B581

ガングリオシド／コレステロール／リン脂質混合系の構造とダイナミクス

○平井 光博、早川 智広、小泉 将治 (群大・工)

細胞表面にスフィンゴ糖脂質 (GSL)、コレステロール、情報伝達に関わる様々な蛋白質が会合してミクロドメイン (或いはラフトと呼ばれる) を形成し、このドメインが情報伝達の受容と発信の機能的構造ユニットとして働いていると現在考えられており、GSL ミクロドメインの物性は情報伝達蛋白質の機能発現に重大な影響を及ぼすものと予測される。ガングリオシドは GSL の主要な成分であるが、その分子認識、細胞接着、神経細胞増殖調節などにおける重要性が明らかにされているにも関わらず、物性に関する知見は極めて乏しい状態にあった。そこで、我々はガングリオシドミセル系、ガングリオシド／コレステロール混合系、ガングリオシド／リン脂質混合系の構造物性に関して研究を行い、ガングリオシド分子の水和・電荷状態の大きな変化、ガングリオシド分子の非対称分布により現われる膜曲率の変化、ガングリオシド分子のセラミド領域にスパーサーとして位置して糖鎖間相互作用を変化させるコレステロールの存在など、生体膜上の GSL ミクロドメインの機能構造ユニットとしての特徴の一端を明らかにしてきた。このようなガングリオシド及びそれを含む脂質混合系の構造物性の特徴は、水素結合受容体として働くグリセロ脂質と比べ水素結合供与体・受容体にもなりうるスフィンゴ脂質としての特性や、糖鎖間相互作用、シアル酸の存在などのガングリオシドの分子構造そのものに起因すると考えられる。現在、より生体膜に近いガングリオシド／コレステロール／リン脂質混合系や、ラット小脳および神経培養細胞から抽出した ラフト画分の構造物性に関して研究を展開中である。放射光 X 線散乱、中性子逆コントラスト変化法、中性子スピンエコー法によって得られたガングリオシド／コレステロール／リン脂質混合系の構造とダイナミクスに関する研究結果の一端を報告する。

M. Hirai, T. Hayakawa and M. Koizumi : Structure and dynamics of ganglioside/cholesterol/phospholipid mixture

B583

化学的・立体的に純粋なスフィンゴミエリンと DMPC から構成される脂質膜の熱的挙動にコレステロールは如何に影響を与えるか

○芝上 基成¹、園山 正史²、後藤 理恵¹、森 美千子¹、鈴木 孫一¹、美宅 成樹^{2,3} (1 産総研、² 東京農工大・工、³ 現名大・院工)

脂質マイクロドメインが生体内での様々な生命活動において重要な役割を果たしていることが、数多くの研究から示唆されている。このマイクロドメインは少なくともスフィンゴミエリン (SM) をはじめとするスフィンゴ脂質とコレステロールから構成されることが予測されている。しかし分子レベルでのコレステロールの役割については未解明である。コレステロールは SM に対してアフィニティーを持つのであろうか？もしそうであれば、如何にして相互作用しているのであろうか？そのようなアフィニティーの存在の有無について解明を試みた研究は、これまで数多く行われてきた。多くの実験結果はそれは存在するものと結論付けている。しかしこれらの研究では天然由来の SM を実験系に用いていた。天然由来の SM は構造的に異なる SM の混合物であることは良く知られているが、この事実は分子レベルでのディスカッションを行うのにはやや曖昧さが残ることを示唆している。一方、これまでに最も精密に行われた実験では、そのようなアフィニティーは観測されなかったと報告しているが、この系では化学的に純粋ではあるが立体的には純粋ではない SM を用いていた。

このような背景から、我々は化学的・立体的に純粋な SM を合成し、これと DMPC から構成されるモデル膜について高感度熱量計を用いて SM とコレステロール間のアフィニティーの有無について検討を行った。このモデル膜は、例えばアルキル鎖間のミスマッチや立体異性体の混入に由来する様々な構造的なファクターを排除するようにデザインしたものである。種々のモル比で構成されるモデル膜の熱測定の結果を比較・検討したところ、(1) SM-コレステロール間のアフィニティーは存在し、(2) そのドライビングフォースは、van der Waals 相互作用に加えて SM とコレステロール間の水素結合であろうと推測された。

M. Shibakmai, M. Sonoyama, R. Goto, M. Mori, M. Suzuki, and S. Mitaku : Effect of cholesterol on thermotropic behavior of membranes that contain chemically and stereochemically pure sphingomyelin and DMPC

B582

天然 *N*-acyl sphingomyelin 及び *N*-(C24:0)-sphingomyelin -水系における層間水の挙動 - D₂O-NMR による評価 -

○敏先 隆幸、青木 宏之、川崎 佑子、窪木 厚人、大平 進、林 謙一郎、野崎 浩、児玉 美智子 (岡山理大・理・生物化学)

【目的】我々はこれまで *N*-(16:0)-sphingomyelin および天然の *N*-acylsphingomyelin の 2 種のスフィンゴミエリン-水系の示差走査熱量測定から、脂肪酸鎖長が同一、あるいは不均一かによってリン脂質 1 分子当りの凍結層間最大水分子数が大きく異なり、*N*-(16:0)-SM -水系で 7.5 分子、*N*-acylSM -水系ではその 1.6 倍の 12 分子であることを明らかにした。この多量の凍結層間水取り込みは、鎖長が異なることによる膜表面に凹凸構造もしくはウオーターポケット構造の形成が予想される。本研究では、より鎖長の長い *N*-(C24:0)-SM -水系試料の D₂O-NMR による縦緩和時間 (T_1) 測定および温度変化に伴うスペクトル測定を行い、層間に存在する水分子とスフィンゴミエリン親水頭部間の相互作用を評価した。【実験および結果】*N*-(C24:0)-sphingomyelin の合成は、Sigma 社製の牛脳由来 *N*-acylSM を用いて半合成した。試料の同定は、正イオンエレクトロスプレーイオン化-質量分析によって行った。半合成された試料および *N*-acylSM はそれぞれ NMR 用 tube に分取し、高真空圧下 (10^{-4} Pa・3 日間) で脱水した後に、乾燥 N₂ 気流中で密閉し、マイクロ天秤によって重量決定した。この試料に目的水分率の D₂O を加え、NMR 試料を作成した。*N*-(C24:0)-SM および *N*-acylSM -水系試料の -60~-70 °C までの温度変化に伴うスペクトル観測を行った。*N*-acylSM 試料では、凍結層間水の氷融解に伴い、-45 °C 付近からブロードなスペクトルは観測されるが、明瞭な分裂スペクトルは観測されなかった。*N*-(C24:0)-SM 試料に関しては現在検討中である。

T. Kuwasaki, H. Aoki, Y. Kawasaki, A. Kuboki, S. Ohira, K. Hayashi, H. Nozaki and M. Kodama : The Behavior of Interlamellar Water for Natural *N*-acyl- and Semi Synthetic *N*-(C24:0)-sphingomyelin Bilayer Systems as Studied by D₂O-NMR

B584

スフィンゴミエリナーゼ処理に伴う、CHO 細胞の脂質膜流動性変化の画像化解析

○武藤 賢志、大木 和夫 (東北大院 理学 物理)

脂質膜に酵素処理をすると、脂質分子の分解が起き、膜の物性、形態、トポロジー等に変化が生じる事が考えられる。その変化のダイナミクスについて、リボソームや細胞を用いて多くの議論がなされているが、殊に構造の複雑な細胞膜については、その詳細について殆ど明らかになっていない。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 は近年専ら注目を集める raft の主要構成脂質として考えられており、また SMase を細胞に処理すると、ATP を枯渇させた状態においても、膜小胞を細胞内に生じるといった報告 (Zha etc J.Cell.Biol(1998)) 等もされている。そこで我々は、SMase 処理による膜構造の変化のダイナミクスについて興味をもち、今回はその詳細を探るべく、膜の構成、変化をよく反映する膜流動性の面からこの事について考察してみた。膜流動性を画像化するために、環境感受性色素 Laurdan を膜中に与え、その発光特性から定義される、Generalized Polarization(G.P.)=(I440+I490)/(I440-I490) 値を計算した。Laurdan は、周囲の状態が液晶相で 440nm、固相で 490nm に発光ピークを持ち、二波長の比をとる事でその間の流動状態を表すことができる。また、顕微鏡下で得られる蛍光像には、非焦点面からの情報が含まれてしまう問題に対して、Washington University の J.A. Conchello らによる、非焦点面の情報を除去する画像処理ソフト XCOSM を用い、焦点面の情報がより鮮明な像を取得した。前回は、リン脂質分解酵素 Phospholipase C を細胞に処理する事で、細胞全体における G.P. 値の上昇を確認したが、特定領域、器官での変化を探る事は困難であった。今回は、空間分解能をあげる事に成功したので、形質膜領域での流動性変化等、特定領域に着目し、そこから膜構造の変化について検討する予定である。

K.Muto,K.Ohki : Imaging analysis of plasmamembrane fluidity of CHO cells during sphingomyelinase treatment