3P241

界面活性剤を用いた基板支持型脂質二重膜の自発的 形成の制御

○石黒 亮、杉浦 智啓、亀山 啓一、平松 宏一（岐阜大・工）

界面活性剤を用いて脂質を可溶化した水溶液に親水性の固体基板を浸漬し、溶液を希釈すると、その表面に脂質二重膜が生成することは既に知られている。我々は基板上の混合脂質膜が溶液中の混合ミセルと熱力学的平衡関係にあることに注目し、混合ミセル内の組成を変化させることによって混合脂質膜の特性を可逆的に制御できると考えた。本研究では、赤外分光法および原子間力顕微鏡法を用いて非イオン性界面活性剤／リン脂質水溶液中に浸漬した基板上に生成する混合脂質膜の物性を評価し、同時に動的光散乱法を用いて溶液中の混合ミセルの物性を評価することによって、混合脂質膜と混合ミセル相との平衡関係の解明を試みた。

非イオン性界面活性剤として n-octyl-beta-D-glucopyranoside (OG) を、中性リン脂質として dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) を使用した。これらの水溶液に対して動的光散乱 (DLS) 測定をおこない、混合ミセルの流体力学的半径の OG および DOPC 濃度依存性を解析した。その結果、溶液中の OG 単量体濃度の増加に伴って混合ミセル内の OG モル分率は増加し、同時にミセル半径は減少することがわかった。また、全反射吸収フーリエ変換赤外分光法 (ATR-FTIR) を用いて、OG/DOPC 水溶液中に浸漬されたゲルマニウム基板上に生成する混合脂質膜の赤外線吸収スペクトルを測定し、膜内の OG および DOPC の定量をおこなった。その結果、混合脂質膜の物性が混合ミセル内の組成によってのみ決まることが明らかになった。これらの結果と原子間力顕微鏡法による結果とを併せて検討し、OG および DOPC からなる混合脂質膜と混合ミセル溶液との相平衡について考察する。

R. ISHIGURO, T. SUGIURA, K. KAMEYAMA, K. HIRAMATSU : Spontaneous Formation of Supported Lipid Bilayer Regulated by Surfactant

3P243

フローサイトメトリーを用いた細胞サイズリポソームの解析：人工細胞モデル構築とその理解に対する新たなアプローチ

○佐藤 周知¹、石川 慶太郎¹、大日方 圭¹、Yu Wei²、若林 真紀²、中石 智之²、Elizabeth Mitamura²、島 康文²、菅原 正³、卜部 格²、四方 哲也^{1,2,4,5} (¹ 阪大院・情報科学・バイオ情報、² 阪大院・工・生命先端、³ 東大院・総合文化、⁴ 阪大院・生命機能、⁵ ERATO・JST)

細胞内での化学反応ネットワークは、外部環境変動に対して柔軟で頑強である。その様なシステムが如何にして進化してきたのかという理解については、細胞内の化学反応を模倣した細胞モデルの構築を行い、その特性と実際の細胞の特性とを比較することが重要である。我々は、これまでに、細胞サイズリポソーム内にて、RNA の複製反応、GFP 遺伝子の転写翻訳反応、および 2 段階のカスケード的遺伝子ネットワーク反応を行った。細胞サイズリポソームの構造特性は、個々が非常に多種多様であり、構成脂質の種類や組成比でも変化する。構造特性において、化学反応場としての内部体積や膜厚の指標は、反応因子の実効濃度や、透過性に影響する。細胞モデル内での化学反応特性を理解するにあたり、反応含量と内封体積および膜厚の相関性の定量的評価は、モデルの理解を深める為に重要なステップである。これまでのリポソーム研究手法における、動的光散乱法や電気抵抗法を用いた大きさ解析や、顕微鏡観察による個々の直接観察では、内封体積や膜厚を同時に定量化することは困難であった。

そこで、我々はフローサイトメトリーを用いて、個々のリポソームの内封体積と膜量の定量化を試みた。フローサイトメトリーは、多重蛍光染色した個々の粒子に対し、各蛍光色素の各蛍光強度を同時に測定できる。個々のリポソームの内封体積と膜量について、緑色蛍光色素溶液と赤色蛍光脂脂肪酸をマーカーとし、定量的測定方法を構築した。これにより、リポソーム内での化学反応の特性を、リポソームの構造特性と相関的に定量解析・評価する可能性を開いた。

K. Sato, K. Ishikawa, K. Obinata, Y. Wei, M. Wakabayashi, T. Nakaishi, E. P. Ko-Mitamura, Y. Shima, T. Sugawara, I. Urabe, and T. Yomo : Flow cytometric analysis of cell-sized liposomes: novel approach toward construction of an artificial cell model

3P242

原子間力顕微鏡によるプロテオリポソームからの膜タンパク質引き抜き

○安田 恵美、Rehana Afrin、Martin Jacobson、猪飼 篤（東工大・生命理工・分子生命科学）

細胞膜は分子認識、物質輸送、情報伝達などの機能を果たし、細胞の生存に必要な不可欠である。そこで、膜タンパク質がどのくらいの力で細胞膜や細胞骨格にアンカーされているかを調べることは、細胞運動や細胞間の相互作用を理解する上で重要な情報を提供するものだと考えられる。原子間力顕微鏡 (AFM) は、探針が試料に直接触れ試料表面の凹凸像を得る顕微鏡である。近年、この直接触れるという特徴を生かして探針-試料間の相互作用力測定に利用されてきている。

我々は以前の報告で赤血球膜から内在性タンパク質を引き抜く力の分布を測定し、最小値を与えるピークの最頻値を 0.2 - 0.25 nN と見積もった。赤血球膜上の主要な膜タンパク質は Band3 とグリコホリンであるが、測定された力の帰属は明らかでない。そこで本研究では、簡単な系を用いてグリコホリンを引き抜く力を測定することとした。グリコホリン A は DOPC(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocoline) と biotin 化脂質とで合成したリポソーム脂質二重膜中へ組み込み、プロテオリポソームとした。グリコホリン A プロテオリポソームは、アピジンあるいは糖結合タンパク質修飾したガラス上に固定し、AFM 探針にはクロスリンカーを修飾し、引き抜き実験を行っている。

本発表では、今回のリポソームからグリコホリン A を引き抜いた力と赤血球から膜タンパク質を引き抜いた結果を比較するとともに、脂質膜の力学的安定性についても議論する予定である。

M.Yasuda, R.Afrin, M.Jacobson and A.Ikai : Extraction of membrane proteins from proteoliposome using atomic force microscopy

3P244

ガングリオシド／コレステロール混合系における糖鎖-糖鎖間相互作用

○安部 悟、高橋 浩（群馬大・工）

ガングリオシドは主に細胞外表面に存在するスフィンゴ糖脂質で、コレステロールなどと共に脂質マイクロドメインを形成し細胞同士の接着や認識、情報伝達に関与することが示唆されている。これらの機能を理解するうえでガングリオシド／コレステロール混合系の糖鎖-糖鎖間の相互作用の詳細な知見を得る必要があり、我々は構造からその相互作用を明らかにすること目的としている。巨大な親水性頭部を持つガングリオシドは水中ではミセルを形成するが、ガングリオシド GM1 /コレステロールの混合系においては、モル比で GM1:コレステロール=1:1 でベシクルを形成することが X 線溶液散乱におけるモデル構造解析で明らかにされている [1]。本研究では McIntosh と Simon の方法 [2] に基づき、溶媒にポリビニルピロリドン (PVP) を加えることで GM1 /コレステロール混合系ベシクルに浸透圧を加え、GM1 の糖鎖-糖鎖間を接近させることにより糖鎖同士の相互作用を放射光 X 線による X 線回折で調べた。その結果、浸透圧を上げると等間隔の反射ピークが得られラメラ状にスタックした状態になることがわかり、浸透圧を変化させることでラメラ間隔を室温付近で 89 Å から 80 Å まで変化させることができた。また、7 次までのシャープな反射ピークが得られたので電子密度分布の再構成を行った。その結果、浸透圧を高くすると二重膜の中心から 40 Å 付近に糖鎖同士が重なったと解釈されるピークがみられた。これらの結果をもとに、GM1 /コレステロール混合系の構造から糖鎖-糖鎖間の相互作用を考察する。また、ガングリオシド GT1b:コレステロール=1:1 の混合系についても同様の測定を行ったのでその結果も発表する予定である。[1] T.Hayakawa and M.Hirai (2003) *J. Appl. Cryst.* 36, 489-493. [2] T.J.McIntosh and S.A.Simon (1986) *Biochemistry* 25, 4058-4066.

S. Abe and H. Takahashi : Sugar-sugar interactions of ganglioside/cholesterol mixtures