

凍結によるベシクルの破壊に対する糖類の保護作用 - 蛍光消光による研究 -

(阪大院基礎工) 家根尚子, 長澤 裕, 宮坂 博

< 緒言 >

トレハロースなどの糖類は、優れた生体保護物質であることが知られている。ある種の生物は体内に蓄積した糖類の寄与により、凍結や乾燥などの環境ストレスに対して優れた耐性を示す。そのような環境ストレスにさらされている間、新陳代謝を完全に停止してその状態に耐える能力のことをクリプトビオシスと呼ぶ。これは、液体の水が存在しないと蛋白質等の生体物質はその高次構造を保つことができないため、生物は死滅してしまうという常識に反するので非常に興味深く、多くの研究がなされている。糖類の保護メカニズムは(1)高濃度の糖水溶液がガラス化してその中に生体物質を閉じ込め保護する、(2)糖が水の代替物質として生体物質に水素結合してその高次構造を保護する、などと説明されている。糖類のもつ生体保護作用について更なる知見が得られれば、食品や医療品など幅広い分野への応用が期待される。

今回我々は、細胞のモデルとして蛍光色素を内包した脂質二分子膜ベシクルを用いて、凍結によるベシクルの破壊に対する糖類の保護作用について蛍光消光法で検討した。色素を内包したベシクルを、糖を含むバッファー中へ分散し、-20度で凍結、室温で融解して内包されている色素の漏出を観測した。凍結によりベシクルが破壊されると内包されていた色素が漏出するが、糖によってベシクルが保護されれば色素の漏出が抑制されると考えられる。

< 実験 >

ベシクルに内包させる色素には、カルセインを用いた。この色素は、コバルト(II)イオンとキレート錯体を形成することにより消光する。ベシクル作成には、リン脂質である POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine) を用いた。

脂質をクロロホルムに溶解してエバポレーターで溶媒を留去し、脂質の薄膜を得た。それをカルセイン 0.1mM を含むバッファー中に分散させた。さらに超音波照射、凍結融解を行い、最後にゲル濾過してベシクルに内包されていない色素を除去した。こうして得られたベシクルの大きさは直径数百 nm である。

色素の漏出を評価するために、保持効率(ベシクルの内外に存在する色素の数の比)を計算した。まず、ベシクル分散液の蛍光強度を a とした。このときは、ベシクル内外にある色素からの蛍光が観測されている。ここに消光剤である塩化コバルト(II)を添加すると、ベシクル

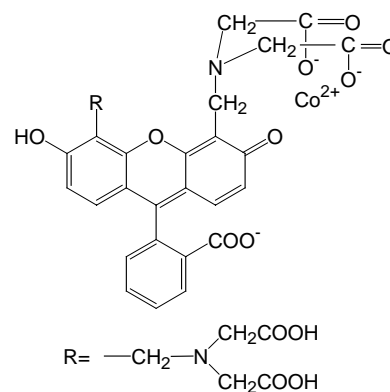


Fig.1 カルセインとコバルト(II)イオンのキレート錯体

に内包されていないカルセインの蛍光が消光され、ベシクルに内包されたカルセインのみによる蛍光が観測される。このときの蛍光強度を b とした。さらに界面活性剤である Triton X-100 を添加すると、ベシクルが完全に破壊され、ベシクルに内包されていた色素が漏出するため全ての蛍光が消光される。このときの蛍光強度を c とした。これらの蛍光強度から、保持効率を次のように計算した。

$$(\text{保持効率}) = \frac{b - c}{a - c} \times 100$$

ベシクルを凍結する前後での保持効率の変化を計算し、糖類の保護作用を検討した。蛍光測定の際の励起波長は 485nm とした。また、保持効率の計算には 520nm における蛍光強度を使用した。

< 結果 >

Fig.2 にカルセインを内包したベシクル分散液に塩化コバルト、Triton X-100 を添加した際の蛍光スペクトルの測定結果を示している。この場合、保持効率は 82% になる。

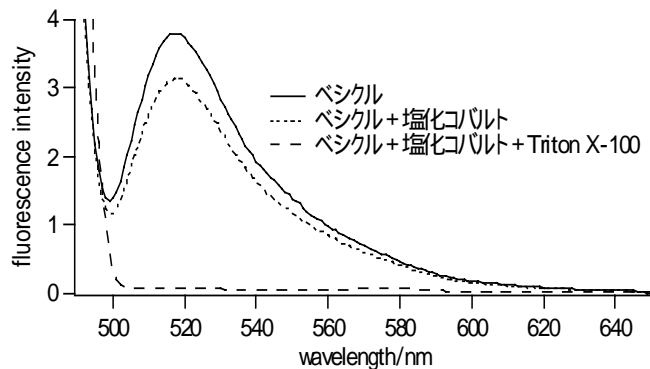


Fig.2 色素を内包したベシクル分散液に塩化コバルト、Triton X-100 を添加した際の蛍光スペクトル

Fig.3 に添加した糖濃度に対する凍結前後での保持効率の比を示した。図に示しているのは、スクロースとグルコースについては 2 回、トレハロースについては、0M は 4 回、0.1M は 2 回、0.2M は 1 回、0.3M は 3 回、0.6M、0.9M は 2 回の測定結果の平均である。どの糖においても糖濃度の増加ともなって保持効率の比も増加しており、ベシクルがある程度保護されていた。

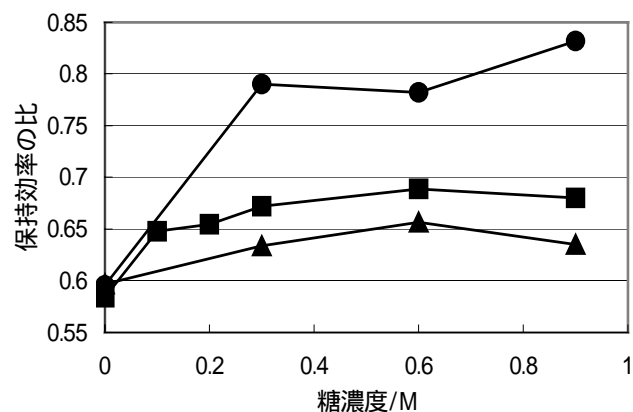


Fig.3 各糖濃度に対する凍結前後でのベシクルの色素の保持効率の比(:スクロース、 :トレハロース、 :グルコース)

ベシクル分散液を凍結すると、氷の結晶にベシクルと色素は取り込まれず、氷の結晶の間の狭い空間にベシクルと色素が高濃度で密集し、ベシクルが押しつぶされて内容物の漏出やベシクル同士の凝集が起こる。それを融解する際に凝集したベシクルに色素が取り込まれることなども考えられるが、今回の実験では融解後に消光剤を添加しているため、糖の添加非添加でそれほど差が出なかったのかもしれない。しかし、ベシクルを凍結する前に消光剤を添加することで、そのような現象も観測できると考えられる。講演では、凍結前に消光剤の添加を行った結果についても報告する。

今回の実験では融解後に消光剤を添加しているため、糖の添加非添加でそれほど差が出なかったのかもしれない。しかし、ベシクルを凍結する前に消光剤を添加することで、そのような現象も観測できると考えられる。講演では、凍結前に消光剤の添加を行った結果についても報告する。