

## 論文内容の要旨

### Nanometer-scale Discernment of Biological Reactions on Cell Membrane

(表面ナノスケール分析手法による細胞膜上生理反応の解明)

学籍番号：47-087011

氏名：松永 宗一郎

#### 序論

近年、Simons らにより、細胞膜上での生体反応には二次元流体的にふるまう脂質分子膜内の局所相分離構造である「脂質ラフト」が重要な役割を果たしていると言われ、多くの研究がなされてきた。しかし脂質ラフトの本質的役割はおろか、脂質ラフトのサイズさえも未だ活発な議論が行われている段階である。その原因として、脂質膜の局所構造をナノスケールの空間分解能を持って画像化できる測定手法を生体環境に適用することが難しかったことが挙げられる。

私は脂質膜のナノスケール可視化のための技術として走査トンネル顕微鏡(scanning tunneling microscopy; STM)に着目し研究を行った。STMは「単分子スケールの空間分解能」を持つ顕微鏡でありながら、生体分子に必須の「水溶液中、常温」下での観測、また生体その場観測で常用される蛍光分子などの「ラベルが不要」といった特徴を持ち、生体分子が実際に動作している現場の単分子スケール観測への有効性が大きいと期待される。しかしSTMによる細胞膜の観測は既存研究例がなく、世界初の試みである。私は測定試料としてのモデル細胞膜作製から研究をはじめ、その表面のナノスケール可視化を行うことで、単分子スケールでの生理反応メカニズムの解明をめざした。

#### 研究方法

原子スケールの超高空間分解能を有するSTMを水溶液中で動作させることで、生体類似環境下にある脂質分子膜の動的挙動をナノスケールで画像化する。

STM観測に好適な二層モデル細胞膜として、一方を金(111)表面上に自己組織的に形成した1-オクタノール(1-OT)単分子膜、もう一方はその上に形成された脂質の単分子膜から構成した。原子レベルで平坦な1-OT/金(111)疎水基板を水溶液中に設置した後、所望の濃度に調整した脂質入り水溶液を注ぐことによって、疎水相互作用により基板上に脂質単分子膜が形成される。

STMによる分子スケール可視化に加え、全反射赤外吸収分光法(Attenuated total reflection infrared absorption spectroscopy; ATR-IR)を用いて分子構造について研究を行った。試料はATR用の台形Siプリズム上に金を蒸着し、その上にSTM測定と全く同じモデル細胞膜を構築した。Siプリズムと金蒸着膜の密着性の向上のためにシランカップリング法により有機単分子層をバッファ

層として作製したことが新規な点として挙げられる。

## 研究結果

STM 観測のためのモデル細胞膜作製方法の確立から始め、脂質膜自身の性質、脂質膜—タンパク質間の相互作用、脂質膜—イオン間の相互作用を分子スケールで可視化することで生理反応メカニズムに含まれる物理的プロセスの解明を行った。

### 1. モデル細胞膜の作製

モデル細胞膜は「STM 観測に耐えうる平坦性」と生体膜に必須の「二分子膜構造に由来する流動性」を両立する必要がある。そこで基板の上に 1-OT の SAM を作製し、その上に脂質分子膜を作製したわけであるが、実際に STM 観測を行うことで、我々のモデル細胞膜が流動性を保持していることを示せた。STM による脂質膜の観測は世界初であり、本研究により STM による細胞膜の分子スケール観測が可能であることが示され、ラフト構造の解明へ向けた光明を示した研究となる。

### 2. 細胞膜に電位勾配を与えたときのナノスケール構造変化

基板の電位を制御することで疑似的な膜電位をモデル細胞膜に与え、その様子を STM で観測した。基板の電位は $+0.22 \pm 0.2V$  (vs. Ag/AgCl)の範囲で正負電位を交互に与えながら観測を行った。図 1 に各電位におけるモデル細胞膜表面の STM 像を示す。それぞれ A)0.22 V, B)0.02 V, C)+0.42 V, D)二回目の 0.02 V を示す。0.22 V のときは流動構造“Fluidic I 構造”を取っていた脂質膜が、初回の負電位のときは流動性を失い固化した“Striped 構造”を示した。その後+0.2 V をかけると流動構造を取り戻したが、その膜の厚みは最初に観測されたモデル細胞膜と異なっていた。これを“Fluidic II 構造”と呼ぶ。次に再び 0.02 V をかけたときは流動性の低い  $4 \text{ nm} \times 10 \text{ nm}$  程度の“Grainy 構造”を取った。この後基板の電位変化に対して Fluidic II と Grainy 構造は可逆的に変化した。初回に負電位をかけたときの Stripe の間隔は約 4 nm であり、これは脂質分子の一分子列であると考えられる。この一連の構造変化は STM によって初めて観測された現象であり、分子細胞生物学的にも非常に興味深い。

そこでこれらのナノスケール構造変化の原因を化学変化に求め、その化学結合状態を追跡するために ATR-IR による振動分光法を用いた。部分的に重水素化された脂質を用い、STM で観測された構造変化に脂質分子のどの官能基が寄与しているのかを詳細に調べた。炭化水素基 ( $2000\text{-}2300 \text{ cm}^{-1}$ )、C=O 基 ( $1730 \text{ cm}^{-1}$ )、リン酸基 ( $1260 \text{ cm}^{-1}$ ) のピークを精密に解析することで、リン酸基の結合の変化、コリン基の脱離が起こっていることが明らかとなった。以上の実験結果より、STM で観測された構造変化において、リン酸部位の化学変化やコリンの脱離が起こっていることが明らかとなった。STM による画像化に加え、分光法によって水溶液中の単分子膜内の反応のメカニズムを解明したことは分子スケールにおける細胞膜の研究において非常に意義深い。

### 3. 異なる種類の脂質分子を用いて作製したモデル細胞膜の物性

脂質分子は疎水性尾部(アシル基)と親水性頭部(グリセロリン酸+ $\alpha$ )をもつ両親媒性分子である。+ $\alpha$  がコリンの脂質を phosphocholine(PC)、エタノールアミンである脂質を phosphoethanolamine(PE)と呼ぶ。これらの脂質の存在場所は異なっており、PE は細胞膜の内側に局在している。STM を用いて、これらの脂質から構成されたモデル細胞膜を観測することで、そ

それぞれの脂質膜の物性をナノスケールにおいて明らかにすることができる。PC と PE の混合比を変えてモデル細胞膜を作製することにより、組成比が膜の物性に与える影響を可視化した。PE 膜は PC 膜の約 3 倍の厚みを持って観測されること、また、PE のみの膜では探針の走査によって脂質分子膜が引っかかれて、膜が乱れていく様子が観測された。つまり PE 膜は PC 膜よりももろいことを意味する。これは水相との水素結合、脂質分子自体の構造によって PE 分子は平面膜というよりも少し凹面の膜を形成しやすいことなどが原因と考えられる。従来の生物学的マクロなスケールの実験で提唱されていたモデルを STM ナノスケール可視化により実際に画像化することができ、マクロ-ミクロスケールで同様の物理が支配していることを示した好例といえる。

#### 4. 脂質ラフトとイオンの相互作用

脂質ラフトのモデルとして異なる脂質を混合して、自発的に起こる相分離構造を調べた。ある種の脂質分子は帯電しており、帯電脂質とイオンの相互作用は脂質ラフトなどのヘテロ構造体の形成の駆動力の一つであると考えられている。そこで PC と帯電脂質 phosphatidylserine(PS)の混合膜を作製し、STM で観測を行った。図 2A に PS-PC 混合膜の STM 像を示す。図中の輝点は直径 5 nm 程度であり、今までに観測された最小の脂質ラフトである。また PC:PS 混合比を変えた膜を作製することにより、このナノドメインは PS から構成されていることが分かった。この PC-PS 系のバッファ溶液に  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを加えた後の STM 像を図 2B に示す。輝点が消えて平坦な膜が形成された。この平坦膜に Annexin V と呼ばれるたんぱく質を加えたところ図 2C のように輝点が観測された。Annexin V は PS- $\text{Ca}^{2+}$  共存系にのみ結合することが知られているタンパク質である。つまり  $\text{Ca}^{2+}$  添加後の平坦膜においても PS は膜内に存在しており、annexin V が表面に結合したと考えられる。

本研究の重要なポイントは二つある。1.  $\text{Ca}^{2+}$  の添加により PS のドメインが解離した。これは従来のマクロスコピックな実験とは逆の結果であり、STM 可視化によって初めて明らかにされた。2. X 線構造解析による annexin V のサイズは約 5 nm であり、STM で観測された輝点は annexin V 一分子であると考えられる。つまりたんぱく質の脂質膜への結合を一分子スケールで観測した初の例といえる。このように単分子スケールで脂質ドメインやタンパク質を画像化することが示せ、本研究で用いた STM による画像化がラフト構造の解明に非常に大きな役割を果たすことを期待させる。

#### 5. 細胞膜および極小脂質集合体とタンパク質の相互作用

均一な脂質ベシクル分散液を得るために、超音波による small uni-lamella vesicle; SUV の作製がよく行われる。SUV は数多くの研究に使われ、その直径は約 30 nm と見積もられてきた。私は STM を用いてこの SUV を実空間可視化することにより、実際には SUV よりも小さい極小脂質集合体(MLP)が形成されていることを発見した。さらに PC のみからなる MLP、PC+PE 混合の MLP を作製し、それぞれに duramycin と呼ばれる PE 特異結合ペプチドを加え、その様子を STM で可視化した。PC のみの系においては MLP に何の変化も見られない一方、PE を含む MLP は duramycin 添加によって崩壊し膜状の構造を形成している様子が観測された。この結果は MLP は PE を含む集合体であることを意味し、さらには MLP のような小さな脂質集合体においてもその特異結合性は失われていないことを示している。さらに動的光散乱法(DLS)を用いることで、これらの現象が基板上に展開された特定の状況ではなく、水溶液中に分散した系においても同様の現

象が起こっており、PE を含む MLP が融合し巨大な直径を持つ膜が形成されていることがわかった。STM ではナノスケールの構造体一つ一つを画像化できるのに対し、測定対象は表面に限られ局所的な構造のみを観測している可能性がある。一方 DLS は溶液中に分散した試料から試料全体の平均の情報を得られる反面、散乱光の強度変化から流体動力学的に形状を見積もるので、得られる構造情報は必ずしも比較可能ではない。現にこの実験では DLS では MLP の粒径は 30 nm と見積もられた。つまり STM と DLS は相補的な測定手法であるといえる。STM と DLS を用いることでお互いの欠点を克服し、タンパク質特異結合について新しい知見を得ることができた。

本研究により STM が細胞膜における生理反応の分子スケール観測に効果的であることを示すことができ、今まで可視化技術の不足のためにブラックボックスとされてきた分子細胞生物学における生理反応のメカニズムの解明が、STM を用いた実空間可視化によって次々と明らかにされることが期待される。

## Figures

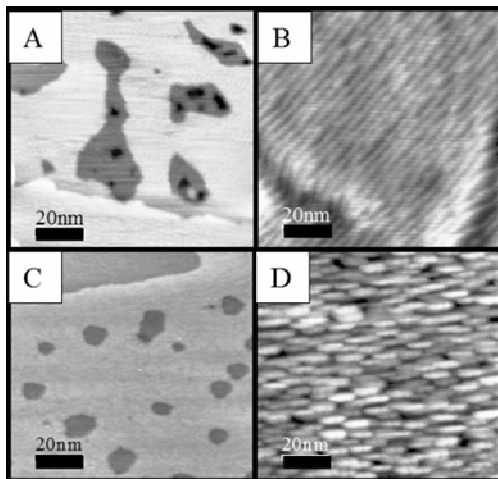


図 1. 基板電位を変化させたときのモデル細胞膜の STM 像。  
 スキャンサイズ 50×50 nm。  
 トンネル電流値 = 1 nA, Bias = 0.4 V。  
 0.05 M, pH = 7.0 NH<sub>4</sub>ClO<sub>4</sub> 水溶液中。  
 A) 0.22 V DHPC “Fluidic I 構造”、  
 B) 0.02 V “Striped 構造”、  
 C) 0.42 V “Fluidic II 構造”、  
 D) 0.02 V “Grainy 構造”。

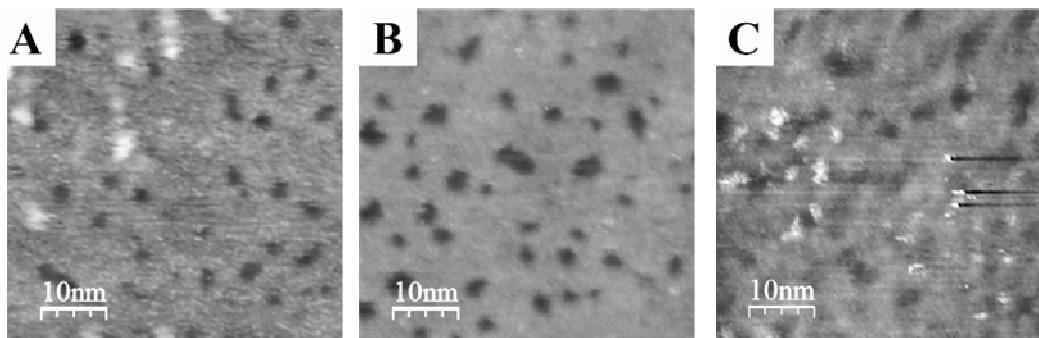


図 2. PC+PS の混合モデル細胞膜の STM 像。スキャンサイズ 50×50 nm。  
 トンネル電流値 = 1 nA, Bias = 0.4 V。0.05 M, pH = 7.0 NH<sub>4</sub>ClO<sub>4</sub> 水溶液中。  
 A) PC:PS=10:1、B) A)に Ca<sup>2+</sup>を添加した後。輝点が消え平坦な膜が形成されている。  
 C) B)にさらに Annexin V を加えた様子。Annexin V 一分子が輝点として観測される。