

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655056

研究課題名(和文) 界面脂質二分子膜のダイナミクス計測

研究課題名(英文) Dynamics of artificial self-supported lipid membranes

研究代表者

藤浪 眞紀 (Fujinami, Masanori)

千葉大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50311436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では生体膜のゆらぎや力学的・化学的特性を探索するための新たな方法論として、生体膜モデルである平面型人工自立脂質二分子膜、黒膜の張力物性を計測可能な界面張力測定手法の開発を目的とした。水相の屈折率制御を行うことによりレーザー誘起変形分光法の黒膜への適用を可能とし、脂質その他の分子の組成制御を行った黒膜や液膜について、膜の組成変化や分子吸着状態の変化に伴う界面張力の計測に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed a methodology of detecting interfacial tension and related properties of a planar artificial self-supported lipid membrane, or black lipid membrane (BLM) for studying fluctuations and mechanical/chemical properties of biomembranes. Laser-induced surface deformation spectroscopy was applied by optimizing the refractive indices of two water phases. As a result, measurement of fluctuation and interfacial tension of BLM has been succeeded and their dependence on its compositions and molecular was discussed.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：膜張力 脂質二分子膜 レーザー誘起界面変形分光法 光学顕微鏡 コレステロール 脂質分子

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜は細胞や細胞内小器官の内外を隔てる隔壁であると共に、様々なイオンやなどの物質輸送変換を担い、生理機能を多く有することで知られているが、同時に多種多様な分子を内包することから、個々の機能について物理化学的に検証するにはあまりに複雑である。生体膜に存在する脂質や膜タンパク質を必要に応じて選択し、再構成できる生体膜モデルとして人工脂質2分子膜が利用されており、特定の膜タンパク質を埋め込み、電気化学的測定や蛍光による観察からイオンチャネルの開閉やイオン輸送のメカニズム解明に向けての研究が行われてきた。また、生体膜中には脂質ラフトのように膜の組成や構造が異なる領域も存在し、分子の運動状態や力学特性も異なっている。これまでこうした生体膜の機能に関する研究にはベシクルやLangmuir-Blodgett膜など、様々なモデルが使用されてきた。これらモデルは、作成法によって形状、担持状態が異なっていることから、同様の組成であっても力学的特性は必ずしも同じではなく、構造的・熱的なゆらぎも異なっている。なかでも、平面型人工自立脂質2分子膜は光を照射したときに膜からの反射・干渉が観察されず黒く見えることから黒膜とも呼ばれ、基板上の特定の孔に形成させることが可能であることから電気化学的測定や位置・大きさの制御、膜内外の組成・圧力の制御が比較的行きやすく、大きな構造の歪みを生じていないという特徴がある。一方、黒膜は非常に薄いことから、黒膜を利用した生体膜の機能についての研究は電気化学的測定と蛍光分子を利用した測定がほとんどだった。

### 2. 研究の目的

本研究では生体膜のゆらぎや力学的・化学的特性を探るための新たな方法論を提案するため、生体膜モデルである平面型人工自立脂質2分子膜、黒膜の張力物性を計測可能な界面張力測定手法の開発を目的とした。このため、レーザー誘起変形分光法の黒膜への適用を進めると共に、黒膜や液膜内部の脂質その他の分子の組成制御を行い、それに伴う膜の内部構造変化や吸着状態、界面張力変化を膜のゆらぎの状態を通じて計測し、生体膜の力学特性や物質輸送とゆらぎとの関係について張力・力学特性の観点から議論を行うことを目標とした。

### 3. 研究の方法

本研究では平面型人工自立脂質2分子膜である黒膜の界面張力を観測するために、レーザー誘起界面変形分光測定装置の構築を行い、黒膜への適用を行った。レーザー誘起変形分光法では、レーザーの輻射圧により界面張力波を外部から誘起し、その周波数応答を計測することにより界面張力についての情報を取得する手法であり、 $\mu\text{N/m}$  オーダー

の小さな界面張力まで測定可能であることから、小さいことが予想される黒膜の界面張力にも適用可能である。ゆえに本研究では図1のような装置を構築して黒膜の界面張力を測定することにした。

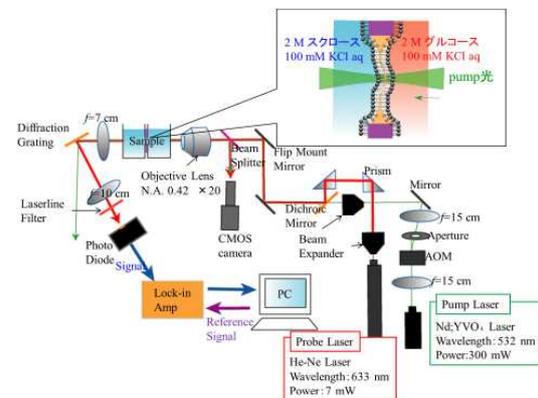


図1 本研究で構築したレーザー誘起界面変形分光法の光学系と黒膜への適用

ここで、レーザー誘起界面変形分光法は黒膜輻射圧による界面変形をプローブするため、黒膜形成で脂質膜が薄くなると屈折率変化の減少により界面変形がほとんど起きなくなることが予想された。そこで、本研究では黒膜の両側の各々の水相として濃度が等しいグルコース、スクロース水溶液等、各水相の屈折率を異なるものにするような工夫を行った。

さらに、黒膜作製手法についても、ペインティング法と張り合わせ法の2種類の黒膜作成手法についてセルを設計・作製して測定を行った。たとえば張り合わせ法では、図2に示すように水相上に展開させた脂質単分子膜を張り合わせることで黒膜が形成される。ここで膜の両側の屈折率差をつけるために溶液組成を調製することで、両方の水相が混ざり合うことなく安定して黒膜を形成可能な条件を見出した。黒膜の厚さについては、電解質溶液に挟まれた黒膜の面積と静電容量測定結果から算出した。

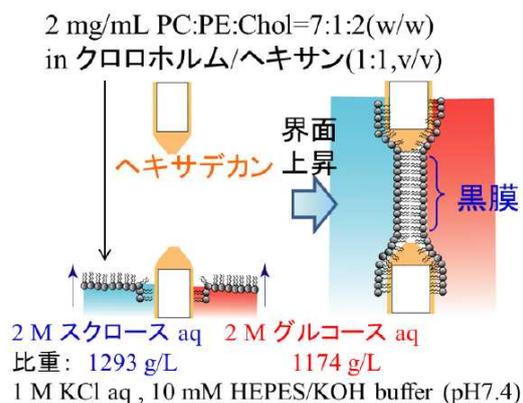


図2 張り合わせ法による黒膜形成の概略

本研究では黒膜以外の膜モデルとして、味覚センサなどのモデルとしても研究が進められている液膜3相系についても膜中の物質輸送と界面張力の関係についての研究を行った。本系では黒膜とは違い界面張力が大きく、時間変化の追跡を行う必要があったため、界面張力波の周波数の検出により界面張力を測定する手法の1つである準弾性レーザー散乱法を用いた。さらに膜の両側の水・油界面について界面張力測定を行うため、準弾性レーザー散乱法におけるレーザーを2つに分割することで、2点の界面張力を同時に測定可能な測定装置の開発を行い、水相-油相-水相の3相からなる液膜系の片方の水相からもう片方の水相に油相を経由して溶質分子が輸送されてきた際発生する電位変化や界面張力変化をとらえた。

#### 4. 研究成果

本研究では当初ペインティング法による黒膜作成と界面張力測定を行った。ペインティング法では筆に塗った脂質デカン溶液を水溶液中で孔の開いた担持用フィルムに塗りつけ薄化させることで黒膜を形成させる。レーザー誘起変形分光法の黒膜への適用を可能にするには膜の両側の屈折率を異なるものにする必要があるが、両側を異なる濃度の水溶液とすると浸透圧による負荷がかかり、膜の物性が変化してしまうことが予想された。そこで本研究では、浸透圧を等しくするために各相に等しい濃度の①LiCl, CsIなどの電解質溶液を使用して屈折率差をつける方法と、②分子量の異なる2種類の糖水溶液(グルコース, スクロース)にて屈折率の差をつける方法を試みた。いずれの方法でも黒膜は形成されたがその寿命は異なっており、①の方法による30分程度の寿命では本研究の測定には十分ではなかったのに対し、②の方法では黒膜形成後数時間を維持することができたことから、その後のレーザー誘起変形分光測定には糖水溶液を使用した。図3にペインティング法で作成した黒膜の測定結果を示す。黒膜形成により、低周波数での信号強度上昇と高周波数での減衰が見られ、黒膜由来の信号が得られたが、信号のばらつき・不安定性が非常に大きかった。

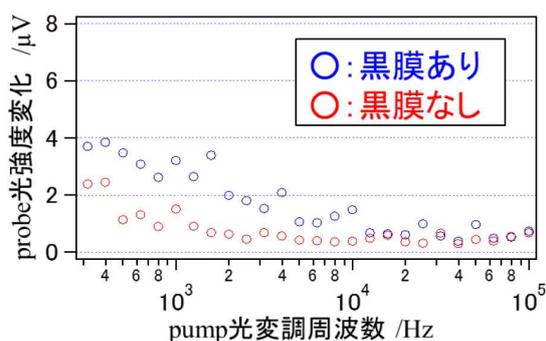


図3 ペインティング法による黒膜のレーザー誘起変形分光測定結果

このペインティング法での信号の不安定性は脂質の溶媒であるデカンの影響と予想されたことから、溶媒の影響が小さい張り合わせ法による黒膜形成と測定を行った。

張り合わせ法により作製された黒膜の測定結果を下図4に示す。ペインティング法とは異なり、張り合わせ法による黒膜では信号のばらつきが小さく、測定信号の周波数特性も理論形状により近いものとなった。さらに、黒膜を構成する脂質中のコレステロール含有率を変更しての測定も行ったところ、周波数特性が異なる信号が得られ、コレステロール含有率が上昇すると界面張力が増加するという結果が得られた。この結果はマイクロピペット吸引法によるベシクルの膜張力の報告例における、コレステロール含有率増加に伴う膜張力上昇と類似しており、黒膜においてもコレステロール含有量の増加により界面張力が増加する可能性を示すものであるといえる。

以上の結果から、レーザー誘起変形分光法は黒膜の界面張力を測定するのに十分な感度を持ち、黒膜の組成やゆらぎによる影響を評価するのに有用な手法であることが分かった。今後、膜タンパク質の導入、脂質組成の影響など、黒膜を生体膜モデルとして活用した際にも膜の物性に応じた結果が得られると予想され、生体膜の力学特性や各種タンパク質の機能解明のための界面張力測定利用の礎となったと考えられる。

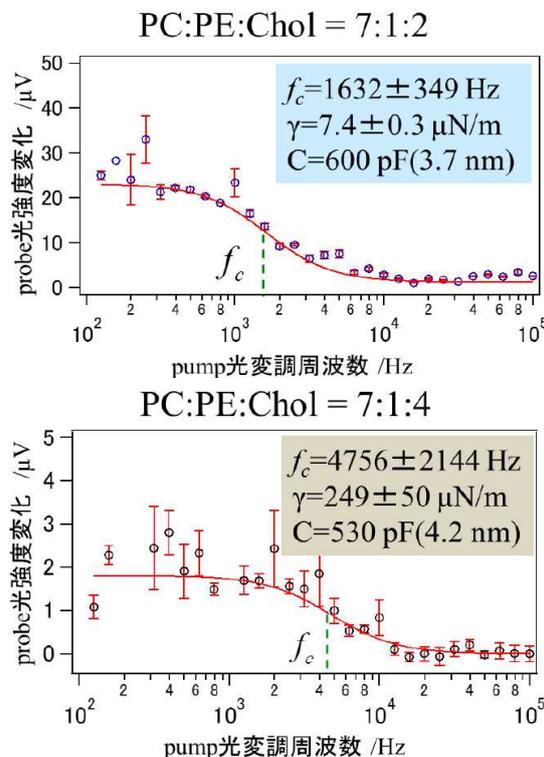


図4 張り合わせ法により作製された黒膜のレーザー誘起変形分光測定結果。コレステロール量の増加に伴い、固有振動数( $f_c$ )の値が上昇して界面張力が大きくなる結果が得られた。

液膜3相系についても、液膜の一方からもう一方への物質輸送に伴う周期的な液膜電位・界面張力振動現象における両相間の電位変化と分子吸着状態の関係を探るため、時間分解準弾性レーザー散乱法による測定を行った。その結果、振動現象の発生源となっている界面や、一方からもう一方の界面への物質輸送と振動現象の周期への影響、および液膜内外の電解質の振動現象への影響について議論を行うことが可能になった。これらの結果は2箇所の界面張力を同時に測定する手法開発を本研究で行うことにより得られたものであり、レーザー誘起変形分光法の結果とも併せて議論していくことで、今後生体膜の力学物性についての議論の幅を広げることが出来ると期待している。

#### 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6件)

- ① Ryo Tanaka, Tomonori Nomoto, Taro Toyota, Hiroyuki Kitahata, Masanori Fujinami, “Delayed Response of Interfacial Tension in Propagating Chemical Waves of the Belousov-Zhabotinsky Reaction without Stirring”, 査読有, *J. Phys. Chem. B*, **2013**, *117*, 13893-13898.  
DOI: 10.1021/jp4079458
- ② Taro Toyota, Koyo Uchiyama, Takahiro Kimura, Tomonori Nomoto, Masanori Fujinami, “Effects of Surfactants and Electrolytes on Chemical Oscillation at a Water/Nitrobenzene Interface Investigated by Quasi-elastic Laser Scattering Method”, 査読有, *Anal. Sci.*, 2013, *29*, 911-917.  
DOI: 10.2116/analsci.29.911
- ③ Atsushi Nakara, Tomonori Nomoto, Taro Toyota, Masanori Fujinami, “Tip-enhanced Raman spectroscopy of lipid bilayers in water with an alumina- and silver-coated tungsten tip”, 査読有, *Anal. Sci.*, 2013, *29*, 865-869.  
DOI: 10.2116/analsci.29.865

[学会発表] (計3件)

- ① 田中 亮・豊田 太郎・北畑裕之・野本 知理・藤浪 真紀, “準弾性レーザー散乱法による水油二相系 BZ 反応の化学波の界面張力時間分解計測”, 第73回分析化学討論会, 北海道, 5月18-19日, 2013年.
- ② Tatsuya Yaguchi, Taro Toyota, Tomonori Nomoto, Masanori Fujinami, “Fluctuation measurement of free-standing bilayer lipid membranes by laser-induced surface deformation spectroscopy”, 26th Conference of the European Colloid and Interface Society, Malmö, 2-7, Sep. 2012.

- ③ 豊田 太郎・内山 光陽・野本 知理・藤浪 真紀, “準弾性レーザー散乱法を用いた界面張力測定による水/油/水三相液膜系の電位差振動現象の分子挙動解析”, 第72回分析化学討論会, 鹿児島, 5月19-20日, 2012年.

[図書] (計0件)

[その他]

ホームページ

<http://chem.tf.chiba-u.jp/gacb11/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

藤浪 真紀 (FUJINAMI, Masanori)

千葉大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号： 50311436

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

豊田 太郎 (TOYOTA, Taro)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号： 80422377

野本 知理 (NOMOTO, Tomonori)

千葉大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号： 00510520