B589

分子レベルでの皮膚角質層の保湿機構の研究

太田 昇¹、坂 貞徳²、田中 浩²、中田 悟²、○八田 一郎³
¹SPRING-8/JASRI、²日本メナード化粧品(株)・総合研究所、³福井工大・工)

表皮では角化細胞が重なり合って層状構造を形成する。この最外層の角質層では角質細胞を十数層の細胞間脂質が包む。このような構造が生体内の分子の障壁、あるいは水分を角質層内に保持し生体を守る。我々はこの細胞間脂質のラメラ構造に着目している。

以前の年会では細胞間脂質の膨潤効果を報告した。小角X線回折実験の結果、細胞間脂質には13.6 nmと約6 nmの2つのラメラ構造が存在し、角質層中の水分量が0 wt%から80 wt%で13.6 nmの長周期ラメラ構造の周期は不変であるのに対し、約6 nmの短周期ラメラ構造は水分量を12 wt%から50 wt%に増やすと5.8 nmから6.6 nmに膨潤することを明らかにした。

今回、結果を詳細に解析し2つのラメラ構造の関係から角質細胞と細胞間脂質の関係を踏まえ細胞間脂質モデルを提案する。水分量20-30 wt%で長周期ラメラ構造の回折ピークが鋭くなり、短周期ラメラ構造の回折ピークも同様に鋭くなる。12 wt%以下では、短周期ラメラ構造は見られない。50 wt%以上では、短周期ラメラ構造の回折ピークが弱くなり、長周期ラメラ構造の回折ピークに重なった。このように20-30 wt%のとき2つのラメラ構造が同時に安定化する結果に基づいて角質層中の水分調節機構を考察する。

Figure. Full width at half maximum of small angle X-ray diffraction peaks for the long (○) and the short (●) lamellar structures.

N.Ohta, S.Ban, H.Tanaka, S.Nakata and I.Hatta : Study on hydration mechanism in stratum corneum at molecular level

B590

原子間力顕微鏡による高湿度下での脂質膜の観察

○八尾 晴彦、春山 大輔、江間 健司 (東工大院・理工・物性物理)

原子間力顕微鏡を用いて大気中で脂質膜を観察する場合、水相が十分でなく、生理条件とは異なった条件で観察が行われる。一方、水中で観察する場合、ノンコンタクトモードではQ値が小さくなるので高分解能で観察できず、コンタクトモードでは脂質膜は壊れてしまう。ところで、大気中でも相対湿度を100%にすれば水中と同じく十分に水和した相になることが報告されている[1]。そこで、我々は十分に水和した脂質膜を高分解能で観察するため、大気中、高湿度条件下での脂質膜のAFM観察を試みた。

観察対象として、リン脂質DMPCのリップル(P_β)相を選んだ。リップル相は水和に敏感な相で、相対湿度が90%以上でないと存在できない。リップル相については、フリーズ・フラクチャー法によるレプリカ膜のTEM、STM観察やX線構造解析によって、その周期が12~14 nmで、左右非対称な形であることなどがわかっている。

試料は超音波処理して作製したSUV分散液に雲母基板を入れ、転移点より高い温度に保つことで平面膜を作製した。観察前に試料は相対湿度100%に1、2時間保ち、リップル相を形成させた。観察はノンコンタクト(タッピング)モードで行った。観察中は相対湿度を100%近くに保った。

観察の結果、リップル相の周期は13.7 nm、振幅は0.97 nmであった。また左右非対称なリップルの長辺と短辺の比は1.4であった。報告されている振幅の値は1.1~1.5 nm、またリップルの長辺と短辺の比は、1.1~3.0であり、良く一致した。発表ではDMPC-コレステロール混合系のリップル相の観察結果も示す予定である。

[1] J. Katsaras, Biophys.J. 73(1997)2924.

H. Yao, D. Haruyama and K. Ema : Atomic force microscopic observation of lipid membranes at high humidity

B591

蛍光性プローブによる生体膜表面の溶媒状態検出法の開発

○児玉 高志、大谷 弘之、荒川 秀雄、猪飼 篤 (東工大院・生命理工)

生体膜表面近傍数nmの溶媒状態は、膜タンパク質のはたらきによりバルクとは異なる性質を示している。一般的に水溶液中のpH、イオン濃度等の情報は様々な感受性色素を使いその蛍光測定をすることで調べることが可能だが、光の回折限界により通常の光学顕微鏡を用いて表面近傍の情報を検出することは困難であった。そこで本研究では液中測定用原子間力顕微鏡(AFM)と共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)の複合測定装置(CLSM/AFM)を開発し、AFMプローブに感受性色素を導入しその接触領域の蛍光を検出することで表面の溶媒状態を定量的に検出する手法を考案した。今回はカンチレバーに半径5 μmのポリスチレン製ビーズをつつ固定し、その表面にフルオレセインを化学結合で固定して蛍光性プローブとした。そしてカバーガラス表面をシランカップリング法により疎水性(-CF₃)、親水性(-NH₂)に修飾した2種類のガラスを試料として用い、それぞれのガラス表面にpH感受性色素として知られるフルオレセインを導入したプローブを接触させた場合、離れた場合にその蛍光強度がどのように変化するかを比較した。pH9.5(100mM炭酸ナトリウム緩衝液)水溶液中で実験した結果、-CF₃表面にフルオレセインを接触させた場合に蛍光強度が減少すること、-NH₂表面の場合にはほとんど変化しないことがわかった。これは疎水性である-CF₃表面にプローブを接触させた際に色素周囲の溶媒がなくなり、接触領域のフルオレセインは疎水環境においてH⁺結合型をとり蛍光量子収率が減少した結果であると考えられる。この結果、本測定手法を用いて試料表面の溶媒状態を検出することが可能であることがわかった。この測定は様々な感受性色素を用いることで多様な生体膜に応用可能である。

T. Kodama, H. Ohtani, H. Arakawa and A. Ikai : Development of fluorescent probe method for the measurement of solvent property on the membrane surface

B592

A new model for the red cell membrane elasticity: A variable length spectrin model

○Ritchie Kenneth^{1,2}、楠見 明弘^{1,2} (¹名大院・理・生命、²ERATO・JST)

The red cell membrane is an amazingly soft and resilient material consisting of a fluid lipid bilayer with a spectrin-based sub-surface network skeleton. Previous models (Evans, Biophys J, 13:926 (1973)) propose that the elastic properties of the membrane are due entirely to the entropy of the soft spectrin polymers of the membrane skeleton. Recently, we have found through single molecule stretching experiments (Tomishige, et al., Biophys J, 80:340a (2001)) that there exist a finite number of reversible, force-labile interactions that restrict the length of the spectrin tetramer prior to full extension. Thus, we propose a new model for the elasticity of the red cell membrane that includes these transitions. This model, though still entropy-based, gives the network the ability to modify the elastic properties of its elements (the nominal spring constant of a polymer is kT/bL , where kT is the thermal energy, b is the repeat segment size and L is the contour length) to soften the entire network (the area compressibility and shear modulus for an isotropic network of spring is directly proportional to the spring constant of the individual springs). This model solves the apparent contradiction in the entropy-only model with the experimental observation of the reduction of the membrane shear modulus with increasing temperature over the range of 5 - 45 deg C (Waugh and Evans, Biophys J, 26:115 (1979)).

Ken Ritchie and Akihiro Kusumi : A new model for the red cell membrane elasticity: A variable length spectrin model