1P229

局所麻酔薬と生体モデル膜との相互作用（2） —コレストロールの影響—

松岡 和彦¹、谷岡 康弘¹、○秦 隆志¹、佐竹 弘²、松木 均³、
金品 昌志³（¹ 高知高専・物質、² 徳大・地共、³ 徳大・工・生物）

代表的な膜作用薬物である局所麻酔薬の作用機構解明のために生体モデル膜への麻酔薬の分配量調査等を通して、生体モデル膜と麻酔薬分子との相互作用の研究がおこなわれている。しかしながら、現在、それらの研究は主として極性脂質のみで構成される生体モデル膜についておこなわれており、生体膜を構成する極性脂質以外、つまり非極性脂質であるコレストロールの影響に対する研究は少ない。そこで本研究では、麻酔薬選択性電極法を用いて、単一のリン脂質から成る生体モデル膜への分配係数に対するコレストロールの影響を調査した。

生体モデル膜にはジミリスチルホスファチジルコリン（DMPC）を、局所麻酔薬にはジブカイン（DC）塩酸塩を用いた。DMPC・コレストロール混合膜は、コレストロールのモル分率が0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 および0.50 となるように加え、パンガム法により調整した。

コレストロールが含有されていないDMPC二分子膜では、分配係数はラメラゲル相<リップルゲル相<液晶相の順に増加した。DMPC・コレストロール膜においてはコレストロールモル分率の増加に伴ってラメラゲル相への分配係数が増加し、ゲル相間での分配係数の差は消失し一定の値を示した。一方、液晶相においては、分配係数は著しく減少した。さらに、コレストロールモル分率0.10 以上では、ゲル-液晶相間での分配係数の差も消失し、全ての測定温度ではほぼ一定の値をとりながらコレストロールのモル分率に従い減少を示した。これらの現象は、コレストロールの脂質膜に与える二様効果、つまり、ゲル相では膜の流動性を高め、液晶相においては流動性を下げる効果によるものと考えられる。生体膜において、コレストロールは麻酔薬の分配に対して制御能を有することが示唆された。

K.Matsuoka, Y.Tanioka, T.Hata, H.Satake, H.Matsuki and S.Kaneshina : Interactions of Local Anesthetics with Model Biomembrane (2) - Effect of cholesterol -

1P231

メリチンの脂質二成分系に及ぼす影響の示差走査熱量測定による研究

○兒玉 篤治、大木 和夫、大場 哲彦（東北大・院理・物理）

[始めに] 生体膜では、膜蛋白質と脂質とが相互作用することで機能を発揮する。膜蛋白質と脂質の相互作用の解明には膜蛋白質のモデルとして、生理活性ペプチドであるメリチンが広く使われている。メリチンは、種々の脂肪酸側鎖長を持つホスファチジルコリンとの系では疎水性領域の整合性からDMPCとの親和性が高いことが知られている。脂質によりその親和性に差があることからメリチンにより脂質多成分系の分布状態に変化が起きることが期待できる。そこで本実験では、脂質二成分系の脂質の分布状態がメリチンによりどのように変化するかを、示差走査熱量測定を通して調べた。

[実験] 脂質には、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンのそれぞれ疎水性部分の脂肪酸側鎖の長さが異なるものを幾つか用いた。実験ではこれら脂質の内、二種類をモル比1:1で混合しバッファ(HEPES 50mM, EDTA 5mM, PH 7.3)を加えて脂質の二成分系を作った。そして各系について異なる量のメリチンを加えて測定を行った。測定には断熱型高感度微小示差走査熱量計(プリバーロフ型DASM-4)を用いた。

[結果] 共通の結果として転移エンタルピーの減少、転移ピーク幅の増大、転移ピークの低温側へのシフトなどが見られた。また個々の系を少し詳しく見てみると、DMPCとDSPCの二成分系では、メリチンを加えるとDSPC由来のピークはほとんど影響を受けずDMPC由来のピークが大きく減少した。また、DMPCとDMPEの二成分系ではこの二つの脂質が比較よく混合していることによると考えられる一つのピークのみ見られていたが、メリチンを加えるとDMPEに由来すると考えられるピークのみが見られるようになった。これらの場合、メリチンが相分離を促進したと考えられる。詳しくは発表で述べる。

A.Kodama, K.Ohki, T.Ohba : DSC study of effects of melittin on lipid binary mixtures

1P230

アネキシン5で流動性を減少させた人工脂質膜中の1分子観測

○市川 壮彦¹、井出 徹²、柳田 敏雄³（¹ 阪大院・基礎工、² 科学技術振興機構・戦略創造、³ 阪大院・生命機能）

我々はイオンチャネルタンパク質の機能と構造変化の相関を調べるために1分子チャネルのイメージングと機能の同時測定系を構築しようとしている。これまで我々は人工脂質平面膜に全反射顕微鏡を組み合わせた装置を用いてBKチャネルの1分子イメージング、機能の同時測定に成功している[1,2]。ところが、人工膜中のチャネル分子は自身の熱運動により顕微鏡の視野外に逸脱してしまうためこれまで長時間の観察は困難であった。リガンドとの結合と機能の関係を測定するためには脂質膜中にチャネル分子を固定する必要があるが、今回我々はアネキシン5を用いて人工脂質二重膜中のチャネル分子の流動性を減少させ、それを実際に観察することに成功した。

アネキシンはカルシウムイオン濃度依存的にホスファチジルセリンに結合する分子である。Pengらはアネキシン12を用いることにより膜の流動性を著しく減少させることができることを発表した[3]。我々はより入手が容易であるアネキシン5を用いて人工膜中の脂質分子の流動性が減少することを蛍光ラベルした脂質を用いて直接観察することにより確かめた。また、蛍光標識した抗体を用いてリアノジン受容体を脂質膜中に固定し1分子観察と同時に機能を測定することにも成功した。

[1]T. Ide et al., (2002) Single Molecules Apr 3(1) 33-42 [2]T. Ide et al., (2002) Jpn J Physiol. 52(5) 429-434 [3]S. Peng et al., (2004) Biophys. J 86 145-151

T.Ichikawa, T.Ide, T.Yanagida : Monitoring single protein in artificial lipid bilayers which diffusion is decreased by annexin5

1P232

ウシラクトフェリシンと酸性リン脂質二重膜との特異的相互作用およびその抗菌作用の解明

○梅山 万左子、西村 勝之、内藤 晶（横国大院・工）

ウシラクトフェリシン（LfcinB）は25アミノ酸残基からなる抗菌ペプチドである。本研究では、黄色ブドウ球菌の細胞膜のリン脂質組成を参考にしたDMPC65%, CL10%, DMPC25%の混合膜を用い、この膜とLfcinBの特異的相互作用を解析し、抗菌作用の分子機構を明らかにすることを目的とした。LfcinBを多重膜リポソーム（MLV）に再構成し、³¹P static, ¹³C MAS, ¹H MAS NMR スペクトルを液晶温度およびゲルの温度で測定した。³¹P static NMR スペクトルの線形解析からLfcinBはDMPC膜より混合膜に特異的相互作用をもつことがわかった。これは混合膜に含まれる酸性脂質とLfcinBの塩基性アミノ酸側鎖との間の静電的相互作用によると考えられる。さらにLfcinB-混合膜系では液晶温度で³¹P static NMR スペクトルに等方成分が観測された。この結果はLfcinBの作用により二重膜に欠陥が生じた可能性を示唆している。そこで、カリウムイオンを内側に含む一重膜リポソーム（LUV）にLfcinBを加えることにより生じるカリウムイオンの透過を、カリウムイオン選択性電極を用いてLUV外側のカリウムイオン濃度変化から測定した。その結果、LfcinBの作用によるカリウムイオンの透過が確認できた。この結果は、LfcinBが細菌の細胞膜に孔を形成してイオン透過を促進するため、イオンの濃度勾配を保てなくなり抗菌作用が発現することを示している。またリン脂質の¹³C MAS NMR 測定結果からLfcinBはリン脂質二重膜のグリセロール部位と相互作用をしたことが示唆された。さらにリン脂質の¹H MAS NMR 測定結果から Trp 残基が二重膜の界面に存在することが示唆された。これらの結果は、リン脂質二重膜の親水性基と疎水性基の界面にLfcinBの塩基性部位（R⁺RWQWR）が局在していることを示している。

M.Umeyama, K.Nishimura and A.Naito : Specific Interaction of Bovine Lactoferricin with Acidic Phospholipid Bilayers and Elucidation of Antimicrobial Activity