

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25630351

研究課題名(和文) pH勾配で駆動する分子集合体ポンプの研究

研究課題名(英文) Study on micropump made of amphiphilic molecules operating under a pH gradient

研究代表者

塩井 章久 (Shioi, Akihisa)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号：00154162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は外界の物質を取り込み、化学反応によって様々な運動性を示す。本研究では、細胞と類似した構造をもつ分子集合体の周囲にpHの変化を与え、それに伴う化学反応で分子集合体を運動させ、その結果、周りに流れを発生させる微小ポンプを作製した。現在、化学分析、化成品の合成など、様々な用途に非常に小さなシステムを用いる研究がなされている。そこでは、流体が流れる流路はマイクロメートルサイズとなるが、このような微小システム内部で流体を流すための駆動力を与える人工的デバイスは研究が進んでいない。本研究では、微小システム内にある化学物質を用いた化学反応から駆動力を得て流体ポンプとして作用する分子集合体を作製した。

研究成果の概要(英文)：Biological cell exhibits self-motility by chemical reactions with the surrounding chemicals. In this study, the amphiphilic molecular assemblies, that resembles biological cell, are exposed to a pH change. The chemical reactions cause the self-motion that induces convection around the molecular assembly. This is a molecular assembly pump that operates in micro-space. Recently, chemical systems with very small scale have attracted much attention for chemical analysis and synthesis. Numerous channels with micrometer scale are embedded in the small system. However, the micropumps that operates in the micro system have not fully been studied. In this study, we have designed a micropump made from amphiphilic molecules that operates by chemical reaction with the surrounding proton or hydroxide ion.

研究分野：非線形化学

キーワード：分子集合体 pH勾配 化学走性 化学エネルギー

1. 研究開始当初の背景

生命機能は化学システムによって実現される究極の高度な機能であるということが出来る。化学プラントや人工臓器に用いられている従来の化学プロセスと比較したとき、生命システムの大きな特徴として、反応や物質移動が能動的に維持されている点あげられる。従来型の化学プロセスでは、物質移動は攪拌やポンプによる輸送過程を除けば基本的に拡散過程であり、それによって混合した物質間の化学反応により生成物質が生まれる。これに対して生命的なシステムでは、反応物質が化学反応による能動輸送によって目的場所まで輸送された後に必要な反応が進む。

化学システムの機能において能動輸送がなされていることの影響は極めて大きく、たとえば、組織の膜に含まれるタンパク質による能動輸送によって組織内外の pH 勾配が維持され、これに基づく非平衡性が多くの物理化学的変化の推進力を生み出している。化学反応による能動輸送によって非平衡性を維持し、それによって生み出された非平衡環境を利用して物質の輸送や反応といった機能をはたす生命的なプロセスを人工系で実現できれば、その科学技術への波及効果は極めて大きい。たとえば、pH は多くの水溶液系化学反応において重要な量であり、反応進行中の溶液内ではいたるところで pH 勾配が形成される可能性があるが、このような pH 勾配を利用して物質を輸送するデバイス (分子集合体) を作成することができれば、pH 勾配を推進力とした化学反応の制御や、局所的に pH が異なっている組織 (ガン細胞など) への物質の能動的輸送が可能となる。

2. 研究の目的

本研究の開始前までに、筆者らは、図 1 で説明するような pH 勾配下で周期的な変形運動を示す両親媒性分子集合体 (ベシクル) の作製に成功している。このベシクル運動は、後に説明するように pH 勾配に沿った物質の輸送を行う能力を有していると考えられる。本研究では、この事実を実証し、そのような分子集合体を利用することで、pH 勾配によって動く分子集合体ポンプを作成する。また、このようなことが可能となる物理化学的条件を解明する。

3. 研究の方法

当初の申請では、ベシクルの構造変化を利用して隣接する物体を pH 勾配に沿って輸送する系としての研究を想定していた。この申請時の計画に沿って、pH 勾配下におかれたベシクルの振動的あるいは可逆的構造変化について、基礎的研究を進めた。

ベシクルは所定濃度のオレイン酸を pH~8 に調製したピシン緩衝液に溶解させることで作製した。このベシクル溶液に所定濃度の水酸化ナトリウム水溶液、炭酸塩緩衝液、塩

酸を、それぞれ、拡散させることで溶液内に pH 勾配を形成させ、ベシクルの構造変化を光学顕微鏡で観察し、記録した動画を画像解析ソフトウェアで解析した。

これらの研究の結果、オレイン酸から構成されるベシクルには、pH 勾配の高い方向に向かって引っ張られるような、熱力学的な力 (泳動力) が働いていることが明らかとなった。この結果から、容易に構造変化しないベシクルをオレイン酸で作製できれば、pH 勾配下で pH の高い方向に移動運動することを予想し、このため、単純な球状ベシクルを作製できるように工夫し、これを用いて上記の予想を確認した。次に、この状況下で球状ベシクルを固定すれば、ベシクルを移動させていた泳動力の反作用が、ベシクル周囲の対流を生み出すと予想した。実際にこの対流の観測に成功し、この対流がマイクロスケールではかなりの強さをもった渦流であることを確認した。

上記の対流は、固定されたベシクルが pH 勾配下でマイクロ流路ポンプとして作用可能であることを示しており、最終的に申請課題である” pH 勾配で駆動する分子集合体ポンプ”を実現したと考えている。次節では、ここに示した順序で、成果を論述する。

4. 研究成果

平成 25 年度の成果 [1]

筆者らが見出した pH 勾配下で周期的な構造変化を示すベシクルについて、その構造変化を詳しく検討し、数理モデルを用いた考察で運動機構を推定した。形態変化を図 1 に示す。

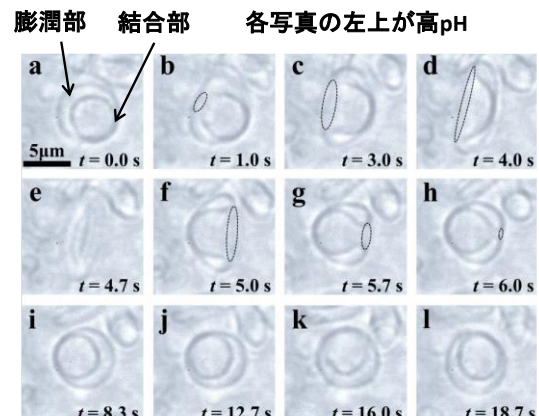


図 1 1M-NaOH 拡散下でのベシクルの周期的形状変化。塩基は左方から拡散している。

周期的な構造変化を示すベシクルは、2 枚のベシクル膜が水をほとんど含まずにお互いに接着している結合部と、2 枚のベシクル膜の間に多量の水溶液を含む膨潤部から形成されている。結合部は球殻の一部となる形状をしており、その反対側に膨潤部が位置している。軟式テニスのボールから空気を徐々に抜いて行ったとき、ボールの片側が凹み、

その凹んだゴム膜が、反対側のゴム膜に張り付いたような形態を考えたとき、2枚のゴム膜が重なった部分が結合部、2枚のゴム膜の間に空気が入っている部分が膨潤部に相当する。したがって、膨潤部中央には、穴が開いている。軟式テニスボールの場合、ゴム膜の弾性が大きいため、この穴はボールの直径と同程度に大きくなるかもしれないが、ベシクルの場合、膜が柔らかいため、この穴はベシクル直径に比べて非常に小さくなることができる。

観測結果によれば、pH 勾配を形成させる前は膨潤部の穴は非常に小さく、塩基を拡散させると、穴の位置が高 pH 側に来るようにベシクルの回転がおこり、穴は高 pH 側に位置する(図 1a)。その後、穴が次第に広がり、それとともに、膨潤部をその周縁に保持する結合部が平らな形状となる(図 1b→d)。このとき、トーラス型の膨潤部は、そのトーラスの穴の直径が最大となる(図 1e)。その後も変形は進み、結合部の膜曲率が最初と逆向きになり、それとともに膨潤部の中央の穴も小さくなり、ついには最初の小穴状に戻る(図 1e→h)。ただし、このとき穴は低 pH 側に向いている。このうち、ベシクル全体が回転をおこし、穴が高 pH 側に位置するようになり構造は初期化されるため、周期的な変化を繰り返すことができる(図 1i→l→a)。

この変形についての数理モデルの作成も行った[1]。周期的な変化は数十回にわたって続くが、この間、光学顕微鏡レベルでのサイズの減少はほとんど観測されなかった。したがって、このベシクル運動は pH 勾配から定常的に力学的仕事を生み出している。

さらに、交付申請書に記載したような定常 pH 勾配の作製を試みたが、定常濃度勾配下

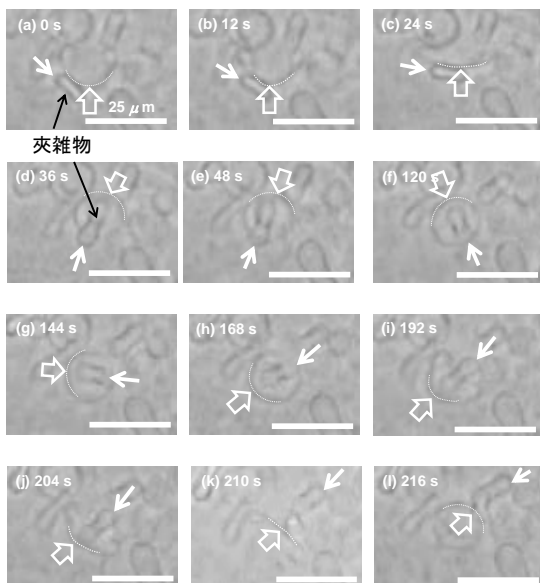


図 2 炭酸塩緩衝液拡散下で周期的変形を示すベシクル(結合部がブロック矢印)が、夾雑物(線矢印)を運ぶ様子。

では、同様の運動を完全な形で得ることはできなかった。この結果については、現在、詳しく検討中である。また、交付申請書に記載したベシクル変形を利用した貨物物質の輸送については、図 2 に示すように、溶液内に存在する夾雑物が、ベシクル変形によって低 pH から高 pH 部に輸送されるという結果を得ることができた。

平成 26 年度の成果

前年度に報告した周期的運動が停止したあとに適切な pH 勾配を与え続ければ、ベシクルは周期運動を停止して円盤状に変化し、図 3 に示すように、円盤側面から偽足状の突起を繰り返し(可逆的に)伸縮させることを見出した。この偽足の突出は、必ず高 pH 側に向かって形成された。したがって、この偽足は周囲の pH ゆらぎを検知して形成されていると考えることができ、アメーバ状の運動であるといえる。本研究では、pH 勾配を NaOH 水溶液の拡散によって形成させたが、NaCl 水溶液を拡散させた場合には、円盤状ベシクルの側面から突起が伸びるだけで、可逆的な繰り返しのある伸縮運動は発生しなかった。

NaOH や NaCl 拡散下では、ベシクル内水相と外水相に浸透圧差が発生し、これによって内水相が外部に排出されてベシクル膜に余剰面積が発生して突起が形成されると考えられる。このとき、オレイン酸および、そのイオン化物から構成されるベシクル膜は、flip/flop によって $H^+(OH^-)$ を通過させる。したがって、NaOH 拡散下で形成された浸透圧差は、 $H^+(OH^-)$ の膜通過と、それによって形成された膜内外の電気化学ポテンシャル差に起因する Na^+ の膜通過によって、比較的速やかに消失し、膜力学的に安定な円盤状に復

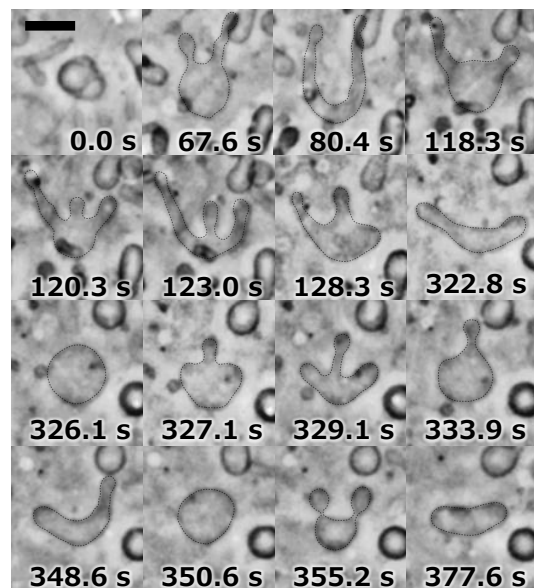


図 3 偽足状突起を可逆的に伸縮する円盤状ベシクル。1M-NaOH を上方から拡散させている。

帰するとして、伸縮運動を数学的に説明することができる。一方、NaCl 拡散下では、形成された膜内外の Na^+ 濃度差が長時間維持されるため、突起は一方的に伸びるだけになる。この考えに基づいた数理モデルで実験結果を半定量的に説明できることも示した [1]。

平成 27 年度の成果 [2]

前年度までの研究成果から、オレイン酸から形成されるベシクルを pH 勾配下におくと、膨潤部を高 pH 側へ向けさせようとする力が発生し、さらに、高 pH 側へ突起を引き出す力が発生する。これらの結果は、ベシクルを pH の高い方向に移動させる力が発生していることを示唆している。この力を仮定すれば、これが膨潤部に強く作用すると考えれば、ベシクルの回転運動が理解でき、さらに、水を含んだ円盤状ベシクルから、高 pH 側へ突起が引き出されることも理解できる。

本年度は、この力の効果をベシクルの並進運動として観測できる系を考案し、さらに、この状態でベシクルの位置を固定することで、生み出される力の反作用としての溶液の対流を測定することを試みた。

このためには、単純な球状ベシクルを作製し、pH 変化によって容易に変形しなくなるようにすること、さらに、このようにして形成されたベシクルを固体基板上に固定することが必要である。

この前半の目的のために、これまでとは異なる手法（液滴移動法、図 4）を用いて単純な球状ベシクルを作製し、これを pH 勾配下におくことで発生する泳動運動を詳しく研究した。液滴移動法では、図 4 に示すようにベシクル内・外膜の脂質分子の種類を制御できるが、研究の結果、内膜、外膜ともにオレイン酸を含んでいるベシクルが、もっとも pH 勾配によく反応して並進運動を生み出すことが分かった。観測した移動運動を図 5 に示す。運動速度を解析した結果、速度は近似的にベシクル直径に比例していた。これは、ベシクルを動かしている力の大きさが、ベシクル膜面積に比例することを示している。この力の発生機構については、十分明らかとはなっていないが、少なくとも、力の発生機構が

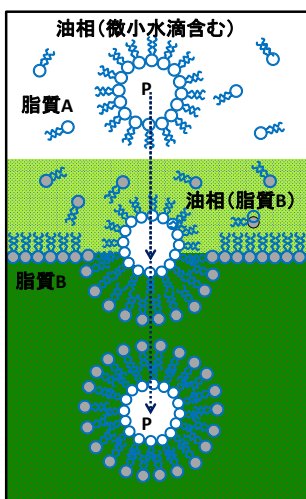


図 4 液滴移動

方の概念図。脂質 A で囲まれた微小水滴を、脂質 B を含む中間層を通して下部水相に投入すると、外膜が B、内膜が A で構成された球状ベシクルが形成する。

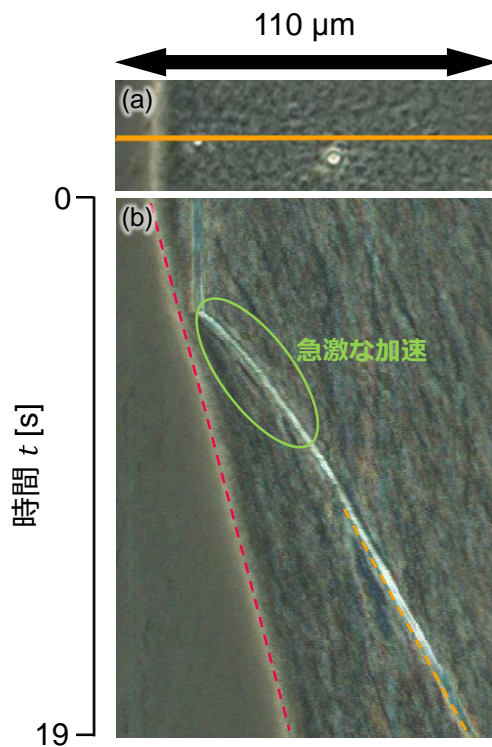


図 5 左から 1M-HCl を拡散させた時、ベシクル(上図実線上の小さな白点)が、右方向に移動する。下図は、上図実線上の画像を時間に沿って、縦方向に並べた時空間プロット。塩酸の影響でベシクルが崩壊するラインが右側に移動していくが(下図破線)、これよりも速くベシクルが右側に移動している(下図実線)。

ベシクル膜面に存在することがわかる。

つぎに、この状況でベシクルを固体板上に固定すると、ベシクルを移動させようとする力が、溶液内の対流として顕在化すると予想した。これに基づき、液滴移動法で作製した外膜、内膜ともにオレイン酸から構成されるベシクルをガラス基板上に固定すると、図 6 に示すような渦状対流がベシクルの周囲で生じることを観測した。この対流は、溶液内の物質の促進輸送に利用できるものであり、pH 勾配下においてマイクロな液流ポンプとして働く分子集合体を作製することに成功したといえる。

本成果の国内外におけるインパクトと今後の展望

マイクロ流路内での反応や化学分析は、マイクロリアクターや Lab on chip の技術として注目されており、今後の研究のさらなる進展が予想される。このような小さな流路内では流体の圧力損失が非常に大きく、流体の慣性効果は実質上全く働かない。このため、持続的な動力によって流体の流れを確保せねばならない。この状況において、流体内に含まれる化学物質や、流体内の化学物質濃度の勾配から持続的な動力を発生させるデバイスがあれば有力なツールとなる。従来は、こ

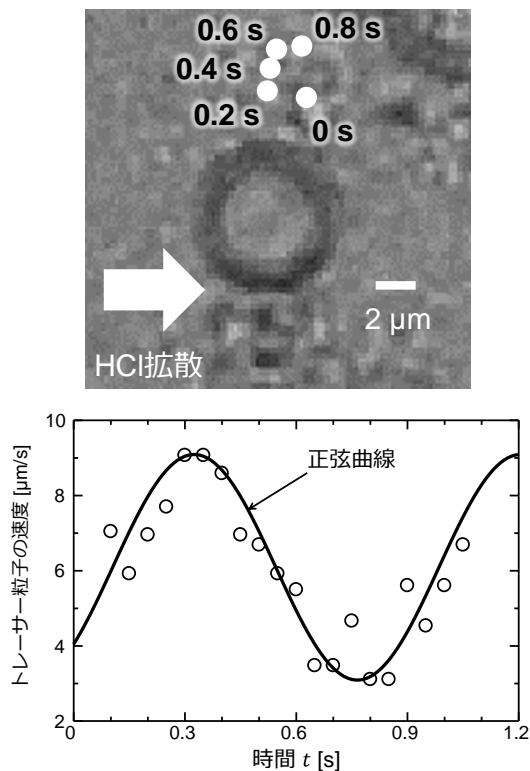


図 6 固体板上にトラップされたベシクルに 1M-HCl を拡散させたときのベシクル上方に存在する小粒子(トレーサー)の位置の時間変化(上), および, トレーサーの速度の横軸方向成分を示したもの(下)。トレーサーは持続的の周回運動を行うが, 図には 1 周分だけのデータを示している。下図の実線は正弦曲線であり, トレーサー粒子が等速円運動をしているとき, データは正弦曲線になる。

のような技術は, 国内外においてほとんど研究されていなかったが, 本研究は, 非平衡現象を利用すれば, このような技術が開発可能であることを示している。このように, 本研究の成果は, 新規な着想に基づいた新しい技術の萌芽となり得るものであり波及効果は大きい,

当初予期していなかった事象とそれにより得られた新たな知見

上記成果で報告したように, pH 勾配は外部からの酸, 塩基の拡散で形成させたが, 生物では pH 勾配そのものを系内の化学反応で自己生成している。このモデル系として, ベシクルにグルコースオキシダーゼを含ませ, 外部にグルコースを拡散せる系の研究を行った。この系では, ベシクル周囲でグルコースが分解され, 最終的にグルコン酸を生じ pH が変化する。この系においても, ベシクルから偽足状突起が可逆的に形成されたが, 突起は星形に等方的に形成された [3]。これはベシクル周囲で形成された pH 分布が, 一方向的なベクトル性を持たないためと考えられ

るが, 本成果は, より生物的な特徴をもつ分子集合体の設計であるといえる。また, この他にも pH 勾配を用いない, 化学反応によるベシクルの移動運動を見出すことにも成功している [4]。

引用文献

1. Erika Nawa, Yasuyoshi Nishigaki, Daigo Yamamoto and Akihisa Shioi, *Soft Matter*, **vol.9**, 7832-7842, 2013
2. Erika Nawa, Daigo Yamamoto and Akihisa Shioi, *Bulletin of Chemical Society of Japan*, **vol.88**, 1536-1544, 2015
3. Erika Nawa, Daichi Sakashita, Kentaro Owaki, Daigo Yamamoto and Akihisa Shioi, *Colloids and Interface Science Communications*, **vol.8**, 10-13, 2016
4. Masato Nakada, Yukihiro Fujikami, Masaharu Kawaguchi, Daigo Yamamoto and Akihisa Shioi, *Molecular Systems Design & Engineering*, DOI:10.1039/C5ME00012B, published on line 12 May 2016

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 4 件)

① 査読有

"A molecular assembly that crawls on a solid substrate with a metabolic-like process"
Masato Nakada, Yukihiro Fujikami, Masaharu Kawaguchi, Daigo Yamamoto and Akihisa Shioi, *Molecular Systems Design & Engineering*, DOI:10.1039/C5ME00012B, published on line 12 May 2016

② 査読有

"Reversible transformation of an acid/soap vesicle by glucose oxidation"
Erika Nawa, Daichi Sakashita, Kentaro Owaki, Daigo Yamamoto and Akihisa Shioi, *Colloids and Interface Science Communications*, vol.8, 10-13, 2016
doi:10.1016/j.colcom.2016.01.002

③ 査読有

"Chemotactic Amoeboid-like Shape Change of a Vesicle under a pH Gradient"
Erika Nawa, Daigo Yamamoto and Akihisa Shioi, *Bulletin of Chemical Society of Japan* vol. 88, 1536-1544, 2015
doi:10.1246/bcsj.20150190

④ 査読有

"Rhythmic Shape Change of a Vesicle under a pH Gradient"
Erika Nawa, Yasuyoshi Nishigaki, Daigo Yamamoto and Akihisa Shioi, *Soft Matter*, vol.9, 7832-7842, 2013

DOI: 10.1039/C3SM51100F

[学会発表] (計 12 件)

国際会議

① Biomimetic c Shape Change of a Vesicle under a pH Gradient,

Erika Nawa, Daigo Yamamoto and Akihisa Shioi,
6th Asian Conference on Colloid and Interface
Science (ACCIS2015)

2015.11.24~11.27, 長崎県佐世保市

② Biomimetic Self-motion of Colloid and Interface

Akihisa Shioi (招待講演)

11th Korea-Japan Symposium on Materials and Interfaces

2014.11.5~11.7, Jeju, Korea

③ Interface-Driven Autonomous Motion - Biomimetic Power Source for Microsystems

Akihisa Shioi (招待講演)

The 5th International Symposium of Advanced Energy Science

2014.10.2, 京都府宇治市

④ Design of Autonomously Moving Colloidal Objects: Systematic Motion of Vesicles, Particles and Oil/Water Interface in a Homogenous Chemical Field

Akihisa Shioi (招待講演)

2013 AIChE Annual Meeting,

2013.11.4, San Francisco, USA

⑤ Vesicle Generating An Oscillatory Shape Change Under a pH Gradient

Erika Nawa, Daigo Yamamoto and Akihisa Shioi

2013 AIChE Annual Meeting,

2013.11.4, San Francisco, USA

国内会議

⑥ pH 変化を生成・利用して運動するベシクル

名和愛利香, 山本大吾, 塩井章久

日本化学会 第96 春季年会

2016.3.24~3.27, 同志社大学, 京都府京田辺市

⑦ グルコースの分解反応を利用したベシクルの自律運動

名和愛利香, 山本大吾, 塩井章久

化学工学会第81 年会

2016.3.13~3.15, 関西大学, 大阪府吹田市

⑧ pH 勾配下におけるベシクルの移動運動および破裂現象

関 麻里, 山本大吾, 塩井章久

第25 回 非線形反応と協同現象研究会

2015.10.3, 旭川医科大学, 北海道旭川市

⑨ pH 勾配から仕事を心得てアメーバ的変形を

行うベシクルとそのメカニズムの解明

名和愛利香, 山本大吾, 塩井章久

化学工学会第80 年会

2015.3.19~3.21, 芝浦工業大学, 東京都江東区

⑩ pH 勾配下におけるベシクルのアメーバ的変形

名和愛利香, 山本大吾, 塩井章久

第24 回非線形反応と協同現象研究会

2014.12.6, 東京電気大学, 東京都足立区

⑪ pH 勾配下におけるベシクルのパーリングをともなう振動的変形

名和愛利香, 山本大吾, 塩井章久

第65 回コロイド界面化学討論会

2014.9.10~9.12, 東京理科大学, 東京都新宿区

⑫ pH 勾配を仕事に変換するベシクルの構造変化メカニズム

名和愛利香, 山本大吾, 塩井章久

第64 回コロイド界面化学討論会 (名古屋工業大学)

2013.9.18~9.18, 名古屋工業大学, 愛知県名古屋市

[図書] (計 1 件)

① 査読有

"Autonomously Moving Interface and Colloidal Objects", in Chemoresponsive Materials: Stimulation by Chemical and Biological Signals, Chap.17 (33 pages)

Daigo Yamamoto, Erika Nawa and Akihisa Shioi,
The Royal Society of Chemistry, 2015

<http://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9781782620624-00483/978-1-78262-062-4#!divabstract>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩井 章久 (SHIOI Akihisa)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号: 00154162