

【生物物理】

與水共舞的脂膜分子

從脂膜分子與水的微妙律動，開創出醫學研究的嶄新視野。

撰文／邱淑慧

沒 有水就沒有生命，生物體內的每個小小細胞都充滿了水，也都生存在水裡，但是，水分子是否能直接通過細胞膜，卻一直未有定論。而台灣大學物理系趙治宇，利用自己改造的全球第一部生物環境穿透式電子顯微鏡（Bio TEM），首

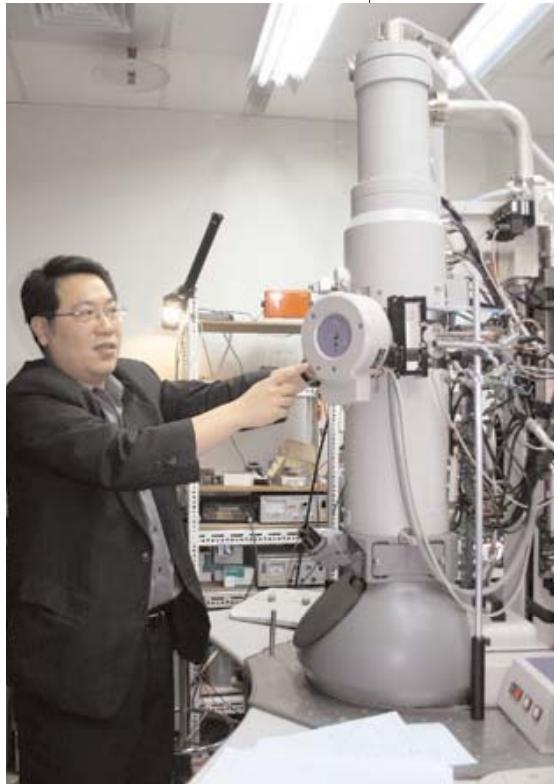
度觀察到水與脂膜分子的共存狀態，是一種未曾發現的微妙動態平衡。這項研究成果發表於2004年12月10日《物理評論通訊》（*Physical Review Letters*），引起了國內外許多生物學家與醫學家的注意與重視。

細胞膜是一種雙層脂膜（lipid bilayer），膜外層為親水端，內部則為疏水端，因此離子與極性分子不易通過。1980年代以前普遍認為，當分子夠小、動能夠大時，分子可以經由滲透方式而通過細胞膜。1988年，阿格雷（Peter Agre）以實驗證實，水分子可經由膜蛋白

構成的通道而進出細胞；1998年麥金農（Roderick MacKinnon）則利用X光繞射，確認了細胞膜上離子通道的蛋白質結構。阿格雷與麥金農也因此獲得2003年諾貝爾化學獎。然而，細胞膜的脂膜分子間並無鍵結，水分子真的不能穿越？

趙治宇用Bio TEM觀察離子型液晶分子「1-十二烷基咪唑」的硝酸鹽（化學式為 $[C_{12}H_{25}-imH][NO_3]$ ），這種分子有個很長的烷基疏水端，又有個親水的含氮雜環，性質上與細胞膜分子非常類似，在水中也會形成像細胞膜般的雙層脂膜結構。在Bio TEM下，這種脂膜分子和水分子產生了一種從未見過的繞射圖案（見右頁上圖），趙治宇表示：「這個圖案具有六角方向性，顯示它不是液體；但這個圖形也非清晰的繞射點，可見分子具有運動，不是固體；此外，它的六個暈狀弧形不似液晶的清晰可辨，可見分子間關聯性極低，排除是液晶的可能。而且，這個由水與脂膜共存時所呈現的新狀態，還具有可逆的相變發生，不是一個混合態。那麼，它到底是什麼？」

經繞射圖形分析與位置關聯性的計算，趙治宇發現脂膜分子的關聯性與液態相同，且在脂膜分子間有約0.5奈米的空

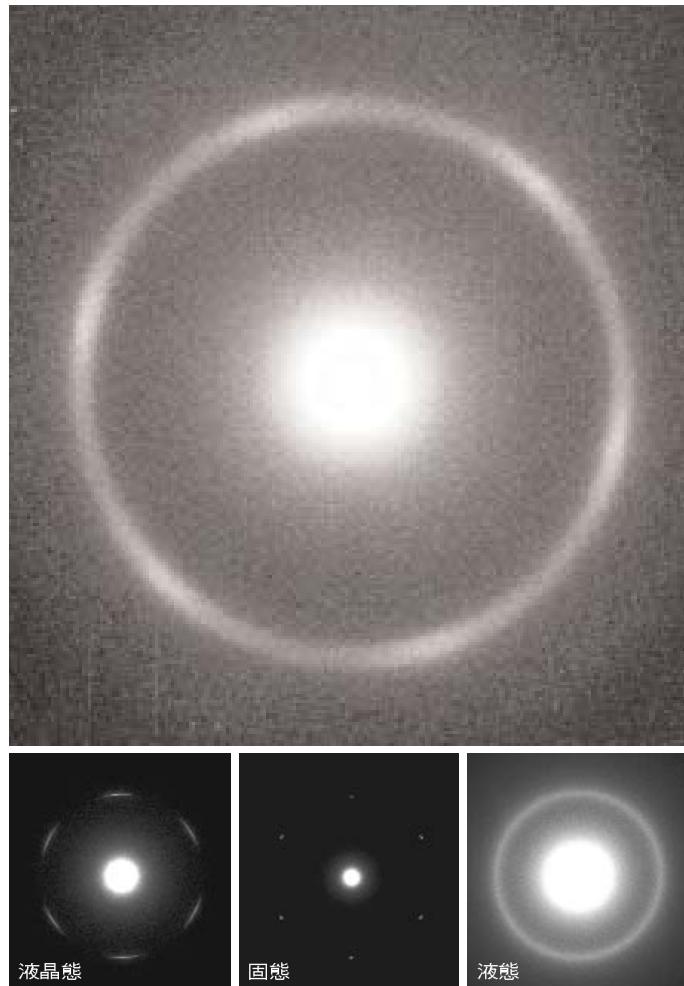


趙治宇以他自行改裝的BioTEM，觀察到一種前所未見、由脂膜與水分子所形成的共存狀態。

隙，從繞射圖形研判，脂膜分子間會不斷開合律動，使水分子得以進入，並因此減弱了脂膜分子間的凡得瓦力，使分子間關聯性大幅降低，但仍可維持一定的六角方式排列（繞射圖案為六個暈狀弧形）。趙治宇認為，從他們觀察到的現象，可以推論水能夠經由與脂膜分子間的互動，而滲透進出。

研究液晶二維薄膜多年的趙治宇，為觀察液晶薄膜結構，致力改造穿透式電子顯微鏡（TEM），並在一年多前完成了全球第一部可以觀察活體生物的電子顯微鏡，這是一具可以同時控制壓力、溫度及濕度的奈米尺度觀察儀器。Bio TEM的自製試片座，共分為水層、緩衝層與真空三層，並維持三層間的動力平衡。待觀測物置於最內部的水層，由於水會從水層上方小孔逸失，緩衝層必須不斷抽氣，以維持試片座外的真空環境，這是電子顯微鏡運作極為重要的條件。由於試片座水層厚度只有一微米，電子束通過時仍能維持彈性散射，雖然解析力降低了2~3倍，對比度也會略為減少，但不會影響觀察結果。

趙治宇觀察到的「脂膜－水」共存狀態以及他的Bio TEM，在科學界引起了一陣熱烈討論。台灣大學物理系主任張慶瑞表示：「在物理上，要定義是否為一種新物質狀態不容易，然而在生物與醫學上，這的確是一項重要的成就。」台灣大學口腔生物研究所專研蛋白質與離子通道的樓國隆指出：「這是令人興奮的成果，如能克服樣本製備的困難，在微小奈米尺度下觀察活體細胞，將可以解決生物學許多隱藏的秘密。特別是研究水分子聚集



「脂膜－水」共存態的電子繞射圖案（上圖）具有六角方向性，但卻沒有清晰的繞射點。一般液態物質因為分子排列與運動雜亂無序，不具方向性，繞射圖案呈現均勻（無方向性）、暈狀（分子運動）的圓形。固態物質分子排列有一定規則（但在不同方向有各異的規則）且分子固定，繞射圖案呈現清晰而有固定方向的繞射點。而介於此兩者之間的液晶，則是具部份方向性且分子關聯性高，繞射圖案呈現清晰弧形。這次新發現的狀態，與此三者皆不相同。

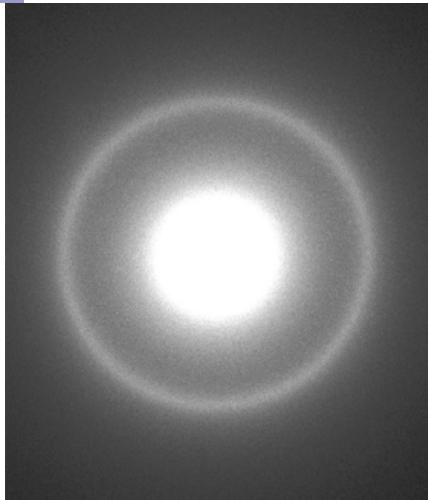
時，可能會有的特殊排列規則。」中央研究院生化學所陳長謙院士則提出了其中的困難點：水分子的紛亂運動會干擾觀察，且細胞膜上的蛋白質外型太過相似，觀察時恐怕不易辨認。

發現了簡單脂膜分子與水的微妙律動之後，趙治宇希望接著能以Bio TEM對生物細胞膜上的蛋白進行三維影像電子繞射，以觀測蛋白質與水分子之間是否也存在著微妙的律動。

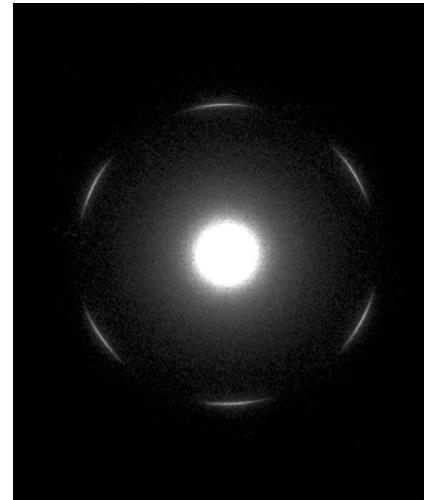
如果這部Bio TEM的技術可以克服種種困難並加以發揚光大，對於生物學在細胞分子層次的研究，將有劃時代的影響，未來可能可以應用在藥物研發與病毒致病機制等研究上。然而這需要更多生物學家與醫學專家的積極參與，正如趙治宇所說，Bio TEM的一切都還只是剛開始，未來還有非常多的研究工作要做。

電子顯微鏡的挑戰

要觀察水與細胞膜作用的機制之所以困難，首先在於其尺度微小。光學顯微鏡的解析力受限於光波波長，無法觀察得到。而具有高解析力的電子顯微鏡，則因為要使電子束不受其他因素干擾，內部環境須維持高度真空，所以只能觀察乾燥的樣本。以往要在電子顯微鏡下研究生物試片，僅能透過結晶、急速冷凍與包埋等方式來進行。



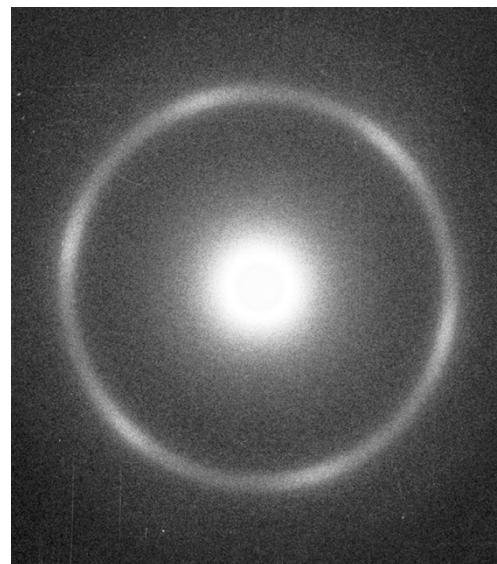
液態



液晶態



固態

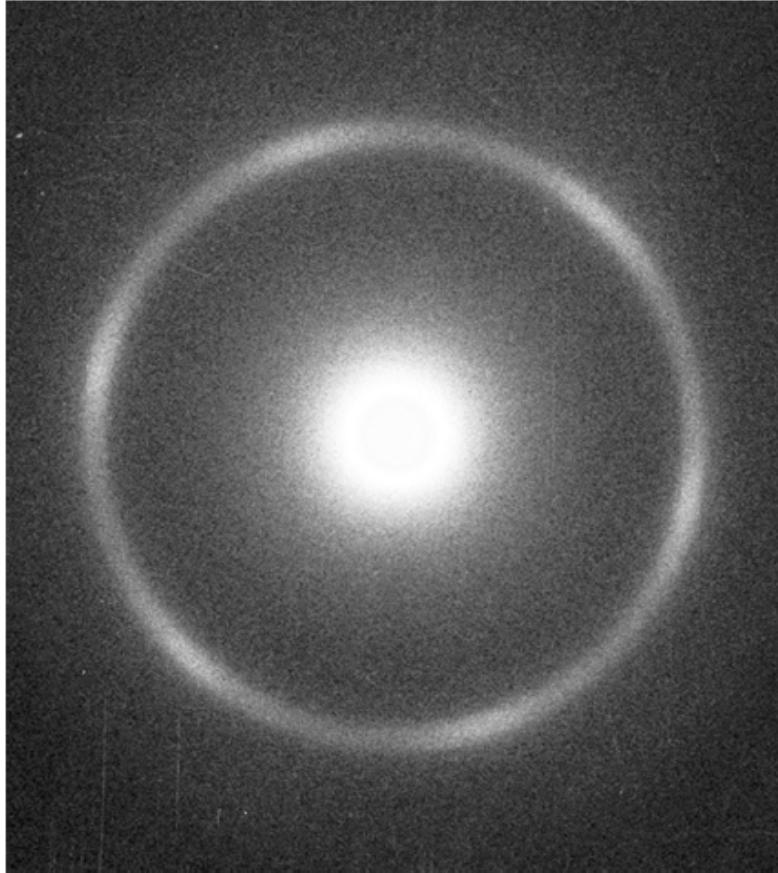


酯膜結構

This new state forms due to the existence of hydration force in **lipid-water** system in biological native environment.



「酯膜-水」結構與液態、液晶態、和固態均不相同



An Exotic Liquid Phase in a Biomembrane-Like System

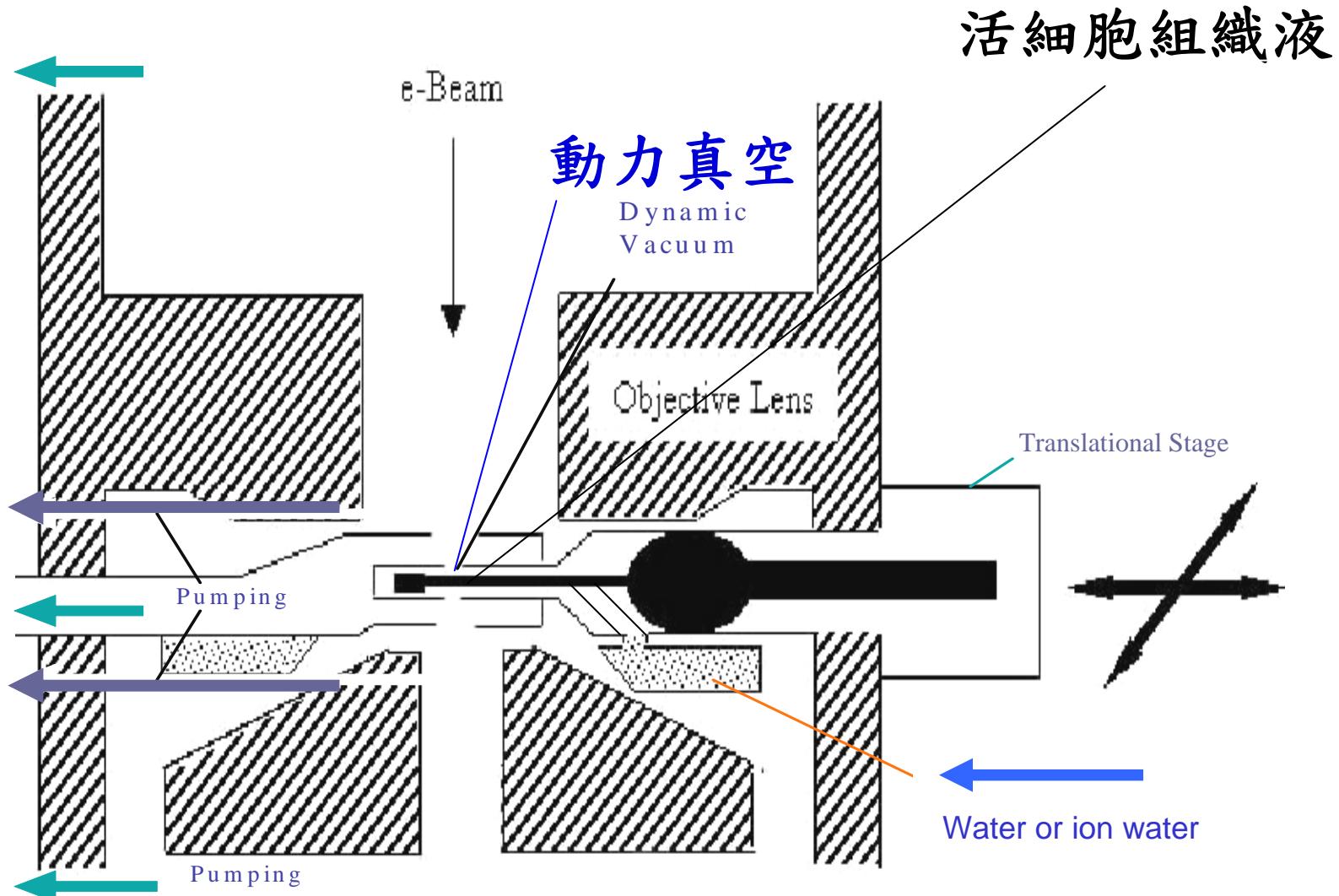
One of the major recent advances in condensed matter physics is the prediction and subsequent experimental confirmation of the existence of an intermediate hexatic phase between the crystalline solid and the isotropic liquid in reduced dimensions. This phase has long-range bond-orientational order, and its positional correlations, while short-range, should be much stronger than those in an ordinary liquid. It has long been suspected but never demonstrated that lyotropic lamellar membrane systems, because of their intrinsic two-dimensional nature, should exhibit hexatic behavior.

Our discovery is important in two respects. This is the first report of hexatic behavior in a lyotropic liquid crystal consisting of amphiphilic bilayers similar to those in biological membrane systems, and should have a broad interest beyond physics. Furthermore, this appears to be a new type of hexatic liquid phase, with the characteristic six-fold symmetry but only liquid-like nearest-neighbor positional correlations. Its existence brings into question our basic understanding of the fundamental mechanism for melting based on the introduction of defects.

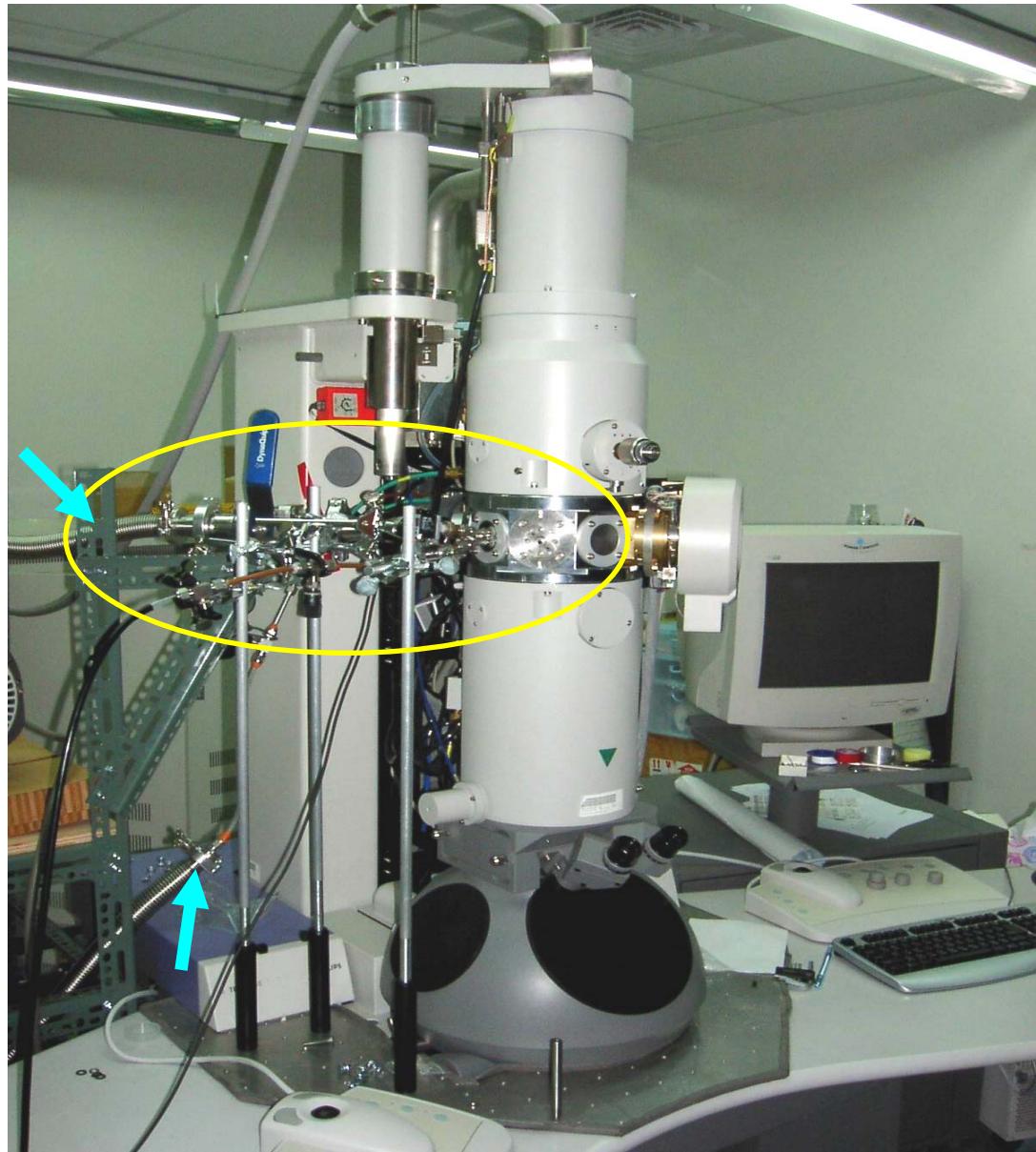
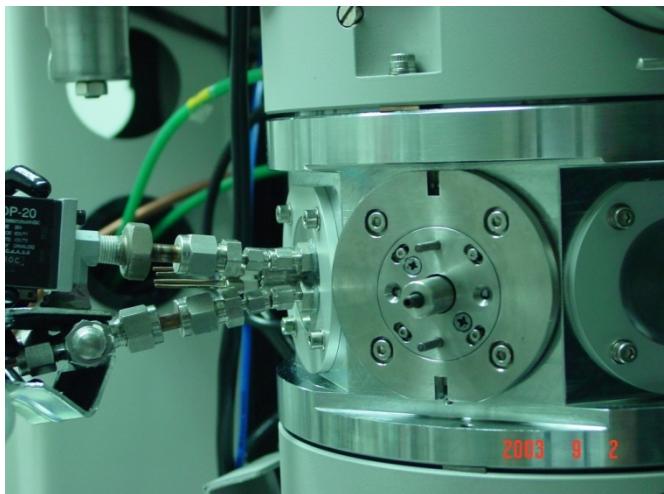
Our discovery also represents the first report of in-plane hydration force in lyotropic lamellar bilayer systems. In addition, our experimental results also suggest that the water molecules possessing larger kinetic energy in between those bilayers could have the chance of passing through the membrane-like bilayer films via the osmosis process, which is directly related to the hydration force. Our results further suggest that the intercalated water molecules or the the plausible passage of water molecules through the membrane-like bilayers weakens the interaction force between the molecules of these bilayer films, and the resulting dynamic balance causes the surface of these lamellar bilayer films to exist in a 'state' qualitatively similar but quantitatively different from the conventional 2D hexatic and 2D liquid states reported previously in many other LC films (*Liquid Crystals Today* 14, 1, 2005).

Our discovery not only reinforces the existence of surface hexatic liquid in nature, but also further provides important information about the composition and organization of bilayers which are model systems for biological membranes. Besides, it provides new food for thought in regard to the location of water molecules in these bilayer membrane films. Moreover, our unique environmental TEM can also open the door to new research areas linking the disciplines of physics, chemistry, biology, and medicine.

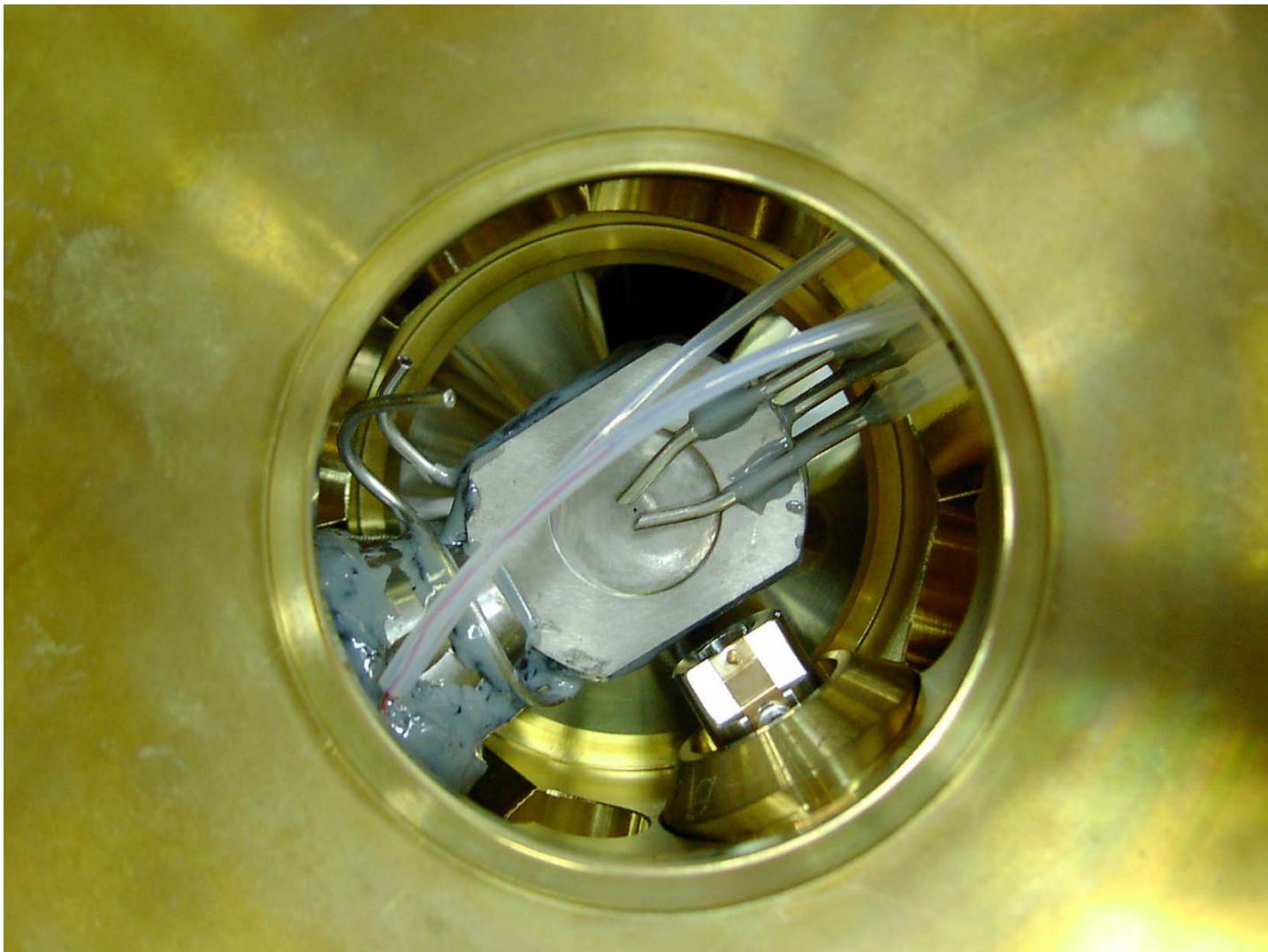
生物環境電子顯微鏡



生物環境電子顯微鏡 (Bio TEM)



水層、緩衝層、真空之動力平衡



* 生物電子顯微鏡相關之美國專利共 12 件.

1. C. Y. Chao, Ultra-thin liquid control plate and combination of box-like member and the control plate, US patent 7554099.
2. C. Y. Chao, Device for operating gas in vacuum or low-pressure environment and for observation of the operation, US patent 7365342.
3. C. Y. Chao, Method of operating liquid in the vacuum or low-pressure environment and observing the operation and device for the operation and observation, US patent 7432511.
4. C. Y. Chao, Method of operating high-pressure chamber in vacuum or low-pressure environment and observing the operation and device therefore, US patent 7544954.
5. C. Y. Chao, Observational liquid/gas environment combined with the specimen chamber of electron microscope, US patent 7425712.
6. C. Y. Chao, Semi-closed observational environment for electron microscope, US patent 7388211.
7. C. Y. Chao, Specimen box for electron microscope capable of observing general specimen and live cell, US patent 7476871.
8. C. Y. Chao, Method of observing live unit under electron microscope, US patent, 0090289, pending.
9. C. Y. Chao, Closed observational device for electron microscope, US patent, 0145289, pending.
10. C. Y. Chao, Cryo-charging specimen holder for electron microscope, US patent, 0242795, accepted.
11. C. Y. Chao, Biological specimen of electron microscope, US patent, Appl. No. 12/453952, pending.
12. C. Y. Chao, Method and apparatus for forming the doped cryo-biology specimen of electron microscope, US patent, Appl. No. 13/137712, pending.

1. C. Y. Chao, *Liquid Crystals Today* 14, Vol. 3, 1 (2005). (Issue Cover)

- * 第一次台灣學者的工作能登上國際專業液晶雜誌 *Liquid Crystals Today*.
- * 發現 lyotropic 液晶新相位。
- * 水分子可嵌於液晶酯膜分子間並進出液晶酯膜結構。
- * 首度能在穿透式電子顯微鏡中控制溼度與試片的含水量。

本人從事電子顯微鏡之研究已將近 20 年，早期自行改裝飛利浦 Tecnai 電子顯微鏡，利用動力真空以及微流通道之概念，通水至電子顯微鏡試片區域之腔體內，達到能控溫控壓並在**生物試片周遭能含水的生物環境穿透式電子顯微鏡 (Bio-TEM)**，本實驗室利用此生物環境式電子顯微鏡之技術來觀察液晶薄膜的相變，透過電子顯微鏡之繞射照片，我們發現了一個介於液體與液晶間可能的新狀態^{1,2}，此狀態很有可能就是液晶酯膜與水共存時之狀態，並提供了我們一個對於瞭解水通過液晶脂膜之動態過程之新的看法¹，此技術也已經申請了超過十項之國際專利(見以上 12 項美國專利)。此項技術之終極目標，在於能在電子顯微鏡高真空腔體內觀察水溶液環境下活體細胞奈米等級之結構，而其可行性也已經由國外之團隊證明^{3,4}，他們利用掃描穿透式環境生物電子顯微鏡(Bio-STEM)，成功的觀察用金粒子與表皮生長因子標定之成纖維細胞(厚度約 10-15μm)，藉此發現表皮生長因子接收器之位置，目前解析度已達 2-3nm，未來隨著奈米標定技術的進步其解析度可望提升到只有幾個原子的大小，同時 IBM 團隊也正全力投入積極研發 liquid-(S)TEM 的技術與其應用，目前已開啟接受各項有潛力之國際合作案的申請⁵，同時 IBM 也邀請本人共同參與 liquid membrane TEM 技術與其相關應用的開發工作。但有鑑於結構生物學在蛋白質之研究上扮演的角色日趨重要，本人之研究團隊於 5 年前便逐漸轉型朝冷凍電子顯微鏡(Cryo-EM)的技術進行研究發展。

Cryo-EM 雖然不需要進行複雜的結晶過程，但其缺點還是尚未能夠達到原子級($<3.5\text{\AA}$;已知氨基酸序列)的解析能力。在這十多年來，科學家們為了提高 Cryo-EM 所能得到的解析度，仍不斷的提升顯微鏡的功能，包括了使用相位片(phase plate)和相差修正儀(Cs & Cc corrector)等等，雖然這些方法雖然對解析度有少許的提升⁶，但卻不能改善限制 Cryo-EM 解析度最根本的問題，另外這些設備的製造都非常的困難，很難在短時間內有重大的突破，而限制 Cryo-EM 解析度最根本的問題，其實是在於輻射傷害⁷，因為在非結晶態冰中並無自由電子，故不具導電性，在電子束照射下會產生永久性無法修復的輻射傷害，目前一般冷凍生物試片能夠承受的電子劑量限制約在 $10\text{--}20\text{e}/\text{\AA}^2$ ，因為這樣的限制，Cryo-EM 很難像 X 光藉由繞射的方式就可達到原子級的解析，但若是能解決冷凍生物試片的輻射傷害問題，將可使冷凍電顯的解析度大幅提升到原子級解析($<3.5\text{\AA}$)內。為了解決非結晶態冰在電子束照射後產生輻射傷害的問題，本人於兩年前提出了理論⁸並陸續發表了三項專利⁹⁻¹¹，我們的方法乃是藉由對非結晶態冰生物試片施以適量電解質摻雜並予以充電，使得摻雜充電過後的非結晶態冰，變成有接近導體的行為，故當有輻射傷害產生時，非結晶態冰試片內的自由電子能迅速的返回修復失去電子的自由基片段，藉此可增加入射電子的劑量，使得電顯照片之訊噪比提高進而達到更高的解析能力，尤其是目前冷凍電顯技術的解析度已達 4\AA 左右¹²⁻¹⁴，與已知氨基酸序列的原子級解析 3.5\AA 已相距不遠矣，若是再配合我們所開發的實驗方法⁸⁻¹¹應可將冷凍電顯的解析度推進原子級($<3.5\text{\AA}$)的解析。此外，為了讓冷凍充電實驗的進行能順利配合電子顯微鏡的操作(因為原有 Gatan holder 改裝不易)，我們從前年開始花費約兩年的時間，終於將 Cryo-charging specimen holder 研發成功，其穩定度相當高且經我們測試過其穩定度比市面上所賣的 Cryo specimen holder 都還來得好。



未來除將繼續改進 Cryo-EM 的解析度外，還將針對調控細胞分裂的 division protein 其結構與功能做深入的探討。因為細胞分裂是生命現象中一個重要的課題也是生物生長的重要過程，生命若失去了細胞分裂是不可能如今日的地球般幽幽芳草遍地生，若失去此功能世界將不再有生物存在。本研究將從結構生物學的角度著手，利用 Cryo-EM 技術解決傳統 X-ray 結晶繞射技術在結晶上所遭遇的瓶頸，以期建構 division protein 的結構來比較說明現今科學家們所提出的 model，此外利用 Cryo-EM 技術所建構之蛋白質結構除了可解釋各個 motif 之重要性外，也將能以結構為基礎進行抑制細胞分裂過程的藥物篩選工作，期望未來能應用在更廣泛的研究及藥物開發上，進行癌症的基礎研究和治療甚至於是工業化酵素的設計，加速新型抗生素、抗癌藥物的開發並解開細胞分裂之謎。

References:

1. C. Y. Chao *et al.*, Liquid Crystals Today **14**(3), 1 (2005). ([Issue Cover](#))
2. C. Y. Chao *et al.*, Phys. Rev. Lett. **93**, 247801 (2004).
3. N. de Jonge and F. M. Ross, **Electron microscopy of specimens in liquid**, Nature Nanotechnology **6**, 695 (2011).
4. N. de Jonge, D. B. Peckys, G. J. Kremers, and D. W. Piston, **Electron microscopy of whole cells in liquid with nanometer resolution**, PANS **106**, 2159 (2009).
5. 國科會內部資料：其中 **Development of liquid cell transmission electron microscopy** 為 NSC-IBM project 中 IBM 所規劃的計畫之一。
6. J. E. Evans, C. Hetherington, A. Kirkland, L. Y. Chang, H. Stahlberg, and N. Browning, Ultramicroscopy **108**, 1636 (2008).

7. R. M. Glaeser, Cryo-electron microscopy of biological nanostructures, Physics Today, January issue, 48 (2008).
8. C. Y. Chao, Bio-molecular microscopy at atomic resolution, Chin. J. Phys. **45**, 557 (2007).
9. C. Y. Chao, Cryo-charging specimen holder for electron microscope, US patent, 0242795, accepted.
10. C. Y. Chao, Biological specimen of electron microscope, US patent, Appl. No. 12/453952, pending.
11. C. Y. Chao, Method and apparatus for forming the doped cryo-biology specimen of electron microscope, US patent, Appl. No. 13/137712, pending.
12. X. Yu, L. Jin, and Z. H. Zhou, Nature **453**, 415 (2008).
13. S. J. Ludtke, M. L. Baker, D. H. Chen, J. L. Song, D. T. Chuang, and W. Chiu, Structure **16**, 441 (2008).
14. W. Jiang, M. L. Baker, J. Jakana, P. R. Weigle, J. King, and W. Chiu, Nature **451**, 1130 (2008).