

## 脂質膜の構造とアポリポタンパク質 A-I との相互作用

田中将史

## Effects of Membrane Structure on Apolipoprotein A-I Binding to Lipid

Masafumi TANAKA

*Department of Biophysical Chemistry, Kobe Pharmaceutical University,  
4-19-1 Motoyama-kitamachi, Higashinada-ku, Kobe 658-8558, Japan*

(Received June 25, 2007)

Interaction of apolipoproteins with lipid surfaces plays crucial roles in lipoprotein metabolism and cholesterol homeostasis. In this study, to understand the detailed mechanism by which apolipoprotein (apo) A-I associates with plasma membrane and lipoprotein particles, we investigated the effects of lipid composition and surface curvature on the lipid-apoA-I interactions. ApoA-I binding to lipid particles depends on membrane structure. Fluorescence and  $^{13}\text{C}$ -NMR measurements revealed that apoA-I recognizes headgroup separation (hydrated space) between phospholipid molecules and displaces water molecules from the surface when it binds. At the surface monolayers of lipoprotein particles, interpenetration of core triglyceride molecules with phospholipid molecules appears to occur to alter the surface structure. ApoA-I binding to lipid membrane induces an increase in  $\alpha$ -helical structure. This  $\alpha$ -helix formation generates exothermic heat and promotes apoA-I binding to lipid. However, binding of apoA-I to small emulsions exhibited endothermic heat although apoA-I increases  $\alpha$ -helical content. Taken together, these observations suggest that the presence of core triglyceride modifies the highly curved emulsion surface and thereby the thermodynamics of apoA-I binding in a manner that compensates for the exothermic heat generated by  $\alpha$ -helix formation.

**Key words**—apolipoprotein; lipid emulsion; amphipathic  $\alpha$ -helix

## 1. はじめに

生体内で脂質輸送を担う血漿リポタンパク質は、非極性なトリグリセライドとコレステリルエステルのコアをリン脂質やコレステロールなどの表面混合単分子膜が覆ったナノオーダーサイズのエマルジョン粒子構造を持つ。血漿リポタンパク質は、その代謝過程において、構成脂質組成や粒子サイズといった粒子表面構造の物理化学的变化を受け、これに伴いアポリポタンパク質や酵素などの結合選択性や活性が調節され、代謝の方向付けがなされる。<sup>1)</sup> 例えば、カイロミクロンがアポリポタンパク質 (アポ) C-II を活性化因子とするリポタンパク質リパーゼの作用を受け、トリグリセライドが加水分解されると、粒子サイズの減少と表面コレステロール濃度の

上昇が観察されるが、これに伴いアポ A-I や C 群がリポタンパク質粒子上から解離し、アポ E を介した肝臓への取り込みに有利に働くことが知られている。また、脂肪乳剤等として臨床で用いられるリピッドエマルジョンも、血中に投与されると、リポタンパク質代謝系により体内異化を受けることが知られている。<sup>2)</sup> したがって、脂質粒子とアポリポタンパク質との相互作用に関する知見は、リポタンパク質代謝メカニズムの解明に限らず、DDS など薬学的応用の観点からも重要であるといえる。

高密度リポタンパク質 (HDL) の主要構成タンパク質であるアポ A-I は、末梢細胞からコレステロールを引き抜き、肝臓へと運搬することによって抗動脈硬化作用を示すことが知られている。アポ A-I は、細胞膜やリポタンパク質の表面脂質膜と相互作用し、HDL の新生や代謝を制御することで、コレステロール代謝恒常性の維持に重要な役割を果たしている。<sup>3)</sup> 筆者らは、このアポ A-I—脂質膜相互作用の物理化学的機序解明を目的として、組

神戸薬科大学薬品物理化学研究室 (〒658-8558 神戸市東灘区本山北町 4-19-1)

e-mail: masatnk@kobepharm-u.ac.jp

本総説は、平成 18 年度日本薬学会近畿支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

成や粒子サイズを制御した脂質粒子を人工的に作製し、アポ A-I の結合性を評価してきた。本稿では、結合を制御する脂質粒子の膜構造要因についての界面化学的解明と結合過程における熱力学的評価について述べる。

## 2. アポ A-I の脂質粒子に対する結合性評価

アポ A-I の脂質粒子に対する結合は、粒子サイズや脂質組成に依存することが知られている。そこで筆者らは、細胞膜モデルとしての脂質二分子膜ベシクル、及びリポタンパク質モデルとしての脂質エマルジョンに対するアポ A-I の結合性を評価した。まず、ともに粒子サイズが 100–120 nm 程度である、大きい一枚膜ベシクル (LUV) とトリオレイン (TO: 脂肪酸炭素数 18) をコアを持つエマルジョン (LEM) を調製した (Fig. 1)。本稿では、特に断らない限り、表面脂質として卵黄由来のレシチン (eggPC) を用いている。

アポ A-I は LEM に対して、LUV の約 10 倍の高い最大結合量 ( $B_{\max}$ ) を示した (Fig. 2(A))。また、 $B_{\max}$  はコア脂質の種類に依存し、中鎖トリグ

リセライド (C8: 脂肪酸炭素数 8) やコレステリルエステル (CE) をコアを持つエマルジョンでは、TO をコアを持つ LEM に比べ、 $B_{\max}$  が減少した (Fig. 2(B))。これらの結果は、アポ A-I と脂質粒子との相互作用が粒子表面のリン脂質膜上で起こるにも係わらず、エマルジョンに対するアポ A-I の結合にコア脂質が重要な役割を担うことを示している。

一方、コア脂質を持たない二分子膜ベシクルであっても、曲率の高い粒子サイズ 25–30 nm 程度の小さい一枚膜ベシクル (SUV) や、表面にコレステロール (Chol) を添加した LUV では、LEM と同程度の高い  $B_{\max}$  を示した (Fig. 2(C))。

## 3. アポ A-I の結合性を決定する脂質粒子の膜構造要因

アポ A-I の結合を制御する脂質粒子の膜構造要因について、蛍光測定や  $^{13}\text{C}$ -NMR 測定により評価した。まず、表面膜の水和状態をリン脂質極性基に蛍光プローブを持つリン脂質誘導体 (dansyl-PE) を用いて評価した。励起された dansyl 基は溶媒中

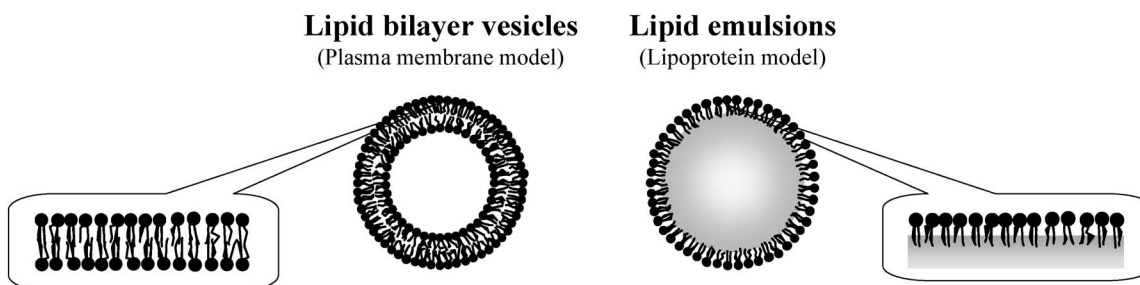


Fig. 1. Schematic View of Lipid Particles Used in the Present Study

Lipid bilayer vesicles are spherical particles composed of phosphatidylcholine (PC) bilayer, and lipid emulsions are triglyceride droplets stabilized by surface PC monolayer.

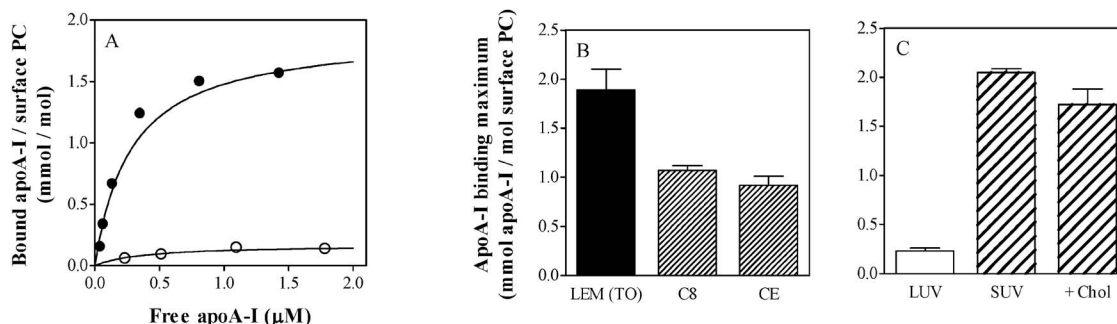


Fig. 2. (A) Binding Isotherms of apoA-I to LEM (Closed Circle) and LUV (Open Circle), (B) and (C) Comparison in apoA-I Binding Maximum ( $B_{\max}$ ) to Lipid Emulsions and Vesicles

The binding curves were obtained by nonlinear regression fitting to a one-binding site model. TO: triolein, C8: medium chain triglyceride, CE: cholesteryl ester, Chol: cholesterol.

の水分子とのプロトントランスファーにより消光されるが、重水中ではその速度が遅く、量子収率の増加が観察される。すなわち、重水下と軽水下での蛍光強度の比 ( $I_{D_2O}/I_{H_2O}$ ) が大きいほど、dansyl 基の周りに水分子が侵入している、つまり、極性基が水和していると考えられる。<sup>4)</sup> この重水同位体効果を利用し、極性基の水和度を評価したところ、LEM の極性基付近は LUV に比べより水和した状態であることが示唆された。

さらに、原子サイトレベルで表面膜の水和状態を明らかにするために、 $^{13}\text{C}$ -NMR 測定を行った。リン脂質極性頭部のコリンメチルやメチレン炭素といったコリン基に由来するシグナルやカルボニル炭素に由来するシグナルは選択的に識別することができたが、アシル鎖領域に由来するシグナルはオーバーラップし、特にコア脂質を持つエマルジョンにおいては、識別が困難であった。化学シフト値は、原子サイト周囲の化学的環境を鋭敏に反映して変化する。曲率の高い SUV では、二分子膜の内側はリン脂質極性頭部が密に詰まった、一方、外側はより広がった構造をしていると考えられる。SUV の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルでは、カルボニル炭素においてのみ、二分子膜の内側と外側に対応する 2 つのシグナルが分裂して観察された。すなわち、カルボニル炭素がリン脂質分子中で最も周囲の微環境変化に敏感な原子サイトであると考えられる。そこで、カルボニル炭素の化学シフト値を表面膜の水和状態の指標として用いた。その結果、LEM 表面は LUV 表面に比べてより水和した、すなわち、表面リン脂質分子間に水分子の入り込み易い広がった構造をしていることが明らかとなった。この結果は、dansyl-PE を用いた水和度の評価とも一致する。さらに、様々な組成の脂質粒子についても同様の測定を行った結果、脂質粒子表面の水和度（リン脂質分子間の広がり）とアポ A-I の  $B_{\text{max}}$  との間に強い相関が認められ、粒子表面膜に生じたリン脂質分子間のスペースがアポ A-I の結合性を支配する重要な因子であることが示された (Fig. 3)<sup>5)</sup>。

#### 4. アポ A-I の脂質粒子上での結合位置

次に、脂質粒子にアポ A-I を結合させ、 $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルの変化を観察した。<sup>6)</sup> アポ A-I の結合による各原子サイトの化学シフト値の変化を、LUV, SUV, LEM で比較した。アポ A-I がほとんど結合

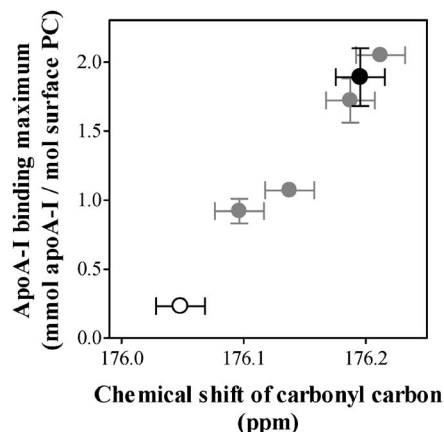


Fig. 3. Correlation between Surface Hydration and apoA-I Binding  
For SUV, the chemical shift of the outer leaflet of bilayers was employed.

しない LUV では、リン脂質分子全体に渡って化学シフト値に大きな変化は観察されなかった。一方、SUV にアポ A-I を結合させると、二分子膜の外側に対応するカルボニル炭素のシグナルが大きく高磁場シフトし、分裂したシグナルが 1 本になった。また、LEM の表面リン脂質カルボニル炭素は LUV に比べより水和した状態にあったが、アポ A-I が結合することにより、LUV と同様の環境になった。これらの結果は、リン脂質界面領域のスペースに存在していた水分子が、アポ A-I の結合によって追い出されたためであると推察された。アポ A-I の脂質結合部位をモデル化したペプチドを用いても、同様の結果が得られた。膜中に深く潜り込むペプチドの場合、化学シフト値の変化はアシル鎖領域でも観察される。これらのことから、アポ A-I は脂質粒子表面膜リン脂質の界面領域に表層的に結合していると考えられた。アポ A-I がリポタンパク質間で結合と解離を繰り返すことを考慮すると、生理的にも妥当な結果であるといえる。

#### 5. 表面膜とコア脂質との相互作用

表面膜の側方拡散をアシル鎖に蛍光プローブを持つリン脂質誘導体 (pyrene-PC) を用いて評価した。<sup>7)</sup> 光を吸収して励起状態となったモノマーの pyrene 基が基底状態の pyrene 基に衝突すると、低エネルギー状態のエキシマーが形成される (Fig. 4 (A)). Pyrene-PC 分子同士の衝突頻度が増加すると、モノマーの蛍光強度は減少し、エキシマーの蛍光強度が増大する。すなわち、エキシマーとモノ

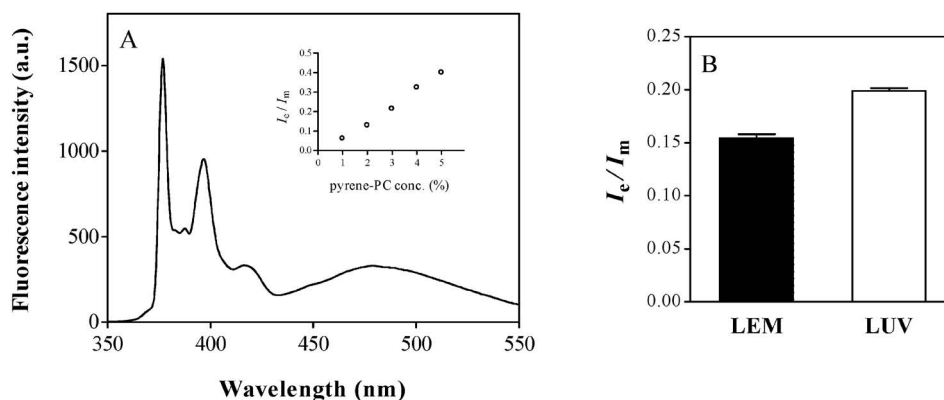


Fig. 4. (A) Fluorescence Spectrum of Pyrene-PC, (Inset) the Concentration Dependence of Excimer to Monomer Fluorescence Intensity Ratio ( $I_e/I_m$ ) in LUV, (B) Ratio of Excimer to Monomer Fluorescence Intensities  
Two peaks, one for monomer ( $I_m$ : intensity at 377 nm) and the other for excimer ( $I_e$ : intensity at 479 nm), were observed.

マーの蛍光強度の比 ( $I_e/I_m$ ) が増大する。Pyrene-PC 分子間の衝突はその局所濃度と拡散速度に依存するため、粒子サイズ一定の LUV 中で pyrene-PC 濃度を増加させると、 $I_e/I_m$  は直線的に増加する (Fig. 4(A) inset)。粒子サイズ (*ca.* 100 nm) と pyrene-PC 濃度 (3%)、すなわち局所濃度を一定に保つと、 $I_e/I_m$  は表面リン脂質の拡散速度に依存することになる。その結果、LEM 表面での側方拡散が LUV 表面に比べて抑制されていることが明らかとなった (Fig. 4(B))。また、蛍光異方性の測定からも同様の結果が支持された。エマルションにおいても、アシル鎖長の短い C8 や 1 本鎖の CE では、表面リン脂質に与える影響は TO をコア脂質に持つ LEM に比べて小さい。これらの結果より、リポタンパク質粒子表面では、コア脂質であるトリグリセライドのアシル鎖が、リン脂質単分子膜のアシル鎖と interpenetration し、表面膜の側方拡散を抑制すると同時に、リン脂質分子間のスペースを広げ、アポ A-I の結合を制御していると考えられた。

#### 6. アポ A-I の脂質粒子への結合における二次構造変化

脂質粒子への結合におけるアポ A-I の構造変化を観察するために円二色性 (CD) 測定を行った。脂質に結合していないアポ A-I は、208 nm と 222 nm 付近に 2 つの極小値を持つ  $\alpha$  ヘリックスに特徴的なスペクトルのパターンを示した (Fig. 5(A))。222 nm でのモル楕円率から、 $\alpha$  ヘリックス含量 (約 45%) を見積もることができる。SUV の存在下 (eggPC : アポ A-I = 60 : 1 (w/w)) では、粒子

による光散乱の影響で低波長側のスペクトルにノイズがみられるが、222 nm におけるモル楕円率にはほとんど影響がない (Fig. 5(A))。また、この条件では、ほぼすべてのアポ A-I が結合していると考えられる。SUV への結合により、ヘリックス含量が 25% ほど増加し、60 残基程度のアミノ酸残基が  $\alpha$  ヘリックス構造に転移することが分かった。

SUV に対するアポ A-I の結合に伴う熱量を等温滴定型熱量計 (ITC) により測定した (Fig. 5(B))。過剰量の SUV 中に、少量のアポ A-I を滴下すると、それらの相互作用に伴う熱の出入りが観察される。ここで観察された熱量から、バッファー中にアポ A-I を滴下することによって得られる希釈熱を差し引くことで、結合エンタルピー  $\Delta H$  を求めることができる。

様々なアポ A-I 変異体について、SUV への結合で  $\alpha$  ヘリックス構造に転移するアミノ酸残基数を CD 測定により、結合エンタルピー  $\Delta H$  を ITC 測定により求めると、両者には良好な相関関係が認められた (Fig. 5(C))。<sup>8)</sup> すなわち、 $\alpha$  ヘリックス構造の形成に伴って、発熱反応、つまり負のエンタルピー変化が起こることが分かる。この直線の傾きから、一残基のアミノ酸残基が  $\alpha$  ヘリックス構造に転移するとき  $-1.1$  kcal/mol の熱量が発生すると見積もることができる。この結果は、Seelig らが D-アミノ酸を含むペプチドを用いて測定した  $-0.7$  kcal/mol と矛盾しない値となった。<sup>9)</sup> なお、この負のエンタルピー変化は、主にヘリックス中の水素結合形成によってもたらされる。SUV への結合によ

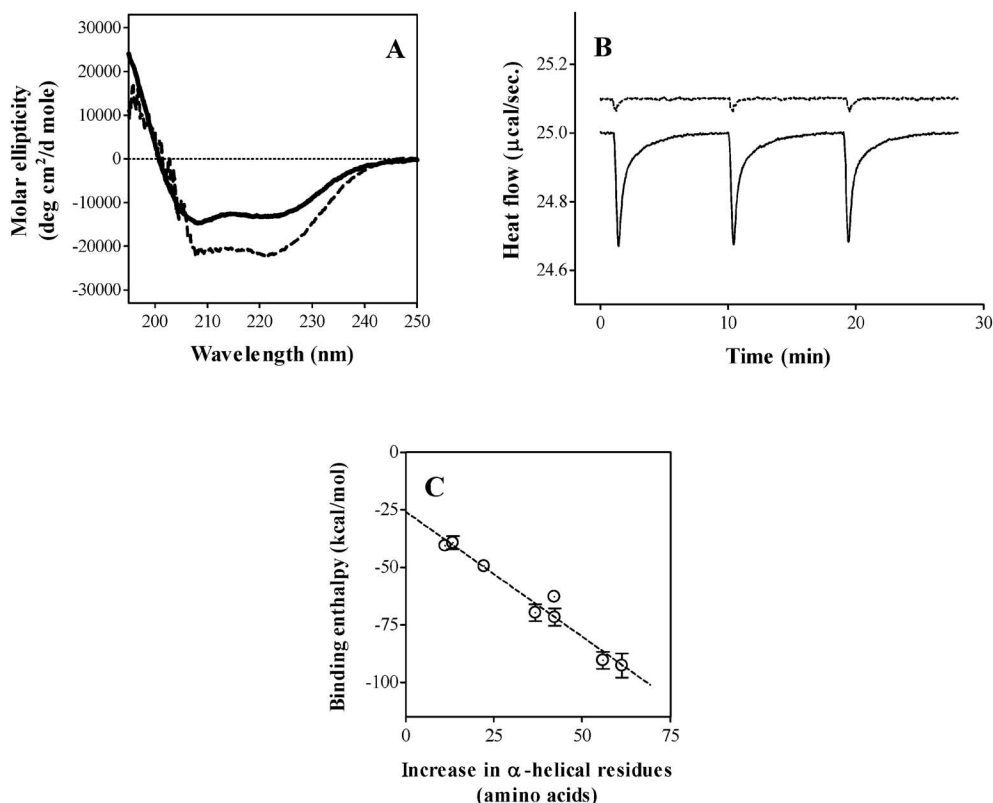


Fig. 5. (A) Far-UV CD Spectra of apoA-I in the Absence (Solid Line) and Presence (Broken Line) of SUV, (B) Heat Generated by apoA-I Binding, Injection of apoA-I into Buffer (Upper Dotted Line) and SUV (Lower Solid Line), (C) Correlation of Binding Enthalpy of apoA-I Variants with Increase in  $\alpha$ -Helix Content

り、60 残基程度のアミノ酸残基が $\alpha$ ヘリックス構造に転移することを考えると、それにより発生する熱量は約 $-66$  kcal/mol となり、結合エンタルピー $\Delta H$  (約 $-90$  kcal/mol) の大半を占めることになる。すなわち、二次構造の形成が、アポ A-I の脂質膜への結合における主要な駆動力となっていると考えられる。

#### 7. アポ A-I とエマルション粒子との相互作用における熱力学的パラメーター

粒子サイズの異なるエマルション粒子 (LEM と SEM) に対して、アポ A-I の結合性を評価したところ、 $B_{\max}$  はほぼ等しい値となった。そこで、 $^{13}\text{C}$ -NMR 測定により表面の水和状態を調べたところ、両エマルション粒子で差異は観察されず、上述したようにリン脂質分子間のスペースにより、アポ A-I の  $B_{\max}$  が制御されることが裏付けられた。

これらエマルション粒子へのアポ A-I の結合に伴う熱量を ITC により測定した。その結果、LEM への結合は SUV と同様に発熱反応 (負のエンタルピー変化) であるのに対して、SEM への結合は吸

熱反応 (正のエンタルピー変化) であった (Fig. 6 (A))。結合等温線から得られる解離定数 ( $K_d$ : [M]) を用いて、結合の自由エネルギー ( $\Delta G$ ) が  $\Delta G = -RT \ln 55.5 (1/K_d)$  の関係式から求められる。ここで、 $R$  は気体定数 ( $1.987$  cal/mol $\cdot$ K),  $T$  は絶対温度 (298 K),  $55.5$  は水のモル濃度 ([M]) を表す。 $\Delta G$  は、エンタルピーとエントロピーの値を用いて、 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  のように定義される。結合の熱力学的パラメーターを比較すると、アポ A-I の LEM への結合はエンタルピー駆動型であるのに対し、SEM への結合はエントロピー駆動型であることが分かり、結合の駆動力が粒子サイズによって異なることが明らかとなった (Fig. 6 (B, C)).<sup>10)</sup> そこで、エマルション粒子への結合におけるアポ A-I の構造変化を観察すると、LEM の存在下では光散乱の影響により CD 測定は不可能であったが、SEM への結合においては、 $\alpha$ ヘリックス含量の増加は SUV への結合と同程度であった。つまり、SEM への結合においては、 $\alpha$ ヘリックス含量の増加に伴って発生する熱量 (負のエンタルピー変

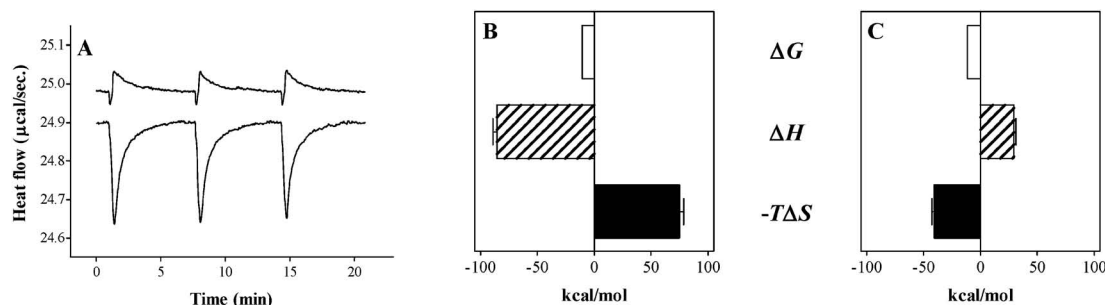


Fig. 6. (A) Isothermal Titration Calorimetry of apoA-I Injected into LEM (Lower) and SEM (Upper), (B) and (C) Comparison in Thermodynamic Parameters upon apoA-I Binding to LEM (B) and SEM (C)

化)が、別の正のエンタルピー変化によって打ち消されることが推定された。この原因として、結合による脂質膜の構造変化が考えられ、粒子サイズの違いによるエマルジョン表面における結合の深さの違いが影響している可能性もあり、今後の検討課題である。

#### 8. おわりに

本稿では、脂質膜の水和状態がアポ A-I の結合を決定する重要な因子であること、エマルジョン粒子表面では、表面膜とコア脂質との相互作用により疎水部の運動性が抑制され、極性部はより水和した構造をとっていることを述べた。脂質膜の物性や動的構造変化が、膜タンパク質などの機能発現に重要な役割を果たすと考えられている。リポタンパク質粒子表面では、表面膜とコア脂質とが動的に相互作用することによって、二分子膜構造とは異なるユニークな膜構造を与えている。この表面膜とコア脂質との動的平衡を調節することで、アポ A-I の脂質膜結合を支配していることが明らかとなった。また、脂質膜への結合過程においてアポ A-I の二次構造変化が熱力学的パラメーターに大きく寄与すること、エマルジョンへの結合では粒子サイズによって結合の駆動力が異なることを示した。タンパク質—脂質膜相互作用の熱力学的解析によれば、その多くはエンタルピー駆動によって起こる相互作用であり、タンパク質の二次構造変化に伴うエンタルピー変化が主要な駆動力であることが知られている。しかしながら、 $\alpha$ ヘリックス構造の形成が確認されるにも係わらず、アポ A-I の SEM への結合はエントロピー駆動型であり、エンタルピー駆動型である LEM への結合とは異なるメカニズムで結合していると推察された。

今後は、アポ A-I の機能部位ペプチド<sup>11,12)</sup>や各種変異体を作製し、<sup>13)</sup>アポ A-I—脂質膜相互作用を制御するタンパク質側の要因に関して研究を展開すると同時に、他のアポリポタンパク質との類似点や相違点について明らかにしていく予定である。<sup>14,15)</sup>また、アポ A-I の機能部位ペプチドを基に、HDL の血中濃度を高める新規ペプチド性動脈硬化症治療薬の設計や開発にもつなげていきたいと考えている。

**謝辞** 本研究を遂行するに当たり、終始懇切なご指導とご鞭撻を賜りました神戸薬科大学・斎藤博幸教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究は筆者が大学院在学時から一貫して取り組んでいるテーマであり、在学中には京都大学大学院薬学研究科・半田哲郎教授、中野実准教授に多くの有益なご助言を頂きました。この場をお借りして、厚く御礼申し上げます。

#### REFERENCES

- 1) Granot E., Schwiegelshohn B., Tabas I., Gorecki M., Vogel T., Carpentier Y. A., Deckelbaum R. J., *Biochemistry*, **33**, 15190–15197 (1994).
- 2) Mizushima Y., Hoshi K., *J. Drug Target*, **1**, 93–100 (1993).
- 3) Marcel Y. L., Kiss R. S., *Curr. Opin. Lipidol.*, **14**, 151–157 (2003).
- 4) Nyholm T., Nylund M., Soderholm A., Slotte J. P., *Biophys. J.*, **84**, 987–997 (2003).
- 5) Saito H., Tanaka M., Okamura E., Kimura T., Nakahara M., Handa T., *Langmuir*, **17**, 2528–2532 (2001).

- 6) Okamura E., Kimura T., Nakahara M., Tanaka M., Handa T., Saito H., *J. Phys. Chem. B*, **105**, 12616–12621 (2001).
- 7) Tanaka M., Saito H., Arimoto I., Nakano M., Handa T., *Langmuir*, **19**, 5192–5196 (2003).
- 8) Saito H., Dhanasekaran P., Nguyen D., Deridder E., Holvoet P., Lund-Katz S., Phillips M. C., *J. Biol. Chem.*, **279**, 20974–20981 (2004).
- 9) Seelig J., *Biochim. Biophys. Acta*, **1666**, 40–50 (2004).
- 10) Tanaka M., Saito H., Dhanasekaran P., Wehrli S., Handa T., Lund-Katz S., Phillips M. C., *Biochemistry*, **44**, 10689–10695 (2005).
- 11) Egashira M., Gorbenko G., Tanaka M., Saito H., Molotkovsky J., Nakano M., Handa T., *Biochemistry*, **41**, 4165–4172 (2002).
- 12) Gorbenko G., Handa T., Saito H., Molotkovsky J., Tanaka M., Egashira M., Nakano M., *Eur. Biophys. J.*, **32**, 703–709 (2003).
- 13) Tanaka M., Dhanasekaran P., Nguyen D., Ohta S., Lund-Katz S., Phillips M. C., Saito H., *Biochemistry*, **45**, 10351–10358 (2006).
- 14) Pearson K., Tubb M. R., Tanaka M., Zhang X. Q., Tso P., Weinberg R. B., Davidson W. S., *J. Biol. Chem.*, **280**, 38576–38582 (2005).
- 15) Tanaka M., Vedhachalam C., Sakamoto T., Dhanasekaran P., Phillips M. C., Lund-Katz S., Saito H., *Biochemistry*, **45**, 4240–4247 (2006).