斉炭素近傍にあるアミド部分による分子間水素結合の寄与を正確に評価できると考えた。さらに、SM分子間の水素結合を介したネットワークの形成やそのサイズについて評価することで、SMの会合状態を解明することを目指した。

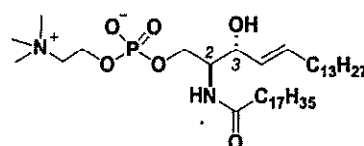
1) Loドメイン形成をもたらすSM-SM間の水素結合とSM-Cho間の疎水性相互作用の精密評価

SSMと、その鏡像体(*ent*-SSM)を用いて、SM分子間、SM-Cho間の相互作用について精査した。それぞれの分子間相互作用を示差走査熱量測定により比較すると、SM間は分子間水素結合によって立体配置特異的に相互作用することを明らかにした。一方で、²H固体NMRではChoはSMの立体化学に関係なくSM脂肪鎖のオーダーを上げることがわかった。加えて、SM/Cho間に働く相互作用ではSMとCho間の水素結合よりChoとSMアシル鎖間での疎水性相互作用の寄与が大きいことが示された。

2) 三成分膜中で形成されるSM分子間水素結合ネットワークの蛍光分光法による解析

SM間の水素結合によるナノドメイン形成を評価するために、蛍光標識したSSMと*ent*-SSMを合成し、脂質ラフトのモデル系である秩序液体 (Lo)ドメイン中の分布を蛍光顕微鏡と蛍光分光法を用いて詳細に観察した。不飽和グリセロリン脂質DOPCを含むSSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho膜でのSSMと*ent*-SSMの分布を蛍光顕微鏡により観測したところ、SSMと*ent*-SSMのマクロな分離は観測されなかった。一方で、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)観測ではSSM/*ent*-SSM間のFRET効率はSSM間のFRET効率より小さいことがわかった。このことから、SSMと*ent*-SSMがそれぞれナノメートルスケールのドメインを形成していることが示された。つまり、Loドメインの微細構造としてSMのナノドメインが存在していると考えた。SM間の水素結合はLoドメイン形成に非常に重要であり²⁾、本研究で明らかとなったナノドメインは生体膜における脂質ラフトの実体を反映していると考えられる。

1) Slotte, J. P. *Biochim Biophys Acta*. **2016**, 1858, 304-10. 2) Yano, Y.; Hanashima, S.; Yasuda, T.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Kinoshita, M.; Al Sazzad, M. A.; Slotte, J. P.; Murata, M. *Biophys. J.* **2018**, 115, 1530-1540.



スフィンゴミエリン (SSM)

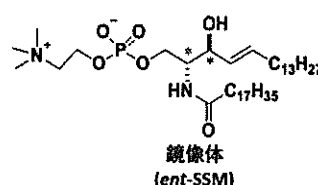
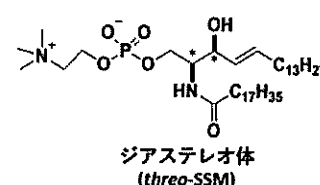
鏡像体
(*ent*-SSM)ジアステレオ体
(*threo*-SSM)

図1 スフィンゴミエリンと各立体異性体の分子構造

(欧文)

Sphingomyelin (SM) is a key component of mammalian cell membrane, particularly in forming cholesterol (Cho)-rich functional domains called lipid rafts. In lipid bilayers, SM segregates from unsaturated lipid to create raft-like liquid ordered (Lo) domains together with Cho. The hydrogen bonds and hydrophobic interactions of SM with neighboring lipids have been considered to stabilize the lipid interactions occurring in the Lo domains¹⁾. However, details of the SM interactions responsible for the lipid raft formation remain largely unknown.

In this study, we synthesized enantiomeric SSM (*ent*-SSM) to elucidate transient lipid-lipid interactions in the Lo domains. An *ent*-SM/*ent*-SM pair, as is the case with SM/SM, showed higher affinity than a hetero *ent*-SSM/SSM pair. Therefore, *ent*-SM is a preferable probe to investigate the role of SM stereochemistry in SM-lipid interactions responsible for the raft formation. The ²H solid state NMR spectra of *d*₂-*ent*-SSM in membrane indicate that *ent*-SSM and SSM are equally susceptible to Cho order effects. In addition, SSM (and *ent*-SSM) received significant order effects from Cho methyl ether. The data suggest that hydrophobic interaction of SM/Cho rather than their hydrogen-bonding is mainly responsible for formation of the Lo domains²⁾. Moreover, inter-lipids FRET experiments using fluorescent probes in a SSM/DOPC/Cho system showed higher intensity than those in an SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho system, suggesting the colocalization of SSM probes rather than the mixing of SSM/*ent*-SSM probes. These results clearly demonstrate that SSM contributes to the stereochemical matching between SM molecules by forming intermolecular hydrogen bonding, which is mainly responsible for the stabilization of the SM/Cho raft domains.

1) Slotte, J. P. *Biochim Biophys Acta*. **2016**, 1858, 304-10. 2) Yano, Y.; Hanashima, S.; Yasuda, T.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Kinoshita, M.; Al Sazzad, M. A.; Slotte, J. P.; Murata, M. *Biophys. J.* **2018**, 115, 1530-1540.

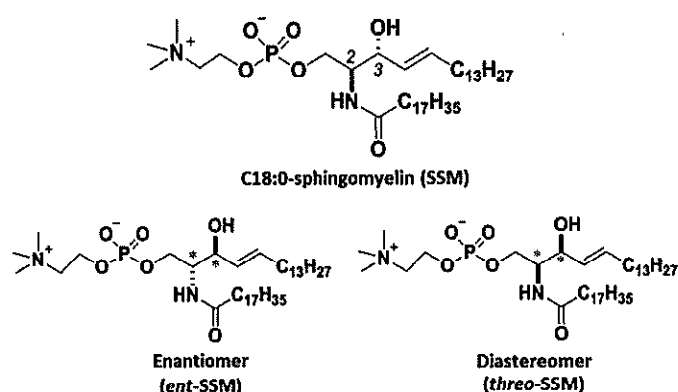


Fig. 1 sphingomyelin and isomer

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (矢野 陽)			
	(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	北 條 裕 信
	副 査	特任教授	島 本 啓 子

論文審査の結果の要旨

矢野氏は学位論文研究として、スフィンゴミエリン(SM)が形成する脂質二重膜に関する化学的および生物物理学研究を行った。SM は生体膜を構成する重要なリン脂質であり、細胞膜の情報伝達プラットフォームとして知られる脂質ラフトの構成成分として多くの注目を集めている。

矢野氏は、脂質膜に形成されるナノメートルサイズのドメイン構造を調べることを目的とし、鏡像体(*ent*-SSM)を用いて二重膜における脂質間相互作用を精査した。すなわち、鏡像体の分子間相互作用において、同じ分子同士では両者は全く同じであるが、異性体間では異なることを利用して、SM が形成するドメインのサイズと性質を解析した。コレステロール(Cho)を含む二成分膜を用いて、膜物性の温度依存性を示差走査熱量測定により評価し、さらに、重水素標識した SM の固体 NMR を測定することによって二重膜疎水性部分の運動性を解析した。また、Cho の 3 位ヒドロキシ基のメチルエーテル体が Cho と同程度のオーダー効果を SM に与えたことから、SM/Cho 間に働く分子間相互作用に関して、水素結合の影響は小さく、Cho の SM 炭化水素鎖に対する疎水性相互作用の寄与が大きいことが示された。

次に、より生体膜に近い三成分膜中で形成される SM ナノドメインの蛍光分光法による解析を行った。すなわち、蛍光標識した SM と *ent*-SM を合成し、脂質ラフトのモデル系である秩序液体相での分布を蛍光顕微鏡と蛍光分光法を用いて観測した。この不飽和リン脂質 DOPC を含む三成分膜での SM と *ent*-SM の分布を、ナノメートル単位の分子間距離を評価できる蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)で計測したところ、SM/SM 間と SM/*ent*-SM 間の FRET 強度に顕著な差があることがわかった。このことから、SM がそれぞれ数～十ナノメートルの極小さいドメインを形成していることが示された。以上、本研究では脂質ラフトのモデル系とされる脂質ドメインに着目し、ナノドメインの形成に関する分子基盤を明らかにした。特に、膜ドメインを SM の特異的分子間相互作用によって形成された分子複合体として捉えることによって、脂質ラフト形成の基盤となる分子間相互作用を明らかにした。

矢野氏の博士論文研究はスフィンゴミエリンを取り上げ、脂質二重膜に形成されるナノドメインに関して多くの新知見を得た点で高い学術的意義がある。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。