界面活性剤膜の厚み揺らぎ

長尾 道弘, 埜和 卓親*

(インディアナ大学物理学科, オクラホマ大学航空機械工学科*)

Thickness Fluctuations in Surfactant Bilayers

Michihiro Nagao and Takumi Hawa*

Department of Physics, Indiana University and

School of Aerospace and Mechanical Engineering, University of Oklahoma*

ABSTRACT

Surfactant bilayers experience thickness fluctuations even when the bilayer is swollen by small amount of solvent. Neutron scattering experiments reveal the characteristic features of the fluctuations. Neutron spin echo (NSE) in particular gives information about time scales of the motion and the fluctuation amplitude. Calculations using a simple computer model suggest that the static parameters, such as fluctuation amplitude, are measurable from small-angle scattering (SAS) data. Combination of SAS, NSE, and computer model provides essential knowledge on the bilayer dynamics. Calculations based on deformation free energy model of elastic membranes prove the feasibility of the scattering experiments and the computer model.

Keywords: *surfactant membrane, dynamics, small-angle scattering, neutron spin echo, computer simulation, deformation free energy*

1. はじめに

両親媒性分子は水及び油への相溶性から自然界に限らず工業的にも幅広く利用される。両親媒性分子は水、油界面に吸着し、界面膜となって様々な自発構造を形成する。本稿では界面活性剤分子が水中で形成する二分子膜に着目する。二分子膜は水中でベシクルやラメラ構造などを形成する。これらの構造形成においては膜弾性エネルギーが重要と考えられており、1970年代のHelfrichによる弾性エネルギーモデルによって構造形成が説明される[1]。膜の単位面積当りの弾性エネルギーは $f = \kappa(C_1 + C_2 - 2C_0)/2 + \bar{\kappa}C_1C_2$ で表され、特徴的な弾性定数 κ と $\bar{\kappa}$ が得られる。これらは曲げ弾性定数とサドルスプレイ弾性定数である。 C_1 と C_2 は膜の二つの主曲率、 C_0 は膜の自発曲率である。中性子散乱法は、これら膜の弾性モデルに重要な定数の決定に利用され、特に中性子スピネコー(NSE)法は κ と $\bar{\kappa}$ の決定に利用される[2,3]。しかし、Helfrich modelは、膜を厚みの無い弾性体として取り扱っており、膜の内部構造の議論には適さない。

一方で、細胞膜の主成分であるリン脂質膜の研究では、脂質膜と膜タンパク質の相互作用が機能に重要であると考えられている。しかしながら、そのミクロスコピックな議論の多くは静的な描像に基づいている。Huangを初めとする膜の変形自

由エネルギーモデル[4-7]の発展も相まって膜タンパク質の機能発現と膜の変形に深い関わりがあることが指摘されている[8]。近年では、局所的な膜の平衡構造とその運動が新たな研究対象として議論可能になってきた。

中性子小角散乱(SANS)はタンパク質や膜の構成成分のスケールを調べるのに適しており、膜内構造の観測が可能である。一方NSEは、これらの長さのスケールでの運動状態を調べることが出来る。NSEはこれまでも膜の曲げ運動の観測に利用されてきた。一方で、より局所的な構造の協同運動については、ほとんど議論が行われていない。第2節では局所的な界面活性剤分子の協同運動の一例として界面活性剤二分子膜及び少量の油によって膨潤された擬二分子膜における厚み揺らぎについて紹介する[9-11]。

コンピュータシミュレーション技術はこれらのスケールでのモデル計算を可能にし、膜の曲げ運動や厚み揺らぎについての議論が行われる[12]。我々のNSE実験結果の議論においても、コンピュータシミュレーションによる解析が、実験及び解釈に正当性を与えた[10]。第3節では、簡単な膜の運動をコンピュータモデルで計算することにより、SANSデータから運動に関わるパラメータを推量する可能性を紹介する[13,14]。

Fig. 1 q -dependence of Γ/q^3 observed by NSE together with $I(q)$ observed by SANS. The solid curve is the fit to a Lorentzian, dashed vertical line shows the position of dip in SANS and peak in NSE data, and the horizontal line shows the contribution of bending to Γ/q^3 . Error bars represent ± 1 standard deviation.

第4節では Huang の提唱した変形自由エネルギーモデル[4]を用いたエネルギー計算の結果、膜の厚み揺らぎが変形自由エネルギーモデルで説明できることを紹介し[15], 第5節で本稿をまとめる。

2. 非イオン界面活性剤膜の厚み揺らぎ観測

NSE による厚み揺らぎの観測は 90 年代半ばの Farago らの実験に遡る[16]. 水で膨潤した SDS 及びプロパノールの擬二分子膜は油中でラメラ構造を形成し、膜に垂直な方向への散乱に膜厚のスケールで単純な拡散では説明出来ない余剰運動項が見られ、膜厚の揺らぎと解釈された[16]. この研究の発展として、我々は少量の油によって膨潤されたポリオキシエチレン系非イオン界面活性剤の擬二分子膜の水中での運動を、膨潤度を変えながら測定した. 膜厚を無視した一枚膜の曲げ揺らぎモデル[17]によって NSE から得られた中間相関関数を解析した結果、膜厚のスケールにおける余剰運動項が Fig. 1 のように観測された. 縦軸は中間相関関数の緩和曲線から得られる緩和係数 Γ を運動量遷移 q の 3 乗で割った値、横軸は q である. 一枚膜の曲げ運動モデルは Γ/q^3 が q に対して一定値を示すのに対し、このデータは明らかなずれを示す. このずれは、丁度 SANS データの極小が現れる q で極大となる. この結果は、膜厚のスケールで曲げ運動では説明できない運動が表れることを示しており、膜厚の揺らぎとして解釈できる. Fig. 1 の Γ/q^3 のピーク高さは緩和時間に、ピークの広がり揺らぎの振幅に対応すると考えられる[10]. このような余剰運動項は散乱コントラストによらずに見られること[11], 脂質二分子膜にも現れること[18]が確認され、膜厚揺らぎは二分子膜で一般的に見られる現象と考えられる.

次に、膨潤度を変えながら同様の測定を行ったところ、 Γ/q^3 のピーク位置は膨潤度（膜厚）の増加とともに低 q 側へシフトし、膜厚と NSE シグナルの相関関係がうまく説明できる. Fig. 2 には揺

Fig. 2 Bilayer thickness d_m dependence of thickness fluctuation relaxation time τ and its amplitude a . Solid line shows the phenomenological relationship between the fluctuation amplitude and the bilayer thickness (see section 3 in the main text) and dashed line is the guide to the eyes.

Fig. 3 Thickness fluctuation relaxation time, τ , normalized to the solvent viscosity, η . The values are also normalized to the value at $T = 29^\circ\text{C}$. The deviation is within 5 % when oil viscosity is used as η , while in 10 % when water viscosity is used.

らぎの緩和時間 τ と揺らぎの振幅 a を膜厚 d_m に対してプロットした. τ は厚みの増加とともに大きくなり、無膨潤の二分子膜では数 ns の緩和時間だったものが厚みの増加とともに 100ns のオーダーで上昇した. 一方、 a は d_m に対してほぼ線形に増加し、およそ膜厚の 10% 程度となった. 厚み揺らぎの振幅はコンピュータシミュレーションによる解析結果と良く一致し、ここで観測された余剰運動が膜厚の揺らぎであることが確認された[10].

一般に界面活性剤膜の運動は溶媒の粘性によって減衰する. 例えば、曲げ弾性運動の緩和時間は溶媒粘度に逆比例する. そこで、厚み揺らぎの緩和時間と溶媒粘度の関係を理解するために、厚み揺らぎの温度依存性を調べた[11]. 温度下降による厚み揺らぎのパラメータは τ を除いてほとんど変化しない. Fig. 3 は温度 29°C で規格化した、 τ と溶媒粘度 η の比の温度依存性である. η として D_2O の粘度を考慮した場合、温度下降とともに τ/η は減少する. 一方、 η として膜内の油の粘度を考慮した場合、 τ/η は 5% の範囲内でほぼ一定となる. すなわち、膜厚揺らぎの緩和時間の決定要因として膜外より膜内の溶媒粘度効果が重要であること、従って、厚み揺らぎを特徴づける物理量は膜内の相互作用や流体力学に依存する.

Fig. 4 Fluctuation amplitude, a , dependence of SANS profiles based on the computer model calculation. The dip position, q_{dip} , does not shift much with increasing a , while the peak position q_{peak} shifts to lower q . Here the bilayer thickness, d_m , is fixed at 10 nm. The bilayer dimension and the wavelength of the fluctuation are assumed to be 500 nm and 5 nm, respectively.

以上のように、NSE は界面活性剤膜の曲げ運動のみならず、膜内の運動、ここでは厚み揺らぎ、について詳細に調べることが可能である。ただし、現在のところ NSE データの解析は現象論的な取り扱いにすぎない。本稿の後半では厚み揺らぎが従う膜の変形自由エネルギーモデルの議論を紹介するが、NSE データ解析と理論的な考察は今後の研究を待たなければならない。

3. 膜厚揺らぎのコンピュータモデルによる解釈

一般的に形状因子の計算では、形状揺らぎを形状多分散性として考慮し、動的な描像として解釈されることは少ない。このため、構造スケールの分布は考慮されるが、運動との関連性についてはあまり検討されてこなかった。そこで、界面活性剤膜の揺らぎを例にとり、形状因子に対する運動の影響を簡単なコンピュータモデルを用いて検討した。ここでは、膜が正弦波的な揺らぎを示す場合の、いわゆる film contrast に対して見られる影響を解析した。

まず正弦波の振幅 a と波長 λ を一定にして膜厚 d_m だけを変化させた場合に計算される $I(q)$ の変化を観測した。 d_m を増大させると形状因子からくる散乱の極大 q_{peak} と極小 q_{dip} の両方が低 q 側へシフトした。一方、 d_m と λ を一定にして a だけを変化させた場合、 Fig. 4 に見られるように a の増大によって q_{peak} は低 q シフトするが、 q_{dip} はほとんど変化しない。また、 λ を変化させても q_{dip} は変わらない。これらの結果から膜厚の推定には q_{dip} を使用するのが有効であると言える。

二分子膜に平行な方向と q ベクトルのなす角を θ とする。特異的な配向の無いラメラ膜を考えると、 q ベクトルは全ての方向から均一にサンプリングされる。その場合、平均の膜厚は $d_m = 2\pi \sin\theta_{\text{ave}}/q_{\text{dip}}$ と表される。 θ_{ave} は θ の平均角度で約 32.7 度であると計算できる[13]。過去の二分子膜の小角散乱等の観測データを基に膜厚を解析したところ、この式が妥当である事がわかった[13]。

次に、 λ が短い ($\lambda/d_m < 1$) 場合の a を q_{peak} から求める事を試みた。まず二分子膜が揺らぎのない

二枚の平行平面であるとした場合、 q_{peak} と q_{dip} の比が約 1.65 になる事が計算データから読み取れた。この値を基準に振幅の増減によるこの比の変化率を観測したところ、以下の経験則が成り立つ。

$$a \approx \left(\frac{1 - 0.61\hat{q}}{15} \right)^{0.426} d_m \quad (1)$$

ここで、 $\hat{q} = q_{\text{peak}}/q_{\text{dip}}$ である。 Fig. 2 の直線はこの経験則による計算結果である。ここで紹介した SANS データから得られた $\hat{q}$ はおよそ 1.4 であった。ただし、膜厚 $d_m = 3.1 \text{ nm}$ の二分子膜では、散乱コントラストが十分でないために、 q_{dip} や q_{peak} が計測不能で、ここでの理論的な枠組みから外れる。そのため、このデータ点は除いた。図から明らかにように、この経験則は厚み揺らぎの振幅を良く見積もっている。

このように SANS データは熱揺らぎの結果が構造に与える影響を含んだ情報として処理することが出来る。これらは一般に多分散性として処理されるが、多分散性の詳細な理解は系の運動状態を理解する上での基本情報であり、散乱理論モデルやコンピュータによる計算と小角散乱及び NSE を組み合わせることにより、より深い系の理解が可能であることを示す好例である。

Fig. 5 Estimated values of thickness compressibility modulus $\bar{B}$ and the thickness fluctuation wavelength λ . The values for $d_m \approx 3 \text{ nm}$ is to the pure bilayer and the others for the oil swollen bilayers. Lines are the guides to the eyes.

4. 厚み揺らぎと変形自由エネルギー

脂質二重膜にタンパク質を埋め込む問題はその生物物理化学的観点から広く研究されている。1986 年に Huang が示した変形自由エネルギーはスメクティック A 液晶の弾性エネルギーモデルを脂質膜の弾性モデルに拡張し、タンパク質の挿入による膜の変形を記述する[4]。単位膜面積当りの自由エネルギー f_{def} は

$$f_{\text{def}} = \bar{B} \frac{u^2}{h} + \frac{\kappa}{2} \left(\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} \right)^2 + \gamma \left[\left(\frac{\partial u}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\partial u}{\partial y} \right)^2 \right] \quad (2)$$

で表される。第一項は膜の圧縮拡張に伴う変形を表し $\bar{B}$ は膜の圧縮弾性率である。第二項は膜内部広がり (splay) によるエネルギー損失を表す。splay 弾性率と曲げ弾性率の関係から係数に κ が現れる。第三項は界面エネルギー変化に対応し表面張力 γ を係数とする。膜の変形は u で表され、 h は膜厚の 1/2 である。この変形自由エネルギーに基づき、厚み揺らぎの振幅が膜の弾性定数を用いて表され

る[4]. 我々の実験結果から得られた厚み揺らぎの振幅をこのモデルと比較することにより, 膜の圧縮弾性率 $\bar{B}$ を決定した[15]. Fig. 5 は得られた $\bar{B}$ の厚み依存性を示している. ここで, κ は NSE 実験から, h は SANS 実験から求められており, γ は文献値を用いた[19]. 無膨潤の二重膜では $\bar{B} = (1.6 \pm 0.7) \times 10^7 \text{ N/m}^2$ が得られ, 文献値 $3 \times 10^6 \text{ N/m}^2$ [20] と比較可能である. 一方, 膨潤膜では膜の圧縮弾性率が厚みに依存して小さくなることわかる. このように, 厚み揺らぎを詳細に調べることでより膜の圧縮弾性率を求めることが出来る.

一方, 厚み揺らぎに伴う変形は膜面内では変形中心から等方的に伝播するため, (2)式をシリンダー座標系に変換し, 変形 u を書き直す. Movileanu ら[7]のように自由エネルギーを書き下せば, 変形自由エネルギーの解析的な表式が得られる[15]. 面内の変形サイズが厚み揺らぎの波長に対応すると仮定すると, 変形自由エネルギーを最小化する厚み揺らぎの波長が計算できる[15]. 得られた揺らぎの波長 λ は Fig. 5 に示したように, 二重膜では 10 nm 程度, 膨潤膜では 20 nm 程度となり, 無膨潤の二重膜と膨潤膜とでは厚み揺らぎの波長に違いが表れる. より圧縮されやすい膨潤膜は, 溶媒が膜内に侵入することにより揺らぎの波長を大きくしていると考えられる. エネルギーの表式(2)に立ち返れば, 圧縮されやすい膜は圧縮拡張項が小さくなり splay 変形項が主要因となる. すなわち, splay 変形は波長の小さな厚み揺らぎを制限する. 一方, 圧縮拡張項は大きな波長を制限する. そのバランスが λ の決定要因である[15]. さらに, 膜の圧縮弾性率が油の混入によって変化したように, 膜への物質の混入は膜の弾性的な性質を変化させ, 揺らぎの性質に影響を及ぼす. このことは, 例えば細胞膜中のタンパク質の効果を理解する上で重要であると考えられる. また油による膨潤膜の場合には, 2 節で紹介したように膜内の流体力学も大切であり, この点も考慮して今後の理論的枠組みを構築する必要がある.

5. おわりに

本稿では, 界面活性剤膜の厚み揺らぎを SANS 及び NSE により観測した結果を基に, コンピュータモデルによる解析や理論モデルとの整合性を調べた結果を紹介した. 界面活性剤分子の協同運動が膜の弾性的性質と密接に関連することを改めて理解するとともに, 局所的な協同運動の観測が運動の振幅や波長あるいは弾性定数等, より多くの情報を提供可能であることを示した. 本稿では割愛したが, 脂質二重膜の場合の厚み揺らぎの緩和時間は 100 ns のオーダーであることが観測され[18], より高分解能な測定が不可欠となっている. ナノ秒付近で見られる平衡運動は, より長時間で発達する動的な現象との関連も考えられ, 興味深い研究対象である. 本稿が今後の研究発展のアイディアに結びつくこととなれば幸いである.

謝辞

コンピュータシミュレーションは S. Chawang 氏と, 小角散乱のモデル計算は V. Lee 氏と, 自由エネルギー計算は R. Ashkar 氏との共同研究である. P. Butler 氏の実験や議論への協力, 瀬戸秀紀氏の助言や激励, さらに, M. Watson 氏及び R. Bradbury 氏との有益な議論に感謝申し上げる.

参考文献

- [1] W. Helfrich, Z. Naturforsch C28, 693 (1973).
- [2] T. Takeda et al., J. Phys. Chem. Sol. 60, 1375 (1999).
- [3] O. Holderer et al., Soft Matter 9, 2308 (2013).
- [4] H.W. Huang, Biophys. J. 50, 1061 (1986).
- [5] P. Helfrich and E. Jakobsson, Biophys. J. 57, 1075 (1990).
- [6] C. Nielsen et al., Biophys. J. 74, 1966 (1998).
- [7] L. Movileanu et al., Bull. Math. Biology 68, 1231 (2006).
- [8] R. Phillips et al., Nature 459, 379 (2009).
- [9] M. Nagao, Phys. Rev. E 80, 031606 (2009).
- [10] M. Nagao et al., Soft Matter 7, 6598 (2011).
- [11] M. Nagao, J. Chem. Phys. 135, 074704 (2011).
- [12] E. Lindahl and O. Edholm, Biophys. J. 79, 426 (2000).
- [13] V. Lee and T. Hawa, J. Chem. Phys. 139, 124905 (2013).
- [14] V. Lee and T. Hawa, submitted.
- [15] M. Nagao and R. Ashkar, in preparation.
- [16] B. Farago et al., Physica B 213&214, 712 (1995); B. Farago, Physica B 226, 51 (1996).
- [17] A.G. Zilman and R. Granek, Phys. Rev. Lett. 77, 4788 (1996).
- [18] A.C. Woodka et al. Phys. Rev. Lett. 109, 058102 (2012).
- [19] S.B. Hladky and D.W. Gruen, Biophys. J. 38, 251 (1982).
- [20] P. Oswald and M. Allain, J. Physique 46, 831 (1985).