



Title	生体膜融合と脂質分子運動
Author(s)	荒磯, 恒久
Citation	電子科学研究, 2, 91-93
Issue Date	1995-01
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/24317">https://hdl.handle.net/2115/24317</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	2_P91-93.pdf



# 生体膜融合と脂質分子運動

細胞機能素子研究分野 荒 磯 恒 久

生体膜を構成するリン脂質膜の融合過程における分子動態を時間分解蛍光偏光解消により測定し次の結果を得た。

- 1) 膜融合過程で逆ミセル形中間体を経由すると考えられる PC/PE/cholesterol 系の人工膜において、cholesterol の分子運動は中間体生成過程で増大した。
- 2) 酸性リン脂質 PS からなる膜は  $\text{Ca}^{2+}$  によって融合するが、このとき PS 頭部が引き付けられ間隙が狭くなることが見いだされ、この系においても逆ミセル中間体が生成するものと結論された。

## I. はじめに

生体膜融合は細胞の食作用や分泌、シナプスに於ける神経伝達物質の放出など生体機能にとって重要な役割をもつ。膜融合は二つの膜が接着し、膜脂質分子の再配列を経て膜が開裂する過程が含まれる。脂質膜分子の再配列機構は、膜融合が引き起こされる誘因によって大きく異なる。現在広く研究されている膜融合過程はおおよそ次のようなものである。

- (1) 膜構成成分に、PE(phosphatidylethanolamine), DG (diacylglycerol) や cholesterol など極性頭部の小さい脂質を含む系における融合。
- (2) PS(phosphatidylserine)などの酸性リン脂質を含む膜と  $\text{Ca}^{2+}$  イオンによる融合。
- (3) ポリエチレングリコールなど外部の高分子による融合。
- (4) ヘマアグルチニンなどの融合タンパク質による融合。

この中で(1)の極性頭部の小さい脂質を含む脂質二重層は、非二重相構造である逆ヘキサゴナル相を取り易いことから、逆ミセル形中間体 (inverted micelle intermediate) を経て融合が進行するものと考えられている。また(2)の  $\text{Ca}^{2+}$  による融合では、 $\text{Ca}^{2+}$  に PS のリン酸部がキレートすることによって二つの膜が引き寄せられ膜間の水分子が除去され融合にいたることが知られているが、脂質分子の再配列機構は明かでない。

本研究では(1)に於ける逆ミセル中間体形成に対する cholesterol の役割、および(2)の  $\text{Ca}^{2+}$  による融合過程での脂質の動的構造を明らかにすることを目的として、時間分解蛍光偏光解消法を用い各融合過程での脂質分子運動を測定した。

## II. 実 験

脂質二重層を構成するリン脂質として、生理的条件に類似させるため牛脳から抽出された PC (phosphatidylcholine), PE, PS (いずれも Sigma 社製)を用いた。蛍光標識脂質には、脂質膜表層に近いグリセロール骨格部の動的構造を測定するために PE 頭部に蛍光製物質である NBD (nitorobenzoxadiazole) が結合した NBD-PE<sup>[1]</sup> を、また cholesterol 分子の運動を測定するため、ほぼ同じ形状の蛍光性分子である DHE (dehydroergosterol) を用いた。

膜小胞体は、研究目的に応じて必要な脂質を混合して chloroform に溶かし試験管内で乾燥させた後リン酸緩衝液を加え、多重層膜小胞体 (multilamellar vesicle) については激しく振盪することにより、また単層膜小胞体 (unilamellar vesicle) については超音波処理により構成した。

それぞれの蛍光プローブの分子運動は時間分解蛍光偏光解消法によって得られる蛍光異方性比の時間変化から、「円錐内揺動運動モデル」を適用して、分子運動の速さを揺動拡散速度 ( $D_{\parallel}$ ) として、また分子運動の

範囲を揺動角 ( $\theta_c$ ) として評価した<sup>[2]</sup>。

### III. 結果・考察

#### DG 誘導による逆ヘキサゴナル相生成過程における cholesterol 分子の挙動

PC/PE/cholesterol (1:1:1, mol: mol) の多重層小胞に DOG (dioleoylglycerol) 5 mol% を加えると、ラメラ相と逆ヘキサゴナル相の混在する状態が小胞膜内にできる。DOG 濃度を高めると逆ヘキサゴナル相の比率が増加し、DOG 20 mol% でほぼすべての脂質が逆ヘキサゴナル相となる<sup>[3]</sup>。このような系で DOG 濃度を変化させラメラ・逆ヘキサゴナル相の比率を変化させて、DHE の揺動拡散速度と揺動角を測定すると表 1 のような結果が得られた。これはラメラ・逆ヘキサゴナル相混在状態では cholesterol の分子運動は、それぞれの相が単独の時より活発になっていることを示す。脂質鎖や脂質頭部の分子運動にはこのような変

表 1 PC/PE/cholesterol (1:1:1 mol: mol) 多重層膜に導入した DHE の揺動拡散速度 ( $D_w$ ) と揺動角 ( $\theta_c$ ) に対する DOG の影響

[DOG] (mol%)	$D_w$ ( $\times 10^7 \text{s}^{-1}$ )	$\theta_c$ ( $^\circ$ )
0	8.0	36.1
2.5	8.3	36.0
5.0	10.2	38.0
10.0	11.1	39.4
15.0	10.6	38.7
20.0	9.9	36.1

化は見られず、cholesterol に特有の性質である。このことからラメラ・逆ヘキサゴナル相移行過程で cholesterol 分子は運動によりその位置を変えながら逆ミセル構造を安定化させ膜構造変化を促進するものと考えられる (図 1, A)。

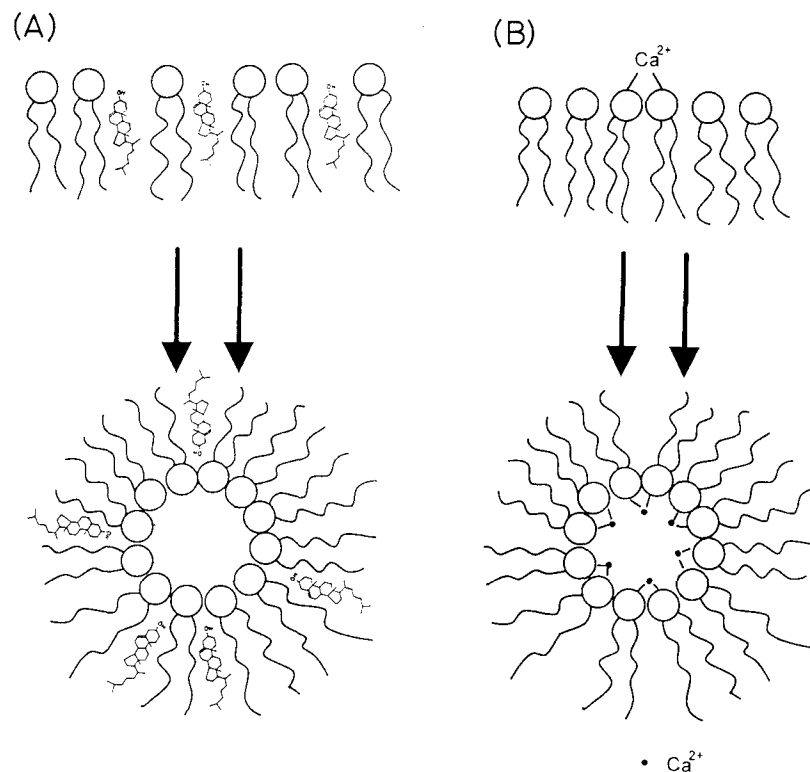


図 1 (A): PC/PE/cholesterol/DG 系における逆ミセル中間体形成に対する cholesterol の役割を表すモデル図。cholesterol はラメラ相では脂質鎖の上部に位置するが逆ミセル中間体では脂質鎖の下部に位置を変え、極性頭部の密度を上げ脂質鎖下部の間隙を埋める。(B):  $\text{Ca}^{2+}$  による PS 膜融合での  $\text{Ca}^{2+}$  の役割を示すモデル図。極性頭部を引き付ける  $\text{Ca}^{2+}$  の結合力により逆ミセル中間体の生成が促進される。

### Ca<sup>2+</sup> 及び Mg<sup>2+</sup> 存在下での PS 膜の分子運動

PS は極性頭部にカルボキシル基を持ち、中性溶液では負の電価を持つ。PS の単層膜小胞体は、10<sup>-3</sup> M オーダーの Ca<sup>2+</sup> 存在下で接着し融合する。Mg<sup>2+</sup> は単独では PS 小胞体の接着のみを誘導し融合には至らない。接着に要する濃度は Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> とも約 3 mM であるが、融合に対する効果が両イオンで大きく異なる。本実験では NBD-PE を蛍光プローブとし、Ca<sup>2+</sup> 及び Mg<sup>2+</sup> 存在下での PS 小胞体の膜脂質表層付近の動的特性を測定し比較した。結果を表 2 に示す。PS ベシクル接着が誘起されるイオン濃度において、Ca<sup>2+</sup> は運動速度を遅くし ( $D_w$  減少), 運動範囲を狭めて ( $\theta_c$  減少) いる。これは隣接する PS 分子を強く引き付け運動を束縛していることを示す。一方 Mg<sup>2+</sup> 存在下では、イオン添加前とほぼ同様の値を示し、Ca<sup>2+</sup> と Mg<sup>2+</sup> では PS 分子運動に与える効果が大きく異なっていることが見いだされた。このことから Ca<sup>2+</sup> の極性頭部を引

表 2 PS 膜に導入した NBD-PE の蛍光部の揺動拡散速度 ( $D_w$ ) と揺動角 ( $\theta_c$ ) に対する Ca<sup>2+</sup> 及び Mg<sup>2+</sup> の影響

	$D_w$ ( $\times 10^7 \text{s}^{-1}$ )	$\theta_c$ (°)
Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> : free	3.4	46
Ca <sup>2+</sup> : 3mM	1.7	38
Mg <sup>2+</sup> : 3mM	2.7	46

き付ける力が、逆ミセル中間体の生成をもたらすものと考えられる (図 1. B)。

### 謝 辞

本研究の遂行にご協力頂いた大学院生早川枝利, 河田伸一郎両氏に感謝します。また NMR 測定を指導して頂いた神隆博士, ならびに本研究に助言を頂いた長沼睦雄博士に感謝します。

### 【文 献】

- [1] 荒磯恒久: 膜, 19, 3 (1994).
- [2] 荒磯恒久, 小山富康: 日本生理学雑誌, 49, 1 (1987).
- [3] 長沼睦雄: 北海道医誌, 69, 65 (1994).
- [4] Papahadjopoulos, D., Nir S. and Duzgues, N.: J. Bioenerg. Biomembr. 22, 157 (1990).