

1P209

固体 NMR によるメラニン細胞刺激ホルモン γ_2 -MSH と中性及び酸性脂質膜結合状態における立体構造解析

○吉田 祥吾¹、西村 勝之²、吉良 敦史³、内藤 晶² (¹横浜国大院・工学府、²横浜国大院・工学研究院、³(株) アルバック・技術開発部)

メラニン細胞刺激ホルモン γ_2 -MSH は 12 個のアミノ酸残基からなり、体色黒化や、心臓血管収縮作用等の生理活性効果が報告されている。生理活性ペプチドホルモンは生体膜に結合して特定の構造をとり、表面を拡散し、受容体に結合する二段階結合モデルが提唱されている。本研究は固体 NMR により γ_2 -MSH とリン脂質二分子膜の相互作用、及びリン脂質結合状態での立体構造を解析しホルモンの作用機構を分子レベルで明らかにすることを目的として行った。 γ_2 -MSH を固相合成し、中性リン脂質として DMPC、酸性リン脂質として DMPG を用いた。 γ_2 -MSH:リン脂質を 1:10、1:20、1:50 のモル比で、脂質膜に再構成後、リポソームを調製し、固体 NMR および QCM により相互作用及び立体構造解析を行った。QCM 測定から γ_2 -MSH は DMPC 及び DMPG とは各々 10^4 、 10^6 M⁻¹ の結合定数を示すことが判明した。³¹P-NMR スペクトルの温度変化を測定したところ、1:20 のモル比では DMPC 膜及び DMPG 膜において、それぞれ典型的な軸対称粉末線形からずれたスペクトルが得られた。これから γ_2 -MSH を含む DMPC 膜は軸対称運動に加えて、膜面を乱すような付加的な運動を持ち、DMPG 膜に対しては γ_2 -MSH の濃度が高い状態において、二分子膜に乱れが生じ軸対称な運動とは異なる複雑な分子運動成分を持つことが判明した。また γ_2 -MSH:リン脂質が 1:20 のモル比において ¹³C-NMR 測定では [1-¹³C]Phe⁶- γ_2 -MSH の等方化学シフト値の考察から、DMPC 膜結合 γ_2 -MSH の Phe⁶ 部位近傍では主に β -sheet、ランダムコイル構造が混在し、DMPG 膜結合 γ_2 -MSH は 40℃において、 α -helix、ランダムコイルの混合状態であることが判明した。

S. Yoshida, K. Nishimura, A. Kira, A. Naito : Structural elucidation of γ_2 -melanocyte stimulating hormone (γ_2 -MSH) bound to DMPC and DMPG lipid bilayers by solid state NMR

1P211

非イオン性界面活性剤を用いた、固体表面におけるリン脂質膜の自発的形成的制御

杉浦 智啓、○石黒 亮、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固体基板を浸漬すると、その表面に脂質膜が生成する現象は既に知られている。我々は基板上に生成する脂質膜が、溶液中の界面活性剤/脂質会合体 (混合ミセル) と熱力学的平衡関係にあることに注目し、溶液の組成を変化させることによって脂質膜の生成を可逆的に制御できると考えた。本研究では赤外分光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脂質膜の特性を評価し、同時に光散乱法を用いて溶液中の混合ミセルの特性を評価することによって、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 octyl-beta-D-glucopyranoside (OG) でリン脂質 dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) を可溶化した水溶液に対して動的散乱 (DLS) 測定をおこない、混合ミセルの流体力学的半径を決定した。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形成される OG/DOPC 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。

DLS 測定の結果によれば、混合ミセル内の OG モル分率は溶液中に共存する OG 単量体濃度の増加に伴って増加し、またミセル半径は減少した。一方、ゲルマニウム基板上に生成した OG/DOPC 吸着膜の ATR-FTIR スペクトルによれば、吸着膜内の DOPC 量は混合ミセル内の DOPC モル分率の増加に伴って増加した。これらの結果を基に、OG および DOPC の吸着膜および混合ミセル相間の平衡について検討した。

T. Sugiura, R. Ishiguro, K. Kameyama and K. Hiramatsu : Spontaneous formation of supported phospholipid layer assisted by non-ionic surfactant

1P210

固体 NMR によるボンポリチン 2-DPPC 分散系の膜融合・分断機構の解析

○虎谷 秀一、西村 勝之、内藤 晶 (横浜国大院・工・機能発現工)

ボンポリチン 2 (BLT2) はマルハナバチの毒液から単離された 17 アミノ酸残基から成るペプチドである。その一次構造は、SKITDILAKLGKVLAVH-NH₂ である。このペプチドは、ミツバチ毒メリチンと同様に赤血球およびリポソームを溶解させることが知られているが、その分子機構は明らかにされていない。そこで本研究では、明確にゲル-液晶相転移点 (T_c) をもつ生体膜モデルとして DPPC 膜を用い、固体 NMR の手法を用いて BLT2 と DPPC 膜の相互作用を明らかにすることを目的とした。Ile³、Ile⁶、Leu⁷、Leu¹⁰ のカルボニル炭素を ¹³C でそれぞれ標識した 4 種類の BLT2 を固相法で合成し、HPLC で精製した試料を測定に用いた。ペプチド対脂質モル比 1 対 10 から成る BLT2-DPPC 二分子膜分散系試料を調製し、固体 ³¹P NMR および ¹³C NMR スペクトルを測定した。³¹P NMR 測定の結果、メリチンの場合と同様に T_c より低い温度で膜分断が誘起され、また T_c より高い温度で膜小胞は膜面を静磁場に対し平行に自発配向することが明らかになった。したがって、BLT2 は一次構造および残基数は異なるが脂質二分子膜に対してメリチンと同様に膜融合・分断を示すことがわかった。T_c より高い温度で形成される自発磁場配向膜に結合した部位特異的 ¹³C 標識 BLT2 の ¹³C 化学シフト異方性を解析し、膜結合 BLT2 の動的構造を調べたところ、標識部位は全て α -ヘリックスの二次構造をとっていることがわかった。さらに、BLT2 は膜法線からヘリックス軸を約 30° 傾けて二分子膜に挿入しており、膜法線のまわりを高速に回転しながら並進拡散していることが明らかになった。本年度ではこの動的膜結合構造を基に BLT2 が誘起する膜融合・分断機構について報告する。

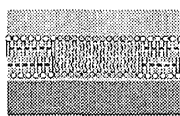
S. Toraya, K. Nishimura, and A. Naito : Membrane Fusion and Disruption Mechanisms of Bombolitin-2-DPPC Dispersion Systems by Solid-state NMR Studies

1P212

光リソグラフィを用いた脂質二分子膜の微細パターン化技術

○森垣 憲一 (産総研・セルエンジニアリング)

生体膜のモデルシステムとして固体基板上に固定化された脂質二分子膜が近年注目されている。我々は、光リソグラフィ技術を用い脂質膜を局所的に光重合することでモデル生体膜をパターン化する手法を報告してきた。光重合性リン脂質として 1,2-bis(10,12-tricosadienyl)-sn-glycero-3-phosphocholine を用い、紫外光 (254nm) 照射によってポリマー化を行った。パターン化露光後に保護されたモノマー膜を界面活性剤によって選択的に除去し、基板上に残ったポリマー膜をテンプレートとして空白部に流動性を持った脂質二分子膜 (モデル生体膜) を vesicle fusion method で挿入した。このようにしてポリマー化脂質膜と流動性脂質膜とが全く同一の二分子膜構造を持って基板上でコンポジットフィルム化された。光重合過程において脂質二分子膜の重合度を変化させることで、ポリマー化膜領域内部における脂質分子の水平拡散速度を制御することが可能であることが示された。(参照文献) (1) Morigaki, K.; Baumgart, T.; Offenhäuser, A.; Knoll, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 172-174. (2) Morigaki, K.; Kiyosue, K.; Taguchi, T. *Langmuir* 2004 (in press)



Micropatterned composite membranes of polymerized and fluid lipid bilayers (schematic drawing and fluorescence microscopy images)

K. Morigaki : Lithographic micro-patterning of substrate-supported lipid bilayers