

東北大学大学院理学研究科物理学専攻・数学専攻・天文学専攻

21世紀 COE 拠点形成プログラム

「物質階層融合科学の構築」

平成15年度リサーチ・アシスタント (RA) 研究報告書

氏名	谷口 幸範
学籍番号	
専攻	東北大学大学院理学研究科 物理学専攻
学年	博士課程後期3年の課程 3年
指導教官	大木 和夫
研究題目	脂質分解酵素が引き起こす巨大脂質二分子膜小胞の形態・物性変化の可視化解析
I. 研究発表（学術雑誌に15年度中に発表または掲載決定したもの、および15年度中の学会等での本人の発表）	
<ul style="list-style-type: none">谷口 幸範、宮田 英威、大木 和夫、スフィンゴリエリナーゼ処理によるリポソームの透過性、形態変化の顕微鏡観察による研究, 日本生物物理学会, 新潟, 2003年9月	

II. 研究活動結果の概要

● 脂質分子変換が引き起こす脂質二分子膜小胞の形態、物性変化の可視化解析

脂質分解酵素スフィンゴミエリナーゼ (SMase) をジャイアントリボソームに作用させ、そのときのリボソームの形態および透過性変化を、光学顕微鏡下でビデオレートで観察した。ジャイアントリボソームの組成は、1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (SOPC)/ N-palmitoyl-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine (C_{16} SM) 3:1 mol%から成るものを主に用いた。リボソーム内に水溶性蛍光色素分子を封入し、その蛍光強度の時間変化から、膜の透過性変化を可視化することできた。リボソーム内に封入する分子として、カルセインおよびデキストラン (M.W. 70000) を用いた。

カルセインおよびデキストランのどちらの場合でも、SMase 処理により、これらの分子は数分にわたり徐々に漏出するということがわかった。カルセインおよびデキストランは、数分以内にリボソーム内からほとんど全て漏出するが、その間、リボソームの大きさにはほとんど変化は見られなかった。したがって、漏出はリボソームに開いた孔からの分子の拡散により起こることがわかった。そこで、溶液の流出は無視し拡散のみを考えて、カルセインの漏出の速さからリボソームに開いた孔の総面積を見積った。多数のリボソームについてそれぞれ孔の総面積を見積ったところ、孔の総面積とリボソームの表面積には正の相関がみられた。孔の総面積とリボソームの表面積との比はおよそ 10^{-6} であった。

膜に孔が開き、それが長時間維持されるためには、膜のエッジエネルギーが低い値をもつ必要がある。そのためには、Cer が非二分子膜構造を形成する、あるいは SMase がエッジに吸着する等の何らかのエッジエネルギーの値を減少させる機構を考えなければならない。

膜の透過性は生体膜の機能と直結する重要な性質であり、今後は、漏出孔が維持される機構を明らかにすることが望まれる。

● 人工ラフト実験系の確立とその物理的特性の研究

1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC)/ C_{16} SM/ Cholesterol 1:1:1 mol% の組成比をもつリボソームを作成し、室温で liquid-ordered phase (L_o 相) と liquid-disordered phase (L_d 相) の二相共存状態を、 L_d 相に選択的に分配する蛍光色素 TR-DPPE、および環境感受性色素 Laurdan による generalized polarization (GP) 測定により可視化した。ここに SMase を処理し、リボソーム外葉で SM を Cer に変換したときのドメインの変化、そのダイナミクスについて観測した。

その結果、SMase 処理により膜の外葉の脂質を分解するだけで、数分の内にリボソームの外葉ともほぼ同時にドメインが消失することがわかった。SMase が L_o 相と L_d 相の二相共存状態に作用し変化させる能力があることが直接的に明らかになった。

本実験系では、内葉の組成が変化するには脂質分子のフリップフロップ運動を考えねばならないが、これまで知られているフリップフロップ運動の時定数からは、数分で内外葉の脂質分子が混ざり合うことは考えにくい。したがって、本実験系では何らかの機構によりフリップフロップ運動が促進されている可能性があり、これは今後明らかにしていく必要がある。