

論文審査の結果の要旨

論文題名

Characteristics of lipid bilayers evaluated with picosecond time-resolved Raman spectroscopy and picosecond time-resolved fluorescence spectroscopy

ピコ秒時間分解ラマン分光法およびピコ秒時間分解けい光分光法による脂質二重膜の特性の評価

論文審査の要旨

多くの生化学反応は、生体膜の内部およびその近傍で進行する。生化学反応の機構を分子の視点から解明するためには、生体膜という環境が化学反応の進行にどのような影響を与えるかを議論する必要がある。

生体膜の主要な構成要素は脂質二重膜である。脂質二重膜は、2層の脂質分子が逆向きに会合して形成される擬2次元物質である。脂質分子は親水部と疎水部を持つ両親媒性分子であり、脂質二重膜では、親水部を外側に、疎水部が内側に、それぞれ配置される。生体膜近傍での化学反応は、分子2層分の疎水部とその外側を取り囲む水という、正反対ともいえる環境が混在する中で進行するのである。この環境は、通常の化学反応が進行するバルク溶液とは異なる。

申請者は、化学反応の場としての脂質二重膜の特性を明らかにするために、いくつかの分光実験を行ってその結果について議論した。それらの研究の成果をまとめたものが本学位論文である。

本学位論文は、6章から成る。各章の題目は、第1章 General introduction, 第2章 Experimental procedures, 第3章 Energy transfer characteristics of lipid bilayers of liposome examined with picosecond time-resolved Raman spectroscopy, 第4章 Viscosity heterogeneity inside lipid bilayers of single-component phosphatidylcholine liposomes observed with picosecond time-resolved fluorescence spectroscopy, 第5章 Picosecond time-resolved fluorescence anisotropy measurement of fluorescent phospholipid with pyrene fluorophore – viscosity inside lipid bilayer of DMPC liposome, 第6章 Concluding remarks である。

第1章では、生体膜および人工脂質二重膜であるリポソームの構造や特性について解説されている。生体膜はリン脂質、タンパク質、コレステロール、糖鎖などの物質が水中に形成する構造体である。生体膜の構造モデルとしては、1972年に提案された「流動モザイクモデル」が有名である。このモデルでは、膜タンパク質は流動性に富んだ脂質二重膜の中にランダムに埋もれているとされた。その後、流動モザイクモデルに代わる有力な構造モデルとして「脂質ラフトモデル」が提唱されるようになった。脂質ラフトは、長鎖の飽和リン脂質とコレステロールが密に会合して形成される集合体で、その集合体が流動的な脂質二重膜の中に「筏」のよう

に存在すると考えられている。脂質ラフトは生成と消滅をくりかえす動的な挙動を示し、膜タンパク質のいくつかは脂質ラフトの中に存在すると仮定される。脂質ラフトの存在の有無や（存在する場合には）その特性を実験的に明らかにすることは、重要な研究課題となっている。

組成や形状を制御することができる人工脂質二重膜は、生体膜のよいモデルとしてよく研究に用いられる。その中で、球状の脂質二重膜はリポソームと呼ばれる。リポソームには、1層の脂質二重膜で形成される単層のリポソームと、複数の脂質二重膜で形成される多層のリポソームがある。直径の揃った単層リポソームも、比較的容易に調製できる。

脂質二重膜は、低温ではゲル相、高温では液晶相と呼ばれる相を示す。ゲル相では、脂質のアルキル鎖が全トランス型の立体配座を取る。脂質分子同士は密に会合する。液晶相では、アルキル鎖の立体配座にゴーシュ型が混ざる。脂質分子同士の会合はゲル相に比べて乱れ、脂質二重膜はゲル相に比べて薄くなる。ゲル相から液晶相への相転移温度は、アルキル鎖の長さや飽和度に依存して変化する。

脂質二重膜の静的な構造を知るだけでは、そこで進行する化学反応の機構を理解することはできない。化学反応の速度や結果は、周囲の媒質の極性や粘度、熱拡散率などの化学的特性によって左右される。ゆえに、生化学反応の理解のためには、脂質二重膜内部におけるこれらの化学的特性を明らかにすることが必要となる。

第2章では、申請者が行った実験の方法について記述されている。申請者は、リポソーム水溶液を薄膜法によって調製した。ガラス壁に形成したリン脂質薄膜を水中に分散させ、加圧下で分子ふるいを通すことで直径 100 nm の単層リポソームを得た。分光実験では *trans*-スチルベンをプローブ分子として脂質二重膜中に可溶化させた。スチルベン分子は水には不溶であり、脂質二重膜の疎水部に存在すると考えられる。

ピコ秒時間分解ラマンスペクトルの測定に用いたラマン分光計では、ピコ秒のチタンサファイア再生増幅器の出力およびその倍波で励起した2台の光パラメトリック増幅器からの出力を波長変換してポンプ光 (300 nm) およびプローブ光 (590 nm) として用いた。試料からのラマン散乱光を分光器 (焦点距離 32 cm) で分散させて液体窒素冷却した CCD 検出器で検出した。ポンプ光とプローブ光の間の遅延をステッピングモーター駆動の遅延回路で制御した。2個の回折格子とスリットで構成された「4f フィルター」を使ってプローブ光パルスの波数幅を制限して、ラマンスペクトルの波数分解能を向上させた。

ピコ秒時間分解けい光分光計では、フェムト秒チタンサファイア再生増幅器で励起した光パラメトリック増幅器の出力を 300 nm に波長変換した光パルスを励起光として用いた。試料からのけい光をイメージング分光器で分散させ、ストリークカメラで時間分解検出した。

第3章では、ピコ秒時間分解ラマン分光法を利用した脂質二重膜内でのエネルギー移動特性の評価について解説されている。申請者は、脂質二重膜中でのエネルギー移動特性を評価するために、脂質膜中の *trans*-スチルベンの冷却過程をピコ秒時間分解ラマン分光計で測定した。*trans*-スチルベンを最低励起 1 重項 (S_1) 状態に光励起する際に約 2600 cm^{-1} の振動余剰エネルギーを与え、その後 S_1 スチルベン分子が冷却する過程を C=C 伸縮振動に対応する 1570 cm^{-1} のラマンバンドの位置を利用して測定した。装置の応答時間は 3.7 ps だった。実測された冷却曲線に単一指数関数減衰を当てはめ、冷却の速度定数を得た。指数関数による減衰は熱拡散方

程式の解ではないが、その減衰の速度定数は冷却過程を特徴づけるよい指標となる。

溶媒の巨視的な熱拡散定数と溶質である *trans*-スチルベンの冷却速度定数の間にはよい相関があることが、これまでの研究で知られている。申請者は、この関係を利用して、6種類の脂質二重膜における熱拡散定数を実測の冷却速度定数から見積もった。見積もられた熱拡散定数は、 8.4×10^{-8} から $9.4 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ の間に分布した。これらの値は、アルカンおよびアルコールの熱拡散定数と類似しているが、水の熱拡散定数 ($1.4 \times 10^{-7} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) とは大きく異なる。6種類の脂質二重膜のうち、液晶相を示す DLPC, DMPC, DOPC, および egg-PC から成る脂質二重膜の熱拡散定数はそれぞれ 8.9×10^{-8} , 9.1×10^{-8} , 9.4×10^{-8} , および $9.1 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ であり、ゲル相を示す DPPC および DSPC から成る脂質二重膜の熱拡散定数はそれぞれ 8.4×10^{-8} および $8.5 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ であった。液晶相の脂質二重膜の熱拡散定数はゲル相の脂質二重膜の熱拡散定数よりも大きい。

申請者は、液晶相とゲル相における熱拡散定数の違いの原因について議論した。まず、液晶相とゲル相の構造の違いが熱拡散定数に与える影響について検討した。液晶相では、アルキル鎖の乱れのためにリン脂質間の平均距離が増加して、水分子が親水部に入り込みやすくなっている。膜厚もゲル相に比べて小さい。そのため、液晶相の脂質膜内での熱拡散は水の影響を受けやすい。水はアルカンに比べて7割程度大きな熱拡散定数を持つので、液晶相における熱拡散はゲル相における熱拡散よりも効率よく進行するであろう。次に、申請者は、脂質二重膜の内部におけるスチルベン分子の分布について検討した。脂質二重膜の親水部の近傍に位置するスチルベン分子は、膜の中央部に位置するスチルベン分子よりも速く冷却するであろう。液晶相とゲル相でスチルベン分子の深さ方向における分布に違いがあれば、見積もられた熱拡散定数に違いが生じるはずである。

申請者は、実際の脂質膜を想定した境界条件における1次元の熱拡散方程式の解を2種類の初期条件のもとで求めて、実測と比較した。熱拡散方程式は巨視的な熱の拡散を記述する方程式ではあるが、実測された脂質膜内部でのスチルベン分子の冷却過程を時定数が約40%異なる程度に再現した。

第4章では、ピコ秒時間分解けい光分光法を利用した脂質二重膜内部の粘度の評価について記述されている。粘度は、溶媒を特徴づける基本的な物理量であり、化学反応の速度に影響を与える。申請者は、単一のリン脂質から構成される6種類のリポソーム脂質二重膜中に *trans*-スチルベン分子を可溶化させて、スチルベン分子のけい光を時間分解測定した。マジックアングルでの測定で得られる光異性化反応速度と偏光測定から得られる回転緩和時間から、それぞれ独立にスチルベン分子周囲の粘度を見積もって比較検討した。

電子基底状態にある *trans*-スチルベン分子が S_1 状態に光励起されると、ほぼ半数のスチルベン分子が *cis* 体に異性化する。これまでの研究から、この光化学反応の速度定数が溶媒の粘度に依存して4倍以上変化することがわかっている。申請者は、脂質二重膜中での *trans*-スチルベンの光異性化反応の速度定数をピコ秒時間分解けい光測定によって求め、得られた速度定数をもとにして脂質二重膜中の粘度を推定した。液晶相とゲル相の双方において、*trans*-スチルベンの光異性化反応は30から290倍異なる2種類の速度定数に従って進行することが分かった。この結果は、脂質二重膜中には粘度が異なる複数の環境が存在することを示唆する。

多くの分子において、その回転緩和時間と周囲の溶媒の粘度との間に相関があることが知られている。この結果は Stokes-Einstein-Debye の式で説明されることが多い。申請者は、脂質二重膜中の *trans*-スチルベン分子の回転緩和時間をピコ秒時間分解けい光の偏光測定（けい光異方性の緩和）から求めて、スチルベン分子の周囲の粘度を見積もった。この実験の結果も、光異性化反応速度の場合と同様に、脂質二重膜中には粘度が異なる複数の環境があることを示した。光異性化反応の速度定数から見積もった粘度と回転緩和時間から見積もった粘度は、スチルベン分子の形を球形で近似した場合には一致しなかったが、回転楕円体で近似した場合にはほぼ一致した。

DMPC が形成する脂質二重膜は、23.6°C で相転移することが知られている。申請者は、11.5°C から 46.2°C までの間で温度を変化させながら *trans*-スチルベン分子の光異性化反応速度を測定した。その結果、膜の粘度が 23.6°C の近傍で変化することを見出した。脂質二重膜へのスチルベン分子の可溶化が相転移温度には影響を与えないことが示された。

申請者は、時間分解けい光測定によって示された複数の粘度の起源について検討した。脂質膜のアルキル鎖の運動は、膜の中央部よりも親水部に近い部分でより制限されていることが推定されている。脂質二重膜の内部でスチルベン分子が位置する深さの違いによって、異なった粘度が示される可能性がある。ただし、この仮説では 30 から 290 倍離れた 2 種類の粘度が検出されることを説明することは難しい。脂質二重膜の構成が均一でなく、疎密がある場合にも 2 種類の粘度が検出されるであろう。しかし、単一のリン脂質から構成されるリポソーム脂質二重膜に疎密のゆらぎがあることを示す実験の結果は、これまでに報告されていない。現段階では、今回の実験で得られた 2 種類の粘度の起源を決めるために利用できる他の実験の結果はない。

第 5 章では、けい光色素で修飾したリン脂質を利用した脂質二重膜の特定の深さにおける粘度の評価について記述されている。前章までの実験では、脂質二重膜中でのプローブ分子の位置（深さ）を特定できないことから、結果の解釈に不確定性が生じていた。申請者は、リン脂質のアルキル鎖に色素分子を結合させたけい光リン脂質の時間分解けい光測定によって、脂質二重膜中の一定の深さにあるけい光プローブの運動を明らかにした。この実験のために、DMPC の一方のアルキル鎖の 4 位から先の炭化水素鎖をピレニル基で置換したけい光リン脂質を組み入れたリポソーム脂質二重膜を、中村浩之教授（東京工業大学）から提供していただいた。このピレニル基の回転緩和過程を、ピコ秒時間分解けい光スペクトルの偏光測定から明らかにした。実測されたけい光異方性は、数十ピコ秒とナノ秒以上の 2 種類の時定数で緩和した。この 2 種類の回転緩和速度の存在は、プローブ分子の深さ方向の分布によっては説明されない。ピレニル基の首振り運動（wobbling motion）を仮定して異方性緩和曲線の遅い成分を解析すると、ゲル相と液晶相における頂角と粘度としてそれぞれ 22° と 2900 mPa s および 62° と 19 mPa s を得た。

申請者が「主論文の内容の要旨」で述べたように、本学位論文は「脂質を系統的に変化させたときの性質の違いを、高速時間分解分光法により調べた数少ない例の一つ」について詳細に報告している。申請者は、生体膜のモデル物質であるリポソーム脂質二重膜を測定対象に選び、

ピコ秒時間分解ラマン分光法とピコ秒時間分解けい光分光法を用いることによってリポソーム脂質二重膜の内部における熱拡散定数と粘度を推定することに成功した。論文審査担当者の知る限りにおいて、これまでに脂質二重膜の熱拡散定数を実験的に求めた例はない。熱拡散定数の値を提示し得たことは、脂質二重膜の研究に対する実質的な貢献である。液晶相での熱拡散定数がゲル相での熱拡散定数よりも大きく見積もられたことは、興味深い問題である。この問題に関する実験や計算による研究が、今後続くであろう。けい光プローブの回転緩和時間から脂質二重膜の粘度を推定する研究は、これまでも行われてきた。しかし、申請者が用いた *trans*-スチルベン分子は、過去に用いられたけい光プローブ分子よりも小さく、脂質膜への影響が比較的小さい。さらに、スチルベン分子を用いることで、光異性化反応速度定数と回転緩和時間という 2 種類の物理量から独立に粘度を見積もることができた。従来用いられた方法よりも応答時間が短い時間分解けい光分光測定を行ったことで、*trans*-スチルベンのけい光減衰挙動を正確に測定することが可能になったといえる。けい光リン脂質を用いた実験では、脂質二重膜中でのけい光プローブの深さを固定した実験が有効であることを示すことができた。この方法は、近い将来において時間分解けい光分光法に限らず、時間分解ラマン分光法の測定においても有力な実験法になると期待できる。

以上を総合し、本論文は博士（理学）の学位を受けるのに十分な価値のあるものと認める。

論文審査委員：主査 岩 田 耕 一 教授
石 井 菊次郎 教授
河 野 淳 也 准教授
大 内 幸 雄 特別非常勤講師
(東京工業大学 教授)