1PD005

生体膜のキュービック相に対する
脂質頭部間の斥力相互作用の効果○青田吉雄¹、李樹杰²、山崎昌一^{1,2}(¹ 静大・理・物理、² 静大・理工学研究科・物質科学)

キュービック相などの非 2 分子膜は、蛋白質と生体膜の相互作用や膜融合などの生理的現象や膜蛋白質の結晶化などの場として、重要な役割を果たしている。これらの相の構造安定性や構造決定因子、および相転移の機構はよくわかっていない。今回はまず、膜の表面電荷密度とバルク相のイオン強度や pH の変化による脂質頭部間の静電相互作用の変化が、キュービック相の構造や相安定性にどのような効果をもたらすかを X 線小角散乱 (SAXS) などで調べた。次に、脂質頭部間の斥力を減少させると考えられている水溶性有機溶媒 DMSO (1) のキュービック相の構造や相安定性に与える効果を SAXS などで調べた。

最初に、過剰の水の存在下の 20°C で Q²²¹ (Pn3m) 相であるモノオレイン (MO) に、中性で負の電荷を持つオレイン酸 (OA) を種々の割合で混合することにより、膜の表面電荷密度を変化させて構造や相を調べた。pH 7.0、0mM NaCl 存在下では、OA 濃度が増加するにつれて Q²²¹ 相から Q²²⁹ (Im3m) 相への相転移が起こり、1.0mol% 以上の OA 存在下では Q²²⁹ 相であった。また、OA 濃度が増加するにつれて、Q²²⁹ 相の格子定数は増加した。OA/MO (1:9 (mol/mol)) 膜は pH 7.0 で Q²²⁹ 相であるが、NaCl 濃度を増加していくと、0.1M NaCl の時に Q²²⁹ 相から Q²²¹ 相への相転移を起こした。また、0M NaCl 存在下で OA/MO (1:9) 膜の構造の pH 依存性を調べたところ、pH が下がるにつれて、pH 5.8 で Q²²⁹ 相から Q²²¹ 相への相転移を起こし、pH 5.3 で Q²²¹ 相から H_{II} 相へ相転移した。これらの結果は、脂質頭部間の斥力相互作用と脂質のパッキングパラメーターにより、合理的に説明できる。

学会では、水溶性有機溶媒 DMSO がキュービック相の構造や相安定性に与える効果の実験結果も報告し、上記の静電相互作用の効果とあわせて総合的に議論する。

(1) Kinoshita, Yamazaki, Submitted to Biochim. Biophys. Acta

Y. Aota, S. S. Li, M. Yamazaki: Effects of repulsive interaction between headgroups of lipids on phase stability of cubic phases

1PD007

Effects of Peptides on Phase Stability of
Nonbilayer Membranes (1)○ Shu Sie Li, Tomoki Tanaka, Kouji Kinoshita,
Masahito Yamazaki (Fac. Science, Shizuoka Univ.)

Nonbilayer membranes such as cubic phases and inverted hexagonal (H_{II}) phase play important biological roles. Several peptides have been reported to induce nonbilayer membranes. However, the mechanism of the peptide-induced phase transition between bilayer membranes and nonbilayer membranes is not well understood. In this report, at first, we have investigated effect of poly(L-lysine), pentalysine, and MARCKS (151-177) peptide on the phase stability of membranes by small-angle X-ray scattering (SAXS) and DSC. These peptides are considered to bind the membrane surface due to the electrostatic interaction, and form microdomains in phospholipid membranes and also biological membranes. Next, we have investigated effects of the N-terminal peptide of HIV gp41, which may play an important role in membrane fusion, on the phase stability of the membranes.

100 mM DOPA/DOPE (1:1 (mol/mol)) membrane in 10 mM PIPES buffer (pH 7.0, 0 mM NaCl) at 20 °C was in L_α phase (1). To investigate their interactions with the membranes, high concentration of poly(L-lysine) (M_w=1000-4000) or pentalysine solution was added to the suspension of the DOPA/DOPE. SAXS data show that with an increase in poly(L-lysine) concentration, a phase transition from L_α to H_{II} phase occurred at 20 mM (lysine residues). In the case of pentalysine, an L_α to H_{II} phase transition occurred at 3 mM.

At the Meeting, we will report results of interactions of the MARCKS peptide and the HIV N-terminal peptide with phospholipid membranes, and discuss effects of these peptides on the phase stability of nonbilayer membranes. Results of the interaction of these peptides with GUVs (Giant Unilamellar Vesicles) of phospholipids will also be discussed.

(1) Nakano, Kinoshita, Yamazaki, Biophys. Jpn., 38S, 57, 1998

1PD006

リン脂質頭部のコンフォメーションと
非 2 分子膜の相安定性 (1)○木下浩司[△]、山崎昌一[△]([△] 静大ベンチャービジネスラボ、[△] 静大・理・物理)

リン脂質の頭部のコンフォメーションは、イオンや低分子、およびペプチドとの相互作用により大きく変化することが、固体 NMR や中性子散乱の実験などから知られている。しかし、このリン脂質頭部のコンフォメーションが、リン脂質膜の相の安定性、特にヘキサゴナル II 相 (H_{II} 相)、インターデジテッドゲル相 (L_pI 相) などの非 2 分子膜の相安定性にどのような影響を与えるかはよくわかっていない。今回は、ホスファチジルコリンの頭部のコンフォメーションを変化させることが知られているイオンの一つである La³⁺ が、リン脂質膜の L_pI 相や H_{II} 相の相安定性に与える効果を、X 線小角散乱 (SAXS) や示差走査熱量計などで調べた。

ジヘキサデシルホスファチジルコリン (DHPC) 膜は、中性で 20°C では L_pI 相である。脂質頭部間の斥力が、この L_pI 相の安定性に重要な役割を果たしている (1)。0.5M KCl を含む緩衝液 (pH 7.4) 中では、30mM 以上の La³⁺ 存在下では L_p 相を形成した。0M KCl 存在下では、210mM 以上の La³⁺ 存在下で L_p 相を形成し、L_pI 相から L_p 相への相転移の La³⁺ の閾値がバルクのイオン強度に依存することがわかった。また、ゲル-液晶相転移温度は La³⁺ の濃度とともに上昇した。

ジパルミトオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DPOPE) や DOPC/DOPE (1:4.6 (mol/mol)) は中性で 20°C では L_α 相である。これらの膜に対する La³⁺ の効果を SAXS で調べたところ、DPOPE 膜では 2mM で、DOPC/DOPE (1:4.6) 膜では 2mM La³⁺ の存在下で、H_{II} 相に相転移することがわかった。

以上の結果より、L_pI 相は La³⁺ 存在下では不安定化し、閾値濃度以上では L_p 相へ相転移し、また H_{II} 相は La³⁺ 存在下では L_α 相より安定化することがわかった。La³⁺ による脂質頭部のコンフォメーション変化および La³⁺ と脂質頭部のリン酸基の負電荷との静電相互作用による脂質頭部間の斥力の減少が、これらの相転移の主因であると考えられる。

(1) Furuike, Levadny, Li, Yamazaki, Submitted to Biophys. J.

K. Kinoshita, M. Yamazaki: Effects of headgroup conformation of phospholipids on phase stability of nonbilayer membranes

1PD008

アルツハイマー・アミロイドβ1-42チャネルの実測:
溶媒、pH、Congo Red のチャネルに対する効果
○平倉 穰、Bruce L. Kagan (UCLA・医)

アルツハイマー病脳を特徴づける老人斑の主要蛋白成分は、42アミノ酸残基からなる Aβ1-42 であり、Aβ1-42 は凝集した時にのみ神経細胞毒性であることが示されている。現在、この凝集体特異的な細胞毒性の分子機構は不明であるが、いくつかの研究によれば、Aβ が神経細胞膜構造を攪乱する、あるいは、神経細胞膜にイオンチャネルを形成することが原因である可能性が示されている。本研究では、Aβ1-42 チャネルの直接的な証拠を提出し、チャネル形成と神経毒性との関連を示唆する。

Aβ1-42 は、神経毒性濃度で脂質平面膜に矩形形状のイオンチャネルを形成した。チャネルは弱いカチオン選択性であり、電位非依存的であった。チャネル形成は大きくばらつき、サンプルをバッファーに加えてからチャネル出現までの潜伏時間は 7.5 ± 8min であり、また、試行回数 67 のうち 32 回 (47%) でチャネル電流が出現させた。チャネル・コンダクタンスは数 pS から数 nS に分布し、開閉時間は数秒に及び、それらはサンプル調製時の溶媒 (初期溶媒) に大きく依存した。チャネルの形成は、膜に酸性脂質を必要とし、酸性溶液中で促進され、Congo Red で抑制された。これらの性質は、チャネルが Aβ1-42 の凝集体によって形成されることを示唆している。また、チャネルは電位非依存的、可逆的に亜鉛イオンでブロックされた。

酸性条件下でチャネル形成の再現性が上昇し、コンゴ・レッドで抑制されたことは、Aβ1-42 が、酸性溶液中で凝集体を促進すること、コンゴ・レッドが凝集体と結合することなどから、チャネル形成が凝集体に由来するものであることを示唆する。さらには、Aβ1-42 の細胞毒性が凝集体に特異的なものであること、コンゴ・レッドで抑制されることから、チャネル形成が細胞毒性と関連すると考える。加えて、酸性脂質がチャネル形成に必要であることは、AD 脳において酸性脂質 PS が膜の外葉に現れていることと関係づけられる。また、研究室によって毒性実験の結果が大きく異なることと、チャネル出現やコンダクタンスのばらつきの大いこととは一致する。

Y. Hirakura, and B. L. Kagan: Alzheimer Amyloid Aβ1-42 Channels: Effects of Solvent, pH, and Congo Red.