

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550033

研究課題名(和文) 麻酔作用発現機構の界面振動分光法による分子論的評価

研究課題名(英文) Mechanism of anesthetic action studied by interfacial vibrational spectroscopy

研究代表者

野口 秀典 (Noguchi, Hidenori)

独立行政法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・MANA研究者

研究者番号：60374188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ステアリン酸ナトリウム分子の石英基板上への吸着をSFG分光法により追跡した。水中では、ステアリン酸分子は二分子膜を形成するが、乾燥雰囲気下では二分子膜が崩壊し高配向した単分子膜が形成することが分かった。ステアリン酸ナトリウム分子の吸着過程におよぼす濃度の影響についても調べ、分子の濃度が臨界ミセル濃度よりも高いと、高配向の単分子膜は形成されにくいことが分かった。次にトレハロースの脂質二分子膜の構造安定化への影響についても調べた。二分子膜を水中で形成させた後、乾燥雰囲気下に置くと、二分子膜は崩壊し単分子膜となるが、トレハロース濃度が高いと乾燥雰囲気下でも二分子膜が安定に存在することが分かった。

研究成果の概要(英文)：Adsorption behavior of sodium stearate molecules at fused quartz/solution interface was studied by measuring SFG spectra in sodium stearate aqueous solution, followed by under Ar gas, in pure water, and under Ar gas flow again. Strong peaks due to CH stretching of CH₃ group appeared under Ar gas flow, showing the presence of the stearic acid monolayer with very high conformational order. However, no SFG signal was detected when it was contact with water, showing that the structure of stearic acid monolayer was totally disordered in water. It was also found that the well ordered stearic acid monolayer was formed only below critical micelle concentration (CMC). The effect of trehalose on the stability of DMPC bilayer in dry state was also studied by SFG and AFM measurements. It was found that trehalose was effective for stabilizing DMPC bilayer in dry state. Results showed that trehalose was effective for stabilizing DMPC bilayer domain in dry state.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：表面界面物性 和周波発生分光法 脂質二分子膜 トレハロース

1. 研究開始当初の背景

生体反応の多くは、細胞膜表面などの界面での反応が重要な役割を果たしている。例えば、現代の外科的手術の際に必須である麻酔(全身麻酔)の作用は、吸入した麻酔薬が細胞膜に溶解することによる細胞膜の膨張、細胞膜の流動性の変化、細胞膜上で麻酔薬周囲に氷状水が形成されることに由来すると、あるいは麻酔薬が膜蛋白質の受容体やイオンチャネルに働くと言った様々な仮説がこれまでに提唱されてきたが、依然として麻酔作用のメカニズムは解明されていないのが現状である。したがってこのような生体反応を理解するためには、細胞表面・界面における分子(水、タンパク質、脂質など)の構造あるいは動的挙動を反応が進行しているその場(水溶液中)で分子レベルで明らかにすることが重要となる。

2. 研究の目的

生体反応の多くは、細胞膜表面などの界面での反応が重要な役割を果たしている。このような生体反応を理解するためには細胞表面・界面における分子(水、タンパク質、脂質など)の構造あるいは動的挙動を反応が進行しているその場(水溶液中)で、かつ高い空間・時間分解能で明らかにすることが重要となる。本研究では生体内の過程を界面選択的な振動分光法を用い分子レベルで生体界面(細胞膜、脂質二分子膜)構造・反応、および機能発現に重要な役割を果たしていると言われている界面水や生体分子自信の構造ダイナミクスを追跡を行う。このような生体界面の構造・ダイナミクスを分子レベルで明らかにしていくことで、生命現象の解明に寄与することを目指す。

3. 研究の方法

和周波発生(Sum Frequency Generation: SFG)分光法は非線形光学効果に基づく分光法の1つであり、周波数 ω_1 と ω_2 の2つの光子から $\omega_3 = \omega_1 + \omega_2$ の1つの光子が発生する過程である。非線形光学過程である事から中心対称性の媒体中では起こらず、界面のみで起こり、 ω_1 を固定波長の可視光とし、 ω_2 を波長可変の赤外光とすると、界面の準位と ω_2 が等しくなったときにSFG強度は共鳴的に増加し、ピークを与える。つまり、SFG分光法は界面敏感な振動分光法であり、バルクに圧倒的に多く存在する分子種の妨害無しに界面の有機分子や界面水の構造を測定可能であり、水環境下にある細胞膜表面・界面の構造・反応を分子レベルで理解する上で有効な手法となる。

生体反応を理解するためには細胞表面・界面における分子(水、タンパク質、

脂質など)の構造あるいは動的挙動を反応が進行しているその場(水溶液中)で、かつ高い空間・時間分解能で明らかにすることが重要となる。そこで、まず既存のSFG分光法に高い空間分解能を兼ね備えた顕微振動分光システムおよび生体界面(脂質二分子膜、細胞膜)計測可能な光学系の構築、性能評価を行う。構築した顕微分光システムを生体界面(脂質二分子膜、細胞膜)へ適用し、生体分子(タンパク・ペプチド)を、その機能性を保持したまま、周囲の環境変化(溶媒、温度、pH、電位等)に対する膜構造の変化、あるいは溶媒との間に働く相互作用(水素結合、親水・疎水性相互作用など)の変化を追跡・評価し、分子の構造・機能に対する溶媒(主として水)の役割を明らかにする。

4. 研究成果

1) 種々の環境下での界面活性剤の構造評価

生体膜における方向が制御された電子伝達や酵素反応など不均一場でおこる反応であり、その本質を理解するためには生体分子(ソフトマター)が機能を維持することができる水環境下で反応に伴う表面・界面における分子の動的挙動を明らかにすることが必要である。このようなソフトマターの固/液界面プロセスの機構を厳密に理解するためには、ソフトマター自身の表面構造や界面水の構造、挙動を分子レベルで、しかも生体反応が実際に進行している水溶液中でその場決定、追跡する必要がある。そこで本研究では、まずは生体分子膜のモデルとして界面活性剤の一つであるステアリン酸分子の石英/溶液界面での吸着過程について界面選択的な振動分光法である和周波発生SFG分光法により分子構造評価を行った。

ステアリン酸溶液中では、SFGスペクトルが観測されなかった(図1(a))。中心対称性をもつバルク構造からはSFG信号が発生しないことから、溶液中でステアリン酸分子は二分子膜分子膜を形成していると結論した。また、溶液を取り除き、Arガス気流下に触れさせると、ステアリン酸のメチル基に帰属されるピークが非常に強く観測されたことから、高配向の単分子膜へと構造変化することが分かった(図1(b))。純水中では再びSFG信号が観測されなくなったことから、二分子膜構造へと変化し(図1(c))。再度Arガス気流下に触れさせると、ステアリン酸のメチル基に帰属されるピークが非常に強く観測され、単分子膜に構造が変化することが分かった(図1(d))。このように水の有無によって二分子膜構造と

単分子膜構造が可逆に変化していることが分かった。

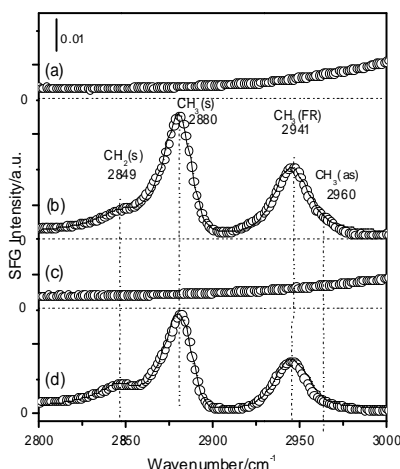


図 1 SFG spectra (circle symbol) of the fused quartz surface and the fitting results (solid line) in CH stretching region (2800-3000 cm^{-1}) obtained (a) in 200 μM sodium stearate solution, (b) in Ar gas after (a), (c) in pure water after (b), and (d) in Ar gas after (c).

また、この単分子膜構造は、ステアリン酸溶液の濃度によって変化し、臨界ミセル濃度より低い濃度では、溶液の濃度が高くなるにつれて、膜の配向性が向上する結果となった。一方、ステアリン酸溶液の濃度が臨界ミセル濃度以上になると、溶液内でステアリン酸分子はミセルを形成しはじめることにより、石英基板上への分子の吸着量が減少し、単分子膜の配向性の低下が観測された(図 2)。

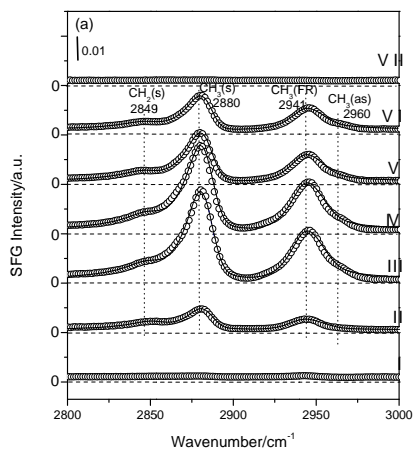


図 2 SFG spectra (circle symbol) and the fitting results (solid line) in CH stretching region (2800-3000 cm^{-1}) of the fused quartz surface obtained under Ar gas flow after the surface was in contact with sodium stearate solutions of 10 (I), 50 (II), 100 (III), 200 (IV), 300 (V), 400 (VI), and 500 μM (VII) for 10 min

2) トレハロースの脂質二分子膜安定化の効果

生物の構成単位である細胞は細胞膜により外部と隔離されている。細胞膜の主構成成分はリン脂質であり、リン脂質を水中に分散すると自発的に自己組織化し、ベシクルあるいはリポソームと呼ばれる二分子膜構造の閉鎖型小胞体を構築する。このため、リン脂質二分子膜構造体は生体膜モデル系として幅広く利用されている。さらに、生体機能を理解する上では、生体界面の構造を明らかにすることが重要であるが、測定法の制限などから理解が遅れている。このような状況に対し、本研究では表面選択的な振動分光法である SFG 分光法を主要な測定法とし、脂質二分子層の安定化に及ぼすトレハロースの効果について調べた。

図 3 は、ジミリストールホスファチジルコリン (DMPC) の二分子膜をベシクルフュージョン法により重水中で石英基板上に展開し、重水中および空気中に取り出して測定した CH 伸縮振動領域の SFG スペクトルを示す。重水中では、二分子膜が形成されるため、スペクトルは観測されないが、乾燥アルゴンガスに取り出した場合は、メチル基の強度が強く支配的なスペクトルが観測されたことから、二分子膜構造から単分子構造へと変化することが分かった。

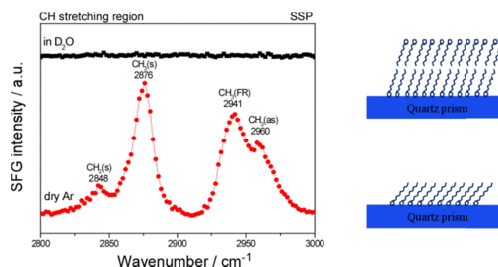


図 3 SFG spectra of DMPC bilayer measured in D_2O (top) and in dry Ar (bottom).

二分子膜にトレハロースを添加することで、二分子膜の構造安定化への効果を調べた。種々の濃度のトレハロースを添加後、乾燥アルゴンガスで得られた CH 振動領域の SFG スペクトルを図 4 に示す。その結果、トレハロースの添加濃度が増加するにつれ大気中に取り出した SFG スペクトルは CH 伸縮振動ピークが弱くなり、次第に観測されなくなった。このことは、トレハロースが脂質二分子膜の構造を安定化し、大気中でも二分子膜構造を維持していることを示唆している。

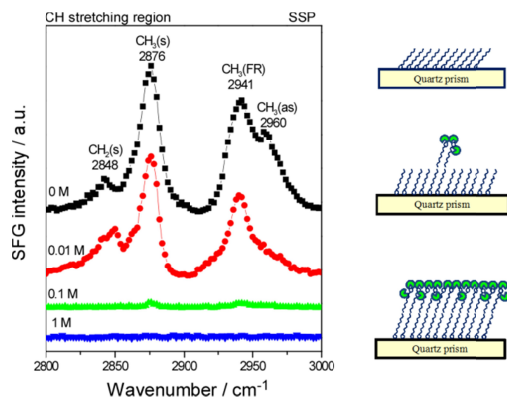


図 4 SFG spectra of DMPC bilayer measured in dry Ar after several concentrated trehalose was attached.

また、トレハロースの二分子膜の構造安定化の効果を原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて調べた結果、トレハロースの濃度が増加するにつれ、二分子膜形成の領域 (ドメイン) が大きく成長していることが分かった。

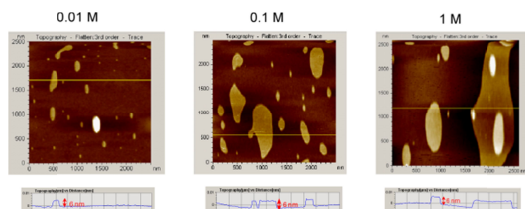


図 5 AFM images of DMPC bilayer measured in dry Ar after several concentrated trehalose was attached.

以上、本研究では当初の目標であった顕微分光まで達成できなかったが、脂質二分子膜のモデル系を用い、二分子膜の構造安定化に関する知見を界面選択的な振動分光法により分子レベルで明らかにすることが出来た。今後は、ここで得られた知見ももとに安定な二分子膜構造を構築し、膜の生体機能性について探る予定である。

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 7件)

Structure of water at zwitterionic copolymer film-liquid water interfaces as examined by the sum frequency generation method

T. Kondo, K. Nomura, M. G-Ide, H. Kitano, H. Noguchi, K. Uosaki, Y. Saruwatari
Colloids Surf. B: Biointerfaces. Vol. 113, 361-367 (2014). (査読有)

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

Y. Zhang, H. Noguchi, S. Ye and K. Uosaki
Surf. Sci., Vol. 607, 92-96 (2013). (査読有)

Takuya. Kondo, Kouji Nomura, Masanobu Miura, Makoto Gemmei-Ide, Hiromi Kitano, Hidenori Noguchi, Kohei Uosaki, Kohji Ohno, Yoshiyuki Saruwatari

Structure of Water in the Vicinity of a Zwitterionic Polymer Brush As Examined by Sum Frequency Generation Method

Colloids Surf. B: Biointerfaces., Vol. 100, No. 1, 126-132 (2012). (査読有)

T. Kondo, M-G. Ide, H. Kitano, K. Ohno, H. Noguchi, and K. Uosaki

The Structure of Water in the Vicinity of an Amphoteric Polymer Brush As Examined by Sum Frequency Generation Method

Colloids Surf. B: Biointerfaces., Vol. 91, No. 1, 215-218 (2012). (査読有)

Y. Han, H. Noguchi, K. Sakaguchi, and K. Uosaki

Formation Process and Solvent-Dependent Structure of a Polyproline Self-Assembled Monolayer on a Gold Surface

Langmuir, Vol. 27, No. 19, 11951-11957 (2011). (査読有)

野口秀典、魚崎浩平

和周波発生分光法・赤外分光法 - 表面振動分光法による生体界面の構造・機能評価 - *オレオサイエンス*, Vol. 11, No. 6, 197-203 (2011). (査読無)

[学会発表](計 12件)

Y. Zhang, H. Noguchi, and K. Uosaki, "Effects of Saccharides on the Stability of Lipid Bilayer in Dry State", 第33回表面科学学術講演会、つくば、2013年11月26日 28日

Y. Zhang, H. Noguchi, and K. Uosaki, "Study on the Structure of Lipid Membrane by Vibration Spectroscopy", Seventh International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, Kobe, Japan, Aug. 25-30, 2013

Y. Zhang, H. Noguchi, and K. Uosaki, "Studies on the Role of Trehalose for the Preservation of Bilayer Structure of DMPC in Air", 日本化学会第 93 春季年会、滋賀、2013

年 3 月 22 日 - 25 日

Y. Zhang, H. Noguchi, and K. Uosaki, "Effect of Trehalose on the Stability of Bilayer Structure of DMPC in Dehydration", 2nd International Conference on Biomaterials Science, Tsukuba, Japan, Mar. 19-22, 2013

Y. Zhang, H. Noguchi, and K. Uosaki, "Effect of Trehalose on the Stability of Bilayer Structure of DMPC in Dehydration", MANA International Symposium 2013, Tsukuba, Japan, Feb. 27-Mar. 1, 2013

H. Noguchi, Y. Zhang, and K. Uosaki, "Interfacial Molecular Structure at Bio-Nanointerfaces Studied by Surface Sensitive Vibrational Spectroscopies" (Invited talk), CRC International Symposium, Sapporo, Japan, Feb. 5-6, 2013

Y. Zhang, H. Noguchi, and K. Uosaki "Adsorption Behavior of Stearic Acid at Solid/Liquid Interface Studied by Sum Frequency Generation Spectroscopy" The 5th GCOE International Symposium, February 21-22, 2012, Sapporo, Japan. (ポスター)

Y. Zhang, H. Noguchi, and K. Uosaki "Adsorption behavior of stearic acid at solid/liquid interface studied by sum frequency generation spectroscopy" Softinterface International Mini-Symposium on Biointerface (SIMS 2012), March 17-19, 2012, Tsukuba, Japan. (ポスター)

Y. Zhang, H. Noguchi, S. Ye, and K. Uosaki "Adsorption Behavior of Stearate Molecule at Quartz/Water Interface Studied by Sum Frequency Generation Spectroscopy" 日本化学会第 92 春季年会(2012), March 25-28, 2012, Yokohama, Japan. (口頭)

Y. Zhang, H. Noguchi, and K. Uosaki "Study on the structure of lipids on quartz surface by sum frequency generation (SFG) spectroscopy" The 28th European Conference on Surface Science, August 28 - September 2, 2011, Wrocław, Poland. (ポスター)

野口秀典、魚崎浩平、「界面振動分光法によるソフトマテリアル表面の構造と機能のその場追跡」(招待講演)、日本分析化学会第 60 年会、名古屋、2011 年 9 月 14 日 - 16 日

H. Noguchi and K. Uosaki, "Biomaterials and functional surfaces studied by in situ surface vibrational spectroscopies", (invited), The 7th Nanjin-Suzhou-Hokkaido-

NIMS/MANA Joint Symposium, Suzhou, China, Nov. 10-12, 2011

〔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〕
ホームページ
<http://www.nims.go.jp/nanointerface/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

野口 秀典 (NOGUCHI, Hidenori)
独立行政法人物質・材料研究機構
国際ナノアーキテクニクス研究拠点
MANA 研究者
研究者番号 : 60374188