

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	脂質膜中でのスフィンゴ糖脂質の存在状態と認識機能の解析
Title(English)	
著者(和文)	橋詰峰雄
Author(English)	
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第4073号, 授与年月日:1999年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第4073号, Conferred date:1999/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

平成十年度 学位論文

脂質膜中でのスフィンゴ糖脂質の
存在状態と認識機能の解析

東京工業大学

生命理工学研究科 バイオテクノロジー専攻

橋詰 峰雄

Mineo Hashizume

目次

第1章 序論	1
1-1 生体膜中のスフィンゴ糖脂質の存在状態	1
1-2 脂質膜上でのスフィンゴ糖脂質の糖鎖認識性	8
1-3 本研究の目的	11
第2章 混合単分子膜中でのスフィンゴ糖脂質の存在状態の解析	21
2-1 緒言	21
2-2 実験方法	23
2-2-1 材料	23
2-2-2 ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 の合成	27
2-2-3 気-水界面での脂質単分子膜の作製	33
2-2-4 表面圧-面積等温線の解析方法	34
2-2-5 ブリュースター角顕微鏡(BAM) 観察	35
2-3 結果および考察	39
2-3-1 スフィンゴ糖脂質単分子膜の表面圧-面積等温線	39
2-3-2 LacCer / リン脂質混合単分子膜	43
2-3-3 GM3 / リン脂質混合単分子膜	46
2-3-4 ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 / リン脂質混合単分子膜	53
2-3-5 混合単分子膜の BAM 観察	57
2-3-6 スフィンゴ糖脂質の構造が混合単分子膜中での存在状態に 与える影響についての考察	60
2-4 結言	63

第3章 LacCer 混合単分子膜に対する allo A レクチンの結合挙動の観察	67
3-1 緒言	67
3-2 実験方法	70
3-2-1 材料	70
3-2-2 水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法	72
3-2-3 測定方法	79
3-2-4 測定結果の解析方法	80
3-3 結果および考察	86
3-3-1 混合単分子膜中の LacCer の存在状態の効果	86
3-3-2 混合単分子膜中の LacCer 含量の効果	88
3-3-3 混合単分子膜の表面圧の効果	91
3-3-4 結合定数の算出	94
3-3-5 他のレクチンの結合挙動との比較	99
3-4 結言	105
第4章 GM3 混合単分子膜に対する抗 GM3 抗体の結合挙動の観察	109
4-1 緒言	109
4-2 実験方法	112
4-2-1 材料	112
4-2-2 測定方法	112
4-3 結果および考察	115
4-3-1 マトリックス脂質の効果	115
4-3-2 抗体の結合特異性についての検討	118
4-3-3 混合単分子膜中の GM3 含量の効果	124

4-3-4 結合定数の算出	128
4-4 結言	131
第5章 ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 混合単分子膜に対する SSA レクチンの結合挙動	
の観察	136
5-1 緒言	136
5-2 実験方法	140
5-2-1 材料	140
5-2-2 測定方法	140
5-3 結果および考察	142
5-3-1 SSA レクチンの結合挙動	142
5-3-2 MSSA レクチンの結合挙動	146
5-3-3 結合定数の算出	149
5-4 結言	153
第6章 結論	158
発表論文	163
学会発表	164

第1章 序論

1-1 生体膜中でのスフィンゴ糖脂質の存在状態

動物細胞は細胞膜により外界との境界をなし、個体の形態を保持している。すなわち細胞に対して外界から何らかの分子が作用するとき、まず最初に細胞膜上の分子との相互作用が起こる。細胞膜は多くの種類の分子から構成されるが、基本となるのは脂質分子によって形成されている二分子膜である。脂質二分子膜は両親媒性の脂質分子が疎水性相互作用によって集合することにより形成される一種の超分子構造である。二分子膜を構成する脂質として主にリン脂質、糖脂質、コレステロールなどが挙げられる¹⁾。

動物細胞に存在する糖脂質はそのほとんどがスフィンゴ糖脂質と呼ばれる、疎水部がスフィンゴシン塩基と脂肪酸が縮合したセラミド骨格からなり親水部に糖鎖を持つ分子である。同じく生体膜構成成分であるリン脂質の多くが疎水部にジアシルグリセリル基を持つのと対照的である。図 1-1 にスフィンゴ糖脂質の1種であるラクトシルセラミド (LacCer) の構造を示した。スフィンゴ糖脂質は疎水部の構造にも多様性があるが、その機能を考えたときには親水部の糖鎖の構造が非常に多様性に富んでいることが注目になる^{2,3)}。最初のスフィンゴ糖脂質は 1874 年に Thudichum により脳において発見され、セレブロシドと名付けられた^{2,4)}。"スフィンゴ (sphingo)" という接頭辞は Thudichum がスフィンゴシンを単離した際に名付けられ、その語源には sphingein (= bind tight) という説とギリシャ神話に出てくるスフィンクスから取られたという説とがある。現在明らかになっているスフィンゴ糖脂質の多様性、神秘性から考えると後者の説の方がふさわしいのかもしれない。これまで約 300 種類もの糖鎖構造が異なるスフィンゴ糖脂質が発見されており、その数は現在も増え続けている⁵⁾。スフィンゴ糖脂質の中には糖鎖中にシアル酸 (NeuAc) を持つものが多く、それらはガングリオシドと呼ばれている^{2,5,6)}。図

1-1 にガングリオシド GM3 の化学構造を示した。糖は核酸やアミノ酸に比べて多量化する際に非常に多くの結合の組み合わせを持つ⁷⁾。しかしながら実際には天然に存在するスフィンゴ糖脂質の糖鎖の結合の仕方は決してランダムなものではなく、全体として見たときには一定の規則性がある。スフィンゴ糖脂質は二次代謝産物であるのでその構造が直接遺伝子上に保存されているわけではない。糖鎖の結合の様式は糖転移酵素の遺伝子によって間接的に制御されている。スフィンゴ糖脂質の糖鎖伸長は N-結合型タンパク質糖鎖の生合成⁸⁾と異なり、セラミドに対して糖が一つずつ付加していく。すなわち一つの糖転移酵素は一つのグリコシド結合の形成を触媒している。したがって糖脂質の生合成経路は複数の糖転移酵素が関与した複雑なものとなっている^{2,9)}。これらの糖転移酵素の発現の制御によって結果として組織特異的、あるいは細胞の状態に応じてある特定のスフィンゴ糖脂質の発現量が増加するというような現象が起こる¹⁰⁻¹³⁾。

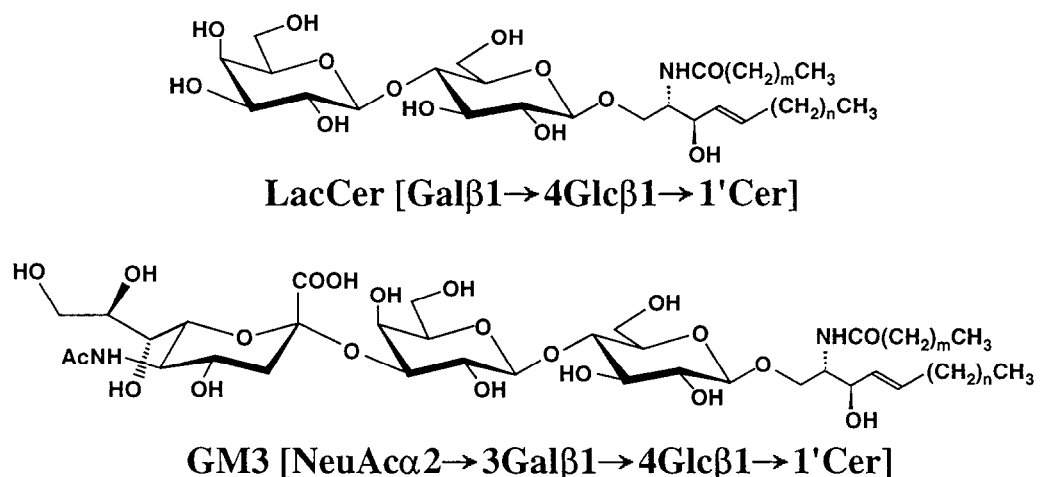


図 1-1 LacCer および GM3 の化学構造

かつてはスフィンゴ糖脂質は単に生体膜を構成する一成分としか考えられていなかった。糖タンパク質が外界に提示する糖鎖に比べればスフィンゴ糖脂質が膜面に提示する糖鎖は非常に外界から認識されにくい状況にあることが容易に想像されるからである。しかしその後研究が進み、そのようなスフィンゴ糖脂質の糖鎖でも十分認識分子としての機能を果たしていることが示されてきた¹⁴⁻¹⁶⁾。またゲスト分子による糖鎖認識のよう

な "trans" の相互作用だけでなく、同じ細胞膜中で膜タンパク質などと "cis" の相互作用をすることでタンパク質を活性化するようなスフィンゴ糖脂質も存在することが明らかとなってきた^{17,18)}。このようなスフィンゴ糖脂質の機能は大まかに分類するだけでも表 1-1 に挙げるように多岐にわたっている^{2,14-16)}。これらの機能はすべてのスフィンゴ糖脂質が同様の活性を持っているわけではなく、ある特定の糖鎖構造を持ったスフィンゴ糖脂質だけが特定の機能を持つことが多い。逆に言えばこのような機能を果たすためにスフィンゴ糖脂質の糖鎖には多様性があるのかもしれない。現在でも単離はされているがその機能が明らかになっていないスフィンゴ糖脂質は数多く、スフィンゴ糖脂質の機能に関する研究はまだ発展途上である。

癌細胞による免疫抑制のためのガングリオシド放出^{19,20)}やカルモジュリン依存性酵素の活性調節²¹⁾などの場合を除けば、表 1-1 に挙げた機能の多くはスフィンゴ糖脂質が細胞膜中に組み込まれた状態で発現されている。したがってスフィンゴ糖脂質がその機能を果たすとき、細胞膜中でどのような存在状態にあるのかについて興味を持たれるようになってきた。

表 1-1 スフィンゴ糖脂質の主な生理機能 (文献2より引用)

表 5-1 糖脂質の生理機能	
1.	細胞表面環境をつくる 糖鎖の官能基 (-OH, -COOH, -SO ₃ H, -NCOCH ₃ , -OCOCH ₃ , -OCH ₃)
2.	受容体機能 (表 6-1) 細菌毒素に対する受容体 細菌, ウイルスに対する受容体 トランスミッター, ホルモンに対する受容体
3.	細胞分化マーカー (表 5-2) 細胞分化マーカー 腫瘍抗原
4.	神経分化制御 成長因子受容体調節 神経突起伸展 シナプス形成 ミエリン形成
5.	細胞内情報伝達機構の制御 (図 6-3) プロテインキナーゼ活性の調節 アデニル酸シクラーゼ活性調節 糖脂質代謝物によるシグナル伝達 (セラミド, スフィンゴシン, de-N-アセチル化ガングリオシド)
6.	細胞膜機能の調節 膜酵素活性の調節 (Na ⁺ , K ⁺ -ATPase など) イオンチャネルの調節 トランスミッター放出の調節 コリンの取込み

細胞膜中でのスフィンゴ糖脂質の存在状態については、これまで脂質二分子膜の外側の方に多く分布することが知られていた程度であった²²⁾。フリッパーゼのような分子の関与によるものかは定かではないが、糖鎖を多く持ったスフィンゴ糖脂質の分子全体の構造を考えてもこの事実は妥当なものであろう。しかし同一膜面内においてスフィンゴ糖脂質がどのような分布状態を示しているのか、すなわち他のリン脂質などの分子と均一に混合しているのかあるいはスフィンゴ糖脂質同士で集合構造をとっているのか、については評価方法が少なく、またスフィンゴ糖脂質の機能が明らかになっていなかったこともありあまり検討されてこなかった。

このような背景の中、1983年に Tillack らにより興味深い報告が出された²³⁾。彼らは細胞膜中でのスフィンゴ糖脂質グロボシドの存在状態を免疫電顕の手法により明らかにした。彼らは赤血球膜上のグロボシドを抗グロボシド抗体とプロテインA-金コロイド複合体で、シアル酸含有糖タンパク質を WGA-フェリチン複合体でそれぞれ同時にラベルし、その電子顕微鏡像を撮影した(図 1-2)。その結果スフィンゴ糖脂質は細胞膜中で糖タンパク質とは別の領域に存在し、糖脂質に富んだ領域を形成していることが明らかとなった。このようにスフィンゴ糖脂質が細胞膜上で局在化するという現象はリポソームを用いたモデル系においても確認されており²⁴⁾、スフィンゴ糖脂質や組み込む脂質の構造によって局在の様子が異なることが示されている。また DSC²⁵⁾や ESR²⁶⁾、蛍光偏光スペクトル²⁷⁾などを用いた測定よりある条件においてはスフィンゴ糖脂質がリン脂質と相分離するという報告も幾つかある。これらの結果から Hakomori らは図 1-3 のような生体膜モデルを提唱している¹⁾。彼らは Le^xを発現した糖鎖同士や GM3 を多く発現した細胞と Gg3 を多く発現した細胞との細胞間接着においては、最初にこのようなスフィンゴ糖脂質のドメイン同士による糖鎖-糖鎖間の相互作用が働くことを示唆する結果を得ている²⁸⁾。

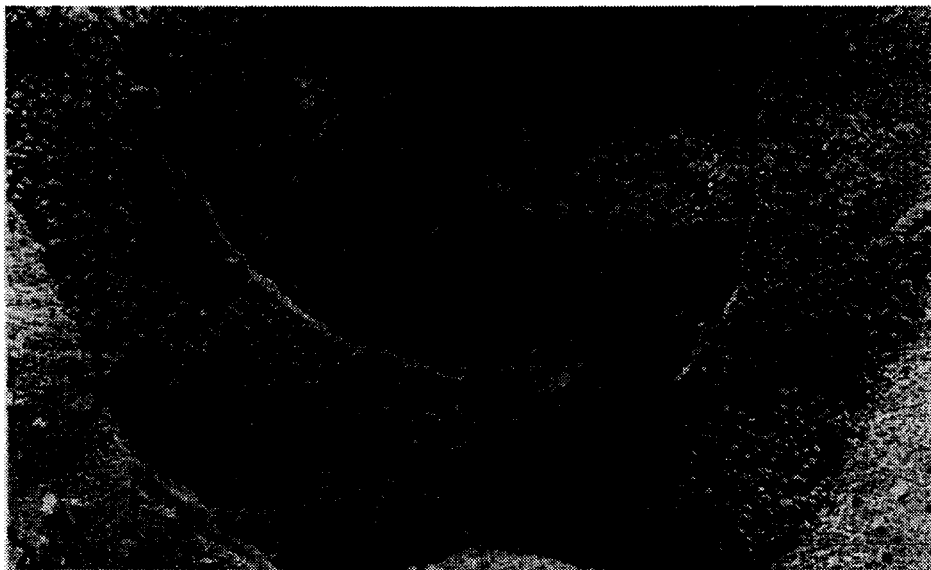


図 1-2 赤血球ゴースト膜表面の凍結割断法による電子顕微鏡写真 (文献 23 より引用)
 スフィンゴ糖脂質グロボシドを抗グロボシド抗体とプロテインA-金コロイド複合体
 (図中の黒い粒子に相当する) で、シアル酸含有糖タンパク質を WGA-フェリチン複合体
 (図中の白い粒子に相当する) でそれぞれ同時にラベルした。

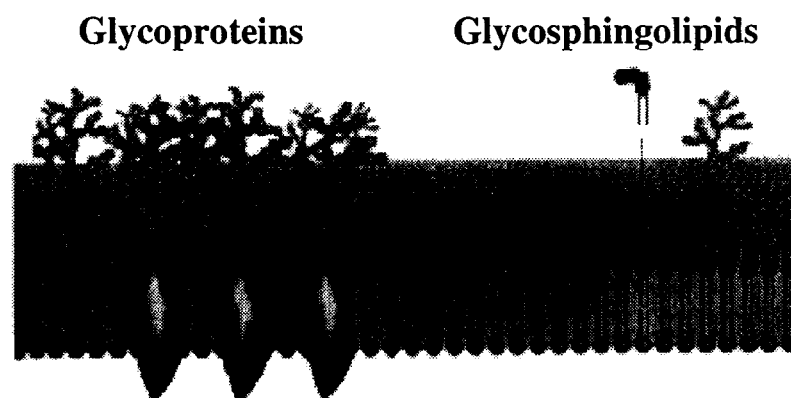


図 1-3 Hakomori らによって提出された生体膜モデル (文献 11 より引用)

また、別のアプローチにより近年カベオラ²⁹⁻³¹⁾と呼ばれる細胞膜中に存在するくぼみや形質膜の一部にスフィンゴ糖脂質に富んだ領域(スフィンゴ糖脂質マイクロドメイン)が存在することが示されてきた(図 1-4)^{32,33)}。それらは細胞膜を界面活性剤で可溶化したとき、不溶画分に存在することから DIG (detergent-insoluble glycolipid-enriched complex)²⁹⁾、あるいは GEM (glycolipid-enriched microdomain)³⁴⁾ などと呼ばれている。この中には脂質分子だけでなくカベオリン、GPI-結合型タンパク質やシグナル伝達に関する膜タンパク質などが共存している³³⁾。また透過型電子顕微鏡観察により実際にこれらの細胞においてスフィンゴ糖脂質がカベオラや形質膜上で局在していることも確認されている³⁵⁾。最近になって GEM に存在するスフィンゴ糖脂質が細胞間相互作用や共存する膜タンパク質のキナーゼ活性などに影響を与えていることが明らかとなった³⁴⁾。

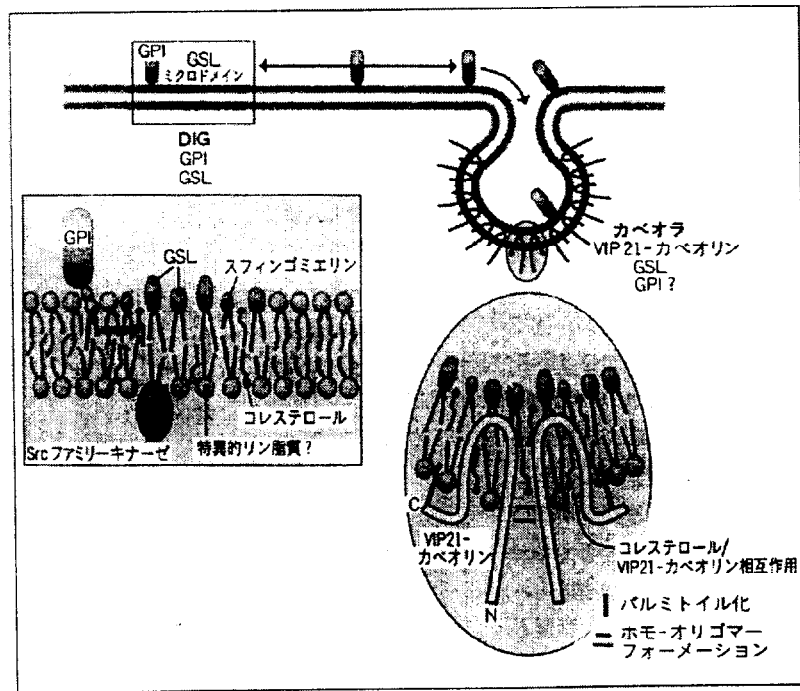


図 1 スフィンゴ糖脂質マイクロドメインとカベオラ
 GSL : スフィンゴ糖脂質, GPI : GPI アンカー蛋白質, DIG : detergent-insoluble glycolipid-enriched complex. (文献 14 より許可を得て転載)

図 1-4 スフィンゴ糖脂質に富んだ領域(スフィンゴ糖脂質マイクロドメイン)とカベオラの模式図 (文献 33 より引用)

このように生体内にはスフィンゴ糖脂質に富んだ領域が存在するのは事実であると言って良いだろう。しかしながらそれらが図 1-3 で示されているようにスフィンゴ糖脂質のみからなるドメインである保証はない。Tillack らの結果はあくまでスフィンゴ糖脂質リッチな領域の存在を示しているに過ぎない。またカベオラなどでは実際にスフィンゴ糖脂質以外にもスフィンゴミエリンやコレステロールも濃縮されていることが示されており³⁶⁾、これらの領域では図 1-5 のような生体膜モデルが提唱されている^{32,33)}。またなぜこのようなスフィンゴ糖脂質に富んだ領域が存在するのか、その形成のメカニズムについては明らかとなっていない。スフィンゴ糖脂質を組み込んだリポソームの DSC 測定などの結果からはスフィンゴ糖脂質分子の持つ物理化学的性質がリン脂質からの相分離の駆動力となっていることは予想されるが、その点まで言及した研究例はない。

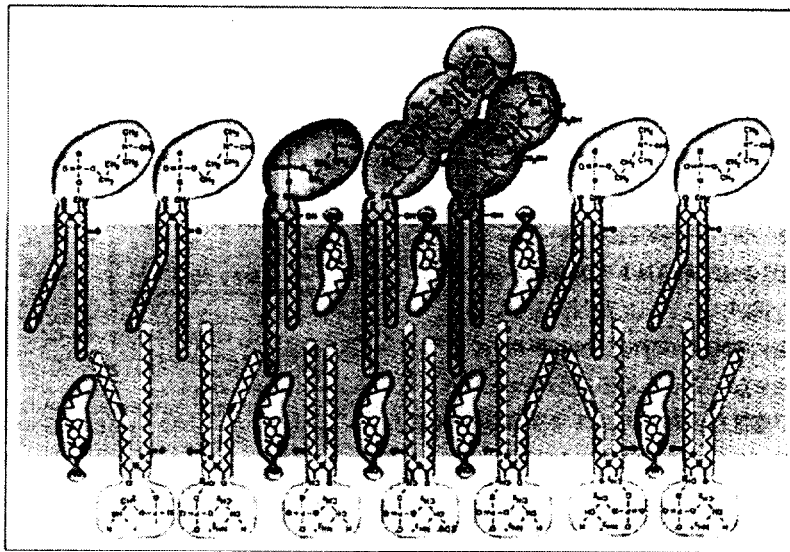


図 2 スフィンゴ糖脂質マイクロドメインの脂質構成モデル^{19,27)}
 灰色 2 本足型：スフィンゴ糖脂質，白色 2 本足型：リン脂質，最小型：コレステロール。

図 1-5 スフィンゴ糖脂質マイクロドメインの脂質構成モデル (文献 33 より引用)

1-2 脂質膜上でのスフィンゴ糖脂質の糖鎖認識性

表 1-1 にも示したように、ある種のスフィンゴ糖脂質はウイルス³⁷⁾や抗体³⁸⁾、毒素³⁹⁾などの特異的な認識分子としての機能を持つことが知られている。この場合スフィンゴ糖脂質は脂質膜中に組み込まれた状態でそれらの機能を果たしている。分子認識という視点から見ると、脂質膜は局所的に見れば2次元平面であるので脂質膜中のスフィンゴ糖脂質に対するウイルスなどのゲスト分子の結合性は、バルク中でスフィンゴ糖脂質が何も束縛を受けない場合での結合性とは必ずしも一致しないと考えられる。したがってスフィンゴ糖脂質の糖鎖認識性について検討する場合にはなるべく生体に近い状態、すなわち生体膜を用いて検討するのが望ましい。しかしながら実際には膜の組成や形状のはっきりした規格化された試料を調製することは非常に困難である。そこで細胞上に発現したスフィンゴ糖脂質に対するゲスト分子の結合性を評価する研究と平行して、リポソームや脂質キャスト膜、脂質単分子膜など生体膜モデルを用いての検討も数多く行われてきた。

それらの中でも 1-1 で述べたような背景に関連した研究例としては、たとえば細胞上にスフィンゴ糖脂質の発現が確認されているにもかかわらず、そのスフィンゴ糖脂質に対する抗体が結合しないという報告がある⁴⁰⁾。Nores らはリポソームやキャスト膜を用いた実験から膜中のスフィンゴ糖脂質含量がある値以上にならないと抗体の結合が起こらないという結果を示し⁴¹⁾、図 1-3 に示したようなスフィンゴ糖脂質のクラスター形成が抗体の結合において重要であると示唆している。しかしながらこれらの報告では実際の脂質膜中でのスフィンゴ糖脂質の存在状態は明らかになっていない。

Serizawa らは気-水界面の脂質単分子膜を用いて、脂質膜中のスフィンゴ糖脂質の糖鎖認識性について検討している。彼らはガングリオシド GM3 に対する WGA レクチン⁴²⁾やインフルエンザウイルス⁴³⁾の結合挙動について検討した。その結果中性スフィンゴ糖脂質グルコシルセラミド (GlcCer) 中に組み込まれた GM3 の方がスフィンゴリン脂質

スフィンゴミエリン中に組み込まれたものよりも WGA やインフルエンザウイルスの結合性が高いことが示されている(図 1-6)^{42,44)}。GM3 はいずれのマトリックス脂質とも均一に混合していることが確認されており、この結果はスフィンゴ糖脂質の集合状態の違いではなくマトリックス脂質の親水部の構造の効果によるものであった。また混合単分子膜中のスフィンゴ糖脂質含量がゲスト分子の結合性に影響を与えることも示されている⁴²⁻⁴⁴⁾。糖脂質含量が高い膜は糖脂質が集合した状態に対応すると考えられる。したがってそのような膜に対するゲスト分子の結合性から、スフィンゴ糖脂質が富んだ領域に存在する際の糖鎖認識性について議論をすることは可能であろう。

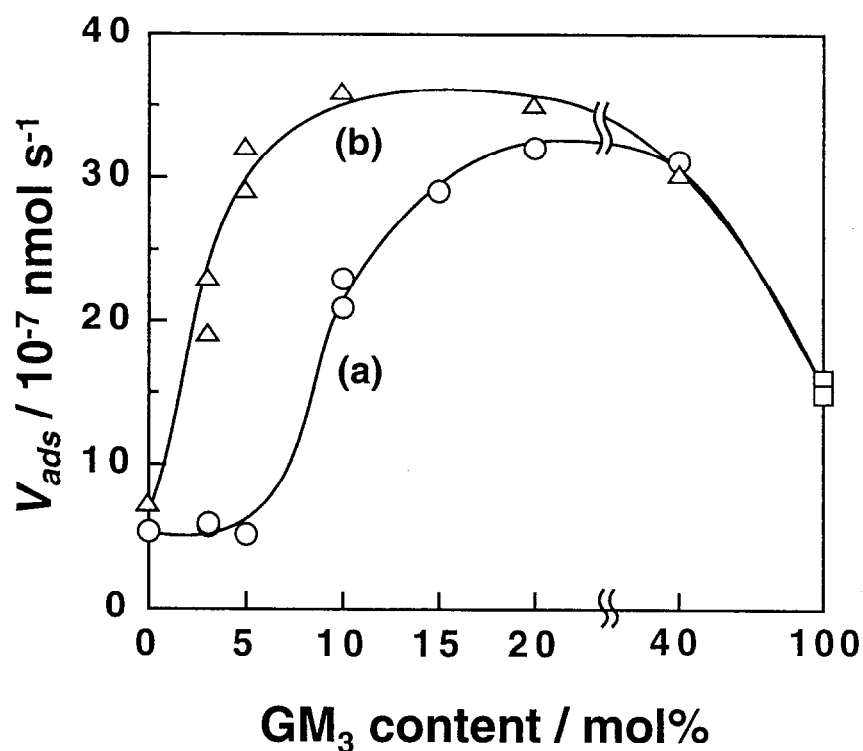


図 1-6 GM3 混合単分子膜に対する WGA の結合性 (初期結合速度 V_{ads})
 (a) スフィンゴミエリン matrix, (b) GlcCer matrix
 (条件: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2), 20 °C, 30 mN m⁻¹, [WGA] = 1.2 × 10⁻⁷ M)
 (文献 44 より引用)

膜中のスフィンゴ糖脂質の集合状態と糖鎖認識性との相関を同じ系で評価した例は非常に少ない。Utsumiらはスフィンゴ糖脂質ガラクトシルセラミド (GalCer) を組み込んだ DPPC リポソームの免疫凝集について検討している⁴⁵⁾。DPPC の相転移温度以上で免疫凝集の値が大きくなった。この系では相転移温度以下では膜中の GalCer はクラスター化していたが相転移温度以上でランダムに分散することが ESR 測定により明らかとなった。すなわちクラスター化した GalCer は抗体の認識性が低く、ランダムに分散することによって抗体に認識されるようになったことを示している。一方リポソームにコレステロールを添加すると、相転移温度以下でも GalCer のクラスターの数が増加していることがわかり、免疫凝集の程度も大きいものとなった。別の研究者による GalCer とコレステロールとの相互作用についての報告⁴⁶⁾から推測すると、この場合では GalCer とコレステロールの相溶性が高いために GalCer のクラスターの数が増加したものと考えられる。この系では GalCer の集合状態を変化させるために温度変化やコレステロールの添加を行っている。他の研究例でも温度変化⁴⁷⁾やカルシウムイオンの添加⁴⁸⁾によってスフィンゴ糖脂質の集合状態を変化させてその糖鎖認識性について検討している。したがって厳密にはこれらの因子が反応の熱力学的側面や膜の安定性などに影響を与えてしまい、スフィンゴ糖脂質の集合状態の効果以外によって糖鎖認識性が変化してしまっている可能性についても考慮しなければならない。

以上のように、現時点においてはできるだけ同一の条件で、スフィンゴ糖脂質の膜中での存在状態だけを変化させてその糖鎖認識性について評価を行うことができる一般的な手法が確立されているとは言い難い。

1-3 本研究の目的

本研究では1-2まで述べてきた背景から、脂質膜中でのスフィンゴ糖脂質の存在状態の系統的な解析、およびそのような存在状態の異なるスフィンゴ糖脂質間での糖鎖認識性の違いについて検討を行った。

本研究ではスフィンゴ糖脂質を組み込んだ生体膜モデル⁴⁹⁾として Maggio⁵⁰⁾や Serizawa⁴⁴⁾らによって検討されてきた気-水界面の脂質単分子膜を用いた。同じ生体膜モデルとして代表的なものにリポソームが挙げられる。リポソームは脂質二分子膜からなる小胞であり、その調整法などはかなり確立されたものとなっている⁵¹⁾。しかしながら、スフィンゴ糖脂質それ自身ではリポソームを形成することはできず、またリン脂質との混合系においても組み込めるスフィンゴ糖脂質含量に限界があるなどの問題点がある。気-水界面の脂質単分子膜^{52,53)}は二分子膜構造ではなく、また膜全体が曲率を持たないという点は生体膜とは異なっている。しかし界面の構造が厳密に制御されており、リポソーム系では不可能なスフィンゴ糖脂質含量が高い混合膜も容易に調整が可能である。膜の調製も再現性良く行うことができ、2種の脂質を混合した単分子膜の表面圧-面積等温線を測定することで単分子膜中での両者の相互作用や混合状態について知ることができる。また混合単分子膜中に存在するドメイン構造などの形態を観察することも可能であり、数多くの利点を持っている。本研究ではスフィンゴ糖脂質とリン脂質の混合単分子膜を調製し、その表面圧-面積等温線を解析することで単分子膜中でのスフィンゴ糖脂質の存在状態を明らかにすることを目的とした。スフィンゴ糖脂質あるいはリン脂質の構造の違いにより膜中でのスフィンゴ糖脂質の存在状態が変化するのか、またその傾向に規則性はあるのかについて検討する。ここで得られた知見により将来人為的に脂質膜中のスフィンゴ糖脂質の存在状態を制御することが可能になるかもしれない。

単分子膜中のスフィンゴ糖脂質の糖鎖認識性は水晶発振子マイクロバランス (Quartz-Crystal Microbalance, QCM) 法を用いて評価した。水晶発振子はその電極上に物質が付

着すると共振振動数が変化することが知られており⁵⁵⁾、この性質を利用して ng オーダーの微量天秤として利用されてきた。振動数の経時変化を追跡することにより電極に固定したホストに対するゲストの結合過程を経時的・定量的に解析することができ、分子間相互作用を解析する化学センサーとして有用であることが示されている⁵⁶⁾。これまで Okahata らにより脂質キャスト膜を固定化した水晶発振子を用いて生理活性物質⁵⁷⁾やリポソーム⁵⁸⁾との相互作用、ホスホリパーゼ A₂ による加水分解挙動⁵⁹⁾、細胞の接着過程⁶⁰⁾、あるいは LB 膜のキャラクタリゼーション⁶¹⁾などについて検討されてきた。彼らはまた水晶発振子の金電極上にチオール化合物の自己会合性単分子膜 (Self-Assembled Monolayer, SAM) を固定化することでホスト-ゲスト間の分子認識の解析も行っている⁶²⁾。金-チオール化合物の相互作用は DNA の電極への固定化法にも応用され、DNA 上での分子認識についても検討されている⁶³⁾。また QCM 法は気相中、水中のみならず最近では超臨界流体中での測定も可能となっている⁶⁴⁾。

近年、Ebara と Okahata によって気-水界面の脂質単分子膜と水晶発振子を組み合わせた測定系が確立された(図 1-7)⁶⁵⁾。これまで脂質膜に対するタンパク質の結合を追跡するにはタンパク質を蛍光ラベルする必要があったが⁶⁶⁾、この測定系を用いればその必要はない。また表面圧-面積等温線の解析で用いたものと同じ膜を測定に用いることができ、脂質膜構造と認識性とを関連づけて議論することができる。彼らは合成糖脂質単分子膜に対するコンカナバリン A (ConA) の結合挙動を解析した⁶⁷⁾。Sato らはより生体に近いモデルとして種々のスフィンゴ糖脂質の混合単分子膜に対するレクチンやウイルスなどの結合について検討した^{42-44,68)}。また気-水界面の単分子膜という特徴を生かし、いわゆる "界面の効果" を利用して水素結合によるホスト-ゲスト間の相互作用の水中での観察も行われている⁶⁹⁾。

近年 QCM 法と同様な情報が得られる化学センサーとして表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance, SPR) の原理を利用した装置が開発、市販され、これを用いてホスト-ゲスト間の相互作用を解析した研究も増えてきている⁷⁰⁾。しかしながら市販の SPR 装置は非常に高価であり、また本研究のように脂質単分子膜に対するゲスト

分子の結合を観察する場合、SPR 装置の基板に単分子膜を固定するためにはそれなりの技術と労力を要する。これに対して QCM 法では SPR 装置に比較すれば装置にかかる費用も安く、また電極上への単分子膜の固定は容易に行うことができる。

本研究においてはスフィンゴ糖脂質の膜中での存在状態およびスフィンゴ糖脂質混合単分子膜に対するレクチンや抗体の結合挙動を解析した。膜中でのスフィンゴ糖脂質の存在状態により認識性に違いがあるのであれば、生体内においてもスフィンゴ糖脂質の発現量は変化させずにその存在状態を変化させることで糖鎖認識性が制御されている可能性を示唆するものとなり、非常に興味深い結果となる。

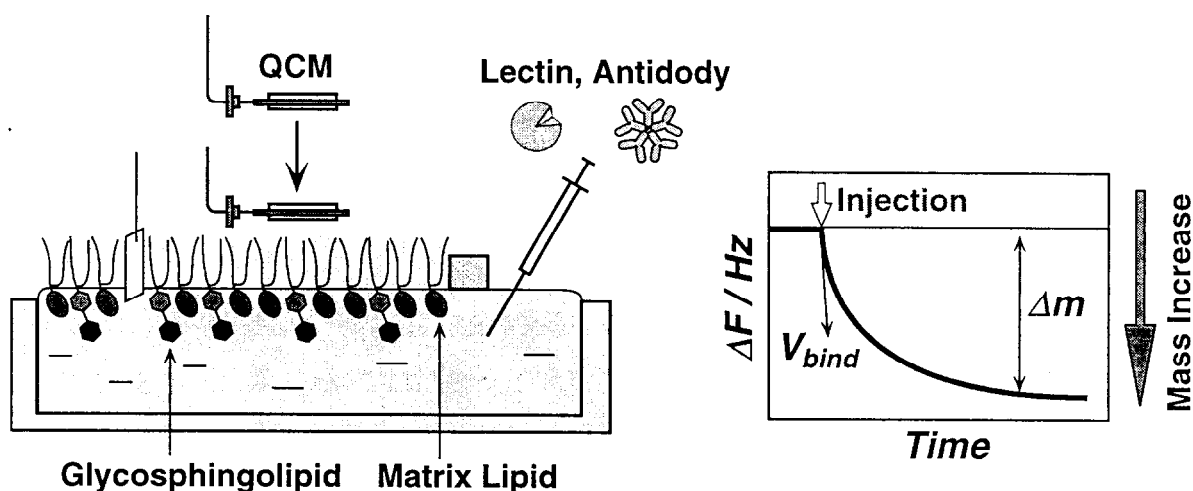


図 1-7 水晶発振子と気-水界面の脂質単分子膜を組み合わせた測定系の模式図

本論文では脂質単分子膜中のスフィンゴ糖脂質の存在状態およびその糖鎖認識性について検討した。本論文は本章を含めた以下の 6 章から構成されている。

第 1 章ではスフィンゴ糖脂質の生体膜中での存在状態とその糖鎖認識性に関するこれまでの知見を紹介し、本研究を行う重要性について説明した。

第 2 章ではスフィンゴ糖脂質 LacCer、GM3 および $(\alpha 2 \rightarrow 6)$ GM3 と飽和および不飽和アシル鎖を持つリン脂質との混合単分子膜を調製し、表面圧-面積等温線の解析からリン脂質のアシル鎖部分の構造がスフィンゴ糖脂質の単分子膜中での存在状態に与える

影響について検討した。またスフィンゴ糖脂質の構造がリン脂質膜中での存在状態に与える影響についても考察した。

第3章では LacCer 混合単分子膜に対するカブトムシレクチン (allo A) の結合挙動を QCM 法により解析し、単分子膜中での存在状態の違いが LacCer の糖鎖認識性に影響を与えるかについて検討した。また他のレクチンの結合挙動との比較も行った。

第4章では GM3 混合単分子膜に対する抗 GM3 抗体 L612 の結合挙動を QCM 法を用いて観察した。GM3 と混合するマトリックス脂質の構造や単分子膜中の GM3 含量の効果などが抗体の結合性に与える影響について検討した。また GM3 以外のスフィンゴ糖脂質に対する結合を観察することで抗体の GM3 に対する結合特異性を評価した。

第5章では (α 2 \rightarrow 6)GM3 混合単分子膜に対するニホンニワトコレクチン (SSA) およびその単量体 MSSA の結合挙動について QCM 法を用いて検討した。SSA の糖脂質の糖鎖に対する結合については検討例がほとんどなく、脂質膜という二次元平面上で提示された糖脂質の糖鎖に対して SSA が結合できるかどうかを評価した。また SSA の単量体に相当する MSSA の結合挙動についても観察し、レクチンが多価の糖結合部位を持つ効果について検討した。

第6章では第5章までの結果から得られた知見をまとめて結論とし、今後の展望について述べた。

第1章 参考文献

- 1) R. B. Gennis, "Biomembranes; Molecular Structure and Function", Springer-Verlag, New York, 1989
- 2) 安藤 進 著, "脳機能とガングリオシド -新たに登場したニューロンの活性物質", 共立出版, 1997
- 3) 木幡 陽, 箱守 仙一郎, 永井 克孝 編, "グライコバイオロジーシリーズ 1 糖鎖の多様な世界", 講談社サイエンティフィク, 1993
- 4) T. Yamakawa, *Glycoconj. J.* **13**, 123-126 (1996)
- 5) 鈴木 康夫, 安藤 進 編著, "生物化学実験法 36 ガングリオシド研究法 II", 学会出版センター, 1995
- 6) 鈴木 康夫, 安藤 進 編著, "生物化学実験法 35 ガングリオシド研究法 I", 学会出版センター, 1995
- 7) 小川 智也, 楠本 正一 編, "化学増刊 122 糖-その多様性を探る", 化学同人, 1992
- 8) 畑中 研一, 西村 紳一郎, 大内 辰郎, 小林 一清 著, "糖質の科学と工学", 講談社サイエンティフィク, 1997
- 9) 鈴木 明身, 鈴木 實, 蛋白質核酸酵素 **37** "複合糖質", 2088-2106 (1998)
- 10) 永井 克孝 他 編, "糖鎖 II. 糖鎖と病態", 東京化学同人, 1994
- 11) 入村 達郎 編, "別冊 日経サイエンス 111 糖鎖と細胞", 日経サイエンス社, 1994
- 12) 辻 崇一, 蛋白質核酸酵素 **43** "糖鎖生物学", 2338-2348 (1998)
- 13) 石井 睦, 齋藤 政樹, 蛋白質核酸酵素 **43** "糖鎖生物学", 2349-2357 (1998)
- 14) S. Hakomori, *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 733-764 (1981)
- 15) R. L. Schnaar, *Glycobiology* **1**, 477-485 (1991)
- 16) S. Hakomori and Y. Igarashi, *J. Biochem.* **118**, 1091-1103 (1995)
- 17) 齋藤 政樹, 蛋白質核酸酵素 **43** "糖鎖生物学", 2484-2487 (1998)
- 18) 辻 崇一, 生化学 **65**, 437-457 (1993)
- 19) A. Rebbaa, E. G. Bremer, and J. Portoukalian, *Trends. Glycosci. Glycotech.* **7**, 223-234 (1995)
- 20) R. Li, D. Gage, and S. Ladisch, *Biochim. Biophys. Acta* **1170**, 283-290 (1993)
- 21) H. Higashi and T. Yamagata, *J. Biol. Chem.* **267**, 9839-9843 (1992)
- 22) H. A. Hanson, J. Holmgren, and L. Svennerholm, *Proc. Natl. Acad. Sci.*,

- USA **74**, 3782-3786 (1977)
- 23) T. W. Tillack, M. Allietta, R. E. Moran, and W. W. Young, Jr., *Biochim. Biophys. Acta* **733**, 15-24 (1983)
- 24) a) M. W. Peters, I. E. Mechlhorn, K. R. Barber, and W. M. Grant, *Biochim. Biophys. Acta* **778**, 419-428 (1984)
b) I. E. Mechlhorn, G. Parraga, K. R. Barber, and W. M. Grant, *Biochim. Biophys. Acta* **863**, 139-155 (1986)
c) P. Rock, M. Allietta, W. W. Young, Jr., T. E. Thompson, and T. W. Tillack, *Biochemistry* **29**, 8484-8490 (1990)
d) P. Rock, M. Allietta, W. W. Young, Jr., T. E. Thompson, and T. W. Tillack, *Biochemistry* **30**, 19-25 (1991)
e) P. Palestini, M. Allietta, S. Sonnino, G. Tettamanti, T. E. Thompson, T. W. Tillack, *Biochim. Biophys. Acta* **1235**, 221-230 (1995)
- 25) a) M. R. Bunow and B. Bunow, *Biophys. J.* **27**, 325-337 (1979)
b) M. C. Correa-Freire, E. Freire, Y. Barenholz, R. L. Biltonen, and T. E. Thompson, *Biochemistry* **18**, 442-445 (1979)
c) M. Masserini and E. Freire, *Biochemistry* **25**, 1043-1049 (1986)
d) M. Gardam and J. R. Silvius, *Biochim. Biophys. Acta* **980**, 319-325 (1989)
- 26) a) M. Delmelle, S. P. Dufrane, R. Brasseur, and J. M. Ruyschaert, *FEBS Lett.* **121**, 11-14 (1980)
b) E. Bertoli, M. Masserini, S. Sonnino, R. Ghidoni, B. Cestaro, and G. Tettamanti, *Biochim. Biophys. Acta* **467**, 196-202 (1981)
- 27) D. A. Rintoul and R. Welti, *Biochemistry* **28**, 26-31 (1989)
- 28) a) I. Eggens, B. Fenderson, T. Toyokuni, B. Dean, M. Stroud, and S. Hakomori, *J. Biol. Chem.* **264**, 9476-9484 (1989)
b) N. Kojima and S. Hakomori, *J. Biol. Chem.* **264**, 20159-20162 (1989)
c) N. Kojima and S. Hakomori, *J. Biol. Chem.* **266**, 17552-17558 (1991)
d) N. Kojima and S. Hakomori, *Glycobiology* **1**, 623-630 (1991)
e) S. Hakomori, *Pure Appl. Chem.* **63**, 473-482 (1991)
f) N. Kojima, *Trends Glycosci. Glycotech.* **4**, 491-503 (1992)
- 29) R. G. Parton and K. Simons, *Science* **269**, 1398-1399 (1995)
- 30) 藤本 豊土, 生化学 **67**, 1396-1401 (1995)

- 31) 花田 賢太郎, 実験医学 **14** "脂質研究の新展開 シグナリングにおける新しい機能", 2065-2069 (1996)
- 32) K. Simons and E. Ikonen, *Nature* **387**, 569-572 (1997)
- 33) 笠原 浩二, 佐内 豊, 蛋白質核酸酵素 **43** "糖鎖生物学", 2522-2530 (1998)
- 34) K. Iwabuchi, S. Yamamura, A. Prinetti, K. Handa, and S. Hakomori, *J. Biol. Chem.* **273**, 9130-9138 (1998)
- 35) a) R. G. Parton, *J. Histochem. Cytochem.* **42**, 155-166 (1994)
b) A. M. Fra, E. Williamson, K. Simons, and R. G. Parton, *J. Biol. Chem.* **269**, 30745-30748 (1994)
c) M. Sorice, I. Parolini, T. Sansolini, T. Garofalo, V. Dolo, M. Sargiacomo, T. Tai, C. Peschle, M. R. Torrisi, and A. Pavan, *J. Lipid Res.* **38**, 969-980 (1997)
- 36) D. A. Brown and J. K. Rose, *Cell* **68**, 533-544 (1992)
- 37) Y. Suzuki, *Prog. Lipid Res.* **33**, 429-457 (1994)
- 38) S. Hakomori and R. Kannagi, *J. Natl. Cancer Inst.* **71**, 231-251 (1983)
- 39) P. H. Fishman, T. Pacuszka, and P. A. Orlandi, *Adv. Lipid Res.* **25**, 165-187 (1993)
- 40) a) Y. Hirabayashi, A. Hamaoka, M. Matsumoto, T. Matsuura, M. Tagawa, S. Wakabayashi, and M. Taniguchi, *J. Biol. Chem.* **260**, 13328-13333 (1985)
b) H. Sakimiya, T. Takahashi, Y. Hirabayashi, and M. Taniguchi, *Cell Struc. Func.* **12**, 93-105 (1987)
c) J. Inokuchi, K. Momosaki, H. Shimeno, H. Nagamatsu, and N. S. Radin, *J. Cell. Physiol.* **141**, 573-583 (1989)
- 41) G. A. Nores, T. Dohi, M. Taniguchi, and S. Hakomori, *J. Immunol.* **139**, 3171-3176 (1987)
- 42) a) T. Sato, T. Serizawa, and Y. Okahata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 551-556 (1994)
b) T. Sato, T. Serizawa, F. Ohtake, M. Nakamura, T. Terabayashi, Y. Kawanishi, and Y. Okahata, *Biochim. Biophys. Acta* **1380**, 82-92 (1998)
- 43) T. Sato, T. Serizawa, and Y. Okahata, *Biochim. Biophys. Acta* **1285**, 14-20 (1996)
- 44) 芹澤 武, 学位論文, 東京工業大学 (1995)

- 45) H. Utsumi, T. Suzuki, K. Inoue, and S. Nojima, *J. Biochem.* **96**, 97-105 (1984)
- 46) a) S. Ali, J. M. Smaby, H. L. Brockman, and R. E. Brown, *Biochemistry* **33**, 2900-2906 (1994)
 b) J. M. Samby, M. Momsen, V. S. Kulkari, and R. E. Brown, *Biochemistry* **35**, 5696-5704 (1996)
- 47) a) W. Curatolo, A. O. Yau, D. M. Small, and B. Sears, *Biochemistry* **17**, 5740-5744 (1984)
 b) I. E. Mehlhorn, K. R. Barber, and C. W. M. Grant, *Biochim. Biophys. Acta* **943**, 389-404 (1988)
- 48) M. Masserini, P. Palestini, B. Venerando, A. Fiorilli, D. Acquotti, and G. Tettamanti, *Biochemistry* **27**, 7397-7398 (1988)
- 49) 佐藤 智典, 化学と工業 **51**, 1173-1177 (1998)
- 50) B. Maggio, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **62**, 55-117 (1994)
- 51) 野島 庄七, 砂本 順三, 井上 圭三 編, "リポソーム", 南江堂, 1988
- 52) 福田 清成, 加藤 貞二, 中原 弘雄, 柴崎 芳夫 著, "超薄分子組織膜の科学 単分子膜から LB 膜へ", 講談社サイエンティフィク, 1993
- 53) 日本化学会 編, "コロイド科学 II. 会合コロイドと薄膜", 東京化学同人, 1995
- 54) a) A. W. Adamson, "Physical Chemistry of Surfaces 5th Ed.", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1990
 b) G. L. Gains, Jr., "Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces" Interscience Publishers, 1966
- 55) G. Sauerbrey, *Z. Physik* **155**, 206-222 (1959)
- 56) D. A. Battray and M. D. Ward, *Chem. Rev.* **92**, 1355-1379 (1992)
- 57) a) Y. Okahata, H. Ebato, and K. Taguchi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1987**, 1363-1365
 b) Y. Okahata, G. En-na, and H. Ebato, *Anal. Chem.* **62**, 1431-1438 (1990)
 c) Y. Okahata and H. Ebato, *Trends Anal. Chem.* **11**, 344-354 (1992)
- 58) 細川 淳一郎, 修士論文, 東京工業大学 (1991)
- 59) Y. Okahata and Y. Ebara, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 116-117
- 60) 江波戸 博, 岡畑 恵雄, 松田 武久, 高分子論文集 **50**, 463-469 (1993)
- 61) a) Y. Okahata, K. Kimura, and K. Ariga, *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 9190-9194 (1989)

- b) Y. Okahata, K. Ariga, and K. Tanaka, *Thin Solid Films* **210/211**, 702-706 (1992)
- c) K. Ariga and Y. Okahata, *Langmuir* **10**, 3255-3259 (1994)
- 62) a) Y. Okahata, K. Matsuura, K. Ito, and Y. Ebara, *Langmuir* **12**, 1023-1026 (1996)
- b) K. Matsuura, Y. Ebara, and Y. Okahata, *Langmuir* **13**, 814-820 (1997)
- 63) a) Y. Okahata, Y. Matsunobu, K. Ijio, M. Mukai, A. Murakami, and K. Makino, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 8299-8300 (1992)
- b) F. Caruso, E. Rodda, D. N. Furlong, K. Niikura, and Y. Okahata, *Anal. Chem.* **69**, 2043-2049 (1997)
- c) Y. Okahata, M. Kawase, K. Niikura, F. Ohtake, H. Furusawa, and Y. Ebara, *Anal. Chem.* **70**, 1288-1296 (1998)
- d) Y. Okahata, K. Niikura, Y. Sugiura, M. Sawada, and T. Morii, *Biochemistry* **37**, 5666-5672 (1998)
- e) K. Niikura, H. Matsuno, and Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 8537-8538 (1998)
- 64) 入本 慶宣, 卒業論文, 東京工業大学 (1997)
- 65) Y. Ebara and Y. Okahata, *Langmuir* **9**, 574-576 (1993)
- 66) a) H. Hass and H. Möhwald, *Thin Solid Films* **180**, 101-110 (1989)
- b) M. Ahlers, W. Muller, A. Reichert, H. Ringsdorf, and J. Venzmer, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **29**, 1269-1285 (1990)
- 67) a) Y. Ebara and Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11209-11212 (1994)
- b) 石原 光輝, 修士論文, 東京工業大学 (1994)
- 68) a) T. Sato, M. Ishii, T. Terabayashi, Y. Kawanishi, and Y. Okahata, *Chem. Lett.* **1997**, 669-670
- b) T. Sato, M. Ishii, F. Ohtake, K. Nagata, T. Terabayashi, K. Kawanishi, and Y. Okahata, *Glycoconj. J.*, in press.
- c) 井上 裕規, 卒業論文, 東京工業大学 (1997)
- 69) a) Y. Ebara, K. Itakura, and Y. Okahata, *Langmuir* **12**, 5165-5170 (1996)
- b) 生方 俊, 卒業論文, 東京工業大学 (1995)
- c) 水谷 勝己, 修士論文, 東京工業大学 (1997)
- 70) a) S. J. Wood, *Microchem. J.* **47**, 330-337 (1993)
- b) Y. Shinohara, F. Kim, M. Shimizu, M. Goto, M. Tosu, and Y. Hasegawa,

Eur. J. Biochem. **223**, 189-184 (1994)

- c) G. M. Kuziemko, M. Stroh, and R. C. Stevens, *Biochemistry* **35**, 6375-6384 (1996)

第2章 混合単分子膜中でのスフィンゴ糖脂質の存在状態の解析

2-1 緒言

水に不溶性の脂質分子を有機溶媒に溶かし水面上に静かに落とすと、有機溶媒が速やかに蒸発した後に脂質単分子膜が形成される¹⁻³⁾。このとき脂質単分子膜が十分に広い水面上に形成されると水の持つ表面張力⁴⁾に影響を与えない。しかしながら、水面の面積を徐々に減少させると脂質分子の親・疎水性や凝集力などにより親水基を水層に、疎水的なアルキル鎖を空気中にさらした形で脂質分子はパッキングし、水の表面張力を減少させる(図.2-1)。この過程における水面の面積と表面張力の減少量との関係をプロットしたものが表面圧-面積(π -A)等温線である。 π -A等温線によって脂質のパッキング状態や混合単分子膜中の脂質間の混合状態あるいは相互作用に関する情報が得られる⁵⁾。

スフィンゴ糖脂質単分子膜の π -A等温線についてはMaggioらのグループを中心に検討されてきた⁶⁾。脂質の構造⁷⁾や温度の効果⁸⁾などについて検討されており、膜の圧縮に要するエネルギーの大きさや膜のパッキング状態などに焦点が当てられている。スフィンゴ糖脂質とリン脂質DPPCとの混合単分子膜について検討した例では、スフィンゴ糖脂質はDPPCと均一に混合するが用いるスフィンゴ糖脂質の構造によりDPPCとの相互作用の程度が異なるという結果が得られている^{9,10)}。またSerizawaはガングリオシドとスフィンゴミエリンの混合単分子膜など、スフィンゴ脂質同士の混合単分子膜について評価を行っている¹¹⁾。この他スフィンゴ糖脂質とコレステロールとの混合単分子膜について検討した例もある¹²⁾。しかしながら生体膜中でのスフィンゴ糖脂質の存在状態を明らかにするという視点に立ったとき、生体膜中に存在するリン脂質のほとんどはそのアルキル鎖中に不飽和結合を持つにもかかわらず¹³⁾、そのようなリン脂質とスフィン

ゴ糖脂質との混合単分子膜についての検討例は、不飽和アシル鎖を持つ galactosylceramide (GalCer) が POPC と単分子膜中で均一に混合するという結果が示されている程度である¹⁰⁾。その一方でガングリオシドと不飽和アシル鎖を持つリン脂質とからなるベシクルにおいては、ガングリオシドが相分離してクラスター化していることを示唆する報告がある¹⁴⁾。このような点からも気-水界面の脂質単分子膜の系においてスフィンゴ糖脂質と不飽和アシル鎖を持つリン脂質との混合状態を検討する意義は大きい。

本章ではスフィンゴ糖脂質 (LacCer、GM3 および $(\alpha 2 \rightarrow 6)$ GM3) と飽和および不飽和アシル鎖を持つリン脂質との混合単分子膜を調製し、 π -A 等温線の解析からリン脂質のアルキル鎖部分の構造がスフィンゴ糖脂質の単分子膜中での存在状態に与える影響について検討した。またスフィンゴ糖脂質の構造がリン脂質膜中での存在状態に与える影響についても考察した。

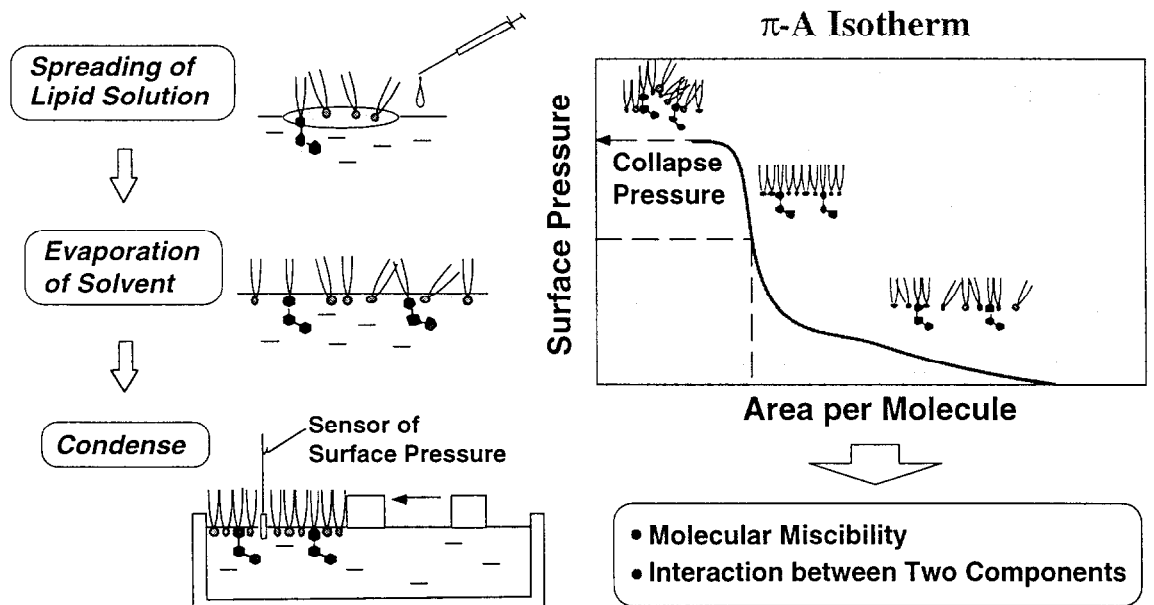
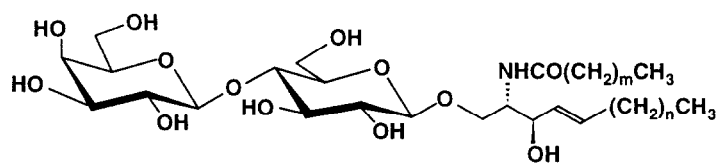


図 2-1 気-水界面での脂質単分子膜の作成過程と π -A 等温線の模式図

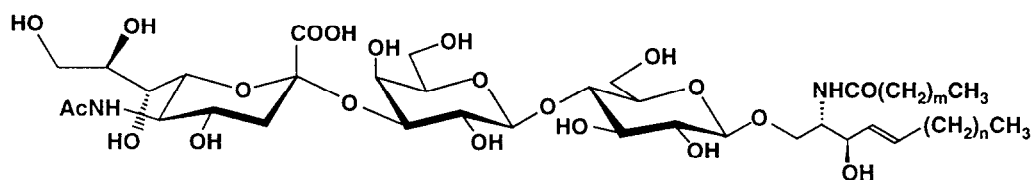
2-2 実験方法

2-2-1 材料

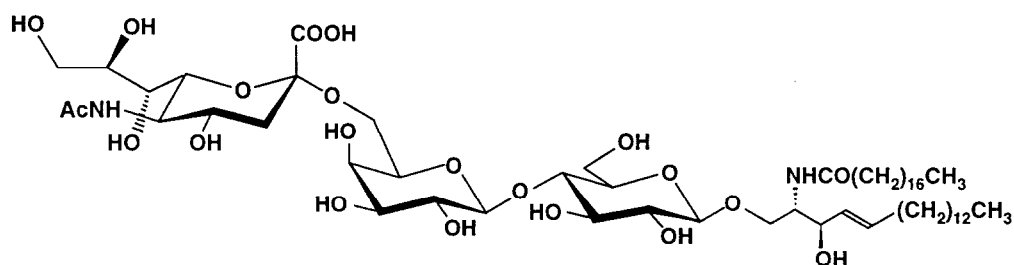
ガングリオシド GM3 (from Bovine Milk, Lot 953221C) および lactosylceramide (LacCer; from Bovine Milk, Lot 926040C, 927050C) は雪印乳業株式会社から、dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC; code C-8080, Lot 70831) は日油リポソーム株式会社からそれぞれ得た。Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC; code P4578)、dipalmitoylphosphatidic acid (DPPA; code P4393)、および dioleoylphosphatidic acid (DOPA; code P2767) は Sigma. Co. Ltd. から購入した。いずれの試薬も更なる精製を行わずに使用した。 $(\alpha 2 \rightarrow 6)$ GM3 は化学合成したものを用いた(2-2-2 参照)。それぞれの脂質の化学構造と略称を図 2-2 に示した。また本研究を通じて用いた天然スフィンゴ糖脂質の脂肪酸および長鎖塩基組成を表 2-1 と表 2-2 にそれぞれ示した¹¹⁾。緩衝液調製用の試薬 (特級) およびスペクトル用溶媒はナカライテスク株式会社から購入した。



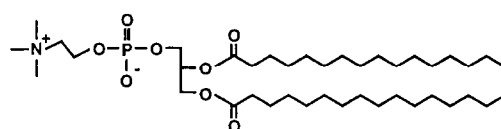
LacCer [Galβ1→4Glcβ1→1'Cer]



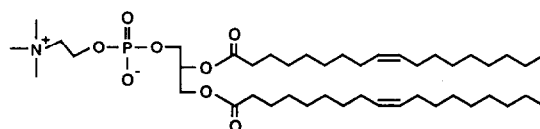
GM3 [NeuAcα2→3Galβ1→4Glcβ1→1'Cer]



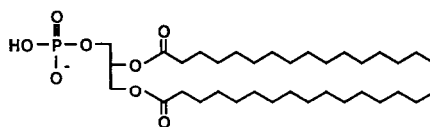
(α2→6)GM3 [NeuAcα2→6Galβ1→4Glcβ1→1'Cer]



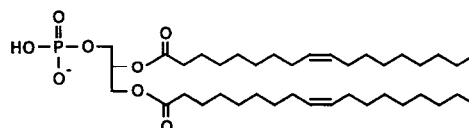
DPPC



DOPC



DPPA



DOPA

図 2-2 本章で用いた脂質の化学構造式および略称

表 2-1 本研究で用いたスフィンゴ糖脂質の脂肪酸組成

Fatty Acid	LacCer	GM3, GD3	GM4	GM1	GlcCer
C 14 : 0	0.4	0.2	n. d.	n. d.	0.1
C 16 : 0	11.6	1.9	1.0	tr.	3.1
C 17 : 0	0.3	tr.	n. d.	n. d.	0.1
C 18 : 0	1.7	0.5	1.1	62.3	1.9
C 18 : 1	0.3	tr.	n. d.	n. d.	0.6
C 20 : 0	1.4	0.8	tr.	28.1	0.7
C 21 : 0	1.1	0.7	n. d.	n. d.	0.5
C 22 : 0	31.1	29.2	tr.	tr.	20.9
C 22 : 1	4.1	4.9	2.6	tr.	1.3
C 23 : 0	22.0	24.3	n. d.	n. d.	16.8
C 23 : 1	2.7	4.0	n. d.	n. d.	1.0
C 24 : 0	15.0	21.5	6.4	1.4	24.2
C 24 : 1	6.1	9.0	15.2	5.3	10.4
C 25 : 0	0.6	1.0	n. d.	n. d.	3.8
C 25 : 1	0.6	1.2	n. d.	n. d.	3.0
C 26 : 0	0.3	0.8	2.1	tr.	3.9
C 26 : 1	n. d.	n. d.	tr.	tr.	n. d.
C 18 : 0 h	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0.6
C 22 : 0 h	0.2	n. d.	2.0	n. d.	1.5
C 22 : 1 h	n. d.	n. d.	8.9	n. d.	n. d.
C 23 : 0 h	0.2	n. d.	n. d.	n. d.	1.9
C 24 : 0 h	0.3	n. d.	32.7	n. d.	3.6
C 24 : 1 h	n. d.	n. d.	24.2	n. d.	n. d.
C 25 : 0 h	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
C 25 : 1 h	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
C 26 : 0 h	n. d.	n. d.	3.0	n. d.	n. d.
C 26 : 1 h	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
total	100.0	100.0	99.2	97.1	100.0

h : α -ヒドロキシ酸 (単位%)

tr : trace

n. d. : not detected

表 2-2 本研究で用いたスフィンゴ糖脂質の長鎖塩基組成

長鎖塩基	LacCer	GM3, GD3	GM4	GM1	GlcCer
d 16 : 0	18.7	17.3	n. d.	n. d.	3.9
d 16 : 1	13.6	13.3	n. d.	n. d.	7.5
d 17 : 0	1.7	1.5	n. d.	n. d.	n. d.
d 17 : 1	4.3	4.0	n. d.	n. d.	4.3
d 18 : 0	11.6	12.0	0.4	0.8	5.0
d 18 : 1	50.1	51.9	99.2	80.4	79.3
d 20 : 0	n. d.	n. d.	n. d.	tr.	n. d.
d 20 : 1	n. d.	n. d.	0.4	18.6	n. d.
total	100.0	100.0	100.0	99.8	100.0

tr : trace (単位%)

n. d. : not detected

2-2-2 ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 の合成

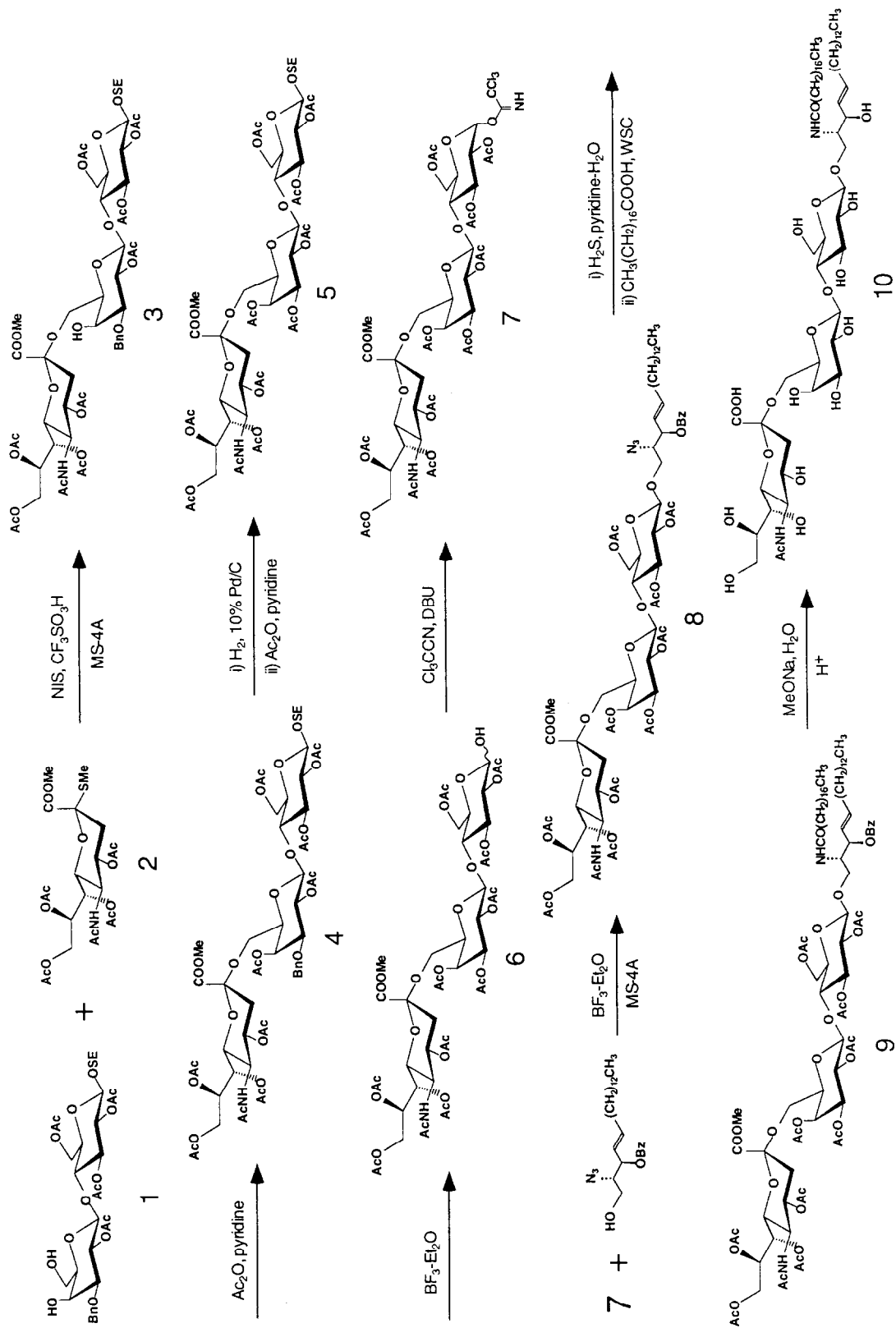
本研究で用いているようなスフィンゴ糖脂質は天然由来のものであり、表 2-1 および 2-2 で示したようにアルキル鎖長が異なる分子の混合物となっている。また試料の供給という面でも現時点では汎用性に乏しい。そこで化学合成によりガングリオシドを合成することでこれらの点を解消する試みが多くなされている¹⁵⁾。化学合成のもう一つの利点は親水部の糖鎖構造が天然には存在しないような誘導体を得ることができるという点であり、これらの誘導体を用いてレクチンやウイルスの糖鎖に対する結合特異性を明らかにしたり、また糖加水分解酵素に対して耐性を持つような誘導体を合成することで酵素阻害剤などの医薬品開発への応用が検討されている¹⁶⁾。本研究ではガングリオシド GM3 の構造異性体である ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 を合成して実験に用いた。

($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 は以下の図 2-3 に示したスキームに従って合成された^{17,18)}。合成操作はダイキン工業株式会社 MEC 研究所の大平 豊 氏と共同で行った。分析には以下の製品または装置を用いた。

TLC(薄層クロマトグラフィー) plate: Merck 5721

¹H-NMR (300 MHz): Gemini 2000 (Varian 製) (東京工業大学生命理工学部生体分子工学科佐藤(史)研究室所有)

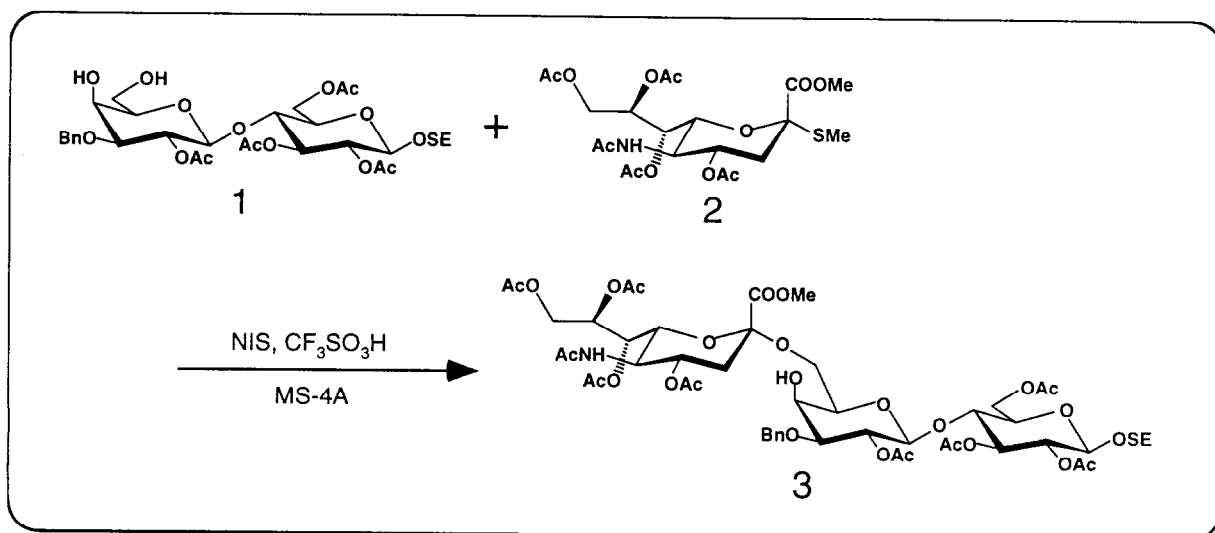
FAB-MASS: Kratos CONCEPT IH high mass spectrometer (Kratos Analytical Instruments 製) (ダイキン工業株式会社 MEC 研究所所有)



(NIS = N-Iodosuccinimide, DBU = 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undecene, WSC = 1-ethyl-3-diisopropylcarbodiimide)

図 2-3 ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 の合成スキーム (文献 17, 18 より)

a) 2-(Trimethylsilyl)ethyl *O*-(methyl 5-acetoamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl- β -*D*-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -*D*-glucopyranoside (3) の合成¹⁸⁾



[操作]

50 ml ナス型フラスコに 2-(trimethylsilyl)ethyl 2,3,6,2'-tetra-*O*-acetyl-3'-*O*-benzyl- β -*D*-lactoside (1) (651 mg, 0.929 mmol) と methyl (methyl 5-acetoamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-2-thio-*D*-glycero- α -*D*-galacto-2-nonulopyranoside)-onate (2) (760 mg, 1.46 mmol) とモレキュラーシーブ 4A (powder, Aldrich, 1.2 g, 使用前に 180 °C で 8 時間真空乾燥して活性化した) を加え、系内をアルゴンで置換した。そこに脱水アセトニトリル (関東化学) を 10 ml 加えてアルゴン雰囲気下室温で一晩攪拌した。反応系を -45 °C としてから *N*-iodosuccinimide (東京化成, 1.3 g, 5.78 mmol) を加え、さらに trifluoromethanesulfonic acid (キシダ化学, 20 μ l, 0.23 mmol) を加えたのち -45 ~ -40 °C で約 2 時間攪拌した。反応液にクロロホルムを加え、セライト (キシダ化学, No.545) 濾過をした。溶液を 5% 炭酸ナトリウム水溶液、チオ硫酸ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した。溶液をエバポレート (40 °C 以下) し、カラムクロマトグラフィー (silica gel Merck 7734, ϕ 50 \times 190 mm, eluent: chloroform \rightarrow chloroform-methanol 100:1 \rightarrow 80:1 \rightarrow 60:1) で精製して粘稠体 (真空ポンプで乾燥後は白色固体) を得た。

収量: 685 mg (0.583 mmol)

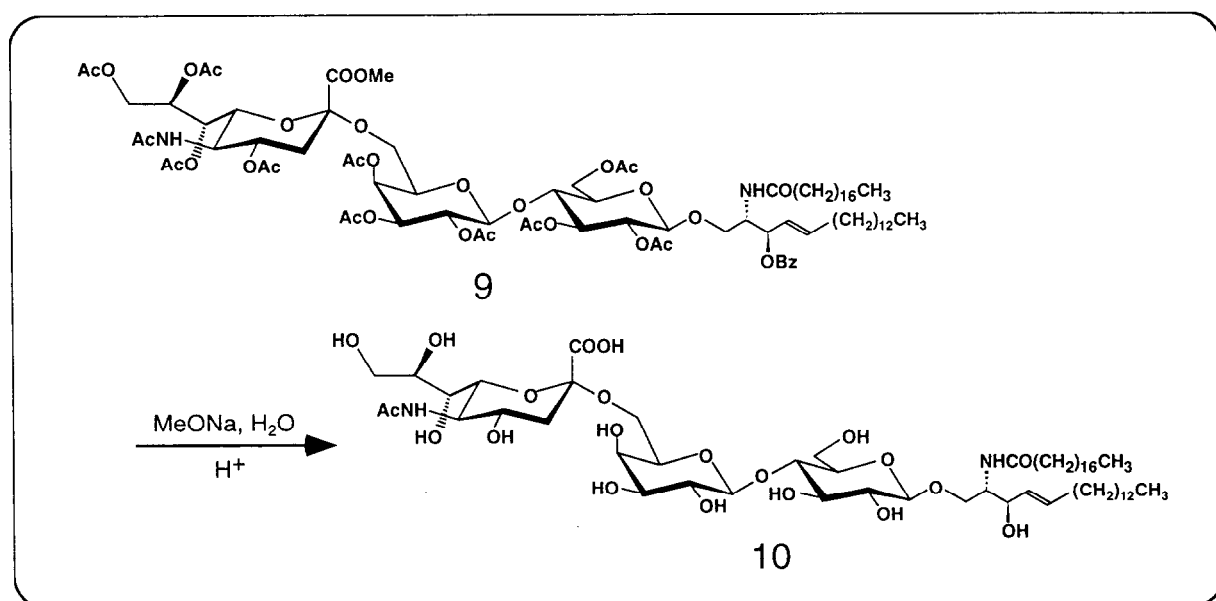
収率: 63%

[分析]

TLC (chloroform / methanol = 20 / 1): R_f = 0.31

¹H-NMR (CDCl₃): NeuAc unit: δ1.9(s, 3H, AcN), 2.6(dd, 1H, H-3eq), 3.8(s, 3H, OMe),
4.0-4.2(m, 3H, H-5,6,9), lactose unit: δ0.9(m, 2H, MeSiCH₂CH₂),
7.28-7.39(m, 5H, Ph), O-Acetyl group: δ2.0-2.3(5), 2.1, 2.15(8s, 24H,
8AcO)

b) *O*-5-acetoamido-3,5-dideoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-2-nonulopyranosylonic acid-(2→6)-*O*- β -*D*-galactopyranosyl-(1→4)-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-(1→1)-(2*S*,3*R*,4*E*)-2-octadecanamide-4-octadecene-1,3-diol (10) の合成¹⁷⁾



[操作]

20 ml なす型フラスコに *O*-(methyl 5-acetoamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylate)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2,3,6-tri- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 1)-(2*S*,3*R*,4*E*)-3-*O*-benzoyl-2-octadecanamide-4-octadecene-1,3-diol (9) を 92 mg (53 μ mol) を入れ、系内をアルゴン置換した。そこに脱水メタノール (関東化学) を 5 ml 加え攪拌した。試料が溶解したのち MeONa (Aldrich) を約 20 mg 加え、室温下一晩攪拌した。TLC 分析により原料のピークの消失を確認後、水を 0.5 ml 添加し、密栓したのち一晩攪拌した。TLC 分析後、反応溶液をアンバーライト IR-120B(H) のカラムに通して(溶出液: メタノール)イオン交換した。アンバーライトは $\phi 20 \times 100$ mm 程度のカラムとした。あらかじめ水、次いでメタノールで洗浄した(始めのうちは樹脂の色が出た)。前処理した樹脂はすぐに使用した。回収したフラクションをエバポレートし、残渣の一部を少量のメタノールに溶解して Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech) カラムにより精製した。Sephadex LH-20 は約 30 g 用い、あらかじめメタノールで一晩膨潤させておいてからカラムに充填し、使用前にもメタノールでしばらく洗浄した。目的物のフラクションを回収し、エバポレート、真空乾燥することで白色固体を得た。

収量: 27.4 mg (23 μ mol)

収率: 43%

[分析]

TLC (n-BuOH / AcOH / H₂O = 2 / 1 / 1): R_f = 0.57

第2章

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OD} = 1 / 1$): δ 0.9(t, 6H, 2MeCH₂), 1.3(s, 50H, 25CH₂), 2.0(s, 3H, AcN), 2.8(b, 1H, NeuAc H-3eq), 5.45(b, 1H, Sphingosine H-4), 5.7(b, 1H, Sphingosine H-5)

FAB-MASS: 分子式 $\text{M} = \text{C}_{59}\text{H}_{108}\text{N}_2\text{O}_{21}$

理論値 $\text{MH}^+ = 1181.75228(53.3\%),$

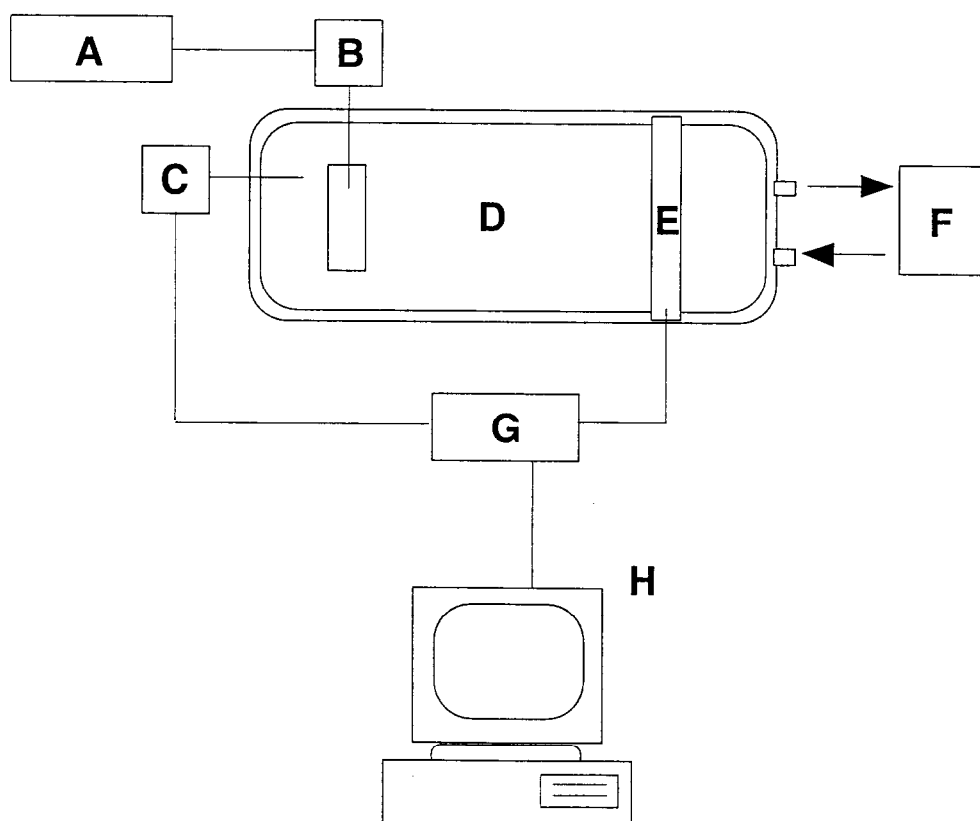
1182.75564(35.3%),

1183.75899(11.5%)

測定値 $\text{MH}^+ = 1181.75099$

2-2-3 気-水界面での脂質単分子膜の作製

脂質単分子膜の表面圧-面積 (π -A) 等温線の測定は、ラングミュア型トラフ (USI 社製) および PC-9801 (NEC 社製) で制御された FILM BALANCE CONTROLLER FSD-110 (USI 社製) を用いたシステムで行った。トラフおよび圧縮バリアはテフロン製であり、トラフの水層面積は $190 \times 100 \text{ mm}^2$ である。下層水としては Milli-Q システム (MILLIPORE 社製) で精製、脱イオン化した超純水(比抵抗 $18 \text{ M}\Omega$ 以上) および 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) あるいは PBS(phosphate-buffered saline) (pH 7.4) を用いた。下層水の温度は、水循環式恒温槽 CCM-2 (池田理化社製) で $20 \text{ }^\circ\text{C}$ に制御した。図 2-4 にシステムの模式図を示した。



- A)** リフトコントローラー, **B)** リフト, **C)** 圧力センサー,
D) トラフ (水槽), **E)** 圧縮用バリア, **F)** 循環式恒温槽,
G) フィルムバランスおよびバリアコントローラー,
H) ホストコンピューター

図 2-4 単分子膜作成システムの模式図

π -A 等温線の測定方法は以下の通りである。FSD-110 システムを等速圧縮モードである π -A モードに設定し、種々の割合で混合した脂質のクロロホルム/エタノール = 4/1 (v/v, いずれもスペクトル用溶媒) 溶液の所定量をマイクロシリンジを用いて静かに水面上に展開した。10 分以上の乾燥の後、 $1000 \text{ mm}^2 \text{ min}^{-1}$ のバリア速度で脂質単分子膜を圧縮した。ろ紙製のウィルヘルミプレートを用いて圧縮に伴う表面圧の変化を PC-9801 に取り込み、 π -A 等温線を描いた(図 2-1 参照)。

2-2-4 表面圧-面積曲線の解析方法

測定により得られた π -A 等温線を以下に示す方法で解析し、スフィンゴ糖脂質とマトリックス脂質との単分子膜中での混合状態について評価を行った。一般に二つの膜成分が単分子膜中で相互作用せずに均一に混ざり合った場合の平均分子占有面積 (A_{ideal})⁹⁾ および単分子膜の崩壊圧 (π_c)¹⁹⁾ は以下の式で表すことができる。

$$A_{\text{ideal}} = x_1 A_1 + x_2 A_2 \quad (\text{式 2-1})$$

$$\pi_c = \frac{x_1 A_{c1} \pi_{c1} + x_2 A_{c2} \pi_{c2}}{x_1 A_{c1} + x_2 A_{c2}} \quad (\text{式 2-2})$$

ここで x_n : 成分 n のモル分率 ($x_1 + x_2 = 1$)、 A_n : 成分 n の単独膜の分子占有面積、

A_{cn} : 成分 n の単独膜の崩壊時の分子占有面積、 π_{cn} : 成分 n の単独膜の崩壊圧

表面圧 10, 20, 30, 40 mN m^{-1} でのそれぞれの混合単分子膜の脂質一分子あたりの平均分子占有面積および単分子膜の崩壊圧の値を読みとり、混合単分子膜中のスフィンゴ糖脂質含量に対してプロットした。崩壊圧の値は、膜の崩壊後そのままプラトー領域が観察された膜についてはその値を、崩壊後表面圧の減少が見られた場合には最大の表面圧となった点を、それ以外の膜では膜の崩壊後表面圧が直線的に上昇していく直前の変曲

点の値を用いた。

それぞれの混合膜について理想混合した場合に予想される結果との比較から単分子膜中でのスフィンゴ糖脂質とマトリックス脂質との相互作用やスフィンゴ糖脂質の存在状態について評価を行った。

2-2-5 ブリュースター角顕微鏡(BAM) 観察

ブリュースター角顕微鏡(BAM) は、1991年にフランスの Henon と Meunier のグループ²⁰⁾とドイツの Hönig と Möbius の2つのグループ²¹⁾がほぼ同時にそれぞれ独立に開発を報告した装置である。原理は水面上の単分子膜中に相状態の違いや混合単分子膜の相分離などによってドメイン構造が存在したとき、そのドメイン間での p 偏光の反射率の違いを検出するというものであり、水面上の単分子膜の形態を観察する装置として有用であると注目されている^{1,22)}。

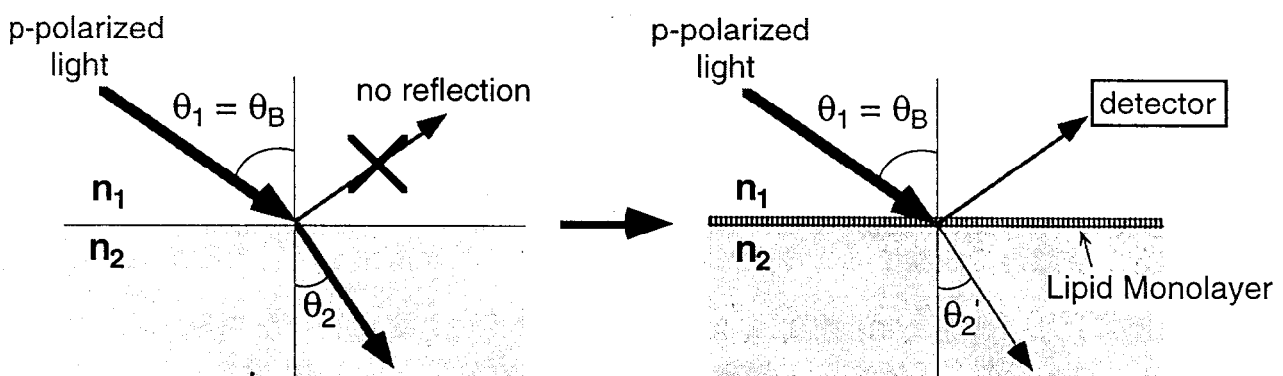


図 2-5 ブリュースター角顕微鏡(BAM) の原理

一般に透明な媒質 1 (屈折率 n_1) からそれと平面で接する透明な媒質 2 (屈折率 n_2) に光が入射する場合(図 2-5)、入射角を θ_1 、屈折角を θ_2 とすると、s 偏光、p 偏光(振動ベクトルがそれぞれ入射面に対して垂直、平行な直線偏光)の振幅反射率(γ_s, γ_p)は Fresnel の法則より次式で与えられる。

$$\gamma_s = \frac{\sin(\theta_1 - \theta_2)}{\sin(\theta_1 + \theta_2)}, \quad \gamma_p = \frac{\tan(\theta_1 - \theta_2)}{\tan(\theta_1 + \theta_2)} \quad (\text{式 2-3})$$

このとき相対的な反射強度(エネルギー反射率)はそれぞれ γ_s^2, γ_p^2 で与えられる。これらの式から p 偏光ではある入射角度で反射強度が 0 になることがわかる。これをブリュースター(Brewster)角(θ_B)という ($\theta_B + \theta_2 = \pi/2$)。さらに Snell の法則

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (\text{式 2-4})$$

よりブリュースター角においては次式が成立する。

$$\tan \theta_B = \frac{n_2}{n_1} \quad (\text{式 2-5})$$

たとえば二つの媒質が空気 ($n_1 = 1.00028$) と水 ($n_2 = 1.3320$) の場合、 $\theta_B = 53.1^\circ$ となる。図 2-6 に空気-水界面での γ_s^2, γ_p^2 それぞれの計算値を示した²²⁾。図の挿入図からもわかるように θ_B 近傍での p 偏光の反射強度率の入射角依存性は大きい。したがってあらかじめ入射角をブリュースター角にしておけば、水面に単分子膜が形成されたときにはブリュースター角の条件が破れるため p 偏光の反射強度が 0 以上になり、CCD カメラを備えた顕微鏡で観察することができる。単分子膜が p 偏光を反射する理由としては 1) 膜の厚みにより界面での屈折率変化領域が増大することで理想的な Fresnel 境界からのずれが大きくなること、2) 膜の屈折率が空気や水のものより大きいこと、3) 膜の屈折率異方性による効果、などが挙げられる。したがって 2 つの脂質の厚さが異なるような相分離構造や液体膨張膜中の液体凝縮膜のドメインなど、膜の厚さに差がある場合は 1) の理由でドメイン構造が観察されると期待される。原理的には 0.1 ~ 0.2 nm の膜厚の差を検出できる。

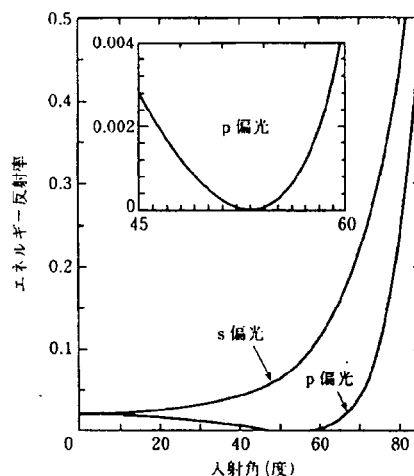
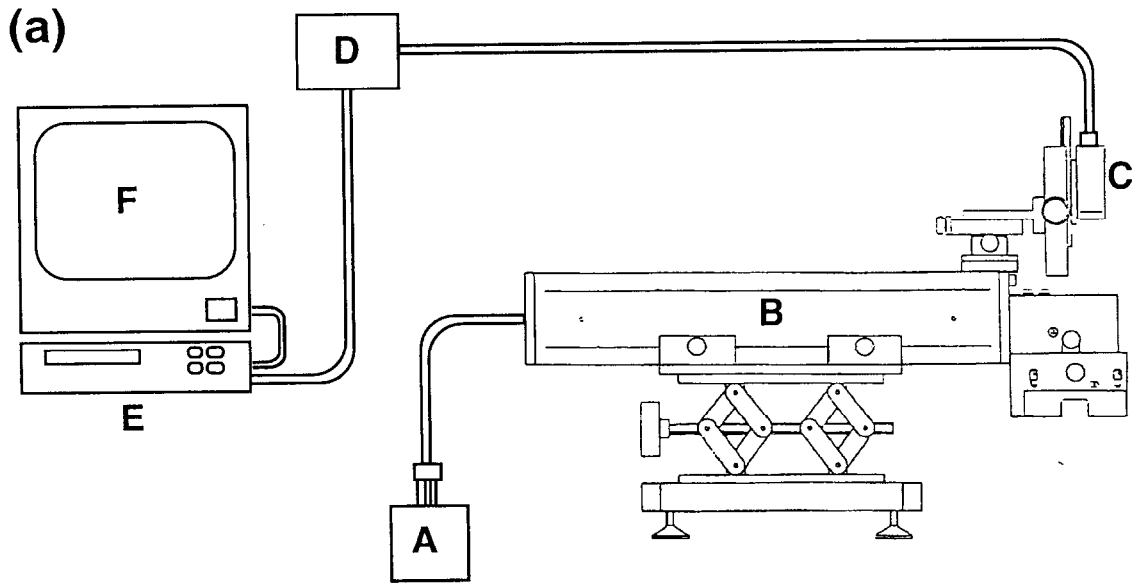


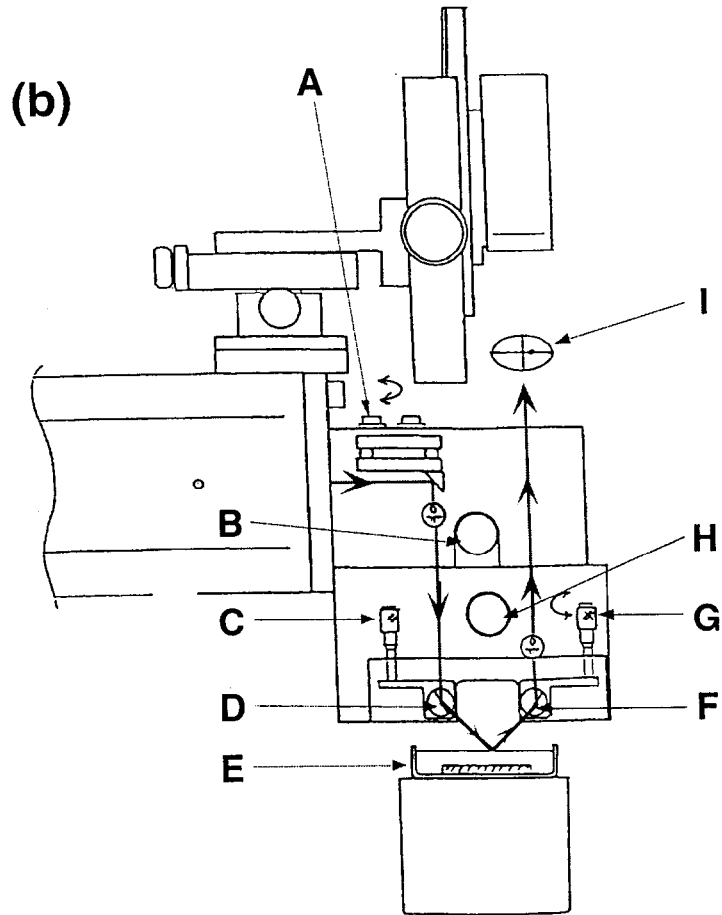
図1・9 p 偏光およびs 偏光の反射強度の入射角度依存性 ($n_1 = 1.00028$ (空気), $n_2 = 1.3320$ (水))

図2-6 空気-水界面でのエネルギー反射率 γ_s^2 , γ_p^2 の計算値
(文献22より引用)

BAM 像の観察は東京工業大学資源化学研究所市村・関研究室所有の超薄膜構造解析装置 NL-LB / EMM-001 (日本レーザー電子株式会社) を用いて行った。装置の概略図を図2-7 に示した。トラフとしてはガラスシャーレ(56.75 cm²) を octadecyltrichlorosilane で疎水化したものを用い、ろ紙製のウィルヘルミプレートによる圧力センサーで表面圧を測定しながら脂質溶液を少しずつ水面に展開することで所定の表面圧の単分子膜を作成した。下層水には超純水を用い、測定は室温で行った。BAM 像は CCD カメラを備えた顕微鏡の像をディスプレイに画像化し、ビデオプリンターにより出力した。実際には p 偏光だけでは像が暗すぎる場合が多かったので偏光子を調節して若干 s 偏光を加えることで明るめの像を得るようにした。



(A) レーザー電源, (B) レーザー, (C) CCD カメラ,
(D) CCD カメラ用電源, (E) ビデオプリンタ, (F) モニタ



(A) 落射調節ネジ, (B) 投光偏光子, (C) 投光角調整ネジ,
(D) 投光ミラー, (E) トラフ(シャーレ), (F) 受光ミラー,
(G) 受光角調整ネジ, (H) 受光偏光子, (I) 位置調整レンズ

図 2-7 BAM 測定に用いたシステムの概略図

(a) 装置全体 (b) 検出部

2-3 結果および考察

2-3-1 スフィンゴ糖脂質の表面圧-面積等温線

図 2-8 に本章で用いたスフィンゴ糖脂質の下層水を超純水としたときの π -A 等温線を示した。LacCer 単分子膜は膜の圧縮に伴って分子占有面積が 0.8 nm^2 付近から表面圧の上昇がみられ、分子占有面積が 0.4 nm^2 に近づいたところで急激な表面圧の上昇がみられた。 0.4 nm^2 という分子占有面積の値は脂質が界面に対して垂直にパッキングした場合のアルキル鎖部分の断面積に相当する。したがって表面圧 30 mN m^{-1} においては LacCer 単分子膜は凝縮した膜構造を形成することがわかった。これに対して GM3 および $(\alpha 2 \rightarrow 6)\text{GM3}$ の π -A 等温線は膜の圧縮に伴い LacCer よりも分子占有面積の大きな領域から表面圧の上昇がみられ、途中変曲点が存在、すなわち単分子膜中で相転移が起こった後により急な表面圧の上昇を示した。したがってこれらの脂質も凝縮相に近い膜構造をとることが示唆された。しかしながら凝縮相の分子占有面積においてもその値は LacCer に比べて大きくなった。これは GM3 および $(\alpha 2 \rightarrow 6)\text{GM3}$ では親水部の糖鎖の構造が LacCer よりもかさ高いため、単分子膜を圧縮した際には疎水部の断面積よりも親水部の断面積の方が大きくなっているためであると考えられた。また GM3 や $(\alpha 2 \rightarrow 6)\text{GM3}$ はこれらは糖鎖中にシアル酸を含んでいる。シアル酸の pKa は高く見積もっても 4 程度であり²³⁾、超純水(pH 5.8) 中では膜の圧縮過程において分子間での静電反発が生じて全体を通して LacCer より膨張した π -A 等温線となった可能性も考えられた。単分子膜の特性を評価するもう一つの指標として単分子膜の崩壊圧がある。ここで用いたスフィンゴ糖脂質の単分子膜はすべて崩壊圧は約 60 mN m^{-1} 以上となり、水の表面張力が 72.76 mN m^{-1} ($20 \text{ }^\circ\text{C}$)^{3,4)} であることを考えても非常に安定な単分子膜を形成することがわかった。GM3 と $(\alpha 2 \rightarrow 6)\text{GM3}$ を比較した場合、 $(\alpha 2 \rightarrow 6)\text{GM3}$ の方がより凝縮した膜構造をとり、崩壊圧も高くなっていることがわかる。これはシアル酸の結合位置の違

いによる親水部のかさ高さの違いおよび GM3 の方ではアルキル鎖部分が混合物である (表 2-1 および 2-2) ことによる効果であると考えられた。

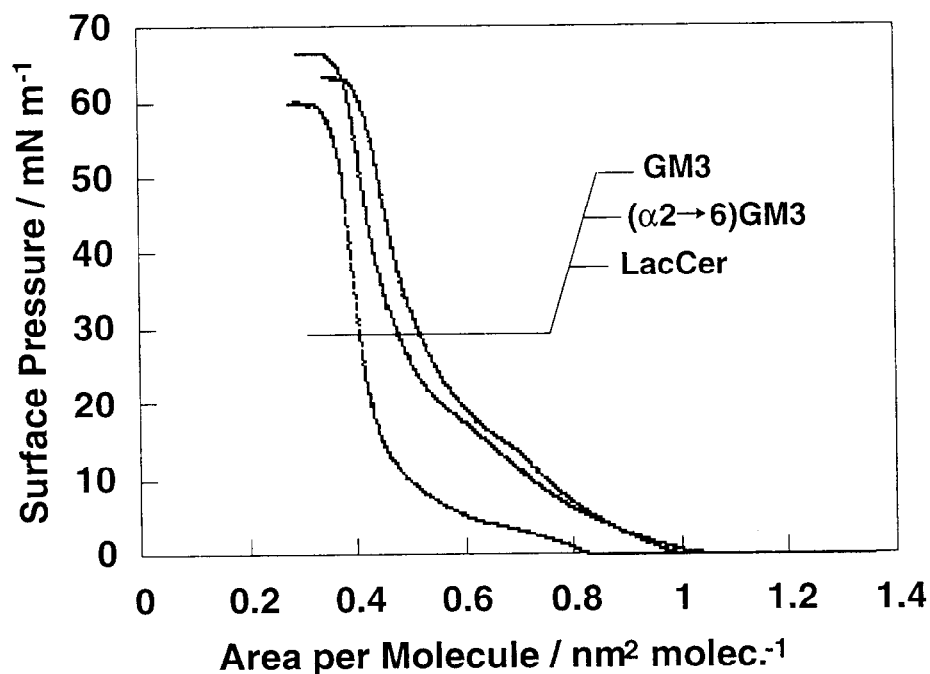


図 2-8 本章で用いたスフィンゴ糖脂質の π -A 等温線
(下層水: 超純水, 圧縮速度 $1000 \text{ mm}^2 \text{ min}^{-1}$, 20°C)

次に下層水を緩衝液としてこれらスフィンゴ糖脂質の π -A 等温線を測定した。超純水を用いた場合との比較を図 2-9 に示した。LacCer は下層水を緩衝液にすることによりわずかに分子占有面積が増加した。これに対して GM3 および $(\alpha 2 \rightarrow 6)\text{GM3}$ では下層水を超純水から緩衝液にすることで大きな π -A 曲線の膨張と崩壊圧のわずかな低下がみられた。先に述べたように下層水を緩衝液とすることで分子間の静電反発が緩和されることが予想されたが、得られた結果から GM3 および $(\alpha 2 \rightarrow 6)\text{GM3}$ では親水部の糖鎖、特にシアル酸と緩衝液成分との相互作用によって単分子膜が膨張したものと考えられた。なおこれらの結果は過去の Serizawa¹¹⁾ や Maggio⁶⁾ らの報告と比較しても妥当なものであった。

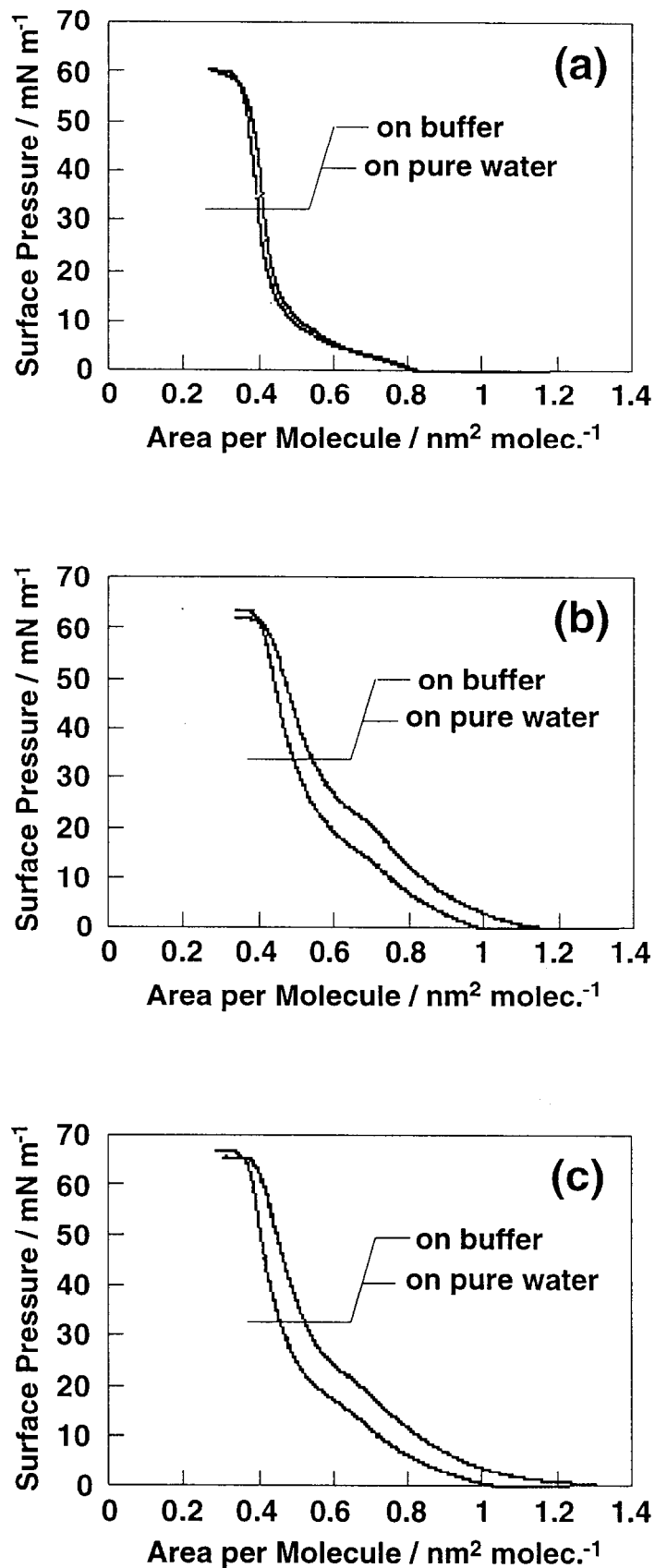


図 2-9 下層水を超純水および緩衝液((a) 10 mM phosphate buffer (pH 7.2), (b)(c) PBS (pH 7.4)) としたときのそれぞれのスフィンゴ糖脂質の π -A 等温線 (a) LacCer, (b) GM3, (c) (α 2 \rightarrow 6)GM3 単分子膜 (圧縮速度 1000 mm² min⁻¹, 20 °C)

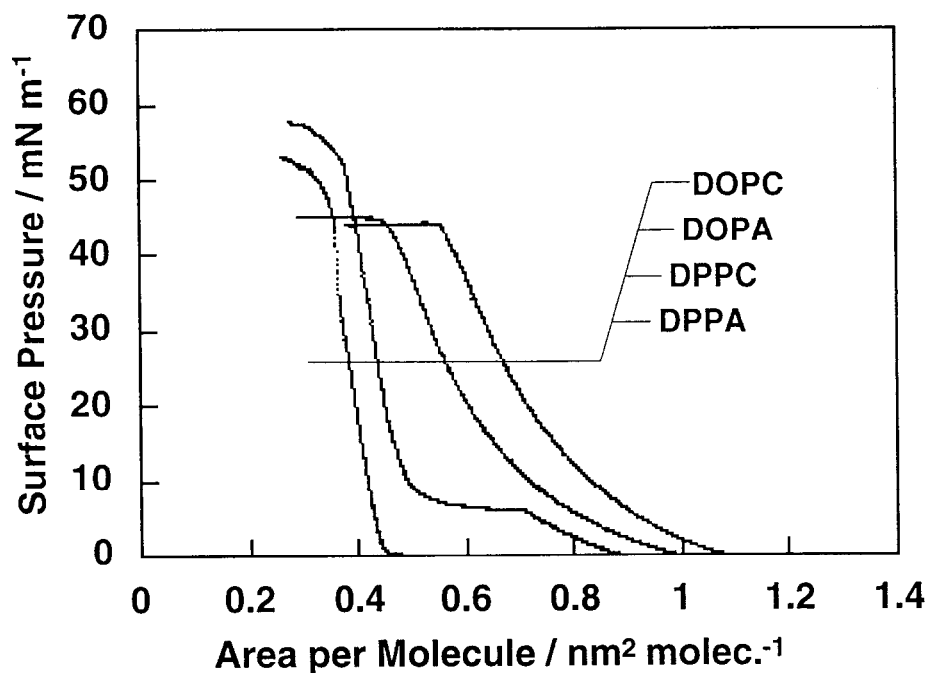


図 2-10 本章で用いたマトリックス脂質の π -A 等温線
(下層水: PBS (pH 7.4), 圧縮速度 $1000 \text{ nm}^2 \text{ min}^{-1}$, 20°C)

図 2-10 には本章で用いたマトリックス脂質単独膜の π -A 曲線を示した。飽和アシル鎖を持つ DPPC と DPPA は凝縮した膜構造をとるのに対し、アシル鎖中に不飽和結合を持つ DOPC と DOPA は膨張膜となり、崩壊圧の低下がみられた。また同じアシル鎖構造を持つ脂質同士で比較した場合、親水部の効果としてホスファチジルコリンを持つ脂質の方がホスファチジン酸を持つ脂質よりも膨張した膜構造となり、親水部の大きさを反映した結果となった。

以上の結果から スフィンゴ糖脂質と飽和アシル鎖を持つリン脂質とはともに凝縮した膜構造をとるのに対して不飽和アシル鎖を持つリン脂質は膨張した膜構造をとることが示された。したがって飽和アシル鎖を持つリン脂質中と不飽和アシル鎖を持つリン脂質中とは他の脂質分子、たとえばスフィンゴ糖脂質との相溶性が異なることが予想され、それらの単分子膜中での存在状態が異なる可能性が示唆された。

2-3-2 LacCer / リン脂質混合単分子膜

まず用いたスフィンゴ糖脂質の中で糖鎖の構造が最も単純な LacCer について検討を行った。図 2-11 に LacCer と DOPC および DPPC との混合単分子膜の π -A 等温線を単分子膜中の LacCer のモル分率を変化させて測定した結果を示した。LacCer / DOPC 混合単分子膜の π -A 等温線は、膜中の LacCer 含量が増加していくにつれてより凝縮した膜構造へと変化していくことがわかった。これに対して LacCer / DPPC 混合単分子膜の π -A 等温線は、元々両方の脂質とも凝縮した膜構造をとるために、単分子膜中の LacCer 含量の変化による π -A 曲線の形状の変化は小さかった。

図 2-12 には表面圧 10, 20, 30, 40 mN m^{-1} における平均分子占有面積の LacCer 含量依存性を示した。LacCer とマトリックス脂質が相互作用せずに混合した場合には平均分子占有面積は式 (2-1) よりそれぞれの膜成分単独での値を結んだ直線上に表される(表面圧 30 mN m^{-1} について点線で示した)⁹⁾。LacCer / DOPC 膜では、特に LacCer 含量が低い領域において理論値からのずれが見られ、LacCer と DOPC が相互作用して単分子膜を膨張させる傾向にあることが示唆された。これに対して LacCer / DPPC 膜では平均分子占有面積はほぼ理論値に近いものとなった。

図 2-13 には混合単分子膜の崩壊圧の LacCer 含量依存性を示した。2つの膜成分が相互作用せずに均一に混合した場合、崩壊圧の理論値は式 (2-2) で与えられる¹⁹⁾。この値を図中に点線で示した。LacCer / DOPC 混合膜では得られた崩壊圧の値はこの理論値から大きく外れていた。さらにその値は DOPC 単独膜の値とほぼ等しかった。この結果は LacCer / DOPC 混合膜では単分子膜中で LacCer と DOPC が相分離していることを意味している。すなわち LacCer / DOPC 混合膜では相分離によって生じた崩壊圧のより低い成分である DOPC のドメインから単分子膜の崩壊が始まっている。相分離は LacCer 含量が 80 mol% という高濃度においてまで観察された。

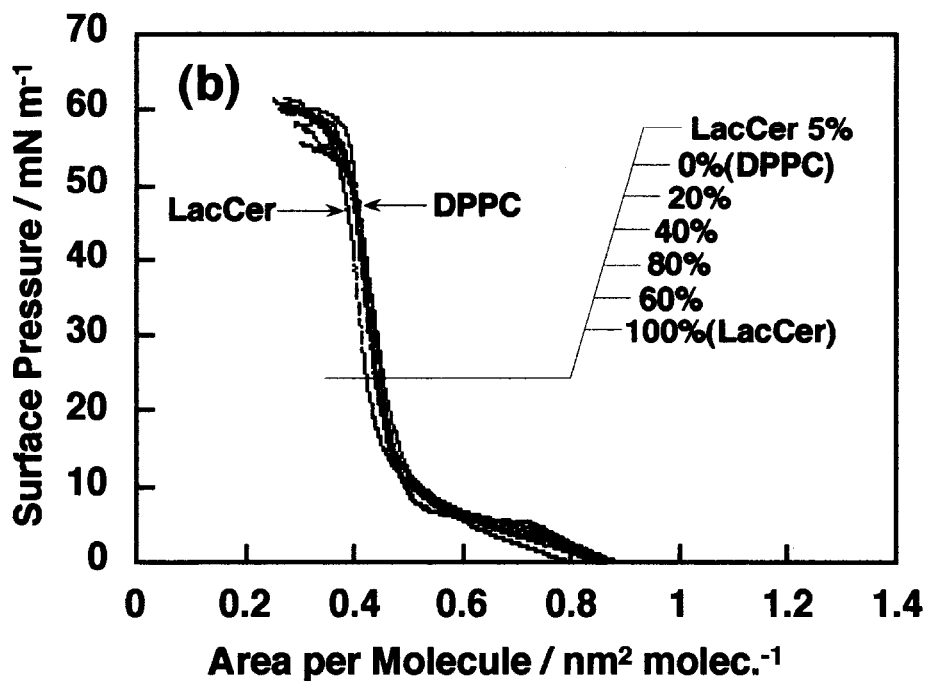
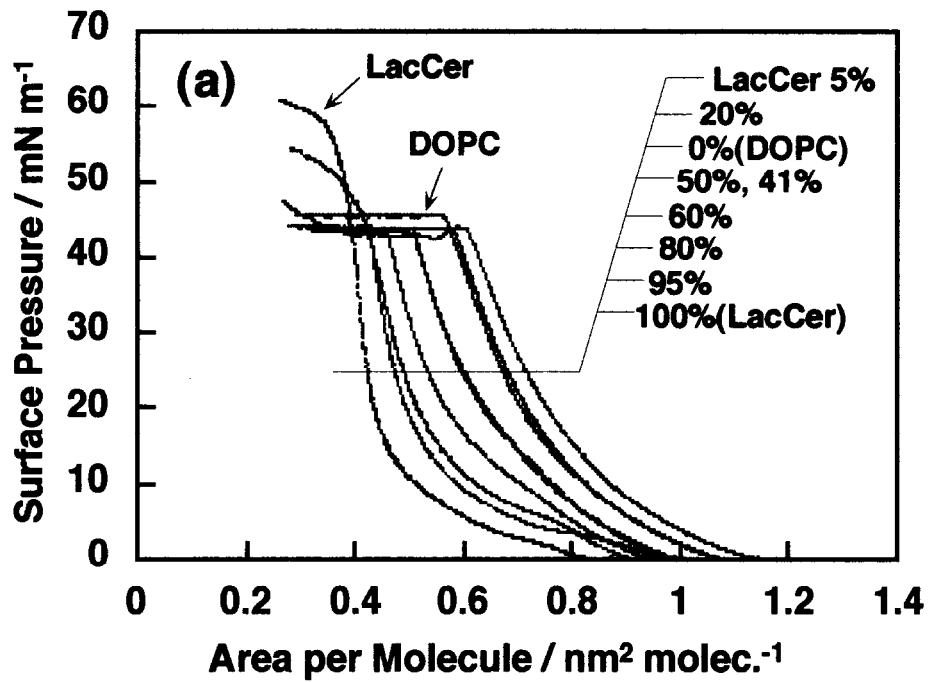


図 2-11 (a) LacCer / DOPC および (b) LacCer / DPPC 混合単分子膜の π -A 等温線
(下層水: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2), 圧縮速度 $1000 \text{ mm}^2 \text{ min}^{-1}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$)

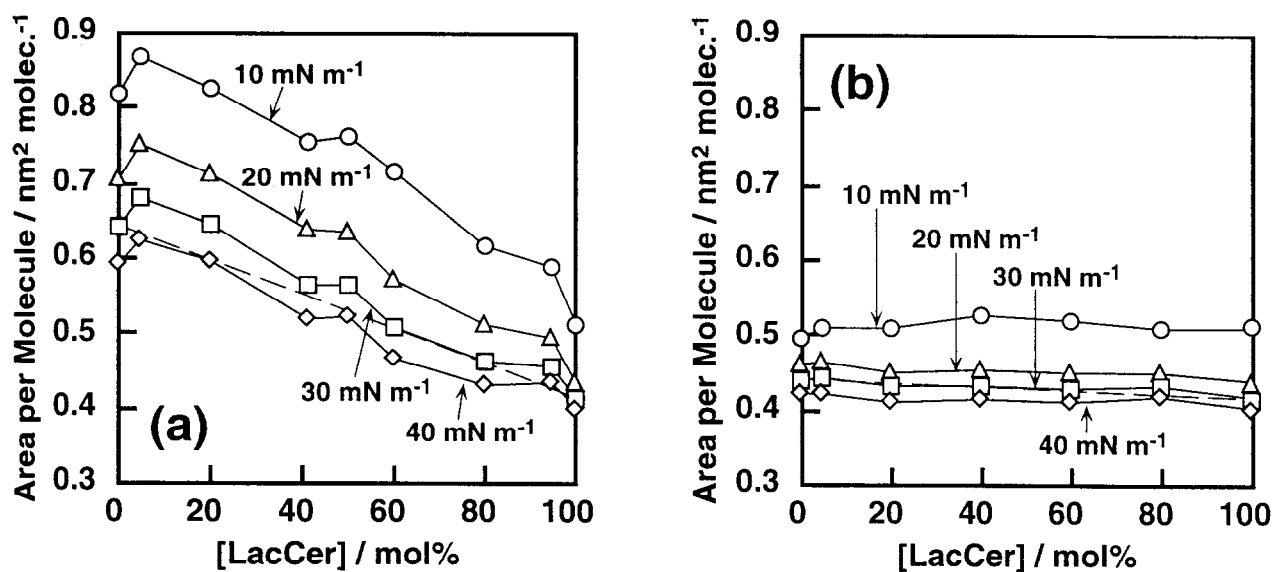


図 2-12 (a) LacCer / DOPC および (b) LacCer / DPPC 混合単分子膜の平均分子占有面積の LacCer 含量依存性 (条件は図 2-11 に同じ)
理想的に混合した場合の平均分子占有面積を点線で示した(30 mN m⁻¹)

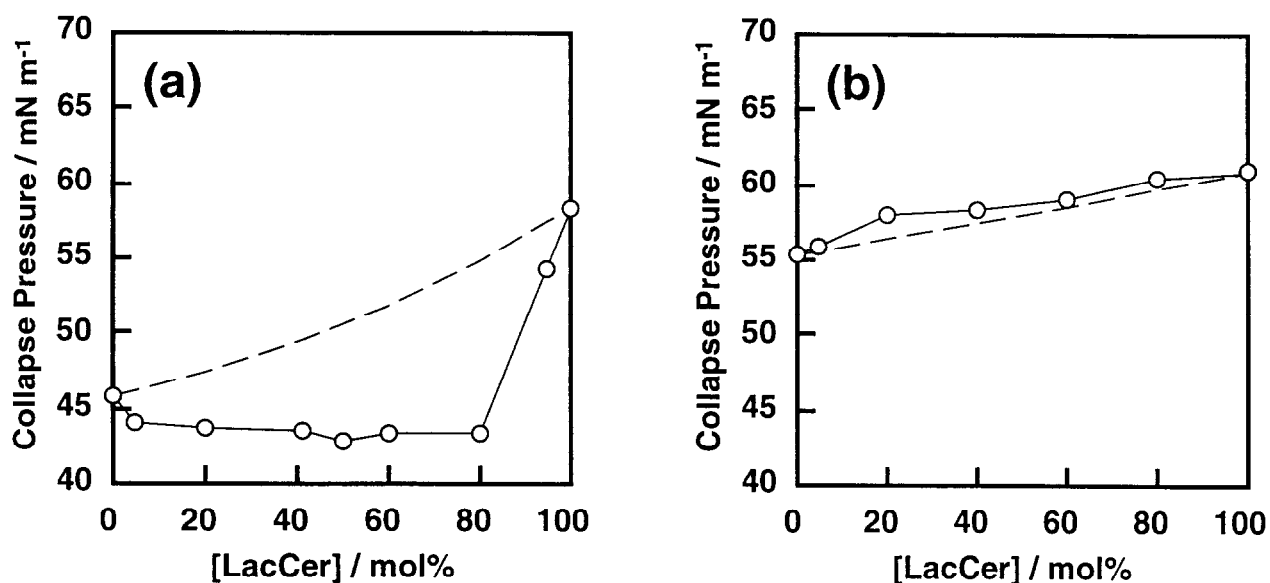


図 2-13 (a) LacCer / DOPC および (b) LacCer / DPPC 混合単分子膜の崩壊圧の LacCer 含量依存性 (条件は図 2-11 に同じ)
理想的に混合した場合の崩壊圧を点線で示した

単分子膜中で相分離が起こっていれば2つの膜成分は相互作用しないはずである。しかしながら図 2-12 より LacCer と DOPC との相互作用が示唆されている。これは相分離して形成された LacCer のドメインと DOPC マトリックスとの境界部での相互作用を反映したものかもしれない。相互作用の程度が両脂質の混合比が 1:1 で極大とならないこともそのことを暗示しているのかもしれない。一方 LacCer / DPPC 混合膜では崩壊圧はほぼ理論値に近いものとなり、図 2-12 の結果をふまえると LacCer と DPPC とは単分子膜中で相互作用せずに均一に混合していることがわかった。このようにスフィンゴ糖脂質 LacCer はマトリックス脂質の種類を変えることで単分子膜中の存在状態が変化し、不飽和アシル鎖を持つ DOPC 中では相分離して LacCer のドメインを形成することが明らかとなった。

2-3-3 GM3 / リン脂質混合単分子膜

次にスフィンゴ糖脂質としてガングリオシド GM3 を用いてリン脂質膜中での存在状態について評価を行った。2-3-2 で用いた LacCer と構造上大きく異なる点は親水部の糖残基の数が1つ多いこととその増えた糖(シアル酸)が負電荷を持つことである。これにより LacCer の場合とは結果が異なる可能性が考えられた。またマトリックス脂質の親水部についてもホスファチジルコリンとホスファチジン酸という2つの構造を用いてその影響について検討した。GM3 とそれぞれのリン脂質との混合単分子膜の π -A 等温線を図 2-14 および図 2-15 に示した。また平均分子占有面積および崩壊圧の GM3 含量依存性を図 2-16 と 2-17 にそれぞれ示した。

GM3/DOPC 混合単分子膜においては、平均分子占有面積の結果では GM3 と DOPC との相互作用が観察されたものの、崩壊圧の値は相分離が起きていることを示していた。しかし LacCer/DOPC 膜の場合では糖脂質含量が 80 mol% においても相分離が観察されたのに対し(図 2-13)、GM3/DOPC 膜では GM3 含量が 60 mol% 付近では既に崩壊圧の値が DOPC 単独膜の値よりも大きくなっており、相分離が観察される糖脂質含量の閾値に違いがみられた。

一方 GM3/DPPC 混合単分子膜では平均分子占有面積の結果から GM3 と DPPC は膜中ではほぼ 1:1 で強く相互作用することがわかり、また分子の混合状態は崩壊圧の結果からほぼ理想混合に近いことがわかった。Maggio らは GD1a や GT1b などのガングリオシドとレシチンの混合単分子膜においては、ガングリオシドの糖鎖とレシチン中のホスホコリン基とが相互作用することにより混合自由エネルギーを低下させ、分子占有面積を減少させることを示している^{9a)}。これは分子モデリングの結果からオリゴ糖鎖とホスホコリン基の構造がちょうどまくパッキングするような組み合わせであること、さらに糖鎖中のシアル酸とコリン残基とが静電的に相互作用することによるためであると考えられている^{9b)}。Serizawa によってもこれと同じ現象が GM3/スフィンゴミエリン混合単分子膜において観察されている¹¹⁾。GM3/DPPC 混合単分子膜の結果はこれらの知見とよく対応したものとなった。相分離が観察された GM3/DOPC 混合単分子膜における分子占有面積の減少も、単分子膜中で GM3 のドメインと DOPC の境界部とでこのような適合が起こっていることを反映した結果かもしれない。

次にマトリックスとなるリン脂質の親水部の効果について検討した。DOPC および DPPC では親水部は双性イオンであるホスホコリン基であり、上述のように 4 級化されたコリン基が GM3 中のシアル酸と静電的に相互作用していることが示唆された。そこでリン脂質の親水部を負電荷を持つホスファチジン酸に変えることにより、GM3 とマトリックス脂質との相互作用や混合状態がホスホコリン基を持つリン脂質との場合とは異なることが期待された。

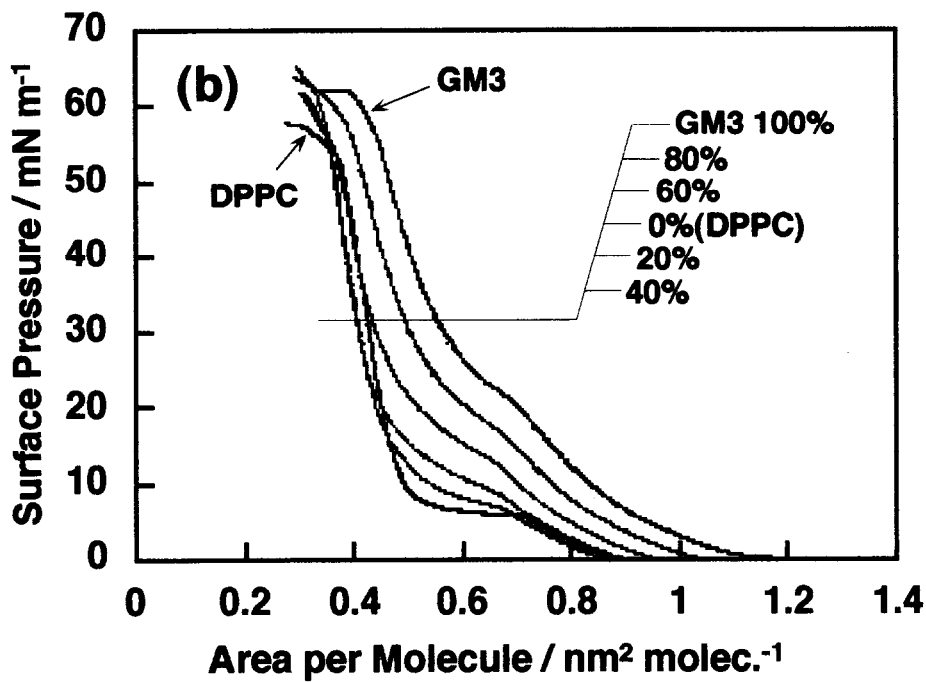
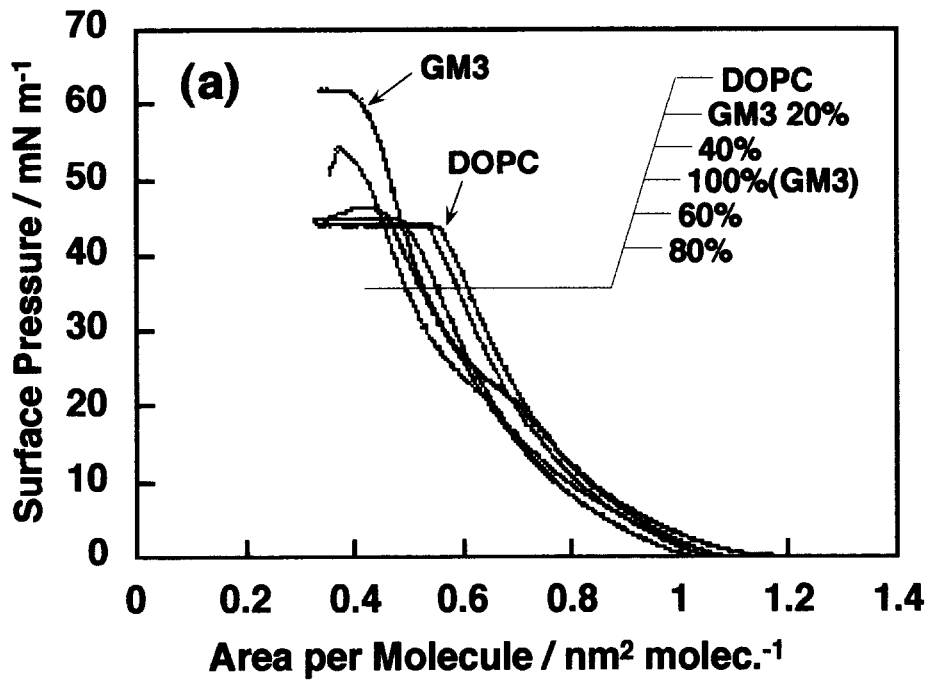


図 2-14 (a) GM3 / DOPC および (b) GM3 / DPPC 混合単分子膜の π -A 等温線
(下層水: PBS (pH 7.4), 圧縮速度 $1000 \text{ mm}^2 \text{ min}^{-1}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$)

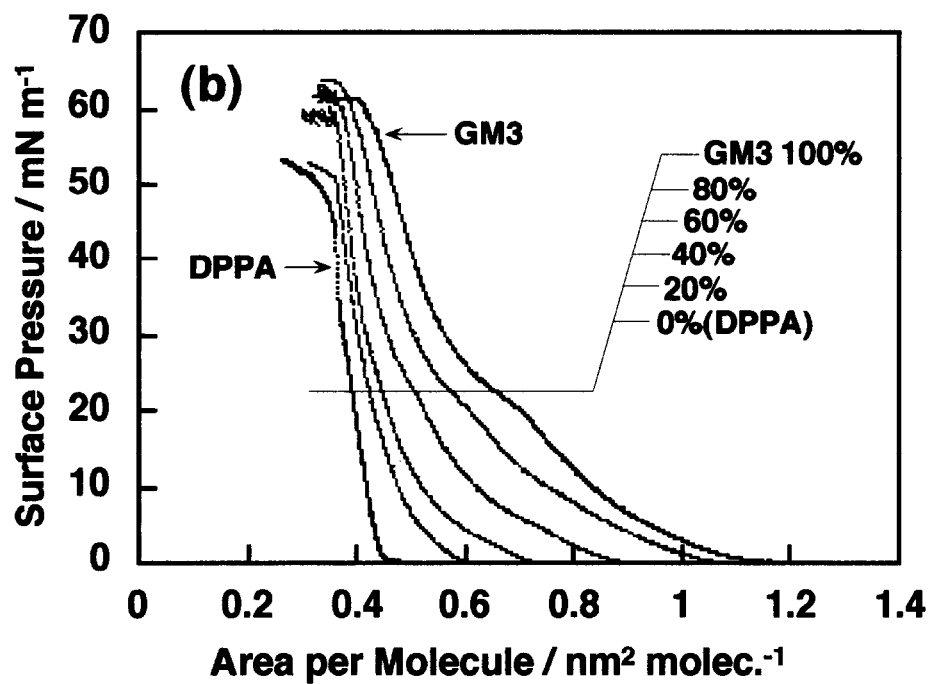
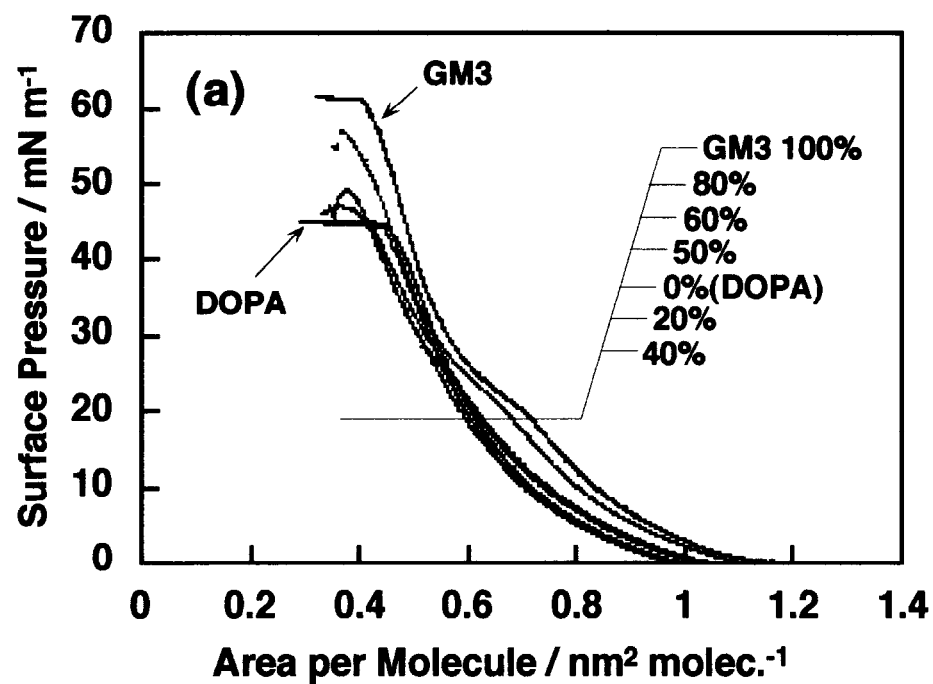


図 2-15 (a) GM3 / DOPA および (b) GM3 / DPPA 混合単分子膜の π -A 等温線
(条件は図 2-14 に同じ)

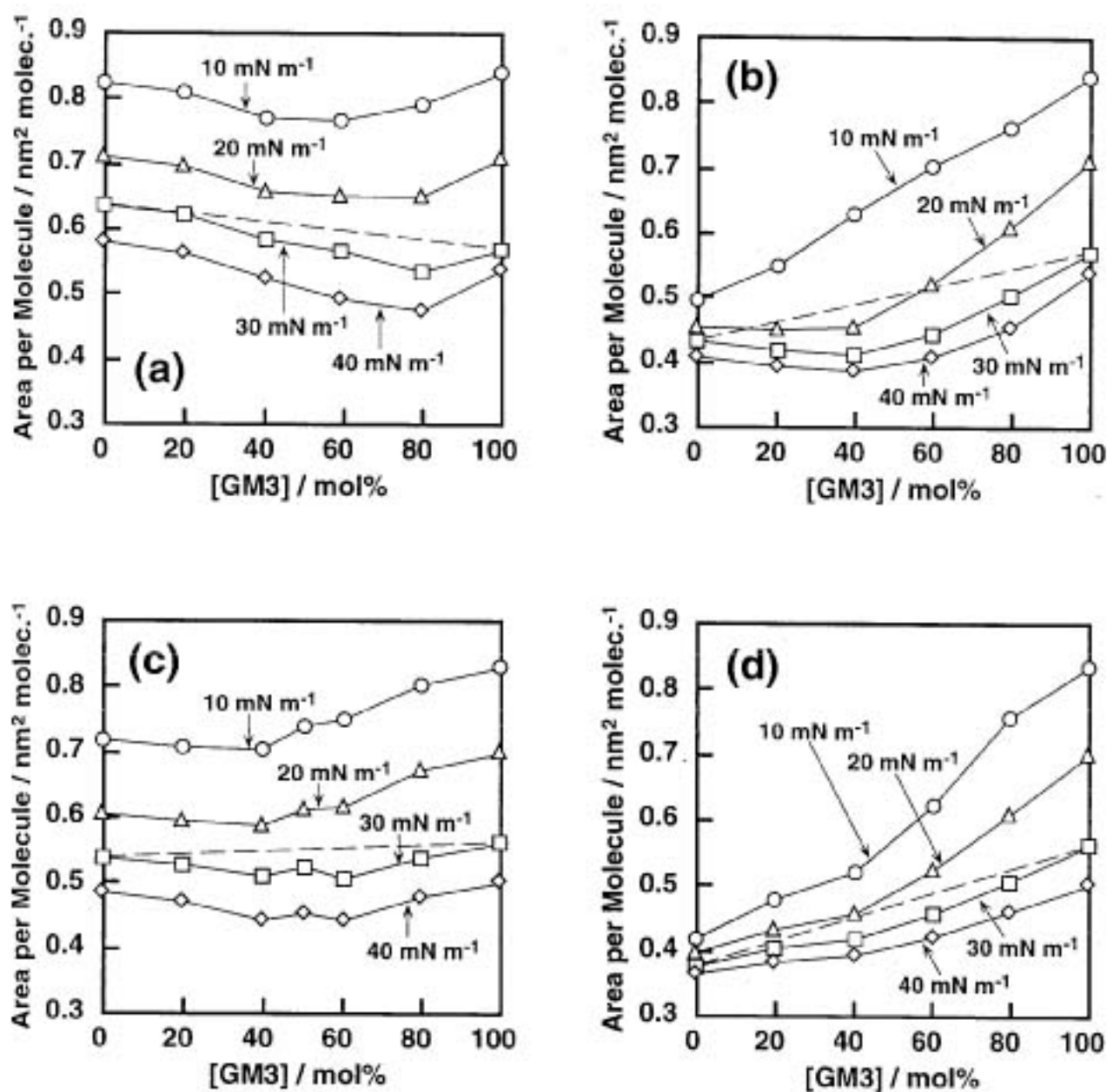


図 2-16 (a) GM3 / DOPC, (b) GM3 / DPPC, (c) GM3 / DOPA, および (d) GM3 / DPPA 混合単分子膜の平均分子占有面積の GM3 含量依存性 (条件は図 2-14 に同じ) 理想的に混合した場合の平均分子占有面積を点線で示した(30 mN m⁻¹)

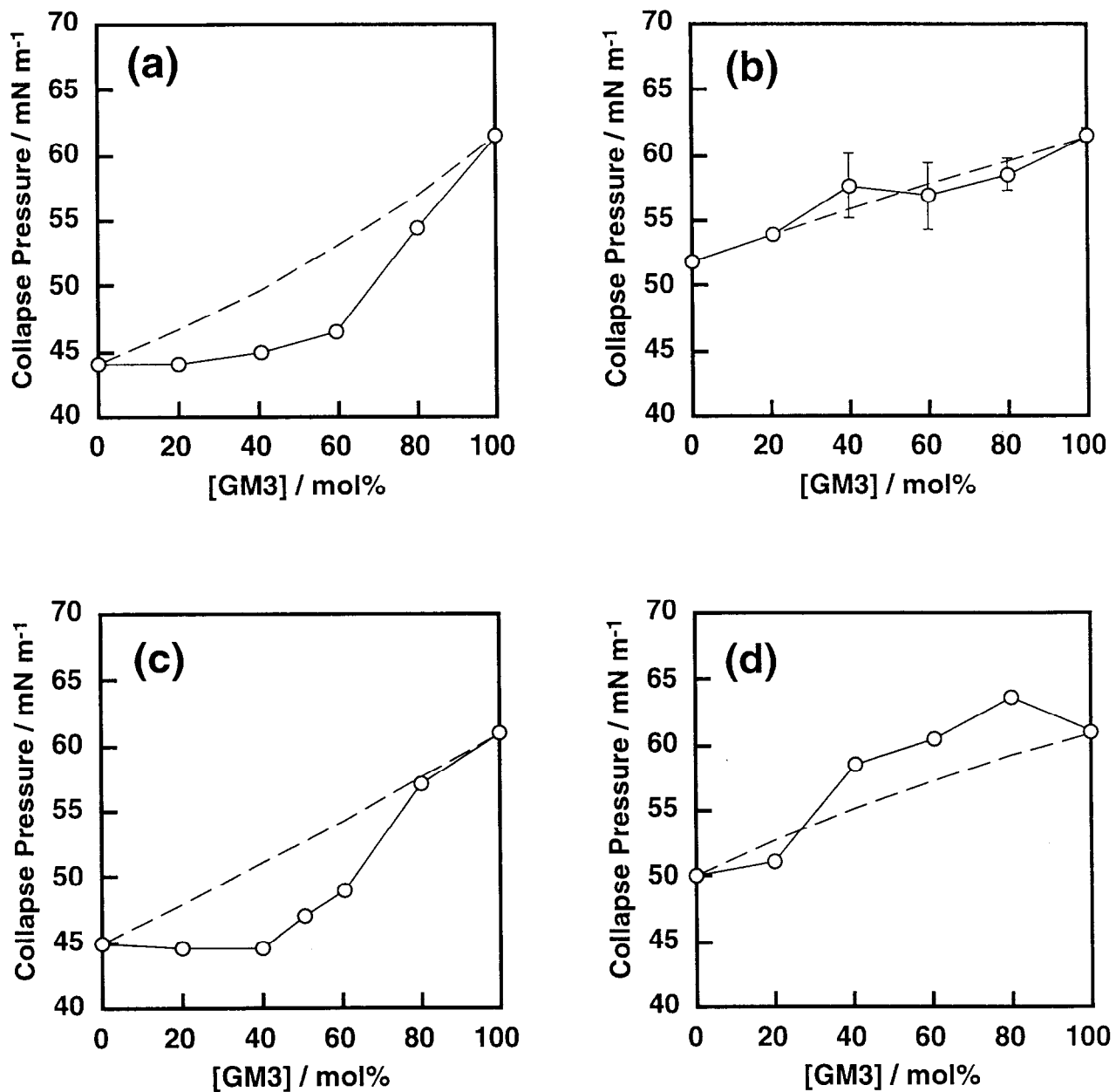


図 2-17 (a) GM3 / DOPC, (b) GM3 / DPPC, (c) GM3 / DOPA, および (d) GM3 / DPPA 混合単分子膜の崩壊圧の GM3 含量依存性 (条件は図 2-14 に同じ)
理想的に混合した場合の崩壊圧を点線で示した
エラーバーは本論文の図すべてにおいて標準偏差を表している

図 2-16 および 2-17 より GM3/DOPA 混合単分子膜では GM3/DOPC 混合単分子膜の場合と同様に相分離が起こることがわかった。GM3 と DOPA のどちらも親水部の荷電は負となるので GM3/DOPC 系に比べて分子間の引力方向の相互作用が減少することが期待されたが、平均分子占有面積の結果は両脂質間で膜を凝縮させる方向に働く相互作用が観察された。また相分離が確認できる限界の GM3 含量の値も GM3/DOPC とほぼ同じかむしろ少し低下するという結果となった。ホスファチジン酸はホスホコリン基と比較して正味の荷電が負であるという点の他に分子のサイズがより小さいという特徴がある。このサイズの効果によって GM3 との混合自由エネルギーが DOPC のものより低下した可能性もある。すなわち GM3 が相分離してクラスター化する場合とマトリックス脂質と混合する場合とでの自由エネルギーの差がより少なくなるのではないかと考えられる。その効果により DOPC の場合よりも相分離のみられた GM3 の濃度域がわずかに狭くなったのかもしれない。またここでは下層水を緩衝液として測定を行っているので親水部の静電的な効果は弱められている可能性もある。下層水を超純水として測定を行うと DOPC と DOPA とでまた異なる挙動を示すのかもしれない。

GM3/DPPA 混合単分子膜では平均分子占有面積および崩壊圧の結果から GM3 と DPPA は単分子膜中で相互作用しながら均一に混合していることがわかった。両脂質間の相互作用は GM3/DPPC の場合に比べて小さくなった。上で述べたようなシアル酸とコリン基の静電的な相互作用が存在しないためと考えられる。また崩壊圧の結果から GM3 と DPPA の相互作用により単分子膜が安定化されることが示唆された。

以上のようにガングリオシド GM3 についても不飽和アシル鎖を持つリン脂質中では相分離して GM3 のドメインを形成することが明らかとなった。しかし相分離が観察された濃度域など LacCer の場合とは異なる傾向がみられた。

2-3-4 ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 / リン脂質混合単分子膜

さらにガングリオシド GM3 の構造異性体である合成糖脂質 ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 と DOPC および DPPC との混合状態について評価を行った。 $(\alpha 2 \rightarrow 6)$ GM3 は GM3 と同じ 3 種の糖からなる親水部を持つが、シアル酸とガラクトースの結合が GM3 とは異なっている。また合成化合物であるためアルキル鎖のきちんとそろった試料を得ることができる。これらの違いによって GM3 の場合とはマトリックス脂質中での存在状態への影響が異なるのかについて検討を行った。 $(\alpha 2 \rightarrow 6)$ GM3 / DOPC および $(\alpha 2 \rightarrow 6)$ GM3 / DPPC 混合単分子膜の π -A 等温線を図 2-18 に、 π -A 等温線から求めた平均分子占有面積と崩壊圧の $(\alpha 2 \rightarrow 6)$ GM3 含量依存性を図 2-19 と 2-20 にそれぞれ示した。

$(\alpha 2 \rightarrow 6)$ GM3 / DOPC 混合単分子膜においては、GM3 / DOPC 混合単分子膜と同様に相分離が観察された。相分離が観察された濃度域も GM3 の場合とほぼ同じであった。しかしながら $(\alpha 2 \rightarrow 6)$ GM3 と DOPC とは膜を膨張させる方向での相互作用がみられ、GM3 と DOPC の間にみられた相互作用とは逆になった。相分離した状態においてはすべての $(\alpha 2 \rightarrow 6)$ GM3 分子が DOPC と相互作用しているのではなく、 $(\alpha 2 \rightarrow 6)$ GM3 のドメインと DOPC との境界部分での相互作用により分子占有面積が増加していると考えるのが妥当であると思われる。シアル酸の結合位置の違いにより $(\alpha 2 \rightarrow 6)$ GM3 ではクラスター化した時の糖鎖部分のコンホメーションが GM3 の場合とは異なり、ホスホコリン基との相互作用がエネルギー的に不利になってしまったのであろう。

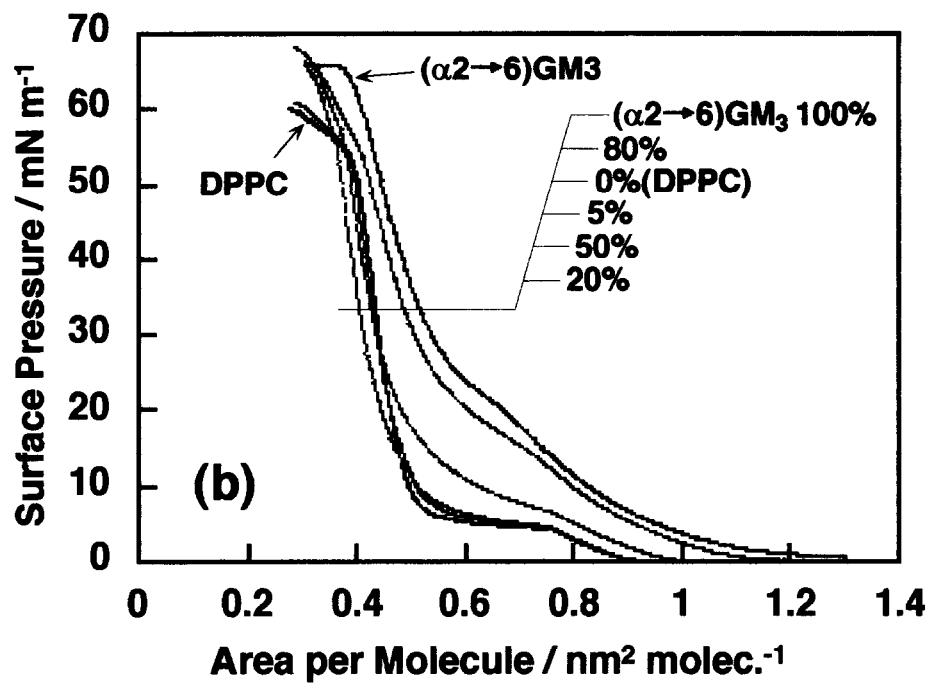
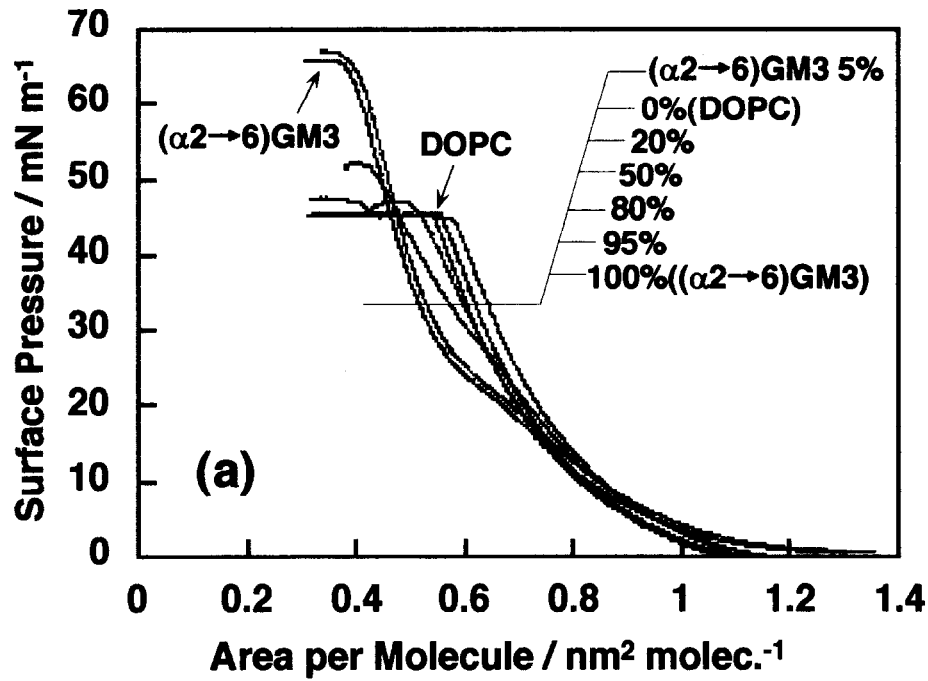


図 2-18 (a) $(\alpha 2 \rightarrow 6)\text{GM}_3 / \text{DOPC}$ および (b) $(\alpha 2 \rightarrow 6)\text{GM}_3 / \text{DPPC}$ 混合単分子膜の π -A 等温線 (条件は図 2-14 に同じ)

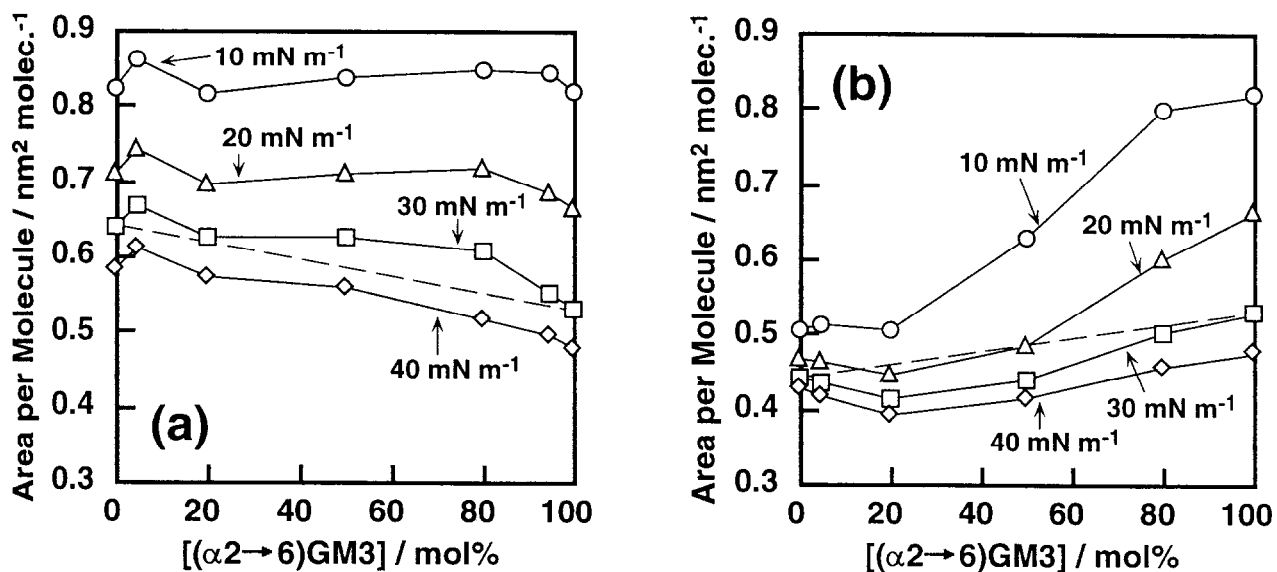


図 2-19 (a) (α2→6)GM3 / DOPC および (b) (α2→6)GM3 / DPPC 混合単分子膜の平均分子占有面積の (α2→6)GM3 含量依存性 (条件は図 2-14 に同じ) 理想的に混合した場合の平均分子占有面積を点線で示した(30 mN m⁻¹)

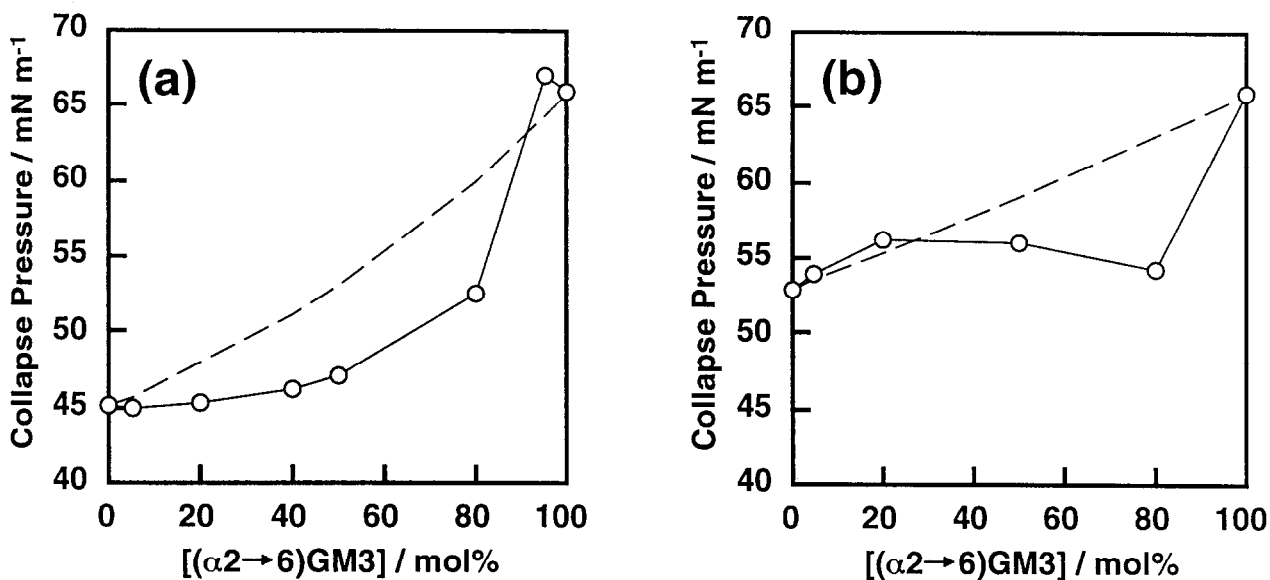


図 2-20 (a) (α2→6)GM3 / DOPC および (b) (α2→6)GM3 / DPPC 混合単分子膜の崩壊圧の (α2→6)GM3 含量依存性 (条件は図 2-14 に同じ) 理想的に混合した場合の崩壊圧を点線で示した

($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 / DPPC 混合単分子膜については ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 と DPPC との分子間の相互作用については図 2-19 より単分子膜を凝縮させる方向での相互作用が観察された。これは GM3 と DPPC との相互作用とほぼ同様な傾向であった。したがって均一に混合した場合の ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 の糖鎖のコンホメーションはホスホコリン基との相互作用に不利にはなっておらず GM3 の場合と同じような DPPC との相互作用がみられたものと推測された。しかし崩壊圧の値については GM3 / DPPC 膜の場合とは異なる挙動を示した。($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 含量が低いときにはほぼ理想混合したときの理論値に等しくなったが、($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 含量の増加とともに理論値から大きく外れ、単分子膜が不安定化されていることが示唆された。($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 含量 80 mol% における崩壊圧の値は DPPC 単独膜の崩壊圧の値に近いものとなり、この濃度域においては相分離が起きている可能性も示唆された。

以上より化学合成したガングリオシド誘導体 ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 においても、他のスフィンゴ糖脂質と同様に飽和アシル鎖を持つ DOPC とは単分子膜中で相分離することが明らかとなった。またシアル酸の結合位置の違いにより GM3 の場合とはマトリックス脂質との相互作用において違いがみられたが DOPC 中での相分離そのものについてはほとんど影響を与えなかった。

2-3-5 混合単分子膜の BAM 観察

π -A 等温線の測定より、本研究で用いたスフィンゴ糖脂質は飽和アシル鎖を持つリン脂質と単分子膜中で相分離し、糖脂質のドメインを形成していることがわかった。 π -A 等温線以外の手法によっても相分離の形成を示すため、また形成した糖脂質のドメインの大きさや形状についての知見を得るために、単分子膜の形態を観察する手法であるブリュースター角顕微鏡 (BAM)²²⁾ を用いてスフィンゴ糖脂質/リン脂質混合単分子膜の観察を行った。

図 2-21 には LacCer / DPPC (LacCer 含量 20 mol%) 混合単分子膜の表面圧 0 mN m^{-1} および 30 mN m^{-1} における BAM 像を示した。表面圧 0 mN m^{-1} においては脂質の存在する領域が明るいドメインとして観察された。さらに脂質を展開していくことにより界面がすべて脂質単分子膜で覆われるため暗いドメインは消失し、全体がやや明るい像となった。 π -A 等温線の結果からこの系では LacCer と DPPC は単分子膜中で均一に混合している。表面圧 30 mN m^{-1} における BAM 像はこのことを反映して全体的に均一な像が得られ、ドメインのようなものは観察されなかった。

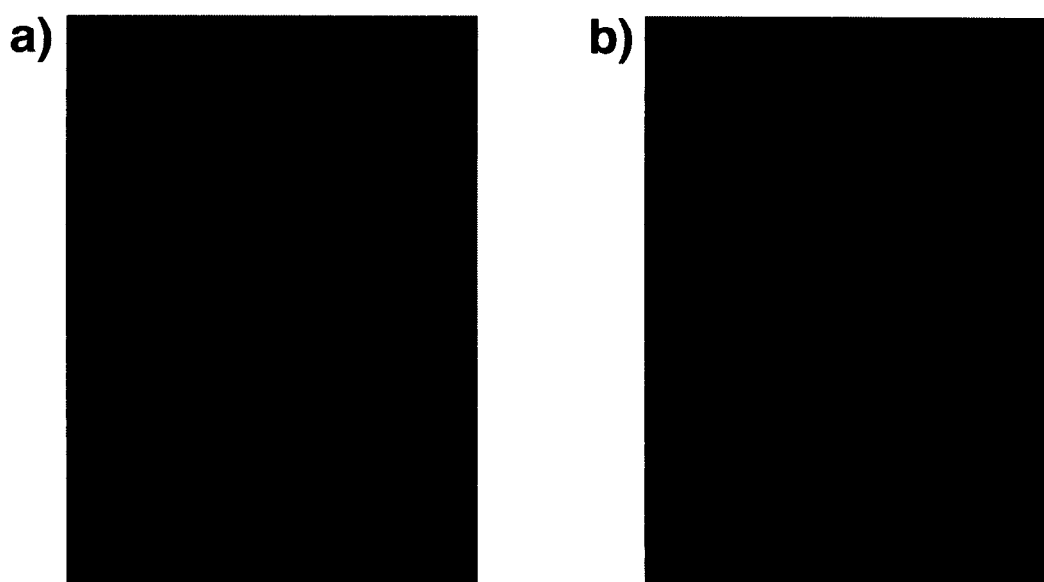


図 2-21 LacCer / DPPC 混合単分子膜の BAM 像

(a) 表面圧 0 mN m^{-1} , (b) 表面圧 30 mN m^{-1} (下層水: 超純水, 室温)

(図の縦が約 0.7 mm 。画像の明るさは偏光子により任意に調整した)

図 2-22 には π -A 等温線の測定により単分子膜中で相分離が起きていることが示された LacCer / DOPC 混合単分子膜 (LacCer 含量 20 mol%) の表面圧 0 および 30 mN m^{-1} における BAM 像を示した。この系においては表面圧 30 mN m^{-1} においてドメイン構造が存在することが期待された。測定中ディスプレイ上に出力した BAM 像においてはコントラストが悪いものの直径 $\sim 10 \mu\text{m}$ 程度のドメインらしきものが観察された。しかしながら像を得る際の調整が完全にはうまくいかず、レーザーの干渉縞などの artifact を画像から除くことができなかった。したがってドメイン構造がそれらと重なってしまった。さらに得られた像をビデオプリンターによって出力した結果得られた写真では解像度の問題でドメイン構造はほとんど見えなくなってしまった。写真をスキャナーによってパーソナルコンピュータに取り込み、画像処理ソフトを用いてコントラストや明度などを極端に変えることによってかろうじて観察される程度であったが、前述したレーザーの干渉縞なども同時に強調されてしまうのではっきりとしたドメイン構造の存在を画像として残すことは結局できなかった。

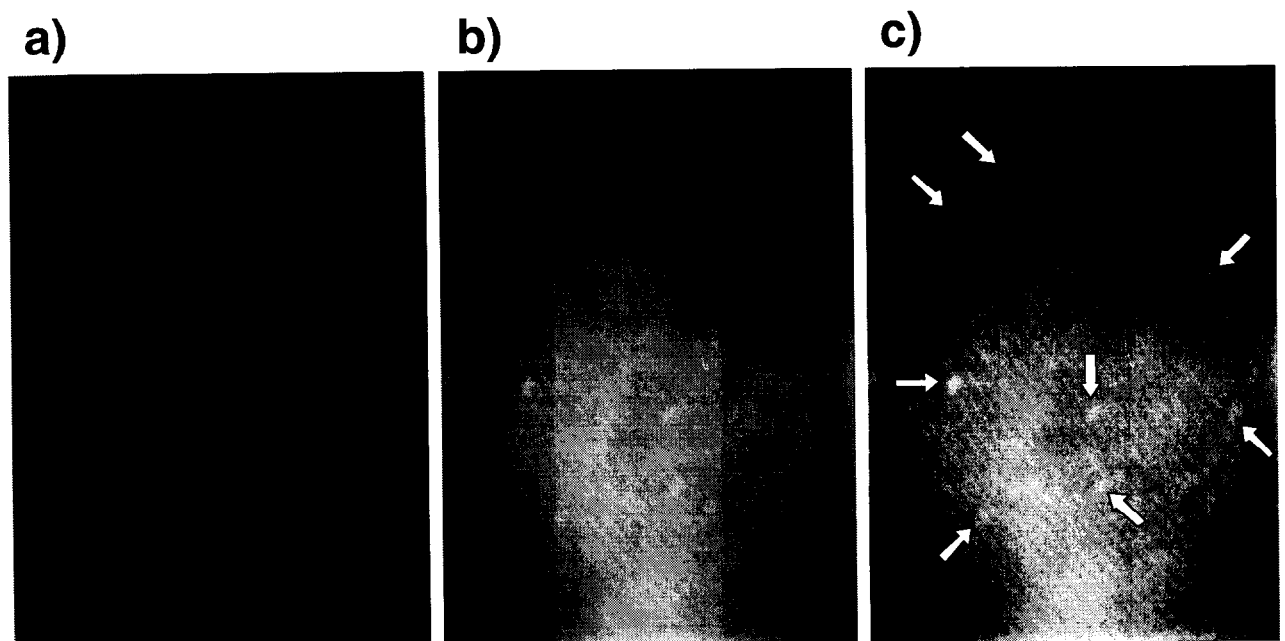


図 2-22 LacCer / DOPC 混合単分子膜の BAM 像
(a) 表面圧 0 mN m^{-1} , (b) 表面圧 30 mN m^{-1} , (c) (b) の像を画像処理してドメインを強調した像
ドメイン構造と思われる箇所の一部を矢印で示した (条件は図 2-21 に同じ)

脂質単分子膜の形態を観察する手段としては、他に偏光顕微鏡、蛍光顕微鏡やあるいは原子間力顕微鏡(AFM)や摩擦力顕微鏡(FFM)といった走査型プローブ顕微鏡(SPM)などが挙げられる^{1,2,22)}。SPMは単分子膜を基板に累積しなければならないという問題はあるが脂質の蛍光ラベル化などの必要がなく、測定も簡便で有用な手法となっている。たとえばFFMによって炭化水素鎖を持つ脂質とフルオロアルキル鎖を持つ脂質との混合単分子膜における相分離構造が観察されている^{24,25)}。この系ではそれぞれのアルキル鎖の表面自由エネルギーの差によって検出が可能となっている。炭化水素鎖をもつ脂質同士の相分離構造についてもアルキル鎖の長さを変えるなどの工夫をすることでAFMによる測定が可能となっている。最近になってDSPE/DOPE混合単分子膜²⁶⁾やGM₁/DOPC混合単分子膜²⁷⁾中での相分離構造をAFMによって観察している報告が出された。これらの系では不飽和アシル鎖は飽和のアシル鎖に比べて単分子膜を形成したときの膜厚が小さいことを利用している。すなわち不飽和アシル鎖を持つ脂質膜中に飽和アシル鎖を持つ脂質のドメインが存在すると高さの差が生じ、これによりドメイン構造を画像化することが可能となっている。本研究で用いたスフィンゴ糖脂質/リン脂質混合単分子膜の系においてもこの手法が十分適用可能であり、今後測定を行えば相分離によって生じたドメインの形状や大きさについての情報が得られるものと期待される。

2-3-6 スフィンゴ糖脂質の構造が混合単分子膜中での存在状態に与える影響についての考察

本章での結果より、スフィンゴ糖脂質 LacCer, GM3, ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3のいずれも不飽和アシル鎖を持つリン脂質中では相分離して糖脂質のクラスターを形成することが明らかとなった。相分離の起こる原因は主としてそれぞれの脂質のアルキル鎖の会合性によるものと考えられた。ここで用いたいずれの糖脂質も膜の圧縮により凝縮相をとることがわかった。これに対して DOPC や DOPA の単分子膜は常に膨張相となった。このようなアルキル鎖の会合性の違いによって相分離が起きたものと考えられる。一方 DPPC や DPPA では単分子膜は圧縮の結果凝縮相をとり、スフィンゴ糖脂質と同じような疎水部の会合性を示している。したがってこれらは単分子膜中で均一に混合したものと考えられた。すなわち疎水部の会合性が似たもの同士は均一に混合し、その性質が大きく異なるもの同士は相分離する、ということが推測できた。したがって逆にアルキル鎖中に不飽和結合を多く含み単分子膜を形成したときに膨張相をとるようなスフィンゴ糖脂質は DOPC など不飽和アシル鎖を持ったリン脂質と均一に混合するが DPPC などとは相分離することが予想される。実際に不飽和アシル鎖を持つ GalCer が POPC と単分子膜中で均一に混合することが確認されている¹⁰⁾。つまりすべてのスフィンゴ糖脂質が不飽和アシル鎖を持つリン脂質中では相分離するというわけではなく、糖脂質自体の会合性によってマトリックス膜中での分布状態は支配されていると考えられた。

脂質の会合性に対応した指標の一つにゲル相-液晶相での相転移温度 (T_c) がある。本研究で用いたスフィンゴ糖脂質の相転移温度は求められていないが、別の由来のものについては報告例があり、LacCer では $74.4\text{ }^\circ\text{C}$ 、GM3 については $35.3\text{ }^\circ\text{C}$ という値が得られている²⁸⁾。由来が異なればアルキル鎖部分の組成も異なってくるのでこの値をそのまま用いることはできないが、少なくとも測定条件下ではここで用いたスフィンゴ糖脂質はゲル相をとると考えることができる。マトリックス脂質については DOPC の T_c は $-22\text{ }^\circ\text{C}$ であり測定条件では液晶相となっている²⁹⁾。DOPA の T_c は測定されていないが

脂質の構造から同様に測定条件下では液晶相をとると考えられる。これに対して DPPC²⁹⁾、DPPA³⁰⁾ の相転移温度はそれぞれ 41.4 °C、65 °C よりこれらは測定条件下でゲル相をとる。したがって測定条件下ではスフィンゴ糖脂質と飽和アシル鎖を持つリン脂質はともにゲル相でありその結果両者は均一に混合したが、不飽和アシル鎖を持つリン脂質は液晶状態にあるためゲル相をとるスフィンゴ糖脂質は相分離した、という説明も成り立つ。気-水界面の脂質単分子膜における相平衡とバルク状態の相平衡を直接結びつけることはできないが、リン脂質単分子膜中でのスフィンゴ糖脂質の分布状態について検討する際に相転移温度がよい指標となることが示唆された。

スフィンゴ糖脂質 LacCer, GM3, ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 のいずれも DOPC や DOPA 中とは相分離したが、相分離が観察された糖脂質含量やマトリックス脂質との相互作用など細かな点ではそれぞれの糖脂質間、マトリックス間で違いがみられた。これらの相違は主に親水部のオリゴ糖鎖の構造によるものであると考えられた。LacCer は糖鎖部分が 2 糖しかなく親水部の体積が比較的小さく、また糖鎖中に荷電を持っていない。したがって膜が凝縮相をとるときにアルキル鎖間が良くパッキングした構造をとることができる。さらに DOPC の親水部であるホスホコリン基との相互作用も少ないことが予想され、疎水部の性質が強く表れたために LacCer 含量 80 mol% という高濃度においても DOPC との相分離が観察されたものと思われる。これに対してガングリオシド GM3 は 3 糖からなる親水部を持ち、さらに負電荷を持つシアル酸を糖鎖中に含んでいる。この親水部のかさ高さや静電的な効果により GM3 単独膜の分子のパッキングの程度は LacCer の場合に比べて弱まっていることが予想される。また分子の親疎水性のバランスも変化している。さらにシアル酸を含んだオリゴ糖鎖とホスホコリン基との間に相互作用が生じ、GM3 と DOPC の疎水部の効果を弱めている可能性もある。よって GM3 / DOPC 混合膜では相分離が観察される限界の糖脂質濃度が LacCer に比べて低下したものと思われる。 $(\alpha 2 \rightarrow 6)$ GM3 は GM3 とほぼ同様な傾向を示し、親水部のシアル酸の結合位置は相分離の形成にほとんど影響を与えなかった。

本章で用いたような天然由来の脂質ではなく合成脂質を用いた単分子膜の系ではある

が、炭化水素鎖を持つ脂質とフルオロアルキル鎖を持つ脂質との混合単分子膜ではそれぞれの脂質の疎水部の表面自由エネルギーの違いにより相分離が起こり、 $\sim\mu\text{m}$ サイズのドメイン構造が形成されることが知られている²⁴⁾。最近 Oishi らは疎水部が炭化水素鎖で親水部に正電荷を持つ脂質と疎水部がフルオロアルキル鎖で親水部に負電荷を持つ脂質との混合単分子膜においては、わずか 100 分子程度からなる nm オーダーのドメイン構造が形成されることを示した²⁵⁾。この結果は適当な分子設計をすることで脂質単分子膜中の相分離によって形成されるドメインのサイズを任意に変えることが可能であることを示唆している。このようなドメインの形成機構はここで検討したスフィンゴ糖脂質の混合単分子膜についても適用できる。本章ではスフィンゴ糖脂質と混合するマトリックス脂質を変えることによりスフィンゴ糖脂質が単分子膜中で均一に分散する場合と相分離する場合とを作り出すことができたが、今後さらなる検討を行うことで相分離した場合におけるスフィンゴ糖脂質のドメインの大きさについても制御することが可能になるかもしれない。

2-4 結言

本章では飽和および不飽和アシル鎖中をもつリン脂質中でのスフィンゴ糖脂質の存在状態について、混合脂質単分子膜の π -A 等温線の解析から評価を行った。その結果用いたスフィンゴ糖脂質 LacCer, GM3, (α 2 \rightarrow 6)GM3 のいずれも不飽和アシル鎖を持つ DOPC とは単分子膜中で相分離することが明らかとなった。これに対して飽和アシル鎖を持つ DPPC とスフィンゴ糖脂質は均一に混合した。これらの結果はスフィンゴ糖脂質と各リン脂質それぞれのアルキル鎖部分の会合性を反映した結果と考えられた。またスフィンゴ糖脂質の種類により相分離が観察された単分子膜中の糖脂質含量の範囲に違いがみられ、スフィンゴ糖脂質の親水部の構造も重要であることが示唆された。得られた結果はスフィンゴ糖脂質分子の物理化学的な性質によってのみもたらされたものである。したがって生体膜中でもスフィンゴ糖脂質が膜タンパク質などとの相互作用なしに細胞膜中に置かれたならば、不飽和アシル鎖を含むリン脂質中からは相分離してドメイン構造を作る可能性は十分あるといえる。また本章の結果は別の言い方をすればここで用いたようなスフィンゴ糖脂質は混合するマトリックス脂質の種類を変えることにより単分子膜中での存在状態を制御できることを示したものであり、人工的にスフィンゴ糖脂質を組み込んだ生体膜モデルを構築する際の有用な知見が得られた。

このようにスフィンゴ糖脂質の存在状態の異なる混合単分子膜を調製できると、それらの膜中でのスフィンゴ糖脂質の糖鎖認識性について興味を持たれる。次章ではその点について検討を行った。

第2章 参考文献

- 1) 福田 清成, 加藤 貞二, 中原 弘雄, 柴崎 芳夫 著, "超薄分子組織膜の科学 単分子膜から LB 膜へ", 講談社サイエンティフィク, 1993
- 2) 日本化学会 編, "コロイド科学 II. 会合コロイドと薄膜", 東京化学同人, 1995
- 3) 石井 淑夫 著, "表面・薄膜分子設計シリーズ 9 よい LB 膜をつくる実践的技術", 共立出版, 1989
- 4) a) 小野 周 著, "物理学One Point-9 表面張力", 共立出版, 1980
b) J. N. Israelachvili, "Intermolecular and Surface Forces 2nd Ed.", Academic Press Ltd., 1992
- 5) a) A. W. Adamson, "Physical Chemistry of Surfaces 5th Ed.", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1990
b) G. L. Gains, Jr., "Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces", Interscience Publishers, 1966
- 6) B. Maggio, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **62**, 55-117 (1994)
- 7) a) B. Maggio, F. A. Cumar, and R. Caputto, *Biochem. J.* **171**, 559-565 (1971)
b) B. Maggio, F. A. Cumar, and R. Caputto, *Biochim. Biophys. Acta* **650**, 69-87 (1981)
c) B. Maggio, T. Ariga, and R. K. Yu, *Arch. Biochem. Biophys.* **241**, 14-21 (1985)
d) S. Ali, J. M. Smaby, and R. E. Brown, *Biochemistry* **32**, 11696-11703 (1989)
e) J. M. Smaby, V. S. Kulkarni, M. Momsen, and R. E. Brown, *Biophys. J.* **70**, 868-877 (1996)
- 8) G. D. Fidelio, B. Maggio, and F. A. Cumer, *Biochim. Biophys. Acta* **854**, 231-239 (1986)
- 9) a) B. Maggio, F. A. Cumar, and R. Caputto, *Biochem. J.* **178**, 1113-1118 (1978)
b) B. Maggio, F. A. Cumar, and R. Caputto, *Biochem. J.* **189**, 435-440 (1989)
c) P. Luckman, J. Wood, S. Froggatt, and R. Swart, *J. Colloid Interface Sci.*

- 156, 164-172 (1993)
- 10) S. Ali, H. L. Brockman, and R. E. Brown, *Biochemistry* **30**, 11198-11205 (1991)
 - 11) 芹澤 武, 学位論文, 東京工業大学 (1995)
 - 12) a) S. Ali, J. M. Smaby, H. L. Brockman, and R. E. Brown, *Biochemistry* **33**, 2900-2906 (1994)
b) J. M. Samby, M. Momsen, V. S. Kulkari, and R. E. Brown, *Biochemistry* **35**, 5696-5704 (1996)
c) J. P. Slotte, A.-L. Östman, E. R. Kumar, and R. Bittman, *Biochemistry* **32**, 7886-7892 (1993)
 - 13) R. B. Gennis, "Biomembranes; Molecular Structure and Function", Springer-Verlag, New York, 1989
 - 14) a) M. R. Bunow and B. Bunow, *Biophys. J.* **27**, 325-337 (1979)
b) E. Bertoli, M. Masserini, S. Sonnino, R. Ghidoni, B. Cestaro, and G. Tettamanti, *Biochim. Biophys. Acta* **467**, 196-202 (1981)
c) D. A. Rintoul and Ruth Welti, *Biochemistry* **28**, 26-31 (1989)
 - 15) 鈴木 康夫, 安藤 進 編著, "生物化学実験法 36 ガングリオシド研究法 II", pp236-242, 学会出版センター, 1995
 - 16) Y. Suzuki, K. Sato, M. Kiso, and A. Hasegawa, *Glycoconj. J.* **7**, 349-356 (1990)
 - 17) A. Hasegawa, M. Ogawa, and M. Kiso, *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 535-536 (1992)
 - 18) a) 長谷川 明, 木曾 真, 有機合成化学協会誌 **50**, 429-440 (1992)
b) Y. Ohira, a personal communication.
 - 19) a) M. Tomoaia-Cotisel and E. Chifu, *J. Colloid Interface Sci.* **95**, 355-361 (1983)
b) P. Joos, *Bull. Soc. Chim. Belges* **78**, 207-217 (1969)
c) P. Joos and R. A. Demel, *Biochim. Biophys. Acta* **447**, 447-457 (1969)
 - 20) S. Henon and J. Meunier, *Rev. Sci. Instrum.* **62**, 936-939 (1991)
 - 21) D. Hönig and D. Möbius, *J. Phys. Chem.* **95**, 4590-4592 (1991)
 - 22) 日本化学会 編, "コロイド科学 IV. コロイド科学実験法", 東京化学同人, 1996
 - 23) 安藤 進 著, "脳機能とガングリオシド -新たに登場したニューロンの活性物質", 共立出版, 1997

- 24) a) R. M. Overney, E. Meyer, J. Frommer, D. Brodbeck, R. Lüthi, L. Howald, H.-J. Güntherodt, M. Fujihira, H. Takano, and Y. Gotoh, *Nature* **359**, 133-135 (1992)
b) M. Fujihira, M. Sakomura, D. Aoki, and A. Koike, *Thin Solid Films* **273**, 168-176 (1996)
- 25) 大石 祐司, 加藤 貴之, 蔵森 幸, 末廣 和昭, 有賀 克彦, 国武 豊喜, 第 47 回高分子学会予稿集, 3171-3172 (1998)
- 26) Y. F. Dufrêne, W. R. Barger, J.-B. D. Green, and G. U. Lee, *Langmuir* **13**, 4779-4784 (1997)
- 27) V. Vié, N. V. Mau, E. Lesniewska, J. P. Goudonnet, F. Heitz, and C. L. Grimellec, *Langmuir* **14**, 4574-4583 (1998)
- 28) B. Maggio, T. Ariga, J. M. Sturtevant, and R. K. Yu, *Biochemistry* **24**, 1084-1092 (1985)
- 29) 野島 庄七, 砂本 順三, 井上 圭三 編, "リポソーム", 南江堂, 1988
- 30) J. M. Boggs, *Biochim. Biophys. Acta* **906**, 353-404 (1987)

第3章 LacCer 混合単分子膜に対する allo A レクチンの結合挙動の観察

3-1 緒言

1-2 で述べたようにスフィンゴ糖脂質に対するレクチン¹⁾や毒素²⁾、抗体³⁾、ウイルス⁴⁾などのゲスト分子の結合は、スフィンゴ糖脂質が脂質膜中に組み込まれた状態で起こっている。脂質膜中でのスフィンゴ糖脂質の糖鎖認識に影響を与える因子としては 1) 糖脂質のオリゴ糖鎖の構造、2) 糖脂質が組み込まれた周辺の脂質(マトリックス脂質)の効果、3) 脂質膜中での糖脂質の存在(分散)状態(均一に分散しているか相分離しているかなど)などが考えられる。またそれらの影響は同じスフィンゴ糖脂質の場合でもゲスト分子がどのような糖鎖結合部位を持つかによってまた異なってくる。

1) についてはたとえばゲスト分子が特異的に結合するといわれている糖(鎖)構造を持つ糖脂質であっても、脂質膜中においては糖鎖の一次構造によっては結合性が大きく変化することがある。コレラトキシンは細胞毒性を持つ A サブユニットと糖鎖結合部位を持つ B サブユニットとからなる AB₅ 型のサブユニット構造を持つ分子である⁵⁾。この B サブユニットはさまざまなスフィンゴ糖脂質の中でガングリオシド GM1 に対して高い結合特異性を持つことが知られている^{6,7)}。またコムギ胚芽レクチン WGA はガングリオシドの糖鎖中に含まれるシアル酸の N-アセチル基に対して結合することが知られている⁷⁾。WGA のガングリオシド混合単分子膜に対する結合性について検討した結果、ホストとなるガングリオシドの糖鎖構造の違い^{8,9)}やラクトン化の効果^{9,10)}などにより WGA の結合性は大きく異なることが明らかになっている。また合成糖脂質を用いた実験において、グルコース残基に結合することが知られているコンカナバリン A (ConA) の認識性についても検討されており、糖脂質の構造により ConA の結合挙動が異なることが示されている¹¹⁾。

2) については GM3 混合単分子膜を用いた測定において、中性スフィンゴ糖脂質 GlcCer 中に組み込まれた GM3 の方がスフィンゴリン脂質スフィンゴリエリン中に組み込まれたものよりも WGA やインフルエンザウイルスの結合性が高いことが示されている(図 1-6)^{12,13)}。すなわち脂質単分子膜中でのスフィンゴ糖脂質の糖鎖認識性はマトリックス脂質の親水部の構造により影響を受けることが明らかとなっている。

3) についてはこれまで混合単分子膜中の糖脂質含量の効果については検討され、ホスト-ゲストの組み合わせにより異なる傾向が得られている。しかし相分離状態と均一に混合した状態との比較というような脂質膜中の糖脂質含量が同じ条件で糖脂質の存在状態が異なる場合についての検討例はほとんどない。たとえばクラスター状のスフィンゴ糖脂質の方が抗体の認識性が高いという予想はあるが、それを実験的に証明した報告はない。

第2章よりスフィンゴ糖脂質 LacCer は混合するリン脂質の種類を変えることにより単分子膜中での存在状態を制御できることが明らかとなった。本章ではこの現象を利用して単分子膜中の存在状態が異なる LacCer に対する allo A レクチンの結合挙動について検討を行った。本章での実験内容を模式的に図 3-1 に示した。

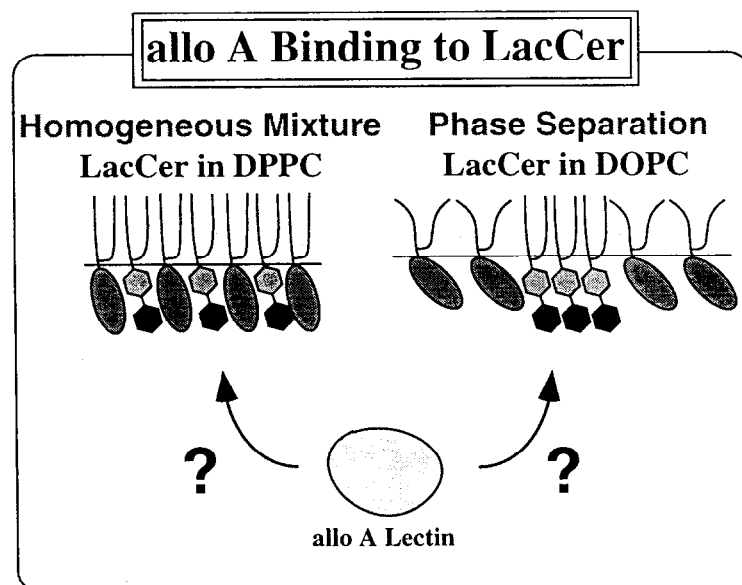


図 3-1 本章での実験の概略図

allo A レクチンは 1984 年に Umetsu らによって報告されたカブトムシ (*Allomyrina dichotoma*) 由来のレクチンであり、分子量は 67000 の 2 種のイソレクチン (allo A-I, allo A-II) からなる、それぞれ 4 つのサブユニットからなる糖タンパク質である¹⁴⁾。一分子あたりの糖結合部位の数や X 線結晶解析による三次元構造まではまだ明らかとなっていないが、 β -D-ガラクトース残基に対して特異性を持つことが知られている¹⁵⁾。allo A を固定化したカラムによるアフィニティークロマトグラフィーの実験から非還元末端に β -D-ガラクトース残基を持つ糖鎖に対して $10^2 \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$ 程度の結合定数が得られており、fetuin など分岐末端のそれぞれに β -D-ガラクトース残基を持つ bi- および tri-アンテナ型のオリゴ糖鎖に対してはいわゆるクラスター効果により結合定数は 10^5 M^{-1} オーダーにまで上昇することが知られている¹⁶⁾。しかしながらこれまで糖脂質の糖鎖に対する結合性については検討されていない。LacCer の非還元末端には β -D-ガラクトース残基が存在するので allo A が結合することが予想される。

本研究では糖脂質とレクチンとの相互作用について気-水界面の脂質単分子膜と水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法を組み合わせた測定系(図 3-2) を用いて検討した。脂質単分子膜を用いることにより、リポソームを用いた系などでは困難な糖脂質含量を固定した様々なマトリックス脂質との混合膜や高い糖脂質含量の混合膜を容易に調製することができる。また QCM 法を用いることでゲスト化合物をラベルすることなく結合過程を経時的、定量的に追跡することができる。

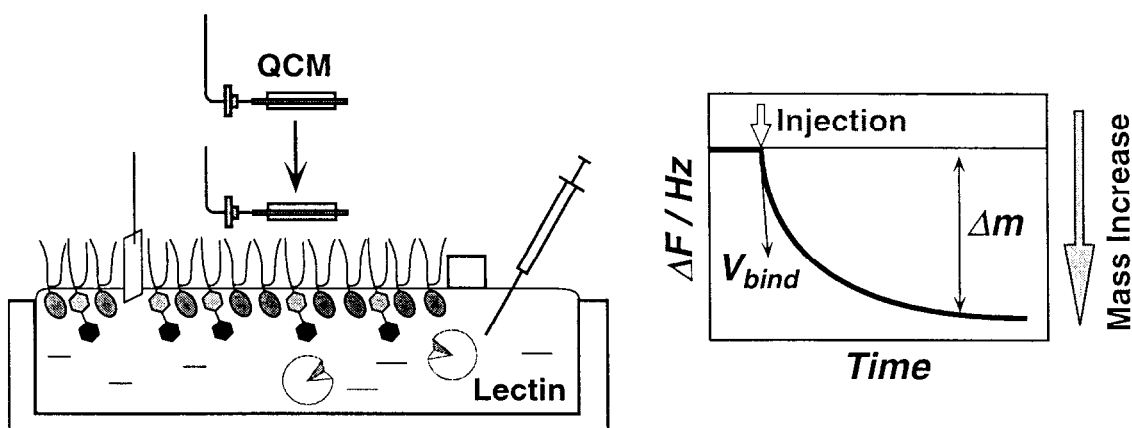


図 3-2 気-水界面の脂質単分子膜と水晶発振子を組み合わせた測定系の模式図

3-2 実験方法

3-2-1 材料

Glucosylceramide (GlcCer; from Bovine Milk, Lot 926040C) は雪印乳業株式会社から得た。Dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE; code P5078) および dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE; code P5078) は Sigma. Co. Ltd. から、 β -D-ラクトース (code 24714, Lot 903C1007) は関東化学株式会社からそれぞれ購入した。他の化合物は 2-2-1 で述べたものを使用した。本章で用いた脂質の化学構造と略称を図 3-3 に示した。カプトムシレクチン allo A (*Allomyrina dichotoma* L; code US-05, Lot 110301, 110306, 120308) はコスモ・バイオ株式会社から、ヒママメレクチン RCA₁₂₀ (*Ricinus communis*; code 300162, Lot 02807, 52307) およびピーナツレクチン PNA (*Arachis hypogaea*, code 300099, Lot 92016) は生化学工業株式会社からそれぞれ購入した。いずれの試薬もさらなる精製を行わずに使用した。

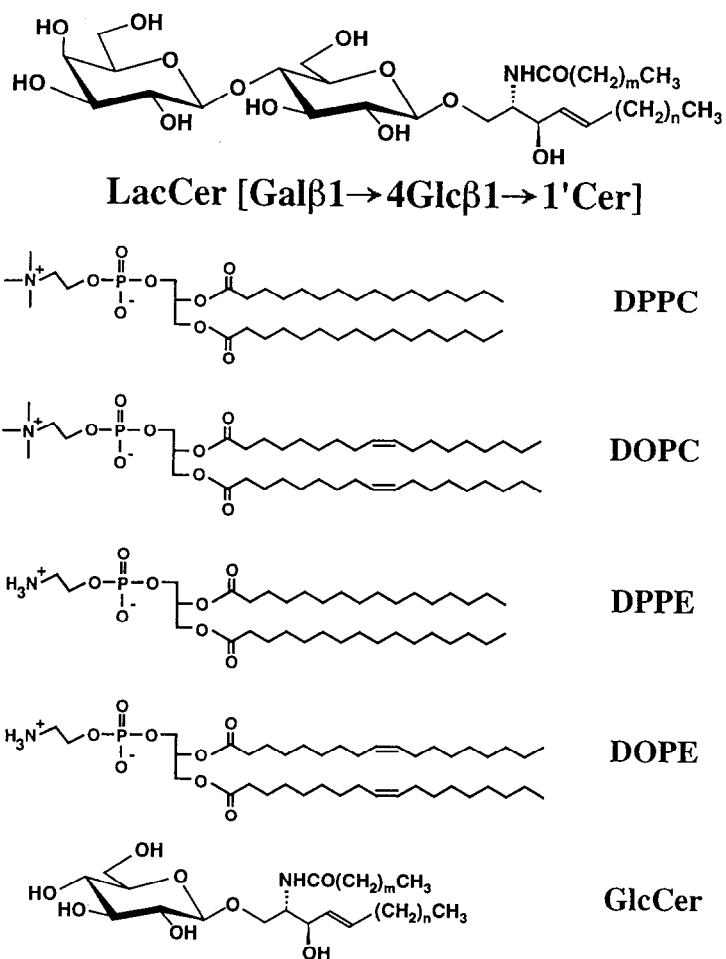


図 3-3 本章で用いた脂質の化学構造および略称
(スフィンゴ糖脂質の脂肪酸および長鎖塩基組成は表 2-1 および表 2-2 参照)

3-2-2 水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法

(a) 水晶発振子について

水晶、ロッシェル塩、電気石など種々の結晶に機械的なストレスを加えると、加えたストレスの対数に比例して結晶を横切る電位に影響を与えることが発見された¹⁷⁾。この挙動は圧電効果と呼ばれ、中心対称のない空間群で結晶化しているものだけに存在する。中心のない物質の単結晶は、結晶格子内の原子の配向に沿って双極子が共同しているため、極に軸を有することになる。よって、水晶などの中心のない物質にストレスをかけると、原子が変位することにより双極子がシフトするために電荷が生じる。

この発見のあと、これらの結晶を横切るように電圧をかけることによって、それぞれに応じた機械的なひずみが生じ、逆圧電効果が確かめられた。この逆圧電効果が水晶発振子の基本となっている。結晶の対称性から一つの極性の電位が印加されることにより圧電物質内に誘起されるひずみの大きさは等しいので、反対の極性が印加されるとそのひずみは反対の方向となる。このことは、AT-cut 型水晶発振子のずり運動として図 3-4 に示した。AT-cut 型水晶発振子は、X 軸から約 35° の角度で水晶のロッドから切り出した水晶の薄いウエハーである。結晶を横切るように電場をかけると、かけた電位に比例してひずみが生じ、水晶中ではこの変形は弾性的である。その反対の極性では、同一のひずみを生じる方向は反対である。交流電場によって、結晶表面に平行な方向に水晶内に振動が生じる。それ故、電気機械的なカップリングとその結果生じるひずみは、結晶の対称性、電場の方向性、結晶軸に対する結晶基板の切り出し角度に依存する。よって結晶軸に対して適当な角度に切り出された結晶だけがずり振動を起こす。この圧電性による電気エネルギーの機械エネルギーへの変換という性質は、さまざまな電気機械的デバイスの工業化のために開発され、スピーカー、マイクロフォン、レコードのピックアップなど多くの分野で応用されてきた。

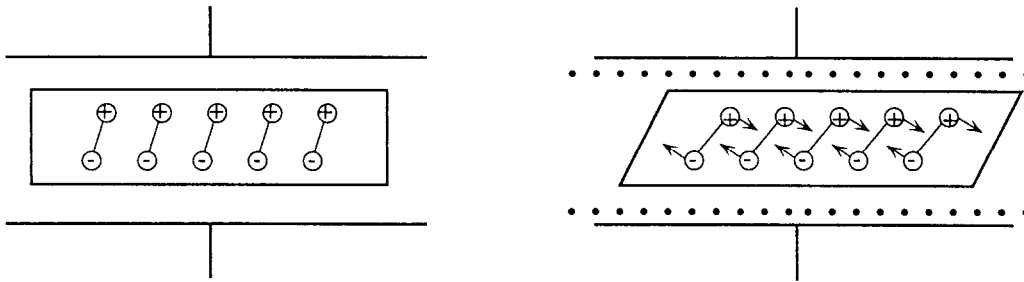


図 3-4 ずり振動の逆電圧効果の模式図

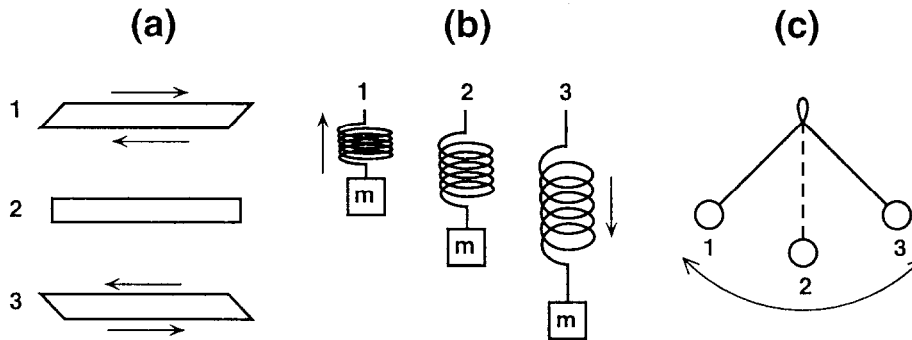


図 3-5 振動の模式図

- (a) AT-cut 水晶のずり振動
- (b) おもりのついたバネの振動
- (c) 左右に揺れる振り子の振動

水晶の調和振動は、振動する糸、振り子、重りのついたバネのそれと同じである(図 3-5)。例えば、振動の振幅は最初に系に与えられたエネルギーによって決定されるが、共鳴振動数は重さや糸の長さのような物理的性質によって決まる。水晶発振子は振動によるエネルギーの損失が非常に少ないという点で他の系とは異なる。よって、水晶発振子は非常に正確かつ安定に発振し、コンピューターなどの周波数制御素子や時計などに広く利用されている。特に、今回実験に用いた AT-cut 型水晶発振子は、温度に対する振動数変化が少なく、外部環境に対する振動の安定性もよいことが知られている。

実験に使用した AT-cut 型水晶発振子は、図 3-6 に示すような外観を持ち、薄い水板とその両面に蒸着された一対の電極(金、銀など)からできている。この電極に電場印加すると、圧電効果によりずり振動を起こす。

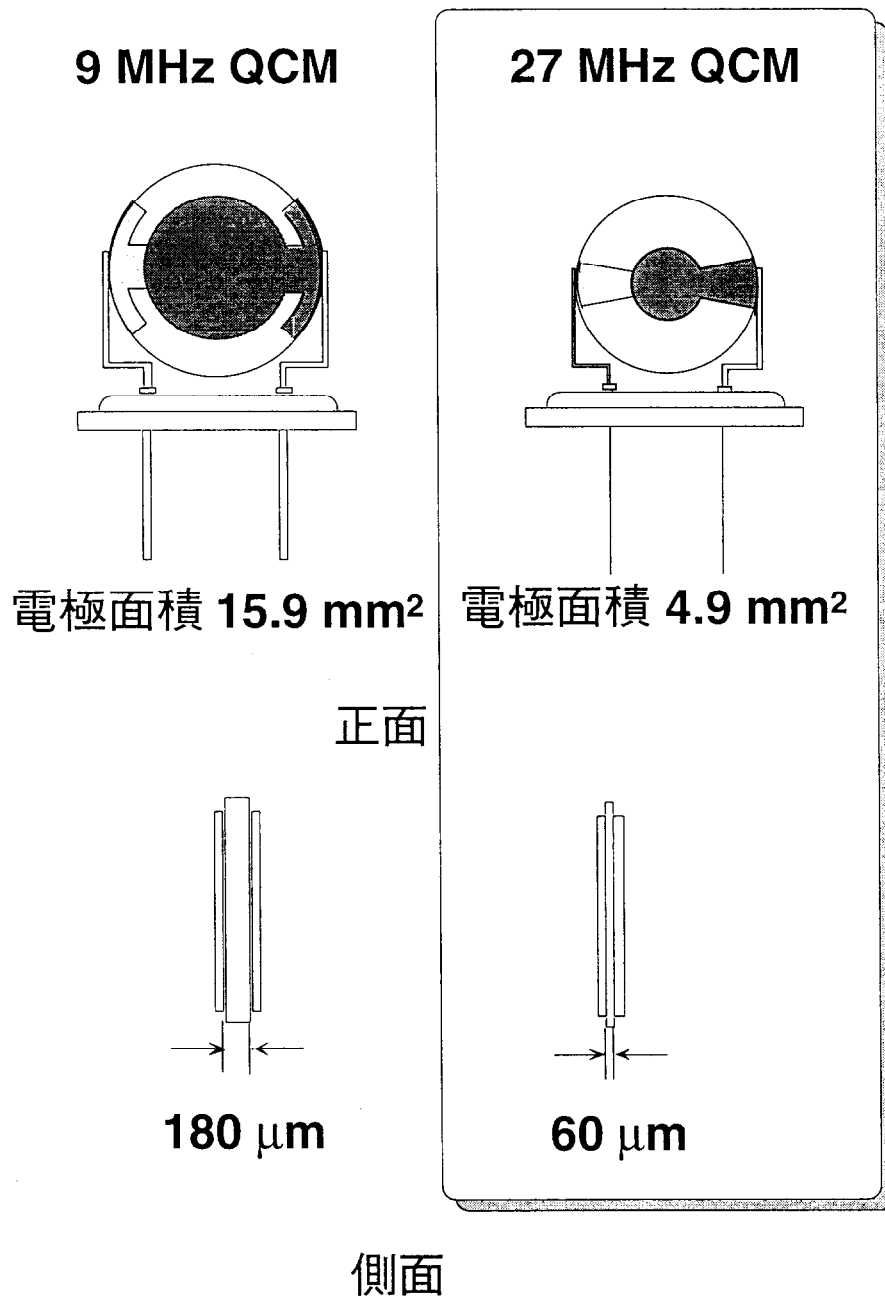


図 3-6 9 MHz および 27 MHz 水晶発振子の外観図

水晶発振子は、その電極上に物質が付着すると付着した物質の質量に比例して、振動数が低下することが1950年代に報告されている¹⁸⁾。マイクロバランスとしての水晶発振子の利用は、1960年頃から始まり、広い分野での応用がなされてきた。振動数の変化量と付着物質の質量との関係は、Sauerbrey式と呼ばれる式(3-1)で表される¹⁹⁾。

$$\Delta F = \frac{-2F_0^2}{(\rho_q \mu_q)^{1/2}} \Delta m \quad (\text{式 3-1})$$

ここで、 ΔF は振動数変化量(Hz)、 F_0 は基本振動数(Hz)、 ρ_q は水晶の密度(2.65 g cm⁻³)、 μ_q は水晶のずり剪断係数(2.95×10¹¹ dyn cm⁻²)、 Δm (ng cm⁻²)は電極1cm²あたりに付着した物質の質量変化である。式(1)の定数項をKと置くと式(3-2)のようになる。

$$\Delta F = K \Delta m \quad (\text{式 3-2})$$

本研究で用いた水晶発振子は昭和クリスタル株式会社製の27 MHz AT-cut型で、従来の9 MHz水晶発振子と比較して水晶板の厚みが1/3になった結果、基本振動数 F_0 はこれまでの3倍の27 MHz、そして電極面積(4.9 mm²)はこれまでの約1/3となっている(図3-6)。これらの条件を式(3-1)に代入すると、式(3-2)の比例定数Kは計算上これまでの9倍となる。LB膜累積実験により比例定数Kを求めると、 $K = 1.62 \text{ Hz ng}^{-1} \text{ cm}^2$ となり0.62 ng cm⁻²の質量変化に対し1 Hz振動数が低下することがわかった²⁰⁾。電極は、下地にチタンを蒸着し、その上に金を蒸着してあり、強力な酸化剤による洗浄に十分耐えうる構造となっている。この27 MHz水晶発振子を用いることにより、これまで検出できなかったわずかな質量変化が検出できることが期待される。実際 Okahata らにより脂質単分子膜^{20,21)}やDNA²²⁾に対する低分子化合物の結合挙動が検出されている。

本研究においては水面単分子膜の電極への固定化量、すなわち膜量は充分少ないとみなすことができ、膜の粘弾性の効果は無視できる。しかしながら水中においてタンパク質の結合を観察すると媒体の効果や粘弾性の効果²³⁾などから得られる振動数の変化量は実際のタンパク質の結合量よりも大きくなった。9 MHz水晶発振子については水中でのタンパク質の結合による振動数変化について $\Delta F(\text{水中}) = 2 \times \Delta m$ という関係が成り立つ

ことが確認されている^{11,24)}。本研究で用いた 27 MHz 水晶発振子についてもこの関係が成り立つことを確認した。

(b) 測定装置について

全装置の概略を図 3-7 に示した。水晶発振子を前述の回路に接続し、直流電圧 (約 5 V) を印加させた。水晶発振子の共振振動数をユニバーサルカウンターに示し、パーソナルコンピューターにデジタル信号として取り込んだ。カウンターとコンピューターの組み合わせは表 3-1 に示したように複数の機種 of の組み合わせが可能となり汎用性が高まった。実際には組み合わせにより表示される時間スケールが実際の時間の経過とはごくわずかに異なってくるのだが本研究においてはそれは実験誤差に比べれば無視できるものであった。専用ソフトにより測定データはリアルタイムで表示され、保存、外部出力が可能である。測定セル (10 ml) はアルミ製ブロック恒温槽に接続されたジャケット内に設置され、任意の温度 (0~80 °C) に設定することが可能となっている。測定セル内は、マグネチックスターラーによって攪拌され、常に系内は均一に保たれた。

本研究のように水溶液中で発振子を使用する場合、何も加工せずに使用すると 2 つの電極間やむき出しになっている通電部分で漏電が生じてしまう。そこで実験に用いた水晶発振子には以下のような加工を施した。クロロホルム-メタノール混合溶媒で煮沸後蒸留水で煮沸したゴム板とプラスチック板とシリコーン糊で水晶発振子の電極の片面を被覆した(図 3-8(a))。その際、微少な空孔ができたり、電極上へのシリコーン糊の流出が起これないように最新の注意を払って加工した。これと平行して昭和クリスタル(株)の努力により、最終的にはシリコン成型された一体型の水晶発振子(図 3-8(b)) が開発され、これにより被覆の必要がなくなった。

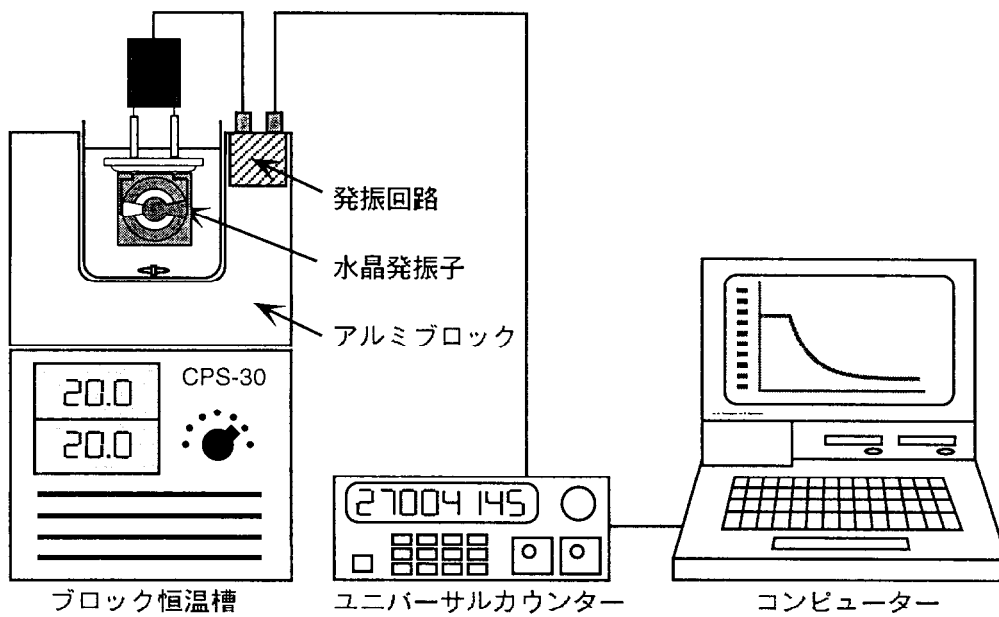


図 3-7 全測定装置の概略図

表 3-1 周波数カウンターとパーソナルコンピューターの接続可能な組み合わせ

Type	周波数カウンター	通信方法	パーソナル コンピューター
(a)	UNIVERSAL COUNTER SC-7201 (岩崎通信機社製)	GP-IB ボード	デスクトップ型 PC-9801 シリーズ (NEC 社製)
(b)	HP 53131A 225 MHz UNIVERSAL COUNTER (HEWLETT PACKARD 社製)	RS-232C	ノート型 PC-9801 シリーズ (NEC 社製)
(c)	HP 53131A 225 MHz UNIVERSAL COUNTER (HEWLETT PACKARD 社製)	RS-232C ↓ モデムポート	Apple Machintosh シリーズ (Apple 社)

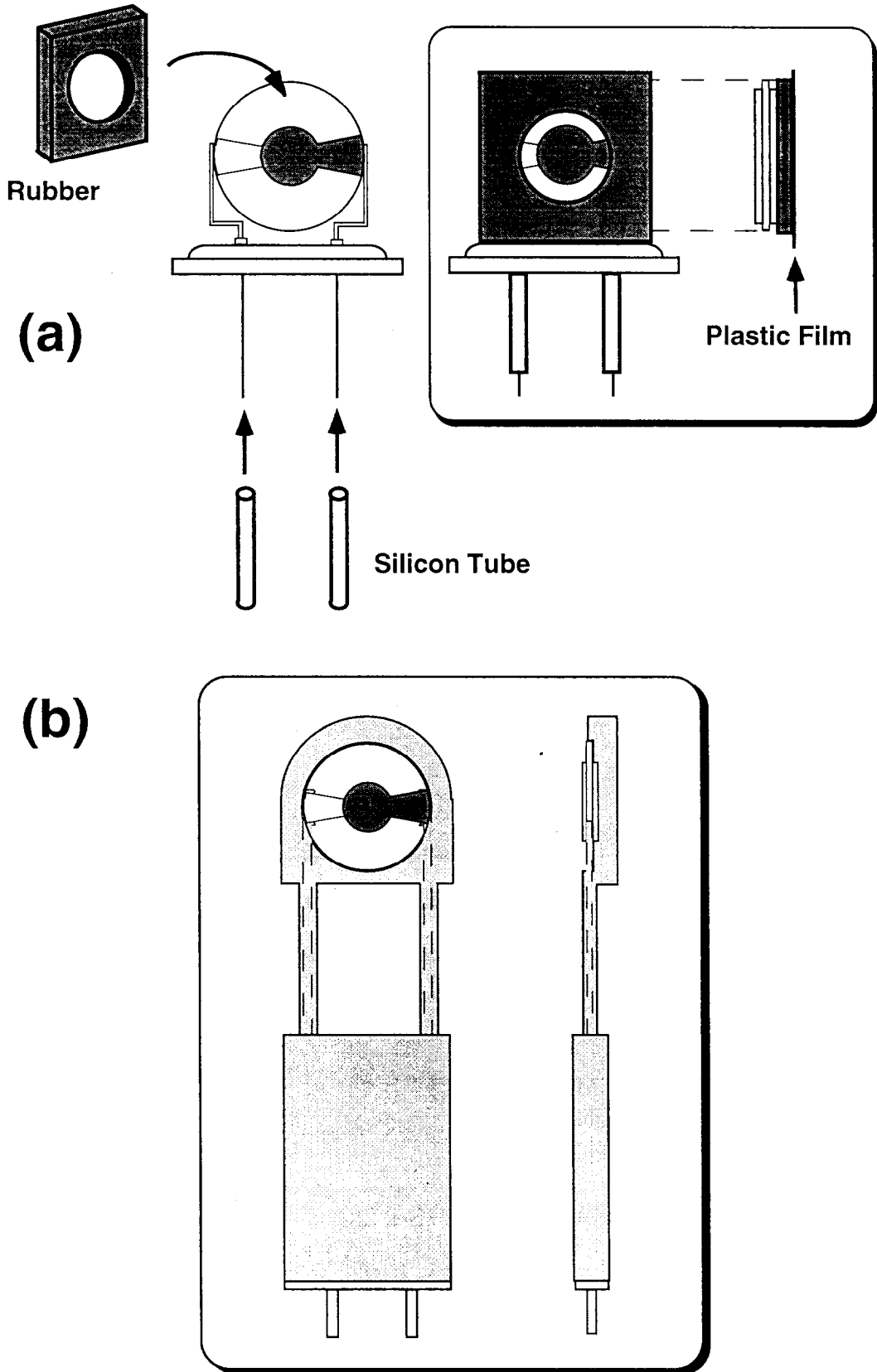


図 3-8 (a) 片面を被覆した水晶発振子および (b) 一体成型型の水素発振子

3-2-3 測定方法

気-水界面の脂質単分子膜と QCM 法を組み合わせた測定系(図 3-2)は Ebara と Okahata によって確立され²⁵⁾、Serizawa らによってガングリオシド混合単分子膜に対する種々のゲスト分子の結合性が評価された^{8-10,12,13)}。

水面単分子膜は第2章で用いたシステムまたは同様の構成から成る圧力センサー FSD-22 とコントローラ FSD-20AD を用いたシステム(サンエス計測株式会社(現 USI システム株式会社))を用いた。測定を指定した表面圧の単分子膜を作成するモードである LB モードにして、単分子膜の表面圧が 30 mN m^{-1} となるように設定した。下層水には $10 \text{ mM phosphate buffer (pH 7.2)}$ または PBS (pH 7.4) を用い、温度は $20 \text{ }^\circ\text{C}$ とした。気-水界面に脂質溶液を展開後、テフロン製バリアで単分子膜を圧縮(FSD-110 システムでは $1000 \text{ mm}^2 \text{ min}^{-1}$; FSD-20AD システムでは $1200 \text{ mm}^2 \text{ min}^{-1}$)した。表面圧 30 mN m^{-1} の単分子膜が作成できたところで LB リフトコントローラ(FSD-110 システムでは FSD-23; FSD-20AD システムでは FACE Surface Pressure Meter HBM (協和界面科学株式会社))により水晶発振子を水面に 10 mm min^{-1} の速度で降下させていき、その電極上に単分子膜を一層付着させた。

本研究で用いた水晶発振子の金電極表面は純水に対して 90° といった静的接触角を持っており十分に疎水的であることから²⁶⁾、水中において脂質単分子膜のアルキル鎖部分を電極面に安定に付着できることが期待された。電極上の脂質単分子膜の剥離あるいは脂質分子の反転を避けるために、緩衝液を満たした移動用カバーを水晶発振子に被せ、脂質膜を空気中にさらすことのない様 8.0 ml の緩衝液が入った測定用セルに移動させた(図 3-9)。また単分子膜を付着させる前の気相中での水晶発振子の振動数と、単分子膜を付着し発振子を乾燥させた後の水晶発振子の振動数の比較により単分子膜がほぼ一層移しとられたことを確認した(振動数にして 500 Hz 程度の減少)。

水面単分子膜を電極面に付着させた水晶発振子を、脂質膜を空気中にさらすことなく、発信回路のアダプターに取り付け、測定用緩衝液 ($10 \text{ mM phosphate buffer (pH}$

7.2) または PBS (pH 7.4)) 8.0 ml の入ったセルに台座がしっかり浸るまで沈め、発振が安定になるまで待った。安定になるのを確認した後、レクチンのストック溶液を系内が所定のレクチン濃度になるようにインジェクトすることにより測定を開始した。

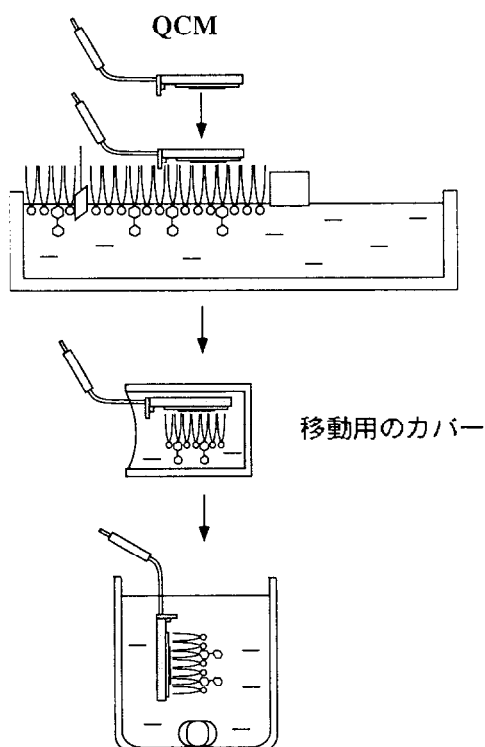
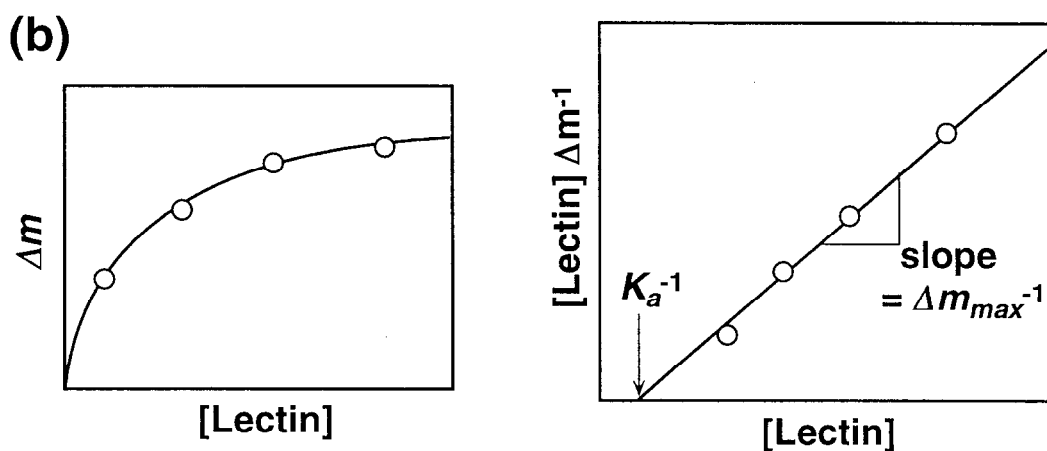
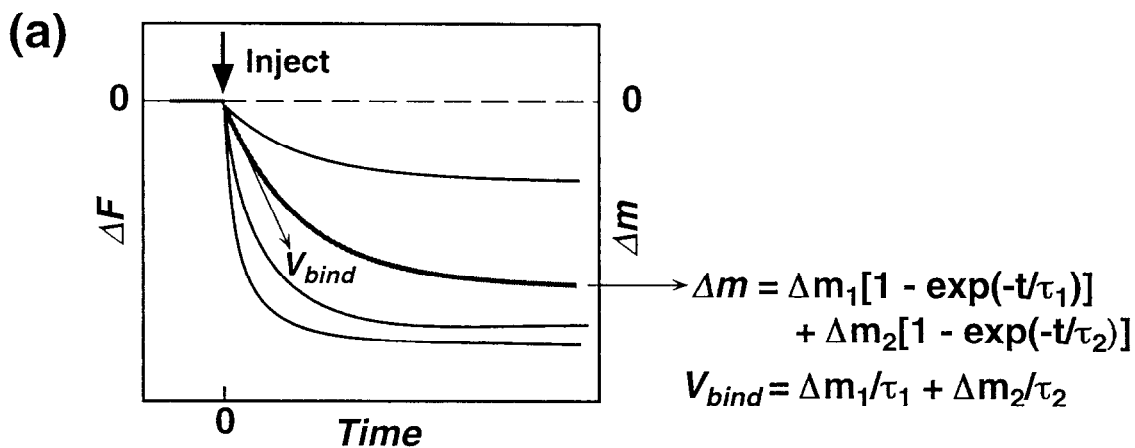


図 3-9 脂質単分子膜を付着させた水晶発振子の測定セルへの移動方法

3-2-4 測定結果の解析方法

水晶発振子の経時変化から初期結合速度 V_{bind} の値を求め、結合が平衡に達したときの振動数変化 ΔF すなわち結合量 Δm についても評価を行った。また Δm のゲスト濃度依存性からホストである脂質単分子膜に対するゲスト化合物の相互作用の動力学パラメーターを求めることができる^{8-13,20,21)}。本研究では飽和法により飽和結合量 Δm_{max} 、結合定数 K_d の値を求めた。更に詳しく結合挙動について評価する場合については緩和法を用いて結合速度定数 k_1 、解離速度定数 k_{-1} 、さらに結合定数 K_d の値を求めた。それぞれの解析方法について模式的に図 3-10 に示した。



$$\frac{[\text{Lectin}]_0}{\Delta m} = \frac{1}{\Delta m_{\max}} [\text{Lectin}]_0 + \frac{1}{\Delta m_{\max} K_a}$$

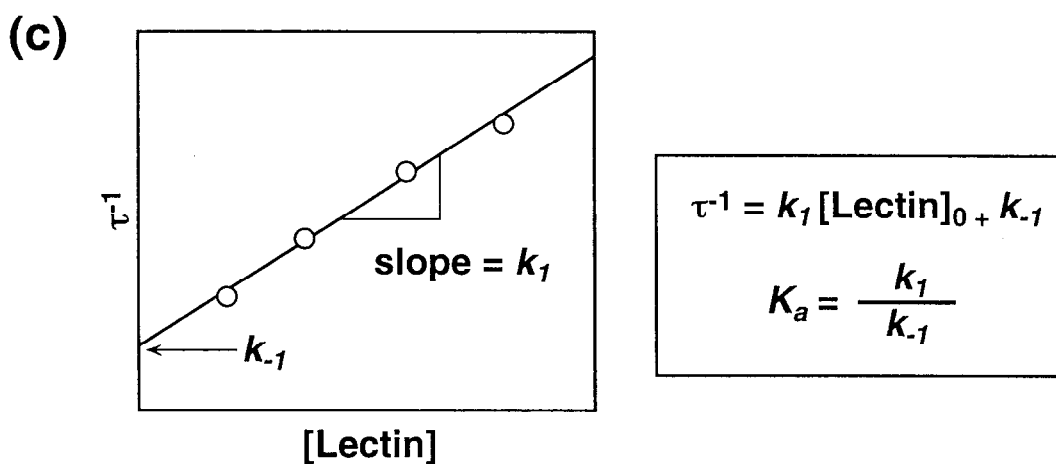


図 3-10 測定結果の解析方法の模式図

(a) 結合曲線のカーブフィッティング

(b) 飽和法による解析

(c) 緩和法による解析

a) 飽和法による解析^{21,27)}

二基質の平衡反応式は次式で表すことができる。



$$K_a = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[C]}{[H][G]} \quad (\text{式 3-4})$$

ここで、[H] は基板上のホストである単分子膜濃度、[G] は溶液中のレクチンなどのゲスト分子の濃度、[C] は生成した複合体の濃度、 k_1 は結合速度定数 ($M^{-1} s^{-1}$)、 k_{-1} は解離速度定数 (s^{-1}) である

今回の測定系では

$$[G]_0 \gg [H]_0$$

とおけることから、

$$[G] \doteq [G]_0$$

$$[H] = [H]_0 - [C]$$

が成り立つ。これを式 (3-4) に代入すると、

$$\begin{aligned} [C] &= K_a [H][G] \\ &= K_a ([H]_0 - [C])[G]_0 \\ &= K_a [G]_0 [H]_0 - K_a [C][G]_0 \end{aligned} \quad (\text{式 3-5})$$

式 (3-5) を変形すると、

$$\frac{[C]}{[H]_0} = \frac{K_a [G]_0}{1 + K_a [G]_0} \quad (\text{式 3-6})$$

と書ける。ここでゲスト濃度 [C] における平衡状態での結合量を Δm 、飽和結合量を Δm_{max} とすると、

$$\frac{[C]}{[H]_0} = \frac{\Delta m}{\Delta m_{max}}$$

であるから、これを式 (3-6) に代入すると

$$\frac{\Delta m}{\Delta m_{max}} = \frac{K_a[G]_0}{1 + K_a[G]_0} \quad (\text{式 3-7})$$

となる。これを变形すると

$$\frac{[G]_0}{\Delta m} = \frac{1}{\Delta m_{max}}[G]_0 + \frac{1}{\Delta m_{max}K_a} \quad (\text{式 3-8})$$

という Langmuir プロット(逆数プロット)の式となる。ゆえに、 $[G]_0$ に対して $[G]_0 / \Delta m$ をプロットすることにより得られる直線の傾きから Δm_{max} を、y 切片から K_a を求めることができる。

b) 緩和法による解析^{11,21,27)}

式 (3-3) の平衡反応式より、複合体の生成速度は次式で表すことができる。

$$\frac{d}{dt}[C] = k_1[H][G] - k_{-1}[C] \quad (\text{式 3-9})$$

ここで $[G] \doteq [G]_0$ 、 $[H] = [H]_0 - [C]$ であるから、

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[C] &= k_1[G]_0([H]_0 - [C]) - k_{-1}[C] \\ &= k_1[H]_0[G]_0 - [C](k_1[G]_0 + k_{-1}) \\ &= -(k_1[G]_0 + k_{-1}) \left([C] - \frac{k_1[H]_0[G]_0}{k_1[G]_0 + k_{-1}} \right) \end{aligned} \quad (\text{式 3-10})$$

ここで、

$$[C]' = [C] - \frac{k_1[H]_0[G]_0}{k_1[G]_0 + k_{-1}} \quad (\text{式 3-11})$$

とすると、

$$\frac{d}{dt}[C]' = -(k_1[G]_0 + k_{-1})[C]' \quad (\text{式 3-12})$$

この式を時間で積分することにより、以下の式が得られる。

$$[C]' = Ae^{-\frac{1}{\tau}t} \quad (\text{式 3-13})$$

ここで、

$$\frac{1}{\tau} = -(k_1[G]_0 + k_{-1}) \quad (\text{式 3-14})$$

とする。

式 (3-11) および式 (3-13) より、

$$[C] = \frac{k_1[H]_0[G]_0}{k_1[G]_0 + k_{-1}} - Ae^{-\frac{1}{\tau}t} \quad (\text{式 3-15})$$

ここで、 $t=0$ のとき、 $[C]=0$ ゆえ、

$$A = -\frac{k_1[H]_0[G]_0}{k_1[G]_0 + k_{-1}} \quad (\text{式 3-16})$$

よって、複合体の生成濃度は以下の式となる。

$$\begin{aligned} [C] &= \frac{k_1[H]_0[G]_0}{k_1[G]_0 + k_{-1}} (1 - e^{-\frac{1}{\tau}t}) \\ &= A(1 - e^{-\frac{1}{\tau}t}) \end{aligned} \quad (\text{式 3-17})$$

水晶発振子を用いた測定では、複合体の生成濃度を $[C] \propto \Delta m \propto \Delta F$ として、 ΔF の経時変化を測定した結果を、式 (3-17) で回帰分析することにより緩和時間の逆数 τ^{-1} が求められる。さまざまなレクチン濃度での複合体生成量の経時変化の結果を同様な方法で回帰分析し、その結果得られた各緩和時間の逆数 τ^{-1} 値を求めた。添加したゲスト濃度 $[G]_0$ に対してこの τ^{-1} 値をプロットすることにより得られる直線から、式 (3-14) にしたがって傾きから k_1 を、 y 切片から k_{-1} を求めることができる。そして k_1 を k_{-1} で除する

ことにより結合定数 K_a (M^{-1}) を算出した。実際にはレクチンの結合挙動は

$$[C] = \Delta m_1 (1 - e^{-\frac{1}{\tau_1} t}) + \Delta m_2 (1 - e^{-\frac{1}{\tau_2} t}) \quad (\text{式 3-18})$$

の式のように2つの exponential の式によくフィットした。このうち緩和時間が遅い方の過程は値のばらつきが大きかったので、緩和時間が速い過程のみについて解析を行った。

本測定においては測定時間内に結合が完全には飽和しない場合が多かったので、飽和法による解析の場合にも結合量 Δm の値は (式 3-18) によって得られた Δm_1 , Δm_2 の値から $\Delta m = \Delta m_1 + \Delta m_2$ として求めた。また初期結合速度は (式 3-18) の微分

$$\frac{d}{dt}[C] = \frac{\Delta m_1}{\tau_1} e^{-\frac{1}{\tau_1} t} + \frac{\Delta m_2}{\tau_2} e^{-\frac{1}{\tau_2} t} \quad (\text{式 3-19})$$

の $t \rightarrow 0$ における値、すなわち

$$V_{bind} = \frac{\Delta m_1}{\tau_1} + \frac{\Delta m_2}{\tau_2} \quad (\text{式 3-20})$$

として与えられるのでこの (式 3-20) により得られた値を用いた。

3-3 結果および考察

3-3-1 混合単分子膜中の LacCer の存在状態の効果

第2章で示したようにスフィンゴ糖脂質 LacCer は単分子膜中で DPPC とは均一に混合するのに対し DOPC とは相分離する。単分子膜中の LacCer 含量を 20 mol% に固定し、DPPC および DOPC をマトリックス脂質とした LacCer 混合単分子膜に対して allo A を 3.0×10^{-7} M 添加したときの水晶発振子の振動数の経時変化を追跡した(図 3-11)。LacCer / DPPC 混合単分子膜に対する allo A の結合はマトリックス脂質単独膜に対する非特異結合と同程度であった。これに対し LacCer / DOPC 膜に対する結合量は非常に大きいものとなった。この結合はあらかじめ 10 mM のラクトースを系に存在させておくことにより抑制された(図 3-12) ことから、膜中の LacCer の親水部のガラクトース残基に対する特異的な結合であることがわかった。以上の結果から allo A は相分離してドメイン状になった LacCer に対して高い結合性を示すことが明らかとなった。膜中の糖脂質含量が同じであるにもかかわらず、その存在状態の違いにより糖鎖認識性が変化するという興味深い結果が得られた。

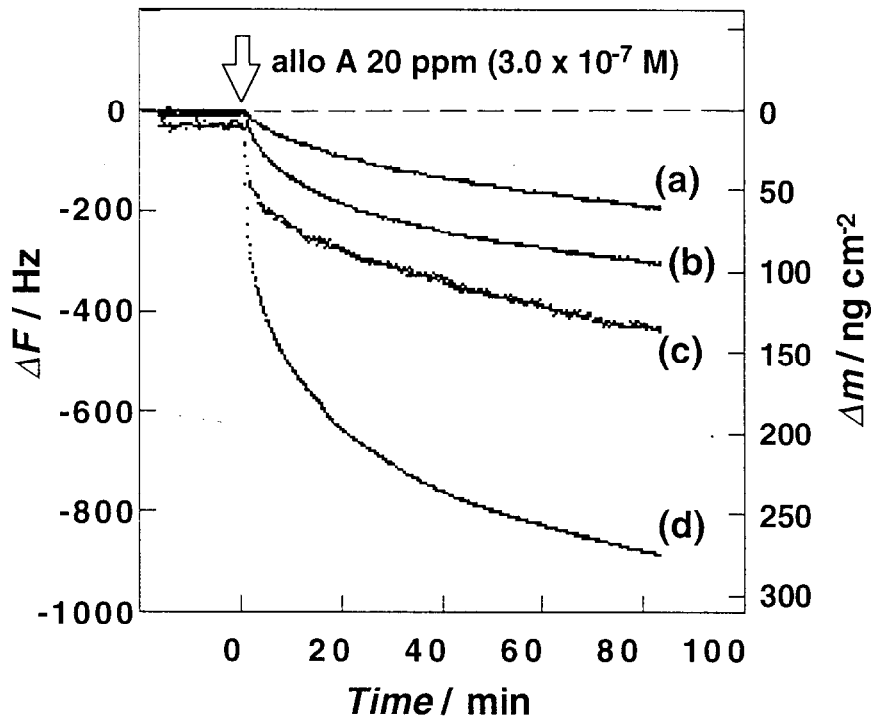


図 3-11 LacCer / リン脂質混合単分子膜に対する allo A の結合挙動
 (a) DPPC 単分子膜, (b) DOPC 単分子膜, (c) LacCer 20 mol% in DPPC 混合単分子膜,
 (d) LacCer 20 mol% in DOPC 混合単分子膜
 (条件: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2), 20 °C, 30 mN m⁻¹)

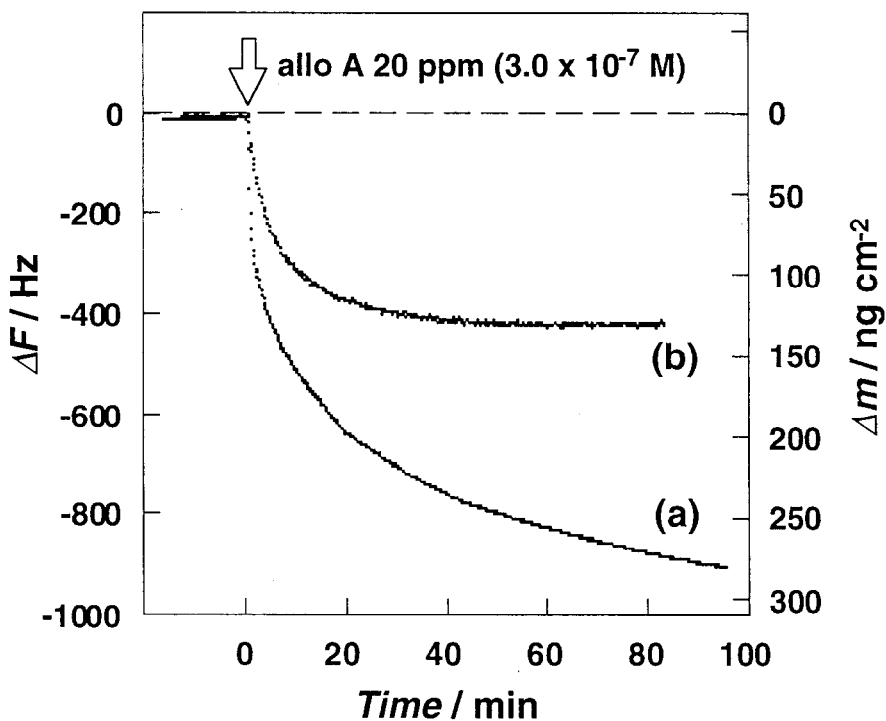


図 3-12 LacCer 20 mol% in DOPC 混合単分子膜に対する allo A の結合挙動
 (a) 0 mM ラクトース, (b) 10 mM ラクトース存在下
 (他の条件は図 3-11 に同じ)

3-3-2 混合単分子膜中の LacCer 含量の効果

次に混合単分子膜中の LacCer 含量の効果について検討した。LacCer / DOPC 混合単分子膜について膜中の LacCer 含量を変化させたときの allo A の結合挙動を図 3-13 に示した。単分子膜中の LacCer 含量の増加とともに allo A の結合量も増加した。LacCer / DPPC 混合膜についても同様の測定を行い、それぞれの混合単分子膜系について得られた結合曲線から結合量 Δm と初期結合速度 V_{bind} を求めた。それらの値を単分子膜中の LacCer 含量に対してプロットした結果を図 3-14 と 3-15 にそれぞれ示した。

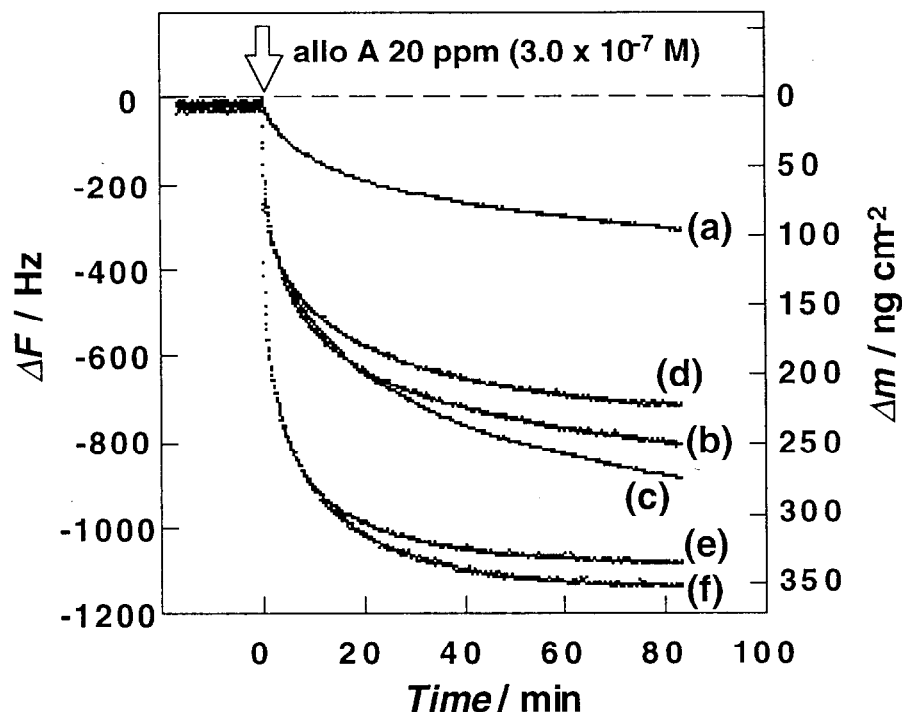


図 3-13 LacCer / DOPC 混合単分子膜に対する allo A の結合挙動
LacCer 含量 (a) 0 mol%, (b) 5 mol%, (c) 20 mol%, (d) 50 mol%, (e) 80 mol%,
(f) 100 mol% の LacCer / DOPC 混合単分子膜 (条件は図 3-11 に同じ)

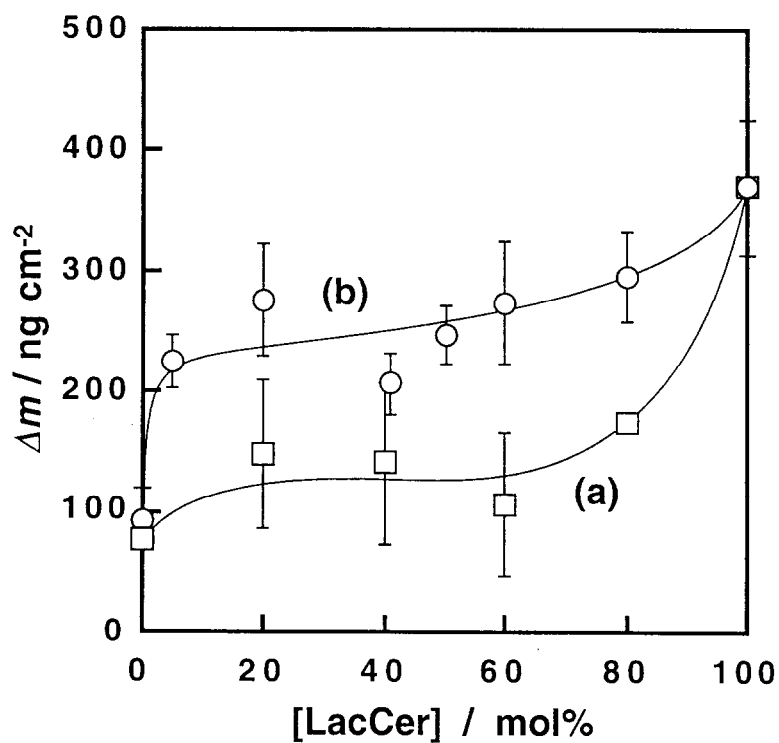


図 3-14 (a) LacCer / DPPC および (b) LacCer / DOPC 混合単分子膜に対する allo A の結合量 Δm の LacCer 含量依存性 (条件は図3-11に同じ)

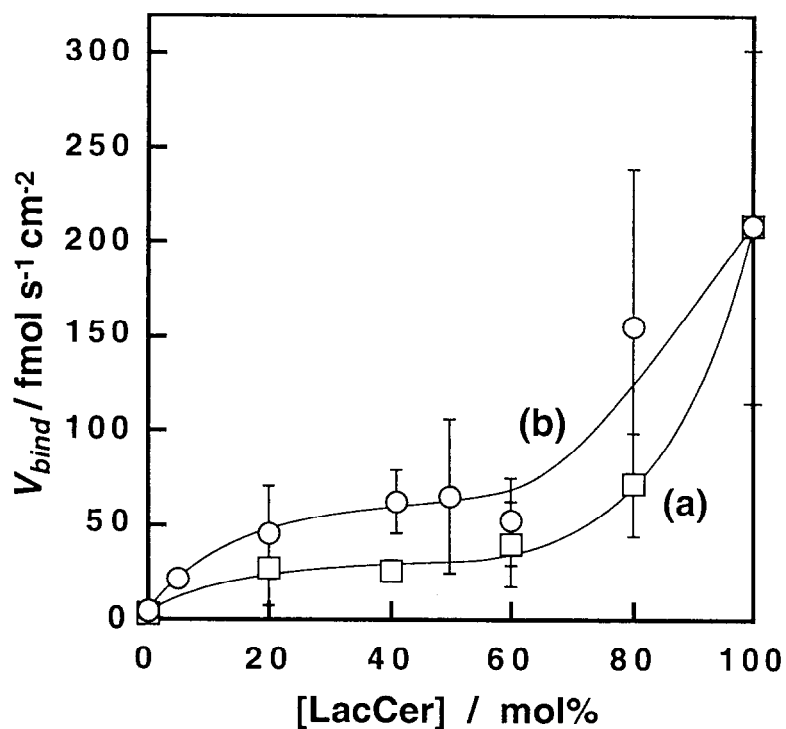


図 3-15 (a) LacCer / DPPC および (b) LacCer / DOPC 混合単分子膜に対する allo A の初期結合速度 V_{bind} の LacCer 含量依存性 (条件は図3-11に同じ)

平衡時における結合量 Δm と初期の結合速度 V_{bind} のどちらのパラメータについても LacCer / DOPC 膜についての値の方が常に LacCer / DPPC 膜の値よりも大きくなり、相分離した LacCer の方が allo A の結合性が高いことがわかった。LacCer 100 mol% 単分子膜に対する結合性が最大であるという結果も、相分離した LacCer に対する結合性が高いことを支持している。LacCer 100 mol% 単分子膜に対しての結合性が最大となったが、これについては水酸基が並んだ界面に対して非特異的に結合してしまっているという危険性があった。そこで同様に界面に水酸基が並んだ GlcCer 単分子膜に対する allo A の結合を観察した(図 3-16(A))。allo A の結合量は非特異結合と同程度となり、LacCer 100 mol% 膜に対する allo A の結合は糖鎖認識を介した特異的なものであることが確認できた。

なおマトリックス脂質を親水部構造がより小さい DPPE としたときには、DPPE 中で均一に混合している LacCer に対して allo A の結合が観察された(図3-16(B))。したがって、LacCer / DPPC 膜に対する allo A の結合量が少なかったのは DPPC の親水部のかさ高さによる効果も大きいことが示唆された。すなわち相分離したドメイン中の LacCer はその影響を受けず allo A に認識されたとも考えられた。

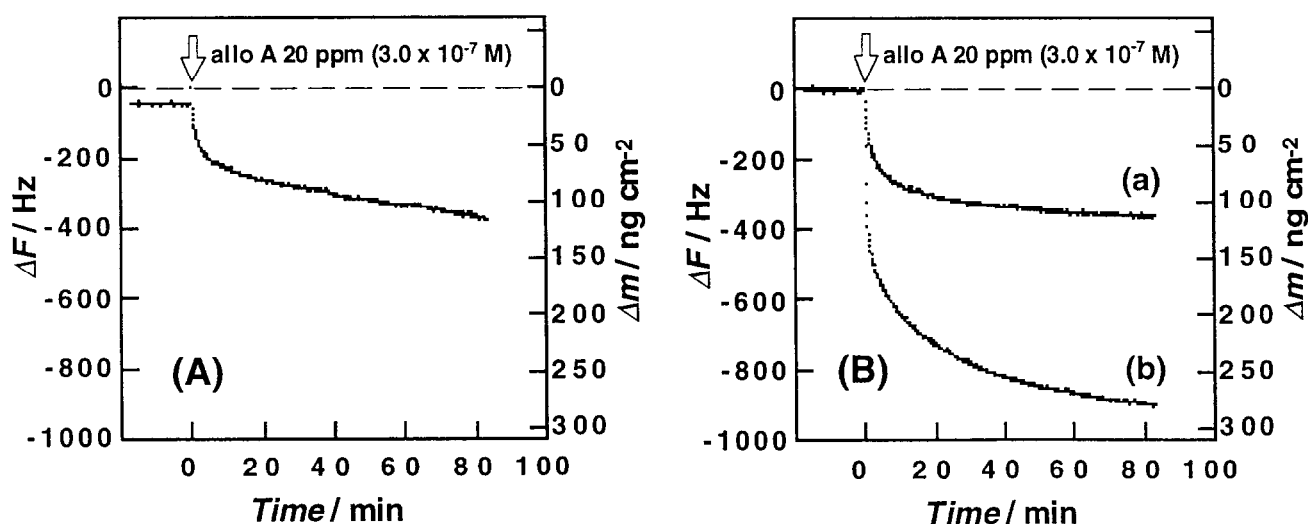


図 3-16 (A) GlcCer 単分子膜に対する allo A の結合挙動
 (B) (a) DPPE 単分子膜 および (b) LacCer 20 mol% in DPPE 単分子膜
 に対する allo A の結合挙動
 (条件は図 3-11 に同じ)

3-3-3 混合単分子膜の表面圧の効果

本章の実験は脂質単分子膜の表面圧を 30 mN m^{-1} に設定して行っている。これは間接的な実験結果から示唆されている生体膜の表面圧が約 30 mN m^{-1} であるという報告²⁸⁾に基づいて設定した値である。しかし実際の生体膜の表面圧はこれらの報告による値とは異なる可能性もある。したがって表面圧の異なる脂質単分子膜に対するゲスト分子の結合性を検討する意義は大きい。

LacCer / DOPC 混合単分子膜の π -A 等温線は膨張した膜構造を示し、表面圧の変化量に対する分子占有面積の変化量が LacCer / DPPC 混合単分子膜に比べてはるかに大きい(図 2-11 および 3-17(A))。この特徴を利用して、混合単分子膜の表面圧、言い換えれば平均分子占有面積がレクチンの結合性に与える影響について検討した。10, 20, 30, 40 mN m^{-1} の各表面圧で単分子膜を累積し、allo A の結合挙動を追跡した(図 3-17(B))。マトリックス脂質である DOPC 単分子膜についても同様の測定を行い、それぞれ得られた結合曲線より求めた結合量 Δm と初期結合速度 V_{bind} の値を単分子膜の平均分子占有面積に対してプロットした結果を図 3-18 と 3-19 に示した。結合量に関しては、LacCer / DOPC 膜に対する値は分子占有面積には依存しなかったが、DOPC マトリックスに対する非特異結合の量は分子占有面積の増加とともに大きくなった。これは分子占有面積の増加により界面に DOPC の疎水部がより多くさらされるようになり、allo A が疎水的相互作用で非特異的に結合したためと考えられる。結果として表面圧の低下、すなわち分子占有面積の増加により特異的な結合と非特異結合との差が小さくなっていくことがわかった。LacCer / DOPC 膜においては膜中の LacCer は DOPC 中から相分離して凝縮した構造を取っているために表面圧の変化による影響をあまり受けず、平均分子占有面積の増加は主に DOPC の寄与によるものであると考えられる。したがって LacCer / DOPC 膜に対する allo A の結合性は変化しなかったのではないかと考えられる。しかし実際には DOPC 膜に対する非特異結合は増加しているので分子占有面積の

より広い LacCer / DOPC 膜に対する allo A の結合ではどちらの寄与が大きいのかは明確ではない。

初期結合速度に関しては DOPC 膜については分子占有面積の増加とともにその値がわずかに大きくなっているが、LacCer / DOPC 膜に対する速度の方がはるかに大きく、実質的には分子占有面積の影響はみられなかった。

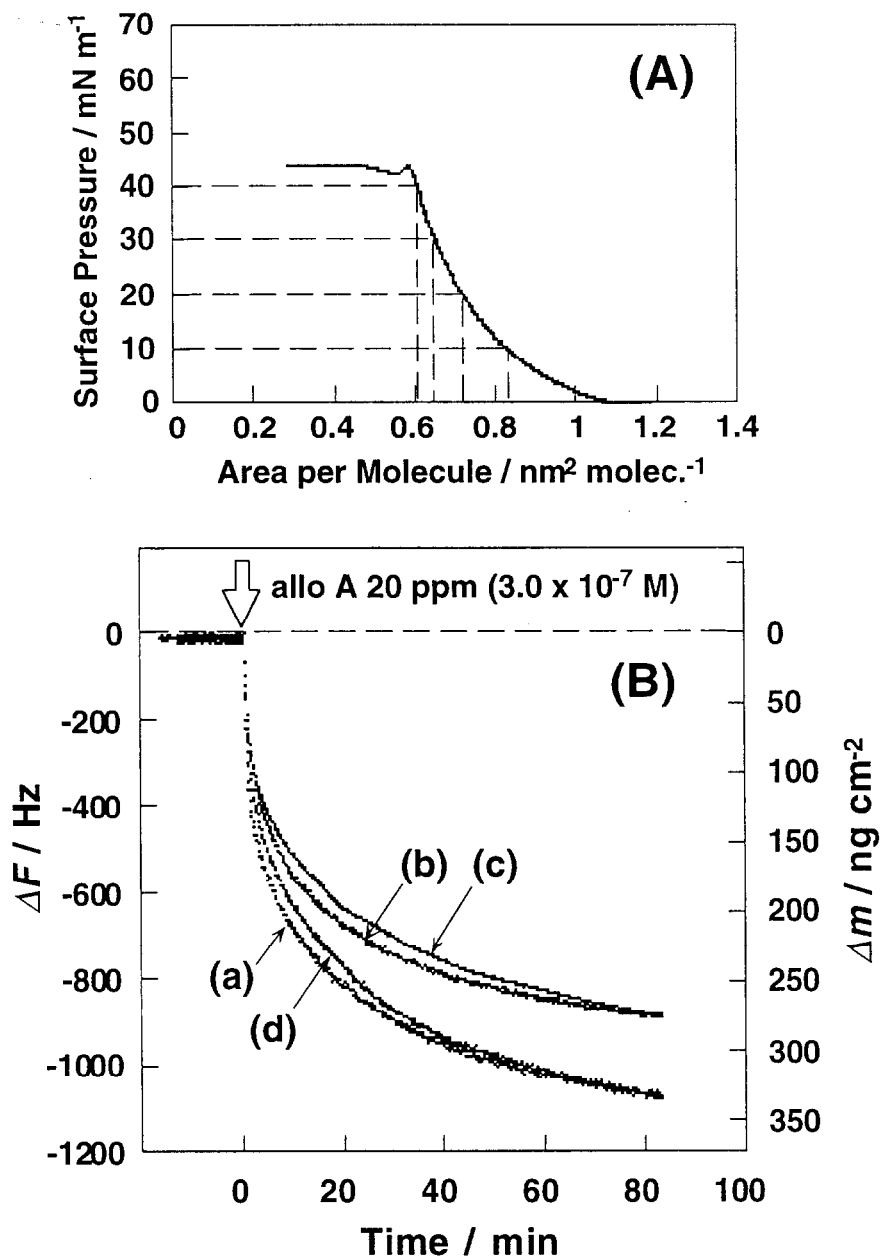


図 3-17 (A) LacCer / DOPC 混合単分子膜の π -A 等温線
 (下層水: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2), 圧縮速度 $1000 \text{ mm}^2 \text{ min}^{-1}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$)
 (B) LacCer 20 mol% in DOPC 混合単分子膜に対する allo A の結合挙動
 (a) 表面圧 10 mN m^{-1} , (b) 20 mN m^{-1} , (c) 30 mN m^{-1} , (d) 40 mN m^{-1} (他の条件は図 3-11 に同じ)

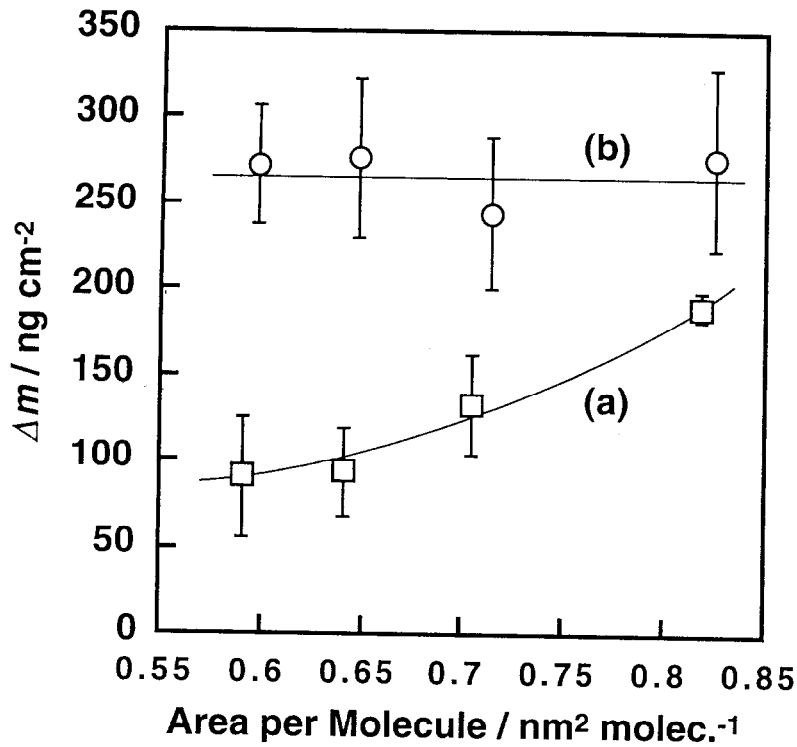


図 3-18 (a) DOPC および (b) LacCer 20 mol% in DOPC 混合単分子膜に対する allo A の結合量 Δm における単分子膜の平均分子占有面積依存性 (他の条件は図 3-11 に同じ)

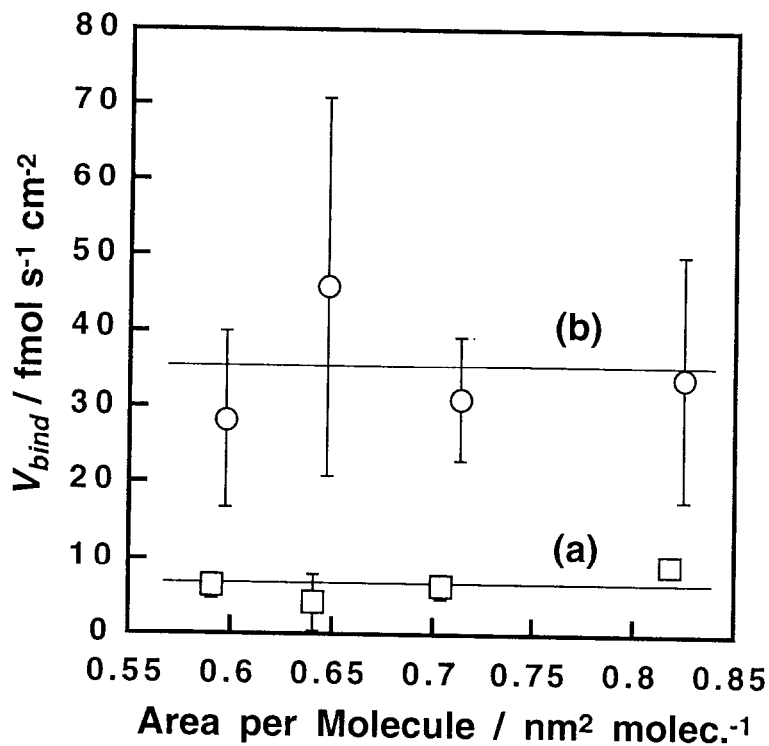


図 3-19 (a) DOPC および (b) LacCer 20 mol% in DOPC 混合単分子膜に対する allo A の初期結合速度 V_{bind} における単分子膜の平均分子占有面積依存性 (他の条件は図 3-11 に同じ)

3-3-4 結合定数の算出

このように allo A は単分子膜中で均一に分散したものよりも相分離した LacCer に対して高い結合性を示すことがわかった。この結合性の違いが LacCer 混合単分子膜と allo A との相互作用における動力学パラメータにどのように反映されているのかを明らかにするために 3-2-4 に示した方法に基づき結果の解析を行った。

はじめに飽和法による解析を行った。図 3-20 には各混合単分子膜に対する allo A の結合における結合等温線を、図 3-21 には逆数プロットの結果をそれぞれ示した。逆数プロットにより得られた結合定数 K_a および飽和結合量 Δm_{max} の値を表 3-2 にそれぞれ示した。得られた結合定数はいずれの膜についても 10^7 M^{-1} のオーダーとなった。末端にガラクトース残基を持つ遊離の単糖に対する allo A の結合定数はせいぜい $10^2 \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$ である¹⁶⁾。LacCer を水晶発振子の電極という基板に固定化した脂質膜中に組み込んだことによる局所的なホスト濃度の増加により結合定数が大きくなった可能性が高い。事実末端にガラクトースを持つ bi- および tri- アンテナ型の糖鎖に対する allo A の結合定数は 10^5 M^{-1} オーダーとなっている¹⁶⁾。またタンパク質は一般に界面に濃縮されやすいことがエネルギー的に示されているのでこの効果も大きいと考えられる²⁹⁾。脂質単分子膜中の糖脂質に対するレクチンの結合定数が遊離の糖鎖に対するものよりも高くなるという現象は以前にも観察されており^{11,13)}、得られた値の大きさもそれらの報告と近いオーダーとなった。このような "界面の効果" は他のホスト-ゲスト間の相互作用においても観察されている^{20,21,30)}。

それぞれの膜における結合定数の値を比較すると LacCer 20 mol% in DOPC 膜や LacCer 100 mol% 膜に対するものと LacCer 20 mol% in DPPC 膜に対するものとはオーダーには差がなく、むしろ均一に分散した LacCer に対する結合定数の方が高いという結果が得られた。一方飽和結合量については LacCer 20 mol% in DPPC 膜について得られた値は他の膜に対する値の約半分となっており、水晶発振子により観察された allo A の結合性の違いは主として飽和結合量の違いによるものであることがわかった。

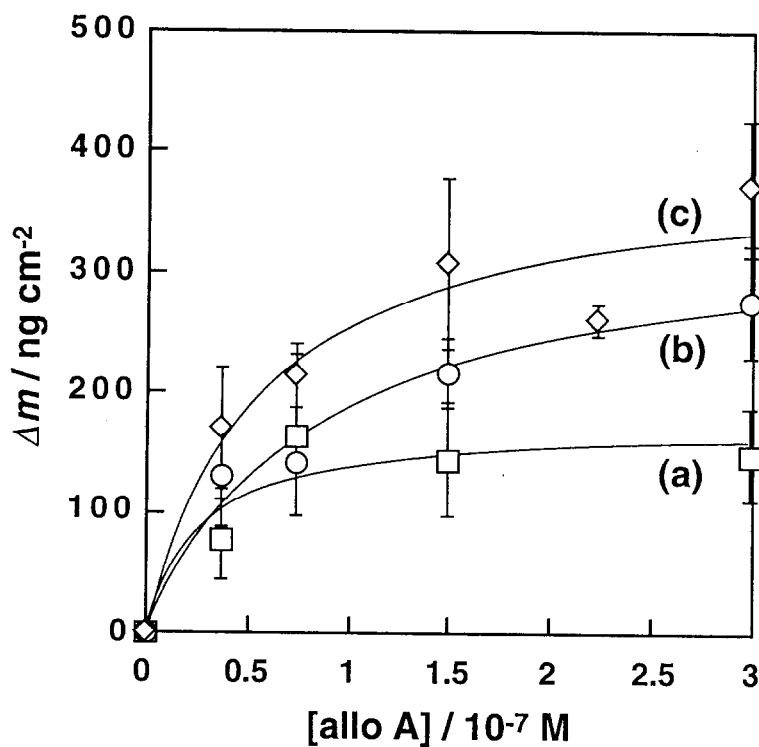


図 3-20 LacCer 混合単分子膜に対する allo A の結合における結合等温線
 (a) LacCer 20 mol% in DPPC, (b) LacCer 20 mol% in DOPC,
 (c) LacCer 100 mol% 混合単分子膜 (条件は図 3-11 に同じ)

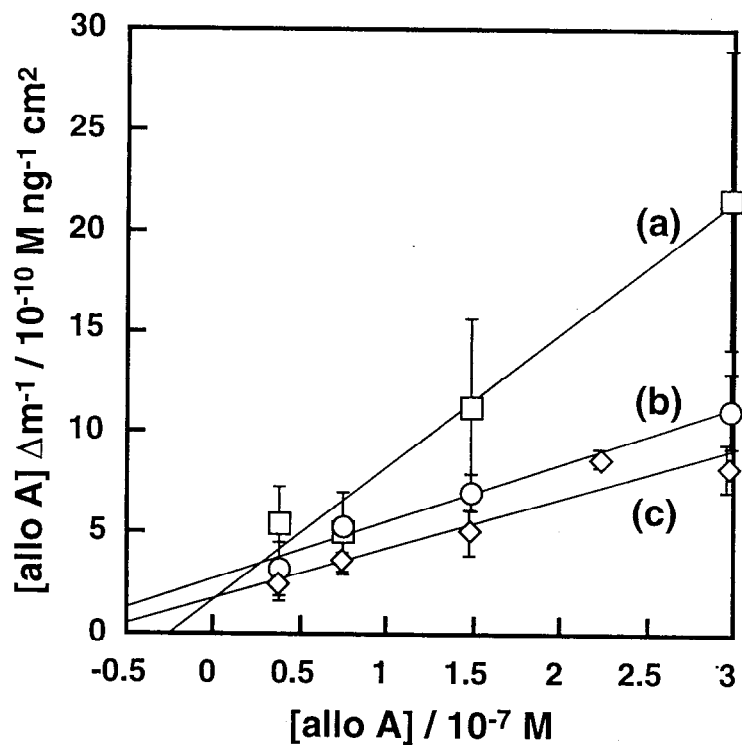


図 3-21 LacCer 混合単分子膜に対する allo A の結合における逆数プロット
 (a) LacCer 20 mol% in DPPC, (b) LacCer 20 mol% in DOPC,
 (c) LacCer 100 mol% 混合単分子膜 (条件は図 3-11 に同じ)

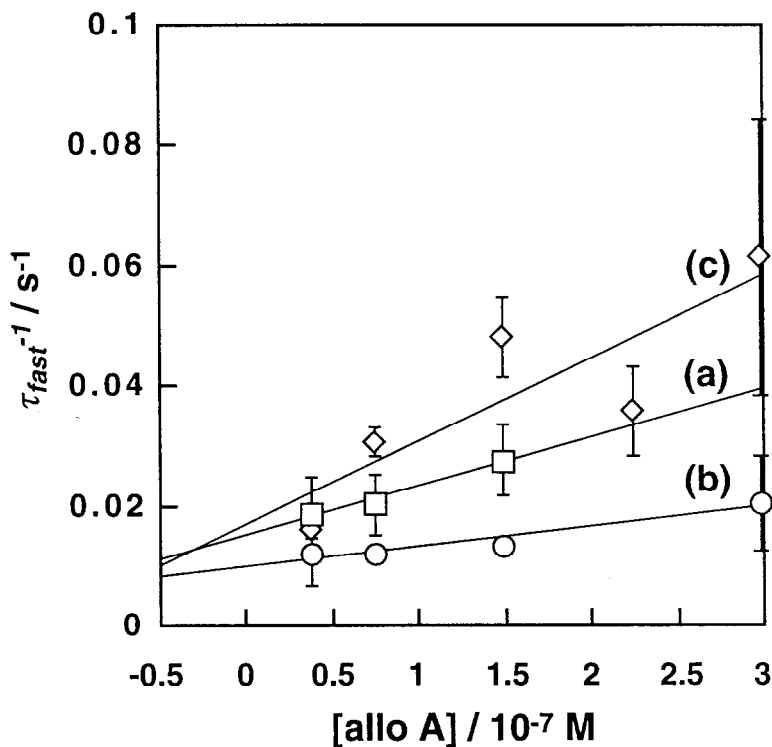


図 3-22 LacCer 混合単分子膜に対する allo A の結合における緩和時間の逆数 τ^{-1} の allo A 濃度依存性
 (a) LacCer 20 mol% in DPPC, (b) LacCer 20 mol% in DOPC,
 (c) LacCer 100 mol% 混合単分子膜
 (条件は図 3-11 に同じ) 緩和時間の速い過程の解析結果を示した

表 3-2 LacCer 混合単分子膜に対する allo A の結合の動力学パラメータ

	緩和法*			飽和法	
	k_1 / 10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹	k_1 / s ⁻¹	K_a / 10 ⁶ M ⁻¹	K_a / 10 ⁶ M ⁻¹	Δm_{max} / ng cm ⁻²
LacCer 20 mol% in DPPC	8.2	0.015	5.5	41	150
LacCer 20 mol% in DOPC	3.4	0.0097	3.5	11	340
LacCer 100 mol%	14	0.018	8.2	15	400

*: 緩和時間の速い過程についての解析結果

ここで得られた結果については大きく分けて2通りの解釈が可能である。一つはそれぞれの膜に対する allo A の結合様式は同じであるが見かけの結合サイトの数が違う、という解釈である。allo A はクラスター状の LacCer に対して結合するとすれば LacCer / DPPC 膜ではクラスターの数、すなわち結合サイトの数が少ないので結合量自体も少なくなった、という考え方ができる。LacCer 20 mol% in DOPC 膜と LacCer 100 mol% では後者の方がクラスター状の LacCer の数が多いにも関わらず飽和結合量の値はそれほど増加していない。これは脂質膜上の糖脂質に対するレクチンの結合においては、みかけの結合サイトの数は最大でもタンパク質が膜界面に単層で結合した量に制限されるためである。実際には糖脂質とレクチンが 1:1 で結合するためにはレクチンの分子サイズにもよるが膜中の糖脂質含量はせいぜい数 mol% もあれば十分である。allo A は分子量 67000 のタンパク質である¹⁴⁾。X線による結晶構造などは明らかになってないため分子のサイズは正確にはわからないが、タンパク質を密度 1 g cm^{-3} の球体と仮定して単分子膜上に単層で結合したときの飽和結合量を見積もると 390 ng cm^{-2} となり、LacCer 100 mol% 膜に対して得られた値とよく一致した。

もう一つの解釈は LacCer / DPPC 膜と LacCer / DOPC 膜とではそれぞれの膜に対する allo A の結合様式に違いがあるのではないかという考え方である。allo A 分子の形状は明らかになっていないが、もし分子の形状に異方性があるならば結合の様式によって膜面に単層に結合したときの飽和結合量の値は異なってくる。各膜に対しての結合定数の値が異なっていることも結合の様式が違うことを示唆している。allo A はサブユニット構成までは明らかになっているが一分子中の糖結合部位の深さや数は明らかになっていない¹⁴⁾。膜中で均一に分散した LacCer と相分離した LacCer とで糖鎖の提示のされ方が異なることは十分考えられ、結果として allo A との結合の様式が異なる可能性は大きい。

次に結合の速度定数を求めることができる緩和法による解析を行った。図 3-22 には緩和時間の逆数 τ^{-1} を allo A 濃度に対してプロットした結果を示した。3-2-4 で述べたように、allo A の結合に基づく振動数変化は式 (3-18) のような2つの exponential の式で

よくフィッティングできたがそのうちの緩和時間の速い過程のみについて解析を行った。この緩和法によって求めた動力学パラメータを表 3-2 に示した。

緩和法により求めた結合速度定数 k_1 については LacCer 100 mol% 膜についての値が他の膜についての値より大きくなった。これは単純に膜中の糖鎖濃度を反映した結果と考えられる。LacCer 含量 20 mol% においては DPPC マトリックスの方が DOPC マトリックスのものよりも大きくなり、均一に分散した LacCer の方が相互作用しやすいという結果となった。解離速度定数 k_2 に関しては DOPC マトリックスの時が他のものよりも小さい値、すなわち脱着しにくいという結果になったが k_1/k_2 から求めた結合定数は LacCer / DPPC 膜の方が LacCer / DOPC 膜よりも大きくなり、飽和法の場合と同様の傾向となった。LacCer 100 mol% 膜については糖脂質密度の効果により k_1 が大きくなったため LacCer 含量 20 mol% の膜よりも大きな結合定数となった。緩和法で求めた結合定数と飽和法で求めたものとは数倍の差がみられたが、これは結合曲線をカーブフィッティングした際の緩和時間の遅い過程についての結合量も全結合量の約半分弱となったためである。今回の系のように結合挙動が 1 つの exponential の式でフィットできず、さらにそれぞれの成分の寄与が同等であるような複雑な結合過程については、緩和法による解析が適当でないのかもしれない。反応の初期における結合性については初期結合速度の値で評価した方が結合曲線との対応がよい。少なくとも平衡時の結合を反映した飽和法による解析結果とは区別して議論した方がよいものと思われる。

結論として単分子膜中で相分離した LacCer と理想混合した LacCer に対する allo A の結合性の違いは「糖鎖の提示のされ方のなど違いによるみかけの結合サイトの数の違い、あるいは allo A と LacCer との結合様式の違い」によるものであると考えられた。

3-3-5 他のレクチンの結合挙動との比較

allo A レクチンは単分子膜中で相分離した LacCer に対して高い結合性を示したが、この現象の一般性を知るために、他のガラクトース認識性レクチンを用いて相分離した LacCer に対する認識性について検討した。

RCA (ヒママメレクチン) はヒマ豆 (*Ricinus communis*) から調製されたレクチンで、RCA₆₀ (RCA II, Ricin) と RCA₁₂₀ (RCA I) の 2 種類が存在する³¹⁾。いずれも基本単位は α (Mw 31000), β (Mw 32000) の 2 つのサブユニットであり、RCA₆₀ は $(\alpha\beta)$ 、RCA₁₂₀ は $(\alpha'\beta')_2$ (Mw 130000) となっている。 α サブユニットは非常に細胞毒性が強く (タンパク質合成阻害活性)、そのため RCA₆₀ は現在市販されていない。RCA₁₂₀ の β' サブユニットには 1 つのガラクトース認識部位が存在する。これまで非還元末端にガラクトース残基を持つ糖ペプチド³²⁾ やリポソームに組み込んだガングリオシド GM1³³⁾ に対して $10^6 \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$ の結合定数を持つことが知られている。

図 3-23 にそれぞれの LacCer 混合単分子膜に対して RCA₁₂₀ を $1.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 添加したときの振動数の経時変化を示した。結合曲線から求めた結合量 Δm と初期結合速度 V_{bind} の値を図 3-24 にまとめて示した。

平衡時の結合量に関しては、LacCer / DOPC 膜と LacCer / DPPC 膜との間で差はみられなかった。LacCer 100 mol% 膜に対する値も同程度となった。マトリックス脂質の親水部のホスホコリン基のかさ高さのために膜中での LacCer の存在状態の効果が現れなかった可能性を考え、親水部がより小さいホスホエタノールアミン基を持つ DOPE および DPPE をマトリックス脂質とした場合についても検討した。これらの脂質と LacCer の単分子膜中での混合状態については検討していないが第 2 章の結果から DOPC および DPPC の場合と同様の傾向になると考えた。LacCer / DOPE 膜に対する結合量は LacCer / DOPC 膜に比べてやや低下した。一方 LacCer / DPPE 膜に対しては最も多くの RCA₁₂₀ の結合がみられた。これらの結果から RCA₁₂₀ は親水部の小さいマトリックス中で均一に分散した LacCer に対して多く結合することが示唆された。

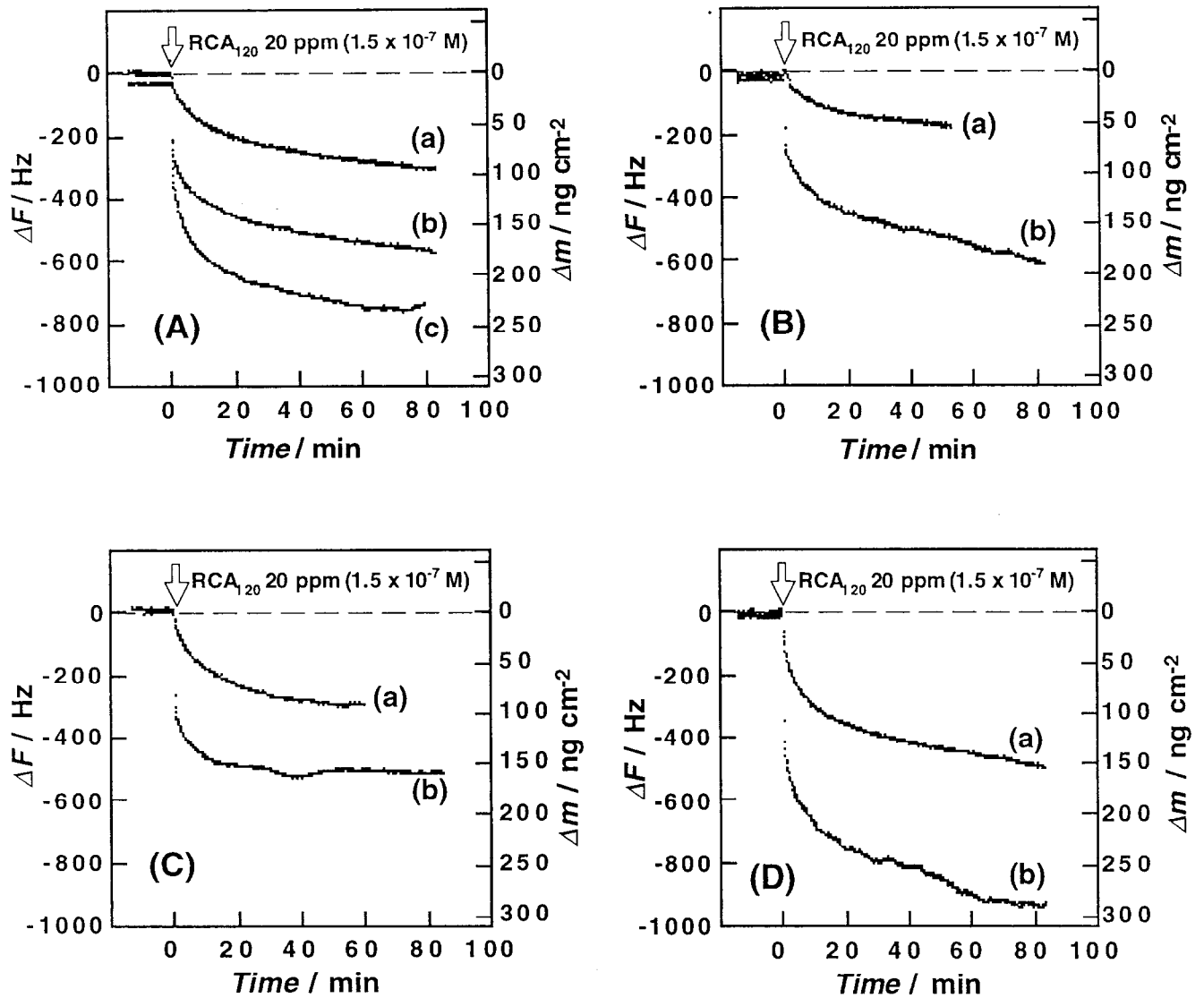


図 3-23 LacCer / リン脂質混合単分子膜に対する RCA_{120} の結合挙動
 (A) DOPC matrix, (B) DPPC matrix, (C) DOPE matrix, (D) DPPE matrix
 (a) matrix 単分子膜, (b) LacCer 20 mol% in matrix 混合単分子膜, (c) LacCer 単分子膜
 (条件: PBS (pH 7.4), 20 °C, 30 mN m^{-1})

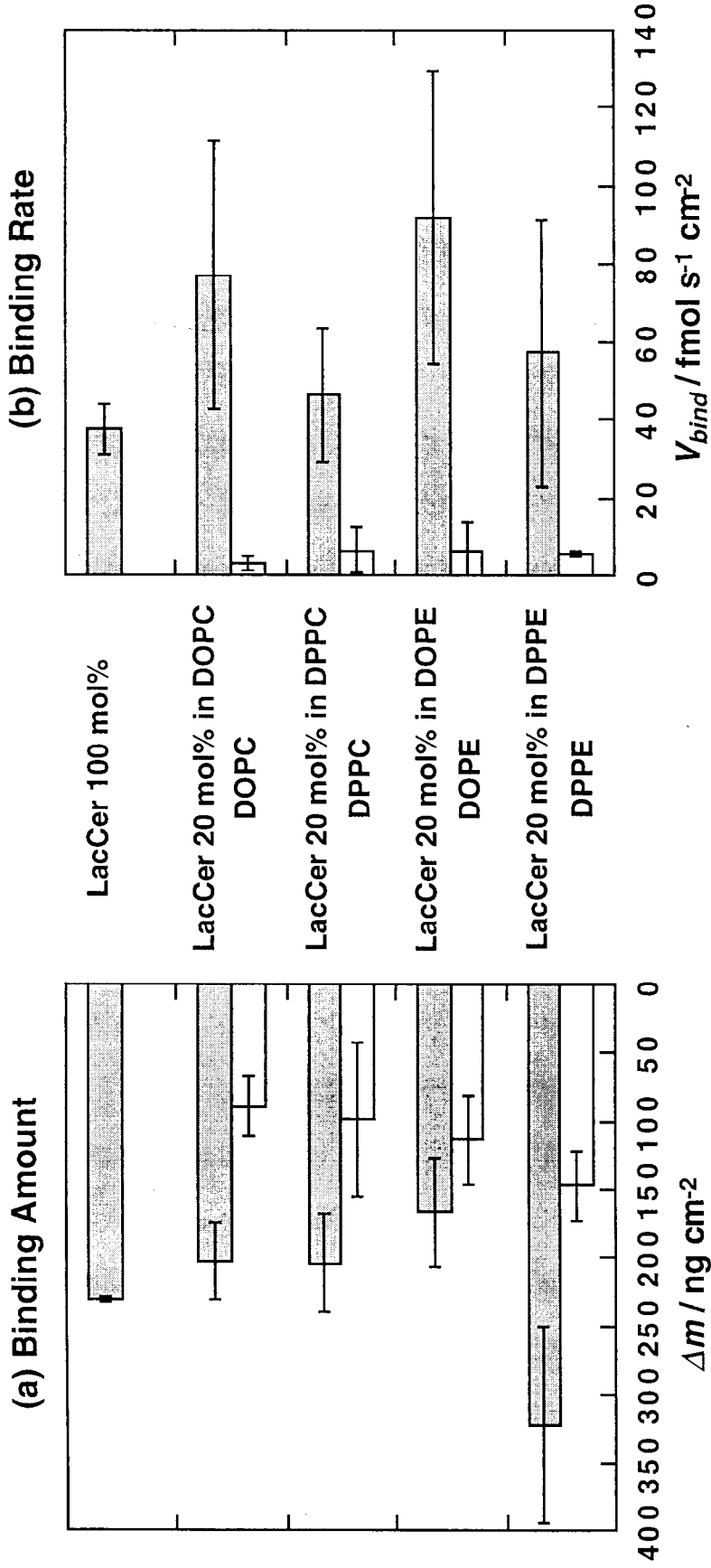


図 3-24 LacCer 混合単分子膜に対する RCA_{120} の (a) 結合量 Δm および

(b) 初期結合速度 V_{bind} (条件は図 3-23 に同じ)

一方初期結合速度については、誤差は大きいものの単分子膜中で相分離した LacCer に対する値の方が均一に分散した LacCer に対するものよりも大きくなった。したがって結合の初期においては相分離した LacCer の方が認識されやすいと考えられた。しかしながら LacCer 100 mol% 膜に対する値は相分離した LacCer に対する値よりも小さくなっており、LacCer のドメインの大きさが重要であることが示唆された。

RCA₁₂₀ の LacCer 混合単分子膜に対する結合においても初期の結合性と平衡時の結合量とは異なる傾向を示し、両者を区別して議論する必要がある。しかし少なくとも allo A の結合挙動とは異なる傾向となることが明らかとなった。

さらに別のレクチンとしてピーナッツレクチン PNA を用いて検討を試みた。PNA はピーナッツ (*Arachis hypogaea*) から調整されたガラクトース認識性のレクチンで、Ca²⁺ と Mg²⁺ を含む³⁴⁾分子量 24500 のサブユニットの 4 量体である (Mw 98000)³⁵⁾。これまでの同様の測定系を用い、各膜に対して PNA を 2.0×10^{-7} M 添加したときの結合挙動を追跡した。しかしながら結合挙動には再現性がなかった(データは示さない)。PNA はラクトースに対する結合性を有し、ラクトースとの共結晶の X 線結晶解析も行われている³⁶⁾が、Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc- よりも Gal(β 1 \rightarrow 3)GalNAc- 構造を持つ糖鎖に対する結合性の方が高いことが知られている³⁷⁾。測定に用いたレクチン濃度域では特異的な結合が観察できなかったのかもしれない。またレクチン自体がストック溶液中で凝集してしまい、結合量が一定しなかった可能性も考えられた。

本章で得られた結果から、LacCer 混合単分子膜に対する allo A の結合性は膜中の LacCer の存在状態に影響され、相分離した LacCer に対して高い結合性を示すことが明らかとなった。これまで相分離した糖脂質単分子膜に対するゲスト分子の結合挙動については検討例がない。リポソームを用いた系でも数例しかなく、たとえば Utsumi らは温度の変化やコレステロールの添加によって膜中の存在状態を変化させた GalCer の糖鎖認識性について検討している³⁸⁾。この系においては GalCer が相分離することにより GalCer に対する抗体の結合性は低下しており、ここでの結果とは逆となっている。

直接の比較はできないが、膜中でマトリックス脂質から相分離した糖脂質の状態は糖脂質単独の単分子膜中の状態と同様であると考えられる。すなわち糖脂質含量 100 mol% の膜に対するゲスト分子の結合に関するこれまでの知見との比較は可能である。たとえば LacCer やスルファチドの混合単分子膜に対するインフルエンザウイルス HA タンパク質の結合においては、単分子膜中の糖脂質含量の増加とともに HA の結合量が増加し、糖脂質含量 100 mol% の単分子膜において最大となることが示されている³⁹⁾。これはここで示した LacCer 混合単分子膜に対する allo A の結合と同様の傾向となっており、逆に言えば HA も相分離した LacCer やスルファチドに対する結合性が高いことが期待される。これらの系では単分子膜中でスフィンゴ糖脂質が相分離、あるいは高密度に存在することによってゲスト分子の結合性が高くなっており、いわゆる正の"クラスター効果"⁴⁰⁾がみられた。低分子化合物の結合の場合とは異なり、これらの系では糖脂質の大きさに比べてゲスト分子の方がはるかに大きい。したがってゲスト分子が糖脂質と 1:1 で結合するためには膜中の糖脂質含量は数 mol% もあれば十分である。それにもかかわらず糖脂質含量 100 mol% において最大の結合を示すという結果は糖脂質のクラスター化が重要であることを意味している。正のクラスター効果が観察された原因として、ゲスト分子が糖脂質と多価で結合することや高密度になったときの糖鎖のコンフォメーションがゲスト分子の結合に適した状態であることなどが考えられる。

一方ガングリオシドに対する WGA の結合^{8,12,13)}や合成糖脂質に対する ConA の結合¹¹⁾においては、単分子膜中の糖脂質含量がある濃度以上になるとゲスト分子の結合性が低下し、糖脂質含量 100 mol% の膜に対する結合はマトリックス脂質単独膜に対する非特異結合と同程度にまで低下することが知られている(図 1-6)¹³⁾。Utsumi らの結果³⁸⁾もこれに当てはまると考えられる。すなわちこれらの系においては負のクラスター効果がみられている。したがって相分離したガングリオシドに対する WGA の結合性などは低下することが予想できる。負のクラスター効果が観察される原因としては糖鎖が密に存在することにより立体障害、あるいはゲスト分子の結合を妨げるような糖鎖のコンフォメーション変化などが生じるためと考えられる。以上について模式的に図 3-25 に示した。

この他 GM1 混合単分子膜に対するコレラトキシン B サブユニットの結合⁴¹⁾や GM4lactone に対する WGA の結合⁹⁾のように膜中の糖脂質含量の増加に対してゲスト分子の結合量が飽和型の挙動をとる系もある。上でも述べたが膜中の糖脂質含量が数 mol% もあればホスト-ゲストの 1:1 の結合は可能であるのでこのような現象がみられるのは妥当なことである。この場合は膜面に提示された糖鎖とゲスト分子との結合が隣接した糖脂質分子の立体的な影響を受けないような形で起きていることが予想される。このように単分子膜中でのスフィンゴ糖脂質のクラスター化あるいは高密度化が糖鎖認識性に与える影響は用いるホスト-ゲストの組み合わせによりさまざまであることが明らかとなった。

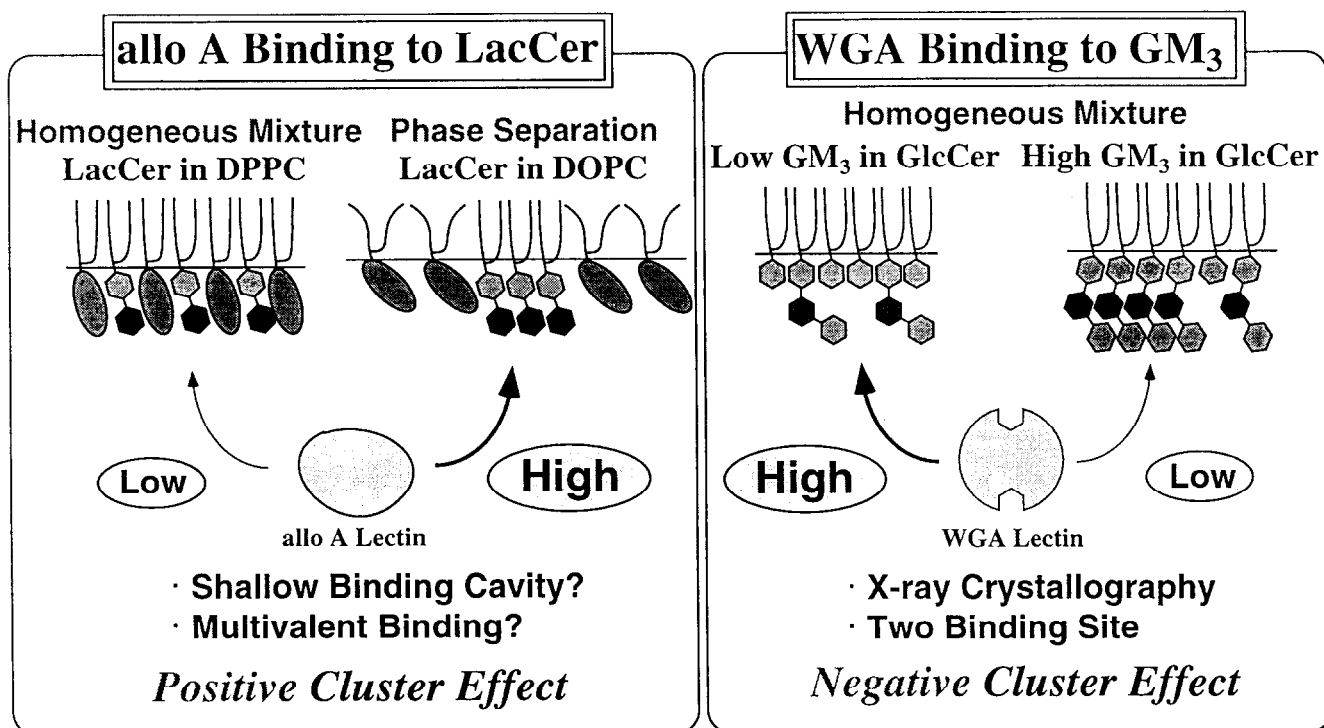


図 3-25 脂質膜中のスフィンゴ糖脂質に対するゲスト化合物の結合性の模式図

3-4 結言

単分子膜中の存在状態の異なる LacCer 混合単分子膜に対する allo A レクチンの結合挙動を QCM 法により検討した。その結果単分子膜中で均一に分散したものよりも相分離した LacCer に対してより多くの allo A の結合が観察され、それぞれの膜でのみかけの結合サイトの違いあるいは allo A との結合様式の違いが示唆された(図 3-26)。

このように脂質膜中の糖脂質含量が同じであるにもかかわらず、その存在状態の違いにより糖鎖認識性が異なるという現象は、生体内におけるスフィンゴ糖脂質のレセプター機能の制御における一つの可能性として非常に興味深いものである。

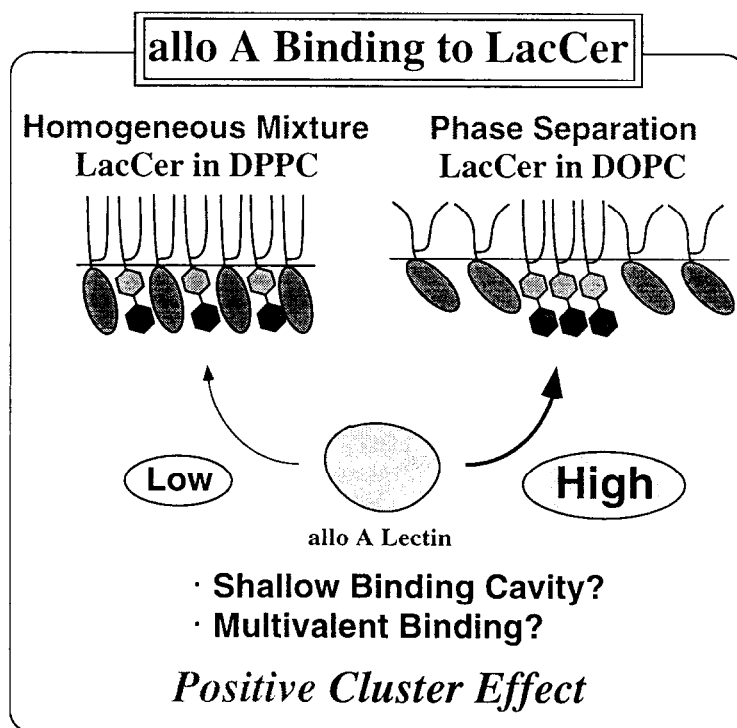


図 3-26 本章での実験から得られた結果の模式図

第3章 参考文献

- 1) a) R. Rendi, C. A. Kuettner, and J. A. Gordon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **72**, 1071-1076 (1976)
b) D. H. Boldt, S. F. Speckart, R. L. Richards, and C. R. Alving, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **74**, 208-214 (1977)
- 2) P. H. Fishman, T. Pacuszka, and P. A. Orlandi, *Adv. Lipid Res.* **25**, 165-187 (1993)
- 3) S. Hakomori and R. Kannagi, *J. Natl. Cancer Inst.* **71**, 231-251 (1983)
- 4) Y. Suzuki, *Prog. Lipid Res.* **33**, 429-457 (1994)
- 5) P. H. Fishman and P. A. Orlandi, *Trends Glycosci. Glycotech.* **25**, 387-406 (1994)
- 6) G. M. Kuziemko, M. Stroh, and R. C. Stevens, *Biochemistry* **35**, 6375-6384 (1996)
- 7) a) B. P. Peters, S. Ebisu, I. J. Goldstein, and M. Flashner, *Biochemistry* **18**, 5505-5511 (1979)
b) W. R. Redwood and T. G. Polefka, *Biochim. Biophys. Acta* **455**, 631-643 (1976)
- 8) T. Sato, T. Serizawa, F. Ohtake, M. Nakamura, T. Terabayashi, Y. Kawanishi, and Y. Okahata, *Biochim. Biophys. Acta* **1380**, 82-92 (1998)
- 9) 井上 裕規, 卒業論文, 東京工業大学 (1997)
- 10) T. Sato, M. Ishii, T. Terabayashi, Y. Kawanishi, and Y. Okahata, *Chem. Lett.* **1997**, 669-670
- 11) a) Y. Ebara and Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11209-11212 (1994)
b) 石原 光輝, 修士論文, 東京工業大学 (1994)
- 12) a) T. Sato, T. Serizawa, and Y. Okahata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 551-556 (1994)
b) T. Sato, T. Serizawa, and Y. Okahata, *Biochim. Biophys. Acta* **1285**, 14-20 (1996)
- 13) 芹澤 武, 学位論文, 東京工業大学 (1995)
- 14) K. Umetsu, S. Kosaka, and T. Suzuki, *J. Biochem.* **95**, 239-245 (1984)
- 15) a) K. Yamashita, K. Umetsu, T. Suzuki, Y. Iwaki, T. Endo, and A. Kobata,

- J. Biol. Chem.* **263**, 17482-17489 (1988)
- b) K. Yamashita, A. Kobata, T. Suzuki, and K. Umetsu, *Methods Enzymol.* **179**, 331-341 (1989)
- 16) S. Sueyoshi, K. Yamamoto, and T. Osawa, *J. Biochem.* **103**, 894-899 (1988)
- 17) P. Currie and J. Currie, *C. R. Acad. Sci.* **91**, 294- (1880)
- 18) W. H. King, Jr., *Anal. Chem.* **36**, 1735-1739 (1964)
- 19) G. Sauerbrey, *Z. Physik* **155**, 206-222 (1959)
- 20) Y. Ebara, K. Itakura, and Y. Okahata, *Langmuir* **12**, 5165-5170 (1996)
- 21) a) 生方 俊, 卒業論文, 東京工業大学 (1995)
b) 水谷 勝己, 修士論文, 東京工業大学 (1997)
- 22) a) Y. Okahata, M. Kawase, K. Niikura, F. Ohtake, H. Furusawa, and Y. Ebara, *Anal. Chem.* **70**, 1288-1296 (1998)
b) Y. Okahata, K. Niikura, Y. Sugiura, M. Sawada, and T. Morii, *Biochemistry* **37**, 5666-5672 (1998)
c) K. Niikura, H. Matsuno, and Y. Okahata, *Chem. Eur. J.*, in press.
d) 中山 元, 卒業論文, 東京工業大学 (1996)
- 23) a) K. K. Kanazawa and J. G. Gordon, *Anal. Chem.* **57**, 1770-1771 (1985)
b) 新倉 謙一, 学位論文, 東京工業大学 (1996)
c) H. Muramatsu and K. Kimura, *Anal. Chem.* **64**, 2502-2507 (1992)
- 24) 白川 信明, 卒業論文, 東京工業大学 (1994)
- 25) Y. Ebara and Y. Okahata, *Langmuir* **9**, 574-576 (1993)
- 26) N. J. Geddes, E. M. Paschinger, D. N. Furlong, F. Caruso, C. L. Hoffman, and J. F. Rabolt, *Thin Solid Films* **260**, 192-199 (1995)
- 27) G. M. Barrow, "Physical Chemistry 5th Ed.", McGraw-Hill, Inc., 1988
- 28) D. Mersh, *Biochim. Biophys. Acta* **1286**, 183-223 (1996)
- 29) C. H. Bamford, S. L. Cooper, and T. Tsuruta, "The Vroman Effect", VSP, Utrrecht, Netherlands, 1992
- 30) D. Y. Sasaki, K. Kurihara, and T. Kunitake, *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 9685-9686 (1991)
- 31) G. L. Nicolson, J. Blaustein, and M. E. Etzler, *Biochemistry* **13**, 196-204 (1974)
- 32) J. U. Baenziger and D. Fiete, *J. Biol. Chem.* **254**, 9795-9799 (1979)

- 33) A. Surolia, B. K. Bachhawat, and S. K. Podder, *Nature* **257**, 802-804 (1975)
- 34) K. J. Neurohr, N. M. Young, and H. H. Mantsch, *J. Biol. Chem.* **255**, 9205-9209 (1980)
- 35) W. W. Fish, L. M. Hamlin, and R. L. Miller, *Arch. Biochem. Biophys.* **190**, 693-698 (1978)
- 36) R. Banerjee, K. Das, R. Ravishankar, K. Suguna, A. Surolia, and M. Vijayan, *J. Mol. Biol.* **259**, 281-296 (1996)
- 37) M. E. A. Pereira, E. A. Kabat, R. Lotan, and N. Sharon, *Carbohydr. Res.* **51**, 107-118 (1976)
- 38) H. Utsumi, T. Suzuki, K. Inoue, and S. Nojima, *J. Biochem.* **96**, 97-105 (1984)
- 39) 大竹 冬華, 修士論文, 東京工業大学 (1997)
- 40) a) Y. C. Lee and R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **28**, 321-327 (1995)
b) 畑中 研一, 西村 紳一郎, 大内 辰郎, 小林 一清 著, "糖質の科学と工学", 講談社サイエンティフィク, 1997
- 41) 中村 美和, 卒業論文, 北里大学 (1996)

第4章 GM3 混合単分子膜に対する抗 GM3 抗体の結合挙動の観察

4-1 緒言

生体内におけるスフィンゴ糖脂質の発現の分布は生物種、組織間、さらにはその組織内においても細胞の種類においてさまざまである^{1,2)}。たとえばヒトの脳における各細胞内のガングリオシドの組成³⁾をみると、ミエリンでは GM1 が総ガングリオシドの約半分を占めるのに対し、灰白質では GM1 の含量が減少し代わりにシアル酸の結合数がさらに多い GD1 や GT1b などの高級ガングリオシドの量が増加している。また胚細胞の卵割⁴⁾や神経細胞での分化⁵⁾の各段階において、あるいは細胞が老化⁶⁾したり癌化⁷⁾した場合にもスフィンゴ糖脂質の組成が変化し、特定のスフィンゴ糖脂質が高発現していることが確認されている⁷⁻⁹⁾。たとえばマウスの胚の発生段階において stage-specific embryonic antigen (SSEA-1) と呼ばれるスフィンゴ糖脂質は 8 細胞期から 32 細胞期において発現がみられ、その後のコンパクション段階では急激に発現量が減少することが知られている⁴⁾。

これらの高発現しているスフィンゴ糖脂質の生物学的な機能について興味を持たれるが、その一方でこの現象を利用して細胞膜上での特定のスフィンゴ糖脂質の発現量を調べ、細胞の分化や癌化の状態を知ろうとする試みも多く行われてきた。そのような意味からこれらのスフィンゴ糖脂質は分化マーカー⁸⁾あるいは腫瘍(関連)抗原^{1,9)}などと呼ばれている。このような目的に限らず、細胞表層に発現した特定のガングリオシドをはじめとしたスフィンゴ糖脂質を検出するために、近年スフィンゴ糖脂質に対するモノクローナル抗体が数多く確立され^{1,10)}、臨床診断や治療¹¹⁾への応用や基礎研究において利用されている^{12,13)}。

しかしながら、細胞上にスフィンゴ糖脂質の発現が確認されているにもかかわらず、

そのスフィンゴ糖脂質に対する抗体が結合しない、という事例が幾つか報告されている¹⁴⁾。Nores らはリポソームやキャスト膜を用いたモデル実験により、抗 GM3 抗体 M2590 の GM3 に対する結合は、膜中の GM3 含量がある一定量以上にならないと起こらないという結果を得ている(図 4-1)¹⁵⁾。彼らはこの結果を膜中での GM3 のクラスター形成に帰するものであると推測している。これらの系ではいずれも脂質膜中でのスフィンゴ糖脂質がおかれている環境が抗体の結合性に影響を与えていると考えられる。

また、ガングリオシドに対するモノクローナル抗体を作成する場合、ガングリオシド分子そのものを免疫原とする方法では免疫原性が低いために目的の抗体が得られないことが多い。最近になって精製ガングリオシドを菌体表面に吸着させたものを免疫原とする手法¹⁶⁾が報告されたが、通常は特定のガングリオシドを高発現した細胞を免疫原とする手法がよく用いられる^{2,17)}。したがって得られた抗体はそのガングリオシドを高発現した細胞に対して結合性を持つことは確かであるが、別の種類の細胞上に発現した同じガングリオシドに対する結合性やあるいは構造の類似したガングリオシド間での結合の特異性がどれ程あるかについては明らかではない。

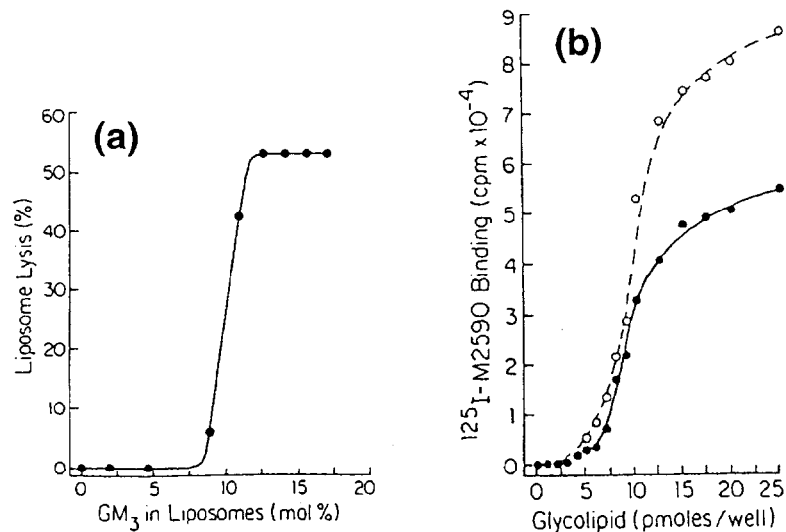


図 4-1 (a) GM3 混合リポソームに対する補体依存性の抗 GM3 抗体 M2590 の結合による蛍光物質の漏れの観察
 (b) GM3 (○) および sialyllactoneotetraosylceramide (●) 混合脂質キャスト膜に対する ¹²⁵I-ラベル化した M2590 の結合
 (文献 15 より引用)

抗 GM3 抗体 L612 は 1993 年に Hoon らによって報告されたヒト IgM 型のモノクローナル抗体である¹⁸⁾。GM3 を高発現したヒトメラノーマ細胞 M12 を免疫原とし、Epstein-Barr virus で形質転換した B 細胞によって¹⁹⁾作製された。これまで GM3 の発現量の異なる細胞間での結合性の違いやスフィンゴ糖脂質の添加による結合阻害などからその特異性について検討されている¹⁸⁾が、膜中の組成のはっきりした生体膜モデルによる結合性の評価は行われていない。

本章では第 3 章で用いた気-水界面の脂質単分子膜と水晶発振子を組み合わせた測定系を用い、ガングリオシド GM3 を含んだ混合単分子膜に対する抗 GM3 抗体 L612 の結合挙動を観察した(図 4-2)。GM3 と混合するマトリックス脂質の構造や単分子膜中の GM3 含量の効果などが抗体の結合性に与える影響について検討した。また GM3 以外のスフィンゴ糖脂質に対する結合を観察することで抗体の GM3 に対する結合特異性を評価した。

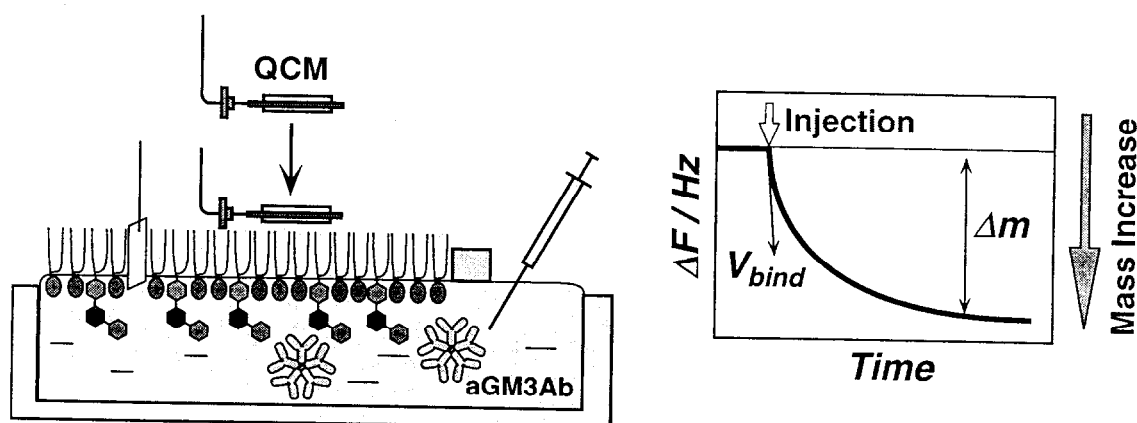


図 4-2 測定系の模式図

4-2 実験方法

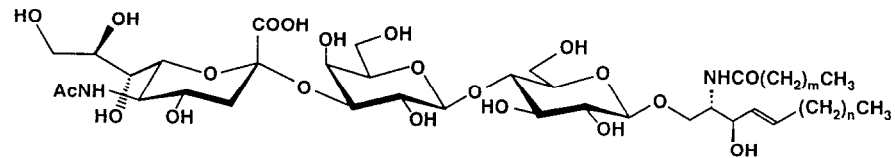
4-2-1 材料

ガングリオシド GD3 (from Bovine Milk, Lot 926040C)、およびシアリルラクトース (NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc) は雪印乳業株式会社から得た。ミンククジラ (*Balaenoptera acutorostrata*) の脳から Momoi らの手法²⁰⁾に従って抽出されたガングリオシド GM1、GM4 は財団法人緒方医学化学研究所 理事 川西 康博 博士より提供された。GM3 ラクトンは GM3 から北里大学理学部分子物理学研究室 助手 寺林 隆志 博士によって調製された²¹⁾。GM3 ラクトンの純度は約 80-90% であり、1 \rightarrow 2 ラクトン 90%、1 \rightarrow 4 ラクトン 10% の混合物であった²²⁾。コレステロール (code 087-22, Lot M0A9439) はナカライテスク株式会社から購入した。他の脂質の入手については 2-2-1 および 3-2-1 で述べた。本章で用いた脂質の化学構造と略称を図 4-3 および 4-4 にそれぞれ示した。抗 GM3 抗体 (Purified Human Monoclonal Antibody, type: IgM, Lot L612-B1-P3S-011698) は 2.12 mg ml⁻¹ の溶液として大塚製薬株式会社から提供された。いずれの試薬もさらなる精製を行わずに使用した。

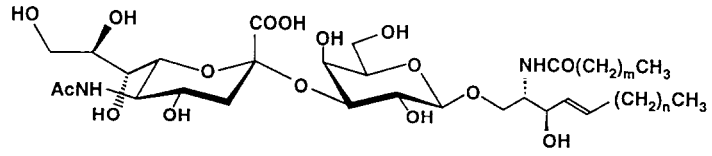
4-2-2 測定方法

測定は 3-2-3 で述べたのと同様のシステムを用いて行った。トラフの下層水および測定用の緩衝液には PBS (pH 7.4) を用いた。GM3 混合単分子膜の表面圧は 30 mN m⁻¹ に設定し、測定温度は 20 °C とした。

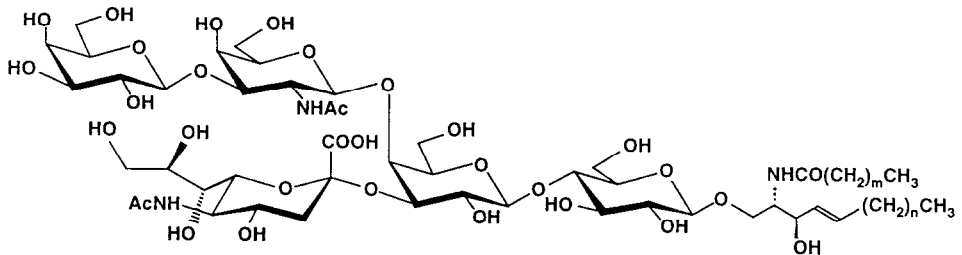
抗体の結合挙動は 3-2-4 で述べた方法に基づいて解析を行った。結合パラメータの算出については本章では飽和法による解析のみを行った。



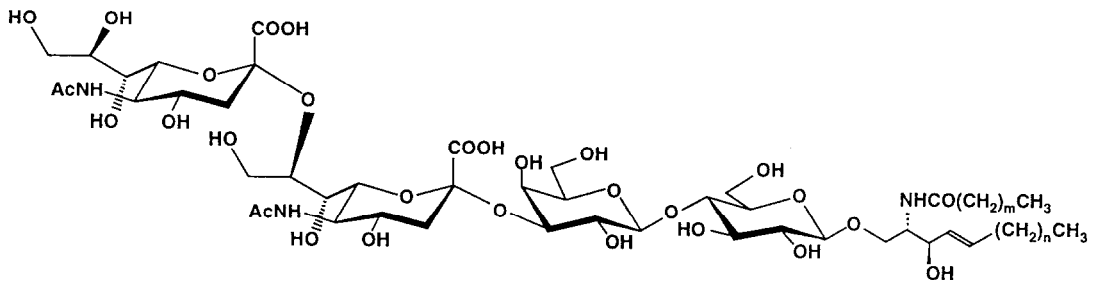
GM3 [NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1' Cer]



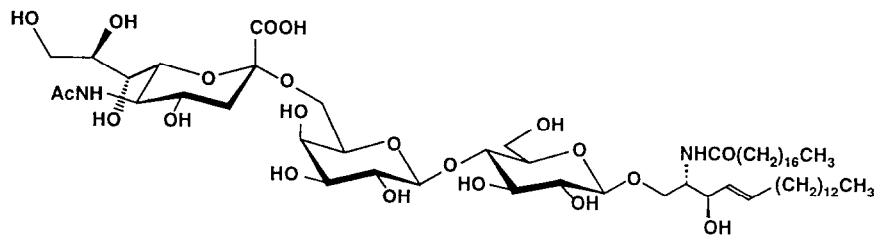
GM4 [NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 1' Cer]



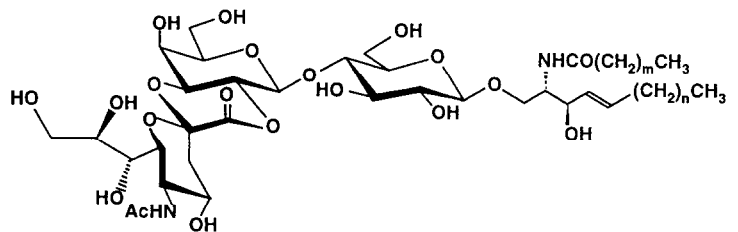
GM1 [Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4(NeuAc α 2 \rightarrow 3)Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1' Cer]



GD3 [NeuAc α 2 \rightarrow 8NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1' Cer]



(α 2 \rightarrow 6)GM3 [NeuAc α 2 \rightarrow 6Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1' Cer]



GM3 lactone [(α 1 \rightarrow 2)lactone]

図 4-3 本章で用いたスフィンゴ糖脂質および誘導体の化学構造および略称
(スフィンゴ糖脂質の脂肪酸および長鎖塩基組成は表 2-1 および表 2-2 参照)

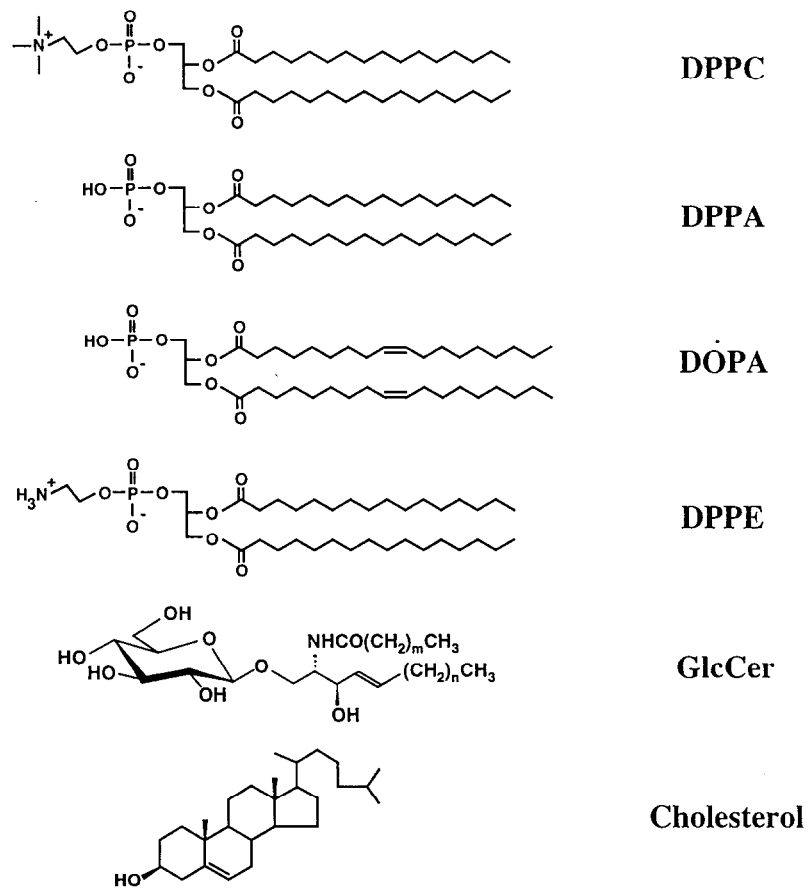


図 4-4 本章で用いたマトリックス脂質の化学構造および略称

4-3 結果および考察

4-3-1 マトリックス脂質の効果

それぞれの GM3 混合脂質単分子膜に対して抗 GM3 抗体 L612 を 2.8×10^{-10} M 添加したときの結合挙動を図 4-5 にそれぞれ示した。はじめに DPPC をマトリックス脂質として用いたが、DPPC 単分子膜の場合と GM3/DPPC 混合単分子膜の場合とで抗体の結合性に差がみられなかった(図 4-5(A))。DPPC 膜への非特異結合が大きく、しかも DPPC 膜中での GM3 は抗体に認識されにくいことがわかったのでマトリックス脂質を変えて測定を行った。より小さな親水基を有する DPPA 単独膜について検討したところ、非特異結合が減少したのでこれをマトリックス脂質として測定を行った。図 4-5(B) より GM3/DPPA 混合単分子膜では DPPA 単独膜よりも多くの抗体の結合がみられ、膜中の GM3 に対する抗体の特異的な結合挙動を観察することが可能となった。

第2章の結果から GM3/DPPA 混合単分子膜においては GM3 と DPPA は均一に混合していることが示されている。第3章で行ったように膜中での存在状態の異なる GM3 に対する抗体の結合性を検討する目的で、相分離が起こることが確認された GM3 20 mol% in DOPA 単分子膜に対する抗体の結合挙動を観察した(図 4-5(C))。しかしながらマトリックス脂質である DOPA に対する抗体の非特異結合が多く、DPPA をマトリックスとした場合との結果と同じ条件で比較することができなかった。

図 4-5(D) にはマトリックス脂質として中性スフィンゴ糖脂質である GlcCer を用いて測定を行った結果を示した。GlcCer 単分子膜に対する非特異結合は DPPA 膜に対する場合ほどではないがかなり抑制されていた。しかし GM3/GlcCer 混合単分子膜に対する抗体の特異的な結合は観察されず、GlcCer 中の GM3 は抗体に認識されにくい状態にあることがわかった。

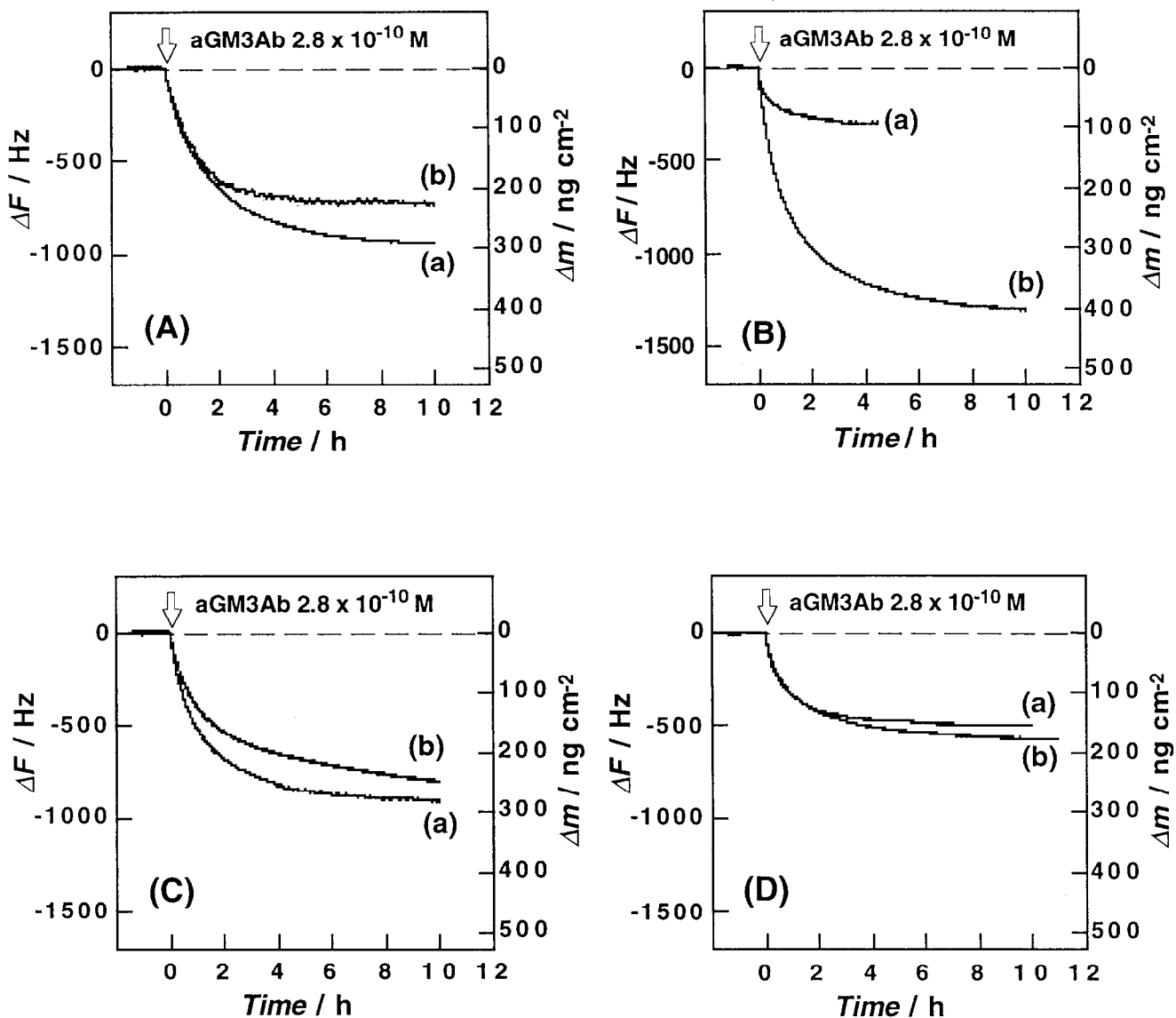


図 4-5 (A) DPPC, (B) DPPA, (C) DOPA, (D) GlcCer をマトリックス脂質としたときの抗 GM3 抗体の結合挙動
 (a) マトリックス脂質単独膜, (b) GM3 20 mol% in matrix
 (条件: PBS (pH 7.4), 20 °C, 30 mN m⁻¹)

図 4-5(E) にはマトリックス脂質の候補となったそれぞれの脂質単分子膜に対する抗体の非特異結合の挙動を示した。マトリックス脂質の構造により抗体の非特異結合は大きく変化した。以降の測定は非特異結合が最も少なく、なおかつ抗体の特異的な結合が観察された DPPA をマトリックス脂質として行った。

通常の ELISA などは抗体の非特異結合を抑制するために BSA などのブロッキング剤の共存下で測定を行っている¹⁾。ここで用いた脂質単分子膜と QCM 法を組み合わせた測定系においては、タンパク質のようなブロッキング剤を用いることができないが、非特異結合の小さいマトリックス脂質を用いることで抗体の特異的な結合挙動を観察することができた。

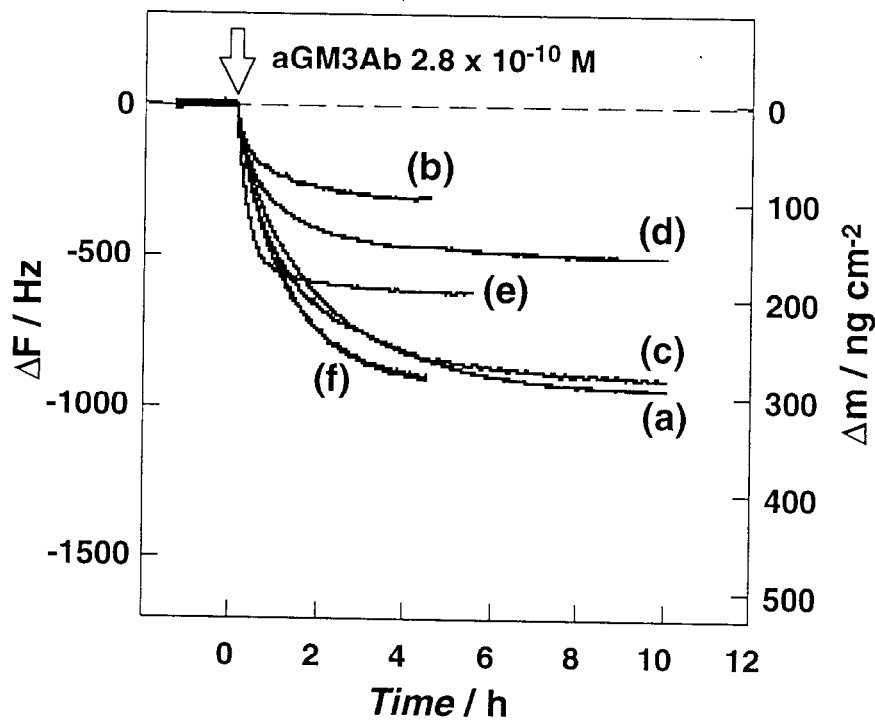


図 4-6 マトリックス脂質の候補となった脂質単分子膜への抗 GM3 抗体の結合挙動
 (a) DPPC, (b) DPPA, (c) DOPA, (d) GlcCer, (e) DPPE, (f) cholesterol 単分子膜
 (条件は図 4-5 に同じ)

4-3-2 抗体の結合特異性についての検討

4-1 で述べたようにここで用いた抗 GM3 抗体 L612 は GM3 を多く発現した細胞に対しての抗体の結合活性によってスクリーニングされてきたものである¹⁹⁾。したがって細胞表層に発現した GM3 に対して結合性を持つことは確かだが、GM3 と構造の類似したスフィンゴ糖脂質に対する結合性が全くないという保証はない。そこで抗 GM3 抗体の糖鎖に対する結合特異性について検討した。始めに阻害実験を行った。あらかじめ系内に GM3 の糖鎖部分に相当する構造を持つシアリルラクトースを添加しておいた状態での抗体の GM3 20 mol% in DPPA 膜に対する結合挙動を観察した(図 4-7)。また結合曲線より求めた平衡時の結合量 Δm と初期結合速度 V_{bind} の値を図 4-8 に示した。シアリルラクトース濃度を 10 mM まで増加させると抗体の結合量が低下した。また初期結合速度はシアリルラクトースの添加量に応じて減少していった。これらより抗体は混合単分子膜中の GM3 のオリゴ糖鎖を認識して膜に結合していることが示唆された。

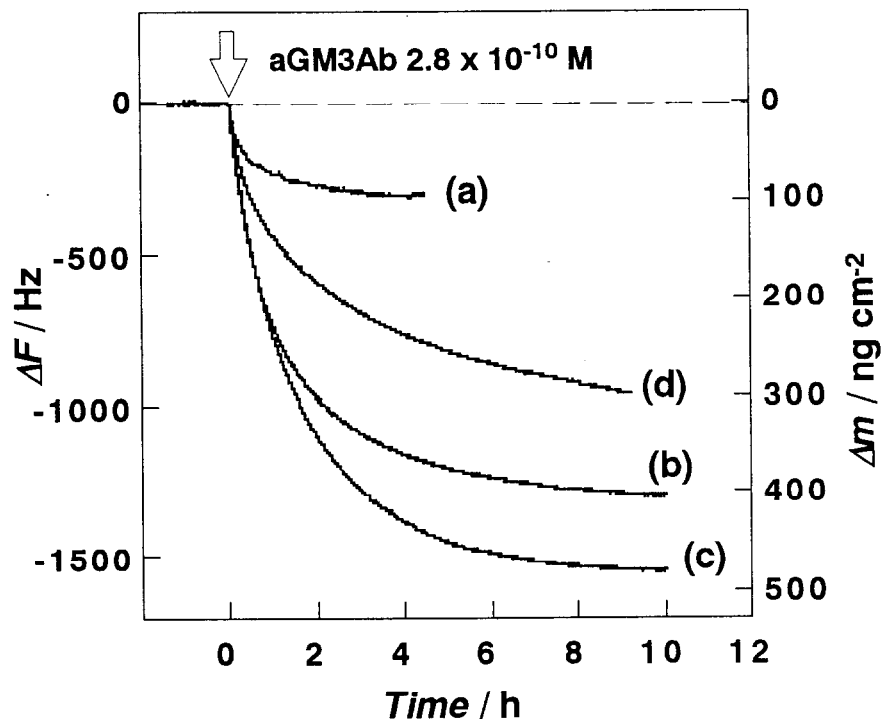


図 4-7 (a) DPPA 単分子膜, (b) 0 mM, (c) 1 mM, (d) 10 mM, のシアリルラクトース存在下での GM3 20 mol% in DPPA 単分子膜に対する抗 GM3 抗体の結合挙動 (他の条件は図 4-5 に同じ)

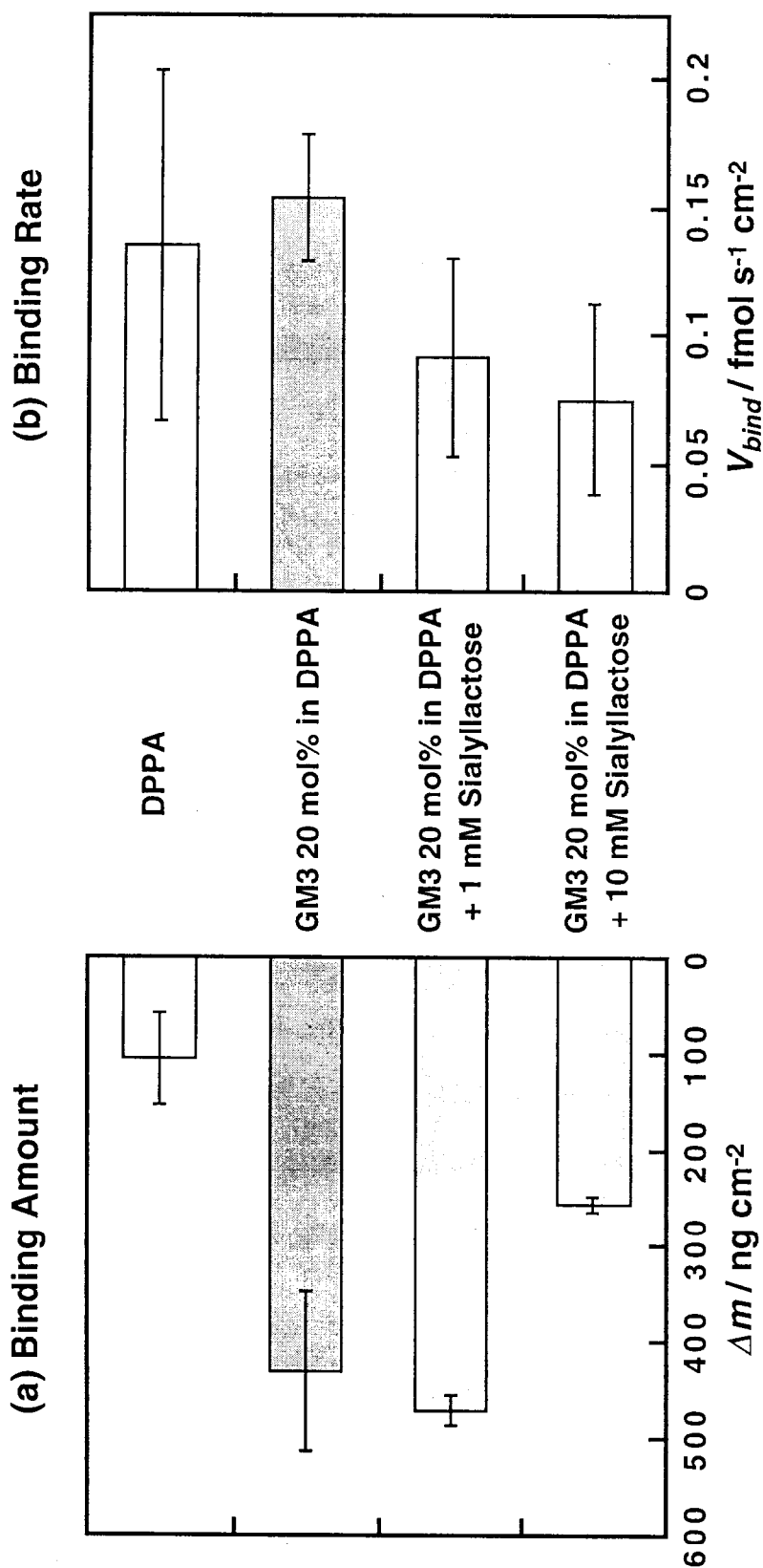


図 4-8 シアリルラクトース存在下の GM3 20 mol% in DPPA 単分子膜に対する抗 GM3 抗体の
 (a) 結合量 Δm および (b) 初期結合速度 V_{bind}
 (他の条件は図 4-5 に同じ)

次にホストとして GM3 以外の糖脂質を用いた混合単分子膜に対する抗体の結合挙動について検討した。DPPA をマトリックス脂質とし、単分子膜中の糖脂質含量は 20 mol% とした。各膜に対して抗体を 2.8×10^{-10} M 添加した際の結合挙動を図 4-9 に、結合曲線から求めた Δm と V_{bind} を図 4-10 にそれぞれ示した。非還元末端に GM3 と同じ NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal- という 2 糖の構造を持つ GM4 に対しても GM3 と同程度の抗体の結合がみられた。しかし NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal- 構造のガラクトースの 4 位にさらに 2 糖が結合した GM1 に対しては抗体の特異的な結合は観察されなかった。NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal- のシアル酸の 8 位にさらにシアル酸が結合した GD3 やシアル酸とガラクトースの結合位置が違う (α 2 \rightarrow 6)GM3 に対しても GM3 程ではないが抗体の結合がみられた。また Nores らによれば抗 GM3 抗体 M2590 は GM3 よりも GM3 ラクトンへの結合性が高いと報告されている¹⁵⁾。ここで用いた抗 GM3 抗体 L612 の GM3 ラクトンに対する結合においては、非特異結合よりは結合量が多いものの明らかに GM3 に比べて少ない結合量となった。抗 GM3 抗体 L612 のスフィンゴ糖脂質に対する特異性については、Hoon らが抗体の GM3 を多く発現した細胞への結合に対しての阻害効果として評価している(表 4-1)¹⁸⁾。表 4-1 とここで得られた結果を比較すると GD3 以外は同様の結果となった。彼らの結果では GD3 には全く阻害効果はなかったが、ここでの結果は GD3 は GM3 には劣るものの抗体の結合活性を有していた(図 4-10)。Hoon らの系ではスフィンゴ糖脂質を水中に添加しているため GD3 がどのような会合状態で抗体と相互作用しているかはわからない。それに対して本章での実験は脂質単分子膜中に GD3 を組み込んで抗体の結合を評価している。このような実験系の違いが結果の違いとして現れたのではないだろうか。

初期結合速度の結果は本来の抗原である GM3 に対する速度が一番速いということ以外はあまりはっきりしたことは言えず、結合量の結果と対応したものにはならなかった。

Hoon らは L612 抗体のアミノ酸の一次配列も決定している¹⁹⁾。図 4-9 に L612 抗体の重鎖および軽鎖のアミノ酸および塩基配列を示した。これより抗体の相補性決定基 (complementary determinig region, CDR) には水素結合能を持つアミノ酸が多数存在す

ることがわかる。また Lys や Arg のようにシアル酸のカルボキシル基と静電的相互作用することが予想されるアミノ酸も存在している。抗体はこれらのアミノ酸との多点の相互作用によって、GM3 の主に NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal- 部分と相互作用していることが示唆された。

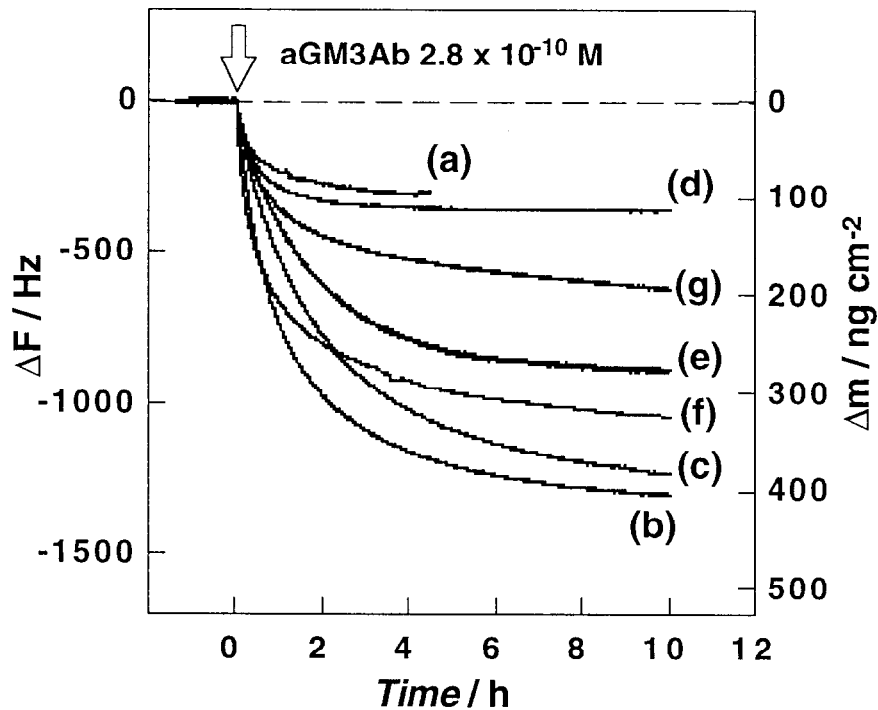


図 4-9 スフィンゴ糖脂質 / DPPA 混合単分子膜に対する抗 GM3 抗体の結合挙動
 (a) DPPA 100 mol%, (b)-(g), (b) GM3, (c) GM4, (d) GM1, (e) GD3, (f) (α 2 \rightarrow 6)GM3,
 (g) GM3lactone 20 mol% in DPPA (条件は図 4-5 に同じ)

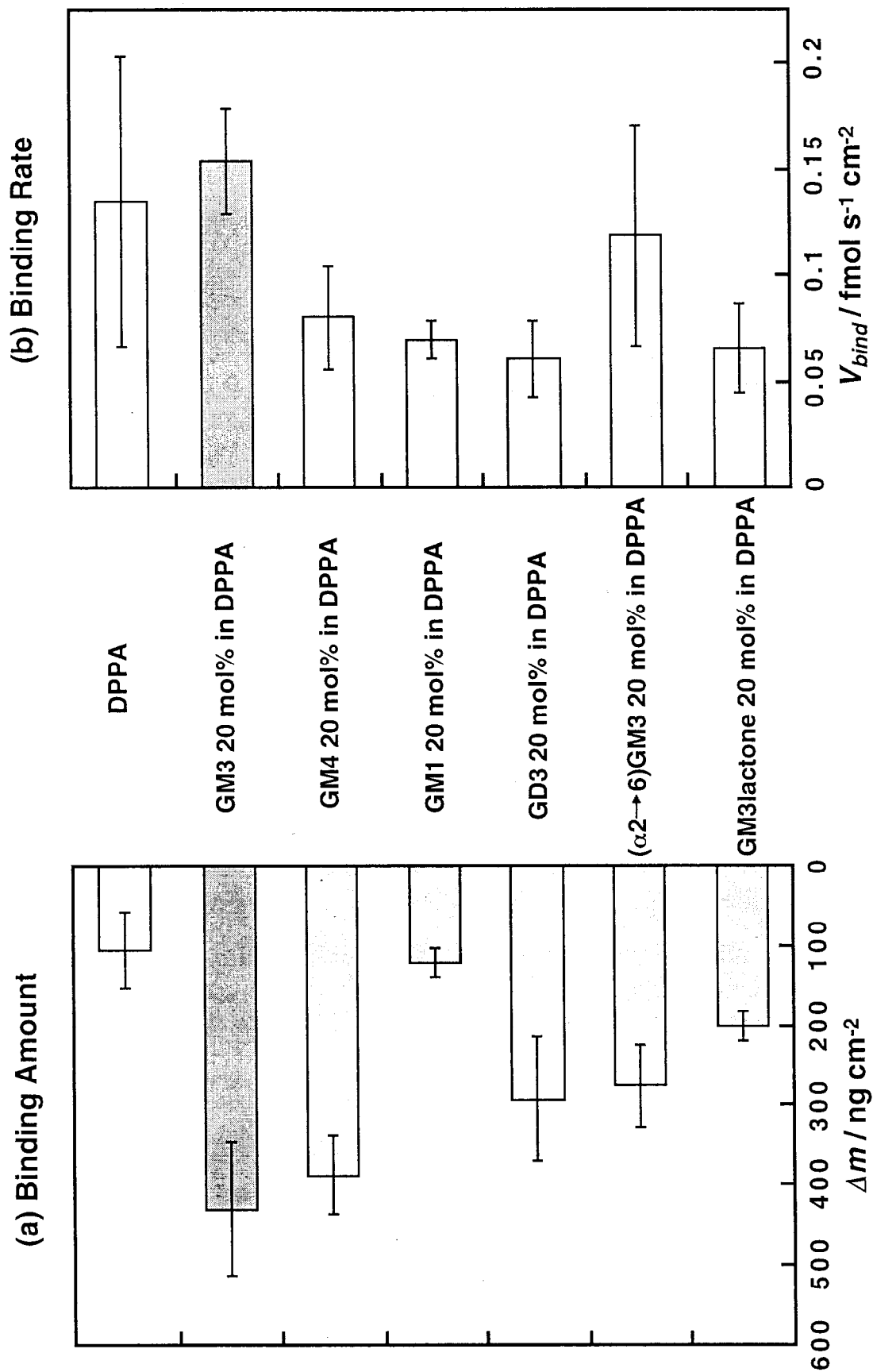


図 4-10 スフィンゴ糖脂質 20 mol% in DPPA 混合単分子膜に対する抗 GM3 抗体の
 (a) 結合量 Δm および (b) 初期結合速度 V_{bind} (条件は図 4-5 に同じ)

表 4-1 GM3 を高発現した細胞に対する抗 GM3 抗体 L612 の結合において
スフィンゴ糖脂質を添加したときの阻害効果 (文献 18 より引用)
(数値の大きいものほど阻害活性が高い)

Table 3 HuMab L612 binding specificity to gangliosides

Gangliosides described according to the classification of Svennerholm and Friedman (1) and IUPAC-IUBC (47). Specificity binding analysis of HuMab L612 to gangliosides was assessed by an IA immunoabsorption inhibition assay. L612 HuMab was incubated with individual antigens (5 nmol) before being assessed for binding in the IA assay with M12 cells (see "Materials and Methods").

Glycolipid name	IA adsorption inhibition	
	Glycolipid structure	Antigen titer
Neutral glycolipid		
CTH*	GbOsc ₃ Cer	0
Globoside	GbOsc ₄ Cer	0
Asialo-G _{M1}	GbOsc ₄ Cer	0
Gangliosides		
G _{M4}	I ³ NeuAc-GalCer	64
G _{M3}	II ³ NeuAc-LacCer	64
G _{M3}	II ³ NeuGc-LacCer	0
G _{M2}	II ³ NeuAc-GgOsc ₄ Cer	0
G _{M2} , G _{M11a}	II ³ NeuAc-GgOsc ₄ Cer	0
SPG	IV ³ NeuAc-nLcOsc ₄ Cer	16
SPG	IV ³ NeuGc-nLcOsc ₄ Cer	0
G _{D3}	II ³ (NeuAc) ₂ -LacCer	0
G _{D2}	II ³ (NeuAc) ₂ -GgOsc ₄ Cer	0
G _{D1a}	IV ³ NeuAc,II ³ NeuAc-GgOsc ₄ Cer	0
G _{D1b}	II ³ (NeuAc) ₂ -GgOsc ₄ Cer	0
G _{T1b}	IV ³ NeuAc,II ³ (NeuAc) ₂ -GgOsc ₄ Cer	0

* CTH, ceramide trihexoside; SPG, sphingosine.

a) HuMab L612 heavy chain variable region sequence*

```

-19      -15      -10      -5
Met Glu Phe Gly Leu Thr Trp Leu Leu Val Ala Asn Leu Lys
ATG GAG TTT OGG CTG ACC TGG CTT TTT CTT GTG GCT AAT TTA AAA

          1          5          10
Gly Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Asp Ser Gly Gly Gly Leu
GGT GTC CAG TGT GAG GTG CAG CTG TTG GAT TCT GGG GGA GGC TTG

          15          20          25
Val Gln Pro Gly Gly Cys Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
GTA CAG CCT GGG GGG TGC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA

          30          35          40
Phe Thr Phe Ser Ser Cys Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
TTC ACC TTT AGC AGC TGT GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA

          45          50          52 52a      55
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly
GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCT ATT AGT GGT AGT GGT GGT

          60          65          70
Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CCG TTC ACC ATC TCC

          75          80          82 82a 82b 82c
Arg Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
AGA GAC AAA TCC AAG AAC ACG TTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG

          85          90          95
Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Asn
AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCG AAA GGT GGC AAC

          100 A B C          105
Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
GAT ATT TTG ACT GGT TAT TAT GCT TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC
    
```

Fig. 4. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the heavy chain of HuMab L612. Underlined amino acids represent the complementary determining regions CDR1, CDR2, and CDR3 (95-102) in order. * The sequence data are under accession no. L11699 from GenBank.

b) HuMab L612 light chain variable region sequence*

```

          1          5          10          15
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCC CTG GCT CTG TCT CTC

          20          25          27a 27b 27c
Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu
GGC GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AAG TCC AGC CAG AGT GTT TTA

          27d 27e 27f          30          35
Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
TAC AGC TCC AAC AAT AAG AAC TAC TTA GCT TGG TAC CAG CAG AAA

          40          45          50
Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG CTC ATT TAC TCC GCA TCT ACC CGG

          55          60          65
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
GAA TCC GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC GGG TCT GGG ACA

          70          75          80
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTC GCA

          85          90          95
Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly
GTT TAT TAC TGTCAG CAA TAT TAT AGT ACT CCT CCG ACG TTC GGC

          100          105
Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGA
    
```

Fig. 5. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the light chain of HuMab L612. Underlined amino acids represent the complementary determining regions CDR1, CDR2, and CDR3 (90-97) in order. * The sequence data are under accession no. L11700 from GenBank.

図 4-11 抗 GM3 抗体 L612 の (a) 重鎖および (b) 軽鎖の一次配列。

図中の下線部は上から順に CDR1, CDR2, CDR3 領域を示している。
(文献 18 より引用)

4-3-3 混合単分子膜中の GM3 含量の効果

4-3-1 で示したように DOPA 単分子膜に対する抗体の非特異結合が DPPA 単分子膜に対するものよりもはるかに大きいため、単分子膜中で相分離した GM3 と均一に分散した GM3 のそれぞれに対する抗体の結合を同じ条件で比較することができなかった。3-3-5 で述べたように、相分離した GM3 の状態は GM3 含量 100 mol% の単分子膜における状態と同様に考えることができる。そこでこの系においては単分子膜中の GM3 の存在状態の効果を単分子膜中の GM3 含量の効果についての結果から議論することとした。単分子膜中の GM3 含量を変化させた GM3 / DPPA 混合脂質単分子膜に対して抗体を 2.8×10^{-10} M 添加したときの振動数の経時変化を図 4-12 に示した。得られた結合曲線から求めた Δm と V_{bind} の値を図 4-13 および 4-14 にそれぞれ示した。

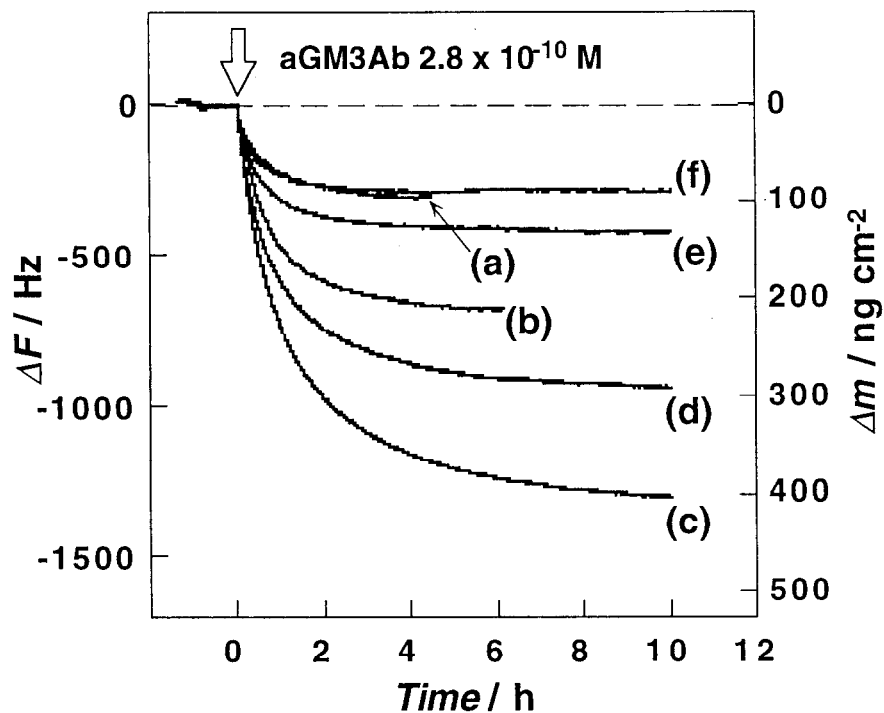


図 4-12 GM3 / DPPA 混合単分子膜に対する抗 GM3 抗体の結合挙動
GM3 含量 (a) 0 mol%, (b) 5 mol%, (c) 20 mol%, (d) 40 mol%, (e) 60 mol%,
(f) 100 mol% の GM3 / DPPA 混合単分子膜 (条件は図 4-5 に同じ)

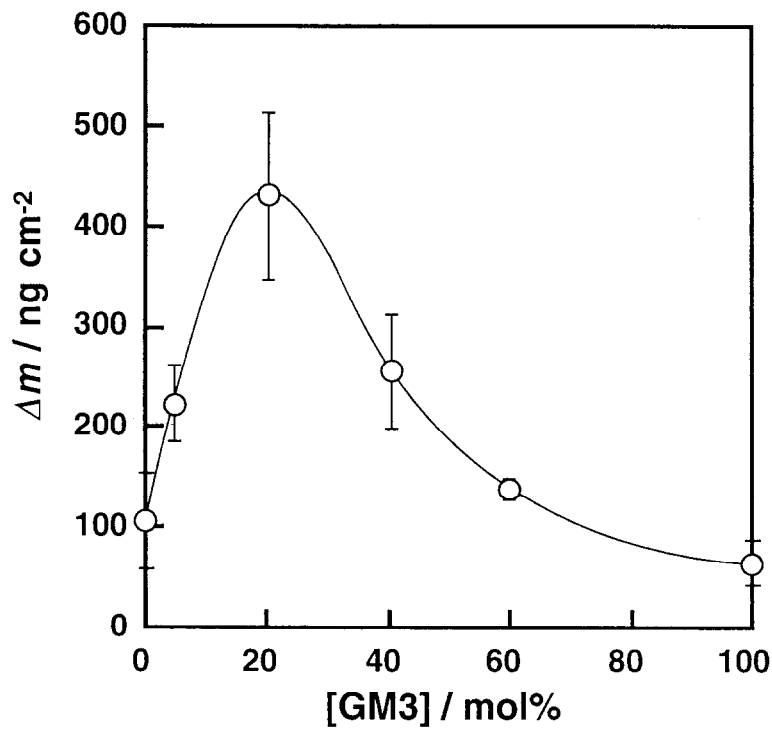


図 4-13 GM3 / DPPA 混合単分子膜に対する抗 GM3 抗体の結合量 Δm の GM3 含量依存性 (条件は図 4-5 に同じ)

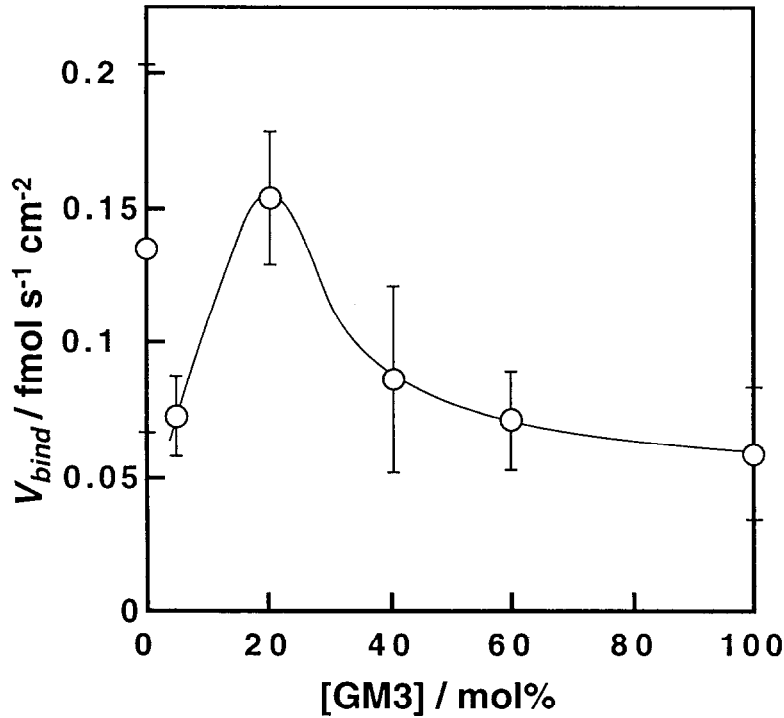


図 4-14 GM3 / DPPA 混合単分子膜に対する抗 GM3 抗体の初期結合速度 V_{bind} の GM3 含量依存性 (条件は図 4-5 に同じ)

これより抗体の結合量は単分子膜中の GM3 含量の増加とともにベル型の挙動をとることがわかった。これは 3-3-5 で述べたように GM3 混合単分子膜に対する WGA の結合性²³⁾などと同様の傾向である(図 1-6 および図 3-25)。単分子膜中の GM3 含量の増加により GM3 の糖鎖間が混み合い、立体障害が生じて抗体の結合性が低下したものと考えられた(負のクラスター効果)。抗体の結合性が最大となった GM3 含量 20 mol% においては、第 2 章の結果から GM3 と DPPA は単分子膜中でほぼ均一に混合していると考えられるので、膜中での GM3 間の距離は約 1.3 nm と見積もることができる。これ以上 GM3 含量が増加すると単分子膜中で確率的に GM3 同士が接触するようになり、そのような密集した GM3 は抗体に認識されないと考えられた。初期結合速度についても誤差の大きい 0 mol% の点を除けば結合量と同様の傾向となった。初期の結合速度であるから膜中の GM3 含量とともに直線的に増加するという可能性もあったが、この系ではホスト濃度増加の効果よりも前述の立体障害の効果の方が大きかった。これらの結果から、単分子膜中で相分離した GM3 は抗体に認識されにくい状態にあると考えられた。したがって GM3 / DOPA 単分子膜に対する抗体の結合量が DOPA 単分子膜に対するものと同程度であったのは非特異結合が増加したこと以外にも DOPA 中の GM3 に対する抗体の結合性が低いことも原因であると考えられた。

Hakomori らはスフィンゴ糖脂質は生体膜中でクラスター化してその機能を発揮していると主張している²⁴⁾。Nores らは GM3 を含んだリポソームや基板上の脂質キャスト膜に対する抗 GM3 抗体 M2590 の結合において、抗体が膜に結合するためには膜中の GM3 含量がある値以上必要であるという結果を得ている(図 4-1)¹⁵⁾。すなわち抗体の結合においては膜中の GM3 含量に閾値が存在し、その閾値以上にならないと GM3 のクラスター化が起こらないために抗体に認識されないのであろうと彼らは推測している。

しかしながらここで示した GM3 混合単分子膜を用いた測定結果では、抗 GM3 抗体 L612 はクラスター化した GM3 に対応すると考えられる GM3 含量の高い混合単分子膜に対して特異的な結合を示さなかった。これは抗体の由来の違いによるという考え方もできるが、いずれの抗体も GM3 を高発現した細胞によって免疫された^{15,18)}ものである

ので膜中の GM3 に対する結合特性はそれほど大きくは変わらないのではないかと考えられる。Tillack らの免疫電顕の結果²⁵⁾などを基に Hakomori らがイメージしているスフィンゴ糖脂質の "クラスター" の大きさは、図 1-3 の模式図^{24a)}からもわかるように nm×nm スケールの小さなものであると思われる。したがって本研究で議論してきた巨視的な相分離や GM3 含量の高い膜などとはドメインのスフィンゴ糖脂質のドメインの大きさがかなり異なっている。Nores らの実験では GM3/DPPC/コレステロール 混合膜を用いている¹⁵⁾。コレステロールの効果は明らかでないが、第 2 章の結果より GM3 と DPPC は単分子膜中で巨視的には均一に混合している。したがって彼らの実験条件においても少なくとも相分離のような GM3 の巨視的なドメインは形成されていないと考えられる。しかし nm² オーダーのミクロクラスター形成は π -A 等温線の解析からは検出できない可能性が高く、彼らの主張を完全に否定する結果ではない。本章での結果も GM3 含量 20 mol% 程度までであれば抗体の結合性は上昇している(図 4-11,12)。しかし彼らの結果(図 4-1)¹⁵⁾のように抗体の結合性が急に上昇する閾値は観察されなかった。単分子膜を用いた場合には GM3 含量 5 mol% 以下に閾値が存在したのかもしれない。また別の解釈として彼らの結果は抗体が結合定数を上げるために膜中の GM3 と多価で結合するための GM3 含量に閾値が存在した、ととることもできる。すなわちこの閾値は膜面において確率的に抗体の複数の結合部位に同時に GM3 が存在するような濃度域を示しているのかもしれない。

Hakomori らの主張が正しいとするならば、膜中での nm² オーダーの微視的な "クラスター" を形成しているスフィンゴ糖脂質と相分離のような巨視的なドメイン中に存在するスフィンゴ糖脂質との糖鎖認識性はまた異なるということになる。したがって膜中でのスフィンゴ糖脂質の存在状態と糖鎖認識性について議論する際には糖脂質の集合状態およびその集合構造のサイズについても注目しなければならないことが示唆された。

4-3-4 結合定数の算出

4-3-3 より単分子膜中の GM3 含量により抗 GM3 抗体 L612 の結合性が変化することが示された。この現象が GM3 混合単分子膜と抗体との結合パラメータにどのように反映されているかを明らかにするため、GM3 / DPPA 混合単分子膜に対する抗体の添加量を変化させたときの結合挙動を観察して結合定数の算出を行った。実際には IgM 一分子あたり抗原 (GM3) 結合部位が 10 個存在する²⁶⁾が、ここでは単純に膜面上の見かけの結合サイト : 抗体 = 1 : 1 の Langmuir 型の単層結合を仮定して逆数プロットにより結合定数を M^{-1} の単位で求めた。それぞれの GM3 混合単分子膜に対する抗体の結合等温線を図 4-15 に、逆数プロットを図 4-16 にそれぞれ示した。逆数プロットより求めた結合定数 K_a と飽和結合量 Δm の値を表 4-2 にまとめた。

抗体の特異的な結合が観察された GM3 含量 5 mol% と 20 mol% の GM3 / DPPA 混合単分子膜においては、結合定数はどちらも約 $10^9 M^{-1}$ のオーダーとなった。抗体の抗原に対する結合定数は $10^4 \sim 10^{11} M^{-1}$ の範囲にあるといわれている²⁶⁾。 $10^9 M^{-1}$ という値は抗体が IgM 型であり GM3 結合部位が多価であることの効果も考えられたが、抗体の DPPA 膜への非特異結合も $10^8 M^{-1}$ のオーダーとなり、その差は約 5 倍程度にとどまった。これより 3-3-5 で述べたいわゆる "界面の効果" も大きいことが示唆された。抗体の特異的な結合がみられなかった GM3 単独膜については DPPA 膜に対する結合パラメータに近い値が得られた。したがって GM3 単独膜に対する抗体の結合は特異的なものではなく表面に負電荷を持った膜に対する非特異結合によるものと考えられた。

飽和結合量は特異結合と非特異結合の場合とでほとんど差がみられなかった。抗 GM3 抗体が脂質膜に単層で結合したときの飽和結合量を見積もると、ヒト IgM が分子量 966000 のほぼディスク状の分子と考えられる²⁷⁾ので、飽和結合量は図 4-17 に示したように抗体の結合の仕方によっておよそ $160 \sim 1100 \text{ ng cm}^{-2}$ の範囲となる。表 4-2 に示した結果から抗体は膜面に対して図 4-17 の右図のような形で単層で結合していることが示唆された。

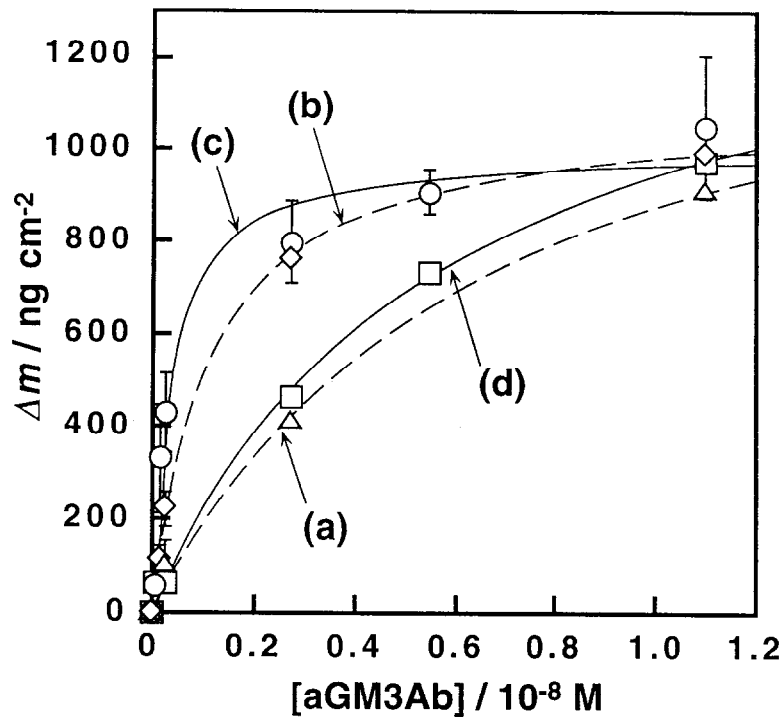


図 4-15 GM3/DPPA 混合単分子膜に対する抗 GM3 抗体の結合における結合等温線 (a) DPPA 単分子膜, (b) GM3 5 mol%, (c) GM3 20 mol%, (d) GM3 100 mol% の GM3/DPPA 混合単分子膜 (条件は図 4-5 に同じ)

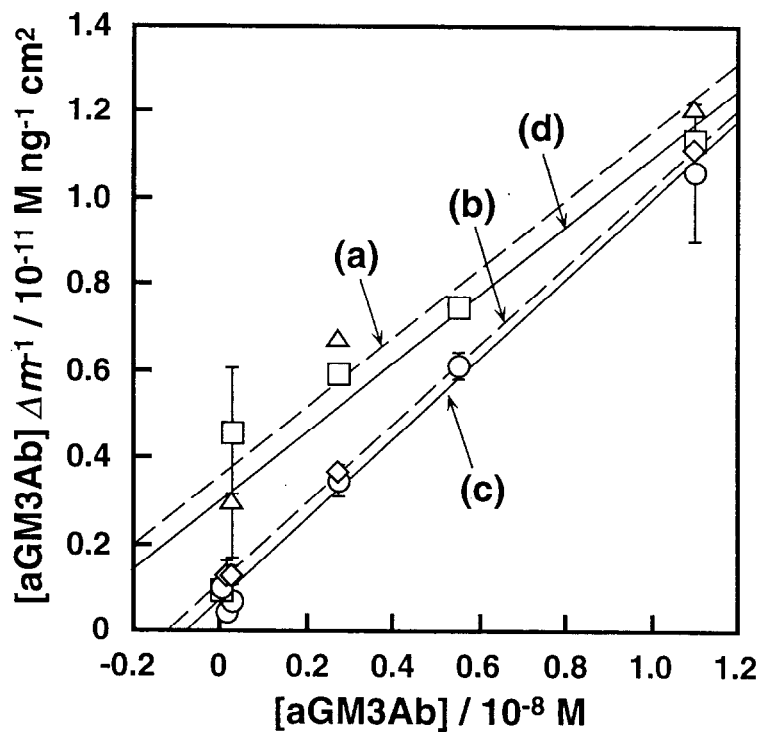


図 4-16 GM3/DPPA 混合単分子膜に対する抗 GM3 抗体の結合における逆数プロット (a) DPPA 単分子膜, (b) GM3 5 mol%, (c) GM3 20 mol%, (d) GM3 100 mol% の GM3/DPPA 混合単分子膜 (条件は図 4-5 に同じ)

表 4-2 GM3 / DPPA 混合単分子膜に対する抗 GM3 抗体の結合パラメータ

	$K_a / 10^9 \text{ M}^{-1}$	$\Delta m_{max} / \text{ng cm}^{-2}$
GM3 5 mol% in DPPA	0.85	1100
GM3 20 mol% in DPPA	1.4	1100
GM3 100 mol%	0.27	1300
DPPA 100 mol%	0.23	1200

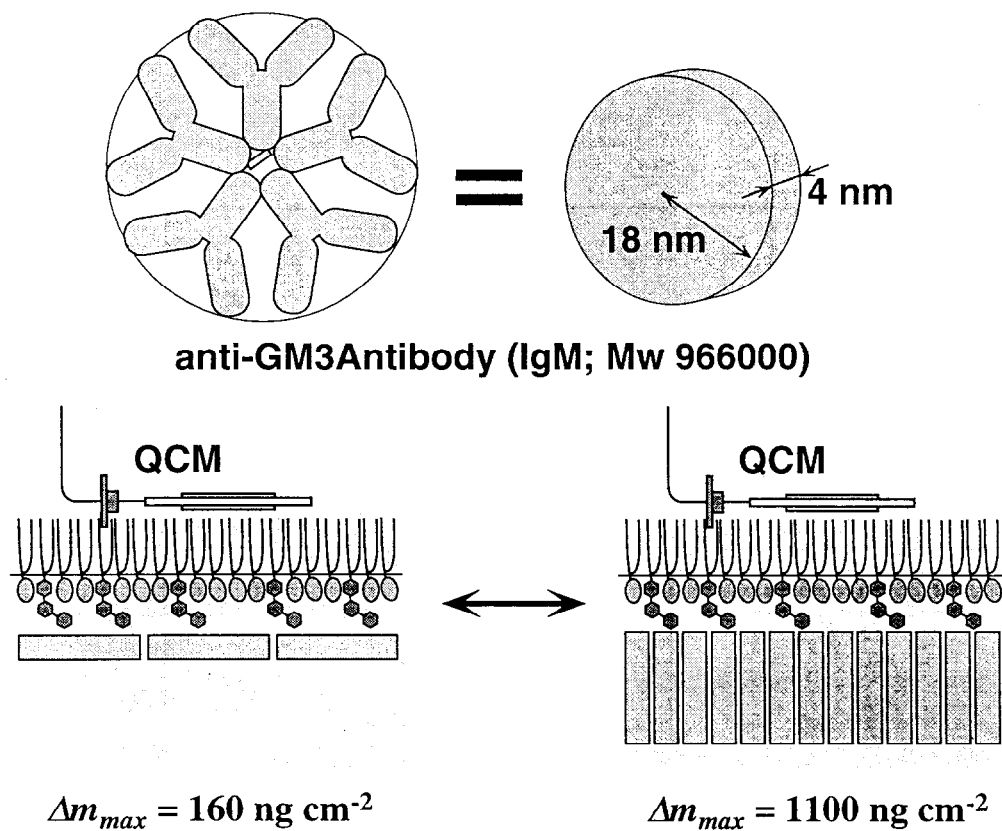


図 4-17 抗 GM3 抗体の飽和結合量の予想図

4-4 結言

GM3 混合単分子膜に対する抗 GM3 抗体の結合挙動について検討したところ、DPPA をマトリックス脂質とすることで特異的な結合を観察することができた。抗体の結合量は単分子膜中の GM3 含量に対してベル型の挙動を示し、単分子膜中の GM3 含量が高くなると抗体は特異的な結合を示さなかった(図 4-18)。これは膜面で GM3 の糖鎖が密に込み合うことにより立体障害などの負のクラスター効果が生じたため抗体に認識されにくくなったものと考えられた。また抗体は GM3 以外にも非還元末端に NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal- 構造を持つ GM4 などに対して結合した。抗体の GM3 混合単分子膜に対する結合定数は 10^9 M^{-1} のオーダーであり、抗体が一分子あたり複数の GM3 結合部位を持つ効果や界面の効果が示唆された。

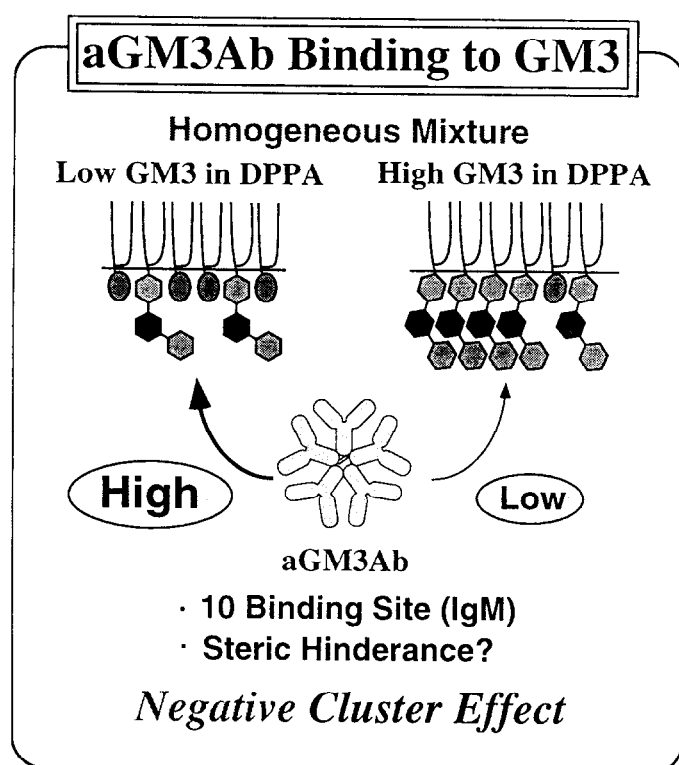


図 4-18 GM3 / DPPA 混合単分子膜に対する抗 GM3 抗体の結合性の模式図

通常抗体の結合を ELISA 法や組織染色などによって検出する場合²⁾、抗体の非特異結合を抑制するために BSA などのブロッキング剤の共存下で測定を行っている。また抗体の結合量は酵素を結合した 2 次抗体などを用いて評価している。ここで用いた気-水界面の脂質単分子膜と水晶発振子を用いた測定系は、マトリックス脂質や添加する抗体の濃度などの条件を選択することによって、ブロッキング剤を用いなくても抗体の結合性を定量的に評価できることが明らかとなった。本測定系では検出には対象となる抗体分子のみがあればよく、2 次抗体を準備する必要がない。これにより 2 次抗体による非特異結合の影響も除くことができる。また厳密に界面が制御された脂質単分子膜をホストとして用いることで脂質膜中のスフィンゴ糖脂質に対する抗スフィンゴ糖脂質抗体の結合性について分子レベルでの議論をすることが可能となった。このように本測定系は脂質膜中の抗原に対する抗体の結合性を評価する手法として非常に有用であると期待される。

第4章 参考文献

- 1) 安藤 進 著, "脳機能とガングリオシド -新たに登場したニューロンの活性物質", 共立出版, 1997
- 2) 鈴木 康夫, 安藤 進 編著, "生物化学実験法 35 ガングリオシド研究法 I", 学会出版センター, 1995
- 3) R. K. Yu and K. Iqbal, *J. Neurochem.* **32**, 293-300 (1979)
- 4) D. Solter and B. B. Knowles, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **75**, 5565-5569 (1978)
- 5) H. Rahmann, *Func. Biol. Med.* **4**, 249-261 (1985)
- 6) 遠藤 玉夫, 蛋白質核酸酵素 **43** "糖鎖生物学", 2582-2588 (1998)
- 7) 箱守 仙一郎, "別冊 日経サイエンス 111 糖鎖と細胞", pp7-19, 入村 達郎 編, 日経サイエンス社, 1994
- 8) S. Hakomori, *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 733-764 (1981)
- 9) a) 中村 充, 齋藤 政樹, 蛋白質核酸酵素 **37** "複合糖質", 1839-1846 (1992)
b) 田井 直, 齋藤 政樹, 蛋白質核酸酵素 **37** "複合糖質", 1863-1867 (1992)
c) 土肥多恵子, 大島 美恵子, 蛋白質核酸酵素 **37** 複合糖質", 1868-1872 (1992)
- 10) 鈴木 康夫, 安藤 進 編著, "生物化学実験法 36 ガングリオシド研究法 II", 学会出版センター, 1995
- 11) a) A. N. Houghton, D. Mintzer, C. Cordon-Cardo, S. Welt, B. Fiegel, S. Vadhan, E. Carswell, M. R. Melamed, H. F. Oettgen, and L. J. Old, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **82**, 1242-1246 (1985)
b) I. Kawashima, T. Tada, F. Fuzimori, and T. Tai, *J. Biochem.* **108**, 109-115 (1990)
- 12) 永井 克孝 他 編, "糖鎖 II. 糖鎖と病態", 東京化学同人, 1994
- 13) 神奈木 玲児, 野吾 和宏, 高田亜希子, 銭田 晃一, 銀屋 治巳, 蛋白質核酸酵素 **37** "複合糖質", 2026-2047 (1992)
- 14) a) Y. Hirabayashi, A. Hamaoka, M. Matsumoto, T. Matsuura, M. Tagawa, S. Wakabayashi, and M. Taniguchi, *J. Biol. Chem.* **260**, 13328-13333 (1985)
b) H. Sakimiya, T. Takahashi, Y. Hirabayashi, and M. Taniguchi, *Cell Struc. Func.* **12**, 93-105 (1987)

- c) J. Inokuchi, K. Momosaki, H. Shimeno, H. Nagamatsu, and N. S. Radin, *J. Cell. Physiol.* **141**, 573-583 (1989)
- 15) G. A. Nores, T. Dohi, M. Taniguchi, and S. Hakomori, *J. Immunol.* **139**, 3171-3176 (1987)
- 16) I. Kawashima, O. Nakamura, and T. Tai, *Mol. Immunol.* **29**, 625-632 (1992)
- 17) 日本生化学会 編, "新生化学実験講座 4 脂質 III 糖脂質", 東京化学同人, 1990
- 18) D. S. B. Hoon, Y. Wang, L. Sze, H. Kanda, T. Watanabe, S. L. Morrison, D. L. Morton, and R. F. Irie, *Cancer Res.* **53**, 5244-5250 (1993)
- 19) R. F. Irie, L. L. Sze, and R. E. Saxton, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **79**, 5666-5670 (1982)
- 20) T. Momoi, S. Ando, and Y. Nagai, *Biochim. Biophys. Acta* **441**, 488-497 (1976)
- 21) T. Terabayashi, M. Tsuda, and Y. Kawanishi, *Anal. Biochem.* **204**, 15-21 (1992)
- 22) T. Sato, M. Ishii, T. Terabayashi, Y. Kawanishi, and Y. Okahata, *Chem. Lett.* **1997**, 669-670
- 23) a) T. Sato, T. Serizawa, F. Ohtake, M. Nakamura, T. Terabayashi, Y. Kawanishi, and Y. Okahata, *Biochim. Biophys. Acta* **1380**, 82-92 (1998)
 b) 芹澤 武, 学位論文, 東京工業大学 (1995)
- 24) a) 箱守 仙一郎, "別冊 日経サイエンス 111 糖鎖と細胞", pp20-29, 入村 達郎 編, 日経サイエンス社, 1994
 b) N. Kojima and S. Hakomori, *Glycobiology* **1**, 623-630 (1991)
 c) S. Hakomori and Y. Igarashi, *J. Biochem.* **118**, 1091-1103 (1995)
 d) K. Iwabuchi, S. Yamamura, A. Prinetti, K. Handa, and S. Hakomori, *J. Biol. Chem.* **273**, 9130-9138 (1998)
- 25) a) T. W. Tillack, M. Allietta, R. E. Moran, and W. W. Young, Jr., *Biochim. Biophys. Acta* **733**, 15-24 (1983)
 b) I. E. Mechlhorn, G. Parraga, K. R. Barber, and W. M. Grant, *Biochim. Biophys. Acta* **863**, 139-155 (1986)
 c) P. Rock, M. Allietta, W. W. Young, Jr., T. E. Thompson, and T. W. Tillack, *Biochemistry* **29**, 8484-8490 (1990)
- 26) D. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson,

"Molecular Biology of the Cell, 3rd Ed.", Garland Publishing, Inc., New York, 1994

- 27) S. J. Perkins, A. S. Nealis, B. J. Sutton, and A. Feinstein, *J. Mol. Biol.* **221**, 1345-1366 (1991)

第5章 ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 混合単分子膜に対する SSA レクチンの結合挙動の観察

5-1 緒言

生体内における分子認識の多くはホスト-ゲストそれぞれが多価で相互作用することによって選択性や結合定数を上げている¹⁾。これは糖鎖に対するゲスト分子の結合においても同様である。肝細胞は細胞膜上にアシアロ糖タンパク質レセプター²⁾を、インフルエンザ A 型ウイルスはエンベロープ膜上にヘマグルチニン (HA) 三量体³⁾を多数発現している。このような個体レベルから第4章で用いた抗体や第3章で用いたレクチンなどタンパク質一分子においても糖鎖との多価の相互作用がおこる。たとえば植物レクチンの多くは一分子が複数のサブユニットから構成され、それぞれ、あるいは一部のサブユニットに糖結合部位を持つ⁴⁾。また WGA⁵⁾ のようにサブユニット間に糖結合部位を持つものもある。したがってレクチン一分子あたりでは複数の糖結合部位が存在し、糖鎖との多価の相互作用が可能となり結合性が増加している。またレクチン一分子が複数の赤血球などの細胞と結合することができいわゆる凝集素 (agglutinin) としての性質を示す。

これまでレクチンなどと糖鎖との多価の相互作用については、おもにリガンドとなる糖鎖分子の多価の効果を中心に検討されてきた⁶⁾。遊離の糖鎖単独ではレクチンとの結合性は低い糖タンパク質糖鎖のような一分子中に複数のリガンド部位を持つオリゴ糖鎖や高分子化した糖鎖に対しては、レクチンの結合定数が単量体の糖鎖に対する値に比べて $10^2 \sim 10^3$ 倍も大きくなることは良く知られている (正のクラスター効果)^{6,7)}。しかしホスト-ゲストの組み合わせによっては糖鎖が密に存在することで立体障害などが生じレクチンの結合性が低下することもある (負のクラスター効果)⁸⁾。これらの現象については本研究においても第3章、第4章において観察されている。厳密には糖鎖が高分子化

したことによるマクロなクラスター効果と局所的な糖鎖密度の増加によるミクロなクラスター効果(glycoside cluster effect)とは区別して議論しなければならないが⁶⁾、本研究で用いた脂質単分子膜の系においては主に後者の寄与が大きいと考えられる。

もう一つのアプローチとして、抗体の Fab 断片の調製⁹⁾を調製して抗原との結合活性を調べる¹⁰⁾場合のように、多価の糖結合部位を持つレクチンをサブユニット化して一分子あたり一つの糖結合部位を持つ分子を調製することが考えられる。このような単量体化した分子を用いればレクチンと糖鎖とのホスト:ゲスト = 1:1 での結合性を評価でき、またレクチンの糖結合部位が多価である効果についての比較材料となる。応用という点からみても、たとえば蛍光ラベル化したレクチンの細胞への結合性などをフローサイトメトリーによって検出する場合に問題となっていた細胞間の凝集を防ぐことができ有用な分子になるといえる。しかしながらこれまでレクチンの(糖結合部位を単位とした)単量体化については検討例が少なく¹¹⁾、さらにその生物学的活性についてはコンカナバリン A (ConA) についてのみ評価されている¹²⁾にすぎなかった。

最近になって Shibuya らは植物レクチンの効率的な単量体化の手法を確立した¹³⁾。彼らは 1989 年にニホンニワトコレクチン SSA (*Sambucus sieboldiana* Lectin) を単離している¹⁴⁾。SSA の分子量は 140000 であり、分子量 31000 の A サブユニットと 35000 の B サブユニットからなる A₂B₂ 型のレクチンである。糖結合部位は B サブユニットに存在する。SSA のサブユニット間の結合の模式図を図 5-1 に示した¹⁵⁾。

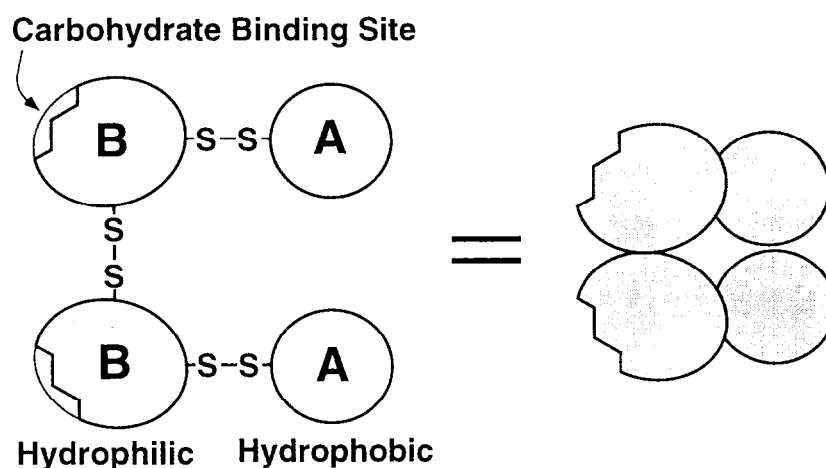


図 5-1 SSA のサブユニット間の結合の模式図 (文献 15 より引用)

SSA の糖鎖に対する結合特異性は凝集阻害実験の結果から NeuAc α 2 \rightarrow 6Gal- \rightarrow NeuAc α 2 \rightarrow 6GalNAc- \gg NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal- であることが知られている¹⁶⁾。彼らは SSA のサブユニット間のジスルフィド結合を還元し、4-vinylpyridine で処理することにより再結合を防ぎ、各サブユニットを単量体化することに成功した。これを精製して糖結合部位を持つ B サブユニットを単離した。彼らはこれを糖結合部位が monomeric な SSA という意味で MSSA と名付けている。MSSA は糖鎖に対する結合特異性を保っていることが確認されている¹³⁾。この手法が他のレクチンにも適用できることも示されている¹⁷⁾。彼ら MSSA の応用についても検討し、細胞に対する結合をフローサイトメトリーにより評価した場合、SSA では細胞の凝集が起これレクチンの結合を正しく評価できなかったが、MSSA を用いれば糖鎖認識による細胞への結合を検出することができたことを示している^{13,17)}。また最近では SPR 法を用いてオリゴ糖鎖に対する SSA と MSSA の結合パラメータの違いについて評価も行っている¹⁸⁾。

本章では第3章および第4章で用いたのと同様の測定系を用いて ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 混合単分子膜に対する SSA および MSSA の結合挙動について検討した(図 5-2)。($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 は NeuAc $\alpha 2 \rightarrow 6$ Gal- という糖鎖構造を持つので理論的には SSA が結合すると考えられる。しかしながらこれまで糖脂質に対する SSA の結合性についてはほとんど評価されていない。脂質膜という二次元平面上で膜界面から近い位置に提示された糖脂質の糖鎖に対して SSA が特異的に結合できるかどうかを評価した。また MSSA との結合挙動の違いについても検討した。

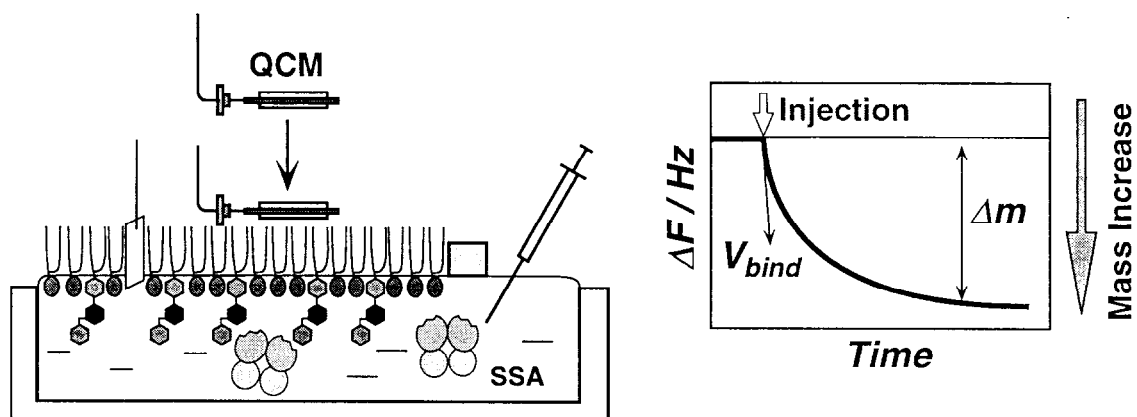


図 5-2 測定系の模式図

5-2 実験方法

5-2-1 材料

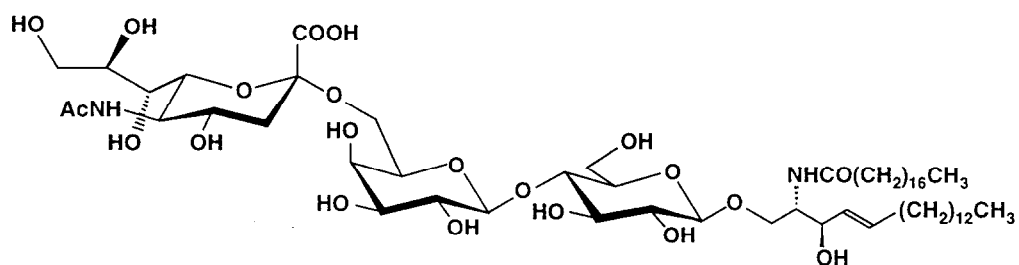
Ceramide (Cer; Non-Hydroxy Fatty Acid Ceramide, from Bovine Brain Sphingomyelin, code C2137, Lot 85H8443) は Sigma. Co. Ltd. より購入した。1,2-dioctadecyl glyceryl ether ($2C_{18}OH$) は東京工業大学の入本より提供された¹⁹⁾。他の脂質は前章までで述べたものを使用した。本章で用いた脂質の化学構造と略称を図 5-3 に示した。

ニホンニワトコレクチン SSA (*Sambucus sieboldia Lectin*) は農水省農業生物資源研究所生物学部の渋谷 直人 博士より提供されたもの¹⁴⁾および生化学工業株式会社から購入した(code 300177, Lot 02116, 30408)ものを使用した。MSSA は同渋谷博士によって調製され¹³⁾提供された。いずれの試薬もさらなる精製を行わずに使用した。

5-2-2 測定方法

3-2-3 および 4-2-2 と同様のシステムを用いて行った。トラフの下層水および測定用の緩衝液には PBS (pH 7.4) を用いた。 $(\alpha 2 \rightarrow 6)GM3$ 混合単分子膜の表面圧は 30 mN m^{-1} に設定し、測定温度は $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ とした。

SSA および MSSA の結合挙動は 3-2-4 で述べた方法に基づいて解析を行った。結合パラメータは飽和法により算出した。



($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 [NeuAc $\alpha 2 \rightarrow 6$ Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ Glc $\beta 1 \rightarrow 1'$ Cer]

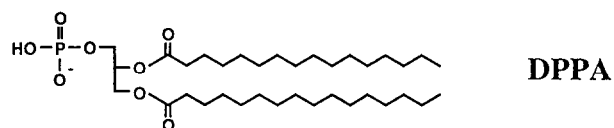
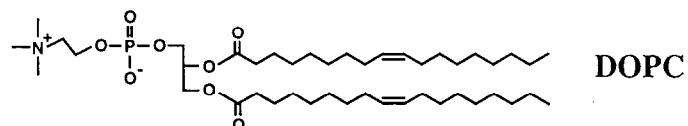
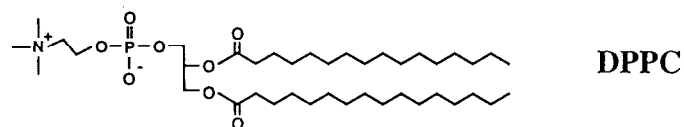
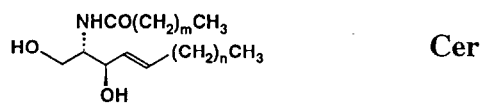
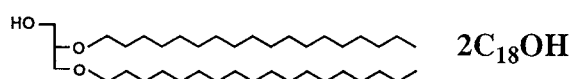
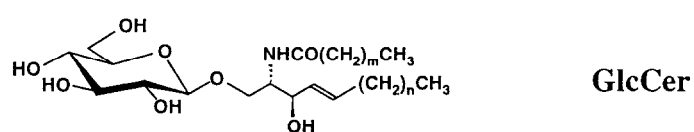


図 5-3 本章で用いた脂質の化学構造および略称
(スフィンゴ糖脂質の脂肪酸および長鎖塩基組成は表 2-1 および表 2-2 参照)

5-3 結果および考察

5-3-1 SSA レクチンの結合挙動

図 5-4 に ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 混合脂質単分子膜に対して SSA を 1.4×10^{-7} M 添加したときの振動数の経時変化を示した。得られた結合曲線のカーブフィッティングから求めた平衡時における結合量 Δm と初期結合速度 V_{bind} の値を図 5-5 にそれぞれ示した。

まずマトリックス脂質の親水部の影響を小さくする目的で比較的親水部の構造が小さい脂質をマトリックス脂質として用いた。しかし ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 混合単分子膜に対する SSA の結合挙動はマトリックス脂質単分子膜に対する非特異結合の場合とほぼ同様になり特異的な結合はみられなかった(図 5-4(A)-(C))。DPPC マトリックス脂質とした場合も同様であった(図 5-4(D))。

検討した中では唯一 DOPC をマトリックス脂質としたときに ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 / DOPC 膜の方が DOPC 単独膜よりも多くの SSA の結合が観察された(図 5-4(E))。しかしながら初期結合速度については DOPC 膜に対する非特異結合の値の方が大きく(図 5-5)、特異的な結合は複雑な過程となっていることがわかった。DOPC は膨張膜となるので界面に親水部近傍のアルキル鎖が露出し疎水的相互作用による非特異結合が優位になっているのではないかと考えられた。SSA の X 線結晶解析は行われていないがサブユニットのアミノ酸配列は Ricin とある程度相同性があり²⁰⁾、その構造をもとに分子モデリングを行うと A は比較的疎水的な、B は親水的なサブユニットであり、サブユニット間の結合は図 5-1 のようになっている¹⁵⁾。すなわち SSA 分子としては疎水的な領域が存在し、膜面への非特異結合が起こりやすいことが予想される。この他 SSA の溶液中での会合状態などの影響も考えられた。

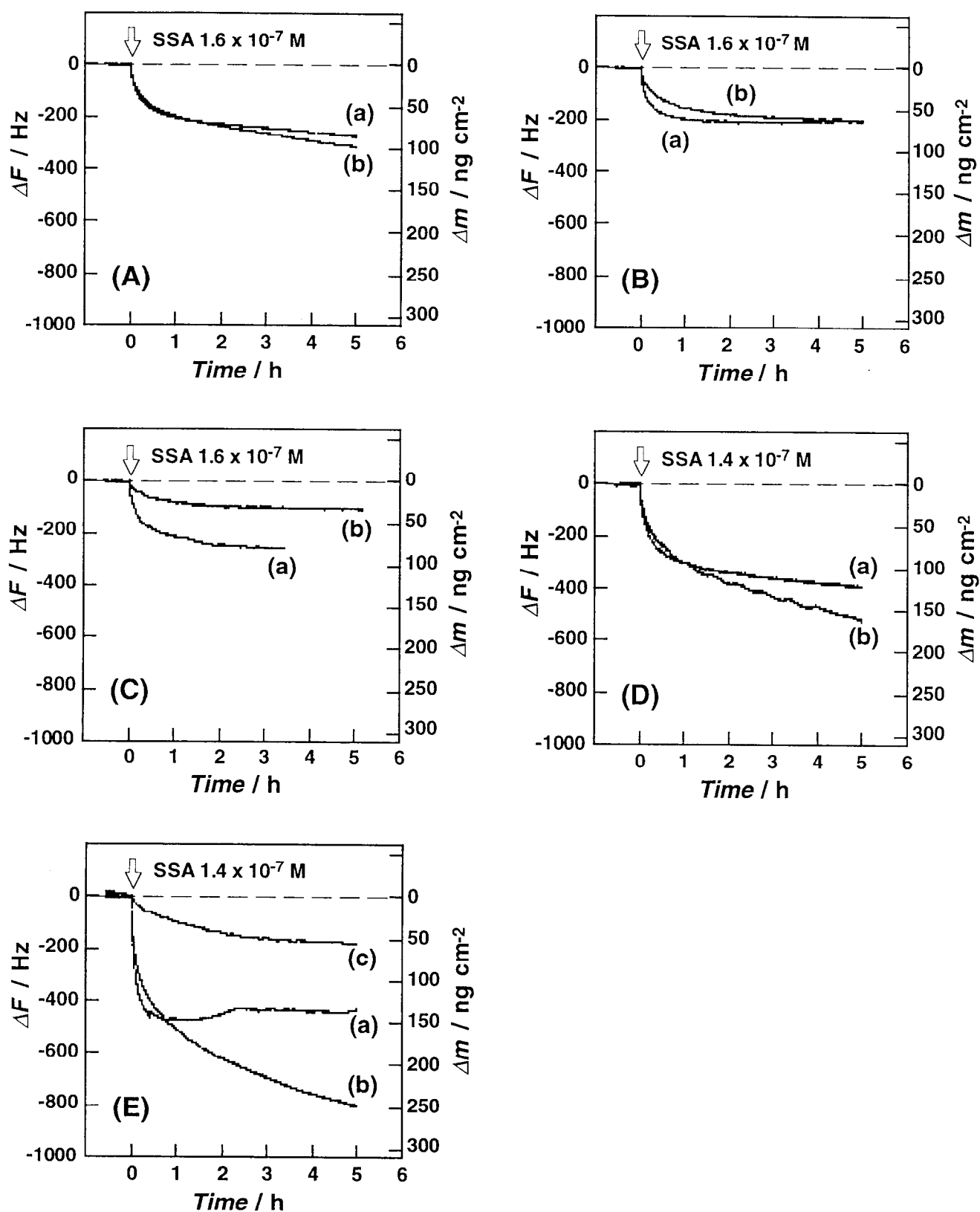


図 5-4 $(\alpha 2 \rightarrow 6)\text{GM3}$ 混合単分子膜に対する SSA の結合挙動

(A) GlcCer, (B) Cer, (C) 2C₁₆OH, (D) DPPC, (E) DOPC matrix

(a) マトリックス脂質単独膜, (b) $(\alpha 2 \rightarrow 6)\text{GM3}$ 20 mol% in matrix,

(c) $(\alpha 2 \rightarrow 6)\text{GM3}$ 100 mol% 単分子膜(in E)

(条件: PBS (pH 7.4), 20 °C, 30 mN m⁻¹, [SSA] = $1.6 \times 10^{-7} \text{ M}$ (in A-C), $1.4 \times 10^{-7} \text{ M}$ (in D, E))

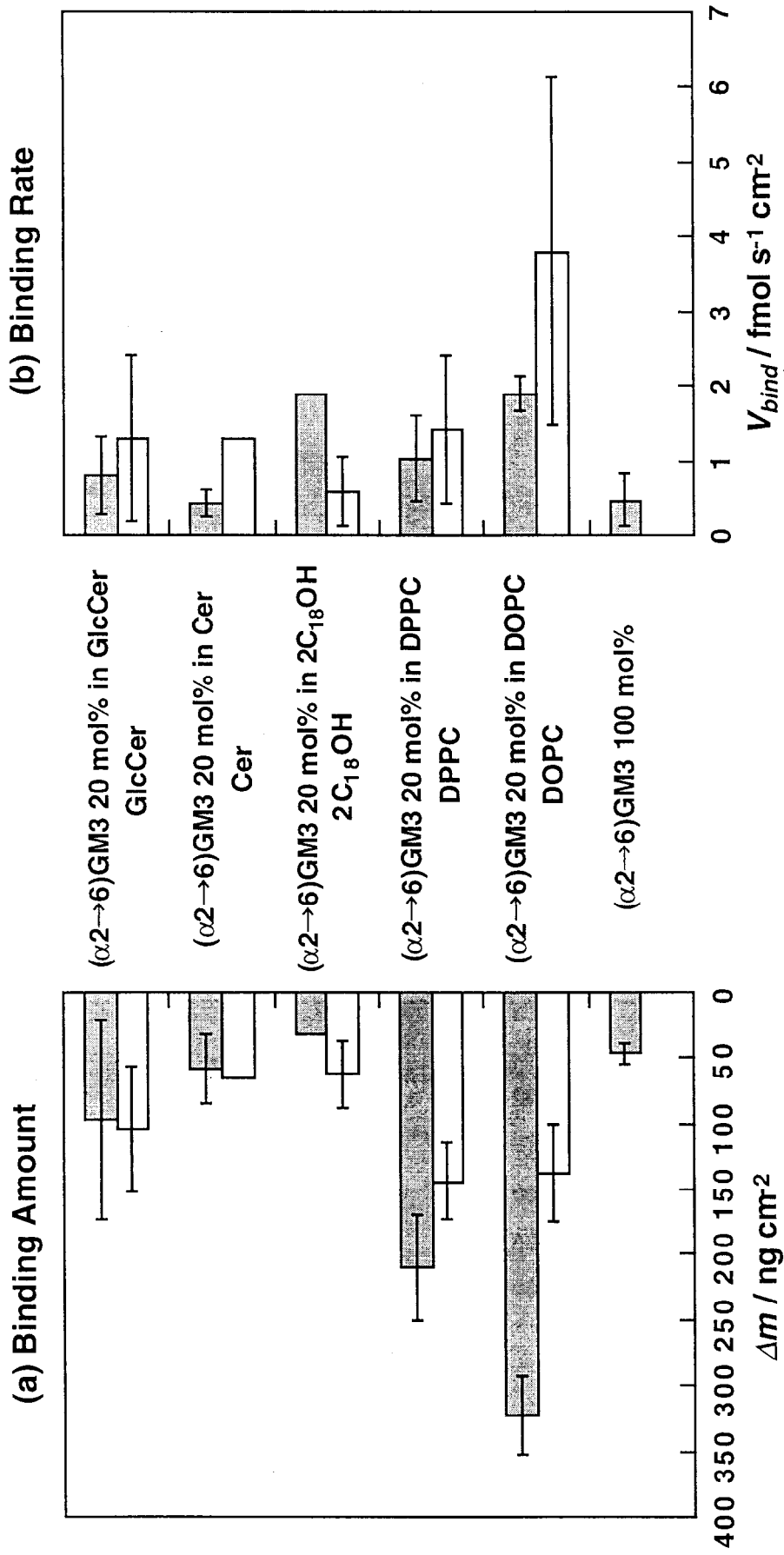
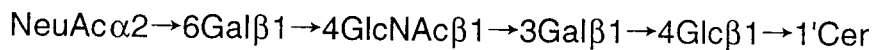


図 5-5 ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 混合単分子膜に対する SSA の (a) 結合量 Δm および (b) 初期結合速度 V_{bind}
 (条件は図 5-4 に同じ)

第2章の結果より ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 20 mol% in DOPC 膜では相分離が起きており ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 は単分子膜中でドメイン構造を形成していることがわかっている。したがって ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 100 mol% の単分子膜に対する SSA の結合挙動は ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 20 mol% in DOPC 膜に対するものと同様であることが期待された。しかし SSA は ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 100 mol% 単分子膜に対して特異的な結合を示さなかった(図 5-4(E))。この場合は明らかに糖鎖が膜面で密に存在することによる立体障害の影響を反映していると考えられた。($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 100 mol% の膜と ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 20 mol% in DOPC 膜に対する SSA の結合挙動の違いから、($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 のドメイン構造の大きさやそのドメイン中での糖鎖の提示のされ方の違い、あるいは ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 のドメインとマトリックス脂質との境界付近などが結合に関与していることが推測された。

総じて SSA は DOPC をマトリックス脂質とした場合を除いて脂質膜中の ($2 \rightarrow 6$)GM3 に対する認識性がないという結果となった。生体内には構造上 SSA のレセプターとなりうる糖脂質自体がほとんど存在しないという問題もあり、これまで糖脂質の糖鎖に対する SSA の結合性をみた例は唯一



(sialyl($\alpha 2 \rightarrow 6$)lactoneotetraosylceramide) に対する結合性を TLC 免疫染色法により検討した例があるだけである。この系では SSA は sialyl($\alpha 2 \rightarrow 6$)lactoneotetraosylceramide に結合することが確認されている²¹⁾。ただしこの場合は糖脂質の会合構造は単分子膜界面とは異なっており、また ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 に比べて SSA の認識部位が脂質の疎水部からより離れている。SSA の分子モデリングの結果からは糖鎖との結合部位はそれほど深くなく²²⁾、($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 の糖鎖構造でも相互作用することが示唆されたが、脂質単分子膜を用いた系では膜界面から糖鎖までの距離が短く、SSA によって認識されにくい状態にあると考えられた。

5-3-2 MSSA レクチンの結合挙動

次にSSAのBサブユニットから調整したMSSA¹³⁾について検討を行った。SSAと比較して糖結合部位が一価となることで結合性が低下する可能性と、疎水的なAサブユニットが除かれたことで立体障害などの影響が低減する可能性の相反する2つの効果が予想された。それぞれの($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3混合脂質単分子膜に対してMSSAを 1.4×10^{-7} M添加したときの振動数の経時変化を図5-6に示した。得られた結合曲線から求めた結合量 Δm と初期結合速度 V_{bind} の値を図5-7にそれぞれ示した。

SSAと同じ濃度域で結合を観察した場合では、検討した中ではGlcCerをマトリックス脂質としたときのみ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3/GlcCer混合単分子膜に対してMSSAの特異的な結合挙動が観察された。GlcCerよりも親水部の小さいCerや $2C_{18}OH$ をマトリックス脂質としても特異的な結合はみられなかった。またDPPAをマトリックス脂質とした場合も同様であった。($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3/GlcCer混合単分子膜においては($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3のNeuAc $\alpha 2 \rightarrow 3$ Gal-以外の部分はGlcCerと同じ構造であるので膜中で疎水部と親水部のグルコース残基の部分までが($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3とGlcCerとで良くパッキングし、結果として糖鎖の提示のされ方がMSSAに認識されやすいようになったのではないかと推測された。また($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3/GlcCer脂質単分子膜に対するMSSAの結合は Δm の値ではGlcCer単分子膜に対する非特異結合と大きな差がみられたが、 V_{bind} の値では差がみられなかった。

レクチンの糖鎖結合部位近傍の環境はMSSAとSSAとでほとんど変わらないと考えられたがSSAの場合はGlcCerをマトリックス脂質とした場合には特異的な結合挙動がみられなかった(図5-4(A))。これよりSSAにおいては疎水的なAサブユニットが脂質膜中への糖鎖に対する結合性に影響を与えていると考えられた。

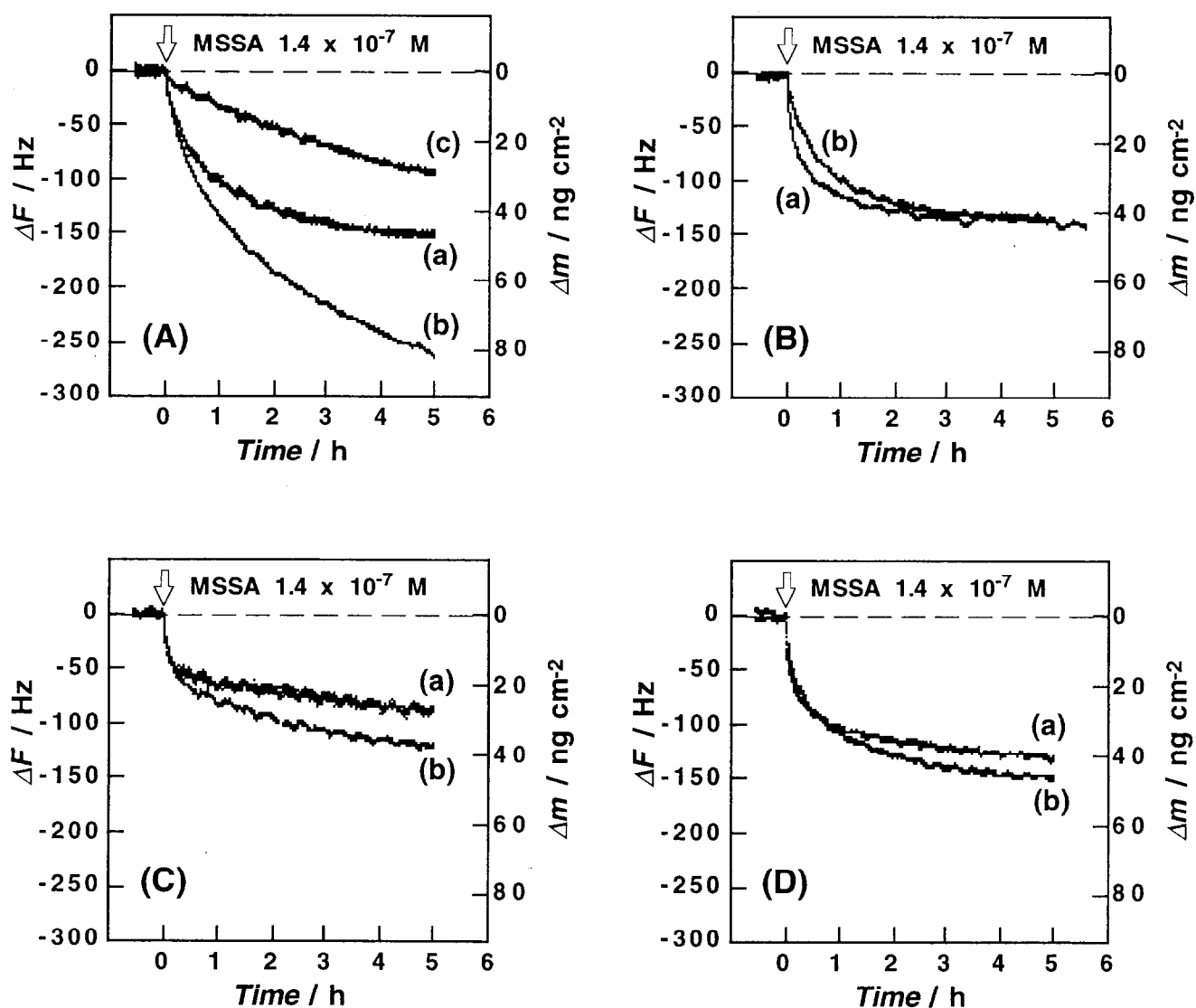


図 5-6 $(\alpha 2 \rightarrow 6)\text{GM3}$ 混合単分子膜に対する MSSA の結合挙動

(A) GlcCer, (B) Cer, (C) $2\text{C}_{18}\text{OH}$, (D) DPPA matrix

(a) マトリックス脂質単独膜, (b) $(\alpha 2 \rightarrow 6)\text{GM3}$ 20 mol% in matrix,

(c) $(\alpha 2 \rightarrow 6)\text{GM3}$ 100 mol% 単分子膜(in A)

(条件: PBS (pH 7.4), 20°C , 30 mN m^{-1})

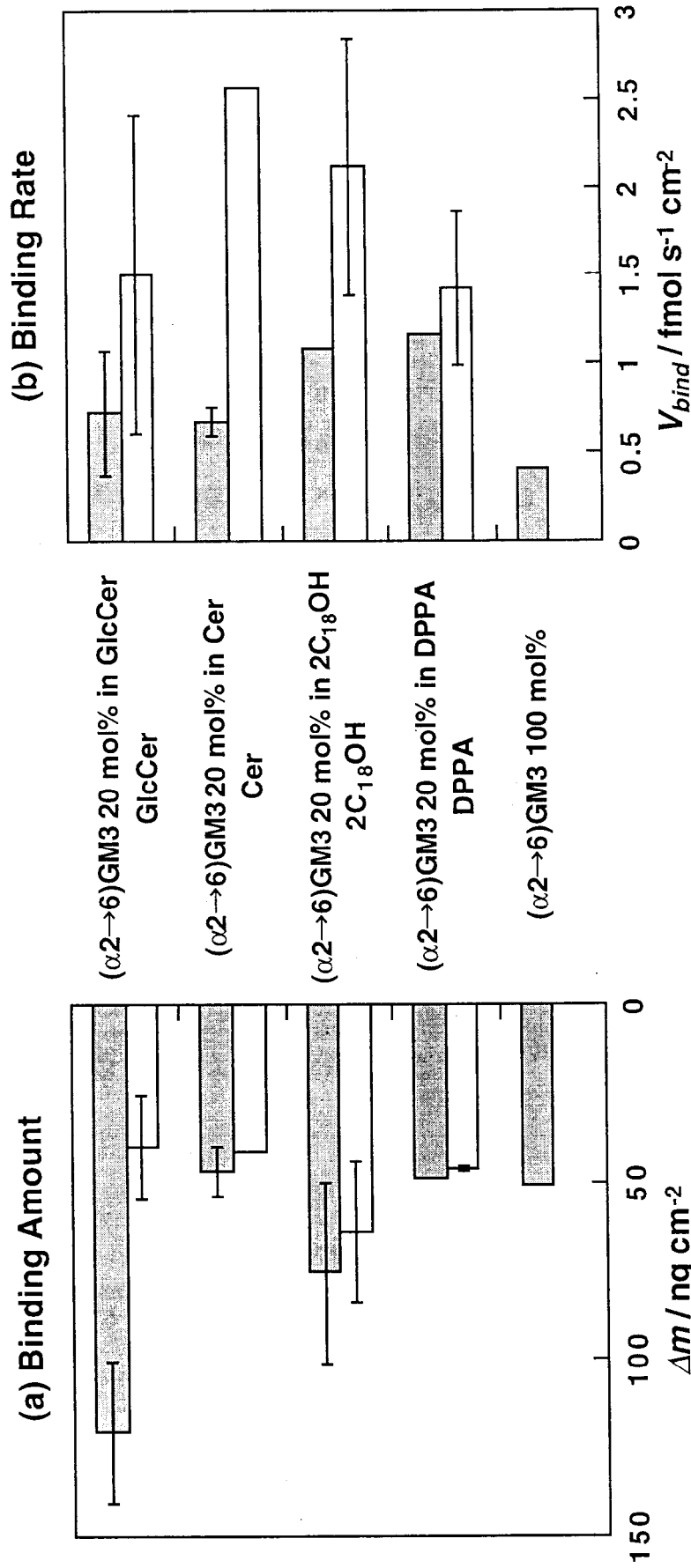


図 5-7 ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 混合単分子膜に対する MSSA の (a) 結合量 Δm および (b) 初期結合速度 V_{bind}
 (条件は図 5-6 に同じ)

5-3-3 結合定数の算出

同一のマトリックス脂質を用いて比較をすることはできなかったが、(α 2 \rightarrow 6)GM3 混合単分子膜に対する SSA および MSSA の結合パラメータを求めた。(α 2 \rightarrow 6)GM3 混合単分子膜に対してそれぞれのレクチンの添加量を変化させたときの結合挙動を観察した。(α 2 \rightarrow 6)GM3 / DOPC 混合単分子膜に対する SSA の結合等温線と逆数プロットを図 5-8 に、(α 2 \rightarrow 6)GM3 / GlcCer 混合単分子膜に対する MSSA の結合等温線と逆数プロットを図 5-9 にそれぞれ示した。求めた結合定数 K_a と飽和結合量 Δm_{max} の値を表 5-1 にまとめた。

結合定数は SSA と MSSA のどちらの系においても 10^6 M^{-1} のオーダーとなり、レクチンの糖結合部位が多価である効果はみられなかった。この系では界面の効果の方が大きく現れてしまっているのかもしれない。動力学定数は求めなかったが初期結合速度 V_{bind} の値(図 5-5(b) および 5-7(b)) を比較しても、誤差が大きいこともあり両者において有意といえるような差はみられなかった。分子モデリング^{20,22)}と Ricin および RCA₁₂₀ の X 線結晶解析の結果²³⁾を参考にし、単分子膜上に SSA および MSSA がそれぞれ単層で結合した場合の飽和結合量を見積もると約 410 ng cm^{-2} および 200 ng cm^{-2} となる。得られた飽和結合量の値は MSSA についてはほぼこの値に近いものとなった。SSA については予想される値よりも大きくなり、疎水的な A サブユニットの影響でレクチン自体が会合して単層以上に結合してしまっている可能性が示唆された。

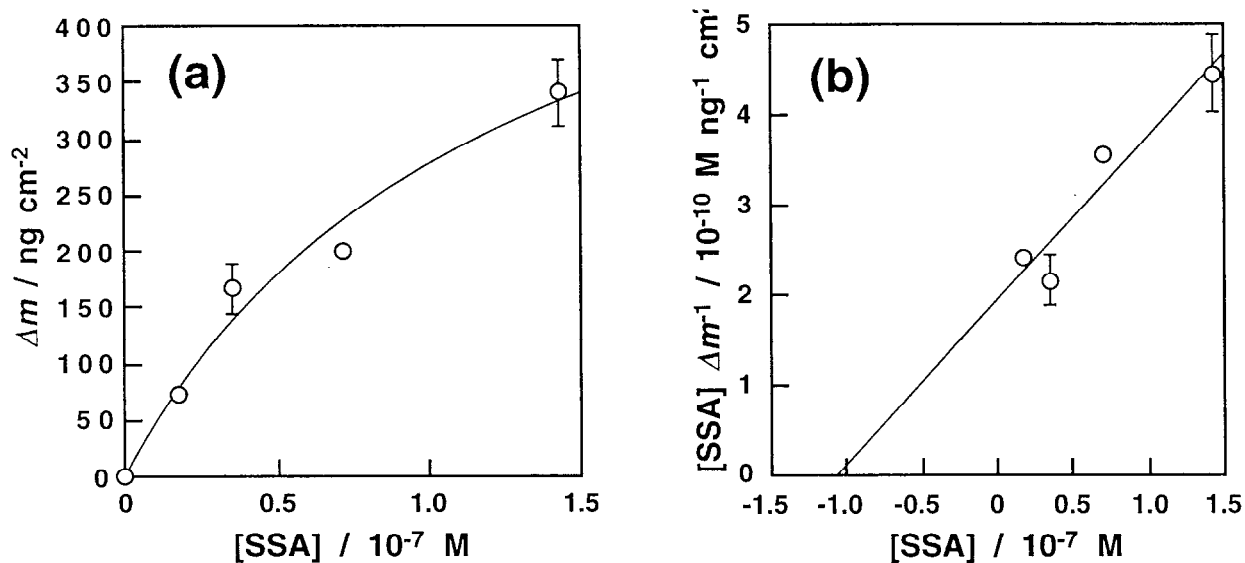


図 5-8 20 mol% ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 in DOPC 混合単分子膜に対する SSA の結合における (a) 結合等温線および (b) 逆数プロット (条件は図 5-4 に同じ)

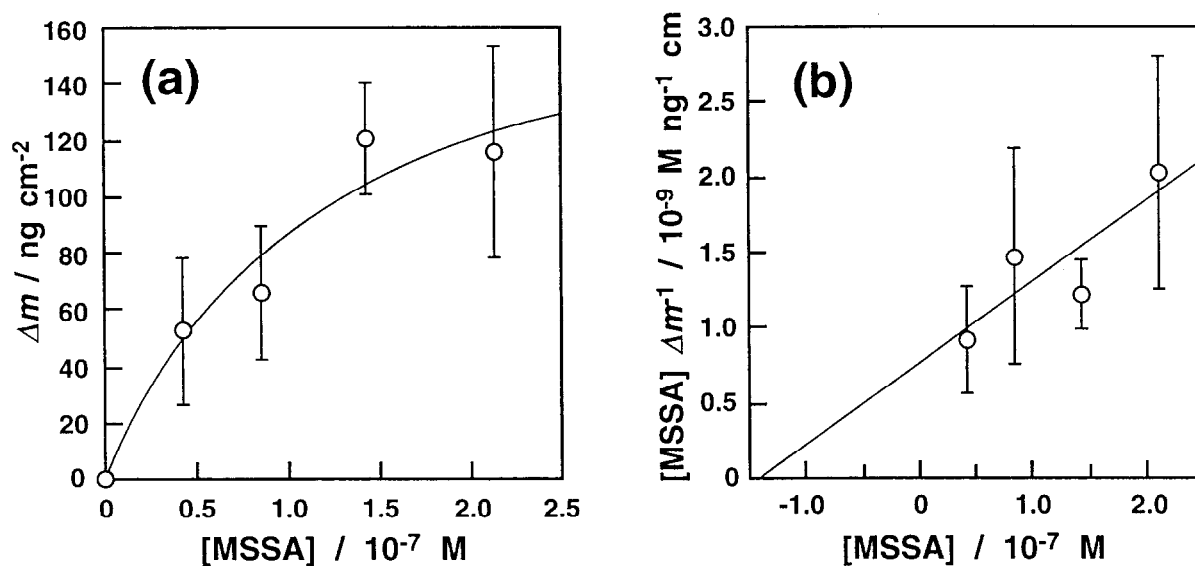


図 5-9 20 mol% ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 in GlcCer 混合単分子膜に対する MSSA の結合における (a) 結合等温線および (b) 逆数プロット (条件は図 5-6 に同じ)

表 5-1 ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 混合単分子膜に対する SSA および MSSA の結合パラメータ

	$K_a / 10^6 \text{ M}^{-1}$	$\Delta m_{max} / \text{ng cm}^{-2}$
SSA Binding to ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 20 mol% in DOPC	9.5	550
MSSA Binding to ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 20 mol% in GlcCer	7.1	190

表 5-2 SPR 法により求められた 6'-sLacNAc 糖鎖に対する SSA および MSSA の結合の動力学パラメータ (文献 18 より引用)

	$k_{ass}^b / 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_{diss}^b / \text{s}^{-1}$	$K_a^c / 10^6 \text{ M}^{-1}$	ΔRU_{max}^d
SSA Binding to 6'-sLacNAc ^a	1.61	0.0024	6.7	2201
MSSA Binding to 6'-sLacNAc	2.90	0.0529	0.55	445

^a6'-sLacNAc = NeuAc $\alpha 2 \rightarrow 6$ Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GlcNAc

^b緩和法により求めた値

^c $K_a = k_{ass} / k_{diss}$ として **b** の値を用いて計算した値

^dScatchard plot により求めた値

表 5-2 には比較として Shinohara らにより SPR 法を用いて求められた、6'-sLacNAc (NeuAc α 2 \rightarrow 6Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc-) 糖鎖に対する SSA および MSSA の動力学パラメータを示した¹⁸⁾。彼らの結果では結合定数は SSA の方が MSSA よりも 1 桁大きくなり、これは k_{diss} の値の寄与によることがわかる。彼らはこの理由として SSA の方が一度解離しても糖鎖との再結合が起りやすいためであるとしている。本章で得られた結果と結合定数を比較すると、SSA については同じオーダーとなったが MSSA については単分子膜上での結合の方が 1 桁大きくなっている。MSSA については界面の効果かあるいは膜面であるための局所的な糖鎖密度の増加により再結合が促進された結果ではないかと考えられた。しかし同じ効果は SSA にも作用すると考えられる。(α 2 \rightarrow 6)GM3 混合単分子膜を用いた測定では NeuAc α 2 \rightarrow 6Gal- 糖鎖は 2 次元平面上で膜界面に非常に近い位置で提示される。SSA はこのような糖鎖に対して 2 つの糖結合部位が同時に結合できるような構造をとれず、そのため結合の強さが MSSA の場合とほとんど変わらなかった可能性が考えられた。これに対して SPR 法による測定では基板に単層に結合した streptavidin に対して NeuAc α 2 \rightarrow 6Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc-(spacer)-biotin を結合させることで糖鎖を固定化している。したがって脂質単分子膜の系に比べて糖鎖の提示のされ方はより自由度を持っており、結果として SSA との多価の相互作用が可能となって MSSA よりも結合性が大きくなったものと考えられた。この SPR の系は糖タンパク質の糖鎖と SSA との相互作用のモデルに対応するといえるのではないだろうか。またここで得られた結果は別の見方をすれば、糖脂質混合単分子膜に対するレクチンの結合性を評価することで、レクチンが持つ複数の糖結合部位の相対的な位置関係についての情報が得られることを示唆するものである。このような視点から糖脂質混合単分子膜を利用することの有用性が期待された。

5-4 結言

($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 混合単分子膜に対する SSA および MSSA の結合挙動について検討した。SSA は単分子膜中で相分離が起きている ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 / DOPC 混合単分子膜に対して特異的な結合挙動を示した。しかし同様に ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 のドメインが形成されている ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 100 mol% の単分子膜に対しては SSA は結合せず、($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 のドメインの大きさなどが影響することが示唆された。一方 MSSA は ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 / GlcCer 混合単分子膜に対して特異的に結合した。GlcCer よりも親水部の小さい脂質をマトリックス脂質としても MSSA は結合しなかったことより、GlcCer 中の ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 の糖鎖の提示のされ方が MSSA が結合しやすい状態となっていることが示唆された。しかしながら SSA は ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 / GlcCer 混合単分子膜に対して特異的な結合を示さず、2つのレクチン間での対応がつかなかった。この原因として SSA の疎水的な A サブユニットが糖鎖に対する結合性に何らかの影響を与えていることが推測された。

SSA および MSSA の ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3 混合単分子膜に対する結合定数はどちらも 10^6 M^{-1} のオーダーとなり、レクチンの糖結合部位が多価であることの効果はこの系においては現れなかった。その理由として界面の効果や SSA が構造的に膜上に提示された糖鎖と多価で結合できないことなどが考えられた。得られた結果を模式的に図 5-10 に示した。

また本章での結果から糖脂質混合単分子膜に対するレクチンの結合性を評価し、他の測定系による結果と比較することで、レクチンが持つ複数の糖結合部位の相対的な位置関係についての情報が得られることが示唆された。これまで糖脂質混合単分子膜は主に生体内での糖脂質の認識機能を解析するための生体膜モデルとして用いられてきたが、今後はこのような視点から糖脂質混合単分子膜を用いた研究が増えてくることが期待される。

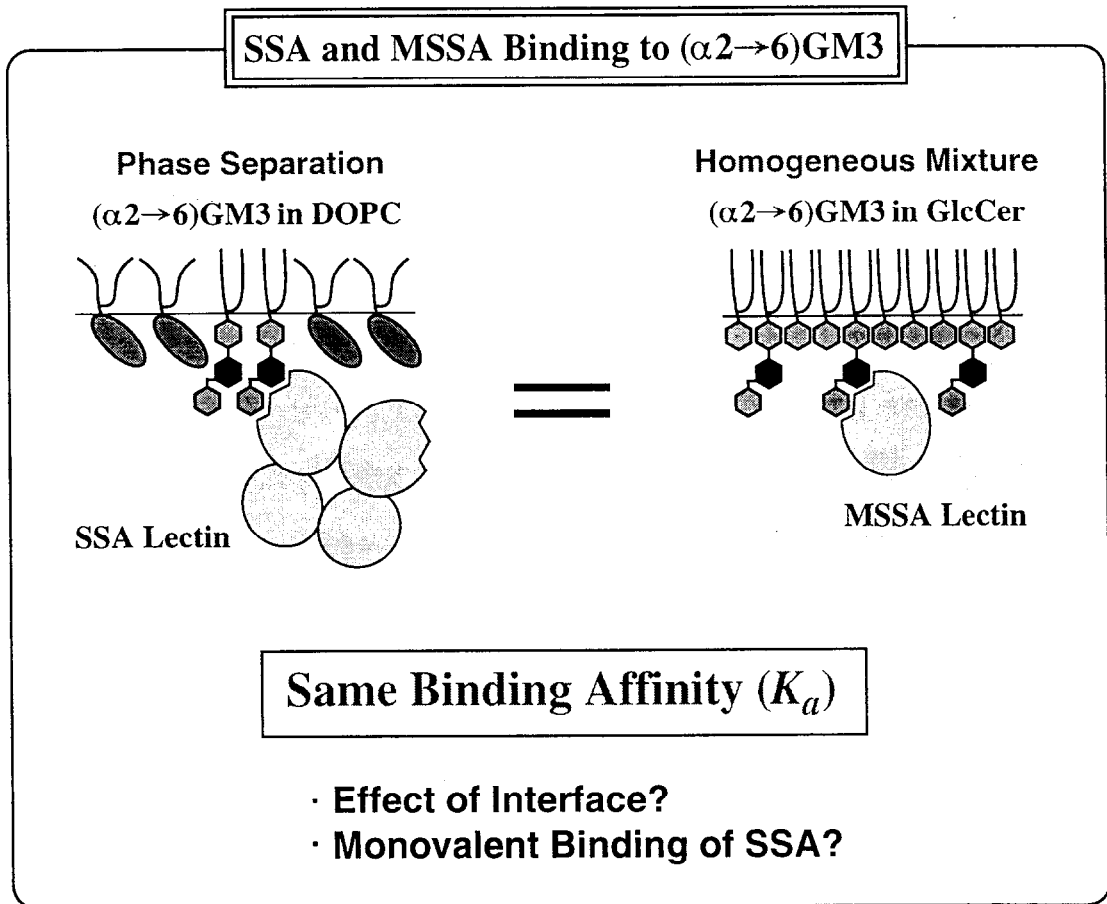


図 5-10 $(\alpha 2 \rightarrow 6)GM3$ 混合単分子膜に対する SSA および MSSA の結合性の模式図

第5章 参考文献

- 1) M. Mammen, S.-K. Choi, and G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 2754-2794 (1998)
- 2) a) G. Ashwell and J. Harford, *Ann. Rev. Biochem.* **51**, 531-554 (1982)
b) 赤池 敏宏, 後藤 光昭, 小林 明, 小林 一清, "別冊 日経サイエンス 111 糖鎖と細胞", pp114-129, 入村 達郎 編, 日経サイエンス社, 1994
- 3) a) 鈴木 康夫, "別冊 日経サイエンス 111 糖鎖と細胞", pp89-101, 入村 達郎 編, 日経サイエンス社, 1994
b) 鈴木 康夫, 蛋白質核酸酵素 **43** "糖鎖生物学", 2559-2566, (1998)
c) 鈴木 康夫, "糖鎖 II. 糖鎖と病態", pp184-196, 永井 克孝 他 編, 東京化学同人, 1994
- 4) a) H. Lis and N. Sharon, *Chem. Rev.* **98**, 637-674 (1998)
b) 山本 一夫, 生化学 **66**, 1111-1129, (1994)
c) 賀来 華江, "糖鎖工学", pp413-421, 糖鎖工学編集委員会 編, 産業調査会, 1992
- 5) C. S. Wright, *J. Mol. Biol.* **139**, 53-60 (1980)
- 6) a) Y. C. Lee and R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **28**, 321-327 (1995)
b) 畑中 研一, 西村 紳一郎, 大内 辰郎, 小林 一清 著, "糖質の科学と工学", 講談社サイエンティフィク, 1997
c) 橋本 康博, 鈴木 明身, 蛋白質核酸酵素 **43** "糖鎖生物学", pp2479-2483, 1998
- 7) a) S. Sueyoshi, K. Yamamoto, and T. Osawa, *J. Biochem.* **103**, 894-899 (1988)
b) M. S. Quesenberry, R. T. Lee, and Y. C. Lee, *Biochemistry* **36**, 2724-2732 (1997)
c) E. E. Simanek, G. J. McGervey, J. A. Jablonowski, and C.-H. Wong, *Chem. Rev.* **98**, 833-862 (1998)
- 8) a) T. Furuike, N. Nishi, S. Tokura, and S. Nishimura, *Macromolecules* **28**, 7241-7247 (1995)
b) A. Tsuchida, S. Akimoto, T. Usui, and K. Kobayashi, *J. Biochem.* **123**, 715-721 (1998)
c) T. Sato, T. Serizawa, F. Ohtake, M. Nakamura, T. Terabayashi, Y.

- Kawanishi, and Y. Okahata, *Biochim. Biophys. Acta* **1380**, 82-92 (1998)
- d) Y. Ebara and Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11209-11212 (1994)
- 9) J. Clausen, "Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules. 3rd Ed.", Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1988
- 10) a) B. Catimel, M. Nerrie, F. T. Lee, A. M. Scott, G. Ritter, S. Welt, L. J. Old, A. W. Burgess, and E. C. Nice, *J. Chromatogr. A* **776**, 15-30 (1997)
- b) U. Brinkmann, K. Webber, A. D. Carlo, R. Beers, P. Chowdhury, K. Chang, V. Chaudhary, M. Gallo, and I. Pasten, *Int. J. Cancer* **71**, 638-644 (1997)
- c) A. Petrossian, *Cell Biophys.* **23**, 111-137 (1993)
- 11) a) T. Kurokawa, M. Tsuda, and Y. Sugino, *J. Biol. Chem.* **251**, 5689-5693 (1976)
- b) I. Tanaka, Y. Abe, T. Hamada, O. Yonemitsu, and S. Ishii, *J. Biochem.* **89**, 1643-1646 (1997)
- c) Y. Ozaki, T. Matsui, S. Suzuki, and, K. Kitani, *Biochemistry* **30**, 2391-2394 (1991)
- 12) M. Saito, F. Takaku, M. Hayashi, I. Tanaka, Y. Abe, Y. Nagai, and S. Ishii, *J. Biol. Chem.* **258**, 7499-7505 (1983)
- 13) H. Kaku and N. Shibuya, *FEBS Lett.* **306**, 176-180 (1992)
- 14) K. Tazaki and N. Shibuya, *Plant Cell Physiol.* **30**, 899-923 (1989)
- 15) H. Kaku, a personal communication.
- 16) N. Shibuya, K. Tazaki, Z. Song, G. E. Tarr, I. J. Goldstein, and W. J. Peumans, *J. Biochem.* **106**, 1098-1103 (1989)
- 17) H. Kaku, Y. Mori, I. J. Goldstein, and N. Shibuya, *J. Biol. Chem.* **268**, 13237-13241 (1993)
- 18) Y. Shinohara, Y. Hasegawa, H. Kaku, and N. Shibuya, *Glycobiology* **7**, 1201-1208 (1997)
- 19) 入本 慶宣, 卒業論文, 東京工業大学 (1997)
- 20) H. Kaku, Y. Tanaka, K. Tazaki, E. Minami, H. Mizuno, and N. Shibuya, *J. Biol. Chem.* **271**, 1480-1485 (1996)
- 21) H. Kaku, Y. Suzuki, and N. Shibuya, unpublished results.

- 22) 賀来 華江, 金子 寛生, M. A. Rojo, 岩田 一道, 石井-南 尚子, 南 栄一, J. Krawetz, K. Seshagirirao, 渋谷 直人, 第 20 回糖質シンポジウム講演予稿集, p87 (1998)
- 23) a) W. Montfort, J. E. Villafranca, A. F. Monzingo, S. R. Ernst, B. Katzin, E. Rutenber, N. H. Xuong, R. Hamlin, and J. D. Robertus, *J. Biol. Chem.* **262**, 5398-5403 (1987)
- b) E. C. Sweeney, A. G. Temiakov, I. I. Agapov, S. Seward, and R. A. Palmer, *Proteins* **28**, 586-589 (1997)

第6章 結論

Hakomori らはスフィンゴ糖脂質は生体膜中でクラスター構造を形成し、その中で特異的な機能を発揮していると提唱している(図 1-3)¹⁾。そのようなスフィンゴ糖脂質のクラスター形成を示唆する報告も近年増えてきている²⁾。しかしながらなぜそのようなクラスターが形成されるのかについての議論はほとんど行われておらず、またクラスター状のスフィンゴ糖脂質の糖鎖認識性を検討した例も数少ない³⁾。

本論文では脂質単分子膜中のスフィンゴ糖脂質の存在状態およびその糖鎖認識性について検討した。生体膜モデルとして気-水界面の脂質単分子膜を用い、そのキャラクターゼーションを行うことで単分子膜中のスフィンゴ糖脂質の存在状態を決定する因子についての知見を得ることができた。また脂質単分子膜と水晶発振子マイクロバランス(QCM)法を組み合わせることで単分子膜中のスフィンゴ糖脂質に対する糖鎖認識を介したゲスト分子の結合を経時的・定量的に評価することができた。本研究で用いた手法により、単分子膜中のスフィンゴ糖脂質の存在状態と糖鎖認識性とを関連づけて議論を行うことが可能となった。

第2章では飽和および不飽和アシル鎖中をもつリン脂質中でのスフィンゴ糖脂質の存在状態について、混合脂質単分子膜の表面圧-面積等温線の解析から評価を行った。スフィンゴ糖脂質(LacCer, GM3, ($\alpha 2 \rightarrow 6$)GM3)は不飽和アシル鎖を持つDOPCとは単分子膜中で相分離してスフィンゴ糖脂質のドメインを形成することが明らかとなった。これに対して飽和アシル鎖を持つDPPCとスフィンゴ糖脂質は均一に混合した。この現象はスフィンゴ糖脂質と各リン脂質それぞれのアルキル鎖部分の会合性を反映した結果であると考えた。さらに親水部の構造がスフィンゴ糖脂質の単分子膜中での存在状態に影響を与えることも示唆された。

第3章では単分子膜中の存在状態の異なるLacCer混合単分子膜に対するallo Aレクチンの結合挙動を脂質単分子膜とQCM法を組み合わせた測定系により検討した。その

結果、単分子膜中で均一に分散したものよりも相分離した LacCer に対してより多くの allo A の結合が観察された。この結合性の違いは結合パラメータの解析により飽和結合量の違いによるものであることがわかり、それぞれの膜でのみかけの結合サイトの違いあるいは allo A との結合様式の違いが示唆された。

第4章では GM3 混合単分子膜に対する抗 GM3 抗体 L612 の結合挙動を QCM 法を用いて観察した。マトリックス脂質を DPPA とすることで抗体の特異的な結合を観察することができた。抗体の結合量は単分子膜中の GM3 含量に対してベル型の挙動を示した。すなわち単分子膜中の GM3 含量が高くなると立体障害などの負のクラスター効果が生じたため抗体に認識されなくなったものと考えられた。また抗体は GM3 以外にも非還元末端に NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal- 構造を持つ GM4 などに対して結合した。抗体の GM3 混合単分子膜に対する結合定数は 10^9 M^{-1} のオーダーであり、抗体が一分子あたり複数の GM3 結合部位を持つ効果や界面の効果が示唆された。

第5章では (α 2 \rightarrow 6)GM3 混合単分子膜に対する SSA および MSSA レクチンの結合挙動について QCM 法を用いて検討した。SSA は単分子膜中で相分離が起きている (α 2 \rightarrow 6)GM3 / DOPC 混合単分子膜に対して特異的な結合挙動を示したが (α 2 \rightarrow 6)GM3 100 mol% の単分子膜に対しては結合せず、(α 2 \rightarrow 6)GM3 のドメインの大きさなどが影響することが示唆された。一方 MSSA は (α 2 \rightarrow 6)GM3 / GlcCer 混合単分子膜に対して特異的に結合した。しかしながら SSA は (α 2 \rightarrow 6)GM3 / GlcCer 混合単分子膜に対して特異的な結合を示さず、2つのレクチン間で異なる結果となった。この原因として SSA の疎水的な A サブユニットが糖鎖に対する結合性に影響を与えていることが推測された。SSA および MSSA の (α 2 \rightarrow 6)GM3 混合単分子膜に対する結合定数はどちらも 10^6 M^{-1} のオーダーとなり、レクチンの糖結合部位が多価であることの効果はみられなかった。その理由として界面の効果や SSA が構造的に膜上に提示された糖鎖と多価で結合できないことなどが考えられた。

以上の結果より、スフィンゴ糖脂質は脂質膜中において周辺のマトリックスとなる脂質の構造に依存してその存在状態が変化することが示された。また脂質膜中のスフィンゴ糖脂質の存在状態はその糖鎖認識性に影響を与えることもわかった。すなわち脂質膜中のスフィンゴ糖脂質の存在状態と糖鎖認識性とは密接な関係にあることが明らかとなった。

本研究で得られた結果は別の視点から見れば、スフィンゴ糖脂質は混合するマトリックス脂質の種類を変えることにより単分子膜中での存在状態、さらにはスフィンゴ糖脂質の糖鎖認識性をも制御できることを示したものであり、人工的にスフィンゴ糖脂質を組み込んだ生体膜モデルを構築する際の一つの指標となると考えられる。将来的には細胞レベルでこのような試みが行われることが期待される。

また脂質膜中のスフィンゴ糖脂質含量が同じであるにもかかわらず、その存在状態の違いにより糖鎖認識性が異なるという現象は、生体内におけるスフィンゴ糖脂質の機能を制御する機構を考えたときに非常に興味深いものである。細胞膜上にスフィンゴ糖脂質の発現が確認されているにもかかわらず、その糖脂質に対する抗体が結合しないという報告⁴⁾とも良く対応している。本研究の結果はスフィンゴ糖脂質自身の発現量は変化しなくてもマトリックス脂質の発現量を変化させることによってスフィンゴ糖脂質の細胞膜中での存在状態および糖鎖認識性を制御できる可能性を示唆している。このような現象が実際に起きているのであれば、スフィンゴ糖脂質の機能制御はマトリックス脂質の生合成を制御しているシグナル伝達機構を含めた上で考えていく必要が出てくる。また細胞膜上に恒常的に発現しているスフィンゴ糖脂質にもまだ明らかになってない機能が存在する可能性は十分考えられる。

細胞膜を界面活性剤で可溶化したときの不溶画分として得られるスフィンゴ糖脂質のマイクロドメイン(detergent-insoluble glycolipid-enriched complex, DIG)にはスフィンゴ糖脂質以外にもスフィンゴミエリンやコレステロールなどの脂質成分やある種の膜タンパク質が濃縮されていることが示されている⁵⁾。したがって生体膜中のスフィンゴ糖脂質のクラスター形成はこれらの分子との相互作用によってもたらされた結果である可能

性は大きい。本研究では生体膜モデルとしてスフィンゴ糖脂質とマトリックス脂質という2種の成分のみからなる単純な系を用いたが、今後はこれらの成分を含めた混合単分子膜での解析が必要になってくるであろう。このような単純な系において、スフィンゴ糖脂質の相分離やクラスター形成についての物理化学的な検討を行うことの意義は非常に大きい。

本論文は脂質膜中のスフィンゴ糖脂質の存在状態と糖鎖認識性との関連を同一の生体膜モデルを用いて系統的に評価した数少ない報告である。今後本論文で用いた測定系をさまざまなスフィンゴ糖脂質に適用することで、生体膜中のスフィンゴ糖脂質の存在状態と糖鎖認識性に関する一般則を導き出せるものと期待される。

第6章 参考文献

- 1) 箱守 仙一郎, "別冊 日経サイエンス 111 糖鎖と細胞", pp20-29, 入村 達郎 編, 日経サイエンス社, 1994
- 2) a) T. W. Tillack, M. Allietta, R. E. Moran, and W. W. Young, Jr., *Biochim. Biophys. Acta* **733**, 15-24 (1983)
b) M. R. Bunow and B. Bunow, *Biophys. J.* **27**, 325-337 (1979)
c) A. M. Fra, E. Williamson, K. Simons, and R. G. Parton, *J. Biol. Chem.* **269**, 30745-30748 (1994)
- 3) H. Utsumi, T. Suzuki, K. Inoue, and S. Nojima, *J. Biochem.* **96**, 97-105 (1984)
- 4) a) Y. Hirabayashi, A. Hamaoka, M. Matsumoto, T. Matsuura, M. Tagawa, S. Wakabayashi, and M. Taniguchi, *J. Biol. Chem.* **260**, 13328-13333 (1985)
b) J. Inokuchi, K. Momosaki, H. Shimeno, H. Nagamatsu, and N. S. Radin, *J. Cell. Physiol.* **141**, 573-583 (1989)
- 5) a) K. Simons and E. Ikonen, *Nature* **387**, 569-572 (1997)
b) 笠原 浩二, 佐内 豊, 蛋白質核酸酵素 **43** "糖鎖生物学", 2522-2530 (1998)

発表論文

本論文に関する原著論文

- 1) M. Hashizume, T. Sato, and Y. Okahata
Selective Bindings of a Lectin for Phase-separated Glycolipid Monolayers
Chem. Lett. **1998**, 399-400

- 2) M. Hashizume, T. Sato, and Y. Okahata
Binding Behaviors of anti-GM3 Antibody L612 against GM3 Reconstituted in Lipid Monolayers
manuscript in preparation.

本論文に関連した原著論文

- 1) T. Sato, M. Hashizume, Y. Hotta, and Y. Okahata
Morphology and proliferation of B16 melanoma cells in the presence of lanthanoid and Al³⁺ ions
BioMetals **11**, 107-112 (1998)

学会発表

本論文に関する学会発表

- 1) 橋詰 峰雄、佐藤 智典、岡畑 恵雄
脂質膜上での糖鎖認識における場の効果
第 46 回高分子年次大会、東京工業大学、1997 年 5 月
- 2) 橋詰 峰雄、佐藤 智典、岡畑 恵雄
糖脂質-レクチン間相互作用における脂質膜構造の影響
第 73 回日本化学会秋季年会、岩手大学、1997 年 9 月
- 3) 橋詰 峰雄、佐藤 智典、岡畑 恵雄
生体膜モデルにおけるスフィンゴ糖脂質のクラスター形成およびそのレセプター機能
第 3 回糖質若手フォーラム、東京大学、1998 年 3 月
- 4) 橋詰 峰雄、佐藤 智典、岡畑 恵雄
相分離した糖脂質単分子膜に対するレクチンの結合挙動の観察
第 47 回高分子年次大会、京都国際会議場、1998 年 5 月
- 5) 橋詰 峰雄、佐藤 智典、岡畑 恵雄
脂質膜中でのスフィンゴ糖脂質のクラスター形成と糖鎖認識性の評価
第 20 回糖質シンポジウム、札幌、1998 年 7 月
- 6) 橋詰 峰雄、佐藤 智典、岡畑 恵雄
単分子膜での相分離を利用した糖鎖認識性の制御
第 13 回生体機能関連化学シンポジウム、愛媛大学、1998 年 9 月
- 7) 橋詰 峰雄、佐藤 智典、岡畑 恵雄
単分子膜中での存在状態に依存したスフィンゴ糖脂質の糖鎖認識性
第 76 回日本化学会春季年会、神奈川大学、1999 年 3 月、発表予定

本論文に関連した学会発表

- 1) 橋詰 峰雄、佐藤 智典、岡畑 恵雄
種々の糖脂質キャスト膜への癌細胞の接着・伸展挙動
第 43 回高分子年次大会、名古屋大学、1994 年 5 月
- 2) 佐藤 智典、遠藤 雅紀、橋詰 峰雄、岡畑 恵雄
種々の糖脂質キャスト膜への癌細胞の接着・伸展挙動とその機構
第 4 回バイオ・高分子シンポジウム、東京工業大学、1994 年 7 月
- 3) 佐藤 智典、遠藤 雅紀、橋詰 峰雄、岡畑 恵雄
種々の糖脂質膜への癌細胞の選択的な接着挙動と血清成分の役割
第 43 回高分子討論会、九州大学、1994 年 10 月
- 4) 佐藤 智典、橋詰 峰雄、岡畑 恵雄
希土類イオンと生体膜との相互作用および細胞機能調節
第 12 回希土類討論会、東京、1995 年 5 月
- 5) 佐藤 智典、橋詰 峰雄、岡畑 恵雄
混合単分子膜におけるガングリオシド (GM3) のイオン応答性
第 17 回糖質シンポジウム、京都、1995 年 7 月
- 6) 橋詰 峰雄、佐藤 智典、岡畑 恵雄
GM3 を含んだ混合単分子膜のイオン認識性
第 44 回高分子討論会、関西大学、1995 年 9 月
- 7) 橋詰 峰雄、佐藤 智典、岡畑 恵雄
メラノーマ細胞の形態および増殖活性における金属イオンの効果
理研シンポジウム「生体微量元素 '96」、理化学研究所、1996 年 3 月
- 8) 佐藤 智典、橋詰 峰雄、岡畑 恵雄
生体膜構造および細胞機能への希土類イオンの影響
第 13 回希土類討論会、京都、1996 年 5 月
- 9) 橋詰 峰雄、佐藤 智典、岡畑 恵雄
金属イオンによる細胞機能の調節
第 45 回高分子年次大会、名古屋、1996 年 5 月

- 10) 堀田 康伸、橋詰 峰雄、佐藤 智典、岡畑 恵雄
金属イオンによって誘起された細胞の増殖抑制と形態変化
第2回バイオテクノロジー部会シンポジウム、岩手大学、1997年9月

- 11) 小林 雅樹、橋詰 峰雄、佐藤 智典、岡畑 恵雄
単分子膜中でのスフィンゴ糖脂質の存在状態の解析
第76回日本化学会春季年会、神奈川大学、1999年3月、発表予定

謝 辞

本研究を進めるにあたり、私の方針を尊重して頂いた上での確かな御指導、御助言を数多く頂きました東京工業大学生命理工学部生体分子工学科 佐藤 智典 助教授ならびに岡畑 恵雄 教授に深く感謝致します。

論文審査にあたられ御指導、御鞭撻を頂きました同学科 佐藤 史衛 教授、赤池 敏宏 教授、ならびに畑中 研一 助教授に深く御礼を申し上げます。

研究を行う上で多くの御助言、具体的な御指導を頂きました岡畑・佐藤(智) 研究室 森俊明 助手、神戸大学発達科学部 江原 靖人 助教授、奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 有賀 克彦 助教授に深く感謝致します。

貴重なスフィンゴ糖脂質を充分量提供して下さいました雪印乳業株式会社、財団法人 緒方医学化学研究所 川西 康博 理事、リン脂質を提供して頂きました日油リポソーム株式会社に厚く御礼申し上げます。GM3 ラクトンを調製して頂きました北里大学理学部 寺林 隆志 助手、糖脂質の合成を基礎から指導して頂きましたダイキン工業株式会社 MEC 研究所 大平 豊 氏に深く感謝致します。抗 GM3 抗体を提供して頂きました大塚製薬株式会社、SSA および MSSA を提供して頂き、多くの御助言も頂きました農水省農業生物資源研究所 渋谷 直人 博士に深く感謝致します。BAM 測定装置を貸して下さいました東京工業大学資源化学研究所 関 隆広 助教授ならびに測定の際に御世話になりました同研究室の生方 俊 氏に深く感謝致します。

オーストラリア留学中に御世話になりました CSIRO 研究所の Dr. D. Neil Furlong、Dr. Frank Caruso (現 Max-Planck Institute) をはじめとした研究室の皆様に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり非常に参考となった研究で成果を挙げられ、多くの御助言、御指導を頂きました鹿児島大学工学部 芹澤 武 助手に深く感謝致します。糖鎖生物学に関する多くの知識を提供して下さいました国立小児病院小児医療研究センター病理病態

研究部 中島 英規 博士に深く感謝致します。修士課程在学中に研究を進めていく上で必要な多くの事柄について御指導頂きました分子科学研究所 田中 健太郎 助手、名古屋大学大学院工学研究科 松浦 和則 助手に深く感謝致します。公私にわたり数多くのディスカッションにお付き合い頂き、暖かい励ましの御言葉を幾度となくかけて下さいましたテキサス大学化学科 新倉 謙一 博士に深く感謝致します。

6年間の研究室生活を有意義なものとして下さいました事務官の木村 めぐみさんをはじめとした岡畑・佐藤(智) 研究室の関係者皆様に御礼申し上げます。

最後に、博士課程進学時や今後の進路決定において寛大な心で私の考えに理解を示して下さいました両親に深く感謝致します。

1999年2月

橋詰 峰雄