

2013年3月

走査プローブ手法による脂質膜および脂質分子のナノスケール観察

物質系専攻 47-116020 清水 裕章

指導教員：川合 眞紀（教授）

キーワード：走査トンネル顕微鏡、自己組織化単分子膜、リン脂質、脂質二重膜

緒言

生体を構成する細胞は、細胞膜によって構造を維持している。主成分は脂質、タンパク質、糖類であり、これらが複雑に分子間相互作用することで構造変化し、膜機能を発現している。特に脂質は分子内に親水性の頭部と疎水性の2本の尾部からなり、脂質二重膜という細胞膜の基本構造を担っている。これまで、細胞膜表面の生体反応のうち、エネルギー輸送酵素などのタンパク質が関わる反応については多くの発見があったが、細胞膜内における脂質の構造変化あるいは外部刺激に対する脂質の応答についてはわかっていないことが多かった。その後、いわゆる脂質のラフト構造 [1] が提唱されて以降は、細胞膜内においても多様な脂質の分布の偏りによって生じるマイクロドメインがこれら未解明の反応を担っているのではないかと考えられ注目を集めている。しかし数十ナノメートルという微小集合体であるマイクロドメインを認識し、ここで起こる分子間相互作用を特定することは非常に困難である。そこで我々はまず、この脂質の微小領域を可視化することが、脂質の担う生体反応の解明の第一歩として有効ではないかと考え、脂質の二次元集合体を作り出して、代表的な局所表面プローブ手法の一つである走査トンネル顕微鏡 (Scanning Tunneling Microscope; STM) を用いて可視化することを試みている。STM は原子スケールの分解能を持ち、常温・常圧・水溶液中でも測定することができ、生体分子の観測も可能である。また、脂質の単一分子について構造式からだけではうかがい知れない分子内のコンフィギュレーションにも注目している。分子間相互作用が働く空間、すなわち脂質分子に含まれる官能基の配置を可視化することも重要なのではないかと考えているからである。

そこで本研究で2つの実験系を組んで観測を進めた。脂質膜の可視化については、最終的なモデルとして脂質二重膜を見据え、親水化処理を施した基板の上に脂質を展開して膜を形成させ STM で測定する方法をとった。水溶液中という疑似生体環境下で基板表面に並ぶ脂質膜の構造を解明することが目的である。脂質単一分子の可視化については、グラファイト基板と脂質分子間に働く CH/π 相互作用を利用して基板表面に脂質分子を規則的に配列させ STM 測定する方法をとった。固液界面における有機分子の STM 測定は多くの前例 [2,3] があり、この系を脂質分子に応用した。二次元配列から脂質分子の構造を規定し、分子間相互作用の働く部分を解明することが目的である。

実験方法

脂質膜の可視化：STM 測定用基板には加工・清浄化が容易な金を用いた。水素バーナーで金線を融解し、急冷することで平坦な(111)表面を露出させた。金基板の修飾は、疎水的なアルカンチオール自己組織化単分子膜を吸着させることで疎水化修飾した先行研究の方法 [4] を踏襲し、本実験では末端に親水的なカルボキシル基を持つアルカンチオールである 3-メルカプトプロピオン酸 (MPA) を用いた。金(111)基板を直ちに 10 mM の MPA/エタノール溶液に浸漬させ、MPA の

自己組織化単分子膜を吸着させることで親水化修飾した。エタノールで十分に洗浄した後、リン酸緩衝液 (pH = 7.2, 0.05 M) 中に静置し、脂質として 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) を加えることで膜形成を試みた。POPC の濃度は 200 μM に調整し、水溶液中でベシクル状になるようあらかじめ水溶液を超音波破碎にかけておいた。基板、MPA 自己組織化膜、脂質膜の各段階について電気化学 STM 測定を行い、その表面構造を分子スケールで可視化することで膜構造を解析した。また、POPC に 50 μM の Cholesterol を加えた測定も行い、Cholesterol の有無が膜形成に与える影響を解析した。

脂質分子の可視化: STM 測定用基板には高配向性熱分解黒鉛 (Highly Oriented Pyrolytic Graphite ; HOPG) を用いた。スコッチテープで劈開した清浄な HOPG 基板の上に様々な脂質分子を溶かした有機溶媒を滴下し、液滴中に STM 探針を近づけ固液界面で測定を行った。溶媒には 1-phenyloctane および nonanoic acid を用いた。STM 像から脂質分子の構造を規定し、二次元配列に寄与する官能基の配置を解析した。

結果と考察

脂質膜の可視化: 金基板上 MPA 自己組織化膜の STM 測定から、MPA 分子の吸着構造は $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$ で表される最密充填であることが確認できた。赤外吸収分光測定でカルボキシル基のピークを検出したことと併せると、基板は表面垂直方向にカルボキシル基の最密充填構造で覆われており親水化修飾されたといえる。この親水化金基板上に POPC を展開した直後、図 A-1 の STM 像が得られた。直径 20 nm 程度の歪んだリング構造が見られた。これはベシクル状 POPC が基板に接触し、膜が広がっていく過程の像であると考えられる。30 分程度経過すると、図 A-2 のように表面全体が 1.8 ± 0.2 nm 間隔のストライプ構造で覆われた。一方、Cholesterol を混ぜた場合は、POPC 投入直後からリング構造を経ることなく 1.9 ± 0.2 nm 間隔のストライプ構造を観測した。Cholesterol の有無によらず同じストライプ構造を得るにもかかわらず、形成過程でリング構造の有無がみられたことから、ベシクル状 POPC が基板を拡散する際に、Cholesterol がその拡散を促す効果を持っていることが考えられる。

このストライプ構造を拡大したものが図 B である。1.9 nm おきに走る窪んだストライプと、0.5 nm の間隔でストライプと平行に連なる突起が確認できた。POPC は 1 分子の大きさが約 3 nm であること、分子内で親水部は疎水部より導電性が高いことから、この突起は POPC の親水部に相当し、1.9 nm \times 1.0 nm の平行四辺形ユニットセル内に 2 分子が並んだ構造をとっていると考えられる。しかし、POPC はこのユニットセルより長いため二次元的な配列は取れない。したがって POPC の疎水部は

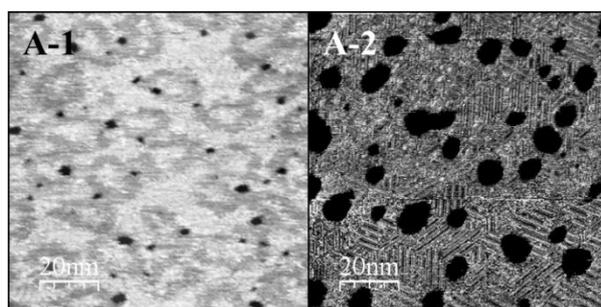


図 A-1 : POPC のリング構造, A-2 : POPC のストライプ構造, ともに $I = 1.5$ nA, $V = -400$ mV, 100 nm \times 100 nm

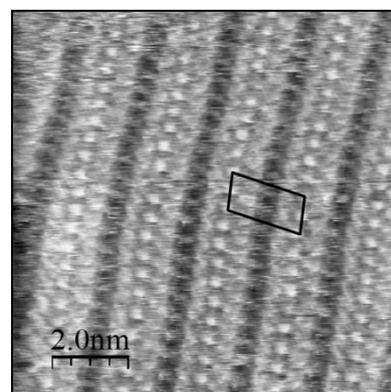
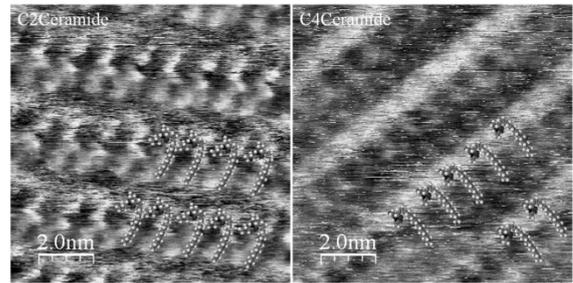


図 B : POPC のストライプ拡大像, $I = 2.5$ nA, $V = -400$ mV, 10 nm \times 10 nm

基板表面から立ち上がり、2分子が向かい合ってアーチ状に絡み合った構造をとっていると考えられる。

脂質分子の可視化：実験で用いた脂質はいずれも、脂質の疎水部が向かい合った脂質二重膜を横から見たようなラメラ構造をとることがわかった。脂質は、親水部と疎水部のわずかな違いが多様性を生んでいる。PA, PE, PS と代表的な脂質であるホスファチジルリン酸の親水部を変えて測定することで、二



次元配列におけるラメラの間隔の違いを可視化することができた。また図 C に示すように、2種類のセラミド分子の STM 像から、親水部が同じでも疎水部の炭化水素鎖の長さが異なることで疎水性相互作用を強めるように分子の配列が変わる様子も可視化できた。

図 C：鎖長の異なるセラミド分子の STM 像，ともに $I = 300 \text{ pA}$, $V = -800 \text{ mV}$, $10 \text{ nm} \times 10 \text{ nm}$

結論

本研究ではまず、親水化金基板上に形成された POPC 分子膜の構造を水溶液中 STM 観測によって分子スケールで解明した。ストライプ形成過程の STM 像はいわば流動的な POPC 膜であり、基板との相互作用を変えることで、脂質膜の測定系として期待できる。また、ラメラ状に吸着した脂質の二次元配列を高分解能で可視化した。ラメラは脂質二重膜の断面図ということもでき、規則的な配列の原動力となる分子間相互作用を担う官能基の位置も規定につながるといえる。両実験系の結果を組み合わせることで、脂質分子が細胞膜内で担う反応の原動力、すなわち微小領域での分子間相互作用をナノスケールで捉えることが期待できる。

参考文献

- [1] K. Simons and E. Ikonen, *Nature* **387**, 569 (1997).
- [2] D. M. Cyr, B. Venkataraman, and G. W. Flynn, *Chemistry of Materials* **8**, 1600 (1996).
- [3] S. De Feyter and F. C. De Schryver, *Chemical Society Reviews* **32**, 139 (2003).
- [4] S. Matsunaga, R. Yokomori, D. Ino, T. Yamada, M. Kawai, and T. Kobayashi, *Electrochemistry Communications* **9**, 645 (2007).

学会発表 (口頭 2 件、ポスター 1 件)

1. **清水裕章**, 松永宗一郎, 山田太郎, 川合真紀 ; “親水化金基板上に展開した脂質分子膜の構造解析” ; 口頭, 第 72 回応用物理学会秋季学術講演会, 山形, 8-9 月 (2011 年).
2. **H. Shimizu**, S. Matsunaga, T. Yamada, and M. Kawai; “Microscopic structure of phospholipid monolayer constructed on hydrophilic surfaces”; Poster, The 6th International Symposium on Surface Science, Tokyo, Japan, Dec. (2011).
3. **H. Shimizu**, S. Matsunaga, T. Yamada, T. Kobayashi, and M. Kawai; “High-resolution *In Situ* Electrochemical STM Imaging of Phospholipid Model Cell Membrane”; Oral, American Vacuum Society 59th International Symposium and Exhibition, Tampa, Florida, USA, Oct.-Nov. (2012).