

令和元年8月31日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04092

研究課題名(和文)非平衡空間がもたらす生体内二次元界面の構造と機能

研究課題名(英文)Structure and function of non-equilibrium two-dimensional biological interface

研究代表者

並河 英紀(Nabika, Hideki)

山形大学・理学部・教授

研究者番号：30372262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非平衡界面における物質間相互作用がもたらす特徴を平衡論的視点との対比により明確化し、生体内反応のロバストネスを保障する因子を実験的に捉えることを試みた。ゲル薄膜や自己組織化膜をモデルとして用い、非平衡性が異なる界面での秩序形成・自己組織化・自己修復等の特徴を区分する実験・理論研究を展開し、生体界面機能における非平衡性の重要性を、自然界のパターン形成の選択律を支配する熱力学的指標から解き明かす基礎学問的知見、生体膜での薬理活性に関して非平衡的観点から分子設計指針を与える工学・薬学的知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちのカラダを支える生命システムは非平衡空間にて駆動しています。一方、生命システムを理解するための化学的研究の多くは平衡空間にて行われており、本質的に異質なものをを用い、生命システムの理解を行おうとしてきました。本研究では、生命システムの本質の一つである非平衡性の意義を検証しました。本研究より、生命システムの分子機構解明へ向けた非平衡度の重要性を理解することが可能となりました。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to experimentally grasp the factors that controls the robustness of the in vivo reaction at non-equilibrium interface, from a comparison with equilibrium systems. Using gel thin films and self-assembled films as model systems, we developed experimental and theoretical studies to distinguish features such as order formation, self-assembly, and self-repair at interfaces with different non-equilibrium properties. We obtained fundamental findings that elucidate the importance of non-equilibrium system in biological interface from thermodynamic features that govern the selection rule of pattern formation in nature. Also, We obtained applicational findings that provide molecular design from a non-equilibrium point of view regarding pharmacological activity on biological membranes.

研究分野：非平衡科学

キーワード：非平衡科学 界面 細胞膜 ゲル リーゼガング Liesegang 反応拡散 アミロイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内反応の多くは、物質・エネルギーの流入が絶えない非平衡開放系にて進行している。平衡から遠く離れた非平衡空間では、系内のエネルギー散逸 ($dS/dt > 0$) により時空間的な自己組織化過程が駆動される。この非平衡下での自己組織化が系に対する秩序形成機構・自己修復機構を与えるため、生体内反応がフレキシビリティとロバストネスという相反する二つの性質を獲得することができている。その中で、皮膚や細胞膜などの非平衡二次元異相界面は、分子・イオン・電子が広範な時空間スケールで反応する活性空間となっている。非平衡開放系内の界面では、化学反応速度と物質拡散速度とのバランスが整った際のみ特徴的な時空間秩序・制御機能を発現する反応拡散場となっていることが知られている。その結果として、熱帯魚などの体表面模様形成や細胞分裂時の細胞膜上タンパク質集団運動など様々な生体機能を与えている。これらの現象の理解・利用・制御へ向け、例えばモデル界面として広く用いられている人工膜などに対し、外部刺激や分子添加に対する応答を観察する研究が世界中で繰り広げられている。しかしながら、その多くはエネルギー散逸の無い平衡界面 ($dS/dt = 0$) における自己組織的応答性を対象としている。そのため、生体内反応の特徴である非平衡開放系界面 ($dS/dt > 0$) に対し、熱力学的観点からは全く異質な状態をモデルとして取り扱っていることになる。両者の差は単に熱力学的な問題にとどまらず、発現する自己組織化構造の周期性、秩序性、安定性など、構造・状態に大きな影響を及ぼす。

2. 研究の目的

この様な背景の中、申請者はこれまでに神経伝播を模倣した非平衡空間によるエネルギー変換に関する研究を行った。しかし、取り扱っている場合は他の世界中の研究例と同様の「擬似的」非平衡空間である。すなわち、系のエントロピー変化がゼロに収束する過程 ($dS/dt > 0$ から $dS/dt = 0$) を部分的に切り取り、そのエネルギー変換機構を利用しているに過ぎない。また、これとは独立した別の研究として、自然免疫機構に類似した細胞膜界面反応に関する機構解明を行った。しかし、ここでもやはり他の世界中の研究例と同様の平衡空間での実験を行っており、完全にエントロピー変化が無い状態 ($dS/dt = 0$) での現象論を対象としていた。このように、申請者を含めた世界中の研究例の多くは、生体機能の模倣・類似・応用を指向した研究であるにもかかわらず、その平衡特性に関して厳密に制御し、かつ、平衡・非平衡さらには擬似的非平衡状態による差異を明確に検証する視点に立脚した研究はない。これは、生体機能のフレキシビリティとロバストネスの理解・利用を指向する上での本質的な問題と言える。そこで本研究では、系の環境を平衡 ($dS/dt = 0$)・非平衡開放系 ($dS/dt > 0$)・擬似的非平衡 ($dS/dt > 0$ から $dS/dt = 0$ へ時間発展) に実験的に制御し、各状態の界面における秩序形成能や自己修復能に関する実験より、生体内反応のロバストネスを保障する非平衡論的尺度を実験的に捉える。また、一部の系に関しては、反応と拡散速度の空間分布を考慮した反応拡散方程式によるシミュレーションとの比較を行い、反応・拡散に対する各系の特質を分子スケールから明確化する。

3. 研究の方法

(ゲル薄膜系)

本研究は大きく分けてゲル系と細胞膜系二つの実験系から構成される。ゲル系では反応拡散方程式によるシミュレーションとの対比も行った。本研究にて取り扱うリーゼガング型反応拡散系ではこれまでにいくつかの数値モデルが提案されている。最も単純なモデルがオストワルドによって提案された Supersaturation モデルである。系内の反応基質 ($A(aq)$, $B(aq)$) が過飽和条件になることで自発的に沈殿 ($P(s)$) が形成するが、その際の反応拡散条件により自発的な周期構造として沈殿が析出するものである。その時の反応式は $A(aq) + B(aq) \rightarrow P(s)$ で記述されるとともに、反応拡散方程式は次のようになる。

$$\frac{\partial a}{\partial \tau} = \nabla^2 a - R(a, b, K_{SP}, K_1^{(SS)})$$

$$\frac{\partial b}{\partial \tau} = \nabla^2 b - R(a, b, K_{SP}, K_1^{(SS)})$$

$$\frac{\partial p}{\partial \tau} = \nabla^2 c + R(a, b, K_{SP}, K_1^{(SS)})$$

このモデルは化学反応ならびに沈殿析出過程が単純化されているため、周期構造形成自体の再現は可能であるが、化学的条件に依存した構造の変調や多様性を含むことはできない。そこで、Supersaturation モデルを A と B の反応 ($A(aq) + B(aq) \rightarrow C(aq)$) ならびに反応生成物 ($C(aq)$) の沈殿形成 ($C(aq) \rightarrow P(s)$) に切り分けたものとして nucleation and growth モデルが提案された。

$$\frac{\partial a}{\partial \tau} = \nabla^2 a - R\theta(ab - K_1^{(NG)})$$

$$\frac{\partial b}{\partial \tau} = \nabla^2 b - R\theta(ab - K_1^{(NG)})$$

$$\frac{\partial c}{\partial \tau} = \nabla^2 c + R\theta(ab - K_1^{(NG)}) - k\theta(c - K_2^{(NG)})$$

$$\frac{\partial p}{\partial \tau} = k\theta(c - K_2^{(NG)})$$

本モデルにより、固体形成の初期過程である核形成に対する記述が導入され、反応拡散方程式上では核形成活性化エネルギーとパターン形成との相関を明示的に示すことが可能となった。しかしながら、実験的には核形成過程の制御が困難であることから、実験と反応拡散モデルとの対比はこれまで行われてこなかった。そこで本研究では、化学還元型リーゼガングにおける反応生成物が金属ナノ粒子であることに着目し、その反応初期過程における金属核クラスターの安定性制御と反応拡散パターンとの相関を実験およびシミュレーションとの対比により行った。具体的には、還元剤であるクエン酸を含有させた二次元ゲル薄膜の中心に Ag イオンを含ませた円筒型ゲルを設置し、Ag イオンが円筒型ゲルから二次元ゲル薄膜へと拡散する過程でクエン酸により還元され Ag ナノ粒子として析出するものである。この時、Ag ナノ粒子は、Ag イオンの還元により形成 Ag 原子が複数個集合化した Ag 核を形成した後に固体結晶である Ag ナノ粒子へと成長するものである。この時、Ag 核はリガンドにより安定化され核形成エネルギーが低下することが知られている。そこで本研究でも、クエン酸含有二次元ゲル薄膜に Ag 核の安定化リガンドとして知られるシステインを添加し、システインの有無によるパターン構造の差ならびにその反応拡散方程式による解析を行った。

(分子薄膜系)

本研究のもう一つのターゲットである分子薄膜系においては、生体内の体液循環を考慮した非平衡空間における分子間相互作用を検討するものである。そこで、まずはアルツハイマー病をターゲットとし、脳脊髄液流動空間を想定したマイクロ流路システムを構築した(図6)。

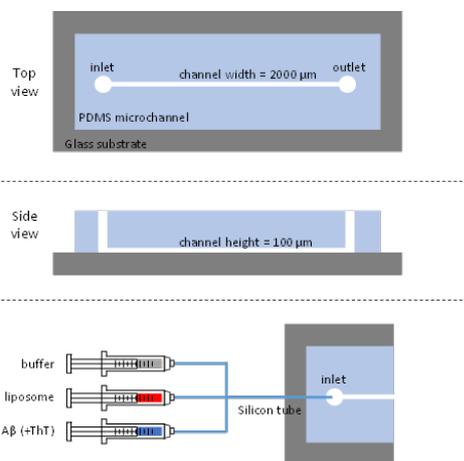


図6. 脳内の非平衡流動空間を構築するために作製したマイクロ流路システム。

4. 研究成果

(ゲル薄膜系)

システインの添加により、発現する周期構造の波長が大幅に低下することが確認された(図1)。本結果の発現機構を検証するため、前述の反応拡散方程式における核形成エネルギーに相当する $K_1^{(NG)}$ の値を変動させた場合に発現するリーゼガング構造のシミュレーションを行った。その結果、 $K_1^{(NG)}$ の低下、すなわち、核形成エネルギーの低下とともに発現する周期構造の波長が低下することが確認された(図1右)。

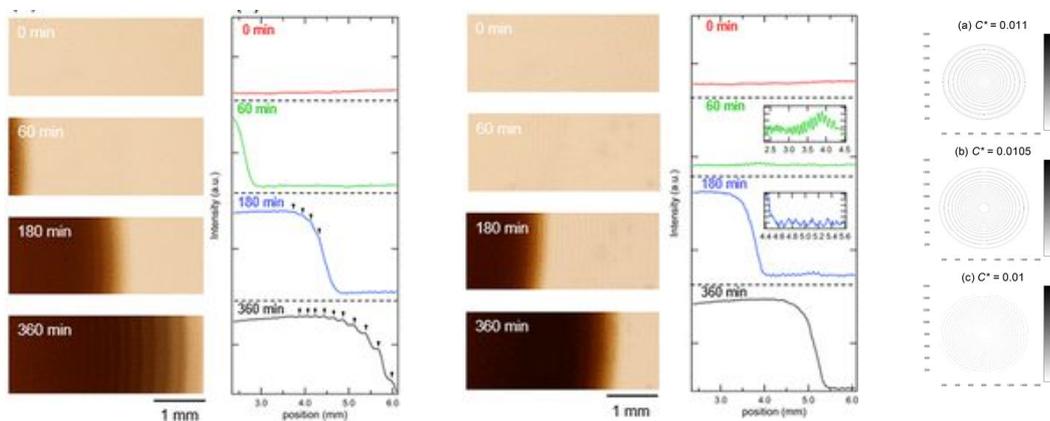


図1.(左)システイン無添加および(中)システイン添加系におけるリーゼガング構造の顕微鏡写真並びにラインプロファイル.(右)核形成閾値を変更した場合のシミュレーション結果。

以上の結果は、二次元ゲル薄膜に添加したシステインが、Ag 原子から Ag 核を形成する際の安定化剤として作用することで、反応拡散プロセス全体を制御していることを示唆するものである。核形成閾値がリーゼガング型反応拡散方程式に組み込まれていることはモデルとしては明示的に示されていたが、これを実験的に立証したものは本研究が世界で初めての成果である。

さらに、Nucleation and Growth モデルにおける沈殿凝集形成にも濃度閾値を組み込んだより厳密なモデルとして Sol-coagulation モデルが知られている。

$$\frac{\partial a}{\partial \tau} = \nabla^2 a - R\theta(ab - K_1^{(SC)})$$

$$\frac{\partial b}{\partial \tau} = \nabla^2 b - R\theta(ab - K_1^{(SC)})$$

$$\frac{\partial c(aq)}{\partial \tau} = \nabla^2 c(aq) + R\theta(ab - K_1^{(SC)}) - k_1\theta(c(aq) - K_2^{(SC)}) - k_2CN(a, b, c, K_3^{(SC)})$$

$$\frac{\partial p}{\partial \tau} = k\theta(c - K_2^{(NG)}) + k_2CN(a, b, c, K_3^{(SC)})$$

ただし、前述の核形成閾値と同様に、この凝集閾値も反応拡散モデルとしては古くから取り入れられてきたがその実験的な立証はなされてきていなかった。そこで本研究では、化学反応型リーゼガング現象において、化学反応プロセスへは関与しない電解質を別途添加することで、凝集プロセスとはターン構造との相関について、実験と反応拡散モデルとの対比を行った。実験には、前述の二次元ゲル薄膜に硫酸ナトリウムを添加することで行った。その結果、添加濃度に依存して発現する周期構造の波長に変化が現れた(図2)。

得られた写真を基に空間係数 p の解析を行ったところ、硫酸ナトリウムの添加濃度の増加とともに空間係数 p が増加する傾向が確認された。そこで、硫酸ナトリウムの役割を明確にするため、DLVO 理論に基づいて Ag ナノ粒子間に働く静電的相互作用エネルギー、van der Waals エネルギーを計算し、その変化を反応拡散方程式における凝集閾値 K_3 へ導入しシミュレーションを行った。その結果、 K_3 の低下、すなわち電解質の添加に伴う凝集促進によりパターンの波長および p が増加することが確認された(図3)。以上の結果は、系内に添加された電解質により DLVO 力の中の電気二重層斥力が遮蔽され、反応拡散プロセスにおける凝集過程に影響を及ぼしたものと考えられる。凝集閾値がリーゼガング型反応拡散方程式に組み込まれていることはモデルとしては明示的に示されていたが、これを実験的に立証したものは本研究が世界で初めての成果である。

(分子薄膜系)

本システムはマイクロシリンジ、マイクロポンプ、マイクロ流路を組み合わせており、正立型・倒立型蛍光顕微鏡にて観察も可能となっている。構築したシステムの動作確認を行うため、蛍光ビーズをトレーサーとして、10、20、30 $\mu\text{m/s}$ の流速になるようにシリンジポンプを駆動させた。その結果、設計通りの速度にて蛍光ビーズが流動する様子が観察され、本システムが正常に駆動していることが確認された(図8)。このシステムを用いることで、常に一定濃度の反応基質が反応流路内に流入し、反応流路内の反応生成物(生理学的老廃物)が反応流路から排斥され

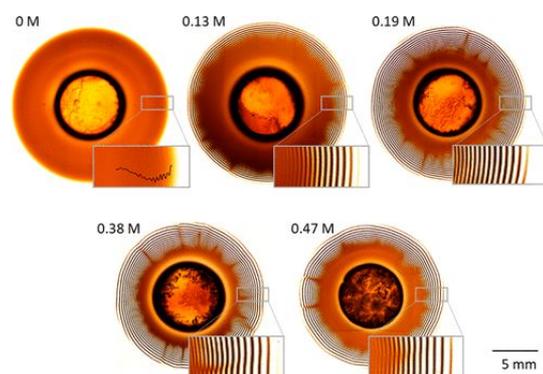


図2. クエン酸含有ゲル薄膜へ硫酸ナトリウムを各濃度で添加した場合のリーゼガングパターンの顕微鏡写真.

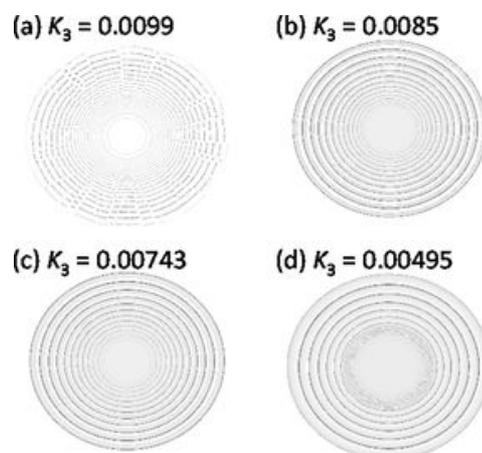


図3. 凝集閾値を変更した場合のシミュレーション結果と空間係数解析結果.

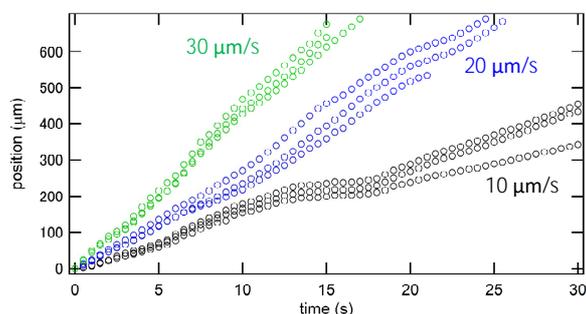


図 7 . 作製したマイクロ流路システムでの流速制御状況の確認 .

るといった、脳脊髄液によるクリアランスシステムを模倣したシステムを構築すること成功した。

次に、アルツハイマー病の原因として知られるアミロイド (A) ペプチドと細胞膜との相互作用について、平衡孤立系と非平衡流動系との差について検証を行った。研究結果は現在論文等呼応中であるため図などを示すことはできないが、非平衡空間においては、明らかに A プラークの形成が促進されることが確認された。本結果は、非平衡流動が A と細胞膜に対して分子スケールから巨視的構造体スケールの多様な時空間レンジにおいて影響を及ぼしていることを示すものである。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1. "Imaging Characterization of Cluster-Induced Morphological Changes of a Model Cell Membrane" H. Nabika, A. Sakamoto, R. Tero, T. Motegi, D. Yamaguchi, K. Unoura, *J. Phys. Chem. C* 120(29), 15640-15647 (2016). DOI:10.1021/acs.jpcc.5b08014
2. "Non-DLVO Aggregation of Gold Nanoparticles Modified with Amino Acids" Y. Nakahashi, K. Unoura, H. Nabika, *Chem. Lett.* 45(8), 946-948 (2016). DOI:10.1246/cl.160324
3. "One-Directional Fluidic Flow Induced by Chemical Wave Propagation in a Microchannel" M. Arai, K. Takahashi, M. Hattori, T. Hasegawa, M. Sato, K. Unoura, H. Nabika, *J. Phys. Chem. B* 120(20), 4654-4660 (2016). DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b02850
4. "Structural Dependence of the Effects of Polyoxometalates on Liposome Collapse Activity", D. Kobayashi, Y. Ouchi, M. Sadakane, K. Unoura, H. Nabika, *Chem. Lett.* 46(4), 533-535 (2017). DOI: 10.1246/cl.161172
5. "Liesegang Mechanism with a Gradual Phase Transition", Y. Shimizu, J. Matsui, K. Unoura, H. Nabika, *J. Phys. Chem. B* 121 (11), 2495-2501 (2017). DOI:10.1021/acs.jpcc.7b01275
6. "Interplay of Hydrophobic and Electrostatic Interactions Between Polyoxometalates and Lipid Molecules", D. Kobayashi, H. Nakahara, O. Shibata, K. Unoura, H. Nabika, *J. Phys. Chem. C*, 121 (23), 12895-12902 (2017). DOI:10.1021/acs.jpcc.7b01774
7. "Molecular Scale Insights Into Activity of Polyoxometalate as Membrane Targeting Nanomedicine from Single Molecule Observations," A. Sakamoto, K. Unoura, H. Nabika, *J. Phys. Chem. C*, 122(2), 1404-1411 (2018). DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b11251
8. "Role of Nuclei in Liesegang Pattern Formation: Insights from Experiment and Reaction-Diffusion Simulation", M. Itatani, Q. Fang, K. Unoura, H. Nabika, *J. Phys. Chem. C* 122(6), 3669-3676 (2018). DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b12688
9. "Role of Electrolyte in Liesegang Pattern Formation", M. Matsue, M. Itatani, Q. Fang, Y. Shimizu, K. Unoura, H. Nabika, *Langmuir*, 34 (37), 11188-11194 (2018). DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b02335
10. "Effect of Diffusion Dimension on the Geometry of Precipitation Patterns in the Liesegang Phenomenon", M. Itatani, Q. Fang, K. Unoura, H. Nabika, *ECS Transactions*, 88, 335-341 (2018). DOI: 10.1149/08801.0335ecst
11. "Interplay between Spinodal Decomposition and Gelation and Their Role in Two- and Three-Dimensional Pattern Formation at Gelatin Gel Surface", K. Sasaki, M. Itatani, D. Sato, K. Unoura, H. Nabika, *J. Phys. Chem. C* (accepted). DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b03684

[学会発表] (計 72 件) (代表的なものだけ記載する)

1. Sato, D.; Shimizu, Y.; Unoura, K.; Matsui, J.; Nabika, H. In *Effect of reaction inhibitor on self-organized pattern formation with polymerization reaction*, The International Symposium of YU-COE(C) AFTEC and HECT, Yonezawa, 2018/11/29, 2018; 'Ed.' Yonezawa, 2018; p^pp.
2. Nabika, H. In *Chemical Control of Pattern Formation in Precipitation Systems*, Gordon Research Conference (Decrypting and Controlling Self-Organized Structures Through Theories and Experiments), Switzerland, 2018/7/12, 2018; 'Ed.' Switzerland, 2018; p^pp.

3. Nabika, H. In *Liesegang phenomenon: Chemical Model for Pattern Formations in Nature*, International Congress on Pure & Applied Chemistry (ICPAC) 2018, Siem Reap, Cambodia, 2018/3/7, 2018; 'Ed.'^'Eds.' Siem Reap, Cambodia, 2018; p^pp.
4. Itatani, M.; Fang, Q.; Unoura, K.; Nabika, H. In *Effect of Heterogeneity of a Reaction Medium on Self-Organized Liesegang Structures*, The International Symposium of YU-COE(C) AFTEC and HECT, Yonezawa, 2018/11/29, 2018; 'Ed.'^'Eds.' Yonezawa, 2018; p^pp.
5. Itatani, M.; Fang, Q.; Unoura, K.; Nabika, H. In *Self-Organized Precipitation Patterns Controlled by Concentration Gradient of Reaction Medium*, THE 6TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON SMART SYSTEMS ENGINEERING 2018, Yonezawa, 2018/10/11, 2018; 'Ed.'^'Eds.' Yonezawa, 2018; p^pp.
6. Itatani, M.; Fang, Q.; Unoura, K.; Nabika, H. In *Hybrid Materials with Controlled Precipitation Pattern of Nanoparticles*, First International Conference on 4D Materials and Systems, Yonezawa, 2018/8/26, 2018; 'Ed.'^'Eds.' Yonezawa, 2018; p^pp.
7. Iida, A.; Ouchi, Y.; Nochi, M.; Unoura, K.; Nabika, H. In *Influence of Flow on Adsorption of Amyloid β to Lipid Membrane*, The International Symposium of YU-COE(C) AFTEC and HECT, Yonezawa, 2018/11/29, 2018; 'Ed.'^'Eds.' Yonezawa, 2018; p^pp.
8. Ouchi, Y.; Nabika, H. In *Permeation of Hydrogen Peroxide across Lipid Bilayer Characterized by Chemiluminescence Method*, The International Symposium of YU-COE(C) AFTEC and HECT, Yonezawa, 2017/11/20, 2017; 'Ed.'^'Eds.' Yonezawa, 2017; p^pp.
9. Nabika, H. In *Chemical Engineering of Liesegang Phenomenon*, International mini-workshop on physico-chemical view of nonequilibrium pattern formation, Tokyo, 2017/7/10, 2017; 'Ed.'^'Eds.' Tokyo, 2017; p^pp.
10. Itatani, M.; Nabika, H. In *Reconstruction of chemical model for Reaction-Diffusion phenomena; modification of spatiotemporal regularity for Liesegang pattern*, The International Symposium of YU-COE(C) AFTEC and HECT, Yonezawa, 2017/11/20, 2017; 'Ed.'^'Eds.' Yonezawa, 2017; p^pp.
11. 並河英紀 In *細胞膜界面で誘起される自己組織的分子再構成：生命システムへの意義，非共有結合系の分子科学：計測技術から探る生体分子科学の新展開*, 神戸, 2019/1/22, 2019; 'Ed.'^'Eds.' 神戸, 2019; p^pp.
12. 並河英紀 In *多様な平衡/非平衡空間における自己集合化*, 日本化学会第97春季年会, 日吉, 2017/3/19, 2017; 'Ed.'^'Eds.' 日吉, 2017
13. 並河英紀 In *原子・分子の自己組織化と時空間構造形成*, 第26回非線形反応と協同現象研究会, 東京, 2016/12/10
14. 並河英紀 In *流れと構造形成*, 第10回自己組織化討論会, 伊東市, 2016/9/25
15. 並河英紀 In *Spatiotemporal Organization under Continuous Flow: Design from Chemical and Mathematical Approaches*, 超機能分子の創成：合成、計測、数理が織りなす社会実装分子の戦略的設計と開発, 岡崎, 2016/6/27, 2016
16. 並河英紀 In *非平衡二次元界面での空間構造形成*, 未来のコロイドおよび界面化学を創る若手討論会, 旭川, 2016/9/21

[図書] (計3件)

1. Nabika, H. *Polyoxometalates: Properties, Structure and Synthesis*, "Chapter2: Antibacterial and Antitumor Activities of Polyoxometalates", Ed. by Aaron P. Roberts, Nova Science Publishers, 2016.
2. Nabika, H. *Surface Chemistry of Nanobiomaterials*, "Chapter8: Interaction Between Nanoparticles and Cell Membrane", Ed. by A. Grumezescu, Elsevier, 2016.
3. "反応拡散現象に基づいた周期的空間構造の形成", 並河英紀, 化学工学, 81(6), 286-289 (2017). (解説記事)

[その他]

ホームページ等 <https://www.nabika-lab.org/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。