

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22656007

研究課題名（和文）

生体膜／半導体アクティブデバイス基本構造の提案

研究課題名（英文）

Prototype of bio-membrane/semiconductor active device

研究代表者

宇治原 徹 (UJIHARA TORU)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：60312641

研究成果の概要（和文）：本研究では生体膜/半導体アクティブデバイスの基本動作のデモンストラーションとして、生体膜に光照射をして任意の位置に相分離ドメインの形成を行った。特にレーザー光照射によるパターンニングを行うために、より効率的にパターンニングが生じるための蛍光脂質組成および拡散係数の制御を行った。さらに、タンパク質凝集の可能性を調べるために、Annexin Vを導入したところ、ドメインの位置と Annexin V の存在位置が一致し、ドメイン制御によるタンパク質凝集制御が可能であることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：In this study, as a demonstration of the basic motion of a biomembrane / semiconductor active device, we performed the formation of the phase separation domains at arbitrary positions by light irradiation. In order to achieve patterning especially by laser light irradiation, fluorescence lipid composition and diffusion coefficient were optimized. Furthermore, in order to investigate the possibility of a protein aggregation, Annexin V was introduced. As a result, the fluorescence due to the Annexin V were observed at the same positions of domain structure. It suggested that the protein aggregation control by domain control was possible.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：結晶成長学

科研費の分科・細目：応用物性・結晶工学

キーワード：脂質二重膜、半導体デバイス、相分離構造

1. 研究開始当初の背景

細胞膜をはじめとする生体膜は、脂質分子、タンパク質などで構成されている。このような多元系の混合物は、環境によって相分離現象をしめす。実際に、様々な生体膜の機能においても、この相分離現象が大きな役割を果たしている。例えば、ラフト構造と呼ばれるコレステロールを多く含む相分離構造は、タンパク質の足場として働くと考えられている。我々は、この相分離現象に注目し、相分離ドメインの形成の制御を実現するため、半

導体による光や電荷の制御によって生体膜中の相分離構造の制御をし、それを介して生体膜の機能の制御を行うというデバイス、生体膜-半導体ハイブリッドデバイスを提案する。これまでの研究で、局所的な光照射により相分離ドメインを凝集させることに成功しており、それを発展させる。(図1)

2. 研究の目的

本研究では、次の二つの点でこれまでの成果を発展させることを目的とした。最初に、

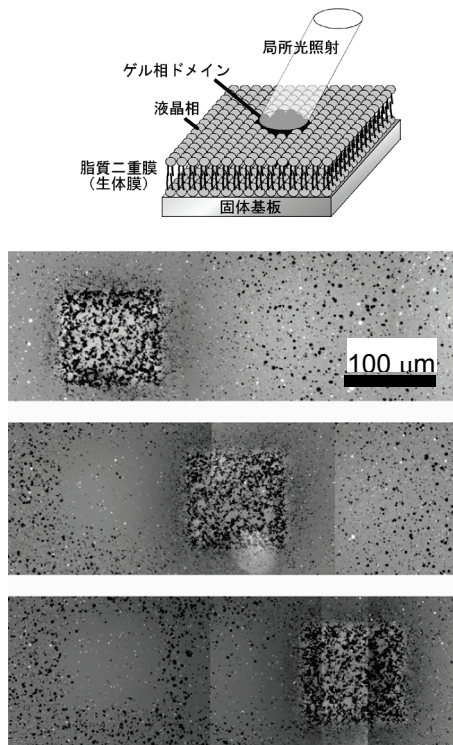


図 1 : Si 基板の上に展開した人工生体膜の相分離構造。光照射位置にゲル相ドメインが集中していることがわかる。さらに、光照射位置を移動することで、ドメイン位置も移動する。

半導体—生体膜ハイブリッドデバイスにこれまで、外部の光学系を用いて照射していた光を、局所光照射位置の制御可能な半導体発光デバイスで行うことで、半導体—生体膜ハイブリッドデバイスに発展させることをめざした。次にここで形成したドメイン構造に、タンパク質を凝集させることで、光パターンニングによるタンパク質の凝集、凝集位置の移動などが可能であることを示すことを目的とした。具体的には次の二段階で研究を進めた。

(1) 相分離構造のレーザーパターンニング手法の確立

ここでは、基板の上に脂質二重膜を形成させ、発光デバイスより光を照射することで相分離構造の制御を試みた。また、より生体に近い系での制御を行うため、ラフト構造形成に大きな影響を与えているコレステロールを含んだ三元系脂質二重膜の制御を目標とした。

(2) ドメイン構造へのタンパク質凝集の確認

先の結果を受けて、酸性リン脂質ドメインのパターンニングを行い、そのドメインにタンパク質が凝集されることを確認した。

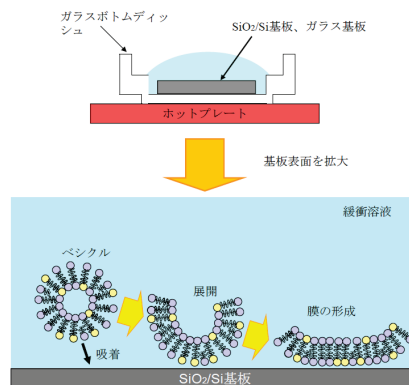


図 2 : ベシクルフュージョン法の概要。

3. 研究の方法

(1) 相分離構造のレーザーパターンニング手法の確立

本研究では、ベシクルフュージョン法によって基板の上に脂質二重膜の形成を行った。その概要を図 2 に示す。実験に用いた脂質には DMPC-DOPC (=1:1) に Texas Red-DPPE を 1 %、NBD-DOPE を 5 % 添加したものをを用いた。脂質二重膜は、ガラス基板の上に緩衝溶液とベシクル懸濁液を滴下し、45°C で 1 時間放置し、その後、室温付近まで降温することにより作製した。相分離ドメインのパターンニング実験は、試料を相分離温度以上である 45°C に昇温、保持して均一化を行った後、24°C に降温して、光を照射しながら、温度を 2°C まで降温し、その後蛍光顕微鏡で観察するというシーケンスで行った。

(2) ドメイン構造へのタンパク質凝集の確認

マイカ基板または表面を熱酸化した後、親水処理を行った Si 基板の上に、ベシクルフュージョン法で平面脂質二重膜を作製した。脂質組成は DMPS/DOPC (=20:80) に TR-DHPE を 1 mol% 加えたものをを用いた。蛍光顕微鏡を用いてその膜を観察した。光照射によるパターンニングは、膜を 45°C に保持して 1 分間光照射をした後、温度を 5 °C に下げることで行った。ドメインと蛋白質との結合を検証するために PS と選択的に結合する蛍光色素 (Alexa Fluor 488) 付きのたんぱく質 Annexin V をを用いた。

4. 研究成果

(1) 相分離構造のレーザーパターンニング手法の確立

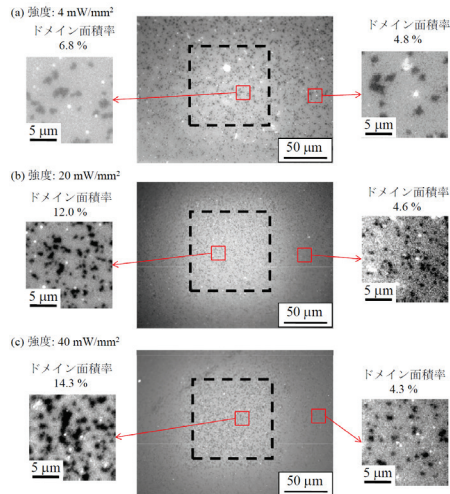


図 3： 光強度のゲル相面積率の関係(a)強度: 4 mW/mm²、(b) 強度: 20 mW/mm²、(c) 強度: 40 mW/mm²。パターンニングに用いる光強度の増加により、光照射領域内に凝集するドメインの面積率が增大している。

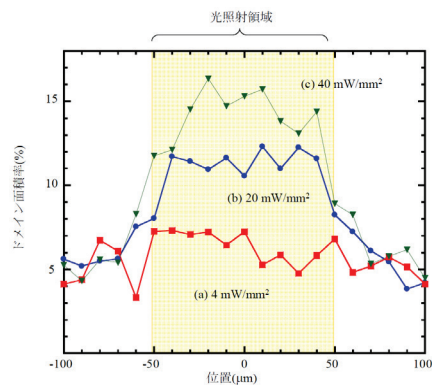


図 4： それぞれの光強度での、位置とゲル相ドメイン面積率の関係。

光照射によるドメインパターンニングのメカニズムは、次のように考えている。二種類以上の脂質からなる膜の場合、その種類によって分子のサイズが異なる。光照射を行うと、膜中の分子がそのエネルギーの一部を吸収して、局所的に温度が上昇する。その結果、局所的に熱膨張し、光照射位置とその周辺の境界付近で歪みが生じることになる。その際に、サイズが小さい分子が光照射位置に集中すると、全体として歪みが緩和されることになる。このようにして、光照射位置の脂質組成が変化し、相分離構造しやすくなると考えている。

このメカニズムによると、より効率的に相分離構造の凝集を生じさせるためには、次の3つが重要であると考えられる。一つは、照射光強度、次に、光を熱に変換する役割をする分子(この場合は Texas-Red DPPE) の量、

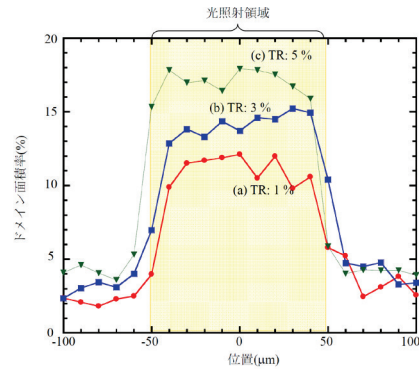


図 5： それぞれの蛍光濃度での、位置とゲル相ドメイン面積率の関係。全ての試料で、光照射領域内のゲル相ドメイン面積率が増加している。また、その面積率は TR 濃度の増加に伴って大きくなっている。

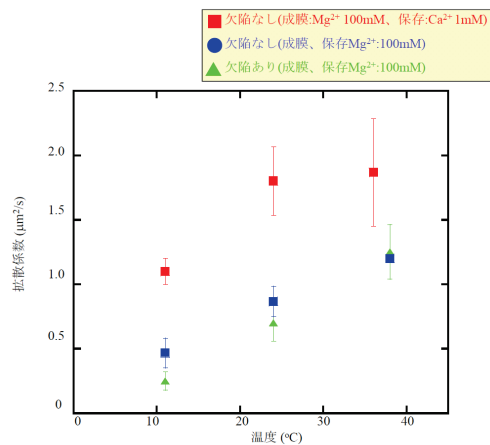


図 6： それぞれの成膜手法での、温度と拡散係数の関係。成膜には高イオン濃度緩衝溶液、保存には低イオン濃度緩衝溶液を用いることにより、拡散係数が大きく上昇している。

そして、膜中の分子の拡散係数である。

図 3 は、光照射によってドメインを凝集させたときの蛍光顕微鏡像である。それぞれ、異なる光強度による結果を示している。いずれの場合も、光照射位置におけるドメイン量が、光を照射していないところと比較して多いことがわかる。また、その差は光強度を増加させるに従って大きくなっていく。図 4 から、光強度が 4 mW/mm² の場合は、光照射領域内外でドメイン面積率は大きく差がないのに対し、光強度が 20 mW/mm² および 40 mW/mm² の場合は、光照射領域内でドメイン面積率が増加しており、ドメインの凝集が起こっている。また、光強度の増加に伴って、光照射領域内のドメイン面積率が高くなっており、光強度を大きくすると、凝集する

ゲル相ドメインを増加するということが分かる。

図5は蛍光分子の濃度を変化させたときのドメイン率の変化であるが、こちらについても蛍光濃度の増加に伴い、凝集率も増加している様子がわかる。

次に、拡散係数の増大によるドメイン凝集の影響を調べた。拡散係数については、膜中の欠陥（主にポイド）の密度と、緩衝液中のイオンの影響の観点から調査を行った。ポイドに関しては、脂質膜の密度が低い場合、温度を下げていく過程の熱収縮により形成される。そこで、従来は、成膜後「降温前」に行っていた余剰ベシクル除去を「降温後に」することで、ベシクルが熱収縮による欠陥を埋めるようにした。その結果、欠陥を減少させることに成功し、拡散係数も上昇した。(図6) また、脂質二重膜が保持されている緩衝液中のイオン濃度も拡散係数に影響を及ぼすことが知られており、それについても考慮したところ、緩衝液中のMgイオンを取り除き、代わりに微量のCaイオンを導入することでさらに拡散係数が増加させることに成功した。

このように最適化した膜や照射条件を参考にして、脂質二重膜に対し、レーザーパターニングを行ったところ、図7のように照射領域内に黒点である相分離ドメインが

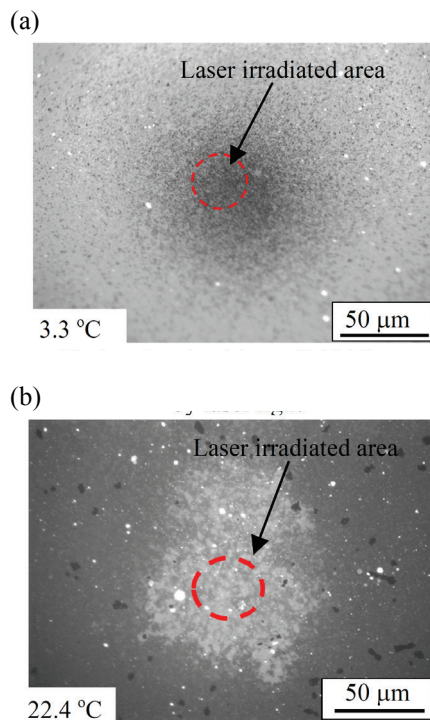


図7：レーザー照射によってパターニングしたドメイン構造。(a) 二元系脂質二重膜と(b) コレステロールを含む三元系脂質二重膜。

凝集している様子が観察された。また、より生体に近い系として、コレステロールを含んだ脂質二重膜のレーザーパターニングを行った。その結果も図7に合わせて示す。方に三元系脂質二重膜を用いた場合も、照射領域内に白い領域である相分離ドメインが凝集している様子が観察された。この場合は、ドメインの凝集を観察するために、Texas-Red DPPEのほかにも、NBD-DOPEも同時に導入し、NBD-DOPEからの蛍光を観察している。この場合は、ドメインの位置にNBDが凝集しているため照射位置のほうが明るく見える。

(2) ドメイン構造へのタンパク質凝集の確認

次に、ドメイン構造へのタンパク質の凝集が可能かどうかを確認するために、DMPS/DOPC(=20:80)系の脂質二重膜に、PSに選択的に結合する蛍光体付タンパク質Annexin V, Alexa Fluor 488 Conjugateを導入して実験を行った。図8は、まず照射によりドメインの凝集を確認した結果である。DMPS/DOPC系においても、ドメインが凝集する様子が確認できた。次に、光凝集したドメインにAnnexin Vを導入する実験を行

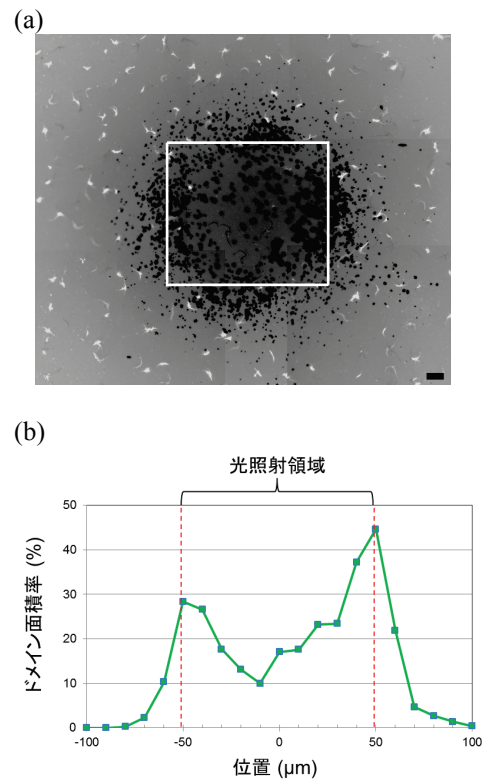


図8：DMPS/DOPC系における照射によるドメインパターニング。

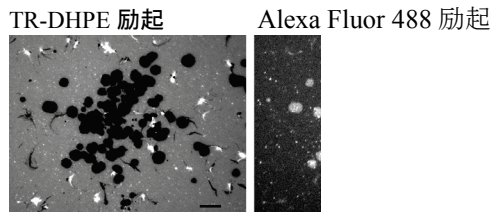


図 10： DMPS/DOPC 系のドメインにおける Annexin V の凝集。。

った。その結果、ドメイン位置での Annexin V の蛍光は観察できなかつた。しかし、さらに注意深く観察をおこなったところ、光照射を行っていない部分に形成されたドメインについては別の結果が得られた。図 9 は、ドメイン部分を Texas-Red および Alexa Fluor 488 からの蛍光を観察した結果を示す。Texas-Red の像から多くのドメインが形成されているのがわかる。また、Alexa Fluor 488 の像から、ドメインの位置に Annexin V が凝集していることがわかる。このことからドメインが DMPS リッチであるあり、さらに、ドメインを制御することで蛋白質の位置制御が可能であることが示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① Masashi Uchida, Toru Ujihara, Ryugo Tero, Yoshikazu Takeda, Laser light patterning on phase-separated domain in supported lipid bilayer, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 15-20 December 2010, Honolulu, Hawaii, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇治原 徹 (UJIHARA TORU)
名古屋大学・工学研究科・教授
研究者番号：60312641

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者

手老 龍吾 (RYUGO TERO)
豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・助教
研究者番号：40390679