

2B07

ベシクル融合による物質輸送を目指した膜表面電荷の制御

○栗原顕輔¹、鈴木健太郎^{1,2}、豊田太郎^{1,2}、菅原正^{1,2}

(1 東大院・総合, 2 複雑系生命システム研究センター)

【序】

ベシクルと呼ばれる、両親媒性分子が水中で形成する中空状の分子集合体は、人工細胞の構築や生命起源の解明に重要な役割を果たすであろうと期待されており、既に内部情報物質の複製や自己生産ダイナミクスを起こすベシクルが報告されている。一方で膜融合も重要なダイナミクスの一つであり、本来静電反発などの影響で融合しにくいベシクルどうしを接着・融合させる研究が盛んである。その中にはベシクル膜に溶け込むことで膜を再構成させる脂質を混合する、負の自発曲率を持つ脂質分子を混合する、接着したベシクルに界面活性剤などを添加して融合を図るなどの方法があるが、できるだけ簡便かつ自然な方法が原始生命の環境を構築する上で望ましい。そこで我々はベシクル膜の表面電荷を制御することで、ベシクルを融合させることを計画した。既に、(i)カチオン性膜分子の添加、(ii)分散液の pH による 2 種の脂質混合ベシクルの表面電荷制御 (iii)多価イオン(La^{3+} など)の添加などの手法を用いて、ベシクルの融合を光学顕微鏡・動的光散乱型粒度分布計・フローサイトメーターを用いて確認している。現在のところ PCR 緩衝液で膨潤したベシクルでは、(iii)の方法で融合に成功している。

【結果・考察】

1) アニオン性ベシクルに対するカチオン性膜分子の添加

アニオン性ベシクルにカチオン性膜分子を添加すると、ベシクル膜表面電荷にばらつきが生じ、電荷量の差がついたベシクルどうしが融合することが期待される。ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)とパルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール(POPG)を脂質組成比 DOPC : POPG = 90 : 10 からなるアニオン性ベシクルの分散液に対して、オクチルトリメチルアンモニウムブロード(OTAB)を添加すると、ベシクルの表面電荷が中和する。OTAB の濃度が 2-10 mM の範囲でベシクルが集合化することがわかった。アニオン性ベシクルに 10 mM の OTAB を添加したところ、図 1 に示すような接着を介したベシクルの集合化が起こった。この条件では、接着による集合化は見られたものの、融合は確認できなかった。

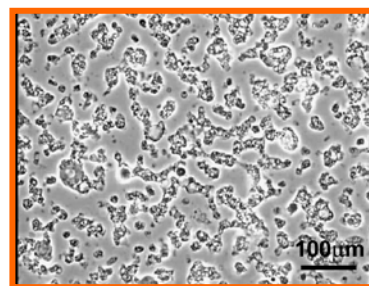


図 1. アニオン性ベシクルに OTAB を添加した時のベシクル集合化

2) 分散液の pH 調整

pH により電荷が異なるリン脂質でアニオン性と中性のベシクルを調製し、外部からプロトンを供給し表面電荷の異なる状態を作り出して接着させる。双性リン脂質のパルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)とアニオン性リン脂質の POPG とコレステロールを 80 : 10 : 10 (mol%) で混合した。アニオン性のベシクルには POPG とコレステロールを 90 : 10 (mol%) で混合した。ベシクル融合時のサイズ変化を動的光散乱法粒度分布計で調べるために、カチオン性のベシクルを孔径 1.2 μm 、アニオン性のベシクルを孔径 0.2 μm のフィルターにそれぞれ通した。両ベシクル分散液を混合し、塩酸を滴下して分散液の pH を 3 に

なるように調整した。pH = 7 (灰色の棒グラフ)とpH = 3(赤色の棒グラフ)を比較すると、粒径が 1.2 μm 付近のベシクルが現れた(図 2)。これはベシクルがヘテロに接着し、サイズが増加したことを強く示唆している。

この現象が異種のベシクル間で起こっていること、及び多数のベシクル間で起こっていることを確認するために、フローサイトメトリーによる集団計測を行った。BODIPY で蛍光標識をした中性ベシクルと消光剤を配合したアニオン性ベシクルを混合後、分散液の pH を 3 に調整すると、ベシクルの膜融合に伴う蛍光の消光を確認した(図 3)。また pH=3 のときのベシクルサイズの増大も観測された。

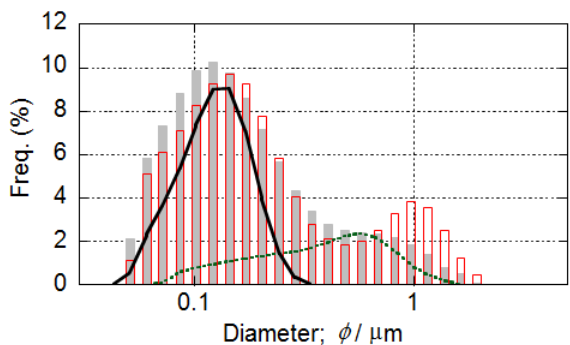


図 2. 融合に伴うベシクルのサイズ分布変化
 実線: POPG ベシクル, 破線: POPC ベシクル
 灰色のヒストグラム: pH7 の時の混合ベシクル
 赤色のヒストグラム: pH3 の時の混合ベシクル

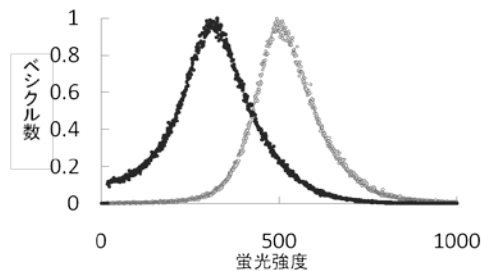


図 3. 蛍光剤配合ベシクルと消光剤配合ベシクルを混合したときのヒストグラム
 灰色: pH 7 で混合 黒色: pH 3 で混合

3) 多価イオンの添加による PCR 条件下でのベシクル融合

ベシクルの表面電荷と外水相に存在する多価イオンの静電相互作用を利用した。先行研究¹にあるように、多価イオンがベシクル間に入り込み、膜の横方向の圧縮力が増大し、外側の膜どうしの融合が起こる。我々は PCR 緩衝溶液で膨潤したベシクルでも融合した後に、肥大と分裂を起こすように、自己生産ダイナミクスに必要な膜分子を含む POPC をベースとする 1 mM ベシクル分散液を調製した。一方で POPG をベースとする 1 mM ベシクル分散液も調製した。両分散液を等量混合した後、1M 塩化ランタン水溶液を添加したところ、図 4 のようなベシクルの融合を確認した。

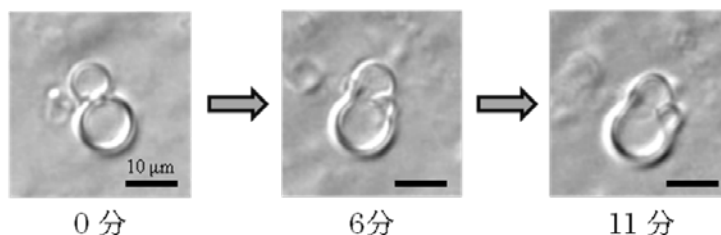


図 4. 塩化ランタン水溶液を用いた PCR 条件下における自己生産できるベシクルの融合の微分干渉顕微鏡像 (時間は塩化ランタン水溶液を添加してからの経過時間)

【まとめ・展望】

分散液の pH 変化で膜表面電荷を制御してベシクルを融合させることは、前生物的環境でも十分に起こりうることであり、仮に情報物質の基質を系に組み込むことができ、さらに熱水噴出孔を模した PCR 反応が進めば生命の起源を探る上で興味深い。

【引用文献】

1. T. Tanaka and M. Yamazaki, *Langmuir* **20**, 5160-5164 (2004).