

令和 2 年 5 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05836

研究課題名（和文）ナノ界面張力の実測定—画像解析によるベシクル/水界面張力測定—

研究課題名（英文）Measurement of interfacial tension of nano systems by image analysis of vesicles

研究代表者

ヴィレヌーヴ 真澄美（VILLENEUVE, MASUMI）

広島大学・統合生命科学研究科（総）・教授

研究者番号：30304554

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：顕微電気泳動法と種々の測定セルを試みたところ、顕微鏡としては落射型の使用が必要となった。また測定系の検討のために行った実験から以下の事柄が明らかになった。水溶性2本鎖リン脂質膜と鉄錯体の相互作用においてpHが明確に影響をおよぼすことが明らかになった。また中鎖脂肪酸の会合挙動については脂肪酸が一部電離するため、pHや脂肪酸濃度に依存して極めて多様な会合体ができていることが明らかとなった。今後目的の測定が可能となった際には最適な実験条件で行うことができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果の学術的意義は二分子膜の界面張力が、簡易的に、そして安価に測定できるようになれば、ベシクル/水界面張力の実測により、リン脂質二分子膜内のミクロドメイン構造について詳細な研究が可能となり、生体膜の機能を物理化学的現象との相関という観点で理解できる。また膜と生理活性分子の相互作用を簡便に測定できるようになる可能性がある。さらに実用化が難航しているリン脂質分子膜によるドラッグデリバリーシステムの実現も期待される。社会的意義としては、赤血球などの細胞の界面張力も測定できるようになり、病気の新たな診断法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：A device that measures interfacial tension between a bilayer and a solvent where the bilayers are dispersed was tried to be developed. Light microscopy and electrophoresis were combined, and several types of measurement cells were designed and tested. Because the microscope was a transmission type, the cells were restricted to be transparent. It has become clear that the light microscope must be changed to a vertical illumination type. While searching for systems to be inspected by the intended new device, the following information was obtained. The interaction between phospholipid film and iron complex in aqueous solution was definitely affected by solution pH; middle-length fatty acids, which are soluble in water, form molecular assemblies of wide variety depending on pH and the fatty acid concentration of the aqueous solution. These findings will give defined systems for our future researches using the device.

研究分野：コロイド界面化学

キーワード：脂質膜 細胞膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

通常の界面張力とは二つの巨視的な相が接する界面内に働く力である。ミセルやベシクルなどの分子集合体は会合数が数十から数千であり、アボガドロ数個の原子や分子の集合体である巨視相と比較すると非常に小さい。それ故、そのような分子集合体は独立な相として溶液から分離することは不可能であるが、擬似的に巨視相の振る舞いも示す。すなわち、ミセルやベシクルなどの分子集合体は原子・分子とも巨視相ともつかない中間的な性質を有する。溶液中の二分子膜には界面張力がないと理論的に主張する研究者もいる (Jahnig, F., What is the Surface Tension of a Lipid Bilayer Membrane?, *Biophysical Journal*, vol. 71, pp. 1348–1349 (1996) )、[2] 末崎幸生, 「界面活性剤の作る分子膜の物理」, *物性研究*, vol. 74, pp. 201–239 (2000) )。一方で、多くのミセルやベシクルは球状を保つため、これらの分子集合体と周囲の溶媒の間には界面張力に類似した力が働いていると考えられる。実験的側面からは、Evans らがマイクロピペットを用いてベシクル二分子膜の面積弾性率を測定するマイクロピペット吸引法を確立しており (Rawicz, W and Olbrich, K C and McIntosh, T and Needham, D and Evans, E, Effect of Chain Length and Unsaturation on Elasticity of Lipid Bilayers, *Biophysical Journal*, vol. 79, pp. 328-339 (2000) )、ベシクル二分子膜/溶媒界面にも界面張力が働くことを示唆している。溶液中で形成される分子集合体と溶媒の間の界面張力、すなわち単位面積当たりの界面過剰エネルギーについては理論的にも実用的 (ベシクルの安定性を決定するパラメータ) にも関心が持たれている。本研究は概念としては存在しうるが、これまで実測されたことのなかった二分子膜/溶媒間界面張力を測定することを目指した。

界面張力は(1)単位面積当たりの界面過剰エネルギーであり、したがって(2)界面の安定性の指標、さらには(3)界面の硬さの指標となる。また(4)厚みが数 nm しかない界面領域の性質を直接反映するきわめて重要な物理量である。ベシクル/水界面張力の実測が可能となれば、メゾスコピックな分子集合体形成に関して新たな知見が得られる。

1985年にIsraelachviliが分子の臨界充填パラメータと形成する会合体の形との相関性を提唱して以来、会合体形成についての理解は臨界充填パラメータで充足されてしまっている。ベシクルと一様に呼ばれる会合体であっても、それらの電顕像は様々である。表面の滑らかな二分子膜でできたものもあれば、硬そうな板状の二分子膜の小さい断片が沢山貼り合わされたように見えるものもある。臨界充填パラメータのみでこれらをすべて理解できているのだろうか?異なるモルフォロジーのベシクルの界面張力を測定することで、分子集合体について全く未知の事実が明らかになる可能性がある。赤血球のような細胞膜界面張力からドラッグデリバリーシステムにおけるベシクルの安定性の評価や赤血球の安定性に及ぼす薬物の影響なども評価することができると考えた。

## 2. 研究の目的

概念としては存在しうるが、これまで実測されたことのなかった二分子膜/溶媒間界面張力を測

定することを目指した。

### 3．研究の方法

二つのバルク相間の界面張力を測定する方法として、懸滴法や静滴法が知られている。これは気相または油相中に静置され、重力によって変形した水滴の輪郭の曲率 (Young-Laplace 式) から界面張力を求める方法である。本研究では重力が作用するのと同方向からベシクル粒子を観察せざるを得ないため重力場は利用できない。そこで、代わりに電場を印加してベシクル粒子を変形させ、静滴法の原理を応用することにした。ナノ粒子の表面電位(ゼータ電位)を測定する手法として顕微鏡電気泳動法が存在する。表面電位測定では粒子が変形しない程度の電場(5 V cm<sup>-1</sup>)をかけるが、本測定法では電気泳動セルの中に障害物を置き、泳動するベシクル粒子がそれによって止められることにより変形することを利用することにした。研究室所有の微分干渉顕微鏡とデジタルカメラを組合せ、撮影した GUV 粒子画像を解析することで GUV 二分子膜/水界面張力を測定する方針であった。

### 4．研究成果

測定セルを種々試作したところ、落射型の顕微鏡に変更する必要が生じた。測定装置の開発と測定方法の確立を試みながら、測定系の探索と検討も行った。その過程で得られた成果は  
水溶性 2 本鎖リン脂質膜と鉄錯体の相互作用

#### 中鎖脂肪酸の会合挙動

について新たな知見が得られたことである。リン脂質膜については、鉄錯体との相互作用に対して pH が明確に影響をおよぼすことが明らかになった。また中鎖脂肪酸の会合挙動に関しては、脂肪酸が一部電離するため、pH や脂肪酸濃度に依存して極めて多様な会合体ができていることが明らかとなった。今後二分子膜張力の測定が可能になった際の実験条件が確実になる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Villeneuve Masumi, Noguchi Hiroki	4. 巻 1861
2. 論文標題 Roles of -methyl trans-cyclopropane groups in behavior of mixed mycolic acid monolayers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 441 ~ 448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.10.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Villeneuve Masumi, Tanaka Mihoko, Saito Natsumi, Sakamoto Hiroyasu, Hayami Yoshiteru	4. 巻 210
2. 論文標題 Uptake of iron (III)-ethylenediamine- N , N , N , N -tetraacetic acid complex by phosphatidylcholine lipid film: Part I. Effect of bulk pH	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemistry and Physics of Lipids	6. 最初と最後の頁 1 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemphyslip.2017.12.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Villeneuve Masumi, Tanaka Mihoko, Saito Natsumi, Sakamoto Hiroyasu, Hayami Yoshiteru	4. 巻 210
2. 論文標題 Uptake of iron (III)-ethylenediamine- N , N , N , N -tetraacetic acid complex by phosphatidylcholine lipid film. Part II. Effect of film curvature	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemistry and Physics of Lipids	6. 最初と最後の頁 14 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemphyslip.2017.12.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Taichi Koga, Masumi Villeneuve
2. 発表標題 Aggregation behavior in cesium hydroxide-decanoic acid mixed solution
3. 学会等名 Okinawa Colloids 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----