

準弾性レーザー散乱法による
脂質膜と生体高分子の相互作用の研究

2015年7月

千葉大学大学院工学研究科
共生応用化学専攻 共生応用化学コース

大野 正司

(千葉大学審査学位論文)

準弾性レーザー散乱法による
脂質膜と生体高分子の相互作用の研究

2015年7月

千葉大学大学院工学研究科
共生応用化学専攻 共生応用化学コース

大野 正司

目 次

第1章 緒 言

1-1	生体高分子と生体膜	1
1-2	相互作用解析法と界面張力	3
1-3	脂質膜と生体高分子の相互作用解析に伴う表面張力変化測定例	4
1-4	脂質二重膜と脂質単分子膜の構造比較	7
1-5	本研究の目的	8
1-6	論文の構成	9
1-7	参考文献	9

第2章 生体高分子と脂質膜

2-1	生体高分子	11
2-1-1	タンパク質の構造	11
2-1-2	核酸の構造	12
2-2	リン脂質の構造	13
2-3	脂質膜構造	15
2-4	生体膜モデル	15
2-5	実験に用いた脂質分子	17
2-6	液液界面の脂質吸着量の決定	18
2-7	生体高分子と脂質膜との相互作用	19
2-8	生体高分子と脂質膜の相互作用に伴う界面張力変化要因	19
2-9	気液界面へのタンパク質の吸着に伴う表面・界面張力変化の定量的検討例	20
2-10	中間領域に準安定状態を持つ系の定量的検討例	22
2-11	参考文献	24

第3章 界面張力測定法と QELS 法の原理と装置

3-1	界面張力測定法	25
3-1-1	ウィルヘルミー法	26
3-1-2	Petelska らによる脂質二重膜の界面張力測定法	27
3-1-3	ペンダントドロップ法	27
3-2	QELS 法	29
3-2-1	QELS 法の原理	29
3-2-2	QELS 装置構成図	31
3-2-3	QELS 法における検出系	34

3-2-4	パワースペクトルの解析	35
3-2-5	QELS法の確度と精度	36
3-3	液液界面の脂質膜と生体高分子の相互作用に伴う界面張力測定法	36
3-3-1	液液界面への飽和脂質膜形成法	36
3-3-2	生体高分子溶液の添加	36
3-3-3	ペンダントドロップ法とQELS法の違い	37
3-3-4	時間分解測定の実現性	38
3-4	参考文献	39
第4章 水/クロロホルム界面に形成された脂質単分子膜へのリゾチーム吸着		
4-1	緒言	40
4-2	実験	
4-2-1	試薬	41
4-2-2	QELS装置	41
4-2-3	液液界面の脂質単分子膜の形成	42
4-3	結果と考察	
4-3-1	リゾチームの水/クロロホルム界面への吸着	42
4-3-2	水/クロロホルム界面での脂質単分子膜の形成	44
4-3-3	脂質単分子膜へのリゾチーム吸着による界面張力の時間変化の脂質依存性	45
4-3-4	脂質単分子膜へのリゾチーム吸着による界面張力の時間変化に与えるNaCl濃度の影響	47
4-3-4-1	DOPC単分子膜	47
4-3-4-2	DOPS単分子膜	49
4-3-4-3	DOPG単分子膜	51
4-3-4-4	DOPE単分子膜	52
4-4	リポソームへのリゾチーム吸着機構に対する考察	54
4-5	まとめ	55
4-6	参考文献	55
第5章 水/クロロホルム界面の脂質膜に対するDNA複合体化に伴う界面張力変化		
5-1	緒言	57
5-2	実験	
5-2-1	試薬	58
5-2-2	QELS装置	59
5-2-3	空気/水界面の表面張力測定	59

5-2-4	水／クロロホルム界面の界面張力測定	59
5-3	結果と考察	
5-3-1	空気／水界面への DNA 添加による表面張力の時間変化	59
5-3-2	空気／水界面の脂質膜への DNA 添加による表面張力の時間変化	60
5-3-3	水／クロロホルム界面への DNA 添加による界面張力の時間変化	63
5-3-4	水／クロロホルム界面への脂質の飽和濃度決定	64
5-3-5	水／クロロホルム界面の脂質膜への DNA 添加による界面張力の時間変化	65
5-3-6	水／クロロホルム界面の脂質膜への DNA 添加による界面張力の時間変化 の CaCl_2 濃度依存性	67
5-3-7	水／クロロホルム界面の混合脂質系膜への DNA 添加による界面張力の 時間変化	74
5-4	まとめ	77
5-5	参考文献	77
第 6 章	まとめ	79
第 7 章	謝 辞	82

略語一覽

第 1 章

DNA : deoxyribonucleic acid

RNA : ribonucleic acid

TEM : transmission electron microscopy

AFM : atomic force microscopy

XRD : X-ray diffraction

SPR : surface plasmon resonance

ESR : electron spin resonance

GIXS : grazing incidence X-ray scattering

BAM : brewster angle microscopy

DPPC : 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

DMPC : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

PMIRRAS : polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy

QELS : quasi-elastic laser scattering

第 2 章

DOPC : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

DOTAP : 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (chloride salt)

DOPE : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine

DOPS : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt)

DOPG : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (sodium salt)

SDS : sodium dodecyl sulfate

第 3 章

AOM : acousto-optic modulator

APD : avalanche photodiode

FFT : fast fourier transform

第 4 章

LB : Langmuir-Blodgett

DPPE : 1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid

CAC : critical aggregation concentration

POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

第 5 章

ODA : octadecylamine

DODAB : dioctadecyldimethylammonium bromide

Tris : tris(hydroxymethyl)aminomethane

SAINT-2 : N-methyl-4(dioleoyl)methylpyridiniumchloride

PMA : poly(methyl acrylate)

DC-Chol : 3- β -[N-(N',N'')-dimethylethane)carbamoyl]cholesterol

第1章 緒言

本研究は、タンパク質や DNA といった生体高分子と生体膜の主要構成成分である脂質膜が相互作用する際の界面張力変化に着目し、その機構を考察したものである。本章では、生体高分子と脂質膜の相互作用解析の重要性と界面張力に着目した理由を述べる。

1-1 生体高分子と生体膜[1-5]

生体は約 60 兆個にも及ぶ多数の細胞からなっており、その大きさは数十 μm 程度 (2.5~200 μm) である。細胞には肝細胞、筋細胞、脂肪細胞、神経細胞などがあり、それぞれ固有の機能をもつ。それらの機能を発揮するために、図 1-1 のように、細胞にはそれぞれに特有な生体膜から形成される細胞小器官が備わっており、ミトコンドリア、小胞体、リボソーム、ゴルジ装置、リソソーム、核などが挙げられる。これらの様々な細胞内に含まれている主な分子としては、核酸、タンパク質と脂質などがあり、これらの分子が相互作用することで、様々な機能を発現する。

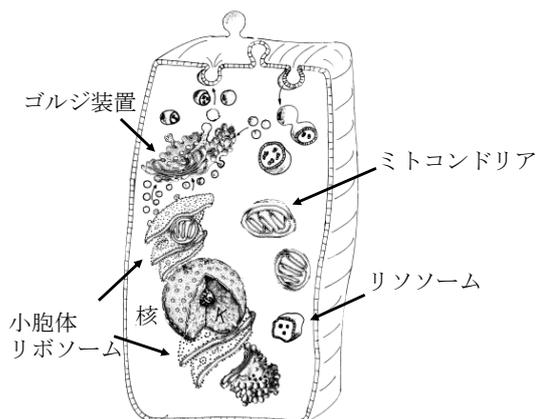


図 1-1 細胞内の細胞小器官 [1]

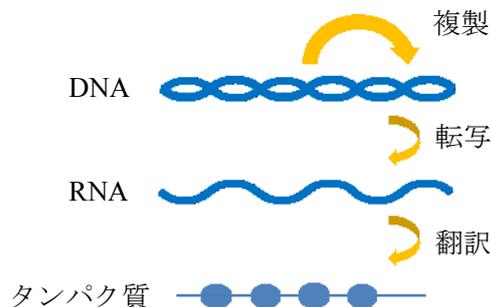


図 1-2 セントラルドグマ模式図

核酸とタンパク質はそれぞれヌクレオチドとアミノ酸が重合してできた生体高分子である。核酸 (DNA (deoxyribonucleic acid) と RNA (ribonucleic acid)) は、タンパク質と共に遺伝情報の伝達に非常に重要な役割を果たしている。遺伝情報は染色体中の DNA がもつ。DNA からの遺伝情報は DNA をもとに RNA が合成されることにより RNA に伝達され (転写), RNA の遺伝情報は翻訳によりタンパク質へと伝わる。図 1-2 のように、この遺伝情報の流れは分子生物学におけるセントラルドグマと呼ばれている。このように、遺伝情報の伝達に直接関わる核酸とタンパク質の相互作用に関する研究は、これまで数多くおこなわれている。脂質分子も核酸やタンパク質と相互作用することで、生体内で機能を発現させている。したがって、脂質分子と生体高分子の相互作用についても、核酸とタンパク質との相互作用と同様に研究がおこなわれている。脂質分子はリポタンパクとして体中に輸送され

ているが、そこではタンパク質と相互作用して運搬されている。また、脂質はタンパク質であるホスホリパーゼによって加水分解されて、多様なセカンドメッセンジャーが生成され、情報伝達に用いられている。タンパク質と比較して DNA と脂質の相互作用に関する研究は少ないが、近年 DNA と脂質の相互作用も注目を集めつつある。細胞核内で DNA や RNA はタンパク質と共にクロマチン複合体を形成して、DNA の発現を制御したり格納したりする役割をもつ。近年、その複合体には脂質も含まれていることがわかってきており、核内脂質は RNA や DNA と相互作用して、細胞プロセスに影響を及ぼしていることが考えられている[6,7]。

このように、脂質は脂質分子としての働きもあるが、生体内では細胞間や図 1-1 のような細胞小器官を隔てている生体膜の主要構成成分の一つとして重要である。生体膜は約 5 nm の脂質二重膜からなる基本構造を持ち、もう一つの主要構成成分であるタンパク質がその膜内を拡散するような流動的な構造をもっている。その基本概念は図 1-3 の流動モザイクモデルであらわされる[8]。

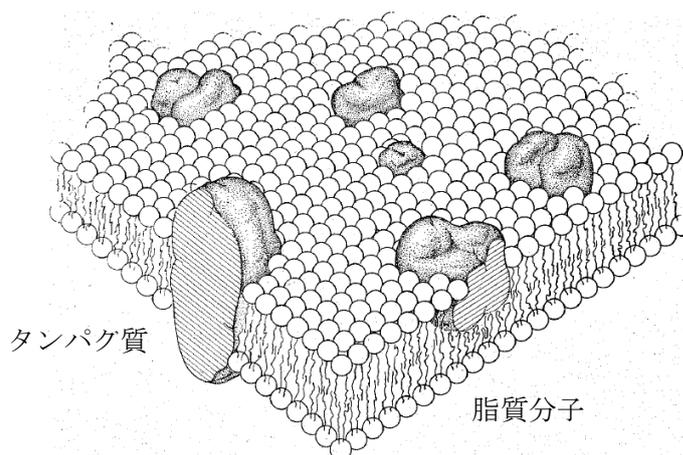


図 1-3 生体膜の流動モザイクモデル[8]

生体膜は細胞の内外、もしくは図 1-1 のような細胞小器官を隔てる壁としてのみ機能しているわけではなく、膜タンパク質などを介して生体膜内外の分子の輸送による情報伝達の場としても作用する。膜タンパク質と接している脂質二重膜も、単に膜タンパク質の支持体としての役割だけではなく、動的に構造を変化させて膜タンパク質の活性を制御したりしていることが明らかになってきている。このように、細胞内のあらゆる場所に存在する生体膜の界面は、多くの生体分子との相互作用の場として機能している。

タンパク質や DNA と脂質は生体内でも重要な役割を果たしているが、食品・医療などの産業分野においても利用研究がおこなわれている。タンパク質や脂質は両親媒性であるため、食品分野における乳化剤や安定化剤として用いられる。例えば、乳化剤としては脂質のレシチンが、安定化剤としてはタンパク質のカゼインなどが挙げられ、エマルジョンを

利用したマヨネーズやマーガリンなどの食品で用いられる。エマルションには油と水が存在するため、その界面で作用する乳化剤と安定化剤は重要な役割を果たしている。また、医療分野では、遺伝子治療を目的としたリポソームと DNA の複合体に関する研究が盛んにおこなわれている。遺伝子治療の初期には、遺伝子導入法としてウイルスベクターが用いられていた。しかし、安全性への懸念などからウイルスを使わないリポソーム-DNA 複合体の検討がおこなわれている。リポソームの構成物質として、脂質分子が利用されている。リポソーム-DNA 複合体そのものだけでなく、複合体が細胞に取り込まれる際にも DNA と脂質膜の相互作用が重要な役割を果たす。

タンパク質や核酸などの生体高分子と脂質分子との相互作用については徐々にわかってきているが、脂質分子の集合体である脂質膜と生体高分子がどのように相互作用して機能を発現しているかはほとんど明らかになっていない。それは、脂質膜は流動性を持ち、それを構成する脂質成分やその存在比は生物種や組織で大きな違いがあるため、単一の組成・構造をもつ核酸やタンパク質とは異なり不定形な構造をとるためである。

1-2 相互作用解析法と界面張力

生体高分子と脂質膜との構造・相互作用解析に用いられる主な解析手法をまとめたものが、表 1-1 である[9]。TEM (transmission electron microscope : 透過型電子顕微鏡) や AFM (atomic force microscope : 原子間力顕微鏡)などの顕微鏡観察は、脂質膜の形態を観察する手法である。TEM は高真空下での測定が必要なため、試料を凍結して観察する必要がある。AFM は溶液中での測定が可能であるが、基板への固定化などが通常必要であり、画像取得にも一定の時間が必要である。したがって、これらの観察手法は巨視的な構造を視覚的に得るのが主な目的となり、相互作用の時間変化を調べることは難しい。XRD (X-ray diffraction : X 線回折) は主に脂質二重膜の厚さなどの評価に用いられ、熱分析は相互作用に伴うエンタルピー変化やエントロピー変化などの熱力学定数を求める目的で用いられる。SPR (surface plasmon resonance : 表面プラズモン共鳴)は生体高分子が脂質膜と相互作用して吸着する際の微量な質量変化を測定し、結合速度定数と解離速度定数を求めることが可能で、そこから結合定数を算出することができる。ESR (electron spin resonance : 電子スピン共鳴) と蛍光分光法は通常プローブ分子を必要とし、それぞれスピンラベル化と蛍光標識化した分子を用いる。ESR は脂質分子にスピンラベル化した部位を導入することで、脂質二重膜の流動性などの性質や、相互作用に伴う変化を調べることができる。蛍光分光法は脂質に蛍光標識した部位を導入、もしくは蛍光物質を加えることで、脂質と生体高分子間の相互作用のモニタリングや動力学、疎水性などの物性を評価することができる。特に蛍光分光法は相互作用の時間変化をミリ秒オーダーで追跡することも可能であるが、蛍光標識したプローブ分子が必要となる場合が多く、得られる情報はプローブ分子周辺の情報に限られる。さらに、蛍光プローブが系に摂動を与えてしまう可能性もある。そのため、複雑な成分系では、プローブ分子周辺の情報から全体の脂質膜構造変化を議論することは難しい

場合が多い。

表 1-1 生体高分子と脂質膜の構造・相互作用解析に用いられる測定手法

測定法	評価項目
TEM, AFM	脂質膜形態の観察
XRD	周期構造
熱分析	エンタルピー, エントロピー変化
SPR	吸着量, 結合定数
ESR	二重膜の流動性や極性変化
蛍光法	脂質の混合や相互作用のモニター

脂質膜全体の情報を反映する指標として、膜張力が挙げられる。細胞は形と大きさが経時的に変化するため、脂質膜にも複数の機械的応力（膜張力）がかかる。Helfrich は 3 つの弾性係数からなるハミルトニアンによって、脂質膜の性質をあらわした[10,11]。その 3 つの弾性係数は、伸び弾性係数、平均曲率係数とガウス曲率係数である。平均曲率係数とガウス曲率係数は構成分子の分子構造に由来するほぼ固有の値と考えられる一方で、伸び弾性係数は脂質膜の表面にかかる張力に相関がある。表面（界面）張力は式(1-1)式であらわされるように、単位面積当たりの自由エネルギー変化に相当する。

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{T,P} \quad \text{式 1-1}$$

ここで γ , G と A は、それぞれ界面張力、自由エネルギー、面積である。したがって、生体高分子の相互作用に基づく脂質膜の界面張力変化は、脂質膜と生体高分子の相互作用に基づく系全体の自由エネルギー変化に相当する[12]。

脂質膜と生体高分子との相互作用を解析する際に、プローブ分子を用いた測定法ではプローブ分子近傍の一部の情報を検出しているために、脂質膜全体の構造を反映しているとは限らない。それに対して界面張力は脂質膜全体の構造を反映するパラメーターであるため、特に生体内で複雑な組成をもつ脂質膜を考慮する場合に都合が良い。脂質膜と生体高分子の相互作用解析手法として、系全体の熱力学的平衡の指標となる界面張力測定に着目することで、流動性を持ち組成が複雑な脂質膜全体と生体高分子が相互作用するダイナミクスの考察が可能となる。

1-3 脂質膜と生体高分子の相互作用解析に伴う表面張力変化測定例

生細胞膜には数多くの脂質やタンパク質などの夾雑物が含まれているため、生細胞膜を使って得られた界面張力変化の解釈は困難である。そこで、脂質膜と生体高分子の相互作用解析の研究では、組成が制御されたモデル脂質膜が用いられる。モデル脂質膜としては二重膜モデル（黒膜、リポソーム、担持二重膜など）と単分子膜モデルがあるが、二重膜

モデルでは摂動なく界面張力を測定することは困難である。そこで、主に気液界面の脂質単分子膜をモデルとして、脂質膜と生体高分子の相互作用解析に伴う表面張力変化が調べられてきた。

気液界面の脂質単分子膜の展開には、図 1-4 a のようなトラフが主に用いられてきた。トラフの仕切り板を調整することで、任意の分子占有面積にする[13]。それと共に、主にウィルヘルミー法を用いて表面圧（脂質がない場合との表面張力差）も測定される。その状態でシリンジ等を用いて水相に生体高分子溶液を添加して、相互作用に伴う表面圧の変化を観測する。いくつかの分子占有面積における表面圧の初期値に対して、生体高分子溶液を添加したことによる表面圧の増減をプロットすることで、図 1-4 b のグラフが得られる。表面圧の初期値が大きいほど脂質単分子膜が密にパッキングされるため、ある表面圧の初期値以上では、生体高分子との相互作用による表面圧の変化が観測されなくなる。このような表面圧の初期値は排除圧力と呼ばれており、この値が大きいほど、脂質膜と生体高分子の相互作用が強いという指標となる。

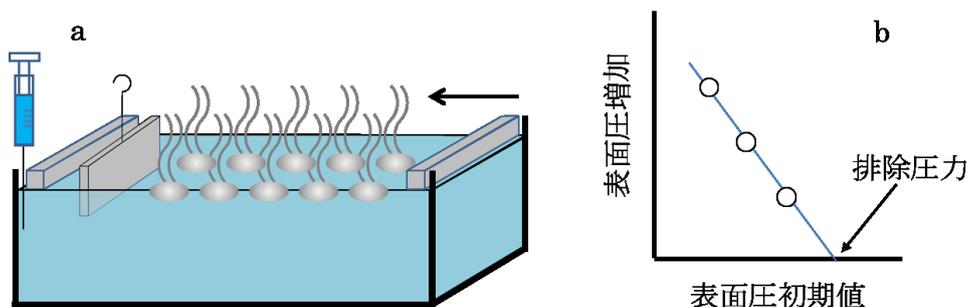


図 1-4 気液界面の脂質単分子膜と生体高分子との相互作用解析法[13]

a 生体高分子注入法, b 排除圧力の算出法

気液界面の単分子膜では上相が気体であるため、他の分析手法を比較的容易に組み合わせることができる利点がある。例えば、気液界面の脂質膜に生体高分子を相互作用させた際の変化を GIXS (grazing incidence X-ray scattering) や X 線反射率によって調べると、脂質分子の規則性や脂質膜の厚さと電子密度プロファイルが得られる。また、蛍光顕微鏡やブリュースター角顕微鏡 (BAM : brewster angle microscopy) といった観察手法や、in situ 赤外分光法を用いて単分子膜の構造や配向を調べることができる。

図 1-5 は、気液界面の DPPC (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) 単分子膜に DNA を相互作用させた際の BAM 像である[14]。図 1-5 a は水相に DNA がない場合で、図 1-5 b は DNA が水相に存在している場合の像であり、共に平均分子面積 $60 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ のものである。図 1-5 a の DNA がない場合は、DPPC 由来の 10 \mu m 程度の小さいドメインが数多く形成されていることがわかる。一方、図 1-5 b の DNA 存在下では、ドメインの形態が変化して、のこぎり状の細長い状態になっていることが確認された。

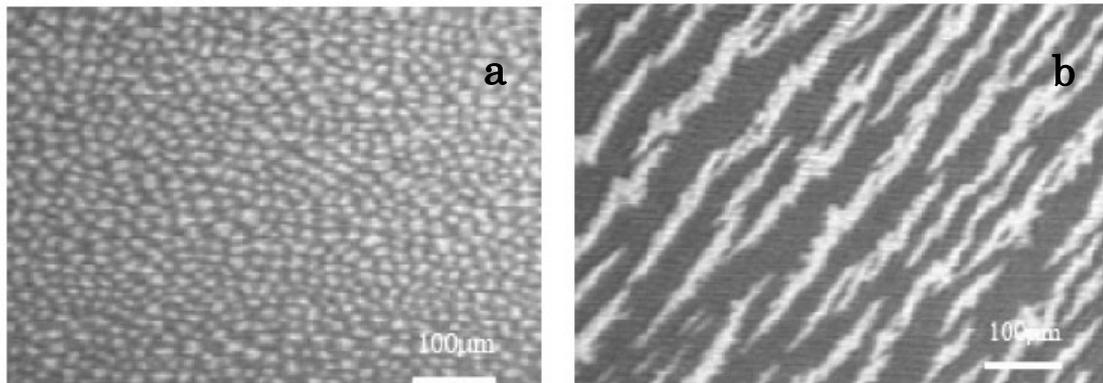


図 1-5 気液界面の DPPC 単分子膜の BAM 像[14]

a DNA なし b DNA あり

図 1-6 は、気液界面の DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) 単分子膜の PMIRRAS (polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy) スペクトルで、単分子膜面に偏光した光を照射している。a は粉末バルクの DMPC のスペクトルであり、その帰属が記載されている[15]。b と c は気液界面の DMPC 単分子膜の表面圧を、それぞれ 0 mN m^{-1} と 30 mN m^{-1} にした際の *in situ* PMIRRAS スペクトルを示す。 1740 cm^{-1} 付近の $\nu_{\text{C=O}}$ だけに着目すると、気液界面の DMPC 単分子膜のエステル結合について、以下のことがわかった。表面圧 0 mN m^{-1} で、DMPC バルクよりも 11 cm^{-1} だけレッドシフトしていることは、表面圧が小さくて隣接分子間の距離が非常に長いため、DMPC のエステル部位が水相の水分子と水素結合していることを示している。また、他の振動モード由来のピークと比較してこのピークの強度が強いため、C=O 結合が単分子膜面の方に優先的に配向している。さらに、そのピーク半値幅が粉末バルクよりも広いため、水相表面で無秩序化していると考えられた。一方、表面圧 30 mN m^{-1} では、 $\nu_{\text{C=O}}$ ピーク位置がバルクでの値に近づくため、エステル部位と水分子の水素結合が抑制されている。また、ピークの半値幅は表面圧 0 mN m^{-1} と 30 mN m^{-1} の中間となっているため、若干無秩序化が残っていることが示唆された。

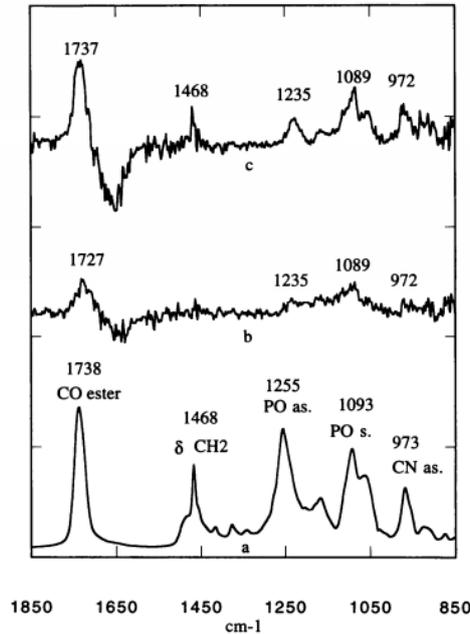


図 1-6 気液界面の DMPC 単分子膜の PMIRRAS スペクトル[15] a : DMPC, b : 気液界面の DMPC 単分子膜 (0 mN m^{-1}), c : 気液界面の DMPC 単分子膜 (30 mN m^{-1})

以上のように、脂質膜と生体高分子の相互作用に伴う表面張力変化の測定では、気液界面の脂質膜を用いて、ウィルヘルミー法による測定がおこなわれてきた。これにより主に生体高分子との相互作用前後の平衡状態における構造の変化などを比較することができる。

1-4 脂質二重膜と脂質単分子膜の構造比較

生体内の脂質膜は、脂質二重膜として存在するため、脂質二重膜と脂質単分子膜の比較に関する研究がおこなわれてきた。Ohki らは脂質二重膜と脂質単分子膜との比較を構造とエネルギーの観点から考察した[16]。図 1-7 は脂質二重膜と脂質単分子膜の炭化水素鎖の模式図である。(a)は脂質二重膜、(b)と(c)は脂質単分子膜で、それぞれ気液界面と液液界面の模式図を示す。緑点線枠部分の炭化水素鎖は秩序のある部分で、それ以外は無秩序になっている部分を表している。図 1-7 (a)の脂質二重膜では、親水性基近くの疎水性鎖部分はある程度秩序化しているが、末端部分にいくほど無秩序になっていく。図 1-7 (b)の気液界面の単分子膜では、炭化水素鎖はあるチルト角で、末端まで秩序構造をもって配向している。一方、図 1-7 (c)の液液界面の単分子膜では、水相近くの炭化水素鎖はあるチルト角で秩序構造をもって配向しているが、炭化水素末端に向かって無秩序になっていき、末端部分では溶媒と相互作用している。以上のように、生体内と同じ液晶状態にある脂質二重膜と類似したモデルは、気液界面よりも液液界面であることがわかる。特に膜の流動性をよく表わすモデルを考える際には、気液界面よりも液液界面を用いた実験の方が適していると考えられる。

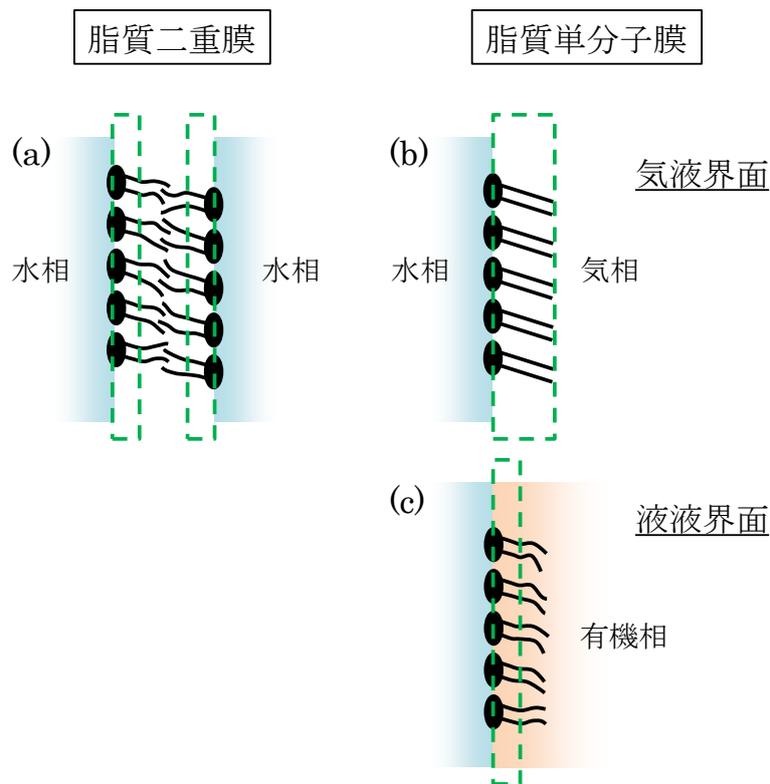


図 1-7 脂質二重膜と脂質単分子膜の炭化水素鎖の模式図
 (a) 脂質二重膜, (b) 気液界面単分子膜, (c) 液液界面単分子膜

1-5 本研究の目的

脂質膜と生体高分子の相互作用に伴う表面張力変化測定法として、これまで気液界面の脂質単分子膜が用いられてきた。排除圧力による相互作用の強さの比較や、脂質膜の構造や配向状態の変化を調べることは可能であるが、Ohki らの考察からもわかるように、生体内の流動性を表す脂質膜としてのモデルとしては、気液界面よりも液液界面の方が適している。さらに、気液界面の表面張力測定でよく用いられるウィルヘルミー法は、プローブとして白金板などのプレートを用いるため、脂質膜の構造を乱す可能性が高い。また、基本的に平衡状態にある表面張力を測定する手法であるため、脂質膜と生体高分子の相互作用に伴う表面張力の時間変化を調べることは難しい。

本研究では、非侵襲かつプローブ分子フリーで液液界面の界面張力の時間分解測定が可能な QELS (quasi-elastic laser scattering) 法を用いて、あらかじめ平衡状態で存在する液液界面の脂質膜に、水溶液側から生体高分子溶液を添加した直後からの界面張力変化を測定した。脂質膜を液液界面に水平に展開することができるため、脂質膜組成と外部環境（水相のイオン強度など）を自由に選択することで、生体高分子の脂質膜への吸着や複合体化、それに伴う脂質膜の構造変化を考察することを目的とした。QELS 法はプローブとしてレーザー光を用いて、界面の熱振動に伴う界面張力波によって散乱された光のドップラーシフト

トから界面張力を求める手法である。さらに、秒オーダーの時間分解測定が可能のため、界面振動現象や液液界面での反応などの界面に非侵襲で時間分解測定をおこなう系でよく利用されている[17-23]。

1-6 論文の構成

第2章 生体高分子と脂質膜

生体高分子と脂質膜について説明した。

第3章 界面張力測定法と QELS 法の原理と装置

まず、一般的な界面張力法について説明した。その後、本研究で用いた QELS 法の原理と装置について説明した。

第4章 水/クロロホルム界面に形成された脂質単分子膜へのリゾチーム吸着

生体環境下で正に帯電するリゾチームをモデルとして使い、タンパク質と脂質膜の相互作用に伴う界面張力変化を測定し、脂質膜の種類の違いによる吸着挙動の変化について考察した。

第5章 水/クロロホルム界面の脂質膜に対する DNA 複合体化に伴う界面張力変化

生体環境下で負に帯電する DNA と脂質膜の相互作用に伴う界面張力変化を測定し、脂質膜の種類の違いによる複合体化挙動の変化について考察した。

第6章 まとめ

生体高分子であるタンパク質と DNA と脂質膜の相互作用解析に伴う界面張力変化の結果についてまとめた。

第7章 謝辞

1-7 参考文献

1. R. Lipowsky and E. Sackmann, “*Handbook of Biological Physics. Volume 1: Structure and Dynamics of Membranes*“, **1995**, Elsevier Science, Amsterdam.
2. 宇井理生, 春日雅人, 香川靖雄, 野沢義則, “*生体膜—新しい膜学への招待*“, **1995**, 講談社.
3. 八田一郎, 村田昌之, “*生体膜のダイナミクス*“, **2000**, 共立出版.
4. 田村隆明, 村松正實, “*基礎分子生物学 第3版*“, **2007**, 東京化学同人
5. 大木和夫, 宮田英威, “*生物物理学*“, **2010**, 朝倉書店.
6. A. Michanek, N. Kristen, F. Höök, T. Nylander, and E. Sparr, *Biochim. Biophys. Acta*, **2010**, 1798, 829.
7. V. V. Kuvichkin, *Bioelectrochemistry*, **2002**, 58, 3.
8. S. J. Singer and G. L. Nicholson, *Science*, **1972**, 175, 720.
9. C. Madeira, L. M. S. Loura, M. R. Aires-Barros, and M. Prieto, *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, 1808, 2694.

10. W. Helfrich, *Z. Naturforsch.*, **1973**, C28, 693.
11. P. Bassereau, B. Sorre, and A. Lévy, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2014**, 208, 47.
12. I. Tinoco, Jr., K. Sauer, J. C. Wang, and J. D. Puglisi, “*PHYSICAL CHEMISTRY Principals and Application in Biological Sciences*” 猪飼 篤 監訳 “バイオサイエンスのための物理化学”, **2004**, 東京化学同人.
13. M. Eeman and M. Deleu, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2010**, 14, 719.
14. D. McLoughlin, R. Dias, B. Lindman, M. Cardenas, T. Nylander, K. Dawson, M. Miguel, and D. Langevin, *Langmuir*, **2005**, 21, 1900.
15. I. Cornut, B. Desbat, J. M. Turllet, and J. Dufourcq, *Biophys. J.*, **1996**, 70, 305.
16. S. Ohki and C.B. Ohki, *J. Theor. Biol.*, **1976**, 62, 389.
17. Z. Samec, A. Trojánek, and P. Krtil, *Faraday Discuss.*, **2005**, 129, 301.
18. T. Morisaku, H. Yui, M. Iwazumi, Y. Ikezoe, M. Fujinami, and T. Sawada, *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 2314.
19. H. Yui, Y. Ikezoe, and T. Sawada, *Anal. Sci.*, **2004**, 20, 1501.
20. K. Sakai, P.K. Choi, H. Tanaka, and K. Takagi, *Rev. Sci. Instrum.*, **1991**, 62, 1192.
21. S. Takahashi, A. Harata, T. Kitamori, and T. Sawada, *Anal. Sci.*, **1994**, 10, 305.
22. T. Toyota, T. Kimura, K. Miyoshi, and M. Fujinami, *J. Colloid Interface Sci.*, **2010**, 349, 632.
23. T. Nomoto, T. Toyota, and M. Fujinami, *Anal. Sci.*, **2014**, 30, 707.

第2章 生体高分子と脂質膜

第2章では、今回の研究に用いた生体高分子と脂質膜の構造について説明する。

2-1 生体高分子

生体高分子は生命活動のために生体内に存在する有機高分子であり、多糖類、核酸(DNA, RNA)、タンパク質が主に挙げられる。本研究ではこれらの生体高分子の中で、遺伝情報伝達に重要な役割を果たす核酸とタンパク質に着目して研究をおこなった。これ以降、本研究で述べる生体高分子とは、核酸とタンパク質を指すこととする。生体高分子と脂質膜の相互作用を解析する際に、電荷と立体構造は重要なファクターとなる。核酸とタンパク質の基本的性質を表2-1にまとめた。

表 2-1 核酸とタンパク質の基本的性質

生体高分子	電荷	構成単位	分子形状	2次構造
核酸	負	ヌクレオチド	線状	二重らせん
タンパク質	構成アミノ酸に依存	アミノ酸	球状, 繊維状	α ヘリックス, β シート

2-1-1 タンパク質の構造

タンパク質は表2-2に示す20種類のアミノ酸がペプチド結合によりつながった高分子である。したがって、タンパク質がもつ性質は、その構成アミノ酸に依存する。本研究のような脂質膜との相互作用においては、電荷と疎水性が重要な役割を果たす。タンパク質がもつ電荷は、酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸の数によって決まるため、その比率によって生体内での電荷が決まる。

表 2-2 タンパク質を構成するアミノ酸の種類[1]

性質		名称
中性		グリシン
親水性	正電荷をもつ	ヒスチジン
		リシン
		アルギニン
	負電荷をもつ	アスパラギン酸
		グルタミン酸
	アミドを含む	アスパラギン

		グルタミン
	ヒドロキシル基をもつ	セリン
		トレオニン
疎水性	芳香環をもつ	フェニルアラニン
		チロシン
		トリプトファン
	硫黄を含む	メチオニン
		システイン
	脂肪族の性質をもつ	アラニン
		ロイシン
		イソロイシン
		バリン
		プロリン

2-1-2 核酸の構造

核酸には DNA と RNA がある。核酸は酸、糖と塩基部位からなるヌクレオチドがリン酸ジエステル結合により重合した生体高分子である。糖の 2'位が H のものがデオキシリボースであり、それを構成単位とするものがデオキシリボ核酸 (DNA) である。一方、糖の 2'位が OH のものはリボースであり、リボ核酸 (RNA) である。

DNA は図 2-1 のような二重らせん構造をとる。2本の DNA 鎖が逆方向に、1本の軸を中心にならせんを巻いている。各 DNA 鎖の塩基同士は水素結合で向かいあい、アデニン (A) はチミン (T) と、グアニン (G) はシトシン (C) と水素結合して塩基対を形成する。塩基はらせんの内部にあり、図 2-1 (b)の赤矢印のように糖-リン酸の骨格は外を向いている。リン酸基が水素を放出して負に帯電するため、核酸は負に帯電する性質をもつ。

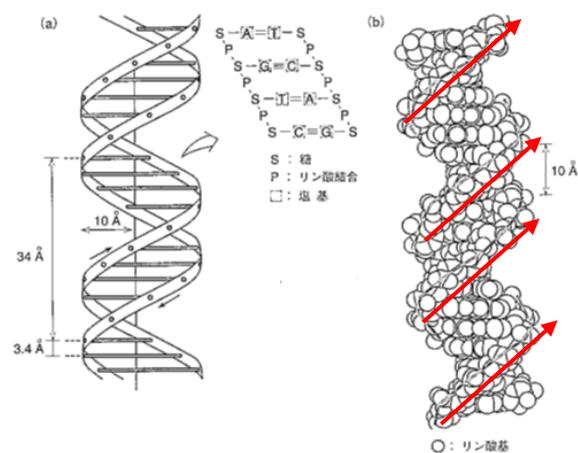


図 2-1 DNA の立体構造[2]

核酸の UV スペクトルは図 2-2 (a)のように 260 nm に吸収極大をもつ。これは核酸を構成する塩基が図 2-2 (b)のように 260 nm 付近に吸収極大をもつためである。二本鎖 DNA の場合、 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ の濃度で 260 nm の吸光度 $A_{260 \text{ nm}} = 1.0$ となることが知られているため、定量に用いられる。

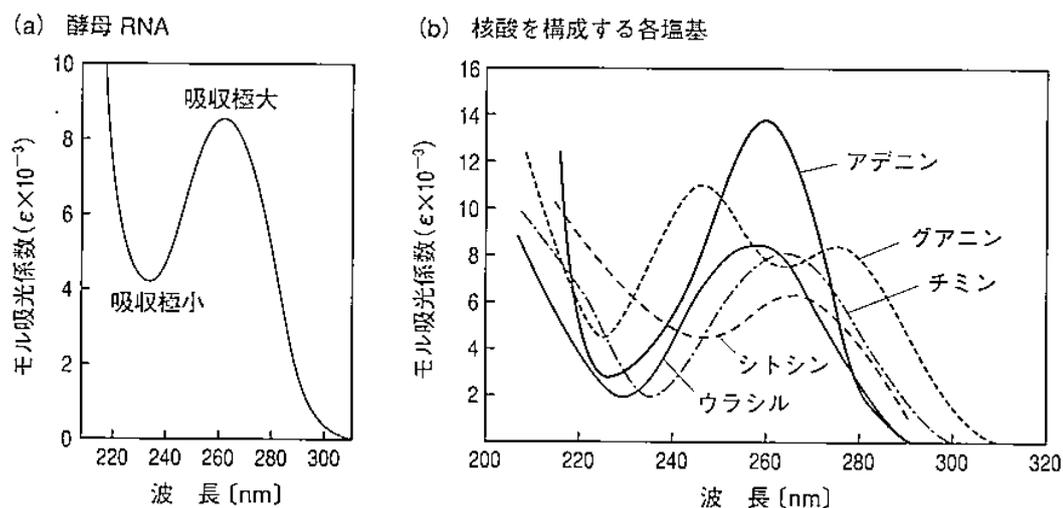


図 2-2 核酸を構成する塩基と核酸の UV スペクトル[2]

また、核酸の UV スペクトルは DNA 純度の指標としても用いられる。核酸の不純物として考えられるタンパク質は 280 nm に吸収極大をもつため、 $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$ が 1.8 以上になると DNA の純度が高いとされている[3]。

2-2 リン脂質の構造

生体内のリン脂質は、スフィンゴリン脂質とグリセロリン脂質の 2 種類に分類される。それぞれの基本構造を図 2-3 と図 2-4 に示す。スフィンゴリン脂質は、図 2-3 の赤部分のスフィンゴシン部位をもつリン脂質である。代表的なスフィンゴリン脂質には、セラミドやスフィンゴミエリンなどがあげられ、シグナル伝達などに利用されている。グリセロリン脂質は図 2-4 の赤部分のグリセロール部位をもつリン脂質である。生体内のリン脂質はほとんどがグリセロリン脂質であるため、本研究ではリン脂質としてグリセロリン脂質を用いた。

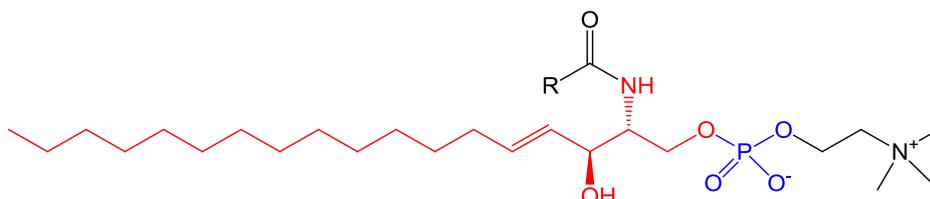


図 2-3 スフィンゴリン脂質の基本構造

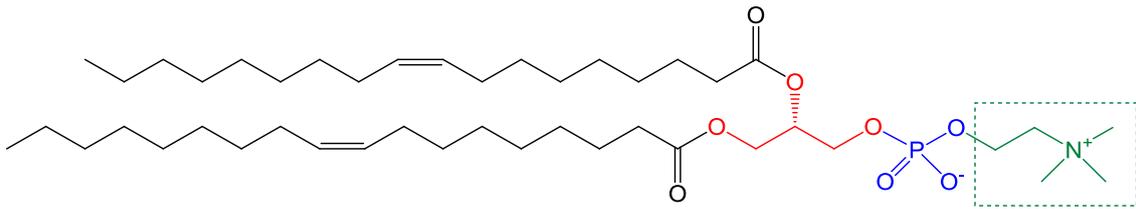


図 2-4 グリセロリン脂質の基本構造
(DOPC : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)

グリセロリン脂質は生体膜の主要構成成分であり，図 2-4 の緑点線枠で囲った親水基の構造の違いにより，主に図 2-5 の 5 つに分類される。このうち生体内の主成分として存在するのは，PC と PE であるが，微量成分も生体内で重要な役割を果たしている。リン酸部位が負電荷をもつため，親水性部位が正電荷をもつ PC と PE は双性イオン脂質であり，中性となる PS, PG と PI は負に帯電する性質をもつ。

- ・ホスファチジルコリン (PC)
- ・ホスファチジルエタノールアミン (PE)
- ・ホスファチジルセリン (PS)
- ・ホスファチジルグリセロール (PG)
- ・ホスファチジルイノシトール (PI)

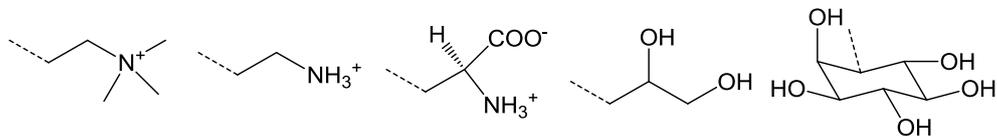


図 2-5 グリセロリン脂質の親水性部位

左から，コリン，エタノールアミン，セリン，グリセロール，イノシトール
点線はリン酸部位との結合部を示す

これらの生体内に存在する脂質とは別に，化学的に合成された脂質が存在する。その一つとして，図 2-6 の DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (chloride salt)) が挙げられる。DOTAP はカチオン性脂質として合成されたもので，カチオン性リポソームの構成成分として使用することで，負に帯電する DNA との複合体形成に用いられる。

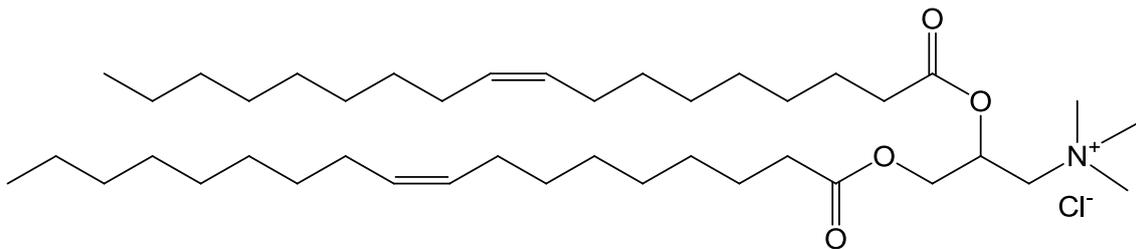


図 2-6 DOTAP の構造式

2-3 脂質膜構造

リン脂質の重要な物性のひとつに、脂質膜の相転移温度がある。リン脂質は自己組織化して一般的に図 2-7 のいずれかの二重膜構造をとるが、相転移温度 (T_m) の前後で特に炭化水素鎖部分の構造に大きな違いがある。相転移温度よりも高温側では炭化水素部位は乱れた構造となっており、液晶 (L_α) 相と呼ばれる。低温側では炭化水素部位も規則正しく並んだ結晶状態になっており、ゲル (L_β) 相と呼ばれている。その中間の温度領域では炭化水素部位はゲル相と同様な結晶状態となっているが、膜は湾曲した状態になっているリップル (P_β) 相と呼ばれる。生体内では基本的に炭化水素部位が乱れた状態である液晶相になっている。この相転移温度はリン脂質構造に依存し、脂肪酸部位の炭素鎖が短いほど、また不飽和結合がある方が、相転移温度は低くなる傾向がある。

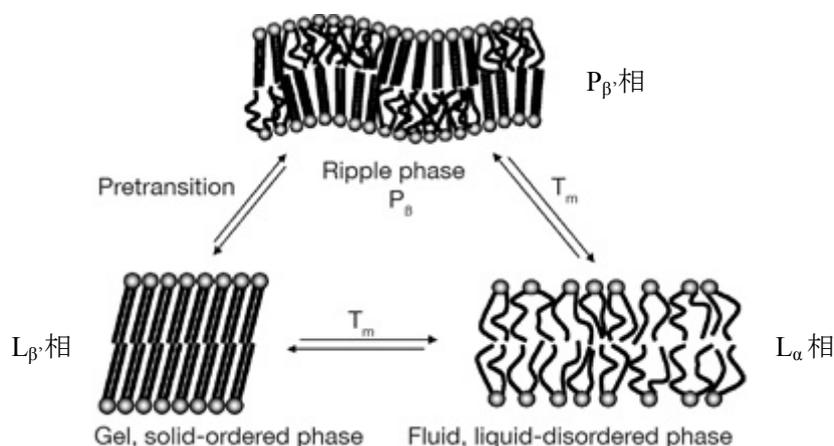


図 2-7 脂質膜の相転移の模式図[4]

2-4 生体膜モデル

生細胞は数十 μm 程度の大きさしかなく夾雑物が多いため、脂質膜に関する研究は一般的に生体膜モデルを使っておこなわれる。図 2-8 は、一般的に用いられる脂質膜モデルの模式図である[5]。最も単純な生体膜のモデルとしては、水/有機相界面が挙げられる。このモデルは水を脂質膜の親水性部位、有機相を疎水性部位とモデル化したものであるが、極端に簡素化されたモデルである。逆に生体の脂質二重膜を良くモデル化したものとして、黒膜またはリポソームが挙げられる。黒膜はテフロン製の数 mm 程度の穴に作成した脂質二重膜で、電位応答性などの研究でよく用いられる。その場合は μm オーダーの黒膜でも十分であるが、界面張力を測定するためにはもっと大きな黒膜が必要となる。Petelska らは直径 1.5 mm のホスファチジルエタノールアミン黒膜を作成し、その界面張力が pH により $2 \sim 4 \text{ mN m}^{-1}$ 程度であることを示した[6]。QELS 測定を目的として 3 mm 程度の黒膜作成検討をおこなったが、黒膜の安定性が悪いため、検討を断念した。Petelska らも黒膜の界面張力は報告しているが、黒膜へ圧力をかけた状態で界面張力測定をおこなっていることもあり、相互作用解析などへの応用は検討していない。黒膜よりも安定な二重膜モデルとしては、

リポソーム（ベシクル）が挙げられる。リポソームは脂質二重膜からなる球状の粒子が水溶液に分散しているのもので、数十 nm～数百 μm の大きさをもつ。多層のものと同層のものがあり、生体膜モデルとしてよく用いられている。細胞と同程度の大きさであるため顕微鏡で観察可能となる利点であるが、複数の脂質を任意に混合したリポソームを作ることが難しい場合もある。担持二重膜も用いられることが多い。担持二重膜はマイカ、ガラスやシリコンウエハなどの固体表面に二重膜を担持させたものであり、二重膜の作成が容易で、ベシクルよりも安定である利点がある。担持されて固定化されているため、AFM などによる観察などに適している。ただし、二重膜の片方の膜表面が固体表面に固定化されているため、流動性などの点で固体表面の影響を受けてしまう。

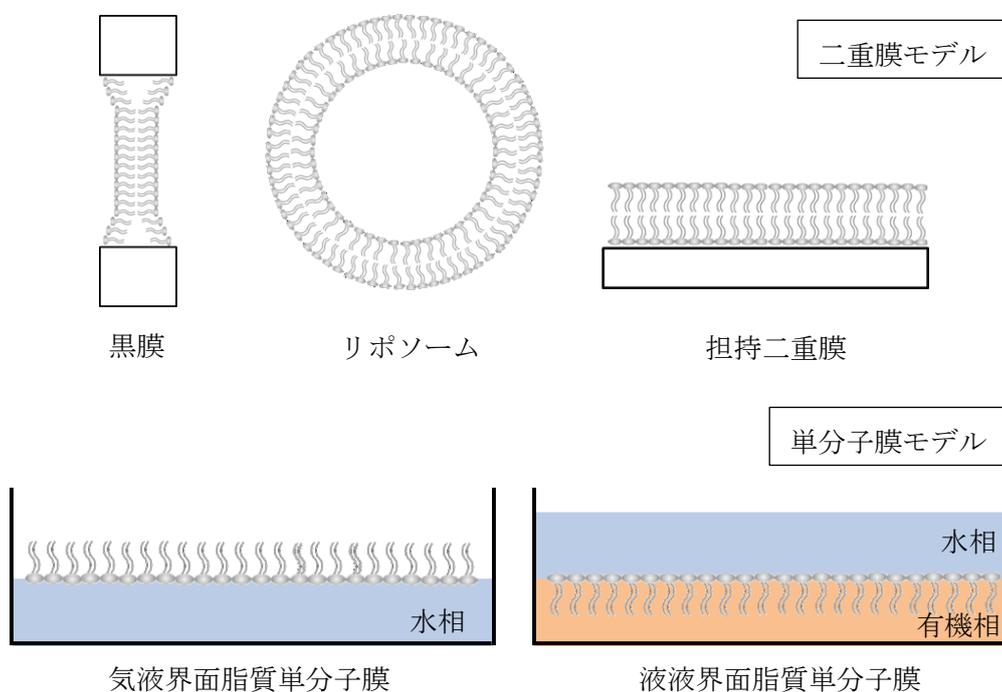


図 2-8 脂質膜モデルの模式図[5]

より単純化されたモデルとしては、脂質単分子膜モデルが挙げられる。これは水／空気界面、もしくは水／有機相界面に脂質を吸着させ、脂質二重膜の半分としてモデル化したものである。水／空気界面の脂質単分子膜は、トラフに展開した脂質単分子膜とウィルヘルミー法による表面張力測定を用いることで比較的簡便に実験をおこなうことができるが、1-3 に述べたように、脂質膜と生体高分子の相互作用前後の平衡状態における構造を比較するのに適している。また、気相側に生体高分子が貫通しにくいために、脂質膜表面への単純な吸着過程の解析などには適しているが、吸着物質が脂質膜の親水性基を貫通して脂質膜構造自体が大きく変化する場合には適さない[7]。水／空気界面よりも流動性の高い脂質単分子膜モデルとしては、液液界面の脂質単分子膜モデルが挙げられる。水／空気界面で

は脂質の疎水性部位が空気表面にあるため疎水性部位の運動に制限があるが、液液界面の場合には疎水性部位が有機溶媒と接しているため、空気の場合よりも疎水性部位が柔軟に動くことが可能となる。また、水／空気界面では界面方向の二次元に脂質分子の運動が制限されるのに対して、液液界面では界面方向と直行する方向にも比較的柔軟に動くことが可能である。このように、液液界面の脂質単分子膜は、実際の細胞の流動性をよく反映したモデルとなることが期待でき、かつ平面上で安定に保つことができる利点がある。一方、液液界面を用いた研究は、水／空気界面ほど盛んではない。液液界面は水相と有機相のバルク相に挟まれた数 nm 程度の厚さのごく薄い領域である。そのため、液液界面の分析手法としては、界面選択性を持ち、バルク相の影響を受けず、厚さ数 nm という微小領域からの微弱なシグナルを測定できる手法である必要がある。そのような制限のため、水／空気界面と比較すると適用できる測定手法が限られてくるのが、液液界面の脂質単分子膜が盛んに利用されない原因である。

2-5 実験に用いた脂質分子

本研究ではタンパク質やDNAなどの電荷をもつ生体高分子との相互作用を調べるのが目的であるため、脂肪酸部位は不飽和度をもつオレイン酸に統一し、親水性部位の異なるグリセロリン脂質を用いた。本研究で用いたリン脂質はすべてグリセロリン脂質であるため、これ以降のリン脂質はグリセロリン脂質を指すこととする。今回の研究で用いたリン脂質の構造を図 2-9 に示す。生体環境中での各脂質の電荷は、DOTAP は正、DOPE と DOPC は中性（双性イオン）、DOPS と DOPG は負となる。また、各脂質の相転移温度は、DOTAP, DOPE, DOPC, DOPS と DOPG で、それぞれ -11.9 [8], -16 [9], -17 [9], -11 [9], -18 [9] °Cである。

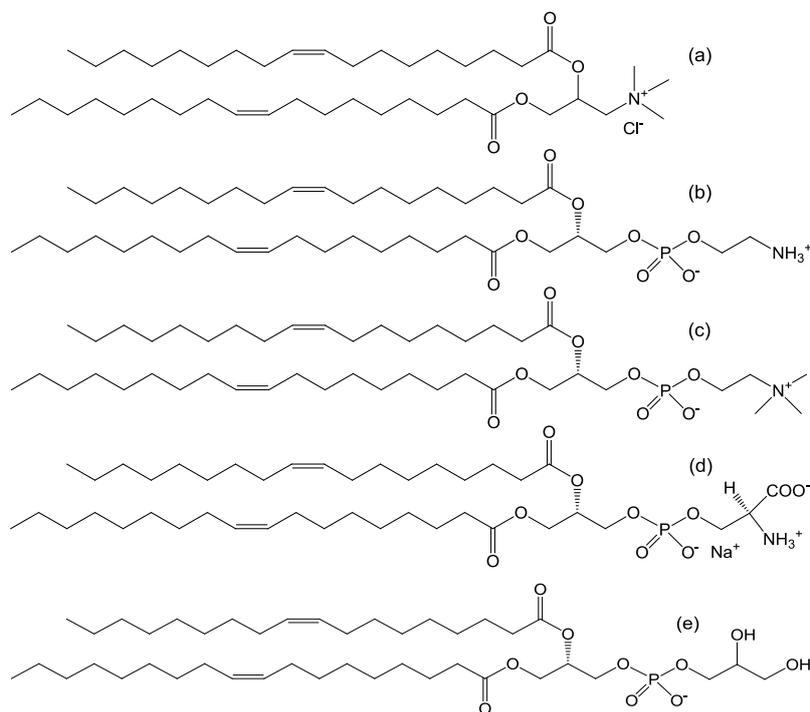


図 2-9 リン脂質の構造

(a) DOTAP, (b) DOPE, (c) DOPC, (d) DOPS, (e) DOPG

DOPE : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine

DOPS : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt)

DOPG : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (sodium salt)

2-6 液液界面の脂質吸着量の決定[10]

界面における脂質分子の吸着量は式 2-1 の Gibbs 吸着等温式で表される。

$$\frac{d\gamma}{RT} = - \sum_i (\Gamma_i d \ln a_i) \quad \text{式 2-1}$$

ここで、 γ は界面張力、 R は気体定数、 T は温度、 Γ は表面過剰量、 a は活量である。希薄溶液において、式 2-1 の活量 a は、濃度 c で代用できる。さらに、溶質が非イオン性、もしくはイオン性であっても共存塩が存在している状況下において、式 2-1 は式 2-2 となる

$$\Gamma = - \frac{1}{RT} \frac{d\gamma}{d \ln c} \quad \text{式 2-2}$$

したがって、 $\gamma - \ln c$ プロットの傾きから、表面過剰量 Γ を求めることができる。

表面過剰量 Γ は、式 2-3 の平均分子面積 A で表されることが多い。表面過剰量が単位面積当たりのモル数であるのに対して、 A は1分子が占める面積に相当する。

$$A = \frac{1}{N_a \Gamma} \quad \text{式 2-3}$$

ここで、 N_a はアボガドロ定数である。

図 2-10(a)は、水／クロロホルム界面における界面張力(平衡値)のクロロホルム中の DOPS 濃度依存性を示し、図 2-10(b)は横軸を自然対数にしたものである。界面張力が平衡値に達していない DOPS 濃度 40 μM 以下の領域の $\gamma - \ln c$ プロットの傾きから、液液界面における DOPS の表面過剰量は $2.1 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-2}$ 、平均分子面積は $78 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ となった。

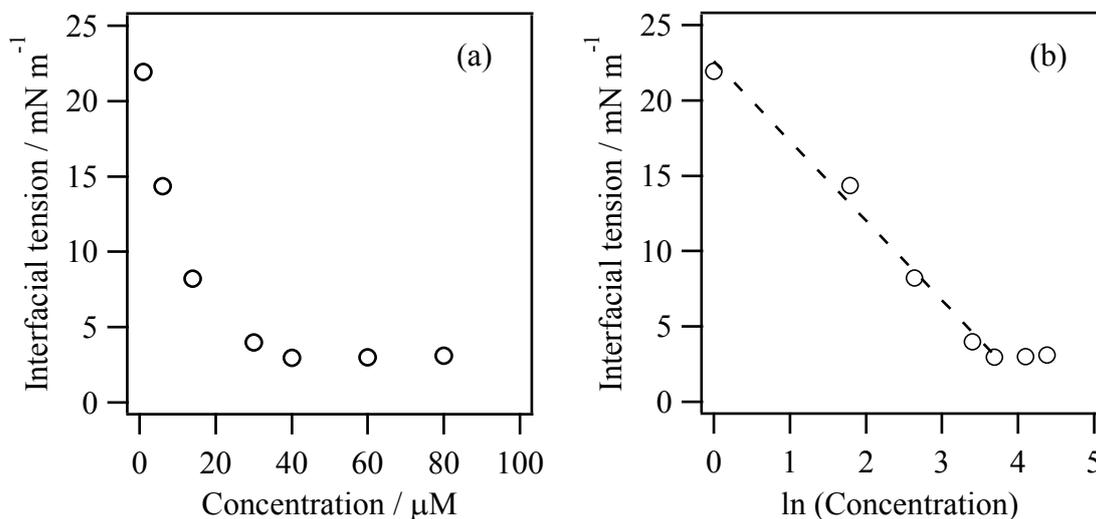


図 2-10 水／クロロホルム界面における界面張力（平衡値）のクロロホルム中の DOPS 濃度依存性 (a) 横軸：濃度, (b) 横軸：濃度の自然対数

2-7 生体高分子と脂質膜との相互作用

本研究で用いた生体高分子はタンパク質と DNA である。これらの生体高分子が脂質膜と相互作用する際には、タンパク質とは「吸着」、DNA の場合には「複合体化」と呼ばれる。脂質膜へのタンパク質の吸着の場合には、 α シートや β シートといったタンパク質の 2 次構造の変化が起きることが多い。一方、脂質膜と DNA の複合体化の場合には、DNA の二重らせん構造は保持したまま、脂質膜の構造が主に変化する。本研究において、タンパク質と脂質膜の相互作用では吸着、DNA と脂質膜の相互作用では複合体化として区別することにする。

2-8 生体高分子と脂質膜の相互作用に伴う界面張力変化要因

本研究において、界面張力の減少要因として、主に吸着、脂質膜の構造変化、再配置の 3 つを考慮した。その模式図を図 2-11 に示す。吸着は、脂質膜表面に生体高分子が吸着した状態で、この段階では脂質膜構造は変化しない。脂質膜の構造変化は、生体高分子が脂質膜内部に挿入され、脂質膜の構造が変化した状態である。再配置は、急激な界面張力減少の後の、緩やかな界面張力減少過程である。この過程は低分子化合物の吸着の際には観測されず、タンパク質のように吸着後に構造変化を起こすような化合物で観測されることが多い[11]。実際には生体高分子(特にタンパク質)自身の構造変化も考慮する必要があるが、

生体高分子が構造変化を起こすと、それに伴い脂質膜構造も変化することがほとんどである。

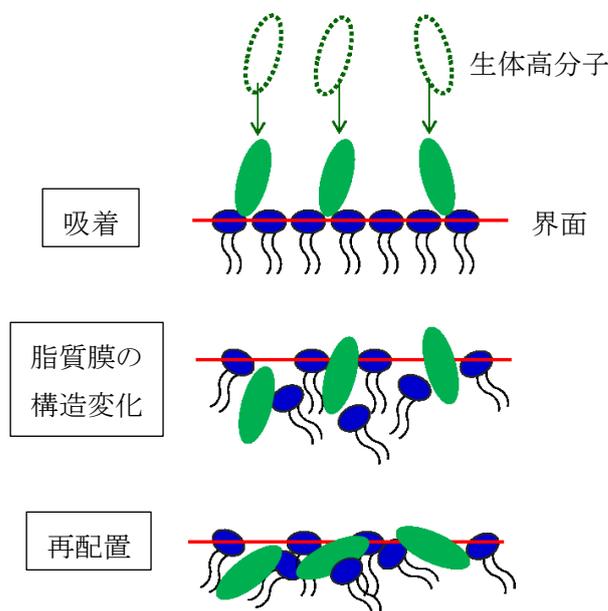


図 2-11 本研究で考慮した界面張力の減少要因の模式図

2-9 気液界面へのタンパク質の吸着に伴う表面・界面張力変化の定量的検討例

気液界面に対するタンパク質の吸着に伴う表面張力変化はよく研究されてきたが、初期の研究例は定性的なものであった。しかし、定量的な取り扱いも研究されてきており、Millerらは以下のような報告をおこなっている[12]。この報告例は気液界面のものであるが、液液界面でも同様に扱うことができる。

タンパク質のような高分子の吸着を取り扱う際には、物質の界面への拡散過程を表す Ward-Tordai 式に加えて、吸着層の平衡状態を表す式を組み合わせたものを用いる必要がある。吸着層の平衡状態を表す式としては、表面層の状態式、吸着等温式、異なる吸着面積における吸着分布関数がある。以下にその概要を記述する。

タンパク質分子は異なるモル面積（吸着面積）で吸着するという実験事実を元に理論式は考えられている。表面被覆率が非常に小さいときは最大のモル面積 ω_{\max} で、表面被覆率が大きいときは最小のモル面積 ω_{\min} をとる。溶媒のモル面積 ω_0 が ω_{\min} よりもかなり小さいとすると、表面層に対して式 2-4 の状態式が成り立つ。

$$-\frac{\Pi\omega_0}{RT} = \ln(1 - \omega\Gamma) + (\omega - \omega_0)\Gamma + a(\omega\Gamma)^2 \quad \text{式 2-4}$$

ここで、 Π は表面圧、 R は気体定数、 T は温度、 a は分子間相互作用パラメーターである。

また、 Γ ($\Gamma = \sum_{i=1}^n \Gamma_i$) は n 個の状態におけるタンパク質の総吸着量、 θ ($\theta = \omega\Gamma = \sum_{i=1}^n \omega_i\Gamma_i$) は総表面被覆量、 ω は吸着したタンパク質の平均分子面積である。

それぞれの状態 j の吸着等温線の式は式 2-5 で表される。

$$b_j c = \frac{\omega \Gamma_j}{(1 - \omega \Gamma)^{\omega_j / \omega}} \exp[-2a(\omega_j / \omega) \omega \Gamma] \quad \text{式 2-5}$$

ここで、 c はバルクのタンパク質濃度、 b_j は状態 j の平衡吸着定数である。 b_j はすべての状態 j で同じ値を取ると仮定する。

状態 $j = 1$ と比較した時、すべての状態における吸着分布関数は式 2-6 で表される。

$$\Gamma_i = \Gamma \frac{(1 - \omega \Gamma)^{(\omega_i - \omega_1) / \omega} \exp[2a(\omega_i - \omega_1) \Gamma]}{\sum_{i=1}^n (1 - \omega \Gamma)^{(\omega_i - \omega_1) / \omega} \exp[2a(\omega_i - \omega_1) \Gamma]} \quad \text{式 2-6}$$

表面層の状態式と吸着等温式が、吸着の動力学と表面張力の動的变化の基礎となる。式 2-7 の Ward-Tordai 式は吸着の動的变化と吸着層における濃度の一般的関係を表す式である。

$$\Gamma(t) = 2 \sqrt{\frac{D}{\pi}} \left[c_0 \sqrt{t} - \int_0^{\sqrt{t}} c(0, t - t') d(\sqrt{t'}) \right] \quad \text{式 2-7}$$

ここで、 c_0 はタンパク質のバルク濃度、 t は時間、 t' はダミーの積分変数である。式 2-7 を用いることで、吸着等温線の式 2-5 に対して個別の $\Gamma(t)$ が求められる。それが拡散律速の吸着モデルに対して、追加の境界条件となる。

図 2-12 は β -カゼインが気液界面に吸着する際の表面張力の時間変化を示す。実測のプロットに対して、式 2-4 から式 2-7 の理論曲線のフィッティングがよい一致を示している。約 500 秒程度までの表面張力がほとんど変化しない領域は、 β -カゼインが界面へと拡散して吸着するまでの過程をあらわしている。式 2-4 から式 2-7 の理論式は、拡散律速で吸着が起こる過程の理論曲線であるため、タンパク質が界面に到達すると吸着がすぐに起きることを前提としている。したがって、表面張力が変化しないこの領域の長さを決めるパラメータは基本的にタンパク質の濃度となる。本研究例ではこの系に脂質膜が加わり、さらにタンパク質の構造変化も複雑になるため、この理論式を適用することは難しい。また、吸着量が増えると表面張力が小さくなることを前提としているため、時間の経過とともに表面張力が減少していく過程のみを表すことができる (4000 秒以降の界面張力が一定な領域は、平衡値を示している)。

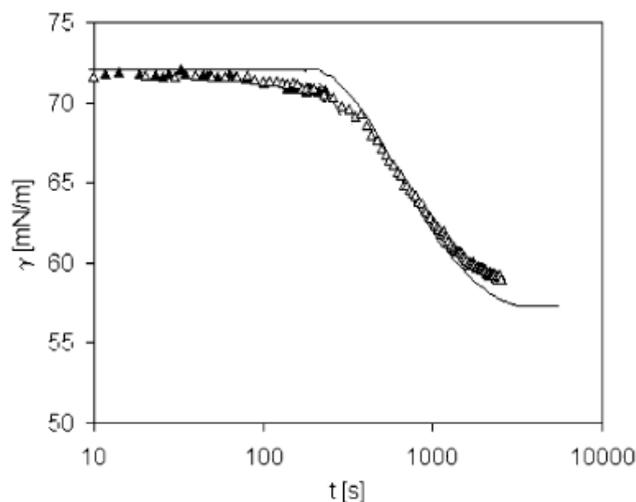


図 2-12 $2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ の β -カゼインが気液界面に吸着する際の表面張力の時間変化[12]

2-10 中間領域に準安定状態を持つ系の定量的検討例

生体環境中で電荷を持つ生体高分子と脂質膜の相互作用では、静電相互作用が重要となる。強い静電相互作用が原因で、吸着の途中の段階で界面張力の値がほぼ一定な準安定状態が観測される場合がある。中間領域で界面張力がほとんど変化しない系における理論式を検討した例を紹介する。図 2-13 の黒丸は、水相が $3.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ SDS (sodium dodecyl sulfate) だけで、それ以外の塩が存在しない場合の、ドデカン/水界面への SDS 吸着に伴う界面張力の時間変化を示したものである[13]。このように共存イオンが存在しない条件下において、SDS のようなイオン性界面活性剤の吸着に伴う界面張力変化では、約 100 秒後に観測されるような界面張力がほとんど変化しない領域が観測される。このような挙動は非イオン性界面活性剤では観測されず、定性的に以下のように説明されている。まず界面に SDS が吸着して界面占有率が高くなるにつれて界面張力が減少するが、強い静電相互作用のために系が自由エネルギーの局所的な極小値に達していったん吸着が止まるために、界面張力がほとんど変化しない領域が観測される。この準安定状態は、より安定な相のドメインの核ができるまで続く。核形成が起点となって吸着が再開して界面占有率が再度上昇することで、界面張力が減少し始める。図 2-13 の約 100 秒後の界面張力がほとんど変化しない領域が観測されるのは、強い静電相互作用が存在するためである。しかし、 0.1 M NaCl などの共存塩が存在すると電荷が遮蔽されるため、図 2-13 の白丸のように、非イオン性界面活性剤と同様な単調な界面張力減少となる。非イオン性界面活性剤の吸着過程は拡散律速であるが、イオン性界面活性剤の吸着過程は、強い静電相互作用のために静電相互作用の障壁を乗り越える段階が律速となる。界面張力がほとんど変化しない領域が観測されるのは、以上のような理由のためである。

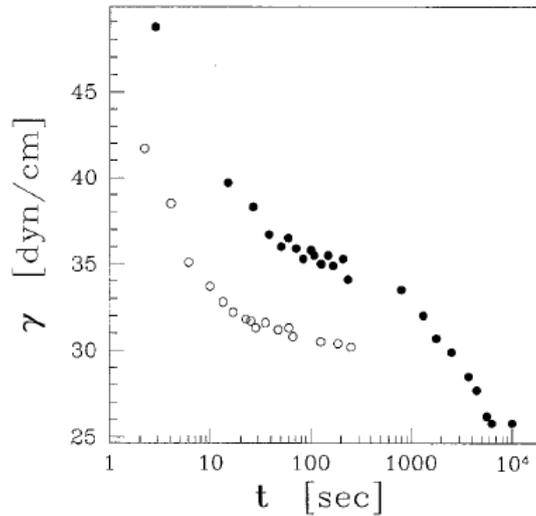


図 2-13 ドデカン／水界面への SDS 吸着に伴う界面張力変化（黒丸： 3.5×10^{-4} M SDS のみ（共存塩なし），白丸：0.1 M NaCl 中の 4.86×10^{-5} M SDS） [13]

Diamant と Andelman は，共存塩が存在しない条件下でのイオン性界面活性剤の界面への吸着に伴う界面張力変化関数を，3つの寄与（界面活性剤，その対イオン，静電場）を考慮して導いた[13]。

$$\Delta\gamma[\varphi_0^+(t)] = \{T[\varphi_0^+ \ln(\varphi_0^+ + \varphi_b^+) + (1 - \varphi_0^+) \ln(1 - \varphi_0^+)] - \alpha\varphi_0^+ - \left(\frac{\beta}{2}\right)(\varphi_0^+)^2 + 2T \left[\varphi_0^+ \sinh^{-1}(b\varphi_0^+) - \frac{\left(\sqrt{(b\varphi_0^+)^2 + 1} - 1\right)}{b} \right] \} / (a^+)^2$$

式 2-8

ここで， φ_0^+ と φ_b^+ はそれぞれ界面とバルクの体積分率， T は温度， α は表面活量パラメーター， β は側方相互作用パラメーター， b は Debye-Hückel 遮蔽長さ， a は界面活性剤の分子面積である。

図 2-14 は式 2-8 に $a^+ = 8.1 \text{ \AA}$ ， $\varphi_b^+ = 1.1 \times 10^{-4}$ ， $\alpha = 14 \text{ T}$ ， $\beta = 9 \text{ T}$ を用いた際の，界面張力と界面占有率のグラフである。実測値へのフィッティングまではおこなわれていないが，静電場を考慮することで，図 2-13 のように界面張力がほとんど変化しない領域を再現することが可能であることがわかる。

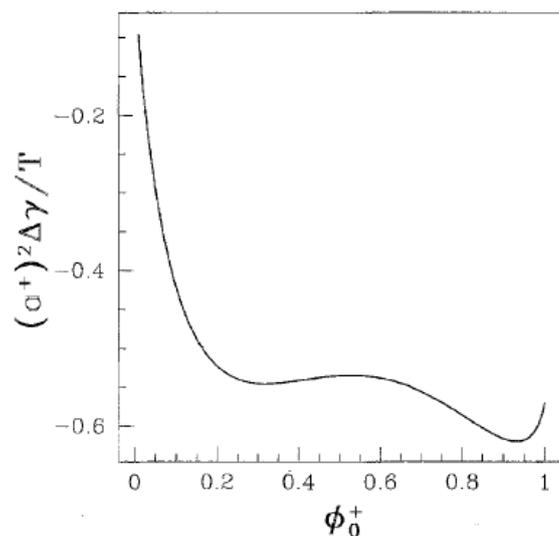


図 2-14 界面張力と界面占有率の関係[13]

2-11 参考文献

1. 田村隆明 村松正實, “基礎分子生物学”, 2007, 東京化学同人.
2. 大木和夫・宮田英威, “生物物理学”, 2010, 朝倉書店.
3. C. R. Cantor and P. R. Schimmel, “*Biophysical Chemistry*”, 1980, W. H. Freeman and Co., San Francisco, CA.
4. M. Eeman and M. Deleu, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2010**, *14*, 719.
5. H. Zhao and P. Lappalainen, *Mol. Biol. Cell*, **2012**, *23*, 2823.
6. A. D. Petelska and Z. A. Figaszewski, *Biochim. Biophys. Acta*, **2002**, *1567*, 79.
7. G. Brezinsinski and H. Möhwald, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2003**, *100-102*, 563.
8. B. Moghaddam, S. E. McNeil, Q. Zheng, A. R. Mohammed, and Y. Perrie, *Pharmaceutics*, **2011**, *3*, 848.
9. J. R. Silvius, “*Thermotropic Phase Transitions of Pure Lipids in Model Membranes and Their Modifications by Membrane Proteins*” in *Lipid-Protein Interaction*, **1982**, John Wiley & Sons, Inc., New York.
10. G. T. Barnes and I. R. Gentl, “*Interfacial Science, An Introduction*”, **2011**, Chap. 3, Oxford University Press, London.
11. B. C. Tripp, J. J. Magda, and J. D. Andrade, *J. Colloid Interface Sci.*, **1995**, *173*, 16.
12. R. Miller, V. B. Fainerman, E. V. Aksenenko, M. E. Leser, and M. Michel, *Langmuir*, **2004**, *20*, 771.
13. H. Diamant and D. Andelman, *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **1997**, *103*, 51.

第3章 界面張力測定法と QELS 法の原理と装置

この章では、一般的に用いられる界面張力測定法について説明した後に、本研究に関連深い手法について、詳しく説明する。その後、本研究で用いた QELS 法の原理と測定装置について説明する。

3-1 界面張力測定法

図 3-1 は一般的な界面張力測定法を示したものである[1]。ウィルヘルミー法は空気/水界面の脂質単分子膜の表面張力測定によく用いられる手法であり、白金板などのプローブを界面に接触させながら測定する手法である。リング法は界面からリングが離れる際にかかる力から測定する手法である。ドロップボリューム法は、高密度溶液相へと低密度溶液相をキャピラリーから注入し、キャピラリーから遊離する液滴の体積から測定する。約 1 秒程度という短時間からの界面張力測定が可能であるが、数百秒～数十分までしか測定できない。ペンダントドロップ法は、液相の中にもう一方の液相をキャピラリーから注入し、液滴の形状から界面張力を算出することができる。動的界面張力測定に用いられることが多い手法である。スピニングドロップ法は、キャピラリー内に 2 液を注入し、キャピラリーを高速回転させた際の液滴の画像から測定する方法である。界面張力の値が小さいときに用いられる。

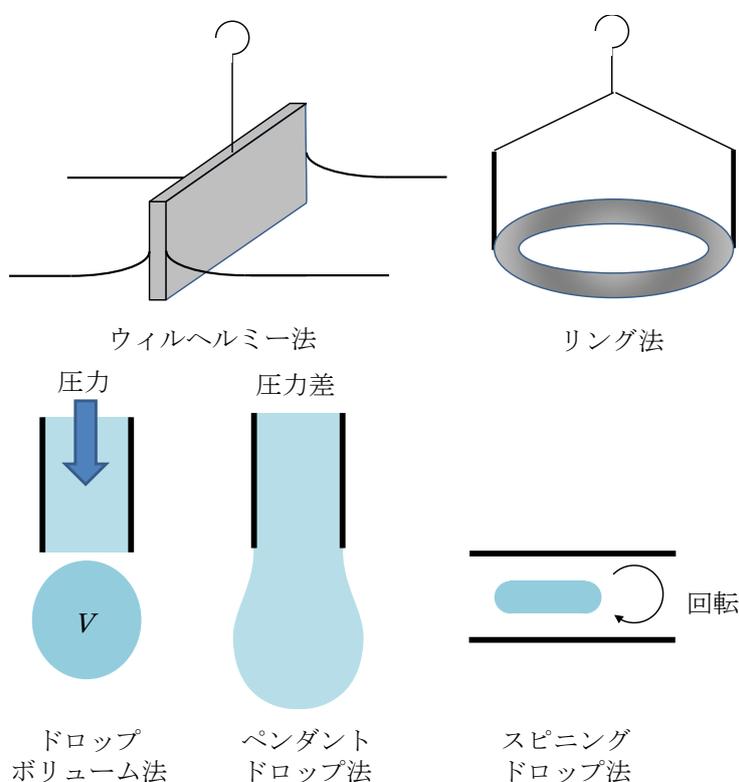


図 3-1 一般的な界面張力法の分類

次に、これらの界面張力測定法の中から、気液界面の単分子膜の表面張力測定に用いられるウィルヘルミー法、脂質二重膜の界面張力測定で用いられる Petelska らの方法、時間分解測定でよく用いられるペンダントドロップ法について詳しく説明する。

3-1-1 ウィルヘルミー法

ウィルヘルミー法は、気液界面の脂質単分子膜の表面張力測定の際に用いられる方法である（図 3-2） [2]。よく洗浄したプレート（白金やろ紙などがよく用いられる）を液体に浸すと、液体が濡れあがる。この際に表面張力によりプレートは液中に引き込まれるため、プレートにかかる力を電子天秤などで読み取ることで、式 3-1、または式 3-2 から表面張力を決定することができる。

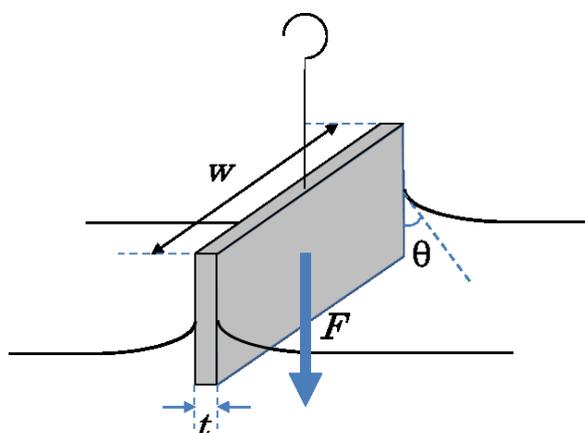


図 3-2 ウィルヘルミー法の模式図

プレートの下方向にかかる力を F とすると、

$$F = Pg + 2\gamma(w + t)\cos\theta - A \quad \text{式 3-1}$$

ここで、 P はプレートの質量、 g は重力加速度、 A は浮力、 w と t ($t \ll w$) はそれぞれプレートの幅と厚さであり、 θ は接触角である。プレートとして熱した白金を用いると、プレートが完全に濡れた状態になり、接触角 θ が 0 になる。そこで式 3-1 は式 3-2 のようになる。

$$F = Pg + 2\gamma w - A \quad \text{式 3-2}$$

ここで、プレートの位置を固定したままで界面の組成が変化すると、 P と A は一定なので、

$$\Delta F = 2w(\gamma_{\text{solution}} - \gamma_{\text{water}}) = -2w\pi \quad \text{式 3-3}$$

ここで、 π は表面圧と呼ばれる。

このようにウィルヘルミー法はプレートを用いるため、界面に存在する脂質膜構造に影響を及ぼすことが懸念される。また、時間分解測定は分オーダー程度で用いられることが多い。

3-1-2 Petelska らによる脂質二重膜の界面張力測定法

Petelska らは、pH、イオン強度や脂質の種類を変化させた際の脂質二重膜の界面張力値を数多く報告している[3,4]。彼らを用いた実験装置は図 3-3 のようなものである。式 3-4 の Young - Laplace 式を利用したもので、脂質二重膜に圧力を加えて、その際の圧力差と膜の曲率半径から界面張力を求めることができる。

$$2\gamma = R\Delta p \quad \text{式 3-4}$$

ここで、 Δp は膜両側の圧力差、 R は膜の曲率半径、 γ は界面張力である。

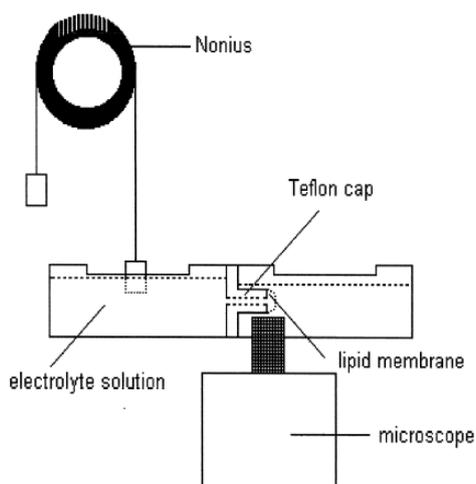


図 3-3 Petelska が用いた脂質二重膜の界面張力測定装置図[3]

測定容器は2つのチャンバーからなり、外径 1.5 mm のテフロンキャップで仕切られている。脂質二重膜は、Mueller -Rudin 法（ペインティング法）によって、脂質の n-デカン溶液（20 mg mL⁻¹）をマイクロピペットでテフロン製の穴付近に注入して形成される。0.1 mm の精度をもつノギスのついた円盤の片側におもりがついており、それを左側のチャンバーの水溶液中に浸した状態にすることで、テフロンキャップ先の脂質二重膜に圧力がかかる。かかった圧力はこのノギスの移動距離により算出される。それと同時に膜の変形を、0.1 mm の精度をもつ顕微鏡で観察して、その値とテフロン穴径から曲率半径が求められる[4]。

3-1-3 ペンダントドロップ法

ペンダントドロップ法は、界面張力の時間分解測定によく用いられる手法であり、液液界面への脂質やタンパク質の吸着過程の解析などに用いられてきた。ある液体に浸したキャピラリーの先端からもう一つの液体を押し出すことで液滴を作り、その形状をイメージデータとして取得する。その装置構成の一例を図 3-4 に示す[5]。

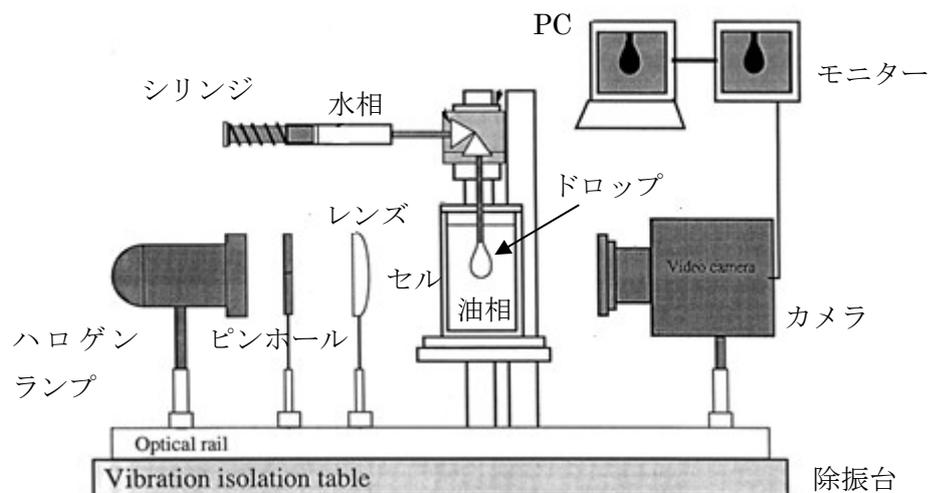


図 3-4 ペンダントドロップ法の装置図例[5]

液滴の形状は、液滴の量、二液間の密度差、界面張力に依存する。液滴の形状を式 3-5 の Young - Laplace 式からフィッティングすることによって、界面張力を算出する。

$$\Delta p = \gamma \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) \quad \text{式 3-5}$$

ここで、 Δp は界面の圧力差、 γ は界面張力、 r_1 と r_2 はそれぞれ液滴の曲率半径である。界面張力値はドロップ全体の画像のフィッティングから求められることが一般的であり、詳細は文献に示されている[6,7]。

図 3-5 は水／クロロホルム界面へ β -ラクトグロブリンが吸着する際の界面張力の時間変化を示したものであり、界面張力が約 20 mN m^{-1} と 7 mN m^{-1} の際のドロップ形状も示してある[8]。このようなドロップ形状のフィッティングにより、界面張力が算出されている。

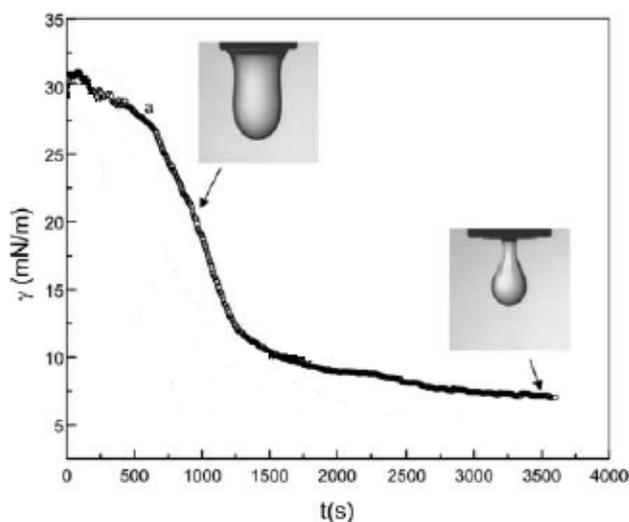


図 3-5 水／クロロホルム界面へ β -ラクトグロブリンが吸着する際の界面張力変化[8]

式 3-5 のように、ペンダントドロップ法は界面に圧力がかかる方法であり、界面に外力をかける方法である。また、ドロップ全体のプロファイルフィッティングから界面張力の値を求めるため、液液界面に脂質膜を展開し安定化した後に、生体高分子溶液を添加することは難しい。したがって、水相にタンパク質溶液、有機相に脂質溶液を用いて実験をおこなった際には、新しく形成された界面に向かってタンパク質分子と脂質分子が競合的に吸着する過程を観測することとなる。

3-2 QELS 法

ペンダントドロップ法や Petelska らの方法は、圧力などの外圧を印加する手法であり、ウィルヘルミー法ではプレートが界面に接触するため、液液界面の脂質膜に影響を及ぼすことが懸念される。今回の研究では、液液界面に平衡状態で形成した脂質膜へ生体高分子が相互作用する際の界面張力変化を QELS 法により検討した。QELS 法の特徴としては、以下の点が挙げられる。

- ・ レーザー光を用いるため、界面に非接触で測定が可能
- ・ プロブ分子が必要ない（界面が存在すれば測定が可能）
- ・ 秒オーダーでの時間分解測定が可能
- ・ 粘度の高い界面の測定は困難

3-2-1 QELS 法の原理[9]

QELS 法の原理を述べる。気液や液液界面では、界面の熱的揺らぎによって絶えずさざ波が発生しており、そのさざ波は界面張力波、あるいはリプロンと呼ばれる。その界面張力波の波長は、通常数十～百 μm 、振幅は数 \AA 程度である。(図 3-6)。

光が通過する媒質において界面が存在すると界面張力波により光が散乱され、散乱光の周波数は入射光に対してわずかにシフトする。

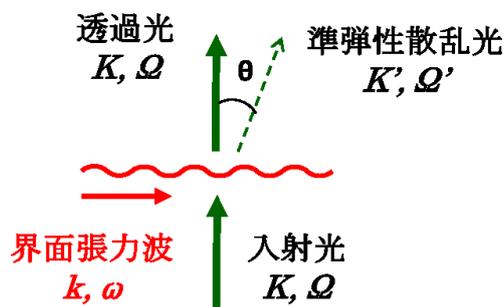


図 3-6 界面張力波の概念図

界面を伝搬する界面張力波の凹凸は光に対して位相回折格子の役割を果たす。波数 k 、角周波数 ω をもつ界面張力波を考えると、界面に垂直に入射した光（波数 K 、角周波数 Ω ）は界面張力波によって、角度 θ の方向に散乱される（波数 K' 、角周波数 Ω' ）（運動量保存則）。

$$K' = K \pm k \quad \text{式 3-6}$$

ここで、 K と K' のなす角を θ とすると、 k は K よりも十分小さいので、以下の式 3-7 が成り立つ。

$$k = K \sin\theta \quad \text{式 3-7}$$

界面には様々な波数の界面張力波が伝搬しているが、ある角度 θ の成分を検出することで、式 3-7 で関係づけられるある特定の波数の界面張力波を取り出していることになる。一方、界面張力波はある位相速度をもって動いているので、界面張力波によって散乱された光の周波数はドップラーシフトの影響を受けて、エネルギー保存則より式 3-8 が成り立つ。

$$\Omega' = \Omega \pm \omega \quad \text{式 3-8}$$

式 3-8 は、散乱光の周波数は入射光の周波数から界面張力波の周波数の大きさシフトすることを意味している。簡単のために気液界面を考えると、気液界面で生じた界面張力波では、式 3-9 が成立する。

$$\omega^2 = \left(gk + \frac{\gamma k^3}{\rho} \right) \tanh(kh) \quad \text{式 3-9}$$

ここで、 ω は角振動数、 g は重力加速度、 ρ は液体の密度、 k は波数、 γ は表面張力、 h は水深である。波長が水深よりも十分深い場合、 $\tanh(kh)=1$ とみなせ、式 3-9 は式 3-10 となる。

$$\omega^2 = \left(gk + \frac{\gamma k^3}{\rho} \right) \quad \text{式 3-10}$$

式 3-10 では、界面の変形を元に戻す力（復元力）として、重力と表面張力が考慮されており、式 3-10 の第一項が重力、第二項が表面張力の効果を表している。本研究で取り扱う液液界面で、上側の液体の厚みが波長よりも十分長い場合、気液界面の式 3-10 に代わって、液液界面では式 3-11 であらわされる。

$$\omega^2 = \frac{\rho - \rho'}{\rho + \rho'} gk + \frac{\gamma k^3}{\rho + \rho'} \quad \text{式 3-11}$$

ここで、 ρ' は上側の液体の密度、 ρ は下側の液体の密度、 γ は界面張力である。

本研究で測定する界面張力波の波数領域においては、 $k \ll k^3$ が成り立つため、式 3-11 の第一項（重力による効果の項）は無視することができ、式 3-12 になる。

$$\omega^2 = \frac{\gamma k^3}{\rho + \rho'} \quad \text{式 3-12}$$

ここで、 $\omega = 2\pi f$ であるため、式 3-13 が成立する。

$$f = \frac{1}{2\pi} \left(\frac{\gamma k^3}{\rho + \rho'} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{式 3-13}$$

ここで、 f は界面張力波の周波数である。以上から、水相と有機相の密度と界面張力波の周

波数がわかれば、式 3-13 の界面張力波と周波数の分散式を用いて界面張力を求めることができる。

3-2-2 QELS 装置構成図

今回の QELS 測定で用いた装置構成図とその写真を、それぞれ図 3-7 と図 3-8 に示す。Nd-YVO₄ レーザーによって発生した波長 532 nm のレーザー光は、ビームスプリッターによって 95 : 5 にスプリットした。95 % にスプリットしたレーザー光は、測定セルの界面に垂直方向から導入して、入射光として利用した。一方、5 % にスプリットしたレーザー光は、AOM (acousto-optic modulator 音響光学素子) を通すことで 80 MHz に周波数変調して、参照光として用いた。入射光と参照光はセル前のレンズを通して、界面で焦点を結ぶ。参照光と平行方向の散乱光を APD (avalanche photodiode アバランシェフォトダイオード) で検出し、FFT (fast fourier transform) アナライザーで処理することで、界面張力波のパワースペクトルを得た。実験は室温 (25 °C) で実施した。

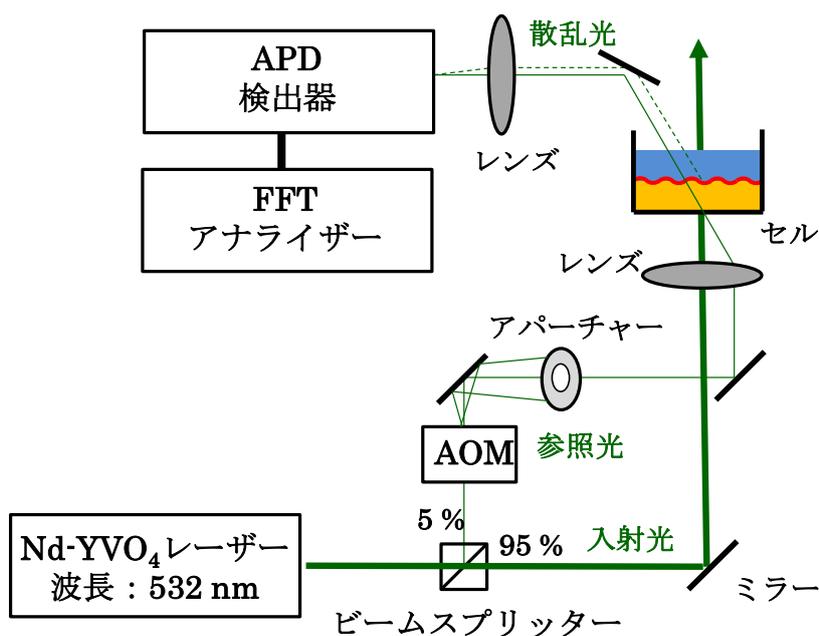


図 3-7 QELS 装置構成図

なお、使用した各機器は以下のものである。

Nd-YVO₄ レーザー (JUNO 100 昭和オプトロニクス)

AOM (1205C-2 ISOMET)

APD 検出器 (C5331-11 浜松ホトニクス)

FFT アナライザー (RSA 5103A テクトロニクス)

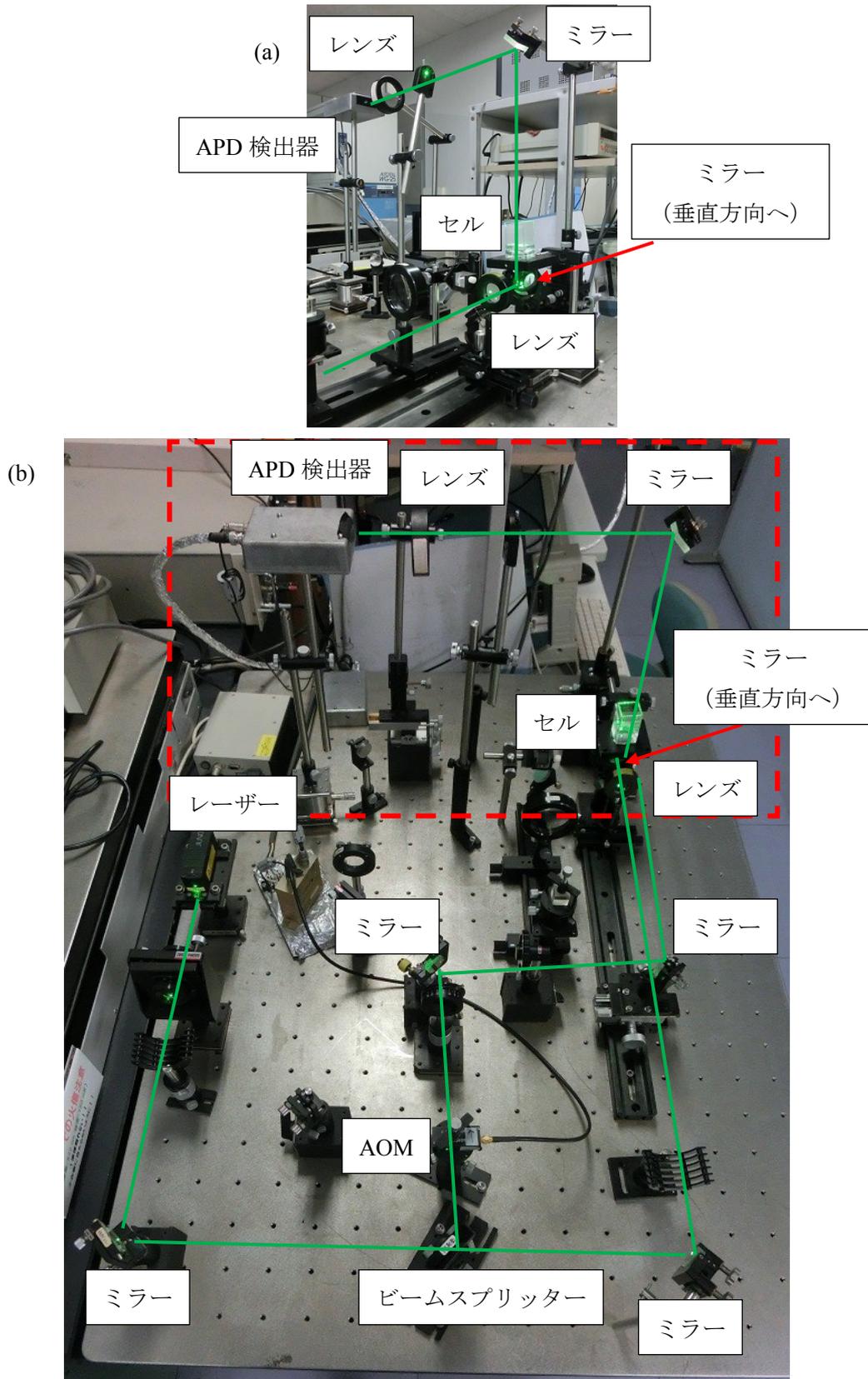


図 3-8 QELS 装置構成図の写真
(a) 赤枠部分を横から見た図 (b) 全体図

音響光学素子 AOM

QELS で取り出す信号は、通常 ~ 1 MHz であり、この程度の低周波数帯に存在するレーザー光源に起因するノイズの影響を受けやすい。その影響を回避する手法として、AOM を用いて参照光の周波数を高周波数にシフトする手法を用いた。AOM の概念図を図 3-9 に示す。参照光を AOM に導入すると、AOM 内に発生させた音響波が回折格子のように振舞い、参照光が回折される。参照光の周波数を F 、音響波の周波数を M とすると、1 次回折光の周波数は $F \pm M$ となり、音響波の周波数分だけ変調することができる。本研究では、AOM で参照光の周波数を 80 MHz だけシフトさせた。

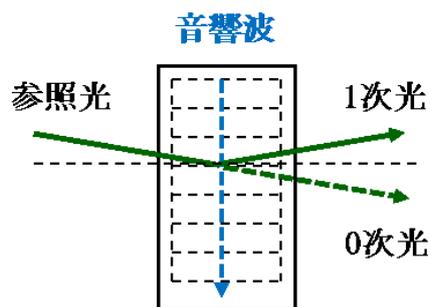


図 3-9 AOM の概念図

アバランシェフォトダイオード APD

検出器としては、APD を用いた。APD はフォトダイオードの PN 接合に逆電圧を印加することで、アバランシェ増幅と呼ばれる現象を利用する。アバランシェ増幅の模式図を図 3-10 に示す。入射した光によって発生したキャリアが、逆電圧によって加速されて、新しく電子 - 正孔対が発生する。この電子 - 正孔対が連鎖的に起こる現象がアバランシェ増幅と呼ばれる。この現象を利用することにより、PIN フォトダイオードに比べて数十倍程度の高い S/N での測定が可能となる[10]。APD 検出器からの信号は FFT アナライザーで FFT 処理することで、参照光成分と散乱光成分の周波数に分離される。

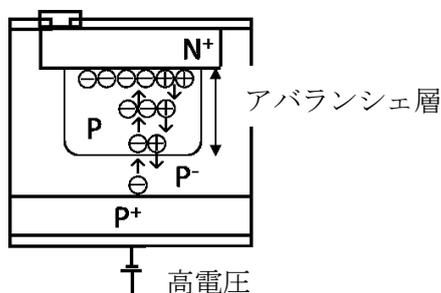


図 3-10 アバランシェ増幅の模式図 (近赤外用)

3-2-3 QELS 法における検出系

QELS 法ではある角度に固定した検出器で散乱光を測定することにより、そのごくわずかな周波数シフトを検出する必要がある。一方、ドップラーシフトによる周波数変化は非常に小さく、実際には散乱光の周波数を精度よく直接検出することは困難である。それに加えて、散乱光の強度は非常に小さい。そのため、光ヘテロダイン法により、入射光と散乱光との周波数差を検出する手法が用いられる。光ヘテロダイン法とは、図 3-11 のように散乱光と平行に参照光を導入して参照光と散乱光を混合することで、その差周波数をビートとして検出する手法である。

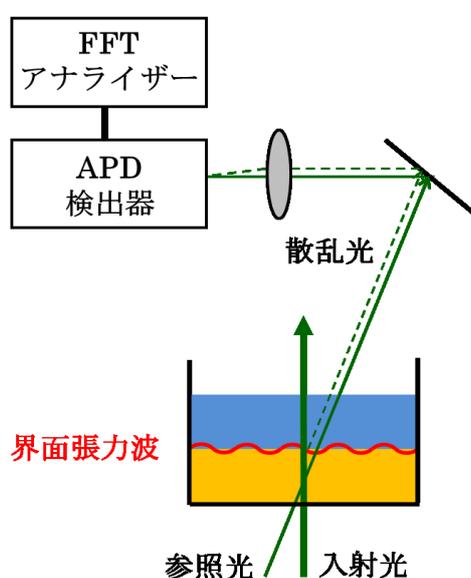


図 3-11 光ヘテロダイン法による検出

光ヘテロダイン法の原理を以下に示す[9]。散乱光の電場成分を $E' \cos(\Omega + \omega)t$ とする。また、この散乱光と平行に偏光した、入射光と同じ周波数成分をもつ参照光の電場成分を $E_1 \cos(\Omega t + \varphi)$ とする。ここで、 φ は散乱光との位相差である。この 2 つの光を混合して、その強度を I とすると、式 3-14 が成り立つ。

$$I = \{E' \cos(\Omega + \omega)t + E_1 \cos(\Omega t + \varphi)\}^2 = E'^2 \cos^2(\Omega + \omega)t + E_1^2 \cos^2(\Omega t + \varphi) + 2E'E_1 \{\cos[(2\Omega + \omega)t + \varphi] + \cos(\omega t - \varphi)\} \quad \text{式 3-14}$$

式 3-14 の各成分で、検出器で検出できる周波数領域にあるのは、 $E'E_1 \cos(\omega t - \varphi)$ の成分のみである。

図 3-12 は、散乱光と参照光、およびそれを足し合わせた光を模式的に示したものである。例として、5.5 Hz と 5.0 Hz の 2 つの波を考える。(a) の 5.5 Hz と (b) の 5.0 Hz の波を足し合わせた (a)+(b) の波には、うなりが観測される。このうなりの周期は、(a) と (b) の差周波数 ((c) の 0.5 Hz) に相当することがわかる。

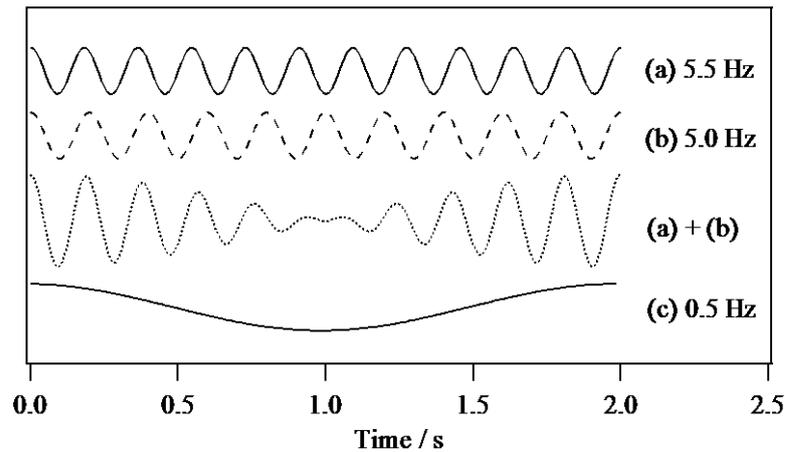


図 3-12 光ヘテロダイン検出の概念図

このように、光ヘテロダイン法を用いることで差周波数を検出することが可能になるが、式 3-14 から検出する光強度は $E'E_1$ に比例するため、参照光により信号強度を強くすることができる利点もある。

3-2-4 パワースペクトルの解析

APD からの信号は FFT アナライザを用いて、参照光と散乱光の周波数スペクトルに分解される。図 3-7 の検出系を用いて得られた空気／水界面のパワースペクトルを図 3-13 に示す。AOM によって変調した 80 MHz の前後の周波数に、2 つのピークが観測されている。これが界面張力波によって散乱された散乱光由来のものであり、そのピーク位置はローレンツ関数によるフィッティングから求めることができる。図 3-13 のパワースペクトルから、80 MHz よりも高周波数側のピーク位置は、80.413 MHz と解析された。したがって、界面張力波による散乱光の周波数は、0.413 MHz である。

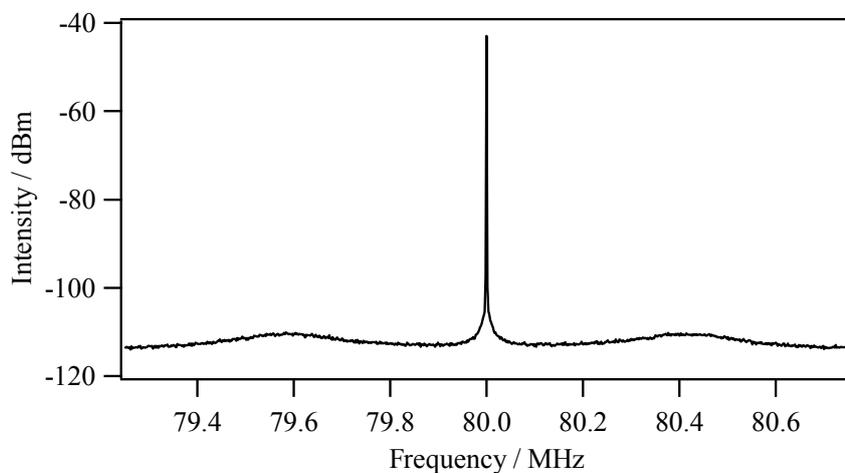


図 3-13 空気／水界面の表面張力波のパワースペクトル

ここで得られた界面張力波の周波数から、式 3-13 を使って界面張力値を算出するためには、界面張力波の波数を知ることが必要である（2 相の密度は文献から既知である）。式 3-7 は、同じ角度で検出をすれば、ある特定の波数の界面張力波を検出していることを意味する。したがって、同じ光学系で界面張力が既知の界面を使って、その界面張力波の周波数を知ることができれば、式 3-13 からその波数を知ることができる。このように界面張力波の波数のキャリブレーションをする界面としては、空気／水界面を用いた（表面張力値 71.99 mN m^{-1} [11]）。

3-2-5 QELS 法の確度と精度

界面張力波の波数のキャリブレーションは、前述のように水／空気界面の表面張力の文献値である 71.99 mN m^{-1} (25°C) [11]を用いておこなった。

界面張力の精度と確度の確認は、クロロホルム／空気界面の表面張力値によりおこなった。6 回の平均値で、クロロホルム／空気界面の表面張力値は、 $26.4 \pm 0.8 \text{ mN m}^{-1}$ (25°C) となった。なお、クロロホルム／空気界面の文献値は 26.67 mN m^{-1} (25°C) である[11]。また、同じ光学系のままでセル内の溶液のみを交換した際の繰り返し再現性は、水／空気界面を用いた測定で、 $\pm 0.2 \text{ mN m}^{-1}$ と見積もられた。

3-3 液液界面の脂質膜と生体高分子の相互作用に伴う界面張力測定法

本研究では、水／クロロホルム界面に脂質膜を平衡状態で形成した後に、生体高分子水溶液を水相から添加し、その時点からの界面張力値を測定した。ここでは、脂質膜の形成法と生体高分子水溶液の添加法について説明する。

3-3-1 液液界面への飽和脂質膜形成法

液液界面への飽和脂質膜形成は以下のような方法でおこなった。脂質分子を溶解させたクロロホルム相と水相をセルに加えた。その後、水／クロロホルム界面の界面張力を QELS 法で測定しながら界面張力値が一定となるまで放置することで、脂質膜が平衡状態となることを確認した。

3-3-2 生体高分子溶液の添加

生体高分子溶液の水相への添加の概略を図 3-14 に示す。液液界面に脂質膜を形成後、マイクロピペットを用いて、生体高分子溶液を水相表面に添加した。添加した直後を 0 秒とし、その時点からの界面張力変化を QELS 法により測定した。4 章のリゾチーム実験では、 $50 \times 50 \times 30 \text{ mm}$ 、5 章の DNA 実験では $26 \times 26 \times 50 \text{ mm}$ の石英セルを用いた。実験で加えた水相の体積は、それぞれ 30 mL と 5 mL である。それぞれの水相の厚さは約 1 cm となるが、リゾチームの拡散係数 $1.10 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ から[12]、単純な拡散のみで物質移動が起こると仮定すると、水相の表面から水／クロロホルム界面までの移動に必要な時間は約 10^6 秒程度と

想定される。しかし、実際には濃度勾配，比重差などの影響が大きく，実験的にも約 2 秒程度で界面張力の変化が観測されたことから，今回の実験において，拡散の影響はほとんど無視できると考えられる。

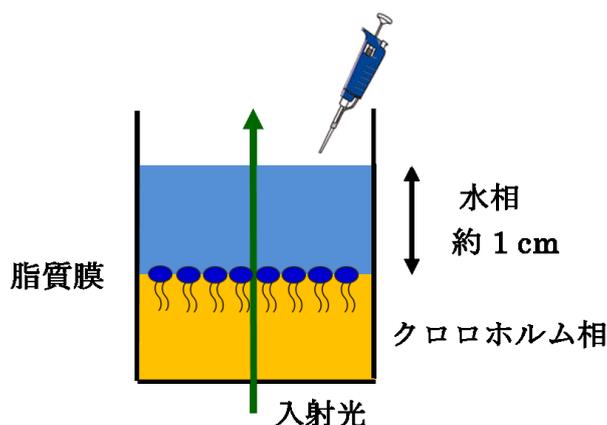
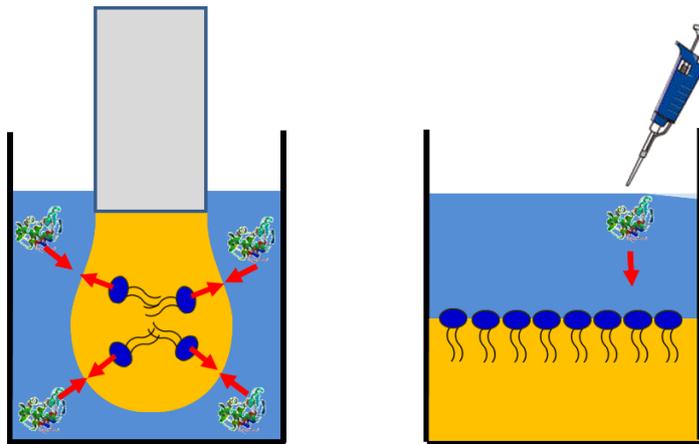


図 3-14 液液界面に形成した脂質膜への生体高分子溶液の添加

3-3-3 ペンダントドロップ法と QELS 法の違い

水／有機相界面への脂質やタンパク質の吸着挙動の界面張力の時間変化による解析は，これまでペンダントドロップ法によりおこなわれている例が多い。図 3-15 にペンダントドロップ法と QELS 法の概念図を示した。今回の QELS 実験で用いた方法では，水相にはあらかじめタンパク質は溶解していない。まず，緩衝液の水相と脂質を溶解させたクロロホルム相をセルに入れて，平衡状態になるまで静置する。したがって，水／クロロホルム界面があらかじめ平衡状態で存在しており，界面に存在する脂質単分子膜も平衡状態で存在する。その状態で水相側からタンパク質水溶液を添加し，その時点からの界面張力の時間変化を測定する。つまり，脂質膜が定常的に存在しているところにタンパク質が吸着していく過程を観測することができる。

一方，ペンダントドロップ法でこれまで報告されている方法は，タンパク質を溶解させた水溶液中に，脂質を溶解させたクロロホルム溶液のドロップを作成する。したがって，ドロップ作成前の水相とクロロホルム相では，それぞれタンパク質と脂質が均一に溶解している状態である。ペンダントドロップ法で界面張力の時間変化が始まるのは，水相中にクロロホルムのドロップができた瞬間となり，そこからの界面張力の時間変化を測定する。したがって，界面形成と同時に各バルク相からの界面へのタンパク質と脂質分子の拡散が起こる。つまり，ペンダントドロップ法を用いた場合，界面が形成されてからのタンパク質と脂質の競争的吸着 (competitive adsorption) を観測することとなる。



ペンダントドロップ法

QELS 法

図 3-15 ペンダントドロップ法と QELS 法の違い オレンジ：クロロホルム相，水色：水相

ペンダントドロップ法でも図 3-16 のように，タンパク質を溶解させていない水相の中に脂質を溶解させたクロロホルム相のドロップを作成して平衡状態にすることで，水／クロロホルム界面にあらかじめ脂質膜が平衡状態で吸着した後に，生体高分子溶液を添加する実験は可能である。この場合，添加した近傍のクロロホルム液滴の界面張力だけが変化する。しかし，ペンダントドロップ法ではクロロホルムの液滴全体の形状から界面張力を決定するため，このような実験では正確な界面張力の算出はできない。

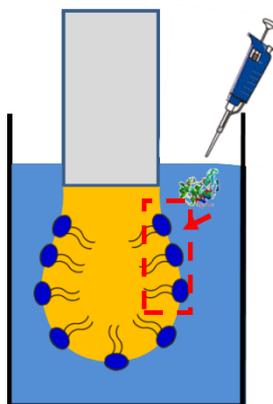


図 3-16 ペンダントドロップ法で，水／クロロホルム界面の脂質膜への生体高分子溶液添加の模式図

3-3-4 時間分解測定再現性

図 3-17 は水／クロロホルム界面に飽和吸着した DOPE 脂質膜に DNA を添加した際の界面張力の時間変化を繰り返し 2 回測定した結果を示す。図の測定範囲における各プロットの差の標準偏差は 0.3 mN m^{-1} であった。また，生体高分子水溶液の添加位置による影響も特に認められなかった。

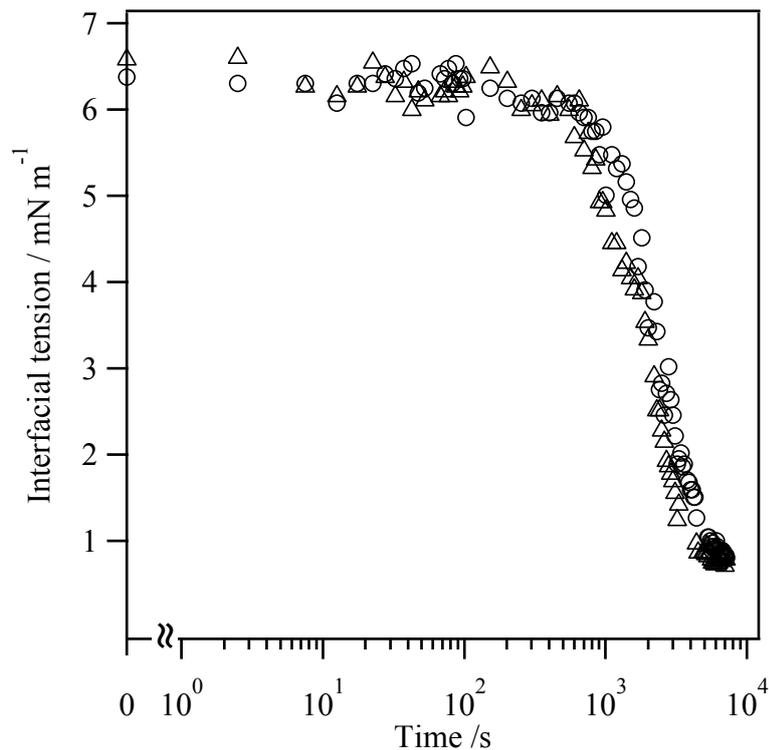


図3-17 水/クロロホルム界面に飽和吸着した DOPE 脂質膜に DNA を添加した際の界面張力の時間変化 (○ 1 回目 △ 2 回目)

3-4 参考文献

1. J. Drelich, C. Fang, and C. L. White, "Encyclopedia of Surface and Colloid Science", ed. P. Somasundaran, **2002**, Marcel Dekker Press, New York, p.3152.
2. R. Maget-Dana, *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1462, 109.
3. A. D. Petelska, *Cent. Eur. J. Chem.*, **2012**, 10, 16.
4. A. D. Petelska and Z. A. Figaszewski, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1998**, 46, 199.
5. C. J. Beverung, C. J. Radke, and H. W. Blanch, *Biophys. Chem.*, **1999**, 81, 59.
6. B. Song and J. Springer, *J. Colloid Interface Sci.*, **1996**, 184, 64.
7. O. I. del Río and A. W. Neumann, *J. Colloid Interface Sci.*, **1997**, 196, 136.
8. Y. Zhang, Z. An, G. Cui, and J. Li, *Colloid Surf., A*, **2003**, 223, 11.
9. 原田明 澤田嗣郎, "レーザー分光分析", **2009**, 丸善株式会社.
10. "光半導体ハンドブック", 浜松ホトニクス, 第 03 章.
11. D. R. Lide ed., "CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2005", **2005**, CRC press, Boca Raton, FL.
12. A. J. Sophianopoulos, C. K. Rhodes, D. N. Holcomb, and K. E. Van Holde, *J. Biol. Chem.*, **1962**, 237, 1107.

第4章 水／クロロホルム界面に形成された脂質単分子膜へのリゾチーム吸着

本章では、水／クロロホルム界面に形成された脂質単分子膜へのリゾチーム吸着に伴う界面張力変化を考察する。

4-1 緒言

タンパク質と脂質膜の相互作用は、血漿中の脂質の輸送、リン脂質の加水分解、レセプターやチャネルの細胞内信号伝達などにおいて重要である[1,2]。タンパク質と脂質が相互作用することにより、タンパク質が構造変化すると同時に、脂質膜も膜融合やポア形成が起こると考えられている[3]。そのような現象において、タンパク質と脂質膜の相互作用による脂質膜の界面張力変化、すなわち界面自由エネルギー変化を、生細胞を用いて計測することは難しい。そこで、単純なモデル脂質膜として空気／水界面に形成されたLB (Langmuir-Blodgett) 膜を用いて、タンパク質を添加した際のLB膜の界面張力を測定する研究が多い[4,5]。しかしながら、LB膜の炭化水素鎖の構造は剛直な構造であり[6]、生体膜とより近い流動性をあらかずモデルは、1-4で説明したように液液界面の脂質膜である。一方、ペンダントドロップ法はタンパク質や脂質がそれぞれ単独に液液界面へ吸着するダイナミクスの測定に利用されている[1,2,7]。近年、液液界面への脂質とタンパク質の競合的吸着に関する研究が報告されている[7-10]。Yan は β -ラクトグロブリンと脂質DPPE (1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine) がクロロホルム／水界面へ競合的吸着するときの界面張力変化をペンダントドロップ法で測定し、食品産業における乳化挙動の素過程の解明に貢献した[10]。

脂質膜に相互作用するタンパク質としては、構造や性質がよく調べられているリゾチームが用いられることが多い[11-13]。リゾチームは細菌の細胞壁を加水分解する酵素である。実験でよく用いられるニワトリ卵白リゾチームは129個のアミノ酸残基により構成されている、分子量約14 kDaの球状タンパク質である。二次構造としては5つの α ヘリックスと5つの β シート構造をもつ。また、4つのジスルフィド結合を持ち、図4-1のような立体構造をもつ。

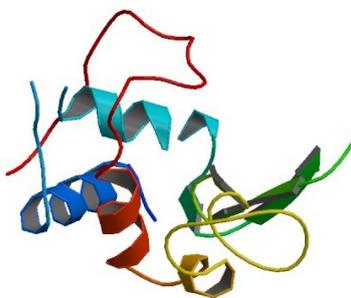


図4-1 リゾチームの構造 PDB ID 1LYZ [11]

酸性アミノ酸 (Asp 7 個, Glu 2 個) に対して塩基性アミノ酸 (Arg 11 個, Lys 6 個) の数が多いことから, pI は 11.35 である[4]。したがって生体内の pH 領域では正に帯電しており, 負に帯電した脂質膜と静電的に相互作用するが, 脂質との相互作用には疎水性相互作用も重要である[14,15]。リゾチームはタンパク質-脂質膜相互作用を通じてリポソームの透過率変化や膜融合を引き起こすが, それは pH やイオン強度に依存する[16,17]。Posse らは pH 4 から 9 の範囲においてリゾチームによりリポソームの膜融合が起きるとしているが, 0.1 M 以上のイオン強度とすることで, その膜融合が抑制されることを報告している[16]。膜融合のように脂質膜の構造変化が起こる際には脂質膜の張力変化が重要であるが, リポソームの脂質膜の張力変化を測定した例はほとんどない。それはリポソーム一個の脂質膜の界面張力を測定することが困難であるためである。脂質二重膜自体の界面張力の値としては, 計算科学と実験的手法から $0.2\sim 6.0 \text{ mN m}^{-1}$ 程度の値が報告されている[18-21]。例えば Petelska らは脂質膜の両側の圧力差とその曲率を計測することで界面張力を測定し, その pH 依存性を報告している[21]。タンパク質-脂質膜相互作用を理解するためには, 界面張力の平衡状態のみならず, 脂質膜へのタンパク質吸着挙動を追跡していく必要がある。3-3-3 でも説明したように, ペンダントドロップ法を用いると, 液液界面の界面張力の時間変化を測定することができる。しかしながら, 有機相と水相が接触し始めてからの界面張力測定であるため, ペンダントドロップ法の応用範囲は, 液液界面への脂質とタンパク質の競合的吸着の解析に限定される。一方で, 液液界面に脂質単分子膜をあらかじめ形成させた状態からのタンパク質の吸着挙動を調べることは難しい。

本研究では, 液液界面に形成されるモデル脂質膜にリゾチームが相互作用して吸着する際の界面張力の時間変化を時間分解 QELS 法により計測し, リゾチームの脂質膜への吸着機構を明らかにすることを目的とした。タンパク質が脂質膜に吸着する際に生じる相互作用としては静電相互作用が考えられるため, 本研究では, 正に帯電しているリゾチームに対して, 脂質膜構成分子として双性イオン型である DOPC や負に帯電する DOPS を使用し, 水相側のイオン強度を変化させて測定をおこなった。

4-2 実験

4-2-1 試薬

リゾチームは MP Biomedicals (フランス) から購入した。4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) は Sigma-Aldrich (ドイツ) から, 塩化ナトリウムとクロロホルムは関東化学 (東京, 日本) から購入した。脂質として用いた DOPC, DOPE, DOPS, DOPG は (構造式は図 2-9), Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) から購入した。すべての試薬は購入したまま使用した。

4-2-2 QELS 装置

QELS 測定装置は 3-2-2 の図 3-7 で示したものをを用いた。50 mm × 50 mm × 30 mm の石英

セルに水相とクロロホルム相を、それぞれ 30 mL と 10 mL 加えて実験をおこなった。この時の水相の厚みは、約 1 cm であった。水／空気界面からの QELS シグナルを消すために、水相の上にスライドガラスをのせて測定をおこなった。

4-2-3 液液界面の脂質単分子膜の形成

脂質単分子膜の形成は次のようにしておこなった。水相と脂質を溶解させたクロロホルム相の界面形成後からの界面張力値を QELS で測定し、界面張力値が平衡状態となるまで静置した。脂質単分子膜を形成した後に、1 mM リゾチーム水溶液 (0.1 M NaCl, 50 mM HEPES pH 7.0) を、マイクロピペットを用いて水相表面に添加した。例えば、1 mM リゾチーム水溶液 50 μ L を 30 mL の水相に添加すると、最終的なリゾチームの平衡濃度は 1.6 μ M となる。リゾチーム水溶液を添加した直後からの界面張力の変化を測定した。リゾチーム水溶液は石英セルの端の方に添加し、レーザー光はセルの中央に導入した。QELS 測定の積算時間は 5 秒とし、図のプロットの横軸の時間は積算開始時と終了時の中間値とした。すべての実験は 25 $^{\circ}$ C でおこなった。

4-3 結果と考察

4-3-1 リゾチームの水／クロロホルム界面への吸着

まず、脂質がない状態で水／クロロホルム界面にリゾチームが吸着する際の挙動を調べた。図 4-2 は、異なるリゾチーム濃度の水溶液を添加した際の水／クロロホルム界面の界面張力の時間変化を示している。NaCl 濃度は 0.1 M とした。リゾチーム添加前の水／クロロホルム界面の界面張力は、22 mN m^{-1} であった。リゾチーム濃度 0.5 μ M では三段階の吸着領域が観測された。まず添加直後から約 200 秒までの領域では、界面張力の値が非常に緩やかに減少した (第一段階)。次に約 1000 秒まで急激に界面張力の値が減少し (第二段階)、それ以降は再び界面張力変化が緩やかになり (第三段階)、最終的に 4.0 mN m^{-1} に達して一定値となった。一方、1.6 μ M、50 μ M では、添加直後から数十秒で急激に界面張力が減少し (第二段階)、1000 秒までは緩やかに減少し (第三段階)、その後一定の値となった。一定となった時の界面張力値は、1.6 μ M と 50 μ M でそれぞれ 4.6 と 3.7 mN m^{-1} であった。50 μ M における界面張力の減少の傾きは、1.6 μ M よりも大きかった。0.5 μ M で観測された三段階の変化は、次のように考えられる。

第一段階：リゾチームが界面に徐々に吸着する段階

第二段階：界面へリゾチームが吸着する段階

第三段階：吸着したリゾチームが安定状態へと再配置する段階

このようなタンパク質が液液界面へ吸着する際の界面張力変化のタンパク質濃度による影響はすでに知られている。Beverung らは水／ヘプタン界面にリゾチームが吸着する際の界面張力変化をペンダントドロップ法により測定した (図 4-3) [1]。

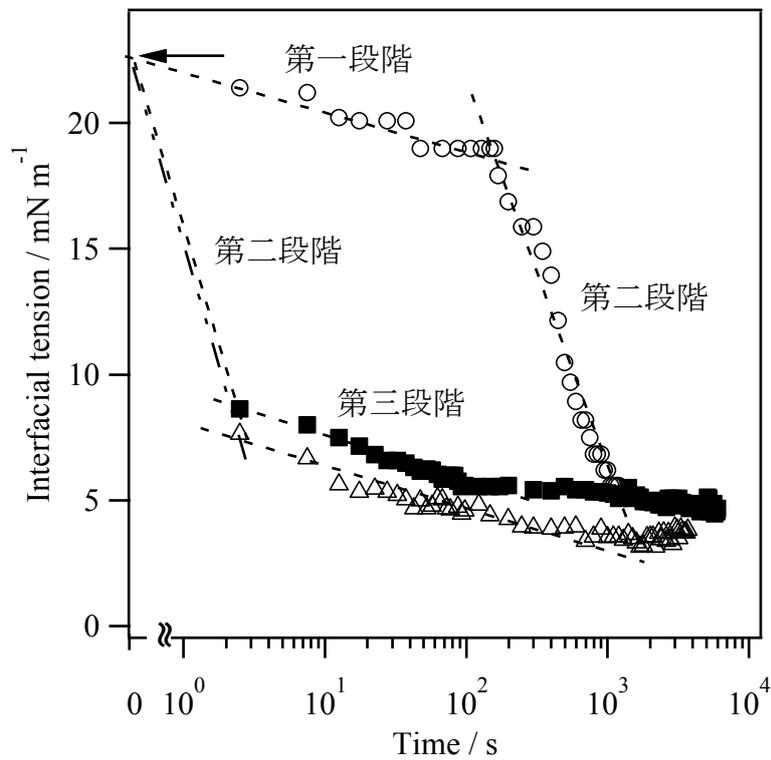


図 4-2 水／クロロホルム界面にリゾチームが吸着する際の界面張力の時間変化 (○ 0.5 μM , ■ 1.6 μM , Δ 50 μM) 実線矢印は, リゾチーム添加前の界面張力を示す。破線はガイドとして記載する。

リゾチーム濃度 0.7 μM ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) では傾きの異なる三段階で減少し, 第一段階では界面張力がほとんど変化しない時間領域が約 40 秒観測されている。リゾチーム濃度が 7 μM ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) になるとそのような時間領域は観測されず, 本結果と同様のものとなることが報告されている。タンパク質濃度が低い場合, 界面張力の値がほとんど変化しない時間領域は, タンパク質が液液界面へと拡散していく過程であると考えられている。

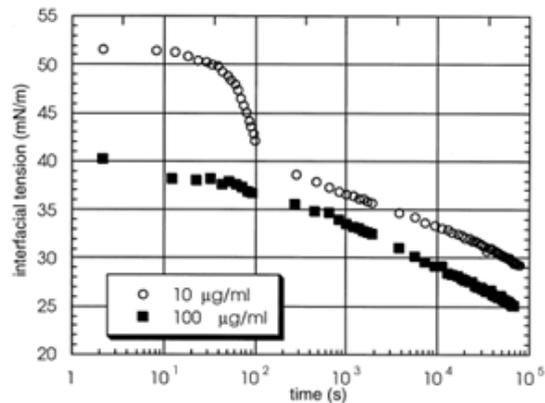


図 4-3 水／ヘプタン界面へのリゾチーム吸着に伴う界面張力の時間変化[1]

液液界面に対するタンパク質の吸着挙動は、図 4-4 に示されるような次の 3 つのステージとされている[1,2,7]。

ステージ 1：タンパク質分子の界面近傍への拡散過程

ステージ 2：界面へのタンパク質分子の吸着

ステージ 3：吸着したタンパク質分子の構造変化

ステージ 1 のタンパク質分子の界面近傍への拡散過程では界面張力の減少がほとんど起こらず、ステージ 2 の界面へのタンパク質分子の吸着が起これると急激に界面張力が減少する。界面へのタンパク質の単分子層レベルでの吸着が終わるとステージ 3 のタンパク質分子の再配置やマルチレイヤー型の吸着過程に変化したりすることで、界面張力は緩やかに減少するとされている。今回の実験におけるリゾチーム濃度 $1.6 \mu\text{M}$ と $50 \mu\text{M}$ で第一段階が観測されないのは、リゾチーム濃度が高くなることで、十分な量のリゾチーム分子が界面に到達するまでの時間が短くなるためである。

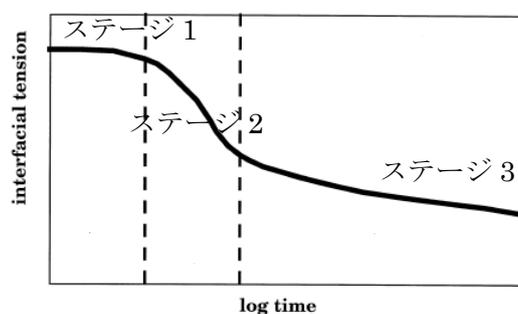


図 4-4 液液界面にタンパク質が吸着する際の界面張力の時間変化の概念図[1]

今回の QELS による実験結果は、これまでペンダントドロップ法などを使った実験結果と合致した。ただし、 $0.5 \mu\text{M}$ の第一段階で徐々に界面張力の値が減少している点が既報とは若干異なり、今回の実験では最初から吸着が徐々に進行し始めていることがわかった。

4-3-2 水／クロロホルム界面での脂質単分子膜の形成

平衡状態の脂質単分子膜を水／クロロホルム界面に形成するため、水／クロロホルム界面に脂質が飽和吸着する脂質濃度を調べた。 $\text{pH } 7.0$ においてリゾチームは正に帯電することから、脂質膜形成に一般的に用いられる双性イオン型の DOPC のみならず、強くリゾチームと静電相互作用しうる負電荷の DOPS も用いて、それぞれの脂質単分子膜を形成した。水相の組成を $0.1\text{M NaCl pH } 7.0$ に固定して、クロロホルム中の DOPC, DOPS 濃度を変化させた際の界面張力の平衡値をプロットしたものを図 4-5 に示す。

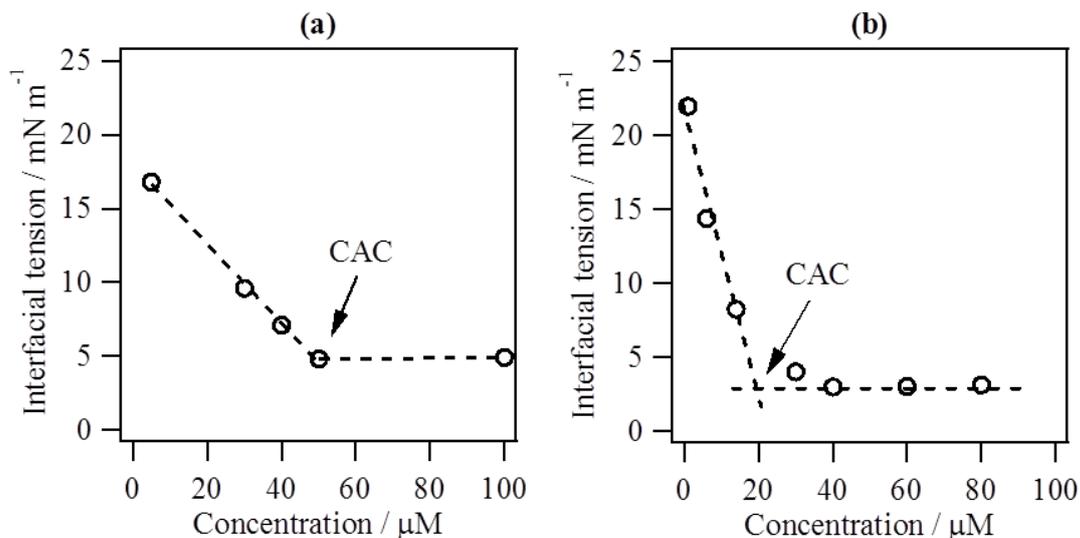


図 4-5 水/クロロホルム界面における界面張力（平衡値）の脂質濃度依存性 (a) DOPC, (b) DOPS 破線は CAC を評価するガイドとして記載する。

図 4-5 において、ある脂質濃度を超えると界面張力がほとんど変化しなくなった。これらの濃度は脂質の CAC (critical aggregation concentration) とされており、今回の実験で決定した DOPC, DOPS の CAC の値はそれぞれ 50 μM と 20 μM となった。CAC 以上の脂質溶液の界面は脂質が飽和吸着した単分子膜を形成する。そこで、脂質が界面に飽和吸着した状態で実験をおこなうために、実験に用いる脂質濃度としては、DOPC と DOPS 共に 100 μM とした。また、Gibbs 吸着等温式から求めた DOPC と DOPS の分子占有面積は、それぞれ 73, 78 Å²/molecule となった。

4-3-3 脂質単分子膜へのリゾチーム吸着による界面張力の時間変化の脂質依存性

リゾチーム濃度 0.5 μM では、界面の脂質膜にリゾチームを添加しても界面張力の変化は観測されなかった。それは吸着量が少なすぎるためであると考えられる。そこで、これ以降の実験では、リゾチーム濃度 1.6 μM に固定して実験をおこなった。

図 4-6 には DOPC または DOPS 単分子膜に 1 mM リゾチーム溶液を 50 μL 添加した際の（水相中のリゾチーム最終濃度は 1.6 μM）界面張力の時間変化を示す。水相中の NaCl 濃度は 0.1 M でおこなった。両方の脂質膜において、三段階の界面張力変化が観測された。DOPC の場合には、最初から 20 秒の間に界面張力の値が 4.8 mN m⁻¹ から 1.7 mN m⁻¹ へと急激に減少し（第一段階）、その後約 1000 秒まで緩やかに減少した（第二段階）。それ以降の界面張力は 1.2 mN m⁻¹ でほぼ一定となった（第三段階）。DOPS では最初から 10 秒の間に界面張力の値が 1.2 mN m⁻¹ から 0.8 mN m⁻¹ へ減少した（第一段階）が、その後に 200 秒程度まで界面張力の値がほとんど変化しない時間領域が観測された（第二段階）。その後、界面張力の値は再び減少し始め、1700 秒後に 0.1 mN m⁻¹ まで減少した（第三段階）。

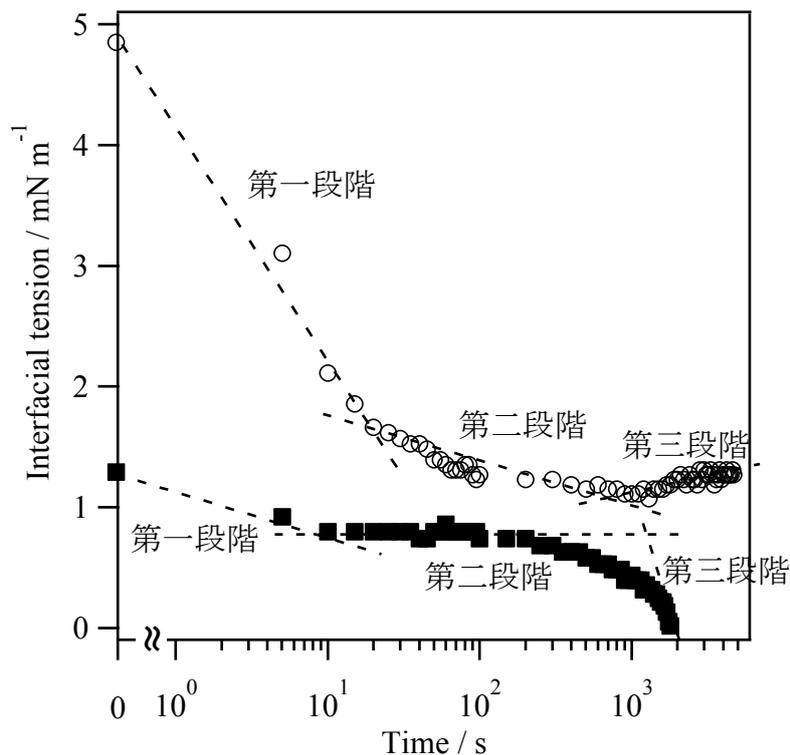


図 4-6 水/クロロホルム界面の脂質膜にリゾチームが吸着する際の界面張力の時間変化 (○ DOPC, ■ DOPS) グラフ左端のプロットは、リゾチーム添加前の界面張力値を示す。破線はガイドとして記載する。

DOPC と DOPS の双方において、リゾチームが脂質膜に吸着することによってタンパク質と脂質それぞれ単独の場合よりも界面張力の値が小さくなっているため、水/クロロホルム界面にはリゾチームと脂質の両方が関与しているものと考えられる。このように、DOPC と DOPS 共に三段階の界面張力減少が観測されることは、リゾチームと脂質膜との相互作用が複数の段階から成り立っていることを示している。今回用いたリゾチーム濃度において、リゾチームは脂質膜表面に単に吸着しているだけではなく、脂質膜の構造変化が起こっていると想定される。双性イオンである DOPC の場合には、脂質膜表面へとタンパク質が吸着すると 20 秒までに全体の構造が大きく変化し、その後約 1000 秒程度にかけて安定な構造へと徐々に変化していくと考察される。

一方、負に帯電した DOPS の場合には、DOPC 単分子膜が存在する場合や脂質膜がない場合とは界面張力変化の挙動が大きく異なり、第一段階でリゾチームが静電相互作用で吸着した後、第二段階で界面張力がほとんど変化しない領域が観測された。

脂質膜へのリゾチームの吸着に関する研究としてはリポソームを用いたものが知られている[4,16,17]。リポソーム脂質膜へのリゾチームの吸着は静電相互作用が主であるとされているが、疎水性相互作用も重要であると考えられている[22]。その詳細は明らかになってい

ないが、次に示す4つの段階で相互作用すると考えられている。

ステップ1：静電相互作用により脂質膜表面にリゾチームが吸着する過程

ステップ2：リゾチームの構造変化

ステップ3：脂質膜の構造再配置

ステップ4：疎水性相互作用による脂質のアルキル鎖部位へのリゾチームの一部挿入

このように、脂質膜へのタンパク質吸着挙動を考察する際に、それらの電荷状態と構造は重要なパラメーターであるが、電荷状態に影響を及ぼす条件としてはpHやイオン強度などがある。そこで、リゾチームの脂質膜に対する吸着時に起こる界面張力変化の要因を調べるために、水相のNaCl濃度を変化させた実験をおこなった。

4-3-4 脂質単分子膜へのリゾチーム吸着による界面張力の時間変化に与えるNaCl濃度の影響

4-3-4-1 DOPC単分子膜

図4-7は、水/クロロホルム界面において平衡状態にあるDOPC単分子膜に対するリゾチーム吸着による界面張力の時間変化に与えるNaCl濃度の影響を示している。リゾチーム添加前の0.1 Mと1 Mにおける界面張力値はそれぞれ 4.8 mN m^{-1} と 2.8 mN m^{-1} であった。これはNaCl濃度によりDOPC膜構造に違いがあることを示している。1 Mでは0.1 Mと比較して界面張力の段階的な変化が不明瞭になった。0.1 M NaClよりも第一段階の界面張力の減少速度は遅くなり、約100秒程度まで緩やかに減少した。その後も約8000秒程度まで徐々に界面張力は減少し(第二段階)、その後 0.9 mN m^{-1} でほぼ一定となった(第三段階)。

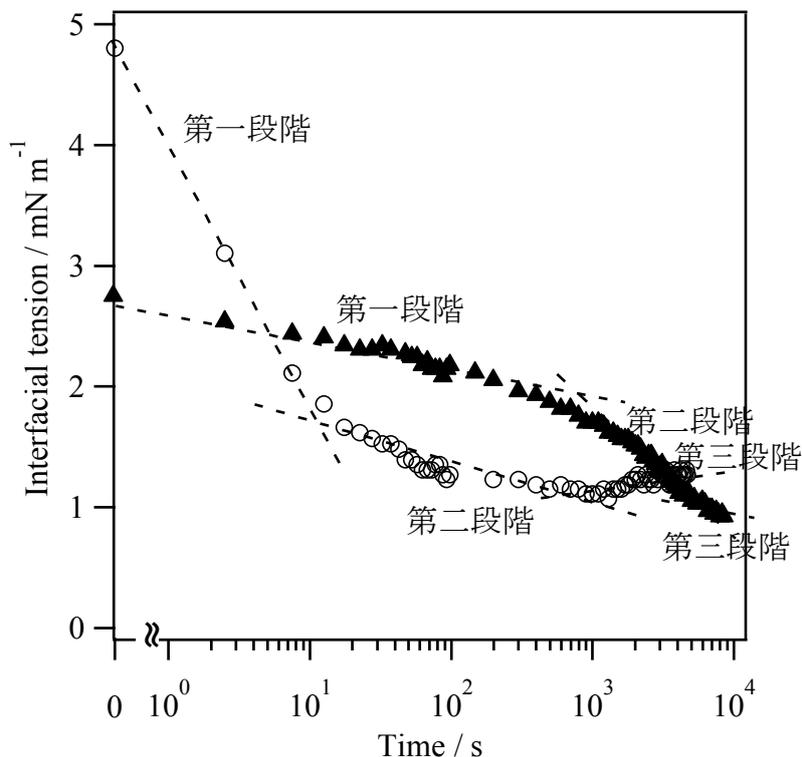


図4-7 水/クロロホルム界面のDOPC膜にリゾチームが吸着する際の界面張力の時間変化のNaCl濃度依存(○ 0.1 M, ▲ 1 M) グラフ左端のプロットは、リゾチーム添加前の界面張力を示す。破線はガイドとして記載する。

DOPCは双性イオン型の脂質であり、イオン強度が高いほどDOPCとリゾチーム双方の電荷が遮蔽されることにより、リゾチームとDOPCとの静電反発が小さくなる。したがって第一段階で静電相互作用が重要であるならば、1 M NaClの吸着速度の方が速くなることが予想される。実験結果がこの予想と逆の結果となったことから、第一段階では静電相互作用に加えて、他の効果も考慮する必要があることを示している。

そこで、NaCl濃度の増加がDOPC脂質膜に与える影響について考察した。1 M NaClの方が第一段階の減少速度が遅いのは、脂質膜の構造変化が起こりにくくなるためであると考えられる。VáchaらはDOPC膜に対する金属カチオンの親和性を調べ、NaCl濃度が高くなるほど脂質の側方拡散が抑制されることを報告している[23]。DOPC脂質膜のDOPC分子の有効側方拡散係数 D_{eff} が、0.15 M NaClでは水と比較して25%減少することを示した[23]。その原因として Na^+ イオンが脂質分子の極性基と強く相互作用していることが、MDシミュレーションから明らかにされている[23,24]。このような Na^+ イオンとホスファチジルコリンの相互作用はDOPC以外でも報告されており、DOPCの炭化水素鎖の一つが飽和のパルミトイル基で置換されたPOPC(1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)のMDシミュレーションのスナップショットを図4-8に示す[24]。NaCl濃度が高いほど第一段階の傾きが

緩やかになるのは、 Na^+ イオンの配位により脂質膜の分子の運動性が低下し、リゾチームとの疎水性相互作用による脂質膜の構造変化に時間がかかるようになるためと考察される。

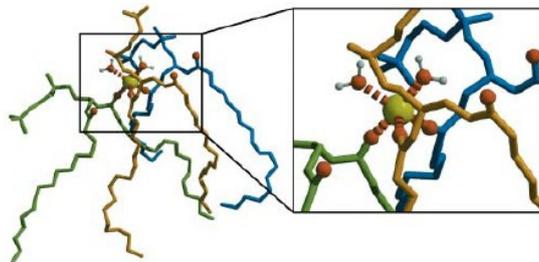


図4-8 Na^+ の周りにPOPC 3分子と水2分子が配位しているMDシミュレーションのスナップショット[24] 赤：酸素原子，黄色： Na^+ イオン

第二段階の緩やかな界面張力減少は、吸着したリゾチームと DOPC 脂質膜が安定な構造へと徐々に移行していく過程であると考えられる。特にタンパク質のように柔軟性のある高分子が急激に界面に吸着した後の緩やかな界面張力減少は、安定構造へむけた再配置であるとされている[25]。第一段階で DOPC 脂質膜にリゾチームが吸着したことにより急激に構造変化した DOPC 脂質膜が、第三段階の安定化にむけて緩やかに構造変化していく過程が第二段階であると考えられる。

まとめると、第一段階はリゾチームの相互作用に基づく DOPC 脂質膜の構造変化が主要因である。構造変化よりも先に起こる静電相互作用も重要であるが、脂質膜の構造変化と区別して観測することはできない。それはリゾチームが DOPC 脂質膜に吸着すると、それと同時に脂質膜の構造変化が起こるためである。第二段階は、DOPC 脂質膜が安定な構造へと徐々に移行していく過程であると考えられる。

4-3-4-2 DOPS 単分子膜

図4-9は、水/クロロホルム界面において平衡状態にある DOPS 単分子膜に対するリゾチーム吸着による界面張力の時間変化に与える NaCl 濃度の影響を示している。1 M NaCl 溶液において、リゾチーム添加前の界面張力は 1.3 mN m^{-1} であった。1 M でも三段階の変化が観測された。添加直後5秒間に 1.3 mN m^{-1} から 1.2 mN m^{-1} へと減少した後（第一段階）、約1000秒まで界面張力の値がほとんど変化しない領域が観測された（第二段階）。その後約4000秒から再び界面張力の値が急激に減少し始めた（第三段階）。0.1 M NaCl と比較すると、界面張力の値がほとんど変化しない第二段階の時間やその後で急激に界面張力が減少し始めるまでの時間が長くなった。

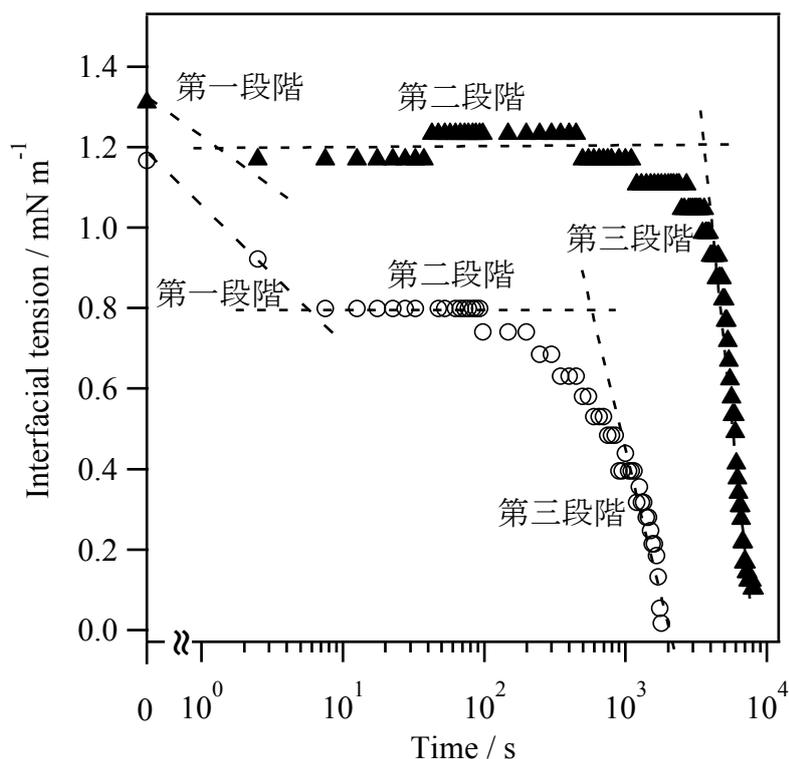


図4-9 水/クロロホルム界面のDOPS膜にリゾチームが吸着する際の界面張力の時間変化のNaCl濃度依存(○0.1 M, ▲1 M) グラフ左端のプロットは、リゾチーム添加前の界面張力を示す。破線はガイドとして記載する。

pH 7.0 においてリゾチームは正に帯電しており、同じイオン強度の場合、タンパク質-脂質膜間の静電相互作用は双性イオン型のDOPCよりも負に帯電したDOPSの方が強い。したがって静電相互作用に基づく吸着は、DOPCよりもDOPSの方が速く起きると考えられる。第一段階の界面張力の減少は、リゾチームとDOPS単分子膜との静電相互作用である。イオン強度が高くなると、電荷をもった分子間の静電相互作用は弱められる。その結果として、逆に帯電した分子間の吸着は抑制され、同じ電荷をもつ分子間の相互作用は減少する[3,26]。NaCl濃度を高くすることによって、正に帯電したリゾチーム分子は負に帯電したDOPS脂質膜との静電相互作用が弱められ、DOPS脂質膜内の負の電荷をもつDOPS分子間の静電反発も弱められる。これらのことはDOPS脂質膜の流動性を低下させ、界面張力の減少を遅らせることになる。しかしながら、1M NaClでは0.1 M NaClよりも第一段階の時間は短くなり、界面張力の減少もはっきりしないものとなった。これは0.1M NaClでは1M NaClよりもDOPS脂質膜が流動性をもつため、脂質膜の構造変化の影響が若干含まれているためであろう。

DOPSの第一段階は静電相互作用によるものであるため、第三段階で再度界面張力が減少する過程は、リゾチーム分子との疎水性相互作用によるDOPS脂質膜の構造変化と推定さ

れる。界面張力の値がほとんど変化しない第二段階は、静電相互作用から疎水性相互作用への遷移過程と考えられる。1 M NaCl で第二段階の界面張力がほとんど変化しない時間が長くなるのは、電荷の遮蔽によりリゾチーム分子間と DOPS 分子間の静電反発が抑制されることで、DOPS 脂質膜の構造変化が起こりにくくなるためである。この第二段階は DOPC では観測されず、DOPS でしか観測されなかった。これは、リゾチームと DOPS の親水性部位との強い静電相互作用が安定な反応中間体のようにふるまい、リゾチームとの疎水性相互作用による脂質膜の構造変化や脂質膜の構造再配置に長時間を要するためだと考えられる。このように界面張力の値がほとんど変化しない段階が観測されたのは、我々が知る限りでは初めてである。この結果は、タンパク質が脂質単分子膜に吸着する際には、脂質単分子膜の性質が重要な役割を果たしているということを示唆している。

まとめると、第一段階はリゾチームと DOPS 脂質膜の静電相互作用による表面吸着過程と考えられる。第二段階の界面張力がほとんど変化しない領域は、リゾチームが DOPS 脂質膜表面に吸着したままの状態であり、リゾチームと DOPS 間の強い静電相互作用が脂質膜内部へのリゾチームの挿入を妨げている。第三段階は DOPS 脂質膜の構造変化で、リゾチームが DOPS 脂質膜内部に入り込んでいく過程である。

4-3-4-3 DOPG 単分子膜

図 4-10 は、水/クロロホルム界面において平衡状態にある DOPG 単分子膜へのリゾチーム吸着による界面張力の時間変化における NaCl 濃度の影響を示している。DOPG は DOPS と同様に、生体環境中で負電荷をもつ脂質である。

0.1 M NaCl では、リゾチーム添加前の界面張力値は 0.7 mN m^{-1} であった。約 30 秒後に界面張力が 0.4 mN m^{-1} まで徐々に減少し（第一段階）、その後約 10 秒程度ほぼ界面張力が変化しない領域が観測された（第二段階）。その後、界面張力は急激に減少して、約 100 秒後には 0.1 mN m^{-1} となった（第三段階）。1 M NaCl では、リゾチーム添加前の界面張力値は 1.7 mN m^{-1} であった。約 20 秒後までに界面張力が 1.5 mN m^{-1} まで徐々に減少した（第一段階）。その後、約 100 秒まで界面張力の変化は認められなかった（第二段階）。その後再び界面張力は増加して、約 1000 秒後に 2 mN m^{-1} になった。その後は再び急激に界面張力が減少して、約 9000 秒後に 0.4 mN m^{-1} となった（第三段階）。

DOPG でも DOPS とほぼ同様な傾向を示し、界面張力がほぼ一定となる時間領域が観測された。第一段階は静電相互作用、第二段階は静電相互作用から疎水性相互作用への遷移過程であり、第三段階はリゾチームとの疎水性相互作用による DOPG 脂質膜の構造変化によると推定される。ただし、1 M NaCl において、第二段階で界面張力の値がほぼ変化しない状態が終了する約 100 秒後から再び界面張力が減少し始める約 1000 秒までの間に、界面張力値がいったん上昇する過程が観測された。この過程は、第二段階の後に第三段階の疎水性相互作用が起こる前に、リゾチームと DOPG 膜の構造の再配置がおこなわれているためと考えられる。

1 M NaCl では 0.1 M NaCl よりも疎水性相互作用が始まるまでの時間が長くなるという結果となった。これは DOPS と同様な傾向であり、その原因も同じであると考えられる。つまり、NaCl 濃度が高くなると、正に帯電したリゾチーム分子は、負に帯電した DOPG 脂質膜との静電相互作用が弱められる。それに加えて、DOPG 脂質膜内の負の電荷をもつ DOPG 分子間の静電反発も弱められることで DOPG 脂質膜の流動性が低下し、界面張力の減少が遅くなると考察された。

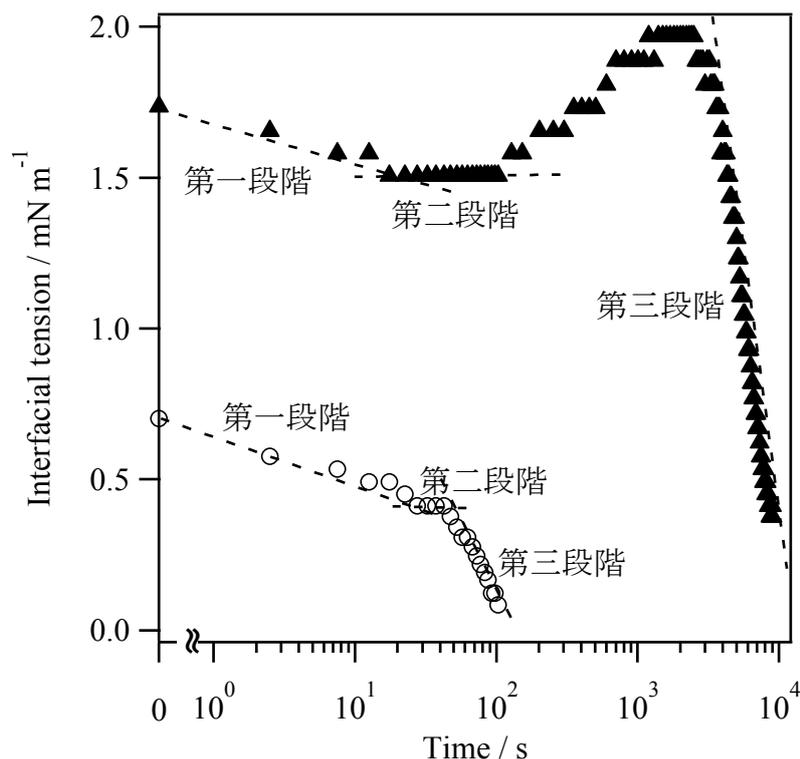


図 4-10 水/クロロホルム界面の DOPG 膜にリゾチームが吸着する際の界面張力の時間変化の NaCl 濃度依存 (○ 0.1 M, ▲ 1 M) グラフ左端のプロットは、リゾチーム添加前の界面張力を示す。破線はガイドとして記載する。

4-3-4-4 DOPE 単分子膜

図 4-11 は、水/クロロホルム界面において平衡状態にある DOPE 単分子膜に対するリゾチーム吸着による界面張力の時間変化に与える NaCl 濃度の影響を示している。DOPE は DOPC と同様に、生体環境中で中性 (双性イオン) な脂質であるが、DOPC の親水性基がコリン基であるのに対して、DOPE ではエタノールアミン基となっている。

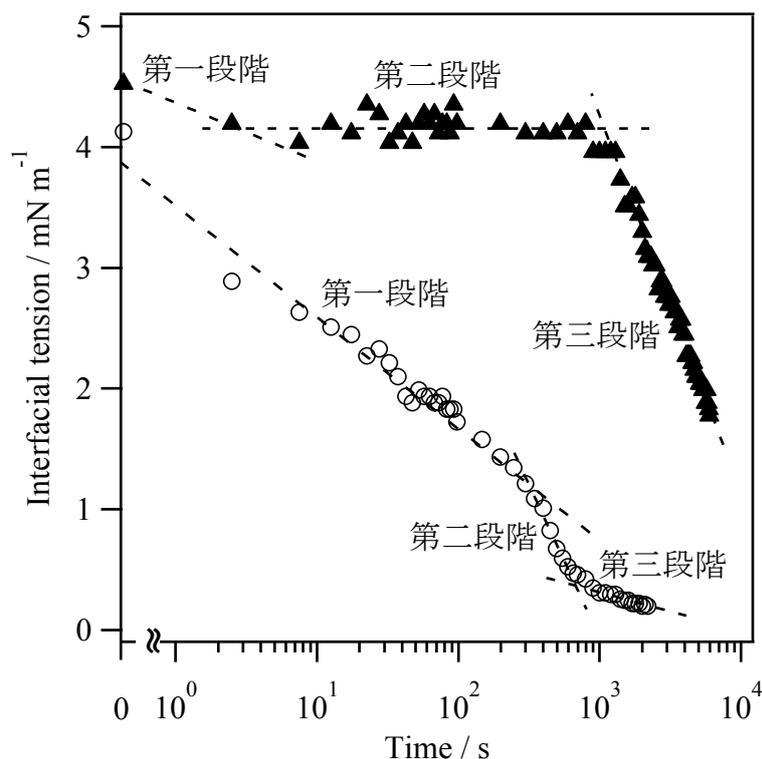


図 4-11 水/クロロホルム界面の DOPE 膜にリゾチームが吸着する際の界面張力の時間変化の NaCl 濃度依存 (○ 0.1 M, ▲ 1 M) グラフ左端のプロットは, リゾチーム添加前の界面張力を示す。破線はガイドとして記載する。

0.1 M NaCl では, リゾチームを添加する前の界面張力値は 4.1 mN m^{-1} であった。リゾチームを添加すると界面張力は減少し, 約 300 秒後に約 1.2 mN m^{-1} となった (第一段階)。その後, 界面張力の減少度が変化し, 約 700 秒後に約 0.4 mN m^{-1} となった (第二段階)。それ以降の界面張力の変化は非常に緩やかになり, 約 2200 秒後には約 0.2 mN m^{-1} となった (第三段階)。1 M NaCl では, リゾチームを添加する前の 4.4 mN m^{-1} から 2.5 秒後に 4.2 mN m^{-1} と若干界面張力の値が減少した (第一段階)。その後は, 約 1000 秒までほとんど界面張力が変化しない領域が観測されたが (第二段階), それ以降は急激に界面張力が減少していき, 約 6000 秒後の界面張力値は 1.8 mN m^{-1} であった (第三段階)。

同じ 0.1 M NaCl における第一段階の時間は, DOPC の約 10 秒よりも長くなった。DOPE では, 末端アミノ基が隣の DOPE 分子のリン酸基と水素結合しているため, DOPE 膜内の分子間の相互作用が強い[27]。そのためリゾチームとの相互作用が遅くなると考えられる。DOPC の 0.1 M NaCl と同様に, 第一段階では静電相互作用と同時に構造変化が起こっており, その後全体の再配置が起こっていると考えられた。

1 M NaCl では, DOPS と似た挙動を示した。第一段階が静電相互作用, 第三段階が構造変化, 第二段階は静電相互作用から疎水性相互作用による構造変化に移行するまでの時間

であると帰属された。同じ双性イオンの DOPC とはリゾチームの吸着挙動が異なることから、リゾチームの脂質膜への吸着は、脂質膜の電荷のみではなく、脂質膜の構造などにも依存すると考えられた。

4-4 リポソームへのリゾチーム吸着機構に対する考察

Kayal らは、リゾチームがリポソームと相互作用する機構として、図 4-12 を提案した[28]。

第一段階：リゾチームのリポソーム表面への吸着

正に帯電したリゾチームが、負に帯電したリポソーム表面に静電相互作用で引き寄せられる。その表面でリゾチームが構造変化した後にアグリゲーションする。この段階は、pH、イオン強度、ベシクルの脂質組成に依存する。一方、リポソーム表面の電荷密度に依存して、一部のリゾチームは二重膜内に貫通するが、貫通したリゾチームはアグリゲーションすることはない。

第二段階：脂質二重膜の不安定化によるリポソーム同士の膜融合

第三段階：繊維状のリゾチーム-脂質構造体の形成

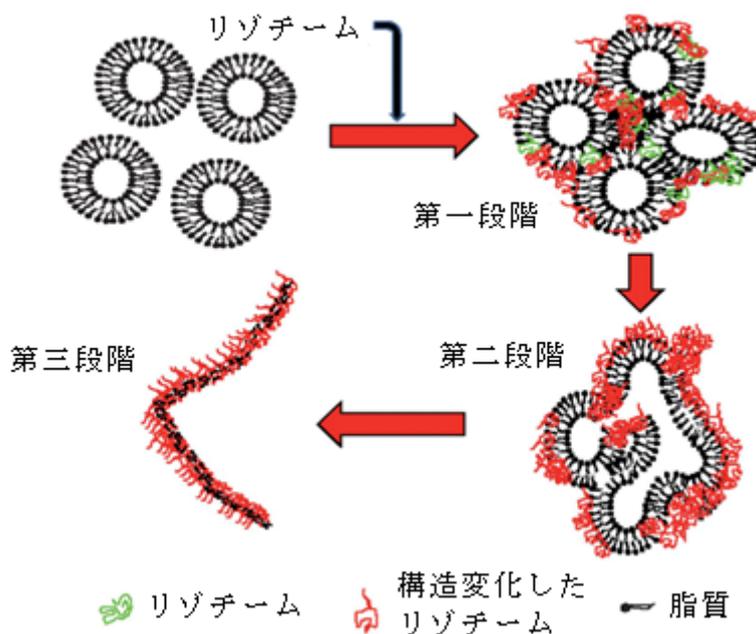


図 4-12 リゾチームが負に帯電したリポソームと相互作用する際の模式図[28]

今回得られた知見をもとに、図 4-12 の第二段階までを以下のように考察した。今回の結果から、双性イオン脂質、特に DOPC ではリゾチームとの静電相互作用と同時に脂質膜の構造変化が起こるが、負に帯電する DOPS ではリゾチームと静電相互作用した後、DOPS 脂質膜表面にリゾチームが吸着した状態を保持している反応中間体のような状態が存在する可能性が示唆された。つまり、リゾチームがリポソーム表面に存在するためには、その部

分のリポソームは十分な負の電荷をもつドメインになっている必要があり、そのような負電荷を持たないドメインに吸着したリゾチームは、吸着と同時にリポソームの疎水性部位に取り込まれる傾向をもつことになる。これを図 4-12 の機構で考えると、第一段階でリポソーム表面にリゾチームが吸着しているドメインは十分な負電荷をもつ部分であるが、リゾチームの二重膜内に貫通している部分は十分な負電荷を持たない部位となる。さらに、そのような十分な負電荷を持たない部位が構造変化を起こすことをきっかけとして、第二段階のリポソーム同士の膜融合が起こると考察できる。

4-5 まとめ

今回の研究では、時間分解 QELS 法を用いて、水/クロロホルム界面の脂質単分子膜にリゾチームが吸着する際の界面張力の時間変化を観測した。0.1 M NaCl では、DOPC と DOPS 脂質膜ともに、三段階の界面張力変化が起こることがわかった。それに加えて、DOPS 脂質膜では、界面張力の値がほとんど変化しない領域が観測された。NaCl 濃度を変化させてイオン強度を変えることでリゾチームと脂質膜間の相互作用を変化させ、三段階の界面張力変化の各段階を考察した。その一覧を表 4-1 に示す。

表 4-1 DOPC と DOPS の界面張力変化の考察

脂質の種類	第一段階	第二段階	第三段階
DOPC (双性イオン)	脂質膜表面への吸着 + 脂質膜の構造変化	再配置	安定化
DOPS (負)	脂質膜表面への吸着	表面吸着状態の保持	脂質膜の構造変化

DOPC と DOPS の双方で、NaCl 濃度を 0.1 M から 1 M にすると、吸着が平衡に達するまでの時間が長くなった。このことから、リゾチームの脂質膜への吸着過程における NaCl 濃度の主な効果は、リゾチームと脂質膜との静電相互作用ではなく、疎水性相互作用に基づくリゾチームと脂質膜との構造変化であると考えられた。DOPC と同じ双性イオン型脂質の DOPE, また DOPS と同じ負電荷をもつ DOPG においても、それぞれと同様な傾向がみられた。

4-6 参考文献

1. C. J. Beverung, C. J. Radke, and H. W. Blanch, *Biophys. Chem.*, **1999**, *81*, 59.
2. J. M.-Valderrama, V. B. Fainerman, E. Aksenenko, M.J. Gálvez-Ruiz, M.A.C.-Vilchez, and R. Miller, *Colloids Surf. A*, **2005**, *261*, 85.
3. J.N. Israelachvili, “*Intermolecular and Surface Forces*”, **2011**, Academic Press, Boston, MA.

4. K. Arnold, D. Hoekstra, and S. Ohki, *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, 1124, 88.
5. H. Brockman, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1999**, 9, 438.
6. R. Pichot, R. L. Watson, and I. T. Norton, *Int. J. Mol. Sci.*, **2013**, 14, 11767.
7. J. Li, Q. He, and X. Yan, “*Biomimetic Interface, in: Molecular Assembly of Biomimetic Systems*”, **2010**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
8. R. Miller, V. B. Fainerman, A. V. Makievski, J. Krägel, D. O. Grigoriev, V. N. Kazakov, and O. V. Sinyachenko, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2000**, 86, 39.
9. J. Wu, J. B. Li, J. Zhao, and R. Miller, *Colloids Surf. A*, **2000**, 175, 113.
10. L. Yan, Y. Zhang, G. Cui, and J. Li, *Colloids Surf. A*, **2000**, 175, 61.
11. R. Diamond, *J. Mol. Biol.*, **1974**, 82, 371.
12. N. C. Strynadka and M. N. James, *J. Mol. Biol.*, **1991**, 220, 401.
13. F. Tanaka, L. S. Forster, P. K. Pal, and J. Rupley, *J. Biol. Chem.*, **1975**, 250, 6977.
14. O. Zschörnig, G. Paasche, C. Thieme, N. Korb, and K. Arnold, *Colloids Surf. B*, **2005**, 42, 69.
15. T. A. Kayal, S. Nappini, E. Russo, D. Berti, M. Bucciantini, M. Stefani, and P. Baglioni, *Soft Matter*, **2012**, 8, 4524.
16. E. Posse, A. L. Viñals, B. F. de Arcuri, R. N. Fariás, and R. D. Morero, *Biochim. Biophys. Acta*, **1990**, 1024, 390.
17. H. K. Kimelberg, and D. Papahadjopoulos, *Biochem. Biophys. Acta*, **1971**, 233, 805.
18. H. T. Tien, “*Bilayer Lipid Membrane (BLM)*”, **1974**, Marcel Dekker, New York.
19. B. Roux, *Biophys. J.*, **1996**, 71, 1346.
20. A. D. Petelska, Interfacial tension of bilayer lipid membranes, *Cent. Eur. J. Chem.*, **2012**, 10, 16.
21. A. D. Petelska and Z. A. Figaszewski, *Biochim. Biophys. Acta*, **2002**, 1567, 79.
22. G. P. Gorbenko, V. M. Ioffe, and P. K. J. Kinnunen, *Biophys. J.*, **2007**, 93, 140.
23. R. Vácha, S. W. I. Siu, M. Petrov, R. A. Böckmann, J. B.-Kraszewska, P. Jurkiewicz, M. Hof, M. L. Berkowitz, and P. Jungwirth, *J. Phys. Chem. A*, **2009**, 113, 7235.
24. R. A. Böckmann, A. Hac, T. Heimbürg, and H. Grubmüller, *Biophys. J.*, **2003**, 85, 1647.
25. B. C. Tripp, J. J. Magda, and J. D. Andrade, *J. Colloid Interface Sci.*, **1995**, 173, 16.
26. M. Rabe, D. Verdes, and S. Seeger, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2011**, 162, 87.
27. M. Langner and K. Kubica, *Chem. Phys. Lipids*, **1999**, 101, 3.
28. T. A. Kayal, S. Nappini, E. Russo, D. Berti, M. Bucciantini, and M. Stefani, *Soft Matter*, **2012**, 8, 4524.

第5章 水／クロロホルム界面の脂質膜に対する DNA 複合体化に伴う界面張力変化

本章では水／クロロホルム界面の脂質膜に対する DNA 複合体化に伴う界面張力変化を考察する。

5-1 緒言

脂質膜と DNA の相互作用に関する研究は、細胞内での DNA と脂質膜との相互作用という基礎的な生命科学の観点から、リポプレックスによる非ウイルス性の遺伝子導入技術の開発という医療応用に至るまで、幅広く関心が寄せられている[1-3]。DNA はイオン化したリン酸基により主鎖が負に帯電しているポリアニオンであるため、リポプレックスを形成するための脂質膜やリポソームにはカチオン性の両親媒性化合物を用いることが多い。通常は細胞への DNA の導入効率を向上させるために、カチオン性の両親媒性化合物に加えて補助脂質として双性イオンの脂質を加えることが多い[4]。遺伝子導入効率は補助脂質として DOPC よりも DOPE を使ったリポプレックスの方がよいが[4,5]、その理由は明らかになっておらず、これら脂質膜と DNA の相互作用に関する研究が物性や構造の面から盛んである[6-8]。脂質膜と DNA の相互作用は遠距離では静電相互作用が支配的で、近距離になると脂質膜近傍や DNA 表面のカウンターイオンや水和水の解放に伴うエントロピー増加が寄与し、その相互作用は一層強められると考えられている[6]。また、Koltover らは DNA-脂質複合体の解析をおこない、DNA-カチオン性リポソーム複合体が DOPE 添加によりラメラ構造から逆ヘキサゴナル相へ転移することを示した[7]。

近年、DNA と脂質膜の相互作用について、脂質膜へ DNA が吸着する際の自由エネルギー変化、つまり膜の界面張力変化を計測する手法が多く報告されている[9-11]。細胞レベルの微小領域での界面張力変化測定は技術的に難しく、そのモデルとして空気／水界面の LB 膜がよく用いられる。それらの研究の多くは DNA の有無による表面圧 - 平均面積等温曲線 (π - A isotherm) の変化から議論しているものが多く、表面張力の時間変化を測定している例は限られている。

Hansda らは、気液界面の ODA (octadecylamine) LB 膜の水相に DNA 溶液を添加して、表面圧の時間変化や BAM 像から ODA と DNA の相互作用を研究した[9]。Cárdenas らは空気／水界面の DODAB (dioctadecyldimethylammonium bromide) 膜に対して DNA を添加した際の表面圧変化に伴う BAM 像の変化を観測し、空気／水界面の複合体のドメイン変化を観測した[10]。これらの研究は分単位のタイムスケールに伴う複合体形成に伴う表面張力変化を調べている。一方、ストップフロー蛍光法から、DNA が脂質膜表面と相互作用し、DNA-脂質複合体が成長するタイムスケールはミリ秒から秒スケールであるとされており[12]、DNA-脂質の相互作用に伴う界面張力変化を観測するためには、秒スケールの時間変化測定が必要となる。

そこで、液液界面に飽和吸着させた脂質膜に対して DNA を添加した際の界面張力変化を

QELS 法により測定し、DNA の複合体化挙動の脂質の種類による違いを調べることが目的として実験をおこなった。脂質としてはカチオン性の DOTAP と双性イオンの DOPC と DOPE を用いて、水/クロロホルム界面の脂質膜の界面張力に対する DNA の影響を明らかにし、これまでに研究例もある空気/水界面の脂質膜の表面張力変化と比較した。また、CaCl₂ 濃度依存性から、DOPE と DOPC の複合体化挙動の違いを考察した。さらに、カチオン性脂質の DOTAP と双性イオン脂質の混合膜系 (DOTAP/DOPC と DOTAP/DOPE) との比較により、混合膜における DNA の複合体化ダイナミクスを界面張力変化から議論した。

5-2 実験

5-2-1 試薬

DNA としては、和光純薬製のサケ精巢由来 DNA を用いた。この試薬は超音波処理により 500~1000 塩基対に断片化したもので、フェノール-クロロホルム抽出によりタンパク質などの不純物を除去してある。2-1-2 で述べたように、DNA 純度は一般的に UV/VIS 分光法により確かめることができる。DNA の吸収極大での吸光度 $A_{260\text{ nm}}$ とタンパク質の吸収極大での吸光度 $A_{280\text{ nm}}$ の比、 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ が 1.8 以上であることが、DNA の純度が高い指標として用いられる。図 5-1 は、本実験で用いたサケ精巢由来 DNA の UV/VIS スペクトルである。 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} = 1.07 / 0.59 = 1.81$ となり、不純物タンパク質の影響を考慮する必要がないことを確認した。

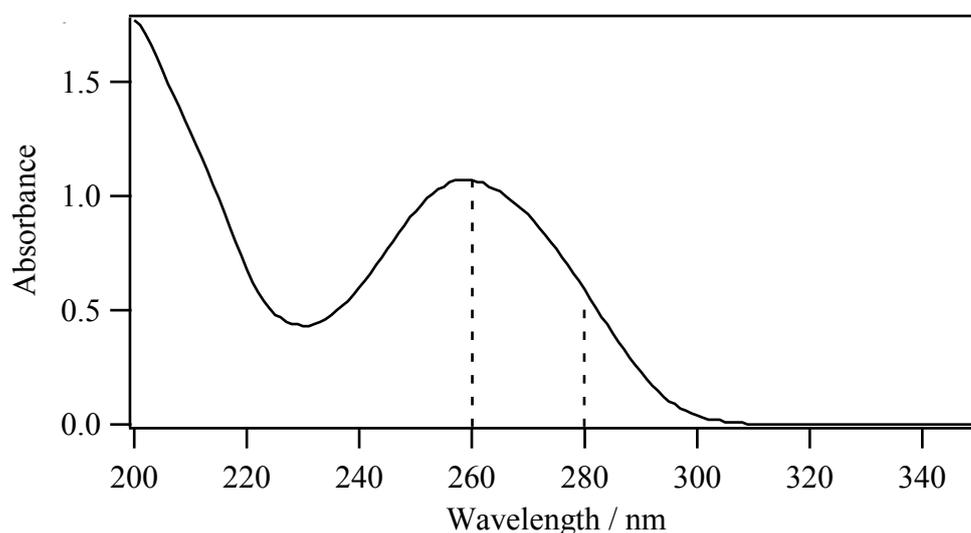


図 5-1 サケ精巢由来 DNA (500~1000 塩基対) の UV/VIS スペクトル

脂質としては、カチオン性の DOTAP, 双性イオンの DOPC, DOPE を用いた。構造式は図 2-9 に示した。DOTAP と DOPC は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) から、DOPE は和光純薬 (大阪 日本) から購入した。DOPC と DOPE は生体内に存在する脂質であるが、DOTAP は合成された脂質で、ラセミ体のものを用いた。塩化ナトリウム, 塩化カルシウム,

塩酸とクロロホルムは関東化学（東京 日本）から購入した。Tris(hydroxymethyl)aminomethane は Sigma-Aldrich (Germany)から購入した。純水は MilliQ system (Nihon Millipore, Tokyo, Japan)を用いた。

5-2-2 QELS 装置

QELS 測定装置は 3-2-2 の図 3-7 で示したものを用いた。測定セルは、26 mm × 26 mm × 50 mm の石英セルを用いた。時間分解 QELS 測定における積算時間は 5 秒とし、図のプロットの横軸の時間は積算開始時と終了時の中間値とした。すべての実験は 25 °C でおこなった。

5-2-3 空気／水界面の表面張力測定

空気／水界面への脂質膜作製法を述べる。まず、石英セルに、水相を 5 mL 加えた。水相としては 3 mM CaCl₂ + 50 mM Tris-HCl pH 7.6 を用いた。クロロホルムに溶解した 0.1 mM 脂質溶液を水相の上に適量添加し、クロロホルムが蒸発して表面張力値が平衡に達するまで静置した。脂質の表面濃度は、滴下した脂質量をセルの面積で割ったものを用いた。DNA の添加の際は、マイクロシリンジを用いて 10 mg mL⁻¹ の DNA 溶液 (50 mM Tris-HCl pH 7.6) 50 μL を水相の下部に添加し (水相における平衡時の濃度 0.1 mg mL⁻¹)、添加時からの表面張力の時間変化を QELS 法で観測した。

5-2-4 水／クロロホルム界面の界面張力測定

石英セルに、脂質を溶解したクロロホルム相と水相を各 5 mL ずつ添加した。セル内での水相の厚さは約 1 cm であった。水相としては、断りのない限り 3 mM CaCl₂ + 50 mM Tris-HCl pH 7.6 を用いた。Ca²⁺イオン濃度依存性の測定の場合には、Ca²⁺イオン濃度は 0.3, 33, 100 mM になるように調整した。水／クロロホルム界面における脂質単分子膜の形成は、界面張力が一定になることにより確認した。DNA の添加の際は、ピペットを用いて 10 mg mL⁻¹ の DNA 溶液 (50 mM Tris-HCl pH 7.6) 50 μL を上層の水相表面に添加し (水相における平衡時の濃度 0.1 mg mL⁻¹)、その後の界面張力の時間変化を QELS 法で観測した。

5-3 結果と考察

5-3-1 空気／水界面への DNA 添加による表面張力の時間変化

まず、これまでに研究例がある空気／水界面の脂質膜への DNA 複合体化挙動における表面張力変化を時間分解 QELS 法によりおこなった。図 5-2 には脂質がない場合の空気／水界面に DNA 溶液を添加した際の表面張力の時間変化を示す。若干の表面張力の変化はあるが、この時間領域で表面張力にほとんど変化はなかった。同様な結果は Frommer と Miller によって報告されている[13]。DNA の界面活性は低く、DNA は気液界面付近には存在するが、それにより低分子の塩が界面近傍から欠乏するために、結果としてほとんど表面張力が変

化しないと考察している[13]。また, Chatteraj と Mitra は, DNA が長鎖で棒状であるため, 気液界面では親水性基を水相側に, 疎水性基を気相側に向けることができないことが原因とした[14]。

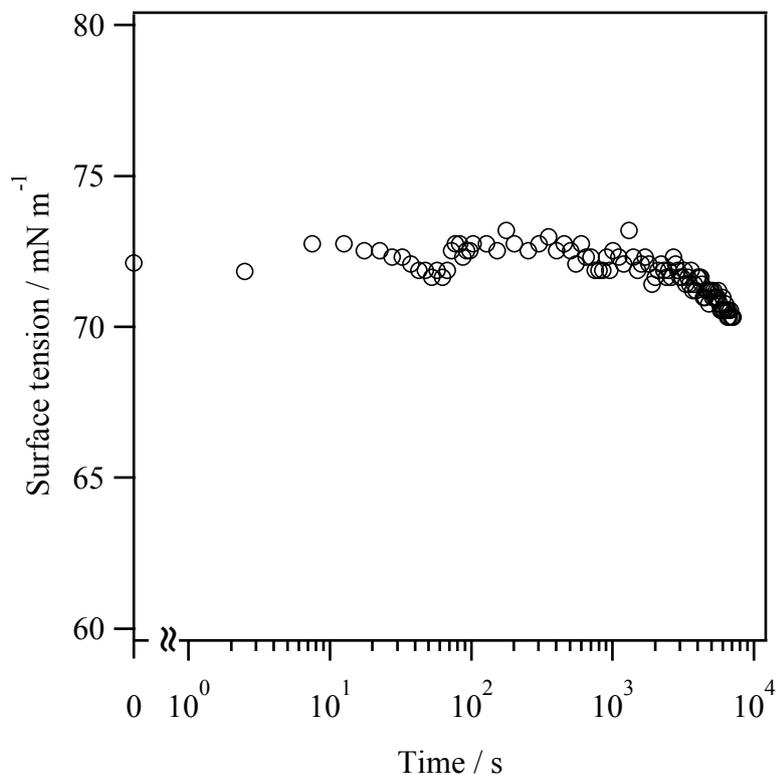


図 5-2 空気/水界面に DNA を添加した際の表面張力の時間変化

5-3-2 空気/水界面の脂質膜への DNA 添加による表面張力の時間変化

空気/水界面に脂質が飽和吸着した状態で DNA 添加実験をおこなうために, それぞれの脂質の空気/水界面における飽和吸着濃度を求めた。空気/水界面に添加した各脂質の添加量と表面張力の平衡値をプロットしたものを図 5-3 に示す。飽和吸着濃度は, 脂質の添加量を増やしても表面張力が一定となる濃度とした。その結果, DOPE, DOPC, DOTAP の飽和吸着濃度は, すべて $3 \mu\text{mol m}^{-2}$ であることがわかった。

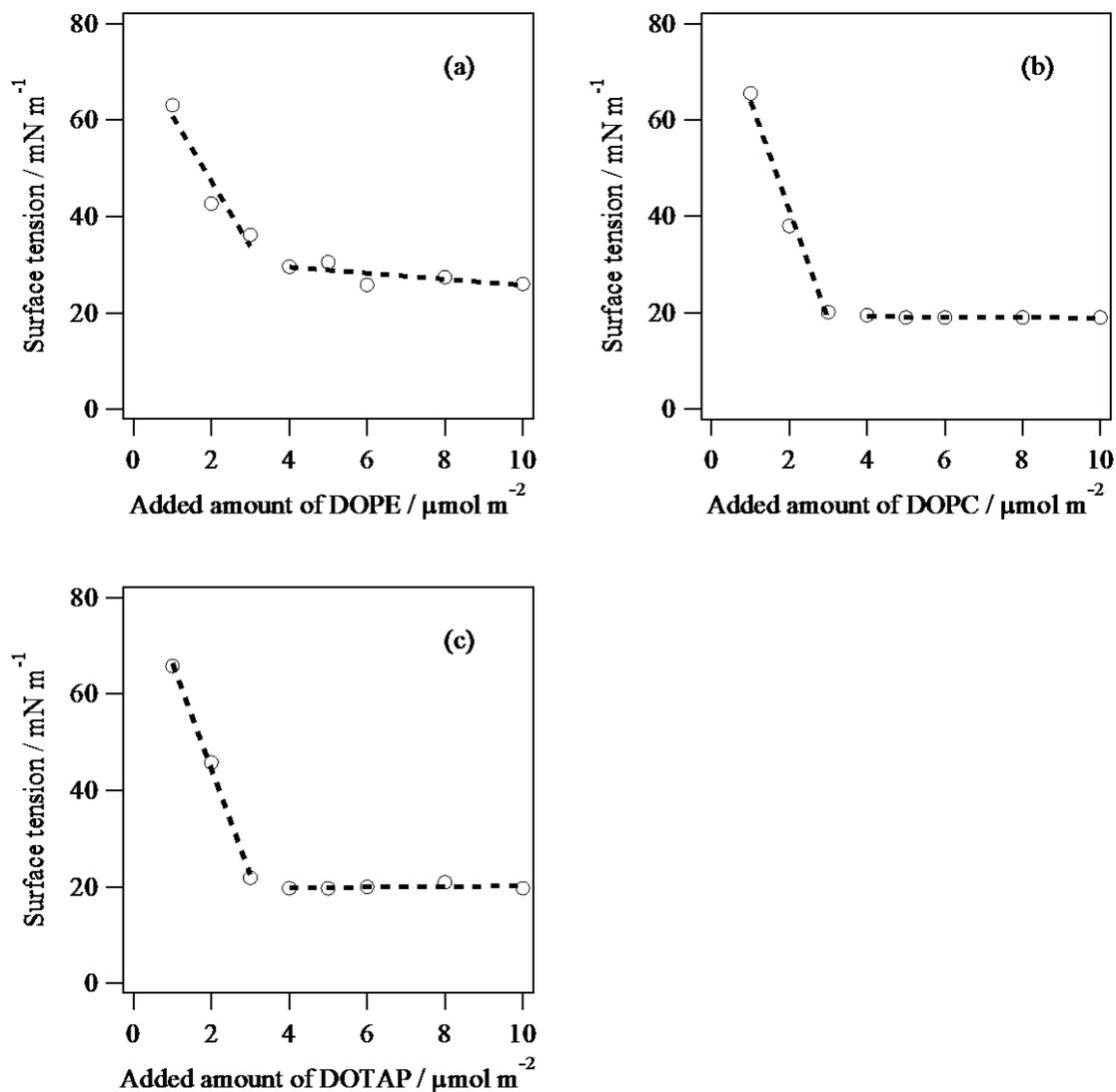


図 5-3 空気／水界面に添加した脂質量に対する表面張力の平衡値

(a) DOPE, (b) DOPC, (c) DOTAP

空気／水界面に脂質が飽和吸着した状態で DNA を添加した際の表面張力変化を図 5-4 に示す。それぞれの脂質において、DNA 添加後約 100 秒までは若干の表面張力の増減はあるが、DNA を添加しても表面張力はほぼ一定で、その後徐々に表面張力が上昇する傾向が観測された。その表面張力が上昇し始める時間は、DOTAP, DOPC と DOPE で、それぞれ約 700, 1000, 1200 秒であった。DNA 添加により表面張力値が徐々に上昇した理由は、脂質との複合体化により脂質が空気／水界面から離脱したため、もしくは複合体化により脂質膜の構造が変化したためと考えられる。双性イオンの DOPC と DOPE でも DNA と複合体化するのは、 Ca^{2+} イオンが DOPC や DOPE と塩橋を形成し、膜表面が正に帯電することにより、静電相互作用により吸着するためである[15,16]。

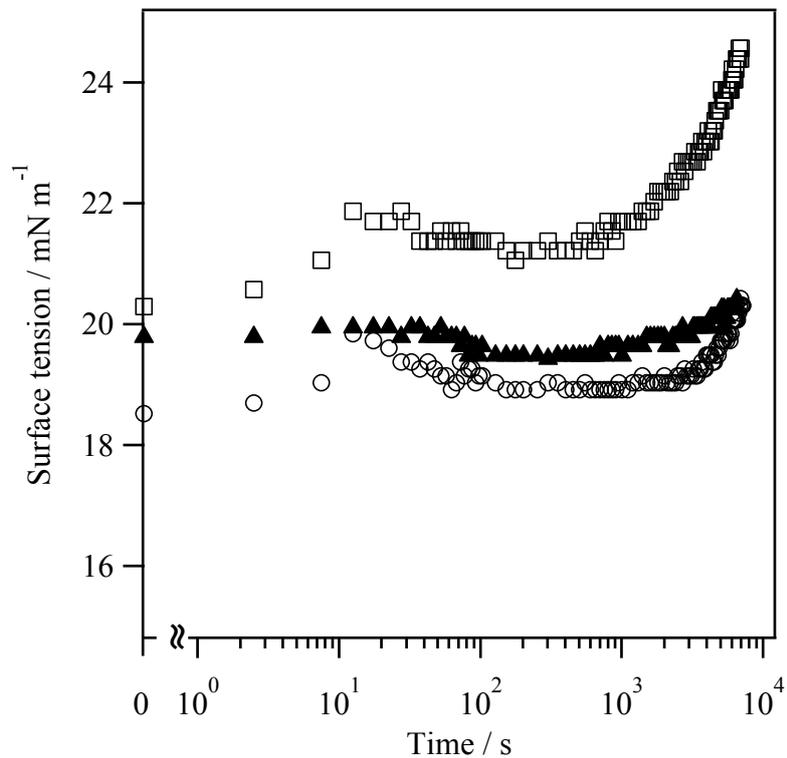


図 5-4 空気/水界面に飽和吸着した脂質膜に DNA を添加した際の表面張力の時間変化 (○ DOPE, □ DOPC, ▲ DOTAP) グラフの左端のプロットは, DNA 添加前の表面張力を示す。

そこで, 水相の CaCl_2 濃度を 33 mM と高くして, 同様な実験をおこなった。水相の CaCl_2 濃度を 33 mM とした際の, DOPE, DOPC, DOTAP の飽和吸着濃度は, それぞれ 5, 3, 4 $\mu\text{mol m}^{-2}$ であった。水相の CaCl_2 濃度を 33 mM とした際の, 空気/水界面に脂質が飽和吸着した状態で DNA を添加した際の表面張力変化を図 5-5 に示す。それぞれの脂質において, DNA 添加後約 100 秒までは若干の表面張力の増減はあるが, DNA を添加しても表面張力はほぼ一定で, その後徐々に表面張力が上昇する傾向が観測された。その表面張力が上昇し始める時間は, DOTAP, DOPC, DOPE で, それぞれ約 1000, 1000, 2500 秒であった。3 mM CaCl_2 よりも表面張力が上昇し始めるまでの時間が長くなる傾向がみられたのは, イオン強度が高くなることで DNA と脂質膜表面の電荷が遮蔽されて, 静電相互作用が弱くなるためであると考えられた。

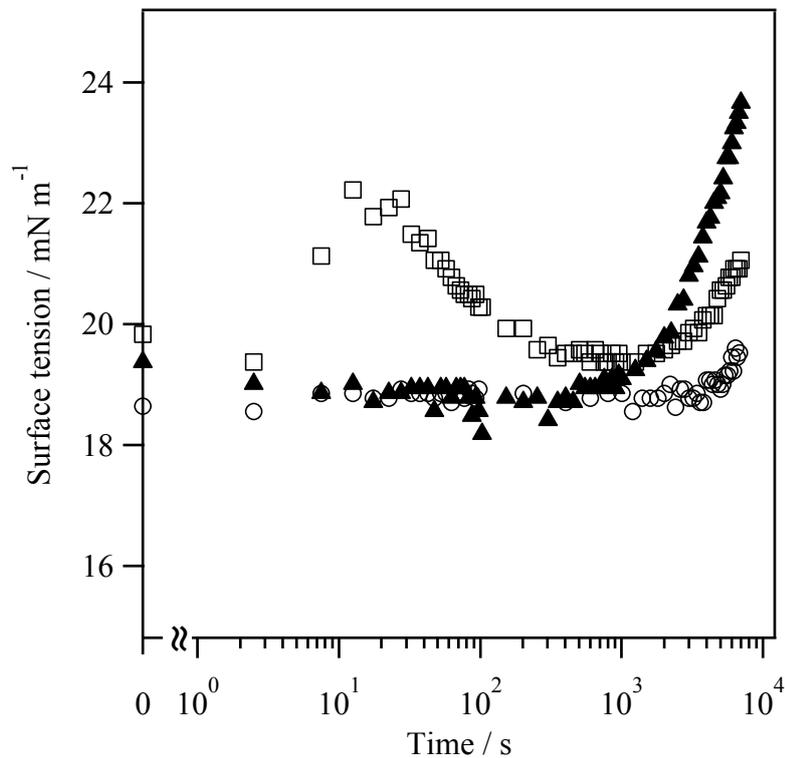


図 5-5 水相を 33 mM CaCl₂ とした際の、空気/水界面に飽和吸着した脂質膜に DNA を添加した際の表面張力の時間変化 (○ DOPE, □ DOPC, ▲ DOTAP) グラフの左端のプロットは、DNA 添加前の表面張力を示す。

Oberle らは空気 / 水界面のカチオン性脂質 SAINT-2 (N-methyl-4(dioleoyl)methylpyridiniumchloride) 単分子膜に p-Cat plasmid (4.7 kbp) を添加し、表面圧の変化を観測した[17]。表面圧は plasmid 添加後すぐに減少し (表面張力は上昇)、1800 秒程度でほぼ平衡に達した。その原因をカチオン性脂質の局所的クラスター化やプラスミド DNA との複合体化による空気/水界面からのカチオン性脂質の脱離としている[17]。今回の実験系では、空気/水界面の脂質膜と DNA は相互作用するが、それによる界面張力の変化は約 1000 秒以降に起こることがわかった。

5-3-3 水/クロロホルム界面への DNA 添加による界面張力の時間変化

図 5-6 には異なる DNA 濃度の水溶液を添加した際の水/クロロホルム界面の界面張力の時間変化を示す。すべての DNA 濃度において、添加直後から約 10 秒までに界面張力の値が急激に減少し、その後は界面張力の減少が緩やかになった。また、その間の界面張力の減少量は、DNA 濃度が高いほど大きかった。DNA 濃度 1 mg mL⁻¹ では、約 1000 秒後に約 5 mN m⁻¹ でほぼ平衡に達した。それに対して DNA 濃度 0.02 と 0.1 mg mL⁻¹ では、1 mg mL⁻¹ よりも界面張力の減少が小さく、約 7000 秒後も徐々に界面張力値が減少していった。約

7000 秒後の 0.02 と 0.1 mg mL⁻¹ の界面張力値は、それぞれ約 14 と 8 mN m⁻¹ であった。このように、DNA 濃度が高いほど界面張力減少の傾きが大きいのは、DNA 濃度が高いほど界面への拡散に要する時間が短くなるためである。

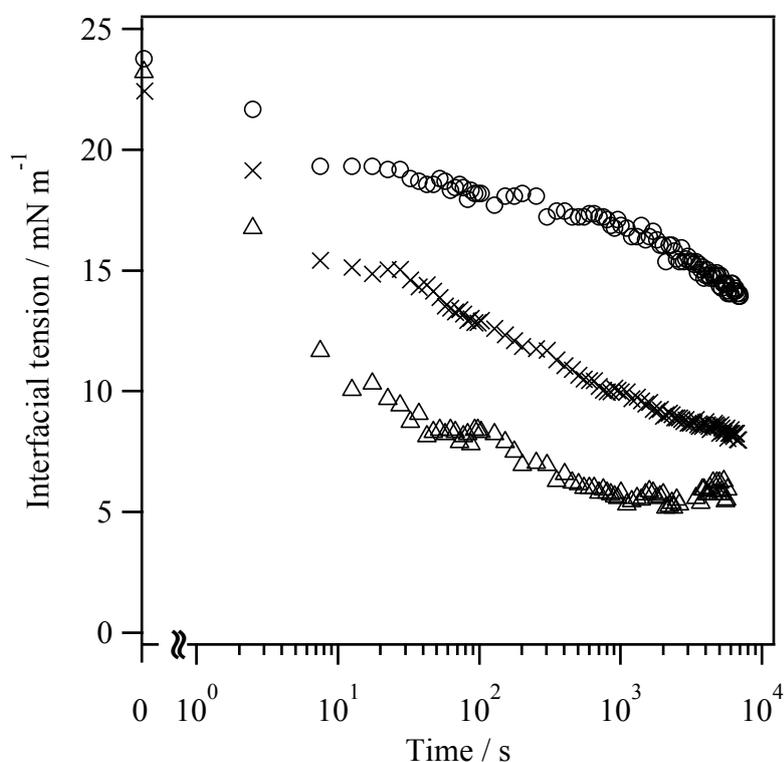


図 5-6 水／クロロホルム界面に DNA を添加した際の表面張力の時間変化 (○ 0.02 mg mL⁻¹, × 0.1 mg mL⁻¹, Δ 1 mg mL⁻¹) グラフの左端のプロットは、DNA 添加前の表面張力を示す。

Beaman らは高分子電解質であるポリメタクリル酸 (PMA : poly methacrylic acid) の水／四塩化炭素界面への吸着挙動を界面張力と total internal reflection vibrational sum frequency spectroscopy によりおこなった[18]。PMA 溶液を水／四塩化炭素界面に添加すると、添加直後に界面張力値が数 mN m⁻¹ ほど急激に減少し、その後は緩やかに界面張力が減少していくと報告している。その機構として、水／四塩化炭素界面に PMA が一層レベルで吸着し、その後徐々にバルク中の PMA 分子が PMA 吸着層に吸着していくことが提案されている[18]。クロロホルムは極性のある有機溶媒 (双極子モーメントは 3.47×10^{-30} C m) なので、高分子電解質の一種である DNA も水相に添加された後に界面へ拡散した後、まず界面への DNA 一層程度の吸着が起こり、それからその吸着層に DNA がさらに吸着していくものと考えられる。

5-3-4 水／クロロホルム界面への脂質の飽和濃度決定

水／クロロホルム界面に脂質が飽和吸着した状態で実験をおこなうために、脂質が飽和

吸着する濃度を調べた。図 5-7 にクロロホルム相の脂質濃度を変化させた際の、各濃度における界面張力の平衡値をプロットしたものを示す。界面張力の値が一定となる濃度が飽和吸着濃度であり、それ以上の濃度では、水/クロロホルム界面は脂質が飽和吸着している。DOPE, DOPC, DOTAP の飽和吸着濃度は、それぞれ 20, 10, 10 μM であった。そこで、脂質濃度は、DOPE, DOPC, DOTAP でそれぞれ 100 μM となるようにして、DNA 溶液を添加した直後からの界面張力の時間変化を計測することとした。Gibbs 吸着等温式から求めた DOPE, DOPC, DOTAP の分子占有面積は、それぞれ 58, 89, 138 $\text{\AA}^2/\text{molecule}$ であった。

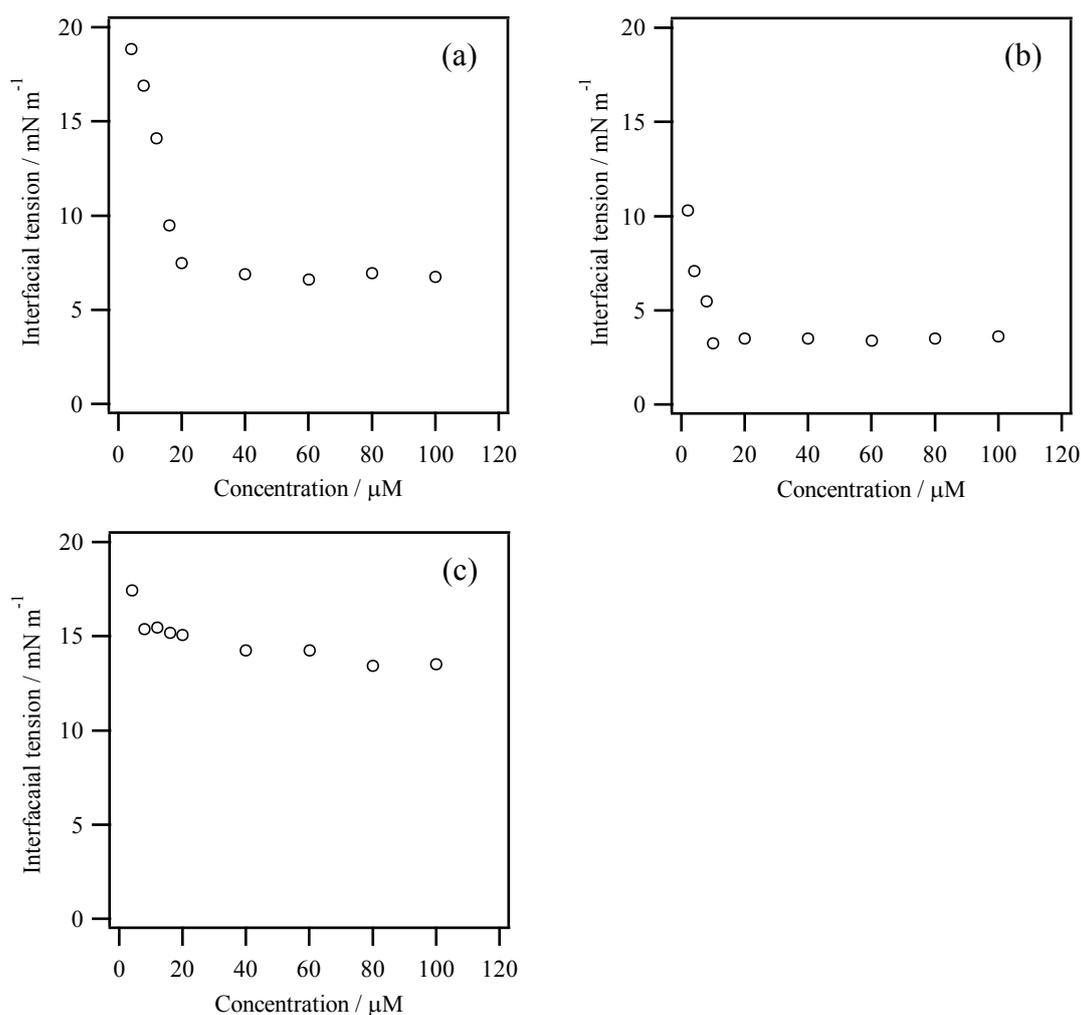


図 5-7 水/クロロホルム界面における界面張力（平衡値）の脂質濃度依存性
(a) DOPE, (b) DOPC, (c) DOTAP

5-3-5 水/クロロホルム界面の脂質膜への DNA 添加による界面張力の時間変化

図 5-8 は水/クロロホルム界面に飽和吸着した脂質膜に対して DNA 溶液を添加した時点からの界面張力変化を示す。DNA 添加前の水/クロロホルム界面における各脂質の界面張力の平衡値は、DOTAP, DOPE, DOPC でそれぞれ 12.6, 6.0, 3.6 mN m^{-1} であった。カチオン性

の脂質である DOTAP の界面張力が双性イオンの DOPE と DOPC と比較して大きいのは、脂質分子間の静電反発により、界面への吸着量が少ないためと考えられる。脂質の種類によって DNA 添加後の界面張力の減少挙動が異なることがわかったが、いずれの脂質の場合も DNA 添加により界面張力が減少することから、水/クロロホルム界面の脂質膜において、脂質-DNA の複合体化が起こっていると考えられる。

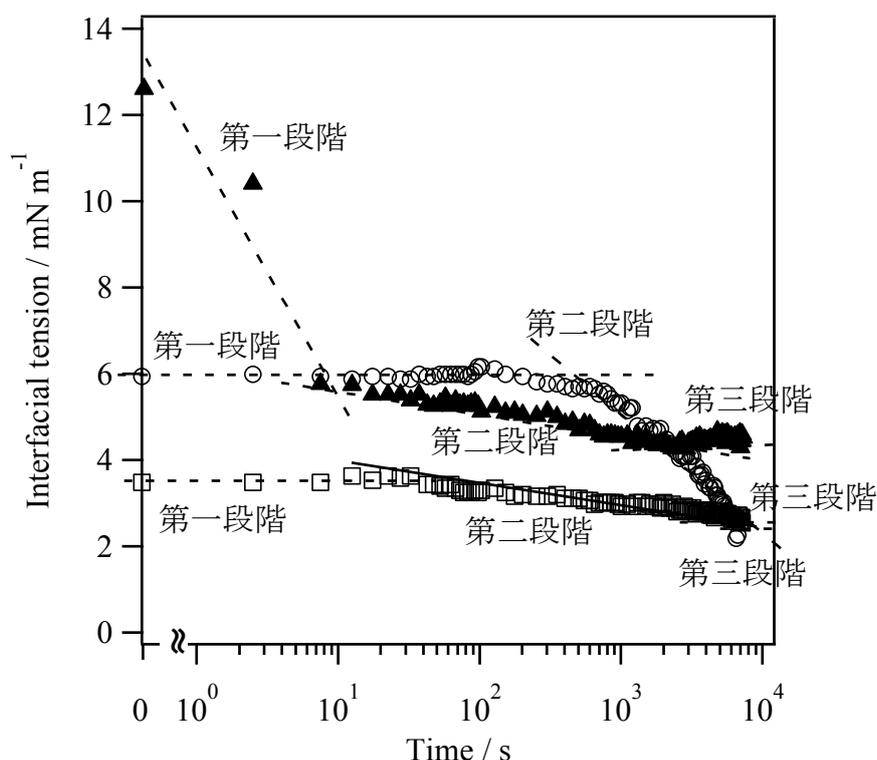


図 5-8 水/クロロホルム界面に飽和吸着した脂質膜に DNA を添加した際の界面張力の時間変化 (○ DOPE, □ DOPC, ▲ DOTAP) グラフの左端のプロットは, DNA 添加前の界面張力を示す。

DOTAP では三段階での界面張力変化が観測された。第一段階では DNA 添加前の 12.6 mN m^{-1} から約 10 秒で 5.7 mN m^{-1} まで急激に界面張力値が減少した。その後界面張力は徐々に減少し (第二段階), 約 800 秒後に 4.5 mN m^{-1} でほぼ平衡に達した (第三段階)。これに対して双性イオンの DOPE と DOPC では, DNA 添加直後に急激な界面張力減少は認められず, 三段階での界面張力変化が観測された。DOPE では DNA を添加しても約 1000 秒までほとんど界面張力が変化しなかったが (第一段階), その後界面張力が減少し始め (第二段階), 約 7000 秒後には 2.3 mN m^{-1} でほぼ平衡に達した (第三段階)。それに対して, DOPC では DNA を添加しても約 40 秒までほとんど界面張力が変化しなかった (第一段階)。その後の界面張力減少は非常に緩やかで (第二段階), 約 7000 秒後の界面張力値は 2.5 mN m^{-1} でほぼ平衡に達した (第三段階)。このように, 双性イオンの DOPE と DOPC では DNA 添加後

に界面張力値が変化しない領域が観測されたのに対して、DOTAP では約 10 秒で界面張力が急激に減少した。その理由は DOTAP と DNA 間の静電相互作用が強いために、DNA 添加後速やかに相互作用して界面で複合化が起るためである。

また、水／クロロホルム界面の脂質膜への DNA 複合体化挙動は、空気／水界面とは異なる時間スケールとなることがわかった。空気／水界面では約 1000 秒以降に複合体化による表面張力変化が観測されたのに対して、水／クロロホルム界面の DOTAP 脂質膜では 10 秒程度でも界面張力変化が観測された。このことから DNA と脂質膜の複合体化は、DNA と脂質膜表面の単純な吸着ではなく、脂質膜の構造や流動性などに影響されることが想定される。Wu らは中性子反射率法から、空気／水界面の DC-Chol (3- β -[N-(N',N'-dimethylethane)carbonyl]cholesterol) 脂質単分子膜の親水性基部分に DNA が若干入り込んでいることを示した[19]。また、Benatti らはスピンラベル-ESR 法から、脂質膜に DNA が吸着すると、膜の流動性低下が起ることを示した[20]。空気／水界面では界面の脂質分子が膜表面の二次元でしか移動できないのに対して、水／クロロホルム界面では界面の脂質分子がクロロホルム相側にも移動できる。水／クロロホルム界面において短い時間スケールで複合体化挙動が観測されたのは、空気／水界面における脂質膜との膜構造の違いと共に、界面における膜の流動性などにもよると考えられる。

5-3-6 水／クロロホルム界面の脂質膜への DNA 添加による界面張力の時間変化の CaCl_2 濃度依存性

水／クロロホルム界面における DNA と脂質との相互作用、特に DOPC と DOPE の違いを考察する際に、静電相互作用が重要なパラメーターとなるが、その強さはイオン強度などに依存する。そこで、 CaCl_2 濃度を変化させた実験をおこなった。

図 5-9 には DOTAP で水相の CaCl_2 濃度を 0.3, 3, 33, 100 mM にした際の界面張力の時間変化を示す。DNA 添加前の界面張力値は、0.3, 3, 33, 100 mM でそれぞれ 11.6, 12.1, 11.5, 10.6 mN m^{-1} であった。いずれの濃度においても DNA 添加後約 10 秒で界面張力の値が急激に減少した。その間の界面張力の減少値は 0.3, 3, 33, 100 mM で、それぞれ 6.7, 6.4, 4.0, 3.1 mN m^{-1} となり、 CaCl_2 濃度を高くすることで、界面張力減少の傾きが小さくなる傾向となった。また、約 7000 秒後の界面張力の平衡値は、それぞれ 3.0, 4.5, 5.5, 5.5 mN m^{-1} でほぼ平衡に達した。33 mM 以下では CaCl_2 濃度が小さいほど界面張力の平衡値が小さくなった。正に帯電している DOTAP は負に帯電している DNA と静電相互作用するが、電解質濃度を高くするほど DOTAP の正電荷が遮蔽されて DOTAP と DNA 間の相互作用が小さくなる。それによって CaCl_2 濃度が高いほど DNA 添加後 10 秒間の界面張力の減少量が小さくなり、界面張力の平衡値は大きくなると考えられる。

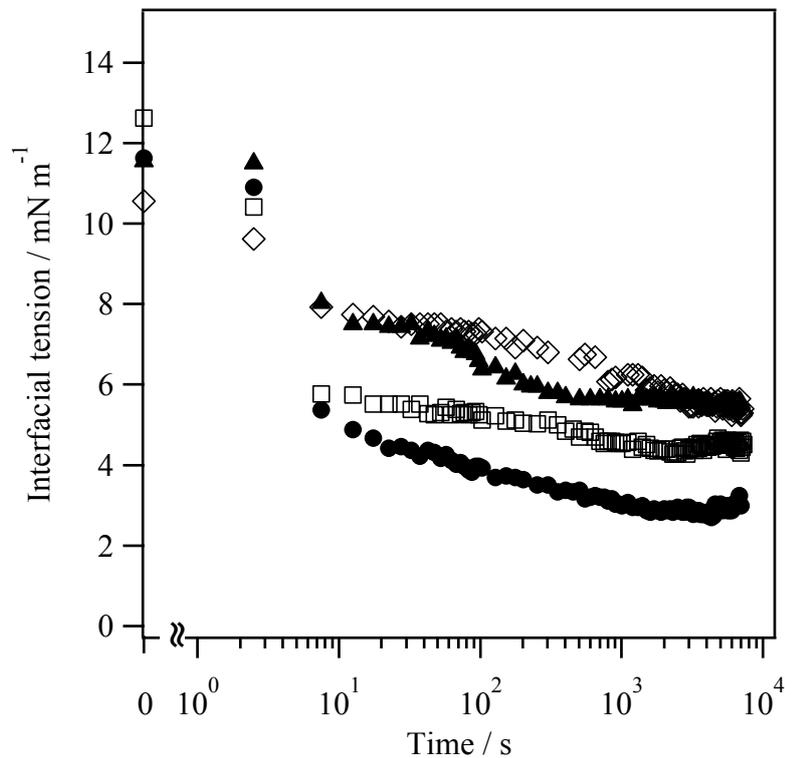


図 5-9 水/クロロホルム界面に飽和吸着した DOTAP 脂質膜に DNA を添加した際の界面張力の時間変化の CaCl_2 濃度依存性(● 0.3 mM, □ 3 mM, ▲ 33 mM, ◇ 100 mM CaCl_2) グラフの左端のプロットは, DNA 添加前の界面張力を示す。

次に双性イオン脂質の DOPC と DOPE の場合に, DNA を添加した際の界面張力の時間変化の Ca^{2+} イオン濃度依存性を, それぞれ図 5-10 と図 5-11 に示す。DOPE では DNA 添加前の界面張力の値はほぼ同じであった。吸着挙動も CaCl_2 濃度によらず, ほぼ同じとなった。このように CaCl_2 濃度依存性が認められないのは, DOPE では親水性基末端のアミノ基が近傍の DOPE 分子のリン酸基の酸素原子と水素結合しているため, Ca^{2+} イオンによる影響を受けにくいことが原因と考えられる (親水性基末端がコリン基である DOPC では, このような水素結合は形成されない) [21]。DOPC では DNA 添加前の界面張力の値は, ほぼ同じであった。DNA 添加後, 100 mM CaCl_2 において他の条件よりも界面張力の値が変化しない時間が長く観測され, 添加後 500 秒程度まで続いた。0.3 mM では約 30 秒から 50 秒の間に約 0.4 mN m^{-1} ほど界面張力が減少し, その後平衡に達した。

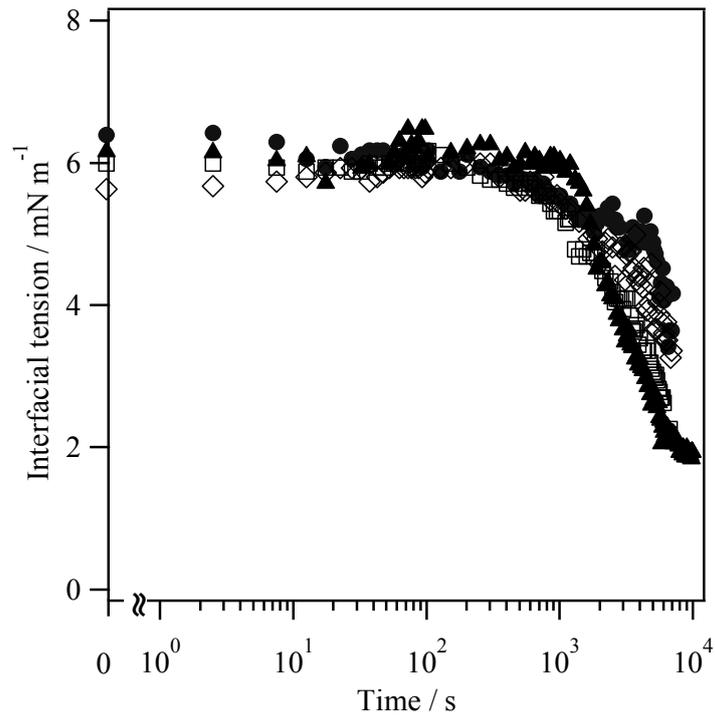


図 5-10 水/クロロホルム界面に飽和吸着した DOPE 脂質膜に DNA を添加した際の界面張力の時間変化の CaCl_2 濃度依存性 (● 0.3 mM, □ 3 mM, ▲ 33 mM, ◇ 100 mM CaCl_2) グラフの左端のプロットは, DNA 添加前の界面張力を示す。

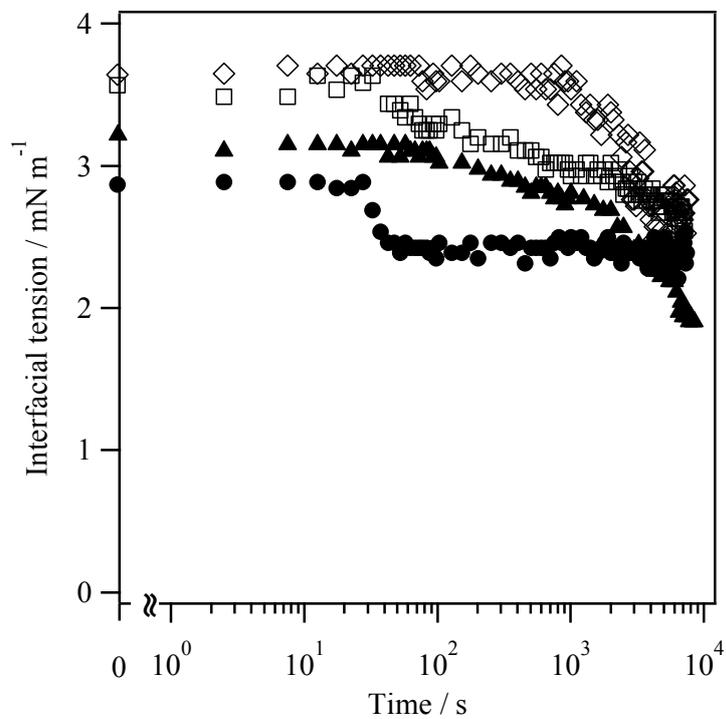


図 5-11 水/クロロホルム界面に飽和吸着した DOPC 脂質膜に DNA を添加した際の界面

張力の時間変化の CaCl_2 濃度依存性 (● 0.3 mM, □ 3 mM, ▲ 33 mM, ◇ 100 mM CaCl_2) グラフの左端のプロットは, DNA 添加前の界面張力を示す。

DOPE と DOPC で CaCl_2 濃度依存性が異なる主な原因として, それぞれの脂質のリン酸基と Ca^{2+} イオンの塩橋, 塩析効果と DOPE 末端アミノ基の脱プロトン化があげられる。双性イオンの DOPE と DOPC は共にリン酸基に Ca^{2+} イオンが配位することによって膜が正電荷を帯び, それにより DNA と静電相互作用する。大小の違いは不明であるが, この塩橋効果は DOPE と DOPC の両方に働くと考えられる。そこで, DOPE と DOPC に対する Ca^{2+} イオンの塩橋効果を調べるために, 水相の塩を 100 mM NaCl に変更して実験をおこなった。

図 5-12 には 100 mM NaCl において, DOPE 脂質膜に DNA を添加した際の界面張力変化を示す。100 mM NaCl では DNA 添加前の界面張力値が 3.8 mN m^{-1} となり, CaCl_2 の場合の 6 mN m^{-1} よりも小さな値となった。これは, DNA 添加前の DOPE 脂質膜の構造が異なることを示している。ただし, 100 mM NaCl の場合でも界面張力の減少が始まるのは約 1000 秒以降であり, CaCl_2 の場合とほぼ同じとなった。DOPE では 100 mM NaCl と CaCl_2 では脂質膜構造が異なるため, Ca^{2+} イオンと DOPE 分子が塩橋などを通して相互作用している可能性はあるが, この濃度領域において Ca^{2+} イオンの塩橋効果はほとんどないと考えられた。

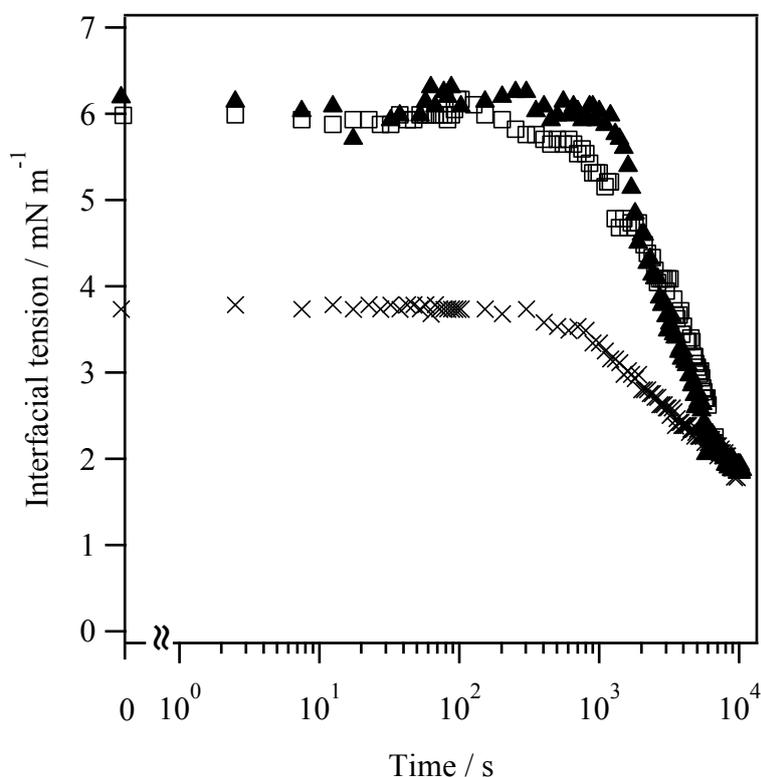


図 5-12 水/クロロホルム界面に飽和吸着した DOPE 脂質膜に DNA を添加した際の界面張力の時間変化 ($\times 0.1 \text{ M NaCl}$) □ 3 mM, ▲ 33 mM CaCl_2 は図 5-10 と同じもので, 比較のために示した。グラフの左端のプロットは, DNA 添加前の界面張力を示す。

図 5-13 は 100 mM NaCl において、DOPC 脂質膜に DNA を添加した際の界面張力変化を示す。DOPC の場合の DNA 添加前の界面張力値は、100 mM NaCl でも CaCl₂ の場合とほぼ同じ値であり、DOPC 脂質膜構造はほぼ同じである可能性が高い。DNA 添加後の界面張力減少挙動も 3 mM, 33mM CaCl₂ とほぼ同じであり、3 mM から 33 mM の範囲においては、DNA 複合体化挙動に与える Ca²⁺ イオンの塩橋効果はほとんどないと考えられた。

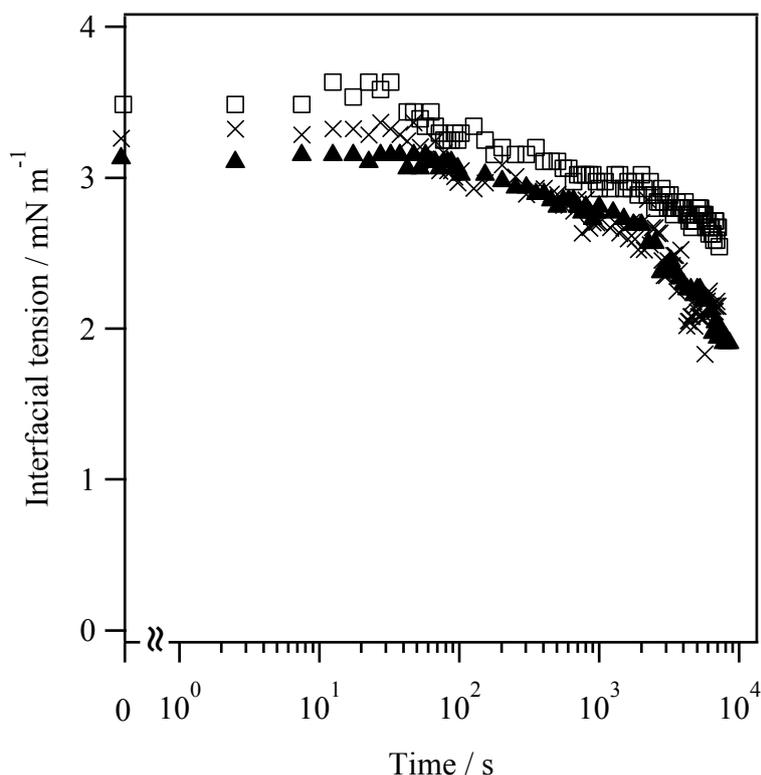


図 5-13 水/クロロホルム界面に飽和吸着した DOPC 脂質膜に DNA を添加した際の界面張力の時間変化 (× 0.1 M NaCl) □ 3 mM, ▲ 33 mM CaCl₂ は図 5-11 と同じもので、比較のために示した。グラフの左端のプロットは、DNA 添加前の界面張力を示す。

次に CaCl₂ 濃度の影響として、塩析効果による阻害効果を考慮した。CaCl₂ 濃度が高いほど脂質膜表面の水和水が減少し、双性イオン間の静電相互作用が強くなることで、DNA との複合体化が阻害される。イオン強度が高いほど、電荷をもった化学種間の静電相互作用は弱くなる[22,23]。したがって、CaCl₂ 濃度が高いほど、負に帯電した DNA と正に帯電した脂質膜間の静電相互作用は妨げられる。DOPC で CaCl₂ 濃度が高いほど DNA 添加直後に界面張力の値がほぼ変化しない時間が長くなる傾向がみられたのは、塩析効果による阻害効果の影響が大きいと考察された。

一方、DOPE では Ca²⁺ イオンによる塩橋効果や塩析効果に加えて、DOPE 末端アミノ基の脱プロトン化も考慮する必要がある。4 級アミンのコリン基をもつ DOPC とは異なり、1 級アミンのエタノールアミン基をもつ DOPE は、-NH³⁺ 基が脱プロトン化して負電荷をもつ

可能性がある[24,25]。Tsui らは DOPC と DOPE を混合したベシクルを用いて、二重膜状態における DOPE の intrinsic pKa を 9.6 と報告している[24]。この値は脂質膜の表面電位などによって変化するが、DOPE 末端の脱プロトン化が起こると、正電荷の減少が起きる。これにより DNA との静電相互作用が DOPC よりも抑制されるため、界面張力が減少し始めるまでに時間を要すると予測される。それに加えて、DOPE のアミノ基と近傍の DOPE 分子のリン酸基の酸素原子との水素結合も、DNA と脂質膜表面の相互作用を抑制すると考えられる[21]。5-3-4 で求めた DOPE と DOPC の分子占有面積は $58 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ と $89 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ であったが、DOPE 脂質膜の方が密になるのは、分子間水素結合の影響と末端部分の占有面積が小さいためである。

DOPE では CaCl_2 濃度に依存することなく、約 1000 秒以降にしか界面張力減少が起こらない。その要因の模式図を図 5-14 にまとめた。DOPE で約 1000 秒後以降にしか界面張力が減少せず、 CaCl_2 濃度依存性がほとんどないのは、隣接する DOPE 分子間の水素結合と末端部分の一部脱プロトン化による正電荷の減少といった 2 つの効果により、DNA と DOPE 脂質膜の複合体化が阻害されるためであると考察された。

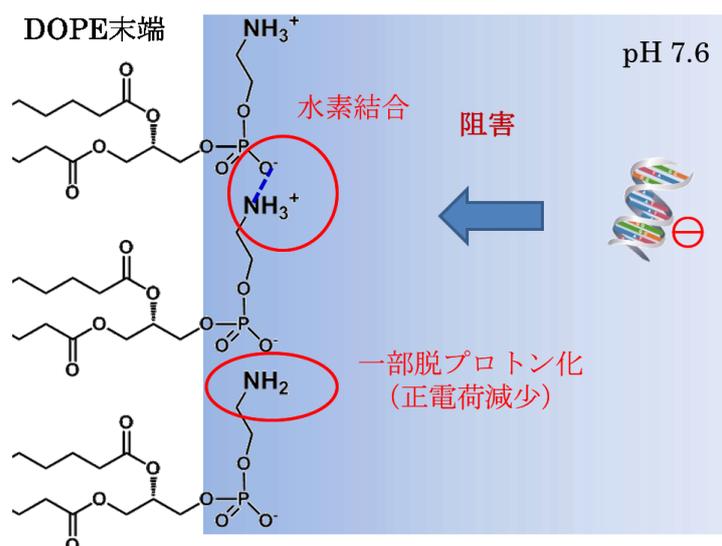


図 5-14 DOPE 脂質膜において DNA 複合体化が阻害される要因の模式図

図 5-15 は DOPC において、DNA 複合体化の阻害が CaCl_2 濃度に依存する要因をまとめた模式図である。DOPC 間の Ca^{2+} イオンによる塩橋効果の影響は CaCl_2 濃度が 3 mM から 33 mM の範囲ではほとんどないが、それ以上の濃度では塩橋効果が影響を与える可能性がある。その塩橋効果に加えて塩析効果による DOPC 脂質膜表面の水和水の減少により DOPC 分子間の相互作用が強くなることで、 CaCl_2 濃度が高くなるほど界面張力減少が始まるまでの時間が長くなると考察された。

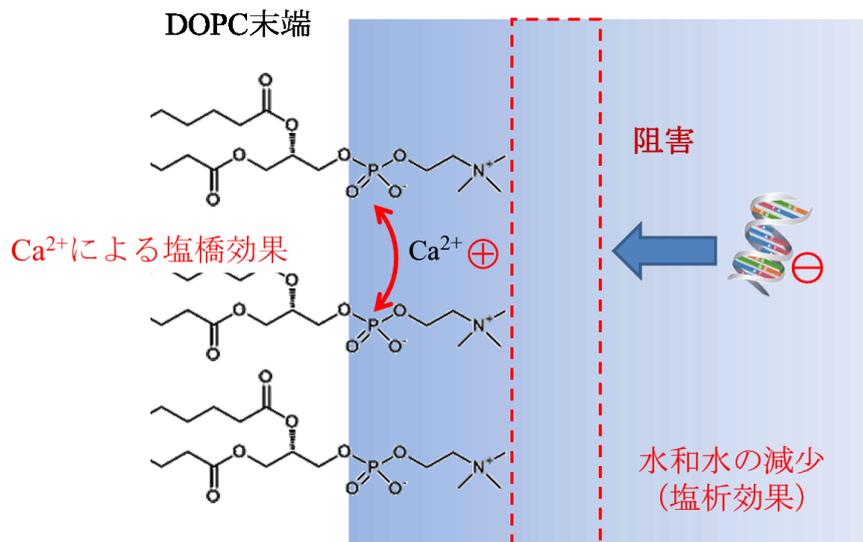


図 5-15 DOPC 脂質膜において DNA 複合体化が阻害される要因の模式図

また、DOPE と比較して DOPC では界面張力の減少がわずかしき起こらない。その原因として、それぞれの複合体構造の違いから考察した。DNA とカチオン性リボソームの複合体構造として、DOTAP に加えて補助脂質として DOPC を用いるとマルチラメラ構造、DOPE では逆ヘキサゴナル構造をとることが知られている[7] (図 5-16)。さらに、 Ca^{2+} が存在すると、DOPE 単独でも DNA と逆ヘキサゴナルの複合体構造をとることが報告されている[26]。DNA-DOPE 複合体の逆ヘキサゴナル構造では、DNA 周りを DOPE の単分子層構造が囲んでいる。これは DOPE の親水性基が小さく、コーン型の構造であることが一つの要因である[27]。

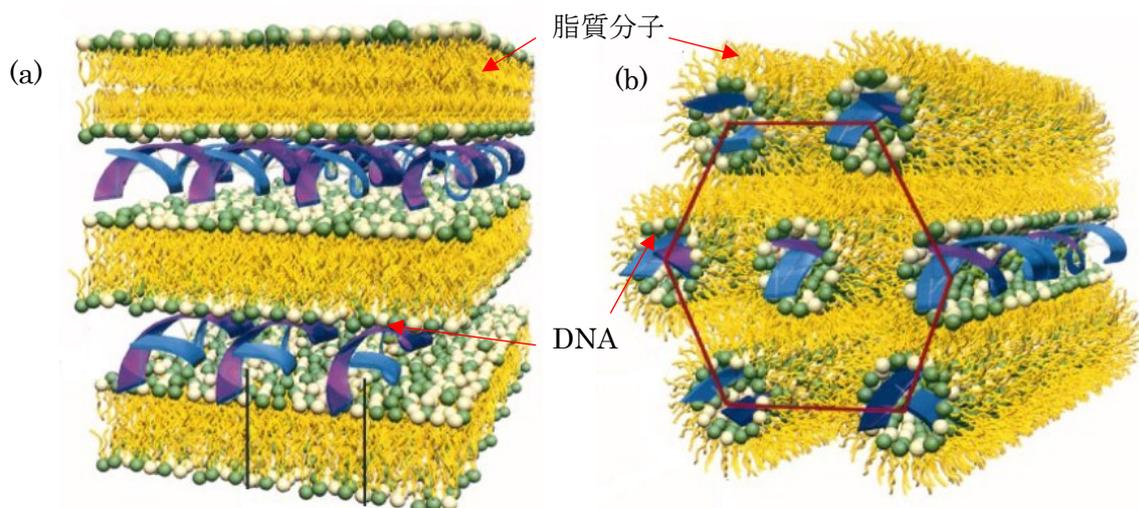


図 5-16 リポプレックスの構造[7]

(a) L_{α}^C マルチラメラ構造 (DOPC 含有) (b) H_{II}^C 逆ヘキサゴナル構造 (DOPE 含有)

水/クロロホルム界面においても DOPE は DNA 分子の周りを取り囲むような大きな構造変化を起こすことができると考えられる。それに対して、DNA とマルチラメラ構造の複合体をとる傾向をもつ DOPC では、水/クロロホルム界面において DNA とのマルチラメラ構造が取りにくいために、複合体化が進行しにくい可能性が高いと推定される。

5-3-7 水/クロロホルム界面の混合脂質系膜への DNA 添加による界面張力の時間変化

遺伝子治療で用いられるリポプレックスの作製には、カチオン性脂質と共に双性イオン脂質が用いられる。そこで DOTAP / DOPC 混合系、DOTAP / DOPE 混合系脂質単分子膜に対する DNA 添加後の界面張力変化測定をおこなった結果を図 5-17 に示す。カチオン性脂質と DOPE のモル比が 1:1 で DNA の細胞への導入効率が最もよくなると報告されているため[4]、DOTAP と双性イオン脂質 (DOPE または DOPC) の混合比は 1:1 (それぞれの脂質濃度 50 μM) とした。なお、水相の CaCl_2 濃度は 3 mM とした。

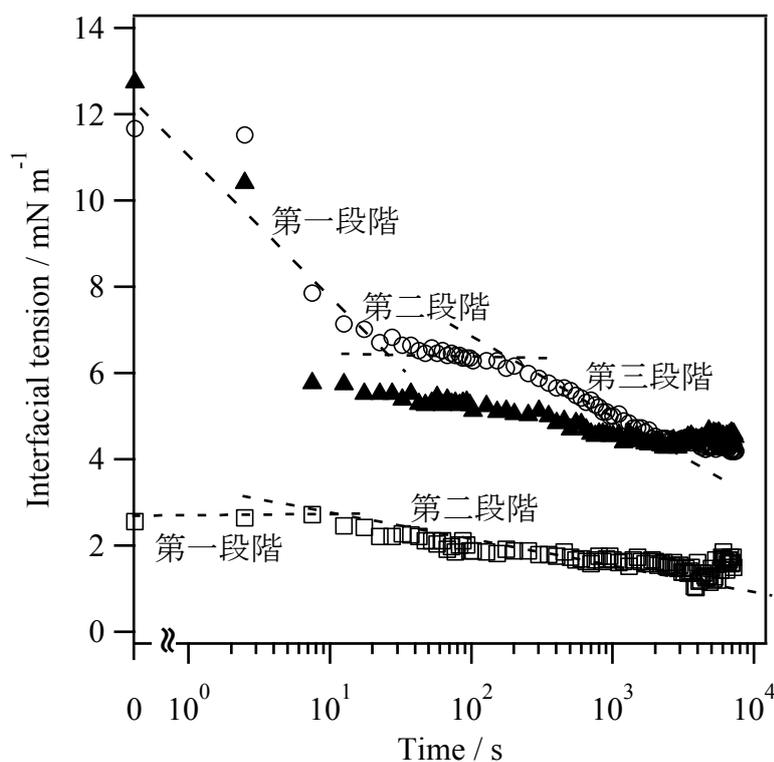


図 5-17 水/クロロホルム界面のカチオン性/双性イオン混合脂質膜と DNA の複合体化に伴う界面張力の時間変化 (○ DOTAP / DOPE, □ DOTAP / DOPC, ▲ DOTAP) 水相の CaCl_2 濃度 : 3 mM グラフ左端棒上のプロットは、DNA 添加前の界面張力を示す。

DOTAP / DOPE 混合系と DOTAP / DOPC 混合系の水/クロロホルム界面における界面張力の平衡値は、それぞれ 11.8 mN m^{-1} と 2.3 mN m^{-1} であった。DOTAP, DOPE, DOPC 単独の界面張力値とは異なるため、水/クロロホルム界面ではそれぞれの混合膜が形成している

と考えられる。DOTAP / DOPE 混合系では、DNA 添加により界面張力の減少過程が三段階で観測された。第一段階では DNA 添加後、約 20 秒で界面張力値が 5 mN m^{-1} ほど急激に減少した。第二段階では約 50 秒から 200 秒までの間はほとんど界面張力が変化しなかった。第三段階では再び界面張力値が徐々に減少して、約 2000 秒後に 4.2 mN m^{-1} でほぼ平衡に達した。このように、約 50 秒までは DOTAP 単独系と、それ以降は DOPE 単独系と類似した挙動を示した。最初の段階の界面張力の減少量は DOTAP 単独系の場合よりも小さくなった。これは DOPE により静電相互作用が弱められている、または界面における DOTAP 量が減少したためと想定される。一方、DOTAP/DOPC 系では、DNA 添加により界面張力の減少過程が二段階で観測された。第一段階では DNA 添加後、界面張力の値がほとんど変化しない領域が 10 秒程度観測された。第二段階では非常に緩やかに界面張力が減少した。このように、DOPC 単独系と類似した挙動を示した。DNA 添加直後から界面張力の値がほとんど変化しない領域が観測されたが、その時間は約 30 秒から 10 秒へと短くなった。これはカチオン性の DOTAP が脂質膜に存在しているために、DOPC 単独の膜に比べて DNA と静電相互作用をしやすくなったためと考えられる。

次に、脂質単独系と同様に、混合脂質膜系においても CaCl_2 濃度依存性を調べた。図 5-18 は、水/クロロホルム界面の DOTAP/DOPE 混合脂質膜と DNA の複合体化に伴う界面張力の時間変化の CaCl_2 濃度依存性を示す。 CaCl_2 濃度 0.3 mM と 33 mM においても 3 mM とほぼ同じ挙動となり、DOPE 単独系の場合と同様に、顕著な CaCl_2 濃度依存性は認められなかった。また、約 8000 秒後の界面張力値は、0.3 mM と 33 mM でそれぞれ 5 mN m^{-1} と 4 mN m^{-1} となった。

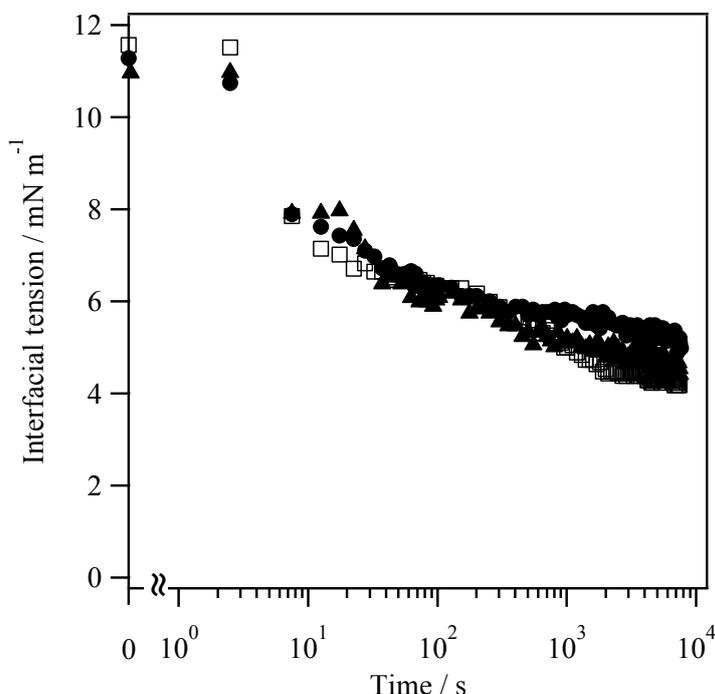


図 5-18 水/クロロホルム界面の DOTAP/DOPE 混合脂質膜と DNA の複合体化に伴う界

面張力の時間変化の CaCl_2 濃度依存性 (● 0.3 mM, □ 3 mM, ▲ 33 mM) グラフ左端枠上のプロットは, DNA 添加前の界面張力を示す。

図 5-19 は, 水/クロロホルム界面の DOTAP/DOPC 混合脂質膜と DNA の複合体化に伴う界面張力の時間変化の CaCl_2 濃度依存性を示す。 CaCl_2 濃度 0.3 mM と 33 mM においても, 界面張力の減少過程が二段階で観測され, DOPC 単独系と類似した挙動を示した。DNA 添加後, 界面張力の値がほとんど変化しない領域も観測され, 0.3 mM と 33 mM でそれぞれ約 10 秒と 100 秒であった。DOPC 単独の場合と同様に, CaCl_2 濃度が高いほど, 界面張力の値がほとんど変化しない時間は長くなった。

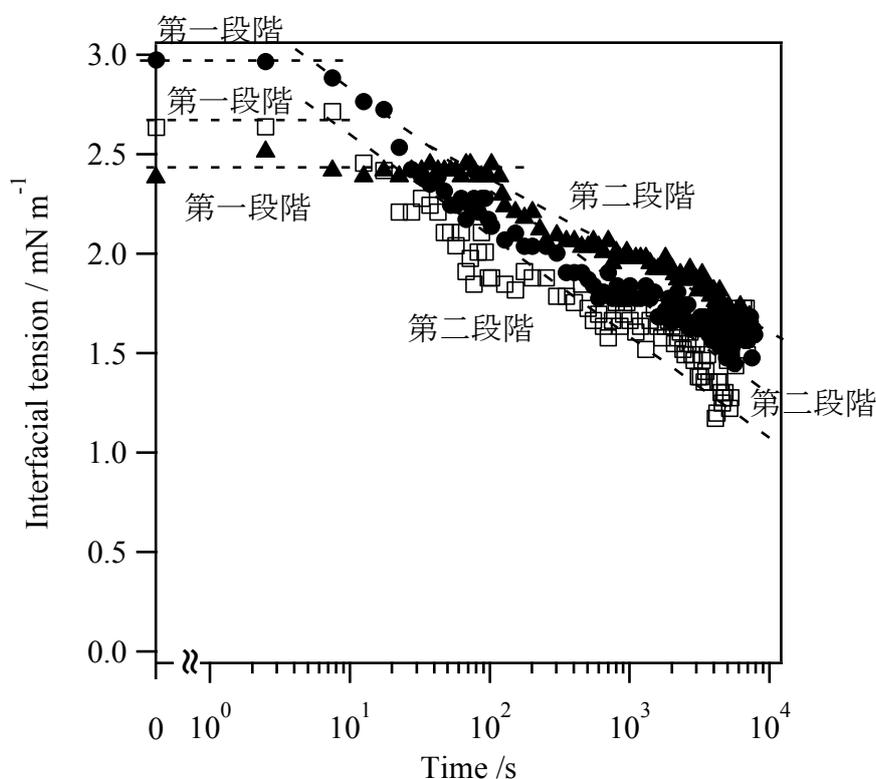


図 5-19 水/クロロホルム界面の DOTAP/DOPC 混合脂質膜と DNA の複合体化に伴う界面張力の時間変化の CaCl_2 濃度依存性 (● 0.3 mM, □ 3 mM, ▲ 33 mM) グラフ左端枠上のプロットは, DNA 添加前の界面張力を示す。

DOTAP/DOPE と DOTAP/DOPC 混合脂質膜系における CaCl_2 濃度依存性は, それぞれの双性イオンの CaCl_2 濃度依存性を反映したものとなった。DNA と混合脂質膜系との複合体化において, 負に帯電した DNA と正に帯電した DOTAP との静電相互作用がまず重要であるが, 補助脂質の影響も重要であることを示している。静電相互作用でまず DNA と混合脂質膜が相互作用した後に, 補助脂質を含めた複合体化が起こっていると推定される。

以上のように、カチオン性脂質の DOTAP と双性イオン脂質の混合系では、界面における双性イオンの種類 (DOPC と DOPE) によって DNA との複合体化挙動が異なることがわかった。リポプレックスの補助脂質としては、DOPC よりも DOPE を使った方が細胞への DNA の導入効率は向上するという点について、今回得られた界面張力の変化量 (自由エネルギー変化量の微分) の実験データから類推する。いったん DNA と脂質が複合体化していても、細胞に導入される過程 (エンドサイトーシスや膜融合) で細胞膜の分子が混ざり合い電荷バランスが崩れる (細胞膜電荷は一般に負)。ここで、複合体化に伴う自由エネルギーの利得と比較すると DOTAP に対する DOPE の混合効果は DOPC よりも著しく大きい。複合体化していた DNA とカチオン性脂質 (DOTAP)/DOPE とが解離しやすくなるものと推定される。このような効果の詳細はまだ不明であるが、本モデル研究がこうした細胞レベルの応用的研究成果の理解の一助になるだろう。

5-4 まとめ

水/クロロホルム界面における脂質膜に対する DNA の複合体化挙動を、時間分解 QELS 法により測定した。カチオン性の DOTAP では 10 秒以内に急激な界面張力減少が観測され、負に帯電した DNA との静電相互作用がその原因であると考えられた。このような急激な界面張力変化は、空気/水界面では観測されなかった。一方、双性イオン脂質の DOPE と DOPC 膜では、DNA を添加しても数十～数百秒間ほとんど界面張力は変化しなかった。これは DOTAP ほど強い静電相互作用が働かないためである。また、双性イオン脂質の DOPC と DOPE でも、複合体化挙動の違いが観測された。DOPC よりも DOPE において界面張力が減少し始めるまでの時間が長いのは、DOPE 親水性基の脱プロトン化と DOPE 分子間の水素結合が原因と推定された。DOPE で約 1000 秒以降に界面張力が減少するのは、DOPE 膜が大きく構造変化を起こすためと考察された。

DOTAP と双性イオン脂質の混合系では、双性イオン脂質の種類によって異なる挙動を示した。DOTAP/DOPE 混合膜では、DOTAP と DOPE 両方の特徴をもつ三段階の界面張力減少過程が観測された。一段階目は DOTAP の影響による DNA との静電相互作用に基づく界面張力減少であるが、それ以降は DOPE と似た挙動を示した。一方、DOTAP/DOPC 混合膜では、DOPC と似た挙動を示し、二段階の界面張力減少過程が観測された。この系では、DOTAP/DOPE 混合膜における DOTAP のような挙動は認められなかった。今回の QELS 法による研究から、DNA と脂質膜の相互作用に関する知見だけでなく、リポプレックスによる非ウイルス性の遺伝子導入における補助脂質の役割に関する知見を得ることも可能となった。これにより、基礎的な生命科学や医療応用への貢献が期待できる。

5-5 参考文献

1. I. Wrobel and D. Collins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1995**, *1235*, 296.
2. M. C. P. de Lima, S. Simões, P. Pires, H. Faneca, and N. Düzgüneş, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2001**,

47, 277.

3. P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, and M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1987**, *84*, 7413.
4. J. H. Felgner, R. Kumar, C. N. Sridhar, C. J. Wheeler, Y. J. Tsai, R. Border, P. Ramsey, M. Martin, and P. L. Felgner, *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 2550.
5. H. Farhood, N. Serbina, and L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta*, **1995**, *1235*, 289.
6. B. A. Lobo, G. S. Koe, J. G. Koe, and C. R. Middaugh, *Biophys. Chem.*, **2003**, *104*, 67.
7. I. Koltover, T. Salditt, J. O. Rädler, and C. R. Safinya, *Science*, **1998**, *281*, 78.
8. C. Madeira, L. M. S. Loura, M. R. A.-Barros, and M. Prieto, *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, *1808*, 2694.
9. C. Hansda, S. A. Hussain, D. Bhattacharjee, and P. K. Paul, *Surf. Sci.*, **2013**, *617*, 124.
10. M. Cárdenas, T. Nylander, B. Jönsson, and B. Lindman, *J. Colloid Interface Sci.*, **2005**, *286*, 166.
11. D. McLoughlin, R. Dias, B. Lindman, M. Cardenas, T. Nylander, K. Dawson, M. Miguel, and D. Langevin, *Langmuir*, **2005**, *21*, 1900.
12. C. Madeira, L. M. S. Loura, M. R. Aires-Barros, and M. Prieto, *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, *1808*, 2694.
13. M. A. Frommer and I. R. Miller, *J. Phys. Chem.*, **1968**, *72*, 2862.
14. D. K. Chattoraj and A. Mitra, *Curr. Sci.*, **2009**, *97*, 1430.
15. V. G. Budker, Y. A. Kazatchkov, and L. P. Naumova, *FEBS Lett.*, **1978**, *95*, 143.
16. S. Gromelski and G. Brezesinski, *Langmuir*, **2006**, *22*, 6293.
17. V. Oberle, U. Bakowsky, I. S. Zuhorn, and D. Hoekstra, *Biophys. J.*, **2000**, *79*, 1447.
18. D. K. Beaman, E. J. Robertson, and G. L. Richmond, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2012**, *109*, 3226.
19. J.-C. Wu, T.-L. Lin, U.-S. Jeng, and N. Torikai, *Physica B*, **2006**, *385–386*, 838.
20. C. R. Benatti, R. P. Barroso, C. Lonez, J.-M. Ruyschaert, and M. T. Lamy, *Biochim. Biophys. Acta*, **2009**, *1788*, 1304.
21. M. Langner and K. Kubica, *Chem. Phys. Lipids*, **1999**, *101*, 3.
22. M. Rabe, D. Verdes, and S. Seeger, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2011**, *162*, 87.
23. J. N. Israelachvili, “*Intermolecular and Surface Forces*”, 2011, Academic Press, Boston, MA.
24. F. C. Tsui, D. M. Ojcius, and W. L. Hubbell, *Biophys. J.*, **1986**, *49*, 459.
25. N. J. Zuidam and Y. Barenholz, *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**, *1329*, 211.
26. O. Francescangeli, M. Pisani, V. Stanić, P. Bruni, and T. M. Weiss, *Europhys. Lett.*, **2004**, *67*, 669.
27. M. C. A. Stuart and E. J. Boekema, *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, *1768*, 2681.

第6章 まとめ

本研究では、非侵襲かつ時間分解界面張力測定法である QELS 法を利用することにより、従来法では実現困難であった液液界面に展開した脂質膜に生体高分子を添加した系において、その界面張力変化から吸着や脂質膜の構造変化を考察することを目的として実験をおこなった。その結果、液液界面に展開した脂質膜への生体高分子（リゾチームおよび DNA）の吸着過程および膜の構造変化の挙動を観察することに初めて成功した。リゾチーム（第4章）と DNA（第5章）の各段階の考察をそれぞれ表 6-1 と 6-2 に示す。

表 6-1 リゾチームと脂質膜の相互作用に伴う界面張力変化の考察

脂質の種類	第一段階	第二段階	第三段階
DOPC (双性イオン)	脂質膜表面への吸着＋ 脂質膜の構造変化	再配置	安定化
DOPS (負)	脂質膜表面への吸着	表面吸着状態の保持	脂質膜の構造変化

表 6-2 DNA と脂質膜の相互作用に伴う界面張力変化の考察

脂質の種類	第一段階	第二段階	第三段階
DOPC, DOPE (双性イオン)	吸着の阻害 (界面張力一定)	脂質膜表面への吸着＋ 脂質膜の構造変化	安定化
DOTAP (正)	脂質膜表面への吸着＋ 脂質膜の構造変化	再配置	安定化

脂質膜との相互作用においてリゾチームと DNA を比較すると、以下のような共通点と相違点があることがわかった。共通点としては、主に 3 段階での界面張力変化が観測され、それぞれ脂質膜への吸着・脂質膜の構造変化・再配置と安定化として帰属された点である。相違点としては主に 2 つが挙げられる。ひとつは生体高分子と双性脂質膜との相互作用において、リゾチームは吸着と脂質膜の構造変化が同時に起こるのに対して、DNA では数十～千秒の間、脂質膜への吸着が阻害される点である。もうひとつは生体高分子と逆電荷を持つ脂質膜との相互作用において、リゾチーム-DOPS では DOPS 脂質膜表面にリゾチームが強く吸着して界面張力が一定な時間を経て脂質膜の構造変化が誘起されたのに対し、DNA-DOTAP では吸着と脂質膜の構造変化が同時に起こる点である。

水相のイオン強度を変化させた実験から、生体環境下で電荷をもつ生体高分子と脂質膜の相互作用では、静電相互作用ばかりでなく、脂質膜分子間の相互作用が重要であること

を明らかにした。このように、生体高分子と脂質間の相互作用は脂質膜表面への生体高分子の単純な吸着ではなく、脂質膜の構造変化を伴う過程となる。したがって、相互作用した生体高分子が親水性基を貫通して空気部分に露出しにくいモデルである空気／水界面の脂質膜よりも、有機相側にも柔軟性を持つ液液界面の脂質膜の方が適している。第 5 章の DNA と脂質膜の相互作用解析で、水／空気界面と液液界面を比較したデータから示されたように、水／空気界面と液液界面の脂質膜モデルでは得られる複合体化挙動が異なり、脂質膜モデルに依存することがわかった。水／空気界面と比較して液液界面を用いた研究例は非常に少ないため、今後さらなる検証を進めていく必要がある。

リポプレックスではカチオン性脂質と共に双性脂質も用いられるため、DNA の実験では DOTAP/DOPC 混合系と DOTAP/DOPE 混合系でも DNA 添加実験をおこなった。DOTAP/DOPC 混合系では DOPC 単独の場合とほぼ同じ挙動となるが、DOTAP/DOPE 混合系では DOTAP と DOPE 両方の影響が観測され、双性イオン脂質 (DOPC と DOPE) の種類によって、複合体化挙動が異なることがわかった。このような挙動を検出できたのは、QELS 法が相互作用に伴う系全体の構造変化を検出することができるためであり、プローブ分子を用いる必要のない QELS 測定の特徴の一つである。

界面張力変化の要因は脂質膜への吸着・脂質膜の構造変化・再配置に判別されたが、生体高分子と脂質膜の相互作用に伴う界面張力変化測定において、拡散以外の要因で界面張力の値がほとんど変化しない領域が存在することが明らかとなった。リゾチームと DOPS 脂質膜では二段階目に界面張力がほとんど変化しない準安定的な状態が観測され、リゾチームと DOPS 間の強い静電相互作用の影響と考察された。また、DNA と双性イオン脂質 (DOPC と DOPE) の場合には、一段階目で界面張力の値がほとんど変化しない領域が数十～数百秒程度観測された。DNA と DOTAP 脂質膜の場合には数秒で静電相互作用による界面張力現象が起こるため、DNA と双性イオン脂質の場合の一段階目は複合体化に障壁があることを示している。本研究と類似した実験系として、気液界面の脂質膜へのタンパク質や DNA の吸着過程の観測や、タンパク質の気液・液液界面への吸着過程の報告例があげられる。これらの報告では基本的に時間の経過とともに界面張力の値が減少していく例が多く、本実験で観測されたような界面張力がほとんど変化しない領域が観測された例はほとんどない。タンパク質の気液・液液界面への吸着過程の研究例では、タンパク質濃度が薄い場合に最初の段階で界面張力の値がほとんど変化しない領域が観測されているが、タンパク質の界面への拡散過程である。本研究で拡散以外の要因で界面張力の値がほとんど変化しない領域を観測できたのは、液液界面の脂質単分子膜は気液界面よりも流動性があるため、生体高分子の脂質膜への吸着だけでなく、脂質膜の構造変化に伴う界面張力変化を検出するのに適しているためと考えられる。

以上のように、液液界面の脂質膜と生体高分子の相互作用に伴う界面張力変化を QELS 法により調べることで、これまで気液界面の脂質膜では検討されてこなかった生体高分子と脂質膜との相互作用に伴う界面張力の時間変化を定性的に議論することが可能となった。

界面張力の変化は自由エネルギー変化を表すため、界面張力の変化量を定量的に取り扱うことが望まれる。しかし、結果として、本研究の実験系では定量的な議論をおこなうことはできなかった。それは脂質膜と生体高分子が相互作用することによって双方が構造変化を起こし、それをモデル化することが困難なためである。また、強い静電相互作用を伴う場合には、静電場による界面張力減少をモデル化する必要があることも、定量的議論を難しくする要因となる。QELS法の界面張力から得られる情報のみでは、液液界面の脂質膜と生体高分子の相互作用の詳細を明らかにすることは難しく、他の分析手法からの知見が必須となる。しかし、2つのバルク相に遮られている液液界面での脂質膜の構造、組成、吸着量などを正確に知る手法は限られている。そのため、気液界面の脂質膜、リポソームなどを使って得られた結果や、計算科学的手法から得られた結果を併用する必要がある。本研究により、液液界面の脂質膜と生体高分子との相互作用に関する新しい知見を得ることができたが、他の分析手法を併用して相互作用機構を詳細に説明することが可能となれば、今回の界面張力の時間変化を定量的に議論できるようになると考えられる。

本研究において、QELS法が液液界面に展開した脂質膜と生体高分子の吸着挙動を考察することに有用であることを示すことができたことから、以下のような応用展開が期待できる。実際の生体膜中に存在する物質を加えた複雑な脂質膜を用いた実験系で、例えば脂質膜にコレステロールを添加する影響や、タンパク質と脂質の混合膜に活性物質を添加した際の構造変化の研究。脂質キナーゼやホスホリパーゼなどによる脂質膜の反応過程の研究。医薬品などの膜透過に伴う脂質膜構造変化の研究。以上のような生体内の相互作用に関する基礎研究だけでなく、産業分野への応用も可能である。タンパク質や脂質は食品分野で乳化剤や安定化剤として用いられている化合物である。また、DNAと脂質膜の相互作用は、カチオン性リポソーム-DNA複合体による遺伝子治療において重要である。それに加えて、生体内に導入されたカチオン性リポソーム-DNA複合体は、生体内に存在するタンパク質と相互作用するため、脂質-DNA複合体に対するタンパク質の相互作用に関する研究も必要となる。今回得られた結果、またそれを基にして今後検討される結果により、脂質膜と生体高分子の相互作用に関する基礎研究と産業分野での応用研究が発展することを期待する。

第7章 謝辞

6年間という長い間、指導していただいた藤浪真紀先生には深く感謝申し上げます。最初の頃、実験がなかなか進まない中でも、計測化学研究室で実験をしたいという私の願いを聞き入れていただいたことには感謝しております。データの細かいところまで考察する姿勢や、論理的な考え方を初めとして、数多くのことを学ばせていただきました。今回の研究テーマである生体膜の解析は、会社においても今後重要になっていくと考えています。今回の研究で得た知識と、その過程で教えていただいたことを、今後活かしていきたいと思えます。

御多忙な中、学位審査を引き受けていただき、貴重なコメントをいただいた、斎藤恭一教授、岩館泰彦教授、唐津孝教授、谷口竜王准教授に感謝申し上げます。

豊田太郎先生には、千葉大から東京大学に異動されてからも、多くのディスカッションをさせていただきました。生物関係のバックグラウンドのない私に、研究の方向性を導いて下さいました。先生の豊富な知識と指導がなければ、この研究を進めていくことができなかったと思います。

野本知理先生には QELS 装置の取り扱いや解析法について、多くのことを指導していただきました。先生の論理的で説得力のある話しぶりには、感心させられることばかりでした。

これまで計測化学研究室でお世話になった学生の方々、特に私に実験操作を教えていただいた三好健太郎さん、QELS 装置の管理でお世話になった内山光陽さん、上本頌子さん、一緒にコインブラの学会に参加した唐澤悠一郎さん、武井智彦さん、QELS チームの方々にも厚くお礼申しあげあげます。

会社に所属しながら博士課程に在籍することを認めていただいた、日産化学工業（株）物質科学研究所物質解析研究部の鬼塚博元部長（現執行役員研究企画部長）、関達也前部長（現アヅマ株式会社）、横山達朗部長、近間克己博士（現機能性材料事業部）、佐藤博彦博士、また、物質解析研究部の組成解析チームと表面解析チームをはじめとする皆様にも感謝申し上げます。今回得た知識を会社に還元できるようにしていきます。

最後に、私を支えてくれた妻と3人の子供たちにも感謝致します。

2015年7月

大野 正司