

京都大学	博士（薬学）	氏名	福田 正和
論文題目	アポリポタンパクA-Iによるモデル膜の自発的なディスク状HDL化		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>高密度リポタンパク (HDL) は末梢細胞の過剰なコレステロールを肝臓へ輸送し、代謝させる役割を担う。この代謝経路はコレステロール逆転送系と呼ばれ、新規動脈硬化症治療薬の創薬ターゲットとなっている。HDL新生については、現在のところ、生体膜に発現したABCタンパクの一種であるABCA1とアポリポタンパクA-I (apoA-I) との相互作用により、直径約10nmのディスク状を呈する未成熟なHDL粒子 (ディスク) が形成されることが知られている。しかし、その分子レベルでのメカニズムは未だ不明であり、ABCA1がATP駆動の脂質トランスポーターとして働き、apoA-Iに脂質を直接受け渡すことでディスクが形成されるという説と、ABCA1が脂質トランスロカーゼとして働き、脂質膜の環境を変化させることでapoA-Iによる脂質の引き抜きとディスク形成を誘導するという説がある。</p> <p>本研究では、膜構造の乱れによってapoA-Iが“自発的”に脂質を引き抜き、ディスクを形成するという仮説を検証すべく、ディスクの熱力学的安定性を評価するとともに、どのような膜構造の乱れが自発的なディスク形成を誘導するのかについて調査した。</p> <p><u>第一章 ディスク状HDL形成におけるエンタルピーとエントロピーの変化</u></p> <p>脂質としてPOPC (1-Palmitoyl-2-oleoyl-<i>sn</i>-glycero-3-phosphocholine) を用い、デオキシコール酸透析法によるディスク形成の温度依存性を、ゲルろ過クロマトグラフィーにより評価した。その結果、脂質とapoA-Iの複合体形成反応であるディスク形成は、エントロピー的には不利であるが、それを凌ぐエンタルピー的な有利によって、熱力学的に安定化する反応であることが示された。また、apoA-IのCD測定により、ディスク形成にともなうエンタルピー低下の大部分が、apoA-Iのα-ヘリックスの増加によってもたらされることが判明した。また、ディスク化による脂質膜の変化を、脂質膜に導入した蛍光プローブ (n-AS) の蛍光異方性、蛍光寿命によって調べたところ、ディスク化にともない、脂質のパッキングが密になることが明らかとなった。このことから、ディスク形成にともなうエントロピーの低下は、apoA-Iのα-ヘリックスの増加とともに、脂質膜のパッキングの上昇が原因であることが示唆された。一方で、POPCからなる直径約120nmの大きな一枚膜リポソーム (LUV) に apoA-Iを加えたときの自発的なディスク形成の速度は極めて遅いことが判明し、脂質膜とapoA-Iの混合物は、準安定にあることが明らかとなった。</p> <p><u>第二章 ディスク状HDLにおけるリン脂質二分子膜の静的・動的特性</u></p> <p>DMPC (1,2-dimyristoyl-<i>sn</i>-glycero-3-phosphocholine) からなるディスクと^2Hで標識したD体のDMPCからなる2種類のディスクを、$\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$混合溶媒中で調製</p>			

した。両ディスクを混合すると中性子散乱強度は時間とともに減少した。これは、受動拡散によるDMPCの膜間移動により、両ディスク間でH体とD体のDMPCが交換され、ディスクと溶媒との間の散乱長密度の差が減少したためである。散乱光強度の減少を解析し、ディスクからのDMPCの解離速度を求め、LUVからの解離速度と比較したところ、ディスクからの解離速度のほうが約20倍も速いことが判明した。解離速度の温度依存性の解析を行ったところ、ディスクからの解離では、LUVに比べて、エントロピー障壁が小さいことが明らかとなった。ディスク中の脂質のオーダーとアシル鎖の水和度を、脂質膜に導入した蛍光プローブ (n-AS) の蛍光異方性、蛍光寿命によって調べたところ、ディスク中の脂質がLUVよりも密にパッキングされていることが判明した。これらの結果より、ディスクからの脂質の解離が速いのは、ディスク中の脂質がLUV中よりも密にパッキングされており、エントロピー的に不安定化しているためであることが明らかとなった。

第三章 アポリポタンパクA-Iによるスフィンゴミエリン含有膜からの自発的なディスク状HDL形成

卵黄(PC) フォスファチジルコリンと卵黄スフィンゴミエリン (SM) からなるLUVにapoA-Iを加えたときの自発的なディスク形成を、LUVの散乱光強度の減少により評価した。その結果、PC LUVはほとんどディスク化されないが、高SM含有LUVは自発的にディスク化されることが判明した。脂質膜に導入した蛍光プローブ (DPH)の蛍光異方性の温度変化から、各組成のLUVのゲル—液晶相転移温度を調べたところ、実験温度に近い相転移温度をもつ組成のLUVが、選択的にディスク化されることが判明し、自発的なディスク形成の原因は膜のゲル—液晶相分離であることが明らかとなった。

第四章 酸性条件におけるアポリポタンパクA-Iの構造変化とモデル膜からの自発的なディスク状HDL形成

酸性条件においてPC LUVに apoA-Iを加えたときの自発的なディスク形成を、LUVの散乱光強度の減少によって評価した。その結果、pH 4付近で自発的なディスク形成が観察された。ApoA-IのpHの低下による二次構造の変化、極性の変化を、それぞれ、CD測定、疎水性環境蛍光プローブ (ANS) の蛍光スペクトル測定により調べた。その結果、低pH領域で、疎水性の高い中性条件とは異なる α -ヘリックス構造が形成されること判明し、このことが自発的なディスク形成の原因であることが明らかとなった。

(論文審査の結果の要旨)

高密度リポタンパク (HDL) は末梢細胞の過剰なコレステロールを肝臓へ輸送し、代謝させる役割を担う。この代謝経路はコレステロール逆転送系と呼ばれ、新規動脈硬化症治療薬の創薬ターゲットとなっている。HDL新生については、現在のところ、生体膜に発現したABCタンパクの一種であるABCA1とアポリポタンパク A-I (apoA-I) との相互作用により、直径約10nmのディスク状を呈する未成熟なHDL粒子 (ディスク) が形成されることが知られている。しかし、その分子レベルでのメカニズムは未だ不明であり、ABCA1がATP駆動の脂質トランスポーターとして働き、apoA-Iに脂質を直接受け渡すことでディスクが形成されるという説と、ABCA1が脂質トランスロカーゼとして働き、脂質膜の環境を変化させることでapoA-Iによる脂質の引き抜きとディスク形成を誘導するという説がある。

本研究では、膜構造の乱れによってapoA-Iが“自発的”に脂質を引き抜き、ディスクを形成するという仮説を検証すべく、ディスクの熱力学的安定性を評価するとともに、どのような膜構造の乱れが自発的なディスク形成を誘導するのかについて調査した。

第1章 ディスク状HDL形成におけるエンタルピーとエントロピーの変化

脂質としてPOPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) を用い、デオキシコール酸透析法によるディスク形成の温度依存性を、ゲルろ過クロマトグラフィーにより評価した。その結果、脂質とapoA-Iの複合体形成反応であるディスク形成は、エントロピー的には不利であるが、それを凌ぐエンタルピー的な有利によって、熱力学的に安定化する反応であることが示された。また、apoA-IのCD測定により、ディスク形成にともなうエンタルピー低下の大部分が、apoA-Iの α -ヘリックスの増加によってもたらされることが判明した。また、ディスク化による脂質膜の変化を、脂質膜に導入した蛍光プローブ (n-AS) の蛍光異方性、蛍光寿命によって調べたところ、ディスク化にともない、脂質のパッキングが密になることが明らかとなった。このことから、ディスク形成にともなうエントロピーの低下は、apoA-Iの α -ヘリックスの増加とともに、脂質膜のパッキングの上昇が原因であることが示唆された。一方で、POPCからなる直径約120nmの大きな一枚膜リポソーム (LUV) に apoA-Iを加えたときの自発的なディスク形成の速度は極めて遅いことが判明し、脂質膜とapoA-Iの混合物は、準安定にあることが明らかとなった。

第2章 ディスク状HDLにおけるリン脂質二分子膜の静的・動的特性

DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) からなるディスクと ^2H で標識したD体のDMPCからなる2種類のディスクを、 $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ 混合溶媒中で調製した。両ディスクを混合すると中性子散乱強度は時間とともに減少した。これは、受動拡散によるDMPCの膜間移動により、両ディスク間でH体とD体のDMPCが交換され、ディスクと溶媒との間の散乱長密度の差が減少したためである。散乱光強度の減少を解析し、ディスクからのDMPCの解離速度を求め、LUVからの解離速度と比較したところ、ディスクからの解離速度のほうが約20倍も速いことが判明した。解離速度の温度依存性の解析を行ったところ、ディスクからの解離では、LUVに比べて、エントロピー障壁が小さいことが明らかとなった。ディスク中の脂質のオーダーとアシル鎖の水和度を、脂質膜に導入した蛍光プローブ (n-

AS) の蛍光異方性、蛍光寿命によって調べたところ、ディスク中の脂質がLUVよりも密にパッキングされていることが判明した。これらの結果より、ディスクからの脂質の解離が速いのは、ディスク中の脂質がLUV中よりも密にパッキングされており、エントロピー的に不安定化しているためであることが明らかとなった。

第3章 アポリポタンパクA-Iによるスフィンゴミエリン含有膜からの自発的なディスク状HDL形成

卵黄 (PC) フォスファチジルコリンと卵黄スフィンゴミエリン (SM) からなるLUVにapoA-Iを加えたときの自発的なディスク形成を、LUVの散乱光強度の減少により評価した。その結果、PC LUVはほとんどディスク化されないが、高SM含有 LUVは自発的にディスク化されることが判明した。脂質膜に導入した蛍光プローブ (DPH)の蛍光異方性の温度変化から、各組成のLUVのゲル—液晶相転移温度を調べたところ、実験温度に近い相転移温度をもつ組成のLUVが、選択的にディスク化されることが判明し、自発的なディスク形成の原因は膜のゲル—液晶相分離であることが明らかとなった。

第4章 酸性条件におけるアポリポタンパクA-Iの構造変化とモデル膜からの自発的なディスク状HDL形成

酸性条件においてPC LUVに apoA-Iを加えたときの自発的なディスク形成を、LUVの散乱光強度の減少によって評価した。その結果、pH 4付近で自発的なディスク形成が観察された。ApoA-I の pHの低下による二次構造の変化、極性の変化を、それぞれ、CD測定、疎水性環境蛍光プローブ (ANS) の蛍光スペクトル測定により調べた。その結果、低pH領域で、疎水性の高い中性条件とは異なる α -ヘリックス構造が形成されること判明し、このことが自発的なディスク形成の原因であることが明らかとなった。

以上、ディスク状HDLの静的および動的性質、リン脂質2分子膜のスフィンゴミエリン含有の効果と酸性条件におけるapoA-Iの構造変化の研究、およびディスク状HDL形成の熱力学的調査より、アポリポタンパクA-I によるリン脂質モデル膜が自発的にディスク状HDLに再構成されることを明らかにした。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成22年2月24日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降