

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13546

研究課題名(和文) 擬似非平衡場としての生体膜：膜上での分子拡散と選択的分子集積

研究課題名(英文) Biomembrane as quasi-nonequilibrium field: molecular diffusion on a membrane and Selective molecular aggregation

研究代表者

菱田 真史 (HISHIDA, Mafumi)

筑波大学・数理物質系・助教

研究者番号：70519058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：リン脂質膜間での分子拡散を膜間距離に対して調べることを目標に、膜間距離の精密な制御方法の確立を行った。湿度変化による制御や中性の膜を用いた制御は困難であったが、荷電脂質膜の膜間距離が決定される機構を実験および理論から確立することができた。Gibbs-Donnan平衡からイオン分布を計算し、電気二重層斥力を求めることで実験を大変よく再現した。長きにわたって信じられてきた電気二重層力の起源を覆す成果となった。

研究成果の概要(英文)：To investigate molecular diffusion in aqueous phase between bilayers, we tried to establish the method for controlling the lamellar repeat distances. Although controls by humidity change or by using a neutrally charged lipid were found to be difficult, we could establish the method by using charged lipid bilayers experimentally and theoretically. Electrostatic double-layer force obtained by considering Gibbs-Donnan equilibrium well agreed with experiments. This result reverses the classical model of double-layer force, which has been widely believed for long.

研究分野：ソフトマター物理学

キーワード：水和 電気二重層斥力 膜間距離 リン脂質

## 1. 研究開始当初の背景

ソフトマターの多くは水中で自己組織化し、様々な構造を形成する。その際に、周囲の水がどうふるまうのか、構造形成に積極的に関与しているのかについては十分にわかっていない。我々はこれまで、リン脂質二重膜表面の水和状態をテラヘルツ分光法によって観測することで、膜表面に nm オーダーにわたってバルクとは異なる水（水和水）が存在することを明らかにしてきた (M. Hishida and K. Tanaka, *Phys. Rev. Lett.* 2011)。また水の状態が膜同士の相互作用や膜の相転移に関与していることも示唆してきた (M. Hishida et al., *J. Phys. Soc. Jpn.*, 2014) (M. Hishida et al., *Langmuir*, 2014)。

一方で、長距離水和層における水の物理量に関してはまだほとんどわかっていない。たとえば圧縮率や粘性、熱容量などといった物理量を明らかにすることは重要である。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では膜表面の水和層における溶質分子の拡散を計測することで、水和層における粘性を調べることを目的に研究をスタートした。

ただしそのためには、膜同士の距離を精密に制御し、分子が拡散する領域を膜からある一定の距離の層に限定する必要がある。そこで本研究では、膜同士の距離を制御する方法を確立することを最初の目標として研究をはじめた。また、水和状態の異なる膜を見出すために、テラヘルツ分光法による水和測定も継続的に行った。

## 3. 研究の方法

膜同士の距離の制御に関していくつかの方法を試みた。初めに、リン脂質乾燥膜を作製し、周囲の湿度変化によって膜の間に含まれる水の量を制御することを試みた。後述するが、これは大変に困難であったために、その

後、荷電リン脂質膜を電解質溶液中に分散させ、溶液中の塩濃度によって膜間距離を変化させることを試みた。

また、脂質の違いによって水和状態がどう異なるのか、脂質の相状態によって水和状態がどう異なるのかを調べるためにテラヘルツ分光法による水和状態解析を行った。

## 4. 研究成果

### 1) 中性脂質膜の膜間距離の制御機構

電氣的に中性の膜の間には van der Waals 相互作用、膜の揺らぎに係る Helfrich 相互作用、および Å 程度の短距離で斥力相互作用が働く。これらのバランスによって膜間距離は決定する。これらの相互作用を系統的に変化させられれば良いが、膜の表面状態を変化させずにそれを行うのは難しい。そのため、同一の膜を用いて膜間距離を制御するためには無理やり膜間から水を奪い、距離を縮めるのが良いと考えた。そこで乾燥した積層膜の周囲の湿度を制御し、膜間の水の量を制御することを試みた。しかし、湿度が 90% 以下ではほとんどの水が揮発してしまうため、90% 以上で精密に湿度を制御することが必要であるとわかった。この領域では一般に湿度制御は難しい。湿度制御システムの構築を試みたが、やはり困難であった。

そこで、異なる方法で膜間距離の変化を追った。電氣的に中性の膜を用いた場合、周囲にイオンが存在しても直接的な相互作用はない。しかし、これまでの研究から、両イオン性の脂質膜の場合、イオンの添加で膜間距離が変化することが分かっていた。そこでこの原因を詳しく調べるために、中性の界面活性剤を用いてイオンの影響を調べた。すると、イオン添加で膜間距離が広がること、添加したアニオンのイオン半径によって膜間距離の変化の仕方が異なることが分かった (M. Hishida et al., *J. Solution Chem.*, **45**, 1612-1619 (2016).)。この変化はこれまでの膜間相

相互作用のモデルでは説明することができなかつた。しかし、この原因については十分に理解できていなかった。そのため、系統的に膜間距離を制御するには至らなかった。イオン半径依存性があることから、水の水素結合ネットワークの状態にイオンが影響を与え、それが膜間の距離に影響している可能性が示唆された。

## 2) 荷電脂質膜の膜間距離の制御機構

電解質溶液中において、電荷を帯びた膜同士の間隔を決めているのは主に電気二重層斥力と van der Waals 引力とのバランスである。これを記述するのが DLVO 理論である。中性膜の場合には膜間距離がイオンによって変化するメカニズムは十分に明らかにならなかったが、荷電膜の場合はイオンと膜の相互作用を考えることでそのメカニズムはより明確になると期待される。

我々はアニオン性リン脂質膜を三つの電解質溶液中に分散させた。電解質のなかのカチオン（対イオン）はすべて一価 ( $\text{Na}^+$ ) に統一し、アニオン（共イオン）を一価 ( $\text{Cl}^-$ )、二価 ( $\text{SO}_4^{2-}$ )、三価 ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) と変えて実験を行った。これまで DLVO 理論によると、溶液中のイオン強度が等しければ電気二重層斥力は等しくなり、その結果膜間距離も等しくなると考えられた。しかし、実際に測定してみると、イオン強度が等しくても共イオンの価数によって膜間距離は異なり、価数が小さいほうが距離が小さかった（図 1）(M. Hishida et al., *Phys. Rev. E*, **96**, 040601(R) (2017).)。この違いは van der Waals 相互作用の違いや、それ以外の相互作用 (Helfrich 相互作用など) の違いによっても説明することができなかつた。そのため、電気二重層斥力が DLVO 理論で求められてきたものとは異なっている可能性が考えられた。

そこで我々は理論的に電気二重層斥力の起源を再考した。用いているリン脂質膜は多重

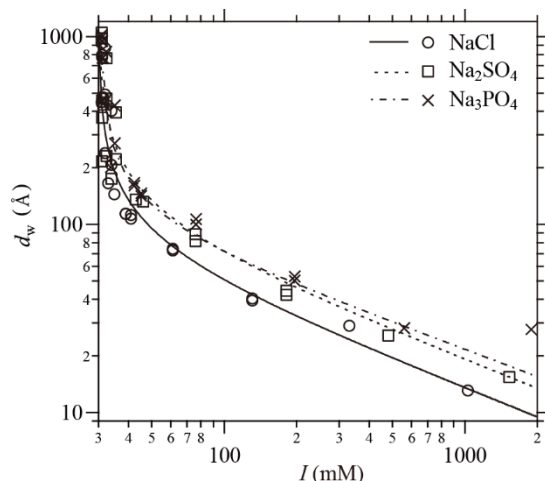


図 1 : アニオン性リン脂質 DOPS の膜間距離のイオン強度依存性。電解質の共イオンの価数を変化させた場合。

膜ベシクルを形成し、バルク溶液と共存している。このようにコロイド（今は膜）が一か所に凝集していてバルクと共存している場合、系内のイオン分布は Gibbs-Donnan 平衡を考えることが重要である。これまで DLVO 理論では、このような平衡条件を考えてきていなかった。今回 Gibbs-Donnan 平衡を用いてバルクと膜間の水溶液中のイオン濃度を計算したところ、添加した塩由来のイオンはほぼすべてがバルク中に存在し、膜の間にはリン脂質にもともとついてきた対イオンのみしか存在していないことが分かった。これは DLVO 理論のもとになっている Gouy-Chapman のモデルや Debye-Hückel のモデルとは異なるイオン分布である。

このイオン分布のもとでは、電気二重層相互作用の形式も Gouy-Chapman のモデルや Debye-Hückel のモデルとは当然大きく異なる。膜の間には対イオンしか存在しないため、電気二重層斥力是对イオン由来のもののみとなり、指数関数的に減衰する従来の式ではなく、べき乗に減衰するものとなる。そのため、しばしば議論されるデバイ長などといった長さも定義できなくなる。さらに、溶液中に添加した塩由来のイオンはほぼすべてバルクに存在し、膜間の溶液とのイオン濃度差が大き

くなる。そのため、浸透圧が発生する。これは膜間に対して引力として働く。この条件で膜間に働く力を記述すると、以下のようになる。

$$P_{DL}(d_w) = \frac{2\pi^2 \epsilon_0 \epsilon}{\beta^2 e_0^2} \frac{1}{d_w^2} - \frac{\rho_{anion}^{add} + \rho_{cation}^{add}}{\beta} \quad \text{式 1}$$

$d_w$ が膜間距離であり、 $\rho^{add}$ は添加したイオン濃度である。右辺第一項が斥力、第二項が浸透圧による引力である。これを積分し、ポテンシャルエネルギーにすると以下となる。

$$U_{DL}(d) = \frac{2\pi^2 \epsilon_0 \epsilon}{\beta^2 e_0^2} \left( \frac{1}{d_w} - \frac{1}{d_w^{max}} \right) + \frac{2I - \rho_0}{z\beta} (d_w - d_w^{max}) \quad \text{式 2}$$

ここで、 $Z$  は共イオンの価数であり、価数に依存して斥力の大きさが異なることが分かる。 $d_w^{max}$ はシステムサイズ（膜の濃度）で決まる定数である。膜間に働く van der Waals 相互作用をこれに足し合わせることで全ポテンシャルエネルギーとすることができる。全ポテンシャルエネルギーの極小の位置から計算される平衡膜間距離を図 1 に実線および点線で表している。すべての実験結果と非常によくあっていることが分かる (M. Hishida et al., *Phys. Rev. E*, **96**, 040601(R) (2017).)。この理論では未知のパラメーターは存在しないにもかかわらず、ここまで広い範囲で実験を再現できたのは驚きである。この極小位置は van der Waals 相互作用の有無にほとんどよらないことも分かった。すなわち、膜間に働く引力の起源は van der Waals 引力ではなく、膜間とバルクとの浸透圧差であることも分かった。

この結果は 100 年以上にわたって信じられてきた電気二重層相互作用の作用メカニズムが必ずしも正しくはなく、場合によっては本研究結果のように大きく異なるメカニズムとなるということを示している。DLVO 理論はコロイド界面科学やソフトマター物理学の基本理論であるため、これを 100 年ぶりに大幅に修正する本研究は大変に歴史的かつ重要な成果といえる。

浸透圧が膜間の相互作用に対して重要だということは、水の化学ポテンシャルを考慮することが重要であるということである。これまでコロイド間相互作用を考える際には水は平均場として与えられてきたが、水の粒子性を考慮する必要があるといえる。本研究における目的は、ソフトマターの自己組織化に対する水の重要性を理解することであったが、本研究によって水の粒子性の重要性が明確になったといえる。

本研究によって荷電脂質膜の膜間距離の制御機構が明らかになった。現在、膜間距離を制御しつつ膜間での分子拡散を測定するべく研究を進めている。

### 3) 膜の相変化に伴う水和状態の変化

これまで、テラヘルツ分光法によって、弱く水和された水まで含めた長距離水和状態を測定できることが分かっていた。ここでは、脂質分子によって水和状態がどう異なるか、脂質膜の相によってどう異なるかを調べた。

まずは過去 (M. Hishida and K. Tanaka, *Phys. Rev. Lett.* 2011) に用いていたリン脂質 (DMPC) と同じ親水基を持ち、疎水基のみが異なる脂質 (DPPC) を用いた。その結果 (当然といえば当然であるが、) 親水基が同じであれば水和状態もほとんど同じであることが分かった。一方で、相によって水和状態は大きく異なることが分かった。DPPC をラメラゲル相 ( $L\beta'$ 相)、リップルゲル相 ( $P\beta'$ 相)、ラメラ液晶相 ( $L\alpha$ 相) と変化させると、ラメラゲル相—リップルゲル相—ラメラ液晶相の順で水和水量が多くなることが分かった (図 2)。脂質の親水基が同じでかつすべて二重膜であるにもかかわらず相によって水和状態が異なるというのは興味深い。それだけでなく、ラメラ液晶相から非二重膜構造である逆ヘキサゴナル構造への転移においても水和水量が大きく増加することが分かった。これらの結果は周囲の水が相転移に関与していることを示

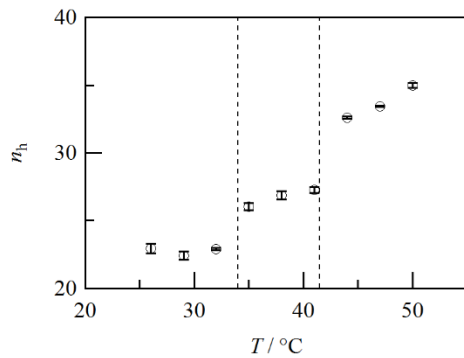


図 2 : DPPC の水和数の温度依存性 (低温からラメラゲル相—リップルゲル相—ラメラ液晶相。点線が転移温度を表す。)

している。本成果に関しては現在論文執筆中である。膜に添加物を添加することによって相挙動を制御できることが分かってきた (H. Usuda, M. Hishida, et al., *Langmuir*, **32**, 5966-5972 (2016).) ため、添加物の量や種類によって相を制御し、一定の温度で相の異なる膜を用意し、周囲の分子の拡散を測定することを試みている。

これらのように、本研究では最初の目標であるリン脂質膜間の膜間距離の制御機構を明らかにするところまで達成することができた。現在はその知見を利用して分子拡散を測定するべく研究を進めている段階である。ただし、本研究で明らかになった膜間距離の制御機構は 100 年以上にわたって信じられてきた理論を覆す、歴史的で重要な成果といえ、本来の目標以上に重要な成果を残すことができたと考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1) Mafumi Hishida, Yoko Nomura, Ryo Akiyama, Yasuhisa Yamamura, Kazuya Saito

"Electrostatic double-layer interaction between stacked charged bilayers"

*Phys. Rev. E*, **96**, 040601(R) (2017).

2) Mafumi Hishida, Yohei Kaneko, Yasuhisa Yamamura, Kazuya Saito

"Salt Effects on Lamellar Structure of Nonionic Surfactants"

*J. Solution Chem.*, **45**, 1612-1619 (2016).

3) Hatsuhiko Usuda, Mafumi Hishida, Yasuhisa Yamamura, Kazuya Saito

"Contrasting Effects of a Rigid Core and an Alkyl Chain in nCB on the Phase Behavior of Lipid Bilayers"

*Langmuir*, **32**, 5966-5972 (2016).

[学会発表] (計 12 件)

1) テラヘルツ分光法を用いたソフトマターの水和状態の観測 および 水和状態と自己組織化構造との相互関係 に関する研究

菱田真史

日本物理学会第 73 回年次大会(2018 年)、2018/3/22-25、東京理科大学、口頭、招待講演、奨励賞受賞講演

2) 荷電脂質膜が作る多重層ベシクルの表面電位

菱田真史、野村遥子、秋山良、山村泰久、齋藤一弥

日本物理学会第 73 回年次大会(2018 年)、2018/3/22-25、東京理科大学、口頭

3) 荷電性リン脂質膜同士に働く 電気二重層斥力 ~co-ion の効果~

菱田真史、野村遥子、秋山良、山村泰久、齋藤一弥

The 11th Mini-Symposium on Liquids、2017/10/14、九州大学、口頭、招待講演

4) Correlation between hydration states and aggregation structures of lipid studied by THz spectroscopy

Mafumi Hishida

Tsukuba Global Science Week、2017/9/26、

つくば国際会議場、口頭、招待講演

5) 荷電性リン脂質膜間に働く電気二重層相互作用: co-ion の価数依存性から  
菱田真史、野村遥子、秋山良、山村泰久、齋藤一弥  
日本物理学会 2017 年秋季大会、2017/9/21～24、岩手大、口頭

6) Changes in the hydration states of phospholipid bilayers accompanying bilayer structural changes: From the studies by THz spectroscopy  
Mafumi Hishida  
第 55 回日本生物物理学会年会、2017/9/19～21、熊本大学、口頭、招待講演

7) Hydration states of phospholipids studied by THz spectroscopy  
Mafumi Hishida、Yuta Hemmi、Yasuhisa Yamamura、Kazuya Saito  
The 10th Liquid Matter Conference、2017/7/17～21、Ljubljana (Slovenia) .ポスター

8) 荷電性リン脂質膜同士に働く 電気二重層斥力 ～co-ion の効果～  
菱田真史、野村遥子、秋山良、山村泰久、齋藤一弥  
つくばソフトマター 2017、2017/5/15、東京大学、口頭、招待講演

9) ゲル-液晶相転移に伴うリン脂質二重膜間の水の状態変化  
逸見優太、菱田真史、山村泰久、齋藤一弥  
日本物理学会 第 72 回年次大会、2017/3/17～20、大阪大学、ポスター

10) PE リン脂質のラメラ液晶-逆ヘキサゴナル相転移に伴う水和状態の変化  
逸見優太、菱田真史、山村泰久、齋藤一弥  
第 39 回溶液化学シンポジウム、2016/11/9～11、産業総合技術研究所、ポスター

11) テラヘルツ分光による PE リン脂質のラメラ液晶-逆ヘキサゴナル相転移に伴う水和状態の変化の観測

逸見優太、菱田真史、山村泰久、齋藤一弥  
平成 29 年度 日本分光学会年次講演会、2016/9/22～24、早稲田大学、ポスター

12) Lamellar repeat distances of charged phospholipid membranes dependent on charges of added co-ions  
野村遥子、菱田真史、山村泰久、長友重紀、齋藤一弥  
The 9th Mini-Symposium on Liquids、2015/7/4～5、九州大学、ポスター

〔図書〕 (計 0 件)

〔受賞〕 (計 1 件)

1) 日本物理学会第 12 回 (2018 年) 若手奨励賞、菱田真史、「テラヘルツ分光法を用いたソフトマターの水和状態と自己組織化構造の相関に関する研究」

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/mafumihishida>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菱田真史 (HISHIDA Mafumi)

筑波大学数理物質系・助教

研究者番号: 70519058