

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22244053

研究課題名(和文)ベシクル変形と化学場の結合：生命誕生へのソフトマターからのアプローチ

研究課題名(英文)Coupling between Deformations of Vesicle and Chemical Stimuli: Approach from Soft Matter toward Cellular Life

研究代表者

今井 正幸 (Masayuki, Imai)

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) 25,900,000円、(間接経費) 7,770,000円

研究成果の概要(和文)：分子集合体としてのベシクルが生命機能を獲得する過程を化学刺激への応答を中心に研究を進めた。まず、化学刺激によるベシクル変形を明らかにする研究手法を確立し、pH勾配によってベシクルがチューブを形成する物理を明らかにした。さらに、化学刺激によりベシクルが駆動する現象も新しく見だし、化学場が機能発現のトリガーになりうる事を明らかにした。さらに生命機能に必須のベシクルの自己生産にも2成分ベシクルを持って再現する事に成功した。

研究成果の概要(英文)：We have investigated vesicle deformations triggered by chemical stimuli to reveal the pathway from vesicles (molecular assemblies of lipids) to cellular life. First we established an experimental technique to examine vesicle deformation triggered by the chemical stimuli and then revealed a mechanism of a tubular membrane formation induced by pH gradient. In addition we found that chemical stimuli drive vesicles toward the chemical source, so-called chemophoresis. These observations clearly show that the chemical stimuli play important roles to develop cellular life from vesicle. In addition we succeeded to reproduce a self-production of vesicle using binary vesicles, which shed light on the pathway toward the protopcell.

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・ソフトマターの物理

キーワード：生命現象の物理

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。従来生体膜の物理的な研究は、粗視化した弾性体モデルでその変形を捉えてきたが、生体系の特徴である化学反応(化学刺激)を考慮した分子集合体の構造形成の研究は未開拓の領域であった。

2. 研究の目的

単純な両親媒性物質の分子集合体が周囲の化学物質と相互作用して、生命機能を獲得した過程をリン脂質からなるベシクルを用いて再現し、その物理を明らかにする。その目的の為に、以下の点に焦点をあてて研究を進める。(1)化学刺激によって引き起こされるベシクル変形のダイナミクスの解明、(2)化学刺激による新奇なベシクルダイナミクスの探索、(3)ベシクル内化学反応と膜変形の結合、(4)単純なベシクルを用いての生命機能の再現、(5)ベシクルダイナミクスの定量法の確立。

3. 研究の方法

上記5つのプロジェクトに対して、以下の様な研究手法を用いて研究を進めた。

(1)化学的な刺激に対してベシクルがどのように応答するのかを明らかにする為には、あらたにベシクルに化学刺激を与える手法を確立する必要がある。我々はこの分野のパイオニアであるフランスの Angelova 教授と共同研究を進め、まず化学刺激によるベシクル変形を研究する手法を確立した。その方法は白金電極に固定したベシクルを electroformation 法により作製し、そのベシクルにマイクロピペットにより特定の化学物質をインジェクションする方法である。このマイクロインジェクション法をもちいて様々なベシクルに pH 勾配をあて、それにより引き起こされるベシクル変形を系統的に調べた。

(2)上記のマイクロインジェクション法をもちいて様々な条件でベシクルに化学刺激を与え、その結果観察されたベシクルの新奇なダイナミクスを系統的に調べる。特に本研究では化学刺激によりベシクルが駆動される現象を見出したので、この現象について系統的に調べた。

(3)ベシクル内化学反応と結合したベシクルの変形については、東京大学の菅原グループと共同でベシクル内で PCR 反応を利用して自己複製する DNA と結合したベシクルの自己生産過程について研究を進めた。特に、膜と DNA の相互作用を膜に PEG 鎖をグラフトすることにより制御し、それによるベシ

クルの分裂ダイナミクスの影響を調べるとともに、内包した DNA の長さを変化させてそれによるベシクル変形ダイナミクスの変化についても調べた。

(4)我々は今まで、両親媒性分子(リン脂質分子)の自発曲率(幾何学的形状)と相分離を結合させることにより、ベシクルの接着・孔形成・脂質のソーティング等が単純な2成分ベシクルで再現できる事を示してきた。そこで本研究では PE を頭部に持つ脂質(PE-脂質)が細胞分裂に際して分裂のくびれ部に局在する事を利用して、生命機能の特徴づける最も重要な機能である細胞膜の自己生産を PE-脂質を含む2成分ベシクルで再現できるかどうかを検討した。

(5)ベシクルの形状を記述する理論モデルとして2分子膜の膜弾性モデル、Area Difference Elasticity model が提案されており、この分野の研究者はそれを元に研究を展開しているが、その定量的な実験と理論の比較は行われていなかった。そこで、高速共焦点レーザー顕微鏡を用い、ベシクルの3次元像を取得し、そこからベシクルの3次元像を解析するプログラムを新たに開発することにより、ベシクル形状を記述する理論の定量的な評価を行った。

4. 研究成果

上記5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、本研究では当初の目的に対して以下のように想定以上の結果が得られたため、それら結果を基にして新たな基盤研究(A)「分子集合体からプロトセルへの物理」を提案し、採択されたため本研究の一部は新しい基盤研究(A)に引き継がれる。

(1)ミトコンドリアの内膜にあるクレストと呼ばれるチューブ状構造を再現する実験を、アニオン性リン脂質と中性リン脂質を混合した2成分ベシクルにアルカリ性水溶液をマイクロインジェクションすることにより再現する事に成功した。さらにベシクル膜上を伝搬する pH 刺激の可視化に成功し(図1参照)化学刺激と膜変形の定量的な評価を行い、その結果を元に弾性エネルギーを考慮した膜の動的な方程式を導入し、観察された膜変形の理論モデルを構築し、化学刺激による膜変形をもたらす機構を解明した。

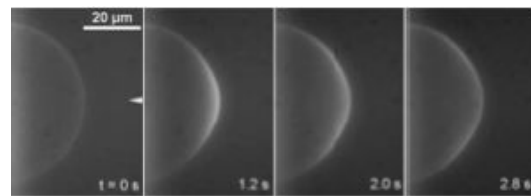


図1 マイクロインジェクションによってベシクル上を伝搬する pH 波とそれによって引き起こされるベシクルの変形

(2) 中性脂質である DOPC からなる均一単成分ベシクルに強塩基性水溶液(10 mM NaOH 水溶液)をマイクロインジェクションすると、ベシクルがマイクロピペットに向かって駆動する現象が確認された。この駆動力は、膜黒インジェクションによる流体力学的な効果や自己駆動する油滴の駆動力であるマランゴニ対流ではなく、膜表面と化学物質の親和性の差によるものと考えられ、表面張力の pH 依存性で速度が再現される事をモデル計算により確かめた。さらに、このような親和性の差はベシクル表面での力の集中をもたらし、ベシクルからチューブ状構造を引き出す変形をもたらすことも明らかとなった。さらに、このベシクルを駆動する化学物質には

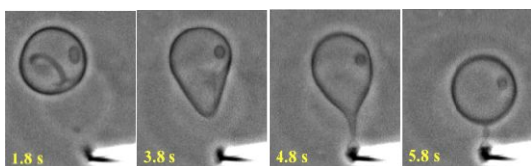


図2 変形しながらマイクロピペットへ動くベシクル

強塩基や 2 価のイオンなどの選択性がある事もわかった。

(3) DNA をベシクル内部で自己複製しながら自己生産するベシクル系の開発に東京大学の菅原グループが成功した。この研究ではその菅原グループと共同で、ベシクル膜と DNA の相互作用を制御する事によって自己生産の経路や速度がどのような影響を受けるかを実験的に調べた。その結果 PEG 鎖によって DNA と膜の直接的な相互作用を妨げた場合、自己生産のキネティクスが budding 型から birthing 型へと変化する事。および、DNA の長さを変化させると budding 型変形の様子が変化する事等が明らかとなった。これらの研究は現在論文にまとめるとともに新しい基盤研究に引き継がれる。

(4) PE 脂質とシリンダー型脂質である DPPC を混合した 2 成分ベシクルにおいて脂質の主転移を挟んで温度変化させると、ベシクルが自発的に自己生産するダイナミクスを世界で初めて見出した。この自己生産のキネティクスは PE 脂質と PC 脂質の組成に依存し PE 脂質が少ない時は budding 型の、PE 脂質が多い時は birthing 型の変形を示した。また、この自己生産は両方の自己生産型において温度サイクルにより子ベシクル、孫ベシクルを生み出す次世代に引き継がれる性質であることも明らかとなった。この研究成果も上記 3) の成果と併せてプロトセルの機構解明を目指す新しい基盤研究に引き継がれる。

(5) ベシクル形状の 3 次元解析を行なう為の実験手法及び解析プログラムの開発を行なった。まず、高速共焦点レーザー顕微鏡に

よりベシクルの 3 次元画像をサブ秒スケールで取得した。その 3 次元画像からモンテカルロ法によりベシクル表面の形状を抜き出すプログラムを開発した。さらにその 3 次元座標から膜弾性エネルギーやベシクルの幾何学的パラメーターを計算させることにより、膜弾性理論モデル(ADE モデル)と実験データの直接的な比較を可能にした。その結果 ADE モデルが実験事実を定量的にもっともよく記述する事を世界で初めて明確にした。

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 12 件)

1) Three-Dimensional Analysis of Lipid Vesicle Transformations, A. Sakashita, N. Urakami, P. Zihlerl, and M. Imai, *Soft Matter*, 8, 8569-8581 (2012). 査読有
DOI: 10.1039/c2sm25759a

2) Lipid membrane deformation in response to a local pH modification: theory and experiments, A.-F. Bitbol, N. Puff, Y. Sakuma, M. Imai, J.-B. Fournier, and M. I. Angelova, *Soft Matter*, 8, 6073-6082 (2012). 査読有
DOI: 10.1039/c2sm25519g

3) Model System of Self-Reproducing Vesicles. Y. Sakuma and M. Imai, *Phys. Rev. Lett.* 107, 198101(1-5) (2011). 査読有
DOI: 10.1103/PhysRevLett.107.198101

4) Molecular dynamics simulation for morphological change of water-in-oil microemulsion droplets induced by addition of polymer chains, T. Kurokawa, N. Urakami, K. Nakaya-Yaegashi, A. Sakashita, M. Imai, and T. Yamamoto. *Soft Matter* 7, 7504-7510 (2011). 査読有
DOI: 10.1039/c1sm05447c

5) Asymmetric distribution of cone-shaped lipids in a highly curved bilayer revealed by a small angle neutron scattering technique. Y. Sakuma, N. Urakami, T. Taniguchi, and M. Imai, *J. Phys. Cond. Matt.* 23, 284104 (2011). 査読有
doi:10.1088/0953-8984/23/28/284104

6) Numerical investigations of the dynamics of two-component vesicles, T. Taniguchi, M. Yanagisawa and M. Imai, *J. Phys. Cond. Matt.* 23, 284103 (2011). 査読有
doi:10.1088/0953-8984/23/28/284103

7) Hydrodynamic effects on concentration fluctuations in multicomponent membranes

S. Ramachandran, S. Komura, K. Seki and M. Imai, *Soft Matter* 7, 1524-1531 (2011).

査読有 DOI: 10.1039/c0sm00783h

8) Periodic modulation of tubular vesicles induced by phase separation

M. Yanagisawa, M. Imai, and T. Taniguchi
Phys. Rev. E 82 051928(1-9) (2010)

査読有 DOI: 10.1103/PhysRevE.82.051928

9) Shape Deformation of Giant Vesicles Encapsulating Charged Colloidal Particles.

Y. Natsume, O. Pravaz, H. Yoshida1, and M. Imai. *Soft Matter* 6 5359-5366 (2010).

査読有 DOI: 10.1039/c0sm00396d

10) Pore Formation in a Binary Giant Vesicle Induced by Cone-Shaped Lipids

Y. Sakuma, T. Taniguchi, and M. Imai
Biophys. J. 99, 472-479 (2010). 査読有

doi: 10.1016/j.bpj.2010.03.064

11) Drag coefficient of a liquid domain in a two-dimensional membrane.

S. Ramachandran, S. Komura, M. Imai, and K. Seki, *Eur. Phys. J. E* 31, 303-310 (2010).

査読有 DOI 10.1140/epje/i2010-10577-3.

12) Diffusion of domains on nanometer sized vesicle. Y. Sakuma, N. Urakami, Y. Ogata, M. Nagao, S. Komura, T. Kawakatsu and M. Imai, *J. Phys. Conf. Ser.* 251, 012036(1-4) (2010). 査読有

doi:10.1088/1742-6596/251/1/012036.

〔学会発表〕(計 31 件)

1) 中性リン脂質ベシクルの化学駆動

兒玉篤治, 佐久間由香, 今井正幸, 川勝年洋
日本物理学会第 68 回年次大会 (口頭)

2013. 3. 28, 広島

2) 化学刺激によるベシクル膜変形

佐久間由香, A.-F. Bitbol, N. Puff, 今井正幸, J.-B. Fournier, M. I. Angelova
日本物理学会第 68 回年次大会 (口頭)

2013. 3. 28, 広島

3) Vesicle deformation triggered by chemical stimulation,

Y. Sakuma and M. Imai

Self-organization and Emergent Dynamics in Active Soft Matter, (Poster)

2013.2.19, Kyoto, Japan

4) Vesicle Dynamics Triggered by Chemical Stimuli, M. Imai, A. Kodama, Y. Sakuma and T. Kawakatsu

German-Japan Workshop "Soft Matter in

Nonequilibrium" (invited)

2013. 2. 16, Kyoto, Japan

5) Molecular Assembly to Protocell

Y. Sakuma and M. Imai

Japanese-German-French workshop "Physics of Active Soft Matter" (Invited)

2012.9.24-25. Heidelberg, Germany

6) Self-Reproduction of Lipid Vesicles

Y. Sakuma and M. Imai

Biomembrane Days (Poster)

2012.9.19, Potsdam, Germany

7) Self-Reproduction of Lipid Vesicles,

Y. Sakuma and M. Imai

ECI conference: Association in Solution III Self-Assembly: From Bio-Colloids to Nano-Engineering, (Poster)

2012.7.25 Bifröst, Iceland

8) Molecular assembly to protocell

M. Imai and Y. Sakuma

ECI conference: Association in Solution III Self-Assembly: From Bio-Colloids to Nano-Engineering, (Invited)

2012. 7. 23-27, Bifröst, Iceland

9) Model Self-Reproducing Binary Vesicle

Y. Sakuma and M. Imai

International Association of Colloid and Interface Scientists, Conference (Oral)

2012.5.14, Sendai. Japan

10) ベシクル変形機構の解明; 三次元画像解析によるアプローチ、坂下あい, 浦上直人,

Primoz Ziherl, 今井正幸

日本物理学会第 67 回年次大会 (口頭)

2012.3.25, 関西学院

11) Model of Self Reproducing Vesicles

Y. Sakuma and M. Imai, Biophysical Society 56th Annual Meeting (Oral)

2012.2.26, San Diego, USA

12) Lipid Membrane Deformation in Response to a Local pH Modification, A.-F. Bitbol, N. Puff, Y. Sakuma, M. Imai, J.-B. Fournier and M. Angelova, Biophysical Society 56th Annual Meeting (Oral)

2012.2.26, San Diego, USA

13) Asymmetric Distribution of Lipids Induced by Membrane Curvature,

Y. Sakuma and M. Imai,

1st Asia-Oceania Conference on Neutron

Scattering (Poster)

2011.11.22, Tsukuba, Japan

14) 膜の曲率に応じた脂質分布の非対称性
佐久間由香, 今井正幸
日本物理学会第 66 回年次大会 (口頭)
2011.9.22, 富山

15) Three-dimensional analysis of lipid vesicle transformations
A. Sakashita, N. Urakami, P. Ziherl, and M. Imai
8th Liquid Matter Conference, (Poster)
2011.9.6, Wien, Austria

16) 三次元画像解析による生体膜変形機構の解明、坂下あい、浦上直人、Primoz Ziherl、今井正幸、物理学会第 66 回年次大会
2011.3.25、新潟大学

17) Slow dynamics in crystallization of soft spheres, M. Imai
The 4th international discussion meeting on glass transition (Invited)
2011.2.28-3.2, Sendai, Japan

18) Dynamics of Nanometer Sized Vesicles
Y. Sakuma, N. Urakami, M. Nagao and M. Imai,
The 4th international discussion meeting on glass transition (Poster)
2011.2.28-3.2, Sendai, Japan

19) 中性子小角散乱でみたベシクルの構造
佐久間由香, 今井正幸
東京大学物性研究所短期研究会「小角・反射率・高分解能装置研究会」(口頭)
2011.2.7, 東京大学物性研究所

20) Minimal Cell への多成分ベシクルからのアプローチ、佐久間由香・今井正幸
「細胞を創る」研究会 3.0 (招待講演)
2010.11.12-13 東京大学生産技術研究所

21) Shape deformations of multi-component vesicles, Y. Sakuma and M. Imai
467th Wilhelm and Else Heraeus Seminar BIOPHYSICS OF MEMBRANE TRANSFORMATIONS Workshop (Invited)
2010.10.26-30, Bad Honnef, Germany

22) Self-Birthing Vesicle
Y. Sakuma and M. Imai
Wilhelm and Else Heraeus Seminar: BIOPHYSICS OF MEMBRANE TRANSFORMATIONS Workshop (Poster)
2010.10.26-30, Bad Honnef, Germany

23) 三次元画像解析による生体膜変形機構の解明、坂下あい, 浦上直人, Primoz Ziherl, 今井正幸
日本物理学会平成 22 年度秋季大会 (口頭)
2010.9.26, 大阪府立大学

24) ベシクルのパーシングダイナミクス
佐久間由香, 今井正幸
日本物理学会平成 22 年度秋季大会 (口頭)
2010.9.25, 大阪府立大学

25) Cascade Birthing Dynamics of Vesicles
Y. Sakuma, M. Imai
ISSP International Workshop on Soft Matter Physics (Oral)
2010.8.23-27, Kashiwa, Japan

26) Three-Dimensional Analysis of Lipid Vesicle Morphologies
A. Sakashita, N. Urakami, P. Ziherl, M. Imai
ISSP International Workshop on Soft Matter Physics (Poster)
2010.8.23-27, Kashiwa, Japan

27) Deformation of Vesicles Controlled by Spontaneous Curvature of Lipids
Y. Sakuma, T. Taniguchi, T. Kawakatsu and M. Imai
International Symposium on NonEquilibrium Soft Matter 2010 (Poster)
2010.8.17-20, Nara

28) Shape deformations of multi-component vesicles, Y. Sakuma, M. Imai
International Symposium on NonEquilibrium Soft Matter 2010 (Invited)
2010.8.17-20, Nara

29) Morphology Transitions of Surfactant Assemblies Induced by Confinement of Colloids, M. Imai, Y. Suganuma, Y. Natsume
21st IUPAC International Conference on Chemical Thermodynamics (Invited)
2010.8.6, Tsukuba, Japan

30) 脂質の自発曲率が誘起するベシクル膜の変形
佐久間由香、谷口貴志、川勝年洋、今井正幸
日本物理学会第 65 回年次大会 (口頭)
2010.3.20-23, 岡山大学津島キャンパス

31) コロイドを内包したベシクルの形態転移
夏目ゆうの、Olivier Pravaz、今井正幸

日本物理学会第 65 回年次大会 (口頭)
2010.3.20-23, 岡山大学津島キャンパス

〔図書〕(計 2 件)

1) Dynamics of Heterogeneity in Fluid Membranes, S. Komura, S. Ramacandran, K. Seki, and M. Imai

Advances in planar lipid bilayers and liposomes Vol. 16 (ed. Ales Iglic) Elsevier, Chapter 5, 129-164 (2012)

2) Shape deformations of multi-component vesicles, M. Imai and Y. Sakuma

Advances in planar lipid bilayers and liposomes Vol. 12 (ed. Ales Iglic) Elsevier, Chapter 3, 41-78 (2010)

〔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

<http://www.bio.phys.tohoku.ac.jp/>

新聞掲載

1) 日刊工業新聞 2011 年 12 月 5 日

「お茶の水女子大、冷やすと内部薬剤を放出するカプセル粒子を開発」

2) 日経産業新聞 2012 年 2 月 28 日

「微小カプセル 冷却で薬剤放出」

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

浦上 直人 (URAKAMI NAOHITO)

山口大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号: 50314795