

ピコ秒時間分解けい光分光法による 人工脂質二重膜と細胞膜の粘度分布の比較

¹学習院大理, ²京大院薬

○林春菜¹, 木村光男¹, 高田直人², 高門輝¹, 申惠媛², 岩田耕一¹

Comparison of Viscosity Distribution Between Artificial Membranes and The Plasma Membrane with Picosecond Time-resolved Fluorescence Spectroscopy

○Haruna Hayashi¹, Mitsuo Kimura¹, Naoto Takada²,
Akira Takakado¹, Hye-Won Shin², Koichi Iwata¹

¹ Faculty of Science, Gakushuin University, Japan

² Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Japan

【Abstract】 The raft structure presumed in the plasma membrane is often compared with the static raft structure artificially formed in phase separated lipid bilayers. We tried to characterize the structure and possible fluctuation of lipid bilayer membranes by estimating their viscosity. We evaluated the membrane viscosity by using *trans*-stilbene as a fluorescence probe, with picosecond time-resolved fluorescence spectroscopy. In this study, we attempted to estimate the viscosity of artificial lipid bilayers in phase separated liposomes and the plasma membrane of HeLa cells by using 4-hydroxy-*trans*-stilbene as a fluorescent probe. The result indicates that both of the phase separated membranes and the plasma membrane have at least two environments with different viscosity. The presence of the lipid raft is strongly suggested in the plasma membrane. The difference in viscosity between the two environments of the plasma membrane is larger than that of the phase separated artificial liposome, suggesting the presence of more complicated raft structure in the plasma membrane.

【序】 近年広く支持されている細胞膜の構造モデルとして、脂質二重膜の中に「ラフト」と呼ばれるミクロドメインが存在するラフトモデルが挙げられる。ラフトは動的な構造ゆえに可視化が困難で、構造やサイズなども明らかとなっていない。このラフトを模したものが相分離系の脂質二重膜であり、細胞膜のモデルとして多くの研究に用いられている。しかし、静的な「人工ラフト」と動的な「ラフト」のあいだでは、その動的挙動の違いゆえに物性やミクロ構造に乖離があると考えられる。そこでわれわれは、構造に依存して変化する物性のひとつである粘度に着目した。われわれはこれまで、脂質二重膜中に封入した *trans*-スチルベン (*tSB*) の異性化速度をピコ秒時間分解けい光分光法によるけい光減衰過程の測定から算出し、粘度を見積もることに成功している [1, 2]。本研究では、三成分系の相分離脂質二重膜と細胞膜に 4-ヒドロキシ *trans* スチルベン (*tSB-OH*) をプローブ分子として封入し、局所粘度を評価することによって、人工ラフトとラフトの構造の比較を試みた。

【方法 (実験・理論)】

DOPC:DPPC:コレステロール (Chol) (モル比 1:1:1) から成るリポソームおよび HeLa 細胞の細胞膜に封入した *tSB-OH* のけい光寿命を、ピコ秒時間分解けい光分光計により測定した。再生増幅された Ti:Sapphire レーザーの出力を OPA を経て時間幅 40 fs、波長 320 nm のパルス光に変換し、この光を励起光として試料に照射した。得られたけい光を分光器に導入後、ストリークカメラによって時間分解検出し、波長 360 nm から

420 nm のけい光減衰曲線を解析に用いた。試料部では、リポソームは 1 cm 角セルに入れて温度制御し、HeLa 細胞は培養フラスコのまま室温で保持した。

【結果・考察】

最初に *t*SB-OH でもけい光寿命から見積もられた光異性化速度定数が、アルカン溶媒の粘度と相関をもって変化することを確認した。*t*SB と同様に、*t*SB-OH の光異性化反応も線時計として利用できる。次に、リポソーム中の *t*SB-OH のけい光減衰曲線を観測した。得られた減衰過程は二重指数関数で近似できた (Fig. 1.(a))。この人工脂質二重膜は、コレステロールに富む DPPC 相とコレステロールに乏しい DOPC 相に相分離することが知られている[3]。DOPC リポソームおよび DPPC:Chol (7:3) リポソーム中の *t*SB-OH の減衰曲線と比較することで、DOPC:DPPC:Chol リポソームの 2 種類の減衰過程には、形成した各相の異なる粘度が反映されていることが明らかとなった。また、*t*SB-OH を封入した HeLa 細胞と *t*SB-OH を含まない HeLa 細胞のけい光差スペクトルから、細胞膜中に封入された *t*SB-OH の時間分解けい光スペクトルを得ることに成功した。得られた *t*SB-OH のけい光減衰曲線 (Fig. 1.(b)) は、二重指数関数で再現できた。このことは、相状態の異なるドメイン構造の存在を示唆する。人工の相分離脂質二重膜においてラフトの存在と矛盾しない結果が得られた。

けい光寿命から見積もった粘度を Table 1 に示す。HeLa 細胞の細胞膜の粘度は人工脂質二重膜と比較して約 10 倍小さい。不飽和脂質の割合が高い細胞膜では流動性が大きいと考えられる。また、膜内に存在する 2 種類の領域の粘度の差が、人工脂質二重膜では 30 倍であったのに対し細胞膜では 100 倍であった一方で、振幅比には大きな差は見られなかった。マクロな観点でドメインの存在比を比較すると人工ラフトは細胞膜に近い良いモデルであるが、複雑な構造が反映されうる各ドメインの粘度には大きな違いが見られることが明らかとなった。

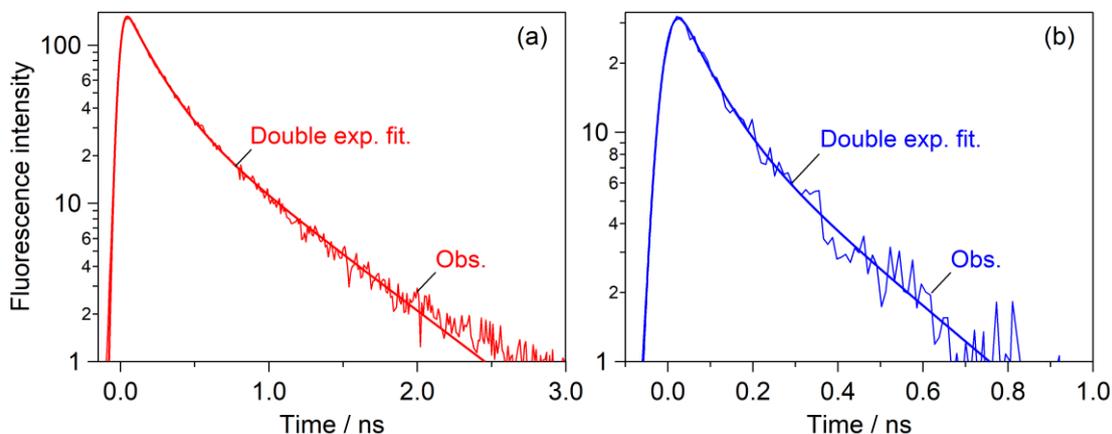


Fig. 1. Fluorescence decay curves of *t*SB-OH embedded in the lipid bilayers of DOPC:DPPC:Chol liposomes (red trace) and the plasma membrane of HeLa cells (blue trace). Each decay kinetics is fitted with a double exponential function.

Table 1. Viscosity (η) of the lipid bilayer and the plasma membranes estimated from fluorescence lifetime of *t*SB-OH.

Sample	η (fluid) / mPa s	η (viscous) / mPa s	Amplitude ratio
DOPC:DPPC:Chol.	10	300	0.72
HeLa cell	0.5	45	0.69

【参考文献】

- [1] Y. Nojima and K. Iwata, *J. Phys. Chem. B* **118**, 8631 (2014).
- [2] 林, Manjusha, 高田, 高屋, 中村, 申, 岩田, 第12回分子科学討論会, 1D20 (2017).
- [3] G. W. Feigenson, *BBA* **1788**, 47 (2009).