

結核菌の宿主細胞内サバイバル機構における 脂質膜構造変化の解析

機能性分子素子の構築を目指した脂質膜の物性に関する基礎的研究

早川 枝李

慶應義塾大学医学部 さきがけ研究者

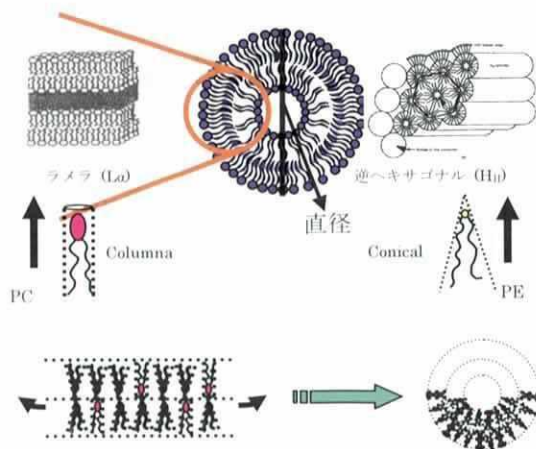
概要

近年、脂質膜の物理化学的性質が膜タンパク質の活性を調節していることがわかってきた。本研究では脂質分子固有の構造の違いに着目し、以下の二つの研究を行った。第一に、脂質分子の異なる形状の組み合わせにより誘導される脂質膜 *curvature stress* が、脂質膜の物性と膜タンパク質の活性にどのような影響を与えるかについて、人工脂質二重層膜と G-プロテイン結合型膜タンパク質であるウシロドプシンを用いて検討した。この結果、脂質膜 *curvature stress* の増大が、ロドプシンの活性を増加させ、脂質分子間のパッキング状態を、より密にしていることがわかった。第二に、細胞における現象モデルとして、ファゴソーム-リソソーム膜融合阻害を伴う結核菌の宿主細胞内でのサバイバル機構を検討するため、ファゴソーム膜類似人工脂質膜の膜構造ドメイン変化について、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy, AFM) と FRET を用いて解析した。この結果、結核菌から産生される *lipoarabinomannan* (LAM) が人工脂質膜の膜構造ドメインを変化させ、また人工脂質二重層膜を用いた系で膜融合を阻害する可能性が *in vitro* 実験により初めて示された。

1. 脂質の分子構造と組成の違いに誘導される脂質膜 *Curvature stress* の膜タンパク質の構造変化に対する影響

(1) はじめに

生体膜の主要脂質成分であるリン脂質は、極性頭部、グリセロール骨格部、アシル鎖の3領域から構成され、特にアシル鎖の長さ、2重結合の位置及びその数は、膜構造を決定する重要な因子となる。それぞれの脂質分子は、極性頭部とアシル鎖領域の分子容の比から、ホスファチジルエタノールアミン (PE) に代表されるコーン型、ホスファチジルコリン (PC) に代表されるカラム型、リゾリン酸に代表される逆コーン型などに分類される。これらの脂質の分子構造の違いは、脂質二重層、逆ヘキサゴナル相など、単一脂質による自己組織化構造を決定する重要な因子であり、さらに脂質分子間のパッキング状態の決定に大きく関与している。PC は大きな極性頭部を持ち、単独では水中で脂質二重層を形成する。また、PE は小さな極性頭部を持ち単独では水中で逆ヘキサゴナル相を形成する。これらを様々な比率で混合し作成した人工脂質二重層膜 (リポソーム) は、一定の直径を与えると、様々な脂質膜 *curvature stress* を示す。このように脂質分子固有の分子構造の違いは、それらの組み合わせにより種々の膜 *curvature stress* と脂質分子間の異なるパッキングコンディションを生む (図1)。この脂質



両者を様々な割合で混ぜると
異なる curvature stress が生まれる

図1. 異なった脂質分子の構造は、それぞれの自己組織化構造を形成するとともに、異なった脂質のパッキング状態を誘導する。例えばPCとPEを様々な比率でミックスすると、様々な膜表面密度を持った脂質膜を作成することができる。このとき脂質膜を一定の大きさにセットすると、構成脂質分子の形状の違いから、異なった Curvature stress や Bending Stiffness が生じる。

ロドプシンの活性に対する脂質組成の影響を検討した。DOPCとDOPEの混在比率はそれぞれ100:0、70:30、50:50とし、全脂質とロドプシンの混在比率は85:1とした。全ての測定はK2 multifrequency crosscorrelation phase fluorometer (ISS)で行った。アシル鎖領域の packing free volume (fv) は1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)の蛍光異方性(Anisotropy)の値と The Brownian rotational diffusion (BRD) modelの組み合わせにより求めた。ロドプシンのMI-MII構造変化は吸光光度計により検出、そこから平衡定数： $K_{eq} = [MII]/[MI]$ を求めた。

(3) 結果

ウシロドプシンは光刺激により活性化され、MI→MIIへと構造が変化する。MI、MII型はそれぞれ480nm、380nmに固有の吸収波長を持つため、吸光光度計を用いて各波長における吸光度を測定する事で、どれだけの割合が活性化されたかを検出する事ができる。PCとPEの混在系において、PEの割合が増加するほど膜 curvature stress が増大することがわかっている。DOPEを0、30、50%と段階的に増加させたときの K_{eq} の値を比較すると、DOPE存在下ではDOPCのみの膜にロドプシンを再構築させた時よりも、MII形成の割合がおよそ70%増大していた。次に脂質膜のアシル鎖領域のパッキング状態に対する膜 curvature stressの影響を調べた結果を図2に示す。極性頭部の分子容の小さいDOPEの増加が脂質膜表面の空間密

膜 curvature stress は膜タンパク質の活性においても重要な役割をもつとされているが、膜 curvature stress が膜の物理的性質や膜タンパク質の活性に対しどのような影響を与えるか、実験結果から直接示した報告はこれまで皆無であった。

そこで本研究では、異なる分子容を持つ2種類のリン脂質により誘導された膜 curvature stress が、脂質分子のアシル鎖領域でのパッキング状態と、G-Protein 結合型膜タンパク質であるウシロドプシンの構造変化について、どのような影響を示すか検討した。

(2) 試料作成&実験方法

ロドプシンはウシ網膜の Rod Outer Segment から単離・精製し、あらかじめ組成を決めたリン脂質ベシクル (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)、1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine (DOPE)) 中に再構築させ、ロ

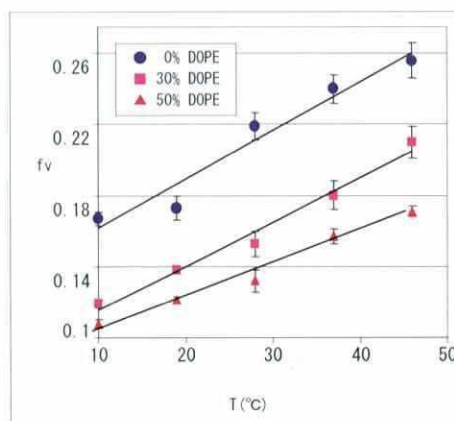


図2 温度変化時の各脂質組成におけるfvの変化。DOPE濃度の増加に伴い、膜 curvature stressが増大し、そのことがアシル鎖領域の free volumeを増大させている。

度を変化させることで、膜 curvature stress が変わり、この結果、アシル鎖領域の free volume の変化を誘導させたことがわかった。これらの結果は、膜 curvature stress の変化が異なる脂質分子間のパッキング状態を生み出し、また、ロドプシンが光刺激を受けた時、膜 curvature stress が大きいほど光子による活性化効率が高くなることを意味し、結果としてロドプシンの光反応能力が促進されることを示唆している。上記の結果はロドプシンのみならず他の膜タンパク質に対する脂質分子の影響を検討する上でも、また、脂質-タンパク質相互作用の一端を解明する上でも重要であると考えている。

2. 結核菌の宿主細胞内におけるサバイバルスキル

(1) はじめに

結核は世界三大感染症の一つであり、結核菌単独で感染可能である。一部休眠状態で人類の 1/3 に既感染しており、感染者数は世界中で 800 万人（日本では 3 万 5 千人）、毎年の死者数は世界では 200 万人、日本でも 2500 人との報告がある。結核菌はマクロファージに感染する。生きた結核菌を取り込んだファゴソームは、リソソームとの膜融合が阻害される。この結果、マクロファージの防御機構が壊され、結核菌はマクロファージの中で生存・増殖が可能となる。このファゴソーム-リソソーム膜融合 (P-L fusion) 阻害は、結核菌由来の脂質である lipoarabinomannan (LAM) と sulfolipid (SL) によってそれぞれ引き起こされることが *in vivo* の実験で報告されているが、どのようなメカニズムによって P-L fusion 阻害が誘導されるのか、決定的なメカニズムはまだ解明されていない。

そこで本研究では、前述の研究で証明された脂質分子のパッキング状態の違いが、細胞内でどのように利用されているかについて、結核菌の宿主細胞内でのサバイバル機構の一つである P-L fusion 阻害をモデルとし、ファゴソーム膜の物性変化について検討を行った。

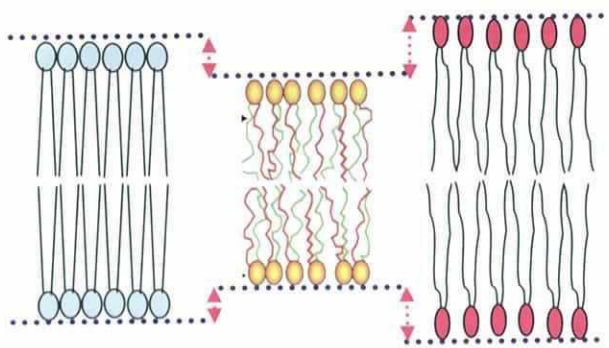
(2) 試料作成&実験方法

脂質は DOPC、 sphingomyelin (SM)、 cholesterol (chol)、 LAM、 蛍光プローブとして phosphatidylethanolamine-lissamine rhodamine B (Rho-PE)、 N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphor-ethanolamine, triethylammonium salt (NBD-PE)、融合促進剤として Polyethylene glycol 8000 (PEG 8000) を用いた。脂質膜内のドメイン構造の検出は液中タッピングモードを用いた AFM により、人工脂質二重層膜を用いた融合測定は Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) によって行った。

(3) 結果

異なる相転移温度を持った脂質を混合させると、脂質ドメインが形成される (図 3)。AFM はナノスケールで試料表面の高さの違いを検出できるため、脂質膜表面を AFM の探針 (プローブ) で走査することにより、脂質膜の表面構造の検出が可能となる。ファゴソーム膜類似組成である DOPC+SM+Chol の系に対し、LAM の有無による膜ドメインの構造変化を室温にて検討した結果、LAM が混在すると、個々の SM+Chol ドメインが細分化し、ドメインサイズが小さくなっていることが認められた。さらに、全体の膜エリアにおけるドメイン密度も高くなっていた (図 4)。

次に、同上の脂質組成により構成された large unilamellar vesicles (LUVs、直径約 100nm) に PEG を加え、その後の融合過程について FRET を用いて観察した。これは、一方のリポソーム膜に 2 種類の蛍



Lipid A: gel phase Lipid B: liquid-disorder Lipid C: liquid-order

図3. 脂質のドメイン構造は、それぞれの脂質が持つ固有の相転移温度の違いの組み合わせの結果、形成される。

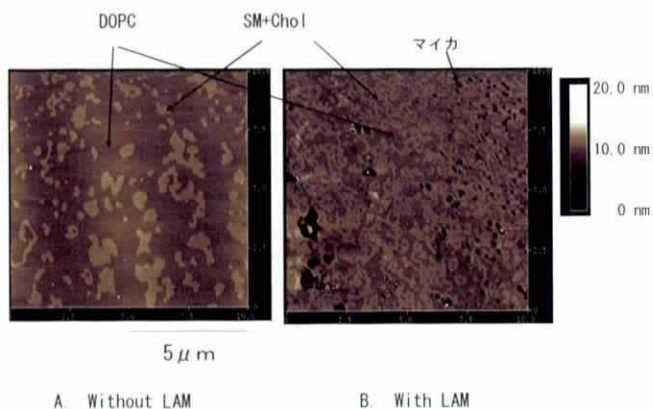


図4. LAM の混在により、膜ドメイン構造が細分化していることがわかる

する必要がある。以上、本研究の結果は、今後新たな側面から薬の開発や治療法などを検討する上で、まったく新しい可能性を示すものといえる。

光プローブ (Rho-PE と NBD-PE) を加え、もう一方のリポソームに何も加えず両者を混在させ、PEG により融合が進むと、リポソームの体積の増加から蛍光分子間の距離が大きくなり、結果として自己消光(Quenching)が解消され、エネルギー移動により Rho-PE の蛍光が検出できるようになる、という原理に基づく。この実験の結果、LAM の存在下では LAM が不在の系と比べて、PEG が共存するにもかかわらず膜融合が阻害されていることが、*in vitro* において初めて証明された。このように、LAM が SM-Chol ドメインのサイズと DOPC ドメインに対する密度を大きく変化させ、また PEG の存在下において脂質膜融合を阻害していたことは、結核菌の P-L fusion 阻害を伴った宿主細胞内サバイバル機構において、脂質分子のパッキング状態の違いが生み出した脂質膜内構造ドメインの変化と膜融合阻害という現象が関連している可能性を、初めて物理化学的側面から検討した結果である。膜融合には SNAP や syntaxin などの SNARE タンパク質が深く関わっていることが知られており、今後はこれらのタンパク質に対する脂質膜構造ドメインの影響も検討