

(様式第 5 号)

広角 X 線散乱を用いた脂質分子の微小な構造の差異が膜の格子欠陥形成に及ぼす影響
Wide angle x-ray diffraction reveals influence of lipid structures on the membrane defects.

著者・共著者 氏名

木下 祥尚・千歳 傑・田中 かおる

Masanao Kinoshita, Takeshi Chitose, Kaoru Tanaka

著者・共著者 所属

九州大学理学研究院 化学部門

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyusyu-University

- ※ 1 先端創生利用（長期タイプ）課題は、実施課題名の末尾に期を表す（Ⅰ）、（Ⅱ）、（Ⅲ）を追記してください。
- ※ 2 利用情報の公開が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後 2 年以内に研究成果公開（論文（査読付）の発表又は研究センターの研究成果公報で公表）が必要です（トライアル利用を除く）。
- ※ 3 実験に参加された機関を全てご記載ください。
- ※ 4 共著者には実験参加者をご記載ください（各実験参加機関より 1 人以上）。

1. 概要（注：結論を含めて下さい）

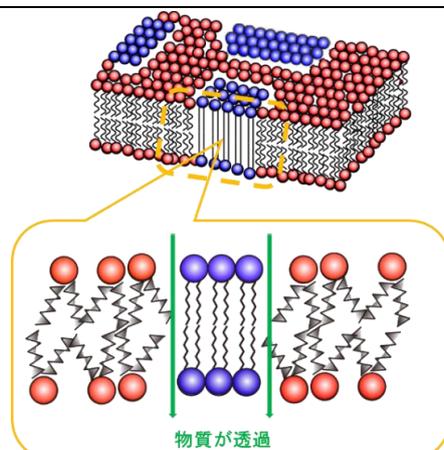
本研究では、生体内に存在するわずかに化学構造の異なる脂質分子、ceramide (Cer) とそのジヒドロ体 dihydroceramide (DHCer) が、脂質膜の格子欠陥形成に及ぼす影響について、広角 X 線散乱を用いて調べた。その結果、Cer に比べ、炭素鎖に二重結合のない DHCer を混合することで、結晶性が高く格子欠陥の少ない脂質膜が形成することを示唆する結果を得た。

(English)

We investigated the influence of structural difference on the formation of the membrane defects using ceramide (Cer) and dihydro-ceramide (DHCer). Our wide angle x-ray diffraction (WAXD) measurements revealed that incorporation of DHCer into sphingomyelin (SM) membranes forms less membrane defects than Cer mixtures. This results indicate that the formation of membrane defects depends on the small structural difference of lipid molecules.

2. 背景と目的

主としてリン脂質とタンパク質で形成される細胞膜の最も重要な役割は、細胞内部と外界との間での物質の交換であり、これは生命を維持するために不可欠である。この交換には、イオンチャンネルなどの他に、細胞膜に存在する格子欠陥の関与が示唆されている(図 1)。そのため、格子欠陥形成の機序は、細胞膜の機能やそれにかかわる病理を議論するための重要な情報である[1]。しかし、これはあくまで推測であり、脂質の分子構造と格子欠陥の相関について、直接的な知見は得られていない。



3. 実験内容（試料、実験方法、解析方法の説明）

本研究では、わずかに化学構造の異なる脂質、ceramide とそのジヒドロ体(DHCer)が、脂質膜の格子欠陥形成に及ぼす影響について、広角X線散乱を用いて調べた(図2)。波長は1Åに設定し、カメラ長(Lc=257 mm)はシリコンを用いてキャリブレーションした(図3)。試料はガラスキャピラリーに封入し、温度

図 1. 脂質膜中に形成される格子欠陥の描像。構造の異なる脂質が近接すると、その部位で充填構造に不整合が生じるので、膜に亀裂(格子欠陥)が生じやすくなる。

制御は窒素ガスを用いた。また散乱の検出は冷却CCDカメラを用いて行った(図3)。得られたデバイ・シェラーリングはFit 2Dを用いて、一次元化した。

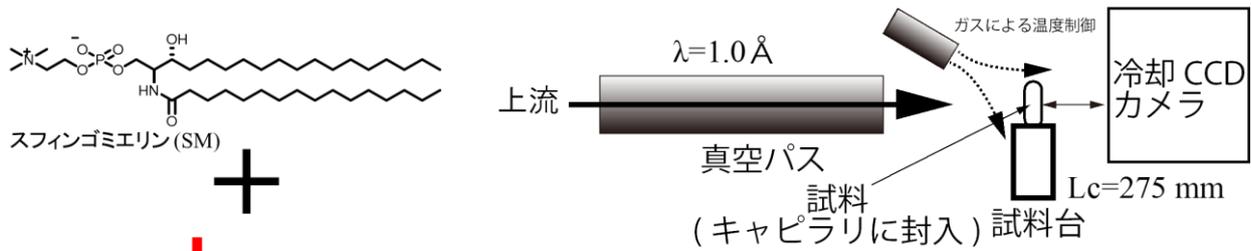


図3.ビームラインの設定と各種パラメータ。

図2. 本研究で用いた試料。赤矢印はセラミドとそのジドロ体の構造の差異を示している。

4. 実験結果と考察

図4に示したのは、sphingomyelin (SM)に対し ceramide (Cer)、および、わずかに構造の異なる dihydro-ceramide (DHCer)を加えた混合脂質膜の昇温過程熱測定(DSC)サーモグラムである。それぞれ、 67.0°C ($\Delta H=35\text{ kJ/mol}$)と 70.0°C ($\Delta H=34\text{ kJ/mol}$)付近に、脂質炭化水素鎖の融解に起因する、単一の転移ピークが生じている。SMに少量のCerを加えると、膜内でCer-poorとCer-rich領域の相分離が生じることが知られている。一方、図4の組成では、いずれの混合膜でも、ほぼ単一の転移ピークが表れていることから、すべての膜領域がCer-rich相に転移していることがわかる。図5に示したのは、SM/CerおよびSM/DHCer混合膜の 25°C における広角X線散乱プロファイルである。それぞれ、 2.41 nm^{-1} と 2.38 nm^{-1} に、脂質炭化水素鎖の充填構造に対応する散乱ピークが生じており、このことは前者の方が、脂質が密に充填していることを示している。次に、散乱ピークの半値幅をもとに、それぞれの脂質膜に生じる格子欠陥の量を比較した。その結果、前者の半値幅は 0.06 nm^{-1} であるのに対し、後者の半値幅は 0.04 nm^{-1} となった。この結果は、SM/Cer混合膜に比べ、SM/DHCerの方が、より結晶性が高く、格子欠陥の少ない膜を形成していることを示唆している。このように、今回の実験では、わずかな分子構造の差異(二重結合の有無)により、膜に生じる格子欠陥の量が制御されることを示唆する結果を得た。

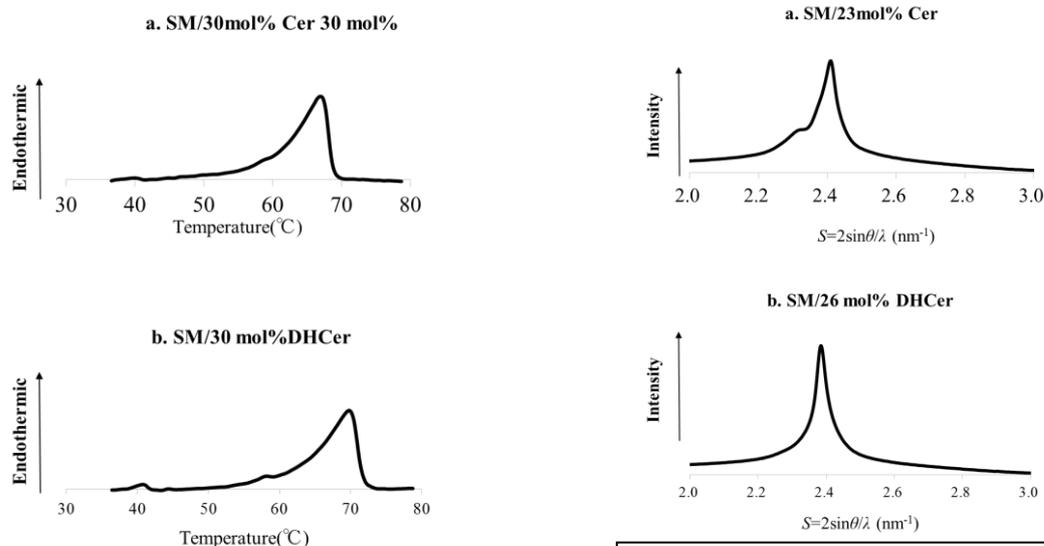


図4. (a) SM/Cer混合膜と(b)SM/DHCer混合膜の昇温過程熱測定サーモグラム

図5. (a) SM/Cer混合膜と(b)SM/DHCer混合膜の 25°C における1次元化した広角X線散乱プロファイル。

5. 今後の課題

本課題はトリアル利用のため、とりわけ二重結合の有無が脂質膜の格子欠陥形成に及ぼす影響に注目した。今後は、二重結合の存在部位と格子欠陥の相関など、より広範囲な情報を取得することで、構造-物性相関の機序を明らかにする。

6. 参考文献

[1] Nitsch *et al.*, Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain.1992. Proc. Natl. Acad USA. 1992. 89, 1671-1675.

7. 論文発表・特許 (注：本課題に関連するこれまでの代表的な成果)

[1]Masanao Kinoshita *et al.*, Kinetics for the subgel phase formation in DPPC/DOPC mixed bilayers. Chem. Phys. Lipids 2010. 163, 712-719.

[2]Masanao Kinoshita *et al.*, Characterization of the ordered phase formed by sphingomyelin analogues and cholesterol binary mixtures. 2013. Biophysics 9, 37-49.

[3]Masanao Kinoshita *et al.*, Raft-based sphingomyelin interactions revealed by new fluorescent sphingomyelin analogs. J. Cell Biol. 2017,

[4]Jun Ando and Masanao Kinoshita *et al.*, Sphingomyelin distribution in lipid rafts of artificial monolayer membranes visualized by Raman microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. 112, 2558-4563.

[5]Masanao Kinoshita and Satoru Kato. Intermolecular interaction of phosphatidylinositol with raft molecules sphingomyelin and cholesterol. *Biophysics* 2008. 4, 1-9.

[6]Masanao Kinoshita *et al.*, Kinetics for the subgel phase formation in DPPC/DOPC mixed bilayers. Chem. Phys. Lipids 2010. 163, 712-719.

[7]Masanao Kinoshita *et al.*, NaCl-dependent formation of the highly crystalline phase in sufficiently hydrated dimyristoylphosphatidylglycerol bilayers. Chem. Phys. Lipids 2009. 161, 1-10.

[8]Masanao Kinoshita *et al.*, Effect of bilayer morphology on the subgel phase formation. Chem. Phys. Lipids 2007. 151, 30-40.

[9]Masanao Kinoshita and Satoru Kato. Time-course of the ordered phase formation in lipid bilayers caused by sphingomyelin hydrolysis. Photon Factory Activity Reports 2012, #29 Part B, p343.

[10]Masanao Kinoshita and Satoru Kato. Cyclodextrin-induced modulation of phase behavior of the dipalmitoylphosphatidylcholin/cholesterol mixed liposome. Photon Factory Activity Reports 2012, #27 Part B, p230.

8. キーワード (注：試料及び実験方法を特定する用語を2～3)

脂質膜、格子欠陥、広角 X 線散乱

9. 研究成果公開について (注：※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消してください。また、論文(査読付)発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入してください(2017年度実施課題は2019年度末が期限となります)。

長期タイプ課題は、ご利用の最終期の利用報告書にご記入ください。