

ソフトマターのセミミクロスケール構造の自己組織化

Semi-microscopic scale self-organization of soft condensed matters

(理事推薦)

代表研究者	京都大学	瀬戸秀紀	Kyoto University	Hideki SETO
共同研究者	広島大学	山田悟史	Hiroshima University	Norifumi YAMADA
	京都大学	菱田真史	Kyoto University	Mafumi HISHIDA
	京都大学	中井唱	Kyoto University	Tonau NAKAI
	京都大学	太田隆夫	Kyoto University	Takao OHTA

<<英文サマリー>>

A characteristic feature of soft condensed matters is its hierarchical structures from microscopic scale (order of angstrom) to macroscopic scale (order of micrometer). Lipid molecules are known to form a bilayer structure with hydrophobic tails inside, and normally, they self-assemble as multi-lamellar structure. However, in biological bodies, they spontaneously aggregate as macroscopic scale liposomes, which is called uni-lamellar vesicles, depending on their functions such as living cells, nucleuses, mitochondrias, and so on. In order to understand the origin of the liposome formation, we investigated structures of lipids and amphiphilic molecules under various conditions by means of small-angle x-ray and neutron scattering, neutron spin echo, optical microscope, and atomic force microscopy. The results indicated that the cooperation of membrane fluctuation and electrostatic repulsion or osmotic pressure induces the unbinding transition, i. e., a inter-membrane distance diverges to infinity.

<<本文>>

1) 研究目的、経過、考察

【研究目的】

高分子、生体物質、両親媒性分子、コロイド等の物質は「ソフトマター」と呼ばれ、最近物理学的な面から興味を持たれている。特に両親媒性分子であるリン脂質は生体膜の骨格を形成する物質であり、生物学的な面からも興味深い系である。

生体膜の振舞いを明らかにしようとする研究は多く行われており、特に合成リン脂質が水溶液中でどのように自己組織化するかについての研究例は多い。一般にリン脂質は水中では疎水基を内側に挟んだ二重膜を形成するが、通常の

人工リン脂質はこの二重膜が数十Åの水の層を挟んで秩序を持って重なり合いラメラ構造を形成する。そしてこれらは会合して数 $\mu\text{m}$ 程度の大きさの多重層リポソーム ("Multi-Lamellar Vesicle" (MLV)) を形成することも知られている。リン脂質分子は温度上昇に伴って徐々に融解し、結晶相からゲル相、液晶相へと転移する。また膜間距離は二重膜中の秩序にも依存するが、それよりも塩濃度や pH、圧力等の溶媒の環境に強く依存する事が知られていた。

また生体膜は多くの場合二重膜が一層あるいは二層で閉じてミクロな空間を形成し、その大きさは細胞膜、核膜等生体中の役割に対応してそれぞれで決まっている。中にはミトコンドリアのように複雑な形状の内膜を外膜が包んでいるような構造のものもある。しかしながらなぜそのような構造を自発的にとるのか、物理的な見地からはほとんど分かっていないと言って良い。

一方、合成リン脂質の単層の二重膜により $\mu\text{m}$ サイズの閉空間構造を形成した"Giant Unilamellar Vesicle" (GUV)は生物工学的観点からも興味を持たれており、例えば人工の細胞状物質として遺伝子導入のキャリア、あるいはドラッグデリバリーのツールとしての応用が考えられている。その作成方法としては、超音波や交流電場を作用させる、あるいは「静置水和法」「逆相蒸発法」等の手法が知られているが、単に水に溶かしただけでは MLV になる合成リン脂質からなぜ GUV ができるのか、その要因は明らかにはなっていない。

以上の学術的な到達点を踏まえて、本研究では合成リン脂質を代表とする両親媒性分子膜の膜間距離の変化に着目して、ソフトマターの自己組織化の要因を明らかにすることを目的とする。我々はそのような観点から、次の 5 つの実験的研究を行った。

- (1) リン脂質 DPPC/水/塩化カルシウムの膜間距離の変化と unbinding transition。
- (2) リン脂質 DPPC/水/エタノール系の圧力・エタノールによる interdigitated 相への相転移。
- (3) リン脂質 DPPC と DOPC の乾燥膜の構造と静置水和法によるベシクル形成過程。
- (4) 非イオン性界面活性剤  $\text{C}_{12}\text{E}_5$ /水系における界面活性剤膜のゆらぎの膜間距離依存性。
- (5) リン脂質 DOPC の膜間距離に対する浸透圧の効果。

## 【研究経過】

(1) DPPC/水系に塩化カルシウムを添加していったときに塩濃度 1mM 付近で膜間距離が増大し、更に添加量を増やすと徐々に減少することが知られていたが、この振る舞いの「ゲル相」と「液晶相」における違いを、X線小角散乱(SAXS)、中性子小角散乱(SANS)、及び中性子スピンエコー法(NSE)により調べた。この結果、塩濃度が 1mM~40mM の場合にゲル相では膜間距離が有限にとどまるのに対して、液晶相では膜間距離が無限にまで大きくなる傾向があることを示した。また、液晶相においては膜の曲げ弾性係数が小さくなるため、熱ゆらぎによる立体反発が大きくなることを実験的に明らかにした。これにより、リン脂質の親水基に吸着したイオンによる静電反発力と立体反発力が協同することにより、膜間距離が無限大になる"unbinding transition"が起きることを初めて示した。

(2) リン脂質 DPPC の水溶液中での膜間距離の温度・圧力依存性、及びエタノール濃度依存性を SANS を用いて調べた。その結果、リン脂質の疎水基同士が互いに貫入しあった「interdigitated 相」が、圧力上昇とエタノール添加により同様に現れることが分かった。また液晶相と interdigitated 相の境界の狭い領域に、膜間距離が通常の 1.5 倍~2 倍程度の膨潤相が現れることを初めて示した。

(3) 室温でゲル相である DPPC と液晶相である DOPC は、静置水和法で GUV を形成させたときに明らかな違いが見られる。すなわち DPPC からは主に MLV が得られるのに対して、DOPC からは GUV ができやすい、という傾向がある。この要因を明らかにするため、我々は膨潤前の乾燥膜の構造を位相差顕微鏡、原子力間顕微鏡(AFM)、及びX線反射率計(XR)により調べた。この結果、DPPC の場合は基板上に凸凹に付いているのに対して、DOPC は階段状に綺麗にスタックしていることが分かった。更に我々は水和による膨潤過程を SAXS により調べた。その結果、DPPC は膨潤がほとんど起きないのに対して、DOPC は一度水が膜間に入って膜間距離が増大し、そこから徐々にリン脂質膜がはがれていく様子を見ることができた。(Fig. 1) 以上の結果より、GUV を作るためには乾燥膜の morphology が重要であることと、膜間に働く反発力が重要であることが明らかになった。

(4) 非イオン性界面活性剤  $C_{12}E_5$  (pentaethylene-glycol dedecylether)は水中でリン脂質と同様の二重層膜を形成し、その膜間距離は主に立体斥力によって

数十から数千Åまで変化することが知られている。我々はこの界面活性剤膜の熱ゆらぎの膜間距離依存性をNSEを用いて調べた。その結果、膜の動的振舞いは隣り合う膜との距離が変化することによる相互作用の変化により説明できることを示した。

(5) リン脂質 DOPC を水和させたときの浸透圧の効果を調べるため、DOPC に NaI を加えた試料を水に溶解した場合と、DOPC を NaI 水溶液に溶解した場合の二重層膜間距離の NaI 濃度依存性を SAXS により調べた。その結果、DOPC に NaI を加えた試料を水に溶解した場合に限って NaI がある濃度以上でラメラ構造が崩れ GUV が形成されることが分かった。すなわち、浸透圧の効果により unbinding transition が起こることを明らかにした。

#### 【考察】

中性の合成リン脂質の膜間に働く相互作用には、主に次のものがあることが知られている。

- (1) 水和水による短距離斥力。
- (2) 膜の熱ゆらぎによる立体斥力。
- (3) van der Waals 引力。

これに塩を加えるとイオンが親水基に吸着して、次の相互作用が現れる。

- (4) イオン間に働く静電斥力。

更に水を加えて膨潤させる際には、次の力が働く。

- (5) 膜間に入り込もうとする水による浸透圧。これは膜間の斥力として働く。

リン脂質の二重膜が規則的に積層したラメラ構造の周期は、これらの引力と斥力がバランスしたところで決まる。通常の合成リン脂質を水に溶かすと(1)~(3)の力が働くが、室温付近では斥力が引力に打ち勝つことはできず数十Åの間隔で並ぶことになる。また、塩を加えることにより静電反発力によりある程度は広がることができるが限界がある。しかしながらリン脂質膜が液晶相に入ると曲げ弾性係数が小さくなり、熱ゆらぎが大きくなる。これに伴って、立体斥力もまた大きくなる。更に乾燥膜に水を加えて水和させた場合には、水の浸透圧も関わってくる。そしてこれらの斥力が協同することにより膜間に働く引力に打ち勝って、膜間が無限大になる"unbinding transition"が起こることになる。すなわち合成リン脂質から GUV を形成するためには液晶相であることが必要であり、その上で静電相互作用をコントロールするか、あるいは kinetic

な相互作用を入れることにより膜を隣から「引き剥がす」事が必要である、と言う結論を得た。

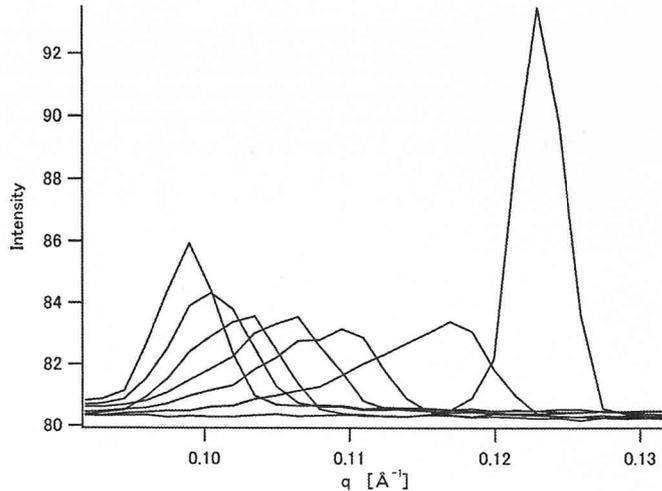


Fig. 1 Initial process of the natural swelling of DOPC dry film observed by SAXS. The Bragg peak at around  $Q=0.125 \text{ \AA}^{-1}$  first decreased its intensity just after wetted by water, shifted to lower- $Q$ , and grew as a new peak at around  $Q=0.10 \text{ \AA}^{-1}$ .

2) 研究発表

<口頭発表>

1. 瀬戸秀紀「中性子スピンエコー法によるソフトマターの動的振舞いの研究」, 物性研究所客員所員着任紹介講演会
2. H. Seto, M. Hishida, H. Nobutou, N. L. Yamada, and T. Takeda, "A swollen phase neighbouring an interdigitated gel phase in DPPC aqueous solution", International Workshop on Dynamics of Complex Fluids.
3. H. Seto, M. Hishida, H. Nobutou, N. L. Yamada, T. Takeda, and M. Nagao, "The interdigitated phase induced by ethanol or pressure and an associated swollen phase", International Workshop on Physics of Soft Matter Complexes.
4. 瀬戸秀紀「両親媒性分子膜の曲げ弾性係数」東京大学物性研究所短期研究会
5. 菱田真史「リン脂質 Dry Film からの Giant Vesicle 形成」ソフトマターの物理学 2004～変形と流動～
6. 菱田真史「リン脂質 Dry Film からの Giant Vesicle 形成」日本物理学会 2004 年度秋季大会
7. M.Hishida, H.Seto, K.Yoshikawa, P.Kaewsaiha, H.Matsuoka "The nanometer-scale structure and the micrometer-scale morphology of phospholipid dry films on glass plates: a mechanism to form giant

unilamellar vesicles” , International Workshop on Physics of Soft Matter Complexes

8. 菱田真史、瀬戸秀紀、吉川研一、P.Kaewsaiha、松岡秀樹「リン脂質 Dry Film の構造におけるリポソーム形成要因」生物物理学会第 42 回年会

9. 菱田真史、瀬戸秀紀、吉川研一、P.Kaewsaiha、松岡秀樹、山田悟史、井上勝晶、「リン脂質ジャイアントベシクルの自発的形成：メカニズムの解明」日本物理学会第 60 回年次大会

10. 山田悟史、武田隆義、瀬戸秀紀、長尾道弘「DPPC/水/CaCl<sub>2</sub>系における静的構造と動的構造の観測」日本中性子科学会第 3 回年会

11. 山田悟史、武田隆義、瀬戸秀紀、「DPPC/水/CaCl<sub>2</sub>系における静的構造と動的構造の観測」日本物理学会第 59 回年次大会

12. N. L. Yamada, T. Takeda, M. Nagao, H. Seto, and Y. Kawabata, "Effect of confinement on membrane undulation", seventh International Conference on Quasi-Elastic Neutron Scattering

13. N. L. Yamada, M. Hishida, and H. Seto, "Unbinding transition induced by osmotic pressure", International Workshop on Physics of Soft Matter Complexes

<誌上発表>

1. N. L. Yamada, H. Seto, T. Takeda, M. Nagao, Y. Kawabata, and K. Inoue, "Effect of membrane undulation in DPPC/water/CaCl<sub>2</sub> system", submitted to Phys. Rev. E.

2. N. L. Yamada, T. Takeda, M. Nagao, H. Seto, and Y. Kawabata, "Effect of confinement on membrane undulation in swollen lamellar phase", J. Phys. Soc. Jpn., in press

3. N. L. Yamada, M. Hishida, H. Seto, K. Tsumoto, and T. Yoshimura, "Effect of osmotic pressure on vesicle formation from lipid films", 準備中

4. M. Hishida, H. Seto, K. Yoshikawa, " The micrometer-scaled morphology of phospholipid dry film influence on the effective GUV formation :a mechanism of GUV formation” , submitted to Europhys. Lett.