

静的・動的構造評価による生体脂質複合体形成機構の解明

中野 実

Elucidation of Lipid Complex Formation Mechanisms by
Static/Dynamic Structural Evaluation

Minoru NAKANO

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshidashimoadachi-cho,
Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan*

(Received May 26, 2009)

Biomembrane is a place for signal transduction, where protein-membrane interactions are controlled by the membrane environment. This environment could be modified by lipid dynamics, such as interbilayer transport and transbilayer movement, which are governed by lipid transfer proteins and translocase enzymes, respectively. Thus, static and dynamic structural evaluations of the membranes are important to understand the links among function, structure, and dynamics of lipid membranes. This review describes our recent studies for 1) the production of lipid nanoparticles with nonlamellar liquid crystalline phases, 2) membrane-protein interaction that relates to the biogenesis of high-density lipoproteins, and 3) the characterization of lipid transfer dynamics by small-angle neutron scattering (SANS). It was demonstrated that different phospholipids have individual effect on membrane-apolipoprotein A-I (apoA-I) interactions that bring about a discoidal lipid-protein complex formation: Phosphatidylethanolamine, possessing the negative spontaneous curvature, increases both the degree of hydration at the membrane interface and the acyl chain order, and enhances the binding of amphipathic helices. A gel phase-forming lipid, sphingomyelin, forms heterogeneous interface of the mixed membranes and facilitates the discoidal particle formation with apoA-I. Phosphatidylserine partly contributes to a reduction in pH at membrane surface, which induces the conformational change of apoA-I and accelerates the discoidal complex formation. It was also demonstrated that SANS is available as a novel method to determine the dynamics of membrane lipids. This technique is perfectly suited to evaluate the activity of proteins relevant to lipid migrations.

Key words—liposome; cubosome; Nanodisc; apolipoprotein A-I; high-density lipoprotein

1. はじめに

動物体内には多様な脂質膜が存在し、その間で脂質の交換を行い、恒常性を維持している。また、脂質膜は情報伝達の介在の場であり、膜の微細環境変化を生じてタンパク質との相互作用を制御していると考えられる。したがって生体膜の生理機能解明のためには、広範囲な時間・空間スケールで、脂質膜の構造やタンパク質との相互作用を把握することが重要である。私は、生命活動に係わる脂質間、及び脂質—タンパク質間の相互作用を、モデル脂質膜を用い、散乱法、分光学的手法から得られる静的・動的

情報に基づき、物理化学的に説明するスタンスで研究を展開してきた。この総説では、これらの成果の一部を紹介する。

2. 非ラメラ液晶分散系の構築と膜脂質の動的特性評価

脂質分子の多くは水中で自己会合し、ラメラ、逆ヘキサゴナル、キュービックなどの多様な集合構造(リオトロピック液晶)を形成する。モノオレイン(MO)はオレイン酸(OA)のグリセリルエステルで、水和により Bicontinuous (両連続) キュービック液晶相を形成する。^{1,2)} また、MOより疎水性の高い脂質を混合すると、逆ヘキサゴナル相を形成する。^{3,4)} これらキュービック、逆ヘキサゴナル相は、非ラメラ相と呼ばれ、レシチンなどのラメラ相形成脂質が水中で分散して小胞(リポソーム)を形成するのは対称的に、非ラメラ相は過剰な水の相とは

京都大学大学院薬学研究科創薬科学専攻 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

e-mail: mnakano@pharm.kyoto-u.ac.jp

本総説は、平成21年度日本薬学会奨励賞受賞を記念して記述したものである。

相分離して存在する。私は、このような非ラメラ液晶相の微粒子化 (Fig. 1) に取り組んだ。油を水中に分散させるには界面活性剤を加えればよいが、非ラメラ相は通常、界面活性剤の添加により崩壊してしまう。一方、両親媒性高分子である Pluronic F127 は poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) の構造を有するトリブロック共重合体で、これを MO/OA 混合物が形成する非ラメラ相と混合しても X 線回折パターンがほとんど変化しないことから、脂質との相溶性が低いことが明らかとなった。^{5,6)} このことは液晶構造を壊さずに分散微粒子化するためには重要な性質である。この F127 を乳化剤として用い、高圧乳化を行うと粒径 100–300 nm の微粒子が得られた。微粒子の X 線回折は液晶相と同じ回折パターンを示したことから (Fig. 2)、内部に液晶構造を保持した微粒子 (キューボソーム, ヘキサソーム) が得られたことが判明した。^{5,6)}

キューボソームの血中安定性⁷⁾ や新規脂質・乳化剤によるキューボソームの調製⁸⁾ など、これらの微粒子の薬物キャリアとしての応用展開も図っている。一方、脂質膜や液晶相の構造特性を評価するためのツールとしてもこれらの微粒子が使えることを実証した。⁹⁾ リン脂質 palmitoylcholine (POPC) と MO の混合物からキューボソーム及びビリソームを調製し、これらの微粒子に導入した蛍光プローブ 3-(4-(6-phenyl)-1,3,5-hexatrienyl) phenylpropionic acid (DPH-PA) の時分割蛍光異方性測定を行った。測定から算出される配向

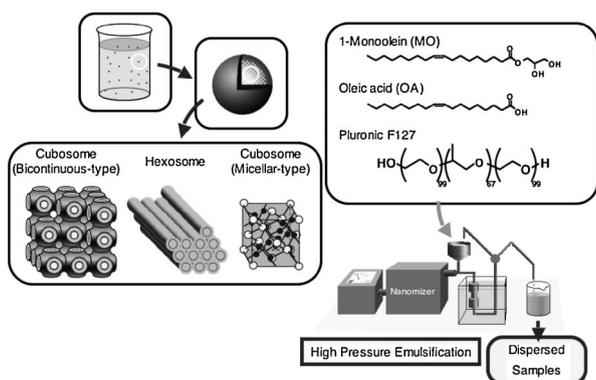


Fig. 1. Schematic Representation of Nanoparticles with Liquid-crystalline Phases (Cubosomes and Hexosomes) (Left) and Preparation of the Nanoparticles by High-pressure Emulsifier (Right)

パラメーターは膜中の MO の割合とともに増加し、ラメラーキュービック相転移に伴い減少した (Fig. 3).⁹⁾ この変化は、負の自発曲率を持つ脂質 (MO) が膜内の側方圧を高めるとともに、このストレスが相転移によって解消されることを表している。このように、個々の脂質の自発曲率は、膜の特性を決定する重要な因子であり、タンパク質やその他のゲスト分子と膜との相互作用においても影響を及ぼすと考えられる。

3. HDL 新生に係わる膜とタンパク質の相互作用

脂質膜とタンパク質の相互作用が関与する生理的

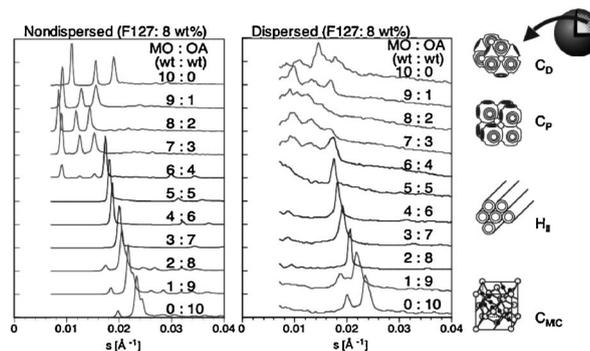


Fig. 2. X-ray Diffraction Patterns for Nondispersed MO/OA/F127 Mixtures (Left) and Their Dispersions (Right)

Diffractions represent the presence of cubic or hexagonal structures even for dispersed systems, suggesting the cubosome and hexosome formations.

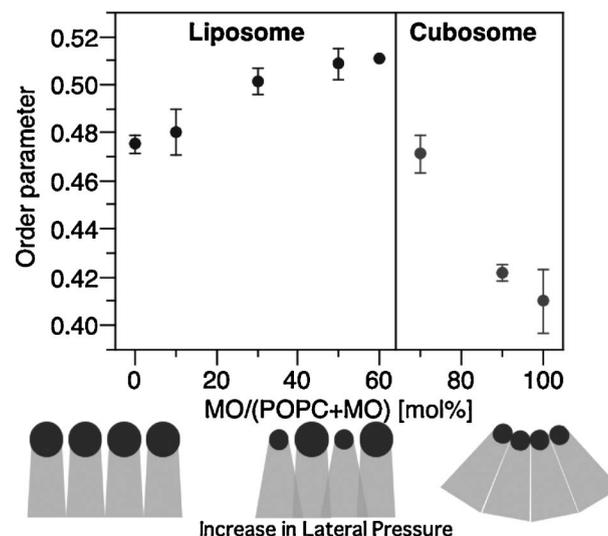


Fig. 3. The Order Parameter of DPH-PA in POPC/MO Mixed Membranes Determined by Time-resolved Fluorescence Anisotropy

Incorporation of MO into bilayers increases the lateral pressure and leads to the nonlamellar (cubic) phase formation.

に重要な現象の1つとして挙げられるのが、高密度リポタンパク (HDL) の新生反応 (Fig. 4) である。HDL は、末梢細胞のコレステロールの唯一の代謝経路であるコレステロール逆転送系を担っており、動脈硬化に対する防御機構として重要である。HDL 新生は、アポリポタンパク質 A-I (apoA-I) と膜タンパク質 ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)¹⁰⁾ との協同機構であり、apoA-I が脂質フリーの状態、ABCA1 が発現している細胞膜と相互作用しコレステロールとリン脂質を含む直径約 10 nm のディスク状 HDL を形成する反応である。しかしながら、その詳細なメカニズムは未解明であり、議論が分かれている。ABCA1 が ATP 駆動のトランスポーターとして脂質を 1 分子ずつ apoA-I に供給する可能性もある。しかしながら、apoA-I だけでなく、ほかのアポリポタンパクや両親媒性ペプチドでも ABCA1 依存的な脂質搬出が観察される¹¹⁾ ことから、脂質のアクセプター側としては、生化学的な相互作用ではなく、“両親媒性ヘリックス”という物理化学的特性が必要因子であると考えられる。また、脂質搬出能はそのアポリポタンパクの脂質親和性と正の相関を示すこと¹²⁾ は、アポリポタンパクの脂質膜との相互作用の重要性を意味していると思われる。さらに、モデル膜系において apoA-I は、条件によって HDL 様のディスク状脂質—apoA-I 複合体を形成できることが知られている。¹³⁾ これらを考慮すれば、複合体形成メカニズムとして、ABCA1 は脂質を直接 apoA-I に運ぶのではなく、脂質トランスポーターとして局所的な脂質分布を変化させ、その作用によって摂動を受けた膜

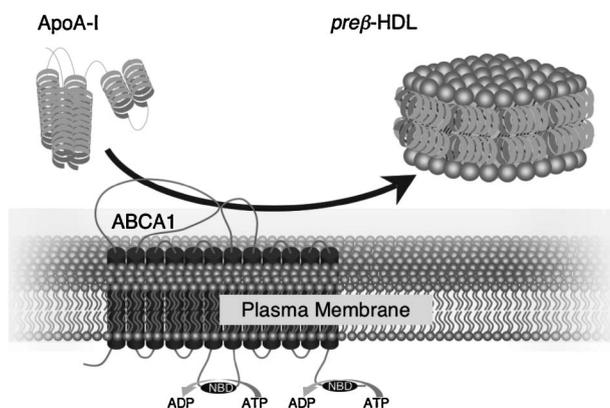


Fig. 4. Schematic Representation of the HDL Biogenesis

に対し apoA-I が結合及び脂質搬出を起こすという可能性も考えられる。私はこのような観点から、モデル脂質膜と apoA-I 及びそのモデルペプチドとの相互作用評価を行い、各種脂質がどのような影響を及ぼすかについて検討した。

負の自発曲率を持つ MO は上述の通り、膜内部の側方圧を高めるが、それと同時に膜表面の水和度を上昇させ、両親媒性ヘリックスの膜結合を促進する。¹⁴⁾ MO は生体膜中には存在しない脂質であるが、フォスファチジルエタノールアミン (PE) も同様の作用を持つことが分かった。¹⁵⁾ Dioleoyl-phosphatidylethanolamine (DOPE) が POPC 膜に加わると、²H NMR の四重極分裂から求められるオーダーパラメーターは増加した。また、蛍光プローブ 2-(9-anthroyloxy) stearic acid (2-AS) の蛍光寿命から評価される膜表面水和度が増大した [Fig. 5(A)]. つまり、負の曲率を持つ脂質が曲率のない平面膜中に組み込まれることによって、アシル鎖領域の側方圧が増大して POPC アシル鎖の配向性は高められ、逆に極性頭部基間は押し広げられるため、水和度 (疎水性水和) が上昇するのである。これらの変化はいずれも膜のエントロピーを減少させる方向に働いている。一方、アポリポタンパクモデルである 18 残基の両親媒性ペプチド Ac-18A-NH₂ が存在すると、膜配向性、表面水和度は低下

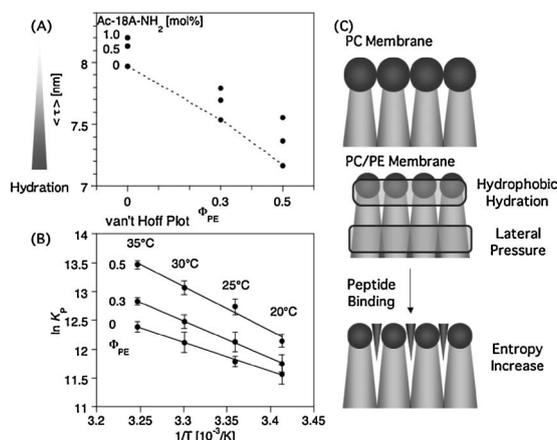


Fig. 5. Effects of DOPE on Bilayer Lipid Packing and Peptide Binding

(A) The mean fluorescence lifetime (τ) of 2-AS in POPC/DOPE mixed membranes with DOPE mole fractions of 0, 0.3, and 0.5 in the absence and presence of 0.5 and 1.0 mol % Ac-18A-NH₂ at 25°C. (B) van't Hoff plot for Ac-18A-NH₂ binding to POPC/DOPE LUVs with DOPE mole fractions of 0, 0.3, and 0.5. (C) Incorporation of DOPE into POPC bilayers increases the lateral pressure and hydrophobic hydration. These entropically unfavorable frustrations are released by the binding of the peptide.

することが判明した。これは、両親媒性ヘリックスが膜表面に結合すると、膜に正の曲率を与えるため、PE と全く逆の効果を示したと解釈できる。このペプチドによる配向性の低下、及び水和度の低下はいずれもエントロピーを増大させる方向に働いている [Fig. 5(C)]. このように、ヘリックスの結合はPE の負の曲率を打ち消すことでPE 含有膜を安定化させることから、Ac-18A-NH₂ の結合性もPE 含有膜の方が高いことが予想された。そこで、トリプトファン蛍光が膜結合により増大することを利用して、ペプチドの膜への結合(分配係数)を評価した。膜/水分配係数の温度依存性 (van't Hoff plot) を Fig. 5(B) に示す。傾きが負であることからペプチドの結合は吸熱過程であり、予想通りPE の多い膜ほど結合性(分配係数)が増大することが判明した。アシル鎖の配向性や膜界面の(疎水性)水和を低下させることが、ペプチドのPE 依存的な結合性の増大の要因である。このように、負の曲率を持つ脂質がアポリポタンパク質の膜親和性を高めることが示された。¹⁵⁾

一方、ドメイン形成脂質であるスフィンゴミエリン (SM) は、高いゲル-液晶相転移温度を有する脂質であり、膜を硬くする性質を持つ。したがって、卵黄レシチン (PC) と SM からなる混合膜への Ac-18A-NH₂ の結合性は SM 含量依存的に減少する。SM 膜へのペプチドの最大結合量は PC 膜の約 6 分の 1 である。ところが、PC/SM のモル比が 2 : 1 のリポソームに Ac-18A-NH₂ を加えると、内包色素の漏出や粒子の凝集など、膜の不安定化が起こることを見出した。両親媒性ペプチドでみられた膜崩壊作用をより詳細に検討するために、apoA-I を用いて実験を行った。種々の組成を持つ PC/SM 混合リポソームに対し、37°C で apoA-I を添加し、散乱強度の減少を観察した。これは、リポソームの脂質が可溶化されてディスク状脂質-apoA-I 複合体が形成されると散乱強度が減少することを利用して、散乱強度変化からディスク状複合体形成を追跡できるからである。PC のみの膜では散乱強度は変化しなかったが、SM 含量の増加とともに apoA-I による可溶化が促進され、PC/SM=1 : 9 の組成で可溶化速度が最大となった (Fig. 6)。この組成の膜は 37°C に相転移温度を持つことから、ディスク状複合体形成促進には、混合膜がゲル相と液晶相

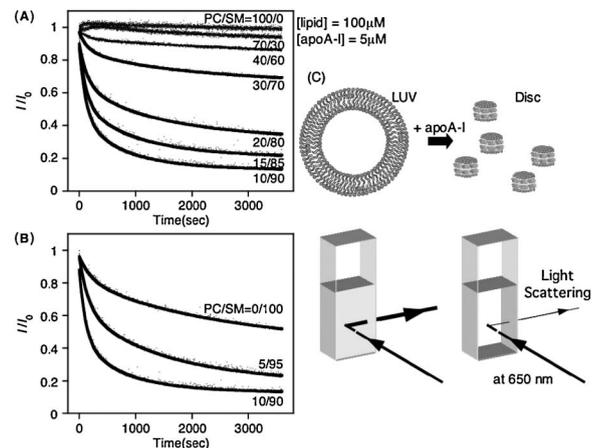


Fig. 6. Solubilization of PC/SM LUVs by ApoA-I

Changes in the right-angle scattering of incident light at 650 nm after mixing of apoA-I (5 μ M) with PC/SM LUVs (100 μ M) with SM mole fractions of 0 to 0.9 (A) and 0.9 to 1.0 (B) at 37°C. The reduction of the scattering intensity is due to the formation of the discoidal lipid/apoA-I complexes schematically shown in (C).

の二相共存状態にあることが関連することが示された。すなわち、SM は apoA-I 結合に伴う膜の構造破綻を招き、HDL 様複合体の形成を促進することが明らかとなった。¹⁶⁾

さらに、apoA-I の脂質可溶化における、pH の効果について検討した。その結果、pH の低下が apoA-I のヘリックス含量と疎水性の増大をもたらす。中性環境では可溶化されない PC リポソームが、酸性条件において速やかに可溶化されることが明らかになった。さらに、酸性リン脂質の添加は膜表面の pH を低下させ、より中性に近い、エンドソーム内 pH レベルでの apoA-I の構造変化、ディスク形成をもたらすことを見出した。¹⁷⁾ これは、エンドソームにおける HDL 形成¹⁸⁾ と ABCA1 の酸性リン脂質の輸送¹⁹⁾ という、報告されている 2 つの現象を結びつけるものである。

これらから、ABCA1 は局所的な脂質組成の変化や相分離を誘起し、apoA-I の複合体形成能を引き出すという可能性を提唱した。すなわち、ABCA1 は apoA-I を結合させることによって、ABCA1 近傍の apoA-I 濃度を高めると同時に、ATP 加水分解エネルギーを利用して脂質を内膜から外膜へ反転 (フロップ) させ、ABCA1 近傍の脂質組成を変えてパッキングストレスや相分離を誘起する。この、ストレスや相分離が誘起された領域に apoA-I が結合し、膜が不安定化され、ディスク状粒子が生成す

るといふメカニズムである。ABCA1 がコレステロールリッチドメインである raft 領域の SM やコレステロールを non-raft 領域へ再分配させるという報告もある。²⁰⁾ これらを詳細に理解、解明するためには脂質膜の構造、環境などの静的な情報のみならず、動的な情報を収集することが不可欠であると考えられる。

4. 中性子小角散乱法による脂質ダイナミクス評価

生体膜中の脂質は自発的に、あるいは輸送タンパク質の介在の下、膜間移動やフリップフロップを行っている (Fig. 7)。上述のように、このような脂質のダイナミクスの制御は、膜とタンパク質との相互作用の制御に、ひいては生命活動において必要不可欠なイベントである。²¹⁾ しかしながら脂質のダイナミクスについての定量的な議論は細胞系のみならず無細胞系でさえほとんど行われていない。これは合理的にダイナミクスを計測する手法に乏しいことに起因している。例えば、放射性同位元素でラベルされた脂質を用いて、ドナー粒子からアクセプター粒子への移動をとらえることができるが、²²⁾ この場合はゲル濾過や超遠心などの手法によってドナー、アクセプター粒子を分離する必要があり、同一組成を持つ粒子間での脂質移動を観察することはできない。蛍光の消光や励起エネルギー移動を利用する手法²³⁾では、粒子の分離操作は不要であるが、観察されるのはあくまでも蛍光脂質のダイナミクスであり、蛍光団の性質によって大きく左右される。

私は、中性子小角散乱 (SANS) のコントラスト変調法を利用して、高分子ミセルの構造と、高分子鎖長や温度の変化に伴うミセル形状変化挙動を評価した。^{24–26)} これは部分重水素化によって特定部分

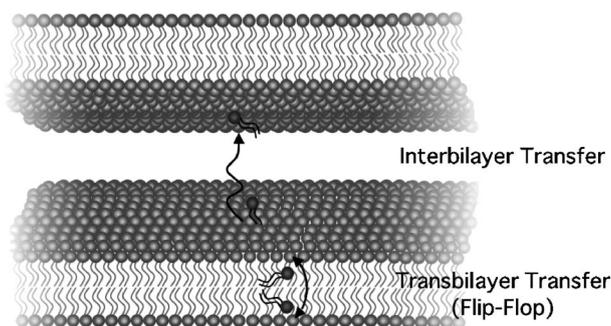


Fig. 7. Interbilayer Transfer and Transbilayer Transfer (flip-flop) of Lipids

からの散乱の寄与を高めたり、逆に消したりする手法であるが、この手法を応用すればリポソームにおける脂質の粒子間移動速度が計測できると着想した。

中性子の散乱は原子固有の散乱長の密度揺らぎに起因する。この散乱長密度 (SLD) は光散乱における誘電率 (屈折率)、X 線散乱における電子密度に対応するものであるが、これらと大きく異なるのは、SLD が同位体、特に水素 (H) と重水素 (D) で大きな差があるという点である。通常の脂質と、重水素化脂質からなるリポソーム (H-LUV, D-LUV) を両者の中間の SLD を持つ溶媒 (D_2O/H_2O) 中で混合すると、それぞれの粒子は溶媒と異なる SLD を有するため強い散乱を起こす。しかし、粒子間の脂質移動と粒子内でのフリップフロップが起こると、LUV 中の D 体と H 体脂質の交換が起こり、粒子と溶媒との SLD の差 ($\Delta\rho$) が減少し、散乱強度が減少する。つまり、中性子の目で見ると「白色」と「黒色」の 2 種類の LUV が脂質交換によって溶媒と同じ「灰色」になり、見えなくなるのである (Fig. 8)。実際、dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) の H-LUV と D-LUV とを混合すると、時間の経過とともに散乱強度が減少し、脂質交換が生じていることが判明した (Fig. 8)。散乱強度から計算される $\Delta\rho$ の減衰曲線をフィッティングすることで、脂質の粒子間移動 (k_{ex}) とフリップフロップ (k_f) の 2 つの速度定数を正確に算出し (Fig. 9)、37°C での膜間移動とフリップフロップの半減期はそれぞれ約 150 分、510 分と求められた。²⁷⁾ 一

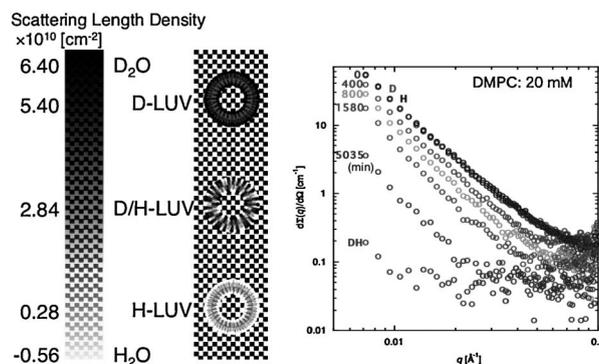


Fig. 8. Determination of Lipid Dynamics by SANS

(Left) Scattering length densities of solvent (D_2O/H_2O) and DMPC LUVs. In 1 : 1 D_2O/H_2O mixture, D- and H-LUVs are visible (high scattering) but D/H-LUV is invisible (low scattering) by neutron, due to the matching of the scattering length density. (Right) Changes in the neutron scattering profiles of 1 : 1 mixture of D-LUV and H-LUV.

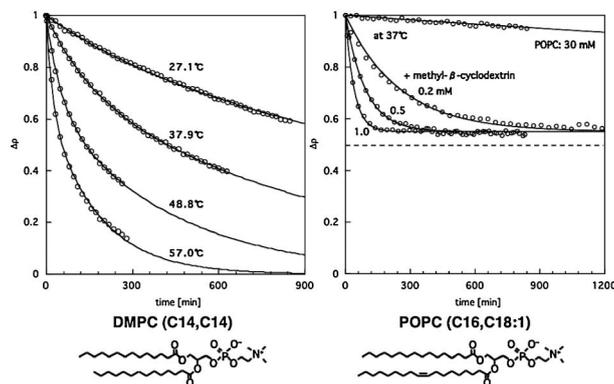


Fig. 9. Distinct Dynamic Properties of DMPC and POPC
(Left) Contrast decays of DMPC LUVs after mixing D- and H-LUV at four different temperatures. (Right) Contrast decays of POPC LUVs in the absence and presence of methyl- β -cyclodextrin.

方, DMPC よりも長鎖で, 生体膜成分の中で最も多いアシル鎖成分 (C16:0, C18:1) を有する脂質, POPC では, 膜間移動は非常に遅く, 約 90 時間という長い半減期を持つことが判明した.²⁸⁾ これは, DMPC よりも疎水鎖が長い分, 膜から水中への解離エネルギーが高まったためと考えられる. この系にメチル- β -シクロデキストリン (M β CD) を添加すると, 脂質のベシクル間移動が M β CD 濃度依存的に促進された. これは, M β CD がリン脂質の疎水鎖を包接することにより, ベシクル間移動を促進させたことを示している. しかし, 長時間後の $\Delta\rho(t)/\Delta\rho(0)$ の値は 0.55 付近で一定となっており, このことは POPC のフリップフロップが起っていないことを示している. DMPC に比べアシル鎖が長くなるとフリップフロップが抑制されたのは, より厚い脂質二重層内に極性頭部を通過させること, 並びに, より長いアシル鎖を反転させることが高いエネルギーを必要とするためと解釈できる. したがって, 生体膜中のリン脂質のフリップフロップには, それを介在するタンパク質の存在が不可欠である.

この時分割中性子小角散乱法により, コレステロールがリン脂質のフリップフロップを完全に抑制することや,²⁸⁾ ディスク状の DMPC-apoA-I 複合体では DMPC の解離速度がリポソームの場合よりも約 20 倍も速いことを明らかにした.²⁹⁾ この手法では, 粒子の分離操作は不要で, 脂質そのもののダイナミクスを *in situ*, real-time で観察, 評価でき, タンパク質等の存在下でも行うことができるのが特長

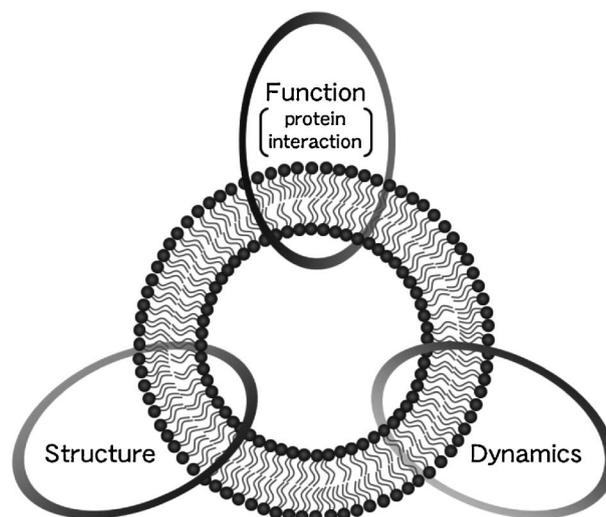


Fig. 10. Close Links among Function, Structure, and Dynamics of Lipid Membranes

である. 中性子線は X 線と比べてはるかにエネルギーが低く, 照射ダメージの影響がないことから, この評価法は脂質輸送に係わるタンパク質の活性評価に応用できる技術である.

5. おわりに

HDL 新生反応の主役である apoA-I が, 膜へ結合する過程, あるいは膜を壊して自発的にディスク状粒子を形成する過程において, 負の曲率を有する脂質, ドメインを形成する脂質, 膜表面 pH, 酸性脂質が重要な役割を持つことを示した. 物理化学的な見地からこの現象を眺めると, HDL 新生反応のもう 1 つの主役である膜タンパク質 ABCA1 の役割は, 細胞膜状の局所的な脂質組成を変えることではないかと考えられる. ABCA1 の機能を含めた HDL 新生反応の解明には, 生化学, 分子生物学的なアプローチに加えて本研究のような物理化学的考察が必須であろう. タンパク質が膜のダイナミクスを制御し, 膜脂質の動的挙動は膜の微細環境を変化させ, 膜環境変化はタンパク質-膜相互作用を制御する. このような膜の機能・構造・ダイナミクス (Fig. 10) が互いにリンクしていることを十分理解した上で, 広範囲な時間・空間スケールで, これらを観測できる技術を確認し, 脂質膜の構造やタンパク質との相互作用を把握することが, HDL 新生を始め, 生体膜を介した諸現象を解明するために重要であろう.

謝辞 本総説は、平成21年度日本薬学会奨励賞受賞を記念して記述したものであり、ご推薦頂いた上野雅晴先生（富山大院薬・教授）を始め、日本薬学会役員、審査員、ご関係の先生方に厚く御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご助言頂いた半田哲郎先生（京大院薬・教授）に深謝致します。また、一緒に研究を行ってきた学生、卒業生の皆様に感謝致します。

REFERENCES

- 1) Hyde S. T., Andersson S., Ericsson B., Larsson K., *Z. Kristallogr.*, **168**, 213–219 (1984).
- 2) Qiu H., Caffrey M., *Biomaterials*, **21**, 223–234 (2000).
- 3) Caboi F., Amico G. S., Pitzalis P., Monduzzi M., Nylander T., Larsson K., *Chem. Phys. Lipids*, **109**, 47–62 (2001).
- 4) Borne J., Nylander T., Khan A., *Langmuir*, **16**, 10044–10054 (2001).
- 5) Nakano M., Sugita A., Matsuoka H., Handa T., *Langmuir*, **17**, 3917–3922 (2001).
- 6) Nakano M., Teshigawara T., Sugita A., Leesajakul W., Taniguchi A., Kamo T., Matsuoka H., Handa T., *Langmuir*, **18**, 9283–9288 (2002).
- 7) Leesajakul W., Nakano M., Taniguchi A., Handa T., *Colloid Surf. B*, **34**, 253–258 (2004).
- 8) Uyama M., Nakano M., Yamashita J., Handa T., *Langmuir*, **25**, 4336–4338 (2009).
- 9) Nakano M., Kamo T., Sugita A., Handa T., *J. Phys. Chem. B*, **109**, 4754–4760 (2005).
- 10) Lee J. Y., Parks J. S., *Curr. Opin. Lipidol.*, **16**, 9–25 (2005).
- 11) Fitzgerald M. L., Morris A. L., Chroni A., Mendez A. J., Zannis V. I., Freeman M. W., *J. Lipid Res.*, **45**, 287–294 (2004).
- 12) Gillotte K. L., Zaiou M., Lund-Katz S., Anantharamaiah G. M., Holvoet P., Dhoest A., Palgunachari M. N., Segrest J. P., Weisgraber K. H., Rothblat G. H., Phillips M. C., *J. Biol. Chem.*, **274**, 2021–2028 (1999).
- 13) Swaney J. B., *J. Biol. Chem.*, **258**, 1254–1259 (1983).
- 14) Kamo T., Nakano M., Kuroda Y., Handa T., *J. Phys. Chem. B*, **110**, 24987–24992 (2006).
- 15) Shintou K., Nakano M., Kamo T., Kuroda Y., Handa T., *Biophys. J.*, **93**, 3900–3906 (2007).
- 16) Fukuda M., Nakano M., Sriwongsitanont S., Ueno M., Kuroda Y., Handa T., *J. Lipid Res.*, **48**, 882–889 (2007).
- 17) Fukuda M., Nakano M., Miyazaki M., Tanaka M., Saito H., Kobayashi S., Ueno M., Handa T., *J. Lipid Res.*, **49**, 2419–2426 (2008).
- 18) Hassan H. H., Bailey D., Lee D. Y., Iatan I., Hafiane A., Ruel I., Krimbou L., Genest J., *J. Biol. Chem.*, **283**, 11164–11175 (2008).
- 19) Smith J. D., Waelde C., Horwitz A., Zheng P., *J. Biol. Chem.*, **277**, 17797–17803 (2002).
- 20) Landry Y. D., Denis M., Nandi S., Bell S., Vaughan A. M., Zha X., *J. Biol. Chem.*, **281**, 36091–36101 (2006).
- 21) Holthuis J. C. M., Levine T. P., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 209–220 (2005).
- 22) Wimley W. C., Thompson T. E., *Biochemistry*, **29**, 1296–1303 (1990).
- 23) Bai J., Pagano R. E., *Biochemistry*, **36**, 8840–8848 (1997).
- 24) Nakano M., Matsuoka H., Yamaoka H., Poppe A., Richter D., *Physica B*, **241–243**, 1038–1040 (1998).
- 25) Nakano M., Matsuoka H., Yamaoka H., Poppe A., Richter D., *Macromolecules*, **32**, 697–703 (1999).
- 26) Nakano M., Matsumoto K., Matsuoka H., Yamaoka H., *Macromolecules*, **32**, 4023–4029 (1999).
- 27) Nakano M., Fukuda M., Kudo T., Endo H., Handa T., *Phys. Rev. Lett.*, **98**, 238101 (2007).
- 28) Nakano M., Fukuda M., Kudo T., Matsuzaki N., Azuma T., Sekine K., Endo H., Handa T., *J. Phys. Chem. B*, **113**, 6745–6748 (2009).
- 29) Nakano M., Fukuda M., Kudo T., Miyazaki M., Wada Y., Matsuzaki N., Endo H., Handa T., *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 8308–8312 (2009).