

氏 名	か も と も あ り 加 茂 倫 有
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 606 号
学位授与の日付	平 成 19 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	Lipid Membrane Structure Modulated by Nonlamellar - forming Lipids and Interaction with Amphipathic Peptide (非ラメラ相形成脂質が誘起する脂質膜構造変化と両親媒性ペプチドとの相 相互作用)
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

生体膜は脂質二分子膜のラメラ構造を有しているが、その膜中には両連続キュービック相や逆ヘキサゴナル相などの、負の自発曲率を持った非ラメラ相形成脂質が存在している。したがって、脂質の自発曲率と実際に形成されている膜の曲率との間に差が生じるため、膜のアシル鎖領域の側方圧や界面領域の水和度は増加していると考えられる。この側方圧の増加（パッキングストレス）や界面水和の変化は膜タンパクの構造や活性に影響していると考えられている。しかしながら、非ラメラ相形成脂質が誘起する膜の物理化学的特性の変化に関する知見は少ない。本研究では、非ラメラ相形成脂質が誘起する膜構造と両親媒性ペプチドとの相互作用に関する基礎的知見を得るために、種々のモデル脂質膜を調製し、X線小角散乱（SAXS）および³¹P NMR測定によりその液晶構造を同定し、蛍光測定により膜の物理化学的特性を評価した。また、両親媒性ペプチドが脂質膜に及ぼす効果について調べた。

第一章

時間分割蛍光異方性によるラメラーキュービック相転移における二分子膜中のパッキングストレスの発生と解消の検出

ラメラ相を形成するフォスファチジルコリン（PC）および両連続キュービック相を形成するモノオレイン（MO）よりなる混合脂質膜の側方圧（パッキングストレス）の変化を、混合膜に導入した脂質型蛍光プローブ（DPH-propionic acid; DPHPA）のオーダーパラメーターの変化としてとらえるために以下の実験を行った。PC/MO混合膜の液晶相をSAXS、³¹P NMRにより同定したところ、MOのモル分率が60%以下ではラメラ相、70%以上ではキュービック相であることが判明した。蛍光異方性測定を行うためにこれらの液晶相を分散し粒径約120 nmの微粒子を調製した。ラメラ相はリポソーム、キュービック相は疎水的な相であるため高分子界面活性剤Pluronic F127（F127）を用いてキュボソームとして分散した。キュボソームについてはSAXSにより粒子内部にキュービック相が保持されていることを確認した。また、粒子に導入したDPHPAは粒子内部の液晶相に分布することを蛍光寿命測定により確認した。DPHPAの時間分割蛍光異方性の測定により得られたオーダーパラメーターは、ラメラ相（リポソーム）ではMOの割合とともに増大し、キュービック相（キュボソーム）で減少した。この変化はアシル鎖領域の側方圧に応じた変化であると考えられる。すなわち、ラメラ相中においては負の自発曲率を持つMOの導入により側方圧が増大し、オーダーパラメーターが増大する。そして、負の曲率を持つキュービック相への転移により側方圧、すなわちオーダーパラメーターは減少する。以上のようにして、脂質微粒子を用いた時間分割蛍光異方性測定により側方圧をオーダーパラメーターの変化としてとらえることができた。

第二章

フォスファチジルコリン／モノオレイン混合膜における側方圧と水の侵入に対する両親媒性 α ヘリックス形成ペプチドの効果

PC/MO混合脂質膜のアシル鎖領域の側方圧および界面領域の水和度の変化を蛍光法により評価し、両親媒性ペプチドが膜に及ぼす効果について調べた。本章では、非分散の脂質液晶相を用い、両アシル鎖末端が蛍光分子ピレンでラベルされた

リン脂質蛍光プローブ、ジピレニルフォスファチジルコリン (DipyPC) の分子内エキシマー形成より側方圧を評価した。アシル鎖の長い DipyPC を用いて実験を行った結果、膜の深い領域の側方圧はラメラ相中で MO の割合とともに増大し、キュービク相への転移で減少することが示された。これは第一章の蛍光異方性の研究結果を支持するものである。しかしながら、アシル鎖の短い DipyPC を用いて膜の浅い領域を評価したところ、キュービク相への転移で側方圧は増大したことから、側方圧は膜の深さによって異なる挙動を示すことが判明した。2-(9-anthroyloxy) stearic acid の蛍光寿命測定により、脂質膜界面領域の水和は混合膜中の MO の割合とともに増大すること、ならびにキュービク相の膜界面領域のパッキングは相転移直前のラメラ相と比較して緻密になっていることが明らかとなった。両親媒性ペプチド 18A を混合脂質膜に導入したところ、18A の膜界面領域への結合により膜浅部の側方圧および界面領域の水和が減少することが明らかとなった。また、18A の脂質一水分係数は混合膜中の MO の割合とともに増大した。アシル鎖領域の側方圧や界面領域の水和（疎水性水和）の増大は膜の自由エネルギーを増大させる。一方、18A の膜への結合は側方圧および水和度を減少させることから、MO の導入によって蓄積された膜のエネルギーを解消することができる。よって、18A は、MO を多く含むことでエネルギー的に不利となった膜に対して高い結合性を示したと考えられる。

第三章

卵黄フォスファチジルコリン／ジオレイン混合系の非ラメラ液晶相とその微粒子化

現在までに報告されている非ラメラ相を内部に保持する微粒子は、MO をベースとしたものが中心であった。本章では MO をベースとしない非ラメラ相分散微粒子の調製を試みた。PC およびジオレイン (DO) よりなる非分散の液晶相を SAXS, ^{31}P NMR により同定した。その結果、混合膜中の DO の割合を増加させることで液晶相はラメラ相 (0-10 mol % DO) → 両連続キュービク相 (20-30 mol % DO) → 逆ヘキサゴナル相 (40-50 mol % DO) へと変化することが判明した。これは DO の持つ負の自発曲率に基づいた変化である。F127 を用い、高圧乳化法により非ラメラ相の分散微粒子化を行ったところ、粒子径 100-250 nm の粒子が得られた。粒子内部へのイオン透過性実験より 20 mol % DO ではリポソームの形成が示唆されたが、30-50 mol % DO の脂質組成では両連続キュービク相または逆ヘキサゴナル相を内部に保持した粒子の形成が示唆された。さらに SAXS の測定から 30-50 mol % DO の微粒子においては分散していない液晶相と同様の回折パターンが得られたことにより、両連続キュービク相および逆ヘキサゴナル相を有した脂質微粒子を調製できたことが示された。

論文審査の結果の要旨

生体膜は脂質二分子膜のラメラ構造を有しているが、その膜中には両連続キュービク相や逆ヘキサゴナル相などの、負の自発曲率を持った非ラメラ相形成脂質が存在している。したがって、脂質の自発曲率と実際に形成されている膜の曲率との間に差が生じるため、膜のアシル鎖領域の側方圧や界面領域の水和度は増加していると考えられる。この側方圧の増加（パッキングストレス）や界面水和の変化は膜タンパクの構造や活性に影響していると考えられている。しかしながら、非ラメラ相形成脂質が誘起する膜の物理化学的特性の変化に関する知見は少ない。本研究は、非ラメラ相形成脂質が誘起する膜構造と両親媒性ペプチドとの相互作用に関する基礎的知見を得るために、種々のモデル脂質膜を調製し、X 線小角散乱 (SAXS) および ^{31}P NMR 測定によりその液晶構造を同定し、蛍光測定により膜の物理化学的特性を評価し、また、両親媒性ペプチドが脂質膜に及ぼす効果について調べたものである。

まず、ラメラ相を形成するフォスファチジルコリン (PC) および両連続キュービク相を形成するモノオレイン (MO) よりなる混合脂質膜の側方圧（パッキングストレス）の変化を、混合膜に導入した脂質型蛍光プローブ (DPH-propionic acid; DPHPA) のオーダーパラメーターの変化としてとらえるために以下の実験を行った。PC/MO 混合膜の液晶相を SAXS, ^{31}P NMR により同定したところ、MO のモル分率が 60% 以下ではラメラ相、70% 以上ではキュービク相であることが判明した。蛍光異方性測定を行うためにこれらの液晶相を分散し粒径約 120nm の微粒子を調製した。ラメラ相はリポソーム、キュービク相は疎水的な相であるため高分子界面活性剤 Pluronic F127 (F127) を用いてキューボソームとして分散した。キューボソームについては SAXS により粒子内部にキュービク相が保持されていることを確認した。また、粒子に導入した DPHPA は粒子内部の液晶相に分布することを蛍光寿命測定により確認した。DPHPA の時間分割蛍光異方

性の測定により得られたオーダーパラメーターは、ラメラ相（リポソーム）ではMOの割合とともに増大し、キュービク相（キューボソーム）で減少した。この変化はアシル鎖領域の側方圧に応じた変化であると考えられる。すなわち、ラメラ相中においては負の自発曲率を持つMOの導入により側方圧が増大し、オーダーパラメーターが増大する。そして、負の曲率を持つキュービク相への転移により側方圧、すなわちオーダーパラメーターは減少する。以上のようにして、脂質微粒子を用いた時間分割蛍光異方性測定により側方圧をオーダーパラメーターの変化としてとらえることができた。

次に、PC/MO混合脂質膜のアシル鎖領域の側方圧および界面領域の水和度の変化を蛍光法により評価し、両親媒性ペプチドが膜に及ぼす効果について調べた。本章では、非分散の脂質液晶相を用い、両アシル鎖末端が蛍光分子ピレンでラベルされたリン脂質蛍光プローブ、ジピレニルフォスファチジルコリン（DipyPC）の分子内エキシマー形成より側方圧を評価した。アシル鎖の長いDipyPCを用いて実験を行った結果、膜の深い領域の側方圧はラメラ相中でMOの割合とともに増大し、キュービク相への転移で減少することが示された。これは第一章の蛍光異方性の研究結果を支持するものである。しかしながら、アシル鎖の短いDipyPCを用いて膜の浅い領域を評価したところ、キュービク相への転移で側方圧は増大したことから、側方圧は膜の深さによって異なる挙動を示すことが判明した。2-(9-anthroyloxy) stearic acidの蛍光寿命測定により、脂質膜界面領域の水和は混合膜中のMOの割合とともに増大すること、ならびにキュービク相の膜界面領域のパッキングは相転移直前のラメラ相と比較して緻密になっていることが明らかとなった。両親媒性ペプチド18Aを混合脂質膜に導入したところ、18Aの膜界面領域への結合により膜浅部の側方圧および界面領域の水和が減少することが明らかとなった。また、18Aの脂質-水分分配係数は混合膜中のMOの割合とともに増大した。アシル鎖領域の側方圧や界面領域の水和（疎水性水和）の増大は膜の自由エネルギーを増大させる。一方、18Aの膜への結合は側方圧および水和度を減少させることから、MOの導入によって蓄積された膜のエネルギーを解消することができる。よって、18Aは、MOを多く含むことでエネルギー的に不利となった膜に対して高い結合性を示したと考えられる。

最後に現在までに報告されている非ラメラ相を内部に保持する微粒子は、MOをベースとしたものが中心であった。本章ではMOをベースとしない非ラメラ相分散微粒子の調製を試みた。PCおよびジオレイン（DO）よりなる非分散の液晶相をSAXS、 ^{31}P NMRにより同定した。その結果、混合膜中のDOの割合を増加させることで液晶相はラメラ相（0-10mol%DO）→両連続キュービク相（20-30mol%DO）→逆ヘキサゴナル相（40-50mol%DO）へと変化することが判明した。これはDOの持つ負の自発曲率に基づいた変化である。F127を用い、高圧乳化法により非ラメラ相の分散微粒子化を行ったところ、粒子径100-250nmの粒子が得られた。粒子内部へのイオン透過性実験より20mol%DOではリポソームの形成が示唆されたが、30-50mol%DOの脂質組成では両連続キュービク相または逆ヘキサゴナル相を内部に保持した粒子の形成が示唆された。さらにSAXSの測定から30-50mol%DOの微粒子においては分散していない液晶相と同様の回折パターンが得られたことにより、両連続キュービク相および逆ヘキサゴナル相を有した脂質微粒子を調製できたことが示された。

以上、非ラメラ相形成脂質が誘起する膜構造の変化が膜と両親媒性ペプチドとの相互作用に及ぼす影響について生物物理化学的研究をおこない、これに関する基礎的知見を得ることができた。

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19年3月1日論文内容とそれに関連した事項につき諮問を行った結果優秀と認定した。