JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	非平衡下で駆動される荷電脂質膜の秩序と運動のカップリング
Author(s)	下川，直史
Citation	科学研究費助成事業研究成果報告書：1-6
Issue Date	2017-05-31
Type	Research Paper
Text version	publisher
URL	http://hdl.handle.net/10119/14321
Rights	
Description	若手研究(B)，研究期間：2014～2016，課題番号：26800222，研究者番号：20700181，研究分野：ソフトマター物理

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年　 ５ 月 ３１ 日現在

機関番号：１３３０２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2016
課題番号：２６８００２２２

研究課題名（和文）非平衡下で駆動される荷電脂質膜の秩序と運動のカップリング

研究課題名（英文）Coupling between order formation and motion of charged lipid membranes under nonequilibrium state

研究代表者

下川　直史（Shimokawa, Naofumi）

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：２０７００１８１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,600,000円

研究成果の概要（和文）：親水頭部に電荷を有する荷電脂質と電気的に中性な脂質を混合し作成した多成分荷電脂質膜での、相分離・膜変形を実験・理論・数値シミュレーションにより明らかにした。また、直流電場下での脂質エマルションの運動と２つのエマルションの融合挙動を明らかにした。荷電脂質間の静電相互作用を制御することで相分離構造と膜変形を実現した。これより、静電相互作用という複雑な相互作用下での秩序形成を明らかにした。本研究成果は生体機能の理解、工業的応用の基礎となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated the phase separation and the spontaneous membrane deformation in charged lipid membranes consisting of negatively charged lipids and neutral lipids by experimental, theoretical, and numerical simulation methods. Moreover, we analyzed the fusion and motion of W/O emulsions under DC electric field. The formation of phase-separated structures and membrane morphological changes can be induced by controlling the electrostatic interaction between charged lipids. From these findings, we revealed the order formation under the electrostatic interactions. These obtained results are expected to lead to understandings of various biocellular functions and foundations of industrial applications.

研究分野：ソフトマター物理

キーワード：相分離　膜変形　静電相互作用　リポソーム　脂質膜

１．研究開始当初の背景

コロイド・高分子・液晶・両親媒性分子・生体物質などの物質群はソフトマターと総称され、その工業的応用のみならず基礎物性や生体との関連性などから注目されている。平衡状態での秩序構造の研究は多くなされてきたが、複雑な相互作用下での秩序形成、非平衡条件下でのダイナミクス、多自由度の結合から表れる多様な物性に関する考察は重要であるが十分な理解には至っていない。

ソフトマターの代表例の一つである両親媒性分子は水中で様々な自己集合構造を形成する。リン脂質は両親媒性分子の一つであり、水中で膜状に自己組織化し二重膜を形成する。この脂質二重膜は細胞膜の基本構造と同一であるため、細胞のモデル系（リポソーム）として注目されている。特に飽和脂質・不飽和脂質から成る多成分リポソームでは、低温において飽和脂質に富む相と不飽和脂質に富む相とに相分離することが知られている。この相分離は細胞膜面上に形成されていると考えられているラフト構造との関係から広く研究がなされている。しかし、現在までのリポソームを用いた多くの研究では、電気的に中性なリン脂質を用いているが、細胞膜内には負に帯電したリン脂質が存在し膜電位の発生や、タンパク質の吸着において重要な働きをしている。

そのため、脂質間の相互作用から生じる、相分離・膜変形・運動を明らかにすることは、生体機能の理解に繋がると同時に、工業的な応用に向けた基礎研究と成り得ると言える。

２．研究の目的

本研究課題では負電荷脂質を含む脂質膜の物理的な性質を明らかにすることを目的とした。特に、静電相互作用という複雑な相互作用下での秩序構造形成、膜内での相分離と膜変形の結合といった多自由度が結合する現象、さらに脂質膜の運動と秩序形成の結合などを明らかにすることを目指した。

３．研究の方法

（１）荷電脂質膜の相分離

中性飽和脂質(DPPC)、負電荷飽和脂質(DPPG)、中性不飽和脂質(DOPC)、負電荷不飽和脂質(DOPG)、コレステロール(Chol)を用いた系での相分離を蛍光顕微鏡・共焦点レーザー顕微鏡により観察した。DOPC/DPPC の２成分をコントロールとし、DOPG/DPPC と DOPC/DPPG の相挙動を明らかにした。また、DPPC/DPPG/Chol の３成分系、DPPC/DPPG/DOPC/Chol の４成分系での観察も行った。また、塩として NaCl を用い、塩添加効果についても議論した。

（２）静電相互作用と脂質の相転移の結合を取り入れた理論モデル

（１）の実験結果に基づき、現象論的なモデルにより荷電脂質/中性脂質２成分系の相挙動を明らかにした。自由エネルギーとして、脂質の相転移を記述するエネルギー、相分離のエネルギー、静電自由エネルギーの３つを考慮した。その際、脂質分子体積が転移の前後で保存する仮定により、脂質の相転移と静電エネルギーが結合する新たな効果を取り入れた。モデルより、相図や分子面積変化を計算した。

（３）荷電脂質膜の自発的変形

（１）の DOPG/DPPC の系で相分離が起きた後、さらに温度を下げると膜面に穴（膜孔）が自発的に形成されることがわかった。このポア形成を蛍光顕微鏡観察により明らかにした。ポア形成における、脂質組成、温度、塩濃度、リポソームサイズ依存性を明らかにした。また、理論モデルによりポア形成を説明した。

（４）粗視化分子動力学シミュレーションによる相分離と変形

（１）と（３）の実験を詳細に議論するために、粗視化分子動力学シミュレーションにより荷電脂質/中性脂質２成分系での相分離と自発的膜変形を明らかにした。脂質の組成比や塩濃度を変化させた際の、相分離ダイナミクスを考察した。さらに、脂質間相互作用と塩濃度を変化させた際の脂質膜変形を明らかにした。

（５）直流電場下でのエマルションの融合

リン脂質で覆われ油中で分散している水滴を W/O エマルションと言う。W/O エマルションに針状の電極により直流電流を流すと、電極間を往復運動することが知られている。この往復運動を利用し、複数のエマルションを衝突させ融合させ、その様子を位相差顕微鏡・蛍光顕微鏡により観察した。脂質として DOPC と DPPC、油としてオリーブオイルを用いた。水相にはポリスチレン粒子、デキストランなどを分散、溶解させた。

（６）張力印可による荷電脂質膜の相分離

中性脂質 DPPC、負電荷脂質 DOPS から成る２成分脂質膜に浸透圧により張力を印可し相分離を誘起させ、蛍光顕微鏡・共焦点レーザー顕微鏡により観察した。グルコースにより濃度差をつけ、浸透圧を誘起させた。脂質の局在を観察するために、Rhodamine-DHPE、NBD-PE、Nile-red の各蛍光試薬を用いた。

４．研究成果

（１）荷電脂質膜の相分離

DOPG/DPPC の系は中性脂質のみから成る DOPC/DPPC の系に比べて相分離しにくい結果を得た。これは相分離した際に DOPG に富んだ相を形成すると DOPG 間の静電反発により自由エネルギーの増加を引き起こすため、相分離が阻害されたと考えれる。塩を添加すると、この静電反発が和らぐために DOPC/DPPC の相挙動に近づくことがわかった。しかし、興味深いことに DOPC/DPPG の系は DOPC/DPPC よりも相分離しやすいことが示された。さらに、塩を添加すると相分離が阻害され、DOPC/DPPC の相挙動に近づいた。この結果から DPPG 間には静電反発を上回る強い静電相互作用由来の引力が働いていることがわかる。我々はカウンターイオンを介した引力を提唱した。これは仮説であり今後追実験により明らかにする必要がある。これらの相挙動は図１にまとめた。

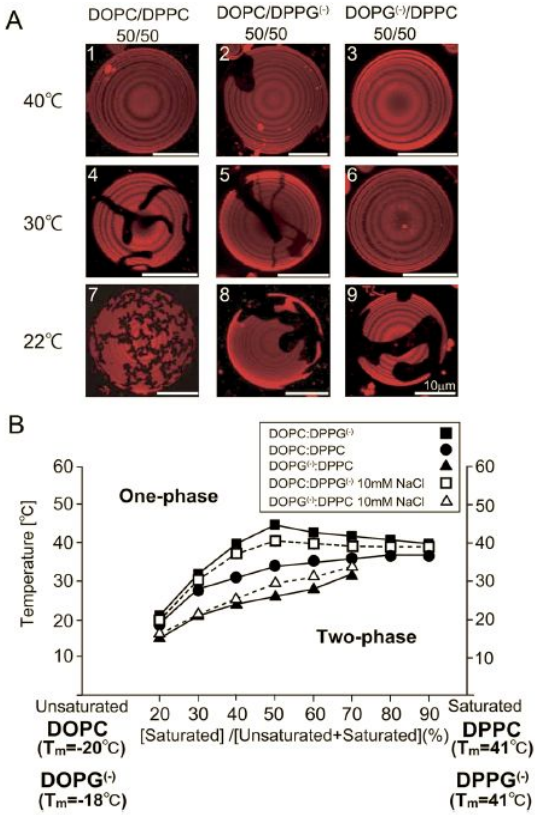

図１：顕微鏡画像と作成した相図

DPPC/DPPG/Chol でも塩を添加すると相分離が阻害されることが示され、DPPG の存在が相分離を促進し、そこへ塩が添加されると相分離の傾向が弱まることが示された。さらに、DPPC/DPPG/DOPC/Chol では特異的な三相共存が観察された。

（２）静電相互作用と脂質の相転移の結合を取り入れた理論モデル

荷電脂質膜の相分離理論の多くは相分離と静電相互作用を考慮したモデルがほとんどであった。しかし、脂質の転移を取り入れたモデルは中性脂質では提案されているものの、荷電脂質の系ではなかった。特に（１）において DOPG/DPPC と DOPC/DPPG と飽和脂質・不飽和脂質のどちらに電荷があるかによって相挙動が大きく変化することが明らかになったため、脂質の転移を考慮したモデルは重要である。そこで、脂質の相転移のエネルギーも取り入れた理論モデルを提案した。特に、分子体積が保存する仮定をすることで、相転移と静電エネルギーが結合する新しい効果を取り入れた。

その結果、荷電飽和脂質/中性不飽和脂質と中性飽和脂質/荷電不飽和脂質で相挙動が大きく異なることが示された。また、分子面積の計算により転移の前後で荷電脂質特有の面積変化があることが示された。

（３）荷電脂質膜の自発的変形

DOPC/DPPC や DOPC/DPPG の系では温度を変化させてもリポソームは球状を維持する。しかし、DOPG/DPPC の系では温度を下げると相分離が形成され、さらに温度を下げると膜面に穴（膜孔）が形成されることがわかった。この膜孔が小さいときはカップ型、大きくなるとボウル型、完全に開くとディスク型となる（図２）。

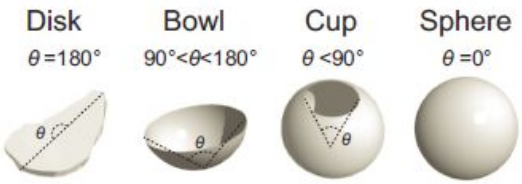

図２：膜孔形成の模式図

膜孔は、DPPC の組成比が大きいとき・低温・低塩濃度・小さいリポソームのときに形成されやすいことがわかった。これらは膜孔を形成した際の縁のラインエネルギーと膜面を曲げる曲率エネルギーのバランスから説明することができる。さらに、膜孔の縁は荷電脂質により安定化されていることが予想される。

分子レベルでの振舞いを明らかにするために粗視化分子動力学シミュレーションにより膜孔形成を再現した。その結果、膜孔の縁に荷電脂質が集まっている様子が明らかになり、実験結果を強くサポートしていることがわかった。

（４）粗視化分子動力学シミュレーションによる相分離と変形

（１）（３）の実験結果をより詳細に議論するために、粗視化分子動力学シミュレーションにより荷電脂質膜の相分離と変形を明らかにした。脂質は１つの親水性ビーズと２つの疎水性ビーズがばねにより直線的に繋がっている模型により粗視化した。脂質 A：脂質 B＝２５００：２５００のとき、A、B ともに中性脂質の場合の相分離ダイナミクスはスピノーダル分解型となる。脂質 A が荷電脂質で塩濃度が十分に高いときは中性脂質と同じ振る舞いを示したが、塩濃度が低くな

ると、核成長型のダイナミクスを示すことがわかった。脂質 A:脂質 B＝１５００：３５００では低塩濃度において相分離ドメイン形成の遅延が見られ、さらに時間の 0.4 乗に比例する特徴的なドメイン成長則が見出された。

また、脂質間相互作用と塩濃度を様々変化させた際に膜形状変化を明らかにした。その結果、球状・ディスク状・ひも状・バイセル状と様々な形態を形成することがわかった（図３）。また、膜孔形成においては、荷電脂質が膜内で傾く動きがきっかけになり、荷電脂質に富んだ相から膜孔が形成される分子メカニズムが明らかになった。

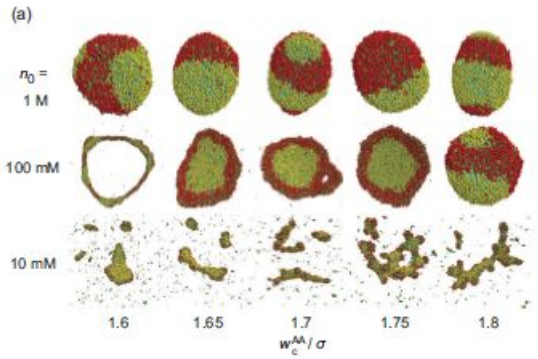

図３：リポソームの形態変化。赤が荷電脂質、黄色が中性脂質。荷電脂質間相互作用と塩濃度を変化させた。

（５）直流電場下でのエマルションの融合

予備実験として、W/O エマルションに直流電流を印可することで往復運動を確認した。電圧が低いと電極間に引き込まれるエマルションが少なく融合が起きにくかった。また、電圧が高すぎるとエマルションが電極間で安定に往復運動しなかった。そのため、融合に最適な電圧(60V)を求め、その電圧で実験を行った。

エマルションの融合を利用し、脂質分子の拡散係数、内水相の拡散係数を求めた。脂質分子の拡散は蛍光褪色法より求めた値とよい一致を示した。また、内水相の拡散では、拡散係数既知の物質の測定から、融合により内水相に流れが生じ拡散が速まることがないことを確認した。そのため、物質の単純拡散を容易に測定することができた。また、ポリスチレンビーズを封入した際には、固体粒子が膜面に吸着することで、融合を阻害することがわかった。

（６）張力印可による荷電脂質膜の相分離

生体内は等温系であると見なすことができる。しかし、多くの相分離研究は温度変化により相分離を誘起している。荷電脂質膜では塩の添加により等温条件下で相分離構造形成を制御できる。さらなる構造形成制御を目指し、張力印可による相分離の観察を行った。

DOPC/DPPC の系において浸透圧により膜に張力を印可すると、相分離が誘起されることが報告されている。その実験結果に基づき、荷電脂質 DOPS と DPPC の２成分系に浸透圧による張力を印可した。その結果、中性の系と同様に相分離が誘起された。興味深いことに、２成分系であるにも関わらず、三相共存構造が形成されることがわかった。この三相は DPPC に富む相、イオン化した DOPS(-)に富む相とイオン化していない DOPS(±)に富む相であることが示唆された。DOPS のカルボキシ基の pKa は 5.5 であるため、pH7 近辺ではイオン化していない DOPS が存在することがわかる。この親水頭部のイオン化に応じた相分離現象は非常に新しく興味深い現象であると言える。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計１３件）

① Naofumi Shimokawa, Rieko Mukai, Mariko Nagata, Masahiro Takagi, Formation of modulated phase and domain rigidification in fatty acids-containing lipid membranes, Physical Chemistry Chemical Physics, 査読有, vol.19, 2017, pp.13252-13263
DOI: 10.1039/C7CP01201B

② Neha Sharma, KeangOk Baek, Huong T. T. Phan, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi, Glycosyl chains and 25-hydroxycholesterol contribute to the intracellular transport of amyloid beta (Aβ-42) in Jurkat T cells, FEBS Open Bio, 査読有, in press
DOI: 10.1002/2211-5463.12234

③ 下川　直史、高木　昌宏、分子間の弱い相互作用と生体秩序-生体模倣膜の相分離構造、化学、査読無、vol.72、No.2、2017、pp.68-69

④ 下川　直史、高木　昌宏、生物、物理、数学の境界領域としての膜研究、生物工学会誌、査読無、vol.94、2016、pp.746-749
https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploadu/file/sbj/9412/9412_tokushu_1.pdf

⑤ 下川　直史、高木　昌宏、２次元・３次元膜ダイナミクスと細胞信号伝達、膜(MEMBRANE)、査読無、vol.41、2016、pp.233-239
DOI: 10.5360/membrane.41.233

⑥ Hiroaki Ito, Yuji Higuchi, Naofumi Shimokawa, Coarse-grained molecular dynamics simulation of charged lipid membranes: Phase separation and morphological dynamics, Physical Review E, 査読有, vol.94, 2016, 042611
DOI: 10.1103/PhysRevE.94.042611

⑦ Naofumi Shimokawa, Hiroki Himeno, Tsutomu Hamada, Masahiro Takagi, Shigeyuki Komura, David Andelman, Phase diagrams and ordering in charged

membranes: Binary mixtures of charged and neutral lipids, The Journal of Physical Chemistry B, 査読有, vol.120, 2016, pp.6358-6367
DOI: 10.1021/acs.jpcb.6b03102
⑧ Ryuichi Okamoto, Naofumi Shimokawa, Shigeyuki Komura, Nano-domain formation in charged membranes: Beyond the Debye-Hückel approximation, Europhysics Letters, 査読有, vol.114, 2016, 28002
DOI: 10.1209/0295-5075/114/28002
⑨ Hiroki Himeno, Hiroaki Ito, Yuji Higuchi, Tsutomu Hamada, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi, Coupling between pore formation and phase separation in charged lipid membranes, Physical Review E, 査読有, vol.92, 2015, 062713
DOI: 10.1103/PhysRevE.92.062713
⑩ Ko Sugahara, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi, Destabililzation of phase-separated structures in local anesthetic-containing model biomembranes, Chemistry Letters, 査読有, vol.44, 2015, pp.1604-1606
DOI: 10.1246/cl.150636
⑪ Naofumi Shimokawa, Mariko Nagata, Masahiro Takagi, Physical properties of the hybrid lipid POPC on micrometer-sized domains in mixed lipid membranes, Physical Chemistry Chemical Physics, 査読有, vol.17, 2015, pp.20882-20888
DOI: 10.1039/C5CP03377B
⑫ Huong T. T. Phan, Mun'delanji C. Vestergaard, KeangOk Baek, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi, Localization of amyloid beta (Aβ1-42) protofibrils in membrane lateral compartments: Effect of cholesterol and 7-Ketocholesterol, FEBS Letters, 査読有, vol.588, 2014, pp.3483-3490
DOI: 10.1016/j.febslet.2014.08.007
⑬ Hiroki Himeno, Naofumi Shimokawa, Shigeyuki Komura, David Andelman, Tsutomu Hamada, Masahiro Takagi, Charge-induced phase separation in lipid membranes, Soft Matter, 査読有, vol.10, 2014, pp.7959-7967
DOI: 10.1039/C4SM01089B

〔学会発表〕（計１９件）
① 下川 直史、向井 梨恵子、長田 真理子、高木 昌宏、飽和脂肪酸添加による脂質膜ドメインの硬化、日本物理学会第 72 回年次大会、2017 年 3 月 20 日、大阪大学豊中キャンパス（大阪府・豊中市）
② 山本 遼太、下川 直史、高木 昌宏、浸透圧による膜張力が促進する荷電脂質膜の相分離、日本物理学会第 72 回年次大会、2017 年 3 月 20 日、大阪大学豊中キャンパス（大阪府・豊中市）
③ 伊藤 弘明、樋口 祐次、下川 直史、荷電脂質ベシクルの膜内相分離と形態変化の粗視化シミュレーション、日本物理学会第 72 回年次大会、2017 年 3 月 18 日、大阪大学豊中キャンパス（大阪府・豊中市）
④ 山本 遼太、下川 直史、高木 昌宏、荷電脂質膜における浸透圧誘起の相分離、日本物理学会 2016 年秋季大会、2016 年 9 月 16 日、金沢大学角間キャンパス（石川県・金沢市）
⑤ 下川 直史、向井 梨恵子、長田 真理子、高木 昌宏、脂肪酸添加による脂質二重膜での相分離構造制御、日本物理学会 2016 年秋季大会、2016 年 9 月 13 日、金沢大学角間キャンパス（石川県・金沢市）
⑥ 下川 直史、向井 梨恵子、長田 真理子、高木 昌宏、脂肪酸を含む脂質混合膜のドメイン形成、日本物理学会第 71 回年次大会、2016 年 3 月 22 日、東北学院大学泉キャンパス（宮城県・仙台市）
⑦ 佐々木 秀彰、下川 直史、高木 昌宏、電場による脂質エマルションの融合解析、日本物理学会第 71 回年次大会、2016 年 3 月 22 日、東北学院大学泉キャンパス（宮城県・仙台市）
⑧ Naofumi Shimokawa, Physical properties of the hybrid lipid POPC on micrometer-sized domains in mixed lipid membranes, International Symposium Bioscience and Biotechnology in JAIST, 2016 年 3 月 18 日, 石川ハイテク交流センター（石川県・能美市）
⑨ 下川 直史、向井 梨恵子、長田 真理子、高木 昌宏、オレイン酸添加による脂質膜面上のパターン形成、日本物理学会 2015 年秋季大会、2015 年 9 月 18 日、関西大学千里山キャンパス（大阪府・吹田市）
⑩ 佐々木 秀彰、下川 直史、高木 昌宏、電場下における脂質エマルションの融合、日本物理学会 2015 年秋季大会、2015 年 9 月 18 日、関西大学千里山キャンパス（大阪府・吹田市）
⑪ Naofumi Shimokawa, Hiroki Himeno, Hiroaki Ito, Yuji Higuchi, Tsutomu Hamada, Masahiro Takagi, Coupling between pore formation and phase separation in charged lipid membranes, Physics of Cells: From Molecule to Systems (PhysCell 2015), 2015 年 9 月 2, 3 日, バート・シュタッフェルシュタイン（ドイツ）
⑫ Naofumi Shimokawa, Mariko Nagata, Masahiro Takagi, Physical properties of the hybrid lipid POPC on micrometer-sized domains in mixed lipid membranes, International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium 2015, 2015 年 8 月 22 日, 京都大学芝蘭会館稲盛ホール（京都府・京都市）

⑬　下川　直史、静電相互作用が作る脂質膜の構造と形状、「分子ロボティクス研究会」2015 年 7 月月例研究会（北陸）、2015 年 7 月 24 日、石川県四高記念文化交流館（石川県・金沢市）
⑭　下川　直史、姫野　泰輝、濱田　勉、高木　昌宏、好村　滋行、David Andelman、静電効果と脂質の相転移の結合を取り入れた荷電脂質膜の相分離、日本物理学会第 70 回年次大会、2015 年 3 月 22 日、早稲田大学早稲田キャンパス（東京都・新宿区）
⑮　姫野　泰輝、下川　直史、濱田　勉、高木　昌宏、脂質分子の電荷が引き起こす膜構造変化と塩添加の影響：膜孔形成と相分離構造とのカップリング、日本物理学会第 70 回年次大会、2015 年 3 月 22 日、早稲田大学早稲田キャンパス（東京都・新宿区）
⑯　下川　直史、長田　真理子、高木　昌宏、ハイブリッド脂質を含む多成分混合脂質膜の相挙動、日本物理学会 2014 年秋季大会、2014 年 9 月 7 日、中部大学春日井キャンパス（愛知県・春日井市）
⑰　姫野　泰輝、下川　直史、濱田　勉、高木　昌宏、荷電脂質を含むベシクルにおける膜孔形成と相分離構造とのカップリング、日本物理学会 2014 年秋季大会、2014 年 9 月 7 日、中部大学春日井キャンパス（愛知県・春日井市）
⑱　Naofumi Shimokawa, Mariko Nagata, Masahiro Takagi, Phase separation in lipid membranes containing hybrid lipid POPC, Biomembrane Days 2014, 2014 年 9 月 1 日, ベルリン（ドイツ）
⑲　Hiroki Himeno, Naofumi Shimokawa, Shigeyuki Komura, David Andelman, Tsutomu Hamada, Masahiro Takagi, Charge-induced phase separation in lipid membranes, Biomembrane Days 2014, 2014 年 9 月 1 日, ベルリン（ドイツ）

〔図書〕（計２件）
①　下川　直史、高木　昌宏、シーエムシー出版、人工細胞の創製とその応用、2017、pp.117-126
②　下川　直史、テクノシステム株式会社、材料表面の親水・親油の評価と制御設計、2016、pp.531-539

〔その他〕
ホームページ等
https://sites.google.com/site/naofumishimokawa/

６．研究組織

(1)研究代表者
下川　直史（Shimokawa, Naofumi）
北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教
研究者番号：２０７００１８１