

化学反応で複製する膜のリアルタイム観察

Microscopic Investigation of Self-Replication of Giant Vesicles

東大院・総合文化・広域科学専攻(菅原研究室)

豊田 太郎

1 膜・人工複製系・「観る」

マクロな物質はミクロな分子で構成されている。しかし分子集合体の性質は、個々の分子の持つ性質の総和では表されず、物性は往々にして分子間の相互作用が本質的に関わっている。これまでに繰り広げられた物性研究では、膜物性も含め、いずれもこの点に関心が持たれてきた。中でも、膜物性研究では、膜分子の協同的ダイナミクスが生体膜の本質的理解に欠かせない。特に近年注目されている研究に、ベシクル(後述)を用いた人工複製系モデルの構築がある⁽¹⁾。そこでは、外界と内部とを隔てる膜そのものの重要性が声高に謳われている。

マクロな膜もミクロな分子で構成されている。ミクロな分子の性質とマクロな膜の機能・ダイナミクスとの相関を研究するにあたり、最近光学顕微鏡でリアルタイム観察のできるジャイアントベシクルが、新たな膜物性の研究題材を提供していることに我々は注目した⁽²⁾。光学顕微鏡下でこのジャイアントベシクルを「観る」研究を通して、人工複製系モデルの構築という野心的なテーマの本質を垣間見ることができると考えたのである。本研究の目的は、我々の側から素性のわかった膜分子を用意し、かつ所定の条件を設定して、生命の基本的複製過程や進化・分化といった現象がいかにか現れるかを、リアルタイムに「観る」ことにある。

2 ジャイアントベシクルと両親媒性分子

ベシクルとは、両親媒性分子が自己集合して形成される袋状2分子膜である。従来でも粒径数十nmのベシクルの研究は行われていたが、近年では粒径が1 μm を越えるジャイアントベシクルの製法が開拓されている。細胞膜そのものも粒径が3~50 μm ほどのリン脂質二分子膜であることから、ジャイアントベシクルは最も単純な原始細胞モデル構築の礎となる。ジャイアントベシクルの最大の特徴は、分子集合体全体の振る舞いを、直接光学顕微鏡下でリアルタイム追跡できることにある。これにより、分子集合体としての膜が、外的環境に対しどのような適応を見せるのか、といったダイナミクスの解析が可能となる。

両親媒性分子とは、親水部(極性基)と疎水部(アルキル鎖)を有し、また分子構造的には単頭極性型のものと同頭極性型のものに区分される。前者の代表的なものは、細胞膜を構成するリン脂質であり、2分子膜を形成しうる。後者の代表的なものは、テトラエーテルリン脂質構造を有し、単分子膜を形成しうる。これは、80 $^{\circ}\text{C}$ を越える熱水でも生息する好熱性古細菌の種の細胞膜に含まれている。

ところで、洗剤やせっけんといった界面活

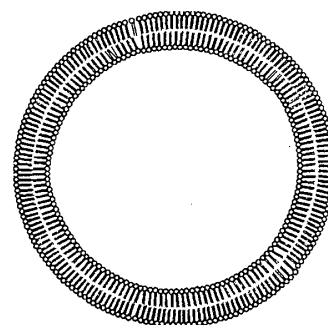


図1 両親媒性分子でできたベシクル

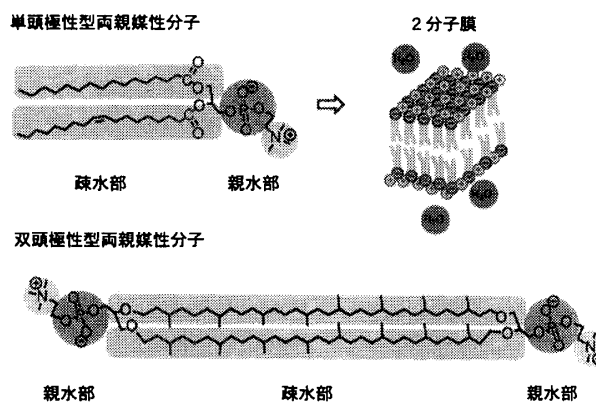


図2 単頭極性型両親媒性分子と双頭極性型両親媒性分子

性剤も両親媒性分子である。これらは水中でミセルという粒径数 nm の会合体を形成する。ミセルは一般に、乳化作用を示す。これは、自らの内部疎水場に油性物質を取り込むことで、水中に油性物質を溶け込ませるという作用である。洗濯洗剤のテレビCMで洗浄作用のリアルタイム観察の映像が流れることがしばしばあるが、油はミセルの乳化作用により、マイクロエマルジョンという光学顕微鏡では観測できないナノサイズまで細分化される。

3 ジャイアントベシクルを「観る」

明視野実体顕微鏡下では、粒径が 1 μ m 以上であっても染色していないジャイアントベシクルを観察することはできない。そこで、まず観測方法の検討を行った。無色透明で極薄なサンプルを、動いているままにリアルタイム観測するためには、特殊な光学フィルターを光学顕微鏡に用いることが多い。実際、サンプルを透過した光と周辺光との位相差を利用して、光学的にコントラストをつけて像として結ばせる位相差顕微鏡により、ジャイアントベシクルを明瞭に観察することができる。しかし、極薄な膜のダイナミクスは観にくい場合があるので、サンプル透過光の位相差に、さらに特殊プリズムによる位相差を干渉させ、コントラスト効果を増幅する微分干渉顕微鏡を、観測システムの屋台骨とした。また、動画記録用に、高性能 CCD ビデオカメラと高分解能モニターを付設することにより、観測者の目でとらえた画像と寸分違わないほど鮮明な動画を記録できるようなセットアップが完成した。

本研究では、化学反応により膜分子が生成され、膜そのものが複製される系を構築するのに、脱水縮合反応を利用することにした。脱水縮合反応は、反応物どうしが衝突して生成物になる際、水分子が脱離する反応であり、一般に平衡反応である。よって、疎水的な環境下ではこの反応の平衡はより生成物側に移動すると期待される。では、会合しながら疎水場を形成する系は、たとえ系全体が水中であっても、脱水縮合反応を起こし、膜を構成しうる両親媒性分子を与えることができるだろうか。これを検証できた実験を、まず紹介したい。

ベンズアルデヒドを末端に有する油性物質 1 と、アニリンを末端に有する両親媒性分子 2 が、我々の研究室で合成された。両親媒性分子 2 は水中では二分子膜を構成せず、洗剤のようにミセルを形成することがわかった。そこで、ミセル 2 の分散液に 1 の油滴を垂らしたところ、微分干渉顕微鏡により、二分子膜からなるジャイアントベシクルが、油滴界面から形成する過程の観測に成功した。まず、ミセルを構成している反応部位を持った両親媒性分子 2 による 1 の油滴の乳化が起こる。その際、両親媒性分子 2 が油滴の疎水的反応場に引き込まれる。次いで、2 は 1 の油滴の中で素早く脱水縮合反応を起こして 3 という新しい膜分子を生成する。その結果、生成した 3 が自己集合化することで、油滴の縁にジャイアントベシクルが形成される。以上の観察により、水中であっても疎水的な環境さえ存在すれば、脱水縮合反応が起こることを確認することができた。

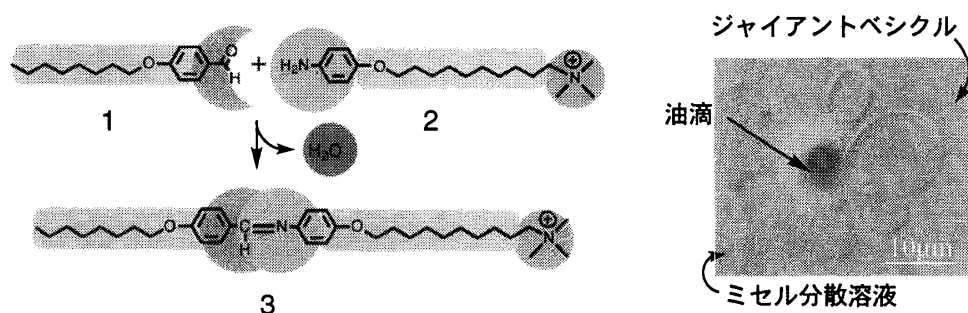
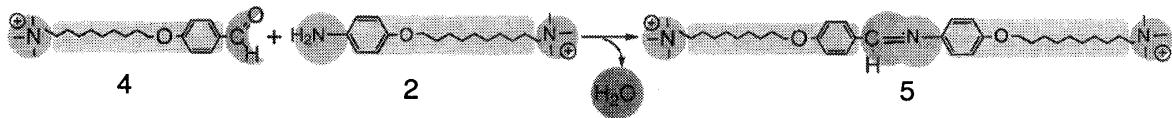


図3 油滴から脱水縮合反応で形成される膜

4 脱水縮合反応を伴うジャイアントベシクルの分裂

先の系では、反応物となる油相が疎水的反応環境となっている。そこで、いよいよ二分子膜中の疎水的反応場で、脱水縮合が起こる系の構築を試みた。ベンズアルデヒドを末端に有する両親媒性分子 4 を合成し、その分散液を調製した。数種のジャイアントベシクル作製法を試みたが、残念ながらジャイアントベシクルは生成せず、オイルエマルジョン様のものしか観察できなかった。ただし、4 の分散液と 2 の分散液を混合して、反応を NMR スペクトルにより追跡したところ、40 時間後には縮合体である 5 が変換率約 80%で生成してくることが判明した。



そこで、光学顕微鏡による膜形成反応の追跡を可能とするため、我々はジャイアントベシクル安定剤として二本のアルキル鎖を有する 4' を新たに合成した。この両親媒性分子 4' のみでは、我々の望むジャイアントベシクルはあまり生成せず、ミエリン様会合体ばかりが形成されるが、4 と 4' を混合させてベシクルを形成させたところ、5 : 1 の割合で混合した場合に、ジャイアント・ユニラメラ・ベシクルが多数生成することがわかった。

この結果を受け、4+4' のジャイアントベシクル溶液と 2 のミセル分散液とを混合する実験に移った。混合したときに起こる対流の抑制や、光学顕微鏡での追跡のしやすさから、カナル型混合プレパラートを利用することを検討した⁽³⁾。これは、スライドガラスとカバーガラスの間にスペイサーでカナル構造を作り上げたプレパラートで、上下に挟まれたカナルに溶液を流し込むと、毛細管現象によるマイルドな混合状態を達成することができる。

我々の顕微鏡観察法に最適化したカナル型混合プレパラートを用いて、ジャイアントベシクル溶液とミセル溶液を混合した。すると、35 分を経過したところで、ジャイアント・ユニラメラ・ベシクルの一部が 2 枚膜となり、その膜が徐々に成長して、過渡的にゆらいだ後に、もとのベシクルから分裂し、新たなジャイアントベシクルとして生成してくる過程を観測することができた。比較実験として、両親媒性アニリン 2 の代わりに脱水縮合反応できない両親媒性分子のミセル溶液を混合しても、そのようなドラスティックな形態変化を起こさないことから、分裂現象は、ミセル分子 2 がジャイアントベシクル分子 4 と脱水縮合反応したことに起因すると考えられる。脱水縮合反応によりジャイアントベシクルが複製する系は、本研究が初めてである。

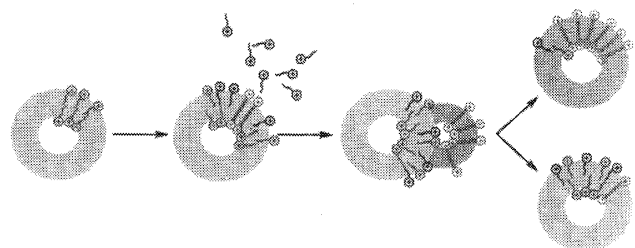
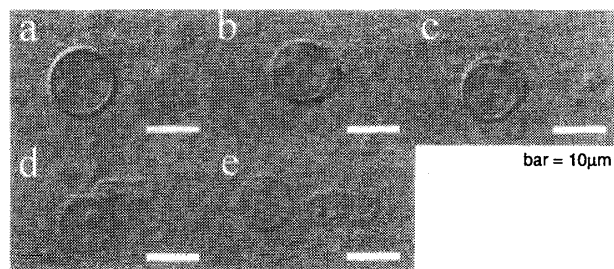
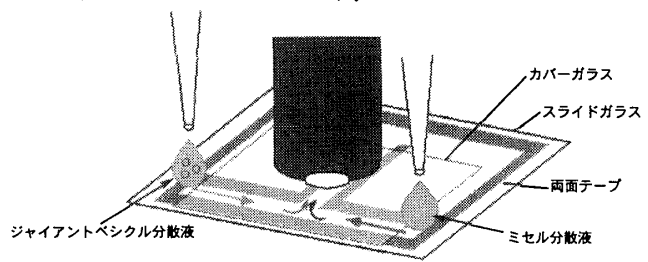


図 4 カナル型混合プレパラートと脱水縮合反応によるジャイアント母ベシクルの分裂のリアルタイム観察像及びその模式図

一般に、ジャイアントベシクルが形成されている分散溶液に対し、ミセル分散液を混合すると、赤血球の溶血現象のように膜がミセルに溶け込まれてしまうことが報告されている⁽³⁾。しかし我々が見出した系では、このような現象とは異なり、4+4'の2分子膜であるジャイアント母ベシクルに、反応部位を有する両親媒性分子からなるミセルが餌として取り込まれ、新たな双頭極性型両親媒性分子 5 を多く含んでいると想定される娘ベシクルが誕生する。このような意味で、全く新しい複製系が構築されたと言えよう。

5 2分子膜構成分子と単分子膜構成分子の引き起こす膜ダイナミクス

そこで、蛍光分子を用いた蛍光顕微鏡法を用いて、こうした膜分子ダイナミクスを詳細に検証することにした。この実験では、二分子膜となる単頭極性型両親媒性分子と、単分子膜となる双頭極性型両親媒性分子とが、ジャイアントベシクル中に共存した場合、どのようなダイナミクスが引き起こされるかを明らかにすることを目的とし、測定系を簡明にするため、反応しないジャイアントベシクル分子 6 および、5 の分散液を混合することにした。両親媒性分子 6 はいわゆるリン脂質の一つであり、水中でジャイアント・マルチラメラ・ベシクルを形成する。一方、5 はそれのみでは単分子膜を形成せず、水中でミセルのみを与える。さらに、それぞれの分子に親和性のあると考えられる BODIPY 蛍光部位を有する両親媒性分子 7, 8 を 5mol% だけ各々に混ぜ、蛍光顕微鏡により、ジャイアント・マルチラメラ・ベシクルは赤い蛍光を、ミセル分散液は溶液全体が緑の蛍光を発することを確認した。

さらに、それら2色の蛍光を同時にリアルタイム観測するための蛍光フィルターを含む蛍光顕微鏡システムを構築した。蛍光部位である BODIPY は吸光度が大きく、蛍光波長帯が狭いので⁽⁴⁾、励起/蛍光フィルターセットをうまく選定すれば、その一つのフィルターセットで 7, 8 の両方について、ほぼ同じ強度の蛍光を測定できる。実際、7 は $\lambda_{EX}: 578\text{nm}$, $\lambda_{EM}: 610\text{nm}$ 、8 は $\lambda_{EX}: 501\text{nm}$, $\lambda_{EM}: 512\text{nm}$ であり、これらは EX: 460-490nm, EM: >515nm の励起/蛍光フィルターで、二色蛍光の同時観察が可能であることが分かった。500nm で励起したときの >515nm の蛍光強度を比較すると、蛍光強度比は 7 : 8 = 2 : 3 と見積もられた。

カナル型混合プレパラートで両者の分散液を混合したところ、まず赤い蛍光のジャイアント・マルチラメラ・ベシクルの外側の膜から徐々に、黄色、黄緑色へと蛍光像が変色していった。さらに、その変色が内側の膜へと進行してゆく際に、特に緑色の強い蛍光部分が現れては、消滅して行く変化が起こり、その度にさらに内側の膜が変色されることが観測された。このような膜の蛍光像の変

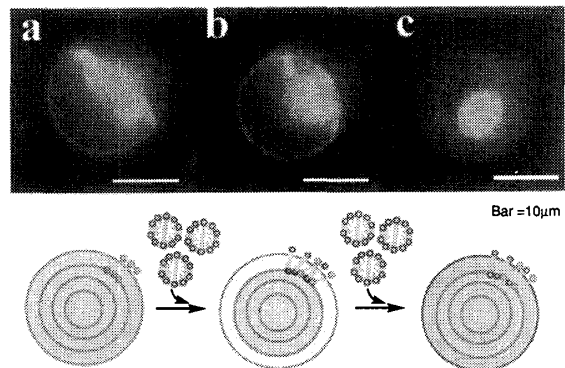
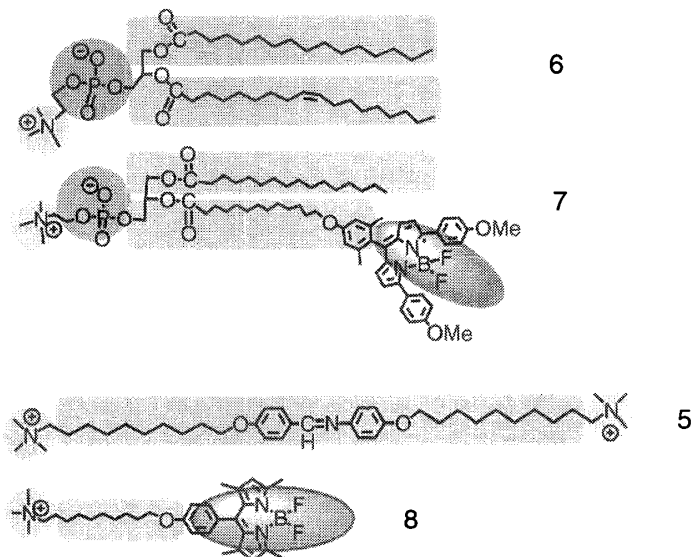


図5 ジャイアントベシクル膜の蛍光変色

化が数度起こった後に、まだ変色していない内部の赤い蛍光のジャイアントベシクルが、瞬く間に、外の変色したベシクル膜をすり抜けて外へと飛び出す現象が観測された。しかも、その飛び出した赤いジャイアントベシクルは、先と同様のダイナミクスを引き起こし、その結果再び、内部の赤く蛍光染色されたベシクルが飛び出すという現象が繰り返し起こったのである。

以上の観察結果に関する考察を試みてみたい。まず、蛍光の変色は明らかに、両親媒性分子 5 が 6 のジャイアントベシクルの最外膜から混入していったことを示す。しかし、5 と 6 とでは分子構造が大きく異なるために、6 の膜の中で 5 が相分離しドメインをつくることで、緑色の蛍光が強く発せられる部分が現れたと考えられる。その不安定な状態は、さらに内側の膜へと 5 が拡散することにより緩和されるのであろう。ゆえに、強く分離した状態は続かずに、内部の膜へと拡散してゆくことで内側の膜が変色してゆくと考えられる。

さらに、そうした膜ダイナミクスの振動が数度起こってから、ジャイアント・マルチラメラ・ベシクル全体の不安定性のために、まだ 5 の侵入を受けていない内側の 6 のみからなるジャイアントベシクルの巨視的な相分離が、誘導されたのではないだろうか。もちろん、外側の膜が侵入を受けていない強固な状態ならば、内側のベシクルも飛び出すことはないのだが、徐々に侵入してくる 5 のために、外膜が不安定な状態になることで、初めて内側の 6 のジャイアントベシクルの相分離が実現したと考えられる。このようにして飛び出したジャイアントベシクルは、サイズが小さくなったものの、初期状態に回帰した訳で、また 5 のミセル分散液の影響を受けることにより、再び内部のジャイアントベシクルが飛び出すという運命を繰り返すことが確認された。

ジャイアント・マルチラメラ・ベシクルの内側のベシクルが、界面活性剤の影響で外に飛び出る現象(“Birthing”現象という)は、ジャイアントベシクルの研究分野では以前から発見されていた⁽³⁾。しかし、今回のように2種の両親媒性分子の動的挙動を、リアルタイムで同時に観測できた研究例は未だ無い。我々は本研究において、水中に高々2種の両親媒性分子が存在するだけの系であっても、これだけドラマティックな非線形現象を発見することができた。

6 まとめ

前半で紹介した研究では、ベシクルがその疎水的反応場を膜分子前駆体に提供することで、膜分子の変換が起こり、さらにはベシクルそのものも分裂するという系を構築することができた。また、後半では、そうした過程で生成した単分子膜分子が2分子膜内に混在することによって、ジャイアントベシクルの分化とも言える分裂現象が起こることを発見することができた。これらは、全てリアルタ

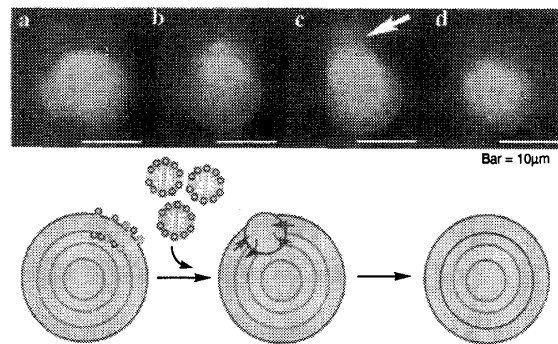


図6 双頭極性型両親媒性分子の膜内相分離現象

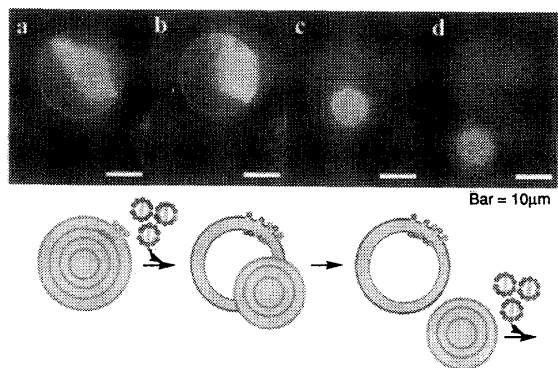


図7 ミセル分子によるジャイアントベシクルの“Birthing”現象

イム観測により追跡できる現象であり、ジャイアントベシクル膜分子のダイナミクス、さらには分散液全体でのジャイアントベシクルの粒度・個数の非線形的変化が引き起こされるという点で興味が尽きない。またこうした実験結果は、マイクロな膜分子のダイナミクスと、マクロな膜そのもののダイナミクスとの相関を「観ている」ことなのかもしれない。従って、複雑系科学の実験的検証としての位置づけも可能ではないだろうか。

以上の研究は、当該研究室の高倉克人博士(両親媒性分子の脱水縮合反応システムの構築と分子合成)、山田幸司博士(新しい膜分子追跡蛍光プローブの合成と光物性評価)、石丸真子氏(カナル型混合プレパラートを用いたリアルタイム観測系の立ち上げ)との共同研究で行われた。指導教官である菅原正教授は、親身な御指導と有益なディスカッションをして下さった。心から感謝申し上げる。最後ではあるが、観測実験システムの構築に有益な助言をして下さった安田賢二助教授(東大院総合文化)、ジャイアントベシクルの作製に関して様々な御提言を下された四方哲也助教授(阪大工・東大院総合文化)、研究全般に関して議論を深めていただいた金子邦彦教授(東大院総合文化)の御先生に御礼申し上げたい。

尚、本研究は駒場 COE プロジェクト「複雑系としての生命システムの解析」の一環として行われたものである。

7 参考文献

- (1) (a) J.W.Szostak, D.P.Bartel, P.L.Luisi, *Nature* 2001, 409, 387 (b) P.L.Luisi, P.Walde, T.Oberholzer, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 1999, 4, 33
- (2) (a) D.D.Lasic, Y.Barenholz, Eds., *Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes*, CRC Press New York 1995 (b) P.L.Luisi, P.Walde, Eds., *Perspectives in Supramolecular Chemistry: Giant Vesicles*, John Wiley & Sons, Inc. 1999
- (3) F.Nomura, H.Hotani, K.Takiguchi, *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 2001, 98, 2340
- (4) K.Yamada, T.Toyota, K.Takakura, M.Ishimaru, T.Sugawara, *New J. Chem.* 2001, 25, 667