●特集 日本膜学会膜学研究奨励賞（2008年）受賞論文

脂質膜構造により制御されるアポリポ蛋白質 A-I の結合性と構造変化

田中将史

神戸薬科大学 薬品物理化学研究室
〒658-8558 兵庫県神戸市東灘区本山北町4-19-1

Surface Structure of Lipid Membrane Modulates Apolipoprotein A-I Binding and Its Conformational Change

Masafumi Tanaka

Department of Biophysical Chemistry, Kobe Pharmaceutical University
Kobe 658-8558, Japan

Interaction of apolipoproteins with lipid surfaces plays crucial roles in lipoprotein metabolism and cholesterol homeostasis. It has been accepted that apolipoprotein (apo) A-I, the major protein constituent of high-density lipoprotein (HDL), is inversely related to risk of cardiovascular disease in humans. ApoA-I binding to lipid surfaces depends on membrane structure. In this study, to elucidate the detailed mechanism by which apoA-I associates with plasma membrane and lipoprotein particles, the effects of lipid composition and surface curvature on the lipid-apoA-I interactions were examined.

In the initial step of the HDL formation, apoA-I produces discoidal particles. The membrane structure in discoidal particles is thought to be distinct from that in lipid vesicles although both contain lipid bilayer structure. The possibilities of lipid nanodisks for application to drug delivery systems will be discussed.

Key words : apolipoprotein A-I / lipid emulsions / interpenetration / lipid nanodisks

1. はじめに

レシチンやコレステロール等により構成される生体脂質膜は、その組成や環境の変化に応じて多様な膜構造をとる。その膜構造に応答して蛋白質の結合（局在）や活性が調節されたり、あるいは逆に、蛋白質の結合（局在）や活性により膜構造の変化が誘発されることが知られている。すなわち、脂質膜と蛋白質との相互作用に従って生体内で動的な調節機構が働いていると考えられる。

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とコレステリルエステルのコ

アをリン脂質やコレステロールなどの表面混合単分子膜が覆ったナノメートルスケールの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サイズ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る¹⁾。筆者は主に、抗動脈硬化作用を有するアポリポ蛋白質（アポ）A-Iと脂質膜との相互作用の物理化学的機序解明を目的として、組成や粒子サイズを制御した脂質粒子を人工的に作製し、それらに対するアポA-Iの結合性を分子論的に評価してきた。本稿では、これまで行ってきた研究の一部を紹介し、さらに近年行っているアポA-Iとリン脂質とで形成されるディスク型ナノ粒子の研究に関する紹介を行う。

Fig. 1 Schematic view of lipid particles. (A) Lipid bilayer vesicles are spherical particles composed of phosphatidylcholine (PC) bilayer. (B) Lipid emulsions are triglyceride droplets stabilized by surface PC monolayer. (C) Lipid nanodisks are discoidal PC bilayers wrapped with apoA-I molecules.

2. アポA-Iの結合性を決定する脂質粒子の膜構造要因

卵黄由来のレシチン (eggPC) を用い、細胞膜モデルとしての脂質二分子膜ベシクル (Fig. 1 (A)), 及びリポ蛋白モデルとしての脂質エマルジョン (Fig. 1 (B)) に対するアポA-Iの結合性を評価した。本稿では、特に断らない限り、粒子サイズは100～120 nm程度に調製している。最大結合量 ($B_{\max}$) はコア脂質の種類に依存し、トリオレインをコアに持つエマルジョン (LEM) に比べ、中鎖トリグリセライドやコレステリルエステルでは $B_{\max}$ が減少した。これらの結果は、エマルジョンに対するアポA-I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。一方、コア脂質を持たない二分子膜ベシクルの場合、リン脂質分子レベルではフラットな表面をもつLUVにはほとんど結合しないが、曲率の高い粒子サイズ25～30 nm程度のSUVや、表面にコレステロールを添加したLUVでは、LEMと同程度の高い $B_{\max}$ を示した。

そこで、アポA-Iの結合を制御する脂質粒子の膜構造要因について、蛍光測定や ^{13}C -NMR測定により評価した。まず、表面膜の水和状態をリン脂質極性基に蛍光プローブをもつリン脂質誘導体 (dansyl-PE) を用いて評価したところ²⁾、LEMの極性基付近はLUVに比べより水和した状態であることが示唆された。

Fig. 2 Correlation between surface hydration and apoA-I binding maximum ($B_{\max}$). For SUV, the chemical shift of the outer leaflet of bilayers was employed.

さらに、原子サイトレベルで表面膜の水和状態を明らかにするために、 ^{13}C -NMR測定を行った。化学シフト値は、原子サイト周囲の化学的環境を鋭敏に反映して変化する³⁾。なかでもカルボニル炭素はリン脂質分子中で最も周囲の微環境変化に敏感な原子サイトであり、この化学シフト値を表面膜の水和状態の指標として用いた。その結果、LEM表面はLUV表面に比べてより水和した、すなわち、表面リン脂質分子間に水分子の入り込みやすい拡がった構造をし

Fig. 3 (A) Fluorescence spectrum of pyrene-PC. Two peaks, one for monomer (I_m : at 377 nm) and the other for excimer (I_e : at 479 nm), were observed. (inset) The concentration dependence of I_e/I_m in LUV. (B) Comparison in I_e/I_m .

ていることが明らかとなった。この結果は、dansyl-PEを用いた水和度の評価とも一致する。さらに、様々な組成の脂質粒子についても同様の測定を行った結果、脂質粒子表面の水和度（リン脂質分子間の拡がり）とアポA-Iの B_{max} との間に強い相関が認められ、粒子表面膜に生じたリン脂質分子間のスペースがアポA-Iの結合性を支配する重要な因子であることが示された (Fig. 2) ⁴⁾。

3. アポA-Iの脂質粒子上での結合位置

次に、脂質粒子にアポA-Iを結合させ、 ^{13}C -NMRスペクトルにおける各原子サイトの化学シフト値の変化を観察した⁵⁾。アポA-Iがほとんど結合しないLUVでは、リン脂質分子全体にわたって化学シフト値に

大きな変化は観察されなかった。一方、LEMの表面リン脂質カルボニル炭素はLUVに比べより水和した状態にあったが、アポA-Iが結合することにより、LUVと同様の環境になった。これらの結果は、リン脂質界面領域のスペースに存在していた水分子が、アポA-Iの結合によって追い出されたためであると推察された。膜中に深く潜り込むペプチドの場合、化学シフト値の変化はアシル鎖領域も含めたリン脂質分子全体にわたって観察される。これらのことから、アポA-Iは脂質粒子表面膜リン脂質の界面領域に表層的に結合していると考えられた。

さらに、アポリポ蛋白質と細胞膜との相互作用におけるコレステロール (Chol) の効果をアポA-Iの脂質結合部位をモデル化したペプチド (Ac-18A-NH₂) を用いて分子論的に研究した^{6,7)}。Cholのリン脂質二分子膜表面への添加により、アポA-Iと同様、Ac-18A-NH₂の B_{max} は増加し、結合親和性は減少した。蛍光測定より、Ac-18A-NH₂はリン脂質のみから構成される二分子膜 (PC LUV) 表面に比べ、Cholを含む二分子膜 (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、蛍光共鳴エネルギー移動法 (FRET) を用いて、二分子膜の中間から結合したAc-18A-NH₂分子中のトリプトファン残基までの距離を求めると、PC LUVでは1.5~1.7 nmであり、PC/Chol LUVでは1.9~2.1 nmであることが明らかとなった。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、細胞表面からのアポA-Iの解離を促進していることが示唆された。

4. 表面膜とコア脂質との相互作用

表面膜の側方拡散をアシル鎖に蛍光プローブをもつリン脂質誘導体 (pyrene-PC) を用いて評価した⁸⁾。光を吸収して励起状態となったモノマーのpyrene基が基底状態のpyrene基に衝突すると、低エネルギー状態のエキシマーが形成される (Fig. 3 (A))。pyrene-PC分子同士の衝突頻度が増加すると、エキシマーとモノマーの蛍光強度の比 (I_e/I_m) が増大する (Fig. 3 (A; inset))。pyrene-PC分子間の衝突はその局所濃度と拡散速度に依存するため、局所濃度を一定に保つと、 I_e/I_m は表面リン脂質の拡散速度のみに依存することになる。その結果、LEM表面での側方拡散がLUV表面に比べて抑制されていることが明らかとなった (Fig. 3 (B))。また、蛍光異方性の測定からも同様の結果が支持された。エマルションにおいても、アシル鎖長の短いトリグリセライドや一本鎖のコレステルイルエステルでは、表面リン脂質に与え

Fig. 4 Model for interpenetration of core lipid with surface phospholipid.

る影響はトリオレインをコア脂質に持つLEMに比べて小さい。これらの結果より、リポ蛋白質粒子表面では、コア脂質のアシル鎖が、リン脂質単分子膜のアシル鎖とinterpenetrationし、表面膜の側方拡散を抑制すると同時に、リン脂質分子間のスペースを拡げ、アポA-Iの結合を制御していると考えられた (Fig. 4)。

5. アポA-Iの結合に及ぼすエマルション粒子サイズの影響

粒子サイズの異なるエマルション粒子 (LEM ~ 120 nm, SEM ~ 35 nm) に対して、アポA-Iの結合性を評価したところ、 B_{max} はほぼ等しい値となった。そこで、 ^{13}C -NMR測定により表面の水の状態を調べたところ、両エマルション粒子で差異は観察されず、上述したようにリン脂質分子間のスペースにより、アポA-Iの B_{max} が制御されることが裏付けられた。

これらエマルション粒子へのアポA-Iの結合に伴う熱量を等温滴定型熱量計 (ITC) により測定したところ、LEMへの結合は発熱反応であるのに対して、SEMへの結合は吸熱反応であった。すなわち、アポA-IのLEMへの結合はエンタルピー駆動型であるのに対し、SEMへの結合はエントロピー駆動型であることが分かり、結合の駆動力が粒子サイズによって異なることが明らかとなった⁹⁾。この原因として、結合による脂質膜の構造変化が考えられ、粒子サイズの違いによるエマルション表面における結合の深さの違いが影響していると推察される。

6. アポA-Iの構造変化

大腸菌で発現したアポA-Iを用いて、脂質粒子に対する結合性を評価した (Fig. 5)。脂質結合性の高い

Fig. 5 Binding isotherms of WT (○), $\Delta 190-243$ (□), and Y18P/ $\Delta 190-243$ (■) apoA-I to eggPC SUV. The binding curves were obtained by nonlinear regression fitting to a one-binding site model.

領域であることが知られている¹⁰⁾ C末端を欠損させた $\Delta 190-243$ 変異体は、野生型 (WT) アポA-Iに比べて著しい結合性の低下を示した。脂質膜との相互作用においては、アポA-Iの二次構造変化、すなわちランダムコイルから α ヘリックス構造への転移が起こる。WTのアポA-IがSUVに結合する際には、約60残基のアミノ酸が α ヘリックス構造に転移するが、 $\Delta 190-243$ 変異体では二次構造変化がほとんど起こらなかった。つまり、C末端部分の脂質膜への結合が引き金となって、N末端側の二次構造変化を誘発することが示唆された。しかしながら、C末端部分が欠損しているにもかかわらず、N末端のヘリックスバンドル構造が緩くなっているY18P/ $\Delta 190-243$ 変異体は、WTと同等の結合性を示し、ヘリックス含量の増加も観察された。この変異体においては、バンドル構造が緩んでいるためC末端以外の領域が脂質膜への結合を促進し、二次構造変化を誘発すると考えられる。これらの結果より、アポA-Iが脂質膜に結合する際、まずC末端がアンカーとなって結合し、引き続いてN末端がヘリックスバンドルを開きながら結合する二段階での結合過程が推察された^{11, 12)}。

7. ディスク型ナノ粒子における脂質膜構造

アポA-Iは高密度リポ蛋白質 (HDL) の主要構成蛋白質であり、末梢細胞からリン脂質とコレステロールを引き抜き、HDLを新生する能力をもつ。この発生初期のHDLはディスク型の構造をとっている (Fig. 1 (C))。その後、アポA-Iを活性化因子とする酵素の作用を受けてコレステロールがエステル化さ

Fig. 6 (A) Outline of nanodisk preparation. (B) Gel filtration profile of eggPC-apoA-I complexes. Concentrations of eggPC (●, left axis) and apoA-I (○, right axis). PC/apoA-I = 60/1 (mol/mol).

れてコアとなり、エマルション様の球形粒子が形成される。このコレステリルエステルを肝臓へと運搬する役割を担うことが、アポA-Iが抗動脈硬化作用を発揮する所以である。

発生初期のディスク型HDLは、アポA-Iとリン脂質とを用いて再構成することができる (Fig. 6)。このディスク型ナノ粒子中に存在するリン脂質は、二分子膜構造を形成しているにもかかわらず、二分子

膜ベシクル (リポソーム) 中とは異なる状態にあると考えられる。というのも、このナノ粒子は直径がせいぜい10 nm程度であり、ベシクル (小胞) 化して連続的につながった状態より協同性が低いことが予想される。また、その周囲は蛋白質に覆われており、境界では脂質-蛋白質相互作用界面を生み出している。実際、上述した方法によりディスク型ナノ粒子中に存在するリン脂質の側方拡散について調べたところ、二分子膜ベシクル (リポソーム) 中のそれとは異なることが示唆された (データ未発表)。一方、周囲を取り囲むアポA-Iも、脂質非結合状態や球形粒子に結合した状態とはコンフォメーションが大きく異なる¹³⁾。この蛋白質の柔軟性が膜のパッキング状態などに影響を及ぼすと考えられ、現在検討を行っている。

8. ディスク型ナノ粒子の応用

近年、アポA-Iを鋳型とした“Membrane Scaffold Protein (MSP)”を用いたディスク型ナノ粒子を、膜タンパク質を精製するデバイスとして活用する試みが盛んに研究されている¹⁴⁾。また、難水溶性薬物の可溶化に利用するという論文も報告されている¹⁵⁾。これらの研究は、上述したように、この粒子に存在するリン脂質が特有の膜構造 (パッキング状態など) を形成することに立脚している。筆者らはさらに脂質・蛋白質の比率や種類を変化させることで、制御された特有の膜構造をもつディスク型ナノ粒子を設計することが可能であると考えている。

トリグリセライドを多く含むリポ蛋白質のモデル粒子であるリピッドエマルションがドラッグキャリアとして使用されていることを考えると、再構成したHDL様粒子であるディスク型ナノ粒子も、生体適合性に優れたドラッグキャリアとなり得ると期待される。さらに、例えば低密度リポ蛋白質レセプターのリガンドとなるアポEで同様の粒子を作製すれば、ターゲティングも視野に入れた粒子設計が可能になると考えられる。今後は、そういったアポリポ蛋白質の機能部位を取り出したフラグメントペプチドを用いてディスク型ナノ粒子を調製し、より高い安定性や均一性を有した、あるいは血中滞留性の向上や特定臓器へのターゲティングといったより高度な機能性を有したDDS製剤の開発に繋げていきたい。

9. おわりに

本稿では、脂質膜の水和状態がアポA-Iの結合を制御する重要な因子であること、エマルション粒子表

面では、表面膜とコア脂質との相互作用により疎水部の運動性が抑制され、極性部は水和した構造をとっていることを示した。また、脂質膜への結合過程において、粒子サイズによって結合の駆動力が異なること、アポA-IのN末端とC末端が独立して二段階で結合することを述べた。脂質膜の物性や動的構造変化が、蛋白質の機能発現に重要な役割を果たすと考えられている。リポ蛋白質粒子表面では、表面膜とコア脂質とが動的に相互作用することによって、二分子膜構造とは異なるユニークな膜構造を与えている。この表面膜とコア脂質との動的平衡を調節することで、アポA-Iの脂質膜結合を支配していることが明らかとなった。

これまで筆者は、分子物性論的研究に基づく生命現象の理解を目的として研究を進めてきた。すなわち、コレステロールのホメオスタシス維持に重要な役割を果たしているアポA-Iの生体内における脂質膜との相互作用について、物理化学的な手法を用いて解明してきた。今後は、脂質膜や蛋白質の構造や機能・相互作用について理解するのみにとどまらず、それらの特徴を積極的に利用することで「膜」を基盤とする新しい研究を発展させていきたいと考えている。

謝 辞

本稿で紹介した研究の一部は、筆者が大学院在学時に行ったものであり、在学中には京都大学大学院薬学研究科・半田哲郎教授、中野実准教授にご指導いただきました。NMR測定におきましては、京都大学化学研究所・中原勝教授、岡村恵美子先生（現姫路獨協大学薬学部教授）に多くの有益なご助言をいただきました。また、神戸薬科大学薬品物理化学研究室内の斎藤博幸教授、及び同研究室の学生諸氏のご協力によって現在の研究を推進しております。この場をお借りして深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Granot E, Schwiigelshohn B, Tabas I, Gorecki M, Vogel T, Carpentier YA, Deckelbaum RJ : *Biochemistry*, **33**, 15190-15197 (1994)
- 2) Nyholm T, Nylund M, Soderholm A, Slotte JP : *Biophys. J.*, **84**, 987-997 (2003)
- 3) Rao URK, Manohar C, Valaulikar BS, Iyer RM : *J. Phys. Chem.*, **91**, 3286-3291 (1987)
- 4) Saito H, Tanaka M, Okamura E, Kimura T, Nakahara M, Handa T : *Langmuir*, **17**, 2528-2532 (2001)
- 5) Okamura E, Kimura T, Nakahara M, Tanaka M, Handa T, Saito H : *J. Phys. Chem. B*, **105**, 12616-12621 (2001)
- 6) Egashira M, Gorbenco G, Tanaka M, Saito H, Molotkovsky J, Nakano M, Handa T : *Biochemistry*, **41**, 4165-4172 (2002)
- 7) Gorbenco G, Handa T, Saito H, Molotkovsky J, Tanaka M, Egashira M, Nakano M : *Eur. Biophys. J.*, **32**, 703-709 (2003)
- 8) Tanaka M, Saito H, Arimoto I, Nakano M, Handa T : *Langmuir*, **19**, 5192-5196 (2003)
- 9) Tanaka M, Saito H, Dhanasekaran P, Wehrli S, Handa T, Lund-Katz S, Phillips MC : *Biochemistry*, **44**, 10689-10695 (2005)
- 10) Mishra VK, Palgunachari MN, Datta G, Phillips MC, Lund-Katz S, Adeyeye SO, Segrest JP, Anantharamaiah GM : *Biochemistry*, **37**, 10313-10324 (1998)
- 11) Saito H, Dhanasekaran P, Nguyen D, Holvoet P, Lund-Katz S, Phillips MC : *J. Biol. Chem.*, **278**, 23227-23232 (2003)
- 12) Tanaka M, Dhanasekaran P, Nguyen D, Ohta S, Lund-Katz S, Phillips MC, Saito H : *Biochemistry*, **45**, 10351-10358 (2006)
- 13) 田中将史 : 膜, **32**, 253-258 (2007)
- 14) Nath A, Atkins WM, Sligar SG : *Biochemistry*, **46**, 2059-2069 (2007)
- 15) Oda MN, Hargreaves PL, Beckstead JA, Redmond KA, van Antwerpen R, Ryan RO : *J. Lipid Res.*, **47**, 260-267 (2006)

(Received 2 May 2008 ;

Accepted 15 May 2008)

著者略歴

田中 将史 (たなか まさふみ)

2004年3月 京都大学大学院薬学研究科創薬科学専攻博士後期課程 修了
博士(薬学)取得
同年4月～2005年5月 米国フィラデルフィア小児病院(ペンシルバニア大学医学部) 博士研究員
2005年6月 神戸薬科大学薬品物理化学研究室 助手・助教
2008年4月～ 同 講師(現在に至る)