

## 固体／液体界面における支持脂質二分子膜のHD-VSFG分光

筑波大院・数理物質

○鍛冶美里, 奥野将成, 石橋孝章

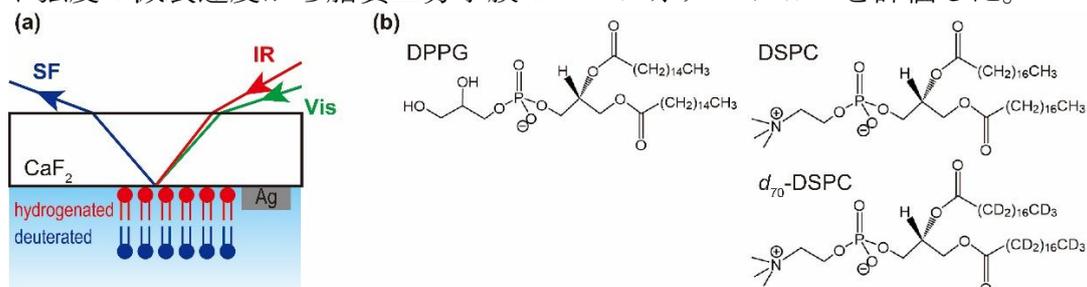
### HD-VSFG spectroscopy of supported lipid bilayers at solid/liquid interface

○Misato Kaji, Masanari Okuno, Taka-aki Ishibashi

Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba

**【Abstract】** Supported lipid bilayers have been used as a model to mimic cell membranes. However, spectroscopies to measure such “buried” interfaces are limited. In recent years, it has been applied heterodyne-detected vibrational sum frequency generation (HD-VSFG) spectroscopy to buried interfaces. The spectroscopy can selectively probe surfaces or interfaces with high sensitivity, and enables us to investigate orientational changes of interfacial molecules. In this study, we used Langmuir-Blodgett/Langmuir-Schaefer techniques to deposit the proximal and the distal leaflets of a single lipid bilayer on a  $\text{CaF}_2$  planar parallel substrate. We evaluated molecular orientations and the signal decay of the supported bilayers by HD-VSFG spectroscopy. The orientations of terminal methyl groups in DPPG/ $d_{70}$ -DSPC bilayers determined by HD-VSFG were consistent with the model. However, the flip-flop rate constant estimated by the decay of the SFG intensity of the methyl symmetric stretching vibrational mode for a DSPC/ $d_{70}$ -DSPC bilayer was faster than previous studies. This suggests that the bilayers had some defects, that is, lipids had not only all-*trans* conformation but also *gauche* conformation.

**【序】** 固体基板／水界面に作製した脂質二分子膜は、生体膜の構造を理解するためのモデルとして多くの研究で用いられている。しかし、このような2つのバルクに挟まれた「埋もれた」界面を測定できる分光法は限られている。近年、界面選択的かつ高感度な振動分光法であるヘテロダイン検出振動和周波発生（heterodyne-detected vibrational sum frequency generation : HD-VSFG）分光法の「埋もれた」界面への応用がはじまっている<sup>[1,2]</sup>。HD-VSFG 分光法で得られる二次非線形感受率 ( $\chi^{(2)}$ ) の符号は分子の絶対配向を反映する。HD-VSFG 分光法で脂質二分子膜が測定できるようになれば、二分子膜が生理活性を持った生体分子と相互作用した際の両者の構造変化の解明などに繋がると期待される。本研究では、 $\text{CaF}_2$  平行平面基板上に非対称的な脂質二分子膜を作製した。HD-VSFG 分光法を用いてバンドの符号から脂質の絶対配向を、バンド強度の減衰速度から脂質二分子膜のコンフォメーションを評価した。



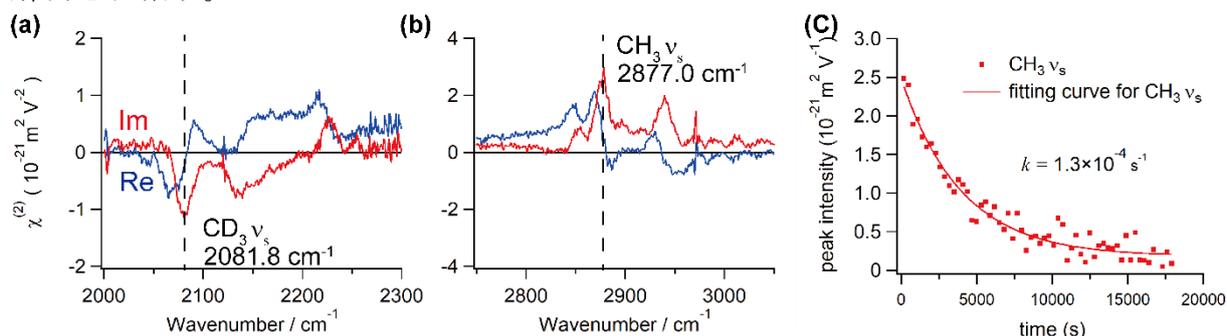
**Figure 1.** SFG experimental geometry and molecular formulas. (a) Reflection geometry employed for a bilayer immersed in water. A silver film is used as a reference to normalize the SFG signals. (b) We prepared asymmetric bilayers for SFG experiments, using DPPG and DSPC as hydrogenated lipids, and  $d_{70}$ -DSPC as a deuterated lipid.

**【実験】**脂質二分子膜を作製するために Langmuir-Blodgett/Langmuir-Schaefer (LB/LS) 法を用いた。CaF<sub>2</sub> 平行平面基板の上に 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG)、または 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC) の LB 単分子膜 (表面圧 30 mN/m) を作製した。続いて、面積一定の測定用セルに第二層として積層する 1,2-distearoyl-D70-*sn*-glycero-3-phosphocholine (*d*<sub>70</sub>-DSPC) の L 膜を作製した。膜の密度は *d*<sub>70</sub>-DSPC のクロロホルム溶液の滴下量で調整した。溶媒を揮発させた後、基板をセルに設置した。基板と下層液が接触した時間を  $t = 0$  とした。偏光配置を SSP (SFG 光 : S 偏光、可視光 : S 偏光、赤外光 : P 偏光) として、CD 伸縮振動領域と CH 伸縮振動領域における二次非線形感受率 ( $\chi^{(2)}$ ) スペクトルを測定した。得られたスペクトルは、基板の底面に蒸着した銀のスペクトルを参照試料として用いて振幅と位相を規格化した。

**【結果・考察】** DPPG/*d*<sub>70</sub>-DSPC 二分子膜の CD 伸縮振動領域と CH 伸縮振動領域における  $\chi^{(2)}$  スペクトルを図 2a, b に示す。いずれの領域においても脂質の末端メチル基の対称伸縮振動 ( $\nu_s$ ) に由来するバンドが強く観測された。それらのバンドの符号はメチル基を水層側に、重水素化されたメチル基を空気側に向けて配向する分子が多いことをそれぞれ示唆しており、想定される脂質の配向と一致した。次に、DSPC/*d*<sub>70</sub>-DSPC 二分子膜について CH<sub>3</sub>  $\nu_s$  のバンド強度の時間変化を測定した。バンド強度は各層の分子数の差に比例するため、フリップフロップの進行とともに減衰する。各層のフリップフロップの速度が等しいと仮定すると、各時間のバンド強度は以下の式に従う。

$$I_{\text{CH}_3}(t) = I_{\text{max}}e^{-2kt} + I_{\text{min}} \quad (1)$$

本研究で求めた DSPC/*d*<sub>70</sub>-DSPC 二分子膜のフリップフロップの速度定数  $k = 1.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  は、先行研究の値  $k = 7.3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  [3] に比べて大きかった。この違いの原因は、我々の脂質二分子膜の不完全性に起因すると考えている。DSPC の疎水性アルキル鎖は表面圧 30 mN/m では全トランス型で秩序性の高い構造をとる。しかし、ゴーシュ型が増えて秩序性が低くなると膜の流動性が向上する。本研究では、膜作製時に脂質のゴーシュ欠陥が引き起こされたため、膜の流動性が向上してフリップフロップの速度が加速されたと考えられる。今後、良質な脂質二分子膜の作製方法を検討するとともに、脂質二分子膜に生体分子を添加したときの両者の分子レベルでの構造変化の解明を目指す。



**Figure 2.** SFG spectra of the DPPG/*d*<sub>70</sub>-DSPC bilayer in the frequency regions of (a) 2000–2300 cm<sup>-1</sup> and (b) 2750–3050 cm<sup>-1</sup>. The CD<sub>3</sub> and CH<sub>3</sub> symmetric stretching ( $\nu_s$ ) modes are strongly observed in each region. (c) Time-dependence of the amplitude of the proximal CH<sub>3</sub>  $\nu_s$  mode from the DSPC/*d*<sub>70</sub>-DSPC bilayer. The red line is the fitting result using equation 1.

[1] N. Myalitsin, S. Urashima, S. Nihonyanagi, S. Yamaguchi, T. Tahara, *J. Phys. Chem. C*, 2016, **120**, 9357.

[2] N. Takeshita, M. Okuno, T. Ishibashi, *J. Phys. Chem. C*, 2017, **121**, 25206.

[3] Wu F., Yang P., Zhang C., Han X., Song M., Chen Z., *J. Phys. Chem. C* 2014, **118**, 17538.