

Title	脂質ベシクルの形状安定性と変形ダイナミクス (特集 ソフトマター研究の最前線)
Author(s)	濱田, 勉
Citation	機能材料, 30(7): 50-55
Issue Date	2010-07
Type	Journal Article
Text version	publisher
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10119/11926">http://hdl.handle.net/10119/11926</a>
Rights	Copyright (C) 2010 シーエムシー出版. 濱田勉, 機能材料, 30(7), 2010, pp.50-55. 本著作物はシーエムシー出版の許可のもとに掲載するものです。
Description	

# 脂質ベシクルの形状安定性と変形ダイナミクス

Morphological Stability and Dynamics of Lipid Vesicles

濱田 勉\*

ソフトマター界面である細胞膜（脂質膜）は、環境に応じたさまざまな形状や、融合・分裂などの膜変形、膜面上での相分離形成などの多様な挙動を示す。脂質膜の物性および組織化メカニズムの理解は、生命機能の解明や生体模倣材料の開発に役立つことが期待される。ここでは、光学顕微鏡観測により明らかとなった、脂質膜小胞（脂質ベシクル）の形状安定性と変形ダイナミクスについて紹介する。

## 1. はじめに

脂質膜はソフトマター集合体の一種であり、水溶液中において両親媒性の脂質分子が自己集合した二層膜構造を形成する（図1）。二層膜の縁が閉じた脂質膜小胞は、「脂質ベシクル」や「リポソーム」と呼ばれる。ベシクル構造は、いわば水中の“逆”シャボン玉である。細胞構造は、この脂質膜を境界に用いることで構成されている。

脂質膜は、細胞表面を覆う細胞膜、細胞内小器官の核膜・ミトコンドリア・小胞体などに共通した界面である。この膜界面は、内部物質の流出を

防ぎ、有害物質や物理的浸食に備えた防御機構として、マイクロメートルスケールの「入れ物」を作り出す。また、ソフト界面であるため、環境に応じたさまざまな形状や、融合・分裂などの膜変形、膜面上での相分離構造形成などの多様な挙動を示す。脂質ベシクルは、生体膜モデルとしての基礎研究、さらに生体に対するなじみが良いためにドラッグデリバリーのキャリアや化粧品などの医薬・産業分野への応用にも利用されている。脂質膜物性の解明は、生命機能の理解および、生体模倣材料の開発に役立つことが期待される。

脂質ベシクルの大きさは、数十 nm から数百  $\mu\text{m}$

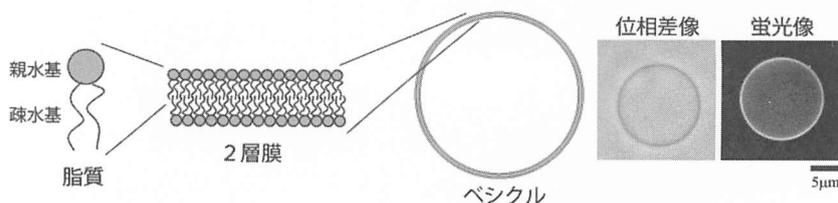


図1 脂質ベシクルの模式図と、位相差および蛍光顕微鏡像

\*Tsutomu Hamada 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

まで存在する。われわれは、細胞と同程度の数十  $\mu\text{m}$  のベシクル（ジャイアントベシクル）を対象に、光学顕微鏡観察実験を行っている。図1に、ベシクルの位相差像と蛍光像を示した。ベシクル一個体の膜挙動の直接観察により、マイクロメートルスケールにおける膜の構造形成およびダイナミクスを解析することが可能である<sup>1)</sup>。

## 2. 脂質膜の物性

### 2.1 膜の自由エネルギー

脂質膜の構造形成に関する代表的なエネルギーを図2に示した。

図2(A)は、曲げ弾性エネルギー (bending energy) であり、膜が湾曲することにより生じる。曲げ弾性係数は、熱ゆらぎの数十倍程度 ( $\sim 10^{-19}$  J) である。図2(B)は、面積弾性エネルギー (area stretching energy) であり、脂質分子の占有面積が最適値からずれることにより生じる。面積弾性

係数は、およそ  $10^{-1}$  J/m<sup>2</sup> である。図2(C)は、膜境界エネルギー (line energy) であり、二層膜の縁および膜孔に発生する。単位長さ当たりの力 (line tension) は、およそ 10 pN である。図2(D)は、相境界エネルギー (phase line energy) であり、多成分の脂質膜において考慮する必要がある (多成分系については2.2項にて述べる)。これら4つのエネルギーが組み合わされて、ベシクルの構造形成およびダイナミクスが引き起こされる。

### 2.2 多成分膜の相分離形成

脂質膜には、熱力学的な固-液相転移が存在する。すなわち、相転移温度以上では膜は流動的な液体状態 (無秩序液体相または液晶相と呼ばれる) をとり、相転移温度以下では固体状態 (秩序固体相またはゲル相と呼ばれる) を示す。また、コレステロールが含まれると、中間的な性質をもつ相 (秩序液体相) が形成されることが知られている<sup>2)</sup>。

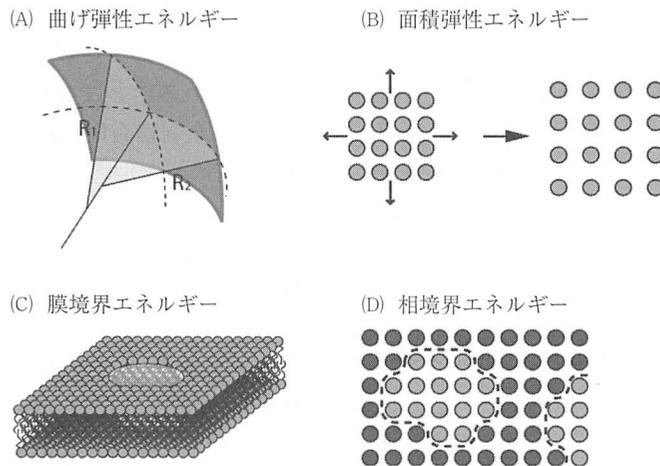


図2 脂質膜の自由エネルギー

表1 脂質膜の相状態

	秩序固体相 (ゲル相)	秩序液体相	無秩序液体相 (液晶相)
炭化水素鎖の内部回転 (トランス $\leftrightarrow$ ゴーシュ)	×	×	○
側方拡散	×	○	○

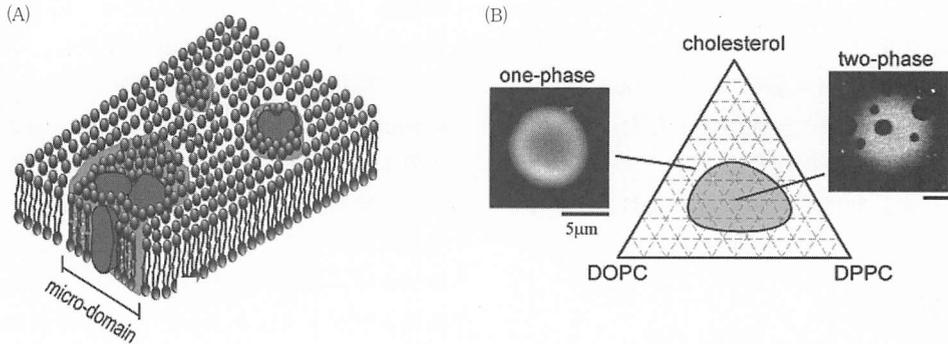


図3 (A)細胞膜のマイクロドメイン<sup>3)</sup>, (B)3成分ベシクルの相分離形成

表1に、脂質膜の代表的な相状態をまとめた。そこで、相転移温度の異なる多種の脂質混合膜では、膜面内で相分離が生じる。この相分離により形成された膜マイクロドメインは、生体において重要な機能を果たしていると考えられている<sup>3)</sup>。細胞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。細胞膜面内に形成された相分離ドメインは、膜タンパク質などの分子を選択的にドメイン内に集積させ、効率的な反応場として機能する(図3(A))。図3(B)は、3成分脂質ベシクルの相図とベシクル膜表面の蛍光顕微鏡像である。ベシクルは不飽和脂質DOPC、飽和脂質DPPCおよびコレステロールからなる。相図の中心部グレー領域において、相分離構造を観察することができる。

### 3. ベシクル形態の安定性とダイナミクス

#### 3.1 ベシクル形態の安定性

はじめに、単純な1成分ベシクルの小胞形態の安定性について考える。ベシクルの自由エネルギーは曲げ弾性エネルギーであり、微小領域の曲率変化をベシクル膜面全体にわたり積分することで得られる。

$$F = \frac{\kappa}{2} \oint dA (2H - C_0)^2 \quad (1)$$

$H$ は平均曲率、 $C_0$ は自発曲率、 $\kappa$ は曲げ弾性係

数である<sup>4)</sup>。 $C_0$ は膜面が好む曲率を表しており、具体的には脂質二層膜の内外層間の構成分子の組成や分子数の差異により決定される量である。自発曲率は通常ベシクル形成時に決まるため、実験的にコントロールすることは困難である(ベシクル形成時の非対称性のコントロールに関しては、4節にて述べる)。幾何学的には、ある膜表面積と内水相体積をもつ小胞体としてさまざまな形状をとりうる可能性があるため、最もエネルギーの低い形態が選ばれることになる。この幾何学的パラメーターは、余剰膜面積と呼ばれ、表面積/体積の比で表させる。 $\kappa$ の大きさは数十 $k_B T$ 程度であり、熱ゆらぎにより膜面には小さな波打ち構造が観察されるものの、ベシクル形態は熱的に安定である。

図4(A)に、浸透圧によりベシクル内水相体積を減少させて、徐々に余剰膜面積が増加する際の変形プロセスを示した<sup>5)</sup>。余剰膜面積を獲得することにより、内部に陥入していたベシクル形状(図4(A)-1)が、円盤形(図4(A)-2)になり、落花生形(図4(A)-3)を経て、最終的に2つの球がつながった出芽形(図4(A)-4)に変化する。すなわち、余剰膜面積の変化に合わせて、ベシクルの安定形状が移り変わっている。これは、余剰膜面積をコントロールできれば、ベシクル形状を制御可能であることを示している。

そこで、われわれは、余剰膜面積をコントロールする膜システムを考案した<sup>5,6)</sup>。光により分子構

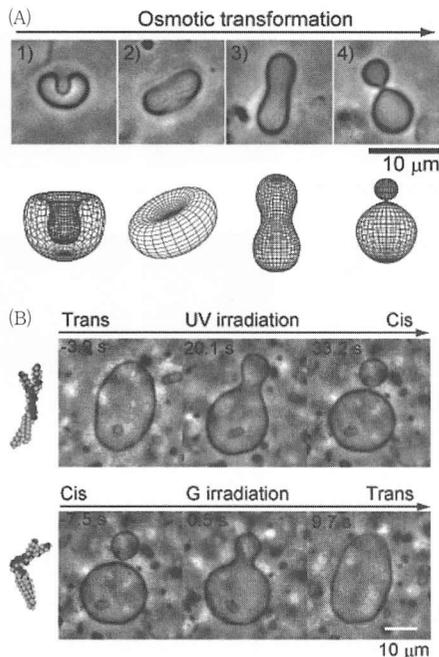


図4 (A)浸透圧によるベシクル形状変化<sup>5)</sup>, (B)アゾベンゼン脂質混合ベシクルの光制御<sup>5,6)</sup>

造を可逆的に変化できるアゾベンゼン脂質を含むベシクルを作製した。アゾベンゼン光異性化による *trans-cis* 体間の分子コンフォメーション変化が、膜表面積を数%変化させる。種々の形状のベシクルに光照射することで、膜形状を可逆的にコントロールすることに成功した(図4(B))。観察された光誘起ベシクル形態転移は、浸透圧による変形プロセスと一致していることから、余剰膜面積をパラメーターとしてベシクル安定性を統一的に説明できることを示している。

ここでは、曲げ弾性エネルギーにより支配される単純な1成分ベシクルの形状について、浸透圧およびアゾベンゼン脂質の光異性化を例にして、余剰膜面積の増減によりベシクル安定形状が変化することを述べた。これは、生体膜の変形メカニズムとして、タンパク質やイオン、温度などの種々の外部刺激による余剰膜面積変化が重要であることを示唆している。3.2および3.3項では、曲げ弾性以外のエネルギーが関与する、より複雑な膜

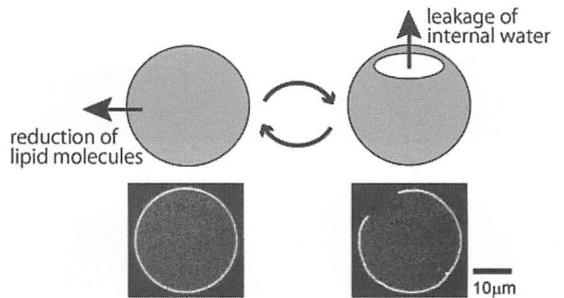


図5 界面活性剤可溶化における膜孔形成ダイナミクス<sup>7)</sup>

ダイナミクスを紹介する。

### 3.2 膜孔形成ダイナミクス

次に、界面活性剤を例に外部刺激により引き起こされる膜ダイナミクスについて紹介する。界面活性剤は細胞膜を溶かす作用があり、細胞膜からの膜タンパク質の抽出や、殺菌に利用されている。

われわれは、不飽和リン脂質 DOPC からなるベシクルに界面活性剤 Triton-X100 を添加し、脂質膜の可溶化ダイナミクスを観察した。すると、ベシクルの可溶化過程において、ベシクル膜面にマイクロメートルスケールの膜孔が観察された。また、興味深いことに、膜孔が開いたままベシクルが小さくなるダイナミクスに加えて、周期的な膜孔の形成(膜孔の開閉振動)ダイナミクスが観察された(図5)<sup>7)</sup>。2種のダイナミクスの選択は、界面活性剤濃度およびベシクルサイズに依存した。

このダイナミクスは、ベシクルの膜面積減少による「面積弾性エネルギー」と膜孔に発生する「膜境界エネルギー」により説明される<sup>8)</sup>。可溶化過程において、界面活性剤はベシクルから脂質分子を引き抜き、水溶液中に混合ミセルを形成する。このとき、ベシクル表面積が徐々に減少するが、ベシクル内水相体積は固定したままである。すると、内圧が上昇し、高まった内圧の緩和のため膜孔が形成される。開いた膜孔から水を出すことで内圧が減少し、膜孔が閉じる。膜孔からの水の流出による内圧緩和速度と可溶化による膜表面積減少速度の大小関係を考えることで、2種のダイナ

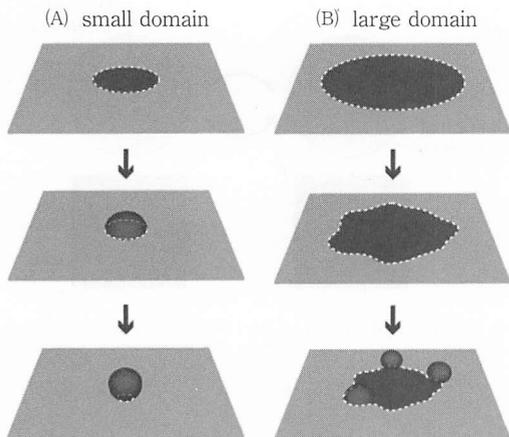


図6 相分離膜の出芽ダイナミクス<sup>9)</sup>  
 小さなドメイン(A)と大きなドメイン(B)における出芽変形

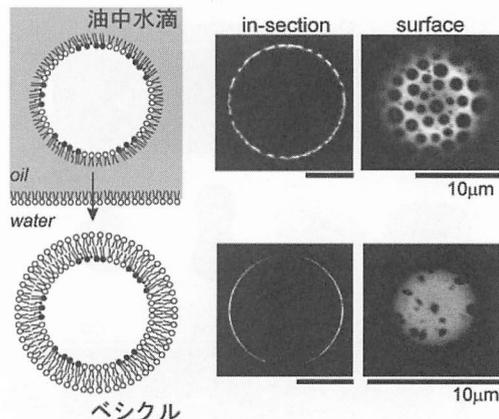


図7 油中水滴からの非対称ベシクル形成<sup>10)</sup>  
 油中水滴(上)および非対称ベシクル(下)の膜相分離の顕微鏡像

ミクスの選択を定性的に説明できる<sup>7)</sup>。

### 3.3 相分離ドメインからの出芽ダイナミクス

次に、多成分脂質からなる相分離ベシクルの膜ダイナミクスについて説明する。3.2項で述べた一様な1成分膜とは異なり、相分離膜のダイナミクスには「相境界エネルギー」の効果が生じる。特徴的な例として、浸透圧や界面活性剤刺激に対して、ベシクル表面のドメイン領域が出芽変形する。このダイナミクスの駆動メカニズムは相境界エネルギーであり、膜を3次的に変形することで相分離境界線を短くしている。

われわれの観察結果では、ドメインサイズに依存して2つのタイプの出芽ダイナミクスが観察された<sup>9)</sup>。ドメインサイズが小さい場合には、ドメイン部全体が曲率を増加させ小胞化する(図6(A))。これに対してドメインサイズが大きい場合には、ドメイン境界が波打ち、そこから小さなサイズの出芽小胞が形成される(図6(B))。

## 4. 非対称ベシクルへの展開

これまで述べたように、脂質多成分系である細胞膜は、相分離により脂質分子が膜表面に不均一分布している。さらに、細胞膜には膜断面方向の

非対称性も存在する。すなわち、細胞内外にそれぞれ向いた単層膜が非対称な脂質組成を備えている。水和法を中心とした従来のベシクル形成方法では、この内外層の非対称性をもつベシクルを作ることが難しかった。そこで、われわれは、油中水滴(W/O エマルション)を2層膜ベシクルの前駆体として利用する新たなベシクル作製方法を開発した(図7)<sup>10)</sup>。

脂質膜に覆われた油水界面を形成させたのち、別途用意した油中水滴を油水界面上に滴下する。すると、油中水滴が重力によって油水界面上に到達し、界面を越え水相へと移行してベシクルを形成する。本手法では、油水界面の単層膜が油中水滴を覆っていた単層膜と結合し二層膜ベシクルが形成される。よって、異なる脂質組成の単層膜を用意することで、非対称な二層膜を備えたベシクルを作り出すことができる。図7に、水滴および非対称ベシクルの膜表面における相分離構造の蛍光像を示した。水滴界面は3成分脂質(飽和脂質 DPPC, 不飽和脂質 DOPC, コレステロール)からなる<sup>11)</sup>。また、非対称ベシクルの内層膜は水滴界面と同じ3成分脂質、外層膜は単一脂質 DOPC からなる<sup>10)</sup>。

このように本手法を用いることで、細胞膜内外

層の「縦」方向の非対称性と、膜マイクロドメインに代表される「横」方向の不均一性を同時に再構成することが可能である。二層膜の非対称性は、脂質膜の力学的性質（自発曲率など）に関係している。本手法により、非対称ベシクルの膜ダイナミクスや相分離形成の解析が可能となることで、脂質膜物性に関する新たな知見が得られることが期待される。

**謝辞**：本稿で紹介した研究成果の共同研究者である北陸先端科学技術大学院大学の高木昌宏教授、京都大学の吉川研一教授、太田隆夫教授、大阪市立大学の長崎健教授に深く感謝の意を表す。本研究は、科研費特定領域研究助成のもと行われた。

- 1) P. L. Luisi, P. Walde, *Giant Vesicles*, John Wiley & Sons, Chichester (2000)
- 2) D. A. Brown *et al.*, *J. Membrane Biol.*, **164**, 103-114 (1998)
- 3) M. Vestergaard *et al.*, *Biotech. Bioeng.*, **99**, 753-763 (2008)
- 4) U. Seifert, *Adv. Phys.*, **46**, 13-137 (1997)
- 5) K. Ishii *et al.*, *ChemBioChem*, **10**, 251-256 (2009)
- 6) T. Hamada *et al.*, *Langmuir*, **21**, 7626-7628 (2005)
- 7) T. Hamada *et al.*, *Phys. Rev. E*, **80**, 051921 (2009)
- 8) M. Kaga *et al.*, *Eur. Phys. J. E*, **21**, 91-98 (2006)
- 9) T. Hamada *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 10853-10857 (2007)
- 10) T. Hamada *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 14678-14681 (2008)
- 11) T. Hamada *et al.*, *J. Phys. Chem. Lett.*, **1**, 170-173 (2010)

\*著者ホームページ (<http://www.jaist.ac.jp/~t-hamada/index.html>) に、本稿で紹介した膜ダイナミクスの動画がある