

学位論文題名

Structure and Reactivity of Bio-interface Studied by
Atomic Force Microscopy (AFM)

(バイオインターフェースの構造と反応性 —原子間力顕微鏡(AFM)による研究—)

学位論文内容の要旨

The bio-membrane plays important roles in the living systems. A variety of biological and chemical reactions take place on the bio-membrane interface and their reactivity is considerably affected by the surface structures of the membranes. A comprehensive elucidation on the relationship between the structure and reactivity on the bio-interface at a molecular level is extremely important to understand and further control these life processes. In my Ph.D. study, with respect to the issues mentioned above, the surface structures of various biological interfaces including the supported monolayers and bilayers which are used as models for the bio-membranes have been investigated by atomic force microscope (AFM) together with other surface science techniques under various environments.

An outline of my Ph.D. thesis is given below:

Chapter 1 gives a brief introduction on the previous studies on the bio-membranes and bio-interfaces. After a general description of the structures and functions for the cells, our interests are focused on the bio-membranes which play crucial roles in the life process of the cell. Several modern techniques used for *in-situ* investigation on the bio-membranes such as π -A isotherms, Brewster angle microscope, differential scanning calorimetry, fluorescence microscope, vibrational spectroscopy, sum frequency generation (SFG), and AFM, are shortly described with some application examples. Then, previous researches on the structures and reactivity on the bio-membranes using these techniques, especially AFM, are concisely reviewed. Finally, the objectives and an outline of the present thesis are given.

Chapter 2 briefly describes the experimental instruments used in the Ph.D study including the Langmuir Blodgett (LB) techniques, AFM as well as infrared spectroscopy. The operation fundamentals and the experimental conditions for each technique in the study are given in details.

Chapter 3 presents *in-situ* AFM study on the hydrolysis reaction of the phospholipids bilayers catalyzed by a phospholipase A₂ (PLA₂) enzyme. Based on the high catalytic selectivity of PLA₂ toward L-enantiomer phospholipids, five kinds of supported bilayers made of L- and D-dipalmitoylphosphatidylcholines (DPPC), including L/L, L/D, D/L, D/D, and racemic LD/LD, were prepared on a mica surface with the gel-phase, to explicate the kinetics and mechanism of the enzyme-induced hydrolysis reaction in detail. By introducing enzyme-inactive D-DPPC into the upper or bottom leaflets of the lipid bilayer, we are able to independently determine the dynamic structural changes in two leaflets during hydrolysis reaction. The present results demonstrate that the hydrolysis catalyzed by PLA₂ preferentially

occurs at the edges of pits or defects in the bilayer surface. The present kinetics analyses reveal that the lipid molecules in bottom leaflet flip up to top leaflet as soon as the L-DPPC molecules in the upper leaflet hydrolyzed (induced flip-flop process), much faster than the spontaneous flip-flop process known for the lipid bilayer. Based on these AFM observation results on the lipid bilayers made of different combination of enantiomers, a novel kinetics model is therefore proposed to quantitatively account for the PLA₂-catalyzed hydrolysis of the supported phospholipid bilayers.

Chapter 4 shows the studies on the temperature-dependent phase transition processes of the supported phospholipid bilayers by using AFM and SFG measurements. The mechanisms for the phase transition process of the supported lipid bilayer have been discussed in a comparison with free lipid vesicles in solution. The phase transition of the supported lipid bilayer takes place in a layer by layer fashion, i.e., the top layer melts first before the bottom layer starts to melt. The interaction between lipids in the bottom leaflet and solid support surface significantly affect the phase transition behaviors. The full width at half maximum (FWHM) of the melted fraction determined by AFM and SFG for the phase transition region in the supported lipid bilayer is much wider ($\sim 10^{\circ}\text{C}$) than that of the endothermic peak determined by differential scanning calorimetry (DSC) for the free lipid vesicles ($\sim 0.2^{\circ}\text{C}$) due to the same reason. Finally, the influences of the membrane proteins on the phase transition processes of the supported lipid bilayers are also investigated. The adsorption of a protein (PLA₂) induces the different phase transition. Only the gel and liquid phases are present after the adsorption of the membrane protein, suggesting the instability of crack phase after protein adsorption.

Chapter 5 describes the structural studies on a cationic surfactant molecule, dioctadecyldimethyl ammonium chloride (DOAC), which has been used as a synthetic model lipid molecule, due to its similar amphiphilic structures to phospholipids. The AFM observations are used to evaluate the morphologies of DOAC monolayers. The present results reveal that the surface morphologies of DOAC monolayers are substantially improved by mixing with a neutral lipid of stearyl alcohol in the monolayer or halide ions in the subphase. It suggests that the stearyl alcohol and halide ions have strong condensation effects on the DOAC molecules in the monolayer by shielding the repulsive interaction between their head-groups and increasing the van der Waals interaction between the long hydrocarbon chains.

Chapter 6 summarizes the observed results and gives a general conclusion for the on the present Ph.D. study. Finally, a prospect for the future study is given.

学位論文審査の要旨

主査	教授	幅崎浩樹	
副査	教授	安住和久	
副査	教授	長谷川靖哉	
副査	教授	大澤雅俊	(触媒化学研究センター)
副査	准教授	叶深	(触媒化学研究センター)

学位論文題名

Structure and Reactivity of Bio-interface Studied by Atomic Force Microscopy (AFM)

(バイオインターフェースの構造と反応性 —原子間力顕微鏡(AFM)による研究—)

生体膜の表面では、様々な化学・生化学反応や物理変化が起こり、その反応活性や物性は膜の表面構造と組成に強く影響されている。これらのプロセスを理解し、さらに有効に制御または利用するためには、分子レベルで生体膜界面における分子構造を解明することは不可欠である。申請者は博士後期課程において、バイオインターフェースにおける構造と反応性の関係の総合的な理解を目指し、高い空間分解能をもつ原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて、種々の脂質分子やタンパク質からなる疑似生体膜の界面構造を分子レベルで調べ、特に疑似生体膜表面における酵素反応や相転移過程について詳細に研究した。

申請者はラングミュア・プロジェクト (LB) 法を用い、生体膜のモデルとして基板表面に種々の組成の支持脂質二分子膜または単分子膜を構築した。特に酵素反応の立体選択性を利用し、脂質二分子膜の構造を設計し、異なったキラル構造をもつ疑似生体膜を構築し、より厳密に酵素反応の活性と反応機構を議論することができた。また、セットアップと溶液セル設計の改良を繰り返し、温度可変の条件下でのその場 AFM 観測を実現した。この手法は、今後のバイオインターフェースでの反応性の解明に向けて、さらなる応用が期待されるものである (第2章)。

申請者は生体膜の骨格分子となるリン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を触媒できる酵素であるホスホリパーゼ A2 (PLA2) に着目し、脂質二分子膜表面での酵素反応について詳細に調べた。対称構造をもつ脂質二分子膜は本来、膜の上下層の反応を区別することが困難であるが、申請者は、立体配置が L 型脂質分子のみと触媒作用する該酵素の立体選択の特性を利用し、L/L 型二分子膜のほかに、触媒活性がない D 型分子との組み合わせで L/D, D/L, D/D 及びラセミ型 LD/LD 等の支持脂質二分子膜を構築し、加水分子反応に伴う膜表面の分子構造の変化について AFM によりその場で観察し、膜の上下層の反応活性について定量的に議論できるようになった。この加水分解反応は、膜の欠陥サイトのエッジサイトで進行し、加水分解生成物が基板から脱離することが AFM 観察で明

らかにした。これらの AFM 測定結果に基づき、酵素反応の反応速度論的解析を試み、酵素による加水分解反応のほかに、リン脂質分子の自発的フリップ・フロップ運動と表面層分子の加水分解に伴う誘導フリップ運動を考慮した上、酵素反応の各反応過程の速度定数を決定した (第 3 章)。

申請者はこれらの支持脂質二分子膜の相転移過程について調べ、融点近くで鋭い相転移過程を示す脂質ベシクル系と比べ、相転移が広い温度範囲に及ぶことを観測した。温度上昇とともに、支持脂質二分子膜の表面層から一層ずつ溶け、バルク脂質の融点近くにおいて二層目の溶け始めることが AFM 測定によって観測された。完全な固相、液相状態のほかに、固相と液相が共存するクラック相が支持脂質二分子膜の相転移過程に確認された。さらに、AFM 測定によって得られた各層の融解割合から、上下各層の融解熱を見積もった。一方、膜タンパク質を導入することにより、クラック相が観測できなくなった。支持脂質二分子膜の相転移過程は基板や膜タンパク質との相互作用によって大きく影響されることを明らかにした (第 4 章)。

申請者は人工脂質分子である四級アンモニウム表面活性剤の単分子膜の表面形状を AFM 測定により検討した。サブフェースにハロゲン化物イオンが存在する場合、単分子膜の密度増加と平坦さの改善が得られた。一方、中性脂質分子である 1-オクタデカノールとの混合において、単分子膜の表面に相分離が見られたが、全体として膜表面が非常に平坦になることが AFM 測定から観測された。これらの結果により、単分子膜内における四級アンモニウム表面活性剤分子同士の末端官能基の静電的反発相互作用と疎水鎖間のファンデルワールス相互作用が単分子膜の表面構造に大きな影響を及ぼすことを明らかにした (第 5 章)。

これを要するに、著者は界面敏感な AFM 測定をバイオインターフェースの界面分子構造の解析に応用し、生体膜表面における酵素反応や相転移反応を分子レベルで捉えることに成功した。本研究は、この分野の基礎科学の進展のみならず、応用研究でも重要なインパクトを与えるものであり、界面化学及び界面制御工学分野の進展に資するところ大である。

よって、著者は、北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格あるものと認める。