

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 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：82118

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22740282

研究課題名（和文）細胞分裂の過程で形成される膜融合状態におけるナノ相分離構造

研究課題名（英文）Nano-domain formation on membrane fusion during cell division

研究代表者

山田 悟史 (YAMADA NORIFUMI)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・助教

研究者番号：90425603

研究成果の概要（和文）：生体膜の主成分であるリン脂質は平面状の脂質二重膜を自発的に形成する。本研究では細胞分裂に関連する特殊な形状を持つリン脂質であるフォスファチジルエタノールアミンが膜融合状態を作るメカニズムを探るために、これと反対の形状を持つ短鎖リン脂質と混合し、相殺効果によって膜融合状態の形成が抑制されることを明らかにした。また、短鎖リン脂質が膜の形態変化に及ぼす影響を調べ、相分離が重要な役割を果たすことを示した。

研究成果の概要（英文）：A phospholipid is a main component of biomembranes, and spontaneously form bilayer structure in water. In this study, the effect of a phosphatidylethanolamine, a phospholipid related with a cell division, was investigated from the viewpoint of molecular shape. For this purpose, the phosphatidylethanolamine was mixed with a normal phospholipid as well as a phospholipid with short hydrocarbon chains which has an opposite molecular shape to phosphatidylethanolamine, and it was found that the membrane fusion was suppressed by the short-chain lipid. Also, the effect of short-chain phospholipid on the membrane structure was investigated, and it was found that the structural transformation caused by the short-chain phospholipid was induced by the phase separation between normal phospholipids and short-chain phospholipid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学 - 生物物理・化学物理

キーワード：生物物理・脂質・自己組織化・量子ビーム

1. 研究開始当初の背景

生体膜は、リン脂質の二分子膜である脂質二重膜にタンパク質等の生体関連物質が埋め込まれた構造をしており、これらが巧妙に作用することによって生体機能が発現している。例えば、細胞分裂の際にリン脂質 PE が分裂溝の表面に局在化することが蛍光顕微鏡により観測されている。フォスファチジ

ルエタノールアミン(PE)は水に対して凸という分子形状をしているため、膜融合の際に現れるストークと呼ばれる接続部分の安定化に寄与している可能性がある。しかし、nmサイズの構造であるストークにおいて PE の配置を直接観測することは極めて困難であり、実際に PE が stalk 形成に果たしている役割は明らかになっていない。

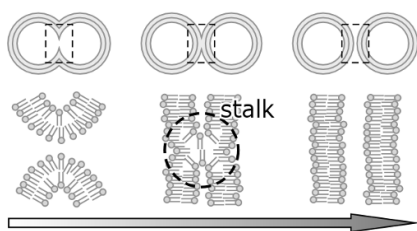


図 1: 脂質二重膜が分裂する際に形成されるストーク構造の模式図

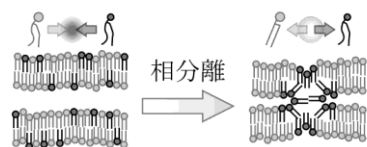
2. 研究の目的

研究開始当初、申請者は PE とは逆の形状を持つ短鎖リン脂質が膜の構造に与える影響について研究を行っていた。この短鎖リン脂質は二分子膜の縁をカバーすることができ、通常のリン脂質と混合すると脂質二重膜の小胞（ベシクル）表面における細孔形成や、ナノディスクへの変形を促進することを発見、さらにはこれが相分離に起因した現象であることが明らかになりつつあった。そこで、これと類似した現象がストーク形成においても生じているのではないかと考え、重水素化ラベリング法により各成分の色分けが可能な中性子散乱法を用いて相分離と面内構造形成の関連を解明する研究を開始した。

短鎖リン脂質は相分離により細孔形成を促進する



PEも相分離によってストークを安定化している？



中性子散乱実験により検証

図 2: 本研究の目的

3. 研究の方法

相分離と面内構造形成の関連、特に分子形状による差を確かめるために、通常のリン脂質であるジパルミトイルフォスファチジルコリン (DMPC) と短鎖リン脂質であるジヘキサノイルフォスファチジルコリン (DHPC)、および PE の一種であるジオレオイルフォスファチジエタノールアミンの 3 種類のリン脂質を混合した試料について、組成に対する構造変化の違いを測定した。実験は斜入射小角散乱法を用い、相補的なプローブである X 線と中性子の両方を用いることを試みた。斜入射小角散乱実験は基板に対して平行に積層

させた脂質二重膜を多次元観測することができるため、ストークのような面内構造を観察するのに適している。X 線による実験は台湾の National Synchrotron Radiation Research Center に適した実験装置があるためそれを用いるが、中性子に関しては適した装置が存在しない。申請者は世界最大級の陽子加速機施設である J-PARC の中性子源に中性子反射率計を建設中であったため、これを用いて斜入射小角散乱を行えるよう整備することとした。

また、これと平行して今までに進めていた短鎖リン脂質の相分離によって誘起されるベシクルの細孔形成やナノディスクへの変形について、メカニズムの詳細を理解すべく中性子小角散乱実験を行った。このケースでは水溶液中の無配向な構造を観察するため、斜入射小角散乱のような特殊な実験ではなく、通常の小角散乱が適している。そこで、東京大学物性研究所の大学共同利用を利用し、特に温度ジャンプ後の形状変化に着目して時分割中性子小角散乱実験を行った。

4. 研究成果

(1) 最初の実験として、基板上に作成した混合リン脂質薄膜の組成依存性について斜入射 X 線散乱を用いたナノ構造観察を行った。リン脂質の積層薄膜は湿度に応じて水を脱吸着することが知られており、特に PE を加えておくと膜間が狭まった時にストーク状の構造が形成することが先行研究により明らかになっている。本実験と先行研究の違いは、PE だけでなく短鎖リン脂質を混合していることで、これによって分子形状の効果が明らかになると期待できる。

図 3 に得られた測定結果について、代表的なデータを示す。まず、先行研究と同様に通常のリン脂質 (DMPC) と PE (DOPE) を混合した系 ($x=0\%$) では、膜間が狭いときに反射角方向 (上下方向) から外れたピークが観測された。これは脂質二重膜の面内方向に周期的な構造が現れていることを意味している。このピークは膜間が広がると消失することから、膜間距離が狭いときのみ現れるというストーク状態であることがわかる。一方、DMPC と短鎖リン脂質 (DHPC) を混合した系 (50%) では、0%とは逆に膜間が広いときのみ面内構造が形成されるという結果が得られた。短鎖リン脂質は細孔形成を促進することから、このピークは規則的に並んだ細孔によるピークではないかと推測される。そして、DOPE と DHPC を混合した系 ($x=33\%$) では膜間によらず面内構造に対応するピークが観察されなかった。これは DOPE と DHPC の形状が互いに相殺されることによって面内構造の形成が抑制されたと理解することができる。

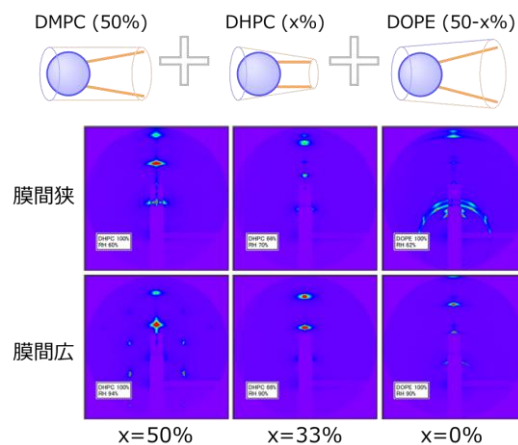


図 3: 斜入射小角散乱実験により得られた散乱プロファイル

(2) 研究目的の欄で述べたとおり、面内構造の形成において、リン脂質同士の相分離が重要な役割を果たしていると考えられる。中性子散乱は重水素化によってラベリングが可能のため、各成分を区別することによって相分離の構造観察が可能である。そこで、中性子を用いた斜入射小角散乱実験用に中性子用の調湿装置を製作し、実験を行った。しかし、中性子のビーム強度は X 線と比較して非常に弱く、世界最大の陽子加速器施設である J-PARC の大強度ビームをもってしてもシグナルを得ることができなかった。現在、これに変わる方法として基板と垂直方向からビームを入射する小角散乱実験を検討している。こちらの方法でもビーム強度が弱いという条件は同じだが、中性子は物質に対する透過力が高いため、試料を何枚も積層することによって散乱強度を稼ぐことが可能である。

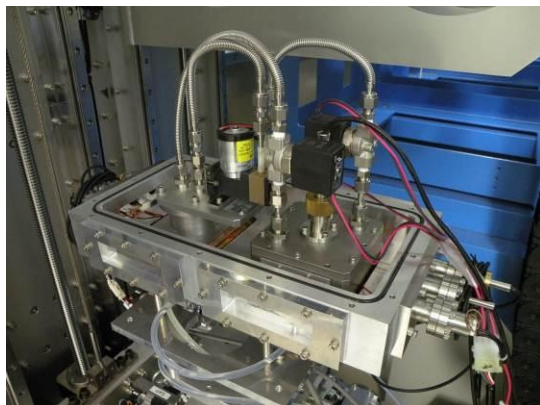


図 4: 中性子斜入射小角散乱実験用に作成した調湿セル

(3) リン脂質による脂質二重膜の形状変化と相分離の関係を明らかにするために、通常のリン脂質 DMPDC と短鎖リン脂質 DHPC の混合水溶液中における膜の形態変化を中性子小角散乱実験により調べた。DMPDC と DHPC の混合

系は室温で直径数十 nm のナノディスクを形成するが、これを高温にするとナノディスクが融合して単層膜ベシクルへと形態変化する。一般的に相分離の強さは相転移温度からの温度で決まるため、ベシクルサイズの温度依存性を調べたところ、一度高温にしてから徐々に温度を下げていくと、不連続的にベシクルサイズが変化することが分かった。この現象について詳しく調べるために、その変形過程を時分割中性子小角散乱実験で調べたところ、ベシクルサイズの変化が起きる前にまず細孔の形成が始まり、ある温度を超えるとベシクルからナノディスクへ変形すること、ただしこのナノディスクは不安定なため互いに融合し、最終的にはさらに大きなベシクルへと変形することが明らかになった。これら一連の現象は膜が曲がることによるペナルティー、膜の縁によるペナルティー、そして相分離による縁の安定化を考慮することにより説明することができ、膜の変形過程において相分離が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

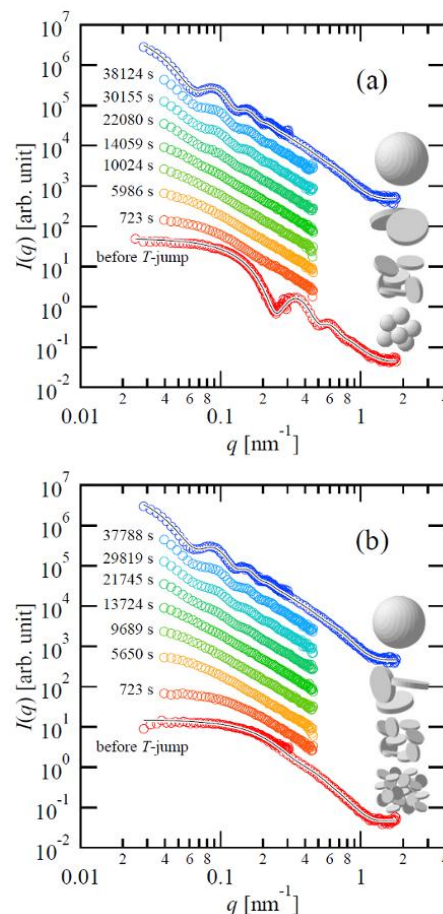


図 5: 時分割中性子小角散乱実験により得られたリン脂質ナノディスクを介した単層膜ベシクル形成過程

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 1 件)

- 1) N. L. Yamada, "*Kinetic process of formation and reconstruction of small unilamellar vesicles consisting of long- and short-chain lipids*", *Langmuir* **28** (2012) 17381-17388. 査読あり
DOI: 10.1021/la3026842

[学会発表] (計 8 件)

- 1) N. L. Yamada, "*Horizontal type neutron reflectometer SOFIA at BL16 in J-PARC/MLF*", 1st Asia-Oceania Conference on Neutron Scattering, EPOCHAL TSUKUBA, Tsukuba, Japan, Nov./22/2011.
- 2) 山田悟史, 試料水平型中性子反射率計 SOFIA, 日本物理学会 2011 年秋季大会, 富山大学五福キャンパス, 2011 年 9 月 22 日.
- 3) N. L. Yamada, "*Horizontal type neutron reflectometer at BL16 in J-PARC/MLF*", 5th European Conference on Neutron Scattering, Clarion Congress Hotel Prague, Prague, Czech Republic, Jul./18/2011.
- 4) 山田悟史, 試料水平型中性子反射率計 ARISA-II の高 S/N 化(2), 日本物理学会第 66 回年次大会, 新潟大学 五十嵐キャンパス, 2011 年 3 月 25 日.
- 5) 山田悟史, 高分子の排除体積効果によるベシクルの再構築, 日本中性子科学会第 10 回年会, 東北大学 片平キャンパス, 2010 年 12 月 11 日.
- 6) 山田悟史, 試料水平型中性子反射率計 ARISA-II のアップグレード, 日本中性子科学会第 10 回年会, 東北大学 片平キャンパス, 2010 年 12 月 10 日.
- 7) 山田悟史, 排除体積効果によるベシクルの再構築, 日本物理学会 2010 年秋季大会, 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス, 2010 年 9 月 25 日.
- 8) 山田悟史, 中性子反射率計 ARISA-II における多次元構造解析, 日本物理学会 2010 年秋季大会, 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス, 2010 年 9 月 24 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 悟史 (YAMADA NORIFUMI)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・助教
研究者番号: 90425603