

Title	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
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によるナノ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	ent-SS	M、 <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-а	示差走查熱量測定	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-а	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	51
		形成	
参考	文献		55
第3章	三成分	系膜中で SM が形成するナノドメインの蛍光分光法による解	57

//• - /		
析		
3-1	SSMと ent-SSM の蛍光プローブ	58

-			20
	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 ent-SSM の合成	58
3-2	共焦点	蛍光顕微鏡を用いた ent-SSM のドメイン観察	60
	3-2-a	ent-SSM による Loドメイン形成の観測	60
	3-2-ь	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 ent-SSM による	66
	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	66
	3-3-b	ラセミ膜における SSM と ent-SSM の脂質間相互作用	68
	3-3-с	三成分系膜における SSM と ent-SSM のナノドメイン形成の	70
		解析	
	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	N,N-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
² H	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
Ру	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	Tetrabuthylammonium fluoride
TBS	t-Butyldimethylsilyl
TCSPC	Time correlated single photon counting
THF	tetrahydrofuran
threo-SM	L-threo-sphingomyelin
TLC	Thin-Layer Chromatography
TFA	trifluoroacetic acid
T _m	main transition temperature
T _p	pre transition temperature
tPA	trans-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 (phosphatidylcholine, PE)、負電荷を持つホスファチジルセリン (phosphatidylcholine, 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 R₁、 R₂ 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 R₃ 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シ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

3

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。

	%(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	

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)

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 ンスオレフィンを有する 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合し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 エンザウィルスや HIV ウィルスの感染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い難い。

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80nm以下の範囲に一時的に捕捉される(約10~20ms) 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、¹⁵N 標識したスフィンゴ脂質と¹⁸O 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 を引き抜きいた脂質膜を用い 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_o)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、Tm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、ゲルー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 6%。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⁻ ⁸⁰⁾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 高いと考えらえている。

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 ⁺NMe₃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(REDOR)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も 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 Smol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¹⁵N,¹³C 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 のアミド部位やビドロキシ基と 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 μs 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、数ナノメーター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ドメイン中であって 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 によるナノメータースケール 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 が形成するナノドメインの性質やサイズに ついて明確になっておらず、このナノ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、このナノ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ノ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 ナノ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 からも、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 分子同士のホモニ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ノ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と考えられている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 ナノ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ノ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 が集積するナノ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.
- 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, PF. *Biochemistry* **1991**, *30*, 1163-1173
- 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, FR. *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. Biophyss. 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.
- 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.
- Damm, E. M.; Pelkmans, L.; Kartenbeck, J.; Mezzacasa, A.; Kurzchalia, T.;
 Helenius, A. J. Cell Biol. 2005, 168, 477-488.
- 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.
- Lichtenberg, D.; Goni, F.M.; Heerklitz, 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.
- 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.
- 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.; Silvius, J. R. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1478-1489.
- Honigmann, 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.
- 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
- 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.

- 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
- Sezgin, E.; Levental, I.; Grzybek, M.; Schwarzmann, G.; Mueller, V.;
 Honigmann, 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.
- 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.
- 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.
- Matsumori, N.; Tanada, N.; Nozu, K.; Okazaki, H.; Oishi, T.; Murata, M. *Chem. Eur. J.* 2011, 17, 8568-8575.
- 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.
- 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
- 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.; Goretta, 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.
- 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
- 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.

- 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.
- 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.
- 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'-*d*₂-*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-SSM5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'-d2-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 示差走查熱量測定

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。

$$\frac{\mathrm{d}\Delta q}{\mathrm{d}t} = -\frac{1}{R}\Delta T \tag{1}$$

d *Δq*/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℃付近の前転移と 45℃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 ℃ と 45.0 ±0.1 ℃ であり、主転移のエンタルピー (ΔHm)や主転移ピークの半値全幅 (T12)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 $T_{1/2}$ $=0.70\pm0.15$, ent-SSM: $\Delta H_m = 9.6\pm0.5$ kcal/mol $T_{1/2} = 0.70\pm0.09$) (表 2-1)。一方で、 *threo*-SSM の主転移温度は 44.1 ± 0.1 ℃ であり、転移エンタルピーは 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 ℃ を示し、SSM や ent-SSM の値(33.2 ± 0.7 ℃)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℃ 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

	$T_{p}(^{\circ}C)$	ΔH_p (kcal/mol)	$T_{\rm m}(^{\circ}{\rm C})$	ΔH_m (kcal/mol)	$T_{1/2}(^{\circ}C)$
SSM	33.2±0.7	3.0 ± 0.4	44.9±0.2	9.4±0.4	0.70±0.15
ent-SSM	34.4 ± 0.7	2.6 ± 0.5	45.0±0.1	9.6±0.5	0.70 ± 0.09
threo-SSM	43.1±0.2	2.0 ± 0.3	44.1±0.1	7.0 ± 0.4	0.35 ± 0.05
racemic-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 ℃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, Ø)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。

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

$$E_{m}^{(2)} = -\frac{hv_{Q}^{2}}{12v_{L}} \frac{m}{24} \{ [3\sin 2\theta - \eta(\sin 2\theta \cos 2\phi + 2i\sin \theta \sin 2\phi)] \\ \times [3\sin 2\theta - \eta(\sin 2\theta \cos 2\phi - 2i\sin \theta \sin 2\phi)] [8m^{2} - 4I(I+1)+1]$$
(2)
$$- \{ 3\sin^{2} \theta + \eta [1 + \cos^{2} \theta \cos 2\phi + 2i\cos \theta \sin 2\phi] \} \\ \times \{ 3\sin^{2} \theta + \eta [(1 + \cos^{2} \theta) \cos 2\phi - 2i\cos \theta \sin 2\phi] \} [2m^{2} - 2I(I+1)+1] \}$$
(2)
$$v_{Q} = \frac{3}{2} \frac{3e^{2}qQ}{2I(2I-1)/h}$$
(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、 v_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 v_m ⁽¹⁾お よび二次 v_m ⁽²⁾の項の周波数は式(4)および式(5)で表される。

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

$$v_{m}^{(2)} = -\frac{h v_{Q}^{2}}{12 v_{L}} \{ [3 \sin 2\theta - \eta (\sin 2\theta \cos 2\phi + 2i \sin \theta \sin 2\phi)] \\ \times [3 \sin 2\theta - \eta (\sin 2\theta \cos 2\phi - 2i \sin \theta \sin 2\phi)] \left[m(m-1) - \frac{I(I+1)}{6} + \frac{3}{8} \right] \\ - \{ 3 \sin^{2} \theta + \eta [1 + \cos^{2} \theta \cos 2\phi + 2i \cos \theta \sin 2\phi] \} \\ \times \{ 3 \sin^{2} \theta + \eta [(1 + \cos^{2} \theta) \cos 2\phi - 2i \cos \theta \sin 2\phi]] \left[\frac{m(m-1)}{4} - \frac{I(I+1)}{12} + \frac{1}{8} \right] \}$$
(5)

重水素のような I=1の核種では、一次の項より v_L を中心にして対称に v_0 ⁽¹⁾の 線幅で分裂し、二次の項の影響で中心が v_L から v_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。

$$\Delta v = 2v_Q^{(1)} = \frac{3}{2} \frac{e^2 qQ}{h} \frac{3\cos^2\theta - 1}{2}$$
(6)

θ は外部磁場 **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 ダブレット)と核四極子分裂幅(Δν)

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 θ =0°で分子の存在割合は最も低いが、 Δv は最大と なるために外側にシグナルを与え、 θ =54.7°(マジック角)では、 Δv =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 θ =90°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ャ 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 Δv は式(7)で 表される。

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

 ς 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る(ξ = 0^o)。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。

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

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(B₀)、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⁾ことからも、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、 d2-SSM と d2-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と、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'-d₂-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、d2-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 d2-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) d2-SSM/Cho(1:1)、d2-

SSM/CME(1:1)、d2-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、d₂-PSPC/Cho 膜を用いて重水素固体 NMR を測定した。40℃ 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 dy-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てい ると推測される。



図 2-11 (a)10',10'-d₂-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

³¹P 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 ³¹P 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。

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

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

$$I(t) = I_0 e^{-(t/\tau)}$$
(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 で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つのフォトンを確実にしている。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) 蛍光寿命測定のスペクトル模式図 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。 な は寿命時間、αi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。

$$I(t) = \sum_{i=1}^{n} \alpha_i e^{-(t/\overline{\alpha})}$$
(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Lβ/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 μm 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τ1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τ1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ために、τ1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、τ2においてもSSM/ent-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; $p \ge 0.05$ (*t*-test)

この理由として、SSM/ent-SSM/POPC/Cho膜ではti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τAV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n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 に特異的な相互者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 からも 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Yasuda, T.; Matsumori, N.; Tsuchikawa, H.; Lönnfors, M.; Nyholm, T. M.; Slotte,
 J. P.; Murata, M. *Langmuir* 2015, *31*, 13783-13792.
- Alanko, S. M.; Halling, K. K.; Maunula, S.; Slotte, J. P.; Ramstedt, B. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005, 1715, 111-121.
- Georgieva, R.; Chachaty, C.; Hazarosova, R.; Tessier, C.; Nuss, P.;
 Momchilova, A.; Staneva, G. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015, *1848*, 1424-1435.
- 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.
- 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.
- 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^のといった観測から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 一移動(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(Me₃N⁺ や PO₄)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(594ent-SSM)(図 3-1)を合成した。



図 3-1 (a) 488SSM と(b) 594ent-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-SSM3 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-SSM3 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 594ent-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。



SSM/DOPC/Cho

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 µm 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 594ent-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(10⁻¹⁵L)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。

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

$$F(t) = \boldsymbol{\kappa} \cdot Q \int dr \ W(r) \cdot C(r, t)$$
⁽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。

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

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

$$D = \frac{W^2}{4\tau} \tag{5}$$

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。

$$G(\tau) = G(0) \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{4D}{W0^2}}\right) \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{4D}{Wz^2}}\right)^{1/2}$$
(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 $0.31 \pm 0.2 \mu m^2/s$ であった。*ent-SSM/DOPC/Cho* 膜における 594*ent-SSM* の拡散係数は $0.34 \pm 0.5 \mu m^2/s$ 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 $\mu m^2/s$ 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594ent-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594ent-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594ent-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、594ent-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 488ent-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(Fo)でドナーの蛍光強度を観測し、その蛍光強度比(F/Fo) 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/Fo 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/Fo 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(Ro: ATTO488 と ATTO594 ペアで は 5.6 nm²⁶⁾)の 1.1 倍の距離(Rc)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。

67



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% 594ent-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 ℃から 64 ℃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 594ent-SSM 間の F/Fo が SSM 膜より高い値を示し、相転移温度(45 ℃)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、594ent-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 ℃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($Rc \Rightarrow 1.1Ro$)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/Fo*)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、d2-SSM/Cho(1:1)膜における重水素固体 NMR 測定では20 ℃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 ℃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℃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 ℃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 ℃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'-d₂-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 $\tau_1(\spadesuit) \ge \tau_2(\blacktriangle)$ 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、不飽和グリセロリン脂質 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 ℃ 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/Fo* 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、488ent-SSM と 594ent-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 488ent-SSM/594ent-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/Fo)の比較 SSM/DOPC/Cho (■)、 ent-SSM/DOPC/Cho (國)、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 ℃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、488ent-SSM/594ent-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も、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/594ent-SSM を同じ系で用いた場合、 10~28 ℃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いてのマクロ相 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 ℃において天然型 FRET ペア 488SSM/594SSM や ent 型 FRET ペア 488ent-SSM/594ent-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/594ent-SSM 間の FRET の差異は、前者の低 Cho 膜では 32 ℃で完全 に消失した一方で、この高 Cho 膜では 28 ℃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/594ent-SSM の F/Fo が低 Cho 膜より減少していることから、Cho により 488SSM と 594ent-SSM 間の FRET が増加している。このことは、488SSM と 594ent-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% 488ent-SSM/1.0 mol% 594ent-SSM(△:entFRETペア)、0.1 mol% 488ent-SSM/1.0 mol% 594ent-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(Rc ≒ 1.1Ro)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充分に小さく、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(Ro)は 5.6 nm である。 臨界距離(Rc)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、594ent-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/594ent-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(Rc)を 除いた面積(AFRET)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/594ent-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/594ent-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充分に大きく、ゲル様ドメイン内に存在する全ての 488SSM は 594ent-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(RFRET>>Rc)、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($\pi R_{FRET}^2 = \pi R_{domain}^2$)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 るとすると、FRET が生じない領域の合計面積(AFRETmax)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/Fo)SM-SM)と 488SSM/594ent-SSM 間の FRET((F/Fo)SM-ent)の効率の差は、式(1)で表される。

$$\frac{\left(\frac{F}{F_{O}}\right)_{SM-SM} - \left(\frac{F}{F_{O}}\right)_{SM-ent}}{\left(\left(\frac{F}{F_{O}}\right)_{SM-SM}\right)_{min} - \left(\left(\frac{F}{F_{O}}\right)_{SM-ent}\right)_{min}} = \frac{A_{FRET}}{A_{FRETmax}}$$

$$= \frac{n\pi R_{FRET}^{2}}{n\pi R_{domain}^{2}}$$

$$= \frac{\pi (R_{domain} - R_{C})^{2}}{\pi R_{domain}^{2}}$$
(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 Rc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($R_{\text{FRET}} >> Rc$)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($n\pi R_{domain}^2$)と等しくなる。((F/Fo)_{SM-SM})_{min}は FRET 効率が最大の時の F/Fo に相当し、実験値のフィッティングより算出した。Rc は フェルスター距離 (5.6 nm)より算出した 6.2 nm (1.1* Ro)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/Fo*)_{SM-SM})と 488SSM/594*ent*-SSM 間の FRET 効率((*F/Fo*)_{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/594*ent*-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(\triangle)とドメイ ン外に過剰に存在するアクセプター(\bigstar)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_{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/Fo は増加する。結果として、50 ℃以下でのドメイン形 成により FRET の効率は低下し、F/Fo は大きくなった(図 3-15)。得られた F/Fo 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。

$$\frac{F/_{Fo} - (F/_{Fo})_{DOPC/Cho}}{F/_{Fo_{max}} - (F/_{Fo})_{DOPC/Cho}} = \frac{A_{FRET}}{A_{FRETmax}}$$

$$= \frac{\pi (R'_{domain} - Rc)^2}{\pi R'_{domain}^2}$$
(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/Fo*)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℃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℃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_o}/n_{L_o})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(α_1 =27.0, α_2 =38.1)から、

$$\frac{n_{S_o}}{n_{L_o}} = \frac{\alpha_1}{\alpha_2 + \alpha_1} = \frac{27.0}{38.1 + 27.0} = 0.41$$
(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定数 K_dは

$$K_{d} = \frac{[gel]}{[Lo]} = \frac{n_{So}/V_{S_{o}}}{n_{L_{o}}/V_{L_{o}}} = \frac{n_{S_{o}}}{n_{L_{o}}} \cdot \frac{V_{L_{o}}}{V_{S_{o}}}$$

$$= \frac{\alpha_{1}}{\alpha_{2} + \alpha_{1}} \cdot \frac{V_{L_{o}}}{V_{S_{o}}}$$
(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_{So}/V_{Lo})は式より算出した値を用いることで

$$\frac{V_{S_o}}{V_{L_o}} = \frac{1}{K_d} \cdot \frac{\alpha_1}{\alpha_2 + \alpha_1}$$

$$= \frac{1}{1.42} \cdot \frac{27.0}{38.1 + 27.0}$$

$$= 0.29$$
(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 ℃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 ℃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。

81

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℃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。



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
- 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.
- 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.
- 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.
- Yasuda, T.; Matsumori, N.; Tsuchikawa, H.; Lönnfors, M.; Nyholm, T. M.; Slotte,
 J. P.; Murata, M. *Langmuir* 2015, *31*, 13783-13792.
- 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.
- 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.
- Kinoshita, M.; Suzuki, K. GN.; Matsumori, N.; Takada, M.; Ano, H.; Morigaki,
 K.; Abe, M.; Makino, A.; Kobayashi, T.; Hirosawa, KM.; Fujiwara, TK.; Kusumi,
 A.; Murata, M. J. Cell Biol. 2017, 216, 1183-1204.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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位ビ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と考えられる。

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 効率は 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 ℃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 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.
- 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.
- 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-3phosphocholine (PSPC), *L*-α-dipalmitoyl phosphatidylcholine (*L*-DPPC), *D*-αdipalmitoyl 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。ATTOneg-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 μm)および Merck シリカ ゲル 60N(40~60 μm)を使用し、逆相カラムクロマトグラフィーについては YMC の ODS-AQ を使用した。逆相 HPLC 用のカラムクロマトグラフィーについては ナカライテスク製の cosmosil5C18-AR- II を使用した。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(CDCl₃: δ 7.24, CD₃OD: δ 3.30)としたときの 値で示した。質量分析には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 µL)。 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 µL)。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



ナス形フラスコにスフィンゴシン保護体 (116 mg, 223 µmol)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 (22.7mg, 186 µmol)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 µL, 2.04 mmol)を加え、4 時間撹拌した。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℃で 91 時間撹拌した。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 7(99.5 mg, 145 µmol, 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 (400MHz, CD₃OD) 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, 6), 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, $J = 4.0, \alpha$), 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



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℃で 3 時間撹拌した。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 umol)を加え、室温で15時間撹拌した。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); $[\alpha]^{25}_D$ +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 $(1H, t, J = 8.0, H3), 3.96 (2H, m, H1 \& H2), 3.62 (2H, br, \beta), 3.21 (9H, s, N(CH_3)_3$, 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]+





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 µmL, 72.7 mmol)を加え、0℃で2時間撹拌した。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, 363µmol)、4-ジメチルアミノピリジン(27.8 mg, 767 µmol)を加え、 室温で 21 時間撹拌した。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 µmol, 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); $[\alpha]^{25}_{D}$ +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: $C_{41}H_{81}D_2N_2O_6P$ 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 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℃で3時間撹拌した。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 µL, 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 µmol)、4-ジメチルアミノピリジン (23.0 mg, 188 µmol)を加え、室温で16時間撹拌した。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, 20.4µmol, 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); $[\alpha]^{25}_D$ +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, 6), 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 µmol)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 µmol)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 µL, 4.07 mmol)を加え、4 時間撹拌した。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℃で 72 時間撹拌した。 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 µmol, 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, CD₃OD) & 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, 6), 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^{-t}Bu & 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



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 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(900 µL, 121 mmol) を加えて 0℃で 3 時間撹拌した。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 µL, 6.48 mmol)を加えた。さらに THF (2.0 mL)に溶 かした p ニトロフェニルステアリン酸 (218 mg, 578 µmol)、4-ジメチルアミノ ピリジン(44.1 mg, 361 µmol)を加え、室温で 15 時間撹拌した。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 μmol, 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, CD₃OD) 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, ddt, 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, -N(CH₃)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 [M+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 µmol)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 µL, 18.3 mmol)、ア スコルビン酸ナトリウム溶液(0.79 mg, 1.4 µmol)を加え、室温で 73 時間撹拌し 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, CD₃OD) 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 [M+3Na-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 µmol)を加え、t-BuOH/H₂O (4:1)溶液(1.0mL)に溶かした。そこに硫酸銅(Π)溶液(2.6 μL, 18.3 mmol)、アス コルビン酸ナトリウム溶液(0.81mg, 1.5 μmol)を加え、室温で 73 時間撹拌し 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, 1:9:13water/methanol/chloroform); NMR (500 MHz, CD3OD) & 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 = 3.3Hz), 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)

OSSM, 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) $SSM(1.0 \text{ mg}, 1.37 \mu \text{mol}), ent SSM(1.0 \text{ mg}, 1.37 \mu \text{mol})$
- 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 μ mol)
- 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)

OPSM/SSM, PSM/ent-SSM

- 1) $PSM(1.9mg, 2.73 \mu mol)$
- 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) $PSM(0.5 \text{ mg}, 0.68 \mu \text{mol}), SSM(1.5 \text{ mg}, 2.05 \mu \text{mol})$
- 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 μmol)
- 2) L-PSPC(1.5 mg, 1.97 μmol), L-DPPC(0.5 mg, 0.65 μmol)
- 3) L-PSPC(1.3 mg, 1.75 μmol), L-DPPC(0.6 mg, 0.87 μmol)
- 4) *L*-PSPC(1.0 mg, 1.31 μmol), *L*-DPPC(1.0 mg, 1.31 μmol)
- 5) *L*-PSPC(0.7 mg, 0.87 μmol), *L*-DPPC(1.3 mg, 1.75 μmol)
- 6) *L*-PSPC(0.5 mg, 0.65 μmol), *L*-DPPC(1.4 mg, 1.97 μmol)
- 7) *L*-PSPC(1.5 mg, 1.97 μmol), *D*-DPPC(0.5 mg, 0.65 μmol)
- 8) L-PSPC(1.3 mg, 1.75 μmol), D-DPPC(0.6 mg, 0.87 μmol)
- 9) *L*-PSPC(1.0 mg, 1.31 μmol), *D*-DPPC(1.0 mg, 1.31 μmol)
- 10) L-PSPC(0.7 mg, 0.87 μmol), D-DPPC(1.3 mg, 1.75 μmol)
- 11) L-PSPC(0.5 mg, 0.65 μmol), D-DPPC(1.4 mg, 1.97 μmol)

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と 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 µL を加えて 5 分間 55℃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 µL の試料をセルに加え、温度変化速度を 0.5℃/分として測定を行っ た。

II. 重水素固体 NMR

\bigcirc 10',10' - d_2 -SSM

- 1) d_2 -SSM(5.0 mg, 6.84 μ mol), SSM(10.0 mg, 13.7 μ mol)
- d₂-SSM(5.1 mg, 6.96 μmol), SSM(10.5 mg, 14.3 μmol), Cho(8.0 mg, 21.0 μmol)
- d₂-SSM(5.0 mg, 6.84 μmol), SSM(2.7 mg, 3.7 μmol), ent-SSM(7.7 mg, 10.5 μmol), Cho(8.01 mg, 21.0 μmol)
- 4) d₂-SSM(5.0mg, 6.84 μmol), SSM(10.4 mg, 14.3 μmol), CME(8.41 mg, 21.0 μmol)

\bigcirc 10',10' - d_2 - ent- SSM

- 1) d_2 -ent-SSM(5.0 mg, 6.84 µmol), ent-SSM(10.4 mg, 14.3 µmol)
- 2) d₂-ent-SSM(5.2 mg, 7.09 µmol), ent-SSM(10.0 mg, 13.7 µmol), Cho(8.05

mg, 20.8 µmol)

- d₂-ent-SSM(5.1 mg, 6.96 μmol), SSM(7.7 mg, 10.5 μmol), ent-SSM(2.7 mg, 3.7 μmol), Cho(8.01 mg, 21.0 μmol)
- 4) d₂-ent-SSM(5.0 mg, 6.84 μmol), ent-SSM(10.4 mg, 14.3 μmol), CME(8.42 mg, 21.1 μmol)

 \bigcirc 10',10' - d_2 - threo- SSM

- 1) d_2 -three SSM(5.1 mg, 6.96 µmol), three SSM(10.2 mg, 14.0 µmol)
- d₂-threo-SSM(5.0 mg, 6.84 μmol), threo -SSM(10.4 mg, 14.3 μmol), Cho(8.01 mg, 21.0 μmol)

 \bigcirc 10',10' - d_2 - PSPC

- d₂- PSPC(5.0 mg, 6.84 μmol), PSPC(10.8 mg, 14.2 μmol), Cho(8.01 mg, 21.0 μmol)
- 2) d₂-PSPC(5.1 mg, 6.69 μmol), PSPC(10.8 mg, 14.1 μmol), CME(8.42 mg, 21.1 μmol)

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℃ 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撹拌し、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撹拌しつつ、凍結融解を繰り返した。最後に脂質水和物が均 ー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 $\therefore 2 \ \mu s$,

interpulse delay τ_1 : 30 µs, τ_2 : 20 µs

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撹拌した (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 のオベレーションおよびデータ解析は FluoFit Pro software で行った。

IV. 蛍光顕微鏡

○顕微鏡観察

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

○分配比算出

- SSM (30 μL, 41.2 nmol), DOPC (32 μL, 38.1 nmol), Cho(8 μL, 20.7 nmol), 594SSM 0.002 mol%
- SSM (30 μL, 41.2 nmol), DOPC (32 μL, 38.1 nmol), Cho(8 μL, 20.7 nmol), 594 ent-SSM 0.002 mol%
- SSM (30 μL, 41.2 nmol), DOPC (32 μL, 38.1 nmol), Cho(8 μL, 20.7 nmol), 488SSM 0.002 mol%
- 4) SSM (30 μL, 41.2 nmol), DOPC (32 μL, 38.1 nmol), Cho(8 μL, 20.7 nmol), 488ent-SSM 0.002 mol%
- ent⁻SSM (30 μL, 41.2 nmol), DOPC (32 μL, 38.1 nmol), Cho(8 μL, 20.7 nmol), 594ent⁻SSM 0.002 mol%
- 6) ent-SSM (30 μL, 41.2 nmol), DOPC (32 μL, 38.1 nmol), Cho(8 μL, 20.7 nmol), 594SSM 0.002 mol%
- 7) ent SSM (30 μL, 41.2 nmol), DOPC (32 μL, 38.1 nmol), Cho(8 μL, 20.7 nmol), 488ent SSM 0.002 mol%
- 8) ent-SSM (30 μL, 41.2 nmol), DOPC (32 μL, 38.1 nmol), Cho(8 μL, 20.7 nmol), 594SSM 0.002 mol%
- 9) SSM (15 μL, 20.6 nmol), *ent* SSM (15 μL, 20.6 nmol), DOPC (32 μL, 38.1 nmol), Cho(8 μL, 20.7 nmol), 594SSM 0.002 mol%
- 10)SSM (15 μL, 20.6 nmol), *ent*-SSM (15 μL, 20.6 nmol), DOPC (32 μL, 38.1 nmol), Cho(8 μL, 20.7 nmol), 594*ent*-SSM 0.002 mol%
- 11)SSM (15 μL, 20.6 nmol), *ent*-SSM (15 μL, 20.6 nmol), DOPC (32 μL, 38.1 nmol), Cho(8 μL, 20.7 nmol), 488SSM 0.002 mol%
- 12)SSM (15 μL, 20.6 nmol), *ent*-SSM (15 μL, 20.6 nmol), DOPC (32 μL, 38.1 nmol), Cho(8 μL, 20.7 nmol), 488*ent*-SSM 0.002 mol%

OFCS

- SSM (15 μL, 20.6 nmol), *ent* SSM (15 μL, 20.6 nmol), DOPC (32 μL, 38.1 nmol), Cho(8 μL, 20.7 nmol), 594SSM 0.002 mol%
- SSM (15 μL, 20.6 nmol), *ent*-SSM (15 μL, 20.6 nmol), DOPC (32 μL, 38.1 nmol), Cho(8 μL, 20.7 nmol), 594*ent*-SSM 0.002 mol%
- SSM (30 μL, 41.2 nmol), DOPC (32 μL, 38.1 nmol), Cho(8 μL, 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1mg/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 µL 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 µL を加えて上からさらにスライドガラスを被せた(図 1)。55 ℃で 加熱しながら白金線を通して10 Hz、10 Vpp 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×, Olympus Corp., Tokyo, Japan FCS:UPLSAPO 60×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

- 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%, 594ent SSM
 1.0 mol%
 E = CCL (250 mol) = CCL (250 mol) + CCL (250 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(150 nmol), Cho(300 nmol), 488SSM 0.1 mol%

ODOPC/Cho

 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%

OSSM/DOPC/Cho

- 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%
- 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

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

○SSM/*ent*-SSM/DOPC/Cho

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

ODSPC/DOPC/Cho

- 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 く撹拌した (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 〇(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





○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 回測定のサーモグラム,上段初回、中段二回目、下段三回目



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
d ₂ -SSM in SSM					27.4
d_2 -SSM in SSM/Cho (1:1)	54.3	53.5	52.3		50.7
d_2 -SSM in SSM/CME (1:1)	54.0	53.4	51.9		50.4
d_2 -ent-SSM in ent-SSM					27.3
d_2 -ent-SSM in ent-SSM/Cho (1:1)	54.1	53.5	52.4		50.7
d_2 -ent-SSM in ent-SSM/CME (1:1)	54.1	53.6	52.2		50.6
d_2 -threo-SSM in threo-SSM					24.8
d_2 -threo-SSM in threo-SSM/Cho (1:1)	53.2	53.0	52.1		50.7
d_2 -SSM in SSM/ <i>ent</i> -SSM (1:1)					27.2
d_2 -SSM in SSM/ent-SSM/Cho (0.5:0.5:1)	54.0	53.4	51.9		50.6
d_2 -ent-SSM in SSM/ent-SSM/Cho (0.5:0.5:1)	54.4	54.0	52.6		51.1
d_2 -PSPC in PSPC/Cho (1:1)	53.5	53.1	52.6	49.5	48.0
d_2 -PSPC in PSPC/CME (1:1)	54.0	53.4	52.8	48.5	46.1

 $\cdot \rm SSM, {\it ent} \cdot \rm SSM, {\it racemic} \, \rm SSM, {\it threo} \cdot \rm SSM \, 50^\circ \! C$



•SSM/Cho (1:1) 10'10'-d₂-SSM



• ent-SSM/Cho (1:1) 10'10'-d₂-ent-SSM



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



•SSM/*ent*•SSM/Cho (1:1:2) 10'10'-d₂-SSM



•SSM/*ent*•SSM/Cho (1:1:2) 10'10'-d₂-*ent*•SSM





•SSM/CME (1:1) 10'10'-d₂-SSM



• ent⁻SSM/CME (1:1) 10'10'-d₂-ent⁻SSM

(a) 25°C

(b) 30°C



•PSPC/Cho (1:1) 10'10'-d₂-PSPC



100

50

-50

-100

•PSPC/CME (1:1) 10'10'-d₂-PSPC



• SSM/POPC/Cho(30:60:10) 10'10'-d₂-SSM

(a) 25℃

(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}	τ1	τ2	τ3	α1	α2	α3
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
ent-SSM	27.6 ± 0.8	40.5 ± 1.3	$12.7 \ \pm 1.0$	3.0 ± 1.0	16.2 ± 0.0	32.4 ± 2.0	51.4 ± 2.4
threo-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
racemic-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							
	$\tau_{\rm AVE}$	τ1	τ2	τ3	α1	α2	α3
SSM	17.4 ± 0.1	$40.1 \pm\ 3.0$	12.4 ± 0.4	$3.3\!\pm\!0.1$	5.4 ± 1.5	30.0 ± 1.5	64.6 ± 2.5
ent-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
threo-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
racemic-SSM	11.2 ± 0.5	37.5 ± 1.3	14.5 ± 0.1	$5.5\!\pm\!0.1$	1.4 ± 0.3	22.6 ± 0.4	76.0 ± 0.6
32°C							
	τ_{AVE}	τ1	τ2	τ3	α1	α2	α3
SSM	12.9 ± 0.2	38.1 ± 4.1	10.5 ± 0.8	3.1 ± 0.3	$2.9\!\pm\!0.6$	31.5 ± 6.2	65.6 ± 0.6
ent-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
threo-SSM	$8.9\!\pm\!0.1$	20.8 ± 2.2	8.1 ± 0.9	3.3 ± 0.4	5.1 ± 1.7	47.8 ± 7.3	47.2 ± 9.0
racemic-SSM	$9.08\!\pm\!0.5$	18.0 ± 1.4	6.1 ± 0.2		25.4 ± 1.7	74.6 ± 1.7	
35℃							
	τ_{AVE}	τ1	τ2	τ3	αl	α2	α3
SSM	$8.9\!\pm\!0.3$	44.5 ± 4.0	8.3 ± 0.8	$2.8\!\pm\!0.1$	$0.8\!\pm\!0.0$	33.1 ± 0.5	66.0 ± 3.2
ent-SSM	8.4 ± 0.2	34.6 ± 3.0	5.7 ± 0.1	$2.0\!\pm\!0.1$	1.2 ± 0.2	37.2 ± 1.0	61.6 ± 0.3
threo-SSM	$6.9\!\pm\!0.1$	12.0 ± 0.2	5.1 ± 0.1	1.6 ± 0.0	12.7 ± 0.3	66.1 ± 0.6	21.2 ± 0.4
racemic-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}	τ1	τ2	τ3	α1	α2	α3
SSM	6.7 ± 0.4	25.9 ± 0.7	4.84 ± 0.3	$1.5\!\pm\!0.0$	0.63 ± 0.0	41.9 ± 3.0	57.5 ± 5.2
ent-SSM	$5.8\!\pm\!0.1$	21.4 ± 0.6	3.76 ± 0.0	1.1 ± 0.1	2.45 ± 0.1	54.7 ± 2.0	42.9 ± 2.4
threo-SSM	$5.0\!\pm\!0.0$	8.70 ± 0.1	4.0 ± 0.0	1.2 ± 0.1	11.2 ± 0.4	69.1 ± 0.7	19.7 ± 1.1
racemic-SSM	$5.3\!\pm\!0.2$	9.9 ± 1.4	4.0 ± 0.2		10.7 ± 0.8	77.7 ± 0.8	
45°C							
	τ_{AVE}	τ1	T2	τ3	α1	α2	α3
SSM	$5.0\!\pm\!0.2$	3.76 ± 0.1	3.76 ± 0.2	1.15 ± 0.1	2.61 ± 0.4	54.3 ± 0.5	43.1 ± 1.3
ent-SSM	$5.6\!\pm\!0.4$	4.54 ± 0.0	4.54 ± 0.2	1.64 ± 0.1	10.1 ± 0.0	66.1 ± 0.3	23.9 ± 0.8
threo-SSM	4.0 ± 0.0	7.9 ± 0.1	$3.5\!\pm\!0.1$	0.9 ± 0.2	7.7 ± 0.6	71.6 ± 0.6	20.7 ± 1.2
racemic-SSM	4.2 ± 0.1	7.5 ± 0.7	3.31 ± 0.1		21.3 ± 3.2	78.7 ± 3.2	

TAVEは平均寿命時間、T1~3は寿命時間、a1~3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(IL₀/ILd) 25℃

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

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

	Average	SE		Average	SE
594SSM	4.52	0.43	 594 <i>ent</i> -SSM	4.54	0.46
594 <i>ent</i> -SSM	3.18	0.40	594SSM	2.86	0.28
488SSM	4.64	0.42	488 <i>ent</i> -SSM	4.68	0.28
488 <i>ent</i> -SSM	3.20	0.38	488SSM	2.97	0.46

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

	Average	SE	
594SSM	4.17	0.51	
594 <i>ent</i> -SSM	4.19	0.38	
488SSM	4.25	0.41	
488 <i>ent</i> -SSM	4.30	0.33	

・FRET 観測による得られる温度(℃)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/e	<i>ent-</i> SSM	(1:1)	488SSI	√/594 <i>e</i>	nt-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/C	ho (1·1) 48855	SM/594	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

SSM/ent-SSM/Cho

SSM/ent-SSM/Cho (0.5:0.5:1) 488SSM/594ent-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) 4885	SM/594	SSM									
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/C	Cho (2:2	:1)										
488SSI	VI594SS	M											
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
488SSN	M594 <i>en</i>	t-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 <i>ent</i>	-SSM59	4SSM											
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 <i>ent</i>	-SSM59	4 <i>ent-</i> SS	M										
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/e	nt-SSM/	DOPC/	Cho(1:1:	2:1)									
488SSN	M/594 <i>ei</i>	<i>nt</i> -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
488SSN	M/594S	SM											
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 <i>ent</i>	-SSM/5	94 <i>ent</i> -S	SM										
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)

488SSI	M/594 <i>ei</i>	<i>nt</i> -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
488SSI	M/594S	SM											
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 <i>en</i> i	-SSM/5	94 <i>ent</i> -S	SM										
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