1PD021

放射光X線小角散乱法を用いた脂質二重層膜内での
メリチンの配向状態の観測

○野末佳伸、¹上野聡、¹大木和夫、¹金子俊博、¹雨宮慶幸
(東大・工・物工、¹広島大・生物生産・食品物理、²東北大・理・生物物理、
³東大・新領域・物質)

メリチンは蜂毒の主成分ペプチドで 26 残基のアミノ酸から構成されている。メリチンは赤血球に対して溶血作用を持つほか、その構造が膜蛋白質の膜結合領域に類似しており電圧依存型イオンチャネルを形成することから、メリチンの膜に対する相互作用、特に膜内でのメリチンの会合・配向状態に関する研究は盛んに行われてきた。最近になって disulphide 結合で人工的にメリチンを 2 量体状態にして行なった蛍光測定の実験でメリチンは膜内で主に 2 量体に会合していることが分かった。一方、膜内でのメリチンの配向特性に関しては円偏光(CD)や ATR-IR 法、X 線小角散乱法(SAXS)などの方法によって調べられてきた。しかし、試料の条件が特殊(CD と SAXS においては配向多重膜、ATR-IR 法では基板上の配向膜)であることから、天然状態で実際にメリチンが作用している分散液系での膜に対する配向状態に関して一般性のある結論はこれまで得られてこなかった。

そこで、今回我々は一枚膜ベシクル(ULV)分散液条件下で SAXS 測定を行いメリチンを添加していった際に生じる脂質二重層膜の厚さの変化を DMPC,DPPC,DSPC の 3 種類の脂質膜に対して観測した。1 枚膜の散乱は非常に散漫であることから本実験には強力な X 線源と優れた検出器が必要であり、実験にはつくばの放射光施設である PF の小角散乱実験ステーション BL-15A を利用し、検出器にはイメージングプレート(IP)を使用し、データを円周平均した。このことで、実験室では得られない分解能($\pm 0.2\text{\AA}$)で 1 枚膜の膜厚の変化を観測する事に成功した。結果は DMPC と DPPC に関してはメリチンを加えていくと膜厚は単調に増加し、DSPC に関しては増加傾向は見られず大きな膜厚の変化は見られなかった。メリチンの長さが大体 DSPC の膜厚に近いと考えられることから分散液系ではメリチンが膜に対して貫通して(transmembrane 状態)で相互作用しているものと考えられる。この方法は従来の配向膜の方法に比べ試料の調製が簡単であり、巨大な膜蛋白質や膜融合活性を持つペプチドなどのような、配向膜を形成するのに時間がかかる、または困難な系に対し有効に適用できると思われる、幅広い応用が期待できる。

1)J.Takei,A.Remenyi and C.E.Dempsey. (1999)FEBS Lett.442.11-14

Y.Noze, S.Ueno, K.Ohki,T.Kaneko and Y.Amemiya : Orientation of Melittin in Phospholipid Bilayer by using Synchrotron Radiation Small-Angle X-ray Scattering

1PD023

異常分散 X 線回折法による Langmuir-Blodgett 膜の構造解析
○日比野政裕、秋本晃一、堀井新司、小山貴之、八田一郎
(名大院・工)

LB 膜は水面上に形成した単分子膜を固体基板上に移しとり、累積して作成される分子組織膜である。生命科学の分野からは生体モデル膜として注目されている。近年、走査型トンネル顕微鏡(STM)、原子間力顕微鏡(AFM)の登場によって試料表面の構造が原子レベルで直接観察できるため、LB 膜を含む有機・生体分子からなる薄膜の研究は飛躍的に進んだ。しかし、表面から少し埋もれた界面の構造はあまり分かっていない。例えば、脂肪酸／金属塩からなる LB 膜では膜中の炭化水素鎖の配向は知られているが、金属塩の配置は未だ明らかではない。

X 線は STM や AFM とは違って、このような界面の研究ができるという利点を持つ。しかし通常の回折条件では、進入深さが大きすぎるためにバックグラウンドが高くなる。これを低減し、界面あるいは表面近傍からの信号を捕らえるためには、シンクロトロン放射光を利用した微小角入射 X 線回折法が適している。さらに、膜中の金属塩の並びが秩序構造からランダムか、さらに、脂肪酸の配向との関係を知るために、異常分散効果を利用した X 線回折法による構造解析法を用いた。異常分散効果を利用するには、ある特定の元素の吸収端近傍の波長に入射 X 線の波長を定める必要がある。この際、自由に波長を選択できるシンクロトロン放射光は必要不可欠である。

実験にはアラキジン酸 Cd から成る LB 膜を用い、測定は SPring-8 の BL09XU で行った。表面界面の分野に多波長異常分散法が応用されるようになってからまだ日が浅い。今回の測定は LB 膜を含む分子組織薄膜の研究分野ではじめての異常分散 X 線回折法の応用例である。

M. Hibino, K. Akimoto, S. Horii, T. Koyama and I. Hatta : Anomalous X-ray diffraction analysis of Langmuir-Blodgett films

1PD022

アセチル化された ganglioside GM3 を含む DPPC 多重層膜の相分離

○松岡審爾¹、秋山盛雄¹、山田大邦¹、土橋桂子²、賀佐伸省²
(札幌医大・医・物理¹、同 化学²)

これまで、我々は ganglioside GM3 を含む DPPC 多重層膜の X 線回折を行ってきた。その結果、ある GM3 濃度以上で GM3 に富む領域(領域 B)とそうでない領域(領域 A)に対応した異なる 2 種類のラメラ間隔による反射が観測された。領域 B が全体に占める割合は GM3 濃度 3 mol% 以上で急に増加し 7 mol% ではほとんどすべての領域が領域 B となった。一方、補体依存性リポソーム崩壊の実験によって、GM3 を認識する抗メラノーマ抗体である M2590 の反応性が調べられている。その抗体の反応性はリポソーム中の GM3 濃度に大きく依存し、ある閾値を境にして急に増大することが報告されている。そこで、抗体 M2590 が領域 B の構造を認識すると考えれば、GM3 の濃度がある閾値を越えてはじめて抗体 M2590 が反応するという実験結果をうまく説明できる。

今回は、ganglioside GM3 のセラミド部分の C-3 位の水酸基がアセチル化された 3-O-AcGM3 を含む DPPC 多重層膜を用いた。これによって、相分離による領域 B の形成と抗体の反応性の閾値との間に対応関係があることをさらに確かめた。3-O-AcGM3 はラットグリオーマ細胞に存在する腫瘍関連物質である。抗体 M2590 は 3-O-AcGM3 とも反応し、GM3 の場合と同様にリポソーム中の 3-O-AcGM3 濃度がある閾値に達すると急に反応性が増大する。しかし、その閾値は GM3 の場合より高いことが報告されている¹。そこで、3-O-AcGM3 を含む DPPC 多重層膜の X 線回折を行ったところ、GM3 の場合と同様の相分離が観測された。そこで領域 B が占める割合の 3-O-AcGM3 濃度依存性を調べた。すると 7 mol% 以上で領域 B が生じることがわかった。この濃度は GM3/DPPC 系の場合より高く、抗体の反応性の閾値と同様の傾向を示した。以上の結果は相分離によって生じた領域 B の構造を抗体 M2590 が認識することを強く示唆する。

参考文献 1.K.Suetake et al. FEBS Lett. 361(1995) 201-205

S.Matuoka, M.Akiyama, H.Yamada, K.Tsuchihashi, S.Gasa :

Phase separation in DPPC multilamellar vesicles containing 3-O-AcGM3

1PD024

X-RAY STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF PHOSPHOLIPID UNILAMELLAR VESICLES PREPARED BY EXTRUSION

○Haruhiko YAO, Keitaro DOUMEN, Sinzi MATUOKA[†], Hiroshi TAKAHASHI[‡], Ichiro HATTA[‡] and Kenji EMA
(Dept. of Phys., Tokyo Inst. of Tech., [†]Dept. of Phys., Sapporo Medical Univ., [‡]Dept. of Appl. Phys., Nagoya Univ.)

Recently, the heat-capacity anomaly near the gel to liquid-crystalline phase transition in unilamellar vesicles(ULVs) of DC₁₄PC prepared by extrusion was studied [1]. It was found that the heat capacity anomaly shows supercritical behavior and depends significantly on the vesicle size. However, the heat-capacity behavior is quite different from ULVs prepared by sonication while the vesicle sizes are comparable. Thus, we have characterized the lamellarity of ULVs prepared by extrusion using small-angle x-ray scattering.

As a result, sharp Bragg peaks caused by bilayer-repeat distance were observed for MLV sample. For 100-nm sample, broad peaks were observed at the same positions of MLV peaks, which shows that the sample contains small amount of oligolamellar vesicles. For 30-nm sample, however, there are no peaks at the position, which indicates that it contains no MLVs. The broad scattering arises from single bilayer and the position of the maximum intensity corresponds to the head-head distance of a bilayer. Assuming that there are uni-, bi-, tri-, tetra-, penta-, octa- and decalammellar vesicles, the ratios were analyzed by fitting Laue functions to the MLV component. It was found that ULV component is more than 74 % in the 100-nm and 30-nm samples prepared by extrusion. Therefore, the reason of the discrepancy between extruded ULV and sonicated ULV is not clear at present. The 30-nm samples contain more ULV than 100-nm samples. Besides, ULV ratio increases as chain length increases. The analysis also shows that there is a distribution of bilayer-repeat distance.

[1]H. Nagano *et al.*: Phys.Rev. **E52**, 4244(1995); K. Uchida *et al.*: Phys.Rev. **E56**, 661(1997).