

大豆由来脂質分子の屈折率観察

渡辺向陽*

岡山大学異分野融合先端研究コア

Refractive Index Observation of Soy Lipids

Koyo WATANABE*

Research Core for Interdisciplinary Science, Okayama University, Okayama 700-8530

ABSTRACT

An observation of the refractive index of a soy lipid (L- α -phosphatidylcholine) is presented in this study. For these observations, a localized surface plasmon sensor and a program for measurement were developed. In the localized surface plasmon sensor, a He-Ne laser with linearly polarized light was used as the light source, and the size of the laser was expanded to 1.2 cm using a set of lenses. Then, to optimize polarization, the linearly polarized light was converted to radially polarized light using a z-polarization device. The light was focused by an oil-immersion objective lens, and a thin metal film deposited on the cover glass was illuminated by the focused laser beam. The distribution of reflected light intensity at the exit pupil plane of the oil-immersion objective lens was captured by a CCD device. In the reflected light distribution, a dark ring due to surface plasmon excitation appeared. As the size of the dark ring was strongly dependent on the refractive index of the metal surface, the changes in the size of the ring due to lipid adsorption on the surface were analyzed to determine the refractive index of the lipid. To observe changes to the refractive index and to calibrate the index, we first assessed water at the metal surface. Subsequently, the soy lipid at a concentration of 3 mM was introduced onto the metal surface by the vesicle fusion method, and observed. For a comparison with the these results, the refractive index of the soy lipids was estimated. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 135-138, 2011.

Key words : soy lipid, refractive index, surface plasmon

*〒700-8530 岡山市北区津島中3-1-1

生体膜は、脂質二分子膜内にたん白質がさまざまな形で埋まっており、それらは脂質二分子膜の中を自由に移動するモザイクモデルとして考えられている¹⁾。脂質二分子膜は、一般に多種の脂質分子から構成されており、脂質分子の組み合わせや圧力・温度などの変化により複雑なドメインを形成することが知られている²⁾。そのドメインの境界部では、脂質分子の受動速度が他の領域に比べ数倍も促進されるなど、脂質膜中のたん白質の動きに大きく影響を与えるため、脂質二分子膜の形状や特性の観察・作製は、たん白質機能を解明する上で重要な課題である。近年では、脂質二分子膜を用いて生体膜環境を固体基板上に人工的に作製する方法が提案され³⁾、たん白質解析研究に役立つさまざまな機能を有する脂質二分子膜基板の開発研究が活発に行われている。

これまでに、脂質二分子膜基板の開発をサポートする測定機器として、局所励起表面プラズモン顕微鏡の有用性が示されてきた⁴⁾。この顕微鏡では、基板上に局在する電場をプローブとして用いることで、脂質二分子膜の屈折率分布を光の回折限界に達する空間分解能でイメージングすることができる。また、脂質分子膜の厚さに対する感度が0.33 nmと非常に高く、長さの異なる脂質分子を区別できるなど、脂質分子薄膜の分布計測および脂質二分子膜基板開発研究への有用性が示されてきた。従来の脂質膜顕微観察に用いられてきた顕微鏡と比べると、原子間力顕微鏡や蛍光顕微鏡のように試料に接触して計測する必要や蛍光標識をする必要が無いため、物理的なダメージを与える可能性や、蛍光分子による脂質膜流動性への影響を心配する必要がなく、脂質本来の性質を損なうことなく観測が可能になる。

局所励起表面プラズモン顕微鏡を用いて脂質二分子膜の観察を考えた場合、生体膜が多種多様な脂質分子から構成されていることから、それぞれの脂質分子がもつ特徴や屈折率値を把握することが、より複雑な脂質二分子膜基板を評価する上で非常に重要となる。そこで、本研究では、脂質二分子膜観察の基礎的研究として、局所励起表面プラズモン顕微鏡の構築を行い、大豆由来脂質 (L- α -phosphatidylcholine (Soy PC)) の屈折率観察を試みた。

方 法

局所励起表面プラズモンセンサー

Fig. 1に作製した局所励起表面プラズモン顕微鏡の光学系を示す。この顕微鏡は、光源、偏光操作デバイ

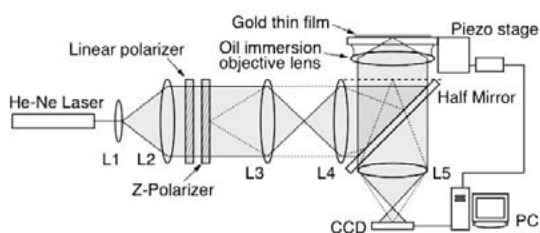


Fig. 1. An optical system of localized surface plasmon microscope.

ス、油浸対物レンズ、金薄膜基板、CCDカメラから構成される。光源には、ヘリウムネオンレーザー（波長632.8 nm）を用いた。レンズ1, 2によりビーム系は約20倍に広げられる。放射状に偏波した偏光が局所励起表面プラズモン顕微鏡の照明光として最適であることが知られている^{5, 6)}。ここでは、偏光板とZ偏光子 (Nano photon) を用いることで放射状偏光を生成した。偏光子による干渉パターンを取り除くため、レンズ3, 4を用いて、素子面を油浸対物レンズの入射瞳面にリレーしている。油浸対物レンズにより集光された光は、金属薄膜上に照明する。金属薄膜基板は、液体試料が観測できるように、フローセルが取り付けられている。また、ピエゾステージを用いることで基板を走査することができ、自由に測定場所を選ぶことができる。さらに、ピエゾコントローラーと組み合わせることで数ナノメートルの精度でステージを走査できる。金属薄膜基板から反射された光は、ハーフミラーを通りCCDへと向かう。このとき、油浸対物レンズの射出瞳における光強度分布は、レンズ5によりCCDに結像される。

CCDにより取得された光強度分布には、円状の光吸収パターンが現れる。この吸収は、表面プラズモンの励起に伴うものであり、この光吸収パターンの半径を推定することで、金表面の屈折率変化を高感度に検出することができる。式 (1) は、金属表面の屈折率 n_s と光吸収パターンの半径 ρ_{sp} の関係を近似的に表したものである。ここで ω , c , n_m はそれぞれ、角周波数、真空中の光速、金属の複素屈折率を表す⁷⁾。

$$\rho_{sp} = \text{Real}\left(\frac{\omega}{c} \left(\frac{n_m^2 n_s^2}{n_m^2 + n_s^2}\right)^{1/2}\right), \quad (1)$$

脂質

Soy PCは、Avanti Polar Lipidsから購入し、あらかじめクロロホルムに溶解したものを選んだ。脂質の調整では、まずクロロホルムは丸底フラスコ内で乾燥さ

せ、1日から2日程度冷凍庫に保存する。その後、脂質の相転移温度より高い温度の水 (Milli-Q) を入れ、その温度を保ちながら1時間以上十分に攪拌する。このときの濃度は3mMとした。さらに、エクストルーダー (Avanti Polar Lipids) とメンブレン (Avanti Polar Lipids) を用い、溶液中のベシクルのサイズを100 nm に調整した。

結果と考察

Soy PCによる屈折率変化を得るために、まず、基板表面が水で覆われた時の射出瞳における光強度分布の取得を行った (Fig. 2)。この図から表面プラズモンの励起に伴う光吸収リングを見ることができる。ここで、画像に現れる直線上の2本の交差する線は、偏光操作デバイスの接合面によるものである。続いてベシクルフュージョン法により、脂質分子を測定基板表面へ導入し計測をおこなった。脂質を基板表面に十分に展開させるために、脂質導入後10分間放置した後、水を入力することで基板上を浮遊する脂質の除去をおこなった。その後、同様に射出瞳における光強度分布の取得を行った。脂質の展開の前後における光強度分布画像から吸収リングの半径を測定することにより、脂質吸着による基板表面の屈折率増加に伴う光吸収リングの変化が取得できる (Fig. 2 右図参照)。これらの半径の大きさを考察するために、式 (1) に半径と金属の複素屈折率を代入し、屈折率の推定をおこなった。ここで、励起波長 632.8 nm に対する金の複素屈折率は、 $0.3+3.089i$ と仮定した。また、水の屈折率を1.33と仮定して、屈折率の規格化をおこなった。その結果、Soy PCによる屈折率変化が0.0108であると確認できた。また、屈折率の測定面内によるばらつきを評価するため

に、 $5\mu\text{m}\times 5\mu\text{m}$ の領域を 64×64 点で測定をおこない、それぞれの光強度分布画像に対して光吸収リングの半径の評価および屈折率の推定をおこない標準偏差を導出した。標準偏差を含めた屈折率の値は、 $1.3408\pm 5.9\times 10^{-4}$ と推定された。

これまでに、いくつかの脂質に関して屈折率観測がおこなわれており、その報告では、観測される屈折率は、脂質分子の密度によって変化することが報告されている⁸⁾。また、観測される屈折率は、脂質分子の長さにも依存することが報告されている。例えば、DLPC (1, 2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine) と DiynePC (1, 2-bis (10, 12-trico-sadiynoyl) -sn-glycero-3-phosphocholine) は、二分子膜の長さがそれぞれ3.0 nm⁹⁾ と4.8 nm¹⁰⁾ であり、水雰囲気中で検出された屈折率は、それぞれ1.3336と1.3357であった⁴⁾。分子構造による分極の違いに大きな違いはなく、脂質分子の炭素鎖の長さによる違いが、検出される屈折率に大きく依存すると仮定すると、Soy PCの炭素鎖の長さは、その分子式よりDLPCより長くDSPC より短いことから、屈折率がそれらの中間値を指すと思われる。しかし、得られた値はDSPCを少し上回るものであった。よって、期待より大きく現れた屈折率は、基板上に形成されるSoy PC分子密度の違いを示している可能性がある。また、今回実験に用いた基板の表面が疎水性 (金) であることから、先行研究で観測された脂質分子と異なる形態の脂質膜が形成されている可能性がある。本実験で得られたSoy PCの屈折率は、他の脂質分子の屈折率と比べるとという意味で一定の価値を示すが、一方で、定量的な値を示すには実験回数が少なく、さらなる追試が必要と考えられる。また、基板等の測定条件を最適化することで、より再現性・信頼性の高い結果を得る必要があると思われる。

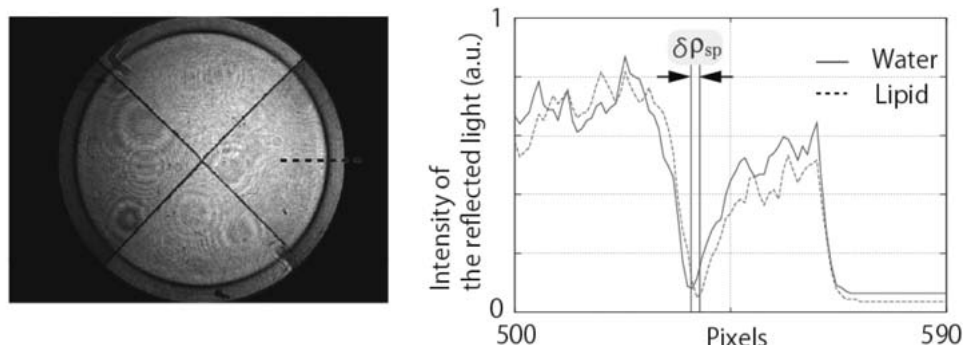


Fig. 2. Observed intensity distribution of the reflected light at the exit pupil plane of the objective lens, and the plots corresponding to the dotted line on the observed distribution.

要 約

本研究では、大豆由来脂質分子 (L- α -phosphatidylcholine (Soy PC)) の屈折率観察をおこなった。また、観察のため局所励起表面プラズモンセンサーの光学系と測定解析プログラムの作製を行った。測定方法として、3mMの濃度に調整した脂質をベシクルフュージョン法にて測定基板上へ展開する方法を採用し、脂質展開前後において屈折率変化を評価した。実験的には、対物レンズの射出瞳における反射光強度分布を取得し、そこに現れる表面プラズモンの励起に伴う光吸収リングの半径より屈折率の変化量を推定した。

文 献

- 1) Singer SJ and Nicolson GL (1972): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731.
- 2) Lin WC, Blanchette CD, Ratto TV and Marjorie LL (2006): Lipid asymmetry in DLPC/DSPC-supported lipid bilayers: A combined AFM and Fluorescence microscopy study. *Biophysical J*, **90**, 228-237.
- 3) Morigaki K, Baumgart T, Offenhäusser A and Knoll W (2001): Patterning solid-supported lipid bilayer membranes by lithographic polymerization of a diacetylene lipid. *Angew Chem Int Ed Eng*, **40**, 172-174.
- 4) Watanabe K, Miyazaki R, Terakado G, Okazaki T, Morigaki K and Kano H (2010): High resolution imaging of patterned model biological membranes by localized surface plasmon microscopy. *Applied Optics*, **49**, 887-891.
- 5) Kano H, Mizuguchi S and Kawata S (1998): Excitation of surface plasmon polaritons by a focused laser beam. *J Opt Soc Am B*, **15**, 1381-1386.
- 6) Watanabe K, Horiguchi N and Kano H (2007): Optimized measurement probe of the localized surface plasmon microscope by using radially polarized illumination. *Applied Optics*, **46**, 4985-4990.
- 7) Raether H (1988): Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings. Springer-Verlag, Berlin.
- 8) Miyazaki R, Kawata F, Terakado G and Kano H (2010): Localized surface plasmon microscopy of patterned lipid bilayers with variation of molecular density. *Proceedings of JSED*, 38-39.
- 9) Marsh D (1990): CRC Handbook of Lipid Bilayers. CRC Press.
- 10) Morigaki K, Schönherr H and Okazaki T (2007): Polymerization of diacetylen phospholipid bilayers on solid substrate: influence of the film deposition temperature. *Langmuir*, **23**, 12254-12260.