

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18750021
 研究課題名(和文) 固体表面機能を活用した脂質二重膜の構造・物性・非対称性制御とその評価
 研究課題名(英文) Investigation and control of the structure, properties and asymmetric characteristics of lipid bilayers utilizing solid surface functions
 研究代表者
 手老 龍吾 (TERO RYUGO)
 分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・助教
 研究者番号：40390679

研究成果の概要：固体基板上に支持された脂質二重膜の構造・物性に固体表面が及ぼす影響について原子間力顕微鏡および蛍光顕微鏡を用いて詳細に調べた。水溶液中でも安定な、原子ステップとテラス構造からなる TiO₂ 表面およびその上での平面脂質二重膜の調整方法を確立した。脂質二重膜の形状変化および膜内の相分離構造に表面—脂質間相互作用と基板表面原子スケール構造が強く関わることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	1,700,000	0	1,700,000
19年度	1,200,000	0	1,200,000
20年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	210,000	3,810,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎科学・物理化学

キーワード：表面・界面物性、脂質、走査プローブ顕微鏡、二酸化チタン、蛍光顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

固液界面において固体表面上に支持された脂質二重膜、"supported planar bilayer (SPB)" (図 1)は壊れやすい脂質膜を安定化しなおかつ様々な表面科学的手法を適用することのできるモデル細胞膜系である。本研究課題開始時点においては基板としてガラス・マイカ等が用いられ、固体基板の影響はあまり考慮されていなかった。私は固体表面の化学修飾や加工についての研究を行っており、SiO₂/Si(100)表面の親水性が SPB 形成過程に強く影響することを見出していたため、固体表面物性が SPB に及ぼす影響について詳細

に調べることによって新規現象の発見に繋がるのではないかと感じていた。

2. 研究の目的

固体表面の性質が SPB に及ぼす効果とその要因を原子・分子レベルで解明するとともに

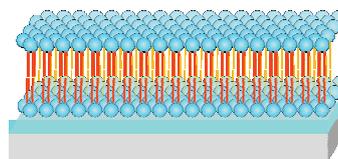


図 1. 固体基板上の平面脂質二重膜(SPB)。

に、固体表面機能を活用して脂質膜の構造物性の制御に繋げることが本研究の目的である。生命活動は細胞内外での情報・物質・エネルギーのやり取りで成り立っており、その授受は細胞膜と膜タンパク質を介して行われている。その際、「ラフト」に代表される脂質膜内の2次元ドメインや、膜厚、流動性、上下の単分子層膜での非対称組成など、脂質膜の構造と物性は細胞膜反応場を形成するために重要な役割を果たしていると考えられている。SPBにおいて固体表面物性がこれらの脂質膜物性と構造に及ぼす影響を詳細に理解することはSPBを人工細胞膜系として用いる際に重要であり、さらに表面修飾技術を活用して脂質膜の構造・物性制御に繋がると期待できる。

3. 研究の方法

(1) ステップ&テラス TiO₂(100)表面の調製とSPB形成

表面物性には粗さ、形状、表面化学種、電荷などさまざまな要因が挙げられるが、脂質膜との相互作用を詳細に調べるために単原子ステップと原子レベルで平坦なテラスからなる、TiO₂単結晶表面上のステップ&テラス表面を用いる。また、本研究においては脂質膜の自発的形狀変化を利用したSPB形成方法であるベシクル融合法によってSPBの作製を行う。この方法では表面物性や脂質膜の組成が平面膜形成の有無を決める要因となり得るので、用いる基板と脂質組成ごとにSPB形成のための最適な実験条件を探す必要がある。

(2) 原子間力顕微鏡および蛍光顕微鏡によるSPBの構造および相分離の観察

脂質膜の2次元ドメイン構造について、原子間力顕微鏡(AFM)と蛍光顕微鏡を用いて観察する。前者は数10 nm~数 μmの、後者は数 μm~10 μmの大きさのドメインを対象としており、両者を併用することで幅広いスケールの相分離現象を追跡することが可能である。いずれも緩衝溶液中で温度制御しながら観察することが可能であり、SPB作製から観察までを同一のセルで試料を大気に曝すことなく行うことができる。AFM観察ではドメイン構造の観察だけでなく、トポグラフ像から膜の厚さ、位相差像から膜の粘弾性に関する情報を得ることができる。

(3) 脂質膜の流動性評価

SPBにおいては固体基板と脂質分子が直接結合しているのではなく、1-2 nmの水の層を介して脂質膜が基板上に担持されている。そのためSPBの平面内を脂質分子が自由拡散することができる。蛍光標識脂質の拡散係数(D)を測定することでSPBの流動性を評価することができるので、SPB流動性への固体基板の影響を調べることができる。マクロな測

定手法である退色後蛍光回復(fluorescence recovery after photobleaching; FRAP)法および、蛍光標識脂質の拡散を直接観察する1分子蛍光追跡(single molecule tracking; SMT)法を行った。

4. 研究成果

(1) ステップ&テラス TiO₂(100)表面上でのベシクルから平面膜への形状変化

HF水溶液を用いたウェット処理と酸素焼成によってTiO₂(100), (001), (110)単結晶表面上に原子ステップとテラスから成る表面(図2)を再現性良く調製する方法を確立

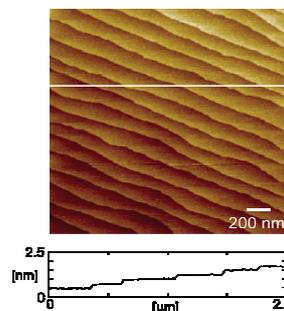


図2. ステップ&テラス TiO₂(100)表面。

した。この表面は水中でも最低1週間は安定であり、SPBの基板として用いることができる。ステップ&テラス TiO₂(100)表面上でのphosphatidyl- choline (PC)吸着ベシクルの形状変化について蛍光顕微鏡により調べた。懸濁液中のベシクルが固液界面で安定吸着ベシクル層を形成するか、平面膜へと形状変化してSPBを形成するかは懸濁液の脂質濃度、ベシクルサイズ、浸漬時間などの環境に大きく依存する。TiO₂(100)表面上で超音波破碎したベシクル(直径<100 nm)を用いた場合、脂質濃度と親戚時間に応じてSPB形成または安定吸着ベシクル層形成の2種類の不可逆な反応経路が存在することを見出した。一度安定吸着状態になったベシクルは、平面膜形成が進行する条件で再浸漬してもSPBへと形状変化しない。しかしながら、蛍光色素標識脂質(rhodamine-B labeled DOPE: Rb-DOPE, Ex 557 nm/ Em 571 nm)を励起する波長の光を照射することにより、平面膜形成を領域選択的に誘起されることを見出した(図3)。発光に使われなかった励起エネルギーの一部が分子運動すなわち熱エネルギーに換わるために形状変化が誘起されていると考えている。フォトマスクを通した光照射などによって、脂質膜アレイ作製へと応用できると期待できる。

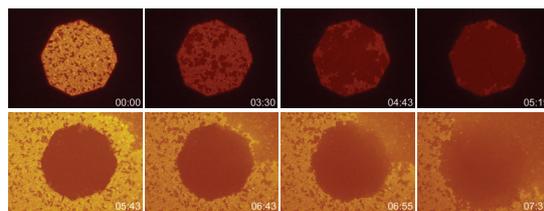


図3. 光誘起で進行する吸着ベシクルから平面脂質膜への形状変化。

(2) ステップ&テラス TiO₂(100)表面上に形成した SPB の相分離構造

図3がステップ&テラス TiO₂(100)表面上に形成した dipalmitoyl PC ($T_c=41^\circ\text{C}$)と dioleoyl PC ($T_c=-36^\circ\text{C}$)の2成分混合 SPB の AFM 像である(T_c はゲル-液晶相転移温度)。脂質の炭化水素がオールトランスにパッキングした DPPC リッチなゲル相が膜厚の大きいドメイン、ランダムに配向した DPOPC リッチな液晶相が膜厚の小さいドメインとして相分離している様子が観察される(図 4a)。ゲル相、液晶相ドメインのいずれにおいても、固体基板上的原子ステップ構造を反映したステップ上構造が観察された。この原子スケールの歪(~ 0.2 nm)は膜厚(~ 5 nm)の5%程度でしかないが、原子ステップに沿ったゲル相ドメインが多く観察されたことから(図 4a の白破線)、 μm オーダーでゲル相ドメインの形状に影響を及ぼしていることが見て取れる。1-2 nm の水の層を介して担持されている柔軟な脂質膜が固体表面の原子スケール構造を反映した構造を取るのには、TiO₂(100)上では表面力が強くはたらくことためである。固体/水溶液/脂質膜の3媒質系について近似を用いることなく厳密に Hamaker 定数を求めることにより、TiO₂(100)表面上での van der Waals (VDW)力を計算し、緩衝溶液中における基板-脂質膜間相互作用エネルギー(W)を距離の関数として下記の式からプロットした(図 4b) :

$$W = W_{\text{VDW}} + W_{\text{DL}} + W_{\text{hyd}}$$

ただし、 W_{VDW} 、 W_{DL} 、 W_{hyd} はそれぞれ VDW 力、電気二重層力、水合力に起因する相互作用エネルギーである。TiO₂(100)上でのポテンシャルの深さは一般に SPB の基板として用いられる SiO₂(100)やマイカの約20倍大きく、室温における膜の波うち運動に起因するエネルギー($W_{\text{undulation}}$)を上回る。この大きな相互作用エネルギーによって TiO₂(100)上では脂質二重膜が原子ステップ構造を反映した構造を保っているのだと結論した。

(3) 脂質膜の流動性評価

SPB 中での脂質分子の拡散係数(D)を評価するために、退色後蛍光回復(FRAP)のための実験系を構築し、解析用のプログラムを作成した。熱酸化により調整した SiO₂/Si(100)表面

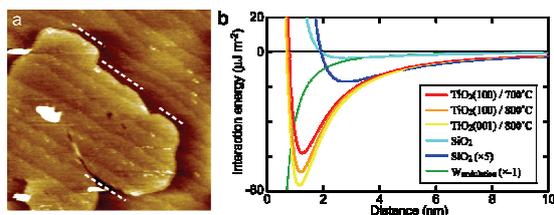


図 4. (a) ステップ&テラス TiO₂(100)表面上の DPPC+DPOPC-SPB 相分離構造の AFM 像 ($2.0 \times 2.0 \mu\text{m}^2$)。 (b) 水溶液中での固体基板-脂質膜間相互作用エネルギー。

上の 1%の蛍光標識脂質(Rb-DOPE)を含む DPOPC-SPB について FRAP 測定を行い、 $D=2.38 \mu\text{m}^2/\text{s}$ が得られた。

一方、TiO₂(100)上の SPB では、1層目の脂質膜の上に2層目の二重膜やベシクルが吸着しやすく、FRAP によって定量的に拡散係数(D)を測定することが困難であった。そこで、1分子蛍光追跡(SMT)法による脂質分子拡散の直接観察を試みた。従来の SMT 測定においては試料をのせたカバーガラスの背面から全反射条件で励起光を入射してエバネッセント照明を行うため、基板材料はガラスや石英に限られていた。励起光を斜照射して試料照明を行い、そのためのセルを作製することによって、基板の透明度・屈折率に依らずに SMT 測定を行うことのできる手法を確立した。図 5a, 5b がそれぞれ SiO₂/Si(100)および TiO₂(100)表面上の DPOPC-SPB 中の 1分子蛍光像である。輝点の動きをビデオレートで追跡し、その拡散距離の平均二乗変異(mean square displacement; MSD, $\langle r^2 \rangle$)の時間(t)に対するプロットを

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt$$

にあてはめることで拡散係数を求めた。SiO₂/Si(100)、TiO₂(100)表面上ではそれぞれ $D=1.52 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 、 $D=1.42 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であった。SMT 解析から D を求める際には100-400本の拡散軌跡について統計処理を行っており、そのための解析プログラムも自作のものを用いた。異なる種類の色素標識脂質(BODIPY-H-PC)を用いた場合も TiO₂(100)上での分子拡散は SiO₂/Si(100)上に比べて遅いことが示された。これはTiO₂上で非常に大きく作用するVDW力(図 4b)に起因するものかと考えている。

(4) 総括

本研究課題によって固体表面構造と SPB 中の分子挙動について原子・分子レベルでア

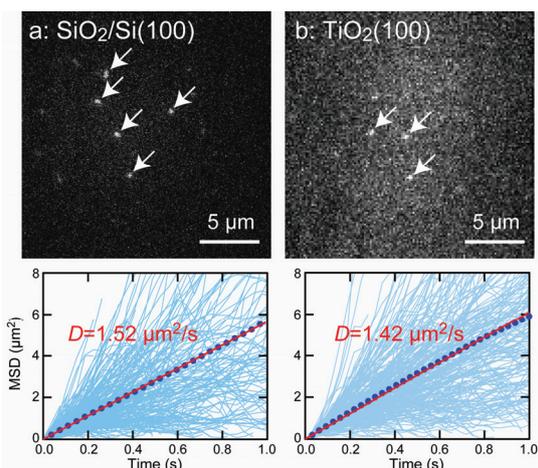


図 5. 励起光斜入射法により観察した(a) 熱酸化 SiO₂/Si(100)、および、(b)ステップ&テラス TiO₂(100)表面上の DPOPC-SPB 中の Rb-DOPE の 1分子蛍光像と、拡散距離の平均二乗変位の時間発展。

アプローチするための試料調整法と方法論の基礎を確立することができた。これまで生化学的に不活性なことだけが求められてきたSPBの固体基板について、その影響と役割に光を当てたことが新規現象を見出すことに繋がった。また、脂質膜の相分離構造が固体表面の原子スケール構造によって影響を受けうる、という現象は、固体表面の詳細な制御とキャラクター化の必要性を明確に示すとともに、表面微細加工技術を利用した新しい脂質膜反応場制御の可能性を期待させるものでもある。脂質膜の重要な性質として二重膜内での非対称性や複雑組成の脂質膜における相分離が挙げられるが、これらの観察・物性計測にまで本研究課題では至らなかった。人工脂質二重膜への表面科学的アプローチには多くの可能性と課題が残されており、これらについてはこれからの研究における課題としたい。

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 R. Tero, T. Ujihara and T. Urisu, "Shape transformation of adsorbed vesicles on oxide surfaces: Effect of substrate material and photo-irradiation", *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.*, accepted (査読有り).
- ② 古川一暁, 並河英紀, 村越敬, 森垣憲一, 手老龍吾, "支持膜 ~ 固体表面に支持した脂質二重膜 ~", *表面科学*, **30**, 印刷中 (2009) (査読有り).
- ③ 手老龍吾, "酸化物基板表面上での人工細胞膜の形成と構造評価", *Colloid & Interface Communication*, **34**, 19-22 (2009) (査読無し).
- ④ R. Tero, T. Ujihara and T. Urisu, "Lipid bilayer membrane with atomic step structure: Supported bilayer on step-and-terrace TiO₂(100) surface", *Langmuir*, **24**, 11567-11576 (2008) (査読有り).
- ⑤ 手老龍吾, 宇治原 徹, 宇理須 恒雄, "固体表面物性がサポータッドメンブレンの形成過程と構造に及ぼす影響", *表面*, **46**, 287-299 (2008) (査読有り).
- ⑥ R. Tero, T. Ujihara and T. Urisu, "Supported lipid bilayers membranes on SiO₂ and TiO₂: Substrate effects on membrane formation and shape transformation" (invited paper), *Proc. SPIE*, **6769**, 67690J-1-12 (2007) (査読有り).

[学会発表] (計26件)

<招待講演>

- ① 手老龍吾, "酸化物表面上の支持脂質二重膜内での分子拡散のその場観察", *電気通信研究所共同プロジェクト研究会「ナノ・バイオエレクトロニクスに関する研究」第12回*

情報バイオエレクトロニクス研究会, 2009年3月13日, 仙台・東北大

- ② 手老龍吾, "固体表面に担持された平面脂質二重膜への表面構造・物性と光照射の影響", *日本表面科学会中部支部研究会「MEMS・バイオと表面および界面」*, 2008年11月28日, 浜松・静岡大学

- ③ 手老龍吾, "原子ステップ TiO₂(100)表面上の平面リン脂質二重膜", *電気通信研究所共同プロジェクト研究会「ナノ・バイオエレクトロニクスに関する研究」第9回情報バイオエレクトロニクス研究会*, 2008年2月21日, 仙台・東北大

- ④ 手老龍吾, "Supported Lipid Bilayer の構造・物性への固体表面の影響", *第38回中野化学関係学協会支部連合秋季大会*, 2007年11月11日, 津・三重大学

- ⑤ 手老龍吾, "固体表面の構造と物性が supported planar bilayer に及ぼす影響", *第27回表面科学講演大会*, 2007年11月1日, 東京・東京大学生産研

- ⑥ R. Tero, "Supported lipid bilayer membranes on SiO₂ and TiO₂: Effects of substrate surface chemical species and atomic structures", *SPIE Optic East 2007*, 12 September 2007, Boston, MA, USA.

- ⑦ R. Tero, "Geometric and Chemical Effects of Substrate Surfaces on Supported Planar Bilayers", *1st International Symposium on Nanomedicine - from Basic to Applications - / 2nd Molecule-Based Information Transmission and Reception (ISNM&MB-ITR2007)*, 21 April 2007, Okazaki, Japan.

- ⑧ 手老龍吾, "固体基板上に堆積した脂質二重膜の構造: 固体表面の化学種および原子レベル構造の影響", *第22回ナノ・バイオテクノロジー研究会*, 2007年3月6日, 名古屋・名古屋工業大学

- ⑨ 手老龍吾, "固体表面上に堆積した脂質二重膜の形状および相分離構造の原子間力顕微鏡・蛍光顕微鏡観察", *平成18年度北海道大学低温科学研究所共同利用研究会「分子自己集合化過程のダイナミクス」*, 2007年2月24日, 札幌・北海道大学

<一般講演: 国際会議9件、国内学会8件>

[その他]

ホームページ等

http://groups.ims.ac.jp/organization/urisu_g/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

手老 龍吾 (TERO RYUGO)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・助教

研究者番号: 40390679