1D09

脂質二分子膜の加水分解反応に伴う界面構造解析

（北海道大学・触媒化学研究センター）○叶　深，呉恒良，葛愛民，大澤雅俊

【序】脂質二分子膜と種々の機能性分子との相互作用過程を解明することは，細胞膜の機能発現を理解する上で極めて有用である．ホスホリパーゼ(PLA_2)という酵素分子は，リン脂質分子の不斉炭素に接するエステル結合の加水分解反応を選択的に触媒することが知られているが[1], 分子レベルで膜表面での反応機構はまだ解明されていない．本研究では，PLA_2 によるリン脂質分子の加水分解に伴う脂質二分子膜の構造変化について，界面分子の構造と配列に極めて敏感である和周波発生(SFG)振動分光法と原子間力顕微鏡(AFM)などのその場計測技術を駆使し調べ，該酵素反応の速度論と反応機構の解明を目指している．

【実験】リン脂質分子はジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)を用いた．脂質二分子膜は，ラングミュアーブロジェット(LB)法により基板表面に作製し，溶液中に浸漬したままその場で測定した[2-3]．脂質分子の不斉炭素に隣接するエステル結合の加水分解反応において，**L** 型リン脂質分子のみと触媒作用する PLA_2 の立体選択の特性を利用し，**L/L** 型二分子膜のほかに，**L/D**，**D/L**，**D/D** 及びラセミ型 **LD/LD** 二分子膜の PLA_2 触媒する加水分解に伴う膜表面の構造変化についてその場追跡した．SFG 分光測定は，当研究室に構築されているブロードバンド SFG 分光測定システムで行われた[2,3]．その場 AFM 測定は，Aglient 5500 を用いてタッピングモードで行われた．すべての測定は 5mM Ca^{2+}を含むトリス緩衝溶液(pH 8.9)中で行われた．

【結果と考察】まず， L-DPPC のみからなる **L/L** 二分子膜の加水分解過程についてSFG 測定により調べた[3]. 酵素が導入された最初の約 10 分間では DPPC 分子末端メチルの非対称伸縮のピークが減少したが，対称伸縮のピークが殆ど変化していなかった．これは PLA_2 の導入に伴い，DPPC 分子の再配向によるものと考えられる．その後，二分子膜からの SFG 信号が急速に減衰し, 約 30 分後ほぼ消失した．このことから，PLA_2 による加水分解過程は「誘導と加速」といった二段階で進行することが示唆された．そして，PLA_2 は二分子膜表面に吸着し，脂質分子を最適な構造に再配向させてから，反応が一気に加速されたものと予想される．

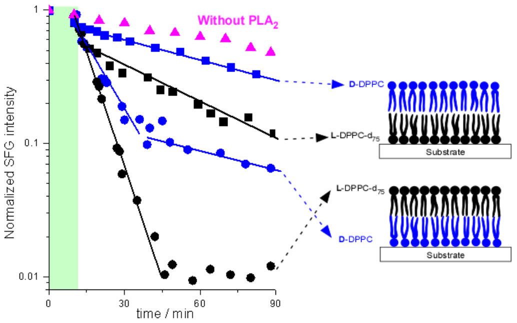

Figure 1. Time-dependent SFG peak intensities for **D/L** and **L/D** DPPC bilayers after PLA_2 introduction.

この加水分解過程の反応機構を詳細に検討するために，PLA_2 の高い立体選択性を利用し，キラリティが異なる DPPC 分子を積層した二分子膜を構築し，PLA_2 による触媒反応過程を追跡した(図 1)[3]．上層に **D**(反応性なし)と下層に **L**(反応性あり)を積

層した脂質二分子膜(**D/L** と記)の場合，上層と下層からの SFG 信号がゆっくり減衰し，基本的に PLA_2 酵素が存在しない場合に近い挙動を示した．これは脂質二分子膜の加水分解の速度が遅く，SFG 信号の低下は主に脂質分子のフリップ･フロップが関与するものと考えられる．一方，**L/D** 積層膜では，酵素が導入されると同時に，**L** 層と **D** 層の SFG 信号ともに速く減衰し，**L**-DPPC 由来の SFG 信号が先に消失し，**D**-DPPC 由来の SFG 信号の減衰速度が小さくなる．PLA_2 に触媒される二分子膜の加水分解反応は膜の表面層から始まり，その生成物が表面から脱離すると同時に，下層にある分子が表面層に反転し，**D/D** 二分子層を形成するために，その信号強度が減少すると示唆される．上層の **L**-DPPC が少なくなると，**D**-DPPC の反転も起こりにくくなるので，減少速度が低下する．また，この反応に伴う酵素の吸着状態についても SFG 測定によって観測されている[3].

一方，加水分解に伴う膜表面の形状変化や反応サイトに関する情報が，SFG 測定から直接に得られないので， AFM 観察により膜表面の形状変化についてさらに調べた．図 2 には，**L/L** 二分子膜の加水分解反応に伴い観測された AFM 結果を示す．LB 法で作製された二分子膜の表面に深さが DPPC 分子の長さの二倍（～5nm）に相当する穴が観測され，膜形成の際にできた欠陥だと考えられる．酵素を導入した直後，AFM イメージの変化が小さく，酵素添加した約 10 分後，これらの表面欠陥の縁からリン脂質分子の加水分解が進行するようになり，約 30 分で基板表面にある DPPC 分子が殆どなくなった．これは，SFG 測定で得られた結果と対応している．

また，二分子膜の構成方法により，二分子膜の加水分解速度が大きく異なっており，**L/L >> LD～LD/LD > D/L >> D/D** という順番で減少することが観測された．さらに，**L/D**，**D/L** と **LD/LD** の二分子膜の加水分解の最終段階において，約五割の脂質分子が表面に残ったことから，PLA_2 の高い立体選択性を示した．ここで，脂質分子の表面拡散とフリップ・フロップ運動の速度を考慮しながら，酵素とリン脂質分子との相互作用時間などのパラメーターを用い，加水分解の反応機構の説明を試みている．

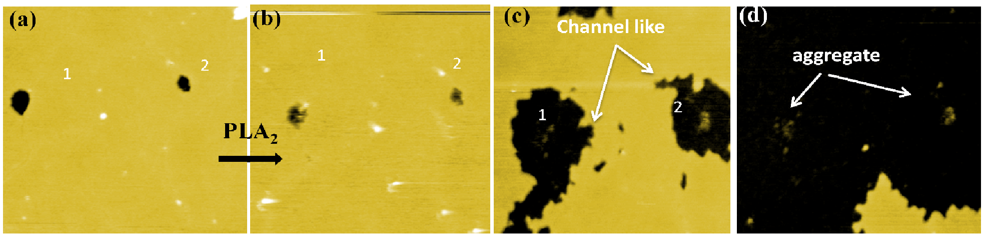

Figure 2. AFM images (1×1 μm^2) of **L/L**-DPPC bilayer (a) before and (b)-(d) 8, 15, 29 min after PLA_2 injection.

このように，SFG と AFM などの高感度の界面計測技術を活用し，擬似細胞膜表面における酵素触媒反応過程のその場追跡に成功した．今後，分子レベルで細胞膜表面における様々な反応過程への応用を目指したい．

(1) Wilton, D. In Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes; 5th ed.; Vance, D., Vance, J., Eds.; Elsevier B.V.: Amsterdam, 2008, p 305.

(2) Ye, S.; Noda, H.; Morita, S.; Uosaki, K.; Osawa, M. *Langmuir* **2003**, *19*, 2238; **2004**, *20*, 357

(3) Tong, Y.; Li, N.; Liu, H.; Ge, A.; Osawa, M.; Ye, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2319