

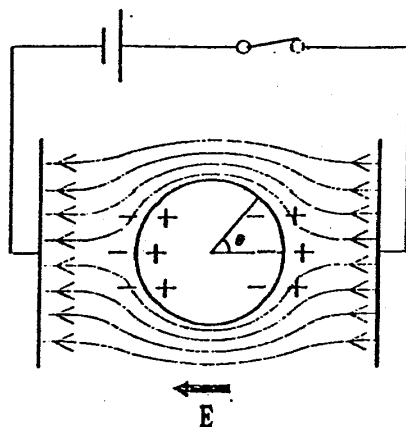
5. リポソームの電気穿孔現象の研究

重 盛 正 哉

1. 細胞電気穿孔

生物の体を構成している細胞は、細胞膜で他の細胞と区切られている。細胞膜は主に脂質二重層と膜タンパク質からできている。

細胞に外から電場を加えると、細胞の内と外はイオンにより伝導性があり、細胞膜は絶縁体なので、膜が電荷をせき止め内外の電位差を支える形になって、細胞膜には（細胞の大きさ）×（電場の大きさ）程度の膜電位が発生する。今、図1のように球形の細胞に電場を加えたときに膜に誘起される膜電位 ΔV は、以下の式であらわされる。



$$\Delta V = 1.5aE \cos \theta (1 - \exp(-t/\tau))$$

$$\tau = aC(r_i + r_e/2)$$

a : 細胞の半径 E : 電場の大きさ

C : 膜容量 r_e, r_i : 細胞内外の比抵抗

図1 外部電場の印加による膜電位の誘起

外から加える電場を大きくしていき、膜電位があるしきい値を超えると、あたかも膜に穴が開いたかのように膜のイオンや分子に対する透過性が急に高まる現象が知られている。この現象は細胞電気穿孔現象（Electroporation）と呼ばれ、膜電位がしきい値に達するとマイクロ秒以内に細胞膜の脂質二重層部分で起こるといわれているが、穴の本質や、その機構はまだはっきりとは解明されていない。この電気穿孔が起こるための膜電位のしきい値は、細胞の種類によらず約1Vである。

本研究では、細胞の簡単なモデルである、脂質分子のみからなるリポソームをサンプルとして、パルスレーザー蛍光顕微鏡を用いて、細胞電気穿孔現象の研究を行った。

2. 方法

1) リボソーム

脂質二重層の膜が、内側に水溶液を含んで球形になっているものをリボソームという（図2）。リボソームは比較的簡単に作ることができ、細胞や細胞膜のモデルとして、それらの性質などを調べるのに利用されている。実験では Muellerらの方法¹ にしたがってアソレクチンという脂質から、直径20～100 μ mのリボソームを作った。

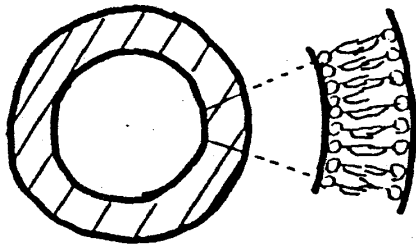


図2 リボソーム

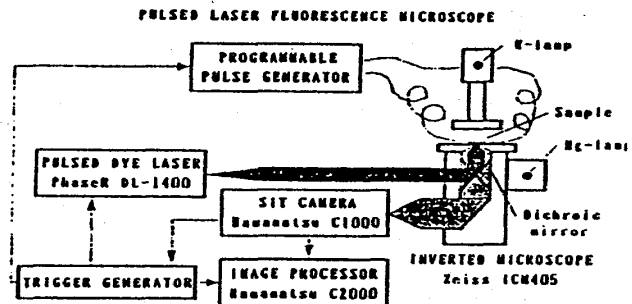


図3 パルスレーザー蛍光顕微鏡

2) パルスレーザー蛍光顕微鏡

顕微鏡とテレビカメラを組み合わせ、顕微鏡像をテレビカメラでとらえる、といった研究が盛んになってきている。しかし、テレビカメラは一画面を走査するのに数十ミリ秒かかるので、普通は時間分解能はそれ以上には上げられない。細胞電気穿孔はマイクロ秒の時間オーダーで起こる非常に速い現象である。このため細胞もしくはリボソーム一つ一つについて顕微鏡下でこの現象をとらえようとすると、その顕微鏡のシステムにはマイクロ秒の時間分解能が必要になる。パルスレーザー蛍光顕微鏡は、光源にパルスレーザーを用い、その強力なパルス光で顕微鏡の像をテレビカメラの画面に焼き付けるといった、一種のストロボ撮影を行うことのできる装置である。^{2,3,4} このため時間分解能はレーザーのパルス幅に依存し、テレビカメラには依存しない。実験にはパルス幅0.3マイクロ秒のパルスレーザーを光源としたパルスレーザー蛍光顕微鏡を使用した。こうしてとらえた顕微鏡像をデジタル画像処理装置に取り込み、そこで解析を行った。

3. 結果と考察

膜に入り込み、膜電位に反応して蛍光強度を変化させる“膜電位感受性蛍光色素”でリボソームを染めて実験に使用した。ウニの卵をサンプルとした同じ実験では、この色素の蛍光強度の変化から電気穿孔現象が見えている。^{2,3,4} しかし、リボソームにおいては、色素の蛍光強度の変化からは、電気穿孔は起きているらしいがはっきりとはわからなかった。しかし、加える電場の大きさを大きく、また時間を長くしていくと、リボソームの膜の一部が消失して顕微鏡下でも目に見えるほどの大きな穴が開いているのが観察された。このような現象はいままでほとんど報告されたことがなく、直接顕微鏡下でみたのは本研究が最初である。

穴の開いたリボソームは、そのまま壊れてしまうものもあるが、元に戻るものもあり、元に戻ったリボソームは穴の開く前より少し小さくなっていることから、この現象は膜の一部が消失して穴が開いていると確認された。これらのリボソームを図4に示す。

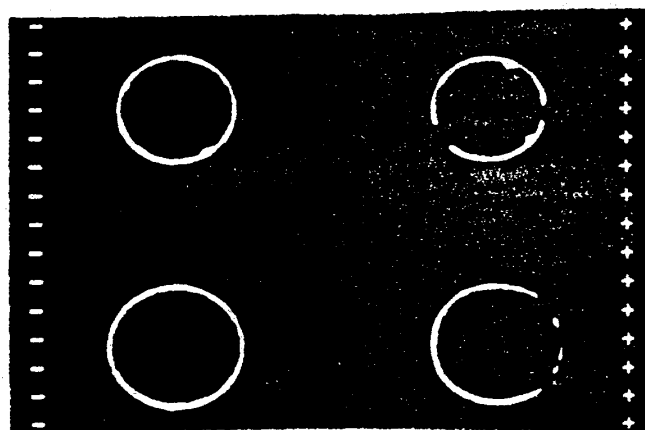


図4 膜の一部が消失しているリボソーム
(左は電場を加える前のリボソーム)

リボソームの膜の消失は、陽極に向いた側で起こりやすいが、陰極側の膜が消失しているものもあり、また両方で消失しているものもある。さらに、一ヶ所だけでなく、一度に数ヶ所の膜が同時に消失しているものもある。膜の消失したリボソームは、計算上膜電位が約1V程度になる電場を数十マイクロ秒加えたあたりから現れ始め、加える電場を大きく、また電場の加わっている時間が長くなるにつれてその割合は多くなっていく。膜の回復に要する時間は、数十～数百ミ

リ秒であった。

また、リボソームに電場を加えると、リボソームが電極方向に引っ張られたかのように延びて楕円形になる現象も観察された（図5）。この現象は、電場によって膜に誘起される膜電位とは直接は関係がなさそうであり、加える電場を大きくしていくと変形の度合いは大きくなっていき、リボソームが大きくなると変形の度合いは小さくなっていく。

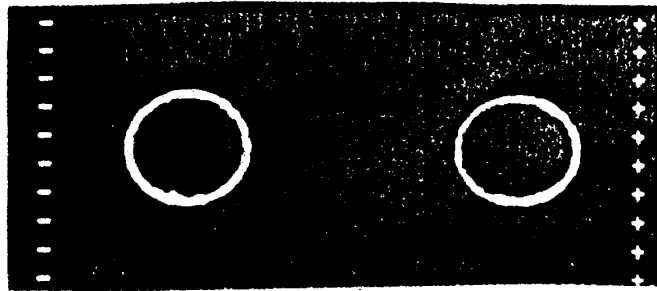


図5 電場によって変形したリボソーム

これらのことから、リボソームの膜の消失は、電場によるリボソームの変形が原因ではなく、電気穿孔のより極端な場合を見ていることがわかった。このことは逆に、細胞電気穿孔現象は細胞膜の脂質二重層の部分で起こっているということを示している。

参考文献

- 1) Mueller, P. and Chien, T.F. 1983 Biophys.J 44:375-381
- 2) 木下一彦、池上 明、永山国昭 1989 細胞工学 8:85-89
- 3) Kinosita, K.Jr. et al 1988 Proceedings of SPIE'88
O-E/LASE 909:271-277
- 4) Kinosita, K.Jr. et al 1988 Biophys.J 53:1015-1019