

完全混合する脂質二重膜中でコレステロールが誘起する

マイクロドメイン形成

Cholesterol-induced Microdomain Formation in Bilayer Membranes Consisting of Completely Miscible Lipids

豊橋技科大¹, 東北大², 東北福祉大³○(M2)メルヴィン ゴー ウェイ シェン¹, 平野 愛弓², 庭野 道夫³, 手老 龍吾¹Toyohashi Univ. Tech.¹, Tohoku Univ.², Tohoku Fukushi Univ.³○Melvin Wei Shern Goh¹, Ayumi Hirano-Iwata², Michio Niwano³, Ryugo Tero¹

E-mail: m153444@edu.tut.ac.jp, tero@tut.jp

【序】膜タンパク質は主要な創薬ターゲットであることから、その研究の重要性は今後ますます高まっていくと考えられる。膜タンパク質の機能を *in vitro* 評価するためには、人工的な脂質膜環境を提供したうえで膜タンパク質を再構成する必要がある。しかし、一般的にプロテオリポソームと人工脂質二重膜の融合率は低く、人工脂質二重膜系における膜タンパク質研究のボトルネックとなっている。

我々は最近、黒膜系でイオンチャネル計測に用いられている phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), コレステロール(Chol)と同組成の支持脂質二重膜(supported lipid bilayer: SLB)に微小ドメインが存在し、プロテオリポソームの融合サイトとして働くことを報告した¹。このSLBの作製に用いた鶏卵由来のPCとPEは、いずれも室温で液晶相にあり完全混合する。部分混合する脂質同士で形成される脂質二重膜ではゲル-液晶(固-液)相分離が起きるが、この系ではコレステロールを添加することで液体秩序-液体非秩序相間の液-液相分離が起きることはよく知られている。完全混合する2種類の脂質にCholを添加することで起きるドメイン形成は、特異的な現象である。膜融合サイトとして働くこの微小ドメインの組成や形成機構を知ること、人工脂質膜へのプロテオリポソーム融合効率の向上に繋がる。本研究では、不飽和度の異なるPEを用いてPC+PE+Chol-SLBを作製し、膜内微小ドメインの脂質組成およびその形成機構を明らかにすることを目的とした。

【実験】SLBはマイカ基板上へベシクル融合法を用いて作製した。ガラスバイアル中にPCとPE、CholをPC:PE:Chol = 67- C_{PE} : C_{PE} :33 (mol%) (PE濃度 C_{PE} = 0-11 mol%)の組成でPE/PC濃度比を変えて混合した。PCは鶏卵由来の物を用い、PEは鶏卵由来のPE (eggPE), di-docosa-hexaenoyl PE (22:6-P

E), または 1-palmitoyl-2-oleoyl-PE (POPE)を用いた。蛍光標識脂質として、親水頭部に蛍光標識した Rb-DPPE, および疎水尾部に蛍光標識した BODIPY-FL-HPC, Bis-BODIPY-FL-HPC を 0.26 mol%相当添加した。作製したSLBは緩衝液中で原子間力顕微鏡 (AFM)および蛍光顕微鏡により観察した。

【結果と考察】ベシクル融合法によるPC+PE+Chol-SLB形成ではいずれのPEの場合でも $C_{PE} \leq 4$ mol%では主に吸着ベシクルが開裂せずに基板表面上に存在したが、 $C_{PE} > 6$ mol%では平面膜化が進み、基板表面のほぼ全体で均一かつ連続的なSLBが形成された。EggPEを用いた $C_{PE} = 11$ mol%のSLBではRb-DPPEの観察で大きさが数 μm 程度の暗領域が存在したのに対し、同じ領域がBODIPY-FL-HPCおよびBis-BODIPY-FL-HPCの観察ではそれぞれ周囲のSLBと同程度がより強い蛍光強度で観察された。脂質膜内にドメインが形成され、光学顕微鏡で観察可能な大きさまで成長したと考えられる。AFM観察では蛍光像における暗領域の大きさに近い凹んだ(depression)領域が観察されたことから、この領域を蛍光像で観察された脂質ドメインと帰属した。EggPE, 22:6-PE, POPEのいずれにおいても、PC+PE+Chol-SLB内のdepressionドメインの面積率(θ_d)は C_{PE} とともに上昇した。EggPEとPOPEでは θ_d は同程度であったのに対し、22:6-PEを用いた場合は θ_d が著しく高かった。PEはPCよりも、また不飽和アシル鎖は飽和アシル鎖よりも、Cholとの混和性が低いため、PCとCholを主成分とするSLB内で多価不飽和PEが凝集してドメインを形成したと考えた。また、22:6-PEを用いてPC+PE+Chol-SLBを作製することでプロテオリポソームの融合効率は著しく向上することを示した。

[1]R. Tero, K. Fukumoto, T. Motegi, et al. *Sci. Reports* **2017**, 7, 17905.