

氏名	たなかまさみ 田中 将史
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	薬博第 537 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 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	薬学研究科創薬科学専攻
学位論文題目	Membrane Structure of Lipid Particles and Binding of Amphipathic α -Helices of Plasma Apolipoproteins (脂質粒子膜構造と血漿アポリポ蛋白質両親媒性 α ヘリックスの結合に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 半田 哲郎 教授 松崎 勝巳 教授 加藤 博章

論文内容の要旨

生体内で脂質輸送を担う血漿リポ蛋白質は非極性なトリグリセライド (TG) とコレステリルエステルのコアをレシチン (PC) やコレステロール (Chol) などの表面混合単分子膜が覆ったエマルション粒子構造をもつ。血漿リポ蛋白質は、その代謝過程において、構成脂質組成や粒子径といった粒子表面構造の物理化学的变化を受け、これに伴いアポリポ蛋白質や酵素などの結合選択性や活性が調節され、代謝の方向付けがなされている。しかしながら、アポリポ蛋白質と脂質粒子との相互作用メカニズムについてはあまり解明されていない。申請者は、TG-rich リポ蛋白質モデル粒子 (脂質エマルション) 及び二分子膜ベシクルを調製し、脂質-アポリポ蛋白質間相互作用を膜構造変化の観点から研究した。

第一章

脂質エマルションにおけるコアトリグリセライドの表面リン脂質単分子膜への貫入

アポリポ蛋白質 A-1 (apoA-1) は、コア脂質を持たない PC 二分子膜ベシクル (LUV) に対してはほとんど結合しなかったが、粒子サイズ、表面脂質組成とも同一であるトリオレイン (TO)-PC エマルションに対しては、その約 10 倍の高い最大結合量を示した。また、その結合量はコア脂質 TG アシル鎖長に依存し、中鎖 TG-PC エマルションでは、TO-PC エマルションに比べ、結合量が減少した。また、LUV 表面にこれら TG を飽和させても apoA-1 の結合量は変化しなかった。これらの結果は、apoA-1 と脂質粒子との相互作用が粒子表面膜上でのイベントであるにもかかわらず、エマルションに対する apoA-1 の結合にコア脂質が重要な役割を担うことを示している。そこで、エマルション表面へのアポリポ蛋白質の結合を支配する脂質粒子表面膜の性質を、主に蛍光分光学的手法に基づき研究した。その結果、脂質エマルションは二分子膜ベシクルに比べ、リン脂質アシル鎖領域の運動性の減少と極性頭部領域の水和度の上昇を示した。すなわち、脂質エマルションにおいては、コア TG アシル鎖が表面リン脂質単分子膜アシル鎖に貫入 (interpenetration) し、アシル鎖領域をタイトにすると同時に、極性頭部を広げ、アポリポ蛋白質の結合を支配していることが示唆された。

第二章

コレステロールによる両親媒性クラス A 型ペプチド、Ac-18A-NH₂ とレシチン二分子膜との相互作用の制御

アポリポ蛋白質と細胞膜との相互作用における Chol の効果をモデルペプチド (Ac-18A-NH₂) を用いて分子論的に研究した。Chol のリン脂質二分子膜表面への添加により、apoA-1 と同様、Ac-18A-NH₂ の最大結合量は増加し、結合親和性は減少した。また、二分子膜に内封した蛍光色素の漏出は Chol の添加により減少した。蛍光スペクトルや蛍光消光実験の結果から、Ac-18A-NH₂ は PC LUV に比べ、PC/Chol LUV 表面ではより浅く結合していることが示唆された。さらに、蛍光エネルギー移動法を用いて詳細に検討した結果、Ac-18A-NH₂ はリン脂質極性頭部付近に局在することが示された。すなわち、Chol が脂質膜表面での蛋白質 (ペプチド) のロケーションをより浅くし、その結果から、細胞からのコレステロール引き抜きにおけるアポリポ蛋白質の解離に有利に働くことが示唆された。

第三章

脂質粒子におけるアポリポ蛋白質 A-1 の表層的結合

脂質粒子表面リン脂質各原子サイトの微環境について、 ^{13}C NMR 法により解析を行った。その結果、表面リン脂質カルボニル炭素の化学シフト値と apoA-1 の最大結合量との間に強い相関が認められた。すなわち、粒子表面膜界面領域に生じたリン脂質分子間のスペースが apoA-1 の結合性を支配する重要な因子であることが示された。また、apoA-1 結合に伴う化学シフト変化を調べたところ、TO-PC エマルションではカルボニル炭素が最も強い perturbation を受け、より疎水的な環境に変化することが分かった。このことは、コア TG アシル鎖の interpenetration によって生じた表面膜界面領域のスペースが、apoA-1 の結合により占有され、それまで存在した水分子が追い出されたためと推定された。

以上、apoA-1 の結合においてコア脂質は必要な役割を担うが、apoA-1 はコア脂質とは必ずしも相互作用せず、表面膜の構造変化を介してコア脂質が間接的にアポリポ蛋白質の結合を調節していることを解明した。

論文審査の結果の要旨

血漿リポ蛋白質は、非極性なトリグリセライド (TG) とコレステリルエステルのコアをレシチン (PC) やコレステロール (Chol) などの表面混合単分子膜が覆ったエマルション粒子構造をもち、その代謝過程で脂質組成や粒子径などが変化を受け、これに伴いアポリポ蛋白質や酵素などの結合選択性や活性が調節され、代謝が方向付けされると考えられている。本論文は、TG-rich リポ蛋白質モデル粒子 (脂質エマルション) 及び二分子膜ベシクルを調製し、コア脂質組成や粒子径変化が脂質粒子-アポリポ蛋白質間相互作用におよぼす影響を表面膜構造変化の観点から研究したものである。

まず、脂質エマルションのコアのトリグリセライドが表面のリン脂質単分子膜の構造に及ぼす影響を検討した。アポリポ蛋白質 A-1 (apoA-1) は、コア脂質を持たない PC 二分子膜ベシクル (LUV) に対してはほとんど結合しなかったが、粒子サイズ、表面脂質組成とも同一であるトリオレイン (TO)-PC エマルションに対しては、その約 10 倍の高い最大結合量を示した。また、その結合量はコア脂質 TG アシル鎖長に依存し、中鎖 TG-PC エマルションでは、TO-PC エマルションに比べ、結合量が減少した。また、LUV 表面にこれら TG を飽和させても apoA-1 の結合量は変化しなかった。これらの結果は、apoA-1 と脂質粒子との相互作用が粒子表面膜上でのイベントであるにもかかわらず、エマルションに対する apoA-1 の結合にコア脂質が重要な役割を担うことを示している。そこで、エマルション表面へのアポリポ蛋白質の結合を支配する脂質粒子表面膜の性質を、主に蛍光分光学的手法に基づき研究した。その結果、脂質エマルションは二分子膜ベシクルに比べ、リン脂質アシル鎖領域の運動性の減少と極性頭部領域の水和度の上昇を示した。すなわち、脂質エマルションにおいては、コア TG アシル鎖が表面リン脂質のアシル鎖に貫入 (interpenetration) し、アシル鎖領域をタイトにすると同時に、極性頭部を広げ、アポリポ蛋白質の結合を支配していることが示唆された。

次に、アポリポ蛋白質と細胞膜との相互作用における Chol の効果を apoA-1 モデルである両親媒性クラス A 型ペプチド (Ac-18A-NH₂) を用いて分子論的に研究した。Chol のリン脂質二分子膜表面への添加により、apoA-1 と同様、Ac-18A-NH₂ の最大結合量は増加し、結合親和性は減少した。また、二分子膜に内封した蛍光色素の漏出は Chol の添加により減少した。蛍光スペクトルや蛍光消光実験の結果から、Ac-18A-NH₂ は PC LUV に比べ、PC/Chol LUV 表面ではより浅く結合していることが示された。さらに、蛍光エネルギー移動法を用いて詳細に検討した結果、Ac-18A-NH₂ はリン脂質極性頭部付近に局在することも示された。すなわち、Chol が脂質膜表面での蛋白質 (ペプチド) のロケーションをより浅くし、その結果、細胞からのコレステロール引き抜きにおけるアポリポ蛋白質の解離に有利に働くことが示唆された。

さらに、脂質粒子上における apoA-1 の表層的結合を詳しく検討するため、脂質粒子表面リン脂質各原子サイトの微環境について、 ^{13}C NMR 法により解析を行った。その結果、表面リン脂質カルボニル炭素の化学シフト値と apoA-1 の最大結合量との間に強い相関が認められた。すなわち、粒子表面膜界面領域に生じたリン脂質分子間のスペースが apoA-1 の結合性を支配する重要な因子であることが示された。また、apoA-1 結合に伴う化学シフト変化を調べたところ、TO-PC エマルションではカルボニル炭素が最も強い perturbation を受け、より疎水的な環境に変化することが分かった。このことは、コア TG アシル鎖の interpenetration によって生じた表面膜界面領域のスペースが、apoA-1 の結合により占有され、それまで存在した水分子が追い出されたためと結論された。

以上、apoA-1 の結合においてコア脂質は必要な役割を担うが、apoA-1 はコア脂質とは必ずしも相互作用せず、表面膜

の構造変化を介してコア脂質が間接的にアポリポ蛋白質の結合を調節していることを解明した。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成16年2月24日論文内容とそれに関連した事項につき試問を行った結果優秀と認定めた。