

システム顕微鏡ユニットを利用した 平面脂質二分子膜形成観測システムの開発

(広市大・情報) ○藤原久志、小山敬弘、石渡孝

【序】平面脂質二分子膜 (Bilayer Lipid Membrane, BLM) は、電解質溶液中の隔壁の穴に形成した脂質膜 (脂質分子を溶かした油滴を付着させたもの) を放置する事で作成できる¹⁾。その形成過程は、液滴中で溶解し無秩序な配向を持つ脂質分子から、秩序だった二分子膜構造が形成される自己集積化現象と考えられる。我々は、電気-画像同時計測をBLM形成過程に適用する事で、この現象が2次元結晶成長 (核生成としての二分子膜形成及びその成長) と見なせ、また非平衡界面ダイナミクス研究の場としても有用な事を示してきた²⁾。現在、「核生成」の瞬間を捉える事を目的とし、画像計測の分解能向上を図るために、BLM形成の反射光観測システムを開発している。

【透過光観測の問題点】これまでの脂質膜の画像計測では、450 nm の透過光像を、長焦点顕微鏡と 210 万画素 CCD カメラの組み合わせで撮影してきた (図 1 参照)。光学的には、二分子膜成長途中にある脂質膜は位相物体である。すなわち、脂質膜中の二分子膜領域と非二分子膜領域は、双方共に透明である一方、それぞれの構造と膜厚 (4 nm および約 100 nm) は異なる。本来透明である両領域が識別できる要因はベッケ線³⁾と考えられ、図 1 では両領域の境界面に見られる白線がベッケ線に相当する。ベッケ線は、位相物体の透過光観測において、ピントを合焦位置から外した時の光の回折により生ずる³⁾。我々の実験では、意図的に焦点外しは行っておらず、ベッケ線を生じた原因は、長焦点顕微鏡が元々低い開口数 (NA) を持っているためと考えられる⁴⁾。一方、「核生成」観測を目的として画像分解能を向上させるためには、合焦条件で開口数を向上させる必要がある。従って、画像コントラスト形成においてベッケ線の作用を期待できず、透過光観測は脂質膜の高分解能観測に適さないと判断される。

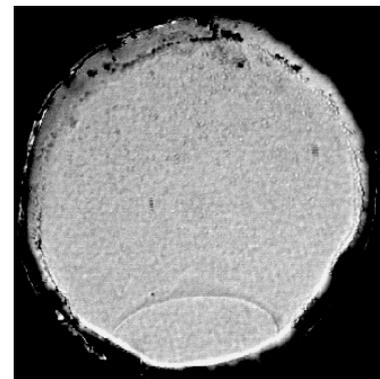


図 1: 膜の透過光画像

【反射光観測システムの開発】上記の考察を受け、市販のシステム顕微鏡 (オリンパス) を利用した反射型脂質膜観測システムの開発に着手した。具体的には (図 2)、薄膜化しつつある脂質膜に対し、蛍光顕微鏡ユニット (励起光カット用のフィルターを外してある) を利用して落射照明を行い、その反射光による膜画像を CCD カメラで撮像するシステムを開発中である。このシステムで得られる画像データには、分解能向上の他に、次の二つの利点が見込まれる: 1)

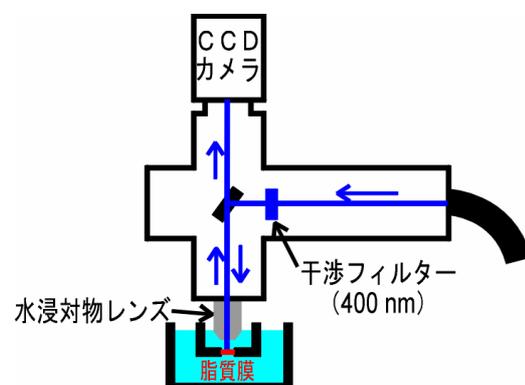


図 2: 反射型脂質膜観測システム

非二分子膜領域においては、膜の上面および下面からの反射光による干渉縞が出現し⁵⁾、これに基づいた三次元形状の復元が可能である（本討論会、小山ポスター発表参照）；2）二分子膜領域は同様の干渉により黒くなり⁵⁾、従って以後の画像処理による領域抽出・解析が容易である。

図3に、実際に開発中の実験システムの写真を示す。システム開発上の最大の難関は、膜形成液滴の隔壁穴への付着方法である。膜形成液（卵黄ホスファチジルコリンを n-デカン+クロロホルムに溶解したもの）の比重は水よりも小さいため、膜形成液は隔壁穴の下から付着させる必要がある。

この為に、コの字型のテフロンチューブを装着したマイクロシリンジ（図4）を、電気生理学実験に用いる3次元可動マイクロマニピュレーターに装着した（図3）。さらに隔壁穴へのテフロンチューブ先端の接近を監視するために、BLMセル下部へ配置した反射鏡を介し、隔壁穴付近を長焦点顕微鏡+CCDカメラで観察可能とした（図3）。これらの工夫により、隔壁穴に対して正確にマイクロシリンジ位置を制御し、膜形成液を送り込めるようになった。

しかし現時点では、隔壁穴の大きさと付着液滴量の最適関係を見出すに到っておらず、今までの予備実験では、付着液滴が薄膜化しなかったり、或いは過剰な膜形成液が水浸対物レンズ付近にまで浮上し画像コントラストが悪化するなどの問題を生じている。これらの問題については、今後さらに実験を繰り返し、最適条件の探索を図ってゆく。

反射型観測システム完成の後には、インピーダンス計測装置も組み込み、新たな電気-画像同時計測システムへと発展させる予定である。最終的には、電気計測と画像計測の双方から、臨界核生成としての二分子膜形成を検出したい。

【参考文献】

- 1) H. T. Tien, *Bilayer Lipid Membranes (BLM): Theory and Practice* (Marcel Dekker, New York, 1974).
- 2) H. Fujiwara *et al.*, *J. Chem. Phys.* (to be published).
- 3) 鶴田匡夫、続 光の鉛筆（新技術コミュニケーションズ、東京、1988）。
- 4) S. Inoue and R. Oldenboug, in *Handbook of Optics (Vol. II), 2nd ed.*, edited by M. Bass, E. W. V. Stryland, D. R. Williams, and W. L. Wolfe (McGraw-Hill, New York, 1995).
- 5) T. Hanai *et al.*, *Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.*, **47** (1969) 327.

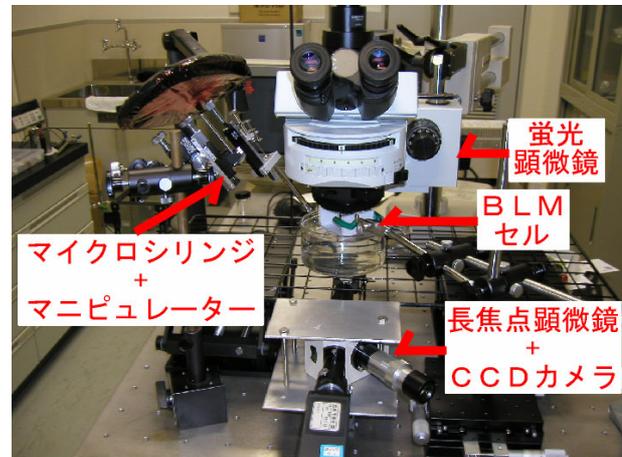


図3：開発中の反射型観測システム

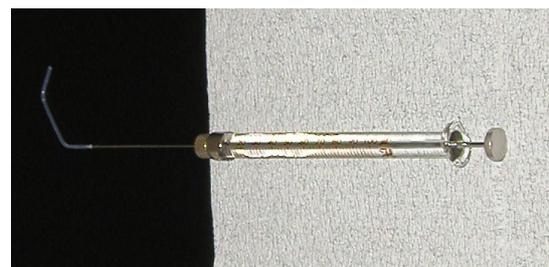


図4：膜形成液導入用マイクロシリンジ