

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15107

研究課題名(和文)電子線ナノ散乱法の開発と脂質ラフトの構造解明

研究課題名(英文)Development of electron nano-diffraction for the study on membrane structures

研究代表者

木下 祥尚(Kinoshita, Masanao)

九州大学・理学研究院・助教

研究者番号：40529517

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文):細胞膜に存在する秩序的膜領域「脂質ラフト」は信号伝達の足場となることが知られ注目されている。ラフトの脂質充填構造はラフト様秩序領域と無秩序領域が相分離した人工膜を用いて研究されてきたが、秩序領域内部で生じる構造の不均一性についてはほとんど議論されていない。本研究では低流量走査電子線散乱法(LFSED)により、秩序領域内部の脂質炭素鎖充填構造を調査した。その結果、単一の領域内には炭素鎖の充填方向が異なる複数のサブドメインが存在することがわかった。さらに、領域の中央部では大きなサブドメインが形成されるのに対し、周辺部では比較的小さなサブドメインが形成することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した低流量走査電子線散乱(LFSED)法により、1)直径1 μ mの領域の構造情報を選択的かつ非侵襲的に取得することができるようになった。また、2)X線より散乱能に優れた電子線を用いることで、脂質単分子膜からでも十分な強度の散乱を取得できた。3)高輝度放射光施設を必要とするX線散乱に比べ、LFSEDは通常の電子顕微鏡で行うことができる。さらに電子線散乱は脂質膜のみならずタンパク質など様々な生体材料の構造解析に適用できることを勘案すると、本手法は生命科学分野の発展に大きく貢献できる。

研究成果の概要(英文): Ordered/disordered phase separation occurring in bio-membranes has attracted researchers' interests since the ordered domains, lipid rafts, are involved in important biological events. While the structure of the ordered domain has been examined with artificial membranes, the substructure inside the ordered domain is not unknown. Here, we examined the packing structure of the lipid carbon chains in the ordered domain using electron diffraction.

We first prepared the dehydrated monolayer samples, which maintain the chain packing structures as those in the aqueous suspension. We then optimized the electron flux to minimize beam damage and developed low-flux scanning electron diffraction (LFSED). Finally, we addressed the chain packing structure inside the ordered domain and found that the ordered domain contains multiple subdomains with different crystallographic axes. Moreover, the size of the subdomain is larger in the domain centre than that near the phase boundary.

研究分野：生物物理

キーワード：電子線散乱 脂質膜 炭素鎖充填構造 相分離

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体膜における局所的な脂質充填構造の違いは、膜タンパク質の凝集状態や活性化の調節など、生体機能と密接に関連することが示唆されている。例えば、細胞膜に存在するサブミクロンサイズの特異領域「脂質ラフト」は信号伝達やタンパク質の選別など、生体機能発現のプラットフォーム注目を集めてきた。このラフトは脂質が「密に充填」することで形成される固く秩序的な領域であることが推測されている。しかし、これはあくまで仮説であり、ラフトの構造に関する直接的な知見は未だ取得されていない。その主たる原因として、X線の直径がラフトより大きいことがあげられる。これまで脂質充填構造に関する直接的知見はX線散乱を用いて取得されてきた。しかし、この種の実験で用いられるX線の直径(> 100 μm)はラフトのサイズ(< 200 nm)に比べてはるかに大きい。それゆえ、ラフト由来の散乱はビーム径に含まれるその他の構造が誘起する散乱に埋没してしまい、ラフトの構造情報を選択的に取得することが困難となる(図1)。しかし生体機能発現のメカニズムを議論するためには、脂質の充填構造に関する知見は不可欠であり、脂質膜に生じる局所構造を解析する手法が熱望されている。

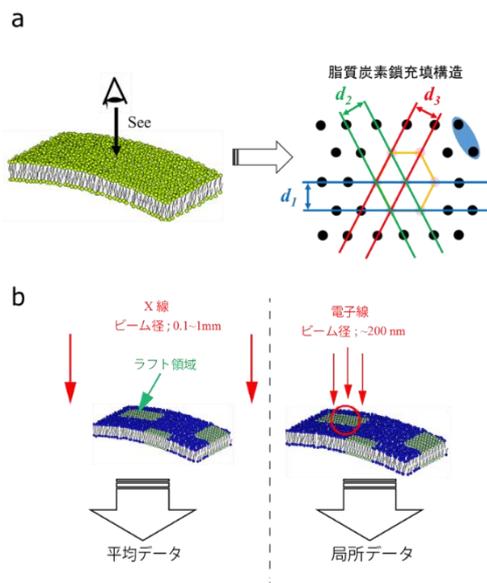


図1. (a)電子線散乱や広角X線散乱で得られる脂質炭素鎖の充填構造。面間隔 d_1 - d_3 に対応した位置に散乱ピークが得られる。(b)電子線散乱とX線散乱のモデル図。収束性に優れた電子線を用いることで目的の膜構造からの散乱を選択的に取得することができる。

2. 研究の目的

本研究では脂質膜中の微小領域の構造情報を選択的に取得するため電子線散乱を脂質膜に適応する技術を開発する。一方、電子線散乱法では試料の乾固が不可欠であることや、電子線は脂質膜試料に大きなダメージを与えることが問題とされてきた。そこで、本研究ではまず(i)rapid-freezing and sublime (RFS)法により、水中での構造を維持したまま脂質膜をTEM用メッシュ(TEM-grid)へ乾固する。次に、(ii)電子線の照射量を最適化することで、脂質膜に与えるダメージを最小化する。最後に(iii)低流量走査電子線散乱法(LFSED)法により人工膜に形成されるラフト様秩序相内部の脂質炭素鎖充填構造を調査する。

3. 研究の方法

急速凍結昇華(Rapid-freezing and sublime; RFS)法による脂質単分子膜の乾固; RFS法では、コロジオンで被覆したTEM-grid上に作製した脂質単分子膜を半固形の液体窒素に投入することで急速に凍結し、その後、固体の窒素が昇華するまでデシケーター中で静置する。この操作を通じて、脂質膜の運動は完全に凍結しているため、水中での構造を維持したまま試料を乾固できる(図2)。実際、RFS法の有用性については蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)で確認した。具体的には二色のFRETペアを含むdioleoil-phosphatidylcholine (DOPC)単分子膜を作製した。ここでは、緑色蛍光物質Bodipy-PCと赤色蛍光物質Texas Red-DPPEを、それぞれFRET-donorとacceptorとして利用した。次に、作製直後の

wet な試料と RFS 法で乾固した試料の FRET 効率を比較した。ここで FRET 効率は donor の蛍光輝度の低下に対応する。

1. LB 法を用いて脂質膜を炭素で被覆した TEM-grid 上に固定する。
2. 試料を半固形の液体窒素中に投入することで急速凍結を行う。
3. 試料を液体窒素で冷却した金属ブロックに固定し、真空中に放置する。

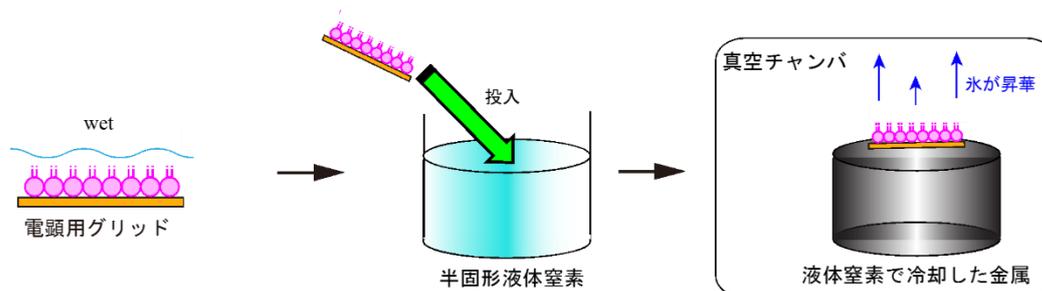


図 2. RFS 法の概略図。脂質膜サンプルは TEM-grid 上に形成した単分子膜を半固形の窒素に投入することで急速凍結したのち、容器ごとデシケーター中で保管することで氷を昇華させた。

電子線照射量の最適化; 電子線照射量の最適化は透過型電子顕微鏡 JEM-2100HCKM (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) を使用した。ここでは distearoyl-phosphatidylcholine (DSPC) 単分子膜を試料として利用し、電子線照射時は cooling ホルダーを用いて -180°C に冷却した。次に、加速電圧 100 kV ($\lambda=0.0037\text{ nm}$) の電子線を試料の同位置に照射しつづけることで、散乱パターンの経時変化を追跡した。散乱は CMOS Camera (TemCam-F416, TVIPS) で取得し、Fit2d を用いて散乱パターンを一次元化した。その後、バックグラウンドであるコロジオン支持膜からの散乱を差し引いたのち、Origin Lab を用いて Lorentz 関数でフィッティングすることで、ピーク強度を算出した。

低流量走査電子線散乱(low-flux scanning electron diffraction); ここでは DSPC/DOPC (モル比 3:7) 混合相分離膜を用いて実験を行った。JEM-1400 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) により加速電圧 100 kV ($\lambda=0.0037\text{ nm}$) の電子線を試料に照射し、制限視野絞りをを用いて $6.2\ \mu\text{m}^2$ (直径 $2.8\ \mu\text{m}$) の領域からの散乱を取得した。散乱パターンは高感度冷却 CCD カメラ(model 900, Gatan, CA) で検出した。電子線の照射位置は蛍光顕微鏡像と電子顕微鏡像を比較することで決定した。具体的には、TEM-grid のフレームに着目して蛍光顕微鏡像と電子顕微鏡像の倍率を統一した。次に、複数のアーティファクト(蛍光物質の凝集やコロジオン膜の破れ)を基準に、蛍光顕微鏡像と電子顕微鏡像の位置関係を決定した。

4. 研究成果

RFS 法が脂質膜構造に及ぼす影響; RFS 法を用いることで、懸濁液中での脂質炭素鎖充填構造を維持したまま乾燥試料が作製できることを、FRET 測定により確認した。FRET 効率は二色の蛍光物質間の距離に逆相関する。それゆえ、もし乾固により炭素鎖の充填が収縮した場合、FRET 効率の増加し、donor の輝度が減少するはずである。図 3 は二色の蛍光物質で標識した DOPC 単分子膜における、FRET-donor の蛍光強度である。大気中で乾燥した試料では顕著な輝度の減少が観察されたのに対し、RFS 法では wet な試料とほぼ同じ donor の輝度が得られた。この結果は、RFS 過程において炭素充填構造が変化しないことを示唆している。

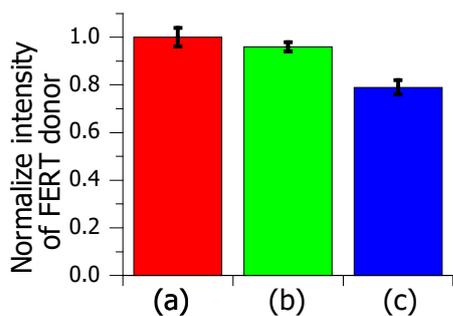


図 3. (b) RFS 法を用いた場合と(c)大気中で乾燥した DOPC 単分子膜の FRET-donor の蛍光輝度の比較。(a) 作製直後に測定した、wet な試料の輝度を 1 とした。蛍光顕微鏡により試料の約 30 ヶ所の輝度を測定し、その平均値を示した。エラーバーは標準誤差を示す。

電子線照射量の最適化; 図 4a は強度 $2.3 \text{ e/nm}^2\cdot\text{s}$ の電子線を distearoylphosphatidylcholine (DSPC) 単分子膜に照射したときの、電子線散乱パターンの経時変化である。同じ領域に電子線を照射し続けたところ、照射直後は鋭い散乱パターンが得られるのに対し、電子線照射時間 t_{irr} が長くなるにつれて幅広くなるのがわかった。より詳細に解析するため、様々な強度の電子線を照射したときに得られる散乱輝度を t_{irr} に対してプロットした (図 4b)。その結果、電子線の強度が弱いほど輝度の変化は小さく、ビームダメージが抑制できることが分かった。ここで、信頼できる散乱パターンを取得するためには 5 秒程度の露光が必要であることを勘案し、初めの 5 秒間の電子線照射で生じる輝度の減少量を測定した。その結果、 $0.9 \text{ e/nm}^2\cdot\text{s}$ 、 $2.3 \text{ e/nm}^2\cdot\text{s}$ 、 $4.7 \text{ e/nm}^2\cdot\text{s}$ 、 $15.9 \text{ e/nm}^2\cdot\text{s}$ の電子線を照射下での散乱輝度の減少率は、 $0.4\pm 5 \%$ 、 $2.8\pm 2 \%$ 、 $5.8\pm 4 \%$ 、and $15.0\pm 7 \%$ となることが分かった。それらの誤差を勘案すると、 $4.7 \text{ e/nm}^2\cdot\text{s}$ 以下のビーム強度であればビームダメージは無視できる程度に小さいことが分かった。この結果をもとに、以下では、 $4.7 \text{ e/nm}^2\cdot\text{s}$ 以下の電子線照射量で散乱パターンを取得した。

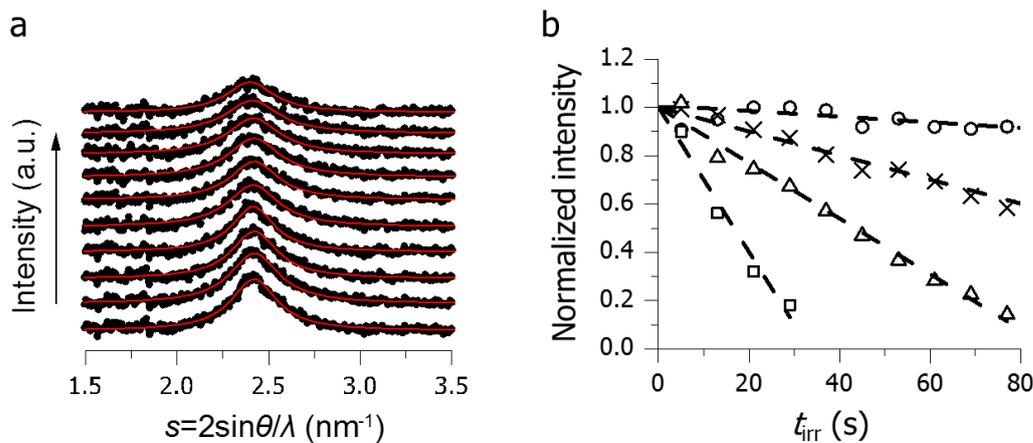


図 4. (a) 強度 $2.3 \text{ e/nm}^2\cdot\text{s}$ の電子線を distearoylphosphatidylcholine (DSPC) 単分子膜に照射したときに得られる、一次元化した電子線散乱パターン。下から順に $t_{\text{irr}}=5\text{s}$, 13s , 21s , 29s , 37s , 45s , 53s , 61s , 69s , and 77s 間電子線を照射したときの散乱パターンを示した。Lorentz 関数による fitting 結果を実線で示す。(b) 様々な強度の電子線を照射したときに得られる散乱輝度を t_{irr} に対してプロットしたグラフ。(circles) $0.9 \text{ e/nm}^2\cdot\text{s}$ 、(crosses) $2.3 \text{ e/nm}^2\cdot\text{s}$ 、(triangle) $4.7 \text{ e/nm}^2\cdot\text{s}$ 、(squares) $15.9 \text{ e/nm}^2\cdot\text{s}$ の電子線を照射した時の経時変化を示している。

低流量走査電子線散乱法によるドメイン内の構造解析; 図 5a は DSPC/DOPC (3:7) monolayer の蛍光顕微鏡像であり、図 5b は(a)の点線で囲まれた領域を拡大したものである。明るい領域が DOPC-rich 無秩序相、暗い領域が DSPC-rich 秩序相に対応する。LFSED 法によりそれぞれ直径 $2.76 \mu\text{m}$ の領域 1-7 から散乱パターンを取得したところ、無秩序相 (領域 1, 2, 7) では幅広いリング状の散乱パターンが得られたのに対し、秩序相 (領域 3, 4, 5, 6) では鋭いヘキサゴナルスポットが取得された(図 5c)。これは脂質

炭素鎖が膜平面に対して垂直方向を向いた、ヘキサゴナルパッキングを形成することを示している。

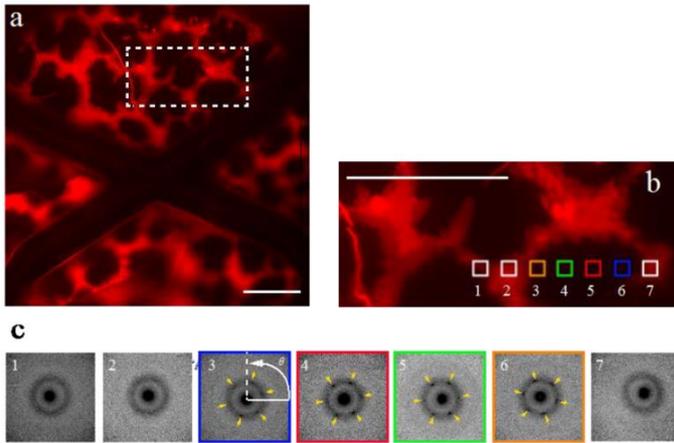


図 5. (a) DSPC/DOPC (モル比 3:7) 混合膜の蛍光顕微鏡写真。暗い領域はラフト様秩序相、明るい領域は無秩序層に対応する。(b) (a) の点線で囲んだ領域の拡大図。領域 1-7 における電子線散乱パターンを(c)に示した。矢印はヘキサゴナルスポットを指す。

さらに秩序相内部での脂質炭素鎖の充填構造を精査するため、領域 3-6 で得られたパターンの方位角 θ に沿った輝度プロファイルを示した(図 5c と図 6a)。プロファイル内の 240° 付近に現れた顕著なピークに注目すると、秩序相の中央付近(領域 4 と 5)では同じ角度に散乱スポットが得られているのに対し、周辺部(領域 3 や 6)では中央付近とは異なる角度に散乱が生じることが分かる(図 6a 矢印)。この結果は、単一の秩序相内にも結晶軸の異なる複数のサブドメインが存在することを示している。また互いに独立した二つのサブドメインが偶然同じ結晶軸を有することは考えにくいので、領域 4 と 5 は同じサブドメインに属することが推測できる。その場合、秩序領域の中央部では大きなサブドメインが形成されるのに対し、周辺部では様々な方向を向いた小さなサブドメインが形成されることが推測できる(図 6b)。

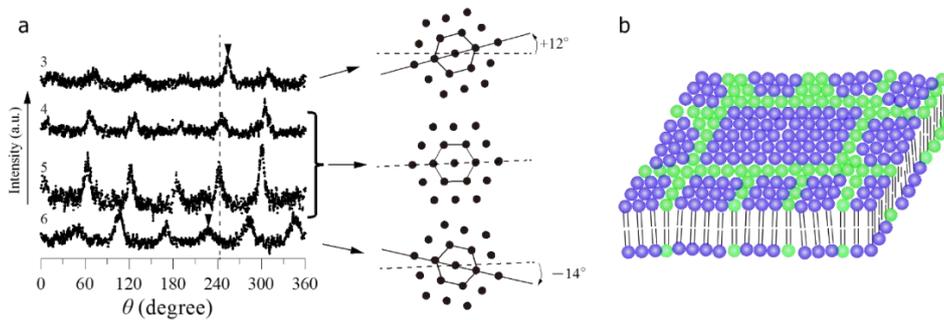


図 6. (a) 領域 3-6 で得られた散乱パターンの方位角 θ に沿った輝度プロファイル(図 5c 参照)。右は炭素鎖充填構造の向きをイラストレーションで示したもの。(b) 予想される秩序領域内部の構造。DSPC 分子と DOPC 分子を、それぞれ濃い丸と薄い丸で示した。

まとめ; 本研究では、RFS 法により懸濁液中における脂質炭素鎖充填構造を維持したまま、試料を乾固することに成功した。さらに新たに開発した LFSED 法により、秩序相内部の構造情報を取得した。その結果、これまで均一とされてきた秩序相内部には結晶軸の異なる複数のサブドメインが存在することが明らかになった。さらに、サブドメインのサイズは秩序相中央部から周辺部へと小さくなることが分かった。最後に本研究で開発した LFSED 法のメリットを列挙する。1) 直径 $1 \mu\text{m}$ の領域の構造情報を選択的かつ非侵襲的に取得することができる。2) X 線より散乱能に優れた電子線を用いることで、単分子膜からでも十分な強度の散乱を取得できる。3) 高輝度放射光施設を必要とする X 線散乱に比べ、LFSED は通常の電子顕微鏡で行うことができる。さらに電子線散乱は脂質膜のみならずタンパク質など様々な生体材料の構造解析に適応できることを勘案すると、本手法は生命科学分野の発展に大きく貢献できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kinoshita Masanao, Tanaka Kaoru, Matsumori Nobuaki	4. 巻 226
2. 論文標題 The influence of ceramide and its dihydro analog on the physico-chemical properties of sphingomyelin bilayers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry and Physics of Lipids	6. 最初と最後の頁 104835 ~ 104835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.104835	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita Masanao, Chitose Takeshi, Matsumori Nobuaki	4. 巻 1863
2. 論文標題 Mechanism of local anesthetic-induced disruption of raft-like ordered membrane domains	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 1381 ~ 1389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.06.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口晋平
2. 発表標題 低流量電子線散乱法を用いた局所的な脂質充填構造の解析
3. 学会等名 第99回日本化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木下祥尚
2. 発表標題 低流量走査電子線散乱法を用いた局所的な脂質充填構造の解析
3. 学会等名 第100回日本化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口晋平
2. 発表標題 Low-flux electron-diffraction discloses the local structure of lipid membrane
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学理学研究院化学部門生体分析化学研究室ホームページ
<http://www.scc.kyushu-u.ac.jp/BioanalChem/>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考