

氏 名	クリスティアーノ ジョルダーニ Cristiano Giordani
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3201 号
学位授与の日付	平成 19 年 9 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	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	Structural and Dynamic NMR Studies on Distribution and Aggregation of Cholesterol in Solution and in Phospholipid Bilayer (溶液およびリン脂質二重膜におけるコレステロールの会合と分布に関する構造的・動的NMR研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 原 勝 教 授 宗 林 由 樹 准教授 松 林 伸 幸

論 文 内 容 の 要 旨

本論文では、溶液および生体モデル膜中でのコレステロールの構造とダイナミクスを、高分解能溶液NMR分光法を用いて研究している。生体膜の疎水的分子環境をモデル化するための溶媒として、誘電率(括弧内の数字)の低いシクロヘキサン(2.0)、クロロフォルム(4.8)、オクタノール(10.3)を選択している。リン脂質二重膜を形成する物質としては、炭素数14の飽和脂肪酸2個およびコリン基をもつリン酸とのグリセロールエステルであるDMPC(dimyristoyl glycerophosphatidylcholine)を用いている。コレステロールの構造とダイナミクスを解明するために行われた測定は、有機溶媒中での一次元 ^1H スペクトル、NOESY二次元スペクトル、パルス磁場勾配法による自己拡散係数、 ^2H のスピン-格子緩和時間である。自己組織化粒子のサイズを100nmに制御したLUV(Large Unilamellar Vesicle)膜中では、一次元 ^1H スペクトルおよびNOESY二次元スペクトルを測定している。申請論文の成果は次の通りである。

コレステロールは、水酸基をもつオクタノール中では、単分子状態で溶存するが、無極性のシクロヘキサンおよびわずかに極性をもつクロロフォルム中では会合しているとの結論を得ている。自己拡散係数と溶媒の粘性係数から求められたコレステロールの流体力学的半径を用いて、コレステロールの溶存状態が単分子であるか否かを判別することに成功している。オクタノール中での流体力学的半径はコレステロールの分子構造から求められた平均半径にほぼ等しく、濃度依存性を示さない。これらの観測結果に基づいて、オクタノール中のコレステロールは単分子状態で溶存していると結論している。一方、シクロヘキサンおよびクロロフォルム中での流体力学的半径は、オクタノール中での値よりも大きい値を示し、濃度の増加とともに増大することを見出している。これらの低誘電率溶媒では、低濃度(数mM)における流体力学的半径が高濃度(数百mM)における値の2倍ないしはそれ以上になる。さらに、スピン-格子緩和時間の解析から回転拡散の流体力学的半径を求め、コレステロールの極性基付近の運動が選択的に抑制されていることを示した。この観測結果はコレステロールの会合体形成の結論を支持するものである。さらに二次元NMRの解析によって、会合体を形成する相互作用力と相互作用している原子サイトのペアを明らかにしている。コレステロールの水酸基に近いメチルプロトンと水酸基を含む環のプロトンとの間にクロスピークを検出し、会合体を形成する力は水素結合であると結論している。

膜中のコレステロールについても一次元および二次元NMRの解析をおこなっている。分子間に十分な寿命の相互作用が存在することを示すクロスピークは、コレステロールのアルキル鎖の末端メチルプロトンとDMPCの極性コリン基および疎水性アシル基の末端メチルとの間で観測された。このクロスピークの検出に基づいて、コレステロールの極性基を内側と外側に向ける、フリッパーフロップの現象が存在することを明らかにしている。さらに、DMPCの一次元スペクトルのピークの半値幅がコレステロールの濃度の増大によって顕著に増大することを見つけている。この結果から、膜中のコレステロールは濃度が高くなると会合する傾向があると結論している。

論文審査の結果の要旨

学位論文は、哺乳動物の細胞膜の機能を制御する役割を果たすコレステロールを研究対象としたものである。特徴のある3種類の有機溶媒（オクタノール、クロロフォルム、シクロヘキサン）における挙動と数ナノメートルの厚さに空間制御されている膜における挙動を比較研究した。これは膜中での挙動が注目されているコレステロールに対する新しい研究と位置付けされる。高血圧症、アルツハイマー病、パーキンソン病などの原因物質と考えられているコレステロールの構造およびダイナミクスを原子レベルで克明に記述しており、従来の研究のレベルを大きく超える論文であると認められる。最新の溶液NMR分光法の手法の威力を最大限に活用した研究である。生体分子の溶液物理化学および膜分子科学の進歩に大きく貢献する、コレステロールについてのNMR研究として高く評価することができる。

自己拡散係数と溶媒の粘性係数から求められたコレステロールの流体力学的半径を用いて会合状態を研究した着想はユニークである。コレステロールは、水酸基をもつオクタノール中では、オクタノール水酸基とコレステロールの水酸基の間に生じる水素結合の効果により単分子状態で溶存するが、無極性のシクロヘキサンおよびわずかに極性をもつクロロフォルム中では会合していることをはじめて示した。コレステロールの会合現象を引き起こす因子が水酸基同士の水素結合による自己会合であることを示したことも価値がある。コレステロールの溶液研究を膜研究に発展させた結果、膜中のコレステロール分子の配向が2種類（膜の外向きと内向き）存在することを明らかにしたことも画期的である。コレステロールの水酸基が膜の外方向だけでなく内方向に向いていることを見出したことは、フリップ・フロップの平衡状態の可能性を示したことになる。これはコレステロールが溶液中と同様に膜中でも会合することを示唆する事実として重要である。さらに、DMPCの一次元スペクトルのピークの半値幅の増大から、コレステロールの会合を結論した。コレステロールの濃度が上昇すると膜の運動性が著しく低下することをはじめて明らかにしたことは、膜中のコレステロールの構造研究に新風を吹き込むものである。

よって、本論文を博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。