

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32641

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17721

研究課題名(和文) 神経細胞間の結合を模倣した振動子のネットワーク化とその時空間ダイナミクスの研究

研究課題名(英文) Physical modeling of biological neural network and investigation of its dynamics

研究代表者

岡野 太治 (Okano, Taiji)

中央大学・理工学部・助教

研究者番号：60622082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：エマルションを用いて、Belousov-Zhabotinsky (BZ) 反応のサイズ依存性について調べた。エマルション中に局在化したBZ反応は、その体積に大きく影響を受けていた。例えば、マロン酸の初期濃度が高くなるにつれて、反応が起こる最小のエマルションサイズは小さくなった。更に、振動周期もエマルションサイズに依存していることが分かった。続いて、BZ反応液中でのリポソームの安定性を調べた。DMPCで作製したリポソームは酸性液中で割れたが、DSPE-PEGを加えたリポソームはpH 1～2の液中でも安定して存在できることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the size dependency of the Belousov-Zhabotinsky (BZ) reaction using water in oil (W/O) emulsion droplets. The BZ reaction encapsulated in emulsion droplet was significantly influenced by the droplet volume. For example, the minimum volume at which the reaction occurred was decreased with increasing the concentration of malonic acid. Furthermore, we found that the period of oscillation also depended on the reaction volume. Next, we investigated the stability of lipid vesicles (liposomes) in the BZ reaction mixture, which is a low pH solution. We found that liposomes composed of DMPC and DSPE-PEG 2000 were stable at pH 1 - 2, whereas liposomes composed of only DMPC were broken after replacing the outer solution with acidic solution.

研究分野：非線形・非平衡系

キーワード：Belousov-Zhabotinsky反応 エマルション サイズ依存性

1. 研究開始当初の背景

脳の神経細胞ネットワークで行われる高度な情報処理は、細胞間の結合の強さやネットワークの可塑性、シグナル伝達の遅れなどの要因が有機的に相互作用することで達成されていると考えられている。これまでに非線形非平衡系の枠組みを利用して、これらの特徴を組み込んだ要素ネットワークの数理モデルが提案され、そのダイナミクスが理論的に研究されてきた。また、実験的研究では、興奮性細胞と定性的によく似た振る舞いを示す Belousov-Zhabotinsky (BZ) 反応を微小ゲル上に局在化し、それらを最大 100 個結合した系において、反応の同期やクラスタリングなどが調べられてきた。一方、細胞の機能発現が細胞自身の大きさと深く関わっているとする理論研究が近年報告され、生化学的な実験でもその可能性が示されている。これは、細胞サイズという物理的な特徴が細胞ネットワークに影響を及ぼし得ることを示唆している。しかし、上述の実験研究では比較的大きなサイズ (数百  $\mu\text{m}$ ) のマイクロゲルが用いられており、細胞サイズ (数  $\mu\text{m}$ ~数十  $\mu\text{m}$ ) との差異が大きい。これを細胞サイズまで小さくすることができればネットワークの更なる大規模化が可能となえ、反応素子が小さいことに起因して生じるスケール効果によって新奇なダイナミクスが創発されることも期待される。

2. 研究の目的

本研究では、エマルションを用いて細胞サイズの BZ 反応素子を作製し、反応液組成によって反応の様子がどのように変化するかを調べた。更に、細胞膜の主構成成分であるリン脂質で作られた小胞 (リポソーム) に BZ 反応を局在化することを目指した。

3. 研究の方法

(1) エマルション作製

エマルションは、オイル (流動パラフィン) に BZ 反応液と脂質溶液を加えて 40 秒間攪拌して作製した。BZ 反応は 4 種類の化合物を混合することで起こり、反応の様子は溶液の色の周期的な変化として観察される (図 1)。

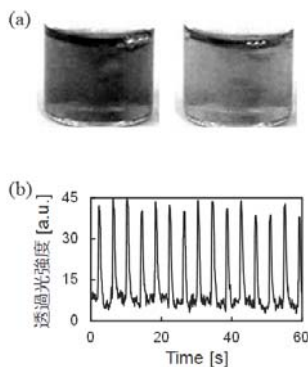


図 1 (a) BZ 反応に伴う反応液の色の変化と、(b) その経時変化。

実験では、反応液組成を様々に変化させたエマルションを作製し、その色の変化を、バンドパスフィルタ (515~555 nm) を通して顕微鏡 (ECLIPSE Ti) で観察した。反応液組成は臭素酸ナトリウム 300 mM, マロン酸 300 mM, 硫酸 500 mM, フェロイン 3.6 mM を基準として、臭素酸ナトリウム, マロン酸, 硫酸の濃度をそれぞれ 200 mM から 1108 mM の間で独立に変化させた (表 1)。反応が安定するまでのラグタイムを短縮するため、反応液には 10 mM の臭化ナトリウムを加えた。脂質溶液は、ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) をクロロホルムに溶解したものを用いた。

表 1 反応液組成

試薬	初期濃度 [mM]
臭化ナトリウム	10
臭素酸ナトリウム	200~300~1108
マロン酸	200~300~1108
硫酸	200~500~1108
フェロイン	3.6

(2) リポソーム作製

リポソームは、W/O エマルション界面通過法により作製した。DMPC を溶解した流動パラフィンにフェロイン 3.6 mM 水溶液を加え、攪拌することでエマルションを作製した。これを純水に重層し、40°C で遠心 (8000 rpm, 10 分間) することでリポソームを得た。得られたリポソームを再度遠心操作し、外水相を、フェロインを除いた BZ 反応液 (臭化ナトリウム 10 mM, 臭素酸ナトリウム 300 mM, マロン酸 300 mM, 硫酸 300 mM) で置換した。脂質膜組成は DMPC 2 mg/ml, または、DMPC 1.8 mg/ml, DSPE-PEG 2000 0.2 mg/ml になるように調製した。

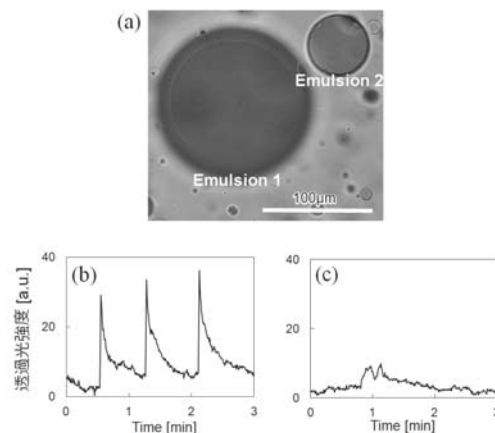


図 2 (a) 作製したエマルションの顕微鏡写真と、(b, c) その色の経時変化。(b) はエマルション 1, (c) はエマルション 2 の色の変化を表している。

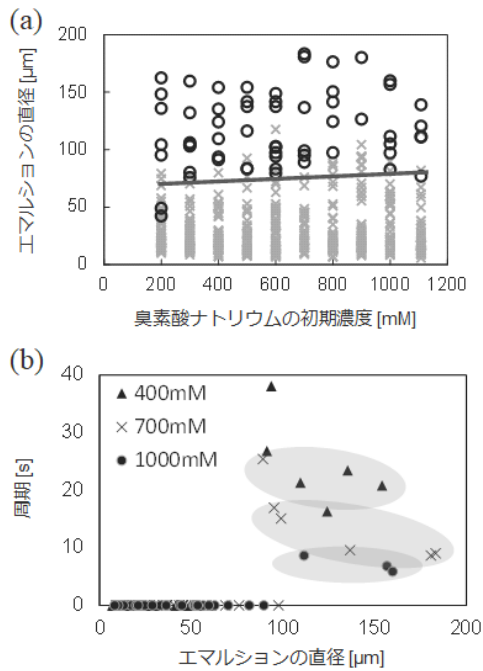


図3 (a) BZ反応が起こるエマルジョンサイズの臭素酸ナトリウム濃度依存性を示した相図と、(b) 反応周期のエマルジョンサイズ依存性. (a) では反応が起こっていたエマルジョンを○, 反応していなかったものを×で表し, その境界の目安を実線で示した. (b) のグレーの領域は, エマルジョン直径に対する周期のおよその傾向を示している.

#### 4. 研究成果

##### (1) エマルジョンによるBZ反応の微小化

直径が数 μm から数百 μm のエマルジョンを作製できた. このとき, 比較的大きなエマルジョンではBZ反応に伴う色 (透過光強度) の変化が観察されたが, 小さなエマルジョンでは観察されなかった (図2).

そこで, 臭素酸ナトリウム, マロン酸, 硫酸の濃度をそれぞれ独立に変化させてエマルジョンを作製し, 反応の様子を調べた. 臭素酸ナトリウム濃度を200 mM から1108 mMの間で変化させたところ, 濃度に関係なく直径約70 μm 以下のエマルジョンでは反応が起こらないことが分かった. 一方, 反応が起こっているエマルジョンでは, 臭素酸ナトリウム濃度が低いほど, 反応周期が長くなる傾向が観察された (図3a, b). 同様に, マロン酸濃度を変化させて実験を行った. その結果, マロン酸濃度を高くすると小さいエマルジョンでも反応を誘起できることが分かった. このとき, マロン酸濃度に関わらず, エマルジョンの直径が小さくなるにつれて反応周期が長くなる傾向が見られた (図4a, b). 硫酸濃度を変えた場合には, 濃度を下げるとより小さなエマルジョンでも反応が起こることが分かった. 更に, マロン酸の場合と同様, エマルジョンの直径が小さくなるにつれて

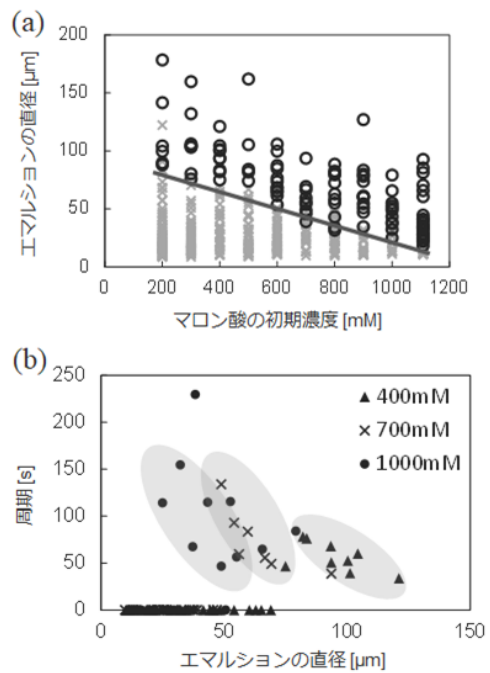


図4 (a) BZ反応が起こるエマルジョンサイズのマロン酸濃度依存性を示した相図と、(b) 反応周期のエマルジョンサイズ依存性.

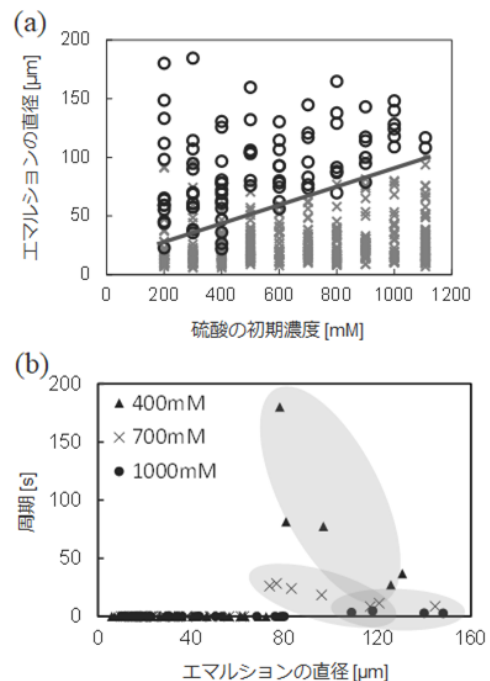


図5 (a) BZ反応が起こるエマルジョンサイズの硫酸濃度依存性を示した相図と、(b) 反応周期のエマルジョンサイズ依存性.

反応周期が長くなる傾向が観察された. この傾向は硫酸濃度依存性であり, 低い硫酸濃度で顕著なサイズ依存性が現れていた (図5a, b).

(2) リポソームによる BZ 反応の局在化

フェロインが封入された、平均直径約 10  $\mu\text{m}$  のリポソームを作製できた。DMPC のみで作製したリポソームを、フェロインを除いた反応液中に分散させたところ、ほとんどのリポソームが破裂する様子が観察された (図 6a)。この原因として、内水相と外水相の浸透圧差による水分子の移動、外水相に含まれている酸の影響が疑われた。

内水相と外水相に用いた水溶液の浸透圧を氷点降下法により計測したところ、それぞれ 113 mOsm, 1493 mOsm であった。この条件下では、水分子は低張液側から高張液側へ移動するので、本来であればリポソームは収縮するはずである。しかし、収縮する様子は観察されなかったことから、外水相に含まれているイオンなどが脂質膜を介して内水相側に拡散し、浸透圧差が小さくなっている可能性が考えられる。このことから、浸透圧差によってリポソームの破裂が引き起こされたとは考え難い。

実験で用いた BZ 反応液の pH は、pH 1 ~ pH 2 であった。脂質膜に用いた DMPC は、酸性液中でも数時間に渡って構造変化が起こらないことが文献で報告されている。そのため、脂質分子が酸によって分解されている可能性は低い。一方、脂質分子によって自己組織化的に形成された膜に対して酸が及ぼす影響は分かっていない。即ち、分子ではなく膜が酸の影響を受けている可能性がある。そこで、化学修飾が施された脂質を膜に加えることで、酸の影響を抑えることを試みた。

平均分子量 2000 のポリエチレングリコール (PEG) が結合したジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE-PEG 2000) を DMPC に加えて、リポソームを作製した。これを、フェロインを除いた BZ 反応液に浸したところ、数時間に渡ってリポソームが安定して存在している様子が観察された (図

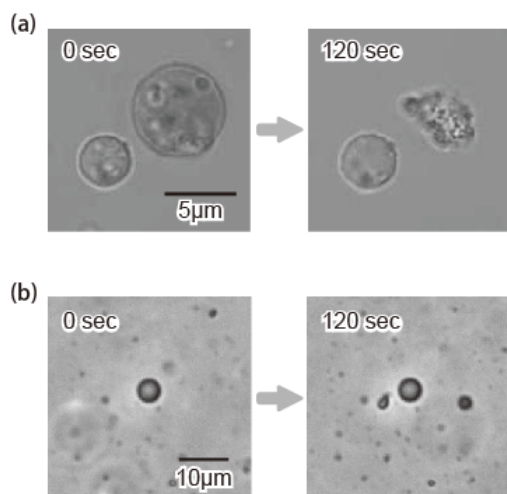


図6 フェロインを除いた BZ 反応液に浸した (a) DMPC のみで作製したリポソームと、(b) DMPC と DSPE-PEG 2000 で作製したリポソーム。

6b).

DMPC と DSPE-PEG 2000 で作製したリポソームにフェロインを封入し、フェロインを除いた BZ 反応液に浸すことで、BZ 反応の局在化を試みた。リポソームの色の変化を観察した結果、反応を観察するには至らなかった。現在、反応誘起に向けて諸条件の検討を行っている。

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)

[学会発表] (計 2 件)

① 和田隼弥, 鈴木宏明, 岡野太治  
「化学振動子の微小化と反応のサイズ依存性」  
化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 32 回研究会 (2015.11.26 – 27, 北九州国際会議場)

② Junya Wada, Hiroaki Suzuki, and Taiji Okano  
“Miniaturization of chemical oscillator and its size dependency,”  
International Symposium on Micro-Nano Science and Technology 2016 (Dec. 16 – 18, 2016, Tokyo)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡野 太治 (OKANO, Taiji)  
中央大学・理工学部・助教  
研究者番号：60622082