

論文の内容の要旨

論文題目 内包された球状粒子の分散に起因するジャイアントベシクル変形

氏名 夏目ゆうの

【1.背景と目的】

細胞は、人工的に同じサイズで同等な機能を発現するよりも、遥かに小さなエネルギーで機能を発現する動作原理を備えている。細胞の内部には生体高分子が高い密度でひしめき合っており、この込み合った状態を利用して、タンパク質の複合体形成といった細胞内部の構造形成や、化学反応の効率制御などが行われている。Minton らは、このように境界内に内包物が込み合った状態で生じる効果を「こみあい効果」と定義した[1]。こみあい効果は構成要素によらず、境界内に内包物が閉じ込められたことによる本質的な効果であるため、素性がよくわかっている分子や粒子などで単純にモデル化し、構成的にアプローチすることが細胞機能の動作原理の解明に重要である。細胞のこみあい効果にアプローチする実験モデルとして、サイズも形状も固定された微小空間に高分子やコロイド粒子を高体積分率（10%以上）で閉じ込めた系はこれまでも提案されている。Dinsmore らは、サイズの異なる2種のコロイド粒子を高体積分率で、ジャイアントベシクル（以下GV）と呼ばれる脂質二分子膜からなる境界内に閉じ込めると、コロイド粒子はGV内部で互いに排除するような空間分布をとることを報告した [2]。

細胞の境界膜である細胞膜は、細胞分裂や細胞運動などにおいて内部状態変化に誘起されて形状変化する。最近、コロイド粒子や高分子を高い体積分率で内包した GV が膜と内包物との枯渇相互作用によって自発的に連球状に変形することが報告された [3,4]。これらは既知の構成要素からなるこみあい効果の実験モデルとして興味深いものであるが、内部粒子の状態を詳細に解析できるソフトマター複合系としての構成モデルに至っていない。そこで本研究では、光学顕微鏡でリアルタイム観測できるマイクロメートルスケールのコロイド粒子を用いたコロイド粒子内包型 GV を創成し、その体積分率に依存した GV の形状変化と内部状態変化の関係を明らかにすることを目的とした。

【2.様々な体積分率でコロイド粒子を内包したジャイアントベシクルの構築】

従来のコロイド粒子内包型 GV の作製法は、脂質二分子膜をコロイド粒子分散液で膨潤させる薄膜膨潤法を基盤としており、コロイド粒子内包型 GV の生成効率は低く、同一条件で体積分率が異なる GV を調製することは困難であった。そこで本研究は、均一な単一膜 GV を調製する手法として利用されている油中水滴遠心沈降法に着目した。コロイド粒子を含む油中水滴エマルジョン（以下 W/O エマルジョン）を調製し、次いで遠心力で GV の外膜となる脂質単分子膜を貼りあわせて GV を調製するという手法である（図 1）。

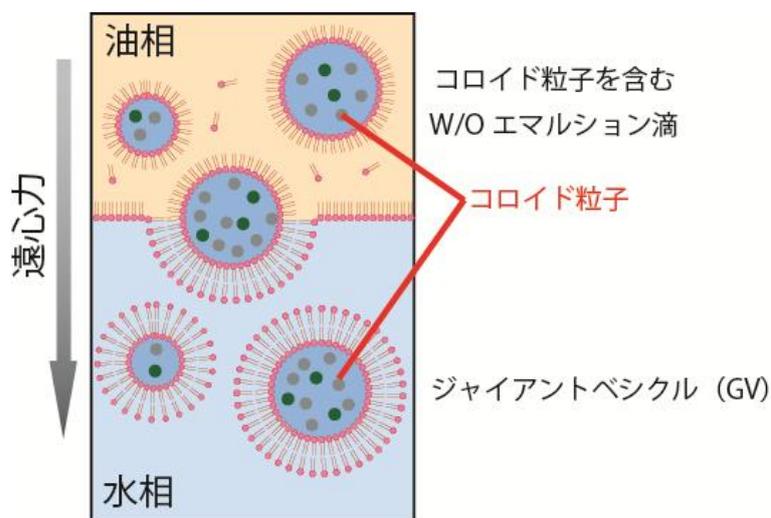


図 1. 油中水滴遠心沈降法によるコロイド粒子内包型 GV の調製プロセスの模式図。

本手法で調製したコロイド粒子内包型 GV は、GV の遠心沈降条件が GV の大きさと比重、GV 分散媒の比重と粘性に依存するため、必ずしも W/O エマルジョン時の分散液と同程度の体積分率でコロイド粒子を内包するとは限らない。そこで比重の異なる 4 つの相（GV 外水相、GV 内水相、GV 膜、コロイド粒子）でソフトマター複合系としてコロイド粒子内包型 GV を作製する条件を検討した。

次に、W/O エマルジョン中の水滴と得られた GV について、コロイド粒子の体積分率を比較した。その結果、W/O エマルジョン水滴中の体積分率は、W/O エマルジョン調製時に

用いるコロイド分散液の体積分率に依存したが、GVの体積分率は、調製時に用いるコロイド分散液の体積分率に依らず、0–45 vol%となることがわかった。この原因は、GVが高粘度の水中を沈降する際のGV変形によるものと考察される。コロイド粒子の比重はGV内部水溶液のそれよりも小さいため、遠心力によってGVが沈降すると、コロイド粒子がGV内の上部に偏在した状態のまま、GVが遠心力と粘性抵抗で引き伸ばされて分裂する。その結果、体積分率が0 vol%のGVと、著しく体積分率の高いGVが生成したものと考えられる。本実験結果は、通常ならば凝集する濃度のコロイド粒子や生体高分子でも、細胞内の体積分率に相当する状態でGVに内包できる要素技術となる点で、従来のGV作製法にはない利点を有しているといえる。

【3. コロイド粒子内包型ジャイアントベシクルの変形挙動】

前章で構築したコロイド粒子内包型GVの膜が弾性膜としてふるまって変形できる物理的な刺激として、糖の高張液を添加することとした。本研究で作製したコロイド粒子内包型GVは内外に糖を含むため、分散液全体の粘度が高い。そこで、粘度や浸透圧を考慮した糖の添加条件を検討し、1.1 Mのグルコース水溶液がGV変形に適していることを見出した。それによって変形を誘起したGVを経時観測したところ、2つの変形パターンに分類されることが明らかになった。内部コロイド粒子の自由エネルギーと膜の弾性エネルギーにより考察される典型的な変形パターンとして、球形から扁球形/偏長型への変形、球形から二球分割型への変形、そして、扁球形になった後に二球分割型に変化し再度扁球形に戻る挙動が観察された。球形から扁球形/偏長型への変形と、二球分割型への変形は、コロイド粒子の体積分率に依存するコロイド粒子の自由エネルギーと膜の弾性エネルギーの競合によりそれぞれの安定状態へ移行するものと考察した。扁球形から二球分割型となり再び扁球形へと変形するパターンは、エネルギー的に準安定の形状に向かって変形する過程が、内部のコロイド粒子の運動と膜の変形挙動の緩和時間が異なることで生じると示唆された。

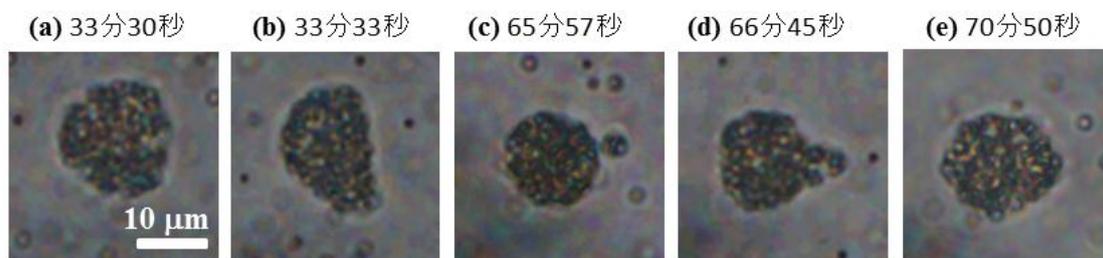


図2. 扁球形から二球分割型となり再び扁球形をとるコロイド粒子内包型GVの位相差顕微鏡像。

さらに、以上のGV内部のコロイド粒子の自由エネルギーと膜の弾性エネルギーの競合のみでは説明できない特異的な変形パターンも現れることもわかった。これらは体積分率が10 vol%前後のコロイド粒子内包型GVで顕著に観測された。これらの変形過程において、

コロイド粒子が GV 内部で不均一に分散していることが観測されたため、何らかのきっかけにより GV 内部でコロイド粒子の一部が凝集形態となり、残りのコロイド粒子との共存状態になることが変形の要因であると考察した。特に、ポリゴン様構造では、コロイド粒子凝集体は排除体積効果により GV 膜に隣接し、膜を裏打ちする。これと同時に、膜に対して浸透圧効果（ドナン膜電位）がかかるので、GV 内部に水が流入し、裏打ちされていない膜の一部が突起を形成すると考えられる。

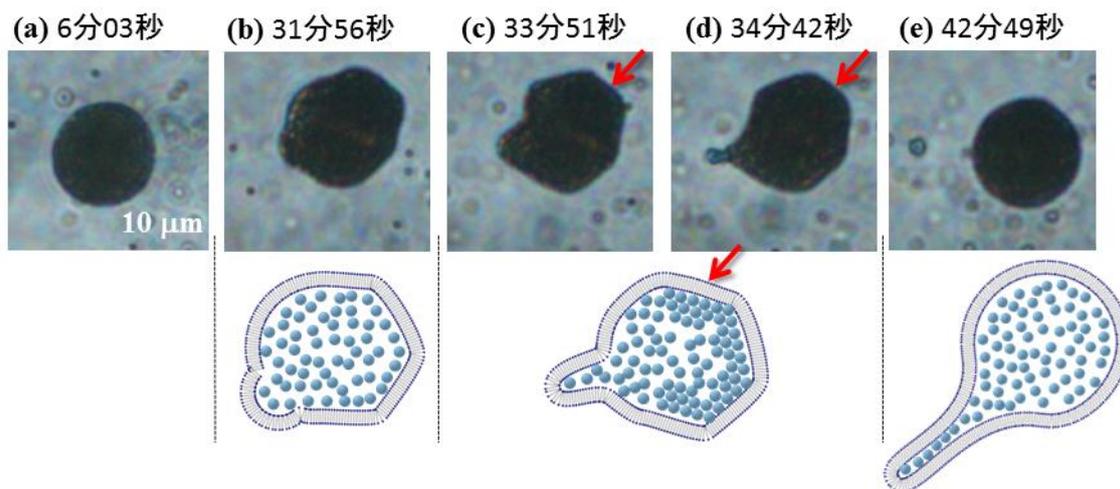


図3. ポリゴン様構造(矢印)を示すコロイド粒子内包型 GV の位相差顕微鏡像と模式図。

その他に、コロイド粒子の一部を放出する挙動や、球形から2つの異なる体積分率の小球へ分割する挙動も観測された。これらのメカニズムも、GV 内部に形成されたコロイド粒子凝集体の浸透圧効果と排除体積効果に起因すると考えられる。本章の最後に、このような内部コロイド粒子の状態変化のきっかけは、アルダー転移であることを提案した。本実験結果は、高い体積分率でコロイド粒子が内包された GV で初めて観測される新奇ダイナミクスとして興味深いのみならず、細胞ダイナミクスのような多様な GV 変形が、単純な構成要因であるコロイド粒子の内部状態変化で誘導されることを見出した点で大きな意義がある。

【4. 光ピンセット法による GV 内コロイド粒子の捕捉】

前章で述べたコロイド粒子内包型 GV 変形には、高い体積分率で内包されたコロイド粒子が空間的に不均一に分散していることが重要であることが示唆された。このとき、内部コロイド粒子の変位や速度を追跡するのみならず、外部からコロイド粒子の変位や速度を操作することで、GV 内部のコロイド粒子の分散を変化させることを着想した。これに対して本研究は光ピンセット法を用いることとした。1064 nm の YAG レーザーを用いて光学系を構築しコロイド粒子内包型 GV は安定な状態のままで、内部コロイド粒子 1 個を捕捉できる条件を見出した。このとき、GV 内部でコロイド粒子の空間分布が GV 内で局在化する

ことが観測された。この局在化の原因は、焦点に合わなかったコロイド粒子の集団がレーザー光から非対称な輻射圧を受けることで初めて現れるものと考えられる。本研究で明らかになった、内部コロイド粒子の空間分布の不均一化は、第三章で観測された GV 変形のきっかけに相当する現象であり、それを光で制御できることを初めて示した点で極めて重要である。

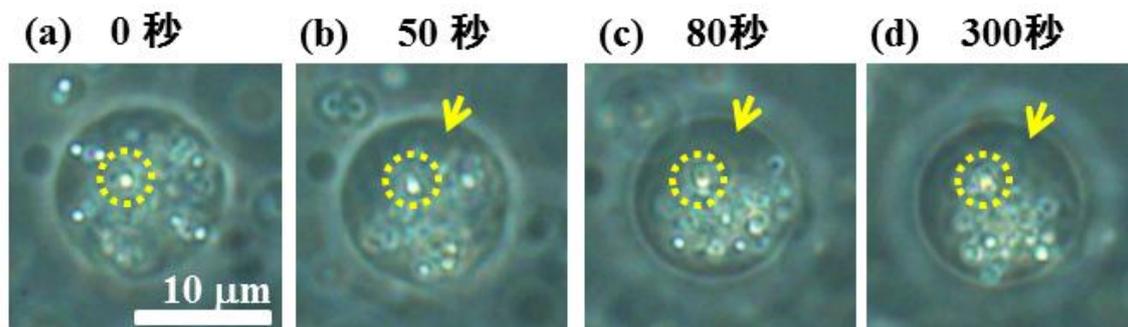


図4. 光ピンセット法で内部コロイド粒子を捕捉した(破線丸印)様子の位相差顕微鏡像。これにより、GV内でコロイド粒子集団が形成され、空間的に疎な部分(矢印)が現れた。

【5. 結論】

本研究の目的は、境界膜としてGV、その内包物としての剛体球粒子(コロイド粒子)を用いて細胞モデルの構築と変形機構の解明とした。油中水滴遠心沈降法に同一条件で0-45vol%の体積分率でコロイド粒子を内包したGVを調製する手法を確立した。さらに、トリガー溶液存在下でGV膜が弾性膜としてふるまう結果、体積分率および分散といった内部粒子の状態により、特異的なGV変形パターンが生じることを見出した。特に、アルダー転移に起因すると考えられる不均一分散する系は、内包された粒子間のこみあい効果の原理を説明しうる新たな実験モデルといえる。さらに、光ピンセット法により、GV内部でコロイド粒子の分散状態を偏らせることを可能にした。本研究成果は、細胞の機能発現の動作原理であるこみあい効果に対し、モデル構築の観点から細胞内動態の普遍則を導くステップになるものと期待される。

【6. 引用文献】

- [1] Ellis, R. J.; Minton, A.P. *Nature* **2003**, *425*, 27-28.
- [2] Dinsmore, A. D.; Wong, D. T.; Nelson, P.; Yodh, A. G. *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *80*, 409-412.
- [3] Natsume, Y.; Pravaz, O.; Yoshida, H.; Imai, M. *Soft Matter*, **2010**, *6*, 5359-5366.
- [4] Terasawa, H.; Nishimura, K.; Suzuki, H.; Matsuura, T.; Yomo, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, *109*, 5942-5947.