

小胞体膜のリン脂質フリップフロップ制御機構  
に関する研究

2016

中尾 裕之



## 略語表

本論文で使用した略語を以下に記す。

<i>n</i> -AS	: <i>n</i> -(9-anthroyloxy)stearic acid
ATF6	: activating transcription factor 6
CD	: circular dichroism
CHAPS	: 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
C <sub>6</sub> NBD-PC	: 1-palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
C <sub>6</sub> NBD-PE	: 1-palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
C <sub>6</sub> NBD-PG	: 1-palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
C <sub>6</sub> NBD-PS	: 1-palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoserine
<i>n</i> -doxyl-PC	: 1-palmitoyl-2-stearoyl-( <i>n</i> -doxyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDEM1	: endoplasmic reticulum degradation-enhancing $\alpha$ -mannosidase-like protein 1
FACL4	: long-chain fatty acid-CoA ligase 4
FMO2	: flavin-containing monooxygenase 2
HED	: heptaethylene glycol monododecyl ether
HPLC	: high performance liquid chromatography
JP3	: junctophilin-3
JP4	: junctophilin-4
KcsA	: potassium crystallographically-sited activation channel
LUV	: large unilamellar vesicle
MALDI-TOF-MS	: matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry
M $\beta$ CD	: methyl- $\beta$ -cyclodextrin
MMP23	: matrix metalloproteinase-23
mPEG <sub>4</sub> -NHS	: methoxy-poly(ethylene glycol) <sub>4</sub> <i>N</i> -hydroxysuccinimide
NBD	: 7-nitro-2-1,3-benzoxadiazole
ORP5	: oxysterol-binding protein-related protein 5
PC	: phosphatidylcholine
PE	: phosphatidylethanolamine

POPC	: 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-phosphoserine
PS	: phosphatidylserine
P4HTM	: transmembrane prolyl 4-hydroxylase
RNF180	: ring finger protein 180
SM	: sphingomyelin
SPAST	: spastin
SUV	: small unilamellar vesicle
TBA	: tetra- <i>n</i> -butylammonium
TMED7	: transmembrane emp24 domain-containing protein 7
UBE2J2	: ubiquitin-conjugating enzyme E2 J2

# 目次

序論 .....	1
本論 .....	4
第一章 モデル膜貫通ペプチドによるフリップフロップの制御	
第一節 序	4
第二節 合成したペプチドの膜貫通評価	6
第三節 親水性アミノ酸残基を配置したペプチドのフリップフロップ促進能の 評価	12
第四節 種々の長さのペプチドのフリップフロップ促進能の評価	17
第五節 ヒト小胞体膜タンパク質の膜貫通領域のアミノ酸残基組成の評価	20
第六節 考察	21
第七節 小括	24
第二章 カリウムチャネル KcsA による pH 依存的なフリップフロップの促進	
第一節 序	25
第二節 フリップ測定条件設定と KcsA の再構成効率の評価	26
第三節 KcsA のフリップフロップ促進能の評価	27
第四節 KcsA のフリップフロップ促進能に対する TBA の効果	31
第五節 KcsA のフリップフロップ促進能に対する M0 ヘリックスの効果	32
第六節 KcsA のフリップフロップ促進能に対するコレステロールの効果	33
第七節 考察	36
第八節 小括	38
第三章 小胞体膜タンパク質の膜貫通配列によるフリップフロップの促進	
第一節 序	39
第二節 膜貫通配列ペプチドの膜貫通評価	41
第三節 膜貫通配列ペプチドのフリップフロップ促進能の評価	43
第四節 EDEM1 と SPAST ペプチドの変異体のフリップフロップ促進能の評価	45
第五節 EDEM1 ペプチド依存的なフリップフロップの熱力学的パラメーターの 解析	47

第六節	EDEM1 ペプチドのフリップフロップ促進能に対するコレステロールの 効果	49
第七節	考察	52
第八節	小括	55
結論	.....	56
実験方法	.....	57
論文目録	.....	67
謝辞	.....	68
引用文献	.....	69

## 序論

生体膜は、主にリン脂質と膜タンパク質から構成される。生体膜で一般的なリン脂質の構造は、リン酸基を含む頭部基からなる親水性の部分と、二本の炭化水素鎖で形成される疎水性の部分を持つというものであり、両親媒性の性質を有する。生体膜において、リン脂質は、炭化水素鎖を膜中央に向け、頭部基を水中に向けることで脂質二重層を形成している<sup>1</sup>。脂質二重層中のリン脂質の動きには、リン脂質の長軸を中心とした回転、膜面に沿って移動する側方拡散、二重層を横切って内外葉を移動するフリップフロップの三種類がある<sup>2</sup> (図1)。人工脂質二重層膜小胞 (リポソーム) においては、リポソームの外葉から内葉への移動をフリップ、内葉から外葉への移動をフロップと呼ぶ。生体膜の主要構成成分である 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) からなる液晶相の人工膜において、常温で、回転拡散定数は  $10^7$ - $10^8$  s<sup>-1</sup> であり、側方拡散定数は  $\sim 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s である<sup>3,4</sup>。それに対してフリップフロップは、37°Cで 20 時間の測定ではほとんど観測されない<sup>5</sup>。リン脂質がフリップフロップするには、極性の頭部基が、水中に露出した極性環境から炭化水素鎖からなる非極性の膜中へ移行する必要があるため、非常に大きなエネルギー障壁が存在する。それゆえ、リン脂質のみからなる膜において、二次元の膜面内で起こる回転や側方拡散は、水中の分子の自由拡散に相当するものであるのに対して、膜法線方向の運動であるフリップフロップは非常に制限されている。

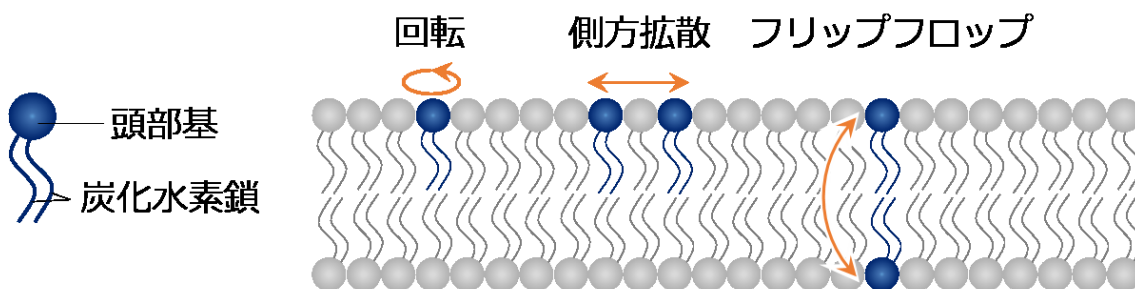


図1. 脂質二重層中のリン脂質の動き

真核生物の各オルガネラ膜では、このフリップフロップ速度が、膜タンパク質により、エネルギー依存的または非依存的に、様々に制御されている<sup>6</sup>。細胞の各オルガネラ膜におけるフリップフロップは、細胞質側への移動をフリップ、細胞質側からの移動をフロップと呼ぶ。

真核生物の細胞膜では、通常、phosphatidylcholine (PC)、sphingomyelin (SM) が脂質二重層の細胞外側に、phosphatidylserine (PS)、phosphatidylethanolamine (PE) が細胞質側に分布している<sup>7</sup>。この非対称性は、アミノリン脂質トランスロカーゼによる PS、PE の細胞質側への輸送 (フリップ)、adenosine triphosphate-binding cassette トランスポータ

一による PC、SM の細胞外側への輸送（フロップ）によって、エネルギー依存的に維持されていると考えられている<sup>8</sup>。また、非対称性の維持には細胞膜の高いコレステロール含量も寄与していると考えられる。コレステロールは脂質二重層中に存在すると、リン脂質の自発的なフリップフロップを抑制する効果を持つ<sup>5</sup>。双方向にフリップフロップを促進するタンパク質、リン脂質スクランブラーゼは、エネルギー非依存的、Ca<sup>2+</sup>依存的に、様々な種類のリン脂質に対して活性を発現する<sup>9-11</sup>。リン脂質スクランブラーゼが活性化されると、非対称性が崩れ、PS が細胞外側に表出する<sup>12</sup>。この PS の細胞外側への表出は、細胞のアポトーシスや血小板凝集に関与すると考えられている<sup>12</sup>。細胞膜のフリップフロップに関与するアミノリン脂質トランスロカーゼはすでに同定されている<sup>13,14</sup>。近年、リン脂質スクランブラーゼについてもタンパク質の同定<sup>9-11</sup>、結晶構造の解明<sup>10</sup>がなされており、その構造から親水性アミノ酸残基を炭化水素領域に露出した部分が、フリップフロップを促進する活性部位ではないかと言われている。このように、細胞膜のフリップフロップ制御機構は明らかにされつつある。

一方、小胞体膜では、フリップフロップが非常に速い速度で起こっている ( $t_{1/2}$  = 数秒~数十分)<sup>15-18</sup>。真核生物において、リン脂質は主に小胞体膜の細胞質側で合成されており<sup>19-21</sup>、脂質二重層構造を維持するため新たに合成されたリン脂質は速やかに内腔側へ移動（フロップ）する必要がある。小胞体膜の速いフリップフロップは、双方向性、エネルギー非依存的であり、リン脂質の頭部基に対しての選択性が低い<sup>15-17</sup>。細胞膜とは異なり、小胞体膜のコレステロール含量が低いことも速いフリップフロップの要因の一つではないかと考えられる。プロテアーゼやタンパク質修飾試薬によりフリップフロップ速度が低下することから、タンパク質の関与が示唆されている<sup>15-17</sup>。また、小胞体膜タンパク質画分をさらに分画したところ、それぞれの画分がスクランブラーゼ活性を示し、かつ、それぞれの画分の活性がプロテアーゼに対して異なる感受性を示すという報告や<sup>22</sup>、タンパク質修飾試薬 *N*-エチルマレイミド、ジエチルピロカーボネートが加算的にスクランブラーゼ活性を阻害するという報告がある<sup>23</sup>。これら 2 つの研究から、小胞体膜のフリップフロップには、複数のタンパク質が関与すると考えられている。しかし、小胞体膜のフリップフロップを促進するタンパク質、「スクランブラーゼ」、については未だ候補すら挙げられていない<sup>24</sup>。

小胞体膜のフリップフロップ促進メカニズムを解明するには、小胞体膜スクランブラーゼを同定し、その機能を解析する必要がある。そのためには、何らかの形で候補を絞り込む必要があるが、上述のように、小胞体膜画分を用いた研究ではほとんど候補を絞り込むことができていない。このような背景から、まず、膜タンパク質のどのような性質がスクランブラーゼ活性を生み出すのかについて明らかにすることで（第一章、第二章）、その情報をもとにスクランブラーゼ活性を予測し、候補を絞り込むことができるのではないか（第三章）と考えた。フリップフロップを促進する物理化学的性質として、スクランブラーゼの構造からフリップフロップ促進に寄与することが示唆されている



膜貫通領域の親水性アミノ酸残基、膜貫通領域と脂質二重層の hydrophobic matching、タンパク質の構造変化に伴う膜貫通領域の揺らぎという 3 つの性質を考え、モデル膜貫通ペプチド、カリウムチャネル potassium crystallographically-sited activation channel (KcsA) を用いて検討を行った。KcsA は細菌の細胞膜タンパク質であるが、その構造について多くの知見が存在するため<sup>25-27</sup>、膜タンパク質の構造変化や膜との相互作用が、フリップフロップにどのような影響を与えるのかを評価するためのモデルタンパク質として用いた。第一章、第二章では、ペプチドや膜タンパク質と脂質二重層の相互作用を詳細に解析するため、膜厚などの物理化学的性質が明らかになっており、かつ、生体膜の主要構成成分である POPC をモデル膜として用いた。ただし、POPC のみのモデル膜で見られた活性が、脂質組成の大きく異なる小胞体膜においても発現するかどうかは不明である。そのため、第三章においてスクランブラーゼ候補を絞り込む際には、小胞体膜のリン脂質組成を模倣したモデル膜を用いた。また、第三章では、コレステロールの効果について検討することで、第一章、第二章で明らかにした POPC 膜においてフリップフロップを促進する物理化学的性質が、小胞体膜においてのみ活性を発現するものなのかについて評価した。

第一章では、モデル膜貫通ペプチドの配列中央に配置した親水性度の高いアミノ酸残基が、フリップフロップを促進するのに重要であることを見出した。さらに、ヒト小胞体膜タンパク質の膜貫通領域の中央付近には、フリップフロップ促進能をもつと考えられるアミノ酸残基が、7%程度存在することが示された。また、ペプチドの疎水性部分の長さが脂質二重層の疎水性領域の長さより短いペプチドが、フリップフロップ促進能を有することが明らかとなった。第二章では、カリウムチャネル KcsA が開構造をとるとき、そのフリップフロップ促進能が増大することが示された。KcsA の膜貫通領域の長さが開構造で短くなるのが、フリップフロップ促進能増大の理由であると考えられた。第三章では、第一章で得られた知見をもとに、フリップフロップの促進に重要なアミノ酸残基が膜貫通領域の中央付近に存在するヒト小胞体膜タンパク質のうち、一回膜貫通タンパク質の膜貫通配列ペプチドを合成し、そのフリップフロップ促進能を評価した。その結果、endoplasmic reticulum degradation-enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein 1 (EDEM1) というタンパク質の膜貫通配列ペプチドが顕著なフリップフロップ促進能を有していたため、EDEM1 が小胞体膜スクランブラーゼとして機能している可能性が示された。また、EDEM1 ペプチドの活性が高いコレステロール含量で阻害されたことから、EDEM1 と同様の性質を有するタンパク質が細胞膜に存在しても、その活性は抑制されることが示唆された。

# 本論

## 第一章 モデル膜貫通ペプチドによるフリップフロップの制御

### 第一節 序

リン脂質がフリップフロップするには、脂質二重層の炭化水素領域を通過しなければならない。親水性の頭部基が水に露出した状態よりも、極性の低い炭化水素領域に存在する状態の方が不安定であることが、フリップフロップの主なエネルギー障壁であると考えられる。したがって、脂質膜中の極性を上昇させるか、膜厚を薄くすることで、フリップフロップを促進することができると考えられる。本章では、これらの性質を膜に与えるペプチドが、モデル膜においてフリップフロップを促進するのかを評価することで、小胞体膜スクランブラーゼ候補の絞り込みに用いることができる知見の解明を試みた。

細胞膜スクランブラーゼの膜貫通領域には、親水性アミノ酸残基が密集した領域が存在する。このことから、膜タンパク質の膜貫通配列中に親水性アミノ酸残基が存在すれば、膜中に極性環境を提供し、フリップフロップを促進することができるのではないかと考えた。そこで、POPC のフリップフロップ促進能を持たない KALP23<sup>5</sup> [Ac-GKKL(AL)<sub>8</sub>KKA-NH<sub>2</sub>] というペプチドの配列を元にして、配列中央に配置した親水性アミノ酸残基の効果を評価するためのペプチドをデザインした (図 2)。

膜貫通ペプチドの疎水性部分の長さが、膜の疎水性領域の長さとは異なると、双方の疎水性部分が水中に露出しないよう、ペプチド近傍の膜が変形することや、ペプチドが膜法線に対して傾くことが知られている (この現象は **hydrophobic matching** と呼ばれる)<sup>28</sup>。特に、ペプチドの長さが膜よりも短い **negative mismatch** では、ペプチド近傍の膜が薄くなるため、フリップフロップする際に頭部基が通過しなければならない疎水性領域の長さが短くなると考えられる。**Hydrophobic matching** がフリップフロップに与える影響を評価するため、上述の配列中央に Gln を配置した TMP23Q の配列を元にして、種々の長さのペプチドをデザインした (図 3)。

POPC からなる **large unilamellar vesicle (LUV)** に各ペプチドを組み込み、中性子小角散乱法と蛍光分光法を用いて、ペプチドのフリップフロップ促進能を評価した。

TMP23K	Ac-GKKLALALALAKWLALALALKKA-NH <sub>2</sub>
TMP23E	Ac-GKKLALALALAEWLALALALKKA-NH <sub>2</sub>
TMP23Q	Ac-GKKLALALALAQWLALALALKKA-NH <sub>2</sub>
TMP23N	Ac-GKKLALALALANWLALALALKKA-NH <sub>2</sub>
TMP23H	Ac-GKKLALALALAHWLALALALKKA-NH <sub>2</sub>
TMP23P	Ac-GKKLALALALAPWLALALALKKA-NH <sub>2</sub>
TMP23Y	Ac-GKKLALALALAYWLALALALKKA-NH <sub>2</sub>
TMP23S	Ac-GKKLALALALASWLALALALKKA-NH <sub>2</sub>
TMP23T	Ac-GKKLALALALATWLALALALKKA-NH <sub>2</sub>
TMP23L	Ac-GKKLALALALALWLALALALKKA-NH <sub>2</sub>

図 2. 親水性アミノ酸残基の効果进行评估するためにデザインしたペプチドの配列

TMP31Q	Ac-GKKLALALALALALALALALALALALALALALALALKKA-NH <sub>2</sub>
TMP27Q	Ac-GKKLALALALALALALALALALALALALALALALKKA-NH <sub>2</sub>
TMP25Q	Ac-GKKALALALALALALALALALALALALALAKKA-NH <sub>2</sub>
TMP23Q	Ac-GKKLALALALALALALALALALALALALALALKKA-NH <sub>2</sub>
TMP19Q	Ac-GKKLALALALALALALALALALALALALALALKKA-NH <sub>2</sub>

図 3. 種々の長さのペプチドの配列

## 第二節 合成したペプチドの膜貫通評価

親水性アミノ酸残基と、ペプチドと膜の hydrophobic matching がフリップフロップに与える影響を評価するために、図 2、3 のペプチドを合成した。これらのペプチドには、蛍光を使ってペプチドの膜貫通評価を行うために、中央の残基の C 末端側に Trp 残基を配置した。LUV 中におけるペプチドのトポロジーを評価するために、アクリルアミドによるトリプトファン蛍光消光実験を行った。ペプチドが膜貫通配向をとり、Trp 残基が膜中央に存在するのならば、水溶性の消光剤であるアクリルアミドは、Trp 残基に近づくことができず、トリプトファン蛍光を消光できないと考えられる。アクリルアミド濃度に対して、 $F_0/F$  値をプロットしたグラフを図 4 に示した。Stern-Volmer 定数 ( $K_{sv}$ ) は、TMP23L、TMP23K、TMP23E に対してそれぞれ、2.2、1.1、2.0 であった。これらの値は水溶液中のトリプトファンに対する値 (13.4) よりも十分小さく、ペプチド中央の Trp 残基は膜に深く埋まっていることが示唆された。

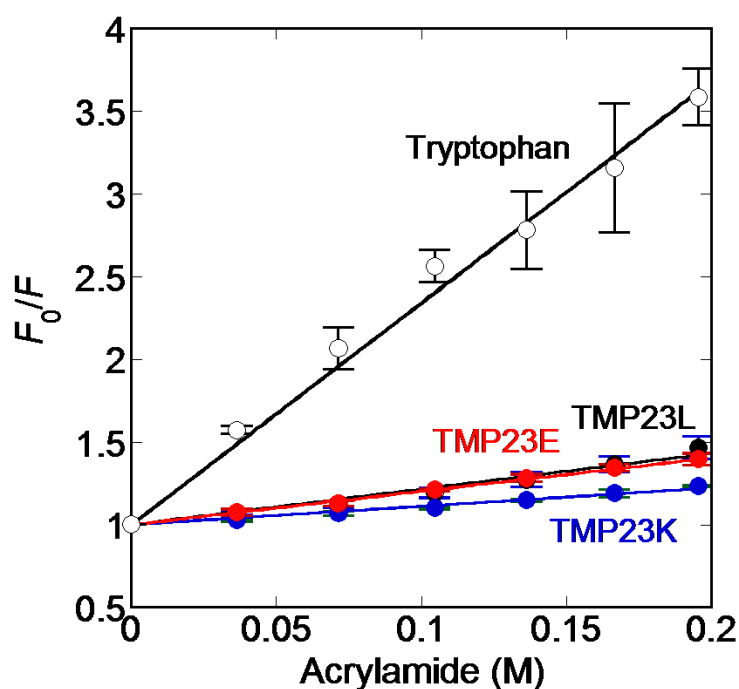


図 4. アクリルアミドによるトリプトファン蛍光消光の Stern-Volmer プロット  
ペプチド (TMP23L、TMP23K、TMP23E、ペプチド/脂質比は 0.4 mol%) もしくは  
トリプトファン 10  $\mu$ M の条件で、蛍光を測定した (25 $^{\circ}$ C、平均値 $\pm$ 標準偏差、n =  
3)。

次に膜挿入型の消光剤 *n*-(9-anthroyloxy)stearic acid (*n*-AS) (*n* = 2、6、12) を用いて、ペプチドのトポロジーを評価した。*n*-AS は蛍光共鳴エネルギー移動によってトリプトファン蛍光を消光するため、Trp 残基と *n*-AS の anthroyloxy 基の距離が小さくなるほど、

効率的に消光が起こる。脂質二重層中での *n*-AS の anthroyloxy 基の位置は、*n* の数が大きくなるほど、膜中央に近づく。したがって、ペプチドが膜貫通の配向をとっている場合、*n*-AS の *n* の数が大きくなるにつれて、トリプトファン蛍光がより消光されると考えられる。TMP23L、TMP23K に対しては、より *n* の数の大きい *n*-AS の存在下で、トリプトファン蛍光強度がより効果的に減少したため、これらのペプチドの Trp 残基は膜中央に存在することが示唆された (図 5 A)。一方、TMP23E の場合は、異なった消光プロファイルが見られた。*n*-AS による消光効率が、他の 2 つのペプチドの場合よりも高く、さらに、2-AS と 12-AS の存在下で、顕著な消光が見られた。このような高効率な消光から、TMP23E と *n*-AS が複合体を形成していることが示唆される。*n*-AS と TMP23E の Glu 残基の 2 つのカルボキシル基の間で、水素結合が形成されていると考えられる (図 5 B)。水素結合は水中ではあまり効果的ではないが、極性の低い環境では強められることを考慮すると、この結果も、Glu 残基を中央に有する TMP23E が、膜貫通の配向であることを支持するものである。

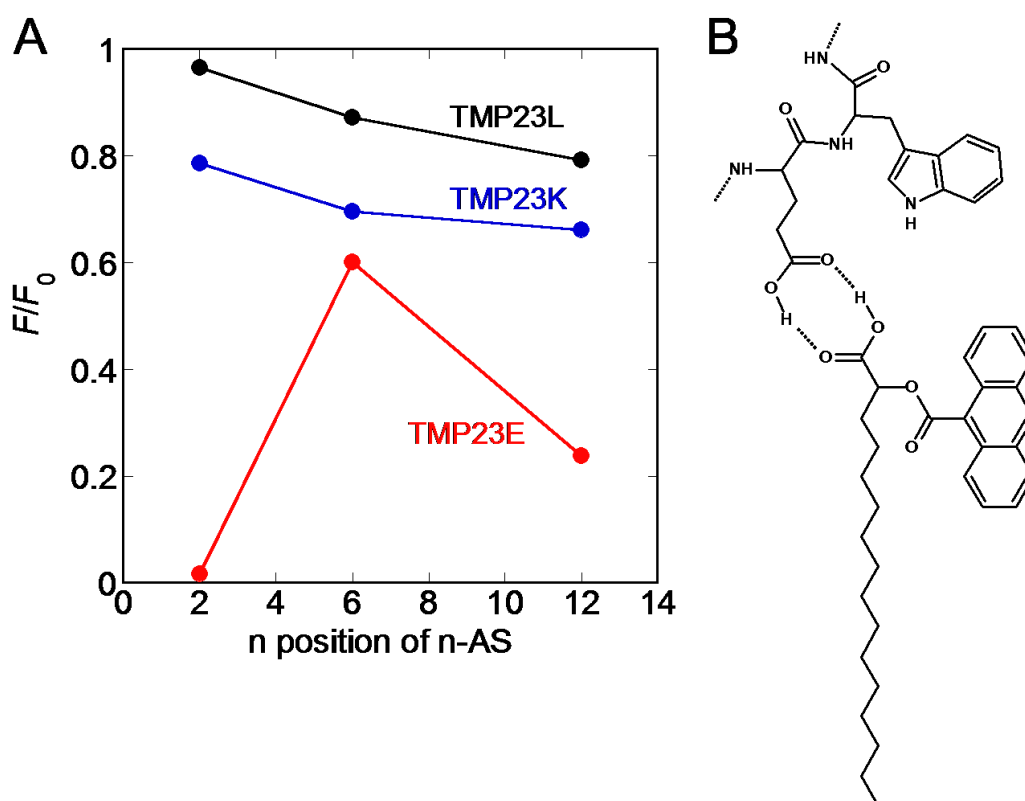


図 5. (A) *n*-AS (0.5 mol%) による POPC LUV (1 mM) 中にあるペプチド (0.1 mol%) のトリプトファン蛍光の消光 (25°C)。 (B) 脂質二重層中における *n*-AS と TMP23E の 2 つのカルボキシル基間の、推定される複合体モデル。

続いて、TMP23K、TMP23E、TMP23L 以外のペプチドについても LUV 中の構造を評価した。LUV 中のペプチドの二次構造を circular dichroism (CD) スペクトルから評価したところ、すべてのペプチドにおいて、 $\alpha$ ヘリックス構造に特徴的なスペクトルが観測された (図 6)。しかし、TMP23P、TMP19Q の  $\alpha$ ヘリックス含有率は、他のペプチドと比較して、低い値であった (表 1)。TMP23P については、中央の Pro 残基により  $\alpha$ ヘリックス構造形成が阻害されるためであると考えられる。TMP19Q については、膜とペプチドの疎水部の長さの mismatch が大きすぎるために、ペプチドが膜貫通配向をとっていない可能性が推察された<sup>29</sup>。

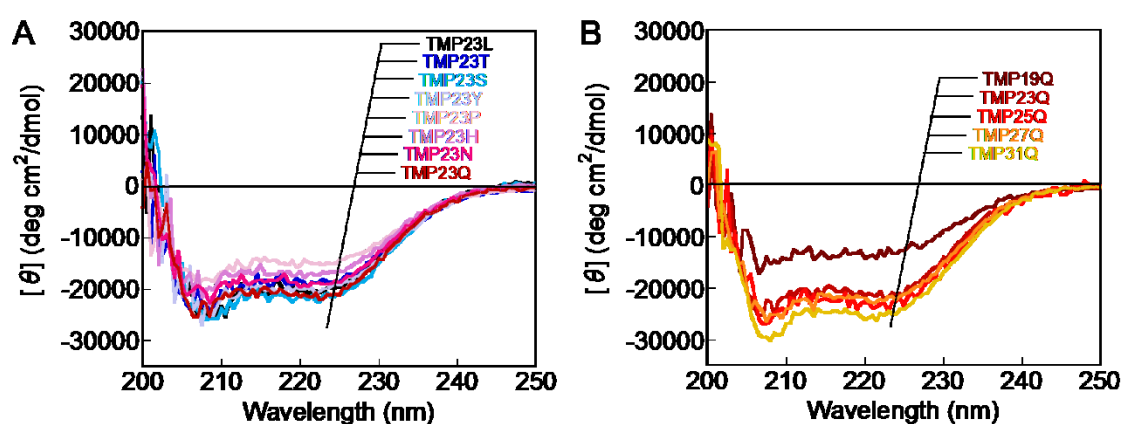


図 6. Small unilamellar vesicle (SUV) 中のペプチド (1 mol%) の CD スペクトル。

表 1 SUV 中のペプチドの  $\alpha$ ヘリックス含有率

Peptide	$\alpha$ -Helix Content (%)
TMP23L	60
TMP23T	54
TMP23S	64
TMP23Y	59
TMP23P	42
TMP23H	48
TMP23N	55
TMP23Q	63
TMP19Q	36
TMP25Q	70
TMP27Q	66
TMP31Q	76

ペプチドのトポロジーを評価するため、1-palmitoyl-2-stearoyl-(*n*-doxyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (*n*-doxyl-PC) (*n* = 5, 10, 16) によるトリプトファン蛍光の消光実験を行った (図 7)。Doxyl 基は Trp 残基と衝突することにより、その蛍光を消光するため、doxyl 基による消光は数 Å の距離で起こる<sup>30</sup>。そのため、*n*-doxyl-PC は、膜中での蛍光分子の位置を評価するために用いられている<sup>31</sup>。脂質二重層中での *n*-doxyl-PC の doxyl 基の位置は、*n* の数が大きくなるほど、膜中央に近づく。したがって、上述の *n*-AS の場合と同様に、ペプチドが膜貫通の配向をとっている場合、*n*-doxyl-PC の *n* の数が大きくなるにつれて、トリプトファン蛍光がより消光されると考えられる。2 種類の *n*-doxyl-PC によるトリプトファン蛍光の消光度合いから、parallax 法<sup>31</sup>を用いて、Trp 残基の膜中での位置を見積もった。結果を表 2 に示す。TMP23Q、TMP23N、TMP25Q、TMP27Q、TMP31Q において、Trp 残基の膜中央からの距離が 4.7–6.0 Å であったことから、Trp 残基が膜中央付近に存在することが示唆された。それに対して TMP19Q では、7.9 Å と見積もられており、CD スペクトルの結果と合わせて、TMP19Q は、定量的には、膜貫通の配向をとっていないと考えられる。中央に Lys、Glu、Gln、Asn 以外の親水性アミノ酸残基を配置した 23 残基のペプチド (TMP23H、TMP23P、TMP23Y、TMP23S、TMP23T) については、LUV 中のペプチドのトリプトファン蛍光スペクトルを測定したところ、すべてのペプチドにおいて、TMP23K、TMP23E、TMP23Q よりもブルーシフトしたスペクトルが観測された (図 8)。この結果は、これらのペプチドの Trp 残基が、膜貫通配向である TMP23K、TMP23E、TMP23Q の Trp 残基よりも極性の低い環境にあることを示していることから、これらのペプチドも膜貫通の配向をとっていると考えられる。

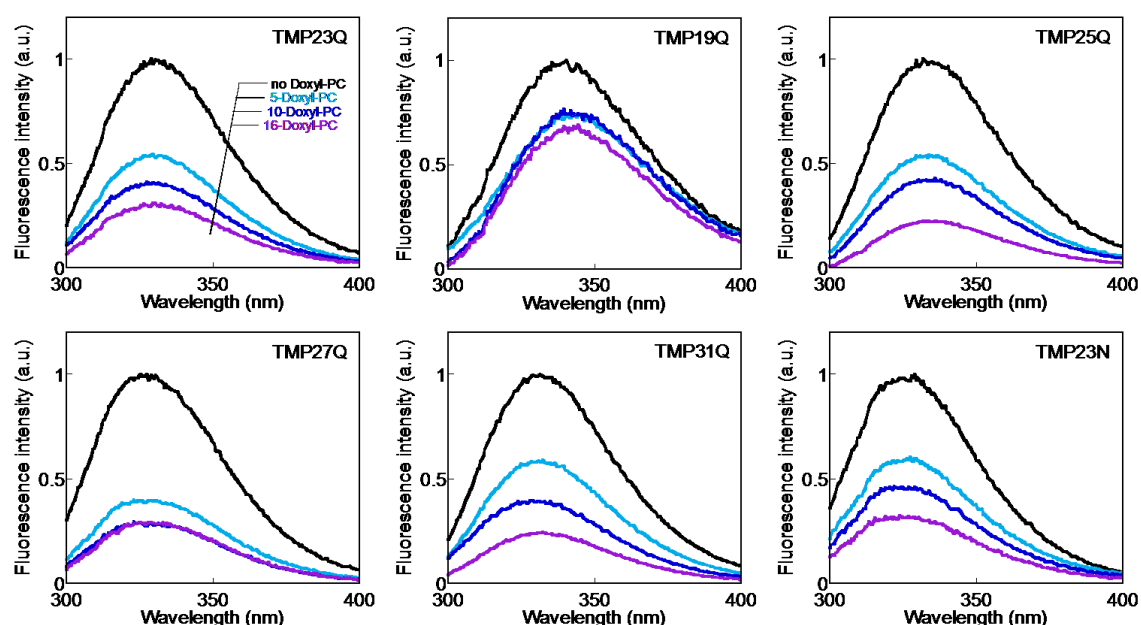


図 7. *n*-Doxyl-PC 存在下、非存在下における、LUV 中のペプチド (1 mol%) のトリプトファン蛍光スペクトル (25°C)。

表2 ペプチドの Trp 残基の膜中での位置

Peptide	<i>n</i> -Doxyl-PC pair used for analysis	Distance from bilayer center (Å) <sup>a</sup>	Average distance (Å)
TMP23Q <sup>b</sup>	5-10	4.9	5.6
	5-16	6.2	
TMP23N <sup>b</sup>	5-10	5.0	5.5
	5-16	6.0	
TMP19Q	5-10	9.1	7.9
	5-16	8.1	
	10-16	6.5	
TMP25Q <sup>b</sup>	5-10	5.1	5.0
	5-16	5.0	
TMP27Q <sup>b</sup>	5-10	4.7	6.0
	5-16	7.3	
TMP31Q <sup>b</sup>	5-10	4.5	4.7
	5-16	4.9	

<sup>a</sup>Trp 残基の膜中央からの距離は parallax 法<sup>31</sup>により見積もった。POPC 膜の疎水性領域の厚さが 25.8 Å であることから<sup>32</sup>、5、10、16-doxyl-PC における doxyl 基の膜中央からの距離を、それぞれ、10.6、6.68、2.00 Å であると仮定した。

<sup>b</sup>これらのペプチドのトリプトファン蛍光が、二重層の両側に存在する 10、16-doxyl-PC によって消光される可能性が見積もられたため<sup>31</sup>、5-10、5-16 のデータのみで評価した。



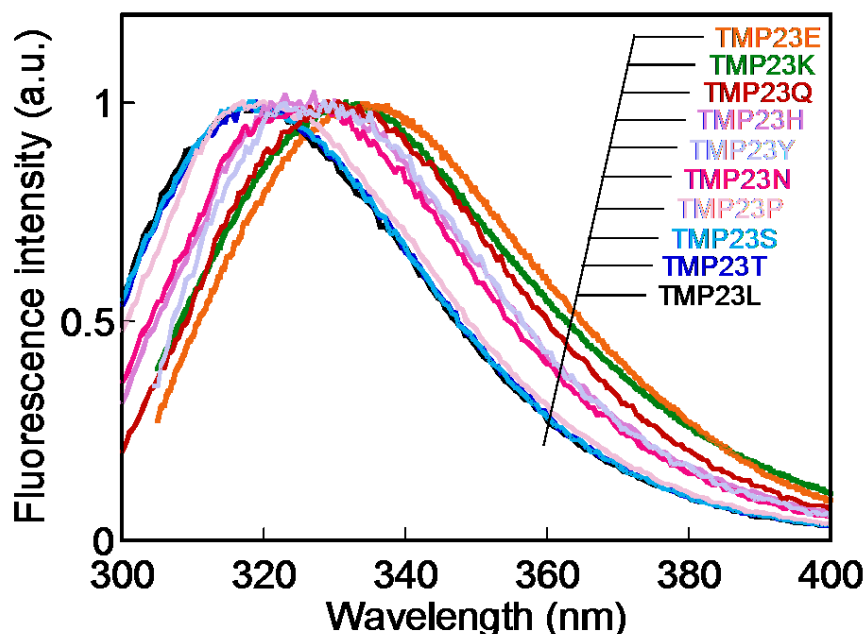


図 8. POPC LUV 中のペプチド(1 mol%)のトリプトファン蛍光スペクトル(25°C)。TMP23Y の場合は 295 nm、それ以外は 280 nm の励起光を用いた。

上述の結果から、TMP19Q 以外のペプチドが、LUV 中で膜貫通していることが推察されたが、Trp 残基の蛍光スペクトルと蛍光異方性のデータから、親水性アミノ酸残基を配置したペプチドにおいて、Trp 残基近傍の環境がペプチドごとに異なることが明らかになった。LUV 中にある TMP23L のトリプトファン蛍光スペクトルと比較して、親水性アミノ酸残基を配置したペプチドでは、蛍光極大波長のレッドシフトが見られた(図 8)。この蛍光極大波長のレッドシフトは、極性残基が膜貫通ペプチドの中央に存在することで、おそらくその周囲に水分子が透過しやすくなり、ペプチド中央付近の極性が上昇したことを示唆するものである。また、LUV 中にある TMP23K、TMP23E の Trp 残基の定常蛍光異方性( $r_s$ )が、TMP23L よりも小さい値であったことから、TMP23K、TMP23E の Trp 残基の運動性が上昇していることが示唆された(図 9)。これらの結果から、膜貫通領域に極性残基が存在することで、ペプチド周囲の膜環境が大きく変化することが明らかになった。

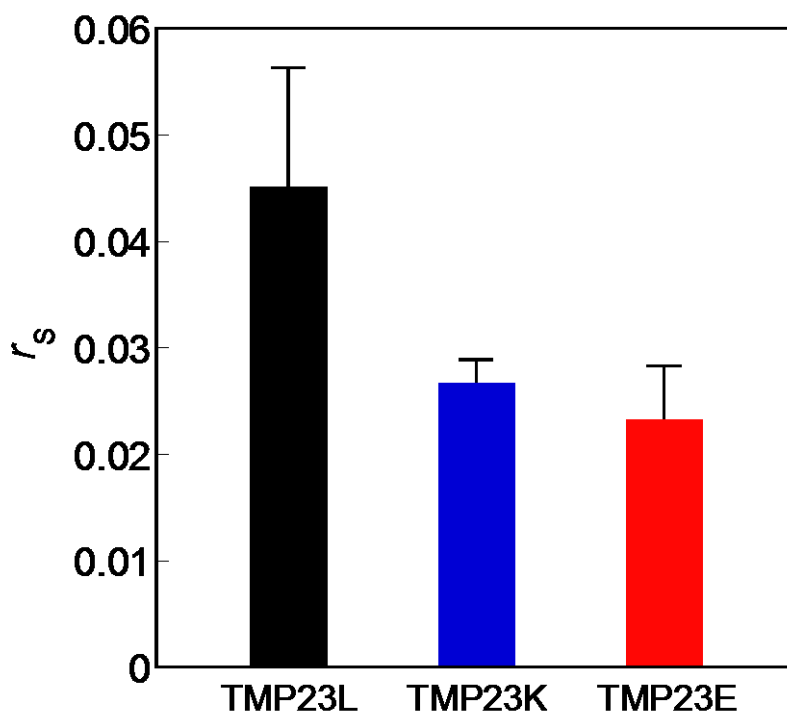


図 9. POPC LUV 中にあるペプチド (0.4 mol%) の Trp 残基の定常蛍光異方性 (25°C、平均値±標準偏差、n = 3)。

### 第三節 親水性アミノ酸残基を配置したペプチドのフリップフロップ促進能の評価

時間分解中性子小角散乱法により POPC のフリップフロップを測定することで、ペプチドのフリップフロップ促進能を評価した。時間分解中性子小角散乱法では、POPC からなる H-LUV と、パルミトイル鎖が重水素化された  $d_{31}$ -POPC からなる D-LUV を用いて、これらの混合物による中性子散乱強度から規格化コントラストを計算し、その減少プロファイルを調べることで POPC のフリップフロップを評価する。ペプチド非存在下では、規格化コントラストが約 0.6 のプラトー値に達した (図 10)。この結果は、methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) 依存的な脂質交換のみが起こり、POPC が自発的なフリップフロップを起こさなかったことを示唆しており、これは以前の結果と一致している<sup>5</sup>。TMP23L を LUV に組み込んだ場合でも、脂質のみの POPC LUV と比較して、コントラスト減少プロファイルはほとんど変化しなかった。以前の研究において、TMP23L 配列の Trp 残基の位置に Ala 残基を有する KALP23 が POPC のフリップフロップを促進しなかったことから<sup>5</sup>、膜貫通ヘリックスの中央に Trp 残基を配置することはフリップフロップに影響を与えないと考えられる。一方、TMP23K、TMP23E の場合には、規格化コントラストが 0.5 を下回ったことから、この 2 つのペプチドは POPC のフリップフロップを促進することが明らかになった。参考文献<sup>5</sup>の式を用いて減衰曲線をフィッティングすることで、TMP23K、TMP23E 存在下のフリップフロップ速度定数 ( $k_f$ ) として、

それぞれ、 $3.0 \times 10^{-3}$ 、 $4.3 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  という値が得られた。これらの結果から、脂質二重層の疎水性領域に親水性アミノ酸残基が存在することで、フリップフロップが促進されることが示唆された。

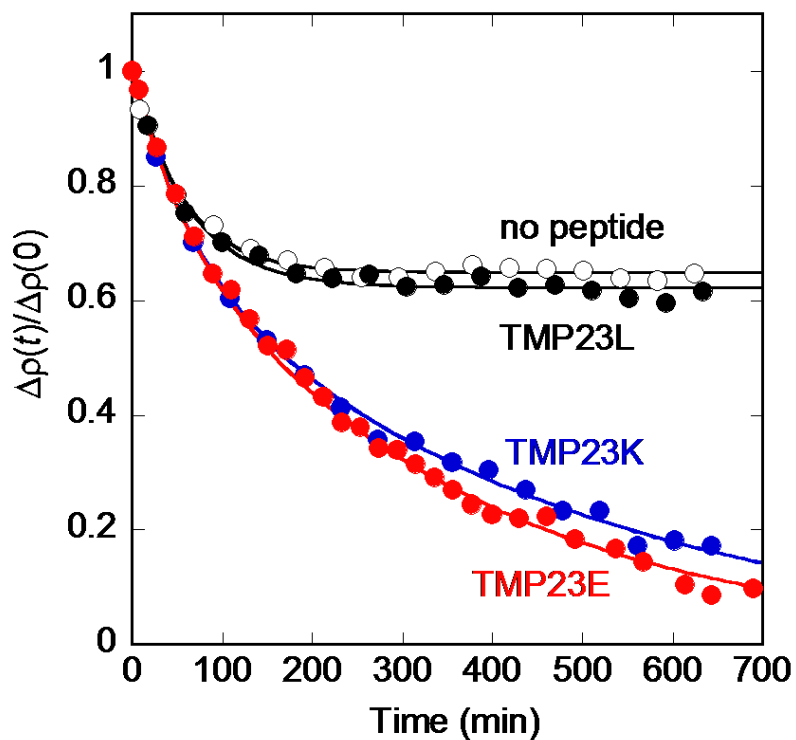


図 10. 中性子小角散乱強度から得られた規格化コントラスト減衰曲線  
脂質のみ、もしくは、0.4 mol%のペプチドを組み込んだ H-LUV と D-LUV の混合物  
(30 mM) に、1 mM の M $\beta$ CD を加えて測定した (37°C)。

中性子小角散乱法を用いた測定は、自然に存在する未修飾のリン脂質のフリップフロップを評価できるという点で有益なものであるが、測定可能なフリップフロップ速度が、M $\beta$ CD による脂質交換速度によって制限されてしまう。そこで、7-nitro-2-1,3-benzoxadiazole (NBD) ラベル化リン脂質を用いて、ペプチド依存的なフリップの測定を行った。内側に移行した NBD ラベル化リン脂質の割合 ( $\Phi_{\text{inner}}$ ) を、膜不透過な消光剤 dithionite 添加前後の蛍光強度比、 $F/F_0$  によって評価した。この測定法は、LUV 間の脂質交換に影響されない。 $\Phi_{\text{inner}}$  の時間変化 (図 11 A、B、D) を (9) 式を用いてフィッティングすることで、フリップ速度定数 ( $k_{\text{flip}}$ ) を得た (図 11 C、表 3)。0.1 mol% の TMP23L 存在下で、1-palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-sn-glycero-3-phosphocholine (C<sub>6</sub>NBD-PC) のフリップ速度は、ペプチド非存在下の場合と比べて、ほぼ変化しなかった。これは、時間分解中性子小角散乱法の結果と同様に、TMP23L が PC のフリップに影響しないことを示唆している。親水性度 (hydropathy index<sup>33</sup>) の低いアミノ酸残基を中央に配置したペプチド、TMP23S、TMP23T の存在下では、ペプチド非存在下の場合と比べて、フリップ速度が 2-3 倍程度であった。それに対して、親水性度の高いアミノ酸残基のペプチド (TMP23K、TMP23Q、TMP23N、TMP23H) は、フリップ速度を 10 倍以上に増加させた。さらに、TMP23E の存在下では、速度が速すぎたために正確な  $k_{\text{flip}}$  を求めることができなかったが、フリップ速度は、少なくとも非存在下の 10 倍以上であった。これらの結果から、中央に配置したアミノ酸残基の親水性度が高いほど、ペプチドのフリップ促進能が高くなることが明らかになった。

ペプチドに配置した酸性と塩基性の残基が、異なる頭部基を持つ脂質のフリップフロップに、異なる影響を与えるかどうかを評価するために、酸性リン脂質である 1-palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-sn-glycero-3-phosphoglycerol (C<sub>6</sub>NBD-PG) のフリップを測定した (図 11 D、表 3)。C<sub>6</sub>NBD-PG の場合、ペプチド非存在下においても、ある程度の速度で自発的なフリップが観測された ( $k_{\text{flip}} = 45 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ )。この結果は、時間分解中性子小角散乱法において、1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (POPG) の自発的なフリップフロップが観測されたことと一致している (data not shown)。C<sub>6</sub>NBD-PC の場合と同様に、TMP23L は C<sub>6</sub>NBD-PG のフリップ速度にほぼ影響しなかった。興味深いことに、TMP23E は、C<sub>6</sub>NBD-PC のフリップを顕著に促進したが、C<sub>6</sub>NBD-PG のフリップ速度は上昇させなかった。対照的に、TMP23K は C<sub>6</sub>NBD-PG のフリップ速度を 6.6 倍に増加させた。

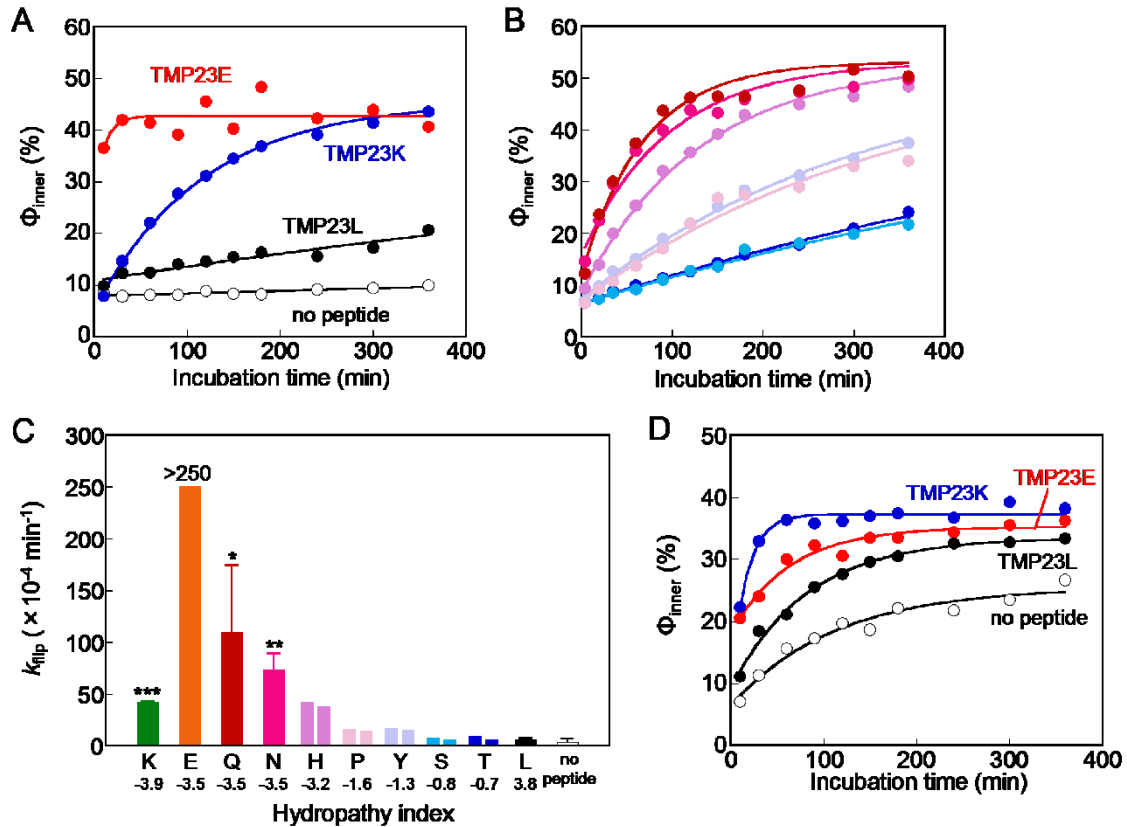


図 11. (A, B) 0.1 mol% のペプチドを含む POPC LUV、もしくは脂質のみの POPC LUV における  $C_6\text{NBD-PC}$  のフリップ測定 ( $37^\circ\text{C}$ )。 (A) TMP23K (●)、TMP23E (●) TMP23L (●)、no peptide (○)。 (B) TMP23Q (●)、TMP23N (●)、TMP23H (●)、TMP23P (●)、TMP23Y (●)、TMP23S (●)、TMP23T (●)。 (C) 0.1 mol% のペプチドを含む POPC LUV、もしくは脂質のみの POPC LUV における  $C_6\text{NBD-PC}$  のフリップ速度定数 ( $37^\circ\text{C}$ )。エラーバーは標準偏差を表す ( $n=3-5$ )。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$  は no peptide に対する有意差。 (D) 0.025 mol% のペプチドを含む POPC LUV、もしくは脂質のみの POPC LUV における  $C_6\text{NBD-PG}$  のフリップ測定 ( $37^\circ\text{C}$ )。

表3 ペプチド存在下、非存在下における C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PG のフリップ速度定数 (37°C、平均値±標準偏差、n = 3-5)

Lipid	Peptide (mol%)	$k_{\text{flip}} (\times 10^{-4} \text{ min}^{-1})$
C <sub>6</sub> NBD-PC	No peptide	3.8 ± 3.2
	TMP23L (0.1)	6.0 ± 2.0
	TMP23K (0.1)	42 ± 1.3
	TMP23E (0.1)	> 250
	TMP23Q (0.1)	110 ± 65
	TMP23N (0.1)	73 ± 16
	TMP23H (0.1)	42, 38
	TMP23P (0.1)	16, 14
	TMP23Y (0.1)	18, 16
	TMP23S (0.1)	8.1, 5.8
	TMP23T (0.1)	10, 6.3
C <sub>6</sub> NBD-PG	No peptide	45
	TMP23L (0.025)	60
	TMP23K (0.025)	300
	TMP23E (0.025)	80

#### 第四節 種々の長さのペプチドのフリップフロップ促進能の評価

次に、hydrophobic matching がフリップフロップに与える影響を評価するために、中央に Gln 残基を配置した、疎水部の長さの異なるペプチドのフリップフロップ促進能を評価した (図 12)。興味深いことに、TMP27Q、TMP31Q は、TMP23Q とは異なり、フリップ促進能を示さなかった (図 12 B)。この結果から、hydrophobic matching の違いがペプチドのフリップフロップ促進能に影響する可能性が示唆された。

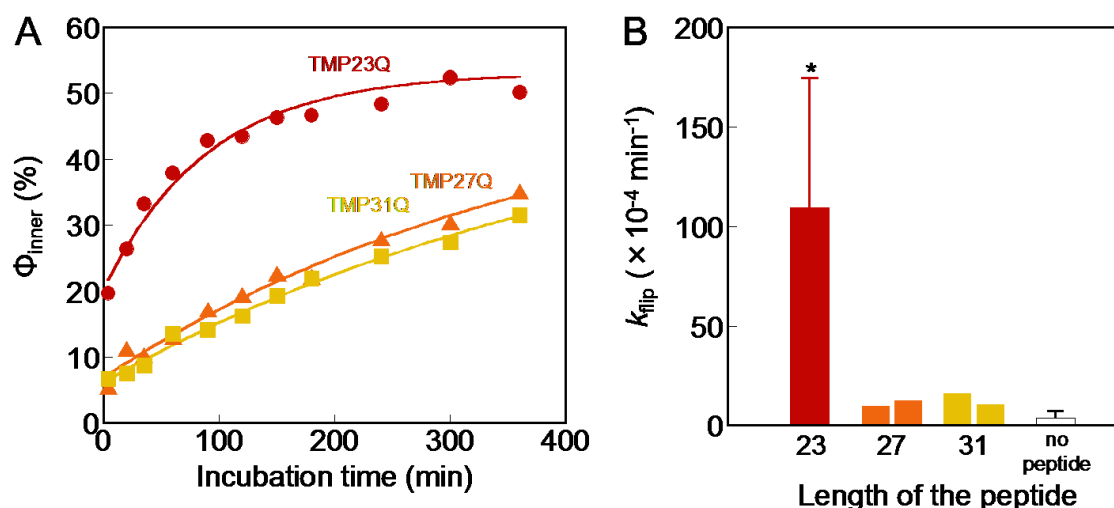


図 12. (A) 0.1 mol%のペプチドを含む POPC LUV における C<sub>6</sub>NBD-PC のフリップ測定 (37°C)。 (B) 0.1 mol%のペプチドを含む POPC LUV、もしくは脂質のみの POPC LUV における C<sub>6</sub>NBD-PC のフリップ速度定数 (37°C)。エラーバーは標準偏差を表す (n = 4 or 5)。\* $p < 0.05$  は no peptide に対する有意差。

TMP23Q と TMP27Q の間でフリップ促進能が大きく変化したため、TMP23Q と TMP27Q の中間の長さである TMP25Q を合成し、そのフリップ促進能を評価した。しかし、他のペプチドの場合は、dithionite 添加後、二相性の減衰曲線が得られるのに対して、TMP25Q を 0.1 mol% 組み込んだ POPC LUV では、単相性の減衰曲線が得られたため、(1) 式を用いて  $\Phi_{\text{inner}}$  値を見積もることが困難であった (図 13)。TMP25Q が膜透過性に与える影響を評価するため、カルセインの漏出実験を行った (図 14)。その結果、0.1 mol% TMP25Q の POPC LUV では、測定時間内にほとんどのカルセインが漏出した。TMP25Q の濃度を 0.033 mol% まで下げると、0.1 mol% の TMP23Q、TMP23N と同様に、あまり漏出は見られなかった。そこで、LUV 中の TMP25Q の濃度を 0.033 mol% まで下げると、二相性の減衰が見られたため (図 13)、この濃度以下で TMP25Q のフリップ促進能を評価した (図 15)。TMP25Q と比較するため、TMP23Q、TMP23N についても、低濃度でのフリップ促進能を評価した (図 15)。その結果、TMP25Q は、低濃度において、TMP23Q と同程度のフリップ促進能を持つことが明らかになった。MD シミュレー

ションを用いて脂質二重層中のペプチド (TMP23Q、TMP23L、TMP25Q、TMP27Q) の状態を調査したところ、TMP25Q 以外のペプチドは膜法線に対して  $10^\circ$  傾いていたのに対して、TMP25Q は  $25^\circ$  傾いていた (data not shown)。この結果から、膜中における傾きの違いが、ペプチドの会合状態などに影響し、TMP25Q によるカルセインの漏出に関与したのではないかと考えられる。また、TMP23Q、TMP23N のフリップ促進能が、それぞれの濃度に対して線形であったことから、これらのペプチドは単量体でフリップを促進していることが示唆された (図 15 B)。

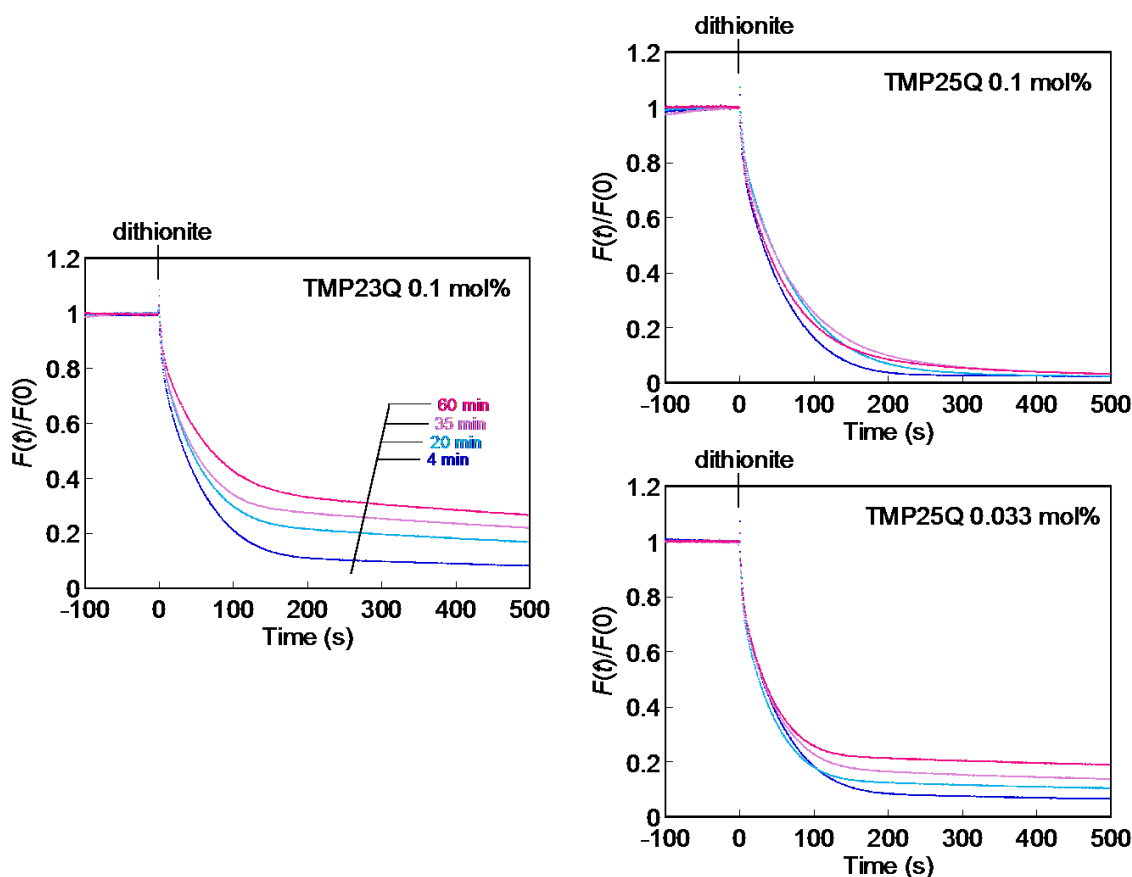


図 13.  $37^\circ\text{C}$  で 4、20、35、60 分間インキュベーションした後の、ペプチドを含む POPC LUV 中の  $\text{C}_6\text{NBD-PC}$  蛍光の dithionite による減衰曲線 ( $25^\circ\text{C}$ )。Dithionite 添加後の蛍光強度  $F(t)$  を、添加前の蛍光強度  $F(0)$  で規格化した後、 $F(t)/F(0)$  を次式でフィッティングすることにより、 $\Phi_{\text{inner}}$  値を見積もった。

$$F(t)/F(0) = (1 - \Phi_{\text{inner}}) \exp(-k_1 t) + \Phi_{\text{inner}} \exp(-k_2 t) \quad k_1 > k_2 \quad (1)$$



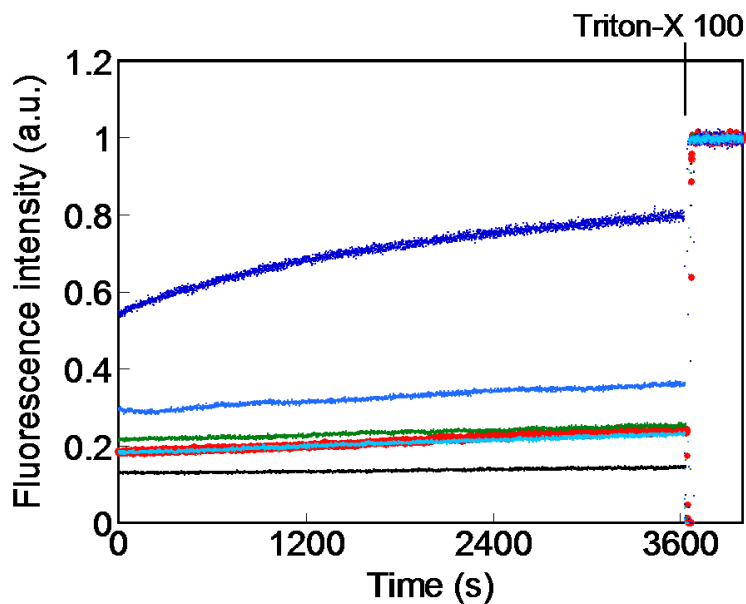


図 14. 0.033–0.1 mol%のペプチドを組み込んだ POPC LUV、もしくは脂質のみの POPC LUV に封入したカルセインの漏出実験 (25°C)。1 時間測定後に Triton-X 100 を 0.25 v/v%加えて、膜を可溶化した。TMP25Q 0.1 (青)、0.05 (薄青)、0.033 mol% (水色)、TMP23Q 0.1 mol% (赤)、TMP23N 0.1 mol% (緑)、no peptide (黒)

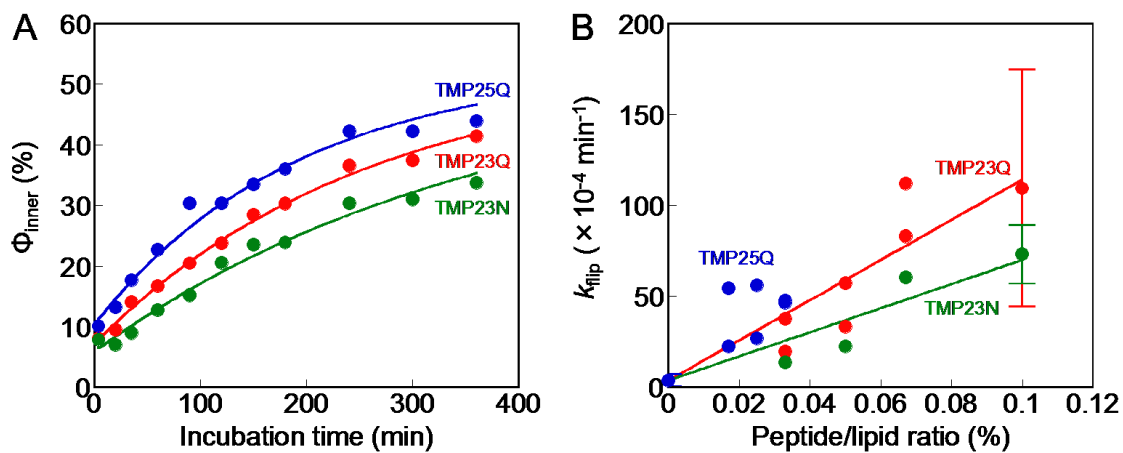


図 15. (A) 0.033 mol%のペプチドを含む POPC LUV における  $C_6$ NBD-PC のフリップ測定 (37°C)。 (B) 0–0.1 mol%のペプチドを含む POPC LUV における  $C_6$ NBD-PC のフリップ速度定数 (37°C)。エラーバーは標準偏差を表す (n = 4 or 5)。

## 第五節 ヒト小胞体膜タンパク質の膜貫通領域のアミノ酸残基組成の評価

膜貫通領域に親水性アミノ酸残基がどの程度存在するのかを定量的に評価するため、Uniprot のデータベースからヒト小胞体膜タンパク質のアミノ酸配列を抽出し、膜貫通領域予測プログラム SOSUI を用いて、その膜貫通配列を予測した。膜貫通配列の中央 6、7 残基におけるアミノ酸残基の組成を表 4 に示した。予想されるように、疎水性のアミノ酸残基が多く見られたが、親水性度の高いアミノ酸残基 (Arg、Lys、Glu、Asp、Gln、Asn、His) が 7.3%存在した。

表 4 SOSUI で予測したヒト小胞体膜タンパク質の膜貫通配列中央 6、7 残基に存在するアミノ酸残基組成

Amino acid	Ratio (%)	Amino acid	Ratio (%)
Gly	6.644	Trp	1.955
Ala	9.437	Ser	5.561
Val	11.76	Thr	4.875
Ile	8.853	Asn	1.380
Leu	23.51	Gln	1.430
Met	2.615	Asp	0.719
Cys	3.030	Glu	0.956
Pro	2.666	His	0.965
Phe	8.769	Lys	0.863
Tyr	3.064	Arg	0.948

## 第六節 考察

シミュレーション研究において、親水性アミノ酸残基が脂質二重層中に存在すると、親水性アミノ酸残基の側鎖を水和させるために水分子が膜中に引き込まれ、**water defect** が形成されることが報告されている<sup>34,35</sup>。また、膜中に引き込まれる水分子数とアミノ酸残基の親水性度には、強い相関が見られている<sup>34</sup>。この **water defect** により疎水性領域の極性が上昇すること、及び、親水性アミノ酸残基と頭部基が極性相互作用することにより、リン脂質がフリップフロップする際の活性化エネルギーが減少し、フリップフロップが促進されるのではないかと仮定した。親水性度の高いアミノ酸残基を配置したペプチドは、二重層中央付近の極性を増大させ、かつ、POPC や蛍光脂質 C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PG のフリップフロップを促進した。親水性アミノ酸残基を配置したペプチドのフリップ促進能に対して、トリプトファン蛍光スペクトルのレッドシフト度合いをプロットすると相関が見られた（相関係数：0.73）（図 16）。このことから、ペプチド近傍の膜中央付近の極性の増大により、リン脂質の頭部基が膜中を通過する際のエネルギーが減少し、フリップフロップが促進されたものと推察される。また、塩基性アミノ酸残基 Lys を配置した TMP23K、酸性アミノ酸残基 Glu を配置した TMP23E が、それぞれ、C<sub>6</sub>NBD-PG、C<sub>6</sub>NBD-PC のフリップをより促進したことから、荷電性アミノ酸残基と脂質頭部（リン酸基、4 級アンモニウム）の静電相互作用がフリップの促進に寄与していることが示唆された。

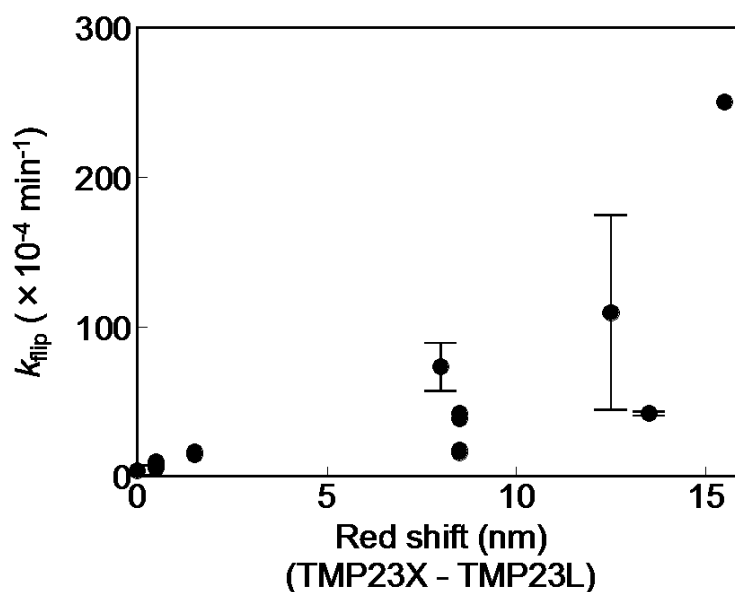


図 16. 各アミノ酸残基を配置したペプチドのトリプトファン蛍光スペクトルのレッドシフト度合いとフリップ促進能の比較。TMP23E を組み込んだ POPC LUV の  $k_{flip}$  は  $>250 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  だが、ここでは  $250 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  として、相関係数を算出した。エラーバーは標準偏差を表す ( $n = 3-5$ )。

ペプチドと膜の **hydrophobic matching** がフリップフロップに与える影響を調べるため、長さの異なるペプチドのフリップフロップ促進能を評価した。その結果、TMP27Q と TMP31Q は、フリップフロップを促進しなかったのに対して、TMP23Q、TMP25Q はフリップフロップ促進能を示した。 $\alpha$  ヘリックス構造では、1 残基ごとにヘリックスの長さが 1.5 Å 増加することを考慮し、それぞれのペプチドのヘリックス含有率から疎水部の長さを見積もると、TMP23Q、TMP25Q、TMP27Q、TMP31Q に対して、それぞれ、21.7、26.3、26.7、35.3 Å であった。活性に違いのある TMP25Q、TMP27Q の疎水部の長さに違いが見られないが、MD シミュレーションにおけるペプチドの膜法線に対する傾きを考慮すると、TMP23Q、TMP25Q、TMP27Q の膜法線方向の長さは、それぞれ、21.4、23.8、26.3 Å となる。POPC 膜の疎水性領域の厚さが 25.8 Å であることから<sup>32</sup>、TMP23Q、TMP25Q、TMP27Q、TMP31Q は POPC 膜に対して、それぞれ、**negative mismatch**、**negative mismatch**、**no mismatch**、**positive mismatch** であると考えられる。これらの結果から、今回デザインしたペプチドのフリップフロップ促進能に **negative mismatch** が重要な役割を果たしていることが示唆された。また、TMP27Q と TMP25Q の長さの違いは 3 Å 程度であると考えられるが、この程度のわずかな **mismatch** の違いでもフリップフロップ促進能に大きな差が見られた。これまでも、膜貫通ペプチドの長さの違いがフリップフロップ促進能に与える影響について研究が行われている。Langer らは、今回の結果と同様に、より短いペプチドがよりフリップフロップを促進することを明らかにしている<sup>36</sup>。一方、Kol らは、23 残基の KALP23 と 31 残基の KALP31 で、フリップフロップ促進能に差は見られなかったと報告している<sup>37</sup>。**Hydrophobic matching** は脂質膜の厚みにも影響されるため、Kol らの研究で用いられた膜 (*Escherichia coli* (*E. coli*) のリン脂質) の正確な厚みが分からない限り、詳細な比較は困難であるが、*E. coli* リン脂質膜と KALP23 の間で **negative mismatch** が生じていなかった可能性も考えられる。**Negative mismatch** のペプチドが膜中に存在すると、アシル鎖の配向性の減少に伴い、膜が薄くなる<sup>38</sup>。今回用いたペプチドの濃度は、膜全体の厚さを変えられるような濃度ではないが、ペプチド近傍の脂質はペプチドの長さに応じて変形するとすれば、脂質頭部が通過しなければならない疎水性領域の長さが短くなることにより、フリップフロップが促進されたと考えられる。親水性アミノ酸残基の結果と合わせて考えると、今回デザインしたペプチドのフリップフロップ促進能には、**negative mismatch** と中央の親水性度の高いアミノ酸残基の両方が必要であると考えられる (図 17)。

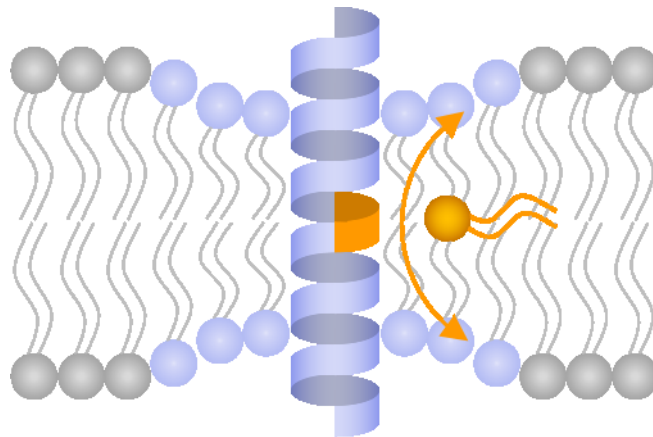


図 17. ペプチドによるフリップフロップ促進の模式図。

Negative mismatch によりペプチド近傍の膜が薄くなること、及び、配列中央の親水性度の高いアミノ酸残基によって炭化水素領域の極性が上昇することにより、活性化エネルギーが減少し、フリップフロップが促進されると考えられる。

ヒト小胞体膜タンパク質の膜貫通配列を予測し、配列中央付近のアミノ酸残基組成を算出したところ、親水性度の高いアミノ酸残基 (Arg, Lys, Glu, Asp, Gln, Asn, His) が 7.3%含まれていた。このことから、本章でデザインしたペプチドと同様の性質を有する膜タンパク質が、小胞体膜に存在する可能性が示唆された。これらの膜タンパク質が小胞体膜に対してどのような hydrophobic matching であるかは不明であり、また、膜中央付近に存在する親水性度の高いアミノ酸残基がヘリックス間の相互作用に関与し、炭化水素領域に露出していない可能性も考えられるが、今回の結果は、これらの残基を含む膜タンパク質がフリップフロップに関与する可能性を示唆するものである。

## 第七節 小括

本章では、膜貫通領域のどのような物理化学的性質が、リン脂質のフリップフロップを促進するのかを解明するため、時間分解中性子小角散乱法、蛍光分光法を用いて、様々な配列のモデル膜貫通ペプチドのフリップフロップ促進能を評価した。

その結果、膜貫通配列中央に親水性度の高いアミノ酸残基 (Lys, Glu, Gln, Asn, His) を配置したペプチドが、POPC、C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PG のフリップフロップを促進することが明らかになった。これらのペプチドを膜に組み込むことにより膜中央の極性が増大したこと、及び、リン脂質の親水性頭部基と荷電性アミノ酸残基の静電相互作用により、フリップフロップが促進されたと考えられる。

種々の長さのペプチドを用いた実験から、ペプチドの疎水性部分の長さが膜の疎水性領域の長さよりも短い、**negative mismatch** のペプチドがフリップフロップを促進することが明らかになった。**Negative mismatch** によってペプチド近傍の膜が薄くなることから、フリップフロップが促進された要因であると推察される。

以上の結果により、スクランブラーゼ活性を発現する膜貫通領域の物理化学的性質として、配列中央の親水性度の高いアミノ酸残基、及び、膜貫通領域と脂質二重層の **negative mismatch** という2つの性質が示された。また、プログラムで予測したヒト小胞体膜タンパク質の膜貫通配列中に親水性度の高いアミノ酸残基が 7.3%存在したことから、これらのタンパク質が小胞体膜スクランブラーゼの候補となる可能性が考えられる。

## 第二章 カリウムチャネル KcsA による pH 依存的な

### フリップフロップの促進

#### 第一節 序

KcsA は放線菌 (*Streptomyces lividans*) 由来のカリウムチャネルであり、リン脂質のフリップフロップを促進することが報告されている<sup>39</sup>。KcsA は原核生物由来のタンパク質ではあるが、カリウムチャネルは原核生物界、真核生物界に渡って、広範に分布しており、膜貫通領域の構造とゲーティング時の構造変化は、すべてのカリウムチャネルにおいて普遍的であると考えられている<sup>40</sup>。KcsA は、すべてのカリウムチャネルの中で、最初に結晶構造が明らかにされたタンパク質であり<sup>41</sup>、そのゲーティングの分子機構について広く研究が行われている<sup>25-27</sup>。したがって、KcsA がリン脂質のフリップフロップに与える影響を調べることで、どのような構造的特徴がフリップフロップを促進するのかを明らかにし、小胞体膜スクランブラーゼ候補の絞り込みにあたって有益な知見が得られると考えた。本章では、チャネルのゲーティングの際の、膜貫通領域のコンホメーション変化に伴い、リン脂質のフリップフロップが促進されるのではないかと仮定した。

KcsA チャネルは細胞内 pH が酸性になると活性化される<sup>42</sup>。ゲーティング時には、KcsA チャネルのポアを形成する膜貫通ドメインが、大きなコンホメーション変化を起こす<sup>25,26</sup>。膜貫通ヘリックスがポアの軸を中心に大きなねじれ運動を繰り返すことでゲートを開閉し<sup>26</sup>、それに伴い膜貫通領域の長さが伸縮する<sup>43</sup>。さらに膜貫通ヘリックスのねじれ運動に連動して、膜表面に局在する、N 末端の両親媒性ヘリックス (M0 ヘリックス) がヘリックスの軸を中心に回転運動する<sup>44</sup>。このような大きなコンホメーション変化が、チャネル—膜界面において局所的に膜を乱し、リン脂質のフリップフロップを促進するのではないかと考えた。

この仮説を検証するために、KcsA を組み込んだ POPC プロテオリポソームにおける NBD ラベル化リン脂質のフリップフロップ速度を、pH の異なる条件下で測定した。さらに、KcsA のゲーティングに修飾を加えた条件 (tetra-*n*-butylammonium (TBA) 存在下、M0 ヘリックスを欠損させた変異体 (KcsA ΔM0)) での測定を行った。TBA は、チャネルの流れを遮断し、チャネルを開構造で静止させる<sup>45</sup>。M0 ヘリックスは、ゲーティングの活性化に大きな影響をもつ。M0 ヘリックスを欠損させると、チャネルの開構造が安定化され、チャネルの開確率が大きく減少する<sup>44</sup>。このようなゲーティングに修飾を加えた条件で測定を行うことで、KcsA がフリップフロップを促進するメカニズムの解明を試みた。

## 第二節 フリップ測定条件設定と KcsA の再構成効率の評価

本章では、蛍光脂質のフリップフロップを測定するために、中性及び酸性条件で、dithionite による消光を用いている。Dithionite は、溶液が塩基性条件のとき、還元剤として機能し、蛍光を消光することが知られている。始めに、dithionite を用いた測定系が pH 7.4、4.0 の条件で利用可能なのかを確認した。2 M Tris に溶解した dithionite を、C<sub>6</sub>NBD-PC で両葉標識した脂質のみの LUV に、Tris の終濃度が 200 mM になるよう添加した。F/F<sub>0</sub> は、pH 7.4、4.0 の条件において、それぞれ、0.528±0.028、0.519±0.006 であった。ほぼ 50% の消光が見られたことから、どちらの条件においても、dithionite が外葉に存在する NBD を完全に消光できることが示唆された。またフリップ測定において、NBD 蛍光強度の測定から、溶液の pH に関わらず、すべての NBD ラベル化リン脂質がリポソームに組み込まれることを確認した (data not shown)。この結果は、以前の研究結果と一致している<sup>18</sup>。加えて、KcsA の再構成効率が、溶液の pH や TBA、コレステロールの存在などの条件によって影響を受けないことを、SDS-PAGE より確認した (図 18)。

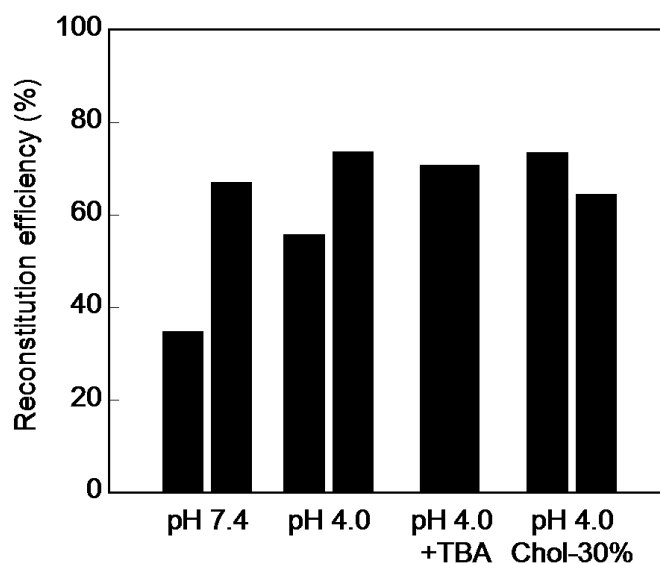


図 18. KcsA のプロテオリポソームへの再構成効率。

$$\text{Reconstitution efficiency (\%)} = \frac{\text{band intensity of proteoliposomes}}{\text{band intensity of detergent-solubilized KcsA}} \times 100\% \quad (2)$$



### 第三節 KcsA のフリップフロップ促進能の評価

リン脂質の自発的なフリップフロップに対する pH の影響と、タンパク質依存的なフリップフロップに対する pH の影響を区別するため、まず、pH の異なる条件で、脂質のみのリポソームにおける NBD ラベル化リン脂質のフリップを測定した (図 19 A-D)。フリップフロップに対する pH の影響は、NBD ラベル化リン脂質の親水性頭部基によって差が見られた。pH 7.4 における C<sub>6</sub>NBD-PC のフリップ初速度は、pH 4.0 とほぼ同じ速度であるのに対して (図 19 B)、C<sub>6</sub>NBD-PG (図 19 C)、1-palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-*sn*-glycero-3-phosphoserine (C<sub>6</sub>NBD-PS) (図 19 D) のフリップ初速度は、pH 4.0 のほうが pH 7.4 よりも速かった。酸性 pH においてこれらの脂質がプロトン付加体になることで、フリップフロップが促進されたと考えられる<sup>46</sup>。C<sub>6</sub>NBD-PG のフリップは、37°C では速すぎて正確に測定することが困難であったため (図 20)、C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PS の測定は 37°C で行ったが、C<sub>6</sub>NBD-PG の測定は 25°C で行った。

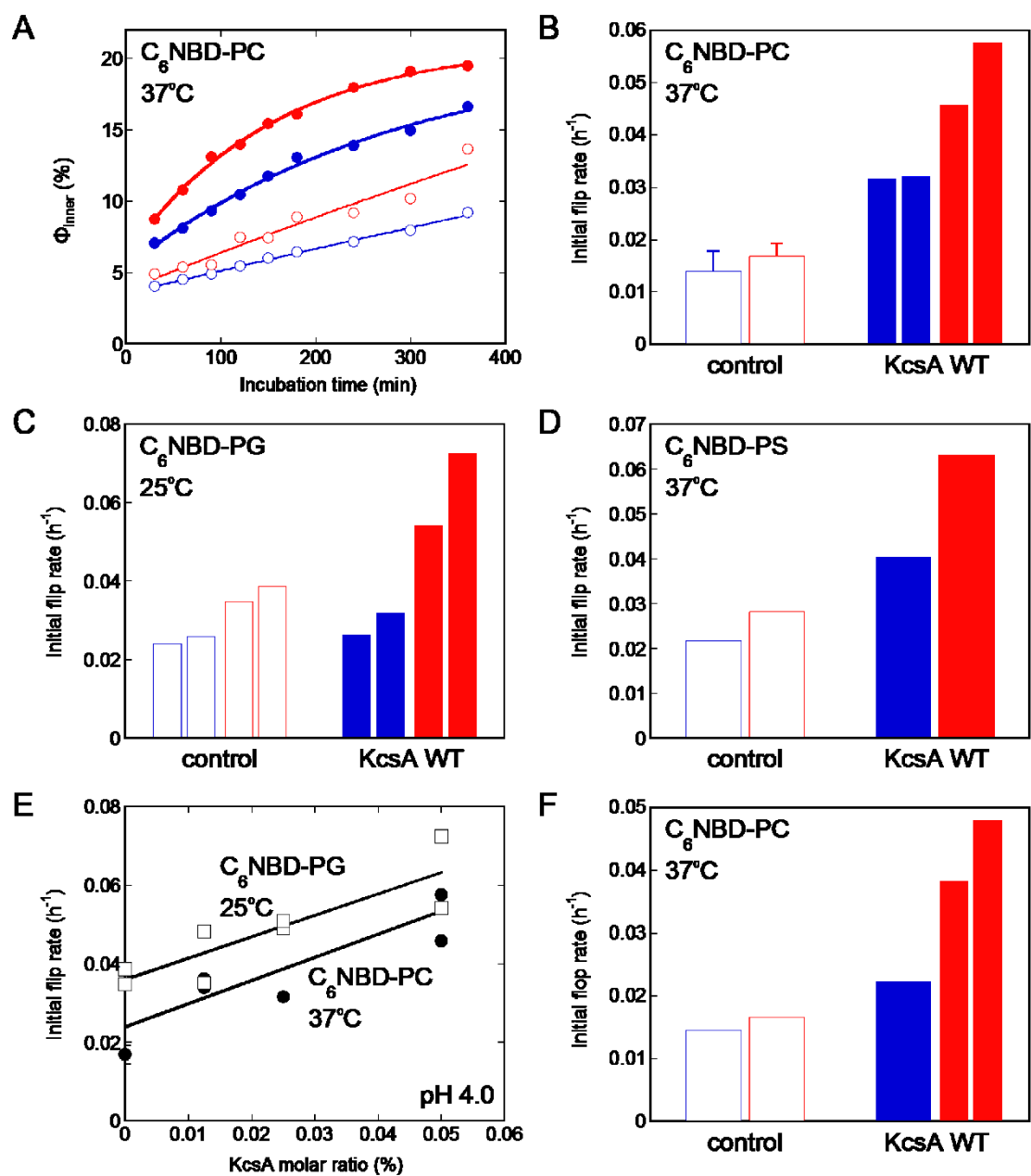


図 19. (A) pH 7.4 (青)、pH 4.0 (赤) での、脂質のみのリポソーム (○)、野生型 KcsA (C 末端 His タグ) を 0.05 mol% 含むプロテオリポソーム (●) における  $C_6$ NBD-PC のフリップ測定。(B–D) pH 7.4 (青)、pH 4.0 (赤) での、脂質のみのリポソーム (control)、野生型 KcsA (C 末端 His タグ) を 0.05 mol% 含むプロテオリポソーム (KcsA WT) における  $C_6$ NBD-PC (B)、 $C_6$ NBD-PG (C)、 $C_6$ NBD-PS (D) のフリップ初速度。(E) pH 4.0 での、野生型 KcsA (C 末端 His タグ) を 0–0.05 mol% 含むプロテオリポソームにおける  $C_6$ NBD-PC (●)、 $C_6$ NBD-PG (□) のフリップ初速度。(F) pH 7.4 (青)、pH 4.0 (赤) での、脂質のみのリポソーム (control)、野生型 KcsA (N 末端 His タグ) を 0.05 mol% 含むプロテオリポソーム (KcsA WT) における  $C_6$ NBD-PC のフリップ初速度。エラーバーは標準偏差を表す (n=3)。

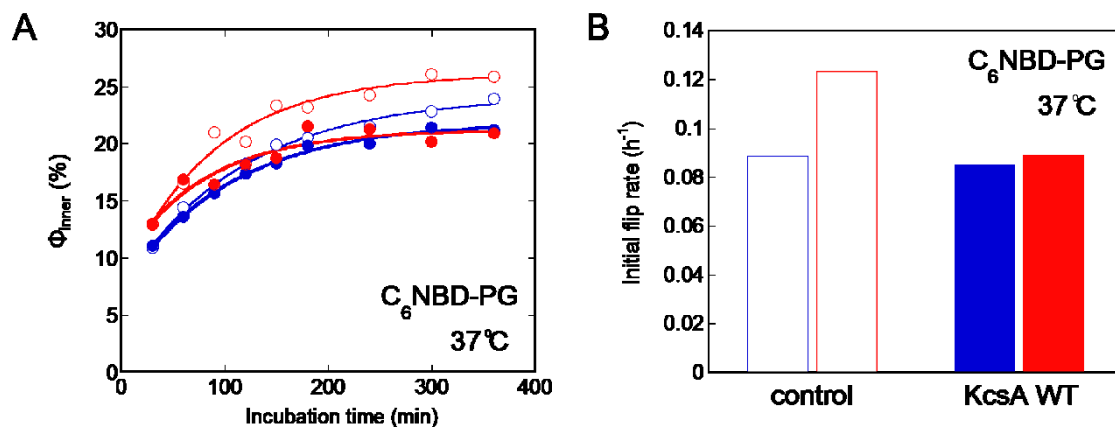


図 20. (A) pH 7.4 (青)、pH 4.0 (赤) での、脂質のみのリポソーム (○)、野生型 KcsA (N 末端 His タグ) を 0.05 mol%含むプロテオリポソーム (●) における C<sub>6</sub>NBD-PG のフリップ測定。(B) pH 7.4 (青)、pH 4.0 (赤) での、脂質のみのリポソーム (control)、野生型 KcsA (N 末端 His タグ) を 0.05 mol%含むプロテオリポソーム (KcsA WT) における C<sub>6</sub>NBD-PG のフリップ初速度。

次に、野生型 KcsA (C 末端に His タグ) を再構成したプロテオリポソームを用いて、フリップ測定を行った。pH 7.4 において、KcsA プロテオリポソーム中の C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PS のフリップ初速度は、KcsA 非存在下と比較して、それぞれ、2.26–2.29、1.87 倍に増加した (図 19 B, D)。それに対して、C<sub>6</sub>NBD-PG のフリップ初速度は KcsA によってわずかしこ増加しなかった (1.01–1.33 倍) (図 19 C)。この結果は、同じタンパク質/脂質比で、C<sub>6</sub>NBD-PG のフリップフロップをほとんど促進しなかった以前の報告と一致している<sup>39</sup>。より重要なことに、KcsA のフリップフロップに対する効果は、中性よりも酸性条件下でより大きく見られた。pH 4.0 における C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PG、C<sub>6</sub>NBD-PS のフリップ初速度は、pH 7.4 の場合と比較して、それぞれ、1.43–1.82、1.69–2.77、1.56 倍であった (図 19 B–D)。pH の減少に伴うフリップ初速度の増加は、脂質のみのリポソームよりもプロテオリポソームでより顕著であった。さらに、pH 4.0 における C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PG のフリップ初速度は、リポソーム中の KcsA 濃度に比例して増加した (図 19 E)。KcsA による pH 依存的なフリップの促進は、N 末端に His タグを付加した KcsA においても同様に見られたため (図 21)、どちらの末端の His タグもフリップフロップには影響しないと考えられる。また、KcsA (N 末端に His タグ) は、フロップ測定においても、pH 依存的な促進能を示しており、この効果はフリップの場合と同等であった (図 19 F)。以上より、KcsA は酸性 pH において、よりリン脂質のフリップフロップを促進することが明らかになった。また、この促進能はリン脂質の頭部基に対して選択性が低かった。

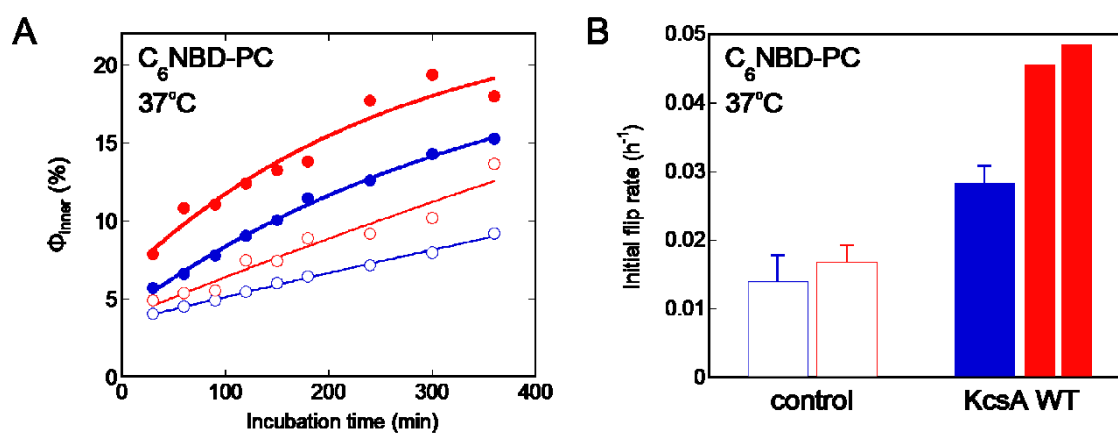


図 21. (A) pH 7.4 (青)、pH 4.0 (赤) での、脂質のみのリポソーム (○)、野生型 KcsA (N 末端 His タグ) を 0.05 mol%含むプロテオリポソーム (●) における C<sub>6</sub>NBD-PC のフリップ測定。(B) pH 7.4 (青)、pH 4.0 (赤) での、脂質のみのリポソーム (control)、野生型 KcsA (N 末端 His タグ) を 0.05 mol%含むプロテオリポソーム (KcsA WT) における C<sub>6</sub>NBD-PC のフリップ初速度。エラーバーは標準偏差を表す (n = 3)。

#### 第四節 KcsA のフリップフロップ促進能に対する TBA の効果

酸性 pH において KcsA がフリップフロップを促進するメカニズムを解明するために、pH 4.0 で TBA 存在下の条件で、フリップ測定を行った。酸性 pH で TBA が KcsA に結合すると、ゲートの開閉が阻害され、開構造のまま静止する<sup>26,45</sup>。脂質のみのリポソームにおける C<sub>6</sub>NBD-PC のフリップ初速度は、TBA の存在では変化しなかったことから (図 22)、TBA は C<sub>6</sub>NBD-PC の自発的なフリップフロップには影響しないと考えられる。しかし、KcsA プロテオリポソームにおいても、TBA による C<sub>6</sub>NBD-PC のフリップ初速度の減少は見られなかった (図 22)。もし、ゲートの開閉による膜貫通領域の揺らぎがフリップフロップを促進するのであれば、ゲーティングのブロッカーである TBA はフリップ初速度を減少させるはずである。したがって、この結果から、ゲートの開閉による膜貫通領域の揺らぎは、リン脂質のフリップフロップに影響しないと結論付けられる。

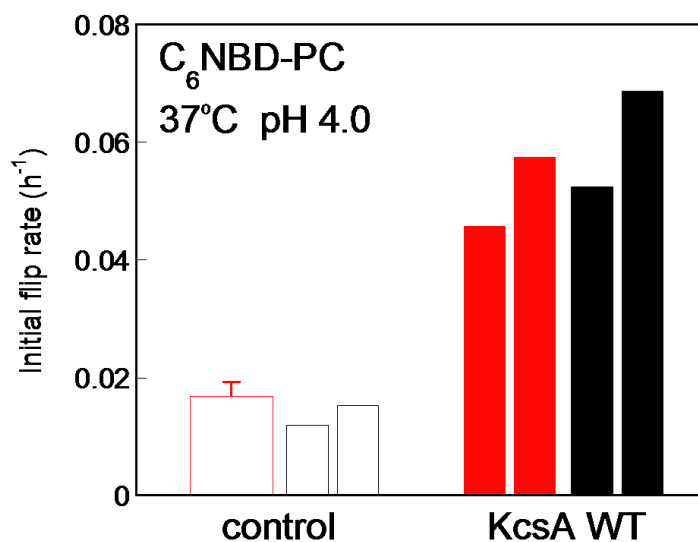


図 22. TBA 存在下 (黒)、非存在下 (赤) における、pH 4.0 での脂質のみのリポソーム (control)、野生型 KcsA (C 末端に His タグ) を 0.05 mol% 含むプロテオリポソーム (KcsA WT) 中の C<sub>6</sub>NBD-PC のフリップ初速度。エラーバーは標準偏差を表す (n = 3)

## 第五節 KcsA のフリップフロップ促進能に対する M0 ヘリックスの効果

M0 ヘリックスを欠損させた変異体 (KcsA  $\Delta$ M0) を再構成したプロテオリポソームを調製した。この変異体は、再構成された人工膜中で、開確率が減少している点を除いては、元々のチャンネル活性を保持している<sup>44</sup>。pH 7.4 では、KcsA  $\Delta$ M0 を再構成したプロテオリポソームにおける C<sub>6</sub>NBD-PC のフリップ初速度は、野生型の場合とほぼ同じ速度であった (図 23 A)。しかしながら、野生型 KcsA の場合と異なり、KcsA  $\Delta$ M0 を再構成したプロテオリポソームでは、pH の減少に伴うフリップ初速度の上昇が見られなかった。言い換えれば、pH の減少は KcsA  $\Delta$ M0 を再構成したプロテオリポソーム中のフリップフロップを促進しなかった。この結果は、M0 ヘリックスの存在が、酸性 pH におけるフリップフロップの促進に重要であることを示唆している。同様の傾向が、C<sub>6</sub>NBD-PG のフリップの場合にも観測された (図 23 B)。C<sub>6</sub>NBD-PG の場合に、M0 ヘリックスを欠損させたことによる、酸性 pH での活性の阻害が部分的であるのは、少数の開構造をとるタンパク質により、わずかにフリップが促進されたものと推察される。

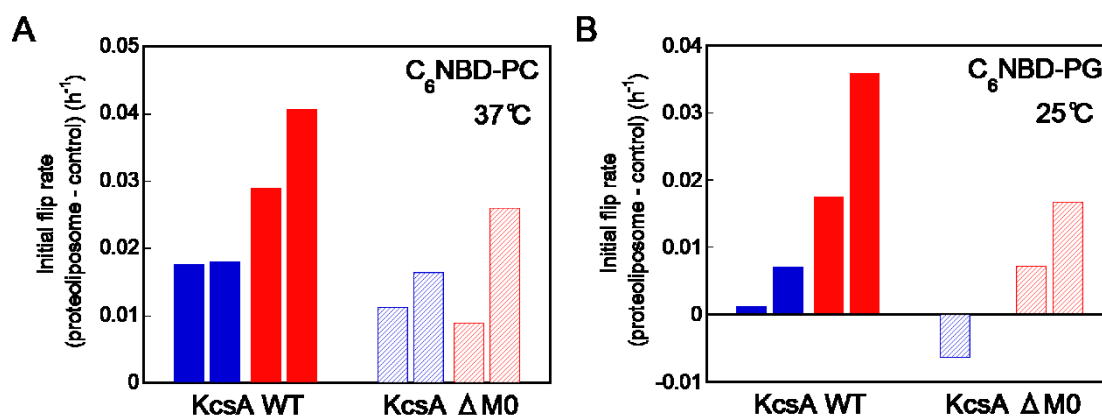


図 23. pH 7.4 (青)、pH 4.0 (赤) での野生型 KcsA、もしくは KcsA  $\Delta$ M0 (どちらも C 末端に His タグ) を 0.05 mol% 含むプロテオリポソームにおける C<sub>6</sub>NBD-PC (A)、C<sub>6</sub>NBD-PG (B) の KcsA 依存的なフリップ初速度。KcsA 依存的なフリップ初速度とは、プロテオリポソームと脂質のみのリポソームにおけるフリップ初速度の違いを表している。

## 第六節 KcsA のフリップフロップ促進能に対するコレステロールの効果

生体膜中のコレステロール含量の違いが、リン脂質のフリップフロップに与える影響を評価するため、脂質のみのリポソームと、野生型 KcsA を再構成したプロテオリポソームの両方にコレステロールを加えた。5%のコレステロールを含むリポソームは、小胞体膜のコレステロール組成を模倣したものであり、コレステロールを 30%含むリポソームは、細胞膜のコレステロール量を反映したものである。図 24 A に見られるように、5%、30%コレステロールのどちらも、脂質のみのリポソーム中の C<sub>6</sub>NBD-PC のフリップ初速度に影響しなかった。対して、C<sub>6</sub>NBD-PG のフリップは 30%のコレステロールによって大きく阻害された (図 24 B)。これら 2 種類の蛍光脂質の測定は異なる温度で行われているものの (C<sub>6</sub>NBD-PC は 37°C、C<sub>6</sub>NBD-PG は 25°C)、コレステロールによる C<sub>6</sub>NBD-PG のフリップの阻害は、37°Cにおいても見られた (図 25)。この結果は、C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PG に対するコレステロールの効果の違いが、温度によるものではないことを示している。さらに、コレステロールはプロテオリポソームにおける C<sub>6</sub>NBD-PC のフリップにも影響しなかった (図 24 A)。プロテオリポソーム中の C<sub>6</sub>NBD-PG のフリップはコレステロールにより阻害されたが (図 24 B)、KcsA を再構成することによるフリップ初速度の増加 (つまり、KcsA 依存的なフリップ初速度) は、コレステロール 0%、30%の場合でほぼ同等であった (図 24 C)。これらの結果はコレステロールが KcsA 依存的なリン脂質のフリップフロップに影響を与えないことを示唆している。

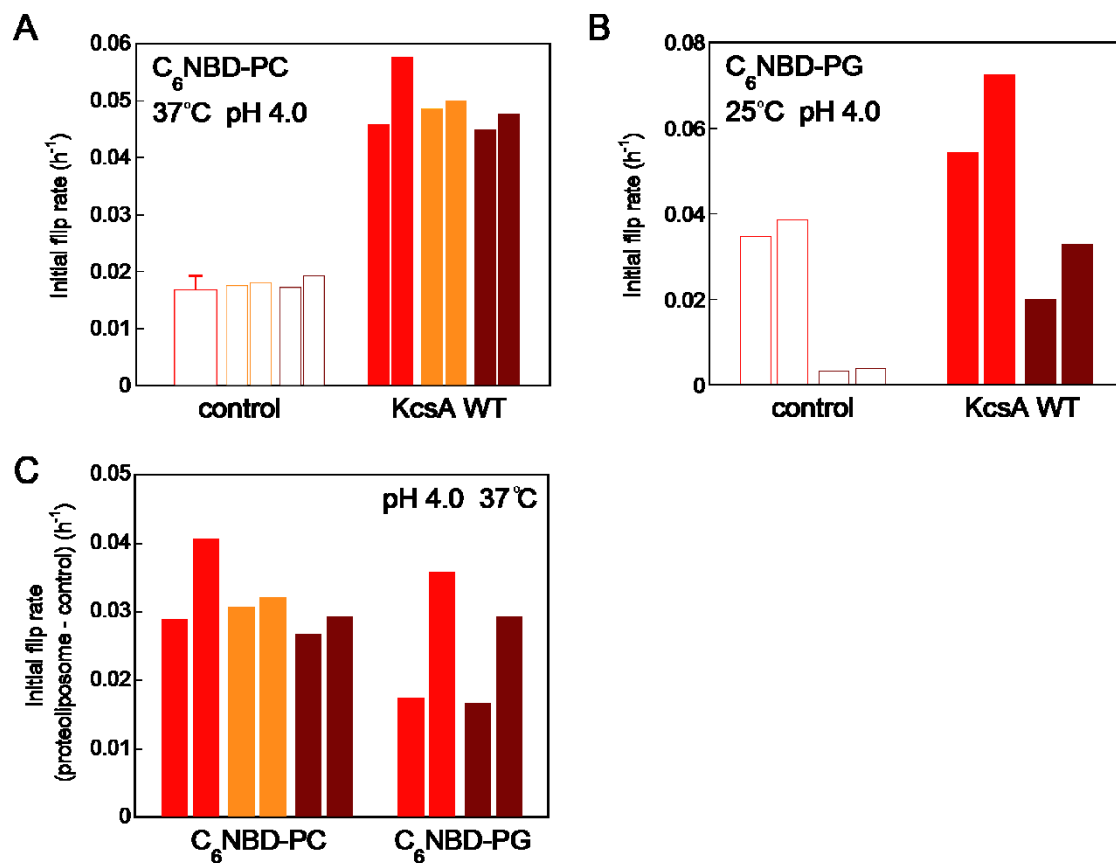


図 24. pH 4.0 での、コレステロールを 0% (赤)、5% (橙)、30% (茶) 含む、脂質のみのリポソーム (control)、もしくは野生型 KcsA (C 末端に His タグ) を 0.05 mol% 含むプロテオリポソーム (KcsA WT) における  $C_6$ NBD-PC (A)、 $C_6$ NBD-PG (B) のフリップ初速度。(C) (A)、(B) で示した KcsA プロテオリポソーム中のフリップ初速度から、control の初速度を差し引いて計算した KcsA 依存的なフリップ初速度。エラーバーは標準偏差を表す (n = 3)。



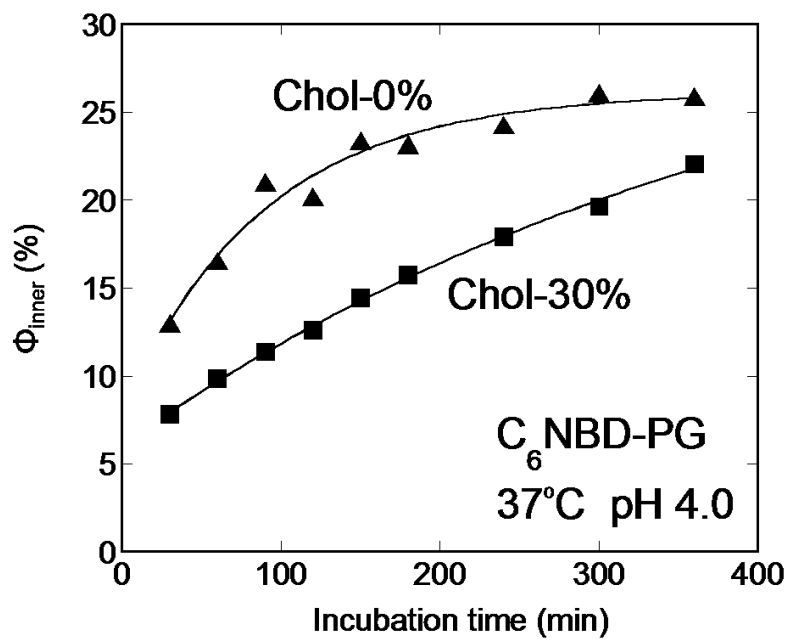


図 25. pH 4.0 での、コレステロールを 0%、30%含む脂質のみのリポソームにおける  $C_6$ NBD-PG のフリップ測定。

## 第七節 考察

本章では、NBD ラベル化リン脂質を用いて、KcsA チャンネルがリン脂質のフリップフロップに与える影響を評価した。これまでの研究から、中性 pH において、KcsA がフリップフロップを促進することが報告されていたが<sup>39</sup>、酸性 pH におけるチャンネルのゲーティングにより、さらにフリップフロップが促進されるのではないかと仮定した。本章において、まず、KcsA が pH 依存的にリン脂質のフリップフロップを促進することが明らかになった。次に、TBA を用いた実験から、ゲートの開閉に伴う膜貫通領域の揺らぎがフリップフロップに影響を与えるかどうか評価した。酸性 pH において、TBA は、KcsA に結合することでゲートの開閉を阻害し、チャンネルを開構造で静止させる<sup>26,45</sup>。したがって、TBA がフリップフロップ速度を減少させなかったという結果から、ゲートの開閉ではなく、開構造がフリップフロップを促進させることが示唆された。対照的に、M0 ヘリックスを欠損させた変異体では、フリップフロップ促進能が減少した。最近の研究から、M0 ヘリックスを欠損させると、チャンネルの開構造が安定化されることが明らかにされている<sup>44</sup>。それゆえ、変異体における活性の減少は、酸性 pH におけるチャンネルの開確率の減少によって説明可能であり、このことは TBA の結果と一致している。

どのようにして KcsA の開構造がフリップフロップを促進するのだろうか。ゲートが開く際、ゲートを構成するヘリックスがねじれ運動を起こし、それに伴い、膜貫通領域の長さが短縮するということが結晶構造から示唆されていたが<sup>25</sup>、最近になって原子間力顕微鏡により、膜に埋め込まれた状態で膜貫通領域の短縮を起こすことが証明された<sup>43</sup>。ゲートヘリックスがコンホメーション変化を起こしても、脂質膜と接する膜貫通領域の疎水性面に、それほど大きな変化はないと思われる。それに対して、膜貫通領域の短縮は、チャンネルと膜の間の **hydrophobic matching** を変化させる。したがって、チャンネル近傍の膜が変形することにより、フリップフロップが促進されたと考えられる(図 26)。Negative mismatch によりフリップフロップが促進されることは、第一章の結果と一致している。また、KcsA は、膜中でゲーティング依存的にクラスター化と分散を起こすことが最近報告されている<sup>47</sup>。中性 pH では、閉構造のチャンネルが会合してクラスターを形成し、酸性 pH では、クラスターが分散して、開構造のチャンネルが単独で存在する。この結果は、酸性 pH においてチャンネルが単独で存在することにより、KcsA によってフリップフロップが促進されているであろう、チャンネル近傍の領域が増加することを示唆するものである(図 26)。

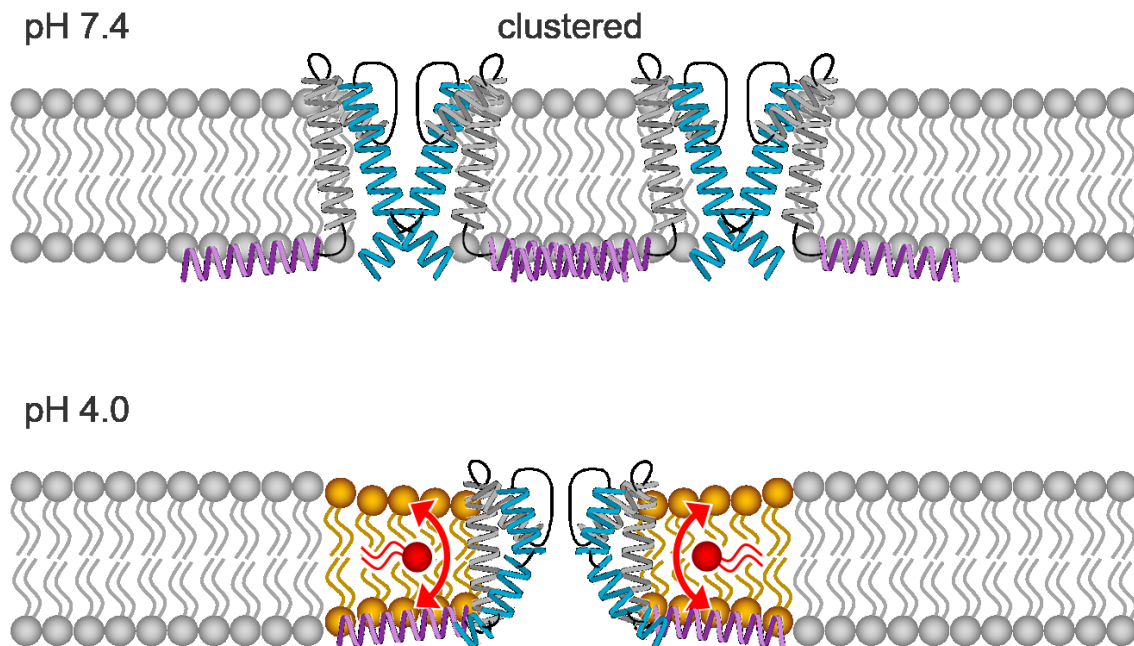


図 26. KcsA によるコンホメーション依存的なフリップフロップの促進の模式図。pH 7.4 では、閉構造のチャンネルがクラスターを形成する。pH 4.0 では、ゲートが開くことにより膜貫通領域の長さが短縮する。Negative mismatch により膜がより薄く変形することで、フリップフロップが促進されると考えられる。また、pH 4.0 では、KcsA が分散して単独で存在することで、フリップフロップが促進されるであろう KcsA 近傍の領域が広がる。

コレステロールはリン脂質の自発的なフリップフロップ速度を減少させることが報告されている<sup>5,46</sup>。コレステロールが膜中に存在すると、アシル鎖の配向性が上昇し、膜透過性が低下する<sup>48</sup>。それゆえ、アシル鎖の配向性の上昇に伴い、フリップフロップ速度が減少すると考えられる。実際に、30%のコレステロール存在下で、C<sub>6</sub>NBD-PGの自発的なフリップはほとんど見られなかった。C<sub>6</sub>NBD-PC に対しては、コレステロールの効果が見られなかったことから、この速度が 37°Cにおけるフリップの最低速度であると考えられる。実際、30%のコレステロール存在下における C<sub>6</sub>NBD-PG のフリップ初速度は 0.039 h<sup>-1</sup>であり、これは C<sub>6</sub>NBD-PC の自発的なフリップ初速度よりも速かった。興味深いことに、コレステロールは KcsA 依存的なフリップフロップには影響を与えなかった。コレステロールを 30%含む脂質膜は、コレステロールが豊富な秩序液体相と、コレステロールをほとんど含まない無秩序液体相に相分離する<sup>49</sup>。コレステロールが KcsA 依存的なフリップフロップに影響を与えなかったことから、KcsA がコレステロールの少ない無秩序液体相に局在しており、コレステロールによるアシル鎖の配向性上昇の効果を受けなかったと推察される。このことは、コレステロールが KcsA を再構成したリポソームにおける Rb<sup>+</sup>の取り込みに影響しないという報告と一致している<sup>50</sup>。

## 第八節 小括

本章では、膜タンパク質のコンホメーション変化が、リン脂質のフリップフロップに与える影響について検討するため、モデルタンパク質としてカリウムチャネル KcsA を用いて、KcsA の活性を様々に制御した条件で、そのフリップフロップ促進能を蛍光分光法により評価した。

その結果、チャネルが活性化する酸性 pH で、KcsA のフリップフロップ促進能が上昇した。KcsA は、酸性 pH で開構造と閉構造を繰り返すゲーティングを起こし、膜貫通領域が揺らいでいる。KcsA のブロッカーである TBA は、酸性 pH で KcsA に結合し、開構造で静止させるが、TBA を加えても KcsA のフリップフロップ促進能は変化しなかった。一方、酸性 pH における開確率が低下する変異体 KcsA  $\Delta M0$  では、野生型 KcsA と比較して、pH 依存的なフリップフロップ促進能があまり見られなかった。これらの結果から、酸性 pH における KcsA のフリップフロップ促進能の上昇は、チャネルが開構造をとることによるものであると考えられる。KcsA は開構造をとるとき、膜貫通領域の長さが短縮することが報告されている。それゆえ、第一章と同様に、膜貫通領域の長さが膜厚よりも短い **negative mismatch** により、KcsA 近傍の膜が薄く変形することで、フリップフロップが促進されたと推察される。

第一章のモデル膜貫通ペプチド、本章の KcsA という配列の異なる 2 つの膜貫通領域において、**negative mismatch** によりフリップフロップが促進されることが示唆された。このことは、生体膜に存在する配列の異なる種々のタンパク質が、その膜に対して **negative mismatch** である場合に、フリップフロップを促進する可能性を示しており、小胞体膜スクランブラーゼ候補を絞り込む際の知見として用いることができるのではないかと考えられる。

## 第三章 小胞体膜タンパク質の膜貫通配列による

### フリップフロップの促進

#### 第一節 序

第一章、第二章から得られた結果は、膜貫通領域の親水性アミノ酸残基、及び、膜貫通領域と脂質二重層の **negative mismatch** がリン脂質のフリップフロップを促進する物理化学的性質であるという仮説を支持するものであった。また、ヒト小胞体膜タンパク質の膜貫通領域を予測し、そのアミノ酸残基組成を調べたところ、膜貫通配列の中央付近に親水性度の高いアミノ酸残基が 7.3%存在していた。一方、膜貫通領域の長さはほとんどが 22 もしくは 23 残基であったため、SOSUI を用いた解析では **negative mismatch** を起こすと考えられるタンパク質を予測することができなかった。そこで、第三章では、親水性度の高いアミノ酸残基を有する小胞体膜タンパク質の膜貫通配列が、小胞体膜組成においてスクランブラーゼ活性を発現しうるのかについて検討した。

ヒト小胞体膜タンパク質の膜貫通配列を抽出し、その膜貫通配列中央付近に親水性度の高いアミノ酸残基を有するタンパク質を探索した。本章では、合成ペプチドを用いて膜貫通領域を再現することが容易である、一回膜貫通タンパク質に着目した。Uniprot データベース中のヒト小胞体膜タンパク質のうち、SOSUI により 588 タンパク質が膜タンパク質であると予測された。この中で、356 タンパク質が、膜貫通配列の中央 6、7 残基（膜貫通配列の残基数が、それぞれ、偶数、奇数の場合）に親水性度の高いアミノ酸残基（Arg、Lys、Glu、Asp、Gln、Asn、His）を有していた。この 356 タンパク質のうち、27 タンパク質が一回膜貫通タンパク質であると予測されており、この中の 13 タンパク質が、Uniprot データベース上で、小胞体に特異的であり、複数膜貫通タンパク質ではないとされていた。この一回膜貫通タンパク質 13 種の膜貫通配列ペプチドをデザインした（図 27）。ペプチドの可溶性を向上させるため、両末端に Lys 残基を 2 つずつ配置した。また、ペプチドの定量をトリプトファンの吸光度や蛍光を用いて行うため、膜貫通配列中に Trp 残基が存在しない場合には、N 末端に Trp 残基を配置した。合成した膜貫通配列ペプチドを LUV に組み込み、そのフリップフロップ促進能を、蛍光分光法を用いて評価した。

また、小胞体膜と細胞膜のフリップフロップ速度の違いに寄与していると考えられるコレステロールが、ペプチドのフリップフロップ促進能に与える影響について評価した。さらに、第一章においてヒト小胞体膜タンパク質に対して行った膜貫通領域の解析を、ヒト細胞膜タンパク質に対しても行うことで、小胞体膜タンパク質と細胞膜タンパク質の性質の違いについて評価した。

ATF6	Ac-WKKVVCVMIVLAFIIL <b>NY</b> GPMSMLEQKK-NH <sub>2</sub>
EDEM1	Ac-KKVLGLVLLRLGL <b>HG</b> VLWLVFGLGPKK-NH <sub>2</sub>
FACL4	Ac-KKLTIIILLPV <b>HLL</b> ITIIYSALIFIPWKK-NH <sub>2</sub>
FMO2	Ac-WKKVAVIGAGV <b>SGLISL</b> KCCVDEGLEKK-NH <sub>2</sub>
JP3	Ac-WKKSAPILVVMVILL <b>N</b> IGVAILFINFKK-NH <sub>2</sub>
JP4	Ac-WKKANPLVVGAVALL <b>DLS</b> LAFLFSQLKK-NH <sub>2</sub>
MMP23	Ac-KKLPALVLLA <b>RLG</b> APAVPAWSAAQGKK-NH <sub>2</sub>
ORP5	Ac-KKSPRSWFLLCVFLAC <b>Q</b> LFINHILKKK-NH <sub>2</sub>
P4HTM	Ac-WKKYFLVLMV <b>FVHL</b> YLG <b>N</b> VLALLLFVKK-NH <sub>2</sub>
RNF180	Ac-KKMVIIYIYS <b>VNW</b> VIGFIVFCFLCYKK-NH <sub>2</sub>
SPAST	Ac-KKYPLFVGFALL <b>RL</b> VAFHLGLLFVWKK-NH <sub>2</sub>
TMED7	Ac-WKKVGEALILLVVSIG <b>Q</b> VFLKSFFSKK-NH <sub>2</sub>
UBE2J2	Ac-WKKHGLLGALAN <b>L</b> FVIVGFAAFAYTKK-NH <sub>2</sub>

図 27. 合成ペプチドのアミノ酸配列。

四角で囲んだ部分が配列の中央領域（7 残基）であり、赤字で示したアミノ酸残基が中央領域に存在する親水性度の高いアミノ酸残基である。ATF6 : activating transcription factor 6、EDEM1 : ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 1、FACL4 : long-chain fatty acid-CoA ligase 4、FMO2 : flavin-containing monooxygenase 2、JP3 : junctophilin-3、JP4 : junctophilin-4、MMP23 : matrix metalloproteinase-23、ORP5 : oxysterol-binding protein-related protein 5、P4HTM : transmembrane prolyl 4-hydroxylase、RNF180 : ring finger protein 180、SPAST : spastin、TMED7 : transmembrane emp24 domain-containing protein 7、UBE2J2 : ubiquitin-conjugating enzyme E2 J2

## 第二節 膜貫通配列ペプチドの膜貫通評価

本章では、一回膜貫通小胞体膜タンパク質の膜貫通領域を模倣した 13 のペプチドを合成した (図 27)。しかし、これらのペプチドは、配列の中央領域に親水性度の高いアミノ酸残基を有するため、実際に人工膜中で膜貫通の配向をとるかは不明である。始めに、LUV 中のペプチドの CD スペクトルを測定し、ペプチドの二次構造の評価を行った (図 28)。MMP23、FMO2 ペプチドの CD スペクトルから、これらのペプチドの構造はほぼランダムコイルであることが示された。このことから、どちらのペプチドも膜と相互作用していないと考えられる。残りの 11 ペプチドについては、 $\alpha$  ヘリックス構造に特徴的なスペクトルが観測された。 $\alpha$  ヘリックス含有率を (5) 式により計算した。結果を表 5 に示す。アシル鎖の組成が本章で使用したモデル膜 (POPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE) : 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserine (POPS) = 6 : 3 : 1) と同じである POPC 膜の疎水性領域の厚みは 25.8 Å である<sup>32</sup>。本章で用いたモデル膜の厚みが POPC 膜と同じであると仮定すると、ペプチドが膜貫通するには、少なくとも 17 残基が  $\alpha$  ヘリックス構造をとる必要がある。これは、27、28 残基のペプチドにおいて、それぞれ、64、61%の  $\alpha$  ヘリックス含有率に相当し、11 ペプチド中 10 ペプチドにおいて、十分な  $\alpha$  ヘリックス含有率が見られた。FACL4 ペプチドは、わずかに低い  $\alpha$  ヘリックス含有率であったが、これは配列中に  $\alpha$  ヘリックス構造を阻害する Pro 残基が 2 つ存在するためであると考えられる。LUV 中の EDEM1、RNF180 ペプチドにおけるトリプトファン蛍光を測定したところ、溶液中のフリーのトリプトファンと比較して、ブルーシフトしたスペクトルが見られた (図 29)。これらの結果は、高い  $\alpha$  ヘリックス含有率の 11 ペプチドが LUV 中で膜貫通の配向をとることを示唆するものである。そのため、これら 11 ペプチドのフリップ促進能を評価した。

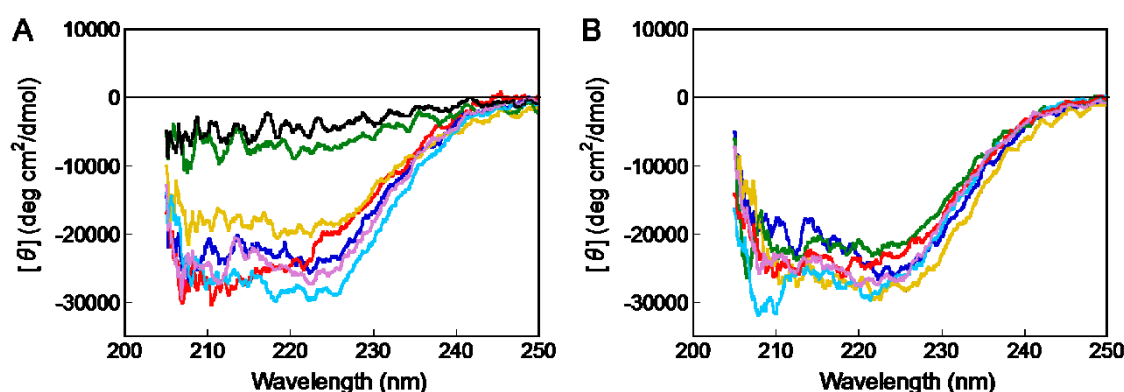


図 28. LUV 中の合成ペプチド (0.2 mol%) の CD スペクトル。

(A) ATF6 (青)、EDEM1 (赤)、FACL4 (黄)、FMO2 (緑)、JP3 (水色)、JP4 (紫)、MMP23 (黒)。(B) ORP5 (青)、P4HTM (赤)、RNF180 (黄)、SPAST (緑)、TMED7 (水色)、UBE2J2 (紫)。

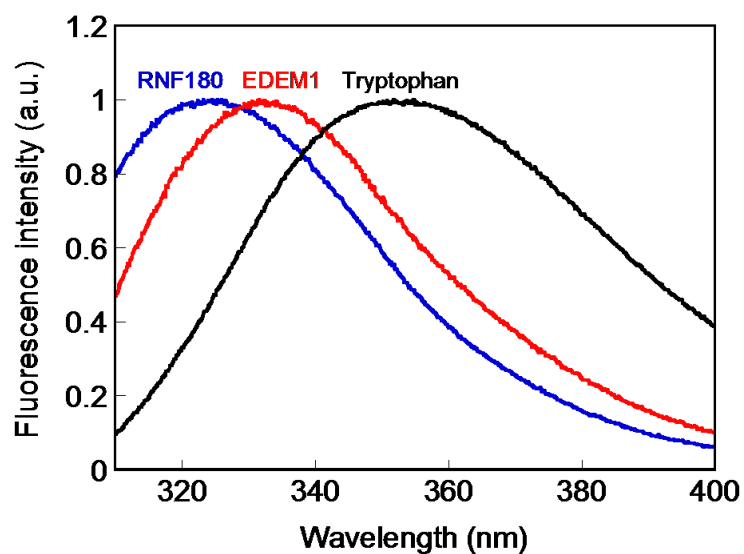


図 29. LUV 中の EDEM1、RNF180 (0.1 mol%) と溶液中のフリーのトリプトファン

のトリプトファン蛍光スペクトル。

表 5 LUV 中のペプチドの  $\alpha$ ヘリックス含有率

Peptide	$\alpha$ -Helix Content (%)
ATF6	65, 75
EDEM1	62, 73
FACL4	52, 58
FMO2	18, 18
JP3	76, 88
JP4	69, 81
MMP23	10, 11
ORP5	70, 77
P4HTM	72, 89
RNF180	89, 93
SPAST	54, 67
TMED7	87, 95
UBE2J2	74, 82



### 第三節 膜貫通配列ペプチドのフリップフロップ促進能の評価

それぞれの合成ペプチドを組み込んだ LUV における 3 種類の蛍光脂質 ( $C_6$ NBD-PC、1-palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine ( $C_6$ NBD-PE)、 $C_6$ NBD-PS) のフリップを評価した (図 30、表 6)。図 30 のプロファイルから、LUV 内葉の蛍光脂質の割合 ( $\Phi_{inner}$ ) が約 50% に到達することが明らかになっており、これはフリップとフロップがほぼ同じ速度であることを示唆している。また、合成ペプチドの両端に配置した Lys 残基は、ペプチドのフリップフロップ促進能に影響を与えないことを確認した (図 31)。

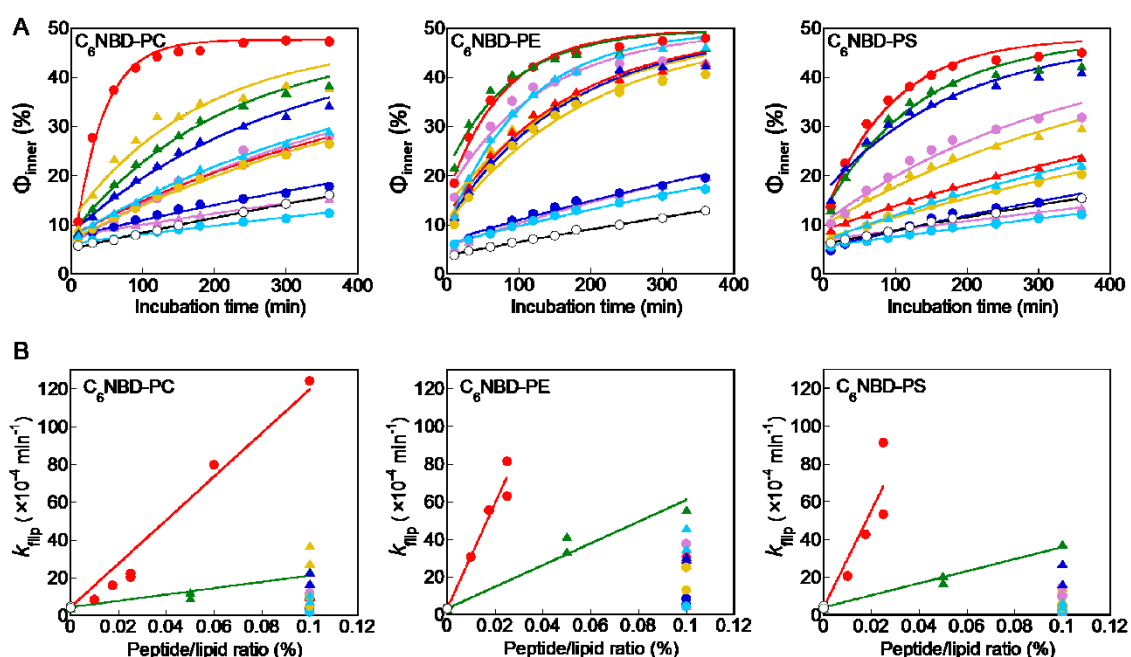


図 30. (A) ペプチド非存在下、もしくは 0.1 mol% ペプチドを組み込んだ LUV における  $C_6$ NBD-PC、 $C_6$ NBD-PE、 $C_6$ NBD-PS のフリップ測定 (37°C)。ATF6 (●)、EDEM1 (●、 $C_6$ NBD-PE、 $C_6$ NBD-PS の場合、0.025 mol%)、FACL4 (●)、JP3 (●)、JP4 (●)、ORP5 (▲)、P4HTM (▲)、RNF180 (▲)、SPAST (▲)、TMED7 (▲)、UBE2J2 (▲)。 (B) ペプチドを組み込んだ LUV (0–0.1 mol%) における  $C_6$ NBD-PC、 $C_6$ NBD-PE、 $C_6$ NBD-PS のフリップ速度定数 (37°C)。記号は (A) と同じものを使用した。

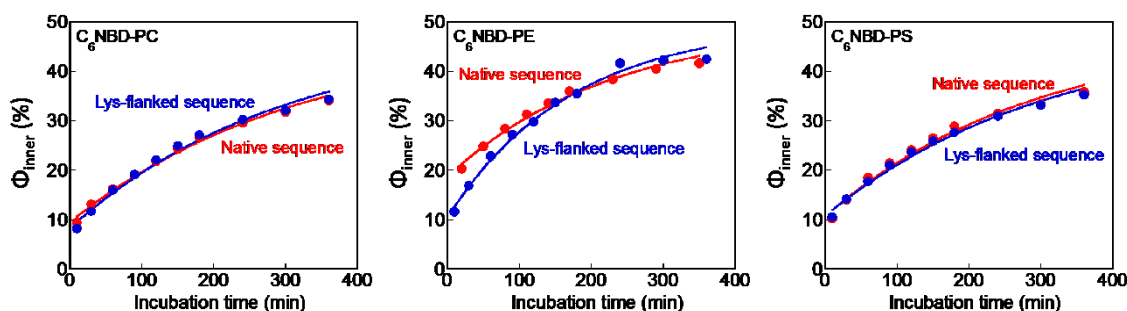


図 31. ORP5 (両端 Lys 配列、天然配列) を 0.1 mol% 組み込んだ LUV における C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PE、C<sub>6</sub>NBD-PS のフリップ測定 (37°C)。

両端 Lys 配列 : Ac- KKS<sub>1</sub>PRSW<sub>2</sub>FLLCV<sub>3</sub>FLAC<sub>4</sub>QLFIN<sub>5</sub>HIL<sub>6</sub>KKK-NH<sub>2</sub>

天然配列 : Ac-A<sub>1</sub>PTP<sub>2</sub>GL<sub>3</sub>LQSP<sub>4</sub>RSW<sub>5</sub>FLLCV<sub>6</sub>FLAC<sub>7</sub>QLFIN<sub>8</sub>HIL<sub>9</sub>KK-NH<sub>2</sub>

表 6 ペプチドを組み込んだ LUV における C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PE、C<sub>6</sub>NBD-PS のフリップ速度定数 (37°C)

Peptide (mol%)	$k_{\text{flip}} (\times 10^{-4} \text{ min}^{-1})$		
	C <sub>6</sub> NBD-PC	C <sub>6</sub> NBD-PE	C <sub>6</sub> NBD-PS
No peptide	4.04, 4.68	3.09, 3.45	3.51, 4.60
ATF6	3.17, 4.41	5.28, 8.36	2.38, 4.18
EDEM1	124	—	—
EDEM1 (0.06)	79.9	—	—
EDEM1 (0.025)	20.3, 22.0	63.0, 81.4	53.2, 91.2
EDEM1 (0.0175)	15.9	55.4	42.7
EDEM1 (0.01)	8.38	30.7	20.6
FACL4	4.72, 9.61	13.0, 25.1	3.68, 5.67
JP3	2.01, 2.31	4.37, 4.58	1.82, 2.40
JP4	10.9, 11.8	30.8, 37.7	10.0, 14.5
ORP5	16.8, 22.8	29.2, 30.9	16.3, 27.2
P4HTM	9.75, 10.3	29.9, 32.4	6.17, 6.78
RNF180	27.7, 37.1	26.8, 35.0	11.5, 14.4
SPAST	23.2	55.5	37.4
SPAST (0.05)	9.11, 12.3	33.6, 41.6	16.8, 20.4
TMED7	7.60, 11.1	35.1, 46.0	4.47, 6.75
UBE2J2	2.10, 3.09	4.57, 5.66	1.67, 2.45

特に記載のない限り、ペプチド/脂質比は 0.1 mol% である。

11 ペプチド中 8 ペプチドが、C<sub>6</sub>NBD-PE のフリップ速度をペプチド非存在下に対して 4 倍以上に上昇させたのに対して、C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PS の場合、それぞれ、4、3 ペプチドしか高いスクランブラーゼ活性を示さなかった。多くのペプチドが C<sub>6</sub>NBD-PE のフリップを促進したのは、以前の研究で示唆されているように、PE の頭部基の親水性が低いためであると考えられる<sup>51</sup>。すべてのペプチドの中央領域に親水性度の高いアミノ酸残基が存在するにもかかわらず、ほとんどのペプチドで予想外に低いフリップ促進能が観測された。中央領域に荷電性アミノ酸残基 Asp を有する JP4 ペプチドは、C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PS のフリップをあまり促進しなかった。UBE2J2、ATF6、JP3 ペプチドは、3 種類すべての蛍光脂質のフリップに対して、ほぼ影響しなかった。これらの結果から、膜貫通領域の中央に親水性度の高いアミノ酸残基を有するすべての一回膜貫通タンパク質が、スクランブラーゼ活性を示すわけではないことが示唆された。しかしながら、他のペプチドとは異なり、EDEM1、SPAST ペプチドは、3 種類すべての蛍光脂質のフリップに対して、高い活性を示した。特に、EDEM1 は、他のペプチドと比較して、非常に低いペプチド/脂質比でフリップを促進した (0.025 mol% EDEM1 存在下で、PC、PE、PS のフリップ速度が、それぞれ、4.4–5.5、18–26、12–26 倍に上昇)。また、フリップ速度が、これらのペプチドの膜中の濃度に対して線形であることから (図 30 B)、EDEM1、SPAST ペプチドは、モノマーでフリップフロップを促進することが示された。

#### 第四節 EDEM1 と SPAST ペプチドの変異体のフリップフロップ促進能の評価

EDEM1、SPAST ペプチドがフリップフロップを促進するメカニズムを解明するため、両配列の中央領域に存在する親水性度の高いアミノ酸残基を、疎水性の Ala 残基に置換した。すべての変異体ペプチドが、野生型 (WT) ペプチドと同様の CD スペクトルを示すことを確認した (図 32)。SPAST ペプチドの Arg 残基を Ala 残基に置換すると、ペプチドのフリップ促進能が失われた (図 33 A、表 7)。しかし、EDEM1 ペプチドの H14A 置換は、活性を部分的にしか阻害しなかった (図 33 B、表 7)。EDEM1 配列中には、中央領域の 1 残基外側に Arg 残基が存在する。興味深いことに、この Arg 残基を Ala 残基に置換した変異体ペプチドは、フリップ促進能を全く示さなかった (図 33 B、表 7)。同様に、中央領域の 1 残基外側の His 残基を Ala 残基に置換した SPAST 変異体ペプチドでは、部分的な活性阻害が見られた (図 33 A、表 7)。これらの結果から、EDEM1、SPAST ペプチドの高い活性は、配列中に存在する 2 つの親水性度の高いアミノ酸残基によるものであることが示唆された。EDEM1 H14A、R10A 変異体ペプチドを等量組み込んだ LUV において、相乗的なフリップの促進は見られなかった (図 33 B、表 7)。この結果は、分子間ではなく、分子内相互作用が EDEM1 のフリップフロップ促進能に重要な役割を果たしていることを示唆しており、これは、EDEM1 WT の活性が、その膜中濃度に対して線形関係にあったことと一致している。また、EDEM1、SPAST ペプチドはどちらも、C<sub>6</sub>NBD-PC よりも C<sub>6</sub>NBD-PS のフリップを効率的に促進した。正電荷ア

ミノ酸残基 Arg が両配列中に存在することを考慮すると、PS への選択性は、Arg 残基の側鎖の正電荷と PS の頭部基の負電荷の静電相互作用によるものであると考えられる。実際に、EDEM1 の Arg 残基を負電荷アミノ酸残基 Glu に置換すると、フリップ促進能がほぼ完全に失われた (図 33 B、表 7)。

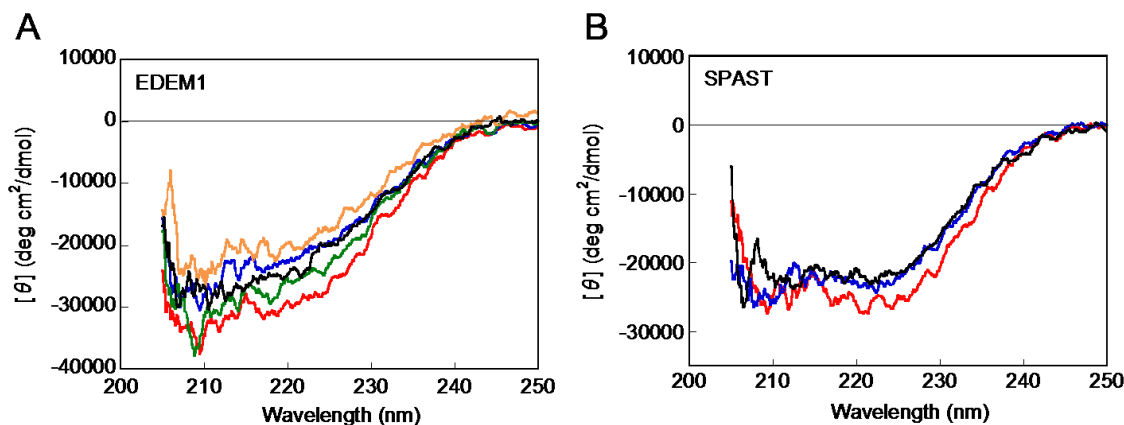


図 32. LUV 中の EDEM1、SPAST、及び、それらの変異体ペプチド (0.2 mol%) の CD スペクトル。(A) EDEM1 WT (●)、R10A (●)、H14A (●)、R10E (●)、20 mol% コレステロール存在下の EDEM1 WT (●)。(B) SPAST WT (●)、R13A (●)、H18A (●)。

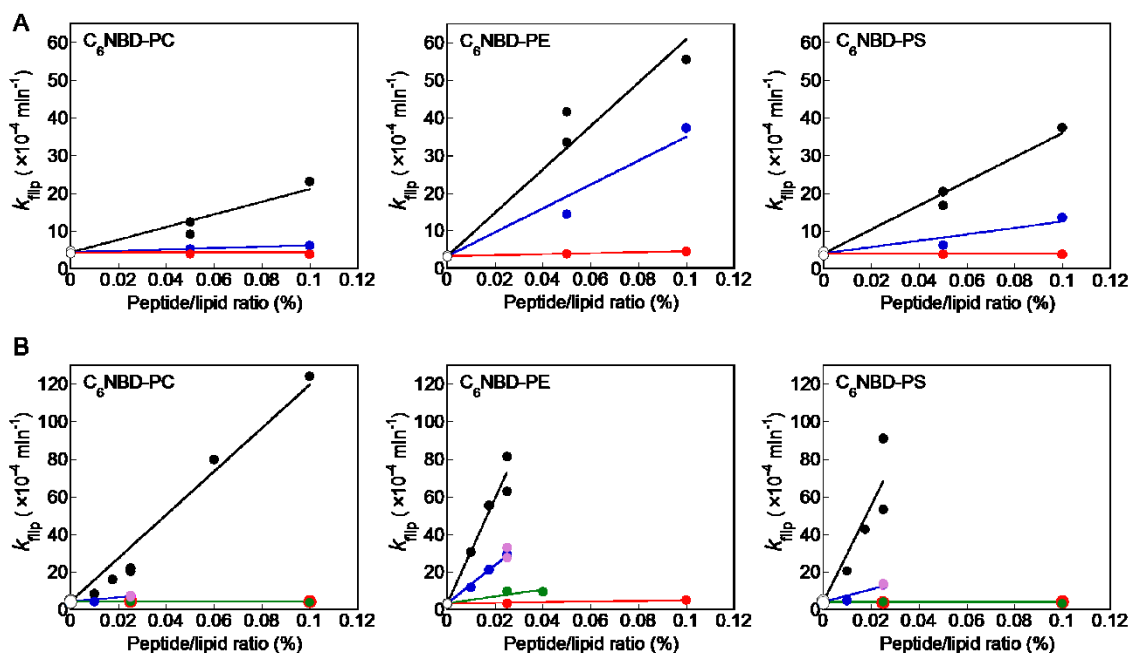


図 33. ペプチドを組み込んだ LUV (0–0.1 mol%) における C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PE、C<sub>6</sub>NBD-PS のフリップ速度定数 (37°C)。(A) SPAST WT (●)、R13A (●)、H18A (●)。(B) EDEM1 WT (●)、R10A (●)、H14A (●)、R10E (●)、0.025 mol% の EDEM1 R10A と H14A (●)

表 7 EDEM1、SPAST 変異体ペプチドを組み込んだ LUV における C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PE、C<sub>6</sub>NBD-PS のフリップ速度定数 (37°C)

Peptide (mol%)	$k_{\text{flip}} (\times 10^{-4} \text{ min}^{-1})$		
	C <sub>6</sub> NBD-PC	C <sub>6</sub> NBD-PE	C <sub>6</sub> NBD-PS
SPAST R13A (0.1)	3.82	4.53	3.80
SPAST R13A (0.05)	3.95	3.84	3.79
SPAST H18A (0.1)	6.17	37.4	13.6
SPAST H18A (0.05)	5.29	14.4	6.19
EDEM1 R10A (0.1)	4.18	5.10	3.98
EDEM1 R10A (0.025)	4.43	3.27	3.63
EDEM1 H14A (0.025)	7.43	29.3	13.4
EDEM1 H14A (0.0175)	–	21.3	–
EDEM1 H14A (0.01)	4.34	11.8	4.94
EDEM1 R10E (0.1)	3.97	–	3.25
EDEM1 R10E (0.04)	–	9.57	–
EDEM1 R10E (0.025)	4.25	9.73	4.02
EDEM1 R10A (0.025) + EDEM1 H14A (0.025)	6.54, 7.48	27.7, 32.9	13.3, 13.7

#### 第五節 EDEM1 ペプチド依存的なフリップフロップの熱力学的パラメーターの解析

EDEM1 のフリップ促進能について詳細に調べるため、EDEM1 存在下、非存在下におけるリン脂質フリップフロップの温度依存性を評価した。ペプチド存在下、非存在下どちらにおいても、より低い温度でより低い速度定数が得られた (表 8)。フリップ速度定数のアレニウスプロットを線形とみなし (図 34)、Homan、Pownall らの方法を用いて<sup>52</sup>、37°Cにおける活性化パラメーターを算出した (表 9)。脂質のみの LUV における蛍光脂質の自発的なフリップフロップは、エンタルピー的にも、エントロピー的にも不利なプロセスであった。これは、1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine について得られた以前の結果と一致している<sup>53</sup>。EDEM1 は活性化自由エネルギーを減少させた (C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PE、C<sub>6</sub>NBD-PS に対して、それぞれ、 $\Delta\Delta G^\ddagger = -3.70, -8.11, -7.49$  kJ/mol)。EDEM1 による活性化エネルギーの減少は、活性化エンタルピー、エントロピー両方の減少を伴うものであった (C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PE、C<sub>6</sub>NBD-PS に対して、それぞれ、 $\Delta\Delta H^\ddagger = -30.4, -20.7, -34.4$  kJ/mol,  $T\Delta\Delta S^\ddagger = -26.7, -12.5, -27.0$  kJ/mol)。この結果は、リン脂質の頭部基が EDEM1 の親水性度の高いアミノ酸残基と静電的に相互作用することにより、遷移状態が安定化されたためであると考えられる。

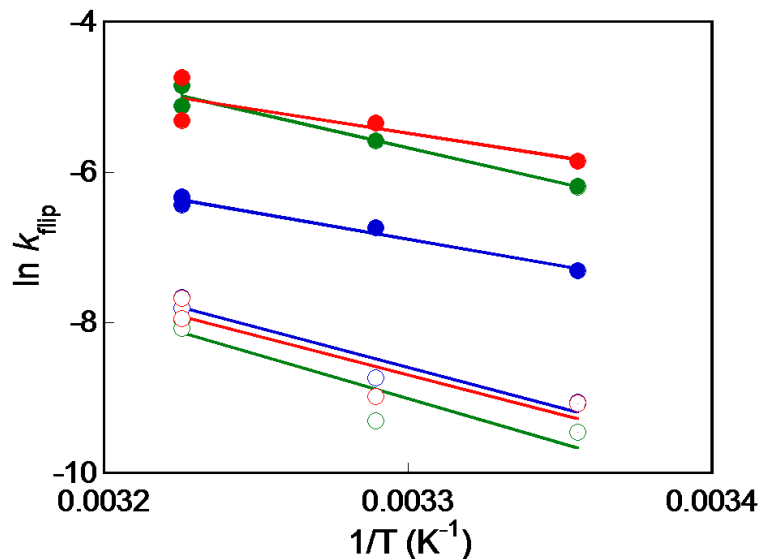


図 34. 自発的 (○)、もしくは 0.025 mol% EDEM1 依存的な (●) フリップ速度定数のアレニウスプロット。C<sub>6</sub>NBD-PC (青)、C<sub>6</sub>NBD-PE (緑)、C<sub>6</sub>NBD-PS (赤)。EDEM1 依存的なフリップ速度定数として、EDEM1 存在下のフリップ速度定数から、自発的なフリップ速度定数を差し引いたものを用いた。

表 8 EDEM1 存在下、非存在下の LUV における C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PE、C<sub>6</sub>NBD-PS のフリップ速度定数 (25、31、37°C)

Peptide (mol%)	Temperature (°C)	$k_{\text{flip}} (\times 10^{-4} \text{ min}^{-1})$		
		C <sub>6</sub> NBD-PC	C <sub>6</sub> NBD-PE	C <sub>6</sub> NBD-PS
No peptide	37	4.04, 4.68	3.09, 3.45	3.51, 4.60
	31	1.61	0.908	1.26
	25	1.16	0.778	1.14
EDEM1 (0.025)	37	20.3, 22.0	63.0, 81.4	53.2, 91.2
	31	13.4	38.5	48.6
	25	7.82	21.2	29.7

表9 37°Cにおける C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PE、C<sub>6</sub>NBD-PS のフリップフロップの活性化パラメーター

Fluorescent lipid	Peptide (mol%)	$E_a$ (kJ/mol)	$\Delta G^{‡a}$ (kJ/mol)	$\Delta H^{‡a}$ (kJ/mol)	$T\Delta S^{‡a}$ (kJ/mol)
C <sub>6</sub> NBD-PC	No peptide	88.5	96.1	85.9	-10.2
	EDEM1 (0.025)	58.1	92.4	55.5	-36.9
C <sub>6</sub> NBD-PE	No peptide	98.1	97.0	95.5	-1.49
	EDEM1 (0.025)	77.4	88.9	74.9	-14.0
C <sub>6</sub> NBD-PS	No peptide	86.6	96.4	84.0	-12.4
	EDEM1 (0.025)	52.2	88.9	49.6	-39.4

<sup>a</sup>活性化パラメーターは Homan、Pownall らの方法<sup>52</sup>により算出した。

#### 第六節 EDEM1 ペプチドのフリップフロップ促進能に対するコレステロールの効果

コレステロールは、疎水性の膜貫通ペプチドのリン脂質フリップフロップ促進能を抑制することが報告されている<sup>51</sup>。ここでは、EDEM1 ペプチドの活性に対するコレステロールの影響について評価した。始めに、20 mol%のコレステロール存在下におけるペプチドの二次構造とトポロジーについての評価を行った。コレステロール存在下、非存在下で、EDEM1 ペプチドの CD スペクトルが変化しなかったことから、コレステロールはペプチドの二次構造には影響しないことが示唆された (図 32 A)。コレステロール含有膜におけるペプチドの膜貫通配向の確認を、膜不透過のアミノ基修飾試薬を用いて行った (図 35)。ペプチドの両端に Lys 残基が 2 つずつ存在するため、ペプチドが膜貫通配向をとっている場合、4 つの Lys 残基のうち 2 つが修飾されと考えられる。実際に、LUV 中の EDEM1 ペプチドでは、 $m/z$  が修飾試薬の分子量の 2 倍増加したのに対して、膜と相互作用しなかった MMP23 ペプチドでは、すべての Lys 残基が修飾された (図 35)。

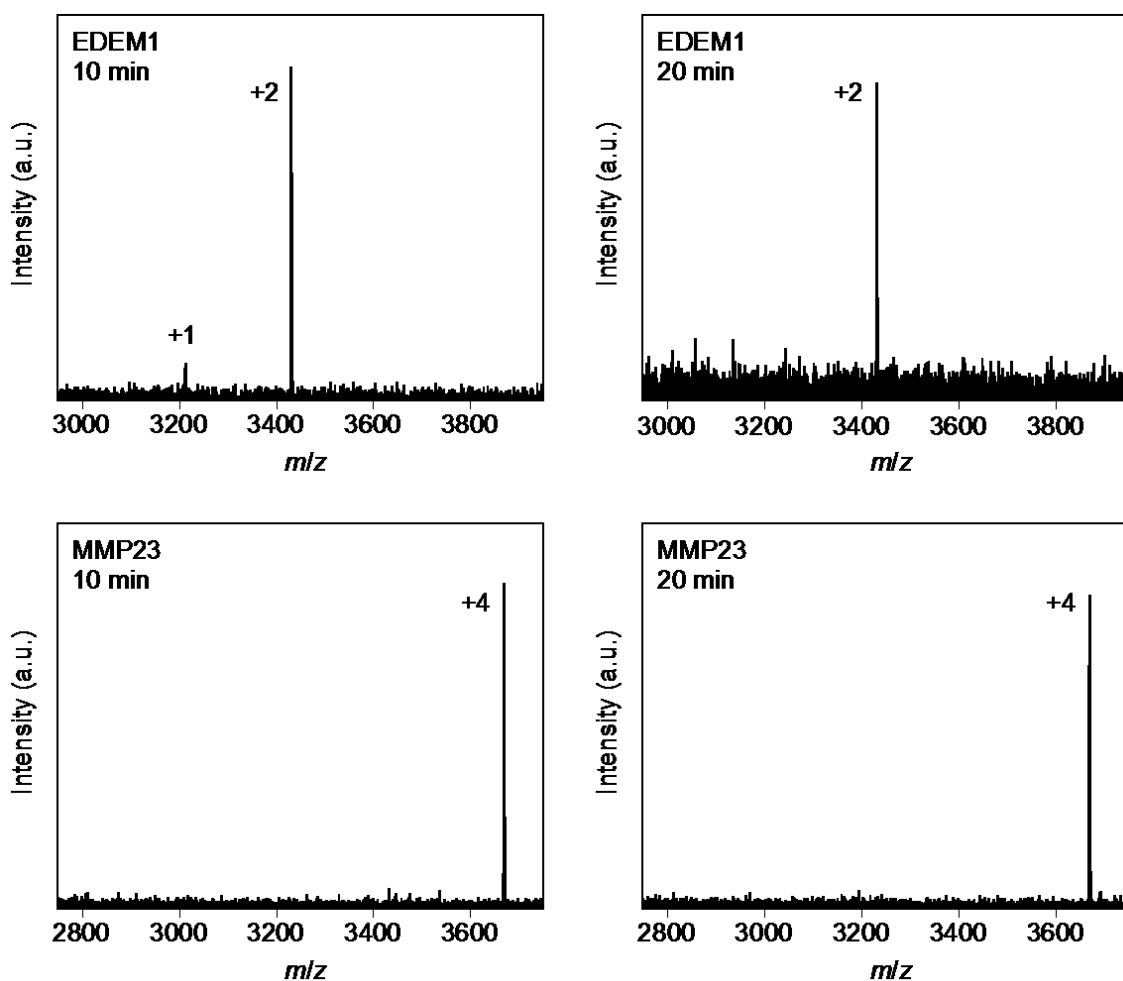


図 35. 質量分析計を用いた人工膜中のペプチドの膜貫通評価。

0.1 mol%ペプチドを組み込んだ、POPC/コレステロールのモル比が 4 : 1 の LUV を、Tricin-NaOH 緩衝液を用いて調製し、250 mM methoxy-poly(ethylene glycol)<sub>4</sub> *N*-hydroxysuccinimide (mPEG<sub>4</sub>-NHS) を試薬/ペプチドのモル比が 500 : 1 になるよう加えた。25°Cで 10、20 分インキュベーション後、NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> を mPEG<sub>4</sub>-NHS の 10 倍量加えて反応を停止させた。Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) を用いて、ペプチドの分子量変化を評価した。mPEG<sub>4</sub>-NHS で 10、20 分インキュベーション後の、コレステロール 20% LUV に組み込んだ EDEM1、MMP23 のマススペクトルを示した。+1、+2、+4 という値は、それぞれ、mPEG<sub>4</sub>-NHS が 1、2、4 個結合したペプチドの *m/z* を表す。



脂質のみの LUV における蛍光脂質の自発的なフリップ速度定数は、コレステロールによる影響をほとんど受けなかった (図 36、表 10)。これは、第二章の結果と一致している。EDEM1 依存的なフリップは、20%コレステロールによって阻害された (PC、PE、PS に対して、それぞれ、0.11、0.22、0.27 倍に減少) (図 36、表 10)。それに対して、5%のコレステロールは、EDEM1 の活性にほとんど影響しなかった。

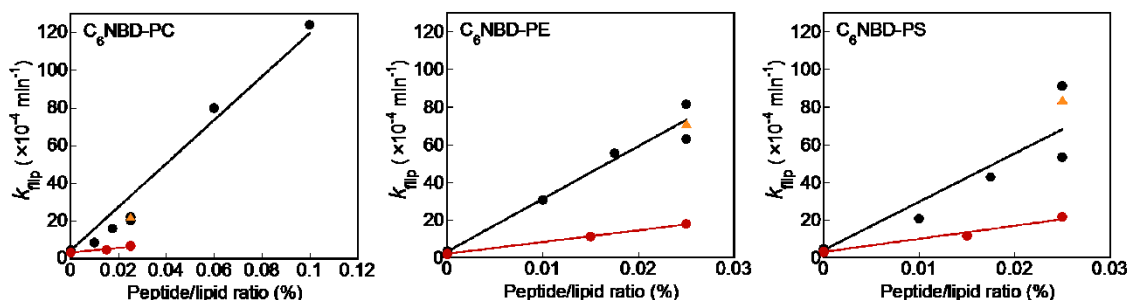


図 36. EDEM1 ペプチドを組み込んだ LUV (0–0.1 mol%) における C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PE、C<sub>6</sub>NBD-PS のフリップ速度定数 (37°C)。コレステロール非存在下 (●)、5% (▲)、20%コレステロール存在下 (●)。

表 10 コレステロール存在下、非存在下における、EDEM1 ペプチドを組み込んだ LUV、もしくは脂質のみの LUV 中の C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PE、C<sub>6</sub>NBD-PS のフリップ速度定数 (37°C)。

Peptide (mol%)	Cholesterol (mol%)	$k_{\text{flip}} (\times 10^{-4} \text{ min}^{-1})$		
		C <sub>6</sub> NBD-PC	C <sub>6</sub> NBD-PE	C <sub>6</sub> NBD-PS
No peptide	0	4.04, 4.68	3.09, 3.45	3.51, 4.60
	20	3.13, 3.31	1.82, 2.27	2.77, 3.30
EDEM1 (0.025)	0	20.3, 22.0	62.7, 81.4	53.2, 91.2
	5	22.2	71.1	83.8
	20	6.53	17.8	21.5
EDEM1 (0.015)	20	4.66	11.0	11.6

## 第七節 考察

本章では、ヒト小胞体膜タンパク質の中で、膜貫通配列の中央領域に親水性度の高いアミノ酸残基を有する一回膜貫通タンパク質の膜貫通配列ペプチドを合成し、そのフリップフロップ促進能を評価した。その結果、予想とは異なり、これらのペプチドは非常に異なる活性を示した。4 ペプチド (FACL4、JP4、P4HTM、TMED7) は、C<sub>6</sub>NBD-PC に対して弱い活性しか示さず、3 ペプチド (ATF6、JP3、UBE2J2) は、ほぼ C<sub>6</sub>NBD-PC のフリップを促進しなかった。第一章において、膜に対して **negative mismatch** である TMP23Q、TMP25Q はフリップフロップ促進能を示したが、**no mismatch** である TMP27Q はフリップフロップを促進しなかった。また、第二章の結果から、**negative mismatch** によりフリップフロップ促進能が上昇することが示唆された。本章で用いた膜貫通配列ペプチドは、SOSUI により 23 残基が膜貫通領域であると予測されており、本章で用いた脂質二重層に対して **negative mismatch** ではないと考えられる。よって、膜貫通配列ペプチドにおいても、**negative mismatch** がない場合、膜貫通領域に親水性度の高いアミノ酸残基が 1 残基存在するだけでは、フリップフロップを促進することができないと結論付けられる。

RNF180 ペプチドは、他の蛍光脂質よりも、C<sub>6</sub>NBD-PC に対してより活性を示した。Langer らは、ヘリックスを安定化する Leu 残基を、かさ高く、ヘリックスを不安定化する Val 残基に置換すると、膜貫通ペプチドのフリップフロップ促進能が上昇すること、及び、その効果は PC に対して最も著しいことを報告している<sup>36</sup>。RNF180 配列は、かさ高い  $\beta$ -branched 残基を 9 残基 (Val4 残基、Ile5 残基) 有しているのに対して、Leu は 1 残基しかない。それゆえ、RNF180 のヘリックス骨格の揺らぎが、スクランブラーゼ活性に寄与していると考えられる。

EDEM1 ペプチドは、非常に低いペプチド/脂質比で (0.025 mol%)、3 種類すべての蛍光脂質のフリップ速度を増加させた。また、SPAST ペプチドを 0.1 mol% 組み込んだ LUV では、蛍光脂質のフリップフロップが促進された。これらのペプチドは、中央領域だけでなく (EDEM1 が His 残基、SPAST が Arg 残基)、その 1 残基外側にも親水性度の高いアミノ酸残基を有している (EDEM1 が Arg 残基、SPAST が His 残基) (図 27)。変異体ペプチドを用いた実験から、2 つの親水性度の高いアミノ酸残基はどちらも、フリップフロップ促進能に重要であることが明らかになった。これらのペプチドのフリップフロップ促進能は、PC よりも、PE、PS に対してより効果的であった。PE に対する選択性は、上述のように、PE の頭部基の親水性が相対的に低いことによるものであると考えられる。第一章において、中央に正電荷アミノ酸残基 Lys を有する TMP23K は、C<sub>6</sub>NBD-PC よりも負電荷の C<sub>6</sub>NBD-PG のフリップをより促進することを明らかにしている。そのため、Arg 残基、His 残基との静電相互作用を介して、PS の負に帯電した頭部基が、膜中により効率的に引き込まれるのではないかと考えられる。興味深いことに、EDEM1 ペプチドは、SPAST ペプチドよりもかなり高い活性を示した。Arg 残基と His

残基の間隔が、EDEM1 配列では 4 残基であるのに対して、SPAST 配列では 5 残基である。αヘリックス構造では 3.6 残基で一回転することを考慮すると、EDEM1 では、2つの残基がヘリックスの同じ面に位置することになり（図 37）、親水性度の高いアミノ酸残基が膜法線に平行に並んだ領域を、リン脂質の頭部基が通ることで、よりフリップフロップが促進されたのではないかと考えられる（図 37）。同様のメカニズムが、エネルギー非依存的なリン脂質スクランブラーゼの結晶構造を明らかにした、最近の報告においても示唆されている<sup>10</sup>。EDEM1 依存的なフリップフロップから得られた活性化パラメーターは、遷移状態において、リン脂質の頭部基と親水性度の高いアミノ酸残基(Arg, His) が相互作用することにより、フリップフロップする際のエンタルピー的な不利さが軽減されるというモデルを、強く支持するものである。

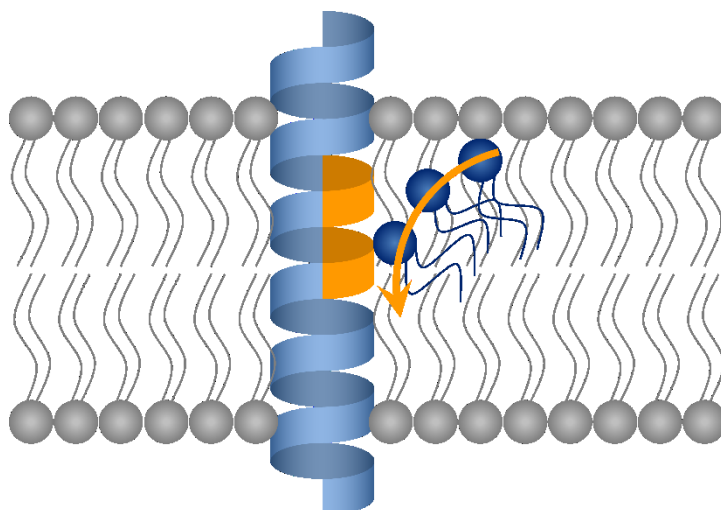


図 37. EDEM1 ペプチドによるフリップフロップ促進のモデル図。

EDEM1 ヘリックス中で、Arg 残基、His 残基が膜法線に平行に並んだ領域を、リン脂質の頭部基が通過することで、活性化エネルギーが減少し、フリップフロップが促進される。

EDEM1 ペプチドは、本章で用いたペプチドの中で、最も高い活性を示した。しかし、図 36 の速度定数の傾きから、EDEM1 一分子の活性は、一秒間にリン脂質 0.2–0.5 分子フリップさせる程度であると見積もられる。用いた脂質組成が異なるため、正確な比較は困難であるものの、この速度は、opsin や *Aspergillus fumigatus* 由来の afTMEM16 のようなリン脂質スクランブラーゼと比較すると、かなり低い値である<sup>9,54</sup>。小胞体膜のフリップフロップ速度が数分程度に達するには、少なくとも約 0.12 mol% の EDEM1 タンパク質が必要であると考えられる。小胞体膜のタンパク質/脂質比が約 1.2 mol%であることを考慮すると<sup>55</sup>、EDEM1 タンパク質が小胞体膜中に 0.12 mol% 存在しているとは考えにくい。それゆえ、EDEM1 はスクランブラーゼ活性を有するタンパク質の一つであり、膜貫通領域に EDEM1 と同様な物理化学的性質を有するタンパク質が、小胞体

膜の速いフリップフロップに関与しているのではないかと推察される。

ヒト細胞膜タンパク質に対して、SOSUIを用いて膜貫通領域を予測したところ、親水性度の高いアミノ酸残基が6.4%存在した。この値は、細胞膜においても、恒常的にスクランブラーゼ活性を有するタンパク質がある程度存在することを示唆している。しかし、真核生物のオルガネラ膜にはコレステロールが広く分布しており<sup>56</sup>、小胞体膜のコレステロール含量がわずか5%であるのに対して、他のオルガネラ膜にはより多くのコレステロールが含まれている（ゴルジ体：16%、細胞膜：30-35%）<sup>56,57</sup>。このコレステロール含量の違いが各オルガネラ膜のフリップフロップ速度に影響しているのではないかと考え、その効果を評価した。その結果、20%のコレステロールは、EDEM1 依存的な蛍光脂質のフリップフロップを抑制した。膜中にコレステロールが含まれると、脂質のアシル鎖の配向性が上昇し、それに伴い膜が厚くなるため<sup>32,58</sup>、フリップフロップが阻害される<sup>5,46</sup>。小胞体膜のコレステロール含量に相当する、5%の場合、EDEM1 の活性はほぼ阻害されなかった。これらの結果は、コレステロールがスクランブラーゼ活性を制御すること、及び、低いコレステロール含量は小胞体膜の速いフリップフロップに必要であることを示唆するものである。一方、細胞膜では、膜貫通領域に1、2残基の親水性度の高いアミノ酸残基を有する膜タンパク質のスクランブラーゼ活性がコレステロールにより阻害されるため、非対称性が保たれているのではないかと推察される。また、本章では、小胞体膜に特異的なタンパク質に絞って活性を評価したが、コレステロールがスクランブラーゼ活性を制御することを考慮すると、スクランブラーゼ活性を有するタンパク質が小胞体膜に局在する必要はないと思われる。したがって、今回評価しなかった親水性度の高いアミノ酸残基を有する一回膜貫通タンパク質14種についても、今後検討を行う必要がある。

## 第八節 小括

本章では、第一章で得られた、膜貫通領域の中央に位置する親水性度の高いアミノ酸残基が、リン脂質フリップフロップの促進に寄与するという知見をもとに、膜貫通配列ペプチドを用いて、小胞体膜スクランブラーゼ候補の探索を行った。

11 種類の膜貫通配列ペプチドのフリップフロップ促進能を評価した結果、多くのペプチドでは高い活性が見られなかったことから、膜貫通領域に親水性度の高いアミノ酸残基を有するすべての一回膜貫通小胞体膜タンパク質が、小胞体膜の速いフリップフロップに寄与するわけではないことが示唆された。一方、EDEM1、SPAST ペプチドは、3種類すべての蛍光脂質のフリップフロップを促進した。特に、EDEM1 ペプチドは、非常に低いペプチド/脂質比でフリップフロップ促進能を示した。

EDEM1、SPAST 配列の中央付近に、Arg、His という2つの親水性度の高いアミノ酸残基が存在した。これらの残基を疎水性のAla残基に置換すると、ペプチドのフリップフロップ促進能が阻害された。この結果から、EDEM1、SPAST ペプチドの高い活性は、配列中央付近に2つの親水性度の高いアミノ酸残基をもつことによるものであると考えられる。また、EDEM1 ペプチドでは、Arg残基とHis残基がヘリックスの同じ面に位置すると考えられることから、この膜法線に平行に並んだ2つの残基の近傍を脂質頭部が通過することで、フリップフロップがより促進されたものと推察される。

EDEM1 ペプチドの活性は、高いコレステロール含量により阻害された。このことから、小胞体膜の低いコレステロール含量が速いフリップフロップに寄与していること、及び、細胞膜ではEDEM1と同様の性質を有するタンパク質が存在しても、その活性は抑制されることが示唆された。

このようにEDEM1 ペプチドが高い活性を示していたことから、EDEM1 タンパク質が小胞体膜スクランブラーゼとして機能する可能性が示唆された。

## 結論

本研究では、小胞体膜のリン脂質フリップフロップ制御機構の解明を目的とし、フリップフロップを促進する膜貫通領域の物理化学的性質を明らかにし、その情報をもとに、小胞体膜スクランブラーゼ候補の探索を行った。それにより以下の知見を得た。

第一章では、膜貫通配列中央の親水性度の高いアミノ酸残基が、膜貫通ペプチドのフリップフロップ促進に重要であることを明らかにした。これらのペプチドによるフリップフロップの促進には、ペプチドの親水性アミノ酸残基近傍の極性の増加、及び、静電相互作用が関与することが示唆された。また、ペプチドの疎水性部分の長さが、脂質膜の疎水性領域の長さよりも短い **negative mismatch** により、フリップフロップが促進されることが示された。さらに、プログラムで予測したヒト小胞体膜タンパク質の膜貫通配列の中央 6、7 残基に、フリップフロップ促進に寄与すると考えられる残基が 7.3% 存在することが明らかになった。

第二章では、カリウムチャネル **KcsA** のフリップフロップ促進能が、酸性 pH で上昇することを明らかにした。酸性 pH で **KcsA** が開構造をとることが、フリップフロップ促進能の上昇に寄与していることが示唆された。**KcsA** は開構造をとると膜貫通領域の長さが短くなるため、**negative mismatch** が生じて **KcsA** 近傍の膜が薄くなることにより、フリップフロップが促進されたものと推察される。

第三章では、小胞体膜タンパク質 **EDEM1**、**SPAST** の予測膜貫通配列のペプチドが、フリップフロップを促進することを明らかにした。これらのペプチドの高い活性は、膜貫通配列中央付近に、**Arg**、**His** という 2 つの残基を有するためであることが示唆された。さらに、**EDEM1** ペプチドは非常に高い活性を示しており、**EDEM1** タンパク質が小胞体膜のフリップフロップに寄与する可能性が示唆された。**EDEM1** ペプチドのフリップフロップ促進機構としては、2 つの残基がヘリックスの同じ面に位置するため、その近傍を脂質頭部が通過することで、フリップフロップが促進されるというメカニズムが推察される。また、コレステロールが **EDEM1** ペプチドの活性を阻害したことから、小胞体膜、細胞膜におけるコレステロール含量の違いが、両者におけるフリップフロップ速度の違いに重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上の結果により、リン脂質のフリップフロップを促進する膜貫通領域の物理化学的性質として、膜貫通配列中央の親水性度の高いアミノ酸残基の存在、及び、膜貫通領域と脂質二重層の **negative mismatch** という 2 つの性質を明らかにした。さらに、**EDEM1** タンパク質が小胞体膜スクランブラーゼ候補となる可能性が示唆された。本研究は、小胞体膜のフリップフロップ制御機構解明に寄与するだけでなく、膜タンパク質によるフリップフロップ促進の分子メカニズム解明においても、有益な情報となることが期待される。

# 実験方法

## 第一章

### 試料

POPC、 $d_{31}$ -POPC、 $C_6$ NBD-PC、 $C_6$ NBD-PG、5-doxy-PC、10-doxy-PC、16-doxy-PC は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, US) より購入した。 $D_2O$  とアクリルアミドは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US) より購入した。2-AS、6-AS、12-AS は Molecular Probes (Eugene, OR, US) より購入した。Calcein は株式会社 同仁化学研究所 (熊本) より購入した。その他の試薬は、すべて最も等級の高いものを使用した。

### ペプチド合成

KALP23 のアミノ酸配列を基にして、配列中央に疎水性アミノ酸残基の Leu、親水性アミノ酸残基の Lys、Glu、Gln、Asn、His、Pro、Tyr、Ser、Thr をそれぞれ配置したペプチドをデザインした (図 2)。種々の長さのペプチドとして、TMP23Q の配列を基に、Leu 残基と Ala 残基の繰り返し配列の長さを変えたペプチドをデザインした (図 3)。これらのペプチドには、蛍光を使ってペプチドの膜貫通評価を行うために、中央の残基の C 末端側に Trp 残基を配置した。TMP23E 以外のペプチドは Fmoc 固相合成法により合成し、イナートシル WP300 C18 カラム (GL sciences、東京) を用いて、逆相 high performance liquid chromatography (HPLC) (株式会社 島津製作所、京都) により精製した。TMP23E は株式会社 ボナック (福岡) より購入した。ペプチドの純度が 90% 以上であることを、HPLC と MALDI-TOF-MS (ブルカー・ダルトニクス株式会社、神奈川) を用いて確認した。メタノール溶液中のペプチド濃度を、トリプトファンとチロシンのモル吸光係数を用いて、280 nm の吸光度により決定した<sup>59</sup>。

### LUV 調製

LUV を調製する緩衝液として、Tris-HCl 緩衝液 (10 mM Tris、150 mM NaCl、1 mM EDTA、0.01 g/mL  $NaN_3$ 、pH 7.4)、もしくはカルセイン溶液 (50 mM カルセイン、220 mM  $Na^+$ 、34 mM  $Cl^-$ 、pH 7.37) を用いた。中性子小角散乱実験用の LUV 調製の際は、30 vol.%  $D_2O$  を含む Tris-HCl 緩衝液を用いた。メタノール：クロロホルム (体積比=2:1) に溶解した脂質と、メタノールに溶解したペプチドを適宜混合し、ナス型フラスコに滴下した。ロータリーエバポレーターにより、溶媒を減圧除去することで脂質薄膜を形成させた。その後、一晚真空乾燥させることで溶媒を完全に除去した。脂質薄膜に上述の溶液を加えて水和させた。この懸濁液に対して凍結融解を数回行った後、LiposoFast extruder (Avestin、Ottawa、Canada) を用いて、孔径 100 nm のポリカーボネートメンブレンフィルター (Avestin、Ottawa、Canada) を数十回通過させることで LUV を調製した。調製した LUV の粒径を、FPAR-1000 (大塚電子株式会社、大阪) を用いた動的光散乱法に

より測定し、約 120 nm であることを確認した。また、PC 濃度は酵素アッセイキット（和光純薬工業株式会社、大阪）を用いて定量した。

### SUV 調製

メタノール：クロロホルム（体積比=2：1）に溶解した脂質と、メタノールに溶解したペプチドを適宜混合し、ナス型フラスコに滴下した。ロータリーエバポレーターにより、溶媒を減圧除去することで脂質薄膜を形成させた。その後、一晩真空乾燥させることで溶媒を完全に除去した。脂質薄膜に Tris-HCl 緩衝液（-NaCl）（10 mM Tris、1 mM EDTA、pH 7.4）を加えて水和させた。この懸濁液を氷上、窒素気流下で 3 分間の超音波処理と 3 分間の冷却サイクルを 3 回行い、SUV を調製した。その際混入した微量のチタンは、遠心分離法で沈殿させ取り除いた。調製した SUV の粒径を、FPA-1000 を用いた動的光散乱法により測定し、40–80 nm であることを確認した。また、PC 濃度は酵素アッセイキットを用いて定量した。

### アクリルアミドによるトリプトファン蛍光の消光実験

0.4 mol% のペプチドを含む POPC LUV（2.5 mM、Tris-HCl 緩衝液）に対して、1.5 M のアクリルアミドを滴下した。トリプトファン蛍光強度の測定は、25°C、励起/検出波長が 285/325 nm の条件で、分光蛍光光度計 F4500（日立、東京）を用いて行った。得られたデータは Stern-Volmer 式により解析した。

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] \quad (3)$$

$F_0$ 、 $F$  は、それぞれ、アクリルアミド非存在下、もしくは濃度  $[Q]$  のアクリルアミド存在下における蛍光強度、 $K_{SV}$  は Stern-Volmer 定数である。コントロールとして、2.5 mM の POPC LUV 存在下で、フリーのトリプトファン 10  $\mu$ M に対して、消光実験を行った。

### $n$ -AS によるトリプトファン蛍光の消光実験

0.1 mol% のペプチドを含む POPC LUV（1 mM、Tris-HCl 緩衝液）に対して、メタノールに溶解した  $n$ -AS（500  $\mu$ M）を 0.5 mol% になるよう加えて、25°C で 1 時間インキュベーションした。トリプトファン蛍光を、 $n$ -AS の存在下 ( $F$ )、非存在下 ( $F_0$ ) で測定した。測定は、25°C、励起/検出波長が 285/325 nm の条件で、分光蛍光光度計 F4500 を用いて行った。

### Trp 残基の定常蛍光異方性の測定

0.4 mol% のペプチドを含む POPC LUV（Tris-HCl 緩衝液）を用いた。Trp 残基の定常蛍光異方性 ( $r_s$ ) の測定は、25°C、励起/検出波長が 285/325 nm の条件で、分光蛍光光度計 F4500 を用いて行った。 $r_s$  は次の式から算出した。



$$r_S = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (4)$$

$I_{VV}$ 、 $I_{VH}$ は、それぞれ、垂直偏光によって励起した際の垂直、水平に偏光した蛍光の強度、 $G$ は装置の異方性感受性に対する補正係数であり、 $G = I_{HV}/I_{HH}$ で表される。ここで、 $I_{HV}$ 、 $I_{HH}$ は、それぞれ、水平偏光によって励起した際の垂直、水平に偏光した蛍光の強度である。

### CD スペクトル測定

ペプチド/脂質比が 1 mol% の SUV を用いた。1 mM の SUV を、光路長 5 mm の石英セルに加え、25°C、200–250 nm の範囲で、円二色性分散計 J-805（日本分光、東京）を用いて測定した。8 回測定した平均値をそれぞれのスペクトルとした。ペプチドを組み込んだ SUV のスペクトルから、脂質のみの SUV のスペクトルを差し引いた後、平均残基モル橢円率に変換した。 $\alpha$  ヘリックス含有率は、次の式を用いて算出した<sup>60</sup>。

$$\alpha\text{-helix content (\%)} = \frac{-[\theta_{222}] - 2340}{30300} \times 100 \quad (5)$$

$[\theta_{222}]$  は 222 nm における平均残基モル橢円率である。

### *n*-Doxyl-PC を用いたトリプトファン蛍光の消光実験

POPC : ペプチド : *n*-doxyl-PC = 100 : 1 : 20 になるよう調整した LUV (Tris-HCl 緩衝液) を用いた。LUV 中のトリプトファン蛍光スペクトルを、25°C、励起/検出波長が 280/300–400 nm の条件で、分光蛍光光度計 F2500（日立、東京）を用いて行った。得られたスペクトルから、POPC のみの LUV のスペクトルを差し引いたものを、ペプチドのトリプトファン蛍光スペクトルとした。

### 時間分解中性子小角散乱法によるフリップフロップ測定

0.4 mol% のペプチドを含む LUV (30 mM) を、POPC (H-LUV)、もしくは  $d_{31}$ -POPC (D-LUV) を用いて調製した。中性子小角散乱実験は、東海村にある研究用原子炉 JPR-3 に設置された、東京大学物性研究所の中性子小角散乱装置 SANS-U を用いて行った。中性子原の波長 ( $\lambda$ ) は 7 Å ( $\Delta\lambda/\lambda = 10\%$ )、試料—検出器間距離は 4 m、経路長 2 mm の石英セル (日本石英硝子、東京) を用いて測定した。各測定は、1 mM の M $\beta$ CD 存在下、37°C で、等量の H-LUV、D-LUV 溶液を混合した直後に開始した。10 分間に計測された総カウントを積算したのち、溶媒の計数率を差し引いた。規格化コントラスト、 $\Delta\rho(t)/\Delta\rho(0)$  は次式より算出した。

$$\Delta\rho(t)/\Delta\rho(0) = (\sqrt{I(t)} - \sqrt{I(\infty)}) / (\sqrt{I(0)} - \sqrt{I(\infty)}) \quad (6)$$

$I(t)$  は、LUV 混合後  $t$  分経過したときの計数率である。 $I(\infty)$  は、POPC と  $d_{31}$ -POPC の 1 : 1 混合物から調製した LUV による計数率、 $I(0)$  は、H-LUV と D-LUV からの計数率の平

均値である。M $\beta$ CD はリン脂質の粒子間移動を触媒するため、理想的には、フリップフロップが起これば、規格化コントラストの値は 0、フリップフロップが起らなければ、0.5 に到達する。しかし、この値は、試料調製（多重層膜ベシクルの存在）や装置の設定によって影響を受けると思われる。そのため、ネガティブコントロールとして、ペプチドを含まない LUV を用いた。

#### 蛍光脂質を用いたフリップ測定 (図 11 A、D)

Tris-HCl 緩衝液で調製した POPC LUV を用いた。LUV の外葉のみを蛍光脂質で非対称に標識するため、0.1、0.025 mol% のペプチドを含む POPC LUV に対して、それぞれ、メタノールに溶解した C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PG を 0.5 mol% (蛍光脂質/非蛍光脂質) 加えた。37°C で種々の時間インキュベーションした後 (10–360 min)、内側に移行 (フリップ) した蛍光脂質の割合を求めるため、150  $\mu$ M の LUV に対して、2 M Tris に溶解した dithionite を 8 mM になるよう加えて、LUV 外葉に残存する蛍光脂質を還元することで、外葉からの蛍光を消光した。Dithionite の添加後、NBD 蛍光の減衰を、25°C、励起/検出波長が 460/534 nm の条件で、分光蛍光光度計 F4500 を用いて、500 秒間測定した。内側に移行した蛍光脂質の割合 ( $\Phi_{\text{inner}}$ ) は、 $F/F_0$  から求めた。 $F_0$ 、 $F$  は、それぞれ、dithionite 添加前、添加後の蛍光強度である。 $F$  値を決定するため、dithionite 添加後 100~500 秒間の減衰曲線を単一指数関数でフィッティングし、添加直後に外挿したものを  $F$  とした。

理論的には、LUV の内葉と外葉に含まれるリン脂質の数が同じならば、 $\Phi_{\text{inner}}$  は次式で与えられる。

$$\Phi_{\text{inner}} = \frac{k_{\text{flip}}}{k_{\text{flip}} + k_{\text{flip}}} [1 - \exp\{-(k_{\text{flip}} + k_{\text{flip}})t\}] \quad (7)$$

$k_{\text{flip}}$ 、 $k_{\text{flip}}$  は、それぞれ、フリップとフロップの速度定数である。フリップとフロップが同じ速度で起こるならば ( $k_{\text{flip}} = k_{\text{flip}}$ ) :

$$\Phi_{\text{inner}} = \frac{1}{2} \{1 - \exp(-2k_{\text{flip}}t)\} \quad (8)$$

実験的には、 $t=0$ 、 $\infty$  における  $\Phi_{\text{inner}}$  値は、0、1/2 に等しくはなかったため、代わりに次式を用いた。

$$\Phi_{\text{inner}} = C_1 \{1 - \exp(-2k_{\text{flip}}t)\} + C_2 \quad (9)$$

#### 蛍光脂質を用いたフリップ測定 (図 11 B、12、13、15)

Tris-HCl 緩衝液で調製した POPC LUV を用いた。LUV の外葉のみを蛍光脂質で非対称に標識するため、エタノールに溶解した C<sub>6</sub>NBD-PC を 0.2 mol% (蛍光脂質/非蛍光脂質) 加えた。37°C で種々の時間インキュベーションした後 (4–360 min)、内側に移行 (フリップ) した蛍光脂質の割合を求めるため、50  $\mu$ M の LUV に対して、2 M Tris に

溶解した dithionite を 8 mM になるよう加えて、LUV 外葉に残存する蛍光脂質を還元することで、外葉からの蛍光を消光した。Dithionite の添加後、NBD 蛍光の減衰を、25°C、励起／検出波長が 460／534 nm の条件で、分光蛍光光度計 F2500 を用いて、500 秒間測定した。内葉に移行した C<sub>6</sub>NBD-PC の割合 ( $\Phi_{\text{inner}}$ ) は、dithionite 消光プロファイル、 $F(t)/F(0)$  を (1) 式でフィッティングして算出した。 $F(0)$ 、 $F(t)$  は、それぞれ、dithionite 添加前、添加後の蛍光強度である。 $\Phi_{\text{inner}}$  の時間変化を (9) 式でフィッティングすることで、 $k_{\text{flip}}$  を求めた。

#### LUV からのカルセインの漏出評価

カルセイン溶液で調製した POPC LUV を用いた。Superdex 200 (GE Healthcare UK、Buckinghamshire、UK) を詰めたスピンカラムにより、LUV の外側のカルセイン溶液を Tris-HCl 緩衝液に置換した。LUV に封入したカルセインの蛍光を、25°C、励起／検出波長が 490／520 nm の条件で、分光蛍光光度計 F4500 を用いて、1 時間測定した。1 時間後に、Triton X-100 を 0.25 v/v% 添加することで膜を崩壊させた。

## 第二章

### 試料

POPC、C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PG、C<sub>6</sub>NBD-PS は Avanti Polar Lipids より購入した。コレステロールは Sigma-Aldrich より購入した。TBA bromide は和光純薬工業株式会社より購入した。その他の試薬は、すべて最も等級の高いものを使用した。

N 末端もしくは C 末端に His タグのついた野生型 KcsA と、N 末端の M0 ヘリックス (1-22) を欠損させた KcsA ΔM0 の発現・精製は、参考文献のプロトコルにしたがって行った<sup>45</sup>。

### サンプル調製

LUV 調整のため、メタノール：クロロホルム (体積比=2:1) に溶解した POPC とコレステロールを適宜混合し、ナス型フラスコに滴下した。ロータリーエバポレーターにより、溶媒を減圧除去することで脂質薄膜を形成させた。その後、一晚真空乾燥させることで溶媒を完全に除去した。脂質薄膜にリン酸緩衝液 (10 mM phosphate、150 mM KCl、1 mM NaN<sub>3</sub>、pH 7.4)、もしくは 10 mM TBA bromide 存在下、非存在下のクエン酸-リン酸緩衝液 (4.5 mM citrate、5.5 mM phosphate、150 mM KCl、1 mM NaN<sub>3</sub>、pH 4.0) を加えて水和させた。この懸濁液に対して凍結融解を数回行った後、LiposoFast extruder を用いて、孔径 100 nm のポリカーボネートメンブレンフィルターを数十回通過させることで LUV を調製した。調製した LUV の粒径を、FPAR-1000 を用いた動的光散乱法により測定し、約 120 nm であることを確認した。また、PC、コレステロール濃度は酵素アッセイキットを用いて定量した (和光純薬工業株式会社、大阪)。

プロテオリポソームの調製は参考文献<sup>61</sup>の方法に少し変更を加えて行った。上述の方法で調製した、コレステロールを 0、5、30 mol% 含む LUV に対して、3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) を終濃度がそれぞれ 34、34、150 mM になるよう加え、25°C で 2 時間インキュベーションした (30%コレステロールの場合に CHAPS 濃度が高いのは、LUV の可溶化に必要なためである)。そこに脂質に対して KcsA (4 量体) が 0.05、0.025、0.0125 mol% になるよう KcsA をそれぞれ加えて、25°C で 20 分間インキュベーションした。界面活性剤を室温で 48 時間透析することで除去し (12 時間おきに緩衝液を交換した)、KcsA の再構成されたプロテオリポソームを調製した。タンパク質を再構成していない脂質のみのリポソームについても、KcsA を加える手順を除いて、同様の操作により調製した。リポソームを 100 nm のポリカーボネートメンブレンフィルターに通すことで粒径を整え、FPAR-1000 を用いた動的光散乱法により 110–150 nm であることを確認した。最終的なタンパク質/脂質比を測定するため、脂質濃度については上述の方法で決定した。KcsA の濃度については界面活性剤に可溶化した状態の KcsA を標準として、脂質濃度を合わせて各試料の SDS-PAGE を行った。染色にはゲル-ネガティブ染色キット (ナカライテスク株式会社、京

都) を用いた。

#### 蛍光脂質を用いたフリップ測定

リポソームの外葉のみを蛍光脂質で非対称に標識するため、KcsA プロテオリポソームに対して、それぞれ、エタノールに溶解した C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PG、C<sub>6</sub>NBD-PS を 0.2 mol% (蛍光脂質/非蛍光脂質) 加えた。25°C、37°C で種々の時間インキュベーションした後 (30–360 min)、内側に移行 (フリップ) した蛍光脂質の割合を求めるため、50 μM のプロテオリポソームに対して、2 M Tris に溶解した dithionite を 8 mM になるよう加えて、LUV 外葉に残存する蛍光脂質を還元することで、外葉からの蛍光を消光した。Dithionite の添加後、NBD 蛍光の減衰を、25°C、励起/検出波長が 460/534 nm の条件で、分光蛍光光度計 F2500 を用いて、500 秒間測定した。

内葉に移行した蛍光脂質の割合 ( $\Phi_{\text{inner}}$ ) は、 $F/F_0$  から求めた。 $F_0$ 、 $F$  は、それぞれ、dithionite 添加前、添加後の蛍光強度である。 $F$  値を決定するため、dithionite 添加後 400 ~ 500 秒間の減衰曲線を単一指数関数でフィッティングし、添加直後に外挿したものを  $F$  とした。 $\Phi_{\text{inner}}$  の時間変化を (9) 式でフィッティングした。蛍光脂質のフリップ初速度は、(9) 式の  $t=0$  における一次導関数を用いて決定した。

$$\text{Initial flip rate} = 2C_1 k_{\text{flip}} \quad (10)$$

#### 蛍光脂質を用いたフロップ測定

LUV 調製前にメタノール:クロロホルム (体積比=2:1) に溶解した脂質混合物に対して C<sub>6</sub>NBD-PC を添加することで、両葉を対称に蛍光脂質で標識したプロテオリポソームを調製した。両葉標識リポソームに対して 2 M Tris に溶解した dithionite を、リポソームと dithionite の終濃度がそれぞれ 1.5、25 mM になるよう添加し、25°C で 5 分間インキュベーションした。これによりリポソームの外葉に存在する蛍光脂質による蛍光が不可逆に消光されるため、内葉のみを蛍光脂質で標識したプロテオリポソームが調製できる。その後、Superdex 200 を詰めたスピнкаラムを用いて、溶液中の dithionite を取り除いた。内葉標識プロテオリポソームを 37°C で種々の時間インキュベーションした後 (30–360 min)、上述のフリップ測定と同様の方法により、外葉に移行した (フロップした) 蛍光脂質の割合 ( $1-\Phi_{\text{inner}}$ ) を算出した。 $1-\Phi_{\text{inner}}$  の時間変化を (9) 式でフィッティングし、(10) 式を用いてフロップ初速度を決定した ((9)、(10) 式における  $k_{\text{flip}}$  の代わりに  $k_{\text{flop}}$  を用いた)。

### 第三章

#### 試料

POPC、POPE、POPS、C<sub>6</sub>NBD-PC、C<sub>6</sub>NBD-PE、C<sub>6</sub>NBD-PS は Avanti Polar Lipids より購入した。コレステロールは Sigma-Aldrich より購入した。mPEG<sub>4</sub>-NHS は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, US) より購入した。その他の試薬は、すべて最も等級の高いものを使用した。

#### 一回膜貫通小胞体膜タンパク質の膜貫通配列ペプチドの合成

上述の 13 タンパク質について、膜貫通配列ペプチドをデザインした (図 27)。ペプチドの可溶性を向上させるため、両末端に Lys 残基を 2 つずつ配置した。また、ペプチドの定量をトリプトファン<sup>61</sup>の吸光度や蛍光を用いて行うため、膜貫通配列中に Trp 残基が存在しない場合には、N 末端に Trp 残基を配置した。ペプチドは、Fmoc 固相合成法により合成し、イナートシル WP300 C18 カラムを用いて、逆相 HPLC により精製した。ペプチドの純度が 90%以上であることを、HPLC と MALDI-TOF-MS を用いて確認した。トリフルオロエタノール溶液中のペプチド濃度を、トリプトファンとチロシンのモル吸光係数を用いて、280 nm の吸光度により決定した<sup>59</sup>。

#### LUV 調製

メタノール：クロロホルム (体積比=2:1) に溶解した脂質と、トリフルオロエタノールに溶解したペプチドを適宜混合し、ナス型フラスコに滴下した。特に記述のない限り、POPC、POPE、POPS が 6:3:1 の脂質組成を用いた。ロータリーエバポレーターにより、溶媒を減圧除去することで脂質薄膜を形成させた。その後、一晚真空乾燥させることで溶媒を完全に除去した。脂質薄膜に Tirs-HCl 緩衝液、HEPES-NaOH 緩衝液 (10 mM HEPES、pH 7.4)、もしくは Tricin-NaOH 緩衝液 (10 mM Tricine、pH 7.5) を加えて水和させた。この懸濁液に対して凍結融解を数回行った後、LiposoFast extruder を用いて、孔径 100 nm のポリカーボネートメンブレンフィルターを数十回通過させることで LUV を調製した。調製した LUV の粒径を、FPAR-1000 を用いた動的光散乱法により測定し、110–150 nm であることを確認した。脂質濃度はリン酸定量法を用いて定量した<sup>62</sup>。また、リポソーム懸濁液のエクストルージョンによりペプチド/脂質比が変化していないことを、ペプチドのトリプトファン<sup>61</sup>蛍光を用いて、確認した (図 38)。

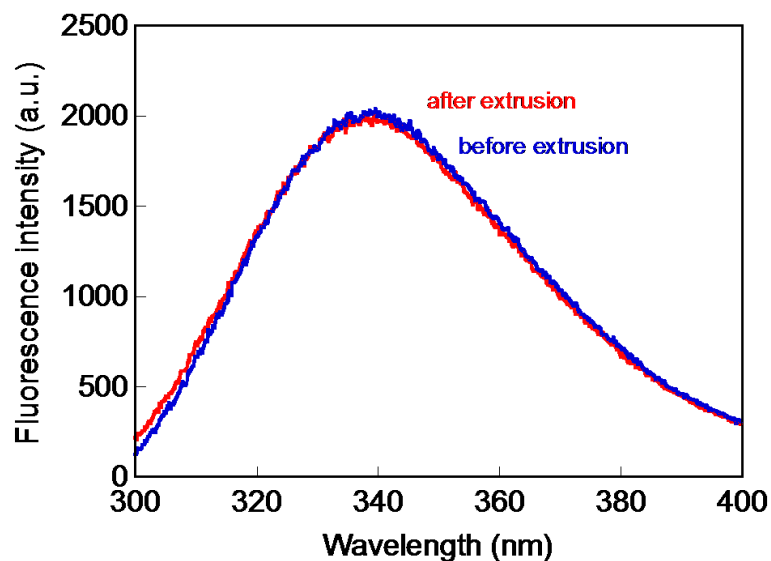


図 38. エクストルージョン前後のベシクル中の EDEM1 ペプチドのトリプトファン蛍光スペクトル。

EDEM1 (0.2 mol%) / 脂質フィルムを HEPES-NaOH 緩衝液に懸濁した。この懸濁液を直接、または、エクストルージョン後に、heptaethylene glycol monododecyl ether (HED) を用いて可溶化した。1 v/v% HED、脂質 500  $\mu$ M の条件で、可溶化したサンプルの蛍光スペクトルを測定した。

#### CD スペクトル測定

HEPES-NaOH 緩衝液を用いて調製した、ペプチド/脂質比が 0.2 mol% の LUV を用いた。3 mM の LUV を、光路長 1 mm の石英セルに加え、25°C、205–250 nm の範囲で、円二色性分散計 J-805 を用いて測定した。10 回測定した平均値をそれぞれのスペクトルとした。ペプチドを組み込んだ LUV のスペクトルから、脂質のみの LUV のスペクトルを差し引いた後、平均残基モル楕円率に変換した。 $\alpha$  ヘリックス含有率は、(5) 式を用いて算出した<sup>60</sup>。

#### 蛍光脂質を用いたフリップ測定

Tris-HCl 緩衝液で調製した LUV を用いた。LUV の外葉のみを蛍光脂質で非対称に標識するため、エタノールに溶解した C<sub>6</sub>NBD-PC を 0.2 mol% (蛍光脂質/非蛍光脂質) 加えた。C<sub>6</sub>NBD-PC (インキュベーション温度: 37°C)、C<sub>6</sub>NBD-PS (31、37°C) の場合には、30 秒以内に 98% 以上の蛍光脂質が LUV に挿入されることを確認した (図 39)。一方、C<sub>6</sub>NBD-PC (25、31°C)、C<sub>6</sub>NBD-PE (25、31、37°C)、C<sub>6</sub>NBD-PS (25°C) が 98% 挿入されるには、それぞれ、5、2、37、30、10、4 分必要だった (図 39)。そのため、蛍光脂質を膜に完全に挿入させるため、後者の条件の場合、上記の時間プレインキュベ

ーションを行った。25、31、37°Cで種々の時間インキュベーションした後(10–360 min)、内側に移行(フリップ)した蛍光脂質の割合を求めるため、50  $\mu\text{M}$  のLUVに対して、2 M Tris に溶解した dithionite を 32 mM になるよう加えて、LUV 外葉に残存する蛍光脂質を還元することで、外葉からの蛍光を消光した。Dithionite の添加後、NBD 蛍光の減衰を、25°C、励起/検出波長が 460/534 nm の条件で、分光蛍光光度計 F2500 を用いて 500 秒間測定した。内葉に移行した NBD ラベル化リン脂質の割合 ( $\Phi_{\text{inner}}$ ) は、dithionite 消光プロファイル、 $F(t)/F(0)$  を (1) 式でフィッティングして算出した。 $F(0)$ 、 $F(t)$  は、それぞれ、dithionite 添加前、添加後の蛍光強度である。 $\Phi_{\text{inner}}$  の時間変化を (9) 式でフィッティングすることで、 $k_{\text{flip}}$  を求めた。

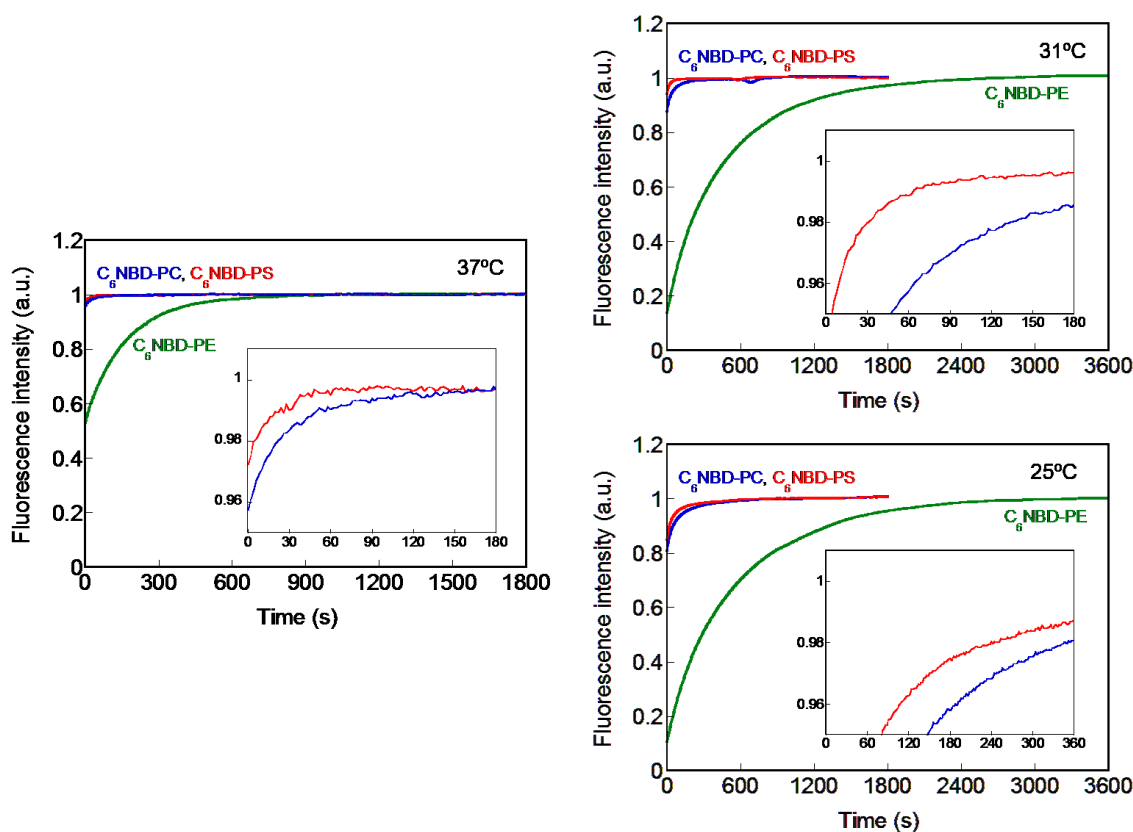


図 39.  $\text{C}_6\text{NBD-PC}$ 、 $\text{C}_6\text{NBD-PE}$ 、 $\text{C}_6\text{NBD-PS}$  の LUV への挿入 (25、31、37°C)。蛍光脂質を LUV 懸濁液に添加後、蛍光強度を測定した。測定終了時 (1800、3600 s) の強度で、データを規格化した。挿入図は、測定開始直後を拡大したものである。



## 論文目録

### 第一章

Kaihara, M., **Nakao, H.**, Yokoyama, H., Endo, H., Ishihama, Y., Handa, T., Nakano, M. Control of phospholipid flip-flop by transmembrane peptides. *Chem. Phys.* **419**, 78-83 (2013)

**Nakao, H.**, Hayashi, C., Ikeda, K., Ishihama, Y., Nakano, M. Effect of hydrophilic residues and hydrophobic mismatch on flip-flop promotion by transmembrane peptides. 投稿予定

### 第二章

**Nakao, H.**, Ikeda, K., Iwamoto, M., Shimizu, H., Oiki, S., Ishihama, Y., Nakano, M. pH-dependent promotion of phospholipid flip-flop by the KcsA potassium channel. *Biochim. Biophys. Acta* **1848**, 145-150 (2015)

### 第三章

**Nakao, H.**, Ikeda, K., Ishihama, Y., Nakano, M. Membrane-spanning sequences in endoplasmic reticulum proteins promote phospholipid flip-flop. *Biophys. J.* **110**, 2689-2697 (2016)

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始手厚いご指導ご鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 石濱泰教授、並びに、富山大学大学院医学薬学研究部 中野実教授に深謝申し上げます。

論文を査読していただき、多大なるご教示を賜りました京都大学大学院薬学研究科 松崎勝巳教授、並びに、加藤博章教授に深謝致します。

本研究遂行において、細部にわたって様々なご指導、ご助言を賜りました富山大学大学院医学薬学研究部 池田恵介准教授に感謝申し上げます。また、短い期間ではありましたが、本研究を進めるにあたり、有益なご助言を賜りました京都大学大学院薬学研究科 若林真樹助教に感謝申し上げます。

本研究で用いた KcsA の発現、精製を行っていただき、さらには研究結果の考察に際して有益なご助言を賜りました福井大学医学部 老木成稔教授、清水啓史講師、岩本真幸助教に深謝致します。

本研究で用いた膜貫通ペプチドの MD シミュレーションを行っていただきました金沢大学大学院自然科学研究科 長尾秀実教授、齋藤大明助教（現：理化学研究所）に深謝致します。

また、本研究を進めるにあたり、ご助言、ご協力をいただきました京都大学大学院薬学研究科 貝原正憲修士、富山大学大学院医学薬学教育部 林千尋修士、そして京都大学大学院薬学研究科 製剤機能解析学分野、及び、富山大学 生体界面化学研究室の卒業生並びに在学生の皆様に感謝致します。

本研究の一部は日本学術振興会特別研究員（DC2）によるものであります。

最後に、これまでの研究生活を支えてくれた両親に感謝します。

## 引用文献

- 1 Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731 (1972).
- 2 Goni, F. M. The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the Singer-Nicolson model. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 1467-1476 (2014).
- 3 Shin, Y. K. & Freed, J. H. Dynamic imaging of lateral diffusion by electron spin resonance and study of rotational dynamics in model membranes. Effect of cholesterol. *Biophys. J.* **55**, 537-550 (1989).
- 4 Harms, G. S., Sonnleitner, M., Schutz, G. J., Gruber, H. J. & Schmidt, T. Single-molecule anisotropy imaging. *Biophys. J.* **77**, 2864-2870 (1999).
- 5 Nakano, M. *et al.* Flip-flop of phospholipids in vesicles: kinetic analysis with time-resolved small-angle neutron scattering. *J. Phys. Chem. B* **113**, 6745-6748 (2009).
- 6 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).
- 7 Zachowski, A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem. J.* **294 ( Pt 1)**, 1-14 (1993).
- 8 Coleman, J. A., Quazi, F. & Molday, R. S. Mammalian P4-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 555-574 (2013).
- 9 Malvezzi, M. *et al.* Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid scrambling by a reconstituted TMEM16 ion channel. *Nature communications* **4**, 2367 (2013).
- 10 Brunner, J. D., Lim, N. K., Schenck, S., Duerst, A. & Dutzler, R. X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase. *Nature* **516**, 207-212 (2014).
- 11 Arashiki, N. *et al.* An Unrecognized Function of Cholesterol: Regulating the Mechanism Controlling Membrane Phospholipid Asymmetry. *Biochemistry* **55**, 3504-3513 (2016).
- 12 Balasubramanian, K. & Schroit, A. J. Aminophospholipid asymmetry: A matter of life and death. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 701-734 (2003).
- 13 Zhou, X. & Graham, T. R. Reconstitution of phospholipid translocase activity with purified Drs2p, a type-IV P-type ATPase from budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 16586-16591 (2009).
- 14 Coleman, J. A., Kwok, M. C. & Molday, R. S. Localization, purification, and functional reconstitution of the P4-ATPase Atp8a2, a phosphatidylserine flippase in photoreceptor disc membranes. *J. Biol. Chem.* **284**, 32670-32679 (2009).
- 15 Bishop, W. R. & Bell, R. M. Assembly of the endoplasmic reticulum phospholipid bilayer: the phosphatidylcholine transporter. *Cell* **42**, 51-60 (1985).
- 16 Herrmann, A., Zachowski, A. & Devaux, P. F. Protein-mediated phospholipid

- translocation in the endoplasmic reticulum with a low lipid specificity. *Biochemistry* **29**, 2023-2027 (1990).
- 17 Buton, X., Morrot, G., Fellmann, P. & Seigneuret, M. Ultrafast glycerophospholipid-selective transbilayer motion mediated by a protein in the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* **271**, 6651-6657 (1996).
- 18 Marx, U. *et al.* Rapid flip-flop of phospholipids in endoplasmic reticulum membranes studied by a stopped-flow approach. *Biophys. J.* **78**, 2628-2640 (2000).
- 19 Vance, D. E., Choy, P. C., Farren, S. B., Lim, P. H. & Schneider, W. J. Asymmetry of phospholipid biosynthesis. *Nature* **270**, 268-269 (1977).
- 20 Bell, R. M., Ballas, L. M. & Coleman, R. A. Lipid topogenesis. *J. Lipid Res.* **22**, 391-403 (1981).
- 21 Fagone, P. & Jackowski, S. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J. Lipid Res.* **50 Suppl**, S311-316 (2009).
- 22 Menon, A. K., Watkins, W. E. r. & Hrafnisdottir, S. Specific proteins are required to translocate phosphatidylcholine bidirectionally across the endoplasmic reticulum. *Curr. Biol.* **10**, 241-252 (2000).
- 23 Chang, Q. L., Gummadi, S. N. & Menon, A. K. Chemical modification identifies two populations of glycerophospholipid flippase in rat liver ER. *Biochemistry* **43**, 10710-10718 (2004).
- 24 Sanyal, S. & Menon, A. K. Flipping lipids: why an' what's the reason for? *ACS Chem. Biol.* **4**, 895-909 (2009).
- 25 Cuello, L. G., Jogini, V., Cortes, D. M. & Perozo, E. Structural mechanism of C-type inactivation in K<sup>+</sup> channels. *Nature* **466**, 203-208 (2010).
- 26 Shimizu, H. *et al.* Global twisting motion of single molecular KcsA potassium channel upon gating. *Cell* **132**, 67-78 (2008).
- 27 Perozo, E., Cortes, D. M. & Cuello, L. G. Structural rearrangements underlying K<sup>+</sup>-channel activation gating. *Science* **285**, 73-78 (1999).
- 28 Killian, J. A. & Nyholm, T. K. Peptides in lipid bilayers: the power of simple models. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 473-479 (2006).
- 29 Kaiser, H. J. *et al.* Lateral sorting in model membranes by cholesterol-mediated hydrophobic matching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16628-16633 (2011).
- 30 Lakowicks, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Edition.* (Springer, 2006).
- 31 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).
- 32 Nezil, F. A. & Bloom, M. Combined influence of cholesterol and synthetic amphiphilic

- peptides upon bilayer thickness in model membranes. *Biophys. J.* **61**, 1176-1183 (1992).
- 33 Kyte, J. & Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132 (1982).
- 34 Johansson, A. C. & Lindahl, E. Amino-acid solvation structure in transmembrane helices from molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* **91**, 4450-4463 (2006).
- 35 MacCallum, J. L., Bennett, W. F. & Tieleman, D. P. Distribution of amino acids in a lipid bilayer from computer simulations. *Biophys. J.* **94**, 3393-3404 (2008).
- 36 Langer, M., Sah, R., Veser, A., Gutlich, M. & Langosch, D. Structural properties of model phosphatidylcholine flippases. *Chem. Biol.* **20**, 63-72 (2013).
- 37 Kol, M. A., de Kroon, A. I., Rijkers, D. T., Killian, J. A. & de Kruijff, B. Membrane-spanning peptides induce phospholipid flop: a model for phospholipid translocation across the inner membrane of *E. coli*. *Biochemistry* **40**, 10500-10506 (2001).
- 38 de Planque, M. R. *et al.* Different membrane anchoring positions of tryptophan and lysine in synthetic transmembrane alpha-helical peptides. *J. Biol. Chem.* **274**, 20839-20846 (1999).
- 39 Kol, M. A., van Dalen, A., de Kroon, A. I. & de Kruijff, B. Translocation of phospholipids is facilitated by a subset of membrane-spanning proteins of the bacterial cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* **278**, 24586-24593 (2003).
- 40 Hille, B. *Ion channels of excitable membranes*. 3rd edn, (Sinauer Associates, Inc., 2001).
- 41 Doyle, D. A. *et al.* The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77 (1998).
- 42 Heginbotham, L., LeMasurier, M., Kolmakova-Partensky, L. & Miller, C. Single streptomyces lividans K<sup>+</sup> channels: functional asymmetries and sidedness of proton activation. *J. Gen. Physiol.* **114**, 551-560 (1999).
- 43 Sumino, A., Sumikama, T., Iwamoto, M., Dewa, T. & Oiki, S. The open gate structure of the membrane-embedded KcsA potassium channel viewed from the cytoplasmic side. *Sci. Rep.* **3**, 1063 (2013).
- 44 Iwamoto, M. & Oiki, S. Amphipathic antenna of an inward rectifier K<sup>+</sup> channel responds to changes in the inner membrane leaflet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 749-754 (2013).
- 45 Iwamoto, M. *et al.* Surface structure and its dynamic rearrangements of the KcsA potassium channel upon gating and tetrabutylammonium blocking. *J. Biol. Chem.* **281**, 28379-28386 (2006).
- 46 Redelmeier, T. E., Hope, M. J. & Cullis, P. R. On the mechanism of transbilayer transport of phosphatidylglycerol in response to transmembrane pH gradients. *Biochemistry* **29**,

- 3046-3053 (1990).
- 47 Sumino, A., Yamamoto, D., Iwamoto, M., Dewa, T. & Oiki, S. Gating-Associated Clustering-Dispersion Dynamics of the KcsA Potassium Channel in a Lipid Membrane. *J. Phys. Chem. Lett.* **5**, 578-584 (2014).
- 48 De Young, L. R. & Dill, K. A. Solute partitioning into lipid bilayer membranes. *Biochemistry* **27**, 5281-5289 (1988).
- 49 Reyes Mateo, C., Ulises Acuna, A. & Brochon, J. C. Liquid-crystalline phases of cholesterol/lipid bilayers as revealed by the fluorescence of trans-parinaric acid. *Biophys. J.* **68**, 978-987 (1995).
- 50 Singh, D. K., Rosenhouse-Dantsker, A., Nichols, C. G., Enkvetchakul, D. & Levitan, I. Direct regulation of prokaryotic Kir channel by cholesterol. *J. Biol. Chem.* **284**, 30727-30736 (2009).
- 51 Kol, M. A. *et al.* Phospholipid flop induced by transmembrane peptides in model membranes is modulated by lipid composition. *Biochemistry* **42**, 231-237 (2003).
- 52 Homan, R. & Pownall, H. J. Transbilayer diffusion of phospholipids: dependence on headgroup structure and acyl chain length. *Biochim. Biophys. Acta* **938**, 155-166 (1988).
- 53 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).
- 54 Goren, M. A. *et al.* Constitutive phospholipid scramblase activity of a G protein-coupled receptor. *Nature communications* **5**, 5115 (2014).
- 55 Quinn, P., Griffiths, G. & Warren, G. Density of newly synthesized plasma membrane proteins in intracellular membranes II. Biochemical studies. *J. Cell Biol.* **98**, 2142-2147 (1984).
- 56 Mesmin, B. & Maxfield, F. R. Intracellular sterol dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 636-645 (2009).
- 57 van Meer, G. Lipids of the Golgi membrane. *Trends Cell Biol.* **8**, 29-33 (1998).
- 58 Bittman, R. & Blau, L. The phospholipid-cholesterol interaction. Kinetics of water permeability in liposomes. *Biochemistry* **11**, 4831-4839 (1972).
- 59 Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411-2423 (1995).
- 60 Chen, Y. H. & Yang, J. T. A new approach to the calculation of secondary structures of globular proteins by optical rotatory dispersion and circular dichroism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 1285-1291 (1971).
- 61 Raja, M. & Vales, E. Improved technique for reconstituting incredibly high and soluble amounts of tetrameric K<sup>+</sup> channel in natural membranes. *J. Membr. Biol.* **241**, 141-144

- (2011).
- 62 Bartlett, G. R. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* **234**, 466-468 (1959).