1G1000

リン脂質二分子膜のゲル-液晶主相転移に及ぼすガス圧力の影響

○松本 知浩、田村 勝弘、鈴木 良尚（徳島大・工）

リン脂質二分子膜の相転移温度に対する圧力効果に関する研究は、様々な脂質について多くなされている。これらの研究はいずれも圧力媒体として液体を用いた密閉系で行われており、圧力媒体が直接リポソーム懸濁液と接することはない。本研究では、ガス麻酔薬を含む種々の気体で直接リポソーム懸濁液を加圧し、気体を強制的に懸濁液中に溶解させて、これらの溶存気体が相転移温度に及ぼす影響を調べた。ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) とジバルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) のリポソームについて、主相転移温度を高圧示差走査熱量計 (CSC 社製 DSC-4100) を用いて決定した。ガスボンベに連結した手動式スクリュウポンプで気体を圧縮し、高圧アンブル内のリポソーム懸濁液を加圧する方法を用いた。使用した気体は、 N_2 、 H_2 、 N_2O 、 O_2 、He、Ar およびこれらの気体の混合物で、常圧から 20 MPa の圧力範囲で実験を行った。

液圧で加圧した DPPC 二分子膜の主相転移温度は数千気圧まで直線的に上昇する ($dT_m/dP = 0.22 \text{ }^\circ\text{C}/\text{MPa}$)。これに対し、ガス圧で直接試料を加圧する方法をとると、いずれも溶存気体分子の影響が大きく現れた。例えば、窒素で加圧すると、主相転移温度は直線的に上昇するものの、液圧と比べ傾きは減少した ($dT_m/dP = 0.12 \text{ }^\circ\text{C}/\text{MPa}$)。一方、酸素では圧力効果が逆転しており、加圧に伴い主相転移温度は減少した ($dT_m/dP = -0.10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{MPa}$)。

これらの結果から、相転移温度は気体の溶解度と溶存気体分子の性質の影響を強く受けると予想される。また、水相に溶解した気体は二分子膜にも分配され、相転移現象に影響を与える。気体分子の水および膜相への溶解度を考慮しながらガス圧力による相転移温度挙動を考察する。

T.Matsumoto, K.Tamura and Y.Suzuki : Effect of gas pressure on the main phase transition of phospholipid bilayer membrane

1G1030

脂質膜の曲率およびパッキングストレスがアシル鎖の運動性に及ぼす影響

○杉田 篤彦、加茂 倫有、中野 実、半田 哲郎（京大院薬）

キュービック相などの非ラメラ相は膜融合、膜輸送、蛋白質の活性制御といった、生体にとって重要な役割を果たしていると考えられている。従って、非ラメラ相中の脂質の物理化学的性質を調べることは重要であるが、これまで、その物性研究はほとんど進展していなかった。これは非ラメラ相が水中へ安定に分散できず、濁度の影響を受ける蛍光などの測定が困難であったためである。我々は室温付近でキュービック相を形成するモノオレイン (MO) と非イオン性の両親媒性高分子プルロニック F127 を用いてキュービック相を分散、微粒化したキュボソームの調製に成功している。これによって非ラメラ相の蛍光法による評価が初めて可能となった。本研究ではラメラ相およびキュービック相のモデル粒子として、リポソーム、キュボソームを各々用い、粒子中でのジフェニルヘキサトリエン誘導体の時間分割蛍光異方性の測定から、パッキングストレスと膜の曲率がアシル鎖の運動性に与える影響を評価した。まず POPC と MO を様々な割合で混合した粒子を調製し、MO が 60 mol% 以下ではリポソーム、70 mol% 以上ではキュボソームであることを ^{31}P NMR、SAXS によって確認した。MO の割合を増加させると、揺動角が 60 mol% までは減少し 70 mol% 以上では増加した。ラメラ相では MO 組成の増加と共に脂質の平均自発曲率は、負の方向へ変化するにもかかわらず膜の曲率は変化しないために、アシル鎖部分にパッキングストレスを生じる。従ってアシル鎖部分の運動性が制限されるために揺動角が減少したと思われる。キュービック相では MO の増加と共に格子定数が減少することから曲率がより負へ変化し、アシル鎖の占有断面積が増加するためにアシル鎖の運動性が大きくなり、揺動角が増加したと考えられる。

A. Sugita, T. Kamo, M. Nakano and T. Handa : The effect of membrane curvature and packing stress on mobility of lipid acyl chains

1G1015

低イオン強度下における DMPG の相転移挙動

○田村 崇、木下 祥尚、加藤 知（関学大・理工・物理）

酸性リン脂質ジミリスチルホスファチジルグリセロール (DMPG) は 2mM NaCl (pH7.4) 存在下で主転移が $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 付近の 1 つのシャープなピークと $20 \text{ }^\circ\text{C} \sim 30 \text{ }^\circ\text{C}$ に広がる複数のブロードなピークに分かれることが知られている。この主転移の分離は DMPG に特異的であり、イオン強度や DMPG の濃度に依存する。また、ブロードなピークが現れる領域ではゲル相と液晶相が共存し、スポンジ相と呼ばれる 3 次元的な構造が現れることが報告されているが、これら複数の転移ピークがそれぞれどのような構造変化に対応しているのか詳細はわかっていない。われわれは Na^+ 存在下での DMPG の主転移における詳細な構造変化を調べるため、凍結割断電子顕微鏡観察および X 線回折実験を行った。電子顕微鏡観察により、2mM NaCl 存在下のリップル相ではリップル構造の畝が小さな領域に分かれて存在しているような像が得られ、主転移温度以下でも単純なベシクル構造でないことが示唆された。さらに、ブロードなピークが現れる領域でどのような構造変化が起こっているのかを細かく温度を変えて観察した。X 線回折では反射光強度をかせぐために脂質濃度を 30wt% としたが、この条件下では 4.8nm と 6.0 nm にピークが現れたことから、単層膜 (ULV) だけでなく多重層膜 (MLV) が共存していると思われる。また、多重層膜の層周期の高次のピークを観察したところ、 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 付近でスペーシングが変化した。DSC よりこの系では一回目の昇温過程ではきれいなピークが現れず、2 回目以降は鋭いピークとその高温側にブロードなピークが現れる。多重層膜の層周期の変化は鋭い熱異常ピークより高温側で起こっており、ULV と MLV は異なる相転移挙動を示すことが示唆された。詳しくは年会にて報告する。

T.Tamura, M.Kinoshita and S.Kato : Phase behavior of DMPG at low ionic strength

1G1045

固体 NMR によるグルカゴン-脂質二重膜の形態変化の解析

○菊池 章恵¹、辻 暁¹、斎藤 肇¹、内藤 晶^{1,2} (¹ 姫工大院・理、² 横国大院・工)

グルカゴンは 29 残基からなるペプチドホルモンであり、主に肝臓でのグリコーゲン代謝に関与し、血糖値を上昇させる作用を持つ。本研究では、生体膜モデルとして DMPC 二重膜を用いて、グルカゴンが DMPC 二重膜の形態に及ぼす影響と、膜結合状態でのペプチドの高次構造解析を固体 NMR を用いて行った。

DMPC とグルカゴンを水和して小胞を調整した後、上清を分離して、上清中のグルカゴン濃度を測定した結果、上清中にグルカゴンが存在していなかったことからグルカゴンは膜と強く結合していることが分かった。さらにグルカゴン:脂質のモル比を 1:10、1:20、1:30、1:50、1:100 に調整した試料で ^{31}P NMR 測定を行った。この結果、グルカゴン濃度が低い (1:50、1:100) 場合、DMPC 膜の相転移点 ($T_m = 24 \text{ }^\circ\text{C}$) 以上では脂質二重膜を形成するが、 T_m 以下で等方的な運動の成分が現れたことから、膜分断が起こっていることが示された。一方、ペプチド濃度が高い (1:30、1:20、1:10) の場合、 T_m 以上、以下に関わらず膜分断は起こらず、二重膜のリン酸基部分の動きが束縛されたスペクトルが得られた。Erand らは T_m 以下ではグルカゴンと脂質の相互作用により、円盤状ミセルが形成され、 T_m 以上ではグルカゴンと脂質との相互作用が消失すると報告している¹⁾。しかし本研究の結果は、グルカゴン濃度は T_m 以下及び以上のどちらの場合にも膜と強い相互作用を示している。また、 $[1 - ^{13}\text{C}] \text{Gly4}$ -グルカゴンを DMPC に再構成した試料 (1:10) において、 ^{13}C NMR 測定で得られた化学シフト値から、グルカゴンの Gly4 近傍は α ヘリックス構造をとっていることが示されたことから、この濃度においてグルカゴンは α ヘリックスを形成し脂質二重膜の表面部位と強く相互作用していると考えられる。

1) Richard M.Erand et al. ,Biochim.Biophys.Acta,514, 185-197(1978)

A.Kikuchi,S.Tuzi,H.Saito,A.Naito : Property of lipid bilayer binding to glucagon by solid-state-NMR