

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23350058

研究課題名(和文)細胞外基質と接する脂質二分子膜の界面構造と機能性発現との関係解明

研究課題名(英文)Elucidation of Interfacial Structure and Functionality of the Biomembrane on the ECM

研究代表者

叶 深 (Ye, Shen)

北海道大学・触媒化学研究センター・准教授

研究者番号：40250419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜の表面には細胞外基質(ECM)と呼ばれる物質に覆われており、細胞膜表面の局所環境を制御し、細胞膜の機能性発現に大きな影響を及ぼすとされているが、その構造と機能性との関係について不明な点はまだ多くある。本研究は、ECMの機能性発現を界面分子構造の観点から理解するために、シクロデキストリンを含むポリロタキサン超分子や高分子電解質、カチオン性表面活性剤分子など、ECMの機能性をもつとされる生体適合性材料の界面分子構造について、和周波発生振動分光法や原子間力顕微鏡などの表面科学的手法により、分子レベルで解析し、その機能性発現の機構理解と制御を試みた。

研究成果の概要(英文)：The surface of cell membrane is typically covered by the extracellular matrix (ECM), which controls the local environment of the cell membrane surface and strongly affects functionality of the cell membrane. However, a number of issues related to the relationship of the structure and functionality of ECM are still unclear. In the present study, to understand the functionality of the ECM, the interfacial molecule structures of a series of biocompatible materials which could be employed as ECM, such as polyrotaxane supramolecules with cyclodextrin hosts, polymer electrolyte and cationic surfactant molecules, have been characterized by the sum frequency generation (SFG) vibrational spectroscopy and atomic force microscope (AFM) at a molecular level. The information obtained is useful to understand the functionality of ECM by controlling their interfacial structures.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・昨日物質化学

キーワード：界面分子構造 細胞膜 細胞外基質(ECM) 生体適合性材料 和周波発生(SFG) ポリロタキサン 高分子電解質 タンパク質分子

1. 研究開始当初の背景

生命現象の基幹に関する細胞の能動物質輸送や物質代謝、情報伝達などの機能性発現過程において、細胞膜が重要な役割を果たしており、細胞膜の界面構造及び機能性との関係を分子レベルで解明することは、細胞生物学や生物物理学において極めて重要な研究課題の一つである。一方、細胞膜表面はナノメートルオーダーの細胞外基質(Extracellular Matrix, ECM)に覆われており、細胞膜表面の局所環境を制御していると知られている。例えば、代表的な ECM の成分として、コラーゲン、フィブロネクチン、マトリゲル、セルロースなどがある。ECM は細胞接着の足場として細胞増殖や機能発現にも有効とされているが、細胞膜との相互作用について分子レベルで未だに理解されていない。

2. 研究の目的

本研究では、細胞培養に近い環境下での細胞膜表面の構造計測を実現するために、ECM の界面構造を高感度に調べ、細胞膜の機能性発現との関連性の解明を目指す。研究には物質の界面や表面における分子構造を高感度に測定できる和周波発生(SFG)振動分光法や原子間力顕微鏡(AFM)を活用し、ECM の機能性をもつとされる種々の生体適合性超分子材料の界面構造について分子レベルで解析し、その機能性発現の機構理解と制御を試みた。

3. 研究の方法

これまでの細胞膜の構造研究では、主に色素で標識された脂質またはタンパク質分子を用い、間接的に調べられてきた。色素フリーの新しい手法で細胞膜の分子構造の直接観察が期待される。一方、二光子からその和の周波数となる一光子への変換過程である和周波発生(SFG)は、反転対称性を持つ媒質のバルクには発生せず、巨視的に反転対称性が失われる表面・界面にのみ発生する(図1)。これらの性質を利用し、励起光源の一つを赤外領域に置くことにより、極めて高選択かつ高感度の界面振動分光法として活用できる。その特徴を活かし、従来の分光法は測定が困難とされる細胞膜やECM物質の界面における分子構造について、選択的に測定できると期待している。また、表面形状について高感度にプローブできる原子間力顕微鏡(AFM)との活用について、これらのバイオインターフェースを総合的に計測できるものと考えられる。

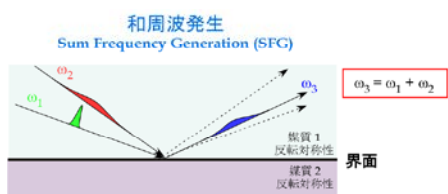


図1. 赤外と可視励起光を利用する和周波発生(SFG)分光法の概念図。

4. 研究成果

本研究において、優れた生体適合性の観点から、数種類の生体超分子材料について詳細に検討した。

(1) ポリロタキサン超分子材料： α -シクロデキストリン(α -CD)の環状ゲスト分子と直鎖のポリエチレングリコール(PEG)のホスト分子からなるポリロタキサン超分子(図2)は、種々の特異的なユニークな性質を示している。由井らは、ポリロタキサン超分子のPEG主鎖に様々な側鎖をつけたりし、 α -CD環に新しい置換基を導入したりすることで、その生体適合性の変化を調べてきた。特に α -CD環にメトキシ基を導入することで、血小板の付着状態の著しい改善を見出したが、原因が必ずしも

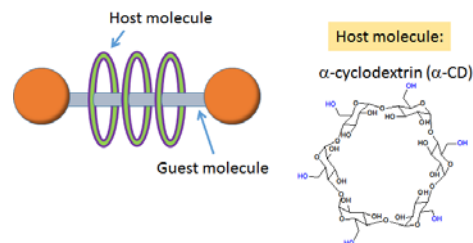


図2. ホストとゲストからなるポリロタキサン超分子。しも解明していない。

血小板分子の特異的な適合性について、超分子の表面分子配列構造と強く関連しているものと考え、メトキシ基とOH基に終端されたポリロタキサン超分子誘導体である OME 分子と PRX 分子の他に、ゲスト部位と側鎖部位に相当する PEG 分子と PMB 分子についてもその界面構造を詳細に調べた。SFG 分光法により C=O 伸縮領域に観察した結果、空気中では、これらの超分子材料の表面は、側鎖部位にあるカルボニル基と膜表面に残留された水分子との水素結合がはっきり観測されたものの、界面構造の大きな相違が得られなかった(図3a)。OME はより強固な水素結合が観測された。一方、水溶液中においては、バルク構造は殆ど変化せず一定であるが、膜表面の分子構造は大きな変化が見られた(図3b)。メトキシ基で終端化された OME 分子のみ、膜表面にあるカルボニル基の水素結合が観測され、ほかの超分子ではカルボニルによるピークが完全に消えていた。C-H 伸縮領域に測定した結果と合わせて解析した結果、水中に浸漬される場合、超分子の薄膜表面にあ

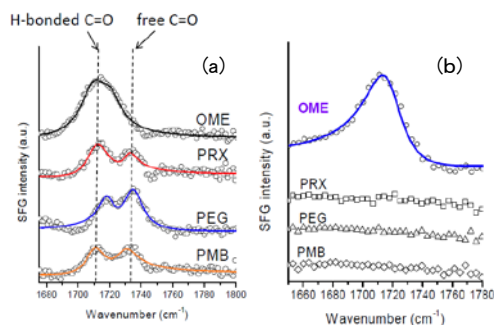


図3. (a)空気および(b)水中における各ポリロタキサン超分子のSFGスペクトル

るポリロタキサンの PEG 主鎖が再構成され、メトキシ基が疎水側鎖と作用し、OME 超分子表面において、集合体が形成されたことが示唆された。これに伴い、OME 超分子薄膜の表面形状も大きく変化したことが、AFM 測定から分かった。これらの構造変化は他の超分子表面に全く観測されていなかったことから、OME 表面の特異的な性質と考える。

さらに、血小板付着に重要な役割を果たすとされる ECM の原因タンパク質分子の一つであるフィブリノーゲンの吸着挙動についてについても調べた。メトキシ基で末端化されたポリロタキサン超分子の OME 薄膜表面において、他の超分子とは異なる吸着構造が観測されていた。このようなタンパク質の吸着配向では、血小板との相互作用において活性部位がブロックされているので、血小板の付着が阻害される可能性があるかと推論した。

(2) 高分子電解質(PE)超薄膜材料：本研究は細胞接着などにも用いられる高分子電解質(PE)膜の界面構造についても調べた。layer-by-layer (LbL) 法でカチオン性の高分子 PDDA とアニオン性の高分子 PSS を多層膜として固体基板上に一層ずつ累積した上、その界面構造の変化について分子レベルで SFG 分光法により追跡した。PE 溶液の支持塩濃度が十分に高い場合、作成直後の多層膜に観測された SFG スペクトルは、最後に累積された PE 分子のものと類似していることから(図 4)、多層膜の表面にその PE 分子によって末端化されたことが推論できた。LbL 法で期待されるように、PE 多層膜は確かに一層ずつ成長し、その表面に秩序な構造を持つことも分かった。この表面膜の構造秩序や界面の電荷量は PE 溶液の支持塩の濃度によっても影響されることを見出した。

一方、室温において多層膜の放置時間とともに、膜の SFG スペクトルが徐々に変化し、最終的に PDDA と PSS の単純混合物の SFG スペクトルと類似するように変化した(図 5)。このことから、LbL 法で作成した PE 多層膜は安定な構造ではなく、常に変化していることが分かった。すなわち、一層ずつ累積した PE 多層膜決して最終的に安定なものではなく、PE は膜内に常に動いて拡散しており、最終的に平衡構造に近い混合膜に変化したことが初めて観測できた。この拡散過程の速度は膜作成際の PE 溶液の支持塩濃度に依存するも分かった。このような経時変化は長期間にわ

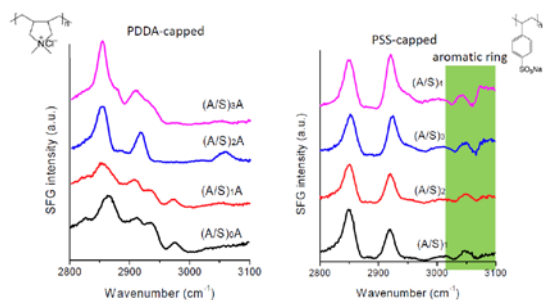


図4. (a)PDDAおよび(b)PSS-末端化されたPE多層膜のSFGスペクトル

たり ECM として用いられる場合、影響を及ぼすことが深刻であり、注意深く考慮する必要があると判断した。このように作製された PE 膜表面に、脂質二分子膜の膜構造、安定性および界面水構造を調べた結果、著しく影響されたことが分かった。適切な ECM として利用する場合、より詳しく検討する必要があるが示唆されている。

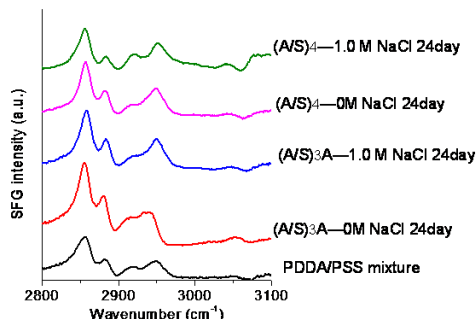


図5. PDDA-PSS多層膜(24日間放置)及び混合物のSFGスペクトル

(3) 生体分解性カチオン表面活性剤：細胞膜の骨格分子の一つであるリン脂質分子と類似性から、カチオン性の表面活性剤分子が生体適応性の分子材料としての利用が期待される。我々はさらに種々の四級アンモニウム表面活性剤分子の単分子膜の界面構造についても検討した。

その結果、四級アンモニウム表面活性剤の単分子膜の構造は分子末端のアンモニウムの正電荷の反発力によって強く影響されていることが分かった。単分子膜の作製において、サブフェースにハロゲンイオンの導入により、膜構造の改善がはっきり見られた。アニオンの存在により、膜末端にあるアンモニウム官能基間の反発力が抑えられ、より密度と秩序の高い単分子膜が構築できた。

一方、疎水アルキル鎖にアミド基やエステル基などの官能基が存在する場合、単分子膜のパッキング状態がさらに改善されている。アミド基官能基が含まれる場合、単分子膜内に水素結合の相互作用が見られることから、膜の構造改善に寄与したと考える。特にエステル基を含む四級アンモニウム表面活性剤分子の単分子膜は最も密にパッキングされていることから、エステル結合の柔軟性が重要な役割を果たすものと考えている。

さらに長鎖アルコール分子との混合効果について SFG 分光法と AFM 測定により検討した。両分子の混合により、膜内に相分離現象が観測されたものの、四級アンモニウム表面活性剤分子の配向とパッキング状態が大きく改善されていることが観測されている。

これらの一連の研究により、ECM のモデル物質となる生体適合性超分子材料の界面構造について初めて検討でき、その機能性発現機構の理解や材料設計の指針に道を開くものと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件, 全て査読有)

- ① Casford, M.; Ge, A.; Kett, P.; Ye, S.; Davies, P. The Structure of Lipid Bilayers Adsorbed on Activated Carboxy Terminated Monolayers Investigated by Sum Frequency Generation Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, **2014**, *118*, 3335-3345.
- ② Zheng, Y.; Mei D.; Chen Y.X.; Ye, S. The redox reaction of hydrogen peroxide at an Au(100) electrode. *Electrochem. Commun.*, **2014**, *39*, 19-21.
- ③ Zhang, H.; Sasaki, Y.; Abe, M.; Zhang, Y.; Ye, S.; Osawa, M.; Uosaki, K. Electrochemical and IR spectroscopic study of the self-assembled monolayer of a cyano-bridged dimeric Ru₃ complex on gold surface. *J. Electroanal. Chem.*, **2014**, *714-715*, 51-55.
- ④ Zhang, H.; Sasaki, Y.; Zhang, Y.; Ye, S.; Osawa, M.; Abe, M.; Uosaki, K. Synthesis and Properties of the Cyano Complex of Oxo-Centered Ru₃ Core Ru₃(μ₃-O)(μCH₃COO)₆(py)₂(CN). *Inorg. Chem.*, **2013**, *53*, 1288-1294.
- ⑤ Ge, A.; Peng, Q.; Wu, H.; Liu, H.; Tong, Y.; Nishida, T.; Yoshida, N.; Suzuki, K.; Sakai, T.; Osawa, M.; Ye, S. Effect of Functional Group on the Monolayer Structures of Biodegradable Quaternary Ammonium Surfactants. *Langmuir*, **2013**, *29*, 14411-14420.
- ⑥ Qiao, L.; Ge, A.; Osawa, M.; Ye, S. Structure and Stability Studies of Mixed Monolayers of Saturated and Unsaturated Phospholipids under Low-level Ozone. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2013**, *15*, 17775-17785.
- ⑦ Zhang, H.; Abe, M.; Zhang, Y.; Li, G.; Ye, S.; Osawa, M.; Sasaki, Y. Proton-Coupled Electron Transfer and Lewis Acid Recognition at Self-Assembled Monolayers of an Oxo-Bridged Ru₂(III) Complex Functionalized with Two Disulfide Anchors. *Langmuir*, **2013**, *29*, 10110-10119.
- ⑧ Yu, L.; Liu, H.; Wang, Y.; Kuwata, N.; Osawa, M.; Kawamura, J.; Ye, S. Preferential Adsorption of Solvents on Cathode Surface of Li-ion Batteries. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5753-5756.
- ⑨ Ge, A.; Wu, H.; Darwish, T.; James, M.; Osawa, M.; Ye, S. Structure and Lateral Interaction in Mixed Monolayers of Dioctadecyldimethyl Ammonium Chloride (DOAC) and Stearyl Alcohol. *Langmuir*, **2013**, *29*, 5407-5417.
- ⑩ Ye, S.; Kathiravan, A.; Hayashi, H.; Tong, Y.; Infahsaeng, Y.; Chabera, P.; Pascher, T.; Yartsev, A.; Isoda, S.; Imahori, H.; Sundström, V. Role of Adsorption Structures of Zn-Porphyrin on TiO₂ in Dye-Sensitized Solar Cells Studied by Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy and Ultrafast Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C*, **2013**, *117*, 6066-6080.
- ⑪ Wu, H.; Yu, L.; Tong, Y.; Ge, A.; Yau, Y.; Osawa, M.; Ye, S. Enzyme-Catalyzed Hydrolysis of the Phospholipid Bilayers Studied by Atomic Force Microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **2013**, *1828*, 642-651.
- ⑫ Yoshida, N.; Yokonishi, R.; Imai, T.; Nakamura, Y.; Kadokura, R.; Tong, Y.; Ye, S.; Watanabe, T.; Okura, T. Preparation of Hydrophobic Metal Oxide Films. *Journal of the Society of Inorganic Materials, Japan*, **2013**, *20*, 275-281.
- ⑬ Liao, L.; Li, M.; Kang, J.; Chen, D.; Chen, Y.X.; Ye, S. Electrode Reaction Induced pH change at the Pt Electrode /Electrolyte Interface and its Impact on Electrode Processes. *J. Electroanal. Chem.*, **2013**, *688*, 207-215.
- ⑭ Darwish, N.; Eggers, P. K.; Ciampi, S.; Tong, Y.; Ye, S.; Paddon-Row, M. N.; Gooding, J. J. Probing the Effect of the Solution Environment around Redox-Active Moieties Using Rigid Anthraquinone Terminated Molecular Rulers. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 18401-18409.
- ⑮ Darwish, T.; Tong, Y.; James, M.; Hanley, T.; Peng, Q.; Ye, S. Characterizing the Photoinduced Switching Process of Nitrospiropyran Self-Assembled Monolayer Using In Situ Sum Frequency Generation Spectroscopy. *Langmuir*, **2012**, *28*, 13852-13860.
- ⑯ Zhang, Y.; Noguchi, N.; Ye, S.; Uosaki, K. Structure of Adsorbed Molecular Layer on Fused Quartz Surface Determined Sequentially in Sodium Stearate Solution, Dry Ar, Pure Water, and Dry Ar by Sum Frequency Generation Spectroscopy. *Surf. Sci.*, **2012**, *602*, 92-96.
- ⑰ Darwish, N.; Eggers, P.; Silva, P.; Zhang, Y.; Tong, Y.; Ye, S.; Gooding, J.; Paddon-Row, M. N. Electro-active Self-assemble Monolayers of Unique Geometric Structures using Rigid Norbornylogous Bridges. *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 283 - 292.

[学会発表] (計 27 件)

1. 叶深, Enzyme Catalyzed Hydrolysis of the Supported Lipid Bilayers, The 3rd International Conference on the MEXT Project of Integrated Research on Chemical Synthesis “Synergy of Theory and Molecular Transformation”, 2014. 1. 10-11, Fukuoka (口頭)
2. 叶深, 非線形振動分光法による界面構造研究, “東北大学・理学研究科・化学専攻セミナー”, 2014. 3. 11, 仙台 (口頭)
3. 喬琳, 葛愛民, 大澤雅俊, 叶深, 低濃度オゾン中における脂質単分子膜の構造と安定性, 第7回分子科学討論会, 2013. 9. 24-27, 京都 (口頭)
4. 喬琳, 葛愛民, 大澤雅俊, 叶深, 気液界面における脂質単分子膜の構造及びその安定性, 2013年電気化学秋季大会, 2013. 9. 27-28, 東京 (口頭)
5. 葛愛民, 喬琳, 彭奇齡, 大澤雅俊, 叶深, 固体表面における有機薄膜の界面分子構造—和周波発生 (SFG) 振動分光法による検討—, 2013年電気化学秋季大会, 2013. 9. 27-28, 東京 (口頭)
6. Ye, S., Enzyme Catalyzed Hydrolysis of the Supported Lipid Bilayers Probed by Sum Frequency Generation (SFG) and Atomic Force Microscopy (AFM), CRC International Symposium on New Challenges on the Bio-interface, 2013. 2. 5, Sapporo (口頭)
7. Wu, H.; Osawa, M.; Ye, S. Phase Transition Behaviors of the Supported Phospholipid Bilayers Studied by SFG and AFM, 同上, 2013. 2. 5, Sapporo (ポスター)
8. Peng, Q.; Osawa, M.; Ye, S. Molecular Structure in Langmuir-Blodgett Multilayer of Fatty Acid probed by SFG, 同上, 2013. 2. 5, Sapporo (ポスター)
9. Qiao, L.; Osawa, M.; Ye, S. Structure and Stability Studies of Mixed Monolayers of Saturated and Unsaturated Phospholipids, 同上, 2013. 2. 5, Sapporo (ポスター)
10. Ge, A.; Kadowaki, K.; Matsusaki, M.; Osawa, M.; Akashi, M.; Ye, S. Salt Effect on Surface Structure of Polyelectrolyte Multilayers Investigated by Sum Frequency Generation (SFG) Spectroscopy, 同上, 2013. 2. 5, Sapporo (ポスター)
11. Ye, S., Phospholipase A₂ (PLA₂) Enzyme Catalyzed Hydrolysis of the Supported Lipid Bilayers Probed by SFG and AFM, Japanese-German Workshop, “Structure and Control of Interfaces”, 2013. 1. 8-1. 10, ベルリン
12. Ge, A.; Kadowaki, K.; Matsusaki, M.; Osawa, M.; Akashi, M.; Ye, S. Structural Studies of Polyelectrolyte Multilayers (PEMs) by Sum Frequency Generation (SFG) Spectroscopy, The Third Asian Spectroscopy Conference, 2012. 11. 28-12. 1, Xiamen (ポスター)
13. Wu, H.; Ye, S. Enzyme-catalyzed Hydrolysis of Supported Lipid Bilayer Investigated by AFM, 3rd Kanazawa BioAFM Workshop, 2012. 11. 7, 金沢 (口頭)
14. Ye, S. Molecular Study on the Lipid Membrane Surface Probed by SFG, *Vibrations at Surfaces 14*, 2012. 9. 25, 神戸 (口頭)
15. Qiao, L.; Osawa, M.; Ye, S. SFG Study on Mixed Monolayers of Saturated and Unsaturated Phospholipids, *Vibrations at Surfaces 14*, 2012. 9. 25, 神戸 (ポスター)
16. Ge, A.; Kadowaki, K.; Matsusaki, M.; Osawa, M.; Akashi, M.; Ye, S. Interfacial Structures of Polyelectrolyte Multilayers, *Vibrations at Surfaces 14*, 2012. 9. 25, 神戸 (ポスター)
17. Ye, S. Enzyme Reaction on Phospholipid Bilayers Probed by Sum Frequency Generation (SFG) and Atomic Force Microscope (AFM), CRC-FHI Joint Meeting “Complex Surfaces in Material Science”, 2012. 9. 21, ベルリン (口頭)
18. Ye, S. Solvent Adsorption on the LiCoO₂ Electrode Surface Probed by Nonlinear Vibrational Spectroscopy, *Spectroelectrochemistry* 2012, 2012. 8. 27, Dresden (口頭)
19. Ye, S. in situ AFM and SFG Studies on the Hydrolysis Reaction of Supported Lipid Bilayer Catalyzed by Phospholipase A₂, 244th ACS, “Structure, Dynamics, and Reactivity at Charged Interfaces” Symposium, 2012. 8. 22, Philadelphia (口頭)
20. Ye, S. Hydrolysis of Lipid Bilayer Catalyzed by PLA₂ Enzyme - in situ SFG and AFM Studies-, IACIS 2012, 2012. 5. 15, 仙台 (口頭)
21. 叶深, 和周波発生分光法による四級アンモニウム塩表面活性剤単分子膜の構造研究, 第5回SFG研究会, 2012. 3. 11, 東北大学 (口頭)
22. 叶深, 和周波発生 (SFG) 分光法による界面水構造の研究, CREST シンポジウム「水と界面」, 2012. 1. 25, 東京 (口頭)
23. 叶深, 和周波発生 (SFG) 分光法による有機薄膜界面の分子構造解析, 日本物理学会北陸支部特別講演会, 2011. 11. 8, 北陸先端科学技術大学院大学 (口頭)
24. Ye, S. In situ Structural Study on the Hydrolysis Reaction of Lipid Bilayer Catalyzed by Phospholipase A₂ (PLA₂) Enzyme, 13th ISEAC, 2011. 8. 22,

- Changchun, China (口頭)
25. Wu, H.; Tong, Y.; Yu, L.; Ge, A.; Osawa, M.; Ye, S. Enzyme Reaction on the Phospholipid Bilayer Surface Evaluated by in situ SFG and AFM Observations, The Third Asian Spectroscopy Conference, 2011. 11. 28, Xiamen (口頭)
 26. 叶深, 呉恒良, 葛愛民, 大澤雅俊, 脂質二分子膜の加水分解反応に伴う界面構造解析, 第5回分子科学討論会, 2011. 9. 20, 札幌 (口頭)
 27. Ye, S. Enzyme-catalyzed Hydrolysis Process of Lipid Bilayer Probed SFG and AFM, The Third Joint Symposium CRC & PCOSS, 2011. 4. 11, アモイ大学 (口頭)

[その他]

ホームページ等

www.cat.hokudai.ac.jp/osawa/member/ye

6. 研究組織

研究代表者

叶 深 (Ye Shen)

所属機関・部局・職：北海道大学・触媒化学研究センター・准教授

研究者番号：40250419