



Title	膜ドメインの形成を司るスフィンゴリエリンによる脂質分子間相互作用の解明
Author(s)	矢野, 陽
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72658
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

膜ドメインの形成を司るスフィンゴミエリンによる
脂質分子間相互作用の解明

平成 31 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

矢野 陽

目次

第 1 章	序論	
1-1	生体膜の生理機能と構造	1
1-1-a	細胞膜の生理的機能	1
1-1-b	流動モザイクモデル	1
1-1-c	リン脂質の多様性と膜物性	2
1-2	スフィンゴミエリン	4
1-2-a	スフィンゴミエリン(SM)	4
1-2-b	脂質ラフトとその解析法	6
1-2-c	秩序液体相	11
1-3	モデル膜を用いた SM と Cho の相互作用解析	14
1-3-a	SM が形成するモデル膜物性と脂質間相互作用の研究	14
1-3-b	SM の特異的な構造に着目した相互作用解析	17
1-3-c	SM と Cho によるナドメイン形成の解析	21
1-4	研究目的	23
	参考文献	26
第 2 章	Lo ドメイン形成をもたらす SM-SM、SM-Cho 間水素結合の精密評価	32
2-1	<i>ent</i> -SSM、 <i>threo</i> -SSM の合成	33
2-2	2 成分系膜における SM 分子間相互作用の評価	35
2-2-a	示差走査熱量測定	35
2-2-b	SSM 分子間の相互作用評価	36
2-3	SM と Cho 間に働く相互作用の評価	40
2-3-a	重水素固体 NMR	40
2-3-b	固体 NMR 測定を用いた SM-Cho 間の相互作用解析	44
2-4	三成分系膜における SM 分子間相互作用の評価	48
2-4-a	蛍光寿命測定	48
2-4-b	三成分系膜における SM 分子間相互作用の比較とドメイン形成	51
	参考文献	55
第 3 章	三成分系膜中で SM が形成するナドメインの蛍光分光法による解析	57
3-1	SSM と <i>ent</i> -SSM の蛍光プローブ	58
3-1-a	ドメイン観察に用いられてきた蛍光プローブ	58

3-1-b	蛍光標識 <i>ent</i> -SSM の合成	58
3-2	共焦点蛍光顕微鏡を用いた <i>ent</i> -SSM のドメイン観察	60
3-2-a	<i>ent</i> -SSM による Lo ドメイン形成の観測	60
3-2-b	蛍光プローブの Lo ドメインへの分配比	65
3-3	蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を用いた SSM と <i>ent</i> -SSM による ドメインの解析	66
3-3-a	蛍光共鳴エネルギー移動(FRET) を用いたドメイン観測	66
3-3-b	ラセミ膜における SSM と <i>ent</i> -SSM の脂質間相互作用	68
3-3-c	三成分系膜における SSM と <i>ent</i> -SSM のナノドメイン形成の 解析	70
2-3-d	FRET を用いたナノドメインサイズの見積もり	75
	参考文献	84
	第 4 章 結論	87
	第 5 章 実験項	91

略語表

AFM	Atomic Force Microscopy
488SSM	ATTO488-nonaethyleneglycol stearoyl-sphingomyelin
594SSM	ATTO594-nonaethyleneglycol stearoyl-sphingomyelin
Boc	t-Butyloxycarbonyl
BODIPY	Boron-dipyrromethene
br	broad
Bu	Butyl
Cer	ceramide
CHARMM	Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics
Cho	Cholesterol
CME	Cholesterol methyl ether
CSA	Chemical shift anisotropy
DCC	N,N-Dicyclohexyl Carbodiimide
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
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
EGF	epidermal growth factor
ent	enantiomeric
ESR	Electron Spin Resonance
ESI	Electrospray ionization
Et	Ethyl

FCS	Fluorescence correlation spectroscopy
FLIM	fluorescence lifetime imaging microscopy
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FTIR	Fourier transform-Infrared spectroscopy
GPI	Glycosyl Phosphatidyl Inositol
GUV	Giant Unilamellar Vesicle
^2H	deuterium
HIV	human immunodeficiency virus
HMPA	hexamethylphosphoric triamide
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
iSCAT	Interferometric scattering microscopy
Ld	liquid disordered phase
Lo	liquid ordered phase
LUV	Large Unilamellar Vesicle
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
PEG(neg)	Polyethylene glycol
PI	phosphatidyl inositol
PMB	<i>p</i> -methoxybenzyl
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
Red-Al	sodium bis(2-methoxy)aluminum dihydride
REDOR	Rotational Echo Double Resonance
Rf	Rate of flow
RMSD	Root mean square deviation
rt	room temperature
S1P	Sphingosine-1-phosphate
SIMS	Secondary Ion Mass Spectrometry
S _{CD}	order parameter
SM	Sphingomyelin
SPT	Single Particle Tracking
Src	Sarcoma
SSM	stearoyl sphingomyelin
STED	Stimulated Emission Depletion
T ₂	spin-spin relaxation time
TBAF	Tetrabutylammonium fluoride
TBS	t-Butyldimethylsilyl
TCSPC	Time correlated single photon counting
THF	tetrahydrofuran
<i>threo</i> -SM	<i>L-threo</i> -sphingomyelin
TLC	Thin-Layer Chromatography
TFA	trifluoroacetic acid
T _m	main transition temperature
T _p	pre transition temperature
tPA	<i>trans</i> -parinaric acid

第1章 序論

1-1 生体膜の生理機能と構造

1-1-a 細胞膜の生理的機能

生命は細胞によって構成されており、生物の構造上・機能上の基本単位として考えられる。細胞は核や小胞体などの細胞小器官を含有する細胞質と、それを包む細胞膜とで構成されている。細胞膜は細胞質を外界から隔離する物理的障壁としての機能だけではなく、細胞間の情報伝達などの機能を担う複雑な反応系を有している。さらに、特定の化合物やイオンを特定の細胞区画内に保持したり排除したりする選択的な膜透過性を有しており、膜タンパク質からなる極めて選択性の高いチャネルやポンプが恒常的に機能している。細胞膜の有する柔軟性や自己閉環性のような物理的性質は、細胞の形態維持に関与する一方で、細胞分裂やエンドサイトーシスの際に起こる膜の形態変化にも対応できる。このような様々な機能を有する生体膜の普遍的な構造として、脂質分子が形成する脂質二重層が挙げられる。

1-1-b 流動モザイクモデル

細胞膜はリン脂質やステロールなどの脂質と膜タンパク質から構成される脂質二重層構造を有する。細胞膜を構成する脂質分子の種類や割合は、生物種や器官などによって異なるが、普遍的な脂質成分としてリン脂質が挙げられる。リン脂質の構造的特徴として、分子の片側は疎水性のアルキル鎖から成り、もう一方は親水性を有した極性部から構成されている。そのため疎水部同士の相互作用および親水部と水との相互作用により、方向性をもって整列することで脂質二重層が形成される。

細胞膜の機能と構造を説明できる代表的なモデルとして 1972 年に Singer と Nicolson により流動モザイクモデルが提唱された(図 1-1)¹⁾。このモデルではリン脂質の疎水性部分は二重層の中心で互いに向かい合うのに対して、極性部は膜界面で水層と相互作用している。膜タンパク質は疎水性の膜貫通ドメインと脂質の間で働く疎水性相互作用により膜に保持され、脂質二重層を媒体として自由に側方拡散することができる。

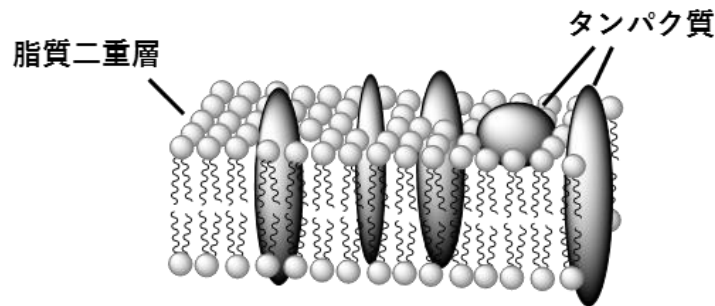


図 1-1 流動モザイクモデル リン脂質は親水性部を外側に向け、疎水性部を内側に
向い合うように並列し、タンパク質はその表面に浮かんでいる、もしくは貫通するように
存在する。このとき、脂質・タンパク質ともに流動性をもち、側方拡散している。

1-1-c リン脂質の多様性と膜物性

生体膜を構成するリン脂質は疎水性の高いアルキル鎖と親水性を有した極性部から成り、主にグリセロリン脂質とスフィンゴ脂質に大別される。グリセロリン脂質はグリセロールに飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸がエステル結合した分子であり、これまでに千種類以上の脂肪酸が報告されている。ヒトの生体膜の主要脂質である 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) はグリセロールの 1 位にパルミチン酸、2 位にオレイン酸を有し、3 位に多様な極性頭部の構造を持つ (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) やホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol, PI) などが挙げられる。

スフィンゴ脂質は、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に脂肪酸がアミド結合したセラミド骨格構造を有する(図 1-1b)。スフィンゴ脂質には、スフィンゴミエリン (sphingomyelin, SM)、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) やスフィンゴ糖脂質を含む。

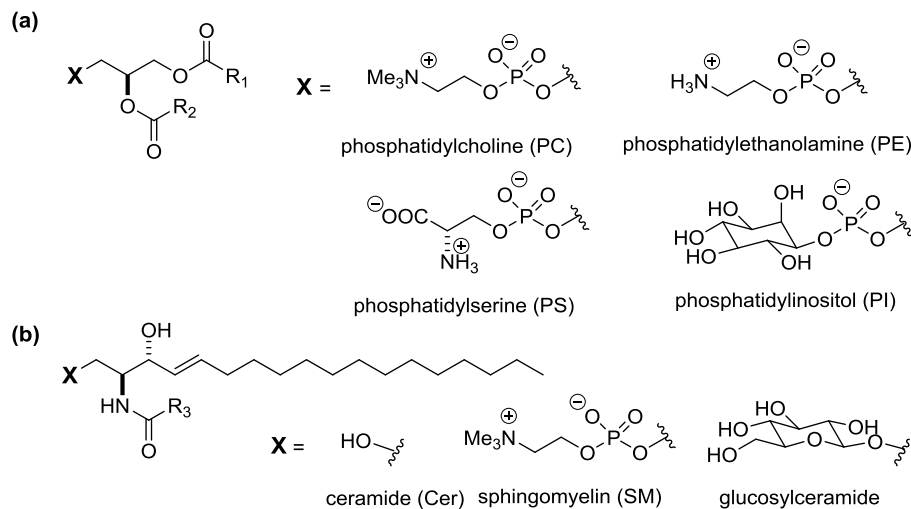


図 1-2 細胞膜を構成する代表的な脂質 (a) グリセロリン脂質 (b) スフィンゴ脂質 (SM)；グリセロリン脂質は、グリセロールの sn-1 位と sn-2 位に R_1 、 R_2 で示される飽和脂肪酸もしくは不飽和脂肪酸がそれぞれエステル結合している。一方、SM は R_3 で示す脂肪酸がアミド結合で結合している。

脂質二重層の物性は構成する脂質分子の種類により決定される。頭部が小さい PE やセラミドは疎水性部分の面積に比べて、親水性部分の面積が小さいため、負の自発曲率を示す。一方で、リゾホスファチジン酸やガングリオンドの頭部基は大きく、正の自発曲率を有する。実際に、生体内における膜融合や小胞形成といった膜の曲率変化が関与する生命現象に、これらの脂質が関連していることが報告されている²⁻⁴⁾。

酸性リン脂質である PS や PI は、膜表層に負電荷を露呈させる。このような膜上の電荷は、タンパク質の塩基性アミノ酸残基と電気的に作用することで、膜タンパク質を膜内に安定に留めておく役割を担う⁵⁾。このように、脂質分子の頭部基構造は生体膜中での膜物性を調節して、細胞機能の発現に大いに関連している。そのため、脂質の分子構造とその膜物性の相関に着目した研究が盛んに行われている一方で、一連の生体膜機能は非常に複雑であり、脂質分子が細胞機能にもたらす寄与については明白でない。

1972 年に流動モザイクモデルとともに、Bretscher により生体膜中の非対称性が提唱された⁶⁾。実際の生体膜では内葉と外葉は種類の異なる脂質分子で構成されているため、膜を構成する脂質分布が膜の内側と外側で非対称である。このような非対称性は細菌から動植物に至るまで、全ての生物種の正常細胞が有する普遍的な性質といえ

る。一般的な脂質分子種の分布としては、PC や SM が外葉に、PE や PS が内葉に多く存在することが報告されている⁷⁾(表 1-1)。特に、SM と Cho は脂質ラフト形成を通じて、外葉中に維持されていると考えられている⁸⁾。しかし、コレステロールは細胞質側に豊富に存在するという報告もあり⁹⁾、Cho の分布については実験的に証明されておらず、明白でない。細胞では、このような非対称な脂質組成により多様な生理機能が制御されている。非対称性の変化は、細胞分裂や細胞極性、アポトーシスなどの生命現象の制御に関与している。また、細胞膜表面上で SM が分解されることで Cer の生成を伴った非対称性の崩壊がおこり、アポトーシスが誘導される¹⁰⁾。この非対称性が崩壊する主要因の一つとして、脂質ラフト形成の阻害が考えられている⁸⁾。

このように、生体膜中のリン脂質の非対称分布は細胞機能の維持において非常に重要な役割を担っており、特にその非対称性の維持に不可欠な脂質間相互作用の分子レベルでの解析が望まれている。

表 1-1 細胞膜を構成するリン脂質の脂質二重層外葉に分布する割合⁷⁾

	% (外葉に含まれる割合)				
	PC	SM	PE	PS	PI
赤血球(man)	78	79	21	8	
赤血球(rat)	62	100	20	6	
血小板(man)	45	93	20	9	16
血小板(pig)	40	91	34	6	
ヒト腎刷子縁	34	80	23	15	
肝細胞(rat)	85	63	50		
脳シナプトソーム(mouse)			10~15	20	

1-2 スフィンゴミエリン

1-2-a スフィンゴミエリン

生体膜を構成する主要なスフィンゴ脂質としてスフィンゴミエリン(sphingomyelin, SM)が挙げられる。SM は哺乳類の細胞を構成する膜脂質に 2~15%の割合で存在し、細胞膜に存在するスフィンゴ脂質の約 85%を占める¹¹⁾。1880 年代 Johann Thudichum によってヒト脳組織から単離された¹²⁾。その構造は 1927 年に決定され¹³⁾、極性部はホスホリルコリンであり、骨格構造はグリセロールではなくスフィンゴシン塩基であることが明らかとされた。SM の炭化水素鎖はこのようなスフィンゴシン鎖とアシル鎖の 2 本により

構成される。スフィンゴシン鎖は 1,3 位にヒドロキシ基、2 位にアミノ基、4-5 位間にトランスオレフィンを含む C18 の炭素鎖から成る特徴がある。天然に存在するスフィンゴ脂質の 2 位と 3 位の立体化学は D-エリスロ (2*S*,3*R*)である¹⁴⁾。2 位のアミノ基にアミド結合したアシル鎖は、単離される動物組織によって炭素数や不飽和度が異なる。一般的に、炭素鎖長の異なる飽和なアシル鎖であることが多いが¹⁵⁻¹⁷⁾、不飽和結合を有する場合はアシル鎖の末端に近い 15 位に位置していることが多い¹⁷⁾。そのため SM は、不飽和鎖を有する PC とは異なり、脂質膜中で比較的強い脂質間の疎水的相互作用を有すると考えられている。また、SM はアミドおよびヒドロキシ基を有しているため、脂質やタンパク質との水素結合形成能が高い。これは供与性プロトンの無いグリセロリン脂質と大きく異なっている。

SM は細胞膜外葉に多く存在しているが、内葉にも 10～20%の割合で存在している。これらの SM が細胞膜内葉に存在している中性スフィンゴミエリナーゼによって分解されることで Cer とホスホリルコリンが生じる¹⁸⁾。Cer は細胞内脂質シグナル分子として機能して、アポトーシスや細胞分化を制御するタンパク質の活性化に関与する^{10,19,20)}。また、Cer から SM 合成酵素によって SM が再合成されることから¹⁸⁾、脂質ラフトに存在する SM はシグナル分子のプールとして機能している。さらに近年、細胞をスフィンゴミエリナーゼ処理することで外葉中の SM を消失させると、Cho の非対称分布が崩壊することが報告されている⁸⁾。これは、細胞膜の外葉に存在している SM が Cho と相互作用することで、Cho を外葉に維持していることを示唆している。また、脂質ラフトが崩壊することで内葉に存在する PE や PS が外葉に露出することからも脂質ラフトは生体膜脂質の非対称性維持に大きく関与していると考えられている。このように、生体膜を構成する脂質分子のなかで、SM は生理学的に非常に重要な物質であることがわかる。

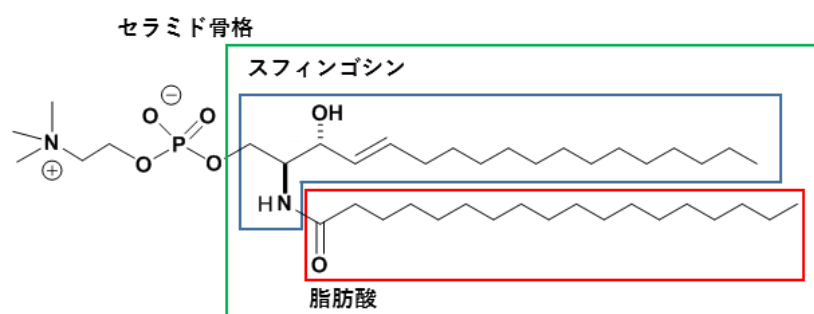


図 1-3 スフィンゴミエリン(SM)の構造

1-2-b 脂質ラフトとその解析法

SM は、生体膜中における脂質ラフトを構成する主要な脂質の一つとして知られている。細胞膜上に脂質が集めたドメイン構造の存在は、1970 年代から議論されてきた。1997 年になって、Simons らが界面活性剤に不要な画分に対して脂質ラフトという名称を与えることによって、この概念を一般化した²¹⁾。脂質がドメインを形成することでタンパク質の機能発現に必要なプラットフォームを提供しており(図 1-4)、特定の脂質およびタンパク質が共存した状態で側方拡散している。このドメインを流動膜に浮かぶ筏になぞらえて脂質ラフトと名付けた。

脂質ラフトは、当初、界面活性剤不溶性画分(detergent-resistant membrane, DRM)として細胞から単離された。この DRM には SM やガングリオシドといったスフィンゴ脂質や Cho だけでなく、GPI アンカー型タンパク質や脂質ラフト局在性の膜タンパク質を多く含む^{22,23)}。また、SM と Cho を含む人工膜中においても SM と Cho に富むドメイン構造が観測されることから、脂質ラフトはスフィンゴ脂質同士、あるいはスフィンゴ脂質と Cho 間の分子間相互作用によって形成されていると考えられている。スフィンゴ脂質の飽和な炭化水素鎖やステロールとの間に働く疎水的な相互作用と、セラミド骨格を介した脂質分子間の水素結合が複合的に作用して脂質ラフトを安定化すると考えられている²⁴⁾。実際に、Cho やスフィンゴ脂質の非存在下では、脂質ラフト形成がおこらないことが観測されており^{25,26)}、スフィンゴ脂質と Cho は脂質ラフトに必要な不可欠な構成要素となっている。

脂質ラフト仮説により、膜輸送やシグナル伝達といった生体膜の動的プロセスには、膜タンパク質だけでなく、膜を構成する脂質の関与が示唆された。また、脂質ラフトはカベオラ形成や細胞膜における非対称性といった細胞の形態維持にも関与する。脂質ラフトは細胞膜における不均一構造を誘起して、細胞機能の一端を担っている。これまでに、脂質ラフトは細胞内小胞輸送²⁷⁾や免疫応答²⁸⁾などへの関与や、インフルエンザウイルスや HIV ウイルスの感染²⁹⁾、発がんやアルツハイマー病といった疾病^{30,31)}と関連することが報告されている。また、SM 合成酵素、G タンパク質、Src ファミリーキナーゼ、EGF 受容体、アセチルコリン受容体など非常に多種類の膜タンパク質が脂質ラフトに集積し、その機能を発現していることが明らかになりつつある^{32,33)}。そのため医学的・薬学的観点からも非常に関心が集まっている一方で、脂質ラフトの詳細な形成機構やサイズといった物理的・化学的実態についての詳細は、明らかになっていない。

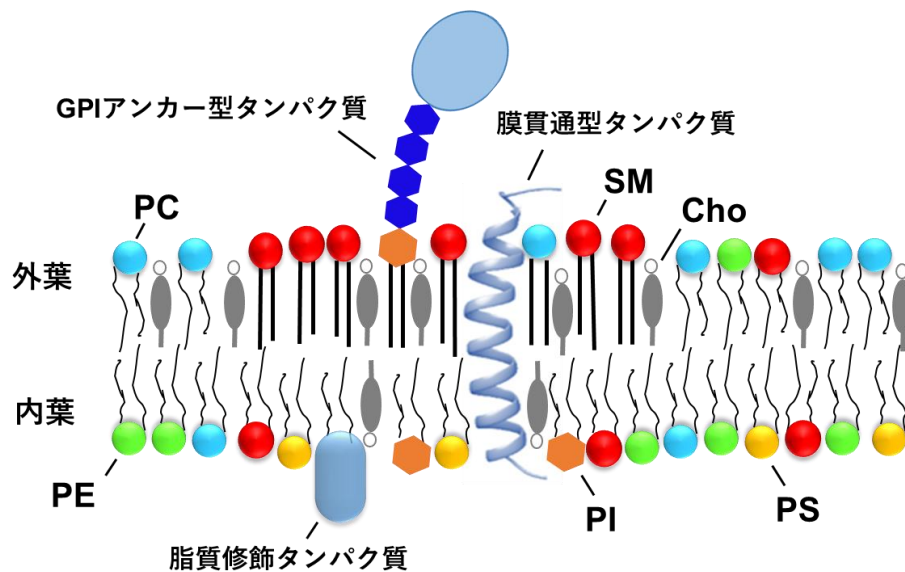


図 1-4 生体膜における脂質ラフトの概略図 外葉中の SM は Cho と共に脂質ラフトを形成する。

脂質ラフトモデルが提唱された発端として、以下のような低温下での界面活性剤不溶性実験が挙げられる。通常、不飽和脂質鎖を持つグリセロリン脂質の膜を界面活性剤 TritonX-100 で処理すると、膜が破壊され脂質が懸濁・溶解する。しかし、細胞膜に対して低温下で TritonX-100 処理し、ショ糖密度勾配超遠心を用いた分画を行うと、低密度のフラクションに TritonX-100 不溶性画分(DRM)が得られる^{22,23)}。この DRM が、脂質ラフトであると考えられていた時期もあり、両者の関係が議論されてきた。DRM の脂質組成としては、Cho が 30~50 mol%、SM は 10~15 mol%、スフィンゴ糖脂質は 10~20 mol%含まれている³⁴⁾。その一方で、全脂質中で約 60%存在している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 GPI アンカー型タンパク質や種々の膜タンパク質も含まれている³⁵⁾。

しかし、DRMは細胞膜を低温下で界面活性剤処理して得られるものであり、生理的条件下とは大きく異なる。また、界面活性剤はドメイン構造の再編成を行う性質があるため、この手法では界面活性剤を加える前から存在していたドメインと、界面活性剤によって形成されたドメインを区別できないという致命的な問題点を抱えている^{36,37)}。したがって、このような界面活性剤を用いた実験は脂質ラフトの構成成分を単離するための手段としては有効であるが、脂質ラフトが実際の膜中で形成されていることを示す直接的な証拠にはなり得ない。

細胞膜上の脂質ラフトなどのドメインを観測する方法として、SM や GM1 のようなラフト脂質に特異的に結合する蛍光標識化タンパク質を用いて間接的に検出する方法がある。例えば、SM を特異的に認識するタンパク質毒素であるライセニンやエクイナトキシンがラフトの研究によく用いられている。ライセニンの SM は、数分子でクラスター化している SM に対して結合する³⁸⁾。一方、エクイナトキシンは SM の状態に依存せず、SM 一分子に結合する³⁹⁾。Makino らはこれらの性質を利用し、緑色蛍光タンパク質 GFP を無毒化したライセニンやエクイナトキシニンに導入し、細胞表面の SM の分布を観測した⁴⁰⁾。その結果、Cho を欠損させた HeLa 細胞では通常の細胞に比べてライセニンの染色は大きく減少した一方で、エクイナトキシニンの染色に対する影響は小さかった。このことは、Cho の欠損により SM のクラスター化が抑制されることを示唆している。しかしながら、ライセニンの SM クラスター認識機構はよくわかっていない。また、コレラ毒素のように、GM1 糖鎖に結合する五量体タンパク質は GM1 分子のクラスター形成を誘導する性質があることが報告されている⁴¹⁾。このように、脂質結合タンパク質を用いる場合は、タンパク質導入による人為的なドメイン形成を注意深く考慮する必要がある。したがって、脂質ラフトを観測するには、複雑な結合タンパク質を観察するよりも、ラフトの構成脂質分子そのものを観測する方が正確である。

そのため、これまでに脂質分子を蛍光標識したプローブの挙動がしばしば観察されてきた。例えば、ボロン-ジピロメテン基(BODIPY)を PC のアシル鎖に導入した BODIPY-PC や、ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール(NBD)を DOPE の頭部に結合させた NBD-DOPE を細胞に取り込ませ、観測を行った例が報告されている⁴²⁻⁴⁴⁾。Cho についても側鎖の末端に NBD や BODIPY を共有結合した蛍光標識体が用いられてきた⁴⁵⁾。しかし、脂肪鎖に蛍光団を導入すると、脂質ラフトへの分布や、フリップ・フロップ、細胞内輸送などに顕著な影響を与えることが知られている^{46,47)}。これは、脂質間相互作用に重要な脂肪酸鎖に蛍光団を導入することで脂質の性質や膜構造が変化することが原因である。従って、これらの蛍光脂質プローブの挙動はラフト脂質と異なるため、蛍光イメージングによって脂質ラフトが観測されているとはいえない。難しい。

そこで、Eggeling らは飽和リン脂質のヘッドグループにリンカーを介して、蛍光発色団を導入した蛍光プローブを報告している⁴⁸⁾。これは、ラフト形成に重要とされている脂質同士の疎水的相互作用に蛍光発色団が影響を与えないように、親水性の長鎖 PEG リンカー介して脂質頭部に結合させることで、蛍光発色団を脂質膜表面から遠ざけた分子設計になっている。さらに、彼らは微小な脂質ラフトを検出するために、誘導放出抑制(STED)蛍光顕微鏡を用いて細胞膜上のナノサイズ領域内を拡散する蛍光

標識化脂質を観測した(図 1-5)⁴⁹⁾。彼らは観測領域を回折限界の約 70 分の 1 以下のスポットサイズに調整することで、スフィンゴミエリンと GPI アンカー型タンパク質がグリセロリン脂質とは異なり、直径 80 nm 以下の範囲に一時的に捕捉される(約 10~20 ms)ことを報告した。さらに、コレステロールオキシダーゼや β シクロデキストリンを加え、膜中の Cho 量を減少させると、蛍光標識化脂質の捕捉が減少することも明らかにした。これらの結果は、提唱されているラフトのサイズや性質と一致しており、脂質ラフトの比較的正確な観測を実現したと考えられる。また、 ^{15}N 標識したスフィンゴ脂質と ^{18}O 標識した Cho を発現させた細胞を超高空間分解能二次イオン質量分析装置(NanoSIMS)で観測した際には、Cho は生体膜に均一に分布する一方、スフィンゴ脂質がナノサイズのドメインに集積していることが報告されている^{50,51)}。また、一分子追跡を用いた Kusumi らの観察結果では、GPI アンカー型タンパク質 CD59 が平均 100 nm サイズのコンパートメントに約 25 ms 滞在することから脂質ラフトの寿命とサイズを推定している⁵²⁾。2 分子の蛍光分子間で励起エネルギーが移動することを利用した蛍光共鳴エネルギー移動法 FRET (fluorescence resonance energy transfer)⁵³⁾や金コロイド粒子で標識した脂質を観察する一分子追跡^{54, 55)}などからもナノメートルサイズのドメインに Cho 依存的なクラスター形成が起こることが明確になりつつある。これらの研究成果と共に、2006 年の Keystone symposium において脂質ラフトは「直径 10—200nm の不均一で非常にダイナミックなステロールとスフィンゴ脂質に富んだ膜ドメイン」であると定義されている⁵⁶⁾。

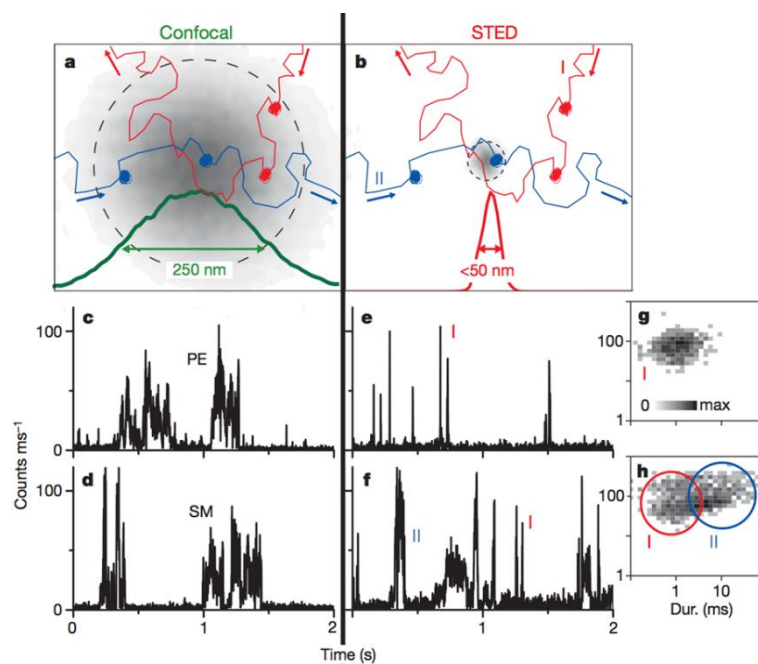


図 1-5 共焦点蛍光顕微鏡観測と STED 顕微鏡観測の比較 (a) 共焦点顕微鏡による従来の観測領域 (b) STED 顕微鏡における観測領域を示した。50 nm 程度にまで調整できる。(c,d) 共焦点顕微鏡の観測領域における蛍光標識化 SM と PE の挙動について、SM と PE の差を観測できていないが、(e,f) 観測領域を回析限界以下にすることで PE より SM の方が観測領域内に長く捕捉されていることを明らかにした。(g) I に示すようにナノスケールの観測領域における PE の捕捉時間は 1 ms 付近が多いが、(h) II で示すように SM では、10 ms 程度が約 50% 存在する。PE より SM の方が拡散の速度が遅く、SM が 50 nm 程度の観測領域内に一時停留するドメインを形成していることを示唆している。 Reprinted with permission from *Nature*. 2009.⁴⁹ Copyright © (2008) Springer Nature.

当研究室においても、ポリエチレングリコール(PEG)リンカーを介して親水性の蛍光分子を SM の極性頭部基部分に導入した SM 蛍光プローブを開発した⁵⁷⁾。この蛍光プローブは SM 極性部が有する電荷を保持するように設計され、親水性の蛍光団を膜から遠ざけることで SM 分子の性質を維持している。また、Eggeling らが用いた 27 nm 程度の PEG リンカーを有する蛍光プローブと異なり、PEG リンカーの長さを 4 nm 程度に抑えることで PEG の凝集を抑制している。この蛍光プローブを用いて細胞膜上での一分子観測を行ない、プローブ 2 分子が 200 nm 以内に共局在する時間を生細胞環

境下で観察した。その結果、SM が 48 ms の共局在時間を示し、不飽和グリセロリン脂質 DOPC や飽和グリセロリン脂質 DSPC より 10 ms 程度長いことが明らかとなった。このことは、セラミド骨格を有する SM の共局在が特異的に安定化されていることを示している。また、メチル- β -シクロデキストリンを用いて Cho を引き抜きた脂質膜を用いた場合、標識化 SM 同士の共局在時間が減少したことから、SM 同士の共局在の安定化には Cho が重要であることを示している。これらの結果から、セラミド骨格を有する SM が Cho と特異的に相互作用する、もしくは Cho による膜物性の変化が SM のドメイン形成を安定化することで SM の共局在性を高めて脂質ラフトの形成が促進されると考えられる。このように、脂質分子を直接標識することで脂質ラフトの直接的な可視化が可能になるとともに、解析技術の向上によりラフト脂質の集積・解離といった動態が明らかになりつつある。ただし、蛍光標識を脂質頭部に導入した場合には、タンパク質そのものと非特異的な相互作用をする可能性があるので、標識化脂質を用いた観測結果の解釈には注意が必要である。

脂質ラフト形成を考える上で、複雑な生体膜中の脂質に働く相互作用を分子レベルで理解して、さらにドメインの大きさを明確に決定することは未だ困難である。特に、蛍光プローブの挙動からも脂質ラフトの形成が示唆されているが、元の脂質ではなく、あくまでも人工的に標識された蛍光プローブの分配であり、スフィンゴ脂質や Cho 自身のドメイン形成における役割まで明らかとなっていない。まず、脂質ラフト形成を議論する上で、ラフト形成に最も重要なスフィンゴ脂質や Cho 間に働く相互作用を分子レベルで精密に理解し、ラフト脂質の特異性を明らかにする必要がある。

1-2-c 秩序液体相

脂質ラフトにおける脂質分子間の相互作用を明らかにするため、生体膜を簡略化した人工モデル膜を用いた研究が盛んに行われている。モデル膜では、構成する脂質の種類はごく限られており、複雑な膜タンパク質も存在しないために、脂質間に働く相互作用の特徴や性質について精密に評価することが可能である。また、その調製方法も容易であり、脂質の性質を調べる上で幅広く用いられている。一般的に飽和グリセロリン脂質 DPPC や SM のような脂質により構成された二分子膜は、室温では密に充填されたゲル相(gel phase, S_0)をとる(図 1-6a)。ゲル相では、疎水部分の炭化水素鎖がすべてアンチ型に近い配座をとり、互いに強く疎水的相互作用をしている。ゆえに

脂質の側方拡散運動は抑えられている。

この脂質膜の相状態は系の環境変化(温度、圧力、溶媒置換など)によって大きく変化する。例えば、SMを始め多くのリン脂質で、ある温度を境にしてゲル相から液晶相(liquid crystalline phase, Ld 相)へ相状態が変化する現象(相転移)が知られている。これは脂質間に働く相互作用のエネルギーより、それを断ち切って脂質が自由に運動することによるエントロピーの利得が大きくなることで生じる。SMの相転移に伴う融解現象は、界面付近に位置するセラミド骨格を介した分子間水素結合により、アルキル鎖末端側から順に伝わる^{58,59)}。Ld相では、脂質の炭化水素鎖の配座交換が促進されており、部分的にゴーシュ配座を取る脂質が生じる。そのため、ゲル相のように密に充填されることができず分子間に働く相互作用は弱い(図 1-6a)。また、脂質分子は側方拡散運動や軸回転運動などがゲル相よりも盛んに起きている。また、DOPCのように不飽和な側鎖を持つ脂質は、シス二重結合に起因するアシル鎖の折れ曲がりによって脂質の密度が低いため、 T_m より高い温度である生理条件において液晶相をとっている。

このような脂質アシル鎖の充填状態の違いは相分離を引き起こす。相分離は、転移温度の異なる二種類以上の脂質成分からなる膜において、ある特定の脂質組成と温度領域において脂質がお互い混ざり合わないことで起こる。この時の二相共存状態を図 1-6b に示す。例えば、室温環境下でゲル相を形成する SM と液晶相を形成する DOPC の二成分混合膜中では、ゲルー液晶の相分離が起こる。この場合、ゲル相では SM は強い分子間相互作用により側方拡散が抑えられているため、硬いドメインを形成する。

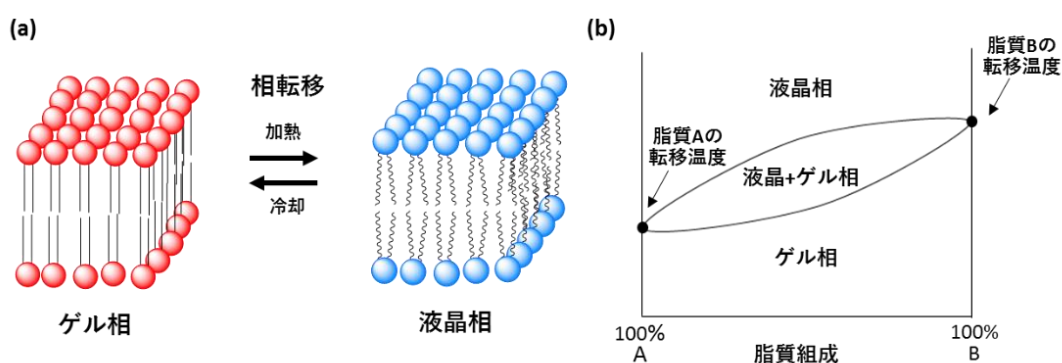


図 1-6 (a)脂質二重層のゲル相および液晶相の模式図 (b)相転移温度の異なる 2 種類の脂質(A, B)による二成分膜の相図 相転移温度の異なる脂質をある割合で混ぜた際に相分離して、ゲル相と液晶相の二相共存状態が生じる。

一方、Sankaram らは、SM などの飽和アルキル鎖を有する脂質で構成される膜に Cho を添加すると、ゲル相を不安定化し、秩序液体(Lo)相⁶⁰⁾を形成することを明らかにした⁶¹⁾。Cho はヒドロキシ基を水層に向け配向し、飽和脂質の炭化水素鎖間に入り込むことで、炭化水素鎖間に働く強い疎水性相互作用を阻害する。その結果、SM は脂質分子間で規則正しく配列したゲル相の格子状態を取ることができず、流動性が大きくなる。一方で、Cho は隣接する炭化水素鎖の立体配座をゲル相に近いほぼアンチ配座に固定するため^{62,63)}、脂質間の秩序はある程度強く維持されている。そのため、Lo 相はゲル相と液晶相の中間の性質を有する⁶⁴⁾。DOPC のような不飽和の炭化水素鎖を有する脂質と飽和脂質、Cho の 3 成分混合系膜中では、Lo 相と Ld 相での脂質間相互作用の違いから、特定の割合の脂質組成でドメインを形成する(図 1-7a)⁶⁵⁾。その際、流動性の異なる Lo 相と Ld 相の相分離であるので、二つの流動相間での線張力の違いにより、Lo 相または Ld 相のドメインは円形を示す。このようなドメインは実際に、飽和リン脂質、Cho、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、蛍光顕微鏡下で観察されている(図 1-7b)⁶⁶⁾。また、Cho を除去することで円形のドメインは消失し、ゲル-Ld の相分離が起きる (図 1-7b)。一方で、過剰の Cho はこの Lo ドメインのサイズを減少させることも報告されており^{67,68)}、実際の細胞膜と同程度(30~40 mol%)の Cho 含有膜中では、このドメインが縮小して、ナノスケールのサイズで存在するとも考えられる。この Lo ドメインは脂質ラフトと同様に界面活性剤処理に対して耐性(不溶性)を示す⁶⁹⁾。加えて、細胞から切り出した細胞膜ベシクル(GPMV)においても、人工膜と非常に類似したドメインの形成が確認されている^{57,70)}ことから、人工膜で形成される Lo ドメインは細胞膜上の脂質ラフトと同等の性質を有する可能性がある。Lo ドメインは飽和リン脂質や Cho を豊富に含み、そのサイズを環境変化や脂質組成に対して変化させるなど、生体膜中での脂質ラフトの物理的な起源に相当するとも考えられており、その形成の機構解明を目指した研究に幅広く用いられている。

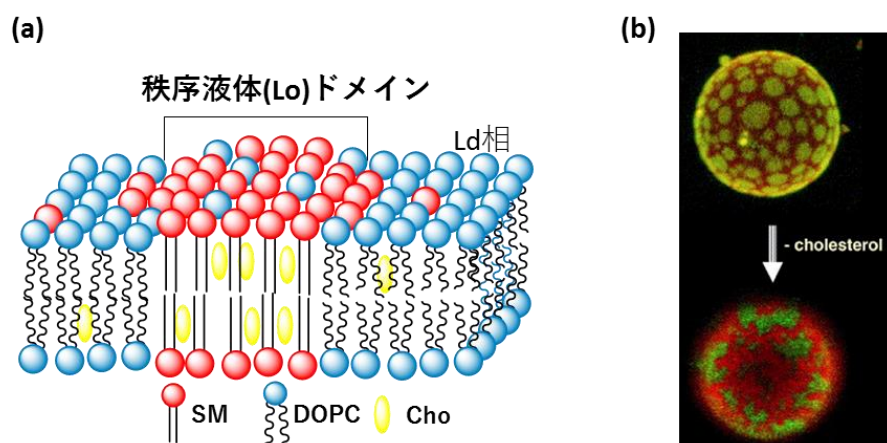


図 1-7 (a) Lo ドメインと液晶相の相分離の模式図と(b)DPPC/DOPC/Cho の 3 成分系膜における蛍光プローブ DiIC18 (赤色) と Bodipy-PC (緑色)による共焦点蛍光顕微鏡イメージ 3 成分系膜中に円形のドメインが形成され、相分離が起こる(上)一方で、Cho の抽出により結晶構造に近い歪な形状をしたドメインが形成される(下)。

Reprinted with permission from *Biochim Biophys Acta*. 2006.⁶⁶ Copyright © (2006) Elsevier.

1-3 モデル膜を用いた SM と Cho の相互作用解析

1-3-a SM が形成するモデル膜物性と脂質間相互作用の研究

人工膜は着目した脂質のみで簡便に調製できるため、脂質間相互作用や脂質の動態を詳細に解析することが可能である。示差走査熱量測定(DSC)^{71,72}、X 線回析法⁷³⁻⁷⁵、赤外分光法⁷⁶、電子スピン共鳴(ESR)⁷⁷、単分子膜の表面圧測定^{78,79}や蛍光異方性測定⁸⁰といった手法が確立されており、相転移や相状態、膜の厚さ、表面圧、拡散係数など、脂質の物理化学的性質をある程度正確に測定することができる。これらの測定により得られる物理量のうちの一部は脂質分子の構造の違いに由来する分子間の相互作用の違いに関係すると考えられる。

生体膜の脂質ラフトドメインと人工膜の Lo ドメインの類似性が議論されてきた(上述 1-2-c 節)。そこで、これらの物理化学的手法を用いて、脂質ラフトを構成する主要な脂質成分である SM と Cho を含有する膜の物理化学的性質を SM の代わりに飽和 PC を含有する膜と比較した研究が数多くなされてきた⁷⁷⁻⁷⁸)。例えば、メチル-β-シクロデキストリンを用いた Cho の脂質膜からの引き抜き実験では、飽和 PC からなる膜ではアシル鎖が長くなると Cho が引き抜かれやすくなるが、SM

からなる膜では膜内に残る Cho の量は各アシル鎖長でほぼ変化がなかった⁷¹⁾。またアシル鎖に不飽和の脂肪酸が入った場合も SM 膜の方が PC 膜よりも膜内に留まる Cho の量が 2 倍ほど多かった⁸⁰⁾。このことは、Cho の膜内での安定化に SM の特異的な骨格が関与していることを示す。また、アルキル鎖長がほぼ等しい SM と PC を比較すると、SM のほうが Cho によるオーダー効果を強く受けて Cho と高い親和性を示した⁷⁸⁾。SM はその構造中にヒドロキシ基とアミド基を有しており、SM 分子同士での疎水的な相互作用に加えて水素結合ドナー・アクセプターを介した強固なクラスター形成が可能である。一方で、PC のエステル結合は水素結合のアクセプターの役割しかない。このような SM と PC の水素結合形成能の違いが、SM がより安定な Lo ドメインを形成しやすい理由の一つと考えられる。実際、SM-SM 分子間や SM-Cho 分子間で水素結合が形成されていることは、NMR⁸¹⁾、フーリエ変換赤外分光(FTIR)^{78,82)}や分子動力学計算(MD 計算)⁸²⁻⁸⁶⁾によって示唆されている。当研究室では、SM と Cho をリンカーで結合した SM-Cho 誘導体を合成して膜の流動性を評価した。その結果、流動性の有意な低下を観測した。この系の MD シミュレーションにより SM-Cho 間の水素結合の形成が流動性を低下に関与していることが示唆された⁸⁷⁾。このことは、SM-Cho 間の相互作用は Cho のステロイド環と SM の疎水性相互作用に加えて部分的な水素結合形成とのバランスにより安定化されているとも考えられる。

SM と PC は同じ頭部構造 (ホスホコリン) を有しているが、NMR や MD 計算から 2 つの頭部の配向は異なり、PC の頭部は膜平面に対して平行であるのに対して、SM の頭部は膜平面に対して 15° 傾いていることが報告されている⁸⁸⁻⁹⁰⁾。また、SM のリン酸エステル部位とヒドロキシ基による分子内水素結合がこの傾斜を安定化していると考えられている⁹⁰⁾。これは SM の頭部が水との接触を妨げるように Cho を覆った状態で存在していることを示唆しており (アンブレラ効果⁹¹⁾)、水分子の膜内への浸透を阻害している⁹²⁾。SM が PC より効率的に頭部を傾け、Cho とのアンブレラ効果が大きいことから、Cho は SM との親和性が高いと考えられている。

このように、物理化学的手法によって PC より SM の方が安定な Lo ドメインを形成することが示されている一方で、Cho 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-Cho 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^{92,93)}。このように多様な結論が導き出されているのは、Cho 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、SM と PC では転移温度や膜圧などの物性が異なるために、単純な比較検討では SM の分子構造が脂質間の相互作用に及ぼす役割を明確にするのは困難である。

そこで、SM のラフト形成機構を解明するために、SM 分子の構造に着目し、その一部のみを改変した SM 類縁体の脂質間相互作用とラフト形成能が調べられてきた(図 1-8)。SM の 4-5 位間トランスオレフィンが飽和された構造を有する dihydro SM(DHSM) では、DHSM 同士の分子間水素結合は 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報告されている⁹⁴⁾。この理由として、4位の二重結合の欠如により分子間で疎水性相互作用が増加する一方で、その立体化学によって C1-C2 結合が回転運動しやすくなり、ヒドロキシ基とリン酸エステルとの分子内水素結合が SM より弱くなると考えられている⁹⁵⁾。ただし、頭部の自由度からアンブレラ効果が働きやすく、Cho との親和性も通常の SM より高いことが報告されている^{96,97)}。

さらに、SM の 3 位のヒドロキシ基の立体を反転させた *L-threo* SM と天然型 SM のジアステレオ混合物では SM に比べてラフト形成能が落ちることが示されている⁹⁸⁾。また、*L-threo* SM の相転移温度と転移エンタルピーは、SM に比べてわずかに小さく、ジアステレオ体間の相互作用は天然型に比べ弱いことが明らかとなっている⁹⁹⁾。さらに、*L-threo* SM では、3 位ヒドロキシ基とリン酸エステル部位との分子内水素結合の形成が困難であることが報告されている¹⁰⁰⁾。このように、SM が有するセラミド骨格の立体化学や不飽和結合は脂質ラフト形成において非常に重要である。

SM の 3 位ヒドロキシ基をメトキシ基(3-OMe SM)または水素(3-deoxy SM) で置換した SM 類縁体は、単分子膜の表面圧測定から得られる平均分子面積に関して SM と比較した場合、優位な差異は観測されていない¹⁰¹⁾。一方で、リポソームにおける 3-OMe SM の転移温度は SM より低く、3-OMe SM 分子間の相互作用は SM 分子間より小さいことが報告されている¹⁰²⁾。また、アミド部位に関してメチル保護した 2-NMe SM では、相転移温度は劇的に低下した。さらに、不飽和グリセロリン脂質 POPC と Cho を加えた三成分系膜では、アミド部位をメチル保護することで Lo ドメインの形成が大きく阻害された¹⁰²⁾。これらの結果から、SM のセラミド骨格を介した水素結合は SM 分子間相互作用を介した Lo ドメインの形成と安定化に寄与することが示唆されている。

以上のように、脂質ラフトを研究する上で SM の分子構造と相状態との関係を調べることは重要である。しかし、化学修飾した SM 誘導体は SM に比べて膜物性などが異なるため、SM の分子構造と膜物性の関係や分子間の相互作用を厳密に解析することは難しい。また、SM がヒドロキシ基やアミド部分を介してどのように他の SM や Cho

と水素結合形成するか、実験的に証明されていない。

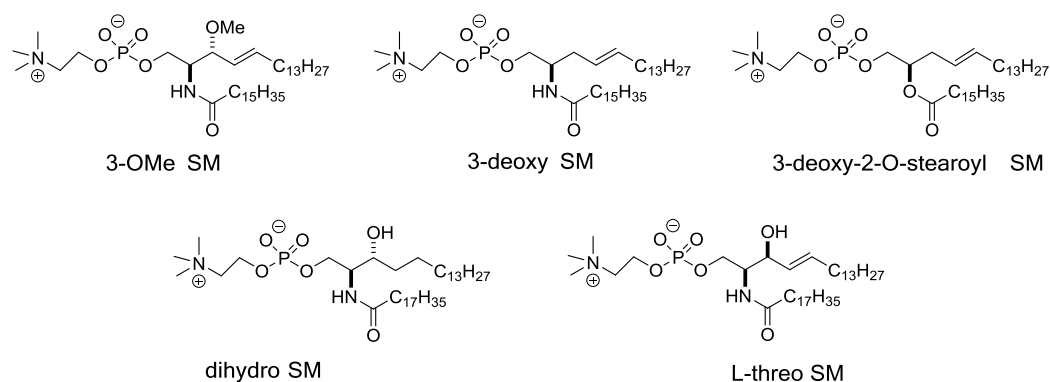


図 1-8 種々の SM 誘導体の構造

1-3-b SM の特異的な構造に着目した相互作用解析

SM と Cho に働く脂質間相互作用について分子レベルで理解するために、計算化学や同位体標識した脂質を用いた NMR 測定が行われている。SM と Cho 間に働く相互作用について、MD 計算からは SM の 3 位ヒドロキシ基と Cho のヒドロキシ基、SM のアミド部位と Cho のヒドロキシ基の間で分子間水素結合が形成され、SM 頭部の $^+\text{NMe}_3$ と分極した Cho のヒドロキシ基の酸素間のイオン-双極子間で相互作用が働くことが示されている¹⁰³⁾(図 1-9)。

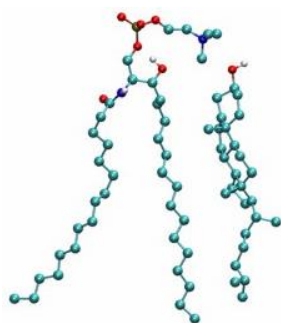


図 1-9 Cho と相互作用する SM のスナップショット¹⁰³⁾ Reprinted with permission from *Biophys. J.* **2007**.¹⁰³ Copyright © (2007) Elsevier.

当研究室では、SM-Cho 分子間に働く相互作用の解明を目指し、同位体標識した SM と Cho (図 1-10)を用いて回転エコー二重共鳴(REDOX)測定を行ない、標識原子間の磁気双極子相互作用の観測を試みた。しかしながら、標識核間の磁気

双極子相互作用を観測するには至らなかった^{104,105)}。このことは、SM と Cho 間に働く相互作用は比較的弱く、SM と Cho の会合状態の寿命が短いことを示唆している。Cho を SM 膜または DPPC 膜に加えた二成分膜のカルボニル基の化学シフトの変化を比較した際に SM と PC で差異がないという報告もある。¹⁰⁶⁾ Cho と DPPC 間の水素結合形成についても、固体 NMR 測定による結果から膜中では Cho の拡散係数が DPPC より大きく、Cho は DPPC よりも運動性が高いことが示されている¹⁰⁷⁾。Cho のフリップフロップが PC に比べて非常に速いことから Cho の運動性は PC よりも大きいと考えられる¹⁰⁸⁾。これらの結果は、Cho と PC や SM の水素結合は安定的には形成されない可能性が高いことを示している。

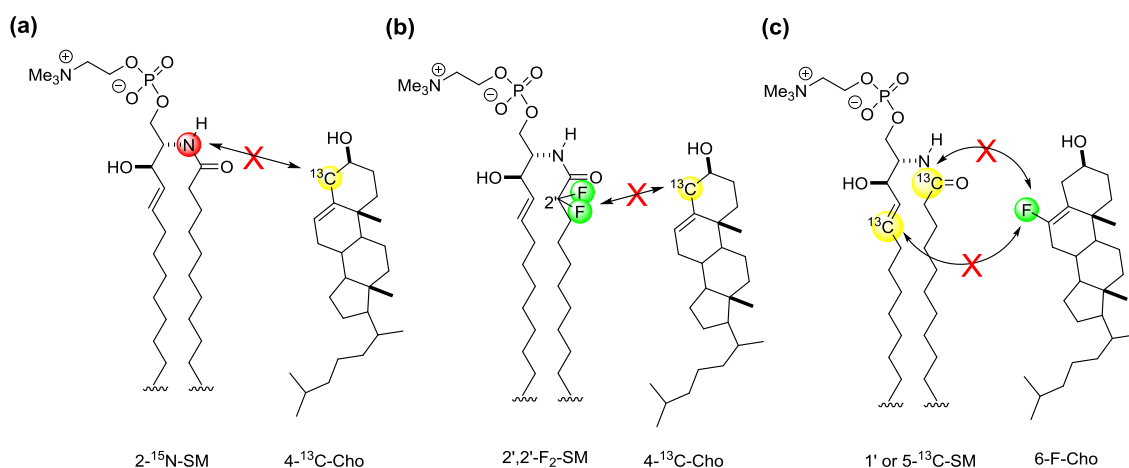


図 1-10 SM-Cho 分子間での REDOR 解析で用いた標識体の構造 (a)2-¹⁵N-SM と 4-¹³C-Cho (b)2',2'-F₂-SM と 4-¹³C-Cho (c)1' or 5-¹³C-SM と 6-F-Cho いずれの場合においても、標識核間の磁気双極子相互作用は観測されていない。

当研究室では SM 分子間で水素結合を形成することが可能かどうかを評価するために、膜中での水素結合形成に関与する SM のアミド部分の配向解析を行った¹⁰⁹⁾。アミド部分に ¹³C や ¹⁵N を導入した標識体を合成し(図 1-11a)、SM のみ、または SM/Cho(1:1)の膜中で固体 NMR を測定した。さらに観測された化学シフト異方性と磁気双極子相互作用の大きさから、SM のアミド平面に対する回転軸の方向と秩序パラメータ S_{mol} を求めた。SM アミド部分が Cho のヒドロキシ基と水素結合を形成して安定な複合体をとる場合、アミドの配向変化が起こると推測されるが、それを示唆する配向変化は観測されなかった。一方で、秩序パラメータ S は Cho 含有膜では大きくなって

おり、その運動性が小さくなっていることを示唆している。さらに、図 1-11d に模式的に示すように、得られた SM アミドの配向からは、隣接するアミド間で水素結合を作りやすいことが示唆された。

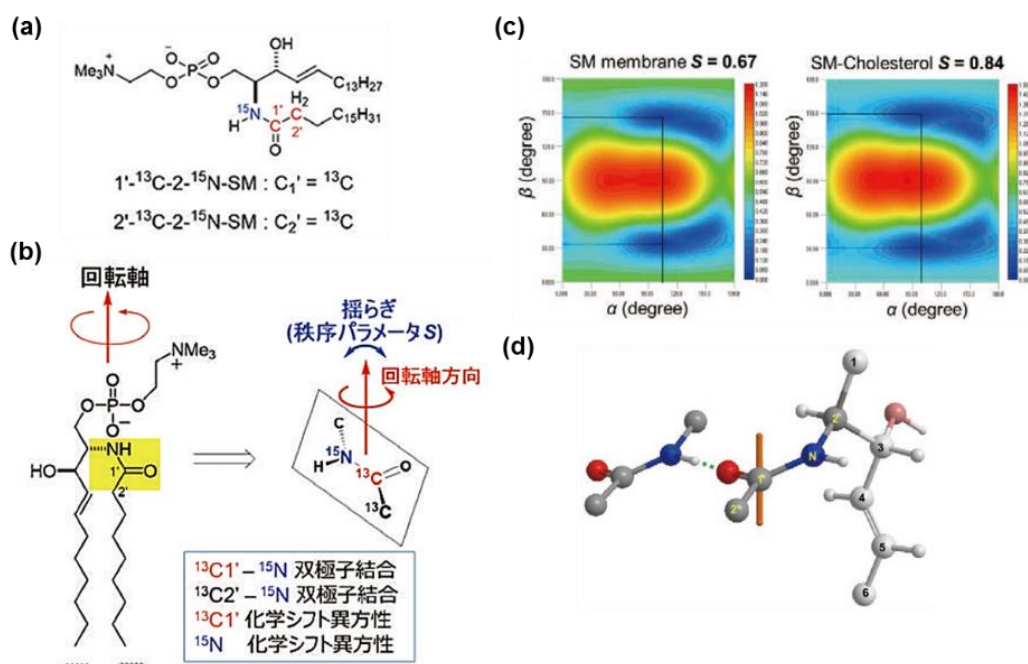


図 1-11 SM アミドの配向解析¹⁰⁹⁾ (a) SM アミド部分に ^{15}N , ^{13}C を導入した二重標識化 SM の構造 (b) SM アミド部分の二重標識を用いた固体 NMR 測定によって得られる、双極子相互作用および化学シフト異方性から、回転軸方向と秩序パラメータを算出した。(c)RMSD 計算によって実測値を最も再現する回転軸方向と秩序パラメータを決定した。(d)得られた相互作用モデル 茶色の軸周りに SM は膜中で回転拡散をしている。回転軸方向は Cho の有無で変化しなかった。緑破線で示すように隣接する SM のアミド基との分子間水素結合を形成することが可能な構造である。 Reprinted with permission from *Biophys. J.* **2015**.¹⁰⁹ Copyright © (2015) Elsevier.

さらに、アシル鎖を位置選択的に重水素で標識した SM を合成し、膜状態における重水素固体 NMR 測定を行った^{110,111)}。重水素固体 NMR 測定により得られるスペクトルの四極子分裂幅が大きいほど膜中でのアシル鎖の揺らぎが小さい。図 1-12 に示すように、単純な SM で構成される膜では SM の頭部から尾部にかけて四極子分裂幅が単調に減少しており、アルキル鎖の末端にいくにつれてその運動性が増加することを

示唆している。それに対し、ラフトを模した SM と Cho で構成される膜ではアルキル鎖中央部における分裂幅が最大値を示すことから、Cho の剛直なステロイド平面とアルキル鎖の間でファンデルワールス力が働くことで、アシル鎖の運動性が抑えられている (図 1-12)。さらに、アシル鎖長がほぼ同じ PSPC でも位置選択的な重水素標識体を合成し、重水素固体 NMR を測定した。その結果、SM 膜では Cho のステロイド骨格は PC 膜中に比べ、より膜の深い位置に位置していることを示唆する結果が得られた。X 線散乱の電子密度分布からも、DMPC 膜に比べ SM 膜中では Cho が約 2 Å 程度深い部分に位置していることが示されている¹¹¹⁾。これらの結果から、PC に比べ Cho は SM とより膜の深い位置で疎水性相互作用していることが考えられる。この理由として、界面付近で SM 分子間に形成される水素結合により、Cho がより深い部分に押し出されていると推測される。また、SM の頭部の配向が PC より膜内部に傾いており、SM のアンブレラ効果が PC よりも大きいことも Cho の分布に関連している可能性がある。いずれにせよ、界面付近に位置する SM のアミド部位やヒドロキシ基と Cho が水素結合するには距離が離れており、Cho は膜の深い位置で SM と疎水性相互作用していると考えられる。

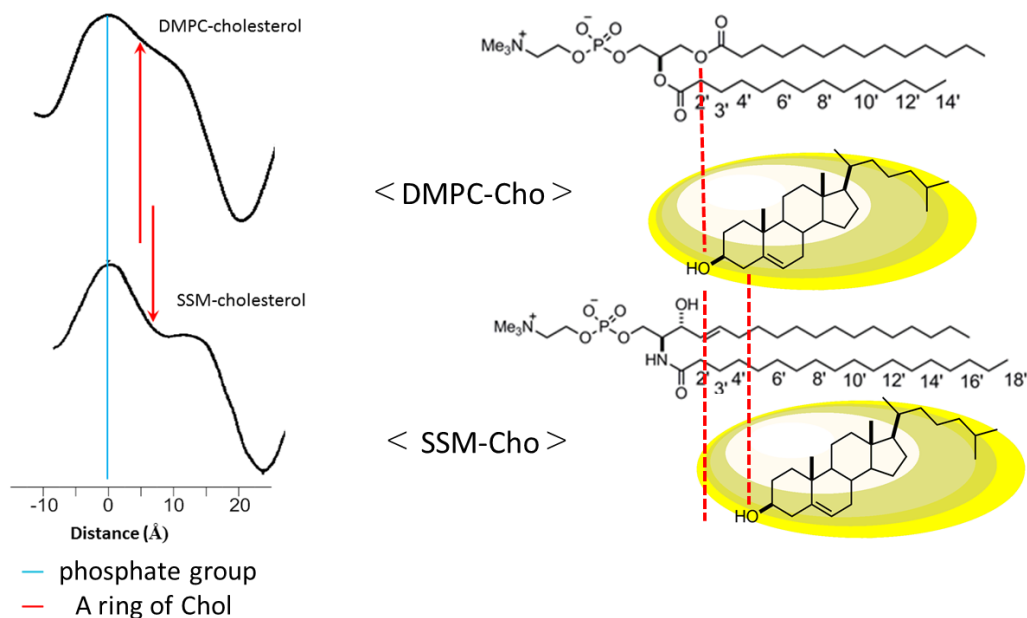


図 1-12 SM 膜と DMPC 膜中の電子密度分布から推定される Cho 分布位置¹¹⁰⁾
SM 膜の Cho の位置は DMPC 膜の Cho よりも約 2 Å 深い。 Reprinted with permission from *Biochemistry*. **2012**. Copyright © (2012) American Chemical Society.

さらに、近年、MD 計算から Lo ドメイン中での SM に働く水素結合について推測されている。3 位ヒドロキシ基とリン酸エステル酸素原子間の分子内水素結合に加えて、SM 間での分子間水素結合が多く形成されていることが報告されている^{86,112)}。加えて、スーパーコンピュータ Anton を用いた 100 μ s スケールの MD 計算においても SM 分子間の相互作用が SM-Cho 間の相互作用と同様にラフトドメイン形成において重要であることが示唆されており¹¹³⁾、特にラフトドメイン中 SM が分子間で水素結合を形成し、数ナノメートルスケールのクラスターを形成することが報告されている。別の計算結果では、SM 分子間に働く水素結合の寿命が SM-Cho 間の水素結合の 2 倍以上長く、Cho の秩序化により SM 分子間の水素結合、ひいてはクラスター化が安定化されていることが報告されている¹¹⁴⁾。また、Cho 分子間の相互作用は SM-Cho 間または SM 分子間の相互作用に比べ、エネルギー的に非常に不安定であることがわかっている。これらの計算結果や過去の報告から、ラフト中では Cho 分子間の相互作用は働きにくく、SM と Cho の疎水性相互作用と共に SM-SM の分子間水素結合が Cho により安定化されている。さらに、この SM 分子間に働く水素結合を介して、SM がクラスター化して存在していると推定される。

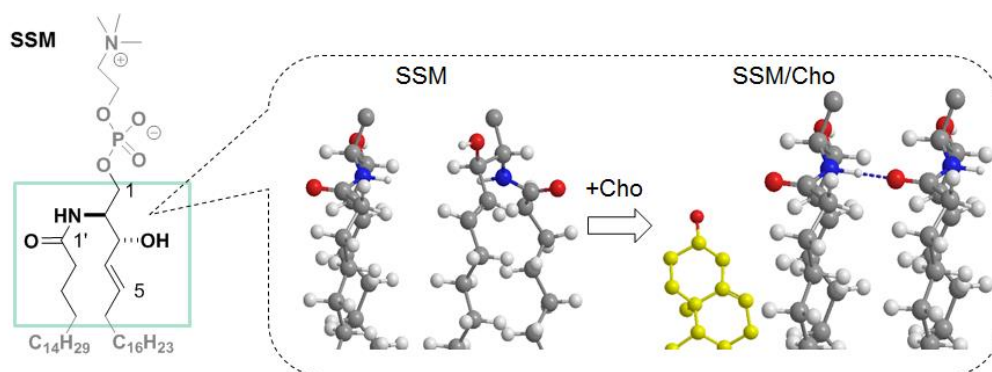


図 1-13 推定される相互作用モデル SM はアミド部分を介して SM 同士で水素結合を形成し、Cho は SM 分子間の水素結合を安定化する。

1-3-c SM と Cho によるナノドメイン形成の解析

これまで、SM についてモデル膜を用いた実験と計算の結果、アミド部位を介した SM 間の水素結合によって Lo ドメイン中で SM がクラスター化していることが報告されるなど、近年、Lo ドメインの実態が明らかになりつつある。当研究室では、生体膜を模した SM/DOPC/Cho からなる 3 成分系膜を調製し、位置選択的に重水素標識した SM、DOPC を用いた重水素固体 NMR 測定を行ってきた¹¹⁵⁾。さらに測定で得られた NMR

スペクトルを基本式から得られる理論値と比較することで Lo、Ld ドメインへのそれぞれの重水素化脂質の分配比を算出した。その結果、SM が豊富な Lo ドメイン中であつても約 3 割もの DOPC(Lo 相を構成する総脂質量のうちの 15 mol%) が分配されていることが明らかとなった。このことは、Lo ドメインは SM と Cho のみで構成されるのではなく、不飽和リン脂質も混在していることを示している。また、Lo ドメイン中での SM の分布を可視化するため、SM 頭部にジインを有する SM プローブを合成して、ジイン SM/DOPC/Cho の 3 成分系の単層膜についてラマン散乱顕微鏡観測が行われた。¹¹⁶⁾ その結果、Lo ドメインの中心付近に SM プローブが密に局在した領域が存在していた。さらに SM プローブの濃度は、局在の中心部からその周辺にかけて徐々に減少することが明らかになった(図 1-14)。このことから、Lo ドメインは決して一様に SM と Cho が混在したドメインではなく、局所的に SM 同士が強く相互作用し、ナノサイズのドメインを形成していると考えられる。SM/DOPC/Cho の 3 成分系膜中で金コロイドで標識した DPPE を用いて一分子追跡した際にも Lo ドメイン中で数十 nm サイズのナノドメイン形成を観測している¹¹⁷⁾。これらの結果から、Lo ドメインは均一ではなく、SM がナノドメインを形成し、その間質を Cho と DOPC が占めていると考えられる。Yasuda らは、蛍光寿命測定を用いてこのナノドメインの観測をしており、SM によるナノメートルスケールの微小ドメインにおいて SM 分子が高速で出入りしていることを報告している¹¹⁸⁾。生体膜中に存在する脂質ラフトはせいぜい数 10~100 nm サイズであり、実際の生体膜中では Cho が一様に分布しているという報告^{50,51)}もあることから、Lo ドメイン中のナノドメインがラフトドメインの根幹を成す、またはラフトそのものであると推測されている。

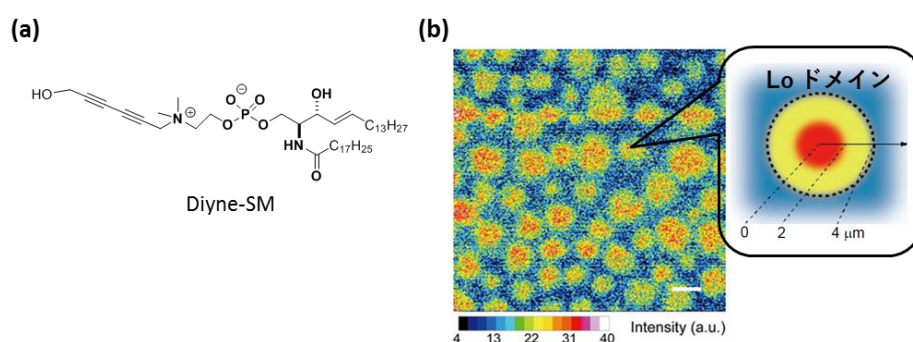


図 1-14 ジイン-SM の分布解析¹¹⁶⁾ (a)ジイン-SM の構造 (b)ジイン-SM/DOPC/Cho をモル比 1:1:1 で混合した 3 成分単層膜におけるジイン-SM の分布をラマン顕微鏡で分析し、アルキンに由来するラマン散乱の強度(信号強度)をプロットした。信号強度が高いほど、SM プローブの濃度が高く、Lo ドメイン中心部から濃度が減少している

ことがわかる。

しかし、これらの先行研究においても、SM が形成するナドメインの性質やサイズについて明確になっておらず、このナドメイン形成については推測の域を脱していない。また、SM 分子間に形成される水素結合ネットワークが、このナドメインの安定化に大きな影響を与えると考えられるが、その寄与について正確に検証されていない。加えて、内葉と外葉間の SM による膜間の相互作用がナドメイン形成をもたらす可能性もある。そのため、ラフト形成のメカニズムを解明するには、SM 分子間の相互作用が Lo ドメインの形成、ならびに Lo ドメインを構成する SM ナドメイン形成に及ぼす影響を詳細に評価する必要がある。

1-4 研究目的

SM は代表的なスフィンゴ脂質であり、シグナル伝達を始めとする多様な細胞機能の発現に重要な脂質ラフトを構成する。SM は骨格構造に Cer を有し、このグリセロリン脂質とは異なる構造的特徴が細胞膜上でのラフト形成に関与していると考えられている。加えて、Cer の産生や脂質膜の非対称性の維持にも関連していると考えられることから、生理学的に非常に重要な分子である。近年、SM が有するヒドロキシ基とアミド結合を介した分子間の水素結合ネットワークがラフト形成に重要であることが推測されてきた²⁴⁾。しかしながら、これまでの研究では SM が水素結合を介して特異的にラフトを形成することを正確に観測するには至っていない。さらに、脂質ラフトを構成する二つの主要な脂質分子である SM と Cho の会合状態の詳細については未解明な部分が多い。

先行研究では、生体膜における SM の機能を解明するために、SM と Cho で構成される人工膜で脂質ラフトモデルとして考えられている Lo 相または Lo ドメインの解析が広く行われてきた。なかでも、脂質の類似体や標識体を用いた研究や MD 計算による解析の結果、ヒドロキシ基やアミド結合による水素結合を介した SM のクラスター化がラフト形成において重要であることが示唆されてきた。一方で、Cho が SM 膜の秩序化を促進することも広く知られている。加えて、Cho のヒドロキシ基と SM 間の水素結合の形成も報告されている。このように、SM が関係する脂質分子間相互作用について分子レベルでの理解が進んできた。しかし、脂質ラフト形成における SM の分子構造と脂質間相互作用の相関がいまだ明白になっていない。故に、水素結合を介した SM の会合状態やそのサイズについてもわかっておらず、ドメイン形成に果たす SM の役割に

ついて明確になっていない。

そこで、本研究では脂質膜中での SM の脂質間相互作用が誘起するドメインの形成機構を解明することを目的とした。特に PC とは異なる SM に特徴的な分子構造として、SM の 2 位、3 位の不斉炭素上に存在するヒドロキシ基やアミド結合に着目し、ラフト形成に支配的な SM-SM、SM-Cho 分子間の相互作用を精密に評価することで、立体配置特異的な SM 分子間相互作用がラフト形成の主要因であることを明らかにする。さらに、SM 分子間の相互作用を介した SM クラスターの形成やそのサイズについて評価することで、Lo ドメイン中の SM の会合状態を明らかにする。これらの研究を通じて、脂質膜中において SM がドメインを形成する機構の解明を目指す。具体的には、以下のような研究を行う。

まず、第 2 章では SM のスフィンゴシン鎖が有するキラリティーの脂質分子間相互作用への寄与に着目した。分子のキラリティーは分子間の相互作用や分子集合体のサイズを考える上で非常に重要である。そこで、SM のキラリティーの違いが脂質間の相互作用に与える影響を精密に評価することで、ラフト中の SM と Cho の会合状態について考察する。特に、SM の場合では、不斉炭素上にヒドロキシ基やアミドが存在しており、膜界面付近の相互作用が SM の会合状態に与える寄与を明らかにできると考えた。そのための研究手法として、SM と物理化学的性質が等しい鏡像異性体(*ent*-SM)を用いる。ここで、単純化して、脂質二分子からなる会合体の構造を考えると、鏡像異性体同士や SM 分子同士のホモ二分子会合体の構造は互いにキラルとなり、それぞれの会合体中のエナンチオメリックな分子間相互作用の様式は等しい。その一方で、SM-鏡像異性体や鏡像異性体-Cho から成るヘテロ二分子会合体は、SM 二分子会合体や SM-Cho 会合体とそれぞれがジアステレオマーの関係になるため、それぞれの会合体中でのジアステレオメリックな分子間相互作用の様式は互いに異なる。これを利用することで、2 位、3 位に存在するヒドロキシ基やアミド結合が脂質間相互作用に与える影響を正確に評価できる。具体的には、まずステアロイル SM(SSM)が形成する二重膜に *ent*-SSM を加えて、膜物性の変化を精査する。その後、Cho とアシル鎖 10 位に重水素標識した SSM や *ent*-SSM を含む二成分膜の重水素固体 NMR を測定することで、膜界面付近の SM 分子のキラリティーが SM-Cho 分子間の相互作用にもたらす影響について検証する。さらに、SM、*ent*-SM を 1:1 で混合したラセミ膜と SM 単一成分膜における Lo ドメインのサイズや流動性を蛍光寿命測定により比較することで、SM 分子間の相互作用と SM-Cho 分子間の相互作用のそれぞれがどの程度ラフト形成に影響しているかを評価する。特に、ヒドロキシ基やアミド部分を介した立体特異的

な SM 分子間の水素結合がラフト形成の主要因であることを明らかにできると考えた。

第 3 章では、SM 分子間の相互作用により形成されるナドメインの観測と解明を目指す。これまで、SM 分子間の水素結合によりナノメートルサイズのドメインが形成されることが考えられている¹¹⁶⁻¹¹⁸⁾。また、実際の生体膜におけるラフトのサイズはせいぜい直径 20~300 nm であることから、このような SM ナドメインが脂質ラフトの基盤をなすと考えられる。本章では、蛍光標識した SSM と *ent*-SSM を合成し、ラセミ体中での SSM と *ent*-SSM の Lo ドメイン中の分布を観測する。SM 分子間の相互作用と *ent*-SSM 間の相互作用は化学的に等価であることから、それぞれが形成するナドメイン間の距離を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を用いて算出することで SM が集積するナドメイン形成の有無やそのサイズを見積もる。

以上より、第 4 章では、第 2,3 章で得られた SM が形成する脂質分子間相互作用が誘起するドメインの形成機構についての解析結果と過去の報告に基づき、脂質ラフトドメイン形成に及ぼす SM の役割について考察する。

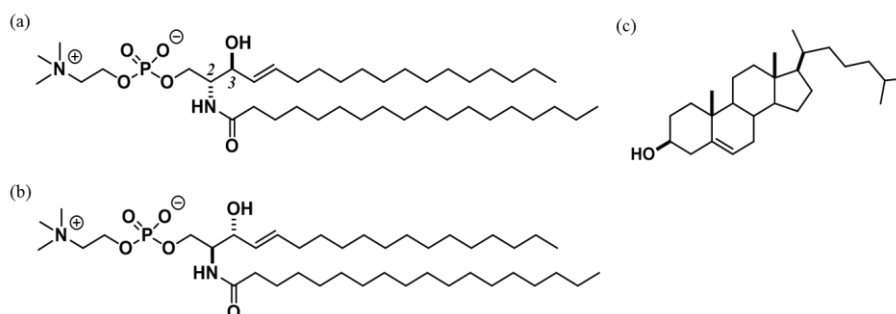


図 1-15 (a)ステアロイル SM(SSM)と(b)*ent*-SSM(c)Cho の構造

参考文献

- 1 Singer, S. J.; Nicolson, G. L. *Science* **1972**, *175*, 720-731.
- 2 Zimmerberg, J.; Vogel, S. S.; Chernomordik, L. V. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1993**, *22*, 433-466.
- 3 Chernomordik, L.; Kozlov, M. M.; Zimmerberg, J. *J. Memb. Biol.* **1995**, *146*, 1-14.
- 4 Pomorski, T.; Menon, A. K. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 2908-2921.
- 5 McLaughlin, S.; Murray, D. *Nature* **2005**, *438*, 605-611.
- 6 Bretscher, M. S. *Nature New Biology* **1972**, *236*, 11-12.
- 7 Devaux, P. F. *Biochemistry* **1991**, *30*, 1163-1173.
- 8 Liu, S. L.; Sheng, R.; Jung, J. H.; Wang, L.; Stec, E.; O'Connor, M. J.; Song, S.; Bikkavilli, R. K.; Winn, R. A.; Lee, D.; Baek, K.; Ueda, K.; Levitan, I.; Kim, K. P.; Cho, W. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 268-274.
- 9 Mondal, M.; Mesmin, B.; Mukherjee, S.; Maxfield, F. R. *Mol Biol Cell.* **2009**, *20*, 581-8.
- 10 Ogretmen, B. *Nature Reviews Cancer* **2004**, *4*, 604-616.
- 11 Slotte, J. P.; Ramstedt, B. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2007**, *109*, 977-981.
- 12 Thudicum, J. L. W. *A Treatise on the Chemical Constitution of Brain* **1884**.
- 13 Pick, L.; Bieischowsky, M. *Klin. Wochenschr.* **1927**, *6*, 1631-1637.
- 14 Shapiro, D.; Flowers, H. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 1047-1050.
- 15 Calhoun, W. I.; Shipley, G. G. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *555*, 436-441.
- 16 Karlsson, A. A.; Michelsen, P.; Odham, G. *J. Mass Spectrom.* **1998**, *33*, 1192-1198.
- 17 Ramstedt, B.; Slotte, J. P. *FEBS Lett.* **2002**, *531*, 33-37.
- 18 Linardic, C. M.; Hannun, Y. A. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 3125-3128.
- 19 Sawai, H.; Hannun, Y. A. *Chem. Phys. Lipids.* **1999**, *102*, 141-147.
- 20 Tilly, J. L.; Kolesnick, R. N. *Chem. Phys. Lipids.* **1999**, *102*, 149-155.
- Olivera, A.; Spiegel, S. *Nature* **1993**, *365*, 557-560.
- 21 Simons, K.; Ikonen, E. *Nature* **1997**, *387*, 569-572.
- 22 Brown, D. A.; Rose, J. K. *Cell* **1992**, *68*, 533-544.
- 23 Fukazawa, M.; Nishijima, M.; Itabe, H.; Takano, T.; Hanada, K. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 34028-34034.
- 24 Slotte, J. P. *Biochimica et Biophysica Acta.* **2016**, *1858*, 304-310.
- 25 Keller, P.; Simons, K.; J. *Cell Biol.* **1998**, *140*, 1357-1367.

- 26 Kabouridis, P. S.; Janzen, J.; Magee A. L.; Ley S. C. *Eur J Immunol.* **2000**, *30*, 954-63.
- 27 Damm, E. M.; Pelkmans, L.; Kartenbeck, J.; Mezzacasa, A.; Kurzchalia, T.; Helenius, A. *J. Cell Biol.* **2005**, *168*, 477-488 .
- 28 Janes, P. W.; Ley S. C.; Magee A. I.; Kabouridis P. S. *Semin Immunol.* **2000**, *12*, 23-34.
- 29 Brown, D. A.; Crise, B.; Rose J. K. *Science* **1989**, *245*, 1499-1501.
- 30 Samir, K. P. *Biochim. Biophys. Acta.* **2008**, *1785*, 182-206.
- 31 He X. et al. *Neurobiol Aging.* **2010**, *31*, 398-408.
- 32 Bromley, S. K.; Iaboni, A.; Davis, S. J.; Whitty, A.; Green, J. M.; Shaw, A. S.; Weiss, A.; Dustin, M. L. *Nature immunology.* **2001**, *2*, 1159-1166.
- 33 Paratcha, G.; Ibáñez, C. F. *Curr Opin Neurobiol.* **2002**, *12*, 542-549.
- 34 Prinetti, A.; Chigorno, V.; Tettamanti, G.; Sonnino, S. *J. Biol Chem.* **2000**, *275*, 11658-11665.
- 35 Li, S.; Couet, J.; Lisanti, M. P. *J. Biol Chem.* **1996**, *271*, 29182-29190.
- 36 Heerklotz, H. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 2693-2701.
- 37 Lichtenberg, D.; Goni, F.M.; Heerklotz, H. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 430-436.
- 38 Yamaji, A.; Sekikawa, Y.; Emoto, K.; Sakuraba, H.; Inoue, K.; Kobayashi, H.; Umeda, M. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 5300-5306.
- 39 Yachi, R.; Uchida, Y.; Balakrishna, B.; Anderluh, G.; Kobayashi, T.; Taguchi, T.; Arai, H. *Genes to Cells.* **2012**, *17*, 720–727.
- 40 Makino, A.; Abe, M.; Murate, M.; Inaba, T.; Yilmaz, N.; Hullin-Matsuda, F.; Kishimoto, T.; Schieber, N.; Taguchi, T.; Arai, H.; Anderluh, G.; Parton, R.; Kobayashi, T. *The FASEB Journal.* **2015**, *29*, 477-493.
- 41 Moon, S.; Yan, R.; Kenny, S. J.; Shyu, Y.; Xiang, L.; Li, X.; Xu. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 10944-10947.
- 42 Marks, D.L.; Bittman, R.; Pagano, R. E. *Histochem. Cell Biol.* **2008**, *130* 819-832.
- 43 Stöckl, M. T.; Herrmann, A. *Biochim Biophys Acta.* **2010**, *1798*, 1444-1456.
- 44 Murase, K.; Fujiwara, T.; Umemura, Y.; Suzuki, K.; Iino, R.; Yamashita, H.; Saito, M.; Murakoshi, H.; Ritchie, K.; Kusumi, A. *Biophys J.* **2004**, *86*, 4075-4093.
- 45 Faletrov, Y. V.; Bialevich, K. I.; Edimecheva, I. P.; Kostsin, D. G.; Rudaya, E. V.;

- Slobozhanina, E. I.; Shkumatov, V. M. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **2013**, *134*, 59-66.
- 46 Elvington, S. M.; Bu, F.; Nichols, J. W. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 40957-40964.
- 47 Wang, T. Y.; Silviu, J. R. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1478-1489.
- 48 Honigsmann, A.; Mueller, V.; Hell, S. W.; Eggeling C. *Faraday Discuss.* **2013**, *161*, 77-89.
- 49 Eggeling, C.; Ringemann, C.; Hell, S. W. *Nature* **2009**, *457*, 1159–1162.
- 50 Frisz, J. F. Klitzing, H. A. Lou, K. Hutcheon, I. D. Weber, P. K. Zimmerberg, J. Kraft, M. L. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 16855-61.
- 51 Kraft, M. L. *Front Cell Dev Biol.* **2016**, *4*, 154.
- 52 Kusumi, A. Ike, H. Nakada, C. Murase, K. Fujiwara, T. *Semin. Immunol.* **2005**, *17*, 3-21.
- 53 Asano, S. Kitatani, K. Taniguchi, M. Hashimoto, M. Zama, K. Mitsutake, S. Igarashi, Y. Takeya, H. Kigawa, J. Hayashi, A. Umehara, H. Okazaki, T. *Mol. Cell Biol.* **2012**, *32*, 3242-52.
- 54 Kiyokawa, E.; Baba, T.; Otsuka, N.; Makini, A.; Hirabayashi, Y.; Kobayashi, T.; *Biophys. J.* **2004**, *86*, 296-307.
- 55 Fujita, A.; Cheng, J.; Hirakawa, M.; Furukawa, K.; Kusunoki, S.; Fujimoto, T. *Mol. Biol. Cell.* **2007**, *18*, 2112-2122.
- 56 Pike, L. J. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 1597-1598.
- 57 Kinoshita, M.; Suzuki, K. G.; Matsumori, N.; Takada, M.; Ano, H.; Morigaki, K.; Abe, M.; Makino, A.; Kobayashi, T.; Hirosawa, K. M.; Fujiwara, T. K.; Kusumi, A.; Murata, M. *J Cell Biol.* **2017**, *216*, 1183-1204.
- 58 門司真美 平成 27 年度修士論文
- 59 下西剛史 平成 28 年度修士論文
- 60 Ipsen J. H.; Karlström, G.; Mouritsen, O. G.; Wennerström, H.; Zuckermann, M. *J. Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *905*, 162-72.
- 61 Sankaram, M. B.; Thompson, T. E. *PNAS* **1991**. *88*, 8686-8690.
- 62 Smith, A. K.; Freed, J. H. *Chem. Phys. Lipids* **2012**, *165*, 348–361.
- 63 佐伯直香 平成 29 年度修士論文
- 64 Lentz, B. R.; Barrow, D.A.; Hoechli M. *Biochemistry*, **1980**, *19*, 1943-1954
- 65 deAlmeida R. F.; Fedorov, A.; Prieto, M. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 2406-2416
- 66 Bagatolli, L. A. *Biochim Biophys Acta.* **2006**, *1758*, 1541-56.
- 67 Petruzielo, R. S.; Heberle, F. A.; Drazba, P.; Katsaras, J.; Feigenson, G. W.

- Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, 1828, 1302-13.
- 68 Usery, R. D.; Enoki, T. A.; Wickramasinghe, S. P.; Weiner, M. D.; Tsai, W. C.; Kim, M. B.; Wang, S.; Torng, T. L.; Ackerman, D. G.; Heberle, F. A.; Katsaras, J.; Feigenson, G. W. *Biophys. J.* **2017**, 112, 1431-1443.
- 69 Ahmed, S. N.; Brown, D. A.; London, E. *Biochemistry.* **1997**, 36, 10944–10953
- 70 Sezgin, E.; Levental, I.; Grzybek, M.; Schwarzmann, G.; Mueller, V.; Honigsmann, A.; Belov, V. N.; Eggeling, C.; Coskun, U.; Simons, K.; Schwille, P. *Biochim Biophys Acta.* **2012**, 1818, 1777-84.
- 71 Ramstedt, B.; Slotte, J.P. *Biophys. J.* **1999**, 76, 908-915.
- 72 Kuikka, M.; Ramstedt, B.; Ohvo-Rekilä, H.; Tuuf, J.; Slotte, J.P. *Biophys. J.* **2001**, 80, 2327-2337.
- 73 Björkbom, A.; Yamamoto, T.; Kaji, S.; Harada, S.; Katsumura, S.; Slotte, J. P. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, 1778, 1501-1507.
- 74 Quinn, P. J.; Wolf, C. *FEBS J.* **2010**, 277, 4685-4698.
- 75 Ivankin, A.; Kuzmenko, I.; Gidalevitz, D. *Phys. Rev. Lett.* **2010**, 104, 108101.
- 76 Ziblat, R.; Kjaer, K.; Leiserowitz, L.; Addadi, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 8958-61.
- 77 Arsov, Z.; Quaroni, L. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, 1778, 880-889.
- 78 Veiga, M. P.; Arrondo, J. L. R.; Goni, F. M.; Alonso, A.; Marsh, D. *Biochemistry* **2001**, 40, 2614-2622.
- 79 Bittman, R.; Kasireddy, C. R.; Mattjus, P.; Slotte, J. P. *Biochemistry* **1994**, 33, 11776-81.
- 80 Halling, K. K.; Ramstedt, B.; Nystrom, J.; Slotte, J.P.; Nyholm, T. K. M. *Biophys. J.* **2008**, 95, 3861-3871.
- 81 Steinbauer, B.; Mehnert, T.; Bayer, K.; *Biophys. J.* **2003**, 85, 1013-1024.
- 82 Arsov, Z.; Quaroni, L. *Biochim. Biophys. Acta.* **2008**, 1778, 880-889.
- 83 Khelashvili, G. A.; Scott, H. L. *J. Chem. Phys.* **2004**, 120, 9841-9847.
- 84 Róg, T.; Pasenkiewicz-Gierula, M. *Biophys. J.* **2006**, 91, 3756-3767.
- 85 Mombelli, E.; Morris, R.; Taylor, W.; Fratenali, F. *Biophys. J.* **2003**, 84, 1507-1517.
- 86 Niemelä, P.; Hyvönen, M. T.; Vattulainen, I. *Biophys. J.* **2004**, 87, 2976-2989.
- 87 Matsumori, N.; Tanada, N.; Nozu, K.; Okazaki, H.; Oishi, T.; Murata, M. *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 8568-8575.
- 88 Malcom, I. C.; Ross, J. C. Higinbotham, J. *Solid state Nucl. Magn. Reson.* **2005**, 27, 247-256.

- 89 村上量弘 平成 28 年度修士論文
- 90 山口敏幸 平成 23 年度学位論文
- 91 Huang, J.; Feigenson, G. W. *Biophys. J.* **1999**, 76, 2142-2157.
- 92 Aittoniemi, J.; Niemelä, P. S.; Hyvönen, M. T.; Karttunen, M.; Vattulainen, I. *Biophys. J.* **2007**, 92, 1125-1137.
- 93 Zhang, Z.; Bhide, S. Y.; Berkowitz, M. L. *J. Phys. Chem. B.* **2007**, 111, 12888-12897.
- 94 Kuikka, M.; Ramstedt, B.; Ohvo-Rekilä, H.; Tuuf, J.; Slotte, J.P. *Biophys. J.* **2001**, 80, 2327-2337.
- 95 Yasuda, T.; Al Sazzad, M. A.; Jäntti, N. Z.; Pentikäinen, O. T.; Slotte, J. P. *Biophys J.* **2016**, 110, 431-440
- 96 Talbott, C. M.; Vorobyov, I.; Borchman, D.; Taylor, K. G.; DuPré, D. B.; Yappert, M. C. *Biochim. Biophys. Acta.* **2000**, 1467, 326-337.
- 97 Kinoshita, M.; Goretti, S.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biophysics* **2013**, 9, 37-49.
- 98 Ramstedt, B.; Slotte, J. P. *Biophys. J.* **1999**, 77, 1498-1506.
- 99 Bruzik, K. S., and M. D. Tsai. **1987**, *Biochemistry* 26, 5364-5368.
- 100 Bruzik, K. S. *Biochim. Biophys. Acta.* **1988**, 939, 315-326
- 101 Grönberg, L.; Ruan, Z. S.; Bittman, R.; Slotte, J. P. *Biochemistry* **1991**, 30, 10746-10754.
- 102 Björkbom, A.; Róg, T.; Kankaanpää, P.; Lindroos, D.; Kaszuba, K.; Kurita, M.; Yamaguchi, S.; Yamamoto, T.; Jaikishan, S.; Paavolainen, L.; Päivärinne, J.; Nyholm, T. K.; Katsumura, S.; Vattulainen, I.; Slotte, J. P. *Biochim Biophys Acta.* **2011**, 1808, 1179-86.
- 103 Aittoniemi, J.; Niemelä, P. S.; Hyvönen, M. T.; Karttunen, M.; Vattulainen, I. *Biophys. J.* **2007**, 92, 1125-1137.
- 104 野津浩平 大阪大学大学院理学研究科化学専攻 平成 18 年度修士論文
- 105 岡崎宏紀 大阪大学大学院理学研究科化学専攻 平成 19 年度修士論文
- 106 Guo, W.; Kurze, V.; Huber, T.; Afdhal, N.; Beyer, K.; Hamilton, J. A. *Biophys. J.* **2002**, 83, 1465-1478.
- 107 Scheidt, H. A.; Huster, D.; Gawrisch, K. *Biophys J.* **2005**, 89, 2504-2512 .
- 108 Bennett, W. F.; Tieleman, D. P. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, 1828, 1765-1776.
- 109 Matsumori, N.; Yamaguchi, T.; Maeta, Y.; Murata, M. *Biophys. J.* **2015**, 108, 2816-2824.
- 110 Matsumori, N.; Yasuda, T.; Okazaki, H.; Suzuki, T.; Yamaguchi, T.; Tsuchikawa,

- H.; Doi, M.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2012**, *51*, 8363-8370.
- 111 Yasuda, T., M.; Kinoshita, M.; Murata, M.; Matsumori, N. *Biophys. J.* **2014**, *106*, 631-638.
- 112 Wang, E.; Klauda, J. B. *J. Phys. Chem. B*, **2017**, *121*, 4833-4844
- 113 Sodt, A. J.; Pastor, R. W.; Lyman, E. *Biophys. J.* **2015**, *109*, 948–955
- 114 Smith, A. K.; Klimov, D. K. *J Phys Chem B*. **2018**, *122*, 11311–11325.
- 115 Yasuda, T.; Tsuchikawa, H.; Murata, M.; Matsumori, N. *Biophys. J.* **2015**, *108*, 2502-2506.
- 116 Ando, J.; Kinoshita, M.; Cui, J.; Yamakoshi, H.; Dodo, K.; Fujita, K.; Murata, M.; Sodeoka, M. *PNAS*. **2015**, *112*, 4558-4563.
- 117 Wu, H. M.; Lin, Y. H.; Yen, T. C.; Hsieh, C. L. *Sci Rep*. **2016**, *6*, 20542.
- 118 Yasuda, T.; Matsumori, N.; Tsuchikawa, H.; Lönnfors, M.; Nyholm, T. K.; Slotte, J. P.; Murata, M. *Langmuir* **2015**, *31*, 13783–13792.

第2章 Lo ドメイン形成をもたらす SM-SM、SM-Cho 間水素結合の精密評価

緒言

SM はスフィンゴ脂質の一種であり、脂質ラフトを構成する主要な脂質である。脂質ラフトは細胞膜上に存在し、シグナル伝達などの生理機能に不可欠なマイクロドメインとして知られている¹⁾。前章で記述したように、この脂質ラフトは SM と Cho を主要な構成脂質としている²⁾。人工膜において Cho は、飽和脂肪鎖を有する SM や PC と脂質ラフトのモデル系となる Lo 相を形成する。このため、飽和の炭化水素鎖と Cho との疎水性相互作用が Lo ドメインの形成に重要な役割を担うと考えられてきた^{3,4)}。一方で、生体膜上で観測される脂質ラフトの成分である SM は、飽和の脂肪鎖を有する PC より Cho と Lo ドメインを形成しやすく、より熱安定性が高いドメインを形成することが報告されている⁵⁻⁷⁾。そのため、SM の構造的な特徴であるスフィンゴシン骨格の水素結合を介した SM と Cho 間、もしくは SM 分子間の相互作用が存在して、これが実際の生体膜上に存在する脂質ラフトの形成と安定化に重要な働きをすることが示唆されてきた⁸⁾。実際に、SM のアミド部分やヒドロキシ基をメチル基で保護すると、Lo ドメイン形成が阻害されることが報告されている⁹⁾。また、天然型 SM のジアステレオマー体である *threo*-SM では、水素結合を形成するスフィンゴシン骨格の 3'位の立体配置が異なることが原因でドメイン形成能が低下することが報告されている¹⁰⁻¹²⁾。これらの結果は、飽和脂肪鎖を介した疎水性相互作用だけでなく、SM の 2 位、3 位に存在する極性官能基を介した相互作用が細胞膜上での脂質ラフトの形成に大きな寄与をしていると考えられる。すなわち、SM が極性官能基を介して隣の SM 分子または Cho との脂質分子間相互作用のネットワークを精密に制御し、脂質ラフトを形成していることを示唆している。しかし、それを直接証明するような実験的証拠はほとんど得られておらず、SM が脂質ラフトを形成できる主要因については未だ明確になっていない。その理由として、側方拡散する SM の動的な分子間相互作用を詳細に解析することは困難であり、SM の分子構造と脂質間相互作用の相関を正確に把握できていないことが挙げられる。

そこで、SM 分子の極性官能基を介した相互作用がドメイン形成にもたらす影響の解明を目的とし、SM の分子構造が脂質間相互作用に与える寄与について精密に評価した。まず、SM と物理化学的性質が等しい鏡像異性体(*ent*-SSM) (図 2-

1)を合成して、SSM、*threo*-SSM と膜物性を比較した。ここで、鏡像異性体同士の相互作用は SM 分子同士の作用と化学的に等しい一方で、SSM と *ent*-SSM 間や *threo*-SSM 間ではジアステレオメリックな相互作用になる。また、Cho も不斉炭素を有しており、*ent*-SSM-Cho 間の相互作用は SM-Cho 間とジアステレオメリックな関係となり異なる。これらの相互作用のエナンチオメリック、ジアステレオメリックな関係を利用して、種々の SM 異性体(*ent*-SSM, *threo*-SSM)を用いて、SM 分子間、SM-Cho 間の相互作用を SM と比較した。

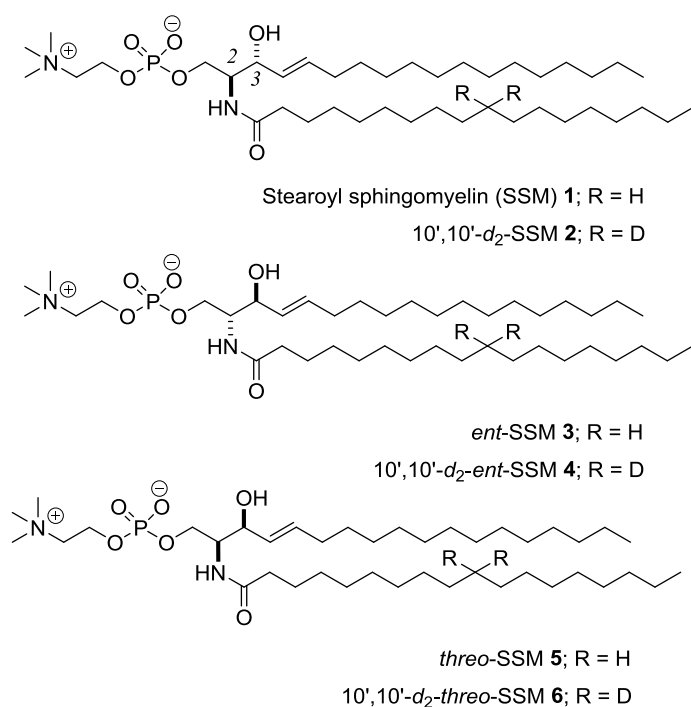
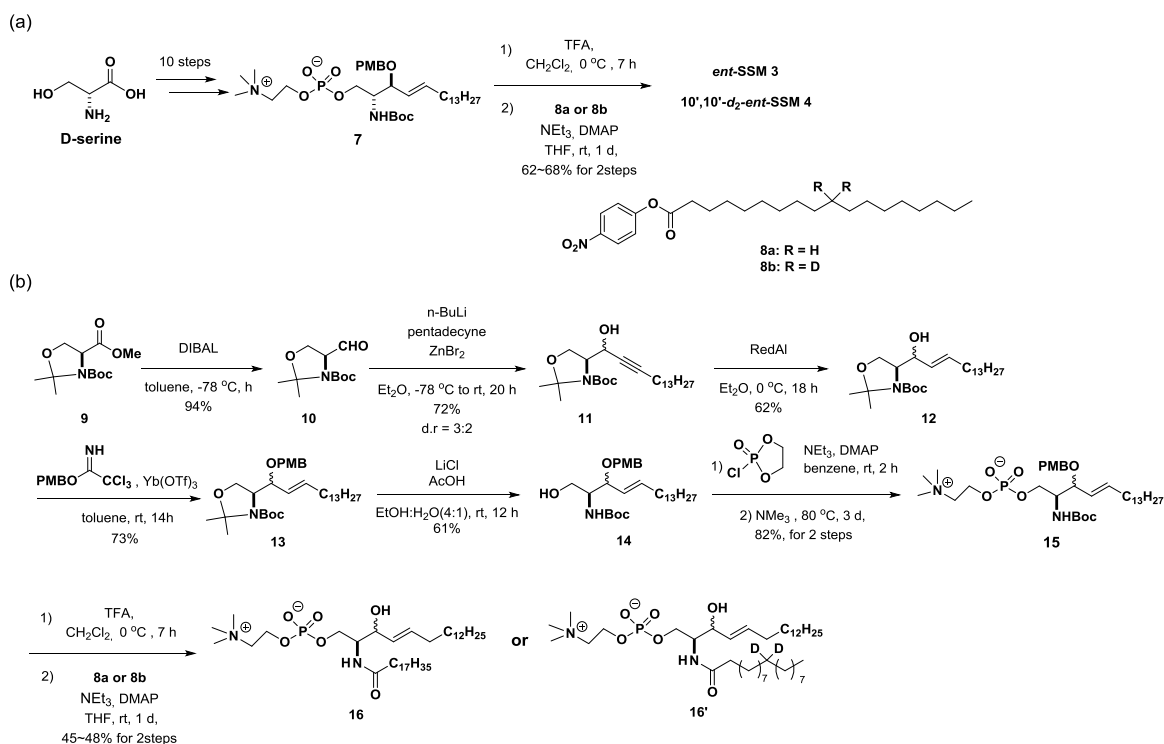


図 2-1. SSM、*ent*-SSM、*threo*-SSM の構造

2-1 *ent*-SSM と *threo*-SSM の合成

修士課程時に *ent*-SSM の合成法を確立した。環状ホスフェートを経由する合成ルート¹³⁾に基づいて *ent*-SSM の合成計画をたてた。原料に L-セリンの鏡像異性体である D-セリンを原料として用いることで *ent*-SSM を合成した。共通中間体であるスフィンゴシンホスホコリン 7 から、アシル鎖 10 位に重水素標識した 10',10'-d₂-*ent*-SSM 3 と *ent*-SSM 4 を合成した(スキーム 2-1a)。

threo-SSM は、Kinoshita らにより報告されている経路¹²⁾で合成を行った(スキーム 2-1b)。市販のエステル **9** を出発物質とし、Garner アルデヒド **10** に導いたのち *n*-BuLi を用いてアセチリドを付加させることでアルキノール **11** を合成した。なお、**11** は 3 位の立体化学が *R* 体と *S* 体の混合物として得られたが、分取は困難であったため、混合物のまま続く反応に用いた。アルキノール **11** に対し、Red-Al を用いて立体選択的に還元を行うことで、アルキン **12** を得た。得られたアルキン **12** のヒドロキシ基を PMB 保護して保護体 **13** を合成した後、酸性環境下でアセトナイドを除去して、アルコール **14** を得た。次に、アルコール **14** に環状クロロホスフェートを反応させてリン酸基を導入した後、ナトリウムで乾燥させたトリメチルアミンを作用させることでスフィンゴシンホスホコリン **15** を得た。得られたスフィンゴシンホスホコリン **15** に対しトリフルオロ酢酸を用いて PMB 基と Boc 基を除去した後、活性エステル **8a** を作用させてアシル鎖を導入することでジアステレオ混合物 **16** を得た。その後、HPLC を用いて *L-threo* 体のみを分取することで、高純度の *threo*-SSM **5** を得た。また、同様の手順で **15** に対して活性化エステル **8b** を作用させ、HPLC 精製することで 10',10'-*d*₂-*threo*-SSM **6** も合成した。



スキーム 2-1. (a) *ent*-SSM とその重水素標識体の合成 (b) *threo*-SSM 及びその重

水素標識体の合成

2-2 2成分系膜における SM 分子間相互作用の評価

2-2-a 示差走査熱量測定

示差走査熱量測定(DSC)を用いて、合成した *ent*-SSM と *threo*-SSM の脂質間相互作用を評価した。DSC はサンプルと基準物質を一定速度で加熱または冷却しながら、基準物質と試料の温度を測定し、サンプルの状態変化や相転移、結晶化に伴う吸熱や発熱により生じる温度差を熱流に変換して観測する。温度差と熱流の関係は式(1)で表される。

$$\frac{d\Delta q}{dt} = -\frac{1}{R}\Delta T \quad (1)$$

$d\Delta q/dt$ はサンプルと基準物質の熱流差、 R は炉と容器の熱抵抗、 ΔT はサンプルと基準物質の温度差を示している。そのため、DSC は状態変化や相転移、結晶化などに伴うエンタルピー変化の測定に用いられる。多くの場合、測定結果は縦軸に熱流、横軸は温度でプロットしたサーモグラムとして表される。ま例えば、SSM のサーモグラムにおいて、ピークの頂点が転移温度、面積が転移エンタルピーを表す(図 2-2a)。また、ピークの山は吸熱反応を、谷は発熱反応を表し、一般に、SSM では 35°C 付近の前転移と 45°C 付近の主転移の 2 つの吸熱ピークが観測される。さらに、ピークの半値全幅はサンプルの協同性に対応している。SSM のピークは PC よりブロードであるため、その協同性は SSM の方が小さい。

前転移は疎水部分の炭化水素鎖の大部分がアンチ形配座をとることで密にパッキングしたゲル相から、脂質頭部間の反発から脂質がうねりを伴って上下に移動しているリップル相への転移を示す。主転移ではリップル相から、炭化水素鎖が部分的にゴーシュ配座をとり、脂質間の相互作用が弱くなった Ld 相への転移を表す(図 2-2b)。

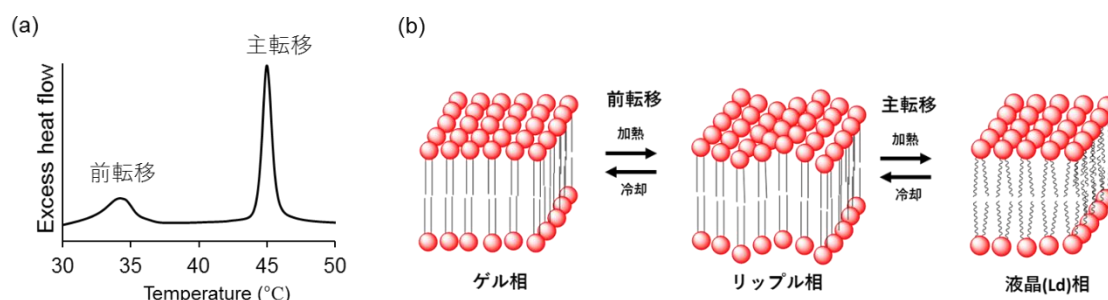


図 2-2 (a)DSC のサーモグラムと(b)飽和脂質の相転移の例

2-2-b SSM 分子間の相互作用評価

ent-SSM と *threo*-SSM の相転移現象について SSM と比較するために DSC 測定を行った(図 2-3)。SSM と *ent*-SSM の主転移温度はそれぞれ 44.9 ± 0.2 °C と 45.0 ± 0.1 °C であり、主転移のエントルピー (ΔH_m)や主転移ピークの半値全幅 ($T_{1/2}$)についても SSM と *ent*-SSM では近い値を示した(SSM: $\Delta H_m = 9.4 \pm 0.4$ kcal/mol $T_{1/2} = 0.70 \pm 0.15$, *ent*-SSM: $\Delta H_m = 9.6 \pm 0.5$ kcal/mol $T_{1/2} = 0.70 \pm 0.09$) (表 2-1)。一方で、*threo*-SSM の主転移温度は 44.1 ± 0.1 °C であり、転移エントルピーは 7.0 ± 0.4 kcal/mol であった。この値は SSM や *ent*-SSM に比べて小さく、*threo*-SSM では脂質分子間の相互作用が SSM より弱いことを示している。また、*threo*-SSM の前転移温度は 43.1 °C を示し、SSM や *ent*-SSM の値(33.2 ± 0.7 °C)よりかなり高い。前転移における変化は脂質頭部付近における脂質間相互作用に由来することから、*threo*-SSM の頭部間の相互作用が SSM と異なることが推測される。特に、DSPC や DPPC などの PC においても前転移温度と主転移温度の差は 2~5°C 程度しかなく¹⁴⁾、*threo*-SSM の前転位と同じように高温で前転位が生じる。SSM や *ent*-SSM の前転位温度と主転移温度の差が *threo*-SSM や PC より大きいことは、SSM に特徴的な分子間水素結合の形成に関連している可能性を示唆している。また、*threo*-SSM の半値全幅は SSM や *ent*-SSM に比べて小さく、これは *threo*-SSM の主転移における協同性が SSM に比べて大きいことを示唆している。SSM は分子間で水素結合ネットワークを形成し、脂質膜中でクラスターを形成する¹⁵⁾と考えられている。そのため、DSC 測定から得られる協同性はクラスター中の SSM 分子の数、すなわちクラスターサイズに対応すると推測できる。SSM や *ent*-SSM が *threo*-SSM や PC より小さい協同性を示すことは、SSM がヒドロキシ基やアミド部分を介した分子間水素結合ネットワークにより *threo*-SSM や PC より小さいクラスターを形成しやすいことを示唆している。

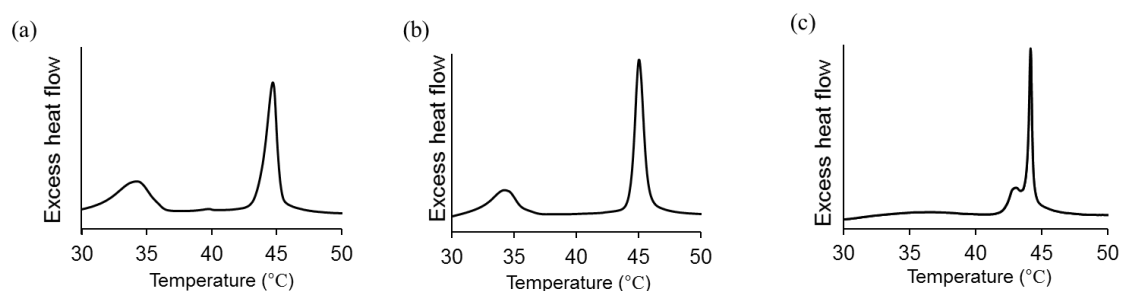


図 2-3 (a) SSM、(b) *ent*-SSM、(c) *threo*-SSM のサーモグラム

表 2-1 DSC の測定結果より得られる転移温度、転移エンタルピー、半値全幅

	T_p (°C)	ΔH_p (kcal/mol)	T_m (°C)	ΔH_m (kcal/mol)	$T_{1/2}$ (°C)
SSM	33.2 ± 0.7	3.0 ± 0.4	44.9 ± 0.2	9.4 ± 0.4	0.70 ± 0.15
<i>ent</i> -SSM	34.4 ± 0.7	2.6 ± 0.5	45.0 ± 0.1	9.6 ± 0.5	0.70 ± 0.09
<i>threo</i> -SSM	43.1 ± 0.2	2.0 ± 0.3	44.1 ± 0.1	7.0 ± 0.4	0.35 ± 0.05
<i>racemic</i> -SSM	—	—	44.5 ± 0.3	8.2 ± 0.5	0.98 ± 0.08

T_p , 前転移温度; ΔH , 転移エンタルピー; T_m , 主転移温度; $T_{1/2}$, 半値全幅.

そこで、SSM 分子間とはジアステレオメリックな関係となる SSM-*ent*-SSM 分子間で働く相互作用を精査するために、SSM に *ent*-SSM を任意の割合で加えた 2 成分脂質二重膜を調製して、その相転移挙動を調べた (図 2-4a)。その結果、25%以上の *ent*-SSM を加えることで、35 °C 付近の前転位が消失した。また、ラセミ体となっている 50:50 の条件では少しブロードな主転移ピークを示した。これは、ラセミ体では相転移における協同性が低下することを示唆している。一方で、相転移温度（主転移）については有意な変化は観測されていない(図 2-4c)。この理由として、2 つ考えられる。一つは、SSM と *ent*-SSM が互いの立体配置に関係なく相互作用して混ざり合うことで、協同性のみが低下していると考えられる。もう一つの可能性は、ラセミ体では SSM と *ent*-SSM はそれぞれの立体配置に依存したホモの相互作用により、排他的に別々のゲルドメインを形成しているとも考えられる。しかしながら、SSM と *ent*-SSM の主転移温度が等しいため、本結果から上述の二つの可能性を区別することは難しい。実際に、*D*-DPPC

と *L*-DPPC の 2 成分で脂質組成を変化させた(図 2-4b)際にも、SSM/*ent*-SSM と同様の傾向が観測され、SSM 分子間の相互作用が立体配置特異的であることを証明するには至らなかった。

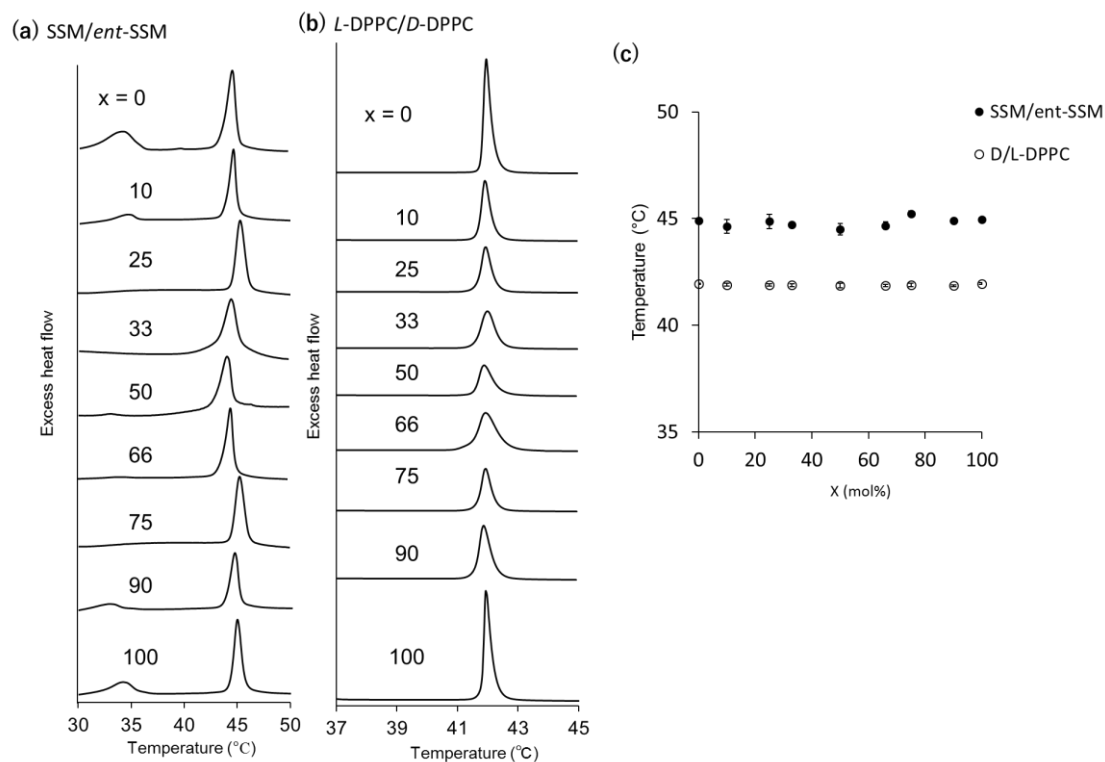


図 2-4 (a) *ent*-SSM 含有率変化に対する SSM のサーモグラム (b) *D*-DPPC 含有率変化に対する *L*-DPPC のサーモグラム (c) *ent*-SSM、*D*-DPPC 含有率変化に対する主転移温度の変化 *X* は SSM 膜、もしくは *L*-DPPC 膜中に占める鏡像異性体の割合(%)を示す。

そこで、相転移温度が SSM より 4°C 程度低い palmitoyl SM (PSM)を用いて、SSM または *ent*-SSM を加えた際の相状態を DSC のサーモグラムから評価した。その結果、PSM/SSM 膜では SSM の増加に伴い、転移温度が上昇し、いずれの系においても一つのブロードなピークを示した(図 2-5a)。このことは、加えた SSM が PSM と相互作用し、均質に近いゲル相を形成していることを示唆している。一方で、PSM/*ent*-SSM 膜では 50:50、33:66、25:75 でそれぞれ 2 つの転移ピークを示した(図 2-5b)。図 2-5c に波形分離したサーモグラムを示す。低温側のピークが PSM の割合の減少に伴い、小さくなり、高温側のピークが

大きくなることから、低温側、高温側のピークがそれぞれ PSM と *ent*-SSM 由来のピークであることを示唆している。つまり、PSM は *ent*-SSM と混ざりにくく、PSM-rich なドメインと *ent*-SSM-rich なドメインに相分離していると考えられる。これらの結果から、PSM は、鏡像体の立体配置を有する *ent*-SSM とは親和性が低く、相分離する¹⁶⁾。一方で、同じ立体配置を有する SSM と PSM は親和性が高く、分子的に混和できることを明らかとした。このことから、図 2-4 で示した SSM のラセミ体での DSC 測定でも、これと同様に、SSM と *ent*-SSM が相分離してそれぞれのドメインを形成していたと考えられる。

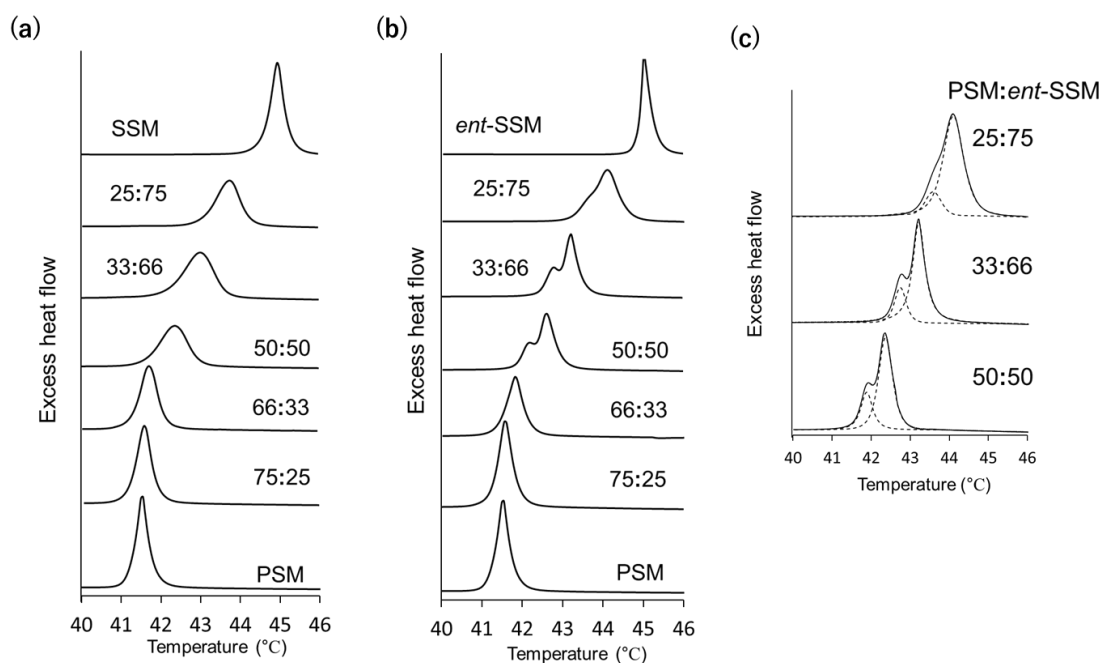


図 2-5 PSM 含有率変化に対する(a) SSM と(b) *ent*-SSM のサーモグラム (c)波形分離した *ent*-SSM/PSM (75:25、66:33、50:50)のサーモグラム

この手法を利用して PC 間での分子間相互作用を評価するために、天然では L 型の立体配置を有する PSPC を使い、PSPC/*L*-DPPC 膜と PSPC/*D*-DPPC 膜で DSC 測定を行った(図 2-6)。PSPC が 100%から DPPC の割合を増加した結果、いずれの系においても DPPC の増加に伴い、転移温度は減少し、ブロードなピークを示した。また、PSPC に対し、逆の立体化学を有する *D*-DPPC を加えた際にも、PSPC/*L*-DPPC 膜と同様の転移ピーク、転移温度を観測しており、均一なゲル相を形成していることを示唆している。これらの結果から、PSPC/*D*-

DPPC 膜と PSPC/L-DPPC 膜の各脂質比率でのサーモグラムは非常に類似しており、PSPC は DPPC の立体化学に関係なく相互作用し、二つの脂質が混合したゲル相を形成すると考えられる。PC はグリセロール骨格を有することから、膜界面付近でエステル結合を介して直接分子間で水素結合することはできない。一方で、SM はアミドやヒドロキシ基を介して SM 分子間で水素結合を形成することが可能である。つまり、DSC 測定の結果から、PC の分子間相互作用は立体配置に依存しない疎水性相互作用が優位である一方で、SM 同士は分子間水素結合により立体配置特異的に作用していると考えられる。

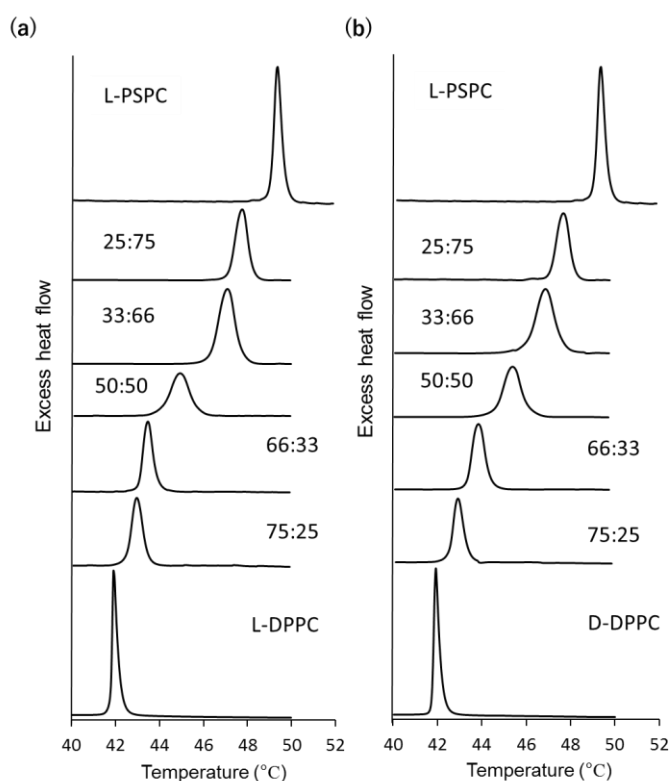


図 2-6 *L*-PSPC 含有率変化(0~100%)に対する(a) *L*-DPPC と(b) *D*-DPPC のサーモグラム

2-3 SM と Cho 間に働く相互作用の評価

2-3-a 重水素固体 NMR

重水素固体 NMR 測定を用いて、Cho と SM の相互作用について評価した。位置選択的に重水素標識した脂質を用いて重水素固体 NMR 測定を行うことで

Pake ダブルレットが得られる。この二つのピーク幅(四極子分裂幅)から標識脂質の運動性や配向状態などの情報が求められる。そこで、SSM と *ent*-SSM などの各異性体の運動性を比較するために重水素固体 NMR 測定を用いた。

重水素はスピン量子数 $I=1$ を有し、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を持つ。この四極子モーメントは、他の核電子や結合電子による電場勾配と相互作用し、核スピンエネルギー準位に影響を与える。ここで、この相互作用は核四極子モーメントおよび電場勾配の大きさのみに依存し、外部磁場に依存しない。しかし、電場勾配はテンソル量であり、外部磁場により配向づけられる。そのため、結合電子状態に関連する分子全体の配向と外部磁場の関係は核四極子モーメントと電場勾配に決定され、四極子相互作用の大きさを評価することができる。

分子の主軸座標系に対して極座標 (θ, ϕ) の方向を磁場が取る場合を考えると、四極子相互作用の一次と二次のエネルギー準位の摂動項は式(1)および式(2)で表される。

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

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

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

e^2qQ は核四極子結合定数、 η は四極子非対称因子、 m は個々のゼーマン準位に対応した磁気量子数、 ν_L はゼーマン相互作用の周波数を示す。これより、 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一次 $\nu_m^{(1)}$ および二次 $\nu_m^{(2)}$ の項の周波数は式(4)および式(5)で表される。

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

$$\begin{aligned}
\nu_m^{(2)} = & -\frac{h\nu_Q^2}{12\nu_L} \{ [3\sin 2\theta - \eta(\sin 2\theta \cos 2\phi + 2i \sin \theta \sin 2\phi)] \\
& \times [3\sin 2\theta - \eta(\sin 2\theta \cos 2\phi - 2i \sin \theta \sin 2\phi)] \left[m(m-1) - \frac{I(I+1)}{6} + \frac{3}{8} \right] \\
& - \{ 3\sin^2 \theta + \eta[1 + \cos^2 \theta \cos 2\phi + 2i \cos \theta \sin 2\phi] \} \\
& \times \{ 3\sin^2 \theta + \eta[(1 + \cos^2 \theta) \cos 2\phi - 2i \cos \theta \sin 2\phi] \} \left[\frac{m(m-1)}{4} - \frac{I(I+1)}{12} + \frac{1}{8} \right] \}
\end{aligned} \quad (5)$$

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 2-7a)。ここで、重水素核の核四極子モーメントは $2.8 \times 10^{-31} \text{ m}^2$ と非常に小さく、二次の項は省くことができる。また、重水素核は電場勾配が軸対称であり、 $\eta=0$ となる。これにより、スペクトルの四極子分裂幅 $\Delta\nu$ は式(6)で表される。

$$\Delta\nu = 2\nu_Q^{(1)} = \frac{3}{2} \frac{e^2 q Q}{h} \frac{3\cos^2 \theta - 1}{2} \quad (6)$$

θ は外部磁場 $\mathbf{B}_0$ と C-D 結合のなす角度であり、スペクトルの分裂幅は θ のみに依存する。さらに、分裂幅の大きさにおいては分子の運動性を考慮しなければいけない。 ^2H NMR のタイムスケールから充分離れた分子運動は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。

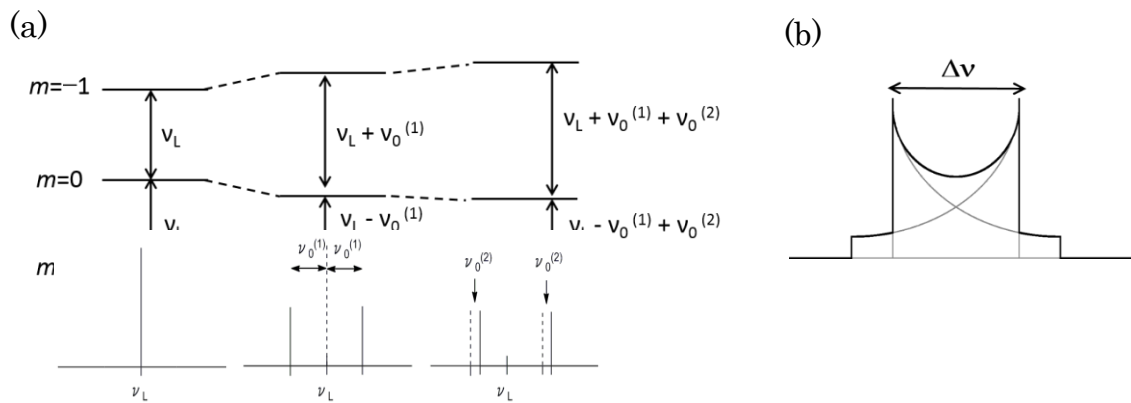


図 2-7 (a)四極子相互作用によるエネルギー準位と共鳴線の位置 (b)重水素 NMR スペクトル (Pake ダブルレット)と核四極子分裂幅($\Delta\nu$)

ここで、リポソームのような膜サンプルで **Pake** ダブレットが得られるのは、膜中に配向した分子の存在比が外部磁場に対して $\sin$ 関数になっているためである。つまり、式(6)において $\theta=0^\circ$ で分子の存在割合は最も低いが、 $\Delta\nu$ は最大となるために外側にシグナルを与え、 $\theta=54.7^\circ$ (マジック角) では、 $\Delta\nu=0$ kHz となりセンターピークが観測される。また、リポソームの場合は外部磁場の向きと膜法線のなす角度が $\theta=90^\circ$ で最も分子の存在割合が高く **Pake** ダブレットにおけるピークトップを与える。しかし、実際は脂質分子の揺らぎや回転・拡散運動が生じ、 θ は一義的に決定できない。これらの点に加えて、と脂質分子がアキシヤルシンメトリックな分子運動をしているモデルを考えると、分裂幅 $\Delta\nu$ は式(7)で表される。

$$\Delta\nu = \frac{3}{2} \frac{e^2 q Q}{h} S_{mol} \frac{3\cos^2\xi - 1}{2} \frac{3\cos^2\sigma - 1}{2} \quad (7)$$

ξ は膜法線と分子回転軸 **R** との角度、 σ は分子回転軸と **C-D** 結合のなす角度を示す。ここで、リポソームの場合は通常膜法線と回転軸は一致していると考え ($\xi=0^\circ$)。そして、 $(3\cos^2\sigma-1)/2$ 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。これらを考慮すると式(8)のように表される。

$$\Delta\nu = \frac{3}{4} \frac{e^2 q Q}{h} S_{mol} \left\langle \frac{3\cos^2\sigma - 1}{2} \right\rangle \quad (8)$$

このように重水素固体 **NMR** 測定により得られる四極子分裂幅は、分子の配向変化や揺らぎに依存している。そのため、各標識体から得られた四極子分裂幅を解析することにより、脂質の運動性を評価できる。

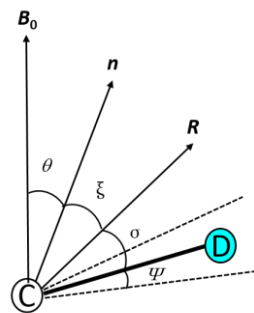


図 2-8 外部磁場(B_0)、膜法線(**n**)、分子の回転軸(**R**)と **C-D** 結合の関係

2-3-b 固体 NMR 測定を用いた SM-Cho 間の相互作用解析

当研究室では重水素固体 NMR 測定を用いて脂質ラフトのモデル膜内部における SM の局所的な運動性や Cho のオーダー効果について報告してきた。具体的には、SM のアルキル鎖における各々の炭素に位置選択的に重水素を導入した 14 種類の SSM を系統的に合成し、Cho 含有膜と非含有膜で重水素固体 NMR を測定した^{5,17)}。その結果、Cho はアルキル鎖中央部のオーダーを最も増加させることを報告した。特に、SSM のアシル鎖 10 位が Cho のオーダー効果を最も強く受けていたことから、各種異性体と Cho との相互作用を重水素固体 NMR 測定で評価する上で、10 位の重水素標識体が有用である。

これを踏まえ、アシル鎖 10 位に重水素標識した 10',10'-d₂-SSM, 10',10'-d₂-*ent*-SSM、10',10'-d₂-*threo*-SSM を用いて Cho 含有膜中のそれぞれの四極子分裂幅を比較した(図 2-9)。SSM とその異性体と Cho が 1:1 で構成された MLV を調製し、25、30、40、50°C で重水素固体 NMR 測定を行った。

結果として、いずれの標識体でも各温度で分裂幅が 50 kHz 以上の値を示し、純粋な SSM や *ent*-SSM、*threo*-SSM 膜の分裂幅(30 kHz 付近、実験項参照)に比べ、広い分裂幅を観測した(図 2-9)。このことは *ent*-SSM、*threo*-SSM が Cho のオーダー効果を強く受けていることを示している。また、*ent*-SSM/Cho(1:1)膜で得られた分裂幅は SSM/Cho(1:1)膜中での SSM 標識体と、いずれの温度でも非常に近い値を示した。このことから、Cho は *ent*-SSM に対しても SSM と同程度のオーダー効果を示すことがわかった。過去の報告で Cho の鏡像体を用いた際にも、PSM との相互作用が天然型の Cho と優位な差がなかった¹⁸⁾ことから、SM と Cho 間の相互作用は互いの立体配置非特異的であると考えられる。そのため、SSM が有するアミド部分とヒドロキシ基付近の 2 位、3 位の立体化学が Cho との相互作用におよぼす影響は小さいと考えられる。

threo-SSM/Cho(1:1)膜では、25°C の分裂幅が SSM/Cho と *ent*-SSM/Cho に比べ、僅かに減少していた。これは、ゲル相における *threo*-SSM 分子間の相互作用が SSM 分子間相互作用より弱いことに起因すると考えられる。DSC 測定では、主転移温度とエンタルピーから *threo*-SSM 間の相互作用は SSM 間や *ent*-SSM 間より弱かった。25°C では、ゲル様ドメインが部分的に存在するため、*threo*-SSM 間と SSM 間の分子間相互作用の違いが四極子分裂幅の差として観測されたと考えられる。一方で、30°C 以上では、*threo*-SSM/Cho 膜と SSM/Cho 膜の分裂幅に有

意な差は観測されなかった。さらに、SSM/*ent*-SSM/Cho(1:1:2)膜中においても、 d_2 -SSM と d_2 -*ent*-SSM のそれぞれが示す四極子分裂幅は、SSM/Cho 膜中での分裂幅と顕著な差はなく、Cho と SSM 間の相互作用に SSM の立体化学が及ぼす影響は非常に小さいと考えられる。これまで 2 位、3 位に存在するアミド部分やヒドロキシ基を介した SM と Cho との水素結合形成が提唱されてきた。仮に Cho がこのような水素結合を形成しているとする、アミド部位の立体配置の異なる *ent*-SSM や *threo*-SSM と Cho 間の相互作用様式は SSM/Cho 間の相互作用様式とはジアステレオマーの関係になり、異なる分裂幅を示すと推測できる。しかし、重水素固体 NMR 測定の結果は Cho が *ent*-SSM や *threo*-SSM に対しても SSM に対してと同程度の強さで相互作用していることを示していた。すなわち、SSM-Cho 間に働く 2 位、3 位のアミド部分やヒドロキシ基を介した水素結合は非常に弱いと考えるのが合理的である。

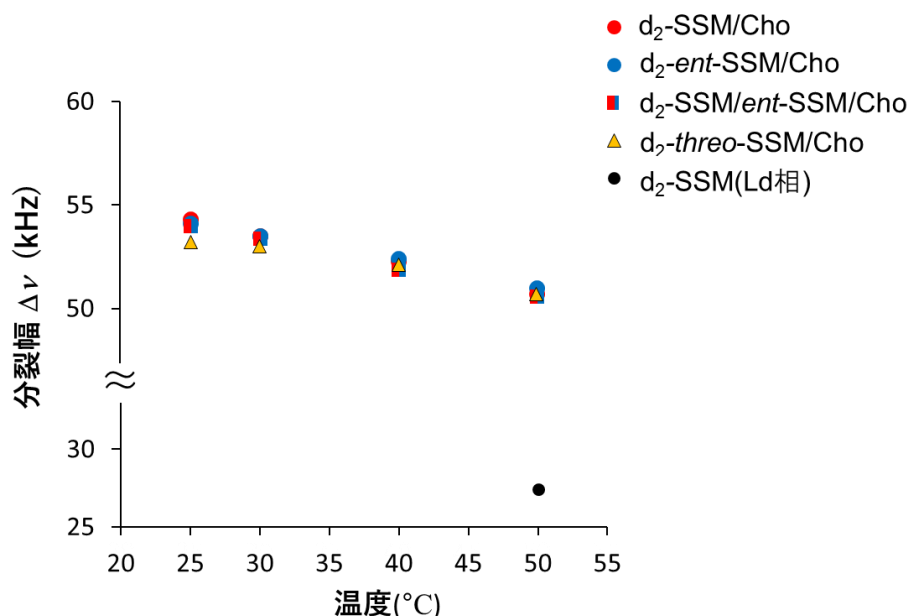


図 2-9 SSM/Cho(1:1)、*ent*-SSM/Cho(1:1)、SSM/*ent*-SSM/Cho(0.5:0.5:1)、*threo*-SSM/Cho(1:1)膜における各重水素標識体の温度変化に対する四極子分裂幅 SSM/*ent*-SSM/Cho 膜では 10',10'- d_2 -SSM の分裂幅を示す。

膜物性に対する SSM/Cho 間の水素結合の形成の寄与を明らかにするために、コレステロールのヒドロキシ基をメチル保護したコレステリルメチルエーテル

(CME) (図 2-10a)を用いて重水素固体 NMR 測定を行った。CME はプロトン供与基であるヒドロキシ基の欠損に加えて、プロトン受容基としての機能も低下している (エーテル結合はヒドロキシ基より弱い)。そのため、Cho のヒドロキシ基が SM-Cho 間の水素結合に関与するならば、SSM/CME 間の相互作用は SSM/Cho 間の相互作用より弱いと考えられる。しかし、 d_2 -SSM/CME 膜中における重水素固体 NMR 測定の結果、Cho のヒドロキシ基保護による d_2 -SSM の分裂幅に優位な差は観測されなかった(図 2-10b)。このことから、SSM と Cho 間に働く相互作用について、Cho の環状部分と飽和のアルキル鎖間に働く疎水性相互作用に比べ、SSM/Cho 間の水素結合の寄与は非常に小さいと考えられる。一方で、Björkbom らが SM のアミド部分、もしくはヒドロキシ基をメチル保護したメチル体を用いて蛍光消光実験を行った際には、Lo ドメインの形成が大きく低下している⁹⁾。また、蛍光異方性測定を用いて各メチル体の相転移について評価した際にも、SM に比べてメチル体の相転移温度は大きく減少した⁹⁾。なかでも、アミド部分とヒドロキシ基を保護した際には、ゲル相は大きく不安定化し、Lo ドメインは消失する。これらの結果と CME を用いた重水素固体 NMR 測定の結果から、メチル保護により SM と Cho 間の水素結合形成を阻害した場合より SM 分子間の水素結合形成を阻害する方がより Lo ドメインが不安定化することを示唆している。つまり、Lo ドメインの形成には SM と Cho 間の水素結合より SM 分子間の水素結合形成が重要であると考えられる。

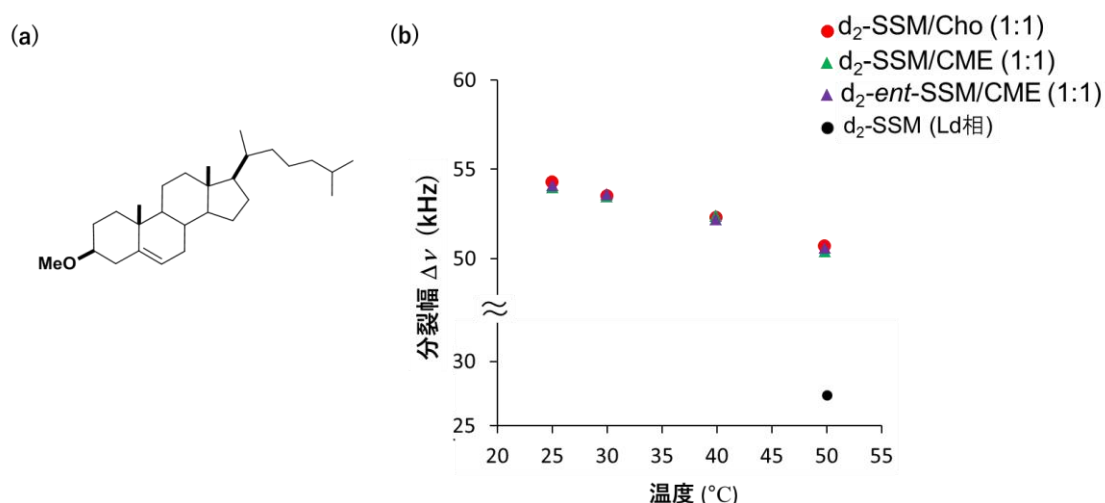


図 2-10 (a) コレステリルメチルエーテル(CME)の構造 (b) d_2 -SSM/Cho(1:1)、 d_2 -

SSM/CME(1:1)、 d_2 -*ent*-SSM/CME(1:1)膜の温度変化に対する四極子分裂幅

比較のため、 d_2 -PSPC/Cho 膜を用いて重水素固体 NMR を測定した。 40°C 以下の温度条件では、SSM/Cho 膜とほぼ同じ分裂幅を示した一方で、 45 、 50°C で SSM/Cho 膜に比べ、顕著に小さい分裂幅を示しており(図 2-11)、この温度領域で PC が SM に比べ運動性が高いことを示唆している。この理由として、PSPC では形成能が SSM より小さいことに起因すると推測される。加えて、図 2-11 で示されたように PSPC/CME 膜では d_2 -PSPC は PSPC/Cho 膜より小さい分裂幅を示したことから、Cho のヒドロキシ基のメチル化により PSPC の運動性は増加した。このことは、PSPC と Cho のヒドロキシ基間で水素結合を形成していると考えられる。これらの結果は、過去に所属研究室で報告された結果を強く支持している。具体的には、位置選択的に重水素標識した SSM と PSPC を用いて Cho の深度を評価した際に、SSM 膜では Cho が PSPC 膜に比べより膜の深い部分に位置していることを示唆する結果が得られている⁵⁾。本研究もこの結果を支持しており、Cho は膜界面付近で PSPC と水素結合する一方で、SSM 膜では Cho が SM の不斉炭素から離れた膜の深い位置に存在することで SSM と Cho 間の水素結合は弱いと考えられる。この理由として、SSM は膜界面付近で SSM 分子間の水素結合を形成する^{19,20)}ことで Cho を膜内部に押し留めっていると推測される。

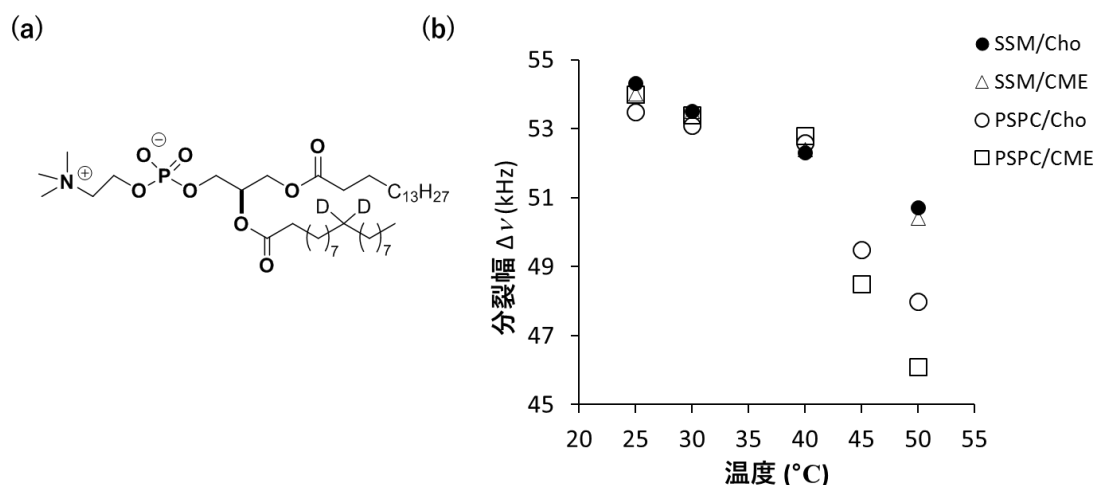


図 2-11 (a)10',10'- d_2 -PSPC の構造 (b) SSM/Cho(1:1)、SSM/CME(1:1)、*ent*-SSM/CME(1:1)膜の温度変化に対する四極子分裂幅

^{31}P NMR 測定を用いて Cho 含有膜中の各異性体頭部の配向や運動性変化を評価した結果、いずれの異性体についても有意な差は観測されなかった(図 2-12)。このことは、SSM の立体配置が Cho 存在下での SSM リン酸エステル部位のオーダーと配向に大きな影響を与えないことを示している。

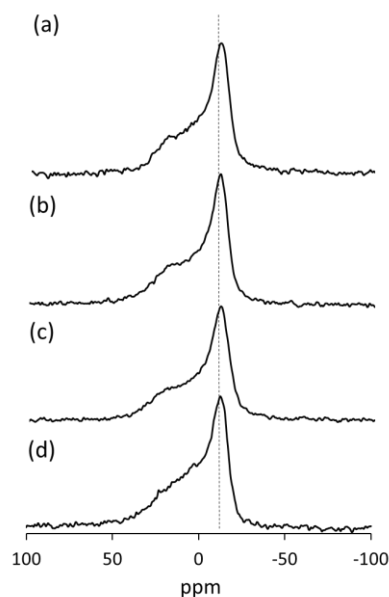


図 2-12 50°C における(a) SSM/Cho(1:1)、(b) *ent*-SSM/Cho(1:1)、(c) *threo*-SSM/Cho(1:1)、SSM/*ent*-SSM/Cho(0.5:0.5:1)膜の ^{31}P ssNMR スペクトル

2-4 三成分系膜における SM 分子間相互作用の評価

2-4-a 蛍光寿命測定

生体膜に近い環境で SM と *ent*-SM の相互作用の違いを評価するために、不飽和結合グリセロリン脂質 POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) を加えて蛍光寿命測定を行った。時間分解蛍光寿命測定では^{21,22)}、脂質膜に導入した蛍光分子をパルス光で励起し、その蛍光寿命を測定することで膜の相状態を高い時間分解能で定量的に解析することができる。パルス光により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中でも準安定な振動準位へ非常に速く (10^{-12}s) 戻り、数十から数ナノ秒後、発光を伴い基底状態に戻る (輻射過程)。この時、励起状態にあった蛍光分子数が $1/e$ (約 37%) まで減少する

のに要する時間が蛍光寿命と定義されている。この蛍光寿命は励起分子からの発光である蛍光を観測することで算出できる。

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 、蛍光発光しない無輻射過程における速度定数を k_{nr} とすると、 n の時間変化は式 9 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 11)。ここで、蛍光強度 I は励起した分子数に対応し、ある時間 t における蛍光強度は式 11 で表される。

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(\Gamma + k_{nr})n(t) \quad (9)$$

$$n(t) = n(0)e^{-(\Gamma + k_{nr})t} \quad (10)$$

$$I(t) = I_0 e^{-(t/\tau)} \quad (11)$$

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、時間 t に対して $\log I(t)$ をプロットして、その減衰の傾きに理論式をフィッティングすることで蛍光寿命を求める。一般的な蛍光分子の脂質膜中の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。例えば、蛍光分子の周囲で膜の流動性が低い場合、蛍光寿命は長くなる。それとは逆に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 2-13a)。

時間相関単一光子計数法 (Time Correlated Single Photon Counting, TCSPC) では、パルス光が試料を数十ナノ秒間隔で繰り返して励起し、100 回の励起パルスに対して 1 つのフォトンを検出することで、1 つのフォトンを実証している。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何万回も繰り返して計測する。ここで、時間経過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 2-13b)。

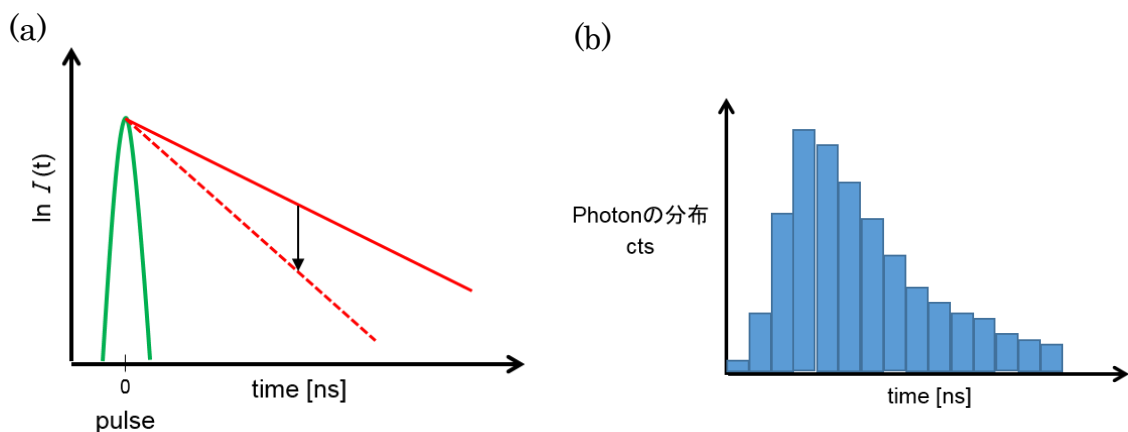


図 2-13 (a) 蛍光寿命測定のスเปクトル模式図 傾きの大きい実線は低い流動性、傾きの小さい点線が高い流動性のときの減衰曲線を示す。(b) TCSPC の原理。

この蛍光寿命測定を行うのに適切な蛍光プローブの蛍光寿命は、膜物性への悪影響が小さく、プローブ周辺環境の変化に敏感である必要がある。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^{23,24)}。tPAは、BODIPYやTexas REDのような嵩高い蛍光発色団と異なり、脂質間で強くパッキングしたゲル相に優位に分配される。そのため、蛍光寿命は脂質間の相互作用が強いゲル相やLo相のオーダーに依存し、膜の流動性を評価する際に最適である。

過去の研究²⁵⁾から、SMとChoで構成されるLo相ではナノ秒スケールで2成分の相状態が存在していることが示唆されている。そこで、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指数関数の和となると仮定すると、蛍光強度は式12のように表される。 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3成分の分解式でフィッティングを行っている。

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i e^{-(t/\tau_i)} \quad (12)$$

系中に含まれるtPA濃度は全脂質量の1 mol%として、過去の報告において生体膜モデルとしてよく用いられてきたX/POPC/Cho(30:60:10)膜²⁶⁻²⁸⁾(X = SSM、*ent-*

SSM、*threo*-SSM、*racemic* SSM)を試料として調製した。SSM/POPC/Cho(30:60:10)膜は、共焦点顕微鏡ではマクロ相分離は検出されない(図2-14)が、相図で示されるようにナノメートルサイズのLo/Ld、もしくはL β /Ldの相分離が起る²⁹⁻³¹⁾。つまり、生体膜に存在する脂質ラフトドメインに類似したサイズのLo相もしくはゲル相のドメインが形成されている。

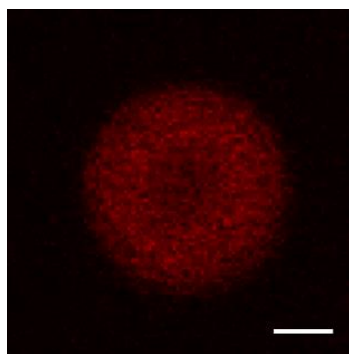


図 2-14 30°C における共焦点蛍光顕微鏡を用いた SSM/POPC/Cho(30:60:10)の GUV 観測 0.1 mol%の TexasRed DPPE による蛍光イメージ。白色のバーは 10 μ m を表す。GUV の表面が一様に赤色の蛍光を示し、均一な相の形成を観測した。

2-4-b 三成分系膜におけるSM分子間相互作用の比較とドメイン形成

図2-15aで示すように膜中のtPA蛍光寿命の解析で得られた各成分では、 τ_1 は 40.1 ± 3.0 ns、 τ_2 は 12.4 ± 0.4 ns、 τ_3 は 3.30 ± 0.1 nsとなり、これらの値は、ゲル相、Lo相、Ld相の純膜における蛍光寿命^{32,33)}と非常に近い値を示した。ここで、*ent*-SSM/POPC/Cho膜では、いずれの蛍光寿命成分もSSM/POPC/Cho膜と非常に近い値を示していることから、SSMと*ent*-SSMで異なる立体化学がChoやPOPCとSSM間の相互作用に与える影響は非常に小さい。一方で、*threo*-SSM/POPC/Cho膜では各成分の蛍光寿命はSSM/POPC/Cho膜に比べて有意に減少していた。なかでも、 τ_1 が大きく減少しており、これは単一成分のDSCで観測された結果と同様に、ゲル相に近い τ_1 成分中の*threo*-SSM分子間の相互作用がSSM分子間、もしくは*ent*-SSM分子間の相互作用より弱いことに起因すると考えられる。つまり、SSM分子間もしくは*ent*-SSM分子間の立体特異的な相互作用が τ_1 成分の増加に関与しており、結果としてゲル相とLo相からなるドメインの安定化に大きく寄与していると考えられる。SSM/*ent*-SSM/POPC/Cho膜においては、平均の蛍光寿命は大きく低下

していた。しかしながら特に重要な τ_1 のみに着目すると、SSM/POPC/Cho膜と有意な差はみられなかった。これは、ゲル相に近い τ_1 成分中でのSSM分子間、もしくは ent -SSM分子間の立体特異的な相互作用がSSM/ ent -SSM/POPC/Cho膜においても維持されていたと推測できる。特に、DSC測定の結果からSSMと ent -SSMが別々のゲルドメインを形成することを考慮すると、SSM/ ent -SSM/POPC/Cho膜においてSSMと ent -SSMが別々のゲル様ドメインを形成するために、 τ_1 に大きな変化が観測されなかったと考えることができる。また、 τ_2 においてもSSM/ ent -SSM/POPC/Cho膜とSSM/POPC/Cho膜では近い値を示したことから、ラセミ体ではSSMと ent -SSMがそれぞれゲル様ドメインを形成することでLoドメインを安定化していると考えられる。

ここで、tPAの平均蛍光寿命 (τ_{AV}) を用いて、膜全体の相状態を比較した場合、SSM/ ent -SSM/POPC/Cho膜の τ_{AV} はSSM/POPC/Cho膜に比べて大きく減少した(図2-15b)。

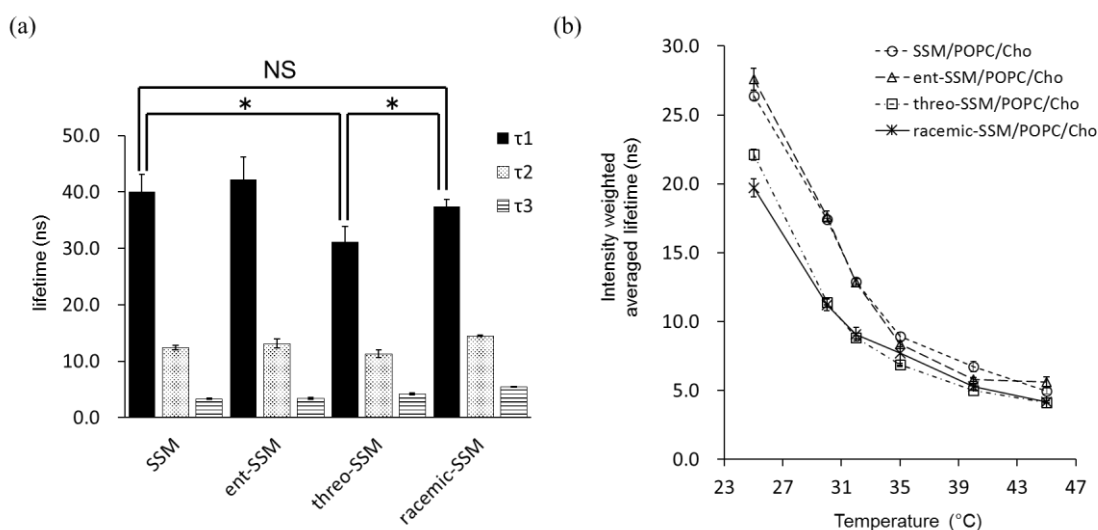


図 2-15 (a) SSM/POPC/Cho、 ent -SSM/POPC/Cho、 $threo$ -SSM/POPC/Cho、SSM/ ent -SSM/POPC/Cho 膜における 30°C の tPA の蛍光寿命 τ_1 、 τ_2 、 τ_3 は multi-exponential model における 3 成分フィッティングから算出される蛍光寿命成分 (b) 各脂質膜における温度変化に対する平均蛍光寿命 * $p < 0.05$, NS; $p \geq 0.05$ (t-test)

この理由として、SSM/*ent*-SSM/POPC/Cho膜では τ_1 成分の割合が減少することで τ_{AV} が減少したと考えられる。SSM/*ent*-SSM/POPC/Cho膜においてSSMと*ent*-SSMがそれぞれ異なるゲル様ドメインを形成するならば、各ゲル様ドメインの融合と分裂がナノ秒スケールで繰り返されていると考えることができる。特に、図2-16に示すように、SSMが形成するゲル様ドメインがSSM/*ent*-SSM(1:1)のラセミ体に置き換わることで、SSMと*ent*-SSMは別々のゲル様ドメインに分裂し、その平均サイズは減少する。このゲル様ドメインのサイズの縮小が τ_{AV} の減少に関連している。加えて、POPCはsn-1に結合する飽和のアルキル鎖により、一部はLoドメインやゲル様ドメインにも分配される^{34,35)}ことが報告されている。このことから、SSMがラセミ体に置き換わることで生じるSSMと*ent*-SSMのゲル様ドメインの間質にはPOPCが分配され、それぞれのドメインサイズを減少させる。いずれにせよ、蛍光寿命 τ_1 がSSM/POPC/Cho膜とSSM/*ent*-SSM/POPC/Cho膜で近い値を示したことから、ラセミ膜中でもSSM間と*ent*-SSM間でそれぞれの立体配置に特異的な相互作用は維持されている可能性が高い。つまり、POPCを加えた3成分膜中においてもSSMは立体配置特異的な分子間の水素結合形成によりクラスターを形成する傾向があると推測した。

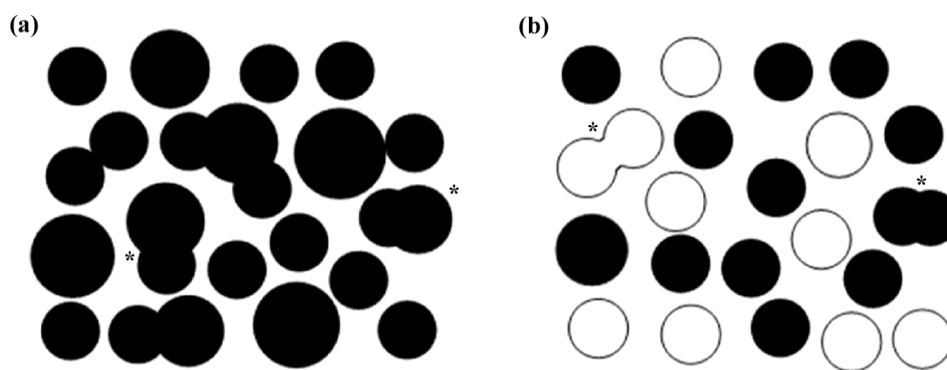


図 2-16 (a)SSM と (b)SSM/*ent*-SSM で構成されるゲル様ドメイン形成のモデル図³⁶⁾ 黒色が SSM により形成されるゲル様ドメイン、白色が *ent*-SSM により形成されるゲル様ドメインを表す。各ゲル様ドメインの間質には、POPC と少量の Cho、SSM(もしくは *ent*-SSM)が存在する。*はゲル様ドメインの融合過程を表す。(a)では、SSM のゲル様ドメインは融合と解離を繰り返す。一方で、(b)では SSM と *ent*-SSM の間でゲル様ドメインの融合は生じにくく、それぞれの平均サイズは小さくなる。 Reprinted with permission from *Biophys J.* 2018.³⁶ Copyright © (2018) Elsevier.

本章では SSM 分子間で働く立体配置特異的な相互作用が Lo ドメインの安定化に強く関与していることを明らかにした。ここで、本章で得られた結果から脂質ラフト形成のメカニズムを考察する。SM は脂質膜中で分子間水素結合を形成してクラスター化する傾向があり、Cho は飽和のアシル鎖と疎水性相互作用することで SM のオーダーを増加させる。Cho により SM のオーダーが増加することで、SM 分子間の水素結合はより安定化される。SSM/CME 膜の重水素固体 NMR 測定において、SSM はヒドロキシ基をもたない CME から Cho と同程度のオーダー効果を受けていた。このため、SSM/Cho 間での水素結合は非常に弱いと考えられる。また、*threo*-SSM との比較から、Lo 相の安定化には Cho によるオーダー効果に加えて、SSM 分子間での水素結合形成が重要であることが示唆された。POPC と Cho を加えた多成分膜中においても、SSM/POPC/Cho、または *ent*-SSM/POPC/Cho 膜における tPA の蛍光寿命が *threo*-SSM/POPC/Cho 膜より有意に大きい値を示したことからも Lo ドメインの安定化には SM 分子間の水素結合形成が非常に重要であることが示唆された³⁶⁾。また、興味深いことに SSM/*ent*-SSM/POPC/Cho 膜においては、SSM と *ent*-SSM がそれぞれ異なるゲル様ドメインを形成し、Lo ドメインを安定化していることを示唆する結果が得られた。つまり、このことから SM の水素結合形成が誘起するドメインの実態解明には Lo ドメインのさらに詳細な構造を明らかにする必要があることが推測される。次章では、Lo ドメインの微細構造を明らかにするために、Lo ドメイン中の SSM と *ent*-SSM がそれぞれ形成するナノドメインのサイズを推定する。

参考文献

- 1 Lingwood, D.; Simons. K. S. *Science* **2010**, 327, 46-50.
- 2 Brown, D. A.; Rose. J. K. *Cell* **1992**, 68, 533-544.
- 3 Grönberg, L.; Ruan, Z. S.; Bittman, R.; Slotte, J. P. *Biochemistry* **1991**, 30, 10746-10754.
- 4 Ahmed, S. N.; Brown, D. A.; London. E. *Biochemistry* **1997**, 36, 10944-10953.
- 5 Yasuda, T., M.; Kinoshita, M.; Murata, M.; Matsumori, N. *Biophys. J.* **2014**, 106, 631-638.
- 6 Veiga, M. P.; Arrondo, J. L. R.; Goni, F. M.; Alonso, A.; Marsh, D. *Biochemistry* **2001**, 40, 2614-2622.
- 7 Ramstedt, J.; Slotte, J. P. *Biochim. Biophys. Acta.* **2006**, 12, 1945-1956.
- 8 Slotte, J. P. *Biochim. Biophys. Acta.* **2016**, 1858, 304-10.
- 9 Björkbom, A.; Róg, T.; Kankaanpää, P.; Lindroos, D.; Kaszuba, K.; Kurita, M.; Yamaguchi, S.; Yamamoto, T.; Jaikishan, S.; Paavolainen, L.; Päivärinne, J.; Nyholm, T. K.; Katsumura, S.; Vattulainen, I.; Slotte, J. P. *Biochim Biophys Acta.* **2011**, 1808, 1179-86.
- 10 Bruzik, K. S.; Tsai. M. D. *Biochemistry* **1987**, 26, 5364-5368.
- 11 Ramstedt, B.; Slotte, J. P. *Biophys. J.* **1999**, 77, 1498-1506.
- 12 Kinoshita, M.; Goretta, S.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biophysics* **2013**, 9, 37-49.
- 13 Cohen, R.; Barenholz, Y.; Gatt, S.; Dagan, A. *Chem. Phys. Lipids.* **1984**, 35, 371-384.
- 14 Mabrey S.,; Sturtevant J. M. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1976**, 73, 3862-6.
- 15 Mombelli, E.; Morris, R.; Taylor, W.; Fraternali, F. *Biophys J.* **2003**, 84, 1507-17.
- 16 Maulik, P. R., and G. G. Shipley. *Biochemistry* **1996**, 35, 8025-8034.
- 17 Matsumori, N.; Yasuda, T.; Okazaki, H.; Suzuki, T.; Yamaguchi, T.; Tsuchikawa, H.; Doi, M.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2012**, 51, 8363-8370.
- 18 Mannock, D. A.; McIntosh, T. J.; Jiang, X.; Covey, D. F.; McElhaney, R. N. *Biophys. J.* **2003**, 84, 1038-46.
- 19 Matsumori, N.; Yamaguchi, T.; Maeta, Y.; Murata, M. *Biophys. J.* **2015**, 108, 2816-2824.
- 20 Smith, A. K.; Klimov, D. K. *J Phys Chem B.* **2018**, 122, 11311-11325.
- 21 Halling, K. K.; Ramstedt, B.; Nyström, J. H.; Slotte, J. P.; Nyholm, T. K. *Biophys. J.* **2008**, 95, 3861-3871.
- 22 Yasuda, T.; Tsuchikawa, H.; Murata, M.; Matsumori, N. *Biophys. J.* **2015**, 108,

- 2502-2506.
- 23 Sklar, L.A.; Hudson, B. S.; Simoni, R. D. *Biochemistry* **1977**, *16*, 819-828.
 - 24 Sklar, L.A. *Molcul. Cell. Biochem.* **1980**, *32*, 169-177.
Yasuda, T.; Matsumori, N.; Tsuchikawa, H.; Lönnfors, M.; Nyholm, T. M.; Slotte, J. P.; Murata, M. *Langmuir* **2015**, *31*, 13783-13792.
 - 25 Yasuda, T.; Matsumori, N.; Tsuchikawa, H.; Lönnfors, M.; Nyholm, T. M.; Slotte, J. P.; Murata, M. *Langmuir* **2015**, *31*, 13783-13792.
 - 26 Alanko, S. M.; Halling, K. K.; Maunula, S.; Slotte, J. P.; Ramstedt, B. *Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, *1715*, 111-121.
 - 27 Georgieva, R.; Chachaty, C.; Hazarosova, R.; Tessier, C.; Nuss, P.; Momchilova, A.; Staneva, G. *Biochim. Biophys. Acta.* **2015**, *1848*, 1424-1435.
 - 28 Goñi, F. M.; Alonso, A.; Bagatolli, L. A.; Brown, R. E.; Marsh, D.; Prieto, M.; Thewalt, J. L. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1781*, 665-684.
 - 29 Ionova, I. V.; Livshits, V. A.; Marsh, D. *Biophys. J.* **2012**, *102*, 1856-1865.
 - 30 Petruzielo, R. S.; Heberle, F. A.; Drazba, P.; Katsaras, J.; Feigenson, G. W. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, *1828*, 1302-1313.
 - 31 de Almeida, R. F. M.; Fedorov, A.; Prieto, M. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 2406-2416.
 - 32 Sklar, L. A.; Miljanich, G. P.; Dratz, E. A. *Biochemistry* **1979**, *18*, 1707-1716.
 - 33 Castro, B. M.; de Almeida, R. F.; Silva, L. C.; Fedorov, A. Prieto, M. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 1639-1650.
 - 34 Brewster, R.; Pincus, P. A.; Safran, S. A. *Biophys J.* **2009**, *97*, 1087-1094.
 - 35 Shimokawa, N.; Nagata, M.; Takagi, M. *Phys Chem Chem Phys.* **2015**, *17*, 20882-20888.
 - 36 Yano, Y.; Hanashima, S.; Yasuda, T.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Kinoshita, M.; Al Sazzad, M. A.; Slotte, J. P.; Murata, M. *Biophys J.* **2018**, *115*, 1530-1540.

第3章 3 成分膜中で SM が形成するナノドメインの蛍光分光法による解析

緒言

前章では、SSM とその鏡像体である *ent*-SSM を用いて脂質分子間の相互作用を調べた結果、SSM 分子間（または *ent*-SSM 間）に立体配置特異的な水素結合が形成されること、また、それが Lo ドメインの安定化に強く関与していることを明らかにした。さらに、SSM/*ent*-SSM/POPC/Cho 膜においては、Lo ドメイン中で、SSM と *ent*-SSM がそれぞれ異なる小さなゲル様ドメインを形成していることを示唆する結果が得られた。

生体膜で観測される脂質ラフトのサイズは 10–200 nm 程度と推定されており^{1,2)}、これまで Lo ドメイン中で形成されるナノドメインが脂質ラフトそのもの、もしくは脂質ラフトの主な構成要因であることが示唆されてきた。特に、これまで干渉散乱顕微鏡(iSCAT)³⁾や誘導放出抑制(STED)顕微鏡⁴⁾、一分子追跡法⁵⁾、プラズモンアンテナアレイ⁶⁾といった観測から Lo ドメインは均一ではなく、Lo ドメイン中で 10~60 nm サイズのゲル様ドメインが検出されてきた。過去に当研究室においてジイン部位を SSM の頭部に付加したジイン SSM の Lo ドメイン中の分布を超解像ラマン顕微鏡を用いて解析した際にも、SSM プローブが集積するナノドメインが形成されることが示唆されていた(図 1-14)⁷⁾。加えて、SSM/Cho 膜を用いた蛍光寿命測定から、Lo 相中での SSM 同士の強い分子間相互作用によりゲル様ドメインが形成されることを示唆する結果が得られている⁸⁾。これらの結果から、Lo ドメインにおける SM 分子間の強い相互作用が、SM を豊富に含むナノメートルサイズのゲル様ドメインの形成を誘起していると考えられる。また、第2章の結果⁹⁾からもこのナノメートルサイズのゲル様ドメインが Lo ドメイン形成の際に核となるとも考えられる。しかしながら、現状ではこのナノドメインの性質やサイズは明確ではない。また、このナノドメインを安定化する要因として、SM 分子間の水素結合が推測されてきたが、実験的には充分には証明されていない。

そこで、本章では蛍光標識した SSM と *ent*-SSM を合成し、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)等の蛍光分光法を用いて SSM と *ent*-SSM の脂質分子間の距離を見積ることで SM と *ent*-SSM の Lo ドメイン中の分布を定量的に観測することを目的とする。特に、SSM 分子間の相互作用と *ent*-SSM 間の相互作用は物理学的に等しいことから、ラセミ SM における膜物性だけでなく、SSM や *ent*-SSM の分布を評価することで SSM 分子のみが形成する分子集合体の有無や性質を明らかにすることができる。この結果は、Lo ドメインの核となっているゲル様ドメインにおける SM の会合構造の解明に繋がると考える。

3-1 SSM と *ent*-SSM の蛍光プローブ

3-1-a ドメイン観察に用いられてきた蛍光プローブ

蛍光顕微鏡を用いた脂質ドメインの観察において、重要な要素となるのが蛍光分子である。脂質の分布を明らかにするために、現在まで多様な蛍光プローブが開発されてきた。代表的なものとして、クラスター化した SM を特異的に認識し結合するタンパク質毒素であるライセニン¹⁰⁾や、SM の存在状態によらずに特異的に結合するエクイナトキシン¹¹⁾等が挙げられる。また、脂質を直接蛍光標識した BODIPY-PC^{12,13)}や、ニトロベンゾ - 2 - オキサ - 1,3 - ジアゾール (NBD)^{13,14)}を DOPE の頭部に結合させた NBD-DOPE を用いて、モデル膜での蛍光プローブの分配を観察した結果が報告されている。これらの蛍光プローブは主に Ld 相に分配されるので、膜中で蛍光発色していないドメインをラフトドメインとして観測することができ、相分離の様子を数値でなく可視化した状態で観測することができる。しかし、このような脂質プローブは Lo ドメインに分配されないため、ラフト脂質そのものを観測することは困難である。そこで、近年、Eggeling らによって蛍光発色団を導入した新たな脂質プローブが報告された¹⁵⁾。これは、飽和リン脂質の頭部に PEG リンカーを介して蛍光発色団を導入することで、脂質膜表面から蛍光部位を遠ざけるように設計されている。このため、Lo ドメインの形成に重要とされている脂質同士の疎水的相互作用に蛍光発色団が影響を与えない。実際に単層膜中でこの蛍光プローブを用いて Lo ドメインの顕微鏡観測に成功している。

3-1-b 蛍光標識 *ent*-SSM の合成

当研究室では、頭部電荷 (Me_3N^+ や PO_4^-) を損なわずに、親水的な蛍光発色団 (ATTO488 や ATTO594) を PEG リンカーを介して SSM の頭部に結合した新規蛍光プローブを開発した(図 3-1a)。488SSM や 594SSM は天然の SSM と同様に、Lo ドメインに分布することがわかった。さらに、これらの蛍光プローブは蛍光標識されていない SSM に非常に近い拡散係数を示すことを蛍光相関分光法 (FCS) によって確認している¹⁶⁾。そこで、筆者は Kinsohita らにより報告された蛍光標識 SSM の合成経路に従って¹⁶⁾、*ent*-SSM のヘッドグループに親水性の高い蛍光発色団である ATTO488、ATTO594 を、PEG リンカーを介して導入した ATTO488-nonaethyleneglycol SSM(488SSM)と ATTO594-nonaethyleneglycol *ent*-SSM(594*ent*-SSM)(図 3-1)を合成した。

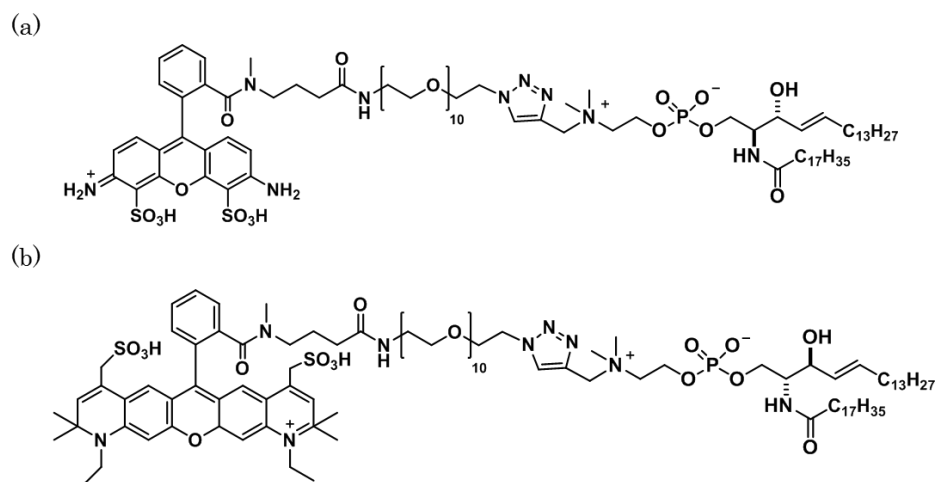
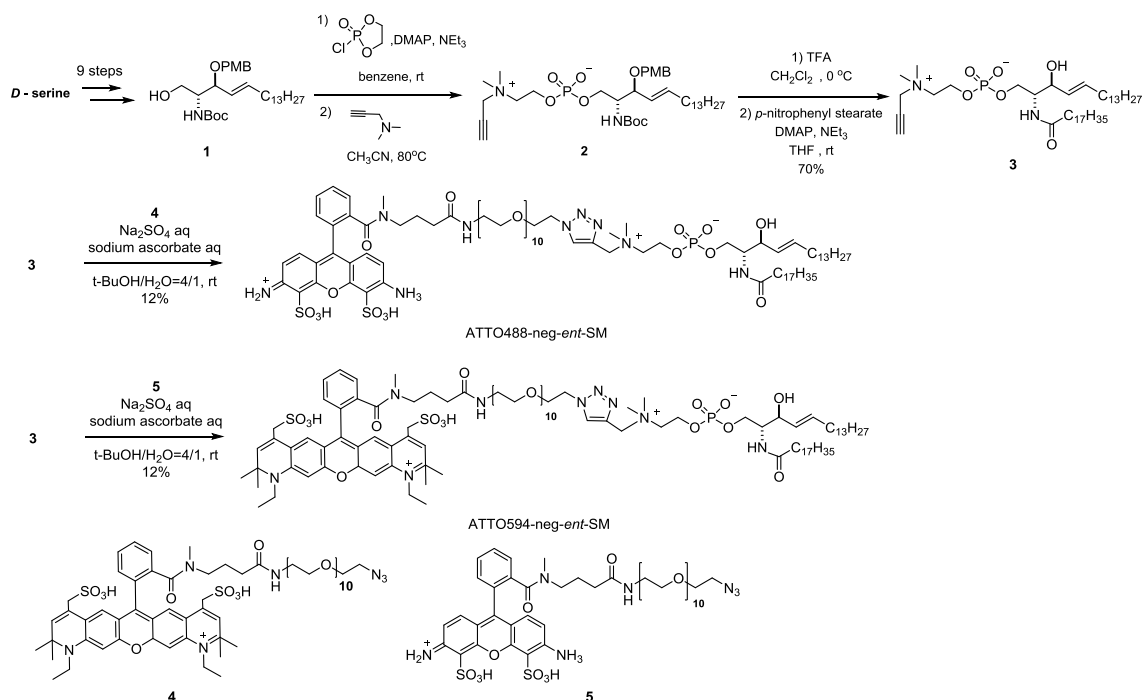


図 3-1 (a) 488SSM と (b) 594*ent*-SSM の分子構造

具体的には、過去のプロパルギル SSM の合成例^{7,17)}をもとにプロパルギル *ent*-SSM **3** の合成を行った。はじめに、PMB 保護体 **1** を出発物質とし、環状リン酸エステル化反応を行った後、プロパルギルジメチルアミンを用いて開環することでプロパルギル体 **2** に導いた。続いて、トリフルオロ酢酸を用いて、PMB 基と Boc 基の脱保護を行った後、活性エステルと縮合してプロパルギル *ent*-SSM **3** の合成に成功した。その後、市販の ATTO488-NHS エステルと PEG リンカーを縮合させた ATTO488neg エステル **4** をあらかじめ調製して、合成したプロパルギル *ent*-SSM **3** とのクリック反応により 488neg-*ent*-SSM の合成に成功した。また、市販の ATTO594-NHS エステルから導いた ATTO594neg エステル **5** に、プロパルギル *ent*-SSM **3** を作用させ、クリック反応に付すことで ATTO594neg-*ent*-SSM を合成した。



スキーム 3-1. 488ent-SSM、594ent-SM の合成

3-2 共焦点蛍光顕微鏡を用いた *ent*-SSM のドメイン観察

3-2-a *ent*-SSM による Lo ドメイン形成の観測

合成した蛍光標識 *ent*-SSM と蛍光標識 SSM を用いて、共焦点顕微鏡観察を行った。まず、SSM/DOPC/Cho (2:2:1) の系で 488SSM と Texas-red DHPE を加えた GUV を作成した(図 3-2)。緑色の蛍光が 488SSM 由来の蛍光であり、赤色の蛍光が Ld 相に分配することが既知の Texas-red DHPE 由来の蛍光を表す。488SSM が Texas-red DHPE が分布する Ld ドメインと異なるドメイン、すなわち Lo ドメインへ分配されることが明らかとなった。つまり、488SSM が SSM と同様に Lo ドメインに分配され、本脂質組成による Lo ドメインの形成を可視的に確認することができた¹⁶⁾。

次に、合成した 594ent-SSM と Ld 相マーカーとして BODIPY-PC を用いて、*ent*-SSM/DOPC/Cho (2:2:1) の系で GUVs 中の相分離を観測した。その結果、594ent-SSM の分配から Lo ドメインの形成を確認した。このことから SSM と同様に *ent*-SSM が DOPC と Cho を含む三成分膜中で Lo ドメインを形成し、合成した蛍光標識 *ent*-SSM が Lo ドメインに分布することが明らかとなった。

さらに、SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho (1:1:2:1) からなる 4 成分膜の GUVs を調製して、488SSM と 594ent-SSM の Lo ドメインへの分布を観測した (図 3-2G-I)。そ

の結果、488SSM 由来の緑色蛍光と 594*ent*-SSM の赤色蛍光が重なり、どちらのプローブも同じドメインに分布していることがわかった。このことから、共焦点蛍光顕微鏡観測下では、蛍光標識した SSM と *ent*-SSM は共に同じ Lo ドメインに分布していると考えられる。

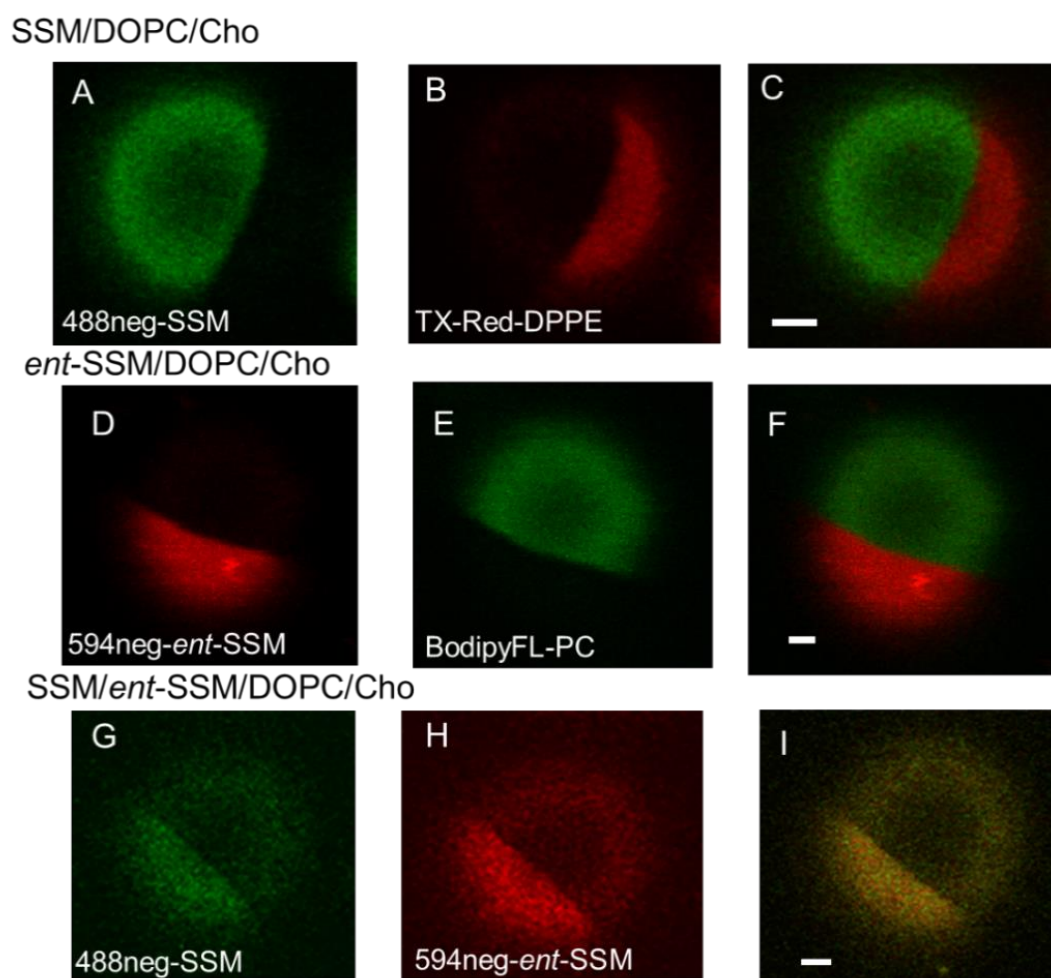


図 3-2 各蛍光プローブを用いた顕微鏡イメージ 上から(A-C) SSM/DOPC/Cho (2:2:1)、(D-F) *ent*-SSM/DOPC/Cho (2:2:1)、(G-I) SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho (1:1:2:1)からなる相分離巨大リポソーム (GUV) の顕微鏡イメージ 左列 A と G は Lo ドメインに分配される 488SSM(0.2 mol%)、また、左列 D は 594*ent*-SSM (0.2 mol%)のイメージ。Ld 相の染色には、中央の(B) では Texas-Red DPPE (0.2 mol%)、中央 E では BodipyFL-PC(0.2 mol%)を用いた。右は(C, F, I)それぞれのイメージの重ね合わせ。測定温度は 23℃で、図内の白色のスケールバーは 10 μ m を意味する。

さらに、SSM/*ent*-SSM/DOPC/Chol (1:1:2:1)膜において蛍光相関分光法(FCS)を用いて 488SSM と 594*ent*-SSM の拡散係数を求めた。FCS は、蛍光分子が測定領域を出入りすることでおこる蛍光強度の時間変化を、共焦点顕微鏡によって検出し、得られた蛍光強度の増減を相関関数として示す手法で、蛍光分子が測定領域を通過する拡散時間などの蛍光分子の動きを求めることができる。

測定領域は図 3-3a に示すように、半径 W 、高さ Z 、体積は数フェムトリットル (10^{-15} L) 程度の円柱で表され、蛍光分子はこの測定領域内において励起され蛍光を発する。その蛍光を検出した信号から図 3-3b に示す蛍光強度の増減のグラフが得られ、図 3-3c に示す観測時間 τ に対する自己相関関数が計算される。なお、今回は通常の FCS で用いられる高感度の電子増倍管 APD の代わりに光電子増倍管(PMT)を用いて光の揺らぎを計測し、取得データを分割することで、その平均値から解析するポイントスキャン FCS 法を用いた。

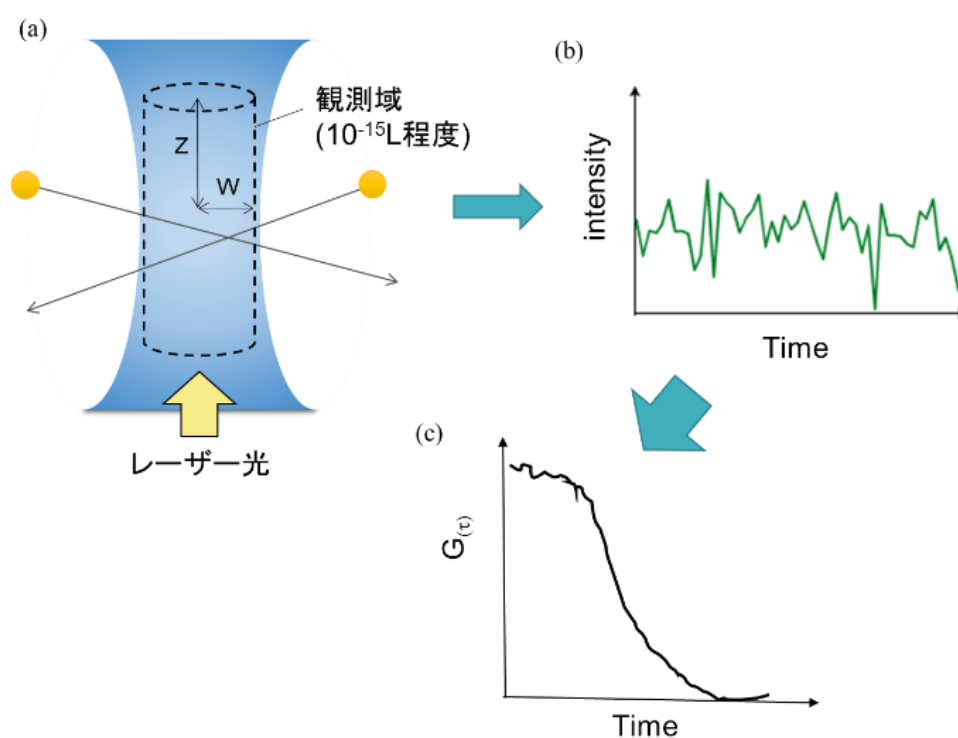


図 3-3 (a) 蛍光相関分光法 (FCS) の装置図 (b) 蛍光強度と時間の関係 (c) 相関関数

FCS 測定で得られた相関関数に対し、Rigler らにより定式化された三次元単純拡散モデル式でフィッティングすることで、蛍光分子の拡散係数が得られる¹⁸⁾。以下に使用する三次元単純拡散モデル式の導出を文献に従って示す¹⁸⁾。

溶液中の粒子はブラウン運動により観察領域内を拡散する。この時、拡散係数と濃度の関係を表す Fick の第二法則を解くことで、ある位置 r から時間 τ の間の拡散係数 D は以下の式で与えられる。

$$\langle \delta C(r, 0) \delta C(r', \tau) \rangle = \langle C \rangle \cdot \frac{1}{(4\pi D)^{-3/2}} \cdot e^{-\frac{(r-r')^2}{4D}} \quad (1)$$

ここで、 C は濃度、 δC は平均濃度からのずれを表す。
さらに、FCS における蛍光強度 $F(t)$ は、式(2)で表される。

$$F(t) = \kappa \cdot Q \int dr W(r) \cdot C(r, t) \quad (2)$$

ここで、 κ は検出効率、 Q は蛍光量子収率、 $W(r)$ は放射光の空間分布を表す関数であり、入射光がガウシアンプロファイルを持つと仮定した場合、以下のように表される。

$$W(r) = e^{-2 \cdot \frac{x^2+y^2}{W_0}} \cdot e^{-2 \cdot \frac{y^2}{W_z}} \quad (3)$$

また、蛍光強度と自己相関関数の関係については、式で表される。

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (4)$$

ここで、 $F(t)$ は時間 t における蛍光強度、 $\delta F(t)$ は時間 t における蛍光強度の測定中の平均強度からのずれを表す。ここで、観測領域 W 中の拡散係数は FCS 測定より得られる拡散時間 τ を用いて

$$D = \frac{W^2}{4\tau} \quad (5)$$

と表される。これらの式より、3次元の単純拡散モデルでは、自己相関関数は式(6)で表される。

$$G(\tau) = G(0) \cdot \left(\frac{1}{1 + 4D/W_0^2} \right) \cdot \left(\frac{1}{1 + 4D/W_z^2} \right)^{1/2} \quad (6)$$

(6)式により得られた相関関数のフィッティングを行うことで、その拡散係数や分子数から分子の動きについて解析できる。

得られた拡散係数について、図 3-4 に示す。SSM/DOPC/Cho 膜における 488SSM の Lo ドメインにおける拡散係数は $0.31 \pm 0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であった。*ent*-SSM/DOPC/Cho 膜における 594*ent*-SSM の拡散係数は $0.34 \pm 0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であり、SSM とほぼ同じ値を示した。SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho から成る 4 成分膜では、SSM と *ent*-SSM は共に Lo ドメイン中の拡散係数に相当する $0.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ を示しており、SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho 膜において蛍光標識した SSM と *ent*-SSM は共に Lo ドメインにほぼ同じ拡散係数で分布していると考えられる。第 2 章の ^2H 固体 NMR 測定の結果からも *ent*-SSM と Cho 間の相互作用は SSM と Cho 間の相互作用と近い値を示しており、*ent*-SSM/DOPC/Cho 膜や SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho 間において形成された Lo ドメイン Cho は、脂質の拡散や Cho のオーダー効果などの性質がほぼ同じであることが明らかになった。

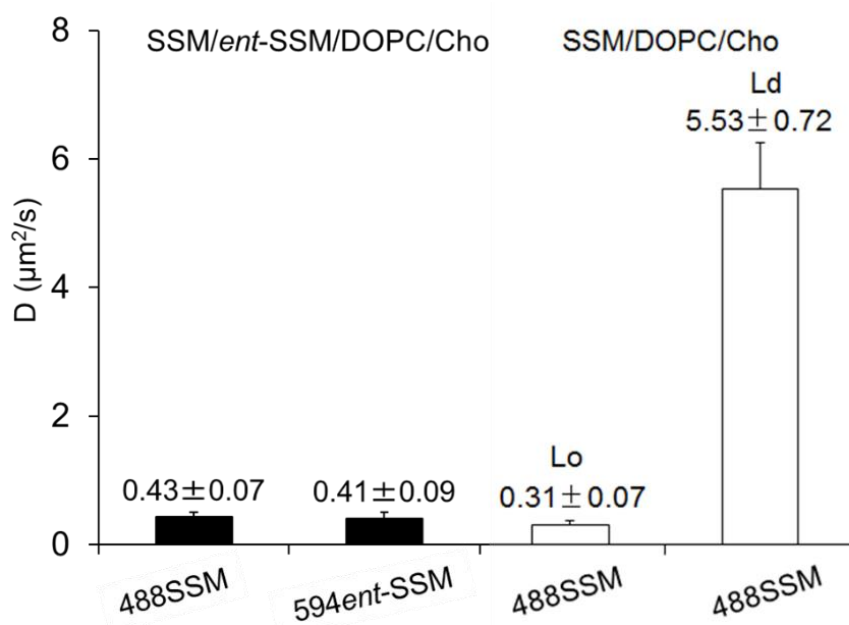


図 3-4 FCS より算出した 488SSM と 594*ent*-SSM の拡散係数 SSM/DOPC/Cho (2:2:1)または SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho (1:1:2:1)を構成成分とする GUV を調製、

0.001 mol%の蛍光プローブを用いて算出した。 $(n > 25)$

3-2-b 蛍光プローブの Lo ドメインへの分配比

蛍光顕微鏡測定では、蛍光強度が蛍光分子の密度に比例することから、Lo 相もしくは Ld 相の領域の蛍光強度を測定することで、蛍光脂質の濃度の比 (I_{Lo}/I_{Ld} = [fluorescent lipid]_{Lo}/[fluorescent lipid]_{Ld})を見かけの分配係数（以下は単に分配係数とする）として算出することができる(図 3-5)。以下はこの I_{Lo}/I_{Ld} 値を分配係数として議論する。^{16,19)}

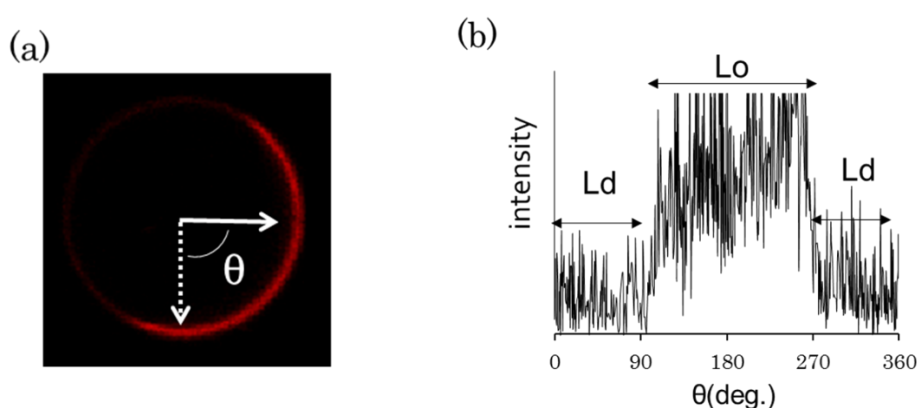


図 3-5 蛍光強度比を用いた分配係数の算出 (a)594SSM を含む SSM/DOPC/Cho (2:2:1)からなる GUV の共焦点蛍光顕微鏡イメージ (b)GUV の円周上の蛍光強度を角度に対してプロットした図 Lo/Ld 相の蛍光強度を容易に比較することができる。

共焦点蛍光顕微鏡の結果と同様に、いずれの蛍光標識 SSM、*ent*-SSM についても得られた分配係数は約 3 もしくはそれ以上であり(図 3-6)、Ld 相よりも優位に Lo ドメインに分配されていることを示した。しかし、SSM/DOPC/Cho からなる三成分膜中では 594*ent*-SSM の分配係数は 594SSM に比べて小さい値を示した。同様に、*Ent*-SSM/DOPC/Cho 膜においても 594SSM の分配係数は 594*ent*-SSM より小さかった。これらことは、蛍光標識 SSM、もしくは *ent*-SSM は同じ立体化学を有する SSM もしくは *ent*-SSM との相互作用があると、Lo ドメインにより分配されやすくなると考えられる。さらに、ラセミ体で構成される SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho 膜では 594SSM と 594*ent*-SSM の Lo ドメインへの分配係数はほぼ同じ値が得られた。このことと、前述の結果を合わせて考えると、594SSM は同じ立体化学を有する非標識の SSM、594*ent*-SSM は非標識の *ent*-SSM と立体特異的な分子間相互作用をすることで Lo ドメインに分配されると考えられる。

蛍光基が異なる 488SSM (もしくは 488*ent*-SSM) においても ATTO594 標識体

と同様に *ent*-SSM（もしくは SSM）から成る 3 成分膜より SSM（もしくは *ent*-SSM）からなる Lo ドメインへ優位に分配することが示された。これは、Lo ドメインへの分配比は PEG リンカーを介して水相に位置する蛍光基²⁰⁾より、セラミド骨格を介した立体配置特異的な脂質間相互作用による寄与が大きいことを示している。

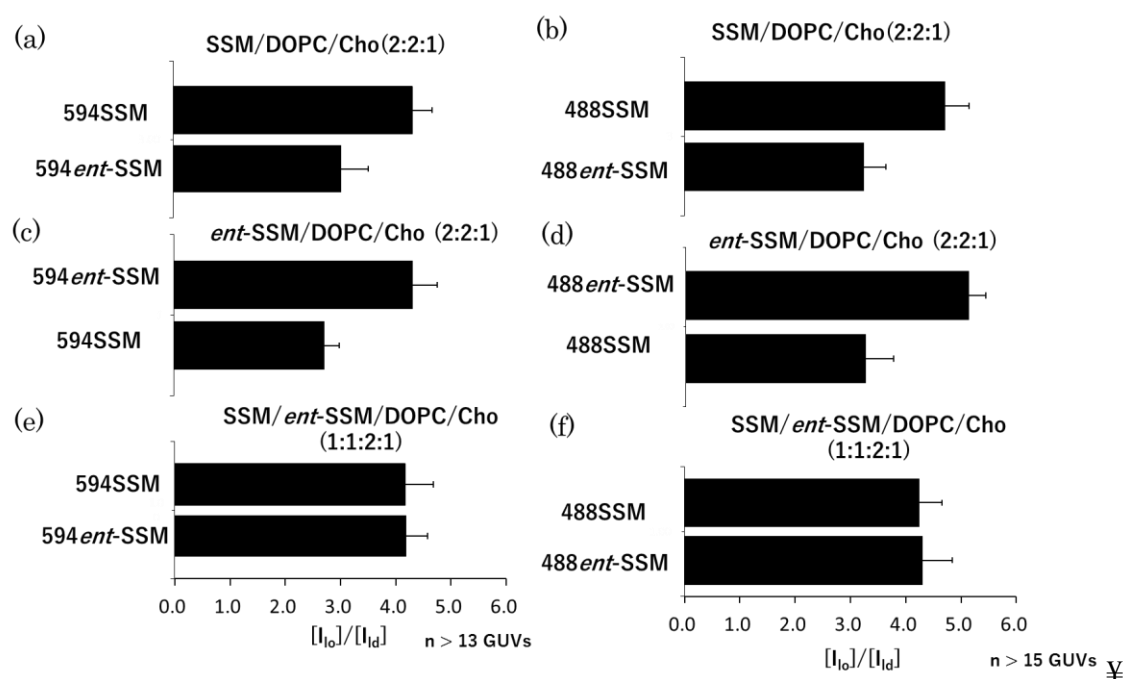


図 3-6 蛍光 SSM の分配係数の比較 (a,c,e)ATTO594 プローブと(b,d,f)ATTO 488 プローブの Lo ドメインと Ld 相の領域の蛍光強度比を(a,b) SSM/DOPC /Cho、(c,d) *ent*-SSM/DOPC/Cho、(e,f) SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho 膜で比較した。

3-3 蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を用いた SSM と *ent*-SSM によるドメインの解析

3-3-a 蛍光共鳴エネルギー移動(FRET) を用いたドメイン観測

蛍光共鳴エネルギー移動(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)を用いて、ナノスケールの短い時空間分解能での SSM や *ent*-SSM に働く脂質間相互作用やドメイン形成を解析した。ある蛍光分子（ドナー）の蛍光スペクトルと、もうひとつの蛍光分子（アクセプター）の励起スペクトルに重なりがある場合、これら蛍光分子が近接し、かつ両分子の遷移双極子モーメントが適切な方向関係にあると、ドナーからの発光が起こる前（ピコ秒オーダー）に、励起エネルギーがアクセプターの分子軌道に移動する現象が生じる。この現象を蛍光共鳴エネ

ルギー移動と呼ぶ。二つの蛍光脂質が近接し、FRET が起きるほどドナーの蛍光が減少し、アクセプターの蛍光が増加する。この「FRET」の効率は蛍光分子間の距離（1～10 nm 程度）の 6 乗に反比例する¹⁹⁾。FRET 効率から得られる距離情報は、前章で用いた ²H NMR や蛍光異方性測定のような時間平均的測定方法とは異なり、ナノ秒間近接しているプローブ間の距離を測定することができる。特に、ドメイン形成やクラスター化によるドナーとアクセプターの距離変化により生じる FRET の変化から、脂質膜における不均一構造をナノメートルスケールで評価できる²¹⁻²⁵⁾。

今回は、ドナーの蛍光発色団に ATTO488、アクセプターの蛍光発色団に ATTO594 を用いて FRET 観測を行った。ATTO488 の蛍光スペクトルと ATTO594 の励起スペクトルは十分な重なりがあり、FRET 観測のためのドナー/アクセプターの組み合わせとして広く用いられている(図 3-7a)^{19,26-28)}。アクセプターの存在下(F)、また非存在下(F_0)でドナーの蛍光強度を観測し、その蛍光強度比(F/F_0)から蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の効率を評価することによって、脂質間の相互作用について調べた。

なお、FRET によるエネルギー移動が大きいほど、ドナー蛍光強度 F は小さくなるので蛍光強度比 F/F_0 の値は小さくなる。例えば、Lo/Ld 相分離した脂質膜中で Lo ドメインにドナーとアクセプターが共に分布し、互いに隣接して FRET が生じた場合、得られる F/F_0 は均一な脂質膜より小さくなる(図 3-7b,c)。ここで、ドナーとアクセプターがフェルスター距離(R_0 : ATTO488 と ATTO594 ペアでは 5.6 nm²⁶⁾)の 1.1 倍の距離(R_c)以下であれば、十分に FRET が観測されると考えられる。また、蛍光分子の配向に関しては、蛍光発色団が PEG リンカーを介して膜外に位置しており、自由回転していると考えられることから、ドナーとアクセプターの蛍光発色団は励起状態寿命の間は等方的に配向しているとする。そのため、蛍光分子の双極子の配向因子は 2/3 と仮定し、SSM と *ent*-SSM で差異が無いと考えられる。

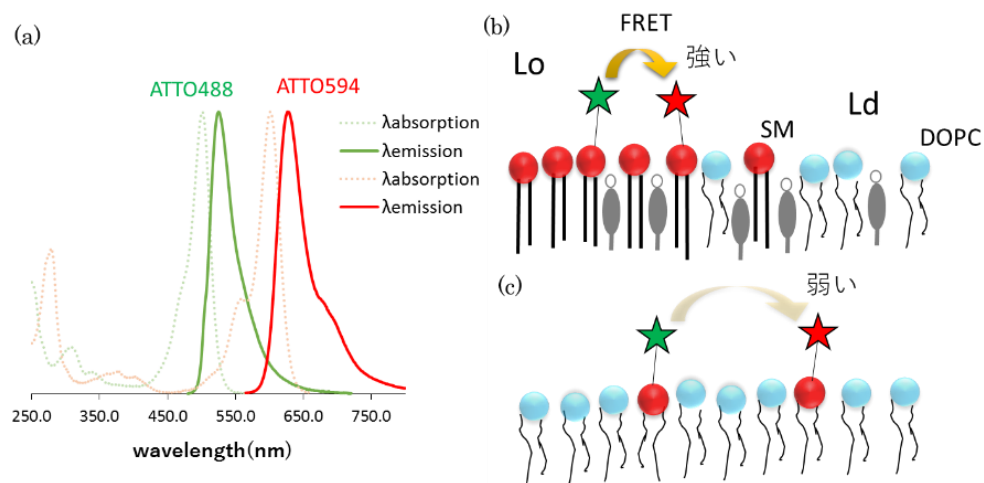


図 3-7 (a)FRET 観測に用いた ATTO488 と ATTO594 の蛍光スペクトル
(b)Lo/Ld 相分離した脂質膜と(c)均一な脂質膜中における 488SSM と 594SSM 間で生じる FRET 効率の違い

3-3-b ラセミ膜における SSM と *ent*-SSM の脂質間相互作用

まず、ラセミ状態における SSM と *ent*-SSM の分子間相互作用を解析するために、SSM 膜と SSM/*ent*-SSM(1:1)膜を調製した。0.1 mol% 488SSM と 1.0 mol% 594SSM、または 1.0 mol% 594*ent*-SSM の蛍光分子を含むリポソームを用いて FRET 観測を行った(図 3-8a)。

488SSM と 594SSM を含む単純な SSM 膜では FRET 効率は 20 °C から 64 °C のいずれの温度においても一定の値を示した。このことは、ドナーとアクセプターの平均距離はいずれの温度においても一定であり、ほぼ均一な相状態の膜を形成していることを示唆している。一方で、ラセミ体では低温で 488SSM と 594*ent*-SSM 間の F/F_0 が SSM 膜より高い値を示し、相転移温度(45 °C)以上では SSM 膜とラセミ体で優位な差は観測されなかった。このことは、ゲル相における蛍光標識 SSM と *ent*-SSM 間での FRET によるエネルギー移動が SSM 分子間より小さいことを意味しており、SSM と *ent*-SSM の共局在性が減少していると考えられる。第 2 章の DSC 測定の結果から、相転移温度以下ではラセミ条件下における SSM と *ent*-SSM の相分離が示唆されており、FRET 観測によっても 488SSM は SSM のゲルドメインに分布し、594*ent*-SSM は *ent*-SSM のゲルドメインに分配された相分離が観測されたと考えられる。⁹⁾

また、FRET 観測により Cho を 50%含む Lo 相における SSM と *ent*-SSM の共局在を評価した(図 3-8b)。その結果、24 °C 以上においては SSM/*ent*-SSM/Cho 膜における SSM と *ent*-SSM 間の FRET 効率は均一な SSM/Cho 膜と類似しており、

SSM と *ent*-SSM の相分離は観測されなかった。これは、Cho により SSM と *ent*-SSM のゲルドメインサイズが減少し、24 °C 以上においてフェルスター距離(5.6 nm)から算出される臨界距離($R_c \cong 1.1R_o$)²⁹⁾以下のドメインサイズになったと考えられる (FRET を用いた詳細は後述する)。

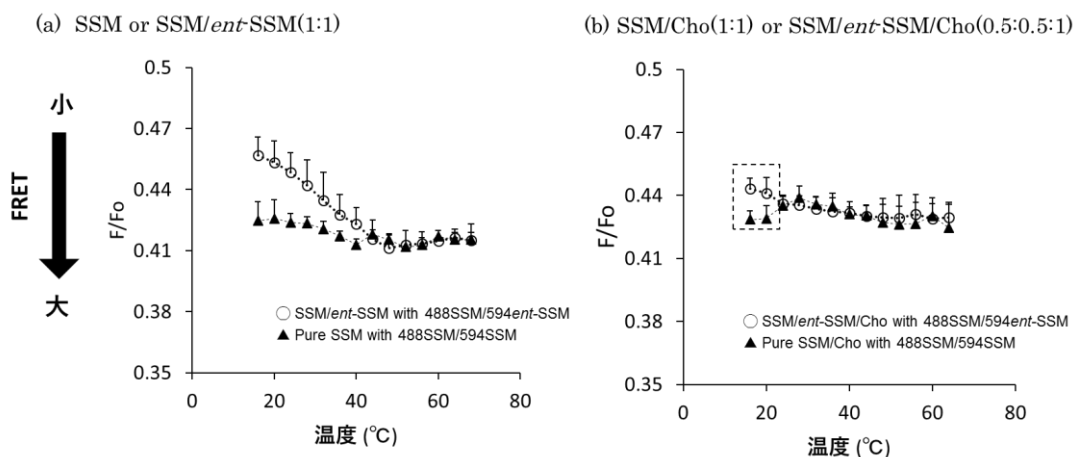


図 3-8 FRET 観測による SSM と *ent*-SSM の分子間相互作用の解析

(a)Cho 非含有膜と(b)Cho 含有膜における FRET 効率(F/F_o)を温度変化に対してプロットした。(a)SSM 純膜と(b)SSM/Cho(1:1)膜における 488SSM/594SSM 間の FRET(▲)と(a)SSM/*ent*-SSM 膜、(b)SSM/*ent*-SSM/Cho(0.5:0.5:1)膜における 488SSM/594*ent*-SSM 間の FRET(○)を比較した。なお、0.1 mol %のドナーと 1.0 mol %のアクセプターを含む多重層リポソーム(MLV)を調製して測定した。

実際に、当研究室で蛍光寿命測定と重水素固体 NMR 測定を用いて、Cho を豊富に含む SSM/Cho(1:1)の Lo 相を評価した際にもナノスケールのゲル様ドメインの存在を示唆する結果が得られている(図 3-9a,b)⁸⁾。具体的には、 d_2 -SSM/Cho(1:1)膜における重水素固体 NMR 測定では 20 °C でゲル相由来のブロードなピークの消失を観測した(図 3-9a)一方で、蛍光寿命測定では 25 °C 付近までゲル相に相当する 40 ns 程度の蛍光寿命を検出した(図 3-9b)。これは、重水素固体 NMR 測定と蛍光寿命測定における測定のタイムスケールの違いから生じる。つまり、重水素固体 NMR 測定で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一方、蛍光寿命測定はナノ秒スケール内の膜脂質の運動を観測することができることから、蛍光寿命測定で観測された 20 °C 以上で形成されるゲル様ドメインはナノ秒時間領域で融合と崩壊を繰り返しており、そのサイズが非常に小さいことから重水素固体 NMR 測定では検出されていないと考えられる⁹⁾。今回の FRET 観測においても、16~20 °C 付近まではゲルドメイン由来の SSM

もしくは *ent*-SSM の相分離を観測しており、24 °C 以上ではドメイン観測の限界である臨界距離 (6.2 nm) より小さいサイズでゲル様ドメインが存在していると考えられる。

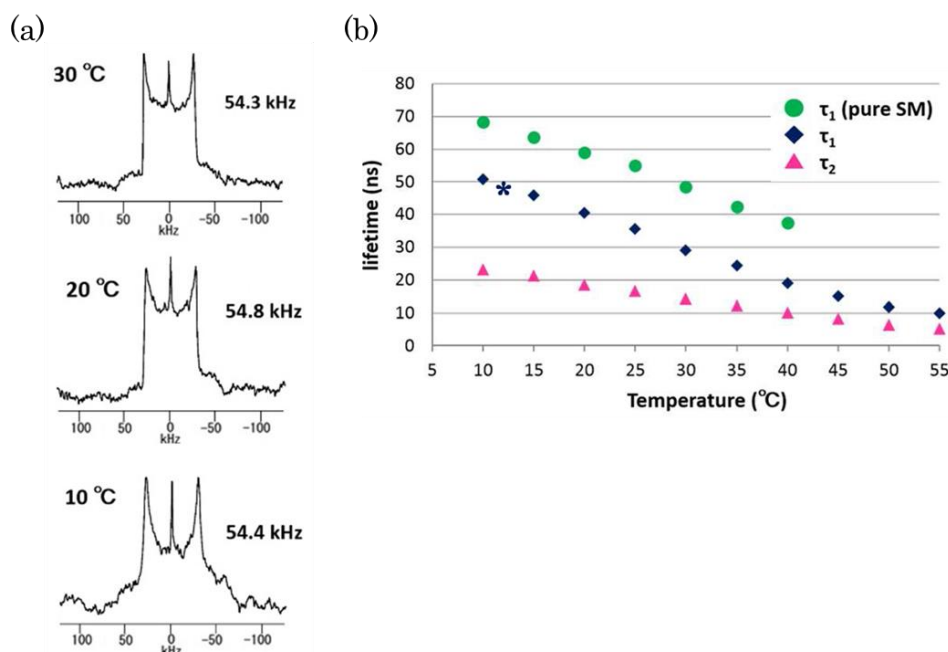


図 3-9 Yasuda らによる SSM/Cho(1:1)膜におけるゲル様ドメインの観測⁸⁾

(a) SSM/Cho(1:1)膜中での 10、20、30 °C における $10',10'\text{-d}_2\text{-SSM}$ の ^2H 固体 NMR スペクトル 10 °C では、20 °C と 30 °C に比べてゲル相由来のブロードなピークを観測した。(b) SSM/Cho(1:1)膜における tPA の 2 つの蛍光寿命成分 τ_1 (◆)と τ_2 (▲) の温度依存性。● (緑) で示すのは SSM 純膜のゲル相中で得られる tPA の蛍光寿命成分。 ^2H 固体 NMR 測定においてゲル相由来のブロードなシグナルを観測した温度。Reprinted with permission from *Langmuir*. 2015.⁸ Copyright © (2015) American Chemical Society.

3-3-c 三成分系膜における SSM と *ent*-SSM のナノドメイン形成の解析

次に、不飽和グリセリン脂質 DOPC と Cho を含む三成分膜中での蛍光標識 SSM プローブと *ent*-SSM プローブの共局在性を評価した。まずは、SSM の代わりに飽和リン脂質 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) を用いて、DSPC/DOPC/Cho (2:2:1) 膜を調製して実験をおこなった。その結果、488SSM と 594SSM のペアを用いた場合は、同じペアが均一な DOPC/Cho 膜で起こす FRET に比べて 54 °C 以下での範囲で高い FRET を示した(図 3-10)。また、同じ脂質組

成の膜に 488SSM と 594*ent*-SSM のペアを用いた場合も高い FRET を観測した。DSPC/DOPC/Cho 膜では 54℃ 以下で Lo ドメインが形成される³⁰⁾ことから、Lo ドメインに分布した SSM と *ent*-SSM の両プローブはいずれも共局在性が増加し、高い FRET を観測したと考えられる。DSPC からなる Lo ドメインでは SSM プローブは立体化学に関係なく高い共局在性を示したので、この膜組成において SSM と *ent*-SSM は混和していると考えられる。

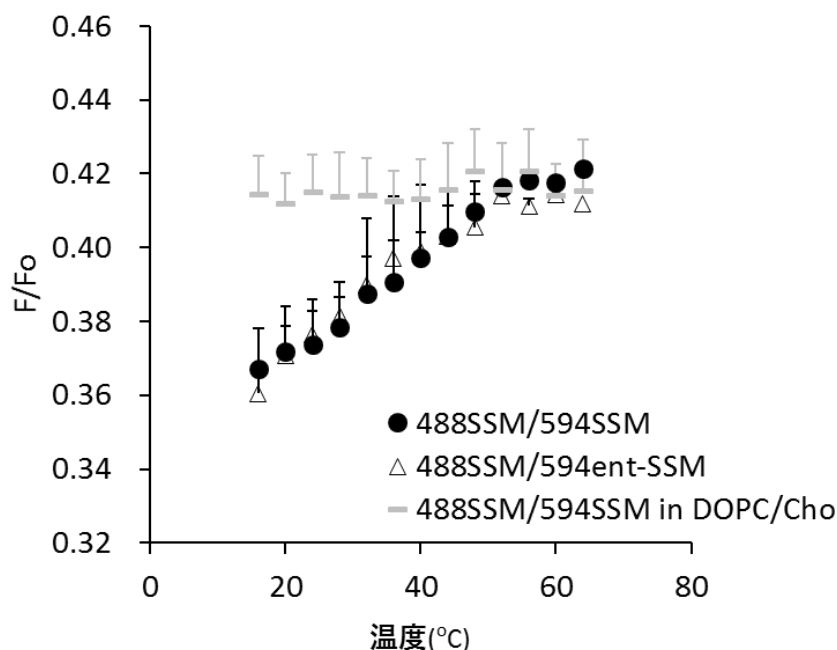


図 3-10 Lo/Ld 相分離系である DSPC/DOPC/Cho (2:2:1)膜を用いた FRET 観測の結果

488SSM(0.1 mol%)とあわせて 594SSM(1.0 mol%)を加えた試料は●にて、594*ent*-SSM(1.0 mol%)を加えた試料は△にて表した。均一な膜中での FRET 観測の結果として、DOPC/Cho (4:1)膜における 488SSM と 594SSM の FRET 測定の結果(—)を示す。

次に、SSM/DOPC/Cho 膜における SSM と *ent*-SSM の相互作用を SSM 蛍光プローブと *ent*-SSM 蛍光プローブをそれぞれ用いて評価した結果を図 3-11 にまとめた。SSM/DOPC/Cho 膜において 488SSM と 594SSM の天然体 FRET ペアを用いた実験では、均一な DOPC/Cho 膜より高い FRET (小さい F/F_o 値) を示した。一方で、488SSM/594*ent*-SSM および 488*ent*-SSM/594SSM の天然体/鏡像体の FRET ペアを用いた場合、天然体のみの FRET ペア(488SSM/594SSM)より低い FRET を示した。これは、先述の実験において明らかになった SSM/DOPC/Cho 膜におけ

る、*ent*-SSM プローブの Lo ドメインへの分配性が小さいことに起因する。つまり、Lo ドメインへ分配される *ent*-SSM プローブが SSM プローブより少ないために、SSM プローブと *ent*-SSM プローブの共局在性が低下することで FRET が減少したと考えられる。一方で、488*ent*-SSM と 594*ent*-SSM の鏡像体ペアを用いて FRET 観測を行った際には、488SSM/594SSM の天然体ペアに次いで高い FRET が観測された。共焦点蛍光顕微鏡観測より算出した *ent*-SSM の Lo ドメインへの分配比は SSM より小さい一方で、*ent*-SSM プローブ間の FRET は比較的高く、SSM/DOPC/Cho 膜中でも *ent*-SSM の共局在性が高いことを意味している。

Ent-SSM/DOPC/Cho 膜においても、SSM/DOPC/Cho 膜と同様に 488*ent*-SSM/594*ent*-SSM 間、次いで 488SSM/594SSM 間で高い FRET を観測した。このことは、同種の FRET ペア(天然体ペアまたは鏡像体ペア)では、Lo の構成脂質が SSM か *ent*-SSM かにかかわらず高い共局在性を示すことを示唆している。この要因として2つ考えられる。1つは、立体化学が等しいドナーとアクセプター同士で互いに相互作用し、共局在することで高い FRET 効率が観測されたと考えられる。また一方で、SM が形成するゲル様ドメインに鏡像体のドナーとアクセプターが分配されず、その間質のみに分布した場合もプローブ間の共局在性は増加し、FRET 効率は高くなる。いずれの場合も SSM 同士もしくは *ent*-SSM 同士の立体配置特異的な強い分子間相互作用が形成される可能性を支持している。

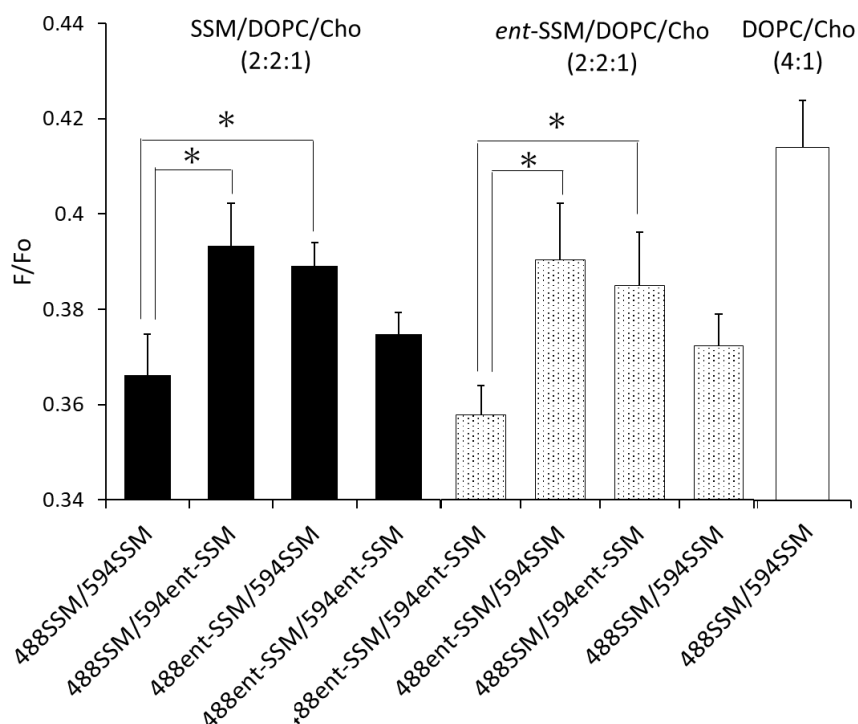


図 3-11 SSM/DOPC/Cho(2:2:1)膜と *ent*-SSM/DOPC/Cho(2:2:1)膜における FRET 効率(F/F_0)の比較 SSM/DOPC/Cho (■)、*ent*-SSM/DOPC/Cho (▤)、DOPC/Cho (4:1) (□)から成る MLV を調製し、ドナー(0.1 mol%)とアクセプター(1.0 mol%)を用いて 20 °Cでの FRET 効率を観測した。

詳細な SSM と *ent*-SSM によるゲル様ドメイン形成を評価するために、ラセミ体 SSM で構成される SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho 膜で FRET 観測を行った(図 3-12a)。この系では、SSM プローブと *ent*-SSM プローブが Lo ドメインに分配される量はほぼ等しく(図 3-6)、各プローブ間で生じる FRET 強度は Lo ドメイン中におけるナノメートルスケールの共局在の変化のみに対応する。そのため、共焦点蛍光顕微鏡観測の観測限界より小さいスケールで SSM と *ent*-SSM の分布を詳細に評価できると考えられる。

実際に、488SSM と 594SSM を用いて SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho(1:1:2:1)膜での FRET 観測を行ったところ、488SSM/594SSM の天然体ペアが、均一な DOPC/Cho 膜と比較して高い FRET 効率を示した。また、488*ent*-SSM/594*ent*-SSM の *ent* ペアについても、24 °C以上で SSM プローブと同じ程度の FRET 効率を示した。SSM プローブと *ent*-SSM プローブの Lo/Ld 分配比は等しいことから、本ラセミ相分離系の Lo ドメイン中で天然型 SSM の FRET ペア、*ent*-SSM の FRET ペアの共局在性はほぼ等しいと考えられる。一方で、ラセミ FRET ペア

488SSM/594*ent*-SSM を同じ系で用いた場合、10~28 °Cにおいて FRET 効率は 488SSM/594SSM より顕著に小さいことが明らかとなった。つまり、天然型 SSM ペア（または *ent*-SSM ペア）の共局在性が SSM と *ent*-SSM 蛍光プローブからなるラセミ FRET ペアの分子間より高いことを意味している。このことは、SSM 分子間の立体配置特異的な相互作用によりラセミ相分離系におけるマクロ相分離（Lo/Ld）に加えて、さらにナノメートルスケールで SSM と *ent*-SSM が相分離していることを示唆している。つまり、Lo ドメイン中で SSM と *ent*-SSM はそれぞれ異なるゲル様ドメインを形成していることを示唆している。特に、SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho 膜の共焦点蛍光顕微鏡イメージでは、SSM プローブと *ent*-SSM プローブ共に Lo ドメインに均一に分布していた一方で、FRET 効率における差異を観測したことから、SSM と *ent*-SSM がそれぞれ形成するドメインは顕微鏡の空間分解能（~250 nm）より小さい数十ナノメートルサイズであると考えられる。

また、Cho がゲル様ドメインのサイズにもたらす影響を調べるために、Cho 濃度が高い SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho(1:1:2:2)膜を用いて FRET 観測を行った(図 3-12b)。結果として、10~24 °Cにおいて天然型 FRET ペア 488SSM/594SSM や *ent* 型 FRET ペア 488*ent*-SSM/594*ent*-SSM から得られる FRET 効率はともにラセミ型 FRET ペアである 488SSM/594*ent*-SSM より大きいことが明らかとなった。Cho 濃度が高い SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho(1:1:2:2)膜においても、SSM と *ent*-SSM がそれぞれ形成するゲル様ドメインが観測された。しかし、SSM プローブ間の FRET と 488SSM/594*ent*-SSM 間の FRET の差異は、前者の低 Cho 膜では 32 °Cで完全に消失した一方で、この高 Cho 膜では 28 °Cで消失した。このことは、ゲル様ドメインのサイズが FRET 観測限界まで減少する温度が Cho 濃度の増加により低下したことを示唆している。また、高 Cho 膜における 488SSM/594*ent*-SSM の F/F₀ が低 Cho 膜より減少していることから、Cho により 488SSM と 594*ent*-SSM 間の FRET が増加している。このことは、488SSM と 594*ent*-SSM の分子間距離が Cho により小さくなることを意味しており、つまり、Cho 濃度が増加することで SSM と *ent*-SSM それぞれのゲル様ドメインのサイズが減少したためと考えられる。

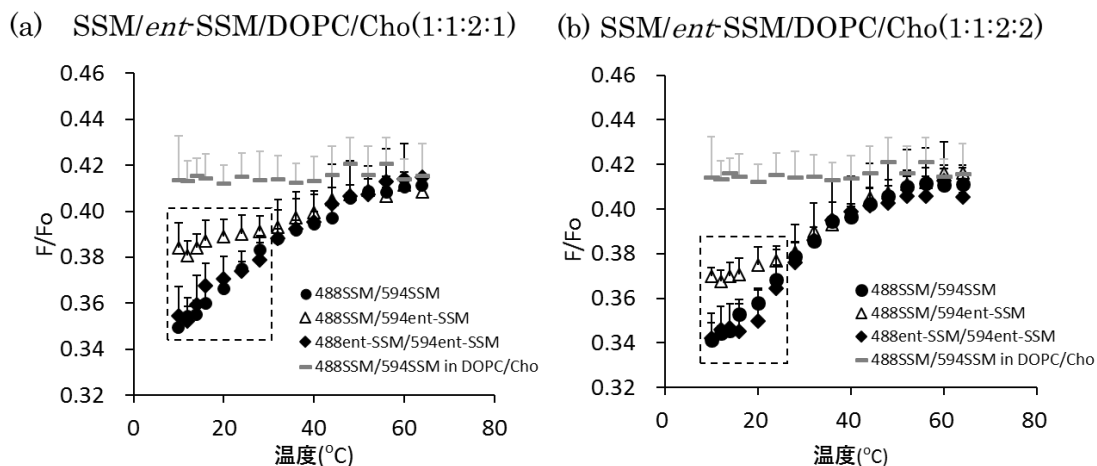


図 3-12 SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho 膜における SSM と *ent*-SSM の FRET の温度依存性 ドナーとアクセプターに 0.1 mol% 488SSM/1.0 mol% 594SSM (●: 天然体 FRET ペア)、0.1 mol% 488*ent*-SSM/1.0 mol% 594*ent*-SSM(△: *ent*FRET ペア)、0.1 mol% 488*ent*-SSM/1.0 mol% 594*ent*-SSM(◆: ラセミ FRET ペア)を含む (a)SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho (1:1:2:1) と Cho 濃度が高い(b) (1:1:2:2)からなる MLV の結果を示す。また、DOPC/Cho(4:1)膜における 488SSM/594SSM(—)の FRET も示す。

3-3-d FRET を用いたナノドメインサイズの見積もり

得られた SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho 膜の FRET 観測から SSM と *ent*-SSM が形成するゲル様ドメインのサイズの見積りを試みた。FRET は蛍光分子間の距離 (1 ~ 10 nm 程度) が近いと起こり、FRET の効率はドナーに対するアクセプターの局所的な濃度に依存している。Fastenberg らは人工膜を用いた FRET 観測や蛍光消光実験で、二次元平面膜中で生じるドナーからアクセプターへのエネルギー移動がドナー周りの一定の領域内で生じることを明らかにした^{31,32)}。この領域の半径は臨界距離($R_c \doteq 1.1R_o$)²⁹⁾と呼ばれ、ドナーはこの領域内に存在するアクセプターとの FRET により消光を生じる³³⁾。ここで、異なるドメインに分配されるドナーとアクセプターを用いた場合、臨界距離より十分に大きいドメインに分配されたドナーはドメイン外に存在するアクセプターとのエネルギー移動は起こさない。しかし、ドメインのサイズが十分に小さく、臨界距離以下のサイズである場合には、ドメイン内のドナーとドメイン外のアクセプター間でのエネルギー移動が効率よく生じる。この中間、つまり、ドメインサイズが臨界距離より大きくなるにつれて、FRET 効率は低下する。Pathak らは、これを利用してドメインのサイズを見積もっており²¹⁾、本研究においてもこの手法を適用してナノドメインサイズを見積もることを試みた。

本研究では、ドナーの蛍光発色団に ATTO488、アクセプターに ATTO594 を用いており、そのフェルスター距離(R_0)は 5.6 nm である。臨界距離(R_c)は 6.2 nm である。ここで実験結果より、SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho 膜の Lo ドメイン中では 488SSM と 594SSM は同じ立体化学を有し、天然体 SM ゲル様ドメインに分配される一方で、594*ent*-SSM は天然体 SM ゲル様ドメイン外に存在すると考える(図 3-8a)。そのため、488SSM/594SSM 間の FRET と 488SSM/594*ent*-SSM 間の FRET の効率の差(図 3-13a)は、ドメイン外のアクセプターと FRET が生じる領域(R_c)を除いた面積(A_{FRET})に対応している(図 3-13b)。したがって、ナノドメインサイズが臨界距離に近づくにつれて、この両者の間の FRET 効率が等しくなる。特に、ドメインサイズが臨界距離より小さい場合には、ドナーがドメイン内に存在するにも関わらず、ドメイン外のアクセプターと FRET を生じるために、均一な相状態に非常に近い FRET 効率を示す。つまり、488SSM/594SSM 間の FRET と 488SSM/594*ent*-SSM 間の FRET 効率の差がなくなる最低温度では、ゲル様ドメインのサイズは臨界距離に等しいと考えられる^{21,31,32}。また、488SSM/594SSM 間の FRET と 488SSM/594*ent*-SSM 間の FRET の効率の差が最も大きい場合は、ゲル様ドメインのサイズが十分に大きく、ゲル様ドメイン内に存在する全ての 488SSM は 594*ent*-SSM への FRET を生じないと仮定できる。この時、ドメインの半径が臨界距離より十分に大きく($R_{FRET} \gg R_c$)、FRET が生じない領域の面積はドメインの面積に一致している($\pi R_{FRET}^2 \cong \pi R_{domain}^2$)と近似できる。また、温度変化に対してゲル様ドメインのサイズのみが変化し、その面積の合計が不変であるとする、FRET が生じない領域の合計面積($A_{FRETmax}$)はドメインの合計面積とほぼ等しくなる。これらのことから、488SSM/594SSM 間の FRET($(F/F_0)_{SM-SM}$)と 488SSM/594*ent*-SSM 間の FRET($(F/F_0)_{SM-ent}$)の効率の差は、式(1)で表される。

$$\begin{aligned}
 \frac{(F/F_0)_{SM-SM} - (F/F_0)_{SM-ent}}{\left((F/F_0)_{SM-SM}\right)_{min} - \left((F/F_0)_{SM-ent}\right)_{min}} &= \frac{A_{FRET}}{A_{FRETmax}} \\
 &= \frac{n\pi R_{FRET}^2}{n\pi R_{domain}^2} \\
 &= \frac{\pi(R_{domain} - R_c)^2}{\pi R_{domain}^2}
 \end{aligned} \tag{1}$$

A_{FRET} は、ラセミ FRET ペアを用いた場合に FRET が生じない半径 R_{FRET} の領域が膜中に占める領域の合計を表す (図 3-13b)。例えば、 n 個のゲル様ドメインが存在するとすると、合計面積 A_{FRET} は FRET が生じない領域の面積を n 個分だけ足し合わせた面積($n\pi R_{FRET}^2$)で表される。ここで、半径 R_{FRET} はゲル様ドメインの

半径 R_{domain} から臨界距離 R_c を引いた値で表される。また、 $A_{\text{FRET max}}$ はドメインサイズが臨界距離より十分に大きい($R_{\text{FRET}} \gg R_c$)状態における A_{FRET} を示し、ゲル様ドメインが占める総面積($n\pi R_{\text{domain}}^2$)と等しくなる。 $((F/F_o)_{\text{SM-SM}})_{\text{min}}$ は FRET 効率が最大の時の F/F_o に相当し、実験値のフィッティングより算出した。 R_c はフェルスター距離 (5.6 nm) より算出した 6.2 nm ($1.1 \cdot R_o$) を用いた³³⁾。

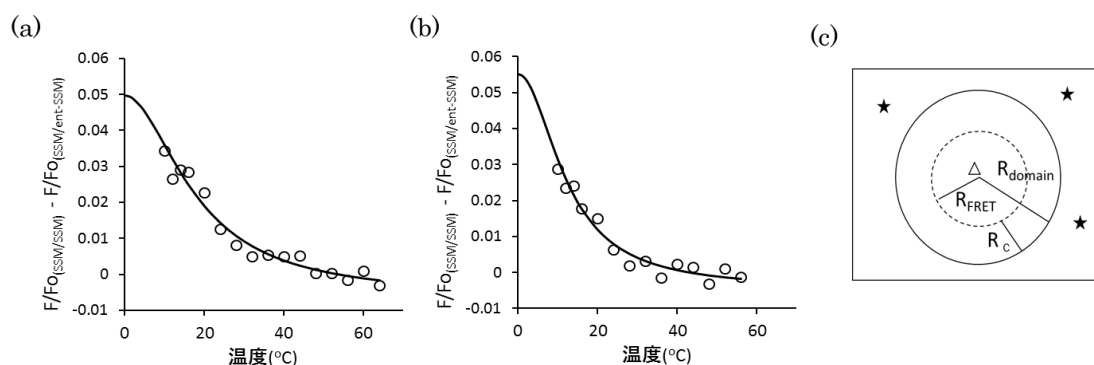


図 3-13 (a,b)温度変化に対する 488SSM/594SSM 間の FRET 効率 $((F/F_o)_{\text{SM-SM}})$ と 488SSM/594ent-SSM 間の FRET 効率 $((F/F_o)_{\text{SM-ent}})$ の差 SSM/ent-SSM/DOPC/Cho (a)1:1:2:1 と(b)1:1:2:2 を示す。実線はシグモイド関数(ロジスティック曲線)によるフィッティング曲線²¹⁾を示す。決定係数(a) $R^2=0.962$ (b) $R^2=0.956$ 。(b)ドメイン中の FRET 領域のモデル図。488SSM/594ent-SSM ペアを例に考える。ドメインが R_c より大きい場合、半径 R_{domain} のドメイン中に存在するドナー(Δ)とドメイン外に過剰に存在するアクセプター($\star$)との間の距離が遠いため、半径 R_{FRET} の点線で示す FRET を生じない領域が生じる。一方で、ドナーがドメインの縁辺に存在する場合、 R_c の領域において FRET が生じる。ドメインサイズが減少し、 R_{FRET} が充分小さくなって $R_{\text{domain}}=R_c$ となった場合には全てのドナーはアクセプターへの FRET を受け、均一な膜と同程度の FRET を示す。

式 1 と FRET 観測の結果から、ゲル様ドメインのサイズを見積もった。その結果を図 3-14 に示す。SSM/ent-SSM/DOPC/Cho(1:1:2:1)膜ではゲル様ドメインの半径は 20℃で 10.6 nm 程度であり、温度が上昇するにつれてその半径は小さくなる。最終的に 32℃では 488SSM/594SSM 間の FRET と 488SSM/594ent-SSM 間の FRET の効率の差が無くなることから、その半径は 6.2 nm 程度であると考えられる。また、Cho 濃度が増加した SSM/ent-SSM/DOPC/Cho(1:1:2:2)膜においては 28℃でゲル様ドメインの半径は 6.2 nm であり、32℃では臨界距離(6.2nm)より小さいゲル様ドメインを形成していると考えられる。このことから、Cho が増加した 1:1:2:2 では 1:1:2:1 の系に比べて、Cho によりドメインサイズは減少してお

り、Cho の機能としてゲル様ドメインサイズを縮小させると考えられる。

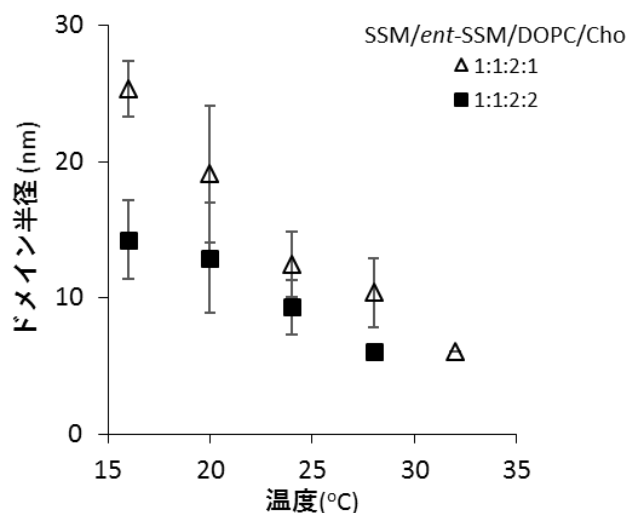


図 3-14 FRET 観測から見積もられる Lo ドメイン中におけるナノドメインサイズの温度変化 SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho からなる MLV の脂質組成を(1:1:2:1)(△)と Cho 濃度が高い(1:1:2:2) (■)でサイズを見積もった。488SSM/594SSM 間の FRET 効率と 488SSM/594*ent*-SSM 間の FRET 効率の有意差が消失する温度(28℃、30℃)を臨界距離である 6.2 nm とした。

ここで、この手法を用いて 488SSM と DOPC の頭部に ATTO594 を標識した 594DOPC を用いて、Lo ドメインのサイズを見積もった。まず、0.1 mol% 488SSM と 1.0 mol% 594DOPC を含む SSM/DOPC/Cho 膜を調製し、FRET 観測を行った。488SSM と 594DOPC の蛍光プローブの組み合わせの場合、Lo ドメインが形成されると 488SSM は Lo ドメインに分配され、594DOPC はドメイン外の Ld 相の領域に存在する。そのため、ドメインのサイズが大きいほど 488SSM と 594DOPC 間の FRET は低下し、 F/F_0 は増加する。結果として、50 °C 以下でのドメイン形成により FRET の効率は低下し、 F/F_0 は大きくなった(図 3-15)。得られた F/F_0 値から Lo ドメインのサイズを見積もる。

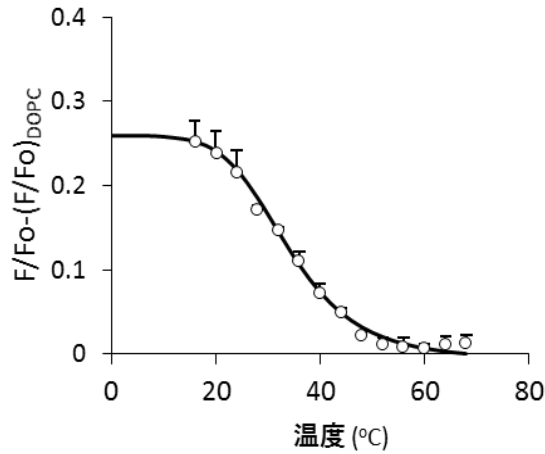


図 3-15 三成分膜における 488SSM と 594DOPC の FRET 効率の温度依存性 0.1 mol% 488SSM と 1.0 mol% 594DOPC を含む SSM/DOPC/Cho(2:2:1)膜における FRET 効率の変化を観測した。実線で示すのはシグモイド関数(ロジスティック曲線)²²⁾によるフィッティングデータ。決定係数 $R^2=0.96$ 。

ここで、半径 R'_{domain} の Lo ドメイン内に存在する 488SSM とドメイン外に存在する 594DOPC の効率の変化は図 3-13b と同様に説明でき、式 2 で表すことができる。

$$\frac{\frac{F}{F_0} - (F/F_0)_{\text{DOPC/Cho}}}{\frac{F}{F_{0\text{max}}} - (F/F_0)_{\text{DOPC/Cho}}} = \frac{A_{\text{FRET}}}{A_{\text{FRETmax}}} \quad (2)$$

$$= \frac{\pi(R'_{\text{domain}} - Rc)^2}{\pi R'_{\text{domain}}^2}$$

この式に実験値のカーブフィッティングから得られる $(F/F_0)_{\text{max}} = 0.68$ を用いることで Lo ドメインのサイズが得られる^{21,34)}。実験に用いた MLV のサイズは 500~1000 nm 程度で有り^{35,36)}、24°C で得られた Lo ドメインの半径は 99 ± 20 nm であった。Feigenson らによって報告されている 23°C での brain SM/DOPC/Cho 膜中の Lo ドメインのサイズは直径 500 nm、800 nm の LUV 中で半径 150 nm、250 nm 程度であり³⁷⁾、得られたドメインサイズは妥当な値であると考えられる。

加えて、蛍光寿命測定から SSM/ent-SSM/DOPC/Cho 膜における Lo ドメインとゲル様ドメインに分配された tPA の割合(n_{s_0}/n_{L_0})は平均蛍光寿命の 3 成分フィッティングから算出されるそれぞれの寿命成分の割合($\alpha_1 = 27.0$, $\alpha_2 = 38.1$)から、

$$\begin{aligned}
\frac{n_{S_o}}{n_{L_o}} &= \frac{\alpha_1}{\alpha_2 + \alpha_1} \\
&= \frac{27.0}{38.1 + 27.0} \\
&= 0.41
\end{aligned} \tag{2}$$

と仮定できる。さらに、Lo ドメイン中に存在する tPA のゲル様ドメインへの分配数 K_d は

$$\begin{aligned}
K_d = \frac{[gel]}{[Lo]} &= \frac{n_{S_o}/V_{S_o}}{n_{L_o}/V_{L_o}} = \frac{n_{S_o}}{n_{L_o}} \cdot \frac{V_{L_o}}{V_{S_o}} \\
&= \frac{\alpha_1}{\alpha_2 + \alpha_1} \cdot \frac{V_{L_o}}{V_{S_o}}
\end{aligned} \tag{3}$$

と表せる。 $[gel]$ 、 $[Lo]$ はそれぞれの相に存在する tPA の濃度とする。ここで、tPA の分配定数は 1.42 である⁸⁾ことから、Lo ドメイン中でゲル様ドメインが占める面積比(V_{S_o}/V_{L_o})は式より算出した値を用いることで

$$\begin{aligned}
\frac{V_{S_o}}{V_{L_o}} &= \frac{1}{K_d} \cdot \frac{\alpha_1}{\alpha_2 + \alpha_1} \\
&= \frac{1}{1.42} \cdot \frac{27.0}{38.1 + 27.0} \\
&= 0.29
\end{aligned} \tag{4}$$

となる。この面積比と算出したドメインサイズから Lo ドメイン中に存在するナノドメインの個数を見積もった。表 3-1 に 24 °C で得られたドメインのサイズや個数を示す。結果として、リポソーム中で形成される Lo ドメインのサイズは半径 100 nm 程度であり、その中に 12.4 nm 程度のゲル様ドメインが存在することが明らかとなった。

表 3-1 FRET 観測と蛍光寿命測定から算出した 24 °Cにおける Lo ドメインのサイズ、SSM もしくは *ent*-SSM が形成するゲル様ドメインのサイズと個数、また Lo ドメイン中のナノドメインの間質が占める面積

Lo ドメイン	ゲル様ドメイン		間質
半径(nm)	半径(nm)	個数	面積(千 nm ²)
99±20	12.4±2.4	10~26	22±8

以上、三成分膜中でのドメインのサイズを見積もった。しかし、実際のところ正確なドメインのサイズを決定することは非常に困難である。本章で用いた手法では、図 3-13c に示すようにドメインの形を円形として仮定している。しかし、ナノドメインの形を正確に観測した例はなく、ゲルドメインに特徴的な歪な形状³⁸⁻⁴⁰⁾をしていると考える方が妥当である。そのため、今回、見積もったドメインサイズは正確ではない可能性がある。また、適用したモデルではドメイン外には多量のアクセプターが存在し、ドメイン外の全てのドナーは FRET を示すことを仮定しているが、アクセプターの濃度が 1.0 mol%程度であるので、FRET を受けないドナーがドメイン外にいくつか存在していると考えられる。その他にも、温度変化に対してドメインのサイズが変化するだけでなく、分裂や融合する可能性もある。本研究で用いた手法以外でドメインサイズを算出した報告例^{37,40,41)}がいくつか存在するが、いずれも蛍光プローブの組み合わせによりサイズは異なる。膜内に存在する蛍光プローブの配向や蛍光特性、膜物性などの影響を正確に評価できないことから、精密なドメインサイズの算出はいまだ困難である。

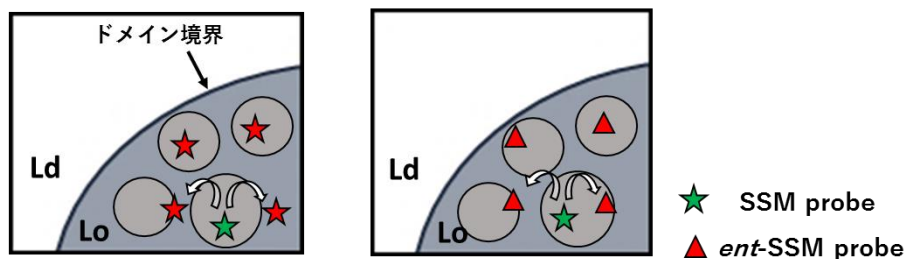
しかし、いずれにせよ本章で観測された SSM 分子間の FRET 効率と SSM と *ent*-SSM 間の FRET 効率の差は、ナノメートルスケールで生じた SSM と *ent*-SSM の共局在性の減少に起因しており、Lo ドメイン中での SSM または *ent*-SSM によるゲル様ドメイン形成を強く示唆している。

以下に、本章の結果をまとめる。Lo ドメイン形成に重要な SM 分子間の相互作用が SM の微小な会合状態を形成させることを FRET 観測により明らかにした。SM 分子間に働く立体配置特異的な相互作用は Lo ドメイン形成において重要である。さらに、近年ではこの分子間相互作用が Lo ドメイン中で SM のクラスター化、もしくはナノドメイン形成に寄与していることが示唆されてきた。しかし、そのクラスター/ナノドメインのサイズが非常に小さく、SM の微小な会合状態を明確に示す実験結果は限られている。そこで、第 2 章で得られた結果から、SSM と同様の分子間相互作用を有する鏡像体 *ent*-SSM を用いて本課題を研究した。*ent*-SSM は SSM と同様にクラスター化やナノドメイン形成をするものの、SSM とは混合せずに *ent*-SSM 分子間のみで会合体を形成すると推測した。その結果、SSM と *ent*-SSM の分子間距離は比較的離れていると考えられる。そこで、FRET を用いてナノメートルスケールの SSM と *ent*-SSM の分子間距離を評価することで、SSM や *ent*-SSM が形成するナノドメインの大きさを評価した。その結果、ラセミ体中では SSM と *ent*-SSM は相分離し、それぞれゲル相を形成することを明らかにした。このことは、SSM 分子間の相互作用が立体配置特異的であり、SSM と *ent*-SSM は異なるゲルドメインを形成することを示唆している。実際に、Cho を豊富に含む Lo 相においても、16~20°C で SSM と *ent*-SSM 間での共局在性の低下を観測しており、Lo 相中のゲル様ドメインは SSM 分子間の立体配置特異的な相互作用により形成されることを示唆した。つまり、SM の 2 位、3 位の不斉炭素付近に存在するアミド部分やヒドロキシ基により形成される分子間水素結合がゲル様ドメイン形成を誘起していると考えられる。

不飽和の炭化水素鎖を有する DOPC を加えた SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho 膜では、SSM と *ent*-SSM 間の相分離は蛍光顕微鏡測定で検出されるマクロな分離ではない。一方で、FRET 観測では SSM 分子間の方が SSM/*ent*-SSM 間よりも FRET 効率が高いことがわかった。これらの結果は、SSM と SSM 分子間の共局在性が SSM と *ent*-SSM 分子間の共局在性よりも高いことを示している。つまり、図 3-18 で示すように SSM 分子間もしくは *ent*-SSM 分子間で形成される水素結合により、Lo ドメイン中において SSM と *ent*-SSM はそれぞれ異なるゲル様ドメインを形成すると考えられる。そして、このナノドメインの間質には Lo ドメイン中に存在する Cho や不飽和脂質が存在し⁴²⁾、Lo ドメインはゲル様ドメインと間質部分からなる不均一な構造を有すると考えられる(図 3-16)。実際に、このゲル様ドメインのサイズを見積もった際に、半径 180 nm の Lo ドメイン中に半径 9.5nm 程度のゲル様ドメインが 100 個程度存在することを示唆する結果が得られた。また、Lo ドメイン中の Cho 濃度を増加させることでゲル様ドメインのサイズが縮小することから、Lo ドメインに過剰に存在する Cho

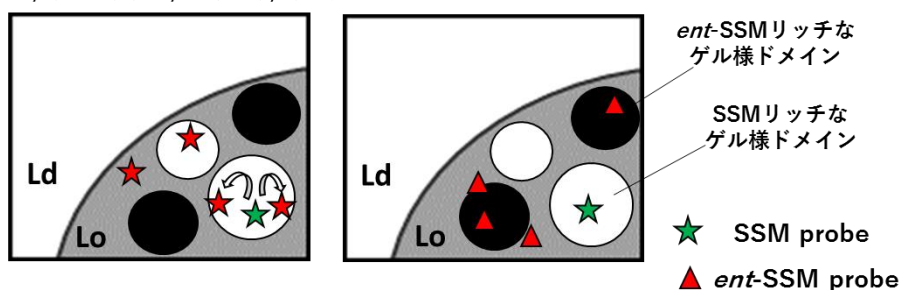
はゲル様ドメインのサイズを小さくする作用を有すると考えられる。

(a) DSPC/DOPC/Cho



$$\text{FRET } 594\text{SSM}/488\text{SSM} = 594\text{ent-SSM}/488\text{SSM}$$

(b) SSM/ent-SSM/DOPC/Cho



$$\text{FRET } 594\text{SSM}/488\text{SSM} > 594\text{ent-SSM}/488\text{SSM}$$

図 3-16 FRET 観測の結果から推測されるドメイン形成と SSM もしくは *ent*-SSM 間で生じる FRET のモデル図。(a)DSPC/DOPC/Cho 膜で形成される Lo ドメインは均一な相状態を示し、SSM と *ent*-SSM は共に等しい FRET を示す。一方で、(b)SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho 膜では SSM 間、もしくは *ent*-SSM 間の相互作用により SSM と *ent*-SSM のゲル様ドメインがそれぞれ形成される。ゲル様ドメインに分配された SSM の蛍光プローブ間では FRET が生じる一方で、異なるドメインに分配される SSM と *ent*-SSM の蛍光プローブ間では FRET の効率が減少する。ゲル様ドメインのサイズが大きいほど SSM(もしくは *ent*-SSM)分子間の FRET 効率と SSM/*ent*-SSM 間の FRET 効率の差異は大きくなる。なお、ここで示すナノドメインは円形と仮定した。

参考文献

- 1 Brown, D.A.; London, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *240*, 1-7
- 2 Eggeling, C.; Ringemann, C.; Medda, R.; Schwarzmann, G.; Sandhoff, K.; Polyakova, S.; Belov, V. N.; Hein, B.; von Middendorff, C. ; Schonle A.; Hell, S. W. *Nature* **2009**, *457*, 1159.
- 3 de Wit, G.; Danial, J. S. H.; Kukura, P.; Wallace, M. I. *PNAS*. **2015**, *112*, 12299.
- 4 A. Honigmann, V. Mueller, S. W. Hell, C. Eggeling, *Faraday Discuss.* **2013**, *161*, 77-89
- 5 Wu, H. M.; Lin, Y. H.; Yen, T. C.; Hsieh, C. L. *Sci Rep.* **2016**, *6*, 20542.
- 6 Chao, M. H.; Lin, Y. T.; Dhenadhayalan, N.; Lee, H. L.; Lee, H. Y.; Lin, K. C. *Small*. **2017**, *13*, 1603408.
- 7 Ando, J.; Kinoshita, M.; Cui, J.; Yamakoshi, H.; Dodo, K.; Fujita, K.; Murata, M.; Sodeoka, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2015**, *112*, 4558-4563.
- 8 Yasuda, T.; Matsumori, N.; Tsuchikawa, H.; Lönnfors, M.; Nyholm, T. M.; Slotte, J. P.; Murata, M. *Langmuir* **2015**, *31*, 13783-13792.
- 9 Yano, Y.; Hanashima, S.; Yasuda, T.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Kinoshita, M.; Al Sazzad, M. A.; Slotte, J. P.; Murata, M. *Biophys. J.* **2018**, *115*, 1530-1540.
- 10 Yamaji, A.; Sekizawa, Y.; Emoto, K.; Sakuraba, H.; Inoue, K.; Kobayashi, H.; Umeda, M. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 5300-5306.
- 11 Makino, A.; Abe, M.; Murate, M.; Inaba, T.; Yilmaz, N.; Hullin-Matsuda, F.; Kishimoto, T.; Schieber, N. L.; Taguchi, T.; Arai, H.; Anderluh, G.; Parton, R. G.; Kobayashi, T. *The FASEB Journal*. **2015**, *29*, 477-493.
- 12 Juhasz, J.; James H, Davis.; Frances, J, Sharom. *Biochemical Journal* **2010**. *430*, 415-423.
- 13 Fuyuki, T.; Jeeseong, H.; James, A. D. *Langmuir* **2004**, *20*, 614-618.
- 14 Tokumasu, F.; Jeeseong, H.; James, A. D. *Distribution*. **2004**, *5*, 614-618.
- 15 Honigmann, A.; Mueller, V.; Hell, S. W.; Eggeling, C. *Faraday Discussions* **2013**, *161*, 77-89.
- 16 Kinoshita, M.; Suzuki, K. GN. ; Matsumori, N.; Takada, M.; Ano, H.; Morigaki, K.; Abe, M.; Makino, A.; Kobayashi, T.; Hirose, K.; Fujiwara, TK.; Kusumi, A.; Murata, M. *J. Cell Biol.* **2017**, *216*, 1183-1204.
- 17 Goretta, S. A.; Kinoshita, M.; Mori, S.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Murata, M. *Bioorg Med Chem.* **2012**, *20*, 4012-4009.
- 18 Rigler, R.; Mets, Ü.; Widengren, J.; Kask, P. *Eur Biophys J*, **1993**, *22*, 169-175.
- 19 Kinoshita, M.; Ano, H.; Murata, M.; Shigetomi, K.; Ikenouchi, J.; Matsumori, N. *Sci Rep.* **2017**, *7*, 16801.

- 20 Mobarak, E.; Javanainen, M.; Kulig, W.; Honigmann, A.; Sezgin, E.; Aho, N.; Eggeling, C.; Rog, T.; Vattulainen, I. *Biochim. et Biophys. Acta.* **2018**, *1860*, 2436-2445.
- 21 Pathak, P.; London, E. *Biophys. J.* **2015**, *109*, 1630-1638
- 22 Koynova, R.; Caffrey, M. *Biochim. et Biophys. Acta.* **1998**, *1376*, 91-145.
- 23 de Almeida, R. F.; Loura, L. M.; Fedorov, A.; Prieto, M. *J Mol Biol.* **2005**, *346*, 1109-1120.
- 24 Heberle, F. A.; Wu, J.; Goh, S. L.; Petruzielo, R. S.; Feigenson, G. W. *Biophys J.* **2010**, *99*, 3309-3318.
- 25 Petruzielo, R. S.; Heberle, F. A.; Drazba, P.; Katsaras, J.; Feigenson, G. W. *Biochim Biophys Acta.* **2013**, *1828*, 1302-1313.
- 26 <https://www.atto-tec.com/index.php?id=197&L=1&language=en>.
- 27 Stachowiak, J. C.; Schmid, E. M.; Ryan, C. J.; Ann, H. S.; Sasaki, D. Y.; Sherman, M. B.; Geissler, P. L.; Fletcher, D. A.; Hayden, C. C. *Nat Cell Biol.* **2012**, *14*, 944-949.
- 28 Suzuki, K. G.; Kasai, R. S.; Hirosawa, K. M.; Nemoto, Y. L.; Ishibashi, M.; Miwa, Y.; Fujiwara, T. K.; Kusumi, A. *Nat Chem Biol.* **2012**, *8*, 774-783.
- 29 Chattopadhyay, A.; London, E. *Biochemistry* **1987**, *26*, 39-45.
- 30 Klausner, R. D.; Kleinfeld, A. M.; Hoover, R. L.; Karnovsky, M. J. *J Biol Chem.* **1980**, *255*, 1286-1295.
- 31 Fastenberg, M. E.; Shogomori, H.; Xu, X.; Brown, D. A.; London, E. *Biochemistry* **2003**, *42*, 12376-12390.
- 32 Pathak, P.; London, E. *Biophys. J.* **2011**, *101*, 2417-2425.
- 33 Fastenberg, M. E.; Shogomori, H.; Xu, X.; Brown, D. A.; London, E. *Biochemistry* **2003**, *42*, 12376-12390.
- 34 Bakht, O.; Pathak, P.; London, E. *Biophys J.* **2007**, *93*, 4307-4318.
- 35 Manconi, M.; Sinico, C.; Valenti, D.; Loy, G.; Fadda, AM. *Int J Pharm.* **2002**, *234*, 237-248.
- 36 Yang, F.; Jin, C.; Jiang, Y.; Li, J.; Di, Y.; Ni, Q.; Fu, D. *Cancer Treat Rev.* **2011**, *37*, 633-642.
- 37 Enoki, T. A.; Heberle, F. A.; Feigenson, G. W. *Biophys J.* **2018**, *114*, 1921-1935.
- 38 Korlach, J.; Schwille, P.; Webb, W. W.; Feigenson, G. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1999**, *96*, 8461-8466.
- 39 Li, L.; Cheng, J. X. *Biochemistry* **2006**, *45*, 11819-11826.
- 40 Usery, R. D.; Enoki, T. A.; Wickramasinghe, S. P.; Weiner, M. D.; Tsai, W. C.; Kim, M. B.; Wang, S.; Torng, T. L.; Ackerman, D. G.; Heberle, F. A.; Katsaras,

- J. ; Feigenson, G. W. *Biophys. J.* **2017**, *112*, 1431-1443.
- 41 Koukalová, A.; Amaro, M.; Aydogan, G.; Gröbner, G.; Williamson, PTF.; Mikhalyov, I.; Hof, M.; Šachl, R. *Sci Rep.* **2017**, *7*, 5460.
- 42 Yasuda, T.; Matsumori, N.; Tsuchikawa, H.; Murata, M. *Biophys. J.* **2015**, *108*, 2502-2506.

第4章 結論

脂質ラフト形成の基盤となる SM の分子間相互作用が誘起するドメインの形成機構を SSM とその鏡像異性体を用いて解析し、脂質ラフトのモデル系として考えられてきた Lo ドメインの詳細な構造を明らかにした。

これまで、SM が形成する Lo ドメインは一般的な飽和グリセロリン脂質である DPPC や PSPC に比べて温度変化に対して安定であり^{1,2)}、SM のラフト形成能は PC より高いことが明らかになってきた²⁻⁵⁾。SM の 2 位、3 位に存在するアミドやヒドロキシ基を介した分子間相互作用がこのような Lo ドメインの安定化に寄与していることが示唆されてきたが、その実験的な証拠はこれまで充分とはいえなかった。その理由として、Cho が SM 膜の秩序化を促進することも広く知られており、Cho のヒドロキシ基と SM 間の水素結合の形成も報告されている。つまり、脂質ラフト形成に最も重要な分子間相互作用は同定されておらず、水素結合を介した SM の会合状態やそのサイズについてもわかっていない。

そこで、我々は SSM と、その鏡像体である *ent*-SSM を用いて、SM 分子間、SM-Cho 間の相互作用における分子基盤について精査した。特に、*ent*-SM 分子間の相互作用は SM 分子間と化学的に等しいことから、Cho や SM を加えた際の SM-他分子間相互作用の程度や立体特異性について評価した。その結果、SM 分子間の相互作用は分子間水素結合によって安定化されており、立体配置特異的に作用することを明らかにした(図 2-3,5)。一方で、Cho は SM の立体化学に関係なく、SM 脂肪鎖のオーダーを上げることがわかった(図 2-10)。また、Cho の 3 位ヒドロキシ基を保護したメチルエステル体が Cho と同程度のオーダー効果を SSM に与えた(図 2-11)。これらのことから、SM/Cho 間に働く相互作用は SM と Cho 間の水素結合より Cho の環状部分と SM の炭化水素鎖間での疎水性相互作用の寄与が大きいことが示された。つまり、Cho は SM の立体配置には非特異的な疎水性相互作用によりオーダー効果を発揮することが示された。

ここで、SSM/Cho 膜を用いた MD 計算では SM 間の水素結合の寿命が Cho により 3 倍ほど長くなる⁶⁾ことが示されている。そこで、Cho の機能として SM の運動性を大きく抑制することで、SM 分子間水素結合を安定化していると考えられる。当研究室で行われた固体 NMR 測定からも膜の深い位置に存在する Cho^{2,7)}が SM の炭化水素鎖間のパッキングを強めることで、膜界面付近のアミドを介した SM 分子間の水素結合形成を促進している⁸⁾ことが示されている。このことから、アミドとヒドロキシ基を有する SM の、PC とは異なる構造的な特徴により、SM 分子間の水素結合形成が促進されることで Lo ドメインが安定化されることが考えられる。

生体膜を模した POPC と Cho を含む三成分系膜で、tPA の蛍光寿命を測定すると、

ent-SSM と Cho が形成する Lo ドメインの蛍光寿命は SSM と Cho での蛍光寿命と非常に近い値を示していた。(図 2-16)。これは *ent*-SSM 間の水素結合の様式が SSM 間と等しいことに起因すると考えられる。一方で、分子間相互作用が SSM に比べて弱いジアステレオ体 *threo*-SSM(図 2-2)では、三成分系膜中の Lo ドメインの蛍光寿命は SSM より短い値を示した(図 2-16)。したがって、Lo ドメインの安定化には SSM (もしくは *ent*-SSM) 分子間の水素結合が非常に重要であることが明らかとなった。また、SSM と *ent*-SSM からなるラセミ体を用いて同様に蛍光寿命測定を行ったところ、ゲル様ドメインに由来する成分の蛍光寿命は変化しなかった(図 2-16)。この理由として、SSM 間に働く分子間相互作用は立体配置特異的であることから、ラセミ体では SSM と *ent*-SSM がそれぞれ異なるゲル様ドメインを形成し、蛍光寿命の等しい SSM もしくは *ent*-SSM が形成するゲル様ドメインが別々に存在していると考えた。

そこで、3 章では蛍光標識した SSM プローブと *ent*-SSM プローブを合成し、それぞれの Lo ドメインでの分布を蛍光顕微鏡と蛍光分光法を用いて詳細に観察することで、Lo ドメイン中のゲル様ドメインの形成やサイズを評価した。SSM/*ent*-SSM 膜の FRET 観測では、DSC 測定で示唆された(図 2-5)ように SSM と *ent*-SSM がそれぞれ異なるゲルドメインを形成していることが明らかとなった(図 3-10)。SSM/*ent*-SSM 膜に Cho を加えた Lo 相においても SSM と *ent*-SSM がそれぞれゲル様ドメインを形成することを示唆する結果が得られた。そこで、DOPC を含む SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho 膜での SSM と *ent*-SSM の Lo ドメインへの分布を蛍光顕微鏡を用いて観測した(図 3-4)ところ、Lo ドメイン中での SSM と *ent*-SSM のマクロな分離は観測されなかった。一方で、ナノメートル単位の分子間距離を評価できる FRET 観測では、SSM プローブと *ent*-SSM プローブ間の FRET 効率に SSM プローブ間の FRET 効率より小さいことが明らかとなった(図 3-10)。このことは、SSM 分子間での共局在性が SSM と *ent*-SSM 間より高いことを示唆しており、SSM と *ent*-SSM がそれぞれナノメートルスケールのゲル様ドメインを形成していることが示唆された。実際に、24 °C でのゲル様ドメインのサイズを見積もった際には Lo ドメイン中に半径約 10 nm サイズのゲル様ドメインが100個程度存在すると推定された(表 3-1)。このことから、SM と Cho で構成される Lo ドメインは均一な相状態ではなく、SM 分子間の強い相互作用により数ナノメートル程度の大きさのゲル様ドメインを形成することが示された(図 4-1)。

これまでの実験結果より Lo ドメイン中には SM や Cho に加えて、DOPC のような不飽和脂質も存在する⁹⁾ことが知られている。そこで、これと本研究にて得られた情報をあわせることで、Lo ドメインの微細構造として SM のゲル様ドメインとその間質に Cho や DOPC が存在していると考えた(図 4-1)。また、SM 分子間の水素結合は Lo ドメイン形成に非常に重要であり¹⁰⁾、本研究で明らかとなったゲル様ドメインは Lo ドメインの核、ひいては脂質ラフトの主要成分になりえると考えられる。

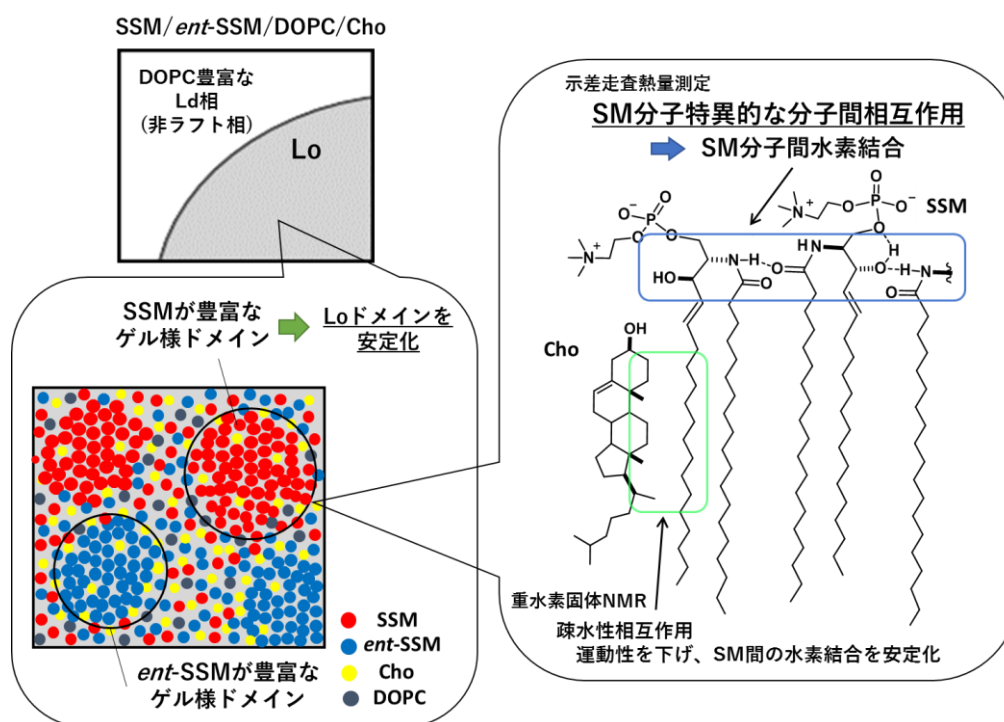


図 4-1 本研究成果から推測される Lo ドメインのモデル図

本研究では、脂質ラフトを単に SM と Cho で構成される秩序液体相として捉えるのではなく、SM の分子構造をもとに組織された機能性分子複合体として捉え、水素結合形成などの SM の特異性がドメイン形成にもたらす寄与を詳細に明らかにした。これにより、SM が膜の構成成分として生体膜に存在するだけでなく、水素結合形成を通じて、脂質ラフトに密接に関与していると考えられる。今後のラフト研究においては、これまで以上により詳細な SM の分子構造に着目した研究が必要となる。例えば、生体膜に存在する SM のアシル鎖長には非常に広い多様性が存在し、ラフト研究においてアシル鎖長の混ざった SM が広く用いられている。しかし、アシル鎖長の炭素鎖数 16 の PSM と 18 の SSM では、主転移温度は SSM の方が約 4℃ 高く、PSM と SSM の分子間相互作用は異なる¹⁰⁾。また、脂質二重層における内葉と外葉間での脂質間相互作用も SSM の方が強い^{11,12)}。炭素数が僅か 2 つの違いであっても、分子間での相互作用は大きく異なり、SM の機能、ひいてはラフト形成も本質的に異なることが推測できる。今後は、立体配置やアシル鎖も含めた SM の微細な分子構造の違いに着目し、ラフト形成への寄与を正確に解明しなければならない。また、本研究では三成分までの人工膜を用いて研究を進めてきたが、より生体膜に近い多成分の脂質組成からなる二重膜や内葉と外葉で脂質組成が異なる非対称膜での分子間相互作用を詳細に解析して、真の SM の機能を明らかにしていかなければならない。

参考文献

- 1 Yasuda, T.; Matsumori, N.; Tsuchikawa, H.; Lönnfors, M.; Nyholm, T. M.; Slotte, J. P.; Murata, M. *Langmuir*. **2015**, *31*, 13783-13792.
- 2 Yasuda, T., M.; Kinoshita, M.; Murata, M.; Matsumori, N. *Biophys. J.* **2014**, *106*, 631-638.
- 3 Veiga, M. P.; Arrondo, J. L. R.; Goni, F. M.; Alonso, A.; Marsh, D. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2614-2622.
- 4 Ramstedt, J.; Slotte, J. P. *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, *12*, 1945-1956.
- 5 Halling, K. K.; Ramstedt, B.; Nystrom, J.; Slotte, J.P.; Nyholm, T. K. M. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 3861-3871.
- 6 Smith, A. K.; Klimov, D. K. *J. Phys. Chem. B.* **2018**, *122*, 11311-11325.
- 7 Matsumori, N.; Yasuda, T.; Okazaki, H.; Suzuki, T.; Yamaguchi, T.; Tsuchikawa, H.; Doi, M.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2012**, *51*, 8363-8370.
- 8 Matsumori, N.; Yamaguchi, T.; Maeta, Y.; Murata, M. *Biophys. J.* **2015**, *108*, 2816-2824.
- 9 Yasuda, T.; Matsumori, N.; Tsuchikawa, H.; Murata, M. *Biophys. J.* **2015**, *108*, 2502-2506.
- 10 Yano, Y.; Hanashima, S.; Yasuda, T.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Kinoshita, M.; Al Sazzad, M. A.; Slotte, J. P.; Murata, M. *Biophys. J.* **2018**, *115*, 1530-1540.
- 11 Wang, Q.; London, E. *Biophys. J.* **2018**, *115*, 664-678.
- 12 Lin, Q.; London, E. *Biophys. J.* **2015**, *108*, 2212-2222.

第 5 章 実験項

一般的事項

試薬および溶媒

試薬および溶媒は特に記載のない限り市販のものをそのまま用いた。ただし、sphingomyelin (Brain Porcine), sphingomyelin (Egg, Chicken), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1-palmitoyl-2-stearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PSPC), *L*- α -dipalmitoyl phosphatidylcholine (*L*-DPPC), *D*- α -dipalmitoyl phosphatidylcholine (*D*-DPPC), は Avanti polar Lipid から、deuterium depleted water は Isotec から購入した。

薄層クロマトグラフィー(TLC)は Merck 社のシリカゲル 60 F254 を用いた。Sphingomyelin (Brain Porcine)は逆相 HPLC 用のカラムクロマトグラフィーで精製した。ATTOne β -*ent*-SSM についてはゲルろ過カラムクロマトグラフィーで精製した。その他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 μ m)および Merck シリカゲル 60N(40~60 μ m)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。ゲルろ過用のカラムは TOSOH 製の TOYOPEARLHW-40F を用いた。

反応は記載のない限りアルゴン雰囲気下で行い、蛍光標識 SSM, *ent*-SSM の合成については遮光条件下で行った。

機器、装置

化合物の構造解析のために溶液 NMR は JEOL 社製 ECS-400(^1H NMR: 400 MHz) と 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(CDCl_3 : δ 7.24, CD_3OD : δ 3.30)としたときの値で示した。質量分析にはサーモクエスト社製 LQA DECA および LTQ-Orbitrap XL を用いた。旋光計は日本分光社製の P2100 を用いた。固体重水素 NMR 測定に関しては Chemagnetic CMX-300 (プローブ:Otsuka Electronics 社製 PRB 300-023)を用いた。DSC 測定に関しては CSC 社製 6100 示差走査微小熱量計を用いた。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。蛍光顕微鏡測定に関しては OLYMPUS 社製 FV1000 共焦点レーザー顕微鏡を用いた。蛍光分光計に関しては、HORIBA 社製 モジュール型蛍光分光光度計 FluoroLog-3 を用いた。

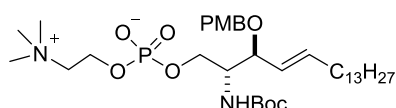
C18:0-SM(SSM), C16:0-SM(PSM)の精製

市販の C18:0 SM 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: 8.0 mL/min., UV: 205 nm, Injection: 50 mg/ 50 μ L)。C16:0 SM(PSM)についても市販の egg SM(16:0 (86%), 18:0 (6%), 22:0 (3%), 24:1 (3%)) から逆相 HPLC によって精製・分取した (Eluent: MeOH, Flow rate: 8.0 mL/min., UV: 205 nm, Injection: 50 mg/ 50 μ L)。LC 精製は、HITACHI 社製 Pump L-7100、UV-Detector (210 nm) L-7405、Chromato-Integrator D-2500 で行った。

合成

●2 章

ent スフィンゴシンホスホコリン 7



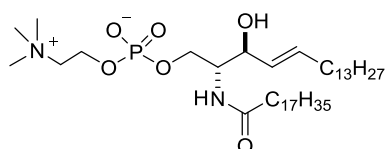
Chemical Formula: $C_{36}H_{65}N_2O_8P$
Exact Mass: 684.4479
Molecular Weight: 684.8958
Elemental Analysis: C, 63.13; H, 9.57; N, 4.09; O, 18.69; P, 4.52

ナス形フラスコにスフィンゴシン保護体 (116 mg, 223 μ mol) を加えベンゼンに溶かし、トリエチルアミン (0.5 mL, 2.3 mmol)、4-ジメチルアミノピリジン (22.7 mg, 186 μ mol) を加え、氷冷した。そこに 2-クロロ-1,3,2-ジオキサホスホラン-2-オキシド (189 μ L, 2.04 mmol) を加え、4 時間攪拌した。その後アルゴン雰囲気下、ガラスフィルターに反応溶液を移して生じた塩を取り除き、トルエン共沸を 3 回行なった。残渣をアセトニトリルに溶かしプレッシャーボトルに反応溶液を移した。そこにナトリウムで 4 時間乾燥させたトリメチルアミンを加え、80°C で 91 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、残渣をカラムクロマトグラフィー (flash silica gel, クロロホルム/メタノール/水 65:25:4) で精製し、スフィンゴシンホスホコリン 7 (99.5 mg, 145 μ mol, 65 %) を白色固体として得た。

7: white solid; R_f 0.25 (silica gel, 4:25:65-water/methanol/chloroform); 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.23 (2H, d, J = 8.8 Hz, PMB-o), 6.87 (2H, d, J = 8.8 Hz, PMB-m), 5.70 (1H, td, J = 6.8, 15.2 Hz, H5), 5.37 (1H, dd, J = 8.4, 15.2 Hz, H4), 4.49 (1H, d, J = 11.2 Hz, PMB-CH₂-), 4.26 (1H, d, J = 11.2 Hz, PMB-

CH₂-) 4.20 (2H, br, β), 3.99 (2H, m, H1&H3), 3.79 (1H, t, *J* = 8.0, H1), 3.77 (3H, s, PMB-CH₃), 3.72 (1H, br, H2), 3.55 (2H, t, *J* = 4.0, α), 3.16 (9H, s, -N⁺(CH₃)₃), 2.08 (2H, q, *J* = 6.8, H6), 1.40 (11H, s, Boc-^tBu & H7), 1.27 (20H, br, H8 - 17), 0.89 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H18); MS (ESI) 707.4379 [M+Na]⁺

ent-SSM 3

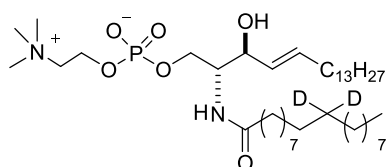


Chemical Formula: C₄₁H₈₄N₂O₆P
Exact Mass: 731.6067
Molecular Weight: 732.1048
Elemental Analysis: C, 67.27; H, 11.57; N, 3.83; O, 13.11; P, 4.23

ナス形フラスコにスフィンゴシンホスホコリン **7** (21.9 mg, 32.0 μmol) を加え、ジクロロメタンに溶かし氷冷した。そこにトリフルオロ酢酸 (450 μL, 32.0 mmol) を加えて 0°C で 3 時間攪拌した。反応液の溶媒を減圧留去した後、THF に溶かしてトリエチルアミン (317 μL, 2.28 mmol) を加えた。さらに THF に溶かしたステアリン酸 *p*-ニトロフェニル (57.6 mg, 142 μmol)、4-ジメチルアミノピリジン (23.2 mg, 190 μmol) を加え、室温で 15 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し残渣をカラムクロマトグラフィー (silica gel, クロロホルム/メタノール/水 65:25:4) で精製し、白色固体を得た。この固体をさらにメタノールに溶かして HPLC を用いて精製し、*ent*-スフィンゴミエリン **3** (10.5 mg, 14.4 μmol, 45 %) を白色固体として得た。

3: white solid; R_f 0.15 (silica gel, 4:25:65-water/methanol/chloroform); [α]_D²⁵ +3.0 (*c* 1.0 MeOH); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 5.69 (1H, td, *J* = 6.8, 15.2 Hz, H5), 5.44 (1H, dd, *J* = 7.6, 15.6 Hz, H4), 4.26 (2H, br, α), 4.09 (1H, m, H1), 4.03 (1H, t, *J* = 8.0, H3), 3.96 (2H, m, H1 & H2), 3.62 (2H, br, β), 3.21 (9H, s, -N(CH₃)₃), 2.17 (2H, dt, *J* = 2.0, 7.2 Hz, H2'), 2.02 (2H, q, *J* = 6.8, H6), 1.57 (2H, br, H3'), 1.28 (48H, br, H7 - 17 & H4' - H17'), 0.89 (6H, t, *J* = 7.2 Hz, H18 & H18'); MS (ESI) 753.5895 [M+Na]⁺

10',10'-d₂-*ent*-SSM 4



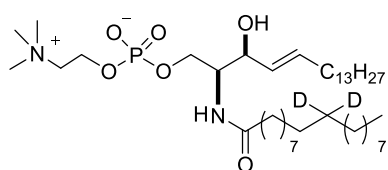
Chemical Formula: C₄₁H₈₁D₂N₂O₆P
Exact Mass: 732.6114
Molecular Weight: 733.1090
Elemental Analysis: C, 67.17; H, 11.69; N, 3.82; O, 13.09; P, 4.22

ナス形フラスコにスフィンゴシンホスホコリン **7** (49.8 mg, 72.7 μmol) を加え、ジクロロメタンに溶かし氷冷した。そこにトリフルオロ酢酸 (539 μL, 72.7 mmol) を加え、0°C で 2 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、THF に溶かして

トリエチルアミン(1.52 mL, 3.64 mmol)を加えた。さらに THF に溶かしたエステル(148 mg, 363 μ mol)、4-ジメチルアミノピリジン(27.8 mg, 767 μ mol)を加え、室温で 21 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し残渣をカラムクロマトグラフィー(silica gel, クロロホルム/メタノール/水 65:25:4)で精製し、白色固体を得た。さらにメタノールに溶かして HPLC を用いて精製し、10',10'-*d*₂-*ent*-スフィンゴミエリン **4**(25.6 mg, 34.9 μ mol, 48 %)を白色固体として得た。

4: white solid; *R*_f 0.31 (silica gel, 4:25:65-water/methanol/chloroform); [α]²⁵_D +6.0 (*c* 1.0 MeOH) ¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 5.69 (1H, td, *J*= 6.8, 15.2 Hz, H5), 5.44 (1H, dd, *J*= 7.2, 15.2 Hz, H4), 4.26 (2H, br, β), 4.10 (1H, m, H1), 4.05 (1H, t, *J*= 8.0, H3), 3.95 (2H, m, H1 & H2), 3.62 (2H, br, α), 3.21 (9H, s, -N(CH₃)₃), 2.17 (2H, dt, *J*= 1.6, 7.2 Hz, H2'), 2.02 (2H, q, *J*= 6.8, H6), 1.57 (2H, br, H3'), 1.28 (46H, br, H7 - 17 & H4' - H17'), 0.89 (6H, t, *J*= 7.2 Hz, H18 & H18'); MS (ESI) 755.6104 [M+Na]⁺

10',10'-*d*₂-*threo*-SSM **6**



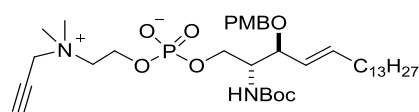
Chemical Formula: C₄₁H₈₁D₂N₂O₆P
Exact Mass: 732.6114
Molecular Weight: 733.1090
Elemental Analysis: C, 67.17; H, 11.69; N, 3.82; O, 13.09; P, 4.22

ナス形フラスコに *threo*-スフィンゴシンホスホコリン(22.0 mg, 32.2 μ mol)を加え、ジクロロメタンに溶かし氷冷した。そこにトリフルオロ酢酸(450 μ L, 32.0 mmol)を加えて 0°C で 3 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、THF に溶かしてトリエチルアミン(317 μ L, 2.28 mmol)を加えた。さらに THF に溶かした *p*-ニトロフェニルステアリン酸 (57.8 mg, 143 μ mol)、4-ジメチルアミノピリジン(23.0 mg, 188 μ mol)を加え、室温で 16 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し残渣をカラムクロマトグラフィー(silica gel, クロロホルム/メタノール/水 65:25:4)で精製し、白色固体を得た。さらにメタノールに溶かして HPLC を用いて精製し、*threo*-スフィンゴミエリン **6**(15.0 mg, 20.4 μ mol, 60%)を白色固体として得た。

6: white solid; *R*_f 0.15 (silica gel, 4:25:65-water/methanol/chloroform); [α]²⁵_D +3.0 (*c* 1.0 MeOH); ¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 5.70 (1H, td, *J*= 6.7, 15.2 Hz, H5), 5.45 (1H, dd, *J*= 7.6, 15.7 Hz, H4), 4.33 (1H, m, H3), 4.25 (2H, br, α), 3.99 (2H, m, H1 & H2), 3.82 (1H, m, H1), 3.62 (2H, br, β), 3.21 (9H, s, -N(CH₃)₃), 2.17 (2H, dt, *J*= 2.0, 7.2 Hz, H2'), 2.02 (2H, q, *J*= 6.8, H6), 1.57 (2H, br, H3'), 1.28 (48H, br, H7 - 17 & H4' - H17'), 0.89 (6H, t, *J*= 7.2 Hz, H18 & H18'); MS (ESI) 755.6004 [M+Na]⁺

● 3 章

スフィンゴシンホスホコリン **2**

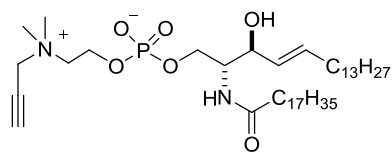


Chemical Formula: $C_{38}H_{65}N_2O_8P$
 Exact Mass: 708.4479
 Molecular Weight: 708.9178
 Elemental Analysis: C, 64.38; H, 9.24; N, 3.95; O, 18.05; P, 4.37

ナス形フラスコにスフィンゴシン(96.8 mg, 186 μ mol)を加えベンゼンに溶かし、トリエチルアミン(1.0 mL, 4.6 mmol)、4-ジメチルアミノピリジン(45.3 mg, 371 μ mol)を加え、氷冷した。そこに 2-クロロ-1,3,2-ジオキサホスホラン-2-オキシド(377 μ L, 4.07 mmol)を加え、4 時間攪拌した。その後アルゴン雰囲気下、ガラスフィルターに反応溶液を移して生じた塩を取り除き、トルエン共沸を 3 回行なった。残渣をアセトニトリル 12 mL に溶かしプレッシャーボトルに反応溶液を移した。そこにジメチルプロパルギルアミンを加え、80°C で 72 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、残渣をカラムクロマトグラフィー(flash silica gel, クロロホルム/メタノール/水 65:25:4)で精製し、スフィンゴシンホスホリルコリン **2**(91.0 mg, 121 μ mol, 65 %)を褐色油状液体として得た。

2: colorless oil; R_f 0.25 (silica gel, 4:25:65-water/methanol/chloroform); 1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 7.23 (2H, d, J = 8.6 Hz, PMB-o), 6.87 (2H, d, J = 8.5 Hz, PMB-m), 5.73 (1H, td, J = 6.7, 15.2 Hz, H5), 5.37 (1H, ddt, J = 1.5, 10.0, 15.2 Hz, H4), 4.49 (1H, d, J = 11.0 Hz, PMB-CH₂-), 4.26 (1H, d, J = 11.3 Hz, PMB-CH₂-) 4.20 (2H, br, β), 4.00 (2H, m, H1&H3), 3.79 (1H, t, J = 8.2, H1), 3.77 (3H, s, PMB-CH₃), 3.72 (1H, m, H2), 3.65 (2H, t, J = 4.0, α), 3.55(1H, t, J = 2.5 kHz, H), 3.25 (9H, s, -N⁺(CH₃)₃), 2.09 (2H, q, J = 6.6, H6), 1.40 (11H, s, Boc-^tBu & H7), 1.27 (20H, br, H8 - 17), 0.89 (3H, t, J = 6.9 Hz, H18); MS (ESI) 709.4379 [M+H]⁺

プロパルギル-*ent*-スフィンゴミエリン **3**



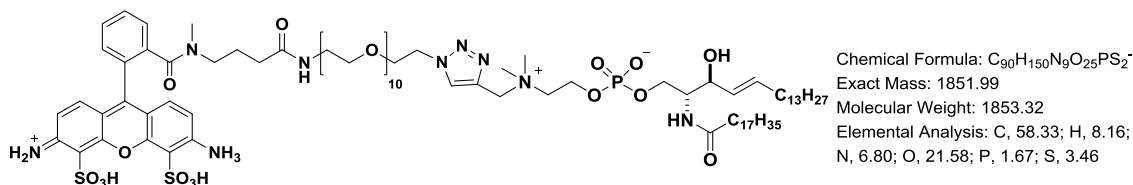
Chemical Formula: $C_{43}H_{83}N_2O_6P$
 Exact Mass: 754.5989
 Molecular Weight: 755.1188
 Elemental Analysis: C, 68.40; H, 11.08; N, 3.71; O, 12.71; P, 4.10

ナス形フラスコにスフィンゴシンホスホコリン **2** (91.0 mg, 121 μ mol)を加え、ジクロロメタンに溶かし氷冷した。そこにトリフルオロ酢酸(900 μ L, 121 mmol)を加えて 0°C で 3 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、THF (5.0 mL)に溶かしてトリエチルアミン(900 μ L, 6.48 mmol)を加えた。さらに THF (2.0 mL)に溶かした *p*-ニトロフェニルスチアリン酸 (218 mg, 578 μ mol)、4-ジメチルアミノピリジン(44.1 mg, 361 μ mol)を加え、室温で 15 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し残渣をカラムクロマトグラフィー(silica gel, クロロホルム/メタノール/水

65:25:4)で精製し、白色固体を得た。さらにメタノールに溶かして HPLC を用いて精製し、プロパルギル *ent*-スフィンゴミエリン **3**(64 mg, 84.8 μ mol, 70 %)を白色固体として得た。

3: white solid; R_f 0.20 (silica gel, 4:25:65-water/methanol/chloroform); ^1H NMR (500MHz, CD_3OD) δ 5.96 (1H, d, J = 6.3 Hz), 5.69 (1H, dtd, J = 0.7, 6.8, 15.2 Hz, H5), 5.44 (1H, dtd, J = 1.2, 7.8, 15.6 Hz, H4), 4.26 (2H, br, β), 4.10 (1H, m, H1), 4.05 (1H, t, J = 8.2, H3), 3.96 (2H, m, H1 & H2), 3.74 (1H, t, J = 5.4 Hz, H2), 3.55 (1H, t, J = 2.5 Hz, H1), 3.27 (9H, s, $-\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 2.19 (2H, dt, J = 2.0, 7.2 Hz, H2'), 2.03 (2H, q, J = 6.8 Hz, H6), 1.57 (2H, br, H3'), 1.28 (48H, br, H7 - 17 & H4' - H17'), 0.90 (6H, t, J = 7.2 Hz, H18 & H18'); MS (ESI) 777.7024 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

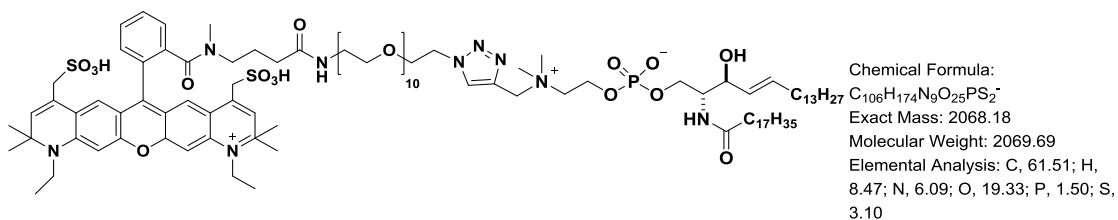
ATTO488neg-*ent*SSM



サンプル管に ATTO488neg スクシンイミドエステル (6.0 mg, impure) とプロパルギル *ent*-スフィンゴミエリン **3**(5.0mg, 6.5 μ mol)を加え、t-BuOH/H₂O (4:1)溶液(1.0 mL)に溶かした。そこに硫酸銅(II)溶液(2.6 μ L, 18.3 mmol)、アスコルビン酸ナトリウム溶液(0.79 mg, 1.4 μ mol)を加え、室温で 73 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し残渣をカラムクロマトグラフィー(silica gel, クロロホルム/メタノール/水 65:25:4)、ゲルろ過(メタノール)でそれぞれ 2 回精製し、ATTO488neg-*ent*SM(0.5 mg, 33%)を青色固体として得た。

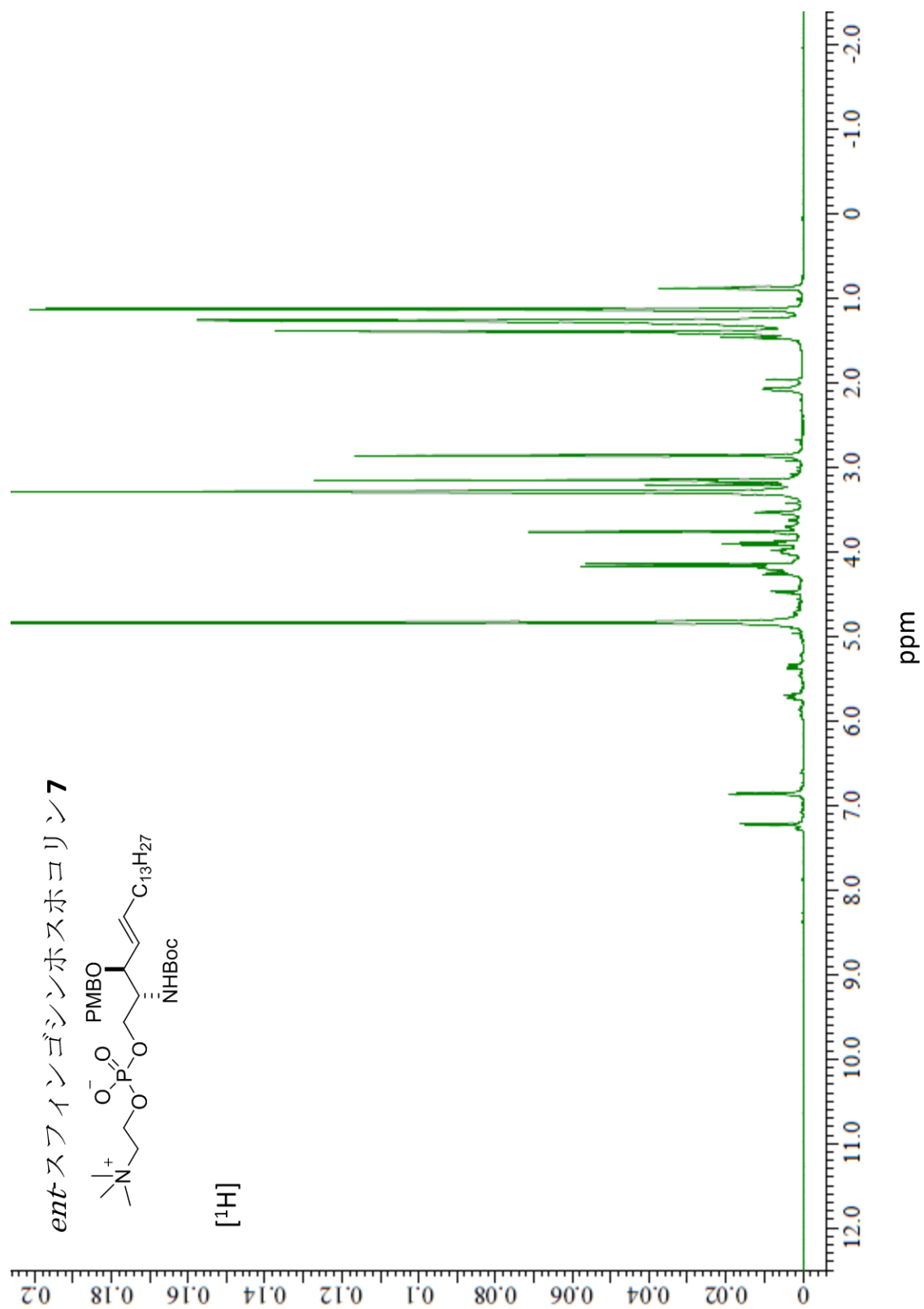
ATTO488neg-*ent*SM :blue solid; R_f 0.25 (silica gel, 1:9:13-water/methanol /chloroform); NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.45 (1H, m), 7.55 (4H, m), 7.25 (2H, m), 6.98 (2H, m), 5.69 (1H, m), 5.46 (1H, m), 4.64 (1H, m), 4.32 (2H, m), 3.99 (4H, m), 3.60 (40H, m), 3.17 (6H, s), 2.87(3H, s), 2.19 (2H, m), 2.00 (2H, m), 1.89 (1H, d, J = 7.8 Hz), 1.60 (2H, m), 1.34 (50H, m), 0.91 (6H, t, J = 6.3 Hz), 0.07 (2H, d, J = 14.9 Hz) MS (ESI) 960.4794 $[\text{M}+3\text{Na}-\text{H}]^{2+}$

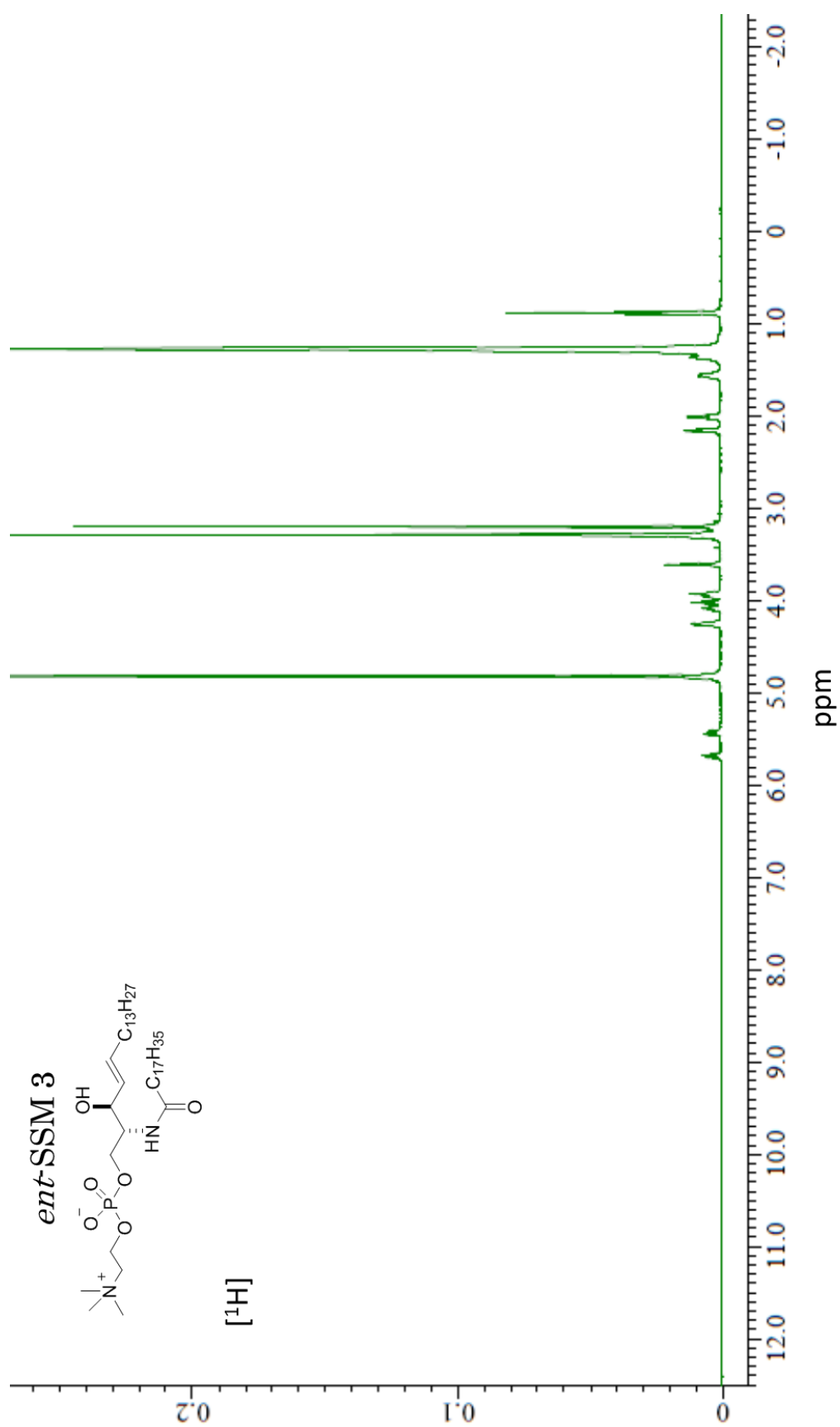
ATTO594neg-*ent*SSM

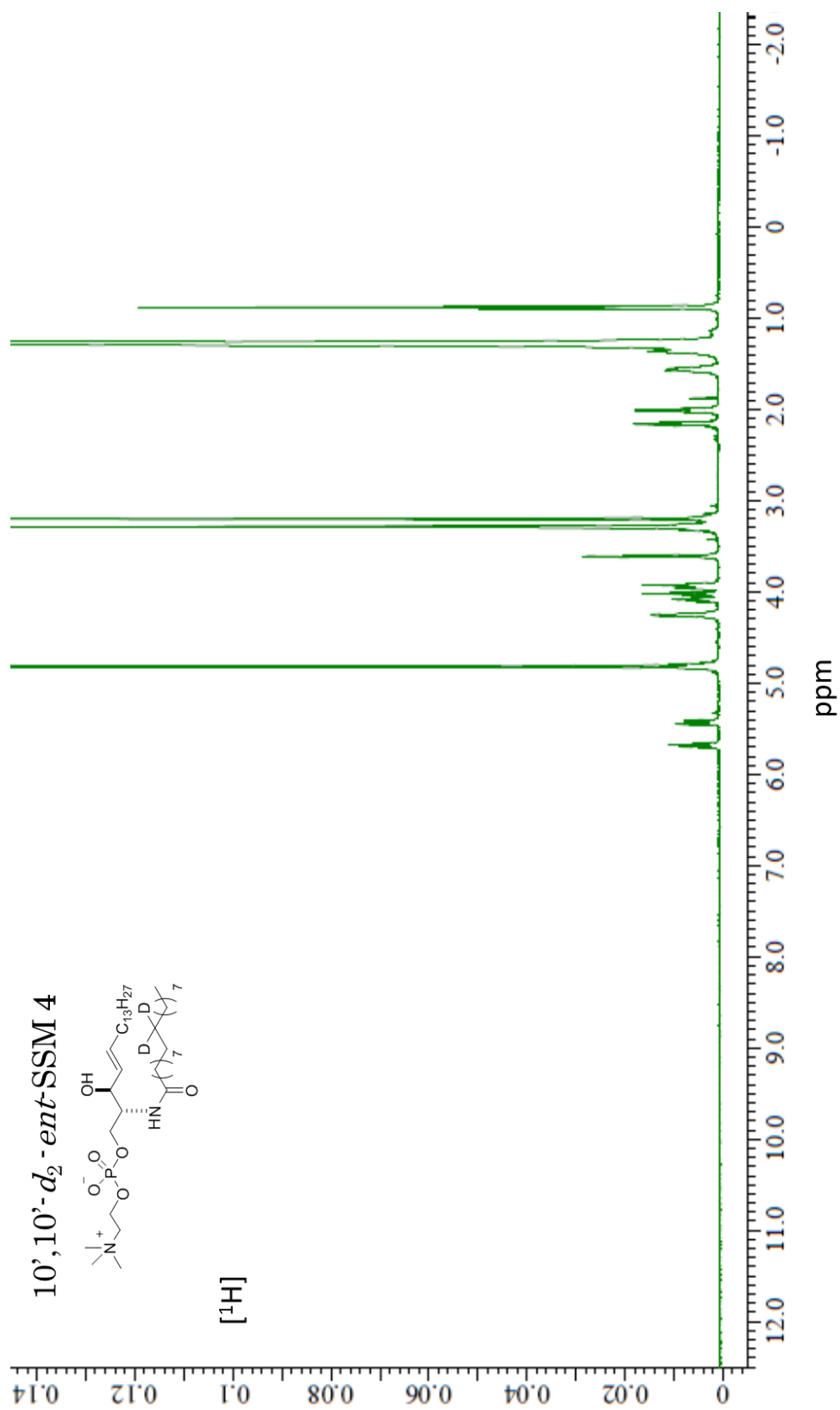


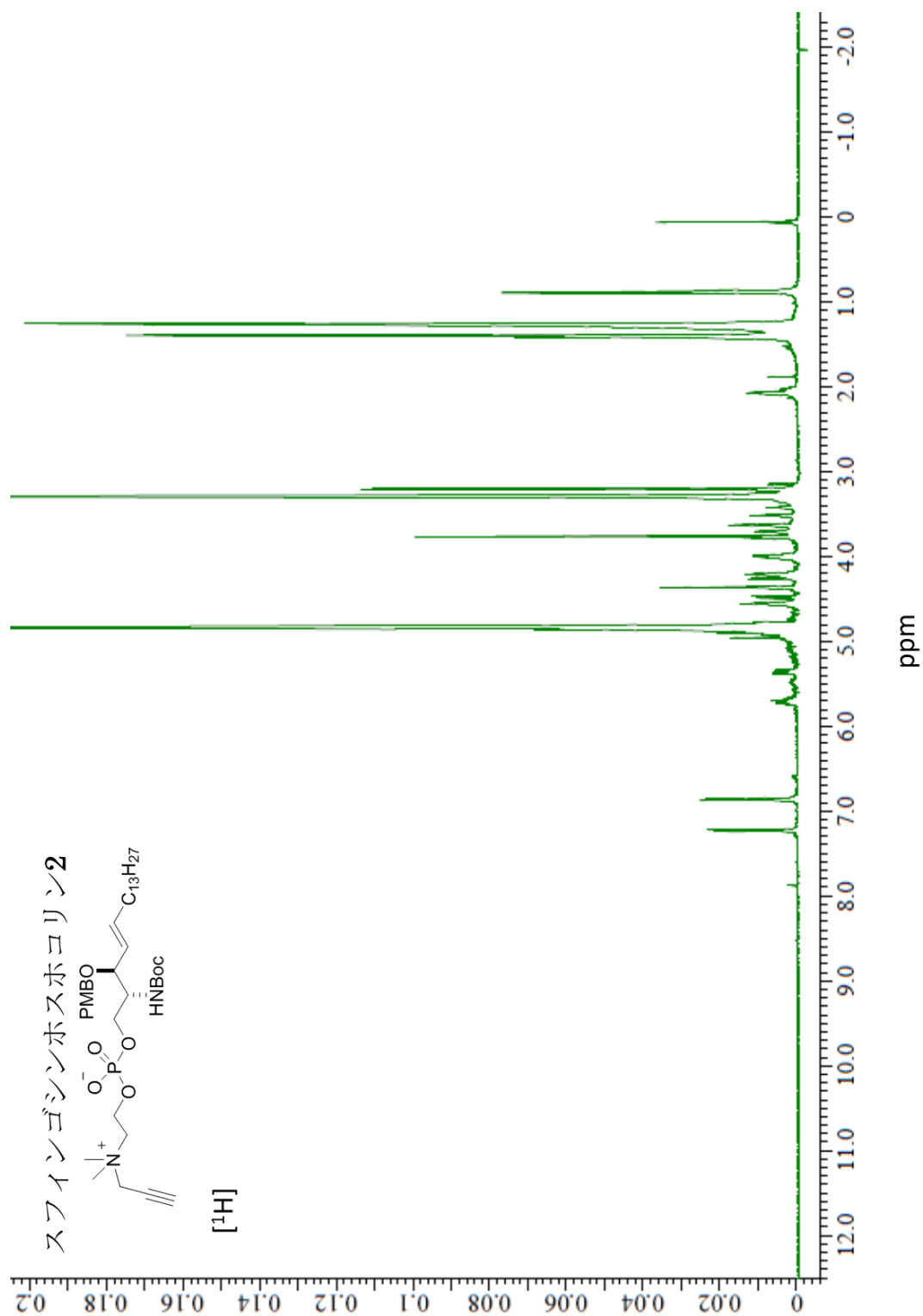
サンプル管に ATTO594neg スクシンイミドエステル(5.0 mg, impure) とプロパルギル *ent* スフィンゴミエリン **3**(3.7mg, 4.8 μ mol)を加え、t-BuOH/H₂O (4:1)溶液(1.0mL)に溶かした。そこに硫酸銅(II)溶液(2.6 μ L, 18.3 mmol)、アスコルビン酸ナトリウム溶液(0.81mg, 1.5 μ mol)を加え、室温で 73 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し残渣をカラムクロマトグラフィー(silica gel, クロロホルム/メタノール/水 65:25:4)、ゲルろ過(メタノール)でそれぞれ 2 回精製し、ATTO488neg-*ent*SM(0.5mg, 8%)を赤色固体として得た。

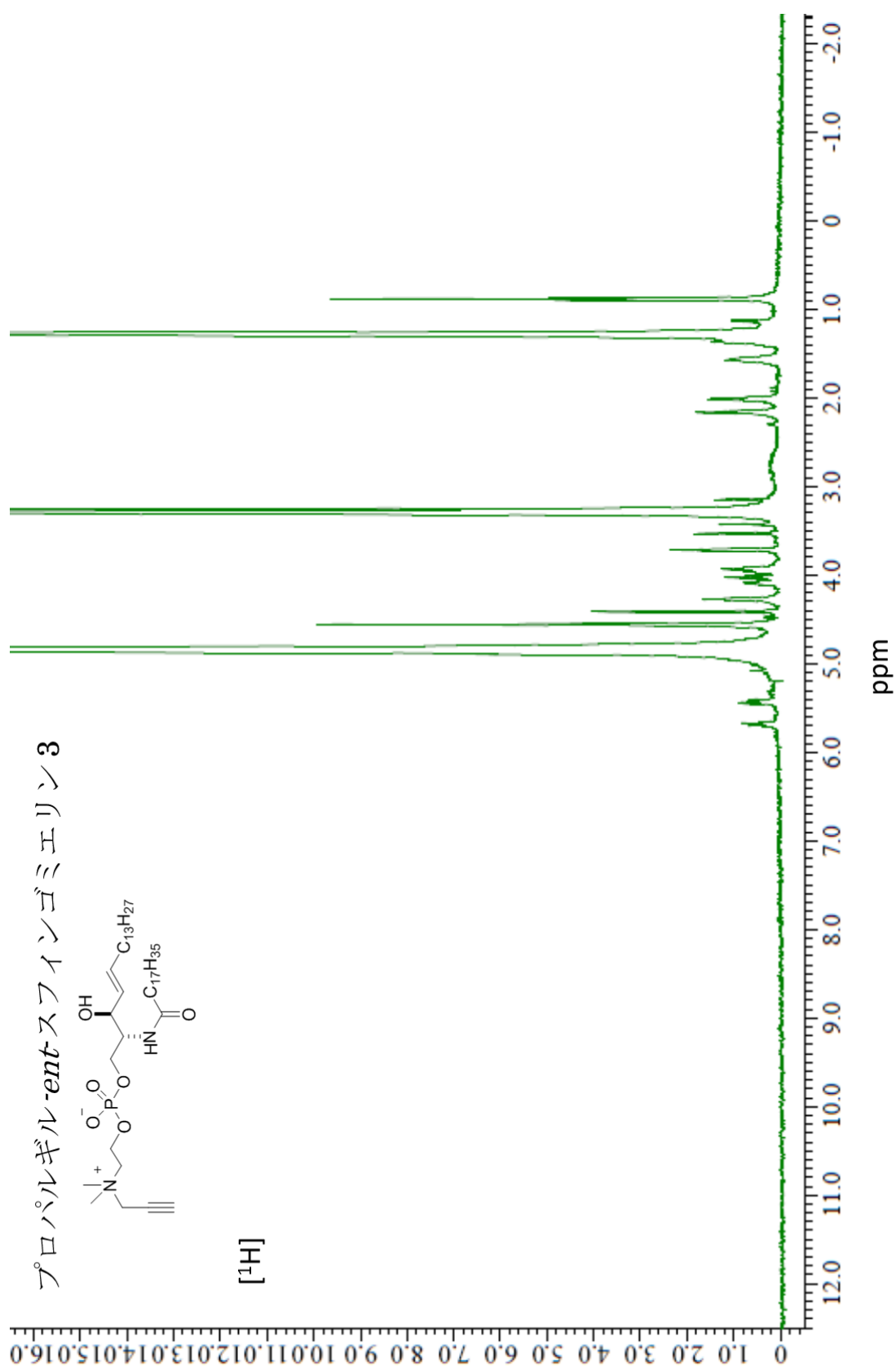
ATTO488neg-*ent*SM : red solid; R_f 0.30 (silica gel, 1:9:13-water/methanol/chloroform); NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8.41 (1H, s), 7.72 (2H, m), 7.60(1H, m), 7.49(1H, m), 7.38(1H, m), 6.79(1H, s), 5.89(1H, m), 5.70(1H, m), 5.45(1H, m), 4.77(2H, s), 4.65(1H, m), 4.60(12H, s), 4.35(1H, m), 4.14(1H, m), 4.05(1H, m), 3.95(2H, m), 3.85(1H, d), 3.76(2H, m), 3.60(40H, m), 3.48(2H, m), 3.18(6H, s), 2.72(1H, s), 2.64(1H, s), 2.20(2H, m), 2.00(2H, m), 1.77(1H, t, $J = 5.7$ Hz), 1.60(4H, m), 1.55(3H, d, $J = 3.3$ Hz), 1.30(50H, m), 0.91(6H, t, $J = 6.7$ Hz), 0.10(1H, s) MS (ESI) 1057.5825 [M+2Na]²⁺ 1068.5746 [M+3Na-H]²⁺

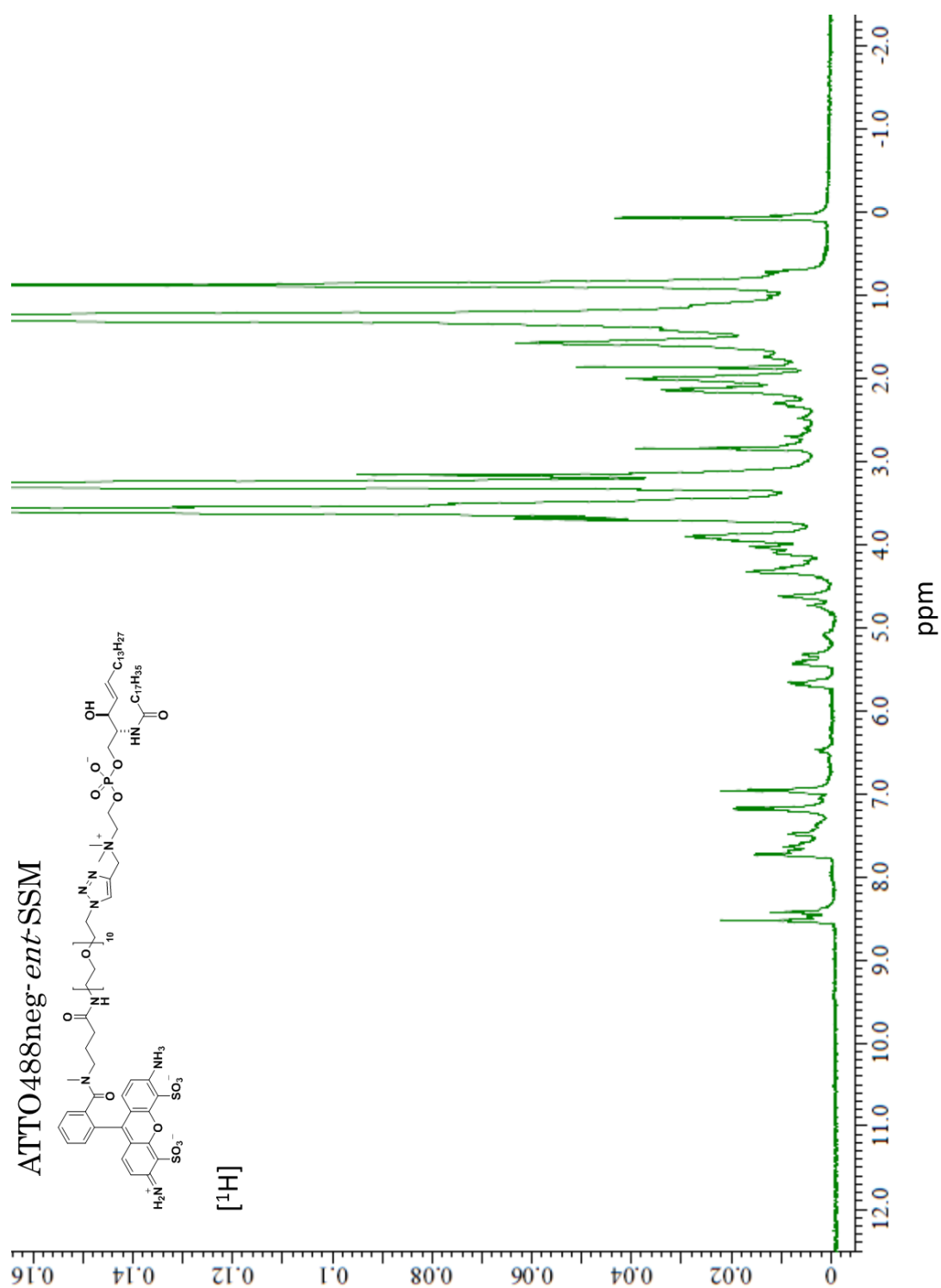


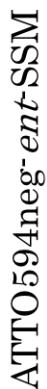












I. DSC

サンプル

○SSM, *ent*-SSM, *threo*-SSM

- 1) SSM (2.0 mg, 2.73 μmol)
- 2) *ent*-SSM (2.0 mg, 2.73 μmol)
- 3) *threo*-SSM (2.0 mg, 2.73 μmol)

○SSM, *ent*-SSM

- 1) SSM(1.5 mg, 2.05 μmol), *ent*-SSM(0.5 mg, 0.68 μmol)
- 2) SSM(1.3 mg, 1.82 μmol), *ent*-SSM(0.7 mg, 0.91 μmol)
- 3) SSM(1.0 mg, 1.37 μmol), *ent*-SSM(1.0 mg, 1.37 μmol)
- 4) SSM(0.7 mg, 0.91 μmol), *ent*-SSM(1.3 mg, 1.82 μmol)
- 5) SSM(0.5 mg, 0.68 μmol), *ent*-SSM(1.5 mg, 2.05 μmol)

○*D/L*-DPPC

- 1) *D*-DPPC(2.0 mg, 2.72 μmol)
- 2) *D*-DPPC(2.0 mg, 2.04 μmol), *L*-DPPC(2.0 mg, 0.67 μmol)
- 3) *D*-DPPC(2.0 mg, 1.81 μmol), *L*-DPPC(2.0 mg, 0.90 μmol)
- 4) *D*-DPPC(1.0 mg, 1.36 μmol), *L*-DPPC(1.0 mg, 1.36 μmol)
- 5) *D*-DPPC(2.0 mg, 0.90 μmol), *L*-DPPC(2.0 mg, 1.81 μmol)
- 6) *D*-DPPC(2.0 mg, 0.67 μmol), *L*-DPPC(2.0 mg, 2.04 μmol)
- 7) *L*-DPPC(2.0 mg, 2.72 μmol)

○PSM/SSM, PSM/*ent*-SSM

- 1) PSM(1.9mg, 2.73 μmol)
- 2) PSM(1.4 mg, 2.05 μmol), SSM(0.5 mg, 0.68 μmol)
- 3) PSM(1.3 mg, 1.82 μmol), SSM(0.7 mg, 0.91 μmol)
- 4) PSM(1.0 mg, 1.36 μmol), SSM(1.0 mg, 1.37 μmol)
- 5) PSM(0.6 mg, 0.91 μmol), SSM(1.3 mg, 1.82 μmol)
- 6) PSM(0.5 mg, 0.68 μmol), SSM(1.5 mg, 2.05 μmol)
- 7) PSM(1.4 mg, 2.05 μmol), *ent*-SSM(0.5 mg, 0.68 μmol)
- 8) PSM(1.3 mg, 1.82 μmol), *ent*-SSM(0.7 mg, 0.91 μmol)
- 9) PSM(1.0 mg, 1.36 μmol), *ent*-SSM(1.0 mg, 1.37 μmol)
- 10) PSM(0.6 mg, 0.91 μmol), *ent*-SSM(1.3 mg, 1.82 μmol)
- 11) PSM(0.5 mg, 0.68 μmol), *ent*-SSM(1.5 mg, 2.05 μmol)

○*L*-PSPC/*L*-DPPC, *L*-PSPC/*D*-DPPC

- 1) *L*-PSPC(2.0 mg, 2.62 μ mol)
- 2) *L*-PSPC(1.5 mg, 1.97 μ mol), *L*-DPPC(0.5 mg, 0.65 μ mol)
- 3) *L*-PSPC(1.3 mg, 1.75 μ mol), *L*-DPPC(0.6 mg, 0.87 μ mol)
- 4) *L*-PSPC(1.0 mg, 1.31 μ mol), *L*-DPPC(1.0 mg, 1.31 μ mol)
- 5) *L*-PSPC(0.7 mg, 0.87 μ mol), *L*-DPPC(1.3 mg, 1.75 μ mol)
- 6) *L*-PSPC(0.5 mg, 0.65 μ mol), *L*-DPPC(1.4 mg, 1.97 μ mol)
- 7) *L*-PSPC(1.5 mg, 1.97 μ mol), *D*-DPPC(0.5 mg, 0.65 μ mol)
- 8) *L*-PSPC(1.3 mg, 1.75 μ mol), *D*-DPPC(0.6 mg, 0.87 μ mol)
- 9) *L*-PSPC(1.0 mg, 1.31 μ mol), *D*-DPPC(1.0 mg, 1.31 μ mol)
- 10) *L*-PSPC(0.7 mg, 0.87 μ mol), *D*-DPPC(1.3 mg, 1.75 μ mol)
- 11) *L*-PSPC(0.5 mg, 0.65 μ mol), *D*-DPPC(1.4 mg, 1.97 μ mol)

サンプル調製法と測定条件

最初に目的脂質をそれぞれクロロホルム/メタノール 4:1 溶液に溶かして 1 mg/mL 溶液を調製した。バイアルに、上記に示す量でそれぞれの溶液を取り、溶媒を減圧留去した。真空条件下で 12 時間以上乾燥させた後、milliQ 水 500 μ L を加えて 5 分間 55°C で加熱、ボルテックスで振動させて水和した。エッペンドルフチューブに移し、遠心分離器を用いて減圧下で 10 分間脱気した後、500 μ L の試料をセルに加え、温度変化速度を 0.5°C/分として測定を行った。

II. 重水素固体 NMR

○10',10'-*d*₂-SSM

- 1) *d*₂-SSM(5.0 mg, 6.84 μ mol), SSM(10.0 mg, 13.7 μ mol)
- 2) *d*₂-SSM(5.1 mg, 6.96 μ mol), SSM(10.5 mg, 14.3 μ mol), Cho(8.0 mg, 21.0 μ mol)
- 3) *d*₂-SSM(5.0 mg, 6.84 μ mol), SSM(2.7 mg, 3.7 μ mol), *ent*-SSM(7.7 mg, 10.5 μ mol), Cho(8.01 mg, 21.0 μ mol)
- 4) *d*₂-SSM(5.0mg, 6.84 μ mol), SSM(10.4 mg, 14.3 μ mol), CME(8.41 mg, 21.0 μ mol)

○10',10'-*d*₂-*ent* SSM

- 1) *d*₂-*ent* SSM(5.0 mg, 6.84 μ mol), *ent*-SSM(10.4 mg, 14.3 μ mol)
- 2) *d*₂-*ent* SSM(5.2 mg, 7.09 μ mol), *ent*-SSM(10.0 mg, 13.7 μ mol), Cho(8.05

mg, 20.8 μ mol)

- 3) d_2 -*ent*-SSM(5.1 mg, 6.96 μ mol), SSM(7.7 mg, 10.5 μ mol), *ent*-SSM(2.7 mg, 3.7 μ mol), Cho(8.01 mg, 21.0 μ mol)
- 4) d_2 -*ent*-SSM(5.0 mg, 6.84 μ mol), *ent*-SSM(10.4 mg, 14.3 μ mol), CME(8.42 mg, 21.1 μ mol)

○10',10'- d_2 -*threo*-SSM

- 1) d_2 -*threo*-SSM(5.1 mg, 6.96 μ mol), *threo*-SSM(10.2 mg, 14.0 μ mol)
- 2) d_2 -*threo*-SSM(5.0 mg, 6.84 μ mol), *threo*-SSM(10.4 mg, 14.3 μ mol), Cho(8.01 mg, 21.0 μ mol)

○10',10'- d_2 -PSPC

- 1) d_2 -PSPC(5.0 mg, 6.84 μ mol), PSPC(10.8 mg, 14.2 μ mol), Cho(8.01 mg, 21.0 μ mol)
- 2) d_2 -PSPC(5.1 mg, 6.69 μ mol), PSPC(10.8 mg, 14.1 μ mol), CME(8.42 mg, 21.1 μ mol)

サンプル調製方法

適量の脂質をクロロホルム/メタノール(1/1)に溶かし、50 mg/mL 溶液を調製した。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、55°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 回繰り返した後、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×10 mm)に移し、接着剤で閉じた。

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。ポイント数は 8192 とした。

III. 蛍光寿命測定

- 1) SSM(90 nmol), POPC(180 nmol), Cho(30 nmol)
- 2) *ent*-SSM(90 nmol), POPC(180 nmol), Cho(30 nmol)
- 3) *threo*-SSM(90 nmol), POPC(180 nmol), Cho(30 nmol)
- 4) SSM(30 nmol), *ent*-SSM(45 nmol), POPC(180 nmol), Cho(30 nmol)

サンプル調製方法

使用する SSM, *ent*-SSM, *threo*-SSM はメタノールに、Cho はヘキサン/2-プロパノール (3:2 v/v)に溶解させた。濃度を酢酸マグネシムを用いた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 300 nmol) と tPA のメタノール溶液 (3.0 nmol)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)。そしてサンプルが室温に戻った後、測定を行った。

測定条件

励起波長 : 298 nm

蛍光波長 : 405 nm

温度範囲 : 20~45 °C

測定時間 : 10~25 min

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。

IV. 螢光顯微鏡

○顯微鏡觀察

- 1) SSM (30 μ L, 41.1 nmol), DOPC (32 μ L, 38.1 nmol), Cho(8 μ L, 20.6 nmol), 488SSM 0.2 mol%, Texas-red DHPE 0.2 mol%
- 2) *ent*SSM (30 μ L, 41.1 nmol), DOPC (32 μ L, 38.1 nmol), Cho(8 μ L, 20.6 nmol), 594*ent*SSM 0.2 mol%, BODIPY-PC 0.2 mol%
- 3) SSM (15 μ L, 20.6 nmol), *ent*SSM (15 μ L, 20.6 nmol), DOPC (32 μ L, 38.1 nmol), Cho(8 μ L, 20.6 nmol), 488SSM 0.2 mol%, 594*ent*SSM 0.2 mol%

○分配比算出

- 1) SSM (30 μ L, 41.2 nmol), DOPC (32 μ L, 38.1 nmol), Cho(8 μ L, 20.7 nmol), 594SSM 0.002 mol%
- 2) SSM (30 μ L, 41.2 nmol), DOPC (32 μ L, 38.1 nmol), Cho(8 μ L, 20.7 nmol), 594 *ent*SSM 0.002 mol%
- 3) SSM (30 μ L, 41.2 nmol), DOPC (32 μ L, 38.1 nmol), Cho(8 μ L, 20.7 nmol), 488SSM 0.002 mol%
- 4) SSM (30 μ L, 41.2 nmol), DOPC (32 μ L, 38.1 nmol), Cho(8 μ L, 20.7 nmol), 488*ent*SSM 0.002 mol%
- 5) *ent*SSM (30 μ L, 41.2 nmol), DOPC (32 μ L, 38.1 nmol), Cho(8 μ L, 20.7 nmol), 594*ent*SSM 0.002 mol%
- 6) *ent*SSM (30 μ L, 41.2 nmol), DOPC (32 μ L, 38.1 nmol), Cho(8 μ L, 20.7 nmol), 594SSM 0.002 mol%
- 7) *ent*SSM (30 μ L, 41.2 nmol), DOPC (32 μ L, 38.1 nmol), Cho(8 μ L, 20.7 nmol), 488*ent*SSM 0.002 mol%
- 8) *ent*SSM (30 μ L, 41.2 nmol), DOPC (32 μ L, 38.1 nmol), Cho(8 μ L, 20.7 nmol), 594SSM 0.002 mol%
- 9) SSM (15 μ L, 20.6 nmol), *ent*SSM (15 μ L, 20.6 nmol), DOPC (32 μ L, 38.1 nmol), Cho(8 μ L, 20.7 nmol), 594SSM 0.002 mol%
- 10)SSM (15 μ L, 20.6 nmol), *ent*SSM (15 μ L, 20.6 nmol), DOPC (32 μ L, 38.1 nmol), Cho(8 μ L, 20.7 nmol), 594*ent*SSM 0.002 mol%
- 11)SSM (15 μ L, 20.6 nmol), *ent*SSM (15 μ L, 20.6 nmol), DOPC (32 μ L, 38.1 nmol), Cho(8 μ L, 20.7 nmol), 488SSM 0.002 mol%
- 12)SSM (15 μ L, 20.6 nmol), *ent*SSM (15 μ L, 20.6 nmol), DOPC (32 μ L, 38.1 nmol), Cho(8 μ L, 20.7 nmol), 488*ent*SSM 0.002 mol%

○FCS

- 1) SSM (15 μ L, 20.6 nmol), *ent*SSM (15 μ L, 20.6 nmol), DOPC (32 μ L, 38.1 nmol), Cho(8 μ L, 20.7 nmol), 594SSM 0.002 mol%
- 2) SSM (15 μ L, 20.6 nmol), *ent*SSM (15 μ L, 20.6 nmol), DOPC (32 μ L, 38.1 nmol), Cho(8 μ L, 20.7 nmol), 594*ent*SSM 0.002 mol%
- 3) SSM (30 μ L, 41.2 nmol), DOPC (32 μ L, 38.1 nmol), Cho(8 μ L, 20.7 nmol), 594SSM 0.002 mol%

サンプル調製法

まず使用する脂質と蛍光標識脂質をそれぞれクロロホルム/メタノール 4:1 溶液に溶かして 1 mg/mL 溶液を調製した。バイアルに、モル比が以下の比率となるように溶液を加えた。2 本の白金線をスライドガラスの上にテープで止めて、その白金線の上に脂質の混合溶液を 10 μ L 乗せ、5 分ほど室温で乾燥させたのち真空条件下で 12 時間以上乾燥させた。白金線の周りをゴムで囲った後、脱イオン交換水 500 μ L を加えて上からさらにスライドガラスを被せた(図 1)。55 $^{\circ}$ C で加熱しながら白金線を通して 10 Hz、10 V_{pp} のパルス を 60 分間かけて単層膜を形成、室温で 30 分放置して測定を開始した。

測定条件

励起波長 : 473 nm、559 nm

蛍光波長 : 485~545 nm、600~700 nm

測定時間 : 5~15 min

レンズ : LUCPLFLN 60 $\times$, Olympus Corp., Tokyo, Japan FCS : UPLSAPO 60 $\times$ W, Olympus Corp., Tokyo, Japan

なお、測定後のサンプルについて質量分析により DOPC の酸化がないことを確認

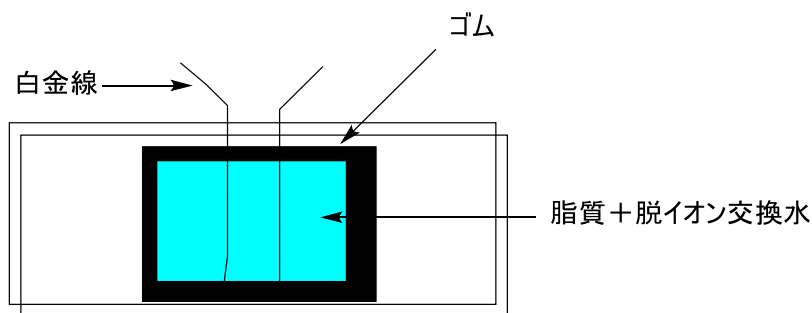


図 1 サンプルの図

V. FRET 観測

○SSM, *ent*-SSM

- 1) F: SSM (500 nmol) 488SSM 0.1 mol%, 594SSM 1.0 mol%
Fo: SSM (250 nmol), *ent*-SSM (250 nmol), 488SSM 0.1 mol%
- 2) F: SSM (250 nmol), *ent*-SSM (250 nmol), 488SSM 0.1 mol%, 594*ent*-SSM 1.0 mol%
Fo: SSM (250 nmol), *ent*-SSM (250 nmol), 488SSM 0.1 mol%
- 3) F: SSM (300 nmol), Cho(300 nmol), 488SSM 0.1 mol%, 594SSM 1.0 mol%
Fo: SSM (300 nmol), Cho(300 nmol), 488SSM 0.1 mol%
- 4) F: SSM (150 nmol), *ent*-SSM (150 nmol), Cho(300 nmol), 488SSM 0.1 mol%, 594SSM 1.0 mol%
Fo: SSM(150 nmol), *ent*-SSM(150nmol), Cho(300nmol), 488SSM 0.1 mol%

○DOPC/Cho

- 1) F: DOPC (400 nmol), Cho(100 nmol), 488SSM 0.1 mol%, 594SSM 1.0 mol%
Fo: DOPC (400 nmol), Cho(100 nmol), 488SSM 0.1 mol%

○SSM/DOPC/Cho

- 1) F: SSM (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488SSM 0.1 mol%, 594SSM 1.0 mol%
Fo: SSM (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488SSM 0.1 mol%
- 2) F: SSM (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488SSM 0.1 mol%, 594*ent*-SSM 1.0 mol%
Fo: SSM (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488SSM 0.1 mol%
- 3) F: SSM (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488*ent*-SSM 0.1 mol%, 594SSM 1.0 mol%
Fo: SSM (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488*ent*-SSM 0.1 mol%
- 4) F: SSM (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488*ent*-SSM 0.1 mol%, 594*ent*-SSM 1.0 mol%
Fo: SSM (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488*ent*-SSM 0.1 mol%

○*ent*-SSM/DOPC/Cho

- 1) F: *ent*-SSM (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488SSM 0.1 mol%, 594SSM 1.0 mol%
Fo: *ent*-SSM (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488SSM 0.1 mol%
- 2) F: *ent*-SSM (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488SSM 0.1 mol%, 594*ent*-SSM 1.0 mol%
Fo: *ent*-SSM (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488SSM 0.1 mol%
- 3) F: *ent*-SSM (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488*ent*-SSM 0.1 mol%, 594SSM 1.0 mol%
Fo: *ent*-SSM (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488SSM 0.1 mol%
- 4) F: *ent*-SSM (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488*ent*-SSM 0.1 mol%, 594*ent*-SSM 1.0 mol%
Fo: *ent*-SSM (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488*ent*-SSM 0.1 mol%

○SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho

- 1) F: SSM (100 nmol), *ent*-SSM (100 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488SSM 0.1 mol%, 594SSM 1.0 mol%
Fo: SSM (100 nmol), *ent*-SSM (100 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488SSM 0.1 mol%
- 2) F: SSM (100 nmol), *ent*-SSM (100 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488SSM 0.1 mol%, 594*ent*-SSM 1.0 mol%
Fo: SSM (100 nmol), *ent*-SSM (100 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488SSM 0.1 mol%
- 3) F: SSM (100 nmol), *ent*-SSM (100 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488*ent*-SSM 0.1 mol%, 594 *ent*-SSM 1.0 mol%
Fo: SSM (100 nmol), *ent*-SSM (100 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488*ent*-SSM 0.1 mol%
- 4) F: SSM (100 nmol), *ent*-SSM (100 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(200 nmol), 488SSM 0.1 mol%, 594SSM 1.0 mol%
Fo: SSM (100 nmol), *ent*-SSM (100 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(200 nmol), 488SSM 0.1 mol%
- 5) F: SSM (100 nmol), *ent*-SSM (100 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(200 nmol), 488SSM 0.1 mol%, 594*ent*-SSM 1.0 mol%

Fo: SSM (100 nmol), *ent*-SSM (100 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(200 nmol), 488SSM 0.1 mol%

- 6) F: SSM (100 nmol), *ent*-SSM (100 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(200 nmol), 488*ent*-SSM 0.1 mol%, 594*ent*-SSM 1.0 mol%

Fo: SSM (100 nmol), *ent*-SSM (100 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(200 nmol), 488*ent*-SSM 0.1 mol%

○DSPC/DOPC/Cho

- 1) F: DSPC (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488SSM 0.1 mol%, 594SSM 1.0 mol%

Fo: DSPC (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488SSM 0.1 mol%

- 2) F: DSPC (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488SSM 0.1 mol%, 594*ent*-SSM 1.0 mol%

Fo: DSPC (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488SSM 0.1 mol%

- 3) F: DSPC (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488*ent*-SSM 0.1 mol%, 594SSM 1.0 mol%

Fo: DSPC (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488*ent*-SSM 0.1 mol%

- 4) F: DSPC (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488*ent*-SSM 0.1 mol%, 594*ent*-SSM 1.0 mol%

Fo: DSPC (200 nmol), DOPC (200 nmol), Cho(100 nmol), 488*ent*-SSM 0.1 mol%

サンプル調製方法

使用するリン脂質と蛍光標識化脂質はメタノールに、Cho はクロロホルム/メタノール 4:1 溶液に溶解させ、濃度 1~2mM の溶液を調製した。必要な量(全体 500 nmol)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、水和した(70 °C、15 min)後、50 °C の遮光環境下で激しく攪拌した (15 min)。その後、凍結融解を 10 回繰り返した後、室温に戻したサンプルを用いて測定を行った。

測定条件

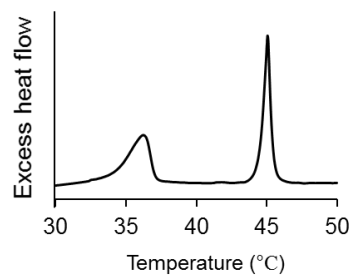
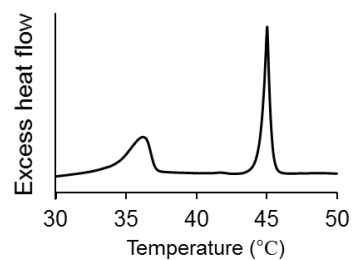
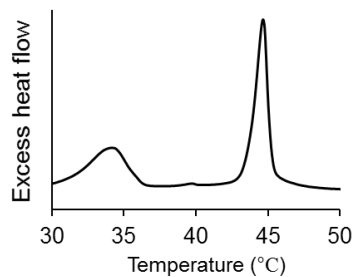
励起波長 : 480 nm 蛍光波長 : 530 nm

DSC サーモグラム

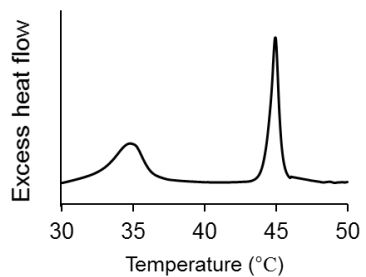
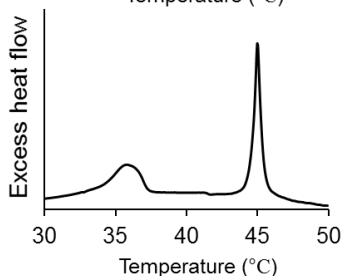
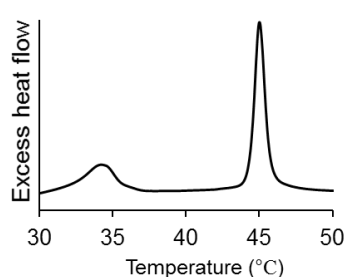
•SSM, *ent*-SSM, *racemic* SSM, *threo*-SSM の3回測定データ

○(a)SSM, (b)*ent*-SSM, (c)*threo*-SSM のサーモグラム、上段初回、中段二回目、下段三回目

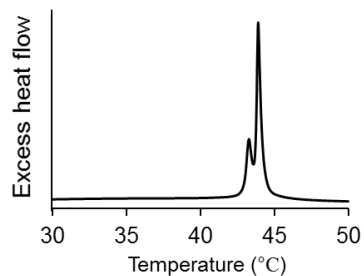
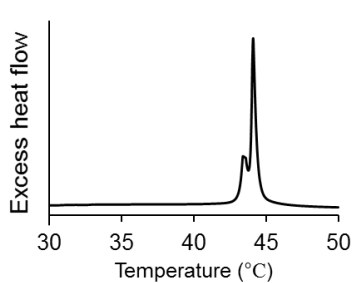
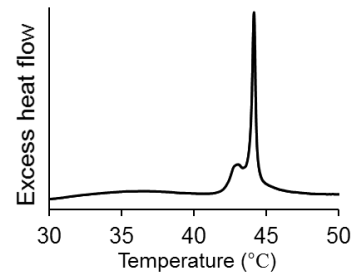
(a) SSM



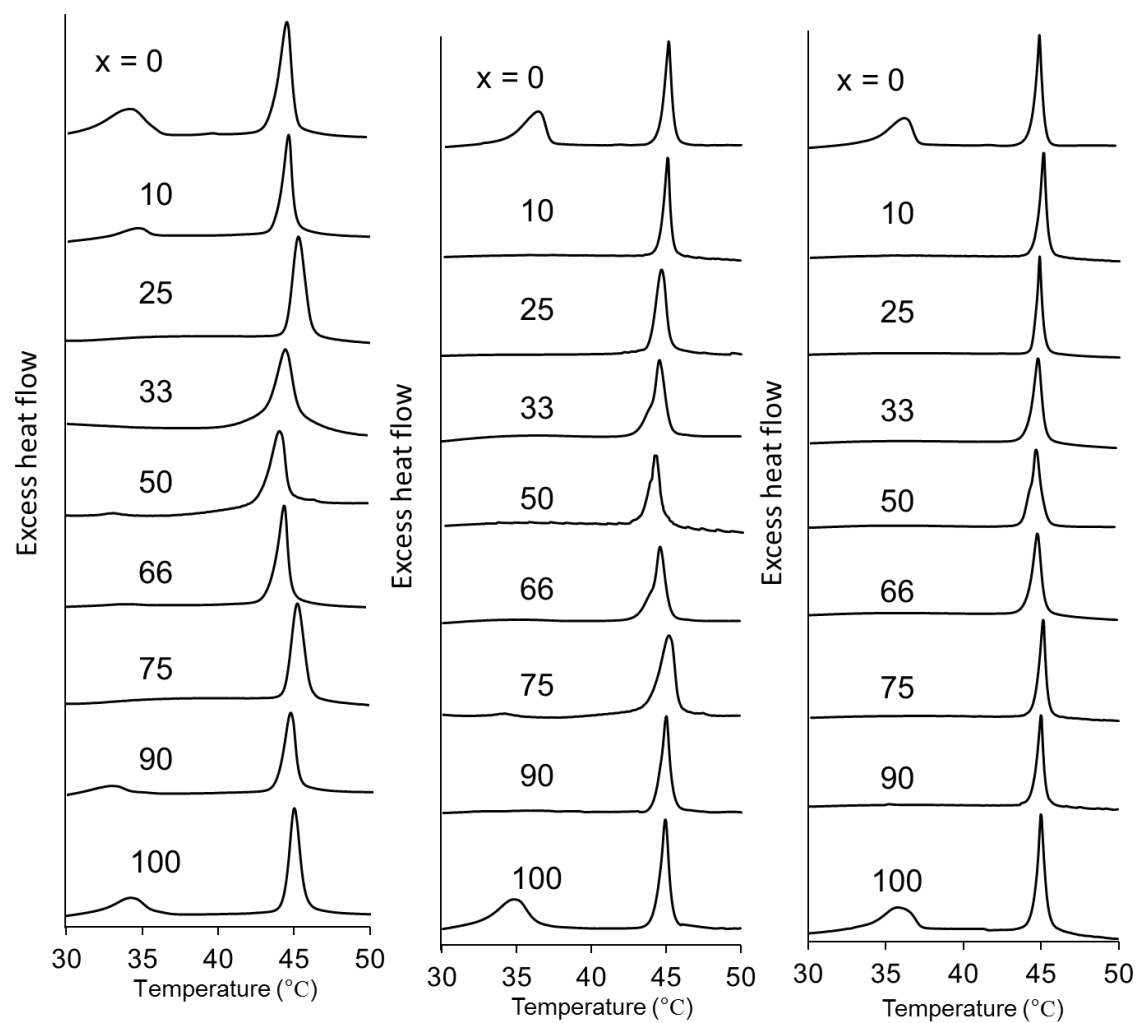
(b) *ent*-SSM



(c) *threo*-SSM

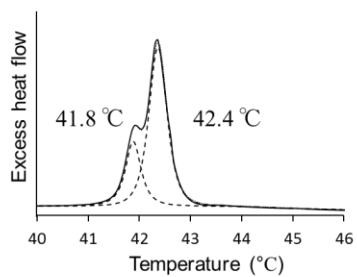


○SSM/*ent*-SSM の 3 回測定データ。3 回目の scan により取得したデータを示す。

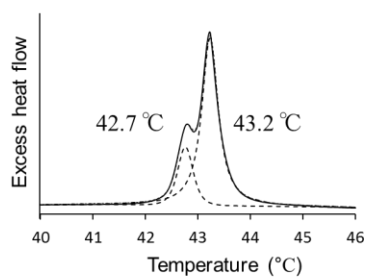


○*ent*-SSM/PSM(a)50:50, (b)66:33, (c)75:25 の3回測定 of サーマグラム, 上段初回、中段二回目、下段三回目

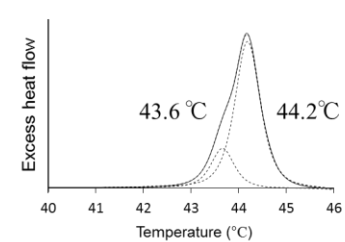
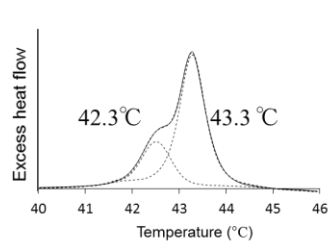
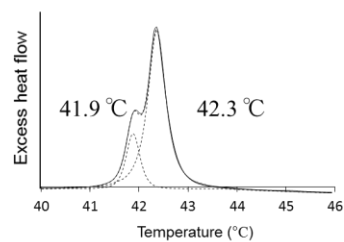
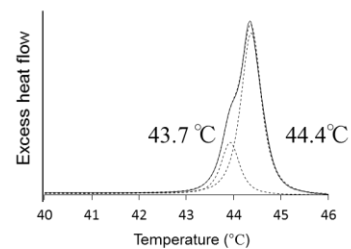
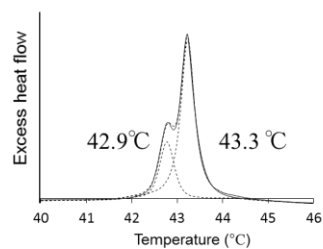
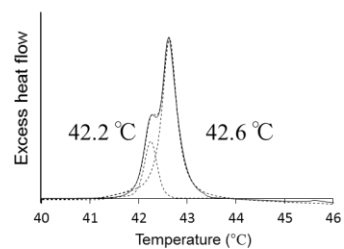
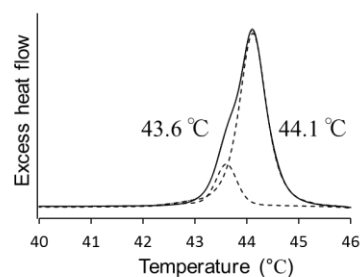
(a) 50:50



(b) 66:33



(c) 75:25



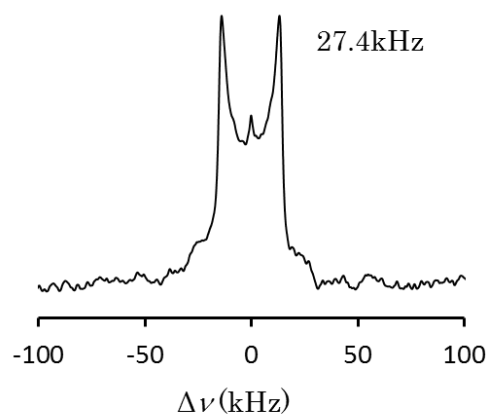
^2H -NMR スペクトルデータ

表. 各標識体を用いて得られた分裂幅(kHz)

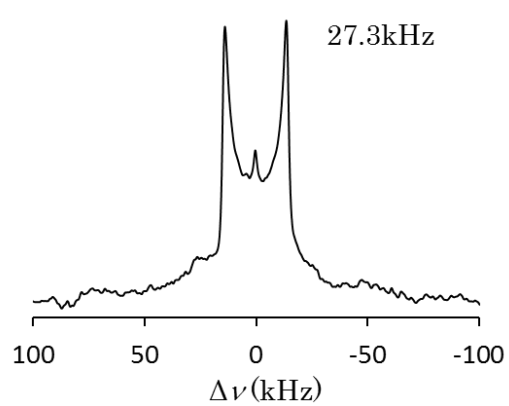
	25° C	30° C	40° C	45° C	50° C
<i>d</i> ₂ -SSM in SSM					27.4
<i>d</i> ₂ -SSM in SSM/Cho (1:1)	54.3	53.5	52.3		50.7
<i>d</i> ₂ -SSM in SSM/CME (1:1)	54.0	53.4	51.9		50.4
<i>d</i> ₂ - <i>ent</i> -SSM in <i>ent</i> -SSM					27.3
<i>d</i> ₂ - <i>ent</i> -SSM in <i>ent</i> -SSM/Cho (1:1)	54.1	53.5	52.4		50.7
<i>d</i> ₂ - <i>ent</i> -SSM in <i>ent</i> -SSM/CME (1:1)	54.1	53.6	52.2		50.6
<i>d</i> ₂ - <i>threo</i> -SSM in <i>threo</i> -SSM					24.8
<i>d</i> ₂ - <i>threo</i> -SSM in <i>threo</i> -SSM/Cho (1:1)	53.2	53.0	52.1		50.7
<i>d</i> ₂ -SSM in SSM/ <i>ent</i> -SSM (1:1)					27.2
<i>d</i> ₂ -SSM in SSM/ <i>ent</i> -SSM/Cho (0.5:0.5:1)	54.0	53.4	51.9		50.6
<i>d</i> ₂ - <i>ent</i> -SSM in SSM/ <i>ent</i> -SSM/Cho (0.5:0.5:1)	54.4	54.0	52.6		51.1
<i>d</i> ₂ -PSPC in PSPC/Cho (1:1)	53.5	53.1	52.6	49.5	48.0
<i>d</i> ₂ -PSPC in PSPC/CME (1:1)	54.0	53.4	52.8	48.5	46.1

•SSM, *ent*-SSM, *racemic* SSM, *threo*-SSM 50°C

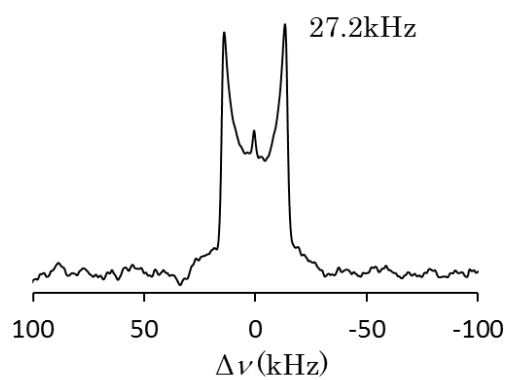
(a) SSM (d_2 -SSM)



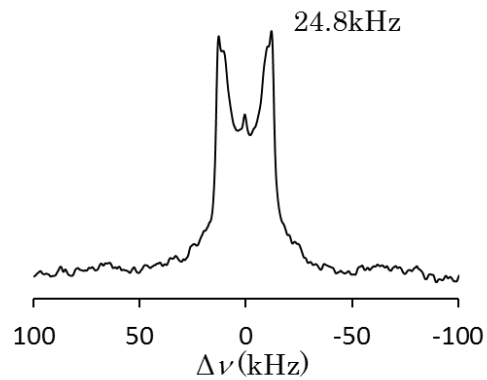
(b) *ent*-SSM (d_2 -*ent*-SSM)



(c) SSM/*ent*-SSM (d_2 -SSM)

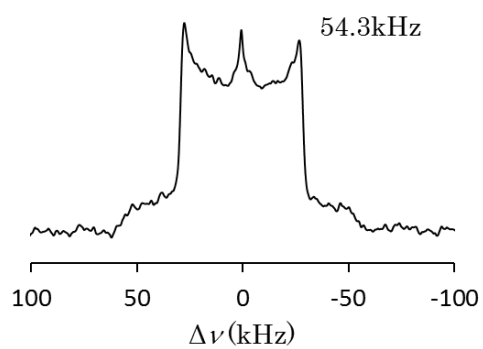


(d) *threo*-SSM (d_2 -*threo*-SSM)

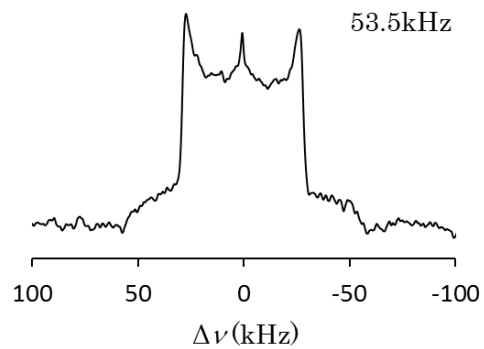


•SSM/Cho (1:1)
 $10'10'$ -d₂-SSM

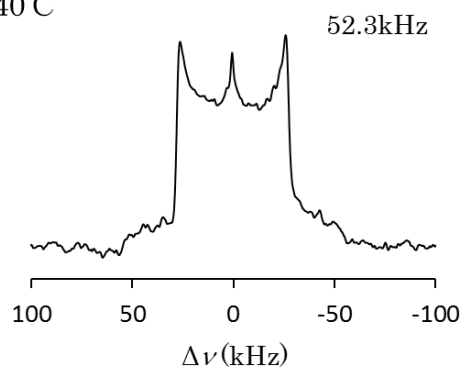
(a) 25°C



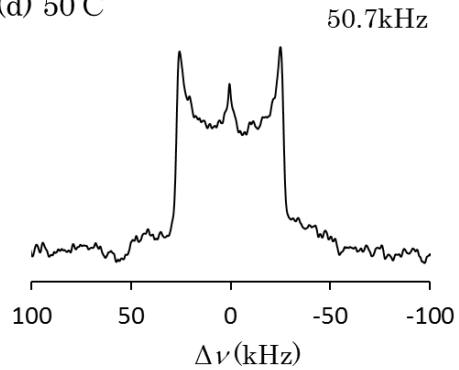
(b) 30°C



(c) 40°C

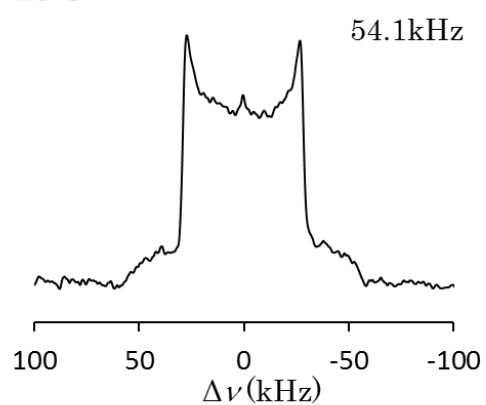


(d) 50°C

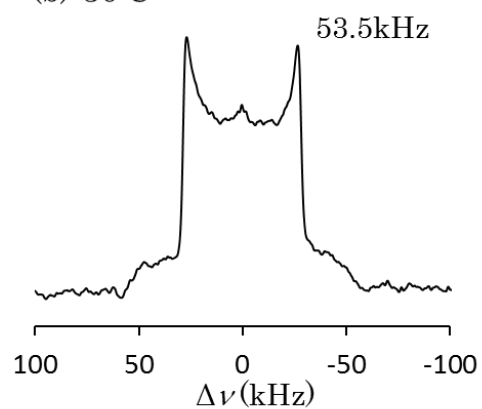


• *ent*-SSM/Cho (1:1)
10'10'-d₂-*ent*-SSM

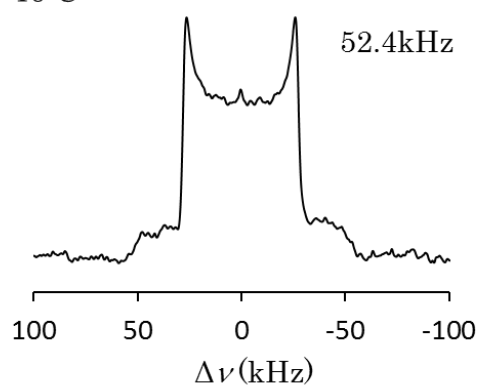
(a) 25°C



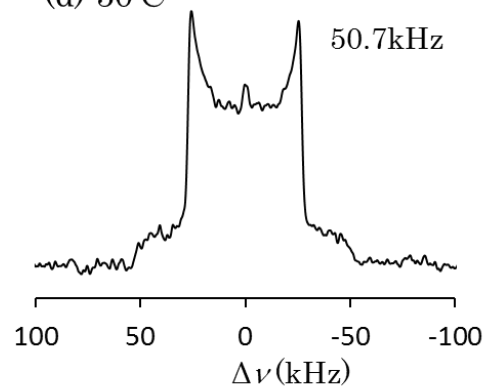
(b) 30°C



(c) 40°C

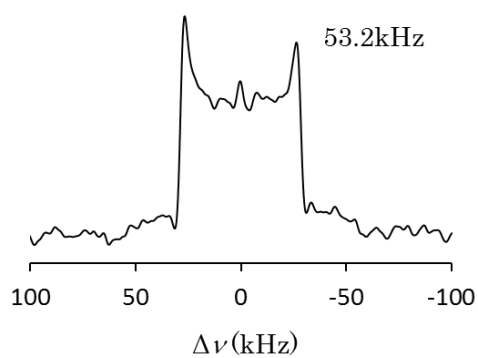


(d) 50°C

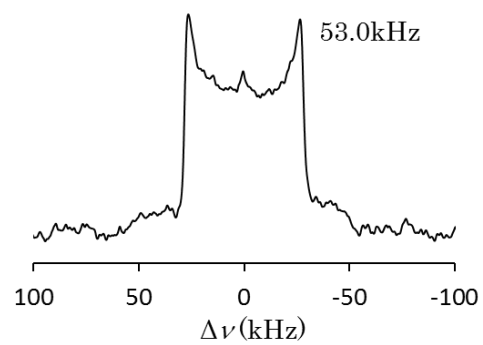


• *threo*-SSM/Cho (1:1)
 $10'10'$ -d₂-*threo*-SSM

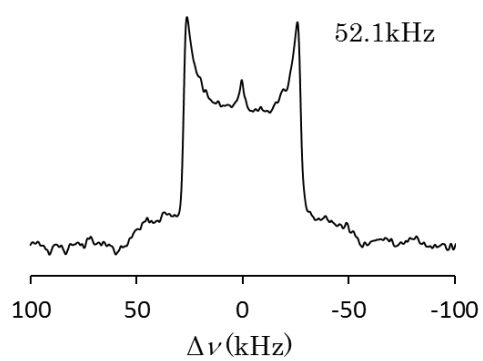
(a) 25°C



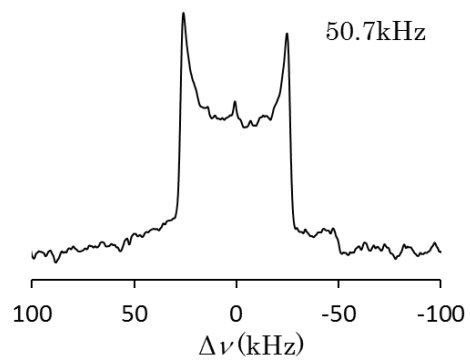
(b) 30°C



(c) 40°C



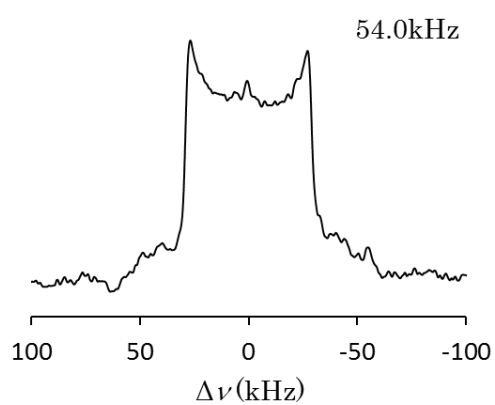
(d) 50°C



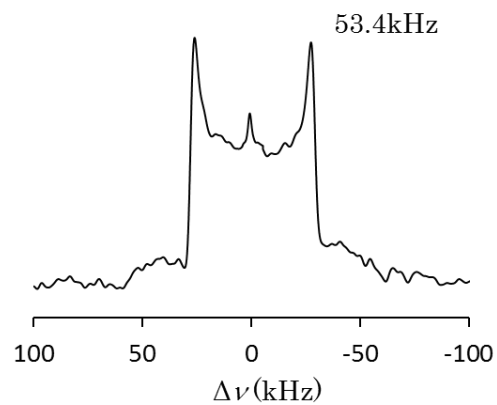
•SSM/*ent*-SSM/Cho (1:1:2)

$10'10'$ -d₂-SSM

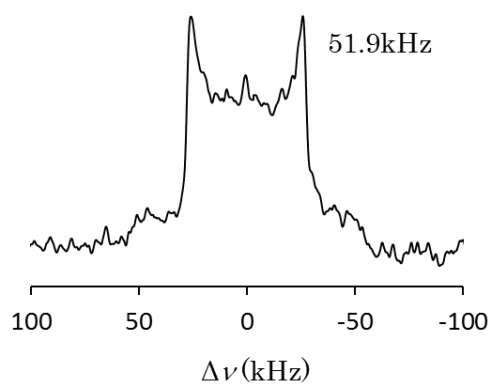
(a) 25°C



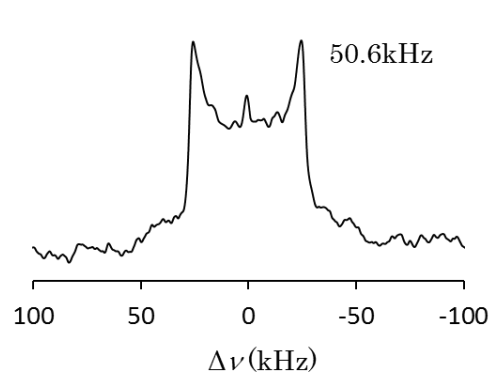
(b) 30°C



(c) 40°C



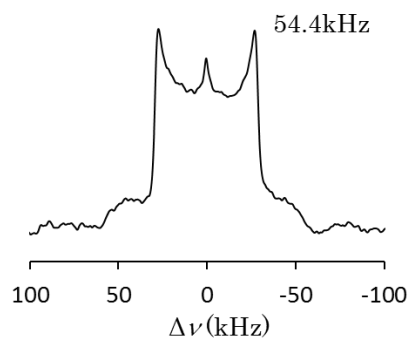
(d) 50°C



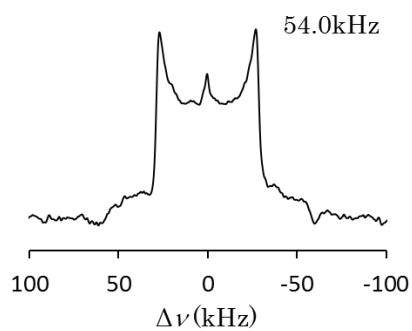
•SSM/*ent*-SSM/Cho (1:1:2)

$10'10'$ -d₂-*ent*-SSM

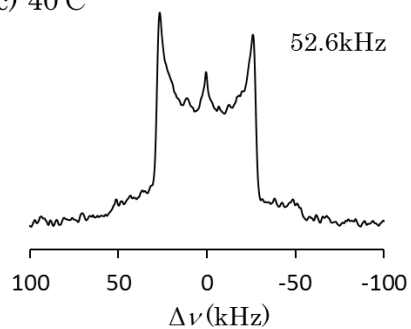
(a) 25°C



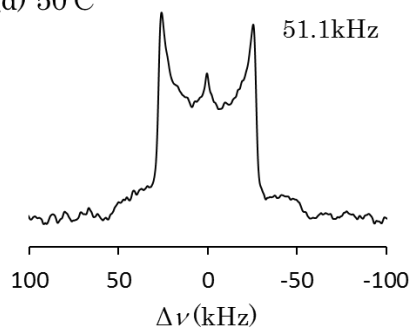
(b) 30°C



(c) 40°C

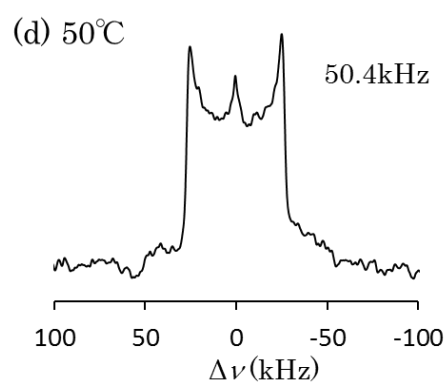
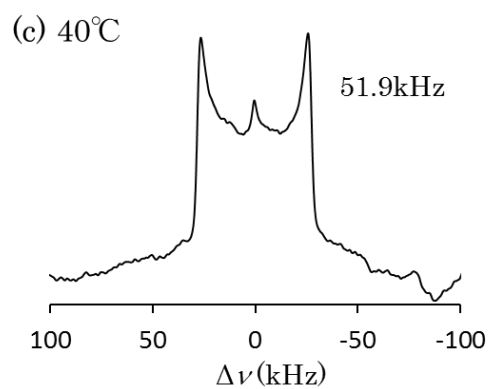
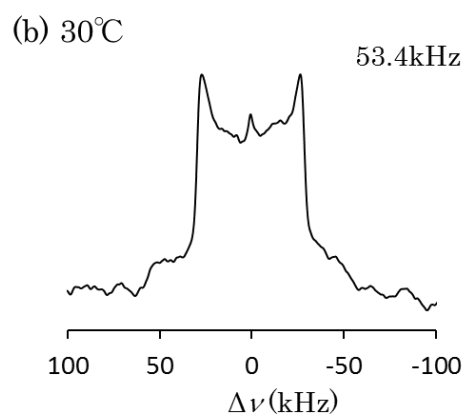
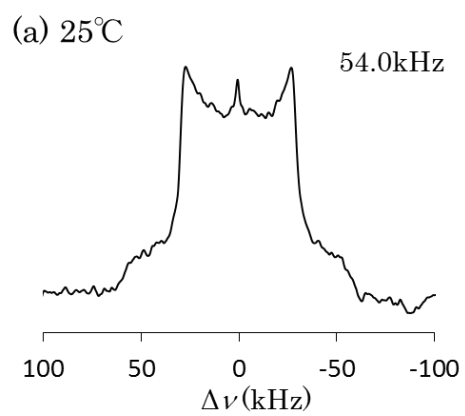


(d) 50°C



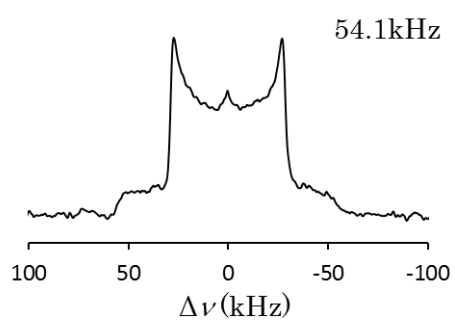
•SSM/CME (1:1)

10'10'-d₂-SSM

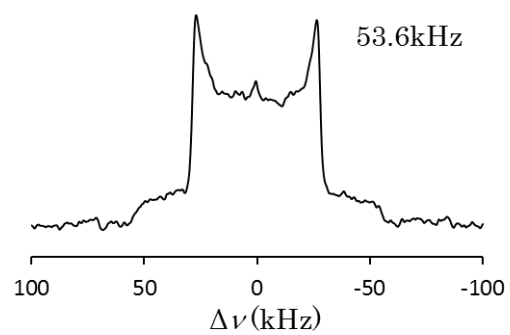


• *ent*-SSM/CME (1:1)
10'-10'-d₂-*ent*-SSM

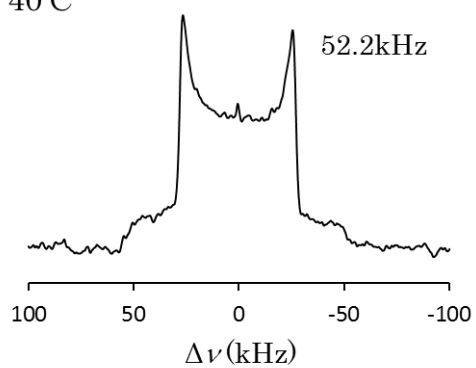
(a) 25°C



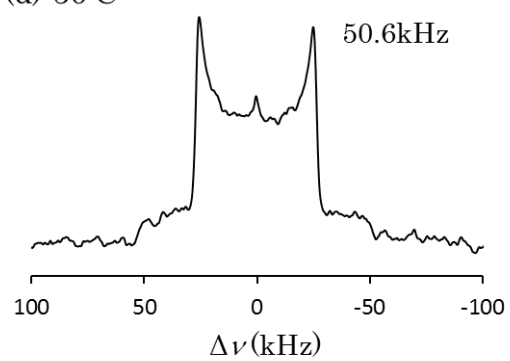
(b) 30°C



(c) 40°C



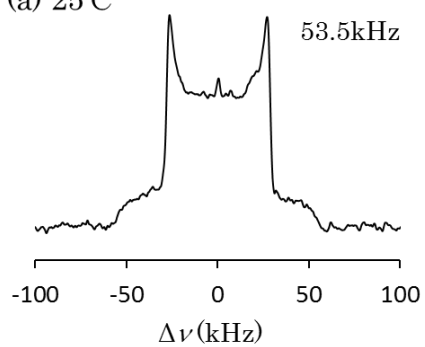
(d) 50°C



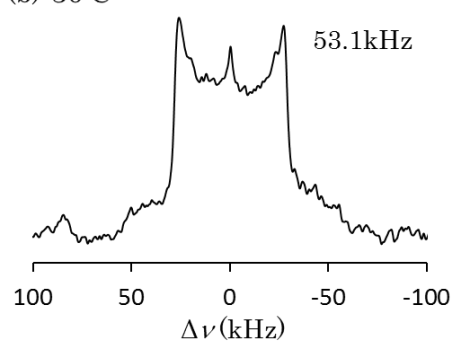
•PSPC/Cho (1:1)

$10'10'$ -d₂-PSPC

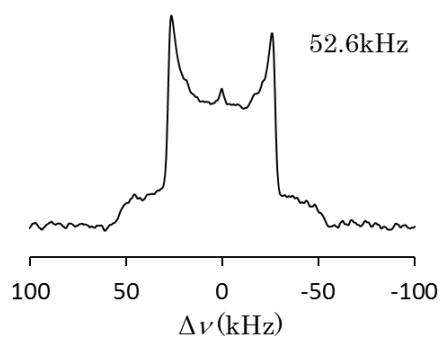
(a) 25°C



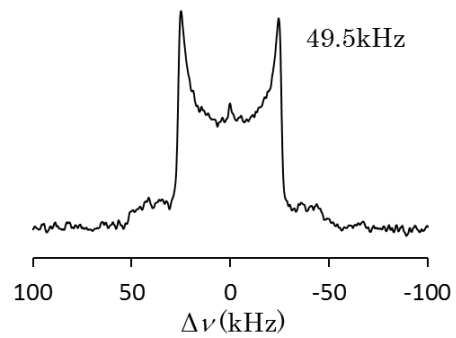
(b) 30°C



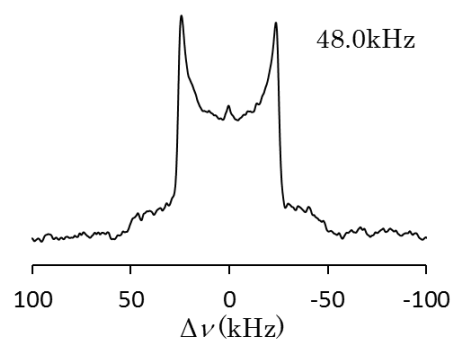
(c) 40°C



(d) 45°C



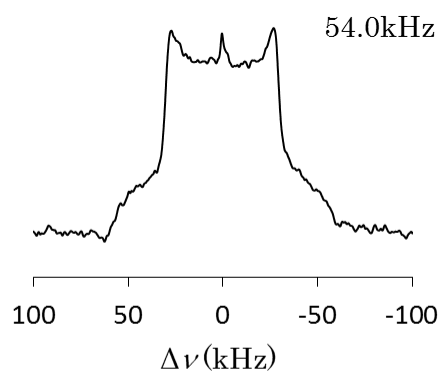
(d) 50°C



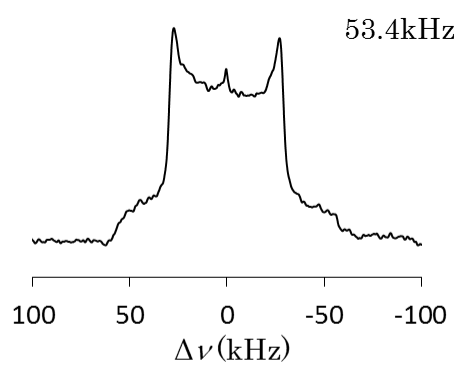
•PSPC/CME (1:1)

$10'10'$ -d₂-PSPC

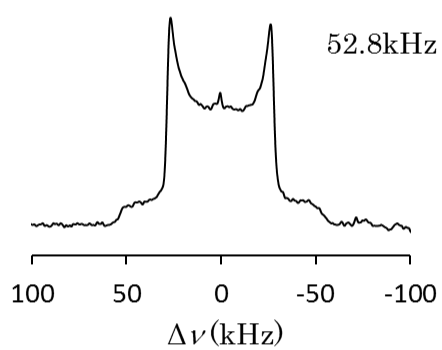
(a) 25°C



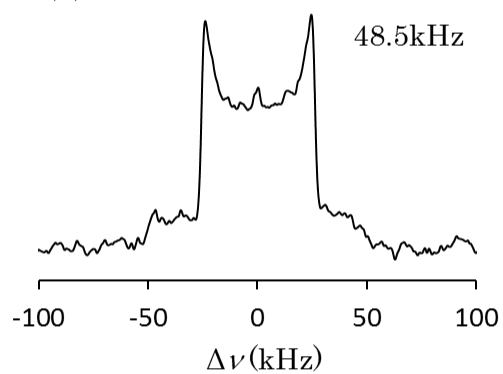
(b) 30°C



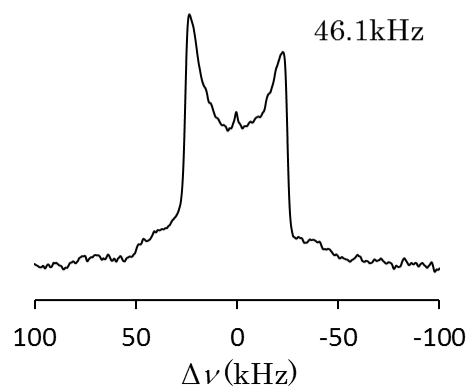
(c) 40°C



(d) 45°C



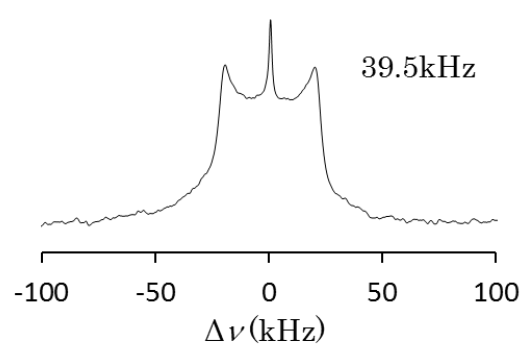
(d) 50°C



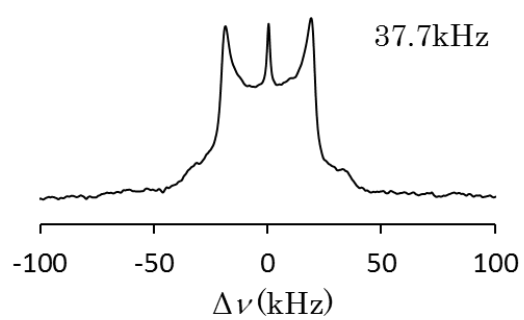
• SSM/POPC/Cho(30:60:10)

$10'10'$ -d₂-SSM

(a) 25°C



(b) 30°C



蛍光寿命測定データ

SSM/POPC/Cho、*ent*-SSM/POPC/Cho、*threo*-SSM/POPC/Cho、SSM/*ent*-SSM/POPC/Cho
膜における tPA の蛍光寿命

25°C

	τ_{AVE}	τ_1	τ_2	τ_3	α_1	α_2	α_3
SSM	26.4 ± 0.8	43.8 ± 1.1	15.0 ± 0.7	3.4 ± 0.2	13.6 ± 0.1	30.9 ± 3.0	55.4 ± 4.2
<i>ent</i> -SSM	27.6 ± 0.8	40.5 ± 1.3	12.7 ± 1.0	3.0 ± 1.0	16.2 ± 0.0	32.4 ± 2.0	51.4 ± 2.4
<i>threo</i> -SSM	22.1 ± 0.4	41.5 ± 0.8	16.6 ± 0.8	5.1 ± 0.2	9.9 ± 0.3	36.1 ± 0.8	54.0 ± 1.0
<i>racemic</i> -SSM	19.7 ± 0.7	40.8 ± 0.9	17.7 ± 0.3	6.3 ± 0.1	7.4 ± 0.5	31.2 ± 1.2	61.4 ± 1.7

30°C

	τ_{AVE}	τ_1	τ_2	τ_3	α_1	α_2	α_3
SSM	17.4 ± 0.1	40.1 ± 3.0	12.4 ± 0.4	3.3 ± 0.1	5.4 ± 1.5	30.0 ± 1.5	64.6 ± 2.5
<i>ent</i> -SSM	17.6 ± 0.4	42.2 ± 4.0	13.1 ± 0.8	3.4 ± 0.2	4.7 ± 1	29.0 ± 1.0	66.3 ± 1.8
<i>threo</i> -SSM	11.4 ± 0.2	31.2 ± 2.7	11.3 ± 0.7	4.2 ± 0.2	3.2 ± 2.3	35.5 ± 2.3	61.2 ± 2.9
<i>racemic</i> -SSM	11.2 ± 0.5	37.5 ± 1.3	14.5 ± 0.1	5.5 ± 0.1	1.4 ± 0.3	22.6 ± 0.4	76.0 ± 0.6

32°C

	τ_{AVE}	τ_1	τ_2	τ_3	α_1	α_2	α_3
SSM	12.9 ± 0.2	38.1 ± 4.1	10.5 ± 0.8	3.1 ± 0.3	2.9 ± 0.6	31.5 ± 6.2	65.6 ± 0.6
<i>ent</i> -SSM	12.9 ± 0.3	37.7 ± 3.2	10.4 ± 1.0	3.1 ± 0.1	3.0 ± 2.1	31.7 ± 8.2	65.4 ± 0.9
<i>threo</i> -SSM	8.9 ± 0.1	20.8 ± 2.2	8.1 ± 0.9	3.3 ± 0.4	5.1 ± 1.7	47.8 ± 7.3	47.2 ± 9.0
<i>racemic</i> -SSM	9.08 ± 0.5	18.0 ± 1.4	6.1 ± 0.2		25.4 ± 1.7	74.6 ± 1.7	

35°C

	τ_{AVE}	τ_1	τ_2	τ_3	α_1	α_2	α_3
SSM	8.9 ± 0.3	44.5 ± 4.0	8.3 ± 0.8	2.8 ± 0.1	0.8 ± 0.0	33.1 ± 0.5	66.0 ± 3.2
<i>ent</i> -SSM	8.4 ± 0.2	34.6 ± 3.0	5.7 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.2 ± 0.2	37.2 ± 1.0	61.6 ± 0.3
<i>threo</i> -SSM	6.9 ± 0.1	12.0 ± 0.2	5.1 ± 0.1	1.6 ± 0.0	12.7 ± 0.3	66.1 ± 0.6	21.2 ± 0.4
<i>racemic</i> -SSM	7.7 ± 0.9	15.3 ± 1.0	5.4 ± 0.4		23.1 ± 3.6	76.9 ± 3.6	

40°C

	τ_{AVE}	τ_1	τ_2	τ_3	α_1	α_2	α_3
SSM	6.7 ± 0.4	25.9 ± 0.7	4.84 ± 0.3	1.5 ± 0.0	0.63 ± 0.0	41.9 ± 3.0	57.5 ± 5.2
<i>ent</i> -SSM	5.8 ± 0.1	21.4 ± 0.6	3.76 ± 0.0	1.1 ± 0.1	2.45 ± 0.1	54.7 ± 2.0	42.9 ± 2.4
<i>threo</i> -SSM	5.0 ± 0.0	8.70 ± 0.1	4.0 ± 0.0	1.2 ± 0.1	11.2 ± 0.4	69.1 ± 0.7	19.7 ± 1.1
<i>racemic</i> -SSM	5.3 ± 0.2	9.9 ± 1.4	4.0 ± 0.2		10.7 ± 0.8	77.7 ± 0.8	

45°C

	τ_{AVE}	τ_1	τ_2	τ_3	α_1	α_2	α_3
SSM	5.0 ± 0.2	3.76 ± 0.1	3.76 ± 0.2	1.15 ± 0.1	2.61 ± 0.4	54.3 ± 0.5	43.1 ± 1.3
<i>ent</i> -SSM	5.6 ± 0.4	4.54 ± 0.0	4.54 ± 0.2	1.64 ± 0.1	10.1 ± 0.0	66.1 ± 0.3	23.9 ± 0.8
<i>threo</i> -SSM	4.0 ± 0.0	7.9 ± 0.1	3.5 ± 0.1	0.9 ± 0.2	7.7 ± 0.6	71.6 ± 0.6	20.7 ± 1.2
<i>racemic</i> -SSM	4.2 ± 0.1	7.5 ± 0.7	3.31 ± 0.1		21.3 ± 3.2	78.7 ± 3.2	

τ_{AVE} は平均寿命時間、 $\tau_{1\sim 3}$ は寿命時間、 $\alpha_{1\sim 3}$ はそれぞれの寿命成分の割合を示す。

蛍光観測データ

・分配比(I_{Lo}/I_{Ld}) 25°C

SSM/DOPC/Cho (2:2:1)

	Average	SE
594SSM	4.52	0.43
594 ent -SSM	3.18	0.40
488SSM	4.64	0.42
488 ent -SSM	3.20	0.38

ent -SSM/DOPC/Cho (2:2:1)

	Average	SE
594 ent -SSM	4.54	0.46
594SSM	2.86	0.28
488 ent -SSM	4.68	0.28
488SSM	2.97	0.46

SSM/ ent -SSM/DOPC/Cho (1:1:2:1)

	Average	SE
594SSM	4.17	0.51
594 ent -SSM	4.19	0.38
488SSM	4.25	0.41
488 ent -SSM	4.30	0.33

・ FRET 観測による得られる温度(°C)と F/Fo データ

SSM

SSM 488SSM/594SSM

温度	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64
	0.428	0.429	0.427	0.425	0.420	0.420	0.415	0.415	0.413	0.412	0.410	0.418	0.415
	0.414	0.416	0.419	0.420	0.417	0.416	0.413	0.413	0.414	0.412	0.415	0.414	0.412
	0.432	0.433	0.426	0.425	0.425	0.415	0.410	0.423	0.417	0.417	0.420	0.419	0.419
平均	0.425	0.426	0.424	0.423	0.421	0.417	0.413	0.418	0.415	0.412	0.413	0.417	0.415
SD	0.009	0.009	0.004	0.003	0.004	0.002	0.003	0.007	0.002	0.000	0.003	0.003	0.003

SSM/ ent -SSM

SSM/ ent -SSM(1:1) 488SSM/594 ent -SSM

温度	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64
	0.455	0.454	0.449	0.437	0.425	0.418	0.414	0.415	0.410	0.413	0.414	0.415	0.415
	0.467	0.464	0.458	0.456	0.450	0.438	0.427	0.412	0.405	0.406	0.408	0.409	0.413
	0.449	0.442	0.439	0.433	0.429	0.427	0.428	0.421	0.419	0.420	0.419	0.420	0.421
平均	0.457	0.453	0.449	0.442	0.435	0.428	0.423	0.416	0.411	0.413	0.414	0.415	0.416
SD	0.009	0.011	0.010	0.013	0.014	0.010	0.008	0.004	0.007	0.007	0.006	0.005	0.004

SSM/Cho

SSM/Cho (1:1) 488SSM/594SSM

温度	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64
	0.432	0.423	0.438	0.442	0.437	0.440	0.428	0.432	0.413	0.411	0.410	0.425	0.411
	0.423	0.427	0.429	0.431	0.431	0.426	0.429	0.424	0.427	0.423	0.425	0.424	0.422
	0.431	0.437	0.439	0.443	0.439	0.439	0.436	0.435	0.441	0.445	0.444	0.443	0.440
平均	0.428	0.429	0.435	0.439	0.436	0.435	0.431	0.430	0.427	0.426	0.427	0.430	0.425
SD	0.004	0.006	0.004	0.006	0.003	0.006	0.004	0.005	0.011	0.014	0.014	0.009	0.012

SSM/*ent*-SSM/Cho

SSM/*ent*-SSM/Cho (0.5:0.5:1) 488SSM/594*ent*-SSM

温度	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64
	0.432	0.423	0.438	0.442	0.437	0.440	0.428	0.432	0.413	0.411	0.410	0.425	0.411
	0.423	0.427	0.429	0.431	0.431	0.426	0.429	0.424	0.427	0.423	0.425	0.424	0.422
	0.431	0.437	0.439	0.443	0.439	0.439	0.436	0.435	0.441	0.445	0.444	0.443	0.440
平均	0.428	0.429	0.435	0.439	0.436	0.435	0.431	0.430	0.427	0.426	0.427	0.430	0.425
SD	0.004	0.006	0.004	0.006	0.003	0.006	0.004	0.005	0.011	0.014	0.014	0.009	0.012

DOPC/Cho

DOPC/Cho(4:1) 488SSM/594SSM

温度	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64
	0.424	0.423	0.418	0.429	0.428	0.416	0.426	0.426	0.432	0.426	0.432	0.418	0.419
	0.400	0.405	0.401	0.400	0.403	0.402	0.400	0.398	0.405	0.398	0.405	0.403	0.397
	0.419	0.408	0.425	0.413	0.411	0.420	0.414	0.423	0.426	0.423	0.426	0.422	0.430
平均	0.414	0.412	0.415	0.414	0.414	0.413	0.413	0.416	0.421	0.416	0.421	0.414	0.416
SD	0.010	0.008	0.010	0.012	0.010	0.008	0.011	0.012	0.011	0.012	0.011	0.008	0.014

DSPC/DOPC/Cho

DSPC/DOPC/Cho (2:2:1)

488SSM594SSM

温度	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64
	0.373	0.379	0.376	0.382	0.396	0.400	0.403	0.412	0.413	0.417	0.419	0.417	0.420
	0.355	0.357	0.363	0.365	0.376	0.378	0.390	0.396	0.412	0.416	0.418	0.419	0.422
	0.374	0.379	0.381	0.389	0.391	0.394	0.399	0.401	0.404	0.412	0.417	0.416	0.422
平均	0.367	0.372	0.374	0.378	0.387	0.391	0.397	0.403	0.410	0.416	0.418	0.418	0.422
SD	0.011	0.012	0.009	0.012	0.010	0.011	0.007	0.008	0.005	0.001	0.001	0.001	0.001

488SSM594 ent -SSM

温度	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64
	0.356	0.366	0.374	0.379	0.388	0.394	0.396	0.404	0.405	0.410	0.407	0.410	0.407
	0.365	0.375	0.379	0.383	0.392	0.400	0.402	0.411	0.415	0.418	0.415	0.418	0.417
	0.365	0.372	0.375	0.381	0.383	0.388	0.394	0.394	0.396	0.406	0.410	0.411	0.413
平均	0.361	0.371	0.376	0.381	0.390	0.397	0.399	0.403	0.405	0.414	0.411	0.414	0.412
SD	0.007	0.006	0.004	0.003	0.002	0.004	0.004	0.008	0.009	0.005	0.006	0.006	0.007

488 ent -SSM594SSM

温度	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64
	0.361	0.365	0.371	0.374	0.392	0.399	0.406	0.412	0.419	0.419	0.413	0.421	0.424
	0.351	0.354	0.357	0.367	0.366	0.375	0.381	0.396	0.412	0.415	0.416	0.418	0.420
	0.371	0.369	0.375	0.378	0.386	0.396	0.404	0.421	0.437	0.442	0.440	0.443	0.444
平均	0.356	0.359	0.364	0.370	0.379	0.387	0.394	0.409	0.423	0.417	0.415	0.420	0.422
SD	0.007	0.008	0.009	0.005	0.018	0.017	0.018	0.012	0.013	0.003	0.002	0.002	0.003

488 ent -SSM594 ent -SSM

温度	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64
	0.364	0.371	0.375	0.383	0.387	0.395	0.401	0.418	0.415	0.415	0.426	0.410	0.429
	0.349	0.357	0.358	0.368	0.369	0.375	0.380	0.384	0.398	0.404	0.409	0.408	0.411
	0.350	0.354	0.357	0.369	0.375	0.383	0.392	0.407	0.409	0.410	0.412	0.412	0.416
平均	0.357	0.364	0.367	0.375	0.378	0.385	0.391	0.403	0.407	0.409	0.417	0.409	0.420
SD	0.011	0.010	0.012	0.010	0.013	0.015	0.015	0.017	0.008	0.007	0.012	0.001	0.013

SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho

SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho(1:1:2:1)

488SSM/594*ent*-SSM

温度	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64
	0.400	0.398	0.400	0.399	0.403	0.408	0.408	0.411	0.412	0.415	0.418	0.419	0.418
	0.381	0.389	0.389	0.392	0.392	0.396	0.401	0.405	0.407	0.409	0.405	0.411	0.405
	0.381	0.380	0.381	0.382	0.385	0.388	0.389	0.399	0.402	0.403	0.397	0.405	0.401
平均	0.387	0.389	0.390	0.391	0.393	0.397	0.400	0.405	0.407	0.409	0.407	0.412	0.408
SD	0.009	0.007	0.008	0.007	0.007	0.008	0.008	0.005	0.004	0.005	0.009	0.006	0.007

488SSM/594SSM

温度	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64
	0.366	0.368	0.376	0.385	0.391	0.395	0.401	0.402	0.409	0.410	0.408	0.410	0.413
	0.363	0.368	0.378	0.386	0.391	0.395	0.395	0.397	0.405	0.410	0.411	0.414	0.414
	0.350	0.361	0.370	0.378	0.382	0.385	0.387	0.392	0.403	0.406	0.406	0.407	0.407
平均	0.360	0.366	0.375	0.383	0.388	0.392	0.394	0.397	0.406	0.409	0.408	0.411	0.411
SD	0.006	0.003	0.003	0.003	0.004	0.005	0.005	0.004	0.003	0.002	0.002	0.003	0.003

488*ent*-SSM/594*ent*-SSM

温度	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64
	0.381	0.384	0.385	0.392	0.410	0.414	0.413	0.425	0.426	0.423	0.432	0.435	0.435
	0.359	0.361	0.364	0.367	0.369	0.375	0.380	0.384	0.389	0.392	0.398	0.398	0.400
	0.362	0.366	0.372	0.377	0.385	0.389	0.394	0.401	0.404	0.406	0.409	0.409	0.410
平均	0.367	0.371	0.374	0.379	0.388	0.392	0.395	0.403	0.407	0.407	0.413	0.414	0.415
SD	0.010	0.010	0.009	0.010	0.017	0.016	0.013	0.017	0.015	0.012	0.014	0.016	0.014

SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho(1:1:2:2)

488SSM/594*ent*-SSM

温度	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64
	0.363	0.366	0.370	0.376	0.389	0.396	0.403	0.410	0.410	0.415	0.414	0.420	0.420
	0.371	0.378	0.378	0.381	0.389	0.390	0.396	0.403	0.407	0.411	0.412	0.415	0.416
	0.378	0.381	0.383	0.385	0.392	0.393	0.398	0.402	0.404	0.407	0.409	0.413	0.412
平均	0.371	0.375	0.377	0.381	0.390	0.393	0.399	0.405	0.407	0.411	0.412	0.416	0.416
SD	0.007	0.008	0.007	0.005	0.002	0.003	0.003	0.004	0.003	0.004	0.003	0.004	0.004

488SSM/594SSM

温度	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64
	0.349	0.359	0.369	0.380	0.387	0.406	0.401	0.412	0.414	0.419	0.420	0.421	0.421
	0.354	0.356	0.363	0.375	0.382	0.385	0.390	0.394	0.397	0.401	0.402	0.403	0.403
	0.354	0.358	0.372	0.381	0.389	0.393	0.398	0.401	0.406	0.410	0.412	0.409	0.409
平均	0.353	0.358	0.368	0.379	0.386	0.394	0.397	0.402	0.406	0.410	0.411	0.411	0.411
SD	0.005	0.006	0.006	0.006	0.006	0.009	0.004	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007

488*ent*-SSM/594*ent*-SSM

温度	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64
	0.337	0.339	0.353	0.364	0.377	0.387	0.392	0.386	0.386	0.386	0.382	0.400	0.404
	0.333	0.339	0.351	0.365	0.372	0.379	0.383	0.390	0.393	0.396	0.402	0.401	0.404
	0.365	0.370	0.389	0.400	0.409	0.419	0.421	0.428	0.428	0.435	0.434	0.437	0.403
平均	0.345	0.350	0.364	0.376	0.386	0.395	0.399	0.401	0.403	0.406	0.406	0.413	0.404
SD	0.014	0.015	0.017	0.017	0.017	0.017	0.016	0.019	0.018	0.021	0.021	0.017	0.000