

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13904

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23685003

研究課題名(和文) タンパク質を含む生体膜モデル反応場での脂質分子配向および反応活性の制御と検出

研究課題名(英文) Detection and control of molecular orientation and reactivity of biomembrane model reaction field including proteins

研究代表者

手老 龍吾 (Tero, Ryugo)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40390679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,300,000円、(間接経費) 5,190,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜反応において反応因子として働く脂質分子の活性構造を明らかにするための新しい生体膜モデル反応場の作製と実証を目指した。イノシトールリン脂質(PI)含有支持脂質二重膜(SLB)中に形成されるサブミクロンdepressionドメインとその周辺領域がそれぞれ、PI-SLB上での膜変形モジュールタンパク質の自己組織化反応において反応の起点として、その反応起点へのタンパク質の供給を行う領域として働く、ことを直接観察し、脂質膜内微小ドメインにおける役割分担を明らかにした。また、膜内分子状態の計測手法開発のために、グラフェン酸化物およびpolyvinyl chloride膜上へのSLB形成法を確立した。

研究成果の概要(英文)：I constructed a new biomembranes model system for the investigation of the active structures of lipid molecules which act as reactive factors of membrane proteins at cell membrane reactions. I fabricated a supported lipid bilayer (SLB) including phosphatidylinositol on mica substrate, and found that depression domains with 20 - 300 nm in lateral size and ~0.9 nm in depth in the PI-SLB. In-situ atomic force microscope (AFM) observation revealed that these submicron depression domains acted as the nucleation site of the self-assembly of F-BAR on the PI-SLB, a membrane deformation protein, and the surrounding region of the depression domains provided the F-BAR to the nucleation site. It is a novel result clearly showing the roles of submicron lipid domains during a protein reaction. I also established the fabrication methods of SLBs on graphene oxide and poly vinyl chloride membrane for the development of the methods to evaluate the molecular state and membrane properties in the SLBs.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：表面・界面 界面物理化学 脂質二重膜 原子間力顕微鏡 蛍光一分子観察

## 1. 研究開始当初の背景

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、脂質二分子層膜を基本構造とする細胞膜は複数の脂質分子が内膜・外膜に非対称的に存在し、「ラフト」に代表される2次元ドメインを形成することで膜タンパク質の足場となる反応場を提供していると考えられている。ある種の脂質分子がタンパク質の反応因子として働くことは知られているが、脂質分子がただ存在するだけでなく、クラスターやドメインなどの集合体を形成して特定の分子配向を取ることがタンパク質の反応に必要なことが示唆されている。その分子メカニズムを明らかにするためには、反応因子である脂質とタンパク質抽出して系に含めた人工脂質膜系を用いることが有効な方法であるが、人工脂質二重膜を用いた従来の研究は脂質だけの膜の性質を調べた物がほとんどであり、タンパク質の反応活性と脂質膜内の構造や分子状態にまで踏み込んだ物はほとんど存在しなかった。そこで、細胞膜反応における分子の運動と構造をその場観察するための新しい生体膜モデル反応場を構築することが必要であると考えた。

## 2. 研究の目的

人工脂質二重膜系の中でも固体基板上の支持平面脂質二重膜(supported lipid bilayer: SLB)を用いて、半導体材料基板の表面に作製し、脂質分子配向の制御と観察を通して反応因子として働く脂質分子の活性構造の決定を目的とした。イノシトールリン脂質や糖脂質といった反応因子として働く脂質を含む支持脂質二重膜に、実際に膜タンパク質やペプチドを導入することで、真に生体膜モデルとして機能する人工脂質膜系を固液界面に構築し、膜内のドメイン構造および脂質分子の状態とこれら生体分子への反応活性の関連を明らかにすることを目指した。また、脂質の分子配向制御や膜の電気的特性を計測するために電極埋め込み基板の作製と脂質二重膜形成を行うことを計画した。

## 3. 研究の方法

### (1)イノシトールリン脂質含有 SLB の作製

Phosphatidylinositol+phosphatidylcholine (1:1)含有脂質支持脂質二重膜(PI+PC-SLB)を、マイカおよび熱酸化 SiO<sub>2</sub>/Si 基板上にベシクル融合法により HEPES buffer (pH 7.4)中にて形成した。蛍光顕微鏡観察のために、脂質膜中での層分配係数が異なる2種類の色素分子、BODIPY-H-PC または DiI-C18 を P 混入して PI+PC-SLB を作製し、落射蛍光顕微鏡観察(epi-FM)または蛍光一分子追跡(single particle tracking: SPB)を行った。滝口(名大)らによって PI 含有脂質二重膜に対して in vitro で膜変形活性を示すことが知られている膜変形モジュールタンパク質 F-BAR を PI+PC-SLB に添加し、その自己組織化過程を AFM によっ

てその場観察した。F-BARは滝口金吾博士(名大)よりご提供いただいた。

### (2)SLB の観察

SLB 形成の有無や構造、流動性などを観察するために、原子間力顕微鏡(AFM)、epi-FM、SPT を用いた。全ての装置について、SLB の観察は全て緩衝液中で行った。SPT 計測には、通常の対物レンズ型の全反射顕微鏡観察に利用される倒立顕微鏡装置を用い、固体基板の透明度や屈折率に依存せず SPT 計測を行うための自作セルを用いて斜入射照明法によって行った。

### (3)グラフェン誘導体上への平面脂質二重膜形成

SLB への電場印加用の基板材料として、また膜内分子位置・配向計測のためのクエンチャー材料として、グラフェン酸化物(GO)を SLB の基板として用いるために、modified Hummer 法による GO 作製のための設備を立ち上げて、グラファイト粒子を原料として単原子層の GO を作製した。GO は熱酸化 SiO<sub>2</sub>/Si 基板上にドロップキャストすることで担持した。また、この担持後の GO をヒドラジーン水合物上に暴露することで還元処理を行い、還元 GO (reduced GO: r-GO)を調製した。得られた GO をよび r-GO を走査型電子顕微鏡 (SEM)、AFM および X 線光電子分光法を用いてフレークサイズと厚さ、酸素含有量を計測した。GO および r-GO 上への脂質膜形成にもベシクル融合法を用いた。

## 4. 研究成果

### (1)PI+PC-SLB 上での F-BAR 自己組織化過程の直接観察と膜内微小ドメインの役割

細胞膜を陥入させて細胞内へと物質を輸送する過程(エンドサイトーシス)には、細胞膜の形状を変形させる複数のタンパク質が関与している。F-BAR はそのような膜変形モジュールタンパク質の 1 つであり、精製した F-BAR を単独で人工脂質二重膜の加えるだけで膜変形活性を示し、脂質チューブを成長させることが報告されている。F-BAR が形状変化を起こす前段階の、脂質膜への吸着、膜上での拡散と会合体形成といった反応素過程を明らかにすることを目的とし、SLB 上での F-BAR の自己組織化過程を原子間力顕微鏡(AFM)を用いてその場観察することを目指した。F-BAR 反応には PI が必要であるため、PI+PC-SLB をマイカおよび SiO<sub>2</sub>/Si 基板上に作製した。SiO<sub>2</sub>/Si 基板上では一度形成された SLB が時間と共に膨潤・破裂する現象が観察されたため、少なくとも通常の実験を行う間は安定に存在できたマイカ基板上の PI+PC-SLB を用いた。AFM 観察により、PI+PC-SLB 内に横方向の大きさが 20-300 nm、深さが約 0.9 nm の微小 depression ドメインが観察された。SPT 計測をビデオレート(30 fps (frames per second)) - 最大 500 fps で行い、蛍

光標識脂質の拡散係数の時空間依存性を求めたところ、depression ドメインが誘起すると考えられる異常拡散現象が見出された。PI+PC-SLB 上に F-BAR を添加してその後の様子を AFM で連続観察したところ、F-BAR と考えられる吸着種が depression ドメイン上に優先的に吸着した、depression ドメインが飽和した後に depression ドメイン外の領域へと F-BAR 吸着領域が広がっていくことを直接見出した。SPT および AFM 観察の結果は、流動性の低いサブミクロン微小 depression ドメインが F-BAR の吸着および 2 次元ドメイン成長の起点として働き、ドメイン周辺の流動的な SLB 領域が depression ドメインへと F-BAR を供給していることを示唆している。F-BAR タンパク質の自己組織化過程において 2 種類の脂質領域の役割分担明確に示すことができた。

## (2) SLB 内分子計測技術の開発：グラフェン酸化物上の SLB

グラフェンは単原子 2 次元炭素シート材料であり、次世代電子デバイス材料としてだけでなく、光学的・物理的にも特異的な性質を示すことから近年バイオセンシングへの応用が始まっている。特にグラフェンおよびその誘導体であるグラフェン酸化物(GO)が示す蛍光クエンチ現象は、通常の分子間での蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)と比べて高効率かつ有効距離が長く、蛍光プローブの発光波長に依存しないという特徴を示す。このグラフェン蛍光クエンチを利用することで、SLB という厚さ 5 nm の微小空間内での分子位置情報を高精度に計測する新規手法の開発に繋がると着想し、本研究課題中で新たに取り組んだ。その端緒として親水・疎水領域がナノスケールで混在した両親媒的不均一表面である GO 上における、両親媒性分子の自己組織化構造である脂質膜の挙動について詳細に調べた。シリコン基板上にベシクル融合法によって 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) の平面膜形成を試みた。GO 上への平面膜形成は SiO<sub>2</sub>/Si 基板と比べて進行しにくかったが、緩衝液中に Ca<sup>2+</sup> 存在下でベシクル融合法を行うことによって GO 上に流動性を保った 1 層または 2 層の SLB を作製する方法を確立した。また、ヒドラジン-水和物蒸気を用いて条件を変えて還元度合の異なる r-GO を調製し、r-GO の還元度合によって脂質分子が平面二重膜、吸着ベシクル、単分子膜、二重膜/単分子膜積層構造といった多様な膜構造を自己組織的に形成することを見出した。

GO 上の SLB は蛍光クエンチのために SPT や fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) など通常の蛍光に基づく手法では流動性を計測することが難しい。そこで、蛍光色素分子よりも高輝度な蛍光プローブである量子ドット(Qdot)を SLB に標識して SPT 計測を行うことにより GO 上の SLB についての

物性計測を試みた。共有結合を介した SLB 上への GO 修飾についての条件検討を行い、GO 上での Qdot 一粒子の SPT 計測に成功した。GO 修飾条件についてはまだ最適化の余地はあるものの、拡散係数とその時空間依存性から、GO 上の SLB が最も一般的な SiO<sub>2</sub>/Si 基板上の SLB とほぼ同様の流動性を持つことが示された。

## (3) イオンイメージセンサ上への脂質二重膜形成

本学で澤田・服部らによって開発された電荷転送型イオンイメージセンサ(CCD-IIS)を基板として用いることにより、SLB への電場印加だけでなく膜物性の計測・評価にも用いることができると考え、CCD-IIS 上への SLB 形成を行った。Plasticized polyvinyl chloride (PVC) 膜はイオン選択性電極用材料として広く用いられており、CCD-IIS のセンサ部分を被覆するイオン感応膜材料としても用いられている。PVC 膜上への SLB 形成に関する報告は見つからなかったため、CCD-IIS 上への SLB 形成の端緒として PVC 膜への脂質二重膜の形成と流動性評価を行なった。可塑剤などを含む PVC の THF 溶液を Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Si 基板上にドロップキャストし、溶媒を蒸発させることで PVC 膜を作製した。蛍光標識脂質 (rhodamine B dipalmitoylphosphatidylethanol-amine (Rb-DPPE)) を 0.5% 混入した DOPC のベシクル懸濁液を調製し、ベシクル融合法により PVC 膜上及び熱酸化 SiO<sub>2</sub>/Si 基板上に脂質膜を作製した。脂質膜の流動性評価は走査型レーザー顕微鏡を用いて FRAP 法によって行なった。

Epi-FM によってベシクル融合法による脂質膜形成後の PVC 膜上には均一に見える平面脂質二重膜が形成されたことを確認した。FRAP の蛍光回復曲線から回復率と脂質分子の拡散係数(D)、拡散する脂質の割合(A)を求めたところ、PVC 膜上の脂質膜では約 30% の拡散しない脂質が存在していることが示された。拡散する脂質についての D は SiO<sub>2</sub>/Si 基板上の脂質分子よりも大きく、ジャイアントベシクルのような free-standing な脂質膜に近い D が得られた。

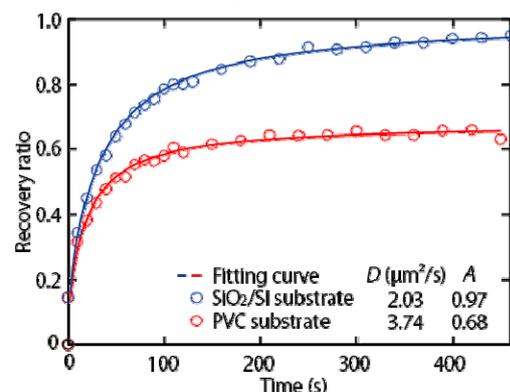


図 1. PVC 膜基板および熱酸化 SiO<sub>2</sub>/Si 上に形成した DOPC-SLB の FRAP 計測における蛍光回復曲線。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

<全て査読有り>

- 1). **R. Tero**, Y. Suda, R. Kato, H. Tanoue and H. Takikawa, "Plasma irradiation to artificial cell membrane system at solid-liquid interface", *Appl. Phys. Express*, in press (2014) [URL: <http://iopscience.iop.org/1882-0786/>].
- 2). T. Kobayashi, A. Kono, M. Futagawa, K. Sawada and **R. Tero**, "Formation and Fluidity Measurement of Supported Lipid Bilayer on Polyvinyl Chloride Membrane", *AIP Conference Proceedings*, **1585**, 145-152 (2014) [DOI: 10.1063/1.4866633].
- 3). S. Raveendran, N. Chauhan, Y. Nakajima, H. Toshiaki, S. Kurosu, Y. Tanizawa, **R. Tero**, Y. Yoshida, T. Hanajiri, T. Maekawa, P. M. Ajayan, A. Sandhu and D. S. Kumar, "Ecofriendly Route for the Synthesis of Highly Conductive Graphene Using Extremophiles for Green Electronics and Bioscience", *Part. Part. Syst. Charact.*, **30**, 573-578 (2013) [DOI: 10.1002/ppsc.201200126].
- 4). **R. Tero**, "Substrate Effects on the Formation Process, Structure and Physicochemical Properties of Supported Lipid Bilayers", *Materials*, **5**, 2658-2680 (2012) [DOI: 10.3390/ma5122658].
- 5). K. Tsuzuki, Y. Okamoto, S. Iwasa, R. Ishikawa, A. Sandhu and **R. Tero**, "Reduced Graphene Oxide as the Support for Lipid Bilayer Membrane", *J. Phys.: Conf. Ser.*, **352**, 012016 (7 pages) (2012) [DOI: 10.1088/1742-6596/352/1/012016].
- 6). Y. Okamoto, K. Tsuzuki, S. Iwasa, R. Ishikawa, A. Sandhu and **R. Tero**, "Fabrication of Supported Lipid Bilayer on Graphene Oxide", *J. Phys.: Conf. Ser.*, **352**, 012017 (6 pages) (2012) [DOI: 10.1088/1742-6596/352/1/012017].
- 7). **R. Tero**, G. Sazaki, T. Ujihara and T. Urisu, "Anomalous Diffusion in Supported Lipid Bilayers Induced by Oxide Surface Nanostructures", *Langmuir*, **27**, 9662-9665 (2011) [DOI: 10.3390/ma5122658].

〔学会発表〕(計 58 件)

<招待講演>

- 1). **R. Tero** "Artificial Lipid Membranes on Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide", *CRC (Catalysis Research Center) International Symposium, New Challenges on the Bio-interface: Structures and Dynamics*, Feb 5, 2013, Sapporo, Japan.
- 2). **R. Tero** "Single molecule/particle tracking in supported lipid bilayers on nanostructured substrates and graphene", *Engineering Lipid Bilayers 2012*, Sep 08, 2012, Leeds, UK.
- 3). **R. Tero** "Supported lipid membranes on graphene oxide and reduced graphene oxide", *Crystal & Graphene Science Symposium - 2012*,

Sep 05, 2012, Waltham, MA, USA.

- 4). **R. Tero**, G. Sazaki, T. Ujihara and T. Urisu "Tracking Single Molecular Diffusion at Oxide-Water Interfaces: Molecular Diffusion in Supported Lipid Bilayers on TiO<sub>2</sub>(100)", *International Symposium & The third Iwasawa Conference on Catalysis and Surface Sciences*, Dec 4, 2011, Xiamen, China.
- 5). **手老 龍吾**, "支持平面脂質二重膜を用いた脂質とタンパク質の動的挙動のその場観察", 第 64 回コロイドおよび界面化学討論会 2013 年 9 月 20 日, 名古屋・名古屋工業大.
- 6). **手老 龍吾**, "人工細胞膜中での脂質およびタンパク質の動的挙動の観察", 第 5 回 CIMoS(協奏分子システム研究センター)セミナー, 2013 年 9 月 10 日, 岡崎・分子研.
- 7). **手老 龍吾**, "グラフェン酸化物上への人工脂質膜プラットフォームの作製", 第 60 回応用物理学会春季学術講演会, 2013 年 3 月 27 日, 厚木・神奈川工科大.  
<一般講演>  
国際会議 28 件, 国内会議 23 件.

〔図書〕(計 6 件)

- 1). K. Tamada, X. Li, P. Wulandari, T. Nagahiro, K. Michioka, M. Toma, K. Toma, D. Obara, T. Nakada, T. Hayashi, Y. Ikezoe, M. Hara, S. Katano, Y. Uehara, Y. Kimura, M. Niwano, **R. Tero** and K. Okamoto, "Fabrication and Application of Plasmonic Silver Nanosheet", in *Reviews in Plasmonics 2010*, edited by C. D. Geddes (Springer, 2011), p. 139-157.
- 2). **手老 龍吾**, "シャボン玉のように作れる細胞膜モデル", *応用物理*, **83**, (応用物理学会, 2014), p. 136-139.
- 3). **手老 龍吾**, "脂質二重膜", *問題と解説で学ぶ表面科学*, 日本表面科学会編 (共立出版, 2013), p. 127.
- 4). **手老 龍吾**, 岡本 吉晃, ムアザム シャー, 岩佐 精二, サンドゥー アダルシュ, "グラフェン酸化物上への細胞膜モデル系の作製とその観察", *Molecular Electronics and Bioelectronics (応用物理学会有機分子・バイオエレクトロニクス分科会会誌)*, **24**, 93-96 (応用物理学会, 2013).
- 5). **手老 龍吾**, 出羽 毅久, "反応場としてのサポーテッドメンブレン", *生物物理*, **52**, 283-286 (日本生物物理学会, 2012).
- 6). **手老 龍吾**, 佐崎 元, 宇治原 徹, 宇理須 恒雄, "酸化物基板表面上の細胞膜モデルシステム: 支持平面脂質膜のダイナミクスと基板表面の影響", *Molecular Electronics and Bioelectronics (応用物理学会有機分子・バイオエレクトロニクス分科会会誌)*, **22**, 89-92 (応用物理学会, 2011).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.eiiris.tut.ac.jp/tero/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

手老 龍吾 (TERO, Ryugo)  
豊橋技術科学大学・環境・生命工学系・准  
教授  
研究者番号：40390679