

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05043

研究課題名(和文) ナノサイズ脂質二重膜のレーザー分光計測による膜構造と膜内部極性分布の解明

研究課題名(英文) Elucidation of structure and polarity inside lipid bilayer membranes as studied by laser spectroscopy of lipid bilayer membrane nanodiscs

研究代表者

高屋 智久 (Takaya, Tomohisa)

富山県立大学・工学部・講師

研究者番号：70466796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：数100個の脂質分子からなる脂質膜ナノディスクを生体膜のモデルとして用い、膜内部の極性分布をレーザー蛍光分光計測によって評価する方法を開発することを本研究の目的とした。極性に敏感な蛍光分子(9,9'-ビアントリル)を脂質膜に封入して蛍光を観測した結果、脂質膜内部の極性がアルコール程度であることが分かった。蛍光分子を含んだ脂質膜ナノディスクの大きさを制御する方法、およびナノディスクの収率を向上させる方法の開発が、今後極性分布を詳細に評価するうえでの課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜の中でさまざまな生化学反応が効率よく結びつきながら進む理由として、細胞膜を形づくる分子が膜内で何らかの特殊な集合体を構成しているという仮説が提起されている。「細胞膜中で分子が集合することで、膜の物理的・化学的性質がどのように分布し、反応に影響を与えるか」を調べるための新しい基礎分析方法を開発し、提案したことが本研究の学術的意義である。細胞膜の性質が正しく分かれば、正確かつ効率的にはたらく薬の開発などに役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed at the development of a method for evaluating the polarity distribution inside lipid bilayer biomembranes using laser-induced fluorescence spectroscopy. Lipid bilayer membrane nanodiscs composed of several hundred lipid molecules were chosen as a model of biomembranes. A fluorescence probe sensitive to the polarity of solvents, 9,9'-bianthryl, was encapsulated in lipid membrane nanodiscs. Fluorescence spectra of 9,9'-bianthryl in lipid membrane nanodiscs indicate that their interior has polarity similar to that of alcohols. Technical improvements in preparing lipid membrane nanodiscs, such as fine control of the disc diameter and a significant increase of the disc yield are necessary for obtaining detailed information on inhomogeneity of the polarity.

研究分野：物理化学・分子分光学

キーワード：蛍光分光 脂質二重膜 蛍光プローブ 膜物性 極性 粘度

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体膜は細胞やオルガネラを構成する分子集合体のひとつであり、リン脂質、コレステロール、膜タンパク質などからなる。生体膜中では膜タンパク質等によるさまざまな生化学反応が進行する。膜中における生化学反応の特性、たとえば反応速度や反応収率などは、生体膜を構成する分子の集合構造によって大きく変化しうる。例えば、タンパク質複合体間の電荷移動はミトコンドリアや葉緑体などの機能に直接関与する生化学反応である。もしタンパク質や他の生体分子が膜中に均一に分布し、ランダムに流動しているならば、電荷移動の速度や効率が著しく低下し、オルガネラや細胞の機能が損なわれるであろう。そこで、膜中の生体分子は不均一に集合していると考えられている。本仮説によれば、リン脂質とステロールによって「脂質ラフト」とよばれるマイクロドメインが形成され、膜タンパク質を可溶化する。ラフトを構成していないリン脂質は、主に脂質ラフトの移動を担う。生体膜の構造が不均一である場合、その不均一構造によって、膜中で起こる電荷移動がどのように制御されるのか、が本研究における核心的な問いである。

(2) 上記の問いに答えるには、膜の不均一構造がどのような大きさで存在し、どのような構造を有するかを解明しなければならない。生体膜の不均一集合構造の大きさを詳細に調べるには、さまざまな大きさの脂質二重膜をモデルとして用意する必要がある。リポソーム脂質二重膜はこれまで最も一般的に用いられてきたモデル生体膜である。リポソーム脂質二重膜は一般に直径数十 nm ~ 数十 μ m の球面状の膜であり、用いる脂質分子によって異なる化学的性質を示す。近年では、単一の脂質からなるリポソーム脂質二重膜において、膜の面内方向に粘度の不均一性が存在すると報告されている。しかしながら、リポソーム脂質二重膜は 10^5 個のオーダーの脂質分子で構成されるため、膜中にさまざまな大きさの不均一構造が生成しうる。よって、リポソーム脂質二重膜だけを用いるのでは、不均一構造の大きさや性質などを詳細に調べることは難しい。

(3) そこで、脂質二重膜ナノディスクに着目した。脂質二重膜ナノディスクは直径 1 ~ 10 nm 程度の円盤状の膜である。 $10^2 \sim 10^3$ 個程度の脂質分子が二重膜を構成し、その外縁を膜骨格タンパク質が取り囲む。生体膜の物性を明らかにするうえで、脂質二重膜ナノディスクは優れたモデル生体膜になると期待される。すなわち、構成分子数が小さいため不均一構造の分散が小さくなること、ディスクの直径が小さいため、分光計測において散乱による感度低下が抑制されること、などが利点となる。以上の背景に基づき、周囲の極性に敏感な蛍光分子プローブを脂質二重膜ナノディスクに封入して脂質二重膜内部の極性の不均一性を調べ、生体膜中の電子輸送・電子伝達の機構を詳細に理解する研究を着想した。

2. 研究の目的

(1) 本研究課題では、 10^2 個のオーダーの脂質分子からなる脂質膜ナノディスクを生体膜のモデルとし、膜内部の極性をレーザー分光計測によって評価する方法を開発することを第一の目的とした。

(2) 周囲の極性に鋭敏な蛍光分子プローブを脂質膜ナノディスクに封入して膜内部の極性の不均一性を評価し、膜中で起こる電荷移動に対する極性の不均一の影響を明らかにすることを第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) ただ 1 種類のリン脂質からなる脂質膜ナノディスクを作製し、直径を評価した。まず、蛍光分子プローブを含まない脂質膜ナノディスクの作製方法を検討し、最適化を行った。次に、脂質膜内部の極性を調べるための蛍光分子プローブとして 9,9'-ピアントリルを封入する方法を検討し、9,9'-ピアントリル封入脂質膜ナノディスクを作製した。9,9'-ピアントリルは水に不溶であるため、確実に脂質膜内部に位置してその極性情報を与えると期待される。

(2) 9,9'-ピアントリルを封入した脂質膜ナノディスクの蛍光スペクトル、蛍光励起スペクトル、および時間分解蛍光スペクトルを測定した。蛍光スペクトルおよび蛍光励起スペクトルの測定には、市販の蛍光光度計を使用した。時間分解蛍光スペクトルの測定には、ストリークカメラを用いたピコ秒時間分解蛍光分光計を製作して使用した。

4. 研究成果

(1) Morgan らの方法に基づき、蛍光分子プローブを含まない脂質膜ナノディスクを作製した。脂質分子に 1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DMPC) を用いた。DMPC のクロロホルム溶液をナスフラスコにとり、溶媒を除去した後、デオキシコロール酸ナトリウムの MOPS 緩衝溶液 (pH 7.4) を加えて振盪し、リポソームを形成させた。リポソーム溶液に膜骨格タンパク質 MSD1P1 を加え、25°C で 3 ~ 4 時間静置した。静置後、バイオビーズにデオキシコロール酸を

吸着させて除き、サイズ排除クロマトグラフィーによって脂質膜ナノディスク溶液を分取した。得られたナノディスクの平均直径は、動的光散乱法により約 4 nm と見積もられた。

(2) 次に、9,9'-ビアントリルを含む脂質膜ナノディスクの作製を試みた。DMPC のクロロホルム溶液に 9,9'-ビアントリルを加えておき、(1)と同様に溶媒を除去してデオキシコール酸ナトリウム溶液を加えたところ、溶液に顕著な白濁がみられた。この結果は、9,9'-ビアントリルが添加されたことによってリポソームの平均直径が大きく分散したことを示唆する。このリポソーム溶液をそのまま用い、MSD1P1 を添加してサイズ排除クロマトグラフィーによる分取を試みたところ、(1)とは大きく異なる形状のクロマトグラムが観測された。

分取された溶液について、吸収および蛍光スペクトルを測定した。9,9'-ビアントリルの吸収帯の大きさは吸光度計の感度限界以下であった。また、吸光度にしておよそ 0.3 のベースライン上昇が観測された。以上から、9,9'-ビアントリル封入脂質膜ナノディスクの収率が低いこと、直径 4 nm を大きく超える脂質膜ディスクが混在していることが示唆された。一方、蛍光スペクトルには波長 400 nm および 430 nm に緩やかな極大を持つ発光帯が観測された(図 1(a)の実線)。波長 470 nm における蛍光強度の励起波長依存性(蛍光励起スペクトル)を測定したところ、9,9'-ビアントリルの吸収帯とほぼ同形状のスペクトルが得られた(図 1(a), (b)の破線)。9,9'-ビアントリルは水に不溶であることから、溶液中に 9,9'-ビアントリルを含む脂質膜が生成していることが確認された。

(3) 脂質膜中の 9,9'-ビアントリルの蛍光極大波長を有機溶媒中の 9,9'-ビアントリルのものと比較し、脂質膜内部の極性を検討した。波長 400 nm の蛍光極大は溶媒の極性によらず観測されたことから、局所励起(LE)状態に帰属される。一方、波長 430 nm の蛍光極大が電荷移動(CT)状態に帰属される。脂質膜中で観測された蛍光帯の極大波長および幅を有機溶媒中で観測された蛍光帯のものと比較すると、極大波長はトルエンに、幅はエタノールに最も近い。したがって、脂質膜内部の極性はエタノールよりも長い炭素鎖長を有するアルコール程度であると推定される。この結論は、9,9'-ビアントリルを封入したリポソーム脂質二重膜について以前に得た結果とよく一致する。

(4) 本研究により、蛍光スペクトルから脂質膜内部の極性を推定する方法論が構築され、ナノディスクを用いた脂質膜内部の極性評価の足掛かりが得られた。しかしながら、9,9'-ビアントリルの封入された脂質膜ナノディスクを確実に、かつ十分な濃度で作製する方法の構築が未達成の課題として残った。9,9'-ビアントリルによるリポソーム溶液の白濁に対処するには、得られたリポソームを押出成形法によって均一な直径に成型する必要がある。ただし、成型時点で多量の 9,9'-ビアントリルが析出し沈殿するため、9,9'-ビアントリル封入脂質膜ナノディスクの収率が改善するかどうかは不明である。9,9'-ビアントリル封入脂質膜ナノディスクの収率向上には、リポソーム溶液の作製における 9,9'-ビアントリル、リン脂質、およびデオキシコール酸の濃度比を最適化する必要がある。収率向上が達成されれば、蛍光スペクトル測定に加えて時間分解蛍光測定による蛍光寿命の決定が可能となり、脂質膜内部の極性をより詳細に評価可能となる。

(5) 本研究の脂質膜ナノディスク作製法は、別の蛍光分子プローブに対しては有効であった。4-ヒドロキシ-*trans*-スチルベンの蛍光は、スチルベン骨格中央の C=C 結合に関して異性化することで消光する。したがって、4-ヒドロキシ-*trans*-スチルベンは周囲の粘度を調べるための蛍光分

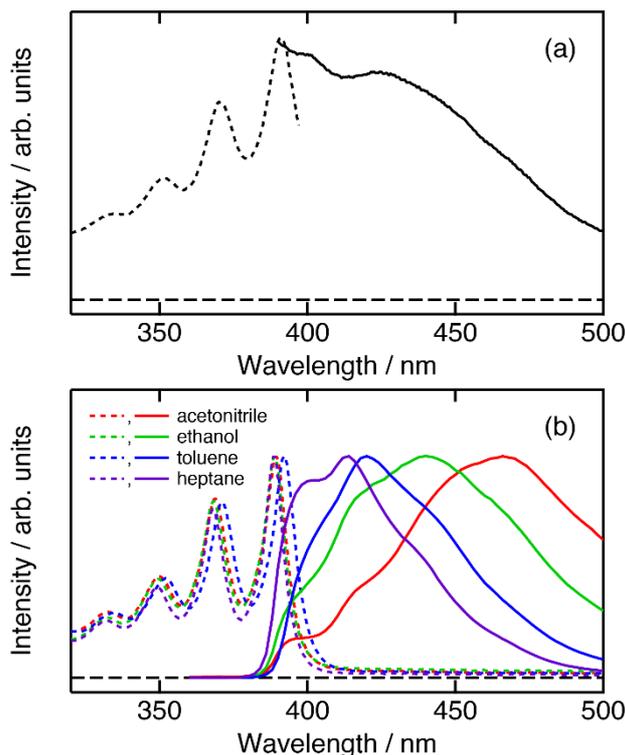


図 1. (a) 9,9'-ビアントリルを含む分画の蛍光スペクトル(実線)および蛍光励起スペクトル(破線)。蛍光スペクトル測定時の励起波長は 375 nm、蛍光励起スペクトル測定時の検出波長は 470 nm である。(b) 9,9'-ビアントリル溶液の吸収スペクトル(破線)および蛍光スペクトル(実線)。赤、緑、青、紫の曲線はそれぞれアセトニトリル、エタノール、トルエン、ヘプタン溶液の測定結果を表す。蛍光スペクトル測定時の励起波長は 355 nm である。吸収スペクトルは波長 390 nm 付近の吸収帯の極大値を、蛍光スペクトルは最大蛍光強度をそれぞれ 1 として規格化されている。

子プローブとしてはたらく。脂質膜ナノディスクに 4-ヒドロキシ-*trans*-スチルベンを封入して時間分解蛍光測定を試みたところ、図 2 のような蛍光減衰曲線が観測された。得られた曲線は 2 つの指数関数減衰曲線の和でよく再現され、いずれもリポソーム脂質二重膜で観測された値の 1/10 程度であった。この結果より、脂質膜ナノディスク内部の粘度はリポソーム脂質二重膜に比べて大きく低下していることが示唆された。脂質膜ナノディスク内部の詳細な粘度評価法に関し、本研究によってきわめて有望な結果が得られた。

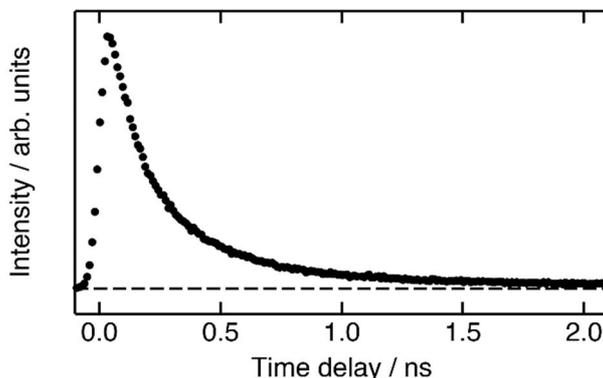


図 2. 脂質膜ナノディスクに封入された 4-ヒドロキシ-*trans*-スチルベンの蛍光減衰曲線。

< 引用文献 >

K. Simos and E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes, *Nature*, Vol. 387, No. 6633, 1997, pp. 569–572.

Y. Nojima and K. Iwata, Viscosity Heterogeneity inside Lipid Bilayers of Single-Component Phosphatidylcholine Liposomes Observed with Picosecond Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy, *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 118, No. 29, 2014, pp. 8631–8641.

T. H. Bayburt, Y. V. Grinkova, and S. G. Sligar, Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins, *Nano Letters*, Vol. 2, No. 8, 2002, pp. 853–856.

I. G. Denisov and S. G. Sligar, Nanodiscs in Membrane Biochemistry and Biophysics, *Chemical Reviews*, Vol. 117, No. 6, 2017, pp. 4669–4713.

H. Kondo, K. Ikeda, and M. Nakano, Formation of size-controlled, denaturation-resistant lipid nanodiscs by an amphiphilic self-polymerizing peptide, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 146, 2016, pp. 423–430.

C. R. Morgan, C. M. Hebling, K. D. Rand, D. W. Stafford, J. W. Jorgenson, and J. R. Engen, Conformational Transitions in the Membrane Scaffold Protein of Lipid Bilayer Nanodiscs, *Molecular & Cellular Proteomics*, Vol. 10, No. 9, 2011, M111.010876.

T. Takaya, G. Mohri, and K. Iwata, Charge transfer dynamics of 9,9'-bianthryl in two lipid bilayers with different acyl chains, *The 26th IUPAC International Symposium on Photochemistry*, 2016, 4EY11.

G. Grebner, K. Rechthaler, and G. Köhler, Two-State Model for the Photophysics of 9,9'-Bianthryl. Fluorescence, Transient-Absorption, and Semiempirical Studies, *Journal of Physical Chemistry A*, Vol. 102, No. 4, 1998, pp. 689–696.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	岩田 耕一 (Iwata Koichi)		
研究協力者	高門 輝 (Takakado Akira)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関