

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03824

研究課題名(和文) 生体膜の膜ゆらぎ計測とその生体膜機能との相関

研究課題名(英文) Correlation between property and fluctuation of the lipid membranes

研究代表者

藤浪 真紀 (Fujinami, Masanori)

千葉大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：50311436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、自立型脂質二重膜である黒膜について、レーザー誘起界面変形法(LISD)、光褪色後蛍光回復法(FRAP)の適用を可能にすると共にコレステロール濃度・浸透圧依存性の測定を行った。浸透圧が増加した場合、膜張力と拡散係数が共に増加したのに対し、コレステロール濃度が増加した場合は膜張力が増加したのに対して拡散係数の減少が見られた。これらの結果は膜張力と流動性についての系統的な測定結果として重要であるだけでなく、これまで測定できなかった平坦、かつ揺らぎが大きな脂質二重膜についての結果である点でも重要であり、今後の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：In the current study, the membrane tension and the diffusion coefficients of free-standing black lipid membranes (BLMs) were observed by systematic control of the cholesterol concentration and the osmotic pressure with the laser induced surface deformation (LISD) and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) techniques. When the osmotic pressure was raised, both the membrane tension and diffusion coefficients increased as well. On the other hand, when the cholesterol concentration was raised, the membrane tension increased whereas the diffusion coefficient decreased. The results are not only important as the quantitative evaluations about relations between membrane tension and fluidity, but also important as the fundamental properties of lipid bilayers with natural fluctuations and perturbative deformation that were unavailable before.

研究分野：分析化学

キーワード：分析科学 生体物理 生体分子 生体膜 表面・界面物性 界面活性分子

1. 研究開始当初の背景

生体膜はリン脂質を主体とした脂質二分子膜と様々なタンパク質からなり、また動物細胞にはコレステロールが存在し、糖脂質が膜の外側に向けて糖鎖を突出させている。生体膜の役割は、細胞内外の物質の流出を防ぐ境界のみならず、酵素による物質代謝やエネルギー変換の反応場、受容体による情報の感受の支持体、分子・イオンの選択的透過や拡散など多彩である。その機能発現の主役は膜タンパク質であり、蛍光測定による単一分子検出や電気化学測定などにより広く調べられている。一方、生体膜は流動性が高いため機能発現に膜ゆらぎ(力学的特性)が強く関与していると云われている。膜タンパク質の挙動分析手法は多くあるが、生体膜の力学特性の定量的評価法は確立されていないのが現状である。膜ゆらぎに関する定量的指標の一つに膜張力があるが、その測定のほとんどは生体膜に大きな変形を与えるものであり、その摂動は膜本来の機能を障害し、値の正確さに影響を与えてしまう。

こうした背景を踏まえ我々は近年、大きな変形を伴うことなく、生体膜の膜張力を非侵襲的に測定可能な手法として、レーザー誘起表面変形(LISD)法をモデル生体膜に適用する研究を進めてきた。

2. 研究の目的

生体膜の機能発現において、主役となるのは膜タンパク質であるが、流動性の高い生体膜では膜ゆらぎといった力学的特性が深く関与している。本研究は、膜物性を制御可能で機能発現との因果関係が明確になる人工生体膜で、その膜張力を非侵襲で測定可能な手法を開発し、膜張力と生体膜特性の相関を得ることを目的とした。本研究は、膜組成を制御し膜タンパク質を導入できる平面状人工生体膜である黒膜と $\mu\text{N/m}$ オーダーの界面張力を非侵襲で測定可能なレーザー誘起表面変形分光法を膜機能分析法として融合することに特徴がある。従来の膜張力測定で問題点であった膜変形という外乱を排除することで、定量的な議論が可能となる。さらには光褪色後蛍光回復法(FRAP)法も併せることで、膜組成依存性や膜流動性に対する膜張力の影響を明らかにし、生体膜機能分析における新たな評価軸を創成することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、モデル生体膜として自立型脂質二重膜である黒膜を貼り合わせ法で作製し、膜の流動性と膜張力という二つの評価軸で測定を行った。膜張力測定はレーザー誘起表面変形分光法(LISD)により、流動性測定は光褪色後蛍光回復法(FRAP)による拡散係数測定により行った。図1に本研究で用いた LISD, FRAP の測定装置概要を示す。LISD の励起レーザーと FRAP の褪色用レーザーは共

通であり、一つの装置で LISD, FRAP の測定を両方行うことができるように構築した。

LISD 法では LISD では緑色レーザーの輻射圧による界面変形を赤色レーザー光で検出し、変形応答の周波数特性から膜張力を得る。輻射圧による膜変形を行うには脂質膜両側の屈折率が異なっていることが必要である。そこで本研究では、膜が隔てる2つの水相にスクロースとグルコースという異なる糖分子を溶解させることで、2相の糖水溶液の濃度差を維持したまま両水相の密度を変化させた。これにより2つの水相の屈折率が異なる値になり、輻射圧による膜変形が可能になった。

FRAP 測定においては蛍光プローブとして DiIC₁₆(3)を脂質膜中に導入して測定を行った。FRAP では緑色光で照明された蛍光像を冷却 CCD カメラで検出しながら、緑色レーザー光を集光して蛍光分子を褪色させ、褪色領域の蛍光強度の回復を測定することで拡散係数を求めた(図2)。脂質分子とコレステロールで構成された黒膜を貼り合わせ法で作製して試料とし、構築した装置を用いて膜張力と拡散係数のコレステロール濃度依存性・浸透圧依存性を取得した。

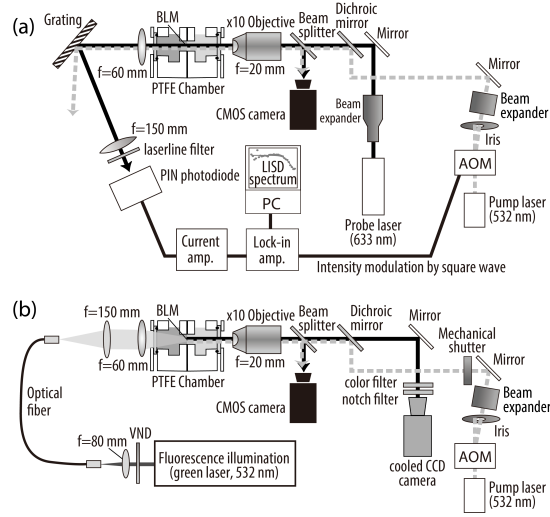


図1: 本研究で構築した(a) LISD, (b) FRAP 測定装置。LISD, FRAP に共通する励起用緑色レーザー光源としては 300mW の Nd:YVO₄ レーザーを使用し、共通の光学系・測定セルを使用することで条件を揃えたデータ取得を可能にした。

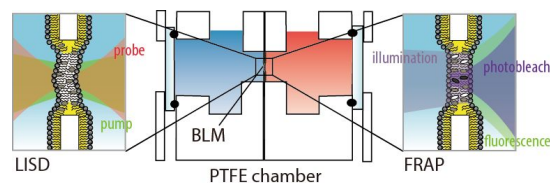


図2: 測定セル周辺の拡大図。左右の2つの水相内にグルコース・スクロースを溶解させることで屈折率差をつけて界面変形を可能にした。界面変形を行う際も、グルコース・スクロース濃度に差をつけて浸透圧を印加した。

4. 研究成果

脂質膜で隔てる2相の間に圧力差があると膜は曲がる。その状態で膜が維持されるためには、圧力差が膜張力によるラプラス圧と釣り合っている必要がある。従って曲率が大きくなると、膜自体が伸びて、膜の張力が増加することが予想される。このような膜変形の影響を最小にするためにはBLMの平坦性の評価が重要である。本研究では膜が隔てる2つの水相間の糖水溶液濃度に差をつけ、浸透圧を変化させることで膜の平坦性の評価を行った。黒膜を形成する分子として1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DOPC)とコレステロールを使用し、膜で隔てられた2つの水相の糖水溶液の濃度差を大きくすることで浸透圧印加した際膜張力変化を図2に示す。

黒膜を挟んだ2つの水相のどちら側の濃度が濃くなった場合も膜張力が増加する傾向が観測された。水相間の濃度差が大きくなると浸透圧が印加され、膜の変形が大きくなると考えられることを踏まえ、この結果は糖水溶液濃度に差がない場合膜が最も平坦であり、濃度差が大きくなり浸透圧が大きくなるにつれて膜も変形し、浸透圧と膜変形によるラプラス圧が釣り合うように膜張力も増加していることを示していると考えられる。また、こうして得られた膜張力は、他の方法で報告された値より100倍程度小さかった。これは、これまで報告されてきた膜張力測定結果がマイクロピペット吸引法による結果であり、袋状のベシクルを変形させて得られた値であるため変形の影響を伴うものであったためであると考えられる。すなわち本研究において、変形を伴わない平坦な脂質二重膜の膜張力が初めて得られたことになる。

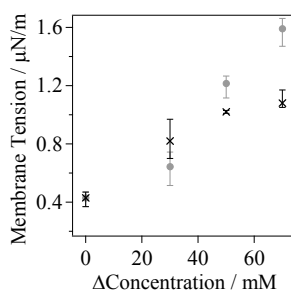


図3: DOPC/Cholesterolによる黒膜の両水相の糖濃度差を変え、浸透圧による変形を加えた際の膜張力変化。DOPC:Cholesterol組成比は8:2であり、グルコース、スクロースのうち一方の水溶液濃度を0.75 mol/Lに固定し、もう一方の糖水溶液濃度を0.75-0.82 mol/Lに変化させた。

次に、黒膜中のコレステロール濃度を変化させた場合の膜張力変化、拡散係数変化を図4に示す。コレステロールの割合が増加すると共に、膜張力の増加が観測された。これはコレステロールの増加により、脂質分子やコレステロール間に疎水性相互作用の強化が起

きているためであると考えられる。コレステロール割合の増加に伴って拡散係数が減少している点も、コレステロール増加に伴う疎水性相互作用の強化を反映していると考えられる。

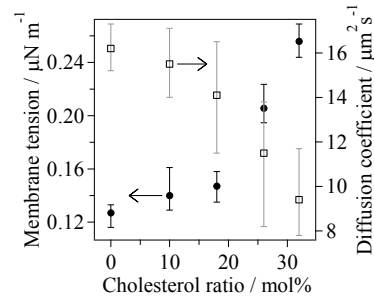


図4: DOPCとコレステロールで構成された黒膜のコレステロール割合と膜張力・拡散係数の関係。糖水溶液濃度はいずれも0.75 mol/Lである。

一方、膜を隔てる2相の糖水溶液濃度差を変えることで浸透圧印加した場合、濃度差増加/浸透圧増加により膜張力が増加したにもかかわらず、コレステロールの場合とは異なり、拡散係数の減少が見られた(図5)。これは膜張力の増加の要因が組成変化ではなく、膜変形による膜の引き伸ばしにあるからと考えられる。脂質の組成変化を伴うことなく脂質膜が引き伸ばされることで、水相からの脂質膜内への水分子の浸透が起きやすくなり、その結果脂質分子間の相互作用を下げる方向に作用したために膜の流動性が下がったのではないかと考えている。

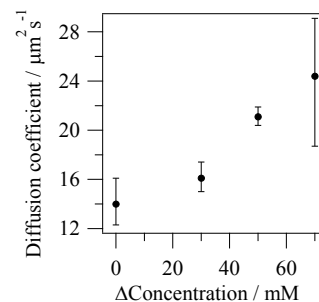


図5: DOPC/Cholesterolによる黒膜の両水相の糖濃度差を変え、浸透圧による変形を加えた際の拡散係数変化。DOPC:Cholesterol組成比は8:2であり、0.75 mol/Lのグルコース水溶液に対し、0.75-0.82 mol/Lのスクロース水溶液を使用した。

以上のように、本研究においてLISD法、FRAP法を黒膜に適用することで、膜の組成と膜張力、流動性の関係を定量的に評価することが可能になった。変形がなく平坦で、ゆらぎが大きく自然な状態の脂質膜の膜張力・流動性の系統的な評価例としても本研究は重要であり、今後の発展が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

1. "Motion modes of two self-propelled camphor boats on the surface of a surfactant-containing solution", Yuichiro Karasawa, Tomonori Nomoto, Luca Chiari, Taro Toyota, Masanori Fujinami, Journal of Colloid and Interface Science, 511, (2018), 184-192. 査読有
 2. "Assemblies of molecular aggregates in the blebbing motion of an oil droplet on an aqueous solution containing surfactant", Shoko Uemoto, Taro Toyota, Luca Chiari, Tomonori Nomoto, Masanori Fujinami, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 529, (2017), 373-379. 査読有
 3. "Effects of halide ions on the acceptor phase in spontaneous chemical oscillations in donor/membrane/acceptor systems", Kazuma Goto, Tomonori Nomoto, Taro Toyota, Masanori Fujinami, Journal of Colloid and Interface Science, 462, (2016), 351-358. 査読有
 4. "Measurement of membrane tension of free standing lipid bilayers via laser-induced surface deformation spectroscopy", Tomohiko Takei, Tatsuya Yaguchi, Takuya Fujii, Tomonori Nomoto, Taro Toyota and Masanori Fujinami, Soft Matter, 11, (2015), 8641-8647. 査読有
 5. "Changes in Interfacial Tension of a Lipid Membrane Formed at the Water/Chloroform Interface upon DNA Complex Formation", Masashi Ohno, Taro Toyota, Tomonori Nomoto, Masanori Fujinami, Analytical Sciences, 2015, 31(10), 979-986. 査読有
 6. "Interfacial tension in adsorption of lysozyme onto a lipid monolayer formed at a water/chloroform interface", Masashi Ohno, Taro Toyota, Tomonori Nomoto, Masanori Fujinami, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 480, (2015), 85-90. 査読有
- ### 〔学会発表〕(計12件)
1. 綿引靖人, Chiari Luca, 豊田太郎, 野本知理, 藤浪真紀, 液液界面におけるオレイン酸ナトリウム自走運動機構, 第77回分析化学討論会, 京都, 2017年.
 2. 藤井拓也, 武井智彦, 高橋昌裕, 野本知理, 豊田太郎, 藤浪真紀, レーザー誘起界面変形分光法による脂質二分子膜膜張力の膜組成および環境依存性, 日本分析化学会第65回年会, 札幌, 2016年.
 3. 伊香智史, 野本知理, 豊田太郎, 藤浪真紀, 三相系化学振動現象における油相電解質の役割, 日本分析化学会第65回年会, 札幌, 2016年.
 4. 唐澤悠一郎, 豊田太郎, 野本知理, 藤浪真紀, 水溶液表面での樟脳船集団運動の駆動力, 日本分析化学会第65回年会, 札幌, 2016年.
 5. Masanori Fujinami, "Self-propelled motion of oil droplet and camphor boat on an aqueous phase", The First International Conference on Multiscale Applications of Surface Tension, Brussels, Belgium, 2016.
 6. Satoshi Iko, Kazuma Goto, Tomonori Nomoto, Taro Toyota, Masanori Fujinami, "Role of interfacial tension of spontaneous chemical oscillation in donor/membrane/acceptor systems", The First International Conference on Multiscale Applications of Surface Tension, Brussels, Belgium, 2016.
 7. Masahiro Takahashi, Takuya Fujii, Tomohiko Takei, Tomonori Nomoto, Taro Toyota, Masanori Fujinami, "Membrane tension of free standing lipid bilayers by laser-induced surface deformation spectroscopy", The First International Conference on Multiscale Applications of Surface Tension, Brussels, Belgium, 2016.
 8. 上本頌子, 野本知理, 豊田太郎, 藤浪真紀, 油滴人工アメーバ運動における会合体挙動, 日本分析化学会第75回分析化学討論会, 山梨, 2015年.
 9. 伊香智史, 後藤和馬, 野本知理, 豊田太郎, 藤浪真紀, 水・油・水三相系化学振動現象における受容相液性依存性, 日本分析化学会第75回分析化学討論会, 山梨, 2015年.
 10. Masanori Fujinami, "Non-invasive Surface Tension Measurement by Quasi-Elastic Laser Scattering Method: Mechanism of Spontaneous Motion of the Oil Droplet on an Aqueous Phase", 29th Conference of the European Colloid & Interface Society, Bordeaux, France, 2015.
 11. Yuichiro Karasawa, Tomonori Nomoto, Taro Toyota, Masanori Fujinami, "Surface Tension Distribution around a Camphor Boat Moving Spontaneously on a Water Surface", 29th Conference of the European Colloid & Interface Society, Bordeaux, France, 2015.
 12. Satoshi Iko, Kazuma Goto, Tomonori Nomoto, Taro Toyota, Masanori Fujinami, "Spontaneous Chemical Oscillation Mechanism in water/oil/water system: Effect of chemical species in the acceptor phase", 29th Conference of the European Colloid & Interface Society, Bordeaux, France, 2015.

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤浪 真紀 (FUJINAMI, Masanori)

千葉大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：50311436

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

野本 知理 (NOMOTO, Tomonori)
千葉大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号：00510520

(4)研究協力者

キアリ ルカ (CHIARI, Luca)
千葉大学・大学院工学研究院・特任助教

綿引 靖人 (WATAHIKI, Yasuhito)
千葉大学・大学院融合理工学府・大学院生

高橋 昌裕 (TAKAHASHI, Masahiro)
千葉大学・大学院工学研究科・大学院生

藤井 拓也 (FUJII, Takuya)
千葉大学・大学院工学研究科・大学院生

唐澤 悠一郎 (KARASAWA, Yuichiro)
千葉大学・大学院工学研究科・大学院生

伊香 智史 (IKO, Satoshi)
千葉大学・大学院工学研究科・大学院生

武井 智彦 (TAKEI, Tomohiko)
千葉大学・大学院工学研究科・大学院生

上本 頌子 (UEMOTO, Shoko)
千葉大学・大学院工学研究科・大学院生

後藤 和馬 (GOTO, Kazuma)
千葉大学・大学院工学研究科・大学院生