



Title	脂質モデル膜におけるガングリオシドGM3とEGF受容体膜貫通ペプチドの相互作用
Author(s)	中野, 幹人
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/82017
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

令和 2 年度 学位論文

脂質モデル膜におけるガングリオシド GM3 と
EGF 受容体膜貫通ペプチドの相互作用

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

中野幹人

目次

第 1 章	序論	1	
1-1	膜タンパク質と脂質の相互作用	1	
1-2	EGF 受容体とガングリオンド GM3 が関与する生理機能	8	
1-3	膜タンパク質－脂質間相互作用を対象とした研究	17	
1-4	FRET(Förster resonance energy transfer)を用いた生体分子の相互作用測定	25	
1-5	研究目的	30	
1-6	参考文献	31	
第 2 章	本論 1	EGF 受容体膜貫通領域の脂質二重膜中での挙動	40
2-1	受容体膜貫通領域を模倣した蛍光標識ペプチドの合成と精製	40	
2-2	均一二重膜中における EGF 受容体の脂質選択性	46	
2-3	時間分解測定を用いたペプチド－脂質間 FRET 解析	53	
2-4	考察	62	
2-5	参考文献	68	
第 3 章	本論 2	ガングリオンド GM3 と EGF 受容体膜貫通領域の相互作用の定量解析	71
3-1	蛍光自己消光によるペプチド会合体の観測と GM3 による影響の評価	71	
3-2	FRET を用いた蛍光標識ペプチド－GM3 間の相互作用解析	74	
3-3	考察	81	
3-4	参考文献	86	
第 4 章	結論	89	
第 5 章	実験項	90	

略語表

bR	Bacteriorhodopsin
CD	Circular Dichroism
Cho	cholesterol
Cl	chloride
DHE	Dehydroergosterol
DIPCI	Diisopropylcarbodiimide
DIEA	Diisopropylethylamine
DLPC	Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine
DMF	Dimethyl formamide
DMPC	Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine
DOPC	Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine
DPPC	Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine
DRM	Detergent-Resistant Membrane,
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ESI	Electrospray ionization
ESR	Electron Spin Resonance
EtOH	ethanol
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
GM1	Ganglioside Monosialoside 1
GM3	Ganglioside Monosialoside 3
GpA	Glycophorin A
GPCR	G-protein coupled receptor
GPI	Glycosyl Phosphatidyl Inositol
HFIP	Hexafluoroisopropanol
LacCer	Lactosylceramide
Ld	Liquid disordered phase
Lo	Liquid ordered phase
MALDI	Matrix-assisted laser desorption ionization
NBD	Nitrobenzoxadiazole
NMP	N-methylpyrrolidone
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OmpX	Outer membrane protein X
PC	phosphatidylcholine
PE	phosphatidylethanolamine
PEG	poly-ethylene glycol
PDB	Protein data bank
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine
SM	sphingomyelin
TFA	trifluoroacetic acid
TFE	trifluoroethanol
TLR4	Toll-like receptor 4
TM	transmembrane
TMR	Tetramethylrhodamine

第1章 序論

1-1 膜タンパク質と脂質の相互作用

膜タンパク質の機能発現にはその多量体構造の変化がしばしば不可欠なステップとなる。多量化によって膜タンパク質周囲の環境をコントロールし、タンパク質自身の働き（リガンドの結合や物質輸送）を活性化させる。同様に、膜タンパク質の周辺環境を制御する分子として、生体膜を構成する脂質分子も重要な役割を果たす。膜タンパク質の機能と構造についてはゲノム研究や結晶構造解析の成果から解明が進んでいるものの、膜タンパク質と並んで主要な生体膜の成分である脂質の振る舞いについては未だ十分に解明が進んでいると言えない。脂質が構成する二重膜は流動モザイクモデルと呼ばれ、細胞の内外を隔てる均質な三次元流動体として認識されてきた¹。その後、1987年にイヌ腎臓上皮(MDCK)細胞に界面活性剤 TritonX-100 を作用させることで、スフィンゴ脂質やコレステロール(Cho), GPI アンカー型タンパク質という特定の成分を豊富に含んだ不溶性画分(detergent-resistant membrane, DRM)が得られることが見出された²。これをきっかけに、1997年に Simons らは細胞膜上において選択的に集合した脂質が機能性ドメインを形成することで、不均一な膜構造をとっているという仮説を提唱した³⁻⁹。このように、多様な脂質がそれぞれ特定の相互作用を有して生理機能を制御しているという観点で研究が進められ始めてからおよそ 20 年が経過したばかりであり、とりわけ膜タンパク質と脂質の関連性については未解明の点が数多く残されている。

1-1-1 膜タンパク質の役割

膜タンパク質のうち、膜貫通タンパク質 (transmembrane proteins) は生体膜を貫通した状態で存在し、細胞膜外からのシグナルを膜内へと伝える役割を担う。一言でシグナルと表現しても、その内容は膜タンパク質の構造や機能によって様々である¹⁰。物質を膜外から膜内へと輸送し、細胞内における生理機能をコントロールする膜タンパク質としてチャネルやイオンポンプ・輸送体が挙げられる。一方、膜外に存在する機能分子を受容して活性化し、構造変化によって新たな細胞内シグナルを生み出す G プロテイン共役型受容体(GPCR; G-protein coupled receptor)の類やチロシンキナーゼ受容体なども生物学上重要な役割を担う。

膜タンパク質は、その三次構造によって分類することができる。一つは、 α -ヘリックス構造を形成して安定化し脂質膜を1回または複数回貫通した状態で機能を発現する膜タンパク質である。複数のヘリックス構造で膜を貫通するものはヘリックスバンドル型と呼ばれ、特に七回膜貫通型を特徴とするバクテリオロドプシン¹¹のようなチャネル型輸送体やGPCRに代表される受容体タンパク質が挙げられる¹²。また、一回膜貫通型の膜タンパク質として研究が進められているものにグリコホリンA¹³や成長因子受容体(GFR; growth factor receptor)がある。これらの膜貫通型タンパク質は、水溶性構造を基本とする生理活性タンパク質(サイトカイン)や、低分子の神経伝達物質を膜外リガンドとして認識して活性化し、構造変化を経て細胞内へとシグナルを伝達する。構造の基本単位や伝達物質の種類によってさらに細かく分類され、それぞれが特定の機能を担っていることから、分子標的治療のターゲットとしても多くの医薬品が開発されている。一方、 α -ヘリックス以外の構造で安定化する膜タンパク質として β -バレル型膜タンパク質が挙げられる¹⁴。こちらは β -バレル構造内のポアを通して物質を通過させるチャネルや輸送体の役割を主に担う。

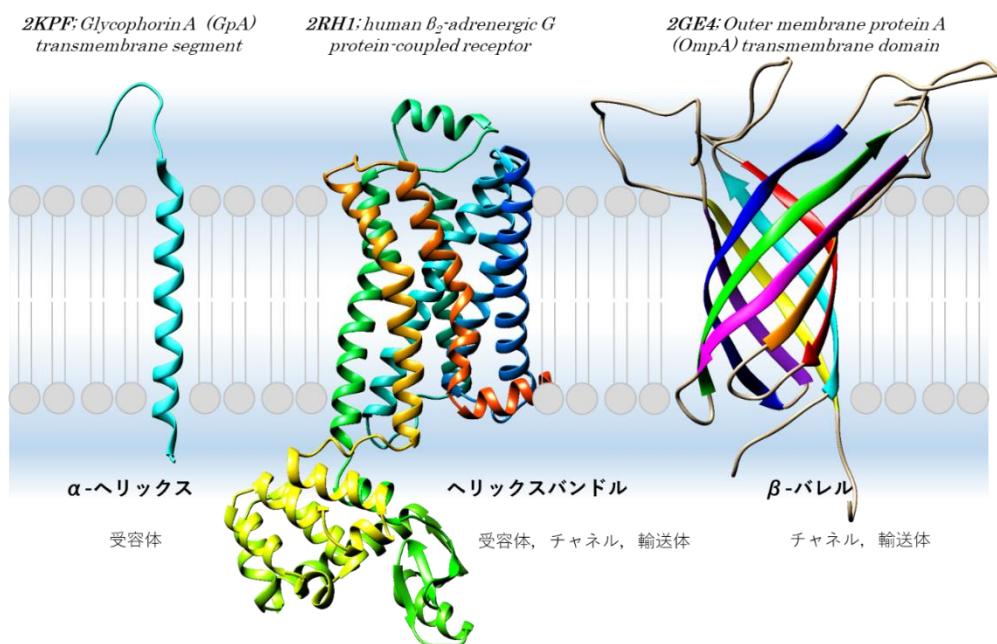


図 1-1. 三次構造によって分類した3種類の膜貫通タンパク質。各構造はプロテインデータバンクより取得して作成した。

1985年に初めてバクテリオロドプシンのX線構造が報告された¹¹ことを契機として、これまで膜タンパク質の構造研究が数多く行われてきた。創薬化学的重要性も

追い風となり、多くの結晶構造情報が今も得られている。2007年にKobilkaらによってGPCRの全体構造が明らかにされたことをはじめ¹²、低温電子顕微鏡が膜タンパク質の構造解析に導入される¹⁵など、膜タンパク質を対象とした構造研究は現在も技術発展が著しい。しかしながら、ゲノム研究の結果からは全タンパク質のうちおよそ30%が膜タンパク質としてコードされていることがわかっている一方で、水溶性タンパク質と大きく異なる性質がネックとなりその構造情報は決して十分に得られているとは言えない。プロテインデータバンク(PDB)に既に掲載されているタンパク質の結晶構造情報のうち、膜タンパク質のものが占める割合はおよそ2%にしか過ぎない。

1-1-2 膜タンパク質の構造と機能

膜タンパク質の多量化とそれに伴う機能発現には脂質が重要な役割を担っている。なかでも一回膜貫通型の受容体は柔軟な構造を有しており、脂質組成に応じて配向や会合構造を変化させやすい。一回膜貫通型タンパク質は α -ヘリックス構造からなる単一の膜貫通部位を有しており、その多くが同種の膜貫通タンパク質とのホモ二量体、もしくは同類異種の膜タンパク質とのヘテロ二量体を基本単位として機能を発現する¹⁶。タンパク質の膜貫通部位は、親水性環境においてアミド基のN-Hと水分子間の水素結合で得られるエネルギーに相当する安定化を、疎水性環境で主鎖アミド基間の水素結合形成によって受けることによってヘリックス構造を形成する。その疎水的なアミノ酸配列が、ヘリックス間の非特異的な凝集を促進する一方で、配列特異的な会合を可能にすることも明らかになっている。例えば、ヒト赤血球膜に存在するグリコホリシンA(GpA)は131残基の小さなタンパク質であり、最も詳細に研究されている一回膜貫通型タンパク質のひとつである¹³。Gly79とGly83からなるGXXXGモチーフを介して安定に会合する構造がミセル・バイセル中におけるNMR測定によって得られている。このGXXXGモチーフとはグリシンおよびアラニンといった側鎖の小さなアミノ酸の間に側鎖の大きな3つのアミノ酸が挿入されたヘリックス構造中の配列である。膜貫通領域が会合体を形成する際によく見られる。相互作用機構として、アミド骨格および側鎖 α 位のプロトンが分子間で水素結合し、その周囲に存在する嵩高い側鎖が膜タンパク質の回転角を固定化すること推定されている¹⁷。また後述するように、細胞の増殖や分化に関与する上皮成長因子(EGF; epidermal growth factor)受容体は膜貫通部位間の特異的な会合体形成が受容体

全体の構造変化と関連しており、活性化における重要なステップのひとつとなることも分かっている¹⁸.

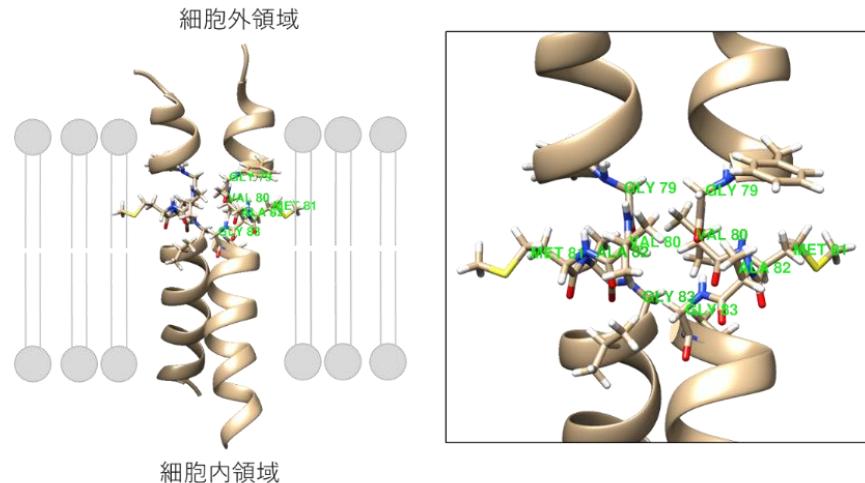


図 1-2. グリコホリソ A 膜貫通領域(70-98)のミセル中における構造. (PDB:2KPE より作成). Gly79—Gly83 が正対する位置を会合面として二量体を形成している様子が確認できる.

1-1-3 一回膜貫通型タンパク質の会合体形成と脂質の関係

膜タンパク質は生体膜によって疎水性環境に保持される。非常に複雑で不均一な三次元流動体である生体膜は、膜タンパク質をある一定の環境に局在させることでその機能制御を行うエネルギーを保持している。生体膜脂質の発揮する主な役割として、①二重膜の厚さや側方圧を調節して膜タンパク質の集積や三次構造を制御する、②膜タンパク質に対して特定の脂質が部位特異的に結合して多量化を誘起する、という二つが主に挙げられる。

①に挙げた作用は、複数の脂質分子からなる細胞膜中の集合領域を基本単位とし、それらが共同して働くものが主たる例である。特に、類似の鎖長を有する炭化水素鎖からなる脂質分子種は、類似した熱力学的性質を示し互いに集合しやすい特徴を有する。細胞膜中で分子の集合が生じることで局所的に二重膜の疎水性部の厚さが変化する。ここに、膜タンパク質が集積、または排斥されるエネルギーが働く。特に、親水性のアミノ酸側鎖を水中に、疎水性の側鎖を膜中に保持しようという力が働くことで、膜に対する配向が変化する。一方、疎水性部が水中に露出する不利が生じる場合にはタンパク質間で会合することによってこの不利を補う力が働く

く¹⁹. 以上のように挙げたような駆動力がタンパク質の構造変化において重要な役割を担っている.

Schneider らは、GpA 膜貫通領域をさまざまなアシル鎖の不飽和脂質からなるモデル膜に組み込み、フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET; Förster resonance energy transfer)から、二量体の形成機能を評価した²⁰. その結果、炭化水素鎖長がおよそ 30.5 Å のときに二量体の割合が最大となることを明らかにした.

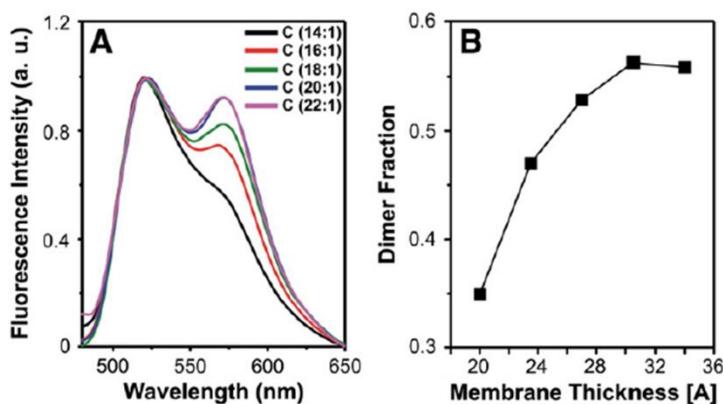


図 1-3. (A)二種類の蛍光分子 Fl ($\lambda=530$ nm), TAMRA ($\lambda=590$ nm)でそれぞれ標識した GpA ペプチドを混合して脂質二重膜に組み込んだ際の蛍光スペクトル. diC(14:1) PC, diC(16:1) PC, (=DOPC), diC(18:1) PC, diC(20:1) PC および diC(22:1) PC. (B)FRET 効率から求めた二量体の割合と二重膜炭化水素鎖長の関係. 二量体の模式図は図 1-2 に示したものに対応している. Reprinted from *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2010**, 1798 (10), 1899–1907. Copyright (2010) with permission from Elsevier.

また、Yano らはアラニンとロイシンからなる一回膜貫通型モデルペプチドの末端を蛍光標識し、リポソーム上での FRET を一分子単位で追跡した²¹. このモデルペプチドは POPC／コレステロール二成分膜中で逆対称二量体を安定に形成する. これはアミド結合中のカルボニル基がペプチド全体としてマクロな双極子モーメントとなって働くためであり、静電相互作用によって逆平行二量体が安定化する. 一方、特異的に二量体を形成する GXXXG モチーフを組み込んだモデルペプチドは POPC 膜中で配列特異的に会合し、平行二量体を優位に形成した. この安定性は流動性の高い POPC 単一膜中でより高く、コレステロールを含む膜では大きな側方圧によって会合は不安定化した.

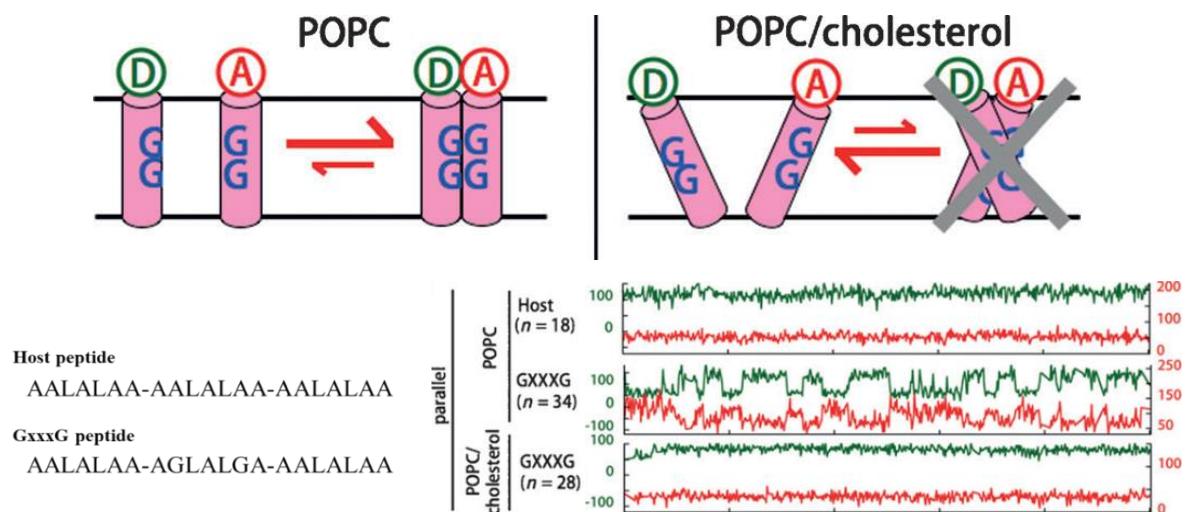


図 1-4. 二種類の配列からなるペプチドをモデル膜に組み込み、単一リポソームの蛍光強度を記録した先行研究例。会合するとアクセプター由来の蛍光強度（右図右軸、赤線）が増大し、ドナー由来の蛍光強度（右図左軸、緑線）が減少する。Reprinted with permission from *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, 56 (7), 1756–1759. Copyright (2017) John Wiley and Sons.

GXXXG モチーフを含むモデルペプチドを用いた Yano らの例では、会合一脱会合状態の時定数から会合自由エネルギーが算出された²¹。また Hristova らは EGF 受容体の TM ペプチドを蛍光標識し DLPC からなるモデル二重膜に再構成し、FRET 測定によって求められるエネルギー移動効率から会合エネルギーを求めた²²。一般的に、タンパク質膜貫通部位の疎水性は、脂質への貫入によってほとんど満たされると考えられている。すなわち、膜貫通部位が適切に膜に挿入されている場合、膜貫通部位同士の疎水性相互作用が大きく働くことはない。したがって、理想的な膜貫通ペプチドの会合を駆動する作用は、ヘリックス構造が示すカルボニル基のマクロ双極子やアミド側鎖間の水素結合といった静電相互作用であるとされている²³。一方、膜貫通部位が脂質膜疎水性部と比べて極端に異なる長さを有する場合にはその限りではない。膜界面付近に露出する膜タンパク質の疎水性表面に水分子が構造化する不利を最小化するように(疎水性ミスマッチ)，膜タンパク質の会合が生じる¹⁹。また、膜タンパク質周囲を取り巻く脂質分子の構造化は、水分子と同じようにエントロピ一面での不利を生じるため、膜タンパク質の会合の駆動力として働くことも報告されている²⁴。

ここまで、脂質二重膜の性質が膜タンパク質の会合に影響を与えるメカニズムについて示した。しかしこれらは膜タンパク質の周辺環境としての脂質の役割を示唆した結果であり、脂質と膜タンパク質の親和性が膜タンパク質の多量化に寄与を行っている直接的な証拠を示すものではない。受容体とリガンドの結合のように複数のアミノ酸残基を介した多点的な結合とは異なり、一回膜貫通型タンパク質と脂質は高い安定性を有する結合を形成するモチーフを有しておらず、タンパク質周辺に存在する多数の脂質が常に交換しながら作用している。したがって、これまで一回膜貫通型タンパク質と脂質の作用に関して、その作用機構や結合構造といった精密な解析が達成された例は少ない。実際に、結合状態の脂質が観測されているものはほとんどが一回膜貫通型のタンパク質と比べて大きな分子量を有する GPCR やチャネル型タンパク質である。一回膜貫通型タンパク質は膜タンパク質のうち約半数を占める階層であり²⁵、それらが示す機能とその活性化に関与する脂質との“安定性の低い”相互作用に対して、精密な評価を行う手法が求められている。

②に挙げた作用は特に GPCR やチャネル型タンパク質のようなヘリックスバンドル型の膜タンパク質と脂質の相互作用においてみられる²⁶。脂質が各 α ヘリックス間の部位に対してリガンドのように結合し、各構造の多量化構造を制御することで膜タンパク質が担う輸送体やチャネルとしての機能を調節する。コレステロールの結合が見られた結晶の例として、GPCR の一種・ β_2 -アドレナリン受容体が挙げられる²⁶。3つのコレステロールおよび1つの共有結合パルミチン酸が形成する面を介して二量体を形成しており、タンパク質同士の接触面積の 73% が脂質分子で構成されている。会合に関与するコレステロールの存在から、脂質ラフトとの関連も示唆されている。しかしながら、脂質の結合が誘起する膜タンパク質の多量化とその機能的重要性は明らかになっていないものも多く、さらなる研究が望まれている²⁶。

1-2 EGF 受容体と GM3 の関連

一回膜貫通型タンパク質 EGF 受容体は 1186 個のアミノ酸で構成されるチロシンキナーゼ型受容体である²⁷。1986 年に Bremer らによって、EGF 受容体の機能を細胞膜構成脂質であるガングリオシド GM3（図 1-7）が制御することが報告された²⁸。GM3 の細胞含有量はリガンドである EGF の結合には影響を与えないが、EGF 結合時の受容体の自己リン酸化を阻害するとされている²⁹。GM3 はスフィンゴ脂質の一種として脂質ラフトドメインに集積することが推測され、複数の脂質成分を介して膜タンパク質を制御するモデルも提唱されている。しかしながら、GM3 は細胞膜に含まれる微量成分のひとつにすぎない。非常に多様な種類の脂質が拡散しながら他の分子との結合と解離を生じている細胞膜上において、微量成分が示す相互作用の結合状態と非結合状態を明確に区別し観測することは困難である。EGF 受容体と GM3 の作用はコレステロールやスフィンゴミエリンが共存するモデル膜条件での再現も試みられたが³⁰、脂質と膜タンパク質間の親和性や結合メカニズムの定量解析を達成するためには、それぞれの基本性質の理解を進める必要がある。

1-2-1 EGFR の構造と生物学的機能

EGF 受容体ファミリーには EGFR1～EGFR4 の 4 つの類似のタンパク質が含まれる³¹。また、それぞれ ErbB1～ErbB4, HER1～HER4 と別の略称が存在している。一般に EGF 受容体は EGFR1 (ErbB1, HER1) を指して呼称することが多いことから、本論文でも踏襲する。一方 EGFR2 は HER2, Neu 受容体とも呼ばれ、大腸がんの主要な変異体マーカーとしての研究が進んでいる。EGF 受容体は上皮成長因子 EGF をはじめとする数種のタンパク質をリガンドとして活性化することができ、細胞内チロシン残基を自己リン酸化する。SHC1, PI3K などの細胞質内タンパク質がこれを認識して結合することでシグナルが細胞内へと伝達され、多数の転写調節因子を活性化して細胞活動に影響を与えており、受容体の変異は細胞の異常増殖を引き起こし、特に非小細胞肺がん (non-small cell lung cancer, NSCLC) において主要な部分因子となっている¹⁶。そのため創薬研究の発展が著しく、リガンド結合部位を標的とした抗体治療薬や、リン酸化部位に結合することでシグナル伝達経路を遮断するチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) が数多く開発されており、一部のがんに対する分子標的治療の有力なターゲットである¹⁶。

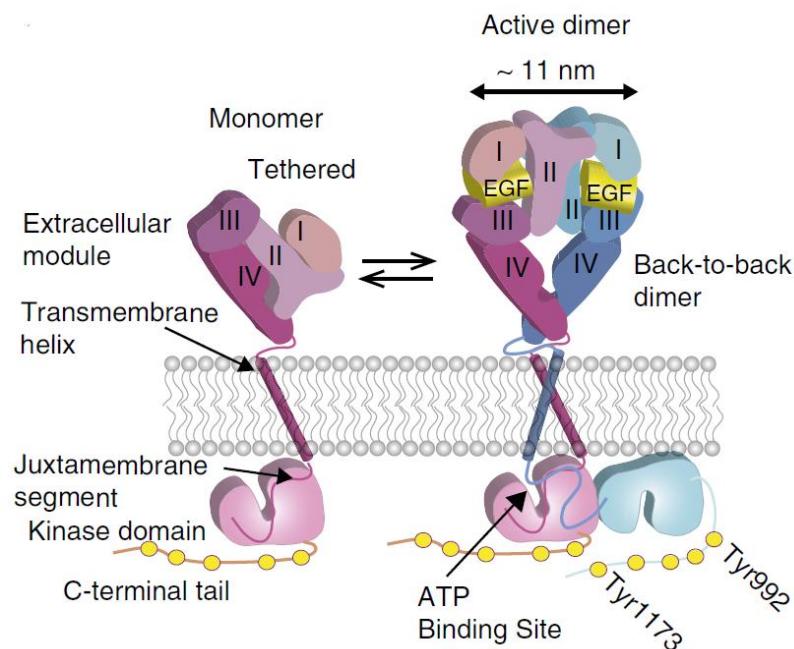


図 1-5 全長 EGF 受容体の各領域と二量体構造の模式図³². Reprinted with permission from *Nat. Commun.* 2016, 7 (7), 1–14. Copyright (2016) John Wiley and Sons.

EGF 受容体は膜外のリガンド結合領域と膜内のチロシンキナーゼ領域、そしてそれらを繋ぐ膜貫通領域からなる。膜外領域と膜内領域はそれぞれが結晶化されており、リガンド結合部位の同定や単量体・二量体の機能研究が行われてきた³³。細胞外領域は N 末端側から順に 4 つの領域に分けられる(図 1-5)。上皮成長因子 (EGF) の結合ポケットは領域 I と III の境界に位置しており、二量化時には領域 II 間での結合形成が進行し受容体全体の構造変化を誘発している。しかしながら、EGF の結合と二量体形成の前後関係については単純なモデル、すなわち“リガンド結合が活性化を引き起こす”一といった純粋なメカニズムではないことが分かっている。その根拠として、EGF 受容体はリガンドが存在しない環境においても膜上に高発現する場合には活性化状態へと移行し、膜内チロシン残基のリン酸化を生じることが明らかになっている³⁴。現在のところ二種類の膜外二量体の結晶構造が確認されており、この構造変化が膜内領域の活性化構造を誘起していることが示唆されている。リガンドの結合は不活性二量体の活性状態への変化を促進し、その安定性を上昇させる機能を担っているという考え方がいくつかのグループから提唱されている³⁵⁻³⁷。

一方、細胞内領域の活性化(=チロシン残基のリン酸化)には図 1-5 に示した ATP Binding Site が非対称な形の二量体を形成することが重要である。この二量化に伴い C 末端側に存在する Y992, Y1045, Y1068, Y1086, Y1173 が自己リン酸化されると、これを Src homology2(SH2)領域を有するシグナルタンパク質、成長因子結合タンパク質 (GRB2), PI3 キナーゼ (PI3K), SRC homology 2 domain-containing transforming protein 1 (SHC1), シグナル伝達兼転写活性化因子(STAT)などのシグナル伝達タンパク質が認識して結合する³⁸。それぞれの伝達タンパク質は MAPK 経路、PI3K 経路といった一連のシグナル伝達経路の細胞内への進行を支え、多数の転写調節因子を活性化して細胞活動に影響を与える³⁹。受容体の DNA 配列に欠損があると L858R 点変異などとして膜上に発現し、恒常活性状態となり細胞の異常増殖を誘起する。

以上のような膜外・膜内領域を対象として結晶構造解析と機能研究の結果から、受容体の活性化は二量化構造の微妙な制御を介して行われていることが分かった。したがってこれらを繋ぐ部分にあたる膜貫通部位の機能は非常に重要である。しかしながら、膜貫通部位は疎水性が高く、その構造解析には X 線結晶構造解析が適用できない。このような性質は一回膜貫通型タンパク質の機能解析における本質的な問題点となっている。その機能研究を領域ごと個別に行う方法を選択せざるを得ず、結晶化の困難な膜貫通領域を対象とした研究は主に NMR によって進められてきた^{18,34,40}。アミド結合をそれぞれ^[13]C, ¹⁵N]で標識した受容体膜貫通領域をミセルや小型バイセルなどの脂質膜に再構成することで、溶液 NMR による各アミノ酸残基の帰属と構造変化が観測可能である。その結果、EGF 受容体の膜貫通領域がモデル膜に再構成されると、領域単体で二量体を形成することが明らかになった(図 1-6)。特に EGF 受容体の膜貫通領域は、GXXXG モチーフと呼ばれる特異的な二量体形成面を構成する配列を二か所含んでいることからも、生理条件下でも二種類の異なる二量体構造が共存している可能性が示唆された。このことは、膜外領域の構造活性研究によって示唆された活性二量体と不活性二量体が共存するモデルにも対応している。

human EGFR(642-671); K₆₄₂IPS₆₄₅IATGMVGALLLLVVA₆₆₁LGIGLFMRRR

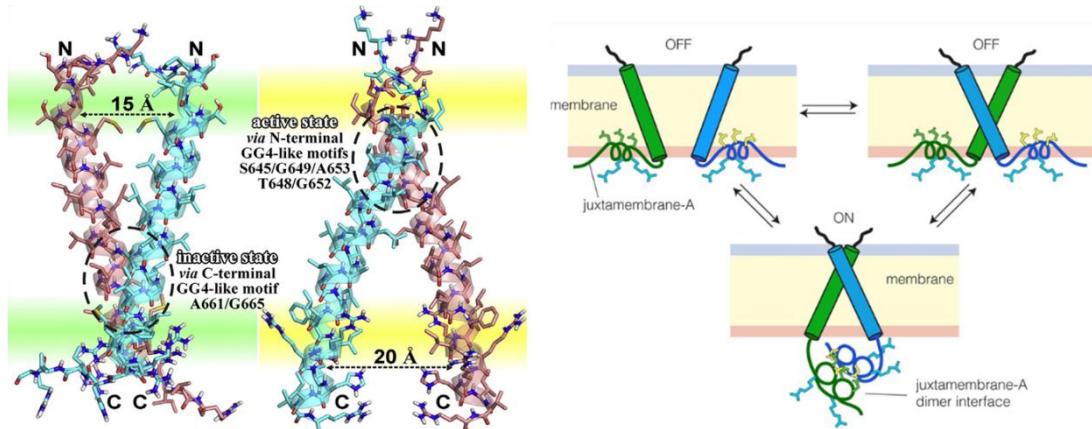


図 1-6. EGF 受容体膜貫通領域の形成する二種類の二量体構造。左がミセル中で得られた構造、右がバイセル中で得られた構造¹⁸。C 末端側の GXXXG モチーフを介して二量化する場合、細胞内領域が脂質膜に吸着した状態を保つため不活性化する。一方 N 末端側の GXXXG モチーフを介して二量化する場合には細胞内領域が脂質膜表面から遊離し、リン酸化領域の活性構造への変換が促進されると示唆されている³⁴。

Reprinted from *Cell* 2013, 152 (3), 543–556. Copyright (2013) with permission from Elsevier.

さらに、Kuriyan らは膜内近傍領域の NMR 解析から、膜貫通領域間の相互作用が膜内近傍領域の膜結合状態を切り替え、リン酸化に対する活性状態を制御していると報告した³⁴。Sato らは EGFR ファミリーに属する HER2 膜貫通領域を用いた研究で、膜貫通領域の構造変化に伴い、細胞内近傍領域の塩基性アミノ酸配列が細胞内膜脂質であるホスファチジルイノシトールリン酸(PIP2)から乖離することを明らかにした⁴¹。これらの結果からも、膜貫通領域の会合体状態の変化が直接、膜内領域の活性化－不活性化を制御しており、周囲の細胞膜環境が受容体の機能に影響を与えることが伺える。

1-2-2 ガングリオシド GM3 の構造と機能

ガングリオシドはシアル酸を有するスフィンゴ糖脂質の総称であり、その構造は脂溶性のセラミド鎖と親水性の糖鎖からなる。主に細胞膜外葉に存在し、組織によってその糖鎖構造の分布が異なっている。GM3はガングリオシドの中で最も単純な構造を有しており、生合成経路における初期の産物である（図1-7）。ガングリオシドの細胞膜上での役割は徐々に明らかになっており⁴²、GM3はII型糖尿病の発症機構においてインスリン抵抗作用を高める機能を持つ⁴³。また、GM3はEGF受容体と作用してそのリン酸化を阻害し、細胞増殖機能を抑制する。一方、血清中に存在する長鎖GM3は外因性のリガンドとしてトル様受容体4(TLR4)のシグナルの制御に関わっていることも示唆された⁴⁴。

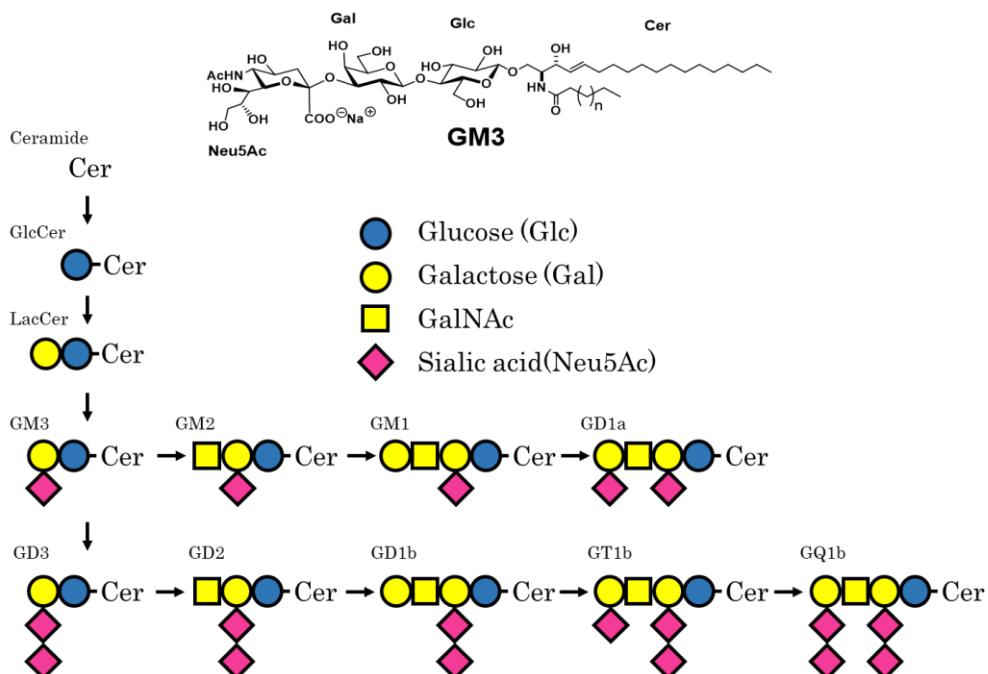


図1-7 GM3の構造と生合成経路

ガングリオシドはスフィンゴミエリンと同様にセラミド鎖を基本骨格としており、スフィンゴ糖脂質の一種として分類される。したがって、スフィンゴミエリン(SPh)、コレステロール(Cho)とともに細胞膜上のマイクロドメインである脂質ラフトに集積すると考えられる。このことは Freeze-Fracture 法と電子顕微鏡観察を用いた結果からも示唆されている⁴⁵。一方で、GM3 は過剰に発現した場合に流動性の高いドメインへと分配することが報告された。この効果によってインスリン受容体のドメイン局在を解消し、細胞のインスリン抵抗性を発現していることが示唆されている⁴⁶。インスリン受容体は EGF 受容体と同じくチロシンキナーゼ型受容体に属する一回膜貫通型の膜タンパク質であり、GM3 との相互作用には受容体の塩基性アミノ酸の存在が鍵となっていることも併せて報告されている。そのため、インスリン受容体と GM3 の関連研究は一回膜貫通型タンパク質と脂質の相互作用のモデルが存在する可能性を示す一つの例として注目されている。

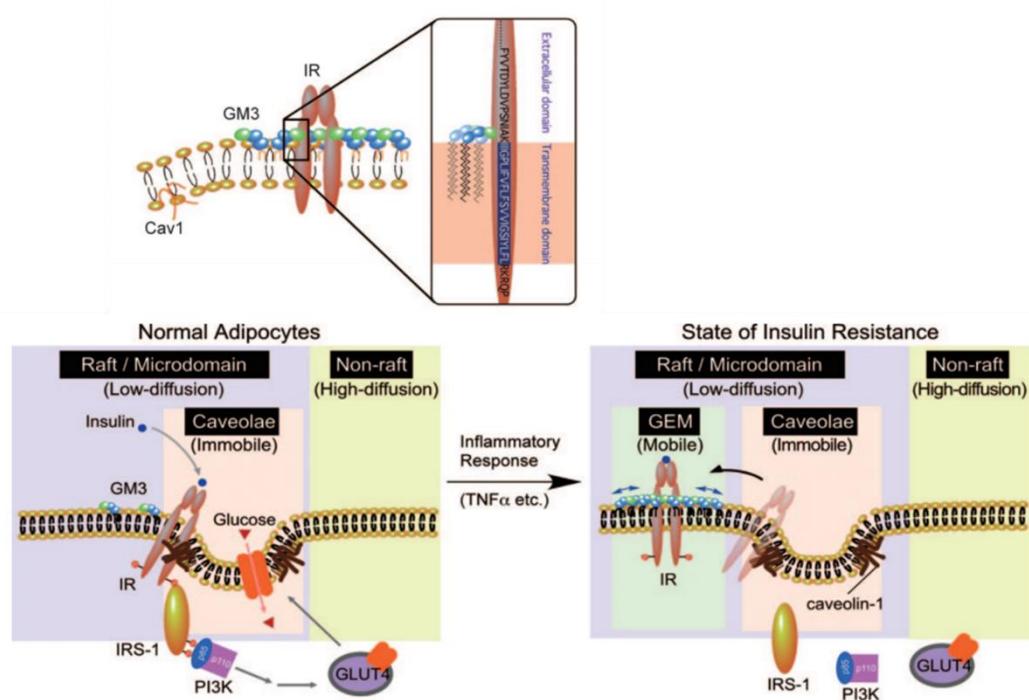


図 1-8. インスリン受容体と GM3 の間に予測される相互作用メカニズム⁴⁶。高濃度の GM3 はカベオラから分離され、糖脂質豊富ドメイン (GEM; Glycolipid enriched membrane) を形成しインスリン受容体の機能を抑制する。Reprinted with permission from *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104 (34), 13678–13683. Copyright (2007) National Academy of Sciences, U.S.A.

1-2-3 EGF 受容体の機能に対する周辺脂質の影響

EGF 受容体の機能を細胞膜脂質が制御していることは、当初細胞を用いた実験において確認され、脂質モデル膜を用いた実験でも再現された¹⁷。ガングリオンド GM3 は EGF 受容体のリガンド結合には寄与せず、受容体のリン酸化を直接的に抑制することが知られている。しかしながら、詳細な作用機構は不明なままである²⁸。2011 年の Coskun らの報告では、EGF 受容体と GM3 の相互作用を脂質モデル膜中で再現し、インスリン受容体の例と同じく塩基性アミノ酸を介した静電相互作用が重要であることが明らかとなった³⁰。彼らは全長の EGF 受容体を昆虫細胞を用いて培養・精製し、スフィンゴミエリン、コレステロール、POPC、および GM3 を用いて調製したリポソームに再構成することを試みた。Lo/Ld 相分離を生じる多成分脂質系 (SM/DOPC/Cho=37.5:37.5:25)においてのみ、GM3 は EGF 刺激に応答して起こる受容体のリン酸化を阻害した。この効果は受容体の膜外直上に存在するリジン 642 残基を変異した場合には観測されなかった。さらに、GM3 糖鎖のシアル酸を除去したラクトシルセラミド(LacCer)や GM3 に二つの糖鎖が付加した GM1 は阻害効果を示さず、GM3 とリジン 642 残基との静電相互作用を介した特異的な結合が示唆された。一方で、POPC とコレステロールで構成され比較的流動性の高い相状態では、相分離条件で観測された GM3 の阻害効果が発揮されず、相分離膜中の EGF 受容体には GM3 非存在化でも一定のリン酸化阻害が働いていることが示された。したがって、GM3 は EGF 受容体の脂質膜中の局在を制御し膜タンパク質に対して適切な周辺脂質環境を提供することで、リン酸化阻害効果を発揮しているメカニズムが示唆された。

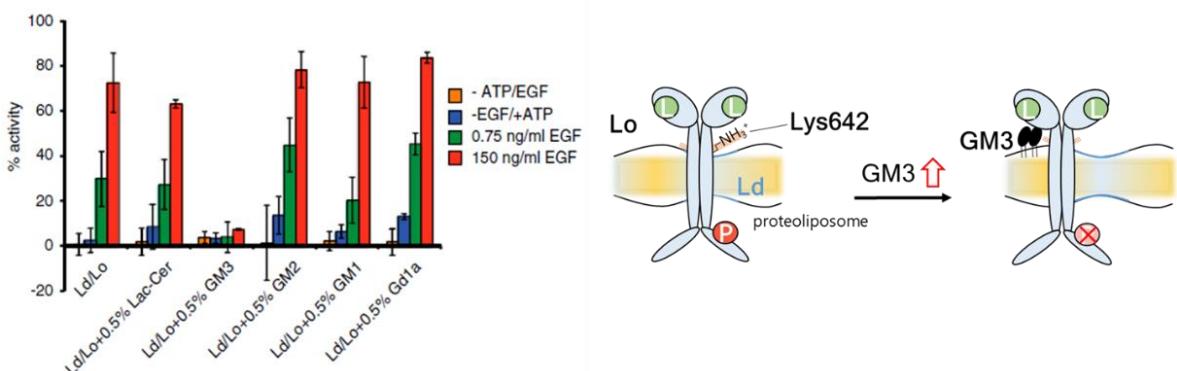


図 1-9 モデル二重膜を用いた EGF 受容体のリン酸化アッセイ。Lo/Ld 相分離条件における結果と、作用機構の模式図。 Reprinted with permission from *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, 108 (22), 9044–9048. Copyright (2011) National Academy of Sciences, U.S.A.

1-2-4 細胞中における EGF 受容体の局在変化

EGF 受容体の活性化は、細胞中のコレステロール濃度に大きく影響を受ける。このことは、細胞に対してシクロデキストリンを作用させ、生体膜中のコレステロールを除くことによって確かめる。また、受容体の膜中での局在については現在も明確な説明は達成されていない。脂質ラフト・カベオラと言った典型的なマイクロドメインに集積するといった報告のほかにも、糖脂質が特異的に集積した領域への局在も示唆されている⁴⁷⁻⁵⁰。

マイクロドメインに局在した受容体がどのような影響を受けるのかという疑問が依然残されている。GpA が二重膜を構成する脂質の炭素鎖長に応じて二量体形成を制御していることは、脂質膜環境が受容体の機能に影響を与えるメカニズムの一つの例である。また、EGF 受容体と同じくチロシンキナーゼ型膜タンパクの一つである纖維芽増殖因子受容体 (PDGFR) は、モデル膜中、その流動性に対応して膜に対する配向角を変化させることが報告された⁵¹。疎水性の大きな膜貫通領域は水中で非常に不安定であるため、その構造安定化のために脂質膜環境の影響を大きく受けた。疎水性部が水に露出することを防ぐため膜に対する傾きを変化させ、濃度が大きい場合には膜貫通領域同士の会合が生じる^{19,52,53}。このように、配向角の変化と受容体の会合の関係性は、脂質膜が膜貫通タンパク質に与える影響を考察する上で重要なポイントとなる。我々は、膜タンパク質間に働く①脂質膜環境、②膜タンパク質の配向、③膜タンパク質の会合、という三つの要素の関係性は、同じく脂質-膜タンパク質間の相互作用を説明する際にも重要なアイデアのひとつになるとを考えている。

本節で示した通り、受容体の活性化には最適な脂質膜環境が必要不可欠であり、これは膜貫通領域の会合状態が大きく寄与する。特に、EGF 受容体の活性化に対して生体膜構成脂質である GM3 が関与を行っていることは古くから報告されているにもかかわらず、その分子レベルでの相互作用メカニズムには未解明の点が多く残されている。EGF 受容体に関連するもの以外を含めても、膜貫通タンパク質をモデル二重膜に組み込んで行った物理化学研究において、脂質分子の位置づけは均一な疎水性二重膜環境を提供するものという扱いがほとんどであり、脂質膜中に微量含まれる脂質分子の相互作用に着目してアプローチした例は限られている。一方で、脂質膜中における膜タンパク質間の相互作用を対象とした研究は比較的進展している領域であると言える。以降の項では、モデル脂質二重膜中において分子間相互作用

を検出した例について、微量脂質に着目したもののはか、より知見の豊富な膜タンパク質間相互作用に関するものも含めて紹介する。そして、本研究において膜タンパク質－脂質間に働く相互作用のメカニズムを解明するために最適な手法を探る。

1-3 膜タンパク質－脂質間相互作用を対象とした研究

真核生物の生体膜脂質は、異なる構造の親水性頭部基と鎖長と不飽和度の異なるアシル鎖を持つ多様な二本鎖脂質およびコレステロールから主に成り立っている⁵⁴。脂質の一つの役割として膜貫通タンパク質の疎水性領域の長さの違いに対応し、同様の疎水性部の厚さを持つ脂質とともに膜タンパク質を局在化させることが挙げられる。膜貫通タンパク質の疎水性領域の長さ情報は、Orientations of Proteins in Membranes (OPM) database から得ることができる。真核生物の細胞膜に見られる膜貫通タンパク質の疎水性領域の長さは 29~36 Å の範囲で異なっており、このことは脂質膜の厚さの違いが膜タンパク質の働きを調整していることを強く示している⁵⁵⁻⁵⁷。また、極性の大きな脂質頭部基の電荷分布は膜タンパク質と脂質が親水性領域で生じる相互作用を調節する。脂質鎖のパッキングの強さに依存して生じる側方圧が膜タンパク質の構造の安定化に影響することも報告されている^{55,58,59}。

以上に示したように、膜タンパク質と脂質の結合には、主に疎水性脂質鎖の作用と、脂質頭部基の静電相互作用が協奏的に働いており、それぞれが膜タンパク質の構造変化に寄与している^{19,60}。二つの作用を区別して観測するためには、脂質分子種を機能ごとに分類し最適な測定手法を選択することによって、解析を行う必要がある。

1-3-1 膜タンパク質への作用の違いに基づく脂質の分類

Stangl, Lee らは総説の中で、脂質膜における膜タンパク質界面と特定の脂質との結合親和性（もしくは結合状態の寿命）に基づいて、脂質と膜タンパク質の相互作用を 3 種類に区別している（図 1-10）⁶¹。二重膜内で高速に拡散し、タンパク質と脂質の界面での接触時間が短い脂質はバルク脂質(bulk lipid)と呼ばれ、一般的に膜タンパク質の構造や機能に直接的には影響しない。しかし、バルク脂質相は二重膜全体の性質を決定しており、膜の流動性やパッキング、疎水性部の厚さ、膜の表面電荷などを変化させている。

膜タンパク質の相互作用が強く働く脂質は結合脂質(non-annular lipid)と呼ばれ、膜タンパク質の疎水性の結合ポケットを介して特異的かつ強固に結合している⁶²。結合脂質が膜タンパク質の機能にどのように影響するかについては、Lee らの総説において詳しく説明されている⁶³。結合脂質は、界面活性剤を用いた膜タンパク質の精製および結晶化プロセスによって、膜タンパク質と結合した状態の原子密度が観測される

場合がある^{64,65}。これらの脂質は膜タンパク質の構造安定性にきわめて重要な役割を果たす⁶⁶。特に分子量の大きなタンパク質複合体では、結合脂質が膜タンパク質中の隣接するモノマー単位またはサブユニット間の隙間を埋めるように結合し、タンパク質複合体の形成を媒介する。酵母チトクローム *c b I* ユニットに対してリン脂質が複数のアミノ酸との相互作用を介して結合する結晶構造が X 線解析によって得られた⁶⁷。

一方、膜タンパク質が特定の結合領域をもたない場合でも、極性の脂質頭部基が膜タンパク質と相互作用する場合や、脂質の炭化水素鎖長と膜タンパク質の疎水性領域の長さが類似する場合に脂質と膜タンパク質による集合体が形成される場合がある。この状態の脂質はバルク脂質と比較して膜タンパク質に対する接触時間が大幅に増加し、膜タンパク質周囲に周辺脂質(annular lipid)の層を形成する。このように中程度の相互作用を有し、数分子単位で交換しながら作用を行う周辺脂質は相互作用解析を困難にする一方で、その特性が膜タンパク質の構造と機能に影響する可能性が強く示唆されている^{62,63}。β-ストランド型膜タンパク質 OmpX 周辺の DMPC などがその代表例である⁶⁸⁻⁷⁰。

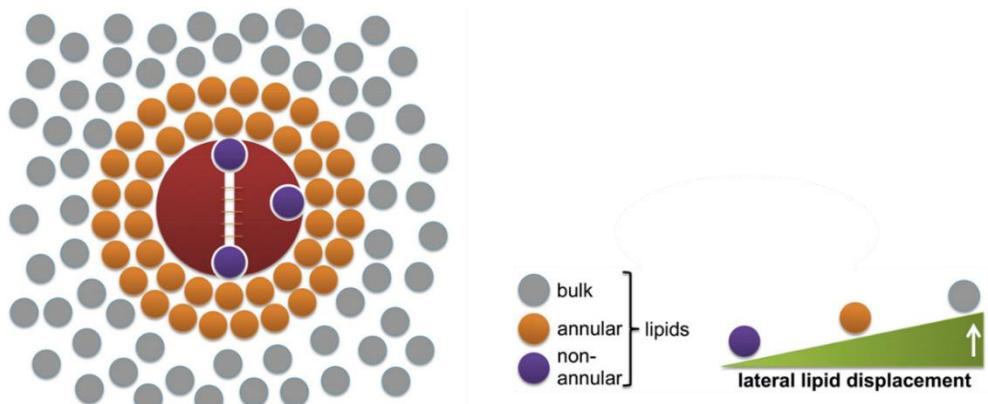


図 1-10. 膜タンパク質と脂質の相互作用を上面からみた模式図⁶⁰。強く結合した結合脂質(non-annular lipid)によって安定化された膜タンパク質二量体が安定化されている。結合脂質はタンパク質表面のポケットに結合して安定な結合を形成する。周辺脂質(annular lipid)はバルク脂質(bulk lipid)に比べて大幅に安定化されており、結合脂質と比べて短い時間で交換している脂質を指す。バルク脂質は膜貫通タンパク質との相互作用の最も低い脂質群である。Reprinted from *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2015**, 1848 (9), 1886–1896. Copyright (2015) with permission from Elsevier.

1-3-2 X線結晶構造解析

酵母チトクローム *cb_I* ユニットから得られた結晶構造には複数のリン脂質由来の電子密度が観測された。頭部のリン酸基は極性アミノ酸と水素結合を介して結合し、アシル鎖は疎水性のアミノ酸が形成する領域にはまり込む。また、頭部に負電荷を有するホスファチジルイノシトール (PI) は塩基性アミノ酸リジンと隣接したイオノペアを形成している。複数のヘリックス構造にわたって結合のネットワークが形成されていることから、結合脂質は複雑な構造の膜タンパク質を安定化する機能を担うことが示唆されている⁶⁷。

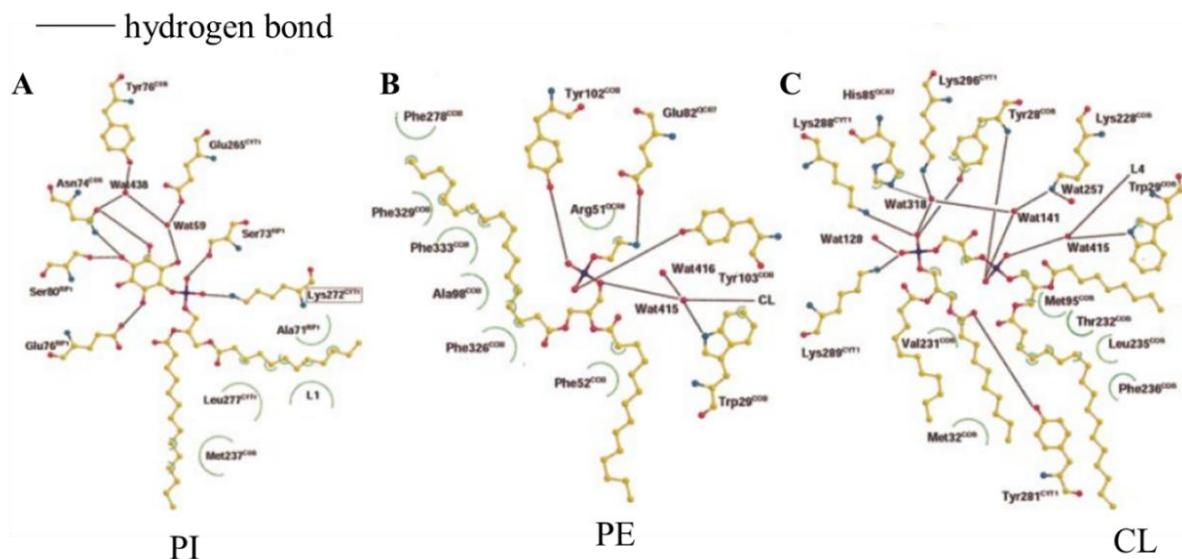


図 1-11. 酵母チトクローム *cb_I* ユニットの結晶構造から得られた脂質の結合モード⁶⁷. 複数のアミノ酸残基を介して PC, PI, PE, CL の頭部基が水素結合を形成している様子が確認された. Reprinted with permission from *EMBO J.* 2001, 20 (23), 6591–6600. Copyright (2011) John Wiley and Sons.

また、タンパク質配列中に含まれるトリプトファンのような側鎖の大きい芳香族アミノ酸残基が特異的に脂質頭部基付近の親水性／疎水性界面を好んで分配することで、膜タンパク質自身の膜貫通領域を定義するという考え方も X 線結晶構造によって提起された重要な概念である。他にも、リシンやアルギニンなどの極性アミノ酸も膜タンパク質の疎水性領域と親水性領域の境界の目安となる。このようなアミノ酸残基特異的な局在は、X 線結晶構造から得られる電子密度情報によって詳細に解析することが可能である。

1-3-3 核磁気共鳴法 (NMR)

これまでに得られている脂質-タンパク質相互作用のデータは、X線結晶構造解析によるものが多くを占めている。X線解析は脂質の結合構造を一義的に決定できるという利点を有している。しかしながらこの手法が適用できるのは膜タンパク質との安定な結合を形成する脂質に限られ、定量的評価に用いることは難しい。X線解析に用いるサンプルにおいては、安定な結合を形成する脂質でなければ界面活性剤を用いた結晶化プロセスにおいてタンパク質表面から取り除かれてしまうという問題点があるからである。弱い相互作用を介して膜タンパク質周囲に存在し交換しながら作用を行う脂質（周辺脂質）の相互作用を観測する場合には、NMRが用いることができる。水和状態の二重膜サンプルを測定に用いることが可能であり、脂質を生体に近い環境下で観測できる利点がある^{57,71,72}。NMRが与えるスペクトル情報は同位体原子の運動性や周辺環境の平均情報を与える。

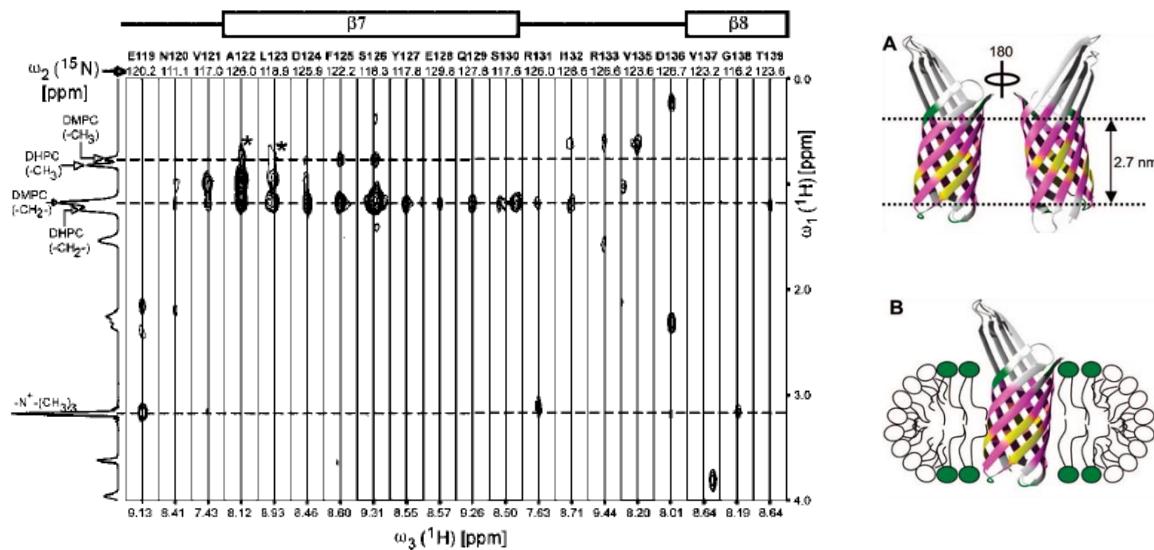


図 1-12. Outer membrane protein (OmpA) の DMPC/DHPC バイセル中における NOESY スペクトル⁶⁸。¹⁵N 標識した膜タンパク質を用い、アミド内の ¹⁵N と ¹H の HMQC によってタンパク質のプロトンを帰属し、アミド内 ¹H と脂質アシル鎖の ¹H 間での NOE 相関を観測した。OmpA と DMPC 炭素鎖間の強い相関が示されたことから、図中 **B** のようなモデルで脂質膜に組み込まれていることが示唆された。Reprinted with permission from *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (42), 13822–13823. Copyright (2008) American Chemical Society.

β -ストランド構造からなる大腸菌由来膜タンパク質 OmpX は、バイセルの平面(図 1-12B)を構成する DMPC と安定な作用成分を有していることが、溶液 NMR によって明らかにされた⁶⁸⁻⁷⁰。¹⁵N 核で標識したアミノ酸の ¹H 化学シフトを分解し ¹H,¹H - NOESY 測定を行うことで、脂質炭化水素鎖の ¹H とタンパク質中のアミド ¹H の分子間 NOE 相関から分子間距離情報が推定された⁶⁸.

当研究室においても、²H 標識したホスファチジルグリセロリン酸メチルエステル (PGP-Me) を用いてタンパク質との結合を観測している⁷³. PGP-Me は古細菌の紫膜の主要な構成要素であり、バクテリオロドプシン (bR) の適切なプロトンポンプ活性に不可欠な物質である。²H NMR スペクトルの分裂幅の増加から、bR との相互作用により ²H 標識アナログのアルキル鎖のオーダーが上昇していることが明らかとなった。bR との脂質-タンパク質相互作用にはビスリン酸部位の機能が関与していることも示唆された。

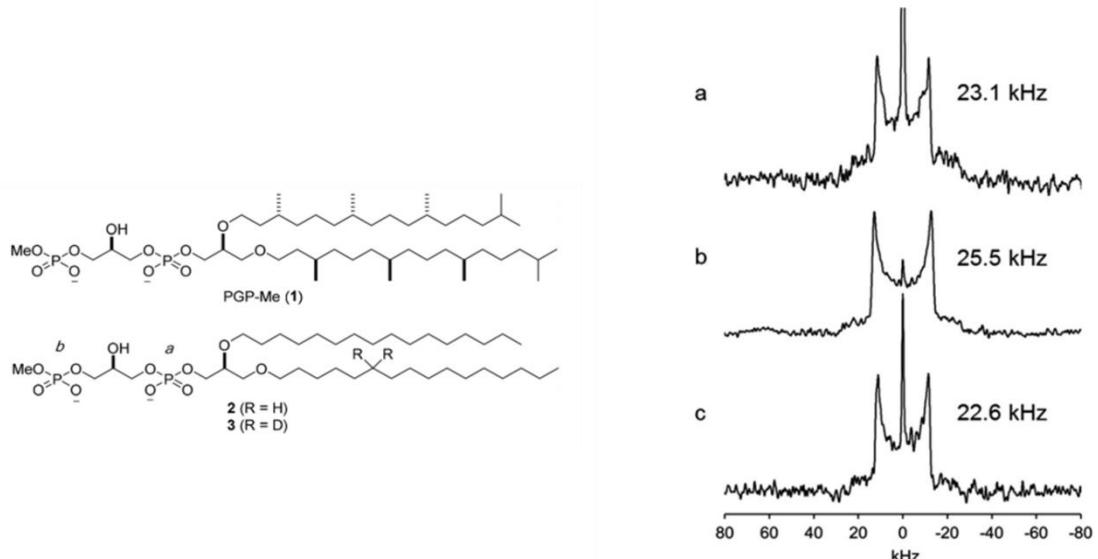


図 1-13. PGP-Me と bR の相互作用. 重水素標識化 PGP-Me を PGP-Me 単一成分で構成したリポソームの NMR スペクトル(a). 重水素標識化 PGP-Me を脱脂質化した bR とともに脂質膜に組み込んだ場合、アシル鎖のオーダーが増加した(b). bR が局在する紫膜(PM)脂質に PGP-Me を組み込んだ場合の NMR スペクトル(c)⁷³. Reprinted with permission from *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (41), 10279–10284. Copyright (2015) Royal Society of Chemistry.

1-3-4 電子スピン共鳴法 (ESR)

膜タンパク質周辺の生理的環境を再現した状態での測定手法として、電子スピン共鳴 (ESR) も広く用いられている^{74,75}.

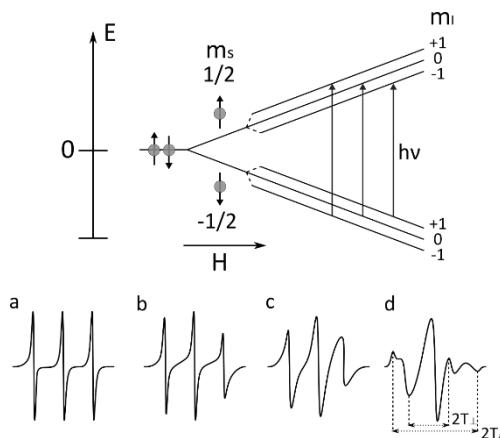


図 1-14. 分子の運動は回転相関時間 τ_c によって特徴付けられる。ニトロキシドのランダムな配向分布を仮定すると、高速で運動している場合には平均化され、a のような 3 本の細い線からなるスペクトルが得られる。一方運動が制限されると外部磁場に対する配向異方性が残余し、各テンソルに由来するスペクトルが重なり合う粉末スペクトルとして、線幅や線形の歪みを示す。

ESR スペクトルでは、シグナル形状が分子のゆらぎに依存するため、脂質膜サンプルにおける周辺脂質とバルク脂質の区別に用いることができる。NMR の時間スケールでは観察することができなかった短い時間単位で交換しながら作用する脂質を、磁気回転比の大きな電子スピンを利用する ESR ではより短いタイムスケールで観測することが可能である⁷⁵。

一方で安定な有機化合物の多くは閉殻構造をとっており不対電子を持たないので、ESR は NMR に比べると適用範囲が狭い。生体分子の挙動を分析するプローブとしてはラジカル原子団を用いた標識体が用いられることが一般的である。スピンドローピングはその回転運動が EPR スペクトルの線幅と形状に反映される。Marsh らは膜タンパク質周辺をとりかこむ脂質層における各スピン標識脂質の存在確率を算出し、脂質の親和性を評価している^{74,76}。また、膜タンパク質と脂質の相互作用が弱い WALP ペプチドなどのモデルペプチドを用いた研究も進められている^{77,78}。しかしながら、ラジカル原子団となる嵩高い Doxyol 基で標識された脂質炭化水素鎖は流動的な性質を示す

ことが知られている。特に飽和脂質を標識する場合には本来の挙動と大きく異なるふるまいを示すことになるので、実験デザインの考慮が必要である。

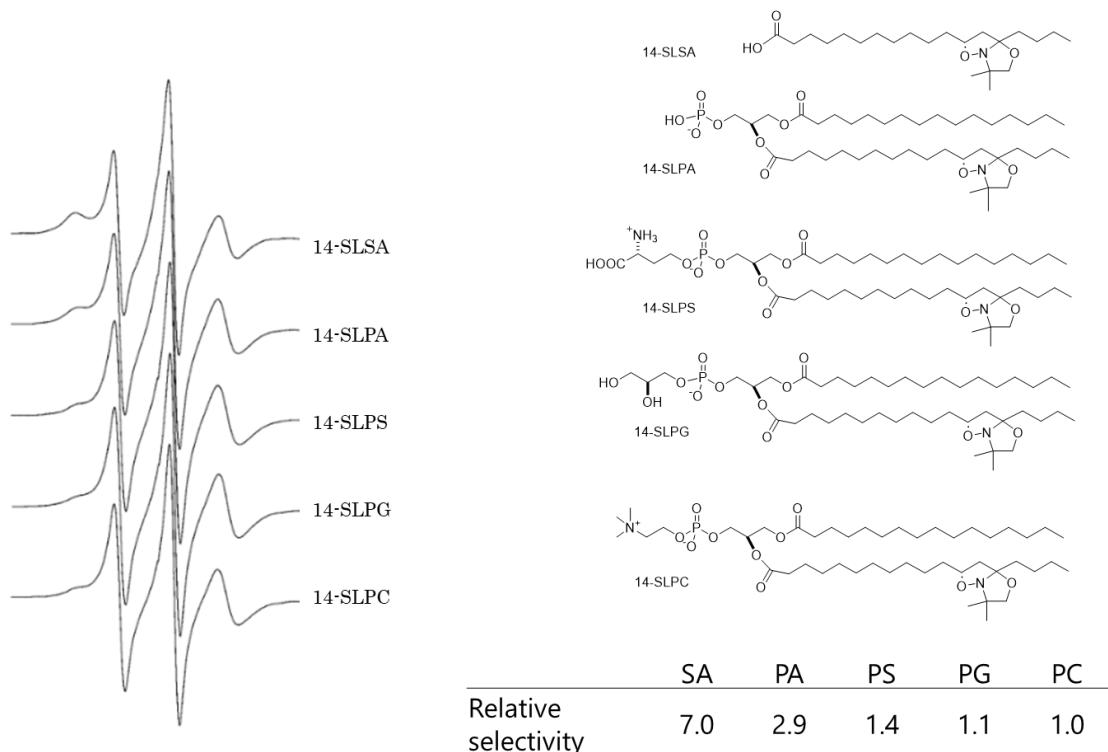


図 1-15. Myelin proteolipid protein (PLP)とスピノン標識脂質の選択性⁷⁴. ESR のスペクトル形状から、PC と比較してステアリン酸由来炭化水素鎖が最も高い割合で PLP に接触し、運動性を制限されることを明らかにした. Reprinted from *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1998**, 1376 (3), 267–296. Copyright (2008) with permission from Elsevier.

1-3-5 蛍光分光法

可視光領域の現象を利用する蛍光分光法による分析も広く用いられている。多くの蛍光性の分子はおよそ数ナノ秒から数十ナノ秒という励起準位の寿命を有し、周囲の環境に応答して性質を変化させるため、膜中の分子の挙動をより鋭敏に検出することができる。

蛍光の自己消光は蛍光分子間での電子の授受を伴う失活過程であり、接近した分子間の情報を与える⁷⁹。これらの手法は、膜タンパク質と直接接觸している周辺分子を検出することができるが、膜タンパク質の界面から離れた脂質を観測することは困難である。

一方, 蛍光共鳴エネルギー移動 (Förster Resonance Energy Transfer; FRET) は, NMR, ESR およびその他の蛍光現象と比較して, 長距離間の相互作用を分析できる手法である. FRET の距離依存性は明確に理論化されており, 生体分子内において分子間距離情報を得るための測定に最適である. 使用する蛍光分子によって 10~100 Å の距離まで測定可能であり, 分光法の中でも高感度で近接を観測できる手法である. 10~100Å という距離は生体内で働く分子間相互作用のスケールに対応しており, 膜タンパク質-脂質相互作用の研究のための優れたツールである. したがって FRET を使用することで, 結合と乖離の状態変化を繰り返し行っている膜タンパク質周辺脂質との親和性を評価することが可能である. 大腸菌に含まれるバクテリオファージ M13 コートタンパク質の脂質選択性がいくつかの脂質種を含む二重膜中で定量化されている^{80,81}. また, コレステロールの蛍光誘導体が膜貫通ペプチドとの特異的な相互作用についての数多くの研究で使用されている^{82,83}.

この節では膜タンパク質に対する作用モデルの違いによって脂質を 3 つに分類し, それぞれを観測することに適した手法をいくつか示した. 結合脂質および周辺脂質は相互作用のタイムスケールに応じた適切な手法を用いることで区別が可能であるが, 膜タンパク質の膜貫通部位の会合面で膜脂質がどのように認識され, 活性構造の形成を制御しているかについては, 明確な一般理論は得られていない.

また, 生体膜中に微量含まれる脂質に着目する際には, その脂質が単独で大きなドメインを作ることは考えにくい. これまで脂質二重膜の巨視的な性質を分析する研究が盛んに行われてきたが, その結果だけでは微量含まれる脂質の作用の詳細を明らかにすることはできない. 一方, 他の脂質と共同で大きなドメインを形成する場合においても, 膜タンパク質との結合に関与する成分は膜タンパク質外周に存在するごく一部であり, 高感度で観測するための測定手法と解析の工夫が必要となる.

1-4 FRET(Förster resonance energy transfer)を用いた生体分子の相互作用測定

本研究では、分光手法の中でも長距離の分子間距離情報を観測できるFRETに着目した。高頻度で脂質交換を生じている膜脂質と膜タンパク質の相互作用や親和性の違いを観測するためには、FRETによる測定が最適である。蛍光分子は周囲の環境に応じて数ナノ秒間に励起状態の寿命を変化させるため、短い時間の相互作用を観測することができる。エネルギー移動の距離依存性はすでに理論的に定式化されているため、脂質膜中における分子の定量的な挙動評価にも利用できる。また、時間分解測定によって得られる蛍光寿命の経時変化は蛍光分子周囲の環境に関する情報を含んでおり、観測する蛍光分子のサンプル条件に応じて様々な解析方法へと展開が可能である。

1-4-1 FRETの原理

FRETは、励起状態のドナー分子(D)と基底状態のアクセプター分子(A)の間でエネルギーの移動が起こる現象である。ドナー分子は通常、光子を放出して励起状態から基底状態へと戻るが、この時の光子の持つエネルギーがアクセプター分子の吸収スペクトルと重なる場合、励起状態のドナー分子は光子を放つことなくアクセプターに対してFRETを生じる。これはドナー分子とアクセプター分子の間の長距離双極子-双極子相互作用に依存して起こるため、エネルギー移動の速度はドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルの重なりの大きさ J 、ドナーの量子収率 Q_D 、ドナーとアクセプターの遷移双極子の相対的な配向因子 κ 、およびドナー分子とアクセプター分子の間の距離 R に依存する。

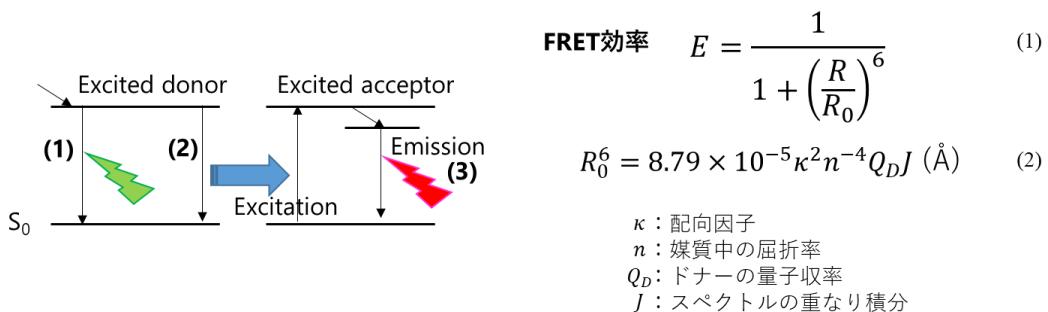


図 1-16. Jablonski diagram (左)。ドナーの失活過程は輻射失活(1)とFRET(2)に区別される。アクセプター分子との距離が接近した場合にはFRET過程(2)が有利に進行する。測定結果は式1,2を用いて計算することで分子間距離情報を定量的に解釈することが可能である。

1-4-2 定常蛍光スペクトル測定

蛍光を観測する方法は主に二つが用いられており、一つは任意時間内に観測される蛍光強度の平均値をプロットする定常 (Steady-State) 蛍光スペクトルである。これは、サンプル内においてさまざま存在する蛍光分子の励起状態と失活過程、それに伴って放出される蛍光のエネルギーを時間積分した値になっている。放出される蛍光の波長が同じである場合、そこに含まれる様々な過程を区別することは難しい。例えば、脂質膜を含んだ不均一なサンプルを用いる場合には、水中に溶解した蛍光分子と膜中に存在する蛍光分子では周囲の環境が異なっており、励起状態の寿命に大きく影響が及ぶ可能性がある。定常蛍光の観測ではこのような二状態を分離して測定することは困難である。一方で、観測される蛍光強度は、サンプル中に存在する輻射失活可能な分子の濃度を鋭敏に反映するために、単純な系において状態を定量する分析には長けていている。

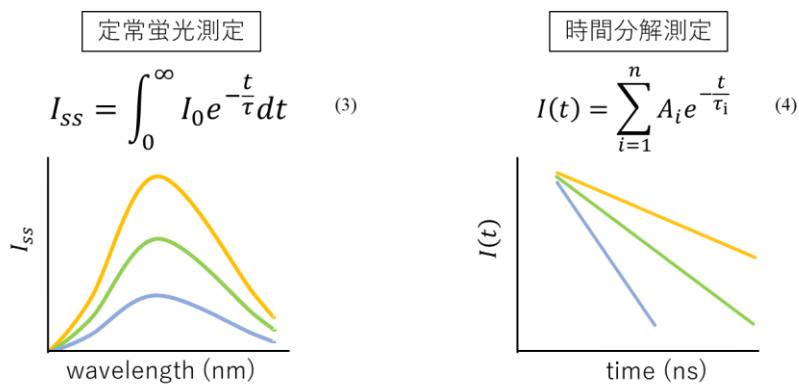


図 1-17. 定常測定と時間分解測定によって得られる結果⁸⁴

1-4-3 時間分解蛍光測定

定常蛍光スペクトルとは異なり、時間依存的な蛍光現象を観測する方法が時間分解 (Time-Resolved) 測定である。励起にはパルスレーザーが用いられ、短い時間単位で蛍光基が繰り返し励起される。励起パルスと観測される蛍光の時間差が装置内で計測され、その結果はヒストグラムとして得られる。通常、光子検出のヒストグラムは指数的に減少する形状となる。図 1-17 中の式 4 に示されるように、蛍光寿命は振幅と減衰時間で構成されるランダムなプロセスである。得られたヒストグラムをこの式でフィッティングすることで、複数の成分からなる蛍光の減衰プロセスを

分離し、解析することができる。ここで A_i は $t=0$ での初期蛍光強度にあたる係数であり、サンプル中の蛍光分子の濃度に対応する。

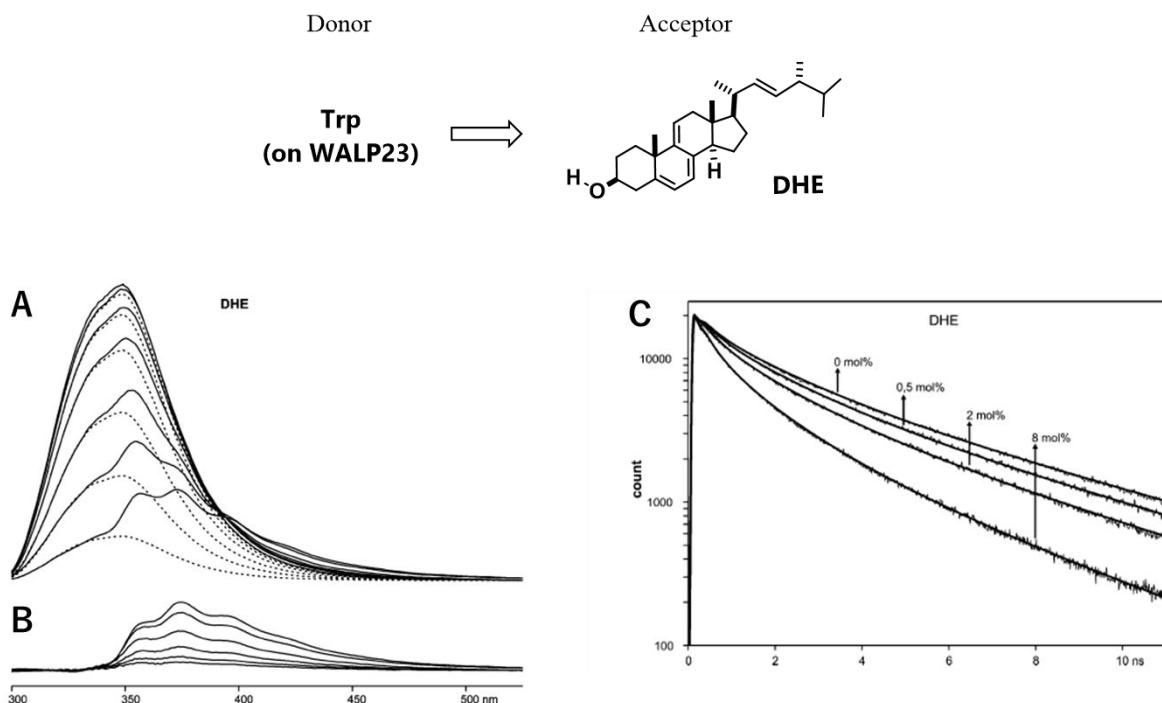


図 1-18. WALP ペプチド上のトリプトファン残基とデヒドロエルゴステロール(DHE)の FRET の観測⁸³. **A:** 膜中の DHE 濃度が増加すると FRET によってトリプトファン由来のピーク強度が低下し、DHE 由来のピーク強度が上昇した. **B:** A のスペクトルからトリプトファン由来のスペクトルを除いたもの. **C:** 時間分解測定によってトリプトファン蛍光の寿命を観測したヒストグラム. DHE の濃度を 8mol%まで上昇させると減数が急激となり、蛍光寿命が低下したことを示す.
Reprinted with permission from *Biochemistry* **2008**, *47* (8), 2638–2649. Copyright (2008) American Chemical Society.

図 1-18 に膜貫通ペプチドとステロールの FRET 実験の例を挙げた。Holt らは蛍光性のアミノ酸トリプトファンを含む 23 残基のモデル膜貫通ペプチドとして WALP23、コレステロールの蛍光性アナログとしてデヒドロエルゴステロール (DHE) を用いて、脂質二重膜中に組み込み FRET を観測した⁸³. 定常蛍光測定では、DHE 濃度の上昇に従って FRET ドナーとなるトリプトファンの蛍光強度が減少し、アクセプターとなる DHE の蛍光強度が上昇した。またトリプトファンの蛍光波長における時間分解光子計測を行った場合には、DHE 濃度の上昇に従って急激な減衰が観測された。これはト

リプトファンの輻射失活の過程に競合して FRET が進行ことで励起状態の寿命が短くなつたことを示している。

1-4-4 脂質膜における FRET

FRET の定量的な解析には FRET 効率の値(式 5)が用いられる。これはアクセプターが存在しない条件での蛍光強度と、アクセプター存在時の蛍光強度の比計算を表している。時間分解測定では、蛍光強度の代わりに蛍光寿命の値を用いる。

□ 実験値

$$E = 1 - \frac{\text{intensity with acceptor}}{\text{intensity without acceptor}} \quad (5)$$

$$= 1 - \frac{\text{lifetime with acceptor}}{\text{lifetime without acceptor}}$$

FRET は、分子内の構造変化や溶液中での結合－乖離平衡を定量化する研究などで広く使用されているが、脂質膜中の測定に適用する場合には注意が必要である。脂質二重膜は水和サンプル内でも蛍光分子が二次元（三次元）に自己組織化している環境であり、膜中をランダムに運動する分子であってもその移動はリポソームの表面積の範囲に制限される。そのため、分子間に特異的な相互作用がない場合でも、均一な三次元溶液空間に比べてアクセプターとドナーの接近が生じる確率を無視できず、比較的低濃度で非特異的な FRET が生じる。この非特異的な近接による FRET 現象は、蛍光分子のフェルスター距離 R_0 、膜中アクセプターの面密度（脂質組成と各脂質分子当たりの占有面積から求める）によって理論的に計算することができる（式 6）^{85,86}。脂質膜中の FRET においては、しばしばこの理論曲線を基準として用いる。理論曲線よりも大きな FRET 効率が観測される場合には、特異的な相互作用が存在することの根拠となる。このとき、 R_0 の計算式に含まれる配向因子 κ は蛍光分子の双極子モーメントの角度に依存する値であり、0 から 2 まで変化する。通常、この値は $\kappa^2 = 2/3$ が用いられる。これは蛍光分子が等方的に配向している場合の値であり、蛍光分子の親水的環境における拡散を想定している。

□ ランダム分散を仮定した理論値

$$E = 1 - \exp(-1.21\pi R_0^2 C) \quad (6)$$

E : FRET効率、0~1の範囲で変化

C : 単位面積当たりのアクセプター数

Prieto らは、大腸菌 *Escherichia coli* に含まれるバクテリオファージ M13 コートタンパク質の蛍光標識体を用いて、頭部基の異なる各脂質との親和性を比較した（図 1-19）^{80,87}。しかしながら、弱い相互作用を観測する場合には、アクセプターの膜中濃度の上昇によってランダム拡散中の分子による FRET の上昇と会合体形成に由来する FRET の寄与が重なり、観測できる差異は非常に小さなものであった。また、膜中のアクセプター濃度が高い場合に理論値と実験値の解離が大きくなる現象が観測されている^{72,80}。高濃度の蛍光分子は二重膜サンプル中に定量的に再構成されないなどの問題が指摘されている。

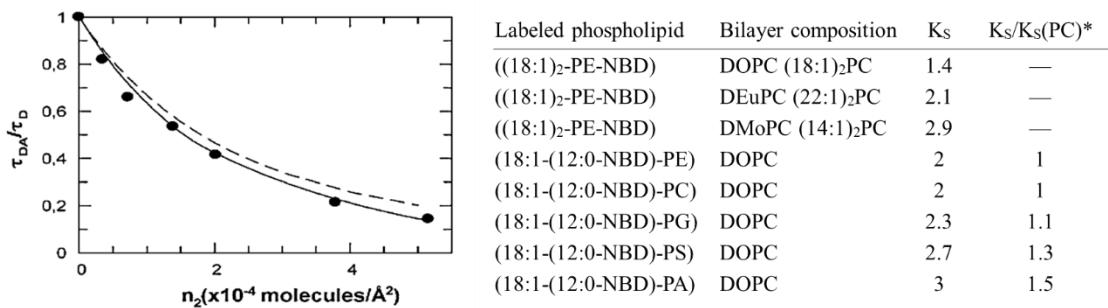


図 1-19. FRET によって求めた M13 コートタンパク質と蛍光標識脂質の親和性。DOPC 中において、ホスファチジン酸(PA)が最も大きい親和性を示した。PA 標識体の結果を左図に示した。点線はランダム分散するドナー／アクセプターペアを仮定した際の理論曲線。黒の丸印が実験値。脂質－タンパク質間の相互作用によって得られる実験値と理論曲線との差はわずかである。右表で各蛍光標識脂質、二重膜脂質における測定によって親和性パラメーターを比較した。Reprinted from Biophysical journal, 87, Fábio Fernandes,Luís M.S. Loura,Rob Koehorst,Ruud B. Spruijt,Marcus A. Hemminga,Alexander Fedorov,Manuel Prieto, Quantification of Protein-Lipid Selectivity using FRET: Application to the M13 Major Coat Protein, 344-352, Copyright (2004), with permission from Elsevier.

以上に例をはじめ、実際には脂質二重膜中における FRET はさまざまな実験上の誤差要因を含むため、理論値による R_0 の設定には慎重さが求められる。このことを踏まえ、相互作用を示さず膜中において均一状態にある FRET ペアを含む条件を別途用意し、実効のフェルスター距離 R_0' を求めて比較を行う場合も報告されている。このような問題点ゆえに、FRET 測定はあらゆる膜タンパク質－脂質間相互作用を容易に評価できる手法として利用されるには至っていない。しかしながら、測定対象に応じて条件を確立しランダムな FRET ペアの寄与を正確に設定することができれば、分子レベルの情報を得ることが可能である。

1-5 研究目的

生体膜を構成する脂質は膜タンパク質との相互作用形態によっていくつかに分類され、その多くが脂質構造に依存した作用を示す。特徴的な頭部構造を有する脂質は頭部基—アミノ酸残基間の相互作用によって膜タンパク質との親和性を示すが、結合状態の結晶構造が得られる例はわずかである。我々は、結晶構造解析では観測されない弱い相互作用を有する脂質に対して周辺脂質という分類を用い、その解析に適當な実験手法を検討した。このような脂質はバルク脂質に比べて強い親和性を示すものの、強固な結合を介して一分子単位で膜タンパク質の構造変化を誘起することは困難であると考えられる。一方でこのような脂質は、流動的な性質を示す生体膜の中で膜タンパク質の側方分配を制御し、活性化／不活性化機構における適切な脂質膜環境を提供する役割を担っていると考えることができる。すなわち、我々は周辺脂質が有する膜タンパク質との弱い相互作用を生命現象の基本単位として捉え、生体環境を単純な系に置き換えて検証すること得意とする生物物理的手法によって解明することを試みる。EGF受容体とガングリオシドGM3の分子レベルの相互作用に着目すると、GM3は相分離が生じたリポソーム中において、EGF受容体の活性化を阻害することが明らかになった。そこでまず、我々は流動的な性質を示す膜環境でGM3とEGF受容体が作用し、これがきっかけとなり受容体の局在が変化する作用メカニズムを仮定した。両者の脂質膜中における相互作用を正確に定量するために、新たな実験手法の確立が望まれる。

本研究では、これまで観測することが不可能であった弱い相互作用を検出する方法として、鋭敏に蛍光標識基の接近を検出できるFRETを用いることを見据え、(1)膜貫通ペプチドおよびGM3の均一二重膜中における挙動を解析することから始める。さまざまな脂質膜条件において測定を行い、EGF受容体とGM3の相互作用が観測される系を明らかすることで、相互作用に影響を与える周辺脂質環境についての考察を行う。また見出した最適な実験条件において(2)EGF受容体とGM3が示す親和性を定量的に評価することを試みる。このようにして得られた結果と相互作用に関する生理学的知見との比較を通して本研究で用いた手法の妥当性評価とGM3が示す作用機構の提案を試みる。

1-6 参考文献

- (1) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* (80-). **1972**, *175* (4023), 720–731. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-207250-5.50008-7>.
- (2) van Meer, G.; Stelzer, E. H.; Wijnaendts-van-Resandt, R. W.; Simons, K. Sorting of Sphingolipids in Epithelial (Madin-Darby Canine Kidney) Cells. *J. Cell Biol.* **1987**, *105* (4), 1623–1635. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.4.1623>.
- (3) Simons, K.; Ikonen, E. Functional Rafts in Cell Membranes. *Nature* **1997**, *387* (6633), 569–572. <https://doi.org/10.1038/42408>.
- (4) Ahmed, S. N.; Brown, D. A.; London, E. On the Origin of Sphingolipid/Cholesterol-Rich Detergent-Insoluble Cell Membranes: Physiological Concentrations of Cholesterol and Sphingolipid Induce Formation of a Detergent-Insoluble, Liquid-Ordered Lipid Phase in Model Membranes. *Biochemistry* **1997**, *36* (36), 10944–10953. <https://doi.org/10.1021/bi971167g>.
- (5) Brown, D. A.; London, E. Structure and Origin of Ordered Lipid Domains in Biological Membranes. *J. Membr. Biol.* **1998**, *164* (2), 103–114. <https://doi.org/10.1007/s002329900397>.
- (6) Friedrichson, T.; Kurzchalia, T. V. Microdomains of GPI-Anchored Proteins in Living Cells Revealed by Crosslinking. *Nature* **1998**, *394*, 802–805. <https://doi.org/10.1038/29570>.
- (7) Varma, R.; Mayor, S. GPI-Anchored Proteins Are Organized in Submicron Domains at the Cell Surface. *Nature* **1998**, *394* (6695), 798–801. <https://doi.org/10.1038/29563>.
- (8) Pralle, A.; Keller, P.; Florin, E. L.; Simons, K.; Hörber, J. K. H. Sphingolipid-Cholesterol Rafts Diffuse as Small Entities in the Plasma Membrane of Mammalian Cells. *J. Cell Biol.* **2000**, *148* (5), 997–1008. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.5.997>.
- (9) Sezgin, E.; Levental, I.; Mayor, S.; Eggeling, C. The Mystery of Membrane Organization: Composition, Regulation and Roles of Lipid Rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 361–374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>.
- (10) Corradi, V.; Sejdiu, B. I.; Mesa-Galloso, H.; Abdizadeh, H.; Noskov, S. Y.; Marrink, S. J.; Tieleman, D. P. Emerging Diversity in Lipid-Protein Interactions. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (9), 5775–5848. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00451>.
- (11) Deisenhofer, J.; Epp, O.; Miki, K.; Huber, R.; Michel, H. Structure of the Protein Subunits in the Photosynthetic Reaction Centre of Rhopseudomonas Viridis at 3 Resolution. *Nature* **1985**, *318* (6047), 618–624. <https://doi.org/10.1038/318618a0>.

- (12) Rosenbaum, D. M.; Cherezov, V.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G. F.; Foon, S. T.; Kobilka, T. S.; Choi, H. J.; Yao, X. J.; Weis, W. I.; Stevens, R. C.; et al. GPCR Engineering Yields High-Resolution Structural Insights into B2-Adrenergic Receptor Function. *Science* (80-.). **2007**, *318* (5854), 1266–1273. <https://doi.org/10.1126/science.1150609>.
- (13) Mineev, K. S.; Bocharov, E. V; Volynsky, P. E.; Goncharuk, M. V; Tkach, E. N.; Ermolyuk, Y. S.; Schulga, A. A.; Chupin, V. V; Maslennikov, I. V; Efremov, R. G.; et al. Dimeric Structure of the Transmembrane Domain of Glycophorin a in Lipidic and Detergent Environments. *Acta Naturae* **2011**, *3* (2), 90–908. <https://doi.org/10.2210/pdb2kpe/pdb>.
- (14) Cierpicki, T.; Liang, B.; Tamm, L. K.; Bushweller, J. H. Increasing the Accuracy of Solution NMR Structures of Membrane Proteins by Application of Residual Dipolar Couplings. High-Resolution Structure of Outer Membrane Protein A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (21), 6947–6951. <https://doi.org/10.1021/ja0608343>.
- (15) Nakanishi, A.; Kishikawa, J. I.; Tamakoshi, M.; Mitsuoka, K.; Yokoyama, K. Cryo Em Structure of Intact Rotary H⁺-ATPase/Synthase from Thermus Thermophilus. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (89). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02553-6>.
- (16) Hynes, N. E.; Lane, H. A. ERBB Receptors and Cancer: The Complexity of Targeted Inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5* (5), 341–354. <https://doi.org/10.1038/nrc1609>.
- (17) Anderson, S. M.; Mueller, B. K.; Lange, E. J.; Senes, A. Combination of Ca-H Hydrogen Bonds and van Der Waals Packing Modulates the Stability of GxxxG-Mediated Dimers in Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b07505>.
- (18) Bocharov, E. V.; Bragin, P. E.; Pavlov, K. V.; Bocharova, O. V.; Mineev, K. S.; Polyansky, A. A.; Volynsky, P. E.; Efremov, R. G.; Arseniev, A. S. The Conformation of the Epidermal Growth Factor Receptor Transmembrane Domain Dimer Dynamically Adapts to the Local Membrane Environment. *Biochemistry* **2017**, *56* (12), 1697–1705. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01085>.
- (19) Killian, J. A.; Nyholm, T. K. Peptides in Lipid Bilayers: The Power of Simple Models. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16* (4), 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.06.007>.
- (20) Anbazhagan, V.; Schneider, D. The Membrane Environment Modulates Self-Association of the Human GpA TM Domain-Implications for Membrane Protein Folding and Transmembrane Signaling. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2010**, *1798* (10), 1899–1907. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.06.027>.

- (21) Yano, Y.; Kondo, K.; Watanabe, Y.; Zhang, T. O.; Ho, J. J.; Oishi, S.; Fujii, N.; Zanni, M. T.; Matsuzaki, K. GXXXG-Mediated Parallel and Antiparallel Dimerization of Transmembrane Helices and Its Inhibition by Cholesterol: Single-Pair FRET and 2D IR Studies. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56* (7), 1756–1759. <https://doi.org/10.1002/anie.201609708>.
- (22) Chen, L.; Merzlyakov, M.; Cohen, T.; Shai, Y.; Hristova, K. Energetics of ErbB1 Transmembrane Domain Dimerization in Lipid Bilayers. *Biophys. J.* **2009**, *96* (11), 4622–4630. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.03.004>.
- (23) Yano, Y.; Matsuzaki, K. Measurement of Thermodynamic Parameters for Hydrophobic Mismatch 1: Self-Association of a Transmembrane Helix. *Biochemistry* **2006**, *45* (10), 3370–3378. <https://doi.org/10.1021/bi0522854>.
- (24) Kuznetsov, A. S.; Polyansky, A. A.; Fleck, M.; Volynsky, P. E.; Efremov, R. G. Adaptable Lipid Matrix Promotes Protein-Protein Association in Membranes. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11* (9), 4415–4426. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00206>.
- (25) Trenker, R.; Call, M. J. M. E.; Call, M. J. M. E. Crystal Structure of the Glycophorin A Transmembrane Dimer in Lipidic Cubic Phase. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (50), 15676–15679. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b11354>.
- (26) Cherezov, V.; Rosenbaum, D. M.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G. F.; Foon, S. T.; Kobilka, T. S.; Choi, H. J.; Kuhn, P.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K.; et al. High-Resolution Crystal Structure of an Engineered Human B2-Adrenergic G Protein-Coupled Receptor. *Science (80-.).* **2007**, *318* (5854), 1258–1265. <https://doi.org/10.1126/science.1150577>.
- (27) Arkhipov, A.; Shan, Y.; Das, R.; Endres, N. F.; Eastwood, M. P.; Wemmer, D. E.; Kuriyan, J.; Shaw, D. E. Architecture and Membrane Interactions of the EGF Receptor. *Cell* **2013**, *152* (3), 557–569. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.030>.
- (28) Bremer, E. G.; Hakomori, S. I.; Bowen-Pope, D. F. Ganglioside-Mediated Modulation of Cell Growth, Growth Factor Binding, and Receptor Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259* (11), 6818–6825.
- (29) Zhou, Q.; Hakomori, S. I.; Kitamura, K.; Igarashi, Y. G(M3) Directly Inhibits Tyrosine Phosphorylation and de-N-Acetyl-G(M3) Directly Enhances Serine Phosphorylation of Epidermal Growth Factor Receptor, Independently of Receptor-Receptor Interaction. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (3), 1959–1965.
- (30) Coskun, Ü.; Grzybek, M.; Drechsel, D.; Simons, K. Regulation of Human EGF Receptor by Lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (22), 9044–9048. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105666108>.

- (31) Citri, A.; Yarden, Y. EGF-ERBB Signalling: Towards the Systems Level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7* (7), 505–516. <https://doi.org/10.1038/nrm1962>.
- (32) Needham, S. R.; Roberts, S. K.; Arkhipov, A.; Mysore, V. P.; Tynan, C. J.; Zanetti-Domingues, L. C.; Kim, E. T.; Losasso, V.; Korovesis, D.; Hirsch, M.; et al. EGFR Oligomerization Organizes Kinase-Active Dimers into Competent Signalling Platforms. *Nat. Commun.* **2016**, *7* (7), 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms13307>.
- (33) Kovacs, E.; Zorn, J. A.; Huang, Y.; Barros, T.; Kuriyan, J. A Structural Perspective on the Regulation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Annu. Rev. Biochem.* **2015**, *84* (1), 739–764. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034402>.
- (34) Endres, N. F.; Das, R.; Smith, A. W.; Arkhipov, A.; Kovacs, E.; Huang, Y.; Pelton, J. G.; Shan, Y.; Shaw, D. E.; Wemmer, D. E.; et al. Conformational Coupling across the Plasma Membrane in Activation of the EGF Receptor. *Cell* **2013**, *152* (3), 543–556. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.032>.
- (35) Ogiso, H.; Ishitani, R.; Nureki, O.; Fukai, S.; Yamanaka, M.; Kim, J. H.; Saito, K.; Sakamoto, A.; Inoue, M.; Shirouzu, M.; et al. Crystal Structure of the Complex of Human Epidermal Growth Factor and Receptor Extracellular Domains. *Cell* **2002**, *110* (6), 775–787. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00963-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00963-7).
- (36) Garrett, T. P. J.; McKern, N. M.; Lou, M.; Elleman, T. C.; Adams, T. E.; Lovrecz, G. O.; Zhu, H. J.; Walker, F.; Frenkel, M. J.; Hoyne, P. A.; et al. Crystal Structure of a Truncated Epidermal Growth Factor Receptor Extracellular Domain Bound to Transforming Growth Factor α . *Cell* **2002**, *110* (6), 763–773. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00940-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00940-6).
- (37) Ferguson, K. M.; Berger, M. B.; Mendrola, J. M.; Cho, H. S.; Leahy, D. J.; Lemmon, M. A. EGF Activates Its Receptor by Removing Interactions That Autoinhibit Ectodomain Dimerization. *Mol. Cell* **2003**, *11* (2), 507–517. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00047-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00047-9).
- (38) Yarden, Y.; Shilo, B. Z. SnapShot: EGFR Signaling Pathway. *Cell* **2007**, *131* (5), 1018.e1-1018.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.013>.
- (39) Paez, J. G.; Jänne, P. A.; Lee, J. C.; Tracy, S.; Greulich, H.; Gabriel, S.; Herman, P.; Kaye, F. J.; Lindeman, N.; Boggon, T. J.; et al. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science (80-.).* **2004**, *304*, 1497–1500. <https://doi.org/10.1126/science.1099314>.
- (40) Bocharov, E. V.; Lesovoy, D. M.; Pavlov, K. V.; Pustovalova, Y. E.; Bocharova, O. V.; Arseniev, A. S. Alternative Packing of EGFR Transmembrane Domain Suggests That Protein-Lipid Interactions Underlie Signal Conduction across Membrane.

- Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2016**, *1858* (6), 1254–1261.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.02.023>.
- (41) Sato, T.; Pallavi, P.; Golebiewska, U.; McLaughlin, S.; Smith, S. O. Structure of the Membrane Reconstituted Transmembrane-Juxtamembrane Peptide EGFR(622-660) and Its Interaction with Ca²⁺/Calmodulin. *Biochemistry* **2006**, *45* (42), 12704–12714.
<https://doi.org/10.1021/bi061264m>.
- (42) Inokuchi, J.; Inamori, K.; Kabayama, K. Biology of GM3 Ganglioside. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2018**, *156*, 151–195.
- (43) Tagami, S.; Inokuchi, J. I.; Kabayama, K.; Yoshimura, H.; Kitamura, F.; Uemura, S.; Ogawa, C.; Ishii, A.; Saito, M.; Ohtsuka, Y.; et al. Ganglioside GM3 Participates in the Pathological Conditions of Insulin Resistance. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (5), 3085–3092. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103705200>.
- (44) Kanoh, H.; Nitta, T.; Go, S.; Inamori, K.; Veillon, L.; Nihei, W.; Fujii, M.; Kabayama, K.; Shimoyama, A.; Fukase, K.; et al. Homeostatic and Pathogenic Roles of GM 3 Ganglioside Molecular Species in TLR 4 Signaling in Obesity. *EMBO J.* **2020**, *39* (12), e101732. <https://doi.org/10.15252/embj.2019101732>.
- (45) Tillack, T. W.; Allietta, M.; Moran, R. E.; Young, W. W. Localization of Globoside and Forssman Glycolipids on Erythrocyte Membranes. *BBA - Biomembr.* **1983**, *733* (1), 15–24. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(83\)90086-X](https://doi.org/10.1016/0005-2736(83)90086-X).
- (46) Kabayama, K.; Sato, T.; Saito, K.; Loberto, N.; Prinetti, A.; Sonnino, S.; Kinjo, M.; Igarashi, Y.; Inokuchi, J. I. Dissociation of the Insulin Receptor and Caveolin-1 Complex by Ganglioside GM3 in the State of Insulin Resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (34), 13678–13683. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703650104>.
- (47) Marsh, D.; Kurad, D.; Livshits, V. A. High-Field Electron Spin Resonance of Spin Labels in Membranes. *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *116* (1–2), 93–114.
[https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(02\)00022-1](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(02)00022-1).
- (48) Chen, X.; Resh, M. D. Cholesterol Depletion from the Plasma Membrane Triggers Ligand-Independent Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (51), 49631–49637. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208327200>.
- (49) Ringerike, T.; Blystad, F. D.; Levy, F. O.; Madshus, I. H.; Stang, E. Cholesterol Is Important in Control of EGF Receptor Kinase Activity but EGF Receptors Are Not Concentrated in Caveolae. *J. Cell Sci.* **2002**, *115* (6), 1331–1340.
- (50) Hakomori, S. I.; Handa, K. GM3 and Cancer. *Glycoconj. J.* **2015**, *32* (1–2), 1–8.
<https://doi.org/10.1007/s10719-014-9572-4>.

- (51) Muhle-Goll, C.; Hoffmann, S.; Afonin, S.; Grage, S. L.; Polyansky, A. A.; Windisch, D.; Zeitler, M.; Bürk, J.; Ulrich, A. S. Hydrophobic Matching Controls the Tilt and Stability of the Dimeric Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR) α Transmembrane Segment. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (31), 26178–26186. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.325555>.
- (52) Yano, Y.; Takemoto, T.; Kobayashi, S.; Yasui, H.; Sakurai, H.; Ohashi, W.; Niwa, M.; Futaki, S.; Sugiura, Y.; Matsuzaki, K. Topological Stability and Self-Association of a Completely Hydrophobic Model Transmembrane Helix in Lipid Bilayers. *Biochemistry* **2002**, *41* (9), 3073–3080. <https://doi.org/10.1021/bi011161y>.
- (53) Yano, Y.; Yamamoto, A.; Ogura, M.; Matsuzaki, K. Thermodynamics of Insertion and Self-Association of a Transmembrane Helix: A Lipophobic Interaction by Phosphatidylethanolamine. *Biochemistry* **2011**, *50* (32), 6806–6814. <https://doi.org/10.1021/bi200560c>.
- (54) Van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. Membrane Lipids: Where They Are and How They Behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9* (2), 112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>.
- (55) Parton, D. L.; Klingelhoefer, J. W.; Sansom, M. S. P. Aggregation of Model Membrane Proteins, Modulated by Hydrophobic Mismatch, Membrane Curvature, and Protein Class. *Biophys. J.* **2011**, *101* (3), 691–699. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.06.048>.
- (56) Weiss, T. M.; Van der Wel, P. C. A.; Killian, J. A.; Koeppe, R. E.; Huang, H. W. Hydrophobic Mismatch between Helices and Lipid Bilayers. *Biophys. J.* **2003**, *84* (1), 379–385. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74858-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74858-9).
- (57) De Planque, M. R. R.; Greathouse, D. V.; Koeppe, R. E.; Schäfer, H.; Marsh, D.; Killian, J. A. Influence of Lipid/Peptide Hydrophobic Mismatch on the Thickness of Diacylphosphatidylcholine Bilayers. A ^2H NMR and ESR Study Using Designed Transmembrane α -Helical Peptides and Gramicidin A. *Biochemistry* **1998**, *37* (26), 9333–9345. <https://doi.org/10.1021/bi980233r>.
- (58) Cymer, F.; Veerappan, A.; Schneider, D. Transmembrane Helix-Helix Interactions Are Modulated by the Sequence Context and by Lipid Bilayer Properties. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2012**, *1818* (4), 963–973. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.035>.
- (59) Marsh, D. Lateral Pressure Profile, Spontaneous Curvature Frustration, and the Incorporation and Conformation of Proteins in Membranes. *Biophys. J.* **2007**, *93* (11), 3884–3899. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.107938>.

- (60) Stangl, M.; Schneider, D. Functional Competition within a Membrane: Lipid Recognition vs. Transmembrane Helix Oligomerization. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2015**, *1848* (9), 1886–1896. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.03.011>.
- (61) Lee, A. G. *Lipid-Protein Interactions in Biological Membranes: A Structural Perspective*; 2003; Vol. 1612. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00056-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00056-7).
- (62) Contreras, F. X.; Ernst, A. M.; Wieland, F.; Brügger, B. Specificity of Intramembrane Protein-Lipid Interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3* (6), 1–18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004705>.
- (63) Lee, A. G. How Lipids Affect the Activities of Integral Membrane Proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2004**, *1666* (1–2), 62–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.05.012>.
- (64) Ernst, A. M.; Contreras, F. X.; Brügger, B.; Wieland, F. Determinants of Specificity at the Protein-Lipid Interface in Membranes. *FEBS Lett.* **2010**, *584* (9), 1713–1720. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.060>.
- (65) Hunte, C.; Richers, S. Lipids and Membrane Protein Structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18* (4), 406–411. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.03.008>.
- (66) Yeagle, P. L. Non-Covalent Binding of Membrane Lipids to Membrane Proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2014**, *1838* (6), 1548–1559. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.11.009>.
- (67) Lange, C.; Nett, J. H.; Trumppower, B. L.; Hunte, C. Specific Roles of Protein-Phospholipid Interactions in the Yeast Cytochrome Bc₁ Complex Structure. *EMBO J.* **2001**, *20* (23), 6591–6600. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6591>.
- (68) Lee, D.; Walter, K. F. A.; Brückner, A. K.; Hilty, C.; Becker, S.; Griesinger, C. Bilayer in Small Bicelles Revealed by Lipid-Protein Interactions Using NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (42), 13822–13823. <https://doi.org/10.1021/ja803686p>.
- (69) Fernández, C.; Hilty, C.; Wider, G.; Wüthrich, K. Lipid-Protein Interactions in DHPC Micelles Containing the Integral Membrane Protein OmpX Investigated by NMR Spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (21), 13533–13537. <https://doi.org/10.1073/pnas.212515099>.
- (70) Renault, M.; Saurel, O.; Czaplicki, J.; Demange, P.; Gervais, V.; Löhr, F.; Réat, V.; Piotto, M.; Milon, A. Solution State NMR Structure and Dynamics of KpOmpA, a 210 Residue Transmembrane Domain Possessing a High Potential for Immunological Applications. *J. Mol. Biol.* **2009**, *385* (1), 117–130. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.021>.

- (71) Schmidt, T.; Situ, A. J.; Ulmer, T. S. Direct Evaluation of Protein-Lipid Contacts Reveals Protein Membrane Immersion and Isotropic Bicelle Structure. *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, 7 (21), 4420–4426. <https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.6b02159>.
- (72) Fernández, C.; Wüthrich, K. NMR Solution Structure Determination of Membrane Proteins Reconstituted in Detergent Micelles. *FEBS Lett.* **2003**, 555 (1), 144–150. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01155-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01155-4).
- (73) Cui, J.; Kawatake, S.; Umegawa, Y.; Lethu, S.; Yamagami, M.; Matsuoka, S.; Sato, F.; Matsumori, N.; Murata, M. Stereoselective Synthesis of the Head Group of Archaeal Phospholipid PGP-Me to Investigate Bacteriorhodopsin-Lipid Interactions. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13 (41), 10279–10284. <https://doi.org/10.1039/c5ob01252j>.
- (74) Marsh, D.; Horváth, L. I. Structure, Dynamics and Composition of the Lipid-Protein Interface. Perspectives from Spin-Labelling. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1998**, 1376 (3), 267–296. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(98\)00009-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(98)00009-4).
- (75) Guzzi, R.; Bartucci, R. Electron Spin Resonance of Spin-Labeled Lipid Assemblies and Proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, 580, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.06.015>.
- (76) Sachse, J. H.; King, M. D.; Marsh, D. ESR Determination of Lipid Translational Diffusion Coefficients at Low Spin-Label Concentrations in Biological Membranes, Using Exchange Broadening, Exchange Narrowing, and Dipole-Dipole Interactions. *J. Magn. Reson.* **1987**, 71 (3), 385–404. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(87\)90241-1](https://doi.org/10.1016/0022-2364(87)90241-1).
- (77) Scarpelli, F.; Drescher, M.; Rutters-Meijneke, T.; Holt, A.; Rijkers, D. T. S.; Killian, J. A.; Huber, M. Aggregation of Transmembrane Peptides Studied by Spin-Label EPR. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113 (36), 12257–12264. <https://doi.org/10.1021/jp901371h>.
- (78) Vogel, A.; Scheidt, H. A.; Huster, D. The Distribution of Lipid Attached Spin Probes in Bilayers: Application to Membrane Protein Topology. *Biophys. J.* **2003**, 85 (3), 1691–1701. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74599-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74599-8).
- (79) Alvis, S. J.; Williamson, I. M.; East, J. M.; Lee, A. G. Interactions of Anionic Phospholipids and Phosphatidylethanolamine with the Potassium Channel KcsA. *Biophys. J.* **2003**, 85 (6), 3828–3838. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74797-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74797-3).
- (80) Fernandes, F.; Loura, L. M. S.; Koehorst, R.; Spruijt, R. B.; Hemminga, M. A.; Fedorov, A.; Prieto, M. Quantification of Protein-Lipid Selectivity Using FRET: Application to the M13 Major Coat Protein. *Biophys. J.* **2004**, 87 (1), 344–352. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.040337>.
- (81) Nazarov, P. V.; Koehorst, R. B. M.; Vos, W. L.; Apanasovich, V. V.; Hemminga, M. A. FRET Study of Membrane Proteins: Determination of the Tilt and Orientation of the

- N-Terminal Domain of M13 Major Coat Protein. *Biophys. J.* **2007**, *92* (4), 1296–1305. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.095026>.
- (82) Scheidt, H. A.; Müller, P.; Herrmann, A.; Huster, D. The Potential of Fluorescent and Spin-Labeled Steroid Analogs to Mimic Natural Cholesterol. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (46), 45563–45569. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303567200>.
- (83) Holt, A.; De Almeida, R. F. M.; Nyholm, T. K. M.; Loura, L. M. S.; Daily, A. E.; Staffhorst, R. W. H. M.; Rijkers, D. T. S.; Koeppe, R. E.; Prieto, M.; Killian, J. A. Is There a Preferential Interaction between Cholesterol and Tryptophan Residues in Membrane Proteins? *Biochemistry* **2008**, *47* (8), 2638–2649. <https://doi.org/10.1021/bi702235k>.
- (84) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- (85) Wolber, P. K.; Hudson, B. S. An Analytic Solution to the Förster Energy Transfer Problem in Two Dimensions. *Biophys. J.* **1979**, *28*, 197–210. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(79\)85171-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(79)85171-1).
- (86) Pathak, P.; London, E. The Effect of Membrane Lipid Composition on the Formation of Lipid Ultrananodomains. *Biophys. J.* **2015**, *109* (8), 1630–1638. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.08.029>.
- (87) Loura, L. M. S.; Prieto, M.; Fernandes, F. Quantification of Protein-Lipid Selectivity Using FRET. *Eur. Biophys. J.* **2010**, *39* (4), 565–578. <https://doi.org/10.1007/s00249-009-0532-z>.

第2章 本論1：EGF受容体膜貫通領域の脂質二重膜中での挙動

2-1 受容体膜貫通領域を模倣した蛍光標識ペプチドの合成と精製

2-1-a 序

本研究では、単純な成分のモデル膜を用いて相互作用解析を行うことで EGF受容体と GM3 の作用メカニズムを明らかにする。これまで一回膜貫通型の膜タンパク質と脂質の結合構造が精密に明らかになった例はなく、結合は非常に単寿命で可逆的であることが予想される。このような特徴をもつ相互作用を観測するため、本研究では合成した蛍光標識化 EGF受容体モデルプローブおよび脂質との蛍光分光法を用いた。本節では、研究目的の達成のために必要なタンパク質一脂質の結合を本質的に再現できる EGF受容体のモデルペプチドを創出するため、純度の高いペプチドプローブの固相合成で作製し、その膜中の挙動を詳細に調べた。

2-1-b アミノ酸配列および蛍光標識プローブのデザイン

本研究で用いた EGF受容体膜貫通領域のアミノ酸配列は human EGFR (638-671, PDB ID: 2M20) に基づき、以下のような点を考慮してデザインした¹。配列には先行研究によって GM3 との作用が示唆された K642 を含む細胞外ドメインの一部と、S645 から M668 までの膜貫通領域を含む。我々は N 末端膜外残基の機能に着目して研究を進めるため、N 末端の配列は天然体のものをそのまま用いた。EGF受容体の膜貫通部を用いた研究は過去にも例があるが、膜への再構成を効率的に達成するために配列に塩基性アミノ酸を複数追加する手法や、親水性の末端部が数多く付随した配列を用いる手法によって工夫がなされてきた^{2,3}。このようなアプローチはペプチドの親水性を高めるが、膜外直上残基の特異的な性質を解析するうえで望まない影響を与えることも予想される。

一方、C 末端のアルギニン残基は水溶性かつ中性残基であるセリンへと変異した。細胞中においては、GM3 は細胞膜外葉に、また膜貫通ペプチドは N 末端を細胞外に向かって配向で存在している。生理条件下において、このような脂質の局在、膜タンパク質の配向は厳密に制御されている一方で、モデル脂質膜中においてこれらをコントロールすることは難しい。したがって、N 末端リジン残基と GM3 の特異的な相互作用を選択的に観測するためには、生体では受容体膜内領域にあり GM3 との相互作用することのない塩基性残基アルギニンの影響を除去しなければならない。また、膜外直

上のリジン残基の影響を評価するため、アラニンに変異した配列 EGFR(K642A)的同时に合成した。

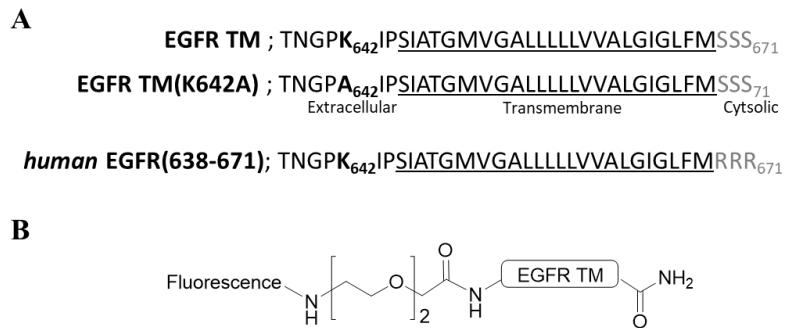


図 2-1 合成したペプチドの配列と構造

TM ペプチドの標識に用いる蛍光分子には、NBD (nitro-benzoxadiazole) および TMR (carboxy tetramethyl-rhodamine) を選択した。NBD は疎水性が高く電荷をもたない蛍光原子団であり、リン脂質頭部や糖脂質との非特異な静電相互作用や親水相互作用が生じにくい⁴。また、蛍光団同士の会合が膜貫通ペプチドの会合挙動に大きな影響を及ぼすことを防ぐ目的で、N 末端残基と蛍光団の間に親水性のジエチレングリコールをリンカーとして導入した^{5,6}。柔軟なリンカーの導入によって蛍光原子団が溶液中において等方的に配向することが促進され、解析の定量性も向上する。2-3 節で示す、FRET アクセプターとして赤色蛍光団である ATTO594 で標識された GM3 を使用する場合を想定し、FRET 効率が 50% となる距離指標であるフェルスター距離 R_0 は計算によって求めることができる⁷。その結果、NBD-ATTO594 の R_0 は 4.88 nm となった。これにより、膜中における分子間相互作用の観測に適用可能な蛍光団のペアであると判断した。

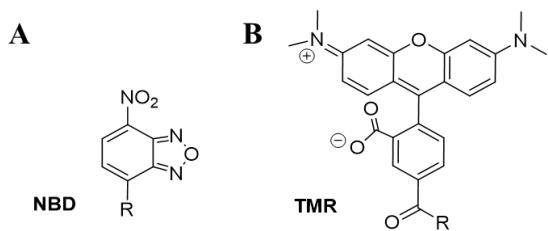


図 2-2 NBD(A)と TMR(B)の構造.

一方、併用した TMR はカチオン性の蛍光原子団であり、その分子量は NBD より大きいものの一般的な蛍光プローブと比較すると小型の部類である。NBD と比較して親水性が大きく、水相で凝集しにくい性質を有する。そのため、自己消光など蛍光分子間相互作用の観測には感度が十分ではないことが予想される。一方で、ペプチド本来の性質に対する蛍光団の影響は軽減されると考えられる。また中程度の量子収率示し、輝度が安定することから共焦点顕微鏡による長時間の観察に適している。

2-1-c NBD 標識化ペプチドの合成および精製方法の検討

ペプチドの伸長には Fmoc 固相合成法を用い、CEM 社製超音波ペプチド合成機 Liberty Blue を使用した。樹脂は Fmoc Rink Amide NovaPEG を用い、DIPCI/HOBt 縮合法でアミノ酸を伸長した。疎水性の高い膜貫通ペプチドの伸長には、膨潤性の高いポリスチレン樹脂の使用が適切である。Fmoc 保護された N 末端を脱保護し、0.2 M アミノ酸 DMF 溶液でペプチドを伸長した。その後、未反応の N 末端を保護するため無水酢酸を含む DMF 溶液を加えてキャッピング反応を行った。

N 末端アミンの蛍光標識は樹脂合成用カラムを用い、手動で導入した。図 2-3 に示す通り、伸長済みの樹脂を再度 NMP に膨潤し、20% ピペリジンを含む NMP 溶液で Fmoc 基を脱保護した。ここに 1.2 当量の Fmoc mini-PEG、1.2 当量の DIPCI、1.2 当量の OxymaPure を含む NMP 溶液を加えてアミド化し、リンカ一部を結合した。さらに Fmoc 基を脱保護したのち、NBD-Cl を含む NMP 溶液を用いて置換反応によって末端アミンに NBD 基を導入した。ペプチドの脱樹脂には Reagent K (TFA 82.5%, チオアニソール 5%, 水 5%, フェノール 5%, エタンジチオール 2.5%) を用いた。ここで得られた溶液をジエチルエーテル中で遠心分離、デカンテーションし残渣を空気乾燥することで褐色フィルム状結晶を得た。

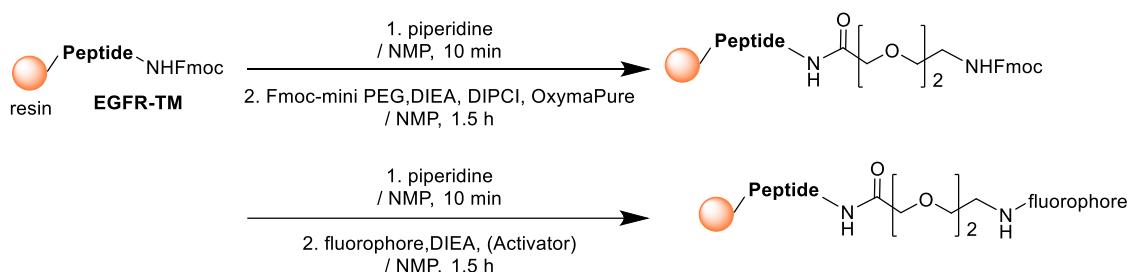


図 2-3. 蛍光標識ペプチドの合成スキーム。

一般に疎水性の高いペプチドの精製は通常の条件では容易ではなく、Bollhagen, Sato, Hara らの報告を参照しアセトニトリル/1-プロパノール/ H_2O のグラジエントやギ酸を含む溶出液を用いた逆相 HPLC 条件を種々検討した⁸⁻¹⁰。また、溶解性向上が報告されている TFE や HFIP を含む溶出液やインジェクト溶液を用いることも検討した。

非標識の EGFR-TM を対象に行った条件検討では、内径の小さな分析用カラムを用いた場合にアセトニトリル系溶出液でピークが分離することが確認できた。一方 NBD-TM を扱う場合、同条件ではピークがブロードになるなど分離が著しく悪化した(図 2-4)。このことから、NBD を用いた標識によってプローブの疎水性が増加していることが示唆された。

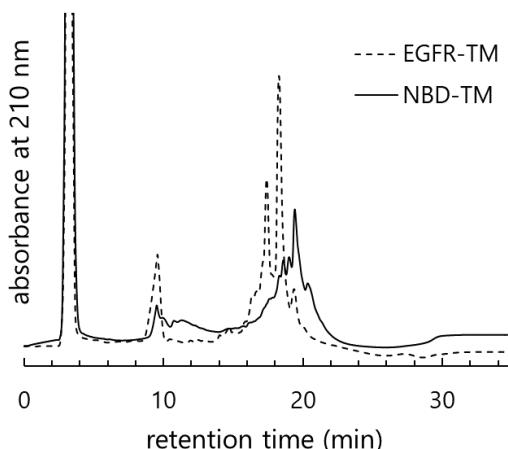


図 2-4. 分析用カラムを用いた EGFR-TM と NBD-TM の HPLC 溶離プロファイル
(water 0.1% TFA (A) and acetonitrile/1-PrOH (2:3) 0.05% TFA (B) gradient using 5Ph-AR-300 4.6*100 mm “analytical column”)

次にギ酸を用いた精製条件を検討した。その結果、ピークの分離が向上した。内径の大きな分取用カラムを用いた際には、ギ酸系の溶出液が不可欠であり、アセトニトリル系溶出液の条件ではピークの分離が顕著に悪化した。また、固定相として C4 構造を選択した。C4 カラムの固定相は疎水性が比較的小さく、膜貫通ペプチドのような疎水性の大きな分子の非特異的な吸着が抑制されるため、C4 以外の候補の一つである Ph カラムと比較してもピークの分離が向上した。結果的に、蛍光標識体は固定相を C4 構造とするカラムおよびギ酸/ H_2O /1-プロパノールのグラジエントを用いる条件を最適化条件と決定した。同条件で K642A 変異体の分析を行った場合、精製時には配列の疎水性の上昇に由来して保持時間が延長した。しかしながらピークの分離は問題なく達成された。(図 2-4)

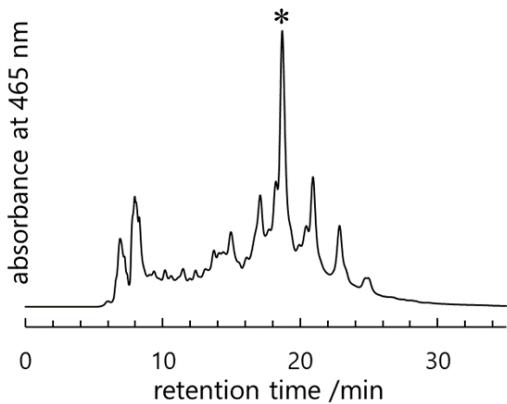


図 2-5

NBD-TM の HPLC 精製プロファイル
(formic acid/H₂O (2:3) (A) and formic acid/1-
PrOH (4:1) (B) gradient using 5C4-AR-300
10*150 mm, “semipreparative column”)

図 2-6 に、分取・精製した NBD-TM の ESI-MS スペクトルを示した。目的化合物は主に三価のイオンとして検出され、ギ酸を含む溶離液を希釈して行った分析でプロトン付加体がメインピークとして観測された。そのほかに、ナトリウム付加体(+23)などが付随するピークとして観測された。一方で、分取後の溶離液の扱いによってはメチオニン酸化体と推定される(+16)のピークが大きく観測される。これはギ酸を用いた精製においてしばしば観測される副反応である⁹。そこで分取後の取り扱い手順の改善を試みた。その結果として、分取した液を等量~2 倍量の MilliQ 水で即座に希釈し凍結、続いて凍結乾燥を実行することで酸化体ピークが低減されることを確認した。

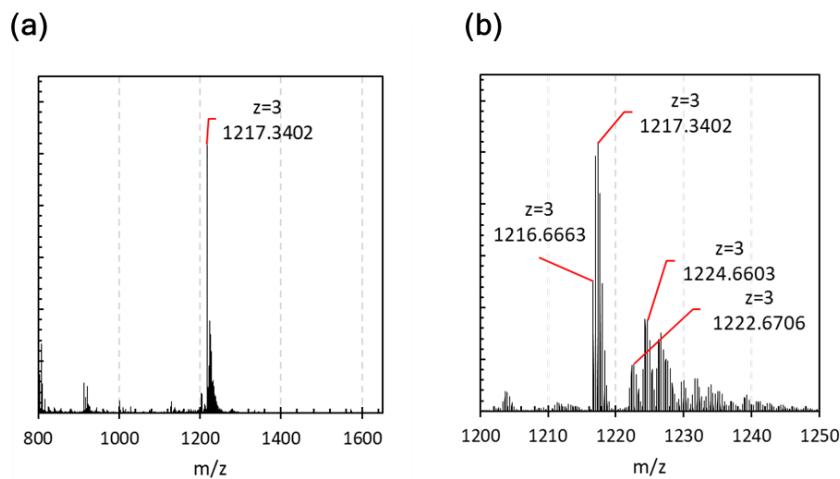


図 2-6 精製後 NBD-TM の ESI-MS スペクトル。m/z = 1216.6663 のピークが[NBD-TM+3H]³⁺の精密質量(1216.6702)にほぼ一致した。m/z = 1224.6603 は[NBD-TM+2H+Na]³⁺に、m/z = 1222.6706 は少量のメチオニン酸化体にそれぞれ対応する。

TMR 基の導入には蛍光団のカルボキシル基を介したアミド化反応が利用可能である。Fmoc 基を脱保護した PEG-TM の N 末端に対して、TMR 1.2 当量、活性化剤として DIPCI, OxymaPure®を各 1.2 当量、塩基として DIEA 1 当量を加えアミド化反応を行った。反応は問題なく進行し、その後の脱樹脂、再結晶を経て淡赤色のフィルムを得た。

精製においても、TMR の親水性の高さが功奏してより温和な条件で可能であった。図 2-7 に TMR-TM のアセトニトリル系溶出液での溶離プロファイルを示した。わずかに保持時間が延長したものの、ペプチドの性質に大きな影響を与えることなく、特異的な吸着によってピークの分離が達成されている。得られた TMR 標識ペプチドは ESI-MS によって同定を行った。以上のように、純度の高い二種類の蛍光プローブを得ることに成功し、またプローブ全体の疎水性が類似したものであることを確認した。

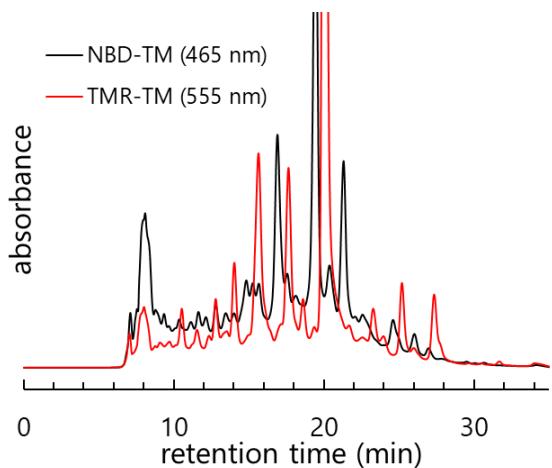


図 2-7

NBD-TM と TMR-TM の HPLC 精製プロファイル。NBD-TM が 19 分に、TMR-TM が 20 分に目的化合物ピークを示した。

(water 0.1% TFA (A) and acetonitrile/1-PrOH (2:3) 0.05% TFA (B) gradient using 5C4-AR-300 10*150 mm, “semipreparative column”)

2-2 均一二重膜中における EGF 受容体の脂質選択性

2-2-a 序

膜貫通ペプチドを対象とした研究でしばしば問題になるのが、その疎水性の高さによって脂質モデル膜への再構成が困難になることである。今回の我々が用いた部分アミノ酸配列は過去に報告例がなく、当然その蛍光標識体の性質は未知である。Sato らは、C 末端に膜外近傍(JM)領域を含むペプチドを作製し、CD 測定によって DMPC 膜中でのヘリックス構造を確認した³。また、Hristova らは N 末端にリジン残基を追加したペプチドに対して蛍光標識を施し、FRET 測定によって DLPC 膜中での会合体形成を定量した²。今回のデザインにおけるポイントとして膜外領域の塩基性残基に着目し、より天然体に近く、極性残基の数を最小限に抑えた配列を用いたことが挙げられる。したがって、合成したペプチド蛍光プローブのモデル膜中での測定を達成するために、膜中のプローブの性質を精査する必要があった。

2-2-b 非標識ペプチドの CD 測定

ペプチドの基本性質を明らかにする手法として、円二色性分散(CD)測定が頻繁に用いられる。得られたスペクトルのピークから二次構造の情報、すなわち、ランダム構造、 β -シート構造、 α -ヘリックス構造の含有率を概算することができる。特に膜貫通ペプチドが示す α -ヘリックス構造は 208 nm と 222 nm に負のピークを与えることが知られており、二次構造を簡便に推定することが可能である¹¹。

図 2-8 に、トリフルエタノール (TFE) 溶液中での非標識 EGFR-TM の CD スペクトルを示した。TFE は疎水性ペプチドの α -ヘリックス構造を溶液中で安定化することが知られている。合成した膜貫通ペプチドを TFE 中で保存し、溶液を CD 測定に用いた。タンパク質配列データベース Uniprot に登録されている情報は、34 残基中およそ 23 残基(68%)が α -ヘリックス構造を形成することを示す。実際にペプチドの二次構造を TFE 中で評価すると、 α -ヘリックス構造をメインとした二次構造が形成されていることを確認した。

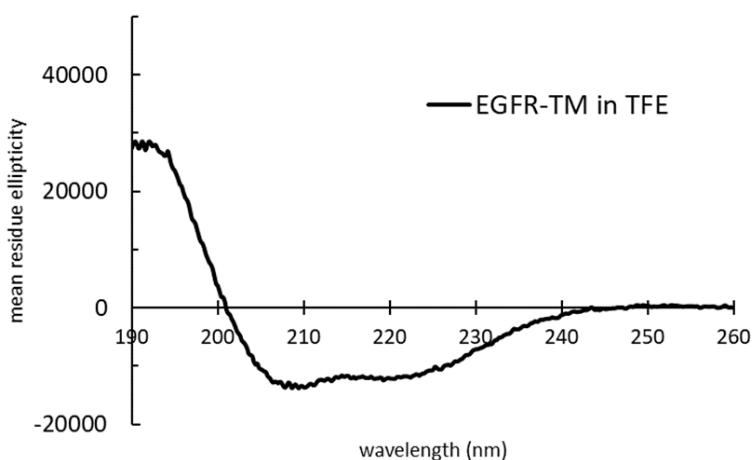


図 2-8 合成したペプチドの TFE 中での CD スペクトル. 測定温度は室温.

続いてモデル膜中での CD スペクトルを観測した. 膜貫通ペプチドの疎水性部の長さに対応した炭素鎖長を有する DMPC をベース脂質として用いて, EGFR-TM を含むストック溶液とともに混合し, ペプチド濃度比を調節した水和 MLV を調製した. 粒形の大きな球状モデル膜が生じる透過光の散乱の寄与を除くため, エクストルーダーを用いて直径 100 nm の LUV を調製した. このサンプルを用いて脂質膜中のペプチドの CD スペクトルを測定した結果, α -ヘリックス構造を形成していることが示唆された(図 2-9). また, ペプチドの脂質に対する濃度を 2mol%まで上昇させた場合でも, 物質量あたりの楕円率に変化は観測されなかった. このことから, ペプチドの膜への再構成が問題なく行われていることを示している.

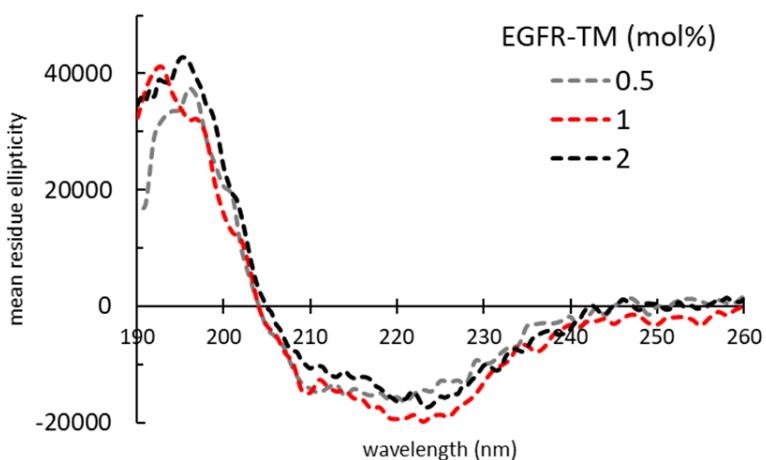


図 2-9 ペプチドの DMPC からなる LUV 中での CD スペクトル. 1 mm セルを用いて測定し, 得られたデータを残基あたりの濃度で規格化した. 測定温度は 23 °C.

2-2-c 蛍光標識化ペプチドの各脂質膜中での蛍光測定

蛍光標識を施した TM ペプチドプローブの性質を確かめるため、炭素鎖長の異なるいくつかの脂質二重膜にプローブを組み込んで蛍光強度を測定した。図 2-10 には、TMR 標識ペプチドを DOPC, DMPC, DPPC にそれぞれ組み込み、15 ~ 45 °C の温度で蛍光強度を測定した結果を示した。DOPC 膜において、TMR の強度は温度上昇に従つて減少した。これは、分子運動の増加に伴って蛍光の無輻射失活が促進され量子収率が低下したためである。一方、飽和脂質である DMPC と DPPC は、測定温度範囲内に相転移温度を有しており、温度上昇によってゲル相から Ld 相へと相転移する¹²。DMPC 中では低温から相転移温度の 24 °C 付近にかけて蛍光強度の急激な上昇を観測した。これは低温において DMPC ゲル相から排除されたペプチドの局所濃度が上昇して蛍光分子の自己消光を生じた一方で、高温における流動的な性質の膜環境において脱会合し、消光を緩和したことを示唆している。また、より炭素鎖長の長い DPPC 膜中では、蛍光強度が著しく減少し、相転移温度である 41°C 付近の強度上昇を軽微ではあるが確認した。以上の結果から、標識化ペプチドは DMPC や DOPC からなるモデル二重膜には再構成されやすく、また流動性の低い条件では会合体を形成しやすいことが示された。モデル膜のベースとなる脂質の不飽和や鎖長によって蛍光強度が異なることについては、DMPC や DOPC は TM ペプチドの疎水性部の長さと膜の厚さが類似していることでプローブの再構成が効率よく進行するためであると考えられた。DPPC は DMPC に比べて脂肪酸鎖あたり二炭素多く、TM ペプチドの疎水性部より厚い二重膜を構成するため膜中のペプチドが不安定であり再構成されにくくと考えられる。さらに、流動性の低い膜で自己消光が促進されるのは、ペプチドが密にパッキングされたアシル鎖から排除されて濃縮されることで、会合体を形成しやすい環境となっているためであると考えられる。

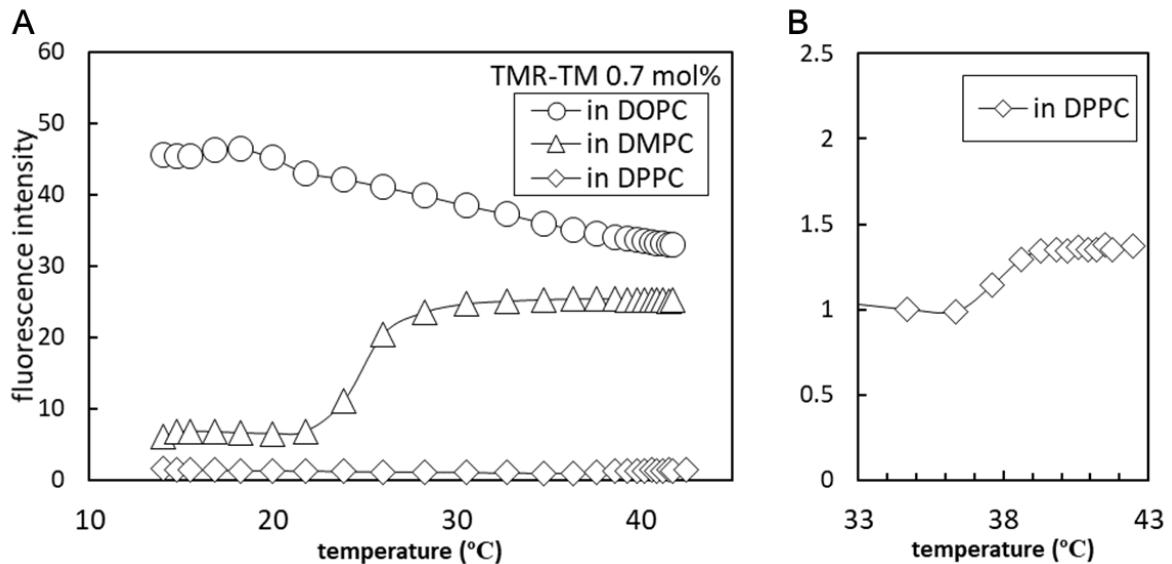


図 2-10 TMR 標識ペプチドの各脂質モデル膜における蛍光強度. 励起波長は 555 nm. 検出波長は 570 nm. 測定温度は 15 ~ 45 °C. A ; DOPC 膜中の結果を丸印, DMPC 膜中の結果を三角, DPPC 膜中の結果をダイヤ型で示した. B ; DPPC 膜中, 38 °C 付近の拡大図. DPPC の相転移温度(41 °C)付近で蛍光強度の上昇がみられる.

2-2-d 光褪色後蛍光回復法 (FRAP) によるプローブの流動性比較

光褪色後蛍光回復 (FRAP: Fluorescence Recovery after Photobleaching) 測定では、まず脂質膜上の一一定範囲内に存在する蛍光分子を強度の高いレーザー光によって褪色させる。その後、範囲外から褪色していない蛍光分子が拡散により褪色範囲内へと流入して蛍光強度が上昇していく時間およびその回復率を測定する。これによって、脂質二重膜の観察範囲内に含まれる分子の流動性を見積もることができる。GUV (Giant unilamellar vesicle)を調製し、膜の流動性変化と各脂質膜環境における蛍光分子の挙動を観測した。GUV を調製する際の脂質として DMPC を使用し、NBD-TM、および比較のために NBD-PE を 0.1 mol%濃度で再構成したサンプルを調製した。モデル膜の構成成分を変化させ測定を行い、各蛍光プローブが示す流動性を比較した。

FRAP 測定を行う際、リポソームそのものが静止していることが重要な前提条件となる。ガラス面に付着し固定化された GUV を探索し観測に用いる事も多いが、この方法は再現性に著しく乏しく、得られた実験結果にも影響が生じる可能性が考えら

れる。そこで、先行研究を参考にアガロースゲルを水和液として用い、GUV を視野に固定化する手法を試みた¹³。通常 MilliQ 水で行っていた水和を重量比 0.4% のアガロース水溶液に置き換える通常エレクトロフォーメーション法と同様に 55 °C での水和した後、しばらく室温で静置すると粘性の高い GUV 浮遊液を得ることができる。これにより、数秒～数十秒間単位の画像取得を必要とする顕微鏡上での光子計測実験を容易に行うことが可能となった。

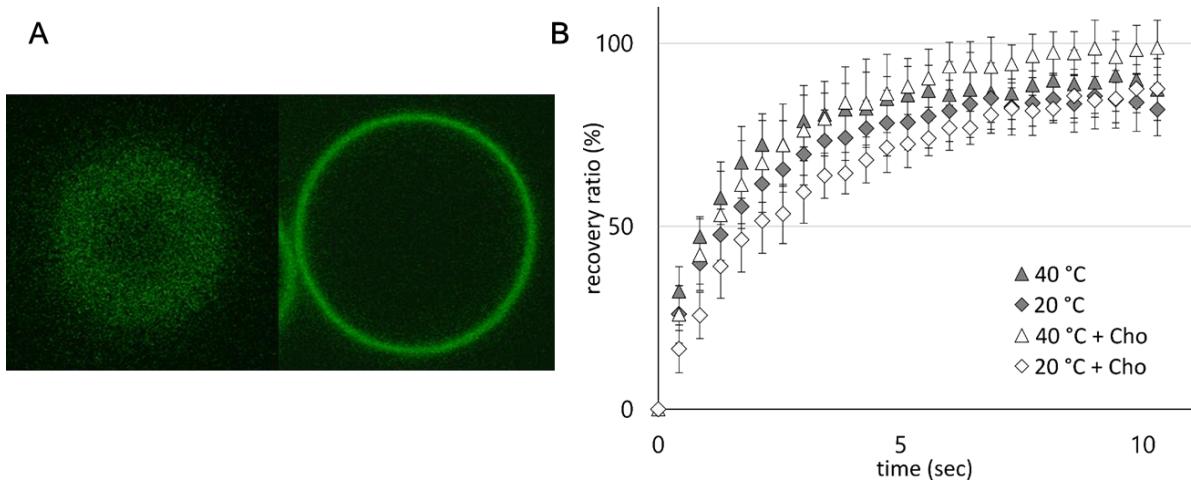


図 2-11 A ; FRAP 測定の対象とした NBD-TM 含有 DMPC リポソームの例。左はリポソーム表面、右は赤道面に焦点を合わせた画像。B ; NBD-PE 含有 DMPC 膜を用いた FRAP 測定の結果。灰色は DMPC 均一膜中、白色は 30% Cho を含む DMPC 二重膜中の結果。三角は 40 °C、ダイヤ型は 20 °C で測定した。

図 2-11 に、DMPC 二重膜中における NBD-PE の FRAP 測定の結果を示した。コレステロールを含まない二重膜中は 40 °C において NBD-PE の蛍光回復率は最も急速に上昇し、流動性の高い膜であることが示された。一方、20 °C の測定では流動性の低下がみられた。コレステロール含有膜、20 °C の測定では蛍光の回復速度がもっとも遅かった。したがってコレステロールを含む低温の膜条件において最も分子の流動性が低くなっている。一方で、コレステロールを含む場合でも 10 秒後の回復率は 100% に近い値へ到達していることから、流動可能な成分が大きな割合を占めている。このことは、十分量のコレステロールの添加によって二重膜が均一化し、ゲル

相領域が消失し NBD-PE がナノスケールで均一に分散していることを示唆している。

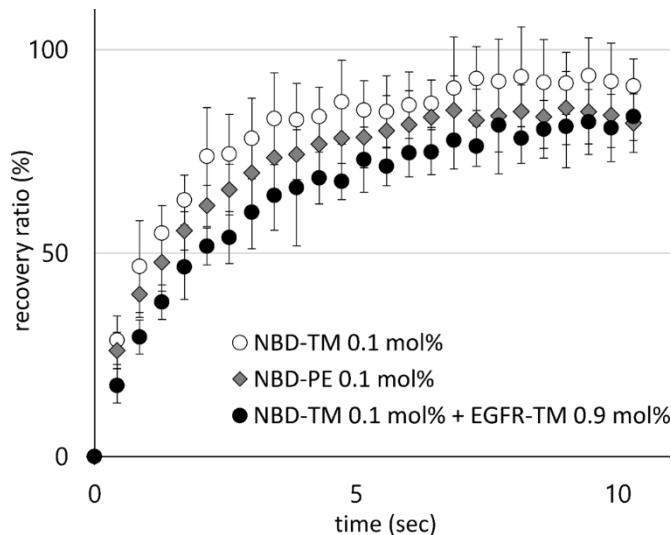


図 2-12 NBD-TM を含むモデル膜を用いた FRAP 測定の結果。白抜きの丸は DMPC 均一膜中に 0.1 mol% の EGFR-TM を含む場合の結果、黒丸は 1 mol% の EGFR-TM を含む場合の結果。参考のため、図 3-5 の灰色ダイヤ型は、NBD-PE を用いた結果を併記した。測定温度は 20 °C。NBD-TM は EGFR-TM の一部として各モデル膜サンプルに 0.1 mol% 混合した。EGFR-TM 1 mol% の条件では 0.9 mol% の非標識体を用い、残りの 0.1 mol% を NBD-TM に置き換えて調製した。

図 2-12 には NBD-TM を含む二重膜中 20 °C での FRAP 測定の結果を示した。NBD-PE と NBD-TM の結果を比較して、等量のプローブを含む場合 NBD-TM は PE と同等もしくはそれ以上に急速な回復率を示した。したがって NBD-TM と NBD-PE を含む DMPC 膜の流動性が同等であり、TM ペプチドの比較対象として、NBD-PE を用いることについての妥当性が支持された。一方で、TM ペプチドを 1 mol% 二重膜に含む場合、NBD-TM の蛍光回復速度は低下した。これは、NBD-TM が会合体を形成して自らの分子運動を低下させたことが原因であると考えられる。その根拠として、回復速度は低下したもののは 10 秒後の回復率は NBD-PE の結果と同等であることから、二重膜の相状態は変化しておらず、大きなドメイン形成が生じていないことが示唆される。回復に至る曲線を測定時間に対する指数関数でフィッティング

すると、得られる時定数のパラメーター $t_{1/2}$ を用いて各結果を定量的に比較することができる。図 2-11, 2-12 に示した各データから求めた $t_{1/2}$ を表 2-1 にまとめた。

表 2-1 NBD-PE および NBD-TM の FRAP 実験の結果から求めた $t_{1/2}$ の結果。

$t_{1/2}$ (sec)	
NBD-PE (20 °C)	1.08 ± 0.11
NBD-PE (40 °C)	0.89 ± 0.35
NBD-PE + Cho (20 °C)	1.86 ± 0.65
NBD-PE + Cho (40 °C)	1.13 ± 0.23
NBD-TM (20 °C)	0.97 ± 0.17
NBD-TM + EGFR TM (20 °C)	1.54 ± 0.21

各蛍光プローブは DMPC 二重膜に 0.1 mol% 混合した。コレステロール含有膜はモル比 30% のコレステロールを含む。

2-3 時間分解測定を用いたペプチド-脂質間の相互作用解析

2-3-a 序

時間分解一光子計測法では、パルスレーザーで励起した蛍光プローブが輻射失活を経て定常状態に戻るまでの時間を計測し、蛍光分子の励起寿命を解析することができる。NBD-PEは、混合される二重膜脂質鎖の構成に応じて秩序液体相(Lo相)または液晶相(Ld相)に分配され、その蛍光寿命が脂質二重膜の相状態を解析するために用いられてきた^{6,14}。

これまで一回膜貫通型の膜タンパク質と脂質の結合構造が明らかになった例は非常に少ない。この理由として前述のように、多くの作用が非常に単寿命で可逆的であることが挙げられ、EGF受容体もその例外ではない。このような特徴をもつ相互作用を観測するため、受容体膜貫通領域および脂質の蛍光標識体を用い、蛍光分光法を用いた高感度な相互作用観測を試みた。種々の蛍光標識化脂質プローブを用いて相互作用の選択性を分子レベルで明らかにし、受容体と脂質の結合モデルをより詳細に解析した

2-3-b 均一脂質二重膜中における時間分解一光子計測

本節では、膜外領域をNBDで標識した二種類のプローブ、NBD-TMを用い、その蛍光現象を比較することで膜貫通ペプチドに働く分子間相互作用の定量的解析を試みた。

まず、脂質総量に対して0.05 mol%のNBD-TMを組み込んだ均一DMPC脂質二重膜に対して、EGF受容体との相互作用が報告されているガングリオンドGM3を組み込み、蛍光寿命を測定した(図2-13)。非標識のGM3を2 mol%まで組み込んだ場合、NBD-TMの蛍光寿命はわずかに上昇したものの、脂質二重膜の相状態の変化を示すような大きな値の変動は観測されなかった。このことから、過剰量のGM3の添加によっても大きなクラスターやドメインを形成しないこと、NBD-TM周囲の膜環境に大きな影響を与えないことが示された。したがって、EGF受容体とGM3の作用は数分子単位で行われており、分子間の特異的な相互作用が働いていると考えられた。一方でわずかな蛍光寿命の上昇は、GM3がNBD-TMの二量体形成に伴う自己消光を緩和したことを見唆している。

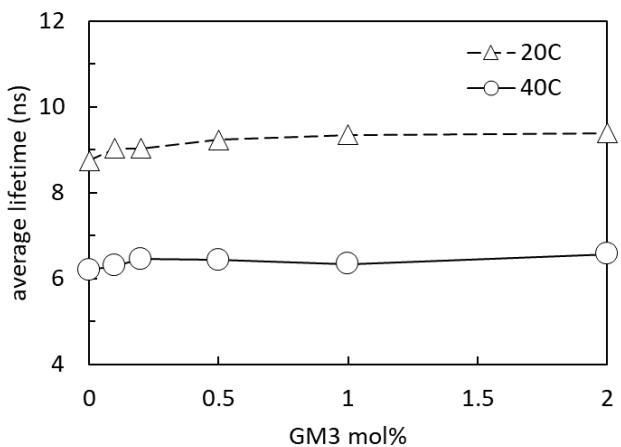


図 2-13. DMPC 二重膜中における NBD-TM (0.05 mol%) の平均蛍光寿命. 三角が 20 °C(ゲル相)での結果, 丸印が 40 °C (液晶 Ld 相) での結果. GM3 を 2 mol%まで添加し, 平均寿命をプロットした. 励起波長は 450 nm で, NBD の蛍光最大波長である 530 nm の光子数を計測した.

2-3-c 時間分解 FRET 解析による膜貫通ペプチドの脂質選択性の定性的比較

蛍光の失活過程には、フェルスター機構を経由するエネルギー移動も含まれる。すなわち定常測定と同様に、FRET を時間分解測定によって観測することが可能である。時間分解測定は定常測定と比べてサンプル中の蛍光分子の濃度の変化を結果に反映しにくく、分子の周辺環境や相互作用を定量的に解析する場合に最適である⁷。EGF 受容体と GM3 の相互作用を観測するため、NBD-TM と ATTO594 標識脂質をモデル二重膜に組み込み、NBD-TM の蛍光寿命の変化からペプチド-脂質間相互作用の比較を試みた。

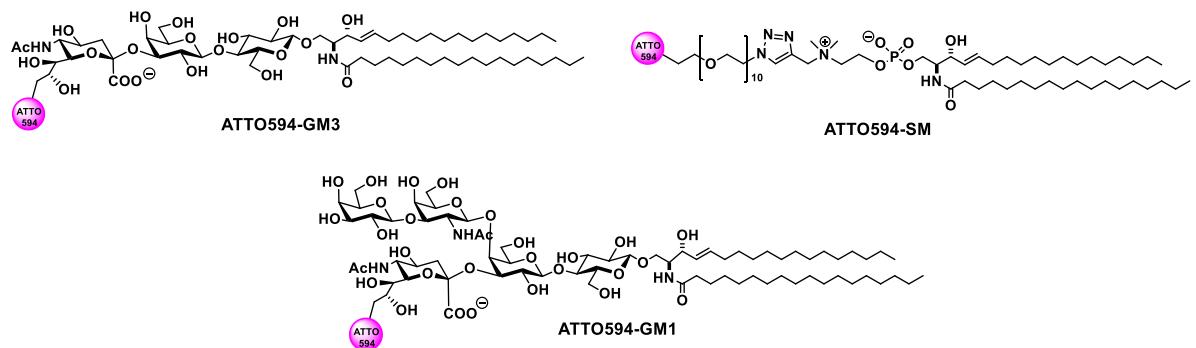


図 2-14. 各 ATTO594 標識化脂質の構造

図 2-14 に各プローブの構造を示した。Komura らは新規ガングリオシド蛍光プローブ創製のために、糖脂質各フラグメントに対する合成化学的アプローチを展開し、標識位置および標識に用いる蛍光団の種類について検討を行った¹⁵。蛍光標識を受けたガングリオシドは、その標識位置によって膜中での挙動に大きな影響を受ける。検討の結果、シアル酸カルボキシ基から離れた位置であるシアル酸 9 位のヒドロキシ基を置換した標識位置がもっともガングリオシド本来の挙動に影響を与えていた。また蛍光原子団としては親水性の高い ATTO488, ATTO594, fluorescein などを用いた場合に天然のガングリオシドと同等の界面活性剤不溶性および糖鎖抗原認識を受けた¹⁵。したがって、糖鎖の標識においてはその置換位置と親水性の高さが重要である。ATTO594 基の親水性は特に高く、その蛍光標識部位は水相中で拡散しやすい性質を有している。そのため ATTO594 標識を適切な位置に施したプローブ分子は膜脂質も含む対象分子の挙動に影響を与えにくく、生体分子本来のふるまいを高く反映するとして脂質研究における重要なプローブとなっている¹⁶⁻¹⁸。これらのプローブを用い、濃度依存的に増加する FRET について、アクセプターとなる各 ATTO594 標識脂質の効果を比較した。

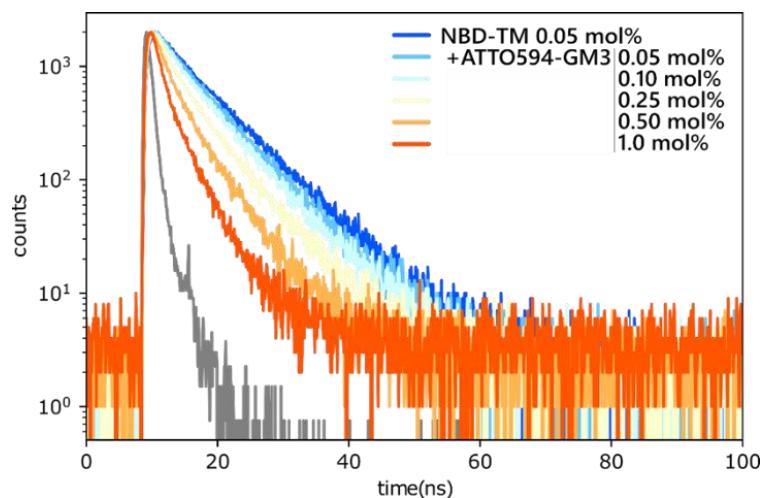


図 2-15. 時間分解測定を利用して得られる NBD の蛍光減衰曲線。DOPC 膜中で、NBD-TM(0.05 mol%)で固定し、ATTO594-GM3 の含有割合を増加させたときの NBD の蛍光減衰の結果。

時間分解測定を用いた FRET 解析では図 2-15 のような蛍光減衰曲線が得られる。アクセプターの濃度を変化させたサンプルを調製し測定を行うと、アクセプターの濃度が大きくなるにしたがって急激な減衰曲線の傾きが観測される。この傾きから以下の式で平均寿命(amplitude weighted average lifetime)を算出し、FRET 効率の計算に用了た。

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (1)$$

$$\langle \tau \rangle' = \frac{\sum_i A_i \tau_i}{\sum_i A_i} \quad (2)$$

$$E_{\text{app}} = 1 - \frac{\langle \tau_{\text{DA}} \rangle'}{\langle \tau_{\text{D}} \rangle'} = 1 - \frac{F}{F_0} \quad (3)$$

ここで、 A_i は減衰曲線を二成分フィッティングした際の振幅、 τ_i は成分ごとの蛍光寿命、 $\langle \tau_{\text{DA}} \rangle'$ はアクセプターを含むサンプルの平均寿命であり、 $\langle \tau_{\text{D}} \rangle'$ はアクセプターを含まないサンプルの平均寿命である。

図 2-16 に、DMPC 二重膜中 NBD-TM と、ATTO594 標識 GM3、GM1 および SM をそれぞれ 0 mol% ~ およそ 0.25 mol%まで組み込んだ場合の FRET 効率の推移を示した。また、膜中でランダムに分散するドナーとアクセプターの非特異的な近接によって生じる FRET の次式の計算結果を破線で合わせて示した¹⁴。

$$E_{\text{random}} = 1 - \exp(-1.21\pi R_0^2 [L]_0 / 100 / 60.6) \quad (4)$$

ここで R_0 は NBD と ATTO594 のフェルスター距離(48.8 Å), $[L]_0$ はアクセプター脂質のモル比(%), 60.6 は DMPC の脂質膜中の占有面積(Å²)である。

ATTO594-SM を用いた場合の結果と比較して、ATTO594-GM3, ATTO594-GM1 の FRET 効率は大きな値を示した。このことから、糖脂質プローブが受容体膜貫通ペプチドに対して親和性を有していることが示唆された。また、SM プローブの FRET 結果はランダム分散を仮定した場合の理論計算結果を示す曲線に近い値を示した。このことは、数あるラフト構成脂質の中でも GM3 がもっとも高い特異性を示す一方で、スフィンゴミエリンがバルク脂質としてふるまう性質であることを示唆している。

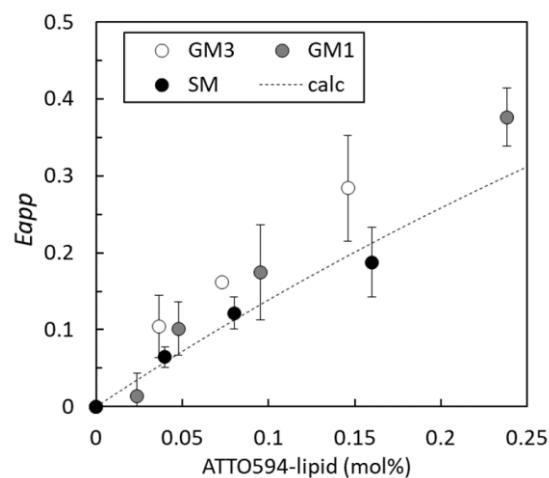


図 2-16 DMPC 二重膜中における NBD-TM と ATTO594-lipid 間の FRET 測定結果。丸印はそれぞれ、白が GM3、灰色が GM1、黒が SM をアクセプタープローブとして用いた際の FRET 測定の結果。誤差バーは標準誤差を示す。測定温度は 40 °C。破線はランダム分散を仮定した FRET の計算値を示す。

2-3-c 非標識 GM3 を 1:1 で併用した FRET 測定とランダム FRET 項の評価

前項 2-3-b で述べた通り、モデル膜中における FRET 測定の結果は、特定の相互作用をもたない分子間のランダムな接近による FRET の寄与を含んでいる¹⁹。前項において理論式から求めたこのランダムな寄与の項は、蛍光分子ペアのフェルスター距離、アクセプターの膜中濃度のみに依存するはずであるが、実際には蛍光分子の構造や純度、脂質二重膜調製の再現性などさまざまな誤差を反映する。したがって、ひとつの理論式を用いて実験系で生じる非特異的な FRET の寄与を見積もることは結果の信頼性低下につながる。そこで、非標識の GM3 を用いた実験を計画した。これまで用いていたアクセプターを、非標識 GM3 と標識 GM3 (ATTO594-GM3) を等物質量混合した条件に置き換えて膜試料を調製し、観測される FRET 効率における特異的な結合の寄与 (E_{bound}) とランダムに生じる近接の寄与 (E_{random}) を見積もる。これは、Chen らが TM ペプチドの二量化率測定において用いた手法であり、非標識体を含むサンプルと含まないサンプルの結果の比較から、信頼性の高い結合項を算出して二量化エネルギーを求めた²。測定結果 E_{app} は、結合状態のドナー・アクセプターによる FRET の寄与 E_{bound} と、ランダム分散しているドナー・アクセプターペアの FRET の寄与 E_{random} の和として表すことができる。

$$E_{\text{app}} = E_{\text{random}} + E_{\text{bound}} \quad (5)$$

本研究での測定は、表 2-2 のように各成分の濃度を設定した。非標識体を含まない試料には DOPC 膜中に NBD-TM を 0.05 mol% 混合し、FRET アクセプターとして ATTO594-GM3 の濃度を 0 から 0.23 mol% まで変化させた (sample A)。一方、非標識体を混合する試料では ATTO594-GM3 を半量にし、代わりに非標識 GM3 を標識体と等量混合した (sample B)。想定される結果は以下の通りである；GM3 の全体濃度は二つのサンプルの組で変わらないため、TM との結合比は変化しないことが予想される。TM と GM3 の 1:1 の結合を仮定すると、非標識体を混合した結果として得られる結合成分由来の FRET (E_{bound}) は GM3 のうち標識体が占める割合と等しい 50% の値となる。一方で、ランダムな近接に由来する FRET (E_{bound}) は、アクセプター濃度を 1/2 にした際の指數関数で表される理論式が適応するはずである。したがって、それらの和は単

純に 50% の値にならない。まとめると、共通の E_{bound} を用いて以下のような対応関係で表され、アクセプター濃度から求まるランダム項の妥当性を評価することができる。

$$E_{\text{app}}(1/2) = E'_{\text{random}} + 1/2E_{\text{bound}} \quad (6)$$

表 2-2 非標識体を用いた FRET 測定の脂質と標識体の濃度

sample A	1	2	3	4
DOPC	433	433	433	433
NBD-TM	0.25	0.25	0.25	0.25
ATTO594-GM3	0	0.25	0.5	1 (μM)
GM3 ratio	0	0.058	0.12	0.23 (mol%)

sample B	1	2	3	4
DOPC	433	433	433	433
NBD-TM	0.25	0.25	0.25	0.25
ATTO594-GM3	0	0.125	0.25	0.5
non-label GM3	0	0.125	0.25	0.5 (μM)
GM3/mol%	0	0.058	0.12	0.23 (mol%)

sample A には DOPC 中 0.05 mol% の NBD-TM と 0~0.23 mol% の ATTO594-GM3 を含む。sample B には DOPC 中 0.05 mol% の NBD-TM と, 0~0.115 mol% の ATTO594-GM3, 0~0.115 mol% の非標識 GM3 を含む。

FRET 効率の取得には時間分解蛍光測定を用いた。アクセプターを含まないサンプルの結果（図 2-17）とその他のサンプルの比から FRET 効率を算出し、GM3 濃度に對して値をプロットした。表から確認できることとして、サンプル B における結合による寄与 (E_{bound}) はサンプル A の 50% の値より大きく、非標識体を含んだ場合でも値に顕著な差がなかった。

sample A	1	2	3	4	(mol%)
ATTO594-GM3/mol%	0	0.058	0.115	0.230	
Eapp	0	0.132	0.243	0.359	
Erandom	0	0.075	0.144	0.267	
Ebound	0	0.057	0.099	0.092	

sample B	1	2	3	4	(mol%)
ATTO594-GM3/mol%	0	0.029	0.058	0.115	
Eapp	0	0.106	0.121	0.244	
Erandom	0	0.038	0.075	0.144	
Ebound	0	0.068	0.046	0.100	

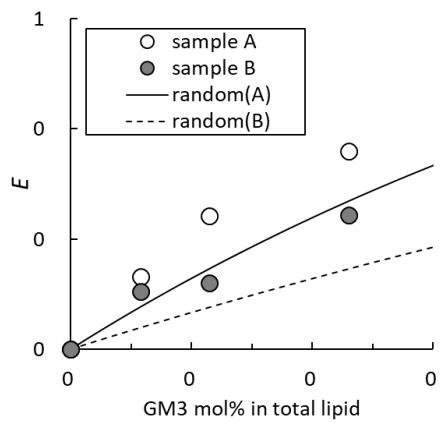


図 2-17 非標識 GM3 を用いた DOPC 膜中での FRET の比較. 結合による FRET の寄与 $E_{\text{bound}} = E_{\text{app}} - E_{\text{random}}$ を計算した. 図 2-16 FRET 効率の実験値 (E_{app}) とランダム分散時の FRET の理論計算値(E_{random})の比較. GM3 濃度に対してプロットした. 測定温度は 23 °C.

この結果から推測されることの一つは、計算による E_{random} が過小に算出されていることである. E_{random} が小さく見積もられてしまう原因として、標識体を用いた際の結合比が変化している可能性も考えられる. TM と GM3 の結合比が 1:1 とならない場合には、より複雑な結果が得られる²⁰. 特に TM に対して GM3 が二分子以上結合している場合、非標識体の結合への介入が FRET に影響しにくくなるため、得られる結果への寄与は小さくなる. また、標識体が非標識 GM3 に比べて結合しやすい性質を有している場合、非標識体を用いた sample B は ATTO594-GM3 と NBD-TM の結合に対して競合しにくく、FRET 効率は大きく観測される.

2-3-d 非標識脂質を用いた競合阻害実験

前項の非標識 GM3 を用いた実験の結果、DOPC 膜中において TM ペプチドと濃度を変えて組み込んだ標識 GM3 の間には複数の相互作用機構が関与している可能性が示された. このような実験上の誤差を最小限にとどめて比較を行う方法の一つとして、種々の糖脂質非標識体を用いた競合阻害実験の比較を行った。DOPC 二重膜に一定濃度の 0.05 mol% NBD-TM および 0.05 mol% ATTO594-GM3 を組み込み、さらに非標識 GM3, GM1, ラクトシルセラミド(LacCer)を ATTO594 標識 GM3 の 10 倍量(0.5 mol%)組み込んだ. その結果測定される FRET 効率にどのような変化が及ぶかを観測した. 結果を図 2-18 に示した.

非標識 GM3 の添加によって、NBD-TM の蛍光寿命がわずかに増加し、ATTO594-GM3 と NBD-TM 間の FRET が緩和されることが明らかとなった。また、GM1 の添加は逆に FRET を促進し蛍光寿命を短縮する傾向があった。一方で、LacCer による FRET の緩和効果も大きく観測された。このことから、NBD-TM との相互作用には、シアル酸の有無だけでなく、糖鎖の立体構造も影響を及ぼしうることが示唆される。しかしながらそれぞれの差異は統計的な有意差より小さく、本来の FRET の寄与が小さいために非標識体の影響の特異性に関して議論するには至らないと判断した。

非標識脂質を用いた二つの実験では DOPC 膜中 0.05mol% NBD-TM の濃度を用いたが、NBD-TM の会合や、糖脂質との結合量論に関して、より詳細な解析が必要であると考えられた。特に、TM ペプチドに関して膜中での二量化が容易に進行することが分かっており、より低濃度の測定条件を検討する必要性が示唆された²。

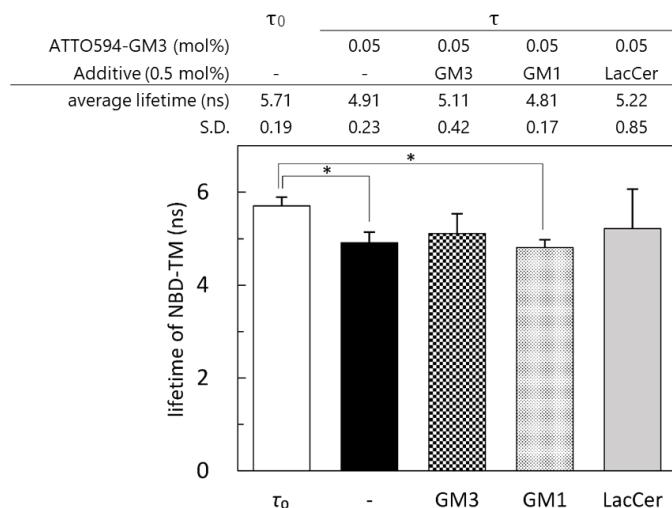


図 2-18 NBD-TM と ATTO594-GM3 間の FRET に対して、非標識脂質が及ぼす影響の比較。DOPC 二重膜中に NBD-TM の濃度を 0.05mol%，ATTO594-GM3 の濃度を 0.05mol%に固定し、0.5mol%の非標識 GM3，GM1，LacCer を含む膜試料をそれぞれ調製した。非標識脂質(GM3, GM1, LacCer)を含まない膜試料における NBD-TM の蛍光寿命と、非標識脂質を含む膜試料の蛍光寿命を比較した。測定温度は室温（23 °C）。*は有意な差 $p < 0.05$ を示す。

2-4 考察

2-4-1 ペプチド含有膜サンプル調製方法と膜中における構造評価

蛍光標識化 TM ペプチドは DOPC, DMPC からなるモデル二重膜に効率的に再構成された。このことから、TM ペプチドが安定に膜中に存在するためには、脂質炭素鎖長がペプチド疎水性部の長さに適合していることが重要であることを確認した。より膜厚の大きな膜中では、TM ペプチドが二重膜を貫通できず水溶液中の凝集が容易に進行する^{21,22}。また、膜に構成された場合でも二重膜厚さと疎水性部の長さの相違を低減するために多量化を生じる性質が報告されている²²。したがって、脂質炭素鎖長は TM ペプチドの膜への再構成プロセスだけでなく、膜中の配向や会合体形成にも寄与を及ぼすことが示唆される^{23,24}。脂質との相互作用を観測するためには適切な二重膜構成脂質を用いることが重要となる。今回、DMPC 膜および DOPC 膜中においてペプチドに対する CD 測定を行い、ヘリックス構造を含んでいることを確認した。Rigby らの報告によると、ヘリックス構造の形成はペプチドの膜への再構成の手法にも大きく依存する²⁵。フィルム水和法と透析法を用いて NMR 測定の結果を比較し、フィルム水和法が EGF 受容体膜貫通ペプチドの膜への再構成に適していることを示した²⁵。今回、フィルム水和法を用いて調製したペプチド含有膜サンプルの CD 測定の結果、ヘリックス構造が確認できたことから、調製方法が適切であることが示された。

一方で、CD 測定から得られる 208 nm, 222 nm の負のピーク強度はサンプル中に含まれるヘリックス量に依存する。得られた結果を定量的にとらえた場合、今回のペプチドにおいてヘリックス構造を形成する割合が先行研究の結果と比べて十分に大きくなかったことが示唆された。すなわち、サンプル中に含まれるペプチドのヘリックス構造に寄与する配列数を算出すると、大きい値でも 34 残基中約 55% にあたる 19 残基となった。これは uniprot に登録されたヘリックス構造に寄与する配列数(23 残基)には満たなかった。この理由として、膜へ再構成されずランダム構造を形成して水中で遊離している成分や、水中で凝集しているペプチド成分が存在していることが考えられる。特に CD 測定においては十分な装置感度を得るために高濃度のペプチドを使用した。水和濃度 5 μM、脂質に対する濃度比 0.5 mol% はともに蛍光測定における条件と比べて高濃度であり、膜に適切に挿入されない成分、水中で凝集する成分は必ず増加する。しかしながら、CD 測定においては、溶液中のベシクル濃度が上昇すると光の散乱が増加して CD 感度が低下するため、脂質濃度をさらに増加させペプチドの膜中

濃度を低く保つことに限界が生じた。そのため、サンプル調製法を改善するには至らなかった。

もう一つの懸念点として、今回用いた配列の特徴が挙げられる。本研究では、Orientations of Proteins in Membranes (OPM) database 等に掲載されている最も一般的な膜貫通配列 23 残基 (I646-M668) に加えて、N 末端に 8 残基、C 末端に 3 残基が付随した 34 残基の配列を使用した。N 末端配列は天然体のものを維持した一方で、C 末端配列は塩基性のアルギニンから中性のセリンへと変異した。これにより配列の疎水性は増加している。一方で、Rigby らは NMR による解析を用いた報告において、R671 までの配列がヘリックス構造を維持していることを示した²⁵。これは、膜貫通領域から数残基までは膜外・膜内領域にヘリックス構造が延長している可能性を示している。今回の配列において、C 末端は S668-S671 の 3 残基として変異されている。天然体配列と比較し疎水性が増加していることから膜中に保持されやすく、ヘリックス構造の形成も有利になると考えられる。しかしながら、C 末端の短い配列は M667 以降のアミノ酸が(*i*, *i*+4)残基間の水素結合による安定化を受けないため、ヘリックス形成において不利を生じる。実際に、今回の配列に対して hydropathy プロット²⁶による予測を行った場合には、F666 までのヘリックス構造が予測され、報告されているヘリックス配列よりも短いものとなった。しかしながら、本研究に用いた配列の膜中における二次構造と配向を精密に解析した例はなく、予測による疎水性の値と CD 測定の結果の相違に関して明確な説明はできていない。

また、膜貫通部位直上の親水性領域にはプロリンをはじめとするアミノ酸残基が含まれ、その機能によって末端部の脂質膜-水界面における局在性がコントロールされている。今回用いた配列の性質によっては、ペプチド N 末端部位が本来のタンパク質中と異なる局所配向をとっている可能性も考えられる。疎水性環境で働く静電相互作用は、周囲の誘電率に反比例し強く観測されるため、用いる配列によって作用が変化する可能性を考慮する必要がある。以上のようなことを踏まえ、ペプチドの膜中における挙動について慎重に議論を進める必要がある。

2-4-2 ペプチドの膜への挿入の確認と膜中における会合挙動

共焦点顕微鏡を用いた蛍光解析の結果から、TM ペプチドが膜に再構成され、脂質と同等の流動性を示すことが示唆された。また、TM ペプチドと GM3 は大きなクラスターを形成せず、通常の濃度では数分子単位で相互作用を行っている可能性が高いことが示された。FRAP 実験において TM ペプチドの濃度を 1 mol%まで上昇させる

と、NBD-TM が示すモデル膜の流動性が低下した。これは NBD-TM が会合体を形成し分子自身の拡散速度を低下させた可能性を示唆しているほか、膜全体の流動性にも寄与していると考えられる。一方で TM ペプチドが低濃度の場合はほとんどその性質に影響は見られなかった。時間分解測定を用いて NBD-TM の蛍光寿命を測定し GM3 濃度を上昇させた場合の結果からは、GM3 が大きなドメインを形成して膜の相状態に影響を与える様子は確認できなかった。一方で、GM3 を NBD-TM と同等の濃度添加した場合にわずかに NBD-TM の蛍光寿命が増加したことから、NBD-TM の会合状態に影響を与え、消光を解消していることが示唆された。

2-4-3 脂質膜中における FRET 測定に用いるフェルスター距離に関する検討

時間分解測定による FRET 解析では、蛍光標識化脂質をアクセプターとして用い、DMPC 膜中において NBD-TM と ATTO594-GM3 の親和性が他の脂質に比べて大きいことを確認した。しかしながらこの結果の解釈に際して、蛍光分子によって FRET の起こりやすさに差が生じている可能性を検討した。一般的に、FRET の起こりやすさは蛍光分子のペアに依存して決まっており、FRET 効率が 50%となる時の分子間距離の値としてフェルスター距離 R_0 を指標に用いる。今回用いた NBD と ATTO594 のフェルスター距離は計算によって 4.9 nm と求められた。これは理想的には各アクセプター標識脂質を用いた場合に共通の値であるが、標識脂質の構造、膜中濃度によっては実際の FRET の起こりやすさが変化する場合がある。まず、蛍光標識脂質の膜への再構成に安定性の違いが生じている場合、等濃度で混合したモデル膜中における蛍光標識脂質の最終濃度が異なっている可能性がある。これに関して、再構成後の脂質膜を再度有機溶媒で可溶化し、アクセプターの最大蛍光波長で強度を測定することでサンプル中のアクセプター標識脂質の最終濃度を定量することができる。その結果、モデル膜サンプルに含まれる蛍光標識脂質は混合濃度の上昇に従って直線的に増加した。すなわち、各蛍光標識脂質は今回の濃度範囲において安定的に膜に再構成され、最終濃度に大きな変化は生じていないと考えられた。

一方構造的な問題も想定される。例えば、TM ペプチドと脂質の結合状態において蛍光原子団の間の距離がプローブによって変化する場合、得られる FRET 効率の値は変化する。また、FRET は蛍光原子団の双極子相互作用に依存して生じ、これはフェルスター距離に影響を与える変数として次式中の κ で表される。

$$R_0 = 9.78 \times 10^3 (\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda))^{1/6} \text{ (Å)}$$

$$J(\lambda) = \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

κ は配向因子パラメーター, n は溶媒の屈折率, QD はドナーの量子収率, J_0 はドナーとアクセプターのスペクトルの重なり積分であり, ドナーの規格化蛍光スペクトルとアクセプターの吸光度スペクトルの積分で表される.

配向因子 κ は蛍光団の双極子モーメントの角度に対応して 0~2 まで変化する値である。蛍光原子団が等方的に配向していない場合, 計算によって求められるフェルスター距離は大きく変化する。一般的には, 蛍光プローブの修飾に柔軟な構造のリンカーを用いることで, 蛍光原子団の等方的な配向を想定すると, $\kappa^2 = 2/3$ という値を用いることができる。今回合成した TM ペプチドプローブにおいても, ポリエチレングリコールを介して蛍光と天然体を結合しているため, 蛍光原子団は等方的に拡散していると考えることができる。

一方でリンカ一部の構造および結合位置は各 ATTO594 標識脂質によって異なっており, 膜表面からの距離に差が生じている可能性が考えられた。柔軟な結合で構成される蛍光部の局所構造を決定することは容易ではないが, 平均距離を踏まえて FRET の起りやすさを想定することは可能であると考えられる。今後, 種々の蛍光プローブを用いて FRET を比較する際には, より精密な分子モデルの仮定と理論計算が必要とされる。

または, FRET ペアが膜中で均一に分散している状態の条件を設けて測定を行うことで, ランダムに近接するペアが示す実効のフェルスター距離(R_0')を設定することも可能である。このように実験値を比較対象として特異的な結合状態について議論を行う方法も広く用いられており, ひとつの解決策となると想定される。第 3 章における内容では, 相互作用を示さない分子としてホスファチジルエタノールアミン(PE)の頭部が NBD で標識された NBD-PE を用い, FRET 実験のコントロールとした。

続いて, ランダム近接の寄与を正確に見積もるために行った非標識 GM3 を混合した実験は複雑な結果を与えた。実験結果は 1:1 の相互作用を仮定して予測された値よりも大きくなかった。この結果から, 計算によってもとめたランダム分散時の FRET の寄与 (E_{random}) が過小に計算されていることが示唆された。考えられる原因のひとつとして, 上で示したようなフェルスター距離 R_0 の計算値と実験値に差異が生じていることも挙げられる。計算によって求められたフェルスター距離と比較して, 実際の系において, より FRET が起きやすい状態になっている場合, 得られる FRET 効率は理論曲線より極端に大きな値となりうる。この場合, FRET ペアがランダム分散するモデル膜条件を適切に設定し, 実効フェルスター距離 (R_0') を算出することが必

要となる可能性が生じる。加えて、DOPC 膜中 0.05 mol% の NBD-TM を用いた場合に NBD-TM と GM3 の結合量論が 1:1 でない可能性も想定される。特に TM ペプチドに対して GM3 が複数結合する場合には、非標識体の混合比が大きい場合でも FRET の結果への寄与は混合比から計算される推測値よりも小さく観測される。

TM ペプチドが単量体－多量体間の平衡状態にある場合には機構はさらに複雑になる。Chen らは DLPC 膜中 0.05 mol% の EGFR-TM が二量体を形成することを報告しており²、今回用いた条件においても主に二量化状態のペプチドの振る舞いを観測している可能性が考えられる。例えば図 2-13において、0.05 mol% NBD-TM を DMPC 膜に組み込み 40 °C における時間分解測定を行った場合、2 mol% の非標識 GM3 添加によって約 6% 蛍光寿命が減少した。これは、DMPC 膜中の NBD-TM の二量体形成を GM3 が解消したことを示唆している。このような条件においては、FRET 測定によって観測するドナー蛍光寿命の減少率と会合解消の寄与が相反し、見かけの FRET 効率は小さく観測される。このことが原因となり、NBD-TM と ATTO594-GM3 の間に生じる FRET に関して明確な特異性を観測できなかったとも考えられる。一方で、NBD-TM の濃度をさらに低下させることは、感度の十分に高くない時間分解測定において測定時間がさらに延長することを示しており、S/N 比の悪化や二重膜サンプルの凝集など望まない影響が及ぶ可能性も考えられる。以上のような理由で、時間分解測定における最適な条件を決定するには至らなかった。

2-4-4 FRET 測定の定量・定性比較に向けた適切な実験デザインの検討

当初時間分解測定による解析を検討した際に期待したのは、減衰曲線の多成分解析によって NBD-TM における ATTO594-GM3 との結合成分・非結合成分を分離することであった。しかしながらこれは達成できなかった。蛍光寿命測定によって得られる光子数ヒストグラムは 2 成分または 3 成分の時定数－振幅の組を用いて行った指数関数フィッティングがもっともよい χ^2 値を与えたが、アクセプター濃度の上昇に従って蛍光寿命の各成分は同程度の割合で変化した。したがって、ヒストグラムの指数関数フィッティングにおいて設定した 2 組または 3 組の寿命成分を結合・非結合状態に分離することはできず、得られる複数の寿命成分は、NBD-TM における複数の状態と正確に対応しているわけではないことが示された。過去の例を参照しても、膜中における蛍光分子の結合－非結合の曖昧な環境の変化を蛍光寿命の多成分解析の結果と精密に対応させることは難しく、今回の結果も同様であった。

続く非標識脂質を用いた実験では、GM3との比較として糖脂質GM1, LacCerを競合脂質として過剰量膜に組み込んだ場合、GM3とLacCerがわずかにNBD-TMとATTO594-GM3のFRET効率を減弱したのに対し、GM1は促進する効果を示したが、有意な差異を観測するには至らなかった。したがって、0.5 mol%の糖脂質を用いた場合、GM3による特異的な作用は確認できず、またGM1などが関与した場合には結合を誘起する周辺脂質環境を形成している可能性も示された。

今回の実験に用いたのは対称モデル膜であり、脂質およびペプチドのモデル膜中における膜内外のオリエンテーションは制御されていない。したがって、実際の細胞条件下では起こりうることのないペプチド間の逆並行会合や、ペプチドC末端とGM3の間の作用について考慮する必要が生じる。EGF受容体の膜貫通部位に関しては、配列に含まれるGXXXGモチーフによって並行二量体が有利に形成されることが想定され、多くの先行研究においてもペプチドのオリエンテーションは考慮されず、対称モデル膜による実験が行われてきた。しかしながら、逆並行二量体の存在が否定できるわけではなく、膜中において一定の割合で形成されていることが予想される。しかしながら本研究においては、ペプチドとGM3の相互作用評価をペプチド濃度が十分に低い条件において検討する場合、ペプチドが形成する二つの二量体状態がGM3との作用に対して大きな影響を及ぼすことはないと想定している。

また、GM3とペプチドC末端部との作用は、ペプチドC末端に存在するアルギニン残基を変異していることから大きく観測されることはない想定している。作用が生じた場合であっても、ペプチドN末端部に標識した蛍光原子団とGM3頭部に標識した蛍光原子団との距離は二重膜を挟んだ長距離となるため、大きな影響を与えることはないと考える。実際に用いたNBDとATTO594のフェルスター距離は約49 nmであり、ペプチドに結合したリンカーの長さとGM3頭部の大きさ、PC二重膜の厚さを考慮すると、蛍光原子団間の距離はフェルスター距離と同程度か、それよりも大きくなる。したがってそのような状態のFRETドナーがエネルギー移動を生じる確率は非常に小さいと考える。

以上のような種々の考察から、TMペプチドや脂質の会合状態を詳細に確認することが分子間相互作用を解明する際の前提として依然必要であることが示された。同時に、会合状態の変化には種々の脂質が異なる様式で作用を行っており、生体膜環境における膜タンパク質の制御においても重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

2-5 参考文献

- (1) Bocharov, E. V.; Lesovoy, D. M.; Pavlov, K. V.; Pustovalova, Y. E.; Bocharova, O. V.; Arseniev, A. S. Alternative Packing of EGFR Transmembrane Domain Suggests That Protein-Lipid Interactions Underlie Signal Conduction across Membrane. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2016**, 1858 (6), 1254–1261. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.02.023>.
- (2) Chen, L.; Merzlyakov, M.; Cohen, T.; Shai, Y.; Hristova, K. Energetics of ErbB1 Transmembrane Domain Dimerization in Lipid Bilayers. *Biophys. J.* **2009**, 96 (11), 4622–4630. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.03.004>.
- (3) Sato, T.; Pallavi, P.; Golebiewska, U.; McLaughlin, S.; Smith, S. O. Structure of the Membrane Reconstituted Transmembrane-Juxtamembrane Peptide EGFR(622-660) and Its Interaction with Ca²⁺/Calmodulin. *Biochemistry* **2006**, 45 (42), 12704–12714. <https://doi.org/10.1021/bi061264m>.
- (4) Pathak, P.; London, E. The Effect of Membrane Lipid Composition on the Formation of Lipid Ultranodomains. *Biophys. J.* **2015**, 109 (8), 1630–1638. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.08.029>.
- (5) Gupta, A.; Korte, T.; Herrmann, A.; Wohland, T. Plasma Membrane Asymmetry of Lipid Organization: Fluorescence Lifetime Microscopy and Correlation Spectroscopy Analysis. *J. Lipid Res.* **2020**, 61 (2), 252–266. <https://doi.org/10.1194/jlr.D119000364>.
- (6) Amaro, M.; Filipe, H. A. L.; Prates Ramalho, J. P.; Hof, M.; Loura, L. M. S. Fluorescence of Nitrobenzoxadiazole (NBD)-Labeled Lipids in Model Membranes Is Connected Not to Lipid Mobility but to Probe Location. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, 18 (10), 7042–7054. <https://doi.org/10.1039/c5cp05238f>.
- (7) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 3rd Edition; Springer, New York,; 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- (8) Bollhagen, R.; Schmiedberger, M.; Grell, E. High-Performance Liquid Chromatographic Purification of Extremely Hydrophobic Peptides: Transmembrane Segments. *J. Chromatogr. A* **1995**, 711 (1), 181–186. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00056-S](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00056-S).
- (9) Hara, T.; Huang, Y.; Ito, A.; Kawakami, T.; Hojo, H.; Murata, M. Trifluoroethanol-Containing RP-HPLC Mobile Phases for the Separation of Transmembrane Peptides Human Glycophorin-A, Integrin Alpha-1, and P24: Analysis and Prevention of Potential Side Reactions Due to Formic Acid. *J. Pept. Sci.* **2015**, 21 (2), 61–70. <https://doi.org/10.1002/psc.2717>.
- (10) Sato, T.; Kawakami, T.; Akaji, K.; Konishi, H.; Mochizuki, K.; Fujiwara, T.; Akutsu, H.; Aimoto, S. Synthesis of a Membrane Protein with Two Transmembrane Regions. *J. Pept. Sci.* **2002**, 8 (4), 172–180. <https://doi.org/10.1002/psc.381>.
- (11) Reed, J.; Reed, T. A. A Set of Constructed Type Spectra for the Practical Estimation of Peptide Secondary Structure from Circular Dichroism. *Anal. Biochem.* **1997**, 254 (1), 36–40. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2355>.
- (12) Nagle, J. F.; Tristram-Nagle, S. Structure of Lipid Bilayers. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **2000**, 1469 (3), 159–195. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00016-2).

- (13) Lira, R. B.; Steinkühler, J.; Knorr, R. L.; Dimova, R.; Riske, K. A. Posing for a Picture: Vesicle Immobilization in Agarose Gel. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (April), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep25254>.
- (14) London, E.; Chattopadhyay, A. Parallax Method for Direct Measurement of Membrane Penetration Depth Utilizing Fluorescence Quenching by Spin-Labeled Phospholipids. *Biochemistry* **1987**, *26* (1), 39–45. <https://doi.org/10.1021/bi00375a006>.
- (15) Komura, N.; Suzuki, K. G. N.; Ando, H.; Konishi, M.; Koikeda, M.; Imamura, A.; Chadda, R.; Fujiwara, T. K.; Tsuboi, H.; Sheng, R.; et al. Raft-Based Interactions of Gangliosides with a GPI-Anchored Receptor. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12* (6), 402–410. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2059>.
- (16) Kinoshita, M.; Suzuki, K. G. N.; Matsumori, N.; Takada, M.; Ano, H.; Morigaki, K.; Abe, M.; Makino, A.; Kobayashi, T.; Hirosawa, K. M.; et al. Raft-Based Sphingomyelin Interactions Revealed by New Fluorescent Sphingomyelin Analogs. *J. Cell Biol.* **2017**, *216* (4), 1183–1204. <https://doi.org/10.1083/jcb.201607086>.
- (17) Suzuki, K. G. N.; Ando, H.; Komura, N.; Konishi, M.; Imamura, A.; Ishida, H.; Kiso, M.; Fujiwara, T. K.; Kusumi, A. *Revealing the Raft Domain Organization in the Plasma Membrane by Single-Molecule Imaging of Fluorescent Ganglioside Analogs*, 1st ed.; Elsevier Inc., 2018; Vol. 598. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.06.038>.
- (18) Suzuki, K. G. N.; Ando, H.; Komura, N.; Fujiwara, T. K.; Kiso, M.; Kusumi, A. Development of New Ganglioside Probes and Unraveling of Raft Domain Structure by Single-Molecule Imaging. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2017**, *1861* (10), 2494–2506. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.07.012>.
- (19) Loura, L. M. S.; Prieto, M.; Fernandes, F. Quantification of Protein-Lipid Selectivity Using FRET. *Eur. Biophys. J.* **2010**, *39* (4), 565–578. <https://doi.org/10.1007/s00249-009-0532-z>.
- (20) Yamashita, H.; Yano, Y.; Kawano, K.; Matsuzaki, K. Oligomerization-Function Relationship of EGFR on Living Cells Detected by the Coiled-Coil Labeling and FRET Microscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2015**, *1848* (6), 1359–1366. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.03.004>.
- (21) Yano, Y.; Yamamoto, A.; Ogura, M.; Matsuzaki, K. Thermodynamics of Insertion and Self-Association of a Transmembrane Helix: A Lipophobic Interaction by Phosphatidylethanolamine. *Biochemistry* **2011**, *50* (32), 6806–6814. <https://doi.org/10.1021/bi200560c>.
- (22) Killian, J. A.; Nyholm, T. K. Peptides in Lipid Bilayers: The Power of Simple Models. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16* (4), 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.06.007>.
- (23) Anbazhagan, V.; Schneider, D. The Membrane Environment Modulates Self-Association of the Human GpA TM Domain-Implications for Membrane Protein Folding and Transmembrane Signaling. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2010**, *1798* (10), 1899–1907. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.06.027>.
- (24) Muhle-Goll, C.; Hoffmann, S.; Afonin, S.; Grage, S. L.; Polyansky, A. A.; Windisch, D.; Zeitler, M.; Bürck, J.; Ulrich, A. S. Hydrophobic Matching Controls the Tilt and Stability of the Dimeric Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR) α Transmembrane Segment. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (31), 26178–26186. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.325555>.

- (25) Rigby, A. C.; Grant, C. W. m.; Shaw, G. S. Solution and Solid State Conformation of the Human EGF Receptor Transmembrane Region. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1998**. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(98\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(98)00020-0).
- (26) Kyte, J.; Doolittle, R. F. A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* **1982**. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0).

第3章 本論2：ガングリオシドGM3とEGF受容体膜貫通領域の相互作用の定量解析

3-1 萤光自己消光によるペプチド会合体の観測とGM3による影響の評価

3-1-a 序

過去の研究において報告されているとおり、EGF受容体の活性化過程において二量体の形成は非常に重要なステップである¹。第2章では、受容体膜貫通領域の脂質膜再構成とその後の膜中における挙動に対して、二重膜を構成する脂質が及ぼす影響について確認を行った。膜貫通ペプチドはその疎水性部の長さに対応した厚さの二重膜によく分配し、均一に分散する性質を示した。GM3を含む膜に再構成した場合でもその性質は変化しなかった。我々はこのような均一膜において膜貫通ペプチドとGM3が一分子単位で周辺環境を認識し、相互作用を行っている可能性に着目した。構成する脂質の種類や測定温度に影響を受けてそれぞれ異なる性質を示す脂質二重膜は、膜貫通ペプチドの配向を制御する。その配向に対応して発現するGM3との相互作用を、均一二重膜中で再現することが可能であると考えた。均一二重膜中における膜貫通ペプチドの二量体形成に対してGM3が及ぼす影響を明らかにするため、合成した蛍光標識化EGF受容体膜貫通領域(NBD-TM)の二量体形成を脂質膜中で観測することを試みた。

3-1-b 萤光自己消光を用いた会合体形成の定量解析

脂質二重膜のベースとなる脂質分子としてDMPCおよびDOPCを選択した。この選択にあたり、各脂質二重膜の疎水性領域の厚さと、NBD-TMのヘリックス長の対応を考慮した。先行研究より、DMPC、DOPC二重膜における炭化水素鎖の厚さはそれぞれ26.2 Å、27.1 Åであり、EGF受容体膜貫通ヘリックスの長さはおよそ32~34 Åと報告されている^{2,3}。前章の結果から、両脂質ともに高い効率でNBD-TM膜に保持する性質を有していることが明らかになった。

NBD-TM会合体の自己消光の観測にあたって、膜貫通ペプチドの膜中濃度は0.005 mol%~0.5 mol%に保ってモデル膜への再構成を行った。なお、種々の検討の結果、さらに高濃度では、疎水性の高い膜貫通ペプチドが適切に膜に挿入されない成分が増加し、実験の再現性が乏しい事が判明した。測定後も変性・凝集せず膜に保持されているペプチドの最終濃度を厳密に算出するために、測定に用いた各サンプルをエタノー

ル溶液で可溶化し蛍光強度を測定した。この強度と脂質膜中の蛍光強度との比をとることで単位濃度あたりの蛍光強度を算出して比較した。濃度依存的な膜挿入成分の減少は、消光実験とは独立して行った可溶化実験においても確認された。

DOPC 二重膜に NBD-TM を異なる濃度で組み込んだ場合の蛍光強度を図 3-1 に示す。エタノール中でのペプチドの蛍光強度を基に単位濃度あたりで規格化された蛍光は、0.05 mol% で NBD-TM を組み込んだ場合、より低濃度の 0.005 mol% で NBD-TM を組み込んだ場合と比べて低く観測された。これは、NBD-TM が高濃度で膜中に存在する場合、二量化したペプチド成分が増加するため自己消光が高い効率で起こったためである。さらに、温度を 5°C から 55°C まで変化させて測定を行った場合、温度上昇に従って蛍光分子の無輻射失活の割合の上昇するため蛍光強度が温度上昇に従って一定の割合で減少した。その一方で、二量体成分の割合の変化を示すような傾きの変化は観測されなかった。

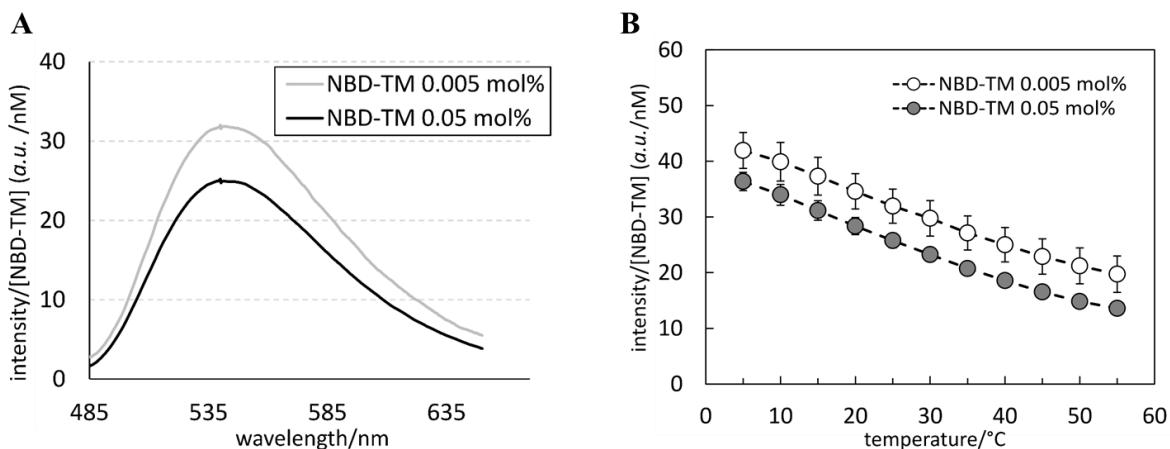


図 3-1 DOPC 膜における NBD-TM の蛍光スペクトル。A; 灰色 ; NBD-TM 0.005 mol%, 黒色 ; NBD-TM 0.05 mol%。励起波長は 450 nm。測定温度は 40 °C。B ; 541 nm における NBD-TM の蛍光強度。測定温度は 5 °C~55 °C。

一方で、より膜厚の小さな DMPC からなる二重膜中では、ペプチドの濃度の違いによって大きな強度の差は観測されなかったが、相転移温度前後の強度に明らかな変化が観測された。特に、より濃度の高い 0.05 mol% NBD-TM の条件では、相転移温度以下のゲル相状態下において、蛍光強度が小さくなる現象を示した。これは、脂質アシル鎖の配座が整列し密にパッキングした状態にあるゲル相からペプチドが追い出され濃縮されることで、二量体が形成されやすい環境を作っているためであると考えられる。

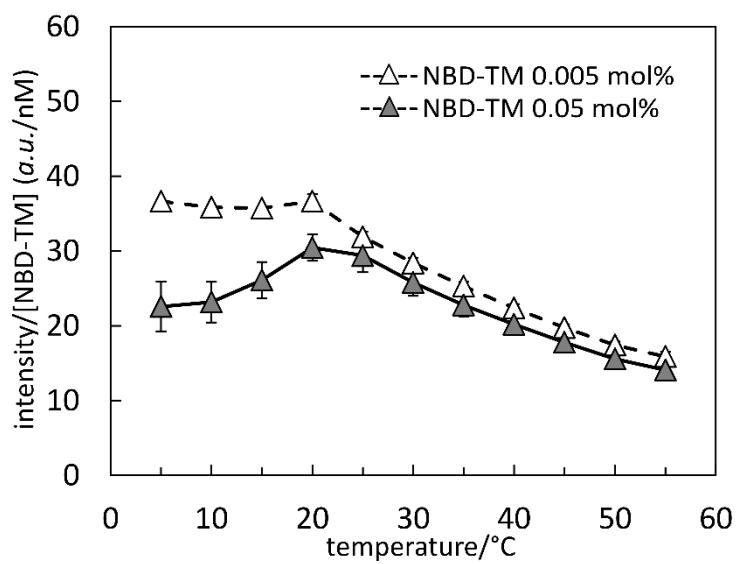


図 3-2 DMPC 膜における NBD-TM の蛍光スペクトル. 灰色 ; NBD-TM 0.005 mol%, 黒色 ; NBD-TM 0.05 mol%. 励起波長は 450 nm. 測定温度は 40°C. B ; 541 nm における NBD-TM の蛍光強度. 測定温度は 5 °C~55 °C.

3-2 FRET を用いた蛍光標識ペプチド-GM3 間の相互作用解析

3-2-a 序

脂質二重膜の性質に応じて NBD-TM の二量化状態が変化することが確認できた。また、種々の実験の結果、TM ペプチドと GM3 は膜中で大きなドメインを形成せず、膜全体の流動性にも影響を与えないことを確認した。そこで、続いて GM3 との直接的な相互作用に関する検討を行った。自己消光実験では、二重膜に GM3 を組み込んだ場合の NBD-TM 由来蛍光強度を観測し、含まない場合の結果と比較した。また、EGF 受容体膜貫通領域の直接的な結合状態を観測するため、フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) 測定を行った。アクセプターとして、ATTO594 標識 GM3 プローブ (ATTO594-GM3) を用い、それを膜に組み込むことで、ドナーである NBD-TM の蛍光強度の減少率から FRET 効率を求めた。脂質膜中の蛍光プローブ同士の非特異的な接近に由来する FRET の寄与を見積もるために、GM3 と相互作用を示さない NBD 標識プローブとして NBD 標識化 DPPE (NBD-PE) を用い、結果を比較した^{4,5}。

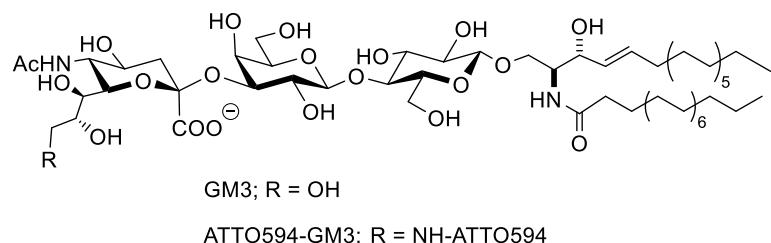


図 3-3 ATTO594-GM3 の構造.

3-2-b ペプチドの二量化に対する GM3 添加の影響

まず、自己消光実験の条件を利用して、GM3 を含有する二重膜にペプチドを組み込んだ場合の二量体構造への影響を確認した。NBD-TM の濃度を変化させ、GM3 を脂質に対して 5 mol% 含有するリポソームを調製して蛍光測定をおこなった。

DOPC 膜中では NBD-TM が 0.05 mol% 以下の低濃度の場合、5 mol% の GM3 の添加によって有意に蛍光強度が回復した。このことから、GM3 には NBD-TM の脱会合を

促進する働きがあると示唆された。一方で、NBD-TM を 0.1 mol% 以上の高濃度に調製した場合には、GM3 の添加は NBD の蛍光強度に大きく影響を与えたかった(図 3-4A)。

ペプチドの膜中濃度上昇に従って二量体の割合が増加するモデルを用いて、Chen らは単量体一二量体からなる会合平衡を定量計算する手法を報告している⁶。この方法に基づき各ペプチド最終濃度における二量体の割合を算出した(図 3-4B)。NBD-TM 0.05 mol% における二量体率の計算値は、GM3 の添加によって約 30% から 20% まで減少した。一方で、ペプチドが高濃度の場合では GM3 添加時の変化が観測されなかつたのは、二量体の割合や会合構造が濃度変化に対応して一定ではないことを示唆しており、疎水性ペプチドの膜中の複雑な挙動が生じていることを示す。

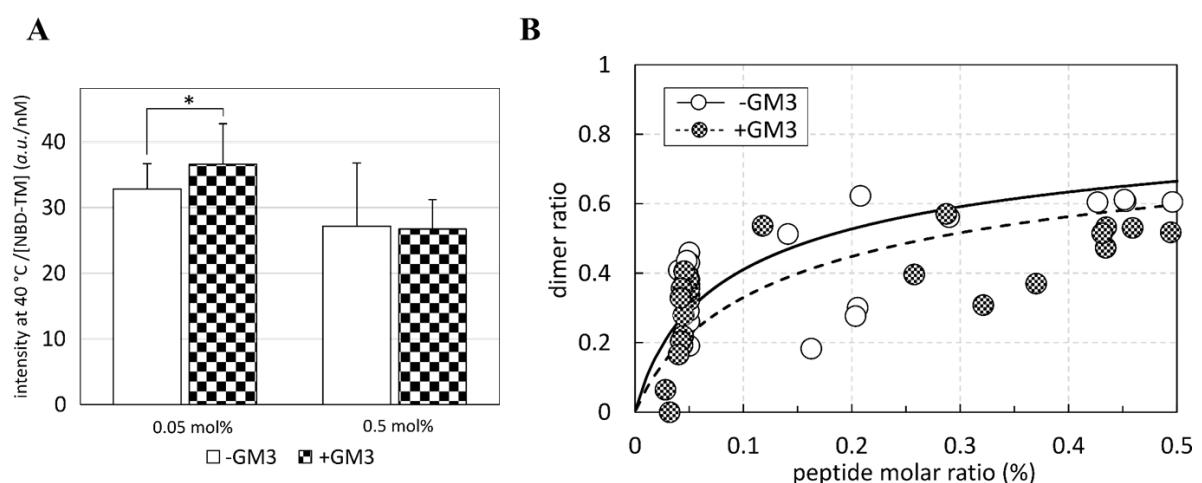


図 3-4 A ; DOPC 二重膜中における NBD-TM の平均蛍光強度。NBD-TM はそれぞれ(左)0.05 mol%，(右)0.5 mol% で脂質と混合した。白抜きは GM3 を含まない二重膜、白黒のタイルで塗られたものは GM3 を 5 mol% 含む二重膜の結果。*は顕著な差 p 値 < 0.05 を示す。B ; NBD-TM の二量化率計算の結果。横軸は膜中のペプチドの最終濃度。丸印は実験結果。最小二乗法で理論曲線を求め、曲線で示した。白抜きの丸および黒の実線が GM3 を含まないサンプルの結果、黒丸および黒色の曲線が GM3 を 5 mol% 含むサンプルの結果。

DOPC 膜において、ペプチド濃度の違いによって二量体の割合が変化した一方で、GM3 による寄与は低濃度条件においてのみ観測された。同様の手法で DMPC 膜における GM3 添加の影響を評価した(図 3-5)。DMPC 中において、白抜きの棒グラフで示される通り、ペプチドを高濃度で組み込んだ場合に蛍光強度が顕著に減少し、濃度上昇に依存して二量体の割合が増加していることが示された。また、チェックの棒グラフから、GM3 は DMPC 中に高濃度で組み込んだペプチドに対しても効

果を示すことが明らかになった。これは、ペプチドの会合モードが DMPC 膜中においてより配列依存的であることを示している。膜厚の大きな DOPC 膜中でペプチドはより直立した構造をとりやすく、配列特異的な二量体成分が減少し、疎水性相互作用による多量化が進行する⁷⁻¹⁰。このような会合成分は GM3 による寄与を妨げる。結果的に、GM3 が相互作用および脱会合機能を発揮するのは、ペプチドが炭化水素鎖の薄い膜環境で単量体または配列特異的な二量体を形成している場合に限られるということが示唆された。

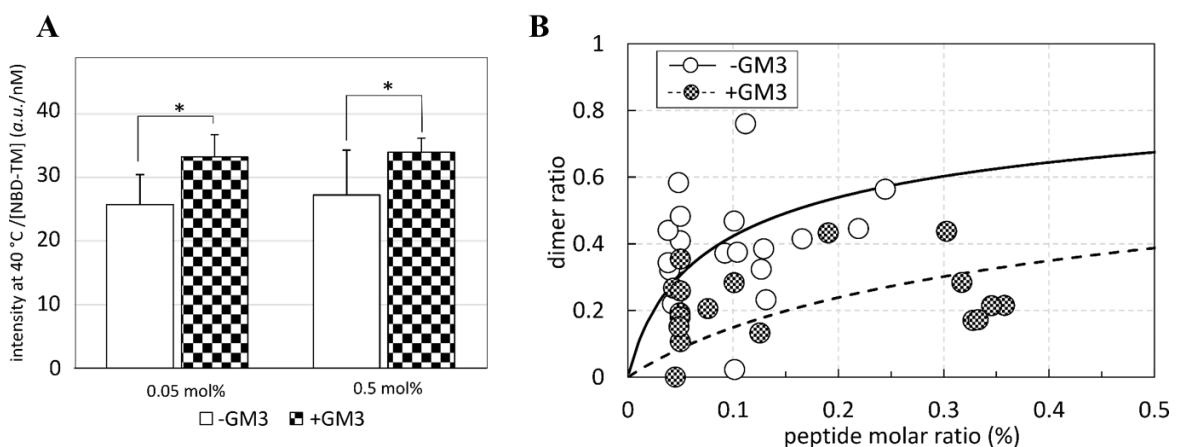


図 3-5 A ; DMPC 二重膜中における NBD-TM の平均蛍光強度。NBD-TM はそれぞれ(左)0.05 mol%, (右)0.5 mol%で脂質と混合した。白抜きは GM3 を含まない二重膜、白黒のタイルで塗られたものは GM3 を 5 mol% 含む二重膜の結果。*は顕著な差 p 値 < 0.05 を示す。B ; NBD-TM の二量化率計算の結果。横軸は膜中のペプチドの最終濃度。丸印は実験結果。最小二乗法で理論曲線を求め、曲線で示した。白抜きの丸および黒の実線が GM3 を含まないサンプルの結果、黒丸および黒色の曲線が GM3 を 5 mol% 含むサンプルの結果。

3-2-c 定常蛍光スペクトルによる FRET の観測

図 3-6 に、NBD-TM と ATTO594-GM3 の間のアクセプター濃度依存的な FRET によるスペクトル形状の変化を示した。蛍光標識 GM3 濃度が上昇するにしたがって、FRET ドナーである NBD-TM 由来の 530 nm 付近のピーク強度が減少している。また、ドナーとして、特異的な結合を示さないと考えられる NBD-PE を用いた場合で

もスペクトルは同様の変化を示し、FRET のうちプローブの非特異的な近接による寄与が大きな割合を占めていることを示している。NBD-PE の構造を図 3-7 に示した。

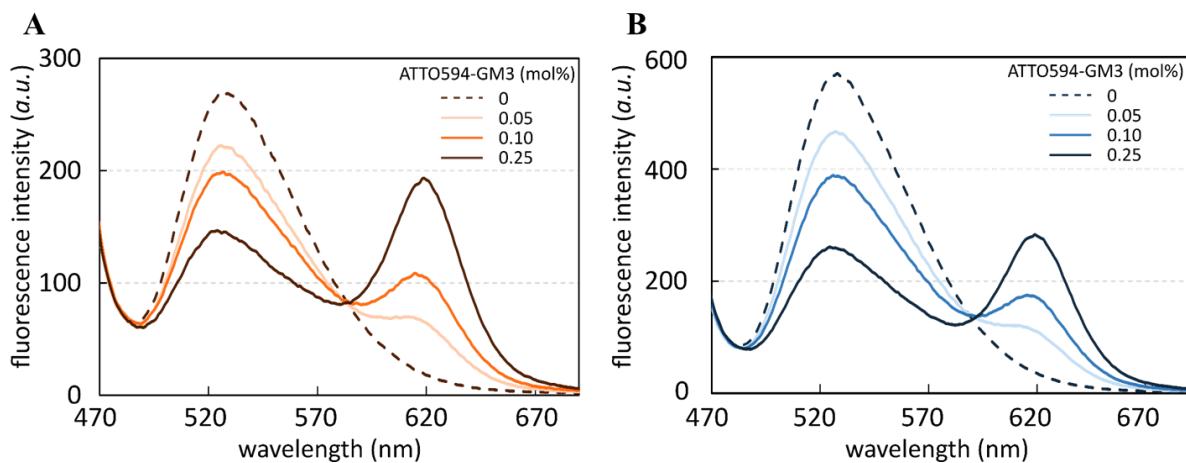


図 3-6 FRET アクセプターとして ATTO594-GM3 を用いた場合の NBD-TM (A)と NBD-PE (B)の蛍光スペクトル。DOPC 二重膜中、ATTO594-GM3 の濃度は 0 mol%から 0.25 mol%まで変化させた。励起波長は 450 nm、測定温度は 23 °C。

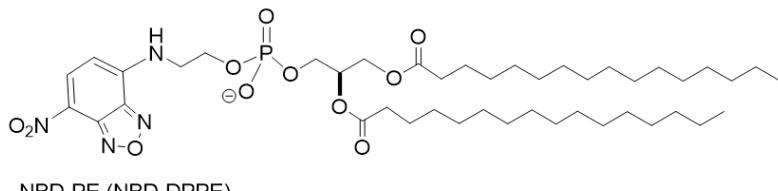


図 3-7 NBD-PE(NBD-DPPE)の構造

3-2-d ペプチド-脂質間作用におけるバルク脂質の影響

EGF 受容体膜貫通ペプチドと GM3 の特異的な相互作用の寄与を見積もるため、温度を変化させながら FRET を測定し、結合の熱力学安定性を観測することを試みた。すなわち、温度変化に対して、FRET 効率をプロットすることで、FRET を生じている分子間の結合モードや安定性のパラメーターを予測することができる。ATTO594-GM3 の濃度を 0.1 mol% で一定に保ち、異なるドナーの濃度 0.005 mol% と 0.05 mol% を検討することで、膜貫通ペプチドが膜中において GM3 と作用を生じる条件の最適化を試みた。

図 3-8 に温度変化に対して FRET 効率をプロットした結果を示した。スペクトル比較の結果でも示された通り、ドナーを 0.05 mol% 含むサンプルの場合は、NBD-TM と NBD-PE の結果に顕著な差は観測されず、特異的な相互作用に由来する成分を算出することは困難であった。一方で、ドナーを 0.005 mol% とした場合には、温度上昇に伴って NBD-TM と ATTO594-GM3 の FRET が上昇していく様子が観測され、これは NBD-PE を用いたサンプルでは観測されなかつた。この結果から、NBD-TM を 0.005 mol% 含む DOPC 二重膜では、温度上昇に従って膜貫通ペプチドと GM3 の相互作用が増加していることが示唆された。

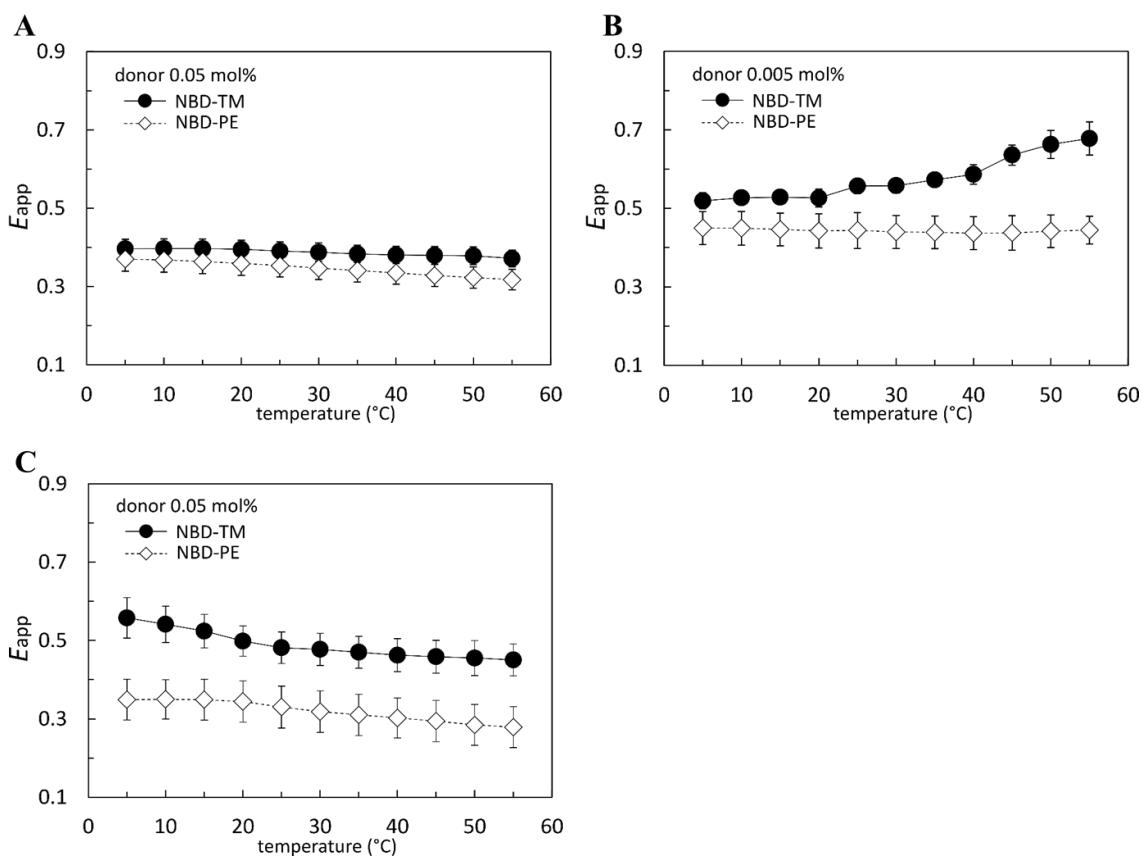


図 3-8 温度変化に対する NBD プローブと ATTO594 標識 GM3 間の見かけの FRET 効率の変化。A；ドナーを 0.05 mol% 含む DOPC 二重膜中での結果。B；ドナーを 0.005 mol% 含む DOPC 二重膜中での結果。C；ドナーを 0.05 mol% 含む DMPC 二重膜中での結果。灰色の丸印がドナーとして NBD-TM を用いた時の結果、白抜きのダイヤ印が NBD-PE を用いた時の結果。励起波長は 450 nm で、NBD 由来の 541 nm の蛍光強度から FRET 効率を求めた。測定温度は 5°C~55°C。

DOPC 中では NBD-TM と NBD-PE の FRET の差がほとんど観測できなかった一方で、 DMPC 中では一貫して NBD-TM が大きな FRET 効率を示した。特に、 DMPC 中では相転移温度前後の顕著な傾きの変化が観測されている。相転移温度以下では、 NBD-TM と GM3 がともに DMPC のゲルドメインから追い出され、濃縮されることで高い FRET 効率を示している。一方で、 NBD-PE は一部がゲル相にも分配するため、 FRET 効率の値は相対的に小さくなる。相転移温度以上においても NBD-TM は NBD-PE の生じる FRET よりも大きな値を示すが、 Ld 条件下における FRET に対する温度変化の影響に大きな違いは見られなかった。

得られた結果について、結合状態の NBD-TM-ATTO594-GM3 成分を見積もるために定式化を行った。実験によって得られた見かけの FRET 効率は、膜中でランダムに分散する蛍光分子ペアの非特異的な接近に由来する FRET (E_{random}) と、結合状態の分子ペアが生じる FRET (E_{bound}) に区別される。これら二つの寄与の和が見かけの FRET 効率 (E_{app}) に相当すると考えると、以下の式が成り立つ。

$$E_{\text{app}} = E_{\text{random}} + E_{\text{bound}} \quad (7)$$

ここで、 E_{random} は NBD-PE を FRET ドナーとして得られた FRET 効率の値を用いる。さらに、ペプチド-GM3 間の 1:1 の相互作用を仮定すると、その平衡定数は以下のように表される。

$$K = \frac{E_{\text{bound}}}{(1 - E_{\text{bound}})([A]_0 - [D]_0 E_{\text{bound}})} \quad (8)$$

ここで、 $[A]_0$ と $[D]_0$ はそれぞれ FRET アクセプターとドナーの初期濃度(モル比%)である。得られた結合定数を用いて縦軸に $\ln K$ 、横軸に温度の逆数をとった van't Hoff プロットを実行すると、この傾きが結合のエンタルピー、y 切片がエントロピーに対応する。また、これら二つのパラメーターから分子の均一分散を標準状態とする結合標準ギブズ自由エネルギー ΔG を算出することができる。

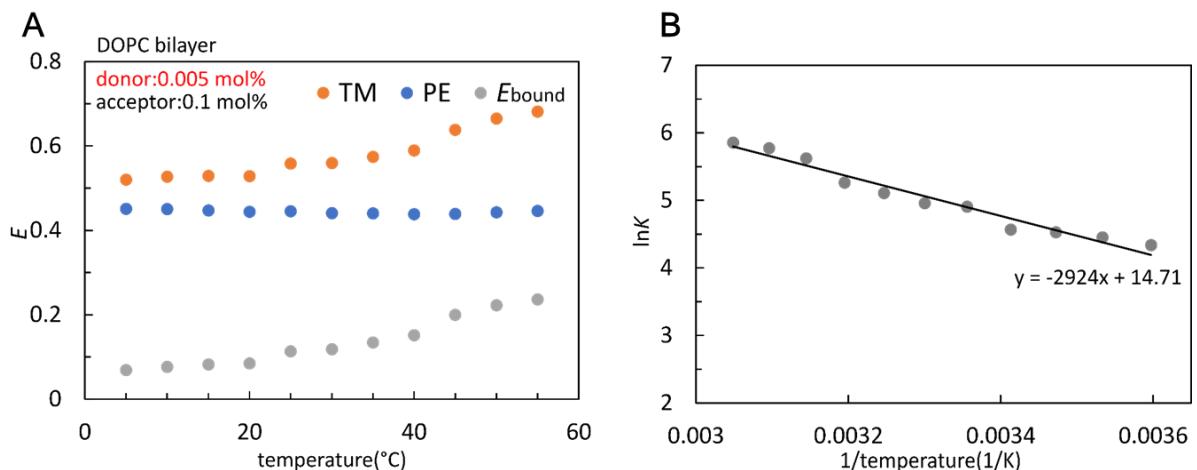


図 3-9 NBD-TM と GM3 の FRET 効率の温度依存性の結果 (図 3-9C) を用いて実行した van't Hoff プロット. DOPC 二重膜中, NBD-TM は 0.005mol%, ATTO594-GM3 は 0.1mol%を含む. 得られた熱力学パラメーターは表 3-1 にも示した.

図 3-9 に結合由来の FRET (E_{bound})の算出と van't Hoff プロットの結果を示した. 解析には, TM と PE の間に顕著な差が観測された NBD-TM 0.005 mol%の条件の結果を用いた. 温度上昇に従って増加した NBD-TM-GM3 間の FRET は同様に E_{bound} が温度上昇に対応して増加することを意味する. この結果から得られる結合定数について, 温度の逆数に対してプロットを行った. その結果、van't Hoff プロットは負の傾きを示し、直線で近似した傾きから, ΔH (24.3 kJ/mol), y 切片から ΔS (122 J/K mol)を得た. 最終的な ΔG の値は-12 kJ/mol となった.

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (9)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (10)$$

表 3-1 NBD-TM と GM3 の FRET 効率の温度依存性の結果を用いて実行した van't Hoff プロットから得た熱力学パラメーター.

Base lipid	ΔH (kJ / mol)	ΔS (J / K mol)	ΔG (kJ / mol, 25 °C)
DOPC (0.005 mol% TM)	24.3	122	-12.1

3-3 考察

本研究において、FRET 実験を用いて膜脂質と膜貫通タンパク質の親和性を定量的に評価する手法を検討した。これまでにも同様の研究が報告されているが¹¹、親和性解析においては非特異的な近接による FRET の寄与を正しく差し引くことが重要となる。モデル膜を用いた実験において、各分子は二次元膜上に凝縮された状態を維持しており、相互作用を持たない FRET ペア間であっても非特異的な近接が生じてしまうためである¹¹。これまで多くの研究では FRET 効率を概算する理論式から得られる値を使用し、非特異的近接の寄与を算出してきたが^{12,13}、本研究ではこの項(E_{random})を実験値より求めた。すなわち、NBD-TM—ATTO594-GM3 間の FRET に生じる非特異的近接の寄与を、NBD 標識化脂質 NBD-PE を用いて取得した FRET 効率の結果から算出した。NBD-PE と ATTO594-GM3 の間に働く FRET 効率を E_{random} として差し引くことで膜貫通ペプチド-脂質間の特異的な相互作用による FRET 効率の割合を選択的に検出することを試みた。膜中での脂質と膜タンパク質との間の特異的相互作用を検出する際のもう一つの問題として、低い親和性を示すことが挙げられる。今回のように特異的なドナー-アクセプター相互作用による FRET の成分が非特異的な近接による FRET 成分よりも小さい場合、特異的な成分を正確に推定することは困難を伴う¹¹。今後、疎水性の高い膜貫通ペプチドや脂質を用いたサンプル調製、特に膜中で高濃度に再構成した場合に生じる FRET の人為的な実験誤差を排除することができれば、脂質膜中の FRET ペアの親和性を推定する本手法の精度の向上が期待できる。

本研究によって得られたデータは、EGF 受容体およびガングリオシド GM3 に関する先行例と比較して一貫性のある結果を示している^{6,14}。EGF 受容体の脂質膜中の挙動と、GM3 がその活性化に寄与するメカニズムについて依然として未解明の点が多く残されているが、脂質モデル膜を用いた本研究の結果はその一般理論について新しい知見を与えるものである。

3-3-a 脂質モデル膜中における EGF 受容体膜貫通ペプチドの会合

本研究では、NBD 標識ペプチドの自己消光を定性的に用い、DOPC 二重膜中で濃度依存的に生じる膜貫通ペプチドの会合を観測した。Chen らは、溶解度向上のために末端に塩基性アミノ酸を追加した EGF 受容体膜貫通配列に対して、異なる蛍光分子を

標識した二種類のプローブを用い、FRET 測定によって膜中濃度依存的な二量体の割合の増加を明らかにした⁶。今回得られた結果から、0.05 mol% の NBD-TM が DOPC 膜中で会合を形成することが示唆された。この結果は Chen らが用いた DLPC 中の TM ペプチドの濃度条件と対応しており、今回観測された会合体がおもに二量体で構成されていることを示している。

また、EGF 受容体膜貫通領域には、二つの GXXXG 配列が含まれている。この GXXXG 配列とは、 α -ヘリックス構造の約 1 ピッチに相当する 4 残基間隔で側鎖の小さな残基が存在し、その間を側鎖の大きな残基が構成することで、アミノ酸骨格間の極性相互作用が誘起するヘリックス間の会合を特異的に安定化する配列モチーフである^{10,15}。したがって EGF 受容体の膜貫通領域は、領域単独で二量体を形成する機能を有している¹⁶。本研究において膜外のリガンド結合領域を使用せず、膜貫通領域配列のみからなるプローブを創製して作用解析を行った。EGF 受容体膜貫通領域がもつ配列特異的な二量体形成機能は、本研究が生物学研究としての側面からも一定の意義を示しうることを支持している。

またこれらの知見は、NBD-TM の膜中での挙動について、非特異的な疎水性の相互作用による多量化と比べて、配列特異的な二量体の形成が進行しやすいことを示している。GM3 の添加による NBD-TM の脱会合効果が TM 0.05 mol% の条件では顕著に観測されたのに対し、より高濃度の条件では明確な効果を観測することができなかった。これは、NBD-TM が DOPC 二重膜において、濃度変化に依存して異なる様式で会合体を形成していることを示唆している。同じく一回膜貫通型の膜タンパク質プローブとして GpA を用いた例では、TM ペプチドが脂質膜の厚さに対応して二量体の割合を変化させていることが報告された⁷。DLPC 二重膜と比較して、DOPC 二重膜はカルボニル間距離が 6 Å 長く、DOPC 膜中で TM ペプチドはより直立した配向をとることが示唆される。膜環境によって配向が制御された TM ペプチドは、配列特異的な会合を形成することが不利となり、疎水性の相互作用による非特異的な会合を形成しやすい。さらに、脂質二重膜の厚さがペプチドのヘリックス長と極端に異なる場合にはリポソーム全体が水和水の表面張力を大きく受けるため、ペプチドが膜中でクラスターや大きなドメインを形成することが有利となる（疎水性ミスマッチ）¹⁷。DOPC 中の NBD-TM に対してこのような作用が働いた場合、GM3 が 1~数分子単位でペプチドの脱会合を促進することは難しくなると考えられる。したがって、GM3 の添加効果を比較して見られた傾向は、DOPC 中の NBD-TM の会合構造が膜中濃度に依存して変化

することを支持している。しかしながら、ペプチドの会合モードが変化する場合には、自己消光の手法によって膜貫通ペプチドが形成する二量体—多量体間の会合量論を定量的に議論することは困難である。また適切な測定手法を用いた場合でも、複数の平衡が関与する膜中の分子間相互作用を定式化した例はわずかであり¹⁸、今後の発展が期待される。

3-3-b 膜貫通ペプチド—GM3 間の相互作用モデルと熱力学パラメーター

一連の自己消光実験から、NBD-TM は膜中濃度に依存して会合状態を変化させることを示唆する結果が得られた。また先行研究を例に用い、TM ペプチドの会合を制御する要素として、ペプチドの膜中での配向と、それを制御する脂質二重膜厚さの影響を挙げた。

FRET による実験では、NBD-TM がより低濃度となる条件において、測定温度の上昇に伴って GM3 との作用が促進される結果を得た。この結果に対しても、同様にペプチドの膜中での会合と配向に着目して考察を行った。すなわち、NBD-TM は低濃度条件において単量体を有利に形成し、温度上昇に伴って脂質膜の厚さの減少とアシル鎖のパッキング緩和が進行して傾いた配向を取る^{19,20}。第一に、低濃度の疎水性ペプチドは多分子単位の会合を形成しにくく、膜に挿入されやすい。このことは抗菌性ペプチドの例を用いて説明される²¹。疎水性の大きなペプチドは通常水溶液中で極めて不安定であり、濃度上昇に従いペプチド間で凝集体を形成して安定化する²²。その際、水和水の放出と分子内水素結合の形成を伴うため α -ヘリックス構造や β -シート構造が観測される。脂質膜を含むサンプル中では、凝集していたペプチドの一部が脂質膜に挿入され、脂質アシル鎖と隣り合う状態で安定化する。サンプル中のペプチドに対して脂質の割合が大きくなるにしたがって、脂質中で安定化するペプチド成分が増加する。一方ペプチドの割合が大きくなると、膜中で安定化する割合が減少するうえ、膜に挿入された場合でもペプチド同士の近接性が高まり、膜中で会合しやすくなる。DOPC 中に NBD-TM を 0.05 mol%組み込んだ際、ペプチドは二量体を一定の割合で形成するが、0.1 mol%組み込んだアクセプター標識化 GM3 はこのような成分に対して十分に作用を生じないことが示唆された。

第二に、高温条件下の脂質膜サンプル中では脂質アシル鎖の分子運動が加速し炭化水素鎖の配座が固定されなくなるため、脂質膜の厚さは減少し脂質一分子の占有面積が増加する。その結果、膜貫通ペプチドは脂質膜に制御を受けることなく、よ

り自由に配向を決定できる。Yano らは、GXXXG 配列を含むモデルペプチドを用いて、POPC 膜中、コレステロールの有無で変化する二量化率を測定した¹⁰。その結果、コレステロールを含む脂質膜はアシル鎖のパッキングおよび膜厚が増加することで、配列特異的な会合の形成を抑制することを報告した。また、Bocharov らは NMR によって、DMPC を平面部とするバイセル中での EGFR-TM の会合構造を推定しており、約 30°の交差角を有する二量体が配列特異的かつ安定な構造であることを報告した⁸。これらを踏まえると、温度上昇に従ってペプチドの配向が自由に決定できる脂質膜環境となることで、非特異的な会合体の割合が減少する。これが要因となり、GM3 と特異的に作用する成分が増加したと考えることができる。

ファントホッフプロットによって得られた結合前後のエンタルピー変化は、負の値を示した。これは疎水性の相互作用において一般的な特徴である。疎水性の相互作用は、しばしば吸熱的に進行するが、結合後に水和水が解放されることによるエントロピーの利得によって自発的な化学変化を生じ得る。過去にも、多くの膜作用ペプチドが膜挿入にあたって負のエンタルピーを示すことが報告されている²¹。想定される寄与として、脂質膜界面付近に存在する水分子と、ペプチド周囲を取り囲むように配置される脂質分子によるものが挙げられる。すなわち、ペプチドが膜中の特定の分子と会合することによって、ペプチド末端付近の水分子や、膜貫通部を囲み、配座が制限された脂質分子が解放されることで、大きなエントロピーのアドバンテージを得ることができると予想される。今回観測した結果も、膜中で傾いた構造を示す NBD-TM が、膜表面付近の水和水を開放しながら GM3 を含む膜中に安定化されることで結合が進行したことを見ている。また GM3 が隣接することによって脂質二重膜との疎水性のミスマッチが解消し、配座が大きく制限されたバルク脂質が減少する。その作用には GM3 の脂質アシル鎖の寄与はもちろんのこと、糖鎖（特に疎水性部に近い場所に位置するグルコース部位）のヒドロキシ基を介してペプチド末端部が安定化されるメカニズムが関与していることも示唆される。一方、リジン残基を介した静電相互作用の特異的な寄与は本研究では実証することができなかった。その原因として、ペプチド N 末端の配列が十分に長くないために、リジン残基の脂質膜境界付近での振る舞いが変化し、より親水的環境において拡散することで静電相互作用の寄与が低減されてしまっている可能性が考えられた。今後さらなる実験条件の最適化が必要とされる。

最終的に得られた結合自由エネルギー($\Delta G = -12 \text{ kJ/mol}$)は、分子動力学計算を用いた先行研究の値($\Delta G = -9 \text{ kJ/mol}$)や、EGF 受容体膜貫通部位の二量化エネルギー(ΔG

$= -10.5\text{--}11.7 \text{ kJ/mol}$ ）におおむね一致した^{14,6,23}。このことから、本研究で用いた測定手法の妥当性が支持された。また、今回得られた値の GM3 の作用は膜貫通ペプチドの脱会合に寄与する可能性が示唆された。一方で、一分子単位で脱会合に寄与するには十分ではないと予想される。実際に得られた FRET 効率の値から予測される GM3 と結合状態の NBD-TM の割合は 10%~20% にとどまっている。また TM ペプチドが高濃度になる場合には GM3 の作用は小さく観測されたことから、二量化状態のペプチドと单量体状態のペプチドでは結合モデルが異なる可能性も考えられる。したがって今回明らかになった TM ペプチドと GM3 の親和性は、GM3 と同じスフィンゴ脂質であるスフィンゴミエリンや、コレステロールで構成される細胞膜中の脂質ラフトドメインとも関連して機能する可能性が高い^{24,25}。以上を踏まえ GM3 は、EGF 受容体が本来不安定である特定の脂質膜環境に局在することを促進し、適切な環境下における活性化メカニズムが進行するという機構の一部分を担っていると考えられる。

3-4 参考文献

- (1) Bessman, N. J.; Lemmon, M. A. Finding the Missing Links in EGFR. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19* (1), 1–3. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2221>.
- (2) Nagle, J. F.; Tristram-Nagle, S. Structure of Lipid Bilayers. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **2000**, *1469* (3), 159–195. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00016-2).
- (3) Bocharov, E. V.; Lesovoy, D. M.; Pavlov, K. V.; Pustovalova, Y. E.; Bocharova, O. V.; Arseniev, A. S. Alternative Packing of EGFR Transmembrane Domain Suggests That Protein-Lipid Interactions Underlie Signal Conduction across Membrane. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2016**, *1858* (6), 1254–1261. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.02.023>.
- (4) Silva, L. C.; De Almeida, R. F. M.; Castro, B. M.; Fedorov, A.; Prieto, M. Ceramide-Domain Formation and Collapse in Lipid Rafts: Membrane Reorganization by an Apoptotic Lipid. *Biophys. J.* **2007**. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.091876>.
- (5) Loura, L. M. S.; de Almeida, R. F. M.; Silva, L. C.; Prieto, M. FRET Analysis of Domain Formation and Properties in Complex Membrane Systems. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2009**, *1788* (1), 209–224. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.012>.
- (6) Chen, L.; Merzlyakov, M.; Cohen, T.; Shai, Y.; Hristova, K. Energetics of ErbB1 Transmembrane Domain Dimerization in Lipid Bilayers. *Biophys. J.* **2009**, *96* (11), 4622–4630. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.03.004>.
- (7) Anbazhagan, V.; Schneider, D. The Membrane Environment Modulates Self-Association of the Human GpA TM Domain-Implications for Membrane Protein Folding and Transmembrane Signaling. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2010**, *1798* (10), 1899–1907. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.06.027>.
- (8) Bocharov, E. V.; Bragin, P. E.; Pavlov, K. V.; Bocharova, O. V.; Mineev, K. S.; Polyansky, A. A.; Volynsky, P. E.; Efremov, R. G.; Arseniev, A. S. The Conformation of the Epidermal Growth Factor Receptor Transmembrane Domain Dimer Dynamically Adapts to the Local Membrane Environment. *Biochemistry* **2017**, *56* (12), 1697–1705. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01085>.
- (9) Muhle-Goll, C.; Hoffmann, S.; Afonin, S.; Grage, S. L.; Polyansky, A. A.; Windisch, D.; Zeitler, M.; Bürck, J.; Ulrich, A. S. Hydrophobic Matching Controls the Tilt and Stability of the Dimeric Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR) α Transmembrane Segment. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (31), 26178–26186. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.325555>.

- (10) Yano, Y.; Kondo, K.; Watanabe, Y.; Zhang, T. O.; Ho, J. J.; Oishi, S.; Fujii, N.; Zanni, M. T.; Matsuzaki, K. GXXXG-Mediated Parallel and Antiparallel Dimerization of Transmembrane Helices and Its Inhibition by Cholesterol: Single-Pair FRET and 2D IR Studies. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56* (7), 1756–1759.
<https://doi.org/10.1002/anie.201609708>.
- (11) Loura, L. M. S.; Prieto, M.; Fernandes, F. Quantification of Protein-Lipid Selectivity Using FRET. *Eur. Biophys. J.* **2010**, *39* (4), 565–578. <https://doi.org/10.1007/s00249-009-0532-z>.
- (12) Holt, A.; De Almeida, R. F. M.; Nyholm, T. K. M.; Loura, L. M. S.; Daily, A. E.; Staffhorst, R. W. H. M.; Rijkers, D. T. S.; Koeppe, R. E.; Prieto, M.; Killian, J. A. Is There a Preferential Interaction between Cholesterol and Tryptophan Residues in Membrane Proteins? *Biochemistry* **2008**, *47* (8), 2638–2649.
<https://doi.org/10.1021/bi702235k>.
- (13) Palacios-Ortega, J.; García-Linares, S.; Rivera-de-Torre, E.; Gavilanes, J. G.; Martínez-del-Pozo, Á.; Slotte, J. P. Sticholysin, Sphingomyelin, and Cholesterol: A Closer Look at a Tripartite Interaction. *Biophys. J.* **2019**, *116* (12), 2253–2265.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.05.010>.
- (14) Hedger, G.; Shorthouse, D.; Koldsø, H.; Sansom, M. S. P. Free Energy Landscape of Lipid Interactions with Regulatory Binding Sites on the Transmembrane Domain of the EGF Receptor. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120* (33), 8154–8163.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.6b01387>.
- (15) Bocharov, E. V.; Mineev, K. S.; Pavlov, K. V.; Akimov, S. A.; Kuznetsov, A. S.; Efremov, R. G.; Arseniev, A. S. Helix-Helix Interactions in Membrane Domains of Bitopic Proteins: Specificity and Role of Lipid Environment. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2017**, *1859* (4), 561–576. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.10.024>.
- (16) Endres, N. F.; Das, R.; Smith, A. W.; Arkhipov, A.; Kovacs, E.; Huang, Y.; Pelton, J. G.; Shan, Y.; Shaw, D. E.; Wemmer, D. E.; et al. Conformational Coupling across the Plasma Membrane in Activation of the EGF Receptor. *Cell* **2013**, *152* (3), 543–556.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.032>.
- (17) Killian, J. A.; Nyholm, T. K. Peptides in Lipid Bilayers: The Power of Simple Models. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16* (4), 473–479.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.06.007>.
- (18) Needham, S. R.; Roberts, S. K.; Arkhipov, A.; Mysore, V. P.; Tynan, C. J.; Zanetti-Domingues, L. C.; Kim, E. T.; Losasso, V.; Korovesis, D.; Hirsch, M.; et al. EGFR

- Oligomerization Organizes Kinase-Active Dimers into Competent Signalling Platforms. *Nat. Commun.* **2016**, *7* (7), 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms13307>.
- (19) Kučerka, N.; Nieh, M. P.; Katsaras, J. Fluid Phase Lipid Areas and Bilayer Thicknesses of Commonly Used Phosphatidylcholines as a Function of Temperature. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2011**, *1808* (11), 2761–2771. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.022>.
- (20) Kučerka, N.; Liu, Y.; Chu, N.; Petrache, H. I.; Tristram-Nagle, S.; Nagle, J. F. Structure of Fully Hydrated Fluid Phase DMPC and DLPC Lipid Bilayers Using X-Ray Scattering from Oriented Multilamellar Arrays and from Unilamellar Vesicles. *Biophys. J.* **2005**, *88* (4), 2626–2637. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.056606>.
- (21) Hall, K.; Lee, T. H.; Aguilar, M. I. The Role of Electrostatic Interactions in the Membrane Binding of Melittin. *J. Mol. Recognit.* **2011**, *24* (1), 108–118. <https://doi.org/10.1002/jmr.1032>.
- (22) Yano, Y.; Yamamoto, A.; Ogura, M.; Matsuzaki, K. Thermodynamics of Insertion and Self-Association of a Transmembrane Helix: A Lipophobic Interaction by Phosphatidylethanolamine. *Biochemistry* **2011**, *50* (32), 6806–6814. <https://doi.org/10.1021/bi200560c>.
- (23) Kuznetsov, A. S.; Polyansky, A. A.; Fleck, M.; Volynsky, P. E.; Efremov, R. G. Adaptable Lipid Matrix Promotes Protein-Protein Association in Membranes. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11* (9), 4415–4426. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00206>.
- (24) Kabayama, K.; Sato, T.; Saito, K.; Loberto, N.; Prinetti, A.; Sonnino, S.; Kinjo, M.; Igarashi, Y.; Inokuchi, J. I. Dissociation of the Insulin Receptor and Caveolin-1 Complex by Ganglioside GM3 in the State of Insulin Resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (34), 13678–13683. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703650104>.
- (25) Coskun, Ü.; Grzybek, M.; Drechsel, D.; Simons, K. Regulation of Human EGF Receptor by Lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (22), 9044–9048. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105666108>.

第4章 結論

EGF受容体膜貫通領域を模倣し、34残基からなる疎水性ペプチドの固相合成を行った。N末端に二種類の蛍光分子を導入し、HPLC精製の条件検討の結果、ギ酸/1-プロパノール/水を用いた溶出液による高純度の精製を達成した。蛍光スペクトルの観測の結果、ペプチドはDOPC、DMPCからなる二重膜に再構成されやすく、炭素鎖長の長いDPPCからなる二重膜中には安定に挿入されないことが示された。

時間分解測定によるFRET解析の結果から、EGF受容体TMペプチドの脂質選択性が示された。GM3と最も強力に、GM1に対して中程度に親和性を示したのに対して、SMに対しては二重膜脂質であるDMPCと同程度の親和性を示すことが明らかとなつた。一方で、DOPC膜中で行った非標識脂質を併用した実験の結果は、一貫した結果を示さなかつた。GM3-TM間の相互作用解析を達成するためには、脂質膜中におけるドナー・アクセプターペアの非特異的な近接によるFRETの寄与を見積もった理論式の正確性向上や、DOPC膜中におけるTMペプチドの会合状態について詳細な検討が必要であることが示唆された。

EGF受容体TMペプチドは、DOPC、DMPC膜それぞれにおいて、濃度依存的に二量化を生じることが示唆された。一方で、GM3による脱会合の効果は、DOPC中ではTMペプチドが低濃度の場合に顕著に働き、ペプチドが高濃度の場合には作用が示されなかつた。DMPC膜中ではペプチドが高濃度の条件においてもGM3の脱会合作用が発揮されたことから、TMペプチドの配向に変化が生じている可能性が示された。

温度変化とともに取得したFRETの結果から、GM3はDOPC膜中に0.005 mol%という低濃度で組み込んだTMペプチドに対して相互作用を示した。GM3はDOPC膜中で単量体として存在するTMペプチドに作用を行うことが示唆された。ファンホッフプロットによって疎水性の相互作用を特徴づける値を得た。したがつて、GM3とTMの作用は、TMペプチドのDOPC膜中における水和を緩和するように働き、疎水性ミスマッチをはじめとする会合作用と競合し、機能を抑制している仮説が示された。得られた結合自由エネルギーは膜中のペプチドの脱会合を完全に進行させるには十分ではなく、生体膜中では他の脂質と連携して受容体を制御している可能性が示唆された。

第5章 実験の部

5-1 試薬および溶媒

N-メチルピロリドン、ピペリジン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン、メタノール、脱水ジエチルエーテル、アセトニトリル、1-プロパノール、2-プロパノール、ギ酸、トリフルオロエタノール、4-クロロニトロベンゾフラザン(NBD)、クロロホルムはナカライテスクから購入した。

4-クロロ-7-ニトロ-2-1-3-ベンゾオキサジオール(NBD)、 α シアノヒドロキシ桂皮酸は東京化成工業株式会社より購入した。

Nova PEG Rink amide は Merck 社より購入した。

Rink Amide-ChemMatrix は Biotage 社より購入した。

各 Fmoc 保護アミノ酸はペプチド研究所より購入した。

Fmoc-mini PEG は Peptide International 社より購入した。

エチル 2-シアノ-2-ヒドロキシアミノアセテート (OxymaPure)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPCI)、トリフルオロ酢酸(TFA)、は渡辺化学工業より購入した。

1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DMPC), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (16:0 NBD-PE), および milk GM3 は Avanti Polar Lipids 社から購入した。

5-2 機器装置

ペプチド固相合成には CEM 社製超音波合成機 Liberty Blue peptide synthesizer を使用した。

樹脂上での蛍光基の導入には、国産化学社製マルチ固相合成器 KMS-3 を使用した。

遠心分離には久保田商事社製マイクロ冷却遠心機 Model 3740 を用いた。

ペプチド精製には島津社製 HPLC Prominence を使用した。各ユニットは以下で構成される。コントローラーCBM-20A, 脱気ユニット DGU-20A, 送液ユニット LC-20AD×2, インジェクターバルブおよびカラムオーブンユニット CTO-20AC, フォトダイオードアレイユニット SPD-M20A. 解析には島津製ソフトウェア LabSolutions を用い、富士通製 PC ESPRIMO 上で操作した。

凍結乾燥には EYELA 社製 FDU-2200 および FDU-1200 を用いた。

化合物の質量分析には Thermo Fisher Scientific 社製 Orbitrap XL (ESI-TOF-MS)、島津製作所社製 AXIMA-CFR および AXIMA-Performance (いずれも MALDI-TOF-MS) を用いた。

蛍光分光計は日本分光製 FP-6500 および FP-8500 を用いた。

円二色性分散 (CD) 測定には日本分光製 J-720 を用いた。

蛍光顕微鏡測定は OLYMPUS 社製 IX81 共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。電力源には FV10-MCPSU, ダイオードレーザーとして LD405-2, LD473, LD559, LD635 および NTT エレクトロニクス社製波長変換レーザーOpti λ を用いた。

蛍光寿命解析は PicoQuant 社製の FluoTime 200 を用いて行い、timing module である PicoHarp 300, パルスレーザー源として PDL 800-D, PLS シリーズの LED を付属した。一部の蛍光寿命測定は、浜松ホトニクス社製 QantaurusTau を用いた。測定装置は分光計 C11367 と time to digital converter (TDC) ユニット M12977 で構成される。

5-3 蛍光標識ペプチドの合成と精製

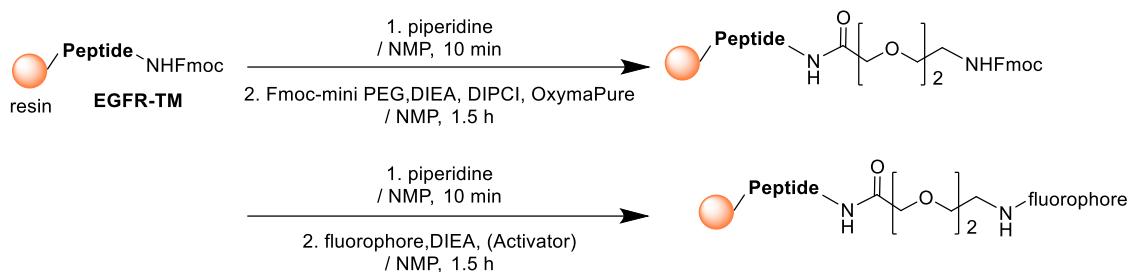


図 5-1 伸長ペプチドへの樹脂上での蛍光団導入スキーム

Fmoc Rink-Amide ChemMatrix(反応点密度 : 0.5 mmol/g)樹脂を合成機の well に 200 mg (0.1 mmol)セットし DMF で十分膨潤した。Fmoc 保護された N 末端は 10%ピペラジン, 0.1 M HOBr, 10% エタノールを含む DMF 溶液を加えて脱保護した。伸長は 0.2 M アミノ酸, 1 M HOBr, 0.5 M DIPCI を含む DMF 溶液を用いて行った。未反応の N 末端をキャッピングするため 30%無水酢酸, 15%DIEA を含む DMF 溶液を加えて反応を行った。伸長終了後の樹脂はメタノール、ジエチルエーテルで順に洗浄し真空中で一晩乾燥させた後、-80°Cで保存した。

蛍光原子団 NBD の導入には、国産化学社製ポリプロピレン製カラム（20mL 用, 2600048）内で樹脂を NMP 中に再度膨潤し、20%ピペリジン-NMP 溶液で 10 秒, 10 秒, 10 分の 3 サイクルの震盪と溶媒除去を繰り返して脱保護した。NMP で 6 回洗浄した後、Fmoc-miniPEG を樹脂反応点に対して 1.2 当量, 1.2 当量 DIPCI, 1.2 当量 OxymaPure, 1 等量 DIEA を含む NMP 溶液で 3 時間震盪して N 末端にリンカーを導入した。NMP で洗浄後、再度 20%ピペリジン-NMP 溶液で Fmoc 基を脱保護し、2 当量 NBD-Cl, 1 当量 DIEA を含む反応溶液で 3 時間震盪し末端アミンに蛍光基を導入した。

脱樹脂時は樹脂をカラムから褐色バイアルに移し、樹脂 40 mg に対して 1 mL の Reagent K (TFA 82.5%, Thioanisole 5%, H₂O 5%, Phenol 5%, Ethandithiol 2.5%) を用いてスターラーで 90 分攪拌した。反応後の溶液を国産化学社製ポリプロピレン製カラム（10 mL 用, 2600030）で濾過して 45mL 容量ファルコンチューブ内のジエチルエーテル 15 mL 中に滴下し、固定角ローターを接続した遠心分離機を用いて回転速度 10000 rpm で 5 分間遠心した。上澄み液をデカンテーションし、ジエチルエーテル 15 mL を加えて残渣をボルテックスで攪拌した。これを再度遠心する操作を 3 サイクル繰り返し、残った固体を空気乾燥することでフィルム状結晶を得た。

得られたペプチド混合物を HPLC にて精製した。カラムにはナカライテスク社製 5C4-AR-300 カラム (10.0×250 mm) を用いた。溶出液は A ; ギ酸 : 水 = 2 : 3, B ; ギ酸 : 1-プロパノール = 4 : 1 を使用し、25 分で B 濃度を 80% から 100% まで上昇させて 2.2 mL/min の流速で溶出させた。粗ペプチドは TFA10 滴、溶出液 B • 2 滴、溶出液 A • 1 滴で溶解し一回の精製で 100 μ L ずつインジェクトした。インジェクト 19 分後のメインピークの溶出液を回収し、ただちに等倍量～1.5 倍量の水で希釈したのち液体窒素を用いて凍結、-89°C 下での凍結乾燥によって結晶を得た。一方、非標識体のペプチドは 5Ph-AR-300 カラム (10.0×250 mm) を用い、A ; TFA0.1% を含む MilliQ 水、B ; TFA0.05% を含むアセトニトリル : 1-プロパノール (2:3) 溶液を使用し、25 分で 65% から 70% まで濃度を変化させた条件で分離が可能であった。

得られたプローブの純度は Thermo Fisher Scientific 社製 ESI-MS • Linear Ion Trap Orbitrap、および島津社製 MALDI-TOF-MS • AXIMA-CFR もしくは AXIMA-Performance を用いて確認した。

● HPLC クロマトグラム

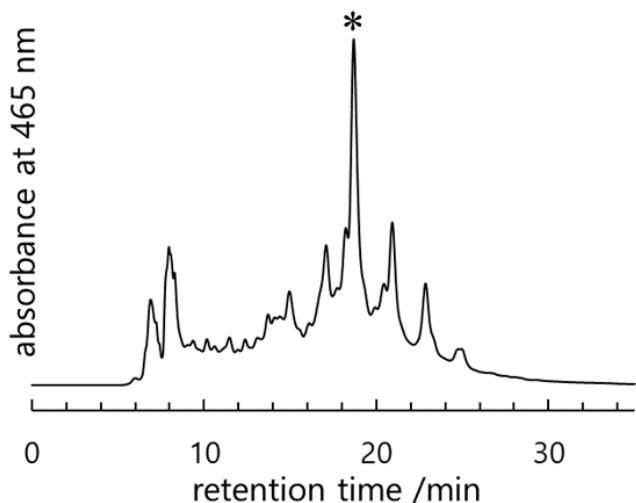


図 5-2 NBD-TM の HPLC クロマトグラム。(本論 2 章図 2-5 より再掲) A ; ギ酸 : 水 = 2 : 3, B ; ギ酸 : 1-プロパノール = 4 : 1 を使用し、25 分で B 濃度を 80% から 100% まで上昇させて 2.2 mL/min の流速で溶出。*は目的化合物(NBD-TM)を含むピークを示す。

- ESI-MS スペクトル

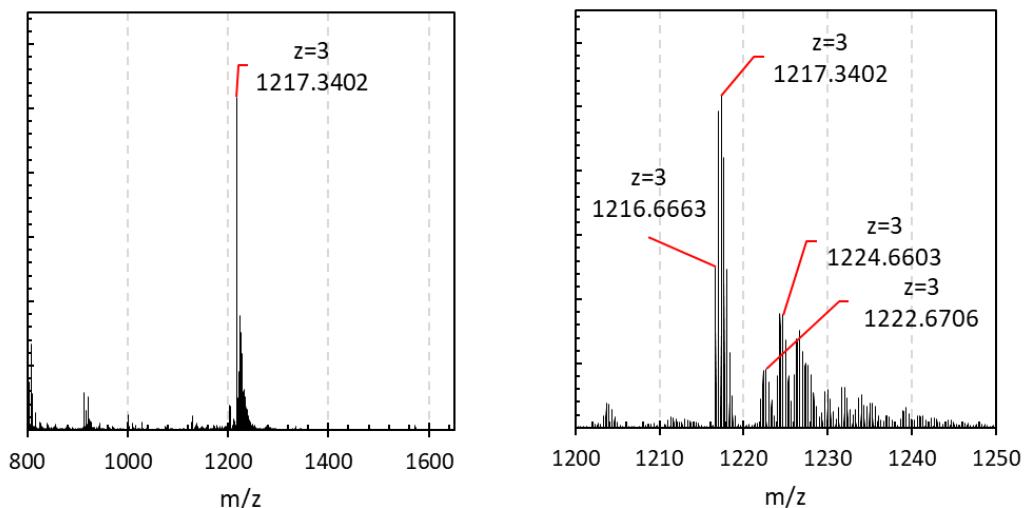


図 5-3 精製後 NBD-TM の ESI-MS スペクトル. 本論 2 章図 2-6 より再掲. $m/z = 1216.6663$ のピークが $[NBD-TM+3H]^{3+}$ の exact mass (1216.6702)に一致した. $m/z = 1224.6603$ は $[NBD-TM+2H+Na]^{3+}$ に, $m/z = 1222.6706$ は少量のメチオニン酸化体に対応する.

TMR 標識ペプチド(TMR-TM)の合成には、蛍光団のカルボキシル基を介したアミド化反応が利用可能である. Fmoc 基を脱保護した PEG-TM の N 末端に対して、TMR 1.2 当量、活性化剤として DIPCI, OxymaPure®を各 1.2 当量、塩基として DIEA 1 当量を加えアミド化反応を行った. 反応は問題なく進行し、その後の脱樹脂、再結晶化を経て淡赤色のフィルムを得た. TMR-TM の精製には A ; TFA0.1%を含む MilliQ 水、B ; TFA0.05%を含むアセトニトリル : 1-プロパノール (2:3) 溶液を使用し、25 分で 65%から 70%まで濃度を変化させた条件を適用した. 流速 2.2 mL/min でインジェクタから 20 分後に観測される主ピークを ESI-MS によって分析し、TMR-TM の同定を行った.

5-4 Multilamellar vesicles (MLVs)の調製

蛍光標識ペプチドおよび脂質を含んだ MLV の調製には、確立された水和方法 (Bangham 法) を用いた. 0.05 mol%の NBD-TM を含む MLV には、DOPC (200 nmol) メタノール溶液、NBD-TM (0.1 nmol) TFE 溶液を混合し、溶液をアルゴンガスで蒸発させフィルム上に調製し、真空下で一晩乾燥させた. その後、50 °C の MilliQ 水 400

μL で水和し、ボルテックスで 30 秒攪拌、 50°C で 5 分静置を 3 サイクル繰り返した。均一化のために、液体窒素を用いた凍結、湯浴 50°C で加熱融解、ボルテックスで攪拌 20 秒のサイクルを 10 回繰り返した。0.005% NBD-TM 条件は、蛍光標識ペプチドの濃度(0.1 nmol)を固定し、10 倍量の脂質 DOPC (2 μmol)を用いることで同様に調製した。非標識 GM3 を含むサンプルは各サンプル脂質に対して 5 mol%をストック溶液から混合しフィルムサンプルを作製し、その後同様の条件で調製した。

サンプル中に含まれる蛍光標識プローブの最終濃度は変動しやすいため、再構成率を算出し強度の規格化を行った。MLV 水溶液を 10 倍量のエタノールに溶解して蛍光強度を測定し、蛍光プローブ低濃度の条件を再構成率 100%と仮定して比較することで他の濃度条件のサンプルの再構成率を算出した。

5-5 円二色性分散 (CD) 測定

- Large unilamellar vesicle(LUV)の調製

TFE 中および DMPC 二重膜中で測定を行った。DMPC 膜中の測定では、リポソームによる散乱が原因で 200 nm 付近の短波長データが非常にノイズを含んだものになる。よって CD 測定に限り MLV を LUV へと調製して測定を行った。

LUV の調製には、AvantiPolarLipid 製 MiniExtruder を基本とするユニットを用いた。送液に用いるシリンジはハミルトン製シリンジ Gas-tight 1000 μL (610017)を用い、テフロン性メンブレンサポートユニットの間にフィルターサポート (610014)、100 nm ポリカーボネートフィルター(610005)を使用し、フィルターサポートはポリカーボネートフィルターの左右に一枚ずつ使用した。テフロン性メンブレンサポートユニットに装着する O-ring(610018)は定期的に新調して用いた。

MLV 溶液を一方のシリンジにとり、各フィルターを装着したユニットに送液した。左右のシリンジに合計 11 回送液し、MLV を抽出したもの異なる側のシリンジから LUV 溶液を送出した。

サンプルは CD 測定用 1 mm セルに加え、測定に用いた

- サンプル濃度

	DMPC(nmol)	TM(nmol)	sample volume(μL)	TM ratio(mol%)
1	295	1.24	300	0.5
2	148	1.24	300	1
3	74	1.24	300	2

- 測定条件

セル長 ; 1 mm, 測定温度 ; 25 °C, レスポンス ; 1 sec, データ間隔 ; 0.5 nm, 走査測度 ; 100 nm/min, スキャン : 1 回. N₂ ガス流速 : 5 L/min

得られたデータは, ソフトウェア SpectraManager 上で, 残基モル濃度あたりの楕円率へと変換した. 残基濃度は 1.24 nmol / 300 μL*34 residues で計算した.

5-6 膜中に再構成された蛍光標識ペプチドの定量方法

TM ペプチドの脂質膜への再構成は、ペプチドの疎水性の高さが原因となり効率よく進行しない。特に TM ペプチドが脂質に対して 1 mol%以上混合した場合には膜中に安定に再構成される割合が著しく低下する。以下でサンプル調製後に構造が維持された TM ペプチドの定量方法を記す。

NBD-TM を各濃度で脂質に対して混合し、通常の測定に用いる場合と同じように水和、凍結融解、LUV の場合はエクストルージョンを行って溶液量を調節し 2 mL の水和ベシクルを調製した。このサンプルをうち、200 μL を試験管にとり、トリフルオロエタノール (TFE) またはエタノールを 2 mL 添加した。このサンプルを 60 秒間ボルテックスし、蛍光強度を比較した。

● サンプル濃度

	1	2	3	4	5
DOPC (μM)	103.8	51.9	25.95	12.975	4.325
NBD-TM (μM)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
TM ratio	0.00048	0.00096	0.0019	0.0039	0.012

● 測定条件

励起波長 : 450 nm, 蛍光波長 : 530 nm, 測定温度 : 室温

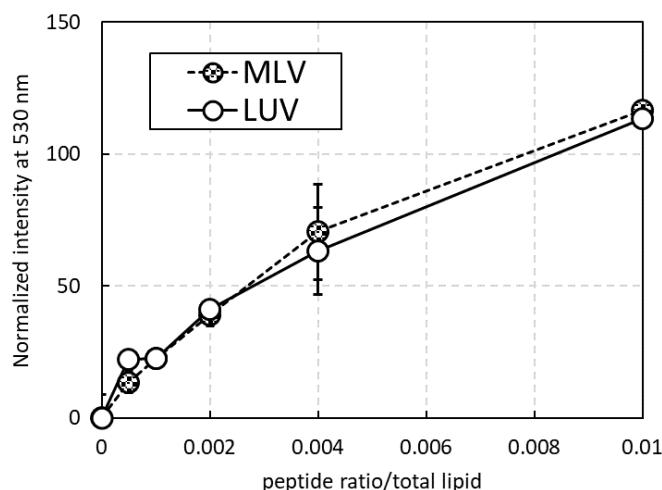


図 5-4 各濃度で DOPC 二重膜に組み込んだ NBD-TM を TFE で可溶化した後の蛍光強度。

5-7 TMR-TM の蛍光強度の脂質膜依存性

TM ペプチドの再構成に最適な脂質を選択するため、炭素鎖長と不飽和度の異なるいくつかの脂質を用いて二重膜を調製し、組み込んだ TMR-TM の蛍光強度、その温度変化を測定した。

● サンプル濃度

	DMPC(μM)	DOPC(μM)	DPPC(μM)	TM(μM)	TM ratio (mol%)*
1	8.26	-	-	0.06	0.73
2	-	8.22	-	0.06	0.69
3	-	-	8.4	0.06	0.68

● 測定条件

セル長；1 cm, 使用装置；FP-6500, 温度調節；水流、測定モード；時間変化測定、励起波長 555 nm, 蛍光波長 570 nm, 測定温度；14~43 °C. *脂質に対する TMR-TM の mol%.

時間変化測定で取得した蛍光強度と、水流恒温循環装置を用いた温度調節によって得られるセル中の温度変化データを個別に取得し、重ね合わせた。したがって温度間隔は一定ではなく、室温と大きく乖離した低温、高温条件では循環水を用いた時間当たりの温度変化が小さく、データ間隔も小さくなっている。

- 本論図 2-9 より， TMR-TM の蛍光強度と測定温度データ.

temperature (°C)	DMPC	DOPC	DPPC
14	6.12133	45.5274	1.52944
	6.10872	45.437	1.49592
	6.05956	45.4756	1.48344
14.75	6.72211	45.3732	1.45313
15.5	6.82379	45.2879	1.44928
16.8	6.75596	46.3011	1.41186
18.25	6.59135	46.423	1.34832
19.93	6.5052	45.1223	1.31064
21.78	6.81808	43.0166	1.28353
23.86	11.1041	42.1438	1.22348
26	20.4239	41.0292	1.14799
28.25	23.4615	39.7925	1.13837
30.5	24.627	38.4172	1.07721
32.75	25.0096	37.2059	1.03336
34.7	25.2178	35.9611	0.99867
36.35	25.3177	35.0987	0.98714
37.6	25.3029	34.5216	1.14138
38.6	25.3309	34.0646	1.29691
39.3	25.227	33.7839	1.34143
39.83	25.1502	33.6275	1.34894
40.22	25.2134	33.4372	1.3458
40.58	25.1789	33.2967	1.36503
40.9	25.1732	33.1624	1.34776
41.21	25.1411	33.0877	1.34827
41.52	25.0665	33.0447	1.37912
41.74	25.1284	32.9661	1.3494
42.45			1.37262

時間変化測定とセル内の温度変化を時間経過に対してプロットしたデータを組み合わせ， 温度対蛍光強度の結果を得た. 表中の数値は蛍光強度（任意単位）.

5-8 光褪色後蛍光回復(FRAP)測定

● GUV の作製

使用する脂質と蛍光標識脂質をそれぞれ TFE/メタノール溶液に混合し、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 $10 \mu\text{L}$ 乗せ、5分ほど室温で乾燥させたち真空条件下で 12 時間以上乾燥させた。白金線の周りをゴムで囲った後、0.4%アガロース水溶液を $500 \mu\text{L}$ を加えて上からさらにスライドガラスを被せた。 55°C 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。

• Sample preparation

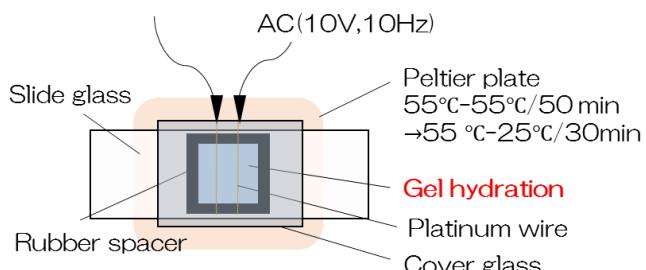


図 5-5 GUV の作製方法

● 測定条件

共焦点顕微鏡画像の取得は $60\times$ 油浸対物レンズを設定した FV1000 顕微鏡で行った。NBD-TM および NBD-PE は、ダイオードレーザー LD473 を用いて 473 nm で励起した。蛍光は 520 nm で収集した。画像の計数処理は、オリンパス製ソフトウェア FV10 を用いて行った。FRAP 画像は、 $256*256$ ピクセルで記録し、17倍で焦点を合わせた。画像は、 10 us/pixel で 30 フレームスキャンした。弱い励起強度 (473 nm レーザーで 10%の強度) で 3 回のプレブリーチ画像を撮影し、その後最大強度で 473 nm レーザーを用いて 2 回のブリーチ実験を反復的に行った。その後 25 フレームでブリーチ領域 ($40*40$ ピクセル) の蛍光強度を得た。蛍光の回復率は Microsoft Excel を用いて計算し、 $t_{1/2}$ は Excel ソフトのソルバープラグインを用いて推定した。バックグラウンドの強度変化と観測エリア全体の強度減少を補正するため、暗部領域と画像外郭をそれぞれ指定しブリーチ範囲と合わせて強度の時間変化を取得した。ブリーチ範囲の強度

変化と画像全体の強度変化の比に対して、バックグラウンド(暗部領域)の強度変化と画像全体の強度変化の比から算出する。以下に模式図と計算式を示す。

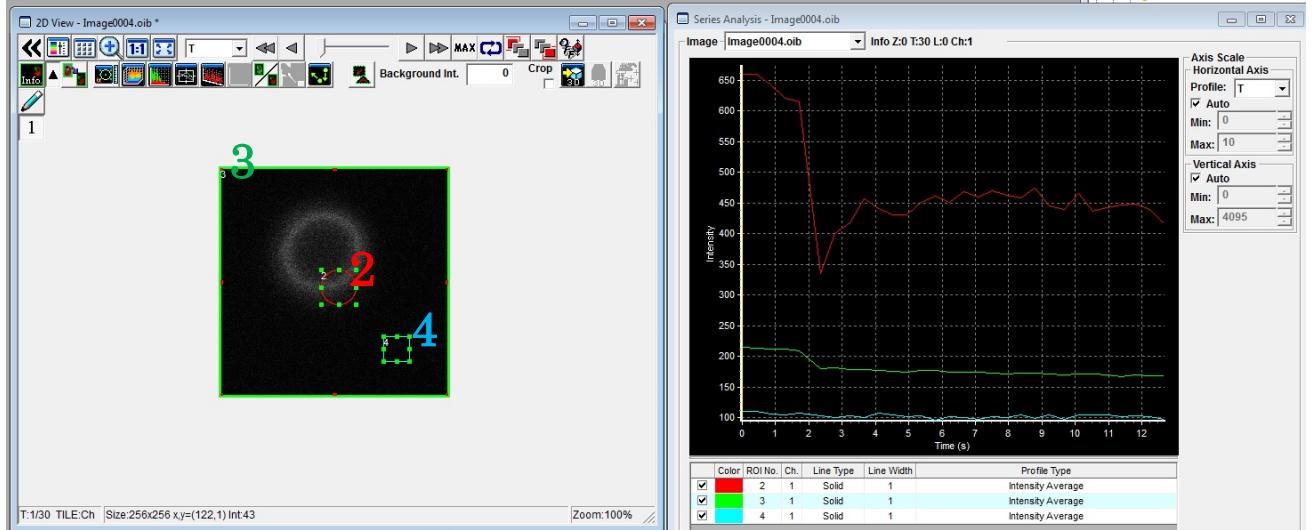


図 5-6 FRAP 実験におけるブリーチ範囲(2), 観測領域全体(3), バックグラウンド(3)の指定方法。

回復率の計算は以下の式で行われる。

(Recovery ratio)

$$\begin{aligned}
 &= \frac{(2 - 4)}{(3 - 4)} \times \frac{\text{(Intensity after bleaching)}}{\text{(averaged prebleach intensity)}} \\
 &\quad - \text{(recovery ratio at frame 6)} \\
 &\quad \times \frac{100}{\text{(averaged prebleach intensity)} - \text{(Intensity at frame 6)}}
 \end{aligned}$$

6 フレーム目以降を観測データとして収集し、各条件ごと 10 個以上の GUV を測定した。

$t_{1/2}$ は以下の式で算出される。

$$(recovery ratio) = A(1 - e^{-bt}) \quad (11)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{b} \quad (12)$$

係数 A を用いて最大強度が 100% になるように各データを補正し、比較した。時定数パラメータ b から $t_{1/2}$ が算出される

- サンプル混合比

	1	2	3	4
DMPC	100	70	100	100
Cho	-	30	-	-
NBD-PE	0.1	0.1		
NBD-TM	-	-	0.1	0.1
EGFR-TM	-	-	-	0.9 (nmol)

それぞれ混合溶液約 100 μL から 5 μL を使用しサンプルを調製した.

- 得られた $t_{1/2}$ のまとめ

	$t_{1/2}$
1. NBD-PE (20 °C)	1.08 ± 0.11
1. NBD-PE (40 °C)	0.89 ± 0.35
2. NBD-PE + Cho (20 °C)	1.86 ± 0.65
2. NBD-PE + Cho (40 °C)	1.13 ± 0.23
3. NBD-TM (20 °C)	0.97 ± 0.17
4. NBD-TM + EGFR TM (20 °C)	1.54 ± 0.21

● FRAP 測定における蛍光強度の回復率(%)

NBD-PE 20°C																	
time(sec)	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13	15	16	17		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.429336	25.09379	36.05414	28.67999	30.26154	17.38454	26.75648	23.20773	22.75078	22.23308	21.58159	28.58782	26.09616	25.95094	32.41787	23.63744		
0.858672	36.43736	55.52346	44.78123	39.68331	37.66907	41.28579	36.93952	36.95013	34.96376	39.49309	47.26966	41.97464	38.95141	33.28961	33.05045		
1.288008	38.29523	66.97837	51.0756	49.11313	41.31495	50.45598	41.6811	51.53714	44.55606	40.19856	52.45821	51.97122	48.7437	46.65932	40.38761		
1.717344	49.88069	63.67639	60.03421	55.27298	49.84605	55.85581	51.47255	57.68274	54.72447	49.39183	63.61833	58.93807	56.53922	56.071	48.75229		
2.14668	54.6415	72.90691	60.72685	65.27323	56.40489	64.41514	54.81134	66.07367	61.1956	59.84321	67.62862	61.25197	62.63998	62.13131	54.30002		
2.576016	63.58521	80.87538	70.50749	60.82849	58.33232	65.72942	58.72279	71.59304	62.92972	63.52716	70.99416	65.61776	64.32377	70.65057	55.73511		
3.005352	66.41496	89.43479	72.12933	66.24923	61.43212	66.09107	65.01866	71.48149	65.60232	63.04316	86.52859	65.97741	70.0465	76.66164	59.09479		
3.434688	65.78607	92.20819	79.81989	69.21027	64.2423	74.28275	65.0557480.77165	69.45158	64.59758	77.94039	74.64135	74.29032	85.80926	62.92401			
3.864024	62.76277	81.45469	85.69282	73.40707	68.9884	75.72754	69.05449	75.92244	73.1821	72.64217	78.20539	75.2139	74.53383	82.38284	63.82677		
4.29336	71.11407	87.02728	90.67448	70.88265	69.02119	76.15037	70.01005	85.28744	73.05478	69.61008	80.71568	78.03074	76.96777	87.17866	65.71063		
4.722696	73.01846	87.79121	92.85726	72.24271	77.51855	78.23214	64.60486	84.41588	70.76908	68.78408	82.79752	83.16911	79.75993	93.17085	64.35795		
5.152032	72.3596	85.12456	82.09346	77.83038	74.00259	76.89302	65.60002	87.94639	75.05673	70.74367	90.52413	82.53576	82.32193	87.00768	66.36382		
5.581368	69.87372	87.61772	97.04873	77.50802	75.75008	81.00039	68.64176	88.15926	74.73557	72.95857	80.97411	80.73655	83.65512	94.46895	67.75069		
6.010704	71.39135	99.90857	83.96993	77.55306	75.72912	85.69448	72.44518	84.70558	80.37018	72.09463	90.54394	84.84292	82.06685	92.47864	69.50974		
6.44004	80.21119	99.97007	88.71064	78.71036	75.30902	82.43248	71.70588	87.74564	79.47974	70.05344	98.13727	88.15399	83.33458	94.56517	72.35178		
6.869376	86.15919	104.7728	88.82224	74.32299	77.814027	76.84445	82.9643	75.56076	85.58124	74.95201	76.33245	97.74109	85.46215	85.10022	86.36877	73.4225	
7.298712	74.52817	97.84186	88.53956	78.14027	76.84445	82.9643	75.56076	85.58124	74.95201	76.33245	97.74109	85.46215	85.10022	86.36877	73.4225		
7.728048	73.37041	93.12553	89.12447	72.59174	76.98804	87.12428	75.23866	84.85365	81.59016	83.17192	99.63717	86.63695	84.673	98.24859	69.27395		
8.157384	79.86953	91.27097	92.25536	83.44526	78.84951	85.78471	74.84851	89.24178	80.22955	77.8347	94.70495	85.70477	86.09499	95.58737	76.20713		
8.586672	75.41583	89.78306	95.40751	75.0628	75.41672	85.93565	76.48915	85.68531	78.24351	79.90072	96.20759	89.09695	93.88429	82.89109	72.90891		
9.016056	73.02197	99.58152	93.01593	78.27334	80.20403	85.85648	74.23015	92.97832	81.01935	84.69934	93.44291	90.98974	89.97323	97.66477	69.44283		
9.443392	75.62974	82.95578	93.24866	76.39603	82.465	85.52554	76.10341	91.01094	82.03553	78.02176	97.52063	89.33434	92.21617	96.16541	72.09768		
9.874728	72.11731	95.70306	92.58793	79.11109	80.32036	87.34515	71.08211	91.5789	81.59244	79.10826	82.82876	80.91178	88.24133	93.00904	72.35549		
10.30406	70.05303	87.67704	86.23193	72.90755	75.59407	87.52654	74.9496	89.55674	81.95092	77.10527	93.60595	86.58201	88.26028	84.51731	72.35645		

NBD-PE 40°C

time(sec)	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.429336	34.69243	35.08179	32.93971	37.00994	40.88643	33.23795	30.90507	41.63653	31.70339	22.59723	29.72514	16.64819
0.858672	49.22149	46.86571	38.68443	47.223934	60.26234	46.25341	47.45755	52.13176	48.76738	44.28863	46.41266	38.64688
1.288008	60.66027	57.13443	47.02803	61.36831	70.31074	51.45648	67.47966	64.84522	58.32112	49.87099	56.61759	48.35824
1.717344	63.61467	66.11807	54.89843	75.24376	78.47103	61.48676	81.68967	80.75933	71.38786	63.60593	63.1642	49.46997
2.146668	67.59219	71.15376	61.04702	76.32501	82.04127	71.01345	72.0006	85.52632	75.54534	73.25792	68.04084	64.94947
2.576016	68.16208	72.84196	62.06246	74.13239	80.30356	69.22933	74.39718	85.98912	74.533371	71.54724	73.5344	61.83846
3.005352	76.75711	76.75658	65.81489	77.58133	81.97678	78.823	81.12352	95.69611	83.555	82.42671	75.07615	70.16323
3.434688	84.07461	81.63864	71.23884	81.92481	82.17692	74.17297	87.65423	90.64828	85.95172	72.92456	78.16981	76.15125
3.864024	86.36839	89.56118	70.72297	84.99694	84.41621	83.70977	86.52993	93.05406	82.02902	70.40343	80.07778	71.59022
4.293336	86.82805	85.25363	70.0189	89.99651	85.63726	80.33426	85.93873	102.0864	84.96666	62.42038	82.361	70.64733
4.722696	90.37639	84.65029	79.71985	82.50768	86.22333	85.18816	91.9195	94.72778	87.60655	72.23408	86.04477	77.21947
5.152032	91.55822	84.16943	90.8336	91.27874	91.65824	77.43974	84.71428	102.0691	78.0702	77.41616	87.65959	73.80463
5.581368	90.45799	93.77086	100.3904	84.30348	89.58664	80.93864	90.9855	91.70453	85.92663	79.48787	84.01609	73.44259
6.010704	86.74001	101.5715	78.12441	82.43166	98.49265	77.19066	87.37743	95.07919	90.98991	79.34463	84.72017	69.2062
6.44004	95.67848	98.3135	104.2611	77.52315	96.1874	72.58625	91.30327	89.04908	90.2378	75.1829	84.7788	73.76623
6.869376	89.34304	92.09107	102.7133	82.88058	92.46636	78.5307	85.49331	95.71996	84.29913	70.55857	83.23266	81.61786
7.298712	87.94012	86.03898	100.7326	90.90626	93.88865	80.35309	86.73215	80.02961	91.04253	73.02719	86.38248	79.28723
7.728048	94.63969	88.99867	99.55124	82.00224	94.70006	80.13689	89.46562	93.706	91.26266	83.56178	88.46716	77.05477
8.157384	96.09948	85.95302	100.0311	89.84002	96.3611	80.01953	95.52928	98.15631	89.83739	83.79632	83.34346	79.54711
8.58672	91.17974	95.66446	106.0738	90.83765	98.13587	72.65239	86.82149	90.86227	92.42874	73.67946	88.74904	79.83699
9.016056	95.10342	94.67104	106.8295	80.27965	98.0693	77.01282	91.36458	91.38773	90.40777	80.67112	87.03122	79.56454
9.445392	92.03848	95.14132	107.0438	106.8425	93.03976	72.13008	91.17654	98.54382	87.90464	81.0354	88.60276	81.46243
9.874728	92.36286	91.33563	107.2868	94.00862	93.70865	77.73148	89.09973	93.92081	94.66331	78.97827	84.07054	84.55313
10.30406	92.12345	95.05168	101.3143	81.16445	96.2249	71.78442	89.07466	88.97249	87.77973	73.3764	83.68611	88.43397

NBD-PE 20°C + Cho

time(sec)	1	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.429336	12.9207	18.70192	14.32639	16.06953	17.1656	16.30171	5.285047	18.78052	15.31115	33.88489	12.9435
0.858672	23.75781	30.70583	22.66803	27.23626	31.72285	28.72014	7.53214	27.50371	27.74456	25.04441	29.61729
1.288008	32.76338	44.59008	42.43054	35.21787	35.14592	34.97612	22.38466	42.67616	36.31378	58.15155	45.19831
1.717344	38.42238	47.36013	50.30397	44.87798	50.58884	43.08858	26.12212	53.97561	41.00015	60.67393	53.39643
2.146668	45.01896	48.50754	53.64346	48.80669	54.16613	50.047	32.19879	53.56413	50.97491	70.25548	59.76121
2.576016	50.20927	55.0587	47.68805	56.9559	56.33784	52.73139	36.33768	50.85484	50.38316	70.94454	60.17044
3.005352	51.27746	62.15719	58.1018	60.09032	62.14043	56.89791	43.09446	62.65145	56.61186	80.25436	60.14757
3.434688	57.54189	64.55884	70.54406	61.87469	67.68284	61.83166	49.38075	66.71054	61.23495	70.08985	70.80516
3.864024	60.69901	65.24872	67.57609	64.1742	67.09779	64.6694	50.63861	59.87995	66.65885	72.53725	70.75777
4.29336	60.93156	69.60864	73.9818	70.72048	67.02413	66.32339	53.56896	77.03988	66.9985	74.65251	68.64149
4.722696	67.35556	74.49502	75.0117	67.87672	67.96237	70.62641	56.9641	78.12153	69.61979	74.08552	84.92592
5.152032	65.88384	75.111822	70.93126	75.30925	72.35704	71.77103	57.28252	79.0197	69.9818	79.31609	80.60702
5.581368	70.17214	80.84996	70.29943	76.51538	74.4761	73.67264	66.73349	69.16443	73.5138	83.25846	76.03366
6.010704	69.22392	78.82176	79.91798	76.9257	76.08302	73.62773	67.3142	86.43749	69.94	84.33941	83.68134
6.44004	69.28544	78.61361	84.104	77.92289	77.71679	74.68289	70.04151	75.70953	74.58222	83.33669	80.52738
6.869376	73.35803	81.08324	86.14629	81.29137	76.88994	79.54572	73.84059	76.26752	81.08992	85.38761	89.7179
7.298712	72.5538	79.61653	88.36377	87.77788	80.28445	83.35813	73.63514	85.00968	77.5033	87.84407	88.45859
7.728048	77.13935	82.43355	84.58288	80.76633	84.46966	80.63151	74.92074	74.86171	83.1451	86.95855	87.59231
8.157384	74.44765	83.04922	82.00396	84.18366	82.53023	80.60541	80.12311	82.78086	80.98081	85.60703	86.9733
8.58672	76.48669	84.46712	84.14201	85.19619	84.08523	80.73936	84.4019	87.92974	78.16106	91.87102	104.8511
9.016056	80.61897	85.45532	85.88824	87.06627	85.97339	84.38855	77.41787	79.32874	82.72836	84.25938	95.84637
9.445392	81.2883	85.74149	102.7316	84.94314	83.0067	90.07073	79.96656	78.60136	83.45575	85.20565	78.46816
9.874728	79.54831	90.8549	87.36199	88.4776	86.15417	83.47406	82.36529	84.89558	86.3065	88.07356	106.15
10.30406	80.95852	86.02534	91.44069	89.55743	88.9648	88.30962	84.14885	82.76931	87.33142	80.56964	102.9233

NBD-PE 40°C + Cho

time(sec)	14	17	18	19	20	21	22	23	25	26	28	29
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.429336	21.33737	20.63638	25.04284	43.71001	11.14354	23.55951	25.35908	27.67394	23.56805	29.50891	23.54824	36.85792
0.858672	37.06874	35.71789	43.65247	62.85154	21.04617	42.78296	39.57022	46.31491	37.81749	47.77595	39.46543	53.04987
1.288008	51.1735	46.37085	57.55913	76.08016	13.1087	51.73365	53.00816	58.78386	50.83291	62.55364	49.95084	66.20553
1.717344	47.83661	54.52868	65.80548	83.58769	35.81539	58.9223	60.60753	64.952	57.78763	73.63834	59.82216	73.84329
2.146668	56.33121	61.9736	71.18423	91.20633	34.39545	65.48846	66.85411	71.64749	62.90683	80.69078	66.22184	78.74035
2.576016	66.79204	70.21391	75.56384	93.18066	42.93763	70.82892	70.72162	74.46041	69.0398	77.90093	72.354	83.15627
3.005352	76.87066	72.24538	83.42352	95.73711	41.93176	72.76043	73.71678	78.33349	72.7994	81.8162	79.05898	86.18077
3.434688	67.93627	75.17	85.10401	96.74535	55.97345	78.12257	76.96973	81.54416	76.25775	86.89785	82.21202	90.60507
3.864024	77.32189	78.71843	86.9044	103.0376	64.16335	77.23095	79.57244	85.70338	80.09278	96.36044	83.7909	92.68643
4.29336	74.42137	79.63197	92.21788	102.432	52.32417	82.23855	81.90089	84.84409	80.38648	94.159	84.81949	94.35557
4.722696	77.54382	82.13182	96.32118	101.5922	58.52098	82.40413	84.44725	89.411	84.04623	93.61129	92.51175	93.23136
5.152032	80.35159	84.37185	94.13158	104.5119	73.59764	84.81465	86.91063	89.15316	84.95632	86.92528	93.73537	95.42641
5.581368	78.70492	87.04979	97.94265	105.318	77.36388	89.67942	86.60245	89.42865	85.64009	99.59437	92.18885	96.0984
6.010704	86.54522	87.3956	101.1645	108.1429	93.59409	90.23418	89.57923	91.12541	85.26181	96.62196	98.11018	97.88487
6.44004	83.80814	91.32022	99.52957	107.5719	95.92531	88.31664	89.52787	90.00198	85.7136	96.99058	97.48828	100.0783
6.869376	76.59203	92.12033	101.7946	108.2158	84.89639	89.45994	90.19627	93.93034	90.45944	96.57111	99.91537	99.82634
7.298712	88.61676	93.04477	97.76693	106.2217	93.81992	87.86348	88.91376	93.91204	91.20905	93.5079	96.81502	101.1547
7.728048	89.8529	95.00462	105.1187	110.3763	96.35139	90.88874	93.04095	95.28879	90.38096	93.85868	98.94444	99.96597
8.157384	93.60596	95.72506	102.4468	111.8771	97.29862	90.15307	92.80864	94.35823	92.50999	98.21549	99.16678	102.0616
8.58672	93.49085	96.75557	101.9889	111.8617	91.17126	91.91109	92.59338	94.3329	92.10187	98.44197	101.6696	101.8658
9.016056	89.36871	96.54391	102.1999	110.5677	111.5797	87.16359	92.8929	98.15744	91.49716	94.83352	105.4785	103.3959
9.445392	91.20592	98.19935	102.2515	111.0006	86.0069	89.63356	94.31647	94.67587	88.21705	95.88613	104.4783	100.0354
9.874728	92.70204	98.53469	102.3708	114.2589	100.7896	92.50295	91.55341	93.83637	89.74417	96.06886	104.3341	102.3269
10.30406	87.26808	99.32506	103.9234	111.869	109.914	91.87475	95.31536	95.89603	90.34884	93.68122	104.7355	102.2719

NBD-TM 20°C

time(sec)	15	16	17	18	19	20	21	22	24	25	26
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.429336	31.29367	39.21146	27.80778	30.0377	32.00091	26.22547	26.61038	29.48311	23.42617	33.59064	14.52231
0.858672	46.0695	76.09882	44.9328843.0987	46.34414	41.78108	44.39941	41.65748	53.62042	49.10158	26.52345	
1.288008	51.55128	64.88603	54.50834	57.54586	57.67015	64.41001	53.5205	48.9694	51.2486	59.41595	40.0993
1.717344	59.91686	74.51658	62.70577	63.79143	64.36034	68.18714	62.68941	60.58217	60.1178	67.69037	48.58694
2.146668	79.03981	81.30429	72.30303	67.83284	75.2363	105.8035	67.77758	67.03053	66.35044	72.02219	56.54281
2.576016	72.46778	89.02519	69.10597	77.06271	84.65205	82.13967	72.20017	71.83349	75.73268	73.73522	49.54726
3.005352	81.31869	97.0467	73.30175	79.94869	83.93207	75.16423	71.73278	69.79257	89.87784	79.20953	58.30282
3.434688	99.451	98.31517	77.77572	81.23386	100.5043	84.93117	79.42699	71.57363	73.07908	81.70786	65.44454
3.864024	92.47391	95.29832	80.59153	77.57687	93.22243	85.87878	79.16949	77.5621	80.56206	85.80728	62.02886
4.293336	90.04498	93.11033	79.20759	82.53111	85.74184	87.11322	82.51144	72.41627	91.25865	86.11313	68.81499
4.722696	104.468	100.927	90.09683	87.88168	86.90055	88.91661	86.2119	85.38419	72.70056	89.17385	65.8777
5.152032	82.83315	89.32593	86.54519	93.10552	96.07344	87.01196	81.73013	71.87736	86.75832	88.63183	72.54561
5.581368	82.1977	96.91112	84.26566	81.2104	96.44702	91.77725	83.49495	80.9388	72.7023	93.59009	68.1988
6.010704	85.79786	92.0861	88.69254	92.32973	93.85097	97.62478	86.10366	73.772	74.71745	90.95249	73.82137
6.44004	87.02951	93.89276	93.46647	86.50823	90.93638	90.02367	83.83158	76.75642	81.49803	92.5751	77.76629
6.869376	80.59772	99.92665	91.25059	89.5449	118.5707	90.55854	83.20547	73.4694	102.0133	93.12069	73.78012
7.298712	95.47622	104.4813	91.51031	90.52568	96.34521	92.79573	90.96524	84.22242	106.404	91.94231	77.02537
7.728048	83.03386	114.9489	85.27211	94.58835	103.1344	94.93557	85.946	82.29488	100.0983	91.68	77.78275
8.157384	119.6029	107.3302	96.7363	92.50556	101.5104	87.63109	85.19932	82.25722	89.1236	92.82286	71.93414
8.58672	96.83302	119.5566	92.24369	89.60174	92.34639	96.71456	86.45089	76.86225	86.1751	93.67134	80.89856
9.016056	91.29235	104.6466	95.84814	88.76641	99.44811	99.65954	82.59691	81.25828	91.00717	93.7379	80.66576
9.445392	89.06063	94.74524	88.91619	99.81273	97.97518	114.7565	84.91973	81.23589	101.1854	94.47851	82.3611
9.874728	81.34915	110.6554	96.96855	88.78371	101.5183	101.72	89.03194	86.99568	84.66957	94.35858	77.84863
10.30406	89.45477	93.56585	91.83622	90.59391	96.32191	94.24831	89.50245	105.0319	80.53251	90.7838	79.56035

NBD-TM 20°C + EGFR-TM

time(sec)	16	17	18	19	20	21	26	27	28	29	30	31
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.429336	28.85134	19.08841	27.39175	14.38	22.60765	23.13274	24.03889	23.18648	21.55027	20.724	19.8248	24.67955
0.858672	42.80888	31.24348	41.95006	28.32806	38.7196	37.04654	39.20248	36.71998	35.11409	35.05705	32.40008	37.68098
1.288008	45.4812	41.73108	51.90584	45.4503	47.33178	44.233	46.80043	48.21231	51.44111	47.47664	44.543	49.96157
1.717344	64.82465	47.5401	63.2838	52.70511	58.17411	50.60908	54.92925	53.35375	55.79584	52.49058	52.02166	56.06728
2.146668	72.60515	52.94172	65.8806	56.98818	63.90749	52.70082	62.51138	59.53579	64.75057	55.11057	55.07639	59.89094
2.576016	77.32216	56.34752	73.09221	59.36541	65.73263	62.03987	64.17911	66.55747	67.55998	56.72304	58.177	68.55684
3.005352	75.54112	63.14553	74.43875	64.13222	72.94064	61.43816	68.15092	66.65819	76.78037	62.01098	67.90627	72.58531
3.434688	82.88681	67.24802	75.97222	69.96115	69.08105	70.94245	75.94044	67.36774	75.7898	64.73309	65.06883	73.30161
3.864024	90.38433	66.48002	76.82083	70.63811	78.34873	74.36134	70.6023	69.70029	82.51074	67.30413	66.02071	77.21885
4.29336	83.21855	73.58973	80.50131	76.04134	73.14231	74.89296	72.91858	76.26429	79.17689	66.70711	71.6902	80.82675
4.722696	83.90206	75.14198	81.16216	79.71659	76.67188	76.39218	76.47024	78.49235	86.24395	70.66543	80.48252	83.77464
5.152032	89.89168	74.51798	83.76283	75.03094	78.15125	77.73319	75.56179	73.70841	88.73487	70.90921	75.9752	81.92004
5.581368	93.17351	80.18014	84.83429	75.55108	82.65597	82.4545	76.12599	74.07806	86.53987	72.58967	78.28827	83.32666
6.010704	103.0465	76.54666	86.48464	79.56685	82.41596	83.08967	81.58534	79.79141	82.84363	72.56509	78.25191	84.64266
6.44004	80.49969	81.66677	81.31577	84.87168	86.85707	80.39976	79.16396	80.76035	86.47572	72.96967	79.23277	86.80363
6.869376	89.2159	81.44274	85.99188	80.8503	88.16873	83.77128	81.74176	76.87691	92.9247	78.1062	76.59005	86.12464
7.298712	97.65868	81.50086	84.61546	80.12033	87.28964	86.18962	84.34027	79.87198	96.54486	74.8134	82.66641	89.75361
7.728048	117.5598	86.33065	84.44015	88.88628	88.98709	86.45981	79.05791	79.0572	88.98586	77.53977	85.665	90.05981
8.157384	96.14415	84.09099	84.5913	86.77594	83.4674	84.87096	80.81216	82.1291	94.73218	78.5224	80.13747	89.54794
8.58672	84.53618	85.56718	86.93695	83.92386	84.71004	88.38947	76.75609	80.85346	93.18057	77.13921	83.4979	89.79145
9.016056	99.84163	87.55342	88.33589	81.98082	87.7742	86.46839	78.28477	81.3028	95.62524	77.08061	81.12253	90.6225
9.445392	111.2247	88.39548	88.49446	87.56553	83.93338	91.54147	83.67464	79.28917	93.6506	76.47354	81.17653	92.5063
9.874728	108.7077	85.44408	86.74719	89.50242	91.6924	87.08128	79.70845	80.87441	92.26285	79.06148	81.10413	93.57114
10.30406	98.31095	85.99396	84.90217	85.57893	90.13162	85.98813	76.43364	82.60802	99.14506	77.89877	83.94687	96.30763

● NBD-TM, NBD-PE(20°C)の平均蛍光強度回復率データ(%)

	NBD-TM, 1 mol%	NBD-TM, 0.1 mol%	NBD-PE, 0.1 mol%
0.00	0.00	0.00	0.00
0.43	17.42	28.56	26.05
0.86	29.39	46.69	39.88
1.29	37.95	54.89	47.70
1.72	46.61	63.01	55.45
2.15	51.66	73.75	61.62
2.58	53.82	74.32	65.60
3.01	60.06	78.15	69.68
3.43	64.19	83.04	73.40
3.86	66.07	82.74	74.20
4.29	68.47	83.53	76.76
4.72	67.63	87.14	78.23
5.15	72.97	85.13	78.43
5.58	71.34	84.70	80.06
6.01	74.62	86.34	81.55
6.44	74.82	86.75	83.39
6.87	77.72	90.55	85.05
7.30	76.26	92.88	82.63
7.73	81.46	92.16	83.71
8.16	78.24	93.33	84.80
8.59	80.42	91.94	83.49
9.02	81.14	91.72	85.63
9.45	82.23	93.59	84.72
9.87	80.76	92.17	83.86
10.30	83.53	91.04	81.92

sec

%

5-9 非標識 GM3 を添加した際の NBD-TM の蛍光寿命変化

DMPC LUV, 水和条件 ; PBS pH 7.4 10mM NaCl

● 20 °C (単位:ns)

NBD-TM(mol%)	GM3(mol%)	τ_1	τ_2	int avg	amp avg
0.05	0	10.242	2.804	8.748	6.681
0.05	0.1	10.388	3.379	9.024	7.4
0.05	0.2	10.282	3.033	9.03	7.278
0.05	0.5	10.627	3.939	9.23	7.846
0.05	1	10.771	3.644	9.34	7.734
0.05	2	10.653	3.806	9.385	7.99

● 40 °C (単位:ns)

NBD-TM(mol%)	GM3(mol%)	τ_1	τ_2	int avg	amp avg
0.05	0	7.1097	2.792	6.2026	5.3661
0.05	0.1	7.1987	1.94	6.2934	4.9086
0.05	0.2	7.3678	2.376	6.4509	5.3161
0.05	0.5	7.4344	2.09	6.4323	5.0249
0.05	1	7.2653	2.243	6.3391	5.1421
0.05	2	7.558	2.394	6.5691	5.3486

5-10 各 ATTO594 標識脂質を用いた FRET の比較

DMPC 膜中に NBD-TM 0.05 mol% と ATTO594 標識脂質を組み込んで FRET 測定を行った。得られた減衰曲線から amplitude weighted average lifetime を取得して次式から FRET 効率を計算した。

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (13)$$

$$\langle \tau \rangle' = \frac{\sum_i A_i \tau_i}{\sum_i A_i} \quad (14)$$

$$E_{\text{app}} = 1 - \frac{\langle \tau_{\text{DA}} \rangle'}{\langle \tau_{\text{D}} \rangle'} = 1 - \frac{F}{F_0} \quad (15)$$

● サンプル調製

GM3

	1	2	3	4
DMPC (nmol)	100	100	100	100
NBD-TM (nmol)	0.05	0.05	0.05	0.05
ATTO594-GM3 (nmol)	0.000	0.036	0.073	0.146
total volume (mL)	2	2	2	2

GM1

	1	2	3	4
DMPC (nmol)	100	100	100	100
NBD-TM (nmol)	0.05	0.05	0.05	0.05
ATTO594-GM1 (nmol)	0.000	0.024	0.048	0.095
total volume (mL)	2	2	2	2

SM

	1	2	3	4
DMPC (nmol)	100	100	100	100
NBD-TM (nmol)	0.05	0.05	0.05	0.05
ATTO594-SM (nmol)	0.000	0.040	0.080	0.160
total volume (mL)	2	2	2	2

● 蛍光強度と FRET 効率の測定データ

GM3	0.000	0.036	0.073	0.146	(mol%)
	5.351	5.007	4.518	4.195	
	5.241	4.479	4.363	3.391	
average	5.296	4.743	4.440	3.793	(ns)
FRET efficiency	0.000	0.104	0.162	0.284	
S.E.	0.000	0.041	0.006	0.068	
GM1	0.000	0.024	0.048	0.095	(mol%)
	4.436	4.661	3.938	4.165	
	5.347	5.102	4.520	3.872	
	5.162	4.982	4.970	4.296	
average	4.982	4.915	4.476	4.111	(ns)
FRET efficiency	0.000	0.013	0.101	0.175	
S.E.	0.000	0.030	0.034	0.062	
SM	0.000	0.040	0.080	0.160	(mol%)
	5.445	4.988	4.577	4.115	
	4.224	4.064	3.811	3.338	
	4.327	4.042	3.902	3.917	
average	4.665	4.365	4.097	3.790	(ns)
FRET efficiency	0.000	0.064	0.122	0.188	
S.E.	0.000	0.013	0.020	0.045	

5-11 非標識 GM3 を用いた FRET 測定

標識率の異なる二つの GM3 含有サンプルで FRET 測定を行い、その測定値から共通の E_{random} を見積もるための実験。

- サンプル濃度

sample A	1	2	3	4
DOPC(μM)	433	433	433	433
NBD-TM(μM)	0.25	0.25	0.25	0.25
ATTO594-GM3(μM)	0	0.25	0.5	1
GM3 ratio (mol%)	0	0.058	0.12	0.23

sample B	1	2	3	4
DOPC(μM)	433	433	433	433
NBD-TM(μM)	0.25	0.25	0.25	0.25
ATTO594-GM3(μM)	0	0.125	0.25	0.5
non-label GM3(μM)	0	0.125	0.25	0.5
GM3 ratio (mol%)	0	0.058	0.12	0.23

- 測定結果

sample A	1	2	3	4	
ATTO594-GM3/mol%	0	0.058	0.115	0.230	(mol%)
E_{app}	0	0.132	0.243	0.359	
E_{random}	0	0.075	0.144	0.267	
E_{bound}	0	0.057	0.099	0.092	

sample B	1	2	3	4	
ATTO594-GM3/mol%	0	0.029	0.058	0.115	(mol%)
E_{app}	0	0.058	0.069	0.168	
E_{random}	0	0.038	0.075	0.144	
E_{bound}	0	0.020	-0.006	0.024	

5-12 非標識脂質による競合阻害実験

測定サンプル：水和 MLV, 水和溶液：PBS pH 7.4 137mM NaCl

- サンプル濃度

	1	2	3	4	5
DOPC	432	432	432	432	432
NBD-TM	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
ATTO594-GM3	-	0.25	0.25	0.25	0.25
GM3	-	-	2.5	-	-
GM1	-	-	-	2.5	-
LacCer	-	-	-	-	2.5 (μM in 400μL)

- 平均寿命 (amplitude weighted average lifetime) の測定結果

ATTO594-GM3 (mol%)	τ_0	τ			
		0.05	0.05	0.05	0.05
Additive (0.5 mol%)	-	-	GM3	GM1	LacCer
lifetime (ns)	5.68	4.81	5.21	4.82	4.69
	5.53	4.66	4.78	4.63	4.74
	5.90	4.99	5.77	4.74	4.96
		5.19	4.70	5.03	6.48
			5.10		
average lifetime (ns)	5.71	4.91	5.11	4.81	5.22
S.D.	0.19	0.23	0.42	0.17	0.85

5-13 蛍光自己消光実験

● NBD 標識ペプチドの蛍光強度観測条件

Excitation バンド幅 : 5 nm

Emission バンド幅 : 5 nm

レスポンス : 0.2 s

走査速度 : 200 nm/min

励起波長 : 450 nm

蛍光波長 : 541 nm

蛍光自己消光解析に用いた蛍光スペクトルは日本分光社製蛍光分光計 FP-6500 および FP-8500 を用いて測定した。NBD は 450 nm で励起し 400 nm から 650 nm まで蛍光強度を掃引した。

530 nm 付近に検出される水のラマン散乱ピーク除くため、水サンプルを同条件で測定して差分した。また、MLV 濃度に依存して検出されるレイリー散乱が検出波長範囲に漏れこむ場合に、蛍光プローブを含まない同濃度の脂質 MLV サンプルを調製し測定することで差分した。

蛍光強度は脂質膜に適切に再構成された蛍光標識ペプチドの最終濃度で規格化した。最終濃度は MLV を含む水溶液を 10 倍量のエタノールに溶解して蛍光強度を測定し、強度算出に以下の式を用いた。

$$I_{\text{norm}} = I_{\text{sample}}^{\text{MLV}} \times \frac{I_{2000}^{\text{EtOH}}}{I_{\text{sample}}^{\text{EtOH}}} \times \frac{1}{(\text{initial concentration})} \quad (16)$$

ここで、 $I_{\text{sample}}^{\text{MLV}}$ はそれぞれ NBD-TM が 0.05 mol% の時の MLV 中での蛍光強度、およびその他の濃度条件のサンプルの MLV 中での蛍光強度。また、 I_{2000}^{EtOH} と $I_{\text{sample}}^{\text{EtOH}}$ はそれぞれ NBD-TM が 0.05 mol% 時のエタノール溶解液中の蛍光強度、およびその他の濃度条件のサンプルのエタノール溶解液中の蛍光強度。すなわち、NBD-TM が MLV 中で低濃度の条件においてペプチドが 100% 膜に再構成されていると仮定し、エタノール溶解液中の強度を他の濃度条件での強度と比較することでサンプル中の蛍光プローブ最終濃度を算出した。MLV 中の蛍光強度を最終濃度で規格化することで、蛍光プローブのモル濃度あたりの蛍光強度として値を比較した。

● 蛍光強度の温度変化測定

NBD-TM の脂質膜中濃度を 0.005 mol% と 0.05 mol% で変化させ、温度変化に対する蛍光強度の変化を比較した。本論 3 章、図 3-1, 3-2 に掲載。

Excitation バンド幅 : 5 nm, Emission バンド幅 : 5 nm, レスポンス : 4 sec, 感度 : High, 励起波長 : 450 nm, 蛍光波長 : 541 nm, 温度変化速度 : 5 °C/1 min, ホルダー温度が測定温度 ± 0.1 °C に 5 秒間とどまつた時に測定。蛍光強度はサンプル中の NBD-TM 濃度で規格化。

● 測定データ

	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	°C
DOPC,0.005 mol%	46.067	44.762	42.324	39.409	36.606	34.705	31.778	29.625	27.544	25.820	24.095	
S.E.	1.248	1.447	0.996	0.295	0.291	0.905	1.554	2.071	2.641	3.135	3.798	
DOPC,0.05 mol%	37.883	35.683	32.753	29.806	27.013	24.383	21.776	19.520	17.395	15.528	14.198	
S.E.	1.209	1.569	1.461	1.237	0.998	0.847	0.675	0.601	0.508	0.447	0.577	
DMPC,0.005 mol%	36.642	35.839	35.727	36.618	31.898	28.382	25.287	22.376	19.756	17.399	15.875	
S.E.	0.125	0.094	0.138	0.954	0.666	0.720	0.648	0.531	0.458	0.484	0.696	
DMPC,0.05 mol%	22.576	23.156	26.089	30.447	29.375	25.779	22.775	20.199	17.783	15.574	14.082	
S.E.	3.302	2.712	2.442	1.770	2.220	1.791	1.566	1.361	1.191	0.961	0.612	

● 二量化率の算出

各脂質膜条件において、もっとも量子収率が高いデータを得た条件においてすべての膜貫通ペプチドが単量体で存在していると仮定し、量子収率の減少率からその他の濃度における二量化率を算出した。

理論式として、膜中のペプチド濃度($[M]_0$)、二量化率($R_D; 0 \sim 1$)、平衡時の単量体、二量体濃度(それぞれ $[M]$, $[D]$)、単量体一二量体平衡の結合定数(K_a)を用いて、以下の計算を行った。

$$R_D = \frac{2[D]}{[M]_0} \quad (17)$$

$$K_a = \frac{[D]}{[M]^2} \quad (18)$$

$$[M] = [M]_0 - 2[D] \quad (19)$$

$$R_D^2 - \left(2 + \frac{1}{2K_a[M]_0} \right) R_D + 1 = 0 \quad (20)$$

$$R_D = \frac{2 + \frac{1}{2K_a[M]_0} - \sqrt{\left(2 + \frac{1}{2K_a[M]_0} \right)^2 - 4}}{2} \quad (21)$$

- 各サンプル中におけるNBD-TMの脂質中モル比と蛍光強度データ・二量化率

DOPC MLVs

	initial molar ratio(%)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.50	0.50	1.00	1.00
	final molar ratio(%)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.16	0.21	0.20	0.14
maximum intensity/concentration (a.u./nM)	30.82	36.87	33.04	26.98	40.79	34.92	36.11	21.88	24.29
dimer ratio	0.38	0.26	0.34	0.46	0.18	0.30	0.28	0.56	0.51

DOPC MLVs, GM3 5 mol%

	initial molar ratio(%)	0.05	0.05	0.13	0.33	0.33	0.50	0.50	1.00
	final molar ratio(%)	0.05	0.03	0.03	0.12	0.26	0.29	0.37	0.43
maximum intensity/concentration (a.u./nM)	33.79	46.70	49.92	23.12	30.12	21.41	31.43	23.33	34.54
dimer ratio	0.32	0.06	0.00	0.54	0.40	0.57	0.37	0.53	0.31

DMPC MLVs

	initial molar ratio(%)	0.05	0.05	0.05	0.20	0.50	0.50	0.50	1.00
	final molar ratio(%)	0.05	0.05	0.04	0.05	0.09	0.10	0.24	0.17
maximum intensity/concentration (a.u./nM)	25.04	27.88	33.04	17.64	26.60	22.52	18.49	24.79	23.48
dimer ratio	0.41	0.34	0.22	0.58	0.37	0.47	0.56	0.41	0.45

DMPC MLVs, GM3 5 mol%

	initial molar ratio(%)	0.05	0.05	0.10	0.19	0.25	0.30	0.32	0.50	0.50	1.00
	final molar ratio(%)	0.05	0.04	0.05	0.19	0.10	0.08	0.30	0.13	0.32	0.59
maximum intensity/concentration (a.u./nM)	37.84	31.06	27.36	42.34	24.03	30.37	33.65	23.83	36.73	30.32	34.00
dimer ratio	0.11	0.27	0.35	0.00	0.43	0.28	0.21	0.44	0.13	0.28	0.20

5-14 フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)

● 見かけの FRET 効率(E_{app})の算出

MLV 中の NBD-TM または NBD-PE は 450 nm で励起され、蛍光は 541 nm で測定した。ATTO594-GM3 は FRET によって励起、または NBD のための 450 nm の励起光によって直接励起され、625 nm 付近で最大蛍光を示した。スペクトルの取得には日本分光社製 FP-8500 を用いた。530 nm 付近に検出される水のラマン散乱ピーク除くため、水サンプルを同条件で測定して差分した。

FRET 効率の算出に用いる F_0 データの取得には、0.05 mol% または 0.005 mol% の NBD プローブ含有 MLV を調製し、蛍光スペクトルを測定した。また FRET アクセプターを含む F データの取得には、0.1 mol% の ATTO594-GM3 を含むサンプルを調製しスペクトルを取得した。NBD の蛍光強度減少率から算出する Donor-quenching FRET について、見かけの FRET 効率(E_{app})を以下の式から計算した。

$$E_{app} = 1 - \frac{F}{F_0} \quad (22)$$

$$\frac{F}{F_0} = \frac{I_{DA}(541) - kI_{DA}(625)}{I_D(541)} \quad (23)$$

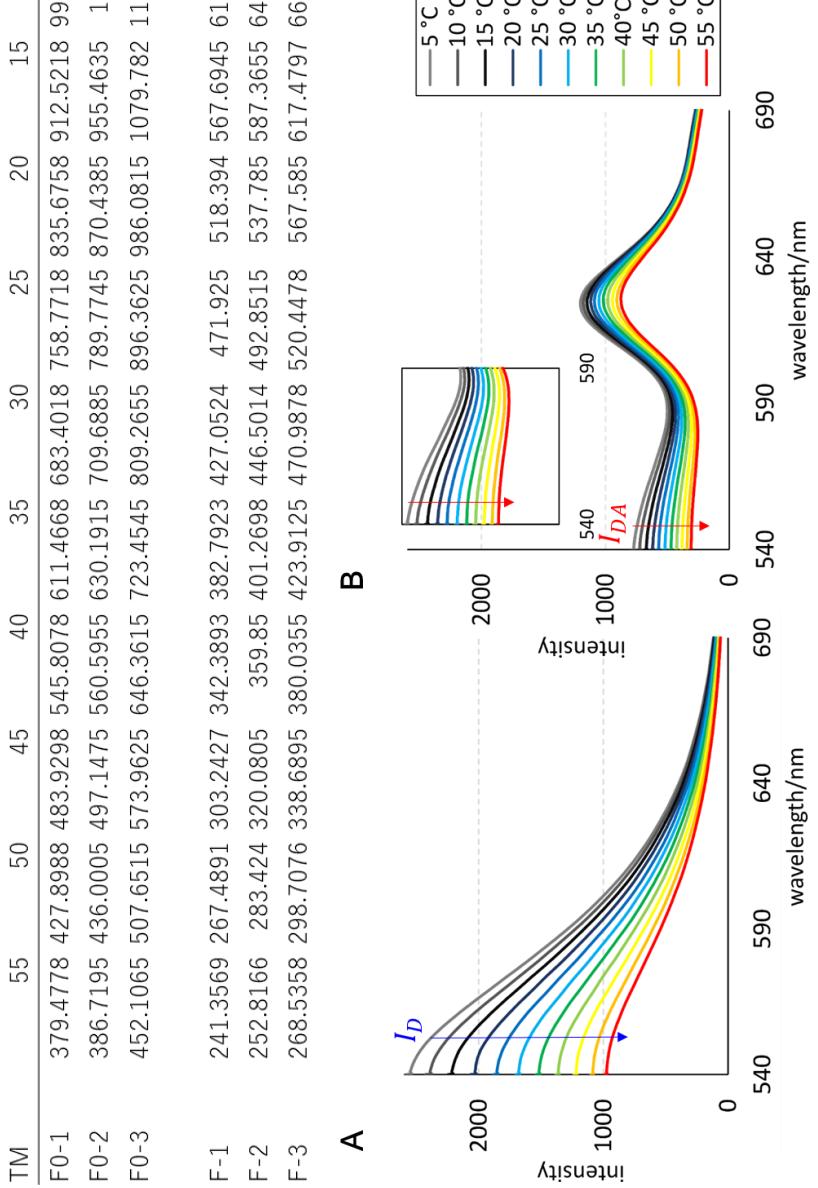
ここで、 $I_D(541)$ と $I_{DA}(541)$ はそれぞれ ATTO594-GM3 を含まない条件、含む条件における NBD 由来 541 nm の蛍光強度である。625 nm を最大蛍光波長とする ATTO594 の 541 nm 域における蛍光の漏れ込みを除くため、サンプルの 625 nm での蛍光強度を併せて取得した。この強度に対して、ドナーを含まないサンプルにおける ATTO594 の 541 nm/625 nm での蛍光強度比を示す定数 $k = I_A(541)/I_A(625)$ を積算することで、ドナーを含むサンプル中での漏れ込みを計算し、除いた。スペクトルはそれぞれ、5 °C から 55 °C まで 5 °C 間隔で取得した。

● 測定条件

励起波長 : 450 nm, 励起側スリット幅 : 5 nm, 蛍光側スリット幅 : 5 nm, 走査速度 : 100 nm/min, 検出感度 : high, レスポンス : 0.2 nsec

- DOPC 中 0.05 mol% 条件、541 nm における蛍光強度まとめ

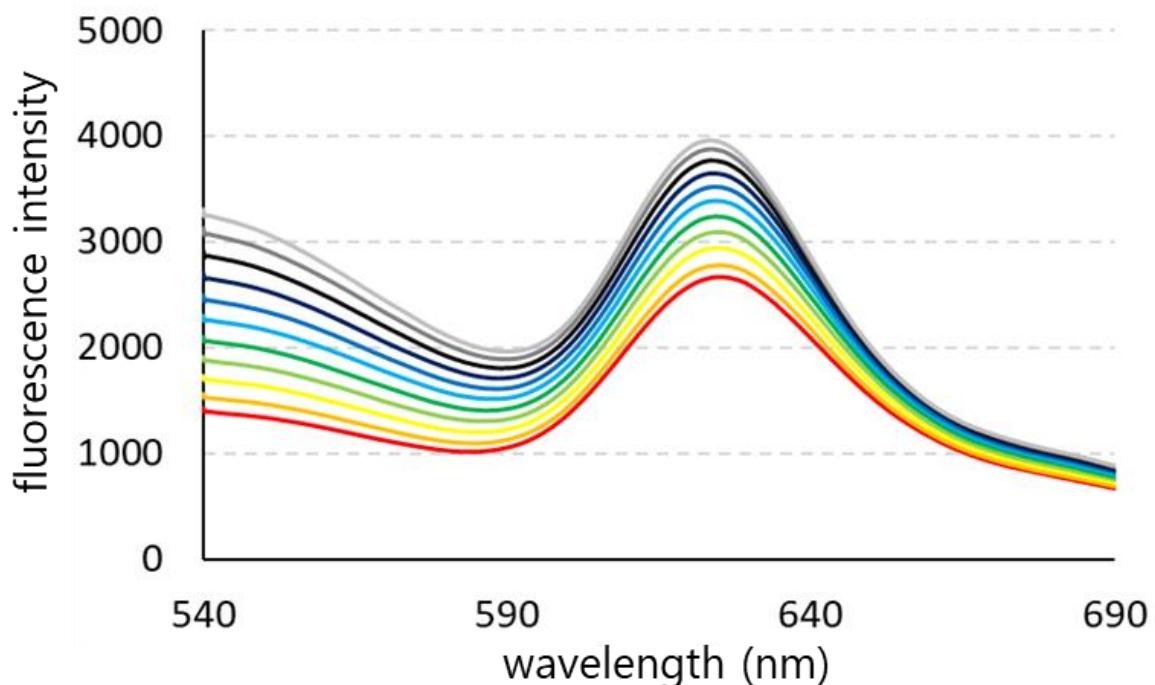
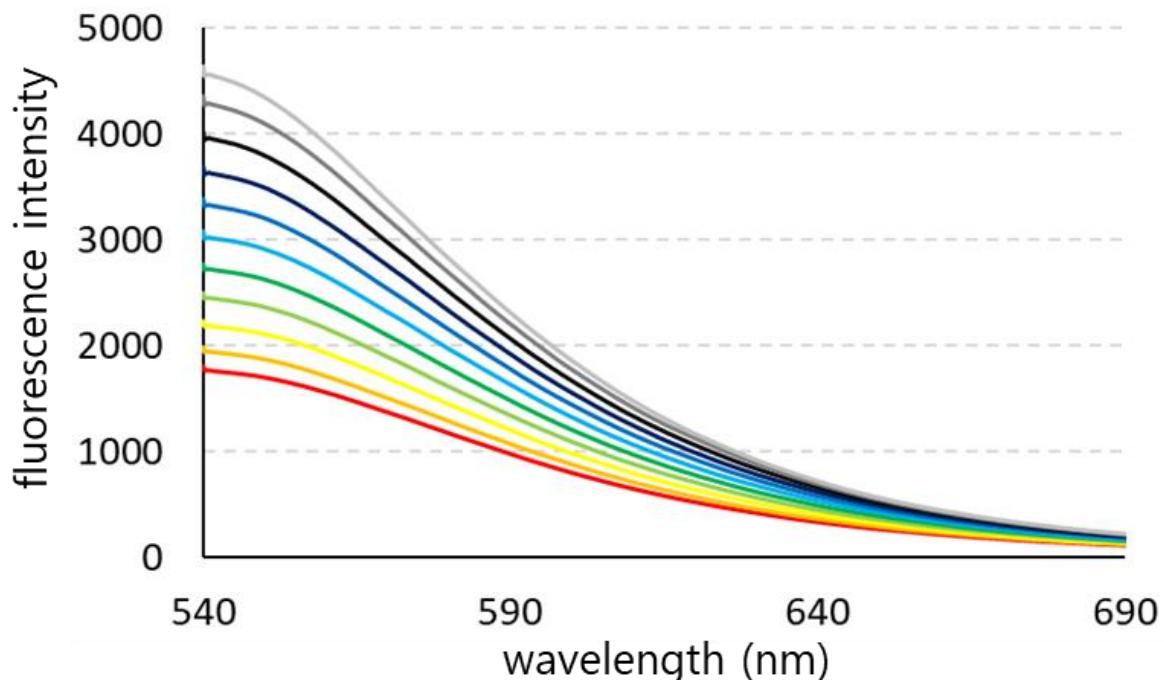
DOPC, 0.05 mol%												
	PE	55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5
F0-1	1804.96	1984.33	2230.4	2493.41	2768.28	3078.79	3384.54	3692.95	4022.5	4355.56	4636.69	
F0-2	973.9503	1072.958	1202.738	1339.308	1493.848	1659.818	1828.948	2008.198	2198.018	2388.418	2548.178	
F0-3	975.5535	1085.162	1218.462	1362.332	1517.602	1679.812	1855.772	2031.432	2217.572	2391.202	2550.772	
F-1	1345.635	1472.963	1643.27	1818.858	2003.606	2199.942	2388.429	2594.23	2804.591	3014.276	3190.416	
F-2	622.2146	679.9322	754.3204	832.3273	919.4022	1013.784	1106.434	1200.068	1303.279	1405.277	1493.184	
F-3	709.1455	776.9635	862.4715	949.6245	1044.702	1144.222	1248.492	1351.242	1458.932	1563.252	1662.182	



● スペクトルの測定データ

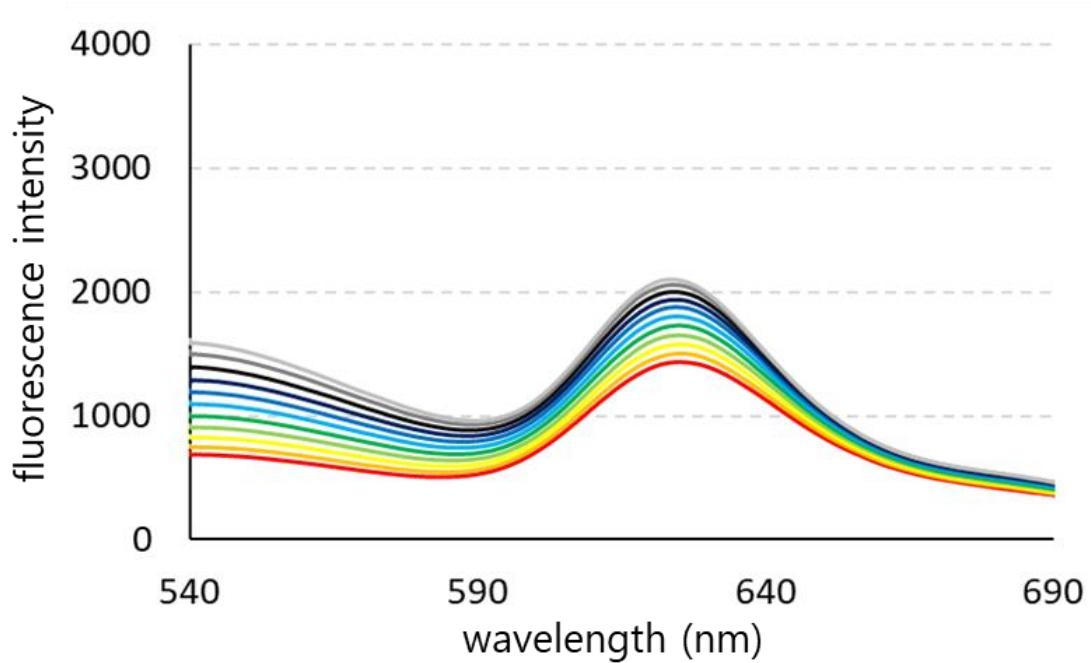
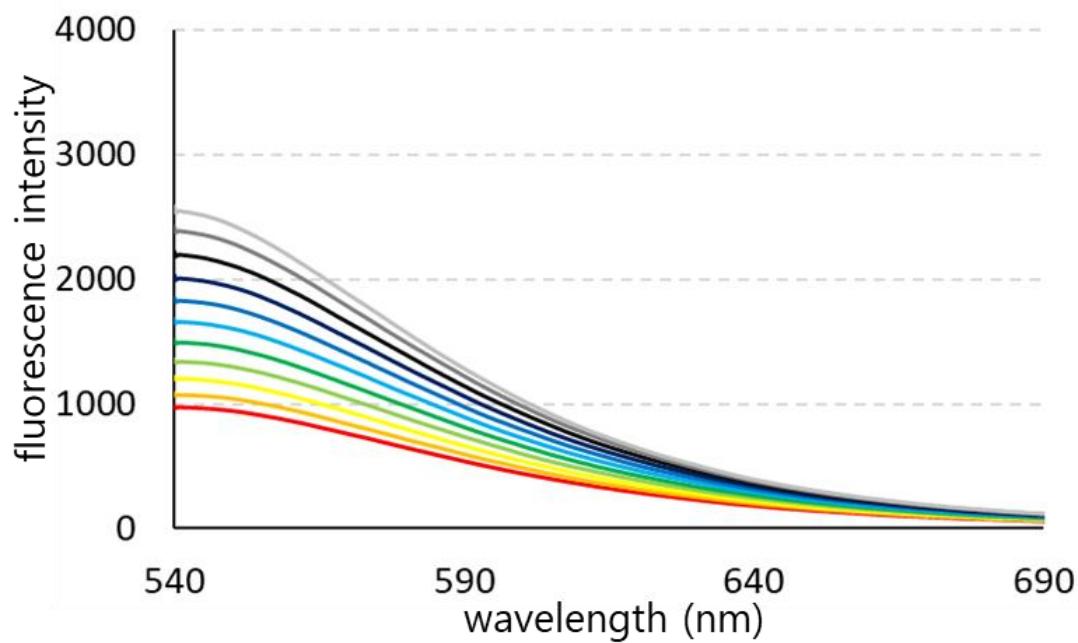
NBD-PE, 0.05 mol%①

サンプル条件 : NBD-PE 50 nM, DOPC 100 μ M



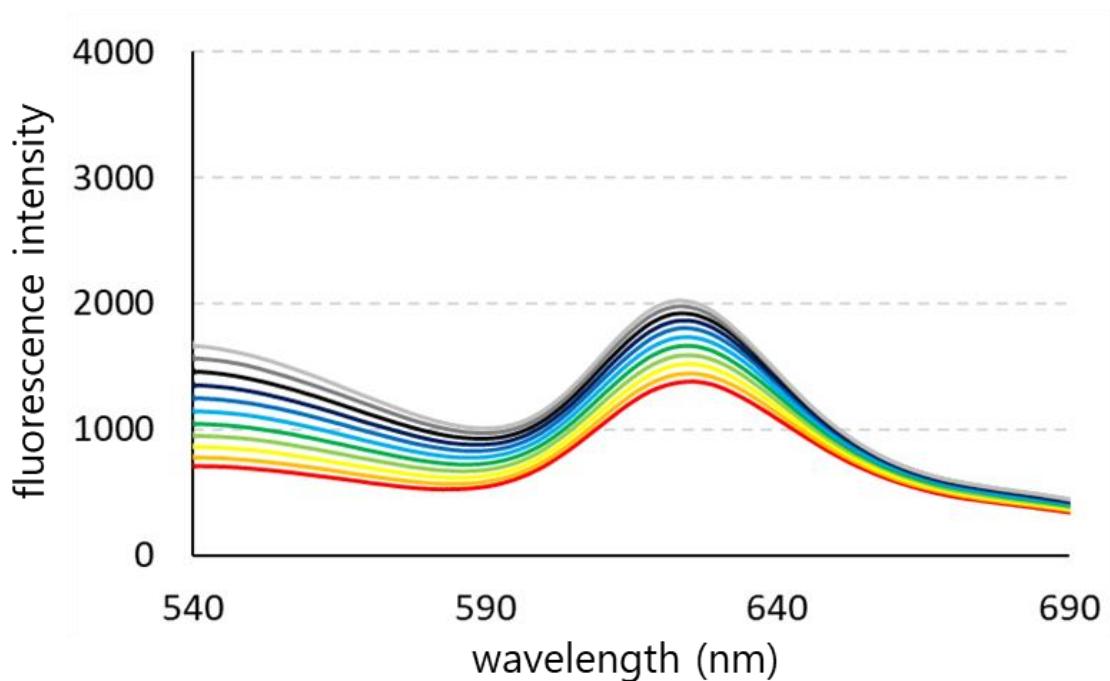
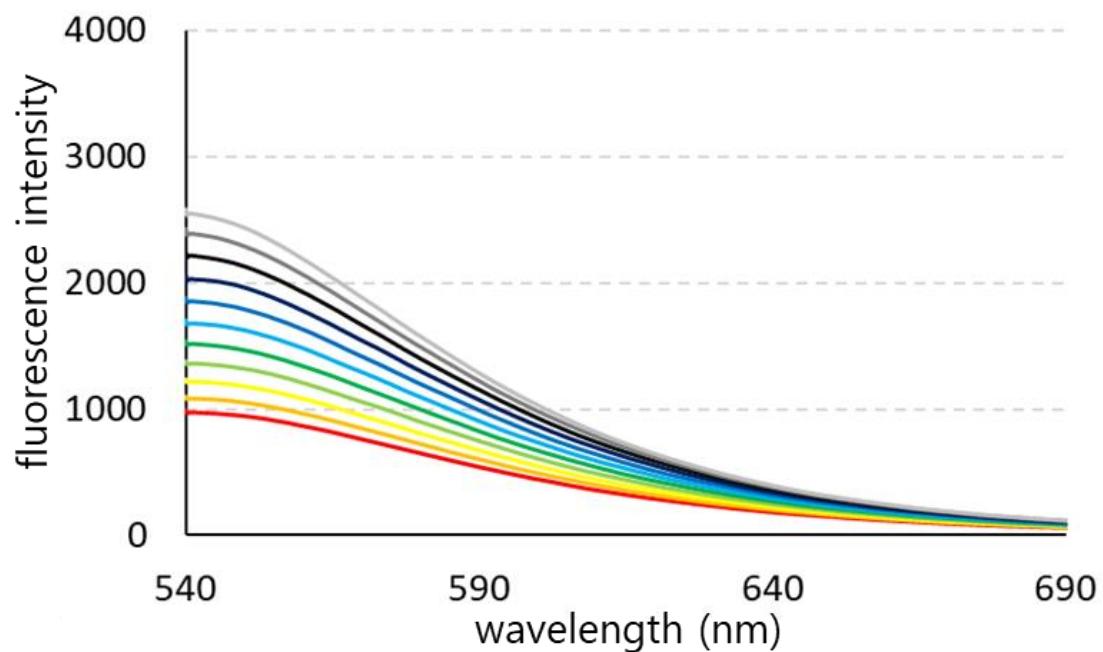
NBD-PE, 0.05 mol%②

サンプル条件 : NBD-PE 25 nM, DOPC 50 μ M



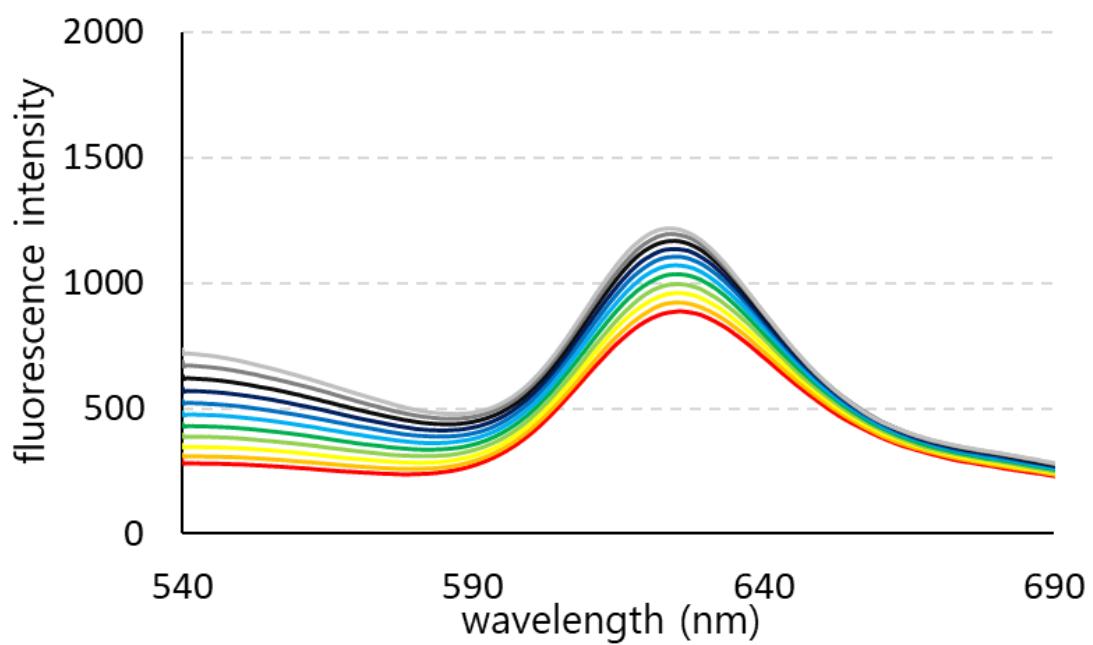
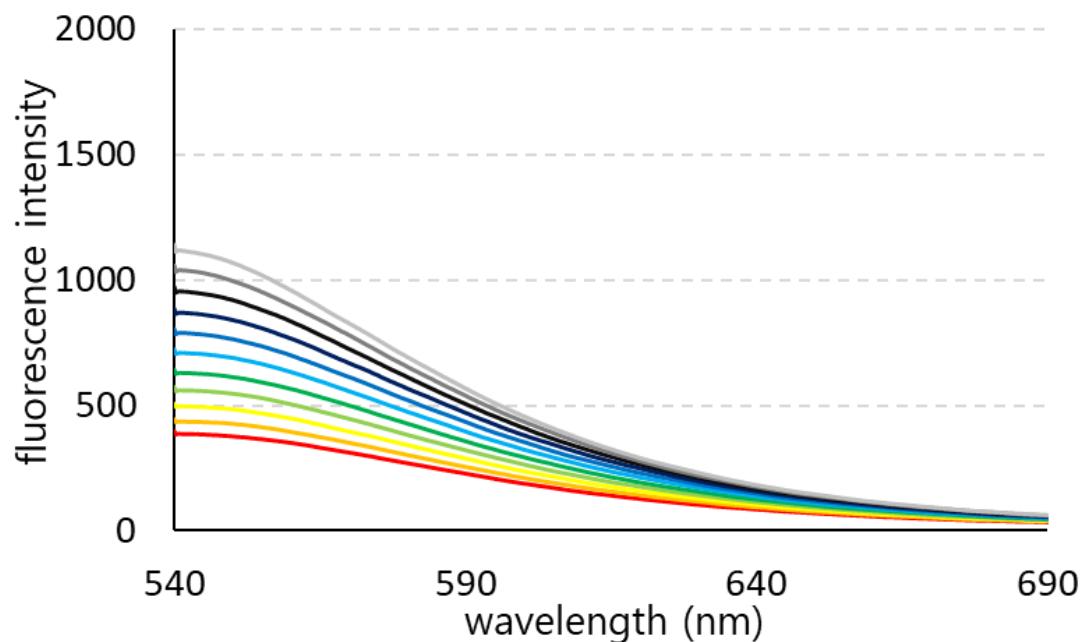
NBD-PE, 0.05 mol%③

サンプル条件 : NBD-PE 25 nM, DOPC 50 μ M



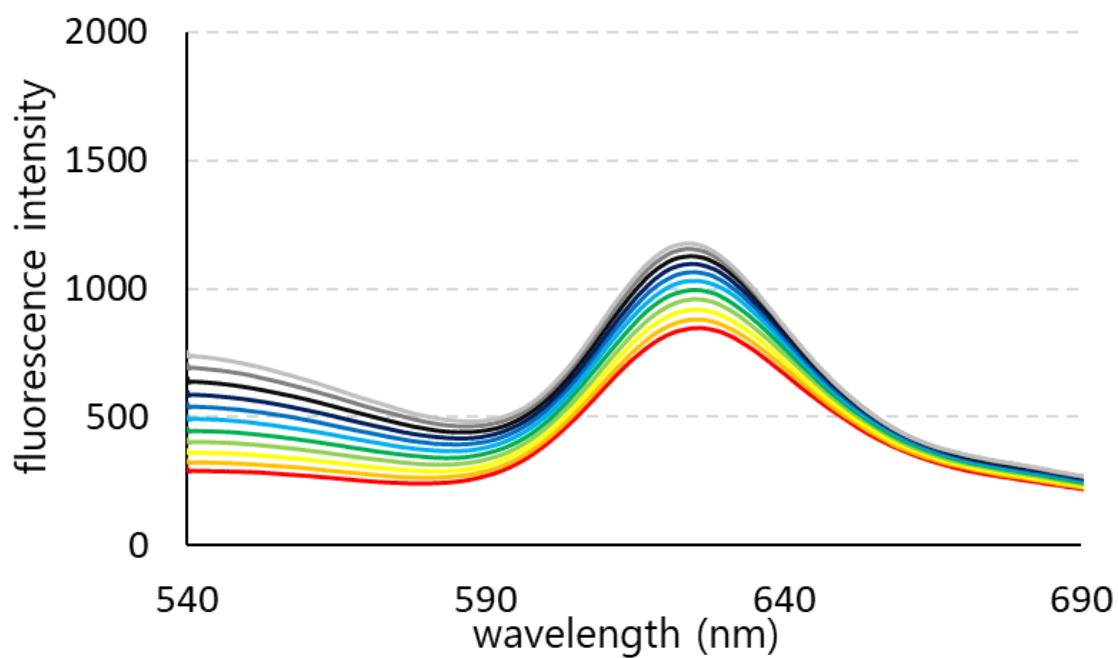
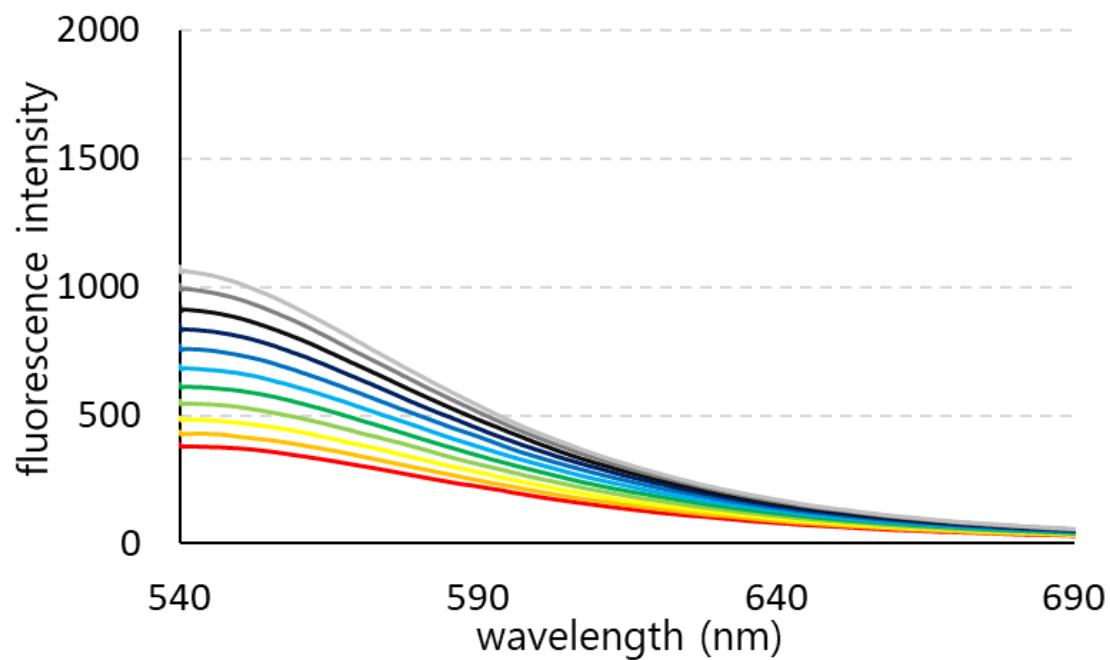
NBD-TM, 0.05 mol%①

サンプル条件 : NBD-TM 25 nM, DOPC 50 μ M



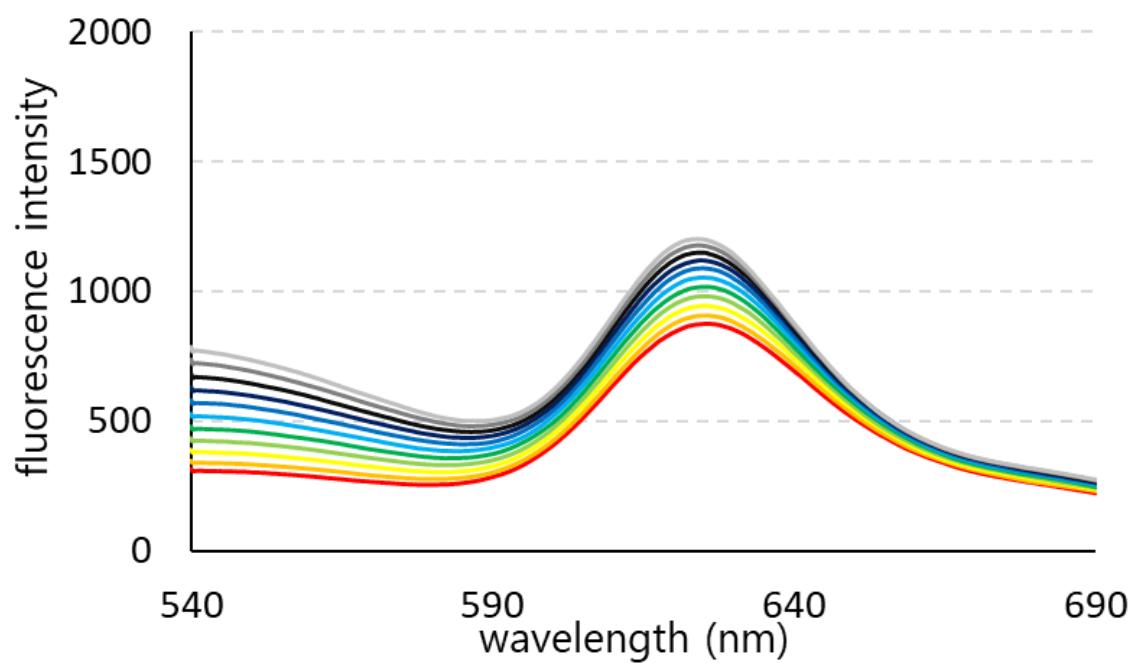
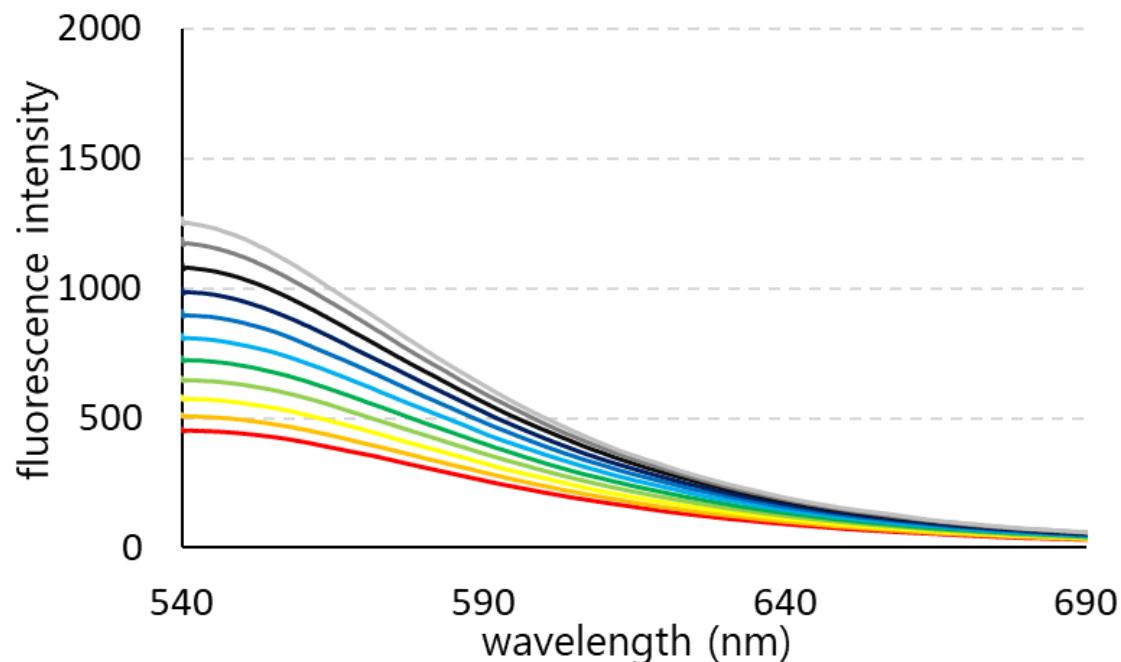
NBD-TM, 0.05 mol%②

サンプル条件 : NBD-TM 25 nM, DOPC 50 μ M



NBD-TM, 0.05 mol%③

サンプル条件 : NBD-TM 25 nM, DOPC 50 μ M



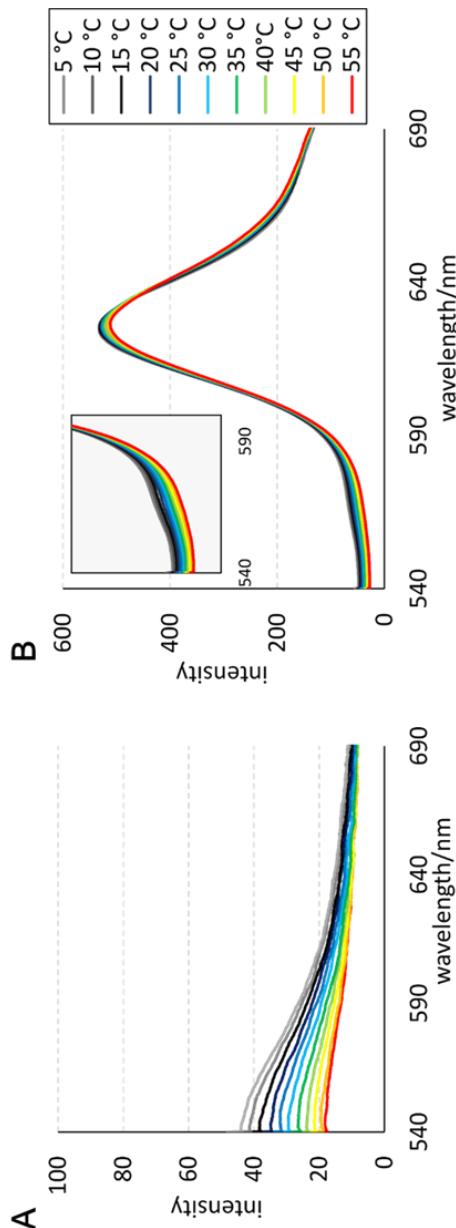
- DOPC 中 0.005 mol% 条件、541 nm における蛍光強度まとめ

DOPC, 0.005mol%		55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5
PE												
F0-1	93.58463	102.5659	113.9215	126.9466	140.2288	155.8385	171.0362	185.5622	202.1215	218.5391	231.9797	
F0-2	87.3216	95.5212	106.0055	118.2625	131.3945	146.2703	159.8061	174.5305	190.2329	206.2083	219.3147	
F0-3	85.9756	93.6952	105.3245	117.5915	130.4625	145.0553	159.7651	174.7725	190.4879	204.0363	216.6087	

TM		55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5
TM												
F0-1	48.94815	53.14586	59.49656	66.42174	72.99112	80.92231	87.44867	95.4788	103.69662	110.5984	117.5171	
F-2	51.76134	57.43272	64.54929	71.7748	79.31756	88.2467	96.26936	105.0947	113.5151	121.9996	129.4286	
F-3	47.3205	52.04432	58.58592	65.83741	72.96647	80.90975	88.66141	97.11466	105.0754	113.0559	119.8856	

TM		55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5
TM												
F0-1	17.8855	18.9256	21.1932	23.6759	26.051	29.2746	31.7122	34.7203	38.2922	41.3409	43.9797	
F0-2	14.7483	15.9038	18.0567	20.0452	22.1844	24.9347	27.5504	29.9346	33.0107	35.6788	37.9132	
F0-3	20.1747	21.5714	24.3493	26.8365	29.176	32.8187	36.0818	39.067	42.3051	45.4385	48.3819	

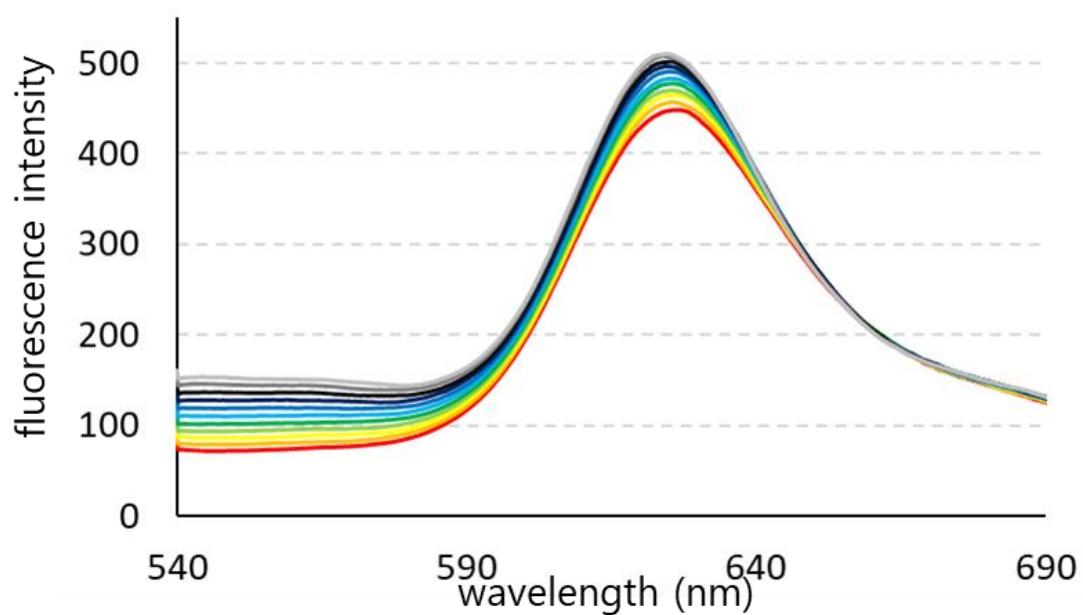
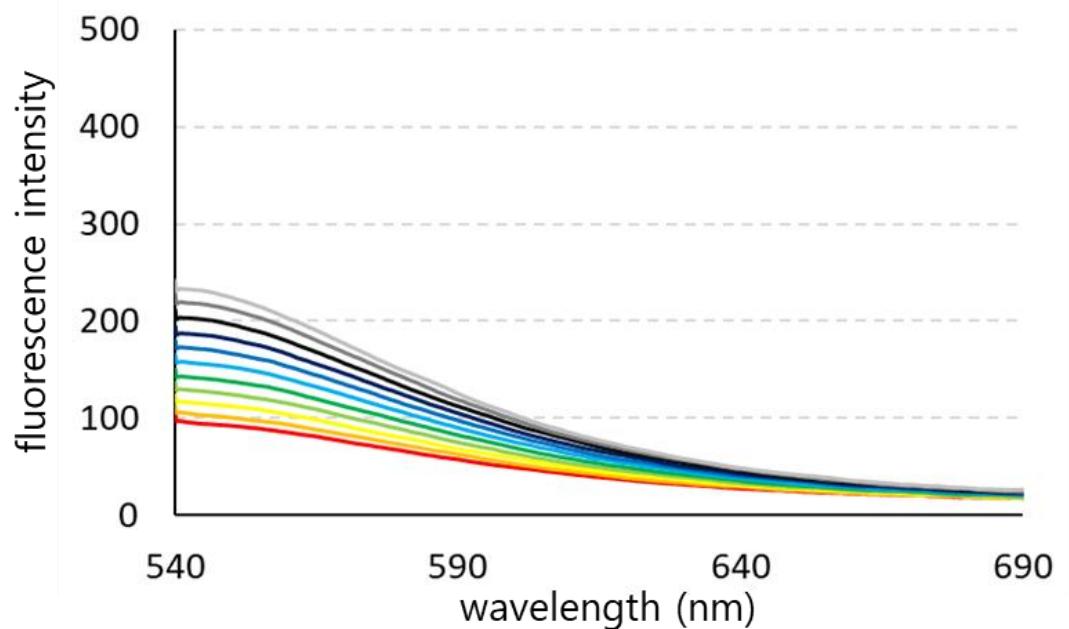
F-1		5.066856	5.694866	7.256681	9.487549	10.93648	12.60104	14.62196	17.04051	18.81677	20.30784	22.15461
F-2	F-3	5.409153	5.928764	7.087681	8.86218	9.818684	11.56189	12.25492	14.42686	15.44889	16.56358	18.0175
		6.364942	7.294655	8.706604	10.65992	12.25129	14.21698	15.26666	17.49338	19.28422	21.09625	22.41867



● 測定データ

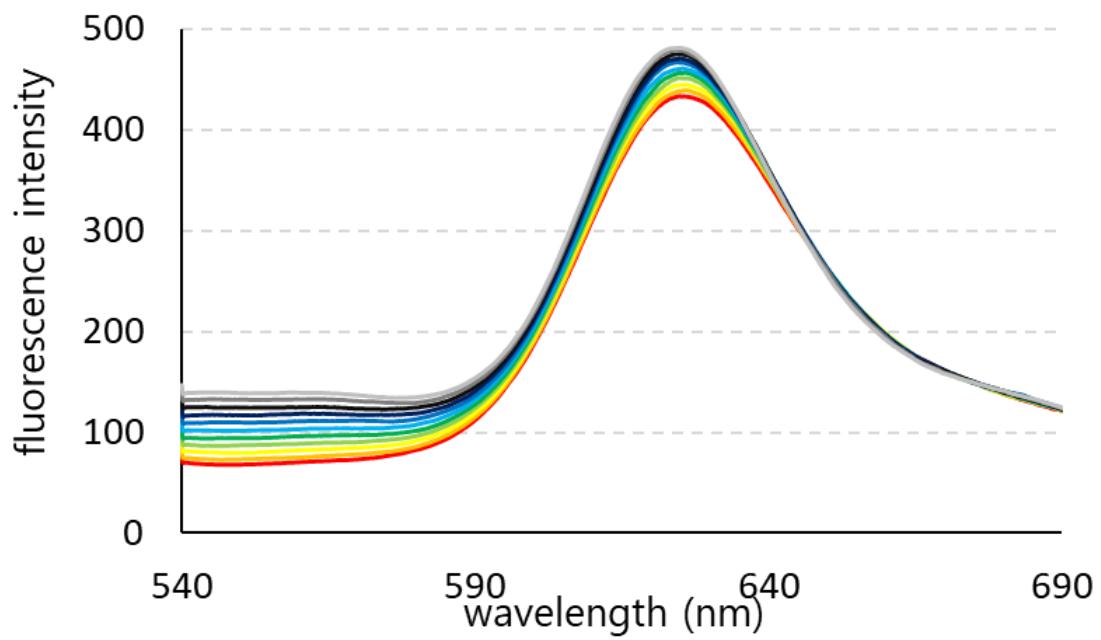
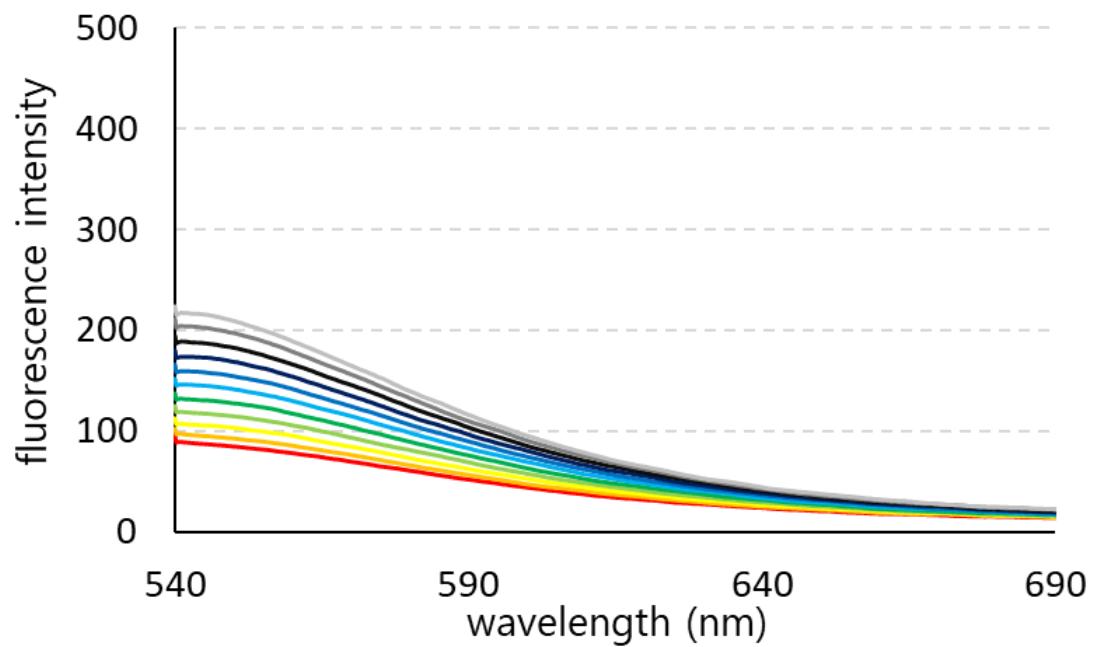
NBD-PE, 0.005 mol%①

サンプル条件 : NBD-PE 12.5 nM, DOPC 50 μ M



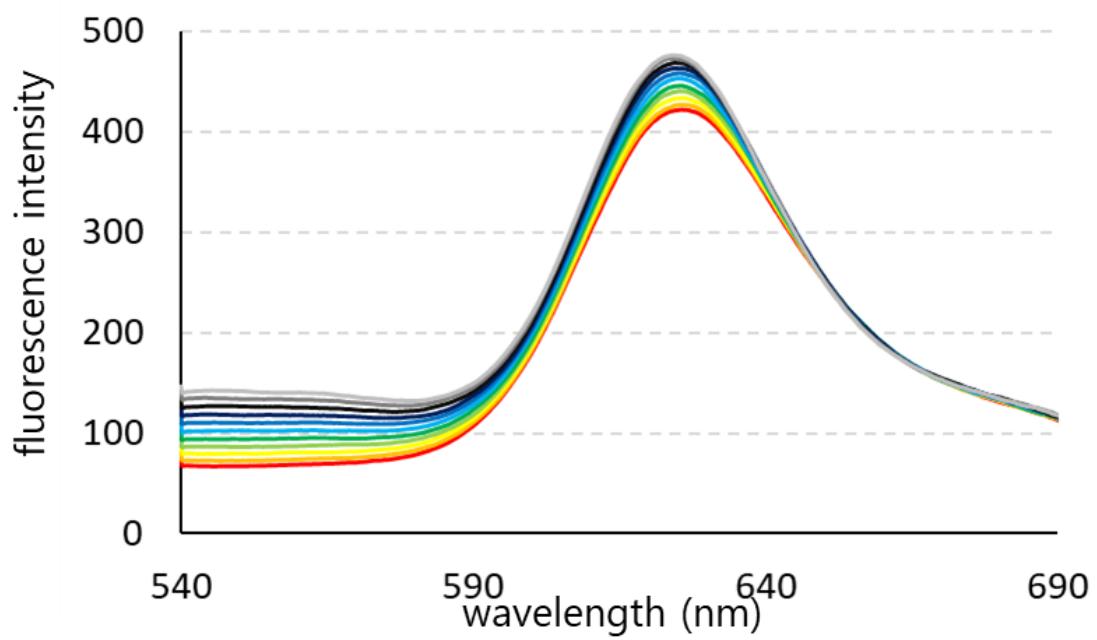
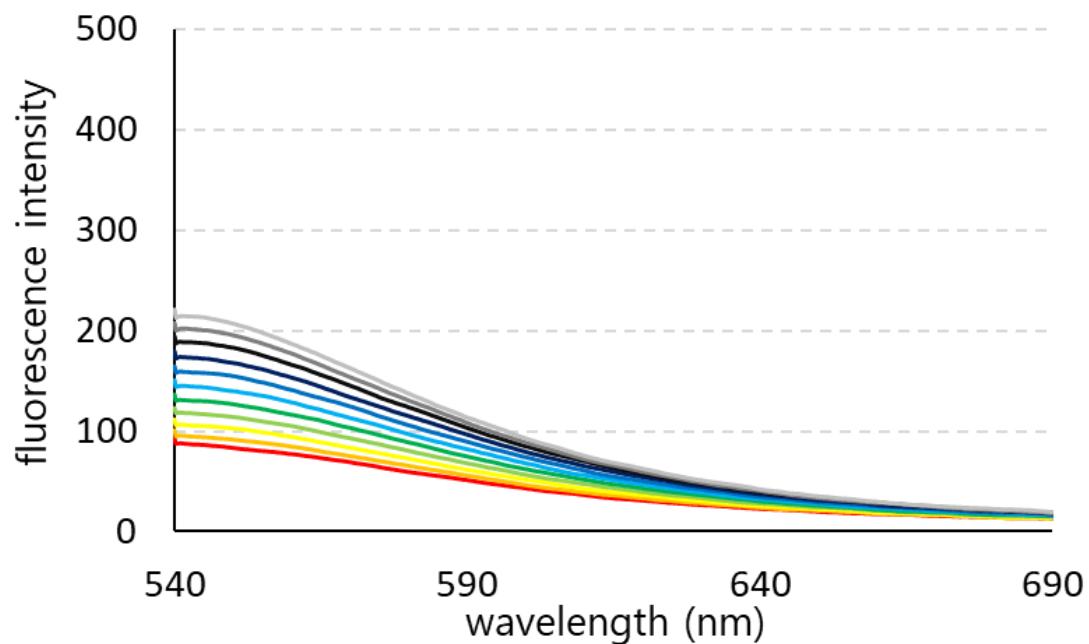
NBD-PE, 0.005 mol%②

サンプル条件 : NBD-PE 12.5 nM, DOPC 50 μ M



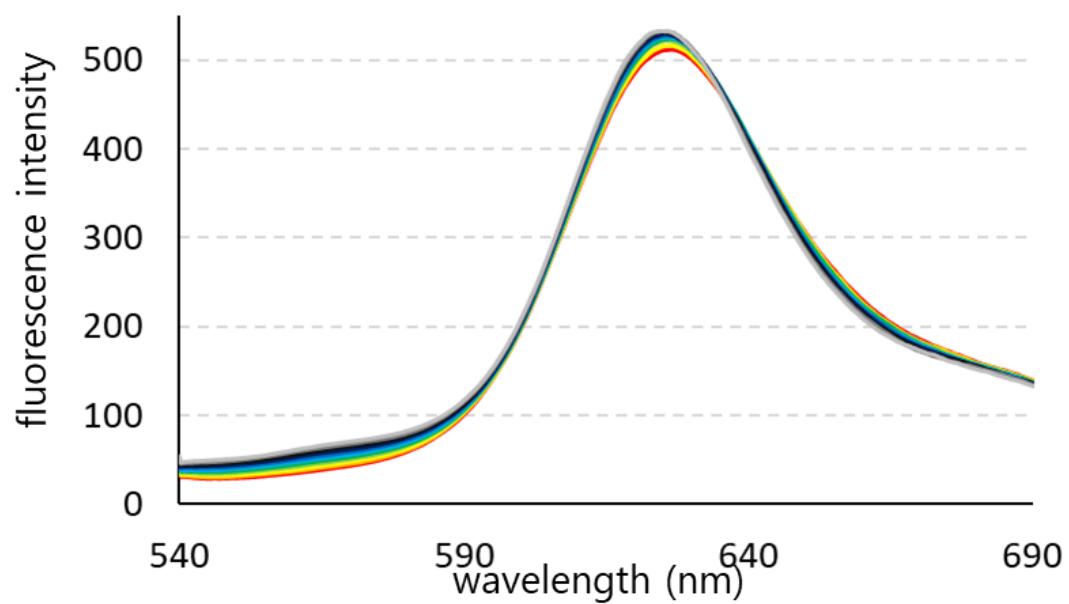
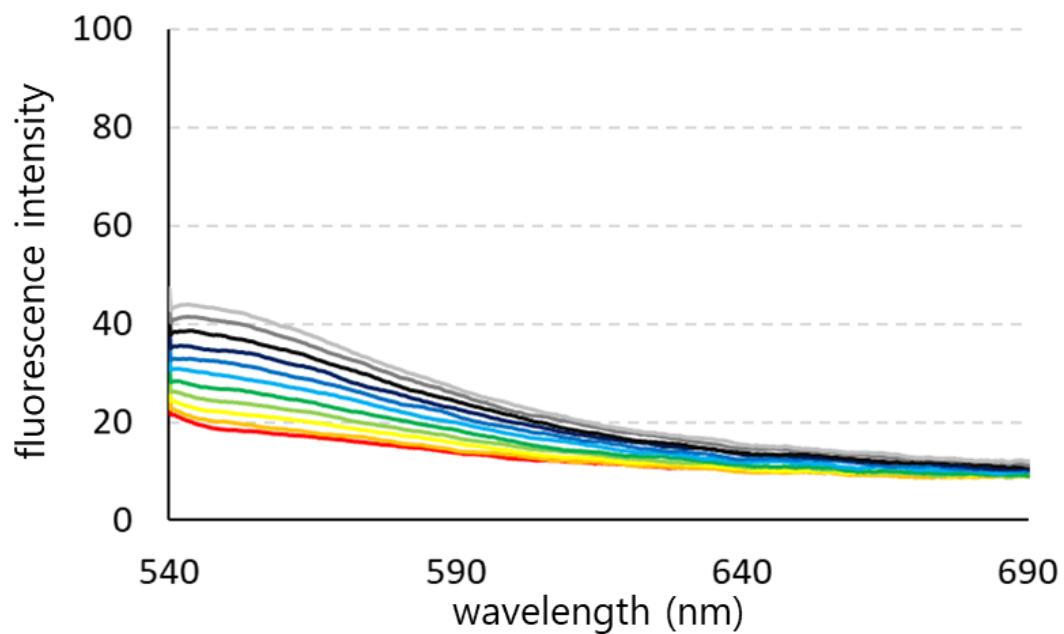
NBD-PE, 0.005 mol%③

サンプル条件 : NBD-PE 12.5 nM, DOPC 50 μ M



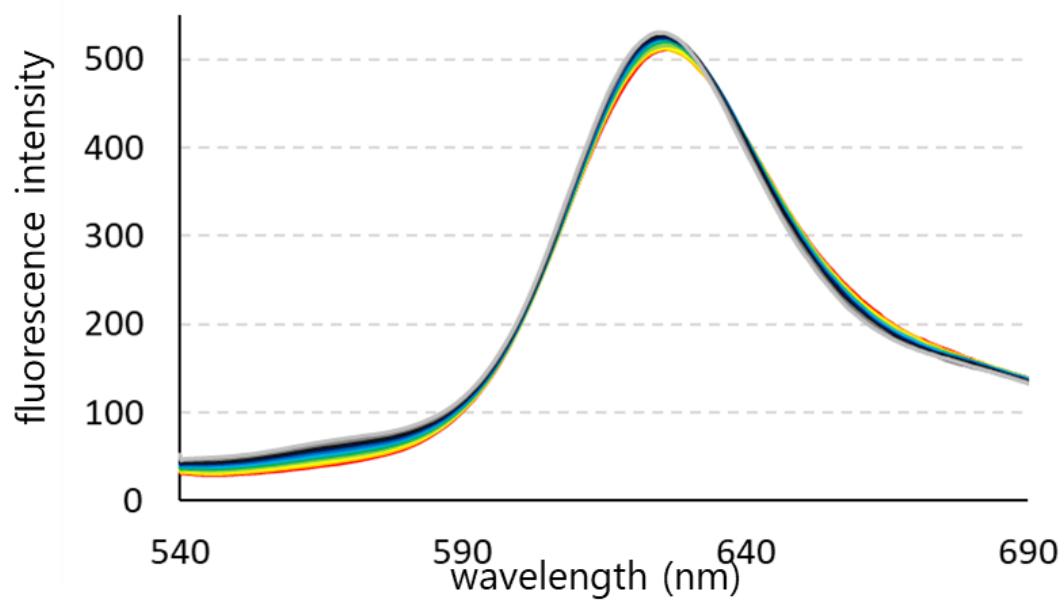
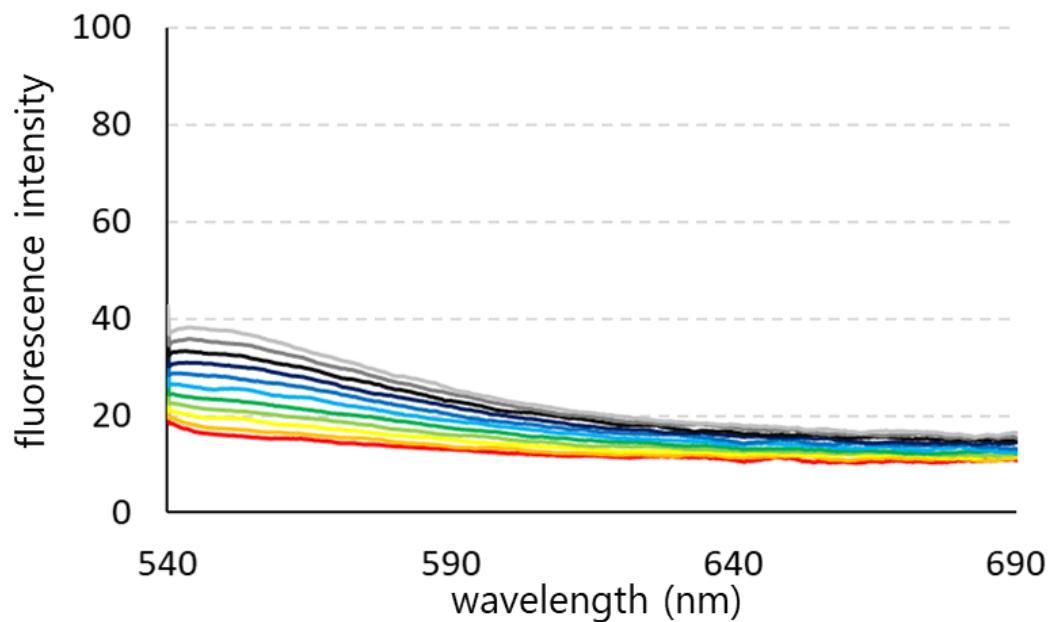
NBD-TM, 0.005 mol%①

サンプル条件 : NBD-TM 12.5 nM, DOPC 50 μ M



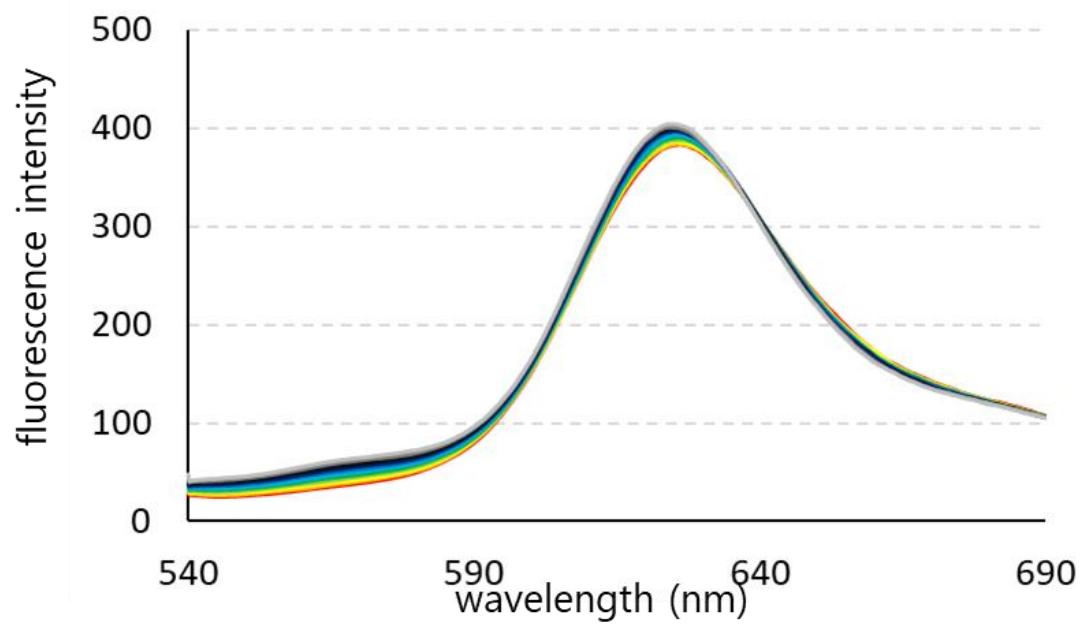
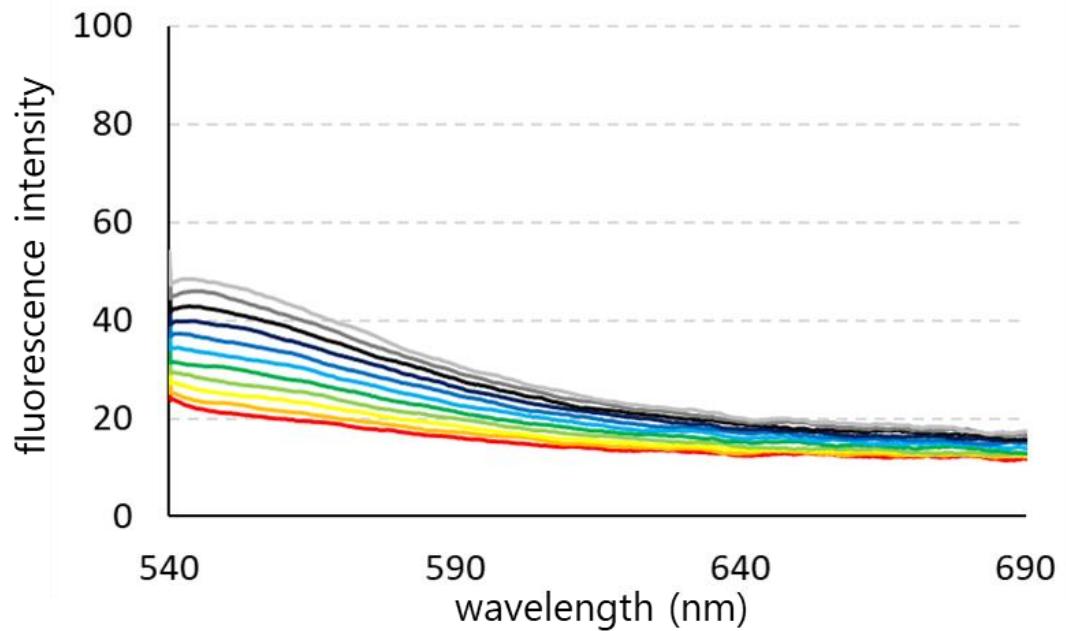
NBD-TM, 0.005 mol%②

サンプル条件 : NBD-TM 12.5 nM, DOPC 50 μM



NBD-TM, 0.005 mol%③

サンプル条件 : NBD-TM 12.5 nM, DOPC 50 μ M



- DMPC 膜中、541 nm における蛍光強度測定結果まとめ
サンプル条件 : NBD-TM or NBD-PE 25 nM, DOPC 50 μM

DMPC, 0.05mol%												
	PE	55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5
F0-1	1196.597	1342.307	1525.727	1717.607	1922.747	2145.917	2409.217	2585.97	2695.447	2803.097	2874.977	
F0-2	1187.907	1312.847	1485.807	1674.427	1883.197	2110.327	2359.907	2532.067	2648.777	2759.787	2838.007	
F0-3	1006.077	1119.427	1268.247	1431.947	1597.697	1785.907	1990.417	2138.197	2234.617	2333.777	2387.667	
F-1	786.1719	867.4223	971.3497	1082.693	1198.983	1326.124	1455.348	1531.39	1588.632	1652.158	1697.637	
F-2	818.7826	910.4418	1017.177	1131.772	1253.625	1385.247	1527.599	1602.309	1660.317	1728.739	1771.683	
F-3	828.7138	909.7765	1017.34	1136.072	1257.118	1385.776	1521.485	1599.705	1659.292	1727.029	1776.24	
	TM	55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5
F0-1	226.1302	254.5012	289.1152	326.3622	368.6192	416.1152	471.1322	490.0782	427.9672	393.3602	378.7022	
F0-2	211.7612	235.8852	268.9792	303.8242	342.5812	387.0452	438.6032	453.1752	392.4842	358.1392	343.8042	
F0-3	212.6992	236.5192	269.3022	304.6582	343.8222	388.7462	440.5252	462.3202	404.4212	367.4762	348.8042	
F-1	113.7587	125.8247	142.8248	159.9467	178.5775	198.1895	223.2448	223.9981	182.8334	159.7635	145.6917	
F-2	120.2339	132.185	149.7327	167.4754	185.865	207.8108	232.181	235.295	193.9816	170.2645	157.0425	
F-3	122.9679	137.0953	154.4733	173.9475	193.5351	215.6878	243.2078	244.1403	204.9825	181.6715	169.1793	

- Van't Hoff プロットのデータまとめ

donor 0.005 mol% in DOPC

	55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5 °C
0.003049	0.003096	0.003145	0.003195	0.003247	0.0033	0.003356	0.003413	0.003472	0.003534	0.003597	1/K
Eapp(TM)	0.6646	0.6376	0.5889	0.5736	0.5590	0.5580	0.5280	0.5286	0.5266	0.5195	
Erandom(PE)	0.4453	0.4427	0.4385	0.4376	0.4397	0.4407	0.4448	0.4434	0.4470	0.4503	0.4508
)											
Ebound	0.2358	0.2219	0.1991	0.1512	0.1339	0.1182	0.1132	0.0845	0.0816	0.0764	0.0688
K	349.7113	320.8069	276.0192	192.7622	165.6780	142.5337	135.2720	96.4073	92.6301	85.9435	76.4861
lnK	5.8571	5.7708	5.6205	5.2615	5.1100	4.9596	4.9073	4.5686	4.5286	4.4537	4.3371

donor 0.05 mol% in DOPC

	55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5 °C
0.003049	0.003096	0.003145	0.003195	0.003247	0.0033	0.003356	0.003413	0.003472	0.003534	0.003597	1/K
Eapp(TM)	0.3719	0.3786	0.3795	0.3807	0.3835	0.3876	0.3908	0.3951	0.3968	0.3969	0.3962
Erandom(PE)	0.3177	0.3229	0.3284	0.3351	0.3408	0.3468	0.3536	0.3589	0.3638	0.3678	0.3701
Ebound	0.0542	0.0557	0.0512	0.0456	0.0427	0.0408	0.0371	0.0362	0.0330	0.0291	0.0261
K	58.8773	60.6366	55.3293	48.8865	45.5477	43.4098	39.2930	38.2955	34.6755	30.3930	27.1937
lnK	4.0755	4.1049	4.0133	3.8895	3.8188	3.7707	3.6710	3.6453	3.5460	3.4142	3.3030

donor 0.05 mol% in DMPC

	55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5 °C
1/K	0.003049	0.003096	0.003145	0.003195	0.003247	0.0033	0.003356	0.003413	0.003472	0.003534	0.003597 1/K
Eapp(TM)	0.4513	0.4565	0.4597	0.4637	0.4711	0.4784	0.4826	0.4995	0.5250	0.5427	0.5595
Erandom(PE)	0.2822	0.2880	0.2977	0.3054	0.3135	0.3219	0.3336	0.3477	0.3524	0.3532	0.3525
Ebound	0.1691	0.1685	0.1621	0.1582	0.1576	0.1565	0.1490	0.1519	0.1726	0.1896	0.2070
K	222.3134	221.2774	210.4477	204.1468	203.1631	201.2914	189.1420	193.7917	228.3736	258.3758	291.2605
lnK	5.4041	5.3994	5.3492	5.3188	5.3140	5.3048	5.2425	5.2668	5.4310	5.5544	5.6742

● 得られた熱力学パラメータ一覧

	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/K mol)	ΔG (kJ/mol, 25 °C)
DMPC (1:2, Ld phase)	3.99	57	-13.1
DOPC (1:2)	12.0	71	-9.13
DOPC (1:20)	24.3	122	-12.1

謝辞

本研究を行うにあたり，終始御懇篤なるご指導，御鞭撻下さいました村田道雄教授に深く感謝致します。

直接御指導を賜り，数々の有益なご助言と，研究を続けていくうえで不可欠な激励の言葉をくださいました，花島慎弥准教授に深く感謝致します。

合成反応やデータ解析において有益な御助言頂きました土川博史助教，梅川雄一助教に深く感謝致します。ペプチド研究に関して，機器操作から科学的基礎まであらゆることを教えてくださった，ERATO 村田脂質活性構造プロジェクト・原利明特任講師に深く感謝いたします。

研究デザインに関して重要なディスカッションを頂くとともに，蛍光実験に関するご指導も頂きました，理学研究科・樺山一哉准教授に深く感謝いたします。

ペプチド合成とアミノ酸分析に関してご協力いただきました，大阪大学蛋白質研究所，北條裕信教授，朝比奈雄也助教に深く感謝いたします。

蛍光標識 GM3 プローブを提供いただきました，岐阜大学 G-CHAIN 安藤弘宗教授，河村奈緒子助教に深く感謝いたします。

蛍光寿命測定に関してご指導いただき，また研究計画に関しても有益なアドバイスをいただきましたオーポアカデミー大学，J. Peter Slotte 教授，Thomas K.M. Nyholm 博士に深く感謝いたします。

日頃から研究に関するディスカッションを通じてよりよい実験系の立案を手助けし，また私の研究者および人間としての成長を促してくださった矢野陽博士に深く感謝致します。

日頃から精神的な支えとなり，研究生活にも力を貸してくださった同期の仲間と研究室のメンバーに深く感謝いたします。

最後に，精神的，経済的に支えてくださいました家族に深く感謝致します。

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Dec 02, 2020|

This Agreement between Osaka University -- Mikito Nakano ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number 4960621389445

License date Dec 02, 2020

Licensed Content Publisher Elsevier

Licensed Content Publication Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes

Licensed Content Title The membrane environment modulates self-association of the human GpA TM domain—Implications for membrane protein folding and transmembrane signaling

Licensed Content Author Veerappan Anbazhagan, Dirk Schneider

Licensed Content Date Oct 1, 2010

Licensed Content Volume 1798

Figure C1. Reprint permission for 1-3.

The Conformation of the Epidermal Growth Factor Receptor Transmembrane Domain Dimer Dynamically Adapts to the Local Membrane Environment



Author: Eduard V. Bocharov, Pavel E. Bragin, Konstantin V. Pavlov, et al

Publication: Biochemistry

Publisher: American Chemical Society

Date: Mar 1, 2017

Copyright © 2017, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
 - If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
 - Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
 - Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
 - One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.
- If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

BACK

CLOSE WINDOW

© 2020 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Terms and Conditions
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

Figure C2. Reprint permission for 図 1-6.

**Quantification of Protein-Lipid Selectivity using FRET:
Application to the M13 Major Coat Protein**



Author:
Fábio Fernandes,Luís M.S. Loura,Rob Koehorst,Ruud B. Spruijt,Marcus A. Hemminga,Alexander Fedorov,Manuel Prieto
Publication: Biophysical Journal
Publisher: Elsevier
Date: July 2004

Copyright © 2004 The Biophysical Society. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Osaka University -- Mikito Nakano ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number	4991670560236 <th colspan="2">Printable Details</th>	Printable Details	
License date	Jan 17, 2021		
Licensed Content		Order Details	
Licensed Content Publisher	Elsevier	Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Licensed Content Publication	Biophysical journal	Portion	figures/tables/illustrations
Licensed Content Title	Quantification of Protein-Lipid Selectivity using FRET: Application to the M13 Major Coat Protein	Number of figures/tables/illustrations	2
Licensed Content Author	Fábio Fernandes,Luís M.S. Loura,Rob Koehorst,Ruud B. Spruijt,Marcus A. Hemminga,Alexander Fedorov,Manuel Prieto	Format	both print and electronic
Licensed Content Date	Jul 1, 2004	Are you the author of this Elsevier article?	No
Licensed Content Volume	87	Will you be translating?	Yes, including English rights
Licensed Content Issue	1	Number of languages	1
Licensed Content Pages	9		
Journal Type	S&T		
About Your Work		Additional Data	
Title	Membrane lipids affect the interplay between the transmembrane domain of the EGF receptor and ganglioside GM3 – thermodynamic quantification of the lateral interaction using FRET	Portions	FIGURE 4, TABLE 1
Institution name	Osaka university, graduate school of science	Specific Languages	Japanese
Expected presentation date	Feb 2021		

Figure C3. Reprint permission for 図 1-19.



Copyright
Clearance
Center

RightsLink



Mikito Nakano ▾

Is There a Preferential Interaction between Cholesterol and Tryptophan Residues in Membrane Proteins?



ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Author: Andrea Holt, Rodrigo F. M. de Almeida, Thomas K. M. Nyholm, et al

Publication: Biochemistry

Publisher: American Chemical Society

Date: Feb 1, 2008

Copyright © 2008, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
 - If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
 - Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
 - Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
 - One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.
- If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

BACK

CLOSE WINDOW

© 2020 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Terms and Conditions
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

Figure C4. Reprint permission for 囗 1-18.

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Dec 02, 2020

This Agreement between Osaka University -- Mikito Nakano ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number 4960660515931

License date Dec 02, 2020

Licensed Content John Wiley and Sons
Publisher

Licensed Content The EMBO Journal
Publication

Licensed Content Title Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc₁ complex structure

Licensed Content Author Carola Hunte, Bernard L. Trumpower, Juergen H. Nett, et al

Licensed Content Date Dec 3, 2001

Licensed Content 20

Figure C5. Reprint permission for 図 1-11.

1. Organic & biomolecular chemistry 0 JPY

Order license ID	Pending	Publisher	ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY
ISSN	1477-0539		
Type of Use	Republish in a thesis/dissertation	Portion	Chart/graph/table/figure

LICENSED CONTENT

Publication Title	Organic & biomolecular chemistry	Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Author/Editor	Royal Society of Chemistry (Great Britain)		

Date	01/01/2003	Rightsholder	Royal Society of Chemistry
Language	English	Publication Type	e-Journal
		URL	http://www.rsc.org/is/journals/current/obc/obcpub.htm

REQUEST DETAILS

Portion Type	Chart/graph/table/figure	Distribution	Worldwide
Number of charts / graphs / tables / figures requested	2	Translation	Original language plus one translation
Format (select all that apply)	Print, Electronic	Copies for the disabled?	No
Who will republish the content?	Academic institution	Minor editing privileges?	No
Duration of Use	Life of current edition	Incidental promotional use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	JPY
Rights Requested	Main product		

NEW WORK DETAILS

Title	Membrane lipids affect the interplay between the transmembrane domain of the EGF receptor and ganglioside GM3 - thermodynamic quantification of the lateral interaction using FRET	Institution name	Osaka University
		Expected presentation date	2021-02-02

Figure C6. Reprint permission for 図 1-13.

 ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Bilayer in Small Bicelles Revealed by Lipid–Protein Interactions Using NMR Spectroscopy

Author: Donghan Lee, Korvin F. A. Walter, Ann-Kathrin Brückner, et al

Publication: Journal of the American Chemical Society

Publisher: American Chemical Society

Date: Oct 1, 2008

Copyright © 2008, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
 - If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
 - Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
 - Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
 - One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.
- If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)

© 2020 Copyright - All Rights Reserved | [Copyright Clearance Center, Inc.](#) | [Privacy statement](#) | [Terms and Conditions](#)
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

Figure C7. Reprint permission for ☒ 1-12.

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Dec 03, 2020

This Agreement between Osaka University -- Mikito Nakano ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number 4961200668590

License date Dec 03, 2020

Licensed Content
Publisher Elsevier

Licensed Content Publication Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes

Licensed Content Title Structure, dynamics and composition of the lipid-protein interface. Perspectives from spin-labelling

Licensed Content Author Derek Marsh,László I Horváth

Licensed Content Date Nov 10, 1998

Licensed Content Volume 1376

Licensed Content Issue 3

Licensed Content Pages 30

Start Page 267

Figure C8. Reprint permission for 図 1-15.

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Dec 02, 2020

This Agreement between Osaka University -- Mikito Nakano ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number 4960640768187

License date Dec 02, 2020

Licensed Content John Wiley and Sons
Publisher

Licensed Content Angewandte Chemie International Edition
Publication

Licensed Content Title GXXXG-Mediated Parallel and Antiparallel Dimerization of Transmembrane Helices and Its Inhibition by Cholesterol: Single-Pair FRET and 2D IR Studies

Licensed Content Author Katsumi Matsuzaki, Martin T. Zanni, Nobutaka Fujii, et al

Licensed Content Date Jan 10, 2017

Licensed 56

Figure C9. Reprint permission for 図 1-4.

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Dec 02, 2020

This Agreement between Osaka University -- Mikito Nakano ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number 4960660347900

License date Dec 02, 2020

Licensed Content
Publisher Elsevier

Licensed Content
Publication Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -
Biomembranes

Licensed Content Title Functional competition within a membrane: Lipid
recognition vs. transmembrane helix
oligomerization

Licensed Content Author Michael Stangl, Dirk Schneider

Licensed Content Date Sep 1, 2015

Licensed Content Volume 1848

Licensed Content Issue 9

Licensed Content Pages 11

Start Page 1886

Figure C10. Reprint permission for 図 1-10.