

平成 30 年 4 月 23 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05463

研究課題名(和文)2次元流体膜で覆われたミクロ3次元粘性流体における相挙動の解明

研究課題名(英文)Elucidation of phase behavior of viscous polymer droplet covered with viscous membrane

研究代表者

柳澤 実穂 (YANAGISAWA, Miho)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：50555802

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 18,600,000円

研究成果の概要(和文):細胞や細胞膜モデルでは、異常拡散を含む非平衡現象が生じることが近年報告されていた。我々はその要因として、高濃度の高分子溶液をミクロ空間に閉じ込めると、高分子の混み合いが顕著化して粘弾性的となり、バルクとは異なる振る舞いが生じるためであると考えた。本研究では、高分子溶液を閉じ込めた細胞モデルでの分子拡散・膜界面揺らぎ等の解析を通じてこれを検証し、膜界面と高分子の相互作用が生み出す非平衡現象を解明することを目的とした。その結果、高分子混雑とミクロサイズ閉じ込めの両方が実現される時、バルクとは異なる分子拡散が生じることや、細胞膜モデルが内部粘性に応じて異なる変形プロセスを示すことを見出した。

研究成果の概要(英文): Non-equilibrium phenomena such as abnormal diffusion have been reported in living cells and cell membrane models. As a factor of the non-equilibrium phenomenon, we assumed that the dense polymer becomes viscoelastic and behaves differently from bulk when confining high concentration polymer solution in the microspace. In this study, we aimed to elucidate the non-equilibrium phenomenon due to the interaction between membrane and polymer by analyzing molecular diffusion and membrane fluctuation using a cell model confining a polymer solution. As a result, a non-equilibrium phenomenon such as (i) abnormal molecule diffusion, (ii) membrane deformation of the cell membrane model due to internal viscosity, for example, was observed when a highly crowded polymer was confined in the microspace.

研究分野：ソフトマター物理

キーワード：高分子混雑 細胞モデル 分子拡散 膜変形 粘弾性 ミクロ閉じ込め

### 1. 研究開始当初の背景

生物の最小単位である細胞や、細胞膜モデルとして汎用されるリン脂質膜小胞(ベシクル)では、非平衡性とエルゴード性の破れが生じることが近年示唆されている。また我々の最近の研究から、高粘性の高分子溶液をリン脂質膜でマイクロ空間に閉じ込めると、高分子の拡散速度が低下することや、相分離の濃度場が熱平衡状態に達しないことが分かってきた。以上から、高濃度の高分子溶液を脂質膜で覆うと、分子の混み合いが顕著化して粘弾性的となり、バルクとは異なる振る舞いが生じるという仮説をたてるに至った。この仮説の検証は、エマルジョンなど、二次元流体膜で閉じ込められたマイクロな三次元粘性流体の振る舞いに対する重要な知見を与えるとともに、細胞が粘弾性流体として振る舞う条件の物理的背景を記述可能にする点で極めて重要である。

本研究では、細胞モデルを用いてこの仮説を検証することを目指した。

### 2. 研究の目的

脂質膜で覆われた高粘性流体がマイクロ空間で相互作用すると、混み合いの効果が顕著化して粘弾性的となり、異常拡散やエルゴード性の破れといった、バルクとは異なる振る舞いが生じる可能性を検証する。本目的のために、高粘性流体からなるマイクロ液滴を脂質膜で覆った細胞モデルを用いて、脂質膜と高分子のマイクロ空間での混み合いが、拡散・相分離・膜変形に対してどのような影響を与えるのかを包括的に解析することとした。

### 3. 研究の方法

高粘性流体として、合成高分子であるポリエチレングリコール(PEG)水溶液と、球状タンパク質である Bovine Serum Albumin(BSA)水溶液を用いた。PEG水溶液は、幅広い濃度領域で単純粘性流体として振る舞うことが知られており、またBSA溶液も我々の最近の研究から洗浄により単純粘性流体として振る舞うことが確認できている。そこで、これら高分子溶液を、リン脂質膜で覆うことでマイクロ空間へ閉じ込め、細胞モデルとして用いることとした。

この細胞モデル中での高分子の振る舞いを解析するために、本予算にて購入した共焦点レーザー顕微鏡を用いて、蛍光相関分光法(Fluorescence correlation spectroscopy; FCS)により分子拡散を測定することとした。拡散分子は、緑色蛍光タンパク質(Green fluorescent protein, GFP)を用いた。

また膜変形に対する内包した高粘性流体の影響を解析するために、BSA溶液を内包したベシクルを作成し、その高浸透圧下での脱水変形と内部粘度との相関関係を解析した。この時の内部粘度は、上記の分子拡散により得られた値を参考とした。

### 4. 研究成果

本研究では、高分子溶液を閉じ込めた細胞モデルを用いて、高分子拡散・膜界面揺らぎなどの解析を通し、膜界面と高分子の相互作用が生み出す非平衡現象を解明することを目的とした。本研究課題に対し、以下の成果を上げた。

(1) リン脂質膜で覆われたマイクロメートルサイズの高分子液滴における分子拡散を、蛍光相関分光法により解析した。高分子混雑とマイクロサイズ閉じ込めの両方が実現される時、バルクよりも速い拡散が生じることを見出した。またその要因として、高分子鎖の配向や不均一分布に由来する低次元での分子拡散を提案した(論文1)。

(2) 異なるサイズ・形状をもつ高分子を混雑分子として用い、(1)同様に高分子混雑する細胞モデル中での分子拡散を解析した。混雑分子の濃度が同じであっても、高分子のサイズ・形状によりその影響が変化することを明らかにした(論文準備中)。

(3) 閉じ込め界面が分子拡散に与える影響を、細胞モデルを覆う膜界面からの距離依存性として解析し、混雑分子の有無により、界面距離依存性が変化することを見出した(2018年春季物理学会他にて発表)。

(4) 高粘性流体を内包したベシクルの膜変形に対する内部粘度の影響を解明するために、BSA溶液を内包したベシクルの脱水変形を解析した。我々はこれまでに、タンパク質溶液を内包したベシクルを高浸透圧環境に置くと、内部粘性に依存して膜小胞形成(budding)かチューブ状突出形成(tubing)が現れることを報告している。しかし、これらの変形を決定付ける、内部粘度の閾値が不明であった。そこで本研究では、粘度が既知のBSA溶液をベシクルに内包し、その後高浸透圧下に置くことで粘度の閾値を実験的に見出した。その結果、粘度値は約2 mPa・sであり、変形開始前の初期内部粘度が最終的な変形パターンを決定することを突き止めた(論文5)。

さらに、生体高分子ゲルを内包することで細胞モデル内の粘弾性を制御する実験系も立ち上げつつある(論文4,9)。今後は、こうした内部粘弾性の変化に伴うベシクルの膜変形を解析することで、膜のゆらぎと内部粘弾性との相関関係を解明したい。

上記(1)~(4)の研究成果は、二次元流体膜で閉じ込められたマイクロな三次元粘性流体の振る舞いに対する重要な知見を与えるとともに、細胞が粘弾性流体として振る舞う条件の物理的背景を解明する上での大きな一歩となった。

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 C. Watanabe & M. Yanagisawa, “Cell-size confinement effect on protein diffusion in crowded poly(ethylene)glycol solution”, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 査読有, 20, 8842-8847 (2018)  
DOI: 10.1039/C7CP08199E

② Y. Yamashita, Y. Yamashita, M. Yanagisawa, M. Tokita, “Dynamics of Spinodal Decomposition in a Ternary Gelling System”, *Gels*, 査読有, 4 (2), 26 (2018)  
DOI: 10.3390/gels4020026

③ M. Yanagisawa, C. Watanabe, K. Fujiwara, “Single micrometer-sized gels: Unique mechanics and characters for applications”, *Gels*, 査読有, 4 (2), 29 (2018)  
DOI: 10.3390/gels4020029

④ A. Sakai, Y. Murayama, K. Fujiwara, T. Fujisawa, S. Sasaki, S. Kidoaki, M. Yanagisawa, “Increasing Elasticity through Changes in the Secondary Structure of Gelatin by Gelation in a Microsized Lipid Space”, *ACS Cent. Sci.*, 査読有, 印刷中.  
DOI: 10.1021/acscentsci.7b00625

⑤ K. Fujiwara & M. Yanagisawa, “Liposomal internal viscosity affects the fate of membrane deformation induced by hypertonic treatment”, *Soft Matter*, 査読有, 13, 9192-9198 (2017)  
DOI: 10.1039/C7SM01421J

⑥ K. Nishizawa, K. Fujiwara, M. Ikenaga, N. Nakajo, M. Yanagisawa, and D. Mizuno. “Universal glass-forming behavior of in vitro and living cytoplasm”, *Sci. Rep.*, 査読有, 7 (1), 15143 (2017)  
DOI: 10.1038/s41598-017-14883-y

⑦ 黒川知加子, 柳澤実穂, 瀧ノ上正浩, 「骨格で支えられた頑丈な人工細胞」, 月刊化学, 査読無し, 2018年1月号, 40-43 (2017)  
<https://www.kagakudojin.co.jp/book/b333385.html>

⑧ 黒川知加子, 柳澤実穂 「人工細胞骨格をもつリポソームの作製と薬用カプセルへの応用」, 月刊ファインケミカル, 査読無し, 46 (12), 36-43, (2017)  
[http://www.cmcbooks.co.jp/products/detail.php?product\\_id=5363](http://www.cmcbooks.co.jp/products/detail.php?product_id=5363)

⑨ C. Kurokawa, K. Fujiwara, M. Morita, I. Kawamata, Y. Kawagishi, A. Sakai, Y. Murayama,

S. M. Nomura, S. Murata, M. Takinoue, and M. Yanagisawa, “DNA cytoskeleton for stabilizing artificial cells” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 114 (28), 7228-7233 (2017)  
DOI: 10.1073/pnas.1702208114

⑩ 柳澤実穂, 藤原慶, 「高分子混雑効果を細胞モデル系から読み解く」 *生物物理*, 査読有, 55:246-249 (2015)  
DOI: 10.2142/biophys.55.246

⑪ M. Morita, H. Onoe, M. Yanagisawa, H. Ito, M. Ichikawa, K. Fujiwara, H. Saito, and M. Takinoue\*. “Droplet-shooting and size filtration (DSSF) method for synthesis of cell-sized liposomes with controlled lipid compositions”, *ChemBioChem*, 査読有, 16: 2029-2035, (2015).  
DOI: 10.1002/cbic.201500354

[学会発表] (計 23 件)

① 柳澤実穂, 藤原慶. 「粘性流体を内包したリポソームの脱水変形」, 日本物理学会第73回年次大会, 2018年3月25日, 東京理科大学・野田キャンパス (千葉県野田市), ポスター発表.

② 黒川知加子, 瀧ノ上正浩, 柳澤実穂. 「DNA からなる骨格を備えた人工膜の力学的測定」, 日本物理学会第73回年次大会, 2018年3月25日, 東京理科大学・野田キャンパス (千葉県野田市), ポスター発表.

③ 渡邊千穂, 柳澤実穂. 「高分子混雑したミクロ液滴における分子拡散挙動の液滴サイズ依存性」, 日本物理学会第73回年次大会, 2018年3月23日, 東京理科大学・野田キャンパス (千葉県野田市).

④ 小堀雄大, 渡邊千穂, 柳澤実穂. 「タンパク質溶液中の分子拡散に対するミクロ空間閉じ込めの影響」, 第4回サイボウニクス研究会, 2017年12月1日, 東京農工大学・小金井キャンパス (東京都小金井市), ポスター発表.

⑤ 伊藤遥紀, 柳澤実穂. 「高浸透圧下における相分離リポソームの膜変形」, 第4回サイボウニクス研究会, 2017年12月1日, 東京農工大学・小金井キャンパス (東京都小金井市), ポスター発表.

⑥ 渡邊千穂, 柳澤実穂. “Micrometric Confinement Induces Anomalous Diffusion in Semi-dilute Polymer Solution”, *International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium 2017 (SFS2017)*, 2017年11月17日, 仙台国際センター (宮城県仙台市), ポスター発表.

⑦ 黒川知加子, 藤原慶, 森田雅宗, 川又生吹, 川岸由, 酒井淳, 村山能宏, 野村M慎一郎, 村田智, 瀧ノ上正浩, 柳澤実穂. “Liposome stabilized with cytoskeleton of DNA gel”,

International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium 2017 (SFS2017), 2017年11月17日, 仙台国際センター(宮城県仙台市), ポスター発表.

⑧ 柳澤実穂, 「粘弾性溶液を内包した細胞膜モデルの膜変形や拡散挙動」, 日本物理学会2017年秋季大会, 2017年9月23日, 岩手大学上田キャンパス(岩手県盛岡市), 招待講演.

⑨ 柳澤実穂, “The world of macromolecular crowding”, 日本生物物理学会第55回年会, 2017年9月20日, 熊本大学(熊本県熊本市).

⑩ 渡邊千穂, 柳澤実穂, “A synergistic effect of macromolecular crowding and biomimetic confinement on molecular diffusion”, 日本生物物理学会第55回年会, 2017年9月20日, 熊本大学(熊本県熊本市).

⑪ 渡邊千穂, 柳澤実穂, “Anomalous Diffusion in Crowding Biomimetic Confinements”, Liquid 2017, 10TH LIQUID MATTER CONFERENCE, 2017年6月17日18日, スロベニア・リュブリャナ, ポスター発表.

⑫ 渡邊千穂, 柳澤実穂, 「脂質膜で覆われたミクロ高分子液滴における高分子混雑と異常拡散」, 第72回日本物理学会年会, 2017年3月20日, 大阪大学・豊中キャンパス(大阪府豊中市), ポスター発表.

⑬ 青木菜摘, 柳澤実穂, 「リポソーム平衡形状における外力の影響」, 第3回サイボウニクス研究会, 2016年12月20日, 東京工業大学・すすがけ台キャンパス(神奈川県横浜市), ポスター発表.

⑭ 渡邊千穂, 柳澤実穂, 「細胞サイズ液滴内における高分子溶液の拡散とその空間閉じ込めの影響」, 第54回日本生物物理学会年会, 2016年11月26日, つくば国際会議場(茨城県つくば市), ポスター発表.

⑮ 黒川知加子, 藤原慶, 森田雅宗, 村田智, 瀧ノ上正浩, 柳澤実穂, “Artificial biomembrane with skeleton network of designed DNA gel”, 4th International Soft Matter Conference, 2016年9月13日, フランス・グレノーブル, ポスター発表.

⑯ 渡邊千穂, 柳澤実穂, 「ミクロ液滴による高分子溶液閉じ込め効果: 拡散係数と閉じ込めサイズの相関」, 第15回関東ソフトマター研究会, 2016年8月15日, 首都大学東京・南大沢キャンパス(東京都八王子市), ポスター発表.

⑰ 柳澤実穂, “Shape regulation of microparticles mimicking cells”, IEEE-NEMS 2016, 2016年4月19日, ホテル松島大観荘(宮城県松島町), 招待講演.

⑱ 黒川知加子, 藤原慶, 森田雅宗, 川又生吹, 村田智, 瀧ノ上正浩, 柳澤実穂, 「DNA ゲル

の裏打ち構造を備えたエマルションの作製と表面張力測定」, 第71回日本物理学会年会, 2016年3月22日, 東北学院大学・泉キャンパス(宮城県仙台市).

⑲ 藤原慶, 柳澤実穂, “Membrane deformation determined by intracellular viscosity”, Pacifichem 2015, 2015年12月18日, アメリカ・ハワイ.

⑳ 柳澤実穂, “Phase transitions of biopolymer blends in cell-sized emulsions coated with a lipid layer”, Pacifichem 2015, 2015年12月18日, アメリカ・ハワイ.

㉑ 柳澤実穂, “Shape control of biopolymer microgels utilizing model cells”, 第53回日本生物物理学会年会, 2015年9月15日, 金沢大学・角間キャンパス(石川県金沢市), 招待講演.

㉒ 黒川知加子, 藤原慶, 森田雅宗, 川又生吹, 村田智, 瀧ノ上正浩, 柳澤実穂, “Liposomes with skeleton network of self-assembled DNA gel mimicking actin cortex”, 第53回日本生物物理学会年会, 2015年9月14日, 金沢大学・角間キャンパス(石川県金沢市), ポスター発表.

㉓ 柳澤実穂, “Pattern formation of binary polymer droplets upon phase separation and gelation”, EMN Meeting on Droplets 2015, 2015年5月9日, タイ・プーケット, 招待講演.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

柳澤研究室ホームページ

[http://web.tuat.ac.jp/~m\\_yanagi/](http://web.tuat.ac.jp/~m_yanagi/)

6. 研究組織

(1)研究代表者

柳澤 実穂 (YANAGISAWA Miho)

東京農工大学・大学院工学研究院・特任准教授

研究者番号: 50555802

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

渡辺千穂 (WATANABE Chiho)