

(別紙様式1)

平成15年度東北大学21世紀COE特別研究奨励費 研究活動結果報告書

21世紀COE拠点リーダー

鈴木 厚人 殿

(ふりがな) 氏名	たにぐち ゆきのり	所 属	資格 (いずれかを囲む)
	谷口 幸範	物理学専攻	COEフェロー・ <u>博士課程</u>
研究課題名	脂質分子変換が引き起こす巨大脂質分子膜小胞の形態・物性変化の可視化解析		
研究指導者	所 属 部 局	職 名	氏 名
	大学院理学研究科	教授	大木 和夫

研究活動結果の概要

研究計画調書に記載した研究目的及び実施計画に対し、その結果・実績について具体的に記載すること。

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 (C₁₆SM) 3:1 mol%から成るものを主に用いた。膜の透過性変化を可視化するために、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を測定することを試みた。リボソーム内に封入する分子としては、カルセインおよびテトラメチルローダミン-デキストラン (M.W. 70000) を用いた。

カルセインは蛍光褪色が比較的激しいため、励起光強度を強くすることができない。したがって、微弱な励起光を用いてカルセインを励起し、微弱な蛍光を検出することになる。カルセインからの微弱な蛍光を効率よく取得するために、ダイクロイックミラーなどの光学フィルタ類を最適化した。これにより、10分間程度の連続観察が可能になり、SMase処理による膜の透過性変化を定量的に評価できるようになった。

その結果、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、なおかつ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る。本研究は、リボソームに封入した蛍光色素分子の漏出をジャイアントリボソームを用いて個々のリボソームについて可視化した初めての例である。個々のリボソームを直接リアルタイムで可視化することによって、これまでのリボソーム集団の平均の挙動をみていた研究からは得られない、個々の漏出孔の安定性やリボソーム表面積との相関を得ることができた。これによりSMaseが引き起こす透過性の変化について理解が一段進んだと思われる。今後は、漏出孔が維持される機構を明らかにし、その知見を元に脂質膜、生体膜の理解につなげていくことが望まれる。また、本研究で開発した透過性の可視化手法は、数nmサイズの孔が開く場合に用いることが可能であり、ヘプチド等のSMase以外の系への応用も考えられる。

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)

学会発表

- スフィンゴミエリナーゼ処理によるリボソームの透過性、形態変化の顕微鏡観察による研究
谷口 幸範、宮田 英威、大木 和夫、日本生物物理学会、新潟、2003年