生体膜のラテラル方向のダイナミックス構造解析

辻 明 彦

浜松ホトニクス 研究部 〒435 浜松市市野町 1126-1

Analysis of Lateral Dynamic Structure of Biomembranes

Akihiko TSUJI

Hamamatsu Photonics K.K., Research Division, 1126-1 Ichino-cho, Hamamatsu 435

Proteins are capable of lateral and rotational motion in lipid bilayer membranes. Lateral diffusion of membrane proteins has been studied mainly by the fluorescence photobleaching recovery (FPR) technique, and rotational diffusion by the technique of anisotropy decay of "triplet probes" bound to proteins or by the technique of saturation transfer electron spin resonance (ST-ESR). From these results, it has become clear that motion of proteins in lipid bilayer membranes can be well described as that of a cylindrical particle in a two-dimensional matrix with a viscosity of a few poise.

However, the protein mobility in cell plasma membranes is, in many cases, largely restricted. This restriction would be due to the interaction of the integral protein with the cytoskeletal proteins. As an example, lateral and rotational motion of an anion channel protein band 3, in human erythrocyte membrane is described. In this case, it is suggested that there are two kinds of restriction/regulation mechanisms. One is the anchoring of band 3 to the cytoskeletal protein network, the other is the trapping in a compartment formed with the cytoskeletal proteins. Based on these studies, the character of lateral dynamics of proteins in biomembranes is discussed.

Key Words: Membrane protein, Lateral diffusion, Rotation, Oligomeric structure, Cytoskeletal protein

1. はじめに
2. ラテラル方向のダイナミックスの測定法
 - 2.1 ラテラル方向の移動速度
 - 2.2 回転運動
 - 2.3 複合体・会合体形成
3. 赤血球膜におけるバンド3タンパク質の lateral motion と回転運動: 裏打ち構造体による制御
 - 3.1 アンキリンの役割
 - 3.2 スペクトリンの4量体 $\rightarrow$ 2量体変換の影響
 - 3.3 バンド3の細胞質側ドメインと裏打ち構造体との相互作用
 - 3.4 裏打ち構造体による制御機構
4. おわりに — ラテラル方向の構造の動的な変化

1. はじめに

生体膜において、タンパク質、脂質など膜を構成している分子は、いろいろなモードの熱運動を行っている。膜タンパク質を例にとると、回転運動をしながらラテラル方向に拡散している、これらの運動は、基本的に、リン脂質層を厚さ h と粘性 μ をもつ平面シートとしたときの円柱状粒子のブラウン運動で表わされる (Saffman-Delbruck のモデル, Fig. 1²⁾). しかしながら、タンパク質が生体膜上を動く速さはいつも同じではない。ときには速く、ときには動かなくなる。動く方向もランダムではなく、膜上の特定部位に集まることもある。また、タンパク質分子間での会合体・複合体の形成や解離も起

Fig. 1 膜におけるタンパク質の運動 (Saffman-Delbrück)²⁾
膜タンパク質を半径 a , 長さ h の円柱で表わした。

h ; リン脂質層の厚さ, μ ; 粘性

μ' ; 水の粘性。

D_T (ラテラル方向の拡散定数), D_R (回転拡散定数) は,

$$D_T = \frac{kT}{4\pi\mu h} \left(\log \frac{\mu h}{\mu' a} - \gamma \right) \dots\dots [1]$$

$$D_R = \frac{kT}{4\pi\mu a^2 h} \dots\dots [2]$$

k ; ボルツマン定数 γ ; オイラー定数 T ; 絶対温度で表わされる。また,

$$D_T/D_R = \left(\log \frac{\mu h}{\mu' a} - \gamma \right) \cdot a^2 \dots\dots [3]$$

きている。このようなラテラル方向の動的な構造変化は、生体膜の大きな特徴であり、膜がさまざまな機能を果たしていく上で大きな役割を荷っていると考えられる。

本稿では、ラテラル方向のダイナミクスとして、並進拡散 (lateral diffusion), 回転運動 (rotational diffusion), 膜タンパク質の複合体・会合体形成をとりあげる。まず、測定法の簡単な説明とそこから得られる膜の動的状態の基本的性質について述べる。生体膜では、この「基本的性質」がタンパク質間相互作用 (膜タンパク質間あるいは膜タンパク質と細胞内に存在するタンパク質との間) によって修飾されており、これが、膜タンパク質の振舞いや膜の局所的構造を決めていると考えられる。その例として、赤血球膜をとりあげ、著者らの研究を中心に述べる。

2. ラテラル方向のダイナミクスの測定法

2.1 ラテラル方向の移動速度

2.1.1 蛍光退色回復法 (Fluorescence Photobleaching Recovery, FPR)

ラテラル方向の動きを測定するとき、広く使われてい

Fig. 2 蛍光退色回復法 (FPR)

A; 測定原理を模式的に表わした

● 蛍光分子 ○ 光退色した分子
円はレーザースポットを表わす。

B; ヒト赤血球細胞膜において、アニオンチャンネルタンパク質バンド3をFITCでラベルしたときのFPRカーブ (26°C, in 5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 10mM NaCl pH7.8)

$F(-)$, $F(0)$, $F(\infty)$ はそれぞれ、退色前、退色直後、退色後無限時間後の蛍光強度を表わす。

mobile フラクション $\left(\frac{F(\infty) - F(0)}{F(-) - F(0)} \right)$; 40%
拡散定数; $5.3 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{s}$

る方法は、蛍光退色回復法である^{3~5)}。測定原理と回復カーブの模式図をFig. 2に示す。タンパク質または脂質を蛍光試薬でラベルしたのち、顕微鏡下で直径1.5~4.0 μm のレーザースポットを生体膜上にあて、スポット内の蛍光強度を測定する。短時間 (~100 ミリ秒) 強い光をあててスポット内の大部分の蛍光分子を光退色 (photo-bleach) させたのち (Fig. 2 A-b), 弱い光 (退色光の1/3000 以下) をあててスポット内の蛍光強度が回復してくるのをモニターする (Fig. 2 A-c)。蛍光強度の回復は、スポット内の退色した分子とスポット外の蛍光分子がともにラテラル方向に運動していることにより起こる。光退色後の回復の大きさ $[F(\infty) - F(0)]/[F(-) - F(0)]$ から動いている成分 (mobile component) の比率が、回復の速さから移動速度が求まる。移動が拡散によるとき、回復曲線は、

Fig. 3 リポソームにおける、脂質・タンパク質の拡散速度⁶⁾.

A は、リン脂質プローブ NBD-PE の拡散速度の、温度依存性、脂質組成依存性を示す。

○ DMPC, ● DMPC-コレステロール (1:1), △ 赤血球膜総脂質 (不飽和脂肪酸, コレステロールを含む)

B は、DMPC 中のタンパク質の拡散速度の温度依存性を示す。

○ バンド 3

NBD-PE: N-(4-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazolyl)-phosphatidylethanolamine

DMPC: dimyristoylphosphatidylcholine

$$F(t)/F(-) = x_1 \sum_{n=0}^{\infty} [(-K)^n/n!] [1 + n(2t/\tau)]^{-1} + (1-x_1)K^{-1}(1-e^{-K}) \quad [4]$$

$F(t)$: 退色後、時間 t における蛍光強度, $F(-)$: 退色前の蛍光強度, x : mobile の成分の比率, K : 退色の大きさ $[F(0)/F(-)]$ により決まる定数, で表わされる. 1 項目が速さ τ で動いている成分, 2 項目が動いていない成分 (immobile component) である. τ は、拡散定数 D_T (lateral diffusion coefficient) と,

$$D_T = W^2/4\tau \quad [5]$$

の関係がある (w は、レーザースポットの半径). Mobile 成分が多成分系のときには、各成分の回復カーブを足し合わせたものになる。

この測定法では、分子がある一定距離 (スポットの大きさに相当する距離) を移動するのに要する時間を測定している. その距離は、100 倍の対物レンズ使用時で $0.5 \sim 0.8 \mu\text{m}$ 程度であるが、これは細胞膜上での移動距離としてはかなり大きい. Immobile 成分とは、拡散速度が非常に遅いもの (100 倍対物レンズ使用時, $D_T < 10^{-13} \text{cm}^2/\text{s}$), あるいはスポットの大きさに相当する距離を移動しないものである。

人工膜における測定例を Fig. 3 に示す⁶⁾. A はリン脂

質の蛍光プローブ NBD-PE を測定したものである. 液晶相においては、 $D_T = 10^{-9} \sim 10^{-8} \text{cm}^2/\text{s}$ のオーダーの拡散速度をもち、速さは脂質組成 (脂肪酸の飽和度, コレステロール含量など) により変化する. DMPC リポソーム中での 23°C 付近での急激な変化は、固相 $\rightleftharpoons$ 液晶相の相転移に対応したものである. 固相においては、液晶相と比較して運動性が 1000 倍近く減少する. B は、タンパク質の測定例であるが、拡散速度は脂質とあまり差がない. これは、Saffman-Delbruck のモデル (Fig. 1, 拡散速度は脂質の粘性と温度には 1 次の依存性をもつが、分子の大きさには強くは依存しない) から予測されることとよく一致している. これらの測定においては、蛍光強度はほぼ 100% 回復し、すべての分子が同じ拡散速度で動いていることが示された。

2.1.2 衝突頻度 (collision rate) の測定

FPR の測定には、試料がレーザースポットと比べて十分に大きいことが必要であり、小さなベシクル (直径 $< 4 \mu\text{m}$) には適用できない. このような試料における lateral mobility を調べるときには、衝突頻度を測定することが有力な方法である. また、FPR 法が広い範囲における移動性をみているのに対し、衝突頻度の測定はより微小な

領域内での運動性をみることになり, lateral mobility に対して相補的な情報を与える。

しかしながら, 衝突頻度を測定する方法は現在のところ確立されておらず, 今後の発展が望まれる。ESR (電子スピン共鳴) 法において, スピン交換を利用して測定する試みがなされており, リポソームや赤血球膜での脂質の拡散速度が求められている^{7,8)}。同法を膜タンパク質の拡散の測定に適用することも試みられている⁹⁾。ここでは文献を示すにとどめる。また, 膜タンパク質・脂質を蛍光・りん光プローブまたはそれに対する消光剤 (quencher) で各々ラベルし, 蛍光 (りん光) 消光の測定から衝突頻度を求める方法も有力であると考えられる。

2.2 回転運動

膜タンパク質は Fig. 1 に示すように, 膜法線方向軸を中心に異方的な回転運動を行っている。この速さを測定する方法として, 蛍光・りん光の異方性 (anisotropy) を利用するものと, 飽和移動 ESR 法とがある。

2.2.1 偏光解消法

個々の蛍光分子は, 吸収や発光に対する“軸 (遷移モーメント)”をもっている。蛍光分子の集団を偏光した光で励起したとき, 励起光と平行方向に遷移モーメントをもつ分子が選択的に励起される。励起光 A と分子の遷移モーメントとのなす角度を α とすると, その分子が励起される確率は, $\cos^2 \alpha$ に比例する。このため, 基底状態および励起状態での分子の遷移モーメントの分布に偏りが生じ, その後の吸収や蛍光の強さは異方性をもつ。異方性 r は, $r = [I_- - I_+]/[I_- + 2I_+]$

I_- : 励起光と平行方向の蛍光 (吸収) の強さ

I_+ : 励起光と垂直方向の蛍光 (吸収) の強さ

で定義される。異方性は, 分子の回転運動により, 時間とともに減衰していく。したがって, 吸収や蛍光の異方性の減衰を調べることで, その分子の回転の速さを知ることができる (偏光解消法)^{10, 11)}。

膜タンパク質が Fig. 1 に示すような回転運動をしているとき, 異方性の減衰 $r(t)$ は,

$$r(t) = r_1 \exp(-D_{\parallel} t) + r_2 \exp(-4 D_{\parallel} t) + r_{\infty} \quad [6]$$

$$r_1 = \frac{6}{5} \sin^2 \theta \cdot \cos^2 \theta, \quad r_2 = \frac{3}{10} \sin^4 \theta,$$

$$r_{\infty} = \frac{1}{10} (3 \cos^2 \theta - 1)^2$$

θ : 膜法線 (回転軸) と遷移モーメントとがつくる角度

$D_{\parallel}$: 膜法線方向を回転軸とする運動の拡散定数

で表わされる³⁷⁾。回転運動が等方的でないため, 無限時

Fig. 4 りん光の異方性の減衰カーブ
赤血球膜において, バンド 3 に結合させたエオシン-5-マレイミドからのりん光の異方性の減衰。
a; 20°C, b; 26°C, c; 30°C, d; 37°C, e; 42°C.
in 5mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 10mM NaCl, pH7.8.

間後も一定量の異方性 (r_{∞}) が残る。測定例を Fig. 4 に示す。温度が上がるにつれて異方性の減衰が速くなり, 回転が速くなることがわかる。これらのカーブは, 式〔6〕には適合せず, 便宜上式〔7〕を用いて解析した。

$$r(t) = R_1 \exp(-t/\tau_1) + R_2 \exp(-t/\tau_2) + R_3 \quad [7]$$

$R_1, R_2, R_3, \tau_1, \tau_2$ をパラメータとし, 回転の速さは便宜上, 回転相関時間 (rotational correlation time) τ で表わす。

このことは, バンド 3 タンパク質の回転には, 少なくとも速さの異なる成分が 2 つまたは 3 つ存在することを示している (R_3 は, r_{∞} と 5 ミリ秒の時間スケールではほとんど減衰しない非常に遅い成分からの異方性との和である)。

この方法が検出する運動の時間スケールは, 用いる蛍光プローブの励起状態での寿命 (life time, ϕ) により決まる。およそ $1/100 < \tau/\phi < 10$ の範囲で測定することができる。たとえば, プローブとしてエオシン ($\phi = 2.6$ ms) を用いたときには, $20 \mu\text{s} < \tau < 20$ ms の範囲である。

2.2.2 飽和移動 ESR 法

ニトロキシドラジカル (N-O $\cdot$) の ESR スペクトルを測定することにより, 膜の中でのタンパク質や脂質の動きをモニターすることができる (スピンラベル法)^{12, 13)}。タンパク質にラジカルを含む試薬 (スピンラベル) を結合させる。ESR の吸収が部分的に飽和を起こすように強いマイクロ波を照射した状態で, 2 次微分吸収スペクトルの 90° 位相の遅れた成分をとる。スペクトル上のパラ

メータから回転相関時間(rotational correlation time) τ_c が求まる (飽和移動法)^{14, 15)}. この方法は, スピン緩和において, スピン-格子緩和と回転運動による緩和との速さの相対的な比率により, スペクトルが変化することを利用したものである. ニトロキシドラジカルのスピン-格子緩和時間は 10^{-5} s の値をもつため, $10^{-3} < \tau_c < 10^{-7}$ s の速さの回転運動を検出することができる. また, 速さの異なる 2 成分以上が存在しているときには, それらを「平均化」した τ_c を与える. 測定例を Fig. 5 に示す¹⁶⁾. 回転相関時間は, $H'/H = 1.0$ のとき $\tau_c = 400 \mu\text{s}$, 0.65 のとき $73 \mu\text{s}$ である. バンド 3 の回転速度は, DMPC の相転移に対応して変化している (Fig. 3B も参照).

2.3 複合体・会合体形成

膜タンパク質は, 2 量体・3 量体などの会合体 (oligomer) や, 他のタンパク質との複合体をつくりやすい. 複合体・会合体形成を, 直接検出・測定することはあまり試みられていない. Fig. 1, 式 [3] から明らかなように, 回転運動の速さは, 分子の大きさ (半径) に大きく依存するため, 回転速度の変化を測定することで, 複合体形成や会合状態の変化を検出・推定することが行われている^{17~20)}.

Fig. 5 飽和移動 ESR 法による, バンド 3 の回転運動の速さの測定¹⁶⁾

バンド 3-DMPC 再構成膜において, バンド 3 をスピンラベルし, 飽和移動 ESR スペクトルを測定した (●). 縦軸の H'/H は, スペクトル上のパラメータで回転運動の速さを反映する (大きいほど遅い). ○は, 裏打ちタンパク質 (アンキリン, スペクトリン, バンド 4.1, アクチン) を加えたときの結果で, これらのタンパク質の結合により, バンド 3 の回転が, 液晶相 (23°C 以上) で約 2.5 倍遅くなることを示している.

3 赤血球膜におけるバンド 3 タンパク質の lateral motion と回転運動: 裏打ち構造体による制御

膜タンパク質のふるまいは, ラテラル方向の移動速度, 回転運動, 会合体・複合体形成などを個別に測定し, それを総合することで推定できる.

人工膜 (再構成膜) においては, これらの関係が Saffman-Delbruck のモデル (Fig. 1) で説明できることが示されている⁴⁰⁾. たとえば, バンド 3 の運動は DMPC 中において, $D_T = 8 \times 10^{-8} \text{cm}^2/\text{s}$, $D_R = 4 \times 10^4 \text{s}^{-1}$ (Fig. 3, 5) であり, 式 [3] の関係をみたとす¹⁶⁾. また, 桿体視細胞のタンパク質ロドプシンの再構成膜において, 脂質とタンパク質との比率 (lipid/protein) を下げていくと回転が遅くなるが, これはロドプシンが, より大きな会合体をつくるためであると考えられる¹⁹⁾.

一方, 生体膜における膜タンパク質の挙動は, Fig. 1 の関係で表わされないことがある. バンド 3 の赤血球膜中の拡散は, $D_T = 5.3 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{s}$ で動く成分が 40%, immobile 成分が 60% である (26°C , in 5mM Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 , 10mM NaCl pH7.8)²⁵⁾. NBD-PE の拡散速度 ($2.5 \times 10^{-9} \text{cm}^2/\text{s}$) から予想されるバンド 3 の D_T は $5 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-9} \text{cm}^2/\text{s}$ である. また, 偏光解消法から得られた回転運動の速さは, バンド 3 2 量体に対

Fig. 6 赤血球膜裏打ち構造体 (Lux, S. E.²⁹⁾)

裏打ち構造体は, アンキリン, スペクトリン 2 量体, バンド 4.1 アクチンで構成される. これらはスペクトリン 2 量体間の head to head 様式の結合による 4 量体の形成, スペクトリン 2 量体の尾部領域でのバンド 4.1, アクチンとの結合により, 網目状にネットワークをつくる. また, アンキリン, 細胞膜にあたるアニオンチャネルタンパク質バンド 3 とスペクトリンの両方に特異的に結合する性質を持つ.

Fig. 7 バンド3のlateral motionに与えるアンキリンの効果²⁵⁾
赤血球膜ゴーストに精製したアンキリンを加えたときのFPRカーブの変化を調べた。
A; 加えるアンキリンの量が増えるにつれて、
a $\rightarrow$ b $\rightarrow$ c $\rightarrow$ d へと変化していく。
B; mobile成分の比率をプロットした。
b(●)は、熱失活させたアンキリンを加えたとき。

して、 $D_R = 10^4 \text{ s}^{-1}$ のオーダーであると推定され、 D_T と D_R の関係は式[3]を満足しない(ラテラル方向の移動速度が小さい)。このようなラテラル方向の移動速度の制限・制御は、膜の細胞質側表面に網目状に存在する構造物(裏打ち構造体, Fig. 6)^{27~29)}により行われている^{21~26)}。裏打ち構造体は数種類のタンパク質——アンキリン、スペクトリン、バンド4.1、アクチン——の複重合体である。

赤血球膜の裏打ち構造体と類似の構造物は、他の細胞においても広く存在していると考えられる。アンキリン、スペクトリン、バンド4.1類似のタンパク質が、多くの細胞の膜細胞質側表面に存在する^{30~32)}。また、細胞内フィラメントは、膜と接触していることが知られている。

このようなとき、「タンパク質間相互作用により、膜タ

ンパク質の挙動がどのように変化するか、その結果、ラテラル方向のオーガニゼーションがどのようにコントロールされるか」が問題である。以下にこの問題への取り組み・解析の例として、赤血球膜におけるバンド3の運動性と裏打ち構造体との関わり合いをとりあげる^{25, 26)}。

3.1 アンキリンの役わり

バンド3は、アンキリンにより裏打ち構造体に結びつけられている。アンキリンは、バンド3とスペクトリンの両方にそれぞれ1:1の比率で結合する。ただし、アンキリンの存在量は、バンド3の10~15%(モル比)である³³⁾。

赤血球膜ゴーストに、精製したアンキリンを加えたときのFPRカーブの変化をFig. 7に示した。Mobileなバンド3の比率が減少していく。アンキリンを¹²⁵Iでラベルし、ゴーストへの結合量を調べると、結合は特異的であり、実験条件下で最大アンキリン/バンド3=0.17(もとから存在する量を合わせるとアンキリン/バンド3=0.30, モル比)であった。このときmobile成分は12%である。熱失活させたアンキリン(バンド3への特異的結合能を失っている)を加えたときには、FPRカーブには変化はみられなかった(Fig. 7Bb)。以上の結果から、アンキリンと結合したバンド3はimmobileであり、結合していないバンド3がmobile($D_T = 5.3 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$)であると考えられる。アンキリン/バンド3が10~15%のとき、immobileの比率が60%であるのは、バンド3が2量体、4量体、……などの会合体をつくることによる^{38, 39)}と考えられる。

3.2 スペクトリンの4量体 $\rightleftharpoons$ 2量体変換の影響

スペクトリンは裏打ち構造体の主要構成タンパク質である。スペクトリンを欠くマウス赤血球変異株では、バンド3のラテラル方向の拡散速度が正常なものよりも50倍速い²¹⁾。スペクトリンは、ヘテロ2量体を単位とする棒状の分子で、head to headの結合により4量体をつくる。4量体と2量体との平衡状態は、赤血球膜に結合した状態および溶液中において、イオン強度、ポリアミンの存在など種々の条件により変化する^{25, 34, 35)}。

Fig. 8は、ポリアミンを加えたときのスペクトリンの4量体と2量体との比率の変化を表わしたものである。ポリアミン存在下(10mM NaCl)でゴーストを37°C 20分間インキュベーションしたのち、4°C、低イオン強度(0.3mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0.2mM EDTA pH7.6)で20時間処理し、スペクトリンとアクチンを遊離させる。ショ糖密度勾配遠心により、スペクトリン4量体と2量

Fig.8 ポリアミンによる, スペクトリンの4量体と2量体との比率の変化²⁵⁾
 A; 溶液中
 B; 赤血球膜に結合した状態
 ○; スペルミン, △; スペルミジン, □; プトレスシン

Fig.9 バンド3のlateral motionに与えるポリアミンの効果²⁵⁾
 ○; スペルミン △; スペルミジン □; プトレスシン ●はトリプシン処理ゴーストに, スペルミンを加えたとき (Fig.10 参照)

体とを分ける (B). スペルミン, スペルミジンの存在は, 4量体の比率を上げる. プトレスシンはほとんど影響を

Fig.10 バンド3のlateral motionにおける, 細胞質側ドメインの役わり²⁵⁾
 赤血球膜ゴーストをトリプシン処理すると, バンド3の細胞質側ドメインが切れて遊離する. トリプシン濃度 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ で処理 (0°C , 20分間) したときには, ほとんどのバンド3が切れている. $0 \sim 0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のときには, 未処理のバンド3とトリプシン処理されたバンド3が混在している.
 A; FPR カーブの変化
 a; 0, b; 0.05, c; 0.1, d; 0.2, e; $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$
 B; 3成分の比率の変化
 □; immobile 成分, ○; $5.3 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$ の成分, △; $4.0 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ の成分.

与えない. A は, 溶液中において, 精製したスペクトリン4量体を 37°C で20分間インキュベーションして2量体に解離させる実験を行ったものである. スペルミン, スペルミジンを加えておくと, 解離が部分的に阻害される.

バンド3のlateral mobilityは, ポリアミンを加えると変化する (Fig.9). Mobile成分とimmobile成分の比率 (40%/60%) は影響を受けないが, mobile成分の拡散速度が低下する. スペルミンが, 0, 20, 50, $200 \mu\text{M}$ 存在するとき, $D_r = 5.3 \times 10^{-11}, 1.3 \times 10^{-11}, 1.0 \times 10^{-11}, 5 \times 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$ である. スペルミジンも同様の変化を起こすが効果は小さい. プトレスシンはほとんど影響を与えない.

スペクトリンの4量体の比率の増加とバンド3の拡散

速度の低下との相関は, NaCl 濃度の変化に対してもみられた. たとえば, NaCl 濃度を 10mM から 150mM へと上げていくと, スペクトリンは 4 量体の比率が 35% から 50% (モル比) へと変化する. このとき, mobile 成分の拡散定数は, $5.3 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{s}$ から $5 \times 10^{-12} \text{cm}^2/\text{s}$ へと約 10 倍低下する.

これらの実験結果から, アンキリン free なバンド 3 の拡散速度は, スペクトリンの会合状態により決定されることが示唆される.

3.3 バンド 3 の細胞質側ドメインと裏打ち構造体との相互作用

ゴーストを穏和な条件下でトリプシン処理すると, バンド 3 の細胞質側ドメイン (分子量 40k ダルトン) が切れて遊離する. スペクトリン, アクチンなどは影響を受けない (アンキリンは切れる可能性がある). トリプシン処理濃度を変えたときの FPR カーブは, Fig. 10 のように変化する. e のカーブは, mobile 成分 70%, $D_T = 4.0 \times 10^{-10} \text{cm}^2/\text{s}$ である. また, b~d の FPR カーブは, mobile 成分 1 つでは解析できない. 3 つの成分 ($D_T = 4.0 \times 10^{-11}$, 5.3×10^{-11} , immobile) の相対的な比率の変化 (B) は, immobile 成分, $D_T = 5.3 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{s}$ の成分とともに, 細胞質側ドメインを失うと, $4.0 \times 10^{-10} \text{cm}^2/\text{s}$ の速さで動くようになることを示している. また, トリプシン処理されたバンド 3 の拡散速度は, スペルミンの影響を受けない (Fig. 9d).

3.4 裏打ち構造体による制御機構

これまでに述べた実験結果から, 裏打ち構造体によるバンド 3 の lateral motion の制御機構として, Fig. 11, 12 のようなモデルが考えられる. ここでは, lateral motion を制限する機構が 2 種類存在する.

① direct linkage

② trapping

である. 網目の中に trap されると, その中での運動は自由である (リン脂質層の粘性により決まる) が, 網目を

Fig. 12 網目の中に trap されたバンド 3 (∞) の lateral motion の模式図

網目を六角形で表わした. 一辺はスペクトリン 4 量体 (—) が形成するが, ところどころ 2 量体 (—) に解離している. b, c は, ある軌跡を表わす. e は, 網目の外には出られない.

Fig. 11 裏打ち構造体による, バンド 3 の lateral motion の制御機構のモデル²⁶⁾

1. アンキリンと結合したバンド 3 は, 裏打ち構造体と直接のつながりをもつことにより, 膜面上で動かない (a).
2. アンキリン free なバンド 3 は, 細胞質側ドメインにより, スペクトリン-バンド 4.1-アクチンがつくる網目の中に trap される (b, c). 網目間の移動は, スペクトリン 4 量体が 2 量体に解離したところ (ゲート) を通ってのみ可能である (本文, Fig. 12 参照).
3. バンド 3 が, 細胞質側ドメインを失うと, 網目の影響を受けなくなる (b).

越えての移動は制限される。網目の大きさは、スペクトリン4量体の長さや網目構造物の電顕写真などからみると、おおよそ直径200nmぐらいである。FPR測定時のレーザースポットの大きさは半径 $0.8\mu\text{m}$ であるので、その距離の移動に要する時間は、網目あたりの平均ゲート数(スペクトリン4量体が2量体に解離している比率)により影響を受ける。この様子をFig.12に模式的に示した。

モデルに従えば、回転運動や網目内での拡散速度など微小な領域における運動性は、網目の状態の影響を受けないことが予想される。ポリアミンの添加やNaCl濃度の変化による、バンド3の回転運動への影響を、りん光偏光解消法で調べた結果は、この予想を支持するものであった。Fig.4のりん光異方性の減衰カーブは、前述したように、回転運動には、速さの異なる少なくとも2つ以上の成分が存在すること、そのなかには、大きな制限を受けているものが存在する($\tau = 1800\mu\text{s}$ の成分と $\tau = \infty$ の成分)ことを示している。これは、アンキリンと結合したものや、大きな会合体をつくっているものに相当すると考えられる。NaCl濃度を10~150mMの範囲で変えたとき、減衰カーブには変化はみられなかった。また、スベルミン、スベルミジン、プトレスシンを加えたときにも基本的に同じ結果が得られた(Fig.13)。図では、高濃度のところで遅い成分の回転相関時間が2~3倍大きくなっている($\circ, \triangle$)、これは会合体形成などが起きているためと思われる。スペクトリンの4量体/2量体の変化に対応してlateral motionの速さが大きく変わる領域(0~0.1mM)においては、回転運動の速さはほとんど変化しない。

また、赤血球膜の他の内在性タンパク質グリコホリンのlateral motionは、FPR法で調べると、約90%がmobileであり、10mM NaCl下で $D_T = 7.5 \times 10^{-11}\text{cm}^2/\text{s}$ 、150mM NaCl下で $D_T = 9.4 \times 10^{-12}\text{cm}^2/\text{s}$ である。これを、上のモデルで説明すると、ほぼすべてのグリコ

Fig. 13 バンド3の回転運動に与えるポリアミンの効果²⁶⁾
りん光の異方性の減衰カーブ(Fig.4)を式[7]で解析し、パラメータ、 $R_1, R_2, R_3, \tau_1, \tau_2$ の値を求めた。回転緩和時間 τ_1 ($\circ, \triangle, \square$)、 τ_2 ($\bullet, \blacktriangle, \blacksquare$)の変化をプロットした。 $R_1/R_0, R_2/R_0, R_3/R_0$ ($R_0 = R_1 + R_2 + R_3$)はほとんど変化しない。
 $\circ$;スベルミン、 $\triangle$;スベルミジン、 $\square$;プトレスシン

ホリン分子が網目の中にtrapされ、スペクトリンの4量体と2量体の比率に対応した速度で拡散していることになる。

4. おわりに—ラテラル方向の構造の動的な変化

人工膜における膜タンパク質の動的挙動は、主としてリン脂質層の物性により決まる。一方、細胞膜においては、膜裏側にタンパク質の複重合体からなる構造物が存在するが、この構造物は膜タンパク質と相互作用を行い、膜タンパク質の動的挙動を人工膜におけるそれから異ならしめていると考えられる。赤血球膜を用いた研究から、その機構として、コンパートメンテーションとアンカータンパク質の存在が示唆された(Fig.14)。

赤血球膜における膜内粒子(IMP)の分布は、フリーズフラクチャー法でみると、ランダムである。これにイ

Fig. 14

ンフルエンザウイルスを結合させ、弱酸性下でインキュベーションすると、4°CでIMPの凝集が起こる。このとき、裏打ち構造体の形態が変化していることが認められた。これは、裏打ち構造体によるコンパートメンテーションのため、IMPの凝集が起こらない状態であったものが、インフルエンザウイルスの影響でコンパートメンテーションが弱くなり、広い範囲にあるIMPが1カ所に集まることができるようになったと考えられる。このとき、バンド3のラテラル方向の拡散速度は大きく上昇していた ($8 \times 10^{-10} \text{cm}^2/\text{s}$)³⁶⁾。

アンキリンのようなアンカータンパク質の存在は、膜タンパク質にmobileな状態とimmobile状態とをもたらす。赤血球膜においては、アンキリンの存在量がバンド3に対して少なく、また、バンド3が会合体をつくる性質をもっている。このため、バンド3の会合状態の変化は、mobile $\rightleftharpoons$ immobile変換をもたらす。たとえば、バンド3が8量体を形成しているときには、すべてがimmobileであろう。会合状態が変化し、2量体になると、全体の75%がmobileへと変換する。膜タンパク質のmobile $\rightleftharpoons$ immobile変換は、アンカータンパク質の生成・分解によるもののほかに、流動性変化などで引き起こされる会合状態の変化により起こることが予想される。

これまで、生体膜の動的構造の研究では、膜を構成している個々の分子の動的状態が詳細に調べられてきた。その結果、膜タンパク質や脂質のラテラル方向の拡散、回転、リン脂質のアルキル鎖の屈曲運動、膜タンパク質表面付近での脂質分子の運動状態などについて多くの知見が得られている。一方、生体膜をラテラル方向にながめたとき、タンパク質や脂質の分布は均一ではない。また、それは動的な状態にあり、外界からの刺激・情報などにより変化していると考えられる。今後は、個々の構成分子の動的状態についてのこれまでの研究成果をもとにして、このような「ラテラル方向のオーガニゼーション」の変化の実態を明らかにしていくことも必要であろう。これは、ラテラル方向の拡散、回転、会合状態の変化、複合体形成などを個別に測定し、その結果を相互に関連づけていくことで可能になると考えられる。

本総説のもとになる研究は、京都大学理学部生物物理学教室 大西研究室にて行ったものです。

文 献

- 1) Singer, S. J., Nicolson, G. L.: *Science*, **175**, 720 (1972)
- 2) Saffman, P. G., Delbrück, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3111 (1975)
- 3) Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E. L., Webb, W. W.: *Biophys. J.*, **16**, 1055 (1976)
- 4) Koppel, D. E., Axelrod, D., Schlessinger, J., Elson, E. L., Webb, W. W.: *Biophys. J.*, **16**, 1315 (1976)
- 5) Jacobson, K., Elson, E., Koppel, D., Webb, W.: *Fed. Proc.*, **42**, 72 (1983)
- 6) Chang, C.-H., Takeuchi, H., Ito, T., Machida K., Ohnishi, S.: *J. Biochem.*, **90**, 997 (1981)
- 7) Popp, C. A., Hyde, J. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2559 (1982)
- 8) Feix, J. B., Popp, C. A., Venkataramu, S. D., Beth, A. H., Park, J. H., Hyde, J. S.: *Biochemistry*, **23**, 2293 (1984)
- 9) Kunicki, T. J., Nugent, D. J., Pitrowicz, R. S., Lai, C.-S.: *Biochemistry*, **25**, 4979 (1986)
- 10) Cherry, R. J.: *Methods in Enzym.* **LIV** 47 (1978)
- 11) Zidovetzki, R., Bartholdi, M., Arndt-Jovin, D., Jovin, T. M.: *Biochemistry*, **25**, 4379 (1986)
- 12) Berliner, L. J. (ed.): "Spin Labeling, Theory and Applications" Academic Press, New York (1976)
- 13) 辻 明彦, 大西俊一: 化学と生物, **22**, 178 (1984)
- 14) Thomas, D. D., Dalton, L. R., Hyde, J. S.: *J. Chem. Phys.*, **65**, 3006 (1976)
- 15) 楠見明弘, 大西俊一: 化学の領域, **33**, 791 (1979)
- 16) Sakaki, T., Tsuji, A., Chang, C.-H., Ohnishi, S.: *Biochemistry*, **21**, 2366 (1982)
- 17) Nigg, E. A., Born, C., Girardet, M., Cherry, R. J.: *Biochemistry*, **19**, 1887 (1980)
- 18) Gut, J., Richter, C., Cherry, R. J., Winterhalter, K. H., Kawato, S.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 7030 (1982)
- 19) Kusumi, A., Sakaki, T., Yoshizawa, T., Ohnishi, S.: *J. Biochem.*, **88**, 1103 (1980)
- 20) Muhlebach, T., Cherry, R. J.: *Biochemistry*, **24**, 975 (1985)
- 21) Sheetz, M. P., Schindler, M., Koppel, D. E.: *Nature*, **285**, 510 (1980)
- 22) Schindler, M., Koppel, D. E., Sheetz, M. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1457 (1980)
- 23) Golan, D. E., Veatch, W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2537 (1980)
- 24) Nigg, E. A., Cherry, R. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4702 (1980)
- 25) Tsuji, A., Ohnishi, S.: *Biochemistry*, **25**, 6133 (1986)
- 26) Tsuji, A., Kusumi, A., Merkle, H., Ohnishi, S.: *Biochemistry*, submitted
- 27) Byers, T. J., Branton, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6153 (1985)
- 28) Schen, B. W., Josephs, R., Steck, T. L.: *J. Cell*

- Biol.*, **102**, 997 (1986)
- 29) Lux, S. E.: *Nature*, **281**, 426 (1979)
- 30) Repasky, E. A., Granger, B.L., Lazarides, E.: *Cell*, **29**, 821 (1982)
- 31) Spiegel, J. E., Beardsley, D. S., Southwick, E. S., Lux, S.: *J. Cell Biol.*, **99**, 886 (1984)
- 32) Bennett, V., Davis, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7550 (1981)
- 33) Bennett, V., Stenbuck, P. J.: *Nature*, **280**, 468 (1979)
- 34) Ungewickell, E., Gratzner, W.: *Eur. J. Biochem.*, **88**, 379 (1979)
- 35) Liu, S.-C., Palek, J.: *Nature*, **285**, 586 (1980)
- 36) Yoshimura, A., Yamashina, S., Ohnishi, S.: *Exp. Cell Res.*, **160**, 126 (1985)
- 37) Rigler, R., Ehrenberg, M.: *Q. Rev. Biophys.*, **6**, 139 (1973)
- 38) Pappert, G., Schubert, D.: *Biochim. Biophys. Acta*, **730**, 32 (1983)
- 39) Bittman R., Sakaki, T., Tsuji, A., Devaux, P. F., Ohnishi, S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **769**, 85 (1984)
- 40) Peters, R., Cherry, R. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4317 (1982)

Clostridium butyricumにおける脂質二重層の安定化制御: エーテル脂質の多形相動態の研究

Regulation of Bilayer Stability in *Clostridium butyricum*: Studies on the Polymorphic Phase Behavior of the Ether Lipids

H. Goldfine, N. C. Johnston, J. Mattai and G. G. Shipley: Department of Microbiology, University of Pennsylvania, School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania 19104-6076; Biophysics Institute, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts 02118
Biochemistry **26**, 2814-2822 (1987)

Clostridium butyricum は膜の主要なリン脂質としてホスファチジルエタノールアミン (PE), エーテル脂質であるプラズメニルエタノールアミン (PlaE) および PlaE のグリセロール骨格の 1 位にある脂肪アルコールのビニルエーテル部分にグリセロールがアセタール結合したもの (Gly-PlaE) をもつ。ビオチン不在下で培地に *cis* 不飽和脂肪酸を添加して培養すると膜リン脂質の側鎖にこの脂肪酸が取り込まれるとともに Gly-PlaE の割合が増加する。ここでは、不飽和脂肪酸型 PE が容易に非二重層構造に移転する性質をもつものに対して、Gly-PlaE が膜を二重層構造に安定化させる役割を果たすことを報告している。

オレイン酸を含むビオチンを含まない培地で *C. butyricum* ATCC 19398 を嫌氣的に培養し、そのリン脂質成分を PE と PlaE を含む分画および Gly-PlaE の分画に分離した。脂肪酸組成を分析したところ 92 から 98% がオレイン酸またはその誘導体であるシクロプロパン脂肪酸に置換していた。147.5 MHz の ^{31}P -NMR、走査示差熱量測定 (昇温降温速度 $5^\circ\text{C}/\text{min}$)、X 線回折により液晶-

結晶の相転移温度、ラメラ相とヘキサゴナル II 相の間の相転移温度を調べた。昇温測定で PE + PlaE 分画は -1.9°C に $\Delta H = 3.8 \text{ kcal/mol}$ の転移を示したのに対して、Gly-PlaE 分画は 3.5°C ($\Delta H = 0.6 \text{ kcal/mol}$) と 16.1°C ($\Delta H = 9.0 \text{ kcal/mol}$) に転移を示した。NMR 測定から PE + PlaE 分画では 0°C でラメラ相とヘキサゴナル II 相が共存するスペクトルが得られたのに対して、Gly-PlaE 分画では 50°C までラメラ相のスペクトルであった。この結果は X 線による回折パターン上でも同一であった。一方、天然の卵黄 PE は 20°C で、合成の DOPE は $15-20^\circ\text{C}$ でほぼ完全にヘキサゴナル II 相に転移しているが、Gly-PlaE を 3 分の 1 含む混合系にすると卵黄 PE で 40°C まで DOPE で 25°C までラメラ相が安定化された。Gly-PlaE が脂質を二重層に安定化させるのは *sn*-1 鎖にアセタール結合したグリセロール基が極めて親水性が強く、水と接触しようとするためと考えられる。このためラメラ相からヘキサゴナル II 相への相転移温度は PlaE から Gly-PlaE になることで 45°C 以上も上昇する。

(名古屋大学工学部 大木和夫)