2P157

リボソームの膜突起形成に必要な力測定

○稲葉 岳彦¹、本田 誠¹、滝口 金吾¹、宝谷 紘一¹、石島 秋彦² (¹名大院・理・生命理、²名大院・工・応用物理)

我々はリボソームを直接観察し、膜小胞の形態形成のメカニズムについて調べている。今回、新たにリボソーム膜の変形に必要な力を求める実験系を考案した。

リボソーム内部で細胞骨格を再構成し、膜小胞の形態を連続的に変化させることができる。リボソーム内部の細胞骨格が重合し伸長するにつれ、始めはレモン型に変形した。さらに細胞骨格の伸長が進むとレモン型の両端から突起状の膜管が形成された。このとき、リボソームの突起以外の部分は球形へと復帰変形した。このことは細胞骨格が重合する際、リボソームを変形し突起状の膜管を形成するのに十分な力が発生することを示している。しかし実際に細胞骨格が発生する力がどれくらいかはまだわかっていない。また、いかにして球部と管部に形態分化するかも興味ある問題である。

そこで今回、内部にポリスチレンビーズ ($\phi=1\ \mu\text{m}$) を2個もつリボソームを作製し、それぞれのビーズを別のレーザーツィーザ光でトラップした。レーザー光の位置を徐々に移動させ、リボソームに張力を加え変形させた。このとき細胞骨格の伸長と同様に、リボソームはまずレモン型、続いて突起を持つ形態へと変化した。このリボソームの変形過程をビデオ記録し、パソコンを用いてビーズの重心位置を測定した。ビーズの変位からリボソームに作用している力を求めることができる。この結果からレモン型リボソームから突起が出現するとき最大の張力が必要であり、突起が生じた後はそれ以上の伸長に必要な力はこれより小さいことが解った。このことは膜変形のシミュレーション結果と合致する (梅田ら J.Phys.Soc.Jap.1998)。この系では細胞骨格を用いず膜を変形させるので、溶液条件を変えることができる。また、脂質組成や、ビーズのサイズを変えた実験から、膜の性質についてさらに詳しく調べることができる。

T.Inaba, M.Honda, K.Takiguchi, H.Hotani, A.Ishijima : Force required for membrane protrusion of a liposome

2P159

スフィンゴミエリナーゼ処理によるジャイアントリボソームの形態変化

○谷口 幸範、宮田 英威、大場 哲彦、大木 和夫 (東北大・院理・物理)

[序論] スフィンゴミエリナーゼ (SMase) はスフィンゴミエリン (SM) をセラミドとホスホコリンに分解する酵素である。SM の分子の形はほぼ円筒状であるが、セラミドは親水性部分が疎水性部分よりも小さく、逆コーン型をしている。SM を含むリボソームに SMase を作用させると、SMase を作用させた側の単分子膜においてのみ SM がセラミドに変換され、膜の内外葉に SM とセラミドの非対称分布が生じる。本研究では、このときリボソームの形態にどのような変化が起こるのか、を顕微鏡下でビデオレートで観察した。

[方法] 静置水合法により作成したジャイアントリボソームに、顕微鏡下でリボソームの外側から SMase を吹きかけ作用させた。その際、膜の枚数はあらかじめリボソームに混ざっていた色素の蛍光強度から判別した。また、リボソーム内外でスクロースおよびグルコース濃度に差をつけることにより浸透圧と比重差を調節した。

[結果] POPC:SM (Bovine Brain):BODIPY-SM 75:24:1 の組成比の一枚膜リボソームに SMase を作用させたところ、始めダンベル形をしていたリボソームの形が球形になり、その後破裂するのが観察された。SMase 処理によりリボソームの表面積は減少し、かつ膜が不安定になることがわかる。また、多重膜のリボソームに SMase を作用させると、外側の膜から壊れて剥れていく様子が膜の枚数分だけ観察された。このことから SMase が膜を透過せずに膜の外葉にのみ作用していることが確かめられた。POPC のみで構成されるリボソームではこのような膜の破裂および剥離は見られなかった。本年会では SM の組成比を変えた実験の結果を踏まえ、SM とセラミドの非対称分布が膜の形や性質に及ぼす影響について議論したい。

Y.Taniguchi, H.Miyata, T.Ohba and K.Ohki : Morphological change of giant liposomes caused by sphingomyelinase treatment

2P158

光ピンセットによる細胞サイズリボソームの輸送

○市川 正敏 (京大院・理学部・物理)

リボソームはリン脂質が自己集合した厚さ 5 ~ 6 nm の膜で囲まれた小胞体である。リン脂質は生物細胞膜の基本構成物であることから、リボソームはモデル細胞として盛んに研究されてきた。本研究では 5 ~ 10 μm の細胞サイズのリボソームに、輸送や固定、変形等の操作を非接触的に行なう事を目的として、集光されたレーザー (光ピンセット) を使用する。細く尖らしたガラスなどのピペットを使用して、陰圧により固定し輸送する従来の手法に比べ、光ピンセットは装置が簡便、非接触な操作が可能などの利点がある。しかし、これまでの研究では光から受ける力は微弱で、細胞サイズのリボソームの効果的な操作は難しいとされていた。本発表では、従来有効な力の取り出しが困難であった理由と、内部溶液の屈折率を上げるという簡単な工夫により自在な操作が可能になる事を、実験結果を踏まえて議論する予定である。

図1、レーザートラップによる細胞サイズのリボソームの輸送。リボソーム内部の屈折率が外部溶液と同じ場合(上段)と、内部の方が高い場合(下段)で、比較している。上段は内外とも 100 mM glucose、下段は内部が 100 mM glucose で、外部が等張である 50 mM NaCl である。白矢印は対象物以外のリボソームであり動いていること目印。黒矢印は運動の向き、+はレーザーの焦点。スケールバーは10 μm 。

M. Ichikawa : Optical Transportation of Cell-sized Liposomes

2P160

リボソームの連続的縮小と断片小胞化を分岐させる要因

○野村 典正、平松 波留香、宝谷 紘一、滝口 金吾 (名大・院理・生命理学)

我々は生体膜の持つ潜在的特性を明らかにするために、リボソームの動態を暗視野顕微鏡によってリアルタイム観察している。その結果、界面活性剤によってリボソーム膜から、その構成成分であるリン脂質をゆっくりと除去してゆくと、融合や分裂以外にも連続的縮小や内部小胞の直接放出、表裏反転、膜穿孔など、様々なトポロジ変換が生じることが分かった。

今回、我々はリボソームが球形を維持したまま徐々に縮小してゆく連続的縮小現象と、瞬間的に消滅する破裂現象に着目し、これら2つの変換経路を分岐させる要因の解明を試みた。ここでは、親水基として単糖のグルコシド系か二糖のマルトシド系を持つ非イオン性界面活性剤を用いた。脂肪鎖の長さが異なる活性剤が入手し易いためである。

構成脂質としてホスファチジルコリン (PC、双イオン性) のみから成るリボソームの場合は、両活性剤ともに連続的縮小を起こした。PC とホスファチジルグリセロール (PG、酸性) から成るリボソームでは、グルコシド系の場合は連続的縮小が、マルトシド系では破裂が起こり、界面活性剤の親水基が変換経路を分岐させる要因の1つであることが分かった。また、PC とホスファチジン酸 (PA、酸性) から成るリボソームでは大勢において、上記の PG 含有リボソームと同様の結果を示した。

また、PC と PA から成る場合は一部のリボソームにおいて、次のような新しい変換方式が見られた。リボソーム上に穴が生じ、そこから全体に向かって膜の断片化が起こり、各々生じた断片がすばやく閉じて小胞になる現象である。この現象を断片小胞化と名付けた。さらにこの現象は用いた界面活性剤の脂肪鎖の長さにも依存した。グルコシド系では脂肪鎖の炭素数が9より長い場合に、マルトシド系では8より短い場合に断片小胞化が見られた。

Y.Nomura, H.Hiramatsu, H.Hotani, K.Takiguchi : Branching factors in liposomal transformation pathway.