

Oral presentation 12 Organic Molecules and Bioelectronics : 12.6 Nanobiotechnology
--

📅 Thu. Sep 21, 2023 9:00 AM - 12:00 PM JST | Thu. Sep 21, 2023 12:00 AM - 3:00 AM UTC | 🏠 D901 (TKP)

[21a-D901-1~11] 12.6 Nanobiotechnology

Ryugo Tero(Toyohashi Univ. of Tech.), Hitoshi Asakawa(Kanazawa Univ.)

9:00 AM - 9:15 AM JST | 12:00 AM - 12:15 AM UTC

[21a-D901-1] Mechanism of intramembrane lateral voltages on artificial lipid bilayers

○Madoka Sato¹, Hironori Kageyama¹, Maki Komiya², Kensaku Kanomata³, Feng Ma⁴, Daisuke Tadaki², Fumihiko Hirose³, Ayumi Hirano-Iwata^{1,2,4} (1.Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku Univ., 2.RIEC, Tohoku Univ., 3.Yamagata Univ., 4.AIMR, Tohoku Univ.)

9:15 AM - 9:30 AM JST | 12:15 AM - 12:30 AM UTC

[21a-D901-2] Visualization of the Effect of “Lateral Voltage”, a New Regulator of Membrane Proteins

○Hironori Kageyama^{1,3}, Daiki Ando^{2,3}, Madoka Sato^{1,3}, Maki Komiya³, Daisuke Tadaki³, Teng Ma⁴, Ayumi Hirano-Iwata^{1,3,4} (1.Grad. Sch. Biomed. Eng., Tohoku Univ., 2.Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., 3.RIEC, Tohoku Univ., 4.AIMR, Tohoku Univ.)

9:30 AM - 9:45 AM JST | 12:30 AM - 12:45 AM UTC

[21a-D901-3] Measurement of ion channel functions based on intramembrane lateral voltages in artificial cell membranes

○Maki Komiya¹, Sato Madoka^{1,2}, Kageyama Hironori^{1,2}, Ma Teng³, Tadaki Daisuke¹, Yamamoto Hideaki¹, Hirano-Iwata Ayumi^{1,3} (1.RIEC, Tohoku Univ., 2.Grad. Sch. of Biomed. Eng., Tohoku Univ., 3.AIMR, Tohoku Univ.)

9:45 AM - 10:00 AM JST | 12:45 AM - 1:00 AM UTC

[21a-D901-4] Stabilization of Lo phase domains in lipid bilayer suspended over microwells

○(M2)Daiki Matsumoto¹, Azusa Oshima², Masumi Yamaguchi², Akira Heya¹, Koji Sumitomo¹ (1.Univ. of Hyogo, 2.NTT Basic Res. Labs., BMC)

10:00 AM - 10:15 AM JST | 1:00 AM - 1:15 AM UTC

[21a-D901-5] Effect of polyethylene glycol modified lipid on lateral diffusion of lipid molecules on microwell substrate

○Azusa Oshima¹, Masumi Yamaguchi¹, Koji Sumitomo² (1.NTT Basic Res. Labs., BMC, 2.University of Hyogo)

10:15 AM - 10:30 AM JST | 1:15 AM - 1:30 AM UTC

[21a-D901-6] Ostwald Ripening of Triacylglycerol Droplets Embedded in Glass-Supported Phospholipid Bilayers

○Chiho Kataoka¹, Kohsaku Kawakami^{1,2} (1.NIMS, 2.Univ. Tsukuba)

◆ Presentation by Applicant for JSAP Young Scientists Presentation Award

10:45 AM - 11:00 AM JST | 1:45 AM - 2:00 AM UTC

[21a-D901-7] Fabrication of Lipid Raft Model in the Artificial Membrane by a Focused Femtosecond Laser

○(PC)Yasushi Tanimoto¹, Yumi Segawa¹, Kyoko Masui¹, Chie Hosokawa¹ (1.Osaka Metropolitan Univ.)

◆ Presentation by Applicant for JSAP Young Scientists Presentation Award

11:00 AM - 11:15 AM JST | 2:00 AM - 2:15 AM UTC

[21a-D901-8] Evaluation of Ion Coordination Structure in Lipid Bilayers Using X-ray Absorption Spectroscopy in Water

○Yu Kinjo¹, Masanari Nagasaka², Koji Okuwaki³, Yuji Mochizuki³, Ryugo Tero¹ (1.Toyohashi Univ. Tech., 2.Inst. Mol. Sci., 3.Rikkyo Univ.)

11:15 AM - 11:30 AM JST | 2:15 AM - 2:30 AM UTC

[21a-D901-9] Preparation of asymmetric vesicles using the inverted emulsion method and evaluation of the products

○(M2)Kazuya Yamamura¹, Akira Heya¹, Koji Sumitomo¹ (1.Univ. of Hyogo)

11:30 AM - 11:45 AM JST | 2:30 AM - 2:45 AM UTC

[21a-D901-10] Molecular Dynamics on Substrate-Supported Lipid Bilayer in an Optical Trap

○Shunya Moriyama¹, Yasushi Tanimoto¹, Kyoko Masui¹, Chie Hosokawa¹ (1.Osaka Metropolitan Univ.)

11:45 AM - 12:00 PM JST | 2:45 AM - 3:00 AM UTC

[21a-D901-11] Manipulation and fusion control of Giant Unilamellar Vesicles

○(M1)Hiromu Yane¹, Hayate Yamamoto¹, Akira Heya¹, Koji Sumitomo¹ (1.Univ. of Hyogo)

人工脂質二分子膜に対する膜平行電圧の作用機構の解明

Mechanism of intramembrane lateral voltages on artificial lipid bilayers

東北大学医工学研究科¹, 東北大学電気通信研究所², 山形大学³

○(D)佐藤まどか¹・陰山弘典¹・小宮麻希²・鹿又健作³・馬騰⁴・但木大介²・廣瀬文彦³・平野愛弓^{1,2,4}.

Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku Univ.¹, RIEC, Tohoku Univ.²,

Yamagata Univ.⁴, AIMR, Tohoku Univ.⁴

○(D) Madoka Sato¹, Hironori Kageyama¹, Maki Komiya², Kensaku Kanomata³, Teng Ma⁴,

Daisuke Tadaki², Fumihiko Hirose³, Ayumi Hirano-Iwata^{1,2,4}.

E-mail: madoka.sato.p6@dc.tohoku.ac.jp

【はじめに】細胞膜の基本構造である脂質二分子膜は電気双極子を持つリン脂質分子の自己集合体であり、100GΩ以上の超絶縁性を持つ。従来は脂質二分子膜に対して垂直方向の電圧を印加した時の電流応答を計測することにより、脂質二分子膜やそこに包埋されるイオンチャネルなどの膜タンパク質の機能が評価されてきた。それに対し我々は、膜垂直電圧に加えて“膜に平行な方向の電圧（膜平行電圧）”を印加することで、有機太陽電池材料であるフラーレン誘導体 PCBM を含有した人工細胞膜において光誘起電流を増大させる現象を発見しており^[1]、膜平行電圧が膜に対する制御パラメータとなりうることを見出した。しかし、膜平行電圧がどのようなメカニズムで膜包埋物質に作用しているのかは不明であった。高絶縁性の膜内に電圧を印加しても、すぐに電圧降下すると考えられるため、膜平行電圧は膜物性を変調している可能性が推測された。そこで本研究では、膜物性の中でも特に膜厚に対する膜平行電圧印加による効果を明らかにするべく、膜厚と関連する特性膜容量(Specific capacitance, C_{sp})の算出、及び、膜厚によって開口時間が変化することが報告されている gramicidin A (gA)チャネルを用いたチャネル電流計測を行い、膜平行電圧印加の有無の条件下における膜厚を評価した。

【実験方法】微細孔（ ϕ : 80-170 μm ）を形成したテフロンフィルムを基板材料として、その微細孔周辺に Ti 電極を蒸着し、その上に絶縁層として SiO_2 を蒸着したものを膜内電界制御のための膜支持体とした。作製した膜支持体において、人工細胞膜の基本構造となる脂質二分子膜を、単分子膜張り合わせ法により微細孔中に形成した。 C_{sp} は、イメージング系を人工細胞膜系と組み合わせることにより、明視野観察による膜面積(A)と電流測定による膜容量(C_m)を同時計測することで C_m/A ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$) として算出した。また、gA チャネルの実験では、形成した人工細胞膜に gA チャネルを包埋し、チャネル電流計測を行うことで、その電流波形から開口時間を算出した。

【結果・考察】膜平行電圧の効果を脂質二分子膜の厚さの観点から議論するために、特性膜容量 C_{sp} の測定を行った。脂質二分子膜は平行平板コンデンサに近似され、その膜厚(d)は ϵ_m / C_{sp} (ϵ_m : 膜の誘電率) として算出される。膜平行電圧の印加前後における C_{sp} を測定した結果、膜平行電圧によって C_{sp} が増大し、膜厚の減少が示唆された。また、その開口時間の膜厚依存性が知られている gA チャネルに対しても検討したところ、gA チャネルの開口時間が膜平行電圧の印加によって延長した。これらの結果は、ともに脂質二分子膜の膜厚減少を示しており、膜平行電圧の作用機構が膜厚変化に起因することを示唆している（図 1）。 [1] T. Ma, et al., *ACS Omega*, **4**, 18299 (2019).

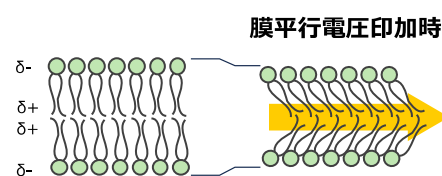


図 1 脂質二分子膜と膜平行電圧

膜タンパク質の新制御因子「膜平行電圧」の作用範囲の可視化

Visualization of the Effect of “Lateral Voltage”, a New Regulator of Membrane Proteins

東北大院医工¹, 東北大院工², 東北大通研³, 東北大 AIMR⁴

○陰山 弘典^{1,3}, 安藤 大貴^{2,3}, 佐藤 まどか^{1,3}, 小宮 麻希³, 但木 大介³, 馬 騰⁴, 平野 愛弓^{1,3,4}

Grad. Sch. Biomed. Eng., Tohoku Univ.¹, Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.²,

RIEC, Tohoku Univ.³, AIMR, Tohoku Univ.⁴

○Hironori Kageyama^{1,3}, Daiki Ando^{2,3}, Madoka Sato^{1,3}, Maki Komiya³, Daisuke Tadaki³, Teng Ma⁴,

Ayumi Hirano-Iwata^{1,3,4}

E-mail: hironori.kageyama.p1@dc.tohoku.ac.jp

1. 背景

我々の身体を構成する細胞は、高絶縁性の脂質二分子膜とそこに包埋される種々の膜タンパク質から成る細胞膜によって覆われている。従来、膜に対して膜垂直方向の電圧を印加することで、膜の電気特性や膜に包埋された膜タンパク質の機能が評価されてきたが、我々は人工細胞膜系を用いることで「膜平行電圧」もまた膜の制御因子として機能することを見出した^[1]。当研究室では、膜平行電圧の作用機構を明らかにするべく、膜厚に着目して膜平行電圧印加時の物性評価を行ったところ、膜平行電圧により膜厚が薄くなることが示唆される結果が得られた。しかしながら、測定された膜厚変化量は膜全体において平均化された数値であり、実際に膜平行電圧の効果が膜全体のどこまで伝播しているのかは不明であった。そこで本研究では、従来の電気生理学的測定に対して蛍光顕微鏡観察系を組み合わせた新たな人工細胞膜系を構築し、膜内電界感受性色素を用いることで膜平行電圧の作用範囲の可視化を試みた。

2. 方法

厚さ 12.5 μm のテフロンフィルム上に形成した微小孔 (ϕ : 80-170 μm) を挟むように Ti 電極を Electron Beam (EB) 蒸着し、絶縁被膜として SiO₂ を EB 蒸着することで、膜平行電圧印加用の膜支持体を作製した。水浸対物レンズが組み込まれたチャンバーに膜支持体を設置し、イメージングシステムと接続した。膜支持体上において人工細胞膜を脂質単分子膜貼り合わせ法

により形成し、対物レンズとは反対側に位置する脂質単分子層に膜内電界感受性蛍光色素である di-4-ANEPPS を導入した。色素の染色ムラや退色によるアーチファクトを低減するために、交互に照射した 2 波長の励起光 (435 nm, 500 nm) の蛍光強度比 ($R_{\text{ex}} = F_{435} / F_{500}$) から膜内電界強度を評価する、二波長比蛍光イメージング法を用いて蛍光観察を行い、脂質二分子膜上の蛍光強度分布を解析した。

3. 結果・考察

構築した実験系において、膜貫通電圧を -100 mV から +100 mV まで変化させると、膜部分の蛍光強度比 R_{ex} は一様かつ膜貫通電圧に対して直線的に変化した ($n = 13$, $R^2 = 0.9995$)。この線形性グラフの傾きが膜平行電圧の ON / OFF で変化するか調査したところ、膜平行電圧印加前と比較して、印加時は人工細胞膜の中心部に向かって広い範囲において R_{ex} の変化量が増幅することがわかった。さらに別の膜に対しても同様の測定を行ったところ、膜側面に配置した電極端部から数十 μm 離れた膜中心部においても再現性高く線形性グラフの傾きの増幅が見られた ($n = 7$)。このことから、膜平行電圧が人工細胞膜内の広い範囲に影響を及ぼしていることが示された。この線形性グラフの傾きの増加は膜貫通電界 E_{Trans} の増強を意味しており、電界と電圧の関係式 ($E_{\text{Trans}} = V_{\text{Trans}} / d$) から、膜厚 (d) の減少が膜中心付近まで長距離伝播しているのではないかと推察された。

[1] T. Ma, et al., *ACS Omega*, **4**, 18299 (2019).

人工細胞膜を用いた膜平行電圧に基づくイオンチャネル機能計測

Measurement of ion channel functions based on intramembrane lateral voltages in artificial cell membranes

東北大通研¹, 東北大院医工², 東北大 AIMR³ ○小宮 麻希¹, 佐藤 まどか^{1, 2}, 陰山 弘典^{1, 2},
馬 騰³, 但木 大介¹, 山本 英明¹, 平野 愛弓^{1, 3}

RIEC, Tohoku Univ.¹, Grad. Sch. of Biomed. Eng., Tohoku Univ.², AIMR, Tohoku Univ.³ ○Maki
Komiya¹, Madoka Sato^{1, 2}, Hironori Kageyama^{1, 2}, Teng Ma³, Daisuke Tadaki¹, Hideaki
Yamamoto¹, Ayumi Hirano-Iwata^{1, 3}

E-mail: maki.komiya.c7@tohoku.ac.jp

膜タンパク質「イオンチャネル」は、分子内の孔の開閉により、選択的にイオンを透過させる。その機能は心臓の拍動や神経情報伝達といった生命現象と関わりが深く、イオンチャネルの機能解析は重要である。従来、イオンチャネルの機能は、細胞膜を貫通する電圧を制御し、その際にチャネル孔を通過したイオン流を電流として記録することで評価されてきた。しかし、イオンチャネルの中には「不活性化」が起こりやすく、一度不活性化すると活性が復活しないものも多く、機能解析をする上での障害となってきた。最近我々は、人工細胞膜を用いた実験から“膜平行電圧”もまた膜貫通電流の制御因子として機能する可能性を発見、報告した^[1]。さらに、その作用機構についても検討し、膜平行電圧の印加により膜厚が減少し、それが膜の中央部まで長距離伝搬している可能性を見出している。そこで本研究では、この膜厚の変化がイオンチャネル開孔確率を変化させる可能性について、不活性化しやすいイオンチャネルを対象に検討した^[2]。

Ti 電極、及び SiO₂ 絶縁被膜層を Electron Beam 蒸着した、微小孔のあいたテフロンフィルムを膜平行電圧印加のための膜支持体として、人工脂質二分子膜を形成した。そこに、不活性化することで有名なヒト由来電位依存性 Nav1.5 チャネルを包埋し、膜平行電圧の有無におけるチャネル電流計測を行うことで、チャネル電流応答頻度から膜内電圧印加によるチャネル開孔効果を検討した。

図 1 に、本人工細胞膜系にて観測された Nav1.5 チャネル電流を示す。膜垂直電圧のみの制御下では、最初にチャネル活性が観測されるものの、すぐに不活性化してチャネル特有の開閉イベントが消失してしまう。そこに膜平行電圧を印加すると、不活性化状態が解除されたかのようにチャネル電流が観測され、この電流は Na チャネルの特異的阻害剤テトロドトキシンで抑制された。本講演においては、膜平行電圧の Nav1.5 チャネルへの開孔促進作用の作用機構や、膜タンパク質機能解析法への展開性についても議論したい。

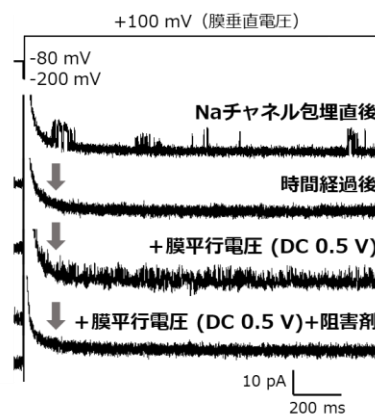


図 1. Na チャネル電流に対する膜平行電圧の効果。[2]より
Copyright 2022 The Royal Society of Chemistry

[1] T. Ma, et al., *ACS Omega*, **4**, 18299 (2019). [2] T. Ma, et al., *Faraday Discuss.*, **233**, 244 (2022).

微小井戸架橋部における Lo 相ドメインの安定化検討

Stabilization of Lo phase domains in lipid bilayer suspended over microwells

兵庫県大工¹, NTT 物性基礎研・BMC²

○(M2) 松本 大希¹, 大嶋 梓², 山口 真澄², 部家 彰¹, 住友 弘二¹

University of Hyogo¹, NTT Basic Res. Labs., BMC²,

°Daiki Matsumoto¹, Azusa Oshima², Masumi Yamaguchi², Akira Heya¹, Koji Sumitomo¹

E-mail: sumitomo@eng.u-hyogo.ac.jp

【序論】 微小井戸を形成した半導体と人工の脂質二分子膜を用いて、膜タンパク質の機能分析を可能にするナノバイオデバイスの開発を目指す。微小井戸の架橋部で秩序液体相 (Lo) / 無秩序液体相 (Ld) の相分離構造を制御できれば、膜タンパク質の機能が期待されるが、時間経過で Lo 相ドメインが縮小し、消失してしまうことが分かっている^[1]。一方、微小井戸を NH₄F 溶液でエッチングし、構造を変化させた場合には Lo 相ドメインが拡大することが報告された^[2]。SiO₂ 膜の厚さの変化とともに開口部のエッジの曲率も変化しており、ドメイン安定化のメカニズムにはまだ議論の余地がある。本研究では SiO₂ 膜の薄膜化後に微小井戸を形成することで、開口部のエッジ鈍りを解消し、膜厚に焦点を絞って Lo 相ドメインへの影響を調べた。

【方法】 120 nm の SiO₂ 膜付き Si ウェハを、NH₄F 溶液で SiO₂ 膜厚が 90 nm 程になるまでエッチングした後、フォトリソ、ドライエッチングで微小井戸を形成した。SM、DOPC、chol を 3 : 4 : 3 の比で作製した Lo/Ld 相分離 GUV を微小井戸基板上で展開し、ドメインの安定化を観察した。

【結果】 Fig.1 (a)、(b)はそれぞれ微小井戸に GUV を展開した直後と 45 分後の蛍光顕微鏡像である。Lo 相の架橋膜は徐々に Ld 相に変化していく。架橋部における Lo ドメインの縮小度合いを、膜厚が 90 nm と 120 nm の場合で比較した結果を Fig.1 (c)に示す。90 nm のものでは架橋部の Lo 相の大きさに変化が少ないことが分かる。開口部のエッジ形状に変化がなくとも、SiO₂ 膜の膜厚の違いにより、Lo 相ドメインの縮小度合いが変化することを示している。

【結論】 本実験で Lo 相ドメインの縮小抑制に SiO₂ 膜の薄膜化が寄与していることが分かった。酸化膜厚がそれらの縮小抑制にどう影響を与えたかの考察も合わせて報告する。

[1] K. Sumitomo and A. Oshima, *Langmuir* **33**, 13277-13283 (2017).

[2] 大嶋梓他 第 68 回応用物理学会春季学術講演会 16p-Z21-4.

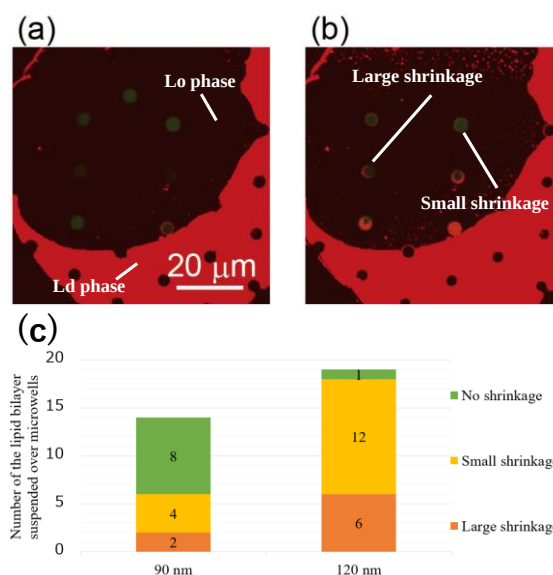


Figure 1. Change of Lo phase domain size in the lipid bilayer suspended over microwells (a) immediately after formation and (b) after 45 min. (c) Comparison of the state of shrinkage of Lo domains after 45 min in SiO₂ of 90 nm and 120 nm thickness.

井戸構造基板における脂質側方拡散のポリエチレングリコール修飾脂質依存性 Effect of polyethylene glycol modified lipid on lateral diffusion of lipid molecules on microwell substrate

NTT 物性基礎研・BMC¹, 兵庫県大工² ○大嶋 梓¹, 山口 真澄¹, 住友 弘二²

NTT Basic Res. Labs., BMC¹, University of Hyogo²

○Azusa Oshima¹, Masumi Yamaguchi¹, Koji Sumitomo²

E-mail: azusa.oshima@ntt.com

井戸構造加工基板上に形成した人工脂質二分子膜は簡易な細胞モデルとしてだけでなく、デバイスとしての応用も期待される。このような脂質二分子膜系において、脂質の動きを制御することは、より多様な細胞の現象を再現するために重要な因子である。これまでに光退色後蛍光回復法 (FRAP) によって脂質の側方拡散の評価を行い、井戸境界部に脂質の動きに対する障壁があることを報告してきた。本研究では細胞膜に含まれる親水性高分子鎖脂質のモデルとして PEG が結合した脂質を加え、側方拡散へ及ぼす影響について検討を行った。

Diolcoyl-phosphocoline に PEG350 が結合した Distearoyl-phosphoethanolamine-PEG (DSPE-PEG) をモル比で 0–7%加えた脂質二分子膜で井戸基板を覆い (Fig.1), 自立膜部分の蛍光色素を退色させ、支持膜と自立膜の境界を移動する脂質の動きによる蛍光強度の回復過程を FRAP 法によって観察した。さらに脂質の動きに拡散係数の異なる速い成分 (D1) と遅い成分 (D2) の 2 成分があると仮定し、蛍光回復曲線のフィッティングを行った。Fig.2 は各 DSPE-PEG 濃度における D1, D2 それぞれの成分で動く分子数の比率である。DSPE-PEG 濃度の増加にともない、退色前の蛍光強度へ回復していく比率が上昇した。これは井戸境界部を動く脂質分子の増加を示している。動いている脂質は D1, D2 の比率が増加し、速く動く脂質と遅く動く脂質ともに DSPE-PEG の影響があった。PEG は脂質二分子膜表面に露出しているため、井戸境界部において脂質二分子膜の曲率や基板に接する側の leaflet の相互作用の緩和に影響したと考えられる。本結果は、高分子鎖脂質が関与する脂質相分離や膜表面反応を再構成するための重要な知見となる。

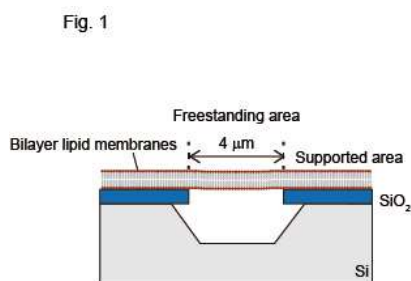


Fig. 1

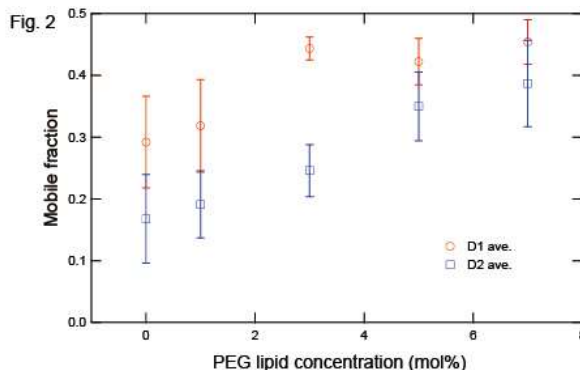


Fig. 2

Fig.1. Schematic image of bilayer lipid membrane over Si microwell.

Fig.2. The mobile fraction of lipid membrane containing PEG-DSPE.

1. A. Oshima, H. Nakashima, and K. Sumitomo, *Langmuir* **35**, 11725 (2019).

ガラス支持脂質膜に埋め込んだトリアシルグリセロール液滴のオストワルド熟成

Ostwald Ripening of Triacylglycerol Droplets Embedded in Glass-Supported Phospholipid Bilayers

NIMS¹, 筑波大院² °片岡 知歩¹, 川上 亘作^{1,2}

NIMS¹, Univ. Tsukuba², °Chiho Kataoka¹, Kohsaku Kawakami^{1,2}

E-mail: kataoka.chiho@nims.go.jp

細胞内の脂肪滴は中性脂質を貯蔵する。脂肪滴は、中性脂質の核と、その界面を覆うリン脂質単分子膜から成る。核の主成分の一つはトリアシルグリセロール (TG) であり、脂肪滴は次のように発生すると考えられている。

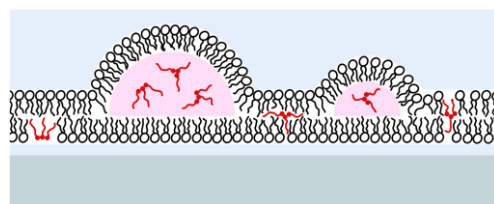


FIGURE 1. Triacylglycerol droplets embedded in a glass-supported bilayer.

始めに、小胞体のリン脂質二重膜内に中性脂質が合成され、膜内を拡散する。そして、臨界濃度を超えると中性脂質は凝集し、2つの単分子膜の間に液滴を形成する。液滴の成長後、二重膜から脂肪滴が発芽する。我々は、支持脂質膜に TG 液滴を埋め込み (**Fig. 1**)、脂肪滴間の相互作用を研究した。

実験では、表面被覆率~0.9 の DOPC 支持膜に TG 液滴を吸着させ、膜に油滴を埋め込んだ。油滴は TopFluor TG で蛍光修飾し、蛍光顕微鏡観察を行った。測定表面全体での合計の TopFluor 蛍光強度は時間に依存せず一定であった。しかし、時間とともに、油滴の数密度は減少した (**Fig. 2A, B**)。液滴の数密度変化に伴い、大きい油滴の蛍光強度は増加し、小さい油滴の蛍光強度は減少した (**Fig. 2C**)。この結果から、油滴の体積変化の原因はオストワルド熟成であることが分かる。本講演では、支持膜への TG 液滴の埋め込みと、オストワルド熟成の速度解析について報告する。

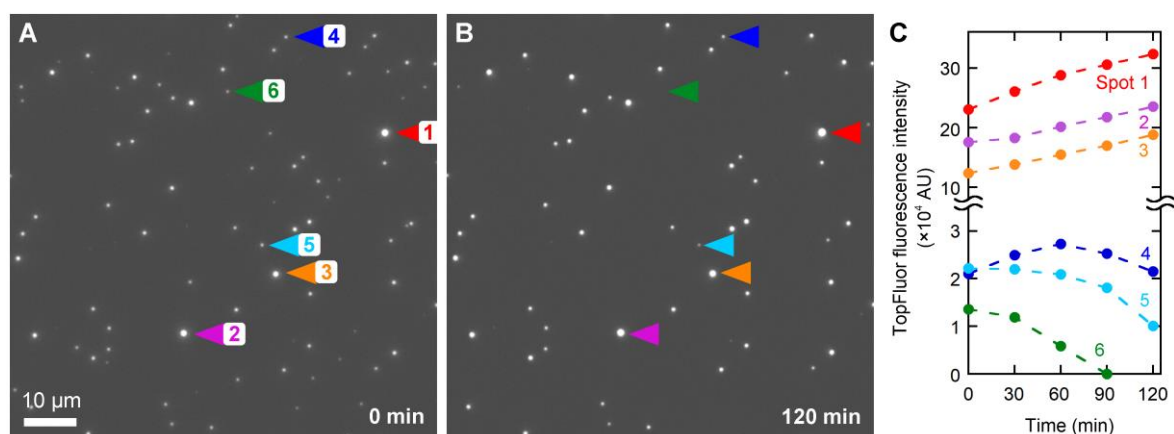


FIGURE 2. TopFluor fluorescence data obtained for triolein droplets incorporated in DOPC bilayers. (A, B) Fluorescence images obtained immediately (A) and 120 min (B) after the droplet incorporation. (C) Dependence of the fluorescence intensities for spots 1–6 in (A) on time.

集光フェムト秒レーザーを用いた生体膜加工による 脂質ラフトモデル構築

Fabrication of Lipid Raft Model in the Artificial Membrane by a Focused Femtosecond Laser

阪公大院理 ○(P)谷本 泰士, 瀬川 夕海, 増井 恭子, 細川 千絵

Osaka Metropolitan Univ., ○Yasushi Tanimoto, Yumi Segawa, Kyoko Masui, Chie Hosokawa

E-mail: yasushi.tanimoto@omu.ac.jp

細胞膜機能を調節する膜ドメインである脂質ラフトはアルツハイマー等、多くの疾病に関与しているが、微小で短寿命であるためその機能評価は困難とされている。秩序相と無秩序相に相分離した人工生体膜は、脂質ラフトのモデル系として細胞膜研究に広く利用されている。ガラスなどの基板に展開した細胞膜由来の脂質二分子膜 (SPMB: Supported Plasma Membrane Bilayer)は細胞膜と同一組成であるため、より生体に近い条件で細胞膜機能評価が可能であることから、近年注目を集めている。SPMB を巨大細胞膜小胞 (GPMV: Giant Plasma Membrane Vesicle) から形成する手法が提案されているが [1]、GPMV は自発的な展開が容易ではなく、その制御は依然として困難である。集光フェムト秒レーザーは高空間分解能で非熱加工が可能であり、集光領域外の損傷が僅かであることから細胞加工や細胞融合に利用されている。本研究では、集光フェムト秒レーザーを用いて GPMV の展開を誘発する方法を考案した。より生体に近い条件で脂質ラフトの機能的意義を研究するため、フェムト秒レーザーを用いて相分離した GPMV を基板平面に展開することにより細胞膜を利用した脂質ラフトモデルを構築した。

無秩序相の蛍光脂質プローブ Octadecyl Rhodamine B Chloride で標識したラット大脳由来の神経細胞を 25 mM Paraformaldehyde と 0、2、20 mM dithiothreitol (DTT)で処理し、分泌した GPMV を処理溶液と共に回収した。フェムト秒レーザー (パルス幅: ~100 fs、中心波長: 800 nm、繰り返し周波数: 82 MHz)を正立型蛍光顕微鏡に導入し、60 倍水浸対物レンズ (N.A. 1.0)を用いて基板に接着した GPMV 膜表面に集光した。2、20 mM DTT で処理すると、室温下で相分離した GPMV が得られた。フェムト秒レーザー (レーザー光強度: 30 mW) を基板に接着した相分離 GPMV に集光したところ、集光領域において膜表面に微小穿孔が生じて GPMV の膜展開が誘起された結果、相分離した SPMB の形成が確認された (Fig. 1)。以上の結果は、フェムト秒レーザーを用いた細胞膜加工により相分離した SPMB の作製が可能であることを明示しており、脂質ラフト研究への有用な手段となることが期待される。

[1] R. Tero *et al.*, *Sci. Rep.*, 7, 17905 (2017).

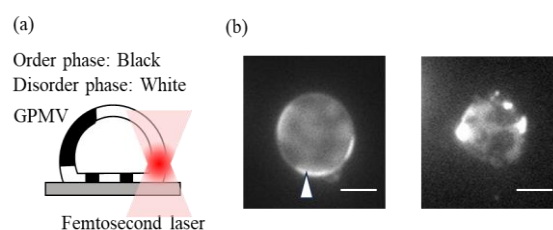


Fig. 1 (a) Schematic image showing the rupture process of a phase-separated GPMV by focused femtosecond laser irradiation. (b) The fluorescence images of a GPMV before (left) and after (right) laser irradiation. The white arrow indicates the laser focus. Dark and bright regions are the order and disorder phases in the SPMB, respectively. The scale bars are 5 μm .

水中 X 線吸収スペクトルによる脂質二重膜へのイオン配位状態評価 Evaluation of Ion Coordination Structure in Lipid Bilayers Using X-ray Absorption Spectroscopy in Water

豊橋技科大¹, 分子研², 立教大³

○金城 ゆう¹, 長坂 将成², 奥脇 弘次³, 望月 祐志³, 手老 龍吾¹

Toyohashi Univ. Tech.¹, Inst. Mol. Sci.², Rikkyo Univ.³

○Yu Kinjo¹, Masanari Nagasaka², Koji Okuwaki³, Yuji Mochizuki³, Ryugo Tero¹

E-mail: kinjo.yu.nx@tut.jp, tero@tut.jp

細胞膜は細胞の最外層に存在し、物質、情報、エネルギーなどを細胞内外に輸送する場として働いている。その基本骨格は、両親媒性分子が形成する脂質二重膜である。細胞内外に存在するカチオンが脂質二重膜に配位することで、膜の流動性や膜内相分離などの性質・構造が変化することが報告されている。近年、水を含む脂質二重膜系の分子シミュレーションが行われるようになったが、系にイオンを含める際における脂質-イオン間の相互作用の扱いは確立されているとはいえず、指標となるべき実験的データが望まれている。本研究では、水中での X 線吸収分光法(XAS)^[1]を用いて脂質二重膜を構成する脂質分子の電子状態を測定し、脂質分子へのイオン配位状態とその塩濃度依存性を明らかにすることを目的とした。

1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC)または 1,2-di-O-(9Z-octadecenyl)-PC (DietherPC)の乾燥脂質フィルムに緩衝液(100 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH 7.4/ NaOH)を加え、攪拌と超音波処理を行いベシクル懸濁液を調製した。2 枚の Si₃N₄ メンブレンを用いて水中 XAS 計測用セルを組み、緩衝液と懸濁液を流通させることで、ベシクル融合法によりセル内壁の Si₃N₄ 上に単層の支持脂質二重膜(supported lipid bilayer: SLB)を作製した。XAS 計測は分子科学研究所 UVSOR-III の BL-3U で行い、液体層の厚さを約 100 nm に保ち 527 - 535 eV の範囲で O-K 端 XAS 計測を行った。

カルボニル基(C=O)をそれぞれ持つ・持たないリン脂質である DOPC と DietherPC の SLB について計測した XAS スペクトルには 531 - 533 eV の範囲に脂質由来の吸収が得られた。これらを PC 分子内のリン酸基由来の 2 つの成分と、C=O 由来の 1 つの成分に帰属した。スペクトル強度が分子配向に依存しない X 線入射角度(T)である $T = 35^\circ$ で、緩衝液中の Na⁺濃度[Na⁺] 2 - 510 mM の範囲で XAS 計測を行い、各成分ピークの塩濃度依存性を調べた。DOPC と DietherPC で、リン酸基由来の 2 つの成分が異なる[Na⁺]依存性を示した。低[Na⁺]、生理条件付近の[Na⁺] = 100 mM 付近、高[Na⁺]それぞれで特徴的なピークシフト、強度変化の様子が観察でき、DOPC、DietherPC で異なる傾向がみられた。FMO-DPD 法とリバースマッピングから求めたイオンを含めた水中の DOPC 二重膜の原子配置を用いて内殻励起スペクトル計算を行った。リン酸基由来のスペクトルの[Na⁺]依存性が実験結果とよく一致した。これらの結果から、脂質分子へのイオン配位の影響を評価でき、カルボニル基の有無による違いを説明できる可能性を示した。

[1] M. Nagasaka, et al., *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena*, 224, 93–99 (2018).

油水界面通過法を用いた非対称ベシクルの作製及びその評価 Preparation of asymmetric vesicles using the inverted emulsion method and evaluation of the products

兵庫県大工¹

○山村 和矢¹, 部家 彰¹, 住友 弘二¹

University of Hyogo¹

Kazuya Yamamura¹, Akira Heya¹, Koji Sumitomo¹

E-mail: sumitomo@eng.u-hyogo.ac.jp

【背景・目的】我々の研究室では、膜タンパク質の単一機能測定が可能となる半導体基板上に脂質二分子膜をシールしたナノバイオデバイスの開発を行っている。このデバイスに非対称脂質二分子膜を使用することで、脂質分子の流動性や生体分子との反応性などの特性を制御することが期待される。本研究では、油水界面通過法を用いて非対称ベシクルを作製し、その非対称性の評価を行った。

【実験方法】油水界面通過法を用いて内葉に DOPC, 外葉に POPC を配置した非対称ベシクルの作製を試みた。作製したベシクルの非対称性を検証するために、内葉を NBD で標識した場合と、外葉を NBD で標識した場合で、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を用いて NBD の消光を行った。

【実験結果】Fig. 1 に $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を加えた後の NBD 蛍光強度の変化を、(a)内葉を NBD 標識した場合と(b)外葉を NBD 標識した場合でそれぞれ示す。内葉を NBD 標識した場合でも蛍光強度は減少するが、その減少量は 25%程度に限られる。一方、外葉を NBD 標識した場合には蛍光強度は大きく減少するが、十分に時間が経過した後も 25%程度の蛍光が残った。 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ により外葉の NBD のみが完全に消光すると仮定すると、ベシクル形成時に内葉と外葉の脂質が一部混合していることが考えられる。消光率から、この場合にはそれぞれの脂質組成が 3:1 の割合で偏在した非対称のベシクルが作製されていることが分かる。

【結論】ベシクル形成時に一部の脂質分子の混合が起こるものの、非対称ベシクルの作製に成功した。今後、非対称ベシクルを半導体基板上に展開し、その特性評価を進めていく。

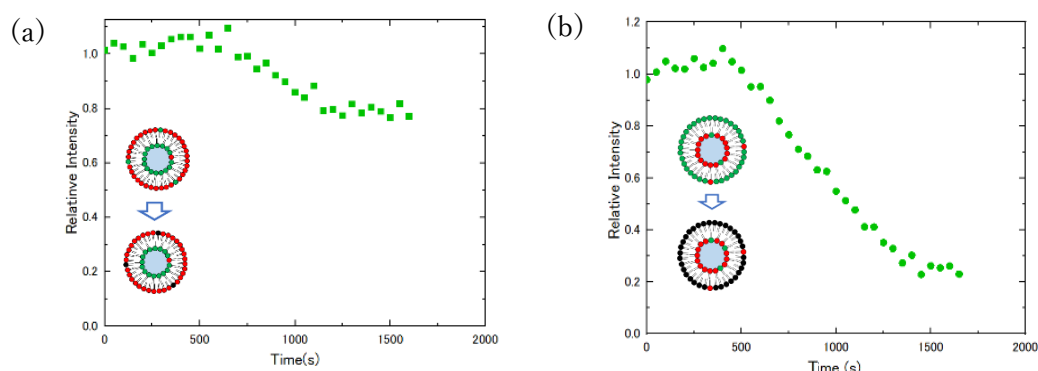


Fig.1 Changes in fluorescence intensity during NBD quenching assay with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ for (a) inner leaflet NBD-labeled and (b) outer leaflet NBD-labeled GUVs.

光圧下における支持脂質二分子膜上分子の動態

Molecular Dynamics on Substrate-Supported Lipid Bilayer in an Optical Trap

阪大院理[○](M1) 森山 俊哉, 谷本 泰士, 増井 恭子, 細川 千絵

Osaka Metropolitan Univ.[○] Shunya Moriyama, Yasushi Tanimoto, Kyoko Masui, Chie Hosokawa

E-mail: se23278b@st.omu.ac.jp

細胞膜中の膜タンパク質は多様なクラスターを形成し、情報伝達等の機能を調節している。我々は、光ピンセットを用いて膜タンパク質の分子動態を操作し、細胞機能の光制御について研究を進めている。光ピンセットは集光レーザービームの光圧により液中の単一粒子を非接触に操作可能な手法である。一般に単一分子の光捕捉は困難とされているが、光圧下において複数のナノ粒子や分子がクラスターを形成して集合することが報告されており、細胞膜上受容体の分子動態操作への応用が期待される [1]。しかしながら、細胞膜の構造は複雑であり、細胞膜表在分子の光捕捉過程は依然として不明である。支持脂質二分子膜 (Substrate-supported lipid bilayer: SLB) は細胞膜を単純化したモデルとして利用されている。本研究では、光圧下における細胞膜表在分子の捕捉、集合過程を明らかにするため、レーザー集光領域における SLB 上分子の動態について検証した。

試料には、DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine) に対しビオチン結合脂質 (Biotin-PE) を 5.0×10^{-2} 、 5.0×10^{-4} mol% の割合で混合した SLB をガラス基板上に作製した。蛍光標識ストレプトアビジン (SAF594) を表在分子モデルとしてビオチンに結合させた。波長 1064 nm の cw-Nd:YVO₄ レーザーを倒立型蛍光顕微鏡に導入し、100 倍油浸対物レンズ (N.A. 1.3) を用いて試料に集光した (Fig. 1(a))。レーザー集光領域内の SAF594 の分子拡散を蛍光相関分光法で評価し、集光領域内の平均滞在時間 τ_D を推定した。レーザーを試料に集光すると、SAF594 からの二光子励起蛍光が観測された。 5.0×10^{-4} mol% Biotin-PE SLB における SAF594 の τ_D は、レーザー出力 100—200 mW においてレーザー出力に依存して増加した。 5.0×10^{-2} mol% Biotin-PE SLB にレーザー (レーザー出力 200 mW) を集光したところ、SAF594 の τ_D は 5.0×10^{-4} mol% での結果と比べて増加した (Fig. 1(b))。SAF594 は単一分子では光捕捉が困難なほど小さい分子であるが、集光領域において複数の SAF594 分子が捕捉された結果、光圧により分子集合体の運動が制限されたと考えられる。膜表在分子の光捕捉、集合過程はレーザー出力、すなわち光圧の大きさと膜表在分子密度に依存することを明らかにした。

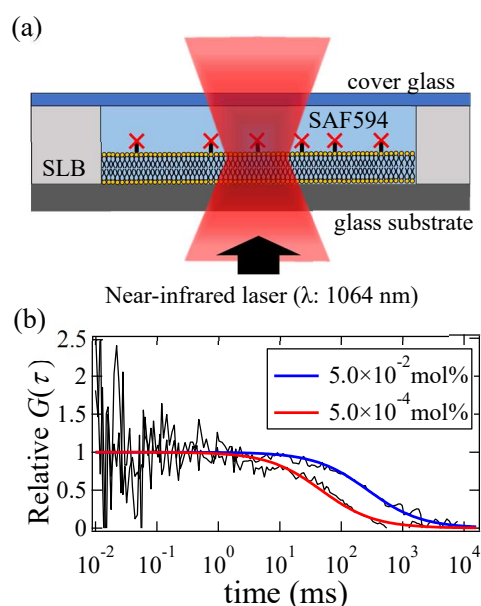


Fig. 1(a) Schematic image of optical trapping of SAF594 on the SLB. (b) Autocorrelation function curves of two-photon excitation fluorescence intensity of SAF594 at the laser focus in the SLBs containing 5.0×10^{-2} (blue) and 5.0×10^{-4} mol% (red) Biotin-PE. The laser power is 200 mW.

[1] T. Kishimoto *et al.*, *J. Photochem. Photobiol. C*, 53, 100554 (2022).

巨大ベシクルのマニピュレーションによる融合制御

Manipulation and fusion control of Giant Unilamellar Vesicles

兵庫県大工

○家根 弘夢, 山本 颯, 部家 彰, 住友 弘二

University of Hyogo

°Hiromu Yane, Hayate Yamamoto, Akira Heya, Koji Sumitomo

E-mail: sumitomo@eng.u-hyogo.ac.jp

【序論】ベシクル融合の制御は、デバイスへの膜タンパク質導入のための基礎技術として重要である。本研究では、巨大脂質ベシクル (GUV) をキャピラリーで保持し任意の場所に誘導し、GUV-GUV 間の融合制御を試みた。

【実験】Fig. 1 に実験手順の概要を示す。直径 20-30 μm のキャピラリーで正電荷をもつ GUV (カルセイン内包) を保持し、基板上に biotin-avidin 相互作用で固定した負電荷をもつ GUV (Rhodamine 標識) の近傍まで誘導し、その融合過程を観察した。

【結果】Fig. 2 に GUV のマニピュレーションによるベシクル融合の反応の過程の蛍光像を示す。二つの GUV を近づけた後、1 分後には保持している GUV (カルセイン内包) からも Rhodamine の蛍光が観察された。近くに誘導された GUV (Calcein 内包) と固定されていた GUV (Rhodamine 標識) は静電引力により、融合を開始したことがわかった。30 分までは保持している GUV (カルセイン内包) に Rhodamine の蛍光が移り強くなることが確認できたが、固定していた GUV へのカルセインの移動は観察されず、外葉のみでの融合、すなわち、半融合で止まってしまったことが確認できた。

【結論】正電荷や負電荷の脂質を混合することで、静電引力により GUV-GUV 間の融合は誘起される。しかし、融合を制御し物質導入に利用するためには、半融合状態から全融合に効率的に進行させる因子の探索が求められる。

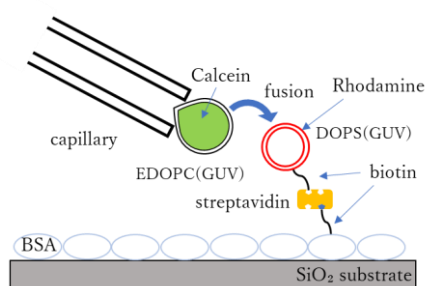


Fig. 1: Schematic illustration of GUV manipulation to control its fusion.

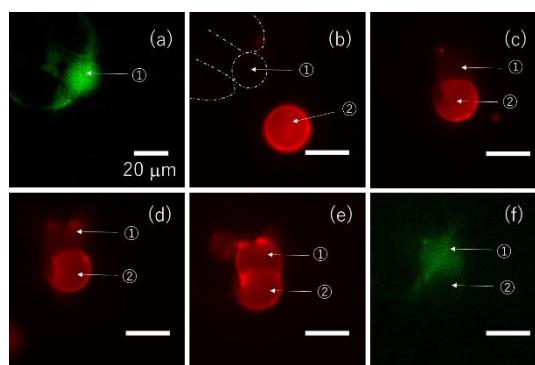


Fig. 2: Fluorescence images during vesicle fusion. Fluorescence of (a) calcein in GUV-① and (b) rhodamine in GUV-② before fusion. Fluorescence of rhodamine at (c) 1 min, (d) 9 min, and (e) 30 min after the start of vesicle fusion. (f) Fluorescence of calcein at 30 min.