2P161

リポソームの周期的揺動の理論的解析

○梅田 民樹¹、野村 典正²、稲葉 岳彦²、滝口 金吾²、宝谷 紘一² (¹神戸商船大、²名大・理・生命理学)

一般に中性脂質から成るリポソーム(脂質二重層膜小胞)に非イオン性界面活性剤を加えると、膜が周期的に揺動を起こしながら収縮する現象が観察される(1)。この現象を解析するため、暗視野顕微鏡像のコンピュータによる画像解析を行った。その結果、リポソームの周期的収縮過程は、1/10 秒程度の時間でおこる急激な体積減少に伴う揺動増大の過程と、その後の約2秒間におこる揺動の緩やかな減衰過程の2つからなることが分かった。前者では、膜に穴が開きリポソーム内の水が流出することによる体積減少と過剰面積分の膜の熱的揺動が発生し、一方後者では穴が塞がり、体積一定の状態では界面活性剤による膜からの脂質分子の除去に起因する面積減少が起こっているものと考えられる。そこで、前者の過程がどうして起こるかを理論的に説明するため、統計力学及び弾性体理論を用いて膜の熱揺動とリポソームの体積との関係を調べた。その結果、膜に穴が開いていると熱揺動により、膜が揺動していない状態に比べてリポソームの体積が

$$\alpha = \frac{3}{8\pi} \frac{kT}{\kappa} \left(\ln \frac{r_0}{a} - 0.67278 \right)$$

の割合だけ減少することが導かれた。ただし、 k はボルツマン定数、 T は温度、 κ は膜の曲げ剛性、 r_0 はリポソームの半径、 a は脂質分子の大きさである。これらに典型的な値を代入すると体積減少率として $\alpha = 0.03$ が得られ、ほぼ実験結果と合致している。このことから、リポソームからの水の流出は膜の熱揺動によって生じる力により起こっていると考えられる。

(1) F. Nomura et al., *PNAS USA*, 98(5), 2340-2345 (2001).

T.Umeda, F.Nomura, T.Inaba, K.Takiguchi and H.Hotani : Theoretical analysis of cyclic fluctuation of a liposome

2P163

インフルエンザウイルス膜融合の最小ユニット：必要なヘマグルチニン分子数について II

今井 正樹²、水野 敬文²、関 尚子^{2,3}、○川崎 一則² (¹感染症研・ウイルス第一部、²産総研・分子細胞、³NEDO)

インフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA)が膜融合を引き起こす際に必要なHAの分子数を明らかにするために、2系統のHA再構成実験を行った。第1の実験では、再構成リポソームのタンパク質/脂質比を一定にして、膜融合活性型HAと非活性型HAの比を変化させた。こうすると、リポソーム膜上におけるHAのレセプター結合部位の濃度を変えずに膜融合活性部位の濃度を変化させることができる。第2の実験では、膜融合活性型HAのみを用いてタンパク質/脂質比を変化させた。この場合は、膜上のレセプター結合部位の濃度と膜融合活性部位の濃度を等しく保ったまま、タンパク質濃度を変化させられる。ウイルスは、A/PR/8/34(H1N1)株をMDCK細胞で培養し、膜融合非活性型のHAを持つウイルス粒子を回収した。HAの膜融合活性化が必要な場合はトリプシン処理を行った。HAは、界面活性剤による可溶化とシロ糖密度勾配遠心で精製し、界面活性剤透析法によりフォスファチジルコリン、コレステロールおよび蛍光性脂質ブロープ、オクタデシルローダミンBを含む脂質膜に再構成した。再構成リポソームが赤血球ゴースト膜との間に引き起こす融合をレーザー स्क্যান顕微鏡によって単一粒子レベルで測定し、膜融合の速度論的解析を行った。第1の再構成実験では、融合速度の活性型HA濃度への依存性は双曲線型の飽和曲線となり、Hillプロットの傾きは約1.0であった。この結果は、膜融合活性部位に関する限り、単一のHA分子があれば膜融合に十分であることを示している。一方、第2の再構成実験では、融合速度のHA濃度への依存性はS字型曲線で、Hillプロットの傾きは約2.6であった。この結果は、膜融合にはHAとレセプター分子の結合も何らかの影響を及ぼしていることを示す。その機構として考えられるモデルについて議論する。

M. Imai, T. Mizuno, T. Seki and K. Kawasaki : Minimum number of influenza hemagglutinin trimers to induce membrane fusion II

2P162

ベシクルの形態変化の分子シミュレーション

○野口 博司(分子研)

脂質分子のベシクル(2分子膜でできた小胞)への自己集合過程、ベシクル間の融合過程などをブラウン運動・シミュレーションを用いて研究した。脂質分子を剛直な棒状分子と近似し、溶媒分子は明に与えず、疎水基間に引力相互作用を与えた[1]。脂質分子は自発的に液晶相のベシクルを形成する。ベシクルは融合する時、まず、ベシクルの外膜が茎状につながった準安定な状態(stalk 中間体)になる(図1)。その後、高温では楕円状になったstalkが曲がって穴があくというこれまで考えられていなかった経路を経て融合する。それに対して低温では修正 stalk 模型の予測と一致する経路を経る。また、脂質の親水基と引力相互作用する粒子を加え、それによるベシクルの形態変化も調べた。

図1 stalk 中間体のスナップショット

(左) 正面から見た断面 (右) 横から見た連結部の断面

[1] H. Noguchi and M. Takasu, *Phys. Rev. E*, in press.

H. Noguchi : Molecular simulation of the morphological change of vesicles

2P164

Single virion imaging によるインフルエンザウイルス-糖鎖相互作用の解析

○川野 光子、川崎 一則、米田 敦子、浅田 真弘、今村 亨、宮本 宏(産総研)

蛍光顕微鏡を用いて個々のインフルエンザウイルス粒子の動きを追うことにより、ウイルスのエンベロープ蛋白質であるヘマグルチニン(HA)とレセプター糖鎖との分子間相互作用を解析することを目指した。インフルエンザウイルスA/PR/8/34(H1N1)は蛍光色素 octadecyl rhodamin B (R18) でラベルした。モデルレセプターとしては、糖鎖末端にシアル酸を持つ糖蛋白質 fetuin をガラス表面に吸着させたものを用いた。ウイルスがレセプター面に結合する様子を、焦点深度の浅い落射蛍光顕微鏡観察下、超高感度ビデオカメラによって毎秒1フレームで1000分間撮影し、レーザーディスクに記録した。この画像を分析してウイルスとレセプターとの相互作用を詳細に解析した。その結果、ウイルス粒子にはレセプターへ結合後、結合したままのものと、様々な滞在時間で離脱するものの両方が観察された。対照としてシアル酸含有量が0.5%未満である asialofetuin を用いた場合には、結合するウイルスの数は少なかった。これらの結合は遊離のシアル酸含有糖鎖存在下で濃度依存的に強く阻害されたことから、ウイルスとシアル酸の特異的結合であると考えられる。さらに、ノイラミダーゼの阻害剤である zanamivir 存在下でレセプターからの離脱が減少したことから、ウイルスのレセプターからの離脱の一部には、ウイルス表面のノイラミダーゼが関与することが示唆された。ウイルスの滞在時間対個数をプロットして得られるレセプターからの解離曲線は指数関数で近似され、ウイルスの結合状態は3つのコンポーネントが関係することが示唆された。対照として用いた asialofetuin では、速いコンポーネントの割合が増加した。これらの観察結果の生物学的意義について議論する。

M.Kawano, K.Kawasaki, A.Yoneda, M.Asada, T.Imamura and H.Miyamoto : Analysis of influenza virus-sugar chain interaction by single virion imaging.