

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：82118

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25400434

研究課題名(和文)リン脂質ナノディスクの積層メカニズムとそれを利用した交互積層膜の作成

研究課題名(英文) Mechanism of stacking of phospholipid nanodisks and trial for manufacturing layer-by-layer made of nanodisks

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、生体膜を構成する主要な成分であるリン脂質が形成するナノディスクに着目し、交互積層膜(Layer-by-layer film)など機能性を付与したリン脂質膜の作成を目的とする。そのためには、リン脂質ナノディスク自体の構造形成メカニズムやリン脂質薄膜の基板上での積層メカニズムを理解することが重要である。この目的を達成するために、本課題は以下の4つの研究に取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：In this proposal, studies for understanding mechanism of stacking of phospholipid nanodisks and trial for manufacturing layer-by-layer made of the nanodisks was performed.

研究分野：ソフトマター物理

キーワード：表面・界面物性 自己組織化 量子ビーム ナノ材料

1. 研究開始当初の背景

今後の科学技術の発展において、ナノスケールの構造制御が最重要課題の一つであることは論を俟たない。特に、高分子、界面活性剤、液晶といったソフトマターが見せるナノスケールでの自己組織化構造は、ナノ構造制御を行う上での重要な鍵となる。例えば荷電高分子を利用すると、シリコンやガラスといった基板や荷電コロイドの表面に、正に帯電した分子と負に帯電した高分子をナノスケールで交互に積層した交互積層膜を作成できることが知られている[G. Decher, *Science* **277** (1997) 1232]。この交互積層膜は、帯電した表面に反対の電荷をもつ高分子を吸着させると過剰吸着により電荷が反転、さらに反対の電荷をもつ高分子を吸着させる、という作業を繰り返すことにより作成が可能で、溶液に繰り返し浸すだけでナノ構造を制御することができる。また、交互積層膜は機能性薄膜としての応用が期待されており、例えば材料を積層する順番を容易に制御可能な性質を利用して「外側から積層が徐々に剥離することによって順番に薬剤を放出するフィルム」といったインテリジェントな機能性材料の開発に向けた基礎研究が行われている[Y. Jang et al., *Macromolecules* **45** (2012) 3549]。ただし、これまでの交互積層膜の研究で主に使用されている高分子は、安定性に優れるものの、必ずしも生体適合性が高いとは言えないという課題が残されていた。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、生体膜の主成分であるリン脂質の複合体を用いて薄膜のナノ構造を制御する方法を提案することにある。リン脂質は生体膜の主成分であることからもわかるとおり生体適合性が非常に高く、その構造制御を行うことによって機能性材料への応用が期待できる。このようなモチベーションに基づく研究はこれまでも広く行われてきたが、本研究課題では特にリン脂質の複合材料に着目し、これを用いた基板界面におけるリン脂質薄膜の構造制御を目的とする。例えば、通常のリン脂質と短鎖のリン脂質を混合するとリン脂質のナノディスクを作成することが可能であり、この吸着挙動を利用することによって交互積層膜のような構造制御が可能になると期待できる。

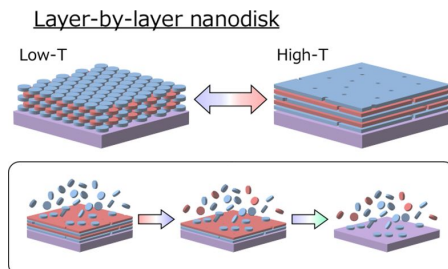


図 1: リン脂質ナノディスクを用いた交互積層膜のイメージ図。

また、リン脂質ナノディスクは適切な組成下において温度制御によりベシクルへと形態変化することが知られている。このベシクルは非常に単分散性が良いことから、これをモデル生体膜として利用するための研究についても検討を行った。

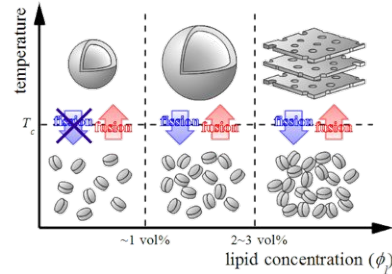


図 2: 長鎖リン脂質/短鎖リン脂質混合系における温度-リン脂質濃度相図。

3. 研究の方法

本研究課題で取り組んだ研究テーマは次の4つである。(1)リン脂質ナノディスク水溶液を基板と接触させた際の吸着挙動を中性子反射率法、および原子間力顕微鏡によって観察し、電荷による効果を明らかにする。(2)基板表面に積層したリン脂質二重膜の積層構造を水和させた際の膨潤・剥離挙動を中性子反射率法で観察し、特に塩化カルシウムの添加による「剥離転移」を利用した積層制御を目指す。(3)重合可能なリン脂質膜の基板上積層膜について斜入射X線小角散乱実験を行い、面内ネットワークが構造と揺らぎに与える影響を明らかにする。(4)リン脂質ナノディスクを元にした単層膜ベシクルを細胞内小胞のモデルとして利用し、タンパク質との相互作用による膜変形挙動を明らかにする。

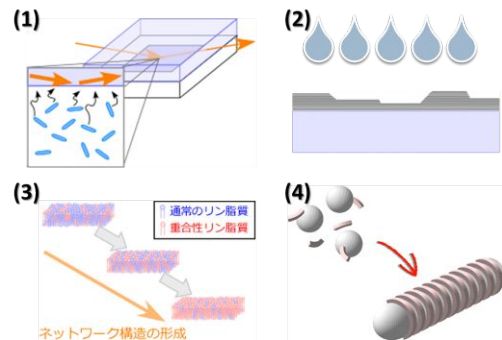


図 3: 本研究課題で行った実験の模式図。

上記の研究を行うにあたって、本研究課題では基板界面におけるナノ構造を観察するために主に中性子反射率法を用いた実験を行った。中性子線は物質に対する透過能が非常に高く、シリコン基板を通して液体を接触させた界面のナノ構造(深さ方向に対して界面から数 nm ~ 数百 nm の領域における散乱振幅密度分布)を観察することができる。つまり、リン脂質ナノディスクの水溶液を基板界面に接触させた際の吸着挙動をその場観察

することが可能で、本研究課題の目的に非常に良くマッチしている。また、中性子反射率法ではカバーできない測定として、表面の実空間像を観測するために原子間力顕微鏡を、面内構造を調べるために斜入射X線散乱法を、溶液中でのリン脂質の複合膜を観察するために中性子小角散乱法を用いた実験も併用し、リン脂質の薄膜を評価した。

4. 研究成果

(1) 基板界面におけるリン脂質ナノディスクの吸着挙動

当然だが、リン脂質ナノディスクが基板の表面に吸着するためには、ナノディスクと基板の間に相互作用が生じる必要がある。特に、静電相互作用はリン脂質ナノディスクのようなミセル水溶液が分散する際に重要な役割を果たすことから、基板への吸着においても鍵になることが予想される。そこで、本研究課題ではこの静電相互作用に着目し、荷電性のリン脂質を添加したナノディスクと基板表面にコーティングを施したシリコン基板を接触させ、基板界面におけるリン脂質ナノディスクの吸着構造を中性子反射率法により観測した。実験は大強度陽子加速器施設 J-PARC に設置された中性子反射率計 SOFIA を用いて行い、基板に垂直方向の運動量遷移 Q_z に対する反射率の変化を観測した。

図4に中性リン脂質であるフォスファチジルコリンのナノディスク水溶液に未処理のシリコン基板、および CH_3 末端、 NH_2 末端を有するシランカップリング剤で処理したシリコン基板に接触させた際の実験結果を示す。未処理の基板と CH_3 末端を有する基板は $Q_z=1.0 \text{ nm}^{-1}$ 付近にリン脂質の積層にピークを有する反射率プロファイルが得られる一方、 NH_2 末端を有する基板においては周期の大きな干渉が現れたものの、リン脂質が積層したような鋭いピークは観測されなかった。詳細な評価を行うためにフィッティングによる解析を施したところ、前者においては基板表面から繰り返し周期 d が約 6 nm のリン脂質二分子膜と水和層に対応する散乱振幅密度(中性子の屈折率に対応する)の変化が現れたのに対し、後者においては最表面にリン脂質二分子膜に対応する散乱振幅密度変化が現れた後、基板表面との距離に対して緩やかにリン脂質の密度が単調減少する奇妙な密度分布が観測された。この結果について、追加実験として水中原子間力顕微鏡によるフォースカーブ測定を行ったところ、 NH_2 末端を有する基板においてのみ、基板に探針を近づけた場合と基板に接触した後に探針を遠ざける場合とで、探針が感じる力が変化していることが明らかになった。これは、 NH_2 末端を有する基板の近傍では基板に吸着せずに漂っているナノディスクが存在しており、これらが探針と相互作用することによって履歴が生じたと考える事により、2つの実験結果を矛盾無く説明することが可能

である。

意外なことに、これらの実験結果はリン脂質ナノディスクに電荷を与えてもほとんど影響が無く、基板の処理方法が支配的であることを強く示唆している。交互積層膜は大量の電荷を有する高分子において用いられる手法であるが、この現象は高分子が自身の電荷を超えて逆電荷を帯電するオーバーチャージ効果によるものだと考えられる。一方、今回の結果によると基板界面のリン脂質においては電荷の効果はあまり大きくないと予想され、リン脂質ナノディスクのみで交互積層膜を作成することは困難であると考えられる。

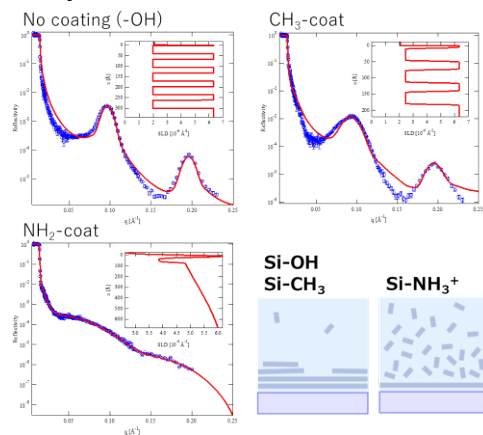


図4: 種々のコーティングを施したシリコン基板において、リン脂質ナノディスク水溶液と接触させた際の実験結果、および得られたデータから解釈される積層構造の模式図。

(2) 基板表面に積層したリン脂質二重膜の膨潤・剥離挙動

生体膜を構成するリン脂質には、親水部において負電荷を有するリン酸基に正電荷を有するコリンやアミンが結合し、全体の電荷がほぼゼロとなる中性リン脂質と、グリセリンやセリンが結合し、全体の電荷が負になる荷電リン脂質が存在する。単純にこれらのリン脂質を水和した水溶液系では、リン脂質の二分子膜がラメラ状の積層構造を形成し、その膜間距離は二分子膜間に働く van der Waals 引力、親水部の水和水による斥力、電荷によるクーロン力、膜の熱揺らぎに起因したエントロピックな斥力のバランスで決まることが知られている。特に、中性リン脂質で構成された系はクーロン力による斥力が働かない上、膜の曲げ弾性係数が高いため熱揺らぎによる斥力も弱く、約 4 nm の膜厚に対して 6 nm 程度の狭い繰り返し周期で積層する。一方、生体内には様々なイオンが存在しており、特に 2 価のカチオンはリン酸基に吸着しやすいことが知られている。例えば、中性リン脂質の二分子膜に塩化カルシウムを添加した場合、濃度が数 mmol/L を超えると、クーロン力が van der Waals 引力に打ち勝ち、膜間距離が無限大に発散する剥離転移が生じる。ただし、既存の研究はバルクのリン脂質水溶液において平衡状態の観察によ

るもので、基板界面での挙動を詳しく観測した例は無い。そこで本研究課題では、前述と同じく中性子反射率計 SOFIA を用いてシリコン基板上に作成したフォスファチジルコリンの積層膜を複数用意し、それらを濃度の異なる塩化カルシウム水溶液に接触させ、そこからの膨潤過程を観察した。いずれの塩濃度においても、水和前は $Q_z=1.2 \text{ nm}^{-1}$ 付近 ($d \sim 5 \text{ nm}$) に乾燥状態の繰り返し周期に対応するブラッグピークが現れ、それが水和に従って数秒～数十秒で $Q_z=1.0 \text{ nm}^{-1}$ ($d \sim 6 \text{ nm}$) まで徐々にシフトしていく様子が観測された。ただし、塩化カルシウム濃度が約 5 mM を超えた場合においては $Q_z=1.0 \text{ nm}^{-1}$ のピークは過渡的な構造で、一次転移的に $d > 15 \text{ nm}$ の長周期構造へとピークがジャンプする (d の値は塩濃度に依存する)。これは、先行研究で予測されていた静電相互作用による膜間距離のジャンプを非平衡下で初めて観測したものである。

その後、この新しいピークは数時間かけて徐々にシフトすると同時に、ブロードニングを起こしており、膜の膨潤と剥離が同時に進行していると考えられる。図 5 に塩濃度 10 mmol/L における終状態(浸漬後 2 日)の反射率プロファイルと解析結果を示す。初期の状態ではリン脂質積層膜の数は 100 枚を超えていると考えられるが、この結果はわずか 3 枚を残して剥離転移を起こしたことを示している。逆に言うと、この 3 枚は剥離転移を阻む何らかの相互作用によって残存していると考えられる。例えば、簡単な自由エネルギーの評価によると、基板とリン脂質膜の間に働く van der Waals 力を考慮すると、数枚のリン脂質膜が残存することが説明可能である。

基板の表面に指示されたリン脂質膜を作成する手法はこれまでも多数提案されてきたが、そのほとんどは単層の膜を積層させたもので、均一に数枚の膜を積層させた例は報告が無い。単層の膜だと基板の相互作用が強すぎるため、この方法によりその影響を緩和させられる可能性がある。

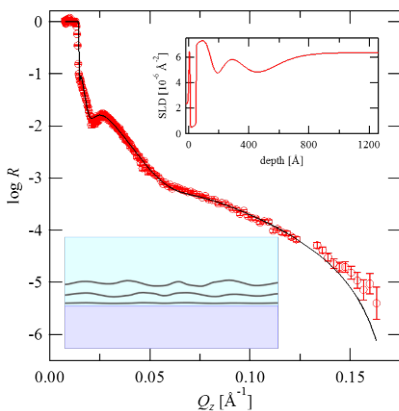


図 5: シリコン基板界面に作成したリン脂質積層膜を 10 mmol/L の塩化カルシウム水溶液で水和させた際の実験結果、および得られたデータから解釈される積層構造の模式図。

(3) 重合性リン脂質による面内ネットワーク

これまで、リン脂質の水溶液中で自発的に形成される脂質二重膜は生体膜のモデルとして精力的に研究が行われてきたが、しかしながら面内のネットワーク構造に着目した研究はほとんどない。そこで、本研究課題では重合性脂質 DiynePC を用いて脂質二重膜の面内にネットワーク構造を作成し、斜入射 X 線小角散乱実験による評価を行った。DiynePC は UV を照射することにより隣接する分子間で重合を起こし、ネットワークを形成する。この際、DiynePC の割合を変化させることでネットワークの密度を制御することができる。ネットワークが形成された脂質二重膜は運動性が著しく減少すると予想され、膜の波状運動による斥力が抑制されると考えられる。そこで、水蒸気雰囲気下で実験を行い、蒸気圧に応じた膜間への水の吸着による繰り返し周期の変化を観察した。

図 6 に相対湿度 68% での GI-SAXS プロファイルを示す。 $Q_z \sim 0.1 \text{ nm}^{-1}$ に現れた Bragg ピークはリン脂質の積層に対応するピークで、リン脂質の混合比に応じて若干の変化が見られる。diynePC の混合比が低いほどピーク位置は低 Q_z 側にシフトしており、膜間により多くの水を含んでいることを示している。この傾向は相対湿度 87% においても同じであったが興味深いことに、diynePC の割合が 80% を超えた場合、相対湿度の違いが膜間距離にほとんど影響を与えない一方、diynePC の割合が 60% 以下の場合には相対湿度の増加に伴って膜間距離も増加した。これは、パーコレーション転移によって面内にネットワークが行き渡り、膜の物性に大きな変化が起きたことを示唆している。

前述の通り、リン脂質二分子膜の膜間距離は膜間に働く相互作用のバランスで決まることが知られており、ネットワーク構造に関しては、膜の波状運動に起因したエントロピックな斥力が変化すると予想される。すなわち、面内のネットワーク構造によって膜が急激に硬くなると、波状運動が抑制される。これはエントロピックな斥力を減少させることにつながるため、前述のような膨潤挙動の違いが生じたと考えられる。

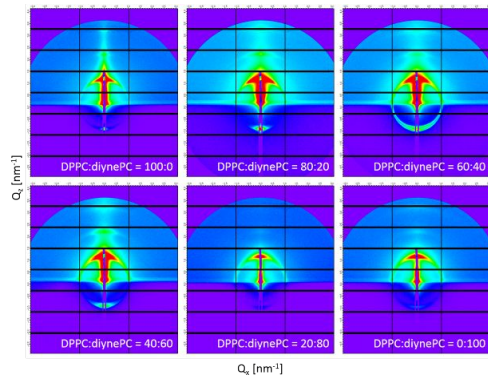


図 6: リン脂質 DPPC と重合性リン脂質 diynePC の混合比に対する斜入射 X 線散乱プロファイルの変化。

(4) タンパク質との相互作用によるリン脂質ベシクルの変形挙動

生物の細胞やその小器官を構成する生体膜はリン脂質と呼ばれる両親媒性分子の二分子膜で出来ている。生命現象には生体膜の変形を伴うものが数多く存在し、リン脂質自身の組成分布の他、膜貫通タンパクや細胞骨格、両親媒性ペプチドなどによっても膜変形が引き起こされることが知られている。本研究課題で着目する FBP-17 は BAR ドメインと呼ばれる数十 nm の曲率を有するバナナ型のドメインを有するタンパク質で、膜に吸着してチューブ状に膜を変形させる。このタンパク質は張力が低い部位に吸着し、他のタンパク質との複合体形成により細胞骨格を重合、細胞運動の際の先端部を形成することが報告されている。張力の低下は局所的な膜の曲率を減少させることから、膜の曲率と吸着・変形挙動との関係を調べることは、この膜変形挙動のメカニズムを理解する上で重要な知見と考えられる。

一方、本研究課題で着目したリン脂質ナノディスクは作成条件を制御することによってサイズの異なるベシクルを作成することができる。そこで、FBP-17 による膜変形のベシクルサイズ依存性を評価する目的でこれを用いた中性子小角散乱実験を行った。実験には長鎖リン脂質/短鎖リン脂質の混合系により形成される単層膜ベシクルを用い、膜表面の半径を 28 nm から 82 nm まで変化させながら FBP-17 の有無によるプロファイルの違いを観察した。実験結果は図 7 に示す通りで、膜の半径が 56 nm 以下のベシクルではタンパク質の有無でデータにほとんど違いが生じなかったのに対し、78 nm 以上のベシクルでは構造変化に対応した変化が観測された。FBP-17 を加えたサンプルでは 2 種類の干渉が現れており、これは変形したチューブの短軸径(直径 約 40 nm)と元のベシクル(直径 約 200 nm)が共存していると考えられる。すなわち、この結果はベシクルサイズが小さく、曲率の大きな膜は FBP-17 と相互作用しないのに対して、ベシクルサイズが大きく、曲率が小さな膜は FBP-17 と相互作用してチューブ構造を形成していることを示唆している。

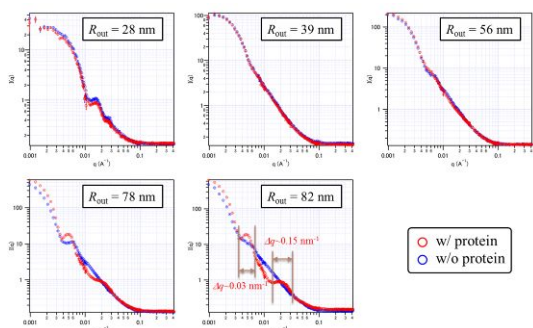


図 7: リン脂質ナノディスクを用いてサイズ制御されたリン脂質ベシクルと F-BAR ドメインを有するタンパク質 FBP13 を混合した際の中性子小角散乱プロファイル。

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)

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 山田悟史、川崎政人、長尾道弘、X線/中性子小角散乱を用いた F-BAR タンパク質による模倣生体膜の変形挙動の観察、日本物理学会 2016 年秋季大会、金沢大学角間キャンパス(石川県・金沢市)、2016 年 9 月 13 日。
2. 山田悟史、秒オーダー時分割中性子反射率法によるリン脂質積層膜の水和過程の kinetics 観測、第 62 回高分子討論会、金沢大学角間キャンパス(石川県・金沢市)、2015 年 9 月 15 日。
3. N. L. Yamada、M. Sferrazza、T. Hirata、K. Tanaka、"Kinetics of unbinding transition induced by electrostatic interaction on hydration process of phospholipid multilayers on a substrate", 6th European Conference on Neutron Scattering, Auditorio de Zaragoza, ザラゴザ(スペイン)、2015 年 9 月 2 日。
4. 山田悟史、中性子反射率計 SOFIA における時分割測定用試料環境の開発、日本物理学会 2014 年秋季大会、中部大学春日井キャンパス(愛知県・春日井市)、2014 年 9 月 9 日。
5. 山田悟史、リン脂質二分子膜の水和過程における静電相互作用による unbinding 転移の kinetics、日本物理学会 2014 年秋季大会、中部大学春日井キャンパス(愛知県・春日井市)、2014 年 9 月 7 日。
6. N. L. Yamada、K. Mitamura、H. Sagehashi、N. Torikai、S. Sato、H. Seto、M. Furusaka、T. Oda、M. Hino、T. Fujiwara、M. Kobayashi、and A. Takahara、"Development of sample environments of SOFIA reflectometer for seconds-order time slicing measurement", the 2nd International Symposium on Science at J-PARC、エポカルつくば(茨城県・つくば市)、2014 年 7 月 14 日。
7. N. L. Yamada、M. Sferrazza、and S. Fujinami、"In-situ measurement of phospholipid-nanodisk adhesion on substrates by neutron reflectometry and atomic force microscopy", the sixth Taiwan-Japan workshop on X-ray and neutron scattering, Howard Civil Service International House、台北(台湾)、2014 年 3 月 12 日。
8. N. L. Yamada、"Nanopore formation and reconstruction of small unilamellar vesicles consisting of long- and

short-chain phospholipids"、
International Soft Matter Conference
2013、the University La Sapienza、ロ
ーマ(イタリア)、2013年9月16日。

9. N. L. Yamada、"Nanopore formation and
reconstruction of small unilamellar
vesicles consisting of long- and
short-chain phospholipids"、27th
Conference of the European Colloid and
Interface Society、Sofia Princess
Hotel、ソフィア(ブルガリア)、2013
年9月3日。

〔図書〕(計1件)

1. 石井淑夫 監修(執筆者 72名)、テクノ
システム、"材料表面の親水・親油の評
価と制御設計" (2016) 487-491。

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