

学生海外調査研究	
脂質ベシクル形態変化機構の解明；実験,シミュレーションによる双方向的アプローチ	
坂下 あい	理学専攻
期間	2012年11月4日～2012年11月23日
場所	Ljubljana, Slovenia
施設	Jozef Stefan Institute/ University of Ljubljana

内容報告

1. 海外調査研究の目的と必然性

1.1 研究背景

我々生物の身体は適度な柔軟性と伸縮性を持ち合わせているため、目的に応じて様々な形状を取ることが可能である。このような現象は細胞レベルでも起こっており、とりわけ赤血球はその優れた変形能から得られる形状は多岐に渡る[1]。物理学の分野ではその形状決定機構の解明を目指し研究が行われてきた。

先行研究で細胞の膜形状は脂質分子が担っていることが明らかにされたため、実験には脂質二分子膜から成る小胞（ベシクル）が用いられる。ベシクルは周囲の環境を変化させることで赤血球に見られる様々な形状を再現し[2, 3]、その形状は Area-difference-elasticity (ADE) model で定量化が可能だとされている[4]。しかし当時の顕微鏡技術の問題からモデル検証は行われず、生体膜研究は行き詰まっていた。

申請者はこの停滞状況を打破するために、近年開発された高速共焦点レーザー顕微鏡を実験に導入しベシクルの三次元画像を取得し、独自に開発した三次元画像解析法で形状を定量化、ADE モデルの検証を行った。その結果世界に先駆けて、従来困難とされていた非軸対称形状を含むほぼ全形状の比較に成功しており、変形過程を定量化した結果から ADE モデルの有用性の立証に成功した。この結果は業界の一流誌である *Soft Matter* に掲載され、得られた結果のビジュアル性の高さから同誌の表紙にも採用された[5]。

現在は本手法をより生態系に近い多重膜ベシクル（マルチラメラベシクル）に適用することでミトコンドリアを始めとした生体内に見られる複雑な形状の決定機構の解明を明らかにする。この手の研究は前例が極めて少ないため[6]、論文が完成した際の業界におけるインパクトは大きいことが予想される。

準備状況としては、既に実験的にマルチラメラベシクルの撮影に成功した。一方で従来の三次元画像解析法のこの系への適応が難しいため、シミュレーション手法に新たに動的三角格子モデル[7]を導入し形状の再現を行った。今回は特に外殻が球のマルチラメラベシクルに注目し、その形状変化を追った。詳細は後述の調査研究の項目で説明する。

1.2 目的,課題

研究調査の目的は、これまでに得られた実験及びシミュレーション結果を議論し、理論及び論文作成の足がかりを作成することである。具体的には以下の四点について研究を行う。

- 1) 撮影した実験結果を元に、形状変化の特徴・特殊性を議論する。
- 2) 得られたシミュレーション結果から外殻の及ぼす影響を定量化する。
- 3) 1, 2 を元に論文を作成できるよう、結果、考察部分の大筋を議論する。
- 4) さらに可能であれば結果をモデル化し、生体系へ還元する方法を議論する。

1.3 施設の選定

今回取り扱っているマルチラメラベシクルは先行研究がほとんど存在しない未開拓な対象である[4]。そのため結果を考察するにあたって適切な意見をいただくために、ベシクルの基礎理論に精通している研究者と議論する必要がある。P. Zihel博士¹と S. Svetina博士²はこの系の理論及び実験の先駆者であり申請者も過去に議論した経験があるため、課題を解決するにあたり有効な議論を行うことが出来ることを見込み、派遣先に選んだ。

1.4 本研究の意義

本研究の独創的な点は、従来取扱が困難とされてきたマルチラメラベシクルの形状に注目して研究を進めている点である。マルチラメラベシクルとは先に述べたように小胞に複数の小胞が内包されたモデル生体膜であり、その形状決定機構の解明は生体内に見られる細胞のその解明に繋がる。本研究では実験に最新式の共焦点高速レーザー顕微鏡を用い、シミュレーションには本分野において非常に独創的で画期的な動的三角格子モデル[7]を導入することで、現象の解明を目指した。今回の調査研究で得られた結果の理論化に成功した暁には、ミトコンドリアを始めとしたより複雑な細胞の形状決定機構の議論が可能になるため、物理学の分野に置ける生体膜研究が飛躍的に向上する成果が期待される。

2. 得られた成果と今後の方針

2.1 調査研究

この節では、滞在期間中に行った議論及び活動について報告する。事前に予定していた議論に加え、幸運にも多くの研究者の方と議論する機会を得ることが出来た。

2.1.1 P. Zihlerl 博士（滞在期間：11/5～11/22）

事前にメールや Skype を利用して入念に研究打ち合わせを行っていたため、現地に到着後スムーズにモデル作成に移ることができた。具体的には、以下の内容で研究を進めた。

11/5-11/9

事前に得られた実験及びシミュレーション結果を元にそれぞれの形状の特徴をまとめ、カテゴリー分けを行うことで理論モデル作成の足がかりを作成した。週の後半では簡単な理論モデルの作成に着手した。

11/12-11/16

第一週目に作成した理論モデルがうまく機能しなかったため原因を究明した。具体的にはそれぞれの形状で得られるエネルギーの内訳を確認し、形状を決定する際に最も影響の大きいものを選定しモデルに反映させた。

11/19-11/21

第二週目の修正によりモデル作成の見通しがたった。また、平行して12月5日に京都で開催される国際会議（2.2, 1 参照）に向けてポスターを作成しつつ、論文の構想を練った。今回得られた結果の全ては論文として発表予定であるため本報告書では記述を避けさせていただきます、何卒ご了承ください。

2.1.2 S. Svetina 博士（訪問：11/12）

S. Svetina 博士はベシクル実験の権威であられるため、University of Ljubljana へ訪問し議論を行った。当日は本研究の実験部分に対するコメントに加えて、同様の系を取り扱っている他の研究者の情報も頂くことができた。

2.1.3 J. Derganc 博士³, S. Vrhovec 氏⁴（訪問：11/12）

J. Derganc 博士と S. Vrhovec 氏は申請者が今年の9月に参加した国際会議(PhysCell2012⁵)で知り合った研究者である。幸いにも彼らは申請者の共同研究者である P. Zihlerl 博士の知り合いであり、上述の S. Svetina 博士がおられる University of Ljubljana に所属されているため、現地についてからコンタクトを取り議論及び研究室見学を行った。彼らは実験家であり、我々同様ベシクルを取り扱っているが、サンプルの作成方法や観察環境が非常に合理的なものであるため[8]、非常に有意義な訪問となった。

2.1.4 A. Šiber⁶ 博士（滞在：11/19～11/21）

博士は P. Zihlerl 博士の知人であり物理学者である一方で、趣味で CG を用いてイラストを作成されるイラストレーターでもある。申請者の論文[5]が SoftMatter 誌の表紙の候補に挙がった際に、図の作成を担当して下さった経緯があり、運良く滞在期間中に Jozef Stefan Institute に滞在されていたため、本研究で得られた結果の魅せ方について相談に乗っていただいた。また研究結果についても議論させていただき、今後もアドバイスをいただける予定である。

2.1.5 セミナー、議論

前述の議論に加えて、訪問中に申請者の従来の研究及び現行の研究について所内でセミナーを行う機会をいただいた。

1. 2012/11/12 University of Ljubljana

2. 2012/11/21 Jozef Stefan Institute

2.2 用いた理論モデル、シミュレーションについて

研究成果の詳細は論文執筆中のため掲載できないので、ここでは使用した理論及びシミュレーションモデルの詳細、独自性について紹介する。

2.2.1 理論モデルの変遷

ベシクルの形状を記述するモデルの考え方の一つに、脂質二分子膜の曲率を基礎にした弾性モデルがある。任意の曲面は任意の点における二つの基本的な曲率、すなわち平均曲率とガウス曲率によって記述することができる。この二つの曲率は主曲率 $C_1=1/R_1$ と $C_2=1/R_2$ によって定義され、ここでの R_1 と R_2 は主曲率半径である。したがって平均曲率とガウス曲率はそれぞれ以下のように定義される。

$$H = \frac{1}{2}(C_1 + C_2), \quad K = C_1 C_2 \quad (1)$$

曲率を用いた膜形状の定量化は 1970 年の Canham による Minimal model が始まりであり、一般的に $(1/R_1^2 + 1/R_2^2) = (2H)^2 - 2K$ から局所エネルギー $f \equiv (\kappa/2)(2H)^2 + \kappa_G$ を導いた。 κ と κ_G はそれぞれ平均曲率とガウス曲率に対する弾性係数である。これを膜表面全体で積分することで以下の膜の自由エネルギーを得る。

$$F_{CV} \equiv \frac{\kappa}{2} \oint (2H)^2 dA + \kappa_G \oint K dA \quad (2)$$

このモデルを元に 1983 年に S. Svetina らが二分子膜の内膜と外膜の面積差 ΔA の制約を加えた bilayer-couple model (BC model) を提案した。

$$\delta F' \equiv \delta(F_{CV} + \Sigma' A + PV + Q \Delta A) = 0 \quad (3)$$

Σ' , P , Q はそれぞれ表面積、体積、面積差を一定にするためのラグランジュの未定常数である。この方程式から導かれるベシクルの形状は以下の換算体積 v と面積差 Δa で定義される。

$$v \equiv \frac{V}{4\pi R_0^3/3}, \quad \Delta a \equiv \frac{\Delta A}{8\pi h R_0} \quad (4)$$

ここで V はベシクルの体積、 R_0 は今考えているベシクルと同じ表面積 A を持つ球の半径 ($R_0 \equiv (A/4\pi)^{1/2}$)、 h は二分子膜の膜間距離の 1/2 であり、 v , Δa は共に球で規格化されている。

2.2.2 Area-difference-elasticity model (ADE model)

今回用いた Area-difference-elasticity model は現在最も実験とよく一致するとされているモデルである。このモデルは先の BC model を発展させた系であるが、面積差の制約を外し、代わりにその影響をエネルギーのペナルティとして膜の弾性エネルギーに加えることで、膜の伸縮を可能にした。これにより面積差は一定でなくなるため、先の ΔA (これは膜の伸縮により変化する) に加えてベシクル固有の面積差 ΔA_0 が次のように定義される。

$$\Delta A_0 = (N^+ - N^-) a_0 \quad (5)$$

ここで N^+ , N^- はそれぞれ外膜、内膜を構成する分子の数、 a_0 は脂質分子一個あたりの断面積である。したがって膜の弾性エネルギーは以下のように定義される。

$$F_{ADE} \equiv F_{CV} + \frac{\alpha\pi}{8Ah^2} (\Delta A - \Delta A_0)^2 \quad (6)$$

膜の伸縮によるペナルティは第二項に示され、 α は膜を構成する脂質分子に寄って変わる定数である (今回用いた不飽和リン脂質 DOPC では 2~3 の値をとる)。これが最小になる条件で形状は決定する。

$$\delta F'' \equiv \delta(F_{ADE} + \Sigma' A + PV) = 0 \quad (7)$$

得られた換算体積 v と面積差 Δa_0 で定義される (図 1)。

$$v \equiv \frac{V}{4\pi R_0^3/3}, \quad \Delta a_0 \equiv \frac{\Delta A_0}{8\pi h R_0} \quad (8)$$

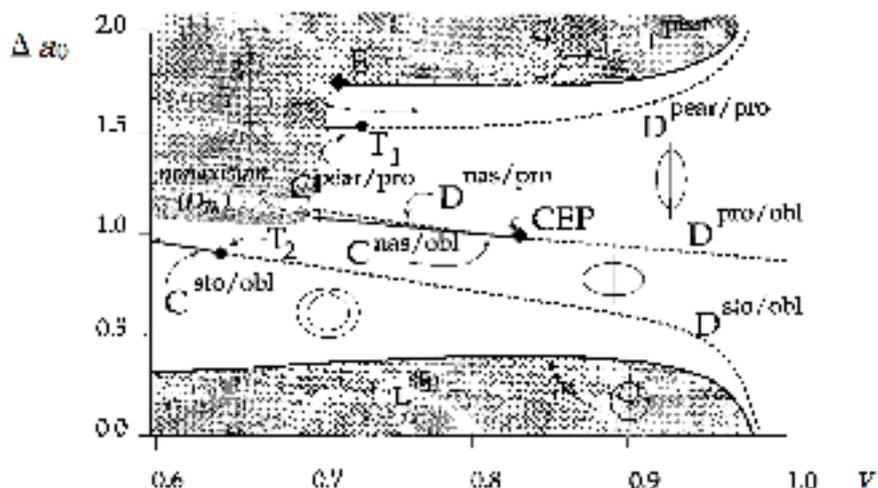


図 1. ADE model で得られる相図[9]

2.2.3 シミュレーション：先行研究

一方膜形状のシミュレーションも盛んに行われてきた。見たい現象のスケールに合わせてシミュレーションモデルも様々であるが、ベシクルの形状や変形に焦点を当てた場合、そのスケールは μm オーダーであるため一般的に膜を三角格子状のメッシュで粗視化して考える (図 2 下段)。シミュレーションに用いるプログラムは配布されているものと自作のものとの主に二通り存在するが、ここでは本分野で一般的に用いられている **Surface Evolver**[10]について触れる。

Surface Evolver は K. Brakke により 1992 年に発表されたフリーソフトであり、ベシクルを始めとした膜形状 (他にも液滴やシャボン玉等も記述できる) の数値計算を得意としているため、現在まで多くの理論研究家に利用されている。ベシクルを取り扱う際には、先に触れた **BC model** の膜の自由エネルギーが最小化されるような形状が決定され (数式(3)), 得られた形状は換算体積 v と面積差 Δa で定義される (数式(4))。この手法は **ADE model** にも応用可能であり、理論で予測される形状の多くを三次元的に描写することができる (図 2)。

しかしながらこの手法の問題点として、膜の弾性エネルギーのみを考慮しているため、図 2(d)のような膜が接触しそうな場合に膜が反発できず、互いに通り抜けてしまうことが挙げられる。今回申請者が考えるマルチラメラベシクルは、外側のベシクルと内側のベシクルが非常に近くに存在することで変形に影響を及ぼしているため、**Surface Evolver** での取扱は困難であった。

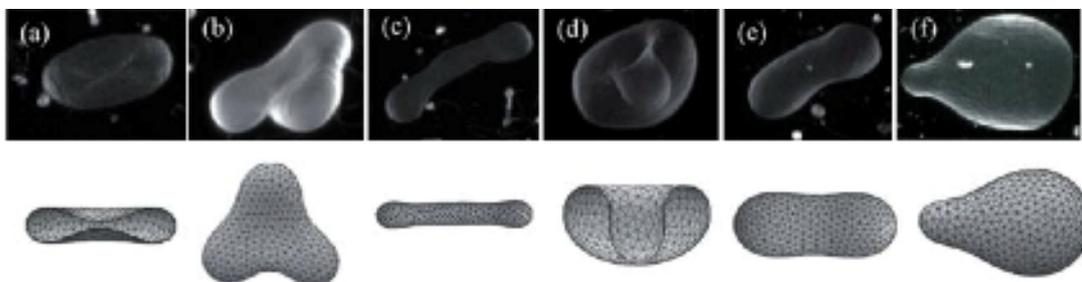


図 2. 実験結果 (上) と **Surface Evolver** で作成した理論形状 (下) [5]

2.2.4 シミュレーション：動的三角格子モデル

この問題を解決できる手法の一つに動的三角格子モデルである。これは現在特別研究派遣学生として指導を仰いでいる東京大学物性研究所野口博司准教授が赤血球等に応用している手法である。このモデルの特徴は、先に触れた ADE model をシミュレーションに取り入れている点に加えて、膜に熱揺らぎを考慮している点である。

このモデルにおいて膜のポテンシャルエネルギーは次のように与えられる。

$$U = U_{CV} + U_{ADE} + U_{bond} + U_{rep} + U_A + U_V \quad (9)$$

ここで U_{CV} , U_{ADE} は先に紹介した膜の弾性エネルギーを意味している。続く U_{bond} , U_{rep} は膜を構成する粒子間の引力、斥力相互作用である。まず U_{bond} についてだが、 i 番目の粒子と j 番目の粒子の粒子間距離が $r_{i,j}$ で表される場合、粒子間距離の最大値を l_{max} 、カットオフを l_{c0} とすると、引力相互作用は以下のよう

$$U_{bond}(r_{i,j}) = \begin{cases} \frac{b \exp[1/(l_{c0}-r_{i,j})]}{l_{max}-r_{i,j}} & (r_{i,j} > l_{c0}), \\ 0 & (r_{i,j} \leq l_{c0}), \end{cases} \quad (10)$$

同様にして斥力相互作用も粒子間距離の最小値を l_{min} 、カットオフを l_{c1} として以下のように表される。

$$U_{rep}(r_{i,j}) = \begin{cases} \frac{b \exp[1/(r_{i,j}-l_{c1})]}{r_{i,j}-l_{min}} & (r_{i,j} < l_{c1}), \\ 0 & (r_{i,j} \geq l_{c1}). \end{cases} \quad (11)$$

このポテンシャルにより膜が互いにすり抜けることなく、変形が行われる。一方 U_A と U_V はそれぞれベシクルの表面積と体積を一定に保つためのポテンシャルであり、以下の式で与えられる。

$$U_A = \frac{1}{2} k_A (A - A_0)^2 \quad (12)$$

$$U_V = \frac{1}{2} k_V (V - V_0)^2 \quad (13)$$

ここで A , V は設定している表面積、体積であり、 A_0 , V_0 は実際の値であり、この二つが一致していない場合ペナルティとしてポテンシャルエネルギーが発生する。 k_A , k_V はこれに対する比例定数で、今回は $k_s=1.0$, $k_v=0.5$ を用いた。

これらのポテンシャルの効果により、本手法では従来取り扱いが困難とされていた、膜同士が近接する系での変形シミュレーションを実現している。また、膜の周囲に溶媒を配置することで、流れ場における変形の再現にも成功しており、現存の手法において最も生体系に近い状況を再現できる優れた手法である (図 3)。

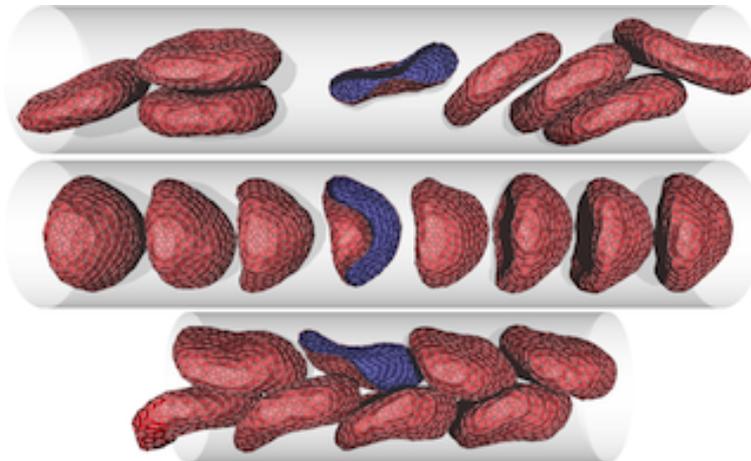


図 3. 細管を流れる赤血球型ベシクルのシミュレーション[11]

2.3 今後の方針

得られた結果は早急に論文にまとめ、来年度までの投稿を目指す。また現在の研究は今後外側のベシクルを非球形のベシクルに変えてより生体系へ近い形状の再現へとシフトさせる予定であるため、今回作成したモデルはそちらにも応用する予定である。最終的には学位論文に全結果を掲載する。

また得られた成果は以下の学会で発表を計画している。

1. ○A. Sakashita, P. Zihlerl, M. Imai and H. Noguchi, 「Compartmentalization by confinement of multi lamellar vesicles」 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究 揺らぎが機能を決める生物分子の科学 第六回公開国際シンポジウム,2012年12月5日,京都 (poster presentation)
2. A. Sakashita, ○P. Zihlerl, M. Imai and H. Noguchi, 「Confinement-induced compartmentalization of vesicles」 7th Christmas Biophysics Workshop, December 17-18, Austria (oral presentation)
3. ○坂下あい, Primoz Zihlerl, 今井正幸, 野口博司 「球状ベシクルに内包されたベシクルの形状決定機構の解明」 第68回年次大会,2013年3月26-29日,広島 (口頭発表)

3. 謝辞

この度はお茶の水女子大学文部科学省特別経費「女性リーダーを創出する国際拠点の形成」プロジェクト「学生海外派遣」プログラムの派遣生として採用していただき、誠にありがとうございました。おかげさまで、当初予定していた Zihlerl 博士, Svetina 博士と実りある議論を行うことができ、論文作成の上でのアウトラインを作成することができました。また、今回の滞在では積極的に現地の研究者の方々とコンタクトを取ることで、自身の研究の議論に加えて研究室見学やショートセミナーの機会等、当初期待していた以上の成果を得ることができました。この場を借りて、深く御礼申し上げます。

今後は得られた結果を元に論文を執筆するとともに、成果を積極的に国際会議の場で報告していくことで、日本を代表する若手研究者として女性リーダーを目指していきたいと思います。この度は誠にありがとうございました。

注

1. Associate professor, Faculty of Mathematics and Physics, University of Ljubljana/ Jožef Stefan Institute
2. Professor, Institute of Biophysics/ Faculty of Medicine, University of Ljubljana
3. Asistant, Institut of Biophysics/ Faculty of Medicine, University of Ljubljana
4. Ph.D. student of Institute of Biophysics/ Faculty of Medicine, University of Ljubljana
5. PhysCell2012 official site: <http://www.physcell2012.com/home>
6. Science advisor, Institute of physics, Zagreb, Croatia.

参考文献

- M. Wortis, from *Soft Matter* edited by G. Gompper and M. Schick, Vol. 4 (Wiley, New York, 2007)
- H. Hotani, *J. Mol. Biol* **178**, 113 (1984).
- M. Yanagisawa, M. Imai, and T. Taniguchi, *Phys. Rev. Lett.* **100**, 148102 (2008).
- S. Svetina and B. Žekš, *Eur. Biophys. J* **17**, 101 (1989).
- A. Sakashita, N. Urakami, P. Zihlerl, and M. Imai, *Soft Matter*, **8**, 8525 (2012).
- O. Kahraman, N. Stoop, and M. M. Müller, *New J. Phys.* **14**, 095021 (2012).
- H. Noguchi and G. Gompper, *Phys. Rev. E* **72**, 011901 (2005).
- S. Vrhovec, M. Mally, B. Kavčič, and J. Derganc, *Lab on a Chip* **11**, 4200 (2011).
- U. Seifert, *Advances in Physics* **46**, 13 (1997).
- K. Brakke, *Exp. Math.* **1**, 141 (1992); the software package is available free of charge at <http://www.susqu.edu/brake/evolver/evolver.html>
- 野口博司, 「赤血球, 脂質小胞の流動ダイナミクス」 日本物理学会誌, **65(6)**, 429 (2010).

さかした あい／お茶の水女子大学大学院 人間文化創成科学研究科 理学専攻

指導教員によるコメント

坂下さんは修士1年生の時から Primoz Zihel 博士との共同研究を行っており, Jozef Stefan Institute への訪問も今回で 4 度目となる。大学における研究も国際化が進む昨今, 早い段階から積極的に海外に出て共同研究を行う姿勢は, 同年代の研究者と比較しても目を見張るものがある。

今回は三週間の調査研究という短い期間であったが, 当初の目的通り理論モデルの作成及び論文作成の目処を立てて無事帰国した。また, 本人の報告にもある通り, 共同研究者である Zihel 博士以外の現地の研究者とも精力的にコンタクトを取り, 議論や研究室見学, ショートセミナーを行う等, 本事業の支援により得られた機会を最大限に生かすことが出来たようである。

坂下さんは来年度から日本学術振興会特別研究員 (DC2) にも採用されているため, 今後も益々研究を発展させ, 我が国を代表する若手女性リーダーとしての活躍が期待される。

(お茶の水女子大学人間文化創成科学研究科自然 (応用科学系)・曹 基哲)