

Title	静電作用による脂質二分子膜小胞の秩序形成メカニズムの解明：2次元相分離構造と3次元膜孔形成のカップリング
Author(s)	姫野, 泰輝
Citation	
Issue Date	2015-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10119/12773">http://hdl.handle.net/10119/12773</a>
Rights	
Description	Supervisor:高木 昌宏, マテリアルサイエンス研究科, 博士

氏名	姫野泰輝		
学位の種類	博士(マテリアルサイエンス)		
学位記番号	博材第373号		
学位授与年月日	平成27年3月20日		
論文題目	Investigation about effect of charged phospholipids on structure of lipid bilayer vesicles :coupling between 2D-phase separation and 3D-pore formation (静電作用による脂質二分子膜小胞の秩序形成メカニズムの解明:2次元相分離構造と3次元膜孔形成のカップリング)		
論文審査委員	主査	高木 昌宏	北陸先端科学技術大学院大学 教授
		藤本 健造	同 教授
		芳坂 貴弘	同 教授
		松村 和明	同 准教授
		篠田 渉	名古屋大学 准教授

## 論文の内容の要旨

The basic structure of biomembrane is lipid bilayer composed of various types of lipid molecules. Biomembranes exhibit various two-dimensional (2D) and three dimensional (3D) dynamics, and play a very important role in regulation of cellular function. The 2D dynamic is represented by phase separation called “lipid raft formation”. The 3D membrane dynamics are morphological changes such as endo- exocytosis, vesicular transport, and autophagy. In these membrane dynamics, physicochemical properties of lipid membranes should play a very important role as well as protein function. In order to reveal the physicochemical properties of lipid membranes, giant unilamellar vesicles (GUV) consisting of mixtures of lipids and cholesterol have been used as model biomembranes.

In the past, most of the studies have investigated the primary physical property of lipid membrane in uncharged model systems. However, biomembranes also include negatively charged lipids. As physicochemical properties of lipid membranes, charged lipids are one of the important factors to be considered. In addition, surface charge of membrane could be controlled by cellular ion such as sodium ion, and calcium ion.

In this thesis, we clarify the electric charge effects on the 2D dynamics (phase behaviour) and 3D dynamics (membrane morphology). We also explored the salt screening effect on charged membranes. We discussed the effects of charge on membrane 2D and 3D dynamics based on free energy model. First, we investigated the phase separation induced by negatively charged lipids. As compared to the neutral lipid mixtures, the phase separation is suppressed by charged unsaturated lipid, whereas it is enhanced by charged saturated lipid. The phase behaviors of all charged mixtures approach that of the neutral mixture due to screening of electrostatic interactions by adding the salt.

Second, we investigated the localization of cholesterol and phase behavior in various mixtures of charged lipid membranes. We found that cholesterol prefers to be localized in unsaturated charged lipid rich phase, while does not to be localized in saturated charged

lipid rich phase. In presence of salt, localization of cholesterol was changed significantly. These results suggest that the interaction between charged lipid and cholesterol plays an important role in structural regulation of phase separation in lipid membrane.

Third, we investigated about the effect of charge on membrane 3D dynamics and discussed relationship between membrane 2D and 3D dynamics. Although vesicles basically formed spherical shape in neutral lipid mixtures, pore formation structures were observed in charged lipid mixtures. Fraction of pore formation vesicles increased with charged lipid concentration. In presence of salt, pore formation was suppressed. In addition, we reproduced experimental system using Coarse-grained molecular dynamics (MD) simulations. MD simulation showed that charged lipids stabilized the edge of membrane pore. Hence, 2D phase separation between neutral lipid and charged lipid is very important to form 3D pore formation.

Our findings will be advanced understanding of the mechanism of dynamic process in biomembrane such as 2D dynamics of lipid rafts structure, and 3D dynamics of membrane morphology including endocytosis, autophagy, and vesicular transport during the signal transduction. Moreover, our finding may help to understand the mechanisms that play an essential role in the interactions of proteins with lipid mixtures.

Key words: phospholipid, liposome, electric charge, phase separation, morphological change

## 論文審査の結果の要旨

細胞膜の基本構造は様々な脂質分子から構成される脂質二分子膜構造である。細胞膜は脂質ラフトの形成や凝集といった膜表面の 2 次元構造変化、エンドサイトーシスやオートファジーに代表される膜の 3 次元構造変化が存在し、様々な細胞機能に関わっている。このような複雑な膜構造形成には、脂質膜の物理化学的性質が重要な役割を担っていることが考えられる。本論文では脂質二分子膜小胞（リポソーム）を細胞のモデル膜系として用い、細胞内に存在する脂質分子の電荷や溶液中のイオンに注目し、静電相互作用が脂質膜の 2 次元構造（相状態）や 3 次元構造（膜形状）に与える影響を、実験・理論の両面から明らかにしている。これまでのリポソームを用いた研究では、多くの研究が電氣的に中性な脂質を用いて行われており、静電相互作用を無視していた。本研究は、世界に先駆けて静電相互作用を取り込んだモデル膜研究を展開し、これまで明らかになっていなかった多くの新規な現象を発見している。

1 章では、上述した背景を述べた後、2 章では、脂質分子の電荷が膜の 2 次元構造（相状態）に多様な影響を与えることを明らかにした。負電荷を持つ脂質でも不飽和脂質、飽和脂質で相分離構造に与える影響が異なることを発見し、自由エネルギーに基づいて理論的に実験結果を説明した。特に、負電荷飽和脂質引き起こす相分離の促進や膜雑な相状態の形成については報告例がなく、重要な研究結果だと言える。

3 章では、ラフトモデルとして用いられる不飽和脂質/飽和脂質/コレステロールの 3 成分系リポソームに対して、負電荷脂質を膜組成に加えた場合のコレステロールの局在を、顕微鏡観察によって実験的に明らかにした。本研究はこれまで飽和脂質にコレステロールが局在し脂質ラフトを形成するとされていた一般的な知見に対して、脂質ラフトの形成が負電荷脂質とイオンの相互

作用によっても制御されていることを見出し、生物学的にも重要な意義がある。

4章では、脂質分子の電荷が引き起こす膜の3次元構造（膜形状）変化に加え、2次元構造と3次元構造の協同関係を、顕微鏡観察を用いた実験的手法・自由エネルギーに基づく理論モデルの構築・そして分子シミュレーションを用いた実験系の再現と多様なアプローチを総合して明らかにした。荷電脂質膜の物性だけでなく、その背景にある生物学的意義まで記述しており、ソフトマター物理学・合成生物学両分野において極めて大きな意義があると評価できる。

以上より総合的に判断し、本学位申請論文は学術的に貢献するところが大きい優れたものとなっており、学位取得に値するものであると言える。また論文内容(2015年1月9日提出)とそれに関連した試問(2015年2月4日実施)の結果、生物学、物理学、英語力をはじめとする基礎的学問に関する学識は優れたものと判定した。以上のことより、博士(マテリアルサイエンス)の学位論文として学問的価値を有すると判断し、合格と認めた。