

学位論文題名

Studies on Structures and Dynamics of Lipid Bilayers
at Single Molecule Level

(単分子領域における脂質二分子膜構造と動力学に関する研究)

学位論文内容の要旨

脂質二分子膜は準安定状態にあり流動的な構造を持つことから特異的な分子操作の場として注目されている。こうした脂質膜の物理化学特性を理解し制御するためには、膜内分子のランダムな熱運動を微小時空間領域で検出・制御することが重要である。本研究では、ブラウニアン・ラチェット機構に注目し、非対称な微小構造を用いて微小空間領域において分子の一定方向の運動を創出する分子操作について検討した。また、微視的な構造不均一性のある脂質膜内の分子運動を単分子レベルで実時間計測する手法を確立し、導入分子と脂質膜の親和性に基づく局所的な分子分配能を支配する要因を定量化することを試みた。分子拡散方向を微小空間にて制御可能なブラウニアン・ラチェット機構と、分子運動を膜状態により制御し任意方向への分子輸送を発現する人工脂質二分子膜とを組み合わせること、で、広範な分子群に適応可能な新規膜内分子操作法を検討した。

第一章ではラチェット機構の動作原理、脂質膜内分子操作、およびこれらを評価する単分子光計測手法について現状と課題を総括した。

第二章ではタンパク質 Cholera Toxin subunit B (CTB) と膜内において CTB と構造が異なる複数種の会合体を形成する糖脂質 ganglioside GM1 (GM1) を分子輸送媒体である脂質膜に導入し、CTB-GM1 会合体形成による、拡散変調を全反射顕微鏡(Total Internal Reflection Microscopy; TIRM)による単分子拡散追跡(Single Particle Tracking; SPT) から評価した。輸送媒体として電解質水溶液内で自発的に基板上を広がる自発展開脂質二分子膜を用いた。その結果、GM1存在下でのみCTB由来の蛍光が拡散輝点として観察されたことから自発展開膜上でのCTB-GM1会合体の形成が確認され、この会合体は蛍光脂質分子よりも拡散係数が一桁以上小さい拡散を示すことがわかった。これより脂質膜上での会合体形成による膜内分子拡散制御が可能であることを示した。

第三章では上記 CTB-GM1 会合体を導入した脂質二分子膜を、電子線描画および金属蒸着により作製した微小金属ラチェット構造を有する親水性ガラス基板上に設置し、CTB-GM1 拡散方向を SPT から評価した(Fig. 1a)。本系においては拡散性の異なる三種の CTB-GM1 が存在し、これらはラチェット構造により膜輸送方位に対して垂直方向にそれぞれ異なる変位量で偏在することがわかった(Fig. 1b)。これより、輸送方位に対して非対称な辺長を有するラチェット構造障壁と外部摂動を必要としない脂質二分子膜自発展開挙動との組み合わせにより、膜内運動性に基づいた新規な膜内分子操作機構を提案した(Fig. 1c)。またこの偏在度合いは既存計算予測よりも大きく、局所的な分子輸送速度減少が構造間隙部での膜構造変調により発現することが示唆された。

第四章ではこうした膜構造変調による膜内分子配向への影響を単分子計測により検討する手法を確立するために、表面プラズモン共鳴を示す異方性金ナノロッド(Au NR)を観察対

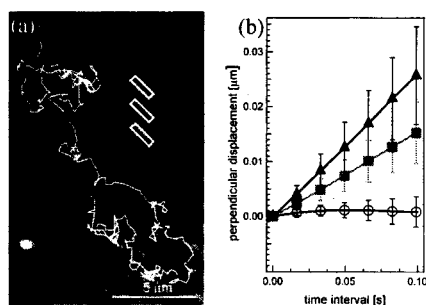


Fig. 1. ラチェット構造基板上での脂質膜内 CTB-GM1 単分子拡散観察の結果。

(a) CTB-GM1 会合体由来の単分子輝点軌跡。白枠はラチェット構造由来の金属散乱像。脂質膜分子輸送方位は図上部から下部方向。
(b) 多数輝点追跡および解析から得た輸送方位に対して垂直方位での平均変位量プロット。○;低, ■;中, ▲;高拡散成分に対応。

象として TIRM による非焦点面観察(defocused imaging)を用い、単分子配向観察を行った。得られた Au NR 発光像の解析から、本手法により微細な粒子形状の差異に基づく散乱双極子特性の詳細および配向変化が検出可能であることがわかった。本結果に基づき膜内色素分子の配向を検出するために十分な空間分解能を有する観察手法を確立した。

第五章では前述の defocused imaging および焦点面における SPT を用い、膜内単分子の配向、拡散評価から、脂質 DPPC, DLPC, cholesterol からなる不均一相形成膜の組成変化に伴う膜内分子運動の変調を検討した。発光強度分布解析に基づく配向評価から膜内 cholesterol 濃度増加に伴い膜内蛍光脂質鎖部の色素長軸と膜平面とがなす角度が変化したこと、脂質鎖部の傾斜凝集構造が緩和したことがわかった(Fig. 2;上段)。また拡散評価から得た平均滞留時間(τ_{esc})と巨視的拡散係数(D_{macro})より、分子閉じ込め拡散を示す平均ドメインサイズが既報の幾何形状観察結果よりも一桁程度小さいことが明らかとなった(Fig. 2;下段)。以上、膜組成変化に伴う微視的な脂質鎖部の配向変化の検出に成功し、巨視的な相構造変化がもたらす膜内分子運動の実効的な空間変調の定量化を達成した。本結果から微小領域での脂質膜構造の変調により膜内分子運動の制御の可能性を示した。

第六章では既存のラチェット機構では拡散方向の制御が困難である蛍光脂質分子を対象とし、微小空間での膜密度制御を利用することで、広範な分子群へ適応可能な分子操作方法を検討した。既存の構造(Fig. 3a;上段)に加え、狭小間隙部を有する構造(Fig. 3b;上段)および流路構造を有する構造(Fig. 3c;上段)を作製し、それぞれの構造による脂質膜内 TR-DHPE の拡散方位への影響を検討した。拡散変位量解析の結果、通常構造を用いた場合に比べ狭小構造では二倍、流路構造では三倍程度の角度を伴って輸送方位に対して垂直方位へと偏在化することがわかった(Fig. 3;下段)。本結果はそれぞれ狭小構造間隙部での分子排斥および流路内における輸送速度減少により、ラチェット構造への衝突頻度が増加に起因する付加的な偏在化発現によるものであると考えられる。

本研究によって、通常室温熱揺らぎにおいて制御が困難な単分子運動を脂質二分子膜構造および外部摂動の最適化によって回転運動、拡散運動とその方向を制御する方法が創出された。さらに定量的な単分子計測によって得られた知見に基づき構造パラメーターを最適化することによって、既存の系では達成不可能な高効率な分子偏在化を実現した。本結果により、極微量の外部エネルギーにより駆動する精妙な分子分別システムの構築が可能となった。今後、生体系における脂質二分子膜の分子制御および構造・エネルギー制御などへの展開応用が期待される。

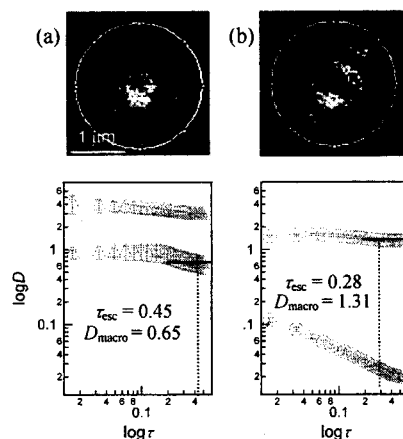


Fig. 2. 不均一膜内単分子観察結果. cholesterol 濃度が(a) 0, (b) 20 mol%の結果. (上段) 膜内単分子配向観察の結果.発光強度分布解析から膜平面に対し脂質鎖部色素長軸がなす角度は(a) 18°, (b) 85°. (下段) 拡散追跡から得た $\log D$ - $\log r$ プロット. 0 mol%の低拡散性、20 mol%の高拡散性成分では脂質相間の移動を示す変曲点 τ_{esc} と巨視的拡散係数 D_{macro} を示す。

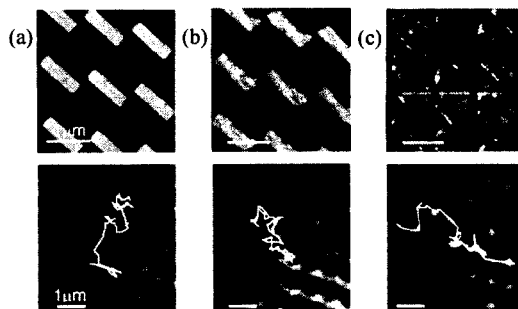


Fig. 3. 異なるラチェット構造を有する基板上での膜内 TR-DHPE 拡散観察の結果. 上段;原子間力顕微鏡像, 下段;輝点軌跡. (a) 通常のラチェット構造, (b) 狭小間隙部を有するラチェット構造, (c) 流路構造を有するラチェット構造を用いた場合の結果。

学位論文審査の要旨

主査	教授	村越	敬
副査	教授	喜多村	昇
副査	教授	石森	浩一郎
副査	教授	村上	洋太

学位論文題名

Studies on Structures and Dynamics of Lipid Bilayers at Single Molecule Level

(単分子領域における脂質二分子膜構造と動力学に関する研究)

脂質二分子膜は準安定状態にあり流動的な局所構造不均一性に基づき、ランダムに熱運動する膜内分子の分配を可能とすることから、特異的な分子操作の場として注目されている。こうした脂質膜の物理化学特性を理解し制御するためには、膜内分子運動を微小時空間領域で制御・検出することが重要である。これに対しまず申請者は学位論文にて、ブラウニアン・ラチェット機構に注目し、非対称な構造を用いた微小空間領域での、任意方向の分子運動を創出する操作法を検討した。また構造不均一性のある脂質膜内の分子運動について、単分子レベルで実時間計測する手法を確立し、導入分子と脂質膜の親和性に基づく分子分配能の支配要因定量化を試みた。

申請者ははじめに、タンパク質会合体を分子輸送媒体である脂質膜に導入し、この会合体がその分子量に従い、ラチェット構造により膜輸送方位に対して垂直方向に、それぞれ異なる変位量で偏在することを明らかにした。これより輸送方位に対して非対称な辺長を有するラチェット構造障壁と外部摂動を必要としない脂質二分子膜自発展開挙動との組み合わせにより、膜内運動性に基づく新規な分子操作機構を提案した。またこの偏在度合いは既存計算予測よりも大きく、構造間隙部での膜構造変調に起因する局所的な分子輸送速度減少に起因することが示唆された。これより、既存のラチェット機構では拡散方向の制御が困難な蛍光脂質分子を対象とし、微小空間での膜構造変調を積極的に誘起した結果、通常ラチェット構造を用いた場合に比べ三倍程度の角度を伴い、膜輸送方位に対し垂直方位へと偏在化することがわかった。

次に、申請者は膜構造変調による膜内分子配向への影響を単分子計測により検討する手法を確立するために、表面プラズモン共鳴を示す異方性金ナノロッドを観察対象として単分子配向観察を行った。得られた発光像解析から、本手法により粒子形状に基づく発光双極子特性の詳細が検出可能であることを明らかにした。

確立した上記手法を用いて、構造不均一性のある脂質膜の組成変化に伴う膜内単分子の配向を評価したところ、膜組成変化に従い、膜内蛍光脂質鎖部の色素長軸と膜平面とがなす角度の変化が得られ、脂質鎖部の傾斜凝集構造が緩和したことがわかった。これより微小領域での脂質膜構造の変調による膜内分子回転運動制御の可能性を示した。

以上より、申請者は通常室温熱揺らぎにおいて、制御が困難な単分子運動を脂質二分子膜構造および外部摂動の最適化により、拡散運動とその方向、回転運動を制御・検出する方法が創出された。本結果により、極微量の外部エネルギーにより駆動する精妙な分子分別システムの構築が可能となった。今後、生体系における脂質二分子膜の分子制御および構造・エネルギー制御などへの展開応用が期待される。よって申請者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。