

研究課題別評価書

1. 研究課題名

細胞膜の界面分子構造と機能性の解明

2. 氏名

叶 深

3. 研究のねらい

細胞膜は細胞の物質能動輸送、物質代謝、細胞間の情報伝達及びエネルギー変換等に重要な役割を果たすことで知られている。一般的には、細胞膜は脂質二分子膜を二次元溶媒として、これに様々な機能性タンパク質が「溶けている」構造とされている。このような脂質二分子膜の構造と細胞膜機能性との関係について解明することは、生命科学や生物物理学の研究において重要な研究課題である。これまでの研究では、主に様々な色素分子によって標識された脂質分子またはタンパク質分子を用い、細胞膜の構造や挙動について間接的に調べられている。「異物」とも見なされる色素分子は、実際の細胞膜に置かれている環境と化学的にも構造的にも大きく異なるため、色素フリーの条件下で新しいプローブで細胞膜の分子構造を直接に観察することが望まれている。

そこで、本研究では、細胞膜の解明構造とその機能性について分子レベルでの解明を目指し、界面や表面での分子構造及びその対称性の変化に極めて敏感である二次非線形振動分光法である和周波発生(Sum Frequency Generation, SFG)分光法(図 1)を、細胞膜表面の分子構造の直接観察に臨んだ。高感度で細胞膜界面の分子構造をその場で計測するために、分子の振動準位励起と電子準位励起による二重共鳴効果を利用できるブロードバンド SFG 計測システムを新たに開発・構築した。溶液温度変化による細胞膜の相転移に伴う構造変化の他に、酵素やタンパク質などの生体分子が存在される条件下で、従来の振動分光測定では観測が困難である細胞膜の微少の構造やコンフォメーション変化についてその場高感度な追跡を試み、その反応機構についても詳しく検討した。

これらの研究成果に基づき、分子構造の観点から細胞膜の機能性とその発現機構を理解するとともに、将来、界面構造制御による細胞膜の機能性制御や新規生体材料の創製が期待できる。

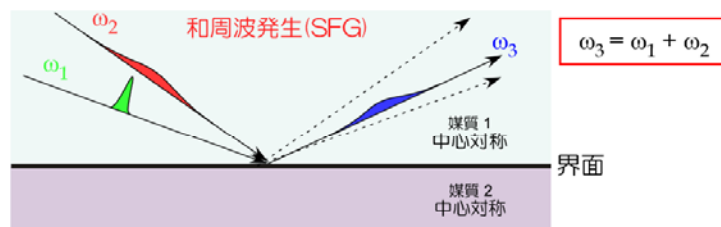


図1. 和周波発生(SFG)の概念図

4. 研究成果

(1) 二重共鳴ブロードバンドSFG計測システム構築

様々な予備検討の結果を踏まえて、図 2 に示すブロードバンド二重共鳴SFGシステムの構築に成功した。チタンサファイア再生増幅器(Spitfire PRO, Spectra Physics)によって増幅されるフェムト秒レーザーパルス(800nm, ~2.2mJ)によって、二台のオプティカルパラメトリックアンプTOPAS-CとTOPAS-White NBがポンプされ、それぞれ波長可変のフェムト秒赤外光(2.5-10 μm, 半値幅:~300 cm⁻¹)及びピコ秒可視紫外光パルス(240-1150 nm, 半値幅:~10 cm⁻¹)の出力が可能となった。この二つのレーザービームを試料表面の同じところに集光させ、ブロードバンドのSFG光を発生させ、分光器に取り付けたCCDカメラによってスペクトルとして直接に取り込まれた。また、紫外から近赤外までの励起光の波長変化に対応するために、

上記分光器の前段にプリズム型分光器を設置することにより対策した。

通常の SFG 測定においては、励起可視波長を基本波の 800 nm に固定し、赤外波長のみ変化させ、界面や表面からの振動励起共鳴の SFG スペクトルが観測される。また、観測対象の電子吸収スペクトルの吸収ピークに合わせて、励起可視光の波長を設定すれば、電子励起共鳴が関与する二重共鳴 SFG スペクトルも得られる。この二重共鳴効果により、振動共鳴のみで検出されにくい微弱な SFG 信号の検出が期待できるので、細胞膜界面にある少量のタンパク質分子からの構造解析への応用が望ましい。

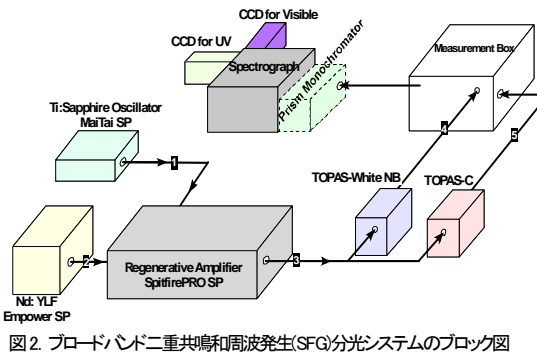


図2. ブロードバンド二重共鳴和周波発生(SFG)分光システムのブロック図

一方、励起可視光の波長可変に伴い、SFG システムのアライメントが煩雑になるので、光学系のアライメントの手順を標準化させ、ポンプレーザーが作動しなくても、グリーンレーザーダイオードにより光学系を短時間かつ正確的に調整できるようにした。

(2)脂質二分子膜の構築と評価

細胞膜の基本モデルとしては、様々なリン脂質分子を、ラングミュアプロジェクト(LB)法またはベシクルフュージョン法により、固体基板表面にトランスファーし、二分子膜を作成した。その後、水溶液中に浸漬したままで素早く分光測定セルにセットアップしてから計測し始めた。脂質分子の二分子膜は対称構造をもち、干渉効果によりSFG不活性となるので、水素と重水素置換した脂質分子を用い、交互に二分子膜の各層を作成した。図3には、LB法により一層目にジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)に、二層目に重水素置換したDPPC-d₇₅を用い作成した二分子膜(H/Dと記)のその場SFGスペクトルを示すのである。C-H伸縮波数領域(2800-3000 cm⁻¹)において、一層目のDPPC 分子末端のメチル基(CH₃)に由来する三本のピーク、C-Hの対称伸縮(Peak 1)、フェルミ共鳴(Peak 2)及び非対称伸縮(Peak 3)が観測された。これに対応して、C-D伸縮波数領域(2000-2350 cm⁻¹)には、二層目にあるDPPC-d₇₅分子末端CD₃基に由来のPeak 1', 2' と3' もそれぞれ観測された。一方、脂質分子のメチレン基(CH₂またはCD₂)は殆ど観測されていないことから、DPPCとDPPC-d₇₅分子は*all-trans*コンフォメーションを取り、基板表面に秩序的に配向していることが分かった。また、基板から観測された僅かなSFG非共鳴バックグラウンド信号の位相から(図3)、一層目と二層目にあるDPPC分子末端のメチル基の配向はちょうど逆であることが分かる。詳細に干渉モデル計算と解析により、脂質二分子膜の界面構造を分子レベルで評価できるようになった。これらのことに基づき、脂質二分子膜系の幾つかの反応過程についてSFG分光法により検討した。

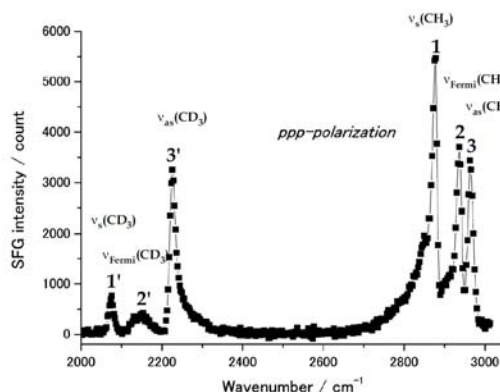


図3. DPPC/DPPC-d₇₅二分子膜のSFGスペクトル。

(3)温度変化による脂質二分子膜の相転移過程の追跡

脂質二分子膜に観測されたC-HまたはC-D伸縮振動由来のSFG信号(図3)は、室温では時間経過とともにゆっくり低下することが観測された。これは二分子膜内にある脂質分子がフリップ・フロップ運動を起こした結果、二分子膜H/Dの分子対称性が向上し、SFG信号が減少した。また、溶液の温度を徐々に上げていくと、SFG信号の減衰速度も速くようになった。図4は、一定速度(0.5°C/min)で(a)昇温及び(b)降温過程に伴い、DPPC二分子膜(H/D)のSFGスペクトルの温度依存性を連続に記録したものである。昇温過程において(図4a)、ある

温度範囲内では、SFG信号強度はほぼ一定であるが、温度上昇とともにSFG信号が徐々に減少して行く途中、急に上昇に転じてピークとなってから再び減少し、最後にほぼ消失した。一方、降温過程において(図 4b)、ほぼ同じ温度でSFG信号の増減に対応するピークも観測されたが、室温になってもSFG信号は初期状態に戻れなくなった。これらの過程において、温度変化によって引き起こされた脂質二分子膜の構造・対称性変化が、SFG信号を変化させたものとする。昇温に伴うSFG信号強度の初期低下は、主に脂質二分子膜のフリップ・フロップによるものである。詳細に解析した結果、この過程は一次反応であり、温度上昇とともに反応速度も大きく増加することが分かった。また、昇温過程の後半にあるSFG信号の変化挙動は、脂質二分子膜がゲル相から液相への相転移過程が強く関与しており、SFG信号がピークとなる温度は、DPPCの相転移温度(T_g)に近いことが分かった。一方、降温過程において同じ温度付近で大きな変化を示し、液相からゲル相への相転移過程に対応するが、室温に戻ってもH/D分子がすでに完全に混合されたので、初期のSFG信号に戻れなくなった。このように、その場SFGにより、脂質二分子膜の相転移温度を直接に測定できるのみならず、温度変化とともに連続的に記録されたSFGスペクトルから、相転移過程における二分膜内における脂質分子の構造変化を詳細に議論できるのが大きな特徴をもつ。ここで興味深いことは、相転移温度に連続的にSFGスペクトルを観測する場合、DPPC二分子膜H/DからのSFG信号がある一定の強度にずっと観測できることから、膜の非対称性の状態がまだ維持されていることが観測されたので、これまでに予想した結果と異なっている。

さらに、相転移温度が異なる種々の脂質分子、例えば、DPPC-DMPC、DPPC-DSPC 等の脂質分子から構成される二分子膜の相転移過程についてもその場追跡したが、複雑な温度依存性挙動が観測され、二分子膜内に相分離またはドメイン形成が絡んでいる可能性が示唆されている。詳細について今現在検討中である。

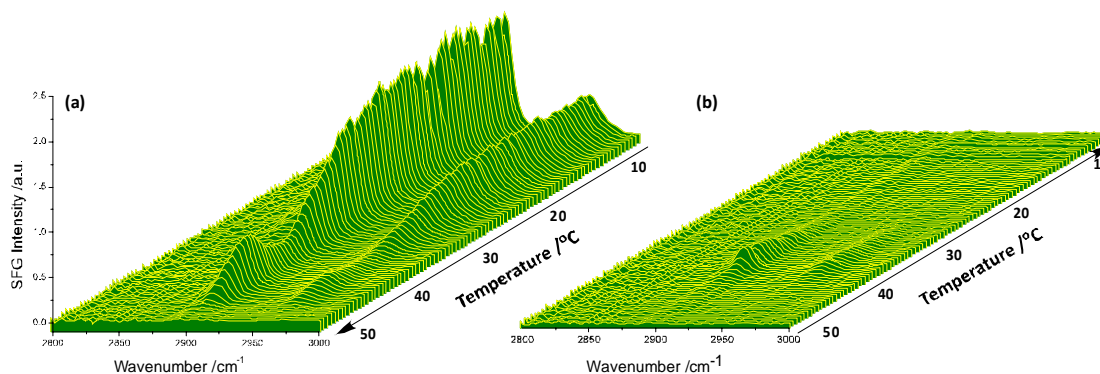


図4. DPPC/DPPC-d₇₅脂質二分子膜の(a)昇温過程と(b)降温過程に観測されるその場SFGスペクトルの温度依存性。

(4)機能性生体分子との相互作用に伴う脂質二分子膜の構造変化

細胞膜の基本モデルとして用いられる脂質二分子膜において、様々な機能性生体分子やタンパク質分子との相互作用に伴う構造変化を調べるには、細胞膜の機能性発現を理解する上に極めて重要である。本研究において、合成抗生物質分子および脂質分子の加水分解酵素ホスホリパーゼとの相互作用に伴う脂質二分子膜の界面分子構造変化及びその反応機構について SFG 分光法により調べた。

加水分解酵素の一つであるホスホリパーゼPLA₂は、脂質分子の不斉炭素に接するエステル結合の加水分解反応に働くことが知られているが、分子レベルで細胞膜との反応機構についてまだ十分に解明されていない現状である。図 5 には、溶液中にPLA₂を導入した際、DPPC二分子膜のSFGスペクトルの時間変化を示すものである。PLA₂が導入された最初の約 10 分間では、DPPC分子末端メチルの非対称伸縮のピークが減少したが、対称伸縮のピークが殆ど変化していないことが観測された(図5aと 5b)。これは酵素分子の導入に伴い二分子膜の配向変化によるものであり、DPPC分子がより表面に対して垂直するように再配向するようにいくことが、解析から分かった。その後、SFG信号が速く減衰し、約 30 分後SFG信

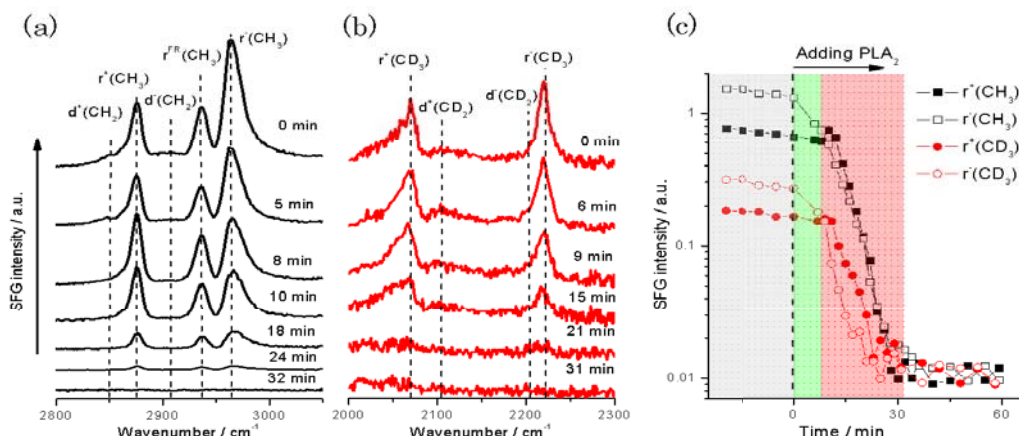


図5. ホスホリパーゼPLA₂を導入する際に、DPPC/DPPC-d₇₅二分子膜の(a)一層目と(b)二層目のSFGスペクトルの時間変化。(c)末端メチル基のC-H対称伸縮振動(r')及びC-H非対称伸縮振動(r'')のSFG強度の時間依存性。

号がほぼ消えた。このことから、ホスホリパーゼPLA₂による加水分解過程は「遅延と急加速」(Lag & Burst)といった二段階で進行することがわかった。PLA₂は二分子膜表面に吸着し、加水分解反応の進行に最適な構造に脂質分子を再配向させてから、反応速度が一気に加速されているように思われる。しかしながら、予想と異なり、一層目と二層目の脂質分子の加水分解速度が非常に近いことが分かった(図 5c)。

一方、PLA₂は、脂質分子の不斉炭素に接するエステル結合の加水分解反応において、L型脂質分子のみと触媒作用する高い立体選択性として知られている。そこで、本研究はこの特徴を利用し、PLA₂による脂質二分子膜

の加水分解反応の反応機構についてさらに検討した。図 6 に示すように、緩衝溶液にPLA₂を導入した際、構築された脂質二分子膜のキラリティ組成によって観測されたSFG信号が全く異なる時間変化を示した。一層目にD型分子(触媒活性なし)と二層目にL型分子からなる脂質二分子膜の場合(D/Lと記)、一層目と二層目からのSFG信号がゆっくり減衰し、PLA₂が存在しない場合と類似しており、主に

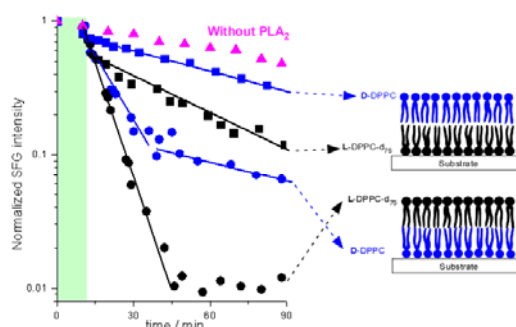


図6. PLA₂と接する際、D/LとL/DのDPPC二分子膜のSFG信号のそれぞれ時間変化。

脂質二分子膜のフリップ・フロップ過程によるもので、膜の加水分解の反応速度が遅いことが分かった。一方、L/Dの二分子膜では、PLA₂が導入されるとともに、L層とD層のSFG信号ともに速く減衰しているように見えたが、L型分子由来のSFG信号が先に消えると同時に、D型分子に由来するSFG信号の減衰速度も急に小さくなった(図 6)。これらの実験結果から、PLA₂による脂質二分子膜の加水分解反応は膜の表面層からスタートし、反応された表面層にある脂質分子の生成物が表面から離れると同時に、二層目にある脂質分子が速やかに表面層に反転し、反応に参加する機構を提案した(図 7)。また、この反応に伴う酵素分子の吸着

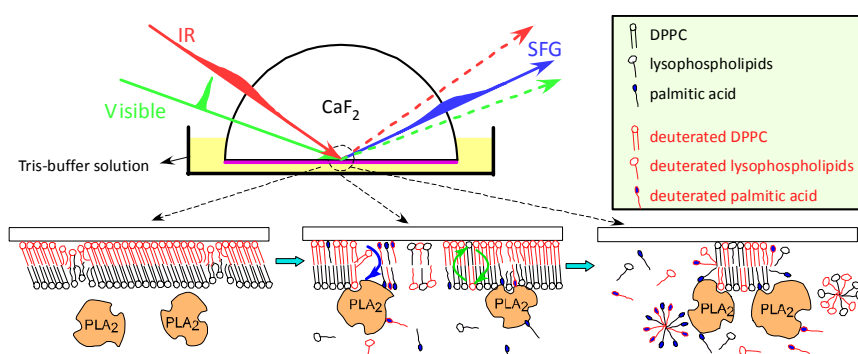


図7. 加水分解酵素のホスホリパーゼPLA₂による脂質二分子膜の加水分解の反応機構

状態についてもその場SFG測定も観測できた。さらに、原子間力顕微鏡(AFM)を用い、酵素による加水分解反応に伴う脂質二分子膜の表面の形状変化についても観察し、分子レベルでその界面構造の変化について総合的に検討した。

5. 自己評価

約三年間のさががけ研究期間中、科学技術振興機構(JST)から貴重な援助を受け、研究総括川合先生と各アドバイザー先生らのご指導のもと、楽しく夢中に研究に取り組むことができた。これまでに持っているレーザー装置を活用し、二重共鳴ブロードバンド SFG 分光システムの構築に成功した。設計当初に不安とされている狭帯域励起可視光の出力はほぼ目標通りに達成された。また、可視光波長変化に伴う SFG 出射方向の変化、SFG 検出効率の影響及び計測システムのアライメントの再現性等問題については、対策によりほぼ解決された。このようなブロードバンド SFG 分光システムにより、脂質二分子膜の分子レベルのその場構造計測には秒の時間分解能かつ高い S/N で実現できるようになった。この期間中、主に (1)温度による相転移過程及び(2)機能性生体分子との相互作用に伴い脂質二分子膜の構造変化の研究にチャレンジしてきた。従来の分光法では観測が困難とされる膜の配向やコンフォメーションの微小変化や、分子配列秩序と対称性の変化及び酵素やタンパク質分子の吸着等を感度良く追跡できるようになった。当初に期待している二重共鳴の増強を使用しなくても、タンパク質の吸着構造の観測が実現できたのは、少し予想外のことである。これらの結果により、分子構造の観点から、これらの過程における反応機構について議論できつつである。これらのことを研究の「芽」として活かしながら、これからの研究を大きく育立ていきたいと考えている。しかしながら、二重共鳴 SFG 分光法を利用する場合、短波長の光照射による試料の損傷影響がまだ大きく、それが解決しないと、増強による生体試料の解析が困難であることが分かった。また、脂質二分子膜は固体基板の表面にのせている状態で計測されていたが、固体基板側からの影響の可能性もある。基板表面に修飾を施しその改善策を講じていく必要があると考える。さらに、これまでに主に疑似的な細胞膜、即ち、リン脂質二分子膜を用いて実験してきたが、「活着している細胞」の細胞膜の計測にはまだ達成していない。いま、共同研究を進めながら、その実現を目指して日々努力しているところである。

6. 研究総括の見解

SFGは界面の分子種の同定とその配向を決められるユニークな分光法である。タンパク分子の生体機能の多くが、脂質二重膜からなる細胞膜表面で生じる。脂質二重膜を構成する分子の種類、膜中のコレステロールなどの存在により、タンパク反応場が異なることが知られている。本研究で組み上がったSFGシステムは明るくかつ、光学セットアップが迅速にできるように工夫されているので、生体系の複雑な分子の組み合わせの謎に迫ることができそうに思う。実際の細胞膜に近い状態を観測するには、顕微分光の必要がありそうだが、是非実現していただきたい。特定の分子に注目するには、同位体の利用も有効であろう。

7. 主な論文等

A. さががけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Tong, Y.; Li, N.; Liu, H.; Ge, A.; Osawa, M.; Ye, S. Mechanistic Studies by Sum-Frequency Generation Spectroscopy: Hydrolysis of a Supported Phospholipid Bilayer by Phospholipase A₂, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 2319–2323.
2. Tong, Y.; Zhao, Y.; Li, N.; Osawa, M.; Davies, P.; Ye, S. Interference Effects in the Sum Frequency Generation (SFG) Spectra of Organic Thin Films. Part I: Theoretical Modeling and Simulation, *J. Chem. Phys.*, **2010**, in press
3. Ye, S.; M. Osawa, Molecular Structures on Solid Substrates Probed by Sum

Frequency Generation (SFG) Vibration Spectroscopy, *Chem. Lett.*, **2009**, *38*, 386-391

②受賞

1. 「SFG 分光を用いた表・界面の解析」で北海道分析化学賞, H21 年 2 月

③著書

1. 叶 深, 大澤雅俊, 和周波分光法(SFG), 「現代界面コロイド化学の基礎」(第3版), 日本化学会, 9.4.5 節, 437-439, 丸善, 2009.
2. 叶 深, 和周波発生振動分光法, 「現代界面コロイド科学の事典」, II-3-10 節, 丸善, 2010.

④ 主な招待講演

1. Ye, S. Nonlinear Vibrational Spectroscopy Study on Biomembrane Surface, The 5th LSW Symposium on Soft & Wet Matter, 2010.1.8, Sapporo.
2. Ye, S. Molecular Structures of Lipid Films Investigated by Sum Frequency Generation (SFG) Spectroscopy, The 2nd CRC Research Cluster Symposium on Structure and Function of Bio-interface, 2008.10.30, Sapporo.
3. Ye, S.; Nishida, T.; Tong, Y.; Holman, J.; Osawa, M. “Molecular Structures on Solid Interface Probed by Sum Frequency Generation (SFG) Vibrational Spectroscopy”, WPI & IFCAM Joint Workshop “Challenge of Interdisciplinary Materials Science to Technological Innovation of the 21st Century”, 2008.2.18, Sendai.
4. Ye, S.; Tong, Y.; Nishida, T.; Zhao, Y.; Tyrode, E.; Osawa, M. “Structural study on lipid bilayer interface by sum frequency generation (SFG) spectroscopy”, Symposium “Structure, Property, and Function of Cell Membranes and Membrane Related Biomolecules”, 235th American Chemical Society (ACS) National Meeting, 2008.4.7, New Orleans.

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Wei, Q. S.; Tajima, K.; Tong, Y.; Ye, S.; Hashimoto, K. Surface-Segregated Monolayers: A New Type of Ordered Monolayer for Surface Modification of Organic Semiconductors, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 17597-17604
2. Liu, H.; Tong, Y.; Kuwata, N.; Osawa, M.; Kawamura, J.; Ye, S. Adsorption of Propylene Carbonate (PC) on the LiCoO₂ Surface Investigated by Nonlinear Vibrational Spectroscopy, *J. Phys. Chem. C*, **2009**, *113*, 20531-20534