

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K03873

研究課題名(和文)モデル系から生体系へのシステムアップデートによる生体膜の流動特性の解明

研究課題名(英文)Elucidation of cell membrane fluidity by updating the system from a model system to a biological system

研究代表者

佐久間 由香 (Sakuma, Yuka)

東北大学・理学研究科・講師

研究者番号：40630801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜の流動性は細胞機能に重要な役割を果たすため、モデル脂質膜の粘度が測定されてきた。しかし、細胞膜には脂質やタンパク質だけでなく、糖タンパク質や糖脂質などの多糖鎖を持つ分子も含まれており、これらの分子が膜の流動性に影響を与えることが予想される。本研究では、高分子をグラフトしたモデル脂質膜の粘度を測定し、膜粘度が高分子密度の増加とともに数倍まで増加することを明らかにした。この膜粘度の増加は、高分子鎖間の接触相互作用に支配されていることを明らかにした。さらに、非生命と生命の膜流動性の違いを理解するために、線虫とホヤの未受精卵と受精卵の膜流動性を測定し、その違いを示すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質、タンパク質、多糖類からなる細胞膜の流動性は、膜内の機能分子の輸送を通じて細胞機能を制御している。多糖鎖などの膜から伸びる高分子鎖は、膜の流動性に大きく影響することが予想されるが、その解明はまだなされていない。本研究では、高分子をグラフトしたモデル生体膜の膜粘度を高分子密度の関数として測定し、膜粘度が最大で数倍まで上昇することを見出した。さらに、膜にグラフトした高分子鎖間の相互作用を考慮した理論モデルを立て、高分子鎖間の相互作用が膜粘度を上昇させることを明らかにした。本研究は、細胞膜の流動性制御を理解するための新たな知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：Since the membrane fluidity plays important roles in the cellular functions, the viscosity of model lipid membrane (GUV) has been investigated. Cell membranes are composed of not only lipids and proteins but also polysaccharide chain-anchored molecules, such as glycoproteins and glycolipids, which are expected to affect the membrane fluidity. To reveal the effects of grafted polymers on the membrane fluidity, in this study, we measured the membrane viscosity of polymer grafted GUVs. The obtained membrane viscosity of polymer-grafted GUVs increased with increasing polymer density up to several times. The increase of membrane viscosity of polymer-grafted GUVs is governed by the contact interaction among polymer chains. To understand the difference in membrane fluidity between non-living and living cells, we also measured the membrane fluidity of unfertilized and fertilized eggs of *C. elegans* and ascidians.

研究分野：ソフトマター物理学, 生物物理学

キーワード：モデル細胞膜 細胞膜流動性 膜粘度 ベシクル

1. 研究開始当初の背景

生体膜は脂質二分子膜を基盤として、そこに代謝や信号伝達などの生体機能を担うタンパク質や糖鎖などの機能性分子が埋め込まれた不均一構造をとっている。生体機能は機能性分子の拡散を通して制御されると言われており、膜の流動性はその機能発現を支配する重要な因子である [Okur et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2019]。また、生きた状態の細胞では、生体膜は常に細胞骨格のアクトミオシンネットワークや細胞質から力を受けた非平衡状態にあり、平衡状態での膜粘度と大きく異なることが予想される。このように生体膜の組成・構造および非平衡性と膜粘度の関係を明らかにすることは膜の流動性制御の機構を解き明かす上で非常に重要である。しかし、生体膜の複雑な構造や非平衡性から膜粘度の測定が困難であるため膜内での局所的な粘度の測定に留まるなど、生体膜の組成や構造に対する系統的な研究からその粘度を支配する要因の理解には至っていない。一方、脂質分子から成る単純な構造を持つモデル生体膜の流動特性はよく調べられてきた。しかし生体膜は、(1) 膜から伸びる糖鎖の存在や、(2) 細胞骨格や細胞質から常に力を受ける非平衡状態 (生きた細胞が持つ非平衡性) など、モデル膜とは異なる点が多くある。最近、研究代表者は球殻状のモデル生体膜 (ベシクル) に局所的な力を加え、それによって膜面に引き起こされる流動パターンを流体力学理論と比較することで膜粘度を求める新しい測定手法を開発した。この方法は流動パターンから膜粘度を直接計測できるため、不均一構造や非対称性など様々な構造を持つモデル生体膜、さらには生きた細胞膜の粘度を系統的に評価するのに非常に適した方法である。そこで本研究では研究代表者が開発した新しい膜粘度測定手法を用いて、シンプルなモデル生体膜の構造に上記(1), (2)の条件を段階的に取り入れることでモデル生体膜から生きた生体膜へとシステムを変化させて膜粘度を測定し、生きた生体膜の流動特性を支配する要因の解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生きた生体膜の流動特性を支配する要因を明らかにすることである。これに対して研究代表者は、シンプルな多成分ベシクルからスタートして、(1) 膜から伸びる糖鎖の存在、(2) 生きた細胞が持つ非平衡性と、その構造を段階的に生きた生体膜に近づけながら膜粘度測定を行い、そこから生体膜の流動特性を支配する要因を明らかにする。特に細胞骨格や細胞質と膜が力学的に相互作用して非平衡状態にある生きた膜と、相互作用の無い平衡 (無生物) 状態の膜の粘度の差異、つまり非平衡性が膜粘度に与える影響は今まで調べられたことがなく、本研究で初めて明らかにできる。

一方で、このような多様な膜構造の粘度を測定するには、膜の条件に対して汎用的かつ信頼性の高い測定法が不可欠である。従来のモデル生体膜における粘度の測定では、膜に埋め込まれたトレーサーの拡散係数を測定し、理論モデルと比較することで膜粘度を計測するという報告が多くなされてきた [Cicuta et al., *J. Phys. Chem. B* 2007]。しかし、この方法では理論モデルの適用範囲に制限があり、粘度や組成に対して広範囲での測定が困難であった。加えて、この理論モデルが均一な平面膜を仮定しており、多成分ベシクルのように不均一構造や曲率を持つ膜への適用が困難であった。これに対し最近、研究代表者はベシクルにマイクロインジェクションの水流により球殻状の膜面上に局所的な力を加えることで引き起こされる流動パターンを、球状膜面上での流体力学理論 [Henle et al., *Phys. Rev. E* 2010] と比較することにより膜の粘度を容易に計測できる手法を開発した。この手法を用いて生体膜の主要構成成分である3種類の脂質分子 (飽和リン脂質: DPPC, 不飽和リン脂質: DOPC, コレステロール: CHOL) から成るベシクルの流動

パターンを、相分離によってできるドメインの動きによって可視化し、組成と膜粘度の関係をマッピングすることに成功した [Sakuma et al., *Biophys. J.* 2020]。その結果、膜粘度は組成により $10^6 \sim 10^{10} \text{ Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}$ と非常に広い範囲で変化することが明らかになった。本研究では、研究代表者が開発した独自の粘度測定法と、モデル膜から生体膜への構造的アプローチを組み合わせることで、生きた生体膜の流動特性を支配する物理的要因の解明に挑む。

3. 研究の方法

本研究では、研究代表者が開発した膜粘度測定手法を用いて(1) 膜から伸びる糖鎖の存在, (2) 生きた細胞が持つ非平衡性が膜流動に及ぼす影響を調べる。具体的な研究手法を以下に示す。

はじめに、研究代表者が開発した膜粘度測定手法の概要について述べる。DPPC/DOPC/CHOL 三成分ベシクルは相分離温度以下で、主に DPPC と CHOL から成る liquid ordered (L_o) 相と主に DOPC と CHOL から成る liquid disordered (L_d) 相に相分離する。この時に L_d 相に局在化する蛍光色素を添加することで蛍光顕微鏡下で L_d および L_o 相を区別することができる。相分離した球殻状のベシクルの北極点にマイクロインジェクションによる水流を当て、膜面上に渦流動を誘起する。この流動場は、相分離によって形成したドメイン構造を追跡することによって可視化できる。この渦流動パターンを Henle と Levine の提唱した流体力学モデル [Henle et al., *Phys. Rev. E* 2010] と比較することで、膜粘度を見積もることができる [Sakuma et al., *Biophys. J.* 2020]。

(1) 膜から伸びる糖鎖の存在

DPPC/DOPC/CHOL 三成分ベシクルのうち、CHOL の一部を高分子 (Poly Ethylene Glycol: PEG) をアンカーしたコレステロール (PEG-CHOL) に置き換えた DPPC/DOPC/CHOL/PEG-CHOL 四成分ベシクルを作製する。このとき、膜内外の溶液はいずれも純水とする。四成分の組成比を様々に変えた時の膜粘度をマイクロインジェクションを用いた方法で測定し、高分子鎖の有無や高分子鎖密度が膜粘度にどのような影響を及ぼすかを明らかにする。

(2) 生きた細胞が持つ非平衡性

実際の生体膜である線虫およびホヤの初期胚 (1 細胞期) において、生きた状態である受精卵、無生物の状態である未受精卵の双方の膜に蛍光コロイドなどのトレーサーを埋め込んで動きを追跡し、膜粘度を測定する。生きて細胞骨格や細胞質との相互作用がある非平衡状態の膜と、平衡状態の無生物の生体膜の流動特性の違いを明らかにし、それを決定づける要因の解明を試みる。

以上(1), (2)の結果から、生体膜に特有な構造が膜流動性に及ぼす影響を解明する。

4. 研究成果

(1) 膜から伸びる糖鎖の存在

膜から伸びる糖鎖などの高分子が膜流動性に及ぼす影響を調べるにあたり、本研究では物性がよく知られた高分子である PEG をグラフトしたベシクルの膜粘度測定を行った。代表者らの先行研究から、DPPC/DOPC/CHOL 三成分ベシクルの組成のうち、相分離した際 L_d 相の面積が全体の半分以上を占める時、つまり L_o 相が円形のドメインを形成する様な組成では、 L_d 相の粘度がベシクル全体の粘度を支配していることがわかっている。そこで、本研究では L_o ドメインを持つ組成のベシクルに PEG をグラフトし、その膜粘度を L_d 相の PEG 濃度の関数として得た。PEG グラフトベシクルは、 L_o ドメインを形成する DPPC/DOPC/CHOL=0.4/0.4/0.2 および 0.3/0.5/0.2 (モル比) 三成分ベシクルのうち、モル分率 x の CHOL を PEG600-CHOL に置き換えて DPPC/DOPC/CHOL/PEG600-CHOL=0.4/0.4/0.2- x/x および 0.3/0.5/0.2- x/x 四成分ベシクルを作製することにより得た。ここで、PEG600-CHOL は分子量 600 の PEG が CHOL の親水頭部に結合し

た分子を表す。このとき、PEG600-CHOL のモル分率 $x=0.1$ までは CHOL を PEG600-CHOL に置き換えた場合も相分離温度が変化しないこと、つまり相分離において PEG600-CHOL が CHOL と同等に振る舞うことを確認した。PEG600-CHOL のモル分率を $x=0$ から 0.1 まで変化させ、PEG グラフトベシクルの膜粘度を測定したところ、PEG 濃度の増加によって膜粘度は PEG をグラフトしない場合の 5-8 倍程度まで上昇することがわかった。この膜粘度上昇は、PEG 鎖同士の接触相互作用の効果を考慮した理論モデルによって説明することができることがわかった。ここで、PEG 鎖同士の接触相互作用の効果には、剛体様の膜外タンパク質同士の接触相互作用のモデル [Guias et al., *Soft Matter* 2015]を引用した。

また、高分子のモル分率を $x=0.005$ に固定し、高分子の分子量を 750-5000 まで変化させた際の PEG グラフトベシクルの膜粘度を測定したところ、膜粘度は PEG をグラフトしない場合の 5 倍程度まで上昇した。PEG600 の場合と同様に、PEG 鎖同士の接触相互作用を考慮した理論モデルと比較すると、分子量が大きくなるにつれ理論モデルは実験から得られた膜粘度上昇を説明できなくなることがわかった。このことは、理論モデルに用いた剛体様の物体同士の相互作用では考慮できない PEG 鎖同士の相互作用（たとえば PEG 鎖同士の絡み合い効果など柔らかい分子特有の相互作用）の存在を示唆している。

さらに、PEG 鎖が L_0 ドメインまたは L_d 相に局在する場合に PEG 鎖間の相互作用が PEG の分布に及ぼす影響を調べた。上述の DPPC/DOPC/CHOL=0.4/0.4/0.2 が相分離した際の L_d 相の組成は DPPC/DOPC/CHOL=0.21/0.61/0.18, L_0 相の組成は DPPC/DOPC/CHOL=0.62/0.15/0.23 で CHOL および PEG600-CHOL はほぼ均等に L_d および L_0 相に分布している。一方、DPPC は L_0 相には L_d 相と比較して 3 倍程度多く分布している。つまり、DPPC の一部を PEG750-DPPE に置換すると PEG 鎖の分布も L_d 相と L_0 相とで 1:3 程度と見積もることができ、PEG 鎖は L_0 相に局在することになる。モル分率 x の DPPC を PEG750-DPPE に置換した DPPC/PEG750-DPPE/DOPC/CHOL=0.4- x / x /0.4/0.2 において、 $x=0$ から 0.1 に変化させた際の PEG グラフトベシクルの膜粘度を測定したところ、膜粘度は 5 倍程度上昇することがわかった。この結果を PEG 鎖同士の接触相互作用を考慮した理論モデルと比較すると、実験から得られた膜粘度は理論モデルより大きい値を取っていることがわかった。このことは、 L_d 相の実際の PEG 濃度は見積もり値より大きいことを示唆している。見積もり通りに PEG750-DPPE が分布すると、 L_0 相では PEG 鎖が密な状態であり、エントロピー的に不利である。一方、 L_d 相では PEG 鎖が比較的疎な状態であるので、 L_0 相の PEG750-DPPE と L_d 相の DPPC が交換することで L_d , L_0 相間での PEG 分布差を小さくしており、このために実際の L_d 相における PEG 濃度は見積もり濃度より大きくなっていると考えられる。実際、 L_d , L_0 相間での PEG 分布がほぼ同程度であるとして L_d 相の PEG 濃度を再見積もりし、実験から得られた膜粘度を理論モデルと比較すると、よく一致することがわかった。

また、DPPC/DOPC/CHOL=0.4/0.4/0.2 において DOPC の一部を PEG750-DOPE に置換すると、 L_d 相と L_0 相における PEG750-DOPE 濃度は 4:1 と見積もることができ、PEG 鎖は L_d 相に局在することになる。DPPC/DOPC/PEG750-DOPE/CHOL=0.4/0.4- x / x /0.2 において、 $x=0$ から 0.1 に変化させた際の PEG グラフトベシクルの膜粘度を測定したところ、膜粘度は 8 倍程度上昇した。理論モデルと比較すると、実験から得られた膜粘度は理論モデルよりも小さく、 L_d 相の実際の PEG 濃度が見積もりより低くなっていることがわかる。これは、 L_d , L_0 相間での PEG 濃度差を小さくするために L_d 相の PEG750-DOPE と L_0 相の DOPC が交換しているためであると考えられる。実際、 L_d , L_0 相間での PEG 分布がほぼ同程度であるとして L_d 相の PEG 濃度を再見積もりし、実験から得られた膜粘度を再見積もりした L_d 相の PEG 濃度に対してプロットすると、理論モデル

とよく一致することがわかった。これらの結果から、PEGの結合した分子は、L₀またはL_d相に局在することを避けるように分布していることが明らかになった。

以上の結果から、細胞膜から伸びている糖鎖などの高分子が、その密度や長さによって膜の流動性に与える影響を明らかにすることができた。これらの成果は論文としてまとめ、学術雑誌 *Biophysical Journal* に投稿中である。

(2) 生きた細胞が持つ非平衡性

動物の胚は受精によって細胞内部で生命活動のための化学反応が始まり、これを受けて細胞質流動などが活発化するため、細胞膜は内部から力学的揺動を受けた非平衡状態に置かれる。一方、未受精卵は平衡状態にある。線虫およびホヤの初期胚（1細胞期）と未受精卵それぞれにマイクロインジェクション法によって同じ大きさの力を与え、流動の様子を観察した。この結果、線虫、ホヤともに未受精卵と受精卵では明らかに流速が異なることがわかった。本研究によって、非生命である未受精卵と、生命体である初期胚の流動性には明らかな違いがあることを示すことができた。この違いは、生きていることに特徴的な非平衡状態が膜流動性に大きく影響を及ぼすことを示唆しており、また、動物種に寄らない普遍的な挙動であることも予想される。この予想を確認するために、引き続き動物の初期胚および未受精卵について、膜流動性の指標である膜粘度の定量的な測定を行う予定である。

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 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Urakami Naohito, Sakuma Yuka, Chiba Toshikaze, Imai Masayuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Vesicle deformation and division induced by flip-flops of lipid molecules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Soft Matter	6. 最初と最後の頁 8434 ~ 8445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1sm00847a	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 Khunpetch Petch, Sakuma Yuka, Imai Masayuki, Kawakatsu Toshihiro	4. 巻 33
2. 論文標題 Birthing of a daughter vesicle in a model system for self-reproduction vesicles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physics of Fluids	6. 最初と最後の頁 077103 ~ 077103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0052248	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 Murakami Kei, Ebihara Ryuta, Kono Takuma, Chiba Toshikaze, Sakuma Yuka, Zihnerl Primoz, Imai Masayuki	4. 巻 119
2. 論文標題 Morphologies of Vesicle Doublets: Competition among Bending Elasticity, Surface Tension, and Adhesion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 1735 ~ 1748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2020.09.030	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 Sakuma Yuka	4. 巻 46
2. 論文標題 Viscosity of multicomponent liposome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 MEMBRANE	6. 最初と最後の頁 58 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5360/membrane.46.58	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 Imai Masayuki, Sakuma Yuka, Kurisu Minoru, Walde Peter	4. 巻 18
2. 論文標題 From vesicles toward protocells and minimal cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Soft Matter	6. 最初と最後の頁 4823 ~ 4849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1sm01695d	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9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 佐久間由香
2. 発表標題 相分離した脂質ベシクルの膜粘度測定
3. 学会等名 日本物理学会 2021年秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐久間由香
2. 発表標題 Membrane viscosity of heterogeneous multi component liposome
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuka Sakuma
2. 発表標題 Membrane viscosity: from artificial cells to living cells
3. 学会等名 25th Anniversary Symposium of German-Japanese Joint Research Project on Non-equilibrium Statistical Physics Perspectives for Future Collaboration (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐久間由香
2. 発表標題 高分子をグラフトしたベシクルの膜流動特性
3. 学会等名 第10回ソフトマター研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐久間由香
2. 発表標題 Viscosity of polymer grafted ternary lipid vesicle
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Juria Tanaka, Kenya Haga, Masayuki Imai, and Yuka Sakuma
2. 発表標題 Viscosity Landscape of Ternary Vesicles in Composition-Temperature Space
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshikaze Chiba, Hironori Sugiyama, Taro Toyota, Yuka Sakuma, Masayuki Imai, Primoz Zihel
2. 発表標題 Morphology of Adhering Vesicles
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Minoru Kurisu, Peter Walde, Yuka Sakuma, and Masayuki Imai
2. 発表標題 ベシクルの自己生産：人工ミニマルセルのボトムアップなデザイン
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryosuke Katayama, Minoru Kurisu, Yuka Sakuma, and Masayuki Imai
2. 発表標題 配列情報と連携したベシクル膜の成長：進化可能なミニマルセルを目指して
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学理学研究科物理学専攻 ソフトマター・生物物理研究室 https://www.bio.phys.tohoku.ac.jp/researchmap https://researchmap.jp/7000002153

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------