2P245

中性子小角散乱と中性子スピネコーによるラフトモデルリポソームの研究

○平井 光博¹、小泉 将治¹、平井 春顕¹、笠原 浩二²、湯山 耕平²、鈴木 直子²、May Roland³、Farago Bela³、Zaccai Joseph³
(¹ 群大・工、² 東京都臨床研、³ Institut Laue-Langevin)

スフィンゴ糖脂質 (GSL)、コレステロール、膜蛋白質などが会合して細胞表面に形成する構造的ユニット (「ラフト」) を直接観測し、膜構造にたいする影響を測定するための方法の一つとして、重水素化脂質混合ベシクルを対象とした中性子小角散乱法や中性子スピネコー法があげられる。前者は、X線小角散乱法と同様に、溶液中に分散した対象物質のナノスケールレベルでの構造的な特徴を捉えることが可能な一般的な方法であるが、中性子散乱では、重水/軽水混合溶媒や重水素化のテクニックを利用することで、対象物質の構成成分の一部分のコントラストを変化させてその構造の特徴を強調して観測することが可能である。また、後者の方法は、膜構造のゆっくりとした揺らぎ (波状運動など) や界面弾性エネルギー (低エネルギー励起) が測定可能なユニークな手法である。そこで、今回、GSLの代表的な成分であるガングリオシド、コレステロール、リン脂質を含むラフトモデルリポソームを作成し、中性子小角散乱法と中性子スピネコー法を利用して温度変化ともなうモデルリポソーム上のガングリオシド/コレステロール成分の非対称分布の様子と膜のダイナミクスの変化の精密な測定を行った。測定には、フランス ILL 研究所に設置されている中性子小角散乱装置 D22 と中性子スピネコー装置 IN15 を使用し、高い統計精度のデータを得ることに成功した。得られた実験結果と新たに開発したモデル構造解析法とを合わせ議論を行う。

M. Hirai, M. Koizumi, H. Hirai, K. Kasahara, K. Yuyama, N. Suzuki, R. May, B. Farago, and J. Zaccai : Study of raft-model liposome using small-angle neutron scattering and neutron spin echo

2P247

laurdan はどのような膜環境を感じているか？

○大場 哲彦、大木 和夫 (東北大院・理)

蛍光色素 laurdan は、膜の流動性を調べる目的で広く用いられ、特に 2 波長 (440nm と 490nm) の蛍光強度のみで膜の柔らかさを定量できることから、蛍光顕微鏡下でのイメージングにも広く応用されている。2 波長の蛍光強度でスペクトル変化を説明できるということは、発光に関与する励起状態が 2 状態のみであることを暗に仮定している。一方、laurdan と同じ発色団をもつ prodan の発光波長は、無極性溶媒 (cyclohexane) 中での 392nm から、水中での 523nm まで大きくシフトし、励起状態で生じた大きな双極子モーメントを安定化させるような溶媒分子の再配向運動 (溶媒緩和) によって、スペクトル変化が説明されている。一般に、溶媒緩和によるスペクトルシフトでは、色素周囲の微視的な誘電率の変化に依存して、発光波長は連続的に長波長シフトすると考えられ、その場合には、2 波長の方法は妥当ではない。また、laurdan の蛍光には、少なくとも 3 つの励起状態が関与しているとの報告もある。果して、laurdan の蛍光を 2 波長で定量する方法は妥当なのであろうか？ また、膜のどのような流動性変化を laurdan は感じているのだろうか？ そのことを明らかにするために、我々は、laurdan や prodan 等の蛍光スペクトルを、Red Edge Excitation Shift (REES) の有無も合わせて詳細に検討した。その結果、次のことが明らかとなった。

少なくとも 2 分子膜中では、laurdan の発光は 2 状態からの発光がほとんどで、2 波長の方法は妥当である。このことは、膜中での laurdan の溶媒緩和は、水素結合のような特異的な溶媒緩和であることを強く示唆する。膜中での prodan やミセル (Tx-100) 中での laurdan は、顕著な REES を示した。このことは、これらの場合には非特異的な溶媒緩和が寄与していることを示している。これらのことを総合して、laurdan の発光についての、新しいモデルを提案する。

T.Ohba and K.Ohki : What environment does laurdan sense?

2P246

DMPC/メリチン系の熱力学的安定状態に関する研究

○玉造 広野、大場 哲彦、大木 和夫 (東北大・院理・物理)

ミツバチ毒の主成分であるメリチンは、膜活性ペプチドとして知られ、膜融合や分裂、膜蛋白と脂質の相互作用などの研究に広く使用されてきた。脂質に対してのメリチンのモル比 ($=R$) が小さい場合は、膜の透過性や溶血性が高くなり、また R が大きい場合は、ゲル-液晶相転移温度以下での膜のミセル化 (脂質の溶液が透明になる) と、相転移温度以上での膜融合 (脂質の溶液が白濁する) が可逆的に起こることが知られている。しかしメリチンの膜に対する過渡的な作用 (膜破壊や膜融合) についてはよく研究されているが、熱力学的に安定な状態についての研究は少なかった。そこで本実験では、DMPC/メリチン系の相図を描くことを目的とし、DSC による熱量測定や、環境感受性蛍光色素 Laurdan を用いた蛍光分析を行った。

その結果、 R が 5mol% 以下の場合には、メリチンの添加により転移ピーク幅の増大、転移ピークの低温シフトなどが見られたが、顕微鏡観察やスペクトル測定からは二分子膜構造自体に大きな変化はみられなかった。 R が 10mol% 以上の場合には、相転移温度以上の領域で数十 μ m 程の球状構造体が観察されたが、その蛍光画像は二分子膜構造のベシクルとは大きく異なり、また偏光子を用いた顕微鏡観察でも二分子膜に特徴的な偏光特性は見られなかった。ゆえにこの構造体は二分子膜構造を持っていないことが強く示唆された。さらに、相転移温度以下の領域では、Laurdan の蛍光スペクトルが、液晶相の膜や TritonX でミセル化した時のスペクトルとは大きく異なり、ゲル相の膜のスペクトルと一致した。このことから、低温度側でできる構造体は過去に報告されたディスクミセル構造であること、また、そのディスクミセル構造の中で、脂質分子はゲル相の膜と同程度に強くパッキングしていると考えられる。

K.Tamatsukuri, T.Ohba, K.Ohki : Study on thermodynamic stable states of DMPC/Melittin system

2P248

Grasteci-Holyst モデルを用いたモノオレイン脂質キュービック相の構造解析

○高橋 浩¹、安部 悟² (¹ 群馬大・工・共通、² 群馬大院・工・生産工学)

生体脂質によって形成されるキュービック (Q) 相は、近年、膜蛋白質の結晶化やドラッグデリバリーへの応用など様々の分野から注目されている。我々は、これまでにモノオレインとモノエライジンの Q 相の格子定数に対する共存溶質の効果を X 線回折により調べ、報告してきた [1]。今回は、Grasteci と Holyst によって提案された構造モデルにもとづき回折強度を計算する手法 [2] を用いて、実験データを解析した。図に、75wt% グリセロール水溶液中のモノオレインが形成した空間群 Pn3m の Q 相の X 線回折像とモデルからの理論回折強度を比較したものを示した。広角領域を除き、良好な一致が見られる。解析の結果、グリセロール濃度の増加に従って、格子定数は減少するが、モノオレインの膜厚の値は、ほぼ一定であることが分かった。また、溶媒中に各種 Na イオンが存在する場合の結果についても報告する予定である。

[1] Takahashi et al. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 374 (2000) 475-482., Takahashi et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* 4 (2002) 2365-2370., Abe, Takahashi, *J. Appl. Cryst.* 36 (2003) 515-519. [2] Garstecki, Holyst, *Langmuir* 18 (2002) 2519-2528. & 2529-2537.

H.Takahashi and S. Abe : Structure analysis of monoolein cubic phase using Grasteci-Holyst simple model