

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03708

研究課題名(和文) 膜外刺激によって誘起される脂質二重膜のダイナミクス

研究課題名(英文) Dynamics of lipid bilayer membrane induced by external stimuli

研究代表者

谷口 貴志 (TANIGUCHI, TAKASHI)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：60293669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、膜外からの刺激による膜機能発現を物理の視点からの解明することを目的とし、次の2つ問題：(1)膜外物質が膜脂質に結合するという刺激(局所的刺激)が膜の動的な変化を引き起こす機構と(2)膜外の特定の化学物質場の刺激(大域的刺激)に誘起される膜の大変形の機構解明を行った。局所的刺激に対する応答の研究では、膜の脂質組成と刺激を受けたGPI アンカー型受容体(GPI-AR)との相互作用と組成の揺らぎとの競合が、クラスター形成と一時的ドメイン生成決定していることを明らかにした。NaOH水溶液注入による膜への大域的刺激の研究ではイオンの移流と拡散が膜変形を支配していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, to clarify the physical mechanism behind bio-membrane functions in response to an external stimulus, we have addressed the two following questions: (1) how a chemical substance (local stimulus) induces a change in the membrane dynamics and (2) how a specific chemical concentration field (global stimulus) can induce large length- and long-time scale shape deformations. In the study of the membrane response to a local stimulus, we found that the competition between local composition fluctuations and the interaction between the lipid-composition and stimulated Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol Anchored Receptors (GPI-AR) is the key factor to determine the formation of GPI clusters and the temporal domain of the lipids. Regarding to the membrane deformation by a global stimulus (i.e., an injection of NaOH-aq. solution), we found that the ion transport by convection and diffusion controls the membrane deformation dynamics.

研究分野：ソフトマター物理学

キーワード：ソフトマター物理 脂質膜 自発曲率 計算物理

1. 研究開始当初の背景

生体膜が示す多様な機能と関係する膜構造は、膜外部からの何らかの刺激により、「発現」と「解消」を動的に繰り返している。近年、生体膜が示す多様な機能や複雑な形態変形を物理学的観点から理解しようとする試みが世界的に盛んに行われている。細胞内外間の情報伝達や膜変形は、多くの場合、様々な細胞外からの刺激(「細胞外のリガンド(ある種の化学物質)が膜上に存在する受容体に結合するという局所的刺激」や「細胞外の化学物質場の大域的刺激により誘起される膜の大変形を利用した特定物質の取込みや排出」)によって引き起こされる。このような膜外刺激に対する応答では生体膜の内部自由度が重要な役割を果たしていると考えられている。この生体膜の内部自由度とは、膜が多種類の脂質やコレステロール等からなるという膜の不均一性を表現する「ある種の場合」を意味している。細胞内外の情報伝達では、「ラフト」と呼ばれる構造(複数種の特定脂質からなる脂質相分離ドメイン)が重要な役割を果たしていること(ラフト仮説[1])が発表されて以来、ラフトを静的で安定な相分離構造として捉える考え方が支配的であったが、ラフトは安定なドメイン構造として存在しているのではなく、情報伝達に必要な場合に生成され不要になると消滅する動的な存在であるということが近年の K. Suzuki らの実験結果から明らかになってきた[2]。物理的視点ではラフトは相分離ドメインであるが、ラフトはドメインが成長し続けることはなく、また、情報伝達の必要がなくなるとドメインが解消されるという事実は、ラフト形成を単純な相転移現象として捉えることができないということの意味している。([1] K. Simons et al, *Nature* **387**, 584 (1997). [2] K. Suzuki et al, *Nature Chemical Biology* **8**, 774 (2012)) 論文[2]によれば、細胞外のリガンドが膜上の受容体に結合するという外部刺激が、受容体の会合とラフトの形成を誘起し、ラフトを介して細胞内外間のシグナル伝達が行われ、その後ドメインは解消されると報告している。この発見は、1 脂質分子の膜面上拡散が直接観察できるなってきた近年の実験法の発展によるものである。しかし、このような精密な測定が可能になった現在でも「相分離ドメインであるラフトが、どのような機構で動的に“形成、解消”されるのか」は未解決まま残されている。上記のラフト形成は、局所的な刺激が重要である現象として捉えられるが、より大域的な刺激が膜の変形と機能発現と関係している現象も多く存在する。例えば、ミトコンドリア内部にはクレステと呼ばれる膜構造が ATP 合成と関係して存在し、そのクレステは長年、板状で静的な構造と考えられてきたが、近年の高解像度 SEM と電子顕微鏡トモグラフィの発展により、板状の構造ではなく、実は Tube 状の構造が支配的で、

それが膜外の化学物質場による刺激により動的に形成と消滅を繰り返しており、その動的な変形により特定物質の膜内部や細胞内部への取り込みや排出が行われていることが分かってきた[3]。([3] C. A. Mannella, *Biochimica Biophysica Acta*, **1762**, 140 (2006)) このように、膜外刺激に対する膜の応答については、近年の実験手法の発展によって新たに分かってきたことも多く、その理論的解明が強く望まれている。

以上の研究動向を踏まえて「膜外刺激による膜の応答の普遍的機構の解明」を行うことを考えた。その代表的問題として「リガンドが膜上の受容体に結合するという刺激によるラフト形成・消滅の機構解明の研究」と「膜外の化学物質場による刺激による変形応答」を代表的問題として取り上げる。ラフト形成の問題では、リガンドが受容体に結合するという刺激後のドメインの形成と解消を、膜上受容体の会合ダイナミクスと強い揺らぎの下での相分離ダイナミクスとの結合を考えると、この問題を解く鍵であると考え、また、化学物質場の刺激による変形では膜の組成と膜外の化学物質場の結合により捉えることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は生体膜が示す多様な機能の中でも、膜外からの刺激による膜の機能発現を物理の視点からの解明することを研究目的とする。具体的には、次の 2 つ問題: (A) 「膜外のリガンドが膜上の受容体に結合するという刺激(局所的刺激)が動的にラフトを形成・解消させる機構」と(B)ミトコンドリア等で起こっている「膜外部の特定の化学物質場の刺激(大域的刺激)に誘起される膜の大変形とそれによる特定物質の取込みや排出の機構」を代表的な問題として取り上げ、その機構解明を行う。そのために生体膜を記述するミニマム・モデルを構築し、そのモデルを解くための「数値計算方法」を開発する。最終的に、膜外からの刺激の応答により起こる膜機能の発現機構を物理学的観点から統一的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、膜外からの刺激による膜の機能発現を物理の視点からの解明することを研究目的に次の 2 つの問題 (A) 「膜外刺激が膜内にどのように伝わるかというシグナル伝達と関係するラフトの形成と消滅の動的機構の解明」と(B) 「細胞外の化学物質場による刺激により誘起される膜変形とそれによる特定物質の取込みと排出機構の解明」に取り組む。これらの研究目的を成し遂げるためには、以下の 4 つのダイナミクス:

- (a) 膜の大変形のダイナミクス
- (b) 膜の局所組成ダイナミクス
(膜上の揺らぎと流体力学効果を考慮した相分離ダイナミクス)

- (c) 膜上での受容体の会合ダイナミクス (特に(b)で解く膜組成の連続場と結合する)
- (d) 膜外の流体中の化学物質場の流動拡散現象(特に(a)の膜変形と結合する)を適切に捉えたモデリングを行い,更に(a)-(d)のダイナミクスが相互に結合している状況を数値計算による解析を行う.今までの数値シミュレーションに加えて粒子法(受容体の膜上ダイナミクス)とのHybrid法,そして粒子運動と膜組成のダイナミクスとの結合を考える.以上を踏まえたうえで,(1),(2)の順で研究を進めた.

(1) [生体膜のモデル化]

生体膜は多成分の脂質,膜タンパク等で構成されている.そのため,ラフト形成をラフト構成脂質とそれ以外の脂質に分け,二成分脂質膜として脂質膜を捉えることを考える(図1).本研究では,膜面上に存在する受容体(脂質の頭部にリガンドと結合する部位を有する)の運動や膜上,膜外の流れ場と合わせて解くことで,生体膜での情報伝達を担うラフトドメインの動的“生成・解消”過程を捉える.本研究で対象としている2つの問題のうち,局所刺激に対するラフト形成の機構解明の問題では,リガンドが結合する受容体の膜上での運動,そして受容体間の会合・解離のダイナミクス,同時に受容体の存在に影響を受ける受容体周囲の脂質の組成のダイナミクスを詳細に追うことが重要である.また,ラフト形成・解消機構を捉えるには,100x100nm²程度の膜領域を捉える必要があり,そのスケールでは膜組成場の時間的な揺らぎが非常に大きく,ラフトの形成と解消に重要な役割を果たしていると考えられる.一方,大域的な刺激による膜の応答の問題ではラフトの形成の場合よりかなり大きなスケールの膜変形と流動拡散現象を扱う.ここでは,揺らぎの効果は重要ではなく,代わって,流体力学効果と膜の大変形,そして膜変形と化学物質場の流動拡散との結合が重要となってくる.よって,以下の効果(a)膜組成の熱揺動の効果,(b)膜上に存在する受容体の拡散,会合の効果,(c)受容体が膜の局所組成に及ぼす影響(受容体と脂質の相互作用),(d)膜上,あるいは膜外の流体力学効果,(e)ベシクル内外に存在するある化学物質の空間場と膜の局所組成の結合の効果を考慮したできる限りシンプルな理論モデルを構築する.

(2) [数値計算] (1)で開発したプログラムを用いたテスト的な数値計算(単一の受容体の膜上での拡散運動のようなシンプルな状況)を行い実験結果と比較を行い,理論モデルの改良を進め,検証を進め.開発した数値計算プログラムを用いて数値計算実験を行った.更に,流体力学効果や静電場の効果など非局所的な効果を効率よく行い大規模な数値計

算が可能ないように,プログラムの並列計算化も推し進めた.

4. 研究成果

本研究は,脂質膜外からの刺激による膜の機能発現を物理の視点からの解明することを目的として,主に次の2つ問題:(A)膜外の物質が膜上の脂質に結合するという刺激(局所的刺激)が膜の動的な変化を引き起こす機構と(B)膜外部の特定の化学物質場の刺激(大域的刺激)に誘起される膜の大変形の機構解明を行った.以下では,(A)局所的刺激に関する研究と(B)大域的刺激による膜の変形に関する研究の成果を分けて書く.

局所的な刺激に対する膜応答ダイナミクスの研究(A)では,(a)膜組成の熱揺動の効果,(b)膜上に存在する受容体の拡散・会合の効果,(c)受容体が膜の局所組成に及ぼす影響(受容体と脂質の相互作用)について膜のモデル化とそれらの効果を取り入れたプログラムを開発し研究をすすめた.

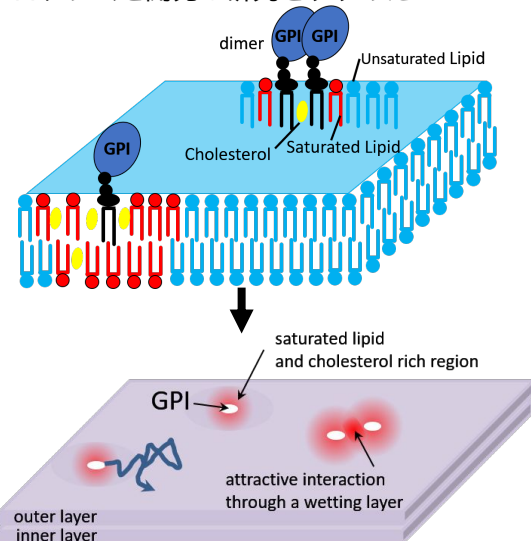


図1: GPI粒子,ラフト構成成分(A成分:赤),それ以外の脂質(B成分:青).ラフト構成脂質を介したGPI間の引力相互作用の模式図(下)

脂質二重膜の外膜に存在するグリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型受容体(GPI)がラフト形成に及ぼす影響を考え,ラフト構成脂質(A成分)とそれ以外の脂質(B成分),そしてGPI(G粒子)の3成分からなる系として捉えなおした(図1).1個のG粒子だけが存在する場合のG粒子近傍の組成の変化をしらべた.膜は,現実の状況を模して,脂質の組成に関して一相状態を設定するため,G粒子近傍においても短い時間スケールでは平均の組成の値の付近でランダムに揺らいでいるが,長時間の平均としてはG粒子と親和性のあるラフト構成脂質(A成分)が集まることがわかった.次に2個のG粒子間に働く相互作用に調べた.G粒子間には直接的な引力相互作用は存在しないが,平均値近傍で激しく揺らいでいる脂質の組成場を介して引力相互作用が働くことが分かった.

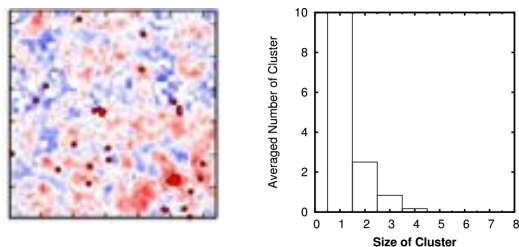


図2: G 粒子の膜の組成を介した引力相互作用によるクラスタ形成(左図), クラスタサイズの定常状態での分布(右図)

次に, 生体膜と同程度の密度で存在する G 粒子集団のダイナミクスを調べた. G 粒子群は, 流体力学的な流れの揺らぎにより拡散運動を繰り返しながら 2 粒子クラスタ(ダイマー)の形成と解消を繰り返していること(図2左), また, 2つのダイマーの会合によるテトラマーの動的形成と解消も起こり得ることが分かった(図2右). この一時的なクラスタ形成には, 膜の脂質組成と G 粒子との相互作用と組成の揺らぎの競合が決定因子となっていることを明らかにした. これは先行実験[2]で報告されている有限時間のダイマー及びテトラマーの存在を支持するものである.

大域的刺激に対する膜の応答に関する研究(B)では, 膜外の化学物質の濃度場のダイナミクスと膜の変形ダイナミクスを同時に扱うことが重要となる. 従来の研究は, 膜自体の弾性エネルギーに焦点を置いた研究が大半であり, 膜外の化学物質場, 流体場, 静電場などの要因まで考慮したものは少ない. そこで本研究では, 生体膜を模して作成した GUV(Giant Unilamellar Vesicle)の近傍に pH 勾配を生じさせ, それに誘引される変形を調べた. Fournier らによる先行実験[4]を参考にし, その実験系全体を Phase Field 法を用いてモデル化し, シミュレーションを行うことで, 膜の変形を外部要因まで含めた物理的側面から解明することにした. このモデル化では, 膜外の化学物質の濃度場のダイナミクスと膜の変形ダイナミクスとを同時に扱い易い, 曲率弾性モデルを拡張して, 膜外のイオンの拡散と自発曲率の局所的な変化を関係付けたモデルを構築した.

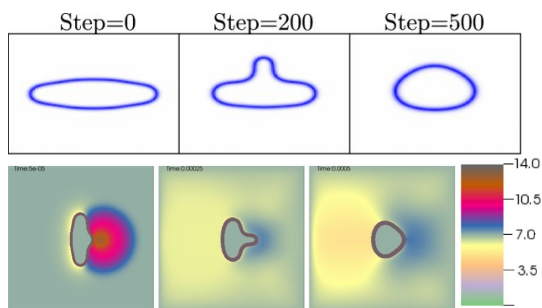


図3: 扁平なベシクルの上側に NaOH を注入した後の膜変形の時間発展の様子(上)と膜の周囲の pH の空間分布の時間変化(下)

ミトコンドリア内膜で生じている tube 状の変形(クリステ)を単純な系で再現した Fournier らの実験系[4]に対応する数値シミュレーション(2D)を行った.

[4] J.-B. Fournier, et al., *Phys. Rev. Lett.* **102**, 018102(2009).

扁平な形状を平衡状態として持つベシクルの扁平部上部に, NaOH 水溶液を注入した後に生じたベシクルの変形と pH 空間分布の時間発展の様子を図3に示す. 先行実験の結果との比較から, 実験で観察された tube 状の変形の様子をよくとらえていることが分かる. 更に流体力学効果を取り入れようとして拡張し, システムサイズの大きな 2次元系の数値シミュレーションを行い, 膜近傍に NaOH 溶液を注入する位置を変化させた場合の変形の

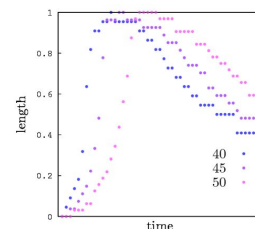


図4: NaOH 水溶液を注入する位置を変えた時の Tube 長の時間変化: 凡例は滴下位置と膜の距離.

成長, 減衰の違いを調べた. 注入位置が膜からある程度遠い場合, 水酸化物イオンが濃い位置に応じて突起状の変形の突起部の最大長は大きくなり, 減衰に時間を要するようになる(図4). 注入位置を遠くするほど, 変形の成長は遅れて生じ, 減衰は緩やかになる点で実験を再現している. 先行実験ではイオンの拡散が膜の変形の度合いに大きく寄与していることが報告されているが, 上記の結果はこの報告を支持するものである. また, 数値計算については, 大規模な 2次元系や 3次元系の計算で非現実的な計算時間が必要となることが問題であったが, 並列計算を進め高速化を実現し比較的現実的な時間で実行可能となった. このように NaOH 水溶液注入による膜への大域的刺激では「イオンの移流と拡散」と「膜変形」の結合がダイナミクスを支配していることを明らかにした.

本研究では, 上記の 2つの課題に加えて, 外部からの糖脂質添加による刺激に対する膜の応答ダイナミクスの研究もおこなった. 外部から添加された糖脂質 (GM1) がマクロ相分離した DPPC, DOPC, コレステロール混合膜の DPPC-rich ドメインと DOPC-rich ドメインに非対称に入り込むことにより起こるミクロ相分離現象の研究を進めた. 通常の相分離ダイナミクスは, 無秩序状態からマクロ, もしくはミクロ相分離を起こすのに対して, この系では, マクロ相分離した状態に糖脂質を外部から添加からすることで, マクロ相から, ストライプ相を中間相として経由し, ミクロ相分離状へ膜のドメイン構造が変化する. その際, マクロ相の二相界面からある波長の揺らぎが成長し, ストライプ相へと転移し, そのストライプドメインの先端で「くびれが生じ, ちぎれる」という興味深い現象が

繰り返され、サイズ単分散なミクロ相へと転移することが分かった。これは相分離ダイナミクスの通常の観点から考えると、全く特異な相転移ダイナミクスであるといえる。この現象に対し非対称な組成に起因する自発曲率を考慮した膜の弾性と相分離を記述する時間依存型ギンツブルグ-ランダウモデルを用いて、この転移現象を数値的にもおよそ再現する事に成功した。解析から、このドメインの微細化を伴う転移現象は、GM1が2種類のドメインに非対称に入り込むことによって誘起される非ゼロの自発曲率によるものであることを明らかにした。

本研究では、生体膜が外部からの刺激に対して示す応答を、(A)局所的な刺激と(B)大域的な刺激という2つの観点から研究を進めた。この研究によって、局所刺激の場合には外膜上でのG粒子のクラスター形成消滅と関係して、動的で一時的なドメインを形成し、その存在が更に内膜に影響を与えて動的構造を安定化させながら生成消滅を繰り返していること、また大域的刺激の場合には、スケールの大きなドメインの内膜と外膜の非対称性が膜の大変形を引き起こすことを明らかにすることができた。これらの成果の一方で、現象の普遍性など未解決問題は、まだ多数残されており、今後更なる研究が必要である。

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 3 件)

Norihiro Oyama, Kosuke Teshigawara, John Jairo Molina, Ryoichi Yamamoto, Takashi Taniguchi, Reynolds number dependent dynamical transitions on hydrodynamic synchronization modes of externally driven colloids, *Physical Review E*, **97**, 032611 (12 pages) (2018), (査読有).
DOI: 10.1103/PhysRevE.97.032611

佐藤健, 谷口貴志, マルチスケールシミュレーションで見る高分子, *高分子*, **66**, 555-557 (2017), (査読無し).

Shunsuke F. Shimobayashi, Masatoshi Ichikawa and Takashi Taniguchi, Direct observations of transition dynamics from macro- to micro- phase separation in asymmetric lipid bilayers induced by externally added glycolipids, *EPL*, **113**, 56005 (6 pages) (2016), (査読有),
DOI: 10.1209/0295-5075/113/56005

[学会発表](計 16 件)

佐藤健, 谷口貴志, 急縮小・急拡大流路における流動と高分子鎖のダイナミクスの関係, 2017年度高分子基礎物性研究会・高分子計算機科学研究会 合同討論会, 2018年3月20日, 東京都.

笹倉彬祿, 勅使河原康祐, 谷口貴志, Shape deformation dynamics of lipid bilayer membrane induced by a chemical stimulus, 第7回ソフトマター研究会, 2017年10月23日~10月25日, 京都大学.

佐藤健, 谷口貴志, 急縮小・急拡大流路における高分子溶液のマクロな流動とミクロな状態の関係, 第7回ソフトマター研究会, 2017年10月23日~10月25日, 京都大学.

金子嘉高, 谷口貴志, 高分子ブロック共重合体の結合点を考慮した自己無同着場理論の拡張 2, 第65回レオロジー討論会, 2017年10月17日~10月19日, 新潟市.

佐藤健, 谷口貴志, 急縮小・急拡大流路におけるマルチスケールシミュレーション - 配向・からみ合いとマクロな流動の関係 -, 第65回レオロジー討論会, 2017年10月17日~10月19日, 新潟市.

馬場啓輔, 児谷勇紀, Gregory Lecrivain, 山本量二, 谷口貴志, 液相中の気泡に付着する固体粒子のダイナミクス, 化学工学会第49回秋季大会, 2017年9月20日~9月22日, 名古屋大学

佐藤健, 谷口貴志, 急縮小・急拡大流路におけるマクロな流動とミクロな高分子状態の関係 - マルチスケールシミュレーションによるアプローチ -, 第66回高分子討論会, 2017年9月20日~9月22日, 愛媛大学.

岸田拓也, 谷口貴志, マルチスケールシミュレーション法による平行平板間高分子溶液二層流の流動挙動解析, 第66回高分子討論会, 2017年9月20日~9月22日, 愛媛大学.

谷口貴志, Deformation of lipid bilayer membrane induced by an externally added chemical stimulus, *Mesoscopic Dynamics of Interfaces (MDOI) 2017*, 2017年9月15日, 名古屋大学

谷口貴志, Hydrodynamic synchronization of externally driven colloids, *レオロジーワークショップ米沢 2017*, 2017年7月14日, 山形大学.

Takashi Taniguchi, Kosuke Teshigawara, John Jairo Molina, Ryoichi Yamamoto and Norihiro Oyama, Hydrodynamically synchronized motion of externally driven colloids, アメリカ物理学会 March Meeting (国際学会), 2017年03月13日~2017年03月17日, New Orleans, USA.

加藤祥太, 谷口貴志, 二成分脂質膜上で崩壊と形成を繰り返すドメインと受容体の会合の相関, 第七回 京都若手ソフトマター研究会, 2017年03月08日~2017年03月08日, 京都大学.

Kosuke Teshigawara and Takashi Taniguchi, Dynamics of the lipid bilayer membrane induced by an external stimulus, The 12th International Workshop for East Asian Young Rheologists (国際学会), 2017年02月08日~2017年02月11日, Pattaya, Thailand.

谷口貴志, Antti Lamberg, 小西剛嗣, 山本量一, 非対称脂質膜のダイナミクスと上皮組織のシミュレーション, 京都大学 高等研究院生体医工学研究部門, 先端医工学研究ユニット 研究発表交流会, 2016年04月20日~2016年04月20日. 京都大学

Shunsuke Shimobayashi, Masatoshi Ichikawa, Takashi Taniguchi, Transition dynamics from macro- to micro-phase separation in asymmetric lipid bilayers, アメリカ物理学会 March Meeting (国際学会) 2016年03月14日~2016年03月18日. Baltimore, Maryland, USA.

下林俊典, 市川正敏, 谷口貴志, 脂質二重膜の非対称な組成に起因する相分離転移現象, 日本物理学会 2015年秋季大会, 2015年09月15日~2015年09月19日. 関西大学千里山キャンパス.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-tph.cheme.kyoto-u.ac.jp/p/taniguch/Activity/Outreach.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 貴志 (TANIGUCHI Takashi)

京都大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：60293669

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

山本 量一 (YAMAMOTO Ryoichi)

京都大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：10263401

モリーナ ジョン (MOLINA John)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：20727581

(4) 研究協力者

なし ()