

論文内容の要旨

論文題目 脂質構造体のマイクロマニピュレーション

氏名 深川暁宏

I. 本研究の目的

脂質分子は生体膜を構成する重要な分子であり、分子内に糖やリン酸などの親水基と飽和・不飽和アルキル鎖の疎水基を持つ両親媒性分子である。水溶液中では自己組織的に多様な脂質構造体を形成し、混合比・溶液環境・温度などの変化により多彩な構造・相をとり、物理・生物学的興味やドラッグデリバリー・マイクロファクトリーといった工業的な応用などの点から盛んに研究の対象となってきた。近年、さらに脂質ナノチューブやリポソームネットワークといった変わった系が発見されており注目を集めている。

脂質構造体は一般にマイクロメートルサイズであるため光学顕微鏡により容易に観察することが出来る。近年、顕微鏡技術や蛍光技術の発達に伴い顕微鏡観察下で微小な物質を蛍光ラベルし、レーザーピンセットやマイクロマニピュレーターで操作するといったことが可能になってきた。この技術により顕微鏡レベルで脂質構造体の力学特性や変形などの研究が行われるようになった。

本研究ではこれらの技術を新たな脂質構造体に対して使用することで、従来では測定されなかった物理的特性を明らかにし様々な応用につなげることを目的とした。具体的には脂質ナノチューブをレーザーピンセットで曲げることによる弾性率測定およびマイクロインジェクターを用いてのガラス基板上へのマニピュレーション、リポソームネットワークをマイクロインジェクターで物質を局所的に混合することによる形態変化の測定を行った。

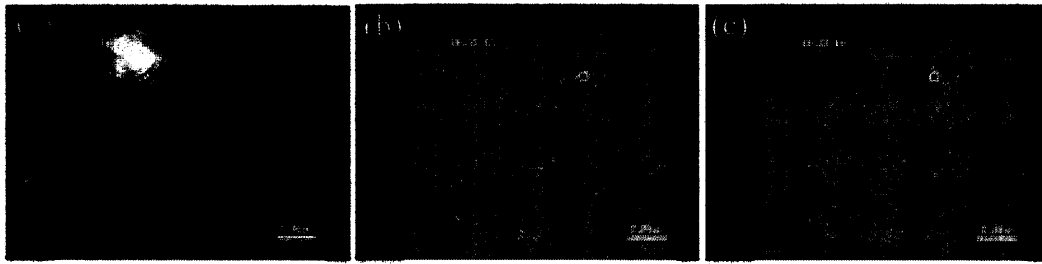


図1. レーザーピンセットによる cardanol ナノチューブの曲げ弾性率測定

II. 脂質ナノチューブの曲げ弾性率測定

脂質ナノチューブとはナノサイズの径を持つ脂質分子の管状チューブ状分子集合体であり、内部空間を利用した DNA 電気泳動や硬さを利用したナノサイズのバネとしての応用が期待されている。最近新たにカシューナッツの殻を原料とした従来の脂質ナノチューブよりも小さな内径 10nm、外径 50nm のチューブである cardanol ナノチューブが発見された。

本研究ではこの cardanol ナノチューブをレーザーピンセットで曲げることで弾性率測定を行いその力学的強度を明らかにすることを目的とした。

レーザーピンセットは対物レンズで集光したレーザー光を粒子に照射することで捕捉する装置であり、脂質ナノチューブもレーザートラップ可能である。そこでレーザーピンセットを用いてナノチューブ曲げ、弾性率の測定を試みた。

図1aのように端点の固定されたチューブの另一端をレーザートラップし、曲げた後レーザーをオフにすると、図1bのように流体からの粘性力とたわみの弾性を感じながら緩和し、元の位置に戻る(図1c)。この緩和の画像からチューブの形状を求め、理論式をフィッティングしたのが図2であり、理論から予想される形状とよく合っていることがわかる。チューブ端点における変位の時間変化は図3であり理論的予測と同じく指数関数的に減衰することがわかる。この緩和時間からチューブの弾性率を求めたところ、 $K=1.31 \times 10^{-23} [\text{Nm}^2]$

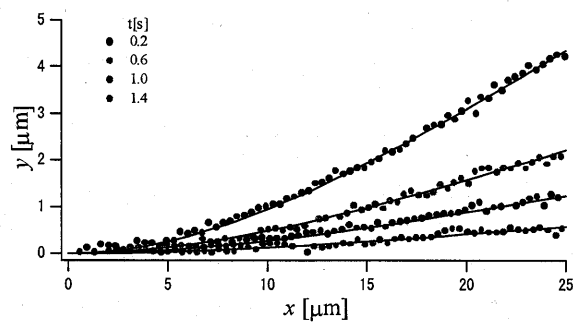


図2. チューブ形状の時間変化

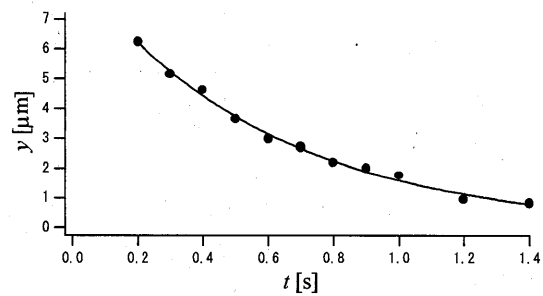


図3. チューブ端点の時間変化

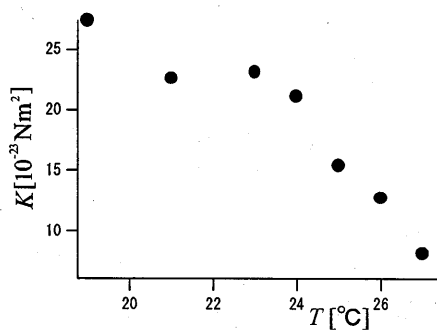


図4. 弾性率の温度依存性

元の位置に戻る(図1c)。この緩和の画像からチューブの形状を求め、理論式をフィッティングしたのが図2であり、理論から予想される形状とよく合っていることがわかる。チューブ端点における変位の時間変化は図3であり理論的予測と同じく指数関数的に減衰することがわかる。この緩和時間からチューブの弾性率を求めたところ、 $K=1.31 \times 10^{-23} [\text{Nm}^2]$

という値が得られた。この値は微小管の曲げ弾性率と同程度である。弾性率から持続長を求めると $L_p = K/k_B T = 3.24[\text{mm}]$ であり顕微鏡観察で得られる持続長と一致する。曲げ弾性率 K はヤング率 E と断面二次モーメント I を用いて $K = EI$ という関係にあり、これからヤング率を求めると $E = 4.27[\text{MPa}]$ であることがわかった。また、曲げ弾性率の温度依存性を求めたところ、相転移温度近くになると弾性率が急激に小さくなることがわかった(図4)。

III. マイクロインジェクターを用いた脂質ナノチューブのマニピュレーション

また、我々はマイクロインジェクターを用いることで脂質ナノチューブの単離および任意の方向への配向の技術を開発した。マイクロインジェクターに cardanol ナノチューブの分散溶液を入れ、乾燥ガラス基板上表面にインジェクター先端を接触させ、表面張力により流れ出した溶媒の流れに乗って出てきたナノチューブの先端がガラス基板に吸着する。このときインジェクターを移動させると、図5のようにナノチューブ全体がガラス基板上に出てくることで自由な方向に脂質ナノチューブをマニピュレーションすることができる。この方法を用いることで脂質ナノチューブを用いたDNA電気泳動チップなどの微細なデバイスの開発が可能である。

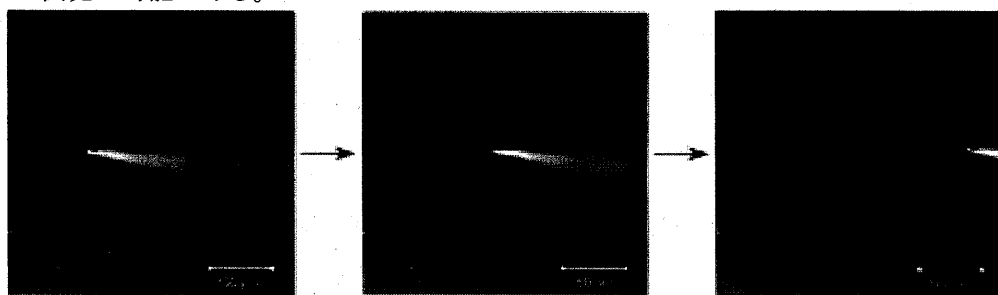


図5. 脂質ナノチューブのマニピュレーション

IV. リポソームネットワークの局所形態変化

リポソームネットワークはリポソーム同士がチューブを介して連結したネットワーク構造であり、実際に脳神経細胞中に含まれる Ganglioside や Cholesterol を DOPC リポソームに加えることでネットワーク構造ができる(図6)。本研究ではジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)/コレステロール(Chol)リポソームネットワークにおいて、ローカルな形態制御を目標として、マイクロインジェクターを用いて神経細胞ネットワークのモデル系であるリポソームネットワークの局所的な部分にメチル- β -シクロデキストリン ($M-\beta\text{-CD}$) の局所的な混合を行った。

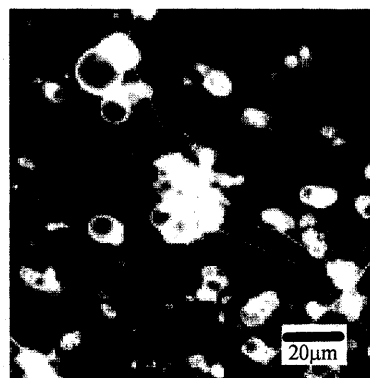


図6. リポソームネットワーク

$M-\beta\text{-CD}$ はコレステロール分子を包接することが知られている。DOPC/Chol リポソームネットワーク系に $M-\beta\text{-CD}$ 溶液を加えるとリポソームネットワーク中のコレステロール分子が包接されることによって脂質二分子膜からコレステロール分子が引き抜かれるため、リ

ポソームネットワークはその形態を維持できずにリポソームだけになってしまう。この M- β -CD を、マイクロインジェクターを用いてリポソームネットワークのチューブ部分近傍で局所的に混合（これを“吹き付け”と呼ぶ）することでチューブの長さの時間変化を共焦点レーザー顕微鏡観察により測定した(図7)。

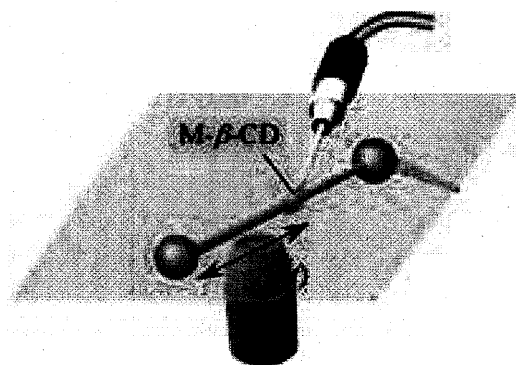


図7. M- β -CD の”吹き付け”

まずバッファー溶液を吹き付けたところ、チューブには変化がなく吹き付けの水流による物理的切断等が無いことを確認した。次に10mMと50mMのM- β -CDを吹き付けたところチューブの長さに変化は見られなかった。続いて100mM、150mM、200mMについて測定したところチューブが吹き付けにより短くなっていく現象が見られ、その時間変化は図8であり、チューブの長さ $L(t)$ は $L(t) = -K(t-t_0)^2 + L_0$ と時間 t の二乗に比例して短くなることが分かった。ここで K は係数、 t_0 は吹き付けを始めた時間、 L_0 は最初のチューブ

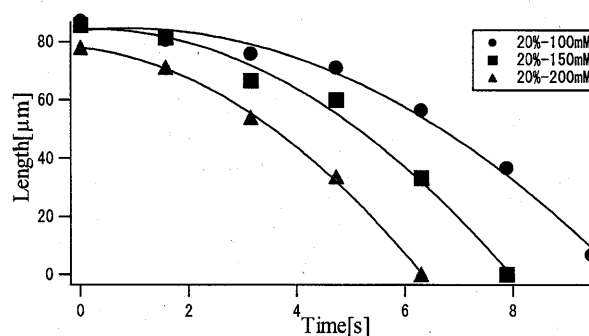


図8. チューブの長さの時間変化

インジェクター先端間の距離である。また係数の K は M- β -CD の濃度に比例する(図9)。低濃度においては M- β -CD が脂質二分子膜中コレステロールを引き抜く方向に平衡がずれていない、もしくはほとんど引き抜かないと考えられ、そのためネットワークの形態には影響を与えない。一方、高濃度においてはコレステロール分子が脂質膜から引き抜かれるが、コレステロールが引き抜かれてももとの DOPC/Chol 比を維持しようとするためチューブを短くすることで比率を維持しようとしている。局在する M- β -CD の濃度は時間の二乗で増えていくため、チューブの長さは時間の二乗に比例して短くなっていくと考えられる。

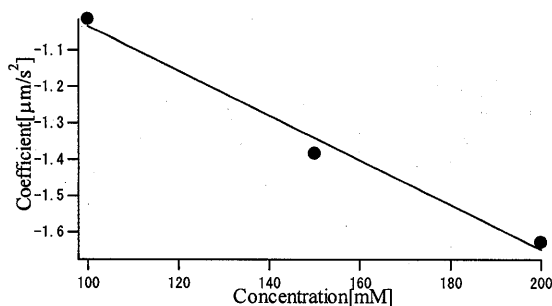


図9. 係数 K の M- β -CD の濃度依存性

また、マクロに M- β -CD を混合した場合にはネットワーク上すべてのチューブが短くなろうとするため、最終的にはチューブに過剰な張力がかかり切断してしまいリポソームネットワークは崩壊し、リポソームだけになってしまうと考えられる。