

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：13904

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21125

研究課題名(和文) 生体膜へのイオン配位状態の分子レベルでの理解：水中X線吸収分光

研究課題名(英文) Understanding ion coordination states to biomembranes at the molecular level:
X-ray absorption spectroscopy in water

研究代表者

手老 龍吾 (Tero, Ryugo)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40390679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜の基本構造である脂質二重膜は、両親媒性の脂質分子が水中で形成する自己組織化構造であり、その物性や膜内ドメイン形成は水溶液中のイオンによって強く影響される。流動状態にある水溶液中の脂質二重膜内におけるイオンの配位部位と結合定数を明らかにすることを目的とする。水中X線吸収分光(XAS)法によってリン二重膜内のリン脂質へのNa⁺イオンの配位を実験的に計測し、第一原理計算に基づいて検証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質二重膜に水中のイオンが影響を与えることは古くから知られていたが、多成分かつ流動状態において脂質分子へのイオンの配位や膜内での分子の構造・運動への影響についてはほとんど分かっていなかった。一般的には真空中に限定されるX線分光法を、生体分子に対して、かつ水中で機能を保った状態で測定した例はこれまでになく、得られた新たな知見ならびに新規測定手法開発としての意義がある。また、自己組織化材料への金属イオン配位の描像を実験的に決める方法論を開発することは、今後益々加速する大規模シミュレーションや機械学習に対して信頼できる実測パラメータを提供することにつながり、波及効果は大きい。

研究成果の概要(英文)：Lipid bilayers, which are the fundamental structure of biomembranes, are self-assembled structure of amphiphilic lipid molecules in water. Physical properties and inner-membrane domain formation is significantly affected by ions in the aqueous solution. The purpose of this study to clarify the coordination site and binding constants of ions in fluid lipid bilayers in aqueous solution. The coordination of Na⁺ ions to phospholipids in bilayer membranes was experimentally measured by X-ray absorption spectroscopy (XAS) in water and verified based on ab initio calculations.

研究分野：界面物理化学

キーワード：脂質二重膜 X線吸収分光 放射光 第一原理計算

1. 研究開始当初の背景

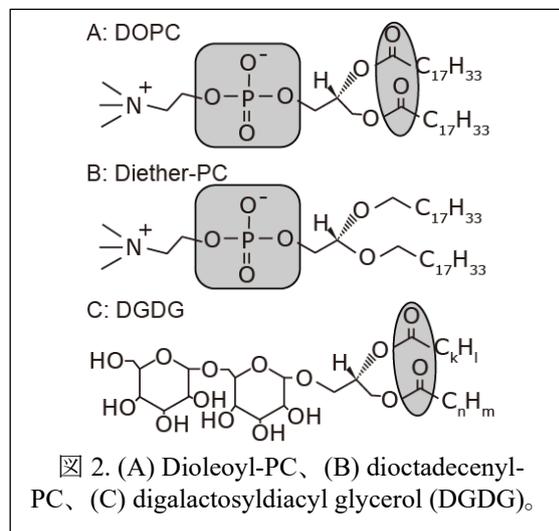
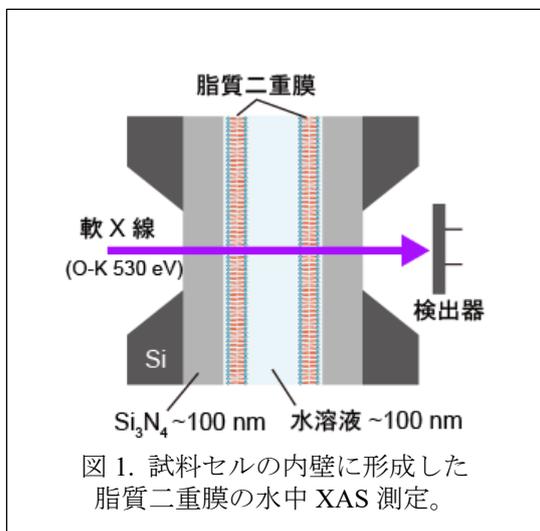
細胞とその内部の器官を形作る生体膜はすべて脂質二重膜を基本構造とし、細胞質や血液などイオンを含む水溶液中に存在している。細胞膜近傍に存在する K^+ 、 Na^+ は膜電位やイオン輸送など主要な現象の駆動力であり、脂質二重膜近傍でのイオンの分布やその状態は生体膜を介した物質輸送・信号伝達に深く関わっている。両親媒性分子である脂質の親水性・疎水性相互作用によって形成される自己組織化構造である脂質二重膜は純水中でも形成される。しかし、水溶液中のイオンは脂質二重膜の物性や膜内ドメイン構造に関わる要因であり、特にカチオン種が強く影響を与えることが知られている。脂質二重膜全体へのカチオンの結合定数については滴定法による報告がされているものの、流動状態にある脂質二重膜について脂質分子のどの部位に、それぞれどれだけの結合定数でイオンが配位するかを実験的に決めた例は無い。近年、分子動力学計算により水とイオンも含めて数千分子オーダーの脂質二重膜のシミュレーションが行われているが、脂質へのイオンの吸着強さについては相反する報告がされている。多成分かつ流動状態において脂質分子へのイオンの配位や膜内での分子の構造・運動への影響については未知の部分が多く残されていた。

2. 研究の目的

分子集合体である脂質二重膜にイオンがどのように作用するか、を根本的な問いと設定した。本研究課題においては、水溶液中の脂質二重膜内でのイオンの配位部位と結合定数を実験的に決定し、計算化学シミュレーションにより検証することで、生体膜へのイオン配位と相互作用強さを分子レベルで明らかにすることを目的とした。実験手法として水中での X 吸収分光(XAS)計測を用い、脂質二重膜を対象とした測定手法の確立と得られるスペクトルの帰属を行う。シミュレーションは、粗視化シミュレーションの手法の一つである散逸粒子動力学(DPD)で必要となる粒子間の有効相互作用パラメータを、フラグメント分子軌道(FMO)計算から第一原理的に算定する FMO-DPD 法によって行う。

3. 研究の方法

細胞膜内の代表的なリン脂質である phosphatidylcholine (PC) の二重膜を対象として、水中 XAS 測定を行った。PC 分子内のカチオン配位サイトであるリン酸基(PO_4^-)およびカルボニル基($C=O$) について、 $O1s$ 軌道の化学シフトを測定した。 $O-K$ 端のような軟 X 線領域では、水による X 線の吸収と光電子の散乱が起きる。輝度と単色性に優れた放射光を光源として、液体層の厚さを 20-2000 nm の範囲で調整可能な試料セル[1]を用いた。厚さ約 100 nm の Si_3N_4 膜で液体層をはさみ、周囲の気圧を変化させることで液体層の厚さを調整する(図 1)。あらかじめ乾燥脂質フィルムを担持した Si_3N_4 膜で組んだ試料セルに緩衝液を導入することで、多層脂質二重膜をセル内に形成した。また、試料セル内部に脂質ベシクル懸濁液を導入して静置することで、ベシクル融合法によりセル内壁の Si_3N_4 膜表面上に単層の支持脂質二重膜を形成した[2]。ベシクル懸濁液は、dioleoyl-PC (DOPC) (図 2A)、dioctadecenyl-PC (DietherPC) (図 2B)、または digalactosyldiacylglycerol (DGDG) (図 2C) の乾燥脂質フィルムに緩衝液を加え、攪拌と超音波破碎によって調製した。蛍光観察を行うための試料には、蛍光標識脂質(Rb-DPPE)を添加した。透過法による XAS 計測は分子科学研究所 UVSOR-III の BL-3U で行った。多重層または単層の二重膜形成前後について 529-535. 5 eV の範囲で $O-K$ 端の XAS 計測を行った。



4. 研究成果

(1) 多重層支持脂質二重膜の XAS 計測

図 3 に水中 XAS 計測用セル内の Si_3N_4 膜表面上に形成した多重層の DOPC 二重膜 (図 3A)、DGDG 二重膜 (図 3B)の蛍光顕微鏡像を示す。乾燥脂質フィルムを水和させて作製した多重層 DOPC 二重膜 (図 3A)では、均一な蛍光強度を持つ平面脂質二重膜が複数重なっている領域が広く観察されたほか、チューブ状の構造体が存在していることが観察された。蛍光強度から概算すると、20 層程度の二重膜が積層していると考えられる。一方、DGDG を用いてベシクル融合法で試料を調整した場合は、平面脂質二重膜が積層した領域と、開裂せずに残ったベシクルと考えられる輝点が観察された。蛍光強度から 8 層程度の二重膜が積層していると考えられる。

図 4 に、DOPC (図 4A)および DGDG (図 4B)の多重層二重膜について緩衝液中で XAS 測定を行った結果を示す。二重膜形成前の Si_3N_4 メンブレンのみの XAS スペクトル (図 4Aa、4Ba) では 530–531.5 eV および 533–535 eV の範囲に吸収が観察された。これらはそれぞれ、 Si_3N_4 上の酸化膜および緩衝液の H_2O の酸素に帰属される。多重層二重膜形成後の XAS スペクトルには、531 eV–533 eV の範囲に新たな吸収が観察された(図 4Ab、4Bb)ことから、これらが脂質二重膜に由来する成分である。蛍光像 (図 3)における蛍光強度との比較から、脂質二重膜の層数が多いほど XAS スペクトルのピーク強度が大きいとされる。この結果により、水溶液中にある脂質二重膜の XAS 計測が可能であることを実証した。

(2) 単層支持脂質二重膜の XAS 計測

多重層二重膜は高い信号強度が得られる利点があるが、溶液中のイオン濃度を変えた際に平衡に達するまでの時間が未知であることや、チューブ状の二重膜や残留ベシクルおよび多層膜内での膜の分岐や折れ曲がりなどが分子の配向依存性のある XAS スペクトル測定[3]に影響をすることなどが懸念される。そこで、脂質二重膜の XAS スペクトルを帰属し、溶媒中のイオン濃度の影響を調べるためには、多重層二重膜よりも単層の二重膜を用いることが適していると考えた。図 5 に、ベシクル融合法により水中 XAS 計測セル内壁の Si_3N_4 メンブレンに作製した単層の DOPC 二重膜の蛍光顕微鏡像を示す。 Si_3N_4 メンブレン表面上全体に均一な蛍光強度が得られた(図 5A)。二重膜形成後の緩衝液の流通条件を最適化することにより、残留ベシクルが少ない二重膜を形成することができた。蛍光褪色後回復 (fluorescence recovery after photobleaching: FRAP)の過程を観察したところ、時間とともに褪色した領域の蛍光輝度が回復した(図 5B)。XAS 計測用セル内の Si_3N_4 メンブレン上全体に、流動性を持ち連続的な単層の二重膜が形成されていることが示された。

本研究では、図 2 に示した 3 種類の脂質分子について XAS 計測を行った。真核生物の細胞膜内に最も多く存在するグリセロリン脂質である PC は、親水頭部にリン酸基(PO_4^-)を、疎水鎖の付け根にエステル結合のカルボニル基($\text{C}=\text{O}$)を持つ(図 2A)。XAS スペクトルにおいては、酸素の σ 結合($\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 、 $\text{P}-\text{O}-\text{C}$)に由来する吸収は 535 eV 以上の領域に現れ、 π 結合由来の吸収が低エネルギー側に現れることから[4]、図 4 で 531–533 eV に観察されたピークはリン酸基の $\text{O}=\text{P}-\text{O}$ 部分およびカルボニル基の $\text{C}=\text{O}$ 由来であると考えられる。この XAS スペクトルを帰属するために、リン酸基のみを持ちカルボニル基を持たない DietherPC (図 2B)を用いて単層二重膜を作製し、XAS 計測を行った。また、DGDG (図 2C)はリン酸基を持たないグリセロ糖脂質である。DOPC と同じく疎水基の根本に $\text{C}=\text{O}$ を持ち、他の酸素は全て σ 結合のみを有する。

XAS 計測用セル内にベシクル融合法で作製した二重膜について XAS 測定を行い、バックグラウンドとして Si_3N_4 メンブレンのスペクトル (図 4Aa、4Ba)で除した XAS スペクトルを図 6 に示す。その形状から、DOPC 二重膜の XAS スペクトル(図 6A)は複数の成分で構成されており、531–533 eV の範囲に少なくとも 531.5 eV 附近と 532.2 eV 附近の二つの成分が存在すると示唆さ

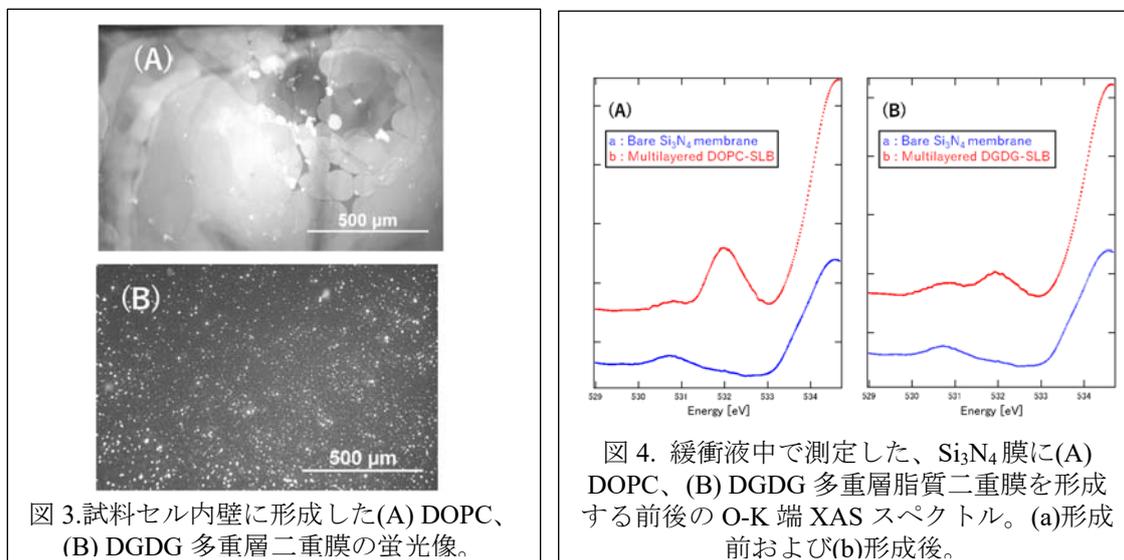


図 3. 試料セル内壁に形成した(A) DOPC、(B) DGDG 多重層二重膜の蛍光像。

図 4. 緩衝液中で測定した、 Si_3N_4 膜に(A) DOPC、(B) DGDG 多重層脂質二重膜を形成する前後の O-K 端 XAS スペクトル。(a)形成前および(b)形成後。

れる。図 6B に、リン酸基のみを持つ DietherPC 二重膜の XAS スペクトルを示す。2 成分のガウスシアンフィッティングでスペクトルを良く再現することができ、そのピーク位置は 531.5 eV と 532.2 eV であった。内殻励起計算の結果から、これらをそれぞれリン酸基の O=P-O 部分の P=O、P-O⁻Na⁺由来のピークであると帰属した。DGDG 二重膜の XAS スペクトル(図 6C)は、532.0 eV の 1 成分でよくフィッティングすることができ、これが C=O 由来のピークと帰属できる。以上の結果から、DOPC 二重膜の XAS スペクトル(図 5A)は P=O (531.5 eV)、P-O⁻Na⁺ (532.2 eV)、C=O (532.0 eV) の 3 つの成分で構成されていることが示された。

(3) イオンを含む脂質二重膜の FMO-DPD シミュレーション

DOPC 二重膜の粗視化シミュレーションは散逸粒子動力学(DPD)法で行い、そのために必要となる粒子間の有効相互作用パラメータを、フラグメント分子軌道(FMO)計算から第一原理的に算定した。このプロトコルを用いた FMO-DPD シミュレーションは、脂質膜・ベシクルや電解質膜などに対して適用済で、計算結果と実験値と良い対応が得られている[5]。NaCl 濃度 2 mM - 500 mM 相当の NaCl を含む脂質二重膜を構成し、構造最適化を行った。Na⁺イオンが脂質二重膜近傍に優先的に配置された。粗視化構造を原子レベルの構造に還元するリバースマッピングを、Na⁺および Cl⁻イオンを含む系に対して実施する手法を確立した。リバースマップされた構造から、DOPC 分子と周囲の水分子および Na⁺イオンを切り出し、内殻励起計算による X 線スペクトルの計算を行った。水分子との水素結合の状態や Na⁺イオンの配位状態の異なる多数の DOPC 分子に対して統計的に X 線スペクトルを解析する方法を開発中である。

本研究課題により実験およびシミュレーションの基盤となる手法を確立することができた。脂質二重膜へのイオン配位の分子レベルの描像解明を目指して、課題期間終了後も研究を継続している。

<文献>

- [1] M. Nagasaka, H. Yuzawa, T. Horigome and N. Kosugi, J. Electron Spectros. Relat. Phenomena **224**, 93 (2018).
- [2] Y. Kakimoto, Y. Tachihara, Y. Okamoto, K. Miyazawa, T. Fukuma and R. Tero, Langmuir **34**, 7201 (2018).
- [3] H. Kondoh, F. Matsui, Y. Ehara, T. Yokoyama and T. Ohta, Langmuir **17**, 8178 (2001).
- [4] J. D. West, Y. Zhu, S. Saem, J. Moran-Mirabal and A. P. Hitchcock, J. Phys. Chem. B **121**, 4492 (2017).
- [5] H. Doi, K. Okuwaki, Y. Mochizuki, T. Ozawa, and K. Yasuoka, Chem. Phys. Lett. **684**, 427 (2017).

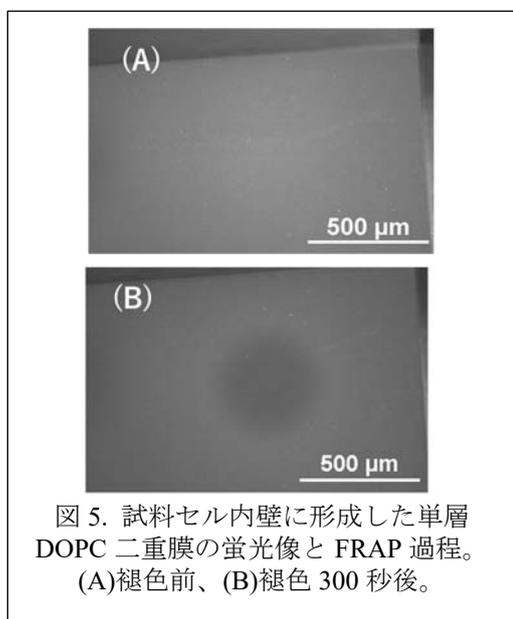


図 5. 試料セル内壁に形成した単層 DOPC 二重膜の蛍光像と FRAP 過程。(A)褪色前、(B)褪色 300 秒後。

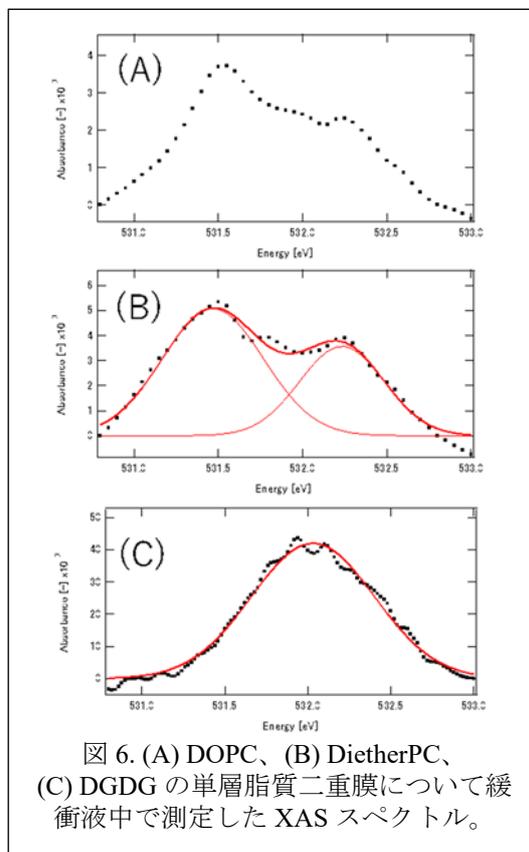


図 6. (A) DOPC、(B) DietherPC、(C) DGDG の単層脂質二重膜について緩衝液中で測定した XAS スペクトル。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Goh WeiZheng, 長坂 将成, 手老 龍吾
2. 発表標題 X線吸収分光法による脂質二重膜へのイオン配位の測定
3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 手老 龍吾
2. 発表標題 生体膜モデル系を用いた脂質・膜タンパク質集合体の観察
3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ゴウ ウェイジェン, 長坂 将成, 手老 龍吾
2. 発表標題 水溶液中で測定した脂質二重膜のX線吸収スペクトルの帰属
3. 学会等名 電気学会光・量子デバイス研究会「医療・バイオ研究に有効なインターフェースと量子ビーム応用の未来」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 手老 龍吾
2. 発表標題 固液界面の生体膜モデル系：生体分子への表面科学的アプローチ
3. 学会等名 第3回日本表面真空学会若手部会研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔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 分担者	長坂 将成 (Nagasaka Masanari) (90455212)	分子科学研究所・光分子科学研究領域・助教 (63903)	
研究 分担者	望月 祐志 (Mochizuki Yuji) (00434209)	立教大学・理学部・教授 (32686)	

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
---------	---------