

論文の内容の要旨

論文題目 **Analysis on Membrane Dynamics of Giant Vesicles**
 ジャイアント・ベシクルの膜ダイナミクスの解析

氏名 豊田 太郎

両親媒性分子が水中で形成する粒径 $1\ \mu\text{m}$ 以上の袋状二分子膜—ジャイアント・ベシクルと呼ぶ—は、構造や大きさの類似性から原始細胞モデルとして注目されている。本研究は、二分子膜内での膜分子の分子変換系（マイクロなレベルの膜ダイナミクス）が仕込まれたジャイアント・ベシクルの見せる形態変化（マクロなレベルの膜ダイナミクス）の解析を通じて、それら階層の異なるダイナミクス間の時間発展を解明することを目的としている(図1)。第1章では、本研究の特色が、「素性のよく知れた基本的な有機分子を用いて、化学反応する膜分子とジャイアント・ベシクルの形態変化との相関を解明するという従来にない視点より、新規解析手法（単一ジャイアント・ベシクルの蛍光計測とジャイアント・ベシクル集団の統計解析）を確立しつつ、その本質に迫る」という点にあることを論じている。

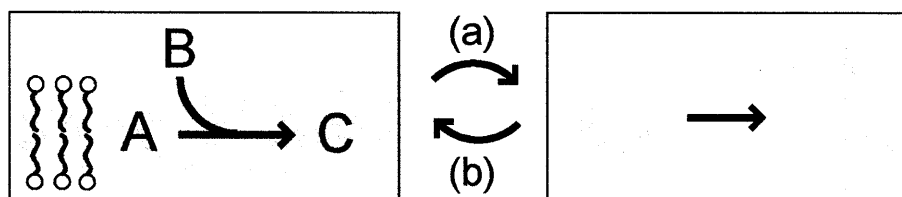


図 1 ミクロなダイナミクスとしての膜内での膜分子変換反応が、マクロなダイナミクスであるジャイアント・ベシクルの形態変化を誘発する(a)。一方、マクロな形態変化のモデル実験に対する詳細な解析からミクロな膜分子のダイナミクスを理解する(b)。

第2章「脱水縮合反応に伴う反応活性型ジャイアント・ベシクルの示す形態変化」では、膜分子前駆体の膜への混入と、それに引き続く膜内での異種の膜分子生産が引き起こす組成の変化が、ジャイアント・ベシクルの形態変化を誘発する系の構築とそのマクロなダイナミクスの顕微鏡観測について記述する(図2)。疎水性部位の末端にベンズアルデヒドを有する一本鎖型の両親媒性分子は、二本鎖型類似分子を混合すると、水中において入れ子構造のジャイアント・ベシクルを形成する。これに両親媒性のアニリン誘導体を添加すると、内部に入れ子状になって封じ込められたベシクルが、外膜をすり抜けて飛び出すダイナミクスを観測することに、世界で初めて成功した(図3)。

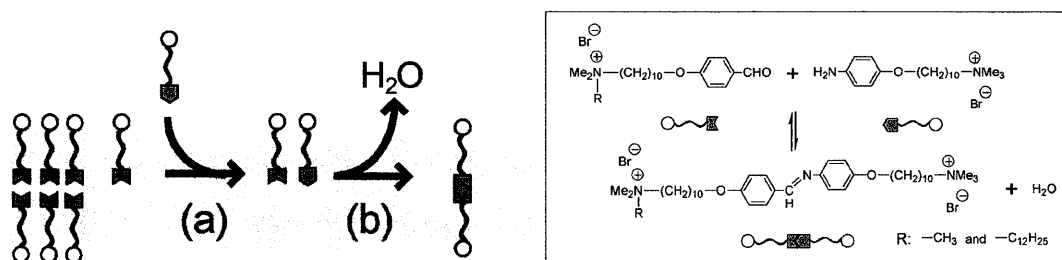


図2 膜分子前駆体の膜への混入(a)と、それに引き続く膜内での異種の膜分子への変換(b)。

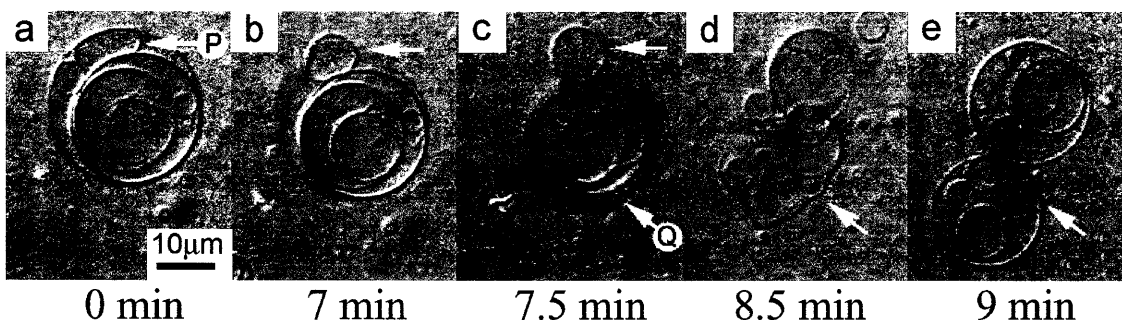


図3 ベンズアルデヒドを末端にもつ膜分子からなるジャイアント・ベシクルの水溶液に、両親媒性アニリン誘導体を添加したときに観測された入れ子型ジャイアント・ベシクルの形態変化の微分干渉顕微鏡像。サイトPでは birthing、サイトQでは separation と呼ばれる現象が観測された。

この現象が観測されるのは、水中であっても二分子膜という疎水的な反応場が形成されているために、ベンズアルデヒドを末端にもつ膜分子と、添加した両親媒性アニリン誘導体とが、この環境下で脱水縮合反応を起こし、双頭極性型の両親媒性分子を与えること、さらにそれが引き金になって、膜の不安定化を誘引することによると結論した。

第3章「ジャイアント・ベシクルの形態変化の蛍光リアルタイム観測」では、第2章の結果を受けて、二分子膜に異種の構成分子（特に単頭極性型と双頭極性型の両親媒性分子）が混入することが引き金となり、ジャイアント・ベシクルが形態変化を起こすメカニズムを明らかにすることを目的として、蛍光両親媒性分子で標識したジャイアント・ベシクルの示すダイナミクスを蛍光顕微鏡を用いて詳細に追跡した。

また、この研究の目的を達成するために、量子収率が高く、それぞれ異なる蛍光波長の極大値を有する複数のジフルオロボラジアザインダセン誘導体と、それらに対応する蛍光顕微鏡からなる観測プロトコルを確立した。リン脂質蛍光プローブを用いて、入れ子型のリン脂質ジャイアント・ベシクルを蛍光染色し、これに脱水縮合反応の生成物である”双頭極性型の両親媒性分子”を添加すると、入れ子型のジャイアント・ベシクルの膜は外側から **budding** という変形を示すことがわかった。一方、入れ子型リン脂質ジャイアント・ベシクルに、蛍光”界面活性剤”を添加すると、ジャイアント・ベシクルは外膜から順々に蛍光変色を伴って溶解することがわかった。

さらに、第2章の結果を受けて、蛍光”界面活性剤”と”双頭極性型の両親媒性分子”の混合溶液を、入れ子型ジャイアント・ベシクルへ添加したところ、蛍光変色した外膜から、内部の非侵襲状態のベシクルがすり抜けて飛び出すという **birthing** が観測された(図4)。こうした非平衡状態での形態変化の要因に対し、蛍光像解析から、異種の両親媒性分子が二分子膜に混入し浸透してゆく際に生じる「膜の張力変化」と「浸透圧による膜内外の圧力差」に関して考察を展開した。

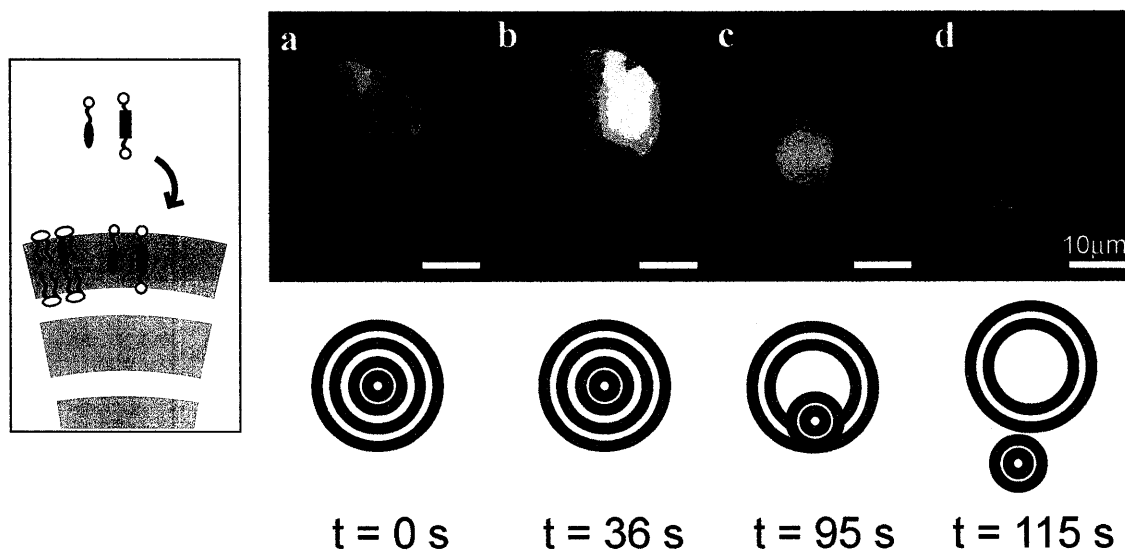






図4 蛍光プローブ()で標識されたリン脂質()の入れ子型ジャイアント・ベシクルへ蛍光界面活性剤()と双頭極性型両親媒性分子()を混入させたときに観測された birthing 現象の蛍光顕微鏡像とその模式図。

第4章「両親媒性のシッフ塩基誘導体の加水分解反応に伴うジャイアント・ベシクルの過渡的な形成」では、化学反応の進行により膜組成が自発的に時間発展するようなジャイアント・ベシクルの形成に成功し、そのダイナミクスについて顕微鏡観測を行った(図5)。

両親媒性のシッフ塩基誘導体の中でも、シッフ塩基が極性基近くにあり、膜内で加水分解されやすい化合物の水溶液(10 mM)を調製したところ、調製直後より、スモール・ベシクル(粒径数十 nm) → ジャイアント・ベシクル(数 μm) → オイルエマルジョン(数 μm) といった経時的な形態変化を起こすことを見出した(図6)。自発的に現れたジャイアント・ベシクルは、NMR スペクトルの解析の結果シッフ塩基誘導体とその分解生成物である n-オクチルアニリンが混合した会合体であることがわかった。そこで、それぞれの形態に対応する組成比の混合水溶液を調製したところ、予想される会合体が観測された。一方、調製後1日経過した後の水溶液を10倍濃縮した際は、オイルエマルジョンからジャイアント・ベシクルへと会合体が変化することが、顕微鏡観察により明らかになった。以上より、この時系列に沿った形態変化は、部分的であるが可逆的に進行することが確認された。

これらの形態変化の要因として、1)加水分解反応によって脂溶性分子が増加するために構造体界面の曲率が変化すること、2)水相中の電解質濃度の増加により構造体界面の電気二重層の厚みが減少し、構造体どうしが会合する、の2点を挙げ考察を行った。

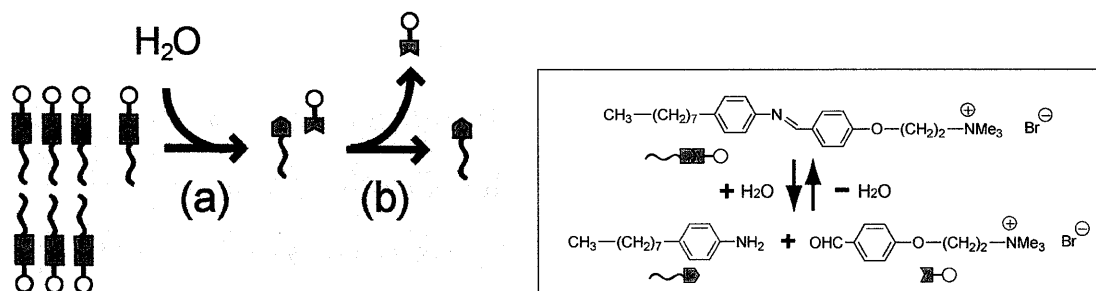


図 5 膜構成分子が水の攻撃を受け加水分解され(a)、生成物である電解質が水相へ移動すると共に、脂溶性の生成物が膜に溶け込んで膜の曲率に変調を加える(b)。

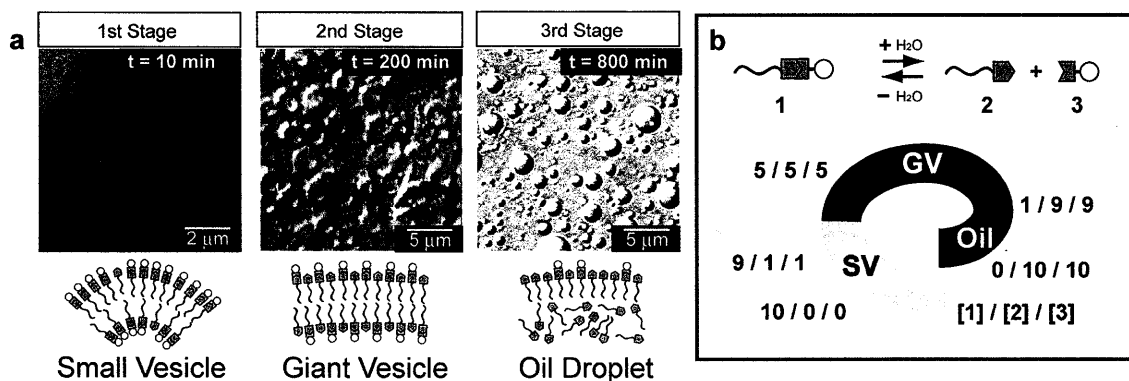


図 6 (a)両親媒性のシッフ塩基誘導体の水溶液中で観測された各自己会合体の顕微鏡像。1st stage : スモール・ベシクル(SV)の電子顕微鏡像。2nd stage : ジャイアント・ベシクル(GV)の微分干渉顕微鏡像。3rd stage : 油滴(Oil)の微分干渉顕微鏡像。(b)膜構成分子の分子変換率に応じた自己会合体の形態変化(例えば 9/1/1 は構成分子 1,2,3 の水溶液中の組成比を示す)。

第 5 章「ベシクルの形状に対する光散乱型フローサイトメーターによる統計解析」では、第 4 章の結果を受けて、脂質の構造の違いや電気二重層の厚みの変化が、ジャイアント・ベシクル集団に与える影響を調べることを目的として、ジャイアント・ベシクルの大きさや内部構造の分散について、光散乱型フローサイトメーターによる評価方法の確立することを目指した。光学顕微鏡は個々の微粒子の形状評価には優れている一方で、統計的な解析には必ずしも適していないという問題点を有しているからである。

ジャイアント・ベシクルのようなソフトな粒子に光散乱型フローサイトメトリーを適用するには、サンプル溶液のイオン強度、温度、洗浄方法などの種々の条件を最適化する必要があるが、これらの点を解決し、水溶液中のジャイアント・ベシクルのサイズや内部構造に関する分布を統計的に解析するプロトコルを確立した。

一本鎖型の両親媒性分子であるオレイン酸のアルカリ性水溶液(pH~8.5)で形成されるジャイアント・ベシクルを200 nmのメッシュに通し粒径を揃えた試料は、時間が経過するごとに、粒径1 μ m以上のジャイアント・ベシクルを形成し(図7)、かつベシクル集団の分布の標準尖度と標準歪度も徐々に減少してゆくことを見出した(図7)。これらの現象について、両親媒性分子の熱力学的会合平衡で示される会合体サイズ分布と比較検証することに

より考察を加えた。

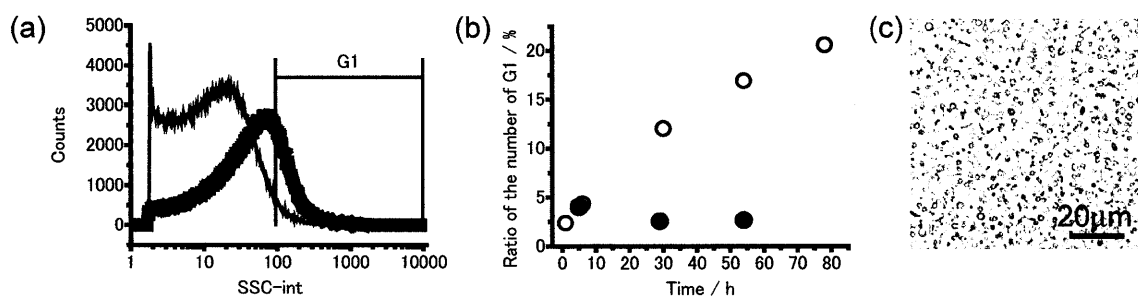


図7 濾過処理により調製されたオレイン酸/オレートのラージ・ベシクル(粒径約 200 nm)の水溶液中でのジャイアント・ベシクルの形成過程。(a)光散乱型フローサイトメーターによる調製直後(—)と3日後(---)の側方散乱のヒストグラム。(b) ヒストグラム(a)における領域 G1 内の総和を時間に対してプロットしたグラフ(O)。参照として、同様の実験をリン脂質で行ったときのプロットを●で示した。(c) 3日後に観測されたオレイン酸/オレートのジャイアント・ベシクルの位相差顕微鏡像。

以上、本研究はジャイアント・ベシクルという、生体膜の動的なモデルであり、また人工細胞構築の分野においても注目されている魅力的な分子集合体を対象とし、単一ジャイアント・ベシクル蛍光観測と、ジャイアント・ベシクル集団の統計解析の両面から、その形態変化の計測法を確立した。さらにその方法論を用いて、ミクロな膜ダイナミクスとしての膜分子変換から、マクロな膜ダイナミクスとしての形態変化に至る、階層的ダイナミクスの時間発展を解明する上で重要な知見を得た。