

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19091

研究課題名(和文) 生体膜機能と力学的特性との相関解明

研究課題名(英文) Mechanical properties and membrane tension of free-standing black 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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非侵襲で界面張力測定が可能なレーザー誘起界面変形分光法を膜張力測定に応用し、光褪色後蛍光回復法と併用することで、生体膜モデルの一つである自立型脂質二分子膜(黒膜)の組成・周辺環境が膜張力・流動性に及ぼす影響を評価するための測定手法開発を行った。黒膜中のステロール種の場合、その濃度増加に伴う膜張力増大と拡散係数の減少、およびステロール種依存性が明らかになった。黒膜周囲のアニオン効果についても、疎水性アニオンの存在により膜張力増加と流動性低下が起きることが明らかになった。今後、生体膜の機能と力学特性の関係を明らかにする手法としても本手法の展開が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では光圧を用いた非侵襲型界面張力測定法であるLISD法を膜張力測定に応用し、拡散係数測定法であるFRAP法と併せることで、従来法で必要だった接触や変形を伴うことなく脂質二分子膜の力学特性・分子間相互作用に対する組成・イオン種の影響評価が可能であることを示すことができた。これは組成・環境制御されたモデル生体膜における力学特性・分子間相互作用評価として重要であるだけでなく、今後より複雑な生体膜の機能と力学特性の関係評価においても本手法を応用できる可能性を示すものとして重要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, non-invasive measurement techniques of membrane tension and diffusion coefficients based on laser-induced surface deformation (LISD) spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) method are developed for studying self-standing bilayer lipid membranes (BLMs). In the cases of sterol effect in BLMs, increasing concentration of sterols in BLMs was found to increase membrane tension and decrease diffusion coefficients. Structural effects of sterols were also observed. In the cases of anion effects around BLMs, hydrophobic anion was found to decrease fluidity and increase membrane tensions. These results are important not only for composition/environmental properties of model cell membranes, it is a step to non-invasive mechanical property investigations of functioning cell membranes.

研究分野：分析化学

キーワード：生体膜 膜張力 人工脂質二分子膜 膜流動 コレステロール 光圧

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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、細胞や細胞内小器官の内外を隔てる隔壁であると共に、様々なイオンや分子等の物質輸送変換を担い、生理機能を多く有することで知られているが、その一方で、多種多様な分子を内包することから、個々の機能について物理化学的に検証するにはあまりに複雑である。それゆえ生体膜に存在する脂質や膜タンパク質を必要に応じて選択、再構成して作製した人工脂質二分子膜を生体膜モデルとすることで、種々の膜タンパク質の機能や電気化学的測定、蛍光観察など、様々な研究に活用されてきた。

これら生体膜モデルを構成する分子にはたらく力はファンデルワールス力、静電力、疎水力など比較的弱い力であるため、生体膜は外場に対して大きな変形や流動などの応答を示すソフトマター分子集合体としての特徴をもつ。従来からベシクルや Langmuir-Blodgett 膜など、様々な製法の生体膜モデルが使用されてきたが、作成法による形状、担持状態の違いから、同様の組成であっても力学的特性は必ずしも同じにはならない。生体膜の力学的特性は、その機能にも影響を与えることを鑑みるならば、組成や構造を制御可能な生体膜モデルを構築し、その力学特性と形状、膜機能、膜中の分子相互作用等の相関を知ることは、生体膜の機能発現メカニズム研究に新しい方向性を創出するものであるといえる。

### 2. 研究の目的

生体膜の様々な機能は、その力学的影響を大きく受けるが、夾雑物の多い実細胞では組成や形状の制御が困難であるために、実際の測定には組成や構造が制御可能な人工脂質二分子膜を構築し、膜張力などの力学特性と特性の相関をとる必要がある。そこで本研究では、生体膜モデルである自立型人工脂質二分子膜を形成し、光圧(輻射圧)により二分子膜の変形を誘起し非侵襲で膜張力を測定する計測系を構築すること、膜組成、膜変形、イオン濃度その他の方法で制御された膜の構造や機能変化を調べ、力学的特性との相関を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、生体膜のモデルとして貼り合わせ法により作製した自立型脂質二重膜(黒膜)について、膜の組成、および膜が接する水相組成変化が膜張力、膜の流動性に及ぼす影響についての評価を行った。膜張力測定にはレーザー誘起界面変形分光法(LISD)を用い、流動性測定には光褪色後蛍光回復法(FRAP)を用いた拡散係数測定を行うことで評価を行った。図1に本研究で用いた LISD, FRAP 測定装置の概要を示す。LISD の輻射圧生成と FRAP の蛍光褪色に使用した緑色レーザーは共通であり、測定セルも共通である。これにより蛍光色素添加以外の LISD, FRAP の測定条件を共通にした。また今回、張り合わせ法による黒膜形成の水面位置制御にシリンジポンプを使用することで、黒膜形成の再現性向上も行った。

LISD 法の膜張力測定では、レーザー照射の輻射圧による界面変形を赤色レーザー光で検出し、黒膜の変形応答の周波数特性から膜張力を得る。輻射圧は屈折率が異なる界面に光が照射されたときに発生する現象であるため、本研究では、分子量が異なる2種類の糖水溶液を黒膜で隔てることで屈折率差を生成し、輻射圧印加を可能にした。FRAP 法の拡散係数測定においては蛍光プローブとして DiIC<sub>18</sub>(3) を脂質膜に添加して測定を行った。FRAP 法では褪色用レーザーにより膜の一部の蛍光プローブを褪色させる。生成した褪色領域の様子を別のレーザーにより照明された蛍光像として冷却 CCD カメラで観察し、褪色量の回復時間から拡散係数を求めた。

黒膜調製には、脂質として室温で液晶相である DOPC を用いた。本研究では(1)脂質二分子膜に対するステロール類影響を評価するため、3種類のステロール(コレステロール、エルゴステロール、ラノステロール)を添加することで組成変化が膜張力・流動性に及ぼす影響についての評価を行った。また、(2)水溶液中のアニオン種が膜張力・流動性に及ぼす影響について評価を行うために、ホフマイスター系列のアニオン種(Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup>)を水相に添加し、膜張力・流動性に及ぼす影響についての評価を行った。

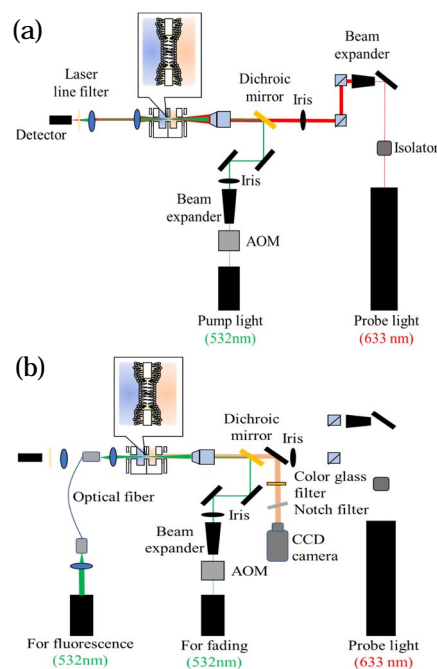


図1: 本研究における(a)レーザー誘起界面変形分光法(LISD)および(b)光褪色後蛍光回復法(FRAP)の測定装置概要。

#### 4. 研究成果

##### (1) 膜張力・流動性のステロール種依存性

コレステロールは細胞膜において膜を硬化し安定化させるほか、膜内外の情報伝達の間である、脂質ラフトの形成にも影響を与えることも知られている。一方、菌や酵母に含まれているエルゴステロールやコレステロールの前駆体であるラノステロールは、コレステロールと類似した構造を持つものの、細胞膜における生物学的機能はドメイン形成条件などの点で異なるといわれていることから、各々のステロール分子がどのようにして膜張力や流動性、膜構造に影響を及ぼし、膜における役割の違いに反映されているかは興味を持たれるところである。そこで本研究では黒膜のステロール濃度を変化させ、膜張力と流動性についての情報を得ることで、ステロールが膜物性に与える影響の評価を行った。

ステロール種の変化による膜物性への影響を評価するために、DOPC/ステロールの二成分膜を作製し、ステロール濃度を 0-33 mol% に変化させ FRAP 測定を行った。三種類のステロールについて、膜張力と拡散係数のステロール濃度依存性を図 2 に示す。いずれのステロール種においても、添加量増加と共に膜張力は増加し、流動性が低下する点は共通していた。これはステロールが脂質二分子膜を硬化させ、安定化させる役割を持つことを示すものである。一方、ステロール添加量に対する膜張力、流動性の変化量には差異もみられた。これは、各々のステロール種とリン脂質との相互作用の程度が異なるためと考えられる。ラノステロールはコレステロールと比較し添加量に対する流動性の変化が小さかったが、これはステロイド環に三つのメチル基を多く持ちかさ高くなることで、脂質二分子膜の炭化水素鎖との相互作用が弱くなったためと考察できる。一方、エルゴステロールでは濃度増加とともに流動性が速やかに低下していたが、これは脂質分子の炭化水素鎖との相互作用が強く、膜内の分子運動が効率的に抑制されている可能性を示すものである。以上から、室温で液晶相を示す DOPC 膜においてもステロールが膜の流動性を下げることが示され、また流動性への寄与が濃度によっても異なることも示すことができた。ステロール種の違いによる生体内での役割の違いがこうした膜物性の違いに起因する可能性も考えられる。以上の結果は生体膜に欠かせないステロールを含有した黒膜を作製し、非侵襲で膜張力測定が可能な LISD 法と膜流動性が測定可能な FRAP 法によって、ステロールが脂質二分子膜に及ぼす影響を定量的に評価したものである。

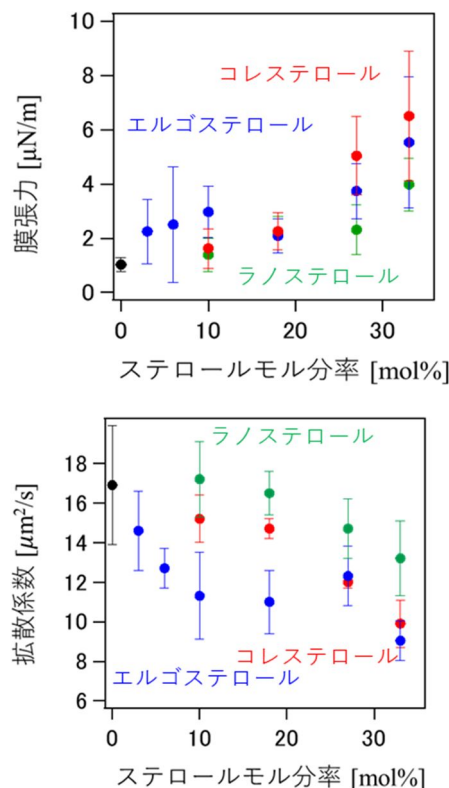


図 2: 膜張力(上)と拡散係数(下)のステロール濃度依存性

##### (2) イオン-生体膜間相互作用のアニオン効果

生体膜周囲に存在するアニオンについても膜物性や分子透過性に影響を与える因子の一つであり、疎水性の違いが異なる挙動をもたらす。本研究ではホフマイスター系列の各種アニオンのナトリウム塩を水相 (スクロース水溶液とソルビトール水溶液を用いた) に加えて、DOPC による脂質二分子膜を形成し、膜張力・流動性の評価を行った。

塩濃度 1.0 mol/L, 糖濃度 1.0 mol/L の水相における LISD 測定と FRAP 測定結果を図 3 に示す。疎水性アニオンになるほど膜張力が上昇し、拡散係数は減少した。水溶液中のアニオンについては、疎水性

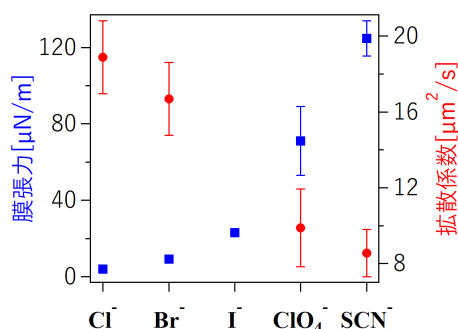


図 3: 膜張力(上)と拡散係数(下)のアニオン種依存性

アニオンほど両親媒性単分子膜へ接触吸着し、親水性アニオンほど膜の間に水を介在して両親媒性単分子膜へ離れて吸着すると考えられている。従って本研究において疎水性アニオンの膜張力の上昇と拡散係数の減少が観察されたのは、疎水性イオンの膜吸着によりイオン-生体膜間のクーロン相互作用が大きくなって膜が密になったことに由来すると考えられる。親水性アニオンによる結果も、アニオンと脂質間に水が介在して距離が遠いために、クーロン相互作用が小さくなり、膜がルーズにパッキングされたことによると考えている。本研究はアニオンの膜への吸着と、膜の流動性、膜張力について定量的な相関を得た初めての結果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomonori Nomoto, Masahiro Takahashi, Takuya Fujii, Luca Chiari, Taro Toyota, Masanori Fujinami	4. 巻 34
2. 論文標題 Effects of Cholesterol Concentration and Osmolarity on the Fluidity and Membrane Tension of Free-Standing Black Lipid Membranes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1237-1242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.18P200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Masanori Fujinami, Yasuhito Watahiki, Tomonori Nomoto, Luca Chiari, Taro Toyota
2. 発表標題 Experimental Approach to the Self-Propelled motion of a sodium oleate tablet and boat at an oil-water interface
3. 学会等名 32nd European Colloid & Interface Society Conference（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhito Watahiki, Tomonori, Nomoto, Luca Chiari, Taro Toyota, Masanori Fujinami
2. 発表標題 Mechanism of the self-propelled motion of a sodium oleate tablet and boat at an oil-water interface using the quasi-elastic laser scattering technique
3. 学会等名 32nd European Colloid & Interface Society Conference（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Yokoyama, Masahiro Takahashi, Takuya Fujii, Tomonori, Nomoto, Luca Chiari, Taro Toyota, Masanori Fujinami
2. 発表標題 Effect of cholesterol concentration on membrane tension and fluidity of free-standing black lipid membranes
3. 学会等名 32nd European Colloid & Interface Society Conference（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Luca Chiari, Tomonori Nomoto, Taro Toyota, Masanori Fujinami
2. 発表標題 Chemical oscillations in three-phase systems using the quasi-elastic scattering method
3. 学会等名 32nd European Colloid & Interface Society Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤浪真紀
2. 発表標題 液体界面における自走駆動粒子の運動駆動力
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 綿引靖人, 豊田太郎, Chiari Luca, 野本知理, 藤浪真紀
2. 発表標題 液液界面におけるオレイン酸ナトリウム集団運動機構
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野本知理, 豊田太郎, 藤浪真紀
2. 発表標題 表面对流および表面張力計測による水溶液表面における樟脳船自走運動機構の液性依存性
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊福健, Chiari Luca, 豊田太郎, 野本知理, 藤浪真紀
2. 発表標題 水表面におけるリキッドマーブルの自走機構
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----