

細胞膜二重層の膜葉間相互作用を調節する トランスミッション領域の分子機構

Molecular mechanism of the transmission region in the cell membrane bilayer that regulates interleaflet interaction

代表研究者	鳥取大学	花島 慎弥	Tottori University	Shinya HANASHIMA
協同研究者	理化学研究所	Peter GREIMEL	RIKEN	Peter GREIMEL
	鳥取大学	佐々木 克聡	Tottori University	Katsuaki SASAKI

Biological membranes exhibit lateral heterogeneity through transient lipid domains, yet their asymmetric leaflet composition has been largely overlooked in model membrane studies. This study pursued three projects to elucidate the asymmetric architecture of lipid rafts. First, to investigate interleaflet coupling and lipid redistribution, we attempted to establish a preparation method for asymmetric phase-separating GUVs using methyl- β -cyclodextrin-mediated lipid exchange, and synthesized fluorescent lipid probes to evaluate Lo/Ld phase partitioning. Second, to clarify the lipid composition-dependent localization of the Src kinase Lyn, which resides on the inner leaflet beneath glycosphingolipid domains, we synthesized a fluorescent molecular probe incorporating lipid modifications via S-palmitoylation via selective thioester exchange and CuAAC-based fluorophore conjugation. Third, to evaluate the effect of cholesterol glucosylation on interleaflet coupling, we examined the flip-flop behavior of cholesteryl- β -D-glucoside (CholGlc) in DOPC bilayers using TMA-DPH and NBD-CholGlc probes. The results demonstrated that CholGlc retains rapid transbilayer movement and membrane ordering capacity comparable to cholesterol, suggesting that its key membrane properties are preserved despite hydrophilic glucose modification.

研究目的

細胞膜における脂質分子は、平面方向への動的な拡散・集合によって一過性のドメインを形成し、細胞間シグナル伝達をはじめとする多様な生命現象を担うことが知られている。また、細胞膜の外葉と内葉は互いに異なる脂質分子種から構成されており、その非対称性が膜機能の発現に重要な役割を果たすと考えられている。これまでのドメイン形成に関する研究の多くは、外葉の脂質組成を模したモデル膜（表裏同一の脂質組成）を用いた熱力学的平衡系における解析に留まっており、生体膜が本来有する非対称性を考慮した系での検討は十分に行われていなかった。したがって、細胞膜におけるドメイン形成機構をより精緻に解明するためには、脂質二重層の表裏非対称性を再現したモデル膜を用い、外葉側に形成されるドメイン構造が内葉との相互作用を介していかに情報伝達機能の発現・制御に寄与するかを

明らかにすることが不可欠である。

これまでの研究において、膜の秩序を評価する蛍光プローブを用いた解析から、外葉脂質の飽和度が内葉の膜秩序に影響を与えること[1]、さらに細胞膜においても外葉への飽和脂質の添加により内葉の膜秩序が上昇すること[2]が報告されている。

本研究では、細胞膜における機能ドメインである脂質ラフトの表裏非対称な構造・動態の解明に向けて、膜葉間における脂質の交換および嵌合メカニズムの解明を目的とし、以下の3つのプロジェクトを遂行した。

(1) 相分離非対称膜の構築

膜葉界面において向かい合う脂質鎖末端間の嵌合、および内葉における飽和脂質分子の再分配機構を解明するため、相分離を示す表裏非対称脂質膜モデルの構築を行った。

(2) 脂質化ペプチドの合成

脂質ラフト内葉に局在する脂質化タンパク質について、その局在が脂質組成に依存して変化するメカニズムを解明するため、脂質化ペプチドの合成を行った。

(3) グルコシル化コレステロールの膜物性への影響評価

膜葉間嵌合を促進するコレステロールのグルコシル化が膜の物理的性質に与える影響を評価した。

研究経過

(1) 相分離非対称膜の構築

表裏非対称な脂質膜の調製手法としては、脂質修飾/代謝酵素を利用する方法や支持膜上の脂質とベシクル上の脂質の交換反応による形成法など、これまでにいくつかの手法が報告されている[3]。本研究では、表裏非対称性と相分離を併せ持つ巨大単層小胞 (GUV) の調製法の確立を目指した。膜の不均一性評価に適した蛍光脂質プローブ分子を合成するとともに、これらを活用した非対称相分離 GUV の調製を行った。優れたモデル細胞膜系の構築が実現すれば、膜の不均一性が細胞機能に与える影響の解明に向けた基盤となることが期待される。

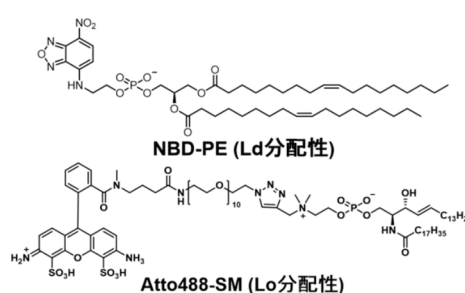
まず、表裏非対称性および相分離の双方を同時に確認するために必要な二種類の蛍光脂質プローブを合成し、相分離を示す対称膜における分配挙動を評価した。液体秩序 (Lo) 相への優先的な分配性を示す ATTO488-SM プローブは、既報の手法[4]に従い、PEG リンカーを介してアジド化した蛍光基と、頭部にアルキンを導入したスフィンゴミエリン (SM) を、銅触媒存在下でのアジド-アルキンクリック反応 (CuAAC) により縮合させることで合成した。

非対称膜の調製には、外葉脂質を選択的に置換可能なメチル- β -シクロデキストリン (M β CD) を用いた[3]。M β CD とドナーベシクルを混合して外葉脂質を包摂させ、これを用いて GUV 外葉の脂質を選択的に交換することで、表裏非対称な GUV の調製を試みた。本検討では、これまでに確立している 100 nm 程度のサイズの表裏非対称大型単層小胞 (LUV) の調製法[5]を基盤として実験を行った。脂質交換の確認には、ドナーベシクルの脂質として NBD を頭部に有する NBD-POPE を用い、交換後の GUV を蛍光顕微鏡により観察した。その結果、GUV 上に蛍光シグナルが検出され、脂質交換の進行が確認された。

一方で、交換後の GUV における蛍光強度は GUV 間でばらつきが認められた。また、亜ジチオン酸ナトリウムによるニトロ基の還元反応を用いて外葉に存在する NBD を選択的に消光した後に蛍光顕微鏡観察を行ったところ、消光後も蛍光が相当量残存していることが判明した。この結果は、蛍光脂質以外の脂質成分も同時に交換されたことを示唆している。

現在は、ドナーベシクル濃度条件の最適化を進めるとともに、M β CD と比較して脂質との親和性が低いメチル- α -シクロデキストリン (M α CD) を新たに合成し、これを用いた脂質交換反応の条件検討を行っている。また、M β CD の残存は GUV 調製における根本的な課題の一つであることから、その除去を目的とした GUV 精製条件の最適化についても併せて検討を進めている。

A



B

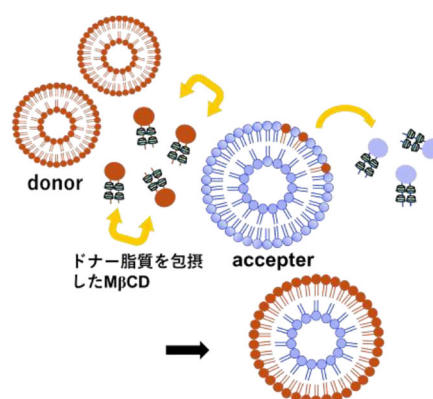


Figure 1 (A) 本実験で用いた脂質蛍光プローブ既報に従い当研究室にて合成した。(B) M β CD の脂質交換反応を用いた、表裏非対称 GUV の調製

(2) 脂質化ペプチドの合成

免疫シグナル伝達に関与する Src ファミリーキナーゼの一員である Lyn は、N 末端近傍のグリシン残基およびシステイン残基において脂質修飾を受ける。

細胞膜において Lyn は、スフィンゴ糖脂質ドメイン（脂質ラフト）の外葉に対応する内葉側に局在し、内葉に存在するスフィンゴミエリンと部分的に共局在することが報告されている[6]。Lyn は抗がん剤の標的分子としても注目されているが、細胞膜内葉の特定領域への局在およびシグナル伝達制御に関わる詳細な分子機構については、未だ不明な点が多い。

我々はこれまでに、N 末端側 7 残基に脂質修飾を施したペプチドモデルを用い、固体 NMR 法によって脂質二重層中での相互作用を解析し、Lyn がアニオン性脂質存在下においてアシル鎖を膜深部へ挿入することを明らかにしてきた[7]。本研究では、脂質分配への関与が唆される Lyn のユニークドメインのうち、N 末端側 20 残基の領域に着目し、膜環境におけるドメイン親和性を詳細に解析するための分子プローブの設計・合成を行った。具体的には、脂質修飾部位および蛍光部位を導入した新規プローブ分子の構築を目指した。

プローブ合成においては、まず位置選択的な蛍光部位導入を想定し、C 末端側にクリックケミストリーのハンドルとなるアルキン部位およびペプチド定量のための Trp 残基を組み込んだ Lyn20 残基ペプチドを、Fmoc 固相合成法により調製した。次に、N 末端 Gly 残基へのミリスチン酸導入を行い、その後、樹脂からの切り出しおよび脱保護を実施した。得られた粗生成物をエーテル沈殿および凍結乾燥した後、逆相 HPLC により精製し、目的ペプチドを単離した。

続いて、システイン残基へのパルミチン酸導入を検討した。種々の条件検討の結果、Kent らによる Native Chemical Ligation への応用報告[8]を参考に、

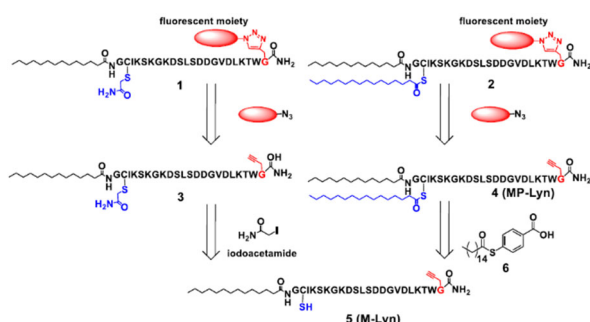


Figure 2. Lyn 蛍光ペプチドの合成経路 FmocSPPS によりアミノ酸を伸長し、N 末端にミリスチン酸部位を導入後切り出し、精製をおこなった。S パルミトイル部位はチオエステル交換反応にて導入し、蛍光部位は CuAAC により導入した。

パルミチン酸チオエステル **6** を合成し、これを試薬として用いたチオエステル交換反応を進行させることで、システイン側鎖へのパルミトイル化を達成した。さらに、銅触媒存在下でのアジド-アルキンカップリング反応 (CuAAC) を適用することにより、蛍光団の位置選択的な導入に成功した。以上の工程により、Lyn の膜相互作用を詳細に解析するための蛍光分子プローブの構築を完了した。

現在は、構築した蛍光プローブを相分離脂質組成からなる巨大単層小胞 (GUV) へ組み込み、脂質分子種依存的な液体秩序 (Lo) 相への分配挙動の解析を進めている。

(3) グルコシル化コレステロールの膜物性への影響評価

哺乳動物の細胞膜において必須の構成成分であるコレステロール (Chol) は、膜内における側方拡散および膜を横断する方向へのダイナミックな運動によって、細胞膜における動的な膜ドメイン形成を促進し、安定化する。特に、Chol が濃縮されたドメインにおける両葉間の高速な膜葉間転移 (フリップフロップ) は、膜葉間嵌合に対して大きな寄与を果たすと考えられている。近年、細胞膜上には Chol がトランスグリコシル化を受けて生成したコレステリル-β-D-グルコシド (CholGlc) が一定量存在することが報告された[9]。CholGlc はストレス応答因子として機能するとともに、神経変性疾患への関与およびリソソーム蓄積症における蓄積が報告されており[10]、その膜における挙動の解明が求められている。我々はこれまでに、Chol がグルコース修飾を受けると、脂質ドメイン形成に関与するスフィンゴミエリンとの相互作用が少し低下することを報告した[11]。本研究では、Chol のグルコース修飾が、膜葉間嵌合に重要な役割を果たす Chol のフリップフロップに与える影響を評価した。

ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC) 膜を用いたモデル系において、二重層外葉の膜秩序を選択的に反映する TMA-DPH、および新たに合成した NBD-CholGlc を含む蛍光プローブを用いて、CholGlc の膜相互作用およびそれに続く膜葉間転移を解析した。TMA-DPH 蛍光異方性の測定により、外部溶液に添加された CholGlc が膜へと組み込まれ、DOPC 膜の膜秩序を上昇させることが示された。また、TMA-DPH 異方性値の経時変化の解析から、CholGlc が両

膜葉に迅速に分布することが確認された。さらに、亜ジチオン酸ナトリウムを蛍光消光剤として用いた NBD-CholGlc の蛍光消光の時間変化の観測により、NBD-CholGlc と NBD-Chol の蛍光減衰曲線が類似した挙動を示すことが明らかとなった。この結果は、DOPC 二重層において Chol のグルコシル化がフリップフロップ速度にほとんど影響を与えないことを示すものである。以上の結果から、高速な膜葉間転移能および膜秩序上昇効果といった Chol の重要な膜特性は、親水性グルコース修飾が施された CholGlc においてもほぼ維持されていることが示された[12]。

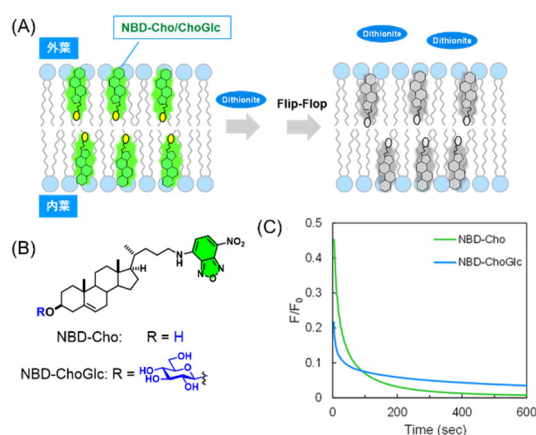


Figure 3. コレステリル-β-D-グルコシドの膜葉間転移の追跡 (A) 実験デザイン 脂質膜中にあらかじめ組み込んだ NBD 標識化 CholGlc を亜ジチオン酸 Na でクエンチする。(B) NBD-CholGlc の構造 (C) 亜ジチオン酸 Na 処理した NBD-CholGlc と NBD-Chol の蛍光減衰曲線

考察

これまでに我々は、100 nm 程度のサイズの大型単層小胞 (LUV) における表裏非対称膜の調製に成功していた[5]。本研究では、脂質分配を顕微鏡下で直接可視化することを目的として、同調製条件を 10 μm 以上のサイズを有する巨大単層小胞 (GUV) の調製へと展開した。フィルター精製後の GUV を顕微鏡観察したところ、GUV が発見できなかった。これは、脂質交換と精製のプロセスの過程で GUV が壊れてしまった可能性が高いと考えた。そこで、ベシクル内外の浸透圧を均一化したうえでフィルター精製を行わずに実験を行ったところ、脂質交換に由来する NBD 蛍光がベシクル膜上に観測され、脂質交換の進行が確認された。しかしながら、亜ジチオン酸ナト

リウム溶液添加後においても GUV 上に NBD 蛍光が相当量残存しており、脂質交換条件および GUV 精製条件のさらなる最適化が必要であることが明らかとなった。現在は、濃度条件のほか他の CD を用いて実験を行っている。

Lyn ペプチドモデルの合成については、これまで固相上において N 末端およびシステイン側鎖への 2 本のアシル鎖導入を行ってきた。しかし、反応収率および樹脂からの切り出し条件における安定性の観点から、今回は大阪大学蛋白質研究所・北條裕信教授のご指導のもと、合成経路を変更した。具体的には、N 末端へのミリストイル鎖のみを固相上で導入し、切り出しおよび脱保護を行った後に、S-パルミトイル鎖を官能基(SH)選択的に導入する経路を採用した。現在は合成したペプチドを対称 GUV へ導入した系で実験を進めている。今後は、非対称膜の内葉に存在するペプチドのみを選択的に観測するため、外葉の蛍光分子を除去する必要がある。そこで、還元条件下で切断可能なジスルフィド (SS) リンカーを介して蛍光部位を導入するプローブ設計への変更を検討している。

CholGlc の高速な膜葉間転移は、その生理活性とも密接に関連している可能性がある。これまでの知見によれば、CholGlc はリソソーム内腔に存在する GBA1、あるいは小胞体などに局在する GBA2 によるトランスグルコシル化反応を介して生合成される[13]。生合成された CholGlc は、親水性のグルコース頭部基を有するにもかかわらず、膜葉間転移を介して細胞膜の両葉へと迅速に拡散・分布する可能性が高いと考えられる。一方、CholGlc はスフィンゴミエリンとの相互作用が Chol と比較してやや低下することが報告されており[11]、これによりドメイン内の脂質秩序や Chol を介した膜葉間嵌合状態が低下する可能性も示唆される。さらに、CholGlc はアミロイド線維形成を促進することが知られており、現在我々は α-シヌクレインを対象として CholGlc による線維形成促進効果を定量的に評価する実験を進めている。

参考文献

1. Q. Lin, E. London *Biophys. J.* **2015**, 108, 2212–2222.
2. G.-S. Yang, A. Wagenknecht-Wiesner, B. Yin, P. Suresh, E. London, B. A. Baird, N. Bag, *Biophys. J.* **2024**, 123, 2256–2270.

3. M. Doktorova, F. A. Heberle, B. Eicher, R. F. Standaert, J. Katsaras, E. London, G. Pabst, D. Marquardt *Nat. Protoc.* **2018**, 13, 2086–2101.
 4. M. Kinoshita, et al. *J. Cell Biol.* **2017**, 21, 1183–1204.
 5. H. Watanabe, S. Hanashima, Y. Yano, T. Yasuda, M. Murata *Langmuir* **2023**, 39, 15153–15408.
 6. T. Mori, et al. *Sci. Rep.*, **2024**, 14, 16872.
 7. S. Hanashima, K. Mito, Y. Umegawa, M. Murata, H. Hojo *Org. Biomol. Chem.* **2022**, 20, 6436–6444.
 8. E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6640–6646.
 9. H. Akiyama, S. Kobayashi, Y. Hirabayashi, K. Murakami-Murofushi *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, 441, 838–843.
 10. R. Franco, J.A. Sánchez-Arias, G. Navarro, J. L. Lanciego *Front. Neuroanat.* **2018** 12, 52.
 11. S. Hanashima, N. Fukuda, R. Malabed, M. Murata, M. Kinoshita, P. Greimel, Y. Hirabayashi. *BBA Biomembr.* **2020**, 183496.
 12. S. Hanashima, T. Asahina, R. Malabed, K. Sasaki, M. Murata *BBA - Biomembranes*, **2025** 1867, 184422.
 13. A.R.A. Marques, et al. *J. Lipid Res.* **2016**, 57, 451–463.
- of inner and outer leaflet lipids in asymmetric model membranes and exosome membranes, RSC Faraday Discussion London, 2025 年 4 月
2. 浪花剛史、佐々木克聡、花島慎弥 植物糖脂物のコア構造となるイノシトールホスホセラミドの合成 日本農芸化学会 2025 年度 関西・中四国・西日本支部合同大会 岡山 2025 年 9 月
 3. 佐々木 克聡、岸 水際、村田 道雄、花島 慎弥 インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ 細胞外ドメインとガングリオシド GM3 糖鎖の相互作用解析 第 44 回日本糖質学会年会 青森 2025 年 10 月
 4. 花島 慎弥、岸 水際、佐々木 克聡、佐藤 祐介、村田 道雄 ガングリオシド GM3 とインテグリン細胞外ドメインの相互作用解析 日本農芸化学会 2026 年度大会 京都 2026 年 3 月

誌上発表

1. Shinya Hanashima, Takafumi Asahina, Raymond Malabed, Katsuaki Sasaki, Michio Murata Effect of glucosylation for the vertical movement of cholesterol in bilayer membranes *BBA - Biomembranes*, **2025** 1867, 184422.
2. Shinya Hanashima, Migiwa Kishi, Katsuaki Sasaki, Yusuke Sato, Michio Murata SPR interaction analysis of GM3 glycan with the integrin $\alpha 5 \beta 1$ head domain *Glycoconj. J.* **2026**, 43, 5.

研究の発表

口頭発表

1. S. Hanashima, H. Watanabe, T. Yasuda, Y. Yano and M. Murata, Observation of distribution and dynamics