

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26800223

研究課題名(和文) 生体膜モデル表面の階層構造と元素特異的な密度分布の精密計測法の開拓

研究課題名(英文) Exploitation of technique for precise measurement of hierarchical structure and ion-specific density distribution of biomembrane interfaces

研究代表者

山本 暁久 (Yamamoto, Akihisa)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・研究員

研究者番号：90706805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、細胞膜モデルを用いて、膜面内および膜近傍のタンパク質が持つ電荷による膜構造の変化と、膜タンパク質の相互作用の強さを解明することを目的とした研究を行った。X線を膜に照射した際に、反射されるX線量の測定(X線反射率)と、膜やタンパク質を構成する原子から放出される蛍光の測定(微小角X線蛍光散乱法)を同時に測定することで、これまでに測ることができなかった細胞膜中の電荷の分布をオングストローム(10億分の1メートル・原子の大きさレベルの長さ)精度で測定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Within this subject, by constructing the model of cell membranes, the effect of electronic charges contained in the membrane and proteins around membranes on membrane structure and the interaction between membrane and proteins was experimentally revealed. Irradiation of X-ray onto the membrane model generates the reflection of X-ray (XRR: X-ray reflectivity) and emission of fluorescent X-ray from atoms (GIXF: grazing incident X-ray fluorescence). Measurement of these signal intensities allowed us to determine the distribution of charges within Angstrom accuracy, which is in the order of the typical size scale of atoms.

研究分野：ソフトマター物理

キーワード：生体膜 生物物理 X線蛍光散乱 X線反射率 静電相互作用



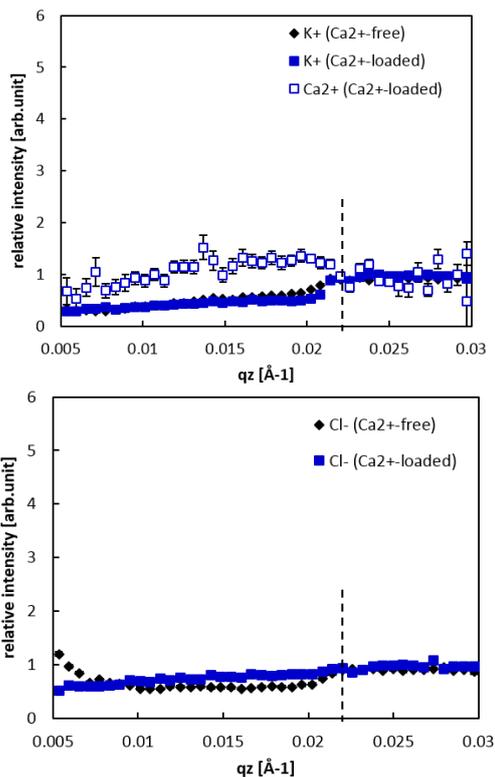


図 4: GIXF 測定から得られた各イオンによる蛍光強度プロファイル。臨界入射ベクトル  $q_c=0.022[\text{Å}^{-1}]$  を超えたバルクでの分布密度に対して規格化し、カルシウムイオンが膜近傍に局在し、カリウムイオンが排斥されることを明らかにした。

(ハ) 糖脂質 Gb3 を含むモデル: 志賀様毒素によるタンパク合成の阻害は (i) 生体膜上での糖分子 Gb3 との結合, (ii) 細胞内空間への取り込み、の二段階を経る。本研究では糖脂質の化学修飾が膜構造及び力学的性質に及ぼす影響を調べた。

#### 4. 研究成果

(イ) 合成リポポリマー (図 3) の気液界面単分子系においては、ブロックコポリマーを用いてラングミュア膜を作成し、双性イオンを多数含む親水基と水相イオンの相互作用を X 線蛍光で直接測定した。膜近傍におけるナトリウムイオンあるいはカリウムイオンとカルシウムイオンの局在の競合について調べ、これまでの一般的な分光法では不可能であった一価・二価のイオン空間分布を測定した。その結果、カリウムイオンはバルク中に比べ膜近傍での存在密度が低いのに比べ、カルシウムイオンはより膜近傍に局在することが明らかになった。一方、塩化物イオンはカルシウムイオンの存在に関わらず膜近傍での特異的な振る舞いが見られなかった (図 4)。これは、分極したフォスフォコリン基が分子鎖内で電気的中性に近い状態を実現していることを示唆している。カルシウムイオンの特異的な局在は塩析の効果であると考えられる。また、疎水基-親水基のバランスを変化させたブロックコポリマーについて実験を行い、X 線反射率測定から Abele's Matrix を用いた理論計算により、分子構造に依存する膜厚・ラフネス・電荷密度を決定した。現在これらの結果をまとめ、国際学術誌への投稿に向け準備を行っている。

(ロ) 酸化脂質の気液界面単分子膜に関して

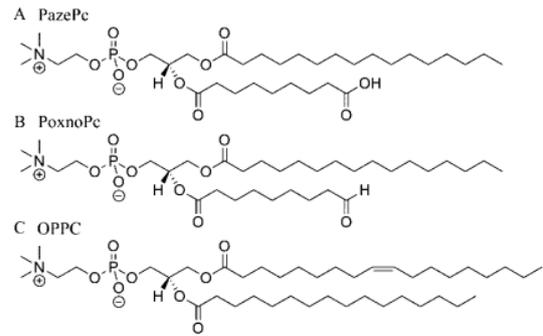


図 5: 酸化脂質 PazePC と PoxnoPC および中性脂質 OPPC の化学構造。

は、構造の異なる 2 つの酸化脂質 (PazePC, PoxnoPC) と中性脂質 OPPC (図 5) について、XRR によりその膜厚をそれぞれ 7.7 nm, 7.4 nm, 11.7 nm と同定し、さらに GIXF 測定からカルシウムイオンが界面からそれぞれ 7 nm, 11 nm, 15 nm の位置に、1 脂質分子あたり 2.0, 0.2, 0.3 個局在することを明らかにした。一方、一価イオンの局在はほとんど見られず、酸化度の違いが膜の静電相互作用に大きく寄与することを定量的に明らかにした。

(ハ) 糖脂質 Gb3 については、その力学的安定性を決定するために、中性子非鏡面散乱実験を行い、膜構造と膜の力学的パラメーターである曲げ剛性率と圧縮弾性率を測定した。非鏡面成分の散乱強度解析と、discrete smectic Hamiltonian に基づいた膜構造の計算から、重水素化 Gb3 脂質膜の曲げ剛性率と圧縮弾性率をそれぞれ  $\kappa=17\text{kT}$ ,  $B=8\text{MPa}$  と

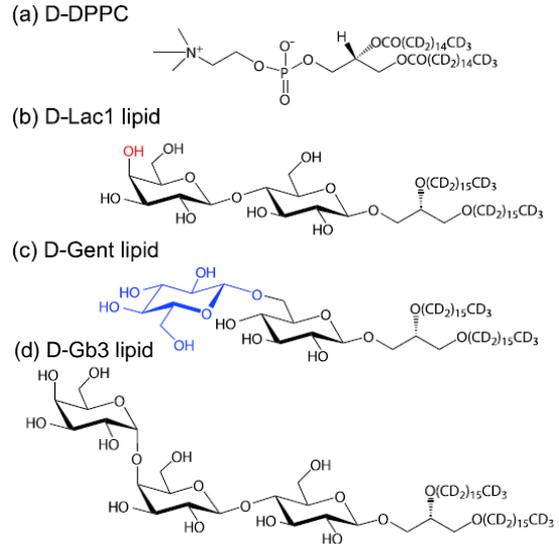


図 6: 中性脂質 DPPC、糖脂質 Lac1、Gent、Gb3 の化学構造。糖鎖立体配位の違いをそれぞれ赤・青で示している。

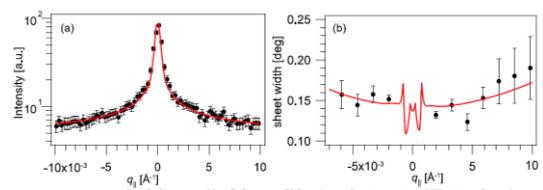


図 7: 中性子非鏡面散乱法から得られた Bragg sheet の強度プロファイル (a) と sheet width プロファイル (b) を同時にフィッティングし、変数である 2 つの力学的パラメーター  $\kappa$ ,  $B$  を決定した。

定した。また、この結果を LacI や Gent 脂質と比較し、長い糖鎖による水和が膜間相互作用を弱め圧縮剛性率を下げ、“曲がった”糖鎖が膜面内秩序を乱すことで曲げ剛性率を下げるといった、分子構造のわずかな差異が膜の力学的特性に与える影響を定量的に明らかにした (図 6・7)。これらの内容をまとめ、結果が Journal of Physical Chemistry 誌に掲載された (業績[1])。

以上のように、本課題では GIXF と GISAXS を組み合わせることで、柔らかいダイナミックな生体膜の構造と近傍のイオンプロファイルを、包括的にかつ原子レベルに近い分解能で直接測定することに成功した。今後はこの手法をさらに発展させ、膜とタンパク質の静電相互作用と水相イオンの複雑な相関を実験的に解明していくことを計画している。将来的には本手法が生体膜同士の相互作用を物理学的に記述するうえでの重要な知見を与えるうえで不可欠になると確信している。

#### 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 1 件)

[1] Akihisa Yamamoto, Wasim Abuillan, Alexandra S. Burk, Alexander Körner, Annika Ries, Daniel B. Werz, Bruno Demé, and Motomu Tanaka, Influence of length and conformation of saccharide head groups on the mechanics of glycolipid membranes: Unraveling by off-specular neutron scattering, The Journal of Chemical Physics, 2015, 142, 154907-1-8, <http://dx.doi.org/10.1063/1.4918585>

[学会発表] (計 3 件)

[2] 山本暁久・田中求、埋もれたソフト界面の物理の定量評価、第 63 回高分子討論会、長崎、2014 年 9 月 24-26 日、口頭発表

[3] Akihisa Yamamoto, Wasim Abuillan, Alexandra S. Burk, Alexander Körner, Annika Ries, Daniel B. Werz, Bruno Demé, and Motomu Tanaka, Impact of membrane-bound carbohydrates on membrane mechanics, iCeMS International Symposium “Hierarchical Dynamics in Soft Materials and Biological Matter”, 京都、2015 年 9 月 23-26 日、ポスター発表

[4] Akihisa Yamamoto, Shigeto Inoue, Taichi Habe, Yuji Higaki, Motoyasu Kobayashi, Wasim Abuillan, oleg Konovalov, Atsushi Takahara, and Motomu Tanaka, Vertical structures and electrostatics of superhydrophilic polymer brushes, iCeMS International Symposium “Hierarchical Dynamics in Soft Materials and Biological Matter”, 京都、2015 年 9 月 23-26 日、ポスター発表

[図書] (計 0 件)

無し

[産業財産権]

無し

[その他]

アウトリーチ活動

田中求、山本暁久、最新エックス線・中性子小角散乱で拓く新しいソフトマター物理学

～有機超薄膜の微細構造・硬さを正確に測る～、NTTサイエンスプラザ 2014 年 11 月 21 日、ポスター発表

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山本 暁久 (Yamamoto, Akihisa)  
京都大学・細胞 - 物質統合システム拠点 (WPI-iCeMS)・研究員  
研究者番号： 90706805

##### (2) 研究分担者

無し

##### (3) 連携研究者

無し