

支持平面脂質二重膜を用いた脂質とタンパク質の動的挙動のその場観察

(豊橋技科大 EIIRIS) ○手老 龍吾

細胞膜は細胞内外での物質・情報・エネルギーのやり取りを行う反応場である。これらの反応においては膜内のタンパク質および脂質分子の拡散やドメイン形成が重要な素過程であり、人工脂質二重膜を用いて膜内分子ダイナミクスを調べる研究が盛んに行われている。本講演では、固液界面に形成される人工脂質二重膜である支持脂質二重膜(supported lipid bilayers: SLB) [1,2]を用いた脂質分子の膜内側方拡散および 2 次元ドメイン形成、また膜上でのペプチドおよびタンパク質の集合体形成に関する我々の研究成果について、実験手法の解説も交えつつ紹介する。

SLB の作製は、脂質ベシクル懸濁液を extrusion および超音波破碎によって調製し、ベシクルの自発的形狀変化を利用する手法であるベシクル融合法[2]によって行った。基板は熱酸化シリコン基板 (SiO_2/Si)、単結晶 TiO_2 、またはマイカを用いた。SLB と膜内ドメインおよび吸着ペプチド・タンパク質の構造観察には原子間力顕微鏡(AFM)を用いた。固体表面が SLB のドメイン形成と反応活性に影響を与える例として、マイカおよび SiO_2/Si 表面上に形成した糖脂質のガングリオシド GM1 とスフィンゴミエリン、コレステロールからなる SLB の例を挙げる。マイカ上では基板表面周期構造を反映した三角形のドメインが形成され、またアミロイド β 線維伸張反応にも高い活性を示した[3]。

SLB 内の脂質分子の拡散は蛍光一分子追跡(SMT)法によって観察した。一般的な SMT 計測は全反射条件で行うため基板がガラスに限定されるが、カバーガラス上に試料を逆さまに配置する斜光照明セットアップ[4]により試料の透明度や屈折率に関わらず SiO_2/Si , TiO_2 , マイカなどの基板上で SMT 計測を行うことが出来る。単原子ステップ $\text{TiO}_2(100)$ 上に形成した SLB 内の異常拡散を例に、斜光照明と高速観察(最大 2000 fps/s)系を組み合わせた実験系について紹介する。

最後にフォスファチジルイノシトール(PI)とフォスファチジルコリン(PC)の混合 SLB 膜内に形成される微小ドメインと、PI+PC-SLB 上での膜変形モジュールタンパク質(F-BAR)[5]の反応について述べる。マイカ上に形成した PI+PC-SLB の AFM 観察では大きさが 20 - 300 nm の微小ドメインが観察された。分配係数の異なる 2 種類の蛍光標識脂質を用いての SMT 計測による微小ドメイン内外での分子拡散性の評価と、この微小ドメインを足場として進む F-BAR の自己組織化反応について述べる。

[1] 手老龍吾, *Colloid&Interface Commun.*, **34**, 19 (2009); 古川一暁ら, *表面科学*, **30**, 207 (2009).

[2] R. Tero, *Materials*, **5**, 2658 (2012). [3] Y. Mao et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1798**, 1090 (2010).

[4] R. Tero et al., *Langmuir*, **27**, 9662 (2011). [5] Y. Tanaka-Takiguchi et al., *Langmuir*, **29**, 328 (2013).

In-situ Observation of Dynamic Behaviors of Lipid and Protein Molecules in Supported Lipid Bilayers
R. TERO (Electronics-Inspired Interdisciplinary Research Institute, Toyohashi Univ. Tech., tero@eiiris.tut.ac.jp)

Lateral diffusion and two dimensional organization of lipids and proteins are crucial fundamental processes in cell membrane reactions such as the transportation of materials, information and energy in and out of cells. Here I introduce our recent works on the dynamic processes of lipids and proteins in and on supported lipid bilayers (SLBs) [1,2], as well as the practical methods for these experiments. The SLB consisting of ganglioside GM1, sphingomyelin and cholesterol is an interesting example of substrate-related domain formation in the SLB and reactivity for amyloid β peptide [3]. We observed the lateral diffusion of lipids in SLBs on silicon and oxide substrates by using single molecule tracking (SMT) method with diagonal illumination setup[4]. I also describe the microdomain formation and lateral lipid diffusion in phosphatidylinositol+phosphatidylcholine-SLB, and their relation with the self-assembly of F-BAR, a membrane deformation protein [5].