

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25630269

研究課題名(和文)人工ナノ細胞創製 - 水中物質反応in-situ高分解能TEM観察への展開 -

研究課題名(英文)Formation of artificial nano-cells for in-situ TEM observation of material reaction in the water

研究代表者

石黒 孝 (Ishiguro, Takkashi)

東京理科大学・基礎工学部・教授

研究者番号：10183162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)を用いてコレステロールを添加したリポソームを合成した。リン脂質二重層の相安定性についてはFT-IR分光法により評価した。超純水、生理的食塩水、もしくはヨウ化セシウム水溶液を内包させた強化リポソームは通常の透過型電子顕微鏡により観察した。これらのリポソームが確かに電子顕微鏡の室温真空中で安定であることを確認した。そして電子線照射により、水は徐々に抜けリポソーム中に単結晶塩が析出する事を確認した。

研究成果の概要(英文)：Liposome reinforced by adding cholesterol was synthesized using the dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). Phase stability of the phospholipid bilayers was examined by FTIR spectroscopy. The reinforced liposomes filled with ultrapure water or physiological saline were observed by the conventional TEM equipped with a mass spectrometer. It was confirmed that the liposomes filled with water or saline solution were stable in the vacuum at room temperature. However, during electron irradiation, water molecules escaped gradually, and a single crystal of rock salt precipitated in the liposome. Similar phenomenon was also observed in the case of cesium iodide solution.

研究分野：ナノ材料

キーワード：バイオマテリアル 水 TEM リポソーム DPPC リン脂質二重層膜 コレステロール

1. 研究開始当初の背景

液中で生じる物理・化学的な現象をナノメートルスケールで透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて観察する手法の開発は盛んに行われている。TEMは高真空条件を前提としており高い蒸気圧の液体試料の観察は通常困難である。Yuk等(Science **336**:6077 (2012): 61-64)は水中に分散した白金ナノ粒子をグラフェンセルに閉じ込め粒子成長の観察に成功した。しかしグラフェンは疎水性のため水溶液中観察には親水性容器が望まれる。そこで我々はリン脂質(ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC))二重層により形成された親水性内面を有するリポソームに着目した。

1967年にChapmanらが報告して以来、生物の細胞を構成するリン脂質二重膜の相転移は生体系にみられる典型的な物性現象の一つとして注目されてきた。DPPC-水系においてDPPCは室温でゲル相であり、中間相(307 K~314 K)を経て、約314 K以上では液晶相で存在することが知られている。しかしながらこの相転移における動的構造変化については未だ明確でない。その要因として水中での分子状態の評価が困難であることが挙げられる。分子の結合・振動の情報を得るのに有効な赤外分光法も水の赤外線吸収率が大きく、生体分子振動を捉えることが難しい。そこで本研究では、1 μm 程度の光路長を持つ測定セルの開発し、水溶液の透過赤外分光を可能とし、DPPC-水系の透過赤外分光に関するスペクトルの温度依存性を調べることで、水中のDPPCの疎水・親水部の振動状態の変化及び相転移に伴う構造変化を捉えることを目指した。加えて、リン脂質膜の強化に用いられるコレステロール添加効果についても検討した。

これらの結果を踏まえてコレステロール添加により強化したリポソームの水および水溶液を内包させ、これを高分解能電顕観察することを検討した。このように実際の生命の細胞を模した容器を電子顕微鏡の真空中に持ち来して観察を行うということは従来の人々の常識からはあり得ない試みである。

2. 研究の目的

本研究ではまずDPPC-水系の相転移を透過赤外分光法により観測し、コレステロール添加による変化を確認する。これを踏まえて水および水溶液を内包するリポソームを人工的に合成し、透過型電子顕微鏡により電子照射に伴う変化をその場観察し、水中物質反応を観察する容器としての可能性について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

リポソームはバンガム法により作製した。DPPC 0.06 molに対してコレステロール濃度

を変化させて3 mLのクロロホルムにメスフラスコ中で溶解させ、その内300 μL をナスフラスコに移し、ロータリーエバポレーター(Yamato Scientific Co., RE-200)により328 Kで溶媒除去(60分)し、コレステロール含有脂質薄膜を作製した。

脂質薄膜に超純水(18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$)もしくは水溶液を3 mL加え、ポルテックスミキサー(ASONE Co., FLX-S50)で1分間水合させた。その後プローブ型超音波発生装置(TOMY精工, UD-211)により328 K, 3 W, 10分間の超音波処理を行い、最後に0.2 μm 細孔径のシリンジポンプにより濾過しリポソーム溶液を調整した。

フーリエ変換赤外分光光度計(JASCO Co., FT/IR-6200)によりDPPC-水系の相転移及びDPPC-水系へのコレステロールの影響を評価した。測定温度領域は303~323 Kとし、冷却及び加熱過程について測定を行った。加熱及び冷却速度は0.4 K/minとした。

リポソームが形成されているの確認をCryo-TEM(JEOL Co.)により行った。更にリポソーム分散水中のリポソーム粒径分布を動的光散乱法(DLS)により評価した。

電子照射時のリポソームからの放出粒子を同定するために質量分析器:835 Vacuum Quality Monitor (MKS Co.)をJEM 2000FX(JEOL Co.)に装着し観察を行い、CCDカメラ装着のJEM-2000EX(JEOL Co.)にて動画観察を行った。試料は水を内包したリポソームの場合だけ電子線に対するコントラストが弱かったためプラチナチミジンプルー(TIブルー)で染色を行った。観察は全て加速電圧200kVで行った。

4. 研究成果

図1にDPPC分散水のIR吸収スペクトルの温度依存性を示す。水由来およびDPPC由来の吸収ピークの同定結果を付記した。315 K以上で CH_2 伸縮振動の吸収強度が減少している。これはDPPCの313 Kゲル相 \square 315 K液晶相に対応する相転移と考えられる。コレステロールを含むDPPC水分散液にも同様の吸収ピークが確認された。

次にこの変化を詳細に追うために、 CH_2 非対称伸縮振動の赤外吸収積分強度(以下積分強度)の冷却・加熱過程における温度依存性を図2(a)に示す。 CH_2 伸縮振動の積分強度は315K近傍において大きな変化が見られた。これは相転移に伴う炭化水素鎖の構造変化を表すと考えられる。DPPCは低温相であるゲル相から高温相である液晶相に相転移すると、炭化水素鎖が伸びきった状態から折れ曲がった構造に変化するとされている。従って、相転移に伴う炭化水素鎖の長さの変化、すなわちC-H間距離の変化が積分強度の変化として捉えたと考えられる。そして、この変化はコレステロール添加により減少し30 mol%choles.ではほぼ消失した。

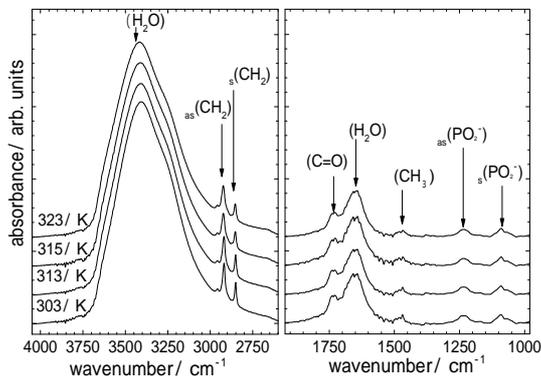


図1 DPPC 分散水の赤外吸収スペクトル

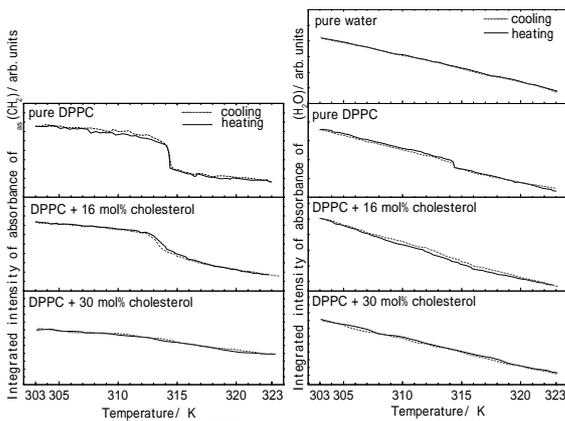


図2 DPPC 分散水の赤外吸収積分強度
(a) CH₂非対称伸縮振動 (b) H₂O伸縮振動

図2(b)示した、DPPC - 水系における H₂O 伸縮振動の積分強度の温度依存性にも 315 K 近傍で CH₂ 伸縮振動の場合と同様の傾向が見られた。超純水にはこの傾向は見られないことから、H₂O 伸縮振動の積分強度の変化も DPPC の相転移に対応していると考えられる。この IR 積分強度は溶液セルの光路中の自由な水分子を観測しているため、水の積分強度減少はラメラ構造の層間への水の取り込み、増大は層間からの水の解放に対応すると考えられる。従って、ゲル相から液晶相への相転移(加熱過程)では層間へ水が取り込まれ、液晶相からゲル相への相転移(冷却過程)では層間から水が出てきていると考えられる。これはゲル相から液晶相への相転移に伴い炭化水素鎖が折れ曲がることで脂質二重膜の厚みが減少するという従来の知見とも一致する。また、コレステロールを含む場合、添加量の増加に伴い図2(a)、図2(b)共に積分強度の温度依存性及び変曲点も見られなくなっている。これは、コレステロールが DPPC の疎水部に作用し、DPPC 分子の動きの抑制・固定化されるためであると考えられ、これがコレステロール添加によるリポソーム強化の一つの要因であると思われる。

図3にDLSにより評価した粒径分布を示す。コレステロール濃度増加に伴い粒径の増加と分布の広がりが認められる。対応するクライオ TEM による観察結果を図4に示す。

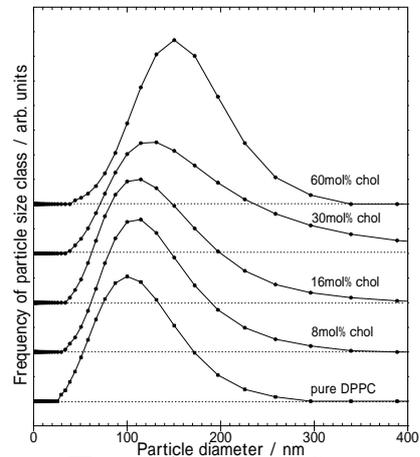


図3 リポソーム粒径分布

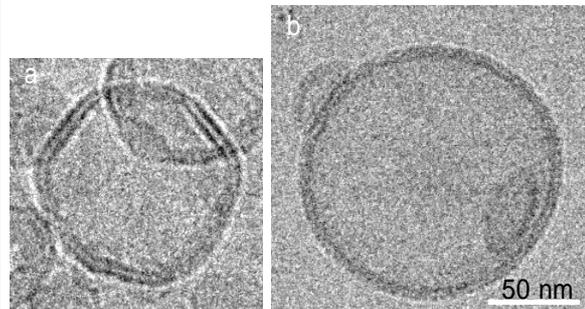


図4 クライオ電顕像
a: pure DPPC, b: 30mol%choles.

コレステロール添加の方が曲率が滑らかな形状をしている。何れもリン脂質二重層が確認され、リポソームの形成を確認した。

以上の結果を踏まえて 30 mol% choles. のリポソームを人工ナノ細胞として形成し電顕観察を行った。

図5に電子線照射に伴いリポソームから放出された粒子の質量分析結果を示す。照射に伴い全圧力は増加し、同様の傾向が OH⁻ と H₂O に対応する Mass 番号 17 及び 18 に現れた。この結果、リポソームは真空中でも水を保持していることが確認された。

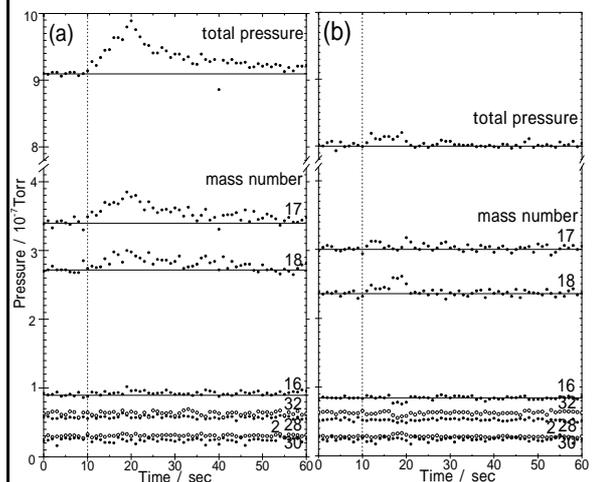


図5 電子線照射に伴う放出粒子
(a)水を内包したリポソーム, (b)生理的食塩水を内包したリポソーム (縦点線が照射開始時刻)

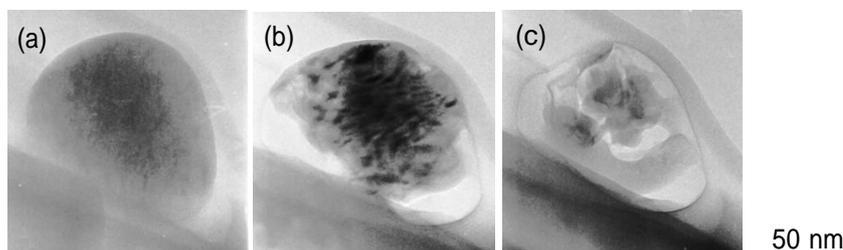


図 6 水を内包したリポソームの電顕観察
電子線照射量は (a) 3.5×10^3 , (b) 1.8×10^4 , (c) 2.1×10^4 electron / nm²

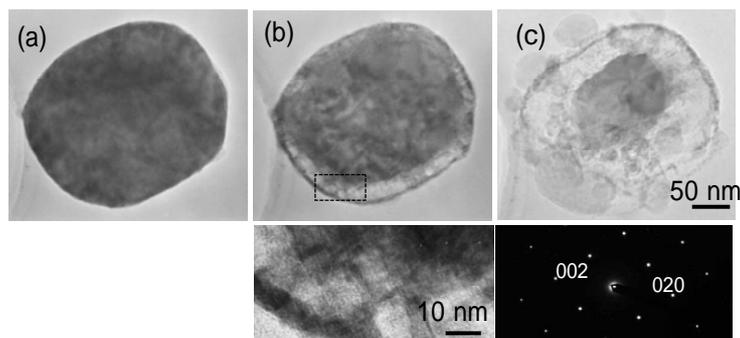


図 7 生理的食塩水を内包したリポソームの電顕観察
図 6 水を内包したリポソームの電顕観察
電子線照射量は (a) 5.4×10^3 , (b) 4.4×10^4 , (c) 6.5×10^4 electron / nm²
(d) (b)の矩形部分の拡大図, (e) (b)の制限視野回折像

図 6 に水内包リポソームの電顕観察を示す。照射とともに内部にコントラストの揺らぎを生じ(a)、水放出に伴い縮小とゆらぎの増大とそれに伴う厚さの変化(b)を経て、リン脂質部の残存(c)に至る。一方生理的食塩水を内包したリポソームは非染色で観察可能図 6 で、照射に伴いコントラストのゆらぎを生じ(a)、水放出に伴い[100]配向した食塩の単結晶が形成され(b), (d), (e)、その後は形成された食塩が昇華し周囲に再付着した(c)。同様の析出現象はヨウ化セシウム水溶液においてもその場観察することができた。

以上の結果、コレステロール添加により強化したリポソームは真空中でも水を内包した状態で安定に存在可能であり、電子線照射に伴い緩やかな水放出を生じ、結晶析出過程を観察できることが実証された。

5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 1 件)

In-situ TEM observation of rock salt crystal precipitation in liposome, Haruka Ai, Naoto Moriya, Takuji Ube, Takashi Harumoto, Yoshihiro Arai, Kazuyoshi Murata and Takashi Ishiguro, MRS Advances, DOI: 10.1557/adv.2016.277

〔学会発表〕(計 5 件)

第一原理計算による水の赤外吸収スペクトルのシミュレーション, 石塚徹, 宇部卓司, 春本高志, 中村吉男, 石黒 孝, 2013 年第 74 回応用物理学学会秋季学術講演会, 2013 年 9 月 16 日 ~ 20 日, 同志社大学

Electron microscopic observation of antigen and antibody, Atsushi Kawashimo, Takashi Harumoto, Akikazu Murakami, Takachika Azuma, and Takashi Ishiguro, International Symposium on Technologies against Cancer 2014, 2014 年 3 月 8 日 ~ 3 月 9 日, Katsushika Campus, Tokyo University of Science, Tokyo, Japan

In-situ TEM observation of crystal precipitation in liposomes filled with sodium chloride aqueous solution, Haruka Ai, Naoto Moriya, Takashi Harumoto, and Takashi Ishiguro, 18th International Microscopy Congress, 2014 年 9 月 7 日 ~ 9 月 12 日, The Prague Congress Centre (Prague, Czech Republic)

リポソーム中溶液反応の直接電顕観察, 阿井晴佳, 森屋直人, 石黒 孝, 村田和義, 新井善博, 2015 年第 24 回日本バイオイメーシング学会学術集会, 2015 年 9 月 26 日 ~ 9 月 28 日, 東京理科大学 葛飾キャンパス

In-situ TEM observation of rock salt crystal precipitation in liposome, Haruka Ai, Naoto Moriya, Takuji Ube, Takashi Harumoto, Yoshihiro Arai, Kazuyoshi Murata and Takashi Ishiguro, 2015 MRS Fall Meeting & Exhibit, 2015. 2015 年 11 月 29 日 ~ 12 月 4 日. Boston, MA USA

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

石黒 孝 (ISHIGURO TAKASHI)
東京理科大学・基礎工学部・教授
研究者番号 : 10183162