

2S19

ガングリオシドミセルの水の吐出・吸蔵、糖鎖・温度依存性
 ○平井光博, 岩瀬裕希, 新井栄揮, 矢吹貞人, 滝沢俊治 (群馬大学工
 学部)

細胞膜情報伝達調節機能, 細胞間認識, 細胞/基質間接着の調節機能, 細胞のガン化との関連などの様々な生理的な機能が明らかにされつつある酸性糖脂質ガングリオシド分子凝集系の構造, 構造安定性・可変性等に関する構造物性学的な性質を明らかにするために, 我々は, 主に放射光X線及び中性子散乱法等の構造学的手法を用いて, 温度やpHをパラメータとしてガングリオシド水分散系における凝集構造, 構造転移, モデル蛋白との相互作用に関する研究を行ってきた。その結果, ガングリオシド分子は巨大な糖鎖頭部の存在により特長的な物化学的性質を示し, 生理的溫度範囲において溫度上昇による親水性頭部領域の大幅な収縮と疎水性側鎖領域の拡大, それに伴うミセル表面電荷ポテンシャルの変化 [1], また, 蛋白との相互作用の糖鎖シアル酸残基と蛋白質化学修飾表面にたいする著しい依存性 [2] などを見出した。

今回, 散乱データのモデルフィッティング解析から得られた構造パラメータを, 新たに検討した結果, 昇降温に伴う親水性頭部領域の収縮と膨潤が熱可逆的な大量の水の吐出・吸蔵により説明されることを見出した。親水性糖鎖頭部あたりの水和水は10-20分子程度と考えられるが, 糖鎖頭部に吸蔵される水分分子数は100-200分子と大きく異なり, このような水の吐出・吸蔵が, 20-40℃で劇的に起きることは今までに報告されてい。また, 吐出・吸蔵過程は, 糖鎖頭部の種類に強く依存する。

1) M. Hirai, et al., Physica B, 1995, 213&214, 748.; Biophys. J., 1996, 70, 1761; J. Phys. Chem., 1996, 100, 11675.; J. Chem. Soc., Faraday Trans., 1996, 92, 4533.
 2) M. Hirai, et al., Physica B, 1995, 213&214, 748.; Prog. Coll. Poly. Sci., 1997, in press.

M. Hirai, H. Iwase, S. Shigeiki, S. Yabuki, T. Takizawa: Intensive extrusion and occlusion of water in ganglioside micelle depending on oligosaccharide chain and temperature

2S21

AFMによる正電荷リポソームの構造と遺伝子導入
 ○川浦雅代, 古野忠秀, 中西守 (名古屋大学薬学部)

【目的】正電荷コレステロール誘導体を素材とした正電荷リポソームにより外来遺伝子の細胞内導入を行い, 遺伝子導入の効率を支配する要因を追究してきた。本研究では, 原子間力顕微鏡(AFM)を用いて, 正電荷リポソーム・DNA複合体の構造を観察し, 遺伝子導入の効率に影響を及ぼすリポソーム・DNA複合体の粒子サイズの検討を行った。

【方法】中性脂質(DOPE)と正電荷コレステロール誘導体を用いて正電荷リポソームを作製し, プラスミドDNA(pSV2CAT)と複合体を形成させ, 数種の培養細胞に導入した。導入遺伝子の発現率は, CAT(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ)活性により測定した。複合体の形態観察は, マイカ基板上に正電荷リポソーム・DNA複合体を滴下し, 蒸留水で洗浄後, 風乾した試料をタッピングモードAFM法を用いて行った。

【結果及び結論】CAT活性の大きく異なる3種類の正電荷コレステロール誘導体を用いて正電荷リポソームを作製し, リポソーム・DNA複合体の構造をAFMで観察した。その結果, それぞれの複合体の構造(粒子径)に大きな違いがあることが明らかになった。そこで, AFMのデータからそれぞれの複合体の粒子径を測定したところ, 発現率の最も高い正電荷リポソームの場合は, 直径0.6-1.2 μ m程度のサイズの粒子が占める割合が最も多かった(重量比として)。発現率が中程度の正電荷リポソームの場合は, 直径1.4-3.0 μ m程度の径のもの占める割合が最も多かった。また, 発現率の最も低い正電荷リポソームでは, 複合体をほとんど形成せず, リポソーム単独の場合の直径200-400nmとほぼ等しかった。リポソーム・DNA複合体の粒子径は, エンドサイトシスによる細胞内への取込み効率に大きく影響を及ぼしていると考えられ, 正電荷リポソームにより, 直径0.6-1.2 μ m程度の複合体の粒子が形成されたときに, 遺伝子導入の効率は最も高くなると推察された。当日はそのような効率のよい正電荷リポソームを用いて蛍光標識したアンチセンスDNAを細胞内へ導入しその動態を共焦点レーザー顕微鏡を用いて追跡した結果も紹介し, 正電荷リポソームによる遺伝子導入の分子機構について論じる。

C.Kawaura,T.Furuno,M.Nakanishi: Structures of cationic liposomes as revealed by AFM

2S20

ガングリオシド GM3 を含む DPPC 多重層膜の構造—電子顕微鏡による—
 ○山田大邦¹, 松岡審爾¹, 秋山盛雄¹, 土橋桂子², 質佐伸省² (札幌
 医大医学部物理¹, 同化学²)

DPPC水分散系における多重層膜は主転移温度41.4度以下, 前転移温度35.0度以上でリップル構造を持ち, その周期は余剰水のある条件下で13nm程度である。スフィンゴ糖脂質類中のガングリオシドGM3はマウス黒色腫の抗原であるが, DPPC-コレステロール系でGM3濃度が10モル%以上では抗GM3抗体(M2590)との反応性が上昇する¹⁾。

昨年度, 凍結断面法を用いて13nmの基本周期構造の他に23モル%で倍周期構造が安定になることを報告した²⁾。これらは凍結後, 膜内割断により表出した面, エッチングにより表出した表面を見ているものである。同一生成条件の多重層膜に対し, 負染色法を用いると, 表出した部分だけではなく全体, 膜実体を含んだ情報が得られる。

その結果,
 1. GM3濃度変化による基本周期, 倍周期の構造を観測することができた
 2. 明らかに膜断片と思われる部分でも, リップル構造が現れており, リップル形成に必ずしも多重層構造を必要としないことが分かった。
 抗GM3抗体(M2590)の凝集の様子については検討中である。

1: K. Suetake et al. FEBS Lett. 361(1995)201-205. 2: 生物物理学会34年会1060.

H.Yamada,S.Matuoka,M.Akiyama,K.Tsuchihashi,S.Gasa: Structures of DPPC-ganglioside GM3 multilamella membranes by electron-microscopy

2S22

培養血管内皮細胞の浸透圧変化に伴う形状と膜表面蛋白の解析
 ○林美明, 調進一郎¹, 會沢勝夫² (オリンパス光学,¹東京医大第3内科,²東京医大第2生理)

【目的】培養細胞をより生理的条件下で経時的に計測できるように改良を加えた原子間力顕微鏡(AFM)を用いて, 培養液の浸透圧を変化させた時の膨張・収縮と弾性を計測し, また, フーリエ変換赤外吸収スペクトル (FT-IR) で細胞膜表面蛋白の継代変化を計測し, 検討した。

【方法】実験には培養ヒト大動脈内皮細胞(HAEC)を用いた。培地をPBS5mlに置換後, AFMにてdish底面より細胞膜までの高さを計測した。培地に1/2濃度のPBS0.5mlを添加することにより浸透圧を290から282mOSM/KgH₂Oに変化させ, 細胞の膨張・収縮を細胞膜の高さの変化として経時的に計測した。また, フォースカーブから細胞の弾性を求めた。培養dishよりシリコンラバーにて剝離したHAEC浮遊液をダイヤモンド20FT-IR分光光度計のセルに静置させ, ATR結晶面に密着したHAEC細胞膜表面における蛋白のアミドI・II領域の赤外吸収スペクトルを測定した。

【結果】1.浸透圧を低下させた直後より数分間にわたって細胞は膨張した。2.浸透圧低下に伴う膨張速度は継代が進むにつれ低下した。3.細胞の弾性は継代が進むにつれ大きいバネ定数を示した。4.アミドI・II各領域で6つのピークを認めた。5.アミドI領域では1630/cm付近の蛋白質beta構造のピークが継代に伴い増大した。6.アミドII領域ではN-Hに伴うピークが継代に伴い減少した。

【結論】内皮細胞は継代が進むにつれ, 細胞膜の蛋白質組成が密になり, 細胞膜の弾性が低下し, 培液の浸透圧低下に伴う膨張速度が低下したと考えられた。

Y.Hayashi,S.Shirabe,K.Aizawa: Cell volume, membrane elasticity and its protein composition change of the endothelial cell due to osmotic pressure reduction