

表裏の脂質構成が異なる脂質二重層におけるコリン脂質の内外葉比の定量的評価

(阪大院理¹) ○渡辺宏史¹・花島慎弥¹・安田智一¹・村田道雄¹

Leaflet-specific quantification of choline lipids in the two layers of asymmetric vesicles

(¹ Graduate School of Science, Osaka University) Hirofumi Watanabe¹, Shinya Hanashima¹, Tomokazu Yasuda¹, Michio Murata¹

A common feature of eukaryotic cell membranes is that the lipid composition of the outer leaflet is different from that of the inner leaflet of the lipid bilayer. This lipid asymmetry is constantly maintained by the flipping/flopping valance, resulting in specific membrane properties. However, it is not easy to precisely quantify the asymmetric distribution of phospholipids in lipid bilayers. We established a new solid-state ¹H NMR method to determine the composition of choline-lipid in each leaflet. The asymmetric liposomes consisting of sphingomyelin with perdeuterated trimethylammonium headgroup in the outer leaflet and unsaturated phosphatidylcholine in the inner leaflets were prepared. The non-deuterated phospholipid signal from the outer leaflet was distinguished from that from the inner leaflet by adding Pr³⁺ as a shift reagent. The peak area of the ¹H-NMR directly revealed the asymmetry of the choline-lipid in the liposomes. Furthermore, the time course of the inner/outer ratio of the Me₃N signal allowed us to estimate the flip-flop rate.

Keywords : asymmetric large unilamellar vesicle, sphingomyeline, solid state NMR, paramagnetic relaxation reagent

真核細胞膜において内葉・外葉を構成するリン脂質の組成は顕著に異なっており、非対称性を有している。このリン脂質の非対称性は酵素や生合成等によって恒常的に維持され、特有の膜物性を供する。一方で、脂質二重層の内外葉を構成するそれぞれの脂質の定量法は限られており、信頼性の点でも課題が残る。そこで我々は、¹H 固体 NMR を用いて脂質二重層の表裏脂質組成比を直接かつ定量的に評価する方法を開発した。具体的には、トリメチルアンモニウム基を全重水素標識したスフィンゴミエリン (SM) を不飽和 PC で構成されたベシクルの外葉に導入することで非対称モデル膜 (図 1) を調製し、Pr³⁺存在下で ¹H 固体 NMR を測定することで、内葉の不飽和 PC に由来する信号と外葉の不飽和 PC に由来する信号を分離し、非対称性を定量的に評価した。その結果、ベシクル調製直後における内葉への DOPC の分配率を定量することができた。さらに内外葉それぞれを構成する脂質組成の時間変化を追跡することでフリップフロップの速度を評価することに成功したので報告する。

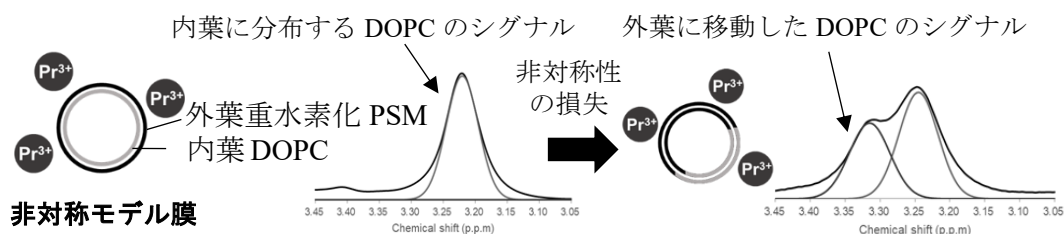


図 1. 非対称モデル膜と非対称性の違いによる ¹H 固体 NMR スペクトル変化の様式図