

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04135

研究課題名(和文) 界線吸着定量解析から明らかにするソフト界面の微小ドメイン形成原理

研究課題名(英文) Elucidation of principle for microscopic domain formation by quantitative analysis of line adsorption

研究代表者

瀧上 隆智 (TAKIUE, Takanori)

九州大学・基幹教育院・教授

研究者番号：40271100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではソフト界面における微小ドメイン形成原理の解明を目指して、単分子膜および二分子膜系でのドメイン線張力定量基盤を構築し、分子構造の変化や浸透圧の印加に対する応答を詳細に検討した。単分子膜では線張力の主要因子である接触エネルギーと双極子間斥力のバランスによりドメイン形成が支配されることやハイブリッド化合物のドメイン境界線への吸着(界線吸着)が微小ドメイン形成を促進すること等が明らかとなった。二分子膜系では浸透圧の印加により線張力が上昇することや臨界点近傍において低線張力の膜状態では浸透圧による変形パターンが通常のものとは大きく異なることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた研究成果は、生体膜での不均一性であるラフト構造の形成原理をドメイン境界線に働く線張力とそれを低下させる要因(界線吸着、二次元ミクロエマルジョン形成)の観点から解き明かす界線科学と呼ぶべき新たな学問分野の開拓につながる。さらに線張力によるソフト界面膜の不均一形態の制御を行うことで、不均一膜を積極的に利用した化学センサーや温度・浸透圧等の外部刺激に応答して物質の取込み・放出をスイッチする新規ソフトマテリアルの創製等にも応用展開が可能となる。

研究成果の概要(英文)：In this research, a strategy for line tension measurement in monolayer and bilayer systems was constructed and applied to them in order to understand a principle of microscopic domain formation associated with the change in molecular structure and application of osmotic pressure to the film. The domain formation in monolayer is determined by a balance between contact energy and dipole-dipole interaction at domain boundary. The line adsorption of hybrid compounds promotes the formation of microscopic domain formation which would be a model of raft in biological membrane. The application of osmotic pressure in bilayer system increases line tension and induces an unusual deformation of domain morphology in the state with low line tension.

研究分野：界面物理化学

キーワード：微小ドメイン形成 線張力 界線活性 浸透圧

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜はリン脂質やコレステロール、タンパク質などから成る二分子膜構造であり、物質透過やシグナル伝達等の高度な機能を担っている。1997年にSimonsらが“ラフト”とよばれるドメインの存在を提唱して以来、生体膜の不均一性と機能との関連が注目を浴びている。ドメイン構造ではドメインとその周囲とを隔てる境界線においてpN程度の線張力が生じるが、その定量法が確立されておらず、ドメイン形態の多様性の起源は依然として全く理解されていない状況であった。また、脂質リポソーム等のモデル膜に比べ生体膜でのLoドメインは数十~百nm程度と非常に小さく、なぜこのような微小ドメインの分散構造が達成されるのかについての合理的な解釈も不十分であった。

### 2. 研究の目的

上記の様に生体膜ラフト等のソフト界面におけるドメイン形態や形成メカニズムは、ドメイン界線に生じる線張力が決定的な影響を与える。本研究では微小ドメインの形成原理や分散構造の安定性を二次元マイクロエマルション形成としてとらえ、吸着膜やリポソームを対象に線張力の計測基盤を構築し、界線吸着の観点から(1)ドメイン形態の多様性、(2)ドメイン分散構造の詳細、および(3)ドメイン形成メカニズムの解明を主目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 線張力定量基盤の構築

単分子膜系：水表面および油/水界面におけるフルオロカーボン(FC)アルコールやハイドロカーボン(HC)アルコールの単吸着分子膜、二本鎖飽和脂質(DPPC) - 不飽和脂質(DOPC)混合系の単分子膜における液体凝縮膜(Lo)ドメインをプリユースター角顕微鏡(BAM)により観察し、変形したドメインの緩和速度 $V$  vs ドメイン半径の逆数プロット $1/R$ の傾きから1~数十pNオーダーの線張力を定量する。

二分子膜系：DPPC - DOPC混合系の二分子膜ベシクルを対象に蛍光顕微鏡(FM)で観察し、 $\mu\text{m}$ サイズのLoドメイン界線のゆらぎをフーリエ級数でフィッティングする。そのモード数 $k$ とフーリエ係数( $a_k, b_k$ )の解析より二分子膜において典型的な数pN以下の線張力を定量する。

#### (2) ドメイン形成と線張力の関係解明

単分子膜系：FCアルコールにFC鎖およびHC鎖を有するハイブリッドアルコールを添加した系やDPPC - DOPC混合膜にPOPC(飽和 - 不飽和ハイブリッド脂質)を添加した系を対象に、界線活性作用が期待されるハイブリッド化合物の添加に伴う線張力の低下を測定し、界線吸着量を定量する。ハイブリッド化合物の界線吸着によって微小な(1  $\mu\text{m}$ 以下)ドメインの形成が予想される系では、微小角入射小角X線散乱(GI-SAXS)測定を行い、ドメインの平均サイズ、ドメイン間距離を決定する。

二分子膜系：DPPC - DOPC - POPC混合系ベシクルなどを対象に、Loドメイン界線揺らぎの変化から線張力の変化を測定し、POPCの線吸着量を見積もる。ハイブリッド脂質の界線吸着により微小ドメインの形成が予想されるベシクルに対して小角X線散乱(SAXS)測定を行い、ドメインサイズ、ドメイン間距離等の構造パラメーターを決定する。

### 4. 研究成果

#### (1) 単分子膜系

1 - 1. 油/水界面におけるフルオロカーボンアルコール(F8H20H)吸着膜系に対して界面張力およびX線反射率測定を行った。ヘキサン/水界面においてF8H20Hは膨張膜 - 凝縮膜相転移を示し、膨張膜では凝縮膜ドメインの形成を確認した。また、油をドデカンやヘキサデカンに変えると、ドメイン被覆率が減少し、ドメイン界線に働く線張力の増大がドメイン形成を抑制することも見出した。さらにF8H20Hとハイブリッドアルコール(F6H60H)との混合系吸着膜では、F8H20Hドメイン被覆率の上昇とサイズの減少が観測され、F6H60Hのドメインの界線への吸着(界線吸着)が示唆された。

1 - 2. フルオロカーボンアルコール(F10H20H)吸着膜構造に及ぼす油分子の効果を界面張力、X線反射率、BAM測定により検討した。ヘキサン/水界面では観測されなかったドメイン形成がヘキサン - フルオロヘキサン混合油/水界面では誘起され、吸着分子と油との親和性の増大により線張力が低下し、数十ミクロンのドメイン形成が促進されることを確認した。また、一本鎖リン脂質(C14PC)とコレステロール(Chol)との混合吸着膜で確認されたドメイン形成は、分子の臨界充填パラメーター(cpp)を考慮した効果的な分子パッキングにより合理的に解釈できることを見出した。

1 - 3. C14PC - コレステロールChol系でのドメイン形成の解釈を深めるために陽イオン界面活性剤(DTAB) - Chol系吸着膜に対して行った界面張力、X線反射率、BAM測定を行った。C14PC - Chol系ではDTAB - Chol系に比べ親水基間斥力の緩和が小さいため、よりサイズの小さな(1  $\mu\text{m}$ 以下)多数のドメイン形成が促進され、界面におけるマイクロエマルション様構造の形成が示唆された。またF8H20H - DTAB混合系ではF8H20HへのDTABの添加によりドメインサイズが増加し、丸みを帯びた形状のドメイン形成が見られた。この結果より異種分子の親水基間に強い相互作用が働くことにより、ドメイン境界線における親水基間斥力のが緩和され、接触エネルギー項が優勢となることが判明した。

## (2) 二分子膜系

2-1. 飽和脂質・不飽和脂質(または炭化水素鎖分岐型脂質)・コレステロールから成る3成分ベシクルに低浸透圧液を加え、分子断面積を変化させて、膜面の相分離の状態変化を蛍光顕微鏡で観察した。浸透圧の印可により、相分離するベシクル数が増加すること、そして相分離ドメインの界線ゆらぎが変化することを確認した。顕微鏡観察したドメインの界線ゆらぎを画像解析し、フーリエ級数でフィッティングすることで、ドメインに働く線張力を定量化した。結果、浸透圧の印加により、線張力が約1pN上昇することを見出した。

2-2. 相分離ドメイン(2次元構造)と2分子膜の曲率形状(3次元構造)の関係性を調査した。相分離リポソームに高浸透圧液を加えて膜変形を誘起させ、膜の余剰面積を増加させた。線張力値が低下した臨界状態近傍のリポソームでは、通常の線張力値を持つリポソームとは異なる変形パターンが生じることが分かった。

2-3. 温度を変化させて相分離リポソームのドメインゆらぎをコントロールし、リポソーム膜面のコロイドの熱運動を顕微鏡観察した。相分離膜ではコロイドは膜の無秩序相に局在し、臨界および一様膜ではコロイドが膜面を自由に熱運動する動きを確認した。相分離、臨界、一様の各状態でのコロイドの動きの解析より、臨界状態近傍の膜における抗力を求めた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

H. Hayase, Y. Imai, T. Ina, K. Nitta, H. Tanida, T. Uruga, T. Takiue  
Solid Film Formation at the Hexadecane/Aqueous Hexadecyltrimethylammonium Bromide Solution Interface Studied by Interfacial Tensiometry and X-ray Reflectometry  
Journal of Physical Chemistry B, 2019, 査読有, 印刷中  
DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b04650

T. Takiue, Soft Interfacial Films as a Model for Lipid Raft, Membrane, 査読有, 44, 2019, 57-62  
DOI 無し

Y. Imai, Y. Tokiwa, S. Ueno, H. Tanida, I. Watanabe, H. Matsubara, T. Takiue, M. Aratono  
Effect of the Headgroup Structure on Counterion Binding in Adsorbed Surfactant Films Investigated by Total Reflection X-ray Fine Structure Spectroscopy  
Bull. Chem. Soc. Jpn., 査読有, 91, 2018, 1487-1494  
DOI: 10.1246/bcsj.20180167

瀧田勉, 人工細胞膜のダイナミクス解析と構造制御、応用物理、査読無、86、2017、875-880  
DOI 無し

M. Tsuura, A. Shuto, S. Hiraki, Y. Imai, H. Sakamoto, M. Aratono, H. Tanida, K. Nitta, T. Uruga, T. Takiue, Surface freezing and molecular miscibility of binary fluoroalkanol-alkanol liquid mixture, Colloids and Surfaces A, 査読有, 525, 2017, 31-37  
DOI: org/10.1016/j.colsurfa.2017.04.047

瀧上隆智、平城慎也、界面膜の不均一構造と線張力、熱測定、査読有、44(2)、2017、60-64、  
DOI 無し

B.M.Law, S.P. McBride, H.S. Wi, G. Paneru, S. Betelu, Y. Ushijima, Y. Takata, B. Flanders, F. Bresme, H. Matsubara, T. Takiue, M. Aratono, Line tension and its influence on droplets and particles at surfaces, Progress in Surface Science, 査読有, 92, 2017, 1-39  
DOI: org/10.1016/j.progsurf.2016.12.002

[学会発表](計23件)

満田るな、伊奈稀哲、新田清文、宇留賀朋哉、谷田肇、今井洋輔、瀧上隆智  
ドデカン/水界面におけるハイブリッドアルコール混合吸着膜の相転移と分子混和性  
第69回コロイドおよび界面化学討論会、筑波大学、9月、2018年

神田涼亜、山川あゆみ、平城慎也、今井洋輔、瀧上隆智  
DPPC/DOPC/コレステロール3成分からなるベシクルでのドメイン形成と線張力  
第69回コロイドおよび界面化学討論会、筑波大学、9月、2018年

山川あゆみ、平城慎也、早瀬はるな、伊奈稔哲、谷田肇、新田清文、宇留賀朋哉、今井洋輔、瀧上隆智

臭化テトラデシルトリメチルアンモニウム-コレステロール混合吸着膜における不均一構造  
第69回コロイドおよび界面化学討論会、筑波大学、9月、2018年

斉木孝輔、伊奈稔哲、谷田肇、新田清文、宇留賀朋哉、今井洋輔、瀧上隆智  
ヘキサノール/水界面におけるフルオロカーボンアルコール-陽イオン界面活性剤混合系の吸着膜構造と分子混和性  
第69回コロイドおよび界面化学討論会、筑波大学、9月、2018年

平城慎也、ファイゲンソングェラルド、瀧上隆智  
飽和リン脂質/不飽和リン脂質/コレステロール混合二分子膜での線張力  
第69回コロイドおよび界面化学討論会、筑波大学、9月、2018年

瀧上隆智、マクロとミクロからの自己組織化膜（依頼講演）

第 69 回コロイドおよび界面化学討論会、筑波大学、9 月、2018 年

S. Hiraki, G. W. Feigenson, T. Takiue,

Line Tension for Ternary DSPC/DOPC/Chol and bSM/DOPC/Chol Bilayers

32nd Conference of European Colloid and Interface Society, Ljubljana, September, 2018

T. Takiue, H. Hayase, S. Hiraki, T. Ina, K. Nitta, H. Tanida, T. Uruga, T. Sugiyama, Y. Imai

Miscibility of cationic and zwitterionic surfactants in adsorbed film and micelle studied by X-ray reflection and XAFS

32nd Conference of European Colloid and Interface Society, Ljubljana, September, 2018

Tsutomu Hamada, Organization and Manipulation of Cell-Sized Lipid Vesicles,

第 6 回生命理工国際シンポジウム、東京工業大学、1 月、2018 年

斉木孝輔、平城慎也、砥上莉菜子、伊奈稀哲、谷田肇、新田清文、宇留賀朋哉、今井洋輔、

瀧上隆智、飽和および不飽和リン脂質のベンゼン/水界面吸着膜相転移と膜構造

第 68 回コロイドおよび界面化学討論会、神戸大学、9 月、2017 年

瀧上隆智、ソフト界面における不均一膜形成（依頼講演）

第 68 回コロイドおよび界面化学討論会、神戸大学、9 月、2017 年

早瀬はるな、平城慎也、伊奈稔哲、新田清文、谷田肇、宇留賀朋哉、今井洋輔、瀧上隆智、臭化テトラデシルトリメチルアンモニウム-テトラデシルホスホコリン混合吸着膜の構造と分子混和性

第 68 回コロイドおよび界面化学討論会、神戸大学、9 月、2017 年

押川泰士、高寄峻一、平城慎也、伊奈稔哲、新田清文、谷田肇、宇留賀朋哉、今井洋輔、瀧上隆智、油/水界面におけるフルオロアルカノール吸着膜の構造に及ぼす溶質 溶媒相互作用の効果

第 68 回コロイドおよび界面化学討論会、神戸大学、9 月、2017 年

山川あゆみ、平城慎也、早瀬はるな、伊奈稔哲、谷田肇、新田清文、宇留賀朋哉、今井洋輔、瀧上隆智、臭化テトラデシルトリメチルアンモニウム-コレステロール混合吸着膜における相転移と分子混和性

第 68 回コロイドおよび界面化学討論会、神戸大学、9 月、2017 年

H. Hayase, A. Yamakawa, S. Hiraki, T. Ina, K. Nitta, H. Tanida, T. Uruga, Y. Imai, T. Takiue

Molecular packing and miscibility of tetradecyltrimethylammonium bromide – *n*-tetradecylphosphocholine or cholesterol mixture in adsorbed film and micelle

91st ACS Colloids and Surface Science Symposium, NY, September, 2017

T. Takiue, S. Takayose, K. Mitani, T. Ina, K. Nitta, H. Tanida, T. Uruga, S. Hiraki,

Effect of Line Tension on Domain Formation of Fluorocarbon Alcohol at Oil/Water Interfaces

91st ACS Colloids and Surface Science Symposium, NY, September, 2017

瀧田勉、人工細胞モデルの構築と動態制御、分子系の複合電子機能第 181 委員会 第 25 回研究会、東京大学、12 月、2016 年

瀧田勉、細胞サイズ空間で創発する膜とコロイドの動的カップリング（依頼公演）、第 67 回コロイドおよび界面化学討論会、北海道教育大学、9 月、2016 年

永井健、太田有紀、執行航希、瀧田勉、臨界組成を持つリボソームに吸着したコロイドのブラウン運動、日本物理学会 2016 年秋季大会、金沢大学、9 月、2016 年

瀧上隆智、界面膜の不均一構造と線張力（招待講演）、第 52 回熱測定討論会、徳島大学、9 月、2016 年

- ⑲ 高寄峻一、三谷謙太、伊奈稔哲、新田清文、谷田肇、宇留賀朋哉、今井洋輔、瀧上隆智、油/水界面における 1H, 1H, 2H, 2H-ペルフルオロデカノールのドメイン形成に及ぼす溶媒の効果

第 67 回コロイドおよび界面化学討論会、北海道教育大学、9 月、2016 年

- ⑳ S. Hiraki, H. Tanida, K. Nitta, T. Ina, T. Uruga, H. Matsubara, M. Aratono, T. Takiue, Miscibility and structure of mixed adsorbed films of *n*-tetradecylphosphocholine and cholesterol at liquid/liquid interface

6th International Colloids Conference, Berlin, June, 2016

- ㉑ T. Takiue, R. Fukuhara, K. Mitani, S. Hiraki, H. Tanida, K. Nitta, T. Ina, T. Uruga, Domain formation and line tension in adsorbed films at oil/water interfaces

6th International Colloids Conference, Berlin, June, 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

<http://www.artsci.kyushu-u.ac.jp/~softinterface/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：濱田勉

ローマ字氏名：Tsutomu Hamada

所属研究機関名：北陸先端科学技術大学院大学

部局名：先端科学技術研究科

職名：准教授

研究者番号 ( 8 桁 ): 40432140

### (2)研究協力者