

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	溶媒支援型自己組織化を利用した脂質二重膜の作製・評価
Title(English)	
著者(和文)	前川達洋
Author(English)	Tatsuhiko Maekawa
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11511号, 授与年月日:2020年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:林 智広,曾根 正人,和田 裕之,柘植 丈治,石田 忠
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11511号, Conferred date:2020/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

2019年度 東京工業大学 博士（工学）学位論文

# 溶媒支援型自己組織化を利用した 脂質二重膜の作製・評価

東京工業大学

物質理工学院

材料系

ライフエンジニアリングコース

前川 達洋

2020年2月提出

指導教員

林 智広 准教授

## 目次

## 目次

図表目次.....	iii
図目次.....	iii
表目次.....	v
略号表記.....	vi
論文要旨.....	vii
第1章 固体表面に支持した脂質二重膜の作製・評価に関する研究意義.....	1
1.1 細胞膜の概説.....	1
1.2 リン脂質および細胞膜の構造と膜機能.....	2
1.3 固体表面に支持した脂質二重膜の重要性.....	17
1.4 脂質二重膜の作製法.....	18
1.5 脂質二重膜の主な特性評価手法.....	27
1.6 本研究の意義と博士学位論文の構成.....	29
第2章 本研究で行った脂質膜作製とその評価方法.....	33
2.1 蛍光顕微鏡法.....	33
2.1.1 蛍光顕微鏡法の原理.....	33
2.1.2 光褪色後蛍光回復法の原理.....	35
2.2 原子間力顕微鏡法 (AFM) .....	40
2.2.1 原子間力顕微鏡法の発明と原理.....	40
2.2.2 コンタクトモードの原理とフォースカーブ測定.....	44
2.2.3 AFM のイメージングモード.....	51
2.3 前駆体脂質溶液調製.....	55
2.4 マイクロ流路チャンバーの設計.....	56
2.5 溶媒支援型自己組織化による脂質膜作製プロトコル.....	58
2.6 蛍光顕微鏡および光褪色後蛍光回復法.....	61
2.7 AFM によるフォースカーブの測定法.....	61
第3章 溶媒支援型自己組織化を利用して作製した脂質膜の拡散係数評価.....	63
3.1 作製した脂質膜の蛍光顕微鏡測定.....	63

## 目次

3.2 膜内リン脂質分子の拡散係数評価.....	67
第4章 作製した脂質膜の機械特性評価.....	71
4.1 AFMによる脂質膜の表面形状測定および機械特性評価.....	71
第5章 液相とゲル相が拡散係数・機械特性および膜機能に与える影響.....	78
5.1 本研究で作製した脂質二重膜の拡散係数および機械特性と過去の研究報告との比較.....	78
5.2 脂質二重膜の拡散係数および力学特性が膜機能にもたらす影響.....	82
第6章 総括と今後の展望.....	85
参考文献.....	88
謝辞.....	105
研究の外部発表状況.....	108

## 図表目次

### 図表目次

#### 図目次

Fig 1.1	代表的なリン脂質分子(a) DOPC、(b) DPPC の構造式。.....	3
Fig 1.2	(a)細胞膜を構成する脂質二重膜の模式図。(b)脂質二重膜内におけるリン脂質分子の動きの模式図。(c)相分離している脂質二重膜の模式図。.....	7
Fig 1.3	ラフト構造の模式図.....	13
Fig 1.4	Langmuir-Blodgett 法による脂質二重膜作製の模式図。(a) リン脂質親水性部分を基板に吸着させる抽出操作と、(b) 脂質二重膜を作製する為の浸水操作。.....	19
Fig 1.5	スピコーティングによる脂質二重膜作製の模式図。.....	21
Fig 1.6	vesicle fusion による SLB 作製の模式図。.....	24
Fig 1.7	溶媒支援型自己組織化による脂質二重膜作製の模式図。.....	26
Fig 2.1	Jablonski diagram.....	34
Fig 2.2	倒立顕微鏡内におけるフィルターの役割をまとめた模式図。.....	35
Fig 2.3	FRAP 測定における(a)レーザー照射、(b)蛍光標識分子の光褪色、(c)リン脂質分子の側方拡散による蛍光回復過程、(d)蛍光回復後の模式図。.....	36
Fig 2.4	AFM 装置の模式図。.....	41
Fig 2.5	光てこ方式の模式図。.....	42
Fig 2.6	z ピエゾの位置と Deflection の関係を表したフォースカーブの概略図。.....	45
Fig 2.7	フォースカーブと各位置におけるカンチレバーの状態の模式図。.....	49
Fig 2.8	水中におけるカンチレバーの振幅-および位相-周波数曲線。(a) 音響励振および(b) 光熱励振。.....	54
Fig 2.9	(a) マイクロ流路チャンバーの各パーツの 3 次元画像。(b) マイクロ流路チャンバーの各パーツを下から見た 3 次元画像。(c) マイクロ流路の断面図。(d) マイクロ流路チャンバーの実物写真。(e) マイクロ流路チャンバーを AFM の XY ステージに載せた実物写真。カバースリップが露出している部分は十分溶液で覆われており、空気に触れる事は無い。.....	57

## 図表目次

Fig 2.10	本実験で用いた溶媒支援型自己組織化のプロトコルと、ガラス基板上における予想されるリン脂質分子の状態を表した模式図。.....	59
Fig 2.11	本実験で用いたマイクロ流路チャンバーで実際に脂質膜を作製している様子の写真。.....	60
Fig 3.1	溶媒支援型自己組織化で作製した脂質膜の蛍光像。脂質膜を構成する脂質の比 DOPC : DPPC はそれぞれ(a)100 : 0 mol%、(b)80 : 20 mol%、(c)60 : 40 mol%、(d)40 : 60 mol%、(e)20 : 80 mol%である（それぞれに DOPC の末端にローダミンが結合している脂質を 0.7 mol%混合）。蛍光像のサイズは $136 \times 136 \mu\text{m}^2$ 。.....	64
Fig 3.2	脂質溶液における DOPC 組成比と脂質膜作製後の蛍光強度の関係 (n = 5)。.....	66
Fig 3.3	(a)FRAP 測定で得られた、各脂質膜中リン脂質分子の拡散係数 (n = 5)。(b)光褪色直後の蛍光像 (左側) と 3 分後に回復した蛍光像 (右側)。DOPC : DPPC が 100 : 0 mol%、(c) 60 : 40 mol%。(d)蛍光像における明るい部分と暗い部分 ((b)および(c)中の記号と対応) の、時間経過に対する蛍光強度の関係を表す曲線。.....	68
Fig 4.1	異なる DOPC:DPPC 組成比で構成された脂質膜の AFM 形状像と形状像内赤線における断面の高さプロファイルの比較。DOPC:DPPC がそれぞれ (a)100:0 mol%、(b)80:20 mol%、(c)60:40 mol%。.....	72
Fig 4.2	DOPC:DPPC の組成比が 40:60 mol%で構成された脂質膜の AFM 形状像と形状像内赤線における断面の高さプロファイルの比較。.....	74
Fig 4.3	(a)本実験の force-separation カーブにおける貫通深さと貫通力の定義を示した概略図。(b)溶媒支援型自己組織化によって作製された各組成比の脂質膜を試料として用いた代表的な force-separation カーブ (Tris 緩衝液中)。(c)各組成比の脂質膜から得られた (c)貫通深さと (d)貫通力の平均値。(エラーバーは標準偏差値を表しており、n = 5).....	77

## 図表目次

### 表目次

Table 1.1 リン脂質頭部の構造式とその名称.....	4
Table 1.2 細胞膜の脂質組成の例.....	10
Table 1.3 細胞膜のリン脂質組成の例.....	11
Table 1.4 ヒト内皮細胞の細胞膜に含まれるPCの脂肪酸の種類と割合.....	11
Table 2.1 脂質膜の作製に用いた前駆体脂質溶液の組成比。.....	55

## 略号表記

### 略号表記

AFM	Atomic force microscopy (原子間力顕微鏡)
AM	Amplitude modulation (振幅変調)
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine (1,2-ジオレオイル- <i>sn</i> -グリセロ-3-ホスホコリン)
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine (1,2-ジパルミトイル- <i>sn</i> -グリセロ-3-ホスホコリン)
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching (光褪色後蛍光回復法)
FRET	Fluorescence resonance energy transfer (蛍光共鳴エネルギー法)
GPI	Glycosylphosphatidylinositol (グリコシルホスファチジルイノシトール)
InvOLS	Inverse Optical Lever Sensitivity (光てこ感度の逆数)
PA	Phosphatidic acid (ホスファチジン酸)
PC	Phosphatidylcholine (ホスファチジルコリン)
PDMS	Polydimethylsiloxane (酸化ポリジメチルシロキサン)
PE	Phosphatidylethanolamine (ホスファチジルエタノールアミン)
PI	Phosphatidylinositol (ホスファチジルイノシトール)
PS	Phosphatidylserine (ホスファチジルセリン)
PSD	Position sensitive detector (位置検出用フォトダイオード)
QCM	Quartz Crystal Microbalance (水晶振動子マイクロバランス法)
Rhod PE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine- <i>N</i> -(lissamine rhodamine B sulfonyl) (ammonium salt) (1,2-ジオレオイル- <i>sn</i> -グリセロ-3-ホスホエタノールアミン- <i>N</i> -リサミンローダミン B スルホニルアンモニウム塩)
SAM	Self-assembled monolayer (自己組織化単分子膜)
SERS	Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (表面増強ラマン分光)
SLB	Supported Lipid Bilayer (固体支持脂質二重膜)
SPT	Single particle tracking (1分子追跡法)
STM	Scanning tunneling microscopy (走査型トンネル顕微鏡法)

## 論文要旨

### 論文要旨

本博士学位論文「溶媒支援型自己組織化を利用した脂質二重膜の作製・評価」は全部で6つの章から構成されている。

第1章「固体表面に支持した脂質二重膜の作製・評価に関する研究意義」では、本博士学位論文の導入として、細胞の内外を隔てる細胞膜について述べた。細胞膜の主要な構成要素であるリン脂質分子の構造と種類について紹介し、細胞膜は様々な種類のリン脂質分子が混成した脂質二重膜であり、脂質二重膜のリン脂質分子がドメインを形成する事を述べた。脂質二重膜に形成されたドメインは細胞外の生体分子を認識する膜タンパク質を偏在させており、細胞内外の情報伝達におけるプラットフォームとして機能する事を述べた。そして、生体分子を認識する機能に倣ったバイオセンサーに広く用いられている、固体表面上に人工的に作製した脂質二重膜の重要性と作製方法を述べた。その上で、固体表面上に脂質二重膜を作製する際に主に用いられてきた従来法の問題点を挙げ、それを解決する為に溶媒支援型自己組織化という手法を導入し、今まで作られた事のない脂質二重膜の作製および評価が可能な、固体支持脂質二重膜の研究プラットフォームを確立するという本研究の学術的意義および本博士論文の構成について記述した。

第2章「本研究で行った脂質膜作製とその評価手法」では、本研究で実際に行った脂質膜の作製手法、脂質膜の評価を行う為の分析手法について述べた。脂質膜の作製に関しては、脂質膜を作製する為の前駆体脂質溶液の調整手順、溶媒支援型自己組織化による脂質膜作製手順について述べた。また、作製した脂質膜を評価する為に用いた蛍光顕微鏡法、光褪色後蛍光回復法 (Fluorescence recovery after photobleaching: FRAP) および原子間力顕微鏡法 (Atomic force microscopy: AFM) によるイメージングとナノ力学測定の原理について述べた。さらに、脂質膜の作製と評価に使用可能な独自に開発したマイクロ流路チャンバーについて述べた。

第3章「溶媒支援型自己組織化を利用して作製した脂質膜の拡散係数評価」では、溶媒支援型自己組織化を利用して室温において液相であり蛍光標識され

## 論文要旨

た 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) とゲル相である 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) を様々な組成比で混成して作製した脂質膜を、蛍光顕微鏡観察および FRAP により評価した。蛍光顕微鏡観察では、DPPC が含まれている脂質膜には蛍光を発していないドメインが確認され、さらに、脂質膜に含まれる DPPC の割合の増加に伴って脂質膜表面を占めるドメイン面積の割合が増加した事も確認された。各組成比の脂質膜蛍光画像の蛍光強度を比較する事で、脂質膜作製前の前駆体脂質溶液における DOPC と DPPC の組成比が、溶媒支援型自己組織化を用いて基板上に作製した脂質膜にも良く再現される事が判明した。加えて、FRAP 測定によって、全ての組成比の脂質膜において DOPC が側方拡散している事が確認され、さらに、脂質膜に含まれる DPPC の割合の増加に伴い、脂質膜内のリン脂質分子の全体的な拡散係数が減少した事も確認された。これらの結果より、溶媒支援型自己組織化により作製された DOPC と DPPC が混成した脂質膜は脂質二重膜としての特徴を確かに有している事が示された。

第 4 章「作製した脂質膜の機械特性評価」では、様々な組成比で DOPC と DPPC を混成して作製した脂質膜を AFM で評価した事について述べた。AFM のイメージングより、液相である DOPC のみで構成された脂質膜の表面にはドメインや膜の欠陥などが観察されなかった。一方、ゲル相である DPPC を含む脂質膜にはドメインが形成されている事が観察された。さらに、脂質膜に含まれる DPPC の割合が低い脂質膜において、蛍光顕微鏡観察では確認する事の出来なかった小さなドメインが確認され、脂質膜に含まれる DPPC の割合の増加に伴い脂質膜表面を占めるドメイン面積の割合が増加した。これは、脂質膜に含まれる DPPC の割合と脂質膜表面を占めるドメイン面積の割合との間に相関がある事を示している。さらに、AFM を用いて本研究で作製した脂質膜の膜厚を評価し、過去に報告されている脂質二重膜の膜厚と比較した。その結果、溶媒支援型自己組織化を利用した本研究の脂質膜は脂質二重膜と同等の膜厚を有する事が判明した。拡散係数の評価と合わせて、溶媒支援型自己組織化により DOPC と DPPC を混成した脂質二重膜が作製可能である事が示された。

## 論文要旨

第5章「液相とゲル相が拡散係数・機械特性および膜機能に与える影響」では、本研究において溶媒支援型自己組織化を利用して作製した脂質二重膜の拡散係数や機械特性を、これまで行われてきた脂質二重膜研究の結果と比較した。その上で、脂質二重膜を構成するリン脂質分子の種類、膜を支持する基板表面の物理化学的性質、固体支持脂質二重膜の系の温度などによる拡散係数や機械特性への影響を述べた。加えて、それらの条件によるドメインの構造や膜機能との関連について述べた。

第6章「総括と今後の展望」では総括として、溶媒支援型自己組織化は細胞膜を人工的に模倣する、高品質で複雑な組成のモデル生体膜を作製する為の有望なアプローチである事を示している。さらに今後の展望として、本研究で確立した溶媒支援型自己組織化による脂質二重膜の作製・評価のプラットフォームが、基礎生物学・生物物理学やバイオセンサーの発展に貢献可能である事を解説した。

## 第1章 固体表面に支持した脂質二重膜の作製・評価に関する研究意義

第1章では本博士論文の導入として、生物を構成する最小単位である細胞を覆っている細胞膜について紹介する。続いて、細胞膜を構成している分子であるリン脂質分子の構造と種類について紹介し、リン脂質分子によって構成されている細胞膜のモデルを解説する。その上で、細胞膜に関する基礎研究や応用技術開発の為に頻繁に用いられている固体表面に支持した脂質二重膜の重要性と作製方法を解説し、本研究の学術的意義および本博士論文の構成について記述する。

### 1.1 細胞膜の概説

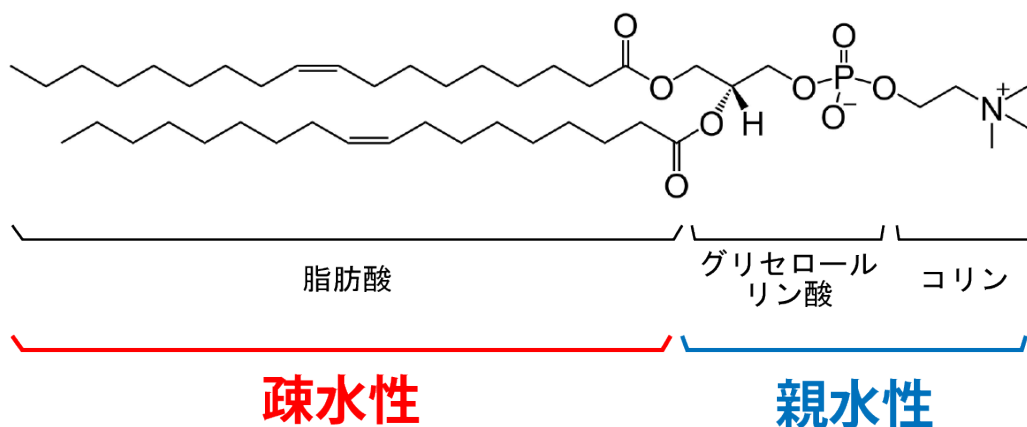
我々人間を始めとする動物や植物などの生物は、細胞によって成り立っている。この細胞は、タンパク質、核酸、炭水化物、細胞の代謝に関与する物質などが混成した細胞質と呼ばれるもので構成されており、これらを厚さ5~10 nm程度の薄膜が取り囲む事によって周囲の環境から細胞は区切られている(1, 2)。細胞質を覆っている薄膜の事を原形質膜、もしくは細胞膜と呼ぶ。細胞の外界は細胞外マトリックスと呼ばれる体液で満たされており、この液体の中には細胞に対して毒性のある物質や細胞が生存して様々な挙動を引き起こす為に必要な物質が含まれている(3-5)。この様な環境で細胞が正常に存在する為に、細胞膜はいくつかの重要な機能を果たしている。特に有名な機能は、選択的に物質を透過する防御壁としての役割である。細胞膜は内外で分子が自由に行き来する事を防いでいる。これは、細胞膜上にチャネルタンパク質と呼ばれる膜タンパク質が存在しており、これが特定の分子を認識する事によって外部からイオンを選択的に取り込み、また、内部からイオンを放出する。その他にも外部刺激への応答、他の細胞との情報伝達など、細胞膜は重要な生物学的機能を有する(6, 7)。そしてその表面にチャネルタンパク質、球状タンパク質、糖タンパク質、糖脂質、コレステロールといった様々な生体分子を収容している。これらの生体分子は外界からの刺激を分子認識して細胞内へ情報伝達する役割を担っている。細胞は

膜表面における生体分子の局所分布や構造をリアルタイムで制御する事によって外界からのシグナル感度を調整しており、その上で生じる分子認識プロセスを介して細胞機能 (細胞接着、細胞分裂、膜融合など) を制御している(8, 9)。この生体分子の細胞膜上における動的変化は、細胞膜が流動性を有する事によって生じている。

## 1.2 リン脂質および細胞膜の構造と膜機能

細胞膜の主要な構成要素は親水部分と疎水部分を有するリン脂質と呼ばれる脂質分子であり、このリン脂質分子が隙間なく並んだ単分子層が重なっている二重膜構造で形成されている。多くの脂質は3つの要素によって構成されている。頭部にはコリンもしくはエタノールアミンなど、グリセロールリン酸、そして疎水性の長い尾である脂肪酸である(10)。代表的なリン脂質分子の例として、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) と 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) の構造式を Fig 1.1(a)、(b)に示した。

(a) DOPC (不飽和脂肪酸)



(b) DPPC (飽和脂肪酸)

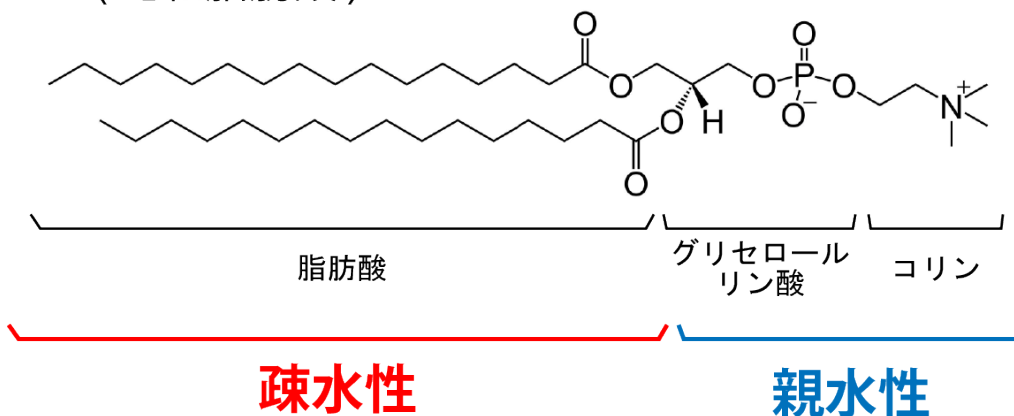


Fig 1.1 代表的なリン脂質分子(a) DOPC、(b) DPPC の構造式。

Fig1.1 には特にリン脂質分子の頭部がコリンの場合を示したが、リン脂質分子はこの部分によって分類される。頭部の構造式とその名称をまとめた表を Table 1.1 に示した。最も単純な構造はリン原子に結合している酸素原子に水素原子のみが結合した構造であり、ホスファチジン酸 (PA) と呼ばれている。その他にも、Fig 1.1 で示した様なコリンが結合したものはホスファチジルコリン (PC) と呼ばれている。特にこのホスファチジルコリンは、生体内に存在するリン脂質の中で最も多い種類として知られている(11, 12)。それ以外だとホスファチジルエタノールアミン (PE) やホスファチジルセリン (PS) といった構造がある。

Table 1.1 リン脂質頭部の構造式とその名称

リン脂質頭部の構造式	名称
—H	ホスファチジン酸 (PA)
$  \begin{array}{c}  \text{CH}_3 \\    \\  \text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—N}^+\text{—CH}_3 \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $	ホスファチジルコリン (PC)
$  \begin{array}{c}  \text{H} \\    \\  \text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—N}^+\text{—H} \\    \\  \text{H}  \end{array}  $	ホスファチジルエタノールアミン (PE)
$  \begin{array}{c}  \text{H} \\    \\  \text{—CH}_2\text{—CH—N}^+\text{—H} \\    \\  \text{O}=\text{C—O}^-  \end{array}  $	ホスファチジルセリン (PS)

Fig 1.1 に示した様に、コリンとグリセロールリン酸を合わせたリン脂質の頭部は親水性を示し、そこから先に存在する 2 本のアルキル鎖である脂肪酸が疎水性を示す。リン脂質分子は水中に分散させると、疎水性部分のアルキル鎖は水の環境から隔絶され、親水性部分は水と接する様な向きで存在する。この様な向きでリン脂質が疎水性相互作用によって自己組織化し、脂質二重膜と呼ばれる二重膜構造を形成する。細胞を覆っている 5~10 nm の薄膜はこの脂質二重膜である。脂質二重膜の模式図を Fig 1.2(a)に示した。この図の様に、細胞膜の基本構造がリン脂質分子の脂質二重膜であるという説は E. Gorter と F. Grendel という研究者が 1925 年に最初に唱え始めた(13)。彼らの実験では、アセトンを用いてヒト赤血球細胞から脂質を抽出して、水槽に張った水の表面を覆うように分散した脂質が占める表面積を計算した。そしてヒト赤血球細胞の表面積と比較すると、水槽中の水の表面を占める脂質の表面積がヒト赤血球細胞の表面積より 2 倍大きい事が判明した。この事より、細胞膜を構成しているリン脂質分子

は脂質二重膜の構造で存在していると結論付けられた。この研究がきっかけとなり、細胞膜の構造に関する様々なモデルが提唱されるように成った。1935年に James Danielli と Hugh Devson という研究者は、球状のタンパク質によって内側と外側が全体的に覆われた脂質二重膜が細胞膜を構築しているという、膜タンパク質も含めた細胞膜のモデルを提唱した(14, 15)。その後、1959年に J. D. Robertson という研究者が髓鞘を超薄切片にしてオスミウム染色したサンプルを電子顕微鏡で観察する事により、約 100 Å 離れた電子密度の高い2つの領域を発見した。これらの電子密度が高い領域こそ細胞膜表面を覆う膜タンパク質とリン脂質分子の頭部を表しており、これらの領域に挟まれた電子密度の低い領域はリン脂質分子のアルキル鎖部分であると考えた(16)。

今まで例に挙げてきた細胞膜モデルはどれも静的な構造と考えられていたが、1970年に L. D. Frye と M. Edidin が行った研究の成果により、細胞膜は流動性を有するという事が示された(17)。この実験では、ヒト細胞とマウス細胞それぞれの膜タンパク質と特異的に結合する抗体を調整し、ヒト抗体とマウス抗体をそれぞれ赤色、緑色で蛍光標識して細胞に結合させた。その後これらの細胞を 37°C の温度条件下で融合させる事により、初期段階は赤色と緑色が半々に分かっていたのにも関わらず、40分経過すると赤色と緑色が細胞膜全体に一様に分布した事が観察された。また、同様の実験を低温条件下で行い、15°Cを下回ると膜タンパク質の動きが急激に鈍くなる事も観察された。これらの実験で膜タンパク質が細胞膜内を側方拡散している事が観察された事より、細胞膜が流動性を有する動的な構造である事が示された。

これらの研究を踏まえて、1972年に S. Jonathan Singer と Garth Nicolson という研究者が、膜タンパク質が脂質二重膜中にモザイク状に埋め込まれた形こそが細胞膜であると提唱した。この細胞膜のモデルは流動モザイクモデルと呼ばれるようになった(18)。このモデルは、前述した E. Gorter と F. Grendel によるヒト赤血球細胞から脂質を抽出する研究で細胞膜が脂質二重膜構造で成り立っていると示された事、そして L. D. Frye と M. Edidin によって細胞膜の膜タンパク質が膜内で側方拡散するという膜の流動性が示された事を組み合わせて成り立

っている説である。以前 James Danielli と Hugh Devson、そして J. D. Robertson が提唱していた、球状の膜タンパク質が脂質二重膜を全体的に覆っているというモデルは脂質二重膜と膜タンパク質が分離している構造であった。しかしながら、この流動モザイクモデルによって、細胞膜における脂質二重膜と膜タンパク質の位置関係や、脂質二重膜に埋め込まれている膜タンパク質が側方拡散しているという結果から細胞膜に流動性があるという事を説明する事が出来る為、この細胞膜構造のモデルは広く受け入れられるようになった。

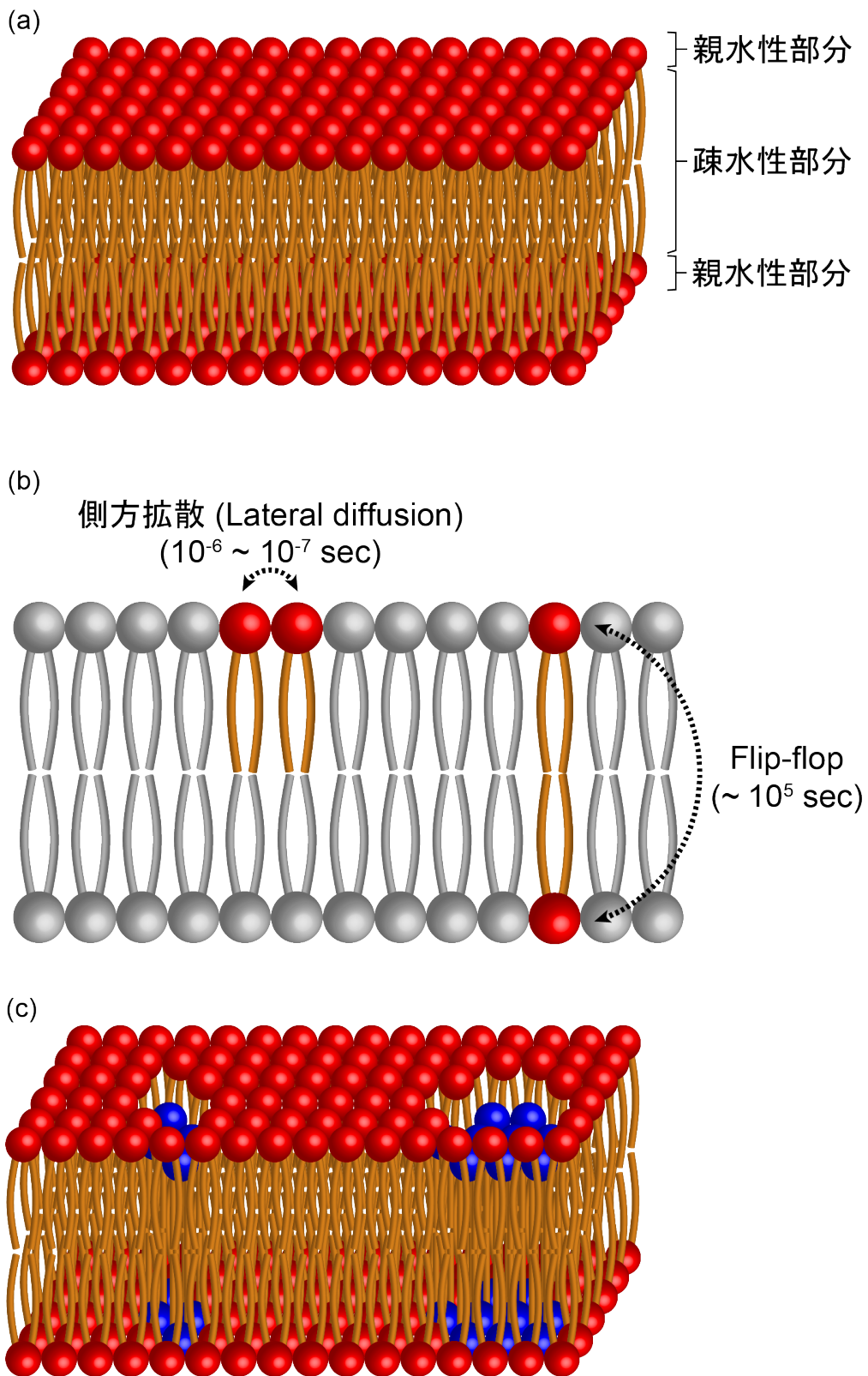


Fig 1.2 (a)細胞膜を構成する脂質二重膜の模式図。(b)脂質二重膜内におけるリン脂質分子の動きの模式図。(c)相分離している脂質二重膜の模式図。

ここまでで述べた細胞膜の動的性質を、脂質二重膜のリン脂質分子に着目して説明する。細胞膜のモデル構造を調べる研究を通して、脂質二重膜は液体に近い状態で存在している事が分かっている。従って、脂質二重膜を構成しているリン脂質分子は膜内において側方拡散をするという特性を有しており、この特性が細胞膜の流動性を生んでいる。これは、脂質二重膜内でリン脂質分子は熱運動による様々な分子運動を繰り返している事による現象であり、その分子運動のうちの1つが側方拡散なのである。脂質二重膜内におけるリン脂質分子の分子運動を説明した模式図を Fig 1.2 (b) に示した。リン脂質分子の動き方として、片方の単分子膜からもう片方の単分子膜へ移動する現象の **flip-flop**、片方の単分子膜内において近接リン脂質分子間で場所を交換する現象である側方拡散 (**lateral diffusion**) という2つが挙げられる。Fig 1.1 (a) の DOPC の様にホスファチジルコリンを持ち不飽和結合を持つリン脂質を例に挙げると、リン脂質分子が1回 **flip-flop** の動きをするのに14時間以上かかる(19)。これは、リン脂質分子が反対側の単分子層に到達する為には極性基を持つリン脂質分子が脂質二重膜の間にある疎水性領域を通過する必要がある、熱力学的に困難だからである(20)。一方、リン脂質分子が1回側方拡散で場所を交換するのにかかる時間はわずか  $10^{-6} \sim 10^{-7}$  秒である事が分かっている(21)。従って、リン脂質分子の脂質二重膜内における **flip-flop** の分子運動は滅多に生じる事は無く、側方拡散が主に生じているのである。

リン脂質分子の側方拡散の度合いは、その分子の構造によって異なる。例えば Fig 1.1(a) の DOPC はアルキル鎖に不飽和結合を有する。不飽和結合を有する DOPC の様なリン脂質分子が自己組織化すると、不飽和結合部分が立体障害を引き起こす為低密度でパッキングされる。すなわち、リン脂質の脂質二重膜内における自由度が大きい為側方拡散の度合いも大きい。これは、膜の相状態が液相であると定義される。一方、Fig 1.1(b) の DPPC はアルキル鎖に二重結合が存在しない飽和脂肪酸であり、自己組織化する際に立体障害が少ない。従って、高密度でパッキングされリン脂質の脂質二重膜内における自由度が小さい為側

方拡散の度合いも小さい。この相状態はゲル相と定義されている。液相やゲル相といった相状態は細胞膜内（脂質二重膜内）で共存しており、生体膜系において相状態は非常に重要である(22, 23)。リン脂質分子にはそれぞれ固有の転移温度があり、その温度を境界として相状態が液相とゲル相の間で変化する。例えば DOPC と DPPC の転移温度はそれぞれ $-17^{\circ}\text{C}$ 、 $41^{\circ}\text{C}$ である。DOPC と DPPC の2種類のリン脂質分子で構成された脂質二重膜は、室温環境 ( $25^{\circ}\text{C}$ ) では DOPC が液相、DPPC がゲル相をとるため、拡散係数の大きい DOPC 脂質二重膜の中に拡散係数が小さく密にパッキングされた DPPC 脂質二重膜がドメインを形成する (Fig 1.2 (c))。この様に複数種類のリン脂質によって構成された脂質二重膜内にドメインが形成される現象の事を、一般的に相分離と呼んでいる(24, 25)。

細胞膜の主要な構成要素はリン脂質分子の脂質二重膜である事をここまで述べてきた。前述した通り、リン脂質分子には様々な種類があり、細胞膜の脂質二重膜にはいくつもの種類のリン脂質分子が混成している。ここでは、脂質二重膜を構成する脂質の組成について述べ、複数種類のリン脂質分子が混成する膜の機能について述べる。

一般的に、我々生物の体を構成する細胞の細胞膜は、PC や PE などの頭部構造を有するリン脂質によって主に構成されており、リン脂質は全脂質の約 70% を占めている。Table 1.2 に例としてヒト内皮細胞と血小板の細胞膜の脂質組成を示した(26)。この表より、細胞膜を構成する脂質はリン脂質が約 70%、そしてコレステロールが約 20%を占めており、これらだけで全体の 90%以上を占めている事が分かる。脂質は単なる細胞膜の構成要素ではなく、膜の性質に深く関わっている。例えば本項で紹介した様な、室温で液相であるリン脂質とゲル相であるリン脂質によって脂質二重膜が構成されていると仮定する。ゲル相のリン脂質は側方拡散の度合いが小さい為、脂質二重膜を構成するリン脂質のうちゲル相であるの割合が高いと、その膜全体は硬く流動性は低くなる。逆に液相のリン脂質の割合が高ければ、膜全体は柔らかく流動性の高い脂質二重膜を構成する事。また、細胞膜に 20%ほど存在しているコレステロールも細胞膜の性質に影響している。コレステロールは分子内のヒドロキシ基を脂質二重膜の表面方向

に向け、残りの部分を脂質二重膜の内側、すなわちリン脂質分子の疎水性部分である2本のアルキル鎖の間に入り込む形で存在している(27, 28)。コレステロールが脂質二重膜の内部に入り込むと、リン脂質分子が自由に側方拡散しにくくなる為、膜の流動性が低くなる。その一方で細胞膜の物理的な耐久性を増加させる働きも有する(29)。

Table 1.2 細胞膜の脂質組成の例

脂質	ヒト内皮細胞 (%)	血小板 (%)
遊離脂肪酸	4.6	1.6
トリグリセリド	2.6	2.4
リン脂質	71.5	74.8
コレステロール	21.3	21.3

また、細胞膜の脂質組成において最も割合の高いリン脂質分子に着目すると、細胞膜のリン脂質組成はPCが全体で最も高い事が分かっている。例としてヒト内皮細胞と血小板のリン脂質組成をTable 1.3に示したが、どちらもPCは約40%程度を占めている事が分かる(26)。この表では2種類の細胞に関して例を挙げたが、他にも赤血球であればPCの組成が全体の70%を占め、その他の細胞でもPCが50%前後含まれる事が知られている(30)。この事から、細胞膜の物性や膜機能を研究する際、リン脂質分子の中でもPCに着目するのは重要な事である。

**Table 1.3** 細胞膜のリン脂質組成の例

リン脂質	ヒト内皮細胞 (%)	血小板 (%)
ホスファチジルエタノールアミン	25.3	31.6
ホスファチジルセリン+ホスファチジルイノシトール	25.6	10.1
ホスファチジルコリン	36.3	44.7
スフィンゴミエリン	12.8	13.5

加えて、リン脂質分子の PC に着目した場合、アルキル鎖の構造によって PC の種類はさらに細分化される。前述した通り、アルキル鎖は飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸に分けられ、このどちらを有するかによってそのリン脂質分子が液相になるか、もしくはゲル相になるかが決まってくる。すなわち、細胞膜の流動性に影響する重要な要素である。ここで例として、ヒト内皮細胞の細胞膜に含まれる PC を脂肪酸で分類し、それぞれが全脂質に占める割合を以下の Table 1.4 にまとめた(11, 31)。

**Table 1.4** ヒト内皮細胞の細胞膜に含まれる PC の脂肪酸の種類と割合

脂肪酸		全脂質に占める割合 (%)
数値表現	慣用名	
16:0	パルミチン酸	31.0
16:1	パルミトレイン酸	3.6
18:0	ステアリン酸	17.5
18:1	オレイン酸	30.7
18:2	リノール酸	4.5
20:3	ミード酸	1.0
20:4	アラキドン酸	10.6
22:5	ドコサペンタエン酸	0.4

この表における数値表現というのは、脂肪酸のアルキル鎖に含まれる炭素数と二重結合の数を表している。例えば数値表現が 16:0 であれば脂肪酸のアルキル鎖は 16 個の炭素がそれぞれ単結合で繋がった構造である。すなわち PC の脂肪酸の数値表現が 16:0 であるリン脂質は DPPC という事になる。また、数値表現が 18:1 であれば 18 個の炭素が繋がっていて、その中の 1 つに二重結合が含まれるという事である。すなわち、PC の 18:1 は DOPC を表している。Table 1.4 より、ヒト内皮細胞の細胞膜に含まれている PC の中では、DOPC と DPPC の組成がどちらも約 30% を占めており、細分化した PC の種類の中でも特に多いという事が分かる。ここではヒト内皮細胞の細胞膜を例に挙げたが、その他の細胞膜においても DOPC と DPPC がどちらも約 30% ずつ占めている事が知られている (32)。

今まで述べてきた様に、細胞膜には数多くの種類のリン脂質分子が含まれている。複数種類のリン脂質分子が脂質二重膜に混成すると、リン脂質分子の種類に応じて局在し、ドメインを形成する事がある(24, 25)。特にゲル相のリン脂質がドメインを形成すると、細胞膜の膜タンパク質を局在化させる役割を担う事がある。この様なドメインはラフト構造と呼ばれており、1990 年代に Kai Simons のグループが提唱した(33, 34)。ラフト構造を提唱するに至ったきっかけは、上皮 MDCK 細胞の細胞膜の外側に向けてスフィンゴ糖脂質であるグルコシルセラミドが優先的に輸送されてドメインを形成している事を 1988 年に同グループが発見した事である(35)。スフィンゴ糖脂質が優先的に細胞膜の外側に輸送されるのは、細胞が外界からの刺激を認識する為にタンパク質を細胞膜外側に送り出し、そのタンパク質を区分けする役割を担わせる為だと考えられた。その後、培養した上皮細胞において、グリコシルホスファチジルイノシトール (Glycosylphosphatidylinositol: GPI) という糖脂質に固定 (アンカー) されたタンパク質が細胞膜の外側に優先的に移動している事を発見した(36)。また、1990 年に Karen G. Rothberg らの研究グループが、受容体 (免疫グロブリン) アンカー糖脂質の細胞膜上でのクラスタリングにはコレステロールの存在が深く関与している事を関節免疫蛍光法により確認した(37)。コレステロールは脂質二重膜の

内部に入り込む事で膜の流動性を低くする為、受容体など分子認識する働きを持つ膜タンパク質が糖脂質によって区分けされ、コレステロールによって流動性の低いドメインが形成されているという説が提唱された。このドメインは細胞膜の外側に優先的に輸送され膜タンパク質を区分けしている事から(38)、細胞膜をいかだ (raft) の様に移動する構造、すなわちラフト構造として提唱されたのである(33)。ラフト構造の模式図を Fig 1.3 に示した。

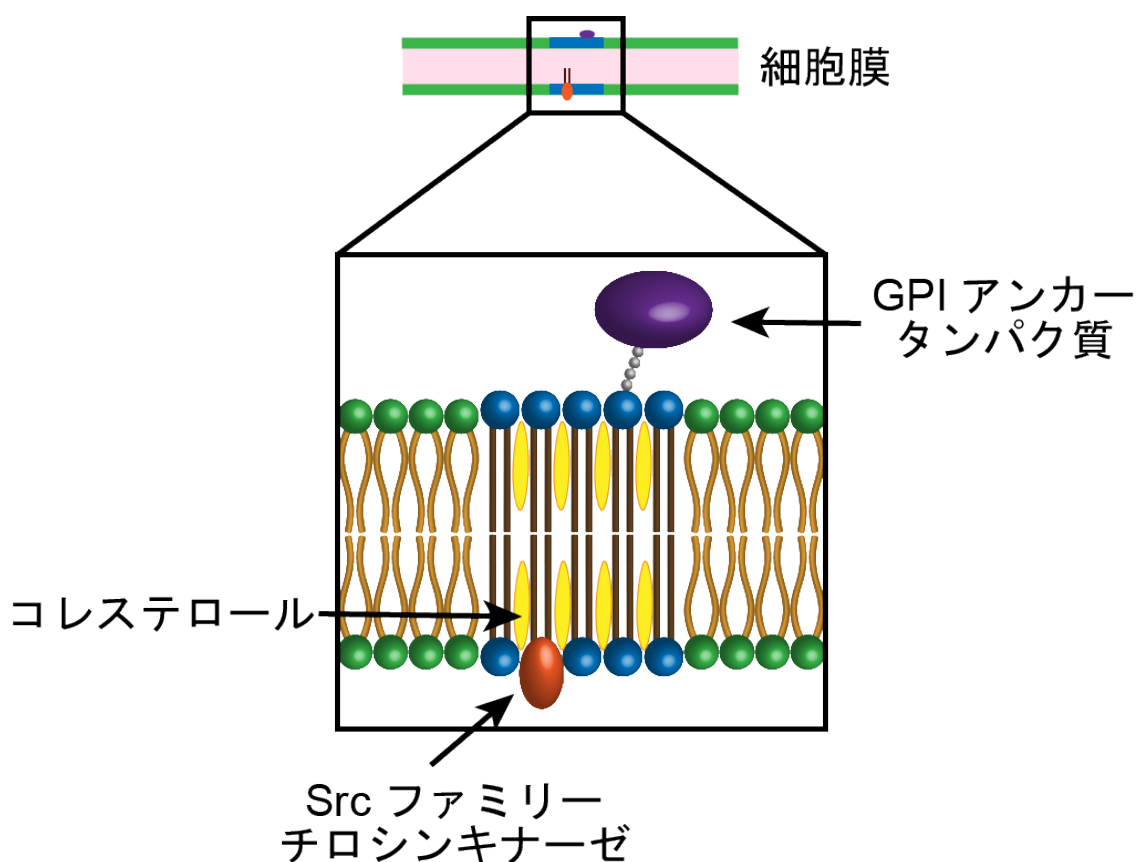


Fig 1.3 ラフト構造の模式図。

Deborah A. Brown と John K. Rose によって、この様な糖脂質のドメインは中性の界面活性剤である Triton X-100 に対して不溶性を示す事が発見された(36)。加えて、細胞膜を Triton X-100 によって可溶化させた際に GPI アンカータンパク質が不溶性を示す事も発見された(39)。これらの発見を経て、細胞を Triton X-100 で処理して糖脂質を勾配遠心分離によって精製し、ラフト構造と呼ばれている

ドメインに局在している様々なタンパク質が確認されている(40)。具体的には、GPI アンカータンパク質、急性炎症反応に関与する細胞内シグナル伝達タンパク質である Src ファミリーチロシンキナーゼ(41)、細胞の増殖・分化に関与する三量体 G タンパク質(42)の様な飽和アシル鎖修飾を受けたタンパク質、その他多くの膜レセプターなどが例として挙げられる。この研究を受けて、膜タンパク質は飽和アシル鎖を持つ脂質に固定され、優先的に脂質ドメイン領域に区分けされている可能性が考えられている。しかしながら、1990年代に提唱されたこのラフト構造という脂質ドメインの存在に関しては、現在においても意見が二分している。というのも、ラフト構造を証明する為に行われてきた研究は界面活性剤による抽出であり、生きた細胞の細胞膜においてラフト構造を直接観察した例は存在しない。その為ラフト構造の存在は疑問視されている(43)。ラフト構造自体は存在が証明されていないものの、リン脂質分子が細胞膜において膜タンパク質を輸送しドメインを形成する事で膜タンパク質を局在させる役割を担っている事を、2000年代に入ってから蛍光共鳴エネルギー法 (Fluorescence resonance energy transfer: FRET) (44, 45)や1分子追跡法 (Single particle tracking: SPT) (46, 47) といった分析手法を用いて観察され始めた(48)。特に、SPTを用いた研究では、受容体タンパク質が 100 nm 程度の大きさのドメインにミリ秒 ~ 分単位の時間滞在した事が確認されている。この事から、リン脂質分子や脂質二重膜におけるリン脂質分子の組成が細胞膜の機能に影響を与えている事が分かる。

次に、脂質二重膜が担っている機能について述べる。最初に述べた様に、細胞が体内で正常に存在する為に、細胞膜はいくつかの重要な機能を果たしている。例えば、細胞膜が細胞内外の物質を選択的に透過させる機能が挙げられる。細胞膜の主要な構成要素である脂質二重膜はリン脂質分子が密に配列した構造である為、 $O_2$ 、 $CO_2$  といった分子は高濃度側から低濃度側へ自由に通過可能である。しかしながら、グルコースなどの大きな分子や  $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Cl^-$  などのイオンは自由に脂質二重膜を通過する事が出来ないとわれてきた。しかしながら、流動モザイクモデルが提唱された後の1975年に Robert H. Michell という研究者が、

細胞膜には  $\text{Ca}^{2+}$  を選択的に通過させるゲートが存在し、ホスファチジルイノシトール (Phosphatidylinositol: PI) 脂質の代謝によってそのゲートが開かれ細胞外から内側へ  $\text{Ca}^{2+}$  を流入させるという事を示した(49)。この研究から、脂質二重膜は  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cl}^-$  などの荷電物質であるイオンを通すイオンチャネルが存在すると考えられ、1970年代に Bertil Hille と Clay Armstrong という研究者がイオンチャネルの存在を裏付ける研究を行い(50)、1980年代に Erwin Neher と Bert Sakmann が筋繊維の膜から1つのイオンチャネルを通るイオンの流れ(電流)を測定する技術を開発する事で実証された(51)。イオンチャネルは特異的であり、通過できるイオンはイオンチャネルの種類に依存する。さらにイオンは高濃度側から低濃度側に向けて通過する様に、イオンチャネルがイオンの流入する向きをコントロールしている。イオンチャネルはゲートを開閉させる事でイオンを通過させている。ゲートを開閉させるトリガーには種類があり、細胞膜内外の電位によって開閉をコントロールする電位開閉チャネル(52)、特定の生体分子がチャネル表面に特異的に結合する事によって開閉するリガンド開閉チャネル(53)、細胞膜が物理的に受ける力やそれによる膜の変形を感知する事によって開閉する機械受容チャネル(54)が知られている。この様な細胞内外で物質をやり取りする働きを持つイオンチャネルはチャネルタンパク質と呼ばれており、脂質二重膜に埋め込まれる事によって機能する。つまり、細胞膜の機能である物質の輸送は、チャネルタンパク質を収容するリン脂質の脂質二重膜によって保証されている。

チャネルタンパク質による物質の輸送以外にも細胞膜は色々な機能を有しており、例えば受容体タンパク質が外部刺激を認識する事による応答も重要な膜機能である(55, 56)。脂質二重膜のラフト構造という概念を説明した際に、リン脂質分子の種類の違いにより形成されるドメインに膜タンパク質が局在している事を述べた。その代表とされる膜タンパク質は Src ファミリーチロシンキナーゼや G タンパク質である。これらは外部からの刺激を認識する受容体であり、生体分子を分子認識する事で自己リン酸化が生じ、シグナルが細胞膜を超えて細胞内部に伝わっていく(57)。特に、1990年代から2000年代にかけて Robert J.

Lefkowitz という研究者が G タンパク質共役受容体に着目して研究し、受容体が分子認識してシグナルを伝達するメカニズムを解明した(58-60)。シグナル伝達は細胞の接着や分化といった様々な挙動を引き起こすきっかけとなる為、受容体が分子認識する事よるこの現象は非常に重要な機能である。そして、前述した通りこの受容体は脂質二重膜のドメイン領域に局在していると言われている。また、リン脂質分子は細胞膜内で側方拡散をする為、ドメイン領域は流動性が低いが液相の細胞膜を移動する事が可能である。これらの特徴は、細胞膜が外界からの刺激を受ける際のシグナルの強度をコントロールする事が出来る事を意味している(61)。この様に、受容体タンパク質を局在させ、外部から生体分子が接近する際に分布を変化させる事が出来るドメインを有するこの細胞膜の機能は、外部刺激を認識するバイオセンシングプラットフォームとして非常に重要な役割を担っているのである。

### 1.3 固体表面に支持した脂質二重膜の重要性

近年、基礎生物学や応用生物学の様々な分野において、細胞膜が持つ様々な機能に関する基礎研究や細胞膜の機能を活かした技術 (特に、バイオセンサー) の開発が注目されている。基礎研究にせよ技術開発にせよ、細胞膜の性質や機能に関する詳細な理解が欠かせない。しかしながら、細胞膜は非常に多くの種類のリン脂質分子や生体分子で構成されており、表面形状や性質が複雑な生体膜である為、細胞膜を直接研究し目的の知見を得る事は難しい。そこで、細胞膜の機能を、単純化したモデルとして人工的に構成して再現して解析する事で、細胞膜を構成している物質の中で特に重要な分子、細胞膜の性質や機能などに関するより詳細な理解に繋げる事が求められる。従って、上述した様な発展的な基礎研究や技術開発の為には、生体膜の本来の形の構造を正確に模倣できる複雑なモデル膜の開発が必要不可欠である(62-65)。例えば膜タンパク質の分子認識を利用した味覚センサの様な技術やその研究開発には、膜タンパク質を安定に収容可能な脂質二重膜を固体表面上に作製する事が求められる(66)。これまで述べてきた様に、細胞膜は数多くのリン脂質分子が複雑な組成で混成して成り立っている。また、リン脂質分子が混成する事によるドメイン領域には、物質の輸送を行うチャンネルタンパク質や外部からの刺激を認識する受容体タンパク質といった膜タンパク質が存在している。この事を踏まえると、細胞膜の特性に関する基礎研究においても、非常に複雑な表面形状、粘弾性、特性を有する細胞膜のうち、必要な膜特性のみを反映させたモデル脂質二重膜を固体表面に作製する事で、簡便な系での実験が可能になる。この様に、膜表面で生じる現象に関する基礎研究とバイオテクノロジーへの応用の両方にアプローチしていく為には、液相とゲル相といった異なる相が混成した様々な脂質組成の、固体表面に支持した脂質二重膜 (Supported Lipid Bilayer: SLB) を作製する必要がある(67)。SLB は、薄くて壊れやすい脂質二重膜を液中で安定に存在させる事ができるという利点を持っている(68)。SLB の重要な特性として、リン脂質分子は固体表面に吸着して存在しているにも関わらず、側方拡散という脂質二重膜に必要な不可欠な特性を維持している事が挙げられる。これは、固体基板表面と脂質二重膜の底面側の単

分子層(親水性表面側)の間に1~2 nm程度の水和層が存在するからである(69)。水和層が存在しているおかげで、リン脂質分子は固体基板上であっても脂質二重膜内で側方拡散する事が可能になっている。加えて、固体表面に作製している為、広範囲において平坦な表面を提供する事が可能である。従って、SLBは細胞膜としての特性を維持しながら液中で安定かつ簡便なモデル脂質二重膜である為、基礎研究やバイオテクノロジーへの応用に対して非常に有用なシステムである(63, 70-73)。具体的には、細胞膜の構造や機能を人工的に模倣したプラットフォームであるSLBは、生体膜とタンパク質、抗体、ペプチド、ナノ粒子などとの間の相互作用といった細胞膜表面で生じる生体现象の基礎研究や、薬物開発試験という医学分野の技術開発など、幅広い研究に有用である(74-78)。また、SLBを構成するリン脂質分子の種類を複数用いる事で、生体膜の相分離や分子配列といった、分子の組成によって生体膜の表面がどのような組成で構成されてどのような機能を有するのかという生物学的に重要な知見を得る事に繋がる(79, 80)。この様に、SLBは基礎生物学に関する基礎研究やバイオテクノロジーへの応用に対して幅広く貢献する事の出来る有用なプラットフォームである。

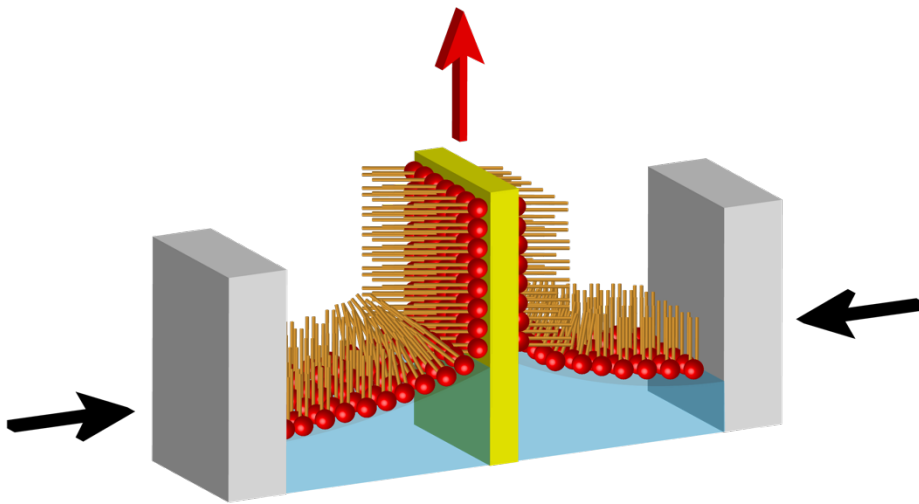
#### 1.4 脂質二重膜の作製法

SLBを作製する為に、これまでにLangmuir-Blodgett法(81)、スピコーティング(82, 83)、自発展開(84, 85)、vesicle fusion(86, 87)など多くの手法が開発されてきた。ここではまず、それぞれの脂質二重膜作製法について解説する。

Langmuir-Blodgett法は1930年代に確立された手法で、リン脂質分子を水層(トラフ)に溜めた水面に滴下し、リン脂質が浮かんでいる水面に対してガラスなどの基板を垂直に上下させる手法である。Langmuir-Blodgett法の概略図をFig 1.4に示す。リン脂質が水面と接触すると、分子内の親水部分が水面と接して疎水部分が水面から上を向く状態で自己組織化し、気液界面に単分子膜が形成される。その部分の水面に対して基板を上げ下げする事でリン脂質の単分子膜が基板に吸着する。従って、脂質二重膜を固体基板上に作製する場合、予め水中に基板を沈めておき、次にリン脂質分子を滴下して自己組織化させる事で気液界面に単

分子膜を作り、その状態で基板を引き上げる事で表面上に単分子膜を作製する。そしてその基板を下げる事で基板上の単分子膜上に逆向きの単分子膜を新たに作製する事で、目的の脂質二重膜を作製する事が可能となる。Langmuir-Blodgett法の興味深い点は、基板の上げ下げをコントロールする事で全てのリン脂質分子が同じ方向を向く非対称二重膜を作製する事も可能である点である。

(a)



(b)

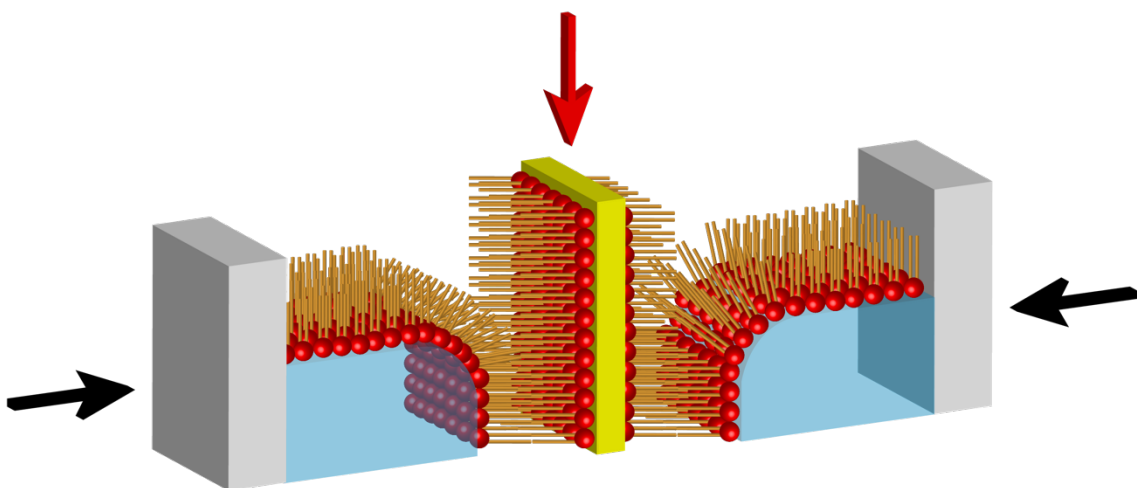


Fig 1.4 Langmuir-Blodgett 法による脂質二重膜作製の模式図。(a) リン脂質親水性部分を基板に吸着させる抽出操作と、(b) 脂質二重膜を作製する為の浸水操作。

SLB を作製する為に確立された最初の手法であり長い間使用されてきた Langmuir-Blodgett 法は、SLB の重要な特徴である平坦な表面を作製する事が可能である。SLB を作製する際には、専用の脂質膜作製装置を準備して使用する必要があるのだが、このプロセスに SLB 作製の困難さがある。基板上にリン脂質の単分子膜を経て脂質二重膜を作製する場合、基板の上下動作や水面に広がっているリン脂質を押すバリアの動作速度を一定に制御しなければならない。以前はこの厳密な制御を可能にする為にピストン油が使用されていたが、これはリン脂質溶液と混ざり合ってしまう脂質膜を汚染してしまう。さらに SLB 作製の為に非常に繊細な実験技術が必要であった。これを解決する為に、現在は全ての操作を自動化する装置が開発された。この装置を導入すれば SLB を作製する事は可能であるが、トラフ内にゴミが入って汚染される、基板からリン脂質が分離しやすい、膜内に欠陥が生じるといった問題は依然として生じている(88)。さらに本手法では基板を上下に動かすプロセスを行いリン脂質の単分子膜を吸着させていき SLB を作製する。それゆえ、ドメインを有する SLB を作製する為に液相およびゲル相のリン脂質それぞれを混ぜたリン脂質溶液で本手法を行うと、基板側と基板から離れた側に吸着する単分子膜内のそれぞれのドメインの上下位置が一致しないといった問題点も挙げられる(88)。これらの理由から、再現性良く高品質な SLB を提供する事は難しい。

スピニングは、平坦な金属製のディスクの表面に溶液を滴下し、そのディスクが高速回転する事による遠心力で溶液が薄く広がり、薄膜を作製する手法である (Fig 1.5)。スピニングの手法を用いた薄膜作製自体は 1958 年頃から行われており、これを 2000 年代初期から脂質二重膜の作製手法として応用されてきた(82, 89)。スピニングを用いた脂質二重膜の作製の利点としては、基板表面の広範囲に簡単に脂質二重膜を作製できる点である。用いる基板の大きさやリン脂質の種類に依存するが、1000 ~ 5000 rpm で 1 分程度リン脂質溶液を回転処理すれば、基板全体に脂質膜が行き渡る。

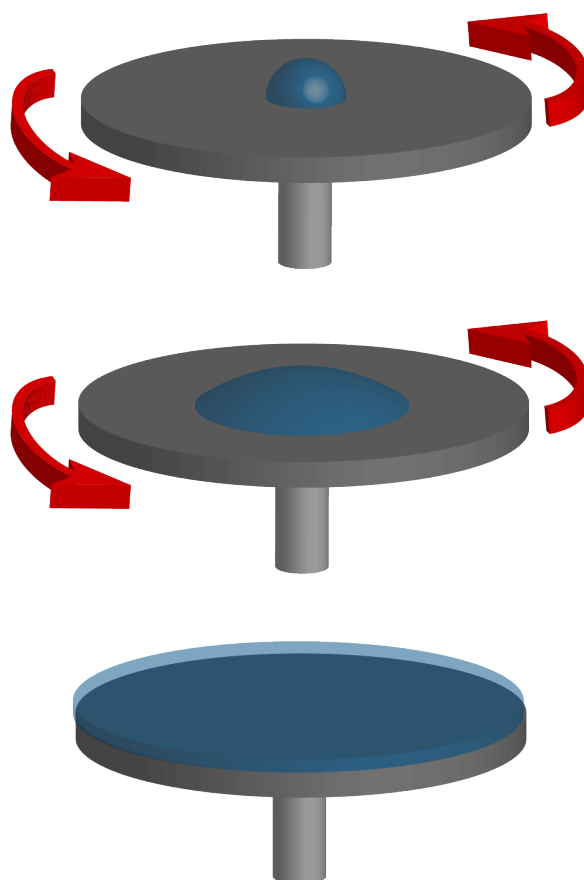


Fig 1.5 スピンコーティングによる脂質二重膜作製の模式図。

しかしながら、この手法にも実験する上での困難な点が存在する。それは、回転軸からの距離に依存して脂質二重膜が多層構造を形成してしまうという点である。本手法の原理として金属プレートを回転させる事による遠心力で溶液を広げていく為、使用する前駆体脂質溶液の濃度が高い場合、膜厚にムラが出来てしまう。脂質二重膜になっている領域もあれば何層も重なった脂質の多層構造が形成される領域もある。過去に報告された研究では、スピンコーティングで作製した脂質膜表面に 100 nm 以上の段差構造が確認されている(89, 90)。前述した通り、SLB に求められる特徴として、表面が広範囲に置いて均一に平坦である事が挙げられる。その観点で考えると、表面に高さの差が生じやすいスピンコーティングで適切な SLB を作製するのは難しい。スピンコーティングで SLB を作

製する為には、本手法に対する豊富な経験や高い実験的スキルが必要となる為、簡便性に欠ける。加えて本手法では、回転処理をした後は溶媒を完全に乾燥させる必要がある。溶媒を乾燥させる為に、通常高真空条件下で20時間程静置する。その処理が終わった後は表面分析を行うまで4°C程度で保存する必要がある。生体膜は乾燥すると表面形状や物理的特性が変化してしまう(91)。従って、元々の脂質二重膜としての特性が失われる可能性がある為、複雑なリン脂質組成のSLBを作製するのは難しい。

これらの実験的問題を受けて、より簡便な手法でかつ再現性よく平坦な表面のSLBを作製する為、自発展開や vesicle fusion という手法が開発された。まず自発展開を例に挙げると、自発展開を行う為にはまず、リン脂質溶液を親水性表面の基板に滴下する。そしてその基板を緩衝溶液に浸漬する事により、リン脂質分子が基板上の滴下された位置を中心として自発的に広がっていく。過去の研究報告によると、リン脂質分子は1分間で数10 μm 拡散して脂質二重膜を基板上に形成するという事が分かっている(84, 92)。自発展開は今まで述べた Langmuir-Blodgett やスピコーティングといった手法に比べて、一様に平坦で巻くの欠陥が少ない高品質なSLBを作製する事ができる。その一方で、基板上に脂質二重膜が自発的に広がっていく為には、基板表面の性質が親水性でなければならないという制限がある。さらに重要な事は、使用するリン脂質溶液にゲル相であるリン脂質が混ざっている場合、基板上で自発的な展開が行われないという事である。すなわち、バイオセンシングプラットフォームとして働くドメインを、SLB内に形成する事が困難であるという事である。過去には、基板に滴下したリン脂質分子を自発的に展開させる前に基板全体の温度をゲル相であるリン脂質の転移温度より高い温度まで加熱して液相に相転移させ、液相状態のリン脂質分子を展開させて脂質二重膜が完全に形成された後にサンプルを室温まで冷却する事により、この問題を回避していた(85)。

また Vesicle fusion は、固体基板上において前駆体リン脂質ベシクルの吸着と自発的破裂によってSLBを作製する手法である。その実験工程の単純さから、SLBの作製において現在最も一般的に用いられている手法の1つである(65, 86,

87, 93-95)。Vesicle fusion を用いた SLB の作製手順を Fig 1.6 に示した。本手法ではまず、リン脂質でベシクルを用意する必要がある。その際、押出法と呼ばれる、リン脂質溶液を専用の孔径のそろったフィルターを通す手法をとる事により、リン脂質分子がベシクルに形態を変える。この手法によって作製されたベシクル溶液を、専用のマイクロ流路にセットされている親水性表面の基板（ガラス基板など）上に流す。ベシクルは親水性表面の基板上に徐々に吸着していき、一定の量に到達するとベシクル同士が融合して大きなベシクルとなる。そしてその大きなベシクルが基板上に飽和したら、ベシクルの外側方向にかかる力によってベシクルが自発的に破裂する。破裂して膜状になったリン脂質が広がり周囲に存在する他の膜と縁が融合する事により、基板上に脂質二重膜が形成される。これらのプロセスを経て、SLB の作製が可能となる。この vesicle fusion の利点は、SLB 作製プロセスが他の手法と比べて簡単な点である。他の手法は専用の大掛かりな装置を用意する必要があり、また、再現性良く膜を作製するにあたって厳密なパラメーターの設定や高い実験的スキルが要求されていた。しかしながら vesicle fusion の場合、市販の孔径のそろったフィルターと流量をコントロール出来るポンプがあれば操作を行う事が可能である為、使用するにあたってのハードルが低い。さらに、液相リン脂質を用いた vesicle fusion では、均一で平坦な表面の SLB を作製する事が可能である。SLB の重要な特徴である平坦な表面を作製する事ができるだけでなく、操作が簡単で再現性良く高品質な SLB を作製する事ができる事が、SLB の作製において本手法が現在最も一般的に用いられている理由であると考えられる。

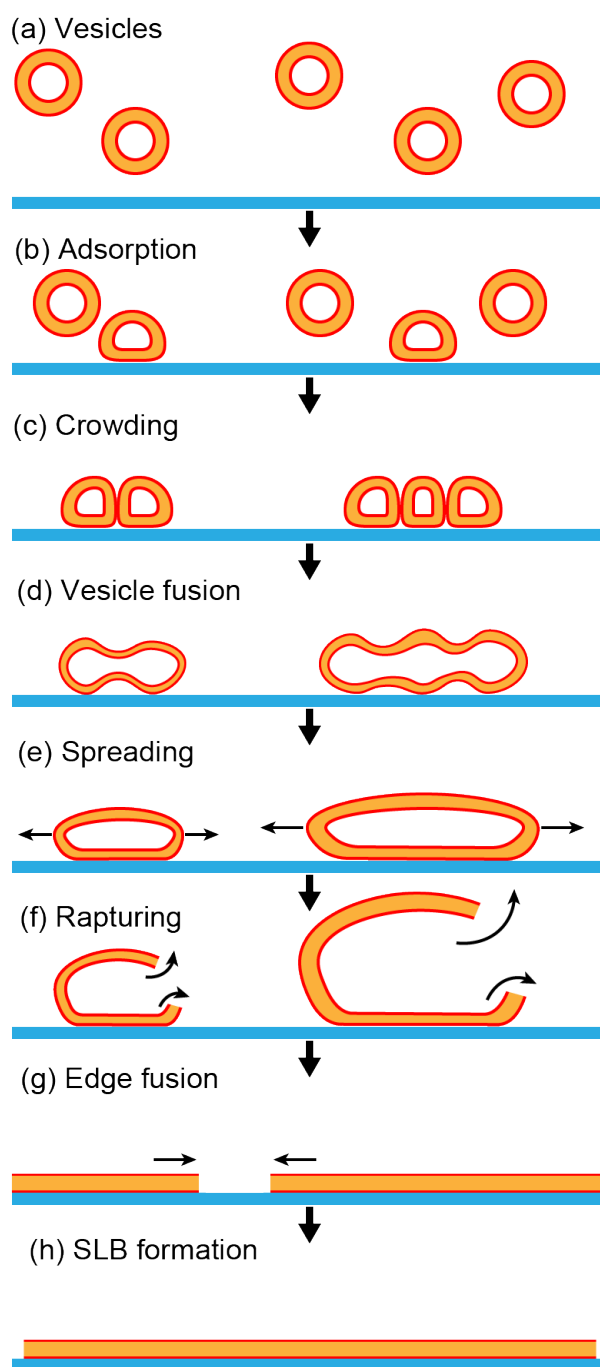


Fig 1.6 vesicle fusion による SLB 作製の模式図。

しかしながら、この一般的に用いられている手法にも欠点がある。それは、ベシクルを構成するリン脂質の中に比較的高い転移温度（すなわち、室温以上）を有するゲル相のリン脂質が含まれる場合、vesicle fusion を用いた SLB 作製実験が室温で試みられた際にベシクルの破裂を妨げてしまうという事である。ゲル

相のリン脂質分子は炭素鎖の二重結合を含まない飽和脂肪酸でありこれらは密にパッキングする為、これらで形成されたベシクルは大きな粘弾性を持つ。従って、ゲル相リン脂質の大きな粘弾性がベシクルの自発的な破裂を妨げてしまい、結果として脂質二重膜の形成が防がれてしまうという問題点がある(96, 97)。いくつかの研究では、**vesicle fusion** においてベシクルを吸着させて破裂させるプロセスの最中に基板全体の温度をゲル相リン脂質の転移温度より高い温度まで上げて液相に相転移させ、脂質二重膜が完全に形成された後にサンプルを室温まで冷却する事により、この問題を回避していた(98, 99)。Vesicle fusion のみならず自発展開の例にも言える事ではあるが、これらの手順を加える事で、ゲル相のリン脂質を含んだ脂質二重膜の形成自体は簡単に行える。しかしながら、大きな熱ゆらぎのせいで信頼性の高い脂質二重膜の動的情報を分析するのが困難になってしまう。従って、温度変化はバルク環境に敏感な表面分析技術（水晶振動子マイクロバランス法や原子間力顕微鏡法など）を使用した脂質二重膜の特性評価を非常に複雑にしてしまう。

前述した制限を克服する為、マイクロ流路を通じて有機溶媒（イソプロパノール、メタノール、エタノールなど）から水性溶媒（水や緩衝液）への溶媒交換プロセスを行うことにより、固体基板上にリン脂質分子を自己組織化させて脂質二重膜を作製する「溶媒支援型自己組織化」という手法が開発された(96, 100-103)。溶媒支援型自己組織化の模式図を Fig 1.7 に示した。有機溶媒中では、リン脂質分子はモノマーとして存在するか、逆ミセルを形成する。有機溶媒から水性溶媒へ溶媒交換をしている間、流路内の有機溶媒濃度は徐々に低下し、リン脂質分子の疎水性部分同士が相互作用を引き起こして集合する事でミセルやベシクルが形成される(104, 105)。そして溶媒交換によって水-有機溶媒混合溶液の有機溶媒濃度をさらに低下させていくに従って、臨界ミセル濃度も減少する(105)。この理論的な根拠は、アルコールと脂質膜の間の熱力学的な相互作用によって過去の研究で説明されている(106, 107)。臨界ミセル濃度が低下する事によってリン脂質分子の疎水性部分同士の相互作用が弱まりミセルやベシクルの構造が壊れる。最終的にマイクロ流路内の有機溶媒が水性溶媒に完全に交換された

時に、バラバラになったリン脂質分子の親水性部分が親水性表面の固体表面を向くように配列され、リン脂質分子の疎水性部分が相互作用する事によって脂質二重膜が形成される(105)。最も注目すべき点は、溶媒支援型自己組織化ではベシクルを準備する必要がない為、理論上ゲル相リン脂質を含む複雑な組成の脂質二重膜を室温で作製可能であるという点である(103, 108)。つまり、従来最も一般的に用いられてきた vesicle fusion には「作製可能な SLB に制限がある」という唯一の問題点を解決する可能性があるのが本手法の特徴である。膜を作製するのに使用する装置は vesicle fusion と同じく流量コントロールが可能なポンプと、基板がセット可能なマイクロ流路チャンバーのみである。従って、vesicle fusion と同様に操作が簡単であるだけでなく理論的には使用するリン脂質の種類に制限ない本手法は画期的な技術であると言える。

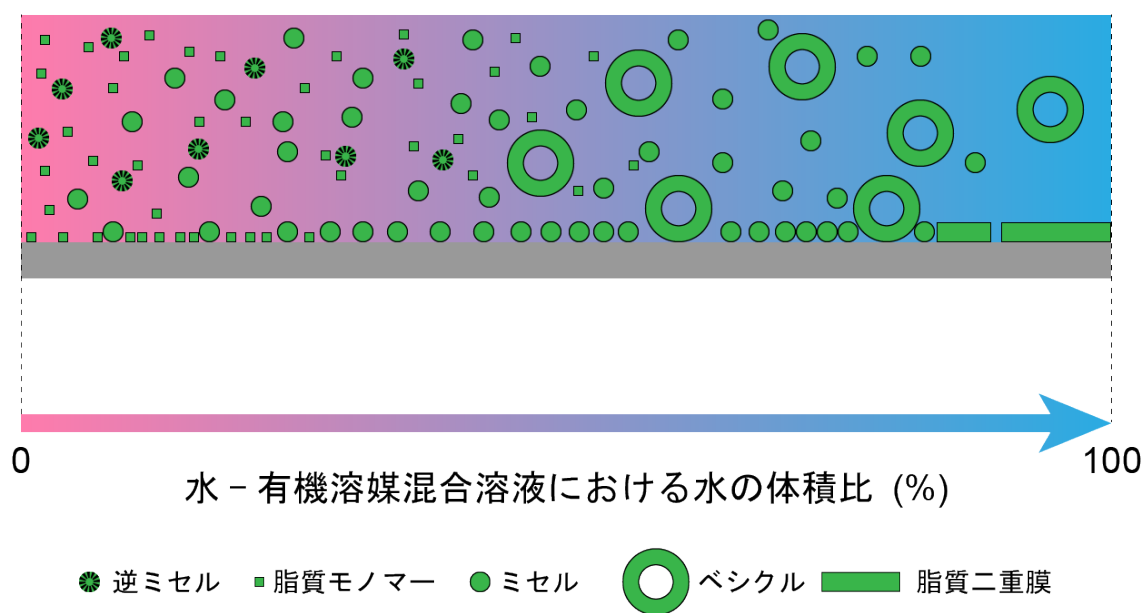


Fig 1.7 溶媒支援型自己組織化による脂質二重膜作製の模式図。

### 1.5 脂質二重膜の主な特性評価手法

細胞膜の様々な特徴や挙動に関する基礎研究やそれらの応用を目的とした技術開発の為に SLB が作製されたら、実際に膜を分析する必要がある。SLB の表面構造、リン脂質の組成、および特徴などの特性評価を行う為に、これまで様々な表面分析技術が用いられてきた。例えば、脂質二重膜の微細構造や分子の配列などの洞察は X 線反射(109, 110)および X 線回折(111)を使用する事によって得られている。これらの分析法により、脂質二重膜作製に用いたリン脂質のアルキル鎖が膜内でどのような配向で存在しているかという事を評価する事が可能である。アルキル鎖の構造や配向を解析する事で、実際の脂質二重膜内におけるリン脂質の相状態を評価する事が出来る。脂質二重膜の作製過程の評価や膜の粘弾性、また生体分子の結合の評価については、水晶振動子マイクロバランス法 (Quartz Crystal Microbalance: QCM)、表面増強ラマン分光 (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: SERS)、反射吸収赤外分光法が用いられている(112-114)。その他の特性評価の手法として、脂質二重膜の表面の分子組成やドメイン (相分離構造) は蛍光顕微鏡によって研究されている(111, 115, 116)。蛍光顕微鏡による脂質二重膜の観察では、リン脂質の親水性部分である頭部に蛍光標識分子を結合させたリン脂質を用いる。また、複数のリン脂質を用いた脂質二重膜では複数種類の蛍光標識分子を使用する、特定の種類のリン脂質を染色しないといった手法を取る事によって、脂質二重膜表面に形成されるドメインの観察も行われている。また、前述したとおり SLB が持つ重要な特性の側方拡散に関しては、光褪色後蛍光回復法 (Fluorescence recovery after photobleaching: FRAP) という手法を用いて評価されている(81, 117-119)。FRAP の測定では、蛍光を発している脂質二重膜に対してレーザーを照射して一度光褪色させる。そして、リン脂質分子の側方拡散による光褪色領域の蛍光回復を一定時間間隔で観察する事で、膜内のリン脂質分子の拡散係数を評価する事が可能になる。なお、FRAP の原理に関しては第 2 章で解説する。蛍光顕微鏡を用いた表面分子組成の観察および FRAP 測定での拡散係数評価は、SLB の組成や流動性といった重要な特性を評価

する事が出来る為、SLBの研究が注目され始めた頃から現在に至るまで非常に強力な特性評価手法として用いられている。

これまで挙げてきた様に、SLBの特性評価をする為に多種多様な方法が用いられてきた。しかしながら、ナノメートルレベルでのSLBの表面構造や特性に関しては、高解像度の表面画像化技術が不足していた為、最近までほとんど評価されていなかった。その様な中で、1980年代にG. Binnigらのグループが発明した原子間力顕微鏡法 (Atomic Force Microscopy: AFM) は(120)、今まで評価されていなかったナノスケールでのSLBの表面分析を可能にした画期的な評価手法である。AFM測定の利点は、液中環境においてSLBの表面構造や表面に存在する分子の構造変化をリアルタイムで観察する事が可能な点である(121)。加えて、AFMカンチレバーの探針で直接SLBを押し込む事によって、膜の粘弾性とその分布をナノスケールで評価する事が出来る点も画期的である(122, 123)。近年特にAFMを用いた脂質膜の分析例が増えてきており、作製したSLBの膜厚評価やドメイン形状観察など、様々な種類のリン脂質が含まれるSLBの表面構造、特性評価に関する研究で幅広く使用されている(124-126)。AFMは1 nm未満の高さの差であっても検出する事が出来る為、SLB表面に形成される相分離構造とその周囲の表面形状を検出可能である。その為、前項で解説した溶媒支援型自己組織化で今まで再現困難であったリン脂質組成の生体模倣脂質膜を作製する場合、AFM測定による特性評価は表面ナノ構造や組成による物性の違いなど有益な結果を多数与えてくれる強力なツールとなる。

## 1.6 本研究の意義と博士学位論文の構成

ここまで述べてきた様に、溶媒支援型自己組織化により様々なリン脂質組成の SLB の作製を可能にする事は、ドメインを含んだ非常に複雑で様々な組成の SLB 表面に関する研究の促進に繋がる為非常に有意義である。溶媒支援型自己組織化は、理論的には、使用するリン脂質の種類によらず SLB の作製を可能にする。これまでに、溶媒支援型自己組織化で実際に SLB が作製出来る事を証明する為に液相である DOPC の脂質膜を作製し、従来法である vesicle fusion で作製した DOPC の SLB と表面構造、DOPC の拡散係数を比較し、確かに SLB を作製可能である事を示されている(100)。また、細胞膜を構成する主要な生体分子であるコレステロールを DOPC と混ぜて脂質膜を作製し、DOPC 環境の中にコレステロールのドメインを形成した SLB である事も確認されている(96)。その一方で、複数種類のリン脂質分子、特に室温において液相とゲル相に明確に分かれるリン脂質分子を混成した SLB の作製例は無い。従って、今まで作製が出来なかった複雑なリン脂質組成の SLB に関する研究を促進させる為には、溶媒支援型自己組織化で様々な組成の脂質膜を実際に作製し、その脂質膜が SLB である事を示す必要がある。

この様な脂質膜を高品質に作製して特性評価を行い SLB であるかどうかを正確に評価する為に、完全にシーリングされた環境で溶媒の流速を制御可能な溶媒交換を実行できるようにするマイクロ流路チャンバーを利用する事が求められる。同時に、作製した脂質膜が SLB である事を示す為に、作製した脂質膜なるべく空気に触れさせずにチャンバー内で特性評価する必要がある。具体的に述べると、そのチャンバーの設計と寸法は、顕微鏡の光学的アクセスを可能にし、なおかつ原子間力顕微鏡法 (Atomic force microscopy: AFM) の探針が脂質膜に接近できるような条件である必要がある。なぜなら、SLB である事を示す為には SLB の重要な特性である側方拡散と膜表面が広範囲において平坦である事を評価しなければならず、それを可能にするには蛍光顕微鏡と AFM による分析を組み合わせる必要があるからである。脂質二重膜を作製する為に従来用いられてきた市販のマイクロ流路チャンバーまたはペトリ皿は、上記の条件を全て

満たすわけではなく、AFM 探針で膜表面に接近不可能、適切なシーリングの機構がない為に二重膜表面に気泡が生成されて膜の欠陥を形成する、多量のリン脂質溶液を使用する必要があるといった、いくつかの欠点がある(86, 127)。この問題を解決する為に本博士論文研究では、市販の、特に本実験で使用する光学顕微鏡 (Eclipse TE 2000、Nikon) および AFM (Asylum Research MFP-3D-BIO、Oxford Instruments、USA) に設置する事が可能な新たなマイクロ流路チャンバーを独自に設計する。概念的には、このマイクロ流路チャンバーの新規性は、光学顕微鏡と AFM の操作を妨げる事なく、流路内の流速を正確に制御できるという事である(127)。加えて、顕微鏡の光学的アクセスを可能にする透明な基板 (特にガラス基板) であれば制限なく使用可能であるという事もこのマイクロ流路チャンバーが持つ新規性である。このマイクロ流路チャンバーが開発される事により、液体環境で溶媒が漏れる事なく複数の溶媒交換プロセスが可能になる為、溶媒支援型自己組織化を利用した脂質膜の作製から特性評価までの一連の操作を行う事が出来る。

独自に設計したマイクロ流路チャンバー内でドメインを形成した SLB を実際に作製する事ができるかどうかを評価する為に、本研究では液相 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC、転移温度 = -17°C) およびゲル相 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC、転移温度 = 41°C) を含む SLB の作製を試みる。DOPC および DPPC の構造式は Fig 1.1(a)、(b)に示した。DPPC の転移温度は室温 (25°C) よりも高い為、室温条件下での vesicle fusion 法を使用した DOPC と DPPC を含む SLB の作製は非常に困難である事が分かっている(124, 128)。従って膜を占める DPPC の割合が相対的に高い SLB を作製するには、以前は転移温度以上で実験を行う必要があった。しかしながら、前述したように、測定環境が高温だと AFM を含むほとんどの分析装置において S/N 比に影響してしまう為、SLB の効果的な特性評価が妨げられてしまう。

これらの事を考慮して、本学位論文の研究目的は、溶媒支援型自己組織化と独自に設計・開発したマイクロ流路チャンバーを組み合わせ、今まで作られた事のない液相である DOPC とゲル相である DPPC が混成した SLB を作製して膜の特

性評価を可能にする、SLB 研究プラットフォームを構築する事である。この研究目的を達成する為に、DOPC と DPPC が混成した脂質膜を溶媒支援型自己組織化によって実際に作製する。次に、蛍光顕微鏡観察、光褪色後蛍光回復 (Fluorescence recovery after photobleaching: FRAP) 法、AFM イメージング、AFM を用いた力-距離曲線測定など、脂質二重膜の特性評価で一般的に用いられる分析手法を実行し、本実験で作製した脂質膜が SLB である事を評価する。その上で、純粋な液相脂質膜 (すなわち、DOPC のみの脂質膜) と DOPC および DPPC を用いた脂質膜の生物物理的特性を比較し、膜を占めるゲル相の割合の増加が脂質膜の表面構造や膜機能に及ぼす影響を調査する。本博士学位論文の構成としては、前述した第 1 章を含めて 5 つの章から構成されている。第 2 章では、本研究の脂質膜特性評価に使用した蛍光顕微鏡法、FRAP および AFM の基本原理について述べる。その上で、脂質膜を作製する前の前駆体脂質溶液の調整法、マイクロ流路チャンバーの詳細、溶媒支援型自己組織化を用いた脂質膜作製プロトコル、蛍光顕微鏡観察と FRAP および AFM 測定の手法と測定条件について述べる。第 3 章では、作製した様々な組成比の脂質膜を蛍光顕微鏡法および FRAP により評価した事について述べる。特に SLB の重要な特徴の一つである膜内リン脂質分子の拡散係数を FRAP によって分析し、溶媒支援型自己組織化による DOPC と DPPC の SLB 作製可能性について評価する。第 4 章では、作製した様々な組成比の脂質膜を AFM により評価した事について述べる。膜内リン脂質の側方拡散以外の SLB の重要な特徴である均一で平坦な表面を有する事を AFM イメージングにより確認する。さらに、力-距離曲線測定を行う事で作製した脂質膜が SLB と同等の膜厚を有しているかどうか、また膜を占めるゲル相リン脂質の割合の増加が脂質膜の硬さに及ぼす影響を評価する。第 5 章では、溶媒支援型自己組織化を利用して作製した脂質膜の拡散係数や機械特性を、これまで過去に行われてきた SLB 研究の結果と比較する事でその妥当性を評価する。その上で、SLB 作製に使用する基板 (特に表面の物理化学的性質)、リン脂質分子の種類、膜作製時の温度などによる拡散係数や機械特性への影響を述べる。加え

て、それらの条件によるドメイン構造の違いと膜機能との関連について述べる。  
最後の第 6 章では、本実験の総括と今後の展望について述べる。

## 第2章 本研究で行った脂質膜作製とその評価方法

第2章では、本研究で実際に行った脂質膜の作製手法、脂質膜の評価を行う為の分析手法について述べた。脂質膜の作製に関しては、脂質膜を作製する為の前駆体脂質溶液の調整手順、溶媒支援型自己組織化による脂質膜作製手順について述べた。また、作製した脂質膜を評価する為に用いた蛍光顕微鏡法、光褪色後蛍光回復法 (Fluorescence recovery after photobleaching: FRAP) および原子間力顕微鏡法 (Atomic force microscopy: AFM) によるイメージングとナノ力学測定 の原理について述べた。さらに、脂質膜の作製と評価に使用可能な独自に開発したマイクロ流路チャンバーについて述べた。

### 2.1 蛍光顕微鏡法

#### 2.1.1 蛍光顕微鏡法の原理

長年にわたる顕微鏡の技術的な改良の多くは、着目している物質 (シグナル) とそうでない物質 (バックグラウンド) のコントラストを高める事に重点を置かれてきた。その中の典型的な例として、蛍光顕微鏡法が挙げられる。この手法は、黒い背景の中に観察対象の物質のみを表して観察する事を目的として開発された(129)。この様に観察対象物質のみを顕微鏡で観察する為、蛍光顕微鏡法では対象物質が蛍光を発する事が必要不可欠となっている。ここでは、蛍光を理解するために、物質中の電子が励起されてエネルギーが放出するまでの過程をまとめた Jablonski diagram (Fig 2.1) を用いて解説する(130, 131)。まず、物質の電子は基底状態 ( $S_0$ ) で存在する。この物質にある波長の光を照射する事で、物質が光を吸収して物質を構成する電子のエネルギーが上昇して励起状態 (励起一重項状態、 $S_2$ ) となる。与えられたエネルギーは自然と放出され、内部転換によって励起状態の中で最もエネルギー準位が低い位置 ( $S_1$ ) までエネルギーが落ちる。そして、 $S_1$  の状態からナノ秒後にさらに余剰エネルギーが放出される事によって、発光が生じる。この発光する現象の事を蛍光と呼ぶ。ちなみに、 $S_1$  の

状態から項間交差を経て励起三重項状態 ( $T_1$ ) に移り、その状態からエネルギーが放出される現象の事を燐光と呼ぶ。

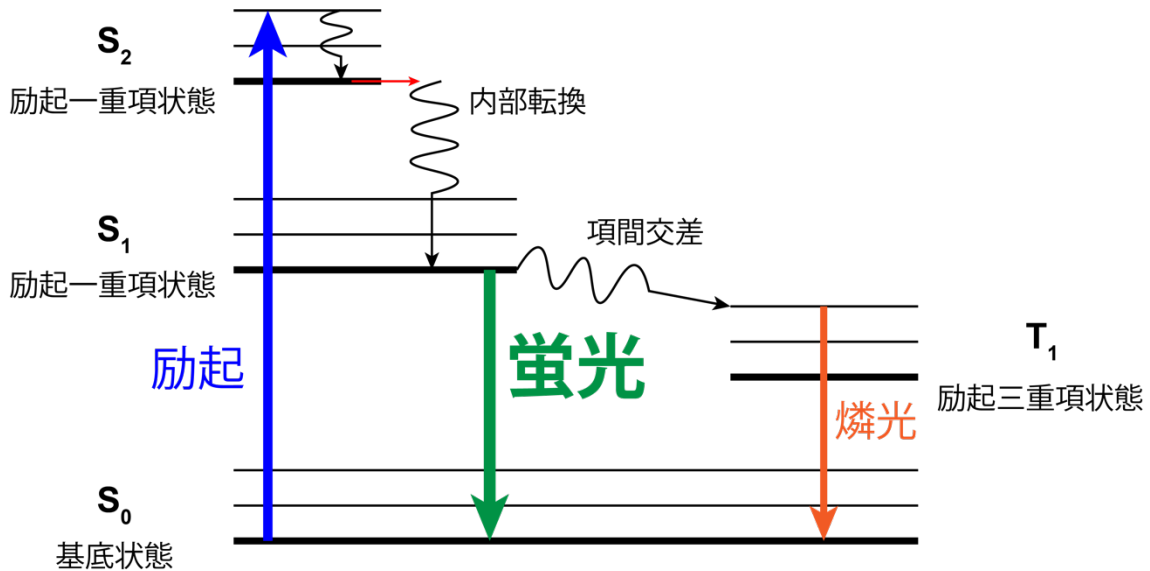


Fig 2.1 Jablonski diagram.

物質はそれぞれ、吸収しやすい光の波長帯を固有に持っている。従って、蛍光顕微鏡で観察対象物質を観察する為には、実験で用いる励起光の波長を特異的に吸収して蛍光を発するような蛍光色素を選択する事が必要不可欠である。代表的な蛍光色素として DAPI、FITC、Rhodamine などが挙げられる。これらを、実験で用いる励起光の波長によって使い分ける。

実験で用いる励起光の波長は、光学顕微鏡の内部に取り付けられた励起フィルターによって決定する。Fig 2.2 に、代表的な倒立顕微鏡内部におけるフィルターの役割をまとめた模式図を示す。例えば光源から白色光が入射して来る場合、励起フィルターはサンプルを励起させる為に必要な波長のみ通す。励起フィルターを通過した励起光はダイクロイックミラーに当たり反射する事で対物レンズを通りサンプルに入射する。このダイクロイックミラーという鏡は、特定の波長の光のみ反射して、それ以外の光を透過するという特徴を持つ。その後サンプルが発光した蛍光やサンプルからの不要な散乱光は再びダイクロイックミラーに当たるが、ダイクロイックミラーの特徴によって、これらの光は接眼レンズ

やカメラの方向に透過する。これらの光が吸収フィルターに当たると、サンプルからの不要な散乱光は透過せず蛍光のみ透過するという仕組みである。吸収フィルターによって得られる蛍光をカメラなどで観察するのである。

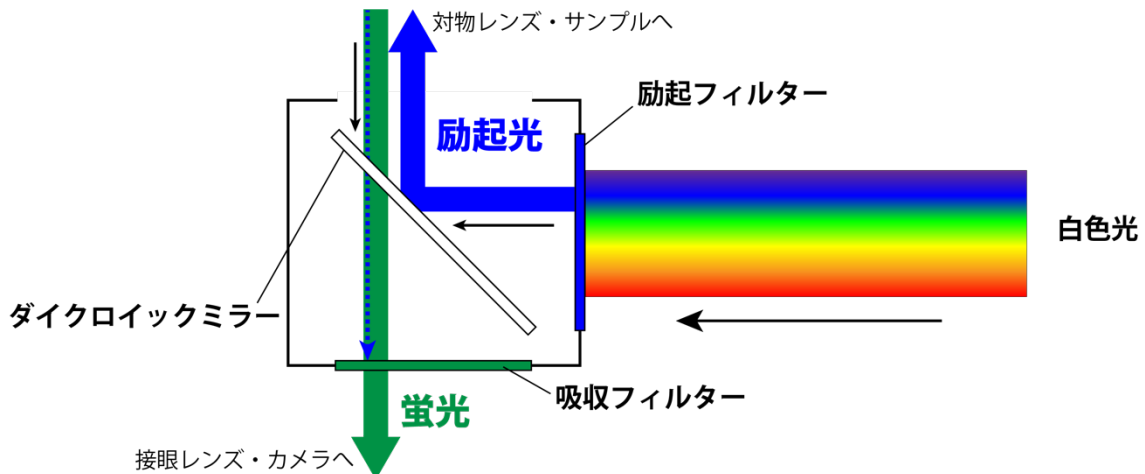


Fig 2.2 倒立顕微鏡内におけるフィルターの役割をまとめた模式図。

### 2.1.2 光褪色後蛍光回復法の原理

蛍光顕微鏡は、試料によっては特性評価にも有用である。例えば試料が脂質二重膜の様に構成している分子が流動性を有する場合、光褪色後蛍光回復法 (Fluorescence recovery after photobleaching: FRAP) という手法を用いて特性評価を行う事ができる(132-134)。FRAP測定を行う為には、まず初めに蛍光標識した試料に強度の高いレーザー光を照射する (Fig 2.3(a))。試料に標識された蛍光色素分子は励起光を当て続けると蛍光を発生し続けるが、強いレーザー光を浴びた事によってその分子構造が変化し、蛍光を放出する事ができない状態になる (Fig 2.3(b))。試料を構成する分子が試料内を自由に流動している場合、褪色していない部分の分子が褪色した部分に入り込む為、徐々に光褪色部位の蛍光が回復する (Fig 2.3(c))。そして最終的に、光褪色部位の蛍光は一定時間後に回復して黒い部分が消失する (Fig 2.3(d))。

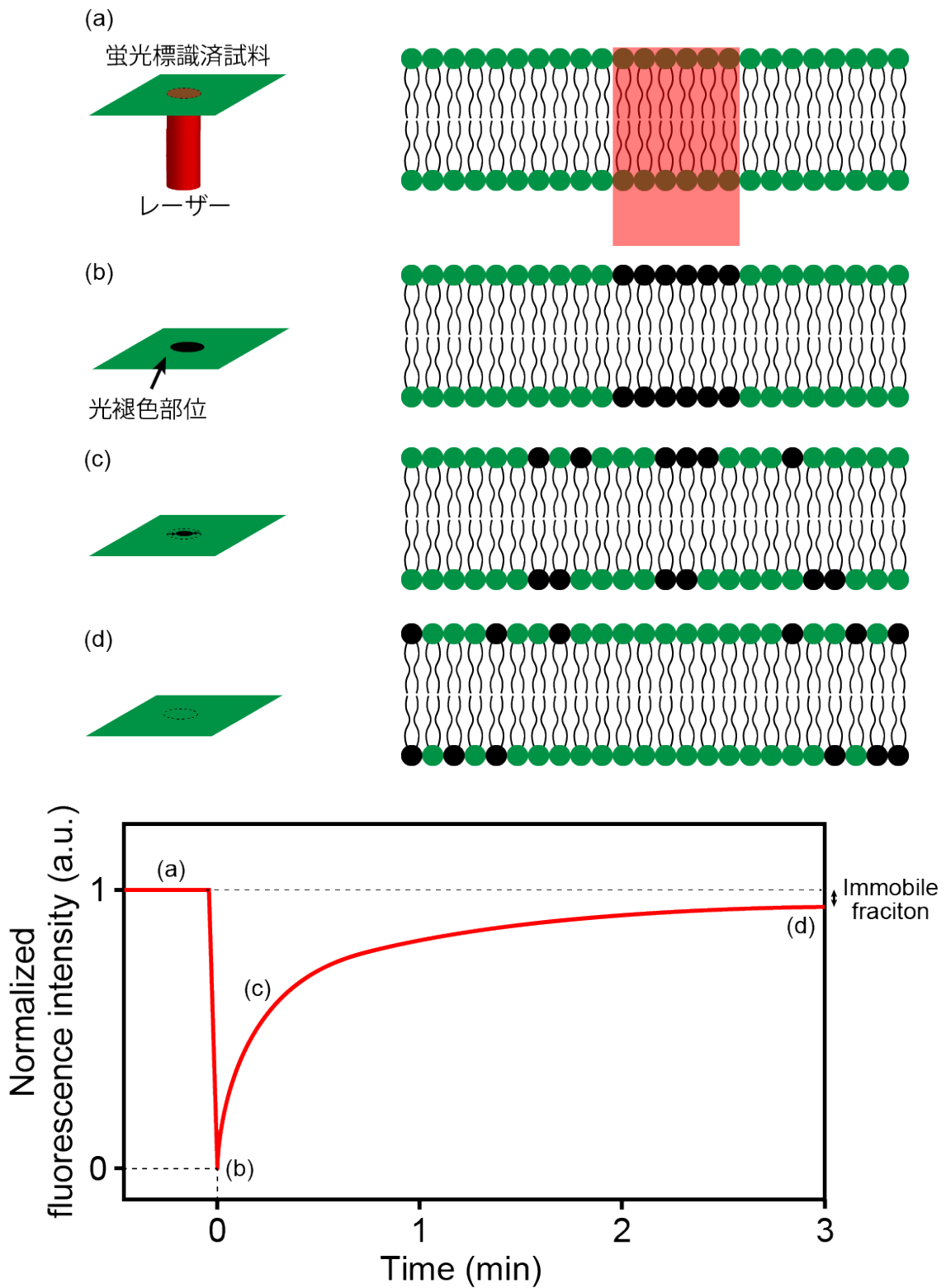


Fig.2.3 FRAP 測定における(a)レーザー照射、(b)蛍光標識分子の光褪色、(c)リン脂質分子の側方拡散による蛍光回復過程、(d)蛍光回復後の模式図。

この FRAP 測定は、得られた結果から脂質二重膜内のリン脂質分子の拡散係数を算出し、膜の流動性を評価する事に用いられる。レーザーを照射する前から十分蛍光強度が回復するまでの間、一定の時間間隔で同じ場所の蛍光像を取得する。後ほど出てくる 2.6 項で具体的な実験条件を示すが、本実験においては 2 秒間隔で 3 分間蛍光像を取得し続けた。蛍光像の光褪色部分を円形と近似し、円形部分の合計蛍光強度を一定時間間隔でプロットする。この操作で得られたプロットのフィッティング曲線から拡散係数を算出する事で、脂質二重膜のリン脂質分子拡散度を評価する事が可能になる。

ここで、この一連の現象をより詳細に解析するモデル式を解説する。光褪色後の試料が平面かつ等方性を持つ時、光褪色後の蛍光標識分子の回復はフィックの第二法則で次のようにモデル化可能である(135)。

$$\frac{\partial c_{r,i}(r,t)}{\partial t} = D_i \nabla^2 c_{r,i}(r,t) \quad (2.1)$$

ここで、 $r$  は光褪色した領域の中心からの半径、 $t$  は時間、 $D_i$  は  $i$  番目の拡散成分の特性拡散係数を表している。変数  $c_{r,i}(r,t)$  は相対濃度  $c_{r,i}(r,t) = c_i(r,t)/c_{i,eq}$  で定義される。ここで、 $i$  番目の蛍光標識分子の濃度が  $c_i$  で、光褪色していない平衡濃度が  $c_{i,eq}$  と表されている。式 (2.1) において、系を単純にする為に光褪色後の蛍光標識分子の初期濃度は円対称性を持っていると仮定する。さらに、蛍光回復が生じている過程の計測中における対流と光褪色の影響は無視できると仮定する。式 (2.1) における局所拡散係数  $D_i$  も等方性をもつと仮定する。ここで、局所拡散係数は異方性挙動を示す事もあるので、この仮定は常に当てはまるわけではない事に注意する(136)。しかしながら、細胞膜内での側方輸送モードの多くは等方性挙動を示す事が確認されており(136)、これは無秩序な系においてほとんど総体的な状況である。従って、今回は異方性拡散への拡張に関しては考えないものとする。

式 (2.1) の解は、例えば光褪色した領域がガウス曲線の強度プロファイルを有しているなど、特別な場合でしか得られない。しかしながら、光褪色の実験系が一般的な場合であっても、光褪色した領域の初期寸法よりもはるかに大きい系だと仮定する場合、ハンケル変換法を用いる事で式 (2.1) の解を決定する事が可能である。式 (2.1) のハンケル変換は、変換 $f_i(k, t)$ が $t$ と空間周波数 $k$ に対して以下のように依存する事を示している。

$$f_i(k, t) = f_i(k, 0) \exp(-4\pi^2 D_i k^2 t) \quad (2.2)$$

ここで、空間周波数が $k$ の時の $f_i(k, t)$ は以下の様に定義される(137)。

$$f_i(k, t) = 2\pi \int_0^\infty (1 - c_{r,i}(r, t)) J_0(2\pi k r) r \, dr \quad (2.3)$$

この時の $J_0$ は、0次のベッセル関数である。式 (2.3) における積分は、積分の収束を得る為に $c_{r,i}(r, t)$ の代わりに $1 - c_{r,i}(r, t)$ という式を含んでいる。従って、ハンケル変換 $f_i(k, t)$ は蛍光標識分子の空間分布に関する情報を含む。ここで、 $k$ という値の大小はそれぞれ遠距離と近距離で濃度がどのように変化するかを表している。

FRAP測定における相対濃度 $c_{r,i}(r, t)$ は、 $i$ 番目の構成要素によって得られる蛍光強度のプロファイルと関連する。これは、ハンケル変換 $f_i(k, t)$ が系の中でたった1つの種類の拡散成分が存在している時、FRAP測定で得られた画像から決定されるという事を意味している。そして、拡散係数 $D_i$ は式 (2.2) によって得られる。異なる拡散成分を含んだ系の場合、代わりに蛍光強度のプロファイルは系の中における全ての蛍光標識分子の合計強度となる。今回の場合、式 (2.2) は次のように書き換えられる。

$$F(k, t) = \sum_i \gamma_i f_i(k, t) = \sum_i \gamma_i f_i(k, 0) \exp(-4\pi^2 D_i k^2 t) \quad (2.4)$$

ここで、パラメーター $\gamma_i$ は光褪色前の  $i$  番目の構成要素から得られる蛍光強度  $I_{pre,i}$  と合計蛍光強度の割合を表している。

$$\gamma_i = \frac{I_{pre,i}}{\sum_i I_{pre,i}} = \frac{q_i c_{i,eq}}{\sum_i (q_i c_{i,eq})} \quad (2.5)$$

パラメーター $q_i$ は、濃度 $c_i(r, t)$ と  $i$  番目の構成要素から得られる蛍光強度との間の比例定数である。式 (2.4) は FRAP 分析をする際の基盤となる式である。

ここで、実際のデータ処理に関する解説をする。まずは、レーザーを照射した直後の蛍光像中で、光褪色した領域の重心となる座標を計算する。この時、光褪色領域を円形と仮定する。そして、式 (2.4) をもとに導出される以下に示した一般的な式の指数関数にハンケル変換をフィッティングする。

$$F(k, t) = F(k, 0) \left( (1 - \gamma_2 - \gamma_0) \exp(-4\pi^2 k^2 D_1 t) + \gamma_2 \exp(-4\pi^2 k^2 D_2 t) + \gamma_0 \right) \quad (2.6)$$

ここで、 $F(k, 0)$ は光褪色直前のハンケル変換である。また、 $D_1$ と $D_2$ は異なる2つの拡散係数である。 $\gamma_2$ は2番目の構成要素の割合であり、 $\gamma_0$ はFRAP測定における不動分子の割合を表す。次に、カーブフィッティングをする際、次の4つの場合のうちの1つを選択する必要がある。

- (1) 不動分子を含まない単一の拡散要素の場合 ( $\gamma_2 = \gamma_0 = D_2 = 0$ )
- (2) 不動分子を含む単一の拡散要素の場合 ( $\gamma_2 = D_2 = 0$ )
- (3) 不動分子を含まない2つの拡散要素の場合 ( $\gamma_0 = 0$ )
- (4) 不動分子を含む2つの拡散要素の場合

これらの中で適切な条件を選択し、正規化されたハンケル変換  $F(k, t)/F(k, 0)$  と指数関数の乗数である  $4\pi^2 k^2 t$  から得られるプロットをカーブフィッティングする。これによって得られたフィッティング曲線から拡散係数を算出する。

上述したような FRAP 測定および解析を行うと、例えば脂質二重膜を構成するリン脂質の分子流動性を定量的に議論する事が可能になる。光褪色部位の蛍光強度と時間の関係の経時変化をプロットする事でリン脂質が脂質二重膜を流動する際の拡散係数を計算できる。これによって膜の柔らかさを評価する事ができる。この解析法が確立された事により、脂質二重膜を用いたバイオセンサーの性能評価や細胞膜タンパク質の膜内挙動に関する研究を行う事が可能になった。

## 2.2 原子間力顕微鏡法 (AFM)

### 2.2.1 原子間力顕微鏡法の発明と原理

本論文の研究で主に用いている原子間力顕微鏡 (Atomic force microscopy: AFM) は、G. Binnig らによって発明された分析装置であり、1980 年代初期に同グループがその前身として開発した走査型トンネル顕微鏡法 (Scanning tunneling microscopy: STM) (138) を改良したものである。STM は、探針を導電性物質表面に接近させ、両者の間で生じるトンネル電流から表面形状を観察するという分析手法である。G. Binnig らは、タングステン製の鋭く尖った探針-白金基板表面間の距離と、その間で生じるトンネル電流やトンネル抵抗の大きさに相関がある事を発見(139)し、トンネル電流の大きさから導電性試料表面の構造を原子レベルで観察する手法として開発した(138)。しかしながら、この分析手法では絶縁性物質表面の構造を観察する事が出来ない為、観察可能な試料には制限があった。この問題を解決する為に同グループは、ダイヤモンド製の探針が先端に付いているカンチレバーと呼ばれる片持ち梁を試料に接触させ、接触によって生じるカンチレバーのたわみ (変位) を STM で計測する AFM という新たな分析装置を開発した(120)。

AFM の測定におけるカンチレバーの変位を計測する主な手法として、4 つのセグメントに分かれた位置検出用フォトダイオード (Position sensitive detector: PSD) が用いられている。Fig 2.4 に AFM 装置の模式図を示す。

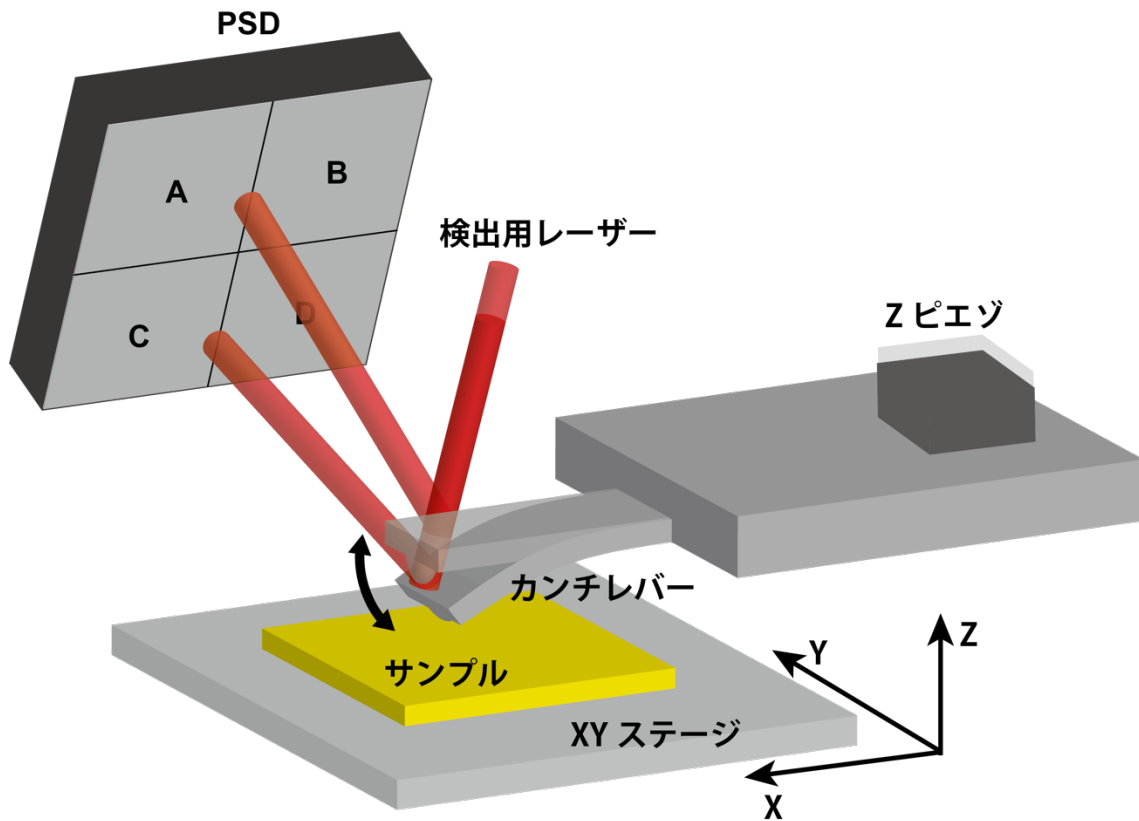


Fig 2.4 AFM 装置の模式図。

カンチレバーの背面に位置検出用のレーザーが照射され、その反射光がこの PSD に入射する。カンチレバーの z 位置を制御する piezo が伸びていき試料に接触する事で力を受けてカンチレバーがたわむと、位置検出用レーザーの反射光の光路が変化する。これによって PSD に入射する光の位置も変わる。これは光てこ方式と呼ばれている(140)。光てこ方式の模式図を Fig 2.5 に示す。通常 AFM の装置内に設置されている検出用レーザー光源とカンチレバーの間の距離よりも PSD とカンチレバーの間の距離の方が十分長くとられている。その場合、カンチレバーがサンプルとの相互作用でたわむ変位が微小であっても、PSD で

は変位を増幅して検出する事が可能である。実際、AFM測定においてはナノメートルオーダーの高さの違いを検出する必要も出てくるが、カンチレバーの変位が数ナノメートルであっても PSD では十分検出する事が可能である。従って、この光てこ方式が採用された事によってサンプル表面の微小な表面凹凸を検出する事が可能となり、AFM測定は検出限界がオングストロームレベルの高感度分析手法となっているのである。

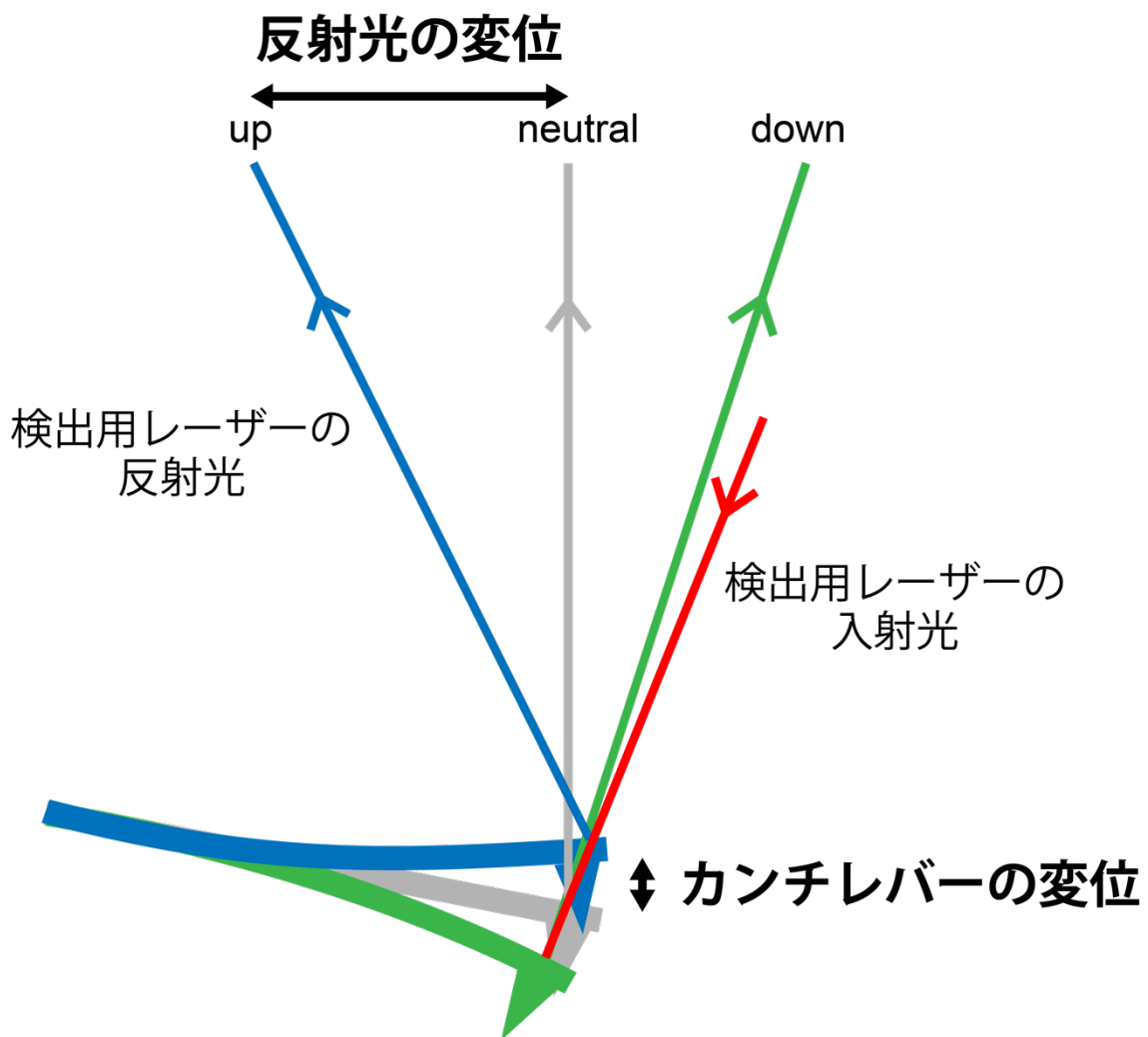


Fig 2.5 光てこ方式の模式図。

前述した通り、カンチレバーの背面で反射したレーザーの反射光は PSD に入射する。PSD は、それぞれ 4 つのセグメントに入射した光の量に比例した電圧が

生じるという特徴を持っている。それぞれのセグメントで生じる電圧をそれぞれ  $V_A$ 、 $V_B$ 、 $V_C$ 、 $V_D$  と定義する。

光てこ方式による反射光の位置の変化は、PSD の上半分で生じる電圧 ( $V_A + V_B$ ) から下半分で生じる電圧 ( $V_C + V_D$ ) を引く事によって、カンチレバーが上下どちらにどれだけ曲がっているのかに関して定量的に議論する事が出来る。ここで、カンチレバーのたわみを Deflection と定義すると、下記のように Deflection が計算可能である。

$$\text{Deflection} = \frac{(V_A + V_B) - (V_C + V_D)}{V_A + V_B + V_C + V_D} \quad (2.7)$$

そしてこの式 (2.7) を用いる事で、カンチレバーがどちら側にたわんでいるかが以下のように判定できる。

Deflection > 0 ← 上側へのたわみ

Deflection < 0 ← 下側へのたわみ

このようにカンチレバーの Deflection によって表面形状をイメージングする為、カンチレバーがたわんでいない neutral の時に Deflection が 0 になるような位置に PSD の位置を調整して測定に臨む必要がある。この状態で試料表面をイメージングする場合、通常探針を試料表面に押し付けると反発力を受けてカンチレバーが反る為 PSD の上側に反射光が当たる。その為 Deflection は正の値をとる。Deflection が正の値をとる時の代表例として、試料表面に探針を押し付ける事で表面形状をイメージングする時や、脂質二重膜の様な生体膜を探針で押し込む事で硬さを評価する時などが挙げられる(141, 142)。これらの現象は、後述する第4章の実験で登場する。一方、探針と試料表面の間に引力が発生するとカンチレバーが下側にたわむ為 PSD の下側に反射光が当たる。その為 Deflection は負の値をとる。Deflection が負の値をとる時の代表例として、柔らかくて粘弾性の高い表面から探針が離れようとする時が挙げられる。

### 2.2.2 コンタクトモードの原理とフォースカーブ測定

カンチレバーがたわむ事による変位を測定してカンチレバーのばね定数を用いる事で、試料から受ける力を解析する事が可能である。そしてこの力が常に一定になるようにカンチレバーの  $z$  位置を制御しながら試料表面を走査する測定法がある。この測定法をコンタクトモード(143)と呼び、試料表面の凹凸を観察する際によく用いられている。さらに、ある一定の値の力がカンチレバーにかかったらフィードバックをかけ、カンチレバーを試料に接近・離反させる測定法もある。カンチレバーが試料に接近しフィードバックがかかったら離反していく一連のプロセスを力-距離曲線 (フォースカーブ) として描く事で、探針と試料の間に働く力を検出する事ができる。フォースカーブ測定を行う際にはカンチレバーにかかる力をもとに正確なフィードバックをかけなければならない。その為、測定の前にはカンチレバーの正確なばね定数を校正する必要がある。カンチレバーの接近・離反プロセスにおける試料とカンチレバーの位置関係については後ほど説明するが、ガラスなどの固体基板に対する接近・離反プロセスで得られる  $z$  ピエゾの位置と Deflection を示す代表的な曲線を Fig 2.6 に示した。

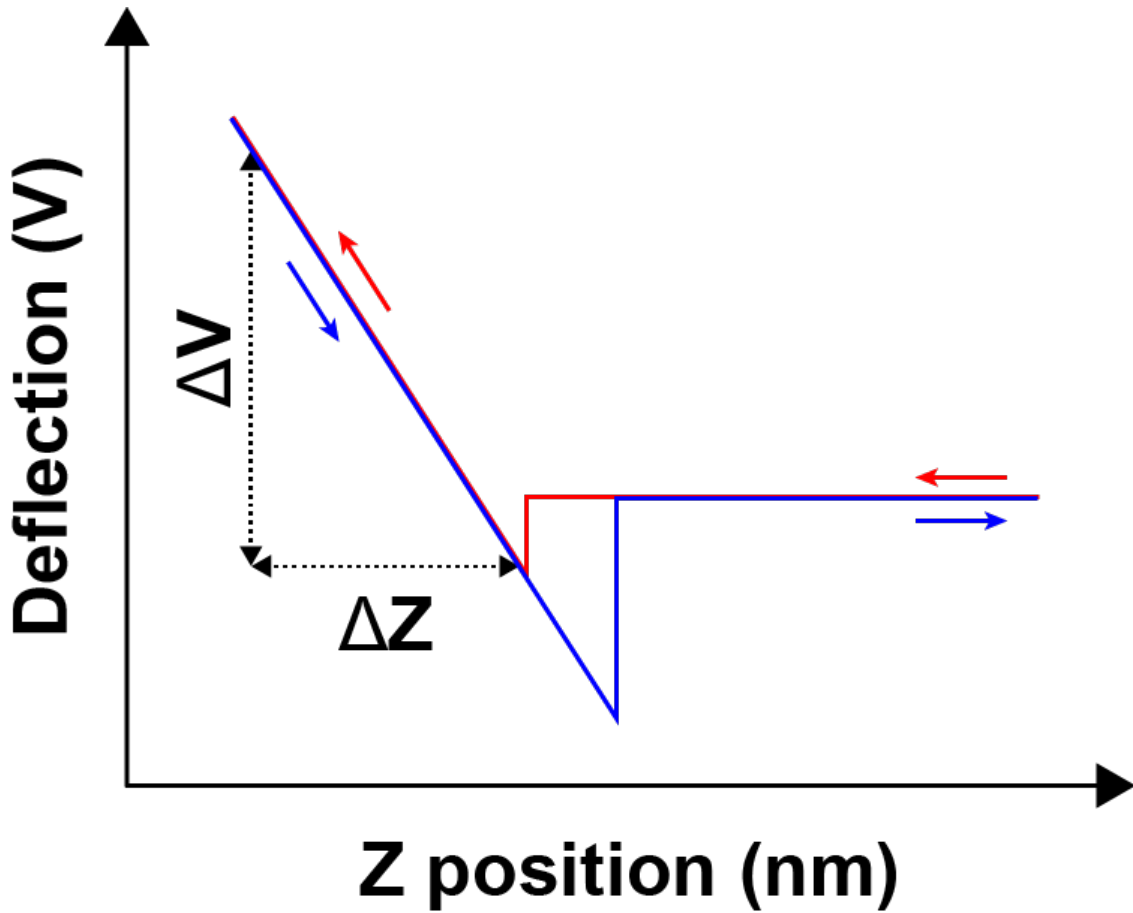


Fig 2.6 z ピエゾの位置と Deflection の関係を表したフォースカーブの概略図。

この曲線において z ピエゾの位置を試料側に近付けるにつれて Deflection が一定の割合で増加する領域がある。この領域では、カンチレバーの探針が試料を押し付けている。ばね定数の校正をする準備段階としてまず、この領域における直線の傾きの逆数を使用する。Deflection の変化量を  $\Delta V$  (V)、z ピエゾの位置の変化量を  $\Delta Z$  (nm) とおくと、これらの変化量の割合は次のように表せる。

$$InvOLS = \frac{\Delta Z}{\Delta V} \quad (2.8)$$

ここで、InvOLS (Inverse Optical Lever Sensitivity) は AFM カンチレバーの感度 (nm/V) を表す数値である(144)。ここで、カンチレバーのばね定数を  $k_c$  とおく。ばね定数の一般的な導出方法として、Hutter と Bechhoefer が 1993 年に確立した Thermal 法(145)という手法が用いられている。これはカンチレバーの熱振動からばね定数を求める手法である。この手法では、熱により数オングストローム程度振動しているカンチレバーを調和振動子であると仮定し、そのハミルトニアンを計算する。この時のハミルトニアン  $H$  は次のような関係が成り立つ。

$$H = \frac{p^2}{2m} + \frac{1}{2}m\omega_0^2q^2 \quad (2.9)$$

ここで、 $q$  は調和振動子の変位、 $p$  は運動量、 $m$  は調和振動子の質量、 $\omega_0$  は角振動数である。エネルギー当配分の法則により、ハミルトニアンのそれぞれの二次項の平均値は  $\frac{k_B T}{2}$  が与えられる。ここで、 $k_B$  はボルツマン定数、 $T$  は温度を表す。具体的にいうと、以下の通りである。

$$\langle \frac{1}{2}m\omega_0^2q^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T \quad (2.10)$$

角振動数は系の質量とばね定数を用いて  $\omega_0^2 = \frac{k_c}{m}$  と表せる為、式 (2.10) に代入する事でばね定数は次のように表せる。

$$k_c = \frac{k_B T}{\langle q^2 \rangle} \quad (2.11)$$

また、平均二乗変位量  $\langle q^2 \rangle$  は次の式で表せる。

$$\langle q^2 \rangle = \frac{\pi}{2} \text{InvOLS}^2 f_R P_{dc} Q \quad (2.12)$$

熱振動している調和振動子はカンチレバーであるという考えに戻すと、ここで、 $f_R$ はカンチレバーの共振周波数、 $P_{dc}$ はDC power response ( $V^2/Hz$ )、 $Q$ はカンチレバーの振動のQ値である。 $f_R$ と $Q$ は使用するカンチレバーに依存する為、カンチレバー熱振動のパワースペクトルをフィッティングする事によって導出する。フィッティングに使用する式は以下の通りである(146)。

$$S(f) \cong P_w + \frac{P_{dc} f_R^4}{(f^2 - f_R^2)^2 + \frac{f^2 f_R^2}{Q^2}} \quad (2.13)$$

ここで、 $S(f)$ は power response function、 $P_w$ は white noise floor ( $V^2/Hz$ )、 $f$ はカンチレバーの周波数 (Hz) を表す。この式 (2.13) を用いたフィッティングにより得られた  $f_R$ と  $Q$ および式 (2.8) であらかじめ取得していた InvOLS の値を式 (2.12) に代入する事で、平均二乗変位量 $\langle q^2 \rangle$ を求める事ができる。最後に式 (2.11) に $\langle q^2 \rangle$ を代入する事によって、目的であったカンチレバーのばね定数  $k_c$ を算出する事が可能である。

この様にして得られた校正値をもとに、AFM の測定ではカンチレバーに働く力を検出する。カンチレバーが試料表面に接触してたわむ事による Deflection の変化量 (V) と *InvLOS* (nm/V) から、以下のように Deflection の変化量の単位を nm、つまりカンチレバーのたわみ量に変換する事ができる。

$$\Delta Def_{(V)} \times \text{InvLOS}_{(nm/V)} = \Delta Def_{(nm)} \quad (2.14)$$

ここで、 $\Delta Def$ は Deflection の変化量であり、各文字の右下に単位を記入した。カンチレバーがたわむ事で受ける力  $F$ は、Hooke の法則よりばね定数  $k_c$ とカンチレバーのたわみ量 $\Delta Def$ との間に以下の関係が成り立つ。

$$F_{(nN)} = k_c (nN/nm) \times \Delta Def_{(nm)} \quad (2.15)$$

式 (2.15) より、AFM 測定においてカンチレバーの探針と試料の間に働く力を検出する事が可能となる。

フォースカーブ測定を理解する為の例として、探針を引き付ける力が働く試料を用いた測定の模式図を Fig 2.7 に示す。

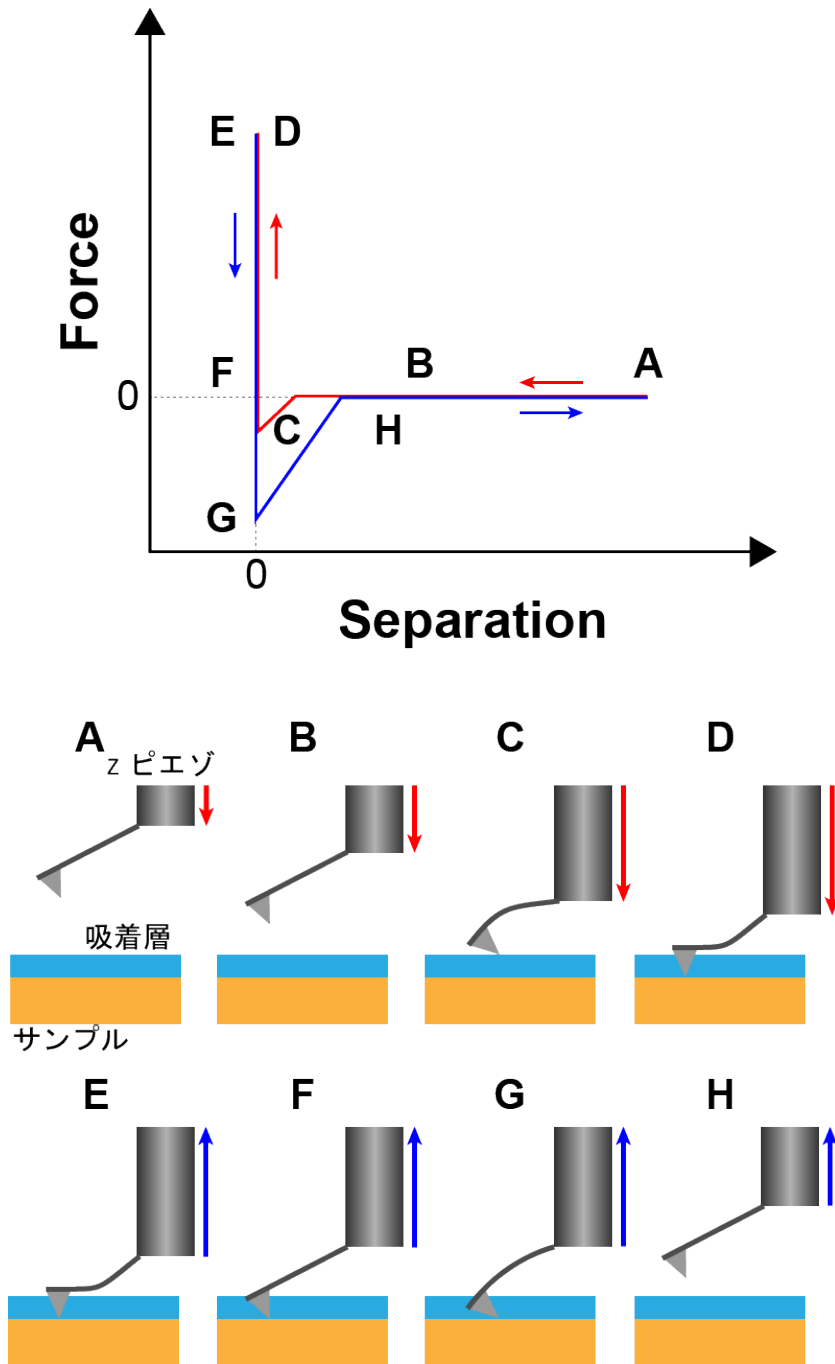


Fig 2.7 フォースカーブと各位置におけるカンチレバーの状態の模式図。

横軸の Separation は、探針先端と試料表面の間の距離を表している。これを定義する為に、z ピエゾの変位からカンチレバーの変位量 (たわみ) を引く事で Separation の値を算出している。具体的には、以下の計算を行う。

$$Separation_{(nm)} = Z\ position_{(nm)} - Deflection_{(nm)} \quad (2.16)$$

カンチレバーを接近・離反させる際にはzピエゾでカンチレバーのz位置を調節している。コンタクトモードでは、カンチレバーが試料表面から受ける力を一定に保つようにフィードバックをかけてz位置を調節している。従って、探針が試料表面に接触し始めても（つまり、探針先端と試料表面の距離が0であっても）フィードバック値に到達するまでzピエゾは伸びる。一方、式

(2.16) で示した様に、zピエゾの位置からカンチレバーのたわみ量を引くと、探針と試料表面が接触した後のzピエゾの変位とカンチレバーのたわみ量が等しくなる為、探針が試料表面に接触した後の接近プロセスでは Separation の値は0を取り続ける。従って、式 (2.16) の計算処理をする事で、AFM測定において探針先端と試料表面の間の距離を表せるのである(143)。

最初に Fig 2.7 の A と B で示した通り、カンチレバーの探針はサンプル表面から十分遠い位置から徐々に表面へ接近していく。その際zピエゾがカンチレバーの高さ位置を制御している。その後Cの時点でサンプルとの引力相互作用により探針は表面に引き付けられる。その際カンチレバーに負方向への力が働く為、カンチレバーは下側にたわみ、検出される力はマイナスの値をとる。さらにカンチレバーを接近させるとサンプル表面と接触し、探針自体の変位は0となる。この状態でさらに接近させると探針-サンプル表面間の距離は変化しないが、探針はサンプル表面から反発力を受ける為カンチレバーが上側に反り、検出される力がプラスの値をとるようになる。DとEで示したように、カンチレバーが受ける力の値が測定前に設定したフィードバックをかける力(トリガーポイント)に到達したら、今度はサンプル表面からカンチレバーが離反する。カンチレバーに力が働かなくなる位置(F)を過ぎると、今度は探針がサンプルから引き付けられ、カンチレバーが下向きにたわむ。そしてzピエゾでの離反で生じる上向きの力がサンプルからの引力を上回るとサンプル表面に引っ張られていた探針が離れ、カンチレバーにかかる力が0に戻る。そして最終的に測定開始時の位置(H)までカンチレバーが戻る。この測定の長所は、測定点

における物性を評価できるという点である。サンプル表面において設定した範囲内で任意の点数分このフォースカーブ測定を行い、カンチレバーが受ける引力の最大値やトリガーがかかった位置における  $z$  ピエゾの値などを各点で像にする。そうする事でフォースマップと呼ばれる画像が得られ、表面の物性 (形状、粘弾性など) を定量的に評価する事が可能である(143)。

### 2.2.3 AFM のイメージングモード

AFM で試料表面の形状をイメージングする場合、フィードバック信号に応じた様々な測定モードから適切な手法を選ぶ事が必要である。最も代表的な測定モードとしては、コンタクトモードイメージングが挙げられる(147)。コンタクトモードは前述した通り、カンチレバーが試料表面から受ける力 (厳密に言えば、カンチレバーの Deflection) を一定に保つようにフィードバックをかけて  $z$  位置を調節している。カンチレバーが試料に接触すると、試料から斥力を受けてカンチレバーが曲がる。曲がった事による変位を光てこ方式により検出する。測定前にフィードバックをかけるカンチレバーの Deflection の値 (セットポイント) を設定しておくこと、測定中のカンチレバーの Deflection がセットポイントの値となるように、カンチレバーの  $z$  位置を調整する  $z$  ピエゾを制御し、表面走査を行う。そして、Deflection の値をセットポイントの値に保つ為に変化した  $z$  位置を記録する事で、試料表面の凹凸をイメージングする事ができる。すなわち、このコンタクトモードによるイメージングは、試料表面に AFM 探針が常に接触しながらなぞって表面形状を走査する測定モードである。この測定モードでは試料表面と常に接触する事から細胞やタンパク質といった柔らかい試料に対してダメージを与える可能性がある。その為、ばね定数が小さく柔らかいカンチレバーを用いるなど、なるべく試料表面にダメージを与えない様な工夫が必要である。

その他の手法として、振幅変調 (Amplitude modulation: AM) モードが挙げられる(148, 149)。AM モードを行う為には、AFM に備わっている励振機構を用いてカンチレバーを共振周波数に近い値の周波数で振動させる必要がある。カン

チレバーを振動させる方法として、励振用のピエゾが一定の周期（通常、使用するカンチレバーの共振周波数に近い周波数が使用される）で伸び縮みする事でカンチレバーにその振動を伝えてカンチレバーを励振させる、音響励振と呼ばれる機構が通常用いられる。この様にして振動したカンチレバーは、検出用レーザーが PSD に入射する事で振幅と位相が記録される。一定のエネルギーの入力信号によって振動しているカンチレバーを試料に近付けながら接触させると、探針が試料表面に接触した事によりエネルギー散逸が生じ、振動振幅が減少する。AM モードはカンチレバーの振動振幅をフィードバックとしており、設定値の振幅を保つようにカンチレバーの z 位置を制御する。この様に、試料表面を振動するカンチレバーでタッピングしながら振幅を一定に保ち、表面の凹凸をイメージングする手法がこの AM モードである。試料表面の形状像に関してはコンタクトモードと同様にフィードバックにより制御された z 位置を記録している。さらに AM モードでは、カンチレバーを励振させる為に入力した信号の位相と、カンチレバーが試料表面をタッピングする事による振動の出力信号の位相を記録し、それらの位相差を画像化した位相差像も取得する事ができる。この位相差像により、試料表面の凹凸情報や粘弾性情報などを得る事が可能である。

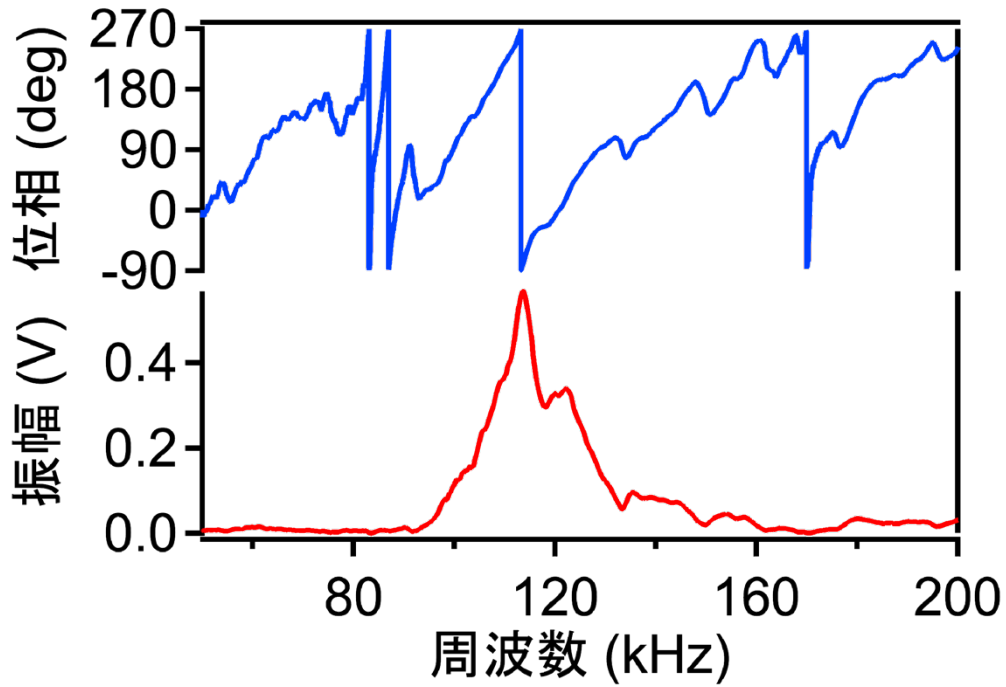
AFM で生体試料を観察する際、試料を水中環境下でイメージングする。これまで、試料表面と常に接触しながら走査するコンタクトモードと、試料表面をタッピングしながら走査する AM モードについて紹介した。コンタクトモードを水中で行う場合、フィードバックに用いる **Deflection** は単に試料から受ける斥力によってのみ影響を受ける為、空気中と同様に観察する事が可能である。しかしながら、AM モードを水中で行う際には注意が必要である。Fig 2.8 (a) に、水中においてカンチレバーを音響励振させた際に得られる振幅-および位相-周波数曲線の例を示した。振幅-周波数曲線において、最も大きな振幅が得られる共振周波数の位置で確かにピークが確認されるものの、周辺の周波数においてもピークが見られる。これは、励振用のピエゾと機械的に接触している様々な部分も同様に共振してしまい、それらの振動が振幅-周波数曲線に反映されてしまうの

である。さらに、位相-周波数曲線には大きな位相変化が生じる周波数帯がいくつもある。その為、ある周波数を選んでカンチレバーを励振させてイメージングしても非常に煩雑な位相差像が得られ、正確にイメージングする事は困難である。

水中で安定にカンチレバーを励振させる為に、カンチレバーを磁性膜コーティングや磁気ビーズを固定したカンチレバーに交流磁場をかけて励振させる磁気励振(150)や、ピエゾが内蔵されたカンチレバーによる自己励振(151)といった他の励振法も存在する。これらは励振させる為に特殊な加工を施したカンチレバーを用いる必要がある為、実験に使用可能なカンチレバーの種類に制限がある。また、励振させる為に磁場を与える装置を AFM 装置におけるカンチレバー付近に設置する必要があるが、AFM 装置は煩雑である為導入は難しい。

このような問題を解決する為に、カンチレバーの背面に強度変調が可能なレーザーを照射し、それによるカンチレバーの熱膨張および収縮を利用して励振させる光熱励振(152, 153)という機構を本研究で用いる AFM 装置 (MFP-3D-BIO) には独自に導入している。AFM 装置に光熱励振用のレーザー (波長 405 nm, NovaPro, RGB Photonics GmbH, Germany) を設置してカンチレバー背面に入射する様に位置調整をし、照射するレーザーの強度を変調可能にして光熱励振機構の導入に成功した。光熱励振により水中でカンチレバーを励振させた際の振幅および位相-周波数曲線の例を Fig 2.8 (b) に示した。振幅-周波数曲線において、カンチレバーの共振周波数でのみ単一のピークが観察され、理想的なカンチレバーの励振に成功した事が分かる。また、位相-周波数曲線においても共振周波数でのみ位相変化が生じている為、光熱励振を用いた水中での AM モードイメージングは安定に行えるという事を示している。

(a)



(b)

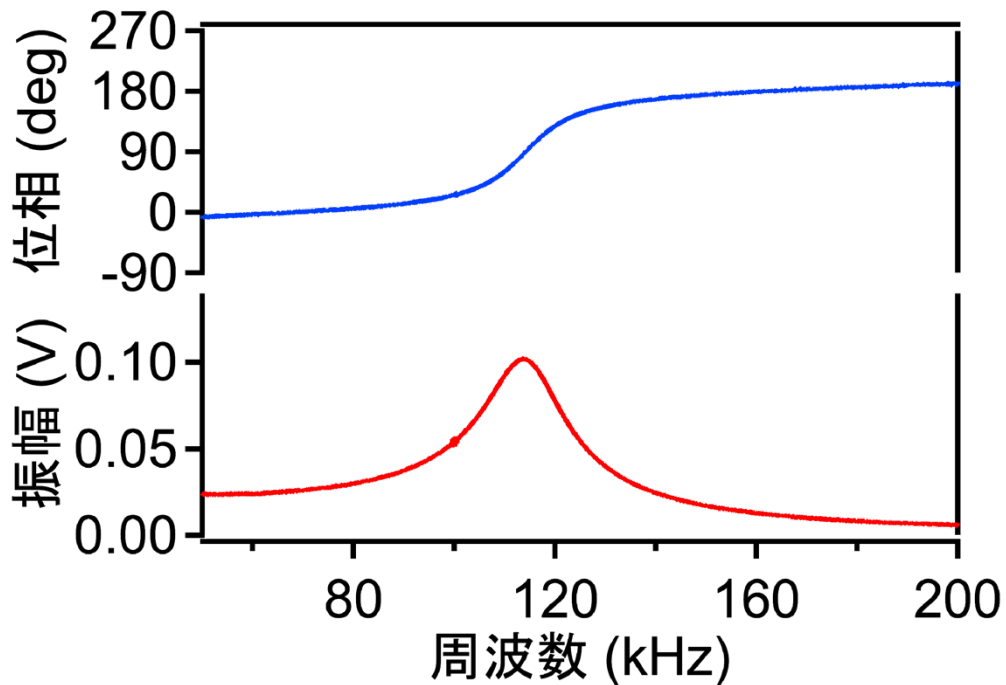


Fig.2.8 水中におけるカンチレバーの振幅-および位相-周波数曲線。(a) 音響励振および (b) 光熱励振。

### 2.3 前駆体脂質溶液調製

本実験で使用した脂質は、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC)、1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC)、および DOPC の末端にローダミンを結合させている 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (ammonium salt) (Rhod PE) である。これらは Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) から購入した。DOPC、DPPC、ローダミンのクロロホルム溶液をそれぞれガラスのバイアルで混合させる事で、前駆体脂質溶液を調製した。また、異なる組成比の脂質膜を作製する為、DOPC と DPPC を様々な組成比で溶液調整を行った。前駆体脂質溶液の組成比をまとめた表を下記 Table 2.1 に示した。混合したバイアル内の溶液は、N<sub>2</sub> ガスを吹きかける事で乾燥させた。また、乾燥した脂質が壁面に付着したバイアルを真空チャンバー内で一晩静置する事で、完全に水分を除去した。その後、2 mL のイソプロパノール（富士フイルム和光純薬、JAPAN）と 2 mL の超純水をバイアルに入れる事で 0.5 mg/mL の前駆体脂質溶液として再び水和させ、その溶液をボルテックスで 2 分間撹拌した。

**Table 2.1** 脂質膜の作製に用いた前駆体脂質溶液の組成比。

DOPC (mol%)	DPPC (mol%)	Rhodamine-PE (mol%)
100	0	0.7
80	20	0.7
60	40	0.7
40	60	0.7
20	80	0.7

#### 2.4 マイクロ流路チャンバーの設計

作製した脂質膜を外気に触れさせずに蛍光顕微鏡測定と AFM 測定を行うため、脂質膜を作製する為の溶媒支援型自己組織化に使用できるマイクロ流路チャンバー装置を設計した (Fig 2.9 (a)-(d))。全ての実験はこの新しくデザインされた、長さ 26 mm、幅 6 mm、高さ 0.5 mm のマイクロ流路チャンバーを用いて行った。このチャンバーは全体で 6 つのパーツで構成されている。チャンバーのトップカバーは、溶液が漏れないように、流路部分と 6 つのネジを用いてしっかりと固定される。また、2 つの異なるサイズのゴム製 O-リングがチャンバーの裏側に付いており (Fig 2.9 (b))、ボトムカバーとチャンバーでカバースリップ (22 × 50 mm) を挟む際にこの O-リングが押しつぶされる事でシーリングしている。これにより、チャンバーとボトムカバーの間から空気が入る事も、注入する溶液が間から漏れる事も無い。さらに、チャンバーの表側中心の長方形に空いた穴からカバースリップが露出する形になるが、トップカバーの裏側中央にある O-リングとチャンバー表面でシーリングする事ができ、カバースリップが空気に触れる事は無い。チャンバーの両端にはチューブを挿す事で溶液を流す事ができる注入・排出口がある (Fig 2.9 (c)、(d))。チャンバー全体の長さは 62 mm、幅が 33 mm であり、これは研究室で所有している AFM 装置 (MFP-3D-BIO、Oxford Instruments、USA) のステージに載せる事が可能である。そして、AFM の XY ステージにシリコングリスを塗り、その上にチャンバーを載せる事でステージに固定可能である (Fig 2.9 (e))。

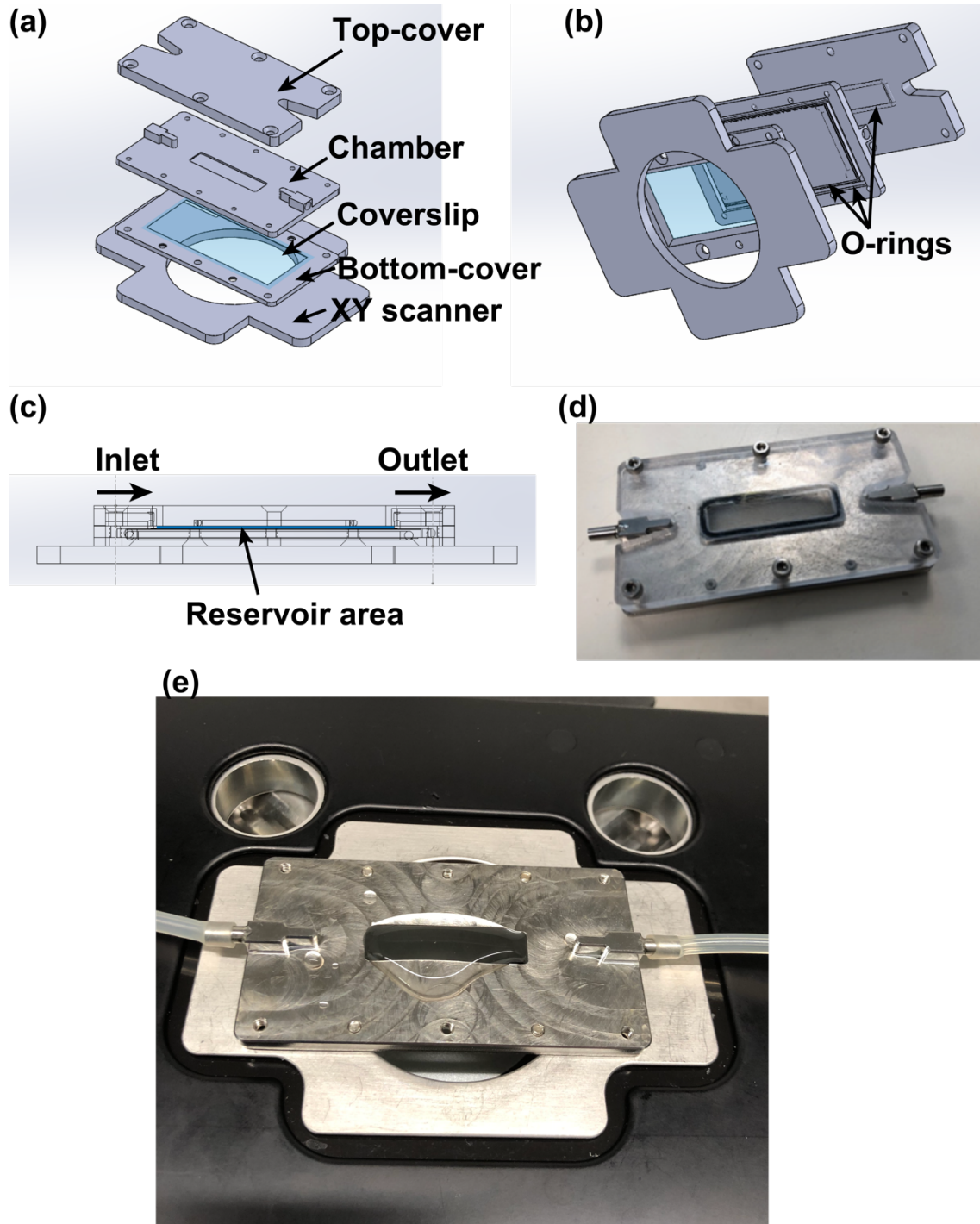
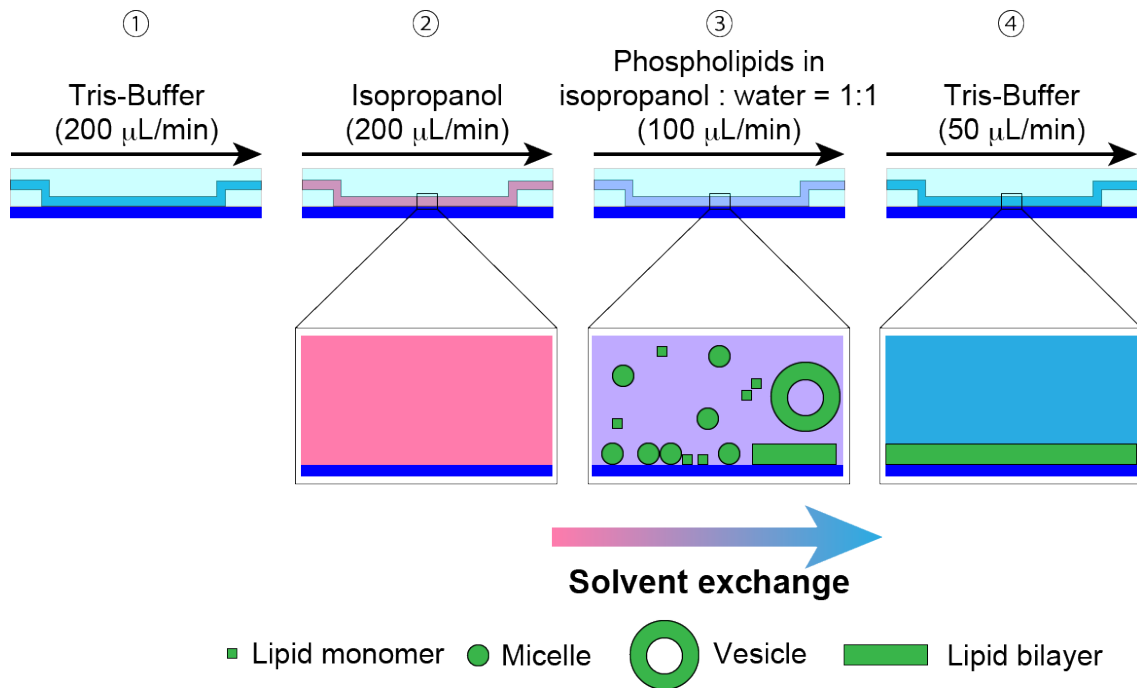


Fig 2.9 (a) マイクロ流路チャンバーの各パーツの3次元画像。(b) マイクロ流路チャンバーの各パーツを下から見た3次元画像。(c) マイクロ流路の断面図。(d) マイクロ流路チャンバーの実物写真。(e) マイクロ流路チャンバーをAFMのXY

ステージに載せた実物写真。カバースリップが露出している部分は十分溶液で覆われており、空気に触れる事は無い。

## 2.5 溶媒支援型自己組織化による脂質膜作製プロトコル

22 × 50 mm のカバースリップ (Fisher Scientific, USA) を超純水で 20 分間超音波洗浄し、N<sub>2</sub> ガスで乾燥させた。次に、親水化処理装置 (HDT-400、JEOL Datum、JAPAN) で 1 分間処理する事でカバースリップ表面を親水性にし、脂質膜を作製する表面を準備した。その後、Fig 2.9 で示したマイクロ流路チャンバーに親水性処理したカバースリップをセットし、組み立てた。次に、蠕動のポンプ (Ismatec Reglo Digital ISM 833, Germany) を用いてトリス緩衝液 (10 mM の Tris (富士フイルム和光純薬、JAPAN)、150 mM の NaCl (富士フイルム和光純薬、JAPAN)、pH=7.5) を流速 200  $\mu$ L/min で注入口からマイクロ流路チャンバーに流し入れ、脂質膜が作製される部分をトリス緩衝液で満たした (Fig 2.10)。その後、イソプロパノールを流速 200  $\mu$ L/min で注入する事で脂質膜が作製される部分の溶液交換を行った。次に、上記 2.3 項で調製したリン脂質溶液を流速 100  $\mu$ L/min で 25 分間注入した。最後に、トリス緩衝液を 50  $\mu$ L/min で 30 分間注入して溶液交換を行う事で、カバースリップ上に脂質膜を作製した。



**Fig 2.10** 本実験で用いた溶媒支援型自己組織化のプロトコルと、ガラス基板における予想されるリン脂質分子の状態を表した模式図。

なお、溶媒支援型自己組織化を用いた脂質膜の作製は、蛍光測定を行う為の光学顕微鏡の XY ステージマイクロ流路チャンバーを置いて行った。マイクロ流路チャンバー、光学顕微鏡、蠕動ポンプをチューブで繋げた脂質膜を作製する為のセットアップを Fig 2.11 に示した。

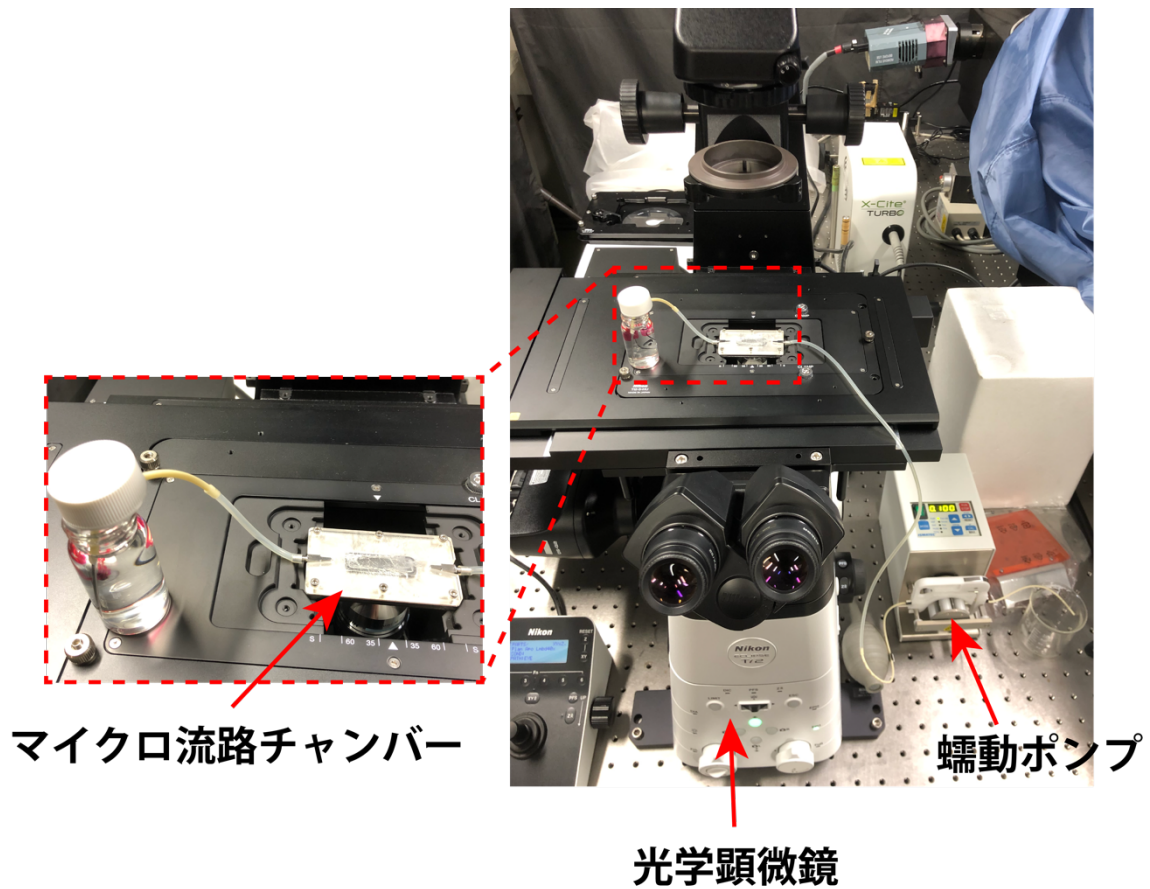


Fig 2.11 本実験で用いたマイクロ流路チャンバーで実際に脂質膜を作製している様子の写真。

溶媒支援型自己組織化のプロセスで使用する溶液の液面にチューブを浸漬し、チューブのもう一方をマイクロ流路チャンバーの inlet 部分に繋いだ。マイクロ流路チャンバーの outlet 部分に繋いだチューブは蠕動ポンプに繋がっており、設定した流量の溶液を流す事が可能である。

## 2.6 蛍光顕微鏡測定および光褪色後蛍光回復測定

60倍の油浸対物レンズ（開口数、NA = 1.49）および Andor iXon+ EMCCD カメラ（Andor Technology、Belfast、Northern Ireland）を備えた倒立落射蛍光顕微鏡（Eclipse TE 2000、Nikon、JAPAN）を使用して、作製した後のローダミン含有脂質膜を観察した。1つのサンプル毎に、最低3箇所異なる部分を蛍光像として取得した。解像度は  $512 \times 512$  ピクセルで、蛍光像のサイズは  $136 \times 136 \mu\text{m}^2$  である。水銀ランプ（Intensilight C-HGFIE、NIKON、JAPAN）からの光は TRITC フィルターを通り、脂質膜サンプルに照射された。撮影された蛍光像の蛍光強度は ImageJ ソフトウェアを用いて計算した。また、作製した膜内での脂質分子の側方拡散を評価する為に、同じ装置で光褪色後蛍光回復（Fluorescence recovery after photobleaching: FRAP）測定を行った。レーザー光（532 nm、100 mW）を5秒間脂質膜に照射する事で、直径約  $35 \mu\text{m}$  の円形領域を光褪色させた。光褪色した部分の蛍光強度の回復は、2秒間隔で3分間蛍光像を取得する事で記録された。その後、ハンケル変換法を用いて MATLAB で膜内の脂質分子の拡散係数を計算した(135)。

## 2.7 AFM によるフォースカーブの測定法

本研究では、液中測定用の液体セルが備え付けられた市販の AFM 装置（MFP-3D-BIO、Oxford Instruments、USA）を使用し、力-距離曲線の測定を行った。測定には、チップ曲率半径の公称値が  $6 \text{ nm}$  である単結晶シリコンカンチレバー（NSG03、NT-MDT、Russia）を使用した。また、ばね定数の公称値は  $2.0 \text{ N/m}$  であり、測定前に熱ノイズを測定する事によってキャリブレーションした(145)。全ての測定は室温（ $300 \text{ K}$ ）で行い、コンタクトモードを用いてフォースマップを取得した。カンチレバーの接近・離反速度は  $4 \mu\text{m}/\text{sec}$  に設定し、探針が試料から離れる時のトリガーとなる力を  $30 \text{ nN}$  に設定した。解像度は、 $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  のスキャンエリア内で  $100 \times 100$  点、合計 10000 本（1点のサイズは  $100 \times 100 \text{ nm}^2$ ）の力-距離曲線を測定してフォースマップとして反映させた。また、カンチレバーのたわみを探針先端と試料表面の間隔（Separation と定義）に変換す

る為、力-変位（カンチレバーの  $z$  位置）曲線において単位変位あたりの力の変化がほぼ一定に増加する領域の始点を、探針先端と試料表面の間隔が 0 であると定義した(154)。脂質膜の膜厚を分析する為、熱揺らぎによって検出される力よりも大きい力の値をとって、なおかつ力の値が 3 点連続して増加する最初の点を、脂質膜と探針が接触する事でカンチレバーが反発力を受ける点と定義した。得られたフォースカーブは Igor Pro ソフトウェアを用いて解析処理した。

### 第3章 溶媒支援型自己組織化を利用して作製した脂質膜の拡散係数評価

第3章では、室温環境において液相である DOPC とゲル相である DPPC を様々な組成比で混成して作製した脂質膜を、蛍光顕微鏡観察により評価した事について述べる。蛍光顕微鏡観察では、2種類のリン脂質を混成させた事による相分離構造が脂質膜表面で観察されるか、そしてその相分離構造が膜表面を占める割合と DPPC 組成比の相関について評価する。加えて、脂質膜を構成する DOPC の膜内における拡散係数を FRAP 測定によって分析し、作製した各組成比の脂質膜が SLB であるかどうかを評価する。これらを通して、溶媒支援型自己組織化による DOPC と DPPC の SLB 作製可能性について評価する。

#### 3.1 作製した脂質膜の蛍光顕微鏡測定

DOPC と DPPC が異なる組成比で含まれている脂質膜の蛍光像を Fig 3.1(a)-(e) に示した。DOPC はリン脂質の親水性部分を蛍光染色してあるので、DOPC のみで構成された液相脂質膜は、走査表面において均一な蛍光強度を示した (Fig 3.1(a))。蛍光染色されていないゲル相の DPPC が含まれている脂質膜においては、蛍光強度が低く周囲と異なる蛍光を発していない領域 (暗い領域) が観察され始めた (Fig 3.1(b))。また、DPPC の組成比を増加させるにつれて、蛍光像中における暗い領域の被覆率の増加が確認された (Fig 3.1(c)-(e)) (155, 156)。過去にコレステロール含有脂質二重膜の作製実験が行われており、コレステロールの組成比を増やす事で同様の現象が生じている(96, 97)。その為、ゲル相の量が増加するにつれて暗い領域の被覆率が増加したという本実験の結果と一致する。しかしながら興味深い事に、暗い領域が空間分布を維持しながらサイズが大きくなる現象は、DPPC の組成比が 40 mol%になるまで生じた (Fig 3.1(c))。DPPC の組成比が 40 mol%から 60 mol%に増加すると、暗い領域のサイズはより均一になるが、より小さなサイズの領域が走査表面一面に分散するようになる (Fig 3.1(d))。そして、本実験で観察した中で最も DPPC 組成比が高い 80 mol%の場

合では、暗い領域は合体して表面全体に乱雑に広がった (Fig 3.1(e))。その結果、暗い領域は横方向の被覆率が劇的に増加した事が観察された。

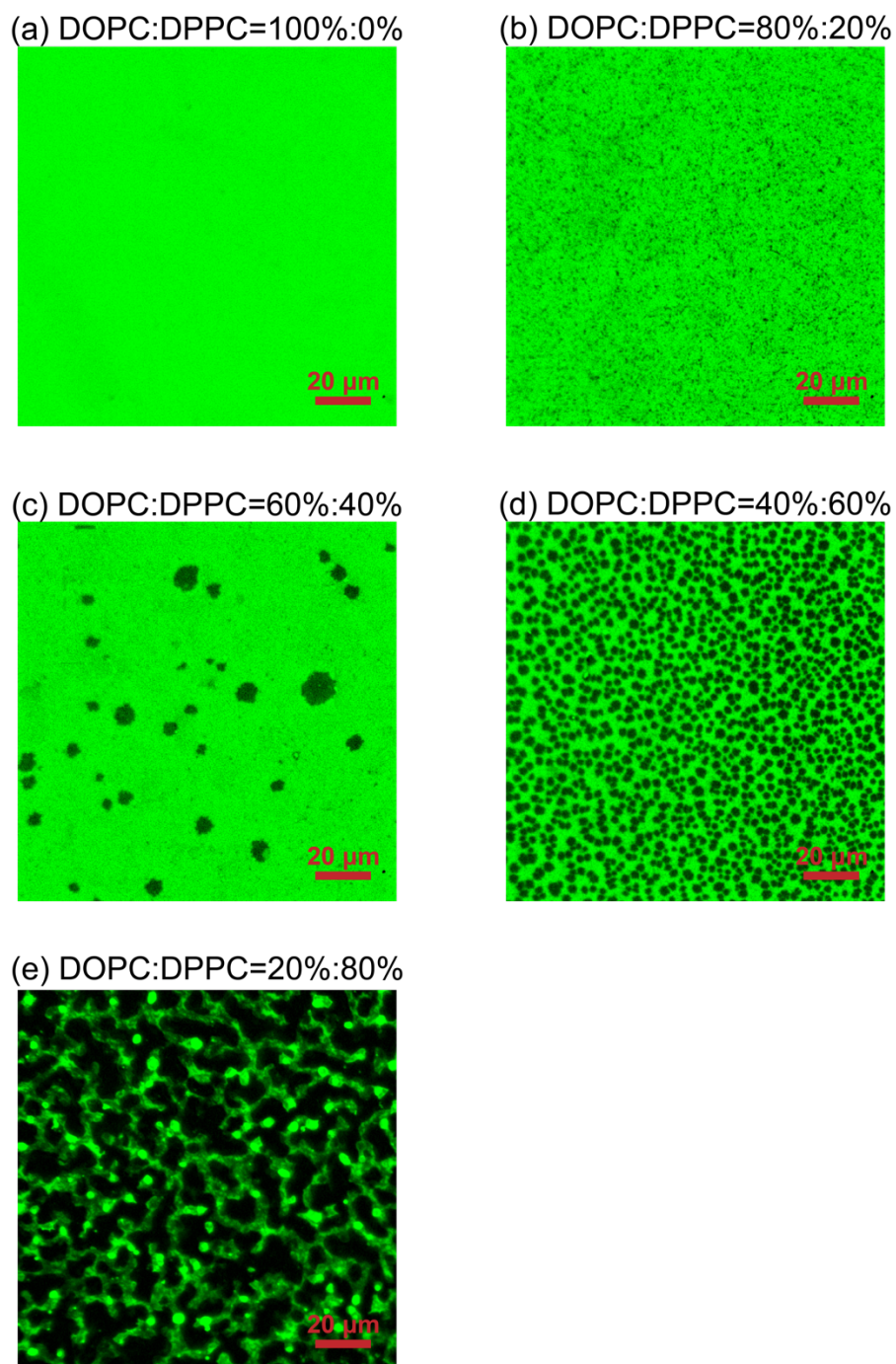


Fig 3.1 溶媒支援型自己組織化で作製した脂質膜の蛍光像。脂質膜を構成する脂質の比 DOPC : DPPC はそれぞれ(a)100 : 0 mol%、(b)80 : 20 mol%、(c)60 : 40 mol%、(d)40 : 60 mol%、(e)20 : 80 mol%である (それぞれに DOPC の末端にロ

ーダミンが結合している脂質を 0.7 mol%混合)。蛍光像のサイズは  $136 \times 136 \mu\text{m}^2$ 。

これらの蛍光像を取得した後、蛍光像全体の平均蛍光強度を解析する事で作製された脂質膜の組成比を評価した。本実験で用いた脂質膜は蛍光染色された DOPC および染色されていない DPPC から成るので、蛍光強度は脂質膜作製前の前駆体脂質溶液における DOPC の組成比に直結するはずである。今回の実験の場合、蛍光強度の最大値をとるのは DOPC の組成比が 100 mol%の脂質膜である。そして、蛍光強度が 0 になるのは、本実験では作製していないが、DOPC の組成比が 0 mol% (すなわち、DPPC のみで構成された脂質膜) の脂質膜である。Fig 3.2 に示した蛍光強度と DOPC のモル比の関係を表したグラフより、実験で測定された DOPC のみで構成された脂質膜から得られた蛍光強度最大値 (強度約 2000 a.u.) を表す点と原点を直線で繋いだ (青い破線)。この直線は、脂質膜中の特定の DOPC モル比について予想される蛍光強度を得る為の基準とすることができる。すなわち、特定の DOPC モル比で調製した前駆体脂質溶液を用いて作製した脂質膜から得られた蛍光強度の測定値と、Fig 3.2 の直線に基づいて予想される蛍光強度を比較する事によって、脂質膜を作製する過程での DOPC 組成再現性の度合いを評価する事が可能になる。例えば、もし観察された蛍光強度のプロットが直線上に乗った場合、脂質膜作製前の前駆体脂質溶液中の DOPC モル比が脂質膜の DOPC モル比に完全に反映されたという事になる。そして、もし観察された蛍光強度のプロットが直線より下に存在する場合、作製された脂質膜を構成する DOPC のモル比は前駆体脂質溶液中の DOPC モル比よりも低い事を意味する。逆の場合もまた同様である。これに基づくと、Fig 3.2 のプロットから、実験で測定された 5 種類の脂質膜の蛍光強度は全て「理想的な蛍光強度」を示す青い破線の近くにプロットされた為、前駆体脂質溶液中の脂質の組成比は溶媒支援型自己組織化によって基板上に作製された脂質膜においても良く再現される事が示された。しかしながら、蛍光像における蛍光を発する領域に

対する暗い領域の面積比（すなわち暗い領域の被覆率）と DPPC の組成比との間には僅かなずれが生じているように見える。実際、得られた蛍光像の暗い領域の面積を解析した所、組成比が DOPC:DPPC = 60%:40%の前駆体脂質溶液で作製された脂質膜中の暗い領域の被覆率は  $10 \pm 3.6\%$ 、DOPC:DPPC = 40%:60%の場合は  $51 \pm 8.8\%$ であった。このような僅かなずれは、200~300 nm 程度の空間分解能を有する光学顕微鏡では約 100 nm の小さな DPPC ドメインを観察する事ができなかった事が原因であると考えられる。

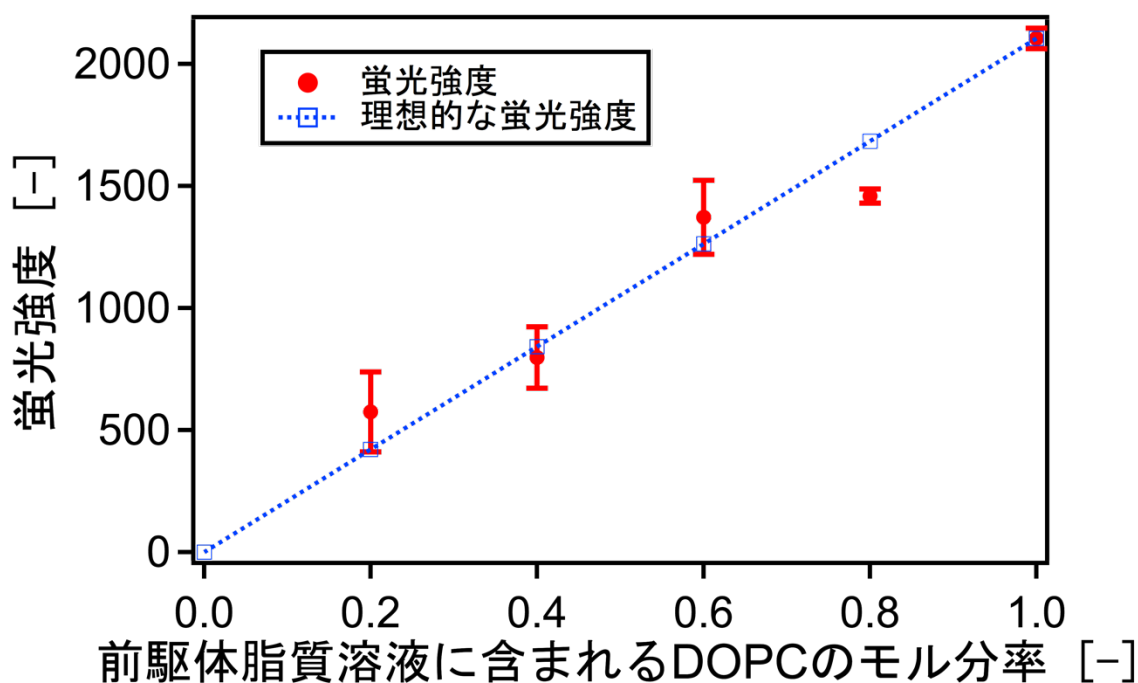


Fig 3.2 前駆体脂質溶液に含まれる DOPC のモル分率と作製した脂質膜の蛍光強度の関係 ( $n = 5$ )。

### 3.2 蛍光染色したリン脂質分子の拡散係数評価

その後、作製した脂質膜が脂質二重膜である事を確かめた。脂質二重膜を構成するリン脂質分子は、基板上の膜内で側方拡散をする性質を持つ。従って、異なる DOPC/DPPC 組成比の脂質膜分子の拡散係数を分析する事により、脂質二重膜の評価が可能になる。ここでは、膜内におけるリン脂質分子の拡散係数を分析して下記2点について評価した。

- (1) 溶媒支援型自己組織化により得られた脂質膜が脂質二重膜であることをリン脂質分子の拡散係数によって示し、最も有名な脂質二重膜作製法である vesicle fusion 法で作製した脂質二重膜の拡散係数と比較。
- (2) DPPC ゲル相の増加による膜内 DOPC 分子の拡散係数の影響。

拡散係数は、脂質膜にレーザー光を照射する事で蛍光を褪色させ、リン脂質分子が膜内を側方拡散する事による褪色部分の蛍光回復を測定する FRAP 測定によって行った。蛍光の回復を測定し、脂質膜内の拡散係数をハンケル変換法に基づいて MATLAB を用いて計算した。ハンケル変換法では、フィッティングカーブからリン脂質分子の拡散係数の値が抽出される前に蛍光回復プロファイルの数学的曲線当てはめを得る為、レーザー光照射により円形に光褪色した部分の蛍光強度平均値を用いる(135)。ここで行った計算により、脂質膜中の DPPC の組成比が増加するに従って膜全体の拡散係数が減少する (Fig 3.3 (a)) という事が分かった。そしてこの結果は、過去に行われている実験結果とも一致する(157, 158)。DOPC のみで構成されている液相脂質膜の場合、DOPC の拡散係数は  $2.6 \pm 0.1$  と計算され、過去に報告された vesicle fusion 法により作製された DOPC 脂質二重膜の場合の実験値とほぼ一致している(100, 159, 160)。つまり、溶媒支援型自己組織化を用いて作製された脂質膜は、vesicle fusion 法によって作製された脂質二重膜と同じリン脂質分子拡散係数を有するという事を証明した事になる。

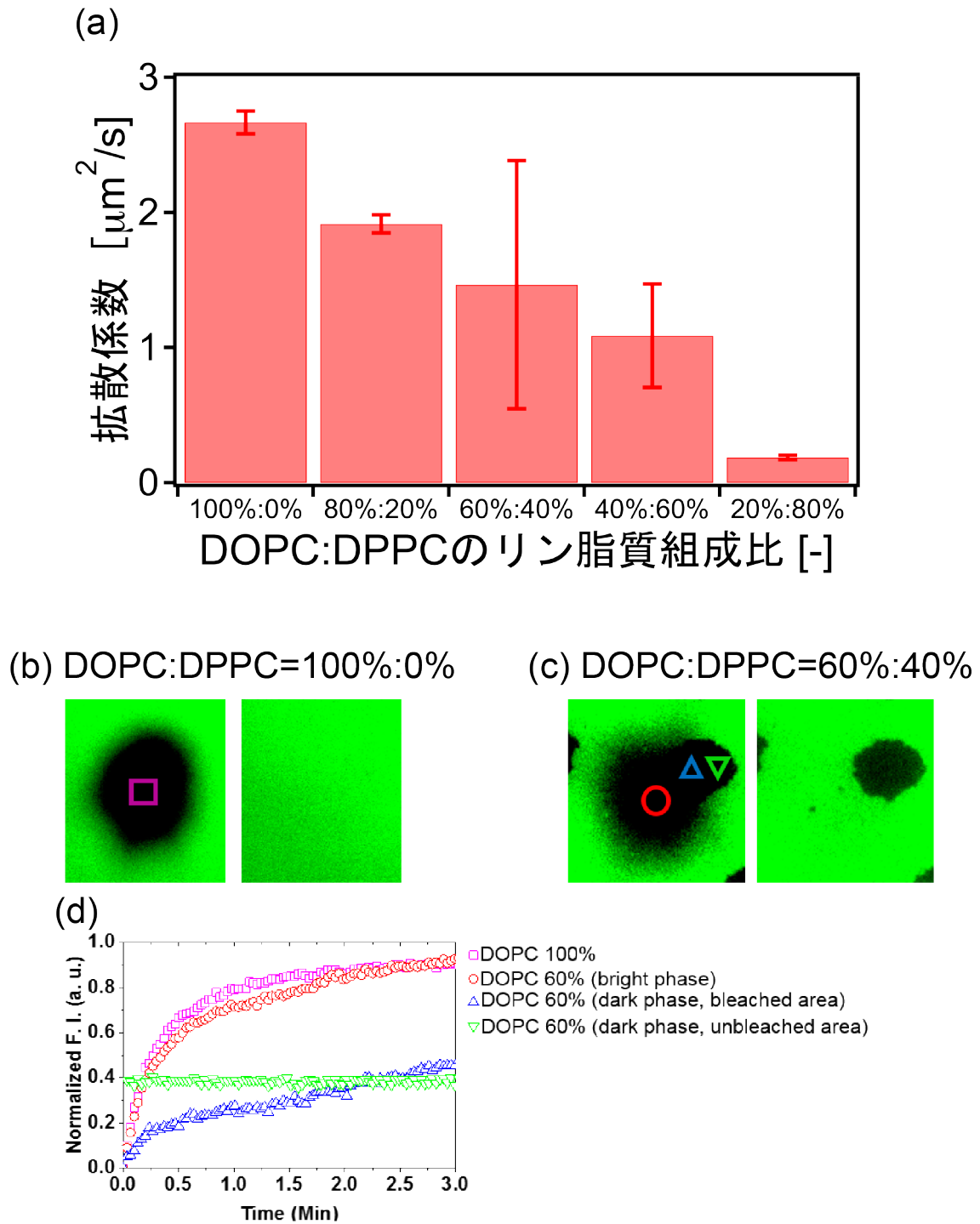


Fig 3.3 (a)FRAP 測定で得られた、各脂質膜中リン脂質分子の拡散係数 ( $n=5$ )。 (b)光褪色直後の蛍光像 (左側) と 3 分後に回復した蛍光像 (右側)。DOPC : DPPC が 100 : 0 mol%、(c) 60 : 40 mol%。 (d)蛍光像における明るい部分と暗い部分 ((b)および(c)中の記号と対応) の、時間経過に対する蛍光強度の関係を表す曲線。

膜内において脂質分子が高い拡散係数を有する事は液相脂質二重膜の特徴の一つであり、そしてこの高い拡散係数は、不規則な凝集もしくはランダムに吸着した脂質分子では観察が困難である(161, 162)。従って、拡散係数の減少に対する膜内におけるゲル相の組成比の増加の効果を理解する為、暗い領域が実際に脂質二重膜のゲル相である事を最初に証明する事が不可欠である。この領域の脂質分子がもし脂質二重膜を形成しているのであれば、かなり減少してはいるが、いくらかの拡散係数を有しているべきである。この考えに従い、DOPCのみで構成された脂質膜、および60 mol%のDOPCと40 mol%のDPPCで構成された脂質膜それぞれにおけるFRAP測定をより詳細に解析した。まず、レーザー光を照射した後と蛍光回復した後の蛍光像をそれぞれ示した(Fig 3.3 (b)、(c))。Fig 3.3 (c)の場合に着目すると、光褪色した範囲には、蛍光染色した領域と暗い領域が含まれている事が分かる。蛍光染色領域と暗い領域から得られた蛍光回復の分析結果(Fig 3.3 (d))に基づくと、十分に蛍光染色されている領域(赤い丸のプロット)は勿論、暗い領域(青い三角のプロット)においても蛍光強度が回復している事を明らかに示している。この事実は、DOPCのリン脂質分子は脂質膜内において自由に側方拡散している事を示しており、これは脂質二重膜の重要な特徴と一致する。そしてこれは、完全な脂質二重膜が形成されており、暗い領域が二重膜内の欠陥や穴ではない事の証でもある事に他ならない。しかしながら、Fig 3.3 (b)、(c)で示した2種類の脂質膜において、蛍光染色した部分の蛍光回復度合いはほとんど違いが見られなかったが、60 mol%のDOPCと40 mol%のDPPCで構成された脂質膜の暗い領域(Fig 3.3 (c))の光褪色した領域に被っている暗い領域)の蛍光回復度合いは蛍光染色領域と比べて明らかに低かった。この蛍光回復度合い、つまり拡散係数の違いは、DPPCが直鎖状の炭素鎖を持つ2つのパルミチン酸基を有する事に起因すると考えられる。直鎖状の炭素鎖間で生じるファンデルワールス相互作用によって、DPPCは脂質二重膜中において高密度で充填されている。一方、DOPCの鎖には炭素二重結合が含まれている為、立体障害が発生して密な充填が阻害されてしまう。言い換えると、

DOPC は膜内での分子運動の自由度が大きいという事である。この充填度の違いが分子の拡散係数を決定しており、自由度の小さい DPPC はゲル相、大きい DOPC は液相の状態で存在している。DOPC が側方拡散をする場合、DOPC 間の弱い相互作用力による結合を切って拡散するより DPPC 間の強い相互作用力による結合を切って拡散する方が大きなエネルギーを要する。従って、観察された脂質膜の全体的な拡散係数は、DPPC を多く含有している膜の方が低くなるのである。以上より、溶媒支援型自己組織化を用いて作製した脂質膜は、DOPC と DPPC の組成比によらずリン脂質の側方拡散という脂質二重膜の重要な特徴を有するという事が分かった。

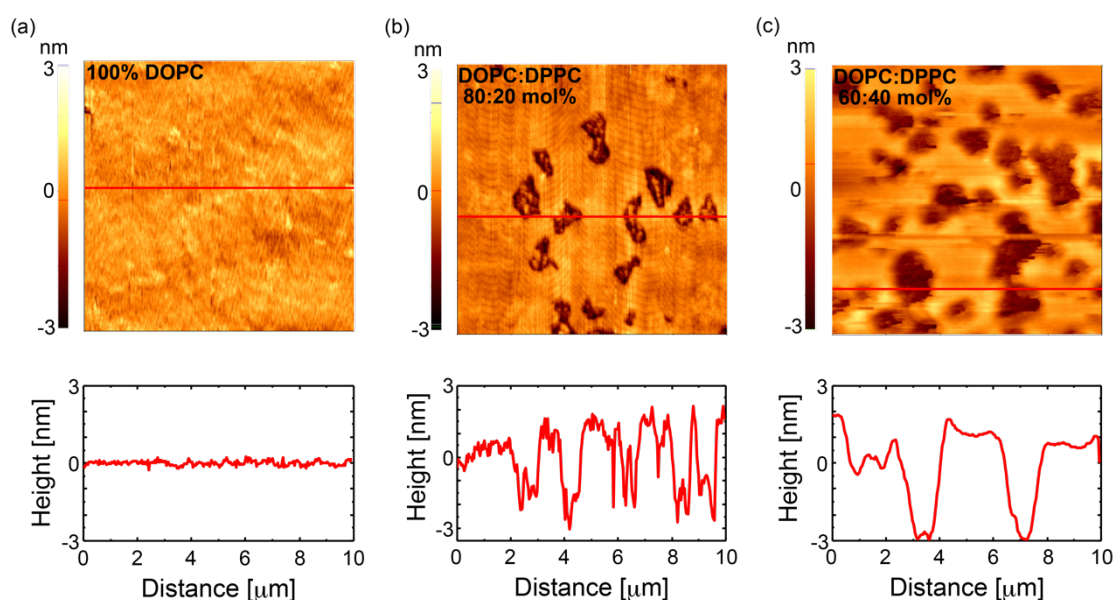
## 第4章 作製した脂質膜の機械特性評価

第4章では、作製した各 DOPC/DPPC 組成比の脂質膜を AFM により特性評価した事について述べる。脂質膜内リン脂質の拡散係数以外では、SLB の重要な特徴として均一で平坦な表面を有する事が挙げられる。従って、AFM を用いたイメージングにより、それぞれの脂質膜の表面形状を観察する。さらに、力-距離曲線測定を行い AFM 探針で作製した脂質膜を貫通する事により、作製した脂質膜が SLB と同等の膜厚を有しているかどうか、またゲル相 DPPC の組成比の増加が脂質膜の硬さに及ぼす影響を評価する。

### 4.1 AFM による脂質膜の表面形状測定および機械特性評価

作製した脂質膜が脂質二重膜である事をより詳細に評価する為に、本実験を行うにあたって設計されたマイクロ流路チャンバーを用いて AFM による脂質膜の表面形状観察および膜貫通力測定を行った。まず初めに、作製した脂質膜の表面形状を観察する為に、AFM のコンタクトモードイメージングを行った。予想通り、DOPC と DPPC が異なる組成比で存在している脂質膜において、その表面上で形状に僅かな差が観察された。DOPC のみで構成された脂質膜においては、高さの差が 0.5 nm 未満である滑らかな表面が観察された (Fig 4.1 (a))。これは、1 種類のリン脂質で構成された脂質二重膜は均一に平坦な表面を有するという特徴と一致している事になる。そして、80 mol% の DOPC と 20 mol% の DPPC で構成された脂質膜の場合、膜表面に黒い領域が観察された (Fig 4.1 (b))。この測定における形状像と断面図を比較すると、黒い領域は周囲の領域と比べて 2~3 nm の低い事が判明した。一方、横方向の寸法は約 1  $\mu\text{m}$  であった、また、60 mol% の DOPC と 40 mol% の DPPC で構成された脂質膜 (Fig 4.1 (c)) の場合では、Fig 4.1 (b) よりも横方向寸法が僅かに大きい分離された領域が観察され、またその領域の被覆率が明らかに増加していた。Fig 4.1 (c) の場合でも同様に断面図を描画した所、4~5 nm の高さの差が確認された。これらを併せると、ゲル相 DPPC の組成比が大きくなるに伴って黒い領域の被覆率が増加するという AFM の形状像を通して観察された全体的な傾向は、蛍光顕微鏡による観察と一

致している事が分かった。従って、AFM の形状像で観察された黒い領域はゲル相 DPPC の相分離構造である事が分かり、溶媒支援型自己組織化により液-ゲル相混成脂質二重膜の形成に成功した事が確認された。Fig 4.1 (b)、(c) で観察された DPPC の相分離構造の横方向寸法は前述した通り約  $1\ \mu\text{m}$  である。これはつまり、第 3 章の蛍光顕微鏡画像において空間分解能が不十分である為観察出来なかった非常に小さな相分離構造を AFM イメージングで観察成功した事に他ならない。従って、この AFM 形状像の結果は、第 3 章で観察された蛍光像における暗い領域と実際の被覆率との間のずれが確かに DPPC の微小なドメインによるものであった事を証明している。



**Fig 4.1** 異なる DOPC:DPPC 組成比で構成された脂質膜の AFM 形状像と形状像内赤線における断面の高さプロファイルの比較。DOPC:DPPC がそれぞれ (a)100:0 mol%、(b)80:20 mol%、(c)60:40 mol%。

ここで注目すべき点は、AFM イメージングで得られた DOPC と DPPC の高さの差は  $3\sim 4\ \text{nm}$  であり、これは DOPC と DPPC の脂質二重膜構造を考えると大きすぎるという事である。この原因としては、Fig 4.1 (b)、(c) の場合には脂質二重膜内でハッキリと相分離構造を形成する為には DPPC の組成比が小さ

かった事が考えられる。組成比が小さい為、膜内のリン脂質分子が不安定な状態、つまり液相とゲル相が混ざりあっている様な状態で膜内ではゲル相の相分離構造が生じ始めた段階である(163)。その為ゲル相 DPPC が脂質二重膜を形成していない部分も生じ、通常よりも大きな膜厚の差になった事が分かる。この事を証明する為、40 mol%の DOPC と 60 mol%の DPPC で構成された脂質膜でも同様の条件で AFM のコンタクトモードイメージングを行った。形状像と断面の高さプロファイルをまとめた結果を Fig 4.2 に示した。この組成比では、ほぼ均一な大きさのドメインが形成された事は蛍光顕微鏡測定により確認されており、その横方向寸法は約 5 nm 程度であった。Fig 4.2 の形状像に注目すると、形状像内右側が周囲の表面より約 1 nm 程低い。約 1 nm 程低い領域の横方向寸法は約 3 ~ 5 nm であり、これは蛍光顕微鏡画像で観察された DPPC のドメインサイズとほぼ一致する。さらに、AFM 形状像内で真っ黒い円形領域が数箇所観察され、断面の高さプロファイルを確認すると周囲に比べて約 6 nm 程低かった。脂質二重膜の構造を考えると、6 nm という高さは DOPC の脂質二重膜の厚さとほぼ同等である為、この黒い領域は脂質二重膜内の欠陥を表している事が分かる。また、この欠陥の深さから、Fig 4.2 で示した脂質膜は脂質二重膜と同等の膜厚を有している事が確認された。そして、Fig 4.1 の場合と異なり、40 mol%の DOPC と 60 mol%の DPPC で構成された脂質膜ではハッキリと相分離構造を形成できる組成比になった為、DOPC と DPPC の高さの差が小さくなり本来の構造通り 1 nm 程度の高さの差が観察されたのである。

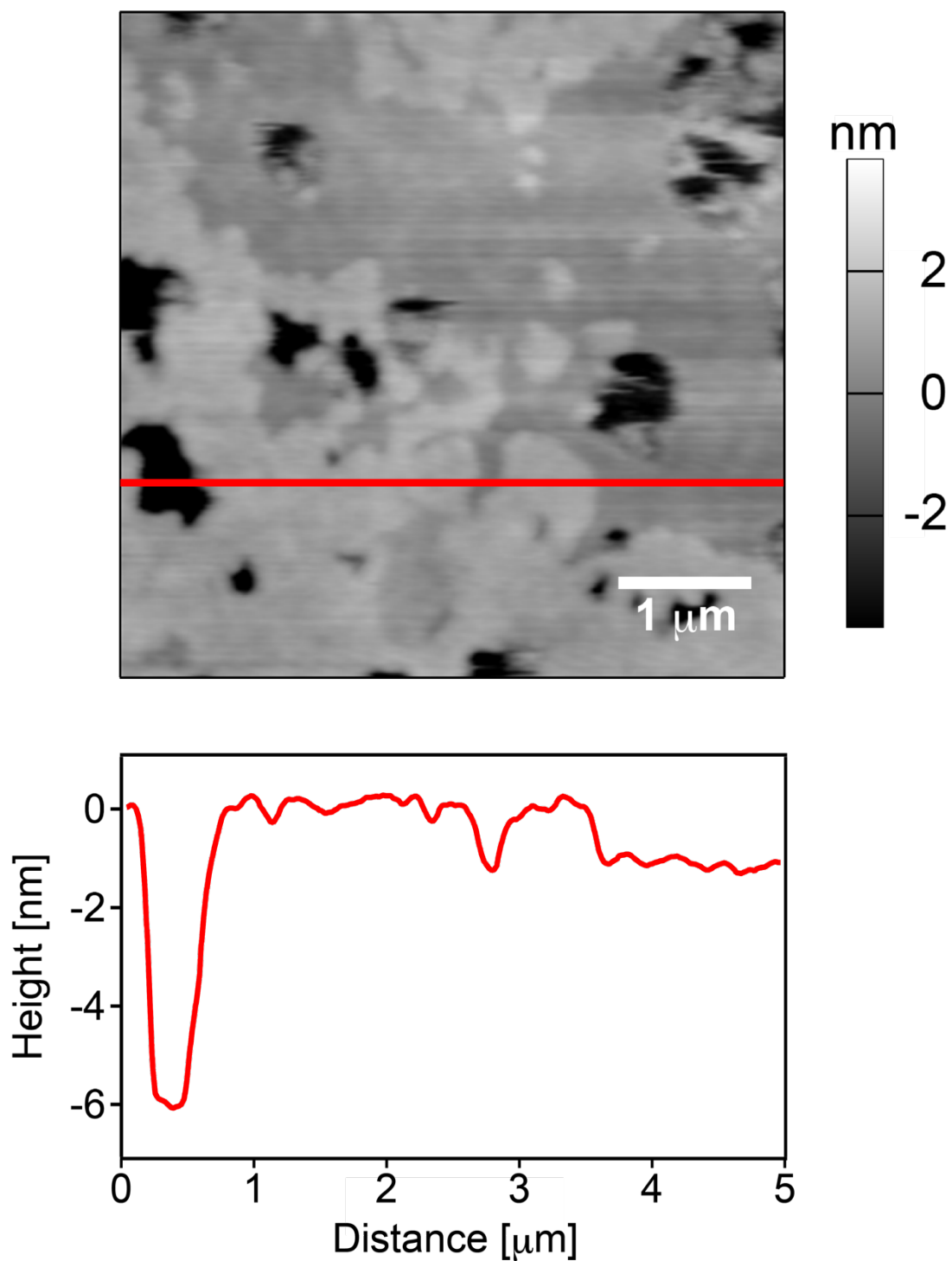


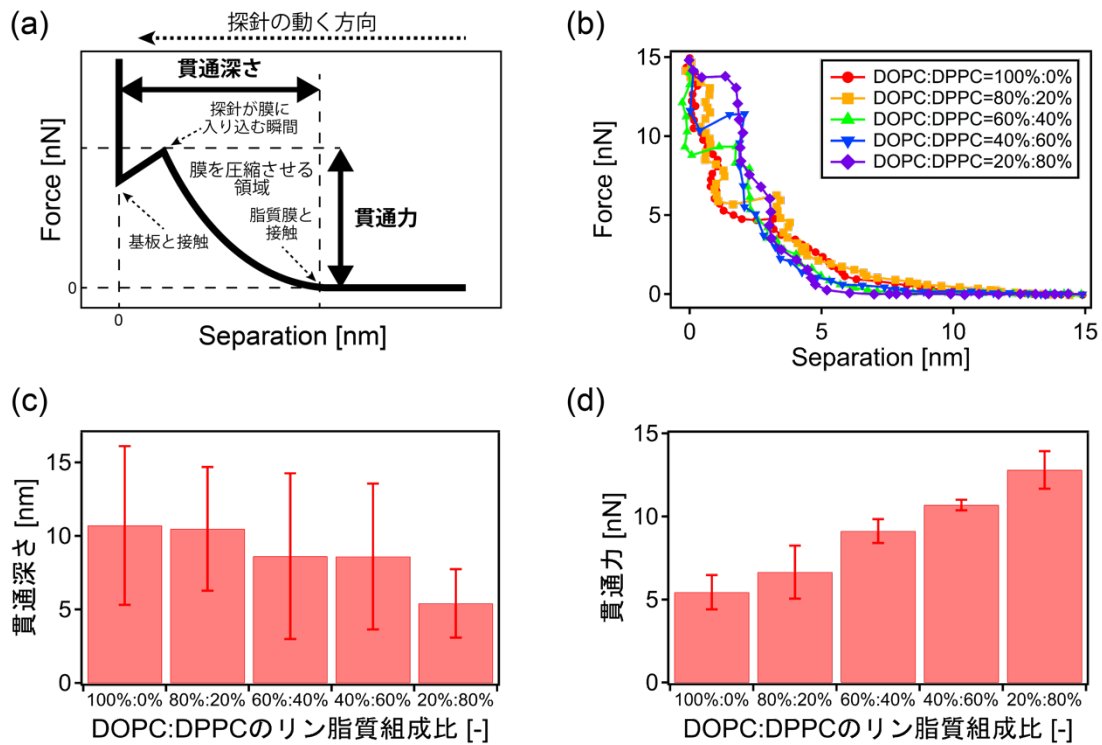
Fig 4.2 DOPC:DPPC の組成比が 40:60 mol% で構成された脂質膜の AFM 形状像と形状像内赤線における断面の高さプロファイルの比較。

次に、AFM 探針を用いて、脂質膜の剛性の変化を評価する為、脂質膜表面で力-距離測定を行った。本測定において、カンチレバーに働く力を *force*、探針先端と試料表面の間隔を *separation* と定義し、それらの関係を表した曲線を *force-separation* カーブと呼ぶ。*Force-separation* カーブに関連して、貫通力は AFM 探針が膜に最初に接触し、その後押し込み続けた際に脂質膜を破壊するのに必要な力の値と定義された。*Force-separation* カーブにおける詳しい定義を Fig 4.3 (a) に示した。DOPC/DPPC の各組成比の脂質膜に対してそれぞれフォースカーブ測定を行った結果を Fig 4.3 (b) に示した。本実験の結果によると、カバースリップ表面からの *separation* が 5 ~ 10 nm の時に探針が脂質膜に接触し、斥力を検出し始めた事が分かった(164)。脂質膜に対して探針先端をさらに押し付けると、脂質膜の圧縮によって斥力が増加する。膜を圧縮した後、*separation* が 2 ~ 3 nm の時に探針先端が脂質膜を破壊し、それにより探針先端が貫通して下層の基板と強く接触する(165)。従って、貫通の深さは、探針先端と脂質膜の間で最初に接触し斥力が生じ始めた点と、探針先端が基板に接触した点の 2 点間の距離として定義される(126, 166, 167)。ガラス基板に支持された脂質二重膜は、厚さ約 1 ~ 2 nm の水和層の上に形成される事が知られており、さらに形成された膜の上にも約 1 ~ 2 nm の水和層が形成される事も知られている(167, 168)。そのため、*force-separation* カーブから評価される貫通深さは、水和層と脂質膜の厚さの合計を示している事になる。ここで、*vesicle fusion* による DOPC のみで構成された脂質二重膜の場合は、一般的に 4 ~ 5 nm の膜厚である事が確認されている(169-171)。本研究の脂質膜から得られた代表的な *force-separation* カーブは、異なる DOPC/DPPC 組成比で構成された脂質膜に対してそれぞれ異なる貫通力および貫通深さを示しており、特に貫通深さは 10 nm 前後である事が分かった (Fig 4.3 (b))。この貫通深さは過去に *vesicle fusion* を用いて報告された膜厚よりもかなり大きな値となっている。この値が正しいかどうかを判断するため、それぞれの脂質膜サンプルに対するフォースカーブ測定で得られた貫通深さの平均値を解析した (Fig 4.3 (c))。その結果、20 mol% の DOPC と 80 mol% の DPPC で構成された脂質膜に関しては貫通深さが約 5 nm であり、その他の脂質膜に関し

では約 10 nm であった。基板と脂質膜の間の水和層と膜表面の水和層がそれぞれ 1 ~ 2 nm であり、DOPC が脂質二重膜であった場合の膜厚は 5 nm 程度なので、これらを合計すると 9 nm 程度となる。ここで、脂質膜は通常熱揺らぎが生じている事に注目する(172, 173)。脂質膜は膜が不規則に揺らいでいる為、膜の表面の広い範囲をフォースカーブ測定すると探針が斥力を検出する Separation にばらつきが生じると考えられる。本実験では  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  のスキャンエリア内で  $100 \times 100$  点のフォースカーブ測定を行っている為、熱揺らぎの影響を受けて通常よりも大きな貫通深さを検出したのである。実際 Fig 4.3 (c) に注目すると、全ての脂質膜において大きなエラーバーが得られている為、フォースカーブ測定が熱揺らぎの影響を受けた事が分かる。従って、本実験で作製した脂質膜の膜厚は過去に報告されている水和層と脂質二重膜の合計値とほぼ一致する。前項で示した、溶媒支援型自己組織化を用いて作製した脂質膜内のリン脂質分子が側方拡散している事と、膜厚が脂質二重膜とほぼ同じであることを併せると、本実験で作製した脂質膜は脂質二重膜であると結論付ける事が出来る。また、DPPC の組成比が高い場合、貫通深さは DOPC のみで構成された脂質二重膜よりも小さかった (Fig 4.3 (c) )。前述した通り、FRAP 測定および AFM のフォースカーブ測定の結果は、DOPC と DPPC 分子の間の強い分子間相互作用の為に、脂質二重膜の剛性は高くなり脂質二重膜内分子の拡散係数が低下する事を意味している。結果として、脂質二重膜の熱揺らぎも減少し、それに伴って貫通深さも低下したと考えられる。

最後に、平均化した膜の貫通力と DOPC/DPPC 組成比の関係を表したグラフを Fig 4.3 (d) に示した。このグラフは、貫通力と組成比には直接的な相関がある事を示している。ゲル相 DPPC の組成比を増加させるにつれて貫通力は大きくなっており、これは、DPPC は脂質二重膜の剛性を増やしている事を意味している。DPPC の組成比の増加に伴う膜の剛性の増加は、前項でも記述したが、DPPC の存在により分子間相互作用力がより強くなったという事によって説明する事ができる(128, 155)。Fig (c) と (d) に注目すると、貫通深さの平均値のエラーバーに比べて貫通力の平均値のエラーバーが小さい事が分かる。これは、

脂質二重膜が熱揺らぎによって不規則に揺らいでいても、AFMの探針で脂質二重膜表面における測定点で膜を貫通するのに必要な力は変わらないからである。前述した通り、貫通深さの定義はカンチレバーが斥力を検出した点が脂質二重膜の最表面（厳密に言えば水和層表面だが）と定義している為、熱揺らぎの影響を受けた。しかしながら、膜が熱で揺らいでいても膜の硬さは変わらない為、探針が膜を貫通するのに要する貫通力もばらつきが少ない。従って、再現性良く貫通力を検出できたのである。



**Fig 4.3** (a)本実験の force-separation カーブにおける貫通深さと貫通力の定義を示した概略図。(b)溶媒支援型自己組織化によって作製された各組成比の脂質膜を試料として用いた代表的な force-separation カーブ (Tris 緩衝液中)。(c)各組成比の脂質膜から得られた (c)貫通深さと (d)貫通力の平均値。(エラーバーは標準偏差値を表しており、 $n = 5$ )

## 第5章 液相とゲル相が拡散係数・機械特性および膜機能に与える影響

第 5 章では、本研究で溶媒支援型自己組織化を利用して作製した脂質二重膜の拡散係数や機械特性を、これまで行われてきた SLB 研究の結果と比較する事でその妥当性を評価する。その上で、SLB を構成する基板やリン脂質分子の種類などによる拡散係数や機械特性への影響を述べる。加えて、それらの条件によるドメイン構造の違いと膜機能との関連について述べる。

### 5.1 本研究で作製した脂質二重膜の拡散係数および機械特性と過去の研究報告との比較

これまで、本研究において溶媒支援型自己組織化を利用して作製した脂質膜の拡散係数および機械特性を評価する事で脂質二重膜である事を示してきた。本項では溶媒支援型自己組織化により得られた脂質二重膜の拡散係数や機械特性を過去の研究報告と比較する事で、本手法による脂質二重膜の拡散係数や機械特性の妥当性について議論する。

これまで、様々な種類のリン脂質分子が用いられて SLB が作製されてきた。その中でも細胞膜に主に含まれている極性頭部基である PC を持つリン脂質が特に注目され、DOPC や DPPC を用いた SLB に関する研究の報告例は多い。例えば、室温 (25°C) における、ガラス基板上に DOPC のみで作製された SLB 中の DOPC の拡散係数は約  $2.5 \pm 0.20 \mu\text{m}^2/\text{s}$  と報告されている(96, 100, 117)。一方、本研究における、溶媒支援型自己組織化を利用して作製した SLB に着目すると、DOPC のみで作製した膜の拡散係数は約  $2.6 \pm 0.10 \mu\text{m}^2/\text{s}$  であった。両者を比較すると DOPC の拡散係数は一致している為、本研究における溶媒支援型自己組織化を利用して作製された SLB の妥当性が確認された。ここでさらに、室温においてゲル相である DPPC の SLB に関しても考察する。DPPC の脂肪酸には不飽和結合が含まれない為分子同士が密にパッキングされ、vesicle fusion の方法では膜の破裂を妨げてしまう。そこで vesicle fusion 以外の方法として、DPPC の様なリン脂質分子は Langmuir-Blodgett によってガラス基板に単分

子膜が作られていき最終的に SLB が作製される。この様にしてガラス基板上に作製された DPPC の SLB の拡散係数は、室温（特に、転移温度未満）においては  $0.050 \sim 0.10 \mu\text{m}^2/\text{s}$  であると報告されている(174)。これらの事より、1 種類のリン脂質分子のみで形成される SLB において、液相である DOPC はゲル相である DPPC に比べて 1 秒あたり 20 ~ 50 倍大きな面積に拡散している事が分かる。ここで、本研究において溶媒支援型自己組織化を利用して作製された DOPC:DPPC = 20%:80% の SLB の場合を考える。本研究では DOPC を蛍光色素であるローダミンで標識した分子を前駆体脂質溶液に混ぜて SLB を作製した。従って本研究で解析した拡散係数は SLB 内における DOPC 分子の拡散を評価している。DOPC:DPPC = 20%:80% の SLB の場合、拡散係数は  $0.19 \pm 0.016 \mu\text{m}^2/\text{s}$  であった。これはつまり、SLB を構成するゲル相リン脂質である DPPC の割合が増加するに伴って、液相リン脂質である DOPC の膜内における拡散係数が、DPPC のみで構成される SLB の拡散係数に近づくという事が示唆された。

次に脂質二重膜の機械特性について考察する。固体上に作製された脂質膜が脂質二重膜であるか、またその SLB が持つ機械特性はどのようなものかを評価する為に、AFM を用いたナノ力学測定が過去の研究で行われてきた。例えば本研究でも用いた一般的な液相のリン脂質分子である DOPC をガラス基板上に作製した場合、その SLB を AFM の探針で貫通するのに必要な力は  $5.0 \sim 6.0 \text{ nN}$  程度であると報告されている(175-178)。本研究において溶媒支援型自己組織化を利用して作製された SLB の場合、DOPC100% の SLB を貫通する際  $5.5 \pm 1.0 \text{ nN}$  という過去の研究報告とほぼ合致した力の値を検出しており、これは本研究での SLB の妥当性を示す根拠となっている。一方 DPPC のみで構成された SLB に着目すると、AFM 探針で貫通する際に検出される力の値は  $15 \sim 20 \text{ nN}$  であると報告されている(122, 179, 180)。ここで、本研究において溶媒支援型自己組織化を利用して作製された DOPC:DPPC = 20%:80% の SLB のナノ力学測定結果によると、貫通する際に検出された力は  $13 \pm 1.1 \text{ nN}$  であった。Fig 4.3 (d) より、DPPC の割合を 20% ずつ増加させるに従って貫通力は約 2 nN 程度増加する傾向が見られた事を考慮すると、仮に溶媒支援型自己組織化を利用して DPPC100%

の SLB を作製した場合、貫通力は過去の研究報告と同等の約 15 nN が得られた可能性があると言える。また力-距離曲線から SLB の膜厚も評価している。過去の研究報告においても SLB をナノ力学測定して、AFM 探針が力を検出する前から膜を貫通して基板に接触しフィードバックがかかるまでの力-距離曲線を取得している。その力-距離曲線では、DOPC および DPPC のみで構成される SLB はどちらも基板から約 4 ~ 5 nm 離れた地点で AFM 探針の貫通が観察されている。この貫通した瞬間の地点は本研究の力-距離曲線においても明らかに一致している。加えて、過去の研究報告における力-距離曲線では、基板から約 10 nm 程度離れた地点でカンチレバーが力を検出している事を示している(177, 178)。SLB はガラス基板の上に存在する 1 ~ 2 nm の水和層とリン脂質の脂質二重膜構造の厚さ、そして膜の熱揺らぎによる厚みの増加を考慮すると、基板から約 10 nm 程度離れた地点での力の検出は妥当である。そして本研究で取得された力-距離曲線においては、どの組成の SLB であってもガラス基板から約 5.5 ~ 10 nm 離れた地点で力が検出された。特に DOPC100%の SLB は基板から約 10.7 nm 離れた地点で力を検出しており、この値は過去の研究報告と良く一致している。これらの事を合わせると、本研究で導入した溶媒支援型自己組織化による DOPC と DPPC を混成させた SLB は、過去の研究報告における SLB と同等の特徴を確かに有している事が確認された。

本研究も含めてこれまで報告した SLB の研究は、脂質二重膜をガラス基板上に作製した例である。しかしながら、過去の研究ではガラス基板以外にも酸化金(181)、ポリマー(182)、自己組織化単分子膜 (Self-assembled monolayer: SAM) (183)、二酸化チタン(184)、酸化ポリジメチルシロキサン (Polydimethylsiloxane: PDMS) (185, 186)、マイカ(187)など多くの基板が脂質二重膜を支持する為に用いられている(117)。興味深い事に、脂質二重膜は支持される固体基板に影響を受けてその拡散係数や機械特性が異なるという事が分かっている(188)。例えばゲル相である DPPC の SLB を再び例に挙げると、室温においてガラス基板上での DPPC 分子の拡散係数が  $0.19 \pm 0.016 \mu\text{m}^2/\text{s}$  であったのに対してマイカ基板上での拡散係数はより小さく、マイカ基板から離れた側の単分子膜内での拡散係数は

0.0060 ~ 0.010  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ 、マイカ基板側の単分子膜内での拡散係数は 0.000090 ~ 0.00050  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  である事が確認されている(174)。マイカ基板の表面はガラス基板と比べてより平坦であり高いゼータ電位を有する。そしてこれらは脂質二重膜と基板の間に強力な相互作用を生み出し、それによって脂質二重膜内の上下の単分子膜でのリン脂質分子の拡散が異なるようになり、膜全体としての拡散係数も低下するのである(189, 190)。この様な脂質二重膜と基板の間の相互作用は、基板表面に形成される水和層の存在が深く関与している(191)。言い換えると、水和層の存在が脂質二重膜内のリン脂質分子の拡散係数に深く関与しているという事である(188)。水和層が脂質二重膜のクッションの様な役割を果たしており、リン脂質分子の流動性を高めている。実際、基板表面の親水性の度合いが大きいほど脂質二重膜に対してクッションの役割を担い、リン脂質分子の拡散係数が増加する事が示されている(192)。また、この様な傾向は SLB の機械特性にもみられ、ガラス、マイカ、シリコン基板などを用いて作製した SLB のナノ力学測定から、水和層と AFM 探針が脂質二重膜を貫通するのに必要な力の大小に相関がある事が確認された(126, 193)。これらの事より、SLB は用いるリン脂質分子の種類や基板(表面の粗さや親水性度合いなど)に影響してその性質が大きく異なる事という事が分かる。その中でも、ガラス基板に DOPC もしくは DPPC の脂質二重膜を作製する系においては、本研究で提案した手法による SLB は性質が良く再現されている事が示された。

## 5.2 脂質二重膜の拡散係数および力学特性が膜機能にもたらす影響

これまで室温（25°C）における SLB の拡散係数や機械特性について議論したが、SLB を高熱にする事で拡散係数や機械特性が変化する事が知られている。例えば DPPC は転移温度が 41°C である為、この温度より高い環境においてはゲル相から液相に相転移する。この性質を利用して、ゲル相であるリン脂質分子を用いた SLB の作製が行われている。例えば、本学位論文ではこれまで vesicle fusion を用いた脂質二重膜の作製において、ゲル相のリン脂質分子を含むベシクルは、密にパッキングされる事による強い分子間相互作用により破裂が妨げられてしまい SLB が作製できないと述べた。しかしながら、ゲル相であるリン脂質分子の温度を転移温度より高温にした場合、ベシクルが破裂して SLB が作製されるという研究報告がされている(124, 128)。この事より、ゲル相のリン脂質分子であっても一度高温にしてしまえば従来の膜作製法の技術的問題点を解決できるのではないかという疑問が生じる。しかしながら、SLB は温度に依存してその性質が変化してしまう為、一度加熱して SLB を作製してから元の温度まで冷却するというプロセスは目的の膜の性質を失ってしまう問題がある。例えば過去の研究では、室温（25°C）でゲル相である DPPC を 60°C まで加熱して液相状態にし、vesicle fusion によって脂質二重膜を作製している。その後、60°C から室温まで徐々に冷却していき、元々のゲル相状態に戻した SLB を取得している。この冷却プロセスにおける脂質二重膜の表面形状を AFM のイメージングする事で、SLB の表面構造の温度依存について調査している(128)。その結果、60°C の液相状態である DPPC の SLB は平坦な表面形状であり、室温まで冷却するプロセスで数  $\mu\text{m}$  の欠陥構造がいくつも生じる事が判明した。これは、高温で液相になった状態ではリン脂質分子の拡散係数が高くなる為分子同士が密にパッキングされない状態であるが、転移温度未満でゲル相となるとより高密度にパッキングされる為、固体基板上において今まで脂質二重膜が満たしていた領域が小さくなるからであると考えられる。実際 SLB 内リン脂質分子の拡散係数の温度依存に関しては過去に研究報告されている。DPPC を例に挙げると、室温（転移温度未満）においてガラス基板上での拡散係数は  $0.19 \pm 0.016 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 、マイカ

基板上ではマイカ基板から離れた側の単分子膜内での拡散係数は  $0.0060 \sim 0.010 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 、マイカ基板側の単分子膜内での拡散係数は  $0.000090 \sim 0.00050 \mu\text{m}^2/\text{s}$  であるのに対し、転移温度より高温だとガラス基板上での拡散係数は  $10 \sim 20 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 、マイカ基板上では基板から離れた側の拡散係数が  $2 \sim 8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 、基板側の拡散係数が  $1 \sim 2 \mu\text{m}^2/\text{s}$  である(174)。すなわち、基板の種類にも依存するが、転移温度より高温で液相の場合に比べて転移温度未満のゲル相の拡散係数は  $10^2$  倍以上も小さな値となる。この為脂質二重膜を形成しているリン脂質分子が部分的に凝集しゲル相に相状態が変化すると共に欠陥構造が生じた事が分かる(194, 195)。

また、液相およびゲル相のリン脂質分子が混成した SLB の場合も、加熱と冷却のプロセスによって膜機能が変化してしまう。代表的なリン脂質分子である DOPC と DPPC を混成させた前駆体脂質溶液を一度  $60^\circ\text{C}$  程度まで加熱して SLB を作製し、その後室温まで冷却する研究は過去に行われている。このプロセスを行うと室温に戻した時にゲル相のドメイン構造は形成されるものの、その構造は SLB 表面の上から見ると羽の様な構造になってしまう事が分かっている(163, 196)。実際の生きた細胞膜上に存在するドメインは表面では円形をとるため、SLB において羽の様な形が形成されてしまうのは実際の細胞膜のモデルとはかけ離れてしまう。さらにこの SLB における羽の様なドメイン形状は、一度加熱した SLB の系の冷却速度にも依存する。冷却速度が遅い場合、液相からゲル相に相転移する際周りから均等に圧縮され円形に近い形状をとるが、冷却速度が早いとランダムに力がかかり不均一な結晶構造をとる(197)。さらに、SLB を作製する際の温度変化により、基板上の脂質二重膜の上下の層で異なる種類のリン脂質分子が配列してしまう事も報告されている(198)。これらの事を合わせると、SLB を作製する際に一度加熱して冷却するプロセスを行うと、実際の細胞膜のドメイン形状および膜機能とは明らかに異なる膜が得られる事になる。本学位論文で前述した通り、細胞膜のラフト構造という概念の様に、細胞膜においてドメインは特定の膜タンパク質を偏在させる機能を有している。様々な分子認識能を有する膜タンパク質とそれを偏在させる脂質二重膜のドメインを合わせたセンシングプラットフォームをバイオセンサーに応用する事を考えた場合、

細胞膜と異なる形状や機能のドメインを SLB で再現してしまうと、膜タンパク質を適切に偏在できない、正常な生体検出が行えないといった不具合が生じてしまう。従って、温度をコントロールしてリン脂質の性質を変化させ（相状態を転移させる事を含む）て SLB を作製する事は、実際の細胞膜機能とかけ離れた模倣細胞膜を作製してしまう可能性が高い為、バイオセンサーのような技術に応用するには注意が必要である。一方、本研究で導入した溶媒支援型自己組織化はリン脂質分子の組成によらず室温で SLB を作製可能である。従って、溶媒支援型自己組織化と独自に開発したマイクロ流路チャンバーを組み合わせた本研究成果は、透明な基板であれば様々な物理化学的性質を付与した固体表面が使用可能であり、細胞膜を模したドメインを有する脂質二重膜を固体表面上に作製し目的に応じた様々な SLB デザインを可能にする優れた SLB 研究プラットフォームを生み出したと言える。

## 第6章 総括と今後の展望

本博士学位論文研究では、新しく独自に開発したマイクロ流路チャンバーを使用し、溶媒支援型自己組織化により異なる組成比の液相 DOPC とゲル相 DPPC を混成させた脂質二重膜を室温で作製した。これによって、外気にさらされることなく脂質二重膜の作製から特性評価に至るまでの一連の操作が可能になった。蛍光顕微鏡観察、FRAP 測定、AFM を使用した表面形状測定および力-距離測定により、従来の vesicle fusion 法では困難であった、ゲル相であるリン脂質の割合が非常に高い場合（本研究では最大 80 mol% の DPPC）の脂質二重膜を、溶媒支援型自己組織化によって作製する事が可能であることを証明した。各リン脂質組成の脂質二重膜蛍光画像の蛍光強度を比較する事で、脂質二重膜作製前の前駆体脂質溶液におけるリン脂質の組成は、溶媒支援型自己組織化を用いて基板上に作製した脂質二重膜にも良く再現されている事が判明した。この事は、溶媒支援型自己組織化により脂質二重膜内のリン脂質の組成を正確に制御できる事を示している。リン脂質組成を正確に制御して得られた脂質二重膜（つまり、20 mol% 間隔で 0 から 80 mol% の DPPC）を使用して、膜を占めるゲル相であるリン脂質分子の割合の増加による脂質二重膜の物性への影響について FRAP、AFM 測定によって調査した。DPPC の割合が増加するに伴って、脂質二重膜内のリン脂質分子の全体的な拡散係数が低下し、膜の剛性が増加する事が分かった。この観察結果は、膜内で密にパッキングするゲル相のリン脂質分子の割合が脂質二重膜内で増えた事により、脂質二重膜内全体の平均的な分子間相互作用がより強くなった事に起因すると考えられる。

この研究で得られた知見は、溶媒支援型自己組織化は生物系の細胞膜を模倣する、高品質で複雑な組成のモデル生体膜を作製する為の有望なアプローチである事を示している。さらに重要な事は、この手法はこのような生物学的模倣物に関するより詳細な定性・定量的な調査を可能にするという事である。本研究では脂質二重膜を作製する際に DOPC と DPPC という 2 種類のリン脂質分子のみを使用した。今後はこれに細胞膜を構成する主要な生体分子のコレステロールやその他のリン脂質分子を混成して、さらに生細胞膜に近いモデル膜を作製

する事が可能であると考えられる。これによって、各リン脂質や生体分子の脂質二重膜内における凝集の様子や分布、そしてそれらが影響する事による脂質二重膜の物性を調査する事が可能である。この事は、細胞膜の構造とその機能の解明という生物学分野の基礎研究に貢献する事ができる。応用技術開発の分野においては、作製した脂質二重膜にタンパク質や受容体といった分子認識能を有する生体分子を修飾する事で、バイオセンサーの新規開発、分子標的薬開発の為の分子認識研究に役立たせる事が出来る。実際、親水性部分にマレイミド基などが修飾してあるリン脂質分子を脂質二重膜に用いる事で脂質二重膜を作製した後タンパク質やペプチドを膜表面に修飾する事が可能である(199, 200)。加えて、本研究で独自に開発したマイクロ流路チャンバーは前述した通り、顕微鏡の光学的アクセスを可能にする透明な基板(特にガラス基板)であれば制限なく使用可能である。すなわち、基板に様々な表面処理を施す事で目的に応じた物理化学的性質を付与した表面の基板を SLB 作製に用いる事ができる。これによって様々な膜の構造や膜機能を持つ SLB を作製可能になる。本研究においては溶媒支援型自己組織化を用いてリン脂質分子のみで構成される脂質二重膜をガラス基板上に作製しただけであるが、使用する基板を選択し、作製後に適切な処理を加える事によってタンパク質や受容体が含まれる SLB に改良する事で、今後さらに幅広い用途のバイオセンサー開発の進歩に繋がる発展的な研究を行う事が可能になる。

第1章で解説したように、細胞膜の表面は非常に複雑な構造で解析する事が困難である事から、未だに細胞挙動メカニズムに関する包括的な知見が得られているわけではない。そこで、実際の生細胞膜の中で目的の組成、構造、機能のみを抽出して単純化した人工生体膜を解析し、新たに解明される現象の知見を蓄積する事によって、従来の細胞膜研究のみでは不十分であった情報を補う事が出来ると私は考える。細胞膜研究、そして人工的に再現した生体膜研究を組み合わせる事で、基礎生物学分野で求められる新たな知見の獲得、そしてそれを応用したバイオテクノロジーの発展に繋がるであろう。本博士学位論文研究で構築した溶媒支援型自己組織化を利用した脂質二重膜の作製・評価プラットフォーム

## 第6章 総括と今後の展望

ームが広く使用される事で、基礎生物学・生物物理学分野やバイオテクノロジー分野が大きな発展を遂げる事を願っている。

## 参考文献

### 参考文献

1. C. G. Siontorou, G. P. Nikoleli, D. P. Nikolelis, S. K. Karapetis, Artificial Lipid Membranes: Past, Present, and Future. *Membranes (Basel)* **7**, (2017).
2. T. L. Steck, The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review. *J Cell Biol* **62**, 1-19 (1974).
3. C. Frantz, K. M. Stewart, V. M. Weaver, The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* **123**, 4195-4200 (2010).
4. N. Wang, D. E. Ingber, Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension. *Biophys J* **66**, 2181-2189 (1994).
5. R. L. Juliano, S. Haskill, Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* **120**, 577-585 (1993).
6. L. Lamallice, F. Le Boeuf, J. Huot, Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* **100**, 782-794 (2007).
7. W. Guo, F. G. Giancotti, Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 816-826 (2004).
8. S. Gordon, Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* **111**, 927-930 (2002).
9. K. H. Kim, K. Moriarty, J. R. Bender, Vascular cell signaling by membrane estrogen receptors. *Steroids* **73**, 864-869 (2008).
10. R. S. Armen, O. D. Uitto, S. E. Feller, Phospholipid component volumes: determination and application to bilayer structure calculations. *Biophys J* **75**, 734-744 (1998).
11. A. A. Spector, M. A. Yorek, Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res* **26**, 1015-1035 (1985).
12. A. Poulos, I. G. White, The phospholipid composition of human spermatozoa and seminal plasma. *J Reprod Fertil* **35**, 265-272 (1973).
13. E. Gorter, F. Grendel, On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. *J Exp Med* **41**, 439-443 (1925).
14. G. Vanderkooi, D. E. Green, Biological membrane structure, I. The protein crystal model for membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **66**, 615-621 (1970).
15. F. M. Goni, The basic structure and dynamics of cell membranes: an

## 参考文献

- update of the Singer-Nicolson model. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 1467-1476 (2014).
16. D. E. Green, J. F. Perdue, Membranes as Expressions of Repeating Units. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **55**, 1295-& (1966).
  17. L. D. Frye, M. Edidin, The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J Cell Sci* **7**, 319-335 (1970).
  18. S. J. Singer, G. L. Nicolson, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731 (1972).
  19. R. D. Kornberg, H. M. McConnell, Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes. *Biochemistry* **10**, 1111-1120 (1971).
  20. T. L. Steck, J. Ye, Y. Lange, Probing red cell membrane cholesterol movement with cyclodextrin. *Biophys J* **83**, 2118-2125 (2002).
  21. R. D. Kornberg, H. M. McConnell, Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 2564-2568 (1971).
  22. R. E. Pagano, R. J. Cherry, D. Chapman, Phase transitions and heterogeneity in lipid bilayers. *Science* **181**, 557-559 (1973).
  23. G. Lindblom, G. Oradd, Lipid lateral diffusion and membrane heterogeneity. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 234-244 (2009).
  24. R. Welti, M. Glaser, Lipid domains in model and biological membranes. *Chem Phys Lipids* **73**, 121-137 (1994).
  25. G. W. Feigenson, Phase diagrams and lipid domains in multicomponent lipid bilayer mixtures. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 47-52 (2009).
  26. B. K. Rastogi, A. Nordoy, Lipid composition of cultured human endothelial cells. *Thromb Res* **18**, 629-641 (1980).
  27. P. F. Almeida, W. L. Vaz, T. E. Thompson, Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: a free volume analysis. *Biochemistry* **31**, 6739-6747 (1992).
  28. D. Corbeil, K. Roper, C. A. Fargeas, A. Joester, W. B. Huttner, Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic* **2**, 82-91 (2001).
  29. A. Pralle, P. Keller, E. L. Florin, K. Simons, J. K. H. Horber, Sphingolipid-

## 参考文献

- cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *Journal of Cell Biology* **148**, 997-1007 (2000).
30. A. Zachowski, Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J* **294** ( Pt 1), 1-14 (1993).
  31. A. A. Spector *et al.*, Effect of fatty acid modification on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* **65**, 1003-1012 (1980).
  32. M. Uemura, R. A. Joseph, P. L. Steponkus, Cold Acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on Plasma Membrane Lipid Composition and Freeze-Induced Lesions). *Plant Physiol* **109**, 15-30 (1995).
  33. K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572 (1997).
  34. D. Lingwood, K. Simons, Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46-50 (2010).
  35. K. Simons, G. van Meer, Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**, 6197-6202 (1988).
  36. D. A. Brown, J. K. Rose, Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533-544 (1992).
  37. K. G. Rothberg, Y. S. Ying, B. A. Kamen, R. G. Anderson, Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J Cell Biol* **111**, 2931-2938 (1990).
  38. P. Dupree, R. G. Parton, G. Raposo, T. V. Kurzchalia, K. Simons, Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J* **12**, 1597-1605 (1993).
  39. S. Mayor, F. R. Maxfield, Insolubility and Redistribution of Gpi-Anchored Proteins at the Cell-Surface after Detergent Treatment. *Molecular Biology of the Cell* **6**, 929-944 (1995).
  40. M. A. Alonso, J. Millan, The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J Cell Sci* **114**, 3957-3965 (2001).
  41. T. Erpel, S. A. Courtneidge, Src family protein tyrosine kinases and cellular signal transduction pathways. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 176-182 (1995).

42. H. R. Bourne, How receptors talk to trimeric G proteins. *Current Opinion in Cell Biology* **9**, 134-142 (1997).
43. S. Munro, Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**, 377-388 (2003).
44. P. Sharma *et al.*, Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell* **116**, 577-589 (2004).
45. B. H. Meyer *et al.*, FRET imaging reveals that functional neurokinin-1 receptors are monomeric and reside in membrane microdomains of live cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 2138-2143 (2006).
46. C. Dietrich, B. Yang, T. Fujiwara, A. Kusumi, K. Jacobson, Relationship of Lipid Rafts to Transient Confinement Zones Detected by Single Particle Tracking. *Biophysical Journal* **82**, 274-284 (2002).
47. M. Dahan *et al.*, Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science* **302**, 442-445 (2003).
48. K. Jacobson, O. G. Mouritsen, R. G. W. Anderson, Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nature Cell Biology* **9**, 7-14 (2007).
49. R. H. Michell, Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim Biophys Acta* **415**, 81-47 (1975).
50. B. Hille, C. M. Armstrong, R. MacKinnon, Ion channels: from idea to reality. *Nat Med* **5**, 1105-1109 (1999).
51. E. Neher, B. Sakmann, Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799-802 (1976).
52. T. Rostovtseva, M. Colombini, ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 28006-28008 (1996).
53. X. Jiang *et al.*, Ligand-specific opening of a gated-porin channel in the outer membrane of living bacteria. *Science* **276**, 1261-1264 (1997).
54. L. Bao, S. Locovei, G. Dahl, Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett* **572**, 65-68 (2004).
55. V. Vogel, M. Sheetz, Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 265-275 (2006).

## 参考文献

56. P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H. J. Gruber, K. Schilcher, H. Schindler, Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3477-3481 (1996).
57. P. Kunapuli, V. V. Gurevich, J. L. Benovic, Phospholipid-stimulated autophosphorylation activates the G protein-coupled receptor kinase GRK5. *J Biol Chem* **269**, 10209-10212 (1994).
58. R. J. Lefkowitz, G protein-coupled receptor kinases. *Cell* **74**, 409-412 (1993).
59. R. J. Lefkowitz, The superfamily of heptahelical receptors. *Nat Cell Biol* **2**, E133-136 (2000).
60. R. J. Lefkowitz, S. K. Shenoy, Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* **308**, 512-517 (2005).
61. J. S. Goodwin, K. R. Drake, C. L. Remmert, A. K. Kenworthy, Ras diffusion is sensitive to plasma membrane viscosity. *Biophys J* **89**, 1398-1410 (2005).
62. E. K. Sinner, W. Knoll, Functional tethered membranes. *Curr Opin Chem Biol* **5**, 705-711 (2001).
63. E. Sackmann, Supported membranes: scientific and practical applications. *Science* **271**, 43-48 (1996).
64. Y. H. Chan, S. G. Boxer, Model membrane systems and their applications. *Curr Opin Chem Biol* **11**, 581-587 (2007).
65. G. J. Hardy, R. Nayak, S. Zauscher, Model cell membranes: Techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **18**, 448-458 (2013).
66. Y. Kobayashi *et al.*, Advanced taste sensors based on artificial lipids with global selectivity to basic taste qualities and high correlation to sensory scores. *Sensors (Basel)* **10**, 3411-3443 (2010).
67. H. A. Rinia, B. de Kruijff, Imaging domains in model membranes with atomic force microscopy. *FEBS Lett* **504**, 194-199 (2001).
68. W. Knoll *et al.*, Functional tethered lipid bilayers. *Reviews in Molecular Biotechnology* **74**, 137-158 (2000).
69. E. T. Castellana, P. S. Cremer, Solid supported lipid bilayers: From

- biophysical studies to sensor design. *Surface Science Reports* **61**, 429-444 (2006).
70. S. G. Boxer, Molecular transport and organization in supported lipid membranes. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 704-709 (2000).
71. R. P. Richter, R. Berat, A. R. Brisson, Formation of solid-supported lipid bilayers: an integrated view. *Langmuir* **22**, 3497-3505 (2006).
72. J. T. Groves, S. G. Boxer, Micropattern formation in supported lipid membranes. *Acc Chem Res* **35**, 149-157 (2002).
73. G.-P. Nikoleli, D. P. Nikolelis, G. Evtugyn, T. Hianik, Advances in lipid film based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **79**, 210-221 (2016).
74. A. Czogalla, M. Grzybek, W. Jones, U. Coskun, Validity and applicability of membrane model systems for studying interactions of peripheral membrane proteins with lipids. *Biochim Biophys Acta* **1841**, 1049-1059 (2014).
75. N. J. Wittenberg *et al.*, High-affinity binding of remyelinating natural autoantibodies to myelin-mimicking lipid bilayers revealed by nanohole surface plasmon resonance. *Anal Chem* **84**, 6031-6039 (2012).
76. T. H. Lee, D. J. Hirst, M. I. Aguilar, New insights into the molecular mechanisms of biomembrane structural changes and interactions by optical biosensor technology. *Biochim Biophys Acta* **1848**, 1868-1885 (2015).
77. E. Rascol, J. M. Devoisselle, J. Chopineau, The relevance of membrane models to understand nanoparticles-cell membrane interactions. *Nanoscale* **8**, 4780-4798 (2016).
78. D. A. Costello, V. A. Villareal, P. L. Yang, Desmosterol Increases Lipid Bilayer Fluidity during Hepatitis C Virus Infection. *ACS Infect Dis* **2**, 852-862 (2016).
79. X. Su *et al.*, Phase separation of signaling molecules promotes T cell receptor signal transduction. *Science* **352**, 595-599 (2016).
80. A. van Oudenaarden, S. G. Boxer, Brownian ratchets: molecular separations in lipid bilayers supported on patterned arrays. *Science* **285**,

## 参考文献

- 1046-1048 (1999).
81. L. K. Tamm, H. M. McConnell, Supported phospholipid bilayers. *Biophysical Journal* **47**, 105-113 (1985).
  82. U. Mennicke, T. Salditt, Preparation of solid-supported lipid bilayers by spin-coating. *Langmuir* **18**, 8172-8177 (2002).
  83. A. Dols-Perez, L. Fumagalli, A. C. Simonsen, G. Gomila, Ultrathin spin-coated dioleoylphosphatidylcholine lipid layers in dry conditions: a combined atomic force microscopy and nanomechanical study. *Langmuir* **27**, 13165-13172 (2011).
  84. J. Radler, H. Strey, E. Sackmann, Phenomenology and Kinetics of Lipid Bilayer Spreading on Hydrophilic Surfaces. *Langmuir* **11**, 4539-4548 (1995).
  85. K. Yokota, A. Toyoki, K. Yamazaki, T. Ogino, Behavior of raft-like domain in stacked structures of ternary lipid bilayers prepared by self-spreading method. *Japanese Journal of Applied Physics* **53**, (2014).
  86. R. Richter, A. Mukhopadhyay, A. Brisson, Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: a combined QCM-D and AFM study. *Biophys J* **85**, 3035-3047 (2003).
  87. R. P. Richter, R. Berat, A. R. Brisson, Formation of solid-supported lipid bilayers: An integrated view. *Langmuir* **22**, 3497-3505 (2006).
  88. H. A. Rinia, R. A. Demel, J. P. J. M. van der Eerden, B. de Kruijff, Blistering of Langmuir-Blodgett bilayers containing anionic phospholipids as observed by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* **77**, 1683-1693 (1999).
  89. L. Perino-Gallice, G. Fragneto, U. Mennicke, T. Salditt, F. Rieutord, Dewetting of solid-supported multilamellar lipid layers. *Eur Phys J E Soft Matter* **8**, 275-282 (2002).
  90. A. C. Simonsen, L. A. Bagatolli, Structure of spin-coated lipid films and domain formation in supported membranes formed by hydration. *Langmuir* **20**, 9720-9728 (2004).
  91. J. H. Crowe, L. M. Crowe, J. F. Carpenter, C. Aurell Wistrom, Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem J* **242**, 1-10

- (1987).
92. K. Furukawa, K. Sumitomo, H. Nakashima, Y. Kashimura, K. Torimitsu, Supported lipid bilayer self-spreading on a nanostructured silicon surface. *Langmuir* **23**, 367-371 (2007).
  93. J. A. Jackman, Z. Zhao, V. P. Zhdanov, C. W. Frank, N. J. Cho, Vesicle adhesion and rupture on silicon oxide: influence of freeze-thaw pretreatment. *Langmuir* **30**, 2152-2160 (2014).
  94. J. A. Jackman, J. H. Choi, V. P. Zhdanov, N. J. Cho, Influence of osmotic pressure on adhesion of lipid vesicles to solid supports. *Langmuir* **29**, 11375-11384 (2013).
  95. E. Kalb, S. Frey, L. K. Tamm, Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers. *Biochim Biophys Acta* **1103**, 307-316 (1992).
  96. S. R. Tabaei *et al.*, Formation of cholesterol-rich supported membranes using solvent-assisted lipid self-assembly. *Langmuir* **30**, 13345-13352 (2014).
  97. S. R. Tabaei, J. A. Jackman, B. Liedberg, A. N. Parikh, N. J. Cho, Observation of Stripe Superstructure in the beta-Two-Phase Coexistence Region of Cholesterol-Phospholipid Mixtures in Supported Membranes. *J Am Chem Soc* **136**, 16962-16965 (2014).
  98. T. K. Lind, M. Cardenas, H. P. Wacklin, Formation of supported lipid bilayers by vesicle fusion: effect of deposition temperature. *Langmuir* **30**, 7259-7263 (2014).
  99. B. Seantier, C. Breffa, O. Felix, G. Decher, In situ investigations of the formation of mixed supported lipid bilayers close to the phase transition temperature. *Nano Letters* **4**, 5-10 (2004).
  100. S. R. Tabaei, J. H. Choi, G. Haw Zan, V. P. Zhdanov, N. J. Cho, Solvent-assisted lipid bilayer formation on silicon dioxide and gold. *Langmuir* **30**, 10363-10373 (2014).
  101. S. R. Tabaei, J. A. Jackman, S. O. Kim, V. P. Zhdanov, N. J. Cho, Solvent-assisted lipid self-assembly at hydrophilic surfaces: factors influencing the formation of supported membranes. *Langmuir* **31**, 3125-3134 (2015).

## 参考文献

102. S. R. Tabaei, S. Vafaei, N. J. Cho, Fabrication of charged membranes by the solvent-assisted lipid bilayer (SALB) formation method on SiO<sub>2</sub> and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Phys Chem Chem Phys* **17**, 11546-11552 (2015).
103. S. R. Tabaei *et al.*, Biomembrane Fabrication by the Solvent-assisted Lipid Bilayer (SALB) Method. *J Vis Exp*, (2015).
104. J. T. Buboltz, G. W. Feigenson, A novel strategy for the preparation of liposomes: rapid solvent exchange. *Biochim Biophys Acta* **1417**, 232-245 (1999).
105. A. O. Hohner, M. P. David, J. O. Radler, Controlled solvent-exchange deposition of phospholipid membranes onto solid surfaces. *Biointerphases* **5**, 1-8 (2010).
106. J. A. Schellman, A simple model for solvation in mixed solvents. Applications to the stabilization and destabilization of macromolecular structures. *Biophys Chem* **37**, 121-140 (1990).
107. P. Westh, C. Trandum, Thermodynamics of alcohol-lipid bilayer interactions: application of a binding model. *Biochim Biophys Acta* **1421**, 261-272 (1999).
108. J. J. Gillissen, S. R. Tabaei, N. J. Cho, A phenomenological model of the solvent-assisted lipid bilayer formation method. *Phys Chem Chem Phys* **18**, 24157-24163 (2016).
109. H. Baltes, M. Schwendler, C. A. Helm, H. Mohwald, Tail and head group interactions in phospholipid monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science* **178**, 135-143 (1996).
110. K. Kago *et al.*, Direct in situ observation of a lipid monolayer-DNA complex at the air-water interface by X-ray reflectometry. *Langmuir* **15**, 5193-5196 (1999).
111. H. Mohwald, Direct Characterization of Monolayers at the Air Water Interface. *Thin Solid Films* **159**, 1-15 (1988).
112. E. L. Florin, H. E. Gaub, Painted supported lipid membranes. *Biophys J* **64**, 375-383 (1993).
113. C. W. Meuse *et al.*, Hybrid bilayer membranes in air and water: infrared spectroscopy and neutron reflectivity studies. *Biophys J* **74**, 1388-1398

- (1998).
114. I. Zawisza *et al.*, Electrochemical and photon polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy study of the electric field driven transformations of a phospholipid bilayer supported at a gold electrode surface. *Biophysical Journal* **85**, 4055-4075 (2003).
  115. J. P. Slotte, Effect of sterol structure on molecular interactions and lateral domain formation in monolayers containing dipalmitoyl phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* **1237**, 127-134 (1995).
  116. S. P. Heyn, M. Egger, H. E. Gaub, Lipid and Lipid Protein Monolayers Spread from a Vesicle Suspension - a Microfluorescence Film Balance Study. *Journal of Physical Chemistry* **94**, 5073-5078 (1990).
  117. K. J. Seu *et al.*, Effect of surface treatment on diffusion and domain formation in supported lipid bilayers. *Biophys J* **92**, 2445-2450 (2007).
  118. V. Schram, H. N. Lin, T. E. Thompson, Topology of gel-phase domains and lipid mixing properties in phase-separated two-component phosphatidylcholine bilayers. *Biophys J* **71**, 1811-1822 (1996).
  119. S. Meker, H. Chin, T. N. Sut, N. J. Cho, Amyloid-beta Peptide Triggers Membrane Remodeling in Supported Lipid Bilayers Depending on Their Hydrophobic Thickness. *Langmuir* **34**, 9548-9560 (2018).
  120. G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* **56**, 930-933 (1986).
  121. Y. F. Dufrene, G. U. Lee, Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope. *Biochim Biophys Acta* **1509**, 14-41 (2000).
  122. S. Garcia-Manyes, G. Oncins, F. Sanz, Effect of ion-binding and chemical phospholipid structure on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. *Biophys J* **89**, 1812-1826 (2005).
  123. M. P. Mingeot-Leclercq, M. Deleu, R. Brasseur, Y. F. Dufrene, Atomic force microscopy of supported lipid bilayers. *Nat Protoc* **3**, 1654-1659 (2008).
  124. S. J. Attwood, Y. Choi, Z. Leonenko, Preparation of DOPC and DPPC Supported Planar Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy and Atomic

- Force Spectroscopy. *Int J Mol Sci* **14**, 3514-3539 (2013).
125. J. D. Unsay, K. Cosentino, A. J. Garcia-Saez, Atomic Force Microscopy Imaging and Force Spectroscopy of Supported Lipid Bilayers. *J Vis Exp*, e52867 (2015).
  126. V. Franz, S. Loi, H. Muller, E. Bamberg, H. H. Butt, Tip penetration through lipid bilayers in atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **23**, 191-200 (2002).
  127. H. Chin, J. J. J. Gillissen, E. Miyako, N. J. Cho, Microfluidic liquid cell chamber for scanning probe microscopy measurement application. *Rev Sci Instrum* **90**, 046105 (2019).
  128. Z. V. Leonenko, E. Finot, H. Ma, T. E. Dahms, D. T. Cramb, Investigation of temperature-induced phase transitions in DOPC and DPPC phospholipid bilayers using temperature-controlled scanning force microscopy. *Biophys J* **86**, 3783-3793 (2004).
  129. J. W. Lichtman, J. A. Conchello, Fluorescence microscopy. *Nat Methods* **2**, 910-919 (2005).
  130. D. Frackowiak, The Jablonski Diagram. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **2**, 399-408 (1988).
  131. U. Noomnarm, R. M. Clegg, Fluorescence lifetimes: fundamentals and interpretations. *Photosynth Res* **101**, 181-194 (2009).
  132. K. Jacobson, E. Wu, G. Poste, Measurement of the translational mobility of concanavalin A in glycerol-saline solutions and on the cell surface by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochim Biophys Acta* **433**, 215-222 (1976).
  133. E. S. Wu, K. Jacobson, D. Papahadjopoulos, Lateral diffusion in phospholipid multibilayers measured by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry* **16**, 3936-3941 (1977).
  134. D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, W. W. Webb, Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* **16**, 1055-1069 (1976).
  135. P. Jonsson, M. P. Jonsson, J. O. Tegenfeldt, F. Hook, A method improving the accuracy of fluorescence recovery after photobleaching analysis.

- Biophys J* **95**, 5334-5348 (2008).
136. H. J. Steinhoff, W. L. Hubbell, Calculation of electron paramagnetic resonance spectra from Brownian dynamics trajectories: application to nitroxide side chains in proteins. *Biophys J* **71**, 2201-2212 (1996).
  137. M. Guizar-Sicairos, J. C. Gutierrez-Vega, Computation of quasi-discrete Hankel transforms of integer order for propagating optical wave fields. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* **21**, 53-58 (2004).
  138. G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel, Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Physical Review Letters* **49**, 57-61 (1982).
  139. G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel, Tunneling through a controllable vacuum gap. *Applied Physics Letters* **40**, 178-180 (1982).
  140. G. Meyer, N. M. Amer, Novel optical approach to atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* **53**, 1045-1047 (1988).
  141. S. W. Hui, R. Viswanathan, J. A. Zasadzinski, J. N. Israelachvili, The structure and stability of phospholipid bilayers by atomic force microscopy. *Biophys J* **68**, 171-178 (1995).
  142. Y. F. Dufrene, W. R. Barger, J. B. D. Green, G. U. Lee, Nanometer-scale surface properties of mixed phospholipid monolayers and bilayers. *Langmuir* **13**, 4779-4784 (1997).
  143. H.-J. Butt, B. Cappella, M. Kappl, Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface Science Reports* **59**, 1-152 (2005).
  144. R. Proksch, T. E. Schäffer, J. P. Cleveland, R. C. Callahan, M. B. Viani, Finite optical spot size and position corrections in thermal spring constant calibration. *Nanotechnology* **15**, 1344-1350 (2004).
  145. J. L. Hutter, J. Bechhoefer, Calibration of atomic - force microscope tips. *Review of Scientific Instruments* **64**, 1868-1873 (1993).
  146. M. J. Higgins *et al.*, Noninvasive determination of optical lever sensitivity in atomic force microscopy. *Review of Scientific Instruments* **77**, (2006).
  147. N. Jalili, K. Laxminarayana, A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences. *Mechatronics* **14**, 907-945 (2004).

## 参考文献

148. R. Garcia, A. San Paulo, Attractive and repulsive tip-sample interaction regimes in tapping-mode atomic force microscopy. *Physical Review B* **60**, 4961-4967 (1999).
149. N. Kodera, D. Yamamoto, R. Ishikawa, T. Ando, Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature* **468**, 72-76 (2010).
150. Y. Martin, H. K. Wickramasinghe, Magnetic imaging by “force microscopy” with 1000 Å resolution. *Applied Physics Letters* **50**, 1455-1457 (1987).
151. M. Kuroda, H. Yabuno, K. Hayashi, K. Ashida, Amplitude Control in a van der Pol-Type Self-Excited AFM Microcantilever. *Journal of System Design and Dynamics* **2**, 886-897 (2008).
152. N. Umeda, S. Ishizaki, H. Uwai, Scanning attractive force microscope using photothermal vibration. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures* **9**, 1318-1322 (1991).
153. D. Kiracofe, K. Kobayashi, A. Labuda, A. Raman, H. Yamada, High efficiency laser photothermal excitation of microcantilever vibrations in air and liquids. *Rev Sci Instrum* **82**, 013702 (2011).
154. T. Hayashi, Y. Tanaka, Y. Koide, M. Tanaka, M. Hara, Mechanism underlying bioinertness of self-assembled monolayers of oligo(ethyleneglycol)-terminated alkanethiols on gold: protein adsorption, platelet adhesion, and surface forces. *Phys Chem Chem Phys* **14**, 10196-10206 (2012).
155. P. Uppamoochikkal, S. Tristram-Nagle, J. F. Nagle, Orientation of tie-lines in the phase diagram of DOPC/DPPC/cholesterol model biomembranes. *Langmuir* **26**, 17363-17368 (2010).
156. P. E. Milhiet *et al.*, AFM detection of GPI protein insertion into DOPC/DPPC model membranes. *Single Molecules* **3**, 135-140 (2002).
157. D. Scherfeld, N. Kahya, P. Schwille, Lipid dynamics and domain formation in model membranes composed of ternary mixtures of unsaturated and saturated phosphatidylcholines and cholesterol. *Biophys J* **85**, 3758-3768 (2003).
158. J. Korlach, P. Schwille, W. W. Webb, G. W. Feigenson, Characterization of

- lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8461-8466 (1999).
159. S. Ladha *et al.*, Lateral diffusion in planar lipid bilayers: a fluorescence recovery after photobleaching investigation of its modulation by lipid composition, cholesterol, or alamethicin content and divalent cations. *Biophys J* **71**, 1364-1373 (1996).
160. A. Åkesson *et al.*, Composition and structure of mixed phospholipid supported bilayers formed by POPC and DPPC. *Soft Matter* **8**, 5658-5665 (2012).
161. S. Garg, J. Ruhe, K. Ludtke, R. Jordan, C. A. Naumann, Domain registration in raft-mimicking lipid mixtures studied using polymer-tethered lipid bilayers. *Biophys J* **92**, 1263-1270 (2007).
162. R. Tero *et al.*, Formation of Cell Membrane Component Domains in Artificial Lipid Bilayer. *Sci Rep* **7**, 17905 (2017).
163. J. M. Vanegas, M. F. Contreras, R. Faller, M. L. Longo, Role of unsaturated lipid and ergosterol in ethanol tolerance of model yeast biomembranes. *Biophys J* **102**, 507-516 (2012).
164. H. Asakawa, T. Fukuma, The molecular-scale arrangement and mechanical strength of phospholipid/cholesterol mixed bilayers investigated by frequency modulation atomic force microscopy in liquid. *Nanotechnology* **20**, 264008 (2009).
165. S. Garcia-Manyes, F. Sanz, Nanomechanics of lipid bilayers by force spectroscopy with AFM: a perspective. *Biochim Biophys Acta* **1798**, 741-749 (2010).
166. C. Das, K. H. Sheikh, P. D. Olmsted, S. D. Connell, Nanoscale mechanical probing of supported lipid bilayers with atomic force microscopy. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **82**, 041920 (2010).
167. M. H. Abdulreda, V. T. Moy, Atomic force microscope studies of the fusion of floating lipid bilayers. *Biophys J* **92**, 4369-4378 (2007).
168. T. Fukuma, M. J. Higgins, S. P. Jarvis, Direct imaging of individual intrinsic hydration layers on lipid bilayers at Angstrom resolution. *Biophys J* **92**, 3603-3609 (2007).

## 参考文献

169. C. Montis *et al.*, Biogenic Supported Lipid Bilayers from Nanosized Extracellular Vesicles. *Advanced Biosystems* **2**, (2018).
170. N. Kucerka, S. Tristram-Nagle, J. F. Nagle, Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains. *J Membr Biol* **208**, 193-202 (2005).
171. E. Drolle *et al.*, Effect of melatonin and cholesterol on the structure of DOPC and DPPC membranes. *Biochim Biophys Acta* **1828**, 2247-2254 (2013).
172. E. Lindahl, O. Edholm, Mesoscopic undulations and thickness fluctuations in lipid bilayers from molecular dynamics simulations. *Biophys J* **79**, 426-433 (2000).
173. J. Daillant *et al.*, Structure and fluctuations of a single floating lipid bilayer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11639-11644 (2005).
174. C. Scomparin, S. Lecuyer, M. Ferreira, T. Charitat, B. Tinland, Diffusion in supported lipid bilayers: influence of substrate and preparation technique on the internal dynamics. *Eur Phys J E Soft Matter* **28**, 211-220 (2009).
175. L. Picas, P. E. Milhiet, J. Hernandez-Borrell, Atomic force microscopy: a versatile tool to probe the physical and chemical properties of supported membranes at the nanoscale. *Chem Phys Lipids* **165**, 845-860 (2012).
176. J. K. Li, R. M. Sullan, S. Zou, Atomic force microscopy force mapping in the study of supported lipid bilayers. *Langmuir* **27**, 1308-1313 (2011).
177. I. Pera, R. Stark, M. Kappl, H. J. Butt, F. Benfenati, Using the atomic force microscope to study the interaction between two solid supported lipid bilayers and the influence of synapsin I. *Biophys J* **87**, 2446-2455 (2004).
178. A. Jacquot *et al.*, Morphological and physical analysis of natural phospholipids-based biomembranes. *PLoS One* **9**, e107435 (2014).
179. S. Garcia-Manyes, G. Oncins, F. Sanz, Effect of temperature on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. *Biophys J* **89**, 4261-4274 (2005).
180. Y. Li *et al.*, Nanomechanics of phospholipid LB film studied layer by layer with AFM. *Chem Cent J* **8**, 71 (2014).

## 参考文献

181. C. A. Keller, B. Kasemo, Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophys J* **75**, 1397-1402 (1998).
182. A. T. A. Jenkins *et al.*, Pulsed plasma deposited maleic anhydride thin films as supports for lipid bilayers. *Langmuir* **16**, 6381-6384 (2000).
183. L. M. Williams *et al.*, Kinetics of the unrolling of small unilamellar phospholipid vesicles onto self-assembled monolayers. *Langmuir* **13**, 751-757 (1997).
184. T. E. Starr, N. L. Thompson, Formation and characterization of planar phospholipid bilayers supported on TiO<sub>2</sub> and SrTiO<sub>3</sub> single crystals. *Langmuir* **16**, 10301-10308 (2000).
185. P. Lenz, C. M. Ajo-Franklin, S. G. Boxer, Patterned supported lipid bilayers and monolayers on poly(dimethylsiloxane). *Langmuir* **20**, 11092-11099 (2004).
186. J. S. Hovis, S. G. Boxer, Patterning and composition arrays of supported lipid bilayers by microcontact printing. *Langmuir* **17**, 3400-3405 (2001).
187. T. Motegi, K. Yamazaki, T. Ogino, R. Tero, Substrate-Induced Structure and Molecular Dynamics in a Lipid Bilayer Membrane. *Langmuir* **33**, 14748-14755 (2017).
188. R. Machan, M. Hof, Lipid diffusion in planar membranes investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **1798**, 1377-1391 (2010).
189. Y. Min, N. Pesika, J. Zasadzinski, J. Israelachvili, Studies of bilayers and vesicle adsorption to solid substrates: development of a miniature streaming potential apparatus (SPA). *Langmuir* **26**, 8684-8689 (2010).
190. M. F. Poyton, P. S. Cremer, Electrophoretic measurements of lipid charges in supported bilayers. *Anal Chem* **85**, 10803-10811 (2013).
191. R. Tero, Substrate Effects on the Formation Process, Structure and Physicochemical Properties of Supported Lipid Bilayers. *Materials* **5**, 2658-2680 (2012).
192. L. Renner *et al.*, Supported lipid bilayers on spacious and pH-responsive polymer cushions with varied hydrophilicity. *J Phys Chem B* **112**, 6373-

- 6378 (2008).
193. M. R. Nussio *et al.*, Nanomechanical characterization of phospholipid bilayer islands on flat and porous substrates: a force spectroscopy study. *J Phys Chem B* **113**, 10339-10347 (2009).
  194. H.-L. Wu, Y. Tong, Q. Peng, N. Li, S. Ye, Phase transition behaviors of the supported DPPC bilayer investigated by sum frequency generation (SFG) vibrational spectroscopy and atomic force microscopy (AFM). *Physical Chemistry Chemical Physics* **18**, 1411-1421 (2016).
  195. M. Wang *et al.*, The effect of temperature on supported dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) bilayers: structure and lubrication performance. *J Colloid Interface Sci* **445**, 84-92 (2015).
  196. A. E. McKiernan, T. V. Ratto, M. L. Longo, Domain growth, shapes, and topology in cationic lipid bilayers on mica by fluorescence and atomic force microscopy. *Biophys J* **79**, 2605-2615 (2000).
  197. C. V. Kulkarni, Lipid crystallization: from self-assembly to hierarchical and biological ordering. *Nanoscale* **4**, 5779-5791 (2012).
  198. W. C. Lin, C. D. Blanchette, T. V. Ratto, M. L. Longo, Lipid asymmetry in DLPC/DSPC-supported lipid bilayers: a combined AFM and fluorescence microscopy study. *Biophys J* **90**, 228-237 (2006).
  199. C. J. Huang *et al.*, Type I Collagen-Functionalized Supported Lipid Bilayer as a Cell Culture Platform. *Biomacromolecules* **11**, 1231-1240 (2010).
  200. S. Svedhem *et al.*, In situ peptide-modified supported lipid bilayers for controlled cell attachment. *Langmuir* **19**, 6730-6736 (2003).

## 謝辞

### 謝辞

本博士論文に関する内容は、私が東京工業大学大学院物質理工学院材料系ライフエンジニアリングコース博士課程在学中に行った研究成果です。研究するにあたり、多くの先生方、研究室メンバー、共同研究者からのご支援・ご協力を頂きました。私一人の力だけでは本研究成果を出す事は不可能でした。この場をお借りして御礼申し上げます。

まず初めに、東京工業大学大学院修士・博士課程の5年間にわたって指導教員として私を導いてくださった林智広先生に心から感謝を申し上げます。研究計画・方針の立て方、表面分析手法、データの解釈など、研究を進めていく上で何度も熱心に議論・指導していただきました。加えて、研究発表（口頭・ポスター）、申請書、論文といった研究成果のアウトプットの大切さを教えてくださり、そのやり方を懇切丁寧に指導していただきました。この様に、研究活動において必要なありとあらゆる事を林先生にご教授頂いたお蔭で、私の研究を博士論文としてまとめる事が出来ました。心より感謝と御礼を申し上げます。

ご多忙の中、私の学位審査を引き受けてくださいました、本学物質理工学院の曾根正人先生、和田裕之先生、柘植丈治先生、本学工学院の石田忠先生にこの場をお借りして感謝申し上げます。

修士・博士課程を通し研究内容やデータの解釈などに関する議論を通じて多くの助言を下さただけでなく、外部の様々な研究者と接する機会を与えてくださいました、旧総合理工学研究科物質電子化学専攻、現物質理工学院応用化学系の原正彦先生、そして現在徳島大学で准教授にご栄転された矢野隆章先生にも感謝申し上げます。

学会参加等出張する際、事務手続きで大変お世話になりました秘書の滝和恵様に御礼申し上げます。

## 謝辞

研究を進める上で、既に修了された方々も含め、研究室の皆様方にも大変お世話になりました。特に、私の1学年上の先輩である丹生隆様には、真空蒸着装置、原子間力顕微鏡といった実験装置やプログラミングの技術など研究する上での必須スキルを、どんなに夜遅くなっても完璧に理解するまで指導して頂き、大変お世話になりました。同期の廣原周様、張嶺碩様には、日々の研究に関する議論や発表資料の添削などで大変お世話になりました。修士・博士課程の5年間を共に出来た事を非常に嬉しく思います。その他、日々の研究室生活において様々な場面で支えて下さった研究室の方々である、Kasinan Suthiwanich様、Rudolf Jason Kwaria様、Evan Angelo Quimada Mondarte様、Elisa Margarita Mendoza Zamarripa様、田原寛之様、中村太一様、Debabrata Palai様、Song Subin様、野村凜太郎様、Wang Fan様に御礼申し上げます。

シンガポールの南洋理工大学 (Nanyang Technological University: NTU) での研究滞在の際、私を快く受け入れてくださった Nam-Joon Cho 先生に深く御礼申し上げます。3ヶ月という短い期間でしたが、その中でも成果をあげる為の研究計画・方針や実験データに関して何度も熱心に議論・指導して頂きました。日本国外の国際的な環境で研究活動を行うという何ものにも代え難い貴重な経験をさせて頂き、大変感謝をしております。また、Nam-Joon Cho 先生の研究室メンバーである Hokyun Chin 様には、お忙しい中 NTU での私の研究活動を懇切丁寧に指導して頂きました。さらに、研究のみならずシンガポールでの生活でも多大なるご支援を賜り、心より感謝と御礼を申し上げます。また、実験の補助や研究のディスカッションでお世話になった Ferhan Abdul Rahim 様、Soohyun Park 様、Sut Tun Naw 様、Gamaliel Ma 様に御礼申し上げます。

修士1年の10月から博士1年の2月までの間、リサーチアシスタントとして雇用して下さり金銭的援助をしてくださいました環境エネルギー協創教育院 (ACEEES) に感謝致します。特に、ACEEES 事務室の射延文様には NTU への

## 謝辞

留学手続きで大変お世話になりました。ACEEES 活動の一環で 2 度の国際会議への出席とシンガポールの NTU での研究滞在をさせて頂いた事は、私の研究生活において非常に重要な経験となりました。誠にありがとうございました。

1 年間卒業研究のご指導をしていただいた、早稲田大学先進理工学部応用化学科逢坂・門間研究室（当時）の逢坂哲彌先生、門間聰之先生に感謝を申し上げます。また、研究が初めてだった私に表面・界面化学の研究のやり方や文章の書き方など、研究活動の基礎を教えてくださいました秀島翔先生と南部谷俊介様に感謝を申し上げます。

最後に、私の意思を尊重し、本学の修士・博士課程への進学を認めてくださり、日常生活で常に支えて下さった両親に心より感謝申し上げます。

2020 年 2 月

前川達洋

研究の外部発表状況

国際学術雑誌

博士論文研究

This thesis is reproduced from “T. Maekawa<sup>†</sup>, H. Chin<sup>†</sup>, T. Nyu, T. N. Sut, A. R. Ferhan, T. Hayashi, N. J. Cho, Molecular diffusion and nano-mechanical properties of multi-phase supported lipid bilayers, *Phys. Chem. Chem. Phys* (2019), 21 (30), 16686-16693. († Equally contributed as co-first authors.)” by permission of the PCCP Owner Societies.

1. **T. Maekawa**<sup>†</sup>, H. Chin<sup>†</sup>, T. Nyu, T. N. Sut, A. R. Ferhan, T. Hayashi, N. J. Cho, Molecular diffusion and nano-mechanical properties of multi-phase supported lipid bilayers, *Phys. Chem. Chem. Phys* (2019), 21 (30), 16686-16693. († Equally contributed as co-first authors.)

博士論文外の研究

1. **T. Maekawa**<sup>†</sup>, T. Nyu<sup>†</sup>, E. A. Q. Mondarte, H. Tahara, T. Hayashi, Nanoscale imaging of molecular recognition sites by amplitude-modulation atomic force microscopy, *Nanoscale* (2020), In preparing. († Equally contributed to this work as the first author.)
2. M. Hirohara<sup>†</sup>, **T. Maekawa**<sup>†</sup>, T. Nyu, Y. Mizushita, T. Hayashi, Proteomic analysis of biomaterial surfaces after contacting with body fluids by MALDI ToF mass spectroscopy, *Coatings* (2019), 10 (1), 12. († These authors contributed equally to this work.)
3. K. Takano, T. Nyu, **T. Maekawa**, T. Seki, R. Nakatani, T. Komamura, T. Hayakawa, T. Hayashi, Observation of structural evolution of giant block copolymer thin film under solvent vapor annealing by atomic force microscopy, *RSC Advances* (2019), 10, 70-75.
4. E. A. Q. Mondarte, **T. Maekawa**, T. Nyu, H. Tahara, G. Lkhamsuren, T. Hayashi, Detection of streptavidin-biotin intermediate metastable states at the single-

- molecule level using high temporal-resolution atomic force microscopy, *Rsc Advances* (2019), 9 (39), 22705-22712.
5. C. Liu, M. Hirohara, **T. Maekawa**, R. Chang, T. Hayashi, C. -Y. Chiang, Selective Electro-oxidation of Glycerol to Dihydroxyacetone by a Non-precious Electrocatalyst, *Applied Catalysis B: Environmental* (2019), 265, 118543.
  6. H. Tahara, T. Nyu, E. A. Q. Mondarte, **T. Maekawa**, T. Hayashi, Application of Fuzzy Logic Algorithm to Single-Molecule Force Spectroscopy of the Streptavidin-Biotin System, *Advances in Materials Physics and Chemistry* (2018), 08 (05), 217-226.

#### 国際学会での発表

1. **T. Maekawa**, E. A. Q. Mondarte, H. Tahara, T. Nyu, and T. Hayashi; “Nanoscale Imaging of Molecular Recognition Sites by Amplitude-Modulation Atomic Force Microscopy”. *1st Tokyo Tech-NCTU Joint Symposium*, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan, September 2019. (Poster)
2. **T. Maekawa**; “The effect of cellular behaviors caused by the total amount, composition and conformational change of adsorbed proteins on cellular behavior for developing new materials which prevent to adsorb balanomorpha”. *The Sixth International Education Forum on Environment and Energy Science*, Gran Meliá Palacio de Isora, Tenerife, Canary islands, Spain, December 2017. (Oral)
3. **T. Maekawa** and T. Hayashi; “Development of new device of generation of carbon hydrates which have interfaces on which algae adsorb high-density and high-orientation”. *The Fifth International Education Forum on Environment and Energy Science*, Catamaran Resort Hotel and Spa, San Diego, California, USA, December 2016. (Oral)

## 研究の外部発表状況

### 国内学会での発表

1. **前川達洋**, 丹生隆, S. Kasinan, 林智広; “振幅変調型原子間力顕微鏡法による分子認識部位のナノスケール分解能イメージング”. 第 37 回表面科学学術講演大会, 横浜市立大学金沢八景キャンパス, 神奈川県横浜市, 2017 年 8 月. (口頭発表)
2. **前川達洋**, 丹生隆, 林智広; “AM-AFM を用いた高速分子認識イベントマッピング”. 日本表面科学会 関東支部 第 4 回関東支部セミナー, 東京大学理学部化学本館, 東京都文京区, 2016 年 10 月. (ポスター発表)
3. **前川達洋**, 廣原周, 水下佳紀, 丹生隆, 関根泰斗, 林智広; “人工材料表面上の細胞の足場を形成するタンパク質の MALDI-TOF-MS による同定”. 第 76 回応用物理学会秋季学術講演会, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市, 2015 年 9 月. (口頭発表)

### 受賞

1. 日本表面科学会関東支部第 4 回支部セミナー ポスター賞; “AM-AFM を用いた高速分子認識イベントマッピング”. 2016 年 10 月