

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：13302

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02942

研究課題名(和文) 脂質二分子膜とコロイド粒子の動的カップリング機構

研究課題名(英文) Coupling dynamics between lipid bilayers and colloids

研究代表者

濱田 勉 (Hamada, Tsutomu)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：40432140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：膜に結合した生体分子群のモデルとしてコロイド粒子を用いて、脂質2分子膜(ベシクル)と膜結合物質が動的にカップリングする物理機構を調べた。外場によりコロイド結合ベシクルに非対称性が生まれ重心運動を示すことや、コロイドを伴うチューブ構造生成や陥入変形などのベシクルの形態ダイナミクス、コロイドの膜透過現象、膜ゆらぎによる相分離変化などの現象を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、生体分子群が結合した生体膜システムの物理学的メカニズムの理解や、複雑なソフトマターの集積システムや非平衡構造の基礎物性の理解に貢献する。また応用面でも、脂質2分子膜とコロイド粒子の関係性の理解は、薬剤の細胞内への効率的吸収(ドラッグデリバリーシステム)や、有害なナノ物質から細胞を防御する医薬研究分野への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated physical mechanisms of dynamic behavior of lipid bilayer vesicles and colloidal particles as a model of membrane-associated molecules. We found asymmetric structure and translational motion of a colloid-vesicle system by external stimuli, morphological dynamics of vesicles such as tube formation and invagination with colloids, internalization of colloids across the membrane, and change in phase separation due to membrane fluctuation.

研究分野：ソフトマター物理

キーワード：生物物理

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の基本構造は脂質分子が自己集合した2分子膜小胞(ベシクル)から成り、膜の秩序形成や変形ダイナミクスは細胞の運動、代謝、情報伝達などの重要な生命機能と直結している。これまでに球、楕円、円盤、出芽型などの様々なベシクル形状が実験で確認され、膜曲率をパラメータにした弾性エネルギーによる理論モデルで物理的メカニズムが説明できることが報告されてきた。その後、ベシクルの変形ダイナミクスや重心運動の観察、ベシクル開閉や膜面上の相分離形成やそのダイナミクスの制御等へと研究が発展し、膜系自身の基本的物性に関する理解は進展してきたが、実際の生体細胞は分子群が集積した機能システムであり、結合分子と脂質膜が相互作用することで動的な秩序が生み出されている。膜に結合した分子は、2次元流体である膜の粘性を受けながら動き、膜面に沿って会合するなど、生体細胞の膜システムは膜と分子が動的にカップルすることで機能が発現するソフトマター分子集合体としての特性を持つ。このような膜システムの理解に向けて、人工膜ベシクルにコロイド粒子を組み合わせたソフトマター分子集合体のモデル研究が近年進められている。

### 2. 研究の目的

脂質二分子膜とタンパク質などの生体分子群が動的に結合した生体膜システムは、ソフトマター分子集合体としての特性を持つ。本研究では、膜に結合した生体分子群のモデルとしてコロイド粒子を用いて、細胞サイズの膜小胞(ベシクル)との相互作用を解析することで、脂質膜と膜結合分子の動的カップリングの物理機構を明らかにすることを目的とした。これまでに、ベシクルとコロイド粒子の実験系を用いて、膜面の相分離構造とコロイド粒子の局在がカップリングすることや、膜の変形とカップルした粒子の拡散挙動などの現象を報告してきている。本研究では、これらの知見を活用し、膜とコロイドから成る複合システムの挙動の理解をさらに深める。

### 3. 研究の方法

コロイドが結合した膜の構造ダイナミクス、および2次元膜上で動くコロイドの観察・解析を行う。膜とコロイドから成るソフトマター分子集合体のダイナミクスの理解を通して、ソフトマター物性の観点から、細胞の膜システムに物理学的にアプローチする。実験で使用する主な膜成分として、相転移温度が高い飽和脂質、相転移温度が低い不飽和脂質、およびコレステロールを組み合わせてベシクル膜面の相分離構造をコントロールし、蛍光・位相差顕微鏡によるリアルタイム観察を行う。ベシクル膜面は秩序液体相と無秩序液体相に分離し、一方の相に局在化する蛍光色素を混合することでドメイン構造が可視化できる。膜へのコロイド吸着と挙動、コロイド結合に伴う膜構造ダイナミクスの変化、ゆらぎ等の膜物性に依存したダイナミクス、電場や温度などによる外場下における非平衡ダイナミクスの解析などを行い、膜とコロイドのカップリング機構を考察する。

### 4. 研究成果

H29年度：電場による induced-charge electro-osmosis(ICEO)効果を利用したベシクル運動の実験を行った。不飽和脂質 DOPC、飽和脂質 DPPC、コレステロールを用いて、液体無秩序相と液体秩序相に相分離するベシクルを調整した。相分離ベシクルとポリエチレン粒子を混合して、ベシクル膜面上の液体無秩序相に粒子を特異的に吸着させた。得られたベシクルに交流電場を印加し、その動きを蛍光顕微鏡で直接観察した。電場印加後に粒子はベシクル赤道面に局在する傾向を示し、ベシクルが重心移動を示した。粒子は、ICEOによって生じたベシクル周辺の溶液の流れにより、赤道面に局在したと考えられる。また、粒子がつくことでICEOの流れが非対称になり、ベシクルが重心移動したと考えられる。さらに、膜面上の粒子量とベシクルの重心移動方向の関係性を解析すると、これらには相関があることが分かった。膜に吸着している粒子が蓄積することで、膜表面のICEOの強さが変化し、非対称性が生じたことが考えられる。

H30年度：外場として浸透圧を用いて、膜ゆらぎおよび膜変形を誘起する実験を行った。負荷電不飽和脂質 DOPG と中性不飽和脂質 DOPC から成るベシクルの成分比および浸透圧強度を変化させ、ベシクル形状ダイナミクスを解析した。そして、ベシクル膜にコロイドを付け、カップリングダイナミクスを観察した。膜上でコロイドの集合や、コロイドが吸着した部位からの膜変形等のパターンが観察された。

また、コロイドの膜透過現象に関する論文を発表した。温度低下により膜張力を変化させると、金ナノコロイドがDOPC二分子膜を透過し、ベシクル内へ移行した。両性電解質高分子を添加することで、透過現象が促進されることを報告した。膜張力は浸透圧による外場でも変化する基本的な膜物性であり、コロイドとの相互作用に影響を及ぼす知見を得ることができた。

更に、膜ゆらぎと相分離現象の関係性についての基礎物性に関する研究を行った。浸透圧で膜ゆらぎを抑えると、三成分ベシクル(DOPC、DPPC、コレステロール)の相分離が誘起されることを実験的に明らかにし、膜の自由エネルギー計算により物理メカニズムを説明した。膜ゆらぎに

関係する自由エネルギーの項は、浸透圧によりゆらぎが抑えられることで低下し、そのエネルギー変化の様子は相の固さに依存した。全自由エネルギーを計算すると、固体相よりも液体相の方が負に移行しやすい、すなわち相分離しやすいことを示した。これは、実験結果と一致した。膜ゆらぎは膜上のコロイド粒子の挙動に影響を与えることが予想され、動的カップリング機構を考えるための基礎的な知見を得た。

R1 年度：相転移温度が高い飽和脂質、相転移温度が低い不飽和脂質、およびコレステロールを膜成分にして、二分子膜ベシクルとコロイド粒子が織りなすカップリング構造を観察した。静電相互作用を利用して、ベシクル膜面にコロイド粒子を結合させた。膜への結合に適したコロイドの粒子サイズや水溶液条件を調査した。次に、ベシクル膜の成分を変化させ、コロイドの吸着に及ぼす影響を検討した。結果、ベシクル膜面の相分離構造の有無によって、コロイド吸着量が大きく異なることが分かった。そして、浸透圧によりベシクル体積を減少させ膜の曲率変形を誘導した。さらに外場として温度変化を利用して、ベシクルの表面積を増減させることで膜の曲率変形をコントロールした。結果、コロイドを伴ったチューブ構造生成や膜面の陥入変形といったコロイド吸着部位が起点となるいくつかの膜の変形パターンを見出した。

また、ベシクル膜面の相分離と膜ゆらぎの関係についての論文を発表した。浸透圧によりベシクル体積を増加させ、膜面のゆらぎ（波うち）を抑えると、多成分膜が相分離する傾向があること、そして相分離した境界領域に働く線張力が増加することを実験的に明らかにした。膜の組成と温度をパラメータにした相図および相分離境界線の揺らぎ解析から算出した線張力が、膜ゆらぎの抑制により変化することを報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sana Ahmed, Kazuaki Matsumura, and Tsutomu Hamada	4. 巻 35
2. 論文標題 Hydrophobic Polyampholytes and Nonfreezing Cold Temperature Stimulate Internalization of Au Nanoparticles to Zwitterionic Liposomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 1740 - 1748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.langmuir.8b00920	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nichaporn Wongsirojkul, Naofumi Shimokawa, Pakorn Opaprakasit, Masahiro Takagi, Tsutomu Hamada	4. 巻 36
2. 論文標題 Osmotic-Tension-Induced Membrane Lateral Organization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 2937 - 2945
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.langmuir.9b03893	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 濱田 勉
2. 発表標題 Organization and Manipulation of Cell-Sized Lipid Vesicles
3. 学会等名 第6回生命理工国際シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永井健, 東彰大, 濱田勉
2. 発表標題 交流電場によるリポソームの自発遊泳
3. 学会等名 日本物理学会第73回年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nichaporn Wongsirojkul, Naofumi Shimokawa, Pakorn Opaprakasit, Masahiro Takagi, Tsutomu Hamada
2. 発表標題 OSMOTIC TENSION-INDUCED MEMBRANE LATERAL ORGANIZATION
3. 学会等名 JSN2019 Workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nichaporn Wongsirojkul, Naofumi Shimokawa, Pakorn Opaprakasit, Masahiro Takagi, Tsutomu Hamada
2. 発表標題 Osmotic pressure-induced phase separation in mixed lipid membranes
3. 学会等名 日本物理学会第75回年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	永井 健 (Nagai Ken)  (40518932)	北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・講師  (13302)	