

氏 名	た の たか のり 田 野 隆 徳
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2003 号
学位授与の日付	平 成 10 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	フーリエ変換赤外分光法によるリン脂質二分子黒膜の構造評価

(主査)

論文調査委員 教授 梅村純三 教授 中原 勝 教授 新庄輝也

## 論 文 内 容 の 要 旨

石けん分子のような両親媒性物質の水溶液の表面には、溶液中から飽和吸着した溶質の単分子膜が生成する。その単分子膜をフレームを使って空気中に引き上げたときにできる二分子黒膜は、水層を中核とし、それを膜分子がサンドイッチ状に挟んだ空気/膜分子/水層/膜分子/空気の構造をもつ。このとき両親媒性物質をリン脂質にすれば、リン脂質二分子黒膜ができる。この黒膜は、生体膜の基本骨格である脂質二分子膜 (BLM) と同じく二分子膜構造をもっているため、生体膜の構造・安定性などを研究する上でも非常に重要な系である。また、今後ますます生体膜の構造と機能を解明する研究が盛んになることが予想されるが、このような数十ナノメートル程度の厚さを持ち、しかもフレキシブルな界面構造をもつ系に、従来の構造決定のための測定方法や理論が適用できるか、ということが問題となってくる。そこでまず、一般に厚さを求めるために使われる Lambert の法則が、黒膜のような超薄膜に適用できるかどうかを調べ、従来の光学理論の検証をおこなった。続いて、これまで広い温度範囲で作ることが非常に困難であったリン脂質二分子黒膜を安定に作製し、赤外分光法で測定するための方法ならびに技術を確立した。これにより、代表的な二本鎖リン脂質であるジミリスチルフォスファチジルコリン (DMPC) 二分子黒膜の温度変化の実験をおこない、膜の状態や構造におよぼす温度の効果をフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR 分光法) を用いて調べた。また、二分子黒膜は、水層部に膜分子の極性基を向けた構造をとるので、水層中に含まれる第三の物質と膜分子との相互作用を捉えるのに適した系である。そこで FT-IR 分光法を用いて、DMPC 二分子黒膜の構造に及ぼす無機塩の効果を調べた。さらに光学異方性を考慮した薄膜光学理論を用いて、膜分子の配向を検討した。

これまで、黒膜の特性を表す重要なパラメーターの一つである水層部の厚さは、Lambert の法則を利用して求めることができると一般に考えられてきた。しかしながら、水層部の厚さが光の波長よりも薄い二分子黒膜では、Lambert の法則が成立するかどうかは疑問である。そこで本研究では、薄膜光学を用いたシミュレーションをおこなうことにより、①薄膜中で光の多重反射による干渉効果によって、Lambert の法則が成立しないこと、②黒膜の厚さを Lambert の法則から求める場合、最大で 25% の誤差を伴うこと、を明確に示した。また、対称 3 層ならびに対称 5 層薄膜系において、Lambert の法則にかわる新しい吸収の法則を表す式を初めて導出した。導出した二つの式は、 $2.94 \mu\text{m}$  の入射光において、厚みが  $50\text{nm}$  より薄い膜に適用でき、今後の活用が期待される。

DMPC 黒膜の CH 伸縮振動領域の FT-IR スペクトルを、種々の温度で測定したところ、DMPC 分子の炭化水素鎖の  $\text{CH}_2$  逆対称 ( $\nu_s\text{CH}_2$ ) および対称 ( $\nu_s\text{CH}_2$ ) 伸縮振動バンドが現れた。この  $\nu_s\text{CH}_2$  バンドの波数は、膜分子のコンフォメーションの状態を敏感に反映することが知られている。解析の結果、温度が下がるとともに炭化水素鎖がゴーシュ構造を含む液晶状態から、全トランス構造のゲル状態に変化することがわかった。温度によってもたらされる相転移は、リン脂質のベシクルなどでは一般的に見られる現象であるが、二分子黒膜のような曲率がゼロの平面膜においても観測される現象であることが、この測定で初めて明らかとなった。また、このときの相転移温度 ( $24^\circ\text{C}$ ) は、曲率の小さな (半径の大きな) ベシクルで観測された値とよく一致することがわかった。

次に、温度を28℃と一定にして、DMPC二分子黒膜に添加する塩の種類と濃度を変えて透過測定をおこない、得られたFT-IRスペクトルの $\nu_s\text{CH}_2$ バンドの波数変化の解析をおこなった。その結果、一般に二、三価の陽イオンの塩では、活量（したがって濃度）が高くなるにつれて、炭化水素鎖がゴーシュ構造を含む液晶状態から、全トランス構造のゲル状態に転移することがわかった。しかし、一価の陽イオンならびに $\text{Mg}^{2+}$ イオンでは、変化は見られない。偏光を用いた傾斜法による分子配向解析の結果から、一価と $\text{Mg}^{2+}$ イオン以外の塩では、塩濃度の増加とともに、炭化水素鎖軸が膜面から法線方向に立ち上がってくる（40°から30°に変化する）ことがわかった。また、吸光係数の解析から、塩濃度の増加とともに、 $\text{Mg}^{2+}$ イオンを除く二、三価の陽イオン、特に $\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Zn}^{2+}$ イオンでは、膜面内密度が大きく変化することもわかった。極性基部分の状態変化の結果も考慮すると、これらはDMPC極性基のリン酸基部分にイオンが吸着し、ブリッジ効果が生じたためと解釈できる。炭化水素鎖の状態変化や配向角の変化、ならびに極性基部分の状態変化から、陽イオンとDMPC分子との相互作用の強さは、 $\text{Zn}^{2+} > \text{La}^{3+} \geq \text{Ca}^{2+} \sim \text{Pb}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+ \sim \text{Li}^+$ であるといえる。これはリン酸と各金属イオンとの会合定数の大きさの順序とよく対応している。

以上のように、まず、リン脂質黒膜の水層部の厚さを求めるための理論を検証し、Lambertの法則にかわる精度のよい近似式を導出している。続いて、リン脂質黒膜をモデル系として利用してゆく上で、その物性がリン脂質分散系とどのように対応しているかを明らかにした。最後に、それらを利用して、リン脂質二分子黒膜に与える金属陽イオンの効果を調べ、分子のコンフォメーションや配向角の変化を明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

リン脂質二分子黒膜の構造が、生体膜のそれと類似して二分子膜構造を有していることが注目されて以来、生体膜モデルの一つとしてリン脂質黒膜系の測定がなされてきた。しかしながら、リン脂質黒膜にゲル-液晶相転移の現象が観測されるかということや、膜中における分子の配向や充填状態、膜分子のコンフォメーション状態などの膜の物性については、ほとんど明らかになっていなかった。それゆえ黒膜の構造ならびに物性の評価・検討が切望されていた。また、黒膜の厚さを求める最も一般的な方法は、Lambertの法則を利用するものであるが、多層構造をもち、しかも非常に薄い膜である黒膜に適用することができるのか疑問があった。そこで申請論文は、まず、膜の厚さを求める際に用いられるLambertの法則の検証をおこなっている。続いて、赤外分光法を用いて測定できる十分な大きさを持ち、しかも安定な黒膜を生成するために、新しい温度コントロールセルを構築し、リン脂質黒膜の作製方法の開発をおこなっている。次に、これを用いて、様々な温度でのリン脂質(DMPC)二分子黒膜の赤外透過スペクトルの測定をおこない、黒膜と分散系との物性の比較を論じている。さらに種々の塩を添加したリン脂質分散水溶液から黒膜を作製し、FT-IR分光法を用いて、定量的にリン脂質黒膜の分子配向を評価するとともに、陽イオンとリン脂質二分子黒膜との相互作用を明らかにしている。

まず、申請論文では、厳密な薄膜光学理論を用いて、連続的に水層部の厚さの違う黒膜の吸光度を計算し、Lambertの法則から得られる吸光度値と比較することで、黒膜のような超薄膜においてはLambertの法則が成立しないこと、また、その原因が光の多重反射による干渉の効果であることを明確に示している。水層部の厚さをLambertの法則から求めると、最大で25%もの誤差が生じると報告している。そこで、薄膜においてLambertの法則にかわる新しい吸収の法則を表す近似式を導出している。この式の誤差は、50nmの厚さにおいて、わずかに2.5%にすぎない。またこの近似式はLambertの式に光の吸収層の屈折率が余分にかかったもので、光の多重反射による干渉の効果が、光が吸収される層の屈折率に集約されることを示した。

次いで、申請論文では、温度を変化させたときの $\text{CH}_2$ 逆対称伸縮振動バンドの波数シフトの解析から、リン脂質二分子黒膜においても、水溶液中に分散させたベシクルと同様に、ゲル-液晶相転移の現象が観測されることを初めて明らかにしている。また、このときの相転移温度(24℃)は、径の大きなベシクルで報告されている値(24.4℃)と合うことを見出した。そして、このことから、径の大きな膜においてはゲル-液晶相転移の現象に与える曲率の効果はほとんど無視でき、炭化水素鎖のコンフォメーション変化からの寄与が支配的であると結論づけている。これらの事実は、今回の解析により初めて明らかとなったものであり、また、リン脂質二分子黒膜が生体膜の構造研究をおこなう上で極めて有用であることを示唆するものである。

続いて様々な金属陽イオンを添加した黒膜において、一価陽イオンならびに $Mg^{2+}$ イオンにおいては、塩濃度を増しても分子の炭化水素鎖は無秩序の状態であり、その配向角はほとんど変化しないことを見出している。一方で、その他の多価陽イオンの場合には、塩の添加にともない炭化水素鎖は全トランス構造となり、その配向角は $30^\circ$ にまで達することを明らかにしている。また、配向角の解析から、薄膜におけるバルクの吸光係数を算出している。この薄膜における値を決定した例は極めて珍しく、薄膜光学の分野に与えるインパクトは大きい。また、この吸光係数の解析から、塩濃度が高くなると分子のパッキングも密になることを明らかにしている。そしてこのような結果は、極性基のリン酸基部分と結びついた多価陽イオンのブリッジ効果のためであると解釈している。さらに、各陽イオンとDMPC分子との相互作用の強さの順列 ( $Zn^{2+} > La^{3+} \geq Ca^{2+} \sim Pb^{2+} > Mg^{2+} > Na^+ \sim Li^+$ ) を決定した。生理作用との関連から、金属陽イオンと生体膜のモデル膜であるベシクルやBLMとの相互作用の研究は数多くなされているが、リン脂質二分子黒膜においては、ほとんどおこなわれておらず、この研究の意義は大きい。

以上のように、申請論文は、薄膜において成立する新しい吸収の法則を表す近似式を導出するとともに、従来、作製することが困難であると考えられていたリン脂質二分子黒膜を、安定に作製する方法を開発し、初めてゲル状態の黒膜の赤外透過スペクトルを測定することに成功しており、今後の黒膜の構造研究の発展に大きく寄与するものである。さらに、添加金属陽イオンの濃度に伴う膜分子のコンフォメーションと、配向角の変化を明らかにしており、イオンと膜分子との相互作用を詳らかにしたものと見える。その学問的意義は大きく、申請論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、主論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問をおこなった結果、合格と認めた。