

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24350012

研究課題名(和文) 生体膜の基礎計測：二次元反応場としての特性の解明

研究課題名(英文) Basic measurement of biomembranes: characterization as two-dimensional reaction field

研究代表者

岩田 耕一 (Iwata, Koichi)

学習院大学・理学部・教授

研究者番号：90232678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：化学反応場としての生体膜の特性を知るために、時間分解分光法を利用してリポソーム脂質二重膜中での熱拡散定数、粘度、および極性を評価する手法を開発した。脂質二重膜中に可溶化したtrans-スチルベンの振動冷却過程をピコ秒時間分解ラマン分光法によって測定し、脂質二重膜を構成するリン脂質の種類や脂質二重膜の温度によってエネルギー移動の効率が変化することを見出した。ピコ秒時間分解けい光分光法を用いて、脂質二重膜中には粘度が30倍から290倍異なる二種類の環境が存在することを結論した。脂質二重膜の特定の深さにおける物性を評価するためのけい光ホスファチジルコリンを新規に開発した。

研究成果の概要(英文)：We examine lipid bilayer membranes as a field of chemical reactions, by estimating their thermal diffusivity, viscosity, and polarity, with time-resolved spectroscopies. Picosecond time-resolved Raman spectroscopy of trans-stilbene solubilized in lipid bilayer membranes reveals that the rate of energy transfer changes when the phospholipid that forms the lipid bilayer or the temperature changes. Picosecond time-resolved fluorescence spectroscopy indicates that there are two environments with viscosity different by 30 to 290 times in the lipid bilayer membranes. We have developed new phospholipids by introducing fluorophores into phosphatidylcholines for examining the properties of lipid bilayer membranes at a fixed depth.

研究分野：分光物理化学

キーワード：生体膜 リポソーム 時間分解分光 ラマン 化学反応

1. 研究開始当初の背景

多数の生化学反応は、生体膜とその近傍で進行している。生体膜は、生物の生存にとって不可欠な構造体であるといえる。生体膜の特性を明らかにすることは、生命現象を理解する上で本質的な問題である。

化学反応が起こる場所としての生体膜は、多くの化学者が化学反応のために利用する溶液と比べるとかなり「特異」である。生体膜の主たる構成要素は脂質二重膜であるが、脂質二重膜は分子2個分の厚さしか持たない。脂質二重膜の内部は疎水的であるが、その外側は水相である。擬2次元系という特別な空間を構成する生体膜が、生きた細胞の中でどのような構造をとり、どのようなダイナミクスを示すかを解明することは、重要な問題であった。

本研究の研究開始時においては、化学反応の場としての生体膜を解明する研究はその途上であった。これは、生体膜が弱い分子間力をもとに形成されていることにも起因していた。この状況は、共有結合から成るたんぱく質や核酸などの生体高分子の研究が大きく進展してきたのと対照的である。しかし、生体膜が細胞の基本的構成要素であり、上述のように多くの生化学反応が生体膜とその近傍で進行することを考えると、化学反応場としての生体膜の基本性質を分子レベルで理解することは、研究開始時における喫緊の課題であった。

研究代表者は、ピコ秒時間分解ラマン分光法やフェムト秒時間分解近赤外分光法などの新たな分光法を開発し、それらの分光法を利用して凝縮相中での化学反応の機構を研究してきた。その過程で、溶液中でも部分的に秩序を維持しているミセル[1]やイオン液体[2]に注目し、それらが形成するメソスコピック構造が巨視的物性や化学反応に与える影響を議論してきた。これらの問題意識の自然な延長として、ミセルやイオン液体と同様に両親媒性物質を主成分とする生体膜の特性解明を着想した。研究代表者は、本課題を申請する2年前に学習院大学に異動したが、新しく研究室をつくる際の研究の柱の一つとして本課題の研究課題を選んでいった。

2. 研究の目的

溶液中の化学反応では、反応分子や生成分子の運動や衝突、エネルギー移動が化学反応の帰趨を左右する。本研究課題では、化学反応の「素過程」ともいべきこれらの分子運動やエネルギー移動が、擬2次元空間である脂質二重膜中ではどのように進行するかを調べることを目的とした。脂質二重膜のようにメソスコピック構造を有する系では、巨視的な物性と脂質二重膜内の微視的環境は当然ながら異なる。本研究では、脂質二重膜内における微視的な粘度、熱拡散定数、極性などの化学反応場としての基本的性質を、実験的に明らかにすることをめざした。

3. 研究の方法

室温の溶液中では溶質分子と溶媒分子が1ピコ秒の間に約10回程度「衝突」する。このため、運動の記憶は数ピコ秒の間に失われる。ゆえに、化学反応の機構を明らかにする際には、ピコ秒からサブピコ秒の時間領域での時間分解分光法が有力な実験法となる。特に、分子間エネルギー移動を直接観測できるピコ秒時間分解ラマン分光法[3]や化学反応の過程で原子核からの束縛が弱くなった電子を検出できるフェムト秒時間分解近赤外分光法[4]は、通常の溶液中の化学反応機構の解明の際には有力な実験法である。本研究課題でも、これらの先端的な分光法を駆使することで、脂質二重膜中に可溶化された分子の並進・回転運動や電子移動・エネルギー移動過程などを調べ、化学反応場としての生体膜の基礎的特性を明らかにすることにした。脂質二重膜中に可溶化するプローブ分子としては、*trans*-スチルベンやピアントリルなどを選んだ。これらの分子は、水には不溶であり、脂質二重膜の中央部にある疎水部に可溶化されている(図1)。

脂質二重膜の試料として、球状の脂質二重膜であるリポソームの水溶液を用いた。調整したリポソームの直径は約100 nmである。リポソーム脂質二重膜を構成する脂質としては、代表的なリン脂質であるホスファチジルコリン(PC)を用いた。ホスファチジルコリンの炭素鎖長および不飽和度を変化させることで、脂質二重膜の性質を系統的に変化させた試料を準備した。飽和したアシル基をもつDLPC(2個のアシル基の炭素数が両方も12個)、DMPC(14個)、DPPC(16個)、DSPC(18個)、不飽和のアシル基をもつDOPC(18個)、および天然由来のEgg-PC(卵黄ホスファチジルコリン、いくつかのPCの混合物)から成る脂質二重膜をそれぞれ分光測定のために用いた。

リポソーム脂質二重膜は、温度を変化させるとゲル相(低温側)から液晶相(高温側)への相転移を示す。リン脂質の炭化水素鎖を変えた6種類のリポソーム脂質二重膜の温度を変えながらこれらの脂質二重膜の分光測定を行い、相転移が脂質二重膜での化学反応に与える影響について検討した。

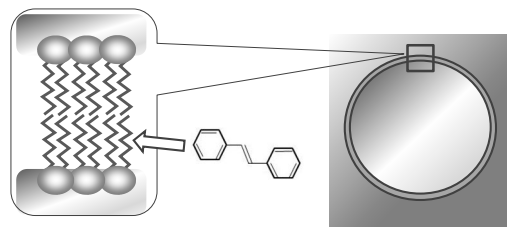


図1 リポソーム脂質二重膜中にプローブ分子(*trans*-スチルベン)を可溶化する様子を示した概念図。

4. 研究成果

(1) 時間分解ラマン分光測定による脂質二重膜内の熱拡散定数の推定

化学反応場としての脂質二重膜の微視的状态を観測するため、研究代表者らが以前に製作したピコ秒時間分解ラマン分光計を改造した。この分光計の光源部の主要構成要素である Nd:YLF レーザー（繰り返し周波数 1 kHz）を本課題の補助によって購入し、チタンサファイア再生増幅器を稼働させた。学習院大学に既設の光パラメトリック増幅器、分光器および CCD 検出器を組み合わせて、ピコ秒時間分解ラマン分光計を構成した。チタンサファイア再生増幅器からの出力を励起源とする光パラメトリック増幅器の出力光のスペクトル幅は 20 cm^{-1} 程度であって、フーリエ変換限界に対して大きい。そのため、回折格子を使った自作の 4f フィルターを使ってスペクトル幅を 10 cm^{-1} まで狭くした。

研究代表者の知る限り、ポンプ光とプローブ光を波長可変にしたピコ秒時間分解ラマン分光計を安定的に運用しているのは、現在世界で 3 グループにすぎない。本課題の研究によって、研究代表者が世界最高性能のピコ秒時間分解ラマン分光計を安定して運用することが可能になった。

ピコ秒時間分解ラマン分光計によって、脂質二重膜中に可溶化した *trans*-スチルベンの振動冷却過程を測定した。スチルベン分子を最低励起 1 重項 (S_1) 状態に光励起する際に、振動余剰エネルギーを与える。電子励起状態で振動励起されたスチルベンが冷却する様子を C=C 二重結合伸縮振動バンドの位置の変化によって検出した。図 2 に、DOPC リポソーム脂質二重膜中で測定した振動冷却曲線を示す。

これまでの研究で、 S_1 状態での *trans*-スチルベンの振動冷却速度は、溶液バルクの熱拡散定数と良い相関を示すことがわかっている[3]。脂質二重膜中に可溶化した *trans*-スチルベンの振動冷却速度を図 2 のようにラマン分光測定から決定し、振動冷却速度と熱拡散定数の関係を利用して 6 種類の室温の脂質二

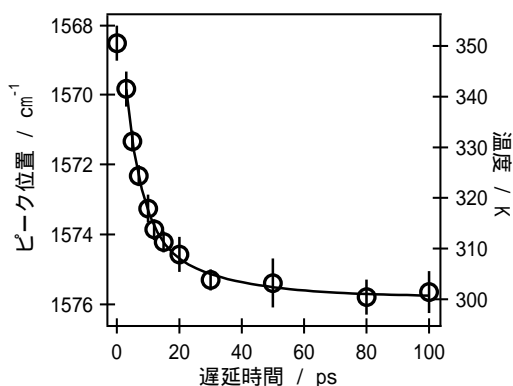


図 2 DOPC リポソーム脂質二重膜中での S_1 *trans*-スチルベンの冷却曲線。

重膜中での微視的な熱拡散定数を見積もった。さらに、24 付近で相転移を示す DMPC 脂質二重膜の熱拡散定数の温度依存性を 17 から 31 の範囲で推定した。これらの実験から、ゲル相の脂質二重膜の中よりも液晶相の脂質二重膜の中の方がエネルギー移動の効率が大きいことを見出した。実験に対応する初期条件と境界条件の下で熱拡散方程式の解を求め、実験の結果を説明した。

(2) 時間分解けい光分光測定による脂質二重膜内の粘度の推定

ピコ秒時間分解けい光分光法を使って、脂質二重膜中の粘度を見積もった。*trans*-スチルベンを S_1 状態に光励起すると、*trans*-体から *cis*-体への異性化反応が起きる。この光異性化反応の速度定数は、溶媒の粘度に依存して大きく変化する。本研究では、*trans*-スチルベンを脂質二重膜中に可溶化させて、そのけい光スペクトルを時間分解測定した。

けい光減衰の速度定数 k_f と光異性化反応の速度定数 k_{iso} の間には

$$k_{iso} = k_f - k_r$$

の関係が成り立つ。ただし k_r は放射減衰の速度定数である。測定した脂質二重膜中における *trans*-スチルベンのけい光減衰の速度定数 k_f と既知の k_r とから k_{iso} を求め、アルカン溶液について調べられている溶媒の粘度と k_{iso} との相関を用いて脂質二重膜内部の微視的な粘度を見積もった。

有機溶媒中においては *trans*-スチルベンのけい光減衰曲線は単一指数関数でよく再現される。しかし、脂質二重膜内部では *trans*-スチルベンのけい光減衰曲線は単一指数関数ではよく近似されなかった。DLPC 脂質二重膜中で測定した *trans*-スチルベンのけい光減衰曲線を図 3 に示す。図では、実測されたけい光減衰曲線が単一指数関数減衰ではなく二重指数関数減衰でよく近似されている。これは脂質二重膜内部に二種類以上の環境が存在することを示唆する。単一の PC で構成された 6 種類の脂質二重膜で同様な測定を行って脂質二重膜中の微視的な粘度を見積もったところ、脂質二重膜中には微視的な粘

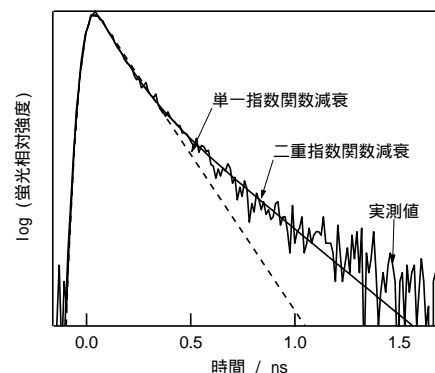


図 3 DLPC リポソーム脂質二重膜中で測定した *trans*-スチルベンの蛍光減衰曲線。

度が 30 から 290 倍異なる二種類の環境が存在することが推定された。回転緩和時間からの見積もりもこの結果を支持した。

これまで一種類の脂質からなる脂質二重膜は均一な構造をとると考えられてきた。しかし、今回得られた結果は、一成分のリン脂質から構成される脂質二重膜も微視的な粘度が数十倍異なる複数の環境を示すような不均一な構造をとり得ることを示している。

(3) 脂質二重膜内の特定の深さにおける粘度の推定

ピコ秒時間分解けい光分光法を用いて、脂質二重膜のある特性の深さでの粘度を見積もることを試みた。けい光プローブの脂質二重膜中での位置を制御するために、炭化水素鎖の一部をけい光発色団であるピレニル基で置換したリン脂質を化学合成して、このリン脂質を含んだリポソーム脂質二重膜を調製した。時間分解けい光スペクトルの偏光測定から、ピレニル基によるけい光の異方性が変化する様子を求め、脂質二重膜の中の特定の深さでの粘度を実験的に評価した。

けい光の異方性緩和の速度よりも測定が容易なけい光強度の減衰の速度から膜中の粘度を推定するために、DMPC の炭化水素鎖の一方に *trans*-スチルベンを導入したけい光リン脂質の合成も試みた。このけい光リン脂質の合成は難度が高く、作業には当初の予定より長い時間を要したが、最終的には目的の化合物を合成することに成功した。

(4) 時間分解近赤外吸収分光測定による脂質二重膜内での分子内電子移動反応の観測

光誘起による 9,9'-ピアントリルの分子内電子移動反応は、最も基本的な光化学反応のひとつである。その反応速度は、周囲の溶媒の極性によって大きく変化することが知られている。研究代表者らは、フェムト秒時間分解近赤外法を用いると、9,9'-ピアントリルの光誘起電子移動反応の様子を詳細に観測できることを示してきた[4]。本研究では、最初に 9,9'-ピアントリルを脂質二重膜中に可溶化した試料のフェムト秒時間分解近赤外吸収スペクトルを測定して、その結果から脂質二重膜中の微視的な極性について検討した。

本研究課題による補助によって、上述のピコ秒時間分解ラマン分光計の改造とともに、フェムト秒時間分解近赤外分光計の大幅な改良も行った。本研究の開始時に研究代表者らが利用していたフェムト秒時間分解近赤外分光計では、平成 12 年に購入した電子冷却方式の InGaAs アレイ検出器(256 チャンネル)を利用していた。本研究では、平成 25 年度に液体窒素冷却方式の InGaAs アレイ検出器(512 チャンネル)を購入して、旧来の検出器と交換した。その結果、検出感度を約 10 倍改善することができた。この大幅な改善によって、膜中に可溶化したプローブ分子

(濃度がバルク溶液に比べて小さい)のフェムト秒時間分解近赤外スペクトルを精度よく測定できるようになった。

研究協力者が合成した 9,9'-ピアントリルをリン脂質である DMPC および Egg-PC がつくくりポソーム脂質二重膜の中に可溶化し、この試料を照射した。照射によって 9,9'-ピアントリルで進行する分子内電子移動反応の様子をフェムト秒時間分解近赤外分光法で測定した。測定の結果、光励起されたピアントリルの電子状態が LE (局所励起) 状態から CT (電荷移動) 状態に変化する様子を追跡することができた(図 4)。この電子状態の変換を示す LE 状態の減衰の速度は、DMPC と Egg-PC では異なった。また、LE 状態の減衰には 2 種類の速度成分があることがわかった。LE 状態から CT 状態への変換の速度は、ピアントリル分子の周囲の極性によって大きく変化する。2 種類の速度成分が観測されたことは、脂質二重膜内の極性が均一ではなく、膜内に極性が異なる環境が複数存在することを示唆している。

本研究によって、フェムト秒時間分解近赤外分光法を利用することで、脂質二重膜中においても 9,9'-ピアントリルの分子内電子移動反応を追跡できることを示せた。今後脂質二重膜を研究する際の有力な実験法としてこの化学反応を利用できることを示せた。

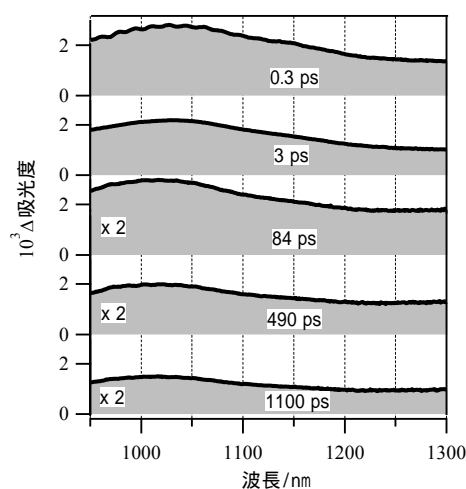


図 4 Egg-PC リポソーム脂質二重膜中で照射された 9,9'-ピアントリルの時間分解近赤外スペクトル。

<引用文献>

- K. Iwata and H. Hamaguchi, *J. Raman Spectrosc.* 29, 915 (1998).
- K. Iwata, H. Okajima, S. Saha and H. Hamaguchi, *Acc. Chem. Res.* 40, 1174 (2007).
- K. Iwata and H. Hamaguchi, *J. Phys. Chem. A* 101, 632 (1997).
- T. Takaya, H. Hamaguchi and K. Iwata, *J. Chem. Phys.* 130, 014501 (2009).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Shunnosuke Okino, Tomohisa Takaya, Koichi Iwata, “Femtosecond time-resolved near-infrared spectroscopy of oligothiophenes and polythiophene: Energy location and effective conjugation length of their low-lying excited states”, Chem. Lett., 査読有, in press. DOI: 10.1246/cl.150330.

Yuki Nojima, Koichi Iwata, “Viscosity Heterogeneity Inside Lipid Bilayers of Single-Component Phosphatidylcholine Liposomes Observed with Picosecond Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy”, J. Phys. Chem. B, 査読有, 118, 8631-8641 (2014). DOI: 10.1021/jp503921e.

Tomohisa Takaya, Koichi Iwata, “Relaxation Mechanism of β -Carotene from S_2 ($1B_u^+$) State to S_1 ($2A_g^-$) State: Femtosecond Time-Resolved Near-IR Absorption and Stimulated Resonance Raman Studies in 900-1550 nm Region”, J. Phys. Chem. A, 査読有, 118, 4071-4078 (2014). DOI: 10.1021/jp504272h.

S. Tachikawa, M. E. El-Zaria, R. Inomata, S. Sato, H. Nakamura, “Synthesis of protoporphyrin-lipids and biological evaluation of micelles and liposomes”, Bioorg. Med. Chem., 査読有, 22, 4745-4751 (2014). DOI:10.1016/j.bmc.2014.07.003

S. Tachikawa, T. Miyoshi, H. Koganei, M. E. El-Zaria, C. Viñas, M. Suzuki, K. Ono, H. Nakamura, “Spermidinium *closo*-dodecaborate-encapsulating liposomes as efficient boron delivery vehicles for neutron capture therapy”, Chem. Commun., 査読有, 50, 12325 - 12328 (2014). DOI: 10.1039/C4CC04344H.

C. Verdía-Báguena, A. Alcaraz, V. M. Aguilera, A. M. Cioran, S. Tachikawa, H. Nakamura, F. Teixidor, Clara Viñas, “Amphiphilic COSAN and I2-COSAN crossing synthetic lipid membranes: planar bilayers and liposomes”, Chem. Commun., 査読有, 50, 6700-6703 (2014). DOI: 10.1039/C4CC01283F.

〔学会発表〕(計 31 件)

Y. Nojima, T. Takaya, K. Iwata, “Thermal Diffusivity of Lipid Bilayer Membranes Estimated with Picosecond Time-resolved Raman Spectroscopy”, 3rd Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy, Sun-Moon Lake, Nantou, Taiwan, 2015 年 7 月 1 日 (水)

Goh Mohri, Tomohisa Takaya, Koichi Iwata,

“Photoinduced Electron-Transfer Reaction of 9,9'-Bianthryl in Liposome Lipid Bilayers Observed with Femtosecond Time-Resolved Near-Infrared Spectroscopy”, 2015 Korea-Japan Symposium on Frontier Photoscience, 2015 年 6 月 27 日, 済州市 (韓国).

Koichi Iwata, “Characteristics of Amphiphile Liquids Examined with Spectroscopic Methods”, International Workshop on Ionic Liquids and Related Materials, 2014 年 11 月 12 日, 東京工業大学 (東京都・目黒区).

Yuki Nojima, Koichi Iwata, “Local viscosity of phosphatidylcholine bilayer membranes estimated with picosecond time-resolved fluorescence spectroscopy”, SciX2014, 2014 年 09 月 30 日, レノ市 (米国).

Koichi Iwata, “Characterizing molecular assemblies with time-resolved Raman spectroscopy - lipid bilayer membranes, ionic liquids and loose electrons”, 24th International Conference on Raman Spectroscopy, 2014 年 08 月 14 日, イエナ市 (ドイツ).

Manping Ye, Setsuka Aarii, Takanori Uwabo, Tomohisa Takaya, Koichi Iwata, “Structure of ionic liquids examined with smaller probes”, 248th National ACS Meeting, 2014 年 08 月 10 日, サンフランシスコ市 (米国).

Yuki Nojima, Tomohisa Takaya, Koichi Iwata, “Energy transfer in liquid-crystal-phase and gel-phase lipid bilayers formed by six phosphatidylcholines. A picosecond time-resolved Raman study.”, 2014 Korea-Japan Symposium on Frontier Photoscience, 2014 年 6 月 23 日, ソウル市 (韓国).

Yuki Nojima, Tomohisa Takaya, Koichi Iwata, “Energy transfer characteristics of liposome lipid bilayers formed by six phosphatidylcholines examined with picosecond time-resolved Raman spectroscopy: difference between liquid crystal phase and gel phase”, 12th Trombay Symposium on Radiation and Photochemistry, 2014 年 1 月 09 日, ムンバイ市 (インド).

Koichi Iwata, “Basic Processes in Chemical Reactions Examined with Time-resolved Vibrational Spectroscopy”, Seventh International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, 2013 年 08 月 28 日, 神戸コンベンションセンター (神戸市).

Koichi Iwata, “Basic processes of chemical reactions studied with picosecond time-resolved Raman spectroscopy and femtosecond time-resolved near-IR spectroscopy”, The First

Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy, 2013年07月05日, 新竹市(台湾).

Yuki Nojima, Tomohisa Takaya, Koichi Iwata, "Energy transfer in phosphatidylcholine lipid bilayer membranes examined by picosecond time-resolved Raman spectroscopy", 16th International Conference on Time-resolved Vibrational Spectroscopy, 2013年05月24日, 別府湾ロイヤルホテル(大分県).

Yuki Nojima, Tomohisa Takaya, Koichi Iwata, "Interior of Lipid Bilayer Membrane Characterized with Time-resolved Spectroscopic Techniques", SPEC 2012 "Shedding New Light on Disease, 2012年11月12日, チェンマイ市(タイ).

Yuki Nojima, Tomohisa Takaya, Koichi Iwata, "Characterizing Liposome Lipid Bilayer Membranes with Picosecond Time-resolved Raman/fluorescence Spectroscopies", 10th Conference on Colloid Chemistry, 2012年8月30日, ブダペスト市(ハンガリー).

Koichi Iwata, "Lipid bilayer membranes and ionic liquids observed with fast time-resolved spectroscopy", Department Seminar, Department of General and Physical Chemistry, Pech University, 2012年8月28日, ペーチ市(ハンガリー).

Koichi Iwata, "Characterizing heterogeneous mesostructures with vibrational relaxation kinetics", 23rd International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS2012), 2012年8月14日, バンガロール市(インド).

[その他]

ホームページ等

<http://www-cc.gakushuin.ac.jp/~20040130/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩田 耕一(IWATA, Koichi)

学習院大学・理学部・教授

研究者番号: 90232678

(2)研究分担者

高屋 智久(TAKAYA, Tomohisa)

学習院大学・理学部・助教

研究者番号: 70466796

中村 浩之(NAKAMURA, Hiroyuki)

東京工業大学・資源化学研究所・教授

研究者番号: 30274434

(3)研究協力者

野嶋 優妃(NOJIMA, Yuki)

毛利 豪(MOHRl, Goh)

北村 捷(KITAMURA, Sho)