

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 脂質膜における相分離構造の線張力による制御   |
| Author(s)    | WONGSIROJKUL, NICHAPORN   |
| Citation     |   |
| Issue Date   | 2020-09   |
| Type         | Thesis or Dissertation  |
| Text version | ETD   |
| URL          | <a href="http://hdl.handle.net/10119/17014">http://hdl.handle.net/10119/17014</a> |
| Rights       |   |
| Description  | Supervisor:高木 昌宏, 先端科学技術研究科, 博士   |

|         |   |       |                  |
|---------|---|-------|------------------|
| 氏名      | Wongsirojkul Nichaporn  |       |                  |
| 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 505 号   |       |                  |
| 学位授与年月日 | 令和 2 年 9 月 24 日   |       |                  |
| 論文題目    | Control of line tension at phase-separated domain boundary in lipid membranes (脂質膜における相分離構造の線張力による制御) |       |                  |
| 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             |
|         |   | 濱田 勉  | 同 准教授            |
|         |   | 都 英次郎 | 同 准教授            |
|         |   | 篠田 渉  | 名古屋大学 准教授        |

## 論文の内容の要旨

### [Background]

Lipid bilayer membrane is the basic structure of cell membrane which is the boundary between inside and outside regions of a cell. Cell membranes have lateral heterogeneity consisting of various lipids, proteins, glycolipids, and glycoproteins. From the raft hypothesis, raft regions mainly consisting of sphingolipids and cholesterol are believed to regulate membrane-protein interaction, cell signaling, and membrane trafficking by modulating the lateral organization of the membrane. Phospholipids in water naturally assemble into the bilayer structure by hydrophobic interactions. Interestingly, phase separation can occur in the artificial multicomponent lipid bilayers. The typical phases at room temperature are a solid-ordered (So) phase which is rich in saturated lipids, a liquid-ordered (Lo) phase which is rich in saturated lipids and cholesterol, and liquid-disordered (Ld) phase composed largely of unsaturated lipids.

It is important to consider the interfacial tension at the phase-separated domain boundary (line tension) when we discuss the stability of phase separation. Generally, as the line tension becomes smaller, the domain size becomes smaller, the domains start to fluctuate, and the phase separation disappears finally. Therefore, the control of line tension leads to the control of phase-separated structures.

In this thesis, the line tension is controlled by two methods. First one is osmotic swelling. The response of cells and their phase behaviors to the osmotic stress is important for cell homeostasis and survival in several body systems, particularly in the circulation system. It was reported that osmotic swelling can enhance the phase separation to occur. In other words, the osmotic swelling may increase the line tension. However, the physicochemical mechanism behind still unclear. Second method is the addition of unsaturated fatty acids. Unsaturated fatty acids decrease the high-density lipoprotein cholesterol and may decrease the risk of cardiovascular disease. Also, Oleic acid, one of unsaturated fatty acids, decreases the line tension at liquid domain boundary. It is expected that the more precise control of

phase separation becomes possible by combining these two methods.

[Objective]

In this thesis, we investigated the effects of osmotic pressure on phase separation and miscibility temperature in lipid membranes consisting of dioleoylphosphocholine (DOPC)/dipalmitoylphosphocholine (DPPC)/ Cholesterol (Chol). The line tension analysis at the domain boundary of DOPC/DPPC/Chol and diphytanoylphosphatidylcholine (DiphyPC)/DPPC/Chol were also compared. In the last part, we showed the modulate of the line tension in the fatty acids mixed DOPC/DPPC/Chol membrane. Also, the changes of line tension in fatty acids-containing lipid membranes by osmotic pressure were examined.

[Results]

It was found that the application of osmotic pressure can widen the area of phase-separated in the phase diagram and increase the miscibility temperature which is a transition temperature between phase separation and homogeneous phase. Interestingly, we found that miscibility temperature increased greater at the higher cholesterol concentration. Furthermore, osmotic pressure can increase the line tension at the domain boundary in both DOPC/DPPC/Chol and DiphyPC/DPPC/Chol systems similarly. The plausible mechanism behind was also proposed that the osmotic pressure mediated membrane tension suppresses the membrane fluctuation and causes the change of free energy.

In the last part, we showed the effects of chemical stimuli, in terms of different chain length and cis position of five monounsaturated fatty acids. Based on their physical properties and our finding results, we can categorize their behaviors in lipid membrane into two types: Oleic acid type which the fatty acid can include in the DPPC region and disturbed the ordered chain length leading to lower in line tension, and Palmitic acid type which can exclude cholesterol from the  $L_o$  phase and produce the  $S_o$  phase. We also showed their effects under osmotic pressure which can increase line tension in the mixed lipid membranes.

Our findings may provide insight into biophysics of cell membranes how cell response to osmotic pressure without osmotic shock and how unsaturated fatty acids regulate the line tension and can be an insightful model for the understanding of the human cell membrane.

Keywords: osmotic pressure, phase separation, line tension, miscibility temperature, unsaturated fatty acid

## 論文審査の結果の要旨

本学位論文では、細胞モデル膜を用いて、生物学的にも重要な意味を持つ膜相分離構造の物理的な性質を明らかにしている。学位論文は、以下の6章から成り立っている。

第1章では、膜相分離構造の生物学的意義と物理的性質について概観している。細胞膜は、細胞の

内側と外側を分離し、細胞信号伝達のプラットフォームになることによって細胞の生存を維持する基本的な構造である。1997年には、異なった構造の脂質間の相互作用が、膜組成の不均一性をもたらし、相分離構造を形成しているという仮説(ラフト仮説)が提唱された。相分離構造の物理的な性質について、人工細胞膜と言えるリポソームを用いて研究した。本章では、研究目的と背景についての説明をしている。

第2章では、相分離に対する浸透圧の影響を調べている。ジオレオイルホスホコリン(DOPC)/ジパルミトイルホスホコリン(DPPC)/コレステロール(Chol)で構成される生体模倣膜での相分離は、固体秩序( $S_o$ )相、あるいは液体秩序( $L_o$ )相が液体秩序( $L_d$ )相中に存在する。脂質膜の相分離の安定性に対する浸透圧の影響を調べ、浸透圧による相分離の形成促進を明らかにした。

第3章では、張力によって引き起こされる  $T_m$ (混和温度)の変化を調べた。相分離の混和性は、温度に左右される。混和温度( $T_m$ )は、相分離の50%が発生する温度で、浸透圧は、混和性温度を変化させ、コレステロールの含有量が高いほど、混和温度を低温側へ変化させる事を明らかにした。

第4章では、線張力によるドメイン境界揺動の抑制効果について調べた。線張力は、相分離の境界での界面張力で、相分離の安定性を評価する重要な指標である。 $L_o$ 相と $L_d$ 相の間では、 $L_o$ の方が膜が厚く、境界で脂質の高さに差が存在していた。飽和脂質量の増加は、線張力を上昇させ、浸透圧は、線張力を増大させた。浸透圧を介して、膜張力が膜揺動を抑制するメカニズムを提案した。

第5章では、混合脂質膜の線張力の変化について調べた。一価不飽和脂肪酸の添加は、相分離の境界で線張力を減少させ、オレイン酸型、パルミチン酸型、中間型の3種類に分類できる事を示した。浸透圧を加えることにより、脂肪酸混合脂質膜の線張力が増大した。物理的および化学的刺激の両面から、相分離構造の応答について理解を深める事ができた。

第6章では、以上の研究成果をまとめ、また関連する分野の研究について、将来への展望を述べている。

以上本論文は、膜構造の物理的性質について詳細な検討を行っており、学術的に貢献するところが大きく、また、肥満が危険因子である生活習慣病の発症メカニズム解明や治療薬開発にも活かす事ができると考えられる。よって博士(マテリアルサイエンス)の学位論文として、十分価値あるものと認める。