

Visualizing the osmotic water permeability of a lipid bilayer under measured bilayer tension using a moving membrane method

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2021-07-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 矢野, 啓太 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/00028741

学位論文の要旨

※ 整理番号		ふりがな 氏名	やの けいた 矢野 啓太			
学位論文題目	Visualizing the osmotic water permeability of a lipid bilayer under measured bilayer tension using a moving membrane method (張力の計測下での脂質二重膜水透過性の可視化—移動平面膜法の開発)					
【研究の目的】						
<p>細胞膜を介する水輸送は生体内のあらゆる部位で行われている重要な生理学的過程である。脂質二重膜の水透過性を測定するための従来の方法は、リポソームや細胞を用いて浸透圧勾配に従った水の流入に伴う体積変化で水の移動を観察してきた。しかし、体積膨張によりそれを包む膜の緊張度（膜張力）が上昇し、この膜張力の増減により膜の水透過性が変化する可能性がある。また、脂質二重膜を隔てて水の透過が起こることにより、膜近傍には非攪拌層（Unstirred Layer：以下 UL）と呼ばれる層が形成される。これにより膜近傍での濃度勾配は実際よりも小さくなるため、水透過性が過小評価される原因となる。さらに細胞膜の場合はその内部構造として脂質二重膜の他、種々の膜タンパク質が含まれている。したがって、膜タンパク質の影響を受けない脂質二重膜そのものの水透過性や、單一種のチャネルの水透過性は細胞膜では測定し得ない。本研究は脂質二重膜そのものの水透過性と、そこに再構成されたチャネルの水透過性をそれぞれ区別して測定し、さらに膜張力のような膜の物理的特性も測定可能な方法を開発することを目的とした。</p>						
【方法】						
<p>ガラスキャピラリー内部に、脂質を含有した有機溶媒と任意の水溶液を、有機溶媒を水溶液で挟み込むように充填する。有機溶媒を吸引することで、水溶液同士の接触面に脂質二重膜が形成される。水が膜を透過すると水溶液コンパートメントの体積が変化する。この時、キャピラリーの一端を閉じておくと脂質二重膜はキャピラリー内を移動する。キャピラリー両側に配置した電極から脂質二重膜の膜静電容量を測定し、膜面積を算出する。脂質二重膜の移動速度と膜面積を用いて脂質二重膜の水透過係数を得る。また、膜に陽イオンチャネルであるグラミシジンAを導入し、それを用いてULによって生じる浸透圧誤差を補正することでより正確な水透過係数を得ることができる。さらに、脂質二重膜に電圧をかけ、膜同士の接触角の変化から膜張力を算出する。</p>						
<p>膜に再構成されたチャネルの水透過性を測定する方法として、膜電位を測定しながら溶液にイオンチャネル（本研究ではグラミシジンA）を添加し、膜電位の変化と水透過性の変化を測定する。膜電位測定により膜に導入されたイオンチャネルの個数を算出し、任意のイオンチャネル1分子あたりの水透過性を測定する。</p>						
【結果】						
<p>膜張力は $2.01 \pm 0.14 \text{ mN/m}$ であった。また、ULは最大 5%であり、従来の報告では過小評価していた。これらの条件の下で測定した脂質二重膜の水透過係数は $35.0 \pm 0.15 \mu\text{m/s}$ であった。脂質二重膜にコレステロールを添加して同一の実験を行なったところ、水透過係数は $26.2 \pm 0.31 \mu\text{m/s}$ と低下し、膜張力は $1.44 \pm 0.16 \text{ mN/m}$ に低下した。また、グラミシジンA1分子あたりの水透過量は $2.66 \pm 0.39 \times 10^{-14} \text{ cm}^3/\text{s}$ であった。</p>						
【考察】						
<p>本研究で評価された脂質二重膜の水透過係数は膜張力 2.0 mN/m という条件での値である。膜張力測定下で脂質二重膜の水透過性を測定したのは本研究が初めてである。</p>						
<p>本法はキャピラリー内に脂質二重膜を作成し、脂質二重膜を介した水透過を膜の移動距離として一次元的に可視化し、さらに電気生理学的手法を用いてULの補正も同時にを行うことで、正確</p>						

な水透過性を測定することができた。また、同じ実験系で膜張力の測定も行うことができた。

本研究では、グラミシジン A の水透過性の測定にも成功しており、今後アクアポリンの水透過性測定にも活用が期待できる。

また、本法の原理はシンプルであり、電解質溶液のキャピラリーへの充填や過剰な油分の吸引などの手順を自動化することができ、複数のガラス管を並列に配置することで、測定の効率を向上させることができる。

【結論】

脂質二重膜の水透過を可視化し、その物理的特性を明らかにするための新しい手法を開発した。本研究において初めて膜張力測定下で脂質二重膜の水透過性測定を行うことが可能となつた。本法はアクアポリンをはじめとしたチャネルの性質を明らかにする方法となりうる。

備考 1 ※印の欄は、記入しないこと。

- 2 学位論文の要旨は、和文により研究の目的、方法、結果、考察、結論等の順に記載し、2,000 字程度にまとめタイプ等で印字すること。
- 3 図表は、挿入しないこと。