



Title	秩序液体相におけるリン脂質の動態解析による脂質ラフト形成の分子基盤解明
Author(s)	安田, 智一
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52281
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

秩序液体相におけるリン脂質の動態解析による
脂質ラフト形成の分子基盤解明

平成 26 年度

大阪大学大学院 理学研究科 化学専攻

生体分子化学研究室

安田 智一

目次

第 1 章	序論	
1-1	生体膜	1
1-2	脂質ラフト	4
1-3	脂質ラフト研究	9
1-4	研究目的	22
第 2 章	本論 I 重水素固体 NMR による Chol 含有膜における 脂質の動的挙動解析	31
2-1	重水素固体 NMR	32
2-2	重水素標識化 PSPC の合成	36
2-3	PSPC の運動性解析および SM との比較	36
第 3 章	本論 II 蛍光実験によるマクロな膜流動性解析および 分子レベルの脂質の動態との比較	48
3-1	蛍光異方性測定	49
3-2	蛍光寿命測定	53
第 4 章	本論 III 重水素固体 NMR による 3 成分系膜における脂質の 動的挙動解析および脂質の分配比の決定	67
4-1	3 成分系 SM/Chol/DOPC (1/1/1) の動的挙動解析	68
4-2	3 成分系 PSPC/Chol/DOPC (1/1/1) の動的挙動解析	76
4-3	脂質の分配比とドメインの大きさとの相関関係	82
4-4	SM および PSPC3 成分系膜の組成比の変化	88
第 5 章	結論	96
第 6 章	実験項	100
	^2H NMR スペクトルデータ	125
	謝辞	207

略語表

^2H	deuterium
α_i	fractional amplitude
AFM	Atomic Force Microscopy
BODIPY	Boron-dipyrromethene
br	broad
Bu	Butyl
cer	ceramide
Chol	Cholesterol
CyD	Cyclodextrin
CSA	Chemical shift anisotropy
d	doublet
DHSM	Dihydro sphingomyelin
DMPC	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DPH	1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DRM	Detergent-Resistant Membrane
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DSPC	Distearoylphosphatidylcholine
ESR	Electron Spin Resonance
ESI	Electrospray ionization
Et	Ethyl
FCS	Fluorescence correlation spectroscopy
f_i	fractional intensity
FID	Free Induction Decay
FLIM	fluorescence lifetime imaging microscopy

FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FTIR	Fourier transform-Infrared spectroscopy
S ₀	gel phase
GPI	Glycosyl Phosphatidyl Inositol
GUV	Giant Unilamellar Vesicle
HIV	human immunodeficiency virus
HMPA	hexamethylphosphoric triamide
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
L _d	liquid disordered phase
L _o	liquid ordered phase
MD	Molecular dynamics
MDCK	Mardin-Darby canine kidney
Me	Methyl
MLV	Multi Lamellar Vesicle
MNBA	2-methyl-6-nitrobenzoic anhydride
Ms	Mesyl
NBD	Nitro-benzoxadiazole
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ODS	Octadecylsilyl
PC	phosphatidyl choline
PE	phosphatidyl ethanolamine
PI	phosphatidyl inositol
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
PS	phosphatidyl serine
PSM	Palmitoyl sphingomyelin
PSPC	1-palmitoyl-2-stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
Py	pyridine
REDOR	Rotational Echo Double Resonance
Rf	Rate of flow
rt	room temperature
S1P	Sphingosine-1-phosphate

S _{CD}	order parameter
SM	Sphingomyelin
SPT	Single Particle Tracking
SSM	stearoyl sphingomyelin
STED	Stimulated Emission Depletion
t	triplet
T ₂	spin-spin relaxation time
TBAF	Tetrabutyl Ammoniumfluoride
TBS	t-Butyldimethylsilyl
TCSPC	Time correlated single photon counting
THF	tetrahydrofuran
TLC	Thin-Layer Chromatography
T _m	phase transition temperature
tPA	<i>trans</i> -parinaric acid
μs	micro second

第1章 序論

1-1 生体膜

1-1-a 細胞膜の機能

全ての生物は細胞を基本単位として成り立っている。細胞内部は、様々な生命現象が起こる場となっているので、細胞膜と呼ばれる膜構造は異なる環境である細胞内外を隔てる物理的な障壁として機能している。また、細胞膜は、細胞の恒常性を維持するための反応の場としても機能している。例えば、細胞膜に埋め込まれているタンパク質は、極めて選択性の高いチャネルやポンプとして機能し、化合物やイオンを特異的に透過させる。また、各種受容体タンパク質によって、細胞間の情報伝達や生物学的エネルギー産生が行われている。このように細胞機能に重要な役割を果たしている細胞膜は、二分子膜構造を基本として構成されている。

1-1-b 細胞膜の組成

細胞膜は、脂質およびタンパク質から構成され、その組成は生物や器官によって異なる。細胞膜を構成する脂質成分の約 50%を占めるリン脂質は、疎水性の2本のアルキル鎖を有した尾部と、親水性を有した頭部から成り立っている。さらにリン脂質はグリセロリン脂質とスフィンゴ脂質に大別される。通常、グリセロリン脂質は飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸を1本ずつ有しており、極性頭部の構造は多種多様である(図 1-1a)。例えば、電荷を帯びないホスファチジルコリン(phosphatidylcholine, PC) やホスファチジルエタノールアミン(phosphatidylethanolamine, PE)、負電荷を持つホスファチジルセリン(phosphatidylserine, PS) やホスファチジリンイノシトール(phosphatidylinositol, PI) が挙げられる。一方、スフィンゴ脂質の骨格構造は、アミノ基およびヒドロキシ基を有するスフィンゴシン塩基であり、飽和脂肪酸と結合している。スフィンゴ脂質には、スフィンゴミエリン(sphingomyelin, SM)(図 1-1b)、セラミド(ceramide, cer)、スフィンゴシン、スフィンゴシン 1-リン酸(S1P) や GM1 に代表されるスフィン

ゴ糖脂質などがある。また生体膜は、脂質として強固な四環構造を有するステロールも含む。特に哺乳動物の細胞膜にはコレステロール (cholesterol, Chol) (図 1-1c) が高濃度で含まれており、その割合は細胞膜脂質の 30~40%であると推定されている。

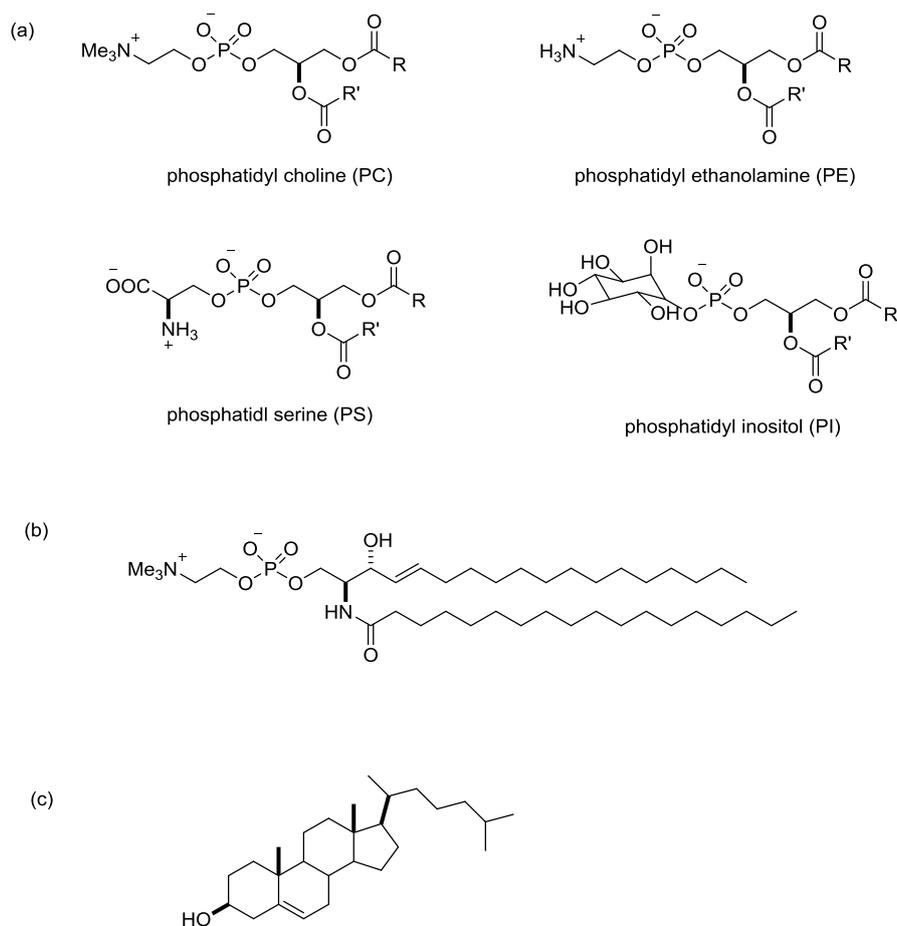


図 1-1 細胞膜を構成する代表的な脂質 (a) グリセロリン脂質 (b) スフィンゴリエリン (SM) (c) コレステロール (Chol); グリセロリン脂質は、グリセロールの C1 位と C2 位に飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸がそれぞれエステル結合している。一方、SM はアミド結合で飽和脂肪酸が結合している。コレステロールは、4つの縮環したステロイド骨格に側鎖のイソオクチル基と C3 位にヒドロキシ基を持つ。

1-1-c 流動モザイクモデル

細胞膜の代表的なモデルとして、1972年に Singer と Nicolson によって流動モザイクモデルが提唱された (図 1-2A)¹⁾。このモデルでは、リン脂質が均一に分布して流動性の高い二重膜を形成し、その中をタンパク質が二次元的に動き回っているとされている。このモデルは現在でも広く受け入れられているが、脂質膜が単に膜タンパク質の媒質としてしか考慮されず、生体膜の脂質の多様性は全く無視されていた。生体膜を構成する脂質の種類は、頭部構造、結合したアシル鎖長、不飽和度の違いを含めると、リン脂質だけでも数千種類に及ぶ。その脂質組成は、細胞種や臓器によって異なることはもちろん、1つの細胞内でも機能や役割によって構成成分は異なっている。また、流動モザイクモデルでは、生体膜の外葉と内葉でも脂質組成が著しく異なっていることも考慮されていない。一般的に、内葉には PI やアミノ基含有リン脂質である PE や PS が多く存在するのに対し、外葉には PC やスフィンゴ脂質が多く存在している^{2,3)}。この脂質分布の非対称性は、生体内の能動輸送によって厳密に維持されている⁴⁾。このように、生体膜中の脂質分子は膜平面上に一様に分布していないことから、脂質分布には偏りがあり、特定の成分が集まって細胞の形態や機能を制御するマイクロドメインを形成しているという新たな考えが生まれてきた (図 1-2B)⁵⁾。

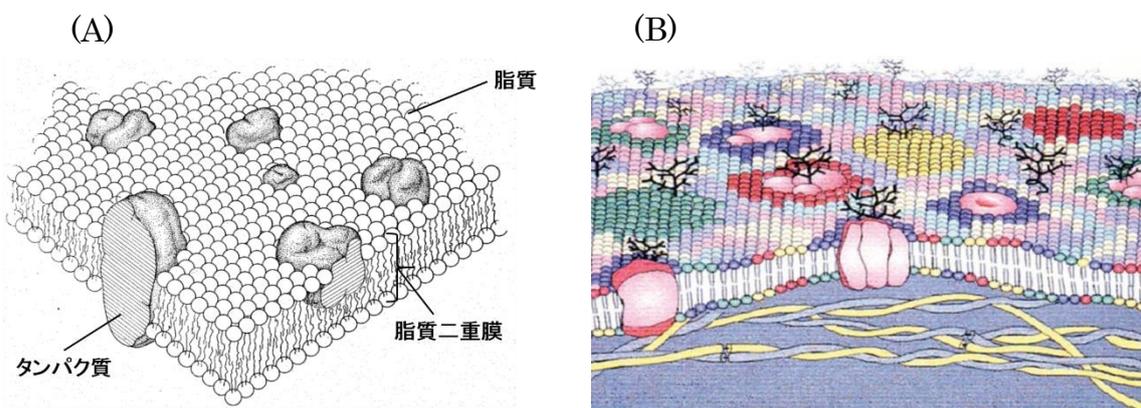


図 1-2 (A) 流動モザイクモデル¹⁾ Reprinted with permission from *Science* 1972, 175, 720-731. Copyright © (1972) The American Association for the Advancement of Science.

(B) 新たな生体膜モデルの代表例⁵⁾ Reprinted with permission from *J. Cell. Mol. Med.* 2008, 12, 829-875. Copyright © (2008) John Wiley and Sons.

1-2 脂質ラフト

1-2-a 脂質ラフト

1988年、Simonsらにより、イヌ腎臓上皮（MDCK）細胞において脂質分子が細胞膜の外葉および内葉で非対称に分布していることが明らかとされた⁶⁾。同時期にMDCK細胞に界面活性剤TritonX-100を作用させることで、スフィンゴ脂質やChol、GPIアンカー型タンパク質を豊富に含んだ不溶性画分（detergent-resistant membrane, DRM）が得られることが見出された⁷⁾。また、SMとCholを等モル量含んだモデル膜においても同様の結果が得られた⁸⁾。

これらの知見を総合的に検証し、1997年にSimonsらは、細胞膜上において選択的に集合した脂質がドメインを形成することで不均一な膜構造をとっているという仮説を提唱した⁹⁾。その特異的な膜構造は、「細胞膜という海に特定の脂質およびタンパク質が凝集した状態で浮かんでいるいかだ」であるとして、「脂質ラフト」と名づけられた（図1-3）。以来、生化学的解析や物理化学的手法によって脂質ラフトに関する研究が数多く報告され、2006年のKeystone symposiumでは、脂質ラフトは「直径10-200 nmの大きさで、ステロールとスフィンゴ脂質に富む不均一でダイナミックかつ細胞プロセスを区画化するドメイン」であると定義された¹⁰⁾。近年では、ラフトの大きさや寿命などラフトの定義に関する新たな報告が盛んに行われている。しかしながら、生体膜中の脂質ラフトの正確な定義はまだなされておらず、今でも議論は続いている¹¹⁾。

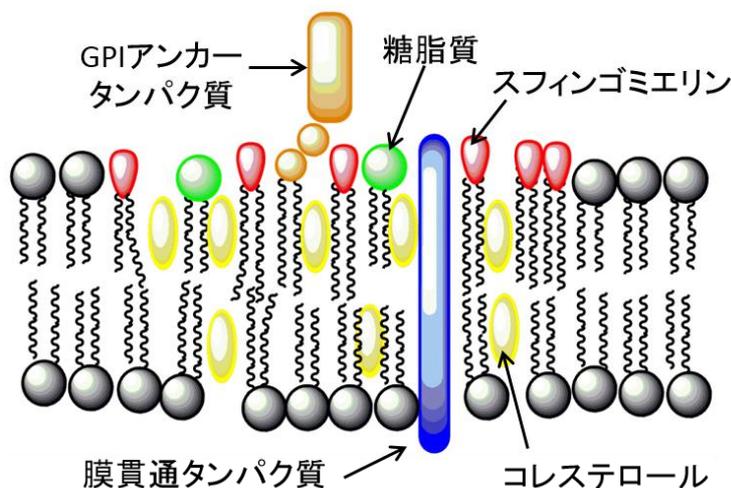


図 1-3 脂質ラフトの概略図

脂質ラフトは主にスフィンゴ脂質（糖脂質や SM）と Chol で構成され、スフィンゴ脂質同士、あるいはスフィンゴ脂質と Chol 間の比較的強い相互作用によって形成されると考えられている。スフィンゴ脂質と Chol 分子間では、水素結合だけでなく、van der Waals 及び疎水的相互作用が働き、Chol がスフィンゴ脂質間の隙間を埋めるように存在することでドメインの構造を保持していると考えられている。またこのドメインには GPI アンカータンパク質や Src ファミリーキナーゼなどのシグナル伝達に関わるタンパク質、膜レセプターやチャネルタンパク質、細胞接着分子など数多くのタンパク質が局在していることが報告されている。この脂質ラフト仮説によって、選択的な膜輸送やシグナル伝達のプラットフォーム^{12,13})といった膜機能の動的プロセスには、膜タンパク質だけでなく膜を形成する脂質も重要であることが示唆されている。例えば、Chol は高濃度に集積することによって、膜の流動性の低下や膜厚の増加を引き起こし、タンパク質機能に影響を与える。このように、ラフトに特定の分子を集積させることの生理的意義として、ラフトへの親和性の違いからシグナル伝達の効率を上げることやシグナル強度の微調整ができること、異なる伝達経路との混線を防ぐことが挙げられる。

脂質ラフトは細胞内小胞輸送や免疫応答¹⁴)などの生理的機能に関与している¹⁵)。また、インフルエンザや HIV などのウイルス感染^{16,17})、ガン¹⁸⁻²⁰)、アルツハイマー病^{21,22})やプリオン病^{23,24})など様々な疾病にも関連していることが報告されている。したがって、疾病のメカニズム解明やラフトを標的とする薬物の開発につなげるため、脂質ラフトの実体解明を目指す研究が医学・薬学的においても盛んに行われている。

1-2-b 脂質ラフトの特徴

i) 界面活性剤不溶性

脂質ラフト説が提唱された発端として、界面活性剤 Triton-X 100 を用いた低温下での界面活性剤不溶性実験がある。細胞膜を低温下で Triton-X100 処理し、シヨ糖濃度勾配にて超遠心を行うと、低密度のフラクションに TritonX-100 不溶性画分が得られる^{7,25)}。一般に不飽和脂肪酸を持ち、相転移温度が低いグリセロリン脂質は界面活性剤に可溶であるのに対し、相転移温度が高いスフィンゴ脂質は界面活性剤不溶性である。このことから、DRM は脂質ラフトの脂質組成を反映していると考えられている。これまでの DRM の分析結果では、Chol は全脂質中の 30~50%、SM は 10~15%、糖脂質は 10~20%含まれている²⁶⁾。一方、全脂質中で約 60%存在している PC や PE といったグリセロリン脂質は DRM 中に 30%以下しか含まれていない。またこの画分には膜貫通タンパク質などのシグナル伝達物質も含まれている²⁷⁾。この方法は生化学的に脂質ラフトを分析するのに有効であるとされてきた。

しかしながら、近年 DRM と実際の生体膜に存在する脂質ラフトとを単純に同一視することはできないという考えが広まってきた²⁸⁾。例えば、DRM は細胞膜を低温下で界面活性剤処理することで得られるため、生理的条件下 (37 °C) でも同様に不溶性画分がラフトとして存在しているかは疑問の余地がある。また、この手法では界面活性剤が膜の再編成を行うため、ドメインが界面活性剤を加える前から存在していたのか、界面活性剤によって形成されたのか判断できないという問題点がある^{29,30)}。

このような問題点を踏まえて、現在では、界面活性剤に対して不溶性を示すこと自体はラフトの特徴であるが、実験操作上で得られる DRM と実際の生体膜に存在する脂質ラフトは異なる 2 つの概念であると認識されている。

ii) 秩序液体相

脂質ラフトの特徴として、周囲の膜とは異なる特殊な相状態である点が挙げられる。一般的にスフィンゴ脂質のような長鎖で飽和な炭化水素鎖を有するリン脂質のみで構成された膜は、室温ではゲル相 (gel phase, S_0) という状態をとる。ゲル相では、疎水部分の炭化水素鎖が互いに疎水的分子間相互作用がしやすいようにオールトランスに近い配座をとって伸長している。そして、分子同士が密にパッキングし、側方拡散運動は抑えられている (側方拡散係数 $D = 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$)。ただし、長軸周りの軸回転運動は可能である。

しかし、ある特定の温度以上になると脂質膜の物理的性質が劇的に変化する。この温度は相転移温度 (phase transition temperature, T_m) と呼ばれ、脂質の炭化水素鎖の長さや不飽和度に依存する。この温度以上では炭化水素鎖が *anti* 配座以外にも *gauche* 配座を取るようになるため、ゲル相のように密にパッキングすることができず分子間相互作用が弱くなる (図 1-4)。このような状態を無秩序液体相 (liquid disordered phase, l_d) もしくは液晶相 (liquid crystalline phase) と呼び、脂質分子は無秩序に配列し、側方拡散運動や軸回転運動などが盛んに行われている (側方拡散係数 $D = 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$)。また、不飽和炭化水素鎖を持つ脂質の場合は、*cis* 二重結合のアシル鎖の折れ曲がりにより密にパッキングすることが難しいため T_m は低く、室温でも液晶相をとっている。実際の生体膜においても、不飽和なグリセロリン脂質が豊富に存在していることから、膜の大部分の相状態は液晶相であると考えられる。

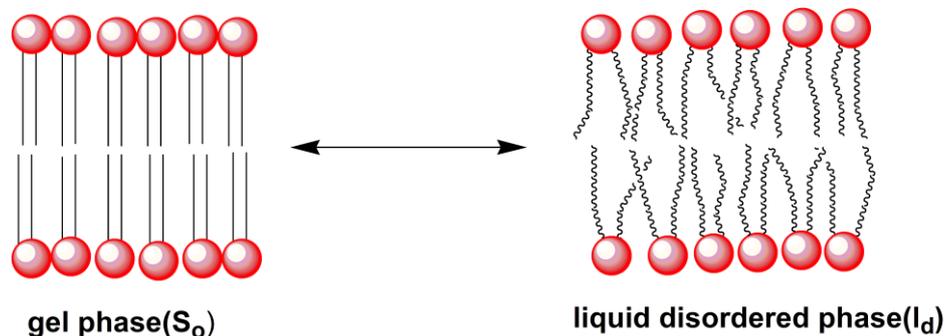


図 1-4 脂質二重膜のゲル相および液晶相の模式図

これに対し、脂質ラフトではスフィンゴ脂質以外に Chol が高濃度で存在している。Chol はヒドロキシ基を水相に向け配向し、脂質分子間に位置しているため、リン脂質がゲル相のように炭化水素鎖の間で相互作用することができなくなる。しかしながら Chol によって隣接する脂質の炭化水素鎖の立体配座が固定されるため、ゲル相に近いほぼオールトランスの配座をしている。そのため Chol のステロイド骨格とスフィンゴ脂質の炭化水素鎖間で疎水的相互作用が働きやすくなり、互いに強くパッキングされている。一方でゲル相のように規則正しく配列した脂質分子の格子を取ることができないため、流動性は液晶相と同程度になる（側方拡散係数 $D = 5 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ ）。このように、脂質ラフトでは脂質の炭化水素鎖の動きは制限されているものの、脂質分子自身の側方拡散運動は速い。この相状態のことを秩序液体相（liquid ordered phase, l_o ）といい（図 1-5）、ゲル相と液晶相の間のような性質を持っているため、明確に物理的性質が変化する相転移温度は存在しない³¹⁾。

この秩序液体相という相状態は脂質ラフトの特徴であるため、スフィンゴ脂質の存在も重要であると考えられるが、2本の飽和脂肪酸を持つ相転移温度の高い PC のようなグリセリン脂質に Chol を添加した膜においても秩序液体相は形成される。基本的には、室温で液晶相である不飽和リン脂質であっても、過剰の Chol が共存していれば秩序液体相は形成される³¹⁾。つまり、脂質ラフトの定義であるスフィンゴ脂質の存在は、相状態という観点では必ずしも必要ないといえる。実際、多くの脂質ラフト研究で、飽和リン脂質で相転移温度も近い、DPPC から構成される脂質膜を脂質ラフトのモデル膜として用いられている。

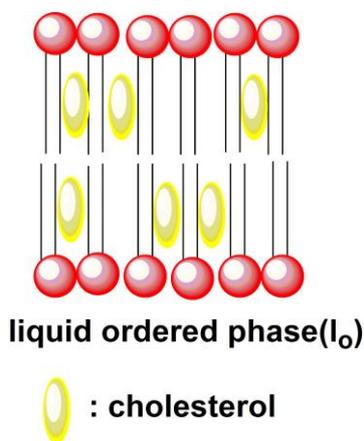


図 1-5 秩序液体相の模式図

1-3 脂質ラフト研究

1-3-a SM の特異的な構造に着目した物理化学的実験

前述のように、脂質ラフトを構成するスフィンゴ脂質の一種である SM と同様のヘッドグループ構造を持つ PC は、Chol によって共に脂質ラフトに特徴的な秩序液体相をとる。しかしながら、実際の脂質ラフトには PC ではなく、SM が豊富に含まれ、後述のように PC よりも SM のほうが Chol との親和性が高いと言われている^{32,33})。この違いは SM の特異的な構造 (図 1-6) に由来すると考えられている。そのため、様々な物理化学的手法によって、SM の特異的な構造に着目した SM-Chol 分子間相互作用の解析が行われてきた。

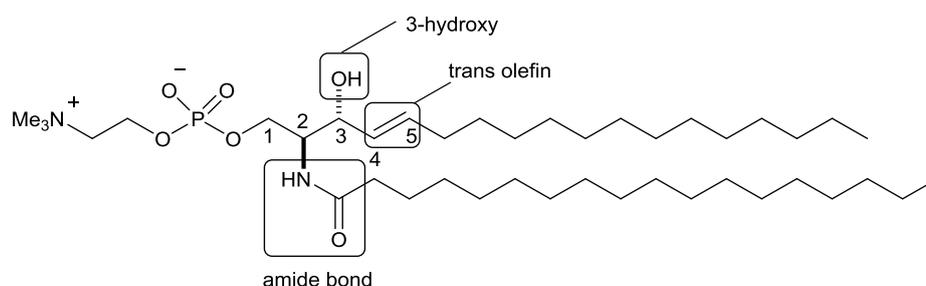


図 1-6 スフィンゴミエリン (SM) の特異的な構造

SM の骨格構造はスフィンゴシン塩基であり、3 位にヒドロキシ基、4-5 位にトランスオレフィンをもっている。C2 位と C3 位の立体化学は D-エリスロ体(2S, 3R)で、C2 のアミノ基と飽和脂肪酸がアミド結合によって結合している。

図 1-7a の上段に示す 3 位のヒドロキシ基をメトキシ基 (3-OMe-*N*-stearoyl SM) および水素 (3-deoxy-*N*-stearoyl SM) に置換した SM は、単分子膜の表面圧測定から得られる平均分子面積やコレステロールオキシダーゼによる膜中の Chol の酸化率が通常の SM と違いがなかった³⁴)。また、ベシクル間の Chol 交換速度も 30%しか減少しなかったため³⁵)、SM3 位のヒドロキシ基は SM-Chol 分子間相互作用には大きく関与しないことが示された。しかし、DPH 蛍光異方性測定や β-シクロデキストリン (β-CyD) による Chol の引き抜き実験では、メトキシ体から成る膜のオーダーは上昇せず、ステロール豊富なドメインを形成

しにくいことが示された。つまり、この結果は、SM3位のヒドロキシ基がCholとの相互作用にとって重要であることを示唆している³⁶⁾。

また、アミド結合を置換したSM (図 1-7a 下段) を用いて、SM-Chol 分子間相互作用解析が行われてきた。エステル結合に置換したSM誘導体(3-deoxy-2-O-stearoyl SM)の膜中では、3-deoxy-N-stearoyl SMで形成した膜に比べてCholの酸化速度が速かった³⁷⁾。また、蛍光異方性測定やCholの引き抜き実験より、Nメチル化体が通常のSMに比べてCholとの相互作用は弱い、形成するドメインは安定であると示された。これらは、SMのアミド結合がSM-Chol分子間相互作用に重要であることを示唆している。同時にNメチル化体の相転移温度がメトキン体や両方メチル化されたSMより低いため、アミドの水素原子がSM分子間の相互作用においても重要であることが示唆された³⁶⁾。

また、4-5位間トランスオレフィンに関しては(図 1-7b)、二重結合が還元されたdihydroSM(DHSM)を用いて、表面圧測定、示差走査熱量測定(DSC)、蛍光異方性測定、蛍光消光実験が行われた。その結果、DHSMの分子間水素結合は通常のSM同士よりも強くなる一方、分子内水素結合は弱くなることが明らかとなった³⁸⁾。また、DHSMのCholとの親和性は通常のSMよりも高く、より堅くて安定なドメインを形成することが示された^{39,40)}。一方、オレフィンのcis-trans異性体を比較すると、cis体のほうがCholの酸化率が低い、Cholの引き抜き実験からは、trans体のほうがCholとの親和性が高いことが示された⁴¹⁾。分子動力学(Molecular Dynamics, MD)計算によってもドメイン形成には二重結合の立体配置が重要であることが報告された⁴²⁾。

SMの2位および3位の立体配置に関しては(図 1-7c)、通常のD-エリスロ体に比べて、3位の立体を反転させたL-スレオ体とのジアステレオ混合物は、DSC、Cholの引き抜き実験からCholとの親和性が低下すること、蛍光異方性測定から、Cholとのパッキングが弱まることが示された⁴³⁾。一方でL-スレオ体自身は、C1-C2結合が回転運動しやすいため、D-エリスロ体と比べて相挙動は異なるが、Cholのパッキング能に違いが見られなかった⁴⁰⁾。

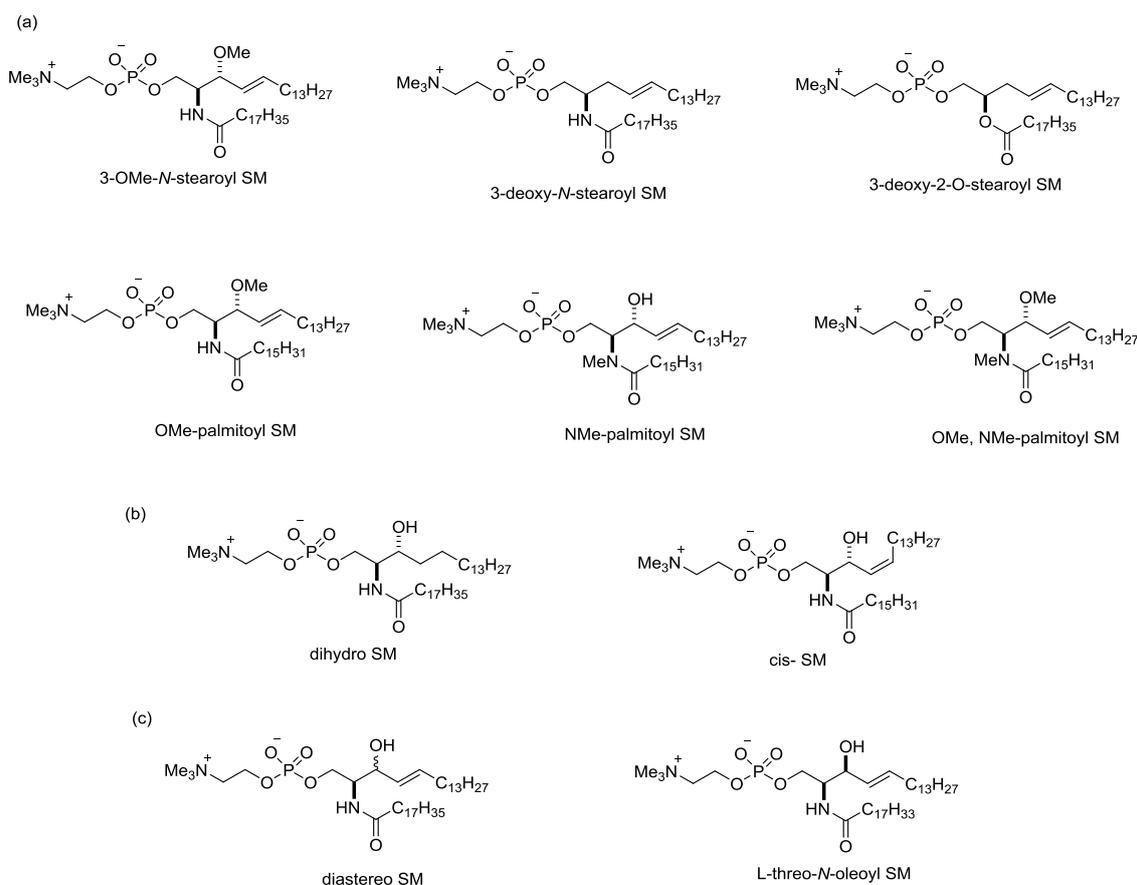


図 1-7 物理化学的手法で用いられた SM 誘導体

(a) 2 位アミド結合、3 位ヒドロキシ基を置換した SM 誘導体、(b) 4 位-5 位トランスオレフィンに着目した SM 誘導体、(c) SM の立体配置に着目した SM 誘導体

また、これらの物理化学的手法を用いて、SM 膜と PC 膜の物理的性質から Chol との親和性の違いが考察されてきた⁴⁴⁻⁴⁷⁾。例えば Chol の引き抜き実験では、アシル鎖が飽和脂肪酸の場合、PC ではアシル鎖が長くなると Chol が引き抜かれやすくなるが、SM ではその量はほぼ変化しなかった³²⁾。またアシル鎖に不飽和の脂肪酸が入るとどちらも Chol が引き抜かれやすくなるが、SM 膜のほうが PC 膜よりも Chol の安定性は 2 倍ほど高かった³³⁾。以上のことから、SM の特異的な骨格が Chol を膜内に留める能力を有し、ラフトを形成する上で重要であることが示唆される。また、アルキル鎖長やオーダーが等しい SM と PC を比較すると、SM のほうがオーダーは高く、Chol と強い親和性を示し、パ

ッキングが強いことが示された⁴⁸⁾。これは SM と PC の構造の違いによる SM-SM 分子間、SM-Chol 分子間の水素結合の影響が大きいと考えられている。実際、SM はヒドロキシ基とアミド結合を有しており、水素結合のドナーとアクセプターの両方の機能が可能である一方で、PC のエステル結合はアクセプターの役割しかない。SM-SM 分子間、SM-Chol 分子間で水素結合が形成されていることは、NMR^{49,50)}、FTIR^{51,52)}や MD 計算⁵³⁻⁵⁶⁾によって示唆されている。

また、NMR や MD 計算から、SM と PC は同じヘッドグループ構造 (ホスホコリン) を有しているが、2 つの配向は異なり、PC のヘッドグループは膜平面に対して平行であるのに対して、SM のヘッドグループは膜平面に対して 15° 傾いていることが報告されている^{56,57)}。これは SM のヘッドグループが Chol を膜外に出ないように覆っていることを示唆しており (umbrella 効果⁵⁸⁾)、SM のコリン部と Chol のヒドロキシ基間で charge-pair 相互作用が働きやすいことを示している⁵⁹⁾。

このように、物理化学的手法によって Chol は PC より SM との親和性が高いことが示されている一方で、Chol との相互作用に関して SM と PC に違いが見られないという報告や、SM-Chol 分子間に水素結合による特異的な相互作用が見られないという報告もある^{59,60)}。このように多様な結論が導き出されているのは、Chol との相互作用について SM と PC の詳細で体系的な比較が不十分なためである。また、生物物理的実験では、SM 特異的な構造に着目した解析が行われているが、膜内部に存在するフレキシブルなアルキル鎖についてはあまり注目されていない。膜中の Chol との相互作用をみていく上で、その運動性や構造を調べることは重要である。さらに、蛍光異方性測定や蛍光消光実験、DSC や表面圧測定のような物理化学的手法で得られる情報は、あくまでも膜全体の物理的性質に由来するものであるため、構成する脂質の分子レベルの情報を直接取得することに至っていない。

1-3-b 膜内部のリン脂質アルキル鎖に着目した重水素固体 NMR

前節のとおり、脂質ラフトのモデル膜の物理的性質の測定は数多く行われているが、脂質の動態を分子レベルで解析することは非常に困難であるため、未だ明らかにされていないことが多い。脂質二重膜のような生体膜試料は、非結晶性や異方的環境であることから、分子の構造解析に用いられる X 線結晶構造解析や溶液 NMR は適用困難である。そこで、膜サンプル中の脂質分子のダイナミクスや構造を感度良く測定できる固体 NMR が汎用されてきた。特に、スピン量子数 $I = 1$ である重水素を観測核とする重水素固体 NMR (^2H NMR) は、 $10^{-4} \sim 10^{-6}\text{s}$ の相関時間の分子運動を感度良く検出でき⁶¹⁾、測定で得られる四極子分裂の大きさから分子の配向と運動性の情報が得られる。

この ^2H NMR は、脂質ラフト説が提唱される以前から、モデル膜中のリン脂質のアシル鎖のダイナミクスや構造、Chol のオーダー効果を調べる手法として用いられてきた⁶²⁻⁶⁵⁾。 ^2H NMR で得られる四極子分裂幅によって、脂質分子の重水素標識部位の挙動をオーダーパラメーター S_{CD} として評価することが可能である。さらに、このオーダーパラメーターから、脂質のアルキル鎖長や平均分子面積、また膜厚や相状態といった脂質膜の物理的性質まで解析することもできる⁶⁶⁾。

これまで、生体膜で最も多く含まれているグリセロリン脂質の一種で 2 本のアルキル鎖が共に飽和脂肪酸である DMPC (Dimyristoyl phosphatidylcholine) や DPPC、DSPC (Distearoyl phosphatidylcholine) と Chol で形成した秩序液体相のモデル膜を用いて、リン脂質の動的挙動が解析されてきた^{63,65,67-70)}。例えば、DMPC のアルキル鎖を全重水素標識した DMPC- d_{54} を用いて、DMPC のみの膜と 50 mol% Chol を含む膜で四極子分裂幅の大きさを比較した (図 1-8)⁶⁷⁾。その結果、Chol を含んだ膜の分裂幅が増加することが示された。さらに、分裂幅を各炭素に割り当てて求めた S_{CD} の推移から、アシル鎖の付け根ほどその増加量は大きく、末端になるほど小さくなることも示された。Chol はリン脂質のアシル鎖をパッキングさせ、アシル鎖内の *anti* 配座の割合を増加させることで、鎖長さらには膜の厚さを増加させていると考えられた。また、温度が上昇するにつれてアシル鎖の S_{CD} は減少していくこと、膜中の Chol の割合が上昇するにつれて S_{CD} は増加していくことが示された⁶⁸⁻⁷⁰⁾。

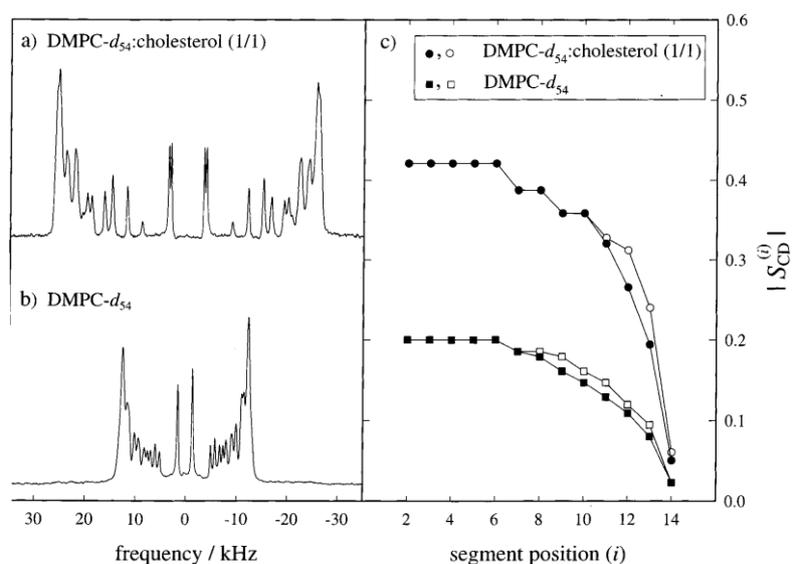


図 1-8 ^2H NMR による DMPC- d_{54} の動的挙動解析⁶⁷⁾

(a) DMPC- d_{54} /Chol (1/1) (b) DMPC- d_{54} の四極子分裂幅 共に配向膜サンプル 40 °C で測定 (c)アシル鎖の各炭素部位におけるオーダーパラメーター S_{CD} (●,■は sn-1 鎖、○,□は sn-2 鎖) Reprinted with permission from *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **1999**, *158*, 281–298. Copyright © (1999) Elsevier.

このように、これまでグリセリン脂質を用いた動的挙動解析は数多くなされてきたが、脂質ラフト説が提唱されて以降、重水素標識 SM を用いて ^2H NMR を測定した報告も増えつつある⁷¹⁻⁷³⁾。Brown, M. F.らは Palmitoyl-SM (PSM)- d_{31} を用いて Chol の割合を 15、20、25、33 mol% と変化させて ^2H NMR を測定した (図 1-9A)⁷³⁾。PC と同様に、Chol を膜中に含むと分裂幅の増加が観測され、アシル鎖末端にいくほどオーダーが減少するという結果が示された。また、膜中の Chol の割合が上昇するにつれて、分裂幅の増加量が上昇する点も同様であった。

しかしながら、 ^2H NMR を用いた脂質膜研究の多くは、アルキル鎖を全重水素標識したリン脂質を用いているため、複数の四極子分裂幅が重なり合ってしまう、解析を困難にしていた。実際、全重水素標識体で観測された分裂幅の帰属は、Chol 存在下においても分裂幅は膜界面から末端に向けて単調に減少するという仮定に基づいて行われ、正確な分裂幅の帰属ができていない懸念があった。また、アルキル鎖のメチレンが全て重水素標識されているため重水素による同

位体効果が影響し、形成される脂質膜の化学的・物理的性質が本来の生体膜の性質とは異なる可能性もある⁷⁴⁾。これまでアルキル鎖を選択的に重水素標識した脂質を使った研究例は数えるほどしかなく^{63,68,75)}、特に SM に関しては膜界面部分しか標識されていなかった^{50,72,77,78)}。

そこで、修士課程時に、脂質ラフトのモデル膜内部の SM の局所的な動的挙動や Chol のオーダー効果を詳細に評価することに取り組んだ。具体的には、膜内部に位置する SM の 2 本のアルキル鎖の各々の炭素に位置選択的に重水素を導入した 14 種類の stearoyl-SM (SSM) を合成し、²H NMR を測定した⁷⁸⁾。その結果を膜界面部の SM の分裂幅と合わせて解析すると、分裂幅の推移はこれまでの報告とは異なり、Chol はアルキル鎖中央部のオーダーを最も増加させることが明らかになった^{78,79)} (図 1-9)。

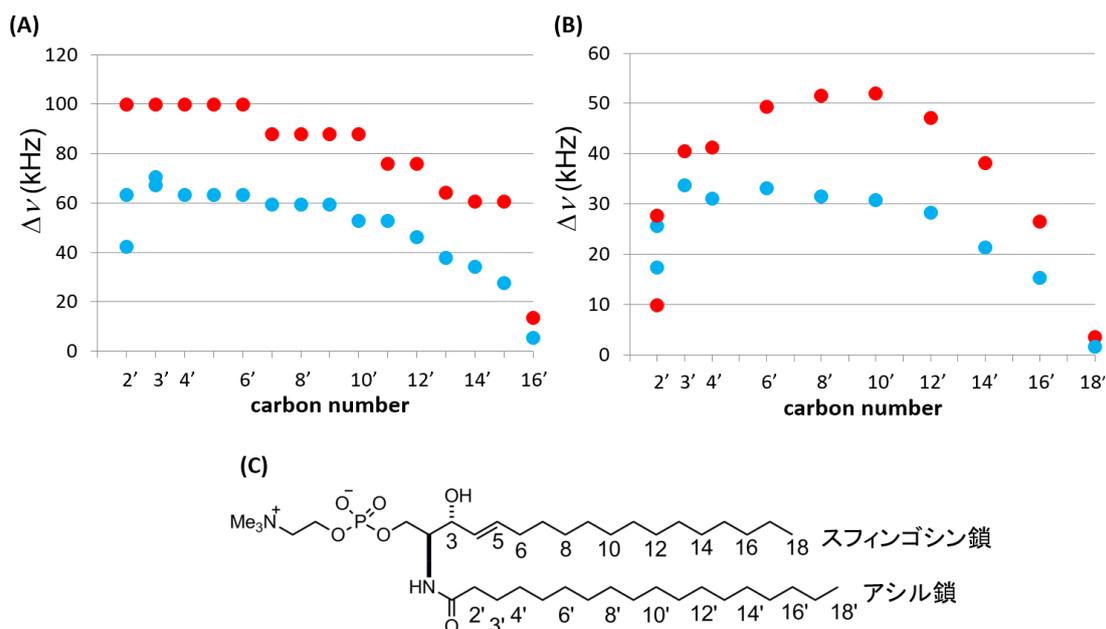


図 1-9 (A) アシル鎖全重水素標識 SM の四極子分裂幅⁷³⁾

● PSM-*d*₃₁/33 mol% Chol, ● PSM-*d*₃₁、配向膜、45 °C

(B) 位置選択的重水素標識 SM の四極子分裂幅^{78,79)}

● *d*₂-SSM/50 mol% Chol, ● *d*₂-SSM、リポソーム、45 °C

(C) 位置選択的重水素標識 SSM

数字を示す箇所に選択的に重水素を導入した。

また、Chol を含有することによる SM スフィンゴシン鎖 (図 1-10A) とアシル鎖 (図 1-10B) のオーダーの上昇から、Chol が SM の 2 本のアルキル鎖に対して同等に相互作用することが示された。さらに、2 本のアルキル鎖は炭素数 2 のずれではほぼ同じ分裂幅の値であることから、メチレン 2 個分の長さでミスマッチしていることが示された (図 1-10C)。このように、位置選択的に重水素を導入した脂質を用いた解析は、膜内部の分子の局所的な挙動を重水素というマーカーによってメチレンユニット単位で得られる点で、従来の全重水素標識体による報告より優位であると判断した。

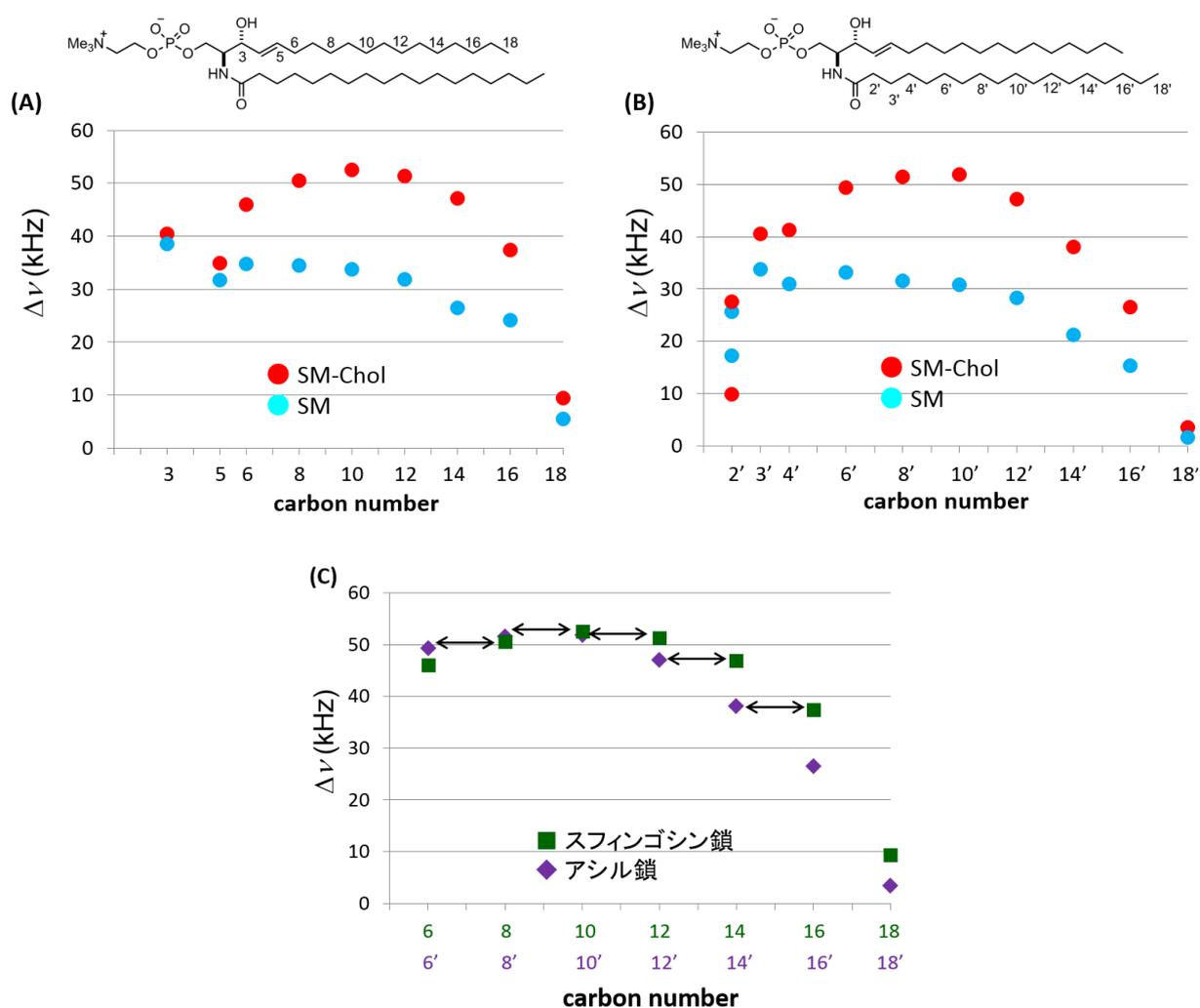


図 1-10 (A) スフィンゴシン鎖 (A) とアシル鎖 (B) 重水素標識 SM の四極子分裂幅 (45 °C) (C) Chol 含有膜の SM の 2 本のアルキル鎖の分裂幅の比較 (45 °C) Reprinted with permission from *Biochemistry*, **2012**, *51*, 8363–8370. Copyright © (2012) American Chemical Society.

そこで、位置選択的に重水素標識した SM を用いて、SM の配向状態を調べることにした。アシル鎖の 2 位や 3 位を位置選択的に重水素標識した SM を測定すると、2'位では 2 組の分裂幅、3'位では 1 組の分裂幅が観測された (図 1-11)^{50,72)}。このことから、2'位の 2 つの重水素は非等価で、アシル鎖の 2'位で分子の回転軸に対して折れ曲がった状態、つまり *gauche* 配座をとっていることが示唆された。これは PC に関しても同様な結果が報告されている^{72,80)}。

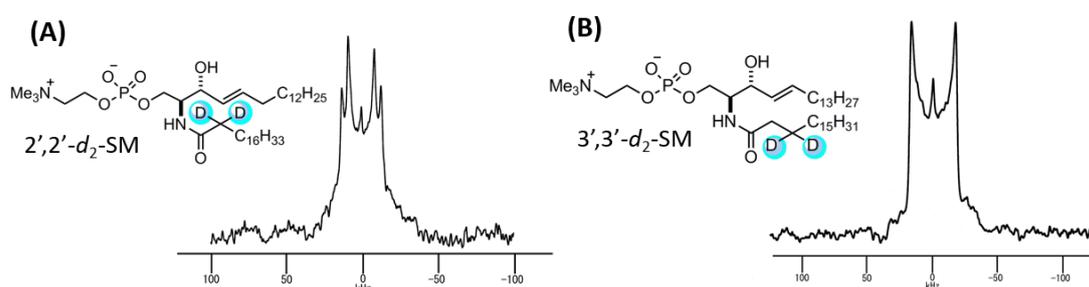


図 1-11 アシル鎖 2、3 位を重水素標識した SM の ²H NMR スペクトル^{50,79)}
 2',2'-*d*₂-SM (A) は 2 組の分裂幅 (17.3, 25.6 kHz) が観測されるのに対し、3',3'-*d*₂-SM (B) は 1 組の分裂幅 (33.7 kHz) しか観測されない。

また、SM と PC のオーダーの比較を行った。これまで PC の局所的な挙動を観測しているのは、位置選択的に重水素標識した DMPC を用いた報告しかない⁶³⁾。SM と PC の分裂幅の推移の比較より、Chol 非含有膜において、SM アシル鎖のオーダーが PC アシル鎖のオーダーよりも全体的に大きいことを示した (図 1-12A)。これは、過去の報告でも示されており^{48,71,72)}、SM アミド結合間で形成される水素結合の影響であると考えられる。Chol はオーダー化の高いリン脂質と相互作用するため⁸¹⁾、このような SM と PC のオーダーの違いが脂質ラフトにおける Chol との相互作用のしやすさに関係していると推定される。一方、Chol 含有膜で SM と PC のアシル鎖のオーダーを比較すると、SM 膜界面付近のオーダーの上昇が PC よりも小さく、また分裂幅が最大値を示す箇所は SM 膜のほうが深い位置であった^{78,79)} (図 1-12B)。このことから、Chol が SM 膜ではより深い位置に分布していることが示唆された。

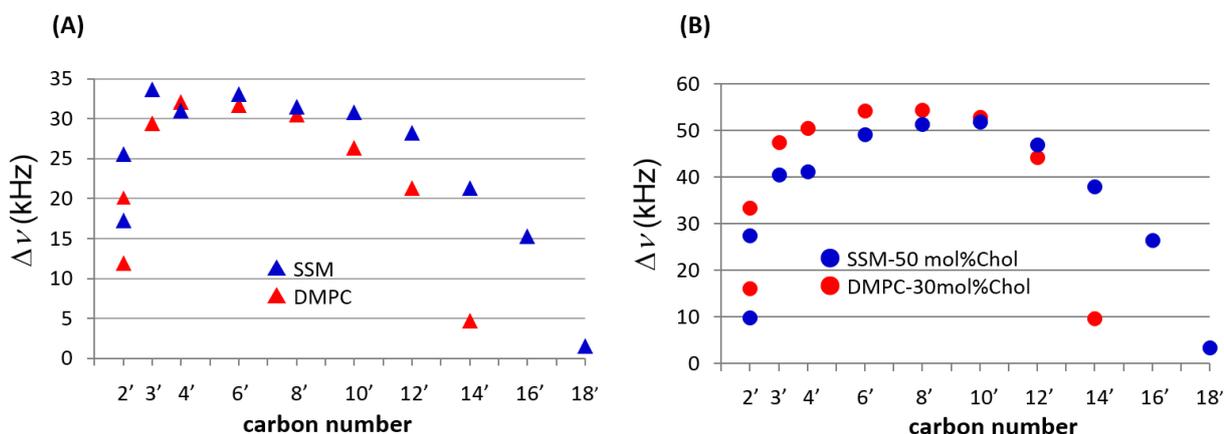


図 1-12 Chol 非含有膜 (A) と Chol 含有膜 (B) における SSM と DMPC の分裂幅の比較 (SSM : 45 °C、DMPC : 23 °C)

しかしながら、Chol を含有した SM 膜と PC 膜のオーダーがほぼ等しいことから、SM と Chol 分子間の特異的な相互作用は示されなかった。実際に、同位体標識した SM と Chol を用いて固体 NMR (Rotational Echo Double Resonance, REDOR) 測定が行われているが、標識原子間の磁気双極子相互作用が観測されず、SM-Chol 分子間相互作用の検出には至っていない (図 1-13)⁵⁰⁾。これは、脂質分子が膜中で速い側方拡散運動をしており、相互作用を検出するには会合状態の寿命が短すぎるため、もしくは標識核種やその位置関係が磁気双極子相互作用を検出するのに不向きであるためだと考えられる。同様に、SM-Chol 分子間で特異的な水素結合による相互作用は検出できなかったという報告もある⁷¹⁾。

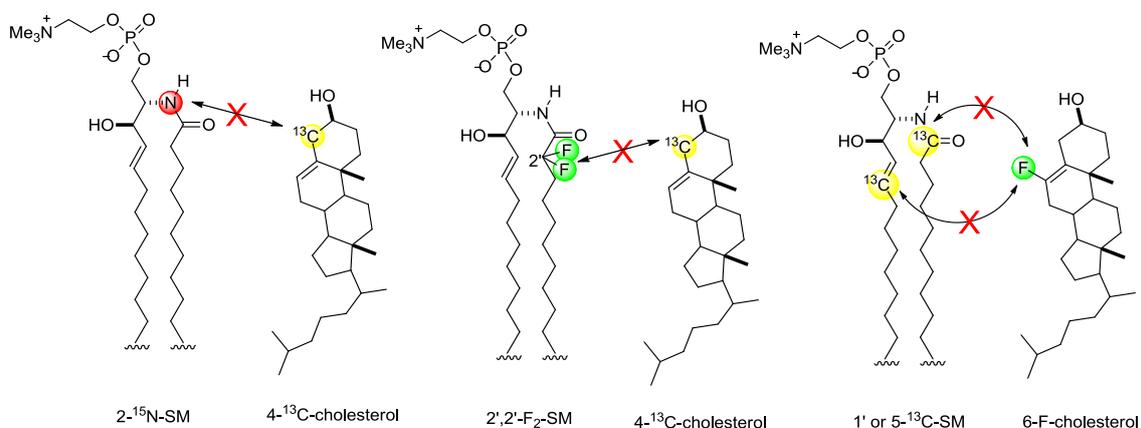


図 1-13 SM-Chol 分子間相互作用検出のための同位体標識体

このように、Chol 非含有膜では SM の方が PC よりもオーダーが高い一方で、Chol 含有膜ではアシル鎖のオーダーに違いがないため、Chol との相互作用に関して SM と PC 間で違いがみられない。しかしながら、この比較には考慮すべき問題点が 2 点ある。1 点目は、比較した DMPC のアシル鎖長は炭素数 14 で SM に比べて短いこと、2 点目は測定温度が異なる (SM: 45 °C、DMPC: 23 °C) ことである。したがって、なぜ生体膜中の脂質ラフトが PC ではなく、SM を主要脂質としているのかという疑問に対する明確な答えを導き出すためには、構造的に近い、同じアシル鎖長を持つ SM と PC 同士で動態を比較することが必要である。

近年では、より生体膜に近い環境で脂質分子の挙動を調べるため、多成分のモデル膜でも ^2H NMR を用いた解析が進んでいる^{73,82-89)}。これまでの飽和リン脂質 (SM や DPPC) / Chol の 2 成分に、不飽和リン脂質 (POPC や DOPC) を加えた 3 成分系のモデル膜は、 L_0 相と L_d 相の大きなドメインが安定に存在している。 ^2H NMR によって、主に 3 成分系中の脂質のオーダーパラメーターが求められ、温度や脂質組成を変化させて相挙動を観察し、相図が作成されている。そして、SM と PC の比較は 3 成分系膜においても行われている。重水素標識した DOPC を用いて、DPPC rich な L_0 相に存在する DOPC のオーダーが、SM rich な L_0 相に存在するものより大きいことが報告された。これは、Chol が DOPC の周辺にではなく、SM rich な L_0 相に分配しやすいことを示唆している。また、SM3 成分系膜は、ある温度で分裂幅が大きく増加したが、PC3 成分系膜では、温度上昇に対して一定の割合で減少した。これは、Chol を含む SM rich な L_0 相の安定性が高いことを示唆している。以上の結果より、SM-Chol 分子間相互作用は PC-Chol 分子間相互作用よりも強いと考えられた⁸³⁾。

しかしながら、3 成分系膜の解析においてもアシル鎖全重水素標識体や異なる長さのアシル鎖が混じった SM が用いられているため、共存する L_0 相と L_d 相中の脂質のダイナミクスやドメインの組成や挙動について未だ詳細には解析されていない。

1-3-c 脂質ラフトの可視化

生体膜において脂質分子がどのような挙動を示し、ラフト形成や細胞機能に関わっているかを分子レベルで解明するために、直接脂質を見る試みがされてきた。その手法の 1 つとして特定の脂質を認識する脂質プローブによる解析がある。例えば、コレラ毒素サブユニット B は、糖脂質であるガングリオシド GM1 に結合するため、蛍光標識されたコレラ毒素がプローブとして用いられている⁹⁰⁾。また、SM に特異的に結合する膜孔形成タンパク質としてライセニンがある⁹¹⁾。ライセニンの認識には、スフィンゴシン骨格、アシル鎖、ホスホコリンといった SM の全体構造が必要であり、SM が 5 分子程度のクラスターを作っているときにのみ結合が生じる^{92,93)}。これらのプローブを用いた細胞染色によって、脂質の細胞内分布を解析することが可能となり、GM1 と SM が膜上で異なるドメインを形成することが報告されている⁹⁴⁾。しかしながら、この手法には、脂質プローブの添加によって本来の脂質の膜上分布や挙動が変化する可能性があることを考慮しなければならない。

また、蛍光標識したリン脂質を用いて、ドメインを可視化する手法がある。飽和リン脂質、Chol、不飽和リン脂質の 3 成分から構成されるモデル膜（配向膜や巨大ベシクル (Giant Unilamellar Vesicle, GUV) に蛍光プローブを導入し、蛍光顕微鏡で観察すると円形上のドメイン形成が確認された⁹⁵⁾。膜は相分離しており、L_oドメインには飽和リン脂質や Chol が豊富に存在しているため、ラフトを再現していると考えられている。この手法によって、様々な組み合わせの 3 成分系膜に関して温度や組成を変化させて相挙動を観察し、相図が作成されている^{84,86,89,96-98)}。蛍光標識リン脂質 (SM, PC, PE) としては、ニトロベンゾ-2-オキソ-1,3-ジアゾール (NBD) や BODIPY といった小さな蛍光基がアシル鎖の尾部に結合している脂質や、Atto や Texas-Red などの嵩高い蛍光基が頭部に結合している脂質がある。しかし、ほとんどの蛍光標識リン脂質は、たとえ SM 構造を有していても L_d相に優先的に分配される。このように、蛍光標識リン脂質は元々の脂質の性質と水溶性やステロールとの親和性などが異なるため、細胞本来の脂質の分布や動態をどこまで反映できているか疑問が残る。また、蛍光顕微鏡の分解能が約 250 nm であるため、サイズの大きいドメインしか検出できず、ラフトの大きさの確定には不向きである。さらに蛍光標識リン脂質自体がドメイン形成に影響を与える場合もあるため、結果の解釈には注意が必要である。

他のイメージング技術として、蛍光共鳴エネルギー移動法 FRET (fluorescence resonance energy transfer)⁹⁹⁾や FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy)¹⁰⁰⁾がある。また蛍光以外の方法として、原子間力走査顕微鏡 (Atomic force microscopy, AFM) を用いる方法があり^{101,102)}、これらの手法ではナノサイズの動態情報や構造情報を得ることができる。また、AFM と蛍光相関分光法 (Fluorescence correlation spectroscopy, FCS) を組み合わせた実験¹⁰³⁾や、分解能の向上した nanoscale farfield Stimulated Emission Depletion (STED) 蛍光顕微鏡法¹⁰⁴⁾では、蛍光標識リン脂質の分布や側方拡散係数が決定されている。

また、近年、一分子追跡法 (Single Particle Tracking, SPT) の発達によって、GPI アンカータンパク質を中心としたラフトが常に安定に存在しているわけではなく、細胞外からシグナルが来て初めてオンデマンドで形成されることが示された^{105,106)}。誘導されたクラスターには Chol と糖脂質が集まることで安定化し、その大きさは数 nm~数十 nm で、寿命がわずか 0.2 秒であった。そしてこれが、細胞内へのシグナル伝達に寄与していることが示唆された。

このように、ラフトを可視的に同定することは、ドメインの大きさや寿命といった動態情報の取得につながるため、ラフト形成のメカニズムやシグナル伝達機構を考察することが可能になる。

しかし、クラスターやモデル膜の L_oドメインに何分子の脂質が集まると脂質ラフトと呼べるかについての明確な定義はまだない。ラフト形成を考える上で、脂質の詳細な分布やドメインの大きさを決定することは極めて重要である。3成分系のモデル膜において、蛍光プローブの蛍光強度によって各ドメインへの脂質の分配比が見積もられているが、元々の脂質ではなく、あくまでも蛍光プローブの分配であり、3成分全ての分配比まで分からない。したがって、できるだけ元の脂質の構造に近い状態で脂質の分布を見ることが可能な手法の開発が必要である。

1-4 研究目的

脂質ラフトは、膜輸送やシグナル伝達といった細胞機能やアルツハイマー病など様々な疾病に関与しているため、その実体の解明を目指す研究が盛んに行われている。そのため、脂質ラフトの膜全体としての構造や動態、生理的機能は次第に明らかになりつつある。しかし、脂質ラフト形成は、特定の分子 (SM や Chol) がある割合で非常に短い時間の中で集積と離散を繰り返す動的平衡に支配されているため、脂質分子の動態が原子・分子レベルで解析された例はほとんどない。そこで、脂質ラフト形成の分子基盤を解明するためには、脂質分子の動態解析が必要であると考えた。

脂質分子の動態を正確に解析するためには、本来ならば実際の生体膜を用いることが好ましい。しかし、実験上の扱いが困難である以上に、脂質の多様性や膜の非対称性という性質があるため、得られる情報が複雑になり、1つの脂質分子種に着目することは困難である。そのため、リポソームなど生体膜と同じ二分子膜構造を持つ人工の生体膜モデルを用いる。人工膜では、構成される脂質分子の種類や数 (一般的に 1~3 成分)、混合の割合を設定できる。したがって、非常に短い時間で選択的に集積するラフト構成成分の脂質の動態情報を抽出し、様々な分析手法による分子レベルの解析を単純化して行うことが可能になる。また、ラフトに集積する脂質分子の特異的な構造・動態がラフト膜の動的性質にどれほど関与しているかを明確に示すためにも人工のモデル膜で再構成することは重要である。さらに、生体膜中のラフト膜領域の相状態が Chol を含む人工膜の秩序液体相と似たような状態であるという報告¹⁰⁷⁾もあることから、人工膜の秩序液体相は脂質ラフトの最小限の定義を満たし、ラフト膜の構造や動態を十分再現していると考えられる。しかしながら、人工膜で得られた脂質の動態が、実際の生体膜中の脂質の動態と相関しているかという問題は常に取り沙汰される。もちろんマクロな視点に立ってみると、脂質の多様性や膜貫通タンパク質の存在など生体膜中で生じる脂質分子の動態への影響を人工膜で完全に再現することは不可能である。しかしながら、ミクロな視点、つまり分子・原子レベルで見ると、秩序液体相の人工膜を形成する脂質の動態や相互作用などの分子基盤は、実際の生体膜上のラフト内でも作用しており、共通であると考えられる。したがって、単純な膜組成から複雑な多成分系に至る人工膜における脂質の動態情報を段階的に解析していくことで、実際の生体膜の動的性質をそれらに基づ

いて総合的に解釈することが可能となる。

これまでの人工の生体モデル膜を用いた脂質ラフト研究には、それぞれ弱点がある。蛍光異方性測定や表面圧測定、Chol の引き抜き実験といった生物物理的実験では、膜全体の物理的性質を用いて考察しているため、直接的な分子レベルの情報に至っていない。また、蛍光標識したリン脂質を用いたラフトの可視化では、蛍光プローブが元の脂質の性質とは異なるため、生体膜本来の脂質の分布や挙動を反映しているとは言いがたい。そのため、脂質の分子レベルの動態を知るには、分子構造や膜物性への影響が少ない同位体標識を利用する NMR が最適である。特に重水素を観測核とする固体 NMR では、分子の運動性を強く反映する四極子相互作用の観測が可能である。しかし、多くの ^2H NMR による解析では、アルキル鎖の水素が全て重水素化されたリン脂質が用いられているため、正確な挙動の評価がされていなかった。そこで、修士課程時に、位置選択的に重水素を導入した脂質を化学合成し、分子の局所情報を取得する手法を確立した。そして、SM 分子のメチレンユニット単位での動的挙動や Chol のオーダー効果を詳細に評価することに成功した。

本研究では、この手法を適用し、脂質ラフト相を再現した秩序液体相内の脂質分子の動態（ダイナミクスや分子間相互作用）を原子・分子レベルで明らかにする。同時に脂質膜全体の動態も調べて、広範に SM と PC の体系的な比較を行うことで、動態の違いを明らかにすることを目的とする（図 1-13）。具体的には以下のような研究を行う。

2 章では、構造的に近い SM と PC の動態を原子・分子レベルで比較するために、修士課程時に詳細な動態を報告した SSM と構造・物性の近い 1-palmitoyl-2-stearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PSPC) を位置選択的に重水素標識した。そして、 ^2H NMR によって Chol 含有の 2 成分系膜で、温度や Chol 含有率を変化させて比較することで、SM との詳細な動的挙動、Chol との相互作用の違いを明らかにする。

3 章では、2 章と同様の Chol 含有の 2 成分系膜において、膜全体の動態情報を 2 つの蛍光実験（蛍光異方性測定、蛍光寿命測定）によって調べる。これらの測定では、NMR では検出できない膜全体の平均流動性や非常に短いナノ秒時間領域の流動性を定量的に評価することができる。これらの結果を原子・分子レベルの脂質の動態情報と併せることで、2 成分系膜において、時空間スケールの異なる視点で広範な解析を行い、SM と PC の違いを多角的に明らかにする。

4章では、より生体膜に近い環境で脂質分子の動態情報を取得することを目指し、ラフト膜を再現する L_0 ドメインと周辺膜を再現する L_d ドメインの2つのドメインが共存する3成分系の人工膜に対して、 ^2H NMR を適用する。3成分系膜になると、得られる分子の動態も複雑化することが予想されるが、2、3章で取得した2成分系膜の動態情報を踏まえた段階的な解析によって解決できる。また、位置選択的に重水素標識した脂質は、元の脂質と構造や物性がほぼ同じであるため、脂質の分布状態を見るのに有用なプローブであるといえる。そこで、ドメインを分子レベルで可視化する手法として ^2H NMR が適用可能ではないかと考えた。したがって、 ^2H NMR によって得られる3成分の脂質分子の動態情報から、共存する2つのドメインへの脂質の分配比を求めることを試みる。これは、生体膜における脂質の分布を決定する手法の開発であると同時に、ラフトを構成する脂質分子数やドメインの大きさを考えるうえでも重要である。さらに3成分系膜においても SM 膜と PC 膜を比較し、脂質分子の動的挙動や分布の違いを明らかにする。また、従来の手法である蛍光顕微鏡を用いてドメインの面積比を見積もり、 ^2H NMR から求めたドメインの組成比から算出した面積比と比較する。

以上より、5章では、2章～4章で得られた秩序液体相内の SM と PC の動態を体系的に比較した結果より、生体膜中で SM がラフト形成を可能にする特異的要因を明らかにし、脂質ラフト形成の分子基盤について考察する。

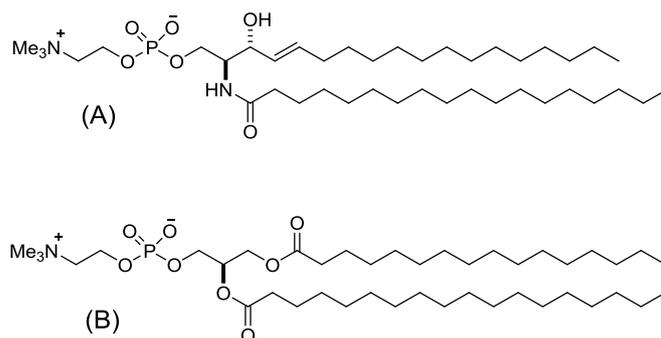


図 1-14 SSM (A) と PSPC (B) の構造

参考文献

- 1) Singer, S.J.; Nicolson, G. L. *Science*, **1972**, *175*, 720-731.
- 2) Op den Kamp J. *Annu. Rev. Biochem.* **1979**, *48*, 47-71.
- 3) Bretscher, M. S. *Science*, **1973**, *181*, 622-629.
- 4) Balasubraman, K.; Schroit, A. J. *Annu. Rev. Physiol.* **2003**, *65*, 701-734
- 5) P. V. Escribá, J. M. González-Ros, F. M. Goñi, P. K. J. Kinnunen, L. Vigh, L. Sánchez-Magraner, A. M. Fernández, X. Busquets, I. Horváth, G. Barceló-Coblijn *J. Cell. Mol. Med.* **2008**, *12*, 829-875.
- 6) Simons, K.; van Meer, G. *Biochemistry*, **1988**, *27*, 6197-6202.
- 7) Brown, D.A.; Rose, J. K. *Cell*, **1992**, *68*, 533-544.
- 8) Ahmed, S. N.; Brown, D. A.; London, E. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 10944-10953
- 9) Simons, K.; Ikonen, E. *Nature*, **1997**, *387*, 569-572.
- 10) Pike, L. J. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 1597-1598.
- 11) M. Leslie *Science*, **2011**, *334*, 1046.
- 12) Simons, K.; Toomre, D. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2000**, *1*, 31-39.
- 13) Hoessli, D. C.; Ilangumaran, S.; Soltermann, A.; Robinson, P. J.; Borisch, B.; Nasir, U. D. *Glycoconj. J.* **2000**, *17*, 191-197.
- 14) James, P. W.; Ley, S. C.; Magee, A. I.; Kaouridis, P. S. *Semin. Immunol.* **2000**, *12*, 23-34.
- 15) Simons, K.; Eehalt, R. *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 597-603.
- 16) Scheiffele, P.; Rietveld, A.; Wilk, T.; Simons, K. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2038-2044.
- 17) Campbell, S. M.; Crowe, S. M.; Mak, J. *J. Clin. Virol.* **2001**, *22*, 217-227.
- 18) Staubach, S.; Hanisch, F. Z. *Expert Rev. Proteomics.* **2011**, *8*, 263-277.
- 19) Murai, T.; Maruyama, Y.; Mio, K.; Nishiyama, H.; Suga, M.; Sato, C. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 1999-2007.
- 20) Murai, T. *Inter. J. Cell Biol.* **2012**, *2012*, 1-6.
- 21) Eehalt, R.; Keller, P.; Haass, C.; Thiele, C.; Simons, K. *J. Cell Biol.*, **2003**, *160*, 113-123.
- 22) Kakio, A.; Nishimoto, S.; Yanagisawa, K.; Kozutsumi, Y.; Matsuzaki, K. *Biochemistry* **2002**, *41*, 7385-7390.

- 23) Taraboulos, A.; Scott, M.; Semenov, A.; Avraham, D.; Laszlo, L.; Prusiner, S.B. *J. Cell Biol.* **1995**, *129*, 121–132.
- 24) Sanghera, N.; Pinheiro, T. J. *J. Mol. Biol.* **2002**, *315*, 1241-1256.
- 25) Fukazawa, M.; Nishijima, M.; Itabe, H.; Takano, T.; Hanada, K. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 34028-34034.
- 26) Prinetti, A.; Chigorno, V.; Tettamanti, G.; Sonnino, S. *J. Biol Chem.* **2000**, *275*, 11658-11665.
- 27) Li, S.; Couet, J.; Lisanti, M. P. *J. Biol Chem.* **1996**, *271*, 29182-29190.
- 28) Korzeniowski, M.; Kwiatkowska, K.; Sobota, A. *Biochemistry* **2003**, *42*, 5358-5367.
- 29) Heerklotz, H. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 2693-2701.
- 30) Lichtenberg, D.; Goni, F. M.; Heerklotz, H. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 430-436.
- 31) deAlmeida R. F.; Fedorov, A.; Prieto, M.; *Biophys. J.* **2003**, *85*, 2406-2416.
- 32) Ramstedt, B.; Slotte, J.P. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 908-915.
- 33) Halling, K. K.; Ramstedt, B.; Nystrom, J.; Slotte, J.P.; Nyholm, T. K. M. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 3861-3871
- 34) Grönberg, L.; Ruan, Z.; Bittman, R.; Slotte, J. P. **1991**, *Biochemistry*, *30*, 10746-10754.
- 35) Kan, C.C.; Ruan, Z.; Bittman, R.; *Biochemistry* **1991**, *30*, 7759-7766.
- 36) Björkbom, A.; Rog, T.; Kankaanpää, P.; Lindroos, D.; Kaszuba, K.; Kurita, M.; Yamaguchi, S.; Yamamoto, T.; Jaikishan, S.; Paavolainen, L.; Pälvärinne, J.; Nyholm, T. K. M.; Katsumura, S.; Vattulainen, I.; Slotte, J. P. *Biochim.Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 1179-1186.
- 37) Bittman, R.; Kasireddy, C. R.; Mattjus, P.; Slotte, J. P. *Biochemistry* **1994**, *33*, 11776-11781.
- 38) Talbott, C. M.; Vorobyov, I.; Borchman, D.; Taylor, K. G.; DuPré, D. B.; Yappert, M. C.; *Biochim.Biophys. Acta* **2000**, *1467*, 326-337.
- 39) Kuikka, M.; Ramstedt, B.; Ohvo-Rekilä, H.; Tuuf, J.; Slotte, J.P. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2327-2337.
- 40) Kinoshita, M.; Goretta, S.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biophysics* **2013**, *9*, 37-49.

- 41) Subbaiah, P. V.; Sircar, D.; Lankalapalli, R. S.; Bittman, R. *Archi. Biochem. Biophys.* **2009**, *481*, 72-79.
- 42) Janosi, L.; Gorfe, A. *Biophys. J.* **2010**, *99*, 2957-2966.
- 43) Ramstedt, B.; Slotte, J.P. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 1498-1506.
- 44) Björkbom, A.; Rog, T.; Kankaanpää, P.; Kaszuba, K.; Kurita, M.; Yamaguchi, S.; Lönnfors, M.; Nyholm, T. K. M.; Vattulainen, I.; Katsumura, S.; Slotte, J. P. *Biophys. J.* **2010**, *99*, 3300-3308.
- 45) Björkqvist, Y. J. E.; Nyholm, T. K. M.; Slotte, J. P.; Ramstedt, B. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 4054-4063.
- 46) Li, X. M.; Momsen, M. M.; Smaby, J. M.; Brockman, H. L.; Brown, R. E. *Biochemistry* **2001**, *40*, 5954-5963.
- 47) Mattjus, P.; Slotte, J. P. *Chem. Phys. Lipids.* **1996**, *81*, 69-80.
- 48) Lönnfors, M.; Doux, J. P. F.; Killian, J. A.; Nyholm, T. K. M.; Slotte, J. P. *Biophys. J.* **2011**, *100*, 2633-2641.
- 49) Steinbauer, B.; Mehnert, T.; Bayer, K.; *Biophys. J.* **2003**, *85*, 1013-1024.
- 50) 岡崎 宏紀 大阪大学理学研究科化学専攻 平成 19 年度修士論文
- 51) Arsov, Z.; Quaroni, L. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778*, 880-889.
- 52) Veiga, M. P.; Arrondo, J. L. R.; Goni, F. M.; Alonso, A.; Marsh, D. *Biochemistry.* **2001**, *40*, 2614-2622.
- 53) Khelashvili, G. A.; Scott, H. L. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 9841-9847.
- 54) Róg, T.; Pasenkiewicz-Gierula, M. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 3756-3767.
- 55) Mombelli, E.; Morris, R.; Taylor, W.; Fraternali, F. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 1507-1517.
- 56) Niemelä, P.; Hyvönen, M. T.; Vattulainen, I. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 2976-2989.
- 57) Malcom, I. C.; Ross, J. C. Higinbotham, J. *Solid state Nucl. Magn. Reson.* **2005**, *27*, 247-256.
- 58) Huang, J.; Feigenson, G. W. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 2142-2157.
- 59) Aittoniemi, J.; Niemelä, P. S.; Hyvönen, M. T.; Karttunen, M.; Vattulainen, I. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 1125-1137.
- 60) Zhang, Z.; Bhide, S. Y.; Berkowitz, M. L. *J. Phys. Chem. B.* **2007**, *111*, 12888-12897.

- 61) Duer, M. J. *Introduction to solid-state NMR spectroscopy* **2004**
- 62) Seelig, J. *Q. Rev. Biophys.* **1977**, *10*, 353–418.
- 63) Oldfield, E.; Meadows, M.; Rice, D.; Jacobs, R. *Biochemistry* **1978**, *14*, 2727-2740.
- 64) Davis, J. H. *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *737*, 117-171.
- 65) Vist, M. R.; Davis, J. H. *Biochemistry* **1990**, *29*, 451-464.
- 66) Patrache, H.; Dodd, S. W.; Brown, M. F. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 3172-3192.
- 67) Brown, M. F.; Nevzorov, A. A. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **1999**, *158*, 281–298.
- 68) Huang, T. H.; Lee, C. W. B.; Das Gupta, S. K.; Blume, A.; Griffin, R. G. *Biochemistry* **1993**, *32*, 13277-13287.
- 69) Sankaram, M. B.; Thompson, T. E. *Biochemistry* **1990**, *29*, 10676-10684.
- 70) Clarke, J. A.; Heron, A. J.; Seddon, J. M.; Law, R. V. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 2383-2393.
- 71) Guo, W.; Kurze, V.; Huber, T.; Afdhal, N. H.; Beyer, K.; Hamilton, J. A. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 1465-1478.
- 72) Mehnert, T.; Jacob, K.; Bittman, R.; Beyer, K. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 939-946.
- 73) Bartels, T.; Lankalapalli, R. S.; Bittman, R.; Beyer, K.; Brown, M. F.; *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14521-14532.
- 74) Calhoun, W. I.; Shipley, G. G. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *555*, 436–441.
- 75) Urbina, J. A.; Pekerar, S.; Le, H.; Patterson, J.; Montez, B.; Oldfield, E. *Biochim. Biophys. Acta.* **1995**, *1238*, 163-176.
- 76) 鈴木孝 大阪大学大学院理学研究科化学専攻 平成 21 年度修士論文
- 77) 山口敏幸 大阪大学大学院理学研究科化学専攻 平成 23 年度学位論文
- 78) 安田智一 大阪大学大学院理学研究科化学専攻 平成 23 年度修士論文
- 79) Matsumori, N.; Yasuda, T.; Okazaki, H.; Suzuki, T.; Yamaguchi, T.; Tsuchikawa, H.; Doi, M.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2012**, *51*, 8363–8370.
- 80) Engel, A. K.; Cowburn, D. *FEBS Lett.* **1981**, *126*, 169-171.

- 81) Kučerka, N.; Marquardt, D.; Harroun, T. A.; Nieh, M.; Wassall, S. R.; de Jong, D. H.; Schäfer, L. V.; Marrink, S. J.; Katsaras, J. *Biochemistry* **2010**, *49*, 7485-7493.
- 82) Aussenac, F.; Tavares, M.; Dufourc, E. J. *Biochemistry* **2003**, *42*, 1383-1390.
- 83) van Duyl, B. Y.; Ganchev, D.; Chupin, B.; de Kruijff, B.; Killian, J. A. *FEBS Lett.* **2003**, *547*, 101-106.
- 84) Veatch, S. L.; Polozov, I. V.; Gawrisch, K.; Keller, S. L. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 2910-2922.
- 85) Veatch, S. L.; Soubias, O.; Keller, S. L.; Gawrisch, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2007**, *104*, 17650-17655.
- 86) Bunge, A.; Müller, P.; Stöckl, M.; Herrmann, A.; Huster, D. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 2680-2690.
- 87) Clarke, J. A.; Seddon, J. M.; Law, R. V. *Soft Matter.* **2009**, *5*, 369-378.
- 88) Davis, J. H.; Clair, J. J.; Juhasz, J. *Biophys. J.* **2009**, *96*, 521-539.
- 89) Juhasz, J.; Sharom, F. J.; Davis, J. H. *Biochim. Biophys. Acta.* **2009**, 1788, 2541-2552.
- 90) Pang, H.; Le, P.; Nabi, I. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 1421-1430.
- 91) Yamaji, A.; Sekikawa, Y.; Emoto, K.; Sakuraba, H.; Inoue, K.; Kobayashi, H.; Umeda, M. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 5300-5306.
- 92) Ishitsuka, R.; Yamaji-Hasegawa, A.; Makino, A.; Hirabayashi, Y.; Kobayashi, T. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 296-307.
- 93) Shogomori, H.; Kobayashi, T. *Biochim. Biophys. Acta.* **2008**, 1780, 612-618.
- 94) Kiyokawa, E.; Baba, T.; Otsuka, N.; Makino, A.; Ohno, S.; Kobayashi, T.; *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 24072-24084.
- 95) Dietrich, C.; Bagatolli, L. A.; Volovyk, Z.N.; Thompson, N. L.; Levi, M.; Jacobson, K.; Gratton, E. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 1417-1428.
- 96) Veatch, S. L.; Keller, S. L. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3074-3083.
- 97) Veatch, S. L.; Keller, S. L. *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 148101-1-4.
- 98) Bezlyepkina, N.; Gracià, R. S.; Shchelokovskyy, P.; Lipowsky, R.; Dimova, R. *Biophys. J.* **2013**, *104*, 1456-1464.
- 99) Rao, M.; Mayor, S. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1746*, 221-233.

- 100) de Almeida, R. F. M.; Loura, L. M. S.; Prieto, M. *Chem. Phys. Lipids.* **2005**, *157*, 61-77.
- 101) Rinia, H.A.; Snel, M.M.E.; van der Eerden, J.P.J.M.; de Kruijff, B. *FEBS Lett.* **2001**, *501*, 92-96.
- 102) Chiantia, S.; Kahya, N.; Ries, J.; Schwille, P. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 4500-4508.
- 103) Chiantia, S.; Kahya, N.; Ries, J.; Schwille, P. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 4500-4508.
- 104) Hell, S. W. *Science*, **2007**, *316*, 1153-1158.
- 105) Suzuki, K. G. N.; Fujiwara, T. K. Sanematsu, F.; Iino, R.; Edidin, M.; Kusumi, A. *J. Cell. Biol.* **2007**, *177*, 717-730.
- 106) Suzuki, K. G. N.; Kasai, R. S.; Hirose, K. M.; Nemoto, Y. L.; Ishibashi, M.; Miwa, Y.; Fujiwara, T. K.; Kusumi, A. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 774-783.
- 107) Gaus, K.; Le Lay, S.; Balasubramanian, N.; Schwartz, M. A. *J. Cell. Biol.* **2006**, *174*, 725-734.

第2章 本論 I

重水素固体 NMR による Chol 含有膜における脂質の動的挙動解析

SM と PC は共に Chol とラフト特有の相状態である秩序液体相を形成するにも関わらず、生体膜中の脂質ラフトは PC ではなく SM を主成分として構成されている。その理由を明らかにするために、これまで分子動力学計算や NMR によって、SM と PC のオーダーや Chol との相互作用の違いが調べられてきた。その結果、Chol 非含有膜では SM アシル鎖のオーダーの方が PC アシル鎖のオーダーよりも高いことが明らかとなった¹⁻³⁾。また、Chol 含有膜では SM-Chol 分子間で水素結合や charge-pair による相互作用が働くため、SM-Chol 膜は PC-Chol 膜よりも安定であることが示された⁴⁻⁶⁾。しかしながら、近年この結果とは異なり、Chol との相互作用に関して SM の特異性はないことが示された^{7,8)}。このように、SM と PC の動態の比較に関して、多様な結論が導き出されてきた。その要因として、NMR 研究ではアシル鎖全重水素標識体が用いられていること、また同じアシル鎖長を持つ SM と PC が比較されていないことが挙げられる。そこで、ラフト形成を可能にする SM の特異的要因を明らかにするためには、構造、物性の近い SM と PC で詳細で体系的な比較を行うことが必要であると考えた。したがって、以前に詳細な動的挙動を報告した SSM⁹⁾のアシル鎖と同じ位置に選択的に 2 つの重水素を導入した 1-palmitoyl-2-stearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PSPC) を合成することにした。PSPC は SSM と同じ長さのアシル鎖 (C18) を持ち、相転移温度も近い (SSM: 44 °C¹⁰⁾、PSPC: 48.8 °C¹¹⁾)。修士課程時の SSM の報告で示したように、選択的に重水素標識することで、重水素をマーカーとして分子の局所的な運動性をメチレンユニット単位で得られる。各標識体の局所的な運動性情報を併せることで、モーション・キャプチャーのように分子全体に渡る運動性を詳細に評価することが可能になる。この位置選択的重水素標識 PSPC を用いて ²H NMR を測定し、得られた分子レベルの動的挙動および Chol との相互作用を SM の動態と比較した。

2-1 重水素固体 NMR

構造解析に用いられる溶液 NMR や X 線結晶構造解析は、脂質膜のような非結晶性のリポソームでは適用困難である。そのため、異方的かつ非結晶な膜サンプルを感度良く測定できる固体 NMR が分子レベルでの解析に用いられている。固体 NMR の中で、脂質分子の運動性や配向情報を得るのに有用であるのが重水素固体 NMR (^2H NMR) である。

スピン量子数 I が 1 である重水素核の電荷分布は、偏った楕円形をしているため核四極子モーメント eQ が生じる。この四極子モーメントは、他の核電子や結合電子によって生じた核のまわりに分配した電場勾配 \mathbf{V} と相互作用し、核スピンのエネルギー準位に影響を与える。

$$\mathcal{H}_Q = \frac{eQ}{2I(I-1)} \mathbf{I} \cdot \mathbf{V} \cdot \mathbf{I} \quad (1)$$

式(1)で示される相互作用の大きさは、核四極子モーメントおよび電場勾配の大きさに依存し、外部磁場 \mathbf{B} に依存しない。しかし電場勾配はテンソル量で、核四極子モーメントは核内に固定されているので、外部磁場により配向づけられる。そのため結合電子状態を反映した分子全体の配向は、核四極子モーメントの配向と同義である。

静磁場が分子の主軸座標系に対して極座標 (θ, ϕ) の方向を向く場合、四極子相互作用の一次および二次のエネルギーの摂動項は式(2)および式(3)で表される。

$$E_m^{(1)} = \frac{h\nu_Q}{4} [3\cos^2\theta - 1 + \eta \cos 2\phi \sin^2\theta] (m^2 - \frac{1}{3}I(I+1)) \quad (2)$$

$$\begin{aligned} E_m^{(2)} = & -\frac{h\nu_Q^2}{12\nu_L} \frac{m}{24} \{ [3\sin 2\theta - \eta(\sin 2\theta \cos 2\phi + 2i \sin \theta \sin 2\phi)] \\ & \times [3\sin 2\theta - \eta(\sin 2\theta \cos 2\phi - 2i \sin \theta \sin 2\phi)] [8m^2 - 4I(I+1) + 1] \\ & - \{ 3\sin^2\theta + \eta[1 + \cos^2\theta \cos 2\phi + 2i \cos \theta \sin 2\phi] \} \\ & \times \{ 3\sin^2\theta + \eta[(1 + \cos^2\theta) \cos 2\phi - 2i \cos \theta \sin 2\phi] \} [2m^2 - 2I(I+1) + 1] \} \quad (3) \end{aligned}$$

$$\nu_Q = \frac{3e^2qQ}{2I(I-1)\hbar} \quad (4)$$

e^2qQ は核四極子結合定数、 η は四極子非対称因子、 ν_L はゼーマン相互作用の周波数を示す。スピン磁気量子数 m から $m-1$ への NMR 許容遷移の周波数に対する遷移エネルギーの中で、ゼーマン相互作用の周波数は、 $\nu_m^{(0)} = \nu_L$ であり、一次 $\nu_m^{(1)}$ および二次 $\nu_m^{(2)}$ の項の周波数は式(5)および式(6)で表される。

$$\nu_m^{(1)} = -\frac{\nu_Q}{2} [3\cos^2\theta - 1 + \eta \cos 2\phi \sin^2\theta] (m - \frac{1}{2}) \quad (5)$$

$$\begin{aligned} \nu_m^{(2)} = & -\frac{h\nu_Q^2}{12\nu_L} \{ [3\sin 2\theta - \eta(\sin 2\theta \cos 2\phi + 2i \sin \theta \sin 2\phi)] \\ & \times [3\sin 2\theta - \eta(\sin 2\theta \cos 2\phi - 2i \sin \theta \sin 2\phi)] \left[m(m-1) - \frac{I(I+1)}{6} + \frac{3}{8} \right] \\ & - \{ 3\sin^2\theta + \eta[1 + \cos^2\theta \cos 2\phi + 2i \cos \theta \sin 2\phi] \} \\ & \times \{ 3\sin^2\theta + \eta[(1 + \cos^2\theta) \cos 2\phi - 2i \cos \theta \sin 2\phi] \} \left[\frac{m(m-1)}{4} - \frac{I(I+1)}{12} + \frac{1}{8} \right] \} \quad (6) \end{aligned}$$

重水素のような $I=1$ の核種では、一次の項より ν_L を中心にして対称に $\nu_0^{(1)}$ の線幅で分裂し、二次の項の影響で中心が ν_L から $\nu_0^{(2)}$ シフトする (図 2-1A)。ここで、重水素核は比較的小さい核四極子モーメント ($2.8 \times 10^{-31} \text{ m}^2$) をもつため、二次の項に関しては無視することができる。また重水素核は電場勾配が軸対称になっているため、 $\eta=0$ となる。つまり ^2H NMR で観測される Paked doublet と呼ばれるスペクトルの四極子分裂幅 $\Delta\nu$ は式(7)で表される (図 2-1B)。

$$\Delta\nu = 2\nu_0^{(1)} = \frac{3}{2} \frac{e^2qQ}{h} \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \quad (7)$$

e^2qQ/h は四極子カップリング定数といい、 sp^2 炭素と sp^3 炭素上の重水素で異なり、それぞれ 175 kHz、170 kHz になる。 θ は外部磁場 \mathbf{B}_0 と C-D 結合のなす角度に相当する。つまり、スペクトルの分裂幅は、式(7)における θ のみに依存し、これは膜に対する分子の配向情報を含むことになる。さらに、分裂幅の大きさに最も強く寄与する因子は分子の運動性である。 $10^{-4} \sim 10^{-6} \text{ s}$ の相関時間の分子運動をパウダーパターンとして感度良く検出できるが、NMR のタイムスケールと同程度の運動性に関してはシグナルがブロードになる¹²⁾。

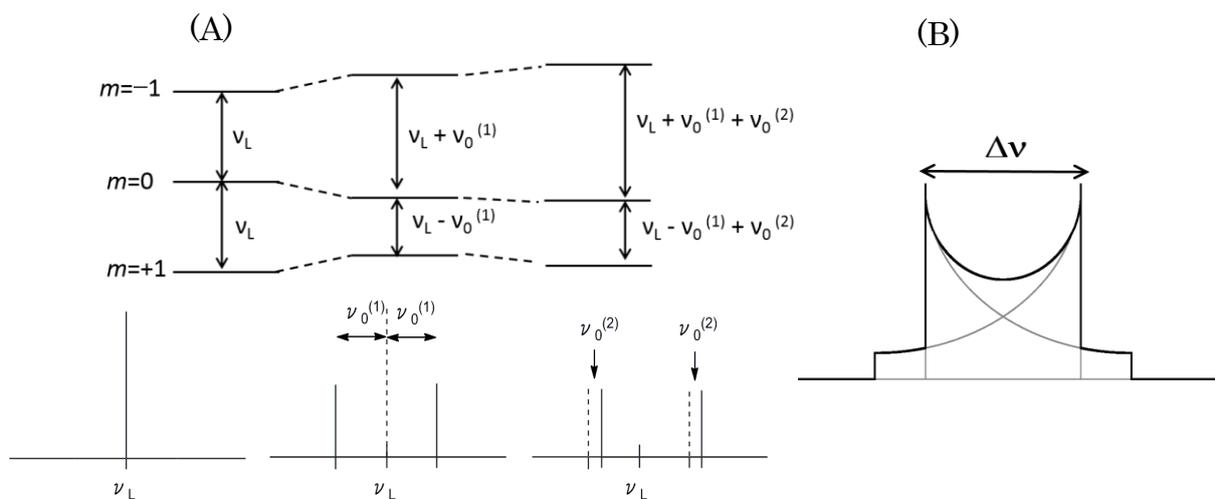


図 2-1 (A) 四極子相互作用によるエネルギー準位と共鳴線の位置
(B) 重水素スペクトル (Pake doublet)

リポソームのような膜サンプルで Pake doublet が得られるのは、膜中の分子の存在比が \sin 関数になっているためである。つまり、式(7)において $\theta=0^\circ$ のとき分子の存在割合は最も低いが、 $\Delta\nu$ は最大となるために一番外側のシグナルを与え、 $\theta=54.7^\circ$ (マジック角) のときには、 $\Delta\nu=0$ kHz となりセンターピークを示す。そして、 $\theta=90^\circ$ のとき最も分子の存在割合が高く Pake doublet におけるピークトップを与える。しかし、実際の脂質膜系では分子の揺らぎや回転・拡散運動のため、 θ は一義的に決定できないので、膜中での分子自身の角度 ξ および σ を用いて、分裂幅 $\Delta\nu$ は式(8)で表される。

$$\Delta\nu = \frac{3}{2} \frac{e^2 q Q}{h} \left(\frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right) \left(\frac{3 \cos^2 \xi - 1}{2} \right) \left(\frac{3 \cos^2 \sigma - 1}{2} \right) \quad (8)$$

θ は磁場 B_0 と膜法線 n のなす角度、 ξ は膜法線と回転軸 R との角度、 σ は回転軸と C-D 結合のなす角度を示す。リポソームの場合、 $\theta=90^\circ$ であり、通常膜法線 n と回転軸は一致すると考える ($\xi=0^\circ$)。そして、 $(3 \cos^2 \sigma - 1)/2$ は回転軸に対する C-D 結合の角度および C-D 結合の揺らぎの情報が含まれる。これらを分離すると

$$\frac{3 \cos^2 \sigma - 1}{2} = \frac{3 \cos^2 \psi_\gamma - 1}{2} \times \frac{3 \cos^2 \sigma' - 1}{2} \quad (9)$$

式(9)のように表される。ここで $(3\cos^2\Psi-1)/2$ は分子の回転軸に対するC-D結合の揺らぎの度合いを示すオーダーパラメーター S に相当する。 S は0から1の間の値をとり、揺らぎの角度 Ψ が大きくなるにつれて値は小さくなる。

このように $^2\text{H NMR}$ の四極子分裂幅は分子の配向と運動性両方に依存的であり、四極子分裂を解析することにより、膜中に存在する脂質の動的挙動を分子レベルで解明することができる。

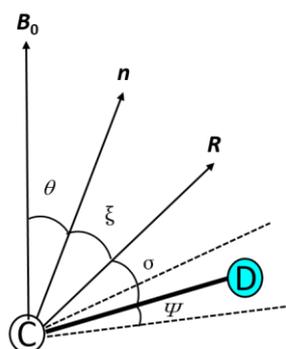


図 2-2 外部磁場(B_0)、膜法線(n)、分子の回転軸(R)と C-D 結合の関係

また固体 NMR は溶液の場合と異なり FID が非常に速く減衰するため、通常のパルスシーケンスでは FID の取り込みの際にデッドタイムにより FID の最初の部分を記録することができない。その影響は大きく、フーリエ変換するとスペクトルが大きく歪むことになる。これを避けるため $^2\text{H NMR}$ では固体エコー（四極子エコー）と呼ばれるパルスシーケンスを用いており、 $90^\circ_x - \tau_1 - 90^\circ_y - \tau_2$ で表わされる（図 2-3）。この 2 つのパルス間を $\tau_2 < \tau_1$ にすることで、FID の最大強度になる前の時間から取り込むことができるため、データを取り逃すことなく得ることができる。観測されたエコー強度は τ_1 の長さ、すなわち横緩和時間 (T_2) に依存する。

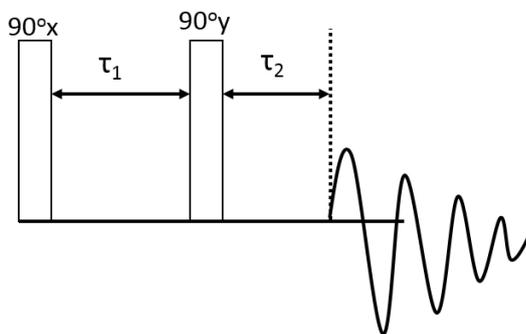
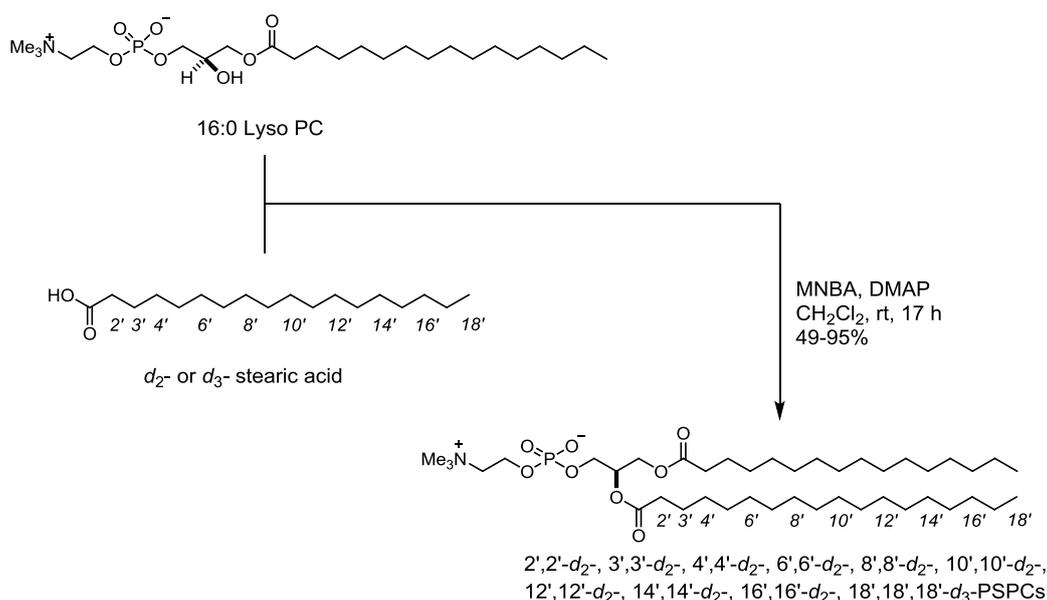


図 2-3 固体エコー法のパルスシーケンス

2-2 重水素標識化 PSPC の合成

市販の 16:0-lyso PC とこれまでに合成した位置選択的重水素標識ステアリン酸⁹⁾をそれぞれ縮合させることで、目的とするアシル鎖位置選択的重水素化 PSPC ($2',2'-d_2$, $3',3'-d_2$, $4',4'-d_2$, $6',6'-d_2$, $8',8'-d_2$, $10',10'-d_2$, $12',12'-d_2$, $14',14'-d_2$, $16',16'-d_2$, $18',18',18'-d_3$ -PSPCs) 計 10 種類を合成することに成功した (スキーム 2-1)。(詳細は実験項)



スキーム 2-1 アシル鎖重水素標識化 PSPC の合成

2-3 PSPC の運動性解析

合成した PSPC を用いて、非ラフト膜 (PSPC) およびラフト膜 (PSPC/Chol = 1/1) のモデル膜を調製し、 ^2H NMR を測定することで PSPC の運動性解析を試みた。非ラフトでは 40、50、55 °C で、ラフトは 20、30、40、50、55 °C で測定を行った。各温度のスペクトルおよび四極子分裂幅値の詳細なデータはスペクトルデータ項にまとめて記載する。それぞれの膜の各温度における分裂幅の推移を図 2-4 に、相転移温度以上の 50 °C におけるそれぞれの膜のスペクトルを図 2-5 に示す。

これらの図より、非ラフト膜では、PSPC の相転移温度 49 °C 未満では明確な分裂幅を示さずブロードなピークとなり、50 °C 以上になると明確な分裂幅が得られた。各炭素番号で分裂幅を比較すると、アシル鎖末端に行くにつれて分裂幅が減少、つまり運動性が上昇することが示された。また、2'位では 2 組の分裂幅、3'位では 1 組の分裂幅が観測されたため、SM や DMPC と同様にアシル鎖の 2'位で分子の回転軸に対して折れ曲がった状態、つまり *gauche* 配座をとっていることが示唆された。

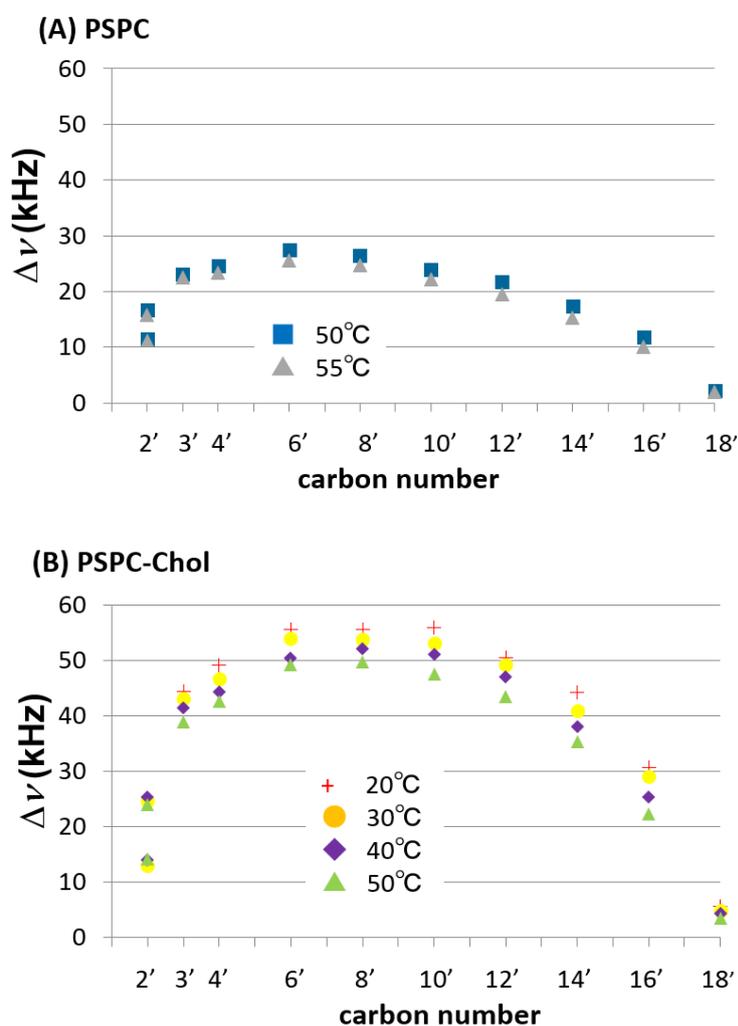


図 2-4 (A) 非ラフト膜 (100%PSPC) と(B) ラフト膜 (PSPC/Chol = 1/1) における重水素標識化 PSPC の各温度における四極子分裂幅

一方、ラフト膜では、Chol が存在することで膜の流動性が上昇し、分子の運動性が増加したことで相転移温度以下においても明確に分裂幅が観測された。

どの標識位置においても、非ラフト膜より分裂幅は増加し、アシル鎖中央部で最大値を示した。これは、Chol が持つ平面で堅固なステロイド骨格がアシル中央部の揺らぎを抑えているためだと考えられる。また、Chol 含有膜の分裂幅の推移は、以前報告された位置選択的に重水素標識した DMPC より得られた分裂幅の推移¹³⁾と同様の傾向を示した。つまり、Chol のオーダー効果に関してアシル鎖長の影響は小さいことが示唆された。

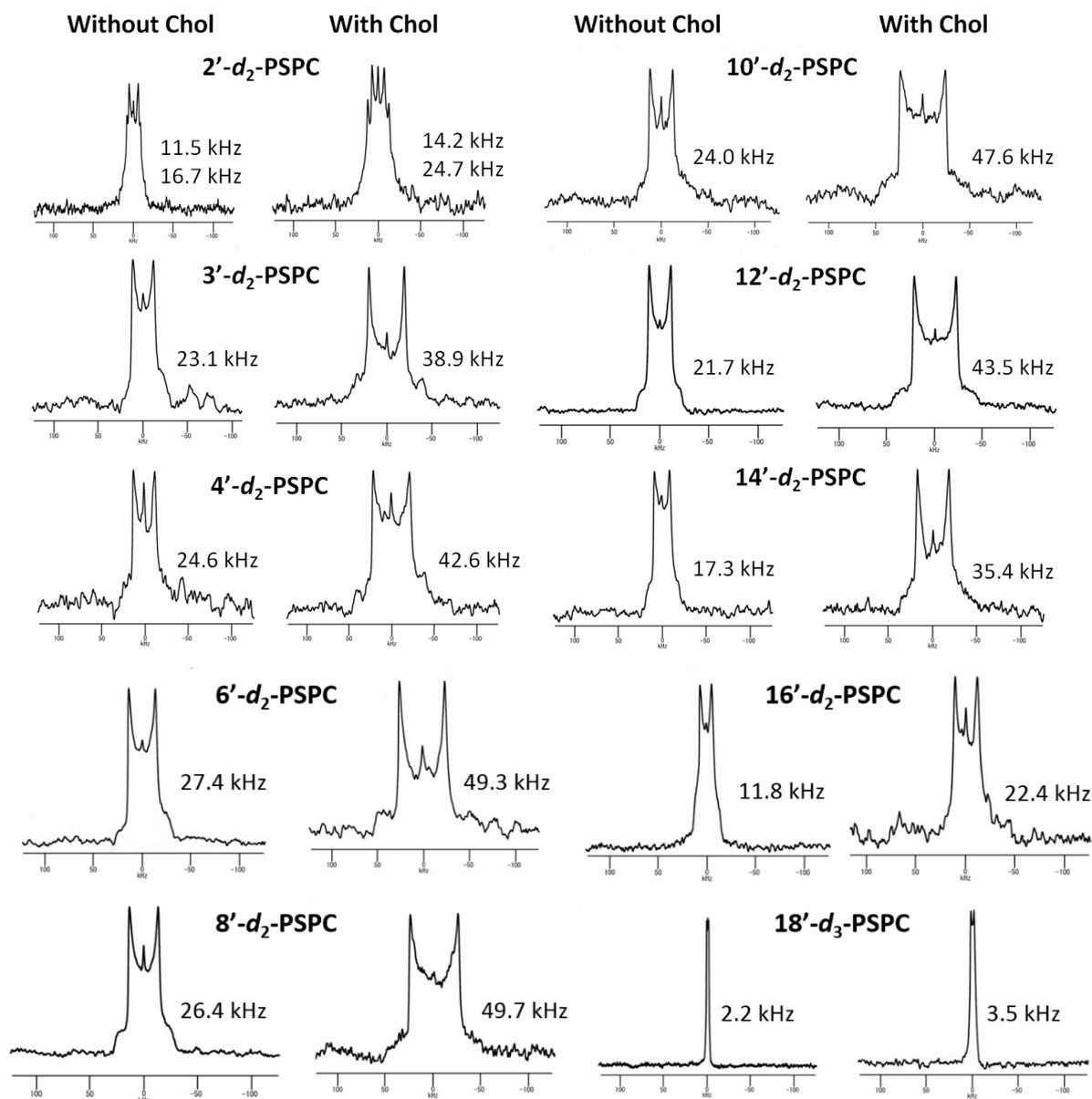


図 2-5 重水素標識化 PSPC の非ラフト膜・ラフト膜の ²H NMR スペクトル (50 °C)

次に、SM と PC の運動性および 2 つの脂質に対する Chol のオーダー効果を比較するため、両方の脂質の相転移温度以上である 50 °C において四極子分裂幅を比較することとした。それらの分裂幅の推移を図 2-6 に示す。

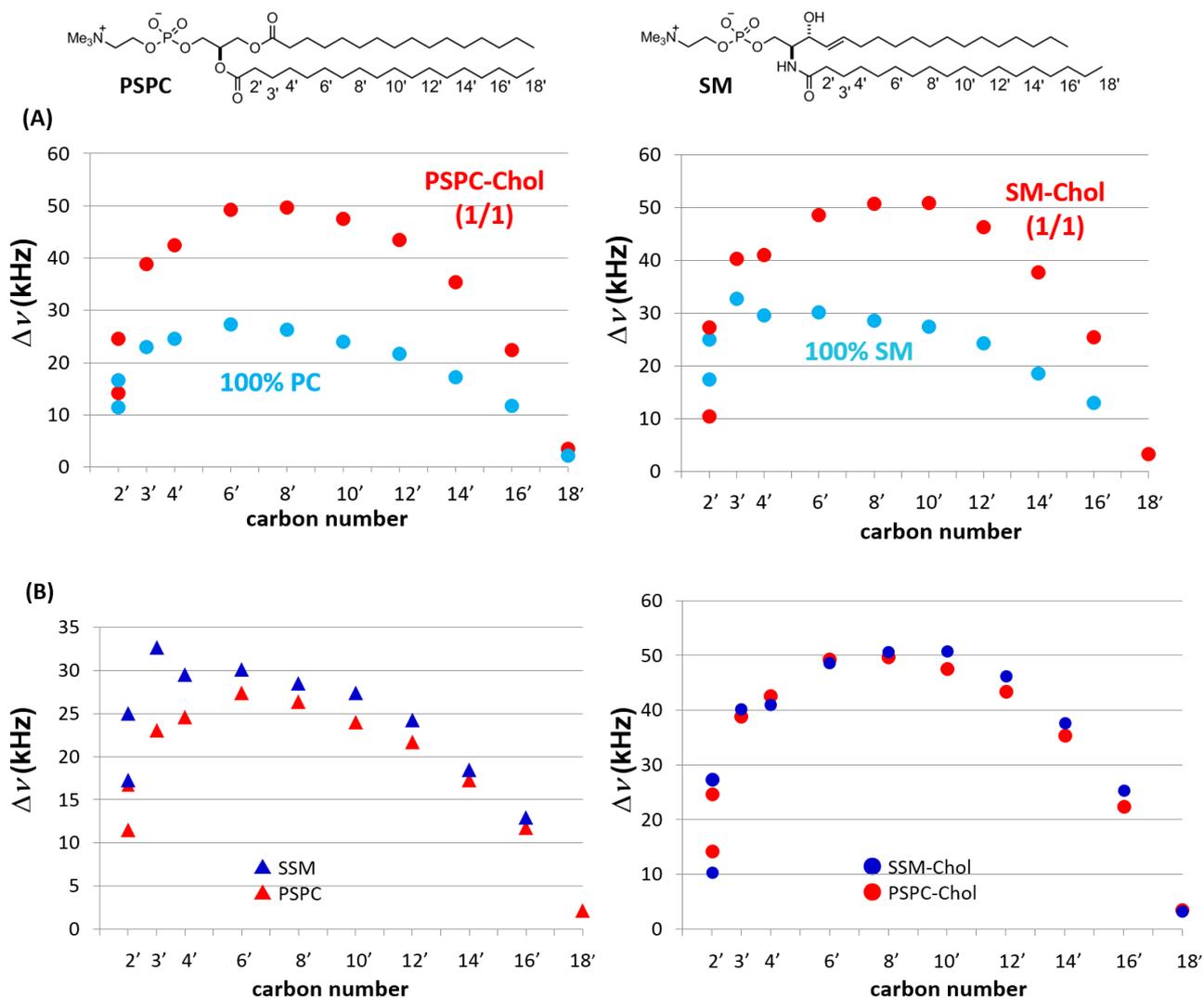


図 2-6 (A) 重水素標識化 SM と PSPC の非ラフト膜・ラフト膜における分裂幅の推移 (50 °C)

(B) 非ラフト膜とラフト膜における SM と PSPC の比較 (50 °C)

非ラフト膜で SM と PC を比較すると、SM の分裂幅の方が大きく観測され、特に 2'位から 4'位にかけて、その違いが顕著に現れた。これは SM が骨格構造にアミド基やヒドロキシ基を持つため、分子間水素結合を形成しているためだと考えられる、実際、当研究室で行われたバイセルを用いた SM 頭部の構造解析や固体 NMR から求めた CSA や双極子カップリングによるアミド部位の配向解析で、SM はアミド間で水素結合を形成するのに適した配座・配向をとっていることが報告されている¹⁴⁻¹⁶⁾。つまり、SM 分子間水素結合が、膜上部の揺らぎを押さえ、その影響が膜内部にも及んでいることが示唆された。

一方、ラフト膜においては、SM と PC 共に分裂幅は、ほぼ同じ推移を示した。しかし、より精査してみると、Chol 含有膜において分裂幅が最大値を示す場所は、SM では 8'位から 10'位であるのに対し、PSPC では 6'位から 8'位であった(図 2-6B)。また、10'位から 16'位にかけて、SM のほうがわずかながら分裂幅が大きい値を示した。分裂幅の増加は Chol のオーダー効果に起因しているので、その影響をより詳細に調べるため、非ラフト膜とラフト膜の分裂幅の差を求めた(図 2-7)。

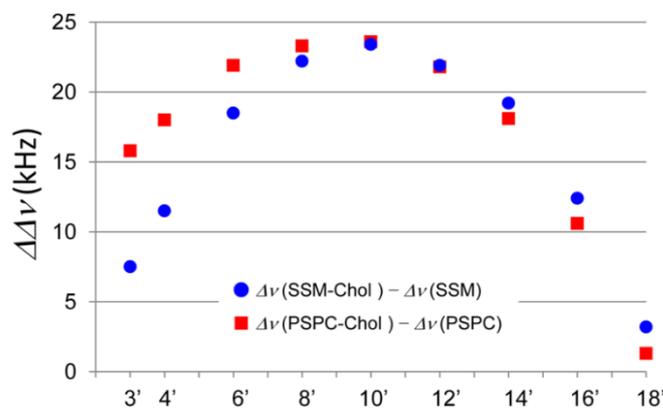


図 2-7 SM と PSPC の Chol のオーダー効果の違い (50 °C) $\Delta\Delta\nu$ は非ラフト膜とラフト膜の分裂幅の差 Reprinted with permission from *Biophys. J.* 2014, 106, 631-638. Copyright © (2014) Elsevier.

図 2-7 より、PSPC のアシル鎖上部 (3'位-6'位) に対する Chol のオーダー効果が非常に大きく、膜内部 (14'位-18'位) にかけては SM のほうがわずかに大きいことが示された。つまり、SM 膜では PC 膜よりも Chol が膜の深い位置に分布

していることを示唆している (図 2-8)。これは、以前 SSM と DMPC を比較した時にも同様に示唆された⁹⁾。

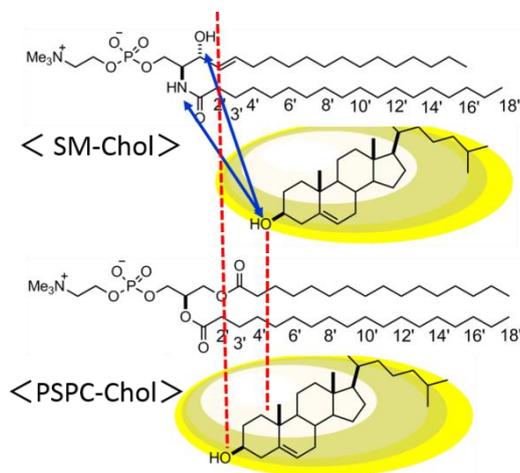


図 2-8 SM 膜と PSPC 膜中の Chol の分布位置の違い

図 2-8 より、SM と Chol の水素結合の供与基と受容基の距離が離れるため、2 分子が膜界面で直接的に水素結合を形成しにくいことが考えられる。これは、当研究室の固体 NMR による SM アミド部位の配向解析の結果も支持している^{14,16)}。SM 膜と PC 膜の Chol の分布位置の違いは、SM 膜の表面部で形成される SM-SM 分子間水素結合が Chol を膜中にわずかに押しているためであると推定される。また、脂質のヘッドグループには、Chol を膜中で安定に存在させるために、膜外の水分子から遮蔽するという役割 (umbrella 効果¹⁷⁾) があるが、そのヘッドグループの配向が PC では膜平面に対して平行であるのに対して、SM では膜平面に対して 15° 傾いているという報告がある^{18,19)}。これは、SM の umbrella 効果が PC よりも大きいことを示しており、Chol の膜中の分布位置には、脂質のヘッドグループの配向の違いも影響していると考えられる。

また、SM と PSPC で膜中のアルキル鎖の平均分布位置を比較するため、膜法線に対する平均アルキル鎖長を求めた (図 2-8)²⁰⁾。その結果、SM と PSPC の Chol 含有膜において、全体的なアルキル鎖長や膜中のメチレンユニットの平均分布位置はほぼ等しいことが分かった。これは、SM と PSPC の分裂幅の極大値の比較から Chol の分布位置について直接的に考察できることを支持している。つまり、一般的に SM 膜と PC 膜で、膜中の Chol の分布位置の違いがあることが示唆された。

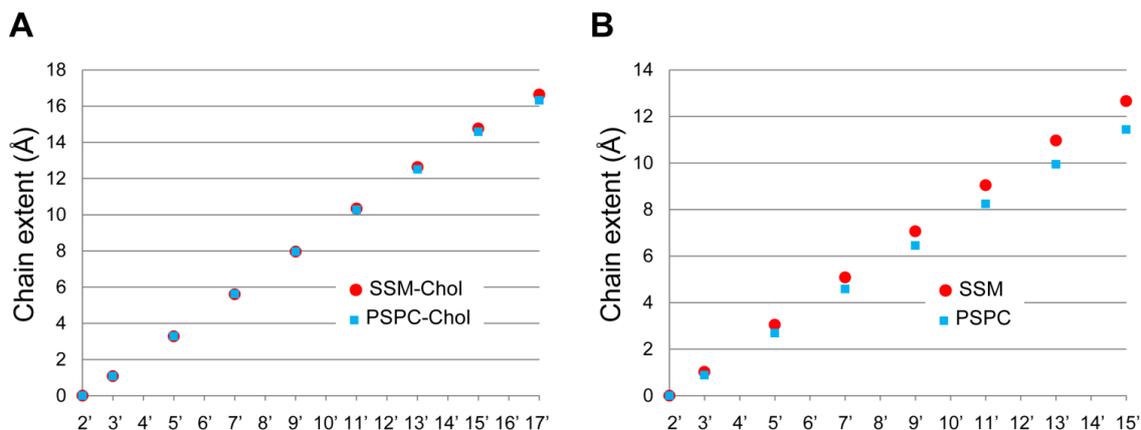


図 2-8 50 °C における膜法線に対する平均アルキル鎖長 (A) Chol 含有膜 (C2'-C17) (B) Chol 非含有膜 (C2'-C15) 計算は first-order mean-torque モデルを用いて分裂幅の大きさより求めた。Reprinted with permission from *Biophys. J.* 2014, 106, 631-638. Copyright © (2014) Elsevier.

次に、²H NMR の分裂幅から求めたオーダーパラメーターより、脂質膜中のアルキル鎖を平均的に円柱や立方体の形をしていると仮定した first-order mean-torque モデル^{20,21)}を用いて、SM と PSPC のそれぞれの膜中の平均分子面積を求めた。表 2-1 の結果はシミュレーションの結果^{22,23)}と一致しており、Chol 非含有膜では、SM は 56.6 Å² となり、PSPC の 60.8 Å² よりも小さいことが分かった。これは、SM が分子間で水素結合を形成しているため、分子がよりパッキングされているためだと考えられる。一方、Chol 含有膜では、SM と PSPC の分子面積はほぼ等しくなった。Chol を含有することによる分子面積の減少度を比較すると、PSPC の 12.8 Å² に対して SM は 9.0 Å² と小さいことが分かった。これは、SM は Chol を膜中に含有することによるエントロピーの損失が少ないことが示唆している。つまり、Chol は SM 膜に分配されるほうが優位であることが推定された。

表2-1 SM膜とPSPC膜の平均分子面積 (Å²) (50 °C)

	PSPC	PSPC-Chol (1/1)	SSM	SSM-Chol (1/1)
Area-per-lipid (Å ²)	60.8	48.0	56.6	47.6

さらに、Chol 含有膜における SM と PSPC の違いを精査するために、温度や Chol 含有率の変化に対する動的挙動の変化を比較した。図 2-8 に SM 膜と PSPC 膜中の異なる深さに位置するメチレンユニットの分裂幅の温度依存性を示す。

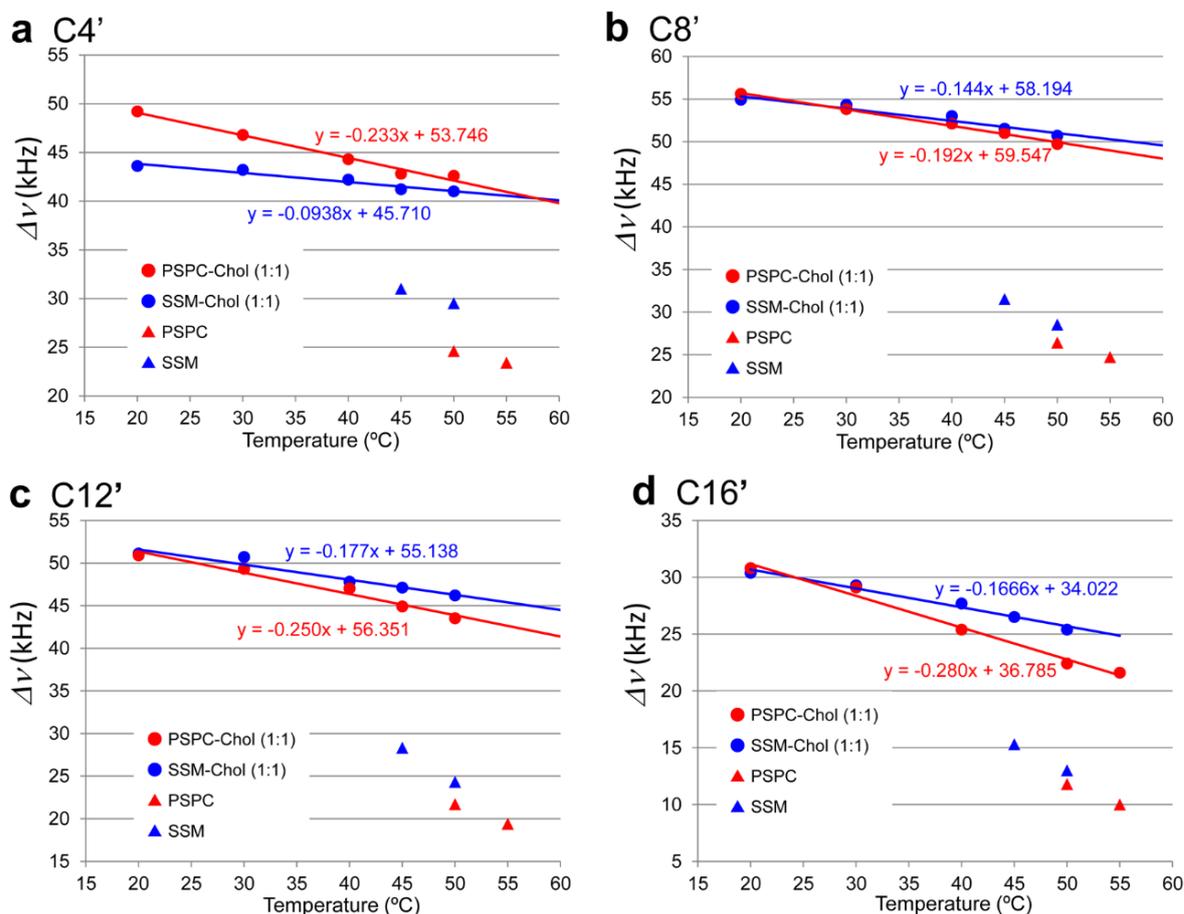


図 2-8 アシル鎖(a) 4'位、(b) 8'位、(c) 12'位、(d) 16'位の SM と PSPC の分裂幅の温度依存性 Reprinted with permission from *Biophys. J.* 2014, 106, 631-638. Copyright © (2014) Elsevier.

その結果、Chol 含有膜において、温度上昇に対する SM と PSPC の分裂幅の変化は、どのメチレンユニットにおいても一次直線で近似され、その傾きは PSPC の方が大きいことが示された。これは、PSPC の運動性が温度に大きく依存していることを意味している。特にアシル鎖の上部 (4'位) や末端 (12'位や 16'位) の温度依存性は、Chol が分布する中央部に比べて大きくなっている。一方、SM の運動性の温度依存性は小さく、特に 4'位では、直線の傾きがほぼ水平にな

った。これは、SM が膜表面部でアミド結合を介して SM-SM 分子間水素結合を形成しているため、熱安定性が高くなったと推定される。また、純粋な SM 膜と PSPC 膜の分裂幅の温度依存性についても解析を試みたが、測定点数が少なく、相転移温度以下ではゲル相の分裂幅が観測されないという問題点があった。解決策として、測定点数を増やすと共に、 ^2H NMR スペクトルから導かれる M_1 モーメントを用いた解析を行うことを考え、現在進行中である。

この温度依存性をさらに詳細に調べるため、Chol 含有率を 20、33 mol% にして測定を行った。図 2-9 には、 $10'$ 位重水素標識化 SM と PSPC の各 Chol 含有率の分裂幅の温度依存性を示す。どの Chol 含有率においても、SM の方が温度依存性は小さいが、Chol の割合が減少するにつれて、その違いはより顕著になった。また、20 mol% になると、分裂幅が観測される温度範囲も狭くなるが、SM 膜では 30 °C でも観測されているのに対して、PSPC 膜では 40 °C からしか観測されなかった。これは、Chol との相互作用の違いによって、それぞれの膜の相状態が異なることが考えられる。SM と PSPC の Chol 含有膜の相状態の解析の詳細については 3 章で述べる。ちなみに、スフィンゴシン鎖側を重水素標識した 12, 12- d_2 -SM を用いて Chol 含有率を変化させて測定したところ、アシル鎖と同様な分裂幅の温度依存性を示した。これは Chol がどちらのアルキル鎖に対しても同等に相互作用していることを示唆している。

以上の分裂幅の温度依存性の結果より、SM-Chol 膜は複雑な相状態である低濃度の Chol 含有膜においても熱安定性が高いことを示した。

以上の考察より、膜表面部で形成される水素結合のネットワークとそれによって膜内部へ押しやられる Chol のオーダー効果との相乗効果によって、SM 膜では広い温度範囲、Chol 濃度範囲で安定な秩序液体相を形成しやすいことが推定された。膜の恒常性の維持という観点からも、SM 膜の高い熱安定性は、生体膜の脂質ラフトの構成成分として SM が PC よりも優位であることを裏付けている。このように、PSPC との詳細な動態の比較によって、ラフト形成を可能にする SM の特異的動態を明らかにした。これは、今回用いた位置選択的に重水素標識した脂質分子が、分子レベルの詳細な動的挙動を明らかにする上で、非常に有用であることを示している。

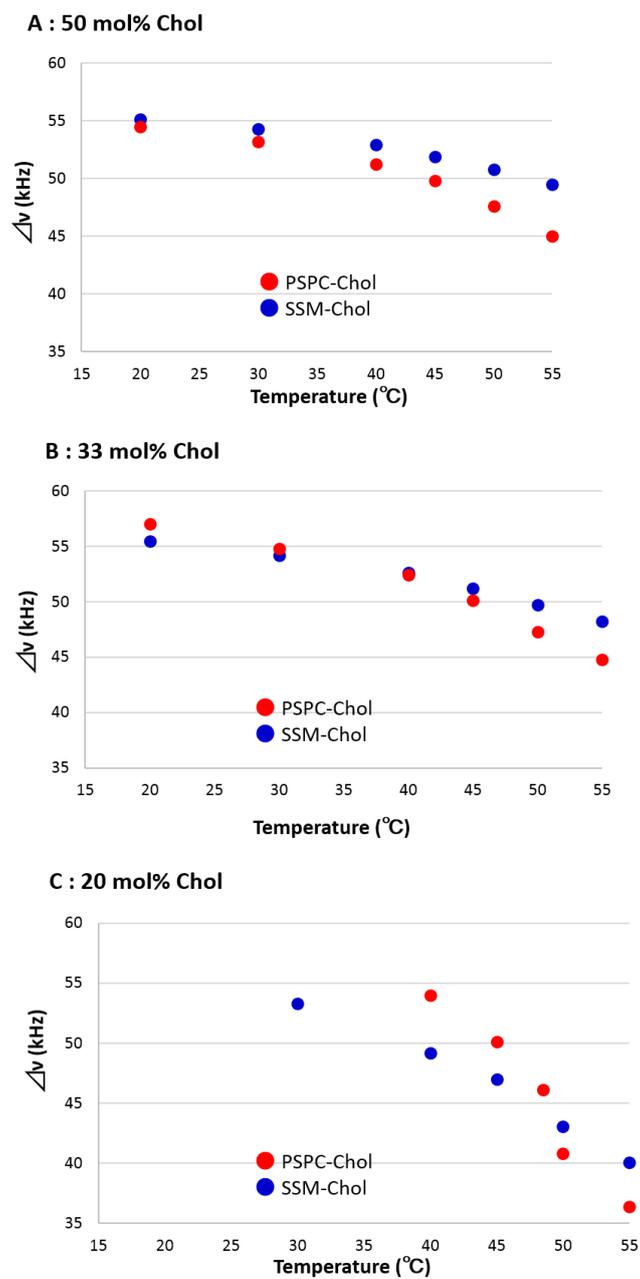


図 2-9 (A) 50 mol%、(B) 33 mol%、(C) 20 mol% Chol 含有膜におけるアシル鎖 10'位重水素標識 SM と PSPC の分裂幅の温度依存性

参考文献

- 1) Niemelä, P.; M. T. Hyvönen; I. Vattulainen. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 2976–2989.
- 2) Mehnert, T.; K. Jacob; R. Bittman; K. Beyer. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 939–946.
- 3) Kučerka, N.; D. Marquardt; T. A. Harroun; M. Nieh; S. R. Wassall; D. H. de Jong; L. V. Schäfer; S. J. Marrink; J. Katsaras. *Biochemistry* **2010**, *49*, 7485–7493.
- 4) Sankaram, M. B.; T. E. Thompson. *Biochemistry* **1990**, *29*:10670–10675.
- 5) Aittoniemi, J.; P. S. Niemelä; M. T. Hyvönen; M. Karttunen; I. Vattulainen. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 1125–1137.
- 6) Lönnfors, M.; J. P. F. Doux; J. A. Killian; T. K. M. Nyholm; J. P. Slotte. *Biophys. J.* **2011**, *100*, 2633–2641.
- 7) Zhang, Z.; S. Y. Bhide; M. L. Berkowitz. *J. Phys. Chem. B.* **2007**, *111*, 12888–12897.
- 8) Guo, W.; V. Kurze; T. Huber; N. H. Afdhal; K. Bayer; J. A. Hamilton. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 1465–1478.
- 9) Matsumori, N.; T. Yasuda; H. Okazaki; T. Suzuki; T. Yamaguchi; H. Tsuchikawa; M. Doi; T. Oishi; M. Murata. *Biochemistry* **2012**, *51*, 8363–8370.
- 10) Jaikishan, S.; Björkbom, A.; J. P. Slotte. *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes.* **2010**, *1798*, 1987–1994.
- 11) Lin, H. N.; Z. Q. Wang; C. H. Huang. *Biochemistry* **1990**, *29*, 7063–7072.
- 12) Duer, M. J. *Introduction to solid-state NMR spectroscopy* **2004**.
- 13) Oldfield, E.; Meadows, M.; Rice, D.; Jacobs, R. *Biochemistry* **1978**, *17*, 2727–2740.
- 14) 山口 敏幸 大阪大学大学院理学研究科化学専攻 平成 23 年度学位論文
- 15) Yamaguchi, T.; T. Suzuki; T. Yasuda; N. Matsumori; T. Oishi; M. Murata. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 270–278.
- 16) 前田 佳子 大阪大学大学院理学研究科化学専攻 平成 22 年度修士論文
- 17) Huang, J.; Feigenson, G. W. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 2142–2157.
- 18) Niemelä, P.; Hyvönen, M. T.; Vattulainen, I. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 2976–2989.

- 19) Malcom, I. C.; Ross, J. C. Higinbotham, J. *Solid state Nucl. Magn. Reson.* **2005**, *27*, 247-256.
- 20) Bartels, T.; Lankalapalli, R. S.; Bittman, R.; Beyer, K.; Brown, M. F.; *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14521-14532.
- 21) Petrache, H. I.; S.W. Dodd; M. F. Brown. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 3172–3192.
- 22) Khelashvili, G. A.; H. L. Scott. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 9841–9847.
- 23) Robinson, D. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 2498–2503.

第3章 本論II

蛍光実験によるマクロな膜流動性解析および分子レベルの脂質の動態との比較

2章では、Chol含有膜内のSMとPCの違いを、分子・原子レベルの動的挙動、およびCholとの相互作用の観点から ^2H NMRによって明らかにした。具体的には、SM膜では表面部で形成される水素結合のネットワーク形成と、それによって膜内部へ押しやられたCholがもたらすオーダー効果との相乗効果によって、熱安定性の高い秩序液体相が形成することを明らかにした。しかしながら、 ^2H NMRによって観測したのは、マイクロ秒オーダー以上の長い時間領域における脂質アシル鎖の局所的な運動性についてである。そこで、Cholを含む2成分系膜において、新たな分析手法を導入し、NMRとは時空間スケールの異なる視点で脂質の動態を解析することが必要であると考えた。具体的には、膜全体の動態を調べるため、2つの蛍光実験（蛍光異方性測定、蛍光寿命測定）を行い、NMRでは検出できない膜全体の平均流動性やナノ秒時間領域の流動性を定量的に評価することを試みた。これらの手法を用いて、前章と同様にSM膜とPC膜の動態の違いを評価した。これまでラフトの物理的性質を明らかにするために、NMRと蛍光実験が個別に用いられることはあったが、それらの結果を体系的に比較した研究はほとんどない。そこで、本章で取得した結果をNMRから取得した分子レベルの脂質の動態情報^{1,2)}と比較して、SMとPCの違いを多角的に明らかにした。

3-1 蛍光異方性測定

蛍光異方性測定では、脂質膜に導入した蛍光分子から発せられる蛍光の偏光成分を測定することで、膜全体の平均流動性やラフト形成能を定量的に解析することができる³⁻⁶⁾。この測定法を行うための蛍光偏光装置の概略図を図 3-1 に示す。

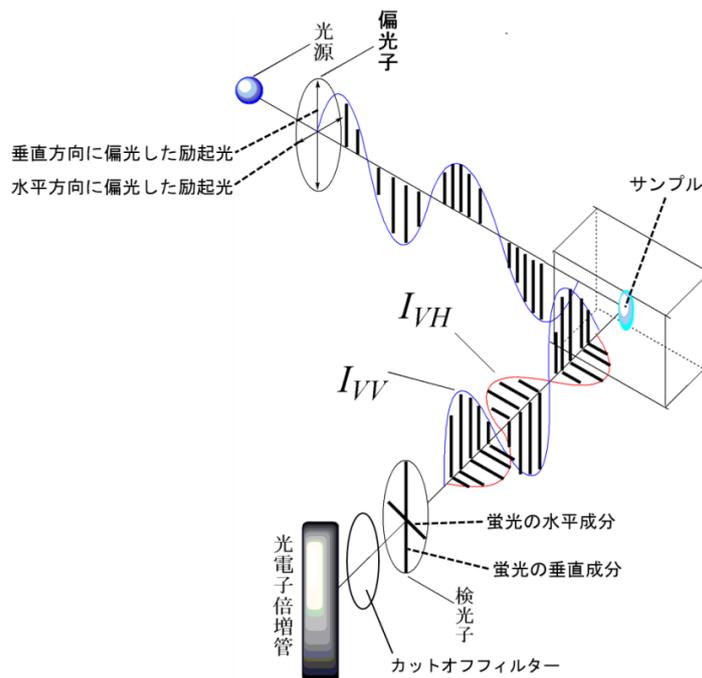


図 3-1 蛍光偏光装置の概略図

蛍光の偏光性をより定量的に解析するために蛍光異方性 r が定義され、式(1)のように示される。

$$r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}} \quad (1)$$

$$I_{//} = I_{VV} \quad (2)$$

$$I_{\perp} = GI_{VH} \quad (3)$$

$$G = I_{HV} / I_{HH} \quad (4)$$

I_{HH} : 励起偏光子 (水平方向)、検光子 (水平方向) のときの蛍光強度

I_{HV} : 励起偏光子 (水平方向)、検光子 (垂直方向) のときの蛍光強度

I_{VH} : 励起偏光子 (垂直方向)、検光子 (水平方向) のときの蛍光強度

I_{VV} : 励起偏光子 (垂直方向)、検光子 (垂直方向) のときの蛍光強度

G (装置関数) : 蛍光側分光器の垂直偏光の水平方向に対する感度比

蛍光異方性測定でよく用いられる蛍光分子として、1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) がある。この分子は、その疎水的性質から、同様の環境である脂質膜内部に入りこむことができる。そのため、DPH の異方性の大きさから膜内部の流動性の定量が可能となる。

具体的には、液晶相 (L_d 相) の場合、脂質アルキル鎖の内部回転による配座変化が頻繁に起こるので、分子同士のパッキングは弱い。そのため膜の疎水領域に存在する DPH の運動性は高くなり、得られる蛍光の偏光性は小さくなる (図 3-2A)。通常、蛍光の偏光が解消される原因として、蛍光寿命中に DPH の分子軸のぶれがブラウン運動によって増大することが挙げられる。そのことで励起された状態とは異なる偏光性をもった蛍光が発せられるため、蛍光の偏光が解消される。一方、ゲル相および秩序液体相 (L_o 相) の場合、脂質分子同士は強くパッキングしているため、疎水領域に存在する DPH の運動性は強く制限されている (図 3-2B)。そのため、蛍光の偏光性は保持される。つまり、蛍光異方性が大きい場合、蛍光の偏光性は十分に保持されているので膜の流動性は低いことを意味している。

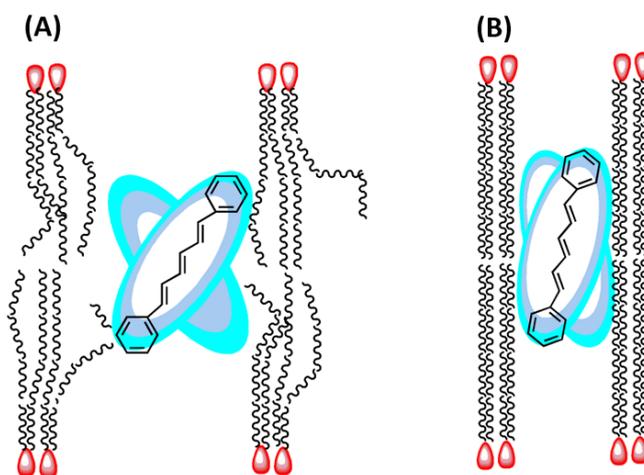


図 3-2 (A) 液晶相での DPH の挙動
(B) ゲル相および秩序液体相での DPH の挙動

今回用いた蛍光分子 DPH はゲル相、 L_o 相、 L_d 相にほぼ均等に分配するため^{7,8)}、測定で得られる蛍光異方性の大きさは、膜中に存在するそれぞれの相状態の流動性が平均されたものとなる。試料として、Chol を 20、33、50 mol% 含む SSM 膜と PSPC 膜を調製し、系中に含まれる DPH 濃度は全脂質量の 1 mol% として、20~60 °C の温度範囲で蛍光異方性を測定した。試料の調製法や詳細な実験条件に関しては実験項に記す。

結果として、純粋な SM 膜と PSPC 膜の蛍光異方性は、それぞれの脂質の相転移温度 (SSM : 44 °C⁹⁾、PSPC : 48.8 °C¹⁰⁾) で大きな減少が見られた (図 3-3)。この変化は、ゲル相から液晶相への相転移を示している。このように、蛍光異方性測定は、温度変化に対する相状態の変化を解析するのに有用である。

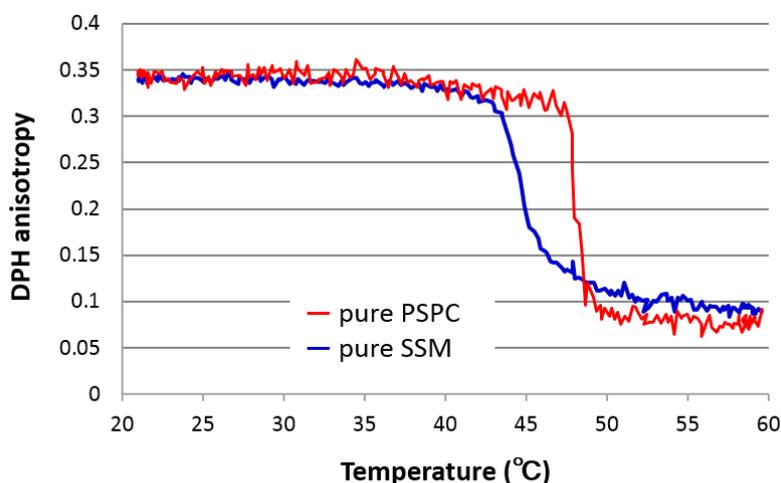


図 3-3 温度変化に対する純粋な SM 膜と PSPC 膜の DPH 異方性変化

一方、Chol 含有膜では、どちらの脂質においても明確な相転移を示さず、高い蛍光異方性の値を保持していた (図 3-4)。つまり、Chol 含有膜は L_o 相を形成していることを示している。SM と PSPC を比較すると、50 mol%Chol 含有膜では違いが見られないが、33、20 mol%では SM 膜は PSPC 膜よりも温度上昇に対する異方性の減少度が小さいことが明らかとなった。この違いは Chol 含有率が減少するほど顕著に現れた。2 章の図 2-9 においても、SM の方が PSPC よりも温度上昇に対する ²H NMR シグナルの分裂幅の減少度が小さいことが示された。つまり、脂質の局所的な運動性からだけでなく、膜全体の流動性からも SM 膜の温度依存性が小さいことが示された。さらに、PSPC-20 mol%Chol 含有膜に着目すると、相転移温度に近い 48 °C 付近でゲル- L_d 相の相転移のように異方性の値が減少していることが示された (図 3-4C)。これは膜中に存在する

相状態と深く関係があると考えられたので、蛍光寿命測定の結果と併せて詳細な解析を行った。

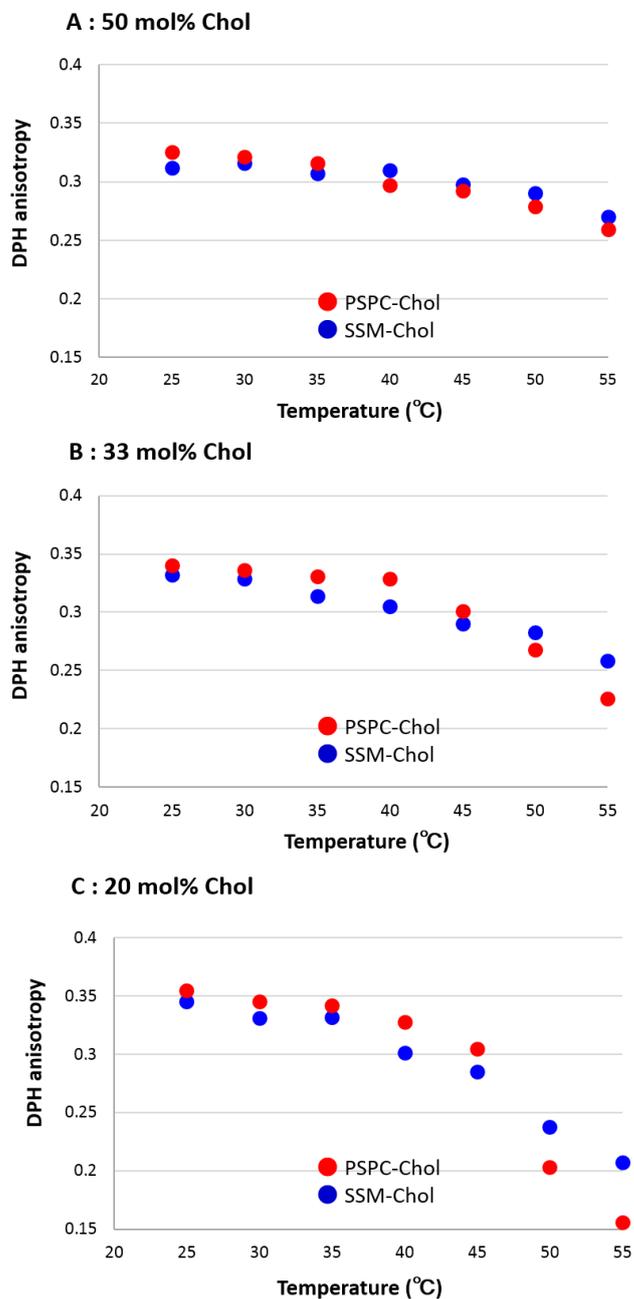


図 3-4 温度変化に対する様々な Chol 含有率の SM 膜と PSPC 膜の DPH 異方性変化 (●PSPC-Chol、●SSM-Chol) (A) 50 mol%、(B) 33 mol%、(C) 20 mol%

3-2 蛍光寿命測定

時間分解蛍光寿命測定では¹¹⁾、蛍光異方性測定と同様に、脂質膜に導入した蛍光分子の性質、すなわち蛍光寿命を測定することで、膜の相挙動を定量的に解析することができる。また、相図の作成や細胞イメージングにも頻繁に利用されている¹²⁻¹⁹⁾。

パルス光によって励起された蛍光分子は、分子内緩和などによって、励起状態の最も低い振動準位へ非常に速く (10^{-12} s) 戻り、一定の時間滞在した後、発光しながら基底状態に戻る (輻射過程)。すなわち、蛍光寿命は蛍光分子が基底状態に戻るまでの励起状態にある平均時間であると定義される。励起分子からの発光である蛍光を観測することで、蛍光寿命を測定することができる。

最初の励起された蛍光分子の数を $n(0)$ 、輻射過程の速度定数を Γ 、熱を放出しながら基底状態に戻る無輻射過程の速度定数を k_{nr} とすると、 n の時間変化は式 5 で表され、励起状態に留まる分子は指数関数的に減少する (式 6)。ここで、蛍光強度 I は励起した分子数に比例するので、ある時間 t における蛍光強度は式 7 で表される。

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(\Gamma + k_{nr})n(t) \quad (5)$$

$$n(t) = n(0)e^{-(\Gamma + k_{nr})t} \quad (6)$$

$$I(t) = I_0 e^{-(t/\tau)} \quad (7)$$

つまり、励起分子の蛍光寿命 $\tau = (\Gamma + k_{nr})^{-1}$ であり、実際の測定では、蛍光強度が測定され、 $\log I(t)$ vs t をプロットして、その減衰の傾きとモデル式をフィッティングすることで蛍光寿命を求める。一般的に、蛍光寿命はナノ秒オーダーと非常に短く、蛍光分子の周囲の環境に強く依存する。つまり、蛍光寿命測定によって、ナノ秒時間領域に起こるプローブ周辺の局所的な膜の相挙動や流動性の変化を定量することができる。これらの情報は、測定のタイムスケールの長い²H NMR や前節の蛍光異方性測定からは得られない。蛍光分子の周囲で大きな変位がない場合、すなわち膜の流動性が低い場合、蛍光寿命は長くなるが、分子の揺らぎが大きく流動性が高い場合、短い寿命が検出される (図 3-5A)。

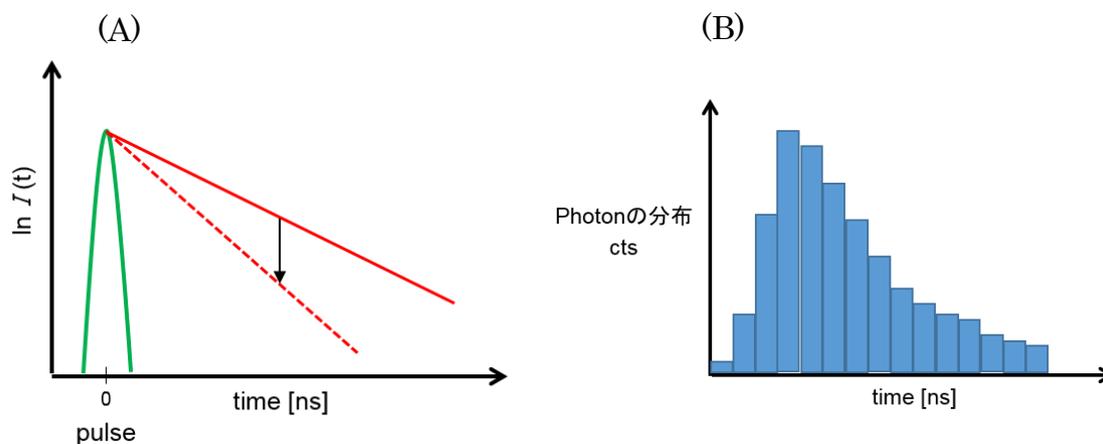


図 3-5 (A) 蛍光寿命測定のスเปクトル模式図 (B) TCSPC の原理

傾きの大きい実線は低い流動性、傾きの小さい点線が高い流動性のときの減衰曲線を示す。

測定手法としては、時間相関単一光子係数法 (Time Correlated Single Photon Counting, TCSPC) が一般的である。この手法では、非常に短い (ピコ秒やフェムト秒) パルス光が試料を数十ナノ秒間隔で繰り返し励起し、その強度は、1つのフォトン検出を確実にするため、100回の励起パルスに対して1つのフォトンが検出できるように調節される。そして、励起パルス光の照射からフォトン検出までの時間をパルス毎に計測することを何万回も繰り返し、時間差に対して、フォトン検出回数すなわち蛍光強度をヒストグラムに表示すると、蛍光強度の減衰が得られる (図 3-5B)。つまり、蛍光寿命 τ は、励起状態にある分子が $1/e$ になる時間を示す。

この蛍光寿命測定を行うのに適切な蛍光プローブは、膜物性への阻害の影響が小さく、プローブ周辺の環境の変化 (温度や相状態) に非常に敏感で、その影響が蛍光寿命の長さに大きく反映されることが好ましい。そこで、本研究では、相状態の違いによって異なる長さの寿命を与え、頻用されている *trans*-parinaric acid (tPA) を用いた^{20,21)}。tPAはオーダーが高い相に存在すると、長い蛍光寿命を示すことが知られている。試料として、異方性測定と同様に、Cholを20、33、50 mol%含むSSM膜とPSPC膜を調製し、系中に含まれるtPA濃度は全脂質量の2 mol%として、20、25、30、35、40、45、50、55 °Cで測定した。試料の調製法や詳細な実験条件に関しては実験項に記す。解析はFluoFit Pro softwareで行った。

蛍光異方性測定によって、膜中に複数の相状態が存在していることが示唆されたので、測定で得られた蛍光強度の減衰曲線を、蛍光プローブが複数の環境下に存在している場合に用いられる**multi-exponential model**でフィッティングを行った。このモデルでは減衰曲線が個々の**single exponential decay**の合計であると仮定するため、式7は式8のように変換できる。 τ_i は寿命時間、 α_i はそれぞれの寿命成分の割合、 n は寿命成分の数を示す。今回、解析ソフトによって2成分と3成分の分解式でフィッティングを行った結果、同程度の偏差が得られたが、解析を容易にするため、より成分の少ない2成分で解析したデータを採用した。つまり、式8は式9に書き換えられる。

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i e^{-(t/\tau_i)} \quad (8)$$

$$I(t) = \alpha_1 e^{-(t/\tau_1)} + \alpha_2 e^{-(t/\tau_2)} \quad (9)$$

解析で得られた各寿命成分 (τ_1 , τ_2) の温度依存性について考察する前に、まずtPAの平均蛍光寿命 (τ_{AV}) を用いて、膜全体の相状態を時間平均化した流動性を解析した (図3-6)。その結果、 τ_{AV} はDPHの蛍光異方性と同様な挙動を示した。つまり、純粋なSM膜とPSPC膜の平均蛍光寿命は、それぞれの脂質の相転移温度付近で大きな減少が見られており (図3-6A)、この寿命の大きな変化は、ゲル相から液晶相への相転移を示している。一方、Chol含有膜では、どちらの脂質においても明確な寿命の減少は観測されなかった (図3-6B-D)。しかしながら、Chol含有率20 mol%のPSPC膜に着目すると (図3-6D)、純粋なPSPC膜ほどではないが、相転移温度付近で寿命の減少度の傾きが変化しているのが見られた。これは、蛍光異方性測定において相転移温度付近で異方性の値が大きく減少していた結果と一致している。

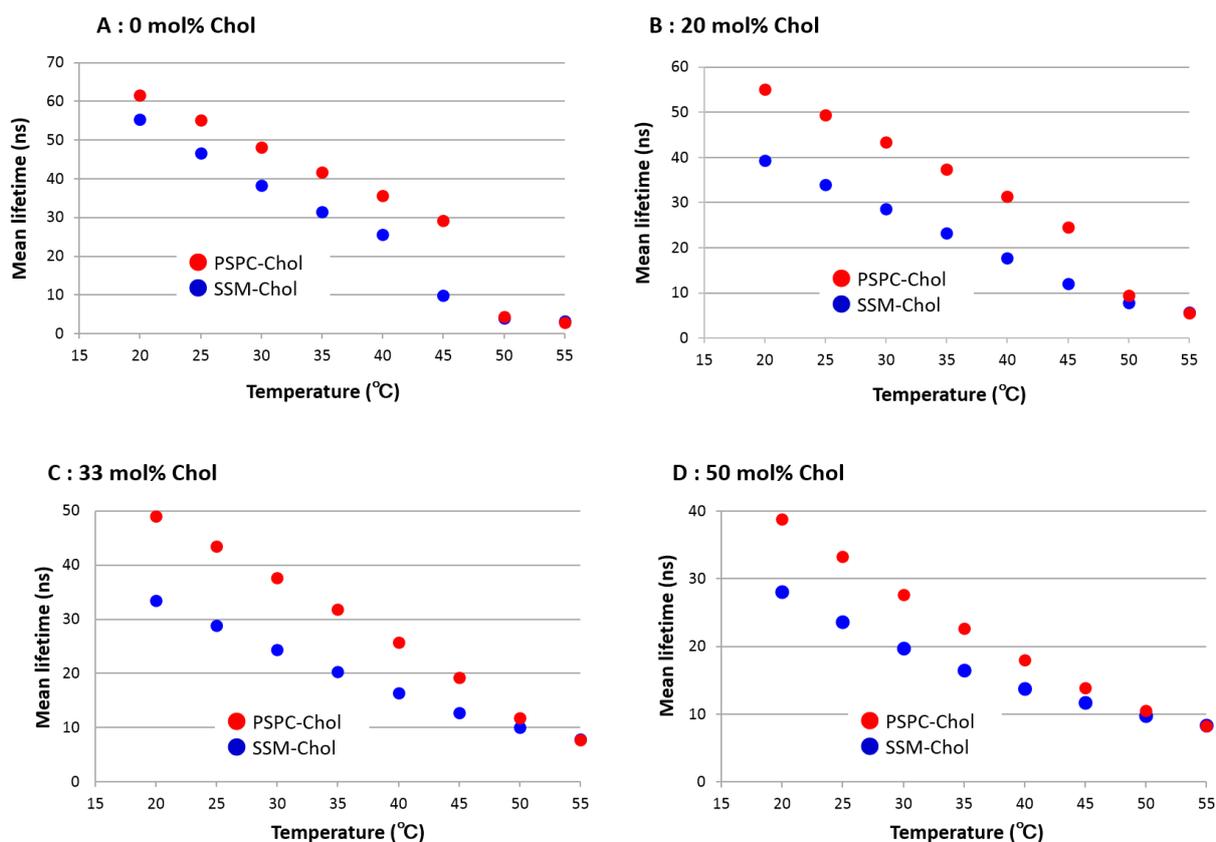


図 3-6 tPA の平均蛍光寿命 (τ_{AV}) の温度依存性 ● PSPC 膜、● SSM 膜
(A) 0 mol%、(B) 20 mol%、(C) 33 mol%、(D) 50 mol%

図 3-7 に、SM-Chol 膜と PSPC-Chol 膜における長さが異なる 2 つの寿命成分の温度上昇に対する変化を示す。膜の流動性が低い場合、蛍光寿命は長くなり、流動性が高いと短い寿命が検出される。したがって、長い蛍光寿命成分である τ_1 はオーダーの高いドメイン、短い τ_2 はオーダーの低いドメインに帰属する。これまで報告された相図^{15,22-27)}によると、2 成分系膜において Chol 含有率が 30 mol%以上では、均一な L_0 相のみしか存在していない。また、SM 膜中の Chol の含有率を変化させて ^2H NMR を測定した結果、Chol 含有率が 25 mol%までは分裂幅が増加したが、25 mol%以降の分裂幅は、ほぼ一定の値を示した (図 3-8)。これは 30 mol%以上では均一な L_0 相のみが存在していることを示しており、従来の相図とも一致している。しかしながら、今回行った蛍光寿命の解析によって 2 つの寿命成分が得られたことは、tPA がナノサイズの異なる環境に分配されていることを意味している。つまり、均一な L_0 相であると報告されてきた 30

mol%以上の Chol 含有膜において、異なるオーダーを示す 2 つのドメインが存在していることが推定される。このことは、蛍光寿命測定で検出可能なナノ秒のタイムスケール内では、2 つのドメインが存在する不均一な膜であることを示唆している。続いて、この 2 つのドメインがどのような相状態をとっているかを考察した。

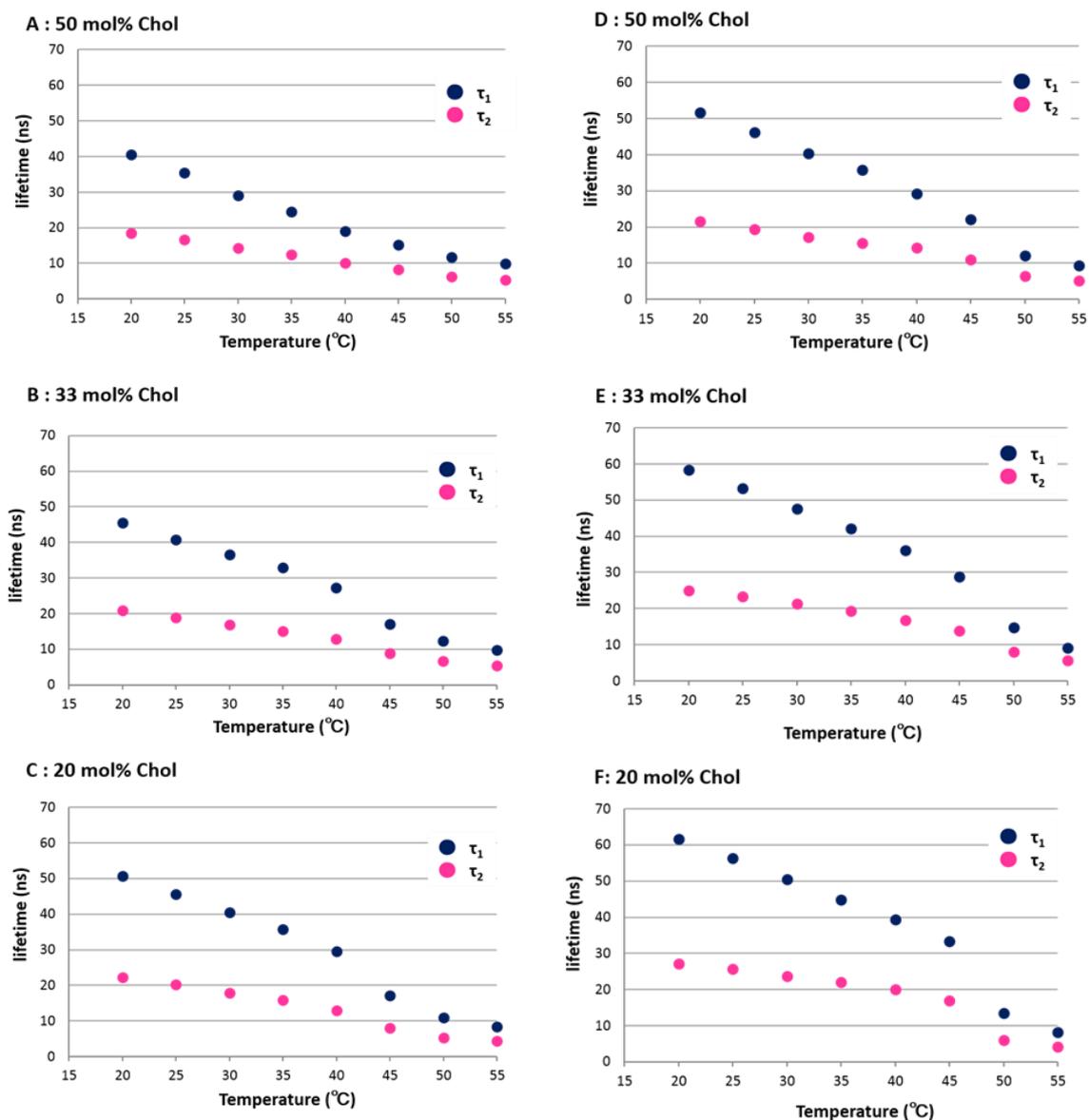


図 3-7 tPA の 2 つの蛍光寿命成分 (τ_1 と τ_2) の温度依存性
(A-C) SSM-Chol 膜、(D-F) PSPC-Chol 膜

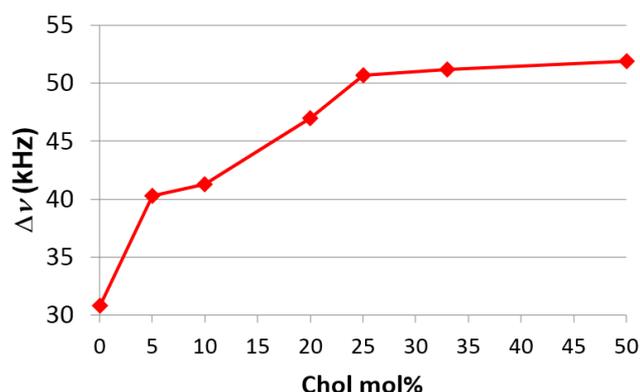


図 3-8 $10',10'$ - d_2 -SM の Chol mol%変化に対する ^2H NMR シグナル分裂幅の変化 (45 °C)

相状態のオーダーは、脂質の側方拡散係数に表されるように、ゲル相、 L_0 相、 L_d 相の順に高い。また、リン脂質のみの膜では、相転移温度を超えると、脂質分子の側方拡散や軸回転運動、アルキル鎖の配座交換が盛んになるので、相転移温度以上でゲル相は存在しない。したがって、相転移温度以上では τ_1 、 τ_2 はそれぞれ共存する L_0 ドメインと L_d ドメインの流動性を反映していると考えられる。

一方、相転移温度以下について、今回の測定では、すべての Chol 含有率で、 τ_1 が 30 ns 以上の長さを示した。これは、膜中に「ゲル相」が存在している特徴であることがこれまでの報告^{12,18,19,28)}より示されている。一般的に脂質二重膜において定義されるゲル相は、長鎖で飽和なアルキル鎖を持つリン脂質のみの膜が相転移温度以下でとる状態である。性質として、脂質アルキル鎖がオ尔特ランスに近い配座をとり、分子同士が密にパッキングするため、側方拡散運動は抑えられており、膜の流動性が低い。しかし、この状態が膜中に 50 mol% もの Chol が存在している環境においても保持されているとは考えにくい。つまり、蛍光寿命で示唆された「ゲル相」を一般的な定義のゲル相と同一視することはできない。以上より、「ゲル相」は、Chol を含有しているものの、その量は L_0 ドメインに比べて極低濃度であると考えられる。この状態では、Chol が存在していても、リン脂質が互いにパッキングし、規則正しく配列した格子状態を取ることができる。そのため、このドメインを構成する脂質分子は、ゲル相を構成する脂質分子の動態に近いと、低い流動性を示すことができると考えられる。そこで、一般的に定義されるゲル相と区別するため、この「ゲル相」を Chol 希薄ゲル相と区別する。

ル様ドメイン (Chol-poor gel-like domain) と名づけた。このようなドメインの存在は、蛍光測定や DSC 測定から構築された相図によって示唆されている²⁹⁾。以上より、相転移温度以下では τ_1 、 τ_2 はそれぞれ共存する Chol 希薄ゲル様ドメインと L_0 ドメインの流動性を反映していると考えられる。このように、2 成分系膜で Chol を豊富に含む膜においても 2 つのドメインが共存していることは、測定のタイムスケールがマイクロ秒オーダー以上である NMR では明らかにできなかった。つまり、共存するドメインは、短寿命の脂質クラスターであり、マイクロ秒オーダーより速い速度で生成と崩壊を繰り返していると考えられる。この共存する異なる 2 つのオーダーを示すドメインの寿命は、 $\sim 0.1 \mu\text{s}$ であるという報告³⁰⁾もあり、今回の結果を支持するものである。相状態のオーダーが高いと、膜中に存在する蛍光分子の運動性が抑えられ、分子が励起状態から基底状態へ緩和する時間が長くなり、蛍光を長い時間発する。また、相状態のオーダーが低い状態、すなわち周囲の脂質分子の運動性が高いと、膜中の蛍光分子の運動性も大きくなり、共役ポリエン構造が乱れ、蛍光の緩和過程が短くなる。したがって、相状態のオーダーの高さと蛍光寿命の長さには相関があると考えられるので、図 3-7 より Chol 希薄ゲル様ドメインでは $> 25 \text{ ns}$ 、 L_0 ドメインでは $10 \sim 25 \text{ ns}$ 、 L_d ドメインでは $< 10 \text{ ns}$ の蛍光寿命を示すと推定される。

次に、寿命成分比 (α_i) に関する解析を試みた。 α_i は各ドメインに存在する蛍光分子の存在量の割合を示すと考えられるので、その大きさから膜中に共存する 2 つのドメインの相対存在比を見積もることができると仮定した。しかしながら、tPA は各相状態に均等に分配する DPH とは異なり、よりオーダーが高い相に多く分配することが報告されている^{15,21)}。さらに、Chol 希薄ゲル様ドメイン、 L_0 ドメイン、 L_d ドメインに対する tPA の詳細な分配係数までは明らかにされていない。したがって、 α_i の大きさを tPA の分配係数で補正することができないため、今回 α_i の大きさをドメインの相対存在比と直接相関させた解析は困難であると判断した。

そこで、相転移温度以下において、ゲル相である純粋なリン脂質膜の寿命成分と図 3-7 に示す Chol 含有膜の 2 つの寿命成分の温度上昇に対する推移を比較することで、SM 膜と PSPC 膜の L_0 ドメインの形成能を推定した。図 3-9 より、SM 膜では PC 膜に比べて Chol 希薄ゲル様ドメインの寿命の長さが、リン脂質のみのゲル相と同じではなく、 L_0 ドメインの寿命の長さにより近いことが示された。この両者の違いは Chol 含有率が少ないほど顕著であった。つまり、SM

膜の Chol 希薄ゲル様ドメインの流動性は、L₀ドメインの流動性により近いことを示している。ドメインの流動性は膜中の Chol 濃度依存的であることから、SM 膜の Chol 希薄ゲル様ドメインには、PC 膜のゲル様ドメインより多くの Chol が分配していると考えられ、SM は Chol との親和性が高いことが推定される。したがって、SM は Chol と共に L₀ドメインを形成しやすいと考えられる。言葉を言い換えれば、SM 膜中に存在する Chol 希薄ゲル様ドメインの割合は少ないと考えられる。

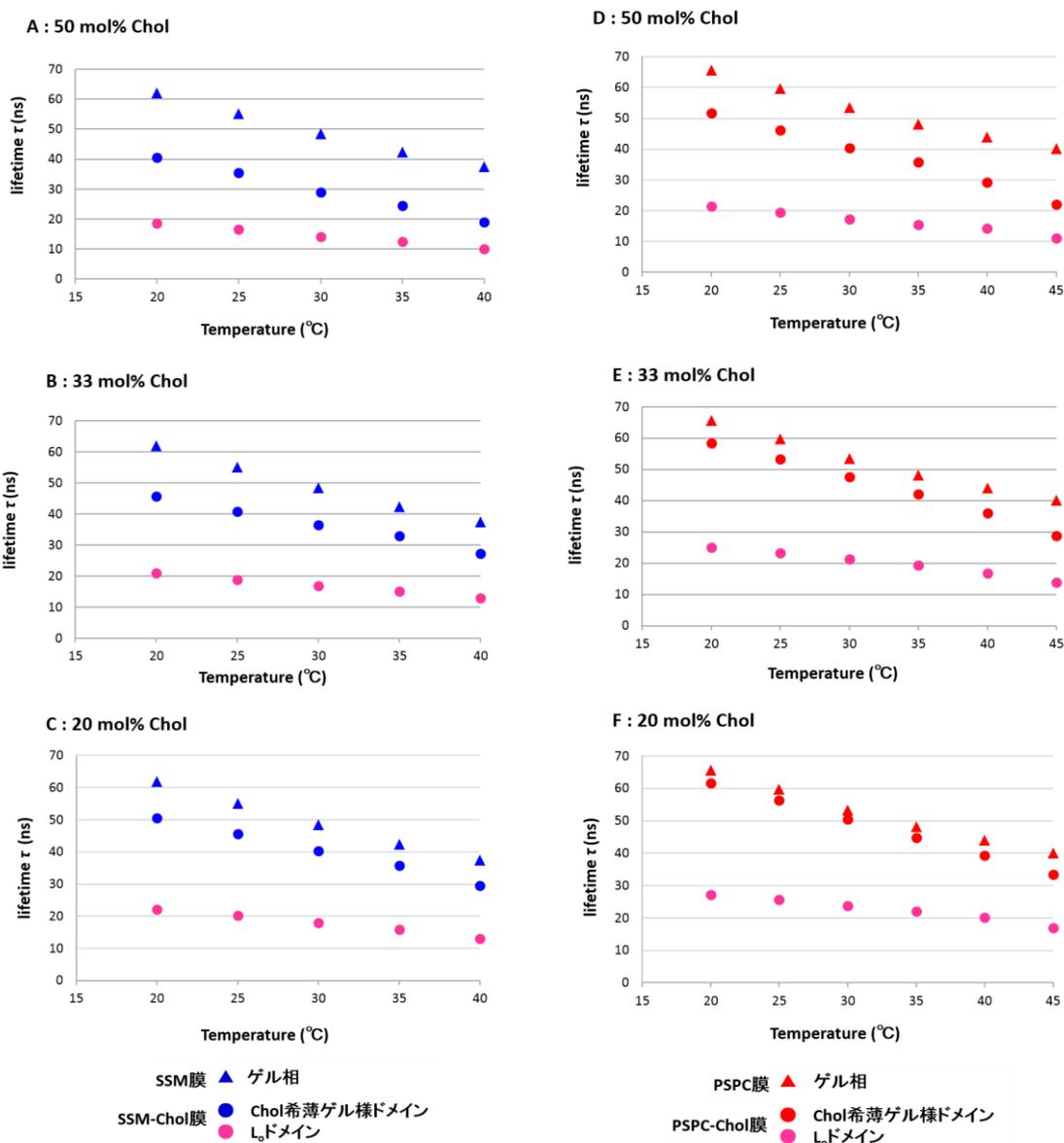


図 3-9 純粋なリン脂質膜と Chol 含有膜の温度上昇に対する寿命成分の推移の比較 (A-C) SSM-Chol 膜、(D-F) PSPC-Chol 膜

一方、PSPC-Chol 膜において、Chol 希薄ゲル様ドメインと純粋なリン脂質膜のゲル相の寿命がほぼ等しいことから、Chol との親和性が低く、より多くの Chol 希薄ゲル様ドメインが膜中に存在していると考えられる。これは、図 3-4、3-6 において PSPC-20 mol%Chol 膜で異方性や平均蛍光寿命が温度上昇に対して相転移のように減少した結果と一致している。

したがって、L_oドメイン形成能の推定より、²H NMR や蛍光実験の結果で示したように SM 膜の高い熱安定性は、SM 膜が多くの L_oドメインで構成されていることに起因すると考えられる。現在 tPA の各ドメインへの分配係数を見積もっており、今後 SM 膜と PSPC 膜において共存するドメインの存在量を定量的に評価していく予定である。

ここで、膜中のドメインに関して考察するため、膜全体の熱的な相挙動が捉えられる示差走査熱量測定 (DSC) のデータを示す (図 3-10)。DSC の昇温過程サーモグラムでは、SM と PSPC のどちらの膜においても Chol 含有率が上昇するにつれて、エンタルピーは減少し、転移ピーク幅は小さくなった。

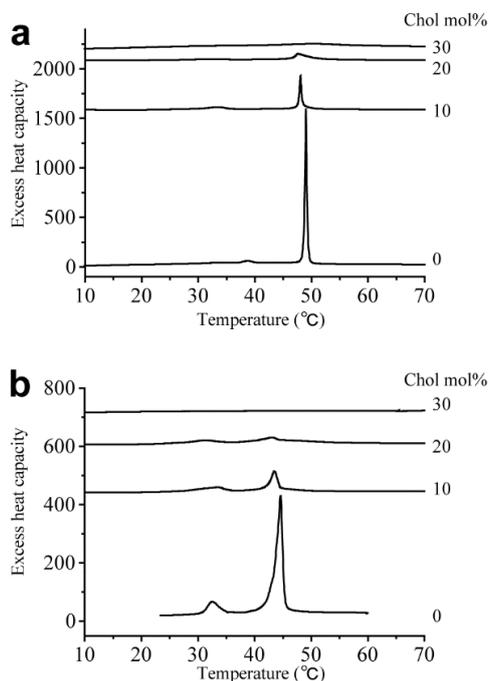


図 3-10 Chol 含有率 0、10、20、30 mol% の PSPC 膜 (a) と SSM 膜 (b) の DSC 測定 Reprinted with permission from *Biophys. J.* 2014, 106, 631-638. Copyright © (2014) Elsevier.

特に、20 mol%Chol 含有 SM 膜のサーモグラムを拡大すると、42 °C (鋭いピーク) と 45 °C (幅広いピーク) に 2 つの主転移が現れた (図 3-10)。これらは、それぞれ Chol 希薄ゲル様ドメインから L_d ドメイン、 L_o ドメインから L_d ドメインへの転移に対応していると考えられ、図 3-7 で考察した共存する 2 つのドメインの存在と一致している。一方、PSPC 膜についても、拡大すると主転移ピークの高温側に小さな肩が見られることから (図 3-11)、同様に相転移温度以下で Chol 希薄ゲル様ドメインと L_o ドメインが共存していることが示唆された。また、Chol 含有率 20 mol% の SM 膜と PSPC 膜のサーモグラムを比較すると、SM 膜の方が高温側の L_o - L_d 相転移に対応するピークが幅広く示された。一般的に、相転移の温度幅はドメインサイズ (cooperative unit) に対応しており、ピークの幅が広いほどドメインサイズが小さいことを意味している。つまり、SM 膜では小さい L_o ドメインが多数形成され、PSPC 膜では大きなドメインが形成されることが示唆された。この考察は、図 3-9 より推定した各脂質膜の L_o ドメイン形成能の違いと一致している。また、ドメインの大きさは、蛍光寿命測定と DSC で観測するタイムスケールが異なっても共通していると推定される。

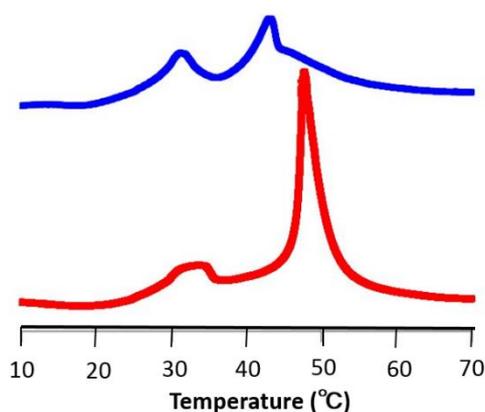


図 3-11 (A) Chol 含有率 20 mol% の SM 膜(—)と PSPC 膜(—)のサーモグラム

さらに、高温側の L_o - L_d 相転移に対応するピークの位置が、PSPC 膜では Chol 希薄ゲル様ドメイン- L_o ドメインの相転移に対応するピークとほぼ重なっていたのに対し、SM 膜では 2 つのピークの分離が明確であった。これは、SM 膜の Chol 希薄ゲル様ドメイン/Chol 豊富な L_o ドメインの相分離が明確で、2 相間の

Chol の分布の偏りが大きいことを示唆している。一方、PSPC 膜では 2 つのピークがほぼ重なっていたため、Chol 希薄ゲル様ドメインと L_0 ドメインの物性がよく似ていると考えられる。3 成分系膜のドメインの相分離に関しては 4 章で述べる。

最後に、本章の 2 つの蛍光実験によって得られた膜全体の平均流動性やナノ秒時間領域の流動性を、 ^2H NMR の結果 (図 2-9) と比較した。その結果、四極子分裂幅・蛍光異方性・平均蛍光寿命は温度変化に対してほぼ同様な推移を示した (図 2-9、3-4、3-6)。これは、リン脂質アシル鎖の局所的な運動性と膜全体の流動性が密接に関連していることを示唆している。また、蛍光実験においても ^2H NMR の結果が示したように、SM 膜の温度依存性が PSPC 膜に比べて小さいことが示された。また、DSC 測定においてもこのことが再現されており、Chol 含有率 20 mol% の SM 膜と PSPC 膜のサーモグラムの転移ピークの大きさは (図 3-11A)、 ^2H NMR (図 2-9C) の分裂幅の温度変化に対する減少の傾きの大きさと一致した。しかし、 ^2H NMR では PSPC 膜において蛍光実験で見られたような相転移は検出されなかった。これは ^2H NMR の測定原理上、ゲル相に含まれる脂質のシグナルがブロードニングするので、明確に観測できないためである²⁹⁾。Chol 希薄ゲル様ドメインは、ドメイン中に Chol を含有しているものの、ゲル相に近い流動性を示すため、分子の局所的な運動性もゲル相に近いと考えられる。実際、20 mol% Chol 含有 PSPC 膜において 40 °C 以下では明確な分裂幅が観測されずブロードなパターンを表した。一方で 20 mol% Chol 含有 SM 膜では 30 °C まで分裂幅が観測されたことから、図 3-9 より推定された SM は L_0 ドメイン形成能が高い結果と一致している。このように、Chol 希薄ゲル様ドメインのような低い流動性を定量的に解析できることは、蛍光寿命測定が ^2H NMR よりも優位な点である。さらに蛍光寿命測定は、ナノ秒スケール内の膜の局所的な流動性の観測が可能である点において他の手法よりも優れている。

2、3 章の ^2H NMR と蛍光実験で観測した 2 成分系膜における脂質の動態情報について、相転移温度以上と以下におけるナノ秒スケールの SM/Chol 膜のモデル図を用いて説明する (図 3-11)。蛍光寿命測定では、ナノ秒時間領域では Chol 希薄ゲル様ドメイン/ L_0 ドメイン (相転移温度以下) と L_0 ドメイン/ L_d ドメイン (相転移温度以上) が共存していることが観測され、それらの局所的な膜レベルの流動性が得られる。蛍光異方性測定では、蛍光寿命測定で得られた各ドメインの動態が時間平均化されるため、定常状態での流動性、つまり各ドメインの

総和として青色で囲まれた膜全体の平均流動性が得られる。 ^2H NMR では、測定タイムスケールがマイクロ秒オーダー以上であるため、蛍光寿命測定で観測された膜中に不均一に共存する小さなドメインが速い交換をしていることを検出できない。しかしながら ^2H NMR で観測している対象は、2つの蛍光実験とは異なり、ドメインを構成する脂質分子アシル鎖の局所的な運動性である。その運動性は、主に分子の軸回転運動やアシル鎖の振動、*anti-gauche* の配座交換であり、タイムスケールでいうとサブナノ秒の非常に速い過程である。したがって、蛍光寿命測定と ^2H NMR で測定タイムスケールは異なるが、観測している運動性のタイムスケールは共通である。つまり、NMR で観測した分子レベルの脂質の運動性が、蛍光寿命測定で得られる寿命の長さを決定付け、膜レベルのドメインの交換のダイナミクスにも大きく影響していると推定される。そのため、各分析手法で得られた脂質の動態の相関を総合的に解釈することは可能であると考えられる。ただ、 ^2H NMR で得られる情報には、運動性の大きさの程度は含まれるが、そこから運動性の速さを見積もるのは困難である。

このように、2成分系膜において空間的（分子レベル～膜レベル）、時間的（ナノ～ミリ秒）にスケールの異なる脂質分子の動態を広範に解析することは、ラフトを正確に理解するうえで重要であると考えられる。

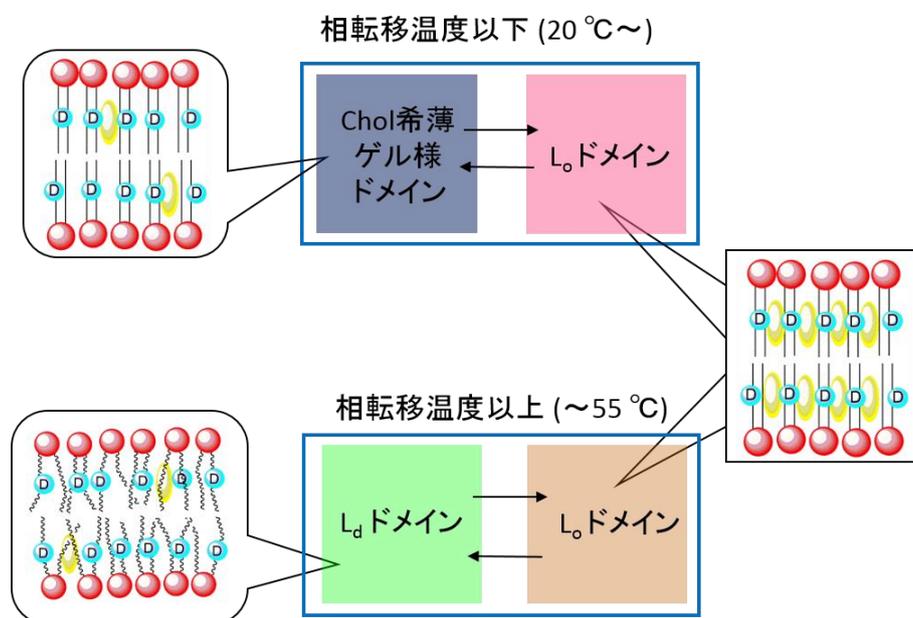


図 3-11 ナノ秒スケールの SM/Chol 膜のモデル図

蛍光実験より膜レベルの脂質の動態情報、 ^2H NMR より分子レベルの脂質の動態情報が観測される。

参考文献

- 1) Matsumori, N.; T. Yasuda; H. Okazaki; T. Suzuki; T. Yamaguchi; H. Tsuchikawa; M. Doi; T. Oishi; M. Murata. *Biochemistry* **2012**, *51*, 8363–8370.
- 2) Yasuda, T.; M. Kinoshita; M. Murata; N. Matsumori. *Biophys. J.* **2014**, *106*, 631-638.
- 3) de Almeida R. F.; Fedorov, A.; Prieto, M. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 2406-2416.
- 4) Lentz, B. R. *Chem. Phys. Lipids.* **1993**, *64*, 99-116.
- 5) Xu, X., and London, E. *Biochemistry* **2000**, *39*, 843-849.
- 6) Megha, J. W., and London, E. *Biochemistry* **2004**, *43*, 1010-1018.
- 7) Lentz, B. R.; Barenholz, Y.; Thompson, T. E. *Biochemistry* **1976**, *15*, 4521-4528; 4529-4537.
- 8) Andrich, M. P.; Vanderkooi, J. M. *Biochemistry* **1976**, *15*, 1257-1261.
- 9) Jaikishan, S.; Björkbom, A.; J. P. Slotte. *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes.* **2010**, *1798*, 1987-1994.
- 10) Lin, H. N.; Z. Q. Wang; C. H. Huang. *Biochemistry.* **1990**, *29*, 7063-7072.
- 11) Joseph R. Lakowicz *Principles of Fluorescence Spectroscopy* **2006**
- 12) Nyholm, T.K.M.; D. Lindroos; B. Westerlund; J. P. Slotte. *Langmuir* **2011**, *27*, 8339-8350.
- 13) de Almeida R. F.; Loura, L. M.; Prieto, M. *Chem. phys. Lipids.* **2009**, *157*, 61-77.
- 14) Stöckl, M.T.; Herrmann, A. *Biochim. Biophys. Acta.* **2010**, *1798*, 1444-1456.
- 15) Mateo, C.R.; Acuña, A.U.; Brochon, J.C. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 978-987.
- 16) Halling, K. K.; Ramstedt, B.; Nystrom, J.H.; J. P. Slotte; Nyholm, T. K. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 3861-3083.
- 17) Maunula, S.; Bjorkqvist, Y. J.; J. P. Slotte; Ramstedt, B. *Biochim. Biophys. Acta.* **2007**, *1798*, 688-689.
- 18) Castro, B.M.; Silva, L.C.; Fedorov, A.; de almeida, R.F.; Prieto, M. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 22978-22987.
- 19) Castro, B.M.; de almeida, R.F.; Silva, L.C.; Fedorov, A.; Prieto, M. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 1639-1650.

- 20) Sklar, L.A.; B.S. Hudson; R.D. Simoni. *Biochemistry* **1977**, *16*, 819-828.
- 21) Sklar, L.A. *Molcul. Cell. Biochem.* **1980**, *32*, 169-177.
- 22) Ipsen, J. H.; Karlström, G.; Mouritsen, O. G.; Wennerström, H.; Zuckermann, M. J. *Biochim. Biophys. Acta*, **1987**, *905*, 162-172.
- 23) Vist, M.R.; Davis, J. H. *Biochemistry* **1990**, *29*, 451-464.
- 24) Chiang, Y.-W.; Costa-Filho, A. J.; Freed, J. H. *J. Phys.Chem. B.* **2007**, *111*, 11260–11270.
- 25) Arsov, Z.; Quaroni, L. *Biochim.Biophys. Acta.* **2008**, *1778*, 880–889.
- 26) Marsh, D. *Biochim. Biophys. Acta.* **2010**, *1798*, 688-699.
- 27) Veatch, S. L.; Keller, S. L. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3074-3083.
- 28) Silva, L. C.; de Almeida, R. F.; Castro, B. M.; Fedorov, A.; Prieto, M. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 502-516.
- 29) Tamai, N.; Izumikawa, T.; Fukui, S.; Uemura, M.; Goto, M.; Matsuki, H.; Kaneshina, S. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 2513–2523.
- 30) Chachaty, C.; Rainteau, D.; Tessier, C.; Quinn, P. J.; Wolf, C. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 4032-4044.
- 31) Greenfield, M. S.; Ronemus, A. D.; Vold, R. L.; Vold, R. R. *J. Mag. Reson.* **1987**, *72*, 89-107.

第 4 章 本論Ⅲ

重水素固体 NMR による 3 成分系膜における脂質の動的挙動解析および脂質の分配比の決定

前章までで Chol を含む 2 成分系膜において、分子レベルから膜レベル、またミリ秒からナノ秒領域に至る SM 膜と PC 膜の動態の違いを ^2H NMR と蛍光実験によって多角的に明らかにした。しかし、実際の生体膜は多成分の分子で構成されているため、より生体膜に近い環境で脂質分子の動態（ダイナミクスや相互作用）を解析することが重要である。そこで、2 成分系膜に不飽和リン脂質である DOPC (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine) を加えた 3 成分系膜を用いた。この 3 成分系膜はラフトを再現する L_0 相と周辺膜を再現する L_d 相の 2 つのドメインが安定に共存している¹⁻⁵⁾。そこで、 ^2H NMR によって観測される分裂幅から、共存する 2 つのドメインを構成する脂質分子の動的挙動および分配比をそれぞれ決定した。さらに、SM 膜と PC 膜を比較し、3 成分系膜においても動態の違いを明らかにした。また、蛍光顕微鏡や蛍光寿命測定を用いて、SM 膜と PC 膜に共存する 2 つのドメインの面積比の違いやナノ秒のタイムスケール内のドメインの存在について考察した。

4-1 3成分系 SM/Chol/DOPC (1/1/1) の動的挙動解析

SM3 成分系膜に関してはすでに修士論文⁶⁾で報告したが、PSPC と比較するにあたり、新たに加えた実験・考察も含めて述べる。SM/Chol/DOPC (1/1/1) 膜で²H NMR を測定すると、30 °C において 2 組の分裂幅が観測された (図 4-1)。

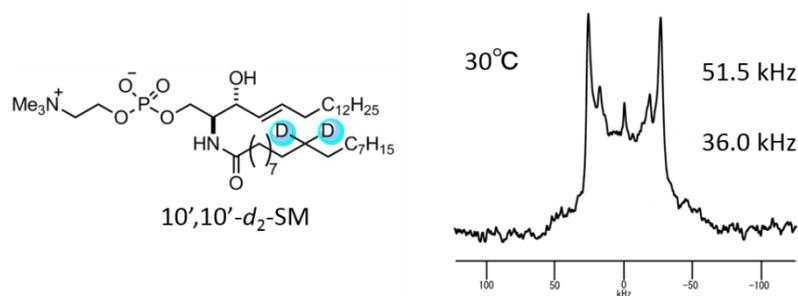


図 4-1 SM/Chol/DOPC (1/1/1) における 10',10'-d₂-SM の²H-NMR スペクトル (30 °C)

オーダーが高い相に存在する分子は、大きい分裂幅の値を示すため、外側の広い分裂幅は SM rich なラフト相 (L₀)、内側の狭い分裂幅は DOPC rich な液晶相 (L_d) に分配した SM に由来すると考えられる。つまり、全ての SM がラフト相に分配しているわけではなく、両方のドメインに存在していることが示された。この 2 組の分裂幅は、温度上昇に対して図 4-2 に示すように変化した。

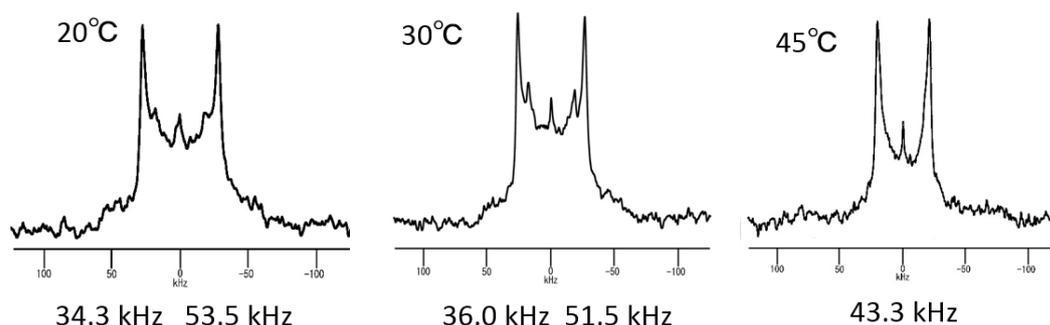


図 4-2 SM/Chol/DOPC (1/1/1) における 10',10'-d₂-SM の分裂幅の温度変化

20、30 °C においては 2 組の分裂幅が観測されたが、高温の 45 °C では分裂幅が 1 組になり、その大きさは 2 組の分裂幅の平均値となった。さらに、内側の分裂幅に着目すると、強度は外側の分裂幅より小さく、温度が上昇するにつれて、強度は徐々に大きくなっている。これまでに報告された 3 成分系膜の相図では、低温では 2 相 (L_o 相と L_d 相) が共存した相状態を取っており、高温になると均一の L_d 相に変化している^{5,7-10)}。この相図を考慮すると、低温側では 2 組の分裂幅は、ラフト相と液晶相に分配した SM の運動性を示しているが、高温の 45 °C では完全にラフト相が融解し、均一な液晶相になるため、1 種類の SM の運動性を示すことになる。つまり、分裂幅の変化から膜の相状態の転移を読み取ることが可能である。ここで、GUV の蛍光顕微鏡観察によって作成された相図では、均一膜になる相転移温度は、より低温の 35 °C であると報告されている⁹⁾。²H NMR の結果と一致しない原因として、蛍光プローブを膜中に取り込ませるため、本来の膜の流動性や脂質分子のパッキングが変わることが考えられる¹¹⁾。そのため、3 成分系膜の相図を作成するためのプローブとしては、蛍光プローブよりも選択的に重水素標識した脂質のように、本来の脂質の性質に近く、膜物性に大きな影響を与えないものが好ましいだろう。

10',10'- d_2 -SM と同様の測定条件で、他の標識位置について測定した結果、2 組の分裂幅が観測された。つまり、3 成分系膜で相分離した 2 相に分配した各々の SM の運動性の推移が同時に得られた (表 4-1、図 4-3 中の■ラフト相、◆液晶相)。このような知見は、全重水素標識体を用いた²H NMR^{12,13)}や MD 計算^{14,15)}を用いた解析では、全く報告されていない。したがって、共存する各相に分配する SM の運動性の推移は、位置選択的重水素標識 SM を用いることによって今回初めて得られた画期的な知見である。

次に、3 成分系膜の各相に分配した SM の運動性の推移を 2 成分系 (SM/Chol) のラフト相や SM/DOPC 膜の運動性の推移と比較した。その際、3 成分系膜において全ての標識位置で 2 組の分裂幅が観測された 30 °C で測定した。それぞれの脂質膜における SM の分裂幅の値を表 4-1 に、SM の運動性の推移を図 4-3 に示す。

表 4-1 各相状態における 10',10'-d₂-SM の四極子分裂幅 (30 °C) 単位 : kHz

	4'	6'	8'	10'	12'	14'	16'
● SM/Chol	43.2	50.1	54.3	54.3	50.7	41.0	29.3
■ 3 成分(SM rich ラフト相)	43.7	49.9	52.2	51.5	48.3	41.0	29.8
◆ 3 成分(DOPC rich 液晶相)	34.8	38.3	38.1	36.0	29.3	24.3	16.2
▲ SM/DOPC	29.9	30.6	29.2	29.2	25.5	16.8	11.9

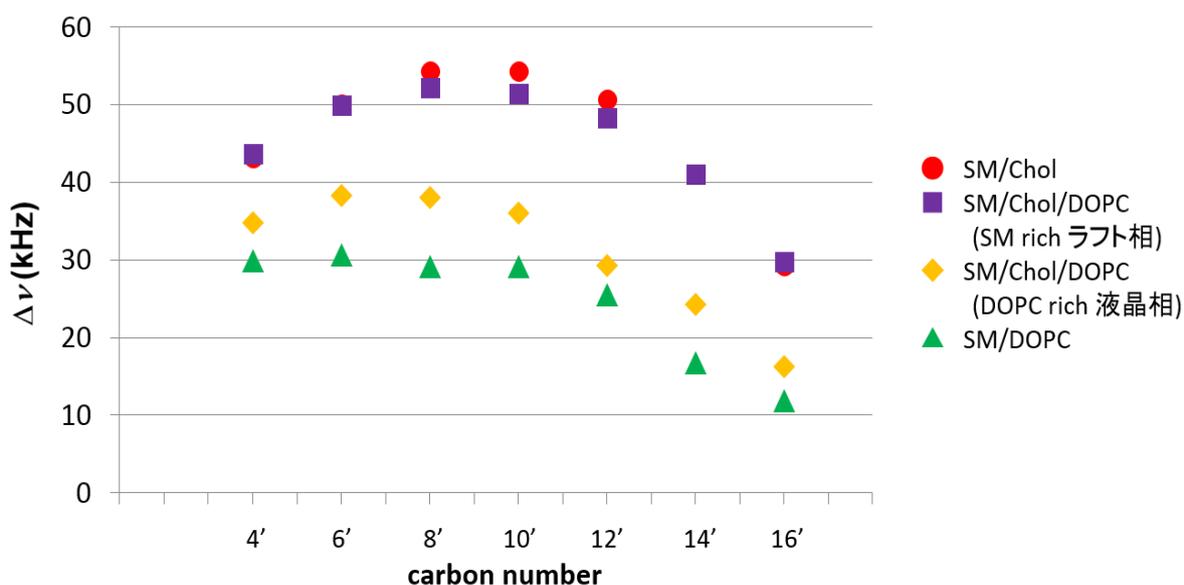


図 4-3 10',10'-d₂-SM の各相状態の分裂幅の推移 (30 °C)

図 4-3 から、■で示される 3 成分系膜のラフト相に分配した SM の運動性の推移は、●で示される SM/Chol の 2 成分系膜の運動性の推移とほぼ等しいことが明らかとなった。この結果は、多成分で構成されるモデル膜、さらには実際の脂質ラフトに存在する SM のオーダーも、SM/Chol の 2 成分系膜の SM アシル鎖のオーダーとほぼ同一であることを示唆している。2 成分系膜と 3 成分系膜でほぼ同じ運動性の推移を示す理由として、図 4-4 で示されるように、ラフト相内で SM/Chol によって形成された短寿命のラフトクラスターが速い生成と崩壊を繰り返して、DOPC とは混和しないことが挙げられる。青色の円で示されたクラスターの生成と崩壊の繰り返しはマイクロ秒オーダーより速いため、NMR のタイムスケール内では、クラスターと DOPC の分離を検出することはできないと考えられる。

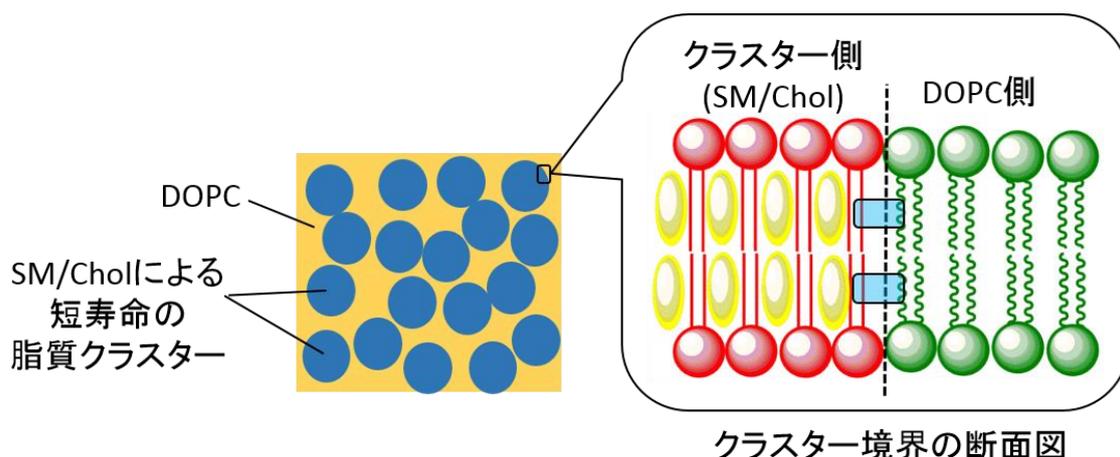


図 4-4 ナノ秒スケールの 3 成分系膜のラフト相内部の挙動

●で示す SM/Chol によるラフトクラスターは、マイクロ秒オーダーよりも速い速度で生成と崩壊を繰り返していると考えられる。

3 章の蛍光寿命測定においても、図 3-7 より 2 成分で構成されるラフト膜においてナノ秒スケール内では L_0 ドメインと L_d ドメインが共存していることが示唆された。この結果は、図 4-4 で示すナノ秒スケールにおける 3 成分系膜のラフト相の挙動を支持している。

SM3 成分系膜のラフト相の分裂幅に関して、より詳細に解析すると、アルキル鎖中央部において SM/Chol の 2 成分系膜の分裂幅より小さいことが示された。これは図 4-4 に示されるように、ラフトクラスターと DOPC の境界面のパッキングが弱いためであり、特に四角で囲んだ DOPC の二重結合が位置する膜中央部では、その影響が大きいと考えられる。この SM/Chol のラフトクラスター形成の分子基盤は、2 成分系膜の考察より、膜表面部で形成する SM 分子間の水素結合のネットワークと膜内部の Chol のオーダー効果による相乗効果であると考えられる。

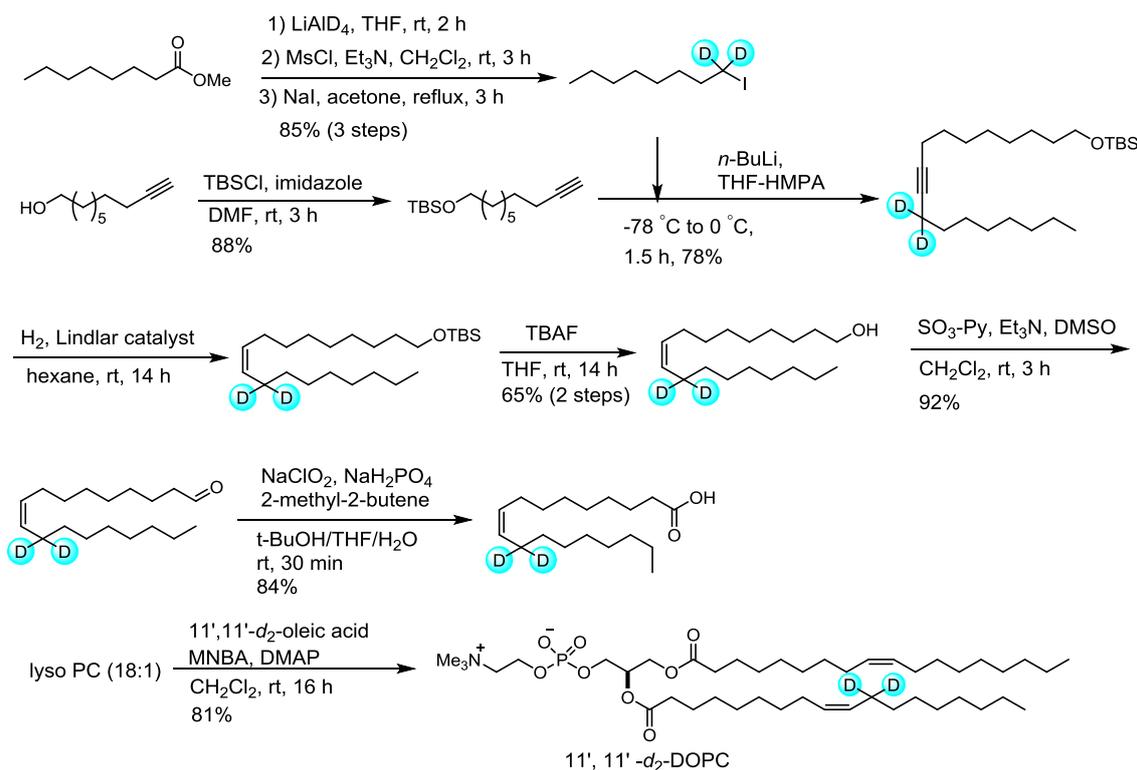
また、図 4-3 より、◆で示される 3 成分系膜の液晶相に分配した SM の分裂幅は、▲で示される SM/DOPC 膜の分裂幅よりわずかに大きいことが明らかとなった。これは、DOPC rich な液晶相にも Chol が分配しており、SM の運動性を押さえているためである。さらに、3 成分系膜の液晶相の分裂幅はラフト相の分裂幅よりも小さいことから、液晶相内では図 4-4 に示されるようなラフトクラスターを形成しておらず、分子は均一に分散していると推定される。

次に、SM3 成分系膜の他の構成成分である Chol や DOPC の運動性も調べることにした。これまで、 $3-d_1$ -Chol を用いて 3 成分系膜中の Chol の運動性が調

べられ、2組の分裂幅 (47.3 kHz、42.6 kHz) が観測された¹⁶⁾。つまり、Chol も共存する2相に分配していることを意味しており、2組の分裂幅は、それぞれ SM/Chol 膜および DOPC/Chol 膜中の 3- d_1 -Chol の分裂幅 (47.9, 41.9 kHz) と近い値を示した。特に、3成分系膜の液晶相の分裂幅と DOPC/Chol 膜の分裂幅がほぼ等しいことは、SM-Chol 分子間相互作用が Chol の運動性を変化させない程度に弱いことを示唆している。これまでに ^2H NMR や ESR によって SM-Chol 分子間相互作用が SM-SM 分子間相互作用に比べて弱いことが報告されており、今回の結果と一致している^{12,13)}。

一方、DOPC についても、SM や Chol と同様に2相由来の2組の分裂幅が観測されるはずであるが、過去の報告¹⁷⁾では、液晶相由来だと考えられる1組の狭い分裂幅しか観測されていなかった。この原因として、DOPC が2相間で NMR のタイムスケールよりも速い拡散運動をするために、シグナルの平均化が生じること、また NMR では検出できないほど DOPC のラフト相への分配が少ないことが挙げられている。しかし、その測定に用いられているプローブは、両方のアシル鎖に4つの重水素を導入した 11,11'- d_4 -DOPC であるため、本来の DOPC の物性とは異なり、3成分系膜の相挙動に影響を与えていると考えられる。そこで、より本来の膜の動態に近づけるため、片方のアシル鎖の 11'位のみならず2つの重水素を導入した 11',11'- d_2 -DOPC を合成し、解析することにした。11'位に重水素を導入したのは、簡便な合成法が既に確立されており、11,11'- d_4 -DOPC のデータと比較を行うことができると考えたからである。既存の合成法^{18,19)}を参考にオクタン酸から8段階で11位重水素標識化オレイン酸を合成した後、市販の 18:1-lyso PC と縮合させることで、目的物である 11',11'- d_2 -DOPC の合成に成功した (スキーム 4-1)。

この DOPC を用いて3成分系膜の ^2H NMR を測定すると、2組の分裂幅 (18.6 kHz、8.5 kHz) が観測された。この2組の分裂幅はそれぞれ DOPC/Chol 膜および SM/DOPC 膜中の 11',11'- d_2 -DOPC の分裂幅 (14.1 kHz、6.1 kHz) より大きい値を示した。このことから、それぞれの相において、DOPC の運動性が SM や Chol によって抑えていると考えられる。以上の測定より、3成分系膜を構成する3種類の脂質分子全てで2組の分裂幅が観測されたので、ラフト相と液晶相の両方のドメインに3成分の脂質分子が分配していることが明らかとなった。



スキーム 4-1 11',11'-*d*₂-DOPC の合成スキーム

そこで、共存するラフト相と液晶相を構成する脂質分子数や各ドメインの大きさを考察するために、3成分の脂質分子の各ドメインへの分配比を見積もることとした。²H NMR のピーク強度は、それぞれのドメインに存在する脂質のモル比に対応すると仮定し、NMR のスペクトルシミュレーションソフトである SIMPSON²⁰⁾を用いて、ピークの強度比を変化させて実測のスペクトルとフィッティングを行った (図 4-5)。

その結果、3成分の脂質の分配比と各ドメインの組成比を決定した (表 4-2)。誤差の値については、マニュアルでフィッティングを行った結果、見積もられた。誤差や分配比の正確性についての詳細は後述する。表 4-2 より SM と Chol は共にラフト相に約 80%、液晶相に約 20%分配していることが示された。さらに、ラフト相に存在する DOPC は少量であるという従来の報告¹⁷⁾とは異なり、DOPC がラフト相にも約 30%も分配していることが明らかとなった。

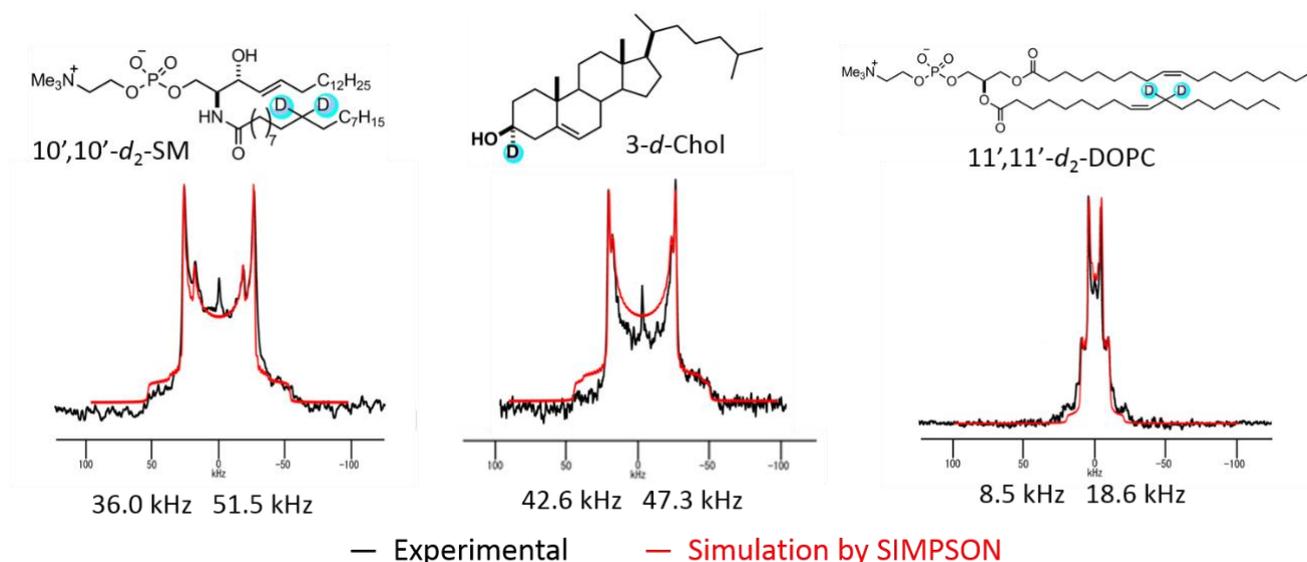


図 4-5 SM3 成分系膜のラフト相と液晶相に分配された 3 種の脂質分子の四極子分裂幅 (30 °C)

表 4-2 3 成分系膜のラフト相と液晶相への脂質の分配比

	ラフト相	液晶相
SM	83 ± 2%	17 ± 2%
Chol	80 ± 1%	20 ± 1%
DOPC	31 ± 2%	69 ± 2%

ラフト相 : $X_{SM} : X_{Chol} : X_{DOPC} = 43/41/16$

液晶相 : $X_{SM} : X_{Chol} : X_{DOPC} = 16/19/65$

ここで、11',11'- d_2 -DOPC の重水素標識位置は二重結合の隣のアリル位の 11 位である。したがって、飽和アルキル鎖中の C-D 結合の配向とは異なり、分子の回転軸と C-D 結合のなす角度は 90° に平均化されず、小さいと考えられる。2 章の式(8)が示すように、分裂幅の大きさは角度情報に大きく依存するので、分子の回転軸と C-D 結合のなす角度が小さいと、2 組の分裂幅がともに小さくなり、明確に分離しにくくなる。そこで、アシル鎖の 6'位が重水素標識された DOPC²¹⁾を用いることにした。6',6'- d_2 -DOPC の重水素標識位置は膜界面に近く、二重結合から離れているため、分子の回転軸と C-D 結合のなす角度は 90° に平均化される。また、DOPC の 6'位は、MD 計算²²⁾より Chol のオーダー効果の

影響が最も大きいと示されているため、2組の分裂幅の違いが明確になると想定される。実際に 6',6'-*d*₂-DOPC を用いて 3 成分系膜の ²H NMR を測定した結果 (図 4-6)、2 組の分裂幅は明確に観測され、その差は 11'位のデータと比較して増加していた。同様に DOPC の分配比を見積もると、ラフト相 : 液晶相 = 29 ± 2% / 71 ± 2% となった。この値は、11'位重水素標識 DOPC から求めた分配比の誤差内に含まれていることから、分裂幅の強度比は C-D 結合の配向と相関がないことが示された。つまり、11'位重水素標識 DOPC から求めた分配比のデータを用いて解析を行っても支障がないと考えられる。

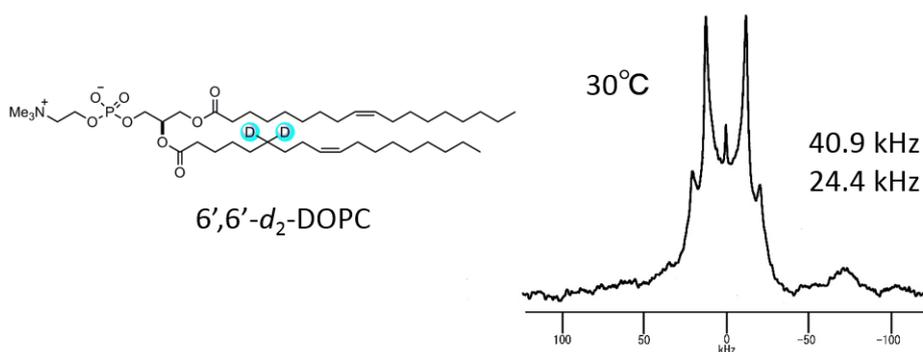


図 4-6 SM/Chol/DOPC (1/1/1) における 6',6'-*d*₂-DOPC の ²H-NMR スペクトル(30 °C)

DPPC3 成分系膜や SM3 成分系膜の脂質の分配比は、これまで蛍光標識脂質プローブの蛍光強度や ²H NMR、相図の tie line、MD 計算から見積もられており 5,10,23-25)、液晶相に存在する DOPC と Chol の比が 10:1 よりも小さいという報告もある。しかしながら、あくまでも蛍光プローブの分布であり、本来の脂質の構造・物性と大きく異なるため、細胞本来の脂質の分布や動態をどこまで反映できているかに疑問が残る。また、相図や tie line 作成は煩雑であり、これまでに多様な相図が報告されていることから、見積もられた分配比の結果に曖昧さが残る。しかしながら、今回の解析では、液晶相に分配した Chol は従来の報告よりも大きい分配比を示した。この違いは、プローブとして用いた 2 つの重水素のみを導入した脂質が、本来の脂質の性質を保持し、膜全体の物性を大きく変化させないためだと考えられる。このことから、脂質の分配比は、実験的な複雑さや曖昧さが伴う相図の tie line からではなく、直接的に分子の動態を捉える ²H NMR のスペクトルから見積もる方が優位であることが示唆された。従来の

分析法とは異なり、選択的に重水素標識した SM を用いたことで、3 成分系膜中のラフト相と液晶相に存在する脂質の動的挙動を同時に観測することと同時に、各相への脂質の分配比を正確に見積もることに初めて成功した。

4-2 3 成分系 PSPC/Chol/DOPC (1/1/1) の動的挙動解析

前節で解析した SM3 成分系膜と同様に、PSPC3 成分系膜の動的挙動解析を行い、SM の結果と比較した。PSPC/Chol/DOPC (1/1/1) 膜で ^2H NMR を測定すると、 20°C において 2 組の分裂幅が観測された (図 4-7)。つまり、外側の広い分裂幅は PSPC rich なラフト相 (L_o)、内側の狭い分裂幅は DOPC rich な液晶相 (L_d) に分配した PSPC の運動性を示している。

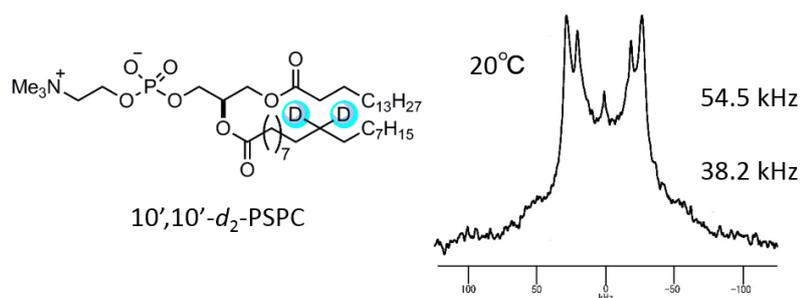


図 4-7 PSPC/Chol/DOPC (1/1/1) における $10',10'\text{-}d_2\text{-PSPC}$ の ^2H -NMR スペクトル (20°C)

この 2 組の分裂幅は、 20°C 、 25°C で観測されたが、 30°C では 1 組しか観測されなかった (図 4-8)。そして、内側の強度は温度上昇に対して変化が見られなかった。このことから、PSPC3 成分系膜では、 30°C で急に 2 相から均一な液晶相へと転移していると推定される。この急激な相転移はドメインの大きさと相関があると考えられる。また、均一膜になる温度は SM 膜の 45°C に比べて低温であった。一般的に、相転移温度はリン脂質の主転移温度に依存すると考えられ、SM では 44°C 、PSPC では 48.8°C であるため、2 成分系膜の DSC データ (図 3-10) においても PSPC2 成分系膜の相転移温度の方が高いことが示されている。したがって、3 成分系膜でも同様な傾向が見られるはずだが、SM3 成分系膜の相転移温度の方が高いことが示された。SM3 成分系膜の相転移温度が PSPC3 成分系膜に比べて高くなる原因のひとつとして、SM rich なラフト相に

は DOPC が混和しにくく、DOPC が SM-Chol 膜構造を乱す影響が小さいことが考えられる。また、膜内部の SM-Chol 分子間相互作用によって、膜界面部の SM 分子間の水素結合のネットワーク形成が促進されることも原因として考えられる。これらの影響によりエンタルピー的にドメインの安定性が高くなると推定される。一方で、PSPC は水素結合のアクセプターの機能を持つエステル結合を有しているが、PSPC 同士では水素結合を直接形成できない。そのため、2章の図 2-9 で示したように、PC 膜の熱安定性は小さくなる。また、Chol との親和性の違いから PSPC-Chol 分子間相互作用は SM-Chol 分子間に比べて弱いと考えられるので、温度上昇に伴い、PSPC rich なラフト相は DOPC の影響を受けやすくなり、ドメインが崩壊しやすいと考えられる。

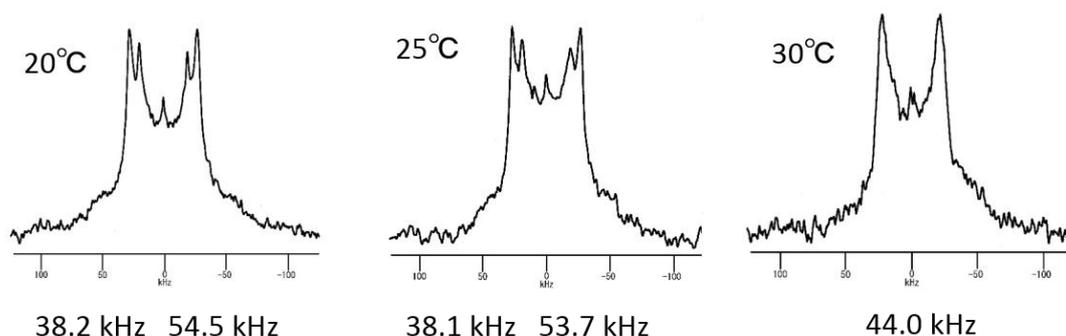


図 4-8 PSPC/Chol/DOPC(1/1/1)における $10',10'-d_2$ -PSPC の分裂幅の温度変化

一般的に、高い相転移温度を示すリン脂質が形成するドメインは、膜中で堅固である。実際、PSPC と近い相転移温度を持つ DHSM (T_m : 50 °C) の 3 成分系膜の均一膜になる温度は 50 °C であると報告されている²²⁾。しかし、PSPC は相転移温度が高いにもかかわらず、均一膜になる温度は低かった。つまり、転移温度の違いは、SM と PC の構造の違いとそれに派生する Chol との相互作用の強さの違いが原因であることが示唆される。以上より、分裂幅の温度依存性から SM によるラフトドメイン (L_o 相) と周囲の膜 (L_d 相) との相分離は、高温まで安定に保持されることが明らかとなった。

10',10'- d_2 -PSPC と同様の条件で、他の標識位置についても測定した結果、2組の分裂幅が観測された。つまり、SM3 成分系膜と同様に、相分離した 2 相に分配した各々の PSPC の運動性の推移が同時に得られた (表 4-3、図 4-9 中の ■ ラフト相、◆ 液晶相)。PC3 成分系膜における脂質の運動性の推移についても全重水素標識体を用いた ^2H NMR の報告²⁶⁾があるが、このような知見は得られていなかった。したがって、3 成分系膜の各相に分配した PSPC の運動性の推移も、今回初めて得られた画期的な知見である。

次に、3 成分系膜の各相に分配した PSPC の運動性の推移を 2 成分系膜 (PSPC/Chol) や PSPC/DOPC 膜と比較した。その際、3 成分系膜において全ての標識位置で 2 組の分裂幅が観測された 20 °C で測定した。それぞれの脂質膜における PSPC の分裂幅の値を表 4-3 に、PSPC の運動性の推移を図 4-9 に示す。

表 4-3 各相状態における 10',10'- d_2 -PSPC の四極子分裂幅 (20 °C) 単位 : kHz

	4'	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'
●PSPC/Chol	49.2	55.7	55.6	54.5	50.9	44.2	30.8	5.6
■3 成分(PSPC rich ラフト相)	45.6	53.2	53.9	54.5	51.5	45.4	34.8	7.2
◆3 成分(DOPC rich 液晶相)	40.0	46.3	44.3	38.2	33.4	26.1	17.8	3.1
▲PSPC/DOPC	25.5	27.8	26.3	22.6	18.4	13.9	8.9	2.1

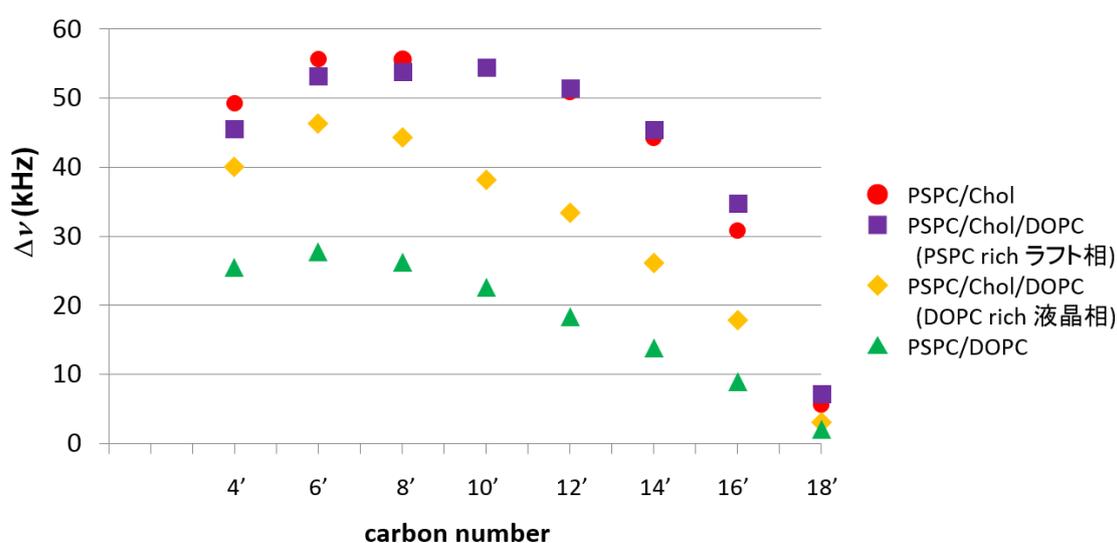


図 4-9 10',10'- d_2 -PSPC の各相状態の分裂幅の推移 (20 °C)

図 4-9 から、■で示される 3 成分系膜のラフト相に分配した PSPC の運動性の推移は、●で示される PSPC/Chol の 2 成分系膜とほぼ等しいことが明らかとなった。これは、SM3 成分系膜と同様に、ナノ秒スケールでは、ラフト相内で図 4-4 に示すような PSPC/Chol のラフトクラスターが生成しているためだと考えられる。しかし、2 章の図 2-9 から示される PC 膜の熱安定性が低いことや 3 章の図 3-9 から示唆される PC-Chol 分子間の親和性は SM-Chol 分子間の親和性に比べて低いことを考慮すると、PSPC/Chol が形成するクラスターは SM が形成するクラスターに比べて寿命は短いと考えられる。また、PSPC3 成分系膜のラフト相の分裂幅は、SM3 成分系膜とは異なり、膜表面部に近い部分で、2 成分系膜の分裂幅より小さいことが示された。これは、ラフト相中で PSPC が同じ親水部構造を持つ DOPC と混和しやすいため、Chol の膜中の分布位置が下がり、表面部の分裂幅の減少が観測されると考えられる。

また、図 4-3 より ◆で示される 3 成分系膜の液晶相に分配した PSPC の分裂幅は、SM3 成分系膜と同様に、▲で示される PSPC/DOPC 膜の分裂幅より大きいことが明らかとなった。しかし、その分裂幅の大きさの違いは、SM 膜に比べて約 2 倍であった。これは、PSPC 膜の DOPC rich な液晶相に分配している Chol が SM 膜に比べて多いことを意味している。

そこで、SM3 成分系膜と同様に、PSPC3 成分系膜を構成する Chol と DOPC の運動性を調べるため ^2H NMR を測定した結果、両方の脂質で 2 組の分裂幅が観測された (図 4-10)。PSPC3 成分系膜中の Chol の分裂幅の大きさ (46.7 kHz、43.6 kHz) は、SM 膜中のそれ (47.3 Hz、42.6 Hz) と違いがみられなかった。一方、DOPC の分裂幅 (19.0 kHz、11.2 kHz) のうち、内側の分裂幅の大きさは SM の分裂幅 (8.5 kHz) よりも大きく示された。これも重水素標識 PSPC でみられたように、液晶相に分配した Chol の量が多いことを示唆している。

以上より、PSPC3 成分系膜を構成する 3 種類の脂質分子は全てラフト相と液晶相の両方のドメインに分配していることが明らかとなったので、各ドメインへの脂質の分配比を SIMPSON によって見積った (図 4-10、表 4-4)。

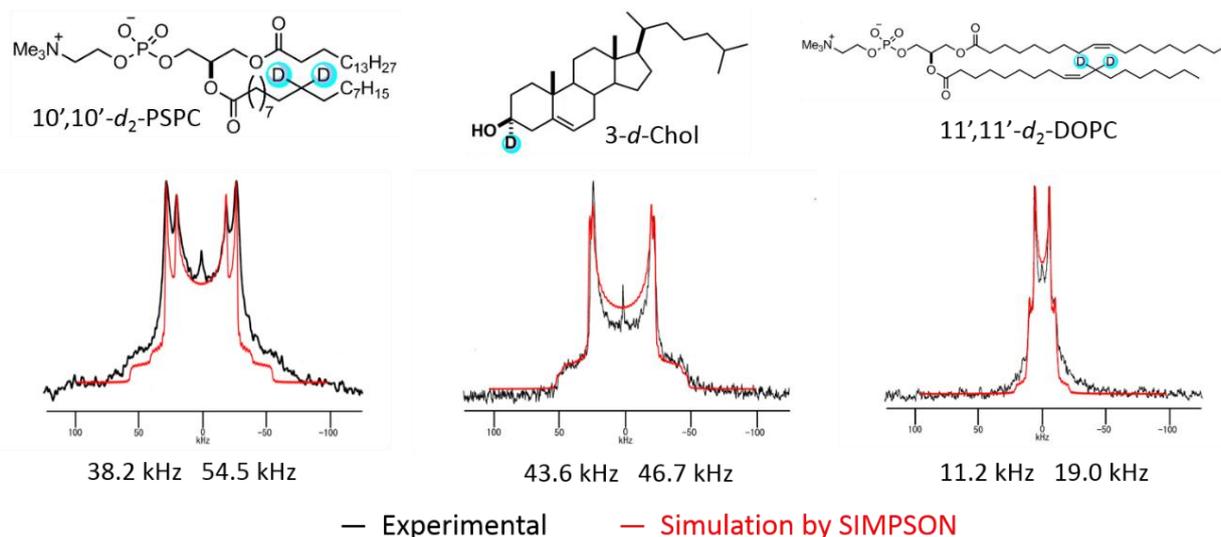


図 4-10 PSPC3 成分系膜のラフト相と液晶相に分配された 3 種の脂質分子の四極子分裂幅 (20 °C)

表 4-4 3 成分系膜のラフト相と液晶相への脂質の分配比

	ラフト相	液晶相
PSPC	66 ± 2%	34 ± 2%
Chol	66 ± 2%	34 ± 2%
DOPC	32 ± 1%	68 ± 1%

ラフト相 : $X_{\text{PSPC}} : X_{\text{Chol}} : X_{\text{DOPC}} = 40/40/20$

液晶相 : $X_{\text{PSPC}} : X_{\text{Chol}} : X_{\text{DOPC}} = 25/25/50$

その結果、表 4-4 に示すようにそれぞれの脂質の分配比と各ドメインの組成比を決定した。PSPC と Chol は共に液晶相への分配が 34% となり、PSPC や DOPC の分裂幅の大きさやピーク強度で示唆された結果と一致している。L_d 相に分配した Chol の量が多いのは、PSPC-Chol 分子間相互作用が特異的ではないためだと考えられる。また、DOPC は同様の骨格構造を持つ PSPC と混和しやすいため、ラフト相への分配が多いと予想していたが、SM 膜と同様にラフト相に約 30% 分配している結果となった。

以上より表 4-2 と 4-4 に示す SM3 成分系膜と PC3 成分系膜のラフト相と液晶相への 3 成分の脂質の分配比を比較した。その結果、ラフト相に分配した飽和リン脂質 (SM と PSPC) と Chol の量が SM3 成分系膜の方が約 20% 多いことが明らかとなった。これは、SM-Chol 分子間の親和性が PC-Chol 分子間の親

和性よりも高く、SM膜では、より多くのラフト (L_o 相) を形成しやすいことを意味しており、2成分系膜の結果と一致する。また、2章のDSCの結果から分配比の考察が可能である。DSCよりSM膜の L_o ドメインは、PSPC膜の L_o ドメインよりもサイズが小さく、そして多数形成されることが示された。 L_o ドメインを構成する主要脂質は一致するので、2成分系膜で形成される L_o ドメインの大きさは、3成分系膜の L_o ドメインの大きさに対応すると推定される。実際に蛍光顕微鏡でドメインを観察した結果は4-3節で述べる。以上よりSMおよびPSPCの3成分系膜のモデル図は、図4-11のように示される。この図から、SM3成分系膜では全体としてドメインを取り囲む周辺相 (L_d 相) との接触面積が増加し、相境界をCholが埋め合わせるため、SM膜のラフト相により多くのCholが分配していると考えられる。一方、PSPC3成分系膜ではパッキングが強いため、 L_o ドメインは大きく、ゲル性が強いので、Cholの分配が少ないと考えられる。また、DOPCの各相への分配比にSM膜とPSPC膜で違いがなかったことから、ラフトの性質は周辺膜 (L_d 相) に存在する脂質分子に影響を受けず、ラフトを構成する飽和リン脂質とCholの挙動や相互作用の違いに大きく寄与することが示唆された。

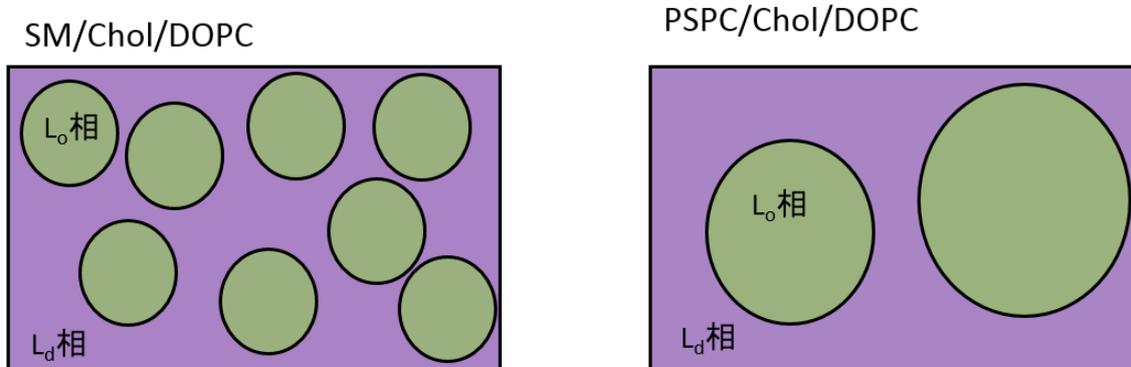


図 4-11 SM3 成分系膜および PSPC3 成分系膜のモデル図

SM膜では多数の小さな L_o ドメインが形成しているので、PSPC膜に比べて L_o ドメインと周辺相 (L_d 相) との接触面積が多い。(図中ではSM膜に存在する L_o ドメインの黒の実線で示す円周の長さの合計がPSPC膜に存在するドメインの円周の長さの合計よりも長いことで示されている。)

4-3 脂質の分配比とドメインの大きさとの相関関係

4-1、4-2 節で求めた脂質の分配比と 3 成分系膜の 2 つのドメインの面積比の相関を調べるため、蛍光顕微鏡によって 3 成分系膜の GUV を観察した。エレクトロフォメーション法によって SM/Chol/DOPC (1/1/1) と PSPC/Chol/DOPC (1/1/1) の GUV を作製した。蛍光標識脂質として用いた Bodipy-PC (図 4-12) は L_d 相に選択的に分配し、本研究では、膜物性への影響を抑えるため、全脂質量に対して通常の 1 mol% よりも少ない 0.2 mol% 取り込ませた。観察する温度については、SM 膜では ^2H NMR と同じ 30 °C で観測できたが、PSPC 膜は、 ^2H NMR と同じ 20 °C では、サンプルのガラスプレートに霜が付着して観察しにくいため、25 °C で観察した。詳細な GUV 作製・観察条件は実験項に記す。

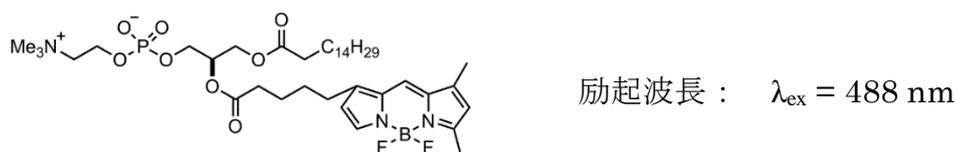


図 4-12 蛍光標識脂質 Bodipy-PC

観察の結果、SM の GUV のサイズは、概して PSPC の GUV のサイズよりも大きくなっていた。これは、PSPC の相転移温度が SM のそれよりも高いため、GUV 作製するとき十分に温度をかけることができなかつたためである。また、どちらの 3 成分系膜においても、過去の報告²⁷⁻³³⁾と同様に、相分離した明るい領域と暗い領域が観察された。蛍光標識脂質の特性から明るい領域は DOPC rich な液晶相、暗い領域は SM もしくは PSPC rich なラフト相であり、2 つのドメインが共存していることが示された (図 4-13)。

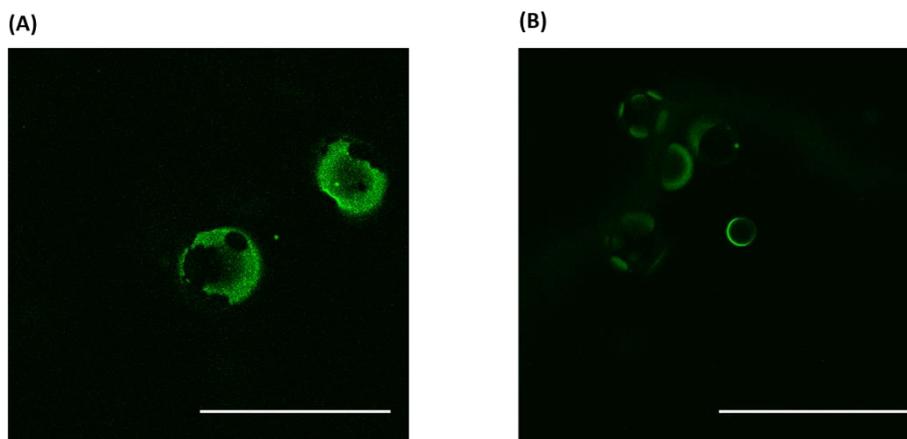


図 4-13 蛍光顕微鏡による GUV 観察例
 (A) SM/Chol/DOPC (1/1/1) 30 °C、(B) PSPC/Chol/DOPC (1/1/1) 25 °C
 スケールバーは 100 μm

しかしながら、蛍光顕微鏡で観察した GUV からドメインの大きさを正確に見積もることには、様々な問題があると考えられる。例えば、面積を見積もることができるのは GUV の上面のみであることや顕微鏡の低い分解能のために小さなドメインは観察できないことが挙げられる。したがって、単純な観察から SM 膜と PSPC 膜のドメインの大きさを比較することは困難である。これらの問題を解決し、正確なドメインの面積比を見積もるためには、分析・画像処理を高精度化することや多くの GUV を観察して統計的な解析をすることが必要だが、実験原理上、多くの GUV を観察するには多大な時間と労力がかかる。さらに、蛍光顕微鏡で観察する対象は GUV という大きな一重層のリポソームであるため、線張力 (line tension) が弱く、堅い L_0 相が形成しにくいので、2つのドメインの面積比に偏りが生じ、誤差が大きくなる可能性が考えられる。

一方、 ^2H NMR で観測するリポソームは MLV と呼ばれ、そのサイズは GUV が 20~30 μm であるのに対して 2~3 μm と小さく、多重層を形成している。そのため MLV ではサイズの異なる、つまり多様な線張力の強さを持つ二重膜を同時かつ多数観測することができる。また、 ^2H NMR では、2つのドメインに分布した全ての脂質分子自身を直接観測している。したがって、 ^2H NMR から見積もった脂質の分配比から 2つのドメインの面積比を見積もると、リポソームのサイズによって異なるドメインの分布や大きさに関係なく、それらを平均した 2相の面積比が得られる。以上より、 ^2H NMR のデータを用いて見積もったドメ

インの面積比の方がより正確であると推定される。

そこで、 ^2H NMR より求めた脂質の分配比と脂質の平均分子面積より 2 相の面積比を計算した。計算を単純化するために、3 成分系膜中に含まれる脂質分子数 N はそれぞれ 100 分子とした (全体で 300 分子)。リポソーム中の L_0 相と L_d 相の面積 (S^{lo} と S^{ld}) は、各相に存在する脂質の分子数 (N) と各相に存在する脂質の平均分子面積 (A) を用いて以下の式で表される。

SM/Chol/DOPC (1/1/1)

$$\begin{aligned} S^{lo} &= N_{SM}^{lo} A_{SM}^{lo} + N_{Ch}^{lo} A_{Ch}^{lo} + N_{DOPC}^{lo} A_{DOPC}^{lo} \\ S^{ld} &= N_{SM}^{ld} A_{SM}^{ld} + N_{Ch}^{ld} A_{Ch}^{ld} + N_{DOPC}^{ld} A_{DOPC}^{ld} \end{aligned} \quad \text{式(1)}$$

脂質の平均分子面積は 2 成分系膜の MD 計算や ^2H NMR によって導かれた過去の報告³⁴⁻³⁹⁾を参照して式 1 を用いると、

$$S^{lo} = 83 \times 47.6 \text{ \AA}^2 + 80 \times 27 \text{ \AA}^2 + 31 \times 63 \text{ \AA}^2 = 8064 \text{ \AA}^2$$

$$S^{ld} = 17 \times 56.6 \text{ \AA}^2 + 20 \times 27 \text{ \AA}^2 + 69 \times 71 \text{ \AA}^2 = 6401 \text{ \AA}^2$$

SM3 成分系膜の 2 相の面積比は $S^{lo} : S^{ld} = 56 : 44$ ($\pm 2\%$ の誤差) となった。PSPC3 成分系膜の面積比に関しても同様に式 2 を用いて求めると、

PSPC/Chol/DOPC (1/1/1)

$$\begin{aligned} S^{lo} &= N_{PSPC}^{lo} A_{PSPC}^{lo} + N_{Ch}^{lo} A_{Ch}^{lo} + N_{DOPC}^{lo} A_{DOPC}^{lo} \\ S^{ld} &= N_{PSPC}^{ld} A_{PSPC}^{ld} + N_{Ch}^{ld} A_{Ch}^{ld} + N_{DOPC}^{ld} A_{DOPC}^{ld} \end{aligned} \quad \text{式(2)}$$

$$S^{lo} = 66 \times 48 \text{ \AA}^2 + 66 \times 27 \text{ \AA}^2 + 32 \times 63 \text{ \AA}^2 = 6966 \text{ \AA}^2$$

$$S^{ld} = 34 \times 60.8 \text{ \AA}^2 + 34 \times 27 \text{ \AA}^2 + 68 \times 71 \text{ \AA}^2 = 7813 \text{ \AA}^2$$

$S^{lo} : S^{ld} = 47 : 53$ ($\pm 2\%$ の誤差) となった。

SM 膜と PSPC 膜を比較すると、SM 膜の方が L_0 相の面積が大きく、PSPC 膜では各相の割合はほぼ同じだが、若干 L_d 相の面積が大きい結果を示した。したがって、SM 膜ではより多くの L_0 相が形成していることが示された。これは 3 章の図 3-9 より推定された SM の高い L_0 ドメイン形成能とも一致している。

このことから、生体膜中で脂質ラフトを形成する上で構成成分として SM が PC よりも優位であることが示唆された。

続いて、ドメインの面積比を見積もるのに用いた脂質の分配比の誤差と正確性について議論する。まず、 ^2H NMR のピーク強度は、それぞれのドメインに存在する脂質のモル比に対応するという仮定を確かめるために、ラフト相 (SM/Chol = 1/1) と非ラフト相 (純粋な SM のみ) のリポソームをそれぞれ別に調製し (ラフト相と非ラフト相の SM モル比は 83/17)、同じサンプル管に封入して同時に測定した (図 4-14)。

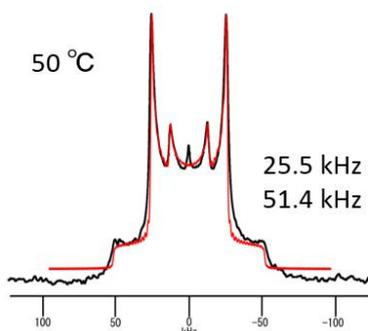


図 4-14 10dSM/Chol : 10dSM = 83/17 のスペクトル (50 °C)

その結果をシミュレーションとフィッティングすると、ピーク強度はラフト相 : 非ラフト相 = 86/14 でサンプルのモル比とほぼ等しくなり、仮定が正しいことが証明された。また、得られた 2 組の分裂幅の大きさは、それぞれ単独に測定したときの分裂幅の値と大きく違っていなかった。つまり、この測定では、異なる組成のリポソームの融合やリポソーム間の脂質の移動によって、観測される分裂幅を大きく変化させていないと推定される。

また本研究では脂質の分配比を求めるために、実測のスペクトルと SIMPSON によるシミュレーションをマニュアルでフィッティングした。解析では、SIMPSON のシミュレーションの脂質の分配比をわずか 1~2% 変化させると、実測のスペクトルと全く一致しなかったため、フィッティングに起因する分配比の誤差は小さいと考えられる。ゲル相の存在も脂質の分配比に影響を与える可能性はあるが、スペクトルよりゲル相特有のブロードなパターンは観測されていなかった。また、 L_0 相と L_d 相の脂質の交換速度に対して、ゲル相・ L_0 相の交換速度は非常に速いため、NMR のタイムスケール内では、たとえゲル相が

存在しても L_0 相と同一視してもよいと考えられる。

次に、SIMPSON のシミュレーションによって求めた脂質の分配比について、横緩和時間の影響を調べた。 ^2H NMR のピーク強度は、横緩和時間の長さに依存し、緩和速度は相状態によって異なり、オーダーが高い L_0 相の方が L_d 相に比べて緩和速度が速いことが知られている。そこで、2つのドメインの緩和時間の影響を調べるため、展開時間 τ の長さを変化させたときの2組のピーク強度比の変化を測定した (図 4-15)。各展開時間の測定スペクトルをシミュレーションでフィッティングして、各相への分配比を見積もった。その結果、100 μs 以上では内側のピーク強度が小さくなるが、展開時間 100 μs まではどちらのピーク強度も大きく減衰せず、分配比も変わらなかった。つまり、100 μs までの展開時間では、それぞれの相由来のピークの緩和が脂質の分配比の見積もりに影響を与えないことが示された。

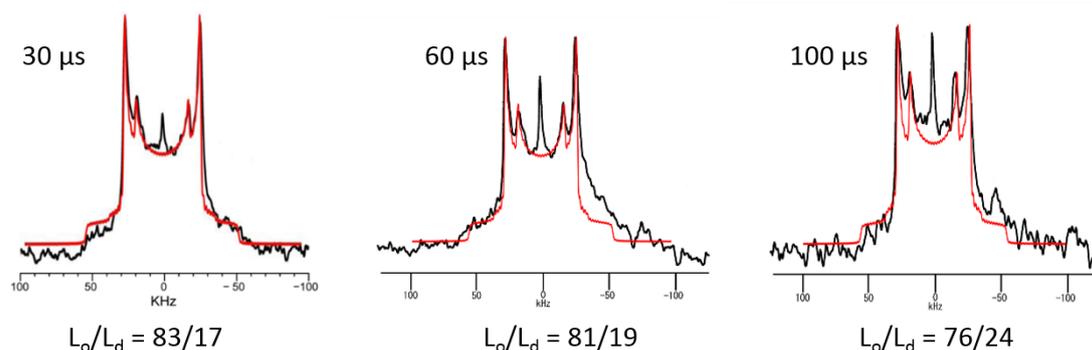


図 4-15 $10',10'-d_2$ -SM/Chol/DOPC (1/1/1) スペクトルの展開時間変化 (30 °C)

ここで、3成分系膜において、ナノ秒のタイムスケール内のドメインの存在を調べるため、tPA の蛍光寿命測定を行った。3種類の蛍光寿命成分が得られたので、その結果を表 4-5 に示す。

表4-5 SMおよびPSPC3成分系膜のtPAの蛍光寿命測定

	τ_1 (ns)	α_1	τ_2 (ns)	α_2	τ_3 (ns)	α_3	τ_{AV} (ns)
SSM/Chol/DOPC (30 °C)	32.8	7.9	14.5	39.6	3.7	52.6	17.1
PSPC/Chol/DOPC (20 °C)	53.8	22.8	21.8	42.4	5.8	34.8	37.1

3章の図 3-7 より推定した蛍光寿命の長さとドメインのオーダーの高さとの相関より、 τ_1 、 τ_2 、 τ_3 はそれぞれ Chol 希薄ゲル様ドメイン、 L_0 ドメイン、 L_d ド

メインに対応し、3種のドメインが共存していることが示唆された。したがって、ナノ秒のタイムスケール内では、2成分系膜と同様に、3成分系膜中の各ドメインがマイクロ秒オーダーより速い速度で生成と崩壊を繰り返していると考えられる。今後、tPAの各ドメインへの分配係数を見積もり次第、共存するドメインの存在量を定量的に評価していく予定である。

また、解析に大きな誤差が生じることを考慮して、参考データとして蛍光顕微鏡観察によって2つのドメインの面積比を見積もった。手法としては、画像解析処理ソフト Winroof を用いて、明るい領域と暗い領域を手動で取り囲み、その領域に含まれる画素数（単位は pix）より面積比を求めた。見積もった面積比の精度を高めるために、できるだけサイズの大きい GUV の面積を測定すると共に、測定する GUV 数を 120 個以上に設定した。

結果的に、SM 膜の面積比では L_0 相が L_d 相に比べて約 2 倍大きく、PSPC 膜では、2 相の面積比はほぼ同じだが若干 L_d 相の割合が大きいことが示された（表 4-6）。また、SM 膜と PSPC 膜の面積比を比較すると、SM 膜の方が L_0 相の面積が大きく、PSPC 膜の方が L_d 相の面積が大きく、この差は十分大きいといえる。蛍光顕微鏡から求めた面積比の誤差（5%）は、統計処理から導き、NMR の面積比の誤差（2%）より大きい値を示した。これらの誤差範囲を考慮すると、驚くことに、蛍光顕微鏡観察で見積もった 2 相の面積比は、 ^2H NMR で求めた脂質の分配比から見積もった面積比と非常に近い値を示した。しかしながら、前述した蛍光顕微鏡でドメインの面積を見積もることに対する問題点は解消されていないため、 ^2H NMR で見積もったドメインの面積比の方がより本来の膜物性を反映した優位な値であると考えられる。

表 4-6 ^2H NMR と蛍光顕微鏡観察によって見積もった SM3 成分系膜と PC3 成分系膜のラフト相と液晶相の面積比の比較

	SM/Chol/DOPC		PSPC/Chol/DOPC	
	L_0	L_d	L_0	L_d
^2H NMR	56	44	47	53
Fluorescent microscopy	66	34	48	52

※蛍光顕微鏡観察で見積もった面積比には±5%の誤差が見込まれる。

4-4 SM および PSPC3 成分系膜の組成比の変化

ここまで 3 種類の脂質分子が同じ割合で含まれる 3 成分系膜において、2 つのドメイン中の脂質分子の動的挙動と分配比を決定することに成功した。特に、脂質の分配比は、膜の相挙動を知る上で必要な相図を作成するもしくは修正するにあたり、重要な情報である。そこで、 ^2H NMR によって、より正確な相図を作成することを目指して、3 成分系の組成比を変化させた場合、脂質の動的挙動や分配比がどのように変化するかを ^2H NMR によって調べた。Chol を 20 mol% に固定し、SM or PSPC / DOPC の比を 1/2、1/1、2/1 に変化させた。測定温度は、脂質の分配比を決定した組成比 SM or PSPC/Chol/DOPC (1/1/1) と同条件、すなわち SM 膜は 30 °C、PSPC 膜は 20 °C に設定した。

まず SM3 成分系膜に関して述べる。図 4-16 に各組成比の 3 成分系膜中の 3 種類の脂質分子のスペクトルと四極子分裂幅の値を示す。

どの組成比においても、SM と Chol では 2 組の分裂幅が観測されたため、SM/Chol/DOPC (1/1/1) と同様に SM rich なラフト相と DOPC rich な液晶相が共存していると考えられる。3 種類の組成比で分裂幅の値を比較すると、 L_0 相に分配した SM の分裂幅の値は、どの組成比においてもほぼ等しく観測された。一方で L_d 相に分配した SM の分裂幅は、SM/DOPC 比が大きくなるにつれて小さく観測された。これは、系中に存在する SM の量が増えるため、より多くの Chol が L_0 相に分配され、 L_d 相に存在する Chol 量が少なくなるためだと考えられる。一方、Chol は組成比に関係なく、 L_0 相と L_d 相それぞれでほぼ等しい分裂幅が観測された。つまり、Chol の運動性は 2 つのドメイン中の脂質の存在比に影響を受けないと考えられる。

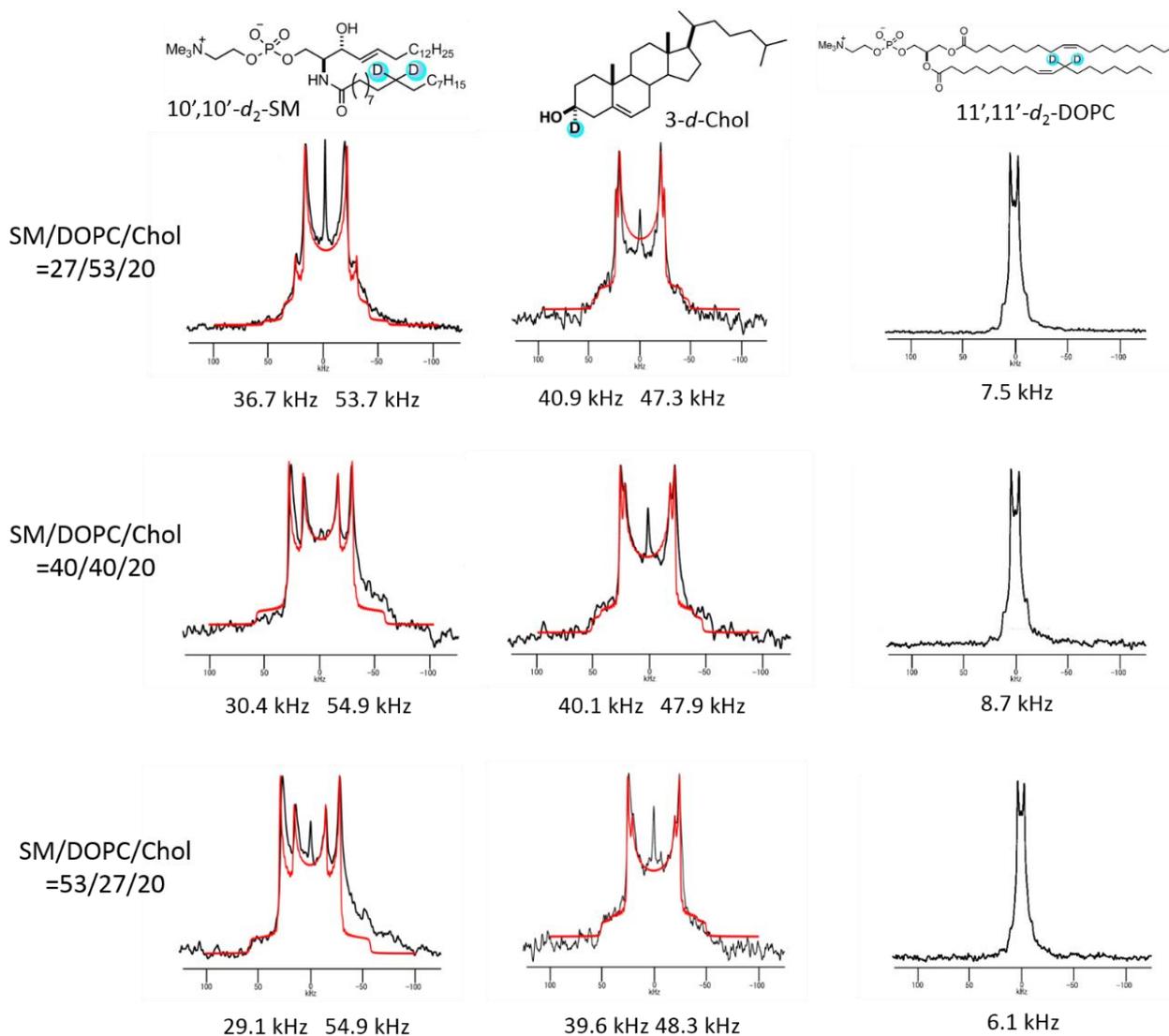


図 4-16 SM3 成分系膜中の 3 種類の脂質分子の四極子分裂幅 (30 °C)

これら 2 つの脂質分子とは異なり、DOPC は全ての組成比で 1 組の分裂幅しか観測されなかった。その大きさから L_d 相に分配した DOPC の運動性を示していると考えられる。SM や Chol では明確に 2 組の分裂幅が観測されたことから、 L_o 相と L_d 相間の脂質分子の交換速度は NMR のタイムスケールよりも十分に遅いと考えられる。また、一般的に同じドメイン中に存在する脂質分子は異なる種類であっても同じ側方拡散係数を有すると考えられている。以上より、DOPC の拡散が速いためではなく、NMR で検出できないほど L_o 相に分配した DOPC の量が少ないため、1 組の分裂幅しか観測できなかったと考えられる。 $^{11'}\text{-d}_2\text{-DOPC}$ の ^2H NMR スペクトルシミュレーションによると、 L_o 相への分配

が 15%より少ない場合、明確に 2 組の分裂幅を示さないので、この考察を支持している。また、この考察を検証するために、今後ラフト相と液晶相の分裂幅の差が大きいことを示した 6',6'-*d*₂-DOPC を用いて測定を行う予定である。

次に、2 組の分裂幅が観測された SM と Chol について SIMPSON を用いて、各相への分配比を見積もった。その結果を表 4-7 に示す。SM/DOPC/Chol = 40/40/20、53/27/20 では、SM と Chol の各相への分配比は非常に近く、大部分が L_o 相を形成していることが示唆された。一方で DOPC の割合が大きい 27/53/20 の組成比では、SM の L_o 相への分配が少なく、Chol は各相へほぼ当量分配されていることが示された。したがって、他の組成比に比べて、L_o ドメインが形成されにくく、各相のドメインの流動性に大きな違いがないと考えられる。また L_o 相内の SM/Chol のモル比に着目すると、元々の 3 成分系膜を構成する SM/Chol の比とほぼ等しい値を示した。このことから SM と Chol がはじめに系中に存在する割合で L_o ドメインを形成した後、ドメインに取り込まれなかった残りの SM と Chol が L_d ドメインに分配されている状態になっていると推定される。

表 4-7 SM3 成分系膜における SM と Chol の分配比と L_o 相内の SM/Chol 比

SM/DOPC/Chol	SM		Chol		L _o 相内の SM/Chol
	L _o	L _d	L _o	L _d	モル比
40/40/20	68	32	71	29	66/34
53/27/20	72	28	81	19	70/30
27/53/20	26	74	53	47	40/60

続いて PC3 成分系膜の各組成比の 3 種類の脂質分子のスペクトルと四極子分裂幅の値を示す (図 4-17)。

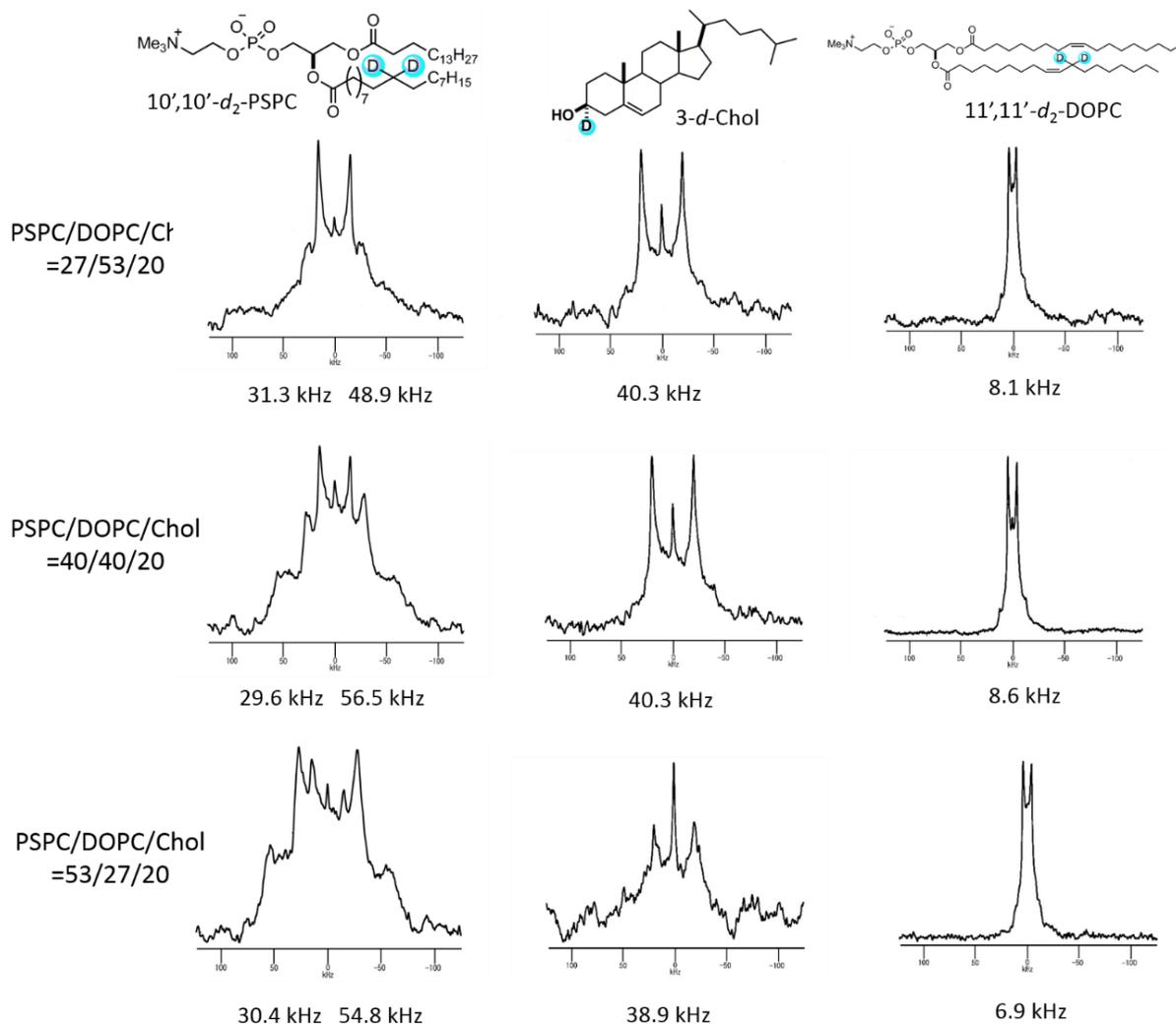


図 4-17 PSPC3 成分系膜中の 3 種類の脂質分子の四極子分裂幅 (20 °C)

PSPC は、どの組成比でも 2 組の分裂幅が観測されたが、Chol や DOPC では 1 組しか観測されなかった。その大きさから L_d 相に分配した脂質の運動性を示していると考えられる。1 組しか観測されなかった原因としていくつか挙げられる。DOPC については、SM 膜と同様に、L₀ 相に分配した DOPC の量が少ないことが原因であることが考えられる。Chol についても同様の原因が考えられるが、どの組成比においても L₀ 相に分配した PSPC の分裂幅は PSPC/DOPC/Chol (1/1/1) の分裂幅とほぼ等しい値を示した。この結果から、L₀ 相に多くの

Chol が分配しているものの、各相中の Chol の運動性に大きな違いはないと考えられる。しかし、これらの原因よりも、Chol 含有率 20 mol%、温度 20 °C の測定条件下では、PSPC のゲル性が高いため、Chol が結晶化し、L₀相を形成しにくくなるのが、最も可能性のある原因として考えられる。実際、PSPC/DOPC/Chol (53/27/20) では、温度を上昇させると Chol は 2 組の分裂幅が観測された。これは、温度上昇によって PSPC の運動性が上昇する（ゲル性が低くなる）ので、Chol と L₀相を形成しやすい状況になっていると推定される。つまり、20 °C ではゲル相も共存していると考えられる。

20 °C において、2 組の分裂幅が観測されたのは PSPC のみであった。しかし、ブロードな成分が少ない 25 °C のスペクトルの方がゲル性は低く、L₀相と L_d相の 2 相への分配比を見積もるのにより適していると考えられる。そこで、25 °C における PSPC の分配比を SIMPSON によって見積もった。30 °C における SM の分配比と比較した結果を表 4-8 に示す。Chol 含有率が 20 mol% で SM or PSPC/DOPC = 2/1、1/2 の場合、SM と PSPC で各相への分配比はほぼ等しい値を示した。一方で SM or PSPC/DOPC = 1/1 の場合、Chol 含有率に関わらず L₀相への分配量は、SM の方が PSPC に比べて多くなった。以上より、SM が系中で不飽和リン脂質に対して 50%以上の優位な成分として存在することが、より多くのラフトドメイン (L₀相) の形成につながると示唆された。また Chol の含有率が減少すると、どちらの脂質も L_d相への分配が多くなった。これは、ラフトドメインを形成しにくくなるので、L_d相への Chol 分配量が増え、脂質分子が L₀相から L_d相へ引き抜かれているためだと推定される。

表 4-8 各組成比の 3 成分系膜における SM と PSPC の分配比

	PSPC (25 °C)		SM (30 °C)	
	L ₀	L _d	L ₀	L _d
33/33/33	67	33	83	17
40/40/20	53	47	68	32
53/27/20	74	26	72	28
27/53/20	23	77	26	74

以上より、3成分系膜を構成する全ての脂質分子の分配比を決定することは、相図作成に非常に有効であるが、今回、組成比や分子種によっては正確に見積もることができなかった。L₀相への分配が NMR 検出可能な脂質量より少ないことや低温におけるゲル性の高いドメインの存在が問題であると考えられる。これらの問題は、Chol 含有率 30 mol%では解消されると推定されるので、Chol が L₀ドメインの相分離の安定化に大きく寄与していると示唆される。つまり、Chol 含有率 30 mol%以上では、本研究のように位置選択的に重水素標識した脂質をプローブとした ²H NMR によって脂質の分配比を決定することが可能であると考えられる。今回確立した手法は、3成分系膜の全ての組成比に適用することは困難ではあるが、既存の手法と組み合わせることで、より正確な相図の作成につながるができる。正確な相図が作成できれば、3成分系膜は実際の生体膜に近い環境なので、そこから得られるドメインの熱力学的情報は、ラフトを深く理解する上で有用である。

参考文献

- 1) Silvius, J. R. *Biochemistry* **1992**, *31*, 3398–3408.
- 2) Silvius, J. R.; D. del Giudice; M. Lafleur. *Biochemistry* **1996**, *35*, 15198–15208.
- 3) Ahmed, S. N.; D. A. Brown; E. London. *Biochemistry* **1997**, *36*, 10944–10953.
- 4) Xu, X., and E. London. *Biochemistry* **2000**, *39*, 843–849.
- 5) de Almeida, R. F. M.; A. Fedorov; M. Prieto. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 2406–2416.
- 6) 安田智一 大阪大学大学院理学研究科化学専攻 平成 23 年度修士論文
- 7) Veatch, S. L.; S. L. Keller. *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 3–6.
- 8) Smith, A. K.; J. H. Freed. *J. Phys. Chem. B.* **2009**, *113*, 3957–3971.
- 9) Farkas, E. R.; W. W. Webb. *Rev. Sci. Instrum.* **2010**, *81*, 093704.
- 10) Bezlyepkina, N.; R. S. Gracià; P. Shchelokovskyy; R. Lipowsky; R. Dimova. *Biophys. J.* **2013**, *104*, 1456–1464.
- 11) Shaw, J. E.; Epand, R. F.; Epand, R. M.; Li, Z.; Bittman, R.; Yip, C. M. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 2170–2178.
- 12) Bartels, T.; Lankalapalli, R. S.; Bittman, R.; Beyer, K.; Brown, M. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14521–14532.
- 13) Bunge, A.; Müller, P.; Stöckl, M.; Hermann, A.; Huster, D. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 2680–2690.
- 14) Pandit, S.; Jakobsson, E.; Scott, H. L. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 3312–3322.
- 15) Aittoniemi, J.; Niemelä, P.; Hyvönen, M. T.; Karttunen, M.; Vattulainen, I. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 1125–1137.
- 16) Matsumori, N.; Kasai, Y.; Oishi, T.; Murata, M.; Nomura, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *130*, 4757–4766.
- 17) van Duyl, B. Y.; Ganchev, D.; Chupin, B.; de Kruijff, B.; Killian, J. A. *FEBS Lett.* **2003**, *547*, 101–106.
- 18) V. Chupin, J. A. Killian; B. de Kruijff. *Biophys. J.* **1987**, *51*, 395–405.
- 19) H. Chen; E. Plettner. *Label. Compd. Radiopharm.* **2012**, *55*, 66–70.
- 20) Bak, M.; J. T. Rasmussen; N. C. Nielsen. *J. Magn. Reson.* **2000**, *147*, 296–330.

- 21) Cui, J.; Lethu, S.; Yasuda, T.; Matsuoka, S.; Matsumori, N.; Sato, F.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *25*, 203-206.
- 22) Mihailescu, M.; Vaswani, R. G.; Jardon-Valadez, E.; Castro-Roman, F.; Freites, J.A.; Worcester, D. L.; Chamberlin, A. R.; Tobias, D. J.; White, S. H. *Biophys. J.* **2011**, *100*, 1455.
- 23) Veatch, S. L.; I. V. Polozov; K. Gawrisch; S. L. Keller. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 2910–2922.
- 24) Veatch, S. L.; Soubias, O.; Keller, S. L.; Gawrisch, K. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 17650-17655.
- 25) Alexander, J. S.; Sander, M. L.; Gawrisch, K.; Pastor, R. W.; Lyman, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 725-732.
- 26) Clarke, J. A.; Seddon, J. M.; Robert V. L. *Soft Matter*, **2009**, *5*, 369–378
- 27) Dietrich, C.; L. A. Bagatolli; Z. N. Volovyk; N. L. Thompson; M. Levi; K. Jacobson; E. Gratton. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 1417–1428.
- 28) Baumgart, T.; S. T. Hess; W. W. Webb. *Nature* **2003**, *425*, 821–824.
- 29) Kahya, N.; D. Scherfeld; K. Bacia; B. Poolman; P. Schwille. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 28109–28115.
- 30) Veatch, S. L.; S. L. Keller. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 268101.
- 31) Veatch, S. L.; S. L. Keller. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 725–726.
- 32) Veatch, S. L.; S. L. Keller. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3074–3083.
- 33) D. Scherfeld; Kahya, N.; Schwille, P. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3758-3768.
- 34) Yasuda, T.; M. Kinoshita; M. Murata; N. Matsumori. *Biophys. J.* **2014**, *106*, 631-638.
- 35) Khelashvili, G. A.; H. L. Scott. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 9841-9847.
- 36) Hofsäss, C.; E. Lindahl; O. Edholm. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 2192-2206.
- 37) Mathai, J. C.; S. Tristram-Nagle; J. F. Nagle; M. L. Zeidel. *J. Gen. Physiol.* **2008**, *131*, 69-76.
- 38) Pan, J., S. Tristram-Nagle, N. Kucerka, and J. F. Nagle. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 117-124.
- 39) Smaby, J. M.; M. M. Momsen; H. L. Brockman; R. E. Brown. *Biophys. J.* **1997**, *73*, 1492-1505.

第5章 結論

2章～4章まで、脂質ラフトを再現した人工膜の秩序液体相において、 ^2H NMR や蛍光実験などを用いて、空間的（原子・分子レベルから膜レベル）、また時間的（ミリ秒からナノ秒）にスケールの異なる脂質分子の動態を定量的かつ広範に解析した。これらの解析を単純な膜組成である1、2成分系から複雑な3成分系へと段階的に行い、脂質ラフトの主要脂質のSMと一般的なグリセロリン脂質であるPCの動態の違いを多角的に比較した。その結果、生体膜中の脂質ラフトがPCよりもSMを優位な構成成分として形成するSMの特異的な動態を明らかにした。SMの特異的な動態に基づいて、ラフト形成の分子基盤について考察を行い、ラフトのモデルを提唱した（図5-1）。

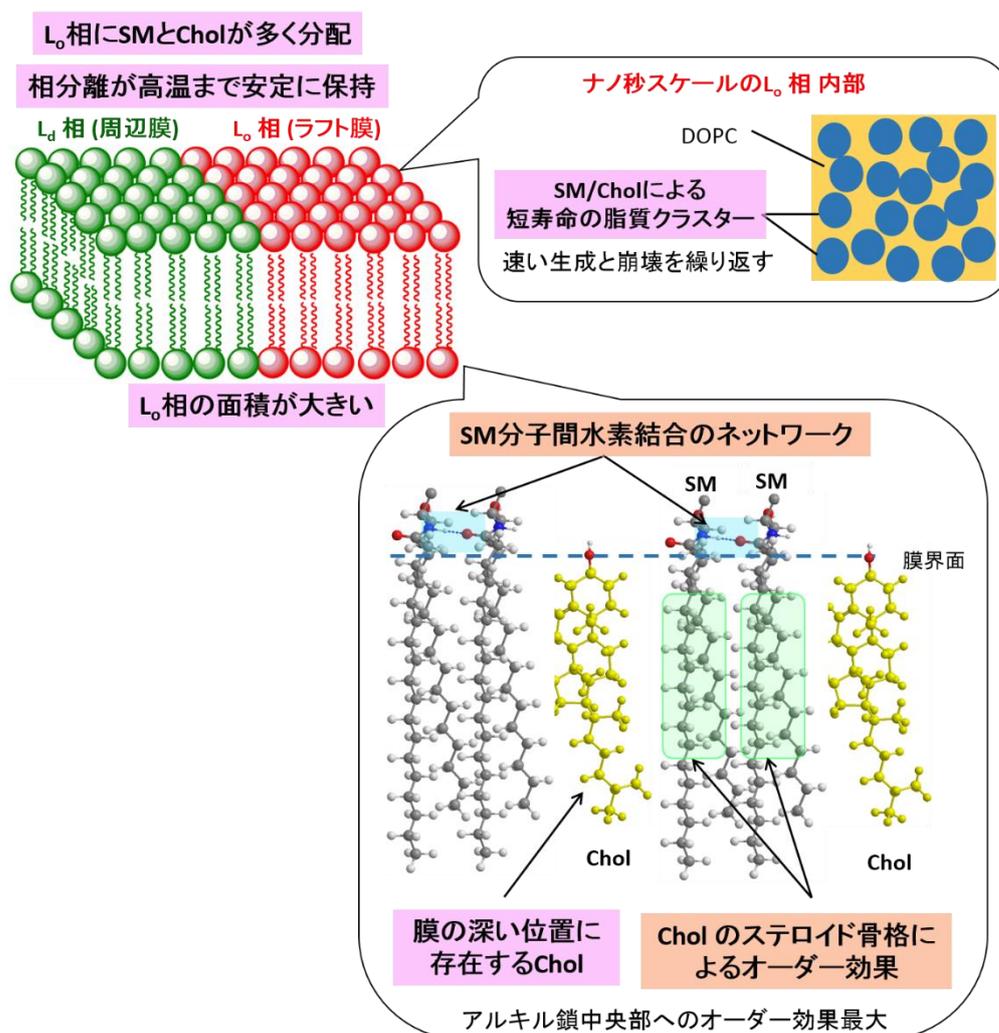


図5-1 脂質ラフト形成のモデル図

このモデルに関して、生体膜における脂質ラフト形成時に SM の特異的な性質が果たす重要な機能の分子基盤を膜レベル、原子・分子レベルの順で説明する。

4 章で行った ^2H NMR を用いた 3 成分系膜の解析より、SM 膜は PSPC 膜に比べて、 L_0 相と L_d 相の共存状態から均一膜になる温度が高温であること (図 4-2、4-7)、 L_0 相により多くの SM と Chol が分配していること (表 4-2、4-4) が示された。つまり、SM と Chol を主成分として構成されるラフトドメイン (L_0 相) と周辺膜 (L_d 相) との相分離は高温まで安定に保持されており、PC 膜よりも多くのラフトドメインを形成していると考えられる。実際、 ^2H NMR で決定した脂質の分配比から求めた 2 相の面積比において、SM 膜では $S^{lo} : S^{ld} = 56 : 44$ で L_0 相の面積が大きく、PSPC 膜では $S^{lo} : S^{ld} = 47 : 53$ で L_d 相の面積が大きい結果を示した (表 4-5)。また、SM 膜の L_0 相には、DOPC が約 30% も分配しているにも関わらず、 L_0 相に分配した SM の運動性は SM/Chol の 2 成分系膜とほぼ等しいことが示された (図 4-3)。これは、 L_0 相内で SM と Chol の強い相互作用によって形成された短寿命のラフトクラスターが、マイクロ秒オーダーより速い速度で生成と崩壊を繰り返して、DOPC とは混和しにくいためであると考えられる。図 4-9 で示す PSPC の運動性の推移より PSPC3 成分系膜の L_0 相においても、PSPC/Chol のラフトクラスターが生成していると考えられる。しかし、SM 膜に比べて PC 膜の熱的安定性が小さいことや Chol との親和性が低いことを考慮すると、そのクラスターの寿命は SM が形成するクラスターに比べて短いと推定される。

3 章で行った 2 成分系膜の蛍光寿命測定によって、ナノ秒スケール内においては 30 mol% 以上の Chol 含有膜においても均一な膜ではなく、 L_0 ドメインと L_d ドメインが共存していることが示唆された (図 3-7)。これは前述した 3 成分系膜の L_0 相内のクラスターに関する考察を支持している。また、蛍光寿命測定によって SM 膜は PSPC 膜に比べて、Chol との親和性が高く、Chol 希薄ゲル様ドメインより多くの L_0 ドメインを形成しやすいことが示唆された。この違いは、SM 膜の Chol 含有率変化による ^2H NMR の分裂幅 (図 2-9) や蛍光異方性 (図 3-4) の温度依存性の推移が小さいという結果にも現れた。さらに、DSC 測定の結果 (図 3-11A) からは、SM 膜では小さい L_0 ドメインが多数形成していることが示唆された。したがって、SM3 成分系膜の L_0 相においてナノ秒スケール内では、SM と Chol による多数の小さな短寿命の脂質クラスターが生成と崩壊を繰り返していると推定される。

続いて、2章で行った ^2H NMRを用いた2成分系膜の解析により明らかにしたSMとPCの動態の違いから、SM-Cholの脂質クラスターを形成する分子基盤について述べる。リン脂質のみの非ラフト膜では、膜表面部のSMの運動性がPCに比べて小さいことが示された(図2-6B)。カルボニル基という水素結合のアクセプターしかもたないPCと比較して、SMは骨格構造にアミド基やヒドロキシ基を持つため、分子間で水素結合が形成され、運動性が抑えられていると考えられる。実際、SM分子間で水素結合を形成しているという報告¹⁻⁵⁾が多数ある。一方ラフト膜においては、SMとPCに対するCholのオーダー効果に大きな違いはみられなかったが(図2-7)、Cholのオーダー効果によって分裂幅が最大値になるアルキル鎖の炭素番号の違い(図2-6B)からSM膜ではPC膜よりもCholが膜の深い位置に分布していることが示唆された。これは、膜表面部で形成されるSM分子間の水素結合とSMヘッドグループによるumbrella効果による影響であると推定される。また、固体NMRの一種であるREDOR実験により、CholによってSMアミド部位の配向はほとんど変化しないがオーダーは上昇することが明らかにされている⁶⁾。この結果からCholがSM分子全体の運動性を抑え、アルキル鎖を伸長させることでSM分子間の距離を縮め、SMアミド部位での水素結合形成を促進していることが示唆されている⁶⁾。つまり、SM-Cholのクラスター形成に対して、従来報告されている膜表面部のSM-Chol分子間相互作用よりも膜内部のCholのステロイド骨格によるSMアルキル鎖に対するオーダー効果の寄与の方が大きいと推定される。したがって、SMとCholから成る脂質クラスター形成の分子基盤は、膜の深い位置に分布するCholのSMアルキル鎖に対するオーダー効果とそれに伴い膜上部で促進されるSM分子間の水素結合のネットワーク形成との相乗効果であると考えられる。これらの寄与によって、SMは広い温度範囲、Chol濃度範囲でも、熱安定性の高いL₀相を優位に形成しやすいと考えられる。

本研究では、化学的手法(有機合成)と物理的手法(^2H NMRや蛍光実験)を組み合わせて、単純な膜組成である1、2成分系から複雑な3成分系の人工膜における脂質の動態をさまざまな角度から明らかにした。特に3成分系膜において共存する2相に存在する脂質分子の動的挙動や分配比を詳細に決定できたことは、これまでにない画期的な成果である。今後、さらにラフト形成の分子基盤の理解を深めるためには、スフィンゴ糖脂質やタンパク質を含む人工膜、より多成分を含む膜組成や非対称膜へと段階的に解析を進める必要がある。そして、最

終的には実際の生体膜を用いた解析が期待される。その際、本研究で適用した位置選択的に重水素標識した脂質を用いる分析手法は、糖脂質や膜タンパク質のリガンドとなる脂質にも適用可能であり、タンパク質の構造や動態を解析するのにも有効であると考えられる。同時に単純な膜組成に対して新たな分析手法を適用し、脂質分子の動態情報の基盤を広げることも必要である。蛍光プローブを用いて脂質分子の拡散運動や分子間相互作用を観察する FCS や FRET、分子の構造情報を取得できる X 線結晶構造解析、アルキル鎖の配座交換のような速い動的挙動を観察する 2D IR などが考えられる。今後、本研究を基盤とした解析が進展できれば、生体膜中の脂質ラフトの形成機構、機能・構造基盤の解明につながることを期待される。

参考文献

- 1) Steinbauer, B.; Mehnert, T.; Bayer, K.; *Biophys. J.* **2003**, *85*, 1013-1024.
- 2) 岡崎 宏紀 大阪大学理学研究科化学専攻 平成 19 年度修士論文
- 3) Niemelä, P.; Hyvönen, M. T.; Vattulainen, I. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 2976-2989.
- 4) Khelashvili, G. A.; Scott, H. L. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 9841-9847.
- 5) Arsov, Z.; Quaroni, L. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778*, 880-889.
- 6) 前田 佳子 大阪大学理学研究科化学専攻 平成 22 年度修士論文

第 6 章： 実験項

6-1 一般的事項

試薬および溶媒

水酸化ナトリウム、オクタン酸、塩化メタンスルホニル、ヨウ化ナトリウム、*n*-ブチルリチウム (ヘキサン溶液)、ヘキサメチレンリン酸トリアミド、*t*-ブチルアルコール、リン酸二水素ナトリウム二水和物、次亜塩素酸ナトリウム、セライト-545RVS、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トリエチルアミン、チオ硫酸ナトリウム、ピリジン、硫酸水素カリウム、濃硫酸、塩化アンモニウム、炭酸水素ナトリウム、コレステロール、酢酸エチル、ヘキサン、クロロホルム、メタノール、アセトン、ジエチルエーテル、無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム、濃塩酸はナカライテスクから購入した。

ピリジン三酸化硫黄複合体、2-メチル-2-ブテン、*tert*-ブチルジメチルシリルトリフラート、2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物 (MNBA)、テトラブチルアンモニウムフロリド (THF 溶液) は東京化成工業から購入した。

重水素化リチウムアルミニウム、4-ジメチルアミノピリジン、Lindlar 触媒は Aldrich から購入した。

イミダゾールは和光純薬工業から、トルエン (脱水)、テトラヒドロフラン (脱水)、ジクロロメタン (脱水) は関東化学から購入した。

sphingomyelin (Brain Porcine)、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC)、1-oleoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine、1-palmitoyl-2-stearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PSPC)、1-palmitoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine は Avanti polar Lipid から、deuterium depleted water は isotec から購入した。

6',6'-*d*₂-DOPC は当研究室 Jin Cui 博士より提供して頂いた。

合成法は Cui, J.; Lethu, S.; Yasuda, T.; Matsuoka, S.; Matsumori, N.; Sato, F.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *25*, 203-206 を参照。

1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) は Molecular Probes より購入し、*trans*-parinaric acid (tPA) は α -リノレン酸より合成されたものを用いた。共に Finland Slotte 研究室より提供して頂いた。

グレードに関して、全ての試薬は市販の試薬を精製することなく使用した。順相カラムクロマトグラフィーには関東化学シリカゲル 60N (100~200 μm) および Merck シリカゲル 60N (40~60 μm) を使用し、逆相カラムクロマトグラフィーについては YMC の ODS-AQ を使用した。逆相 HPLC 用のカラムクロマトグラフィーについてはナカライテスク製の cosmosil5C18-AR-II を使用した。TLC プレートは Merck シリカゲル 60F₂₅₄ を用いた。

機器、装置

化合物の構造解析のために溶液 NMR に関しては JEOL 社製 ECS-400 (¹H NMR: 400 MHz) および ECA-500 (¹H NMR: 500 MHz) を用いて測定した。¹H NMR スペクトルの化学シフトは溶媒のシグナルを内部基準 (CDCl₃: δ 7.24, CD₃OD: δ 3.30) としたときの値で示した。質量分析には Thermo Fisher Scientific 社製 LQA DECA および LTQ-Orbitrap XL を用いた。重水素固体 NMR 測定に関しては Chemagnetic CMX-300 (プローブ: Otsuka Electronics 社製 PRB 300-023) および AVANCE III 400 (プローブ: 4 mm Bruker WL Static solid Probe) を用いた。

蛍光異方性測定は ISS 社の PC-1 を使用し、蛍光寿命測定では、PicoQuant 社製の PicoHarp 300E TCSPC の module 付きの FluoTime 200 を用いた。蛍光顕微鏡観察では、OLYMPUS 社の倒立型電動リサーチ顕微鏡 IX81 を使用し、レンズは LUCPLFLN 60x (60 倍、NA; 0.7) である。

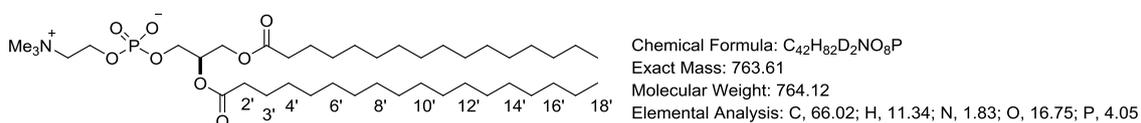
C(18:0)-SM の精製

市販の C18:0 SM では、スフィンゴシン骨格 3 位のエピマー混合物であるため、ウシ脳由来の SM (bSM, 16:0 (2%), 18:0 (49%), 20:0 (5%), 22:0 (8%), 24:0 (6%), 24:1 (20%)) から C18:0-SM (SSM) を逆相 HPLC によって精製・分取した (Eluent: MeOH, Flow rate: 4.0 mL/min., UV: 205 nm, Injection: 20 mg/ 50

μL)。 Retention time は 47 分 (16:0)、55 分 (18:0)、72 分 (20:0)、90 分 (24:1) である。HPLC 精製は、HITACHI 社製 Pump L-7100、UV-Detector (210 nm) L-7405、Chromato-Integrator D-2500 で行った。

6-2 合成

Synthesis of 2',2'-d₂, 3',3'-d₂, 4',4'-d₂, 6',6'-d₂, 8',8'-d₂, 10',10'-d₂, 12',12'-d₂, 14',14'-d₂, 16',16'-d₂, 18',18'-d₃-PSPCs



ナス形フラスコに 1-palmitoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine (52.1 mg, 0.11 mmol) とこれまでに合成した重水素標識ステアリン酸 (41.1 mg, 0.14 mmol) を加え、ジクロロメタン (3.0 ml) に溶かした。そこに 2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物 (MNBA) (189 mg, 0.55 mmol) と 4-ジメチルアミノピリジン (134 mg, 1.10 mmol) を加えて室温で 17 時間攪拌した。その後、メタノールでクエンチし、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー (silica gel, CHCl₃/MeOH = 3/1, CHCl₃/MeOH/H₂O = 65/25/4) で精製し、アセトン沈殿をした後、重水素化 1-palmitoyl-2-stearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (PSPC) を白色固体として得た。

2'-d₂-PSPC: white solid (52.9 mg, 0.07 mmol, 63%). R_f 0.70 (silica gel, CHCl₃/MeOH/H₂O = 65/35/8); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 5.24 (2H, br, H2), 4.41 (1H, dd, *J* = 12.4, 3.2 Hz, H1), 4.25 (2H, br, α), 4.15 (1H, dd, *J* = 12.0, 6.8 Hz, H1), 3.98 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, H3), 3.62 (2H, t, *J* = 4.8 Hz, β), 3.21 (9H, s, -N⁺Me₃), 2.30 (71%*, br, H2'), 2.01 (4H, t, *J* = 6.4 Hz, H3'), 1.27 (50H, s, -CH₂-), 0.88 (6H, t, *J* = 6.4 Hz, H18, H18') *not deuterated H (%); ESI-HRMS *m/z* calcd for C₄₂H₈₂D₂NO₈PNa⁺ (M+Na)⁺ 786.5952, found 786.5946.

3'-*d*₂-PSPC: white solid (38.7 mg, 0.05 mmol, 50%). Rf 0.67 (silica gel, CHCl₃/MeOH/H₂O = 65/35/8); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 5.25 (2H, br, H2), 4.41 (1H, dd, *J* = 12.4, 3.2 Hz, H1), 4.25 (2H, br, α), 4.15 (1H, dd, *J* = 12.0, 6.8 Hz, H1), 3.98 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H3), 3.62 (2H, t, *J* = 4.8 Hz, β), 3.21 (9H, s, -N⁺Me₃), 2.30 (4H, br, H2'), 2.01 (66%*, br, H3'), 1.25 (50H, s, -CH₂-), 0.88 (6H, t, *J* = 6.4 Hz, H18, H18') *not deuterated H (%); ESI-HRMS *m/z* calcd for C₄₂H₈₂D₂NO₈PNa⁺ (M+Na)⁺ 786.5952, found 786.5946.

4'-*d*₂-PSPC: white solid (44.8 mg, 0.06 mmol, 49%). Rf 0.71 (silica gel, CHCl₃/MeOH/H₂O = 65/35/8); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 5.25 (1H, br, H2), 4.40 (1H, dd, *J* = 12.4, 3.2 Hz, H1), 4.25 (2H, br, α), 4.15 (1H, dd, *J* = 12.0, 6.8 Hz, H1), 3.98 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H3), 3.62 (2H, t, *J* = 4.8 Hz, β), 3.20 (9H, s, -N⁺Me₃), 2.30 (4H, br, H2'), 2.01 (4H, br, H3'), 1.24 (50H, s, -CH₂-), 0.88 (6H, t, *J* = 6.4 Hz, H18, H18'); ESI-HRMS *m/z* calcd for C₄₂H₈₂D₂NO₈PNa⁺ (M+Na)⁺ 786.5952, found 786.5952.

6'-*d*₂-PSPC: white solid (72.6 mg, 0.09 mmol, 90%). Rf 0.69 (silica gel, CHCl₃/MeOH/H₂O = 65/35/8); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 5.25 (1H, br, H2), 4.41 (1H, dd, *J* = 12.4, 3.2 Hz, H1), 4.24 (2H, br, α), 4.15 (1H, dd, *J* = 12.0, 6.8 Hz, H1), 3.98 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H3), 3.62 (2H, t, *J* = 4.8 Hz, β), 3.20 (9H, s, -N⁺Me₃), 2.30 (4H, br, H2'), 2.01 (4H, br, H3'), 1.25 (50H, s, -CH₂-), 0.88 (6H, t, *J* = 6.4 Hz, H18, H18'); ESI-HRMS *m/z* calcd for C₄₂H₈₂D₂NO₈PNa⁺ (M+Na)⁺ 786.5952, found 786.5958.

8'-*d*₂-PSPC: white solid (70.0 mg, 0.09 mmol, 90%). Rf 0.70 (silica gel, CHCl₃/MeOH/H₂O = 65/35/8); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 5.25 (1H, br, H2), 4.41 (1H, dd, *J* = 12.4, 3.2 Hz, H1), 4.24 (2H, br, α), 4.15 (1H, dd, *J* = 12.0, 6.8 Hz, H1), 3.98 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H3), 3.62 (2H, t, *J* = 4.8 Hz, β), 3.21 (9H, s, -N⁺Me₃), 2.30 (4H, br, H2'), 2.01 (4H, br, H3'), 1.25 (50H, s, -CH₂-), 0.88 (6H, t, *J* = 6.4 Hz, H18, H18'); ESI-HRMS *m/z* calcd for C₄₂H₈₂D₂NO₈PNa⁺ (M+Na)⁺ 786.5952, found 786.5960.

10'-*d*₂-PSPC: white solid (74.0 mg, 0.10 mmol, 95%). Rf 0.71 (silica gel, CHCl₃/MeOH/H₂O = 65/35/8); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 5.25 (1H, br, H2), 4.41 (1H, dd, *J* = 12.4, 3.2 Hz, H1), 4.24 (2H, br, α), 4.15 (1H, dd, *J* = 12.0, 6.8 Hz, H1), 3.98 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H3), 3.62 (2H, t, *J* = 4.8 Hz, β), 3.21 (9H, s, -N⁺Me₃), 2.31 (4H, br, H2'), 2.01 (4H, br, H3'), 1.24 (50H, s, -CH₂-), 0.88 (6H, t, *J* = 6.4 Hz, H18, H18'); ESI-HRMS *m/z* calcd for C₄₂H₈₂D₂NO₈PNa⁺ (M+Na)⁺ 786.5952, found 786.5961.

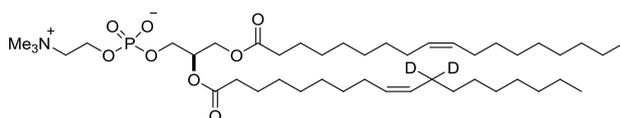
12'-*d*₂-PSPC: white solid (70.9 mg, 0.09 mmol, 92%). Rf 0.70 (silica gel, CHCl₃/MeOH/H₂O = 65/35/8); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 5.25 (1H, br, H2), 4.41 (1H, dd, *J* = 12.4, 3.2 Hz, H1), 4.24 (2H, br, α), 4.15 (1H, dd, *J* = 12.0, 6.8 Hz, H1), 3.98 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H3), 3.61 (2H, t, *J* = 4.8 Hz, β), 3.21 (9H, s, -N⁺Me₃), 2.31 (4H, br, H2'), 2.01 (4H, br, H3'), 1.25 (50H, s, -CH₂-), 0.88 (6H, t, *J* = 6.4 Hz, H18, H18'); ESI-HRMS *m/z* calcd for C₄₂H₈₂D₂NO₈PNa⁺ (M+Na)⁺ 786.5952, found 786.5960.

14'-*d*₂-PSPC: white solid (65.6 mg, 0.09 mmol, 83%). Rf 0.71 (silica gel, CHCl₃/MeOH/H₂O = 65/35/8); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 5.25 (1H, br, H2), 4.41 (1H, dd, *J* = 12.4, 3.2 Hz, H1), 4.24 (2H, br, α), 4.15 (1H, dd, *J* = 12.0, 6.8 Hz, H1), 3.98 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H3), 3.60 (2H, t, *J* = 4.8 Hz, β), 3.20 (9H, s, -N⁺Me₃), 2.31 (4H, br, H2'), 2.01 (4H, br, H3'), 1.25 (50H, s, -CH₂-), 0.88 (6H, t, *J* = 6.4 Hz, H18, H18'); ESI-HRMS *m/z* calcd for C₄₂H₈₂D₂NO₈PNa⁺ (M+Na)⁺ 786.5952, found 786.5960.

16'-*d*₂-PSPC: white solid (65.0 mg, 0.08 mmol, 58%). Rf 0.71 (silica gel, CHCl₃/MeOH/H₂O = 65/35/8); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 5.25 (1H, br, H2), 4.41 (1H, dd, *J* = 12.4, 3.2 Hz, H1), 4.24 (2H, br, α), 4.15 (1H, dd, *J* = 12.0, 6.8 Hz, H1), 3.98 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H3), 3.60 (2H, t, *J* = 4.8 Hz, β), 3.20 (9H, s, -N⁺Me₃), 2.31 (4H, br, H2'), 2.01 (4H, br, H3'), 1.25 (50H, s, -CH₂-), 0.88 (6H, t, *J* = 6.4 Hz, H18, H18'); ESI-HRMS *m/z* calcd for C₄₂H₈₂D₂NO₈PNa⁺ (M+Na)⁺ 786.5952, found 786.5958.

18'-*d*₃-PSPC: white solid (54.7 mg, 0.07 mmol, 86%). Rf 0.71 (silica gel, CHCl₃/MeOH/H₂O = 65/35/8); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 5.25 (1H, br, H2), 4.41 (1H, dd, *J* = 12.4, 3.2 Hz, H1), 4.24 (2H, br, α), 4.15 (1H, dd, *J* = 12.0, 6.8 Hz, H1), 3.98 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H3), 3.60 (2H, t, *J* = 4.8 Hz, β), 3.20 (9H, s, -N⁺Me₃), 2.31 (4H, br, H2'), 2.01 (4H, br, H3'), 1.25 (50H, s, -CH₂-), 0.88 (3H, t, *J* = 6.4 Hz, H18); ESI-HRMS *m/z* calcd for C₄₂H₈₁D₃NO₈PNa⁺ (M+Na)⁺ 787.6015, found 787.6024.

Synthesis of 11',11'-*d*₂-DOPC



Chemical Formula: C₄₄H₈₂D₂NO₈P
 Exact Mass: 787.61
 Molecular Weight: 788.14
 Elemental Analysis: C, 67.05; H, 11.00; N, 1.78; O, 16.24; P, 3.93

ナス形フラスコに 1-oleoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine (95.1 mg, 0.18 mmol) と合成した 11,11-*d*₂-オレイン酸 (61.4 mg, 0.22 mmol) を加え、ジクロロメタン (5.0 ml) に溶かした。そこに 2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物 (MNBA) (310 mg, 0.90 mmol) と 4-ジメチルアミノピリジン (220 mg, 1.80 mmol) を加えて室温で 14 時間攪拌した。その後、メタノールでクエンチし、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー (silica gel, CHCl₃/MeOH = 3/1, CHCl₃/MeOH/H₂O = 65/25/4) で精製し、アセトン沈殿をした後、11',11'-*d*₂-1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) (114 mg, 145 μmol, 81%) を白色固体として得た。

white solid. Rf 0.52 (silica gel, CHCl₃/MeOH/H₂O = 65/25/4); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 5.38-5.27 (4H, m, H9', H10'), 5.25 (1H, br, H2), 4.41 (1H, dd, *J* = 12.4, 3.2 Hz, H1), 4.24 (2H, br, α), 4.15 (1H, dd, *J* = 12.0, 6.8 Hz, H1), 3.98 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H3), 3.62 (2H, t, *J* = 4.8 Hz, β), 3.20 (9H, s, -N⁺Me₃), 2.30 (4H, m, H2'), 2.03 (6H, br, H8', H11), 1.60 (4H, br, H3'), 1.25 (40 H, s, -CH₂-), 0.89 (6H, t, *J* = 6.4 Hz, H18'); ESI-HRMS *m/z* calcd for C₄₄H₈₂D₂NO₈PNa⁺ (M+Na)⁺ 810.5952, found 810.5959.

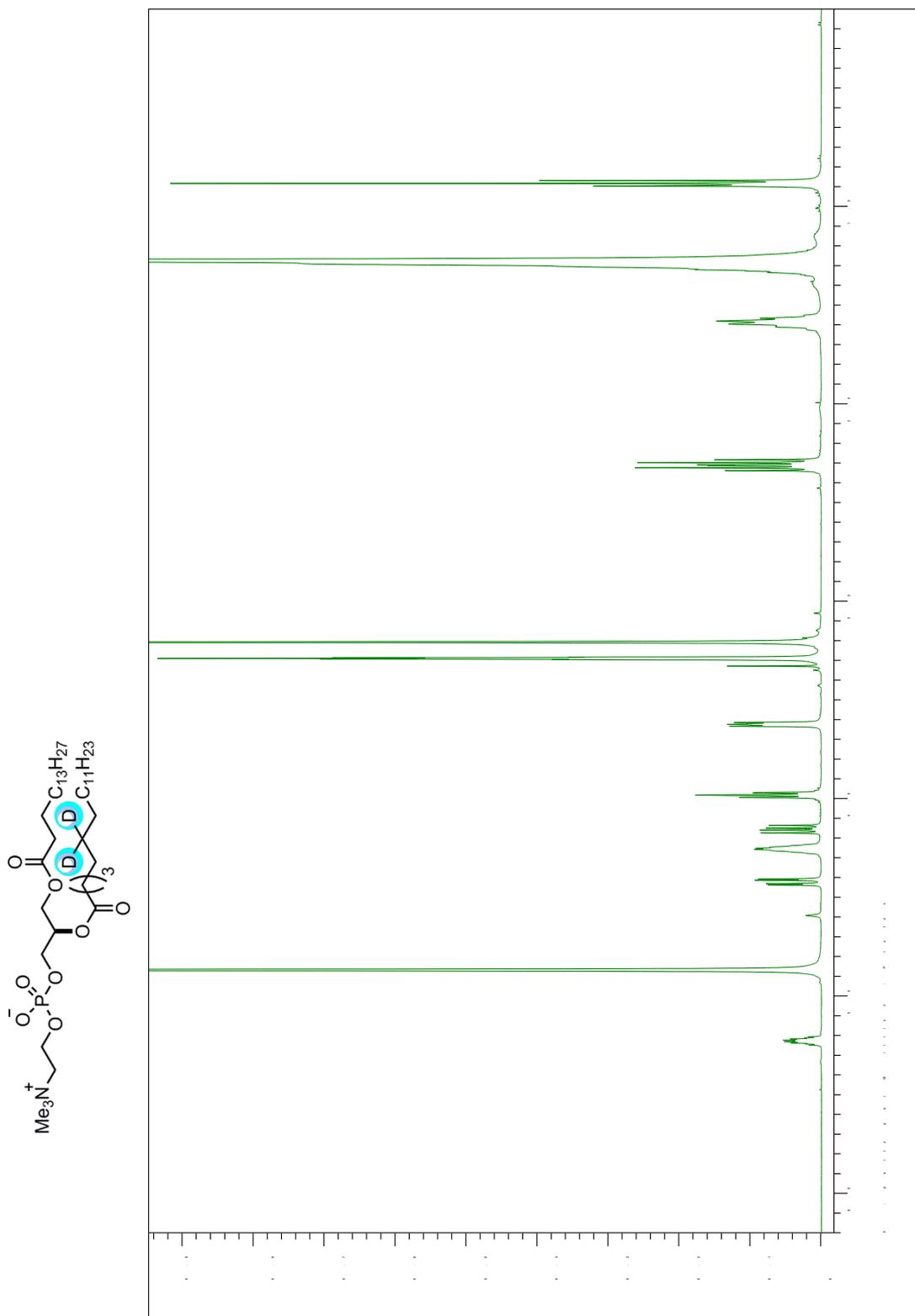


図 6-1 6',6'-d₂-PSPC の ¹H NMR スペクトル (CD₃OD 中)

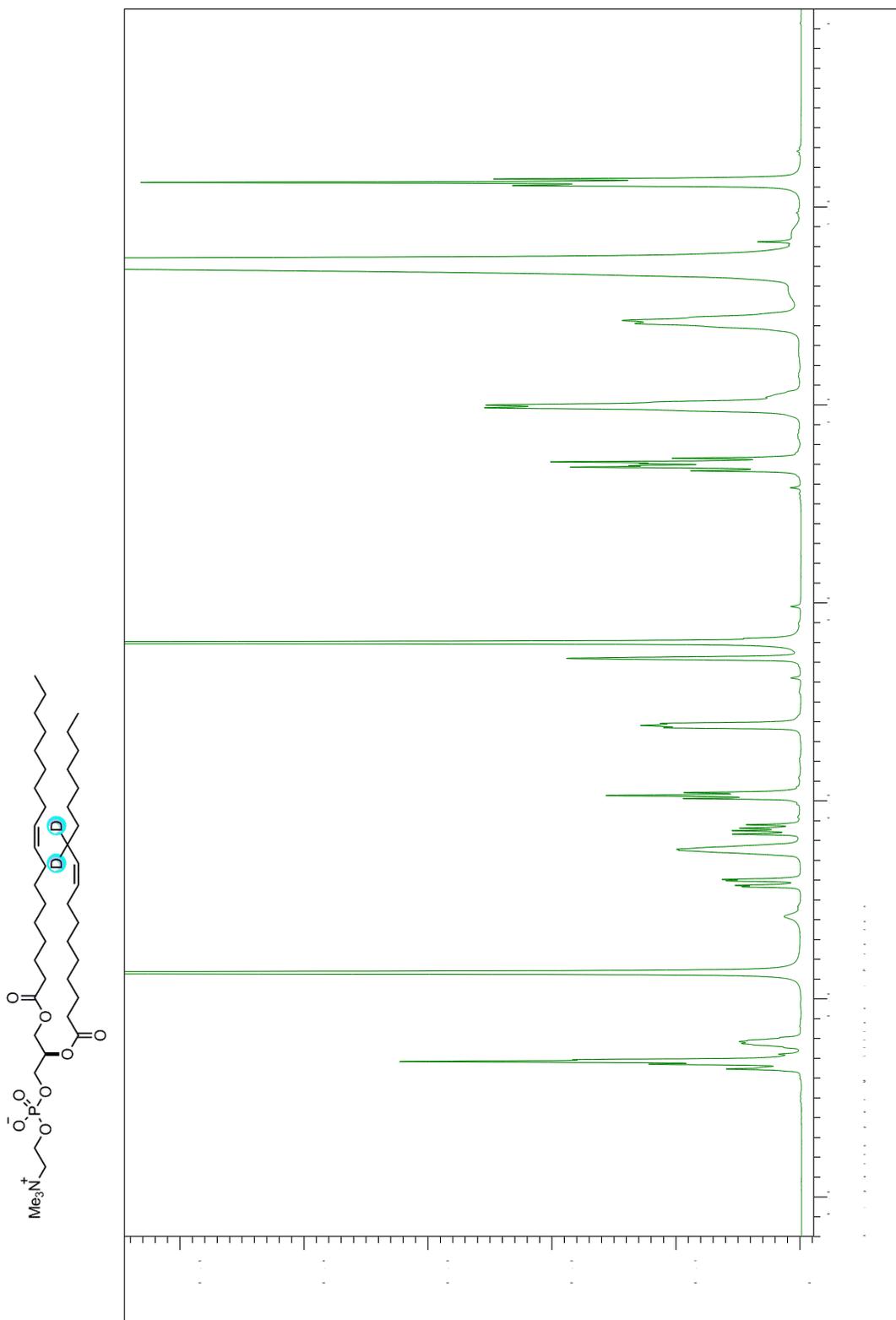


図 6-2 11',11'-d₂-DOPC の ¹H NMR スペクトル (CD₃OD 中)

6-3 固体重水素 NMR 測定

(A) 試料

○2',2'- d_2 -PSPC

- 1) PSPC (10.70 mg, 14.0 μmol), 2',2'- d_2 -PSPC (9.68 mg, 12.7 μmol)
- 2) PSPC (8.82 mg, 11.6 μmol), 2',2'- d_2 -PSPC (6.40 mg, 8.38 μmol), Chol (7.71 mg, 19.9 μmol)

○3',3'- d_2 -PSPC

- 1) PSPC (14.05 mg, 18.4 μmol), 3',3'- d_2 -PSPC (6.64 mg, 8.69 μmol)
- 2) PSPC (9.14 mg, 12.0 μmol), 3',3'- d_2 -PSPC (6.33 mg, 8.28 μmol), Chol (7.85 mg, 20.3 μmol)

○4',4'- d_2 -PSPC

- 1) PSPC (14.86 mg, 19.5 μmol), 4',4'- d_2 -PSPC (5.18 mg, 6.78 μmol)
- 2) PSPC (10.10 mg, 13.3 μmol), 4',4'- d_2 -PSPC (5.07 mg, 6.64 μmol), Chol (7.69 mg, 19.9 μmol)
- 3) PSPC (4.86 mg, 6.38 μmol), 4', 4' - d_2 -PSPC (5.31 mg, 6.95 μmol), DOPC (10.5 mg, 13.3 μmol)
- 4) PSPC (4.94 mg, 6.48 μmol), 4', 4' - d_2 -PSPC (5.35 mg, 7.00 μmol), Chol (5.21, 13.5 μmol), DOPC (10.6 mg, 13.5 μmol)

○6',6'- d_2 -PSPC

- 1) PSPC (14.27 mg, 18.7 μmol), 6',6'- d_2 -PSPC (6.24 mg, 8.17 μmol)
- 2) PSPC (9.00 mg, 11.8 μmol), 6',6'- d_2 -PSPC (6.43 mg, 8.42 μmol), Chol (7.82 mg, 20.2 μmol)
- 3) PSPC (5.15 mg, 6.76 μmol), 6', 6' - d_2 -PSPC (5.09 mg, 6.66 μmol), DOPC (10.55 mg, 13.4 μmol)
- 4) PSPC (5.10 mg, 6.69 μmol), 6', 6' - d_2 -PSPC (5.22 mg, 6.83 μmol), Chol (5.23 mg, 13.5 μmol), DOPC (10.63 mg, 13.5 μmol)

○8',8' -*d*₂-PSPC

- 1) PSPC (15.0 mg, 19.7 μmol), 8', 8' -*d*₂-PSPC (5.5 mg, 7.20 μmol)
- 2) PSPC (10.1 mg, 13.3 μmol), 8', 8' -*d*₂-PSPC (5.5 mg, 7.20 μmol), Chol (7.9 mg, 20.4 μmol)
- 3) PSPC (5.01 mg, 6.76 μmol), 8', 8' -*d*₂-PSPC (5.40 mg, 7.07 μmol), DOPC (10.72 mg, 13.6 μmol)
- 4) PSPC (4.88 mg, 6.40 μmol), 8', 8' -*d*₂-PSPC (5.40 mg, 7.07 μmol), Chol (5.21 mg, 13.5 μmol), DOPC (10.59 mg, 13.5 μmol)

○10',10' -*d*₂-PSPC

- 1) PSPC (15.04 mg, 19.7 μmol), 10', 10' -*d*₂-PSPC (5.10 mg, 6.67 μmol)
- 2) PSPC (9.58 mg, 12.6 μmol), 10', 10' -*d*₂-PSPC (5.30 mg, 6.94 μmol), Chol (7.55 mg, 19.6 μmol)
- 3) PSPC (5.11 mg, 6.71 μmol), 10', 10' -*d*₂-PSPC (5.24 mg, 6.86 μmol), DOPC (10.66 mg, 13.6 μmol)
- 4) 10', 10' -*d*₂-PSPC (9.67 mg, 12.7 μmol), Chol (4.89 mg, 12.7 μmol), DOPC (9.95 mg, 12.7 μmol)
- 5) PSPC (4.47 mg, 5.87 μmol), 10', 10' -*d*₂-PSPC (10.08 mg, 13.2 μmol), Chol (3.68 mg, 9.53 μmol)
- 6) PSPC (4.58 mg, 6.01 μmol), 10', 10' -*d*₂-PSPC (10.08 mg, 13.2 μmol), Chol (1.85 mg, 4.80 μmol)
- 7) 10', 10' -*d*₂-PSPC (8.31 mg, 10.9 μmol), Chol (2.10 mg, 5.44 μmol), DOPC (8.55 mg, 10.9 μmol)
- 8) 10', 10' -*d*₂-PSPC (8.47 mg, 11.1 μmol), Chol (1.62 mg, 4.18 μmol), DOPC (4.44 mg, 5.64 μmol)
- 9) 10', 10' -*d*₂-PSPC (8.16 mg, 10.7 μmol), Chol (3.06 mg, 7.91 μmol), DOPC (16.5 mg, 21.0 μmol)

○12', 12' -*d*₂-PSPC

- 1) PSPC (15.00 mg, 19.7 μmol), 12', 12' -*d*₂-PSPC (5.34 mg, 6.99 μmol)
- 2) PSPC (11.92 mg, 15.6 μmol), 12', 12' -*d*₂-PSPC (5.25 mg, 6.87 μmol), Chol (8.70 mg, 22.5 μmol)

- 3) PSPC (5.04 mg, 6.61 μmol), 12', 12' - d_2 -PSPC (5.14 mg, 6.73 μmol), DOPC (10.49 mg, 13.3 μmol)
- 4) PSPC (5.13 mg, 6.73 μmol), 12', 12' - d_2 -PSPC (5.03 mg, 6.58 μmol), Chol (5.15 mg, 13.3 μmol), DOPC (10.46 mg, 13.3 μmol)

○14',14' - d_2 -PSPC

- 1) PSPC (14.07 mg, 18.5 μmol), 14',14' - d_2 -PSPC (6.04 mg, 7.90 μmol)
- 2) PSPC (9.10 mg, 11.9 μmol), 14',14' - d_2 -PSPC (6.26 mg, 8.19 μmol), Chol (7.78 mg, 20.1 μmol)
- 3) PSPC (4.96 mg, 6.51 μmol), 14', 14' - d_2 -PSPC (5.14 mg, 6.73 μmol), DOPC (10.40 mg, 13.2 μmol)
- 4) PSPC (4.27 mg, 5.60 μmol), 14', 14' - d_2 -PSPC (6.28 mg, 8.22 μmol), Chol (5.34 mg, 13.8 μmol), DOPC (10.86 mg, 13.8 μmol)

○16',16' - d_2 -PSPC

- 1) PSPC (10.96 mg, 14.4 μmol), 16',16' - d_2 -PSPC (9.10 mg, 11.9 μmol)
- 2) PSPC (8.65 mg, 11.94 μmol), 16',16' - d_2 -PSPC (6.64 mg, 8.69 μmol), Chol (7.75 mg, 20.0 μmol)
- 3) PSPC (4.79 mg, 6.29 μmol), 16', 16' - d_2 -PSPC (5.33 mg, 6.98 μmol), DOPC (10.42 mg, 13.3 μmol)
- 4) PSPC (4.47 mg, 5.87 μmol), 16', 16' - d_2 -PSPC (5.56 mg, 7.28 μmol), Chol (5.08 mg, 13.1 μmol), DOPC (10.33 mg, 13.1 μmol)

○18',18',18' - d_3 -PSPC

- 1) PSPC (13.65 mg, 17.9 μmol), 18',18',18' - d_3 -PSPC (6.59 mg, 8.61 μmol)
- 2) PSPC (8.76 mg, 11.5 μmol), 18',18',18' - d_3 -PSPC (6.51 mg, 8.51 μmol), Chol (7.73 mg, 20.0 μmol)
- 3) PSPC (4.84 mg, 6.35 μmol), 18',18',18' - d_3 -PSPC (4.80 mg, 6.27 μmol), DOPC (9.92 mg, 12.6 μmol)
- 4) PSPC (5.27 mg, 6.92 μmol), 18',18',18' - d_3 -PSPC (4.57 mg, 5.97 μmol), Chol (4.98 mg, 12.9 μmol), DOPC (10.13 mg, 12.9 μmol)

○12,12 - d_2 -SM

- 1) C18:0 SM (10.04 mg, 13.7 μ mol), 12,12 - d_2 -SM (4.93 mg, 6.74 μ mol), Chol (3.96 mg, 10.2 μ mol)
- 2) C18:0 SM (10.11 mg, 13.8 μ mol), 12,12 - d_2 -SM (5.04 mg, 6.88 μ mol), Chol (2.00 mg, 5.18 μ mol)

○18',18',18' - d_3 -SM

- 1) C18:0 SM (4.90 mg, 6.70 μ mol), 18,18,18- d_3 -SM (5.12 mg, 6.97 μ mol), DOPC (10.75 mg, 13.7 μ mol)
- 2) C18:0 SM (5.10 mg, 6.98 μ mol), 18,18,18- d_3 -SM (4.98 mg, 6.78 μ mol), Chol (5.32 mg, 13.8 μ mol), DOPC (10.82 mg, 13.8 μ mol)

○10',10' - d_2 -SM

- 1) C18:0 SM (9.91 mg, 13.6 μ mol), 10',10' - d_2 -SM (5.01 mg, 6.83 μ mol), Chol (2.63 mg, 6.79 μ mol)
- 2) C18:0 SM (10.1 mg, 13.8 μ mol), 10',10' - d_2 -SM (5.10 mg, 6.96 μ mol), Chol (0.89 mg, 2.31 μ mol)
- 3) C18:0 SM (9.90 mg, 13.5 μ mol), 10',10' - d_2 -SM (5.10 mg, 6.89 μ mol), Chol (0.42 mg, .08 μ mol)
- 4) 10',10' - d_2 -SM (9.20 mg, 12.6 μ mol), Chol (4.85 mg, 12.6 μ mol), DOPC (9.87 mg, 12.6 μ mol)
- 5) 10',10' - d_2 -SM (8.59 mg, 11.7 μ mol), Chol (2.27 mg, 5.86 μ mol), DOPC (9.21 mg, 11.7 μ mol)
- 6) 10',10' - d_2 -SM (8.17 mg, 11.1 μ mol), Chol (1.63 mg, 4.21 μ mol), DOPC (4.46 mg, 5.68 μ mol)
- 7) 10',10' - d_2 -SM (7.50 mg, 10.2 μ mol), Chol (2.93 mg, 7.58 μ mol), DOPC (15.78 mg, 20.1 μ mol)
- 8) 10',10' - d_2 -SM (2.60 mg, 3.55 μ mol)
- 9) 10',10' - d_2 -SM (12.8 mg, 17.5 μ mol), Chol (6.75 mg, 17.5 μ mol)

○3-*d*₁-Chol

- 1) C18:0 SM (10.36 mg, 14.2 μmol), 3-*d*₁-Chol (5.49 mg, 14.2 μmol), DOPC (11.14 mg, 14.2 μmol)
- 2) C18:0 SM (9.88 mg, 13.5 μmol), 3-*d*₁-Chol (2.61 mg, 6.76 μmol), DOPC (10.62 mg, 13.5 μmol)
- 3) C18:0 SM (15.81 mg, 21.6 μmol), 3-*d*₁-Chol (3.15 mg, 8.16 μmol), DOPC (8.66 mg, 11.0 μmol)
- 4) C18:0 SM (8.00 mg, 10.9 μmol), 3-*d*₁-Chol (3.13 mg, 8.10 μmol), DOPC (16.88 mg, 21.5 μmol)
- 5) PSPC (14.73 mg, 19.3 μmol), 3-*d*₁-Chol (7.47 mg, 19.3 μmol)
- 6) PSPC (10.03 mg, 13.2 μmol), 3-*d*₁-Chol (5.10 mg, 13.2 μmol), DOPC (10.35 mg, 13.2 μmol)
- 7) PSPC (15.8 mg, 20.7 μmol), 3-*d*₁-Chol (4.01 mg, 10.3 μmol), DOPC (16.3 mg, 20.7 μmol)
- 8) PSPC (20.0 mg, 26.3 μmol), 3-*d*₁-Chol (3.84 mg, 9.90 μmol), DOPC (10.51 mg, 13.4 μmol)
- 9) PSPC (10.24 mg, 13.4 μmol), 3-*d*₁-Chol (3.86 mg, 9.96 μmol), DOPC (20.74 mg, 26.4 μmol)
- 10) DOPC (14.0 mg, 17.8 μmol), 3-*d*₁-Chol (6.88 mg, 17.8 μmol)

○11',11'-*d*₂-DOPC

- 1) DOPC (5.00 mg, 6.36 μmol), 11',11'-*d*₂-DOPC (5.00 mg, 6.34 μmol)
- 2) DOPC (3.00 mg, 3.82 μmol), 11',11'-*d*₂-DOPC (7.00 mg, 8.88 μmol), Chol (4.91 mg, 12.7 μmol)
- 3) C18:0 SM (6.30 mg, 8.62 μmol), 11',11'-*d*₂-DOPC (6.79 mg, 8.62 μmol)
- 4) C18:0 SM (8.71 mg, 11.9 μmol), Chol (4.61 mg, 11.9 μmol), 11',11'-*d*₂-DOPC (9.39 mg, 11.9 μmol)
- 5) C18:0 SM (8.08 mg, 11.1 μmol), Chol (2.14 mg, 5.53 μmol), 11',11'-*d*₂-DOPC (8.71 mg, 11.1 μmol)
- 6) C18:0 SM (10.27 mg, 14.1 μmol), Chol (2.05 mg, 5.30 μmol), 11',11'-*d*₂-DOPC (5.64 mg, 7.16 μmol)

- 7) C18:0 SM (5.28 mg, 7.22 μmol), Chol (2.07 mg, 5.35 μmol), 11',11' - d_2 -DOPC (11.17 mg, 14.2 μmol)
- 8) PSPC (8.19 mg, 10.8 μmol), Chol (4.16 mg, 10.8 μmol), 11',11' - d_2 -DOPC (8.47 mg, 10.8 μmol)
- 9) PSPC (8.15 mg, 10.7 μmol), Chol (2.07 mg, 5.35 μmol), 11',11' - d_2 -DOPC (8.43 mg, 10.7 μmol)
- 10) PSPC (10.37 mg, 13.6 μmol), Chol (1.99 mg, 5.13 μmol), 11',11' - d_2 -DOPC (5.46 mg, 6.93 μmol)
- 11) PSPC (5.47 mg, 7.18 μmol), Chol (2.05 mg, 5.32 μmol), 11',11' - d_2 -DOPC (11.10 mg, 14.1 μmol)

○6',6' - d_2 -DOPC

- 1) C18:0 SM (6.69 mg, 9.15 μmol), Chol (3.54 mg, 9.15 μmol), 6',6' - d_2 -DOPC (7.21 mg, 9.15 μmol)
- 2) PSPC (5.32 mg, 6.98 μmol), Chol (2.70 mg, 6.98 μmol), 6',6' - d_2 -DOPC (5.50 mg, 6.98 μmol)

(B) 試料調製方法

適量の脂質をクロロホルム/メタノール (1/1) に溶かし、脂質フィルムを均一な状態になるまで、溶媒を留去およびクロロホルム/メタノール溶液に溶かす作業を繰り返した。均一な脂質フィルムにした後、12 時間以上真空中乾燥させた。次に millQ 水 (脂質重量の約 30 倍量) を加え、60 °C に加熱して試験管ミキサーおよび超音波振動器で激しく攪拌し、脂質フィルムを水和させた。さらに凍結融解を 10 回以上繰り返してリポソームとした後に 12 時間以上凍結乾燥した。得られた残渣物に deuterium depleted water (脂質重量と等量) を加え、試験管ミキサーで激しく攪拌しつつ、凍結融解を 10 回以上繰り返した。最後に脂質水和物が均一になったことを確認し、NMR 管 (5 mm×12 mm) に移し、接着剤で閉じた。

(C) 測定条件

90° pulse width : 2 μ s,

interpulse delay τ_1 : 30 μ s, τ_2 : 20 μ s

repetition rate : 0.5 s

スペクトルの観測幅は 250 kHz で、積算回数は~150000 とした。

3 成分系膜において、 T_2 緩和時間測定および展開時間の違いによる 2 組の分裂幅の強度変化の観測では、 τ_1 の長さを変更し、それに応じて τ_2 の長さを τ_1 より 10 μ s 短く設定した。

(D) 測定データ

スペクトル、分裂幅の表をまとめて項末に示す。

6-4 蛍光異方性測定

(A) 試料

SSM

PSPC

SSM/Chol (50 mol%)

PSPC/Chol (50 mol%)

SSM/Chol (33 mol%)

PSPC/Chol (33 mol%)

SSM/Chol (20 mol%)

PSPC/Chol (20 mol%)

(B) 試料調製方法

SM および PSPC はメタノールに、Chol はヘキサン/2-プロパノール (3:2 v/v) に溶解させた。濃度をリン酸定量*によって決定した脂質のメタノール溶液 (合計 200 nmol) および DPH のメタノール標準溶液 (2.0 nmol) を試験管に加えて、 N_2 フローで溶媒を留去した。Ar 置換した millQ 水 (2000 μ l) を加え、加温 (70 °C、30 min) した後、vortex を行った。そして、超音波振動器で激しく攪拌し (70 °C、10 min)、均一なベシクルを形成させた。最後に、

溶液を室温に戻した後、残渣を遠心分離（13.2 kpm、1 min）によって取り除き、測定を行った。

*Rouser, G.; Fkeischer, S.; Yamamoto, A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*. **1970**, *5*, 494-496.

(C) 測定条件

励起波長：360 nm

蛍光波長：430 nm

温度範囲：20～60 °C

温度勾配：2 °C /min

測定は3回行い、蛍光異方性の値は平均値をとった。

装置 ISS PC-1 のオペレーションおよびデータ解析は Vinci software で行った。

(D) 測定データ

表 6-1 SM 膜の蛍光異方性の温度変化

T (°C)	25	30	35	40	45	50	55
50 mol%Chol	0.312	0.316	0.307	0.297	0.301	0.298	0.270
33 mol%Chol	0.332	0.329	0.314	0.305	0.290	0.283	0.258
20 mol%Chol	0.345	0.331	0.332	0.301	0.285	0.238	0.207

表 6-2 PSPC 膜の蛍光異方性の温度変化

T (°C)	25	30	35	40	45	50	55
50 mol%Chol	0.325	0.321	0.318	0.297	0.292	0.279	0.263
33 mol%Chol	0.340	0.336	0.331	0.329	0.301	0.268	0.226
20 mol%Chol	0.355	0.345	0.342	0.328	0.305	0.203	0.156

6-5 蛍光寿命測定

(A) 試料

SSM	PSPC
SSM/Chol (50 mol%)	PSPC/Chol (50 mol%)
SSM/Chol (33 mol%)	PSPC/Chol (33 mol%)
SSM/Chol (20 mol%)	PSPC/Chol (20 mol%)
SSM/Chol/DOPC (1/1/1)	PSPC/Chol/DOPC (1/1/1)

(B) 試料調製方法

SM および PSPC はメタノールに、Chol はヘキサン/2-プロパノール (3:2 v/v) に溶解させた。濃度をリン酸定量によって決定した脂質のメタノール溶液 (合計 200 nmol) およびを試験管に加えて、N₂ フローで溶媒を留去した。Ar 置換した millQ 水 (2000 μ l) を加え、超音波振動器で激しく攪拌した (75 °C、5 min)。tPA のメタノール標準溶液 (3.0 nmol) を加えた後 (サンプルのメタノール濃度 \leq 1 vol%)、vortex して再度超音波振動器で激しく攪拌し (75 °C、5 min)、ベシクルに tPA を取り込ませた。そしてサンプルが室温に戻った後、測定を行った。

(C) 測定条件

励起波長 : 298 nm

蛍光波長 : 405 nm

温度範囲 : 20~55 °C

測定時間 : 10~25 min

高温になるにつれて測定時間を長くした。

測定は 3 回行い、蛍光寿命および fractional amplitude は平均値をとった。装置 Fluo Time 200 のオペレーションおよびデータ解析は FluoFit Pro software で行った。

(D) 測定データ例

SM/50 mol%Chol 30 °C

PicoQuant FluoFit

25.9.2013



<enter comment here>

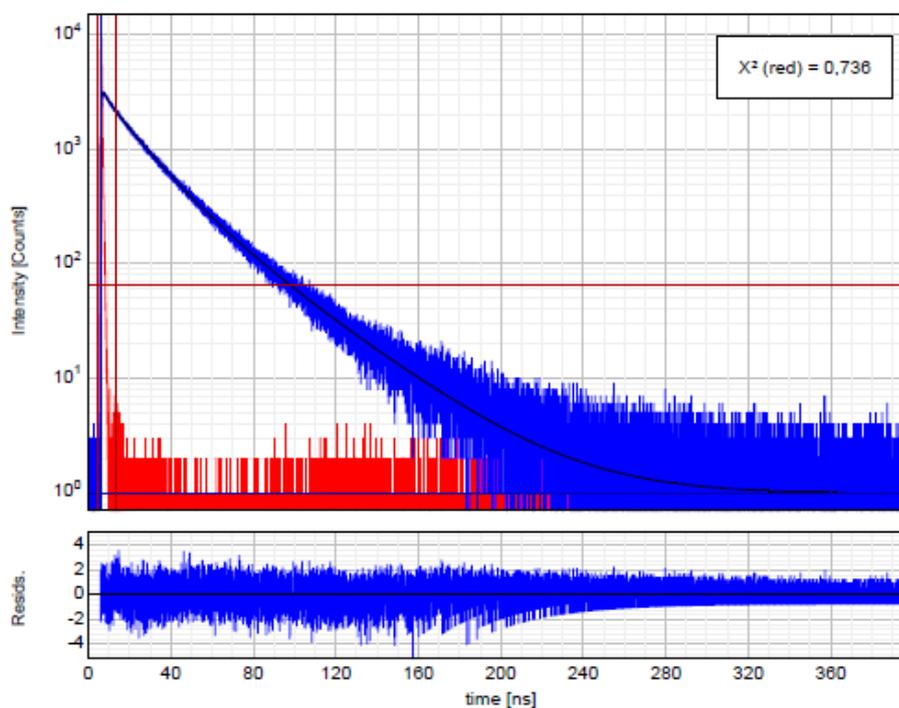
Model: Exp. [Reconv.] (Exponential)

Plotted Data Set #0 Decay: "\.\\100913 SSM50mol%chol 2nd.phd" (2)

Plotted Data Set #0 IRF: "\.\\100913 SSM50mol%chol 2nd.phd" (0)

X²(reduced): 0,7355 ; Fitted Data Points: 24634

Main Plot



$$I(t) = \int_{-\infty}^t IRF(t') \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} dt'$$



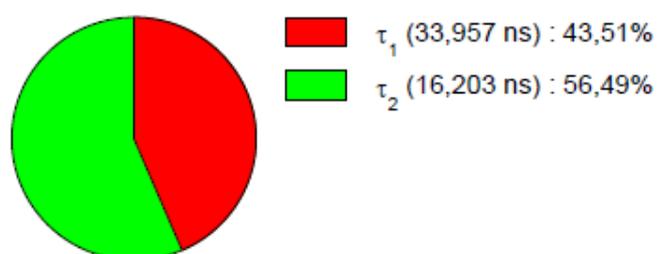
Parameter	Value	Conf. Lower	Conf. Upper	Conf. Estimation
A ₁ [Cnts]	928,5	-21,3	+21,3	Fitting
τ ₁ [ns]	33,957	-0,455	+0,455	Fitting
A ₂ [Cnts]	2526,4	-45,4	+45,4	Fitting
τ ₂ [ns]	16,203	-0,260	+0,260	Fitting
Bkgr. Dec [Cnts]	0,977	-0,296	+0,296	Fitting
Bkgr. IRF [Cnts]	65,84	-7,10	+7,10	Fitting
Shift IRF [ns]	-0,00189	-0,0196	+0,0196	Fitting
A _{Scat} [Cnts]	32190	-7040	+7040	Fitting

Average Lifetime:

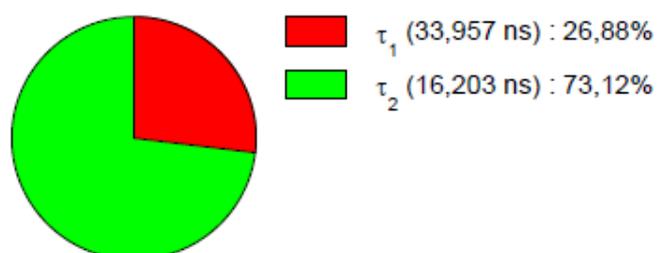
$$\tau_{Av,1} = 23,928 \text{ ns (intensity weighted)}$$

$$\tau_{Av,2} = 20,974 \text{ ns (amplitude weighted)}$$

Fractional Intensities of the Positive Decay Components:

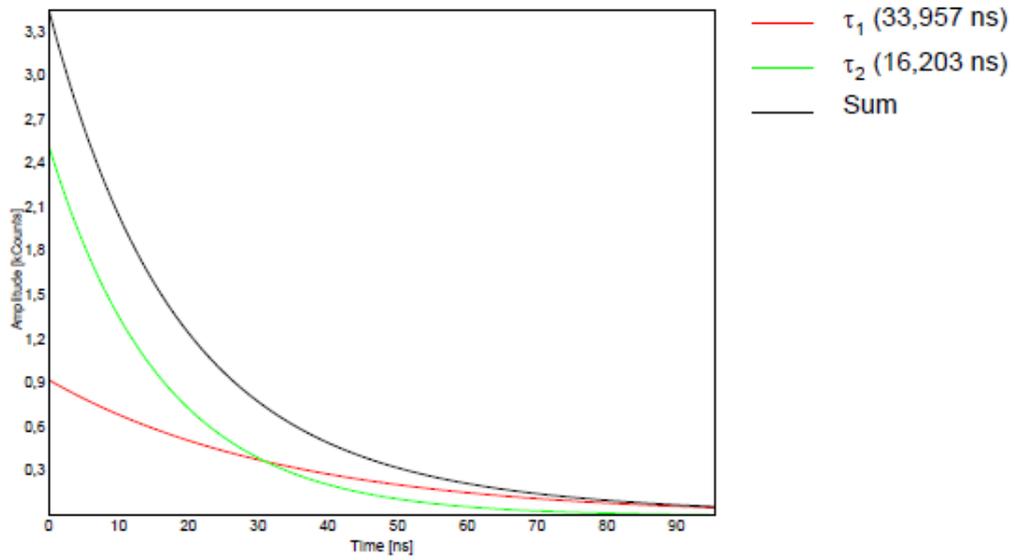


Fractional Amplitudes of the Positive Decay Components:

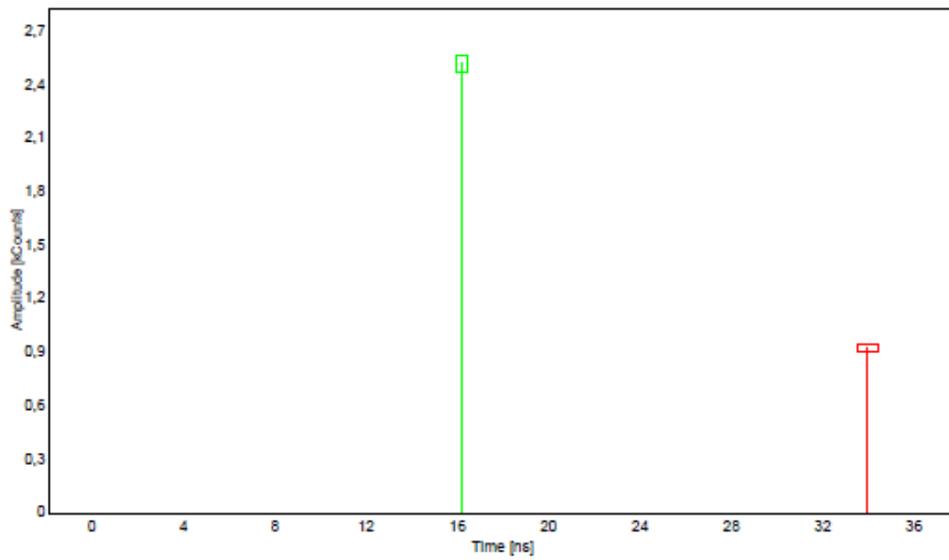




Fitted Decay and Exponential Components:



Confidence Intervals:



(E) 解析データ

表6-3 SM/50 mol% Chol膜のtPAの蛍光寿命の温度変化

$T(^{\circ}\text{C})$	τ_1 (ns)	f_1	α_1	τ_2 (ns)	f_2	α_2	τ_{AV} (ns)
20	40.6 ± 0.8	42.7 ± 2.0	25.6 ± 2.0	18.5 ± 0.4	57.3 ± 2.0	74.4 ± 2.0	28.1 ± 0.7
25	35.5 ± 0.7	37.5 ± 1.1	21.9 ± 0.7	16.6 ± 0.2	62.5 ± 1.1	78.1 ± 0.7	23.7 ± 0.4
30	29.0 ± 0.6	37.2 ± 2.5	22.5 ± 1.9	14.2 ± 0.2	62.8 ± 2.5	77.5 ± 1.9	19.7 ± 0.3
35	24.5 ± 0.8	34.1 ± 3.0	20.8 ± 2.3	12.4 ± 0.3	65.9 ± 3.0	79.2 ± 2.3	16.5 ± 0.3
40	19.0 ± 0.4	41.8 ± 3.6	27.8 ± 2.9	10.1 ± 0.3	58.2 ± 3.6	72.2 ± 2.9	13.8 ± 0.2
45	15.1 ± 0.3	49.5 ± 4.1	35.2 ± 3.6	8.3 ± 0.2	50.5 ± 4.1	64.8 ± 3.6	11.7 ± 0.1
50	11.7 ± 0.2	64.1 ± 1.5	49.1 ± 1.3	6.3 ± 0.2	35.9 ± 1.5	50.9 ± 1.3	9.8 ± 0.1
55	9.9 ± 0.1	67.4 ± 0.9	52.3 ± 0.3	5.3 ± 0.1	32.6 ± 0.9	47.7 ± 0.3	8.4 ± 0.1

表6-4 SM/33 mol% Chol膜のtPAの蛍光寿命の温度変化

$T(^{\circ}\text{C})$	τ_1 (ns)	f_1	α_1	τ_2 (ns)	f_2	α_2	τ_{AV} (ns)
20	45.6 ± 0.6	51.2 ± 2.5	32.5 ± 1.1	20.9 ± 0.4	48.8 ± 2.5	67.5 ± 1.1	33.5 ± 0.8
25	40.8 ± 1.2	45.9 ± 1.4	28.2 ± 1.3	18.8 ± 0.5	54.1 ± 1.4	71.8 ± 1.3	28.9 ± 0.7
30	36.5 ± 1.0	38.4 ± 1.1	22.4 ± 0.7	16.9 ± 0.4	61.6 ± 1.1	77.6 ± 0.7	24.4 ± 0.6
35	32.9 ± 0.2	29.0 ± 1.2	15.8 ± 0.9	15.1 ± 0.2	71.0 ± 1.2	84.2 ± 0.9	20.3 ± 0.3
40	27.3 ± 0.3	25.1 ± 1.5	13.7 ± 1.1	12.9 ± 0.0	74.9 ± 1.5	86.3 ± 1.1	16.5 ± 0.2
45	17.0 ± 0.3	47.3 ± 1.0	32.0 ± 0.9	8.9 ± 0.1	52.7 ± 1.0	68.0 ± 0.9	12.7 ± 0.2
50	12.4 ± 0.1	57.6 ± 1.6	42.1 ± 1.4	6.6 ± 0.1	42.4 ± 1.6	57.9 ± 1.4	10.0 ± 0.1
55	9.8 ± 0.1	56.7 ± 0.9	41.9 ± 1.0	5.4 ± 0.1	43.3 ± 0.9	58.1 ± 1.0	7.9 ± 0.1

表6-5 SM/20 mol% Chol膜のtPAの蛍光寿命の温度変化

$T(^{\circ}\text{C})$	τ_1 (ns)	f_1	α_1	τ_2 (ns)	f_2	α_2	τ_{AV} (ns)
20	50.6 ± 0.2	60.6 ± 0.1	40.3 ± 0.1	22.2 ± 0.1	39.4 ± 0.1	59.7 ± 0.1	39.4 ± 0.2
25	45.6 ± 0.1	54.1 ± 0.4	34.4 ± 0.4	20.3 ± 0.1	45.9 ± 0.4	65.6 ± 0.4	34.0 ± 0.2
30	40.4 ± 0.2	47.4 ± 0.4	28.6 ± 0.4	17.9 ± 0.1	52.6 ± 0.4	71.4 ± 0.4	28.6 ± 0.2
35	35.7 ± 0.0	37.8 ± 0.7	21.2 ± 0.5	15.8 ± 0.1	62.3 ± 0.7	78.8 ± 0.5	23.3 ± 0.2
40	29.6 ± 0.7	29.0 ± 0.9	15.2 ± 0.6	13.0 ± 0.3	71.0 ± 0.9	84.8 ± 0.6	17.8 ± 0.3
45	17.1 ± 0.7	44.5 ± 0.4	27.2 ± 0.4	8.0 ± 0.4	55.5 ± 0.4	72.8 ± 0.4	12.1 ± 0.6
50	10.9 ± 0.6	45.5 ± 2.2	28.9 ± 2.7	5.3 ± 0.3	54.5 ± 2.2	71.1 ± 2.7	7.8 ± 0.6
55	8.3 ± 0.5	33.2 ± 1.3	20.4 ± 1.0	4.3 ± 0.3	66.8 ± 1.3	79.6 ± 1.3	5.6 ± 0.4

表6-6 純粋な SM膜のtPAの蛍光寿命の温度変化

$T(^{\circ}\text{C})$	τ_1 (ns)	f_1	α_1	τ_2 (ns)	f_2	α_2	τ_{AV} (ns)
20	62.0 ± 0.8	80.7 ± 2.1	65.0 ± 2.5	27.6 ± 0.2	19.3 ± 2.1	35.0 ± 2.5	55.4 ± 1.4
25	55.1 ± 0.8	72.3 ± 2.1	53.9 ± 2.3	24.7 ± 0.4	27.7 ± 2.1	46.1 ± 2.3	46.7 ± 1.2
30	48.4 ± 0.6	61.6 ± 0.5	42.2 ± 0.4	22.1 ± 0.2	38.4 ± 0.5	57.8 ± 0.4	38.3 ± 0.5
35	42.4 ± 0.1	52.3 ± 0.7	33.6 ± 1.0	19.6 ± 0.1	47.7 ± 0.7	66.4 ± 1.0	31.5 ± 0.2
40	37.5 ± 0.2	42.0 ± 0.2	24.7 ± 0.1	17.0 ± 0.1	58.0 ± 0.2	75.3 ± 0.1	25.6 ± 0.2
45	18.3 ± 0.6	32.5 ± 0.4	13.2 ± 0.6	5.7 ± 0.2	67.5 ± 0.4	86.8 ± 0.6	9.8 ± 0.2
50	8.3 ± 0.3	11.4 ± 1.2	5.1 ± 0.6	3.4 ± 0.1	88.6 ± 1.2	84.9 ± 0.6	4.0 ± 0.1
55	7.6 ± 0.1	8.1 ± 0.2	3.2 ± 0.1	2.9 ± 0.1	91.9 ± 0.2	96.8 ± 0.1	3.2 ± 0.1

表6-7 PSPC/50 mol% Chol膜のtPAの蛍光寿命の温度変化

$T(^{\circ}\text{C})$	τ_1 (ns)	f_1	α_1	τ_2 (ns)	f_2	α_2	τ_{AV} (ns)
20	51.7 ± 0.8	57.4 ± 1.1	35.9 ± 1.3	21.5 ± 0.1	42.6 ± 1.1	64.1 ± 1.3	38.9 ± 0.4
25	46.2 ± 0.9	52.0 ± 0.7	31.2 ± 0.8	19.4 ± 0.2	48.0 ± 0.7	68.8 ± 0.8	33.3 ± 0.6
30	40.4 ± 1.0	45.4 ± 1.0	26.2 ± 1.0	17.2 ± 0.2	54.6 ± 1.0	73.8 ± 1.0	27.7 ± 0.5
35	35.8 ± 1.0	35.4 ± 1.5	19.2 ± 1.2	15.5 ± 0.2	64.6 ± 1.5	80.8 ± 1.2	22.7 ± 0.6
40	29.2 ± 1.6	29.8 ± 1.3	16.3 ± 1.4	14.3 ± 0.2	70.2 ± 1.3	83.7 ± 1.4	18.0 ± 0.5
45	22.1 ± 0.8	26.2 ± 1.2	15.1 ± 0.4	11.0 ± 0.1	73.8 ± 1.2	84.9 ± 0.4	13.9 ± 0.3
50	12.0 ± 0.2	70.0 ± 1.0	55.8 ± 1.2	6.5 ± 0.0	30.0 ± 1.0	44.2 ± 1.2	10.5 ± 0.3
55	9.3 ± 0.1	75.9 ± 1.6	63.5 ± 1.1	5.1 ± 0.2	24.1 ± 1.6	36.5 ± 1.1	8.3 ± 0.0

表6-8 PSPC/33 mol% Chol膜のtPAの蛍光寿命の温度変化

$T(^{\circ}\text{C})$	τ_1 (ns)	f_1	α_1	τ_2 (ns)	f_2	α_2	τ_{AV} (ns)
20	58.3 ± 0.6	71.9 ± 0.3	52.4 ± 0.3	25.1 ± 0.2	28.1 ± 0.3	47.6 ± 0.3	49.0 ± 0.6
25	53.3 ± 0.6	67.4 ± 0.2	47.5 ± 0.3	23.3 ± 0.3	32.6 ± 0.2	52.5 ± 0.3	43.5 ± 0.5
30	47.6 ± 0.4	62.0 ± 0.5	42.2 ± 0.5	21.4 ± 0.2	38.0 ± 0.5	57.8 ± 0.5	37.7 ± 0.4
35	42.1 ± 0.3	54.7 ± 0.5	35.6 ± 0.4	19.3 ± 0.2	45.3 ± 0.5	64.4 ± 0.4	31.8 ± 0.3
40	36.0 ± 0.2	46.3 ± 0.3	28.7 ± 0.4	16.8 ± 0.2	53.7 ± 0.3	71.3 ± 0.4	25.7 ± 0.2
45	28.8 ± 0.1	35.6 ± 0.5	21.0 ± 0.2	13.8 ± 0.2	64.4 ± 0.5	79.0 ± 0.2	19.2 ± 0.1
50	14.7 ± 0.4	55.9 ± 2.5	41.2 ± 2.3	8.1 ± 0.3	44.1 ± 2.5	58.8 ± 2.3	11.8 ± 0.2
55	9.1 ± 0.2	58.9 ± 1.6	47.0 ± 1.4	5.7 ± 0.2	41.1 ± 1.6	53.0 ± 1.4	7.7 ± 0.1

表6-9 PSPC/20 mol% Chol膜のtPAの蛍光寿命の温度変化

$T(^{\circ}\text{C})$	τ_1 (ns)	f_1	α_1	τ_2 (ns)	f_2	α_2	τ_{AV} (ns)
20	61.6 ± 0.2	81.1 ± 0.3	65.4 ± 0.4	27.1 ± 0.3	18.9 ± 0.3	34.6 ± 0.4	55.1 ± 0.1
25	56.3 ± 0.1	77.8 ± 0.2	61.4 ± 0.3	25.6 ± 0.2	22.2 ± 0.2	38.6 ± 0.3	49.5 ± 0.1
30	50.5 ± 0.1	73.6 ± 0.3	56.8 ± 0.3	23.7 ± 0.2	26.4 ± 0.3	43.2 ± 0.3	43.4 ± 0.1
35	44.8 ± 0.1	67.5 ± 0.4	50.5 ± 0.3	22.0 ± 0.2	32.5 ± 0.4	49.5 ± 0.3	37.4 ± 0.1
40	39.3 ± 0.1	58.0 ± 0.2	41.4 ± 0.1	20.1 ± 0.1	42.0 ± 0.2	58.6 ± 0.1	31.3 ± 0.0
45	33.4 ± 0.0	46.2 ± 0.5	30.3 ± 0.5	17.0 ± 0.2	53.8 ± 0.5	69.7 ± 0.5	24.6 ± 0.2
50	13.4 ± 0.2	47.5 ± 0.7	28.7 ± 0.7	6.0 ± 0.1	52.5 ± 0.7	71.3 ± 0.7	9.5 ± 0.2
55	8.1 ± 0.2	31.5 ± 0.2	19.2 ± 0.4	4.2 ± 0.0	68.6 ± 0.2	80.8 ± 0.4	5.4 ± 0.2

表6-10 純粋な PSPC膜のtPAの蛍光寿命の温度変化

$T(^{\circ}\text{C})$	τ_1 (ns)	f_1	α_1	τ_2 (ns)	f_2	α_2	τ_{AV} (ns)
20	65.6 ± 1.2	88.6 ± 0.6	77.8 ± 0.8	29.7 ± 1.2	11.5 ± 0.6	22.2 ± 0.8	61.5 ± 1.0
25	59.7 ± 1.2	85.1 ± 0.7	73.9 ± 1.3	29.5 ± 0.2	14.9 ± 0.7	26.1 ± 1.3	55.2 ± 0.9
30	53.4 ± 1.2	78.5 ± 0.3	66.6 ± 1.1	29.1 ± 0.2	21.5 ± 0.3	43.4 ± 1.1	48.2 ± 0.8
35	48.2 ± 1.2	67.4 ± 1.0	54.9 ± 1.4	28.3 ± 0.2	32.6 ± 1.0	45.1 ± 1.4	41.7 ± 0.7
40	44.0 ± 1.1	51.8 ± 0.7	39.2 ± 0.1	26.5 ± 0.1	48.2 ± 0.7	60.8 ± 0.1	35.6 ± 0.6
45	40.1 ± 0.7	33.6 ± 1.2	23.0 ± 1.1	23.6 ± 0.1	66.4 ± 1.2	77.0 ± 1.1	29.1 ± 0.1
50	12.6 ± 0.1	6.5 ± 0.1	2.0 ± 0.0	3.8 ± 0.0	93.5 ± 0.1	98.0 ± 0.0	4.4 ± 0.0
55	5.6 ± 0.3	13.3 ± 1.8	6.3 ± 1.3	2.5 ± 0.1	86.7 ± 1.8	93.7 ± 1.3	2.9 ± 0.1

6-6 蛍光顕微鏡観察

(A) 試料

SSM/Chol/DOPC (1/1/1)

PSPC/Chol/DOPC (1/1/1)

(B) 試料調製方法・観察条件

C18:0 SM、PSPC、Chol、DOPC をそれぞれクロロホルム/メタノール (1/1) に溶かした溶液 (1 mg/ml) を用いて、モル比が 1/1/1 になるように SM と PSPC の 3 成分系の溶液を調製した。そこに、蛍光剤 Bodipy-PC のメタノール溶液 (50 µg/ml) を全脂質の 0.2 mol% 加えた。その溶液をプレパラート上にテープで固定した白金線に滴下し、17 時間真空乾燥した。白金線をゴムのしきいで囲い、その中に millQ 水を添加した後、もう一枚のプレパラートを重ねた。それを 50 °C もしくは 55 °C で、エレクトロフォーメーション法 (10 Vpp、10 Hz を 45 分印加) によって GUV を作製した。その後 20 °C で 15 分程度インキュベーションした後、励起波長 488 nm、温度を 30 °C (SM) もしくは 25 °C (PSPC) にして写真撮影を行った。

(C) 解析

三谷商事株式会社 ビジュアルシステム部の画像解析処理ソフト Winroof のトライアル版を用いて、画像中の GUV の明るい領域と暗い領域を手動で取り囲み、その領域に含まれる画素数より面積を見積もった (補正等はなし)。

^2H -NMR スペクトルデータ

単位は全て kHz

○PSPC

2',2'- d_2 -PSPC			3',3'- d_2 -PSPC		
	PSPC	PSPC/Chol		PSPC	PSPC/Chol
20 °C		broad	20 °C		44.5
30 °C		13.0, 24.7	30 °C		43.1
40 °C	broad	14.0, 25.4	40 °C	broad	41.4
50 °C	11.5, 16.7	14.2, 24.7	50 °C	23.1	38.9
55 °C	11.3, 15.7	14.4, 24.1	55 °C	22.5	37.9

4',4'- d_2 -PSPC				
	PSPC	PSPC/Chol	PSPC/DOPC	PSPC/Chol/DOPC
20 °C		49.2	25.5	40.0, 45.6
25 °C			25.0	42.2
30 °C	broad	46.8	25.0	40.7
40 °C	broad	44.3	24.7	
45 °C	broad	42.8		
50 °C	24.6	42.6		
55 °C	23.4	43.0		

6',6'- d_2 -PSPC				
	PSPC	PSPC/Chol	PSPC/DOPC	PSPC/Chol/DOPC
20 °C		55.7	27.8	46.3, 53.2
25 °C			27.7	49.2
30 °C		54.1	27.1	45.2
40 °C	broad	50.5	26.8	
50 °C	27.4	49.3		
55 °C	25.6	48.0		

8',8'-*d*₂-PSPC

	PSPC	PSPC/Chol	PSPC/DOPC	PSPC/Chol/DOPC
20 °C		55.6	26.3	44.3, 53.9
25 °C			25.9	50.8
30 °C		53.8	25.7	46.9
40 °C	broad	52.1	25.2	
45 °C	broad	51.0		
50 °C	26.4	49.7		
55 °C	24.7	47.8		

10',10'-*d*₂-PSPC

	PSPC	PSPC/Chol	PSPC/DOPC	PSPC/Chol/DOPC	PSPC/Chol (33 mol%)	PSPC/Chol (20 mol%)
20 °C		52.1	22.6	38.2, 54.5	57.0	—
25 °C			22.2	38.1, 53.7		
30 °C		53.2	21.9	44.0	54.8	broad
40 °C	broad	51.2	22.2		52.4	54.0
45 °C	broad	49.8			50.1	50.1
50 °C	24.0	47.6			47.3	40.8
55 °C	22.2	45.0			44.8	36.4

※PSPC/20 mol%Chol 47.5 °C : 46.1 kHz

12',12'-*d*₂-PSPC

	PSPC	PSPC/Chol	PSPC/DOPC	PSPC/Chol/DOPC
20 °C		50.9	18.4	33.4, 51.5
25 °C			18.9	34.5, 49.9
30 °C		49.3	19.4	39.1
40 °C	broad	47.0	18.9	
45 °C	broad	44.9		
50 °C	21.7	43.5		
55 °C	19.4	42.5		

14',14'- d_2 -PSPC

	PSPC	PSPC/Chol	PSPC/DOPC	PSPC/Chol/DOPC
20 °C		44.2	13.9	26.1, 45.4
25 °C			13.3	27.7, 44.6
30 °C		41.0	13.2	32.6
40 °C	broad	38.1	14.0	
50 °C	17.3	35.4		
55 °C	15.3	34.4		

16',16'- d_2 -PSPC

	PSPC	PSPC/Chol	PSPC/DOPC	PSPC/Chol/DOPC
20 °C		30.8	8.9	17.8, 34.8
25 °C			9.2	17.9, 34.0
30 °C		29.1	9.9	22.7
40 °C	broad	25.4	10.4	
50 °C	11.8	22.4		
55 °C	10.0	21.6		

18',18',18'- d_3 -PSPC

	PSPC	PSPC/Chol	PSPC/DOPC	PSPC/Chol/DOPC
20 °C		5.6	2.1	3.1, 7.2
25 °C			2.0	3.5, 6.4
30 °C		4.8	1.9	4.2
40 °C	broad	4.3	1.9	
50 °C	2.2	3.5		
55 °C	1.9	2.9		

○ Chol の含有率変化

10',10'- d_2 -SM/Chol

	50 mol%	33 mol%	25 mol%	20 mol%	10 mol%	5 mol%
20 °C	54.8	55.5	broad	broad	—	—
30 °C	54.3	54.2	55.5	53.3	55.4	broad
40 °C	52.9	52.6	52.9	49.2	49.0	49.7
45 °C	51.9	51.2	50.7	47.0	41.3	40.3
50 °C	50.8	49.7	48.2	43.1	36.7	35.8
55 °C	49.5	48.2	44.0	40.1	35.5	32.6

12,12- d_2 -SM/Chol

	50 mol%	33 mol%	20 mol%
20 °C	54.4	56.4	broad
30 °C	53.6	53.4	broad
40 °C	52.3	52.4	50.8
45 °C	51.3	50.4	45.9
50 °C	50.7	49.1	42.9

○3 成分系膜

18',18',18'- d_3 -SM

	SM/DOPC	SM/Chol/DOPC
20 °C	-	2.8, 4.7
30 °C	1.1	2.4
40 °C	-	2.6
45 °C	-	2.4

30 °C

	SSM/DOPC (1:1)	SSM/DOPC/Chol (1:1:1)
4'- <i>d</i> ₂ -SSM	29.9	34.8, 43.7
6'- <i>d</i> ₂ -SSM	30.6	38.3, 49.9
8'- <i>d</i> ₂ -SSM	29.2	38.1, 52.2
10'- <i>d</i> ₂ -SSM	29.2	36.0, 51.5
12'- <i>d</i> ₂ -SSM	25.5	29.3, 48.3
14'- <i>d</i> ₂ -SSM	16.8	24.3, 41.0
16'- <i>d</i> ₂ -SSM	11.9	16.2, 29.8

11',11'-*d*₂-DOPC

	DOPC	DOPC/Chol	SM/DOPC	PSPC/DOPC	SM/Chol/DOPC	PSPC/Chol/DOPC
0 °C	7.3	16.9	7.5		10.5, 19.0	
10 °C	6.5	16.1	6.8		9.4, 19.6	
20 °C	5.8	15.0	6.0	5.6	8.6, 20.0	11.2, 19.0
25 °C				5.5		10.9
30 °C	5.2	14.1	6.1	5.4	8.5, 18.6	12.3
40 °C	4.6	13.2	5.8	5.6	9.7, 15.9	
45 °C	4.5	12.7	5.4		11.4	
50 °C	4.1	12.2	5.1	5.5		

※DOPC only -20 °C : 7.9 kHz, -25 °C : broad

6',6'-*d*₂-DOPC

	SM/Chol/DOPC	PSPC/Chol/DOPC
20 °C	25.0, 42.9	26.8, 42.4
25 °C		26.3, 41.3
30 °C	24.4, 40.9	26.3
40 °C	24.6, 36.1	
45 °C	26.6	

3-*d*₁-chol

	SM/Chol	SM/Chol/DOPC	DOPC/Chol	PSPC/Chol	PSPC/Chol/DOPC
20 °C	48.5	42.1, 47.9	44.4	48.5	43.6, 46.7
25 °C			44.0	48.3	45.5
30 °C	47.9	42.6, 47.0	43.7	48.2	45.0
40 °C	47.8	45.3	43.0	47.7	
50 °C	47.2	44.4	42.3	47.0	

10',10'-*d*₂-SM

SM/DOPC/Chol	27/53/20	40/40/20	53/27/20	33/33/33
20 °C				34.3, 53.5
30 °C	36.7, 53.7	30.4, 54.9	29.1, 54.9	36.0, 51.5
40 °C				38.4, 49.6
45 °C				43.3

3-*d*₁-Chol

SM/DOPC/Chol	27/53/20	40/40/20	53/27/20	33/33/33
20 °C				42.1, 47.9
30 °C	40.9, 47.3	40.1, 47.9	39.6, 48.3	42.6, 47.0
40 °C				45.3
45 °C				44.4

11-*d*₂-DOPC

SM/DOPC/chol	27/53/20	40/40/20	53/27/20	33/33/33
20 °C	7.6	7.5	6.3	8.6, 20.0
30 °C	7.5	8.7	6.1	8.5, 18.6
40 °C	8.1	10.7	7.4	9.7, 15.9
45 °C				11.4

10',10' - d_2 - PSPC

PSPC/DOPC/chol	27/53/20	40/40/20	53/27/20	33/33/33
20 °C	31.3, 48.9	29.6, 56.5	30.4, 54.8	38.2, 54.5
25 °C	31.3, 52.2	29.5, 55.2	29.3, 55.6	38.1, 53.7
30 °C	32.3	29.5, 54.9	29.3, 54.9	44.0
40 °C	29.9	32.6	39.3	

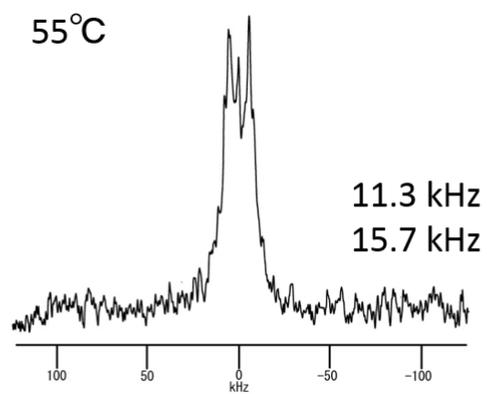
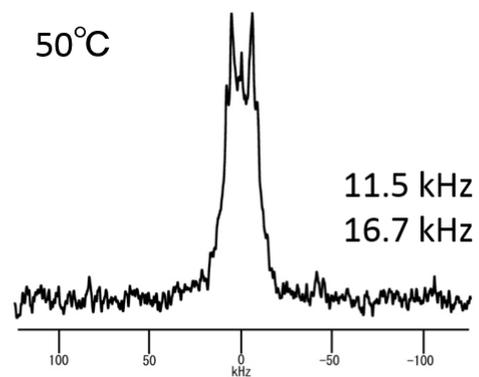
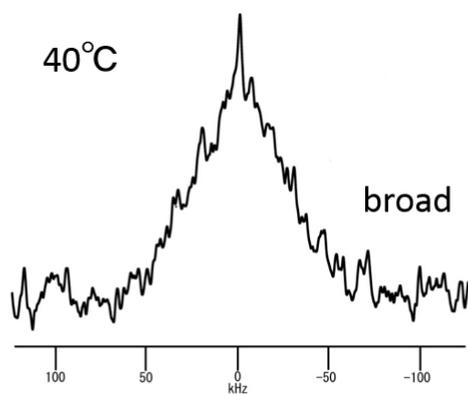
3- d_1 -chol

PSPC/DOPC/chol	27/53/20	40/40/20	53/27/20	33/33/33
20 °C	40.3	40.3	38.9	43.6, 46.7
25 °C	40.2	40.8	39.0	45.5
30 °C	40.6	41.7	39.3, 47.3	45.0
40 °C	39.9	41.5	42.6	

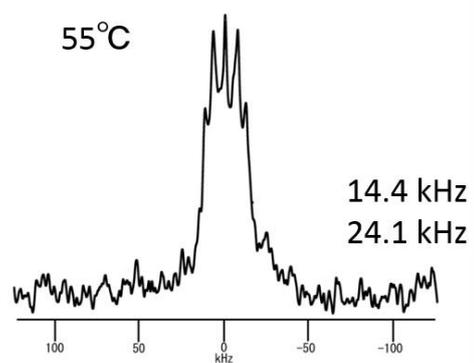
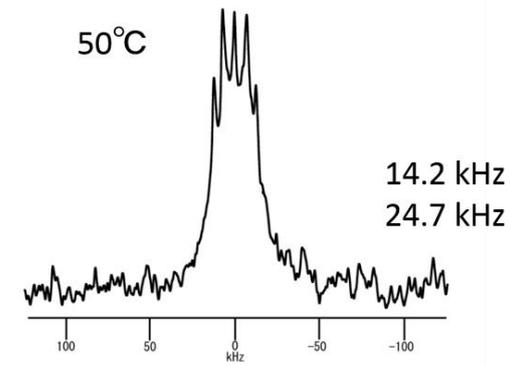
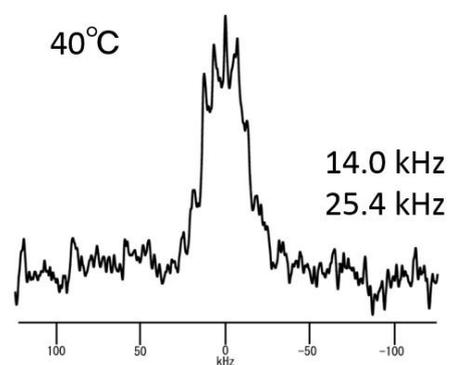
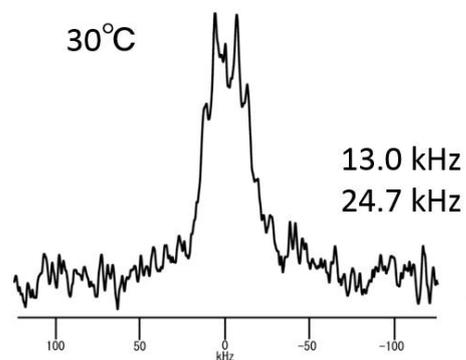
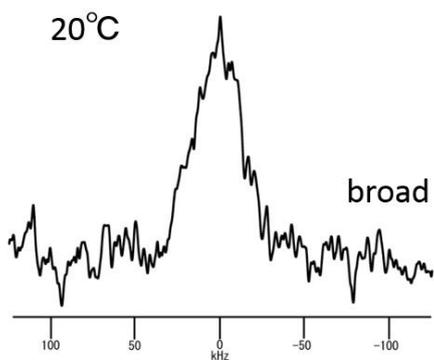
11- d_2 -DOPC

PSPC/DOPC/chol	27/53/20	40/40/20	53/27/20	33/33/33
20 °C	8.1	8.6	6.9	11.2, 19.0
25 °C	8.2	9.0	6.9	10.9
30 °C	8.4	9.3	7.1	12.3

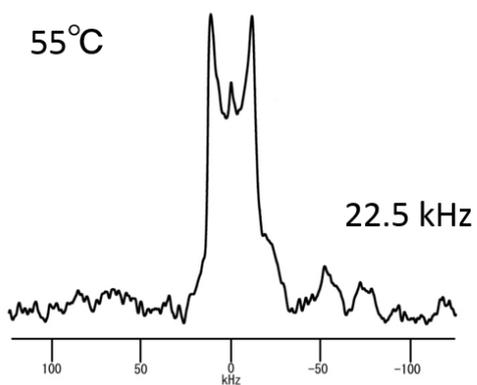
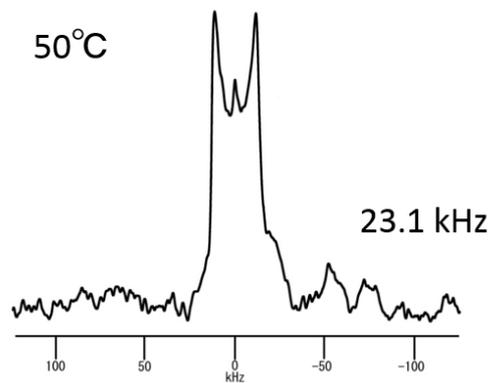
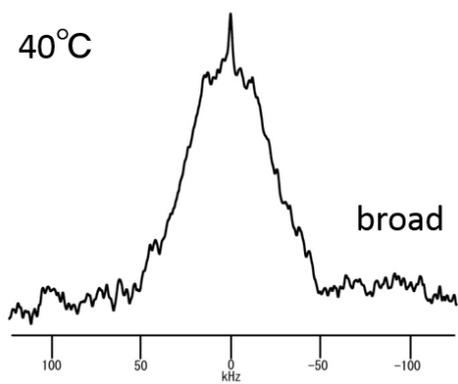
○2',2'-d₂-PSPCにおける²H NMR スペクトル



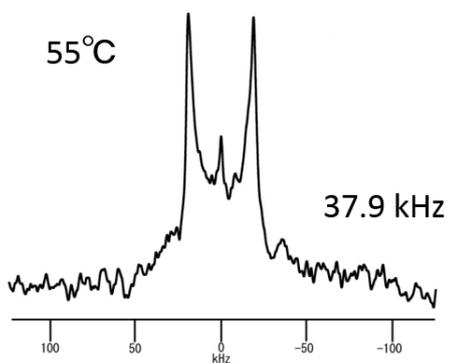
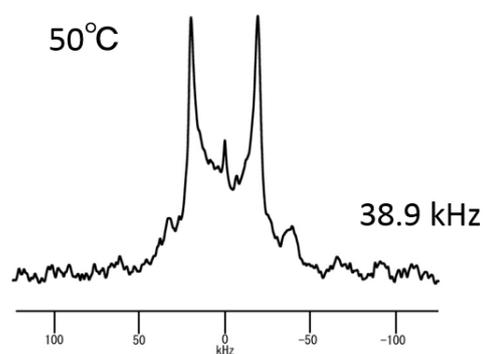
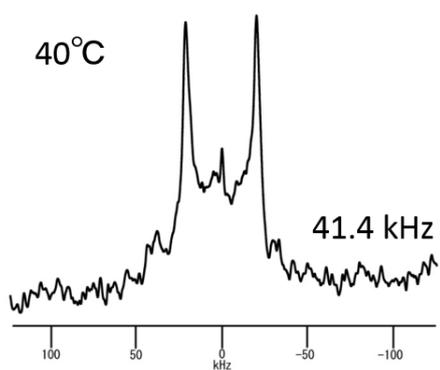
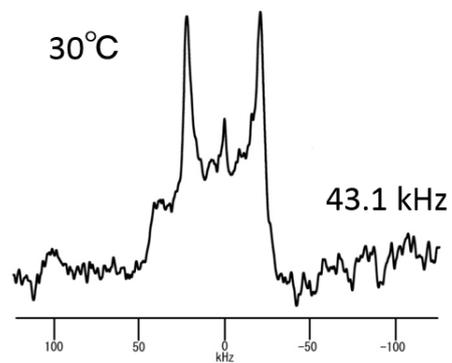
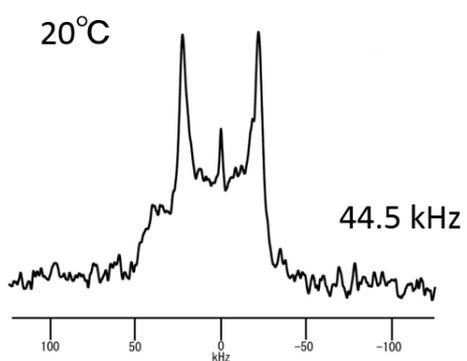
○2',2'-d₂-PSPC/Chol における ²H NMR スペクトル



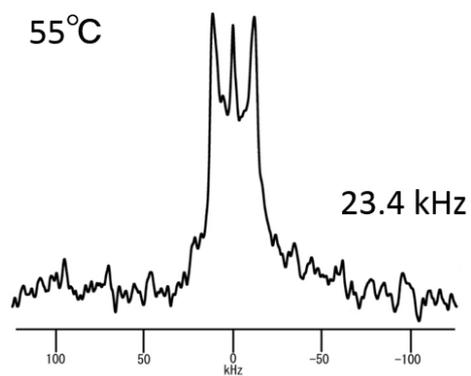
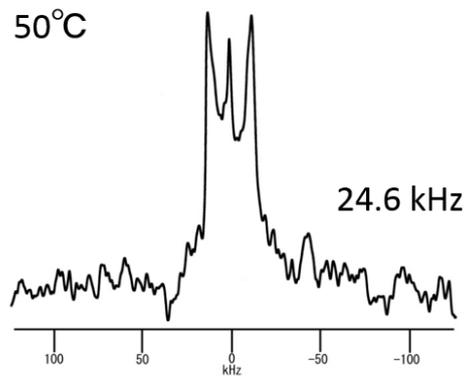
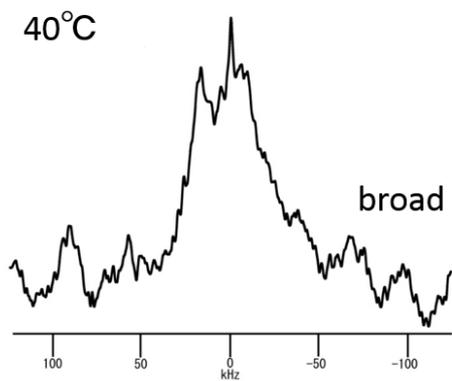
○3',3'-d₂-PSPCにおける²H NMR スペクトル



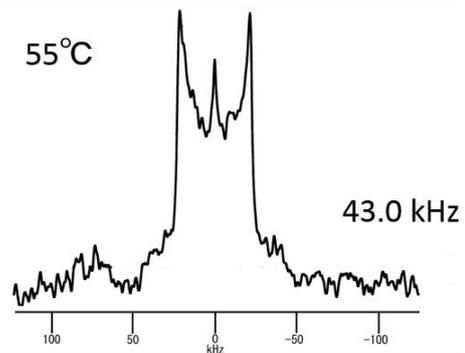
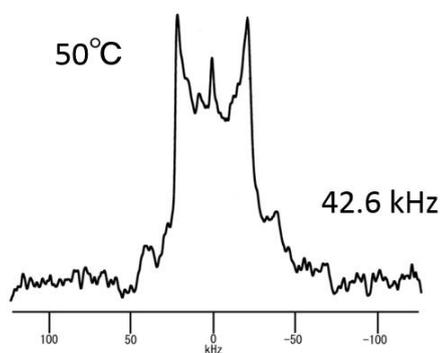
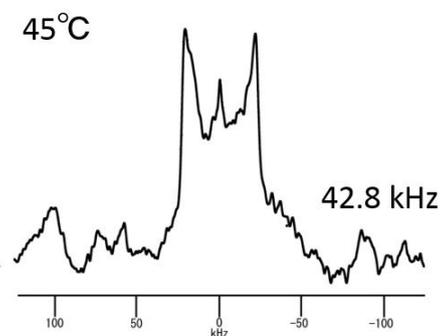
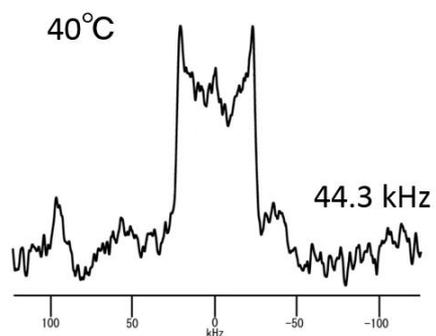
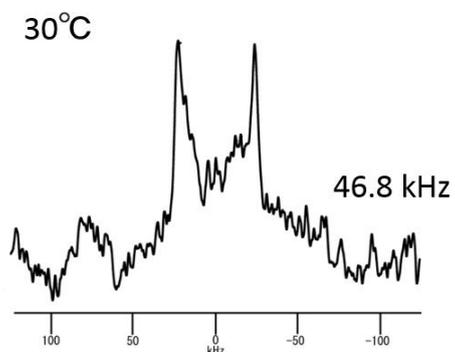
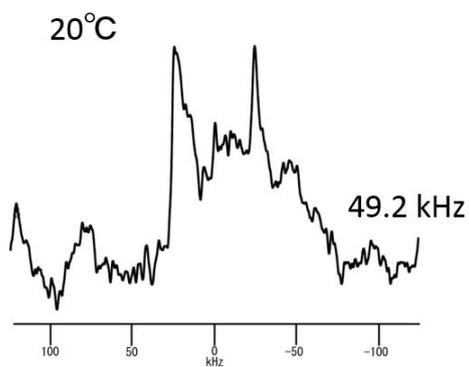
○3',3'-d₂-PSPC/Chol における ²H NMR スペクトル



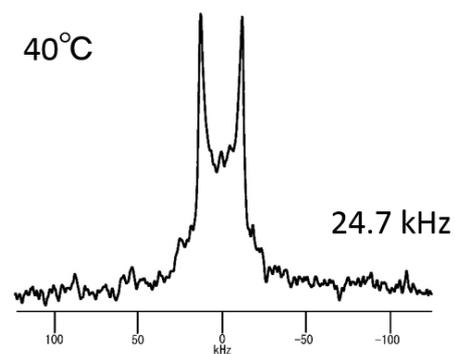
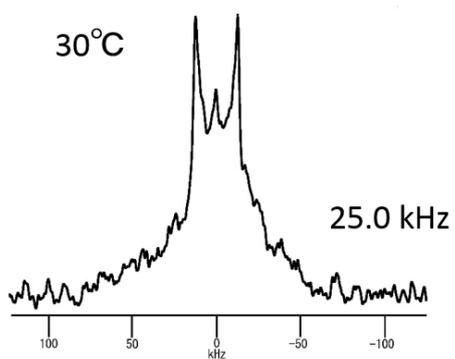
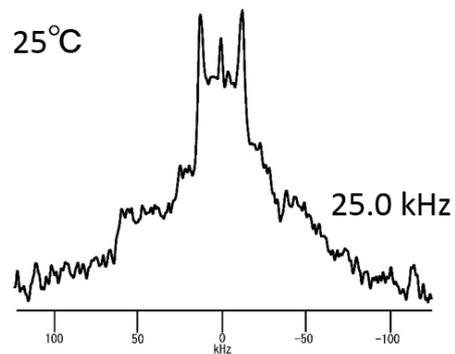
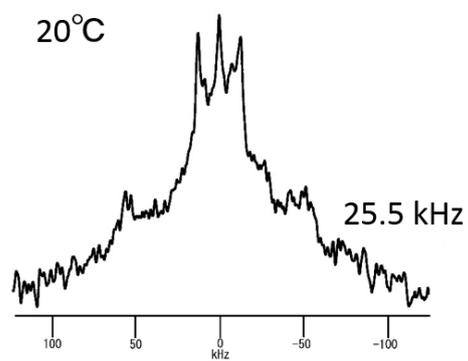
○4,4'-*d*₂-PSPC における ²H NMR スペクトル



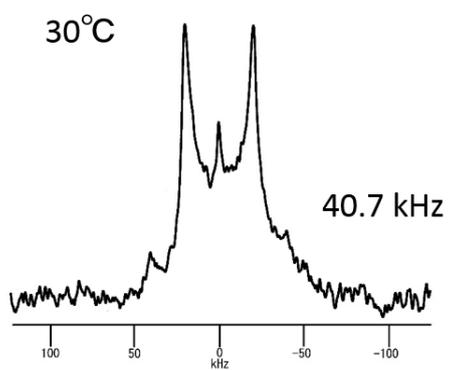
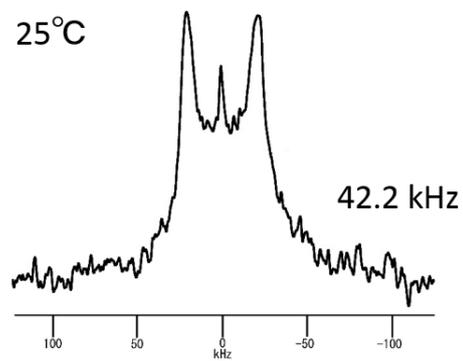
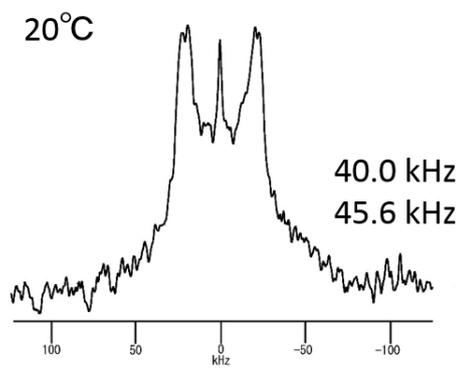
○4',4'-*d*₂-PSPC/Chol における ²H NMR スペクトル



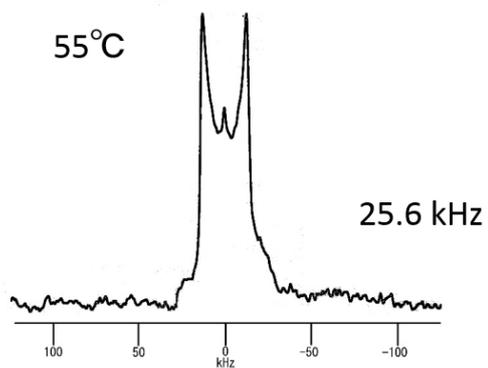
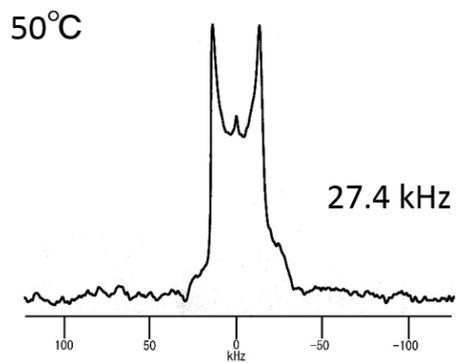
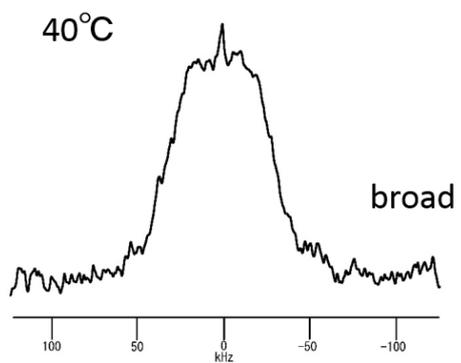
○4',4'-*d*₂-PSPC/DOPC における ²H NMR スペクトル



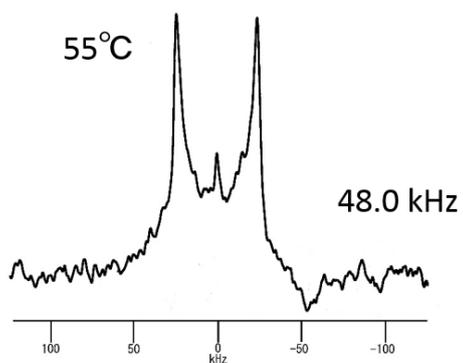
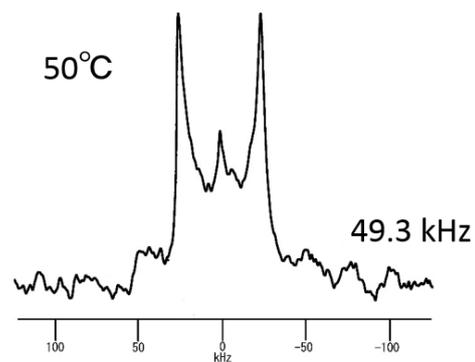
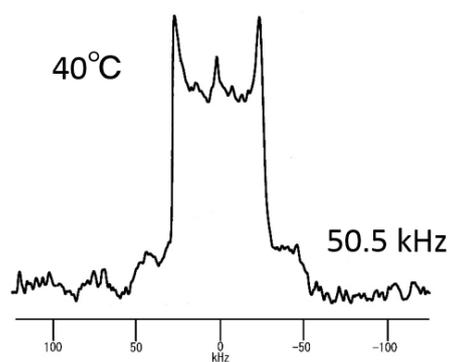
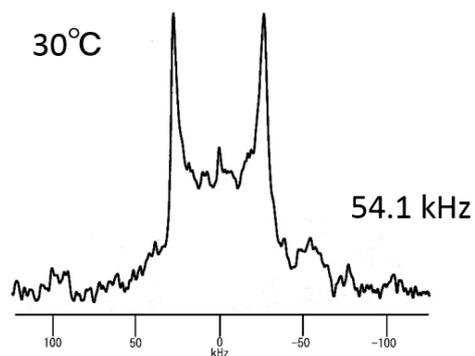
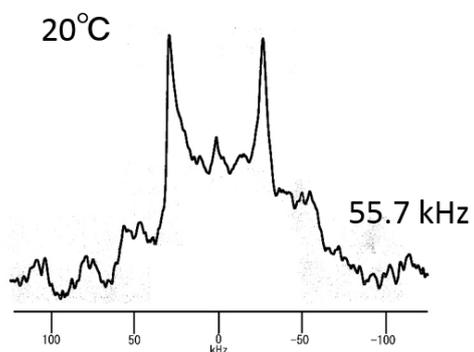
○4',4'-d₂-PSPC/Chol/DOPC における ²H NMR スペクトル



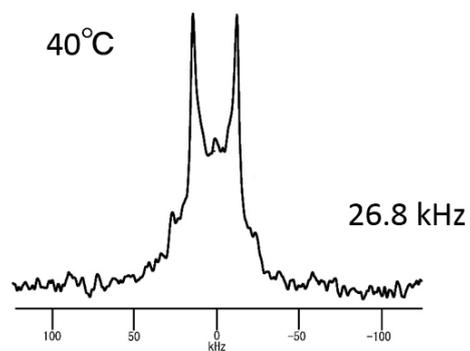
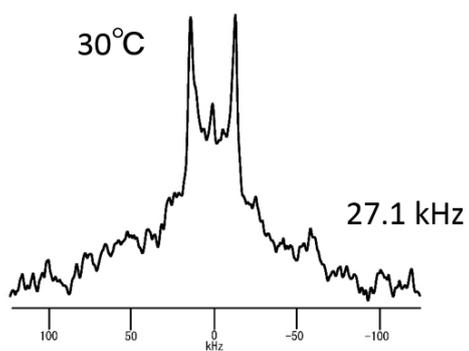
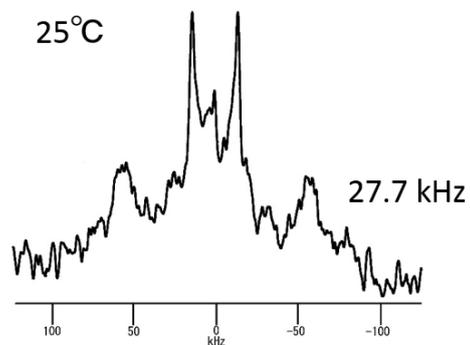
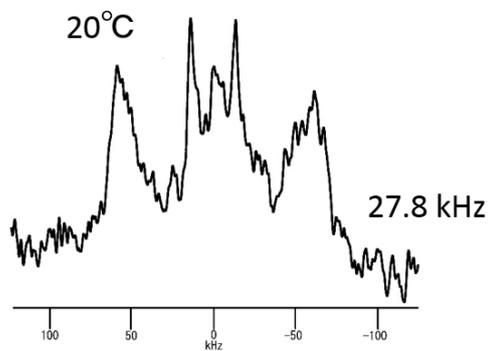
○6',6'-d₂-PSPCにおける²H NMR スペクトル



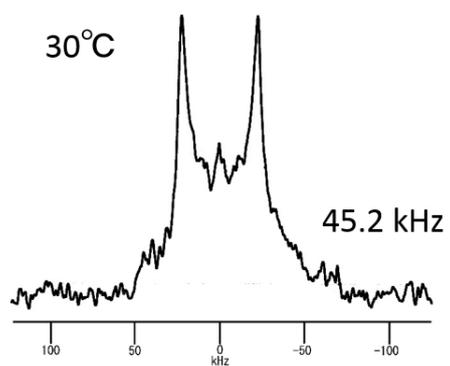
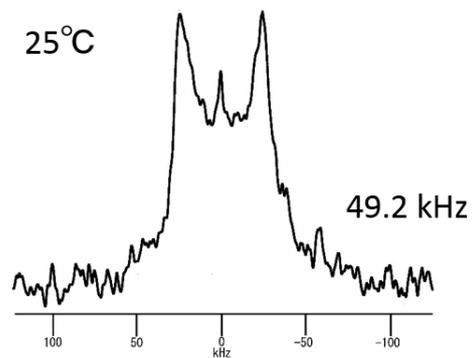
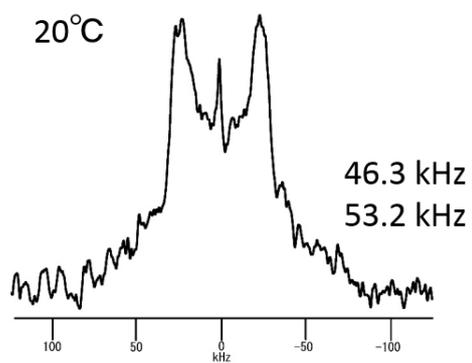
○6',6'-d₂-PSPC/Chol における ²H NMR スペクトル



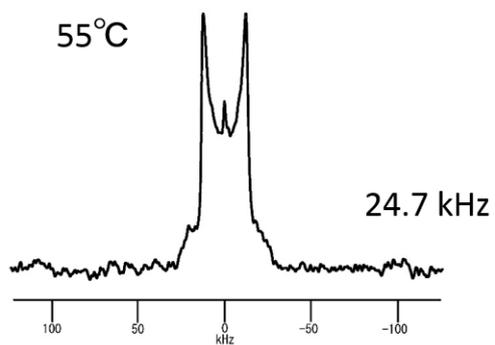
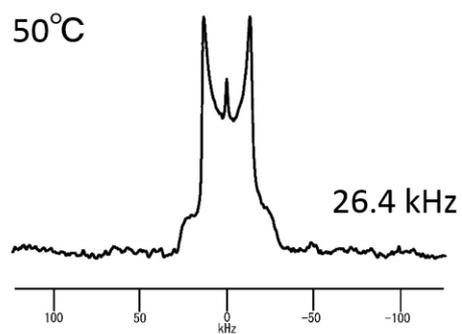
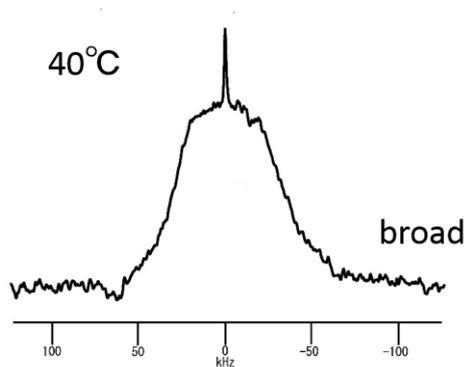
○6',6'-d₂-PSPC/DOPC における ²H NMR スペクトル



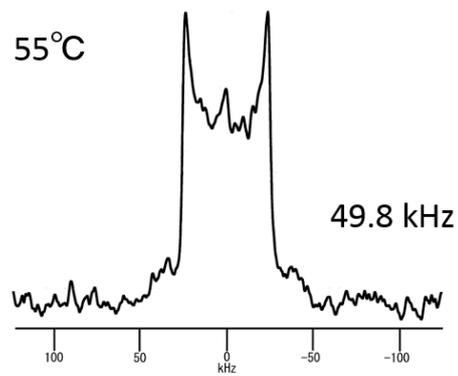
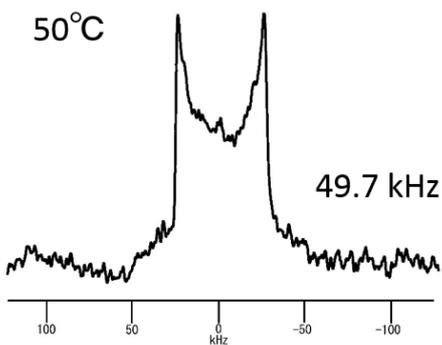
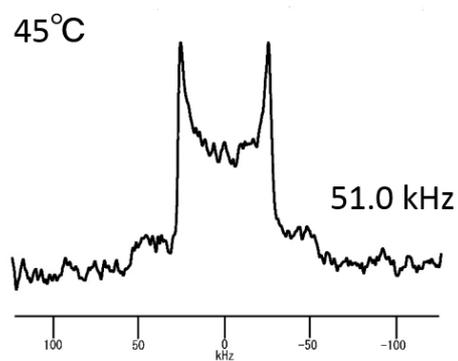
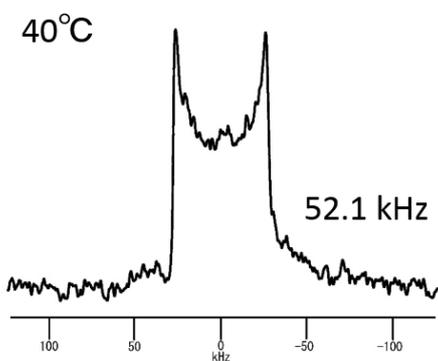
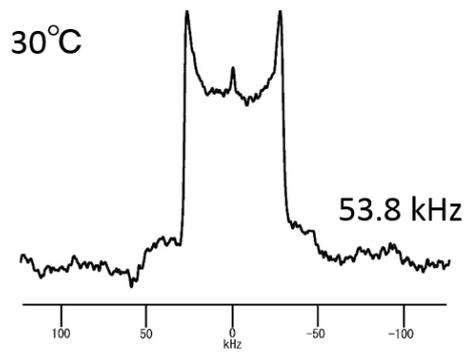
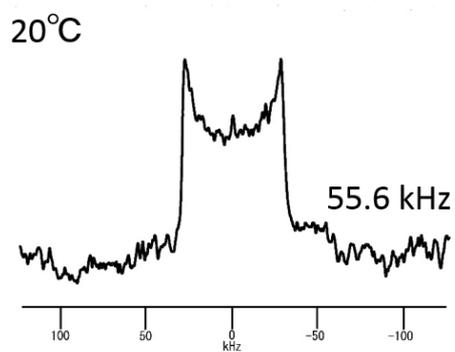
○6',6'-d₂-PSPC/Chol/DOPC における ²H NMR スペクトル



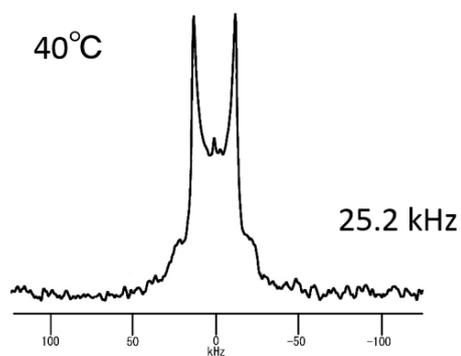
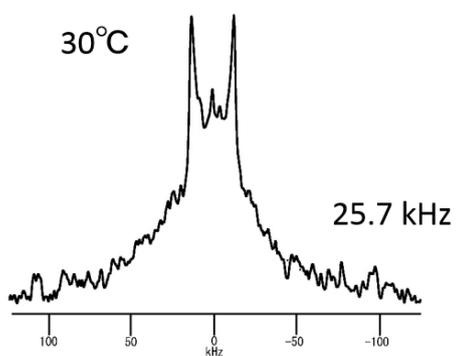
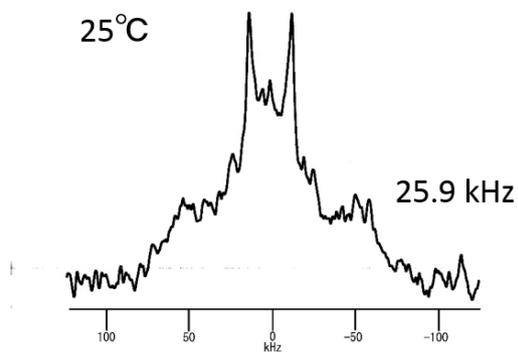
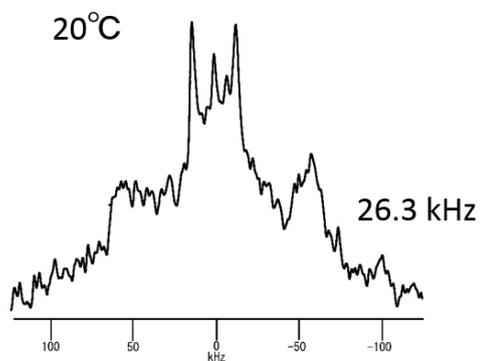
○8',8'-d₂-PSPCにおける²H NMR スペクトル



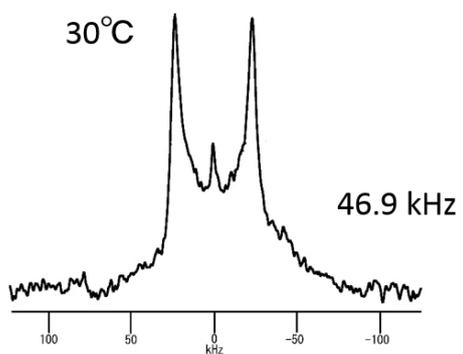
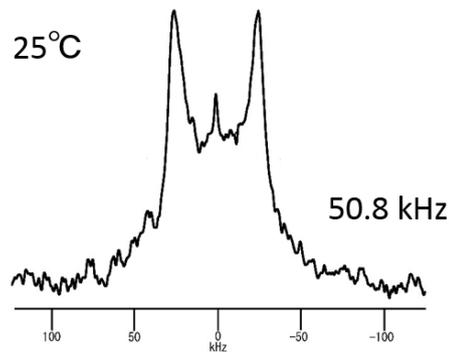
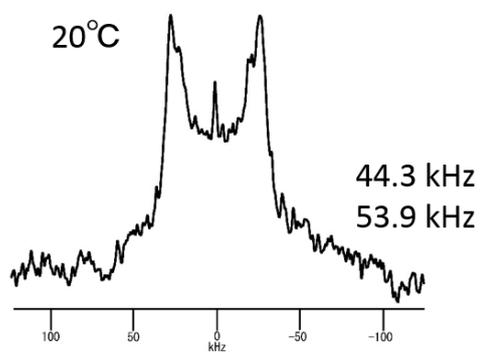
○8',8'-d₂-PSPC/Chol における ²H NMR スペクトル



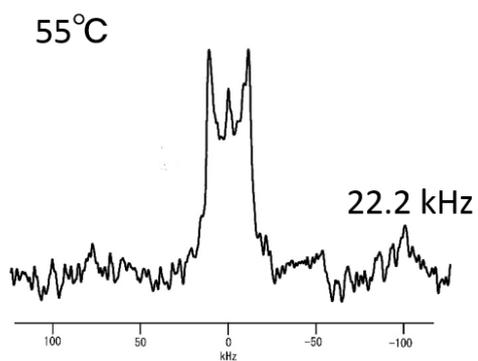
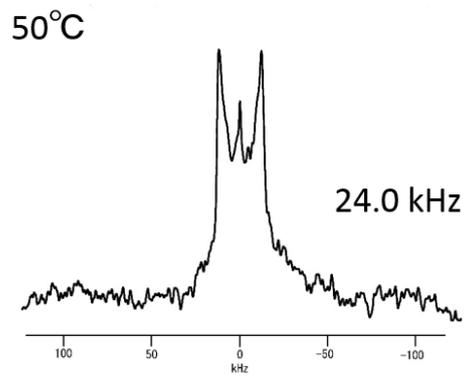
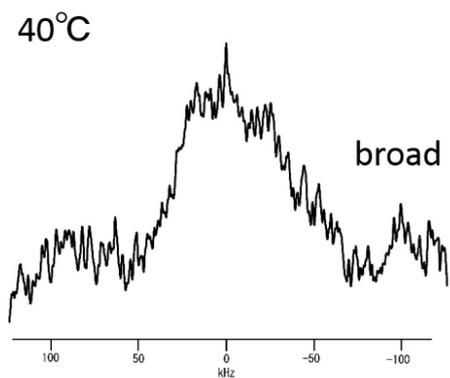
○8',8'-d₂-PSPC/DOPC における ²H NMR スペクトル



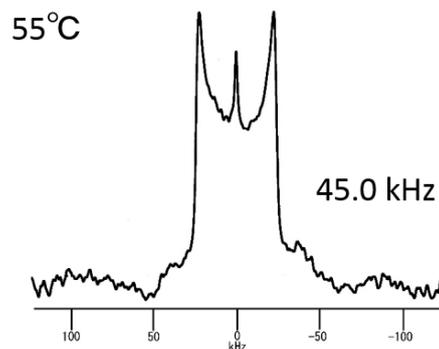
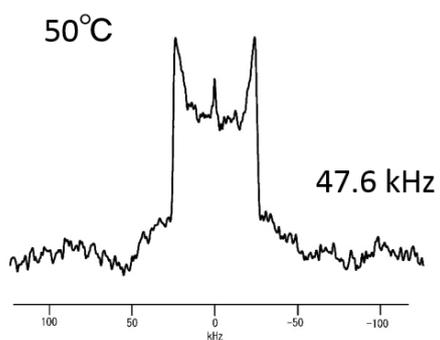
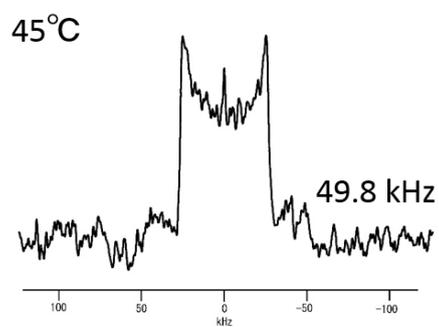
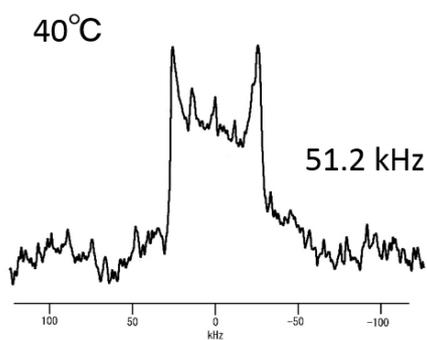
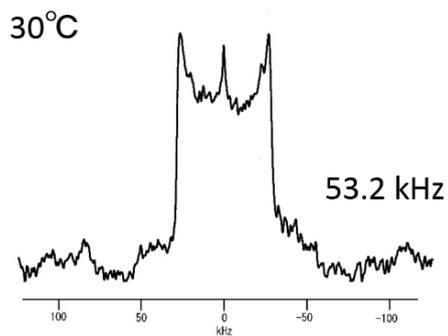
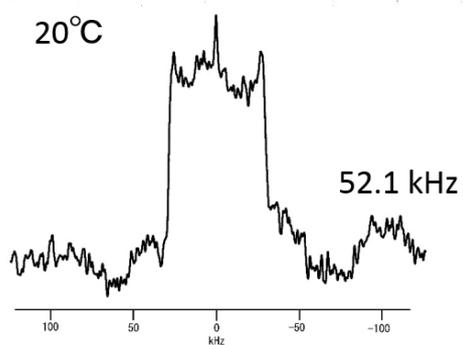
○8',8'-d₂-PSPC/Chol/DOPC における ²H NMR スペクトル



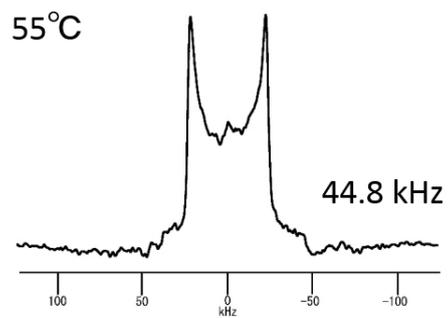
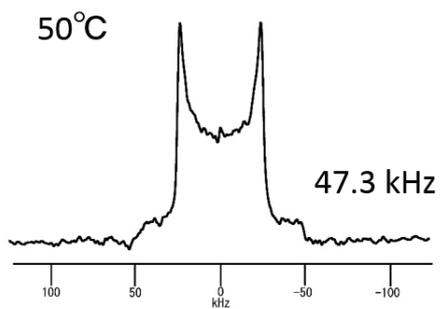
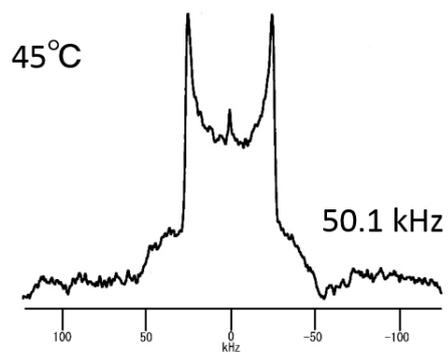
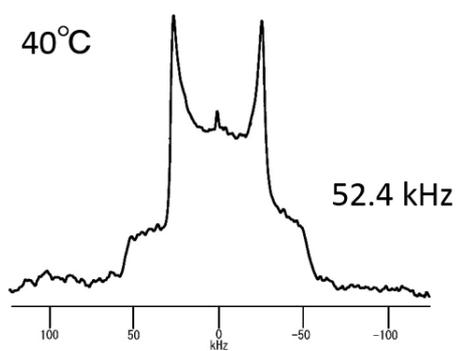
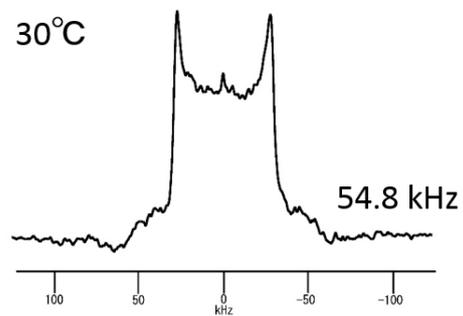
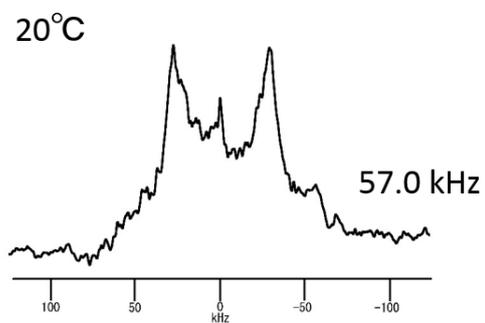
○ $10',10'-d_2$ -PSPC における ^2H NMR スペクトル



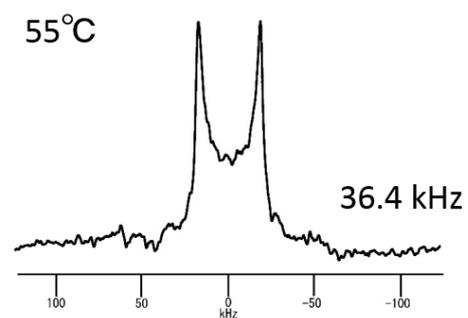
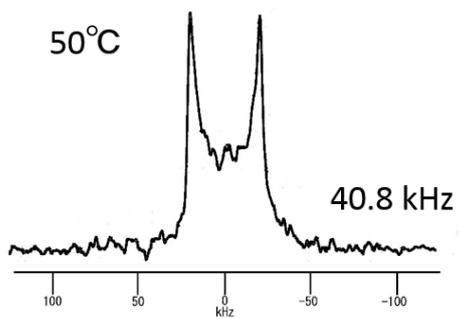
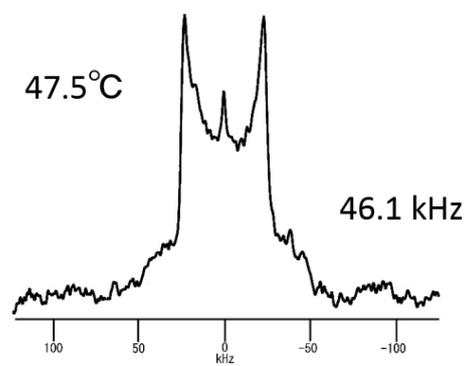
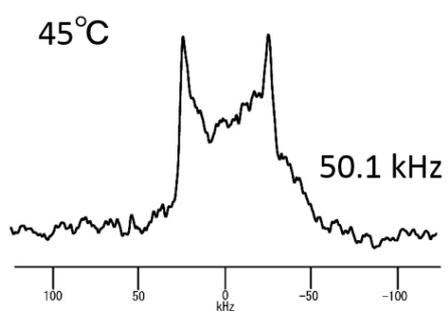
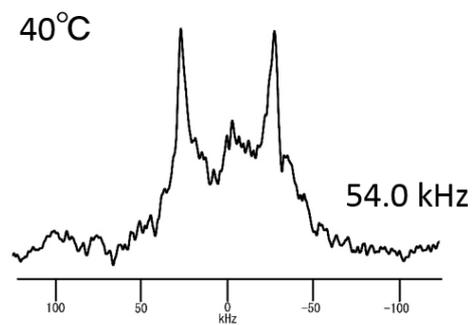
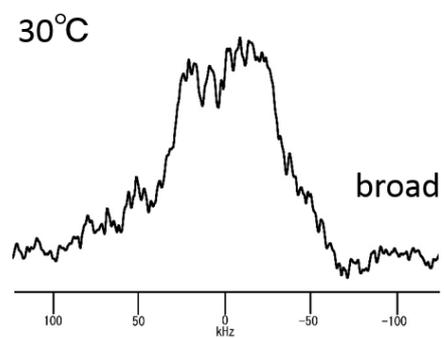
○ $10',10'-d_2$ -PSPC/Chol (50 mol%) における ^2H NMR スペクトル



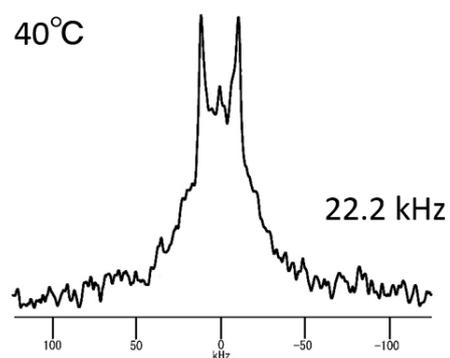
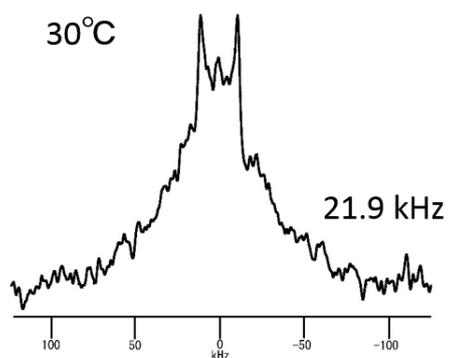
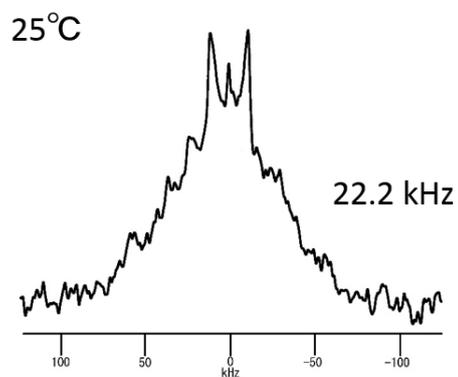
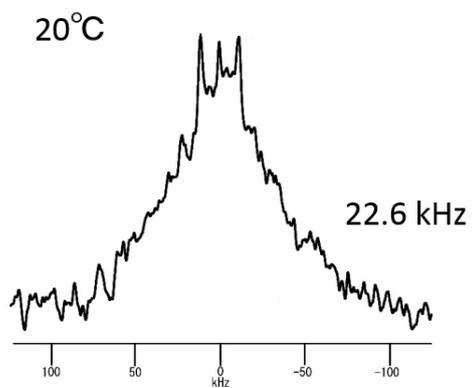
○ $10',10'-d_2$ -PSPC/Chol (33 mol%) における ^2H NMR スペクトル



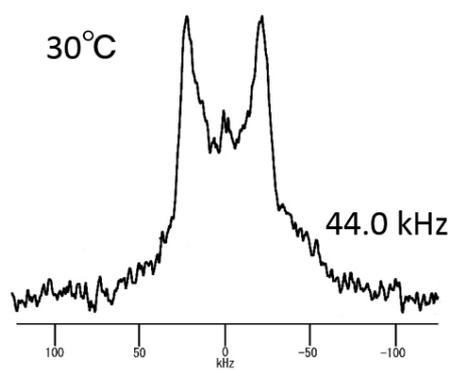
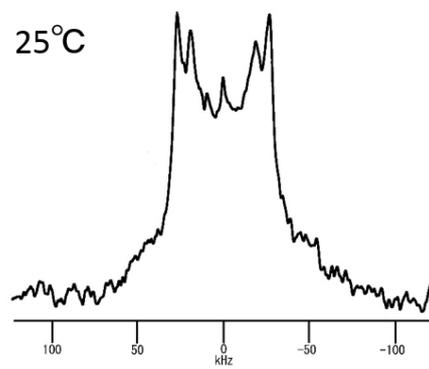
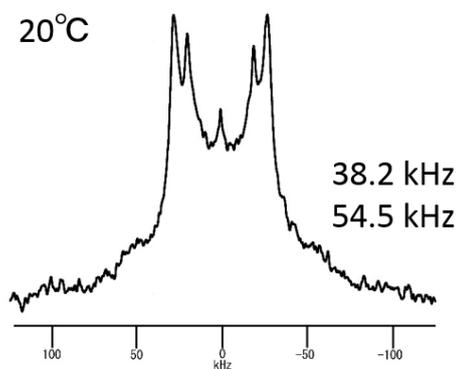
○ $10',10'-d_2$ -PSPC/Chol (20 mol%) における ^2H NMR スペクトル



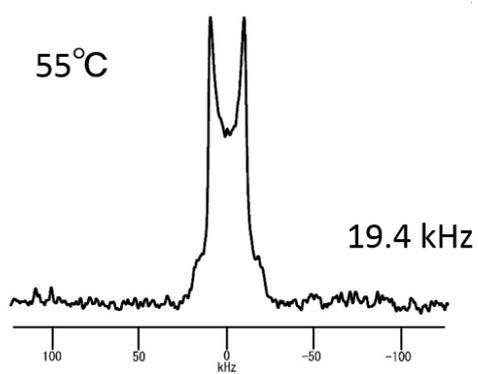
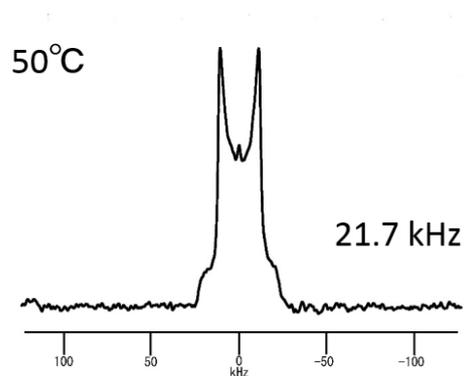
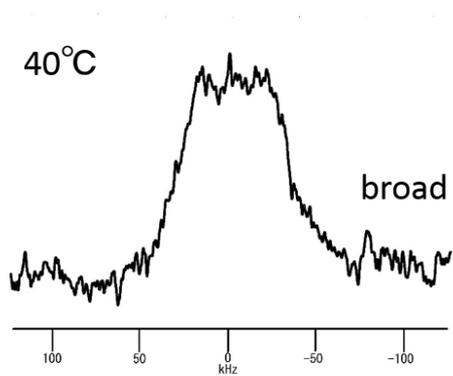
○ $10',10'-d_2$ -PSPC/DOPC における ^2H NMR スペクトル



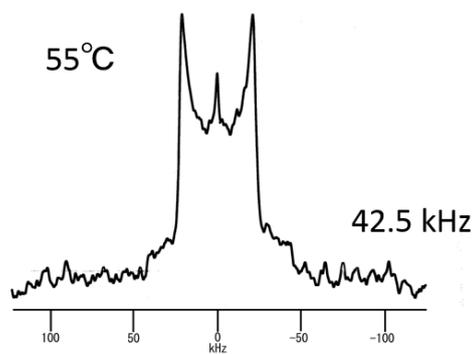
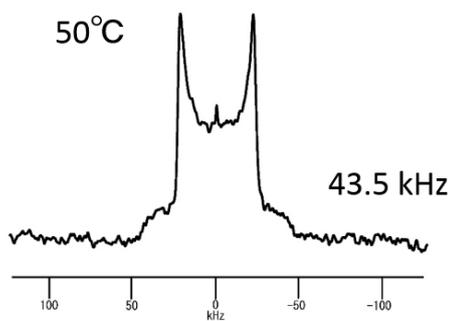
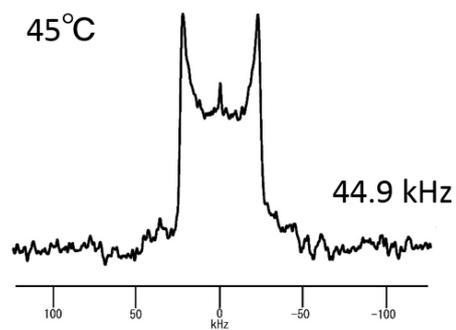
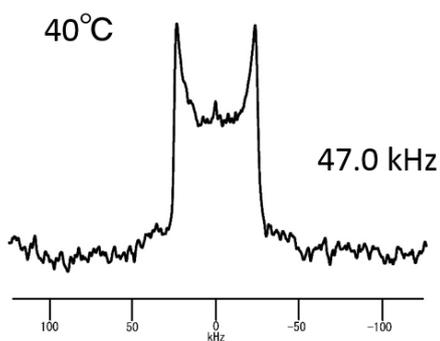
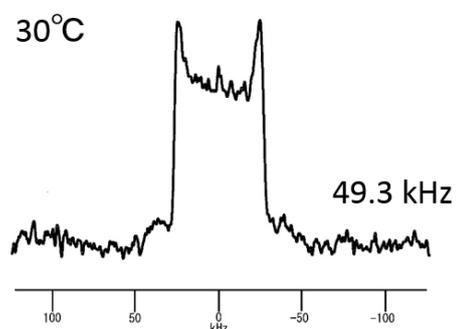
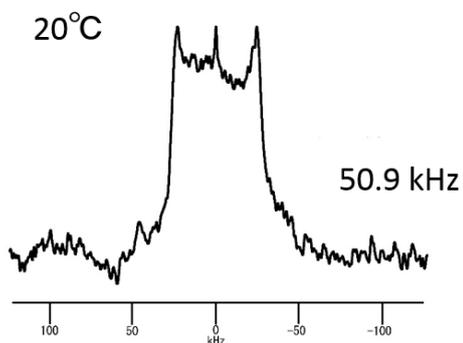
○ $10',10'-d_2$ -PSPC/Chol/DOPC における ^2H NMR スペクトル



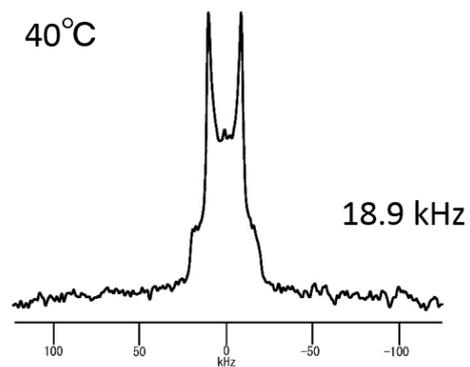
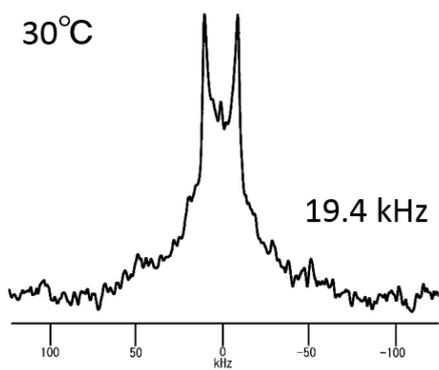
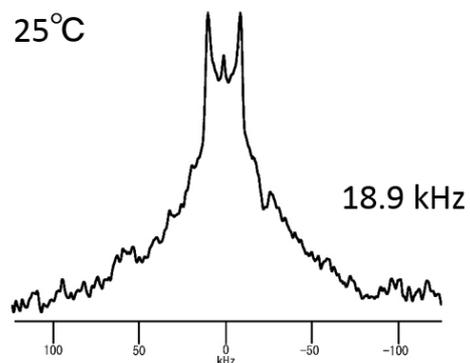
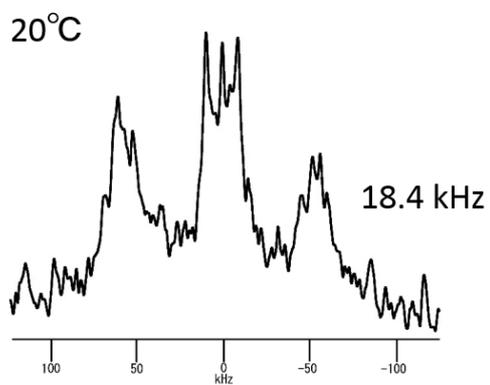
○ $12',12'-d_2$ -PSPC における ^2H NMR スペクトル



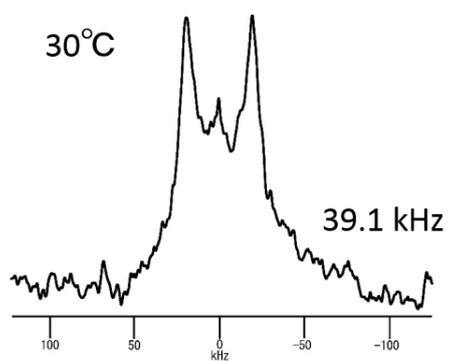
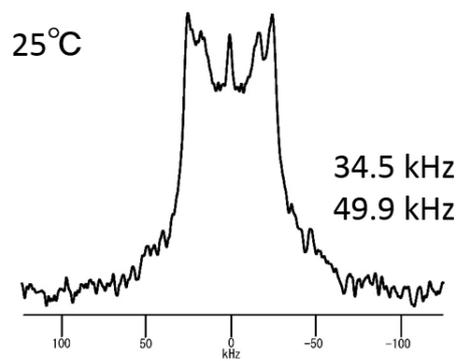
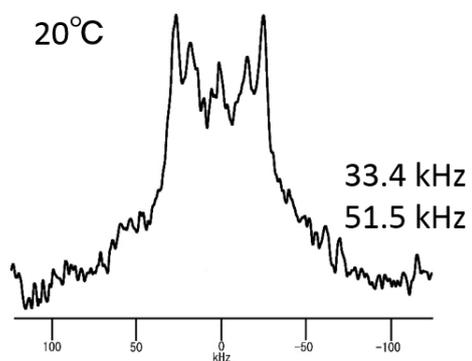
○ $12',12'-d_2$ -PSPC/Chol における ^2H NMR スペクトル



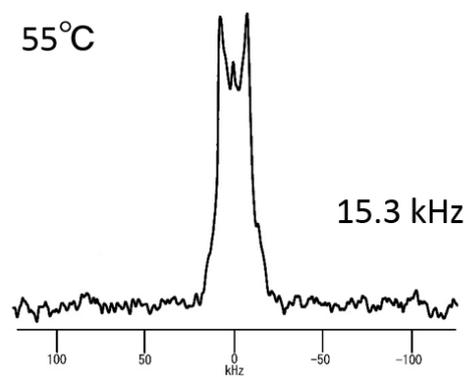
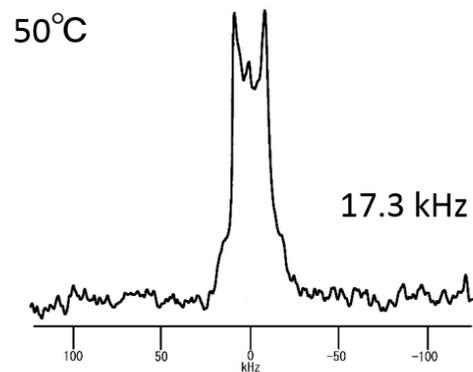
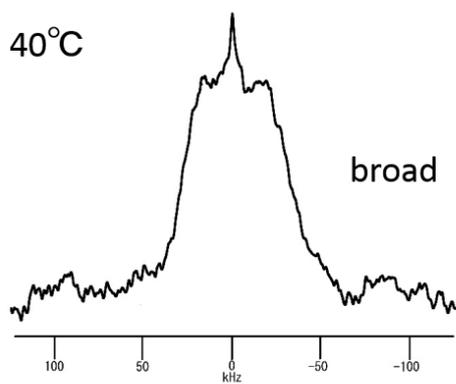
○ $12',12'-d_2$ -PSPC/DOPC における ^2H NMR スペクトル



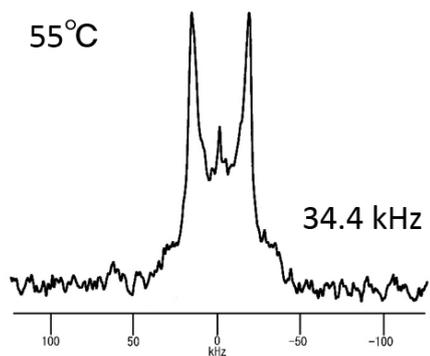
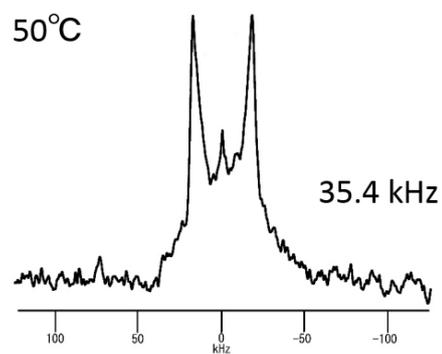
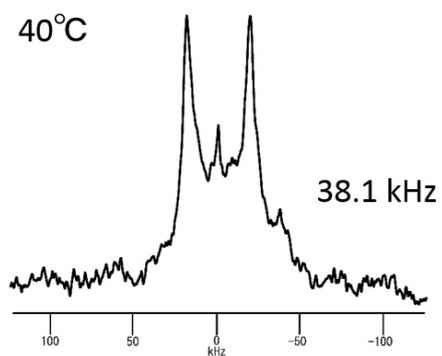
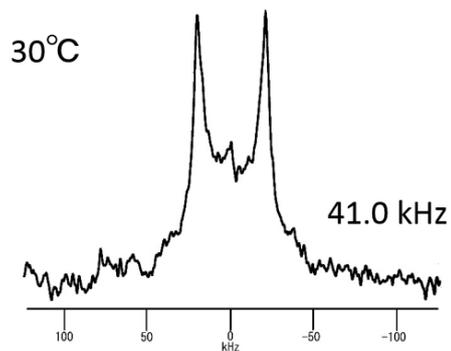
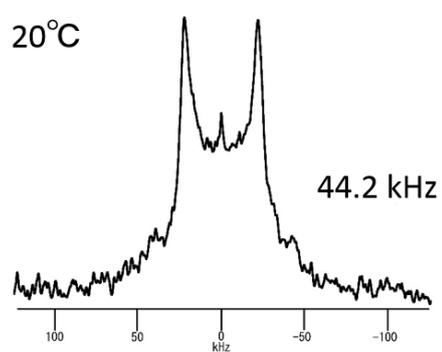
○ $12',12'-d_2$ -PSPC/Chol/DOPC における ^2H NMR スペクトル



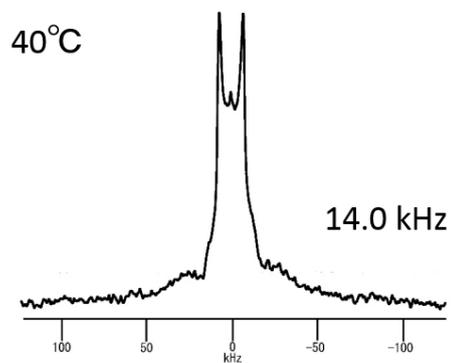
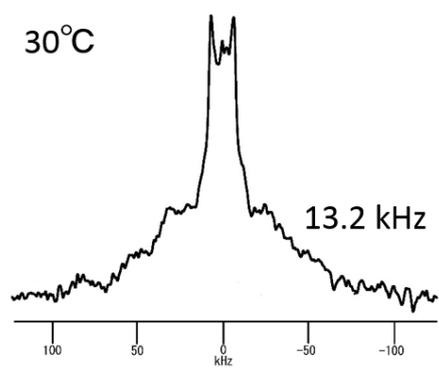
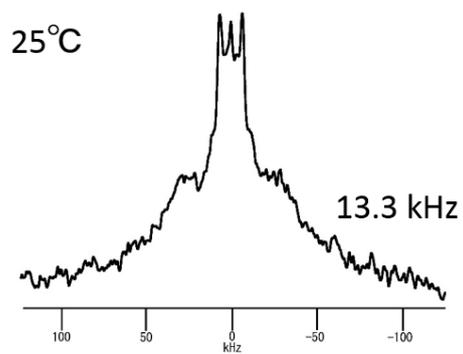
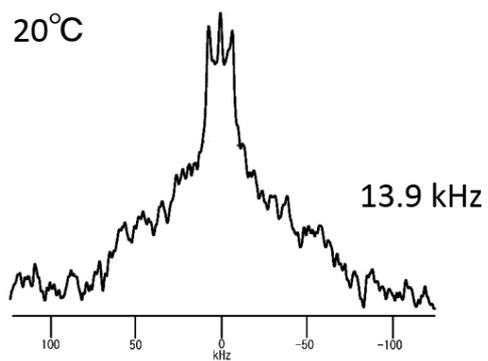
○ $14',14'$ - d_2 -PSPC における ^2H NMR スペクトル



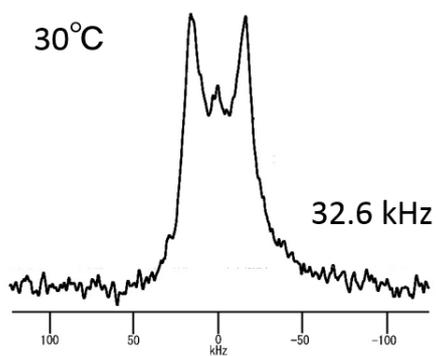
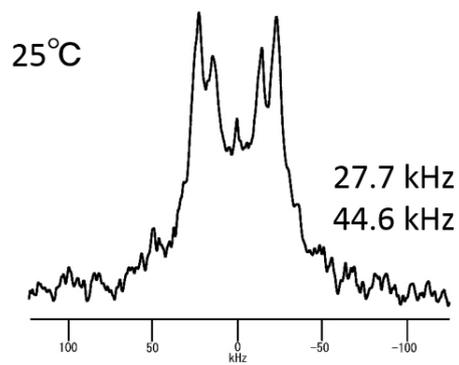
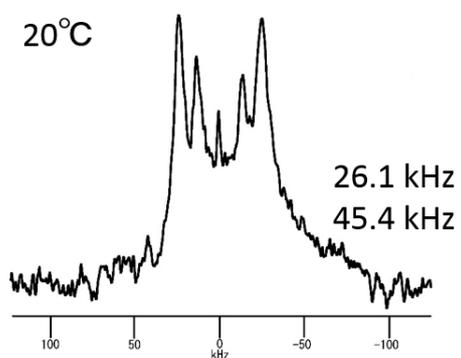
○14',14'-d₂-PSPC/Chol における ²H NMR スペクトル



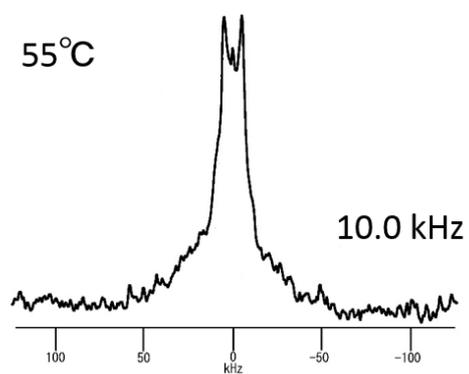
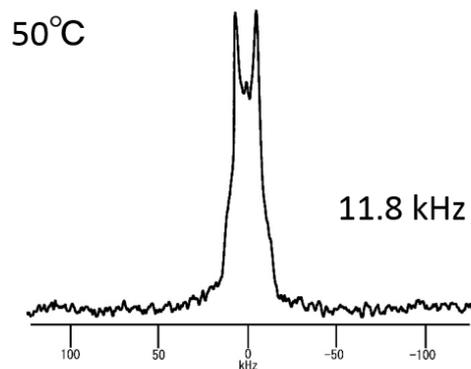
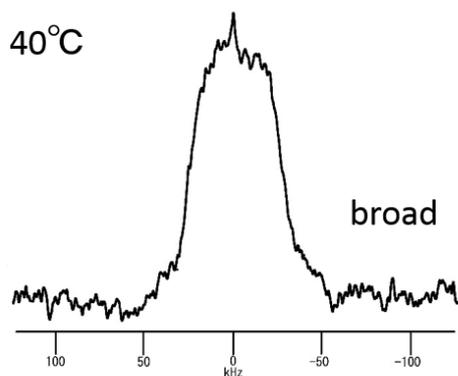
○14',14'- d_2 -PSPC/DOPC における ^2H NMR スペクトル



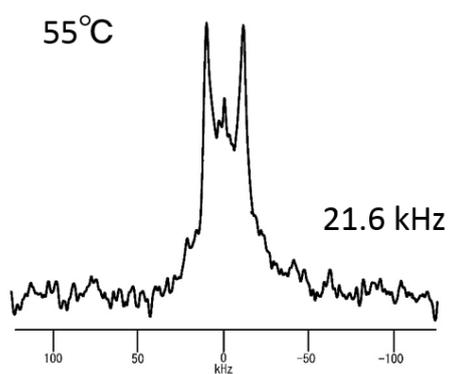
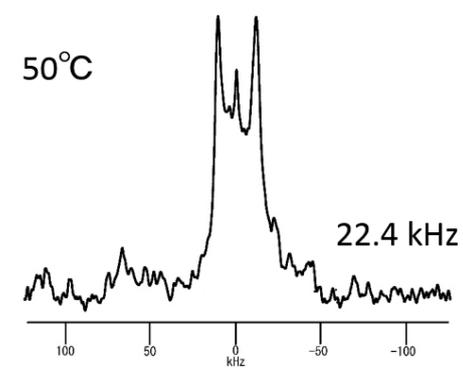
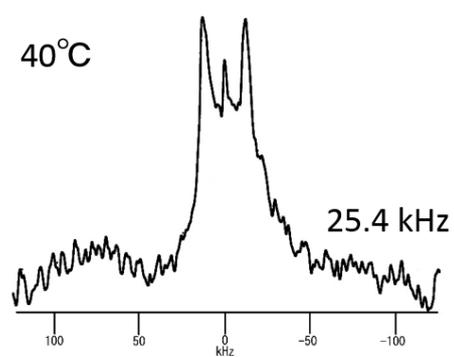
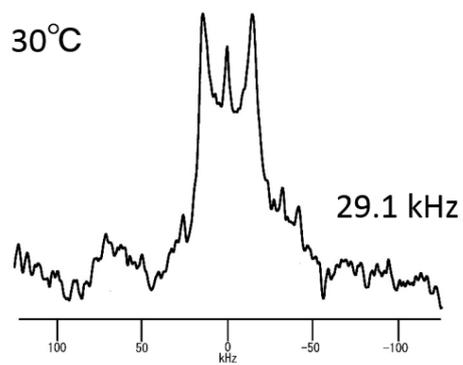
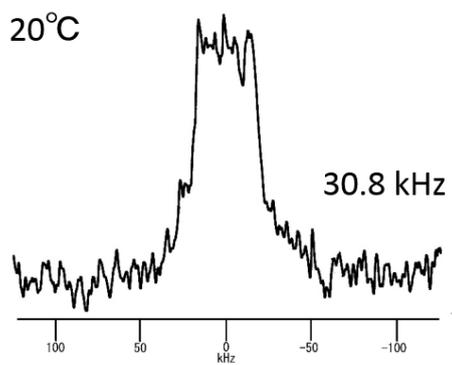
○ $14',14'$ - d_2 -PSPC/Chol/DOPC における ^2H NMR スペクトル



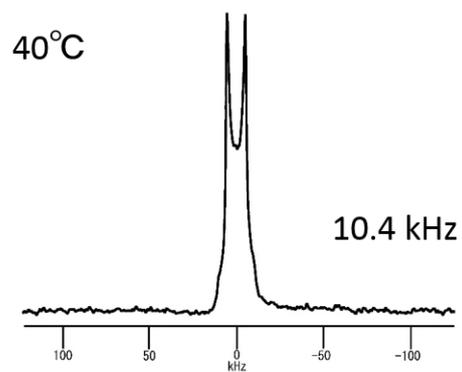
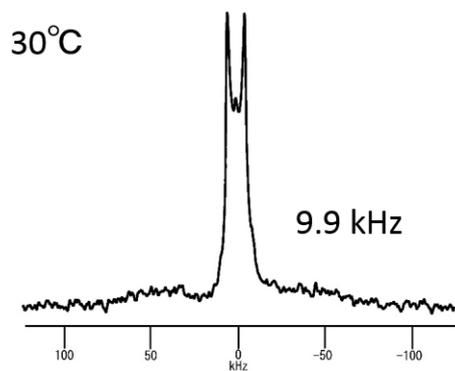
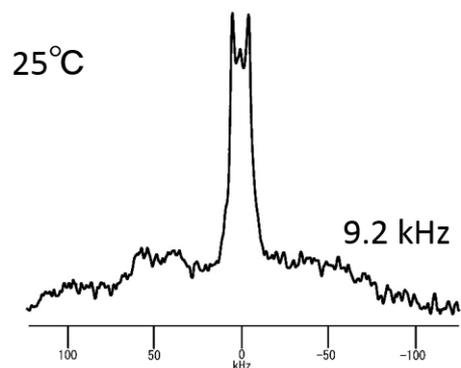
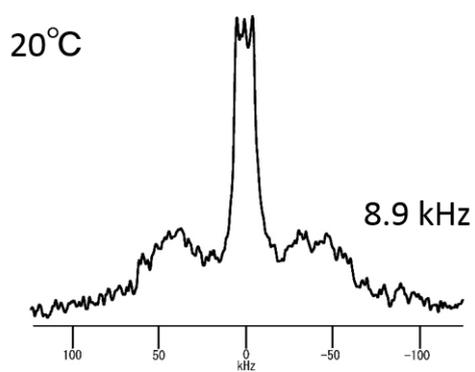
○ $16',16'-d_2$ -PSPC における ^2H NMR スペクトル



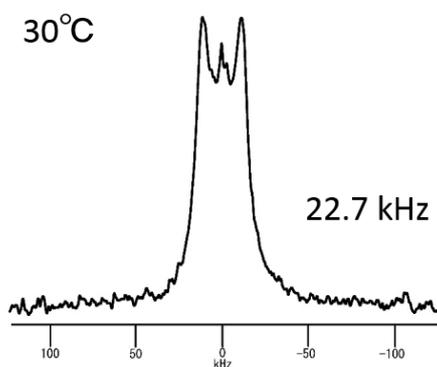
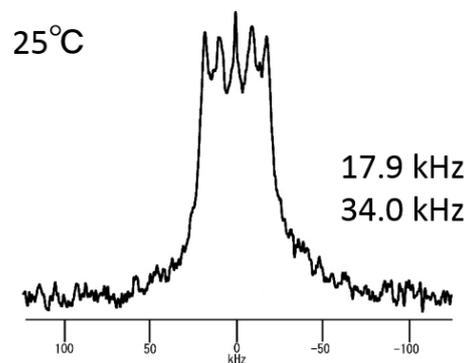
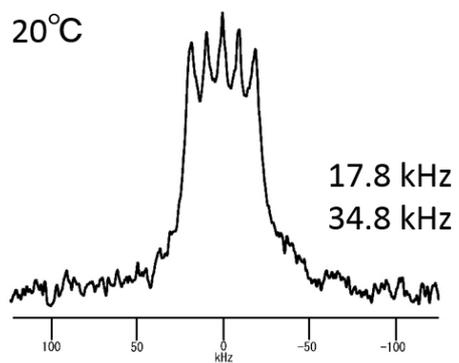
○ $16',16'-d_2$ -PSPC/Chol における ^2H NMR スペクトル



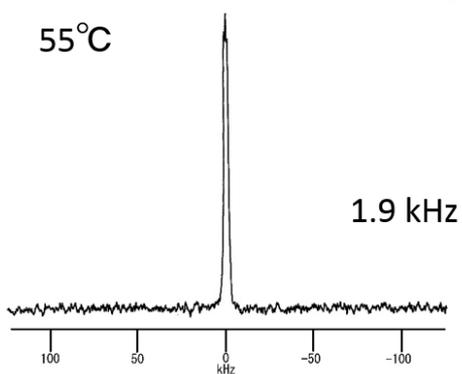
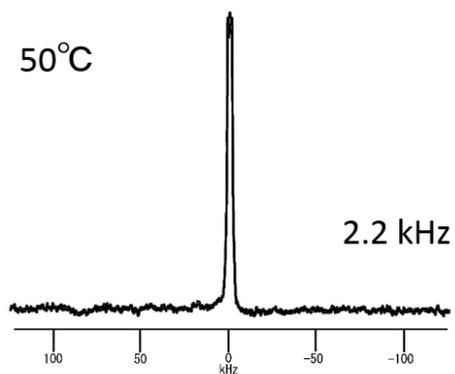
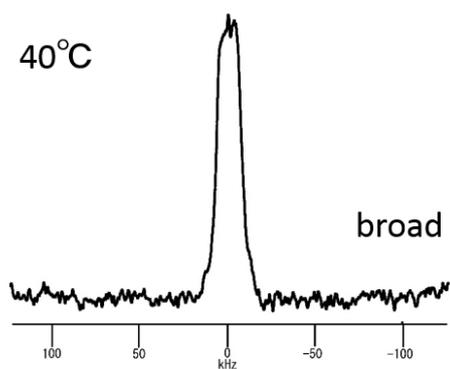
○ $16',16'$ - d_2 -PSPC/DOPC における ^2H NMR スペクトル



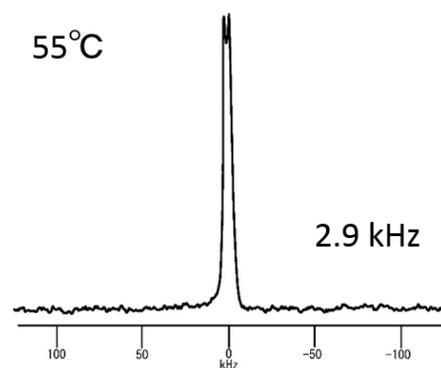
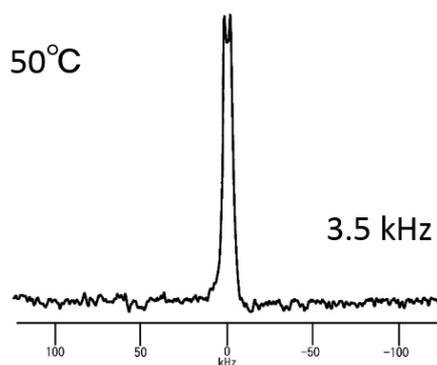
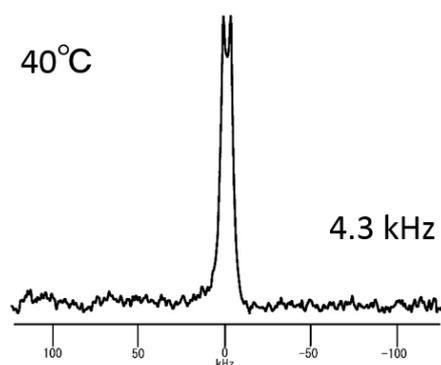
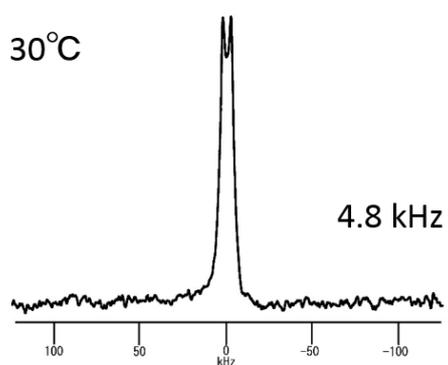
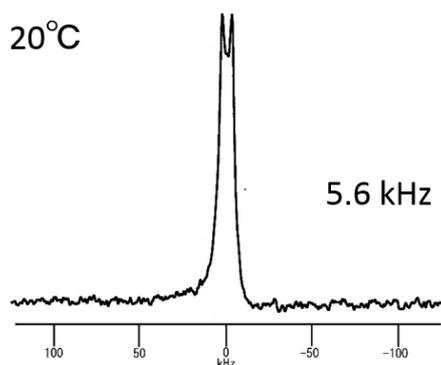
○ $16',16'$ - d_2 -PSPC/Chol/DOPC における ^2H NMR スペクトル



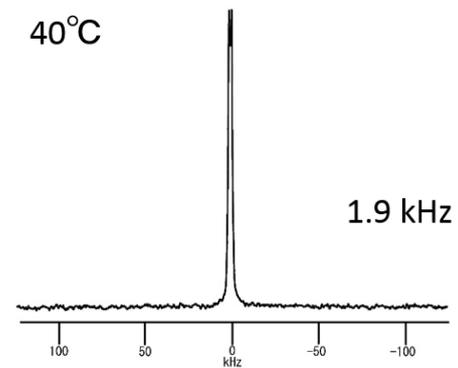
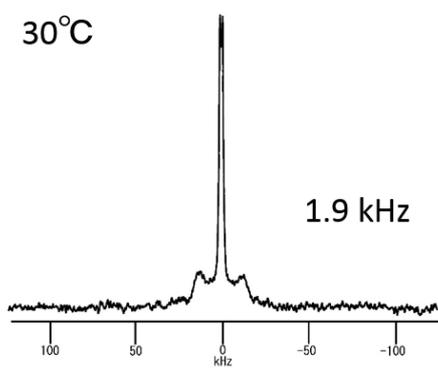
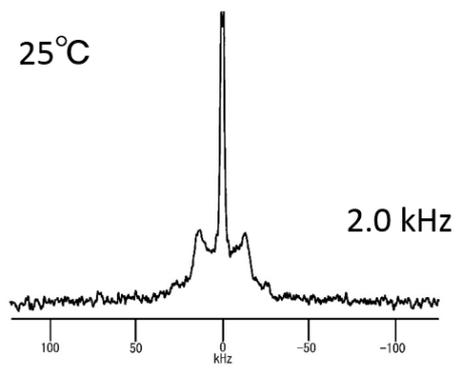
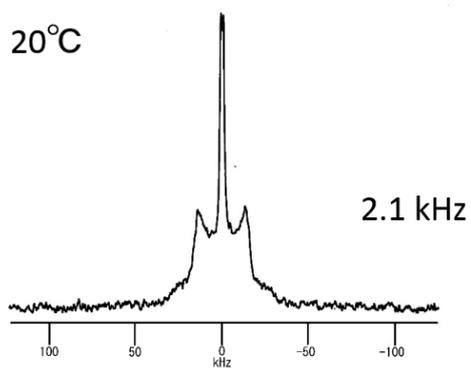
○ $18',18',18'-d_3$ -PSPC における ^2H NMR スペクトル



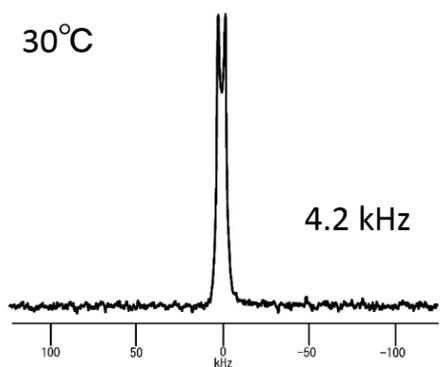
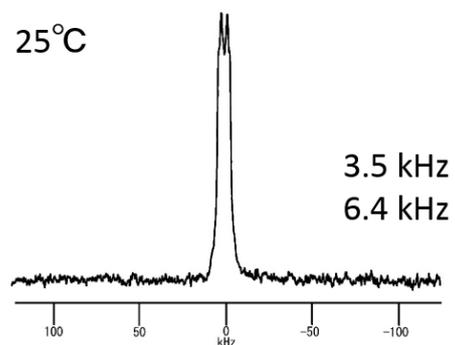
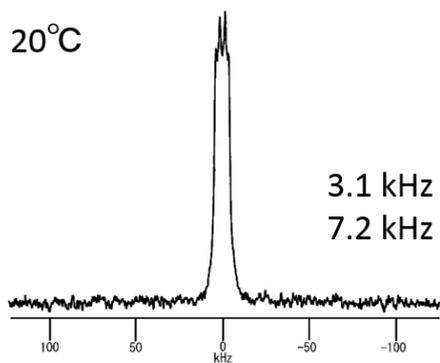
○ $18',18',18'-d_3$ -PSPC/Chol における ^2H NMR スペクトル



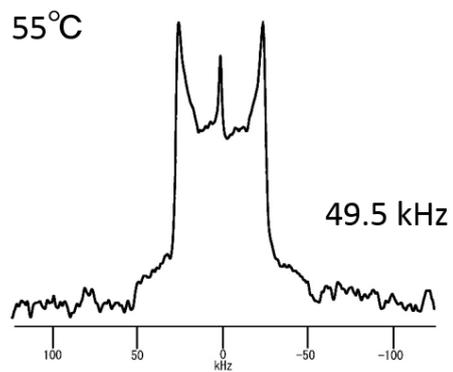
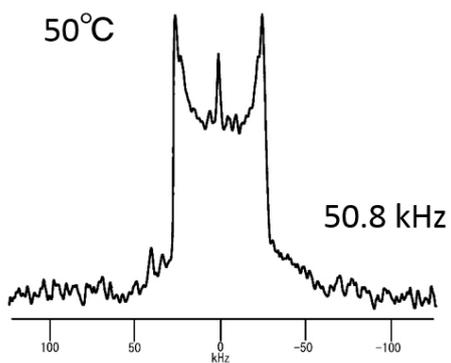
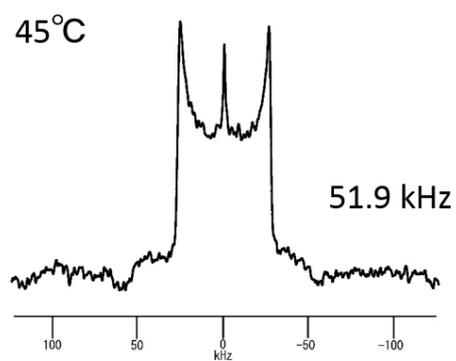
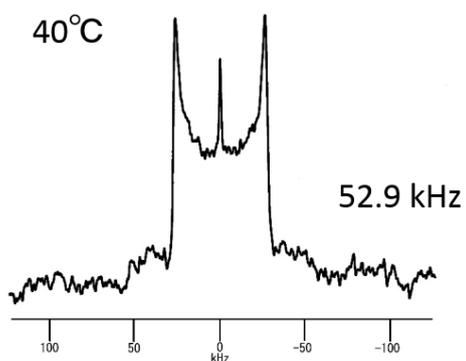
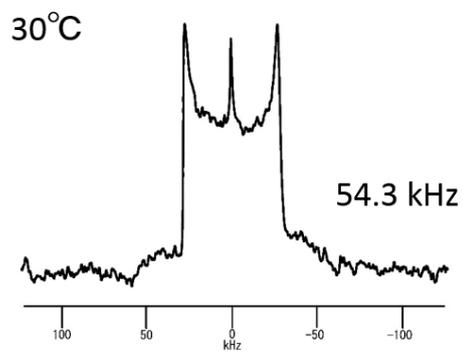
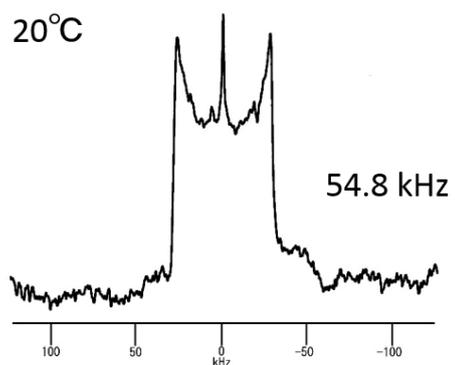
○ $18',18',18'-d_3$ -PSPC/DOPC における ^2H NMR スペクトル



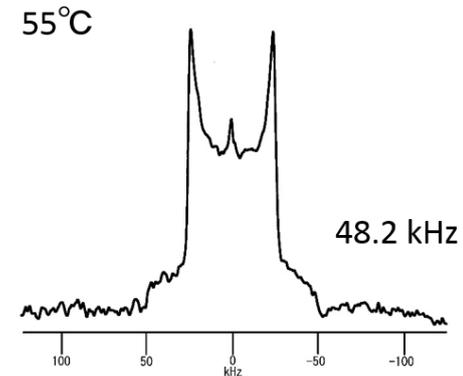
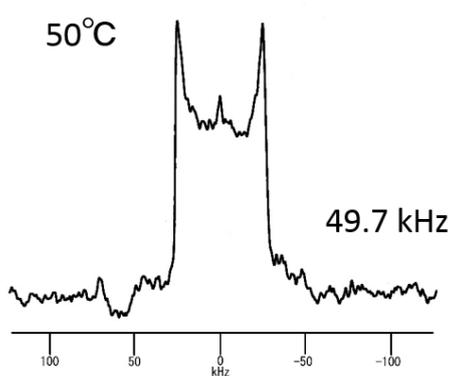
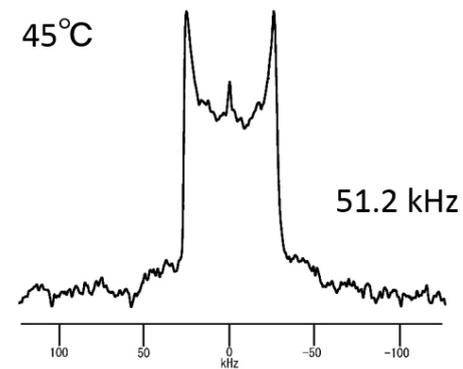
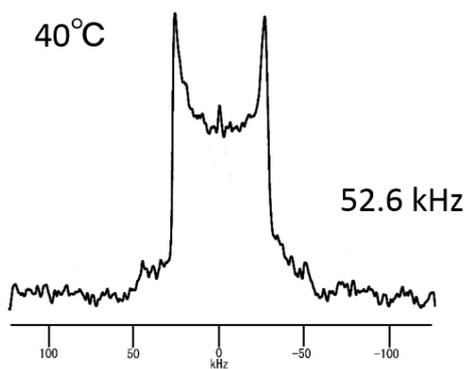
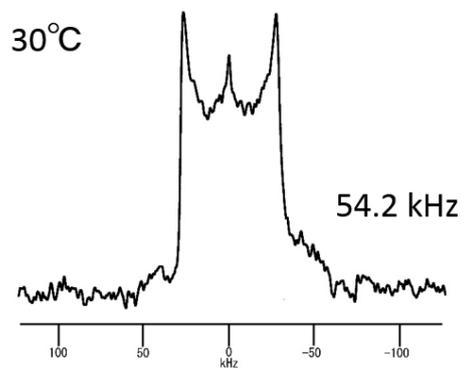
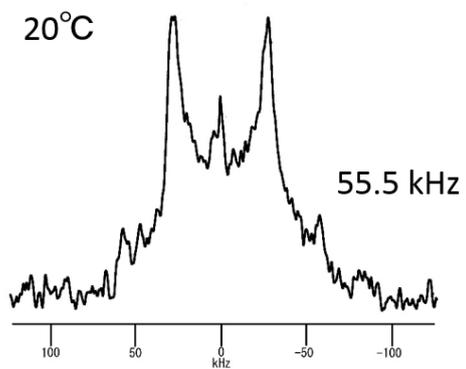
○ $18',18',18'-d_3$ -PSPC/Chol/DOPC における ^2H NMR スペクトル



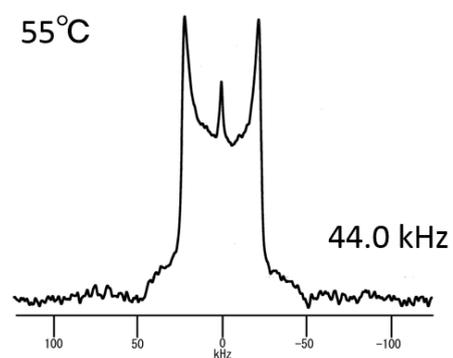
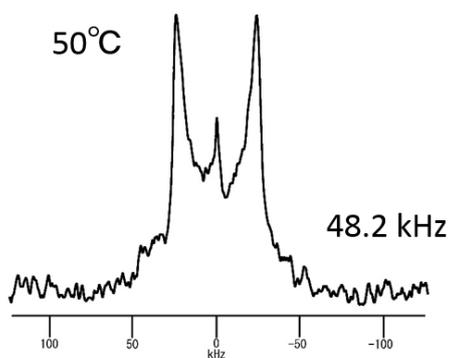
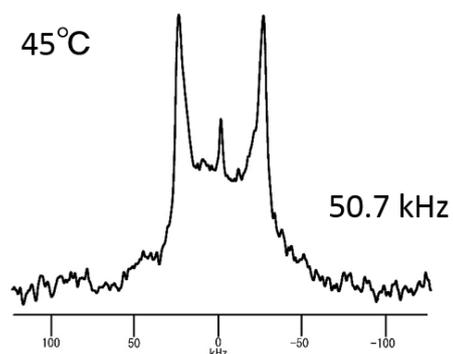
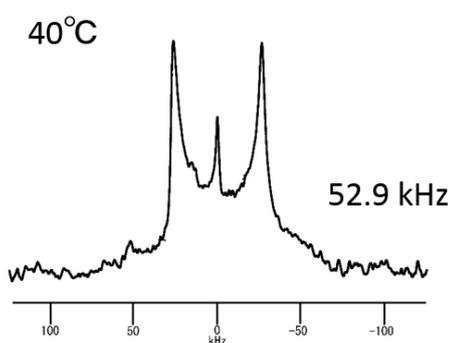
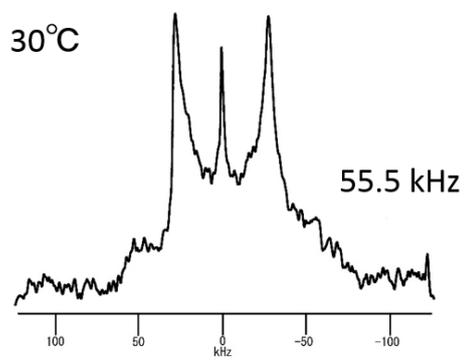
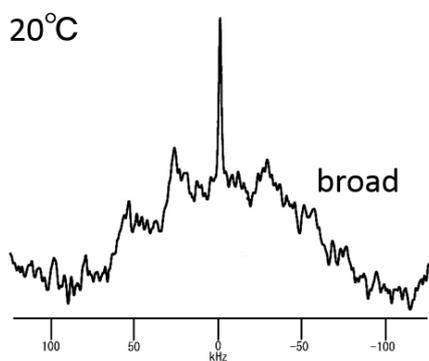
○ $10',10'-d_2$ -SM/Chol (50 mol%) における ^2H NMR スペクトル



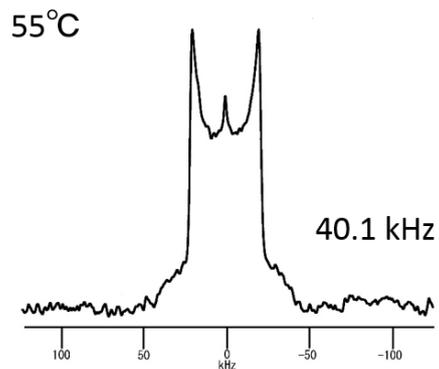
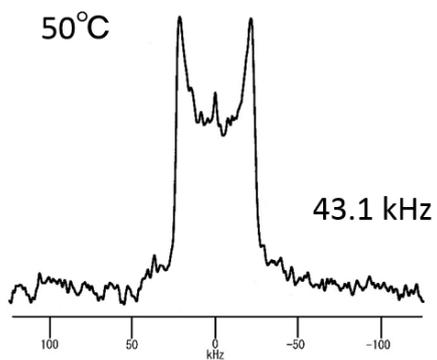
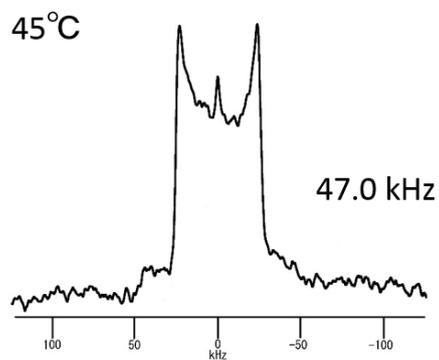
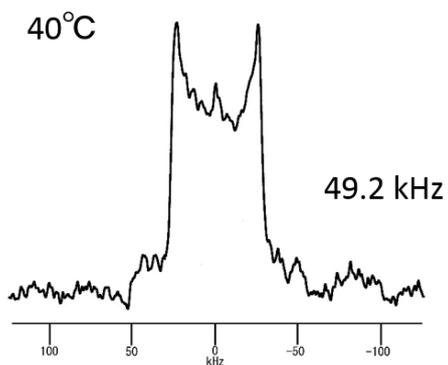
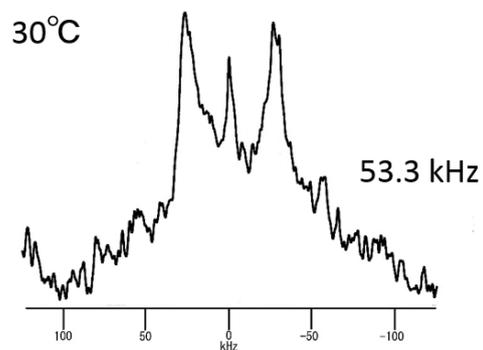
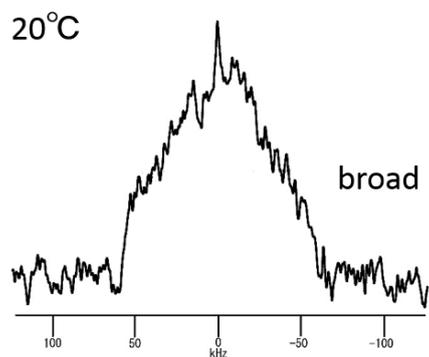
○ $10',10'-d_2$ -SM/Chol (33 mol%) における ^2H NMR スペクトル



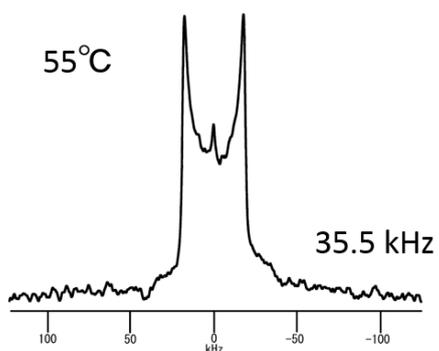
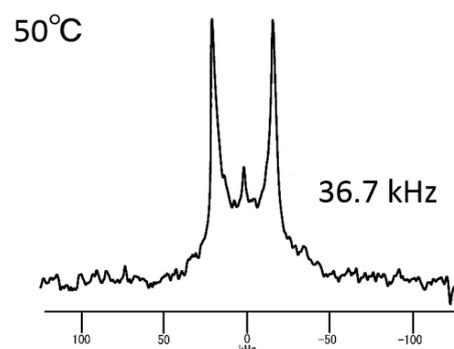
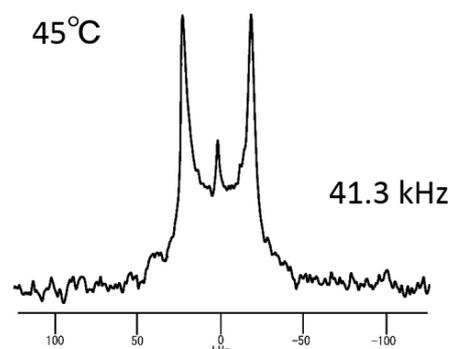
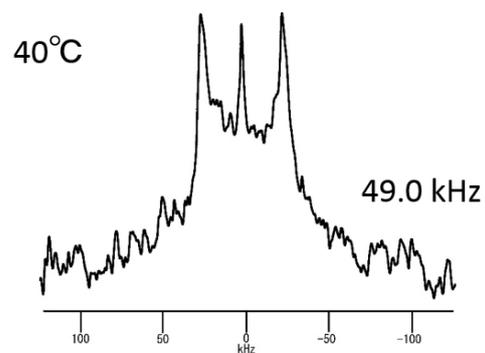
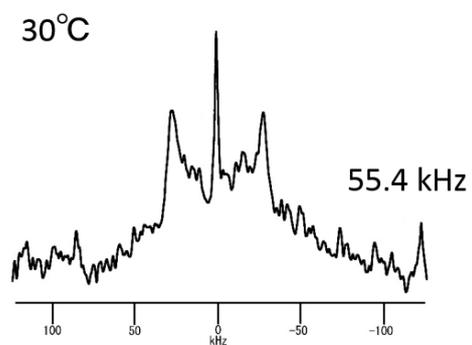
○ $10',10'-d_2$ -SM/Chol (25 mol%) における ^2H NMR スペクトル



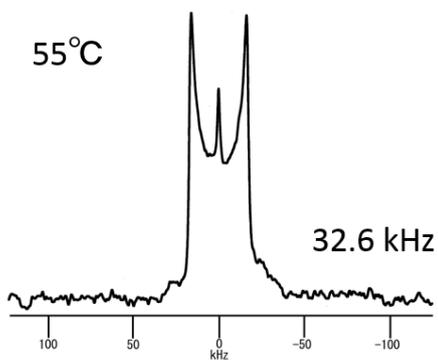
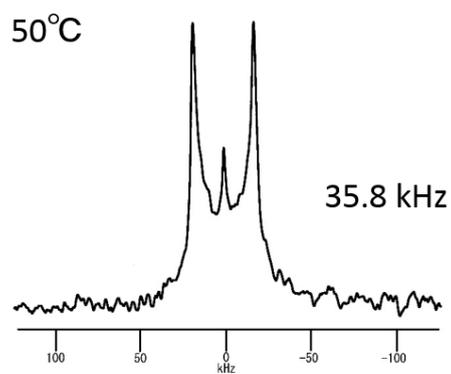
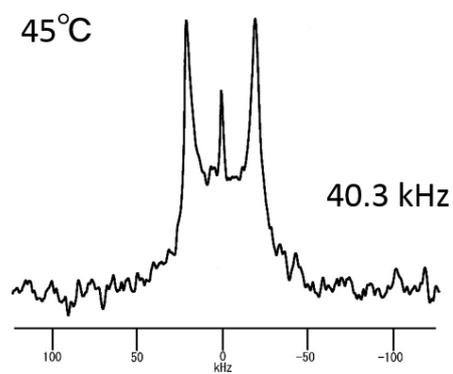
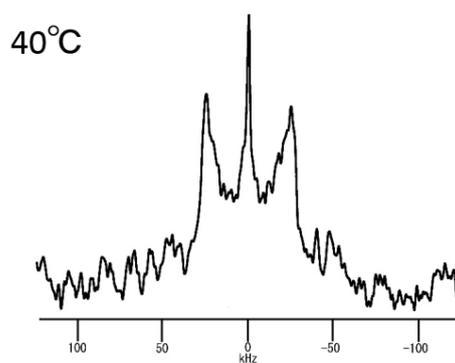
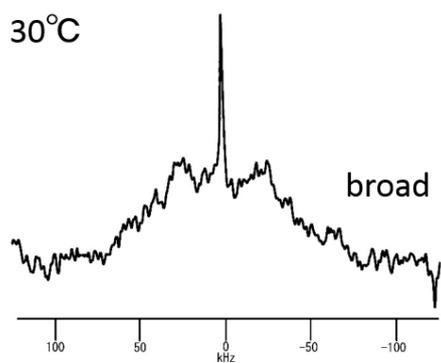
○ $10',10'-d_2$ -SM/Chol (20 mol%) における ^2H NMR スペクトル



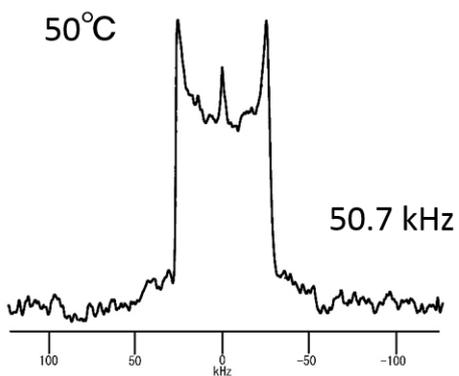
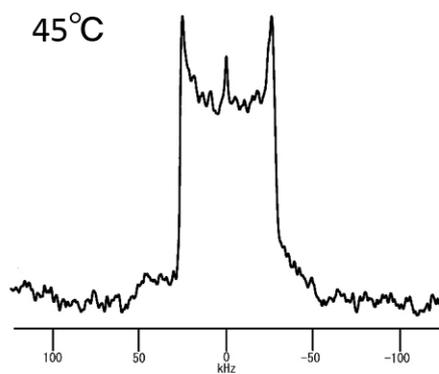
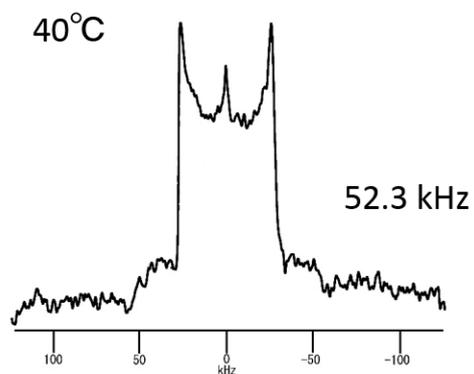
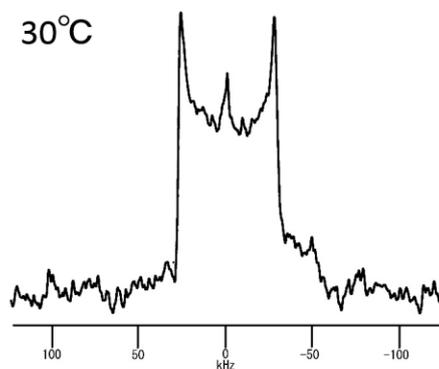
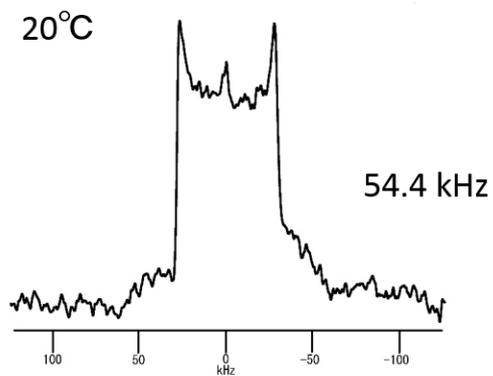
○ $10',10'-d_2$ -SM/Chol (10 mol%) における ^2H NMR スペクトル



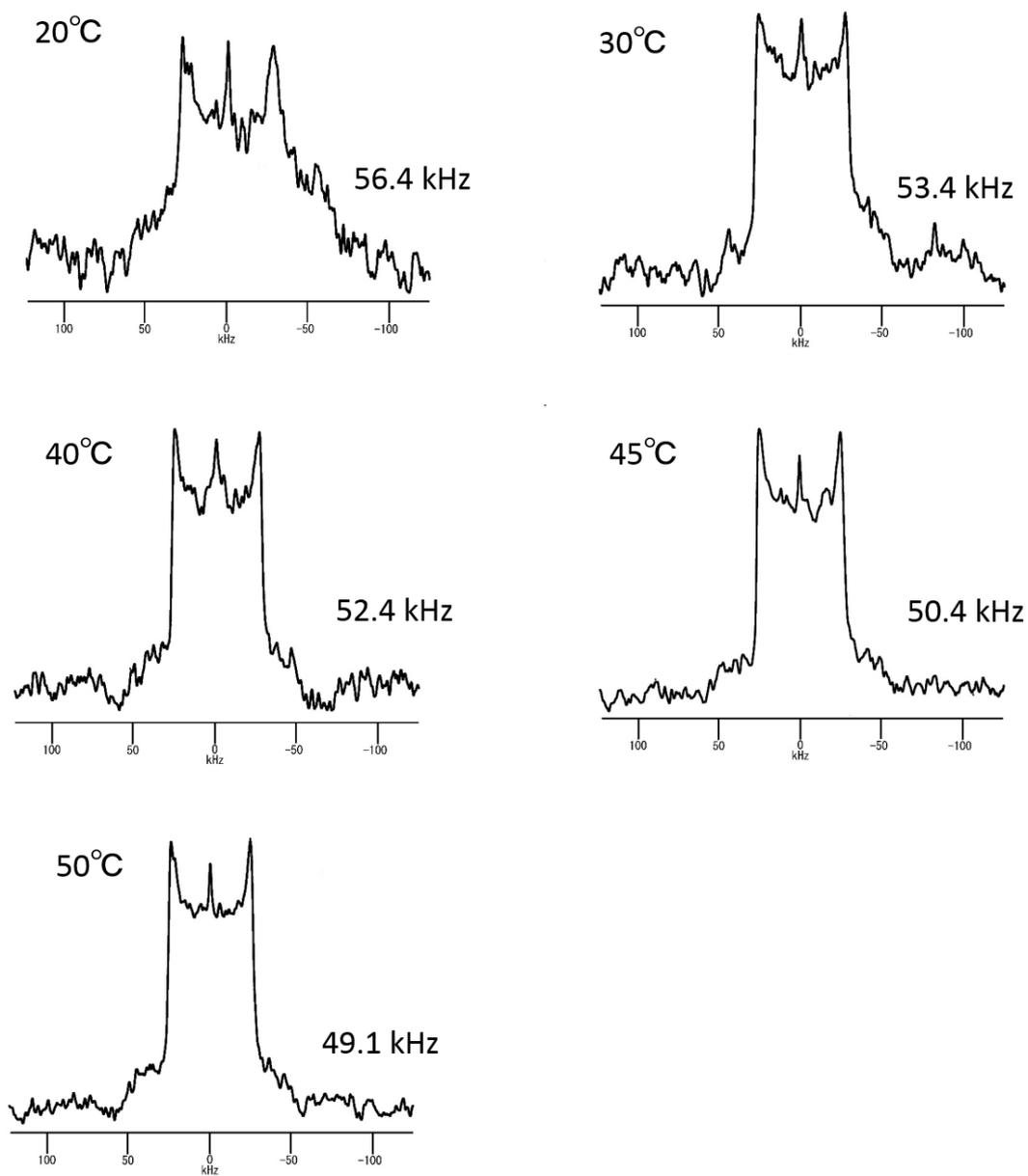
○ $10',10'-d_2$ -SM/Chol (5 mol%) における ^2H NMR スペクトル



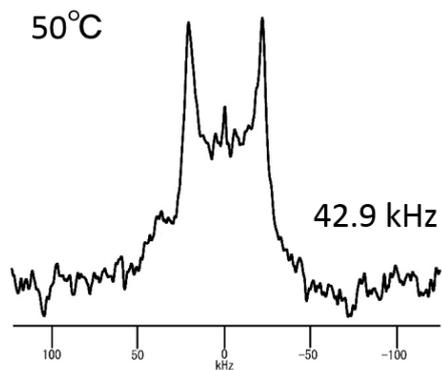
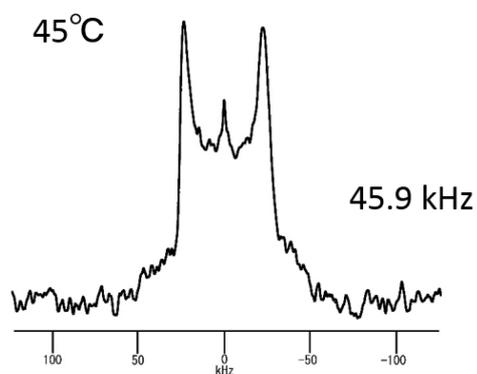
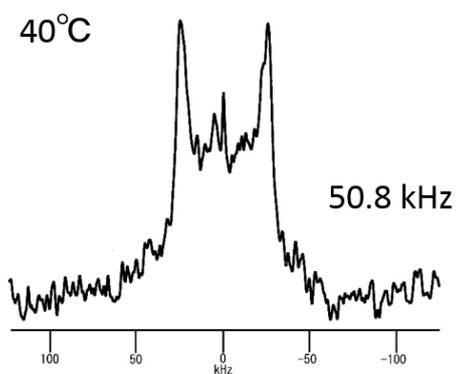
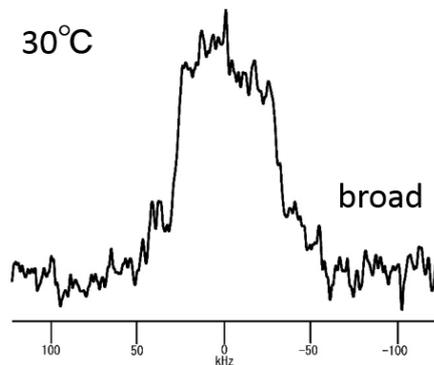
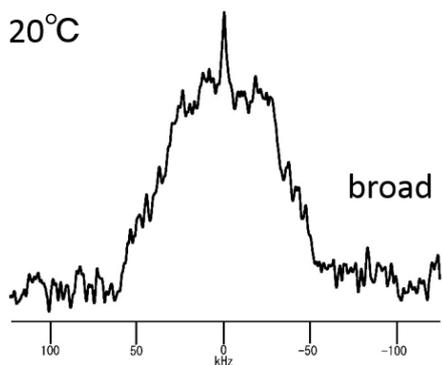
○12,12- d_2 -SM/Chol (50 mol%) における ^2H NMR スペクトル



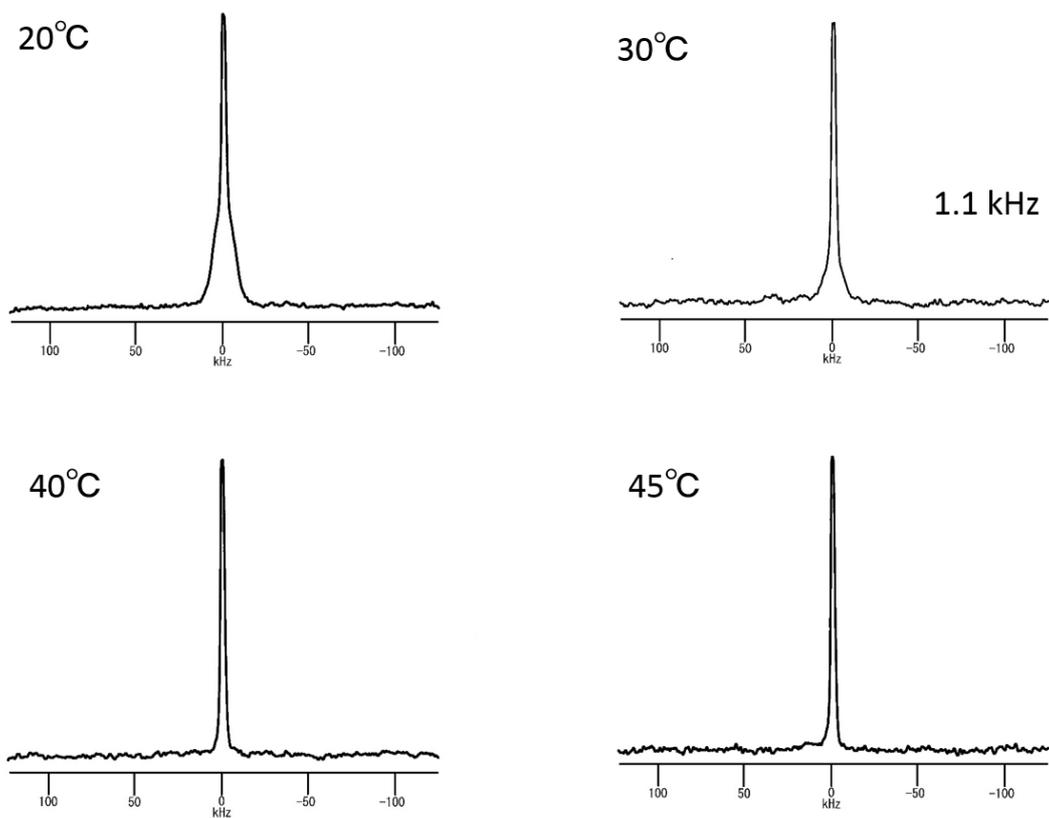
○12,12- d_2 -SM/Chol (33 mol%) における ^2H NMR スペクトル



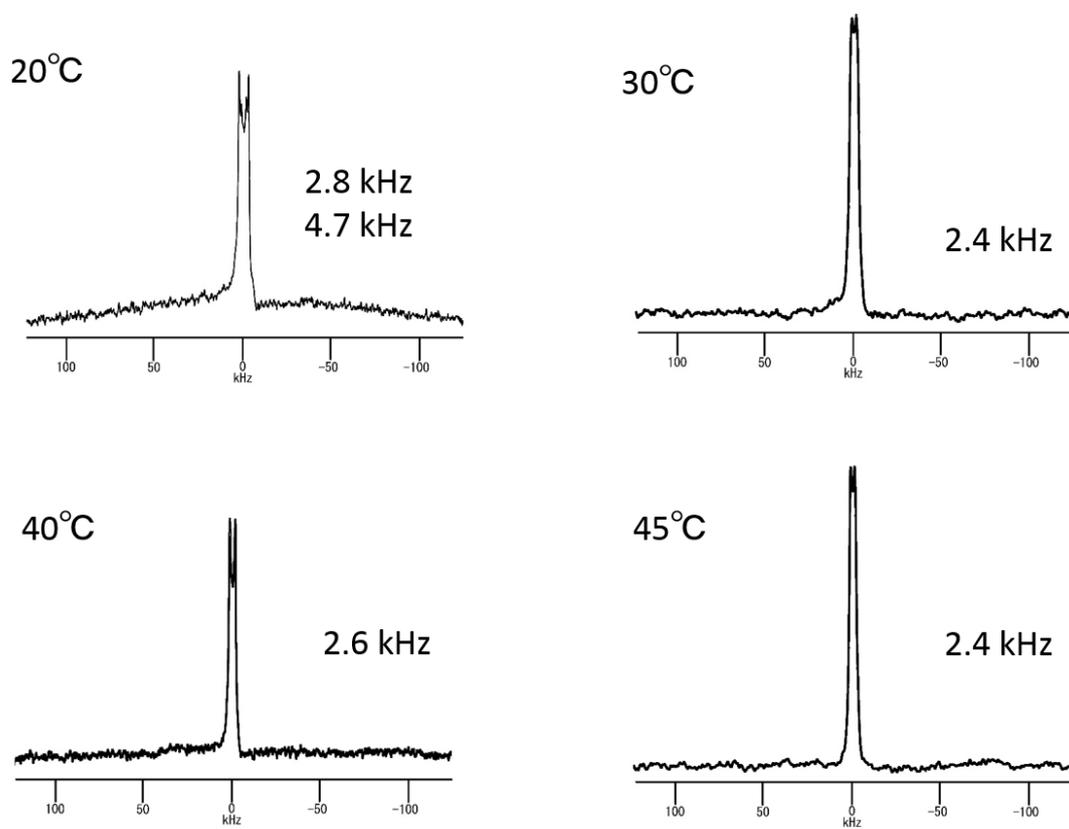
○12,12- d_2 -SM/Chol (20 mol%) における ^2H NMR スペクトル



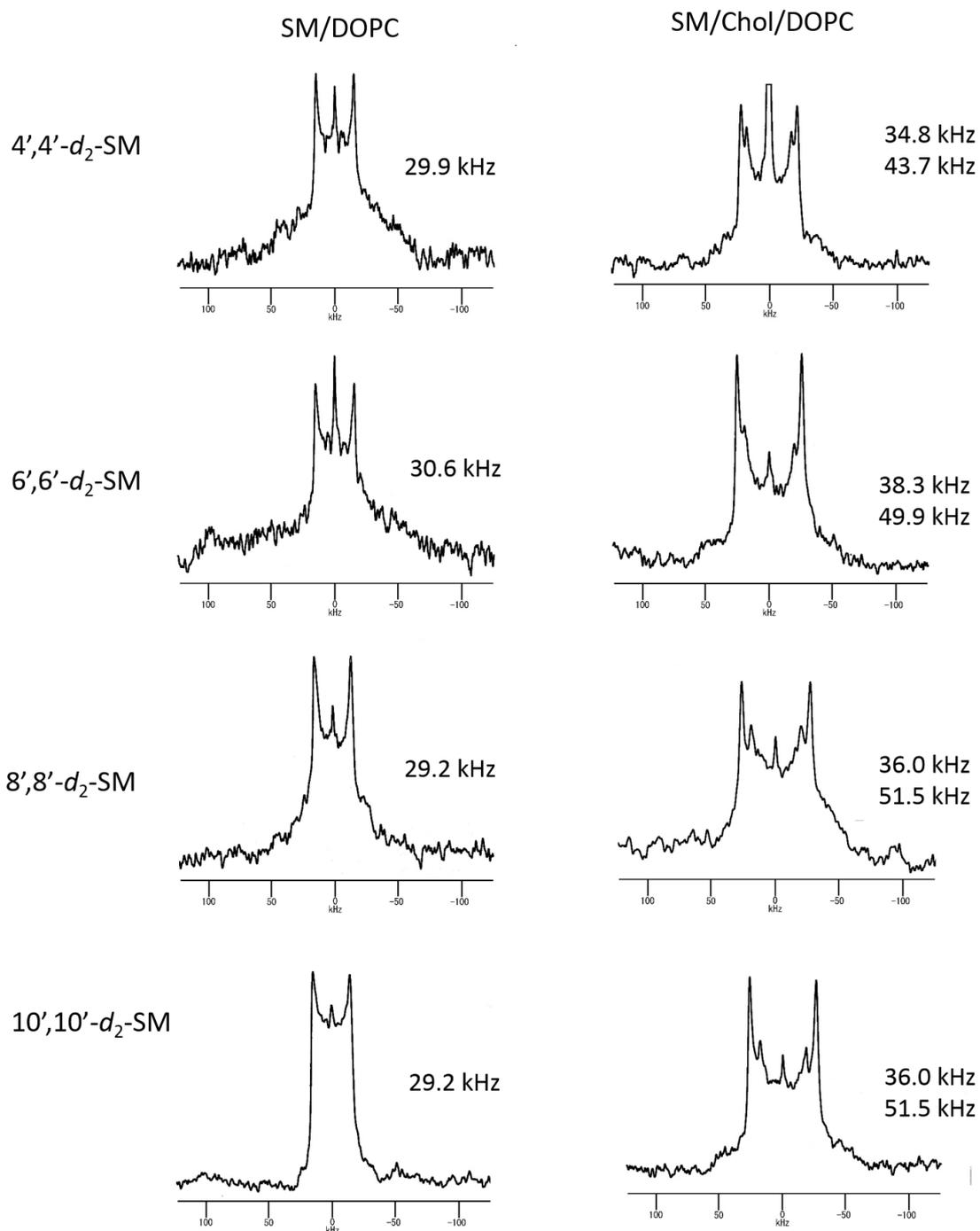
○ $18',18',18'-d_3$ -SM/DOPC における ^2H NMR スペクトル



○ $18',18',18'-d_3$ -SM/Chol/DOPC における ^2H NMR スペクトル



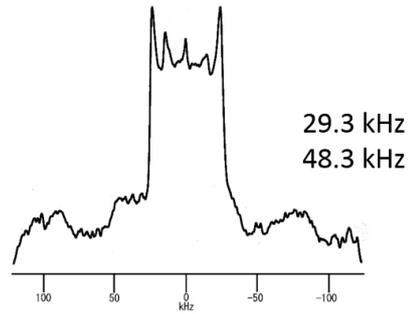
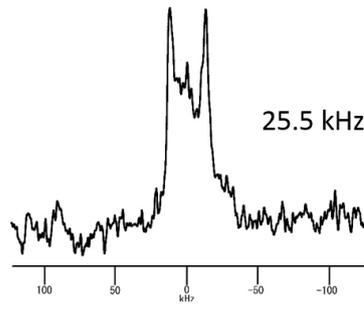
○ d_2 -SM/DOPC および d_2 -SM/Chol/DOPC における ^2H NMR
 スペクトル (30 °C)



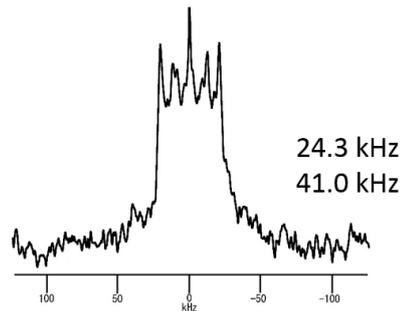
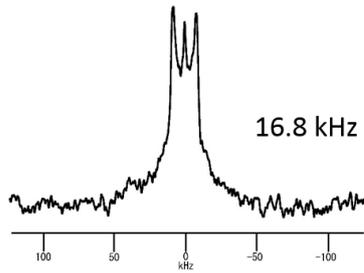
SM/DOPC

SM/Chol/DOPC

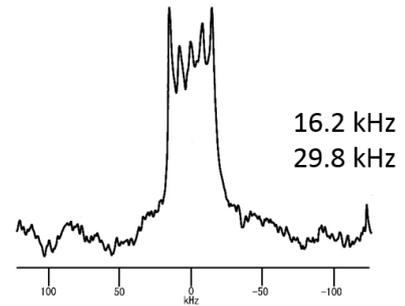
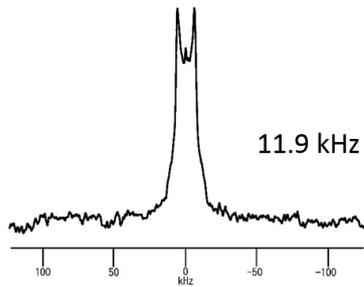
12',12'-d₂-SM



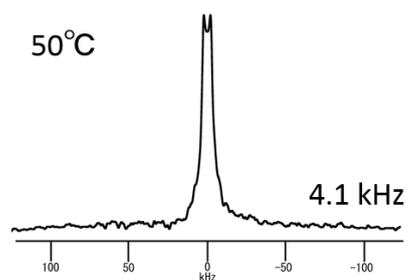
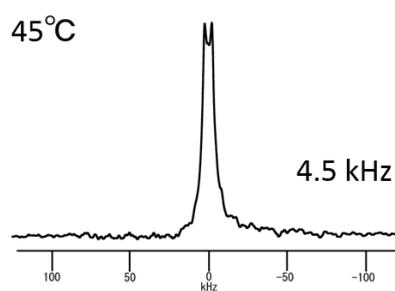
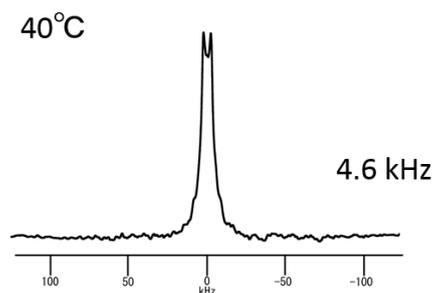
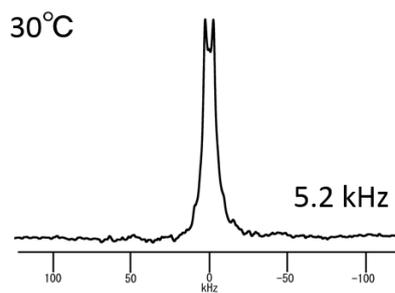
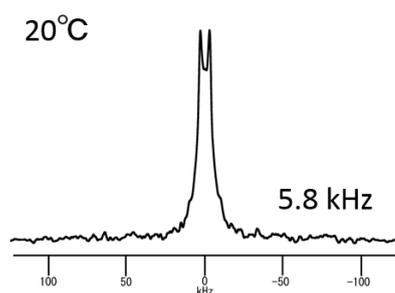
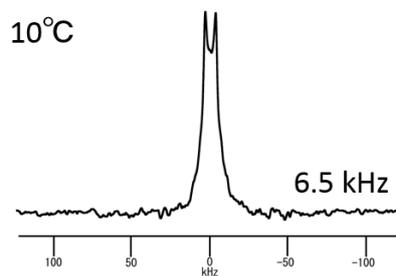
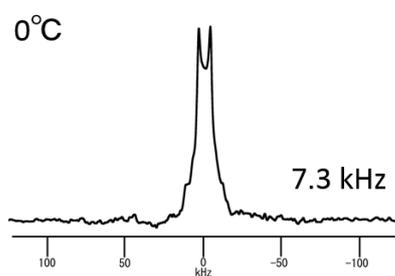
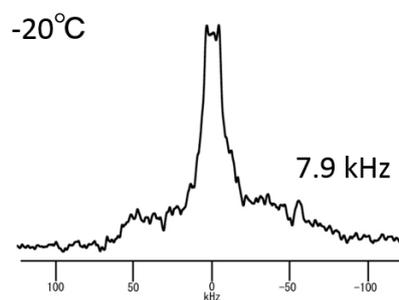
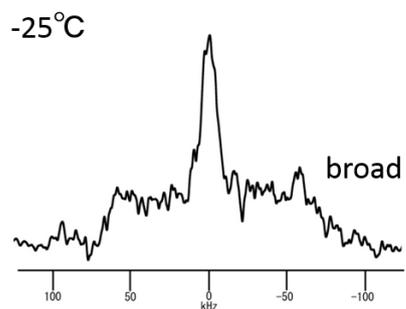
14',14'-d₂-SM



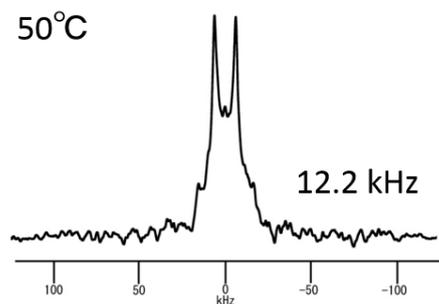
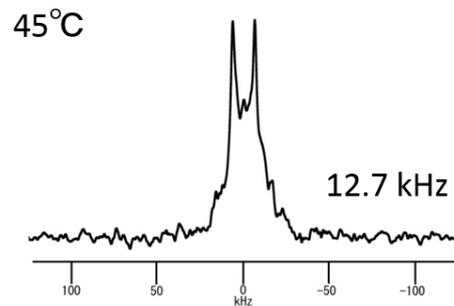
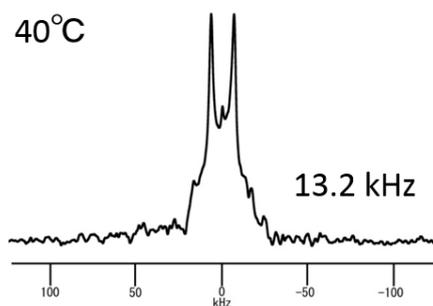
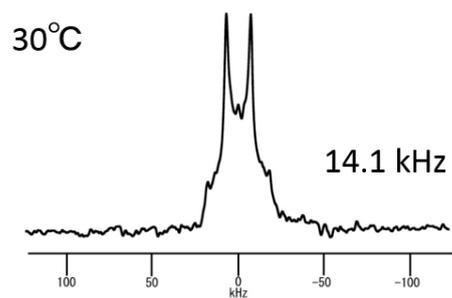
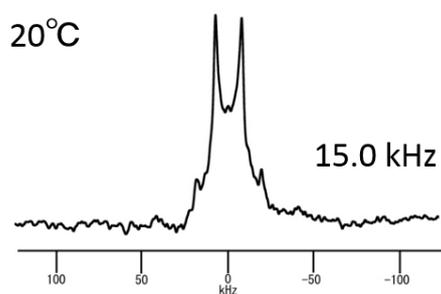
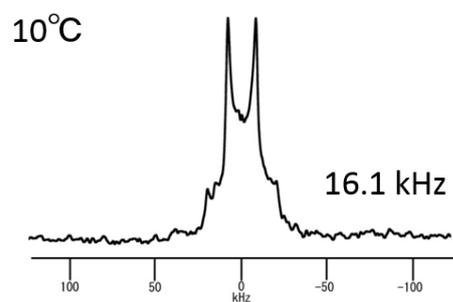
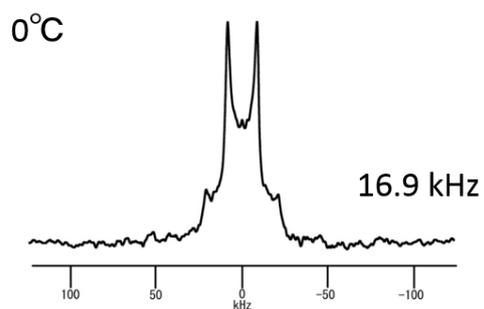
16',16'-d₂-SM



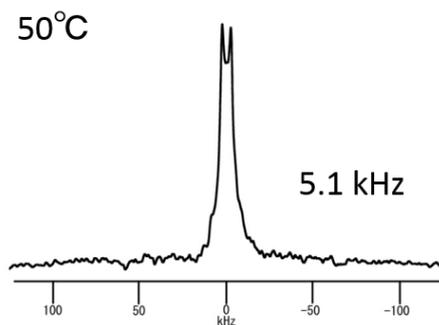
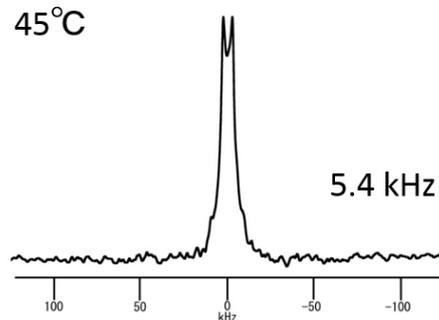
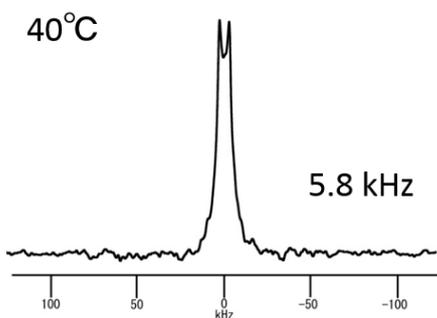
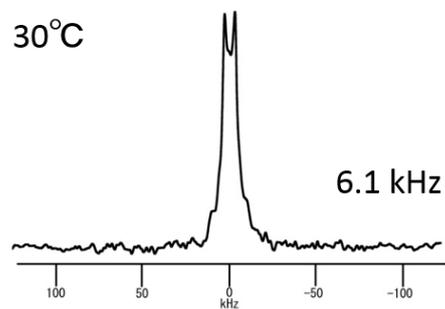
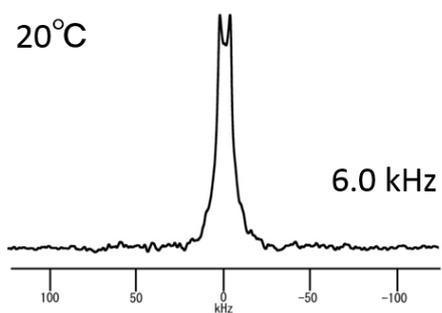
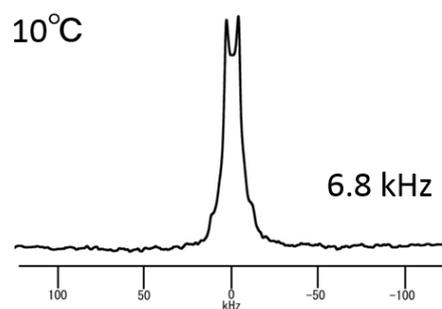
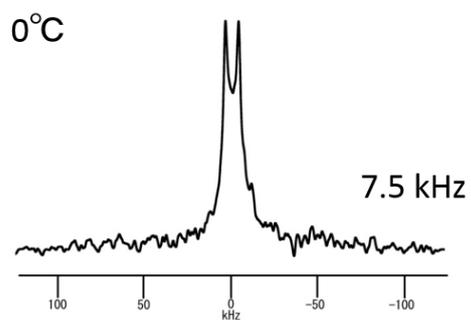
○11',11'- d_2 -DOPC における ^2H NMR スペクトル



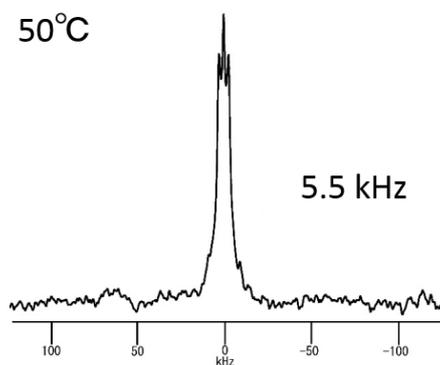
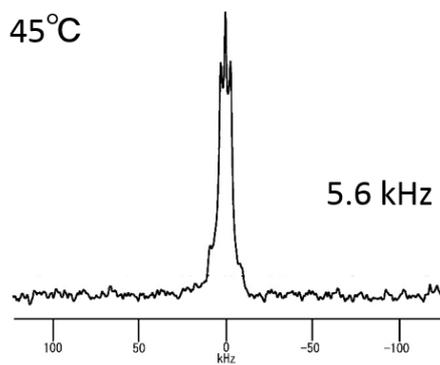
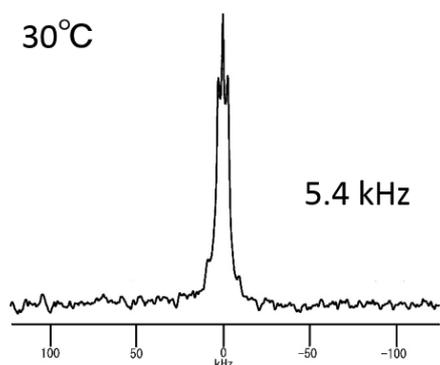
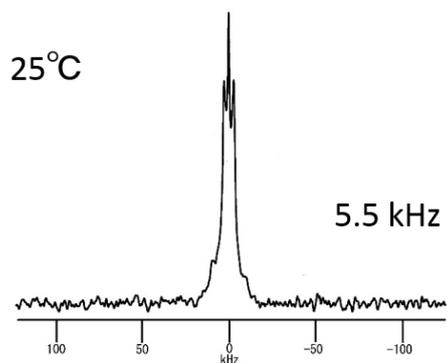
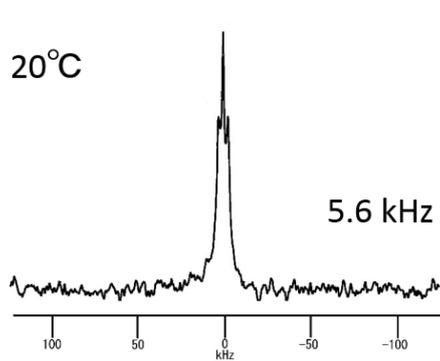
○11',11'-*d*₂-DOPC/Chol における ²H NMR スペクトル



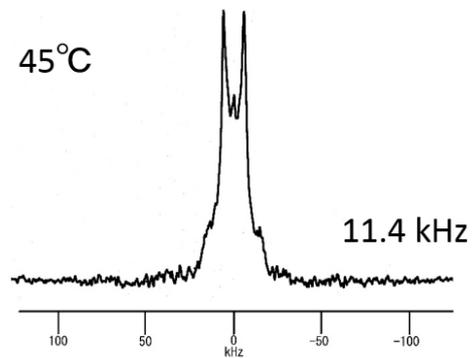
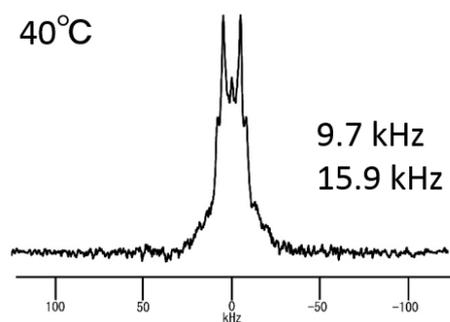
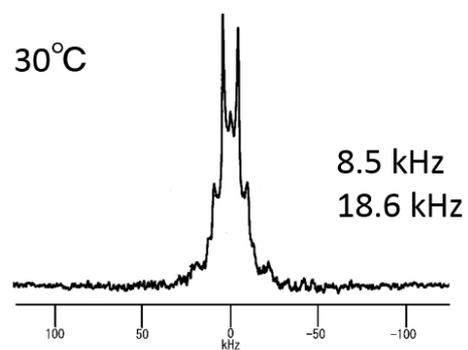
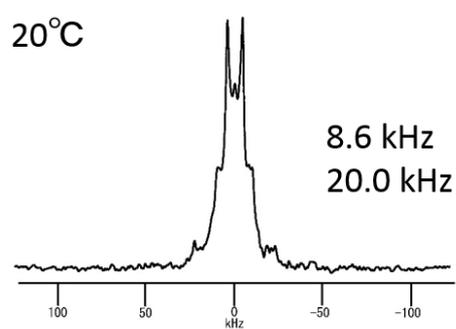
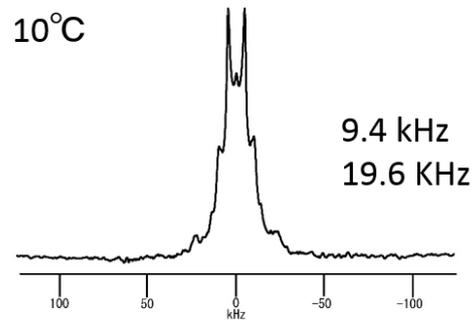
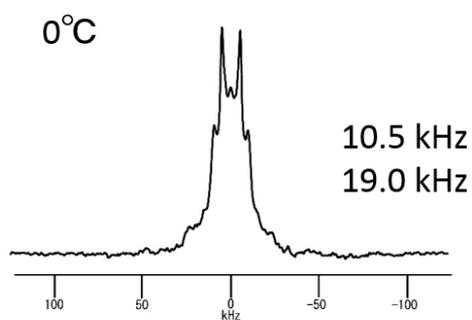
○SM/11',11'- d_2 -DOPC における ^2H NMR スペクトル



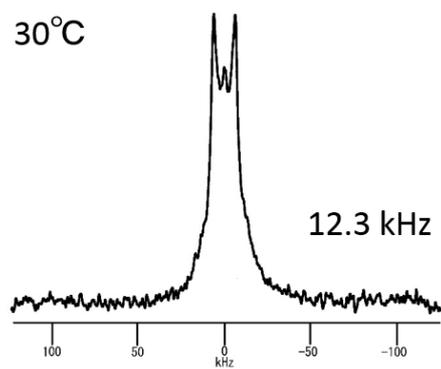
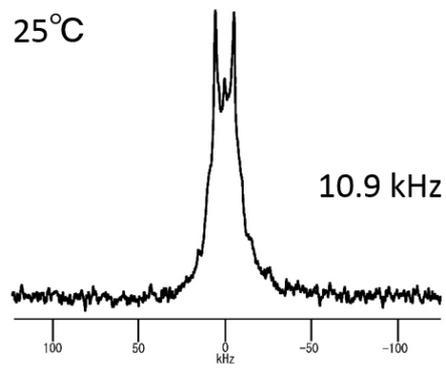
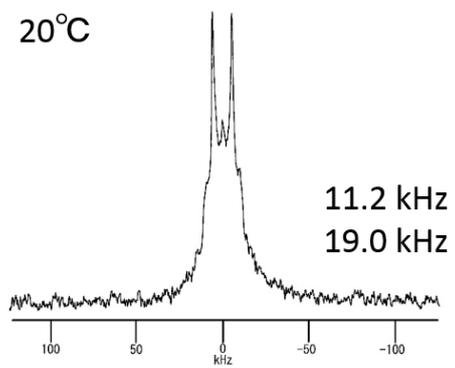
○PSPC/11',11'- d_2 -DOPC における ^2H NMR スペクトル



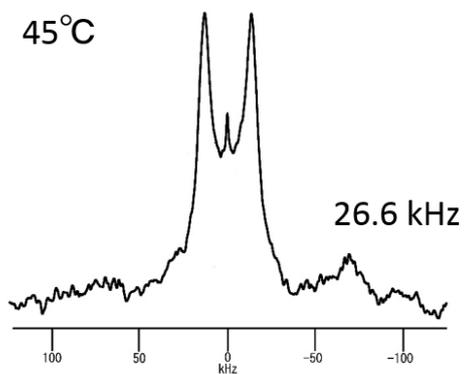
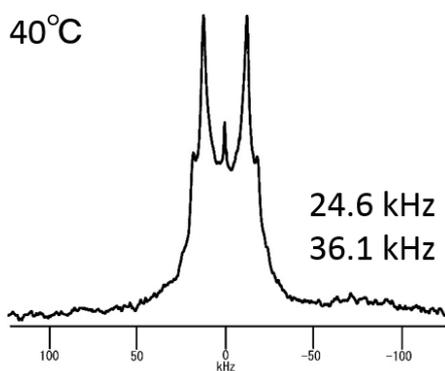
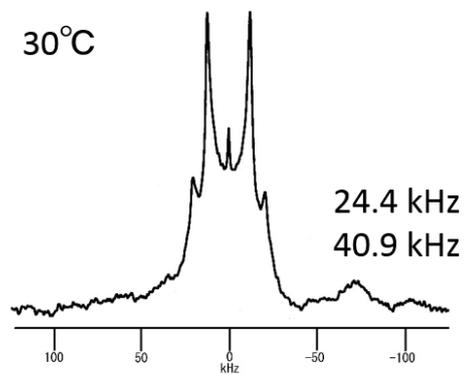
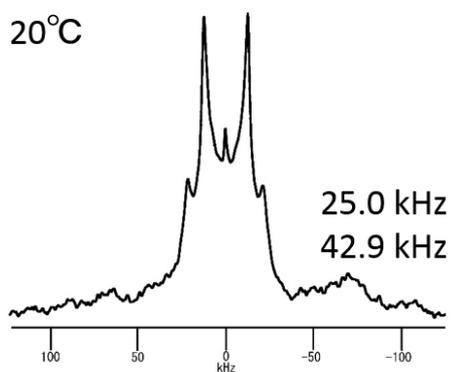
○SM/Chol/11',11'- d_2 -DOPC (1/1/1) における ^2H NMR スペクトル



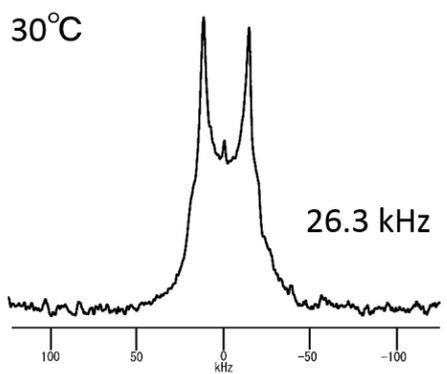
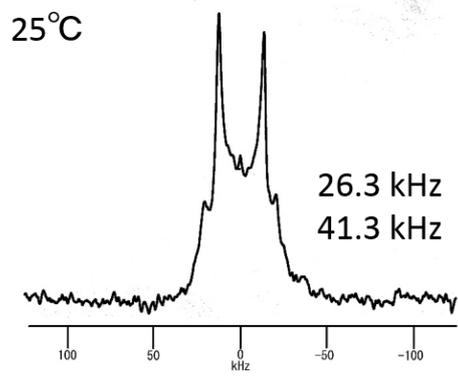
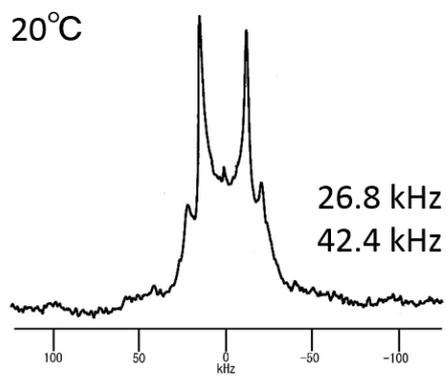
○PSPC/Chol/11',11'- d_2 -DOPC (1/1/1) における ^2H NMR スペクトル



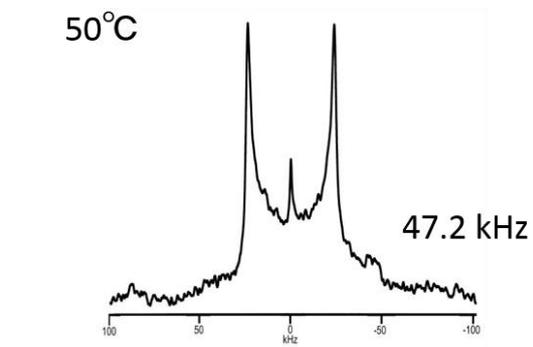
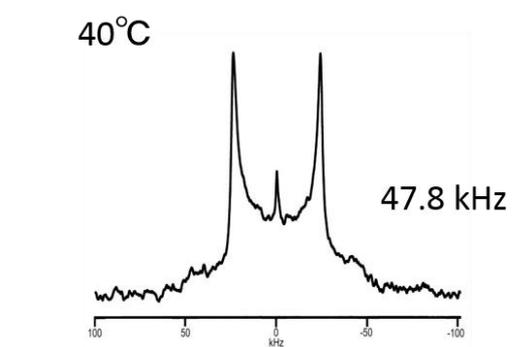
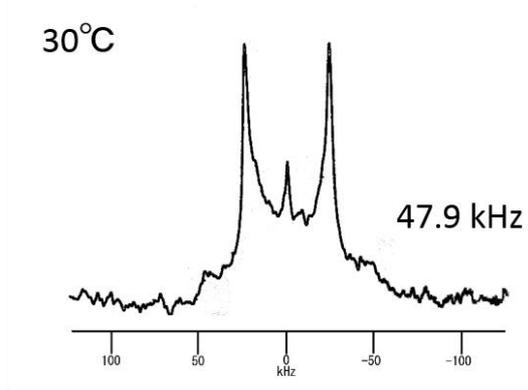
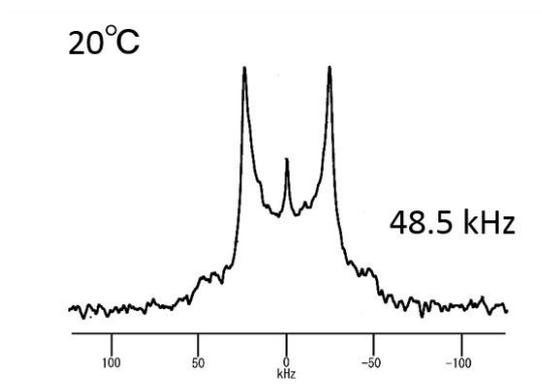
○SM/Chol/6',6'-d₂-DOPC (1/1/1) における ²H NMR スペクトル



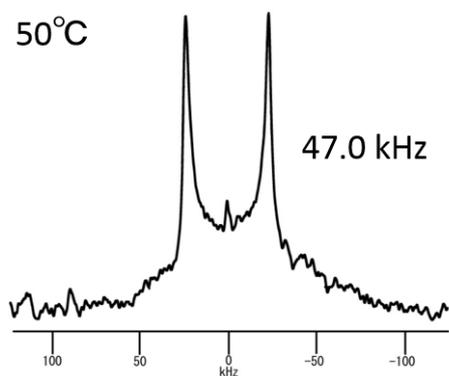
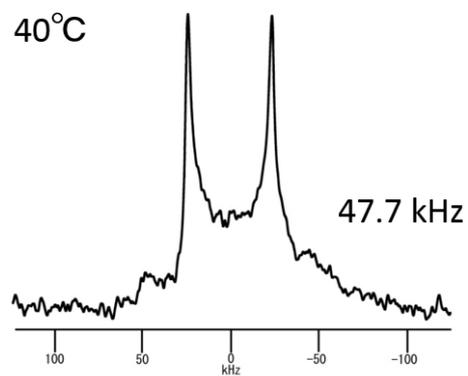
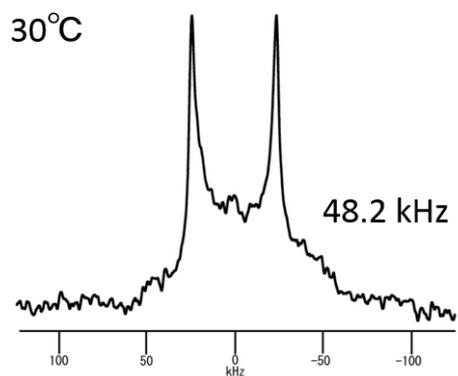
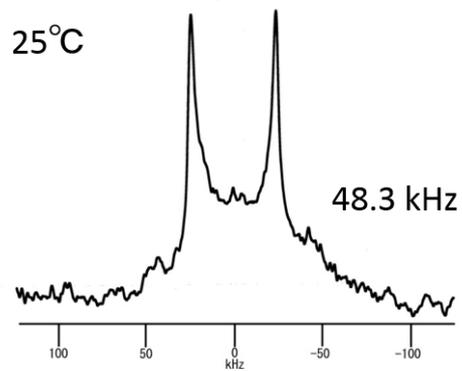
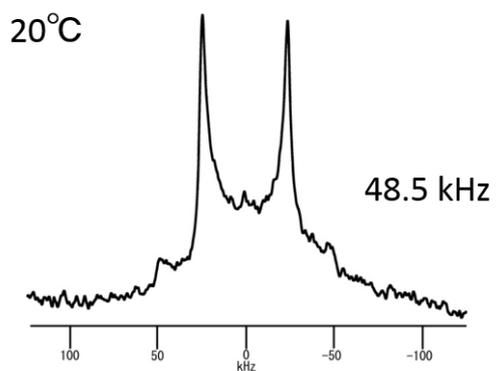
○PSPC/Chol/6',6'- d_2 -DOPC (1/1/1) における ^2H NMR スペクトル



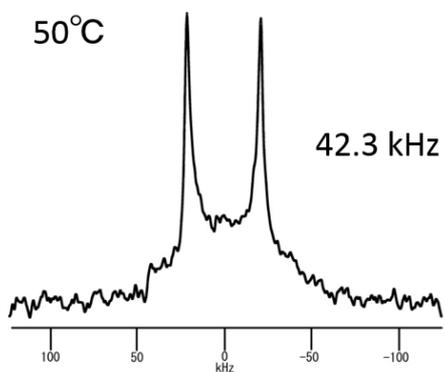
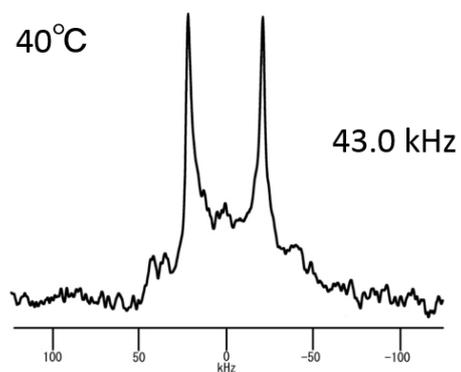
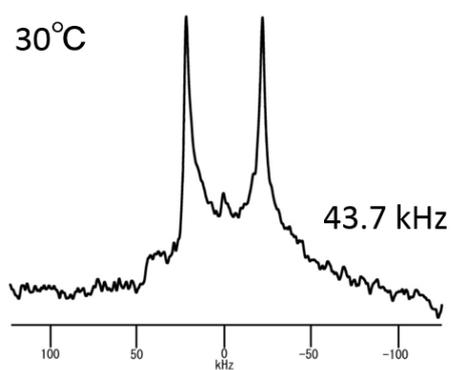
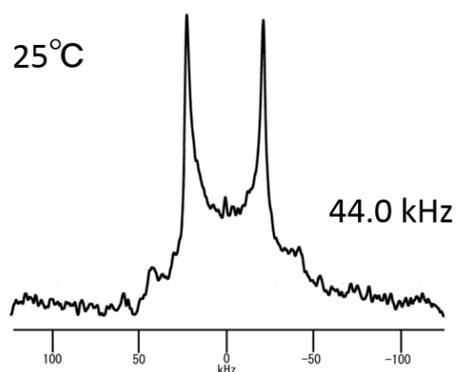
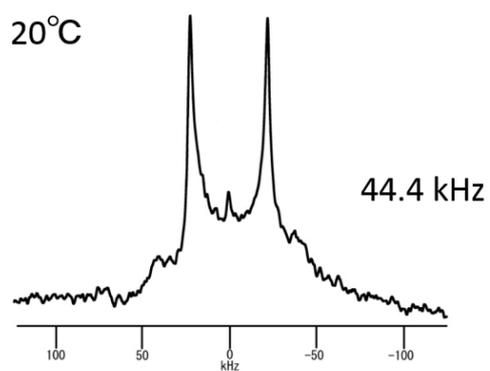
○SM/3-*d*-Chol における ^2H NMR スペクトル



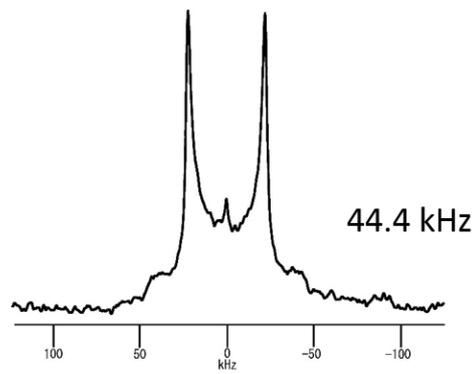
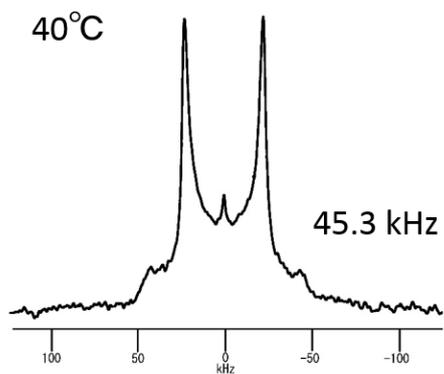
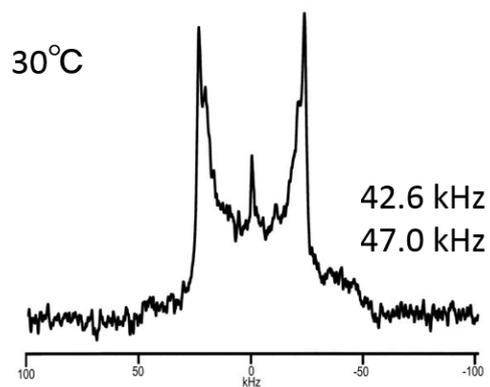
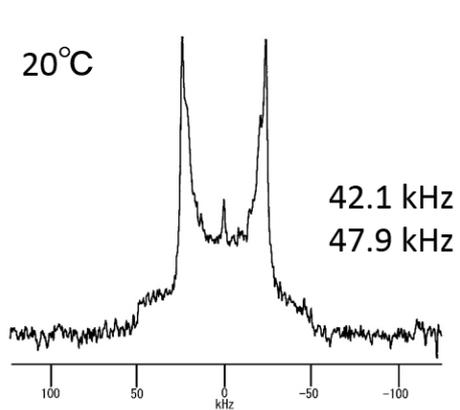
○PSPC/3-*α*-Chol における ^2H NMR スペクトル



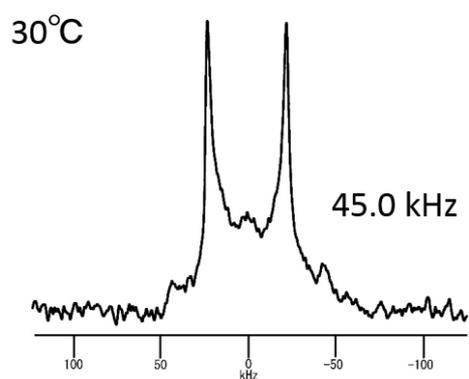
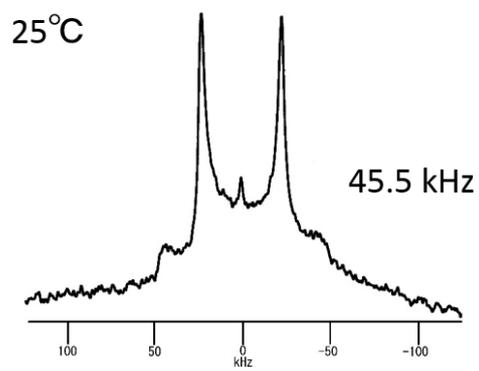
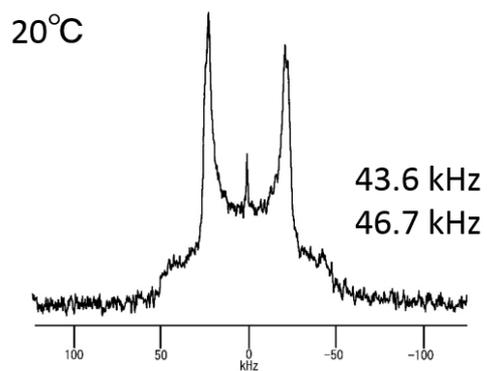
○DOPC/3-*d*-Chol における ^2H NMR スペクトル



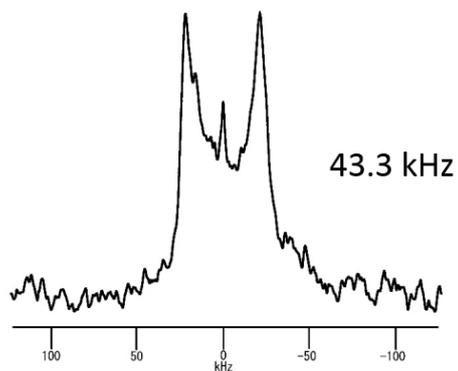
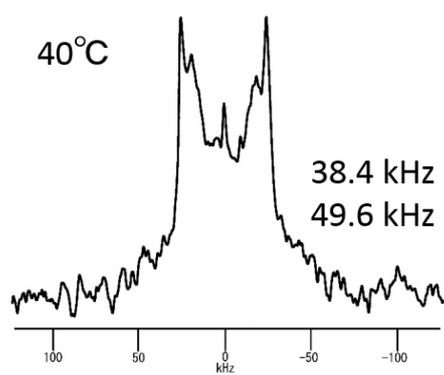
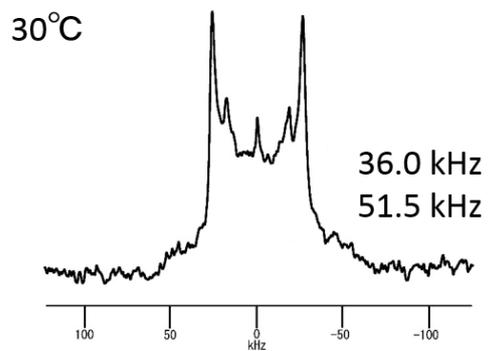
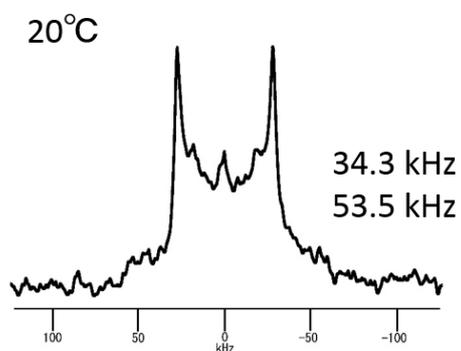
○SM/3- α -Chol/DOPC (1/1/1) における ^2H NMR スペクトル



○PSPC/3-*α*-Chol/DOPC (1/1/1) における ^2H NMR スペクトル

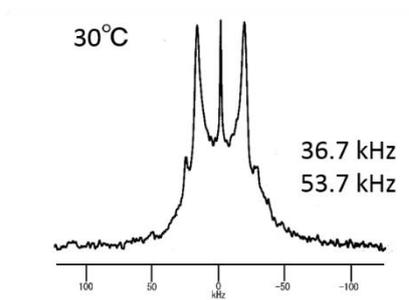


○ $10',10'-d_2$ -SM/DOPC/Chol (1/1/1) における ^2H NMR スペクトル

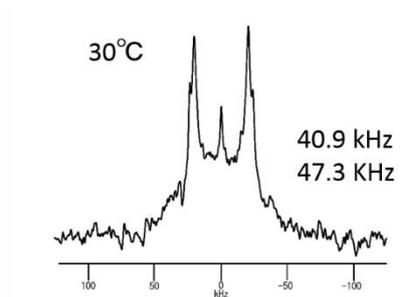


○SM/DOPC/Chol (27/53/20) における ^2H NMR スペクトル

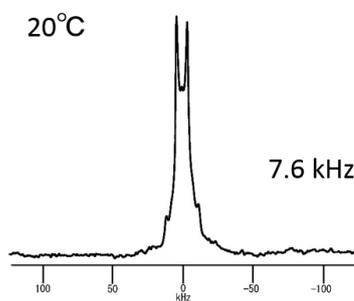
10',10'- d_2 -SM



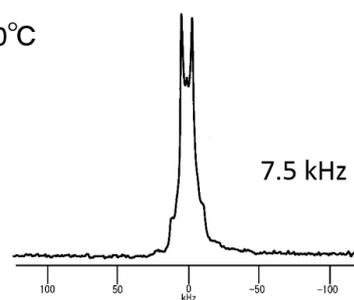
3- d_1 -Chol



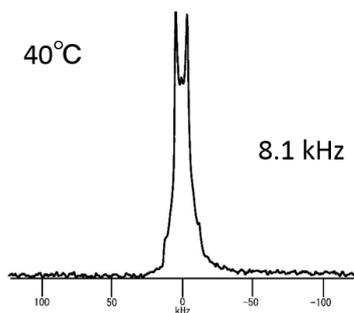
11',11'- d_2 -DOPC



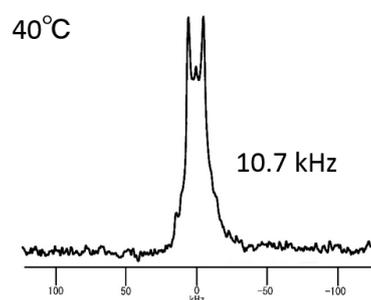
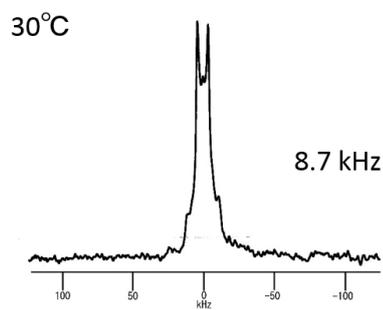
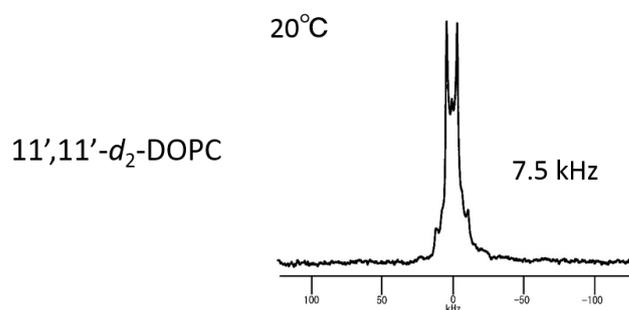
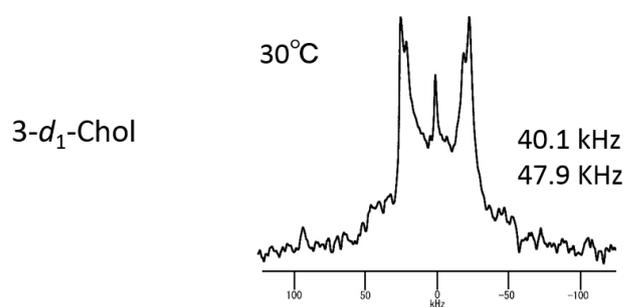
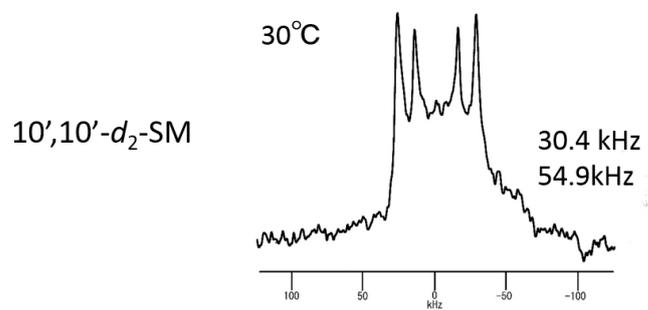
30°C



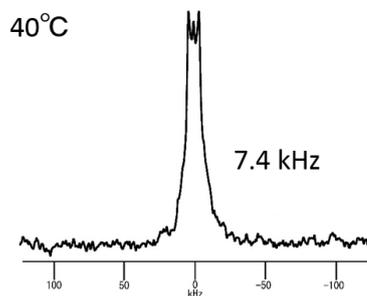
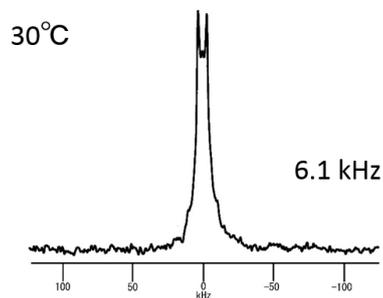
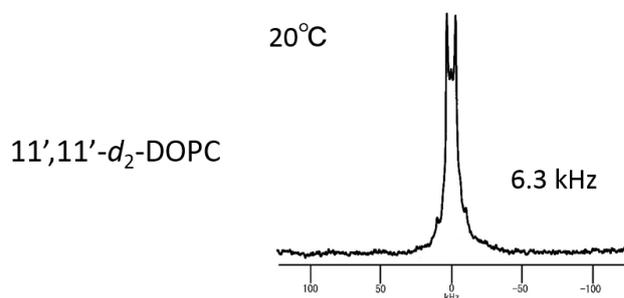
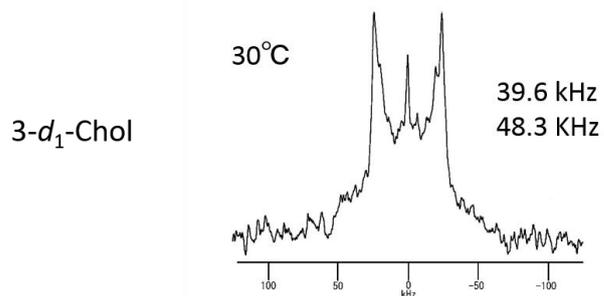
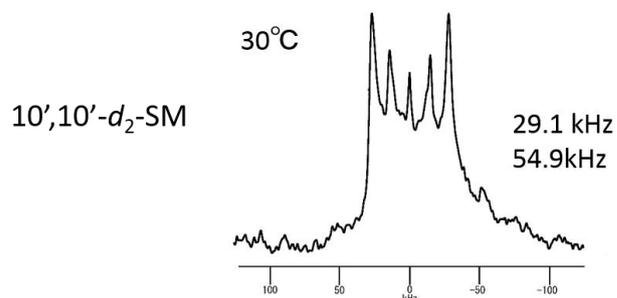
40°C



○SM/DOPC/Chol (40/40/20) における ^2H NMR スペクトル

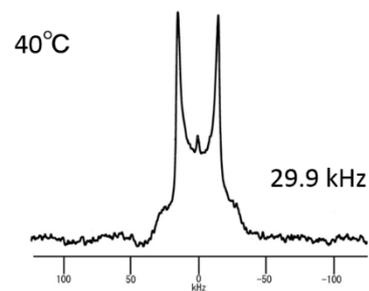
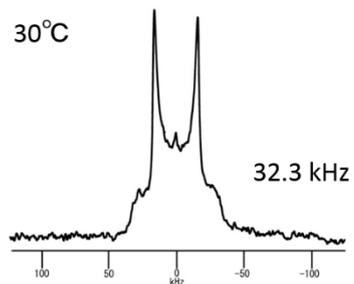
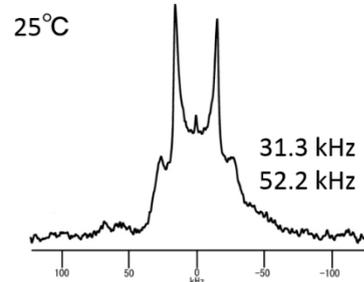
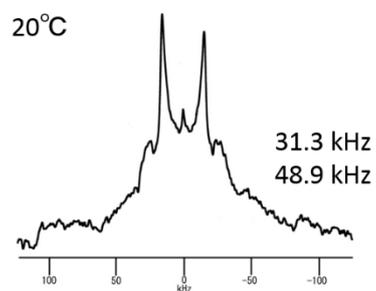


○SM/DOPC/Chol (53/27/20) における ^2H NMR スペクトル

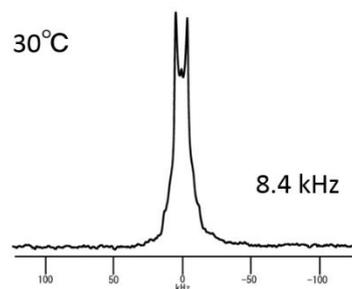
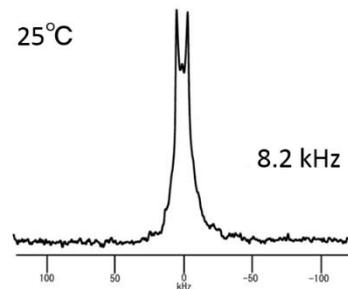
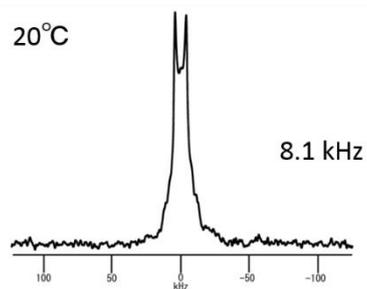


○PSPC/DOPC/Chol (27/53/20) における ^2H NMR スペクトル

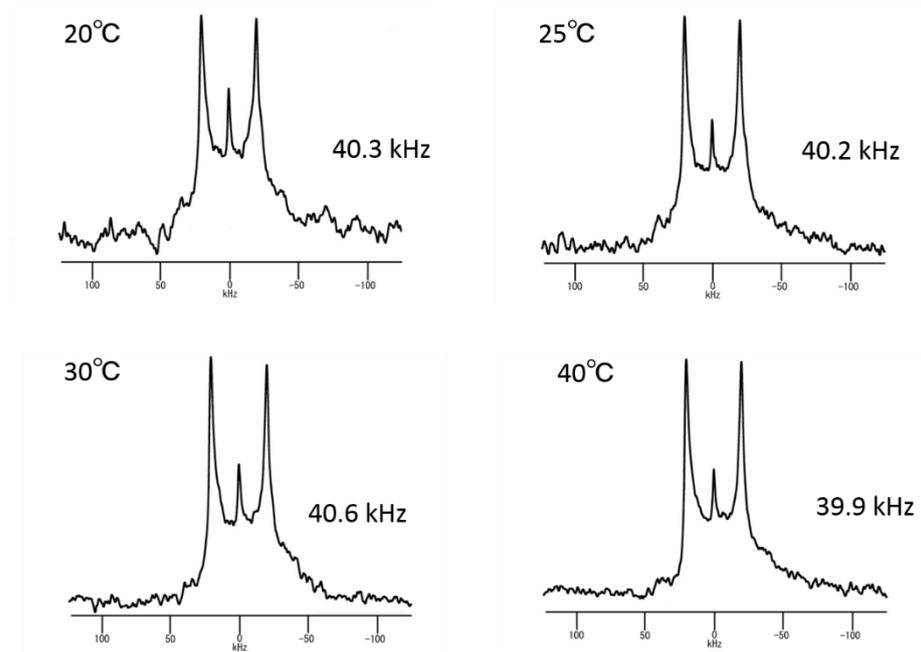
$10',10'-d_2$ -PSPC



$11',11'-d_2$ -DOPC

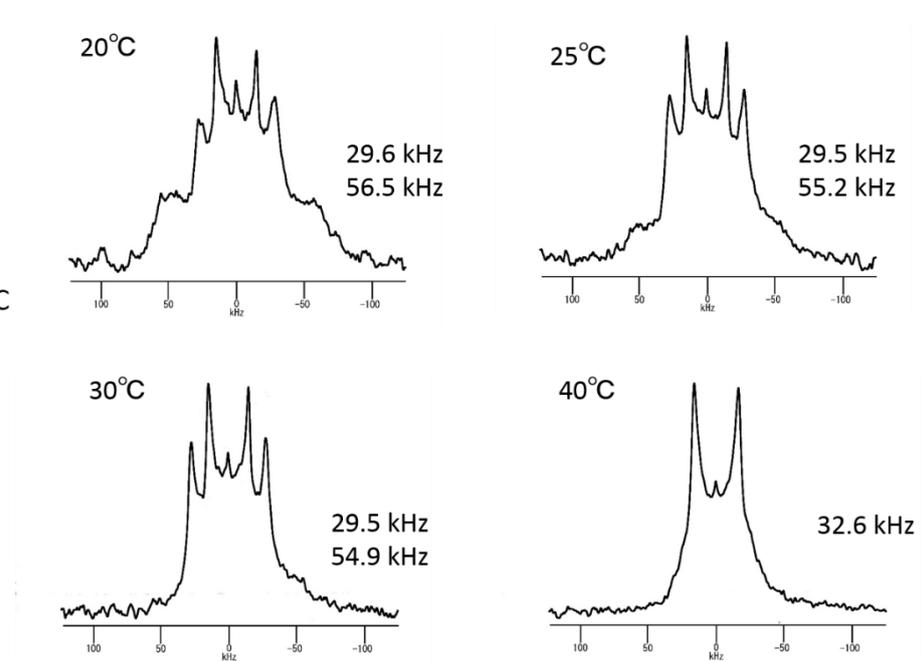


3- d_1 -Chol

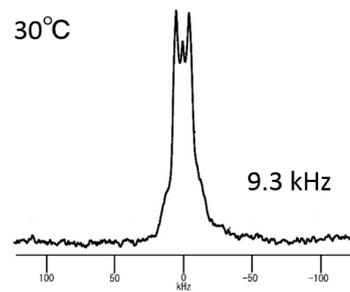
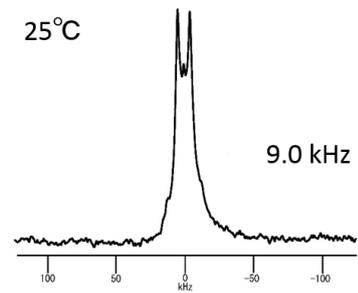
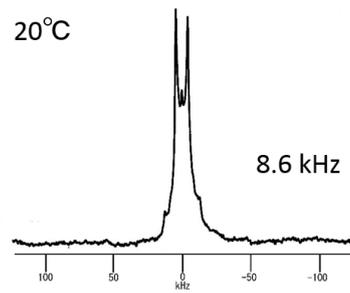


○PSPC/DOPC/Chol (40/40/20) における ^2H NMR スペクトル

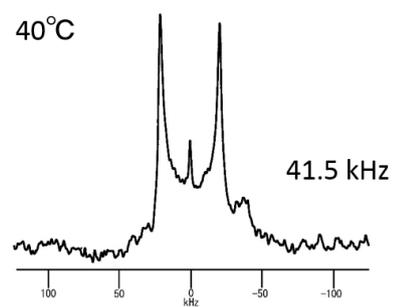
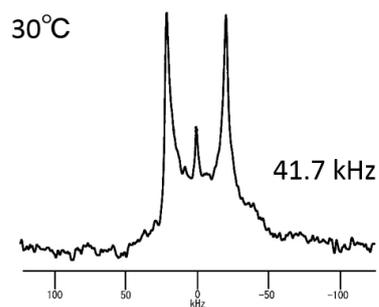
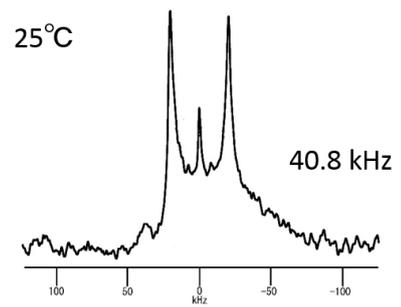
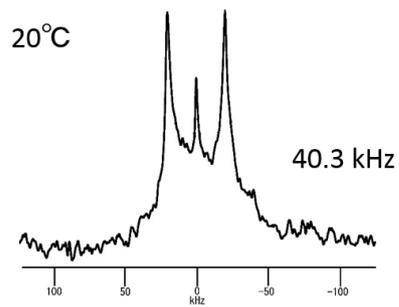
10',10'- d_2 -PSPC



11',11'-d₂-DOPC

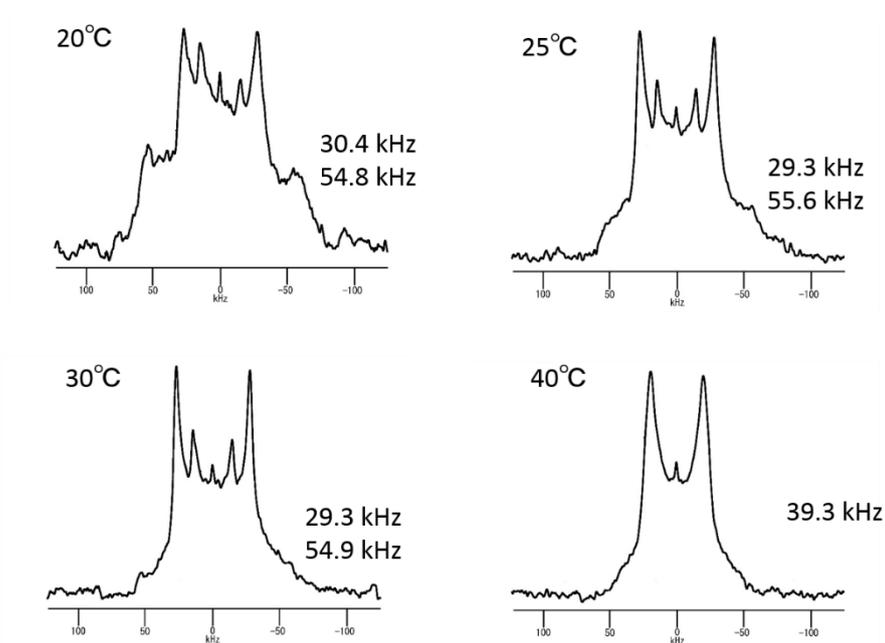


3-d₁-Chol

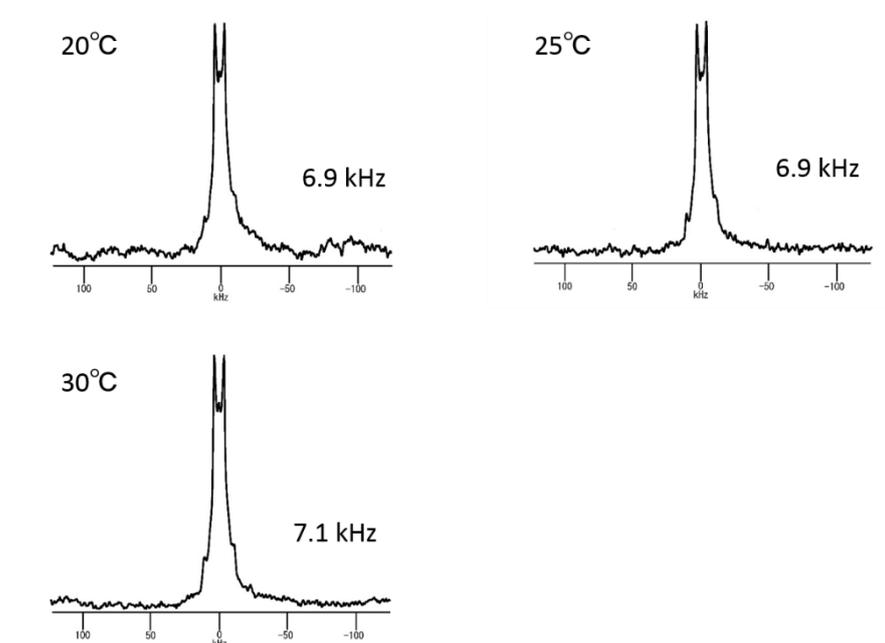


○PSPC/DOPC/Chol (53/27/20) における ^2H NMR スペクトル

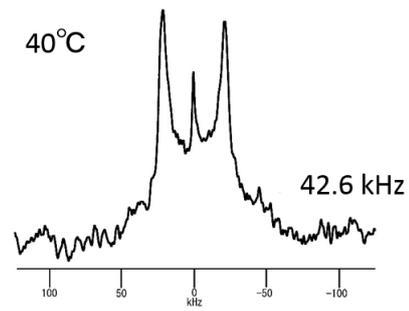
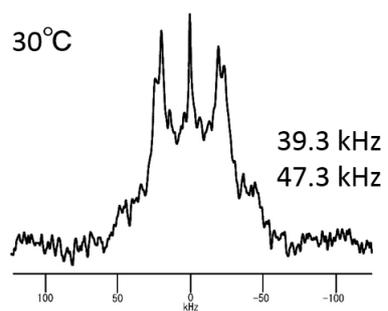
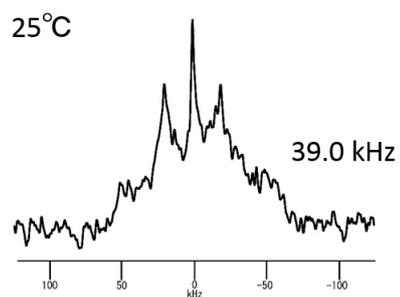
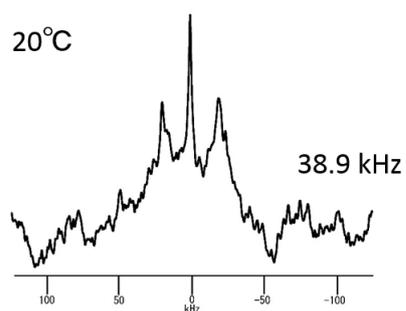
$10',10'-d_2$ -PSPC



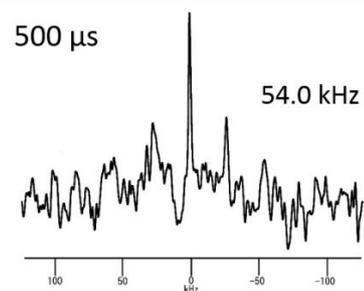
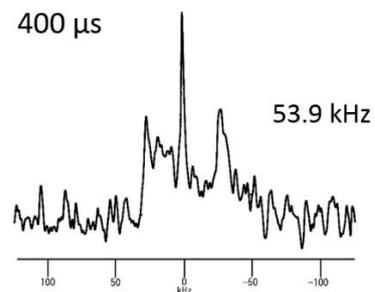
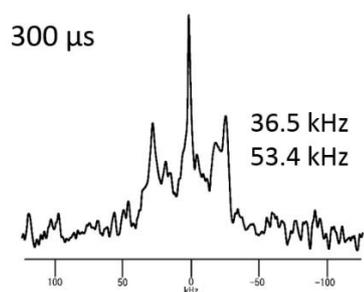
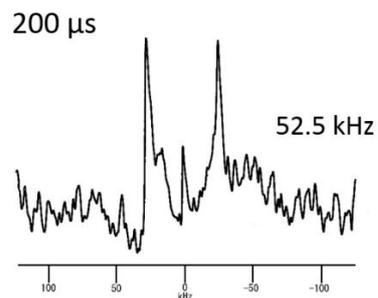
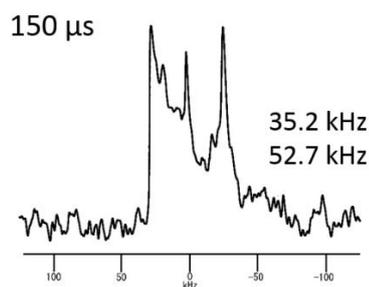
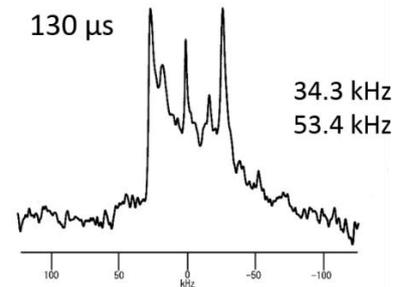
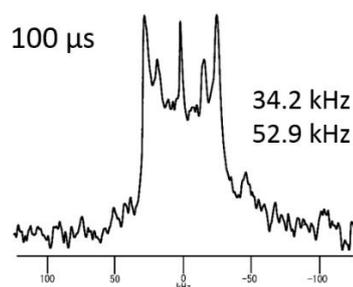
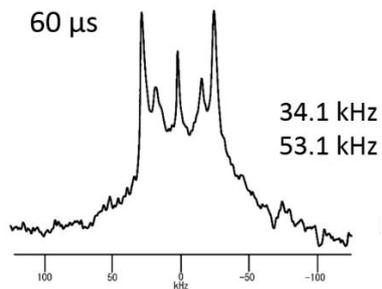
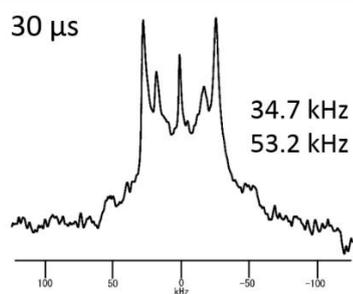
$11',11'-d_2$ -DOPC



3-*d*₁-Chol



○SM/DOPC/Chol (1/1/1) における ^2H NMR スペクトルの
展開時間変化 (30 °C)



謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻くださいました村田道雄教授に深く感謝致します。

直接御指導を賜り、研究を行う上で、有意義な御助言、御討論して頂きました現・九州大学大学院理学研究院化学部門 松森信明教授に深く感謝致します。

蛍光実験を行う上で、有意義な御助言、御討論して頂き、また Finland での留学生活に大変便宜をはかって頂きました Åbo Akademi University, Biochemistry, Department of Biosciences J Peter Slotte 教授に深く感謝致します。

研究のみならず日常生活においても様々な御助言をして頂きました花島慎弥講師、土川博史助教、梅川雄一特任助教に深く感謝致します。

重水素固体 NMR 測定において多大な御協力をして頂きました大阪大学大学院理学研究科技術部 稲角直也博士に深く感謝致します。

DSC 測定、蛍光顕微鏡観察において多大なご協力、御助言をして頂きました ERATO 村田脂質活性構造プロジェクト 木下祥尚特任助教に深く感謝致します。

固体 NMR 測定や合成の実験操作など本研究を行うにあたっての基礎を教えてください、また常日頃から激励してくださいました山口敏幸博士、鈴木孝修士ならびに前田佳子修士に深く感謝致します。

ラフト研究を行う上で、標識体合成など心温まる御支援頂きました Jin Cui 博士、島田真典修士、森祥子修士、中森有沙修士、齋木悠修士、門司真美学士に深く感謝致します。

研究のみならず、日常生活においても御助言頂きました生体分子化学研究室の皆様へ深く感謝致します。

最後に、精神的、経済的に支えてくださいました両親に深く感謝致します。