

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32702

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870837

研究課題名(和文) 真核細胞モデルを視野に入れた内部に区分けのあるベシクル系の構築と利用

研究課題名(英文) Construction of photo-sensitive GV(giant vesicle)-in-GV inspired by eucaryotic cell structure

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：袋状分子集合体ジャイアントベシクル(GV)は、その内部に種々の物質を封入することができる。ここに互いに相互作用しうる溶液を区別してを封入し、外部刺激によってそれらが相互作用できるようになれば、内部変化に誘発される、実際の細胞に通じたダイナミクスが期待される。そこで、GV内部に紫外線開孔性のある小GVを封入した二重ベシクルの構築を試みた。この二重ベシクルに、内部GV中にDNAを、さらに外部GV内水相にDNA感応型蛍光色素をそれぞれ封入することに成功した。これら封入物は、紫外線を照射しない限り相互作用しないが、紫外線照射すると、両者間で複合体が形成されることを蛍光顕微鏡観察により確認した。

研究成果の概要(英文)：Giant Vesicle (GV) is a spherical self-assembly with an inner water phase which is separated from a bulk phase by its membrane. GV encapsulation of a chemical reaction which can be triggered by an external stimulus is interesting from the viewpoint of construction of artificial cell containing inter reaction system. In this study, a GV containing a photo-sensitive smaller GV as a microcapsule was constructed by a w/o emulsion centrifugation method using a prepared dispersion of internal microcapsules containing a solution of double stranded DNA (dsDNA): the membrane of the encapsulated microcapsule contains a photo-labile phospholipid. The dsDNA in the microcapsule was released into the water pool of the external GV containing a dsDNA intercalator (SYBR-Green I, SG) by UV irradiation. Photo-induced increase of the fluorescence originated from the dsDNA-SG complex was traced by a real-time fluorescence microscopy.

研究分野：有機物理化学

キーワード：ベシクル 人工細胞モデル 光分解反応 DNA リン脂質

1. 研究開始当初の背景

リン脂質に代表される両親媒性分子は、水中での自己集合化によりベシクルと呼ばれる袋状構造体を形成する。その内部には、脂質二分子膜によって外界から隔てられた内水相を有し、さまざまな物質を封入できる。細胞膜に覆われた細胞質を持つ生体細胞と類似した、このベシクル構造を利用した、ベシクル型人工細胞の研究が進められている[1]。従来のベシクル型人工細胞[2]では、ベシクル内部に直接情報複製系が封入された原核細胞と類似した構造を有していたが、より高度な人工細胞の構築を目指すには、ベシクル内部にさらに小さなベシクルが封入された、真核細胞に類似した構造を持つベシクルの構築が有用であると考えられた。このようなベシクルを構築することで、外的刺激によって、任意のタイミングで化学反応を引き起こしたり、競合する複数の化学反応を封入したりすることが期待できる。これを通じ、新しい人工細胞の構築への発展が期待できる。

2. 研究の目的

ベシクル内水相に、時間と共に進行する化学反応系のような「アクティブな系」を封入してやれば、内部状態の変化によって、自ら種々の形態変化ダイナミクスを引き起こすベシクルの構築が期待される。このような、マクロ形態変化の原因を内在するシステムは、内部での代謝反応によって自らを維持する細胞と相同の性質を持つと見なせる。しかし、ベシクル封入前から変化するアクティブな系を、観察直前まで初期状態のまま保持することは一般に難しい。そこで、核膜や小胞体を持つ真核細胞を参考に、ベシクル内部へと小さなベシクルを導入することが考えられる。小ベシクルを仕切りとすることで、アクティブな系を相互作用前の状態に留め置くことができる。さらに、区別である小ベシクルを、外的刺激によって開孔させることで、封入された系を活性化させられる。この研究を通じ、化学を基盤とする人工細胞研究に有用な知見を得るだけでなく、ベシクル内部空間の有効利用や、生物物理や膜物理と言った化学以外の分野にまで波及する成果へと繋げていく。

3. 研究の方法

(1) ベシクル(外ベシクル)の内部にカプセルとしての小ベシクル(内ベシクル)が封入された二重ベシクルを形成する。そのために、まず内ベシクルとなるベシクルを含む分散液を先に調整し、次いで、その分散液を内水相とするベシクルを作ることで行う。その際、内外ベシクルの内水相や二重ベシクルの外水相中の成分は、目的に合わせて個別に調整する必要がある。しかし、標準的なベシクル調整法である薄膜法では、水相中の成分の制御が困難である。そこで、油相中に形成させた脂質で覆われた水滴を、遠心分離によって水相に押し出す“遠心沈降法[3]”が有用であると考えた。その際、一段階目の内ベシクルの調整も遠心沈降法で行う二段階遠心沈降法と、一段階目の内ベシクル調整は薄膜法によって調整す

るハイブリッド法による調整を行うこととした。

(2) 内ベシクル内部に封入された成分を、何らかの外的刺激によって放出できなければ、二重ベシクル中の各成分を会合させ、活性化させることが出来ない。そこで、山口らによって報告された、疎水部末端に紫外線照射によって親水性となるカルボン酸ニトロベンジル部位を有するリン脂質(光応答型リン脂質、図1)から成る紫外線応答性ベシクル[4]に着目した。

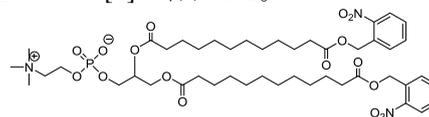


図1 光応答型リン脂質

この分子は通常状態ではベシクルを形成可能なリン脂質として振る舞う。しかし、350 nm 付近の紫外線が照射されると、ニトロベンジル部位が切り離され極性基であるカルボン酸部位が出現し、分子は成膜性のない双頭極性型両親媒性分子へと変化する。従って、この分子からなるベシクルは、紫外線照射によって崩壊し、内封物質を放出することになる。

このようなベシクルを内ベシクルとして用いるとともに、外ベシクル膜には紫外線に対する吸収を持たない一般的な脂質を用いて二重ベシクルを調整すれば、紫外線照射によって内ベシクルだけを崩壊し、封入された成分を互いに混合させることが出来る。

(3) 構築された紫外線応答性二重ベシクルにおいて、紫外線照射前の、内ベシクルによる物質の区分と、紫外線照射後の、内ベシクルから外ベシクル内水相への物質放出を利用して、紫外線照射によるベシクル内状態の変調を検証するために、二重鎖 DNA と、それを検知する蛍光色素 SYBR Green I (SG) とが、個別に封入された二重ベシクルを構築する(図2)。

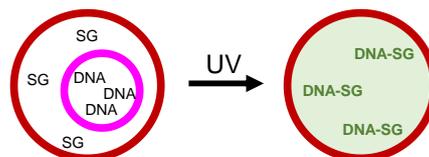


図2 紫外線照射によって引き起こされるベシクル内部での DNA-SG 複合体形成

ベシクルに、外部からの DNA 添加が、特徴的な形態変化を引き起こすことが知られている[5]。もし、ベシクル内部から DNA を供給することが出来れば、ベシクル自身がダイナミクスを引き起こす系と見なせ、人工細胞を研究する上で興味深い。酵素反応を利用して、ベシクル内部で DNA を増やす方法は知られているが[6]、この場合 DNA 増幅は顕微鏡ステージ上では行うことが出来ないため、変化の途中過程を追うことが難しい。本二重ベシクルを用いることで、DNA 放出前から放出後までの一連のダイナミクスを観察可能な系の構築へ繋がるものと期待できる。

さらに SG は、DNA に対して強い配位能を有

するとともに、複合体形成後は 1000 倍以上蛍光強度が増大することが知られており[7]、紫外線照射前後の、DNA と SG との錯形成状態を、蛍光顕微鏡で容易に区別できる。

4. 研究成果

(1) 二段階遠心沈降法によって、二重ベシクルの構築を行った。まず、1回目の遠心沈降法により、内ベシクルを含む外ベシクル内水相となるベシクル分散液を調整した。さらに、2回目の遠心沈降法によって、調整したベシクル分散液を内水相とする二重ベシクルを構築した。モデル封入物であるピラニンを用いることで、内ベシクル内部にのみ、ピラニンが封入された二重ベシクルの構築を確認した。しかし、二重ベシクル形成の効率が悪かったため、一段階目のベシクル調整を、薄膜法によって行うハイブリッド法を試みた。その結果、高頻度で二重ベシクルが形成されることを確認した(図3)。

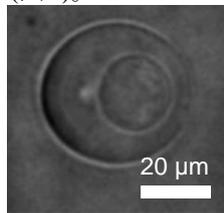


図3 ハイブリッド法で調整した二重ベシクル

(2) 従来、光応答型リン脂質の合成には、塩化カドミウムを用いた方法が用いられてきた[4]。しかし、環境負荷の大きなカドミウムの利用は出来る限り避ける方が望ましい。そこで、市原らによって提案された、珪藻土(セライト)を用いたリン脂質合成法[7]を利用したカドミウムフリーの合成を試みた。種々の条件を検討することで、従来法と同様の収率で目的の光応答型リン脂質を得る合成法を確立した。

(3) 内ベシクルにのみ光応答型リン脂質を含有させた二重ベシクルを、ハイブリッド法により調整した。紫外線照射による、内ベシクル内部から外ベシクル外水相への物質放出能を、モデル封入物質としてピラニンを用いた蛍光顕微鏡観察にした(図4)。紫外線照射前は、ピラニン由来の蛍光は内ベシクル内部にのみ局在していたが、照射後はそれが消失し、期待通り放出が行われたことが確認された。

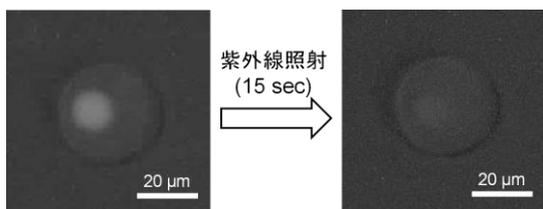


図4 紫外線照射による内ベシクルからの物質放出

(4) 図3に示した DNA と SG が内部に別々に封入された紫外線応答性二重ベシクルをハイブリッド法により調整した。外ベシクル内水相には、内ベシクル内部にのみ DNA が存在し、それ以外の水相には SG が存在する状態を作る必要があ

るので、内ベシクル分散液調整時に、それらを制御する必要がある。薄膜法では、このような物質制御は困難であるが、今回は、酵素反応を用いる方法で、この点を解決した。薄膜からベシクルを膨潤する際、DNA 溶液を用いることで、内外水相に DNA が存在するベシクル分散液を調整した。ここに、DNaseを加え、外水相の DNA を完全に加水分解した。ただし、酵素が残ったままだと、後の DNA 放出の際、放出された DNA が分解してしまうので、熱を加え DNase を熱変成させた。ここに、SG を加えて、外ベシクル内水相となるベシクル分散液を調整した。これを用いて遠心沈降法を行うことで、目的とする二重ベシクルが得られた(図5)。

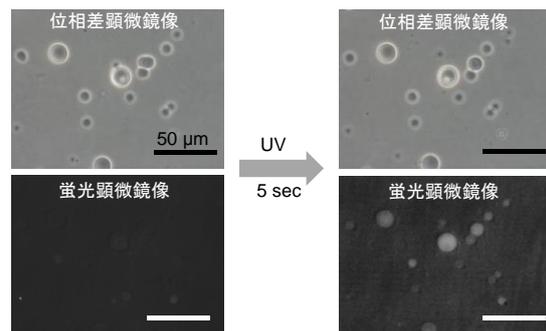


図5 DNA と SG を区別して封入した二重ベシクルの位相差および蛍光顕微鏡像

得られた二重ベシクルの位相差および蛍光顕微鏡像を図5左に示す。複数のベシクルが観察されているが、どのベシクル内部にも、明確な蛍光は観察されておらず、これは、二重ベシクル内で DNA と SG が区別されて封入されていることを示す。ここに、紫外線を照射すると、観察されているほぼすべてのベシクルで、内部での蛍光強度の増大が見られた。これは、内ベシクルから放出された DNA が SG と会合し、強い傾向特性を有する DNA-SG 錯体を形成した結果であると考えられ、目的通りの二重ベシクルが形成されたことが確認された。

(5) 紫外線応答型リン脂質合成を試みている際、オレイン酸のケージド化合物、2-ニトロベンジルオレイン酸(NBO)を得た。この分子は、紫外線照射によって塩基性水中で界面活性のあるオレイン酸を与える。

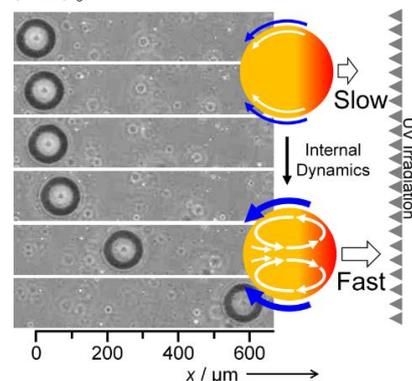


図6 紫外線照射によって紫外線照射方向に向かって駆動する NBO 油滴

NBO からなる粒径 100 μm 程度の油滴に紫外線を照射したところ、油滴が紫外線源の方に向かって動き出す正の走光性ダイナミクスを見出した(図6)。これは、紫外線の照射面でのみ活発に起こる光分解反応により、照射面の表面張力が選択的に低下するために、油滴前方を上流とする水相のマランゴニ流が出現するためであると理解される。さらに、同じ光強度の紫外線を照射し続けると、油滴の移動速度に非線形の加速現象が見られることを確認された。

<引用文献>

- ① 菅原・鈴木, 分子科学の挑戦, *Mol. Sci.* **4**, A033 (2010)など参照
- ② K. Kurihara, K. Suzuki, T. Sugawara *et al.*, *Nature Chem.* **3**, 775 (2011).
- ③ S. Pautot *et al.*, *Langmuir* **19**, 2870 (2003)
- ④ K. Yamaguchi *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **71**, 1923 (1998)
- ⑤ M. Angelova *et al.*, *Eur. Biophys. J.* **28**, 142 (1999).
- ⑥ K. Shohda, K. Suzuki, T. Sugawara *et al.*, *Soft Matter* **7**, 3750 (2011)
- ⑦ A.I. Dragan *et al.*, *J. Fluoresc.* **22**, 1189 (2012).
- ⑧ K. Ichihara *et al.*, *Chem. Phys. Lipids* **137**, 94 (2005)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

- ① K. Suzuki, T. Sugawara, Phototaxis of Oil Droplets Comprising a Caged Fatty Acid Tightly Linked to Internal Convection, *ChemPhysChem*, 査読有, 2016, in press.
DOI: 10.1002/cphc.201600273
- ② K. Kurihara, Y. Okura, M. Matsuo, T. Toyota, K. Suzuki, T. Sugawara, A Recursive Vesicle-based Model Protocell with a Primitive Model Cell Cycle, *Nature Communications*, 査読有, Vol. 6, 2015, Article Number 8352.
DOI:10.1038/ncomms9352
- ③ 菅原 正, 鈴木 健太郎, 自らが増殖する人工細胞の化学構築, 高分子, 査読無, Vol. 63, 2014, pp. 382-384.
<http://main.spsj.or.jp/c5/kobunshi/kobu2014/1406.html#382>
- ④ 菅原 正, 鈴木 健太郎, 栗原 顕輔, 豊田 太郎, 分子システムとしてつくる人工細胞, 豊田研究報告, 査読無, Vol. 67, 2014, pp. 63-70.
http://www.toyotariken.jp/Toyota_report/67/k-01.pdf
- ⑤ 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, *Chemical Communications*, 査読有, Vol. 49, 2013, pp. 9386-9388.

DOI:10.1039/C3CC43488E

[学会発表] (計 41 件)

- ① 鈴木 健太郎, 町田 巧太郎, 山口 和夫, 菅原 正, 紫外線によりトリガーされるベシクル内部での DNA 複合体形成, 日本化学会第 96 春季年会, 2016/3/24, 同志社大学京田辺キャンパス(京都府・京田辺市)
- ② K. Suzuki, N. Nakayama, T. Sugawara, Self-driven motion of oil-droplet emerged after chemical reaction, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), 2015/12/18, Honolulu (US)
- ③ K. Machida, K. Suzuki, K. Yamaguchi, T. Sugawara, Giant vesicle containing a photo-sensitive smaller giant vesicle, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), 2015/12/17, Honolulu (US)
- ④ 町田 巧太郎, 鈴木 健太郎, 山口 和夫, 菅原 正, 二重ベシクルの紫外線照射による光応答性内部ベシクルからの内包物の放出, 第 26 回基礎有機化学連合討論会, 2015/9/24, 愛媛大学文京キャンパス(愛媛県・松山市)
- ⑤ K. Suzuki, K. Machida, K. Yamaguchi, T. Sugawara, Construction of Photo-sensitive GV in GV, International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium 2015 (SFS2015), 2015/8/21, Kyoto(Japan)
- ⑥ 町田 巧太郎, 伊藤 慎弥, 中島 拓磨, 鈴木 健太郎, 山口 和夫, 菅原 正, 紫外線応答型二重ベシクル, 日本化学会第 95 春季年会, 2015/3/27, 日本大学船橋キャンパス(千葉県・船橋市)
- ⑦ 町田 巧太郎, 伊藤 慎弥, 中島 拓磨, 鈴木 健太郎, 菅原 正, 紫外線応答型ベシクルを目指した珪藻土吸着法によるリン脂質合成, 第 25 回基礎有機化学討論会, 日本化学会第 95 春季年会, 2014/9/7, 東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.kanagawa-u.ac.jp/~sugawara/>

<http://suzukiscientia.web.fc2.com>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 健太郎 (SUZUKI, Kentaro)

神奈川大学・理学部化学科・外部資金雇用研究者

研究者番号:60512324

(2)連携研究者

菅原 正 (SUGAWARA, Tadashi)

神奈川大学・理学部化学科・教授

研究者番号:50124219