

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25247070

研究課題名(和文) 分子集合体からプロトセルへの物理

研究課題名(英文) Physics of development from molecular assembly to protocell

研究代表者

今井 正幸 (Imai, Masayuki)

東北大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60251485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではベシクルが生命機能を獲得する最初の一步に着目し、ベシクルと化学反応の連携がもたらすベシクルダイナミクスに焦点を当てて研究を進めた。その結果、単純な化学刺激によりベシクルの駆動や変形などの生命機能に特有な現象を見出し、その機構が化学刺激による膜表面の界面張力や膜面積の変調であることを明らかにした。また、自己生産するベシクル系として、膜表面での加水分解反応を利用したリン脂質系の開発に成功した。さらに自己生産ベシクルの機構を解明するために、分子シミュレーション法を開発し、分子形状とベシクルの形状が連携することにより変形・分裂・再帰の性質が保証されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：in this research we have investigated vesicle dynamics triggered by chemical stimuli, which might be the first step of the evolution from vesicles to cellular life. By applying chemical stimuli, vesicles show unique dynamics, such as migration, deformations, relevant to biological functions. We revealed that chemical modifications of the surface tension and molecular cross section are responsible for the observed vesicle dynamics. In addition we succeeded to synthesize a new artificial lipid precursor molecule, which is hydrolyzed to produce the membrane molecule at the membrane surface. The membrane molecules are incorporated into the vesicle membrane and causes the vesicle growth. The growing vesicle produces offspring vesicles by division. The vesicle division process was investigated by a molecular dynamics simulation. the simulation revealed that the coupling of molecular shape and vesicle shape plays an important role in the vesicle division.

研究分野：ソフトマター物理

キーワード：プロトセル ベシクル 化学刺激 膜分子合成 分子シミュレーション

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜は脂質・蛋白質・糖鎖など様々な成分から成る多成分膜であり、これら成分の分散状態や周囲の化学物質との反応によりその形状を変化させて機能発現を導く事が知られている。特にシグナル伝達経路では、生理活性分子がトリガーとなって様々な反応経路を経て、最終的な膜変形や代謝反応を促進する。その意味で外部から化学刺激によるベシクル膜が示すダイナミクスを理解することはソフトマター物理を生体系へ展開する場合に避けて通れない重要な目標の一つである。

### 2. 研究の目的

本研究では、球殻状の分子集合体であるベシクルが生命機能を獲得する一つの道として、ベシクルと化学反応が連携することによるベシクルダイナミクスの制御を、最低限の生命機能(ベシクルの自己生産、外部分子を利用した代謝、自己生産と代謝を情報として伝える遺伝)を有する仮想的なモデルベシクル系であるプロトセルの実現を見据えて展開することにある。具体的には、1)化学刺激による機能発現、2)膜分子合成系と結合したベシクルの自己生産機構の解明、3)多機能ベシクルの創成、にターゲットを絞り、分子集合体が自律的な世界へ発展する為の非平衡ソフトマター物理を探究する。

### 3. 研究の方法

上記3つのプロジェクトに対して、以下のよう

#### 1) 化学刺激による機能発現

マイクロピペットを用いて、特定の化学物質溶液をベシクルにインジェクションし、その応答ダイナミクスを高速ビデオカメラで計測する。そのため、このマイクロインジェクション法の実験では以下の計測技術の開発を行った。ベシクルに与えられる化学物質の濃度を、拡散方程式を解くことにより定量的に評価できるようにした。化学刺激により誘起されるベシクルの変形は、膜弾性モデルを基にした3次元解析を開発し、その定量的解析を可能にした。化学刺激により誘起されるベシクルの駆動現象では、本研究費により購入した高速・高分解能カメラにより、精密な駆動速度の計測を可能にした。これらの技術開発により、化学刺激による新しいベシクルダイナミクスの発見とその機構の解明につながった。

#### 2) 膜分子合成系と結合したベシクルの自己生産機構の解明

リン脂質分子(膜分子)が作るベシクルに、このリン脂質分子のボラ型前駆体を加えると、膜上にある触媒的作用により前駆体から膜分子が生成し、この膜分子の増加によりベ

シクルが自己生産する合成自己生産分子系を実現する人工的なリン脂質分子(膜分子)の合成を第一目的とする。次にこの人工リン脂質を用いて分子供給系(代謝系)をもつベシクルの自己生産過程を計測し、その機構を解明する。一方で、そのより単純なモデルの構築を目指したモデル系の開発を行う。まず、脂肪酸ベシクル懸濁液では、膜表面での表面電位によりカウンターイオンが凝集し、その結果解離状態のシフトから溶液中の膜分子が膜に取り込まれベシクルが成長する現象が期待される。一方、膜表面での化学反応により表面電位を制御し、それによるベシクルの成長も可能性がある。このような様々な化学反応と連携したベシクルの成長とその自己生産の探索を行う。さらに、この自己生産過程に関してはその分子機構の解明を目指して分子シミュレーション手法(Molecular Dynamics)を開発し、自己生産を行う膜分子に要求される必要条件を明らかにした。

#### 3) 多機能ベシクルの創成

プロトセルではベシクルには、様々な機能を有することが求められる。例えば、成長、分裂、物質輸送、駆動などであり、さらにこれらの機能は、持続的である必要がある。このような持続する多機能性をもつベシクルを開発するために、3成分系ベシクルを用いた探索を行う。また、このような多機能性を保証する機構を自己生産するベシクルの詳細な3次元解析から解明する。

### 4. 研究成果

上記3つのプロジェクトに対して以下の研究成果が得られた。ただし、化学刺激によるベシクルの自己駆動現象の発見など、当初予想もしていなかった新発見により、当初の想定以外の研究も進めた。

#### 1) 化学刺激による機能発現

##### 化学刺激によるベシクルの自走現象

中性リン脂質(DOPC)ベシクルに様々なイオンをマイクロインジェクションしたところ特定のイオン種において、化学刺激に応じてベシクルが濃度の高い方に駆動する現象を見出した(図1)。この自己駆動現象は基本的には、濃度勾配によるdiffusiophoresis現象の枠内で捉えられる現象であることを、ベシクル膜内で対流が存在しないことから明らかにした。ただし、pH刺激に対してはリン脂質膜が加水分解をおこし、それによりベシクル表面に界面張力の勾配が生じてベシクルが駆動することを接触角などの実験により定量的に明らかにした。これは、化学刺激によって誘起される化学反応(化学エネルギー)が運動エネルギーに変換されて駆動を引き起こす現象の例として注目される。

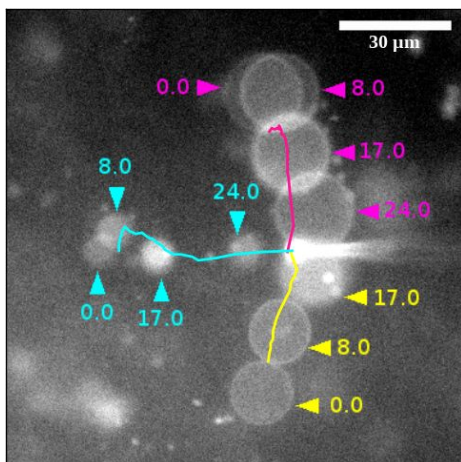


図1 NaOH のマイクロインジェクションによりピペットの方へと自走するベシクル

#### 金属イオンの作用により変形するベシクル

中性リン脂質(DOPC)ベシクルに様々な金属イオン( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ )を作用させるとベシクルが金属イオンの種類によって異なる変形を示すことがわかった。例えば  $\text{Ca}^{2+}$  では prolate 型ベシクルが stomatocyte 型ベシクルへと変形するのに対して、 $\text{Na}^+$  では prolate 型ベシクルが pear 型ベシクルへと変形することなどである。これは金属イオンが脂質分子に結合した時にその相互作用により分子断面積が減少するのか、増加するのかで決定される。本研究ではこの変形過程を3次元解析し、膜弾性理論から予想される相図と比較することにより分子断面積の変化を定量化することに成功し、Molecular Dynamics シミュレーションの結果とよく一致することを示した。

#### pH 刺激が誘起する脂肪酸ベシクルの融合

脂肪酸(デカン酸)ベシクルに NaOH 水溶液をマイクロインジェクションすると、脂肪酸分子の臨界凝集濃度(CAC)が pH に依存するため、膜分子の溶解が始まる。これにより reduced volume が増加しベシクルは球状ベシクルへと転移する。その後も膜分子の溶解が進むため、ベシクルの膜張力は上昇を続ける。この時ベシクル同士が隣接していると、その膜張力を解消するためにベシクルが融合する現象が観察された。一般に、ベシクルの融合現象はベシクル間で膜分子の移動が必要のため、非常に起こりにくいと考えられていたが、今回の pH 刺激によるベシクルの融合現象の発見は、化学刺激による膜張力の制御によりベシクルの融合を制御できる可能性を示すものである。

### 2) 膜分子合成系と結合したベシクルの自己生産機構の解明

#### 自己生産する新規膜分子系の合成

人工リン脂質分子の前駆体が、膜上にある触媒の作用して膜分子が生成する、膜分子合成系と連携した自己生産ベシクルモデル系の

新規化学合成を進めた。この目的の為、親水基にホスホコリン基を有し、末端にさまざまな化学反応に利用可能なホルミル基を持つ長鎖アルキル基を疎水基として持つ、ベシクル形成可能な化学反応性リン脂質に対し、この前駆体となる親水性分子の合成を行った。種々の合成条件を検討した結果、両親水基末端に加水分解により脱離可能な親水基が導入された双頭極性型両親媒性分子を、高純度で得ることに成功した。これにより、膜分子としてリン脂質誘導体を用いた新しいベシクル自己生産系の構築が可能となり、現在その自己生産ベシクルの3次元解析を行っている。

### 膜表面での化学変換によるベシクルの成長

新しい、膜分子合成系と結合したベシクル系として、脂肪酸が特定の pH 領域でのみベシクルを形成することを利用する方法を考案した。これは、陰イオン性の脂肪酸ベシクルでは、その表面電位によりカウンターイオンとしてのプロトン凝集させることにより pH を変調させてベシクルの成長を促進させるモデルである。このモデルに基づき実際にデカン酸ベシクルが特定の pH 領域で急激に成長する現象を確認した。この成長するベシクルを自己生産に結びつける研究が今回基盤研究(A)「ベシクルからプロトセルへの道:代謝・情報・熱力学」として採択された。

### 分裂するベシクルのシミュレーション

ベシクルの自己生産における最大の難関は、ベシクルの分裂である。我々はすでに逆コーン型とシリンドラー型の脂質からなる2成分ベシクルで再現よく分裂するベシクルを見出した。このベシクルの分裂機構を解明するために Molecular Dynamics シミュレーションを行い、分裂の再現に成功した(図2)。分裂のポイントは形状(ガウス曲率弾性率)の異なる逆コーン脂質が分裂時にネック部から排除されることによりネックが不安定化するためであることがわかった。

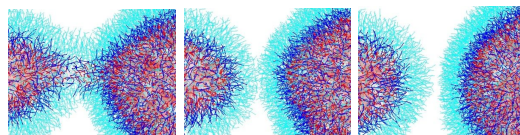


図2 逆コーン型とシリンドラー型脂質からなる2成分ベシクルの分裂過程のシミュレーション

### 3) 多機能ベシクルの創成

#### 3成分ベシクルを用いた多機能化

今まで開発してきた2成分ベシクルによる分子形状と機能の連携を多機能ベシクルへと展開するために、コーン型、シリンドラー型、逆コーン型の3成分からなるベシクルを用いて、接着・孔形成・分裂など複数の機能を併せ持つベシクルの開発を進めたが、単純な

混合だけでは多機能化はできないことが明らかになった。これは、ベシクル内での分布をうまく制御できていないことに原因がある。そこで、3成分ベシクルの詳細な相図を作成し、脂質の分散状態と機能発現の関係を検討している。残念ながらこの課題については、当初の目的まで達せられなかったが、生体膜では非常に多成分の脂質が、干渉することなくそれぞれの機能を発現させている。その機構を解明するためにも、このアプローチは継続し、多機能ベシクルの開発を進める。

#### 自己生産ベシクルの解析による恒常性の起源

上にも述べたように、多成分な生体膜が常に正しく機能を発現させるための機構を明らかにするため、自己生産ベシクルの3次元解析を行った。自己生産ベシクルでは変形-分裂-再起 といった複数のプロセスが干渉することなく進んでいる。この機構を3次元計測と膜弾性モデルによる解析により、膜の形状と脂質2分子膜内での脂質の分布が、非常に精密にリンクしていることがこの恒常性をもたらしていることを明らかにした。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計11件)

- 1) T. Jimbo, Y. Sakuma, N. Urakami, P. Zihnerl, and M. Imai  
Role of Inverse-Cone-Shape Lipids in Temperature-Controlled Self-Reproduction of Binary Vesicles  
Biophys. J, 110, 1551-1562 (2016)  
査読あり  
10.1016/j.bpj.2016.02.028
- 2) A. Kodama, Y. Sakuma, M. Imai, Y. Oya, T. Kawakatsu, N. Puff and M. I. Angelova  
Migration of phospholipid vesicles in response to OH<sup>-</sup> stimuli  
Soft Matter, 12, 2877-2886 (2016)  
査読あり  
10.1039/c5sm02220g
- 3) K. Ikari, Y. Sakuma, T. Jimbo, A. Kodama, M. Imai, P.-A. Monnard and S. Rasmussen  
Dynamics of fatty acid vesicles in response to pH stimuli  
Soft Matter, 11, 6327-6334 (2015)  
査読あり  
10.1039/c5sm01248a
- 4) K. Kurihara, Y. Okura, M. Matsuo, T. Toyota, K. Suzuki, and T. Sugawara  
A Recursive Vesicle-based Model Protocell with a Primitive Model Cell Cycle

Nature Commun. 6, 8352 1-7, (2015)

査読あり

10.1038/ncomms9352

5) Y. Sakuma and M. Imai

From Vesicles to Protocells: The Roles of Amphiphilic Molecules

Life, 5, 651-675 (2015)

査読あり

10.3390/life5010651

6) N. Urakami, A. Kakai, M. Imai and T. Yamamoto

Molecular dynamics simulation for shape change of water-in-oil droplets

Molecular Simulation, 41, 986-992 (2015)

査読あり

10.1080/08927022.2014.931582

7) H. Noguchi, A. Sakashita and M. Imai

Shape transformations of toroidal vesicles

Soft Matter, 11, 193-201 (2015)

査読あり

10.1039/c4sm01890g

8) A. Sakashita, M. Imai, and H. Noguchi  
Morphological variation of a lipid vesicle confined in a spherical vesicle

Phys. Rev. E 89, 040701(R) 1-4, (2014)

査読あり

10.1103/PhysRevE.89.040701

9) Y. Kageyama, N. Tanigake, Y. Kurokome, S. Iwaki, S. Takeda, K. Suzuki, T. Sugawara

Macroscopic Motion of Supramolecular Assemblies Actuated by Photoisomerization of Azobenzene Derivatives

Chem. Commun. 49,9386-9388 (2013)

査読あり

10.1039/C3CC43488E

10) M. Iwasaka, Y. Miyashita, Y. Mizukawa,

K. Suzuki, T. Toyota, T. Sugawara

Biaxial Alignment Control of Guanine

Crystals by Diamagnetic Orientation

Appl. Phys. Express, 6,037002 1-4, (2013)

査読あり

10.7567/APEX.6.037002

11) Y. Sakuma, T. Taniguchi, T. Kawakatsu, and M. Imai

Tubular Membrane Formation of Binary Giant Unilamellar Vesicles Composed of Cylinder and Inverse-Cone-Shaped Lipids

Biophys. J, 105, 2074-2081 (2013)

査読あり

10.1016/j.bpj.2013.09.021

[学会発表](計 23 件)

1) K. Machida, K. Suzuki, K. Yamaguchi, and T. Sugawara

Giant vesicle containing a photo-sensitive smaller giant vesicle  
2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies,  
(2015.12.15-20) Hawaii, US

2) T. Sugawara, K. Takakura, K. Kurihara, T. Toyota, and K. Suzuki

Self-reproduction of giant vesicle emerged under non-equilibrium condition  
2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015),  
(2015.12.15-20) Hawaii, US

3) M. Imai

Chemical control of vesicle dynamics  
iCeMS International Symposium,  
(2015. 9. 23-26) Kyoto University, Kyoto, Japan

4) N. Urakami

Molecular simulations of shape changes of vesicles  
International Workshop on Challenge to Synthesizing Life,  
(2015. 8. 25-26) Kagetsu-en, Hakone, Japan

5) T. Jimbo, and M. Imai

Physics of self-reproduction of vesicle reveal by 3D analysis  
International Workshop on Challenge to Synthesizing Life,  
(2015. 8. 25-26) Kagetsu-en, Hakone, Japan

6) Y. Sakuma

Approach to Minimal Cell based on membrane physics  
International Workshop on Challenge to Synthesizing Life,  
(2015. 8. 25-26) Kagetsu-en, Hakone, Japan

7) K. Suzuki, K. Machida, K. Yamaguchi, and T. Sugawara

Construction of Photo-sensitive GV in GV  
International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium 2015  
(2015. 8. 20-23) Kyoto University, Kyoto, Japan

8) T. Sugawara, K. Kurihara, M. Matsuo, T. Toyota, and K. Suzuki

Sustainability of Recursive Vesicle-based Protocell  
International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium 2015  
(2015. 8. 20-23) Kyoto University, Kyoto, Japan

9) T. Jimbo, Y. Sakuma, P. Zihnerl, N. Urakami, and M. Imai

A key for self-reproduction of vesicles  
International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium 2015,  
(2015. 8. 20-23) Kyoto University, Kyoto, Japan

10) A. Kodama, Y. Sakuma, M. Imai, Y. Oya, T. Kawakatsu, N. Puff and M. Angelova

Migration of phospholipid vesicles in response to chemical stimuli  
International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium 2015,  
(2015. 8. 20-23) Kyoto University, Kyoto, Japan

11) T. Sugawara, K. Kurihara, M. Matsuo, T. Toyota, and K. Suzuki

Recursive Vesicle-based Protocell Constructed as a Molecular System  
SysChem 2015,  
(2015. 5.19-22) Kerkrade, Netherland

12) T. Sugawara, K. Kurihara, K. Suzuki, T. Toyota, M. Matsuo

How Self-proliferative Vesicle-based Protocell Acquire Responsibility and Recursibility  
BIT's 1st Annual World Congress of Smart Material-2015,  
(2015.3.23-25) Busan, Korea

13) T. Sugawara, K. Kurihara, M. Matsuo, T. Toyota, K. Suzuki

How could a model protocell acquire identity as life through autonomous responses towards external stimuli?  
4th Symposium on Artificial Life and Biomimetic Functional Materials,  
(2014.11.28) Tokyo University, Tokyo

14) T. Sugawara, M. Matsuo, K. Kurihara, T. Toyota, K. Suzuki

How Prebiotic Materials Collaborate in a Vesicle-based Protocell  
Open Questions on the Origin of Life 2014,  
(2014.7.12-13) International Institute for Advanced Studies, Kyoto, Japan

15) T. Sugawara, M. Matsuo, K. Kurihara, T. Toyota, K. Suzuki

Constructive Approach towards a Vesicle-based Protocell  
Origins2014, 2nd ISSOL - The International Astrobiology Society and Bioastronomy (IAU C51) Joint International Conference,  
(2014. 7. 6-11) Nara Prefecture New Public Hall, Nara, Japan

16) T. Jimbo, Y. Sakuma, P. Ziherl, and M. Imai

Physical background of self-reproduction of vesicles  
Open Questions on the Origin of Life 2014,  
(2014.7. 12-13) International Institute for Advanced Studies, Kyoto, Japan

17) K. Suzuki

Morphological Change of Giant Vesicle Caused by Molecule-based Dynamics  
The 9th International Symposium on the Kanagawa University - National Taiwan University Exchange Program 2013,  
2014年3月15日, 神奈川大学、神奈川県

18) M. Imai

Chemophoresis of Vesicle  
Workshop on Cross Correlation & Transport Phenomena in Soft Matter  
(2014. 1. 28) Waseda University, Tokyo, Japan

19) Y. Oofuji, N. Urakami, T. Yamamoto  
Dissipative Particle Dynamics Simulation of shape changes of vesicle  
The International Conference on Artificial Life and Robotics 2014,  
(2014.1.13) B-Con PLAZA, Oita, Japan

20) N. Urakami, A. Takaki, M. Imai, T. Yamamoto

Molecular dynamics simulation for shape change of water-in-oil droplets  
3rd International Conference on Molecular Simulation  
(2013.11.18) Kobe International Conference Center, Kobe, Japan

21) Y. Sakuma

Binary lipid vesicles having functions of protocell  
International Workshop "From Soft Matter to Protocell"  
(2013. 9. 19) Tohoku University, Sendai, Japan

22) M. Imai

Chemophoresis of Neutral Phospholipid Vesicle  
International Workshop "From Soft Matter to Protocell"  
(2013. 9. 19) Tohoku University, Sendai, Japan

23) Y. Sakuma and M. Imai

From Vesicle to Protocell  
245th ACS National Meeting and Exposition  
(2013. 4. 8) New Orleans, USA

〔図書〕(計2件)

1) Biomembrane as a Soft Matter  
Yuka Sakuma and Masayuki Imai  
Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials  
Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2015).  
ISBN 978-3-642-29647-5

2) リピッドワールドの物理－脂質ベシクルの形態とダイナミクス  
佐久間由香、今井正幸  
生体膜の分子機構－リピッドワールドが先導する生命科学  
梅田真郷編 (2014) 化学同人 京都

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ  
東北大学理学部物理学科今井研究室  
<http://www.bio.phys.tohoku.ac.jp>  
山口大学理工学研究科情報科学分野浦上研究室  
<http://mms.sci.yamaguchi-u.ac.jp/~urakami/paper.html>  
神奈川大学理学部化学科菅原研究室  
<http://www.chem.kanagawa-u.ac.jp/~suawara/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井正幸 (IMAI, Masayuki)  
東北大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号: 60251485

(2) 研究分担者

佐久間由香 (SAKUMA, Yuka)  
東北大学・大学院理学研究科・助教  
研究者番号: 40630801

浦上直人 (URAKAMI, Naohito)  
山口大学・理工学研究科・准教授  
研究者番号: 50314795

鈴木健太郎 (SUZUKI, Kentaro)  
神奈川大学・理学部・外部資金雇用研究者  
研究者番号: 60512324

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: