1K1030

DSPCにおける2相共存状態の出現機構

○中沢 寛光, 久保 博毅, 加藤 知 (関学大・理)

代表的リン脂質の1つであるDSPCの多重層ベシクルでは、そのDSCサーモグラムにおいて主転移の1度前後低温側に小さな転移ピーク(ここではサブピークと呼ぶ)が出現し、この転移ピークはKCl存在下で顕著に増大することが知られている。昨年度はこのサブピークの出現が2相共存状態の形成に対応していることを明らかにしたが、今回はこの2相共存状態の出現機構を明らかにするため、添加物の種類や濃度に対する依存性、エンタルピー増大の可逆性などについて詳細に検討した。凍結-解凍を繰り返した後、再び昇降温を繰り返すとサブピークの転移エンタルピーの増大が加速されるのが観測された。また、エンタルピー増大を加速するには、主転移温度近傍に試料を保持しても効果は小さく、転移温度を挟んで温度走査することが必要であった。これらの処理過程でベシクルの破壊が起こり、多重度が減少していると考えられ、サブピーク出現には膜間の相互作用が関与していることが示唆された。また、膜内外に塩濃度勾配をかけた試料を作製後、溶液に塩を追加して濃度勾配をなくすと、可逆的にサブピークが消えていくことがわかった。このことは、多重層ベシクルの最外層がサブピークに関与している可能性を示唆している。さらに、浸透圧の効果が考えられるが、この点に関しては、PEGの濃度勾配ではサブピークが現れないことや、蒸留水中でもサブピークが出現することと矛盾する。添加物の種類としては、多種の塩、糖、アルコールなどを試みた。糖の系列では、凍結防止能とサブピーク出現の相関が推測され、またアルコールでは、Interdigitated gel相の形成に伴い、サブピークが消えるのが観測された。これらの実験結果に基づいて、DSPCにおける2相共存状態の出現機構について議論する。

H.Nakazawa, H.Kubo and S.Kato : Formation mechanism of the domain structure in DSPC bilayers.

1K1100

放射光X線小角散乱法によるメリチン-脂質膜相互作用の研究

○野末 佳伸¹、上野 聡⁴、大木 和夫³、金子 俊博²、雨宮 慶幸² (¹東京大・工・物工、²東京大・新領域・物質、³東北大・院理・生物物理、⁴広島大・生物生産・食品物理)

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ン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1枚膜系での、メリチンの膜に対する配向状態に関しては、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、昨年までに我々は、放射光X線小角散乱法を用いて1枚膜ベシクル中にメリチンが添加されることによって生じる散乱曲線の変化を観測し、解析してきた。その結果、メリチンは、液晶状態のベシクル中では、膜の厚さとメリチンのヘリックスのマッチングの度合いに応じて、膜内での配向状態の割合を変えている事が分かった。また、DSC観察により、メリチンの添加に従って、膜のゲル-液晶相転移が平坦化し、分裂していくことを観測した。しかし、メリチンを添加したときに起こる膜のゲル-液晶相転移挙動の変化を解釈するには、ゲル状態の1枚膜ベシクルへのメリチンの分配も観測する必要がある。今回は、ゲル状態の1枚膜内へのメリチンの配向状態を発表し、液晶状態の膜へのメリチンの配向状態と併せて、相転移の際に生じる構造変化を考察する予定である。また、メリチン/DMPC(5/95)系で、温度を少しずつ上昇させていったときの小角/広角X線散乱曲線の変化とDSCピークとの対応についても議論する予定である。

Y.Nozone, S.Ueno, K.Ohki, T.Kaneko and Y.Amemiya : Investigation of MELITTIN-lipid interaction by using synchrotron small angle X-ray scattering

1K1045

塩存在下で2相共存状態にあるC17PCのX線回折

○加藤 知¹、中沢 寛光¹、久保 博毅¹、高橋 浩²、松岡 審爾³ (¹関学大・理、²群馬大・工、³札幌医大・医・物理)

炭素数17から20の飽和アシル鎖をもつホスファチジルコリン(PC)では、塩や糖を添加すると従来知られていた前転移、主転移以外に新たな転移が主転移の低温側に現れることが知られている。昨年度、この新たな転移の出現は、系内に2つのドメインが共存することに関係していることを報告した。本研究では、この2相共存状態の構造を解析するため、高エネルギー物理学研究所の放射光を用いてX線回折実験を行った。試料には、各転移ができるだけ互いに干渉し合わない条件で実験するために、転移の分離がよい炭素数17のPC(C17PC)を用いた。その結果、KCl存在下では、ラメラ周期に対応する小角領域のピーク強度が全体に減少する傾向がみられた。また、ゲル相ではピーク幅が広く、膜の多重度が小さいか周期に大きな乱れがあることが示唆された。このピーク幅は、主転移より高温では狭くなる。小角領域の大きな特徴は、同時測定で行った熱測定では、主転移の低温側に大きな吸熱ピークが見られたにもかかわらず、X線では顕著な変化が見られなかったことである。2相共存状態では、新たにできたドメインに由来するブラッグ反射が観測されないほどラメラ周期が乱れていると考えられる。

さらに、炭化水素鎖のパッキングに関係する広角領域では、KCl存在下のゲル相で2つの鋭いピークが現われた。これは、炭化水素鎖のパッキングの異なる2つのドメインが共存しているか、炭化水素鎖の膜面に対する傾きがない可能性を示唆している。いずれにしてもKClがない条件で現れる鋭いピークとブロードなピークの組み合わせとは異なり、炭化水素鎖のパッキングに変化が起こっていることが明らかになった。これらの結果に基づいて、2相共存状態の構造モデルについて検討する。

S.Kato, H. Nakazawa, H. Kubo, H. Takahashi, S. Matuoka : X-ray diffraction study on the domain structure of C17PC in the presence of salt

1K1115

アラメシチンの膜侵入過程 -脂質の運動性変化の測定から-

○菊川 峰志¹、岸本 憲²、荒磯 恒久¹ (¹北大・先端研、²北大・院・地環研)

アラメシチンは *Trichoderma viride* という菌が産生する抗生ペプチドである。この20個のアミノ酸から成るペプチドは脂質二重膜に取り付き、数分子が会合したチャンネルを形成する。チャンネルを形成している状態に対しては"barrel-staveモデル(樽板構造モデル)"が広く受け入れられている。しかし、チャンネル形成以前にどのような過程を経て膜に侵入するのは多くが調べられておらず、特に膜側に起こる変化に着目した報告は少ない。本研究では、膜側に誘発される変化を脂質の運動性変化として捉え、これによりアラメシチンの膜侵入過程を予想することを試みた。

試料には蛍光プローブ(NBD-PEあるいは β -DPH HPC)を微量含んだSmall Unilamellar Vesicleを用い、蛍光異方性から膜流動性を評価した。NBD-PE、 β -DPH HPCから得られる蛍光異方性は、それぞれ脂質のグリセロール骨格部、脂質鎖部の流動性を主に反映する。また、脂質にはPOPCおよびDOPCを使用した。

NBD-PEの蛍光異方性は、アラメシチン濃度の増加に伴いSigmoid状の上昇を示した。アラメシチンは協同的に膜へ侵入することが知られている。この協同現象がグリセロール骨格部の運動性束縛にも反映していると考えられる。これに対して、 β -DPH HPCの異方性には極小値が現われた。アラメシチン濃度を増加させると、 β -DPH HPCの異方性はまず減少し、その後上昇に転じて初期値を上回るようになる。極小値を与えるアラメシチン濃度は、NBD-PEの異方性の上昇が始まる濃度にはほぼ一致しており、協同的な膜への侵入に先立って脂質鎖部の運動性が高まっていることを示している。極小点を境として、アラメシチンの存在様式が変化していること-膜表面への吸着から膜内への侵入へ-が考えられる。

T.Kikukawa, A.Kishimoto and T.Araiso : Alamethicin insertion into lipid bilayers: As deduced from lipid mobility change