

氏名・(本籍)	たに ぐち ゆきの のり 谷 口 幸 範
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	理博第2072号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科, 専攻	東北大学大学院理学研究科(博士課程)物理学専攻
学位論文題目	脂質分解酵素が引き起こす脂質二分子膜小胞の形態・物性変化の可視化解析
論文審査委員	(主査) 教授 須藤 彰 三 教授 大木 和夫, 川勝 年洋 助教授 吉澤 雅幸, 宮田 英威

## 論 文 目 次

### 第1章 序論

- 1.1 背景
- 1.2 本研究の目的
- 1.3 本論文の構成

### 第2章 SMase 処理による膜の形態および透過性変化

- 2.1 背景
- 2.2 材料及び実験方法
- 2.3 結果
- 2.4 考察

### 第3章 SMase 処理によるモデル膜ラフトの変化

- 3.1 背景
- 3.2 材料及び実験方法
- 3.3 結果
- 3.4 考察

### 第4章 バクテリオクロロフィルc(BChl c)-DPPC 系の相挙動とBChl c 会合体可視化の試み

- 4.1 背景
- 4.2 材料及び実験方法
- 4.3 結果
- 4.4 考察

### 第5章 結論および今後の展望

謝辞

付録A 脂質分子の形とその集合体の構造

付録B BChl c の分光学的特性

参考文献

# 論文内容要旨

脂質分子は親水性頭部と疎水性尾部からなる両親媒性分子であり、水中では疎水的効果等により自己集合する。脂質分子集合体の一つである脂質二分子膜は生体膜の基本構造である。生体膜を構成する脂質の主要成分であるホスファチジルコリン(PC) やスフィンゴミエリン(SM) は水中で脂質二分子膜が袋状に閉じた小胞(リポソーム)を形成する。なかでも細胞サイズ(およそ直径 $10\mu\text{m}$ 以上)のリポソームはジャイアントリポソームと呼ばれ、光学顕微鏡下での形態、物性測定に用いられている。

脂質分解酵素スフィンゴミエリナーゼ(SMase)は、SMから親水性頭部を切り離し、セラミド(Cer)に変換する酵素である。SMは細胞膜を構成する主要な脂質であり、コレステロールとともに脂質マイクロドメイン(ラフト)を形成し、シグナル伝達や蛋白質の選別に関わっていると考えられている。また、Cerはシグナル伝達物質としてよく知られた脂質であり、細胞の分化やアポトーシスにおいて重要な役割を担っている。

SMとCerでは分子の形状や膜内での分子の占有面積が大きく異なるため、SMase処理によりSMからCerへ分子が変換されれば、その集合体である膜の形態や物性が変化することが予想される。これまでに、SMaseを細胞あるいはリポソームに処理することにより膜の一部が内側へ陥入し小胞化することや、膜の透過性が上昇することが報告されている。

本研究では、ジャイアントリポソームにSMaseを顕微鏡下で作用させ、形態、物性、相分離ドメインの変化をビデオレートで観察した。結果、ある瞬間にリポソームが崩壊するという現象を見出し、また、膜の透過性増加の機構はリポソームに開いた孔からの分子の拡散であることを明らかにした。さらに、SMase処理が相分離ドメインを変化させることを直接明らかにし、そのときのダイナミクスについての知見を得た。

本論文は以下の様に構成される。

第1章「序論」では、本研究の背景および目的を述べた。

第2章「SMase処理による膜の形態および透過性変化」では、脂質分子の幾何学的な形状の変化が、その集合体であるリポソームの形態、物性をどう変化させるのかに着目した。1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (SOPC)/ N-palmitoyl-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine ( $C_{16}$ SM)3:1 mol%から成るジャイアントリポソームを主に用いてリポソームの形態および透過性変化を観察した。

その結果、SMase処理により、まずジャイアントリポソームの表面積減少と形の球形化が見られ、同時に膜の熱ゆらぎが見られなくなった。続いて、ある瞬間にリポソームが崩壊し、無数のより小さな小胞やそれらが繋がったものに変形するという現象や、リポソーム内に封入した水溶性の分子カルセインおよびデキストラン(M.W. 70000)が数分にわたり徐々に漏出するという現象を見出した。カルセインおよびデキストランは、数分以内にリポソーム内からほとんど全て漏出するが、その間、リポソームの大きさにはほとんど変化は見られなかった。したがって、漏出はリポソームに開いた孔からの分子の拡散により起こることがわかった。そこで、溶液の流出は無視し拡散のみを考えて、カルセインの漏出の速さからリポソームに開いた孔の総面積を見積った。多数のリポソームについてそれぞれ孔の総面積を見積ったところ、孔の総面積とリポソームの表面積には正の相関がみられた。孔の総面積とリポソームの表面積との比はおよそ $10^4$ であった。

SMase処理によりSMがCerに分解されると、分子形状が変化し、膜内での分子の占有面積が減少する。これらは、1、リポソームの曲げ弾性エネルギーを増加させる、2、リポソームの表面積を減少させ、浸透圧および張力の増加をもたらす、と考えられる。これらの膜の力学的因子の変化という観点から、観察さ

れた現象の説明を試みた。

リポソームの崩壊現象は、膜に曲げ弾性エネルギーが蓄積され、膜の一部が破れ張力が消失することを引き金として、一気に形態変化を引き起こしたものと考えられる。また、リポソーム内容物の漏出現象において、膜に孔が開き、それが長時間維持されるためには、膜のエッジエネルギーが低い値をもつ必要がある。そのためには、Cer が非二分子膜構造を形成する、あるいはSMase がエッジに吸着する等の何らかのエッジエネルギーの値を減少させる機構を考えなければならない。

第3章「SMase 処理によるモデル膜ラフトの変化」では、膜の脂質組成変化による相状態の変化と、そのダイナミクスに着目した。1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC)/ C16SM/Cholesterol 1:1:1 mol% の組成比をもつリポソームは室温でliquid-ordered phase (Lo 相) とliquid-disordered phase (Ld 相) の二相共存状態にあり、生体内での脂質マイクロドメイン(ラフト) のモデル系として位置付けられている。この二相共存状態にあるジャイアントリポソームにSMaseを処理し、リポソーム外葉でSMをCerに変換したときのドメインの変化、そのダイナミクスについて、Ld 相に選択的に分配する蛍光色素TR-DPPE、および環境感受性色素Laurdan によるgeneralized polarization (GP) 測定により観測した。

その結果、SMase 処理により膜の外葉の脂質を分解するだけで、数分の内にリポソームの内外葉ともほぼ同時にドメインが消失することがわかった。SMase がLo 相とLd 相の二相共存状態に作用し変化させる能力があることが直接的に明らかになった。

本実験系では、内葉の組成が変化するには脂質分子のフリップフロップ運動を考えねばならないが、これまで知られているフリップフロップ運動の時定数からは、数分で内外葉の脂質分子が混ざり合うことは考えにくい。したがって、本実験系では何らかの機構によりフリップフロップ運動が促進されている可能性がある。

第4章「バクテリオクロロフィルc(BChl c)-DPPC 系の相挙動とBChl c 会合体可視化の試み」では、ジャイアントリポソームを用いた相分離の可視化の応用として、クロロフィル類のなかでも特に会合体を形成する能力が高いと考えられているBChl c と、リポソーム研究によく用いられる脂質であるDPPC を用いて、DPPC 中でのBChl c 会合体を可視化することを試みた。その際、Differential scanning calorimetry(DSC) 測定とBChl c の吸収、蛍光スペクトル測定を用いて、BChl c-DPPC 系の相挙動を調べ、相図を作成した。

BChl c の吸収スペクトルから、BChl c が5-20mol%において37℃以下でBChl c 会合体が形成されることがわかったが、光学顕微鏡で観察できる大きなドメインは形成されないことがわかった。また、BChl c 20mol%以上では温度によらず生体内の会合体と類似の吸収スペクトルを示す会合体が形成されるが、この組成ではジャイアントリポソームは形成されず、おそらく二分子膜構造ではない別の構造をとっていることが考えられる。

第5章「結論および今後の展望」では、本研究の結論と今後の展望について述べた。

## 論文審査の結果の要旨

細胞の脂質代謝で重要な役割を果たす脂質分解酵素スフィンゴミエリナーゼ(Sphingomyelinase)処理により、細胞膜を構成する主要な脂質のスフィンゴミエリン(Sphingomyelin)はセラミドに変換される。本研究では、脂質集合体であるリポソームをスフィンゴエミリンで調製し、スフィンゴミエリナーゼ処理による形態および透過性に関する知見を得ることを目的としている。生体膜の機能は、細胞が生命活動を営む上で欠くことのできない重要なものである。その中でも、形態変化(トポロジーの変化)を利用した、細胞内生体物質の分布と濃度勾配の制御、シグナルの伝達と制御、膜構造体の小胞化、膜融合などの現象は重要な役割を果たしている。しかし、実際の生体膜は、脂質と膜蛋白質から成る多成分系であること、さらにそれらが複雑に相互作用しているために、その本質的な現象および機構を理解することは難しい。

そこで、生物物理分野では、より単純化した人工的に作成したモデル膜での研究が進んでいる。そのような流れの中で、本研究においては、顕微鏡下での観察が可能なジャイアントリポソーム(Giant liposome)を用いて、スフィンゴミエリナーゼ処理による形態および透過性の変化に関する知見を得ることに成功した。ジャイアントリポソームは、直径数十ミクロン程度であり、個々のリポソームについて、光学顕微鏡下にビデオ観察することが可能である。先に、エレクトロフォーメーション法により作成された試料による一部の報告があるが、本研究では、静置水和法により袋状に閉じたりポソームを用いており、水中に浮いた状態での観察を可能にした。その結果、個々のリポソームの崩壊と内容物の漏出の2つの現象を観測した。始めに、スフィンゴミエリナーゼ処理によりリポソームの表面積の減少と形の球状化、熱揺らぎの減少を観測した。ついで、(1)崩壊するものと(2)内容物(カルセイン、デキストラン)の漏出が観測された。(1)に関して、力学的考察から、表面の占有面積の減少による応力の増加から起こると結論した。(2)に関してtension coupled pore modelを用い、穴の総面積の評価と密度の関係を議論している。以上の成果は本人が自立して研究活動を行うに必要な研究能力と学識を有していることを示している。よって、谷口幸範提出の博士論文は博士(理学)の学位論文として合格と認める。