

氏 名	吉 田 一 也		
学位(専攻分野)	博士(理学)		
学位記番号	博理理甲 第27号		
学位授与の日付	2015年3月7日		
学位授与の要件	学位規則(昭和28年4月1日文部省令第9号) 第4条第1項該当		
学位論文題目	モデル生体膜挙動に対する機能性分子の作用の 物理学的理解		
論文審査委員	主 査 教 授	西 尾	泉
	副 査 教 授	宮 野	雅 司
	副 査 教 授	阿 部	文 快
	副 査	北陸先端科学技術大学院大学准教授 濱 田 勉	

論文内容の要旨

吉 田 一 也

細胞膜に代表される生体膜は、我々生物が生きていく上で重要な存在である。その生体膜は主に、疎水鎖と親水基を持つリン脂質が二重膜を形成し、その中にタンパク質やその他の分子が入り込んでいるような構造をとっており、エンドサイトーシスやエキソサイトーシスなどの膜形態の変化を伴う小胞輸送なども、生体膜の重要な役割である。それに加えて生体膜は、脂質ラフトと呼ばれる一種の相分離ドメインを有し、そのラフトがさまざまな生理現象において、重要な役割を果たしているのではないかと考えられている。

そのような生体膜の性質を調べるために、リン脂質の二重膜で構成されるリポソームが最も単純なモデル系として用いられ、その中でも光学顕微鏡で観察できるような巨大リポソームは、膜の状態の直接観察が可能のため、よく用いられている。また、数種類の脂質を用いた多成分リポソームに見られる相分離は、脂質ラフトのモデル系として用いられることが多い。このリポソームは、膜の物性そのものを調べるた

めに用いられるだけでなく、光応答性のアゾベンゼン誘導体を脂質二重膜内に添加し、光を照射することによって膜形態を制御するなど、分子ロボットやドラッグデリバリーシステム（DDS）などへの応用を考えた工学的分野にも用いられている。その他に、界面活性剤による膜可溶化の物理化学的メカニズムの解明のためや、脂質ラフトを可逆的に破綻させて機能発現していると考えられている麻酔薬の、多成分リポソームの相分離状態に対する影響を調べるためなど、さまざまな分野での研究例が報告されている。

本研究では、そのような研究の一環として、リン脂質膜に対する光応答性分子、極性有機溶媒、局所麻酔薬の3つの分子の影響について調べるために、実験を行なった。実験結果と、それにもとづく考察について以下に述べる。

まず、光応答性の分子とリポソームの相互作用について述べる。今回は紫外線応答性のフォトクロミック分子 *pseudogem*-bis (diphenylimidazole) [2.2]paracyclophane (*pseudogem*-bisDPI[2.2]PC) をリポソームの二重膜内にドーブし（おそらく脂質の疎水鎖の間に入り込んでいる）、その光応答性分子含有リポソームに対して紫外線照射実験を行なった。その結果、紫外線照射によってリポソームの形態が変化することがわかった。典型的な膜変形の様子を図1に示す。変形の原因として考えられることは、ベシクルの表面積が変化するか体積が変化するか、又はその両方であることが予想される。そのどちらが原因であるのかを確かめるため、スクロースを用いて浸透圧をかけ、ベシクル内の水分子が膜を通して外に流出し易い状態をつくり、同様に紫外線照射実験を行なった。そのときの、ベシクルの表面積と体積の時間変化を計算し、表面積が紫外線照射とともに増加し、一方の体積はあまり変化しないという結果が得られた。その結果から、*pseudogem*-bisDPI[2.2]PCの光異性化によって、水分子の膜透過量が増加し、ベシクル内の体積が減少して変形したのではなく、表面積が増加したことがベシクル変形の原因であると考えられる。それに加えて、表面積が増加した原因を調べるために、紫外線照射前と照射中の膜のゆらぎを、時間相関関数を用いて比較した。光異性化によって単純に周りのリン脂質が押しつけられて膜の表面積が増加している場合、照射前と同じように熱的に揺らいでいることが予想される。その場合、相関関数の緩和が同じ程度になるか、むしろ揺らぎが大きくなり速く緩和する可能性が考えられる。しかし実際には、紫外線照射時に相関関数の緩和が遅くなり、揺らぎにくくなったという情報が得られた。その結果から、単純に *pseudogem*-bisDPI[2.2]PC が周りの脂質を押しつけただけではないということ

がわかった。光応答性分子*pseudogem-bisDPI[2.2]PC*の紫外線照射時のラジカルとの反応によって脂質が変性し、膜の揺らぎが変化した可能性がある。そのような可能性を調べるために、高速液体クロマトグラフィーや紫外可視分光測定を行い、紫外線照射後の生成物について調べた。それらの結果から、不可逆的な化学反応は起こっていないという結果が得られた。これらの結果から、紫外線照射によって*pseudogem-bisDPI[2.2]PC*とリン脂質の疎水鎖が絡まってしまったり、緩和時間の長い物理的な相互作用を起こし、それによって表面積が増加することによって膜が変形したのではないかという結論に達した。その他この結論をサポートするような実験結果についても本論文中で述べた。

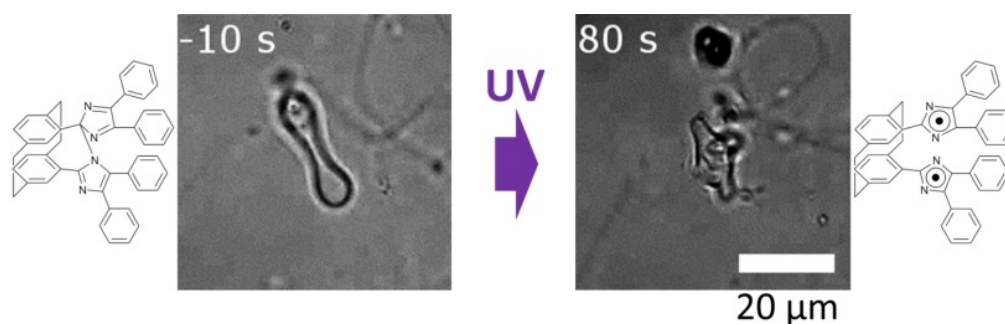


図1：紫外線応答性分子のリン脂質膜への影響。

次に、極性溶媒として紫外可視分光における溶媒などによく用いられているアセトニトリルの、リポソームに対する影響について述べた。アセトニトリルは細胞内で代謝されると、有毒なシアン化物などを生成し、生体に悪影響を及ぼすことが知られている。それゆえ細胞膜とアセトニトリルの相互作用を知ることは重要だと考えられる。それに加えて、アセトニトリルのような極性分子も脂質膜内に入り込むことが予想され、界面活性剤のように膜の可溶化作用を示すのではないかと考えられる。

そのような可溶化作用の有無を調べるため、本研究ではリポソームに対してアセトニトリル水溶液を作用させ、そのときの様子を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果、膜は主に破裂、変形、縮小の3パターンのダイナミクスを示すことがわかった（図2に破裂の模式図を示す）。これらのダイナミクスのうち、破裂、縮小の2パターンは、膜の可溶化に用いられるような界面活性剤の場合において報告されており、

このアセトニトリルにおいても同様に膜の可溶化作用があるということが示唆された。これら3つのダイナミクスのうち、破裂するベシクルの割合が最も多く、作用させるアセトニトリル水溶液の濃度が上昇するとともに破裂するベシクルの割合が増加することがわかった。その破裂するベシクルに関して、アセトニトリルを作用させてからベシクルが反応するまでの時間を、アセトニトリルの濃度別に調べ、その経過時間に対するヒストグラムを作成した。その結果によると、濃度が低い条件のほうが破裂するまでにより時間がかかるという結果が得られた。つまり、破裂するために必要な量のアセトニトリル分子が膜内に入り込むまでに、濃度が低い場合にはより時間が必要だということを示している。それに加えて、破裂するまでの時間とベシクルの直径（曲率）との関係性を調べた結果、100 μm ほどの大きなベシクルの場合、1000秒以上時間がかかることがわかった。この結果から、小さな曲率の膜の場合には、大きな曲率の場合と比べるとより時間がかかるということが判明した。これらの結果から、アセトニトリルが膜内に入り込む速度が濃度によって変化し、アセトニトリルのフリップフロップの割合よりも遅い場合は外膜だけでなく内膜へもアセトニトリルが浸透するので、膜の表面積が増加し、膜が変形するのではないかと考えられる。さらに濃度が高くなり、膜に入り込む速度がフリップフロップの割合よりも速くなると、外膜にのみアセトニトリルが蓄積して膜の自発曲率が上昇し、最終的に二重膜を維持できなくなり、破裂してしまうのではないかと考えられる。縮小するものにおいては、単純に膜内に入り込むだけではなく、膜表面に脂質の塊ができることによってそちらに膜を構成する脂質分子が取り込まれ、膜には張力がかかってしまうのでベシクル内の水分子が外に流出することによってその張力を解消し、徐々に縮んでいくのではないかと考えられる。

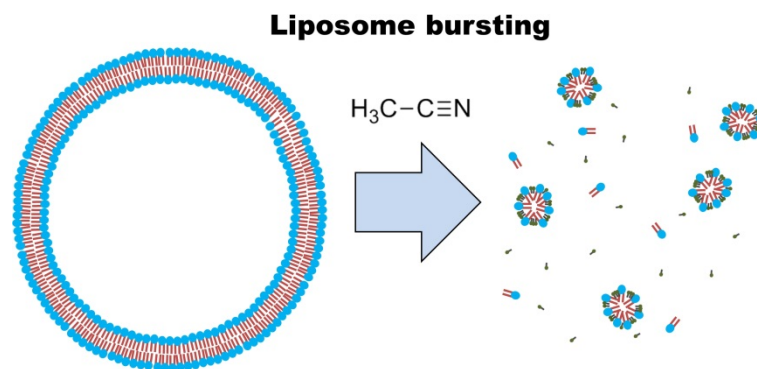


図2：アセトニトリルによるリポソーム破裂の模式図。

次に、局所麻酔薬ジブカインの多成分リポソームに対する影響について述べる。前述のように性質の異なる数種類のリン脂質を混ぜてリポソームを作成すると、温度、脂質の混合比などの条件によって相分離することが知られている。その相分離の状態がジブカインを作用させることによってどのように変化するか、ということについて調べた。まず、ジブカインの濃度を変化させ、さらに温度を変化させて蛍光顕微鏡観察を行なった。次に、その顕微鏡画像をもとに、輝度情報から二次元空間相関関数を計算して相状態を定量化した結果、ジブカインが相分離の臨界温度 (T_c) を低下させているということがわかった。実空間の原点を中心として全角度で平均化した空間相関関数をさらにフーリエ変換すると、波数 $k \approx 0.3, 0.6 \mu\text{m}^{-1}$ のときのフーリエ振幅が、相分離しているものは高く、していないものは低くなるので、10個以上のサンプルのフーリエ振幅の値を調べると、そのときどきの条件の相分離しているリポソームの割合が見積もれる。そのフーリエ振幅の、ジブカイン濃度別の温度依存性を図3に示した。図はジブカインによって T_c が低下したことを示している。つまり、ジブカインは脂質ラフトを壊す方へ T_c を変化させるということである。それに加えて、その T_c 低下の原因を調べるために、温度 20°C のときの秩序相ドメインの真円度を計算した。相境界の真円度は界面張力と相関があることが示されており、界面張力を見積もるためにもドメインの真円度を計算することが有益である。その結果、ジブカインの濃度が増加すると、真円度が減少した。真円度が減少したということは張力も減少したということが考えられ、臨界現象の式 $\sigma \propto (T_c - T)^\nu$ から、張力の減少によって T_c も減少したのではないかと結論づけた。式中の σ は界面の張力を、 T は系の温度 (ここでは $T = 20^\circ\text{C}$) を、 ν は臨界指数 ($\nu = 1.2 \pm 0.2$) をそれぞれ示している。

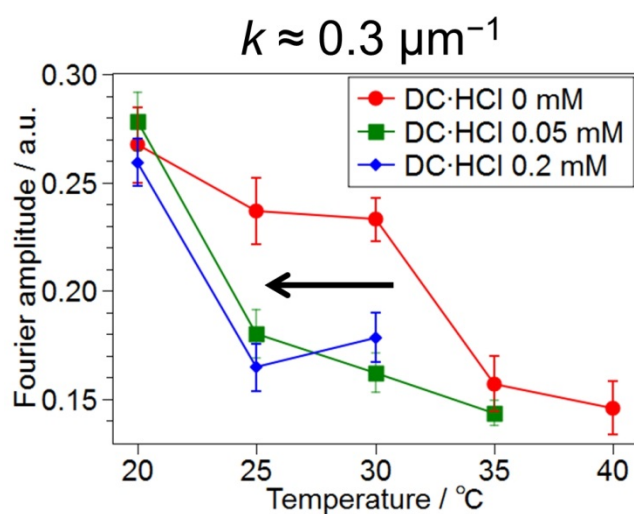


図3：局所麻酔薬ジブカインによる T_c 変化。

最後に総論として、これら3つの分子のリン脂質膜への影響をまとめる。これらの分子はそれぞれの性質によってリン脂質膜内の入り込む位置が異なると考えられる。光応答性分子*pseudogem-bisDPI[2.2]PC*はその構造から、脂質膜内の疎水鎖の間に入り込むことが予想される。極性有機溶媒アセトニトリルと局所麻酔薬ジブカインはそれぞれ先行研究によって、脂質の親水部分と疎水鎖の境界付近に入り込むことが示されている。*pseudogem-bisDPI[2.2]PC*は壊すことなく膜の形を変形させ、アセトニトリルは膜を壊す作用が強いことが判明したので、膜内への入り込む位置によって、分子の働きが異なるという事実が示唆された。そのような観点から考えると、ジブカインもアセトニトリルと同じような場所に入り込むので、さらに高濃度の状況下では膜を壊す作用があるのではないかと考えられる。さらに、同様の理由でアセトニトリルにも、二次元的な相分離への影響もあるのではないかと考えられ、今後、それらを明らかにするための実験が必要であると考えられる。

以上の結果から、光応答性分子*pseudogem-bisDPI[2.2]PC*には膜を変形させる作用があり、アセトニトリルには膜を壊す作用があり、局所麻酔薬ジブカインには脂質ラフトを壊す作用があるのではないかという結論に達した。今後は、前述のように、アセトニトリルの相分離への影響や、ジブカインの膜形態への影響も調べる。特に、相分離への影響は、脂質の混合比によつての挙動の変化を知るために相図を作成し、混合の自由エネルギーを用いた議論を行う予定である。

発表論文

本研究に関する論文

【学術雑誌】

(査読のあるもの)

1. Kazunari Yoshida, Yasuhiro Fujii, and Izumi Nishio, Deformation of lipid membranes containing photoresponsive molecules in response to ultraviolet light, *J. Phys. Chem. B*, 118, 4115-4121, (2014) .
2. Kazunari Yoshida, Keitaro Horii, Yasuhiro Fujii, and Izumi Nishio, Real-time observation of liposome bursting induced by acetonitrile, *ChemPhysChem*, 15, 2909-2912, (2014) .

(査読の無いもの)

1. Kazunari Yoshida, Akito Takashima, and Izumi Nishio, Effect of dibucaine on phase behavior of ternary liposome, arXiv: 1411.1809, (2014) .

【国際会議議事録】

(査読の無いもの)

1. Kazunari Yoshida, Yasuhiro Fujii, and Izumi Nishio, Ultraviolet-light irradiation effect on lipid vesicles containing photoresponsive molecules, *International Soft Matter Conference 2013*, MEMB-1493, (2013) .
2. Kazunari Yoshida, Keitaro Horii, Yasuhiro Fujii, and Izumi Nishio, Direct observation of liposome bursting induced by acetonitrile, *Biomembrane Days 2014*, poster No. 65, (2014) .

審査の結果の要旨

吉田一也氏の学位論文「モデル生体膜挙動に対する機能性分子の作用の物理学的理解」は

第1章 序章、

第2章 光応答性分子含有リン脂質膜における紫外線照射効果、

第3章 極性有機溶媒のリポソームへの影響

第4章 局所麻酔薬の多成分リポソームへの影響

および

第5章 総論、 の全5章より構成されている。

以下、各章について簡単に述べる。

第1章 「序章」 では本研究のキーワードとなる、生体膜について概要が述べられている。リン脂質を主成分とする両親媒性分子の自己組織化により形成されるモデル生体膜：リポソームおよびその生物学的な重要性に重点をおいて解説されている。

また本研究で用いられたリン脂質、不飽和脂肪酸であるジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、飽和脂肪酸であるジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、およびコレステロール (Chol) の性質について詳しく述べられている。

さらに、以下の章で述べられている研究についての概論と、この論文全体の目的について述べている。

第2章以下では各機能性分子とモデル生体膜であるリポソームとの相互作用について各論が述べられている。

第2章 「光応答性分子含有リン脂質膜における紫外線照射効果」では、リポソームに光応答性フォトクロミック分子である*pseudogem-bis*(diphenylimidazole) [2.2]paracyclophane (以下*pseudogem-bis*DPI[2.2]PC) をドープすることによって実験が行われた。本章では光応答性の分子機構について述べた後、この分子をリポソームにドープし、そのリポソームに紫外線を照射した結果について述べている。この分子は疎水性が強く、水にほとんど溶解しない物質であるため、リポソーム作成時に有機溶媒にリン脂質と混合した後、水和して膨潤させたものを試料として用いている。このようにして作られたリポソームに紫外線を照射し、その結果として現れるリポソームの形状の変化を記録し、様々な方法で解析している。その結果、リポソームの体積は変化せず、膜の表面積だけが増加すること、その結果リポソームの形が円(球形)から回転楕円体に変形すること、及び多層膜のほうがドラスチックな変形をすることを膜の揺らぎの角度相関関数やフーリエ成分を使って示している。

この分子は紫外線を吸収するため、膜の温度上昇や、ラジカルの生成によるDOPC分子などとの化学結合の可能性があるため、吉田氏は系の温度を可変にして膜の挙動を見る、後述の温度に敏感な相分離膜にこの分子をドープして紫外線照射を行い相挙動に変化がないこと、高速液体カラムクロマトグラフィーにより、化学結合による分子の変化の有無を綿密に調査し、この核挙動の変化が光応答性分子とDOPC分子の物理的なエンタングルメントによるものであるとの結論を導き出している。

この研究が行われるまでは、光応答性物質は膜の外部での変形による直接的な膜の変形を扱ったものが多く、膜の内部、特に疎水的な部分に光応答性分子を取り込んだ実験は殆ど無く、新しい膜変形メカニズムとして高く評価されている。

第3章 「極性有機溶媒分子のリポソームへの影響」

本章で取り上げられている有機溶媒、アセトニトリル ($\text{N}\equiv\text{CCH}_3$) は液体クロマトグラフィーの溶媒として広く用いられているが、その生体膜との相互作用は、X線回折などの静的な測定が主で、生体膜に対する作用のダイナミックな測定はあまり行われていない。

吉田氏は、本研究においてリポソームの懸濁液とアセトニトリル水溶液との界面において、アセトニトリル分子による蛍光ラベルされたりポソームの変形及び破壊過程をリアルタイムで観測することによって、アセトニトリル分子の作用を解析した。

この研究により、アセトニトリル分子の濃度が高い場合には、アセトニトリル分子のリポソーム二重膜の外側の層への急速な侵入により膜に大きなストレスがかかり破裂することを見出した。また濃度があまり高くない場合には、外層への分子の取り込みと、分子の内層への輸送の釣り合いにより膜の面積の増加だけをもたらす結果となり、膜の破壊ではなく、面積の増加に伴う、リポソームの変形を引き起こすことを数十以上のリポソームのアセトニトリルとの相互作用の測定から、統計的に示すことに成功している。またリポソームの曲率と相互作用の相関から、リポソームの曲率半径が大きい場合には核形成的な相互作用が支配的になり、一箇所からの膜へのアセトニトリル分子の侵襲が支配的になることも示している。

これ等の結果は、今後の膜と有機溶媒などの低分子との相互作用を理解する上で重要な結果であると高く評価されている。

第4章 「局所麻酔薬の多成分リポソームへの影響」

近年、多成分リポソームにおける相分離状態の研究が盛んに行われつつある。これは実際の生体膜が多成分膜であること、及び多成分膜に特有の相分離状態が、実際の生体膜でその存在が有力視されているラフトと関係しているとの考えから、広く研究が進んだことに起因している。

ラフトとはイカダを表す言葉であるが、神経細胞膜にある神経信号の伝達に関係したイオンチャンネル等の膜タンパク質の周りに、他の膜の部分と異なる秩序液体相 (Lo相) があり、それがあつる種の膜タンパク質の機能に対して重要な働きをして

いるという観点から盛んに研究されているものである。

ここで述べた秩序液体相（Lo相）は相転移温度の高い飽和リン脂質と相転移温度が低い不飽和脂肪酸およびコレステロールからなる他成分リポソーム見られる一種の2次元相分離、すなわち飽和脂肪酸とコレステロールの多い秩序液体相（Lo相）と不飽和脂肪酸を主成分とする無秩序液体相（Ld相）への相分離状態として物理的に理解される。

吉田氏はこの相分離状態への局所麻酔薬であるジブカインの作用に注目し、一定の濃度のジブカイン塩酸と平衡状態にある相分離膜の相転移温度について研究を行った。この相転移温度は、これまでは多数のリポソームを温度を変えて測定し、相分離した膜の割合を統計的に測定し、決定することが主であった。これに対して同氏は膜の蛍光顕微鏡像の自己相関関数やフーリエ変換を用いて少数のリポソーム膜の測定から決定する方法を導入し、ジブカインのリポソームへの作用および転移温度の変化を測定することに成功している。また、相境界の形状から境界の線張力を見積もることを行い、転移温度との関係を明確に示すことに成功している。

これらの結果を総合し吉田氏は局所麻酔薬であるジブカインが相転移温度を下げる作用があることを示し、局所麻酔薬が神経伝達に働いているイオンチャンネルなどのタンパク質の周りのラフト構造に作用して神経伝達をブロックしている可能性を示唆することに成功している。

この問題は、現在でも局所麻酔薬がイオンチャンネルに直接作用しているという考え方と、膜に作用して間接的にイオンチャンネルに作用しているという2種類の考え方があるが、吉田氏はこの間接作用に一票を投じたこととなる。

第5章 総論 ではここで研究された機能性分子の膜内での位置、分子量、極性の大きさを座標軸として多次元的に分類を行い、統一的な理解へ向けた一歩を踏み出すことに成功しており、さらには、今後の研究に対する指針を示していると結論付けられる。

これらの結果は原著論文2篇および投稿中の論文1篇としてまとめられており、また国際会議での発表2件、国内の学会発表9件として発表され高い評価を得ている。なお、これらの発表の第一著者は全て吉田一也氏である。

以上のように、本論文はリポソームと3種類の機能性分子についての相互作用を研究し、その作用形態の分類と統一的な理解の可能性を示唆したものとして、リポソーム、ひいては生体膜の研究に大きな貢献をしていると考えられる。よって、本委員会は本論文が博士（理学）の学位論文として適切であると判断した。