

二次元蛍光寿命相関分光法による支持脂質二重膜中脂質の拡散特性に関する研究

埼玉大院理工

○乙須拓洋, 山口祥一

Diffusion property of lipids in a supported lipid bilayer studied by two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy

○Takuhiro Otsu, Shoichi Yamaguchi

Department of Applied Chemistry, Saitama University, Japan

【Abstract】 To fully understand the various biological functions expressed on biological lipid membranes, one needs to understand the dynamical properties of lipids on lipid membranes. In this regard, we have developed fluorescence lifetime correlation spectroscopy with total-internal reflection microscopy (TIR 2D-FLCS) and applied it to measure the diffusion of lipids in each leaflet of a supported lipid bilayer (SLB). The results presented in the last conference have shown that the diffusion property of lipids in each leaflet can be quantitatively analyzed by TIR 2D-FLCS. In this study, we performed TIR 2D-FLCS to analyze the effect of solution pH on the diffusion properties of lipids in each leaflet of SLB deposited on a glass coverslip. The results showed that the interaction between a glass and lipids in the proximal leaflet becomes stronger with decreasing pH. On the other hand, the diffusion property of lipids in the distal leaflet was not strongly affected by the change in pH. We believe that the results in this study give the fundamental insight into the interleaflet coupling (friction) of a lipid bilayer.

【序】 生体膜はリン脂質からなる脂質二重膜中に膜蛋白質やコレステロールなど機能分子が埋め込まれた複雑な二次元膜である。この生体膜が示す多彩な機能の真の理解には、生体膜を構成する脂質二重膜の物性に関する基礎的な知見が重要となってくる。この点に関して、我々は全内部反射二次元蛍光寿命相関分光法 (TIR 2D-FLCS) をモデル生体膜である支持脂質二重膜の物性研究に適用することで、脂質二重膜を構成する二つの脂質単層膜それぞれにおける脂質の拡散計測に成功し、昨年の本討論会で発表を行った[1-3]。今回は得られた結果のさらなる考察のため、脂質二重膜を取り囲む溶液の pH を変えて同様の計測を行い、pH が支持脂質二重膜を構成する各単層膜中脂質の拡散に与える影響について検討を行った。

【方法】 Fig. 1 には測定に使用した試料のイメージ図を示している。本研究では、双性イオンを親水基に有する DOPC を用いてカバーガラス上に支持脂質二重膜を作製し、その後二重膜上層のバルク層に蛍光消光剤として知られているヨウ化カリウム(KI)を 50 mM になるように加えた。ヨウ化カリウムは脂質二重膜不透過であることが知られており、バルク層に親水基を向けている単層膜(distal leaflet)中蛍光脂質のみが消光作用を受けることが予想される。これによりガラス基板側の単層膜(proximal

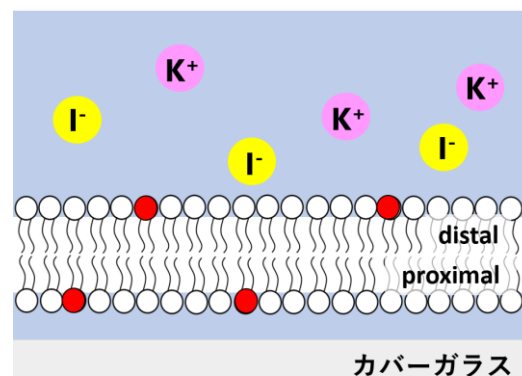


Fig.1. Sample image

leaflet)中蛍光脂質との間に蛍光寿命の差が生じる. TIR 2D-FLCS ではこの蛍光寿命の違いを検出, 解析することにより, 各単層膜中脂質の相関関数を抽出する.

解析の詳細は省略するが, 測定された蛍光光子データをもとに二次元発光遅延時間相関マップを作成, 逆ラプラス変換により独立蛍光寿命成分の蛍光減衰カーブを抽出した. 次に各独立成分の蛍光減衰カーブをもとに FLCS 解析を行う事で, 各独立成分の自己相関関数を得た[2].

【結果・考察】 本研究では溶液の pH が各単層膜中脂質の拡散に与える影響について調べるため, pH 5.0, 7.4, 10 の pH 条件下で支持脂質二重膜を作製, 計測を行った. Fig. 2 には例として pH 7.4 の条件で 2D FLCS 解析を行って得た二つの独立蛍光寿命成分(sp1, sp2)の蛍光減衰カーブを示している. 比較として KI 非存在下で得た蛍光減衰カーブも合わせて示しているが, 二つの独立成分のうち長寿命成分である sp2 は KI 非存在下でのデータと完全に一致した. これはどの pH 条件でも同様であった. この結果より, sp2 は KI と相互作用しない proximal leaflet 中蛍光脂質由来の成分, sp1 は KI の消光作用を受ける distal leaflet 中蛍光脂質由来の成分であると帰属した.

この帰属に基づき, それぞれの蛍光減衰カーブを用いて FLCS 解析を行い, 各単層膜中蛍光脂質の自己相関関数を算出した. 各 pH 条件で得られた結果を Fig. 3 に示す. 結果より, pH 10 においては両 leaflet 中脂質の拡散時間がほぼ一致した一方で, pH が下がるにつれ proximal leaflet 中脂質の拡散が distal leaflet 中脂質と比較して顕著に遅くなる事が確認された. この結果は pH が下がるにつれてカバーガラスと proximal leaflet 中脂質の相互作用が強くなる事, またそれら相互作用が distal leaflet 中脂質の拡散に与える影響はそれほど大きくない事, を強く示唆する. これは単層膜間の疎水性相互作用の強さや, 摩擦力を考える上で重要な知見を与えるものであると考えている.

発表では今回得られた結果がどのような脂質-ガラス間相互作用に起因するのかについて議論を行う.

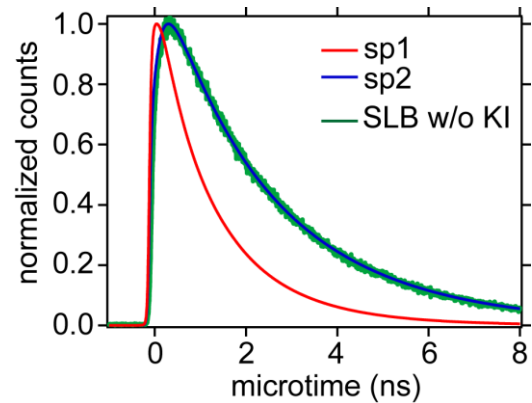


Fig.2. Fluorescence decay curves of the independent lifetime species (sp1, sp2) obtained by 2D FLCS analysis. For comparison, ensemble-averaged decay curve of fluorescent lipids in the absence of KI (SLB w/o KI) is also shown.

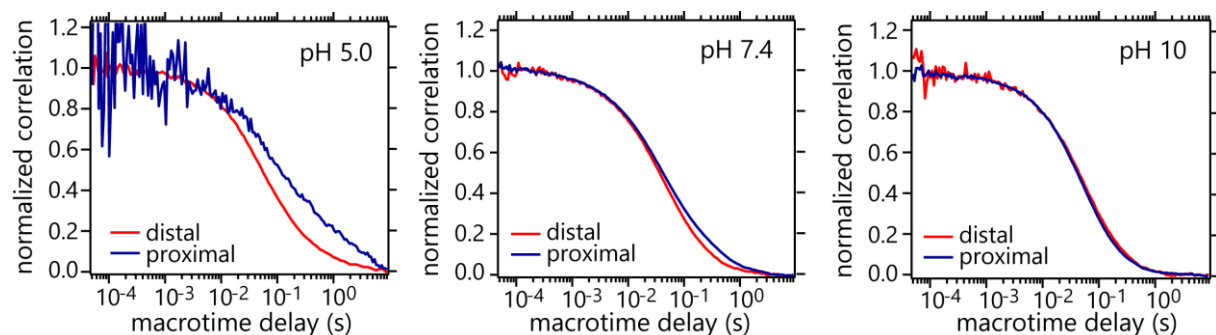


Fig.3. Fluorescence autocorrelation curves of fluorescent lipids in the distal (red solid line) and proximal (blue solid line) leaflets of a supported DOPC bilayer. Data measured at pH 5.0 (left), 7.4 (center) and 10 (right) are shown.

【参考文献】

- [1] K. Ishii and T. Tahara, *J. Phys. Chem. B* **117**, 11414-11422, 11423-11432 (2013).
- [2] T. Otsu and S. Yamaguchi, *J. Phys. Chem. B* **122**, 5758-5764 (2018).
- [3] 乙須拓洋, 山口祥一 第11回分子科学討論会 1D04 (2017).