

細胞膜中分子の拡散計測法の開発

Development of novel spectroscopic method for understanding the diffusion of molecules in biomembrane

研究機構研究企画推進室, 理工学研究科物質科学部門(兼任) 乙須 拓洋
Research and Development Bureau, Graduate School of Science and Technology
Takuhiro OTOSU

Abstract

Biological membrane is fluidic and the fluidity of lipids and proteins on the membrane is essential for expressing various biological functions. Determination of the accurate diffusion coefficients of biomembrane constituents is thus crucial to understand the dynamical property of membranes and its relationship with the unique biological functions.

To analyze the diffusion coefficient of molecules on biomembrane, novel fluorescence correlation spectroscopy, standing evanescent-wave fluorescence correlation spectroscopy (SEW-FCS), is developed. Utilization of evanescent wave is beneficial to selectively excite molecules on a supported lipid bilayer, an artificial lipid bilayer formed on the glass surface. Furthermore, fringe pattern (standing wave) illumination achieved by the interference of two evanescent waves enables us to measure the diffusion times with two different spatial resolutions. The performance of SEW-FCS is tested by measuring the diffusion coefficient of fluorescence lipids on the supported lipid bilayer.

1. 細胞膜の微細構造と膜中分子の拡散特性

生物の最小構成単位である細胞は細胞膜に覆われている。その細胞膜はリン脂質からなる脂質二重膜で構成されており、膜中には膜蛋白質やコレステロールといった様々な分子が存在している。また細胞膜表面には膜構造を下支えするように細胞骨格と呼ばれる蛋白質繊維が網目状に張り巡らされている。このように複雑な細胞膜中において、膜蛋白質などの分子は流動的に拡散しながら離散集合を繰り返すことにより、細胞内部の恒常性維持や細胞内外への情報伝達といった細胞膜特有の機能を発現している。ゆえに膜中分子の膜上での並進拡散ダイナミクスを理解することは、細胞膜が示す様々な生理機能の速度論的な理解のために非常に重要である。

実際に細胞膜中、ならびにモデル細胞膜中における脂質の拡散計測はこれまでも数多く報告されてきたが、それらの結果より膜中分子の拡散はその構造複雑性より非常に興味深い挙動を示すことが明らかとなりつつある。例として図1には細胞骨格存在下における脂質の拡散時間の観測サイズ依存性に関するシミュレーション結果を模式的に示している¹。図にあるように、細胞骨格存在下では、細胞骨格による網目サイズの前後で観測される拡散時間の観測サイズ依存性が大きく異なる。これは網目サイズより大きな観測サイズで計測すると、細胞骨格による障壁を乗り越える律速段階が測定データに寄与することに由来する。この事は逆に考えると、このようなデータを取ることができれば、細胞骨

格の微細構造についての知見が得られることを意味している。細胞骨格の微細構造は直接可視化することがいまだ困難なことから、観測サイズ依存の拡散計測に注目が集まっている。

2. 蛍光相関分光法による拡散計測

水溶液中ならびに膜中分子の拡散係数の計測には、古くから蛍光相関分光法 (FCS) が適用されてきた。FCS は顕微鏡の焦点領域から検出される蛍光強度の揺らぎを解析する手法である²。ざっくり説明すると、検出される蛍光信号はターゲット分子が焦点領域内に滞在しているときは強く、拡散により焦点領域外に出ていくと蛍光信号は弱くなる。つまり、蛍光強度の強い時間は分子が焦点領域内に入ってきてから出ていくまでの時間、つまりは拡散速度を反映することから、解析ではこの蛍光強度の揺らぎの時定数を、得られる相関関数の減衰時間より算出する。

FCS はその測定 of 簡便さから細胞膜中分子の拡散計測にも応用されてきたが、上述した観測サイズ依存の拡散計測においては 2 つの欠点を有している。一つは、一回の計測で 1 つの観測サイズでのデータのみ取得可能であるため、観測サイズ依存性の計測には複数回の計測を必要とする点である。このような長時間にわたる計測は、細胞をはじめとするサンプルの経時変化、細胞死につながることから、迅速な計測が望まれる。もう一つの欠点は、一般的な共焦点顕微鏡による観測では最小観測サイズが回折限界により決まっていることから、それよりも小さな観測サイズでの計測が困難であるという点である。上述した細胞骨格の網目サイズは共焦点顕微鏡の分解能よりも小さいとの報告があることから、細胞膜の微細構造理解にはより高い空間分解能での計測が求められている。

3. 光の干渉を利用した新規蛍光相関分光装置の開発

そこで我々は光の干渉を利用した新たな蛍光相関分光装置を開発した³。装置の模式図を図 2 に示す。通常の FCS では共焦点顕微鏡を用いた測定を行うが、共焦点顕微鏡は深さ方向の空間分解能が悪いため、細胞膜のように二次元に広がる膜上での拡散計測においては、膜外領域からの信号の寄与が大きく正確な測定が困難になる。そこで本装置では全反射顕微鏡を FCS に適用する。全反射顕微鏡は光の全反射により発生するエバネッセント光を励起光として用いる顕微鏡である。エバネッセント光は全反射を起こす界面 (本研究ではカ

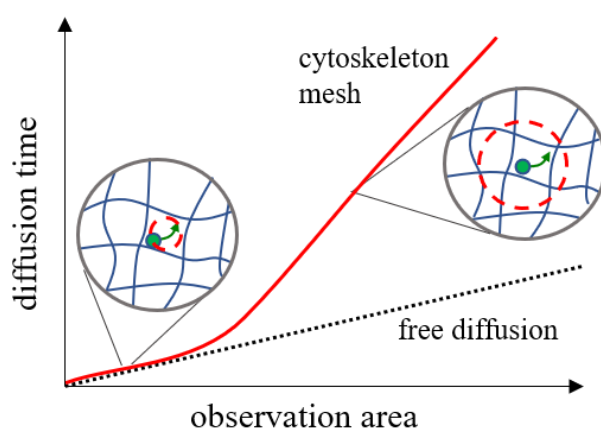


図 1: 細胞骨格による網目構造存在下での、脂質二重膜中分子の観測サイズに依存した拡散時間 (実線)。破線の円は観測領域を示している。比較として自由拡散の例を点線で示す。

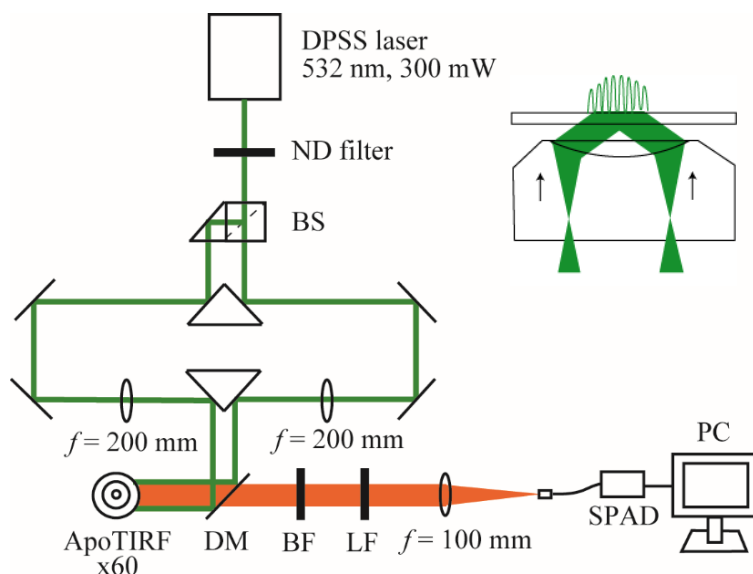


図 2: 新規蛍光相関分光装置の概略図。対物レンズを横から見た模式図を図中右に示している。図中の略語は以下の通りである。ND; neutral density, BS; beam splitter, DM; dichroic mirror, BF; bandpass filter, LF; longpass filter, SPAD; single-photon avalanche photodiode。

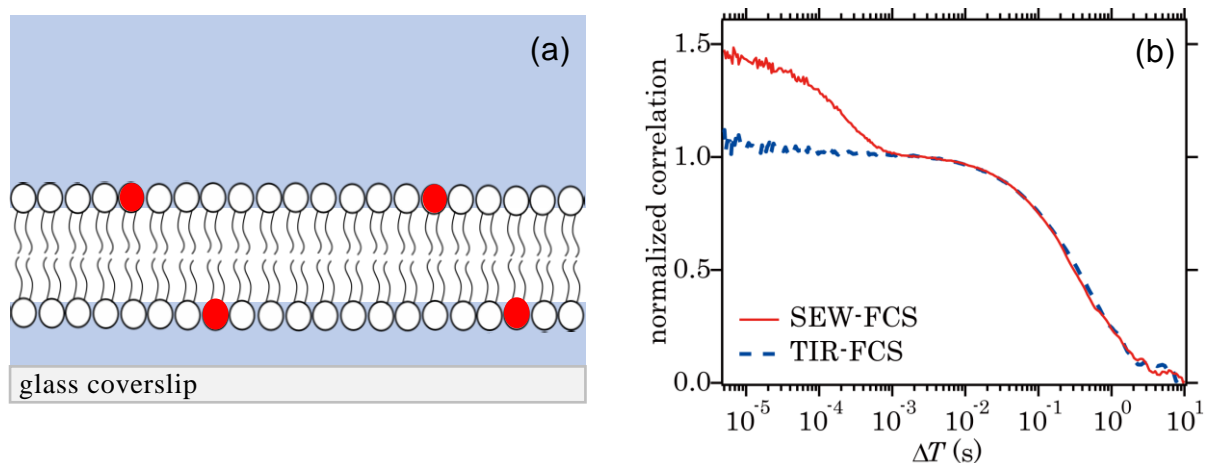


図3: (a) ガラス基板上に作製した支持脂質二重膜の模式図. 赤で示しているのは蛍光脂質である. (b) 干渉縞励起(SEW-FCS)ならびに通常の全反射顕微鏡配置(TIR-FCS)で計測された支持脂質二重膜中蛍光脂質の相関関数.

カバーガラスとサンプル溶液の界面)の微小領域(~100 nm)のみに発生するため,カバーガラス表面に作成した人口細胞膜の研究を行うにあたり非常に有用である.実際にエバネッセント光を利用したFCS装置は既に報告されているが,本装置では発生するエバネッセント光を干渉させることにより干渉縞を形成させ,形成した干渉縞を励起光として利用する.

励起光源には,ダイオード励起固体レーザー(DPSS laser, 532 nm)を用いる.ビームスプリッターで均等に二つに分けたのち,別々の光路を経て対物レンズの瞳の両端から入射する.端から入射することにより対物レンズを抜けた光はカバーガラス-サンプル溶液界面で全反射し,エバネッセント光を発生する.さらに2つのレーザー光がそれぞれ同じ場所でエバネッセント光を発生させるため,両エバネッセント光はカバーガラス表面で干渉し干渉縞(定在波)を形成する(図2右).本装置ではこの干渉縞を励起光として用いる.干渉縞の半値全幅は励起光の入射角,波長,ガラスの屈折率などから理論的に計算することができ,本装置では~120 nmとなる.これは回折限界より決定される通常の共焦点顕微鏡の空間分解能よりも狭い領域に光を当てていることになるため,そこから得られる情報は超解像での検出によるものといえる.

干渉縞によって励起された分子からの蛍光は同じ対物レンズで収集し,カラーフィルターにより励起光の散乱等を除去したのち,単一光子検出フォトダイオード(SPAD)に接続したマルチモードファイバーの端面に集光することで検出を行う.このときに用いるファイバーの内径と集光レンズの f 値,ならびに対物レンズの倍率が全観測領域を規定する.本装置ではサンプル上の直径1.64 μm を検出するような設計で検出を行っている.検出された各蛍光光子については,PC上の光子カウンターで検出時間を計測,記録し,時間相関解析に使用する.

先述したように蛍光相関分光法では検出される蛍光強度の揺らぎを解析する.本装置のように干渉縞存在下では,光の強め合う領域では励起光強度が強いためサンプルからの蛍光強度が強くなる一方で,弱めあう領域では蛍光強度は弱くなる.つまり本装置を用いた測定では,干渉縞に起因する蛍光強度の揺らぎと観測領域全体への出入りによる蛍光強度の揺らぎの両方が検出されるため,干渉縞一本を分子が通過する時間と観測領域全体を分子が通過する時間の二つの時定数を同時取得することが可能となる.言い換えれば,異なる二つの空間分解能(=時間分解能)で分子の拡散係数の計測が可能となる.

本装置の性能評価のため,カバーガラス上に作成した人口細胞膜である支持脂質二重膜中の蛍光脂質の拡散計測を行った(図3a).今回は中性リン脂質であるDOPCに蛍光脂質(TRITC-DHPC)を

少量加えたものをサンプルとして用い、DOPC からなる支持脂質二重膜中を拡散する蛍光脂質由来の蛍光を、開発した装置で計測した。

図 3b には測定によって得た干渉縞励起での蛍光相関関数(SEW-FCS, 実線)を示す。比較のために 2 つの励起光のうち 1 つをブロックし、干渉縞のない通常の全反射照明下で測定した結果(TIR-FCS, 破線)も合わせて示している。結果より干渉縞存在下では相関関数は二つの時定数で減衰していることがわかる。一方、全反射照明下では SEW-FCS で見られた早い時間領域での減衰は見られず、サブ秒での減衰が SEW-FCS における 2 つ目の減衰と一致したことから、SEW-FCS により得られる早い時定数は干渉縞一本を分子が通過する時間、遅い時定数は観測領域全体を分子が通過する時間に相当していることがこの結果から示された。

4. まとめ

細胞膜が示す興味深い生理機能は膜中分子の膜上での拡散挙動と密接に関係している。本研究で紹介した新たな蛍光相関分光装置は、それら膜中分子の拡散特性理解のための新たな知見を提供するものであると大いに期待される。

5. 謝辞

本研究の遂行にあたり山口祥一教授、吉川洋史准教授(埼玉大学)のご協力をいただいた。この場を借りて感謝を申し上げる。

6. 参考文献

1. Wawrezynieck L. et al., Fluorescence correlation spectroscopy diffusion laws to probe the submicron cell membrane organization. *Biophys J* **89**, 4029-4042 (2005)
2. Elson, E.L. and Magde, D. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Pept Sci* **13**, 1-27 (1974)
3. Otsu T. and Yamaguchi S. Communication: Development of standing evanescent-wave fluorescence correlation spectroscopy and its application to the lateral diffusion of lipids in a supported lipid bilayer. *J Chem Phys* **147**, 041101 (2017)