

人工細胞システムの創成と構造制御

濱田 勉¹⁾, 市川 正敏²⁾

生命の最小ユニットである細胞は、約5ナノメートルの厚さの脂質膜により覆われ、その構造をダイナミックに変化させる。本稿では、細胞サイズの人工膜小胞（リポソーム、液滴）を用いた最新の細胞モデル実験を紹介する。まず膜の弾性的性質を説明し、膜のダイナミクス計測および制御の実験を述べる。そして、膜と機能分子との相互作用解析、膜との相互作用により発現する分子複合システムの微小空間特性について議論する。

1. はじめに

生命の最小ユニットである細胞は、分子が集積した10~100マイクロメートル程度の大きさの微小システムである。この生きた分子集積体は、約5ナノメートルの厚さの脂質膜により覆われ、その構造を形作っている。さらに真核細胞では、膜がさまざまな部屋（細胞内小器官）を仕切り、生体高分子が活動する階層的な空間を作り出す。また、この膜で仕切られた空間は、ダイナミックに変化し、部屋と部屋との間の物質輸送を可能とする（膜動輸送）。細胞内では至るところにこのような脂質膜の界面が存在するため、多くの生体分子は膜と相互作用し機能している。細胞というシステム機能を理解するには、膜で囲まれた微小空間における分子群の振る舞いを解析することが必要であるが、このような観点からの研究は数少ない。

我々は、このようなダイナミックな膜システムを人工的に創り出し、その物性解析を進めることで、生体分子を集積させた人工細胞システムの設計を進めている。マイクロ・ナノのサイズに閉じ込められた分子システムが、いかなる「物理的効果」を受けるのか、そしてそれをどのように設計にフィードバックさせるのか、「細胞サイズ空間で機能する分子システム」の物理学的本質の理解は、その設

計の可能性を大きく広げるだろう。本稿では、人工細胞システムの最新の研究成果について紹介する。

2. 人工細胞システム

1) 細胞サイズのリポソーム

ここでは人工細胞システムとして、細胞と同じスケールでのモデル実験が可能な細胞サイズのリポソームを用いる¹⁾。両親媒性の脂質分子は、水溶液中で疎水基を内側に並べて自己集合することで、2分子膜小胞（リポソーム）を形成する（図1a）。膜を構成する分子と分子の間には、ファンデルワールス相互作用や静電相互作用、疎水性相互作用などの比較的弱い力が働いているため、膜は外力に対して大きな変形や流動を示すソフトマター特性を備えている。

2) 細胞サイズの液滴

液滴とは、油の中に分散させた水滴である（図1b）。液滴表面の油水界面は脂質の単分子膜で覆われ、リポソームと同様に細胞内を模倣した空間を作ることができる¹⁾。液滴はリポソームと比較して物理的な力に強く、内部に生体高分子を容易に封入し観察することが可能である利点を持つ。

また、この液滴が油水界面を通過し水相に移行すると、リポソームが作製される。液滴を覆う単分子膜がリポソーム2分子膜の内層となり、油水界面を覆う単分子膜が外層となる。つまり、非対称な2分子膜を備えたりポソームの作製が可能となる。我々は、この液滴からリポソームへの移行ダイナミクスの詳細を検討し、実験と理論の両面から移行メカニズムを明らかにした。10 μm 程度という大きさが、液滴からリポソームへの移行に最も効率がよいという

¹⁾北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科（〒923-1292 石川県能美市旭台1-1）

²⁾京都大学大学院理学研究科

Creation and manipulation of an artificial cellular system
Tsutomu Hamada¹⁾ and Masatoshi Ichikawa²⁾ ⁽¹⁾School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science & Technology, 1-1 Asahidai, Nomi, Ishikawa 923-1292, Japan,
⁽²⁾Graduate School of Science, Kyoto University)

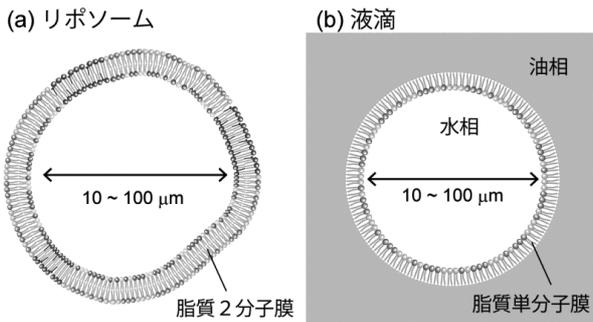


図1 細胞サイズのリポソーム (a) と液滴 (b)

結果が得られた²⁾。これにより、人工細胞作製効率の向上が望めるとともに、原初の細胞がどこから来たのか、という問いに対して新しいストーリーを想像させる。原始の地球に、もしも有機物の「油」が液体として存在し、水に接していたならば、そこから10 μm程度の細胞のようなモノが生まれえたとも言えるからだ。

3. 膜のダイナミクス測定と制御

1) 膜のダイナミクス測定

細胞サイズのリポソームの変形ダイナミクスの話に移る前に、その基礎部分をまずは議論したい³⁾。リポソームに適度な変形を加えると、元の球形に戻そうという力が働く。この力は膜の曲げ剛性を源としており、実際に元に戻そうと働くエネルギーは数~数十 $k_B T$ 程度である。ナノリポソームであれば、何か工夫を加えた場合を除き、球形に戻るエネルギーとしては十分である。しかし、面積 ($\sim R^2$) と曲率の2乗 ($\sim 1/R^2$) の双方に比例する曲げ剛性エネルギーは、変形形状が相似なら、ナノでもマイクロでも元に戻ろうとするエネルギーは変わらない。直感的な言葉でいえば、大きなリポソームほど「やわらかい」。これが、ナノリポソームと異なり、細胞サイズのリポソームの形態変化が非常に多様で面白いものとなる理由である。

この細胞サイズリポソームの形態変化であるが、脇道に逸れることを承知で、短くではあるが、日本の宝谷グループの研究が先駆的な役割を果たしたことを紹介しておきたい。彼らは、浸透圧変化によってリポソーム内部体積を調整し、そのときの形態変化を慎重に観察することにより、

その多種多様な形態と、そこに至る特徴的な変形経路を発見した⁴⁾。この発見を契機にして、リポソームの形態に関する理論的研究と、実験的研究が大きく進展した。

さて、このような興味深いリポソームの大変形以外に、熱揺らぎによる変形も、細胞サイズリポソームでは顕在化する。この点に着目して、膜の物性を測定した研究がある⁵⁾。膜が揺らいでいるようすを顕微鏡で直接観察し、その「揺らぎ」を統計処理することで、曲げ弾性係数を得る。マイクロピペットによる吸引や光ピンセットによる伸長⁶⁾を利用した測定に対して、非侵襲的である。しかし、実際に細胞膜の熱揺らぎの大きさを測ると、数十~数百 nm 程度であり、通常の光学顕微鏡で測ることは難しい。それに対して我々は、膜の局所構造の揺らぎから同様の測定が可能であろうと見込み、細胞の中にも登場する局所構造として、脂質膜のナノチューブの定式化を試みた(図2)。ここでは、チューブ主軸の曲げと脂質膜の円筒の弾性エネルギーを計算することにより、 $\kappa = k_B T l / 2\pi R$ という式を得た⁷⁾。これは、動的散乱でブラウン運動から粒子の大きさを計算するのに用いられるアインシュタイン・ストークスの式と相似のものである。膜の曲げ剛性率 κ が既知なら、チューブの揺らぎの持続長 l からチューブの太さ R を導くことができ、逆もまた然りである。チューブが細ければ、熱揺らぎ程度でも大きく曲がるので測定にも都合がよい。次に、この式をF-BARというタンパク質ドメインが誘起するチューブ構造に適用した⁸⁾。F-BARはエンドサイトーシスなどの膜変形時に働くタンパク質群を持つ特徴的なドメインであり、細胞の中で強発現させると、内部をチューブだらけにするものもある。これを細胞サイズリポソームにふりかけると、細胞内と同じ太さで、脂質のナノチューブが形成される。この再構成したナノチューブに先の式を適用することで、チューブの「かたさ」が明らかになり、F-BARファミリー内での分子系統樹との相関が議論できるようになった。これは、電子顕微鏡写真などから推測されている、F-BAR どのの会合によるチューブ構造の強化を定量化したものといえる。

2) 膜のダイナミクス制御

ここまでは脂質膜の揺らぎや変形を手がかりに物性測定を行う方法を紹介した。次に、その変形を制御することを

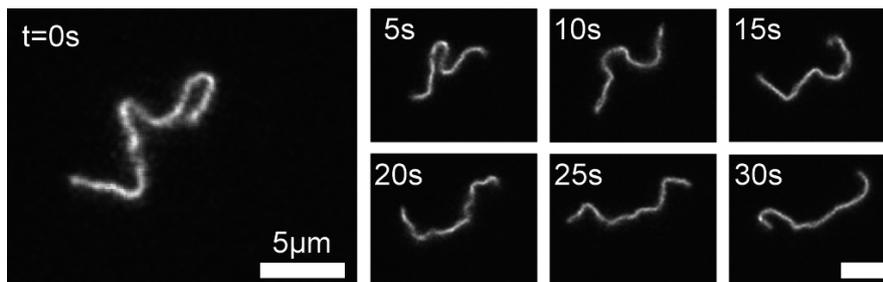


図2 ブラウン運動する脂質ナノチューブ
山本暁久氏よりご提供いただいた。

考えてみる。脂質膜の安定性は、弾性エネルギーにより記述される。すなわち、膜のエネルギー状態や弾性特性を活用することで、膜の構造や動きを操ることが可能となる。我々は、光応答性を備える分子を膜に導入することで、膜の物性を制御し、細胞系を模倣した膜のダイナミクスを操ることに成功している。この光応答性分子 KAON (*N*-[4-[4'-*N,N*-ビス-[3-(*N*-リシルアミノ)プロピル]アミノカルボニル]フェニルアゾ]フェノキシアセチル]ジドデシルアミン) は、アゾベンゼンを含み、紫外光照射で *cis* 体に可視光照射で *trans* 体に光異性化する。

まず、膜表面における脂質分子の分布の制御について述べる。生体膜は多成分の脂質分子からなるため、さまざまな相転移温度を有する脂質が混在している。よって、膜面内で相分離が生じ、秩序相と無秩序相が共存した状態が形成される。この相分離により形成された領域は、脂質ラフトなどと呼ばれる生細胞膜上の分子認識場と成分が殆ど同一である。飽和脂質・不飽和脂質・コレステロールからなる人工膜リポソームで、このラフト様の相分離構造を観察することができる。我々は、この膜系に光応答性分子 KAON を導入し、光で分子形状をスイッチすることで、相分離の生成・消滅を可逆的にコントロールすることに成功している (図 3a)⁹⁾。相分離 (分子の偏り分布) の安定性は、異種の分子間に生じる結合エネルギーの大きさに起因する。これは、分子間の相互作用をデザインすることで、相分離構造を制御できることを意味する。我々の制御システムは、脂質分子と KAON 分子の結合エネルギーが、*trans* 体と *cis* 体で異なることを利用している。

また、膜の形についても、光による制御システムを構築している。その一つは膜小胞の開閉である。この動きは、細胞内の膜動態として知られるオートファジー機能を模倣したものである。KAON 分子は親水部が大きいコーン型の形状であるため、2 分子膜の縁に局在し、膜面に開いた穴を安定化させる傾向がある。膜の弾性エネルギーの観点からは、膜面に開いた穴を閉じる力 (線張力) を減少させる効果を持つといえる。ただし、*trans* 体から *cis* 体に分

子形状が変化すると、KAON 分子間のパッキングが乱され、線張力がやや増加する。2 分子膜の縁の揺らぎ運動から測定した線張力値は、*trans* 膜で 0.05 pN、*cis* 膜で 0.2 pN であった。この線張力の増減を利用して、開いた「円盤」と閉じた「球」との間で膜形状を光コントロールできる (図 3b)^{10,11)}。

4. 分子複合システムの設計

1) 細胞サイズ空間の分子システム挙動

さて、細胞やその中で微小空間の効果が出てくるとしたら、主役になるのはおそらく膜である。単位体積あたりの膜接触面積が増大するマイクロ空間では、膜と機能分子との相互作用の比重が大きくなるのが直感的に想像できる。では、どんなことが起こりうるだろうか。図 4 は DNA とアルギン酸の混合溶液を液滴の中に封入した実験と数理モデルの模式図である¹²⁾。この二つの分子はより高濃度で互いに相分離する性質を持っているが、一様条件の混合溶液を封入すると、サイズ依存的に相分離が誘起された。大きな液滴内では、DNA と膜界面はむしろ斥力的条件にあることに注目すると、単純な挙動ではないことがわかる。実験の傾向を説明できる数理モデルを検討したところ、仮に 1 分子あたりの膜との引力相互作用が吸着するには弱くとも、相分離という協同現象がサイズ依存の性質を持つため、細胞サイズを境に現実の構造として現れうることが明らかになった。弱い相互作用が協同現象を通じて大きな駆動力となり、サイズ効果が反映された例である。

2) ヘテロな膜表面と分子の相互作用

前項で、膜と機能分子の相互作用が微小空間の分子システム挙動にとって重要であることを述べた。これは、膜の表面特性の変化が、生体分子システムの構造や機能に大きな影響を及ぼすことを示唆する。特に、生体膜は相分離により流動性の異なる領域が共存したヘテロな界面である。我々は、このような膜のヘテロ性が機能分子との相互作用

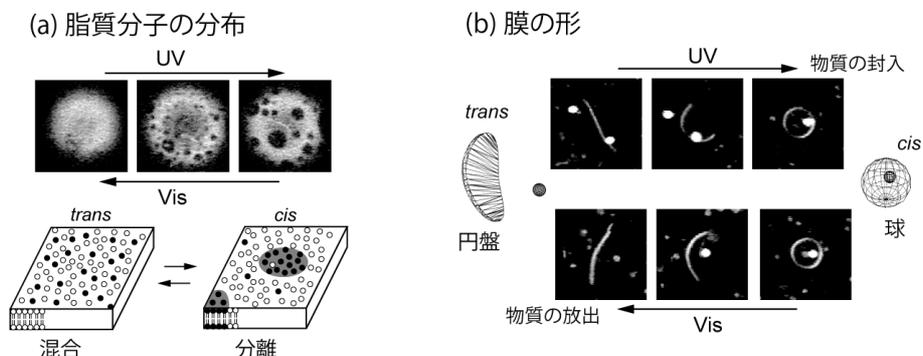


図 3 膜ダイナミクスの制御系

(a) 膜面上の脂質分子の分布 (相分離) の光制御. (Adapted from Ref. 9 with permission from The Royal Society of Chemistry)

(b) 膜の形の光制御. 膜の開閉により、物質の封入・放出を可能とする. (Adapted with permission from Ref. 10, Copyright 2010 American Chemical Society)

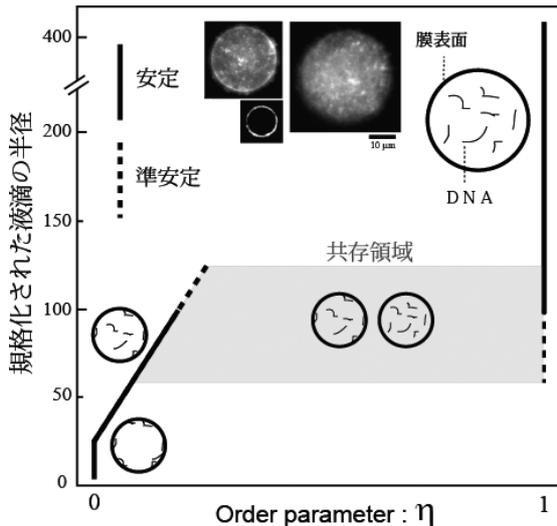


図4 微小液滴に封入したDNAとアルギン酸と、安定状態を計算した結果の模式図⁸⁾
 η が1のときはDNAが内部で分散していることを示し、0のときはすべてのDNAが膜表面に吸着することを示す。縦軸の単位はDNAのクーン長100 nmを想定している。

に与える影響に着目した。ヘテロな膜構造を備えたりポソームを作製し、さまざまな機能分子との相互作用を調べた。これまでに、ナノ粒子がそのサイズに依存して、吸着する膜領域を変化させることを見いだしている^{13,14)}。小さい粒子は膜の秩序相に、大きい粒子は膜の無秩序相に選択的に吸着する(図5)。また、自己会合性のペプチド(アミロイドベータ)は、その会合度に応じて、局在する膜領域を変化させた¹⁵⁾。数理モデルによる考察の結果、膜の弾性特性である「曲げのエネルギー」と「膜揺らぎのエントロピー」が、この膜によるサイズ依存的な物質認識機能を支配していることが示された。

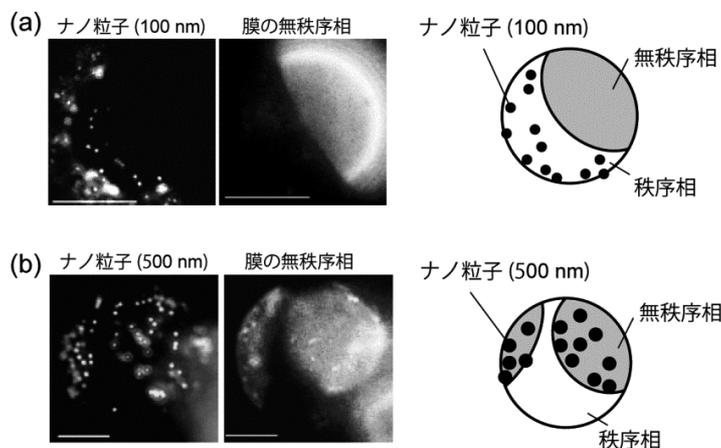


図5 ヘテロな膜表面へのナノ粒子の吸着挙動
 小さい粒子は膜の秩序相に (a)、大きい粒子は膜の無秩序相に局在する (b)。(Adapted with permission from Ref. 13, Copyright 2012 American Chemical Society)

5. まとめ

本稿では、細胞サイズの膜小胞を用いた最新の人工細胞実験を紹介した。膜ダイナミクスの計測と制御、そして膜と機能分子との相互作用により発現する分子システム特性について述べた。今後の生命科学は、生体内で機能する分子を同定する研究から、分子集合体の機能システムを理解・設計する研究へとシフトするであろう。我々は、特にアクティブ(非平衡)な環境設定の下、分子集団が生み出す動的機能(細胞運動や細胞分裂など)の発現原理に迫りたいと考えている。

謝辞

北陸先端科学技術大学院大学の高木昌宏教授、大阪市立大学の長崎健教授、名古屋大学の瀧口金吾博士をはじめとする論文共著者の方々に深く感謝いたします。本研究は、科学研究費補助金およびサントリー生命科学財団の支援を受けて行われました。

文 献

- 1) Hamada, T. & Yoshikawa, K. (2012) *Materials*, 5, 2292–2305.
- 2) Ito, H., Yamanaka, T., Kato, S., Hamada, T., Takagi, M., Ichikawa, M., & Yoshikawa, K. (2013) *Soft Matter*, 9, 9539–9547.
- 3) サフラン, S.A. (2001) コロイドの物理学 (好村滋行訳), 吉岡書店.
- 4) Hotani, H., Inaba, T., Nomura, F., Takeda, S., Takiguchi, K., Itoh, T.J., Umeda, T., & Ishijima, A. (2003) *BioSystems*, 71, 93–100.
- 5) Faucon, J.F., Mitov, M.D., Méléard, P., Bivas, I., & Bothorel, P. (1989) *J. Phys. France*, 50, 2389–2414.
- 6) Shitamichi, Y., Ichikawa, M., & Kimura, Y. (2009) *Chem. Phys. Lett.*, 479, 274–278.
- 7) Yamamoto, A. & Ichikawa, M. (2012) *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.*, 86, 061905/1–6.

- 8) Tanaka-Takiguchi, Y.T., Itoh, T., Tsujita, K., Yamada, S., Yanagisawa, M., Fujiwara, K., Yamamoto, A., Ichikawa, M., & Takiguchi, K. (2013) *Langmuir*, 29, 328–336.
- 9) Hamada, T., Sugimoto, R., Nagasaki, T., & Takagi, M. (2011) *Soft Matter*, 7, 220–224.
- 10) Hamada, T., Sugimoto, R., Vestergaard, M.C., Nagasaki, T., & Takagi, M. (2010) *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 10528–10532.
- 11) 濱田 勉 (2012) 薬剤学, 72, 211–214.
- 12) Negishi, M., Ichikawa, M., Nakajima, M., Kojima, M., Fukuda, T., & Yoshikawa, K. (2011) *Phys. Rev. E Stat, Nonlin, Soft Matter Phys.*, 83, 061921/1–5.
- 13) Hamada, T., Morita, M., Miyakawa, M., Sugimoto, R., Hatanaka, A., Vestergaard, M.C., & Takagi, M. (2012) *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 13990–13996.
- 14) 濱田 勉 (2013) 生物物理, 53, 210–211.
- 15) Morita, M., Hamada, T., Tendo, Y., Hata, T., Vestergaard, M. C., & Takagi, M. (2012) *Soft Matter*, 8, 2816–2819.

著者寸描

● 濱田 勉 (はまだ つとむ)



北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科准教授。博士 (理学)。

■略歴 1978 年和歌山県に生る。2001 年大阪大学理学部物理学卒業。04 年日本学術振興会特別研究員 (DC2)。06 年京都大学大学院理学研究科物理学・宇宙物理学専攻修了。同年北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科助教。11 年より現職。

■研究テーマと抱負 ソフトマター物理学に基づく人工細胞設計の研究。生体高分子と膜がダイナミックに会合する原始細胞モデルを創り出し、操作することを目指している。

■ホームページ <http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/hamada/>

■趣味 本とアートと植物。

● 市川正敏 (いちかわ まさとし)



京都大学大学院理学研究科講師。博士 (理学)。

■略歴 1978 年大阪府に生る。2000 年京都大学理学部卒業。02 年日本学術振興会特別研究員 (DC1)。05 年京都大学大学院理学研究科修了・博士 (理)。同年九州大学理学研究院助教。09 年より現職。

■研究テーマと抱負 生命現象などの非平衡開放系での自己秩序形成に関する研究。生き物の中で使われている物理を明らかにしたいと考えています。現在のブームは細胞運動の再構成です。

■ホームページ <http://www.chem.scphys.kyoto-u.ac.jp/>

■趣味 旅行・写真・温泉。