

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：22604

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25103010

研究課題名(和文) 生体膜におけるメソ構造の非平衡ダイナミクス

研究課題名(英文) Non-equilibrium dynamics of meso-structures in biomembranes

研究代表者

好村 滋行 (Komura, Shigeyuki)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：90234715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜の構造と機能を解明することは、生命現象の理解にとって不可欠な要素の一つである。本計画研究では理論とシミュレーションを駆使して、多成分生体膜の相分離現象やゆらぎを媒介とした非平衡ダイナミクスの基礎的原理を明らかにした。具体的には、流体力学的相互作用が働く多成分生体膜系のダイナミクス、非平衡条件下のベシクルの形態転移のダイナミクス、アクティブな生体膜におけるブラウン運動や異常拡散の問題を解明した。それ以外にも、粘弾性体中のアクティブな力双極子による異常拡散や、粘弾性体中のマイクロマシンの遊泳についても新しい研究成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Understanding of structures and functions of biological membranes is one of the indispensable aspects to reveal biological phenomena. In this research project, by using analytical methods and simulations, we have established a fundamental understanding of nonequilibrium dynamics in multi-component biomembranes which exhibit phase separations and fluctuations. In particular, we have clarified the dynamics of multi-component membranes with hydrodynamic interactions, the dynamics of morphological transition of vesicles under nonequilibrium conditions, and Brownian motion or anomalous diffusion of active membranes. Furthermore, we have obtained important results concerning anomalous diffusion due to active force dipoles in viscoelastic media, and micromachines swimming in viscoelastic fluids.

研究分野：ソフトマター物理

キーワード：生体膜 非平衡 相分離 化学反応 ずり流動 ラフト マイクロレオロジー ガラス

1. 研究開始当初の背景

生体膜は細胞や細胞小器官の内外を区別する膜である一方で、生命体の存在基盤を根源的に規定するという本質的な役割を果たしている。すなわち、一つ一つの細胞は生体膜に包まれることによって細胞としての独立性を確保し、さらに多数の細胞が機能的に集合して生命体を構築している。従って、生体膜の研究開始構造と機能を科学的に解明することは、生命現象の理解にとって不可欠な要素の一つである。典型的な生体膜の主な構成成分は脂質であり、水環境下で二重膜を構成している。これは脂質分子が両親媒的な性質を持ち、その二本の炭化水素鎖が水を遠ざけるように自己集合するためである。しなやかで柔らかい脂質二重膜の厚さはおよそ7~10nmであり、生体温度では流動性を有している。1972年にシンガーとニコルソンが「流動モザイクモデル」を提唱して以来、タンパク質は脂質二重膜の「海」の中を浮遊し、ブラウン運動によって移動していると考えられていた。

研究開始当初は、伝統的な生体膜の描像が大きく変わりつつあった。一般に、生体膜は数十種類の脂質で構成されており、多数のステロールなども含まれている。1997年にシモンズとイコネンによって提唱された「ラフト仮説」によると、多くの成分は生体膜内で均一には分布しておらず、特定の脂質が集まった動的ドメインが特定のタンパク質を取り込み、シグナル伝達などの役割を果たしている。このような生体膜の新しい描像に触発されて、飽和脂質/不飽和脂質/コレステロールの三成分からなる人工膜の物理化学的な研究が、2000年以降に世界中で爆発的に進展した。人工膜の温度を下げると、脂質の炭化水素鎖の秩序度が高い液体秩序相と、その秩序度が低い液体無秩序相に相分離することが確認され、その結果生じるドメイン構造がラフト仮説の動的ドメインと関連しているのではないかと考えられた。このような研究の流れを背景にして、生体膜における有限サイズドメインの生成機構や動力学、さらにドメイン形成と生体膜の形態の関連性を解明することは、ラフト仮説の最重要課題となっていた。特に非平衡状態にある生体膜では、ゆらぎによって駆動される内部自由度と外部自由度の動的な連動性が本質的な役割を担っている。

動的ドメインの形成機構については、大きく分けて二つの異なる解釈があった。一方は生体膜が相分離温度以下の二相共存状態にあってドメインが形成されるという立場であり、他方は生体膜が転移温度以上の一相状態にあって動的な濃度ゆらぎが生じているという見方である。これらに加えて、生体膜のダイナミクスに関する正しい知見を得るためには、生体膜の周囲に存在するバルク溶媒を媒介とする流体力学的相互作用を考慮することが本質的に重要であった。

2. 研究の目的

本計画研究は、理論とシミュレーションを駆使して、多成分生体膜の相分離現象やゆらぎを媒介とした非平衡ダイナミクスを探求し、最終的にはそのメソ構造形成を制御することを目的とする。

第一の目的は、流体力学的相互作用が働く多成分生体膜系のダイナミクスを厳密に探索することである。研究代表者は以前に、周囲の溶媒の流体力学効果を考慮した濃度ゆらぎのダイナミクスや、転移温度以下でのドメインの粗大化の時間発展について研究してきた。一方、生体膜の内外には細胞骨格や細胞外マトリックスが存在し、周囲の溶媒は粘弾性体と考えるのが妥当である。また、生体膜は二重膜で構成されており、平坦ではなく多様な形態をとる。そこで、本計画研究では生体膜やバルク溶媒の粘弾性効果、脂質二重膜間の結合効果、生体膜の曲率効果などの問題を考察して、多成分生体膜における構造形成や不均一性のダイナミクスに関する研究を行う。また、イオン液体といった他の物質においてここで得られた知見が応用できるか検討する。

第二の目的は、相分離を起こす生体膜や非平衡条件下のベシクルの様々な形態転移のダイナミクスを、計算機シミュレーションによって解明することである。以前に開発した脂質モデルを多成分系に拡張し、新しい現象を探求する。例えば、様々な流動場における多成分の脂質分子の自己集合、構造形成のシミュレーションを行う。また、化学反応と相分離が連動する多成分ベシクルのシミュレーションも行い、化学反応にともなう動的な膜物性の変化が本質的な役割を果たす非平衡構造の発見や形成機構の解明を目指す。

第三の目的は、タンパク質の存在や外場などの非平衡条件下にあるアクティブな生体膜におけるブラウン運動や異常拡散の問題を理論とシミュレーションにより解明することである。生体膜は周囲の溶媒と結合しているため、生体膜に埋め込まれた物体の2次元な運動を観察することによって、3次元溶媒の粘弾性の情報を得ることも可能であり、新しいマイクロレオロジーの手法の提案につながる。また、得られた粘弾性法則の知見から、効率の良いマイクロマシン遊泳のメカニズムも考察する。

本計画研究は、生体膜が多成分系であることに着目して、相分離や流体力学的効果、ブラウン運動という純粋に物理的な現象のみで、どれだけ実在する細胞に肉迫できるかを理論的に見極めようとするチャレンジングかつ独創的な課題であった。最終的には、非平衡状態にある生体膜のダイナミクスを支配する普遍法則を見出して、その動的なメソ構造の予測を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

生体膜における流体力学的効果の理論的解析において、生体膜は二次元流体であると仮定し、生体膜とバルク溶媒の両方に対して流体力学方程式を適用する。また、問題を一般的にするために、バルク溶媒は生体膜から一定の距離に置かれた二つの固体壁に挟まれているとする。生体膜の周囲の溶媒には細胞骨格や細胞外マトリックスが含まれるので、溶媒は粘弾性体として扱い、その粘性は周波数に依存すると仮定する。まず、波数と周波数に依存する一般化易動度テンソルを導出する。最初は、流体膜と壁の距離が十分に小さい極限を考える。この場合は、固体基板に支持された脂質二重膜中のダイナミクスを考察することに対応し、脂質二重膜中の運動量は周囲の溶媒に強く散逸することになる。この極限で、膜中に埋め込まれた固体円盤の周波数に依存した抵抗係数を求める。この結果は、生体膜中の一粒子マイクロレオロジーの実験に対して有益な情報となる。さらに、この散逸が強い条件下で、易動度テンソルから二粒子間の相対易動度を計算する。これは、生体膜中の二粒子マイクロレオロジーにおいて有用な関係式を与える。また、それらの結果を逆ラプラス変換することによって、生体膜中のブラウン運動に対する溶媒の粘弾性効果を議論することが可能である。

生体膜のダイナミクスに対する脂質二重膜間の結合効果も検討する。二枚の単層膜間の結合様式として、自由エネルギーを通じて生じる静的な寄与と、運動方程式を通じて生じる動的な寄与の二種類を考える。前者に係わる物理的要因としては、膜タンパク質による架橋や、極性基が有する電荷同士の静電相互作用などがある。一方、動的結合としては二枚の単層膜間の摩擦効果を考察する。さらに、これまで通りに周囲のバルク溶媒の流体力学効果も考慮して、二重膜の相分離ダイナミクスを記述するモデルを構築する。このようにして得られたモデルに対して、二重膜における濃度ゆらぎのダイナミクスを解析する。我々は濃度ゆらぎの減衰率の波数依存性を解析的に計算し、二重膜の動的構造因子などを求める。さらに、球面上の生体膜の流体力学の定式化や、非平衡条件下にあるアクティブな生体膜におけるブラウン運動の問題を解析的に検討する。

タンパク質を含む多成分ベシクルの形態転移ダイナミクスのシミュレーションを行う。生体膜の曲率を局所的に変えるタンパク質による膜の形態形成を、メッシュレス膜模型を用いた粗視化粒子シミュレーションを用いて調べる。タンパク質の自己集合と膜変形がカップリングする。また、核膜孔を形成するタンパク質を考慮した動的三角格子膜シミュレーションを行い、核膜の形態形成を調べる。

ベシクル中の疎水性分子と溶媒中の親水性

分子間の結合と解離による両親媒性分子の生成、消滅の化学反応を考慮した粗視化粒子シミュレーションを行い、化学反応によって誘起されるベシクルの形態ダイナミクスを解明する。化学反応の伝搬にともない、どのような動的な構造が生まれるかを明らかにする。膜と溶媒との粘性差が与える影響も調べる。

4. 研究成果

(1) 脂質二重膜のゆらぎと構造のダイナミクス

二種類の脂質からなる二重膜を「曲げ弾性をもった二成分流体」としてモデル化し、そのダイナミクスを調べた。膜外部の流体力学方程式と膜自身の流体力学方程式を連立させて解くことにより、膜運動の緩和率を導出した。我々は単層膜間の摩擦、脂質密度と膜の曲げのカップリング、膜内と膜間での脂質同士の相互作用を考慮した。計算の結果、五つの緩和モードを得た。二成分に拡張したことにより、相互拡散に起因する二つの新たな緩和モードが得られた。これらのモードは、相分離の臨界点近傍で非常に遅くなることがわかった。

(2) 非平衡環境下における生体膜のゆらぎ

生体膜と細胞骨格の相互作用のように、生体膜の外部環境における非熱的なゆらぎによって誘起される膜の非平衡ゆらぎについて考察した。具体的には、ランダムな速度を発生するアクティブな壁と相互作用する生体膜のブラウン運動の解析を行った。ポテンシャルで束縛されている膜の流体力学方程式を解くことにより、膜断片の平均二乗変位を計算した。壁が静的な場合、平均二乗変位は時間の $2/3$ 乗と $1/3$ 乗で増加する領域が見られる。一方、壁がランダムな速度を発生する場合、平均二乗変位が時間に比例する時間領域が存在する。

(3) 粘弾性体中のアクティブな力双極子による異常拡散

アクティブな力双極子を有する粘弾性体中のブラウン運動について検討した。粘弾性体は二流体モデルで記述し、タンパク質を模倣したアクティブな力双極子の相関は特徴的な緩和時間をもつとした。プローブ粒子の平均二乗変位を計算した結果、熱ゆらぎのみ存在する場合、平均二乗変位は時間の 0 乗から 1 乗の間で変化することを導出した。一方、アクティブな力双極子によって、平均二乗変位は時間の 0 乗から 2 乗の間の全ての異常拡散が起こることを示した。我々の結果は、近年のガン細胞中の異常拡散の振る舞いを適切に説明している。

(4) 粘弾性体中のマイクロマシンの遊泳 ソフトマターのような粘弾性体中を遊泳

するマイクロマシンの動作機構について理論的に考察した。具体的には、アクティブ・マイクロレオロジーで使われている基本式を三つ玉スイマーに適用することで、スイマーの遊泳速度とソフトマターの複素粘性率を結びつける関係式を導出した。この関係式によると、三つ玉スイマーがソフトマター中を遊泳するには二通りの可能性があり、一方は形状変形の時間反転対称性を破ることであり、他方はスイマーの構造対称性を破ることである。この原理を「スイマー・マイクロレオロジー」と命名した。

(5) BAR タンパク質による膜チューブ形成

最近、生体膜に吸着し膜を曲げるバナナ状のBARドメインを持つタンパク質が多く見つかっている。このバナナ状タンパク質による膜変形機構を明らかにするため、我々はメッシュレス膜模型を用いたシミュレーションを行った。タンパク分子同士に直接の引力を与えなくても、タンパク質の自発曲率を上げていくと膜を介した相互作用で自己集合する。しかし、通常の相分離と異なり、この集合はタンパク質の軸に沿った方向と垂直方向に分かれて段階的に起こることを明らかにした。ベシクルでは自発曲率を上げていくと赤道上への集合がまず起こり、その後、一箇所に集合する。高タンパク密度では多面体状ベシクルが形成する。

また、これまでの研究ではタンパク質に沿った自発曲率のみが考慮されていたが、側方に弱い自発曲率を加えることでチューブ形成のダイナミクスが大きく変わることが分かった。平衡状態の性質はそれほど変化しないが、集合途中にみられるネットワーク構造の安定性が変わることによって、チューブ形成速度が大きく変わる。また、2種類のバナナ状タンパク質を混合した場合、周期的なヒダ状の構造を形成されることも明らかとなった。タンパク質同士の相互作用はFournierによるガウス近似を用いた解析的な予想とよい一致を示す。

(6) 化学反応による二重膜の構造変化

生体内では脂質分子の合成、分解が盛んに行われているが、それによって生じる生体膜のダイナミクスはよくわかっていない。親水分子、疎水分子の結合による両親媒性分子の生成、また逆反応による分解を考慮した粗視化分子動力学計算を行い、二重膜の構造変化を研究した。ベシクルの内外に基質の濃度差がある場合、化学反応によって、二重膜の外膜と内膜の間を分子の移動が起こる。これにより、板状の二重膜の形成伸長、ベシクル内への球状のコブ形成が起こることが明らかになった。膜とベシクル内外の溶液の粘性の比がどちらのダイナミクスが起こるか決めるのに重要である。

(7) 核膜形状の構築

核膜は小胞体と繋がっているが、小胞体を除くと、高いトポロジー種数を持つストマトサイトと見なすことができる。この形状は核膜孔複合体による膜孔サイズの拘束だけでは形成されず、核質の浸透圧による核質体積の増加、核膜槽の体積の減少、核膜孔間の反発力などによって安定化させることができることを明らかにした。

(8) イオン液体における液晶構造形成

イオンのみで液体状態を取る常温溶融塩が電解液、反応溶媒、潤滑剤などとして近年注目されており、メソスケールの内部構造が機能性発現に重要であることが実験的に示唆されている。アルキルイミダゾリウム系イオン液体の合同原子モデルの1マイクロ秒に渡る長時間分子動力学計算により液晶構造の形成を再現し、液晶構造がフラジイルな動的性質に寄与すること、液晶構造によってイオン輸送が層内に制約され異方的となることを見出した。

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26件)

1. T. V. Sachin Krishnan, Kento Yasuda, Ryuichi Okamoto, and Shigeyuki Komura, Thermal and active fluctuations of a compressible bilayer vesicle, *J. Phys.: Condens. Matter* 30, 175101/1-9 (2018). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1088/1361-648X/aab6c7>

2. Hailong Peng, Momoji Kubo, and Hayato Shiba, Molecular dynamics study of mesophase transitions upon annealing of imidazolium-based ionic liquids with long-alkyl chains, *Physical Chemistry Chemical Physics* 20, 9796-9805 (2018). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1039/C8CP00698A>

3. Yuto Hosaka, Kento Yasuda, Isamu Sou, Ryuichi Okamoto, and Shigeyuki Komura, Thermally driven elastic micromachines, *Journal of the Physical Society of Japan* 86, 113801/1-4 (2017). 査読有
<http://dx.doi.org/10.7566/JPSJ.86.113801>

4. Ryuichi Okamoto, Shigeyuki Komura, and Jean-Baptiste Fournier, Dynamics of a bilayer membrane coupled to a two-dimensional cytoskeleton: Scale transfers of membrane deformations, *Physical Review E* 96, 012416/1-10 (2017).

査読有

<http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.96.012416>

5. Yuto Hosaka, Kento Yasuda, Ryuichi Okamoto, Shigeyuki Komura, Lateral diffusion induced by active proteins in a biomembrane, *Physical Review E* 95, 052407/1-10 (2017). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.95.052407>

6. Hiroshi Noguchi and Jean-Baptiste Fournier, Membrane structure formation induced by two types of banana-shaped proteins, *Soft Matter* 13, 4099-4111 (2017). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1039/c7sm00305f>

7. Kento Yasuda, Ryuichi Okamoto, and Shigeyuki Komura, Swimmer-microrheology, *Journal of the Physical Society of Japan* 86, 043801/1-4 (2017). 査読有
<http://dx.doi.org/10.7566/JPSJ.86.043801>

8. Kento Yasuda, Ryuichi Okamoto, and Shigeyuki Komura, Anomalous diffusion in viscoelastic media with active force dipoles, *Physical Review E* 95, 032417/1-14 (2017). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.95.032417>

9. T. V. Sachin Krishnan, Ryuichi Okamoto, and Shigeyuki Komura, Relaxation dynamics of a compressible bilayer vesicle containing highly viscous fluid, *Physical Review E* 94, 062414/1-14 (2016). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.94.062414>

10. Hayato Shiba, Yasunori Yamada, Takeshi Kawasaki, and Kang Kim, Unveiling Dimensionality Dependence of Glassy Dynamics: 2D Infinite Fluctuation Eclipses Inherent Structural Relaxation, *Physical Review Letters* 117, 245701/1-6 (2016). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevLett.117.245701>

11. Koh M. Nakagawa and Hiroshi Noguchi, Nonuniqueness of local stress of three-body potentials in molecular simulations, *Physical Review E* 94, 053304/1-11 (2016). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.94.053304>

12. Jean Wolff, Shigeyuki Komura, and David Andelman, Budding transition of asymmetric two-component lipid domains, *Physical Review E* 94, 032406/1-8 (2016). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.94.032406>

13. Hiroshi Noguchi, Construction of nuclear envelope shape by a high-genus vesicle with pore-size constraint, *Biophysical Journal* 111, 824-831 (2016). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2016.07.010>

14. Kento Yasuda, Shigeyuki Komura, and Ryuichi Okamoto, Dynamics of a membrane interacting with an active wall, *Physical Review E* 93, 052407/1-12 (2016). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.93.052407>

15. Ryuichi Okamoto, Naofumi Shimokawa, and Shigeyuki Komura, Nano-domain formation in charged membranes: Beyond the Debye-Huckel approximation, *EPL* 114, 28002/1-6 (2016). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1209/0295-5075/114/28002>

16. Ryuichi Okamoto, Yuichi Kanemori, Shigeyuki Komura, and Jean-Baptiste Fournier, Relaxation dynamics of two-component fluid bilayer membranes, *The European Physical Journal E* 39, 52/1-21 (2016). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1140/epje/i2016-16052-3>

17. Hiroshi Noguchi, Membrane tubule formation by banana-shaped proteins with or without transient network structure, *Scientific Reports* 6, 20935 (2016). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1038/srep20935>

18. Hayato Shiba, Hiroshi Noguchi, and Jean-Baptiste Fournier, Monte Carlo study of the frame, fluctuation and internal tensions of fluctuating membranes with fixed area, *Soft Matter* 12, 2373-2380 (2016). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1039/C5SM01900A>

19. Takuma Hoshino, Shigeyuki Komura, and David Andelman, Correlated lateral phase separations in stacks of lipid membranes, *Journal of Chemical Physics* 143, 243124/1-9 (2015). 査読有

<http://dx.doi.org/10.1063/1.4934984>

20. Shigeyuki Komura, Kento Yasuda, and Ryuichi Okamoto, Dynamics of two-component membranes surrounded by viscoelastic media, *Journal of Physics: Condensed Matter* 27, 432001/1-7 (2015). 査読有

<http://dx.doi.org/doi:10.1088/0953-8984/27/43/432001>

21. Koh M. Nakagawa and Hiroshi Noguchi, Morphological changes of amphiphilic molecular assemblies induced by chemical reactions, *Soft Matter* 11, 1403-1411 (2015). 査読有

<http://dx.doi.org/10.1039/C4SM02571G>

22. Hiroshi Noguchi, Ai Sakashita, and Masayuki Imai, Shape transformations of toroidal vesicles, *Soft Matter* 11, 193-201 (2015). 査読有

<http://dx.doi.org/10.1039/c4sm01890g>

23. Jean Wolff, Shigeyuki Komura, and David Andelman, Budding of domains in mixed bilayer membranes, *Physical Review E* 91, 012708/1-10 (2015). 査読有

<http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.91.012708>

24. Hiroshi Noguchi, Two- or three-step assembly of banana-shaped proteins coupled with shape transformation of lipid membranes, *EPL* 108, 48001/1-6 (2014). 査読有

<http://dx.doi.org/10.1209/0295-5075/108/48001>

25. Shigeyuki Komura and David Andelman, Physical aspects of heterogeneities in multi-component lipid membranes, *Advances in Colloid and Interface Science* 208, 34-46 (2014). 査読有

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2013.12.003>

26. Hayato Shiba and Takeshi Kawasaki, Spatiotemporal heterogeneity of local free volumes in highly supercooled liquid, *The Journal of Chemical Physics* 139, 184502/1-8 (2013). 査読有

<http://dx.doi.org/10.1063/1.4829442>

〔学会発表〕(計3件)

1. Shigeyuki Komura, Swimmer-microrheology, Association in Solution IV (Jul. 31 - Aug. 4, 2017), St. John's, Canada.

2. Hiroshi Noguchi, Structure formation of biomembranes induced by protein adsorption, *Structured Soft Interfaces: Caught Between Multi-Scale Simulation and Application* (Jan. 23-27, 2017), Leiden, Netherlands.

3. Shigeyuki Komura, Anomalous diffusion in active cells, *BioSoft Frontiers: Physics of Soft and Biological Matter* (Sep. 18-21, 2016), Rehovot & Tel Aviv, Israel.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.comp.tmu.ac.jp/shigekomura/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

好村 滋行 (KOMURA Shigeyuki)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号: 9 0 2 3 4 7 1 5

(2) 研究分担者

野口 博司 (NOGUCHI Hiroshi)

東京大学・物性研究所・准教授

研究者番号: 0 0 5 1 4 5 6 4

(3) 研究分担者

芝 隼人 (SHIBA Hayato)

東北大学・金属材料研究所・特任助教

研究者番号: 2 0 5 4 9 5 6 3