

高圧力が誘起するリン脂質二重膜の膜融合

(徳島大院ソシオテクノサイエンス研究部)

○松木 均・後藤優樹・玉井伸岳

【緒言】 脂質分子が自発的に形成する二重膜ベシクルはその大きさにより、小さな単層ベシクル (SUV)、大きな単層ベシクル (LUV) および多重層ベシクル (MLV) に分類される。近年、1 μm 以上の大きさを持つ巨大単層ベシクル (GUV) が実細胞のモデルとして注目を集めている。SUV や MLV のような nm サイズのベシクル系からは多集団の平均物理量が得られるが、GUV では光学顕微鏡を用いてベシクル個々の構造を直接観察できるので、一個体レベルの物性が追跡可能となる。

他方、ベシクルはある特定の条件下、ベシクル同士が相互に合一する膜融合を引き起こす。これまで常圧下では、酸性リン脂質二重膜への二価金属塩の添加が膜融合を誘発することが知られているが、高圧力下における膜融合についてはまだ調査されていない。今回は、高圧力下、光学顕微鏡を用いて GUV を観察したところ、高圧力が誘起する GUV の膜融合現象を見出したので報告する。

【実験】 脂質は、不飽和アシル鎖と小さな極性頭部を有し、膜融合を促進させる脂質として知られているジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) および同じアシル鎖を有し、大きな極性頭部を有するジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC) を用いた。両脂質を、全濃度 10 mmol kg^{-1} 、組成比 1:1 で混合し、膜融合を促進させるために等モル量 (10 mmol kg^{-1}) の多価金属無機塩 (塩化ランタン) を添加後、静置水和法により GUV を作製した。この GUV を高圧顕微鏡用耐圧セル (光高圧機器社製) 内に封入後、光学顕微鏡 (Nikon 社製 ECLIPSE 80i) のステージ上にセルをセットした。恒温水をセル内に循環させることにより温度を 25°C 一定下に保温した状態で、常圧下および高圧力下で GUV の形態を直接観察した。

【結果と考察】 最初に、高圧力下においてベシクル分散液をリアルタイムで観測可能な耐圧内部セルの開発を行った。試料溶液を石英ガラスと緩衝材で挟み込んだ形式の内部セルを作製し、顕微鏡の焦点深度、作動距離や加圧密封性などをチェック後、加圧条件下のもとでベシクル形態の観察が可能なことを確認した。

この内部セルを用いて、高圧力下における GUV の観察を行った。常圧下において、直径約 10 μm の GUV を選び、72 時間継続して観察を続けたが、その GUV の形状はほとんど変化しなかった。これに対して、100 MPa の加圧下で同様に GUV の形状を 72 時間観察したところ、当初、直径 10 μm 程度であった GUV が時間と共に徐々に成長し始め、72 時間後にはほぼ球形の形状で、且つ 150 μm を超える直径を有する GUV に成長するのを観測した。また、72 時間経過直後に大気圧下まで一気に減圧してみたところ、巨大リボソームに縮小や局所的な形態変化のようなことは全く起こらず、成長した球形形態をそのまま維持したことから、この成長現象は不可逆的であることがわかった。加圧は一般に体積を小さくする方向へ作用するが、この現象は加圧によりベシクル間の膜融合が促進され、一個体のベシクル体積が見掛け上増加するという興味深い現象である。

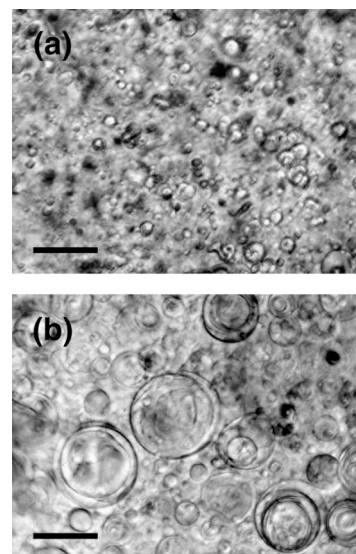


Fig. 1 Pressure-induced membrane fusion of liposomes: (a) 0 hr. at 100 MPa, (b) 72 hrs. at 100 MPa. Black bar indicates 100 μm .

Membrane Fusion of Phospholipid Bilayer Membranes Induced by High Pressure

H. MATSUKI, M. GOTO, N. TAMAI (Institute of Technology and Science, The University of Tokushima, matsuki@bio.tokushima-u.ac.jp)

It is well known that bilayer vesicles cause the membrane fusion at a certain condition under atmospheric pressure, but there is no report on the membrane fusion under high pressure. We investigated the membrane fusion of giant unilamellar vesicles (GUV) formed by two kinds of unsaturated phospholipids in the presence of an inorganic salt by a method of high-pressure microscopy. The shape of GUVs with a diameter of ca. 10 μm under atmospheric pressure did not change with time course up to 72 hr., whereas that of GUVs under high pressure (at 100 MPa) grew up spherically and irreversibly to over 150 μm after 72 hr. Although pressure generally brings about the volume decrease of the system, this is an interesting phenomenon that the volume of an individual vesicle apparently increases due to the promotion of membrane fusion under high pressure.