

二酸化チタン上に形成した脂質二重膜への 表面特性の影響および UV 照射効果

分子科学研究所

手老 龍吾

Lipid bilayer membranes on TiO₂ substrates were investigated by means of atomic force microscopy (AFM) and fluorescence microscopy. Lipid bilayer membranes deposited on flat solid surfaces are called "supported planar bilayers" (SPBs), and expected to be an effective cell-membrane-mimicking model system *in vitro*. TiO₂ is widely used in cosmetic products such as sunscreens, face-powders, foundations, etc. I propose that the SPB on TiO₂ surfaces can be a good model-system of the cell/cosmetics interface on skins.

Single-stepped rutile-TiO₂ low index surfaces were used in order to clarify the effects of surface atomic structures and chemical properties of each TiO₂ surface. Single-stepped TiO₂(100), (001) and (110) surfaces were prepared by HF aq. immersion and thermal treatment at 700-850°C at O₂ flow. The SPBs were formed by vesicle fusion methods using extruded vesicles through 50-100 nm and sonicated vesicles. Two kinds of saturated phospholipids, dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), an unsaturated phospholipid, dipalmitoleoylphosphatidylcholine (DPOPC), or their mixture were used for the SPBs on purpose.

After the single-stepped TiO₂(100) surface was incubated in the 100-nm-filtered and sonicated DPOPC vesicle suspension, a defect-less and full-coverage SPB formed. Fluorescence recovery after photobleaching experiment showed that the SPB retains the fluidity. In the AFM images, the trace of the single steps was recognized on the DPOPC-SPB on the TiO₂(100). This step-trace was also observed on both gel-phase and liquid-crystal-phase domains in a phase-separated binary SPB of DPPC and DPOPC. The gel-domains edges along the substrate steps preferentially appeared. It was also found that the nucleation of the gel-domains occurred on the terrace regions. These results indicated the atomic structure on the substrates actually affects to the assembly of lipid molecules in the SPBs.

The DMPC 50-nm-filtered vesicles transformed to planar bilayer on the O₂-annealed TiO₂(100), but adsorbed as vesicles on the UV-irradiated TiO₂(100). Stable hydrogen-bonded water layer formed due to the UV-induced hydrophobicity on the TiO₂ surface. The water layer worked as the barrier for the interaction between the DMPC head group and the substrate.

1. 緒言

化粧品には金属酸化物や粘土鉱物などの様々な無機材料の微粒子が使われており、生体物質(細胞)と無機物質の界面系として捉えることができる。細胞膜の主成分である脂質分子を固体表面上に平面二重膜として堆積した“supported planar bilayer (SPB)” (図1)は細胞膜のモデルシステムとして生化学や医療分野で有力視されている。本来は流動的で壊れやすい脂質二重膜が固体表面に支持されることにより安定化され、また、走査プローブ顕微鏡や各種分光法などの高空間分解能・高感度の表面科学的実験手法を用いて解析を行うことができる点が長所として挙げられる。本研究では、白色顔料やUVカット素材として化粧品に広く用いられているTiO₂の表面に堆積したSPBを用いて、無機固体の物理的・化学的特性が脂質膜にどのよ

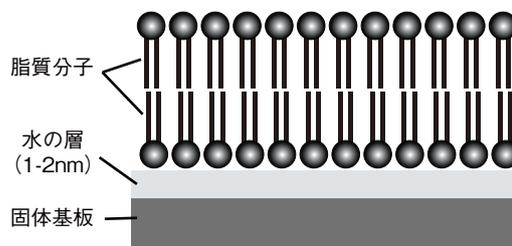


図1 Supported planar bilayer (SPB) の模式図

うな影響を与えるかを明らかにする事を目的とする。

近年では化粧品に用いられるTiO₂は透明度を上げるために超微粒子化が進んでいる。ナノメートルサイズの微粒子は、粒径や調整方法によって低指数面の組み合わせで形成される特徴的な構造を取ることが知られている^{1, 2)}。図2がルチル型TiO₂の代表的な低指数表面の構造である。ルチル型TiO₂表面は酸化物表面の中ではこれまでに最も多くの研究がなされており、表面原子構造、電子状態、化学反応特性について多くの情報が既に得られている^{3, 4)}。それぞれの低指数面のSPBに対する特性をTiO₂単結晶表面を試料として用いることでモデル化すれば、基板表面物性の「何が」「どのように」脂質膜に影響するのかを要素化することができると期待される。また、TiO₂はUV照射による超親水性の発現など、多様な表面機能を示す。本



Effect of Surface Properties and UV irradiation on the Supported Lipid Bilayer Membranes on Titanium Dioxide Surfaces

Ryugo Tero

Institute for Molecular Science

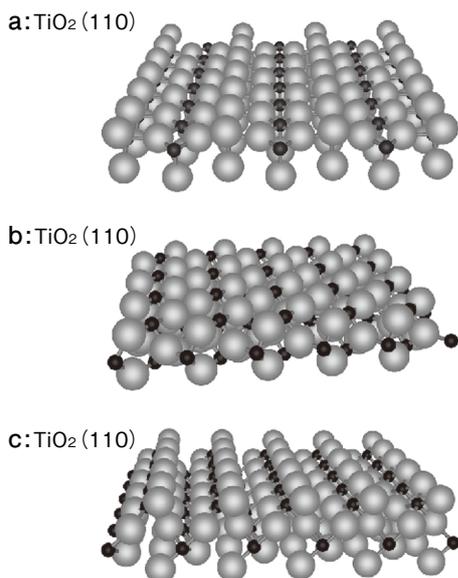


図2 ルチル型 TiO₂ 低指数面のバルク終端構造モデル (a) TiO₂(110) ; (b) TiO₂(001) ; (c) TiO₂(100) 。ルチル型 TiO₂ の単位格子は正方晶なので、(001) 面と (100) 面は等しくない。

レポートでは、TiO₂ の表面構造および表面状態が SPB の形状や性質、ドメイン構造に及ぼす影響を原子間力顕微鏡 (AFM) と蛍光顕微鏡を用いて調べた結果について報告する。

2. 実験

2.1 リン脂質ベシクル懸濁液の調製

目的に応じて、ゲル-液晶相転移温度 (T_c) の異なる 3 種類のリン脂質を使用した; dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC, $T_c = 41^\circ\text{C}$) dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC, $T_c = 24^\circ\text{C}$), dipalmitoleoylphosphatidylcholine (DPOPC, -36°C)。ガラスバイアル壁面に広げて真空乾燥させた後、リン脂質フィルムを緩衝溶液 (KCl 150 mM, MgCl₂ 40 mM, HEPES 5 mM /pH 7.2 KOH) 中で攪拌して 0.1 mg/ml のベシクル懸濁液とした。この懸濁液を凍結・解凍 5 回、超音波破碎、ポリカーボネート膜 (50 nm または 100 nm メッシュ) を通すフィルタリング⁵⁾、のプロセスによって SPB 形成に適した small unilamellar vesicle を調製した^{6, 7)}。これらのプロセス (凍結時は除く) は懸濁液をそれぞれのリン脂質の T_c 以上に保って行った。

2.2 シングルステップ TiO₂ 表面の調製

TiO₂ 表面の処理は、文献⁸⁾ のウェット法を一部変更して用いた。アセトン、メタノール、純水中で超音波洗浄した TiO₂ 単結晶基板を H₂SO₄+H₂O₂ (4:1) 溶液中で 5 s 煮沸して有機物を完全に除去、10% HF 水溶液中に 10 min 浸漬した後、酸素流通下 (1.0 L/min) で 700-850°C、1 h 焼成した。

2.3 基板表面上への SPB 形成

TiO₂ 表面への SPB 形成はベシクル展開法^{6, 7)} によって行った。洗浄・焼成した TiO₂ 表面上にベシクル懸濁液を滴下し、40°C に 30 分間保った後、液相を緩衝溶液で置換して未反応のベシクルを取り除いた。

2.4 AFM および蛍光顕微鏡観察

AFM 観察は、TiO₂ 表面形状は大気中、SPB 形成後の試料は緩衝溶液中でそれぞれ行った。前者は通常のタッピングモード、後者は磁気励振モードで行った。

蛍光顕微鏡観察のために、あらかじめ色素ラベルしたリン脂質 (lissamine rhodamine B sulfonyl-dioleoylphosphatidylethanolamine (Rb-DOPE), Ex/Em: 550/590 nm) を 1% 混ぜてベシクル懸濁液を調製した。脂質膜の蛍光顕微鏡観察は水銀ランプを備えた落射型顕微鏡を用いて行った。

3. 結果

3.1 TiO₂ 低指数面の表面構造

酸素雰囲気下で焼成した後の TiO₂ 低指数表面の AFM 像を図 3 に示す。TiO₂ (110) (図 3a), (001) (図 3b), (100) (図 3c) の 3 種類の低指数面を用いて、平坦なテラスとステップで形成される表面を再現性よく調製することができた。図 3d には TiO₂(100) 面 (図 3c) のラインプロファイルのみを示したが、それぞれのステップの高さは単位格子 1 つ分の高さに等しく、シングルステップが形成されていることがわかる。

TiO₂(100) 面上では、焼成温度を変えることでモフォロジーの異なるステップ & テラス構造が現れることを見出した。焼成温度 700°C ではシングルステップが形成される (図 3c, d) が、焼成温度 800°C ではステップ高さが 2 倍になったダブルステップ構造が現れた (図 3e)。テラス幅もおよそ 2 倍に広がっているため、面全体での平均の傾きは変わっていない。焼成温度 850°C の表面では、ステップ高さはシングルステップ相当ながら、いびつなステップ形状を持ち、テラス上に [001] 方向に走るストリーク構造が観察された (図 3f)。

図 3 に示した TiO₂ 表面は、いずれの表面も室温の大気中、緩衝溶液中で安定に存在することを確認した。次に、これらの TiO₂ 表面のうち、TiO₂(100) 表面上への SPB 形成にの結果について述べる。

3.2 TiO₂(100) 表面上の SPB

図 3c に示したシングルステップ TiO₂(100) 表面上にベシクル展開法によって SPB 形成を行った。100 nm フィルターを通してから超音波破碎した DPOPC ベシクル懸濁液下で TiO₂(100) を 40°C でインキュベーションすることに

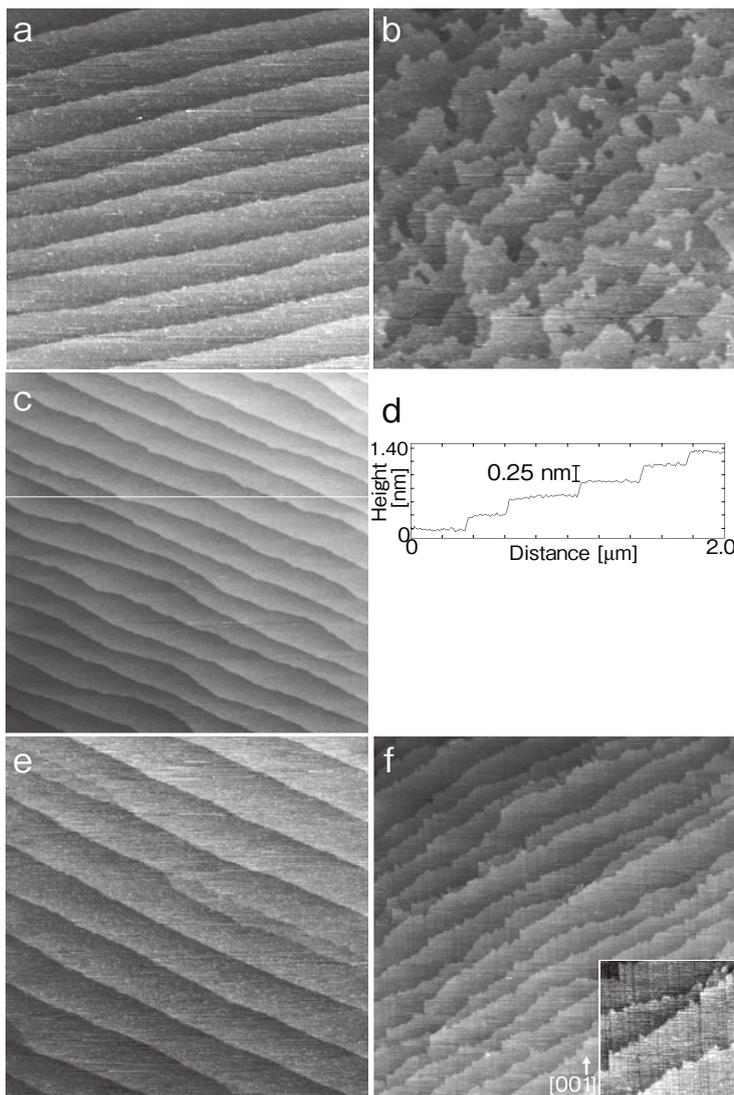


図3 HF処理後に酸素雰囲気下で1h焼成したTiO₂単結晶低指数表面のAFM像
 (a)TiO₂(110), 焼成温度800°C ((1.0×1.0 μm²); (b)TiO₂(001), 850°C ((1.0×1.0 μm²); (c)TiO₂(100), 700°C (2.0×2.0 μm²); (d)図3cのラインプロファイル; (e)TiO₂(100), 800°C (2.0×2.0 μm²); (f)TiO₂(100), 850°C (2.0×2.0 μm²), 挿入図は400×400nm². 全て大気中、室温で観察。

よって、ディフェクトの無いSPBがTiO₂表面全体を覆うことを蛍光顕微鏡観察によって確認した(図4a)。蛍光消光回復法(FRAP)によって、形成されたSPBが連続的で流動性を保っていることが示された。吸着ベシクルと2層目のSPBが存在するため、定量的な拡散係数の算出はできなかった。図4aの試料をそのままAFMで観察したものが図4bである。表面全体を覆っている脂質膜が、基板のステップ&テラス構造を反映した階段状の構造をとっていることがわかる。

一般的に液晶相のSPBは流動性が高く膜に欠陥が由来にくいいため、AFM像からは被覆率100%のSPBと何も無い表面の見分けが付きにくい⁹⁾。図4bにおいても、蛍

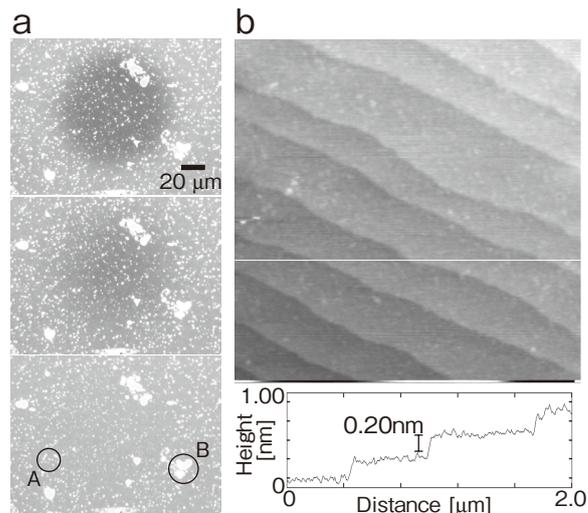


図4 シングルステップTiO₂(100)表面上に形成したDPoPC-SPBの(a)蛍光顕微鏡像と(b)AFM像(2.0×2.0 μm²)
 (a)は同じ領域でFRAPを行い、蛍光が回復していく過程を撮影したもの。A, Bで示した輝点と明るい領域はそれぞれ吸着ベシクルと2層目の二重膜。

光顕微鏡像とステップ高さがシングルステップよりも低く観察されることなどから観察領域全体が脂質膜に覆われていると考えられるが、直接的なデータであるとは言いがたい。そこで、室温で液晶相のDPoPC (T_c= -36°C)に室温でゲル相をとるDPPC (T_c=41°C)を1:1で混ぜた2相系SPBを形成し、AFM観察を行った(図5a)。2種類の脂質を混ぜることでDPPCのT_cが低下するため、インキュベーション(40°C)時には全体が液晶のSPBが形成されるが、室温付近では相分離が起こり、DPPCリッチなゲル相ドメインが析出する。液晶からゲルへの相転移に伴いランダムな配向をとっていたリン脂質の炭化水素鎖がオールトランス配向に変化してパッキングするため、膜厚が増加して、1分子当たりの占有面積は減少する。そのため、

AFM像の高さの差から、ゲル相と液晶相のドメインを区別することができる。また、面積の減少にともないSPBに欠陥が形成されて基板表面が露出するため、SPBの厚さを評価することができる。ゲル相ドメイン、液晶相ドメインの膜厚はそれぞれ5.8 nm, 4.3 nmであった(図5a)。AFM像のZ方向のコントラストを強調すると、いずれのドメイン上でもTiO₂基板のステップ構造を認識することができたことから(図5b)、相状態にかかわらずSPBが基板表面の原子レベル構造を反映した形状をとっていることが確認された。また、ゲル相ドメインの2次元的な形状に着目すると、図5cのように基板ステップ方向に伸びたエッジ多く観察された。

DPPCとDPoPCの混合比と観察温度を制御すること

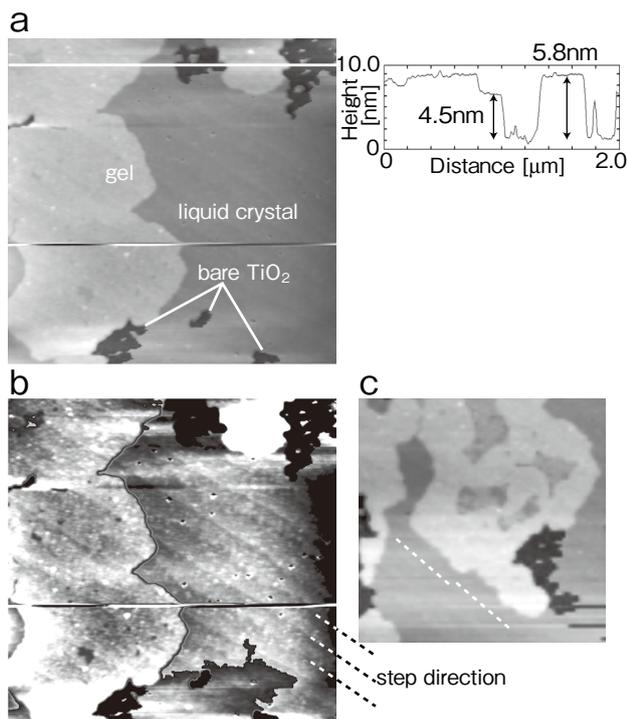


図5 (a)シングルステップ TiO₂(100) 表面上に形成した DPoPC+DPPC (1:1) の2相混合 SPB の AFM 像 (2.0 × 2.0 μm²)。 (b) 図5bのZ方向のコントラストを強調した像。 (c) ステップ方向に沿ったエッジを持つゲル相ドメインの AFM 像 (1.5 × 1.5 μm²)。

で、ゲル/液晶ドメインの割合を変化させることができる。図6はダブルステップの TiO₂(100) 表面 (図3e) 上に形成した DPPC : DPoPC = 1 : 3 の混合 SPB を 30 K/s で 25℃ から 5℃ に冷却し、5℃ で観察した AFM 像である。この冷却条件では DPoPC リッチな液晶相の SPB の中に、小さなゲル相ドメインが点在しているのが観察された (図6a)。ゲル相ドメインの大きさがテラス幅と同程度まで小さくなっており、液晶ドメイン上から基板のステップ構造が認識できるため、ゲル相析出の核生成サイトを調べることができる。図6b から、ゲル相の析出は平坦なテラス上で優先的に起きていることが確認された。

3.3 TiO₂ 表面への UV 照射効果

TiO₂ の重要な表面特性として、紫外光照射による超親水性の発現が上げられる¹⁰⁾。基材表面の親水性は微粒子の分散度などにも関係する要因であり、また、紫外光誘起の表面改質は屋外に長時間滞在した際の基材の材質変化としても影響すると考えられる。そこで、ベシクル展開法によって脂質を堆積する前の TiO₂ 表面上に紫外光照射を行った場合の SPB 形成への影響について調べた。

まず、シングルステップ TiO₂(100) 面 (図7c) に低圧水銀灯 (25W) を用いて大気中で紫外光照射を行い、表面構造に変化が現れないことを確認した。次に、フィルタ

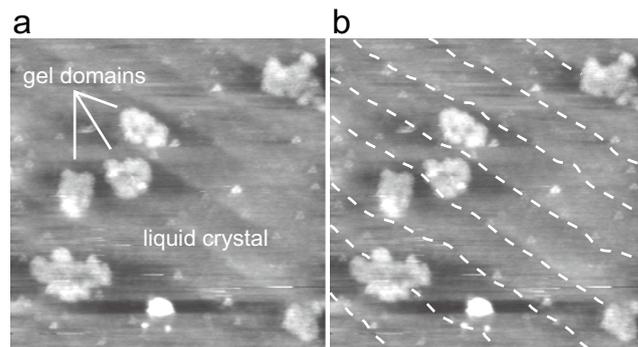


図6 (a)ダブルステップ TiO₂(100) 表面上に形成した DPoPC+DPPC (3:1) の2相混合 SPB の AFM 像 (2.0 × 2.0 μm²)。 (b) 図6aの液晶相上に観察されるステップ構造を破線で示した。

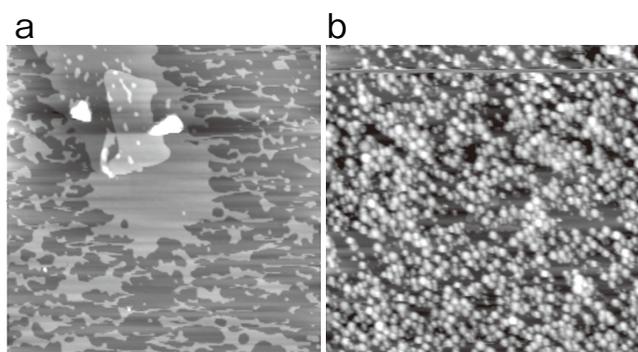


図7 シングルステップ TiO₂(100) 表面上へのベシクル展開法による SPB 形成における、基板表面への紫外光照射の効果。(a)紫外光照射なし。平面膜が形成されている。(b)紫外光照射を行った TiO₂(100)。表面にベシクルが吸着したままで、平面膜形成が進んでいない。

ーを通して粒径を約 50nm にそろえた DMPC-ベシクル懸濁液を用いて、紫外光照射の有無により SPB 形成に差が現れるかどうかを確かめた。紫外光照射を行わない TiO₂(100) 表面上では図4-6同様 SPB が形成された (図7a) のに対し、あらかじめ紫外光照射した TiO₂(100) 面上ではベシクルが吸着したままで平面膜の形成が進まなかった (図7b)。

4. 考 察

焼成後の TiO₂ 表面でシングルステップ現れるという結果は文献⁸⁾ に倣ったものであるが、加熱を酸素下で行ったことによってステップ形状などに違いが現れている。また、TiO₂(100) 表面が焼成温度によってステップ & テラス構造を保ちながらも、異なるモフォロジーを持つことは非常に興味深い (図3c-e)。これらの表面上での SPB の挙動を詳細に調べることによって、無機材料の表面処理方法と生体膜の相互作用について新しい知見が得られると期待できる。

本研究においては TiO₂(100) 表面にベシクル展開法に

よって比較的容易に SPB 形成をすることができたが、過去の報告では TiO₂ 表面上では SPB の形成が進みにくいとされてきた^{11,12)}。SPB は固液界面に存在する有機分子の自己組織化構造であり、基板表面の形状と化学状態、溶液のイオン濃度や pH、脂質の組成と相状態など、非常に多くのパラメーターを含む複雑な系である。TiO₂(001), TiO₂(110) 表面上での平面二重膜形成にも着手しており、いずれも質の良い SPB を作製できそうな感触を得ている。これらの実験によって、「表面」の持つパラメーターを要素化することに近づくと期待している。

Supported bilayer においては、脂質分子は基板表面に直接吸着しているのではなく、図 1 に示したように 1-2 nm の水の層を介して基板上に支持されている¹³⁾。この水の層を挟んだ上で、図 4, 5 で観察されたように、厚さ約 5 nm ある SPB はたった 0.25 nm の表面原子ステップ構造を反映した形状をとっており、基板表面と脂質膜間の距離が広範囲にわたってオンゲストロームオーダーで精密に決まっていることがわかる。また、図 5, 6 の結果は、この脂質膜の厚さのわずか 5% 程度の小さなひずみが、脂質膜内のドメイン形状やゲル相の核生成などの相分離過程に大きく影響を及ぼしていることを示している。ゲル相ドメインの形状が表面ステップ構造を反映したことから、脂質膜中での 2 次元分子拡散がステップに垂直 / 平行な方向で異方性を持っている可能性がある。表面微細構造を利用した指向性分子輸送や、拡散速度の違いを利用した分子選別などにつながると期待できる。ゲル相の核生成がテラス上で選択的に起きた (図 6) のは、ステップ構造によってできた歪によって分子の分配係数が変化したためであろう。脂質膜が歪んだ状態のステップ上にはよりフレキシビリティの高い液晶相の DPoPC が優先的に存在するため、結果として平坦なテラス上の SPB 内での DPPC 濃度が上昇し、過飽和度を越えた時点でゲル相の析出が始まると考えている。しかし、このような立体的効果だけでなく、ステップとテラスでの原子の化学状態の違いが影響している可能性も残されており、今後 TiO₂(110), (001) 面など表面原子配列や化学特性の異なる低指数表面を用いての実験で詳細を明らかにしたい。

紫外光照射による超親水性発現のメカニズムについては今でも盛んに研究が行われているが、TiO₂ 表面においては水分子が光誘起の解離吸着を起こして準安定的に表面水酸基密度が増加した状態になると報告されている¹⁰⁾。ベシクルあるいは SPB のリン脂質分子は親水性頭部によって水を介して親水基板表面に支持されているため、直観的には基板表面親水性の上昇にともないベシクル吸着が強まり SPB 形成速度は上昇しそうに思えるが、図 7 の結果は全くの反対である。筆者は以前、表面親水性を制御した SiO₂ 表面上への SPB 形成において、ある程度まで親水

性を低下させた方が SPB 形成速度が上昇することを報告した⁷⁾。これは、表面水酸基密度が高く最も親水度が高い SiO₂ 表面近傍には、水素結合で表面水酸基と結ばれた安定な水の層が存在するためである。この水素結合ネットワークがベシクルの基板表面への安定吸着を妨げ、平面膜形成のための障壁として働いている。光照射によって表面水酸基密度が増加した TiO₂ 表面上で SPB 形成が進まなかったことも、同様のメカニズムで説明することができると考えている。

5. 総括

TiO₂ 単結晶基板上にステップ & テラス構造を調整して SPB 形成を行い、その構造を AFM と蛍光顕微鏡によって観察した。SPB は原子ステップ高さの表面構造を反映した形状をとっており、その微細なひずみによって SPB 内での相分離の際にドメイン構造や核生成サイトの形状・位置が影響されることを明らかにした。また、TiO₂ 表面の光誘起親水性の発現によって脂質膜の吸着構造が大きく変化することを見出した。

謝辞

本研究は、分子科学研究所・宇理須恒雄教授、名古屋大学・宇治原徹助教授との共同研究である。本研究に対して助成をいただきました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝いたします。

(参考文献)

- 1) P. M. Oliver, G. W. Watson, E. T. Kelsey, et al., Atomistic simulation of the surface structure of the TiO₂ polymorphs rutile and anatase, *J. Mater. Chem.*, 7, 563-568, 1997.
- 2) T. Ohno, K. Sarukawa, and M. Matsumura, Crystal faces of rutile and anatase TiO₂ particles and their roles in photocatalytic reactions, *New J. Chem.*, 26, 1167-1170, 2002.
- 3) Y. Iwasawa, Dynamic oxide interfaces by microscopic techniques at high resolutions, *Surf. Sci.*, 404-404, 8-19, 1998.
- 4) U. Diebold, The surface science of titanium dioxide, *Surf. Sci. Rep.*, 48, 53-229, 2003.
- 5) R. C. MacDonald, R. I. MacDonald, B. P. M. Menco, et al., Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, 1061, 297-303, 1991.
- 6) R. Tero, M. Takizawa, Y. J. Li, et al., Lipid membrane formation by vesicle fusion on silicon dioxide surfaces modified with alkyl self-assembled monolayer islands,

- Langmuir, 20, 7526-7531, 2004.
- 7) R. Tero, H. Watanabe, and T. Urisu, Supported phospholipid bilayer formation on hydrophilicity-controlled silicon dioxide surfaces., Phys. Chem. Chem. Phys., 8, 3885-3894, 2006.
- 8) Y. Yamamoto, K. Nakajima, T. Ohsawa, et al., Preparation of atomically smooth TiO₂ single crystal surfaces and their photochemical property, Jpn. J. Appl. Phys., 44, L511-L514, 2005.
- 9) S. Furuieka, J. Hirokawa, S. Yamada, et al., Atomic force microscopy studies of interaction of the 20S proteasome with supported lipid bilayers, Biochim. Biophys. Acta, 1615, 1-6, 2003.
- 10) K. Hashimoto and H. Irie, Photo-induced Hydrophilic Conversion on TiO₂ Surface, Hyomenkagaku, 25, 252-259, 2004.
- 11) C. A. Keller and B. Kasemo, Surface Specific Kinetics of Lipid Vesicle Adsorption Measured with a Quartz Crystal Microbalance, Biophys. J., 75, 1397-1402, 1998.
- 12) I. Reviakine, F. F. Rossetti, A. N. Morozov, et al., Investigating the properties of supported vesicular layers on titanium dioxide by quartz crystal microbalance with dissipation measurements, J. Chem. Phys., 122, 204711-204711-204718, 2005.
- 13) C. M. Ajo-Franklin, C. Yoshina-Ishii, and S. G. Boxer, Probing the Structure of Supported Membranes and Tethered Oligonucleotides by Fluorescence Interference Contrast Microscopy, Langmuir, 21, 4976-4983, 2005.