

Title	荷電脂質二重膜の溶液環境非対称性と塩添加による相分離挙動
Author(s)	郭, 婧宇
Citation	
Issue Date	2022-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/17765
Rights	
Description	Supervisor:高木 昌宏, 先端科学技術研究科, 博士

氏 名	GUO, Jingyu		
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 527 号		
学 位 授 与 年 月 日	令和 4 年 3 月 24 日		
論 文 題 目	Phase separation behavior due to solution environment asymmetry and salt addition for charged lipid bilayer membranes		
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
		高村 禅	同 教授
		藤本 健造	同 教授
		都 英次郎	同 准教授
		山口 拓実	同 准教授
		神谷 典穂	九州大学大学院工学研究院応用化学部門 教授

論文の内容の要旨

[Background]

Lipid rafts on biomembranes are thought to have essential functions in signal transduction in living organisms. The structure and function of lipid rafts are expected to contribute to the understanding of cellular functions. Phospholipids, the main components of biomembranes, spontaneously form lipid bilayer structures in water. The liposome, which is closed to the lipid bilayer, has attracted much attention as a model system because its structure is similar to that of biomembranes. Further, the phase separation formed in liposomes consisting of multicomponent phospholipids is helpful as a model system for raft formation studies. From this point of view, studies on phase separation at the liposome membrane surface have been conducted, and many studies have been researched to control the phase separation behavior by using electrically neutral phospholipid membranes.

However, considering the biological environment, the presence of charged lipids, the induction of phase separation under isothermal conditions, and the roles of metal ions and polyamines inside and outside the cell are all critical. Previous studies have reported phase separation of phospholipid membranes containing charged lipids by the addition of metal ions and phase separation induced by osmotic application of the hypotonic solution to neutral lipid membrane vesicles. In conjunction with these studies, we use a system that more closely resembles the biological environment, considering the effects of the presence of charged lipids, isothermal environments, variable temperature environments, the addition of metal ions and polyamines, and the valence of charged lipids.

[Objective]

In this thesis, we clarify the changes of phase separation on the DOPS/DPPC binary GUVs in a hypotonic solution under isothermal conditions. We investigated the formation of the phase separation of DOPS/DPPC/Chol ternary GUVs adding monovalent to pentavalent metal salts and amines at room temperature, 30°C, 40°C. Also, we discussed the effect of multivalent charged lipids on the membrane behavior based on line tension calculations.

[Results]

First, phase separation was induced by osmotic pressure on the GUVs, and a three-phase coexistence structure

was observed: a DPPC-rich phase, a negatively charged DOPS [DOPS(-)] phase, and a neutral DOPS [DOPS(N)] phase. The ionic dissociation of the DOPS head group was found to be essential for phase separation. Next, as the concentrations of metal ions and amines increased, phase separation formation was promoted. It was found that phase separation was more likely to occur at room temperature than at 30°C, 40°C. On the other hand, the concentration at which phase separation was induced significantly varied depending on the type of metal ions or amines. The concentration required for phase separation was temperature-sensitive for amines, which are linear chains. Last, confirmed that charged lipids decreased the domain line tension and that the addition of CaCl₂ suppressed the decrease in line tension. It was clarified that electrostatic interaction is involved in the decrease of line tension.

These experimental results suggest that the degree of ionization of charged lipids, osmotic pressure, temperature change, structure and concentration of added salts (especially metal ions and amines), and lipid valence significantly affect raft formation. Our findings may be helpful for the contribution of understanding the formation of ordered structures in living organisms and can be a model for charged lipid membrane.

Keyword: lipid; charged lipid; phase separation; osmotic pressure; salts; polyamines; line tension

論文審査の結果の要旨

当該博士研究では、生命活動における生体内のイオン環境や温度変化について考察する上で、生体モデル膜を実際の生体環境に近づける事を目指し、荷電脂質膜の相分離について多面的な実験を行っている。

脂質膜相分離形成において、荷電脂質が担う物理的な役割を明らかにし、相分離（ラフト）形成において荷電脂質による静電相互作用が持つ重要性に関する新たな知見とともに考察する事ができている。

第一章で研究背景を概観した後、第二章では、荷電脂質を含む脂質膜に対する荷電脂質の電離状態が相分離ドメインに与える影響を解明するため、等温条件下で、張力を加えた荷電脂質膜について実験を行った。相分離はリポソームに浸透圧を加えることによって引き起こされ、DPPC に富む相、マイナに帯電した DOPS 相[DOPS(-)]、および中性 DOPS 相[DOPS(N)]の三相共存構造が観察された。DOPS ヘッドグループのイオン解離は、相分離構造に重要であり、相分離に多様性がある事を明らかにした。

第三章では、金属イオンとアミン類（生命活動に重要なポリアミン類を含む）添加時における荷電脂質膜の相分離挙動について実験を行った。金属イオンやアミン類の濃度を上昇させるにつれて相分離形成の促進が観察され、40°Cや 30°Cと比べて室温のほうが相分離起きやすいことを明らかにした。一方で、相分離が引き起こされる濃度は、金属イオンやアミン類の種類によって大きく異なることが認められた。相分離を引き起こす濃度には、カチオンの構造と価数が関係し、直鎖の形を取るアミン類は相分離に必要な濃度が温度に対して敏感に応答する事、ポリアミン類は、温度の影響を受けにくい事等を明らかにした。

第四章では、多価の荷電脂質を用いた脂質膜の相挙動を観察し、相分離膜における荷電脂質の挙動とその価数の影響などについて考察を行った。ドメイン界面張力が荷電脂質により低下し、CaCl₂ を添加すると界面張力の低下が抑制されることが確認された。特に生命活動に於いて重要な役割を担う、Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) の静電相互作用が界面張力低下に関与することを明らかにした。第五章では、新たに得られた知見を総括するとともに、将来展望について述べている。

過去の膜相分離研究は、炭化水素間の相互作用に着目していたが、本研究では、ヘッ드의電離状態に着目している点で、ユニークで、これまでにない新たな知見を多く得る事ができている。

以上、本論文は、荷電脂質を含む膜についてラフト形成が静電相互作用によって制御されている可能性を強く示唆したものであり、学術的に貢献するところが大きい。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た。