

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 4 日現在

機関番号：32670

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06653

研究課題名(和文)ベシクル内複数種コロイド粒子の秩序化と膜変形の協同

研究課題名(英文) Synergy between ordering of several kinds of colloidal particles and membrane deformation in vesicles

研究代表者

夏目 ゆうの (Natsume, Yuno)

日本女子大学・理学部・助教

研究者番号：10706831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内で内包物が密に存在することで生じる“こみあい効果”に着目し、コロイド粒子を内包した袋状脂質2分子膜(ベシクル)の挙動について研究を進めた。油中水滴遠心沈降法を用いて、様々な物質を内包したベシクルの調製法を確立し、実験的にベシクル内部粒子の秩序化と膜変形の協同現象や異なる内部粒子間の自発的な秩序形成を見出した。モデルをたてて実験結果と比較することで、これらの機構に対する内部粒子の浸透圧平衡や粒子と膜間のこみあい効果の寄与を検証した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the ‘crowding effect,’ which involves entropic interactions in cells. As an in vitro model for analyzing the crowding effect, we used vesicles containing colloidal particles. Particles were encapsulated in the vesicles by means of a water-in-oil centrifugal sedimentation method. Vesicles encapsulating colloidal particles at a specific volume fraction (~13 vol%) showed synergy between vesicular membrane deformation and ordering of the internal particles. We observed that smaller microspheres tended to localize spontaneously in vesicles that contained two kinds of microspheres with different sizes. In comparison with the in vitro experimental results and the theoretical model, we examined the contribution of the osmotic pressure equilibrium of the internal particles to ordering and localization from the viewpoint of the crowding effect.

研究分野：ソフトマターの物理

キーワード：ソフトマターの物理 生物物理 ベシクル コロイド粒子 排除体積効果

1. 研究開始当初の背景

細胞内の生体高分子の構造形成、あるいは細胞分裂やエンドサイトーシスといった膜変形に対して、細胞内で内包物が密に存在することで生じる“こみあい効果”が寄与していることが明らかになりつつある。こみあい効果には、“拡散の抑制”と“排除体積効果”がある。排除体積効果は、大きさや形状の異なる柔らかな物質(ソフトマター)間に生じるエントロピー的な引力相互作用である。そこで、組成のよくわかった物質を組み合わせた細胞モデルでこみあい効果による境界膜内の内包物の秩序形成や境界膜の変形を再現、その機構を明らかにすることが求められている。しかしこれまで、境界内における種々の内包物間の秩序形成や境界膜との協同による膜変形を表現したモデルは限られている。本研究では、異なる種類のコロイド粒子を様々な比率で内包した袋状脂質2分子膜(ベシクル)を作成した。内部粒子の自発的な秩序形成と、粒子と相互作用する柔らかい膜の変形挙動を同時に観測できる系であり、挙動を観察・解析し、その機構における排除体積効果を議論した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、複数種のコロイド粒子を内包したベシクル系を構築し、内部粒子の秩序形成と膜変形の協同現象を明らかにすることである。こみあい効果の一種である排除体積効果は、構成要素が空間内にしめる体積分率や個々のサイズに依存する。そこで、粒径の異なるポリスチレンビーズを内包したベシクルを調製する手法を確立した。単種粒子内包型ベシクルにおいて、内包粒子の秩序形成と膜変形の協同現象を実験的に得て、排除体積効果を加味したモデルを立てた。加えて、サイズの異なる複数種のビーズを内包することで、ベシクル内部における粒子の自発的な秩序形成を見出した。これについて、排除体積効果を加味したモデルを構築した。さらに、2種粒子内包型ベシクルと単種粒子内包型ベシクルに対して、膜変形を誘起し、それらの変形を比較した。

以上の目的に対する方法と研究成果を、次の4つに項目立てて記述する。

(1) 物質や種数の異なる内包物をもつベシクルの調製、(2) ベシクル内コロイド粒子の秩序形成と膜変形の協同、(3) ベシクル内部の大・小コロイド粒子の秩序形成、(4) 内包物に依存した膜変形

3. 研究の方法

以下の様に(1) - (4)の各項目に対して研究の方法を述べる。

(1) 物質や種数の異なる内包物をもつベシクルの調製

内包物を有するベシクルの調製に適した、油中水滴遠心沈降法を用いた。この方法で

は図1の様に、内包したい物質の溶液や分散液と脂質を融解した油を用いて油中水滴エマルションを作成し、遠心力をかけてエマルションを油水界面に貼った単分子膜を通して、袋状脂質2分子膜(ベシクル)を作成する。遠心力や物質の比重を調整することで、様々な物質の内包が可能である。実際に顕微鏡で個々の粒子が可視化可能な直径1.0 μm の蛍光性ポリスチレンビーズを内包物として、ビーズがベシクル内に占める体積分率の同定、誤差の評価を行った。

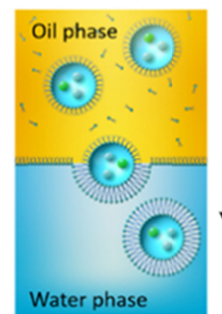


図1. 油中水滴遠心沈降法の模式図

(2) ベシクル内コロイド粒子の秩序形成と膜変形の協同

研究開始当初において、特定の体積分率でコロイド粒子を内包したベシクルにおいて、粒子の規則的な配列とそれに伴いベシクルが角張る現象が得られていた。本研究の目的である複数種を内包したベシクルにおける複数種の粒子間及び粒子-膜間の排除体積を議論するために、まず、要素が少ないこの新規現象において、排除体積効果を議論した。粒子の浸透圧効果と粒子-膜間の排除体積効果を共に考慮したモデルを提案した。

(3) ベシクル内部の大・小コロイド粒子の秩序形成

油中水滴遠心沈降法で直径0.05, 0.1, 0.5, 1.0 μm のビーズから2種を組み合わせベシクルに内包した。ベシクル調製後に静置し、自発的な秩序形成が生じるビーズの組み合わせを明らかにした。サイズにより蛍光色の異なる蛍光性ビーズを用いて、落射蛍光顕微鏡で観察した。蛍光顕微鏡像を解析し、輝点の抽出と蛍光強度比から濃度比を見積もることで、大・小両粒子の配置を見積もった。浸透圧平衡モデルを立て、実験結果と比較し、排除体積効果の寄与を議論した。自発的な偏在の機構を推測した。

(4) 内包物に依存した膜変形

当初予定では、高張液の添加による膜変形と膜分子前駆体の添加による膜変形を試みる予定であった。高張液の添加では、変形するベシクルもあったが、変形しないベシクルも多数観察された。一方、膜分子前駆体としてオレイン酸ナトリウムを添加したところ、効率よく膜変形が誘起された。添加によりオレイン酸が生じベシクルに取り込まれて膜

表面の膜分子を増加させたと考えられる。これを踏まえて、大・小2種の粒子を内包したベシクルの分散液に、オレイン酸ナトリウムを添加し膜変形を誘起した。対照実験として大粒子のみ、小粒子のみを内包したベシクルに対しても同様に膜変形を誘起し、それらの変形を比較した。

4. 研究成果

(1) 物質や種数の異なる内包物をもつベシクルの調製

様々な物質をベシクル内に内包する手法

油中水滴遠心沈降法(図1)を用いてベシクルを作成した。同一のプロトコルでナノメートルサイズの蛍光分子、高分子鎖、サブマイクロ、マイクロメートルサイズのポリスチレンビーズを内包したベシクルの調製に成功した。特に、直径 $1\mu\text{m}$ のビーズについては、直径10から $20\mu\text{m}$ のベシクルに対して、 $1/10$ 程度の大きな内包物と言える。そこで、直径 $1\mu\text{m}$ のビーズがベシクル内に占める体積分率について評価したところ、体積分率10vol%程度と比較的高い体積分率であった。

これらの成果を論文 に報告した。

サイズの異なる2種のコロイド粒子を内包したベシクルの調製

ビーズ分散液に糖を溶解し、ベシクルの内水相の比重を、ポリスチレンビーズと等しくした。遠心力を調整し、2種のビーズを比較的高い体積分率で内包したベシクルを得た。

(2) ベシクル内コロイド粒子の秩序形成と膜変形の協同

コロイド粒子の配列化とベシクルの角形成

直径 $1\mu\text{m}$ のビーズを内包したベシクルの分散液に高張液を添加し、膜変形を誘起した。ベシクルの外水相が内水相よりも高張となり水が流出し、膜の張力が緩和されて変形が誘起される。

特定の体積分率(約13vol%)でビーズを内包したベシクルにおいて、図2(a)の様にベシクルに複数の角張りが形成されるとともに、(b)の様に内部粒子が六方格子状に規則的に配列する現象が見出された。

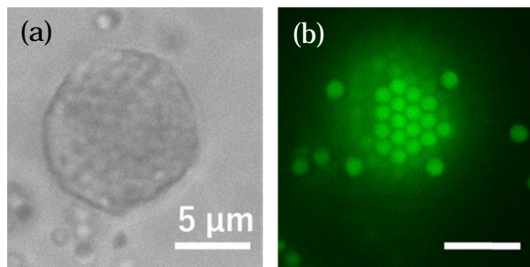


図2. 直径 $1\mu\text{m}$ のビーズを内包したベシクル (a)位相差顕微鏡像 ベシクルの角張りが見られる。(b)蛍光顕微鏡像 ベシクル内部のビーズが六方格子状に規則的に配列している。

内部コロイド粒子の浸透圧平衡と粒子 膜間の排除体積効果

この様に内部粒子の一部が配列するためには、規則的に配列した粒子と不規則に配置した粒子の浸透圧平衡が成り立つ必要がある。また、膜表面では粒子の重心が排除される排除体積が存在する。この排除体積は膜面積に依存するためベシクルの一部が多面体様になった形状に対して幾何的に見積もることができる。浸透圧平衡と排除体積の両条件を同時に満たす、ベシクルの体積と粒子の体積分率を算出したところ、実験で得たベシクルの体積および粒子の体積分率と一致した。したがって、多面体様へのベシクル変形が内包物の浸透圧と排除体積効果によって生じたと示唆された。

これらの成果を論文 と に報告した。

(3) ベシクル内部の大・小コロイド粒子の秩序形成

小粒子のベシクル膜近傍への自発的な偏在

大きさの異なる2種のポリスチレンビーズを内包したベシクルを、調製後十分に時間がたってから顕微鏡観察した。直径 0.1 と $1.0\mu\text{m}$ のビーズを内包したベシクルにおいて、図3(a)の様に、直径 $0.1\mu\text{m}$ のビーズ(以下、小粒子)が膜近傍に自発的に偏在した。特に直径 $1.0\mu\text{m}$ のビーズ(大粒子)が、小粒子よりも高い体積分率で内包されたベシクルについて再現性良く偏在が観察された。これは、サイズの異なる粒子の共存する系において、サイズの大きな粒子の体積分率が相対的に低く、かつ大きな粒子が凝集・偏在する従来の系と異なり、新規現象である。

小粒子偏在に対する浸透圧平衡モデル

この新規現象に対して、図3(b)の様に、小粒子偏在相と大・小粒子分散相が平衡状態にあるとするモデルをたて、実験結果と比較した。(2)において扱った剛体球の浸透圧の議論を援用した。排除体積を加味した浸透圧平衡モデルから、浸透圧がつりあうときの、両相の体積比を算出した。実験結果からは、蛍光顕微鏡像を解析し、大・小両粒子の配置を見積もった。結果は、ベシクル内に浸透圧平衡が成り立つ相の境界の存在を示した。本系において、大粒子の浸透圧・排除体積効果が誘因となって小粒子の偏在が生じ得ることが示唆された。

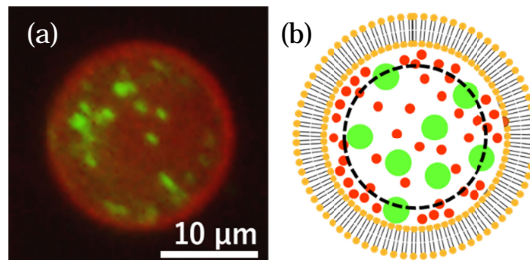


図3. 直径 0.1 と $1.0\mu\text{m}$ のビーズを内包したベシクル (a)蛍光顕微鏡像 小粒子(赤色)がベシクルの膜近傍に偏在している。(b)

小粒子偏在の模式図 小粒子偏在相と大・小粒子分散相の2相が平衡状態にある浸透圧平衡モデルをたてた。破線は相の境界を示す。

(4) 内包物に依存したベシクル変形 膜面積増加によるベシクル変形の誘起

さらに、(3)で得た自発的な偏在が生じる2種粒子内包型ベシクルに膜分子前駆体を添加し、膜変形を誘起した。比較の議論のため、大粒子のみ及び小粒子のみを内包したベシクルについても同様に膜変形を誘起し、これらの変形を観察した。

体積分率や種数に依存して、頻出する膜変形が異なり、内部粒子の状態と膜変形の協同を強く示唆する結果を得た。

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 3件)

Y. Natsume*, H. Wen, Z. Tong, K. Itoh, L. Sheng, K. Kurihara, Preparation of giant vesicles encapsulating microspheres by centrifugation of a water-in-oil emulsion, Journal of Visualized Experiments, 査読有り, 119, 2017, doi: 10.3791/55282.

Y. Natsume* and T. Toyota, Appearance of Crystalline Pattern for Colloidal Particles Encapsulated in Giant Vesicles -Direct Cross-sectional Observation of Ordered and Disordered Phases-, Transaction of the Materials Research Society of Japan, 査読有り, 41(2), 2016, 147-149, doi: 10.14723/tmrj.41.147.

Y. Natsume and T. Toyota, Asymmetrical Polyhedral Configuration of Giant Vesicles Induced by Orderly Array of Encapsulated Colloidal Particles, PLoS one, 査読有り, 11(1), 2016, doi: 10.1371/journal.pone.

[学会発表](計 11件)

夏目ゆうの、温欣宜、伊藤一実、栗原顕輔、「大小2種の球状コロイド粒子を内包したベシクルにおける自発的な小粒子偏在」、日本物理学会第72回年次大会、2017年3月18日、大阪大学(大阪・豊中)

夏目ゆうの、「熱力学的アプローチによる細胞モデルの構築 -細胞モデルの自発的な内部秩序形成-」、ABCプロジェクトミニワークショップ「低温度周りの光合成」、2017年3月8日、東京大学(東京・本郷)

夏目ゆうの、伊藤一実、夏目雄平、栗原顕輔、「ベシクルに大小2種のコロイド粒子を内包させた系の相分離 -朝倉・大沢理論との対応-」、第54回日本生物

物理学会年会、2017年11月27日、つくば国際会議場(茨城・つくば)

夏目ゆうの、伊藤一実、夏目雄平、栗原顕輔、「ベシクルに大小2種のコロイド粒子を内包させた系の相分離 -朝倉・大沢理論との対応-」、日本物理学会2016年秋季大会、2016年9月13日、金沢大学(石川・金沢)

伊藤一実、栗原顕輔、夏目ゆうの、「2種の剛体球粒子を内包したベシクルにおける粒子偏在」、日本物理学会第71回年次大会、2016年3月22日、東北学院大学(宮城・仙台)

夏目ゆうの、伊藤一実、「複数種コロイド粒子を内包したリポソームにおける粒子の構造体形成と膜変形」、日本女子大学理科縦の会、2016年3月12日、日本女子大学(東京・目白)

夏目ゆうの、伊藤一実、栗原顕輔、「ベシクルに閉じ込めた2種コロイド粒子の偏在 -こみあい効果の新展開-」、科学研究補助金新学術研究「ゆらぎと構造の協奏」第2回若手勉強会、2016年3月10日、東京大学検見川セミナーハウス(千葉・千葉)

夏目ゆうの、「熱力学的アプローチによる細胞モデルの構築」、ABCプロジェクトミニワークショップ「極限環境の光合成」、2016年2月6日、立川グランドホテル(東京・立川)

Y. Natsume, K. Ito, K. Kurihara, "Colloidal Ordering and Membrane Deformation in Giant Vesicles Encapsulating Two Kind of Particles", The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, Dec.17 2015, Honolulu (USA).

夏目ゆうの、豊田太郎、「内包された剛体球粒子の配列を伴うジャイアントベシクルの変形」、細胞を創る研究会8.0、2015年11月13日、大阪大学(大阪・吹田)

伊藤一実、栗原顕輔、夏目ゆうの、「複数種の剛体球粒子を内包したジャイアントベシクルにおける粒子の偏在と膜変形」、日本物理学会2015年秋季大会、2015年9月17日、関西大学(大阪・吹田)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

夏目 ゆうの (NATSUME, Yuno)

日本女子大学・理学部・助教

研究者番号: 10706831

(2) 研究協力者

伊藤 一実 (ITHO, Kazumi)

日本女子大学・理学部・研究支援員

(3) 研究協力者

小森 陽子 (KOMORI, Yoko)

日本女子大学・理学部・研究支援員