

アポリポタンパク-脂質膜相互作用によるディスク状複合体形成と 高密度リポタンパク質 (HDL) 形成原理の考察

中野 実

Disk-like Complex Formation by Apolipoprotein-Lipid Membrane Interaction and Relevance to High-Density Lipoprotein Formation

Minoru NAKANO

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Shimo Adachi-cho,
Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received November 1, 2007)

The interaction of apolipoprotein A-I (apoA-I) with transmembrane ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) is a crucial step for high-density lipoprotein (HDL) formation, however, its molecular mechanism is less well understood. Here, we used apoA-I and its model peptide, Ac-18A-NH₂, to investigate their interaction with mixed membranes of phosphatidylcholine (PC) with phosphatidylethanolamine (PE) or sphingomyelin (SM). It was shown that PE, possessing the negative spontaneous curvature, increased both the degree of hydration at the membrane interface and the acyl chain order, and that Ac-18A-NH₂ had opposite effects to PE, since the α -helix formation at the membrane surface induced positive curvature strain. In addition, increased PE in PC/PE large unilamellar vesicles (LUVs) enhanced the peptide's binding. Although SM significantly lowered the peptide binding capacity, the peptide's binding to PC/SM LUV led to membrane disruption. The interaction with PC/SM LUVs was then investigated using ApoA-I. The spontaneous rHDL formation from pure PC LUV proceeded very slowly at 37°C, but SM-rich PC/SM LUVs, which are in a gel/liquid-disordered (L_d) phase at this temperature, were rapidly solubilized to form rHDL by apoA-I. The addition of cholesterol decreased the rate of the rHDL formation and induced the selective extraction of lipids by apoA-I, which preferably extracted lipids of L_d phase rather than lipids of liquid-ordered (L_o) phase. These results suggest that heterogeneous interface of the mixed membranes facilitates the insertion of apoA-I and induces L_d phase-selective lipid extraction to form rHDL, and are compatible with recent cell works on the apoA-I-dependent HDL generation.

Key words—apolipoprotein A-I; phosphatidylcholine; phosphatidylethanolamine; sphingomyelin

1. はじめに

アポリポタンパク質 A-I (ApoA-I) は複数の両親媒性 α -ヘリックスモチーフを有するポリペプチドであり、高密度リポタンパク質 (HDL) の主要構成タンパク質である。HDL を介した脂質輸送は、末梢細胞のコレステロール (Chol) の唯一の代謝経路である Chol 逆転送系を担っており、動脈硬化に対する防御機構として重要である。その最初のステップである HDL の形成についてはいろいろな議論がなされていたが、1999 年に、極端な低

HDL 血症を呈する遺伝病であるタンジール病の原因が ABCA1 遺伝子にあることが明らかにされ、¹⁻³⁾ 膜タンパク質 ABCA1 が注目されることとなった。それ以降 HDL 研究はめざましく進歩しており、病理学的及び細胞生物学的研究によって HDL 新生反応に係わる多くの因子が特定されている。その主役は上述の apoA-I と ABCA1 である。HDL の構成タンパク質である apoA-I は脂質フリーの状態では、ABCA1 が発現している細胞膜と相互作用し Chol とリン脂質を含む直径約 10 nm のディスク状 HDL を形成する。ABCA1 の変異や欠損で HDL 形成能が失われることから、ABCA1 の ATP 加水分解活性が HDL 形成に利用されているのは確かである。しかし、最も重要な、apoA-I と脂質との複合体形成のメカニズムに関しては議論が分かれている。

京都大学大学院薬学研究科創薬科学専攻 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

e-mail: mnakano@pharm.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 127 年会シンポジウム S31 で発表したものを中心に記述したものである。

ABCA1 が ATP 駆動のトランスポーターとして脂質を 1 分子ずつ apoA-I に供給する可能性もある。しかしながら, apoA-I だけでなく, 他のアポリポタンパクや両親媒性ペプチドでも ABCA1 依存的な脂質搬出が観察される⁴⁾ことから, 脂質のアクセプター側としては, 生化学的な相互作用ではなく, “両親媒性ヘリックス” という物理化学的特性が必要因子であると考えられる。また, 脂質搬出能はそのアポリポタンパクの脂質親和性と正の相関を示すこと⁵⁾は, アポリポタンパクの脂質膜との相互作用の重要性を意味していると思われる。さらに, モデル膜系において apoA-I は, 条件によって HDL 様のディスク状脂質-apoA-I 複合体を形成できることが知られている。⁶⁾ これらを考慮すれば, 複合体形成メカニズムとして, ABCA1 は脂質を直接 apoA-I に運ぶのではなく, 脂質トランスロカーゼとして局所的な脂質分布を変化させ, その作用によって摂動を受けた膜に対し apoA-I が結合及び脂質搬出を起こすという可能性も考えられる。本研究では, 脂質として Fig. 1 に示すフォスファチジルコリン (PC) とフォスファチジルエタノールアミン (PE), スフィンゴミエリン (SM) に焦点を絞り, モデル脂質膜と, apoA-I 及び両親媒性 α -ヘリックス形成ペプチドとの相互作用について評価を行い, 膜の脂質組成の重要性について考察した。

2. フォスファチジルエタノールアミンの膜への効果と両親媒性 α -ヘリックス結合性⁷⁾

フォスファチジルエタノールアミン (PE) はフォスファチジルコリン (PC) に比べて極性頭部が小さく, 負の曲率を有し, 逆ヘキサゴナル液晶相を形成する脂質である。このような脂質が脂質二重層中に加わるとその構造や環境を変化させる可能性がある。そこで, この脂質の脂質膜構造への効果を調査した。PC として palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine [POPC, Fig. 1(a)], PE として dioleoylphosphatidylethanolamine [DOPE, Fig. 1(b)] を用いた。まず, POPC の一部を, 重水素化 palmitoyl 基を持つ POPC に置き換えて調製した PC/PE 混合脂質多重膜 (MLV) について, ²H NMR 測定を行った。²H NMR の四重極分裂からオーダーパラメータ, すなわちアシル鎖の配向性が評価できる。Figure 2 に示すように, アシル鎖のオーダーパラメータは PC/PE 混合膜中の PE の増加により上昇

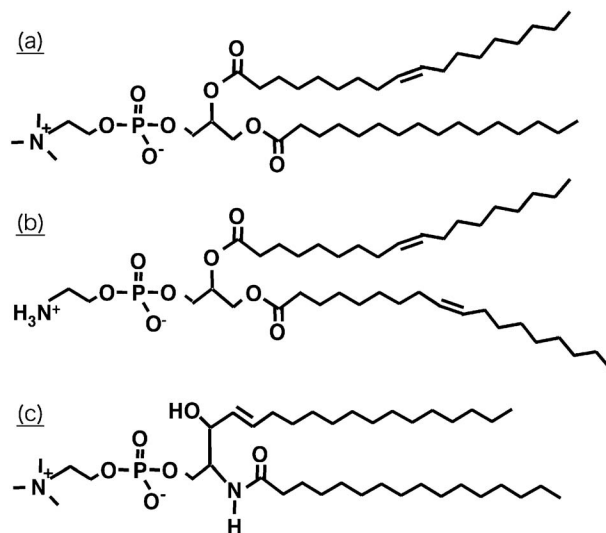


Fig. 1. Chemical Structure of (a) Palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine (POPC), (b) Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), and (c) Sphingomyelin (SM)

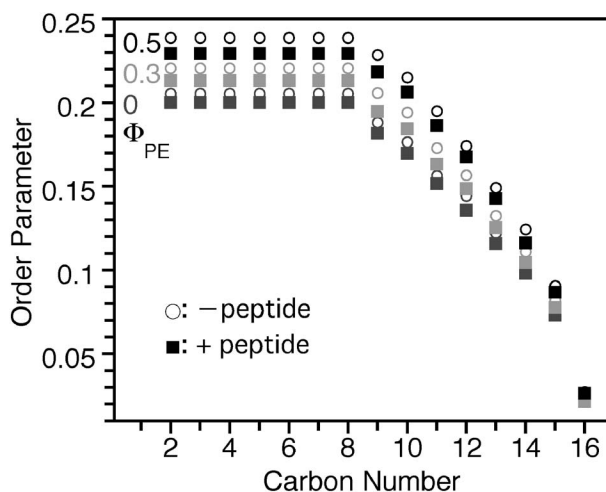


Fig. 2. Order Parameter for Each Carbon Site of POPC Palmitoyl Chains in POPC/DOPE Mixed Membranes with DOPE Mole Fractions of 0, 0.3, and 0.5 in the Absence (open symbols) and Presence (closed symbols) of 1 mol% Ac-18A-NH₂ at 25°C

した。

また, 蛍光プローブ 2-(9-anthroyloxy) stearic acid (2-AS) を少量含む MLV の蛍光寿命測定を行った。蛍光寿命はその蛍光プローブの環境に強く依存し, 特に, 水分子との接触頻度が増加すると短くなることが知られている。2-AS の蛍光団は疎水性であり, 膜界面付近に分布するため, その蛍光寿命から, 膜界面付近の水和度 (疎水性水和) を評価できる。Figure 3 に示すように, 蛍光寿命は PE の含

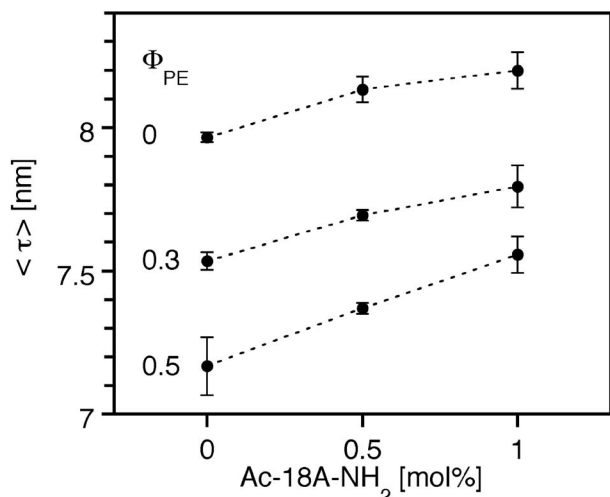


Fig. 3. The Mean Fluorescence Lifetime (τ) of 2-AS in POPC/DOPE Mixed Membranes with DOPE Mole Fractions of 0, 0.3, and 0.5 as a Function of the Molar Ratio of Ac-18A-NH₂ to Total Lipid at 25°C

Each point represents the mean \pm S.D. of three samples.

有率の高い膜ほど短くなったことから、膜界面付近の水和度は、PEの増加により上昇することが判明した。つまり、負の曲率を持つ脂質が曲率のない平面膜中に組み込まれることによって、アシル鎖領域の側方圧が増大しPOPCアシル鎖の配向性は高められる。逆に極性頭部基間は押し広げられるため、水和度が上昇するのである。これは、脂質固有の曲率と実際の膜の曲率の不一致に起因するパッキングストレスと呼ばれる。

両親媒性 α -ヘリックス形成ペプチド、Ac-18A-NH₂は18残基からなるポリペプチドで典型的な両親媒性ヘリカルモチーフを持つ (Fig. 4)。このペプチドはapoA-Iと類似の生化学的、物理化学的機能を有することが示されている。⁸⁾ Ac-18A-NH₂存在下でMLVを調製し、同様の測定を行った。ペプチド存在下でのアシル鎖の配向性 (Fig. 2) 及び、膜界面付近の水和度 (Fig. 3) は、非存在下と比べてともに低下することが示された。これは、両親媒性ヘリックスが膜表面に結合すると、膜に正の曲率を与えるため、PEと全く逆の効果を示したと解釈できる。このペプチドによる配向性の低下、及び水和度の低下はいずれもエントロピーを増大させる方向に働いている。

このように、ヘリックスの結合はPEの負の曲率を打ち消すことでPE含有膜を安定化させることから、Ac-18A-NH₂の結合性もPE含有膜の方が高い

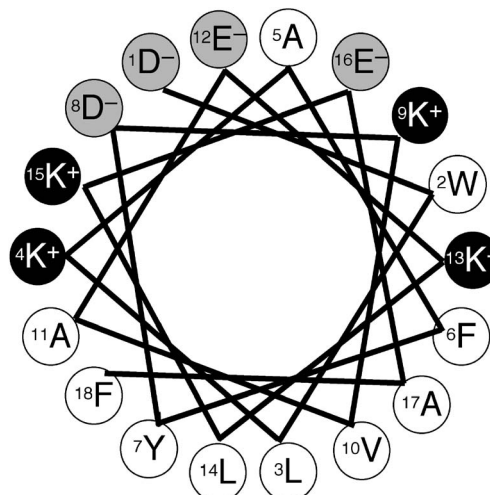


Fig. 4. Helical-wheel Representation of Ac-18A-NH₂

ことが予想される。そこで、PC/PEの1枚膜ベシクル (LUV) を調製し、Ac-18A-NH₂のTrp残基の蛍光を利用してペプチドの膜結合性を評価した。膜/水分分配係数の温度依存性 (van't Hoff plot) を Fig. 5 に示す。傾きが負であることからペプチドの結合は吸熱過程であり、予想通りPEの多い膜ほど結合性 (分配係数) が增大することが判明した。アシル鎖の配向性や膜界面の (疎水性) 水和を低下させることが、ペプチドのPE依存的な結合性の増大の要因である。負の自発曲率を有し、両連続キュービク相を形成する脂質であるモノオレインもPEと同様の効果を示した⁹⁾ことから、負の曲率を持つ脂質がアポリポタンパク質の膜親和性を高めることが示された。

3. 両親媒性 α -ヘリックス結合によるスフィンゴミエリン含有膜の不安定化¹⁰⁾

スフィンゴミエリン [SM, Fig. 1(c)] は高いゲル-液晶相転移温度を有する脂質であり、膜を硬くする性質を持つ。したがって、Ac-18A-NH₂のPC/SM混合膜への結合性はSM含量依存的に減少する。SM膜へのペプチドの最大結合量はPC膜の約1/6である。ところが、PC/SMのモル比が2:1の膜にAc-18A-NH₂を加えると膜の不安定化が起こることを見出した。Figure 6はカルセインという蛍光色素を内包したリポソームにペプチドを加えたときの色素の漏出を検出したものである。25°CにおいてPC膜及びSM膜に作用してもペプチドはほとんど色素を漏らさないのに対し、PC/SM混合膜で

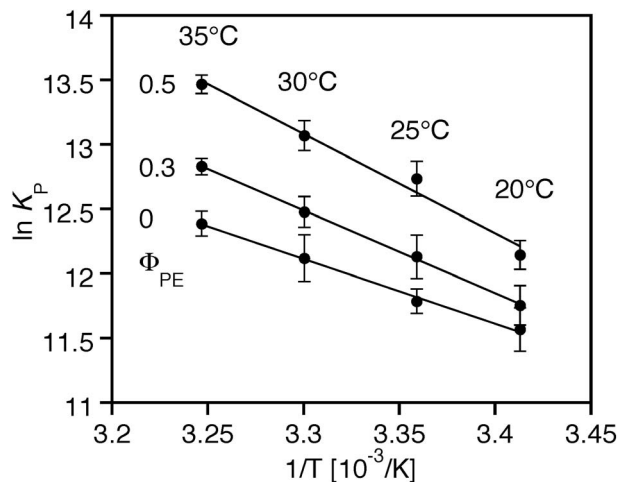


Fig. 5. van't Hoff Plot for Ac-18A-NH₂ Binding to POPC/DOPE LUVs with DOPE Mole Fractions of 0, 0.3, and 0.5. Each point represents the mean \pm S.D. of three samples.

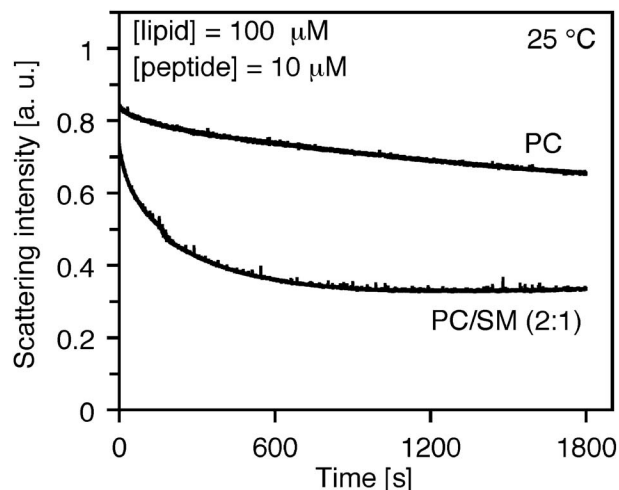


Fig. 7. Changes in Right-angle Scattering of Incident Light at 400 nm after Mixing of Ac-18A-NH₂ (10 μ M) with PC LUV and PC/SM (2 : 1) LUVs (100 μ M) at 25°C

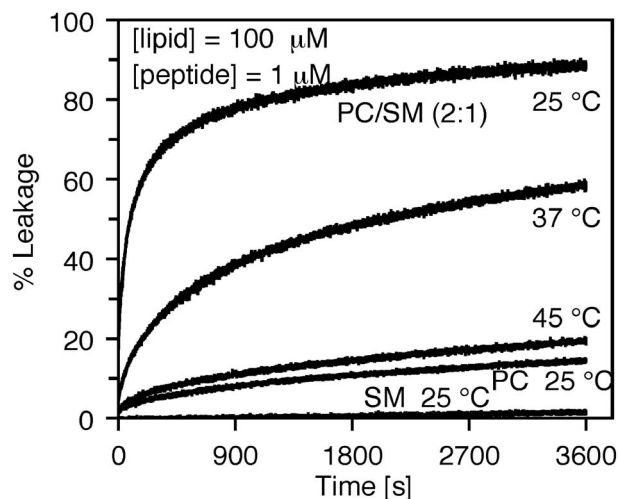


Fig. 6. Calcein Leakage from PC, PC/SM (2 : 1), and SM LUVs (100 μ M) after Mixing with Ac-18A-NH₂ (1 μ M)

は大きな漏出がみられた。この漏出には温度依存性がみられ、高温では抑制された。

次に、Ac-18A-NH₂ 量を 10 倍にして、脂質の可溶化を観察した。リポソームの脂質が可溶化され、脂質-ペプチド複合体が形成されると、散乱強度は減少する。ペプチド添加に伴う散乱強度の変化を観察したところ、PC 膜よりも PC/SM 混合膜の方が、可溶化速度が速いことが判明した (Fig. 7)。これらの結果は、PC 膜に SM が加わると膜が硬くなってペプチドの結合性が下がるにも係わらず、ペプチドによる膜崩壊が促進されることを示している。この原因を明らかにするため、種々の PC/SM 組成を持つリポソーム膜に蛍光プローブ 1,6-

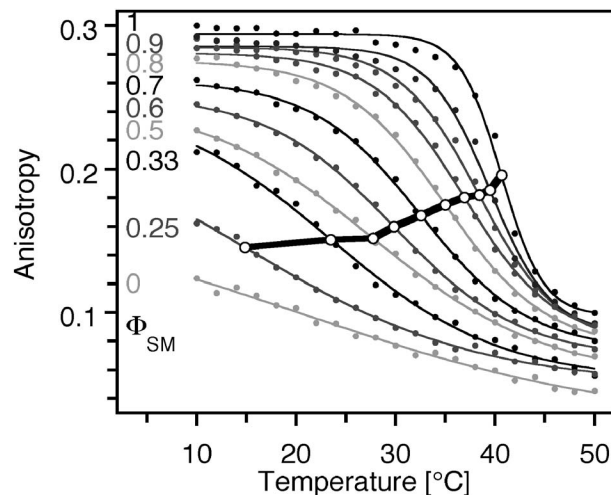


Fig. 8. Fluorescence Polarization of DPH ($\langle \gamma \rangle_{DPH}$) in PC/SM LUVs with SM Mole Fractions of 1, 0.95, 0.9, 0.85, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.33, 0.25, and 0 (from top to bottom) as a Function of Temperature

The temperature profile was fitted by the sigmoidal function to determine midpoint of phase transition (open circles).

diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) を導入し、その蛍光異方性を測定した。膜のゲル-液晶相転移に伴い膜の異方性、すなわち硬さが急激に減少することが知られている。蛍光異方性の温度依存性を測定し、その変曲点、すなわち相転移温度を求めると、SM 含量の減少に伴い低下し、PC/SM=2 : 1 の膜では 25°C 付近であることが判明した (Fig. 8)。つまり 25°C においてペプチドが膜崩壊を引き起こすのは、混合膜がゲル相と液晶相の二相共存状態であ

ることが関連していることが示唆された。

4. ApoA-Iによるディスク状複合体形成¹¹⁾

両親媒性ペプチド Ac-18A-NH₂ でみられた膜崩壊作用をより詳細に検討するために, apoA-I を用いて実験を行った. 種々の組成を持つ PC/SM 混合 LUV に対し, 37°C 及び 33°C で apoA-I を添加し, 散乱強度の減少を観察した. PC のみの膜では散乱強度は変化しなかったが, SM 含量の増加とともに apoA-I による可溶化が促進され, 37°C においては PC/SM=1:9 の組成で可溶化速度が最大となった (Fig. 9). 33°C においても同様の現象が観察されたが, 可溶化速度が最大となる脂質組成は 37°C の場合とは異なっていた. それぞれの温度における各 LUV の可溶化速度を, Fig. 8 で求めた LUV 膜の相

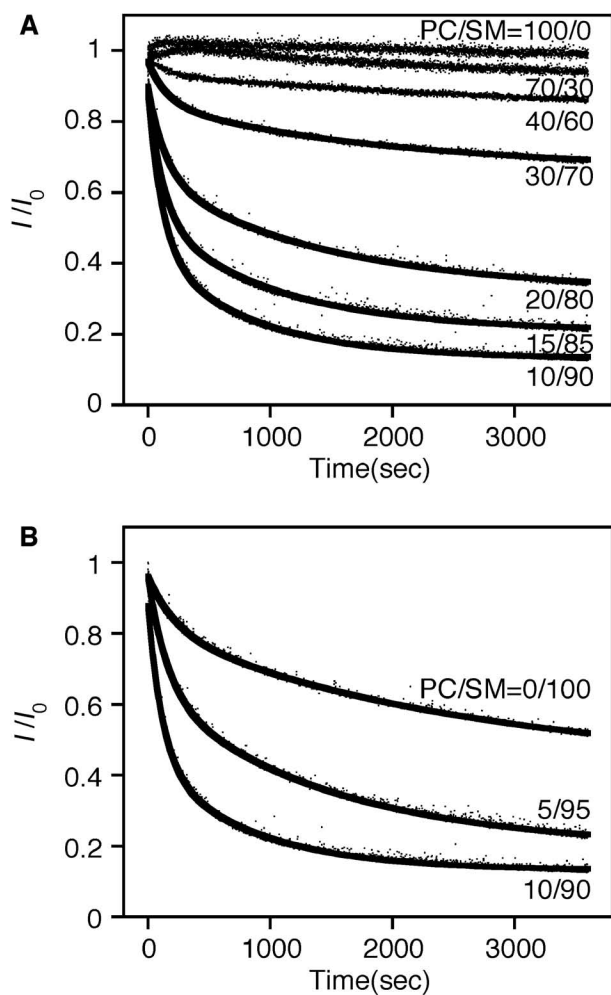


Fig. 9. The Reduction in Light Scattering Intensity of PC/SM LUVs by ApoA-I at 37.0°C

The PL and apoA-I concentration was 100 μ M and 5 μ M, respectively. The data was analyzed as a two-exponential decay model.

転移温度に対してプロットしたところ, 最大可溶化速度となる膜の相転移温度が実験温度と一致した (Fig. 10). この結果は, 膜の二相共存状態において apoA-I による膜の可溶化が促進されることを表している.

これまでにみられた, apoA-I による膜の可溶化とは, ディスク状の脂質-タンパク質複合体の形成を指すものである. 実際, apoA-I により散乱強度が減少した試料について電子顕微鏡観察を行うと, ディスク状の粒子が形成されていることが確認できた (Fig. 11). ディスクの直径はおよそ 15 nm であり, 1つのディスクは 2 ないし 3 個の apoA-I が約 200 個の脂質を取り囲んだ構造をしていると推定される.⁶⁾ なお, ディスク粒子が連鎖状にスタックした像が得られているが, これはネガティブ染色によるアーティファクトとされている.¹²⁾

コレステロール (Chol) は細胞膜に約 30% 含まれる主要構成脂質であり, 膜のパッキングを高め流動性を下げる性質を持つ. Chol を加えた 3 成分系 PC/SM/Chol 膜では, apoA-I による可溶化が Chol 濃度依存的に抑制された. この結果から考えると, 生体膜において Chol が apoA-I による自発的な HDL 形成を抑制, 制御しているのかもしれない. 一方, この PC/SM/Chol 混合膜は, 脂質 raft ドメインを形成することが知られているが, この膜から apoA-I によって形成されるディスク粒子の脂質の由来を, 蛍光プローブを利用して調べてみると,

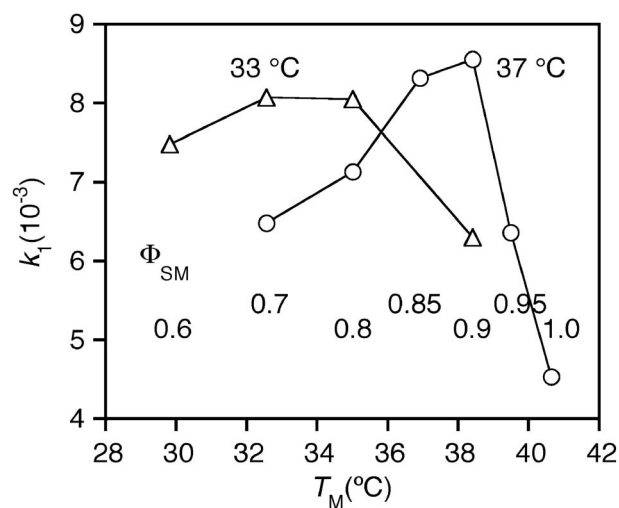


Fig. 10. Kinetic Constant (k_1) for Microsolubilization of PC/SM LUVs at 37 (circles) and 33°C (triangles) as a Function of the Phase Transition Temperature (T_M) of Each LUV

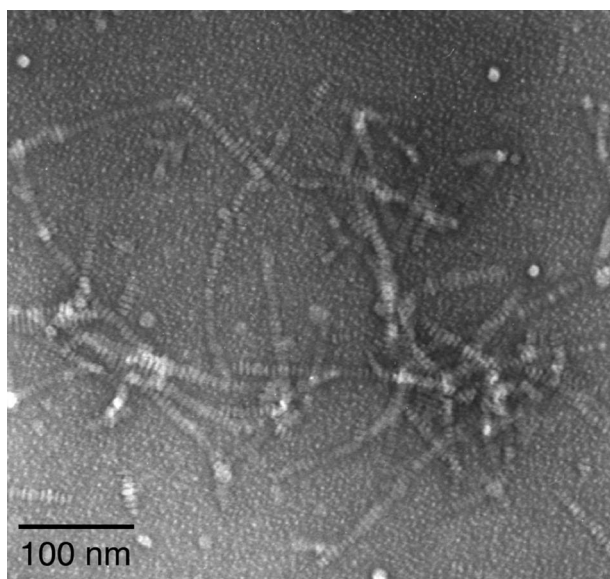


Fig. 11. Electron Micrograph of a Negatively Stained Sample of the Mixture of PC/SM (1 : 9) LUV (300 μ M) and ApoA-I (5 μ M)

The sample was incubated at 37.0°C for 12 h and then negatively stained with ammonium molybdate.

L_D 相, すなわち non-raft の脂質によって選択的に構成されていることが判明した。Figure 12 は L_D 相に分布する pyrene-PC と L_0 相, すなわち raft に分布する NBD-PE とを含む LUV から生成したディスクの相対蛍光強度比を示しており, Chol 含量の増加とともに pyrene 強度が相対的に強くなることを示している。したがって, apoA-I によるディスク形成において引き抜かれるのは non-raft 領域の脂質であり, raft 領域は apoA-I がアクセスし難い領域であると考えられる。細胞レベルで観察される HDL, すなわち, ABCA1 依存的に形成される HDL も non-raft の脂質によって構成されていることが報告されており,¹³⁾ その関連性が興味深い。

5. おわりに

HDL 新生反応の主役である apoA-I が, 膜へ結合する, あるいは膜を壊して自発的にディスク状粒子を形成するプロセスにおいて, 負の曲率を有する脂質, ドメインを形成する脂質が重要な役割を持つことを示した。物理化学的な見地からこの現象を眺めると, HDL 新生反応のもう 1 つの主役である ABCA1 の役割は, 細胞膜状の局所的な脂質組成を変えることではないかと考えられる。すなわち, ABCA1 は apoA-I を結合させることによって, ABCA1 近傍の apoA-I 濃度を高めると同時に,

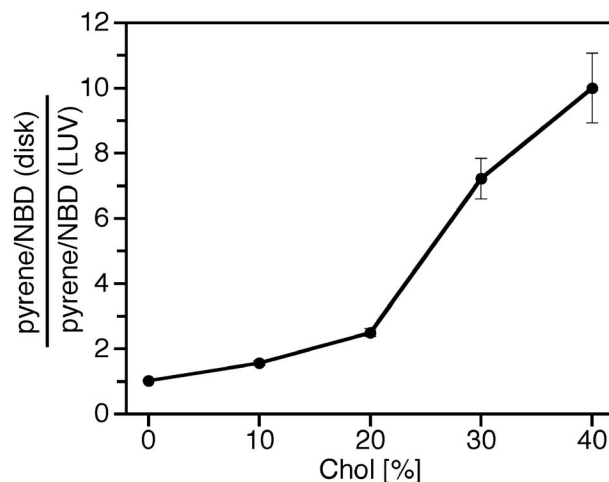


Fig. 12. Selective Lipid Extraction from PC/SM/Chol LUVs by ApoA-I

Molar ratio of PC : SM was 2 : 8. The increase in relative fluorescence intensity (pyrene/NBD) in disks denotes the increase in the selectivity of lipid extraction from L_D phase.

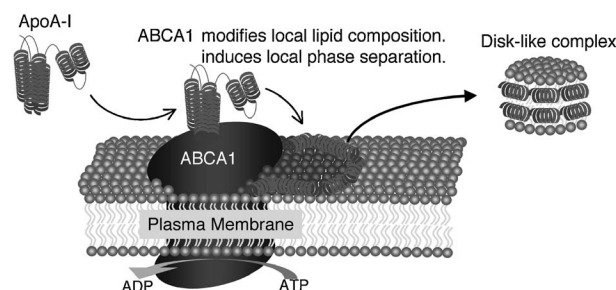


Fig. 13. Putative Mechanism of ABCA1 Dependent HDL Formation

ATP 加水分解エネルギーを利用して脂質を内膜から外膜へ反転 (フロップ) させ, ABCA1 近傍の脂質組成を変えてパッキングストレスや相分離を誘起する。この, ストレスや相分離が誘起された領域に apoA-I が結合し, 膜が不安定化され, ディスク状粒子が生成するというメカニズムである (Fig. 13)。ABCA1 が raft 領域の SM や Chol を non-raft 領域へ再分配させるという報告もある。¹⁴⁾ ABCA1 の機能を含めた HDL 新生反応の解明には, 生化学, 分子生物学的なアプローチに加えて本研究のような物理化学的考察が必須であろう。

謝辞 本研究を遂行するに当たり, 半田哲郎教授, 加茂倫有博士, 有安葵, 新藤圭介, 福田正和修士に御協力頂きました。また, 科研費, 独医薬基盤研究所, 勸新世代研究所, 資生堂サイエンス研究

ラントからの助成を受けました。電子顕微鏡観察では、上野雅晴先生（富山大院薬）にお世話になりました。ここに厚くお礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Brooks-Wilson A., Marcil M., Clee S. M., Zhang L.-H., Roomp K., van Dam M., Yu L., Brewer C., Collins J. A., Molhuizen H. O. F., Loubser O., Ouelette B. F. F., Fichter K., Ashbourne-Excoffon K. J. D., Sensen C. W., Scherer S., Mott S., Denis M., Martindale D., Frohlich J., Morgan K., Koop B., Pimstone S., Kastelein J. J. P., Genest Jr. J., Hayden M. R., *Nat. Genet.*, **22**, 336–345 (1999).
- 2) Bodzioch M., Orsó E., Klucken J., Langmann T., Böttcher A., Diederich W., Drobnik W., Barlage S., Büchler C., Porsch-Özcürümez M., Kaminski W. E., Hahmann H. W., Oette K., Rothe G., Aslanidis C., Lackner K. J., Schmitz G., *Nat. Genet.*, **22**, 347–351 (1999).
- 3) Rust S., Rosier M., Funke H., Real J., Amoura Z., Piette J.-C., Deleuze J.-F., Brewer H. B., Duverger N., Denèfle P., Assmann G., *Nat. Genet.*, **22**, 352–355 (1999).
- 4) Fitzgerald M. L., Morris A. L., Chroni A., Mendez A. J., Zannis V. I., Freeman M. W., *J. Lipid Res.*, **45**, 287–294 (2004).
- 5) Gillotte K. L., Zaiou M., Lund-Katz S., Anantharamaiah G. M., Holvoet P., Dhoest A., Palgunachari M. N., Segrest J. P., Weisgraber K. H., Rothblat G. H., Phillips M. C., *J. Biol. Chem.*, **274**, 2021–2028 (1999).
- 6) Swaney J. B., *J. Biol. Chem.*, **258**, 1254–1259 (1983).
- 7) Shintou K., Nakano M., Kamo T., Kuroda Y., Handa T. (submitted).
- 8) Datta G., Chaddha M., Hama S., Navab M., Fogelman A. M., Garber D. W., Mishra V. K., Epand R. M., Epand R. F., Lund-Katz S., Phillips M. C., Segrest J. P., Anantharamaiah G. M., *J. Lipid Res.*, **42**, 1096–1104 (2001).
- 9) Kamo T., Nakano M., Kuroda Y., Handa T., *J. Phys. Chem. B*, **110**, 24987–24992 (2006).
- 10) Nakano M., Ariyasu A., Kudo T., Sakamoto A., Fukuda M., Handa T. (submitted).
- 11) Fukuda M., Nakano M., Sriwongsitanont S., Ueno M., Kuroda Y., Handa T., *J. Lipid Res.*, **48**, 882–889 (2007).
- 12) Surewicz W. K., Epand R. M., Pownall H. J., Hui S. W., *J. Biol. Chem.*, **261**, 16191–16197 (1986).
- 13) Mendez A. J., Lin G., Wade D. P., Lawn R. M., Oram J. F., *J. Biol. Chem.*, **276**, 3158–3166 (2001).
- 14) Landry Y. D., Denis M., Nandi S., Bell S., Vaughan A. M., Zha X., *J. Biol. Chem.*, **281**, 36091–36101 (2006).