●特集：人工膜と生体膜の接点を探る—膜構造と機能発現—

脂質の物性から見た生体膜の構造形成と機能

大 木 和 夫

東北大学大学院理学研究科 ☎ 980-77 仙台市青葉区荒巻字青葉

Considering formation of biomembranes and its function from a viewpoint of physical property of lipids

Kazuo Ohki

Department of Physics, Tohoku University, Graduate School of Science
Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-77, Japan

The interactions of membrane proteins with lipid bilayers are principally hydrophobic and electrostatic in nature. Integral proteins interact hydrophobically with the hydrocarbon chains of membrane lipids by crossing the bilayer once or several times. Since every biomembrane contains a wide variety of different lipid species, an understanding of the differential interactions between proteins and lipids is required to clarify many aspects of membrane functions. The integral membrane proteins have an amphipathic nature since there exist separated surfaces of hydrophobic and hydrophilic regions. The hydrophobic force is the major factor in constructing the biomembrane structures, and so the hydrophobic part of integral protein traverses or penetrates the hydrophobic core of the lipid bilayer. In this review, matching of the hydrophobic regions of the lipids and proteins in membranes is discussed, and then a possible mechanism of activating protein kinase C in signal transduction of phosphatidylinositol cycle.

Key words : biomembrane structure / lipid-protein interaction / signal transduction / phospholipase / protein kinase

1. はじめに

生物の構造および機能の特徴はその生物種がもつ DNA 上の遺伝情報に由来している。蛋白質は生体膜の主要な成分であり、生体膜の構造と機能にも遺伝情報が反映しているが、生体膜の基本構造となる脂質二重層は脂質分子の集合体として

形成されている。脂質分子の特徴は水環境の中で、その両親媒性と形状に依存した熱力学的な過程によって集合し、脂質二重層膜を形成することである¹⁾。生体膜の構造形成はプログラムされた遺伝子の発現で進行し、生体膜に導入される蛋白質は粗面小胞体で合成され、ゴルジ体から形質膜へと小胞化と膜融合により輸送される。これらの蛋白

Fig. 1 Dynamic structure of biomembrane.
Top : Integral membrane proteins are inserted into lipid bilayer membrane by hydrophobic interaction and peripheral membrane proteins are bound to the membrane surface electrostatically.
Bottom : Both membrane proteins and lipids exert rotational and lateral diffusion. Membrane lipids also have transverse motion (flip-flop).

質は信号ペプチド、信号アンカー、膜停止領域などの特徴的なアミノ酸配列をもつことで、標的となる膜へ特異的に組み込まれる²⁾。ここでは、生体膜の生合成の過程は取り上げず、脂質膜の物性と蛋白質との相互作用から生体膜の構造形成を考察する。生体膜は構成要素と構造が多種多様であり、残念ながら、その構造を分子レベルで完全に解明するには到っていない。しかし、生体膜についての全体的な概念は流動モザイク生体膜モデルにより理解されている³⁾。それは脂質二重層膜への膜蛋白質の組み込みについて、静電的な相互作用による表在性膜蛋白質と疎水性相互作用による内在性膜蛋白質の2種類に分類して配置した。流動モザイク膜モデルには、それまでに得られていた膜脂質および膜蛋白質の拡散運動の知見が膜流動性の概念で表現されている (Fig. 1)。生体膜機能の発現には、複雑な構造形成の過程と膜構成成分

Fig. 2 Hydration of phosphatidylcholine and physical properties of lipid bilayer membrane.

Top : Process of myelin formation of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) molecules. Hydration of DPPC crystal starts just above the phase transition temperature (41°C). Sequential images observed by a microscope are shown every 5 sec.

Bottom left : Phase structures of lipid bilayer membranes of DPPC (side view). Fluid phase (above 41°C), ripple phase (between 41°C and 34°C), gel phase (between 34°C and 18°C) and crystal phase (below 18°C).

Bottom right : Schematic representation of phase separation in tertiary mixture of lipid bilayer membrane (top view). From a homogeneously mixed phase, one component (●) is phase separated when it changes to solid phase.

子の運動および分子間の相互作用が関与しており、さらに、代謝による分子の変換も含めた動的な構造を考える必要がある。ここでは、著者の研究を基礎にして、人工膜との接点を意識した「生体膜の構造形成と機能の関連」について述べてみたい。

Fig. 3 Annular lipids of integral membrane protein.

Three-dimensional structure of cytochrome c oxidase is determined by X-ray diffraction study of Tsukihara et al⁸⁾. Molecular models of annular lipids are arranged on the hydrophobic surface of the protein.

2. 脂質二重層膜の構造形成とその特性

膜脂質の主要な分子種であるリン脂質は臨界ミセル濃度が低いため、水中で自発的に集合して脂質二重層膜を形成する。脂質二重層膜のもつ区画性により細胞内で起こっている膨大な数の化学反応は生体膜によって特定の領域に分けてられている。一方、細胞ではエンドサイトーシス、エクソサイトーシス、細胞分裂など種々の膜融合現象があり、それは区画を変更する動きをしている。さらに、脂質二重層膜は小さな温度変化で相転移して大きく流動性を変えるとともに相分離によって不均一な領域を生じさせる (Fig. 2)。膜構成成分の代謝も含めた生体膜の動的構造は、脂質と蛋白質の相互作用を介して、その機能に影響を及ぼしていると考えられる。例えば、生体膜の流動性は生体膜内の分子の拡散と衝突に影響を及ぼすので、結果的に化学反応の制御となっている。最近、細胞の刺激受容に対する応答としての脂質代謝と細胞の機能制御の関係が広く研究されてお

り、これには機能性脂質という用語も使われている。これは脂質代謝の側面での生体膜の動的構造であるとも言える⁴⁾。

3. 脂質と蛋白質の相互作用と生体膜の構造

生体膜の構成脂質は電荷に注目すれば、中性リン脂質と酸性リン脂質に分類できる。酸性リン脂質の負電荷は金属陽イオンだけでなく、蛋白質を構成する塩基性アミノ酸の正電荷とも静電的に相互作用し、表在性膜蛋白質を結合させるだけでなく、酸性リン脂質自身も相分離を生じる⁵⁾。貫通型の内在性膜蛋白質であるシクロトーム c 酸化酵素が生体膜の流動性に影響を及ぼすこと⁶⁾から、膜蛋白質と直接に相互作用している膜脂質は境界脂質として存在していることが見出され⁷⁾、さらに、月原らはシクロトーム c 酸化酵素を結晶化し、その構造を解析した⁸⁾ (Fig. 3)。一方、生体膜における蛋白質と脂質の相互作用に対する理論的な取り扱いは Owicki ら^{9, 10)} や Mouritsen と Bloom により行われているが¹¹⁾、内在性膜蛋白質が α ヘリックスを形成して脂質二重層膜を複数回貫通している場合の α ヘリックスの束について、最近、Ben-Tal と Honig は静電的な相互作用を導入すると、膜を貫通している α ヘリックスが反平行で束となるとの結論を得ている¹²⁾。一方、リン脂質の脂肪側鎖は多様な構造をもち、それは分子間の疎水性相互作用にも微妙な影響を及ぼしていることから、脂質の疎水性脂肪側鎖と膜蛋白質の疎水領域のサイズが一致したとき、最大の疎水性相互作用となり安定化する^{10, 11)}と想像される。実際に、生体膜の酵素活性が脂質二重層膜の厚さに依存することが、一連の膜蛋白質で示されている^{13~15)}。我々は糖脂質の糖を付与するグルコース転移酵素をリン脂質膜に再構成する実験で、酵素活性が脂質膜の厚さに依存し最適の厚さが存在することと、これが膜の流動性に関連していることを示した。これは膜蛋白質表面の疎水性部分が脂質二重層膜の疎水性領域と相互作用するとき、両者が整合するように、構造の歪みが生じるためと考えられる (Fig. 4)。つまり、膜蛋白

Fig. 4 Matching between the hydrophobic thickness of an integral protein and the activity of membrane protein.

Top : Activity of UDP-glucose : ceramide glucose transferase depends on thickness of reconstituted lipid bilayer membranes.

Bottom : Mismatching shrinks (left) or extends (right) the membrane protein, and the maximum activity is obtained in matching of a protein and lipids (center).

質に生じた変形が酵素活性の変化として測定されていると理解できる。

以上のことを一般化すれば、種々の物理的または化学的な因子は、脂質と蛋白質の相互作用を介して膜蛋白質の構造に影響を及ぼすことで生体膜の機能を制御していると考えられる。実験的には、脂質膜の相転移挙動を DSC で測定して蛋白質との相互作用を調べる方法が広く行われている。DSC のサーモグラムに表われる変化から McElhaney は脂質と蛋白質の相互作用を 3 つのタイプに分類しており¹⁶⁾、それぞれ表在性、係留型、貫通型の膜蛋白質に対応させることができる。DSC 測定からは蛋白質の濃度に依存した相転移エンタルピーの減少から、蛋白質と強く相互作用している脂質分子の数を見積ることが可能であ

Fig. 5 Preferential interaction of melittin and dimyristoylphosphatidylcholine.

Left : Melittin molecules preferentially locate in DMPC-rich region rather than DSPC-rich one.

Right : Disappearance of the transition peak from DMPC-rich region proves that melittin molecules penetrate DMPC-rich region.

り、Semin らはシトクローム c 酸化酵素の輪状脂質を 72 分子とし¹⁷⁾、Freire らは係留型の内在性膜蛋白質であるシトクローム b_5 の強い影響下に 14 脂質分子があるとしている¹⁸⁾。著者も蜂毒の主成分の 1 つであり、26 個のアミノ酸からなるポリペプチドを膜蛋白質の疎水性領域部分のモデルとして膜脂質との相互作用について研究を行い、ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) とジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) の 2 成分系で、メリチンは DMPC と選択的に相互作用していることを示した (Fig. 5)。リン脂質二重層膜の疎水領域の厚さは DMPC と DSPC ではそれぞれ 33 Å と 42 Å 程度であり、 α ヘリックス構造を取ったメリチンの疎水性領域は DMPC に対応する。これは膜脂質と膜蛋白質の疎水領域に整合があることに実験的な証拠を与えている¹⁹⁾。

4. 形質膜フリッパーゼと膜脂質の非対称分布およびエンドサイトーシス活性

本質的に、非対称の構造をもつ膜蛋白質は脂質を非対称に分布させる原因となり得るが、一方、

Fig. 6 A possible role of PS flippase in endocytosis of a cell.

A schematic representation of endocytosis triggered by PS flippase. Bending of membrane is accompanied with translocation of PS to cytoplasmic layer of the bilayer.

Protein kinase C

ATP に依存する能動的な非対称分布も報告されている。そこで、CHO 細胞野生株と PS フリッパーゼ不活性変異株を取得して²⁰⁾、膜脂質の非対称分布の形成への関与を調べたが、形質膜の PS フリッパーゼ活性が膜脂質の非対称性の形成に積極的に関与しているとの証拠は得られなかった。一方では、PS フリッパーゼ活性がエンドサイトーシス活性と関連しているとの結果が得られ、その機構を Fig. 6 のように推測している²¹⁾。

5. 細胞の情報伝達機構における膜構造と機能

生体膜上の機能の中で情報伝達機構は、生物体の全体的な調和のために細胞機能を制御する重要な役割を担っている。この機構の1つ、イノシトール・サイクルでは、リガンドのレセプターへの結合により、トランスデュシを介してイノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼ C が活性化されると、トリホスホイノシチド (TPI) がジアシルグリセロール (DG) に変換される。この DG はホスファチジルセリン (PS) と Ca^{2+} の存在下にプロテイン・キナーゼ C (PKC) を活性化

Fig. 7 A possible mechanism of activating protein kinase C coupled with phosphatidylinositol cycle.

Binding of a ligand to a receptor activates triphosphoinositide (TPI) specific phospholipase C through transducin, and TPI is hydrolyzed to diacylglycerol (DG) and IP_3 . DG is able to enhance phase separation of phosphatidylserine (PS) induced by Ca^{2+} . In the separated region, the surface becomes hydrophobic because hydrated water is replaced by Ca^{2+} . Then protein kinase C (PKC) binds to the hydrophobic surface and the pseudo substrate region is opened by the electrostatic interaction with anionic phospholipids.

する。PKC が膜に結合するときの脂質と蛋白質の相互作用を DG による PS の Ca^{2+} による相分離の促進と関連付けて考察してみる。この機構ではホスホリパーゼ C (PLC)、ホスホリパーゼ D (PLD)、ジアシルグリセロール・キナーゼ (DGK) などによる膜脂質の変換があり、これは局所的な膜の脂質構成の変化を生じさせるので、蛋白質との静電相互作用および疎水性相互作用に影響を及ぼすものと考えられる。ところで、細胞

内には水溶性の蛋白質が多数含まれているが、これらの存在状態は機能と相関して生体膜の表面への結合と離脱の動的な状態にある。プロテインキナーゼ C (PKC) は構造の一部に疎水性領域をもつが水溶性であり通常は非結合状態にある。白血球 (好中球) から部分精製した PKC と好中球細胞の膜とを、種々のカルシウム濃度で混合した後、遠心により膜と上清を分離し、膜への結合と PKC の活性を調べた報告では、結合と活性の間にカルシウム濃度に依存した相関が見られた^{2,2)}。同様な変化は DGK でも観察されている^{2,3)}。一方、ホスファチジルセリン単層膜の表面圧を変化させて膜への PKC の結合を調べた実験から、表面圧 26~43 dyn/cm で Ca^{2+} 濃度に依存した脱着が示された^{2,4)}。PKC は細胞内の各種蛋白質をリン酸化することで細胞機能を制御している重要な酵素であり、既に、その一次構造は解明されている^{2,5)}。分子レベルでの活性化機構はまだ明らかではないが、PKC はアミノ末端側の 19 番目から 36 番目に基質となる蛋白質のリン酸化される部位と類似の配列をもち、通常はこの領域が触媒部位に結合して活性が抑制されている。この領域は塩基性アミノ酸 7 残基を含み、酸性アミノ酸は存在しないので、膜の酸性リン脂質と静電的に結合し、触媒部位が開くことで活性化されると考えられる^{2,6)}。

6. 細胞の刺激受容時の膜脂質の変換にともなうプロテインキナーゼ C 活性化のモデル

細胞の情報伝達機構では、神経伝達物質、ホルモン、成長因子など細胞機能を外部から調節する物質は、形質膜に存在する特異的な受容体に結合するとイノシトール・サイクル、スフィンゴミエリン・サイクルなどの脂質代謝系を活性化する。トランスデュースを介してイノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼ C が活性化されると、トリホスホイノシチド (TPI) がジアシルグリセロール (DG) に変換される。この DG はホスファチジルセリン (PS) と Ca^{2+} の存在下に

PKC を活性化するが、PKC が膜に結合するときの脂質と蛋白質の相互作用をその物性からは Fig. 7 に示すように理解することもできる。

イノシトールリン脂質が DG に変換される PS の Ca^{2+} による相分離が促進する^{2,7, 2,8)}。このとき、膜表面は水和水が Ca^{2+} に置換されて疎水的になり、疎水的な部分をもつ PKC が結合する。その結果、PKC が活性化されることになると思像される。

文 献

- 1) J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell and B.W. Ninham : *Biochim. Biophys. Acta* **470**, 185-201 (1977)
- 2) P. Walter et al : *Cell* **38**, 5-8 (1984)
- 3) S. J. Singer and G. L. Nicolson : *Science* **175**, 720-731 (1972)
- 4) 野澤義則, 大木和夫 : 「生体膜のバイオダイナミクス」, 羊土社, 東京, 1993
- 5) J. M. Boggs, K. D. Wood, M. A. Moscarello and D. Papahadjopoulos : *Biochemistry* **16**, 2325-2329 (1977)
- 6) 大木和夫, 大西俊一, 日本生化学会編「新生化学実験講座第 20 巻機器分析概論」, pp. 117-130, 東京化学同人, 東京 1993
- 7) P. C. Jost, O. H. Griffith, R. A. Capaldi and G. Vanderkooi : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 480-484 (1973)
- 8) T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa : *Science* **269**, 1069-1074 (1995)
- 9) J. C. Owicki, M. W. Springgate and H. M. McConnell : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1616-1619 (1978)
- 10) J. C. Owicki and H. M. McConnell : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4750-4754 (1979)
- 11) O. G. Mouritsen and M. Bloom : *Biophys. J.* **46**, 141-153 (1984)
- 12) N. Ben-Tal and B. Honig : *Biophys. J.* **71**, 3046-3050 (1996)
- 13) M. Caffrey, G. W. Feigenson : *Biochemistry* **20**, 1949-1961 (1981)
- 14) R. B. Cornell : *Biochemistry* **30**, 5881-5888 (1991)

- 15) G. In'tVeld, A. J. M. Driessen, J. A. F. Op den Kamp : *Biochim. Biophys. Acta* **1065**, 203-212 (1991)
- 16) R. N. McElhaney : *Biochim. Biophys. Acta* **864**, 361-421 (1986)
- 17) B. K. Semin, M. Sarast and M. Wikstrom : *Biochim. Biophys. Acta* **769**, 15-22 (1983)
- 18) E. Freire, T. Markello, C. Rigell and P. W. Holloway : *Biochemistry* **22**, 1675-1680 (1983)
- 19) K. Ohki : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 850-856 (1989)
- 20) T. A. Endo, T. Kobayashi and K. Ohki : *Exp. Cell Res.* **228**, 341-346 (1996)
- 21) P. F. Devaux : *Biochemistry* **30**, 1163-1173 (1991)
- 22) E. Melloni, S. Pontremoli, M. Michetti, O. Sacco, B. Sparatore, F. Salamino and B. L. Horecker : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6435-6439 (1985)
- 23) F. Sakane, K. Yamada, S. Imai and H. Kanoh : *J. Biol. Chem.* **266**, 7096-7100 (1991)
- 24) M. D. Bazzi and G. L. Nelsestuen : *Biochemistry* **27**, 6776-6783 (1988)
- 25) P. J. Parker, L. Coussens, N. Totty, L. Rhee, S. Young, E. Chen, S. Stabel, M. D. Waterfield and A. Ullrich : *Science* **233**, 853-859 (1986)
- 26) M. Mosior and S. McLaughlin : *Biophys. J.* **60**, 149-159 (1991)
- 27) K. Ohki, T. Yamauchi, Y. Banno and Y. Nozawa : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**, 321-327 (1981)
- 28) K. Ohki, T. Sekiya, T. Yamauchi and Y. Nozawa : *Biochim. Biophys. Acta* **693**, 341-350 (1982)

(受付 1997 年 5 月 6 日 掲載決定 5 月 14 日)