# **Accounts of Materials & Surface** Research

# Effect of *n*-Alkane on Bilayer Structure and Dynamics in Nanoscales **Observed by Neutron Scattering**

Hatsuho Usuda<sup>a,b\*</sup>, Mafumi Hishida<sup>b</sup>, Michihiro Nagao<sup>c,d</sup>

a. Nanomaterial Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8565

b. Department of Chemistry, Faculty of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8571

c. Center for Exploration of Energy and Matter, Indiana University, Bloomington, IN, USA d. Department of Physics and Astronomy, University of Delaware, Newark, DE, USA \*hatsuho.usuda@aist.go.jp

Bilayers, formed as a stack of two monolayers, exhibit distinct dynamics from the monolayers. Especially, bilayer features as a stack appear when accessed nanometer and nanosecond scales. Here, based on neutron scattering experiments, we demonstrate that an incorporation of *n*-alkanes into 1,2-dipalmitoyl-snglycero-3-phosphocholine (DPPC) bilayers significantly alters the structure and dynamics of the bilayers. Relatively long alkanes condense on the central plane of the bilayers which reduces the interleaflet coupling of the two leaflets. The change in the internal membrane dissipation modifies dynamics of the bilayers; a bilayer softening is observed despite a thickening of the bilayers. By accessing nanoscale structure and

dynamics, insights of membrane dynamics are advanced.

Keyword: bilayer membrane, phospholipid, neutron spin echo, interleaflet coupling, neutron scattering

Hatsuho Usuda received her Ph. D in Science from University of Tsukuba in 2020. She started working as a researcher at National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) in 2020. Her research interests include thermodynamics and mechanical properties of nanomaterials.

Mafumi Hishida received Ph.D from Department of Physics, Kyoto University (2009). He moved to iCeMS Kyoto University (2009-2011) as a WPI researcher, and moved to Department of Chemistry, University of Tsukuba (2011-) as an Assistant Professor. His research interest is self-assembly mechanisms of soft matter.

Michihiro Nagao received his Ph. D. in Physics from the University of Tokyo in 2001. He was a research associate at Institute for Solid State Physics, the University of Tokyo from 1997, then moved to the NIST Center for Neutron Research in 2006. He was a Staff Scientist at Indiana University from 2006, an Associate Scientist from 2012 and a Senior Scientist from 2019 at Center for Exploration of Energy and Matter, Indiana University. He is also an Affiliated Associate Professor at Department of Physics and Astronomy, University of Delaware from 2020. His research interests are structure and dynamics of soft materials especially by means of neutron scattering.





# 中性子散乱で観る *m*アルカン添加が 膜のナノスケールの構造と運動に与える影響

臼田初穂 <sup>«ь\*</sup>、菱田真史<sup>ь</sup>、長尾道弘 <sup>«.d</sup> a. 産業技術総合研究所、b. 筑波大学、c. インディアナ大学、d. デラウェア大学

## 1. 二分子膜のダイナミクス

界面活性剤やリン脂質などの両親媒性分子を 水中に分散させると厚さ数 nm の二分子膜を形 成する。二分子膜は膜平面に垂直な方向には 二分子だが、平面方向には無限に広がる。二 次元流体と呼ばれることもある二分子膜は、動 植物の細胞膜の基本構造であり、化粧品や洗 剤中にも存在する身近な構造体である。温度変 化に伴うアルキル鎖の構造変化により、固体膜 や液体膜及びそれらの状態間の相転移も知ら れている。固体状の膜は固く、分子のアルキル 鎖が二次元方向に配列秩序を持つ(ゲル相)。 この配列秩序は、ある温度(主転移温度)より高 くなると乱れ、二次元方向に流動的な液晶相に 相転移する。液晶相では、分子配列が乱れて いるため、二分子膜のダイナミクスはゲル相に 比べて速くなり、実験的なダイナミクスの観測が 容易になる。本稿では、液晶相における膜の構 造とダイナミクス、特に nm スケールの膜全体の 運動に焦点を当てる。分子レベルからマクロな レベルまで階層的に存在するダイナミクスのうち、 nm スケールの運動は生体膜と膜タンパク質の 相互作用とも関連しており、物質輸送や情報伝 達、分子認識に影響していると考えられている<sup>1)</sup>。

二分子膜のダイナミクスは分子 1 個の運動か ら膜全体の協同的な運動あるいは膜同士の融 合や分離など多岐に渡る。nm スケールの協同 的な膜全体の運動として我々が注目するのは 曲げゆらぎと厚みゆらぎである(Fig. 1)<sup>2)</sup>。曲げ ゆらぎは膜の片面が伸び、反対側が圧縮される という動きが時間的に、また空間的にも繰り返さ れるという運動である。位相差顕微鏡を用いて 二分子膜からなる直径 20 µm 程度の小胞を観 察すると、焦点面の膜のゆらぎが見られる<sup>3)</sup>。あ る時刻におけるゆらぎの振幅の角度自己相関 関数を求め、それぞれのゆらぎモードに分解す



thickness fluctuation

**Figure 1** Bending and thickness fluctuations of the bilayers.

ることで、膜の硬さを表す曲げ弾性係数を求め ることができる。しかし、顕微鏡観察からは、µm 以下のゆらぎ運動をとらえることはできない。一 方、厚みゆらぎはぜん動モードとも呼ばれ、膜 が平均の厚みよりも厚くなったり薄くなったりする 運動である。厚みゆらぎも振幅が数 nm、緩和時 間が数百 ns と空間的・時間的に観測しにくいス ケールのダイナミクスである。このような他の手 法では観測が難しい nm スケールの運動も、中 性子スピンエコー(NSE)法を用いると、測定す ることができる<sup>4</sup>。

曲げゆらぎや厚みゆらぎなどの協同運動は、 膜の物性と直接関連づけられる。厚みゆらぎの 振幅や緩和時間は圧縮率や膜内外の粘性率 に依存する。一方、曲げゆらぎの振幅や緩和時 間は、膜全体の曲げ弾性や面積圧縮率だけで なく、2枚の単分子膜同士のカップリング(滑り やすさ)によって変化する。すなわち、2枚の単 分子膜同士が摩擦なく滑るのであれば、それぞ れが独立してゆらぐ膜と捉えられるし、摩擦が非 常に大きくカップリングが強いのであれば、2枚 の膜は一体となった1枚の膜としてゆらぐであろ う。機械物理学的には、2枚の弾性板が密着し て滑らない(完全カップリング)場合と摩擦の影 響なく自由に滑る(完全デカップリング)場合と では曲げ弾性係数が4倍異なることが計算され ている。この考察との類推により、二分子膜にお いても2枚の単分子膜が滑りにくい(カップリン グが強い)ほど曲げ弾性係数が大きくなり、膜平 面に垂直な方向への曲げゆらぎが小さくなると 予想される。

この単分子膜同士のカップリングについては、 観測の難しさから、これまでほとんど研究されて きていないのが現状である。一方本稿で我々は、 NSE を用いて膜の厚みゆらぎを観測することで カップリングに関する情報を知ることができること を示す。まずはシンプルな系でその特徴を捉え ることが重要であると考え、我々はリン脂質膜に 対する添加物の効果に注目した。添加物として 特に、長さの異なる直鎖アルカンを用いた。これ は、次に示すように、長さの異なるアルカンを添 加することで、系統的に膜の物性を変化させら れることが分かっていたためである。

### 2. 添加物の効果

DPPC 膜をはじめとするリン脂質膜は生体膜 の基本構造であるから、これまでコレステロール などの生体分子の添加効果が個々に調べられ てきた 5)-11)。 筆者 12)-18)らも、 転移温度や分子充 填などの膜の物理化学特性に添加物が影響す ることを系統的に明らかにしてきた。特に、添加 分子の分子形状に注目して研究を進めてきて おり、アルカンをはじめ、かさ高い化合物も添加 して、膜の構造や相挙動といった膜物性に与え る影響を調べてきた<sup>12)-18)</sup>。たとえば n-アルカン 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine を (DPPC) 膜に等量添加した場合、鎖長が長いほ ど主転移温度を上昇させ、ゲル相におけるアル キル鎖の充填を密にする<sup>14)</sup>。また、末端官能基 が異なる n-テトラデカン誘導体を添加した際に も、化学種によらずアルカンと同様に主転移温 度を上昇させ、ゲル相での充填を密にすること も見出している。これらの直鎖分子の効果はコ ア状分子であるコレステロールとは正反対であ る。そこでさらに、同一分子内にコアと直鎖を持 つ分子を添加する研究も行い、直鎖分子の割 合が大きくなるほど、コア部分の添加効果が打 ち消されることも見出した 15)。

すなわちこれらの結果から、添加効果は、分子が直鎖状であるかコア状であるかといった分子形状や、その長さに系統的に依存することを示してきている。このことから、添加物が脂質膜のダイナミクスや機械物性に与える効果も分子形状に依存するのではないかと考えられる。そこで、本研究でも、分子形状として鎖長に注目し、最も単純な形状の化合物である n-アルカンを用いて、添加効果の鎖長依存性を調べた。n-アルカンとして、n-オクタン(C8)、n-デカン(C10)、n-ドデカン(C12)、n-テトラデカン(C14)を、脂質膜として、DPPCを用いた<sup>19</sup>。

### 3. 二分子膜の中性子散乱測定

中性子散乱実験の一つの特徴は、軽水素と 重水素の中性子散乱振幅密度(scattering) length density; SLD)が大きく異なることを利用し て、測定試料に及ぼす物理的な影響を最小化 しつつ、特定部位にコントラストを与えることであ る。溶媒と溶質の間にコントラストをつけることは もちろん、分散質の内部構造にもコントラストを つけられる。例えば、一般的なリン脂質と水の場 合、膜の電子密度分布は Fig. 2a のようになる。 X 線は試料の電子密度分布に依存した散乱プ ロファイルを与えるため、コントラストの大きな親 水基間の距離を同定するのに優れている20)。一 方、中性子散乱の場合は原子核との相互作用 により散乱が起きるため、電子密度分布ではな くSLDを考慮する。二分子膜に添加したアルカ ンの分布を知りたい場合には Fig. 2b のようにア ルカンのみ重水素化した試料を用いればよい。 また、軽水素からなる膜を重水中に分散させる ことで膜全体の構造と運動を観測できる(Fig. 2c)。あるいは、膜の疎水領域のみ重水素化し て重水中に分散させた場合には、親水領域の 相関が特異的に観測される(Fig. 2d)。たとえば、 厚みゆらぎを観測したい場合には、このようにし て親水基同士の相関のダイナミクスを追えばよ いことになる。

二分子膜を水中に分散させると、端の疎水領 域が水に触れるのを避けるため、シャボン玉の ように閉じた構造を形成する。その際にまず形 成するのは膜が玉ねぎ状に重なった多重膜小



**Figure 2** (a) The electron density (ED) profile of protiated bilayers in H<sub>2</sub>O. The scattering length density (SLD) profiles of (b) bilayers composed of protiated DPPC and deuterated *n*-alkanes in D<sub>2</sub>O, (c) fully protiated bilayers in D<sub>2</sub>O, and (d) the bilayers composed of tail-deuterated lipid and deuterated *n*alkanes in D<sub>2</sub>O. Black and red portions of the molecules are protiated and deuterated parts, respectively. <sup>19</sup>

胞である。一方で、膜同士の相互作用を避け、 一枚の膜の構造とダイナミクスを観測するため には、水中に分散させたリン脂質が一枚膜小胞 を形成するような調製方法が必要となる。多重 膜小胞を 100 nm の穴が開いた膜フィルターか ら押し出すと、一枚膜小胞が形成する。この作 業は液晶相で行う必要がある。DPPC の場合、 41 ℃ が主転移温度なので<sup>21)</sup>、それよりも十分 高い温度で押し出せば、一枚膜小胞を形成さ せることができる<sup>22)</sup>。

# 4. 長さの異なる *n*-アルカン添加時の二分子膜の 構造

添加した *n*-アルカン分布や膜構造の変化は、小角 X 線散乱(SAXS)と小角中性子散乱(SANS)を用いて調べることができる。

Fig. 3a は DPPC/*n*-アルカン膜(DPPC:*n*-アル カン = 6:4 (mol:mol))を軽水中に分散させた 試料(Fig. 2a)の SAXS プロファイルである。横 軸は  $q = 4\pi \sin\theta \lambda$ であり、 $\lambda$ は入射中性子の波長、 2 $\theta$ は散乱角である。図には小角散乱解析ソフト、

Acc. Mater. Surf. Res. 2020, Vol.5 No.5, 171-182.



**Figure 3.** (a) SAXS profiles of DPPC and DPPC/*n*-alkane (DPPC: *n*-alkane = 6:4 (mol:mol)) bilayers in H<sub>2</sub>O at 54 °C. Error bars represent ±1 standard deviation, and the 95% confidence intervals are 1.96 times of the error bars throughout the paper. Solid lines: fitting results. (b) Plot of  $d_c$  obtained from fitting to the SAXS profiles. Broken line:  $d_c$  of the pure DPPC bilayer. Dotted lines: calculated  $d_c$  assuming that all the incorporated *n*-alkane locates in the central plane of the bilayers.<sup>19</sup>

SASView<sup>23)</sup>を用いて Fig. 2a に示した電子密度 分布プロファイルを仮定してフィットした結果を 実線で示してある。フィットは良好で、求められ た膜の厚み ( $d_c$ )を Fig. 3b に示した。添加した n-アルカンの長さが長いほど  $d_c$ が大きくなることが わかるが、無添加膜 (pure) との違いはあまり顕 著ではない。

ここで、アルカンの膜中での分布は二通りの可能性があることに気が付く。すなわち、アルカ

ンがリン脂質のアルキル鎖と平行に並ぶ場合 (Fig. 4a)と、二枚の単分子膜の間に挟まれる場 合(Fig. 4b)である。Fig. 3b の点線の斜線は添 加アルカンがすべて膜の中央平面に分布する と仮定した場合の d。の計算値である。添加アル カンの分子体積の増加に伴う厚み変化が予想 されるが、測定値が計算値よりも低いことから、 添加アルカンの大部分が中央平面に凝集せず、 リン脂質分子に平行に並んでいると考えられる。

より詳細な添加アルカンの配置を調べるため、 中性子小角散乱(SANS)によるコントラスト変調

# (a) $\begin{array}{c} (b) \\ (b) \\ (c) \\$

**Figure 4.** (a) *n*-alkanes aligned parallel to the lipid molecules. (b) *n*-alkanes located on the central plane of the bilayer.

実験を行った。Fig. 2b に示したように、H 体のリ ン脂質に D 体のアルカンを添加して測定した SANS 結果を Fig. 5a に示した。Fig. 5a には SANS とともに、Fig. 5b に示すような二種類の添 加アルカン分布を考慮した場合の計算結果も 示した。実線はアルカンが膜中心面に凝集した 場合(Fig. 5b の上側)、破線は膜内の一様分布 (Fig. 5b 下側)の場合である。

Pure 及び C8 の場合、破線と実験が比較的良 い一致を示し、アルカンが脂質分子に平行に分 布しているモデルが良いことがわかる。一方、 C10やC12のように鎖長が長い場合には、アル カンが中央平面にも分布しているモデル(実線) とよく合う。このことから、添加アルカンの鎖長が 長い場合には、アルカンが膜の中央平面にも分 布する割合が高くなることがわかった。添加アル カンが中央平面に分布すれば、潤滑剤としての 役割を果たし、2枚の単分子膜のカップリングが 緩くなることが期待される。2枚の単分子膜間の カップリングが小さくなれば、膜が曲げやすくな り曲げ弾性係数も小さくなると考えられる。この 仮説を検証するために、中性子スピンエコー (NSE)測定により膜の運動を調べた結果を次 節に紹介する。



**Figure 5.** (a) SANS profiles of DPPC and (protiated DPPC): (deuterated *n*-alkane) = 6:4 (mol:mol) bilayers in D<sub>2</sub>O at 54 °C. Solid and broken lines correspond to the models at the top and bottom in (b), respectively. (b) SLD of bilayers consist of protiated DPPC and deuterated *n*-alkanes (red) in D<sub>2</sub>O.<sup>19</sup>

# 5. 中性子スピンエコー(NSE)法を用いた二分子 膜のダイナミクスの観測

NSE がカバーする時間空間スケールはÅか ら 10 nm、ps から 100 ns の領域である。この範 囲では、脂質膜のダイナミクスのうち、脂質分子 の協同運動である曲げゆらぎと厚みゆらぎを観 測することができる <sup>4)</sup>。NSE では散乱則  $S(q, \omega)$ のフーリエ変換として中間散乱関数 I(q, t)を直 接測定する。これらの物理量は時間空間相関 関数 G(r,t)と同等であり、物質の構造と運動を相 関関数として記述する。 $\omega$ は中性子と試料との 間で交換したエネルギーで、tは NSE に特徴的 なフーリエ時間である。I(q, t)は無限に薄い弾性 膜を考慮した場合、Helfrich のモデル<sup>24)</sup>に基づ いて単一膜の曲げゆらぎを記述した Zilman と Granek のモデルにより次のように表される<sup>25)</sup>。

$$\frac{l(q,t)}{l(q,0)} = \exp\left[-(\Gamma t)^{\frac{2}{3}}\right] \quad \text{Eqn. 1}$$

Γは中間散乱関数の緩和係数である。有限の 厚みがある膜では曲げにより膜の表と裏で密度 差が生じる(一方の面は拡張され、他方は圧縮 される)。このような密度差は長距離及び長時間 の観測スケールでは問題とならないが、分子ス ケール及び短時間で観測を行う場合には結果 に影響を及ぼす。すなわち、密度差を解消する ような分子の再配置を考慮する必要がある。 SeifertとLanger<sup>26)</sup>によって提案されたこのような 密度緩和はWatsonとBrownによってNSEの 解析モデルに拡張され<sup>27)</sup>、さらに本稿の著者 の一人でもあるNagaoらが理論的考察を加え、 緩和速度Γを次のように表した<sup>28),29)</sup>。

$$\frac{\Gamma}{q^3} = 0.0069 \sqrt{\frac{k_{\rm B}T}{\kappa} \frac{k_{\rm B}T}{\eta}} \quad \text{Eqn. 2}$$

k<sub>B</sub>Tは熱エネルギー、κは膜の曲げ弾性係数、η は溶媒の粘性である。

一方、弾性膜モデルでは、膜が曲げられる際の密度変化は、2つの面のエネルギーが等しいとすることにより、κと面積圧縮率 K<sub>A</sub>の関係に帰結される。

$$\kappa = \frac{K_{\rm A}}{\beta} d_{\rm c}^2$$
 Eqn. 3

 $\beta$ は 2 枚の単分子膜のカップリング定数であり、 カップリングの程度を表す。 $\beta$ が大きいほど 2 枚 の単分子膜のカップリングが弱く、滑りやすい。 κと d。は NSE と SAXS あるいは SANS によって 定量することができるので、 $K_A$  を定量することが できれば、 $\beta$ の変化について言及できる。

統計力学的に、 $K_A$ は面積の微小変化  $\sigma_A = \Delta A / A$ に関連付けられ、下記のように表される<sup>30)</sup>。

$$K_{\rm A} = \frac{k_{\rm B}T}{\sigma_{\rm A}^2 A_0}$$
 Eqn. 4

 $A \ge A_0$ はそれぞれ膜の単位面積と単分子面積 である。体積圧縮率を無限小とすると( $V=Ad_c$ ,  $\Delta V/V \approx \Delta A/A + \Delta d_c/d_c \approx 0$ , Vは体積)、 $\sigma_A$ は厚 みの微小変化 $\sigma_a$ と等しくなる。すなわち、 $\sigma_a^2 = \sigma_a^2 = (\delta d_c/d_c)^2$ であり<sup>30),31)</sup>、面積圧縮率は厚みの 微小変化と関連づけられる。これらの関係を用 いると、二分子膜の親水領域にコントラストをつ けた試料(Fig. 2d)のNSE 測定により、膜の厚み ゆらぎが観測可能であり、 $K_A$ を見積もることがで きる<sup>28)</sup>。それによると、親水領域にコントラストを つけた試料をNSE で測定すると、Γに Eqn. 2 で 表される $q^3$ 依存性から外れた領域が現れる<sup>4),32)-<sup>37)</sup>。この $q^3$ 依存性からの差は、膜の厚みゆらぎ によるものと解釈される。この場合、Γは曲げゆら ぎと厚みゆらぎの重ね合わせとして、現象論的 に次のように表される<sup>28),29</sup>。</sup>

$$\frac{\Gamma}{q^3} = 0.0069 \sqrt{\frac{k_{\rm B}T}{\kappa} \frac{k_{\rm B}T}{\eta}} + \frac{(\tau_{\rm TF}q_0^3)^{-1}}{1 + (q - q_0)^2 \xi^2} \quad \text{Eqn. 5}$$

右辺第一項は曲げゆらぎに由来し、Eqn.2 と等しい。第二項のローレンツ関数は膜の厚みゆらぎに由来し、 $\tau_{FF}$ は厚みゆらぎの緩和時間、 $\xi^{1}$ は厚みゆらぎの振幅と比例関係にある。 $q_{0}$ は膜の厚みの逆数( $q_{0}=2\pi/d_{c}$ )によって決まる。これは先に示したように同じ試料の SANS で得られる散乱プロファイルから見積もることができる。

厚みゆらぎの項に含まれているパラメータ *ξ*<sup>1</sup> と 膜の厚みの微小変化は次のように表される<sup>28)-30)</sup>。

$$T_{\rm d} = \frac{\delta d_{\rm c}}{d_{\rm c}} = (q_0 \xi)^{-1} \quad \text{Eqn. 6}$$

したがって、実験的に測定される *q*oをと *K*A を関 連付けられる。

$$q_0 \xi = \sqrt{\frac{K_A A_0}{k_B T}} \propto \sqrt{K_A}$$
 Eqn. 7

このようにして計測した圧縮率を用いて、Eqn.3 を通してカップリング定数に言及可能であること がわかる。NSE を用いた曲げゆらぎと厚みゆら ぎの観測により、二分子膜の機械物性について 多くの情報を得ることができる。

# 6. 長さの異なる *n*-アルカン添加時の二分子膜の ダイナミクス

では、実際に得られた実験データを見てみよう。まず、曲げ弾性係数 κを求めるために曲げゆらぎを解析した。曲げゆらぎ解析用の試料は、

主に軽水素からなる一般的な DPPC/アルカン膜 (DPPC: n-アルカン = 6:4 (mol:mol))を重水中 に分散させることにより、膜全体にコントラストを つけたものである (SLD プロファイルは Fig. 2c に 相当する)。この試料の NSE 測定で得られる に 12 に従うはずである。

Fig. 6a のプロットは C8 を添加した DPPC 膜 の NSE 測定で得られた I(q, t)/I(q, 0)である。 Zilman と Granek の理論 <sup>24)</sup>とよく合っている。こ の結果は、二分子膜がアルカンを含んでいる場 合でも、これまで単成分膜に使われてきた理論 が適用可能であることを示している。各 q ごとに Eqn. 1 でフィッティングして得られたFをプロット したものが Fig. 6b である。C10, C12, C14 を添加 した DPPC 膜についても同様に解析した。Fは Eqn.2 による予想の通り、すべて直線状の  $q^3$  依 存性を示した。

このフィッティングで求めた reg. 6c に丸い シンボルで示した。κは添加アルカンの鎖長が 長いほど小さくなる。これは添加アルカンの鎖長 が長いほど膜が曲げやすくなったことを意味す る。C8 を添加した場合は DPPC 単成分膜よりも кが大きく、膜が硬くなる。一方で、C10 よりも長 いアルカンを添加した場合は、DPPC 単成分膜 よりも柔らかくなっている。構造観測で見た(Fig. 2b)ように、添加アルカンを加えると、その鎖長 が長いほど膜の厚みは大きくなる。Eqn. 3 に示 すような d.とKの関係からも明らかなように、一般 に、膜の厚みが大きくなると膜は曲げにくくなる はずである。すなわち、アルカンを添加した DPPC 膜では一般的に成り立つ厚みと弾性率 の関係が成り立たない。仮に、KAとBを一定と仮 定し、 $\kappa \propto d_c^2$ の関係を用いて計算した $\kappa$ が Fig. 6c の四角のプロットである。実験値とは逆の傾 向を示しており、アルカンの添加により KA また はβに変化があることが明確である。

4 節で述べたように、厚みゆらぎを解析するこ とにより K<sub>A</sub> の変化を見積もることができる。厚み ゆらぎ解析用の試料は Fig. 2d に示す SLD プロ ファイルを持つように、アルキル鎖重水素化 DPPC と重水素化アルカンを重水中に分散させ、 親水基にコントラストを付けたものである。重水と 疎水領域の SLD を等しくするために、軽水素か



**Figure 6.** (a) Intermediate scattering function of the protiated DPPC:C8 (6:4 mol:mol) bilayers in D<sub>2</sub>O at 54 °C. Solid lines: the fits by Eqn. 1. (b) The *q* dependence of  $\Gamma$  for the fully protiated samples (DPPC : *n*-alkane = 6 : 4 (mol : mol)) at 54 °C. The solid lines are the fit results by Eqn. 2. (c) Circles: Experimentally determined  $\kappa$  at 54 °C. Squares: Calculated  $\kappa$  based on the measured change in bilayer thickness. <sup>19</sup>



**Figure 7.** (a) l(q,t)/l(q,0) of tail-deuterated DPPC with deuterated C10 (6/4 mol/mol) bilayers in D<sub>2</sub>O measured by NSE at 50 °C. Solid lines : Fits by Eqn 1. (b) The *q* dependence of  $\Gamma/q^3$  for the hydrophilic-group-highlighted bilayers (DPPC : *n*-alkane = 6 : 4 (mol : mol)) at 50 °C. Solid lines: Fitting results of Eqn. 4. Pure: The case of the pure DPPC bilayers<sup>28</sup>. (c)  $\xi q_0$  of the *n*-alkane incorporated DPPC bilayers at 50 °C.<sup>19</sup>

らなる DPPC とアルカンも少量用いられている。 重水素化された脂質膜の相転移温度は軽水素 の場合と比べて 4 ℃ 低くなることが知られてい る <sup>38)</sup>。また、膜の機械物性は主転移温度との温 度差依存性がある <sup>39)</sup>。そのため本実験では、測 定温度と主転移温度との差を等しくするために、 厚みゆらぎ解析用試料の NSE 測定は曲げゆら ぎ解析用試料の場合よりも 4 ℃ 低い 50 ℃ で 測定された。

Fig. 7a のプロットは C10 を添加した DPPC 膜 の NSE 測定で得られた I(q, t)/I(q, 0)である。曲 げゆらぎ解析用試料の結果と同様、Zilman と Granek の理論 <sup>25)</sup>を用いて解析した。Fig. 7a の 各 q に Eqn. 1を用いて求めた $\Gamma e q^3$ で除したも のが Fig. 7b の紫色のプロットである。C8, C12, C14を添加した DPPC 膜についても同様に解析 し $\Gamma/q^3$ を得た。観測されたダイナミクスがすべて 曲げゆらぎに由来するならば、 $\Gamma$ は $q^3$ に比例し、

 $\Gamma/q^3$ は q に対して一定となる。しかし、添加アル カンが C8 以外の場合は q0 = 0.07 Å-1 付近にピ ークが見られる。C10, C12, C14 で比較すると、 添加アルカンの鎖長が長いほど、ピークが低 g 側に観測される。このピークは膜の厚みゆらぎ に起因していると考えられピーク位置は膜厚に 対応しているので、位置の変化は、添加アルカ ンの鎖長が長いほど膜の厚みが大きくなることと 整合している。C8 の場合にピークが見られない 原因として考えられるのは、ピークがブロードに なった( $\xi^1$ の増加)か、ピークが小さくなった( $\tau_{\rm TF}$ の増加)可能性が考えられる。C8 を添加した系 で比較すると、厚みゆらぎ解析用試料のΓ/ q<sup>3</sup>の 平均値は 13 Å<sup>3</sup> ns<sup>-1</sup> である(Fig. 7b)のに対し、 曲げゆらぎ解析用試料 $\Gamma/q^3$ の平均値は9Å<sup>3</sup> ns<sup>-</sup> 1である。この差は緩和時間の差を示唆し、ピー ク幅( $\xi^1$ )が大幅に増加した可能性を示している。 しかし、今回の測定データからは定量的な議論

は不可能である。

Fig. 7b の C8 以外のデータについて Eqn. 4 でフィッティングした結果が実線である。qo とκは それぞれ厚みゆらぎ解析用試料の SANS と曲 げゆらぎ解析用試料の NSE 測定から得られた 値を用いている。フリーパラメータはξ<sup>1</sup>とτ<sub>TF</sub>であ る。フィッティング結果はξ qo として Fig. 7c に示 した。Eqn. 5 からわかるようにξ qo は厚みゆらぎ の振幅の逆数に比例する。つまりξ qo が小さい ほど膜の厚みゆらぎの振幅は大きい。Fig. 7c は、 添加アルカンの鎖長が長いほど、厚みゆらぎの 振幅が小さくなることを示す。

Eqn. 7からわかるようにξq₀の増加はK<sub>A</sub>の増加、つまり膜が平面方向に圧縮しにくくなることを意味する。Eqn. 3 にしたがってκの傾向とも矛盾無く説明するには 2 枚の単分子膜のカップリング定数βが増加しなければならない。βが大きくなったことは 2 枚の単分子膜のカップリングが弱くなることを意味する。これは、添加アルカンの鎖長が長いほど膜の中央にアルカンが分布するというミクロスコピックな構造変化とも整合す

る。2 枚の単分子膜間に分布するアルカンが潤 滑剤のような役割を果たして単分子膜間のカッ プリングを弱く、滑りやすくすると考えられる。こ れにより、膜はより曲げやすくなると解釈できる のである。

#### 7. 結論

本稿では、主に中性子散乱実験の結果を用 いて、二分子膜の構造とダイナミクスに添加ア ルカンが与える影響を説明した(Fig. 8)。構造に ついては重水素化された試薬を用いてコントラ ストをつけた試料の SANS プロファイルから、添 加アルカンの膜内分布を説明した。添加アルカ ンの大部分は DPPC 分子と平行に配列するが、 鎖長が長い n-アルカンほど、膜の中央平面にも 分布する割合が大きくなる。膜の機械物性とダ イナミクスは、曲げゆらぎ解析用と厚みゆらぎ解 析用の試料の NSE 結果から説明した。添加ア ルカンの鎖長が長いほど膜の厚みが大きくなる 一方で、膜は柔らかくなるため、一般的な厚みと 弾性率の傾向とは矛盾する。しかし、厚みゆら



**Figure 8.** Schematic illustration of collective membrane fluctuations as well as potential internal dissipation, namely interleaflet coupling, in lipid vesicle systems. These fluctuations and internal dissipation are significant in nanometer and nanosecond scales, which are accessible by means of neutron spin echo spectroscopy.

ぎの振幅から膜の面積圧縮率の傾向を捉え、 薄膜弾性モデルを考慮することにより、添加ア ルカンの鎖長が長いほど、2枚の単分子膜のカ ップリングが弱まることがわかった。中性子スピ ンエコー法は nm スケールでの膜の運動を観測 するのに適した手法であり、膜内の散逸機構に 敏感である。その特徴が 2枚の単分子膜のカッ プリングの議論を可能にする。中性子散乱実験 により、二分子膜のミクロスコピックな構造とメソ スケールの運動の関連性を明らかにすることが できた。

### 8. 中性子散乱実験の実際

本稿で見たように、中性子散乱法は膜の構造 と運動を観測する手法としてユニークかつ有用 である。特に、厚みゆらぎの実験的測定は現在 のところ NSE によってのみ可能である。しかしな がら、中性子を取り出すためには原子炉におけ る核分裂反応あるいは加速器による核破砕反 応を制御する必要があり、現状では中性子散乱 実験のほとんどはラボスケールでは困難で、大 型の施設で行われる。(注、現在小型中性子源 の開発と設置が国内外で盛んに議論されており、 日本国内でもすでに数カ所の利用が可能であ る。今後は両者の中性子源を目的に応じて使 い分ける時代が来ると考えられる。)このような施 設は先進各国に一ヶ所から数カ所以内に限ら れるため、実験を行うためには実験課題申請を 行い、審査の末にビームタイムと呼ばれる実験 時間が供与される。測定データを公開する場合、 利用料は無料であるが、実験施設への旅費は 必ずしも提供されない。

例えば、構造観測に有用な中性子小角散乱 装置は各大型施設に必ず設置されており、ほと んどの場合、日本国内の装置で十分な実験が 可能である。しかしながら、中性子スピンエコー 法に至っては世界に 10 台に満たない装置しか 稼働していない。日本国内では、日本原子力研 究所の改造 3 号炉に東大物性研が有する iNSE が運用可能で、J-PARC に高エネ研と京 大が共同開発中の VIN-ROSE があるが、iNSE は東日本大震災以来稼働停止中である。その ため、2020 年現在、本格的な NSE 実験は海外 で行うしかない。本実験は、米国標準技術研究 所(NIST)に設置した NGA-NSE 装置を用いて 測定を行ったのだが、この装置は元々ドイツの ユーリッヒ研究所で開発されたものを米国に運 んでいる。NSE 法については、その発祥から開 発に至るまで長くヨーロッパが牽引してきた。そ の中で、日本の装置は iNSE も VIN-ROSE もそ の開発は海外からはある程度独立しており、ヨ ーロッパ以外で NSE が開発されているのは日 本をおいて他にない。

さて、話を戻して、NIST はワシントン DC 郊外 のメリーランド州ゲイザースバーグ市にあり、緑 豊かな広々としたキャンパスと、膜や高分子など のソフトマター研究を行うのに有利な中性子散 乱装置がラインナップしている。試料調整室や 簡単な試料キャラクテリゼーション装置群及び ユーザー控え室が中性子散乱実験ホールと隣 り合わせになっており、試料の調整から実験、 解析が淀みなく行える。また、装置担当者のオ フィスも隣り合わせに並んでおり、オープンな場 所で議論も盛んに行われている。世界的に見て も大変素晴らしい実験環境である。

### 9. 謝辞

本研究の共同研究者である齋藤一弥教授、山 村泰久准教授、Elizabeth. G. Kelley 博士に改め てお礼申し上げる。

NSE Spectrometer を用いた測定は、米国 NIST と National Science Foundation との契約 (No. DMR-1508249)に基づき Center for High Resolution Neutron Scattering にて行った。本研 究は、JSPS 科研費助成番号 JP18J12652 (HU)、 JP18K0355 (MH) および JP19H05717(MH)、 NISTからの協力協定 70NANB15H259 (MN)の 補助を受けて行った。米国 NIST で実施された SANS および NSE 実験の旅費は、東京大学物 性研究所中性子散乱実験用の一般ユーザー プログラム(提案番号 18560 および 17902)の支 援をいただいた。

Fig. 2, 4-7 は the Royal Society of Chemistry より許可を得て転載している。

### 参考文献

- E. Ikonen, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2008, 9, 125–138.
- 2) T. Browicz, Zbl. Med. Wiss., 1890, 28, 625-627.
- J. F. Faucon, M. D. Mitov, P. Méléard, I. Bivas,
   P. Bothorel, J. Phys. France, **1989**, *50*, 2389-2414.
- 4) M. Nagao, Phys. Rev. E, 2009, 80, 031606.
- 5) B. D. Ladbrooke, R. M. Williams, D. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta*, **1968**, *150*, 333-340.
- 6) R. A. Demel, B. D. Kruyff, *Biochim. Biophys. Acta*, **1976**, *457*, 109-132.
- 7) T. P. W. McMullen, R. N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta*, **1995**, *1234*, 90-98.
- H. Ohvo-Rekilä, B. Ramstedt, P. Leppimäki, J. P. Slotte, *Prog. Lipid Res.*, **2002**, *41*, 66-97.
- O. Edholm and J. F. Nagle, *Biophys. J.*, 2005, 89, 1827-1832.
- T. T. Mills, J. Huang, G. W. Feigenson, J. F. Nagle, *Gen. Physiol. Biophys.*, **2009**, 28, 126-139.
- N. Tamai, T. Izumikawa, S. Fukui, M. Uemura, M. Goto, H. Matsuki, S. Kaneshina, *Biochim. Biophys. Acta*, **2013**, *1828*, 2513-2523.
- 12) 16) H. Usuda, M. Hishida, Y. Yamamura, K. Saito, *Chem. Lett.*, **2018**, *47*, 1512-1514.
- 13) M. Hishida, R. Yanagisawa, H. Usuda, Y. Yamamura K. Saito, *J. Chem. Phys.*, 2016, 144, 041103.
- 14) M. Hishida, A. Endo, K. Nakazawa, Y. Yamamura, K. Saito, *Chem. Phys. Lipids*, 2015, *188*, 61-67.
- 15) H. Usuda, M. Hishida, Y. Yamamura, K. Saito, *Langmuir*, **2016**, *32*, 5966-5972.
- 16) 菱田真史, C&I Commun., 2020, 45, 36-39.
- 17) 菱田真史、リン脂質二重膜の物性に対す る添加分子の効果を体系的に理解する、脂 質・脂肪酸関連物質の使いこなし方-素材 開発・機能創生・応用技術-、石井 淑夫 (編)、第2章第4節、テクノシステム、 2020.
- 18) 菱田真史, 熱測定, 2017, 44, 65-71.
- 19) H. Usuda, M. Hishida, E. G. Kelly, Y.

Yamamura, M. Nagao, K. Saito, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2020**, *22*, 5418-5426

- 20) G. Pabst, M. Rappolt, H. Amenitsch, P. Laggner, *Phys. Rev. E*, **2000**, *62*, 4000-4009.
- 21) H. Matsuki, H. Okuno, F. Sakano, M. Kusube,
  S. Kaneshina, *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, *1712*, 92-100.
- 22) M. J. Hope, M. B. Bally, G. Webb, P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1985**, *812*, 55-65.
- 23) www.sasview.org/
- 24) W. Helfrich, Z. Naturforsch. C: Biochem. Biophys. Biol. Virol., 1973, 28, 693-703.
- 25) A. G. Zilman, R. Granek, *Phys. Rev. Lett.*, **1996**, 77, 4788-4791.
- 26) U. Seifert and S. A. Langer, *Europhys. Lett.*, **1993**, *23*, 71–76.
- 27) M. C. Watson, F. L. H. Brown, *Biophys. J.*, 2010, 98, L9-L11.
- 28) M. Nagao, E. G. Kelley, R. Ashkar, R. Bradbury, P. D. Butler, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2017, *8*, 4679-4684.
- 29) E. G. Kelley, P. D. Butler, M. Nagao, Collective Dynamics in Model Biological Membranes Measured By Neutron Spin Echo Spectroscopy, De Gruyter, Berlin, Boston, 2019, *ch.* 4, pp. 131-176.
- E. Lindahl, O. Edholm, *Biophys. J.*, 2000, 79, 426-433.
- B. D. Ladbrooke, R. M. Williams, D. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta*, **1968**, *150*, 333-340.
- 32) R. J. Bingham, S. W. Smye, P. D. Olmsted, *Europhys. Lett.*, **2015**, *111*, 18004.
- 33) R. Bradbury, M. Nagao, Soft Matter, 2016, 12, 9383-9390.
- 34) E. G. Kelley, P. D. Butler, M. Nagao, Soft Matter, 2019, 15, 2762-2767
- 35) A. C. Woodka, P. D. Butler, L. Porcar, B. Farago, M. Nagao, *Phys. Rev. Lett.*, **2012**, *109*, 058102.
- M. Nagao, S. Chawang T. Hawa, *Soft Matter*, 2011, 7, 6598-6605.
- 37) R. Ashkar, M. Nagao, P. D. Butler, A. C.

Woodka, M. K. Sen T. Koga, *Biophys. J.*, **2015**, *109*, 106-112.

- 38) G. Bryant, M. B. Taylor, T. A. Darwish, A. M. Krause-Heuer, B. Kent, C. J. Garvey, *Colloids Surf.*, *B*, **2019**, *177*, 196-203.
- 39) E. G. Kelley, P. D. Butler, R. Ashkar, R. Bradbury, M. Nagao, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2020**, *117*, 23365-23373.