膜物性による生体膜機能の制御：測るから見るへ

大木 和夫

東北大学大学院理学研究科物理学専攻 〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉

Regulation of Biomembrane Function by Physical Properties of The Membrane: Methodological Change from 'To Measure' to 'To See'

Kazuo Ohki

Department of Physics, Graduate School of Science, Tohoku University, Aza-Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan

The cell, which is a fundamental unit of the life, has been constructed of biomembranes. The inside of the cell in which the complicated chemical reaction progresses has been divided three-dimensionally by the biomembranes which are mainly composed of proteins and lipids. The function appears on membrane protein by the interaction with the lipid and is affected by the physical property of membrane lipid. In the cell, various biological phenomena occur in the regions divided by the biomembranes. Image analysis system under the microscope makes it possible to obtain spatial and time-related information of the biological phenomena in order to clarify the biological system of cell. We have developed the equipment that images the physical property of the biomembrane at video rate under the microscope using fluorescence dye Laurdan. This equipment was applied to the analysis of the fluidity change of the cell membrane of PC12 cell in the apoptosis process. And, it was applied to Giant liposome prepared for bilayer mixture of DMPC and DMPE, and the phase separation phenomenon was observed at the video rate.

Key words : physical property / microscopic imaging / lipid-protein interaction / non-bilayer forming lipid

1. はじめに

地球上の生命は細胞を基本単位としており、単細胞生物だけでなく、多細胞生物もその周囲を環境とする影響下に細胞は存在している。細胞を構築する生体膜は区画性と選択的な透過性を備え、制御された化学反応システムである細胞内に細胞小器官と呼ばれる多様な化学反応槽を形成している。1972年にSingerとNicolsonが提唱した‘流動モザイク膜モデル’は生体膜の動的な構造の概念か

ら生物機能との関連を考察する端緒となった。生体膜は蛋白質と脂質を主要な構成成分とし、膜脂質分子はその両親媒性のため、水分子の水素結合による疎水性効果で、二重層膜構造に集合する。生体膜の機能は第一義的にはDNAの遺伝情報に従って合成された蛋白質によっているが、膜蛋白質の活性には脂質が要求され、活性は多かれ少なかれ、脂質との相互作用の影響下にある¹⁾。膜脂質の分子量は大きくても1,000程度であり、多数の分子が集合して形成する脂質二重層膜は流動性

(粘性の逆数に相当), 相転移, 相分離などの物性を示す。すべての物性は温度依存性であり, 温度変化に対して生物機能を維持する恒常性が進化の過程で遺伝情報として蓄積されており, 恒温生物由来の細胞でさえも, 環境温度の変化に应答する。細胞の温度適応機構として, 脂質二重層膜の温度依存的な物性が及ぼす効果から生体膜機能を解明する研究が広く行われた³⁾。一方, 多細胞生物は膨大な数の細胞の働きを制御し個体としての調和を保っているが, 個々の細胞はホルモン系と神経系のいずれでも, 細胞表面の形質膜に存在する受容体がりガンドを結合して, 細胞の情報伝達系がトリガーされている。細胞の温度適応機構が物理的な因子への应答とすれば, これは化学的な因子への細胞応答である。受容体で得た化学的因子による信号は細胞内の各種システムに伝達されて機能制御が行われるが, ここで, 脂質分子が関与した信号伝達系が, 生体膜との関連で注目される⁴⁾。シグナリング機構の解明には細胞内での信号伝達を空間的・時間的に解析することが必要となる。ところで, 光学顕微鏡は伝統的に細胞の観察に使用されてきたが, 近年, その技術革新は著しく, レーザー光源の利用, エレクトロニクス技術によるカメラの高性能化, コンピューターによる画像処理などで光学顕微鏡観察システムの性能が画期的に向上している。既に, 医療分野ではX線-CT, MRIなどの画像診断技術が実用化されているが, ここでは膜物性による生体膜の機能制御の研究が総体的な(バルクの)測定方法から画像化技術を用いたシステムの時間的・空間的な相互関係の解析への方向となっていることを踏まえて生体膜の構造・物性と機能との関連についての研究を紹介する。

2. 生体膜の構造と物性による生体膜機能の発現と制御

生物機能は遺伝情報に従って合成された蛋白質が担っており, 生体膜もその例外ではない。生体膜の動的な構造の提唱により, 膜流動性と機能との関係を解明するために, スピンラベル法や蛍光偏光解消法などで, 生体膜や人工膜で広く膜流動

Fig. 1 Enzyme activity of UDP-glucose:ceramide glucosyl transferase reconstituted in various phosphatidylcholine membranes.

UDP-glucose:ceramide glucosyl transferase was purified from membrane fraction of rat brain by CHAPS and DEAE-Toyopearl and then reconstituted with various phosphatidylcholines. Top: Activity of the enzyme reconstituted in various phosphatidylcholine molecules. Bottom: Apparent Michaelis constant (K_m) for the each substrate (Nomura and Ohki in preparation).

性の測定が行われた。膜流動性が生体膜の機能を制御している例として, アドレナリンがその受容体に結合し, アデニル酸シクラーゼを活性化する機構で, シクラーゼの活性化が生体膜の粘度に依存し, 拡散速度が律速となっていることが示された⁵⁾。生体膜の脂質二重層内に組み込まれて存在する内在性膜蛋白質は周囲の脂質と疎水性相互作用しており, とくに, 蛋白質の周囲を取り巻く輪状脂質(annular lipid)はこの相互作用により脂質分子の運動が強く制限されており, boundary lipidとも呼ばれている⁶⁾。膜蛋白質表面の疎水性アミノ酸領域と膜脂質の疎水性側鎖との長さが一致するとき熱力学的に安定な構造となることが理論的⁷⁾にも実験的^{8,9)}にも示されている。生体膜の

厚さは構成する脂質の脂肪側鎖の長さで決定されることから、生体膜の酵素活性が脂質二重層膜の厚さに依存していることが、 Ca^{2+} -ATPase¹⁰⁾, CTP:ホスホコリンーシチジル酸転移酵素¹¹⁾, 乳酸球菌のロイシン輸送系¹²⁾など一連の膜蛋白質で示されている。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。つまり、膜蛋白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。著者らも脂質膜の厚さと酵素活性の関係をUDP-グルコース:セラミド グルコース転移酵素を脂肪酸側鎖の単数が6から18までの長さが異なるホスファチジルコリン膜に再構成して調べた。その結果、炭素数12のとき酵素活性がピークとなり、ミカエリス定数の測定ではセラミドを基質としたとき炭素数15まで上昇するのに対して、UDP-グルコースを基質とすると炭素数12で最大となるのが明らかになった(Fig.1)。一方、脂質二重層膜の厚さが変化する相転移として、アルコールなどの添加でホスファチジルコリンの脂質二重層膜に惹起される指組み構造への転移^{13,14)}があるが、生体膜の機能との関連はまだ知られていない。ところで、生体膜の基本構造は脂質二重層膜であるが、膜脂質分子には非二重層構造を形成する分子種が存在する。最近、非二重層構造形成脂質の役割が解明されつつあり、大腸菌膜の主要な脂質が非二重層形成脂質のホスファチジルエタノールアミンである理由が脂質膜の側方圧力を高め膜蛋白質の構造を安定させることであると提唱された¹⁵⁾。実際に、酵素活性との関連が調べられ、膜蛋白質の機能が非二重層形成脂質により活性化されることが示されている¹⁶⁾。チラコイドやミトコンドリアの膜は蛋白質の割合が高いが、同時に非二重層形成脂質も多く含まれている。蛋白質の割合が高いために、非二重層形成脂質が存在しても二重層膜構造を維持しているが、膜蛋白質の分解や集合で蛋白質の割合が低下するとその部分は非二重層構造のキュービック相やヘキサゴナルII相を形成し、これらは膜脂質供給の貯蔵槽となるとの仮説が提唱されている¹⁷⁾。非二重層形成脂質とは、熱力学的な脂

Fig.2 Hydration of two types of phospholipids: Non-bilayer forming lipid and bilayer forming lipid.

Phospholipid powder was placed on a slide glass and water was dropped on it. Hydration was started by heating up the sample above phase transition temperature. Hydration process was observed by an optical microscope equipped with CCD camera and video recorder. Top; Dimyristoylphosphatidylethanolamine (DMPE, $T_m = 50^\circ\text{C}$), Bottom; Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC, $T_m = 42^\circ\text{C}$)

質分子の自己集合過程で、キュービック相やヘキサゴナルII相を形成する脂質であり、Israelachviliらは脂質分子の形状と集合体の形態の関係式を理論的に求めている¹⁸⁾。彼らは円柱型の形状をもつ脂質分子が脂質二重層膜となり生体膜の基本構造を形成するのに対して、円錐型の脂質分子が非二重層形成脂質になると分類した。

3. 非二重層形成脂質による曲率変化と生体膜

生体膜を構成する脂質成分は多様な分子種からなり、その構造も千差万別であるが、非二重層形成脂質は円錐型の共通構造をもっており、それらの分子は脂質二重層膜内で集合体は曲率を高める効果をもっている。実際に、リン脂質の水和過程を顕微鏡下に観察すると非二重層形成脂質のホスファチジルエタノールアミンは二重層形成脂質のホスファチジルコリンに比較して径が細いミエリン形成の部分が観察されており (Fig.2), 脂質集合体のレベルでの効果と考えられる。生体成分となる

Fig.3 Endocytosis-like phenomenon induced by sphingomyelinase treatment CHO cells were changed to energy deficient state by adding energy poisons (deoxy-d-glucose and sodium azide), and then treated with sphingomyelinase in the presence of rhodamine-dextran. Endocytosis-like phenomenon was observed by fluorescence microscope equipped with CCD camera and digital video recorder.

Top left: Phase contrast image of the CHO cells in energy deficient state. Top right, bottom left and bottom right: Fluorescence images of CHO cells treated with sphingomyelinase in the order of time course. The second image was taken after 9 sec and the third one was taken after 30 sec of the first image.

分子はすべて細胞の代謝経路の中にあるが、細胞の機能と関連して酵素の活性化による代謝の促進が広く観察されている。イノシトールリン脂質がホスホリパーゼCによってジアシルグリセロールに変換されるホスファチジルイノシトール・サイクルは二重層形成脂質から非二重層形成脂質への変換と見なせる¹⁹⁾。また、スフィンゴミエリン・サイクルでもスフィンゴミエリナーゼによるスフィンゴミエリンのセラミドへの代謝が非脂質二重層形成脂質への変換となっている。この変換と生体膜機能との関連については、CHO細胞をスフィンゴミエリナーゼで処理してスフィンゴミエリンをセラミドに変換させるとATPを必要としないエンドサイトーシス類似の現象が生じることが報告され²⁰⁾、我々も追試により確認した(Fig.3)。一方、エンドサイトーシスと生体膜の湾曲の関係については生体膜の外層と内層の間で脂質を移行させるフリッパーゼの関与をDevauxが提唱してい

たが²¹⁾、ホスファチジルセリンのフリッパーゼ欠損したCHO細胞の変異株を取得してエンドサイトーシスとの相関を調べたところ、フリッパーゼが欠損した株²²⁾ではエンドサイトーシス活性が低下することが確認できた²³⁾。

4. 生体膜の物性を顕微鏡下に観察する方法の開発

生体膜は細胞を構成する要素として、3次元的な区画を作ること、立体的な細胞機能を発現させ制御している。細胞の情報伝達系で中心的な役割を担うプロテインキナーゼCは細胞質に存在する非活性型が、ジアシルグリセロールと Ca^{2+} の存在下にホスファチジルセリンを含む生体膜に結合して活性型になる²⁴⁾。その過程²⁵⁾、および、酵素の擬基質配列ペプチドがホスファチジルセリンの相分離を誘起する現象²⁶⁾が顕微鏡下に観察された。細胞は複雑な情報処理システムとして時間的・空間的なプロセスで機能が発現しており、その過程を“見る”研究が重要になっている。そこで、光学顕微鏡下に生体膜の物性の変化を画像として見る装置を開発した。その原理は生体膜に導入された環境感受性蛍光色素Laurdanが生体膜の流動性に対応して水が膜内に浸入する程度をその蛍光スペクトルに反映させることを利用した²⁷⁾。つまり、Laurdanの発光ピークが疎水性（非極性）環境の440 nmから水（極性）環境の490 nmにシフトするので、両波長の画像を取得し、これからGeneralized Polarization (G.P.;一般化極性値)の画像を求める。この装置は発光波長のシフトを用いている点に特徴があり、ビデオレートで録画した画像の処理によりリアルタイム観察が可能である(Fig.4)。

5. 膜物性顕微鏡画像化装置の細胞への適用

開発したこの装置を神経成長因子(NGF)に応答して神経突起を進展させるPC12D細胞に適用して、膜物性の変化を観察した。その結果、細胞体部分でNGF処理直後にGP値の低下、つまり、膜流動性の上昇が一過性に生じることが示された²⁸⁾。

Fig.4 Optical system of microscope for video rate generalized polarization (G.P.) imaging.

G.P. of environment sensitive dye, Laurdan, was calculated from the emissions at 440 nm and 490 nm (Ref.3375). The fluorescence images of 440 nm and 490 nm were arranged on the plane of CCD chip, and recorded by digital video recorder. G.P. image was calculated from the two images by use of personal computer.

これは、脂質の生合成が行われる小胞体とゴルジ体の領域で膜流動性が増加しているものと想像できる。さらに、細胞のアポトーシス現象について、その過程が膜の流動性変化に対して、どのような時間的な関連があるかを顕微鏡下に観察して解明することを試みた。過酸化水素で誘導したPC12D細胞のアポトーシス過程では、処理時間に依存して、処理時間6時間からCaspase3の活性が上昇し、12時間からDNAラダーが形成され、24時間から核の形態変化が観察され、一方、ホスファチジルセリンの細胞表面への表出であるAnnexin Vによる染色性は2時間から見られた。また、膜物性顕微鏡画像化装置で観察した膜の流動性は過酸化水素水処理後2時間まで時間とともに増加し、その後は変化していなかった。過酸化水素処理で誘導したPC12D細胞のアポトーシスの過程では膜物性の変化が他の現象に先行して生じるという興味あ

Fig.5 Microscopic G.P. images of PC12D cells in different stages of apoptosis.

Apoptosis of PC12D cells was induced by 0.5 mM H_2O_2 in the culture medium. Each phenomenon was observed in apoptosis process in the following times; sensitivity to annexin V for 2 h, increase of caspase 3 activity for 6 h, formation of DNA ladder for 12 h and morphological change of nucleus for 24 h. The cells, grown in the medium containing H_2O_2 , were stained with 10 μ M Laurdan at 37 $^{\circ}$ C for 30 min. Top left: phase contrast image of PC12D cells just after the addition of H_2O_2 . Photographs shown in a series were taken at the indicated time and G.P. images were obtained by computer calculation.

る知見が得られた(Fig.5)²⁹⁾。

6. 相分離現象の実時間膜物性画像化顕微鏡による観察

生体膜の基本構造となる二重層膜を形成する脂質分子は集合体として統計熱力学的な物性である相転移と相分離を示す。これらは脂質膜の基本的な物性であり、膜蛋白質との相互作用を介して、生体膜の機能に影響を及ぼしている。相転移は大きな物性変化であり、その観察は生体膜でも難しくはない。しかし、相分離は物性の異なる領域を空間的に分離できる分解能が必要であり、容易ではない。作製した装置を脂質二重層形成脂質と非二重層形成脂質の2成分系であるDMPC/DMPE (1:1)の巨大リポソーム($\phi \approx 35 \mu$ m)に適用して、リアルタイムで膜物性の顕微鏡画像化観察を行った。その結果、顕微鏡下に相分離を観察すること

Fig.6 Phase separation of DMPC/DMPE (1:1) giant liposome observed by G.P. imaging.
Giant liposomes of dimyristoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylethanolamine (molar ratio 1:1) containing 1 mol % Laurdan were prepared by hydration in 2 mM CaCl₂ solution. Representative microscopic images of selected from a series of video rate images.

ができた。得られたG.P.画像を解析すると巨大リポソームの直線的な部分の流動性の低い領域と曲率が大きく流動性の高い領域に分離していることが確認された(Fig.6)。

7. おわりに

「百聞は一見に如かず」“To see is to believe.”古今東西を問わず、直接に見ることが出来れば理解し易く説得力もあります。レーザー、放射光、CCDカメラ、コンピューターサイエンスなどの技術革新は、多様な分野で‘見る’技術を発展させており、今後、システムとしての生体膜の機能は視覚的な研究で解明が進むものと期待されます。

文 献

1) Singer J, Nicolson GL: *Science*, **175** 720-731 (1972)

2) Sandermann H Jr: *Biochim. Biophys. Acta*, **515** 209-237 (1978)
3) 大木和夫, 野澤義則: 油化学, **30**, 636-642 (1981)
4) 実験医学増刊14 (1996)「脂質研究の新展開」竹縄忠臣編
5) Hanski E, Rimón G, Levitzki, A: *Biochemistry*, **18** 847-853 (1979)
6) Jost PC, Griffith OH: *Annal. New York Acad. Sci.*, **348** 391-407 (1980)
7) O.G. Mouritsen OG, Bloom M: *Biophys. J.*, **46** 141-153 (1984)
8) Ohki K: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164** 850-856 (1989)
9) 大木和夫: 日本物理学会誌, **49** 369-373 (1994)
10) Caffrey M, Feigenson GW: *Biochemistry*, **20** 1949-1961 (1981)
11) Cornell B: *Biochemistry*, **30** 5881-5888 (1991)
12) In't Veld G, Driessen AJM., Op den Kamp JAF: *Biochim. Biophys. Acta*, **1065** 203 (1991)
13) Ohki K, Tamura K, Hatta I: *Biochim. Biophys. Acta*, **1028** 215-222 (1990)
14) Adachi T, Takahashi H, Ohki K, Hatta I: *Biophys. J.*, **68** 1850-1855 (1995)
15) De Kruijff B: *Nature*, **386** 129-130 (1997)
16) Van der Does C, Swaving J, Van Klompenberg W, Driessen AJ: *J. Biol. Chem.*, **275** 2472-2478 (2000)
17) Garab G, Lohner K, Laggner, Farkas T: *Trends in plant science*, **5** 489-494 (2000)
18) Israelachvili JN, Mitchell DJ, Ninham W: *Biochim. Biophys. Acta*, **470** 185-201 (1977)
19) Ohki K, Sekiya T, Yamauchi T, Nozawa Y: *Biochim. Biophys. Acta*, **693** 341-350 (1982)
20) Zha X, Pierini LM, Leopold PL, Skiba PJ, Tabas I, Maxfield FR: *J. Cell Biol.*, **140** 39-47 (1998)
21) Devaux PF: *Biochemistry*, **30** 1163-1173 (1991)
22) Endo T, Kobayashi T, Ohki K: *Exp. Cell Res.*, **228** 341-346 (1996)
23) 遠藤高帆, 大木和夫: 膜, **21** 334-340 (1996)
24) Sakai N, Sasaki K, Ikegaki N, Shirai Y, Ono Y, Saito N: *J. Cell Biol.*, **139** 1465-1476 (1997)
25) Kishimoto A, Takai Y, Mori T, Kikkawa U, Nishizuka Y: *J. Biol. Chem.*, **255** 2273-2276 (1980)
26) Yang L, Glaser M: *Biochem.*, **34** 1500-1506 (1995)
27) Parasassi T, De Stasio G, d'Ubaldo A, Gratton E: *Biophys. J.*, **57** 1179-1186 (1990)
28) Ohba T, Kiuchi T, Kamakura Y, Goto A, Kumeta T, Ohki K: *J. Biosciences*, **24** (S1) 117 (1999)
29) 田中 拓, 木内 泰, 大場哲彦, 大木和夫: 脂質生化学研究, **44** 259-262 (2002)

(受付 2002年5月7日 掲載決定 6月1日)