

令和 2 年 5 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14368

研究課題名(和文)化学刺激による脂質ベシクルの膜輸送経路の構築

研究課題名(英文)Construction of Membrane Traffic Pathway by Chemical Stimuli

研究代表者

佐久間 由香 (Sakuma, Yuka)

東北大学・高度教養教育・学生支援機構・助教

研究者番号：40630801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜の基本的な機能である膜輸送経路には接着・融合・分裂等の膜変形が伴う。この機能性膜変形を実現する物理的基盤の解明を目指し、脂質から成るモデル生体膜(ベシクル)にマイクロインジェクション法により化学刺激を与えて膜変形を再現し、膜弾性モデルとの比較を行った。この結果、アニオン性脂質から成るベシクルに電解質を与えると膜間相互作用や膜張力などの物理パラメータの制御が可能になり、接着・融合・孔形成などの機能性膜変形を再現できることを明らかにした。さらにマイクロインジェクションが膜面に誘起する流動パターンを見出し、膜組成と膜の流動特性の関係を測定する新規手法の開発へと発展した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体膜において、生命機能に伴う膜変形はタンパク質がその鍵を握っている。しかし、物性物理の立場から見た際にタンパク質がどのようなパラメータを制御して膜変形を実現しているかは明らかになっていない。本研究では膜輸送経路の素過程である接着、融合、孔形成などの多様な膜変形を制御するために、化学物質の持つ個性に着目し、様々な化学刺激をベシクルに作用させることで機能性膜変形の再現に成功した。これは、膜を基本とした生命機能の発現・維持の物理的基盤を解明するための重要な鍵となると期待される。さらに、ドラッグデリバリーシステムなど工学的利用への展開も多いに期待される。

研究成果の概要(英文)：Membrane traffic which is fundamental cell function shows membrane deformations such as adhesion, fusion or pore formation. The purpose of this study is to understand membrane deformations associated with cell functions from soft-matter physics point of view. Membrane deformations of lipid vesicle were reproduced by chemical stimuli using micro-injection method, and were compared with membrane elasticity model. As a result, it is revealed that membrane interactions or membrane tension can be controlled by microinjection of electrolytes to vesicles containing anionic lipid, which realize to membrane deformations relevant to cell functions(e.g. adhesion, fusion, pore formation and so on). In addition, membrane flow induced by microinjection was found in this study, which led to development of a unique technique to measure membrane viscosity for wide range of membrane compositions.

研究分野：ソフトマター物理学

キーワード：ベシクル 化学刺激 マイクロインジェクション 膜変形 膜張力

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜は生命現象において様々な形態変化を起こす。例えば、生命の基本機能であるサイトーシス経路では図1に示すように細胞膜の一部が物質を取り込みながら陥入し、分裂して小胞を形成する。小胞が細胞内部に運んだ物質を用いて情報分子やタンパク質、膜分子などを合成し、合成された分子の一部は小胞に取り込まれて細胞膜と接着、融合をすることで目的の器官に運搬される。このように生命機能には膜変形が密接に関係している。特に、サイトーシス経路に伴う膜変形はタンパク質やペプチドが膜に作用することで局所的に膜の曲率や張力を変化させ、膜変形を実現していると言われている。近年、フランスの Angelova のグループがマイクロインジェクションという手法によってリン脂質のみから成るモデル生体膜(ベシクル)に局所的に化学刺激を与えると、膜が部分的に貫入または突出するという現象を報告している[1,2]。この報告は、与える化学刺激の種類と脂質の組み合わせによって膜の変形の方法を制御できる可能性を示唆している。

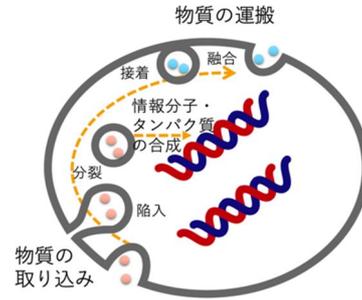


図1 サイトーシス経路のモデル図。細胞膜の一部の変形・分裂を通して物質を細胞内部に取り込み、その物質を用いて生命維持に必要な分子を合成する。合成された分子は小胞膜と細胞膜の接着・融合を通して目的器官に運搬される。

### 2. 研究の目的

上述のように生体膜は膜接着・融合・孔形成・分裂などを素過程とする膜輸送や自己生産を通して、生命の最も基本的な機能を発現している。研究代表者は膜変形の基盤となる物理を理解するために、二成分リン脂質ベシクルの相分離を利用して脂質分子の幾何学的形状と膜の局所的な曲率を連携させることにより、生体機能に伴う膜変形のうち膜輸送を支える小胞の接着と孔形成、及びベシクルの自己生産を再現することに成功してきた[3-6]。これらの結果から、生体機能に伴う膜変形を「脂質の幾何学的形状と膜内相分離の結合」というコンセプトでベシクル膜面上の局所的曲率を制御することで再現できることを示した。次のステップは、個々に再現してきた膜変形を実際の生体膜のように化学刺激をトリガーとして原料の摂取・膜の成長・分裂からなる再帰的な一連の細胞サイクルとして統合することである。本研究では、化学刺激が脂質の幾何学的形状を一時的に変化させることに着目し、一つのベシクルに逐次的に化学刺激を作用させることにより、膜変形を誘起して一連の細胞サイクルを再現し、その物理的機構を明らかにすることを目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、「化学刺激による膜の平均曲率とガウス曲率の制御」をコンセプトに、化学刺激による機能性膜変形の再現及びそれらの膜変形の統合を以下の三段階において進めた。この結果を膜弾性の理論モデルと比較することにより、生体機能に伴う膜変形を実現している物理的基盤の解明を目指した。

(1) **化学種と脂質の相互作用がもたらす膜変形の系統的理解**  
イオン性脂質を含む様々な脂質からなる単成分(均一)ベシクルに化学物質をインジェクションし(図2参照)脂質の形状にどのような変化が誘起されるのかを系統的に整理した。得られた結果をもとに、自発曲率の変化を生むグループ、曲率変化を引き起こさないグループに分類した。代表者のこれまでの研究により、膜接着、部分分裂、自己生産に関しては脂質の持つ負の自発曲率が、孔形成に関しては正の自発曲率が重要であることが明らかになっている。これらグループの脂質と化学物質を組み合わせることで、種々の生体機能に伴う膜変形の再現を試みた。

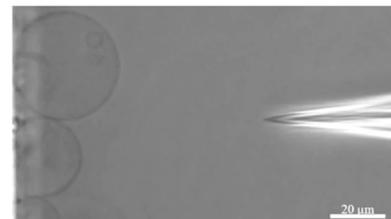


図2 マイクロインジェクションの様子。左側のベシクルに対し、マイクロピペットを用いて化学刺激を吹き付けた。

#### (2) 化学刺激と相分離の結合による膜輸送経路の構築

二種類以上の脂質から成る多成分ベシクルが相分離した状態において、(1)と同様の実験を行った。相分離によって膜面上で異なる化学物質感受性を持つドメインが共存しているという特徴を利用して、同一ベシクルにおける複数の機能性膜変形の再現が期待される。このようなベシクル膜面上での複数の機能性膜変形の実行から、接着・融合・孔形成・分裂などの膜輸送経路の素過程の統合を試みた。

#### (3) 自己生産系及び化学反応との結合

上に述べた膜輸送経路を膜の成長・分裂を繰り返す自己生産系との結合を試みた。膜輸送経路の素過程でもある膜接着・融合によってベシクルに新たに膜分子を供給し、成長させ、さらに化学刺激による膜分裂を再現し、個体数を増やす。これによりベシクルは成長・分裂し化学刺激に対する感受性を保ちながら持続的な増殖が可能になることが期待される。このように、自己生産系と化学刺激による膜変形系を結合させ、生命系に近いベシクルシステムへの展開をソフトマター物理の観点から目指した。

#### 4. 研究成果

上記の三段階での研究において、以下の研究成果が得られた。

##### (1) 化学種と脂質の相互作用がもたらす膜変形の系統的理解

###### ベシクル膜の化学刺激源への泳動

様々な脂質（アニオン性、中性、カチオン性）から成るベシクルに対して、1, 2 価の金属イオンを化学刺激として与えた場合に見られる膜変形を観察し、観察された膜変形から化学刺激が脂質にもたらす幾何学的形状の変化を系統的に分類した。この中で特に、中性のDOPC単成分ベシクルに化学刺激として1価電解質NaCl, 2価電解質CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>をインジェクションすると、DOPCベシクルはマイクロピペットに向かって直線的に泳動し、最終的にはマイクロピペット先端に吸着することがわかった。DOPCベシクルの膜表面が水中で微弱に負に帯電しているため、化学刺激によってベシクル周囲が局所的に電解質溶液となり、帯電しているベシクルが電気泳動と同じ原理で化学刺激源に引き寄せられているために起きる現象だということをも明らかにした[7,8]。

##### (2) 化学刺激と相分離の結合による膜輸送経路の構築

様々な脂質（アニオン性、中性、カチオン性）の組み合わせの二成分ベシクルに1-3 価の電解質及び水酸化物を化学刺激として与えた結果、以下のような膜変形を再現することができた。

###### 1, 2 価電解質による二成分ベシクルのチューブ構造形成

アニオン性脂質を含む二成分ベシクルを白金線に固定し、1 価及び2価電解質をインジェクションした。この結果、膜の一部が化学刺激源であるマイクロピペットの方向に向かって突出し、チューブ構造が形成されることがわかった。これは、(1)で述べた泳動現象と原理は同じだが膜面上でより化学刺激に反応しやすいアニオン性脂質部分が化学刺激源に向かってチューブとなって変形したものと考えられる。

###### 3 価電解質による二成分ベシクルの接着・融合

一方、アニオン性脂質を含む二成分ベシクルに対して3 価電解質をインジェクションすると、その濃度が低い時に膜接着、高い時に膜融合が観察されることがわかった。

3 価電解質がアニオン性脂質に吸着することでベシクル表面の電位が負から0になり、2つのベシクル膜間の相互作用（ファンデルワールス引力、静電斥力、立体斥力、水和斥力）のバランスが斥力優位から引力優位に転じるために接着が起きることを明らかにした。ただし、3 価電解質が低濃度の場合、2つのベシクルは接着状態で安定し、融合には至らないことがわかった。3 価電解質濃度を高くすると、2つのベシクルは接着状態を経て融合することがわかった。3 価電解質がアニオン性脂質の占有面積を減少させ、ベシクル膜張力が上昇するために融合が再現されることを明らかにした。

###### 水酸化物による二成分ベシクル膜面上での孔形成

アニオン性脂質を含む二成分ベシクルに水酸化物をインジェクションすると、ベシクル膜表面に1つだけ孔が開き、瞬時に閉じる現象が観察された。周囲に他のベシクルが無い状態で水酸化物をインジェクションすると膜張力が上昇し、その張力を解消するために膜面に孔を開けていることがわかってきた。

##### (3) 自己生産系及び化学反応との結合

###### ベシクル膜の組成による流動特性の変化

生命はエネルギー源を求めて移動し、それを体内に取り込んでエネルギーや膜分子を合成し、不要物を排出するという代謝を行なっている。(1), (2)に示したように、本研究ではベシクルへの化学刺激を1, 2 価の電解質にすることで泳動を、3 価にすることで膜接着、膜融合、孔形成という物質を内外に輸送するための現象を再現することができた。

次のステップとして、泳動・接着・融合の統合（同一ベシクルでの複数の機能性膜変形の再現）を試みた。多成分ベシクルが相分離し、膜面上に異なる化学物質感受性を持つドメインが共存する状態のベシクルに化学刺激を与える実験の中で、化学刺激の流れによって膜に流動場が誘起されることを見出した。生体膜の流動特性も生体機能を制御するパラメータの一つである。しかしこれまで膜組成と流動性の指標である膜粘度の関係は、膜の曲率や不均一性といった難条件から広範囲で測定する手段が無く、未解明のままであった。今回、水流が球状ベシクルに流動を誘起し、その流動パターンが膜粘度によって変化することを見出したことで広範囲に渡る組成において、膜粘度の測定が可能となった。このように、本研究代表者が新たに開発した測定手法で、多成分ベシクルの組成比を様々に変化させた際に膜粘度がどのように変化するかを調べた。この結果、三種類の脂質からなるベシクルの組成比を変化させると、膜粘度が3桁にもわたる広範囲で変化するという世界に先駆けて解明した[9]ことは特筆に値する。

###### <引用文献>

- N. Khalifat, et al. *Biophysical Journal* **95**, 10, 4924-4933 (2008).
- J.-B. Fournier et al., *Phys. Rev. Lett.* **102**, 018102 (2009).
- Y. Sakuma et al., *Eur. Phys. J. E*, **25**, 403-413 (2008).
- Y. Sakuma et al., *Biophys. J.*, **99**, 472-479 (2010).
- Y. Sakuma et al., *Phys. Rev. Lett.*, **107**, 198101(1-5) (2011).
- T. Jimbo et al., *Biophys. J.*, **110**, 1551-1562 (2016).
- A. Kodama et al., *Langmuir*, **33**, 10698-10706 (2017).
- A. Kodama et al., *Langmuir*, **34**, 11484-11494, (2018).
- Y. Sakuma et al., *Biophys. J.*, **118**, 1576-1587, (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Atsuji Kodama, Mattia Morandi, Ryuta Ebihara, Takehiro Jimbo, Masayuki Toyoda, Yuka Sakuma, Masayuki Imai, Nicolas Puff, and Miglena I. Angelova	4. 巻 34
2. 論文標題 Migration of Deformable Vesicles Induced by Ionic Stimuli	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 11585-11494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.8b02105	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
1. 著者名 Atsuji Kodama, Yuka Sakuma, Masayuki Imai, Toshihiro Kawakatsu, Nicolas Puff, and Miglena I. Angelova	4. 巻 33
2. 論文標題 Migration of Phospholipid Vesicles Can Be Selectively Driven by Concentration Gradients of Metal Chloride Solutions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 10698-10706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.7b02617	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
1. 著者名 Miglena I. Angelova, Anne-Florence Bitbol, Michel Seigneuret, Galya Staneva, Atsuji Kodama, Yuka Sakuma, Toshihiro Kawakatsu, Masayuki Imai, Nicolas Puff	4. 巻 1860
2. 論文標題 pH sensing by lipids in membranes: The fundamentals of pH-driven migration, polarization and deformations of lipid bilayer assemblies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 2042-2063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2018.02.026	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
1. 著者名 Naohito Urakami, Takehiro Jimbo, Yuka Sakuma, Masayuki Imai	4. 巻 14
2. 論文標題 Molecular mechanism of vesicle division induced by coupling between lipid geometry and membrane curvatures	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Soft Matter	6. 最初と最後の頁 3018-3027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C7SM02188G	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 Sakuma Yuka, Kawakatsu Toshihiro, Taniguchi Takashi, Imai Masayuki	4. 巻 118
2. 論文標題 Viscosity Landscape of Phase-Separated Lipid Membrane Estimated from Fluid Velocity Field	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 1576 ~ 1587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2020.01.009	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 Kurisu Minoru, Aoki Harutaka, Jimbo Takehiro, Sakuma Yuka, Imai Masayuki, Serrano-Luginb?hl Sandra, Walde Peter	4. 巻 2
2. 論文標題 Reproduction of vesicles coupled with a vesicle surface-confined enzymatic polymerisation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42004-019-0218-0	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11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 佐久間由香
2. 発表標題 脂質の分子形状と相分離の結合によるベシクル膜変形
3. 学会等名 「ベシクルの変形の物理と数理」勉強会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上圭, 海老原隆太, 河野拓馬, 佐久間由香, Primoz Zihel, 今井正幸
2. 発表標題 接着したベシクルの形態転移
3. 学会等名 日本物理学会2018年秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊田真之, 佐久間由香, 今井正幸
2. 発表標題 化学刺激によるベシクルの形態制御
3. 学会等名 第8回ソフトマター研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuka Sakuma
2. 発表標題 Control of vesicle deformation toward protocell
3. 学会等名 International Conference The Origin of Life (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 海老原隆太, 河野拓馬, 佐久間由香, 今井正幸, Primoz Zihel
2. 発表標題 接着したベシクルの変形解析
3. 学会等名 日本物理学会2017年秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川勝年洋, 佐久間由香, 今井正幸
2. 発表標題 ベシクルの自己生成過程の非平衡熱統計力学的アプローチ
3. 学会等名 日本物理学会2017年秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 栗栖実, 青木春隆, 今井正幸, 佐久間由香, Peter Walde
2. 発表標題 鋳型重合と連携したベシクルの成長
3. 学会等名 日本物理学会2017年秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 栗栖実, 青木春隆, 佐久間由香, 今井正幸, Sandra Luginb hl, Peter Walde
2. 発表標題 ベシクルと情報高分子の連携による自己複製システム
3. 学会等名 日本物理学会2018年春季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐久間由香, 川勝年洋, 谷口貴志, 今井正幸
2. 発表標題 脂質三成分ベシクルの膜粘度マップ
3. 学会等名 第9回ソフトマター研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐久間由香
2. 発表標題 三価イオンによる膜張力制御が誘起するベシクルの接着・融合
3. 学会等名 第9回ソフトマター研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊田真之, 佐久間由香, Nicolas Puff, Miglena Angelova, 今井正幸
2. 発表標題 化学刺激によるモデル生体膜の形態制御
3. 学会等名 日本物理学会2019年秋季大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東北大学理学部物理学科 ソフトマター・生物物理研究室 研究業績  <a href="http://www.bio.phys.tohoku.ac.jp/achieve_soft.html">http://www.bio.phys.tohoku.ac.jp/achieve_soft.html</a></p> <p>東北大学 研究者紹介 佐久間由香  URL: <a href="http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/7eb1319e82f89a1e3f5070fb5ee1a2eb.html">http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/7eb1319e82f89a1e3f5070fb5ee1a2eb.html</a></p>
---

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