1PD049

高分子結合リン脂質を含む GUV (Giant Unilamellar Vesicle) の特性解析 (2) ○岡正人¹、田中智樹²、古池晶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)

直径が 10 μ m 以上あるような一枚膜の脂質のベシクルである GUV (Giant Unilamellar Vesicle) は、ベシクルの形態変化、膜の弾性率の測定、繊維状蛋白質との相互作用の研究などで、イオン強度が低い条件で主に使用されてきた。昨年の年会で、高分子結合リン脂質 (1) を膜に少量混合することによって、高いイオン強度 (たとえば 0 ~ 2 M 程度の NaCl 存在下や 0 ~ 1 M 程度の CaCl₂ 存在下) の水中や緩衝液中で、ホスファチジルコリン (PC) の GUV 生成が可能であることを報告した (2)。今回は、その GUV の特性について報告する。

高分子結合リン脂質としては、脂質頭部に分子量 2,000 のポリエチレングリコール (PEG-2K) が結合したジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン (DOPE) である PEG-2K-DOPE を主に利用した。0.5 ~ 10mol% の PEG-2K-DOPE を含む DOPE の GUV の膜の膨張弾性率を測定するために、マイクロピペット吸引法 (3) を試みたところ、小さな吸引圧力で、GUV から小さなベシクルが生成し脱離した (Fission) 場合や Budding を起こす場合が多かった。ピレン PC をプローブにしたエキサイマー法で膜の流動性を測定したところ、PEG-2K-DOPE を含む DOPE の GUV は、100%DOPE の GUV に比べて脂質の拡散定数は大きく、膜の流動性は大きかった。また、この GUV のイオン透過性を調べるために、GUV 内部に Calcium Green-1 を含むものを作り、Ca イオンフォアの A-23187 添加で GUV 外部の Ca²⁺ が内部に透過することが蛍光顕微鏡の観察でわかった。

学会では、脂質の組成変化による GUV の特性の変化や、イオノフォアやイオンチャンネル蛋白質による他のイオンの透過性についても議論する。また、この GUV 中に F-アクチンを再構成し、そこでのアクチンと GUV の相互作用についても報告する予定である。

- (1) Furuike et al., Biophys. Jpn. 37S, 123, 1997
(2) Oka et al., Biophys. Jpn. 38S, 57, 1998
(3) Kinoshita and Yamazaki, Biophys. Jpn. 38S, 57, 1998; Submitted.

M.Oka, T.Tanaka, S. Furuike, M. Yamazaki: Physical Properties of GUVs containing PEG-lipids

1PD051

人工脂質平面膜の電気的・光学的観測 (II) ○井出 徹¹、上村 武²、柳田 敏雄^{1,2} ¹ 科学技術振興事業団・1 分子過程プロジェクト ² 阪大・医

単一イオンチャンネルの構造変化と、電流揺らぎを同時計測可能な実験系の開発を行っている。蛍光ラベルしたイオンチャンネル 1 分子による蛍光揺らぎと、電流揺らぎを同時に計測することにより、ゲーティングの分子実体を解明することが目標である。

予備実験として、電位固定した人工膜上での単一脂質分子の熱運動を計測した。蛍光ラベルした脂質 (β -BODIPY 530/550 HPC) を含む人工脂質二重層膜を、プラスチック板等にあげた小孔 (直径約 100 μ m) に形成し、その蛍光像を ISIT、或いは ICCD カメラで観察した。脂質膜は、高分子コートしたガラス表面に接触させた状態で保持し、エバネッセント照明による観察を可能にした。膜電位は、パッチクランプ用アンプを用いて固定し、膜を介して流れる電流を同時に記録した。

上記人工膜は、開口中心付近の脂質二重層膜と、それを取り囲むバルク層とから成っていると思われ、膜電位 $\pm$ 200mV の範囲で、電気的に安定であった。二重層膜上の蛍光分子 1 分子の熱運動をイメージングしながら、同時にチャンネル形成ペプチド (alamethicin, gramicidin) による単一チャンネル電流揺らぎを計測することが可能となった。

T. Ide, T. Uyemura, T. Yanagida: Optical and electrical measurement of artificial planar lipid membranes II.

1PD050

開口放出反応に伴う水動態のエバネッセンス法と光ピンセット法による解析

○坪井 貴司^{1,2}、菊田 敏輝²、寺川 進²
(¹ JSPS、² 浜松医科大学光子医学研究センター)

開口放出反応の際には、細胞質に存在する分泌顆粒が細胞膜と融合し、その内容物を細胞外に放出する。しかし、開口放出反応時の細胞膜融合に伴う分泌のダイナミクスについては、明らかになっていないことが多い。そこで本研究では、分泌顆粒を蛍光染色し、細胞膜近傍だけを観察できるエバネッセント照明を用いて、単一分泌顆粒の開口放出反応を可視化解析した。また、開口放出反応時の水流変化を光ピンセット法にて捕捉したビーズによって測定、解析した。

倒立顕微鏡を用い、対物レンズ (N.A.=1.65) からレーザ光を入射する方法によってエバネッセント照明をした。光源は、DPSS レーザー (532nm) を用いた。また、光ピンセットには、Nd:YAG レーザー (1064nm) を用いた。画像は、ICCD カメラを使ってデジタルビデオに録画し、解析した。

培養ウシ副腎髄質細胞の分泌顆粒をアクリジンオレンジで蛍光染色しエバネッセンス顕微鏡で観察すると、明るい蛍光輝点が認められた (1.1 個/ μ m²)。微小電極による刺激をすると数秒間で、蛍光染色した分泌顆粒が蛍光強度を一瞬上げてから広がりながら消失する反応が主に観察された。この蛍光増加反応は、Cl⁻ チャネル阻害剤である DIDS および NPPB により抑制された。また、ボツリヌス毒素を与えた場合、蛍光増加反応も消失反応も、共に完全に抑制された。また、免疫蛍光染色法により、分泌顆粒膜上に Cl⁻ チャネルが分布することが分かった。光ピンセット法で細胞近傍の水中にビーズ (直径 2 μ m) を置くと、開口放出反応に伴ってわずかに動くことが分かった。以上の結果から、開口放出反応時には、融合孔から短い水噴出が起ることが明らかになった。

T. Tsuboi, T. Kikuta, S. Terakawa: Imaging of a single exocytotic response by evanesence microscopy and by optical tweezer force-metry

1PD052

単一心筋ミトコンドリアにおける膜電位変動の測定
○渡辺 功一、作山 孝法、太田 善浩
東京農工大学大学院 工学研究科 生命工学専攻

[目的]

細胞内小器官であるミトコンドリアにおいて作られる ATP は、生物活動に必要なエネルギー源として用いられる。このため ATP を合成する最小単位である一つ一つのミトコンドリアを対象として、ATP 合成に至る中間反応を調べることによって ATP の合成メカニズムが明らかになる。

これまで本研究室の実験より、細胞から取り出した個々のミトコンドリアでは、基質添加に伴い膜電位が急激に変動することが明かとなった。このため個々のミトコンドリアの膜電位変動を調べることで、その変動を制御する機構を解明する。

[実験方法]

蛍光顕微鏡と CCD カメラを用いて個々のミトコンドリアの蛍光強度時間変化を観察するため生きたままガラスプレパレート上に固定した。

固定した個々のミトコンドリアの反応を開始させるにはリンゴ酸を用いた。リンゴ酸は NADH 合成、それに続く電子伝達系反応を引き起こす物質の 1 つである。個々のミトコンドリアにおいて、リンゴ酸添加により起こる NADH の生成、フラビンタンパク質の還元、膜電位の変動を蛍光強度時間変化で追った。反応を観察する際に NADH の生成、フラビンタンパク質の還元では自家蛍光、膜電位については膜電位感受性蛍光試薬を用いて測定を行った。

また膜電位測定においては、反応開始剤であるリンゴ酸濃度を変えて測定を行い、リンゴ酸濃度に対する膜電位の変化を観察した。

[実験結果]

個々のミトコンドリアにおいて NADH の生成、フラビンタンパク質の還元、膜電位の変動を測定した。その結果リンゴ酸添加後の NADH の生成、フラビンタンパク質の還元においてはミトコンドリア集団と個々のミトコンドリアで同じ挙動を示した。これに対して膜電位変化は集団では穏やかであるが、個々のミトコンドリアでは急激な変化を伴うものであった。さらに膜電位変化について、リンゴ酸の濃度を変えてその変化を追った。その結果、膜電位形成速度がリンゴ酸濃度に依存することが明らかとなった。

K.Watanabe, T.Sakuyama, Y. Ohta: Fluorescence imaging analysis of membrane potential changing in a single mitochondrion.