

一般セッション(口頭講演) | 12 有機分子・バイオエレクトロニクス: 12.6 ナノバイオテクノロジー

2025年3月17日(月) 13:00 ~ 16:00 会 K402 (講義棟)

[17p-K402-1~11] 12.6 ナノバイオテクノロジー

住友 弘二(兵庫県立大)、松木 伸行(神奈川大)

13:00 ~ 13:15

[17p-K402-1]

モデル膜分子を用いた細胞膜間相互作用解析

○有馬 祐介¹、大野 友輔¹、玉田 薫¹ (1.九大先導研)

13:15 ~ 13:30

[17p-K402-2]

人工細胞膜実験と分子動力学シミュレーションによる脂質二分子膜の電界応答の評価

○(DC)陰山 弘典^{1,2}、高島 海央^{1,2}、小宮 麻希²、但木 大介²、山本 詠士³、平野 愛弓^{1,2} (1.東北大医工、2.東北大通研、3.慶大理工)

13:30 ~ 13:45

[17p-K402-3]

電圧印加条件における脂質二重膜挙動のFMOによる詳細解析

○奥脇 弘次^{1,2}、中島 亮太¹、土居 英男¹、住友 弘二³、望月 祐志^{1,4} (1.立教大理、2.(株)JSOL、3.兵庫県立大工、4.東大生研)

13:45 ~ 14:00

[17p-K402-4]

コレステロールを含有した脂質二分子膜上分子の光圧による動態変化

○森山 俊哉¹、谷本 泰士¹、増井 恭子¹、細川 千絵¹ (1.阪公大院理)

14:00 ~ 14:15

[17p-K402-5]

光ピンセットによる神経細胞由来巨大膜小胞膜ドメインの操作

○平杉 嘉孝¹、谷本 泰士²、増井 恭子²、細川 千絵² (1.阪市大理、2.阪公大院理)

14:30 ~ 14:45

[17p-K402-6]

共鳴光ピンセットによる神経伝達物質受容体分子の並進拡散運動の抑制

○(D)宮崎 達夢¹、谷本 泰士¹、増井 恭子¹、細川 千絵¹ (1.阪公大院理)

◆ 奨励賞エントリー

14:45 ~ 15:00

[17p-K402-7]

脂質二分子膜内の残留油が膜流動性に与える影響

○本川 茉奈¹、三木 陽介¹、部家 彰¹、住友 弘二¹ (1.兵庫県大工)

◆ 奨励賞エントリー

15:00 ~ 15:15

[17p-K402-8]

脂質二分子膜のプロトン透過と残留有機溶媒の影響

○吉馴 悠人¹、本川 茉奈¹、三木 陽介¹、大嶋 梓²、山口 真澄²、部家 彰¹、住友 弘二¹ (1.兵庫県大工、2.NTT物性基礎研・BMC)

◆ 奨励賞エントリー

15:15 ~ 15:30

[17p-K402-9]

巨大ベシクルとバキュロウイルスの融合制御

○井上 友莉香¹、大嶋 梓²、湊元 幹太³、山口 真澄²、部家 彰¹、住友 弘二¹ (1.兵庫県立大、2.NTT物性基礎研・BMC、3.三重大)

15:30 ~ 15:45

[17p-K402-10]

膜融合を介した脂質ベシクル間の分子交換

後藤 あい¹、広瀬 侑¹、○手老 龍吾¹ (1.豊橋技科大)

15:45 ~ 16:00

[17p-K402-11]

SHGアッセイによる細胞膜の分子配向の乱れと回復の観察

小原 千幸¹、本田 覇人²、原 毅流¹、○加藤 徳剛^{1,2} (1.明大院理工、2.明大理工)

モデル膜分子を用いた細胞膜間相互作用解析

Intermembrane interaction studied using model membrane molecules

九大先導研 °有馬 祐介, 大野 友輔, 玉田 薫

Kyushu Univ., °Yusuke Arima, Yusuke Ohno, Kaoru Tamada

E-mail: arima@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

【緒言】 細胞表面で起こる分子間相互作用は、周辺環境に対する細胞応答の開始起点として重要な役割を果たしている。細胞膜上にある分子の相互作用は弱く (解離定数 K_D : $\sim \mu\text{M}$)、細胞膜上における弱い相互作用の動作原理を理解することができれば人工システムへの活用にもつながる。我々は、細胞表面を単鎖 DNA-ポリエチレングリコール-リン脂質 (ssDNA-PEG-lipid, Fig. 1) で修飾し、相補対形成を介した細胞間接着の誘導を行ってきた。ssDNA-PEG-lipid は分子設計が容易なことから、弱い相互作用の動作原理を理解するためのモデル膜分子として利用できると考えた。本研究では、ssDNA-PEG-lipid の塩基長を変えることで、分子間相互作用の強さが細胞膜間での相互作用へ与える影響を調べた。

【実験】 塩基長 6, 10, 21, PEG 分子量 5000, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphatidyl-ethanolamine (DPPE) からなる ssDNA-PEG-DPPE を合成した。細胞表面での相補対形成を調べるため、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株を ssDNA-PEG-DPPE で修飾後、蛍光標識した相補 ssDNA' を 4°C で作用させ、その直後および 20°C , 37°C で 30 分間静置後の蛍光強度を測定した。また、細胞間接着の塩基長依存性を調べるため、片方の細胞を蛍光標識 ssDNA-PEG-DPPE, 別の細胞を相補 ssDNA'-PEG-DPPE で修飾後、室温または 37°C にて混合した。

【結果】 塩基長の異なる ssDNA-PEG-DPPE で細胞表面を修飾後、相補対形成の温度依存性を調べた。蛍光標識した相補 ssDNA' を 4°C で結合後昇温すると、6 mer では 20°C で、10 mer では 37°C で蛍光強度が大きく減少し、DNA 相補対の解離が見られた (Fig. 2)。一方、21 mer では 37°C においても相補対はほとんど解離せず、細胞表面での相補鎖 1 対の結合・解離は溶液中と同程度であることが分かった。

次に、細胞間接着の塩基長依存性を調べたところ、6 mer の場合でも T_m 以上の 37°C で細胞間接着は誘導され、ssDNA-PEG-DPPE は界面に集積した (Fig. 3)。細胞膜間では、面一面での接触および分子の集積による多価効果によって相互作用が増強され、1 分子レベルの相互作用が小さくても細胞間接着の誘導には十分であることが分かった。

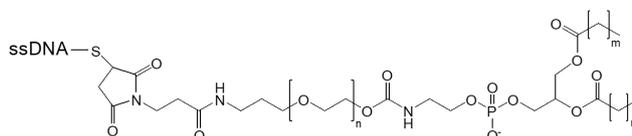


Fig. 1 ssDNA-PEG-DPPE の構造

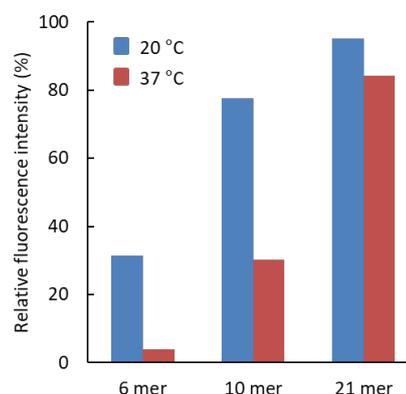


Fig. 2 ssDNA-PEG-DPPE 修飾した細胞表面における相補 ssDNA' 結合の温度依存性

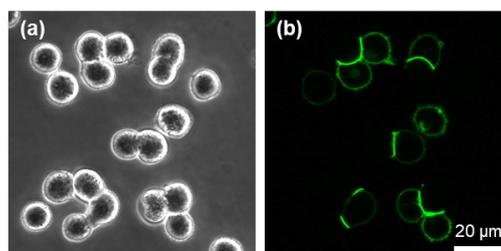


Fig. 3 蛍光標識 ssDNA-PEG-DPPE 修飾細胞と ssDNA'-PEG-DPPE 修飾細胞の 37°C における接着。(a) 位相差像, (b) 蛍光像

人工細胞膜実験と分子動力学シミュレーションによる 脂質二分子膜の電界応答の評価

Analysis of electric field-induced structural changes in lipid bilayers
using artificial cell membrane experiments and molecular dynamics simulations

東北大院医工¹, 東北大通研², 慶大理工³

○陰山 弘典^{1,2}, 高島 海央^{1,2}, 小宮 麻希², 但木 大介², 山本 詠士³, 平野 愛弓^{1,2}

Grad. Sch. Biomed. Eng., Tohoku Univ.¹, RIEC, Tohoku Univ.², Keio Univ.³

○Hironori Kageyama^{1,2}, Mio Takashima^{1,2}, Maki Komiya², Daisuke Tadaki², Eiji Yamamoto³,
Ayumi Hirano-Iwata^{1,2}

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

1. 背景

細胞膜は、細胞を外部環境から隔てる薄膜であり、細胞の恒常性維持、物質輸送、シグナル伝達において重要な役割を果たしている。また、膜を介したイオン濃度勾配による電場は、膜の張力や曲げ剛性といった機械的特性に影響を与え、細胞の形態や機能に関与していることが知られている。従来の研究では、主に膜貫通方向の電界成分に焦点が当てられてきたが、我々の研究グループでは膜平行方向の電界成分に着目し、独自の膜平行電界印加系を用いた機能評価を行っている^[1]。本研究では、人工細胞膜を用いた明視野観察実験および分子動力学シミュレーションを通じて、外部電界が細胞膜の機械的特性に与える影響を評価した。

2. 方法

Folding 法（脂質単分子膜貼り合わせ法）により、直径約 100 μm の人工脂質二分子膜を形成した。脂質溶液は DOPC : Cholesterol = 4 : 1 (wt. %) を使用し、膜安定化のための有機溶媒は *n*-Hexadecane を、水相には 0.15 M KCl+10 mM HEPES/KOH (pH 7.4) を用いた。この垂直方向に形成した人工細胞膜の膜面積を取得するため、チャンバーの側面から水浸対物レンズを挿入して明視野観察を行った。膜面積は取得した膜画像から動的輪郭法により算出し、電気容量は容量性電流波形をもとに算出した。

分子シミュレーションには GROMACS ソフトウェアと CHARMM36 力場を使用した。初期

構造は、CHARMM-GUI の membrane builder を用いて作成し、DOPC/Cholesterol の混合膜比率を種々に変更してシミュレーションを実施した。電界強度は 0.05 V/nm、温度は 300 K に設定して計算を行った。

3. 結果・考察

明視野観察実験と分子シミュレーションそれぞれについて、膜貫通電界と膜平行電界を印加した際の膜の構造変化を評価した。

3-1. 実験結果

人工細胞膜の明視野観察実験において、膜貫通電界を印加すると電気容量と膜面積は膜貫通電圧の二乗に比例して増加した。一方、膜平行電界を印加すると膜面積と電気容量は減少し、貫通方向と平行方向で膜構造の変化の方向性が異なることがわかった。

3-2. シミュレーション結果

全原子分子動力学シミュレーションの解析から、膜面積や脂質疎水基の秩序性が、膜貫通電界と膜平行電界で異なる変化を示すことが明らかになった。また、同一の電界強度で比較した場合、膜平行電界の影響が膜貫通電界よりも顕著であることが確認された。

これらの結果は、細胞膜の電界応答特性に関する新たな知見を提供するとともに、機能制御への応用可能性を示唆している。

[1] T. Ma, et. al., *Faraday Discuss.*, **233**, 244-256 (2022)

電圧印加条件における脂質二重膜挙動の FMO による詳細解析

Detailed analysis of lipid bilayer under applied electric fields using FMO

立教大理¹, (株) JSOL², 兵庫県立大工³, 東大生研⁴○奥脇 弘次^{1,2}, 中島 亮太¹, 土居 英男¹, 住友 弘二³, 望月 祐志^{1,4}Rikkyo Univ.¹, JSOL Corp.², Univ. Hyogo³, Univ. Tokyo⁴Koji Okuwaki^{1,2}, Ryota Nakajima¹, Hideo Doi¹, Koji Sumitomo³, Yuji Mochizuki^{2,4}

E-mail: okuwaki@rikkyo.ac.jp

【序論】脂質二重膜に電圧を印加することで膜透過性を高め、様々な分子を挿入するエレクトロポレーション技術は、医薬品輸送、食品、バイオセンサーなど様々な応用がなされている[1]。電圧印加による水性細孔形成が主な要因とされているが、細孔形成を直接観察することは難しく、分子シミュレーションによるナノレベルでの現象解明が期待されている。各原子を露わに扱う全原子シミュレーションが直截であるが、計算できるサイズや時間スケールに限られるため、任意のサイズの原子集団を粒子とし、相分離の予測に優れる散逸流離動力学(DPD)も主な手段の一つである[2]。我々はフラグメント分子軌道 (FMO) 法で算出した相互作用を DPD に用いる FMO-DPD 技術により、非経験的なパラメータで構造解析を行うワークフローを確立しており[3]、昨年の春季学術講演会にて、単一脂質二重膜への電圧印加条件の細孔形成の DPD シミュレーションを報告した[4]。今回は細孔の詳細に焦点をあて、DPD シミュレーションから得られた結果をリバースマッピング技術により全原子化し、FMO 法を用いて、細孔形成下の分子間相互作用を量子化学レベルで詳細解析した結果を報告する。

【手順】細胞膜の主要なリン脂質である POPC を対象に、電極間電位を制御した外部電場の印加を用いた DPD シミュレーションにより[5]、細孔形成をシミュレーションした。POPC 分子を 6 種類 12 個の粒子、水 4 分子を 1 粒子として表現し、パラメータは FMO 計算により非経験的に求めた値を使用した。5300 分子の POPC の二重膜状態 (約 46nm) を初期構造として設定し、更に脂質頭部のコリン、リン酸部にそれぞれ正、負の電荷を付与し、印加する電圧の強さを変え細孔構造を作成した。得られた構造を全原子化し、MP2/cc-pVDZ レベルの FMO 計算にて、電圧印加前の構造と、相互作用の様態を比較した。

【結果】DPD の結果、双極子を電場に合わせたい脂質が細孔に嵌入し、水が入り込んで大きな細孔が形成された。膜表面は頭部、尾部でマイクロ相分離しており、脂質間の相互作用も初期構造と比べ大きな変化が見られた。

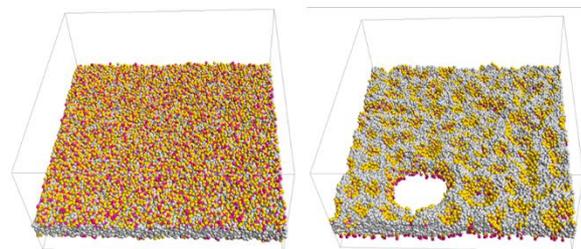


図 1. 初期構造(左)と DPD 後の細孔構造(右)

FMO 計算の相互作用解析結果の詳細は当日紹介する。【謝辞】本研究は立教 SFR からの支援を受けた。【文献】 [1] K. Balantič et al., *Acta Chim. Slov.* **68**, 753 (2021). [2] R. Vaiwala et al., *J. Chem. Theory Comput.* **15**, 5737 (2019). [3] 奥脇ら, *J. Comp. Chem. Jpn.* **17**, 102(2018). [4] 中島ら, 第 71 回応用物理学会春季学術講演, 23a-1BN-6 (2024). [5] T. Aoyagi, *Polymer Prep. Jpn.*, **67**, 2 (2018).

コレステロールを含有した脂質二分子膜上分子の光圧による動態変化

Molecular Dynamics on Cholesterol-Containing Lipid Bilayers by Optical Forces

阪公大院理 [○]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

神経細胞膜には、シナプス伝達に寄与する神経伝達物質受容体などの膜表在分子が局在している。我々は、集光近赤外レーザーの光圧により神経伝達物質受容体の分子動態を操作し、シナプス伝達効率を可逆的に制御する研究を進めている [1]。膜表在分子の光捕捉・集合過程を解明するためには、脂質二分子膜モデルを用いた検証が有用である。これまでに、単一の脂質組成で構成された支持脂質二分子膜 (Supported Lipid Bilayer: SLB) に対し、膜表在分子モデルである量子ドット標識ストレプトアビジン (QD-SA) を結合させ、レーザー集光領域において QD-SA の分子動態が抑制されることを示した [2]。神経細胞膜は膜表在分子の他にも多様な脂質分子で構成されており、特にコレステロール (Chol) は脂質ラフト形成に関与し、細胞膜の流動性を低下させる性質を持つ。今回、生体細胞膜を模倣した細胞膜モデルとして Chol 含有 SLB に QD-SA を結合させ、レーザー集光領域における SLB 上の QD-SA の分子動態について検証した (Fig. 1 (a))。

試料として、1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (DOPC) にビオチン修飾脂質 (Biotin-PE) と Chol を含有した SLB をガラス基板上に作製した。Biotin-PE 5.0×10⁻¹ mol% に対し、Chol を 0 mol%, 5 mol%, 10 mol% 含有した三種類の SLB を使用した。QD-SA を Biotin-PE に結合させ、LED (波長 530-550 nm) 励起により蛍光観察を行った。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。SLB 上 QD-SA のレーザー集光領域における分子拡散を蛍光像の一粒子追跡法により評価した。SLB 上 QD-SA の自由拡散の拡散係数を算出したところ、Chol の含有量が増加するにつれて拡散係数が減少した。QD-SA に対してレーザーを集光したところ、集光領域における QD-SA の拡散係数はレーザー未照射時と比較して減少した (Fig. 1 (b))。Chol 含有量の増加に伴って未照射時に対する照射時の QD-SA の拡散係数の減少率は大きくなる傾向が得られた。以上の結果は、Chol を含有した SLB 上の膜表在分子に対して光捕捉力がより強く働くことを示唆しており、神経細胞の膜表在分子の光捕捉・集合過程の解明に向けた重要な知見である。

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

[2] 森山俊哉他, 第 85 回応用物理学会秋季学術講演会, 21a-D901-10 (2024).

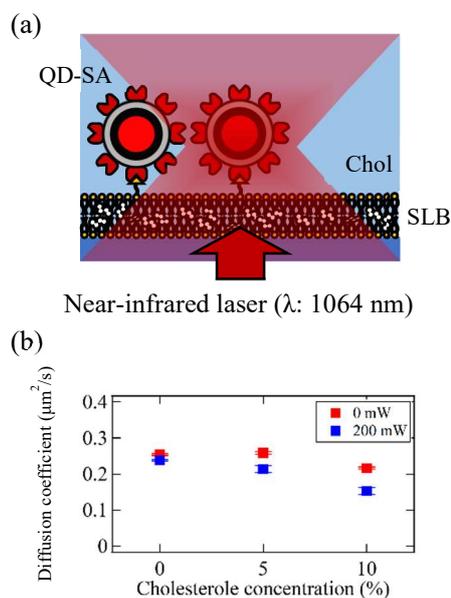


Fig. 1 (a) Schematic image of optical trapping of QD-SAs on SLB. (b) The diffusion coefficient of QD-SAs on the SLB at the laser focus. Each SLB contains 0 mol%, 5 mol% and 10 mol% cholesterol, respectively. The laser power is 0 mW (red) and 200 mW (blue).

光ピンセットによる神経細胞由来巨大膜小胞膜ドメインの操作

Direct Manipulation of Membrane Domains in Giant Plasma Membrane Vesicles Using Optical Tweezers

阪市大理¹, 阪公大院理² ○(B)平杉 嘉孝¹, 谷本 泰士², 増井 恭子², 細川 千絵²

Osaka City Univ.¹, Osaka Metropolitan Univ.², ○Yoshitaka Hirasugi¹, Yasushi Tanimoto²,

Kyoko Masui², Chie Hosokawa²

E-mail: a21sd026@st.osaka-cu.ac.jp

神経細胞の細胞膜ドメインは特定の膜タンパク質と脂質で構成され、神経伝達をはじめとした細胞膜機能の調節において重要な役割を担っている。細胞膜ドメインを外部から操作することにより神経伝達効率の局所的な操作が期待される。光ピンセットは、集光レーザービームの光圧により微小な物体を非接触、非破壊に操作する手法である。先行研究では、液体秩序相 (Liquid order: Lo)と液体無秩序相 (Liquid disorder: Ld)に相分離した脂質二分子膜から成る巨大膜小胞において、Lo 相ドメインを光ピンセットにより直接操作することに成功している [1]。本研究では、より生体膜に近い条件下で膜ドメイン操作を実証するため、細胞膜由来の巨大膜小胞 (Giant Plasma Membrane Vesicle: GPMV)を作製し、光ピンセットによる膜ドメイン操作を試みた。

試料として、Ld 相を蛍光性脂質プローブ Octadecyl Rhodamine B Chloride (R18)で標識した培養 16 日目のラット胎児大脳由来神経細胞を Paraformaldehyde と Dithiothreitol で処理し、分泌した GPMV を上清と共に回収した。次に、回収した GPMV を蛍光標識タンパク質 Cholera Toxin B subunit Alexa conjugate 488 (CTB 488)で標識し、ガラス基板上に静置して蛍光観察を行った。GPMV 膜内の R18 と CTB 488 の蛍光像から、両者が異なる位置に局在し、室温において GPMV 膜が相分離している様子が観察された (Fig. 1 (A))。波長 1064 nm の Nd:YVO₄ レーザーを 100 倍油浸対物レンズ (N.A. 1.3)を用いてガラス基板上的 GPMV 表面にレーザー光強度 300 mW の条件で集光したところ、照射直後より R18 の蛍光強度が均一になり、GPMV 膜の相転移が示唆された。さらに、相分離した GPMV の Ld相と Lo相の境界にレーザー (レーザー光強度 100 mW)を集光したところ、Lo 相ドメインが局所的に光捕捉される様子が確認された (Fig. 1 (B))。以上の結果は、光ピンセットにより神経細胞由来の細胞膜中の膜ドメインを操作可能であることを示唆している。

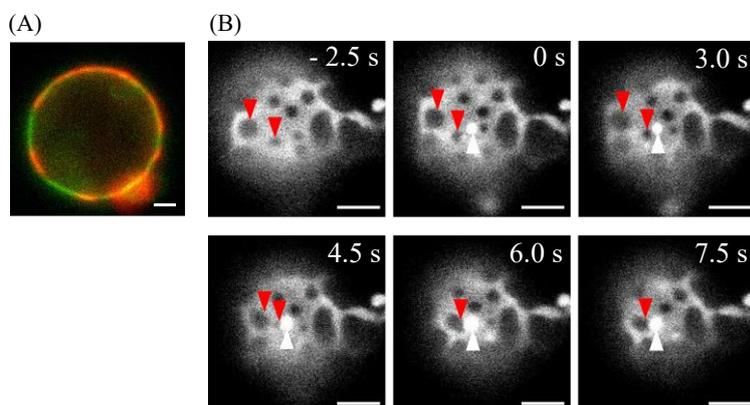


Fig.1 (A) Fluorescence images of R18 (red) and CTB 488 (green) to show a phase-separated GPMV. (B) Time evolution of fluorescence images of R18 under optical trapping of membrane domain. The white and red arrows indicate the laser focus and the Lo domains, respectively. The laser power is 100 mW. The laser was switched on at 0 s and maintained for 7.5 s. The scale bars are 3 μ m.

[1] M. S. Friddin et al., Commun. Chem., 2, 6 (2019).

共鳴光ピンセットによる神経伝達物質受容体分子の並進拡散運動の抑制

Suppression of Molecular Diffusion of Neurotransmitter Receptors on Neurons
with Resonant Optical Tweezers阪公大院理 [○](D)宮崎 達夢, 谷本 泰士, 増井 恭子, 細川 千絵Osaka Metropolitan Univ., [○]Tatsumi Miyazaki, Yasushi Tanimoto, Kyoko Masui, Chie Hosokawa

E-mail: sg22230q@st.omu.ac.jp

中枢神経系の興奮性シナプスでは、神経細胞表面に局在する膜貫通型の AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) がシナプス伝達において重要な役割を果たしている。我々は、神経細胞間のシナプス伝達効率を光で可逆的に制御することを目的として、光ピンセットにより量子ドット (QD) で標識した AMPAR (QD-AMPA) の分子動態を操作する手法の開発を進めている。光ピンセットは、集光レーザービームの光圧により微粒子を非接触に捕捉可能な手法であるが、光捕捉力は捕捉対象の体積と屈折率に依存するため、ナノ粒子を安定的に捕捉することは依然として困難である。近年、単一ナノ粒子に働く光捕捉力を増大する手法として、従来の光ピンセット用近赤外 (NIR) レーザーと捕捉対象の電子遷移に共鳴する波長のレーザーを同時に照射する、共鳴光学応答を用いた手法が注目されている [1]。本研究では、NIR レーザーに加えて QD の電子遷移に共鳴する波長のレーザーを同時に集光し、神経細胞表面の QD-AMPA の分子動態変化について検証した。

免疫染色法により培養 16-17 日目のラット胎児由来海馬神経細胞の細胞膜に局在する AMPAR に QD (発光ピーク波長: 655 nm) を標識した。波長 1064 nm の NIR レーザーに加え、共鳴用レーザーとして波長 488 nm に調整した波長可変 Ar⁺レーザーを同軸で倒立顕微鏡へ導入し、100 倍の油浸対物レンズを用いて QD-AMPA に集光した。レーザー集光領域内における QD-AMPA の蛍光像を CMOS カメラで取得し、神経細胞表面の QD-AMPA の分子動態を一粒子追跡法により解析した。NIR レーザー出力を 300 mW、共鳴用レーザー出力を 0–1100 nW の範囲で神経細胞上の QD-AMPA に同時に集光した (Fig. 1 (a))。NIR レーザー照射中において、集光点の中心座標から QD-AMPA の重心座標間の距離が、共鳴用レーザー出力の増加に伴い減少する傾向がみられた (Fig. 1 (b))。QD-AMPA の各フレーム間の移動距離は、共鳴用レーザー出力の増加に伴い減少する様子も確認され

た。これらの結果は、共鳴光ピンセットにより光捕捉力が増大し、神経細胞膜上の分子拡散をより強く束縛した可能性を示唆している。

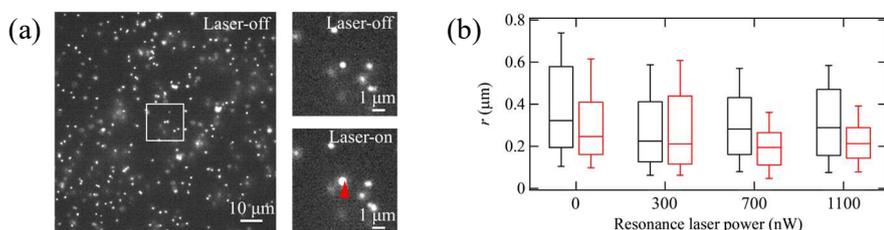


Fig. 1. (a) Fluorescence images of the QD-AMPA on neurons and enlarged images (right) of the white square before and during NIR and resonance laser irradiation. The red arrow indicates the laser focus. (b) Distances between the center of the laser focus and the centroid coordinate of the QD-AMPA before (black) and during (red) NIR and resonance laser irradiation. In (b), the lower and upper fences are the 25th and 75th percentiles, respectively, and the median is in between. The bars represent the 10th and 90th percentiles, respectively.

[1] T. Kudo and H. Ishihara, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15, 14595-14610 (2013).

脂質二分子膜内の残留油が膜流動性に与える影響

Effects of oil contamination in lipid bilayers on membrane fluidity

兵庫県立大工 °本川 茉奈, 三木 陽介, 部家 彰, 住友 弘二

University of Hyogo, °Mana Honkawa, Yosuke Miki, Akira Heya, Koji Sumitomo

E-mail: ma.honkawa@gmail.com

巨大ベシクル(GUV)は、そのサイズや構造から細胞モデルとして注目され、膜タンパク質の機能解明や分子センサーへの応用が期待されている。GUV 作製方法には様々あり、油水界面通過法は目的の水溶液を GUV 内に内包できる方法である。しかし、作製過程で脂質二分子膜内に油が残留してしまうことが懸念されている。この残留油は、脂質二分子膜の特性や膜タンパク質の機能に影響を与えてしまう可能性がある。本研究では、光褪色蛍光回復法(FRAP 法)を用いて、油水界面通過法で使用する油の種類による脂質二分子膜の拡散係数の違いを求めた。

油水界面通過法では、ヘキサデカン、ドデカン、シクロヘキサンの 3 種類の油を用いた。また有機溶媒が残留しない Electroformation 法により作製した GUV と比較した。各 GUV に対する FRAP の結果を Fig.1 に示す。ヘキサデカン、ドデカンを用いた場合は Electroformation 法と比べて拡散係数が大きくなり、シクロヘキサンの場合にはあまり変わらない。この違いは、脂質二分子膜内への油の残留状態の違いによるものだと考えられる(Fig.2)。ヘキサデカン、ドデカンは直鎖状分子であり、脂質分子の間に入り込むために脂質の流動性を促進し、シクロヘキサンは環状構造のため、脂質分子の間から排出され、脂質分子の拡散にほとんど関与しないと考えられる。

油の分子構造によって脂質二分子膜内への油の侵入位置が異なり、ヘキサデカンやドデカンなどの直鎖状分子は環状分子に比べて膜の流動性に、より影響することが分かった。

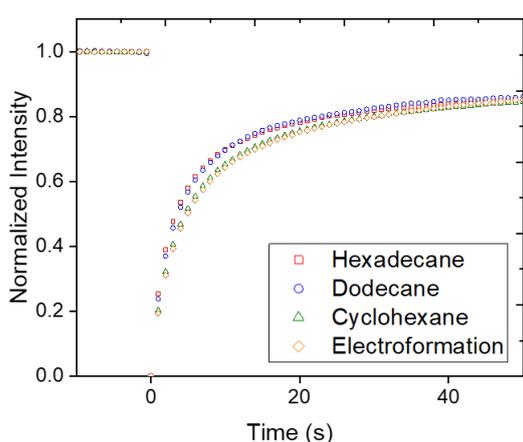


Fig.1. Fluorescence recovery curves in supported lipid bilayers formed by rupturing each GUV on a SiO₂ substrate.

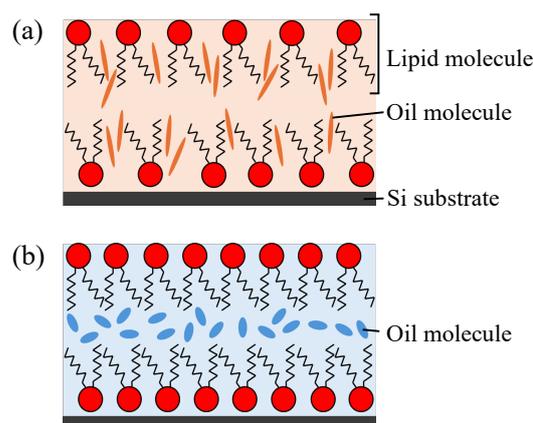


Fig.2. Model of contamination oil in lipid bilayers. (a)Hexadecane and dodecane penetrate between lipid molecules. (b)Cyclohexane remains between the lipid leaflets.

脂質二分子膜のプロトン透過と残留有機溶媒の影響

Effect of residual organic solvents on proton permeation through lipid bilayers

兵庫県大工¹, NTT 物性基礎研・BMC²

○吉馴 悠人¹, 本川 茉奈¹, 三木 陽介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

○Y. Yoshinare¹, M. Honkawa¹, Y. Miki¹, A. Oshima², M. Yamaguchi², A. Heya¹, K. Sumitomo¹

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

【序論】生体膜模倣の反応場として幅広く利用されている巨大ベシクル (GUV) は、油水界面通過法 (W/O 法) やエレクトロフォーメーション法 (EF 法) など様々な手法で作製が可能である。W/O 法は高濃度塩など多様な物質を内包できるが、膜間に残留する有機溶媒が懸念されている。本研究では他のイオンと比較して膜透過係数が大きいプロトンに着目し、有機溶媒の有無や種類によるプロトン透過とそれに伴う膜電位発生の影響を調査した。

【実験】直鎖アルカン構造のヘキサデカン ($C_{16}H_{34}$) を用いた W/O 法と EF 法により pH 感受性色素 (pyranine) を内包させた GUV をそれぞれ作製した。そこに GUV 外の pH を変化させるためにシリンジポンプで外液を置換し、脂質二分子膜のプロトン透過を促進させた。そして pyranine の蛍光強度変化から pH 変化を有機溶媒の有無で比べた。さらに炭素数が異なるが構造の似ているドデカン ($C_{12}H_{26}$) や構造の異なるシクロヘキサン (C_6H_{12}) を用いて有機溶媒の種類による比較も行った。

【結果】Fig. 1 に時間経過における GUV 内外の pH 変化を示す。pyranine の 488 nm 励起の蛍光強度を 405 nm 励起の蛍光強度によって規格化して pH 換算した。外液の pH が上昇することによりプロトン透過が起こるが、それに伴う膜電位の発生でイオン透過が抑制され平衡状態に達した。しかし W/O 法 (ヘキサデカン) と EF 法で平衡状態に達した pH に違いがあることが確認された。これは脂質二分子膜間にヘキサデカンが残留し、GUV の比誘電率が低下したからと考える。また残留する有機溶媒の種類を変えた結果から脂質二分子膜のイオン透過には有機溶媒の分子構造も影響があることが示唆された。

【結論】ヘキサデカン等直鎖アルカンは膜間に残留しやすく、プロトン透過やそれに伴う膜電位に大きく影響した。そのため生体膜モデルとして用いる場合は残留有機溶媒も考慮する必要がある。

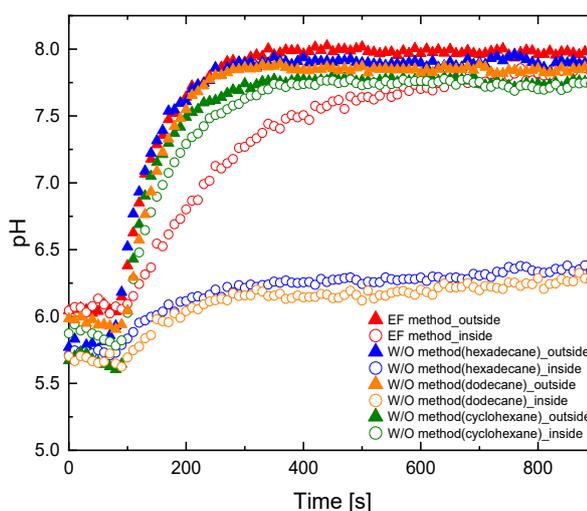


Fig.1: pH changes inside and outside the GUV during solution exchange around the GUV.

巨大ベシクルとバキュロウイルスの融合制御

Controlled fusion of giant unilamellar vesicles and budded baculoviruses

兵庫県立大¹, NTT 物性基礎研・BMC², 三重大³

井上 友莉香¹, 大嶋 梓², 湊元 幹太³, 山口 真澄², 部家 彰¹, 住友 弘二¹

Univ. of Hyogo¹, NTT Basic Res. Labs., BMC², Mie Univ.³

Yurika Inoue¹, Azusa Oshima², Kanta Tsumoto³, Masumi Yamaguchi²,

Akira Heya¹, Koji Sumitomo¹

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

巨大ベシクル(GUV)は、膜融合やタンパク質合成など細胞再構成系のプラットフォームとして幅広く研究されている。一方、バキュロウイルスの出芽ウイルス(BV)は弱酸性条件下で活性化し融合を促進する膜タンパク質 GP64 を持つエンベロープウイルスであり、人工脂質膜への膜タンパク質組み込みなどに応用されている。例えば、pH 4.0~5.5 の溶液中で酸性リン脂質を持つ GUV に融合することが報告されている¹。本研究では、GUV の形成方法によって BV との融合に違いを見出したので報告する。

DOPC : DOPS : cholesterol = 75 : 20 : 5 の脂質組成で Electroformation 法と界面通過法を用いて GUV を作製し、BV (AcMNPV)との膜融合を試みた。GUV と BV はそれぞれ蛍光色素 NBD-DOPE, Alexa Fluor 546 NHS Ester で標識した。pH 4.5 の酢酸緩衝液下で GUV と BV を混合し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Electroformation 法で作製した GUV では、GUV の膜表面に BV が付着していることが確認できた(Fig. 1 上段)が、融合は見られなかった。一方、界面通過法で作製した GUV では、同様の融合条件でも GUV の膜の周上に均一に Alexa Fluor 546 の蛍光が分布していた(Fig. 1 下段)。BV は界面通過法で作製した GUV の方が融合しやすいことが確認された。界面通過法作製時に膜間に混入する有機溶媒(hexadecane)が GUV と BV の膜融合に影響したと考える。今後は GUV の膜特性と BV 融合の関連性について検討し、その制御機構を確立する。

1) Koki Kamiya *et al.*, *BBA Biomembranes* **1798**, 1625 (2010).

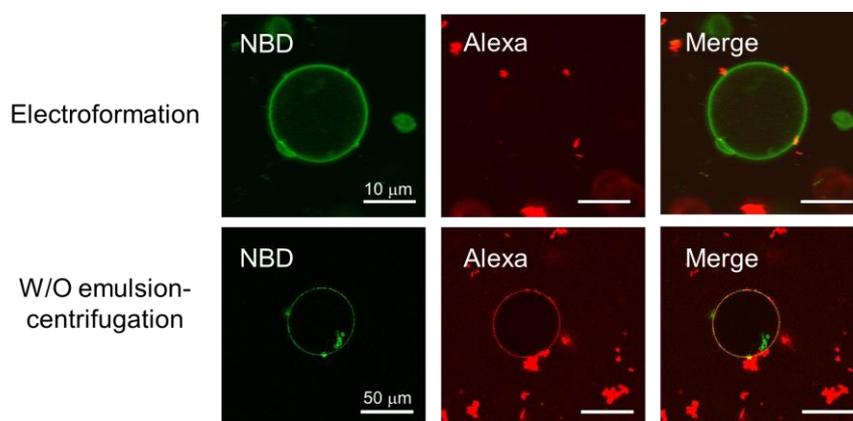


Fig. 1 Confocal microscopy images of GUVs mixed with BVs. GUV formed by electroformation method is compared with that formed by W/O emulsion centrifugation method. Fluorescent labels for GUVs and BVs are NBD (green) and Alexa Fluor 546 (red), respectively.

膜融合を介した脂質ベシクル間の分子交換

Inter-vesicle Molecular Exchange via Membrane Fusion

豊橋技科大¹, 後藤 あい¹, 広瀬 侑¹, [○]手老 龍吾¹

Toyohashi Univ. Tech.¹, Ai Goto¹, Yu Hirose¹, [○]Ryugo Tero¹

E-mail: tero@tut.jp

細胞膜の基本骨格は、リン脂質などの両親媒性分子が構成する二分子層膜であり、この脂質二重膜内の組成や物理的性質は、細胞内外の物質輸送や情報伝達などの反応場の on/off や効率を決める要因である。我々はこれまでに、多価不飽和脂質、一価不飽和脂質、cholesterol (Chol)からなる脂質二重膜内において、多価不飽和脂質に富むマイクロドメインが形成され、膜融合を促進するサイトとして働くことを報告した¹⁾。多価不飽和脂質の不飽和度が高いほど、また全不飽和度が同じ場合は sn-1, sn-2 位のアシル鎖に二重結合が分かれて存在するほど、ドメインが形成されやすい。本研究では、不飽和度の異なる phosphatidylethanolamine (PE), 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC), Chol からなるベシクルを用いて、膜融合を介したベシクル間での脂質分子の混合と交換を、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)法により評価した。

PE (1,2-dilinolenoyl-PE (18:3PE), 1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl-PE (16:0-22:6PE)または1,2-dioleoyl-PE (18:1PE)), POPC, Cholと蛍光標識脂質 (Bis-Bodipy-FL-PC (Ex/Em: 488/512 nm)または TopFluor-TMR-PC (Ex/Em: 544/571 nm))を $C_{PE}:(67-C_{PE}):33:1$ (モル比, C_{PE} は PE のモル割合)で混合した脂質フィルムを真空乾燥後、緩衝液(120 mM KCl, 10 mM HEPES/KOH [pH 7.2])を加え、攪拌と超音波処理を行うことでベシクル懸濁液を調製した。 $C_{PE} = 0 - 22$ (mol%)の Bis-Bodipy-FL-PC 含有ベシクルと TopFluor-TMR-PC ベシクルの懸濁液を、超音波処理終了から5分後に1:1 (v/v)で混合し($t = 0$ (s)), 励起光 480 nm で 500 - 650 nm の範囲で 60 s 間隔で蛍光スペクトル測定を行った。

18:3PE を含む $C_{PE} = 12$ (mol%)のベシクル懸濁液を混合すると、 $t = 60 - 1260$ (s)のあいだで時間とともに Bodipy-FL (512 nm)の蛍光強度($I_d(t)$)が減少し、TopFluor-TMR(571 nm)の蛍光強度($I_a(t)$)が増加した。これはドナーである前者からアクセプターである後者への FRET によるものであり、別々のベシクル内に存在していた両者が脂質二重膜内で混合したことを示している。一方、同じ時間範囲でベシクル粒径はほとんど変化しなかったことから、ベシクル同士が完全融合することなく、ベシクル間での脂質交換が行われていることが示唆される。蛍光強度比 $I_a(t)/I_d(t)$ を混合前のベシクルの強度比で規格化した R を脂質交換の指標とした。PE を含まない POPC+Chol ベシクル($C_{PE} = 0$ (mol%))でも混合後に R が増加したが、18:3PE を添加したベシクル($C_{PE} \geq 3$ (mol%))では R の初期増加速度が上昇し、 R の増加が緩やかになるまでの時間が短くなった。これらの効果は C_{PE} が高いほど大きくなる傾向が見られた。これらの効果は(16:0-22:6PE)では小さく、18:1PE ではほとんど見られなかった。ベシクルの半融合と脱離によってベシクル間の分子交換が起きており、多価不飽和 PE は半融合状態を形成しやすくし安定化することで脂質交換を促進したと考えられる。

1) M. W. S. Goh and R. Tero, Colloids Surf. B: Biointerfaces **210**, 112235 (2022); M. W. S. Goh and R. Tero, e-J. Surf. Sci. Nanotechnol. **20**, 90 (2022); H. Doi, et al., Appl. Phys. Express **17**, 055001 (2024).

SHG アッセイによる細胞膜の分子配向の乱れと回復の観察

Observation of perturbation and recovery of molecular orientation in plasma membranes by SHG assay

明大院理工¹, 明大理工² 小原千幸¹, 本田覇人², 原毅流¹, ◯加藤徳剛^{1,2}

Meiji Univ., Chiyuki Obara, Haruto Honda, Takeru Hara, ◯Noritaka Kato

E-mail: nkato@meiji.ac.jp

【背景・目的】非線形光学現象である第二次高調波発生(SHG)を用いて、細胞膜の脂質分子の配向の乱れを検出する SHG アッセイを開発した。ポリカチオンは静電吸着して、細胞膜を損傷することが、細胞から漏出する酵素を検出することで評価されてきた。このような方法では、損傷が検出されない低濃度域において、

Fig.1a から b のような細胞膜の脂質分子の配向の乱れや、ダイナミクスの変化を SHG アッセイで検出した[1,2]。そこで、細胞膜の分子配向が乱れた細胞が、その乱れを回復させる過程を SHG アッセイで観察し、膜構造修復機構を解明することを目的とした。

【方法】分子超分極率が大きい蛍光性両親媒性色素で細胞膜を染色し、波長 850nm でパルス幅約 100fs の励起光を用いて、SHG 像と二光子励起蛍光(TPF)像を撮像した。それぞれの 3D 像の積分強度(I_{SHG} , I_{TPF})の比(I_{SHG}/I_{TPF})が、低いほど分子配向が乱れていると評価した。カチオン性のトランスフェクション剤である直鎖型ポリエチレンイミン(PEI)を添加した FBS 不含培地を HeLa 細胞に 1h 曝して膜構造を乱した後、増殖培地(5% FBS)に入れ替え、SHG アッセイを行った。なお、アッセイを行う時点で細胞膜を染色して、SHG 像と TPF 像を撮像し、 I_{SHG}/I_{TPF} 値を求めた。

【結果】1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の直鎖型 PEI に 1h 曝すと、 I_{SHG}/I_{TPF} 値は 1.02 から 0.56 に低下した。SHG 像から、その強度が低下している (Fig.2a, b)ため、分子配向が乱れていることが分かる。その後、増殖培地に入れ替え、18h 培養したら I_{SHG}/I_{TPF} 値が 1.07 まで上昇し、SHG 像からもその強度が回復していることが分かる (Fig.2c)。従って、乱れた膜構造が回復することが分かった。直鎖型 PEI の他に、分岐型 PEI や膜透過性ペプチドであるアルギニン 10 量体により乱された細胞膜構造の回復についても評価して、それぞれの違いについて議論する。

[1] N. Kato, Biophysical Reviews 11 (2019) 399-408.

[2] E. Aiyama, N. Kato, J. Phys. Chem. B 128 (2024) 1680-1688.

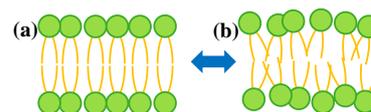


Fig. 1 (a) Ordered and (b) disordered structure in the plasma membrane.

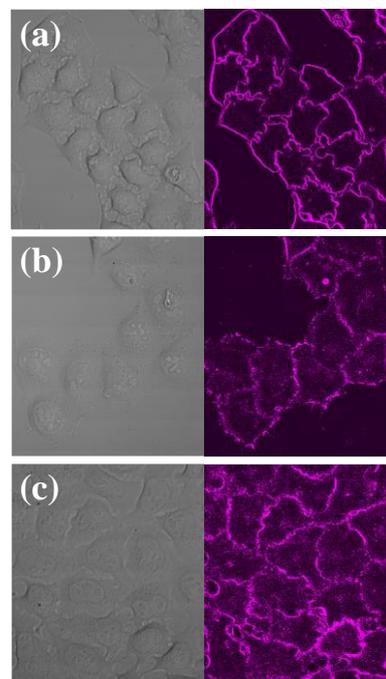


Fig. 2 Bright field and SHG images of the HeLa cells (a) before and (b) after the 1h-exposure of the linear PEI containing medium to the cells. (c) Bright field and SHG images of the cells cultured in the growth medium for 18h after perturbing their membranes by the 1h-exposure of the linear PEI.