

顕微ラマン分光によるリポソーム膜構造変化の追跡

(東大院理) 西川朋恵、瀧口宏夫

【序】 リポソームはリン脂質のみから成る人工膜であり、脂質二重膜の閉鎖小胞である。その膜構造は、生体膜の構造とよく似ていることから、生体膜のモデルとして多くの研究に用いられている。リポソームの脂質二重膜は、図1のようにゲル相から液晶相へと相転移することが知られている。これまでに、ラマン分光を用いたリポソームの研究はいくつか報告されているが、単一リポソームについての分子レベルでの研究は、まだほとんど行われていない。膜流動性などの膜構造の情報を得るには、単一リポソームを観測する必要がある。そこで本研究では、リン脂質として、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC、相転移温度:41 ~ 42)を用いてリポソームを作成し、単一リポソームの相転移を実時間で観測するため、顕微ラマン分光を用いて、その膜構造変化を調べた。また、DPPC リポソームの二重膜内部にβ-カロテンを封入する事により、ゲル相、液晶相の膜流動性を観測した。

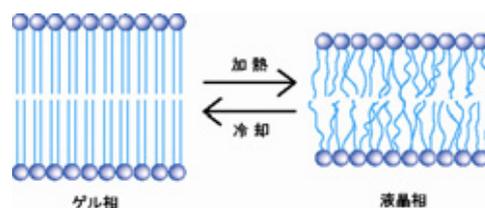


図1 脂質二重膜の相転移

【実験】 共焦点ラマン顕微鏡を用いて、リポソーム膜のラマンスペクトルを測定した。励起光源としてHe-Neレーザー(波長632.8nm)を用い、X-Y平面内250nm、奥行き方向(Z軸方向)2μmの空間分解能で測定を行った。試料の温度は、20(室温)から50まで、ヒーターを用いて調整した。試料に照射したレーザー強度はDPPCリポソームでは約3mW、β-カロテンを含むDPPCリポソームでは約0.7mWとし、露光時間はすべて300秒として測定した。本実験に用いたDPPCの炭化水素鎖の炭素数は16で、不飽和結合を含まない。

【結果】 図2にDPPCリポソームの20(室温)、50における空間分解ラマンスペクトルを示す。室温において、DPPCリポソームはゲル相であることがわかっている。ラマンスペクトルにみられるいくつかのバンドのうち、1733 cm^{-1} は炭化水素鎖のC=O伸縮振動、1440 cm^{-1} はC-C変角振動、1295 cm^{-1} はC-H₂ねじれ振動、1128 cm^{-1} はC-H伸縮振動(*trans*)、1095 cm^{-1} はC-C伸縮振動(*gauche*)、1062 cm^{-1} はC-C伸縮振動(*trans*)、715 cm^{-1} は極性頭部のCN⁺(CH₃)₃に帰

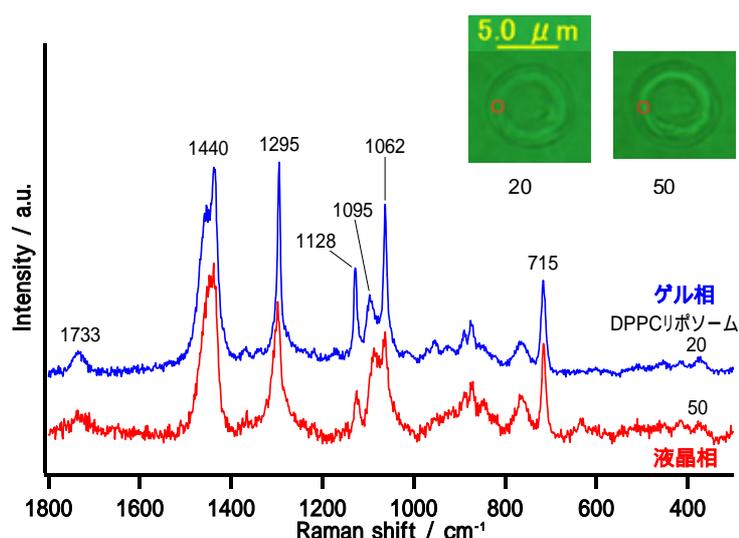


図2 DPPCリポソームの20、50における空間分解ラマンスペクトルと顕微鏡写真(赤丸はレーザースポットの位置を示す)

属される。図2ではDPPCリポソームの20と50スペクトルを、極性頭部由来の 715cm^{-1} のバンドで規格化した後比較している。50では、20のときと比べ、 1300cm^{-1} C-H₂ねじれ振動のバンドが弱くなり、ブロードになった。さらに、 1120cm^{-1} 、 1062cm^{-1} のC-C伸縮振動(*trans*)のバンドも弱くなり、20のときとは違いが顕著となった。この事より、20では整列していた炭化水素鎖が、50になるとC-C結合のまわりで内部回転し、膜の流動性が高まった事が示唆される。この結果より、顕微鏡の光学像では確認することのできない、脂質二重膜の相転移の様子が、ラマンスペクトルによって観測できた。

図3にβ-カロテンを封入したDPPCリポソームの20（ゲル相）での時空間分解ラマンスペクトルを示す。右の写真は3枚とも

同一の単一多重層リポソームを示している。β-カロテンを封入したDPPCリポソームを測定し続けると、β-カロテン由来の 1523cm^{-1} 、 1155cm^{-1} 、 1005cm^{-1} のバンドはほとんどみられなくなった。このことから、β-カロテンは、この波長のレーザーを照射し続けると消失すると考えられる。β-カロテンのバンドが消失した後、別の二点(、)を測定すると、β-カロテンはまだ膜内に残っており、その量は最初のレーザー照射スポットから離れた点αで多い事がわかった。これは、ゲル相での膜の流動性が低いためレーザースポット外の分子がほとんど拡散しない事を示唆している。

図4にはβ-カロテンを封入したDPPCリポソームの50（液晶相）での時空間分解ラマンスペクトルを示す。右の写真は3枚とも同一の単一多重層リポソームを示している。50においても、20のときと同様にβ-カロテン由来のバンドは消失したが、その後さらに別の二点(、)を測定すると、この二点においてもβ-カロテン由来のバンドはみられなかった。これは、β-カロテンが膜内部を速く拡散する事により、膜内部全てのβ-カロテン分子が2100秒後には消失したためと考えられる。このため、液晶相の膜内部はゲル相と比べて非常に流動性が高い事がわかった。時空間分解ラマン分光法により、将来は単一リポソームのゲル相、液晶相における膜内部の拡散定数が定量的に求められる事が期待される。

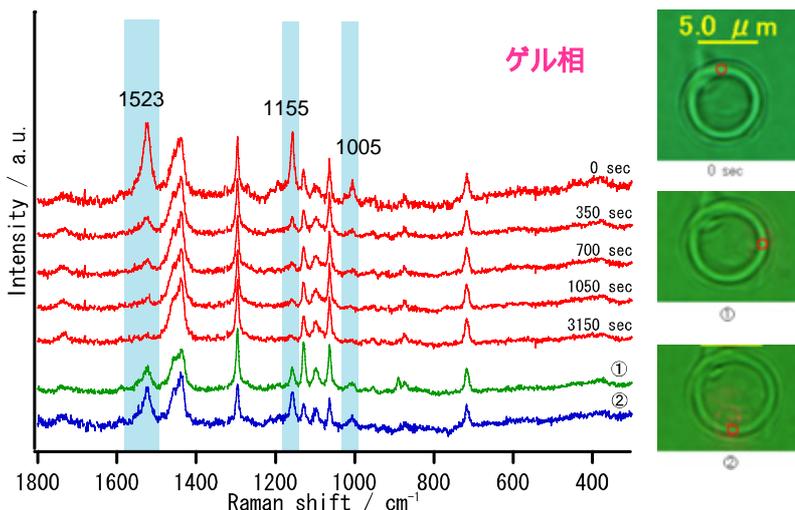


図3 β-カロテンを封入したDPPCリポソーム(20)の時空間分解ラマンスペクトルと顕微鏡写真(赤丸はレーザースポットの位置を示す)

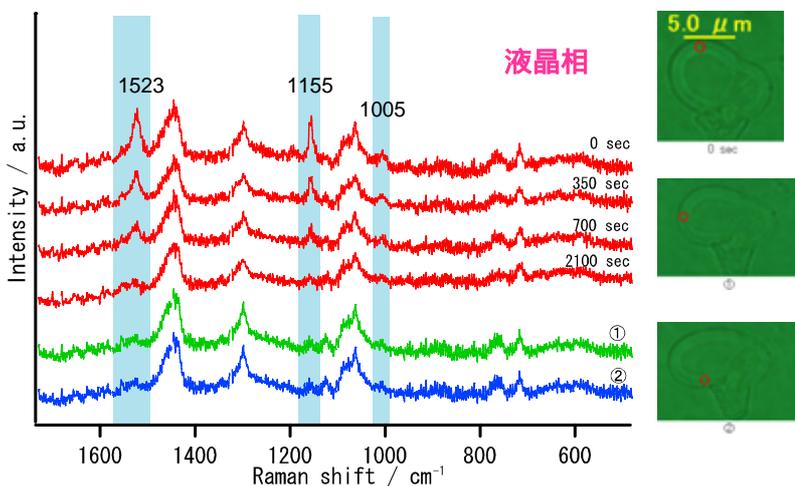


図4 β-カロテンを封入したDPPCリポソーム(50)の時空間分解ラマンスペクトルと顕微鏡写真(赤丸はレーザースポットの位置を示す)