

多成分脂質膜におけるマイクロドメインの成長過程

お茶の水女子大学 理学部
今井正幸・増井友美・柳澤実穂

概要

不飽和リン脂質と飽和リン脂質およびコレステロールの3成分からなるモデル生体膜におけるドメイン構造形成を散乱実験および蛍光顕微鏡観察により検討した。ドメイン形成は数 nm スケールでの核形成過程に始まり、ドメインの衝突・合体により成長していくが、ドメインサイズがある値にまで成長すると、膜の弾性的性質と強く結合し発芽(budding)と呼ばれるドメインの変形挙動が観察される。この他にもモデル脂質膜でのドメイン清澄には多くの特徴的な振る舞いが観察されるが、その多くは未解決問題として残っている。

1. はじめに

生命活動を担う基本構成単位である細胞は、その周囲を生体膜によって囲まれ外界と隔てられている。しかし、この細胞膜は完全に細胞内と外界を遮蔽しているわけではなく、代謝を行うに必要な物質や情報を内と外との間にやり取りする為に様々な機能性物質（蛋白質や糖鎖など）を溶かし込んだ複合膜として存在する。実際の生体膜（赤血球膜）の構成成分の組成を表1に示す[1]。大きく分けると細胞膜は蛋白質と脂質からなっており、脂質はリン脂質とコレステロールに分けられる。このリン脂質はグリセロール-3-リン酸を骨格として、1,2 の位置の水酸基に長鎖脂肪酸がエステル結合したグリセロリン脂質が主成分であり、この他にアミノアルコールを基本骨格としたスフィンゴミエリンの仲間が存在する。このリン脂質の化学構造を見てみると、その疎水性を担う炭素鎖には不飽和 2 重結合を持たない飽和リン脂質と不飽和 2 重結合をもつ不飽和リン脂質の2つのタイプが存在する事がわかる。そして、この飽和リン脂質はコレステロールを取り込んだ形で不飽和リン脂質と細胞膜内で相分離し、ラフト構造と呼ばれる数 nm スケールのドメイン構造を形成することが知られている。この飽和リン脂質ドメインと不飽和脂質ドメインでは、その化学構造に起因して膜厚が異なるため、各々のドメインに可溶化される蛋白質に選択性が現れ、この選択性が細胞膜の機能発現に重要な役割を果たして

表1. 赤血球膜の構成成分（重量パーセント）

タンパク質	49.2%		
脂質	43.6%		
リン脂質	32.5%	ホスファチジルコリン(PC)	34.7%
		ホスファチジルエタノールアミン(PE)	28.0
		スフィンゴミエリン(Sph)	20.1
		ホスファチジルセリン(PS)	14.3
		ホスファチジン酸(PA)	2.2
コレステロール	11.1%		
炭水化物	7.2%		
糖タンパク質として	6.7%		
糖脂質として	0.5%		

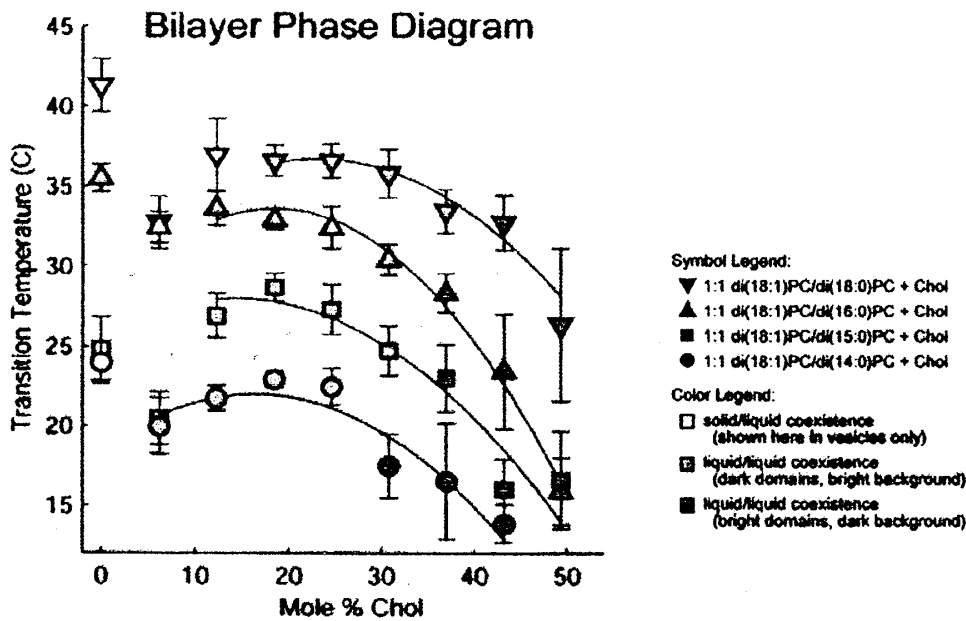


図1. 飽和リン脂質/不飽和リン脂質/コレステロールを複合膜の巨大リポソームの温度-コレステロール濃度相図を何種類かの飽和リン脂質の種類に対してプロットしたもの[6]。

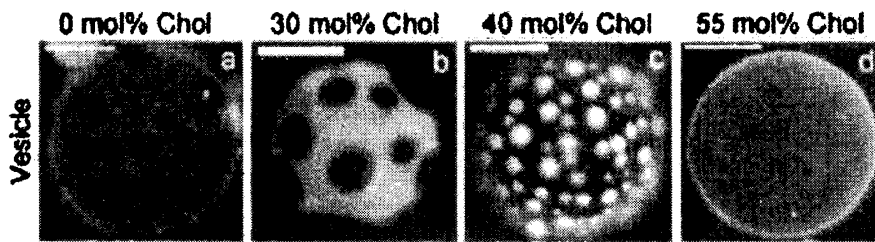


図2. 1:1 に混合した di(18:1)PC/di(16:0)PC のリン脂質膜に加えるコレステロールの分量を変化させた時に観察されたリポソーム膜上のマイクロドメインの様子[6]。

いると考えられている[2,3,4]。

このような背景から、最近、不飽和リン脂質と飽和リン脂質およびコレステロールの3元系からなるモデル生体膜を用いてドメイン構造形成を調べる研究が盛んになってきている[5,6,7]。S. Keller のグループのホスファチジルコリン(PC)系のリン脂質を用いたその相挙動に関する実験[6]では、飽和リン脂質(例えば di(16:0)PC (DPPC)) と不飽和リン脂質 (di(18:1)PC (DOPC)) およびコレステロールを様々な割合で混合したリン脂質複合膜の巨大リポソーム (GV: 直径数十 μm) を作成し、蛍光色素で染色した後、リポソーム表面のドメイン構造を蛍光顕微鏡を用いて観察している。図1にはこの3成分系の温度-コレステロール濃度相図を飽和リン脂質の種類を変えて示している。いずれの系においても高温側では均一相状態であるが、低温側では固/液ないしは液/液の2相分離状態であることを示している。1:1 に混合した di(18:1)PC/di(16:0)PC のリン脂質膜に加えるコレステロールの分量を変化させた時に観察された液/液2相共存状態におけるリポソーム膜上のマイクロドメインの様子を図2に示す。用いた蛍光色素はコレステロールが多い領域 (コレステロールは飽和リン脂質のドメインに局在化する) からは排除される性質を有しているため、暗い領域がコレステロールが多い領域であり、

明るい領域がコレステロールが少ない不飽和リン脂質領域であり、脂質膜上で相分離によりドメイン形成を見事に捉える事に成功している。本報告では、モデル生体膜（3成分脂質膜）におけるこのマイクロドメインの成長過程について述べる。

2. マイクロドメイン形成の初期過程

生体膜においては、ラフト構造はナノメートルスケールで存在すると考えられており、飽和リン脂質、不飽和リン脂質、コレステロールを混合したモデル生体膜で観察されるマイクロメートルスケールでのドメインが本当にナノメートルスケールで安定に存在し得るのかを知る事は、ラフト構造とマイクロドメイン構造との関係を知る上で非常に重要である。この目的のため、我々は 10nm サイズの均一ベシクルを作成し、この極小ベシクル上でのドメイン形成を中性子小角散乱法により追跡した。まず始めに、極小ベシクルのサイズと多分散性を調べるため、軽水素化脂質で作成した極小ベシクルの重水溶液の中性子小角散乱を測定した（図3）。

ベシクルは球殻構造を有しており、内水相の半径を R_i 、ベシクルの外殻半径 R_o （2分子膜の厚みを δ とすると $R_o = R_i + \delta$ ）と表すと、系からの散乱強度 $I(q)$ は

$$I(q) = \rho_v \int_0^{\infty} f(r) P(q,r) dr S(q) \quad (1)$$

で表される。ここで ρ_v はコロイド粒子の数密度、 $f(r)$ は球状コロイド粒子の多分散性を表す式で、ここでは Schultz 分布を仮定した次式を用いた。

$$f(r) = \frac{(z+1)^{z+1}}{R_0 \Gamma(z+1)} \left(\frac{r}{R_0}\right)^z \exp(-(z+1)r/R_0) \quad (2)$$

ここで R_0 は $R_0 = (R_i + a)/2$ で表されるコロイド半径、 $\Gamma(x)$ はガンマ関数である。 z は次式で表される多分散性を表すパラメーターである。

$$z+1 = 1/p^2 = \langle r \rangle^2 / (\langle r^2 \rangle - \langle r \rangle^2) \quad (3)$$

また、 $P(q,r)$ は半径 r のベシクルの形状因子であり、水相、脂質 2 分子膜相の散乱長密度をそれぞれ b_w, b_l とすると形状因子は次のように書ける。

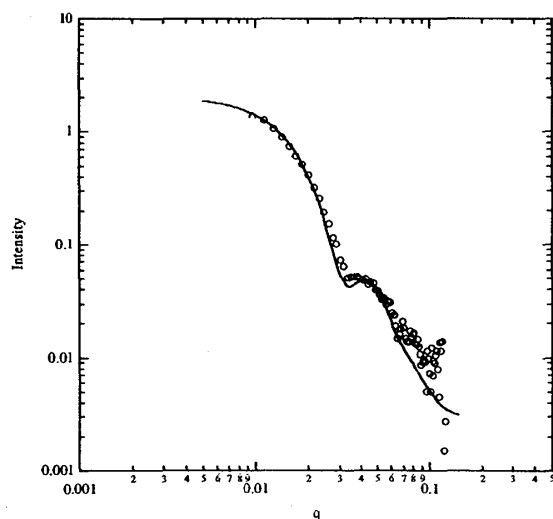


図3 極小ベシクルの重水溶液の中性子小角散乱曲線

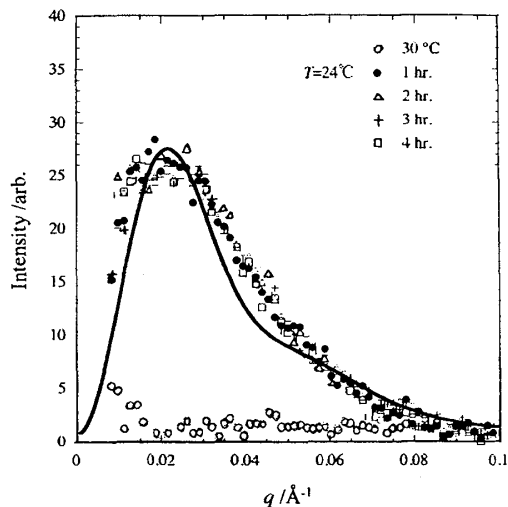


図4 コントラストマッチさせた試料からの中性子小角散乱曲線

$$P(q) = \left\{ (b_w - b_l) \frac{4\pi R_i^3}{3} f(qR_i) + (b_l - b_w) \frac{4\pi R_o^3}{3} f(qR_o) \right\}^2 \quad (4)$$

$$f(x) = \frac{3(\sin x - x \cos x)}{x^3} \quad (5)$$

これらの式を用いて実験から得られた散乱曲線を fitting すると、ベシクルの外殻半径 $R_o=10\text{nm}$ 、2分子膜の膜厚 $\delta=3.7\text{nm}$ 、 $p=0.15$ の値が得られ、ほぼ均一な極小ベシクルが形成している事が分かった。

このような極小ベシクルにおけるドメイン形成を観察するには、一般に用いられている蛍光顕微鏡法ではサイズが小さすぎ不可能である。そこで、我々は重水素化ラベルした脂質分子を用いるコントラスト変化中性子小角散乱法を用いて、nm スケールでのマイクロドメイン形成を調べた。ここでは、極小ベシクルを重水素化した DPPC(DPPC-d62)と軽水素化 DOPC とコレステロールを用いて作成し、その脂質膜の平均の散乱長密度と一致する様に軽水と重水を混合した水を用いて散乱実験を行った。実験はまず、充分高温 (60°C) で脂質膜を均一相状態にした上で温度を下げて、相分離温度 (図1参照) の直上 (30°C) で散乱曲線を測定した。次に、温度を相分離温度以下に下げて、相分離に伴う構造形成を散乱法により追跡した。図4には 30°C で測定した均一相状態の脂質膜ベシクルからの散乱曲線と相分離温度以下の 24°C にて測定したドメイン形成後の散乱曲線を時間発展の形で示している。 30°C では膜からの散乱長密度と溶媒からの散乱長密度が一致しているので、膜からの散乱は観察されない。一方 24°C においては、 $q=0.02\text{\AA}^{-1}$ (q は散乱ベクトルの絶対値) 付近にピークを持つ散乱曲線が観察され、そのプロファイルは時間に依存せずほぼ一定であった。この事は、形成したドメインが平衡状態にあることを意味している。平衡状態については、ドメインが budding により分裂してより小さなベシクルとして水中に浮かんでいる場合と、budding せずに膜内で完全に2つの領域に分離してしまっている場合の2つの場合が考えられる。図4の 24°C の散乱曲線のピーク位置は図3の球状ベシクルからの散乱曲線に観察される 0.04\AA^{-1} 付近のピーク位置よりも低角側であり、またその関数型もベシクルから予想される関数型とは異なることから、ドメインは budding せずに膜内で完全に2つの領域に分離した状態であると考えた。そこで、図5に示すような散乱長密度分布を考え、その形状因子は次の様に計算する事ができる。

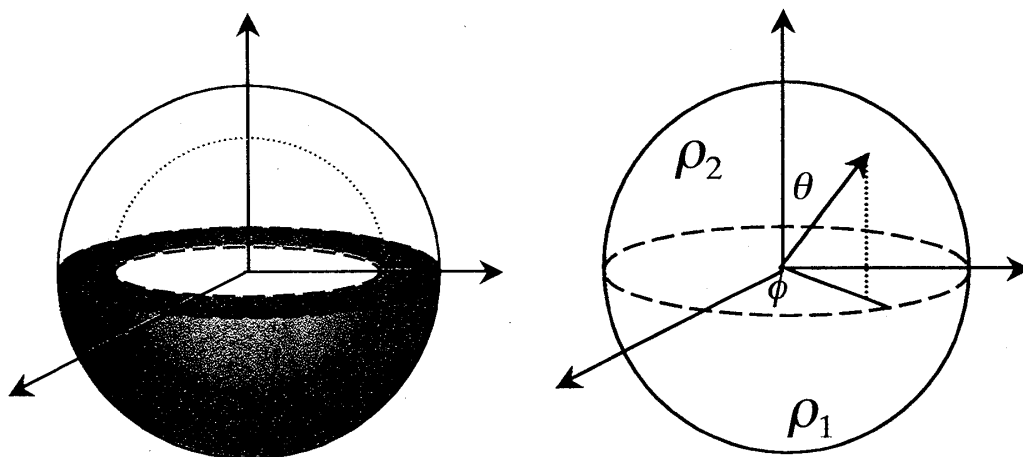


図5 極小ベシクルでのマイクロドメイン構造とそれを表す座標系。

$$P(q) = \Phi(q)^2 \tag{6}$$

$$\begin{aligned} \Phi(q, R) &= \int_{R-\delta}^R \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \rho(\theta) e^{iqr \cos\theta} r^2 \sin\theta \, dr d\theta d\phi \\ &= 2\pi \int_{R-\delta}^R \left\{ \int_0^{\theta_c} \rho_1 e^{iqr \cos\theta} r^2 \sin\theta \, d\theta + \int_{\theta_c}^\pi \rho_2 e^{iqr \cos\theta} r^2 \sin\theta \, d\theta \right\} dr \end{aligned} \tag{7}$$

この形状因子を用いて 24°C での散乱曲線を fit した結果を図 4 中に実線で示しており、この形状因子は得られた散乱曲線を凡そ再現している事がわかる。この fitting から得られたベシクルの外殻の半径は 10 nm、ドメインの面積分率を規定する開き角は 65° となり、この状況を模式図で表すと図 6 の様になり、nm スケールで安定にマイクロドメインが形成することがわかった。

また、図 7 には、このコントラストマッチさせた極小ベシクルからの散乱曲線の温度依存性を示している。相分離温度から温度が離れるに従って、散乱強度が増大するものの、その関数型はほぼ同じであり、またそのピーク位置も温度によって殆ど変化しないことがわかる。このことは、温度によって、ドメインの形状やサイズが殆ど変化しない事を意味している。一方、散乱強度の増大は、ドメインの形状やサイズが殆ど変化しない事から散乱コントラストの変化にその原因があると考えられる。すなわち、相分離温度に近い所の温度では、形成した重水素化飽和リン脂質ドメインと軽水素化不飽和リン脂質マトリックスの間の散乱長密度差が小さくなっていると考えられる。これはドメイン内およびマトリックス内の組成が温度によって変化している事を意味し、相分離温度に近い温度領域では、ドメインの内部にはまだ多くの軽水素化不飽和リン脂質が残っているが、相分離温度から離れるに従って、ドメイン内での軽水素化不飽和リン脂質が減少して行く事を表している。

また、この散乱データからマイクロドメインの核形成過程について考えてみる。2 次元膜上での相分離に対する安定核サイズ R^* は、ドメイン形成による単位面積あたりの安定化エネルギーを $\delta\mu$ で表すと、

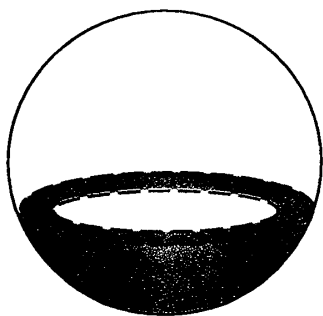


図 6 散乱曲線の解析から得られた極小ベシクルのドメイン構造モデル

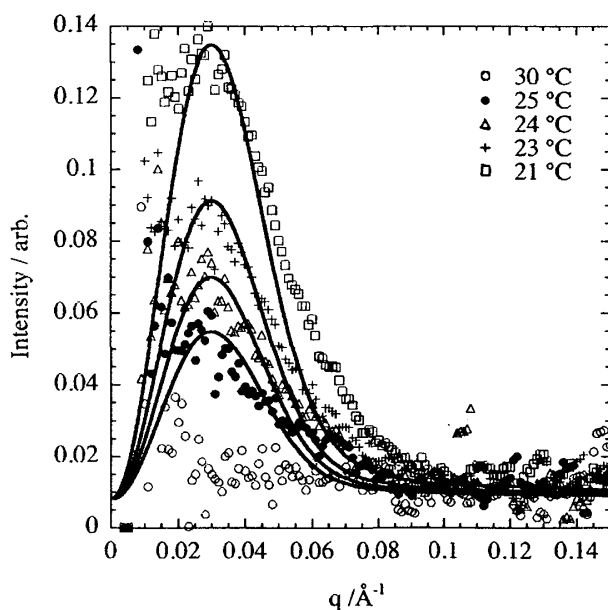


図 7 コントラストマッチさせた試料からの中性子小角散乱曲線の温度依存性

$$2\pi R^* \sigma - \pi R^{*2} \rho \delta\mu = 0 \quad (8)$$

により表される。ここで、 ρ は密度である。今、 $\delta\mu$ が次のような温度依存性を持つとする。

$$\delta\mu = \frac{\delta h(T_c - T_x)}{T_c} \quad (9)$$

ここで、 δh は相分離に対する潜熱であり、 T_c は相分離温度、 T_x は実験温度である。この式を(8)式に代入すると、 R^* の温度依存性として次の式が得られる。

$$R^* = \frac{2\sigma}{\rho \delta h(T_c - T_x)} \quad (10)$$

すなわち、安定核サイズは相分離温度に近づく程大きくなる事が分かる。もし、極小ベシクル上に出来るドメインサイズがこの安定核サイズよりも小さくなると、安定なマイクロドメインは形成されず、ドメインからの散乱は消失するはずであり、この温度では散乱コントラストもゼロになる点として現れる。この事から、散乱強度の温度依存性をプロットして強度がゼロになる温度、約 28°C がこの温度に対応し、ここが安定核サイズが大凡 10nm 程度であると考えられることができる。

3. マイクロドメイン形成の中・後期過程

核形成により生まれたマイクロドメインはその後、衝突・合体を繰り返しながら成長する。不飽和リン脂質飽和リン脂質、コレステロールの3成分モデル脂質膜(巨大ベシクル:GV)において蛍光顕微鏡観察された成長過程を図8に示す。ここで、図中に示した時間スケールは参考の為に示したものであり、実際のドメイン成長のタイムスケールは観察しているベシクルの個体差によって大きく変わる事に注意されたい。 μm スケールから観察され始めたドメインは時間とともに成長を続け、図2、8に示すようなドメインの粗大化過程を示すが、後期過程に

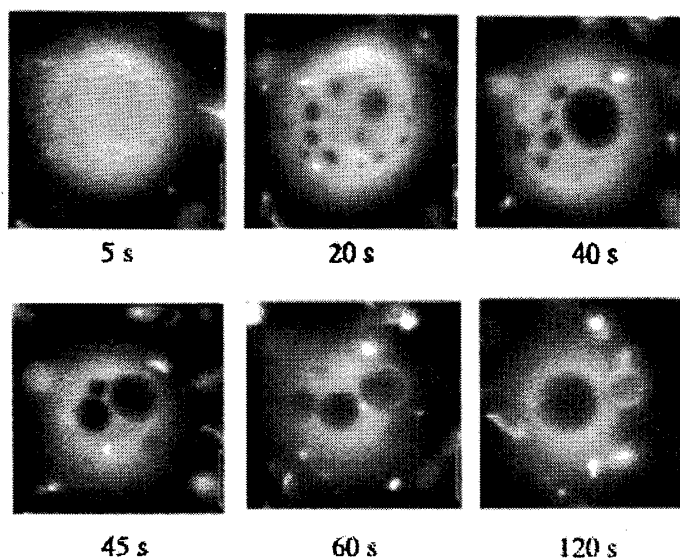


図8 巨大ベシクルで観察されるマイクロドメインの成長過程

入ると、膜上におけるドメイン成長過程に特徴的な budding (発芽) 現象と呼ばれる、膜の弾性的性質と強く結合したドメインの変形現象が観察される。図 8 に示している様に相分離によりマイクロドメインが形成すると、各ドメインは衝突・融合を繰り返しながら成長するが、ドメインがある程度の大きさにまで成長すると、突然膜の外側に飛び出す様に変形を始め、膜の外側に瘤状のベシクル (この状態を incomplete budding と呼ぶ) を形成し、最終的にこのベシクルは親ベシクルから離脱して、一つの小さな球状ベシクル (この状態を complete budding と呼ぶ) として浮遊するようになる。

この budding 現象は、理論的には形成されたドメイン状膜のもつ曲げ弾性率とドメイン境界における線張力を考える事により理解できる。この変形したドメイン膜を記述する構造パラメーターを図 9 のようにとる。 $C=1/R$ を膜ドメインの曲率、 C_0 を膜の自発曲率、 κ を曲げ弾性率とおくと、平面膜からお碗状に変形した膜の弾性エネルギーは

$$F_{bend} = A \frac{1}{2} \kappa (2C - 2C_0)^2 = 2\pi\kappa (LC - LC_0)^2 \quad (11)$$

となる。一方線張力からの寄与は、円状境界線の長さを $2\pi N$ で表すと $N = L\sqrt{1 - (LC/2)^2}$ の関係から、線張力を σ として

$$F_{edge} = 2\pi N\sigma = 2\pi\sigma L\sqrt{1 - (LC/2)^2} \quad (12)$$

により与えられる。今、特徴的な陥入長 $\xi = \kappa/\sigma$ を導入すると、 $\bar{F} = (F_{bend} + F_{edge})/2\pi\kappa$ で表される無次元化されたドメインの全エネルギーは

$$\bar{F} = (LC - LC_0)^2 + (L/\xi)\sqrt{1 - (LC/2)^2} \quad (13)$$

により表される。図 10 には例えば対称性 2 分子膜のような C_0 が 0 の場合に対する換算自由エネルギー \bar{F} を換算曲率 LC の関数として示している。 $LC = \pm 2$ というのは完全に芽(bud)が球にまで成長したことに対応する事に注意すると、 L/ξ が小さい時 \bar{F} は $LC=0$ で最小値をもち、平

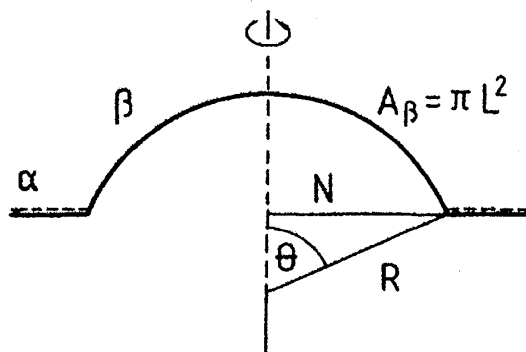


図 9 Budding を記述するモデル

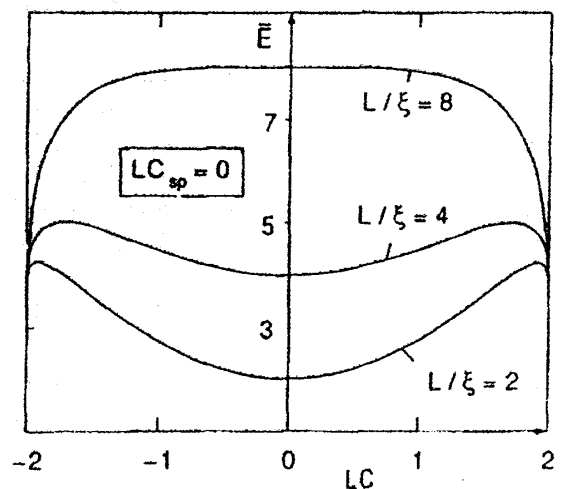


図 10 自発曲率が 0 の場合の換算自由エネルギー曲線をドメインサイズの関数としてプロット。

面状のマイクロドメインが安定であることを示しているが、 L/ξ の値が大きくなると、次第に平面膜は準安定になり、代わって $LC = \pm 2$ の分裂した球状ドメインが安定状態となり、 $L/\xi=8$ では、平面膜は不安定化して自発的に球状ドメインが形成される (+,-の符号は budding の方向が内側か外側かを表している)。(13)式より形成した膜ドメインが完全に球形 bud を形成する為の臨界ドメインサイズ L^* は

$$L^* \approx 4\xi \quad (14)$$

で与えられる。通常リン脂質膜の κ は 10^{-19} J 程度、 σ は 10^{-12} N 程度なので L^* は $0.4\mu\text{m}$ となる。しかし、実験では図 8 にもみられるように、数 μm の大きさを持つマイクロドメインが普通に観察されており、このモデルとの定量的な不一致がある事が分かる。このドメイン成長中・後期過程における成長ダイナミクスの研究はまだ始まったばかりであり、今後の研究の進展が望まれる領域である。

参考文献

- [1] 大西俊一 生体膜の動的構造 東京大学出版会 (1993).
- [2] D. Brown, and J.K. Rose, Cell, **68**, 533 (1992).
- [3] M. Sargiacomo, M. Sudol, Z. Tang, and M.P. Lisnti, J. Cell Biol. **122**, 789 (1993).
- [4] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Water, Molecular Biology of the Cell 4th edition, Grland Science, New York, 2002.
- [5] K. Simons, and E. Ikonen, Nature(London) **387**, 369 (1997).
- [6] S.L. Veatch, and A.L. Keller, Phys. Rev. Lett. **89**, 268101 (2002).
- [7] T. Baumgart, S. T. Hess, and W. W. Webb, Nature **425**, 821 (2003).
- [8] R. Lipowsky, J. Phys. II France **2**, 1825 (1992).