

博士論文

蛍光及び中性子小角散乱法による
リン脂質の膜間移動解析に関する研究

平成 30 年度

富山大学大学院 医学薬学教育部

杉浦 太一

略語表

本論文で使用した略語を以下に記す。

CHAPS	: 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate
Chol	: cholesterol
CL	: cardiolipin
CRALBP	: cellular retinaldehyde-binding protein
cryo-TEM	: cryogenic transmission electron microscopy
DAG	: diacylglycerol
DMAP	: 4-dimethylaminopyridine
DMPC	: 1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DMPI	: 1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoinositol
DOPC	: 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DOPG	: 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
<i>d</i> -PC	: 1-palmitoyl- <i>d</i> ₃₁ -2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DPPC	: 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DPPG	: 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
Ergo	: ergosterol
FRET	: fluorescence resonance energy transfer
LUV	: large unilamellar vesicle
MALDI-TOF MS	: matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectroscopy
MNBA	: 2-methyl-6-nitrobenzoic anhydride
M β CD	: methyl- β -cyclodextrin
NBD	: 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl
PC	: phosphatidylcholine
PE	: phosphatidylethanolamine
PI	: phosphatidylinositol
PI4P	: phosphatidylinositol-4-phosphate

PIPs	: phosphoinositides
PLA ₂	: phospholipase A ₂
POPC, <i>h</i> -PC	: 1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
POPE	: 1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
POPG	: 1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
POPS	: 1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serine
PS	: phosphatidylserine
Py-PC	: 1-palmitoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
Py-PG	: 1-palmitoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
Py-PI	: pyrene-labeled phosphatidylinositol
Py-PL	: pyrene-labeled phospholipid
SANS	: small-angle neutron scattering
SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Sec14L2	: Sec14-like 2
Sec14L3	: Sec14-like 3
Sfh	: Sec14 homolog
SLD	: scattering length density
SPF	: supernatant protein factor
SPR	: surface plasmon resonance
SUV	: small unilamellar vesicle
TAP1	: tocopherol associated protein 1
α -TTP	: α -tocopherol transfer protein

目次

序論	1
第1章 Methyl-β-cyclodextrin による脂質輸送の速度論的解析	6
第1節 緒言	6
第2節 ピレン脂質輸送の M β CD 濃度依存性	6
第3節 ピレン脂質輸送の脂質濃度依存性	10
第4節 解離速度定数 k_{off} の算出	12
第5節 M β CD による脂質輸送の活性化パラメーター	16
第6節 考察	19
第7節 小括	19
実験方法	20
第2章 リン脂質輸送タンパク質 Sec14 の脂質輸送機構の解明	22
第1節 緒言	22
第2節 Sec14 による PC/PI 輸送の評価	24
第3節 Sec14 の基質選択性	26
第4節 酸性リン脂質による Sec14 脂質輸送の促進	27
第5節 SANS 法による脂質輸送評価	28
第6節 酸性リン脂質による脂質輸送促進メカニズム	29
第7節 基質による Sec14 の膜からの解離の促進	34
第8節 Sec14 による PC/PI ヘテロ交換の評価	36
第9節 考察	39
第10節 小括	41
実験方法	42
第3章 Sec14 脂質輸送能に対する脂質膜パッキングの影響	46
第1節 緒言	46
第2節 Sec14 脂質輸送能に対する膜曲率の影響	46
第3節 Sec14 脂質輸送能に対するコーン型脂質の影響	51
第4節 Sec14 脂質輸送能に対するステロールの影響	54
第5節 Sec14 脂質輸送能に対する脂質不飽和度の影響	55
第6節 考察	58
第7節 小括	59
実験方法	60

結論	62
参考文献	63
論文目録	69
謝辞	70

序論

生体膜は脂質二重層を基本構造とし、リン脂質やスフィンゴ脂質、ステロールなど数千種類の脂質から構成される。細胞内のオルガネラは脂質膜で区画化され、各オルガネラ膜で脂質組成が異なることが知られている。例えば、スフィンゴ脂質やステロールは原形質膜にそれぞれ約 30–40% 含まれるが、小胞体膜におけるそれらの含有量は数%に制御されている¹。また、リン脂質分子種でも各オルガネラ膜で組成が異なり、原形質膜には phosphatidylserine (PS)、ミトコンドリア膜には cardiolipin (CL)、小胞体膜や Golgi 膜には phosphatidylinositol (PI) が豊富に含まれている¹。CL はミトコンドリアに特有なリン脂質であり、ミトコンドリア膜上で生合成されるが、PS や PI、さらに phosphatidylcholine (PC) や phosphatidylethanolamine (PE) などの主要なリン脂質は小胞体膜上で生合成され、その後、各オルガネラに分配される (Figure 1)²。これまでに、脂質の膜間移動に関する研究が行われ、リン脂質の自発的な膜間移動の半減期は数時間から数日であり、とても遅い過程であることが分かっている^{3,4}。一方で、細胞内では、脂質輸送タンパク質や小胞輸送によって、各オルガネラへ脂質が速やかに輸送される^{5,6}。

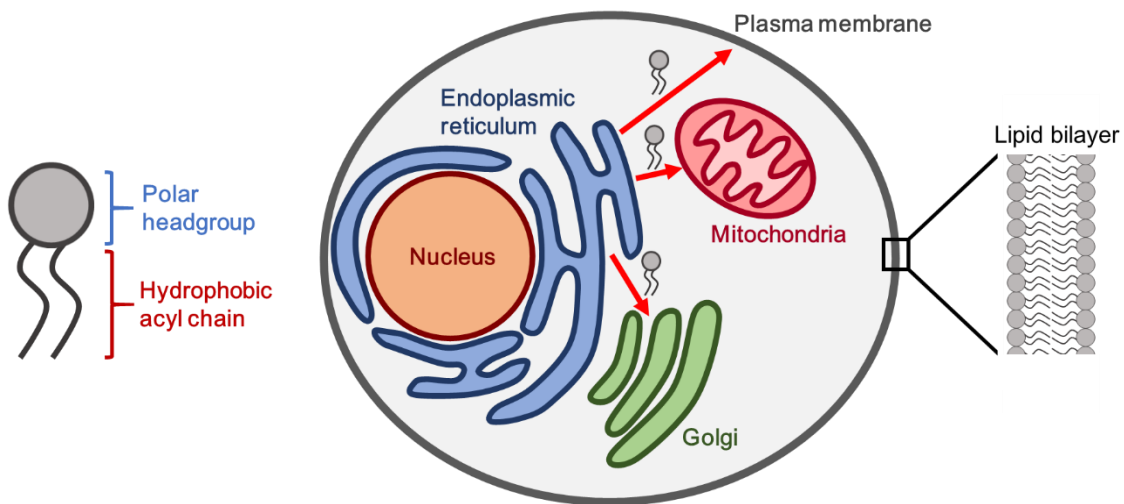


Figure 1. リン脂質の模式図 (左図) と細胞内のリン脂質の分配 (右図)。生体膜は、リン脂質が疎水性のアシル鎖領域を互いに向かい合わせるように並んだ脂質二重層構造を基本とする。リン脂質は主に小胞体膜上で生合成され、その後、細胞内小胞輸送や脂質輸送タンパク質によって、原形質膜を含む各オルガネラ膜へと分配される。

小胞輸送による脂質輸送では、小胞体や Golgi 体から出芽する小胞の脂質二重膜中に、目的の脂質分子が取り込まれ、各オルガネラに届けられる。一方で、脂質輸送タンパク質は、各タンパク質が特異的な輸送基質を持ち、1種もしくは2種類のリン脂質を輸送する。それら脂質輸送タンパク質の例として、酵母の Sec14 と Kes1 が挙げられる。Sec14 は PC と PI に対する輸送活性を持ち^{7,8}、Kes1 は ergosterol (Ergo) と phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) を輸送する⁹。これらのタンパク質は単に脂質を輸送するだけでなく、trans-Golgi からの小胞出芽にも関わっている (Figure 2)。Sec14 が trans-Golgi 上で PC と PI を交換すると、PI 4-OH キナーゼである Pik1 が活性化され、PI が PI4P へと変換される^{10,11}。PI4P は小胞形成を担うタンパク質群の標的であり、PI4P 量の増加によって trans-Golgi からの小胞出芽が促進される。Kes1 は、Ergo を小胞体膜から Golgi 膜へ、PI4P を Golgi 膜から小胞体膜へ輸送し、輸送された PI4P は Sac1 によって脱リン酸化され、PI へと変換される^{9,12}。そのため、Kes1 は Sec14 機能の逆に働き、trans-Golgi からの小胞出芽を抑制する。つまり、酵母では、Sec14 と Kes1 の働きのバランスによって trans-Golgi からの小胞出芽が調節されている。このように様々な脂質輸送タンパク質の働きが組み合わさることで、生体膜の脂質組成が調節されるとともに、細胞機能が緻密に制御されている。脂質輸送タンパク質の機能を理解するためには、その脂質輸送メカニズムの解明が重要であり、これまで様々な脂質輸送タンパク質の活性評価が行われてきた。

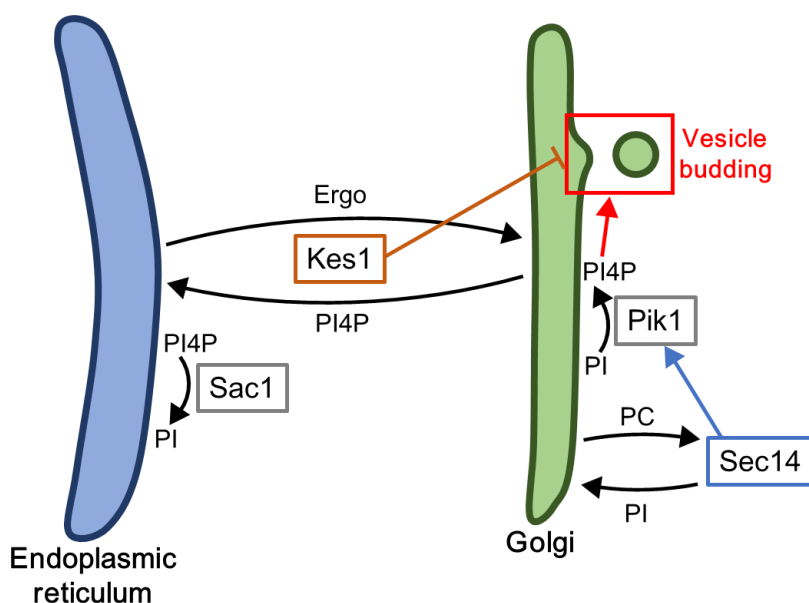


Figure 2. Sec14 と Kes1 の機能の模式図。Sec14 は Golgi 膜からの小胞出芽を促進する一方で、Kes1 はそれを抑制する。Sec14 や Kes1 の脂質輸送能と小胞出芽の制御は関連していると考えられている。

従来、*in vitro* における脂質の膜間移動の評価は³H ラベルされた脂質を用いて行われてきた³。この手法では、ある時間でドナーリポソームとアクセプターリポソームを分離し、各粒子の放射能を測定することで、ドナーからアクセプターへ移動した³H ラベル脂質を定量する (Figure 3)。Thompson らは³H ラベルした 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) の自発的な膜間移動を評価し、30°Cにおける膜間移動の半減期を 9.4 時間、50°Cでは 0.67 時間と見積もった。しかしながら、この評価法では、ドナーとアクセプターの分離という煩雑な操作が必須であり、脂質輸送タンパク質による速い脂質輸送の評価や、その詳細な解析は困難となる。そのため、近年では蛍光を用いて、脂質輸送タンパク質による速い脂質輸送がリアルタイムに測定されている。異種蛍光分子間の共鳴エネルギー移動 (FRET)^{9,13,14} がその代表例であるが、この手法でもいくつか問題点がある。一つは、適切な FRET ドナー/アクセプターの組み合わせを用いなければならない、それらが付加された脂質分子を手に入れる必要がある。また、FRET ドナー/アクセプターの組み合わせのうち、どちらか一方の分子が輸送基質として膜間を輸送され、輸送基質でないもう一方の分子は移動せずに初期の粒子に留まる必要がある。さらに、FRET でよく用いられる蛍光団である 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl (NBD) は極性を有するため、アシル鎖の末端に付加すると、脂質膜中において、NBD が付加されたアシル鎖が途中で折れ曲がり、NBD 部分が水相に露出しやすくなることが知られている¹⁵⁻¹⁸。このように、蛍光団の種類によっては脂質分子自体の物理化学的な特性を変化させてしまう。

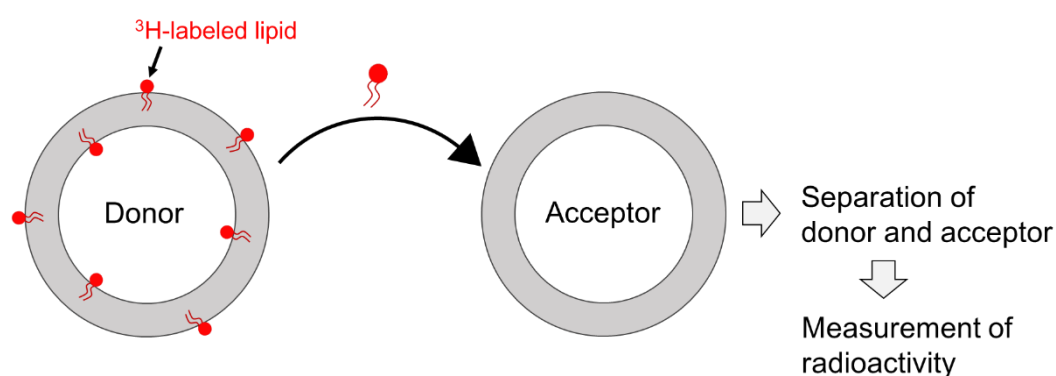


Figure 3. ³H ラベル脂質を用いた脂質輸送評価の概略図。ある時間でドナーとアクセプターを分離し、各粒子の放射能測定により、³H ラベル脂質の輸送量を定量する。

そこで、本研究においてピレン蛍光を利用した脂質輸送評価系を構築した。この手法では、*sn*-2 位のアシル鎖をピレンで標識したリン脂質を用いる。ピレンは非極性分子であり、NBD とは異なり、アシル鎖に付加されたピレン基は脂質膜中におけるアシル鎖の状態を変化させない¹⁹。励起状態のピレンは基底状態のピレンと相互作用して励起二量体 (エキシマー) を形成し、単量体 (モノマー) よりも長波長の蛍光を発する (Figure 4A)。エキシマー形成はピレン同士の二分子間相互作用であるため、ピレンの局所濃度に依存する。ピレンラベル脂質 (py-PL) がドナー粒子 (py-PL 含有) からアクセプター粒子 (py-PL 非含有) へ輸送されると、ドナー中のピレン濃度が低下し、エキシマー蛍光強度が相対的に低下する。つまり、ピレンのエキシマー/モノマー蛍光強度の変化によって脂質輸送を評価できる (Figure 4B)^{20,21}。また、この手法では単一のプローブのみを用いるため、複数のプローブを用いる FRET 法に比べ簡便な手法である。

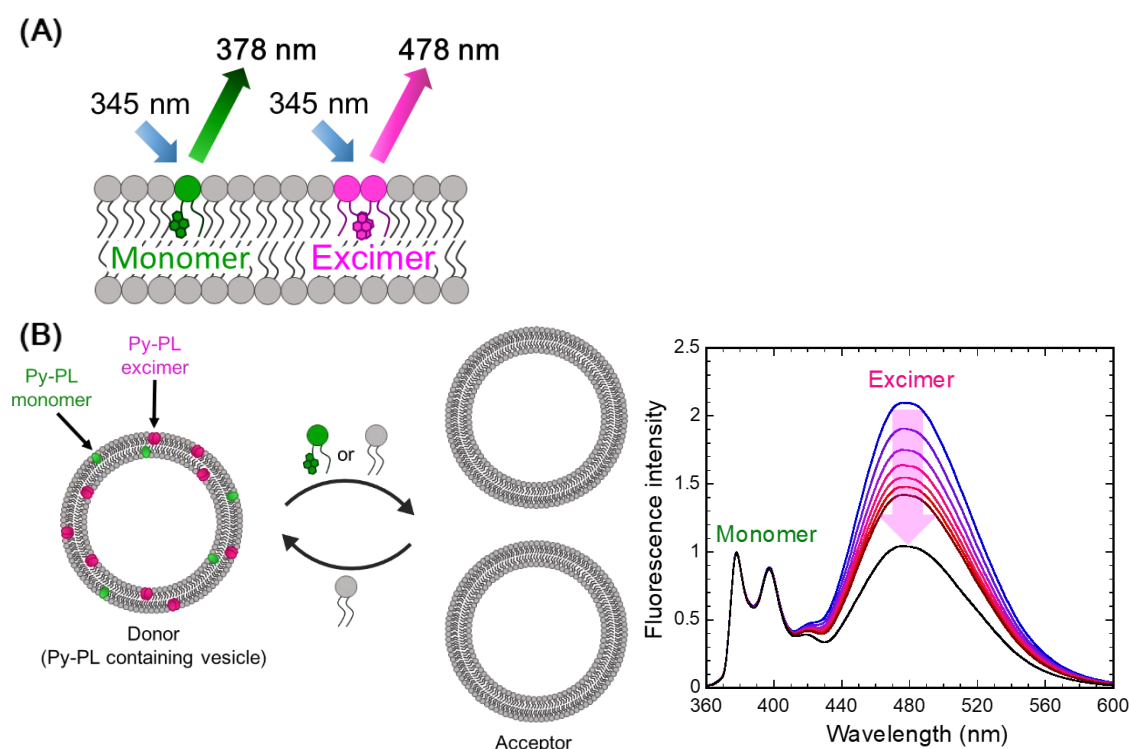


Figure 4. (A) Py-PL のエキシマー形成。(B) ピレン蛍光を用いた脂質輸送評価系の概略図。ドナーからアクセプターへ py-PL が輸送されると、モノマー蛍光が増加し、エキシマー蛍光が低下する。よって、脂質輸送に伴ってエキシマー/モノマー蛍光強度比 (E/M) が減衰する。右図は py-PC 輸送に伴う蛍光スペクトル変化。各波長の蛍光強度を py-PC モノマー (378 nm) の蛍光強度で規格化した。

また、私の所属する研究グループは、これまでに中性子小角散乱 (SANS) によるリアルタイム脂質輸送測定法を開発した。この SANS 法では、アシル鎖を重水素ラベルした脂質を用いる。中性子線の散乱強度は散乱体と媒質の散乱長密度 (SLD) 差の 2 乗に比例する。重水素化脂質のリポソームと通常の軽水素脂質のリポソームを D_2O/H_2O 混合溶媒中で懸濁すると、各粒子と溶媒の SLD 値が大きく異なるため、初期状態では強い中性子散乱が観測されるが、両粒子間で脂質交換が起こり、粒子の脂質膜組成が変化することで、粒子と溶媒の SLD 値が近づき、散乱強度が低下する (Figure 5) ⁴。この手法でも、蛍光法と同様に両粒子の分離を必要とせず、脂質輸送をリアルタイムに測定できる。さらに、蛍光法では蛍光団によって脂質のアシル鎖がかさ高くなってしまいが、SANS 法では重水素ラベルであるため、より自然に近い脂質輸送を観測できる。実際、SANS 法により求められた DMPC の自発的な膜間移動速度は、Thompson らによる 3H ラベル DMPC の測定結果とほとんど一致している ^{3,4}。

本研究では、上述の 2 種類の手法を用いることで、様々な脂質輸送担体の活性を評価した。第 1 章では、ピレン蛍光を利用した脂質輸送評価系を構築し、methyl- β -cyclodextrin (M β CD) の脂質輸送活性の速度論的解析を行った。第 2 章では、酵母の脂質輸送タンパク質である Sec14 の脂質輸送能を蛍光法と SANS 法で測定し、Sec14 による脂質輸送サイクルの物理化学的な特性を評価した。第 3 章では、Sec14 の脂質輸送に対する脂質膜パッキングの影響について検討し、酵母内で Sec14 が Golgi 膜を認識するメカニズムについて考察した。

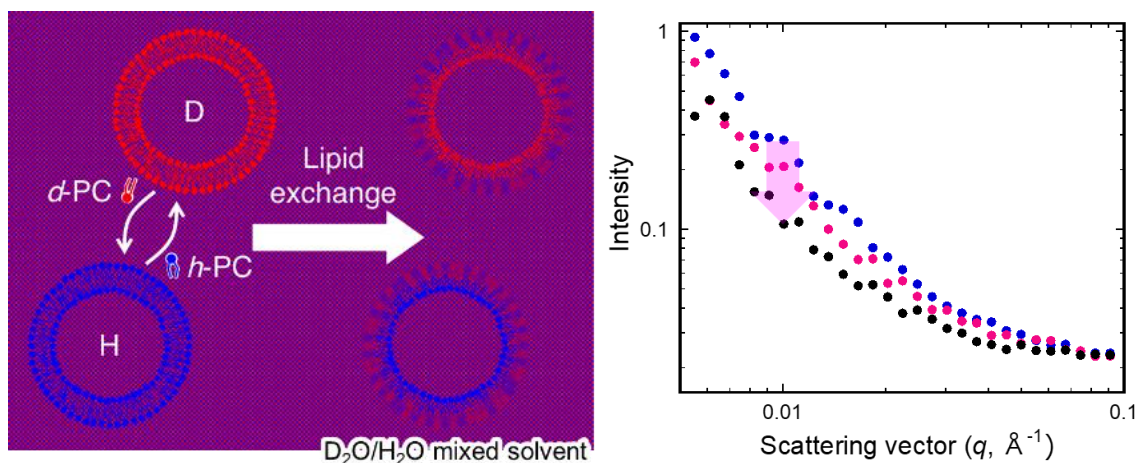


Figure 5. SANS 法による脂質輸送評価系の概略図。重水素化 PC (d -PC) で調製した D 体リポソームと通常の軽水素 PC (h -PC) で調製した H 体リポソームは、 D_2O/H_2O 混合溶媒中で強い中性子散乱を示すが、両粒子間で d -PC と h -PC が交換されると、中性子線の散乱強度が減衰する。右図は PC 輸送に伴う中性子線の散乱強度の低下 (I - q データ)。

第 1 章

Methyl- β -cyclodextrin による脂質輸送の速度論的解析

第 1 節 緒言

Methyl- β -cyclodextrin (M β CD) は、7 分子の D-グルコースが α -1,4-グリコシド結合によって結合した環状構造を基本構造とし、水中で疎水性分子を環内に取り込み複合体を形成する。M β CD はリン脂質とも複合体を形成し、リポソームを可溶化することができるが、それには高濃度の M β CD を必要とする^{22,23}。一方で、およそ 15 mM 以下の M β CD 濃度では、リポソームは可溶化されず、M β CD は粒子間で脂質を輸送することが知られている²²。そのような M β CD による脂質輸送は、脂質二重層の内葉と外葉で脂質組成の異なる非対称リポソームの作成や^{24,25}、外部から培養細胞への脂質の導入などに応用されている²⁶。しかしながら、M β CD による脂質輸送の詳細な解析はこれまで行われておらず、輸送脂質の選択性などは不明である。本章では、ピレン蛍光を利用した脂質輸送評価系を構築し、M β CD による脂質輸送の物理化学的な特性を評価した。

第 2 節 ピレン脂質輸送の M β CD 濃度依存性

本研究では、16 mol % のピレンラベル脂質 (py-PL、**Figure 6A-C**) と 84 mol % の 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC、**Figure 6D**) で調製したドナーリポソームと、POPC のみで調製したアクセプターリポソームを用いて、脂質輸送を評価した。まず、ドナーとアクセプターがそれぞれ 20 μ M と 40 μ M の条件で、M β CD 添加後のピレンエキシマー/モノマー蛍光強度比 (E/M) を測定した。Py-PL がドナーからアクセプターへ輸送されると、ドナー粒子中のピレン濃度が低下するため、エキシマー強度が減衰し、モノマー強度は上昇する (**Figure 7**)。したがって、 E/M 値は脂質輸送に伴って減衰する。

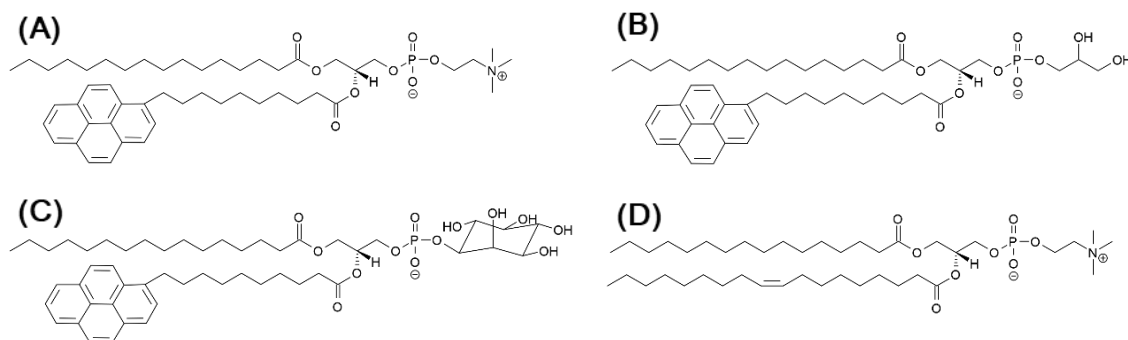


Figure 6. Py-PL (py-PC (A)、py-PG (B)、py-PI (C)) と POPC (D) の化学構造。

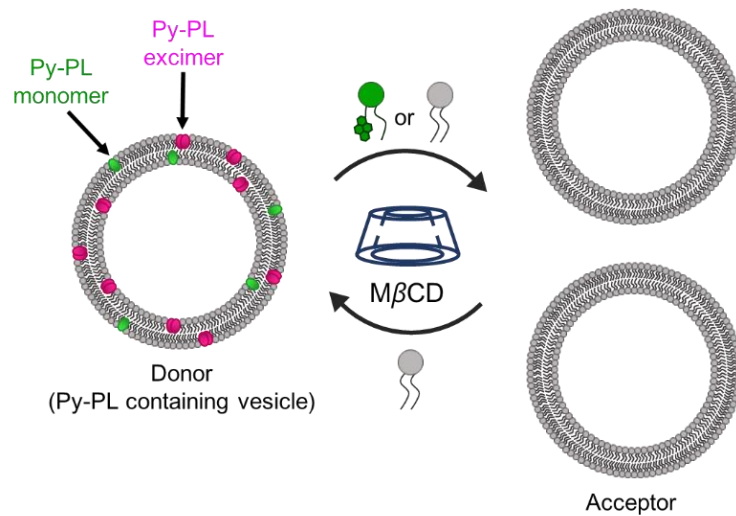


Figure 7. 脂質輸送評価系の概略図。Py-PL を含有するドナー粒子と py-PL を含有しないアクセプター粒子の混合液中に $M\beta CD$ を添加した。

Pyrene-labeled PC (Py-PC、**Figure 6A**) と pyrene-labeled phosphatidylglycerol (py-PG、**Figure 6B**) の E/M 値は $M\beta CD$ 濃度依存的に速く減衰したが、 $M\beta CD$ 非存在下では E/M の減衰はほとんど観測されなかった (**Figure 8A,B**)。この $M\beta CD$ による E/M の減衰は、 $M\beta CD$ 濃度が数百 μM から数 mM 程度のオーダーで観測された。これらの結果は、 $M\beta CD$ が py-PL をドナー膜から引き抜いたことによる、もしくはアクセプター膜へ輸送したことによるエキシマーの解消を示している。そこで、アクセプター非存在下において、ドナー懸濁液中に $M\beta CD$ を添加し、py-PL の引き抜きを評価したところ、 E/M の減衰は観測されなかった (**Figure 9A,B**)。このことは、py-PL の $M\beta CD$ 包接体は検出限界以下であることを示している。したがって、 E/M の減衰は $M\beta CD$ によるアクセプターへの py-PL 輸送のみを反映していることが明らかになった。ドナー/アクセプター混合懸濁液中に $M\beta CD$ を添加後、24 時間インキュベーションすると、どの $M\beta CD$ 濃度でも、規格化後の E/M 値 (Normalized E/M) は py-PC の場合で ~ 0.44 、py-PG の場合で ~ 0.42 に収束したため、プラトー値に達したと考えられた。ドナー (20 μM) に 16 mol % 含まれていた py-PL がアクセプター (40 μM) に均一に分配された場合、各粒子の py-PL の割合は 5.3 mol % となる。そこで、py-PC を 5.3 mol % 含む粒子 (60 μM) の蛍光を測定したところ、Normalized E/M は ~ 0.3 となり、 $M\beta CD$ による py-PL 輸送で得られたプラトー値よりも低くなった。このことは、py-PL が脂質二重層の内葉/外葉間の移動 (フリップフロップ) を起こしにくく、ドナーからアクセプターへ py-PL が輸送されても、ドナー膜内葉の py-PL 濃度は 16 mol % のままであることを示唆している。実際、POPC の自発的なフリップフロップは起こらないことが報告されており²⁷、py-PL も POPC と同様な特性を持つ可能性がある。

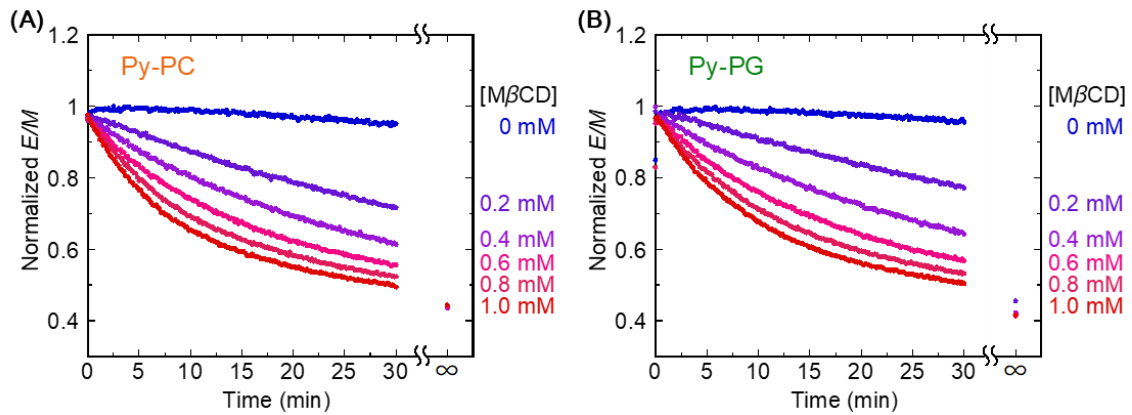


Figure 8. 規格化エキシマー/モノマー比 (Normalized E/M) の時間変化。 $M\beta CD$ (0–1.0 mM) のバッファー溶液をドナー (20 μM) とアクセプター (40 μM) の混合液中に $t=0$ で添加した (38°C)。 $M\beta CD$ 添加 24 時間後の E/M を $t=\infty$ の時の値として示してある。(A) ドナーが py-PC/POPC (16:84)、アクセプターが POPC の場合。(B) ドナーが py-PG/POPC (16:84)、アクセプターが POPC の場合。

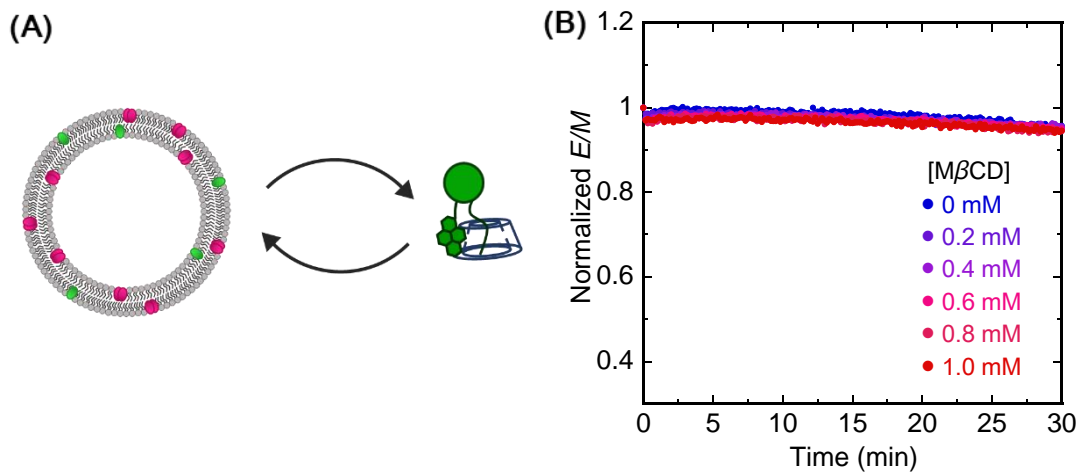


Figure 9. (A) 脂質引き抜き評価系の概略図。(B) Normalized E/M の時間変化。 $M\beta CD$ (0–1.0 mM) の溶液を py-PC/POPC (16:84) ドナー (20 μM) の懸濁中に $t=0$ で添加した (38°C)。

24 時間後の Normalized E/M を $E/M(\infty)$ として、 $\ln(E/M(t) - E/M(\infty))$ を時間 t に対してプロットすると、線形性が得られた (**Figure 10A,B**)。このことは、 $M\beta CD$ による py-PL の膜間輸送が一つの速度定数で表されることを示している。しかしながら、0.6 mM よりも高濃度の $M\beta CD$ では、直線とプロットのずれが大きくなった。高濃度の $M\beta CD$ (> 0.6 mM) では、おそらくリン脂質一分子が数分子の $M\beta CD$ によって包接され、脂質輸送の様式が複数存在するのではないかと考えられる。各直線の傾きから見かけの速度定数 (k_{app}) を求め、 $M\beta CD$ 濃度に対してプロットしたところ、線形性が得られた (**Figure 10C**)。つまり $k_{app} = k[M\beta CD]$ と表され、比例係数 k は py-PC の場合で $0.074 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ 、py-PG の場合で $0.059 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ と見積もられた。

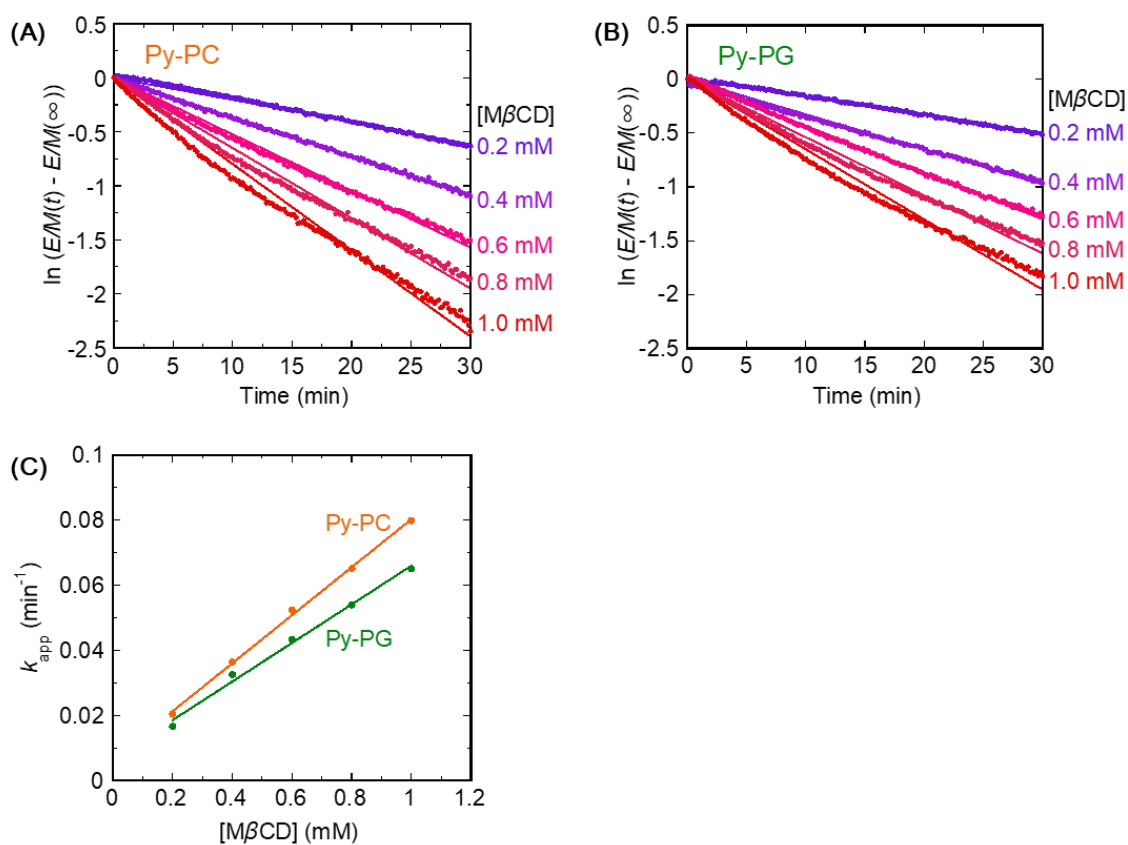


Figure 10. (A, B) $\ln(E/M(t) - E/M(\infty))$ 対 t のプロット。(C) (A) および (B) のプロット
の線形フィッティングによって得た傾きを $M\beta CD$ 濃度に対してプロットした。

第3節 ピレン脂質輸送の脂質濃度依存性

M β CD による py-PC 輸送を様々な脂質濃度で測定した。まず、M β CD の最終濃度を 0.6 mM に固定し、ドナーとアクセプター濃度をそれぞれ 10 μ M と 20 μ M から 40 μ M と 80 μ M まで（ドナー/アクセプター比を 1:2 で固定したまま）増加させたところ、Normalized E/M の減衰プロファイルは脂質濃度の増加によって変化しなかった (**Figure 11A,D**)。次に、ドナー濃度を 20 μ M に固定し、アクセプター濃度を 20 μ M から 80 μ M に変化させて py-PC 輸送を評価した。アクセプター濃度が高い方が、最終的な py-PC 濃度が薄まるため、見かけ上アクセプター濃度の上昇に伴って Normalized E/M がより大きく減衰した (**Figure 11B**)。しかしながら、 $\ln(E/M(t) - E/M(\infty))$ を時間 t に対してプロットすると、どのアクセプター濃度でも同様な傾きの直線になり、アクセプター濃度に対する依存性は見られなかった (**Figure 11E**)。最後に、M β CD 濃度とドナー/アクセプター濃度をともに変化させて py-PC 輸送を評価したところ、M β CD 濃度の上昇に伴って k_{app} が増加した (**Figure 11C,F**)。これらの結果から、 E/M の減衰は脂質濃度には依存せず、M β CD 濃度にものみ依存することが明らかとなった。このことは、M β CD による脂質輸送には、脂質粒子同士の衝突は寄与しないことを示唆している。M β CD による脂質輸送プロセスは大まかに次の二つのステップに分けられる。①膜上の M β CD が脂質を膜から引き抜き、膜から解離する（速度定数 k_{off} ）。②M β CD と脂質の複合体が別の膜に結合し、脂質を受け渡す（速度定数 k_{on} ）。後者のステップは脂質粒子濃度に依存するはずであるが、py-PC 輸送は脂質濃度に依存せず M β CD 濃度にものみ依存したことから、前者の k_{off} が輸送の律速段階であると考えられる ($k_{off} \ll k_{on}$)。

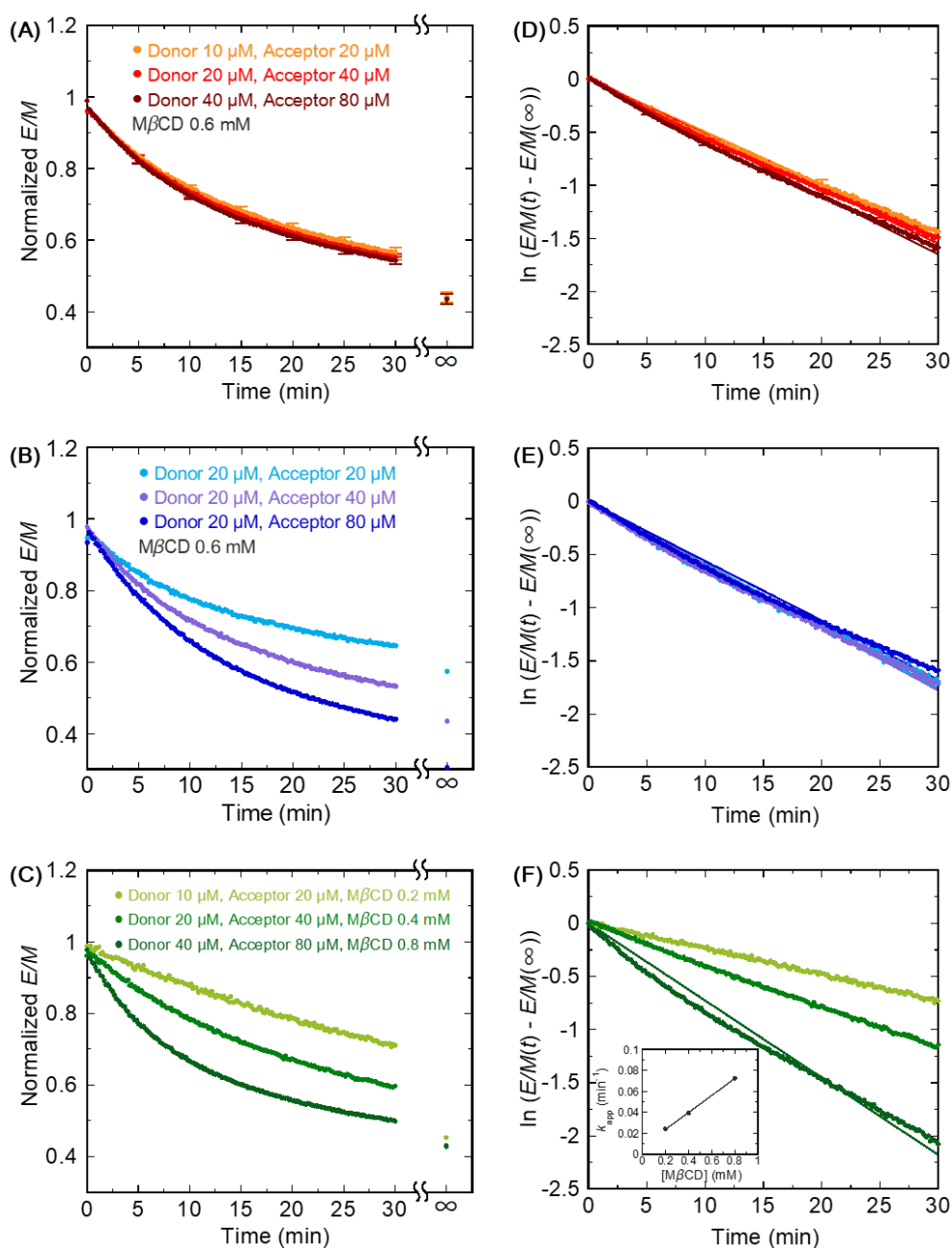


Figure 11. Py-PL 輸送の脂質濃度依存性。M β CD の溶液をドナー（16 mol % py-PC）とアクセプターの混合液中に $t=0$ で添加した（38 $^{\circ}$ C）。各粒子と M β CD の最終濃度は各パネル中に示してある。(A) ドナー/アクセプター比を 1:2、M β CD を 0.6 mM に固定して、総脂質濃度を変化させた。(B) ドナーを 20 μ M、M β CD を 0.6 mM に固定して、アクセプター濃度を変化させた。(C) ドナー/アクセプター比を 1:2 に固定して、M β CD と総脂質濃度を変化させた。M β CD 添加 24 時間後の値を $t=\infty$ に示してある。(D–F) は、それぞれ (A–C) の $\ln(E/M(t) - E/M(\infty))$ 対 t のプロットである。(F) の挿入図は、(F) のプロットの線形フィッティングから得られた傾きを M β CD 濃度に対してプロットしてある。(A) と (D) のエラーは 3 回の実験の標準偏差を示す (means \pm S.D.)。

第4節 解離速度定数 k_{off} の算出

脂質輸送の定量的な知見を得るために、 E/M の減衰曲線をより詳細に解析した。上述の結果から、py-PL の膜間輸送速度は M β CD による py-PL の引き抜き（解離速度定数 k_{off} ）によって決まり、また、py-PL は脂質膜内でフリップフロップしないと考えられる。ドナーとアクセプターが 1: X のモル比の場合、ドナー粒子外葉の py-PL 濃度 ($[\text{Py}]_{\text{D}}$) とアクセプター粒子外葉の py-PL 濃度 ($[\text{Py}]_{\text{A}}$) の変化は以下の式で表される。

$$-\frac{d[\text{Py}]_{\text{D}}}{dt} = \frac{X}{1+X} k_{\text{off}}[\text{M}\beta\text{CD}][\text{Py}]_{\text{D}} - \frac{1}{1+X} k_{\text{off}}[\text{M}\beta\text{CD}][\text{Py}]_{\text{A}} \quad (1)$$

$$-\frac{d[\text{Py}]_{\text{A}}}{dt} = \frac{1}{1+X} k_{\text{off}}[\text{M}\beta\text{CD}][\text{Py}]_{\text{A}} - \frac{X}{1+X} k_{\text{off}}[\text{M}\beta\text{CD}][\text{Py}]_{\text{D}} \quad (2)$$

ここで、式中の $[\text{Py}]_{\text{D}}$ と $[\text{Py}]_{\text{A}}$ は溶液中のモル濃度 [mol/L] であり、膜中のモル分率ではない。 $t=0$ のときの $[\text{Py}]_{\text{D}}$ を $[\text{Py}]_{\text{D},0}$ とすると、そのときの $[\text{Py}]_{\text{A}}$ は 0 となる。フリップフロップが起こらない場合、ドナーとアクセプターの内葉の py-PL 濃度は変化せず、それぞれ $[\text{Py}]_{\text{D},0}$ と 0 のままである。 $[\text{Py}]_{\text{D}} + [\text{Py}]_{\text{A}} = [\text{Py}]_{\text{D},0}$ を式(1)に代入すると、以下の式が得られる。

$$-\frac{d[\text{Py}]_{\text{D}}}{dt} = k_{\text{off}}[\text{M}\beta\text{CD}] \left([\text{Py}]_{\text{D}} - \frac{1}{1+X} [\text{Py}]_{\text{D},0} \right) \quad (3)$$

式3を積分すると、以下の式が導かれる。

$$[\text{Py}]_{\text{D}} = \frac{[\text{Py}]_{\text{D},0}}{1+X} \{ X \exp(-k_{\text{off}}[\text{M}\beta\text{CD}]t) + 1 \} \quad (4)$$

式4を脂質のモル濃度で割ることでドナー粒子外葉の py-PL のモル分率 ($\Phi_{\text{D}}^{\text{out}}$) が得られる。

$$\Phi_{\text{D}}^{\text{out}}(t) = \frac{\Phi_{\text{D},0}^{\text{out}}}{1+X} \{ X \exp(-k_{\text{off}}[\text{M}\beta\text{CD}]t) + 1 \} \quad (5)$$

本実験系では、 $X=2$ 、 $\Phi_{\text{D},0}^{\text{out}}=0.16$ なので、ドナーもしくはアクセプターの外葉と内葉の py-PL のモル分率はそれぞれ以下の式で表される。

$$\Phi_D^{\text{out}}(t) = \frac{0.16}{3} \{2 \exp(-k_{\text{off}}[M\beta\text{CD}]t) + 1\} \quad (6)$$

$$\Phi_D^{\text{in}}(t) = 0.16 \quad (7)$$

$$\Phi_A^{\text{out}}(t) = \frac{0.16}{3} \{1 - \exp(-k_{\text{off}}[M\beta\text{CD}]t)\} \quad (8)$$

$$\Phi_A^{\text{in}}(t) = 0 \quad (9)$$

式中の out と in はそれぞれ膜の外葉と内葉を、D と A はそれぞれドナーとアクセプターを表している。

解離速度定数 k_{off} を得るために、実験から得られた蛍光のデータを Φ_D^{out} に変換しなければならない。各時間の Φ_D^{out} におけるピレンのエキシマーとモノマーの蛍光強度は、4 種類のリポソーム (Φ_D^{out} 、 Φ_D^{in} 、 Φ_A^{out} 、 Φ_A^{in} に対応するモル分率の py-PC を含有) の混合によって再現できると考えられる。例えば、脂質輸送が進み、 $\Phi_D^{\text{out}}(t)$ が 0.14 になったとき、ドナー (20 μM) では $\Phi_D^{\text{out}} = 0.14$ 、 $\Phi_D^{\text{in}} = 0.16$ であり、アクセプター (40 μM) では $\Phi_A^{\text{out}} = 0.01$ 、 $\Phi_A^{\text{in}} = 0$ となるはずである (**Figure 12A**)。したがって、この時のピレン蛍光は、14、16、1、0 mol% の py-PC を含むリポソームをそれぞれ 10、10、20、20 μM の濃度で混合した試料から得られるピレン蛍光と一致すると考えられる。この考え方で、 Φ_D^{out} が 0.16、0.14、0.12、0.10、0.08、0.053 の場合に対応する 6 つの試料を調製し (**Table 1**)、Normalized E/M を Φ_D^{out} に変換するためのデータ (キャリブレーションデータ) を測定した (**Figure 12B**)。キャリブレーションデータは 29°C と 38°C で測定し、29°C から 38°C への温度上昇によって規格化前の E/M 値はおよそ 1.3 倍増加したが、 $\Phi_D^{\text{out}} = 0.16$ の時の E/M 値で規格化すると、Normalized E/M に対する温度依存性は見られなかった。

Table 1. キャリブレーションに用いた試料中の py-PC 含有リポソームの組成

Φ_D^{out}	A	B	C	D
	10 μM	10 μM	20 μM	20 μM
0.16 (= $\Phi_{D,0}^{\text{out}}$)	16 mol %	16 mol %	0 mol %	0 mol %
0.14	14 mol %	16 mol %	1 mol %	0 mol %
0.12	12 mol %	16 mol %	2 mol %	0 mol %
0.10	10 mol %	16 mol %	3 mol %	0 mol %
0.08	8 mol %	16 mol %	4 mol %	0 mol %
0.053 (= $\Phi_{D,\infty}^{\text{out}}$)	5.3 mol %	16 mol %	5.3 mol %	0 mol %

リポソーム A-D の組成はそれぞれ Φ_D^{out} 、 Φ_D^{in} 、 Φ_A^{out} 、 Φ_A^{in} に対応する。

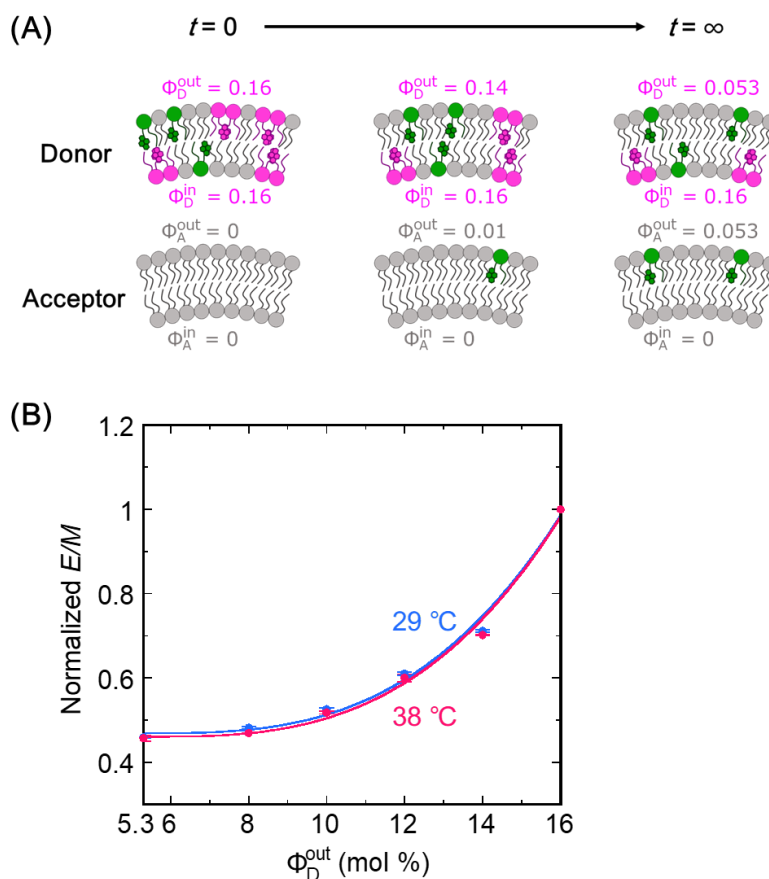


Figure 12. エキシマー/モノマー比のピレン脂質のモル分率へのキャリブレーション。

(A) 脂質輸送による、ドナーとアクセプターの内葉/外葉中のピレン脂質のモル分率の変化の模式図。(B) Normalized E/M 対ドナー外葉中の py-PC 濃度 (Φ_D^{out}) のキャリブレーション曲線。実線は式 11 によるフィッティング曲線である。エラーは 2 回の実験結果の標準偏差を示す (means \pm S.D.)。

データ解析を簡略化するために、Normalized E/M と Φ_D^{out} は N 次関数で関係づけられると仮定した。

$$\frac{E/M - E/M_\infty}{E/M_0 - E/M_\infty} = \left(\frac{\Phi_D^{\text{out}} - \Phi_{D,\infty}^{\text{out}}}{\Phi_{D,0}^{\text{out}} - \Phi_{D,\infty}^{\text{out}}} \right)^N \quad (10)$$

式中の 0 と ∞ はそれぞれ $t=0$ と $t=\infty$ の場合を表しており、 $\Phi_{D,0}^{\text{out}} = 0.16$ 、 $\Phi_{D,\infty}^{\text{out}} = 0.053$ である。また、 E/M_0 と E/M_∞ はそれぞれ、 $\Phi_{D,0}^{\text{out}}$ と $\Phi_{D,\infty}^{\text{out}}$ における Normalized E/M を表している。 E/M_0 は 1 であり、 E/M_∞ は N とともにフィッティングパラメーターとした。

$$E/M = \left(1 - E/M_\infty \right) \left(\frac{\Phi_D^{\text{out}} - 0.053}{0.107} \right)^N + E/M_\infty \quad (11)$$

得られたキャリブレーションデータは式 11 によくフィットし (**Figure 12B**)、パラメーターの N と E/M_∞ はそれぞれ 3.0 ± 0.4 、 0.46 ± 0.02 (エラーはフィッティングから得られた値) と見積もられた。ここで、 E/M_∞ は py-PL の輸送実験で得られたプラトー値 ($E/M(\infty) \approx 0.44$) とほぼ等しい値となった。式 5 を式 10 に代入し、 $\Phi_{D,0}^{\text{out}}/(1+X) = \Phi_{D,\infty}^{\text{out}}$ であることを考慮すると、最終的に次式が得られる。

$$\frac{E/M(t) - E/M_\infty}{E/M_0 - E/M_\infty} = \exp(-k_{\text{off}}N[M\beta\text{CD}]t) \quad (12)$$

この式は、 $\ln(E/M(t) - E/M(\infty))$ 対 t のプロットの傾きが $-k_{\text{off}}N[M\beta\text{CD}]$ に対応することを示している。つまり、 $k_{\text{off}} = k_{\text{app}}/N[M\beta\text{CD}]$ となり、解離速度定数 (k_{off}) は N の値を用いて求められる。37°C における py-PC 輸送の k_{off} は $0.025 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ と見積もられ、SANS 法を用いた先行研究²⁷ から求められた POPC 輸送の k_{off} は $0.024 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ であった。つまり、本実験系において、 $M\beta\text{CD}$ は 2 種類の脂質 (POPC と py-PC) を同様な速度で輸送していると考えられる。

第 5 節 $M\beta CD$ による脂質輸送の活性化パラメーター

脂質輸送の活性化パラメーターを得るために、 $M\beta CD$ による各 py-PL (py-PC、py-PG、py-PI、**Figure 6A–C**) 輸送の温度依存性を評価した。ドナーとアクセプターはそれぞれ $20\ \mu\text{M}$ と $40\ \mu\text{M}$ 、 $M\beta CD$ は $0.6\ \text{mM}$ の条件で実験を行った。全ての py-PL の輸送は温度上昇に伴って速くなり (**Figure 13A–C**)、アレニウスプロットは線形性を示した (**Figure 13D**)。絶対反応速度論^{28,29}より、アレニウスプロットから活性化エンタルピー (ΔH^\ddagger)、活性化エントロピー (ΔS^\ddagger)、活性化ギブズエネルギー (ΔG^\ddagger) を求めた (**Table 2**)。

$$k_{\text{off}} = A \exp\left(\frac{-E_A}{RT}\right) \quad (13)$$

$$A = \frac{ek_B T}{c^\circ h} \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \quad (14)$$

$$\Delta H^\ddagger = E_A - RT \quad (15)$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (16)$$

ここで、 A の次元を k_{off} ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$) と合わせるために標準濃度 ($c^\circ = 1\ \text{M}$) を導入した。

まず、py-PC 輸送の活性化パラメーターを、SANS 法によって求められた DMPC の自発的な膜間移動のパラメーター⁴と比較した (**Table 2,3**)。その結果、DMPC の自発的な膜間移動に比べ、 $M\beta CD$ による py-PC 輸送では、 ΔG^\ddagger の値がより小さな値であった。さらに、この ΔG^\ddagger の違いは ΔS^\ddagger の違いに起因することが分かった。自発的な DMPC の膜間移動は負の ΔS^\ddagger であり、DMPC のアシル鎖領域が水中に移行するときの疎水性水和の影響によるものと考えられる。一方で、 $M\beta CD$ による py-PC 輸送では、 ΔS^\ddagger は正の値となった。これは、 $M\beta CD$ によるリン脂質のアシル鎖部分の包接によって疎水性水和の効果が低減されるためだと考えられる。したがって、今回得られた結果は、自発的に膜から水中へ解離したリン脂質を $M\beta CD$ が包接するのではなく、脂質膜表面でリン脂質と $M\beta CD$ の複合体が形成されることを示している。

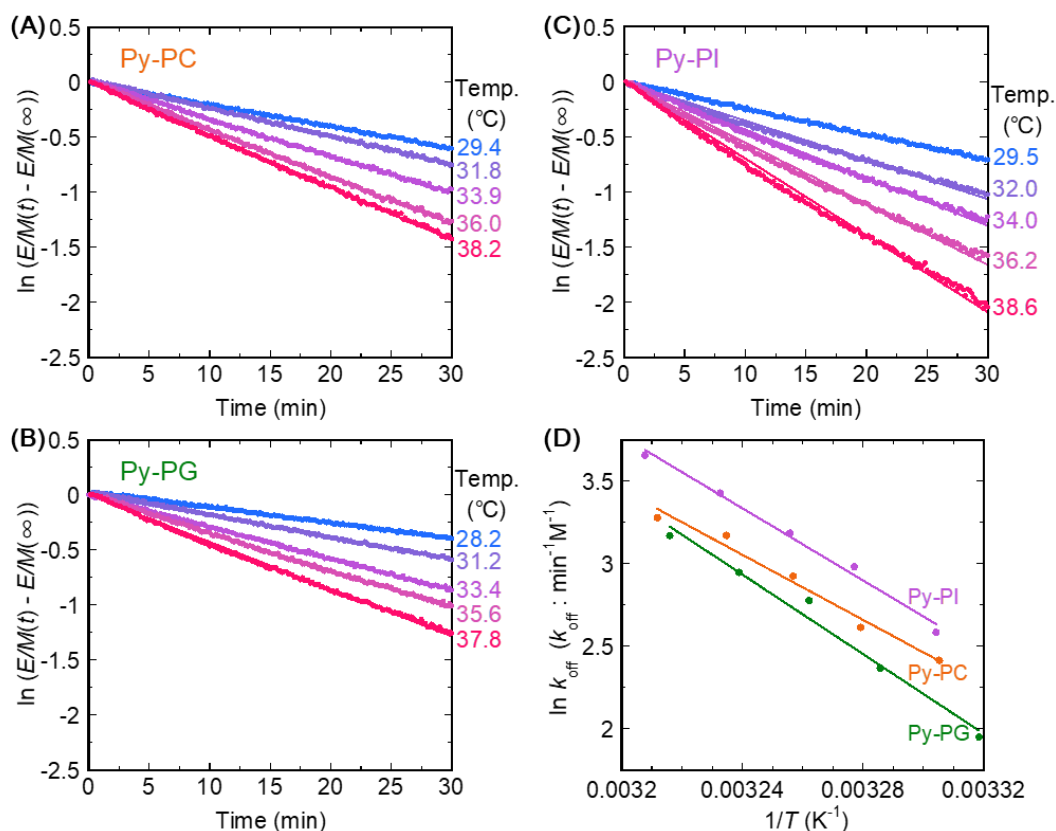


Figure 13. Py-PL 輸送の温度依存性。アクセプター (POPC 40 μM) と 16 mol % の py-PC (A)、py-PG (B)、py-PI (C) を含むドナー (20 μM) の混合液中に $M\beta\text{CD}$ 溶液 (0.6 mM) を $t=0$ で添加した。(D) Py-PC、py-PG、py-PI 輸送の k_{off} のアレニウスプロット。

Table 2. 37°Cにおける py-PC、py-PG、py-PI 輸送の活性化パラメーター

	ΔH^\ddagger (kJ/mol)	$T\Delta S^\ddagger$ (kJ/mol)	ΔG^\ddagger (kJ/mol)
Py-PC	79.4 ± 6.9	1.0 ± 7.0	78.3 ± 0.1
Py-PG	97.7 ± 7.8	19.1 ± 7.8	78.7 ± 0.1
Py-PI	88.3 ± 5.2	10.7 ± 5.3	77.6 ± 0.1

エラーはフィッティングから得られた値を示す。

Table 3. 37°Cにおける DMPC の自発的な膜間移動の活性化パラメーター⁴

	ΔH^\ddagger (kJ/mol)	$T\Delta S^\ddagger$ (kJ/mol)	ΔG^\ddagger (kJ/mol)
DMPC	82.1	-18.4	101

次に、頭部の異なる3種類のpy-PL (py-PC、py-PG、py-PI) で活性化パラメーターを比較した (Table 2)。37°Cにおけるpy-PC、py-PG、py-PI 輸送の ΔG^\ddagger はそれぞれ78.3、78.7、77.6 kJ/mol となり、ほぼ等しい値であった。用いた3種類のpy-PL は同じアシル鎖の組成であるため、M β CD はリン脂質の頭部構造による選択性を示さないことが明らかになった。得られた ΔS^\ddagger はどのpy-PL でも正の値となり、これは上述したように、M β CD がリン脂質のアシル鎖領域を膜上で包接するためと考えられる。 ΔH^\ddagger を比較すると、M β CD による膜からのpy-PG や py-PI の引き抜きは、py-PC に比べるとエンタルピー的に不利な結果となった。23%の1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG) を含むPOPC膜の分子動力学 (MD) シミュレーションでは、平衡状態におけるPOPG/POPC混合膜の平均特性 (脂質一分子当たりの占有面積やアシル鎖のオーダーパラメーター) は純粋なPOPC膜と変わらないが、脂質頭部の挙動に違いが見られており、全POPGのうち、約半数の分子がPOPCとの水素結合に関わっていることを示している³⁰。また、対イオン (Na⁺) の効果を考慮したMDシミュレーションでは、POPC膜に比べ、POPG膜は脂質一分子当たりの頭部面積が小さく、膜の流動性が低下するという結果を示している³¹。したがって、脂質頭部間の水素結合や、膜中でのpy-PGアシル鎖のパッキングの増強が ΔH^\ddagger の増加に寄与していると考えられる。PIに関するMDシミュレーションの結果は入手できなかったが、PIは頭部に水酸基を有するため、膜中で他の脂質分子と水素結合を形成している可能性がある。また、DMPC/1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoinositol (DMPI) の50:50混合膜の中性子回折により、DMPIのイノシトール環が、頭部領域を最小にするように膜の法線方向に配向することが報告されている³²。したがって、py-PIの頭部領域はpy-PGと同様に ΔH^\ddagger を増加させることが推察されるが、py-PGに比べるとその効果は小さいと考えられる。

第6節 考察

本研究の結果から、py-PLの膜からの解離速度定数 (k_{off}) はM β CD濃度に比例することが分かった。このことは、リン脂質の膜間輸送が主にM β CDとpy-PLの1:1複合体によってなされることを示唆している。リン脂質/M β CDの複合体構造に関しては、Andersonらが等温滴定型カロリメトリーにより評価し、高濃度M β CDの条件下ではPOPCとM β CDが1:4の化学量論比で複合体を形成すると報告しており²²、私の所属する研究グループも同様な結果を示している³³。 β -Cyclodextrinがhead-to-headで二量体を形成した場合の疎水性内腔の高さは1.57 nmとなり³⁴、POPCのアシル鎖の長さと同様である。そのため、POPC/M β CD (1:4)の複合体では、POPCのアシル鎖一本に対して2分子のM β CDが包接すると考えられている²²。この知見から、py-PL/M β CD (1:1)の複合体では、py-PLのアシル鎖の半分ほどしか包接されていないと推察される。ここで、sn-1位にアシル鎖を持ち、sn-2位が水酸基であるlysophospholipidは、自発的な膜間移動の半減期が数分から数十分であることが知られている³⁵。本研究で観測されたM β CDによるpy-PL輸送の半減期は数十分程度であり、M β CDがpy-PLのアシル鎖を半分包接するだけで、py-PLが膜間移動を起こすには十分である可能性がある。また、Tanhuanpääらは、二本のアシル鎖がどちらもピレン修飾されたリン脂質は2-3分子の γ -cyclodextrin (8分子のグルコースによってできた環状分子)と複合体を形成し、ピレンのエキシマー蛍光が増大することを報告している³⁶。この結果は、ピレンラベルされた二本のアシル鎖が同一の γ -cyclodextrin内に挿入されていることを示している。この構造はピレン基同士の π - π 相互作用が一部寄与して安定化されている³⁷。Py-PL/M β CD (1:1)複合体形成において、M β CDが、py-PLのsn-1位のアシル鎖、もしくはピレン基が付加されたsn-2位のアシル鎖のどちらか一方のみを包接している可能性と、どちらも包接している可能性があるが、その構造を明確にするためにはさらなる知見を要する。

第7節 小括

本章では、ピレンエキシマーの解消を利用してM β CDによる脂質輸送を評価した。その結果、数百 μ Mから数mM程度のM β CD濃度でpy-PL輸送が観測された。観測されるピレンのエキシマー/モノマー比を粒子中のpy-PL量に換算することで、M β CDによる脂質輸送の物理化学的パラメーターを得ることができた。M β CDによるpy-PL輸送は活性化エントロピーの上昇を伴うことが分かった。このことは、M β CDが膜上でリン脂質を包接することで、リン脂質が脂質膜から水中へ移行する時に生じる疎水性水和の影響を低減することを示している。また、py-PLの輸送過程では、M β CDがリン脂質と1:1の複合体を形成することが示唆された。今回用いた脂質輸送の定量的な解析法は、様々な脂質輸送タンパク質の活性評価に応用できると考えられる。次章では、ピレン蛍光を利用して、酵母の脂質輸送タンパク質であるSec14の脂質輸送能を評価した。

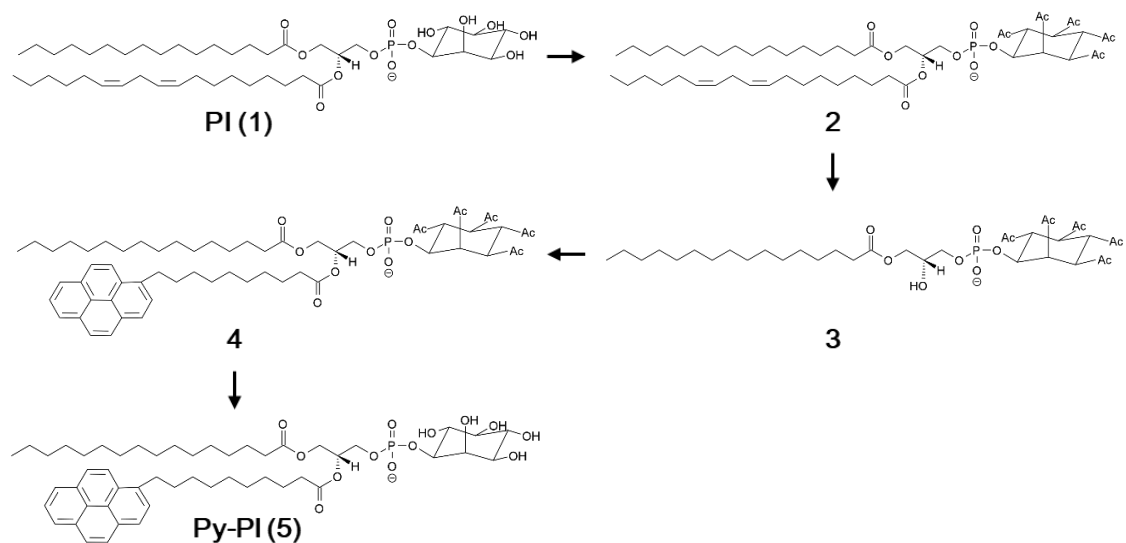
実験方法

試料

POPC は日油（東京）から購入した。1-Palmitoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (py-PC)、1-palmitoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (py-PG) は Molecular Probes (Eugene, OR) から購入した。1-Pyrenedecanoic acid は Setareh Biotech (Eugene, OR) から購入した。M β CD、ブタ膵臓由来ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂)、トリエチルアミンは Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO) から購入した。無水酢酸、4-dimethylaminopyridine (DMAP)、ヒドラジン一水和物、コール酸ナトリウムは富士フィルム和光純薬（大阪）から購入した。2-Methyl-6-nitrobenzoic anhydride (MNBA) は東京化成（東京）から購入した。大豆由来 L- α -phosphatidylinositol (PI) はナカライテスク（京都）から購入し、主要成分は *sn*-1 位に palmitoyl (C16:0)、*sn*-2 位に linoleoyl (C18:2) のアシル鎖を持つものである。全て最も等級の高いものを用いた。

Py-PI 合成

Py-PI は参考文献^{38,39}をもとに PI と 1-pyrenedecanoic acid から合成した (**Scheme 1**)。PI (75 mg (~89.7 μ mol)) (**化合物 1**) を 4.5 mL の塩化メチレンに溶解し、そこへ無水酢酸 (1 mmol) と DMAP (0.5 mmol) を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を 2 mL のメタノール/0.1 M HCl (1:1 (v/v)) で 2 回、2 mL のメタノール/0.1 M アンモニア (1:1 (v/v)) で 1 回洗浄し、**化合物 2** を得た。得られた**化合物 2** 全量を 5 mL の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (14 mM コール酸ナトリウム、20 mM CaCl₂, pH 8.0) に懸濁し、1.4 mg の PLA₂ を加え、37°Cで一晩攪拌した。反応液を 5 mL のメタノール/クロロホルム (1:2 (v/v)) で 3 回分液した後、クロロホルム層をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけることで**化合物 3** を得た。MNBA (58 μ mol)、DMAP (52.8 μ mol)、トリエチルアミン (58 μ mol) を 0.5 mL の塩化メチレンに溶解し、室温で攪拌しながら、1-pyrenedecanoic acid (52.8 μ mol) の塩化メチレン溶液 1.5 mL を滴下した。ついで、**化合物 3** (29 μ mol) の塩化メチレン溶液 1 mL を滴下し、そのまま一晩反応させた。反応液に水を 2 mL 加えて分液し、塩化メチレン層をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ、**化合物 4** を得た。得られた**化合物 4** 全量をヘプタン 260 μ L に溶解し、そこへ水 2.6 mL とヒドラジン一水和物 320 μ L を加え、室温で 2.5 時間攪拌した。反応液に 6 mL のクロロホルム、3 mL のメタノール、1 mL の 2% NaCl 水溶液を加え、クロロホルム層を採取した。そのクロロホルム層を 3 mL のメタノール/0.1 M HCl (1:1 (v/v)) で洗浄し、さらに 3 mL のメタノール/0.1 M アンモニア (1:1 (v/v)) で洗浄した。最後に洗浄後のクロロホルム層をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけることで py-PI (**化合物 5**) を得た。MALDI-TOF MS により py-PI が主に palmitoyl 基を持つことを確認した。したがって、py-PI のアシル鎖は py-PC や py-PG と同じである。



Scheme 1. Py-PI の合成経路。PI の *sn*-2 位のアシル鎖を PLA₂ で加水分解し、そこへ pyrenedecanoyl 基を導入した。

LUV 調製

脂質のメタノール/クロロホルム (1:2 (v/v)) 溶液を必要量ナス型フラスコに入れた。ロータリーエバポレーターによって溶媒を減圧除去し、フラスコ底部に脂質薄膜を形成させた後、真空乾燥機に一晩置き、溶媒を完全に除去した。脂質薄膜を Tris-HCl 緩衝液 (10 mM Tris、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mg/mL NaN₃、pH7.4) で膨潤させ、vortex により脂質懸濁液とした。この懸濁液に対して凍結融解を 5 回行った後、LiposoFast extruder (Avestin、Ottawa、Canada) を用いて、孔径 100 nm のポリカーボネートフィルターを数十回通過させることで大きな一枚膜ベシクル (LUV) を調製した。LUV の粒径は、FPAR-1000 (大塚電子、大阪) を用いて、動的光散乱によりおよそ 140 nm であることを確認した。PC 濃度はコリンアッセイキット (富士フィルム和光純薬、大阪) により定量し、py-PG や py-PI を含有する LUV の濃度はリン定量⁴⁰により求めた。

脂質輸送評価

16 mol % の py-PL を含有する POPC LUV をドナー、POPC 100% の LUV をアクセプターとした。360 μ L のドナー/アクセプター混合液に 40 μ L の M β CD 溶液を添加した。最終濃度は、ドナーが 20 μ M、アクセプターが 40 μ M、M β CD は 0–1 mM とした。F-4500 分光光度計 (日立ハイテクサイエンス、東京) を用いて、345 nm 励起光におけるピレンのエキシマー蛍光強度 (478 nm) とモノマー蛍光強度 (378 nm) を 30 分間 10 秒毎に測定した。ピレンエキシマー/モノマー蛍光強度比 (*E/M*) を算出し、M β CD 添加直前の値で規格化した。30 分間測定後のサンプルは 25°C で 1 日インキュベーションし、平衡状態にした。この時のピレン蛍光を測定し、*t* = ∞ の *E/M* 値とした。

第2章

リン脂質輸送タンパク質 Sec14 の脂質輸送機構の解明

第1節 緒言

真核生物にとって重要なリン脂質である PI は、小胞体膜上で生合成され、その後他のオルガネラ膜へと分配される⁴¹。各オルガネラ膜中の PI の一部は頭部のイノシトールのリン酸化によっていくつかの phosphoinositides (PIPs) に変換され、様々な調節因子として機能する。一例として、酵母の PI 4-OH キナーゼである Pik1 は PI を PI4P へと変換し、PI4P は小胞形成に関わるタンパク質群の標的脂質として trans-Golgi 膜からの小胞出芽を促進する^{42,43}。逆に、PI4P ホスファターゼの Sac1 や、PI4P 結合タンパク質の Kes1 は PI4P シグナルの阻害因子として機能する。興味深いことに、Pik1 のリン酸化酵素活性は細胞にとって“不十分”であり、PI4P シグナルの阻害作用に打ち勝つために必要な量の PI4P を産生することはできない^{10,11}。Pik1 が小胞出芽に必要な量の PI4P を産生するためには、Pik1 の活性化因子である Sec14 を必要とする^{10,11}。

In vitro において Sec14 は脂質膜ベシクル間で PC と PI を輸送することができる。一方で in vivo では、Sec14 機能の欠損株に対して、その機能をバイパスする変異の網羅的な分析が行われた結果、Sec14 は単に脂質を輸送するわけではなく、PI と PC の代謝に関与して、PI4P と PC の生成を制御することが判明した^{7,10,11}。これまでの研究から、Sec14 は何らかの方法で、Pik1 を活性化することで trans-Golgi 膜中の PI4P 量を増加させ、また、PC 生合成経路を抑制することで diacylglycerol (DAG) の量を増加させることが示唆されている⁴⁴⁻⁴⁶。これら2種類の脂質が増加することで、trans-Golgi からの小胞出芽が促進される。PI4P の役割は上述の通りであり、DAG は小さい頭部基を持つ脂質であるため、小胞形成に伴う trans-Golgi 膜の局所的な湾曲を助けると考えられている⁴⁴。さらに、PC、PI のどちらか一方にしか結合できない Sec14 の変異体や、両変異体の混合物は、Sec14 機能を代替できないことが知られている¹⁰。これらの結果は、Sec14 一分子が PC と PI のどちらとも結合できることが細胞にとって重要であることを示している^{10,11}。

Sec14 の脂質交換メカニズムの解明はその機能の理解のために重要であるが、脂質交換サイクルの詳細は明らかになっていない。X線結晶構造解析から、Sec14 は脂質一分子を収容できる疎水性ポケットと、そのふたの役割をする両親媒性ヘリックス(ゲート)を持つことが知られている (Figure 14A)⁴⁵。Sec14 の結晶構造は、基質 (PC/PI) ではなく界面活性剤の β -octylglucoside 共存下で得られたものであり、Sec14 がゲートを開けた状態を示していると考えられている。酵母には Sec14 ホモログタンパク質 (Sfh) が 5

種類存在し、その中でも最も相同性の高い Sfh1 の PC もしくは PI 結合状態の結晶構造が得られている。それによると、Sfh1 の両親媒性ゲートヘリックスは脂質結合ポケットを覆うように閉じた状態にある¹⁰。これらの知見から次のような Sec14 の脂質輸送モデルが提唱されている。まず、ゲートを閉じた状態の Sec14 が膜と会合し、ゲートを膜に挿入して開状態になる。それによって Sec14 に結合していたリン脂質が疎水性ポケットから離れ、脂質膜から新たにリン脂質を取り込む。ポケット内部の脂質と膜中の脂質の交換が膜上で何度行われるのかは定かではないが、あるタイミングでゲートが閉じ、最終的に Sec14 が膜から解離する (Figure 14B)^{10,11,45,46}。しかしながら、上述の脂質輸送モデルは未だ証明されておらず、Sec14 の脂質輸送の速度、輸送基質の選択性、実際に膜上で脂質交換を行うのかなど不明な点が多い。そこで、本章では、第 1 章のピレン蛍光や中性子小角散乱 (SANS)^{4,27} を用いた脂質輸送のリアルタイム測定により、Sec14 の脂質輸送活性を評価し、その物理化学的特性を評価した。

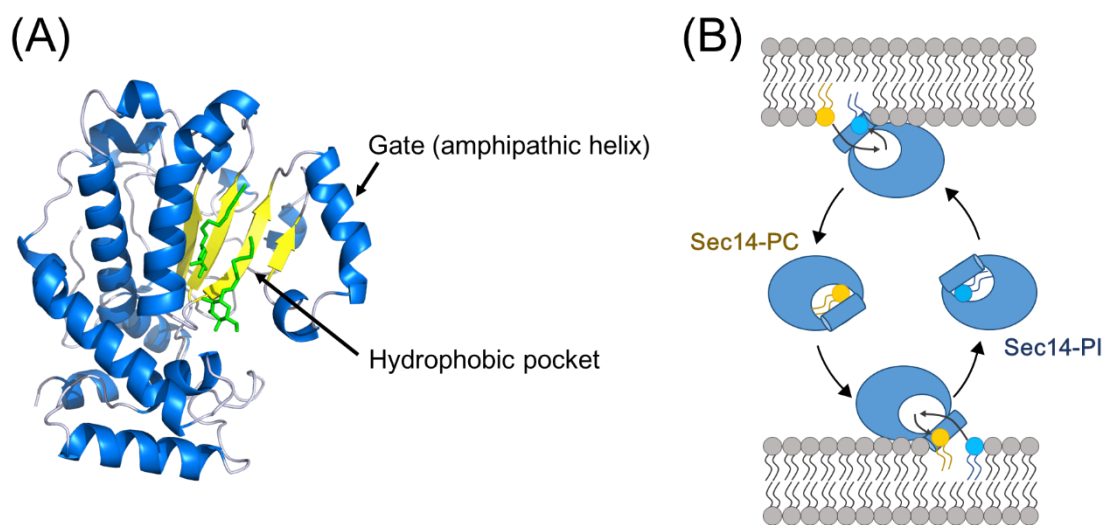


Figure 14. (A) Sec14 の結晶構造 (PDB 1AUA)。緑で示した分子は octyl- β -D-glucopyranoside である。(B) 提唱されている脂質輸送モデル。膜に会合した Sec14 は、膜上でゲートを開き脂質交換を行うと、ゲートを閉じて膜から解離する。

第2節 Sec14によるPC/PI輸送の評価

まず、py-PCとpy-PI (Figure 6A,C) を用いて、in vitroにおけるSec14の脂質輸送評価を行った。第1章で述べたように、py-PLがドナーからアクセプターへ輸送されることによってピレンエキシマーの形成頻度が低下し、エキシマー/モノマー蛍光強度比 (E/M) が減衰する。細胞内でSec14はtrans-Golgiで機能するため、Golgi膜組成を模倣した粒径約120 nmの大きな一枚膜ベシクル (large unilamellar vesicle、LUV) を調製した (PC/PI/phosphatidylserine (PS) /phosphatidylethanolamine (PE) /cholesterol (Chol) = 40:40:4:8:8)⁴⁷。ここで、PCとしてPOPCを用い (Figure 6D)、PSとPEはPOPCと同様にsn-1位にpalmitoyl、sn-2位にoleoylのアシル鎖を持つもの (POPSとPOPE) を、PIは大豆由来で、sn-1位にpalmitoyl、sn-2位にlinoleoylを主成分として持つものを用いた (Figure 15)。

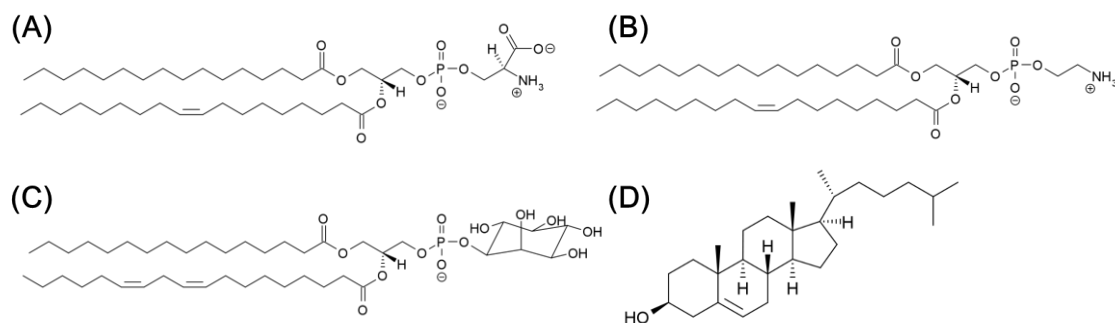


Figure 15. POPS (A)、POPE (B)、大豆由来PIの主成分 (C)、Chol (D) の化学構造。

まず、16 mol %のpy-PCを含有するドナー (py-PC/PC/PI/PS/PE/Chol = 16:24:40:4:8:8) とpy-PCを含まないアクセプター (PC/PI/PS/PE/Chol = 40:40:4:8:8) を混合し、Sec14を添加することで、Sec14のPC輸送能を評価した (Figure 16A)。その結果、Sec14の添加により、 E/M が減衰した (Figure 16B 茶)。ここで、Sec14が単にドナー粒子からpy-PCを引き抜くだけでも E/M は減衰するため、引き抜きの効果を検証した (Figure 16C)。アクセプター非存在下において、ドナー懸濁液にSec14を添加したところ、 E/M が減衰し、Sec14による E/M の減衰には脂質の引き抜きも寄与することが判明した (Figure 16D 茶)。この引き抜きにおけるNormalized E/M のプラトー値は0.794となり、アクセプター存在下ではこの数値を下回った。このことは、Sec14は単にドナーからpy-PCを引き抜くだけでなく、アクセプター膜へpy-PCを輸送することを示している。次に、py-PIを含有するドナー粒子を調製し (PC/py-PI/PI/PS/PE/Chol = 40:16:24:4:8:8)、Sec14によるPI輸送を評価した。その結果、Sec14の添加によって E/M が減衰し、さらに、その速度はpy-PCの場合に比べておよそ9倍速かった (py-PC輸送の速度定数は 0.058 min^{-1} 、py-PI輸送は 0.520 min^{-1}) (Figure 16B 青)。Py-PI輸送においても、アクセプター非存在下

における引き抜きアッセイのプラトー値 (0.703) を下回り (Figure 16D 青)、Sec14 が py-PI をドナーからアクセプターへ輸送していることを確かめた。以上の結果から、Sec14 による PI 輸送は PC 輸送よりも優位であることが明らかになった。

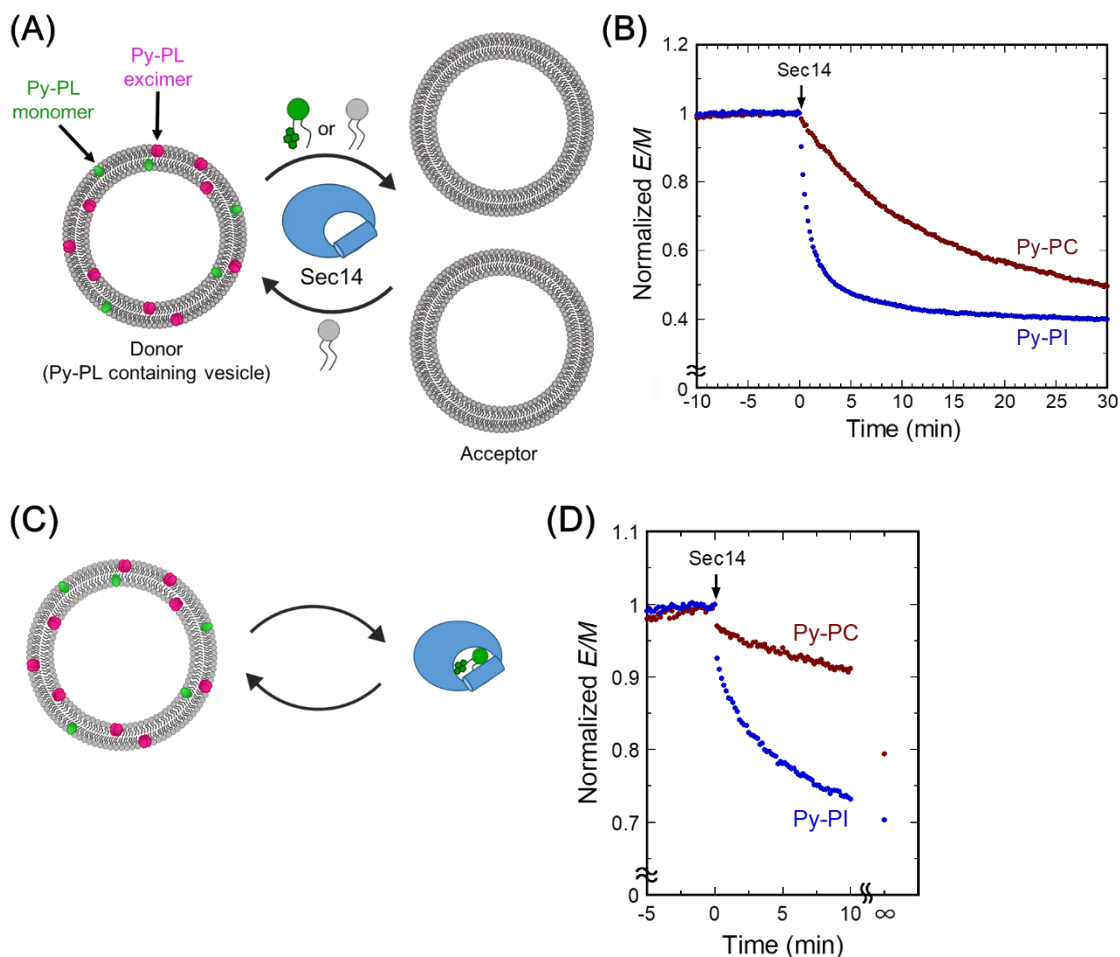


Figure 16. (A) 脂質輸送評価系の概略図。(B) Golgi 膜組成の LUV を用いた脂質輸送評価。 $t = 0$ で Sec14 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した。アクセプター組成は PC/PI/PS/PE/Chol = 40:40:4:8:8 (40 μM)。ドナー組成は、py-PC 輸送評価では py-PC/PC/PI/PS/PE/Chol = 16:24:40:4:8:8 (茶)、py-PI 輸送評価では PC/py-PI/PI/PS/PE/Chol = 40:16:24:4:8:8 (20 μM) (青)。(C) 脂質引き抜き評価系の概略図。(D) Golgi 膜組成の LUV を用いた脂質引き抜き評価。 $t = 0$ で Sec14 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した。ドナー組成は、py-PC 引き抜き評価では py-PC/PC/PI/PS/PE/Chol = 16:24:40:4:8:8 (茶)、py-PI 引き抜き評価では PC/py-PI/PI/PS/PE/Chol = 40:16:24:4:8:8 (20 μM) (青)。24時間インキュベーション後の Normalized E/M を $t = \infty$ に示してある。

第3節 Sec14の基質選択性

Sec14がPIに対して選択性を持つことが示唆されたため、Sec14の基質選択性をpy-PLの引き抜きにより評価した。各種py-PL (py-PC、py-PI、py-PG、Figure 6A-C) を含有するドナー懸濁液 (py-PL/PC = 16:84) にSec14を添加すると、py-PCとpy-PIの場合でE/Mが減衰し、py-PGではE/Mの減衰は観測されなかった (Figure 17A)。この結果は、Sec14がPCとPIに対して高い基質選択性を持つことを示している。各py-PLのアシル鎖構造は同じであるため、Sec14はPCやPIの頭部構造を認識していると考えられる。さらに、py-PCドナー中の30 mol %のPCをSec14の基質ではないPSに置き換えたところ (py-PC/PC/PS = 16:54:30)、E/Mがより小さな値まで減衰した (Figure 17B)。このことは、py-PCの引き抜きと、ピレン修飾されていない通常のPCの引き抜きが競合することを示している。一方、PCをSec14のもう一つの基質であるPIに置き換えたところ、ドナー中のPIの増加に伴ってE/Mの減衰が抑制された (Figure 17B)。つまり、この実験からも、Sec14はPCよりもPIに対してより高い親和性を持つことが明らかになった。

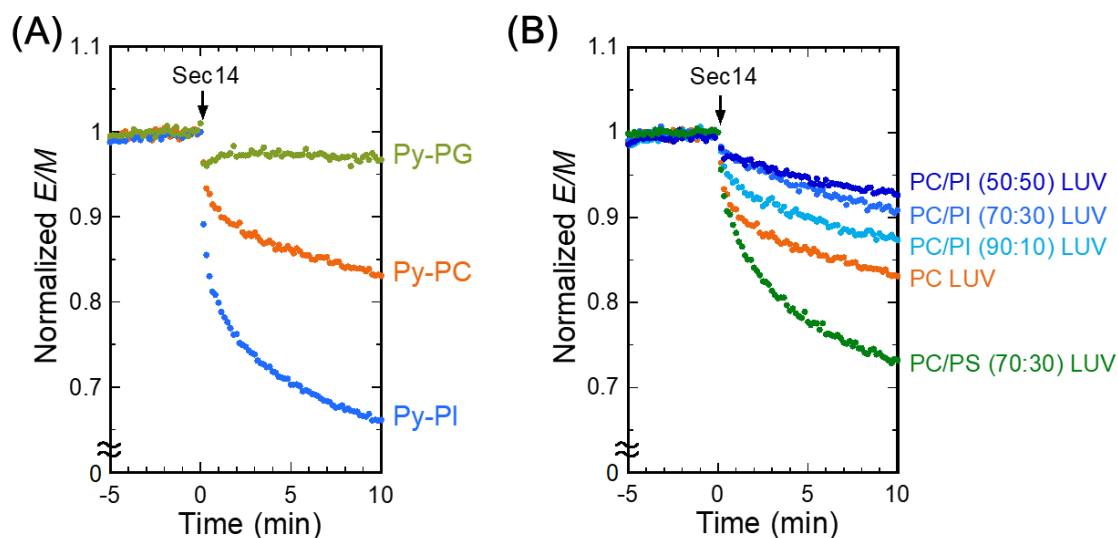


Figure 17. (A) Sec14による各種py-PL (py-PC、py-PI、py-PG)の引き抜き (Sec14濃度は50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。脂質組成はpy-PC/PC = 16:84、py-PI/PC = 16:84、py-PG/PC = 16:84 (20 μM)。 (B) 様々な脂質組成におけるpy-PC引き抜き評価 (Sec14濃度は50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。脂質組成はpy-PC/PC/PI = 16:34:50、16:54:30、16:74:10、16:84:0、もしくはpy-PC/PC/PS = 16:54:30 (20 μM)。

第4節 酸性リン脂質による Sec14 脂質輸送の促進

Sec14 は Golgi 膜上で機能し、脂質膜環境が Sec14 の機能を制御している可能性がある。実際、Sec14 による py-PC の膜間輸送は、Golgi 組成のリポソームを用いた場合 (Figure 16B) に比べ、PC のみで調製したリポソームを用いた時にその速度が大幅に遅くなった (Figure 18A)。ここで、酵母の Golgi 膜が PI や PS といった頭部に負電荷を持つ酸性リン脂質に富むことに着目した⁴⁷。30 mol % の PI や PS を膜中に含ませたところ、Sec14 の py-PC 輸送が促進された (Figure 18A)。ここで、PI は py-PC の引き抜きを競合阻害する一方で (Figure 17C)、py-PC の膜間輸送は促進した。さらに、PI もしくは PS 含有リポソームを用いた系において、緩衝液の塩濃度の低下に伴って Sec14 の py-PC 輸送は速くなった (Figure 18B,C)。これらの結果から、Sec14 と酸性リン脂質との静電相互作用が Sec14 の脂質輸送促進に寄与することが明らかになった。

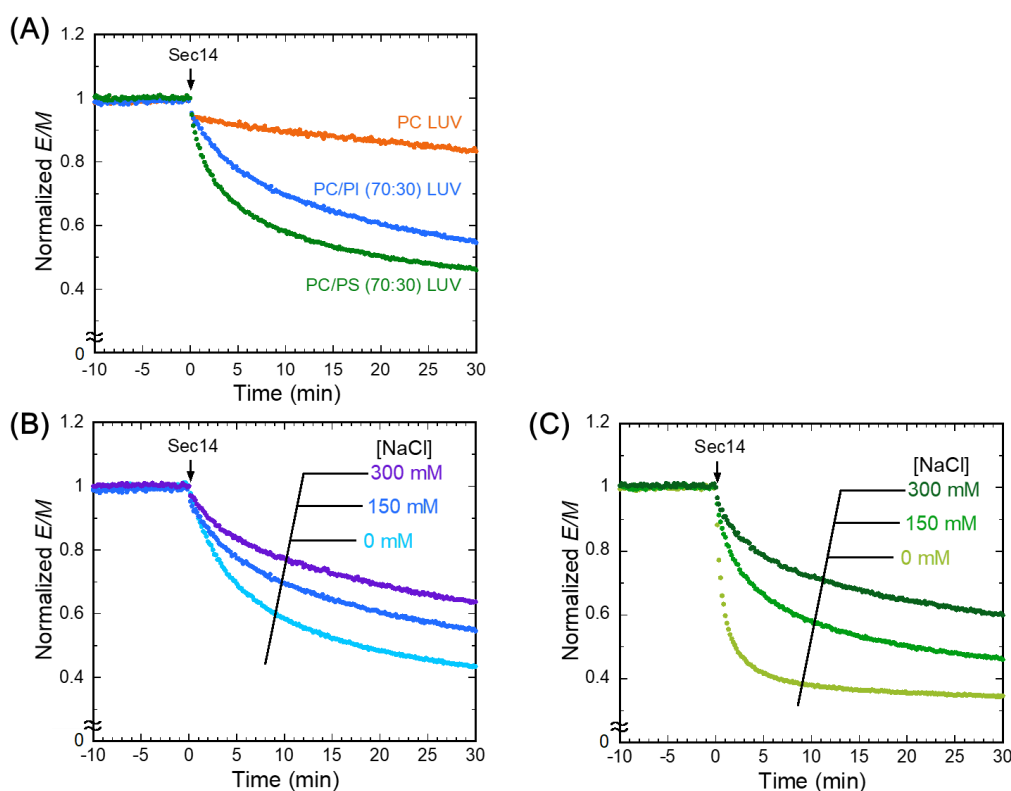


Figure 18. (A) 様々な脂質組成における py-PC 輸送評価。Sec14 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を $t = 0$ でドナー (20 μM)、アクセプター (40 μM) 混合液中に添加した。PC のみの系では、ドナーは py-PC/PC = 16:84、アクセプターは PC 100% (橙)。PI 含有系では、ドナーは py-PC/PC/PI = 16:54:30、アクセプターは PC/PI = 70:30 (青)。PS 含有系では、ドナーは py-PC/PC/PS = 16:54:30、アクセプターは PC/PS = 70:30 (緑)。(B,C) 様々な塩濃度における py-PC 輸送評価。(B) の脂質組成は (A) の PI 含有系と同様であり、(C) の脂質組成は (A) の PS 含有系と同様である。

第5節 SANS法による脂質輸送評価

ピレンを用いた脂質輸送測定では、ピレンラベル脂質 (py-PL) の輸送と非ラベル脂質の輸送が競合している。さらに、 E/M の減衰は、py-PL の膜間輸送だけでなく、Sec14 による py-PL の引き抜きによっても起こる。これらの問題のために、Sec14 の脂質輸送のより詳細な解析は困難となる。そこで、SANS 法により Sec14 の脂質輸送を評価した。この手法では、通常の軽水素リン脂質と重水素化リン脂質が異なる散乱長密度 (SLD) を有することを利用して脂質輸送をリアルタイムに測定する。*sn*-1 位の palmitoyl 鎖を完全重水素化した PC (*d*-PC、 $SLD = 2.8 \times 10^{10} \text{ cm}^{-1}$ 、**Figure 19A**) で調製した D 体リポソームと、軽水素 PC (*h*-PC、 $SLD = 0.26 \times 10^{10} \text{ cm}^{-1}$ 、**Figure 6D**) で調製した H 体リポソームは、溶媒 (30% D_2O 、 $SLD = 1.5 \times 10^{10} \text{ cm}^{-1}$) と大きく異なる SLD 値を有するため、中性子線の強い散乱を示す。両粒子間で *d*-PC と *h*-PC が交換されると、次第に両粒子の SLD が溶媒の値に近づき、中性子線の散乱強度の減衰が観測される (**Figure 19B**)。

Sec14 による PC の膜間輸送を様々な組成 (PC、PC/PI=90:10、PC/PS=90:10) の LUV を用いて行った (Sec14 濃度は $50 \mu\text{g/mL}$ に固定)。まず、D 体 LUV と H 体 LUV はどちらも同じ組成のものを用いた (各 15 mM)。SANS 強度から計算した Normalized Contrast ($\Delta\rho(t)/\Delta\rho(0)$) は Sec14 の添加により減衰し、Sec14 による *d*-PC と *h*-PC の膜間輸送を観測できた (**Figure 19C**)。ここで、Sec14 濃度 ($50 \mu\text{g/mL} = 1.4 \mu\text{M}$) は脂質濃度 (30 mM) よりも十分小さいため、Sec14 による脂質の引き抜きの寄与を無視できる。Normalized Contrast は最終的におよそ 0.5 まで減衰し、このことは、LUV 外葉の PC のみが輸送されたこと、さらに、PC が脂質膜の外葉/内葉間を移動 (フリップフロップ) しないことを示している²⁷。また、ピレン蛍光を用いた手法と同様に、SANS 法による脂質輸送評価でも、両粒子に 10 mol % の PI や PS を含ませると、Sec14 による PC 輸送が促進された (**Figure 19C**)。

次に、異なる脂質組成をもつ粒子間での PC 輸送を評価するため、D 体リポソームとして 100% *d*-PC の LUV を、H 体リポソームとして 10 mol % の PI もしくは PS を含有する *h*-PC LUV を用いた。その結果、Normalized Contrast の減衰は、D 体/H 体 LUV がどちらも PC のみの場合よりも速くなり、両粒子が PI もしくは PS を含有する場合よりも遅くなった (**Figure 19C**)。これらの結果は、Sec14 が PC のみの LUV にも、PI もしくは PS を含有する LUV にも等しく結合すること、つまり、酸性リン脂質は Sec14 の膜結合性を高めないことを示唆している。

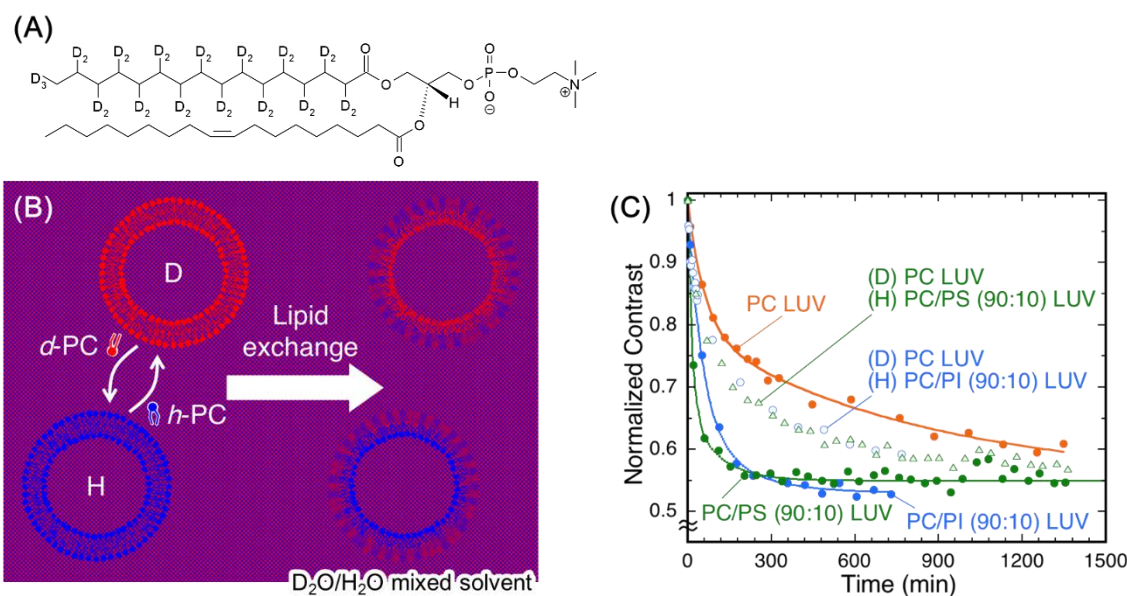


Figure 19. (A) *d*-PC の化学構造。(B) SANS 法による脂質輸送評価系の概略図。(C) D 体/H 体 LUV がどちらも PC LUV、PC/PI (90:10) LUV、PC/PS (90:10) LUV の系における Normalized Contrast の時間変化 (closed circle)。Sec14 (50 μg/mL) を D 体/H 体 LUV 混合液中 (各 15 mM) に $t = 0$ で添加した。実線は double-exponential 関数 (式 17) によるフィッティング曲線である。D 体 LUV が 100% *d*-PC で、H 体 LUV が *h*-PC/PI (90:10) もしくは *h*-PC/PS (90:10) の場合は open symbol で示してある。中性子散乱は SANS-U を用いて測定した。

第 6 節 酸性リン脂質による脂質輸送促進メカニズム

Sec14 による脂質輸送を詳細に解析するために、様々な Sec14 濃度で SANS 実験を行った。Normalized Contrast ($\Delta\rho(t)/\Delta\rho(0)$) の減衰は Sec14 濃度依存的に速くなり、それらの減衰曲線は double-exponential 関数 (式 17) によくフィットした (Figure 20A–D)。

$$\Delta\rho(t)/\Delta\rho(0) = (1 - C) \{A \exp(-k_1 t) + (1 - A) \exp(-k_2 t)\} + C \quad (17)$$

式中の定数 C は、全 PC 分子に対する、輸送されない PC の割合を表しており、D 体 LUV と H 体 LUV の混合液と M β CD を 6 時間以上インキュベーションすることでその値を得た。リポソーム外葉の脂質のみが輸送されるため、理想的な C の値は 0.5 である

が、実際には 0.55–0.6 となった。これは、用いた LUV が全て単一層 (unilamellar) ではなく、多層 (multilamellar) のものが混在するためではないかと考えた。C の理想の値 (0.5) からのずれが multilamellarity (リポソームの最外膜以外にいる PC の割合) のみに起因すると仮定すると、今回用いた LUV の multilamellarity は 10–20% と見積もられる。以前に SANS 法⁴⁸ や cryo-TEM⁴⁹ によって LUV の multilamellarity が評価されており、それぞれの結果から 16% と 5% と算出できる。これは、今回見積もられた値と同等かわずかに小さい値である。

$t=0$ におけるフィッティング曲線の微分から輸送の初速を計算し、Sec14 濃度に対してプロットした (Figure 20E)。その結果、10 mol % の PI や PS によって、Sec14 による PC 輸送は顕著に促進された。Sec14 は脂質膜に結合し、その後、脂質輸送を行うため、脂質輸送の初速は Sec14 の膜結合量に比例すると考えられる。よって、langmuir 型の式でフィッティングすることにより、Sec14 の膜結合に関する見かけの解離定数 (K_D) を見積もった。その結果、PC のみの系では 118 $\mu\text{g/mL}$ (3.4 μM)、PC/PI (90:10) の系では 129 $\mu\text{g/mL}$ (3.7 μM)、PC/PS (90:10) の系では 263 $\mu\text{g/mL}$ (7.5 μM) となった。PI や PS による K_D 値の低下が見られなかったため、酸性リン脂質によって Sec14 の膜結合性は高められないことが示唆された。また、Sec14 濃度が 0 における傾き ($[\text{min}^{-1} (\mu\text{g/mL protein})^{-1}]$) は、タンパク質一分子当たりの PC 輸送速度の最大値 k_{tr} ($[\text{PC protein}^{-1} \text{s}^{-1}]$) に比例する。

$$k_{tr} = \text{slope} \times [\text{PC}_{\text{out}}] \times \text{MW}_{\text{Sec14}}/60 \quad (18)$$

ここで、 MW_{Sec14} は Sec14 の分子量 (34901 Da) であり、 $[\text{PC}_{\text{out}}]$ は脂質二重層外葉に存在する PC の濃度である (PC のみの系では 15 mM、PC/PI (90:10)、PC/PS (90:10) の系では 13.5 mM)。式 18 から、1 秒間に Sec14 一分子が輸送する PC 分子数が見積もられ、PC のみの系では 0.87、PC/PI = 90:10 の系では 2.4、PC/PS = 90:10 の系では 3.4 となった。これらの結果から、10 mol % の PS によって Sec14 の PC 輸送はおよそ 3.9 倍速くなり、PI による促進効果 (およそ 2.7 倍) は、PS に比べ小さいことが分かった。PI は Sec14 の輸送基質であり、Sec14 による PC 輸送と競合しているためだと考えられる。

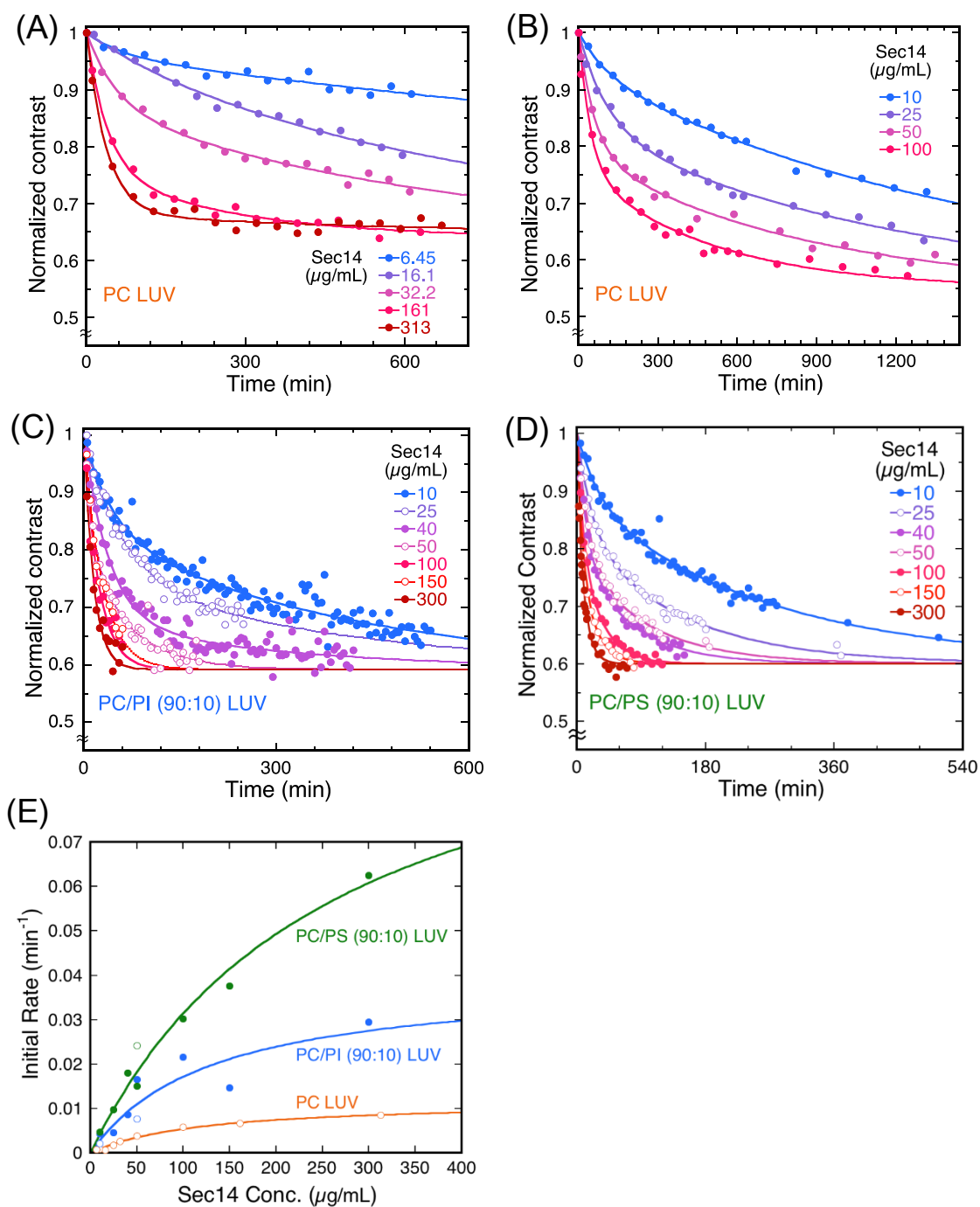


Figure 20. D体/H体 LUV がどちらも PC LUV (A,B)、PC/PI (90:10) LUV (C)、PC/PS (90:10) LUV (D) の系における Normalized Contrast の時間変化。様々な濃度の Sec14 を D 体/H 体 LUV 混合液中 (各 15 mM) に $t=0$ で添加した。実線は double-exponential 関数 (式 17) によるフィッティング曲線である。(A) と (B) は SANS-U、(C) と (D) は TAIKAN を用いて測定した。(E) Sec14 濃度に対する PC 輸送の初速度のプロット。(E) の open circle は SANS-U、closed circle は TAIKAN による測定結果である。

Sec14 の膜結合性に対する酸性リン脂質の影響を、表面プラズモン共鳴 (SPR) とリポソームフローテーションアッセイによって直接評価した。SPR 測定には L1 センサーチップを用いた。これは、デキストラン層上に疎水基を持つチップで、リポソームを添加すると、脂質二重層構造を保ったまま脂質膜を固定化できる。PC、PC/PI (90:10)、PC/PS (90:10) の 3 種類の脂質膜をチップ表面に固定化し (固定化量は全て ~6000 Resonance Unit (RU))、その後 Sec14 を添加した。Sec14 の脂質膜への結合/解離のセンサーグラムはどの組成でも同様となり、10 mol % の酸性リン脂質は Sec14 の膜結合性を高めないことが明らかになった (Figure 21A)。酸性リン脂質を 10 mol % より多く含む脂質膜は、静電反発のためにチップ上への固定化が困難であったため、リポソームフローテーションアッセイによって 30 mol % の酸性リン脂質を含む場合の Sec14 の膜結合性を検証した。この手法では、スクロース非含有リポソームと Sec14 をインキュベーションし、スクロース密度勾配遠心によってリポソームを浮かせる。膜結合型 Sec14 はリポソームとともに遠心管上部に、遊離型 Sec14 は遠心管下部に現れる。Sec14 (175 µg/mL = 5 µM) と LUV (2 mM) をインキュベーションし、膜結合型 Sec14 の割合を SDS-PAGE によって定量した。その結果、PI や PS によって Sec14 の膜結合量は変化せず、酸性リン脂質は Sec14 の膜結合性にほとんど影響しないことが明らかになった (Figure 21B)。Sec14 の脂質輸送過程は、①膜への結合、②膜上での脂質交換、③膜からの解離の 3 つのステップに分けられる。上述の脂質輸送および膜結合性評価から、PI や PS などの酸性リン脂質は Sec14 の膜結合性に影響しないことが判明したため、それらは膜上での脂質交換を促進すると考えられる。

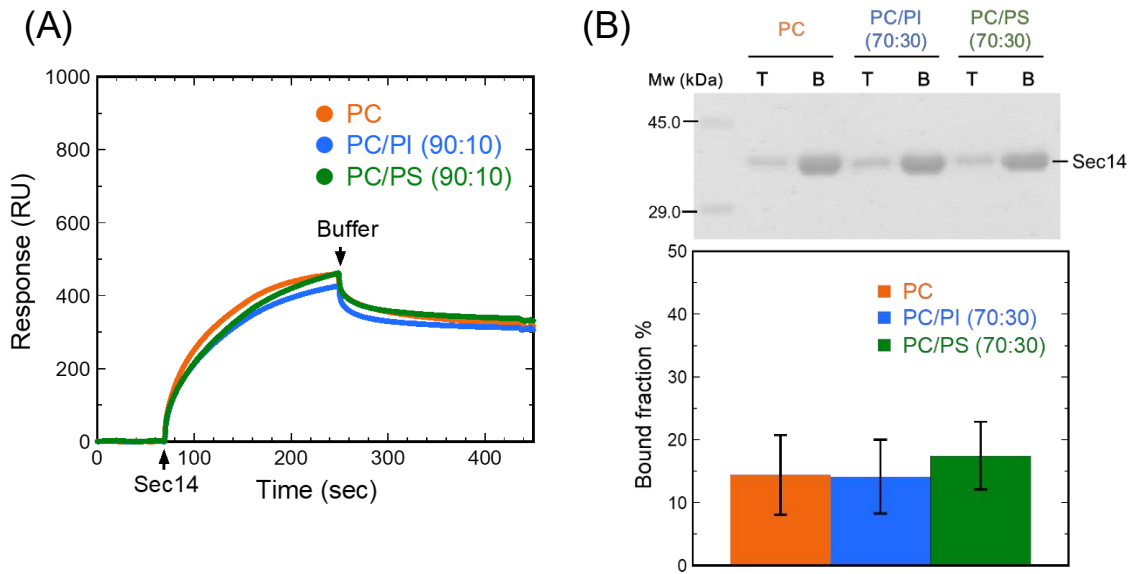


Figure 21. (A) SPR 測定 of センサーグラム。PC、PC/PI (90:10)、PC/PS (90:10) の LUV をセンサーチップ上に固定し、Sec14 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した。(B) リポソームフローテーションアッセイ。Sec14 (175 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を PC、PC/PI (90:10)、PC/PS (90:10) の LUV (2 mM) とインキュベーション後、スクロース密度勾配遠心により top fraction (T) と bottom fraction (B) に分け、各画分を SDS-PAGE により分析した (上図)。LUV 結合型 Sec14 を、全 Sec14 量 (top fraction + bottom fraction) に対する top fraction の割合として算出した (下図)。エラーは 4 回の実験結果の標準偏差を示す (means \pm S.D.)。

第7節 基質による Sec14 の膜からの解離の促進

Sec14 の機能メカニズムに関して、Sec14 が基質 (PC、PI) を掴んでいない状態 (apo-form) で膜から解離できるのか不明である。そこで、膜中の基質によって Sec14 の膜結合性が変化するのかを調べた。まず、PS LUV (基質なし)、PC/PS (50:50) LUV、PI/PS (50:50) LUV に対する Sec14 の結合をリポソームフローテーションアッセイによって評価した。その結果、Sec14 の基質を含まない PS LUV の場合では、およそ 50% の Sec14 が膜結合画分に現れた。一方で、LUV に PC や PI が含まれる場合では、Sec14 の膜結合量はおよそ 20–30% に低下した (**Figure 22A**)。これらの結果は、Sec14 が基質を掴むことで膜からの解離が容易になることを示唆している。さらにこのことを確かめるために、PC か PI のどちらかとしか結合しない変異体を用いて実験を行った。Sec14^{R65A,T236D} (Sec14 AD) と Sec14^{S173L,T175I} (Sec14 II) はそれぞれ PI と PC に対する結合能を欠損した変異体である¹⁰。Sec14 の PC や PI との結合部位は、アシル鎖領域はオーバーラップしているが、頭部領域では異なることが知られている¹⁰。この知見から、PC もしくは PI と特異的に相互作用するアミノ酸残基を変異させることで、上述の 2 種類の変異体を作成した。Sec14 AD (PC のみが基質) の PC/PS (50:50) LUV に対する結合性は、基質を含まない PS LUV の場合よりも有意に低下し、逆に、PI/PS (50:50) LUV では、結合量の低下は見られなかった (**Figure 22B**)。同様に、Sec14 II (PI のみが基質) の膜への結合量は、PI によって低下し、PC では低下しなかった (**Figure 22C**)。Sec14 II の SPR 測定から、基質を含まない PC 膜や PC/PS (90:10) 膜に対する Sec14 II の結合センサーグラムは 1000 RU 以上に達したが、基質 (PI) を含む PC/PI (90:10) 膜ではその値が著しく低下し (**Figure 22D**)、野生型 Sec14 の場合 (**Figure 21A**) とほぼ同等な値となった。これらの結果は、Sec14 が膜から解離する際に、適切な基質をポケット内に結合する必要がある、Sec14 が基質を結合していない apo-form では膜から解離できないことを示唆している。

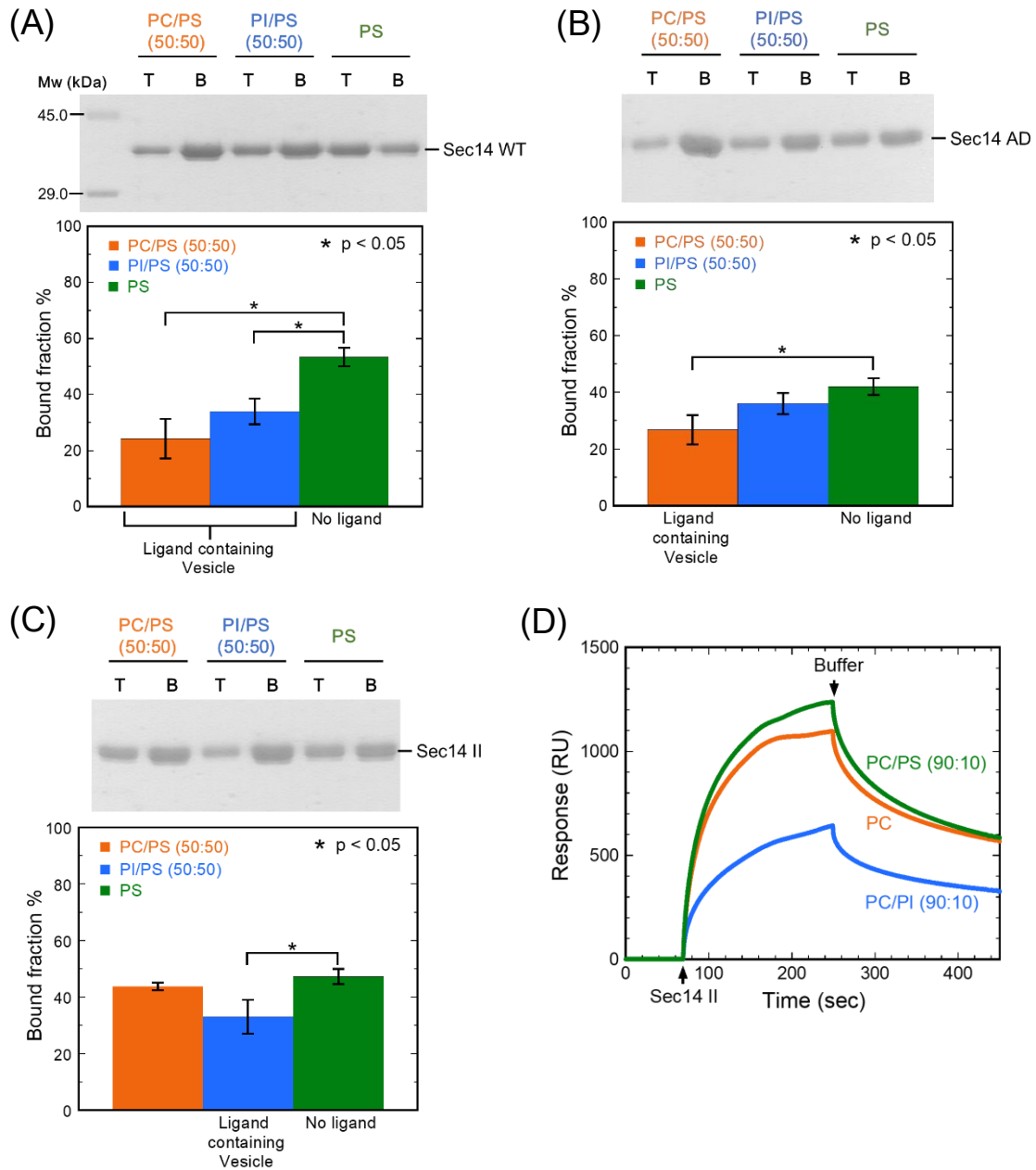


Figure 22. (A) 野生型 (WT) Sec14 (175 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を PC/PS (50:50)、PI/PS (50:50)、PS LUV (2 mM) とインキュベーションした場合のリポソームフローテーションアッセイ。エラーは 4 回の実験結果の標準偏差を示す (means \pm S.D.)。 (B,C) PI 結合能欠損体 (Sec14^{R65A,T236D}、Sec14 AD) (B) もしくは PC 結合能欠損体 (Sec14^{S173I,T175I}、Sec14 II) (C) のリポソームフローテーションアッセイ。脂質組成は (A) と同様。 (D) SPR 測定 of センサーグラム。PC、PC/PI (90:10)、PC/PS (90:10) の LUV をセンサーチップ上に固定し、Sec14 II (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した。

第 8 節 Sec14 による PC/PI ヘテロ交換の評価

細胞において Sec14 機能の欠損は致死性であり、Sec14 AD や Sec14 II といった PC、PI の一方としか結合できない変異体はその機能を代替することはできない¹⁰。さらに、両変異体の共発現でも Sec14 機能の代替は不可能であり、細胞の生存には、Sec14 が一分子で PC と PI のどちらとも結合できることが必須である¹⁰。そのため、Sec14 による PC/PI ヘテロ交換が細胞機能に重要と考えられているが、これまで PC/PI ヘテロ交換を実際に観測した例はない。そこで、SANS 法を用いて、*in vitro* における PC/PI ヘテロ交換の観測を試みた。

まず、Sec14 変異体 (Sec14 AD、II) の脂質輸送特性を確かめた。PC/PI (90:10) LUV を用いて SANS 法により PC 輸送を評価したところ、予想通り、野生型 Sec14 と Sec14 AD (PI 結合能欠損体) は PC 輸送活性を示したのに対し、Sec14 II (PC 結合能欠損体) は PC 輸送活性を示さなかった (**Figure 23A**)。また、Sec14 II を含む全ての Sec14 は、PI 非存在下において PC LUV 間で PC 輸送活性を示した (**Figure 23B**)。PI 非存在下では Sec14 II は PC を輸送したが、PI 存在下では PC 輸送は見られなかった。酵母において PI は重要な脂質であり、酵母の全脂質に対する PI の割合はおよそ 20–25% であるため、細胞内において Sec14 II は PC を輸送しないと考えられる。また、重水素化 PI を入手できなかったため SANS 法により PI 輸送を観測できなかったが、PI 結合能を欠損した Sec14 AD は py-PI を輸送しないことを確認した (**Figure 23C**)。

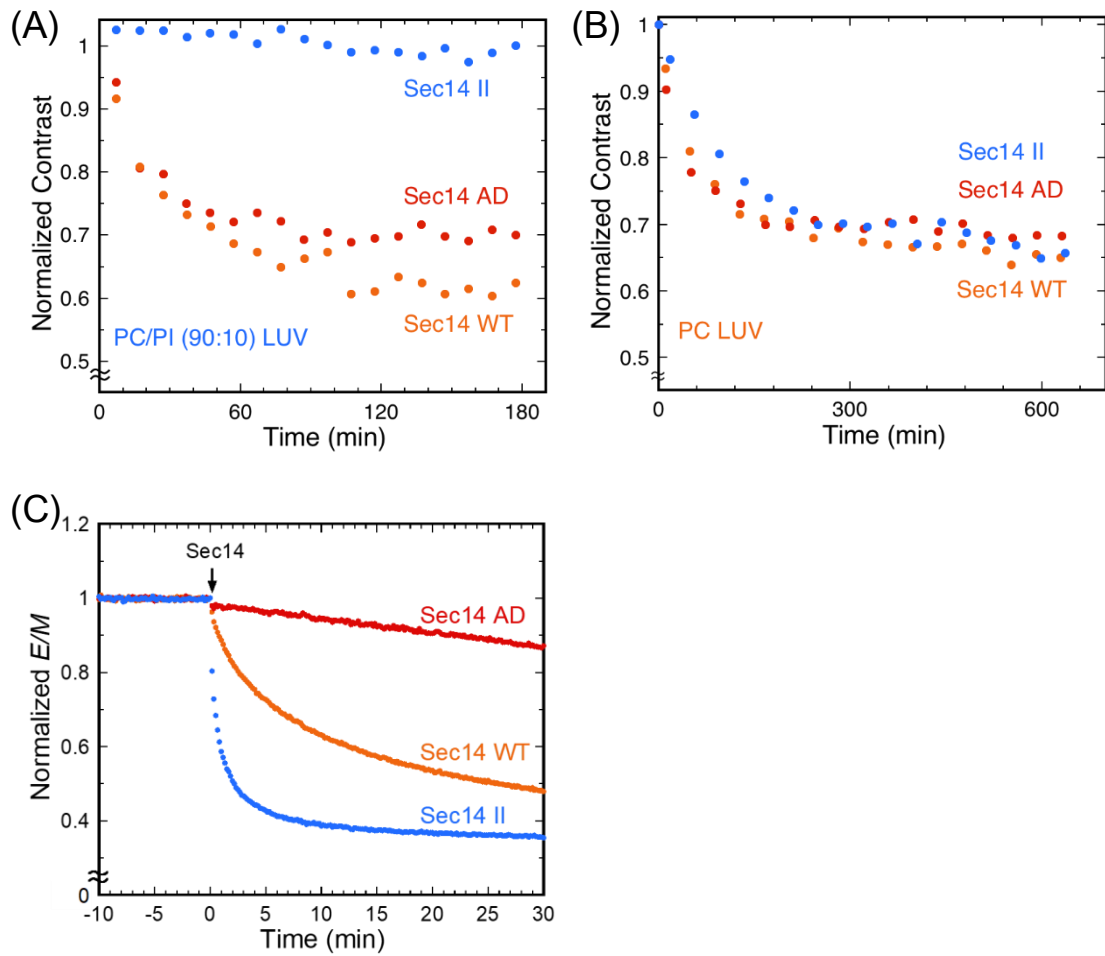


Figure 23. (A) D体/H体 LUV がどちらも PC/PI (90:10) の場合の Normalized Contrast の減衰プロファイル。Sec14 WT、Sec14 AD、Sec14 II (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を D 体/H 体 LUV の混合液 (各 15 mM) に $t = 0$ で添加した。(B) D 体/H 体 LUV がどちらも PC の場合の Normalized Contrast の減衰プロファイル。各 Sec14 タンパク質の濃度は 166 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、脂質濃度は (A) と同様である。(C) Py-PI 輸送評価。Py-PI/PC (16:84) のドナー (20 μM) と PI/PC (16:84) のアクセプター (40 μM) の混合液中に各 Sec14 タンパク質 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した。

次に、D 体リポソームとして *d*-PC/PI (90:10) LUV を、H 体リポソームとして *d*-PC/PI (10:90) LUV を用いた SANS 実験を行った。両粒子の混合系では、*d*-PC と PI が粒子間で交換された場合に中性子線の散乱強度が低下し、膜間の PC/PI 交換を検出できる。野生型 Sec14 を両粒子の混合液中に添加すると、Normalized Contrast の減衰が観測され、PC/PI ヘテロ交換が起こっていることが明らかになった (Figure 24)。その速度は PC/PC 交換 (Figure 23A) に比べおよそ 5 倍遅かった。PC/PI 交換の測定では、PI が豊富な LUV (*d*-PC/PI = 10:90) を H 体リポソームとして用いており、PC/PC 交換の場合 (*h*-PC/PI = 90:10) に比べ PI の量が多くなっている。この高濃度の PI と、Sec14 の PI に対する高い結合性のために、PC/PI 交換の評価系では Sec14 の PI 結合体が主に存在し、Normalized Contrast の減衰が遅くなったと考えられる。

野生型 Sec14 とは対照的に、Sec14 AD (PI 結合能欠損体) や Sec14 II (PC 結合能欠損体) では Normalized Contrast の減衰はほとんど観測されず、さらに両変異体の混合物でも PC/PI 交換は観測されなかった (Figure 24)。この結果は、Sec14 AD と Sec14 II はそれぞれ PC/PC 交換と PI/PI 交換を行い、脂質膜組成を変化させないことを表している。つまり、野生型 Sec14 のみが PC/PI ヘテロ交換が可能で、結果的に脂質膜組成を変化させるということである。したがって、PC や PI の濃度勾配に沿った輸送を達成するには、Sec14 一分子が PC と PI のどちらとも結合できるという性質が必要であることが明らかになった。

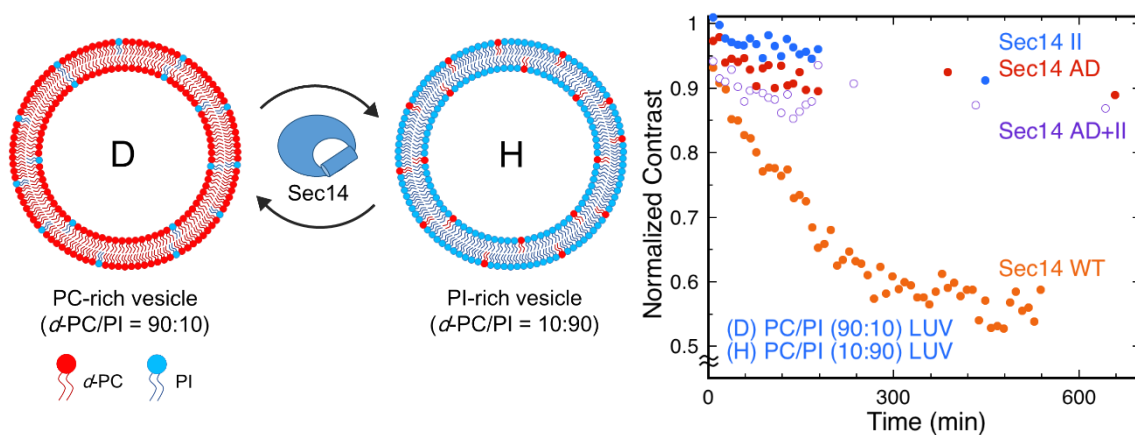


Figure 24. SANS による PC/PI ヘテロ交換評価系の概略図 (右図) と、得られた Normalized Contrast の減衰プロファイル (左図)。D 体 LUV として *d*-PC/PI (90:10)、H 体 LUV として *d*-PC/PI (10:90) のものを用い、それらの混合液中 (各 15 mM) に Sec14 (WT、AD、II はそれぞれ 50 μ g/mL、AD + II は 50 μ g/mL + 50 μ g/mL) を添加した。この条件では、両粒子間で *d*-PC と PI が交換された場合に中性子線の散乱強度が低下する。

第9節 考察

真核生物の Sec14 superfamily には 500 種類以上のタンパク質が含まれ、Sec14 はそれらのプロトタイプである^{50,51}。酵母には 5 種類の Sec14 ホモログタンパク質 (Sfh1-5) が存在し、それらは PC 輸送活性を持たないことが知られている⁵²。さらに、PI や PIPs との結合能は Sec14 superfamily によく保存された特徴であるが、PC 結合能は全てのタンパク質に共通してはいない。そのため、Sec14 ホモログタンパク質は PC 以外の基質を持ち、PI や PIPs とのヘテロ交換を行うと考えられている^{10,11,51}。実際に、哺乳類の Sec14 ホモログタンパク質は様々な種類の基質分子を持つ。例えば、neurofibromin⁵³ の PE や PG、CRALBP^{54,55} の retinoid、 α -TTP^{55,56} の α -tocopherol、SPF/Sec14L2/TAP1^{57,58} の α -tocopherol や squalene などが挙げられる。これらタンパク質群のプロトタイプである Sec14 の脂質交換メカニズムを解明することで、様々な Sec14 タンパク質に共通するメカニズムや個々の機能の解明につながると考えられる。

本研究では、Sec14 が PC よりも PI に対してより高い結合性を示し、速い PI 輸送能を持つことを明らかにした。ピレン脂質を用いた評価から、Sec14 の PI 輸送は PC 輸送に対しておよそ 9 倍速いことが判明した。以前に Sec14 が PC に比べ PI に対して 12-15 倍高い結合性を持つと見積もられており⁵⁹、このことは今回得られた結果とよく一致している。また、Sec14 と最も高い配列相同性 (64%) を持つ Sfh1 の PC または PI 結合状態の結晶構造から、PC と PI のアシル鎖の結合部位はオーバーラップしているが、脂質頭部の結合部位は異なることが報告されている。PC 頭部は疎水性ポケットのより深部に結合するが、PI 頭部はよりタンパク質表面に近い部分と相互作用する¹⁰。PI 結合状態では PC の場合に比べ、より多くの水素結合を形成しており¹⁰、PI 結合状態がより安定であることを示している。

酵母では、Sec14 は Golgi 膜上で機能し、そこには PI や PS が豊富に含まれている^{1,47}。本研究では、10 mol % の PI や PS によって PC 輸送がそれぞれ 2.7 倍と 3.9 倍速くなるが、PI や PS は Sec14 の膜結合性にほとんど影響しないことを明らかにした。これらの結果から、酸性リン脂質は膜上での脂質交換過程を促進することが示唆される。Sec14 の両親媒性ゲートヘリックスの親水性面にはアルギニン (R₂₂₆) とリジン (K₂₂₉) があり、正に帯電している。そのため、ゲートと酸性リン脂質との静電相互作用が、Sec14 が膜上でゲートを開くことを助け、脂質交換を促進する可能性がある (Figure 25)。

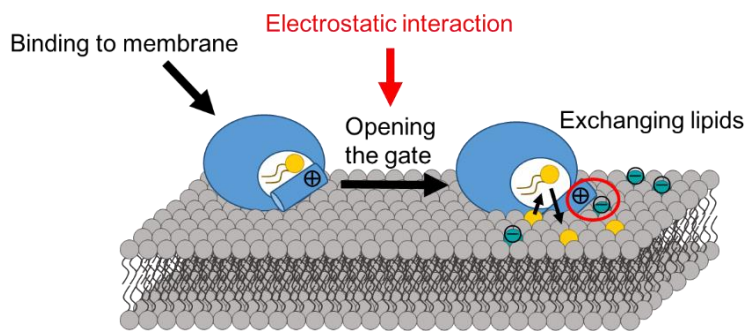


Figure 25. 酸性リン脂質による脂質輸送促進の模式図。Sec14 が膜に結合後、ゲートヘリックスと酸性リン脂質が静電相互作用することで、脂質交換が促進される。

また、SANS 法を用いて Sec14 による膜間の PC/PI ヘテロ交換を初めて観測した。その結果、PC/PI のどちらも結合できる野生型 Sec14 のみが濃度勾配に沿った PC/PI 輸送を達成し、脂質膜組成を変化させることが明らかになった。SPR やリポソームフローテーションアッセイでは、基質を含む膜に比べ、基質を含まない膜への Sec14 の結合量が増加し、このことは、Sec14 は基質をポケット内に取り込むまでは膜から解離しないことを示している。つまり、Sec14 は、輸送先の膜で基質を受け渡すと、基質を掴んでいない apo-form で膜から解離するという脂質の一方向輸送を行うわけではなく、輸送先の膜から別の基質を引き抜くという膜上での脂質交換を行うということである (Figure 26)。

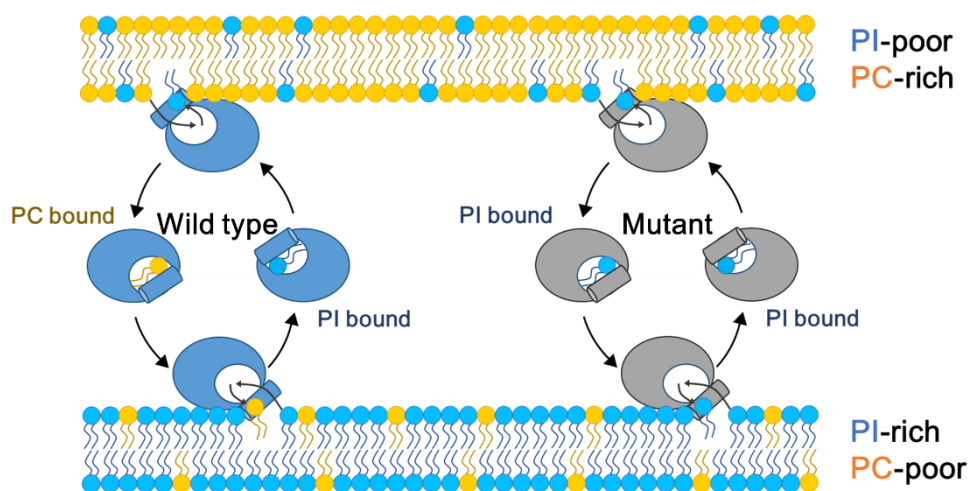


Figure 26. 野生型 Sec14 と PC 結合能欠損 Sec14 の脂質輸送サイクルの模式図。野生型 Sec14 は PC/PI のどちらも結合できるため、それらの濃度勾配に沿った脂質輸送により脂質膜組成を変化させる。一方の基質としか結合できない変異体は同種の基質しか輸送できないため、脂質膜組成を変化させることはできない。

第 10 節 小括

本章では、蛍光法および SANS 法を用いた脂質輸送評価により、Sec14 の脂質輸送サイクルの物理化学的な特性を明らかにした。Sec14 は、M β CD とは異なり、PC と PI に対して高い基質選択性を示し、それら 2 種類の基質の間でも、PI に対してより高い選択性を有することが明らかになった。また、酸性リン脂質による輸送促進は Sec14 との静電相互作用によることが明らかになり、さらに、酸性リン脂質は Sec14 の膜結合性を高めないことが示された。これらの結果から、酸性リン脂質は Sec14 の膜結合後の脂質交換過程を促進することが示唆された。最後に、SANS 法により Sec14 の PC/PI 交換の検出に成功した。Sec14 は基質をポケット内に取り込むことで膜から解離でき、PC/PI のどちらとも結合できることで、それらの濃度勾配に沿った脂質輸送を達成し、結果的に脂質膜組成を変化させることが明らかになった。

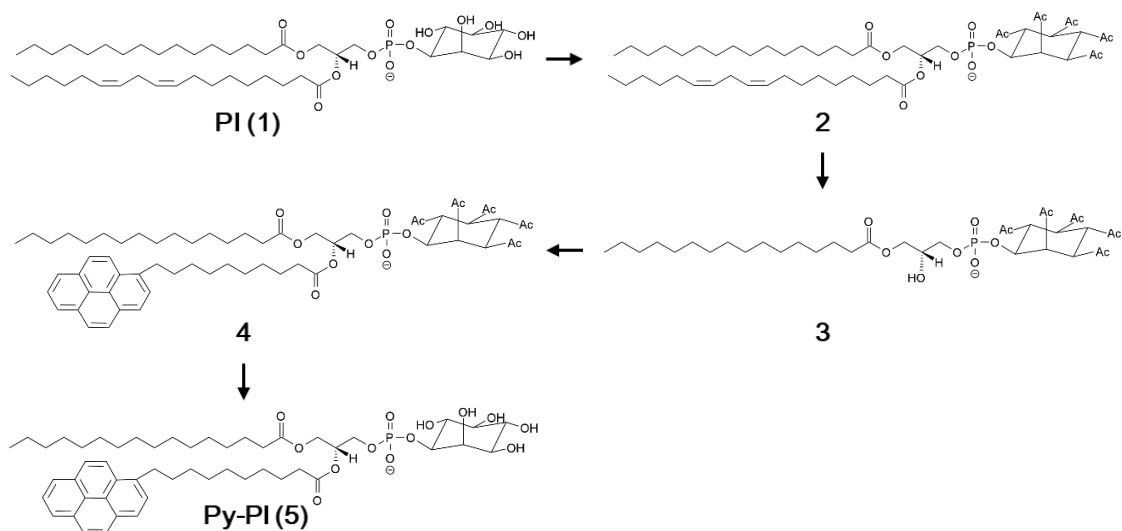
実験方法

試料

POPC (本文中で PC もしくは *h*-PC と表記)、POPE (本文中で PE と表記) は日油から購入した。Py-PC と py-PG は Molecular Probes から購入した。POPS (本文中で PS と表記)、*d*-PC、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (Rho-PE) は Avanti Polar Lipids から購入した。大豆由来 PI はナカライテスクから購入した。1-Pyrenedecanoic acid は Setareh Biotech から購入した。Chol、PLA₂、トリエチルアミンは Sigma-Aldrich Corporation から購入した。無水酢酸、DMAP、ヒドラジン-水和物、コール酸ナトリウムは富士フィルム和光純薬から購入した。MNBA は東京化成から購入した。全て最も等級の高いものを用いた。

Py-PI 合成

Py-PI は参考文献^{38,39}をもとに第 1 章と同様の方法で合成した (Scheme 1)。PI (100 mg (~120 μmol)) (化合物 1) を 4.5 mL の塩化メチレンに溶解し、そこへ無水酢酸 (1.2 mmol) と DMAP (0.6 mmol) を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を 2 mL のメタノール/0.1 M HCl (1:1 (v/v)) で 2 回、2 mL のメタノール/0.1 M アンモニア (1:1 (v/v)) で 1 回洗浄し、化合物 2 を得た。得られた化合物 2 全量を 5 mL の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (14 mM コール酸ナトリウム、20 mM CaCl₂、pH 8.0) に懸濁し、1.8 mg の PLA₂ を加え、37°C で一晩攪拌した。反応液を 5 mL のメタノール/クロロホルム (1:2 (v/v)) で 3 回分液した後、クロロホルム層をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけることで化合物 3 を得た。MNBA (67 μmol)、DMAP (20 μmol)、トリエチルアミン (108 μmol) を 0.5 mL の塩化メチレンに溶解し、室温で攪拌しながら、1-pyrenedecanoic acid (67 μmol) の塩化メチレン溶液 1.5 mL を滴下した。ついで、化合物 3 (54 μmol) の塩化メチレン溶液 1 mL を滴下し、そのまま一晩反応させた。反応液に水を 2 mL 加えて分液し、塩化メチレン層をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ、化合物 4 を得た。得られた化合物 4 全量をヘプタン 260 μL に溶解し、そこへ水 2.6 mL とヒドラジン-水和物 320 μL を加え、室温で 2.5 時間攪拌した。反応液に 6 mL のクロロホルム、3 mL のメタノール、1 mL の 2% NaCl 水溶液を加え、クロロホルム層を採取した。そのクロロホルム層を 3 mL のメタノール/0.1 M HCl (1:1 (v/v)) で洗浄し、さらに 3 mL のメタノール/0.1 M アンモニア (1:1 (v/v)) で洗浄した。最後に洗浄後のクロロホルム層をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけることで py-PI (化合物 5) を得た。MALDI-TOF MS により py-PI が主に palmitoyl 基を持つことを確認した。



Scheme 1. Py-PI の合成経路。PI の *sn*-2 位のアシル鎖を PLA₂ で加水分解し、そこへ pyrenedecanoyl 基を導入した。

リポソーム調製

脂質のメタノール/クロロホルム (1:2 (v/v)) 溶液を必要量ナス型フラスコに入れた。ロータリーエバポレーターによって溶媒を減圧除去し、フラスコ底部に脂質薄膜を形成させた後、真空乾燥機に一晩置き、溶媒を完全に除去した。脂質薄膜を Tris-HCl 緩衝液 (10 mM Tris、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mg/mL NaN₃、pH 7.4) で膨潤させ、vortex により脂質懸濁液とした。この懸濁液に対して凍結融解を 5 回行った後、LiposoFast extruder を用いて、孔径 100 nm のポリカーボネートフィルターを数十回通過させることで LUV を調製した。FPAR-1000 を用いて、動的光散乱により、LUV の粒径はおよそ 120 nm であることを確認した。PC 濃度はコリンアッセイキットにより定量し、PC 以外のリン脂質を含有するリポソームの濃度はリン定量⁴⁰により求めた。

タンパク質の発現・精製

実験で用いたタンパク質は Vytas A. Bankaitis 教授 (Texas A&M) から提供されたものを用いた。発現・精製の手順は簡単に以下のとおりである^{10,60}。pET28b-His₈-Sec14 を *Escherichia coli* BL21 に導入し、発現した組換えタンパク質を TALON[®] metal affinity beads (Takara Bio、Mountain View、CA) に吸着させ、イミダゾールで溶出させた。その後、リン酸緩衝液 (25 mM Na₂HPO₄、300 mM NaCl、5 mM β-mercaptoethanol、pH 7.5) で透析した状態で提供された。各実験で用いる前に、Tris-HCl 緩衝液でさらに透析した。

蛍光による脂質輸送/引き抜き評価

16 mol % の py-PL を含有する LUV をドナー、py-PL を含有しない LUV をアクセプターとした。360 μL のドナー/アクセプター混合液に 40 μL の Sec14 溶液を添加した。最終濃度は、ドナーが 20 μM 、アクセプターが 40 μM 、Sec14 は 50 $\mu\text{g/mL}$ とした。F-4500 分光光度計を用いて、345 nm 励起光におけるピレンのエキシマー蛍光強度 (478 nm) とモノマー蛍光強度 (378 nm) を 37°C で 30 分間 10 秒毎に測定した。ピレンエキシマー/モノマー蛍光強度比 (E/M) を算出し、Sec14 添加直前の値で規格化した。脂質の引き抜きは、アクセプター非存在下において、上述の輸送評価と同様に行った。

SANS による脂質輸送評価

100 もしくは 90 mol % の *d*-PC を含有する LUV を D 体リポソーム、0 もしくは 10 mol % の *d*-PC を含有する LUV を H 体リポソームとし、それらを 30% D_2O の Tris-HCl 緩衝液で調製した。30% D_2O 溶液の散乱長密度 (SLD) は $1.5 \times 10^{10} \text{ cm}^{-1}$ であり、この値は、D 体リポソーム ($\text{SLD}_{d\text{-PC}} = 2.8 \times 10^{10} \text{ cm}^{-1}$) と H 体リポソーム ($\text{SLD}_{h\text{-PC}} = 0.26 \times 10^{10} \text{ cm}^{-1}$) の SLD の平均値と一致する。SANS 測定は、SANS-U (JRR-3、日本原子力研究開発機構 (JAEA))、もしくは TAIKAN (物質・生命科学実験施設 (MLF)、大強度陽子加速器施設 (J-PARC)) により行った。SANS-U では、中性子線の波長を 7 Å ($\Delta\lambda/\lambda = 10\%$)、サンプルと検出器の距離を 4 m とし、サンプルは 2 mm の光路長の石英ガラスセル内で測定した。二次元検出器で観測された散乱のカウントの合計値を散乱強度 ($I(t)$) とし、バックグラウンド、空セル、溶媒からの散乱の寄与を差し引いた値とした。TAIKAN では、サンプルは 1 mm の光路長の石英ガラスセルを用いて測定した。中性子のパルスビームの散乱を time-of-flight 法で観測し、 I - q プロットに変換後、バックグラウンド、空セル、溶媒からの散乱を差し引いた。0.007 < q < 0.11 Å の範囲の $I(q)$ の積分値を $I(t)$ とした。

D 体リポソームと H 体リポソーム (最終濃度は各 15 mM) の混合液に種々の濃度の Sec14 を混合した直後に SANS の時分割測定を開始した (37°C)。Normalized Contrast ($\Delta\rho(t)/\Delta\rho(0)$) は次式から算出した。

$$\Delta\rho(t)/\Delta\rho(0) = \{I(t)/I(0)\}^{0.5} \quad (19)$$

ここで、 $I(0)$ と $I(t)$ は Sec14 添加後の時間 0 と t における散乱強度である。以前の研究から、POPC が自発的にフリップフロップしないことが分かっているため²⁷、中性子散乱強度の減衰は Sec14 による膜間 PC 輸送のみに起因する。

表面プラズモン共鳴 (SPR)

SPR 測定は Biacore T200 (GE Healthcare、Chicago、IL) を用いて 37°C で行った。ランニング緩衝液として Tris-HCl 緩衝液を用いた。まず、L1 センサーチップ (GE Healthcare、Chicago、IL) に 20 mM CHAPS 溶液を 30 秒間添加した。この操作を 2 回行い、チップ表面を洗浄した。その後、LUV (脂質濃度 0.5 mM) を添加することによりチップ表面に脂質膜を固定化した。脂質膜の最終固定化量はどの組成でもおよそ 6000 RU になるように設定した。その後、50 mM NaOH 水溶液を 1 分間添加することでチップ表面に緩く結合した LUV を取り除き、100 µg/mL のウシ血清アルブミン溶液を 5 分間添加することでチップ表面が脂質膜で完全に覆われていることを確認した。Sec14 溶液 (50 µg/mL) を流速 30 µL/min で 3 分間添加することで、Sec14 の脂質膜結合を測定し、その後、Sec14 の解離を 3 分間測定した。RU の値は Sec14 の添加前直前の値を 0 とした。各測定の終了後に、イソプロパノール/50 mM NaOH (2:3) の混合液を 30 秒間添加することで、チップ表面に吸着していた脂質とタンパク質を除去し、チップを再生した。

リポソームフローテーションアッセイ

Sec14 (175 µg/mL = 5 µM) を 1 mol % Rho-PE を含有する LUV (2 mM) と混合し、37°C で 30 分間インキュベーションした (全量 100 µL)。その混合液を 100 µL の 60% (w/v) スクロース溶液と混合し、30% スクロース溶液とした後、その上に 250 µL の 25% (w/v) スクロース溶液と 50 µL の 0% スクロース溶液を載せた。そのサンプルを、アングルローター (S140AT、日立工機ホールディングス、東京) を用いて、170000 × g で 1 時間超遠心にかけた。遠心後のサンプルを下層 (250 µL) と上層 (250 µL) に分け、それらから 100 µL ずつ回収した。両フラクションのタンパク質をメタノール/クロロホルム法⁶¹で沈殿させ、SDS-PAGE で分析後、coomassie brilliant blue で染色した。Sec14 のバンド強度は ImageJ (NIH、Bethesda、MD) を用いて見積もった。各条件における測定結果の差は unpaired *t* 検定によって分析し、*P* 値が 0.05 より小さい場合に有意差ありとした。

第3章

Sec14 脂質輸送能に対する脂質膜パッキングの影響

第1節 緒言

細胞には、原形質膜をはじめ、Golgi 膜、小胞体膜など様々なオルガネラ膜が存在するが、Sec14 が如何にして Golgi 膜を認識するのか未だ不明である。ヒトの Sec14 ホモログタンパク質である Sec14L3 は高曲率膜に対して高い結合性を示すことが報告されており⁶²、酵母の Sec14 も同様な特性を持つ可能性がある。また、原形質膜は主に飽和鎖を持つリン脂質やスフィンゴ脂質と 30–40% 程度のステロールによって構成されているが^{1,63}、Golgi 膜は主に不飽和鎖を持つリン脂質で構成され、ステロール含有量はおよそ 10% である^{47,63}。そのため、原形質膜は脂質同士のパッキングが密な固い膜であるが、Golgi 膜は脂質同士のパッキングが緩い柔らかい膜となっている。本章では、Sec14 が細胞内において脂質膜の曲率やパッキング状態を認識する可能性を考え、Sec14 の脂質輸送能に対するそれらの影響について検討した。

第2節 Sec14 脂質輸送能に対する膜曲率の影響

まず、SANS 法により、Sec14 の脂質輸送に対する膜曲率の影響を評価した。Sec14 を、*d*-PC もしくは *h*-PC で調製した粒径約 30 nm の小さな一枚膜ベシクル (small unilamellar vesicle、SUV) の懸濁液中に添加した。その結果、Normalized Contrast は、両粒子が PC LUV (粒径約 120 nm) の場合よりも著しく速く減衰した (**Figure 27A**)。プラトー値はおよそ 0.33 となり、LUV の場合 (プラトー値は約 0.5) に比べて低くなった。これは、SUV 膜の外葉の脂質量が内葉のおよそ 2 倍であるためである。一方、*d*-PC SUV と *h*-PC LUV の混合系を用いて、大きさの異なる粒子間での PC 輸送を評価したところ、両粒子が LUV の場合の輸送よりも遅くなった (**Figure 27A**)。この条件では、SUV と LUV の間の PC 輸送のみを検出でき、SUV 間の PC 輸送は結果に反映されない。そのため、Sec14 が SUV のような高曲率膜に対して高い結合性を有し、SUV と LUV の混合系では、SUV 間での脂質輸送が主に生じていると考えられる (**Figure 27B**)。

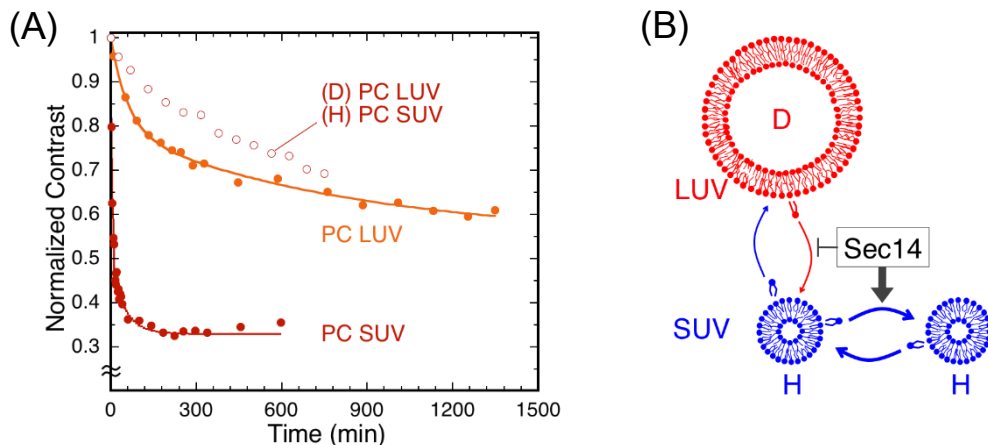


Figure 27. (A) D 体/H 体リポソームがどちらも PC LUV もしくは PC SUV の場合における Normalized Contrast の減衰プロファイル (closed circle)。Sec14 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を D 体/H 体リポソーム混合液中 (各 15 mM) に $t = 0$ で添加した。また、D 体リポソームとして 100% *d*-PC LUV を、H 体リポソームとして 100% *h*-PC SUV を用いて SANS 実験を行った (open circle)。(B) LUV/SUV 混合系における Sec14 による脂質輸送の模式図。Sec14 は SUV に対して高い結合性を示し、主に SUV 間で脂質輸送を行うため、LUV/SUV 間の脂質輸送はほとんど起こらない。

ピレン蛍光を用いた手法によっても、Sec14 の脂質輸送能に対する膜曲率の影響を評価した。ドナー粒子として py-PC/POPC (16:84) LUV (20 μM)、アクセプター粒子として POPC LUV (40 μM) を用いた場合、Sec14 の添加によって E/M が減衰した。一方、ドナー/アクセプターをともに高曲率膜である SUV にした場合、 E/M の減衰が顕著に促進された (**Figure 28**)。さらに、ドナーを LUV、アクセプターを SUV にした場合、Sec14 による py-PC 輸送が抑制された (**Figure 28**)。これらの現象は SANS 実験の結果 (**Figure 27A**) と同様である。Sec14 が SUV に対して高い結合性を持つため、SUV 間で速い脂質輸送を行い、LUV/SUV の混合系では LUV にほとんどアクセスしないために異粒子間での脂質輸送が起こらなかったと考えられる。

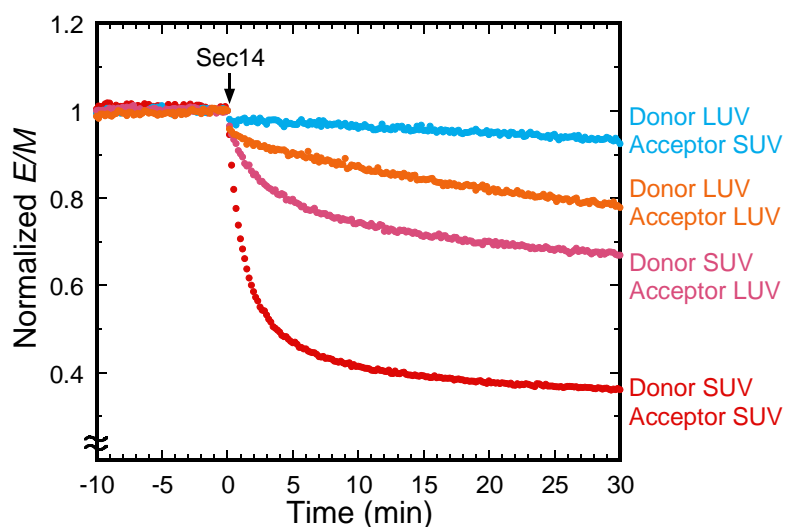


Figure 28. Sec14 による py-PC 輸送に対する膜曲率の影響。ドナー (py-PC/POPC = 16:84, 20 μM) とアクセプター (POPC, 40 μM) の混合液中に Sec14 (50 $\mu\text{g/mL}$) を添加した。ドナーとアクセプターとしてそれぞれ LUV もしくは SUV を用いた。

また、ドナーを SUV、アクセプターを LUV とした場合には、 E/M が減衰したものの、SUV 間の輸送に比べ、Normalized E/M がより高い値で止まった (**Figure 28**)。ピレン蛍光による輸送評価系では、Sec14 がドナー粒子から py-PC を引き抜いただけで E/M が減衰する。そのため、アクセプター非存在下において、SUV からの py-PC の引き抜きを評価した。その結果、py-PC の引き抜きによる Normalized E/M の減衰プロファイルは、SUV ドナーと LUV アクセプターの混合系の場合とほぼ一致し (**Figure 29A**)、SUV ドナーと LUV アクセプターの混合系では、SUV からの py-PC の引き抜きのみが起きていることが明らかになった。次に、Sec14 をあらかじめドナー-LUV (py-PC/POPC = 16:84) とインキュベーションし、その後、種々のアクセプターを添加することで、Sec14 によるアクセプターへの py-PC の送達を評価した (**Figure 29B**)。この時、アクセプター添加前の E/M 値は一定であったため、Sec14 による py-PC の引き抜きはプラトーに達していることを確認した。この系に POPC LUV を添加すると、 E/M が減衰し、Sec14 によるアクセプターへの py-PC の送達が観測された。一方、同じ系に POPC SUV を添加した場合、 E/M の減衰がより速くなり、py-PC 送達が促進された (**Figure 29C**)。これらの結果は、Sec14 の高曲率膜に対する高い結合性を示すものである。

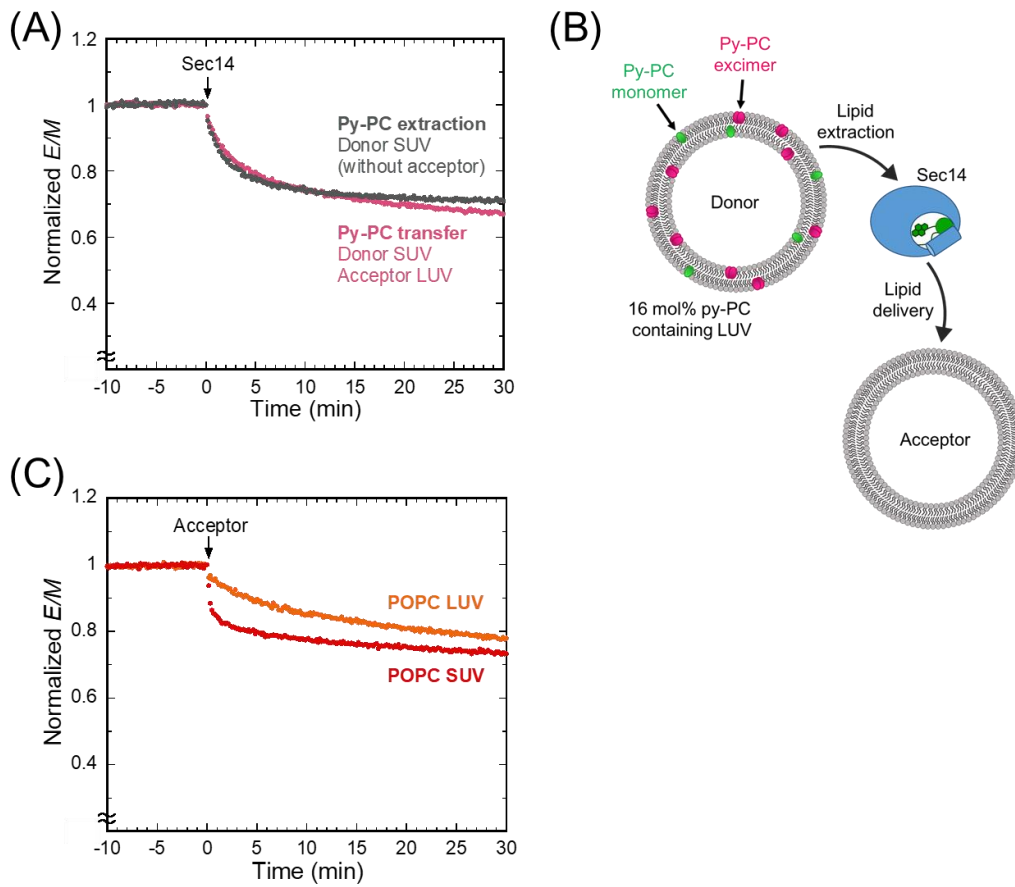


Figure 29. (A) Py-PC 引き抜き評価。ドナーSUV (py-PC/POPC = 16:84、20 μ M) に Sec14 (50 μ g/mL) を添加した。ピンクのプロットは py-PC 輸送評価の結果で、**Figure 28** のドナーSUV/アクセプターLUV の場合のプロットと同じである。(B) Sec14 による py-PC 輸送の概略図。Sec14 がドナーから py-PC を引き抜き、アクセプターへ送達する。(C) Sec14 による py-PC 送達評価。Sec14 とドナーLUV (py-PC/POPC = 16:84) を 37°C で 30 分間インキュベーションした後、POPC LUV もしくは POPC SUV を添加した。

実際に、リポソームフローテーションアッセイによって Sec14 の膜結合性に対する曲率の影響を検証したところ、SUV に対する Sec14 の結合量は LUV に場合に比べおよそ 2.7 倍となった (Figure 30)。したがって、膜の曲率が上昇すると、Sec14 の膜結合性が高まり、脂質輸送が促進されることが明らかになった。

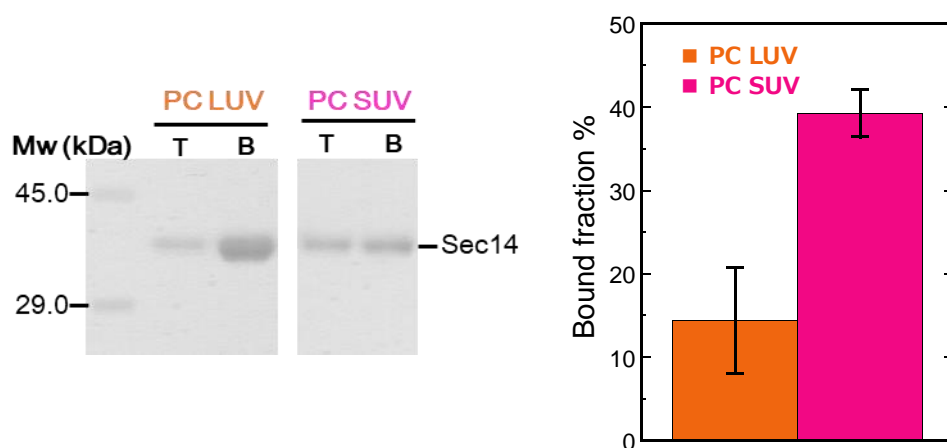


Figure 30. リポソームフローテーションアッセイ。Sec14 (175 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を PC LUV もしくは PC SUV (2mM) とインキュベーション後、スクロース密度勾配遠心により top fraction (T) と bottom fraction (B) に分け、各画分を SDS-PAGE により分析した (右図)。リポソーム結合型 Sec14 を、全 Sec14 量 (top fraction + bottom fraction) に対する top fraction の割合として算出した (左図)。エラーは4回の実験結果の標準偏差を示す (means \pm S.D.)。

第3節 Sec14 脂質輸送能に対するコーン型脂質の影響

高曲率膜では脂質頭部間にすき間 (packing defect) が生じ、packing defect は両親媒性ヘリックスの膜結合性を高めることが報告されている⁶⁴。Sec14 のゲートヘリックスは両親媒性であることから、packing defect によって Sec14 の膜結合性が高められる可能性がある。そこで、高曲率膜と同様に packing defect を生じさせる頭部の小さいコーン型脂質 (POPE、**Figure 15B**)⁶⁵ の Sec14 脂質輸送能に対する影響を評価した。

ドナー/アクセプターの両粒子 (LUV) に 30 mol % の POPE を含ませると、Sec14 による py-PC 輸送が促進された (ドナーが py-PC/POPC/POPE = 16:54:30、アクセプターが POPC/POPE = 70:30) (**Figure 31A**)。次に、POPE による脂質輸送促進作用をより詳細に調べるため、脂質引き抜きと脂質送達を区別して評価した。アクセプター非存在下において、py-PC の引き抜きを評価したところ、POPE によって Normalized E/M がより小さな値まで減衰した (**Figure 31B**)。POPE は Sec14 の輸送基質ではなく、Sec14 による py-PC の引き抜きは POPC とのみ競合する。したがって、POPE 含有系では Sec14 がより多くの py-PC を引き抜けるため、 E/M がより減衰したと考えられる。次に、アクセプターへの py-PC の送達を評価した。ここでは第2節と同様にドナーとして py-PC/POPC (16:84) LUV を用い、py-PC の引き抜きがプラトーに達した後に種々のアクセプター-LUV を添加した。その結果、POPC LUV を添加した場合に比べ、POPE/POPC (70:30) LUV を添加した場合に、 E/M の減衰がより速くなり、py-PC 送達が促進された (**Figure 31C**)。これらの結果から、POPE は、Sec14 による脂質の送達を促進することが明らかになった。

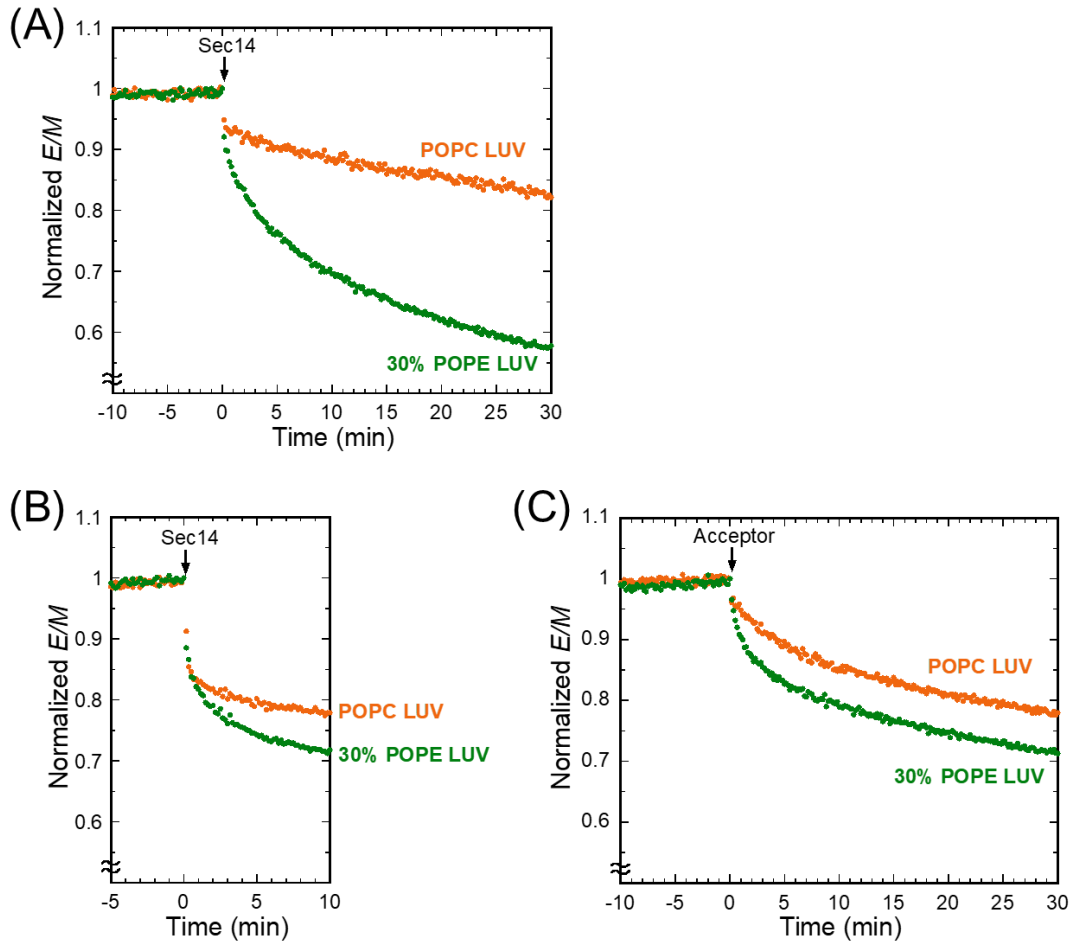


Figure 31. (A) Sec14 による py-PC 輸送に対する POPE の影響。ドナーとアクセプターの混合液中に Sec14 を添加した。脂質組成はそれぞれ、ドナーが py-PC/POPC (16:84) でアクセプターが POPC (橙)、ドナーが py-PC/POPC/POPE (16:54:30) でアクセプターが POPC/POPE (70:30) (緑)。(B) Py-PC 引き抜きに対する POPE の影響。ドナー-LUV に Sec14 を添加した。ドナー組成はそれぞれ、py-PC/POPC (16:84) (橙)、py-PC/POPC/POPE (16:54:30) (緑)。(C) Sec14 による py-PC 送達に対する POPE の影響。Sec14 とドナー LUV (py-PC/POPC = 16:84) を 37°C で 30 分間インキュベーションした後、種々のアクセプター-LUV を添加した。アクセプター組成はそれぞれ、POPC (橙)、POPC/POPE (70:30) (緑)。

POPE による脂質輸送促進が、Sec14 の膜結合性の上昇によるものかどうかをリポソームフローテーションアッセイにより評価した。まず、POPC LUV と POPC/POPE (70:30) LUV で比較すると、どちらの場合でも Sec14 の結合量はおよそ 15% となり、POPE による膜結合量の上昇は見られなかった (**Figure 32A**)。第 2 章で述べたように、Sec14 は膜中に基質 (PC/PI) が存在すると、それらを引き抜いて速やかに膜から解離してしまう。つまり、Sec14 が PC を引き抜き膜から解離する速度が大きいため、POPE 含有系であっても結合量の増加が見られなかった可能性がある。そこで、基質のない系で POPE の効果を検証した。その結果、Sec14 の基質ではない POPS の LUV に対する Sec14 結合量は 34% であったのに対し、POPS/POPE (50:50) LUV に対する Sec14 結合量は 77% とおよそ 2.3 倍に増加した (**Figure 32B**)。これらの結果から、POPE は Sec14 の膜結合性を上昇させるが、PC 存在下では、Sec14 は膜上に留まる訳ではなく、PC を結合して速やかに膜から解離すると考えらえる。

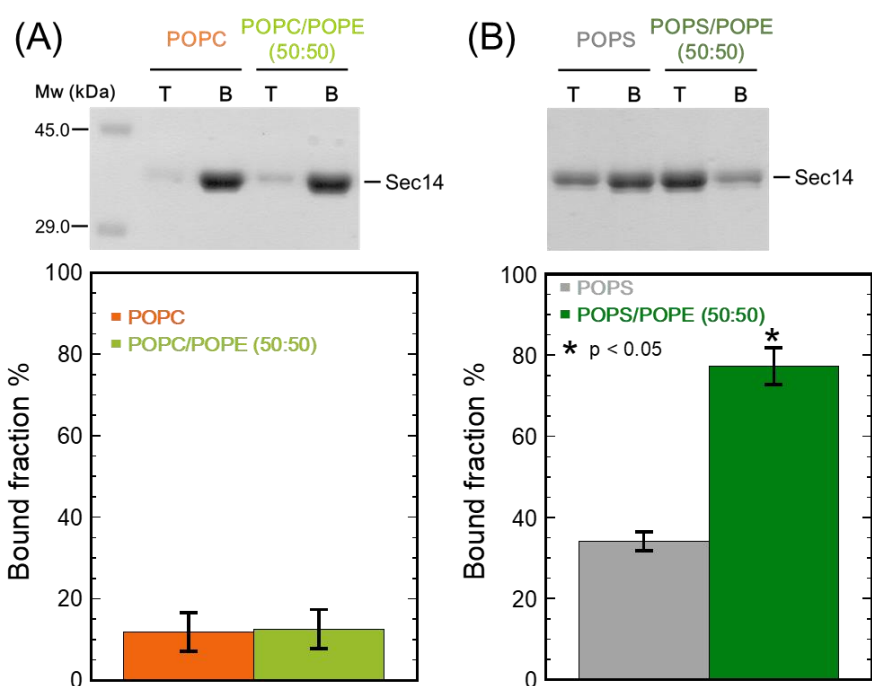


Figure 32. (A) Sec14 (175 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を POPC LUV もしくは POPC/POPE (50:50) LUV (2 mM) とインキュベーションした場合のリポソームフローテーションアッセイ。エラーは 4 回の実験結果の標準偏差を示した (means \pm S.D.)。 (B) Sec14 (174.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を POPS LUV もしくは POPS/POPE (50:50) LUV (2 mM) とインキュベーションした場合のリポソームフローテーションアッセイ。エラーは 4 回の実験結果の標準偏差を示す (means \pm S.D.)。

第4節 Sec14 脂質輸送能に対するステロールの影響

Sec14 が機能する Golgi 膜の特徴として、原形質膜に比べ、ステロール含有量が少ないことが挙げられる。酵母の原形質膜はおよそ 30–40% の ergosterol (Ergo, **Figure 33A**) を含み、Golgi 膜は 10% 程度に抑えられている^{1,47}。そこで、Sec14 の脂質輸送能に対する Ergo の影響を評価した。ここで、30 mol % の Ergo を含む POPC 膜は、37°C (実験温度) において、Ergo が豊富な L_0 相と、Ergo が少ない L_d 相に相分離する⁶⁶。30 mol % の Ergo を含むドナー粒子 (py-PC/POPC/Ergo = 16:54:30) の Sec14 添加前のピレン蛍光を観測したところ、PC のみの場合 (py-PC/POPC = 16:84) に比べ、 E/M 値が約 1.5 倍に増加した。これは、Ergo 含有系において、py-PC が主に L_d 相に分配し、py-PC の局所濃度が高まったためだと考えられる^{67,68}。そのため、ドナーに Ergo を含有する系では正確な脂質輸送評価ができなかった。そこで、py-PC/POPC (16:84) のドナー-LUV から Ergo 含有アクセプター-LUV への脂質送達を評価した。その結果、10 mol % もしくは 30 mol % の Ergo を含む LUV の添加による E/M の減衰は POPC LUV の場合と同程度となり、Ergo は Sec14 の脂質送達には影響しないことが明らかになった (**Figure 33B**)。

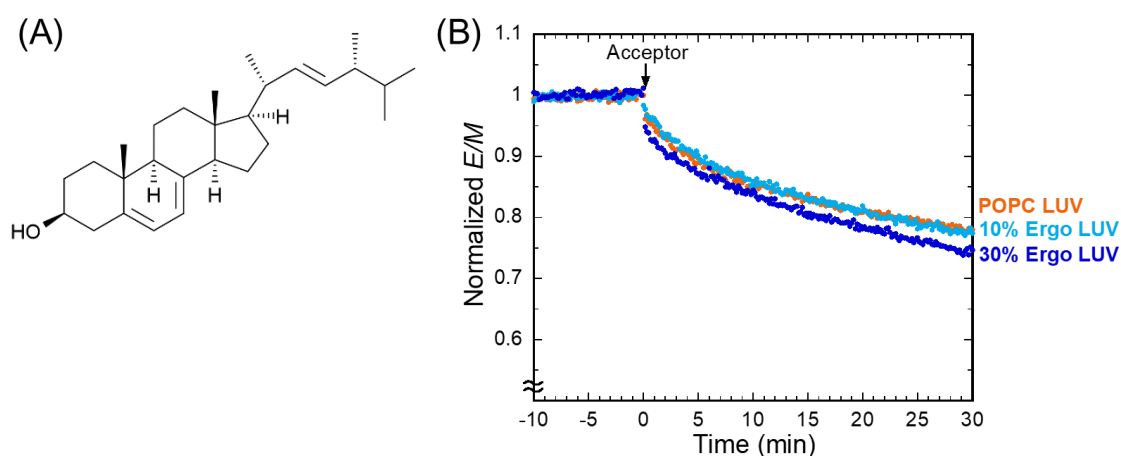


Figure 33. (A) Ergo の化学構造。(B) Sec14 による py-PC 送達に対する Ergo の影響。Sec14 とドナー-LUV (py-PC/POPC = 16:84) を 37°C で 30 分間インキュベーションした後、種々の LUV を添加した。アクセプター組成はそれぞれ、POPC (橙)、POPC/Ergo (90:10) (水色)、POPC/Ergo (70:30) (青)。

第5節 Sec14 脂質輸送能に対する脂質不飽和度の影響

ステロール含有量以外の特徴として、Golgi 膜は主に不飽和のアシル鎖を持つ脂質で構成される^{47,63}。そこで、Sec14 の脂質輸送能に対する脂質不飽和度の影響について評価した。飽和脂質として 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC、**Figure 34A**) を、不飽和脂質として 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC、**Figure 34B**) を用い、*sn*-1 位が palmitoyl で *sn*-2 位が oleoyl となっている POPC (**Figure 6D**) を DPPC と DOPC の中間の脂質として用いた。ドナー/アクセプターを共に POPC で調製した場合に比べ、両粒子に 30 mol % の DOPC を含ませると (ドナーが py-PC/POPC/DOPC = 16:54:30、アクセプターが POPC/DOPC = 70:30)、py-PC 輸送が促進された (**Figure 34C**)。一方で、30 mol % の DPPC を含ませると (ドナーが py-PC/POPC/DPPC = 16:54:30、アクセプターが POPC/DPPC = 70:30)、py-PC 輸送が抑制された (**Figure 34C**)。これらの結果から、Sec14 は不飽和脂質が豊富な膜間で速い脂質輸送を行うことが明らかになった。ここで、純粋な DPPC 膜はゲル/液晶相転移温度が 41°C であるため、DPPC 含有膜の相分離が懸念されるが、POPC/DPPC (70:30) の膜は 37°C (実験温度) において相分離せず、液晶相であることが報告されている⁶⁹。

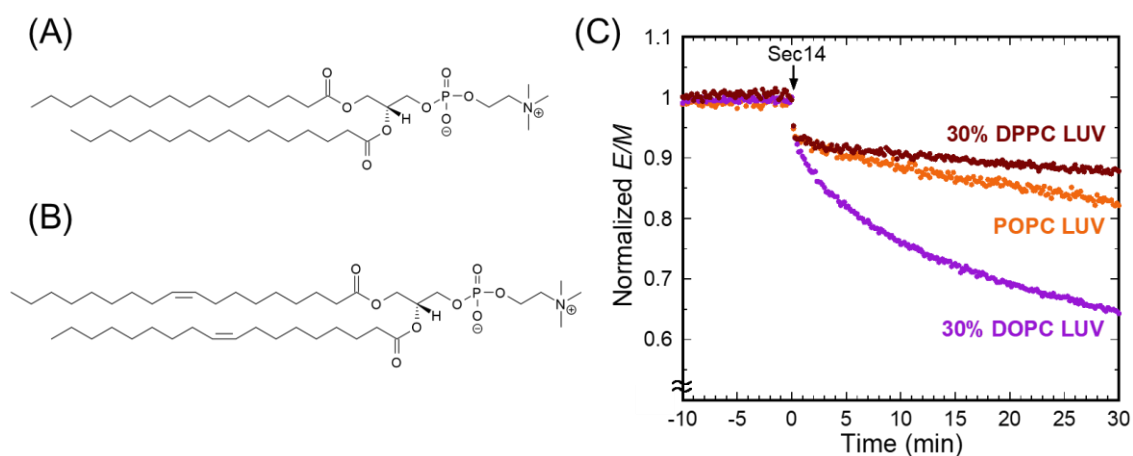


Figure 34. (A,B) DPPC (A) と DOPC (B) の化学構造。(C) Sec14 による py-PC 輸送に対する脂質不飽和度の影響。ドナーとアクセプターの混合液中に Sec14 を添加した。脂質組成はそれぞれ、ドナーが py-PC/POPC (16:84) でアクセプターが POPC (橙)、ドナーが py-PC/POPC/DPPC (16:54:30) でアクセプターが POPC/DPPC (70:30) (茶)、ドナーが py-PC/POPC/DOPC (16:54:30) でアクセプターが POPC/DOPC (70:30) (紫)。

Sec14による脂質輸送を脂質の引き抜きと送達に区別し、それらに対する脂質不飽和度の影響を評価した。まず、アクセプター非存在下で py-PC の引き抜きを評価したところ、DOPC による引き抜きの促進や DPPC による抑制は見られなかった (**Figure 35A**)。これらの結果は、POPC 膜の場合と同様な速度で、Sec14 が DOPC もしくは DPPC 含有膜から py-PC を引き抜くこと、また、POPC、DOPC、DPPC で Sec14 の基質選択性が無いことを示している。次に、Sec14 によるアクセプターへの py-PC 送達を評価したところ、DOPC によって py-PC 送達は促進され、DPPC では抑制された (**Figure 35B**)。つまり、脂質不飽和度の上昇によって Sec14 による膜への脂質送達のみが促進されることが明らかになった。

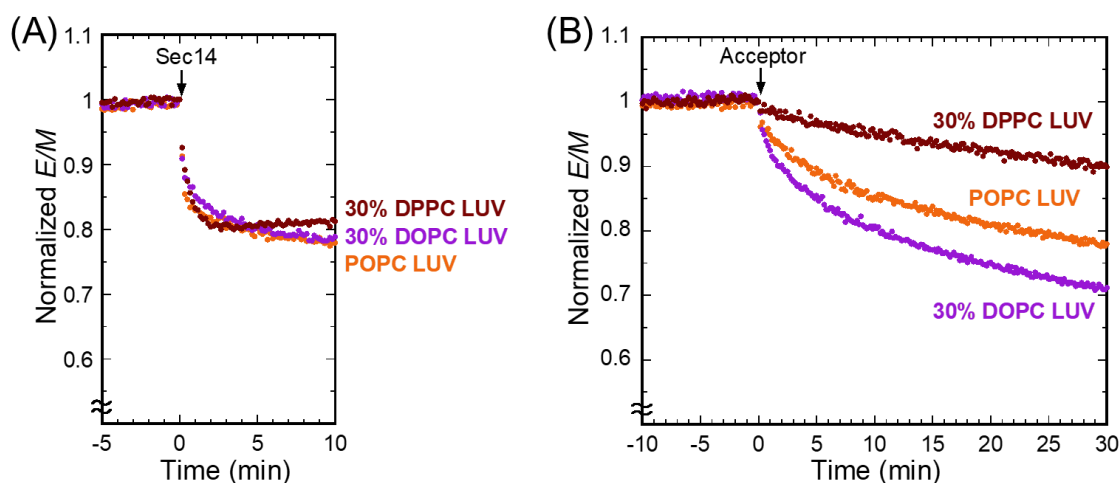


Figure 35. (A) Sec14 による py-PC 引き抜きに対する脂質不飽和度の影響。ドナーLUV に Sec14 を添加した。ドナー組成はそれぞれ、py-PC/POPC (16:84) (橙)、py-PC/POPC/DPPC (16:54:30) (茶)、py-PC/POPC/DOPC (16:54:30) (紫)。(B) Sec14 による py-PC 送達に対する脂質不飽和度の影響。Sec14 をドナーLUV (py-PC/POPC=16:84) と 37°C で 30 分間インキュベーションした後、種々のアクセプターLUV を添加した。アクセプター組成はそれぞれ、POPC (橙)、POPC/DPPC (70:30) (茶)、POPC/DOPC (70:30) (紫)。

Sec14の膜結合性に対する脂質不飽和度の影響をリポソームフローテーションアッセイにより評価した。膜中に基質が存在すると、Sec14の膜からの解離が速いため、ここではPCの代わりにSec14の基質ではないPGを用いた。1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG、**Figure 36A**)のLUVに対するSec14の結合量に比べ、飽和脂質である1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG、**Figure 36B**)を含むLUVではSec14の膜結合量は変化しなかったが、不飽和脂質である1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DOPG、**Figure 36C**)を含むLUVではSec14の膜結合量がおおよそ1.3倍増加した(**Figure 36D**)。つまり、上述の不飽和脂質による輸送促進は、高曲率膜やPOPEの場合と同様、Sec14の膜結合性の上昇に起因することが示された。これは、不飽和脂質のアシル鎖領域が広いため、膜にpacking defectが生じたためだと考えられる^{70,71}。

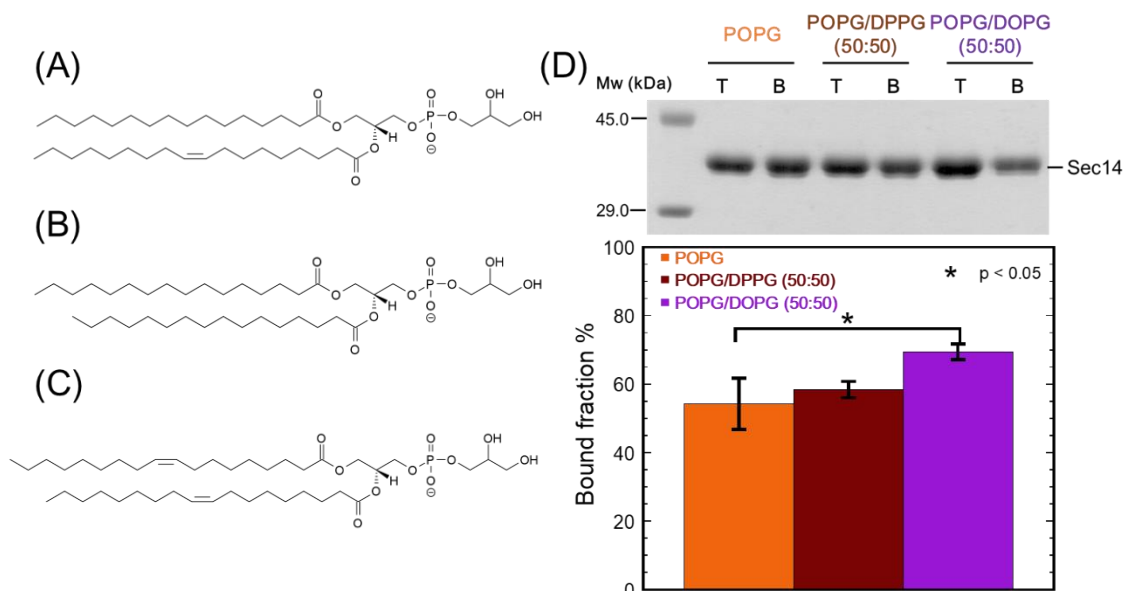


Figure 36. (A–C) POPG (A)、DPPG (B)、DOPG (C) の化学構造。(D) Sec14 (174.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を各種 PG LUV (2 mM) とインキュベーションした場合のリポソームフローテーションアッセイ。脂質組成はそれぞれ、POPG (橙)、POPG/DPPG (50:50) (茶)、POPG/DOPG (50:50) (紫)。エラーは4回の実験結果の標準偏差を示す (means \pm S.D.)。

第6節 考察

Sec14 は細胞内において Golgi 膜上で PC と PI を交換し、trans-Golgi からの小胞出芽を促進するが^{10,11}、Sec14 が細胞内において如何にして Golgi 膜を認識するのかは不明である。本研究において、高い膜曲率、コーン型脂質、不飽和脂質によって膜に packing defect が生じると、Sec14 の膜への結合性が上昇し、脂質輸送が促進されることが明らかになった (Figure 37)。

ピレン蛍光による脂質輸送評価において、ドナーLUV とアクセプターSUV の混合液中に Sec14 を添加しても *E/M* はほとんど減衰しなかった。一方で、Sec14 とドナーLUV をあらかじめインキュベーションした後にアクセプターSUV を添加すると、*E/M* の減衰が観測された。このことは、脂質を掴んだ状態の Sec14 が速やかに高曲率膜へ脂質を送達することを示している。細胞内小胞輸送を促進する酵母の P4-ATPase は、そのリン脂質フリップ活性によって膜の変形を促し、局所的な膜の曲率を誘導する⁷²。細胞内において、Golgi 膜に高曲率部分が生じると、Sec14 がその部分で活発な脂質交換を起こすと考えられる。

飽和脂質 (DPPC) や不飽和脂質 (DOPC) は Sec14 によるドナーからの脂質の引き抜きに影響しなかったが、アクセプターへの脂質の送達は DPPC によって抑制され、DOPC により促進された。また、不飽和脂質 (DOPG) は Sec14 の膜結合性を高めたが、飽和脂質 (DPPG) は Sec14 の膜結合性には影響しなかった。これらの結果から、脂質不飽和度の変化による Sec14 の脂質輸送活性の抑制や促進は、単に Sec14 の膜結合性の変化のみによるものではないと推察される。DPPC 含有膜は脂質同士のパッキングが密な固い膜である一方で、DOPC 含有膜はパッキングの緩い柔らかい膜である。Sec14 は固い膜へは新たに脂質を挿入しにくく、柔らかい膜であれば速やかに脂質を膜中に受け渡すのではないかと考えられる。細胞の原形質膜は飽和リン脂質を多く含むが^{1,63}、Golgi 膜は不飽和リン脂質に富むことが知られている^{63,70}。不飽和脂質によって Sec14 の膜結合性が上昇するとともに、膜への脂質挿入も容易になり、Golgi 膜上での効率的な脂質交換が達成されることが考えられる。しかしながら、小胞体膜も不飽和脂質の豊富な膜であり^{63,71}、Sec14 が小胞体膜と Golgi 膜を区別する機構についてはさらなる知見を要する。

PI 4-OH キナーゼ (Pik1) は細胞にとって“不十分”な酵素であり、Sec14 が PC/PI へテロ交換によって PI を Pik1 に提示し、そのリン酸化酵素活性を高めると考えられている^{10,11}。現在提唱されている nanoreactor モデルでは、Sec14 が膜のある限局された部分で複数回脂質交換を行うことで Pik1 を活性化すると考えられている⁵¹。本研究では、細胞内において Sec14 が膜のパッキング状態を認識して機能することが示唆された。とりわけ、SANS による脂質輸送評価から、高曲率膜である SUV 間の Sec14 による脂質輸送の初速は、低曲率膜である LUV 間に比べおよそ 28 倍であった。この速い脂質輸送サイクルによって Sec14 が Pik1 へ効率的に PI を提示している可能性がある。

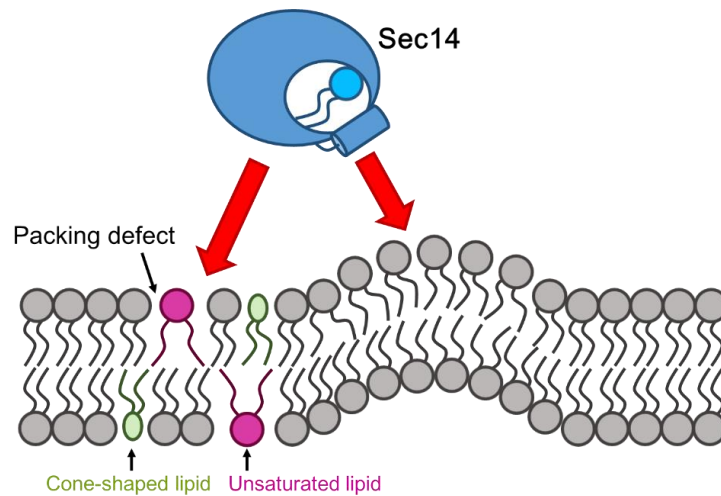


Figure 37. Sec14 による脂質膜認識機構の模式図。不飽和脂質、コーン型脂質、膜の曲率によって生じる packing defect を認識する。また、不飽和脂質が豊富な Golgi 膜は脂質同士のパッキングが緩く、Sec14 が脂質を外部から挿入しやすい。

第7節 小括

本章では、Sec14 の脂質輸送機能に対する膜の曲率や脂質不飽和度の影響を評価した。その結果、Sec14 は脂質膜に packing defect が生じると膜への結合性が上昇し、脂質輸送が促進されることが明らかになった。細胞内において、小胞形成に伴い膜に曲率が誘導されると、Sec14 が膜表面に生じた packing defect を認識し、Golgi 膜からの小胞出芽を促進すると考えられる。また、DOPC のような不飽和脂質が豊富な膜には Sec14 が脂質を挿入しやすいことが示唆された。細胞の原形質膜は飽和リン脂質やステロール、スフィンゴ脂質が豊富な固い膜であり、Golgi 膜は不飽和脂質が豊富な柔らかい膜である。Sec14 がそのような膜の性質の違いを認識して機能すると考えられる。

実験方法

試料

POPC、DOPC、DPPC、POPE、POPG、DOPG、DPPG は日油から購入した。Py-PC は Molecular Probes から購入した。POPS、Rho-PE は Avanti Polar Lipids から購入した。Ergo は Sigma-Aldrich Corporation から購入した。全て最も等級の高いものを用いた。

リポソーム調製

脂質のメタノール/クロロホルム (1:2 (v/v)) 溶液を必要量ナス型フラスコに入れた。ロータリーエバポレーターによって溶媒を減圧除去し、フラスコ底部に脂質薄膜を形成させた後、真空乾燥機に一晩置き、溶媒を完全に除去した。脂質薄膜を Tris-HCl 緩衝液 (10 mM Tris、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mg/mL NaN₃、pH 7.4) で膨潤させ、vortex により脂質懸濁液とした。この懸濁液に対して凍結融解を 5 回行った後、LiposoFast extruder を用いて、孔径 100 nm のポリカーボネートフィルターを数十回通過させることで LUV を調製した。SUV は、UD-200 probe-type sonicator を用い、脂質懸濁液に対して、窒素ガス下で 5 分間の超音波処理を 5 サイクル行うことで調製した。FPAR-1000 を用いて、動的光散乱により、LUV の粒径はおよそ 120 nm、SUV はおよそ 30 nm であることを確認した。PC 濃度はコリンアッセイキットにより定量し、PE や PS を含有するリポソームの濃度はリン定量⁴⁰により求めた。

タンパク質の発現・精製

実験で用いたタンパク質は Vytas A. Bankaitis 教授 (Texas A&M) から提供されたものを用いた。発現・精製の手順は簡単に以下のとおりである^{10,60}。pET28b-His₈-Sec14 を *Escherichia coli* BL21 に導入し、発現した組換えタンパク質を TALON[®] metal affinity beads に吸着させ、イミダゾールで溶出させた。その後、リン酸緩衝液 (25 mM Na₂HPO₄、300 mM NaCl、5 mM β-mercaptoethanol、pH 7.5) で透析した状態で提供された。

SANS による脂質輸送評価

100% *d*-PC の LUV もしくは SUV を D 体リポソーム、100% *h*-PC の LUV もしくは SUV を H 体リポソームとし、それらを 30% D₂O の Tris-HCl 緩衝液で調製した。30% D₂O 溶液の散乱長密度 (SLD) は $1.5 \times 10^{10} \text{ cm}^{-1}$ であり、この値は、D 体リポソーム ($\text{SLD}_{d\text{-PC}} = 2.8 \times 10^{10} \text{ cm}^{-1}$) と H 体リポソーム ($\text{SLD}_{h\text{-PC}} = 0.26 \times 10^{10} \text{ cm}^{-1}$) の SLD の平均値と一致する。SANS 測定は、SANS-U により行った。中性子線の波長を 7 Å ($\Delta\lambda/\lambda = 10\%$)、サンプルと検出器の距離を 4 m とした。サンプルは 2 mm の光路長の石英ガラスセル内で測定した。二次元検出器で観測された散乱のカウントの合計値を散乱強度 ($I(t)$) とし、バックグラウンド、空セル、溶媒からの散乱の寄与を差し引いた値とした。

D 体リポソームと H 体リポソーム（最終濃度は各 15 mM）の混合液に種々の濃度の Sec14 を混合した直後に SANS の時分割測定を開始した（37°C）。Normalized Contrast ($\Delta\rho(t)/\Delta\rho(0)$) は次式から算出した。

$$\Delta\rho(t)/\Delta\rho(0) = \{I(t)/I(0)\}^{0.5} \quad (19)$$

ここで、 $I(0)$ と $I(t)$ は Sec14 添加後の時間 0 と t における散乱強度である。

蛍光による脂質輸送/引き抜き評価

16 mol% の py-PC を含有するリポソームをドナー、py-PC を含有しないリポソームをアクセプターとした。360 μL のドナー/アクセプター混合液に 40 μL の Sec14 溶液を添加した。最終濃度は、ドナーが 20 μM 、アクセプターが 40 μM 、Sec14 は 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。F-4500 分光光度計を用いて、345 nm 励起光におけるピレンのエキシマー蛍光強度 (478 nm) とモノマー蛍光強度 (378 nm) を 37°C で 30 分間 10 秒毎に測定した。ピレンエキシマー/モノマー蛍光強度比 (E/M) を算出し、Sec14 添加直前の値で規格化した。脂質の引き抜きは、アクセプター非存在下において、上述の輸送評価と同様に行った。

蛍光による脂質送達評価

Sec14 と py-PC/POPC LUV (16:84) を 37°C で 30 分間インキュベーションし、様々な組成のアクセプター (LUV もしくは SUV) を添加した。最終濃度はドナーが 20 μM 、アクセプターが 40 μM 、Sec14 は 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。F-4500 分光光度計を用いて、345 nm 励起光におけるピレンのエキシマー蛍光強度 (478 nm) とモノマー蛍光強度 (378 nm) を 37°C で 30 分間 10 秒毎に測定した。 E/M を算出し、アクセプター添加直前の値で規格化した。

リポソームフローテーションアッセイ

Sec14 (175 $\mu\text{g}/\text{mL} = 5 \mu\text{M}$) を 1 mol% Rho-PE を含有する LUV (2 mM) と混合し、37°C で 30 分間インキュベーションした (全量 100 μL)。その混合液を 100 μL の 60% (w/v) スクロース溶液と混合し、30% スクロース溶液とした後、その上に 250 μL の 25% (w/v) スクロース溶液と 50 μL の 0% スクロース溶液を載せた。そのサンプルを、アングルローター (S140AT) を用いて、170,000 $\times g$ で 1 時間超遠心にかけた。遠心後のサンプルを下層 (250 μL) と上層 (250 μL) に分け、それらから 100 μL ずつ回収した。両フラクションのタンパク質はメタノール/クロロホルム法⁶¹で沈殿させ、SDS-PAGE で分析後、coomassie brilliant blue で染色した。Sec14 のバンド強度は ImageJ を用いて見積もった。各条件における測定結果の差は unpaired t 検定によって分析し、 P 値が 0.05 より小さい場合に有意差ありとした。

結論

本研究では、ピレン蛍光や SANS を用いて M β CD と Sec14 の脂質輸送を評価し、それらの脂質輸送の物理化学的な特性を明らかにした。

第 1 章では、M β CD によるピレン脂質輸送を評価し、観測されるピレンのエキシマー/モノマー比を膜中のピレン脂質量に換算することで、M β CD による脂質輸送の物理化学的パラメーターを得た。その結果、M β CD は、脂質輸送の際に、脂質の頭部構造の違いによる選択性を持たないことが明らかになった。また、M β CD によるピレン脂質の輸送過程では、M β CD がリン脂質と 1:1 の複合体を形成することが示唆された。

第 2 章では、Sec14 による脂質輸送をピレン蛍光と SANS によって評価した。その結果、M β CD とは異なり、Sec14 はリン脂質頭部を認識し、PC と PI に対して基質選択性を持つことが明らかになった。さらに、酸性リン脂質は Sec14 との静電相互作用により脂質輸送を促進する一方で、Sec14 の膜結合性を高めないことが示された。したがって、酸性リン脂質は Sec14 の膜結合後の脂質交換過程を促進することが示唆された。また、膜上での Sec14 による PC と PI の交換の検出に成功した。その結果、Sec14 は脂質の一方方向輸送を行うわけではなく、Sec14 は膜上で脂質交換を行うことで、脂質膜組成を変化させることが明らかになった。

第 3 章では、Sec14 の脂質輸送能に対する膜の曲率や脂質不飽和度の影響を評価した。その結果、高い膜曲率やコーン型脂質、不飽和脂質によって膜に packing defect が生じると Sec14 の膜への結合性が上昇し、脂質輸送が促進されることが明らかになった。さらに、不飽和脂質が豊富で、脂質同士のパッキングが緩い膜には、Sec14 が新たに脂質を挿入しやすいことが示唆された。

本研究により、M β CD と Sec14 による脂質輸送機構の違いが明らかになった。M β CD は数百 μ M から数 mM 程度で脂質輸送活性を示したが、Sec14 は数 μ M のオーダーで脂質を輸送した。M β CD がリン脂質を非選択的に輸送するのに対し、Sec14 は高い基質選択性を持つとともに、膜上で基質と結合することで速やかに膜から解離するというメカニズムにより、M β CD よりも効率的な脂質輸送を達成していることが明らかになった。本研究で用いたピレン蛍光や SANS による脂質輸送評価によって、M β CD や Sec14 以外の脂質輸送担体の機能解析も可能である。Sec14 の構造は酵母からヒトまで広く保存されており、ヒトの Sec14 ホモログタンパク質の変異によって家族性ビタミン E 欠乏症、神経線維腫症 I 型などの疾患を発症することが知られている。そのため、それらのプロトタイプである Sec14 の脂質輸送メカニズムが明らかになれば、それらの分子機能や病理メカニズムの解明に寄与するものと考えられる。

参考文献

1. van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124 (2008).
2. Bell, R. M., Ballas, L. M. & Coleman, R. A. Lipid topogenesis. *J. Lipid Res.* **22**, 391–403 (1981).
3. Wimley, W. C. & Thompson, T. E. Exchange and flip-flop of dimyristoyl phosphatidylcholine in liquid-crystalline, gel and two-component, two-phase large unilamellar vesicles. *Biochemistry* **29**, 1296–1303 (1990).
4. Nakano, M., Fukuda, M., Kudo, T., Endo, H. & Handa, T. Determination of interbilayer and transbilayer lipid transfers by time-resolved small-angle neutron scattering. *Phys. Rev. Lett.* **98**, 238101 (2007).
5. Lev, S. Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 739–750 (2010).
6. Wong, L. H., Čopič, A. & Levine, T. P. Advances on the transfer of lipids by lipid transfer proteins. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 516–530 (2017).
7. Bankaitis, V. A., Aitken, J. R., Cleves, A. E. & Dowhan, W. An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature* **347**, 561–562 (1990).
8. Cleves, A., McGee, T. & Bankaitis, V. Phospholipid transfer proteins: A biological debut. *Trends Cell Biol.* **1**, 30–34 (1991).
9. de Saint-Jean, M., Delfosse, V., Douguet, D., Chicanne, G., Payrastre, B., Bourguet, W., Antony, B. & Drin, G. Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers. *J. Cell Biol.* **195**, 965–978 (2011).
10. Schaaf, G., Ortlund, E. A., Tyeryar, K. R., Mousley, C. J., Ile, K. E., Garrett, T. A., Ren, J., Woolls, M. J., Raetz, C. R. H., Redinbo, M. R. & Bankaitis, V. A. Functional anatomy of phospholipid binding and regulation of phosphoinositide homeostasis by proteins of the Sec14 superfamily. *Mol. Cell* **29**, 191–206 (2008).
11. Bankaitis, V. A., Mousley, C. J. & Schaaf, G. The Sec14 superfamily and mechanisms for crosstalk between lipid metabolism and lipid signaling. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 150–160 (2010).
12. Fairn, G. D., Curwin, A. J., Stefan, C. J. & McMaster, C. R. The oxysterol binding protein Kes1p regulates Golgi apparatus phosphatidylinositol-4-phosphate function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 15352–7 (2007).
13. Mattjus, P., Molotkovsky, J. G., Smaby, J. M. & Brown, R. E. A fluorescence resonance

- energy transfer approach for monitoring protein-mediated glycolipid transfer between vesicle membranes. *Anal. Biochem.* **268**, 297–304 (1999).
14. Watanabe, Y., Tamura, Y., Kawano, S. & Endo, T. Structural and mechanistic insights into phospholipid transfer by Ups1-Mdm35 in mitochondria. *Nat. Commun.* **6**, 1–12 (2015).
 15. Chattopadhyay, A. & London, E. Parallax method for direct measurement of membrane penetration depth utilizing fluorescence quenching by spin-labeled phospholipids. *Biochemistry* **26**, 39–45 (1987).
 16. Chattopadhyay, A. & London, E. Spectroscopic and ionization properties of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labeled lipids in model membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **938**, 24–34 (1988).
 17. Abrams, F. S. & London, E. Extension of the parallax analysis of membrane penetration depth to the polar region of model membranes: Use of fluorescence quenching by a spin-label attached to the phospholipid polar headgroup. *Biochemistry* **32**, 10826–10831 (1993).
 18. Huster, D., Müller, P., Arnold, K. & Herrmann, A. Dynamics of membrane penetration of the fluorescent 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl (NBD) group attached to an acyl chain of phosphatidylcholine. *Biophys. J.* **80**, 822–831 (2001).
 19. Sassaroli, M., Ruonala, M., Virtanen, J., Vauhkonen, M. & Somerharju, P. Transversal distribution of acyl-linked pyrene moieties in liquid-crystalline phosphatidylcholine bilayers. A fluorescence quenching study. *Biochemistry* **34**, 8843–8851 (1995).
 20. Massey, J. B., Gotto, Jr., A. M. & Pownall, H. J. Kinetics and mechanism of the spontaneous transfer of fluorescent phospholipids between apolipoprotein-phospholipid recombinants. Effect of the polar headgroup. *J. Biol. Chem.* **257**, 5444–5448 (1982).
 21. Pownall, H. J., Hickson, D., Gotto, Jr., A. M. & Massey, J. B. Kinetics of spontaneous and plasma-stimulated sphingomyelin transfer. *Biochim. Biophys. Acta - lipids lipid Metab.* **712**, 169–176 (1982).
 22. Anderson, T. G., Tan, A., Ganz, P. & Seelig, J. Calorimetric measurement of phospholipid interaction with methyl- β -cyclodextrin. *Biochemistry* **43**, 2251–2261 (2004).
 23. Huang, Z. & London, E. Effect of cyclodextrin and membrane lipid structure upon cyclodextrin-lipid interaction. *Langmuir* **29**, 14631–14638 (2013).
 24. Cheng, H. T., Megha & London, E. Preparation and properties of asymmetric vesicles that mimic cell membranes. Effect upon lipid raft formation and transmembrane helix orientation. *J. Biol. Chem.* **284**, 6079–6092 (2009).
 25. Chiantia, S., Schwille, P., Klymchenko, A. S. & London, E. Asymmetric GUVs prepared

- by M β CD-mediated lipid exchange: An FCS study. *Biophys. J.* **100**, L1–L3 (2011).
26. Kainu, V., Hermansson, M. & Somerharju, P. Introduction of phospholipids to cultured cells with cyclodextrin. *J. Lipid Res.* **51**, 3533–3541 (2010).
 27. Nakano, M., Fukuda, M., Kudo, T., Matsuzaki, N., Azuma, T., Sekine, K., Endo, H. & Handa, T. Flip-flop of phospholipids in vesicles: Kinetic analysis with time-resolved small-angle neutron scattering. *J. Phys. Chem. B* **113**, 6745–6748 (2009).
 28. Glasstone, S., Eyring, H. & Laidler, K. J. *The theory of rate processes*. (McGraw-Hill, 1941).
 29. Matsuzaki, N., Handa, T. & Nakano, M. Kinetic and thermodynamic analysis of cholesterol transfer between phospholipid vesicles and nanodiscs. *J. Phys. Chem. B* **119**, 9764–9771 (2015).
 30. Janosi, L. & Gorfe, A. A. Simulating POPC and POPC/POPG bilayers: Conserved packing and altered surface reactivity. *J. Chem. Theory Comput.* **6**, 3267–3273 (2010).
 31. Dickey, A. & Faller, R. Examining the contributions of lipid shape and headgroup charge on bilayer behavior. *Biophys. J.* **95**, 2636–2646 (2008).
 32. Bradshaw, J. P., Bushby, R. J., Giles, C. C. D. & Saunders, M. R. Orientation of the headgroup of phosphatidylinositol in a model biomembrane as determined by neutron diffraction. *Biochemistry* **38**, 8393–8401 (1999).
 33. Ikeda, K. & Nakano, M. Energetics of the mixing of phospholipids in bilayers determined using vesicle solubilization. *Langmuir* **32**, 13270–13275 (2016).
 34. Cappadona, T. A., Daniels, L. M. & Siddiquee, T. A. Host–guest complex of β -cyclodextrin and disulfide form of 4-aminothiophenol. *Appl. Sci.* **2**, 773–779 (2012).
 35. Weltzien, H. U. Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* **559**, 259–287 (1979).
 36. Tanhuanpää, K., Cheng, K. H., Anttonen, K., Virtanen, J. A. & Somerharju, P. Characteristics of pyrene phospholipid/ γ -cyclodextrin complex. *Biophys. J.* **81**, 1501–1510 (2001).
 37. Ghosh, P., Mandal, S., Das, T., Maity, A., Gupta, P. & Purkayastha, P. “Extra stabilisation” of a pyrene based molecular couple by γ -cyclodextrin in the excited electronic state. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 11500–11507 (2012).
 38. Somerharju, P. J., Virtanen, J. A., Eklund, K. K., Vainio, P. & Kinnunen, P. K. J. 1-Palmitoyl-2-pyrenedecanoyl glycerophospholipids as membrane probes: Evidence for regular distribution in liquid-crystalline phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry* **24**, 2773–2781 (1985).
 39. Somerharju, P. & Wirtz, K. W. A. Semisynthesis and properties of a fluorescent phosphatidylinositol analogue containing a cis-parinaroyl moiety. *Chem. Phys. Lipids*

- 30**, 81–91 (1982).
40. Bartlett, G. R. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* **234**, 466–468 (1959).
 41. Holthuis, J. C. M. & Menon, A. K. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* **510**, 48–57 (2014).
 42. Johansen, J., Ramanathan, V. & Beh, C. T. Vesicle trafficking from a lipid perspective: Lipid regulation of exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Logist.* **2**, 151–160 (2012).
 43. Graham, T. R. & Burd, C. G. Coordination of Golgi functions by phosphatidylinositol 4-kinases. *Trends Cell Biol.* **21**, 113–121 (2011).
 44. Asp, L., Kartberg, F., Fernandez-Rodriguez, J., Smedh, M., Elsner, M., Laporte, F., Bárcena, M., Jansen, K. A., Valentijn, J. A., Koster, A. J., Bergeron, J. J. M. & Nilsson, T. Early stages of Golgi vesicle and tubule formation require diacylglycerol. *Mol. Biol. Cell* **20**, 780–790 (2009).
 45. Sha, B., Phillips, S. E., Bankaitis, V. A. & Luo, M. Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol-transfer protein. *Nature* **391**, 506–510 (1998).
 46. Ryan, M. M., Temple, B. R. S., Phillips, S. E. & Bankaitis, V. A. Conformational dynamics of the major yeast phosphatidylinositol transfer protein Sec14p: Insight into the mechanisms of phospholipid exchange and diseases of Sec14p-like protein deficiencies. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1928–1942 (2007).
 47. Klemm, R. W., Ejsing, C. S., Surma, M. A., Kaiser, H.-J., Gerl, M. J., Sampaio, J. L., de Robillard, Q., Ferguson, C., Proszynski, T. J., Shevchenko, A. & Simons, K. Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* **185**, 601–612 (2009).
 48. Schmiedel, H., Almásy, L. & Klose, G. Multilamellarity, structure and hydration of extruded POPC vesicles by SANS. *Eur. Biophys. J.* **35**, 181–189 (2006).
 49. Kamal, M. M., Mills, D., Grzybek, M. & Howard, J. Measurement of the membrane curvature preference of phospholipids reveals only weak coupling between lipid shape and leaflet curvature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 22245–22250 (2009).
 50. Phillips, S. E., Vincent, P., Rizzieri, K. E., Schaaf, G., Bankaitis, V. A. & Gaucher, E. A. The diverse biological functions of phosphatidylinositol transfer proteins in eukaryotes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 21–49 (2006).
 51. Nile, A. H., Bankaitis, V. A. & Grabon, A. Mammalian diseases of phosphatidylinositol transfer proteins and their homologs. *Clin. Lipidol.* **5**, 867–897 (2010).
 52. Li, X., Routt, S. M., Xie, Z., Cui, X., Fang, M., Kearns, M. A., Bard, M., Kirsch, D. R.

- & Bankaitis, V. A. Identification of a novel family of nonclassic yeast phosphatidylinositol transfer proteins whose function modulates phospholipase D activity and Sec14p-independent cell growth. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1989–2005 (2000).
53. Welti, S., Fraterman, S., D'Angelo, I., Wilm, M. & Scheffzek, K. The Sec14 homology module of neurofibromin binds cellular glycerophospholipids: Mass spectrometry and structure of a lipid complex. *J. Mol. Biol.* **366**, 551–562 (2007).
 54. Liu, T., Jenwitheesuk, E., Teller, D. C. & Samudrala, R. Structural insights into the cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP). *Proteins Struct. Funct. Genet.* **61**, 412–422 (2005).
 55. Kono, N. & Arai, H. Intracellular transport of fat-soluble vitamins A and E. *Traffic* **16**, 19–34 (2015).
 56. Kono, N., Ohto, U., Hiramatsu, T., Urabe, M., Uchida, Y., Satow, Y. & Arai, H. Impaired α -TTP-PIPs interaction underlies familial vitamin E deficiency. *Science* **340**, 1106–1110 (2013).
 57. Zingg, J. M., Libinaki, R., Meydani, M. & Azzi, A. Modulation of phosphorylation of tocopherol and phosphatidylinositol by hTAP1/SEC14L2-mediated lipid exchange. *PLoS One* **9**, e101550 (2014).
 58. Christen, M., Marcaida, M. J., Lamprakis, C., Aeschmann, W., Vaithilingam, J., Schneider, P., Hilbert, M., Schneider, G., Cascella, M. & Stocker, A. Structural insights on cholesterol endosynthesis: Binding of squalene and 2,3-oxidosqualene to supernatant protein factor. *J. Struct. Biol.* **190**, 261–270 (2015).
 59. Szolderits, G., Hermetter, A., Paltauf, F. & Daum, G. Membrane properties modulate the activity of a phosphatidylinositol transfer protein from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **986**, 301–309 (1989).
 60. Nile, A. H., Tripathi, A., Yuan, P., Mousley, C. J., Suresh, S., Wallace, I. M., Shah, S. D., Pohlhaus, D. T., Temple, B., Nislow, C., Giaever, G., Tropsha, A., Davis, R. W., St. Onge, R. P. & Bankaitis, V. A. PITPs as targets for selectively interfering with phosphoinositide signaling in cells. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 76–84 (2014).
 61. Fic, E., Kedracka-Krok, S., Jankowska, U., Pirog, A. & Dziedzicka-Wasylewska, M. Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis. *Electrophoresis* **31**, 3573–3579 (2010).
 62. Hishikawa, D., Shindou, H., Harayama, T., Ogasawara, R., Suwabe, A. & Shimizu, T. Identification of Sec14-like 3 as a novel lipid-packing sensor in the lung. *FASEB J.* **27**, 5131–5140 (2013).
 63. Schneiter, R., Brügger, B., Sandhoff, R., Zellnig, G., Leber, A., Lampl, M., Athenstaedt, K., Hrastnik, C., Eder, S., Daum, G., Paltauf, F., Wieland, F. T. & Kohlwein, S. D.

- Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **146**, 741–754 (1999).
64. Shintou, K., Nakano, M., Kamo, T., Kuroda, Y. & Handa, T. Interaction of an amphipathic peptide with phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine mixed membranes. *Biophys. J.* **93**, 3900–3906 (2007).
 65. Slater, S. J., Kelly, M. B., Taddeo, F. J., Ho, C., Rubin, E. & Stubbs, C. D. The modulation of protein kinase C activity by membrane lipid bilayer structure. *J. Biol. Chem.* **269**, 4866–4871 (1994).
 66. Silva, L., Coutinho, A., Fedorov, A. & Prieto, M. Competitive binding of cholesterol and ergosterol to the polyene antibiotic nystatin. A fluorescence study. *Biophys. J.* **90**, 3625–3631 (2006).
 67. Viani, P., Galimberti, C., Marchesini, S., Cervato, G. & Cestaro, B. N-Pyrene dodecanoyl sulfatide as membrane probe: A study of glycolipid dynamic behavior in model membranes. *Chem. Phys. Lipids* **46**, 89–97 (1988).
 68. Chong, P. L.-G., Tang, D. & Sugar, I. P. Exploration of physical principles underlying lipid regular distribution: effects of pressure, temperature, and radius of curvature on E/M dips in pyrene-labeled PC/DMPC binary mixtures. *Biophys. J.* **66**, 2029–2038 (1994).
 69. Svetlovics, J. A., Wheaten, S. A. & Almeida, P. F. Phase separation and fluctuations in mixtures of a saturated and an unsaturated phospholipid. *Biophys. J.* **102**, 2526–2535 (2012).
 70. Vanni, S., Hirose, H., Barelli, H., Antonny, B. & Gautier, R. A sub-nanometre view of how membrane curvature and composition modulate lipid packing and protein recruitment. *Nat. Commun.* **5**, 4916 (2014).
 71. Bigay, J. & Antonny, B. Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: Defining cellular territories in determining specificity. *Dev. Cell* **23**, 886–895 (2012).
 72. Takada, N., Naito, T., Inoue, T., Nakayama, K., Takatsu, H. & Shin, H. Phospholipid-flipping activity of P4-ATPase drives membrane curvature. *EMBO J.* **37**, e97705 (2018).

論文目録

1. **Sugiura, T.**, Ikeda, K. & Nakano, M. Kinetic analysis of the methyl- β -cyclodextrin-mediated intervesicular transfer of pyrene-labeled phospholipids. *Langmuir* **32**, 13697-13705 (2016).
(第 1 章)
2. **Sugiura, T.**, Takahashi, C., Chuma, Y., Fukuda, M., Yamada, M., Yoshida, U., Nakao, H., Ikeda, K., Khan, D., Nile, A. H., Bankaitis, V. A. & Nakano, M. Biophysical parameters of the Sec14 phospholipid exchange cycle. *Biophys. J.* **116**, 92-103 (2019).
(第 2 章および第 3 章の一部)
3. **Sugiura, T.**, Nakao, H., Ikeda, K., Khan, D., Nile, A. H., Bankaitis, V. A. & Nakano, M. Regulation of the Sec14 lipid transfer by lipid packing of membranes. *in preparation*.
(第 3 章)

謝辞

富山大学から初めて受け入れる学生であった私を、時には温かく見守り、時には厳しく御指導してくださいました中野実教授（富山大学大学院医学薬学研究部）に心より感謝申し上げます。また、これまでの研究室生活で大変お世話になるとともに、研究活動に関する様々な助言を賜りました池田恵介准教授ならびに中尾裕之助教（富山大学大学院医学薬学研究部）に深く感謝申し上げます。

井上将彦教授ならびに友廣岳則教授（富山大学大学院医学薬学研究部）には本学位論文を審査していただき、多大な御教示のみならず、今後の研究につながる様々な示唆も賜りました。深く感謝申し上げます。

Vytas A. Bankaitis 教授、Aaron H. Nile 博士ならびに Danish Khan 博士（Texas A&M）からは本研究で用いた Sec14 を提供していただき、また、研究結果の考察に有益な助言を賜りました。ここに感謝の意を表します。

中性子小角散乱の測定では、遠藤仁博士、高田慎一博士（日本原子力研究開発機構 J-PARC センター）ならびに岩瀬裕希博士（CROSS 中性子科学センター）に多大な御協力を賜りました。深く感謝申し上げます。

研究室では、多くの方々に大変お世話になりました。宮崎公一博士（現 アステラス製薬株式会社）、高橋知里修士（現 同志社女子大学薬学部特任助手）、横山弘和修士（現 第一三共株式会社）をはじめとする富山大学生体界面化学研究室の卒業生の皆様、さらに、吉田右京学士をはじめとする同研究室在学生の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、9年間という長い大学生活を何不自由なく過ごすことができ、本研究を達成できましたのは両親からの様々な御支援のおかげです。心より感謝申し上げます。

平成 31 年 2 月
杉浦 太一