脂質膜の形態形成メカニズムの理解にむけて

菱田 真史

(京都大学 理学研究科 物理学第一教室)

Towards the Understanding of Lipid Membrane Formation

Mafumi Hishida

Department of Physics, Kyoto University

ABSTRACT

How can we understand the formation mechanism of various morphologies of biomembrane? We are trying to understand the formation mechanism from the view point of soft matter physics, i.e., from physical properties of lipid assembly. We have especially studied the mechanism of giant vesicles formation from the lipid film by means of time-resolved Small-Angle X-ray Scattering, and the results suggest that the morphologies of lipid membrane strongly depend on the kinetics of the formation process. Thus, the observation of formation kinetics of various membrane morphologies should become more important to understand the biomembrane formation from soft matter physics. For observing the kinetics of membrane self-assembly, time-resolved measurements of Small-Angle Neutron Scattering and Neutron Spin Echo spectroscopy will make a significant contribution and will shed light on the various morphologies of biomembrane.

Keywords: *Soft matter physics, Biophysics, Lipid membrane, SAXS, SANS, NSE*

1. はじめに

1.1. 生体膜とソフトマター

生命は等温で非平衡条件をうまく利用しながら活動を行っており、その理解は生物学にとどまらず、物理学においても重要な課題となっている。中でも細胞や細胞内オルガネラの形態形成は重要な問題の一つである。これらの形態を決めている生体膜は基本的にリン脂質と呼ばれる両親媒性分子が親水基頭部を外側に、疎水鎖を内側に向けるようにして二重膜を形成することにより成り立っている。生体中の膜形態はひとつにはタンパク質が膜に作用して決定しているといわれているが、一方で脂質の物理的性質の重要性も指摘されており、膜の形態形成メカニズムを明らかにするためにはソフトマター物理学的視点から脂質膜の形態形成に迫ることが不可欠である。

リン脂質をはじめとするソフトマターを研究する上で重要な特徴は分子スケールの構造とマクロな構造との間にミセルや二重膜のような数〜数百 nm スケールの中間階層構造をもち、それがマクロな物性に大きな影響を与えるということである。さらに自己組織化によりこれらの中間階層構造が形成するための相互作用は van der Waals 相互作用や疎水性相互作用といった熱揺らぎ $k_B T$ 程度の相互作用であるため、温度や溶媒などの環境のわずかな変化によりその自己組織化構造は劇的に変化

する。そこでこういった構造の観測には数 Å〜数百 nm スケールの観測に適し、また溶液中でのその場観測が可能な X 線小角散乱や中性子小角散乱が威力を発揮する。

1.2. リン脂質ジャイアントベシクル

リン脂質分子は一般的に、水中に溶かしたただけで二重膜構造を形成することが知られているが、リン脂質をただ水中に分散させただけではマルチラメラ構造と呼ばれる膜小胞が何重にも入れ子状に重なった玉ねぎ状の構造（だいたい数百 nm 程度）が形成される。これはリン脂質-水の系での熱力学的に安定な構造がマルチラメラ構造であることを示している。では生体膜に見られるような μm スケールで単層の小胞構造（ジャイアントベシクル、細胞サイズリポソーム）はどのように効率的に形成されるのか。言い換えると、脂質膜構造はいかにジャイアントベシクルという準安定な状態にトラップされ得るのか。我々はこれまでとくにこのジャイアントベシクルの形成メカニズムに注目して研究を行ってきた。

中でも注目したのが「静置水和法」と呼ばれる、古くから経験的に知られていたジャイアントベシクル形成法である[1]。この方法は、あらかじめ基板上にリン脂質 dry film を作成しておき、それを水和することで自発的にジャイアントベシクルが

Fig.1 Phospholipid dry films observed by atomic force microscopy. (a) Liquid-crystalline phase (DOPC at room temperature), (b) Gel phase (DPPC at room temperature).

形成されるというものである。この方法はジャイアントベシクルを細胞モデルとして利用しようとするような応用科学的な研究でもよく用いられる方法であり[2], そのメカニズムを理解することは、いかにして脂質膜が決まった構造を効率的に形成しているのかというメカニズムの理解だけでなく、どのような条件で最も効率的にジャイアントベシクルが形成できるかといった応用に向けた技術的示唆も可能にするものである。

我々のこれまでの研究では特に、静置水和法によってジャイアントベシクルを形成する際の初期状態であるリン脂質 dry film の nm~ μ m の構造と、それが水和されたときのジャイアントベシクルへの構造変化のキネティクスを、顕微鏡および時分割 X 線小角散乱を用いて観測することによりこのメカニズムに迫ってきた。

2. ジャイアントベシクルの形成メカニズム

我々はまず、静置水和法によりジャイアントベシクルを形成する際の初期状態であるリン脂質 dry film の構造の観測を位相差顕微鏡および原子間力顕微鏡、さらに X 線反射率測定を用いて行った[3,4]。その結果、脂質のアシル鎖が融解し膜内で分子の流動性のある液晶相では、dry film は μ m スケールで膜面が平滑なテラス状の積層膜構造が、反対にアシル鎖が結晶化したゲル相では激しい凸凹が見られることを見出した (Fig.1)。またこれらの dry film の構造が水和によるジャイアントベシクルの形成効率に関与しており、テラス構造を作ることがジャイアントベシクル形成に重要であることを見出した。

さらに続いて、これらのリン脂質 dry film が水和された時、基板上的積層膜がどのようにジャイアントベシクルに構造転移していくのかを時分割 X 線小角散乱を用いて観測した[5]。この転移過程は秒単位での観測が必要であるため、十分な X 線強度が得られるよう放射光 X 線 (SPring-8, BL40B2) を用いて実験を行った。実験は専用の特殊なセルを作製することで、基板上に積層した膜の挙動を追った。観測は乾燥状態から始め、film がバルク水に浸って十分に時間がたちほとんど信号が見えなくなるまで測定を続けた。

脂質が液晶相で dry film がテラス構造をとる場合の実験結果を Fig.2 に示す。十分に時間がたつと基板上的積層膜からくる Bragg ピークが消滅し、膜がほぼ剥がれていることが分かる。このときジ

Fig.2 Time-resolved small-angle X-ray scattering profiles of hydrated stack of lipid bilayers. Three stages of the hydration kinetics are observed: (a) water penetration between bilayers reduces the peak intensity, (b) the peak position shift to lower- q and the peak intensity recovers, and (c) the peak position is constant but the intensity decreases monotonically.

Fig.3 The hydration process of stacked lipid bilayers. (a) Soon after the hydration, water molecules penetrate between bilayers. (b) The lipid stack swells to a quasi-stable state. (c) The bilayers gradually peel off from the outermost layer and become giant vesicles.

ャイアントベシクルが形成されていることも確認された。とくにこの実験結果で興味深いのは、ジャイアントベシクルが形成するまでの水和過程が 3 段階のキネティクスを経て進むということである。Bragg ピークの位置から膜間距離を、強度や幅からその秩序度や積層枚数を見積もることにより、その 3 段階のキネティクスの解析を行うと、この水和過程は

- (a) 膜間への水の浸透
- (b) 膜間が膨潤し、一定の膜間距離を保ちつつ積層したままという準安定構造へと緩和
- (c) 膜が徐々に剥離していく

というように進むことが明らかになった。水和過程の模式図を Fig.3 に示す。とくに重要なのは、水和後も基板上に積層したままの膜の状態が比較的長い時間準安定に存在し、膜の剥離が最外膜からのみ(もちろん理想的にはであるが)おこっているということである。これによって一枚ずつ膜がはがれて、さらに膜の端は水中で不安定なのでそれが閉じることで単層のジ

ジャイアントベシクルとなるのである。

さらに我々はここで観測された脂質膜の剥離現象を、膜同士に働く相互作用を考慮したモデルを立てることで説明を行った。そこで示唆されたことは、この剥離現象を大きく支配しているのが「熱揺らぎによる膜の波うちダイナミクス」[6]であるということである。つまり波打ち運動により隣り同士の膜がぶつかり合い、それによって実効的に μm スケールまで働くような大きな斥力が膜を剥がすということがわかった。

脂質がゲル相をとる場合にも同様の観測を行ったところ、Fig.1 (b)に示すようなラフな Film が水和された時は、膜間に水が浸透し膨潤する過程は観測されるが液晶相の時に見られたような膜の剥離過程は観測されないということがわかった。これはゲル相の dry film を水和してもジャイアントベシクルが形成しないという事実ともよくあう結果である。液晶相と同様にモデルによる議論を行ったことでわかったのは、ゲル相ではアシル鎖の結晶化により膜が硬いため、熱揺らぎによる波打ちの効果が小さく、膜が剥離するのに十分な斥力が働かないということであった。

本研究では積層膜からジャイアントベシクルへの構造転移のメカニズムを形成過程のキネティクスから迫ったが、そこからわかるのは、ジャイアントベシクルが効率的に形成されるのには、初期状態である dry film のテラス構造と水和された時に一枚ずつ膜が剥がれるというキネティクスが重要であるということである。

このメカニズムの理解は、より効率的にジャイアントベシクルを形成する方法の提案へと発展する。つまりテラス状に形成した脂質膜の膜間に塩や糖を含有させておき、それを純水で水和することで最外膜に大きな浸透圧を誘起できる。それが膜の波打ちによる斥力と合わさることで、より十分に最外膜をひき剥がす力となって、ジャイアントベシクルが効率的に形成されるだろうというものである。実際に塩を用いて研究を行った結果、塩がない場合にはジャイアントベシクルはある程度多重膜のベシクルも混ざって形成されるが、塩の含有下ではほとんど単層のものばかりが形成されるということがわかった[7]。本方法はジャイアントベシクルを細胞モデルとして使用するような研究に大変有用であろう。

3. 今後に向けて

3.1. 脂質膜の形態形成メカニズム

これまでの研究により、リン脂質ジャイアントベシクルといった“準安定状態に強く束縛された構造”が形成するメカニズムの理解には、「初期構造」の決定と「構造形成の緩和挙動」の理解が重要であることがわかる。しかしこれまでの脂質膜に関する研究は平衡状態に関するものが多く、非平衡な構造形成キネティクスに関してはまだまだ理解されていない部分が多い。

しかし、実際の生体中においても様々な脂質膜

形態は非平衡な条件のもとで形成されていることを考えると、上のような発想は多くの場合に適用でき、脂質膜の構造形成をその形成過程のキネティクスに注目して研究を行うという視点は今後より重要となってくると考えられる。私は今後、この発想を発展させることで、ジャイアントベシクルだけでなく脂質膜系でみられる様々な膜形態の形成メカニズムに迫っていきたい。さらにこれまでの研究で示唆されたように、膜の形態形成キネティクスは膜の波打ちなど熱揺らぎによるダイナミクスに支配されている。より原理的に脂質膜の形態形成をキネティクスから理解するには、熱揺らぎ等による膜のダイナミクスがどのように全体の形態形成キネティクスを支配しているのかを理解することも重要である。

とくに実際の生体膜では数千もの脂質分子が混合することで膜を形成していることが知られ、さらに組織によっては特異的にある脂質が濃縮されていることも知られている。このことから脂質分子の化学種がその膜の形態形成に重要であるということが主に分子生物学の分野から指摘されている。そこで、これまでにわれわれが行ってきた一成分だけでできた膜の形態形成だけでなく、複数の脂質がある場合にはどのようにそれぞれの脂質が役割を果たしながら膜の形態形成が行われるのかということを、平衡構造と非平衡な形態形成キネティクス両面から明らかにしていくことは、ソフトマター物理学から実際の生体膜に迫っていく上で不可欠なステップだと言えよう。こういったステップを積み重ねることで将来的には例えばミトコンドリア内膜のような構造が特異的な脂質の集積により生まれるのか、なぜ細胞は基本的に μm サイズなのかといった命題にチャレンジしていきたいと考えている。

たとえば私が最近注目しているのは脂質膜の内膜外膜非対称性である。複数の脂質を混合した際に自発的に形成される二重膜では、ベシクルが数十 nm スケールの小さなものであったり、それぞれの脂質の物理化学的な性質が極めて大きく異なったりしない限り、内膜と外膜の脂質組成は同じになる。一方で生体膜では二重膜の内膜と外膜で脂質組成が異なっており、それによりうまく膜環境を作りだしている。生体中ではこの準安定状態と思われる非対称性をフリッパーゼなどのタンパク質を使って制御していることが分かっている。しかし一方でこの非対称性は、脂質膜の物性として自発的に生まれることはないのだろうか、またはジャイアントベシクルなどの人工膜上において作り出すことはできるのだろうか。非対称膜の形態形成キネティクスに注目することで、非対称性における脂質膜の物理的性質の重要性を明らかにできると期待している。

3.2. 中性子の利用

われわれはこれまでX線を用いた時分割測定により膜構造の形成キネティクスを観測してきた。

これは放射光による強度の強いX線を利用することで可能になったものであるが、一方で試料をX線向きに調整（一種類の脂質のみを用いて作成）する必要があった。これはX線では電子密度分布しか測れないため、わずかに化学種の異なる脂質分子を見分けることができない為である。一方、脂質分子や溶媒を重水素化することで任意にコントラストをつけて観測の行える中性子散乱は、X線が白黒写真なのに対してカラー写真であるといえよう。つまり中性子散乱を用いれば、X線散乱では不可能であった、複数の脂質分子が存在するときにそれぞれの脂質がどのようなキネティクスを見せるのか、またそれによって膜全体のキネティクスが一成分の時とどのように変化するかといった、より実際の生体膜に近い環境での脂質膜の形態形成キネティクスを観測することができる

と期待される。

もっとも現時点では我々がこれまでに行ってきたような数秒程度の時分割測定を中性子で行うことは強度の問題があつて難しい。そこでまずは比較的遅いキネティクスの観測に焦点を当てていくべきである。たとえば最近京都大学の中野らは、時分割中性子小角散乱を用いることにより、脂質二重膜の内膜と外膜での脂質分子の入れ替わりのキネティクスを観測している[8]。これはこのキネティクスが数分から数十分かかる遅いものであるため可能となっている。将来的には大強度中性子源と装置開発によってこれまでに行ってきたような早いキネティクスまで観測したいというのが我々の夢である。

また、熱揺らぎによるダイナミクスと形態形成キネティクスの関係を探るには中性子スピネコーを用いるのがよい。大強度中性子源の発展によりスピネコーも時分割で行えるようになれば、非平衡な形態形成の過程において熱揺らぎダイナミクスがどう変化していくのか、それがどう形態形成に影響を及ぼすのか明らかにできるだろう。

4. おわりに

脂質膜にとどまらず、DNAやタンパク質などの生体分子や界面活性剤、高分子といったソフトマターは固体とは異なり数～数百 nm スケールでミセルや膜といった中間階層構造をもつため、一般的に平衡構造に緩和するのが非常に遅く、数日以上かかることも多い。これは、こういった物質においてもジャイアントベシクルのように非平衡な過程で準安定状態に強くトラップされた構造が多く存在するであろうということを示唆している。しかし、これらソフトマターの研究はまだ歴史が浅く、多くは平衡状態の理解にとどまっている。こういった準安定構造の形成メカニズムを明らかにするにあたってはその形成キネティクスを理解することが重要である。そこで今後はより一層キネティクスの観測に対する重要性が増してくるだろう。その中で、重水素化によるコントラスト法をうまく利用した時分割中性子小角散乱や、

熱揺らぎによる超分子のダイナミクスを観測できる中性子スピネコー法は、他ではできないような新しい現象の観測に役立つと期待される。

謝辞

本研究は京都大学理学研究科の吉川研一教授、および高エネルギー加速器研究機構の瀬戸秀紀教授のご指導のもとで行ってまいりました。その他多くの方に関わっていただきました。ここに厚くお礼申し上げます。また本研究は日本学術振興会科学研究費補助金（特別研究員奨励費 19・2774）のご支援のもと行われました。

参考文献

- [1] A. D. Bangham, M. M. Standish and J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.* **13**, 238 (1965).
- [2] S-i. M. Nomura, K. Tsumoto, T. Hamada, K. Akiyoshi, Y. Nakatani, and K. Yoshikawa, *ChemBioChem*, **4**, 1172 (2003).
- [3] M. Hishida, H. Seto and K. Yoshikawa, *Chem. Phys. Lett.* **411**, 267 (2005).
- [4] M. Hishida, H. Seto, P. Kaewsaiha, H. Matsuoka and K. Yoshikawa, *Colloid Surf. A*, **284-285**, 444 (2006).
- [5] M. Hishida, H. Seto, N. L. Yamada and K. Yoshikawa, *Chem. Phys. Lett.* **455**, 297 (2008).
- [6] W. Helfrich, *Z. Naturforsch.* **33a**, 305 (1978).
- [7] N. L. Yamada, M. Hishida, H. Seto, K. Tsumoto and T. Yoshimura, *Europhys. Lett.* **80**, 48002 (2007).
- [8] M. Nakano, M. Fukuda, T. Kudo, H. Endo and T. Handa, *Phys. Rev. Lett.* **98**, 238101 (2007).