1PD029

アクチン線維とミオシン I を組み込んだリポソーム

○本田誠、宝谷絃一、滝口金吾 (名大院・理・生命理学)

リポソームは細胞と同様に脂質二重層膜に囲まれた小胞である。リポソームに蛋白質を組み込み、そのリポソームの挙動を直接観察することにより、組み込んだ蛋白質の機能の解析、さらに細胞のモデルの構築を目指している。特に細胞の形態形成における細胞骨格系蛋白質の働きを知るために、アクチン線維とその結合蛋白質を用いた実験を行ってきた。

本研究ではニワトリの小腸から精製したミオシン I を組み込んだリポソームを作成し、その形態変化を観察した。ミオシン I は、アクチン線維と脂質膜のどちらとも結合することができるモーター蛋白質である。

アクチンとミオシン I を同時に組み込んだリポソームでは、アクチン線維がリポソーム膜に沿って局在するようになることを観察した。その場合アクチン線維だけでは変形を起こさない程の低濃度のアクチンで、リポソームの形態が変化した。さらに ATP の加水分解に伴うミオシン I のモーター活性によるリポソームの形態変化の観察を行なう予定である。

M. Honda, K. Takiguchi, H. Hotani : The liposome containing F-actin and myosin-I.

1PD030

ウニ卵タンパク質による脂質二重層膜の開放端の形成

○武田修一、伊藤知彦、瀧口金吾、宝谷絃一 (名大院・理・生命理学)

我々は、生体膜のダイナミックな形態制御機構を人工脂質膜小胞 (リポソーム) によるモデル系を用いて研究している。これまでにリポソーム溶液中に細胞骨格系タンパク質の talin, band4.1 や ezrin などを加えると、リポソーム膜に安定な穴が開く (膜穿孔) することを暗視野顕微鏡によって観察した。穴は加えたタンパク質濃度に依存して拡大し、最終的にリポソームはシート状の一枚の脂質二重層膜となる。タンパク質は開口部の周辺に沿って局在していたことから、脂質二重層膜の縁で疎水性部位を露出しないように覆うことにより、その形態を維持しているものと考えられる。

今回、我々はウニ未受精卵より抽出したタンパク質にも、膜穿孔活性が存在することを報告する。バフンウニ未受精卵より得られた抽出液をリポソーム溶液に加えると、上記の細胞骨格系タンパク質の場合と同様の脂質膜穿孔活性が観察された。プロテアーゼ処理した抽出液ではリポソームの変形が起こらなかったことから、タンパク質が活性に必要なことがわかった。抽出液中の膜穿孔活性に必要なタンパク質の同定のため、ゲルろ過、イオン交換、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー等を用いた分画を行なった。その結果、画分中の複数のタンパク質が膜穿孔活性に関与していることがわかった。現在、更なるタンパク質の精製・同定を試みている。

S. Takeda, T. J. Itoh, K. Takiguchi, H. Hotani : Opening-up of liposome membrane by the proteins isolated from sea urchin eggs

1PD031

メリチンにより引き起こされた膜小胞の融合過程の直接観察

○野村典正、永田美希、石川哲、滝口金吾、*高橋敏、宝谷絃一 (名大・理学・生命理学、*京大化研)

生体膜の融合現象は生命活動に必要な現象である。しかしながら、これまでの電子顕微鏡観察や分光学的方法では、個々の膜小胞間で起こる融合の過程を捉えることは困難である。我々は、人工膜小胞 (直径: ~数 10 μm) と融合活性が報告されている種々のペプチド (ミツバチ毒主成分のメリチン、インフルエンザ・ウイルスのヘムアググチニン由来の合成ペプチド HA) を用い、高輝度暗視野顕微鏡で膜融合過程の直接観察を試みた。以前の学会で我々は、HA 類似ペプチドの E5 と K5 の混合溶液を中性 pH で膜小胞に作用させたところ、膜小胞が縮小した後、融合が起こることを報告した。この場合の縮小は、一枚膜から多重膜にトポロジー変換されることによって生じると思われる。

今回、塩存在下で、ホスファチジルコリン (PC) から調製した膜小胞にメリチンを加えたところ、膜小胞は縮小することなく一枚膜のまま融合することが観察された (下図)。さらに、脂質組成や塩条件を変えることにより、縮小後の融合や膜穿孔などの多様な形態変換を起こしうることがわかった。

塩存在下でのメリチンによる PC 膜小胞の融合。縮尺 = 5 μm

F. Nomura, M. Nagata, S. Ishikawa, K. Takiguchi, S. Takahashi and H. Hotani : Direct observation of the vesicle fusion induced by melittin.

1PD032

界面活性剤による膜小胞の表裏反転

○滝口金吾、野村典正、永田美希、宝谷絃一 (名大・理学・生命理学)

生体膜は、水溶液中で自発的に閉じて小胞を形成する。この性質は生命活動において必須である。我々は、前回の学会で、膜小胞が小胞を分裂させることなく、その膜面積を連続的に減少させて、縮小し得ることを報告した。界面活性剤の Triton X-100 をホスファチジルコリンから成る人工膜小胞に作用させると、膜が張っている状態と激しく振動している状態という 2 つの状態間を繰り返しながら縮小する。また、膜が振動しているとき、内部小胞が直接放出されているのが観察された。

今回、様々な脂質組成の膜小胞に種々の界面活性剤を加えて、膜小胞の変化を観察したところ、驚くべきことに上記した以外にも、膜の表裏反転が起こることを見出した (下図)。この反転は脂質二重層の表側からの脂質単層から、界面活性剤の可溶化作用によって脂質分子が取り除かれ、表側単層の面積が裏側単層に比べて減少するためだと考えられる。したがって、フリップフロップの容易なる脂質組成では起こりにくい現象だと推測され、この結果も報告する予定である。

1 mM PC:DMTAP (=1:1) liposome に 100 mM HTAB を加え、暗視野顕微鏡で観察した。縮尺 = 5 μm

K. Takiguchi, F. Nomura, M. Nagata and H. Hotani : Inside-out transformation of liposomes caused by surfactants.