

pH 変化感知性の自律運動を示す
オレイン酸系ベシクルに関する研究

名和 愛利香

同志社大学

目次

第 1 章	序論	1
1-1	はじめに.....	2
1-2	ベシクルの自律運動系に関する既存の研究と本論文の研究目的	9
1-3	本論文の概要.....	12
	References.....	14
第 2 章	pH 勾配下におけるベシクルの周期的構造変化	19
2-1	緒言	20
2-2	実験方法	21
2-2.1	試薬.....	22
2-2.2	溶液の調製法.....	23
2-2.3	ベシクルの観察.....	23
2-2.4	オレイン酸ナトリウム水溶液の中和滴定	24
2-3	結果と考察	25
2-3.1	ベシクルの周期的構造変化	25
2-3.2	ベシクルによる pH 勾配に沿った物体の輸送	35
2-3.3	オレイン酸の状態とベシクル構造	38
2-4	ベシクル運動のモデル.....	43
2-4.1	膜弾性を基盤にしたモデル	43
2-4.2	計算結果と考察.....	48
2-5	pH 勾配下でのベシクルの回転.....	52
2-6	結言	55
	References.....	56
	補遺.....	58

第 3 章	pH 勾配下におけるベシクルの走化性を示すアメーバ的変形	61
3-1	緒言	62
3-2	実験方法	64
3-2.1	試薬.....	64
3-2.2	実験手順.....	64
3-3	結果と考察	66
3-3.1	ベシクルの形状変化	66
3-3.2	変形中のベシクルの定量的評価	79
3-4	ベシクル変形の数学的モデル.....	82
3-5	結言	90
	References.....	91
第 4 章	グルコースの分解反応を利用したベシクルの可逆的な変形運動および分裂	93
4-1	緒言	94
4-2	実験方法	95
4-2.1	試薬.....	95
4-2.2	実験手順.....	96
4-3	結果と考察	97
4-3.1	ベシクルの運動.....	97
4-3.2	グルコースの分解反応によるグルコース溶液の pH 変化	100
4-3.3	ベシクルの変形に対するグルコースオキシダーゼの影響	102
4-3.4	ベシクルに対する浸透圧の影響	102
4-3.5	グルコースオキシダーゼの分配.....	104
4-3.6	ベシクルの変形メカニズム	108
4-4	結言	109
	References.....	110

第 5 章	局所的な pH 勾配下におけるベシクルの構造変化.....	111
5-1	緒言	112
5-2	実験方法	113
5-2.1	試薬.....	113
5-2.2	実験手順.....	113
5-3	結果と考察	114
5-3.1	酸性溶液による局所的 pH 勾配下におけるベシクルの運動.....	114
5-3.2	塩基性溶液による局所的 pH 勾配下におけるベシクルの運動.....	119
5-3.3	pH 勾配に対するベシクル変形運動の周期の依存性	121
5-4	結言	125
	References.....	126
第 6 章	結論	127
	謝辞.....	132

第 1 章 序論

Introduction

1-1 はじめに

生物は自らの体内において実に多様に生体システムを機能させている。それらのシステム内ではそれぞれの目的に合わせて高度な機能を極めて効率的に発現させている[1,2]。そのような高度な機能の1つの例として細胞内の物質輸送がある。一般的に物質の輸送には、拡散などによる受動的なものと自らエネルギーを生産しながら動く能動的なものがあるが、拡散による物質の輸送は長距離の移動に向いていない。なぜなら、移動距離が長くなるほど、拡散によって濃度が希薄化し、かつその輸送速度も遅く、その輸送本来の目的を達成できないためである[1]。したがって、高度な機能を効率的に働かすことを考えれば、物質輸送は能動的または自発的な運動によっておこなわれることが重要であり、アクチンフィラメントに沿って貨物を運搬する分子モーター[3]や生体膜に存在するタンパク質による自発運動は、このことの重要性を現している。

膜タンパク質はこのような自発運動性の獲得のために、しばしば化学ポテンシャル勾配を利用しているが、この化学ポテンシャル勾配そのものが能動的に形成される場合がある。例えば、ミトコンドリアでは、ミトコンドリア内膜の内外にプロトンの濃度差がないとき、内膜に展開する3つのタンパク質複合体を順番に電子が移ることによって、内膜と外膜の間（内膜の外側）へプロトンが輸送され、内膜の外側でプロトンが過剰になるような濃度勾配が形成される[1]。また、ミトコンドリア内膜でアデノシン三リン酸（ATP: adenosine triphosphate）を合成する酵素（ATPase）がATPを加水分解してアデノシン二リン酸（ADP: adenosine diphosphate）と無機リン酸（Pi）を生成する際に、ATPase自体もプロトンを内膜の外側へ能動的に輸送するポンプとして働くことがあり、ATPの加水分解のエネルギーによっても内膜の内外でプロトン勾配ができる。

このようにしてミトコンドリアが自発的に形成したプロトン濃度勾配は、その濃度勾配に従った（内膜の外側から内側のマトリックスへの）プロトンの移動も生み出すことができる。このとき、プロトンはATPaseの中を通るが、その際ATPaseの回転子（分子モーター）を力学的に回転させることでADPとPiからATPを合成する[4,5]（Fig. 1.1）。すなわち、この生体システム（膜タンパク質）内では、能動的に形成された化学ポテンシャル勾配（この場合はpH勾配）が力学的な仕事を生み、必要な物質を生成しているといえる。

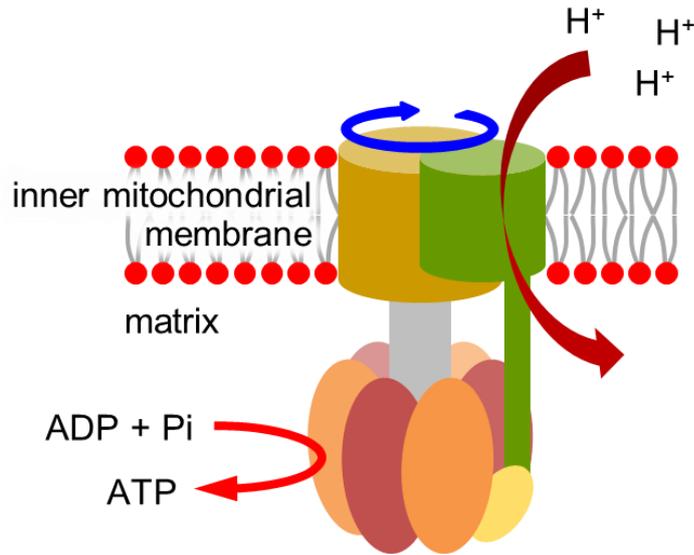


Fig. 1.1 Molecular motor protein moving under a pH gradient across the inner mitochondrial membrane [4,5].

また、化学ポテンシャル勾配から仕事を生み出す生体システムの他の例として、白血球の化学走性が挙げられる。白血球は体内の炎症箇所からの誘因物質を検出することで、その炎症部へと向かって移動することや[6]、バクテリアから放出される分泌物質の濃度勾配を感知することでバクテリアを追いかけることが知られている[7]。

このように、生体組織やその機能の多くは、その運動性によって維持される。一方、従来の化学プロセスでは、化学ポテンシャルなどの違い（系の状態の違い）を、あらかじめ与えることでシステムを設計して利用してきた。この場合の系の状態の違いは、人工的に形成されたものや、自然界にすでに存在している場合などがある。前者の例として熱機関や電池の中の二種類の半電池、後者の例として太陽電池に用いる太陽と地球の温度差などがあげられる。このように、従来用いられてきた状態の差というのは、生体システムのように自律的な過程で能動的に形成されたものではない。また、従来の化学プロセス技術において着目される現象の多くは、生物的な系に比べて静的あるいは受動的な移動現象を利用したものであり、生体システムのような運動性に着目したものはほとんどないといえる。

しかしながら、このような従来型のシステムに生物に見られるような自律的・自発的な運動性を与えることができれば、生物を模倣したような化学システムを構築できるのではないかと著者は考えている。例えば、化学ポテンシャル勾配によって生じるコロイ

ドサイズの物体の周期的変形や化学走性を研究し理解することは、マイクロメータスケールにおけるドラッグデリバリーシステム[8]にも利用可能な能動輸送性[9,10]のある高性能なキャリアの設計やターゲティング技術につながると期待できる。このような物体は特定の化学種やその濃度勾配などの刺激に応答することでその機能を発現させていると考えられ、生じた運動が周期的・持続的な性質を示すとき、その物体は化学ポテンシャル勾配を力学的仕事に連続的に変換しているといえる。また、このような自律的に運動している物体に走化性が備わっていれば、その物体は特定の場所や化学種を目標に定めて移動することができる。さらに、運動性を発現するための一様でない化学ポテンシャルの場を自ら生み出し、そのポテンシャル勾配を利用して運動する物体を設計することができれば、そのような物体の創製は生物の運動性を模倣した化学システムの構築につながると考えられる。

このように、生体が示すような微小なスケールでの化学ポテンシャル勾配を利用して運動性を示すシステムはエネルギー効率の観点からみても魅力的であり、それらの機能を人工的に創製することができれば、科学技術の進歩へ与える影響は極めて大きい。このような観点から、様々な分野において、生体機能に含まれる化学プロセスについて盛んに研究されているが、生体機能は非常に複雑であり、それらをそのまま人工系で再現することは極めて困難である。そこで、生体機能に似た特徴をもつ現象を単純な系を用いて再現し、解明、理解することが重要である。なぜなら、このような系は、生物的な特徴をもつ化学システムに必要な最小限の物理的特徴を理解するためのモデル系になるためである。

そのようなモデル系として、周囲の化学物質の濃度揺らぎや化学反応によって生じた化学ポテンシャル勾配（化学物質の濃度勾配など）を用いてコロイドサイズの物体を自律的に動かす研究では、微粒子や液滴に関するものが比較的盛んに報告されている[11-79]。

例えば、物体の駆動力に物質移動プロセスやマランゴニ効果を利用する系に着目すると、樟腦の自発運動[11-13]、アルコール滴の変形をともなう運動[14-16]、フッ素系油の集団運動[17]、オレイン酸ナトリウム／オレイン酸の固液複合体の自走運動[18]などが挙げられる。最初の例では、樟腦粒子が水面に設置されるとき、樟腦が水面上で並進や回転などの自発的な運動をおこなう。この系では、樟腦が水面に不均一拡散するために樟腦粒子の周囲に表面張力勾配が発生し、そのマランゴニ効果によって自発運動をおこ

なう。2番目の例では、水とペンタノールを含む水溶液中にペンタノール滴を設置すると、液滴が変形や分裂をおこなう。また、水溶液の温度によって方向性を持った運動や不規則な運動をおこなう。これも樟脳粒子の運動と同様に、アルコール滴の周囲に表面張力勾配ができ、それによるマランゴニ効果による運動である。3番目の例では、水面上に揮発性のフッ素系油（PFOB : Perfluorooctylbromide）を滴下すると、すぐに水面全体にPFOBが広がり薄膜が形成される。その後、水面がむき出しになるような空孔が現れ、空孔サイズが大きくなると空孔の縁に数珠状に連なる隆起部が発生する。この空孔では、PFOB薄膜からマイクロサイズの液滴が放出され、最終的に水面上で液滴がバクテリアや魚や鳥の集団に見られるような集団運動[80-82]をおこなう（Fig. 1.2）。液滴の発生は、PFOBが薄膜を形成した後、PFOBが蒸発すると、その蒸気によって水に対する濡れ性が変化するためにおこる。さらにPFOBの蒸発によって発生した対流によって集団運動をおこなったと考えられている。4番目の例では、超純水の上にオレイン酸の液滴を浮かべ、滴の端に接するようにオレイン酸ナトリウムの固体を設置すると、このオレイン酸ナトリウム／オレイン酸の固液複合体はオレイン酸ナトリウム側を先頭にして自走する。このとき、オレイン酸ナトリウムは界面活性剤として固体から溶け出し、オレイン酸と純水の油水界面に単分子層を形成している。油水間の界面張力はオレイン酸ナトリウムに近いほど低くなるため、オレイン酸の滴の周囲に界面張力勾配が形成する。これによってマランゴニ対流が発生し、複合体は自走すると考えられている。

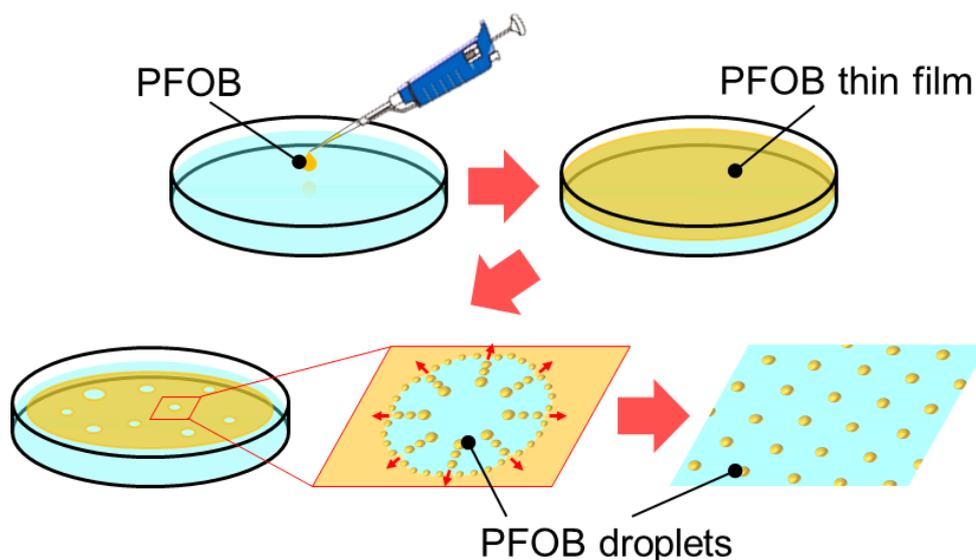


Fig. 1.2 Spontaneous collective motion of PFOB droplets on water [17].

物体の駆動力に反応エネルギーを利用する系に着目すると、水相中の固体基板上の液滴（油滴）の運動[27-32]や金属を用いたマイクロモーターの自律運動が挙げられる[45-78]。前者の例として、ニトロベンゼンの油滴の移動運動がある[29-32]。アニオンを含むニトロベンゼンを、水相中でカチオン性界面活性剤(TSAC: trimethyloctadecyl -ammonium chloride) が吸着しているガラス基板の上に滴下すると、油滴が基板上を移動する。油滴の中でアニオンとTSACが反応すると、基板からTSACが脱着し親水的になる。一方、油滴の前方ではTSACが基板に吸着していて疎水的になっている。このため、油滴の前方と後方で油滴の基板に対する濡れ性に勾配が発生し、油滴はより疎水的になっている前方に向かって進行する[33-37] (Fig. 1.3)。反応を利用して移動する油滴の他の例として、水中における界面活性剤を分解する触媒を含む油滴の遊走がある[38]。水中に予め界面活性剤を加水分解する触媒[39]を溶解させた油滴を設置し、この油滴に界面活性剤 (*N*-4-[3-[trimethylammonio]ethoxy]benzylidene)-4-octylaniline bromide) を加えると、油滴は界面活性剤を取り込みながら遊走する。このとき油滴内部では対流が発生しており、この内部対流の合一や離散が油滴自体の運動方向に連動する。後者の例として、過酸化水素溶液中で泳動する異方性微粒子（白金と金の複合ナノロッド）がある[52]。複合ナノロッドを過酸化水素溶液に入れると、白金側を先頭にして並進運動をおこなう (Fig. 1.4)。その機構についてはいくつかの説があるが[51-52,73-75]、白金側で還元反応が生じ、金側で酸化反応が生じることで、ロッド内では電子の、ロッド周辺では水素イオンの流れが白金側から金側に向かって発生する。その結果として、ロッド周辺の溶液は白金側から金側へと流れ、その反作用としてナノロッドは白金側を先頭にして移動する自己電気泳動[73-75]が推進機構として有力であると考えられる。

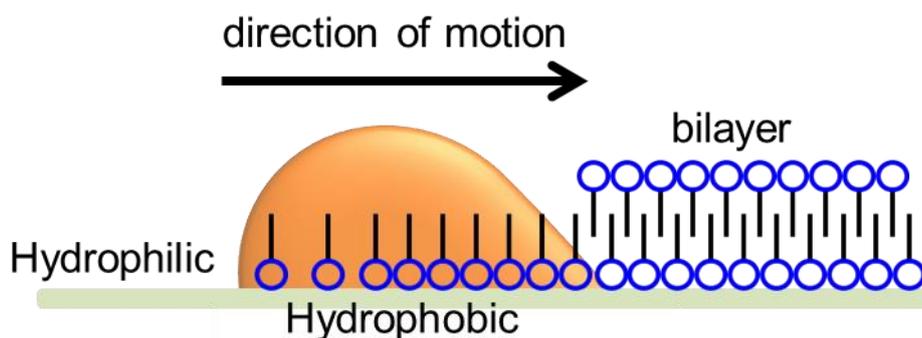


Fig. 1.3 Motion of an oil droplet driven by surface energy gradient on a solid substrate with chemical reaction [31].

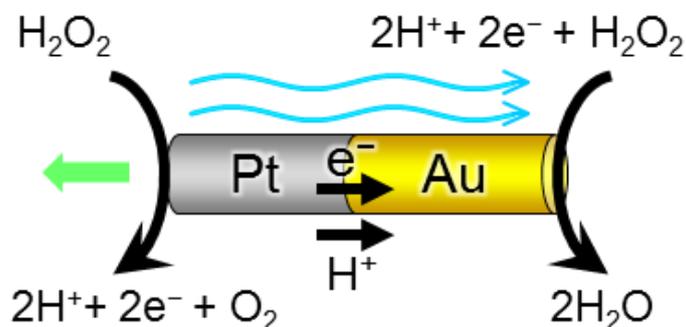


Fig. 1.4 Self-propelling microrod composed of platinum and gold in hydrogen peroxide aqueous solution [52].

物体の駆動力に化学走性が備わっている系に着目すると、溶液のpH勾配によって周囲に発生した気液界面の表面張力差を利用して迷路を解く液滴（油滴）[42]や過酸化水素ゲルに集まる白金／金ナノロッド[76,77]が挙げられる。前者の油滴には界面活性剤が含まれており、塩基性溶液で満たした迷路の入口に設置すると、油滴内の界面活性剤は周囲の溶液へ溶け出す。ここで、出口に酸性溶液を浸み込ませたゲルを設置すると、迷路には出口から入口に向かってpHが高くなるようなpH勾配が形成される。油滴には2-hexyldecanoic acid (HDA) が含まれており、油滴から溶出したHADは低pH側でよりプロトン化し、高pH側でより脱プロトン化するため、油滴周囲の気液界面の表面張力は低pH側で上がり、高pH側で下がる。このようにして発生した界面張力差を駆動力として油滴はpHが一番低くなっている出口へと向かうことが可能になる (Fig. 1.5)。場のポテンシャル勾配を利用して物体が迷路を解く例は微粒子についても報告されている [78,79]。後者では、白金／金ナノロッドが過酸化水素を含む寒天ゲルに向かって進み集まっていく。これは、ナノロッドの拡散速度が過酸化水素濃度に依存し増加するためにおこっていると考えられる。

また、例は少ないが、マランゴニ効果を利用しない油滴の運動がある[83,84]。界面活性剤 (TSAC) を含む水相の上に脂肪酸 (パルミチン酸) を含む油滴 (テトラデカン) を乗せると、油滴の縁上でいくつもの球状突起が出入りし、油滴が移動する。これは、TSACとパルミチン酸が反応し油水界面でゲルのような中間層が生成と消滅を繰り返すことによると考えられている。

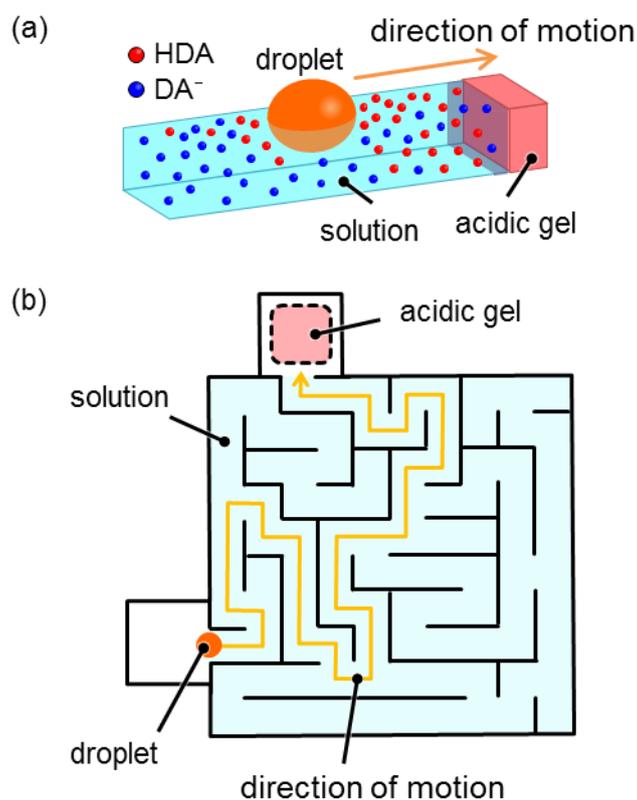


Fig. 1.5 Maze solving by chemotactic droplet. (a) Schematic representation of a droplet in a channel. (b) Illustration of the droplet in a maze. [42].

これまで述べたように、微粒子や液滴の運動は化学走性によるものも含めて、一部を除いて運動のほとんどはマランゴニ効果（あるいは広い意味での表面エネルギー勾配）によって発生した対流によって駆動される。マランゴニ効果は界面エネルギーの勾配によって生じるが、この勾配は通常、固液や油水など十分な界面エネルギーを持つ界面で形成される。したがって、このようなマランゴニ効果を利用した運動は自己運動自体を研究するための手段として非常に有効であり、広く研究されてきたと言える。

一方で、より生物的な分野で用いるための物質輸送のキャリアの設計やターゲティング技術の発展という点に着目すると、微粒子や液滴の利用は必ずしも有効ではない。例えば微粒子はそれ自体が運動することは可能だが、構造変化などを利用して内包する物質を放出したり、逆に外部の物質を取り込んだりすることなどは困難であり、キャリアには向かないと考えられる。また、液滴は周りの液体と混和しないことが必要であり、生体内など様々な液相環境での利用が困難である。また、液滴は他の液滴と合一しやすく、滴の孤立性が維持しにくいことなども懸念される。

したがって、より生物的な化学システムを対象として、その物理的特徴を理解し、さらに物質輸送のキャリアとして応用するという観点から、細胞組織に近い膜構造を持つベシクルを用いた自律運動を研究することは非常に意義深いと考えられるが、そのような研究は少ないのが現状である[85-88]。ベシクルは両親媒性分子による2分子膜や多層膜で構成されるため、ベシクル膜の内側と外側は双方水相である。この特徴もまた、細胞組織と一致しており、さらに、系に油相を用いないことは、生物に対する有毒性を下げることにつながると考えられる。しかし、ほとんどの場合、膜内外の2相（内水相と外水相）の化学組成にはほとんど差がないため、一般的にはベシクル膜の界面エネルギーは油水界面や固液界面に比べて低い場合が多く、ベシクルの内外でマランゴニ効果による対流などはめったに起こらず、微粒子や液滴のように界面のエネルギー差を駆動力とするような周期的変形や化学走性を備えた自律運動をベシクルに実現させることは非常に困難である。実際に、生物の運動の多くは、可逆的や振動的な運動によって維持されており[89,90]、したがって、生体機能と似たような運動を示すベシクルを作製するためにはマランゴニ不安定性とは全く別のメカニズムを考える必要がある。

1-2 ベシクルの自律運動系に関する既存の研究と本論文の研究目的

既存の研究において、自律運動をおこなうベシクル[91-94]やベシクル構造の周期的変化[95-101]がいくつか報告されている。例えば、ベシクルの周期的な孔の開閉が挙げられる。これらの研究では、ベシクル膜は光を照射されたり化学物質を添加されたりすることで部分的に溶解し、その結果として開孔が引き起こされる[95-101]。その後、ベシクル内水相の放出が進み孔は閉じるが、この孔の開閉運動は何回か繰り返されることも報告されている (Fig. 1.6)。その他の例としては、単純なイオン交換によって駆動されるベシクルが報告されている[102]。この研究では、ベシクル膜を構成する界面活性剤と周囲に拡散してきた溶液中のイオンが交換されることで、このベシクル膜を消費して凝集物が生成される。このときの反作用を駆動力としてベシクルは移動することが可能となる (Fig. 1.7)。しかしながら、このようなベシクルの周期運動や自律運動に関する研究においては、ベシクルのサイズはそのサイクル毎や時間とともに単調に減少している[96-98]。

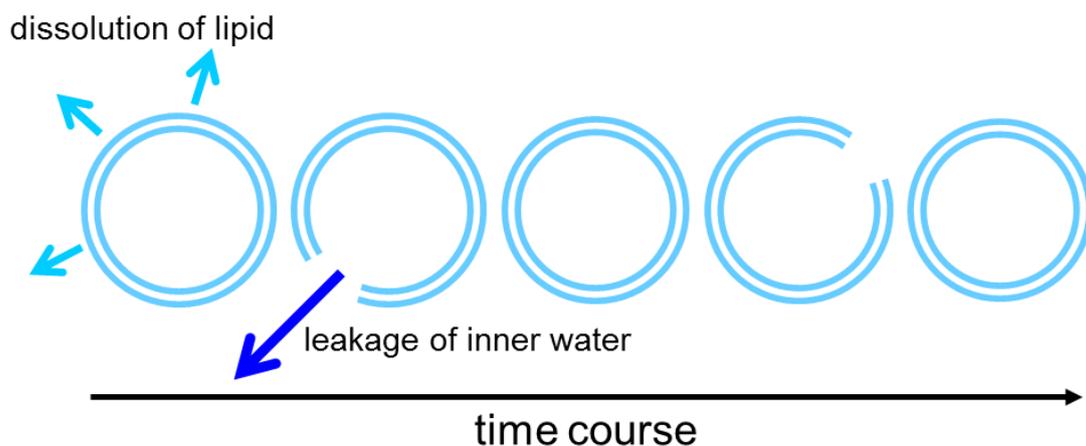


Fig. 1.6 Schematic representation of rhythmic pore and shrinkage of phospholipid vesicle [100,101].

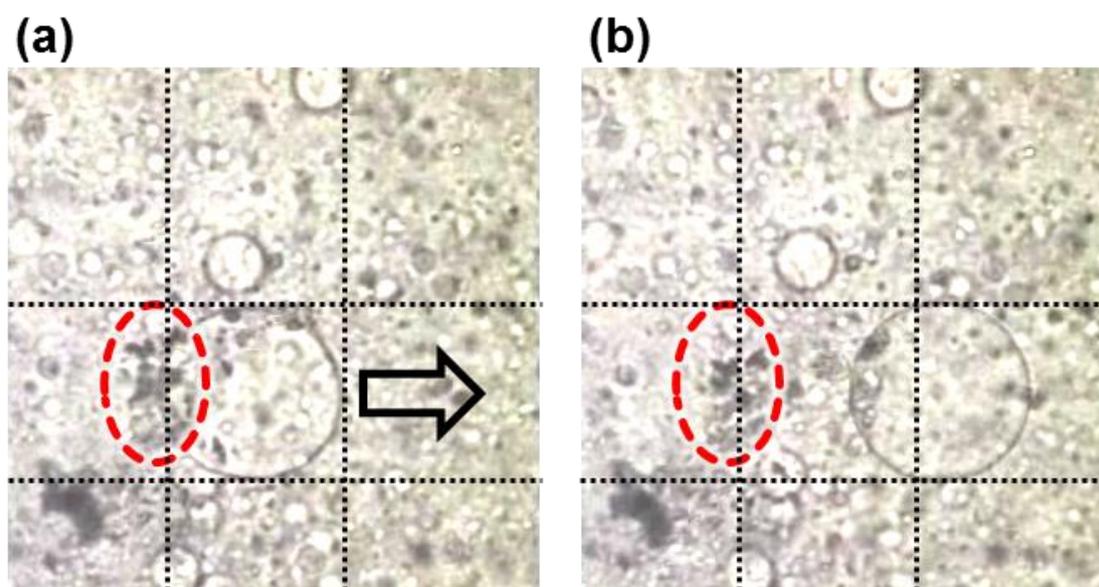


Fig. 1.7 Vesicle that is composed of didodecyldimethylammonium bromide translates driven by ion exchange due to diffusion of KI. Photograph (b) is of 1.1 s after (a) [102].

このように、周期的形状変化や自律運動を示すベシクルの研究は比較的少ないうえに、多くの場合それらの運動や変形にはベシクルの著しいサイズ減少をともなう[101]。数少ないサイズを維持するベシクル（小胞）運動の例としては、リステリア菌などのアクチン重合による移動[103-106]およびそれを模倣した系[91-93]が挙げられるが (Fig. 1.8)、これはリステリア菌の移動機構を人工的なベシクルに付与したものであり、自己運動系の研究として興味深い。

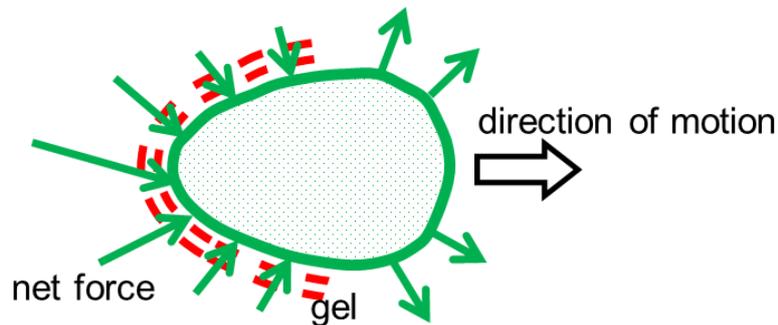


Fig. 1.8 Illustration of a vesicle that moves by actin polymerization [93].

生体内で、力学的運動への変換を引き起こす化学ポテンシャル勾配の代表的な例として、pH勾配が挙げられる。pH勾配は水溶液の中で形成しやすく、様々な化学反応で発生させやすいなど、人工的な自己運動系の場合として利用しやすい特徴がある。このようなpH勾配をベシクルの自己運動に応用する研究は興味深い。既存の研究において、ベシクルの変形や膜の性質について研究する際には、主にリン脂質やカチオン性界面活性剤のDDAB (Didecyldimethylammonium bromide) などがベシクルを構成する両親媒性分子として用いられていた。しかしながら、これらの物質は、pH変化によって分子の状態が大きく変化することなく、それらから構成されるベシクルに対してpH変動は決定的な効果を与えにくい。そこで、ベシクルの材料としてpHに敏感に反応する脂肪酸を用いることでpH変化に反応するベシクルができるものと考えられる。例えば、オレイン酸およびそのイオン化した物質 (acid/soap) は限られたpH範囲で様々な種類のベシクルを形成することが報告されている[107-109]。さらに、オレイン酸でできた螺旋状の分子集合体が、周囲のpH変化に応じて螺旋の向きを右巻きから左巻きへ構造変化させるというようなダイナミクスが報告されている[107]。

これらの条件を踏まえて pH 変動に反応して運動するようなベシクルを作製する実験系を考えると、第1に周囲の pH 変化の影響でベシクルの構造変化がおこることが必要であり、第2にベシクルの構造が元の状態に戻る運動が必要であると考えられ、これらの結果として崩壊せずに周期運動を持続させるベシクルを見出すことができる。

このような観点から、本論文では次のことを目的としている。まず、pH勾配下における様々な構造をもったオレイン酸系ベシクルの様々な周期的・可逆的な運動が実現可能かどうかを検討した。さらに、そのような現象を見出し、その運動発生機構を解明するとともに、生体を模倣するようなベシクルを設計するためのモデル系を確立する。

さらに、ベシクル自体が化学反応によりpH変動を誘起して運動するベシクルを見出し、様々な化学反応に適応できるようなベシクルのモデル系を確立する。

構造の複雑な細胞の代わりに、非常に単純な分子構造を有するベシクルを用い、簡単なメカニズムによって生体的な特徴をもつ運動を再現することは、生体機能をより深く理解することにつながるという点においても重要である。本論文では、現象論的なパラメータを用いて運動のモデル化をおこなったが、異なる分子を用いても現象論的なパラメータが共通していれば同じ現象として扱えることになる。さらに、このような生物のように化学ポテンシャル勾配を連続的に仕事に変換するようなベシクルを作製することは、新たなドラッグデリバリーシステムや能動輸送系の人工的な設計につながり、科学技術の発展に大きな影響を与えると考えられる。

1-3 本論文の概要

本論文は序論（第1章）と結論（第6章）を含む6章で構成され、それぞれの章の概要は以下の通りである。

第2章では、pH勾配下で周期的構造変化を示すベシクルを検討した。このベシクルはオレイン酸（acid/soap）を含み、初めはストマトサイト型[88]もしくは外見上2重球の構造をもつ。その内水相は2重球ベシクルの片側に局在しており（以下、膨潤部）、逆側は水分をほとんど含まない（以下、結合部）。水酸化物イオンの拡散がpH勾配を形成したとき、高pH側にある膨潤部の中央にある小孔が開き始め、ベシクルは初期状態と反対の曲率を持った2重球になるように反転し、小孔を再び閉じる。その後、このベシクルは最初の状態に戻るよう回転し、膨潤部は高pH側を向く。この周期的な構造変化は何度も繰り返されるが、ベシクルのサイズは運動が繰り返される間、ほとんど一定に維持される。第2章では、このようなpH勾配から仕事を連続的に生み出すベシクルを位相差顕微鏡を用いて観察し、その変形モデルを報告する。

第3章では、pH勾配下でアメーバのように擬足構造を伸縮させるベシクルについて検討した。このベシクルも第2章と同様にオレイン酸（acid/soap）で構成されており、第2章で説明したような2重球の反転回転サイクルを数回起こした後、2重球構造から扁平構造に変化する。その後、NaOHの拡散下で、擬足構造はベシクルから高pH側へ

向かって伸長し、続いて収縮する。このベシクルはアメーバ的な“擬足”の伸縮を示すが、このような運動は生体模倣的性質をもつ両親媒性分子集合体の設計するうえで重要であると考えられる。このように変形の方法を選択するようなベシクルの例はこれまでにほとんどなく、そのメカニズムの理解も不十分であった。したがって、第3章で報告されるベシクルの運動は、生体模倣型のベシクルを設計するための1つのモデル系になるといえる。

第4章では、グルコースの分解反応によるベシクルの構造変化について検討した。第2、第3章では、pH 勾配はベシクル溶液に直接的に塩基を加えることで形成されていたが、第4章では化学反応を用いてベシクルが自ら周囲に pH 変動を形成する系を考えた。ベシクルの構成成分には第2、第3章と同様にオレイン酸 (acid/soap) を用いた。化学反応にはグルコースオキシダーゼ (GOx) によるグルコースの分解反応を用いた。この反応ではグルコースから最終的にグルコン酸が生成される。したがって、グルコース溶液中のベシクルに GOx が含まれていれば、化学反応によってベシクル周囲の pH が下がると予想される。第4章では、ベシクルから等方的に伸びる可逆的な擬足構造の伸縮が観察された。ベシクルに擬足構造を伸長させるだけの余剰面積が存在するとき擬足の伸縮が発生すると推定された。この構造変化は生物と同様にグルコースを燃料としている点でも興味深いと考えている。また、第4章の結果から、ベシクル周囲に直接的な pH 変動を与えなくても、pH 変動を形成するような任意の化学反応を用いてベシクルの可逆的な構造変化を発生させることができる可能性を示した。

第5章では、局所的な pH 勾配下における2重球ベシクルの周期的構造変化および扁平型ベシクルの可逆的な擬足の変形を観察し、ベシクルの運動に対する pH 勾配の依存性について検討した。ベシクルの構成成分には第2から4章と同様にオレイン酸 (acid/soap) を用いた。局所的 pH 勾配はマニピュレータを用いてベシクル溶液に酸や塩基を拡散させることで形成した。第2、第3章では、pH 勾配の形成には塩基を用いていたが、第5章では酸を用いた pH 勾配下でもベシクルが運動することを確認し、またその運動周期はマニピュレータ先端からの距離に依存した。このことから、ベシクルの運動周期は pH の絶対値ではなく勾配の大きさに依存すると考えられる。

第6章では、結論として本論文における成果をまとめ、今後の展望を示した。

Reference

1. R. Phillips, J. Kondev and J. Theriot, "Physical Biology of the Cell," Taylor & Francis Group, Abingdon, (2008).
2. G. Pocock and C. D. Richards, "Human Physiology: The Basis of Medicine Third edition," Oxford University Press, Oxford, (2006).
3. A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, P. R. Selvin, *Science*, 300, 2061 (2003)
4. H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida and K. Kinoshita Jr., *Nature*, 386, 299 (1997)
5. T. Elston, H. Wang and G. Oster, *Nature*, 391, 510 (1998).
6. A. J. Ridley, M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons and A. R. Horwitz, *Science*, 302, 1704 (2003).
7. R. I. Gamow, B. Böttger and F. S. Barnes, *Biophys. J.*, 11, 860 (1971).
8. Y. Y. Won and H. Lee, *J. Control. Release*, 170, 396 (2013).
9. R. Eichhorn, J. Regtmeier, D. Anselmetti and P. Reimann, *Soft Matter*, 6, 1858 (2010).
10. C. Reichhardt and C. J. Olson Reichhardt, *Physical Rev. E*, 73, 011102 (2006).
11. L. Rayleigh, *Proc. R. Soc. Lond.*, 47, 364 (1889).
12. H. Kitahata, K. Iida and M. Nagayama, *Phys. Rev. E*, 87, 010901 (2013).
13. N. J. Suematsu, S. Nakata, A. Awazu and H. Nishimori, *Phys. Rev. E*, 81, 056210 (2010).
14. C. M. Bates, F. Stevens, S. C. Langford and I. T. Dickinson, *Langmuir*, 24, 7193 (2008).
15. K. Nagai, Y. Sumino, H. Kitahata and K. Yoshikawa, *Prog. Theor. Phys. Suppl.*, 161, 286 (2006).
16. K. Nagai, Y. Sumino, H. Kitahata and K. Yoshikawa, *Phys. Rev. E*, 71, 065301 (2005).
17. D. Yamamoto, C. Nakajima, A. Shioi, M. P. Krafft and K. Yoshikawa, *Nature commun.*, 6, Article 7189 (2015).
18. F. Takabatake, N. Magome, M. Ichikawa and K. Yoshikawa, *J. Chem. Phys.*, 134, 114704 (2011).
19. C. D. Bain, *ChemPhysChem*, 2, 580 (2001).
20. M. K. Chaudhury and G. M. Whitesides, *Science*, 256, 1539 (1992).
21. S. Daniel, M. K. Chaudhury and J. C. Chen, *Science*, 291, 633 (2001).
22. F. D. Dos Santos and T. Ondarçuhu, *Phys. Rev. Lett.*, 75, 2972 (1995).

23. K. Ichimura, S. K. Oh and M. Nakagawa, *Science*, 288, 1624 (2000).
24. S. W. Lee and P. E. Laibinis, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 5395 (2000).
25. D. T. Wasan, A. D. Nikolov and H. Brenner, *Science*, 291, 605 (2001).
26. Y. Sumino, H. Kitahata, H. Seto and K. Yoshikawa, *Phys. Rev. E*, 76, 055202 (2007).
27. E. Nakache and M. Dupeyrat, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 9, 583 (1982).
28. E. Nakache, M. Dupeyrat and M. Vignes- Adler, *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 77, 189 (1984).
29. K. Kitahata and K. Yoshikawa, *Physica D*, 205, 283 (2005).
30. Y. Sumino, N. Magome, T. Hamada and K. Yoshikawa, *Phys. Rev. Lett.*, 94, 068301 (2005).
31. Y. Sumino, H. Kitahata, K. Yoshikawa, M. Nagayama, S. M. Nomura, N. Magome and Y. Mori, *Phys. Rev. E*, 1672, 041603 (2005).
32. Y. Goto, M. Kanda, D. Yamamoto and A. Shioi, *Scientific Reports*, 5, Article 14348 (2015).
33. A. Shioi, T. Ban and S. Suzuki, *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 77, 036208 (2008).
34. A. Shioi, T. Ban and S. Suzuki, *Chem. Phys. Lett.*, 467, 210 (2008).
35. A. Shioi, K. Katano and Y. Onodera, *J. Colloid Interface Sci.*, 266,415 (2003).
36. Y. Sumino, H. Kitahata, K. Yoshikawa, M. Nagayama, S. M. Nomura, N. Magome and Y. Mori, *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 72, 041603 (2005).
37. Y. Sumino, N. Magome, T. Hamada and K. Yoshikawa, *Phys. Rev. Lett.*, 94, 068301 (2005).
38. T. Toyota, N. Maru, M. M. Hanczyc, T. Ikegami and T. Sugawara, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 5012 (2009).
39. T. Toyota, K. Takakura, Y. Kageyama, K. Kurihira, M. Maru, K. Ohnuma, K. Kaneko and T. Sugawara, *Langmuir*, 24, 3037 (2008).
40. T. Ban, T. Yamagami, H. Nakata and Y. Okano, *Langmuir*, 29, 2554 (2013).
41. M. M. Hanczyc, T. Toyota, T. Ikegami, N. Packard and T. Sugawara, *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 9386 (2007).
42. I. Lagzi, S. Soh, P. J. Wesson, K. P. Browne and B. A. Grzybowski, *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 1198 (2010).
43. P. G. de Gennes, *Physica A*, 249, 196 (1998).
44. A. M. Reynolds, *Phys. Rev. E: Stat. Nonlinear Soft Matter Phys.*, 81, 062901 (2010).

45. N. Yoshinaga, K. H. Nagai, Y. Sumino and H. Kitahata, *Phys. Rev. E*, 86, 016108 (2012).
46. S. Gangwal, O. J. Cayre, M. Z. Bazant and O. D. Velev, *Phys. Rev. Lett.*, 100 (2008) 058302.
47. W. Gao, S. Sattayasamitsathit, K. M. Manesh, D. Weihs and J. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 14403 (2010).
48. S. Tottori, L. Zhang, F. Qiu, K. K. Krawczyk, A. Franco-Obregón and B. J. Nelson, *Adv. Mater.*, 24, 811 (2012).
49. W. Wang, L. A. Castro, M. Hoyos and T. E. Mallouk, *ACS Nano*, 6, 6122 (2012).
50. W. Gao, A. Pei, R. Dong and J. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 2276 (2014).
51. R. F. Ismagilov, A. Schwartz, N. Bowden and G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41, 652 (2002).
52. W. F. Paxton, K. C. Kistler, C. C. Olmeda, A. Sen, S. K. St. Angelo, Y. Cao, T. E. Mallouk, P. E. Lammert and V. H. Crespi, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 13424 (2004).
53. H. Yuping, W. Jinsong and Z. Yiping, *Nano Letters*, 7, 1369 (2007).
54. J. G. Gibbs and Y. P. Zhao, *Applied Physics Letters*, 94, 163104 (2009).
55. T. C. Lee, M. Alarcón-Correa, C. Miksch, K. Hahn, J. G. Gibbs and P. Fischer, *Nano Letters*, 14, 2407 (2014).
56. S. Fournier-Bidoz, A. C. Arsenault, I. Manners and G. A. Ozin, *Chem. Commun.*, 441 (2005).
57. S. J. Ebbens and J. R. Howse, *Langmuir*, 27, 12293 (2011).
58. L. Baraban, M. Tasinkevych, M. N. Popescu, S. Sanchez, S. Dietrich and O. G. Schmidt, *Soft Matter*, 8, 48 (2012).
59. A. A. Solovev, Y. Mei, E. B. Ureña, G. Huang and O. G. Schmidt, *Small*, 5, 1688 (2009).
60. D. A. Wilson, R. J. M. Nolte and J. C. M. Van Hest, *Nature Chemistry*, 4, 268 (2012).
61. S. Wang and N. Wu, *Langmuir*, 30, 3477 (2014).
62. R. Golestanian, T. B. Liverpool and A. Ajdari, *Phys. Rev. Lett.*, 94, 220801 (2005).
63. R. Liu and A. Sen, *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 20064 (2011).
64. W. Gao, X. Feng, A. Pei, Y. Gu, J. Li and J. Wang, *Nanoscale*, 5, 4696 (2013).
65. F. Mou, C. Chen, H. Ma, Y. Yin, Q. Wu and J. Guan, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, 7208 (2013).
66. W. Gao, A. Pei and J. Wang, *ACS Nano*, 6, 8432 (2012).
67. W. Gao, A. Uygun and J. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 897 (2012).
68. F. Mou, C. Chen, Q. Zhong, Y. Yin, H. Ma and J. Guan, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 6, 9897 (2014).
69. T. R. Kline, W. F. Paxton, T. E. Mallouk and A. Sen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 744 (2005).
70. D. Kagan, P. Calvo-Marzel, S. Balasubramanian, S. Sattayasamitsathit, K. M. Manesh, G. U. Flechsig and J. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 12082 (2009).
71. J. Burdick, R. Laocharoensuk, P. M. Wheat, J. D. Posner and J. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*,

- 130, 8164 (2008).
72. G. Zhao and M. Pumera, *Langmuir*, 29, 7411 (2012).
 73. W. F. Paxton, P. T. Baker, T. R. Kline, Y. Wang, T. E. Mallouk and A. Sen, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 14881 (2006).
 74. J. L. Moran and J. D. Posner, *J. Fluid Mech.*, 680, 31 (2011).
 75. Y. Wang, R. M. Hernandez, D. J. Bartlett, Jr., J. M. Bingham, T. R. Kline, A. Sen and T. E. Mallouk, *Langmuir*, 22, 10451 (2006).
 76. Y. Hong, N. M. K. Blackman, N. D. Kopp, A. Sen and D. Velegol, *Phys. Rev. Lett.*, 99, 178103 (2007).
 77. A. Sen, M. Ibele, Y Hong and D. Velegol, *Faraday Discussions*, 143, 15 (2009).
 78. K. Suzuno, D. Ueyama, M. Branicki, R. Toth, A. Braun and I. Lagzi, *Langmuir*, 30, 9251 (2014).
 79. P. Lovass, M. Branicki, R. Tóth, A. Braun, K. Suzuno, D. Ueyama and I. Lagzi, *RSC Adv.*, 5, 48563 (2015).
 80. H. P. Zhang, A. Be'er, E. L. Florin and H. L. Swinney, *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 13626 (2010).
 81. J. K. Parrish, S. V. Viscido and D. Grünbaum, *Biol. Bull.*, 202, 296 (2002).
 82. C. K. Hemelrijk and H. Hildenbrandt, *PLoS ONE*, 6, e22479 (2011).
 83. Y. Sumino, H. Kitahata, H. Seto and K. Yoshikawa, *Soft Matter*, 7, 3204 (2011)
 84. Y. Sumino and K. Yoshikawa, *Eur. Phys. J. Special Topics*, 233, 1345 (2014)
 85. S. M. Christensen and D. Stamou, *Soft Matter*, 3, 828 (2007).
 86. P. Stano and P. L. Luisi, *Chem. Commun.*, 46, 3639 (2010).
 87. D. Abreu, M. Levant, V. Steinberg and U. Seifert, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 208, 129 (2014).
 88. U. Seifert, *Adv. Phys.*, 46, 13 (1997).
 89. D. Marsland, in *Int. Rev. Cytol.*, ed. G. H. Bourne and J. F. Danielli, Academic Press, vol. 5, 199 (1956).
 90. A. Rajendran, M. Endo and H. Sugiyama, *Chem. Rev.*, 114, 1493 (2013).
 91. J. Solon, P. Streicher, R. Richter, F. Brochard-Wyart and P. Bassereau, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103, 12382 (2006).
 92. P. A. Giardini, D. A. Fletcher and J. A. Theriot, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 6493 (2003).
 93. A. Upadhyaya, J. R. Chabot, A. Andreeva, A. Samadani and A. van Oudenaarden, *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 4521 (2003).
94. O. Sandre, L. Moreaux and F. Brochard-Wyart, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96, 10591 (1999).
 95. F. Brochard-Wyart, P. G. de Gennes and O. Sandre, *Physica A*, 278, 32 (2000).
 96. F. Nomura, M. Nagata, T. Inaba, H. Hiramatsu, H. Hotani and K. Takiguchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 2340 (2001).
 97. T. Umeda, F. Nomura, T. Inaba, K. Takiguchi and H. Hotani, *ChemPhysChem*, 6, 1047 (2005).
 98. S. Takeda, A. Saitoh, M. Furuta, N. Satomi, A. Ishino, G. Nishida, H. Sudo, H. Hotani and K. Takiguchi, *J. Mol. Biol.*, 362, 403 (2006).
 99. T. Hamada, Y. Hirabayashi, T. Ohta and M. Takagi, *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 80, 051921 (2009).
 100. M. Kaga and T. Ohta, *Eur. Phys. J. E*, 21, 91 (2006).
 101. M. Kaga and T. Ohta, *J. Phys. Soc. Jpn.*, 76, 094003 (2007).
 102. T. Miura, H. Oosawa, M. Sakai, Y. Syundo, T. Ban and A. Shioi, *Langmuir*, 26, 1610 (2010).
 103. C. S. Peskin, G. M. Odell and G. F. Oster, *Biophys. J.*, 65, 316 (1993).
 104. A. Mogilner and G. Oster, *Biophys. J.*, 71, 3030 (1996).
 105. F. Gerbal, P. Chaikin, Y. Rabin and J. Prost, *Biophys. J.*, 79, 2259 (2000).
 106. A. Mogilner and G. Oster, *Biophys. J.*, 84, 1591 (2003).
 107. M. Ishimaru, T. Toyota, K. Takakura, T. Sugawara and Y. Sugawara, *Chem. Lett.*, 34, 46 (2005).
 108. I. Lagzi, D. Wang, B. Kowalczyk and B. A. Grzybowski, *Langmuir*, 26, 13770 (2010).
 109. K. Morigaki and P. Walde, *Langmuir*, 18, 10509 (2002).

第 2 章 pH 勾配下におけるベシクルの周期的構造変化

Rhythmic shape change of a vesicle under a pH gradient

2-1 緒言

第1章で述べたように、周期的変化や自律運動といった特徴を持つベシクルは、ドラッグデリバリーなどのマイクロメートルサイズの高性能なキャリアとして利用されることが期待できる。このようなベシクルは特定の化学種やその濃度勾配のような刺激に応答することでその機能が発現すると考えられ、これらの運動が周期的・持続的な性質を示すときベシクルは化学ポテンシャルを力学的仕事に連続的に変換する分子集合組織になり得ると考えられる。例えば、自律的に運動しているベシクルに走化性が備わっていれば、そのベシクルは特定の場所や化学種を目標に定めて移動することができる。またそのような周期的あるいは自律的な運動はベシクルを用いた能動輸送(化学ポテンシャル勾配に依存しない輸送)を可能にすると考えられる。これらの特徴的な分子集合体の研究は科学技術を飛躍的に進歩させるような新しい技術を生み出し、生体細胞的な動的性質を示す分子集合体モデルになると考えられる。

自律的に運動するベシクル[1-3]やベシクル構造の周期的変化[4-8]はこれまでも多数研究されており、ベシクルの周期的な孔の開閉はその一つの例である。この開孔は、ベシクル膜への光の照射や化学物質の付加によって誘発されるベシクル膜の部分的な溶解によって生じ[4-8]、その後、孔は閉じる。また、この運動はたびたび繰り返される。このようなベシクルの周期運動に関する研究においては、ベシクルのサイズはそのサイクル毎に段階的に減少しており[5-7]、段階的なサイズ減少の間に動的な形状変化を示すベシクルもすでに報告されている[5]。その他の例としては、化学反応を用いて自律的に動いているベシクルが実現されている。例えば、生体分子であるアクチンを内包するベシクルの並進運動などが報告されている[1, 2]。一方、生体分子を用いないベシクル運動の例として、三浦らは単純なイオン交換によって駆動されるジャイアントベシクルを見出した[9]。この系では、ベシクルの構成成分であるカチオン界面活性剤(DDAB: Didecyldimethylammonium bromide)がイオン交換によって凝集物を作る。このベシクルのサイズが運動中に減少しており、ベシクルはカチオン界面活性剤を消費することで、その凝集物を作製し、その凝集物が一箇所に集積する反作用としてベシクルを押し出す力を得ている。

周期的形状変化や自律運動を示すベシクルの研究では、このように多くの場合、運動や変形にともない著しいサイズ減少を伴う[10]。これとは別に、近年、自律的に運動す

る液滴や粒子などのコロイド物体の研究が注目されている。例えばベシクルの研究でよく利用されるオレイン酸とオレイン酸ナトリウムで構成される液滴も自己推進物体の設計に利用されている[11, 12]。これらの自己運動するコロイドの研究者らは、これらの研究はナノテクノロジーや生体模倣科学技術の発展に貢献するであろうと言及している。例えば、周囲の環境に応じて自律的に運動するベシクルや、連続的もしくは周期的な運動を示すベシクルの実現は、その内部に様々な積み荷を含ませ、生物細胞をまねたリアクターとして働くベシクルの作製に繋がると考えられる。

本章では、pH 勾配下でのベシクルの周期的構造変化について述べる。本ベシクルはオレイン酸とオレイン酸ナトリウムで構成され、その構造は見かけ上 2 重球に見えるストマトサイト状[13]で、球体ではない。この周期的構造変化は pH 勾配による泳動力とベシクル膜の弾性エネルギーによって誘発され、サイズの減少をほとんど伴わずに何度も繰り返される。また、条件を整えば低 pH 側から高 pH 側へ小さな荷物を運ぶことも可能である。pH 勾配は様々な応用において有望な化学場の一つであり、数々の生体システムでも使われている。このような、pH 勾配を利用した持続的自己運動の応用は生体模倣の観点からみても魅力的である。

2-2 実験方法

ベシクルを作製するために乾燥再水和法[14]、固体水和法[11]および超音波法[15]の 3 種類の方法を試みた。ベシクルの構造は作製方法に依存し、超音波法を利用したときのみ周期的構造変化を示すベシクルが得られた。その周期的構造変化を示すベシクルは後述で説明されるような 2 重球であったが、超音波法によって作製されたベシクルの形状は、2 重球以外にも単純な 1 重球、ロッド・紐状、数珠状、洋ナシ状などの形状が混在していた。一方、乾燥再水和法や固体水和法で 2 重球構造を得ることは難しかった。本章では超音波法によるベシクルの作製方法について述べる。また、全ての実験は約 20-25°C に調節された室温で行われた。

2-2.1 試薬

以下に本研究で用いた試薬を記す。また、Table 2.1中の試薬の構造式をFig. 2.1に示す。

Table 2.1 Reagent of experiment

試薬	製造元
Sodium oleate (特級) > 97.0 %	東京化成工業(株)
Bicine (特級) > 99.0 %	SIGMA-ALDRICH
Sodium hydroxide 1M (容量分析用)	和光純薬工業(株)
Hydrochloric acid 1M (容量分析用)	和光純薬工業(株)
Rhodamine 6G (特級)	SIGMA-ALDRICH
Thymol blue solution (pH 試験用)	SIGMA-ALDRICH

以下、Sodium oleate をオレイン酸ナトリウム、Bicine をビスシン、Sodium hydroxide をNaOH、Hydrochloric acid をHCl、Rhodamine 6G をローダミン 6G、Thymol blue solution をチモールブルーと記す。

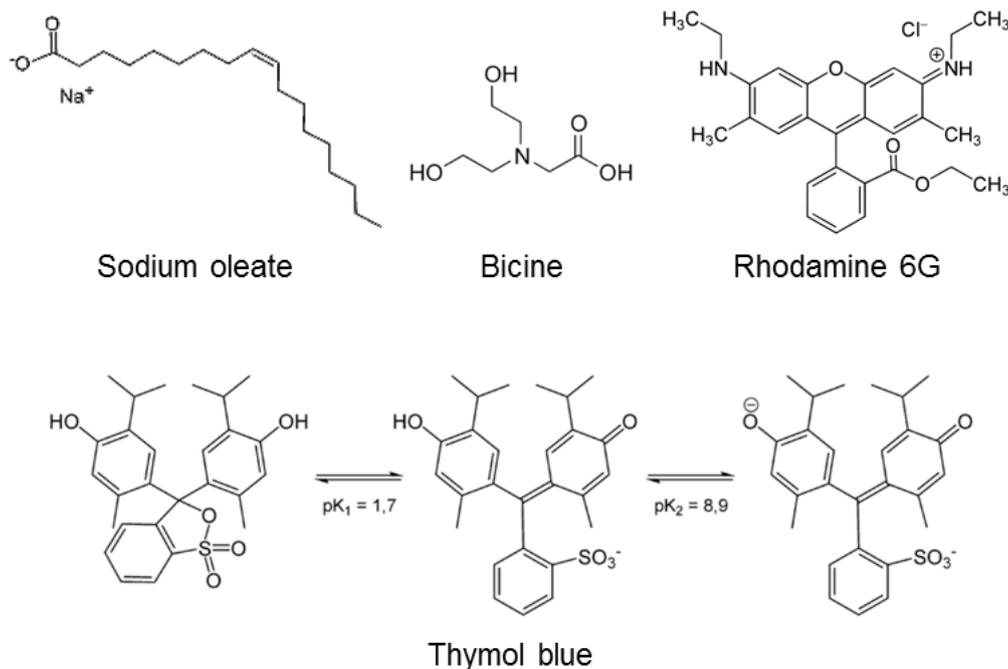


Fig. 2.1 Structural formula of reagent.

2-2.2 溶液の調製法

ビスシン緩衝液の調製

2.85 g のビスシンを 250 mL の超純水で溶解させる。この水溶液に 1 M の NaOH を加え、pH を約 8.1 に調整した。

ベシクル溶液の調製

37.5 mg のオレイン酸ナトリウムを 5 mL の pH が約 8.1 のビスシン緩衝液に加え、顆粒がなくなるまで超音波を照射して 24.6 mM のオレイン酸ナトリウム溶液を得た。この溶液をマイクロスライドセル (μ -Slide 1⁰⁴Luer for Live Cell Analysis, 日本ジェネティクス株) にセットし、室温で 5 時間静置し、ベシクルを形成させた。

pH 指示薬を含むベシクル溶液の調製

37.5 mg のオレイン酸ナトリウムを、予めチモールブルー溶液 0.1 mL を滴下してから pH を 8.1 に調整したビスシン緩衝液 5 mL に加え、顆粒がなくなるまで超音波を照射して 24.6 mM のオレイン酸ナトリウム溶液を得た。この溶液をマイクロスライドセルにセットし、室温で 5 時間静置し、ベシクルを形成させた。体積比はビスシン緩衝液 : pH 指示薬を含む溶液 = 50 : 1 とした。

蛍光試薬を含むベシクル溶液の調製

37.5 mg のオレイン酸ナトリウムと蛍光物質として極微量のローダミン 6G を pH が約 8.1 のビスシン緩衝液 5 mL に加え、顆粒がなくなるまで超音波を照射して 24.6 mM のオレイン酸ナトリウム溶液を得た。この溶液を、スライドガラスの表面中央部が丸く凹んでいるホールスライドガラスのホール部分に満たしてカバーガラスで溶液の乾燥と対流を防いだ後、室温で 5 時間静置した。

2-2.3 ベシクルの観察

ベシクル溶液の入ったマイクロスライドセルを 5 時間静置した後、光学顕微鏡 (Olympus IX-71) に設置した。次に高 pH 溶液に浸されたろ紙片をマイクロスライドセルの片側の溶液注入口に設置した (Fig. 2.2)。高 pH 溶液には NaOH 水溶液または炭酸塩緩衝液 (pH = 10.1) を使用し、pH 勾配は注入口からマイクロスライドセルの中央部に向かって徐々に形成される。著者はこの pH 勾配下でのベシクルの変化を観察した。

また、ベシクルの3次元構造を評価するために、ベシクル溶液の入ったホールスライドガラスを五時間の静置後、蛍光共焦点顕微鏡（Olympus BX-51）に設置し、ベシクルの断面を観察した。

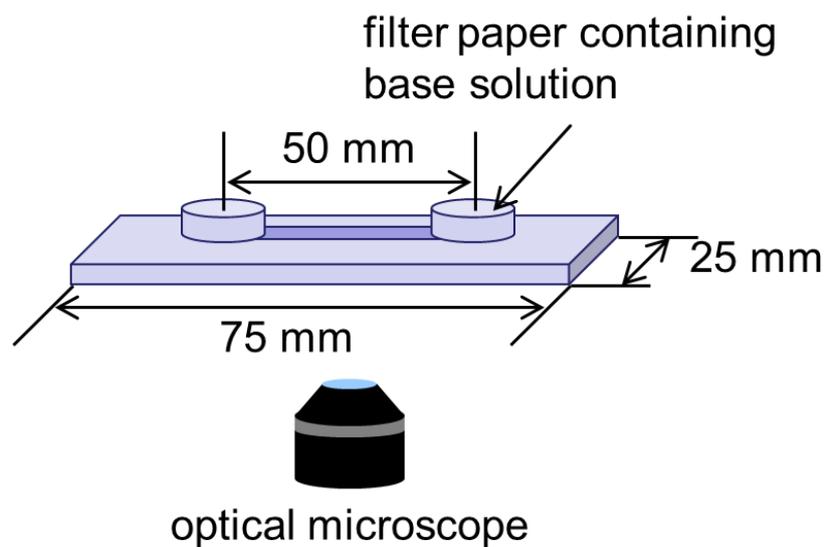


Fig. 2.2 Illustration of a microslide cell.

2-2.4 オレイン酸ナトリウム水溶液の中和滴定

オレイン酸の pH 変化に伴う状態変化や化学平衡を考察し、2重球ベシクルが形成される pH 範囲を明らかとするため、一般的な滴定方法で HCl によるオレイン酸ナトリウムの滴定曲線を得た。初期体積は 30 mL で 10 mM のオレイン酸ナトリウム水溶液に 1 M の HCl を 10 μ L ずつ加えていき水溶液の pH を測定した。

2-3 結果と考察

2-3.1 ベシクルの周期的構造変化

前述の実験方法を用いて様々な構造のベシクルが観察され、典型的な構造としては球状、管状、トーラス形状やボールがへこんで丸まった形状（以下外見上 2 重球構造）などが観察された。その中で外見上 2 重球構造のベシクルは観察された全ベシクルのうちの数パーセントを占めていた。ベシクルの多くは pH 勾配下で規則性のない単調な運動を示したが、外見上 2 重球のベシクルは周期的な構造変化を示した。また、この周期運動の再現性は非常に高く、ほとんど全ての外見上 2 重球ベシクルが pH 勾配下で周期的構造変化を示した。

Fig. 2.3A に 1 周期分のベシクル形状の経時変化を示す。ベシクルは最初 ($t = 0$ s)、2 重球ベシクルに見える。Fig. 2.3A のようなタイプの構造変化は約 10-30 回以上繰り返す、十分に時間が経った後、Fig. 2.3B に見られるような運動に変化した。最終的に、このベシクルは完全な 2 重球には戻らず、弾性膜のように振動し、その運動が止まるときベシクルは最終的にトーラス形状のような構造になった。

次に Fig. 2.4A に外見上 2 重球のベシクルの断面の観察結果を示す。また、この 2 重球ベシクルとその周期的構造変化の概略を Fig. 2.4B (a') に示している。Fig. 2.4A の結果から外見上 2 重球のベシクルの 3 次元構造を推定すると、光学顕微鏡では 2 重球に見えたベシクルは空気の抜けたボールのような構造をしていると考えられ、厳密に 2 つの球が重なっているわけではないが、本論文ではこのベシクルを 2 重球ベシクル（構造のみ指す場合には 2 重球構造）と呼ぶ。この 2 重球ベシクルは 2 つの部分で構成されていると考えられる。一方は Fig. 2.4B 中で膨潤部 (swollen state) として示されている部分であり、内部に緩衝液を含んでいる。もう一方は Fig. 2.4B 中で結合部 (bound state) として示されている部分であり、内部に緩衝液を含まず、膨潤部をつくる膜層が重なって一枚の層になっているように見える構造を持つ。Fig. 2.3 や 2.4A の結果からは膨潤部を構成する膜が単層膜であるか多層膜であるかを識別することは困難であるが、ベシクルの 3 次元構造を考えれば、結合部の膜の厚みは膨潤部の膜の厚みの 2 倍であると考えられる。本章では膨潤部をプラス端、結合部をマイナス端としてベシクルの向きを定義し、Fig. 2.4B 中に示した。ベシクルのプラス端が高 pH 側に位置するとき、ベシクルと pH 勾配の方向が並行、プラス端が低 pH 側に位置していれば逆並行とする。

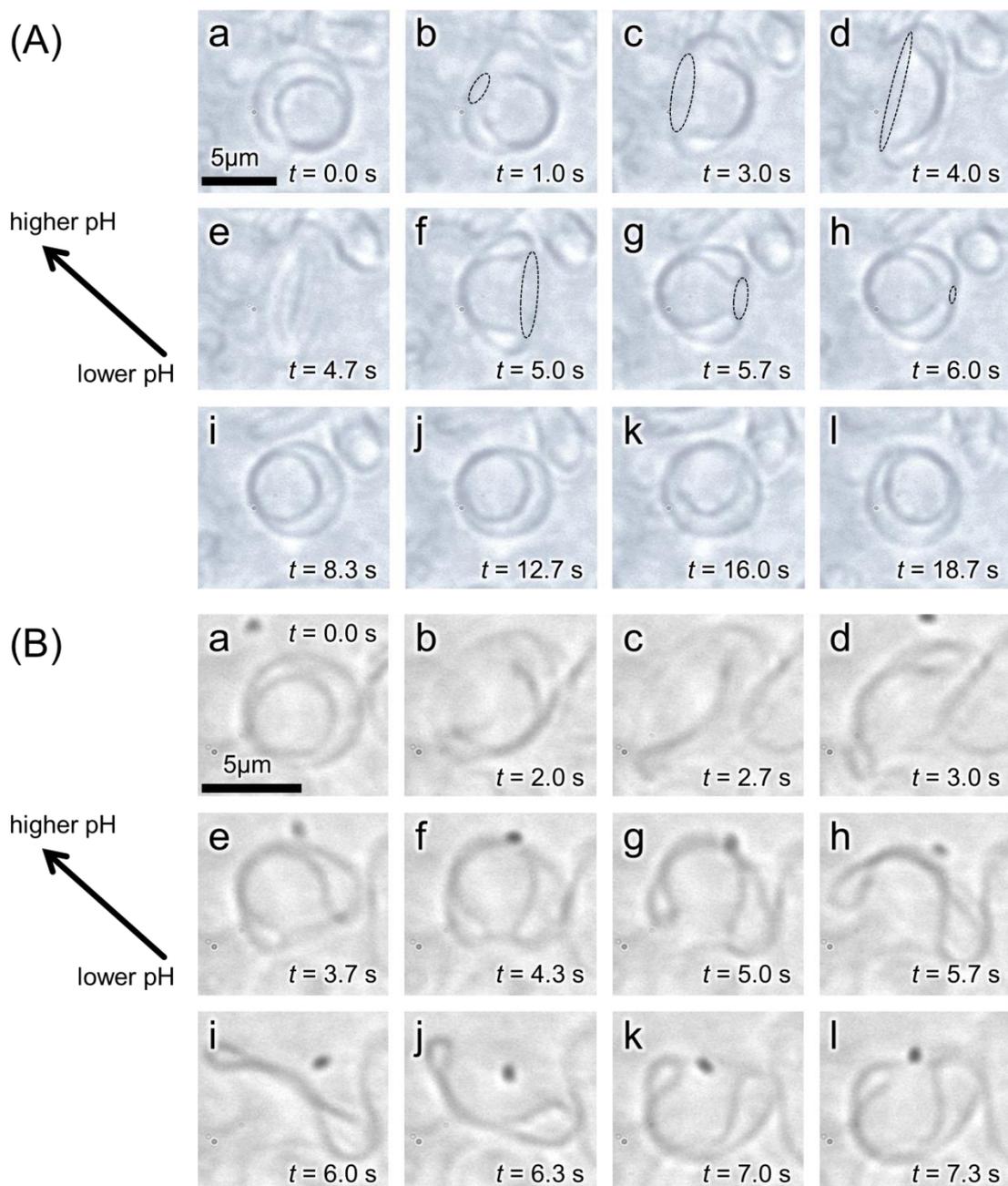


Fig. 2.3 Vesicle transformation is shown. The direction of the pH gradient is shown by the arrow. Transformations with (A) and without (B) a completely closed shape are shown. The hole surrounded by the edge of the swollen part is indicated by a dotted curve in images (b)–(h) of (A). A 1 M NaOH solution was used as the high-pH source.

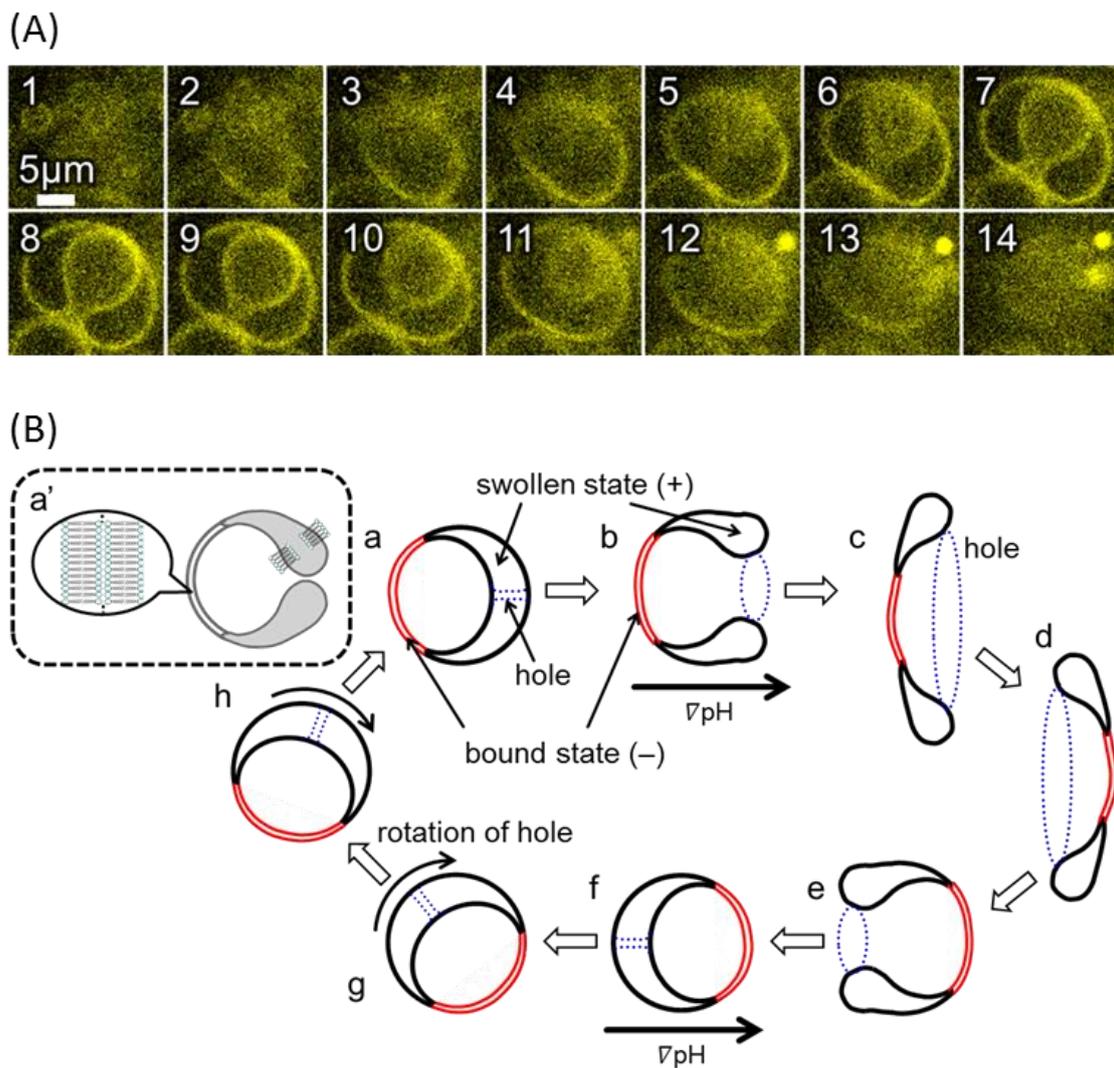


Fig. 2.4 (A) Cross-sections of a double spherical vesicle. Photographs were taken at approximately each 1 mm of depth from top (1) to bottom (14). Rhodamine 6G was used as a fluorescent dye.

(B) Schematic representation of the shape change of a vesicle.

2 重球ベシクルでは小孔が膨潤部の中央に観察される (Fig. 2.4A (6)-(9))。この小孔 (Fig. 2.4B 中で hole) の存在からも、一見 2 重球に見えるベシクルが通常の 2 重球ではなく、完全な球体のベシクルから内水相が排出されることによって形成されたような構造を持つことがわかる。完全な球状ベシクルから内水相が排出されたとき、あるいはベシクル形成時に比表面積が大きくなり (膜が余り) 球形をとれないとき、ベシクルの向かい合う部分に位置する膜が互いに近づき、やがて接する。この接した膜同士が結合部を形成していると考えられる。このとき残っている水が結合部の周囲に内包されるため、その結果として、膨潤部は輪状に形成する (Fig. 2.4B (a))。したがって、このような構造上、小孔は膨潤部の中央に保持される。このように、この 2 重球に見えるベシクルはマイナス端に強く結びついた膜を持つストマトサイト構造[13]が丸まったような構造であると考えられる。

高 pH 溶液を拡散させる前、ベシクルのプラス端およびマイナス端の向きはランダムに分布していた。しかし、拡散を始めると、ほとんどの 2 重球ベシクルのプラス端とマイナス端がそれぞれ高 pH 側と低 pH 側に向き (Fig. 2.5)、pH 勾配と並行になる様子が観察された。このようなベシクルの回転が発生した後、Fig. 2.3A (b)→(d)、Fig. 2.4B (b)→(c)に示すように、ベシクルの小孔の直径は大きくなり、また同時に結合部の膜の曲率は下がった。このとき、2 重球ベシクルは中央に結合部を持ち膨潤部がトーラス状になったような形状となった。この構造変化の後に、結合部の膜の曲率はゼロの状態 (フラットな形状) を経て反転した (Fig. 2.3A (f)、Fig. 2.4B (d))。結合部の膜の状態が曲率 0 に近づいたとき、その膨潤部の断面は小さくなっているが、これは膨潤部に含まれる内水相の体積が保存されるためであると考えられ、フラットな状態では膨潤部の断面積は最小になる。この構造変化に続いてベシクルは再度小孔を閉じる様子が観察された (Fig. 2.3A (g)→(h)と Fig. 2.4B (e)→(f))。この小孔を閉じる変形は Fig. 2.3A (i)と Fig. 2.4B (f)に示すように再び 2 重球構造になるまで進む (Fig. 2.3A (i))。pH 勾配の方向に対して垂直な面を対称面としたとき、Fig. 2.3A (i)の 2 重球構造は初期状態の構造 (Fig. 2.3A (a)) と面対称となっていることがわかる。このとき膨潤部 (プラス端) は低 pH 側に位置し pH 勾配と逆並行となる。その後、ベシクルは膨潤部と結合部がそれぞれ高 pH 側と低 pH 側に向く (pH 勾配と並行になる) まで回転する (Fig. 2.3A (i)→(l)→(a)、Fig. 2.4B (f)→(h)→(a))。

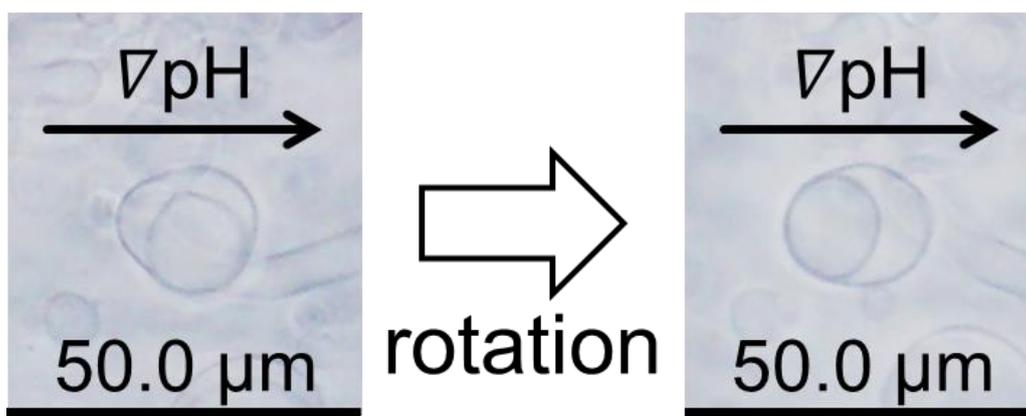


Fig. 2.5 Vesicle rotation at the onset of the pH gradient is shown. A 1 M NaOH solution was used as the high-pH source.

この過程では、ベシクル自体が回転しているのか、内水相のみがベシクルの内で移動しているのかは判別しにくいですが、回転とともに小孔も移動していることから、ベシクル自体が回転していると考えられる。この後、ベシクルは Fig. 2.3A (Fig. 2.4B) と同じサイクルを繰り返した。また、この運動は上記のような著しい構造変化であるにも関わらず、その過程でベシクルの重心位置はほとんど移動しなかった。

このようなベシクルの構造変化を定量的に表現する上で、結合部の曲率が幾何学的形状を代表するパラメータとなると考えられる。本章ではこれを $H^*_{\text{bound}} = \{A_{\text{bound}} / (4\pi R_{\text{bound}}^2)\}^{1/2}$ と定義した。 A_{bound} と R_{bound} はそれぞれ結合部の面積と曲率半径である。 R_{bound} 値は顕微鏡像に合わせた円を球の大円の一部として評価し、 A_{bound} は顕微鏡像から推定される結合状態の膜の立体角と R_{bound} 値から算出した (Fig. 2.14 で後述する)。

Fig. 2.6a のプロットは 1 M NaOH を拡散させたときの、ベシクル運動の開始から 5 周期分の構造変化における H^*_{bound} の経時変化である。このとき正と負の曲率は、それぞれ、ベシクルが pH 勾配の方向と並行と逆並行であることを示す。負から正の曲率への急な値の変化はベシクルが回転して Fig. 2.3A (a) のような初期状態の構造に戻ったことを示している。Fig. 2.6a では、 H^*_{bound} の変化がゆるやかな誘導期間と急速な減少で構成されているが、その曲線の細部はおのおのの過程で異なっており、曲線は 2-5 回目の変形では僅かに S 字状になっている。

Fig. 2.6b のプロットは炭酸塩緩衝液 (pH = 10.1) を用いたときの 1 周期分の H^*_{bound} の経時変化である。このときの誘導期間は NaOH 系よりも長いですが、その曲線は Fig. 2.6a で見られるものと似ている。実際、Fig. 2.6a の 1 周期目の変形の H^*_{bound} 変化の時間軸を適切にスケーリングしたものを Fig. 2.6b の結果に重ね合わせたところ、炭酸塩緩衝液系と NaOH 系の曲線がほとんど相似であることがわかる。すなわち、ベシクルの構造変化を観察した動画を適当に速度を変えて再生したとき、全ての構造変化のパターンはほとんど同じように見えると予想される。したがって、NaOH による大きな pH 勾配下ではベシクルの構造変化は相似性を維持したまま速くなることがわかる。

このような観点から、Fig. 2.7 に、拡散させる塩基性水溶液中に存在する OH^- の濃度を横軸として、一回分の反転にかかる時間 (正の曲率で完全に閉じている状態から負の曲率で同じ状態になるまでの時間) を示した。ここで、 OH^- の濃度が 0 M に近いデータは pH 10.1 の炭酸塩緩衝液の結果に対応している。

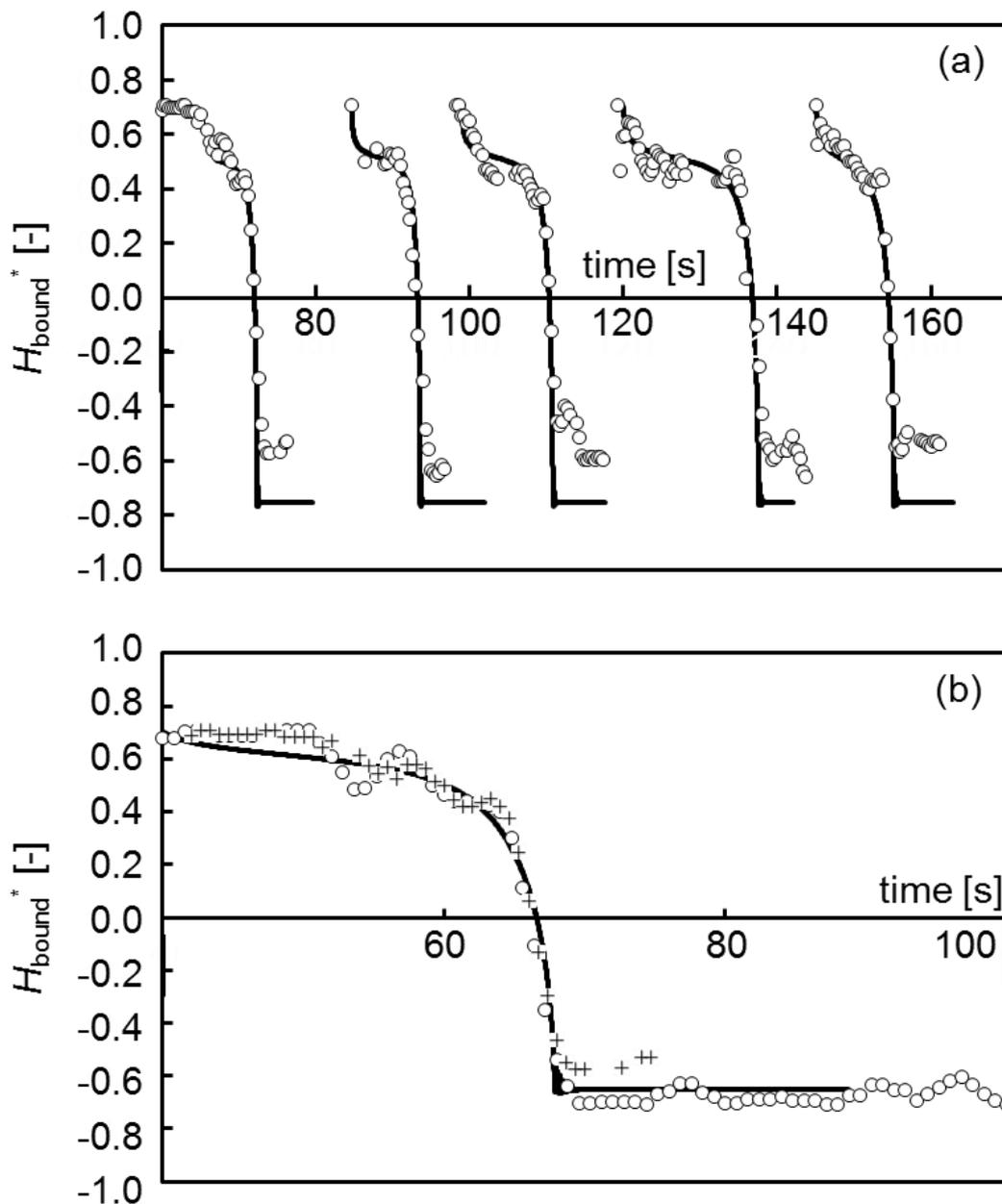


Fig. 2.6 H_{bound}^* is shown as a function of time for (a) and (b). The high-pH source was either 1 M NaOH (a) or a carbonate buffer solution (b). The initial five repetitions of the curvature change (a) and the single shape change (b) are shown with open circles. The plus key (+) of (b) is the same result as that obtained for the first transformation of (a); however, the time is scaled so as to overlap the results obtained with a carbonate buffer. The solid curves in (a) and (b) were calculated by eqn (9a)–(d), where $s_A^* = 8$, $\kappa^* = 0.3$, $l^* = 1$, and $H_{\text{bound,max}}^* = 4.9$. The l^* values were 0.83 (a) and 0.8205 (b). The time t^* was appropriately scaled and shifted.

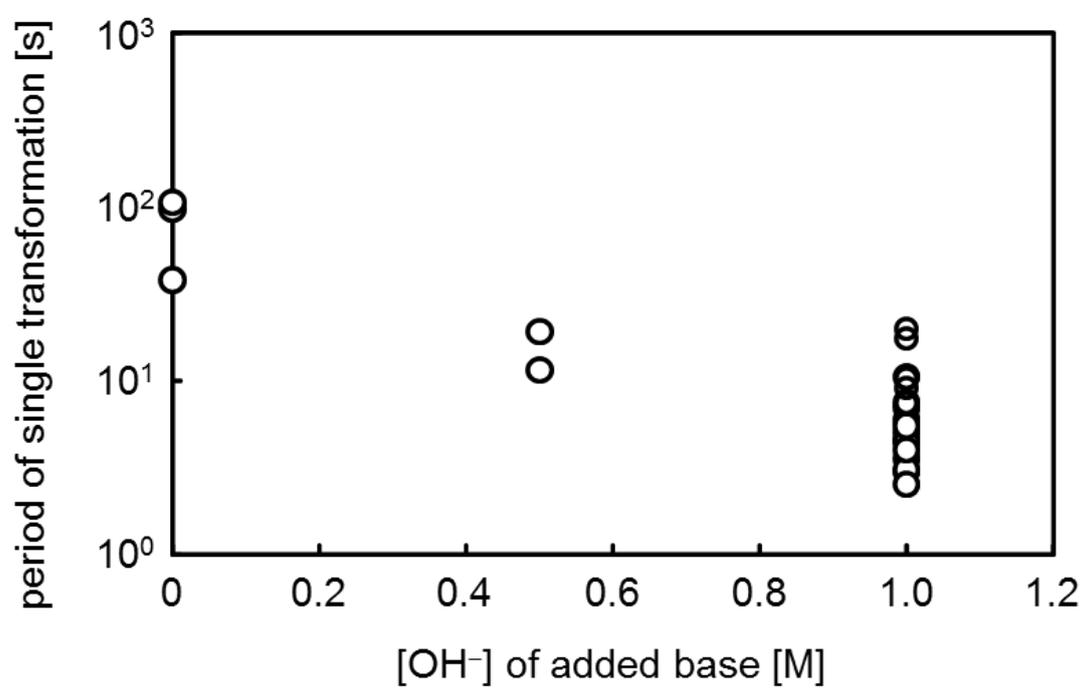


Fig. 2.7 The period for a single transformation is shown. Three types of high-pH sources were used: carbonate buffer (left), 0.5 M NaOH (center), and 1 M NaOH (right).

Fig. 2.7 の結果から、拡散溶液の pH の増加で一回の変形の期間が短くなっていることがわかる。一方、運動サイクルを繰り返す回数は実験条件に対して系統的な傾向を示さなかった。本実験系では、pH 勾配は非定常であり、pH のレベルは時間とともに上昇する。そのため、十分に時間が経った後、ベシクルの運動は停止し、ベシクル自体も溶解したり、他の構造変化に移行したりするが（詳細は第 3 章で述べる）、このような非定常な pH 勾配下でも、10–30 回以上の周期運動を観測することができた。

次に、各周期における pH 勾配に並行な配置でベシクルの小孔が閉じきった構造（2重球構造）になるときの膨潤部の内水相体積 (V_{swell}) とベシクル膜の全面積 (A_{total}) を画像から推定評価した結果を Fig. 2.8a に示す。体積と膜面積は顕微鏡像を回転体の断面と仮定して概算した。計算する際、ベシクル像を回転体の対称軸（pH 勾配の方向に並行）に対して垂直ないくつもの小さな断面に分割し、その各断面の体積と膜面積を合計した。全膜面積 A_{total} は $2A_{\text{bound}} + A_{\text{swell}}$ で表され、 A_{swell} は膨潤部が持つ膜面積である。結合部は重なり合う 2 枚の膜層から成るため、これを $2A_{\text{bound}}$ としている。Fig. 2.8 中の各プロットは毎周期の 1 周期を完了した後の 2 重球ベシクルの体積と膜面積を表す。また、 $s_A^* = A_{\text{total}} / V_{\text{swell}}^{2/3}$ で定義される無次元化比表面積を Fig. 2.8b に示す。このデータは動画像から分析されたものであるため、画像の解像度によって生じる誤差を含んでいる。 A_{total} と V_{swell} は時間と共に僅かに減少しているように見えるが、これは、上述の画像解析における誤差によるものと考えている。少なくとも、200 s 以降は、 A_{total} と V_{swell} はほとんど一定である。

周期変形の間サイズが変わらないことは、本研究のベシクルの重要な特徴である。以前からベシクル形状の周期的な変化は観察されているが、著者の知る限り、それらの変形は全て周期変化を経る毎にサイズの減少をともなっていた[5-8,10]。

本実験系では、塩基溶液の拡散によって生じた pH の変動は非常に強く、緩衝液はその pH 変動を緩和しきれないと考えられる。また、pH 勾配は定常状態ではなく、pH レベルは実験中に上昇すると予想される。このような観点から、周期的構造変化を起こすベシクルの周囲の溶液の局所的な pH を測定することを試みた。初めに、pH の変化を輝度変化として観測できる蛍光物質である 8-Hydroxypyrene -1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt（ピラニン）を用いて pH 測定を試みたが[16]、ベシクル周囲の狭い範囲における pH の正確な測定は困難であった。

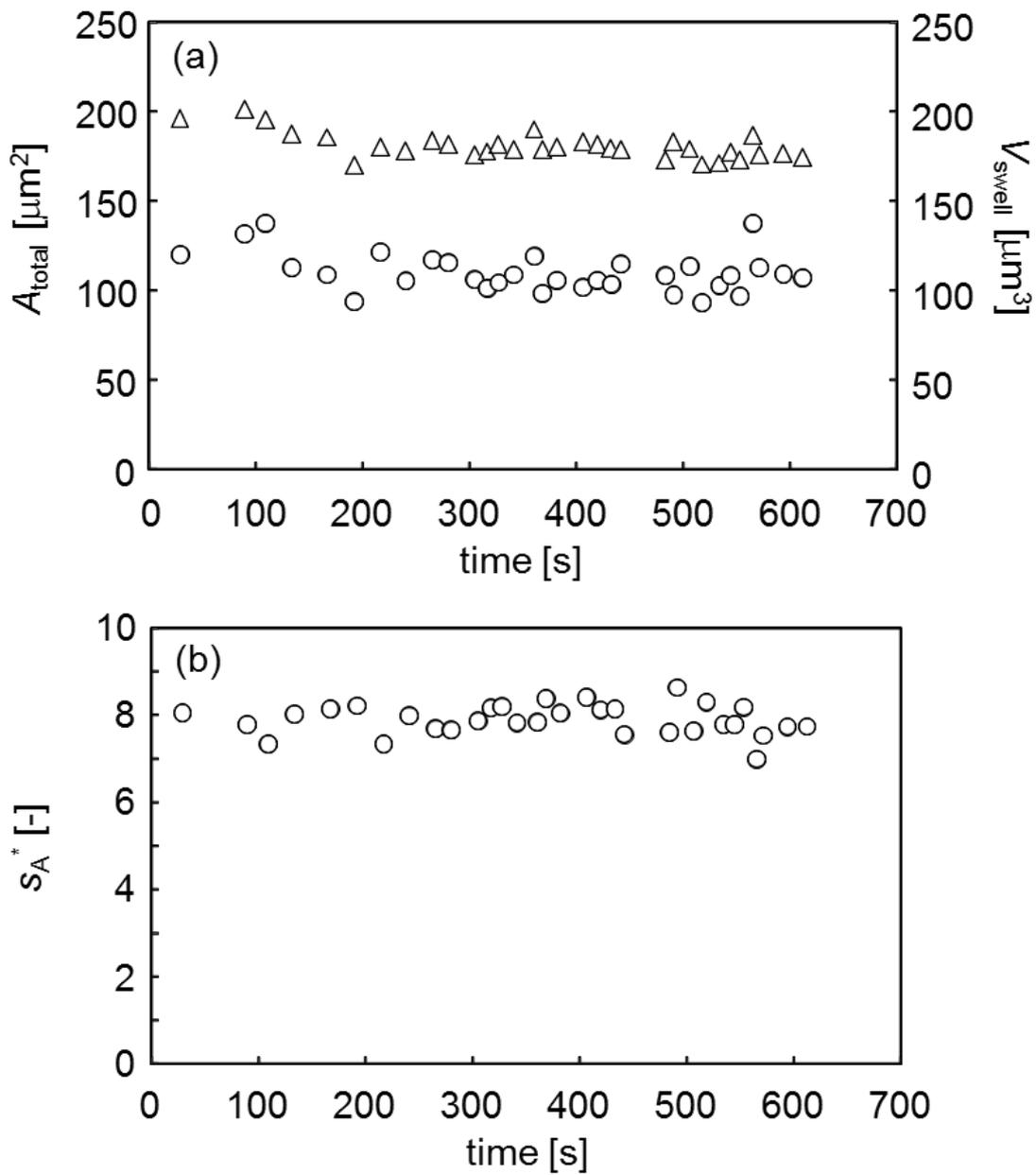


Fig. 2.8 Geometrical parameters A_{total} (triangle), V_{swell} (circle) and s_A^* evaluated for the completely closed shape are shown. The high-pH source was 1 M NaOH.

次に、チモールブルーを用いて pH 勾配のある顕微鏡画像中で色の違いを観察した結果、顕微鏡の画像からベシクル近傍の pH について情報を得ることができた。Fig. 2.9 にチモールブルーを含むピシン溶液を光学顕微鏡で観察した画像と各溶液の pH を示す。Fig. 2.9 から pH 8.1-8.7 にかけて顕微鏡観察下でも溶液に僅かな色の変化が観察された。1 M の NaOH が十分に拡散したとき、巨大な分子集合体はすべて溶解し、光学顕微鏡ではベシクルは観察できなかった。Fig. 2.10 にベシクル溶液と NaOH (1 M) によってベシクルが溶解したと考えられる領域との境界付近の画像を示す。図の中央の破線で囲んだ部分が境界である。NaOH (1 M) は画像の右側から拡散してきており、境界の左側の領域が NaOH (1 M) による溶解が進んでいないベシクル溶液、境界の右側の領域が NaOH (1 M) の強いアルカリによってベシクルが崩壊した後の溶液である。境界の右側の溶液の着色状態を Fig. 2.9 と比較すると、pH は 8.7 以上であることがわかる。このことから NaOH の濃厚な側は pH 8.7 以上、その境界よりも NaOH の希薄な側は pH 8.7 未満であると言える。また、ベシクル溶液に用いたピシン緩衝液の pH は 8.1 であった。したがって、ベシクルの周期的構造変化が生じる pH 範囲はベシクルの両端で、近似的に 8.1 (緩衝液の pH) から 8.7 であり、本研究で用いられるベシクルは狭い pH 範囲で動くと考えられる。

2-3.2 ベシクルによる pH 勾配に沿った物体の輸送

これまでに述べた周期的構造変化を利用すれば、本ベシクルは低 pH 場から高 pH 場へ物体を運ぶことが可能である。Fig. 2.11 はその一つの例である。この実験系では 2 重球ベシクルのマイナス端付近 (Fig. 2.11a 中の白矢印) に一つの分子集合体 (Fig. 2.11a 中の赤矢印、以下“貨物”とする) がある状態で炭酸塩緩衝液を拡散させた。炭酸緩衝液を拡散させた後、初めに、2 重球ベシクルの小孔が高 pH 側で開く様子が観察された (Fig. 2.11a-c)。このとき、傍に物体がなければ、ベシクルは開孔の後フラット形状を経て 2 重球構造へと変形したはずであるが、この傍の物体がベシクルの完全な閉孔を妨げるため、結果としてベシクルはこの物体をつかんだ (Fig. 2.11d)。この物体はベシクルの回転運動を経て高 pH 側へと移動し (Fig. 2.11d-h)、その後、構造変化の 2 周期目が始まった。その際に、結合部の弾性膜的な運動によって物体がベシクルの外へと押し出される様子が観察された (Fig. 2.11h-l)。この物体輸送の駆動力は pH 勾配から与えられており、また、物体の化学的性質はこの物質輸送過程には関係ないと考えられる。したがって、この輸送は pH 勾配によって引き起こされた能動輸送であるといえる。

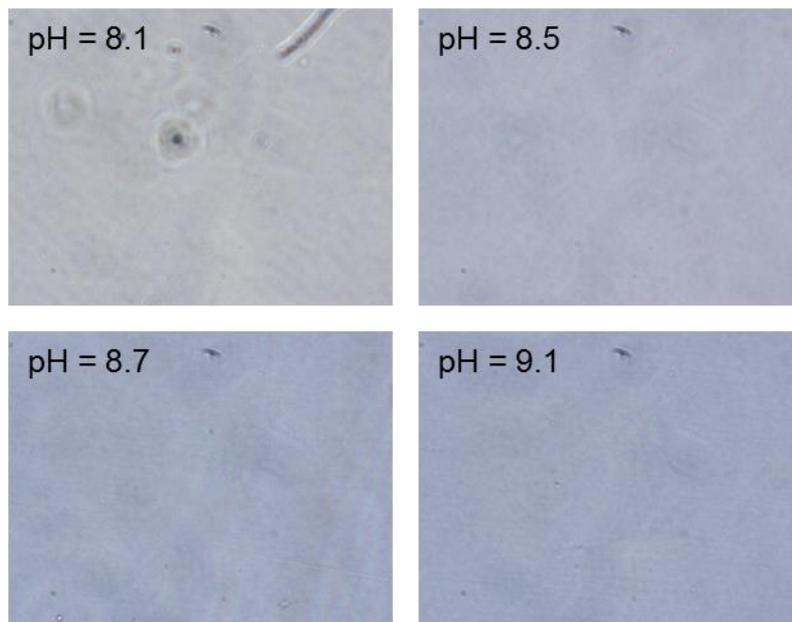


Fig. 2.9 Color of bicine buffers with thymol blue of each pH that were observed by optical microscope.

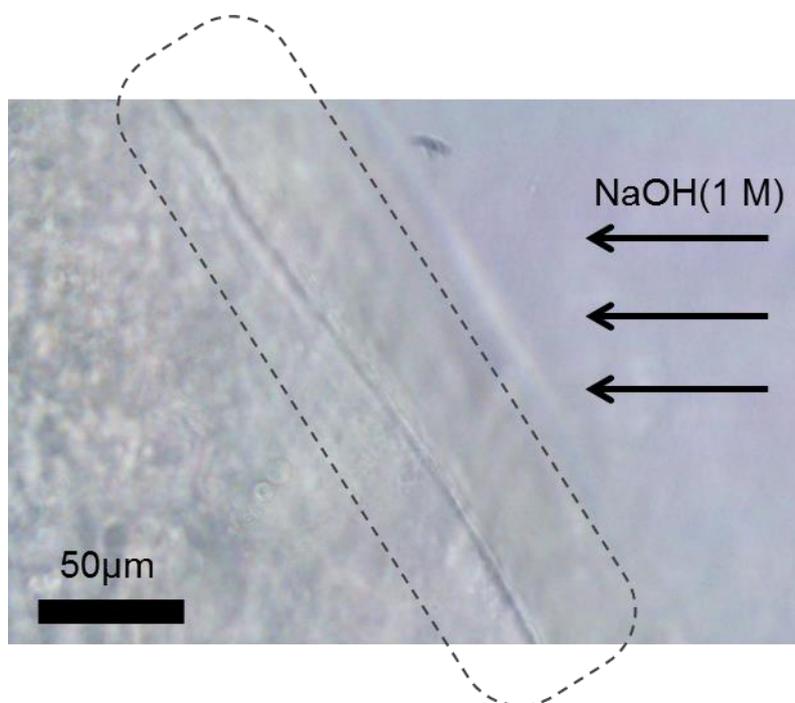


Fig. 2.10 The border between vesicle solution (left) and solution with 1 M NaOH (right). In the right part, vesicles were dissolved by 1 M NaOH. pH of bicine buffer was 8.1

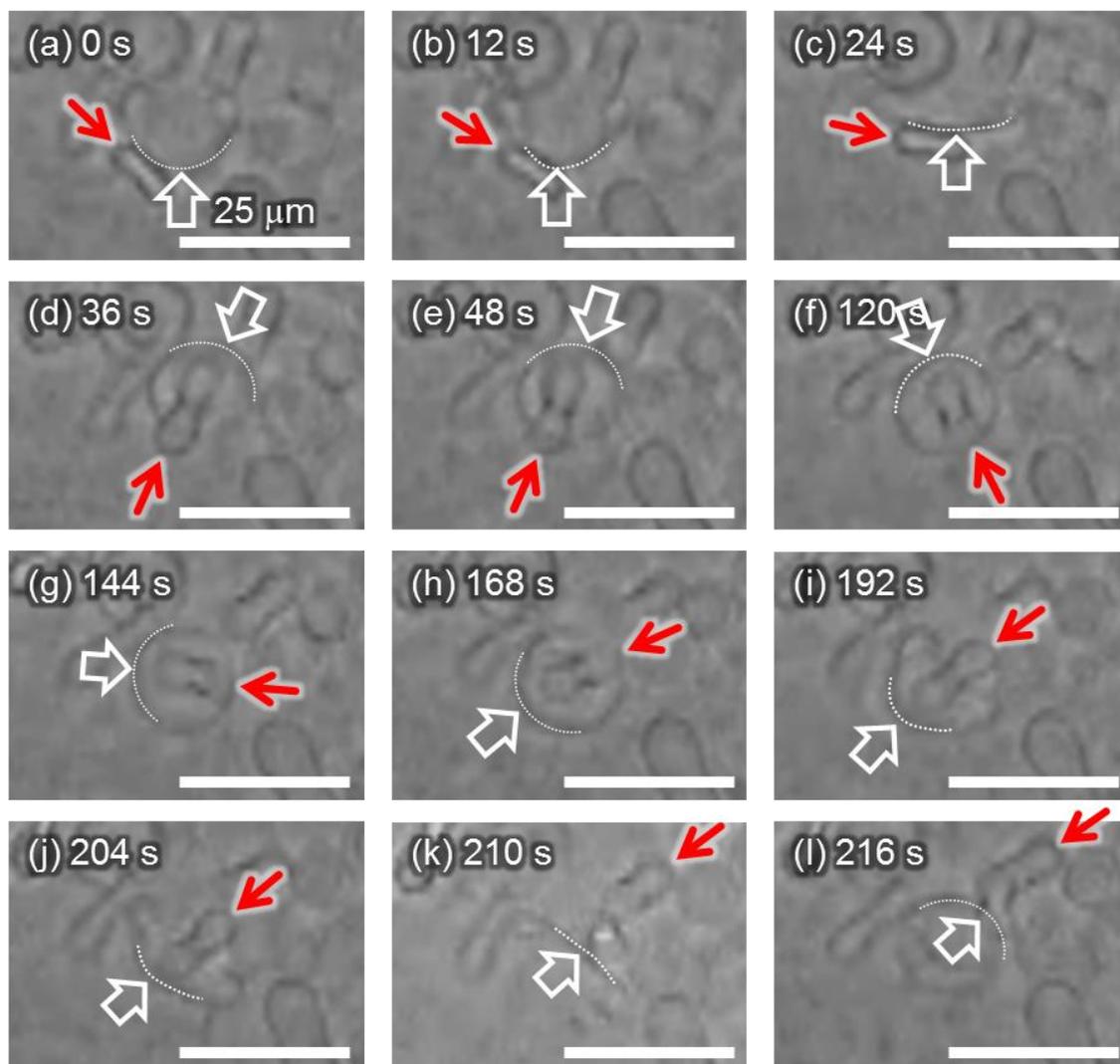
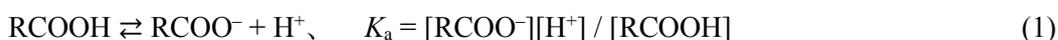


Fig. 2.11 Snapshot of the transport of cargo against the pH gradient. The cargo is indicated by a red arrow. The bound-state membrane is indicated by a white dotted curve. The high-pH source (carbonate buffer) was placed at the upper-right position in each photograph. The white arrows indicate the bound-state membrane of the vesicle.

近年、コロイド系における能動輸送の人工的実現のため、いくつかの着想が提案されている。化学反応によって駆動される触媒ナノモーターはひとつの例であり、過酸化水素の分解によって運動する異方性構造を持った様々な種類の触媒粒子が研究されている[17-21]。その他の例では、ラチェット機構を用いることによるランダムな運動を整流した能動輸送がある[22-25]。生体システムにおいて、能動輸送は重要な役割を担っており、能動輸送を示す人工的な化学システムの設計は非常に魅力的である。本章では、ベシクルが pH 勾配に沿ってコロイド物質を運ぶことが示されたことから、本章のベシクルの周期的構造変化は能動輸送を行う分子集合体機械の研究へとつながると考えられる。また、pH 勾配は生物的なシステム内の能動輸送過程とよく関連付けられ、本ベシクルの運動は生体模倣的なダイナミクスを示す分子集合体システムの設計の基盤になる可能性がある。

2-3.3 オレイン酸の状態とベシクル構造

オレイン酸ナトリウムとオレイン酸の化学特性は広く研究されている[26-33]。それらの研究によれば、水相中のイオン化したオレイン酸 (RCOO^-) とプロトン化したオレイン酸 (RCOOH) の比は溶液の pH に依存する。溶液の pH が低いときでは RCOOH がより豊富で、水にはほとんど溶けず、pH が高いときでは RCOO^- が主に存在し、水に容易に溶ける。本研究で用いているベシクルは、溶液の pH がおよそ中性領域で形成され、 RCOOH と RCOO^- のモル比がおよそ 1 のときに形成されることがわかっている[27-33]。その中でも、我々は 2 重球ベシクルが形成される pH 範囲を知るため、塩酸によるオレイン酸ナトリウムを含む水溶液の中和滴定を行い、任意の pH でのベシクル形成状態を光学顕微鏡をもちいて観察した。中和滴定の結果とベシクルの形成状態の結果をそれぞれ Fig. 2.12a 中のプロットと Fig. 2.13 に示す。実験に用いた RCOONa の初期濃度は 10 mM である。オレイン酸ナトリウムの中和滴定において、単純なオレイン酸の酸解離平衡のみが存在するとして計算したときの酸解離曲線の結果を Fig. 2.12a 中の黒破線で示す。オレイン酸の酸解離平衡は次式で表せられる。



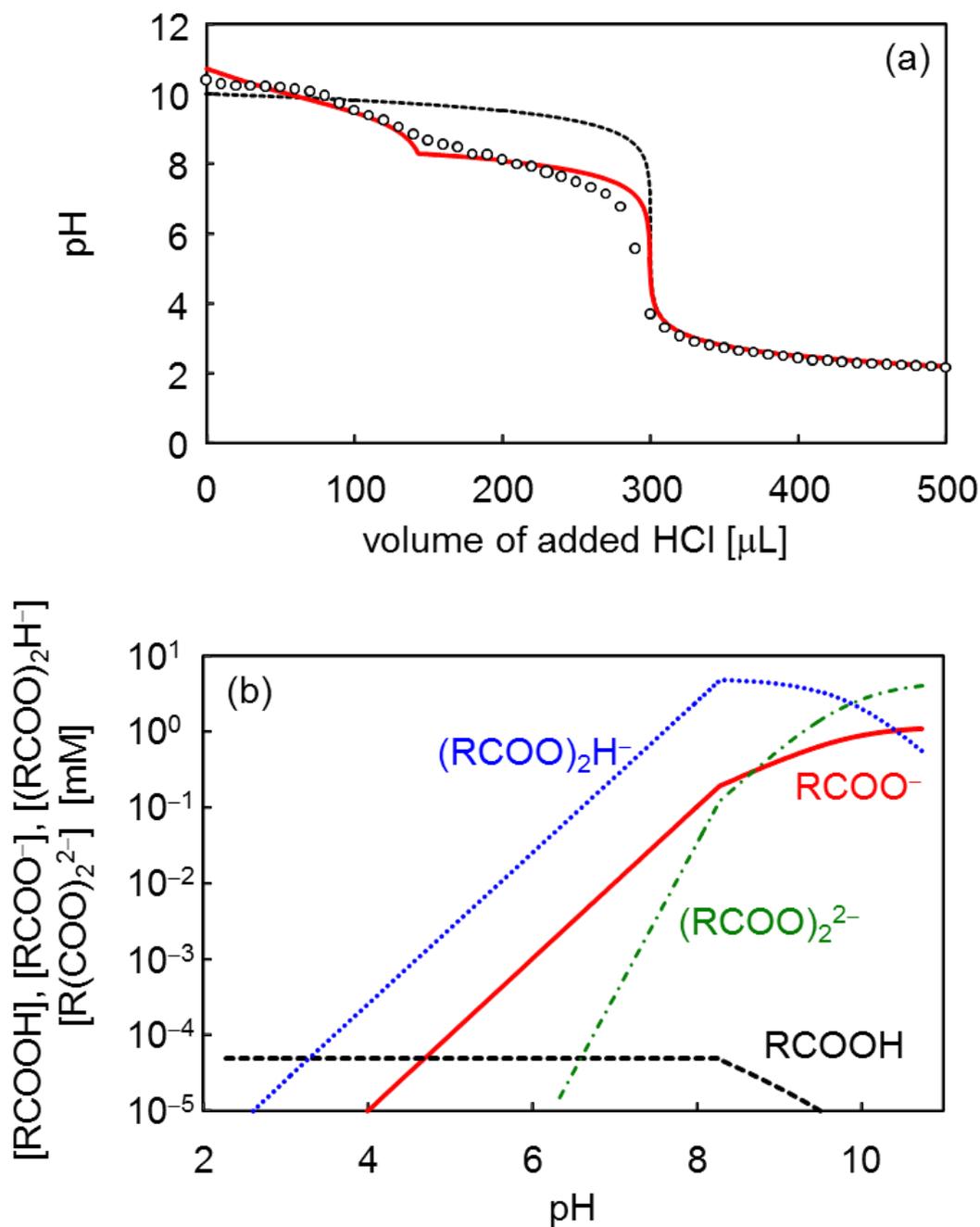


Fig. 2.12 (a) Titration curve for the titration of an aqueous solution containing sodium oleate with hydrochloric acid. The dotted curve (black) represents the results calculated from eqn (1) based on the solubility of RCOOH. The solid curve (red) represents the results calculated from eqn (1)–(3). The RCOOH concentration reaches its solubility limit at $\text{pH} \approx 8$, where the differential coefficient of the solid curve shows a discontinuity. (b) Calculated concentrations of RCOO^- (red solid curve), RCOOH (black dashed curve), $(\text{RCOO})_2\text{H}^-$ (blue dotted curve), and $(\text{RCOO})_2^{2-}$ (green dashed and dotted curves).

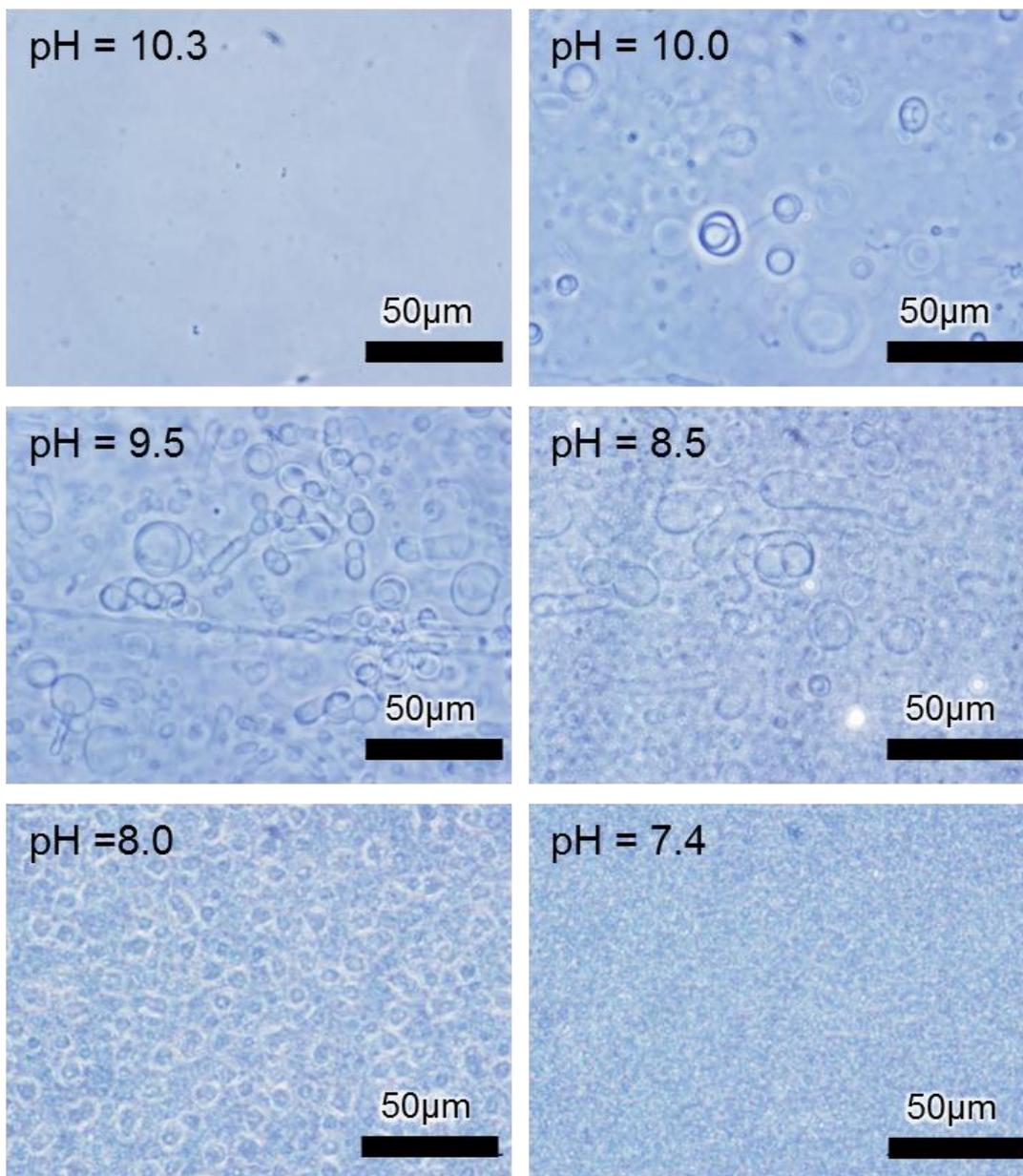
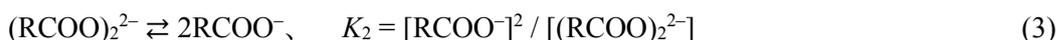
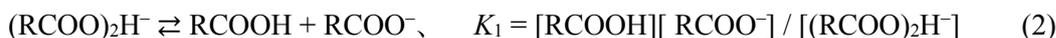


Fig. 2.13 Snapshot of vesicle solution at each pH.

pHが高い領域では、滴定結果（プロット）と酸解離曲線（黒破線）は一致しなかった。したがって、オレイン酸ナトリウムの中和滴定では他の化学平衡も存在していることがわかる。また、2重球ベシクルは8.0から10.0のpH範囲で観察された（Fig. 2.13）。pHが8よりも低いとき、2重球ベシクルは観察されず、数々の小さな凝集体が観察された。それらの多くはオレイン酸の小さな油滴や分子集合体であると考えられる。pHが10よりも高いとき、溶液中にベシクルや分子集合体、凝集体などが観察されないことから、オレイン酸ナトリウムはほとんどイオン化してミセルを形成していると考えられる。

このような観察結果から、Fig. 2.12aの滴定曲線を理解するために次のような化学平衡を考えた[33]。



式2はオレイン酸のRCOOHとRCOO⁻から成る二量体の形成を表している。この二量体（acid/soap）はベシクル膜の主成分であると考えられる[26-31]。オレイン酸ナトリウムと塩化水素は完全に電離しており、その溶液は電氣的に中性であることを考慮して、適切な各平衡定数の値を式1-3に与えて計算した結果をFig. 2.12aの赤の実線で示す。このとき、平衡定数には $K_a = 2.0 \times 10^{-5}$ M、 $K_1 = 2.0 \times 10^{-9}$ M、 $K_2 = 3.0 \times 10^{-4}$ Mを用いた。また、溶液中の、RCOO⁻、Na⁺、Cl⁻の物質量は保存し、HClとベシクル溶液の混合体積の影響や(RCOO)₂HNaの影響[33]は無視できるとして計算した。さらに、水相中のRCOOHの溶解度は非常に低いとして、RCOOHの算出濃度がその溶解度を超えるとき、各化学種の濃度はRCOOHが溶解度濃度になるとして計算した。このときに溶液に溶けなかったRCOOHは極めて小さな油滴として滞留していると考えられる。RCOOHの溶解度には 5.0×10^{-8} Mを用いた。このように、式1-3を用いて実験の滴定曲線を近似的に再現することができた（Fig. 2.12a）。

Fig. 2.12aのpH ≅ 8で微分係数が不連続であるように見えるが、これはRCOOHの濃度がこのpHで溶解度に達したことを示している。計算に用いた K_a と K_2 の値と溶解度は文献値（ $K_a = 10^{-4.95}$ M、 $K_2 = 10^{-4}$ M、溶解度 2.5×10^{-8} M）と比較的一致していたが[33]、

K_1 の値は文献で報告されている値 ($K_1 = 10^{-4.95}$ M) よりも非常に小さくなった。また、Fig. 2.12a で示した実験結果は、初期濃度 10 mM のオレイン酸ナトリウムを 1 M の塩酸で滴定した結果であるが、さらに希薄な溶液 (0.5 mM オレイン酸ナトリウムと 0.05 M 塩酸) で滴定実験を行ったところ、Fig. 2.12a と同様に小さな K_1 の値を用いて滴定曲線を再現することができた。オレイン酸ナトリウム水溶液の中和滴定において、ベシクルとして存在する分子集合体を溶質として扱うべきか、あるいは沈殿体として扱うべきかは明白でなく、このことが K_1 の値が小さくなった原因ではないかと考えられる。

Fig. 2.12b に、式 1-3 の平衡定数を用いて算出した RCOOH 、 RCOO^- 、 $(\text{RCOO})_2\text{H}^-$ の濃度を pH の関数として示す。pH が 8 付近よりも低いとき、 RCOOH はほとんどが油相として滞留し、溶液中の RCOOH 濃度は溶解度と等しくなる。したがって、 RCOOH 濃度が溶解度と等しい範囲では、全 RCOO 濃度は 10 mM よりも低くなる。Fig. 2.12b によれば、実験ではベシクルが多く観測される pH 範囲では $(\text{RCOO})_2\text{H}^-$ の濃度が高い。(光学顕微鏡の観察結果 (Fig. 2.13) では、ベシクルの総数は pH が 8.5-9.5 のときにもっとも多く、Fig. 2.3 の実験では、塩基性溶液を拡散させる前のベシクル溶液の pH は 8.1 (緩衝液の pH) であり、pH がおよそ 8.7 まで上昇する間に構造変化が始まる。また、Fig. 2.12b では水相中の RCOO^- 濃度は pH と共に上昇している。これは、水酸化物イオン (OH^-) の拡散によって周囲の pH が上がれば、ベシクルを構成するオレイン酸がイオン化して水中へと溶解していることを示している。一方で、本研究のベシクルの主成分は $(\text{RCOO})_2\text{H}^-$ であるが、Fig. 2.12b ではベシクルが形成される pH 範囲 (8.0-10.0) で $(\text{RCOO})_2\text{H}^-$ 濃度がほとんど維持されている。このことが、周囲の pH が 8.1 から 8.7 の間で上昇しても Fig. 2.3 でベシクルのサイズが減少しなかった要因であると考えられる。

ここで計算される $(\text{RCOO})_2\text{H}^-$ 濃度は過去の文献で報告されたものよりも非常に大きい [33]、この不一致はそれぞれの K_1 値の違いによるものであると考えられる。しかし、pH の変化に対する RCOOH 、 RCOO^- 、 $(\text{RCOO})_2\text{H}^-$ の濃度の依存性の傾向は文献で報告されたものとほとんど同じである [33]。

2-4 ベシクル運動のモデル

2-4.1 膜弾性を基盤にしたモデル

ベシクルが、何らかの外部環境の変化で運動を始めても、その運動はエネルギー散逸によって減衰する。したがって、ベシクル構造の周期的変化には運動エネルギーを与え続けるような化学反応や物質移動が必要である。これまでも、そのような化学反応や物質移動を利用したサイズの減少を伴うベシクル構造の周期的変化は研究されてきている[5-10]。本研究では、拡散した塩基がオレイン酸のイオン化を促進するため、膜成分の部分的な溶解はおこっている可能性があるが、少なくとも1周期の間はベシクルのサイズ減少はほとんど観察されず、膜の溶解が運動に重要な役割を果たしているとは考えにくい。2重球の構造変化の最初の段階は過去に報告されている自律的な孔形成とも似ているが[4]、過去の研究では、膜弾性と小孔の周囲の線張力とのバランスが運動をコントロールすると考えられており、加えて、膜張力によって生まれるラプラス圧が変形に重要な役割をはたしている。しかし、本章で扱っているベシクルでは、その膜自体に穴が開いているわけではなく、ベシクルの構造変化にはラプラス圧による影響が関与しているとは考えにくい。したがって、本章の構造変化は線張力（縁のエネルギー）やラプラス圧を考慮せずに理解できるはずである。

本章では、ベシクル変形をモデル化するために、ベシクル形状を単純化し、ベシクルの形状を Fig. 2.14 に示すように簡略化した。この形状は、pH 勾配と並行な軸を回転軸（対称軸）としたときの回転体の断面を表す。膨潤部はトーラス構造であり、結合部の膜は球殻の一部としてであるとした。緩衝液は結合部の膜中には含まれないとした。これは、本実験系では結合部膜の含む親水基 RCOO^- が相対的に少ないことを表している。おそらく、その2分子膜の2枚のシートは水素結合等によって結合していると考えられる。これに対して、膨潤部の膜は、水相と相対的に多くのイオン化した親水基 RCOO^- を含み、一般的なベシクル膜とほとんど同じ状態である。ベシクルの周囲で OH^- の濃度が増加したとき、 RCOOH 、 RCOO^- 、 $(\text{RCOO})_2\text{H}^-$ 、 $(\text{RCOO})_2^{2-}$ の濃度は式 1-3 で示された化学平衡を満たすように変化すると考えられる。既存の研究では、単層膜で構成されたベシクルの内膜と外膜の状態が異なると、2分子膜の両側で親水基の専有面積が異なり、それによってベシクルの曲率が変化することが報告されているが（ADE モデル）[13]、本研究では、顕微鏡画像からベシクルは多層膜で構成されていると考えられる。

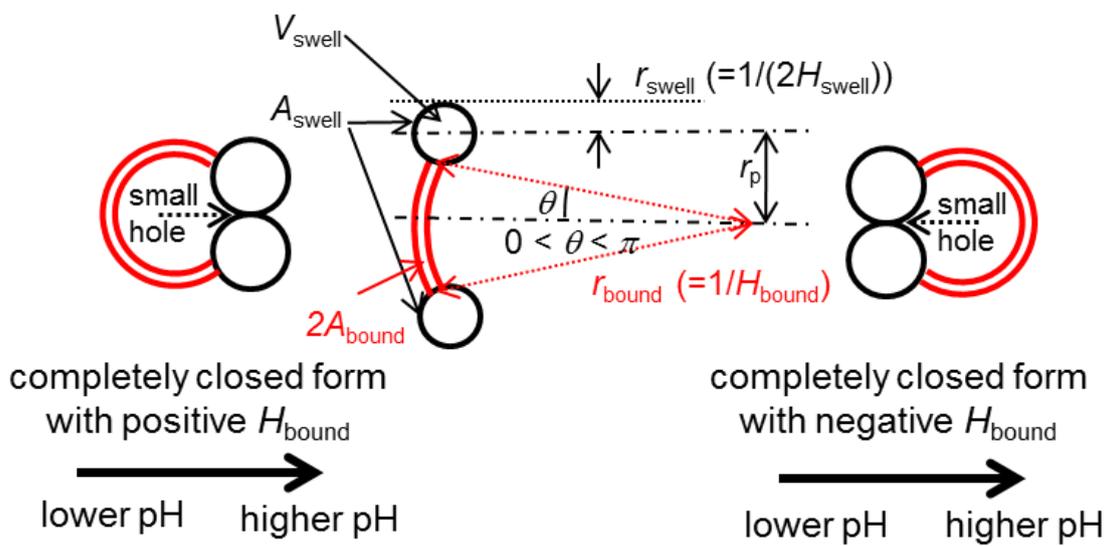


Fig. 2.14 Simplified model of the vesicle shape and the definition of each parameter.

多層膜のベシクルでは、内外の pH 差によって膜の分子の状態がどのように変化するかは不明であり、ADE モデルを用いて考察することは複雑である。したがって、本章ではベシクル変形をより簡単なモデルを用いて理解すること目的とし、この変形を物理的な現象として考察する。

ベシクルの持つ膜弾性については、ベシクル膜が曲率 0 の状態でより安定になると考え、膜弾性エネルギー(E_i)を次の式 4、5 で表した。このとき、結合部の膜では、

$$E_{\text{bound}} = \kappa_{\text{bound}} H_{\text{bound}}^2 A_{\text{bound}} \quad (4)$$

膨潤部の膜では、

$$E_{\text{swell}} = \kappa_{\text{swell}} H_{\text{swell}}^2 A_{\text{swell}} \quad (5)$$

として弾性エネルギーを表現できると考えられる。ここで、 κ_i と A_i はそれぞれ i 部での膜弾性と膜面積を示し、 H_i は i 部での平均曲率を意味する。各パラメータの内容は Fig. 2.14 中で示される。

OH がベシクル膜に達したとき、膜中のオレイン酸のイオン化度が上昇する。そのため隣接したオレイン酸の親水基間の静電反発は強くなり、その結果として、高 pH 側の小孔は開き始めると考えられる。小孔の周りの親水基の静電的な反発相互作用を考慮し、次の式 6 によって小孔周辺の膜エネルギー(E_h)を評価した。

$$E_h = \frac{\lambda(H_{\text{bound}} + H_{\text{bound,max}})}{2\pi(r_p - r_{\text{swell}})} \quad (6)$$

式 6 では、この膜エネルギーは円周長の減少に伴って上昇するようになっており、 E_h は周長の逆数に比例する。また、式 6 では E_h は小孔が低 pH 側にあるときよりも、多くの OH に接する高 pH 側にある時の方が高くなるとしている。pH 勾配の向きに対して、小孔が高 pH 側に位置するようなベシクル結合部の曲率を正であると定義する。すなわち、 H_{bound} が正のときに小孔は高 pH 側に位置し、負のとき低 pH 側に位置する (Fig. 2.14)。これらを考慮して、 E_h を H_{bound} の一次関数とし、さらに、 H_{bound} が負のときでも E_h が正の値となるように、分子に定数($H_{\text{bound,max}}$)を加えた。ここで、今回のモデルでは pH 勾配

は非定常であるが、 λ は pH 勾配が大きいほど大きくなり、pH 勾配の絶対値が保たれると考え、定数とみなした。

式 4-6 より、無次元の全膜エネルギーは次のように表される。

$$\begin{aligned}
 E^* &= \frac{E_{\text{bound}} + E_{\text{swell}} + E_{\text{h}}}{2\pi\kappa_{\text{swell}}} + \xi^*(t^*) \\
 &= 2\kappa^* H_{\text{bound}}^{*2} + 2\pi^2 r_{\text{A}}^* (1 - H_{\text{bound}}^{*2}) \\
 &\quad + \frac{\lambda^* H_{\text{bound,max}}^* + H_{\text{bound}}^*}{2\pi (1 - H_{\text{bound}}^{*2})^{1/2}} \frac{1}{1 - \frac{1}{4\pi r_{\text{A}}^*} \frac{1}{1 - H_{\text{bound}}^{*2}}} + \xi^*(t^*) \quad (7)
 \end{aligned}$$

式 7 に用いた無次元パラメータは以下のとおりである。式 7 の導出過程は第 2 章補遺に記載する。

$$\begin{aligned}
 H_{\text{bound}}^{*2} &= \frac{A_{\text{bound}} H_{\text{bound}}^2}{4\pi}, H_{\text{bound,max}}^{*2} = \frac{A_{\text{bound}} H_{\text{bound,max}}^2}{4\pi}, \\
 \kappa^* &= \frac{\kappa_{\text{bound}}}{\kappa_{\text{swell}}}, \lambda^* = \frac{\lambda}{\kappa_{\text{swell}} A_{\text{bound}}}, r_{\text{A}}^* = \frac{A_{\text{bound}}}{A_{\text{swell}}}
 \end{aligned}$$

本実験での pH 勾配は定常ではない。そのため、ベシクル周辺の平均の pH レベルは時間とともに上昇する。しかし、その pH レベルは膜エネルギーの曲率に対する依存性には影響しないと考え、pH レベルの変化は式 7 の末項に $\xi^*(t^*)$ を加えることで表現した。

構造変化に関するニュートンの第 2 法則を次式に表す。

$$I \frac{\partial^2 H_{\text{bound}}}{\partial t^2} = -\eta \frac{\partial H_{\text{bound}}}{\partial t} - \frac{1}{A_{\text{total}}} \frac{\partial E}{\partial H_{\text{bound}}} \quad (8)$$

ここで、 I は構造変化によるベシクルの慣性を表し、右辺の第一項は構造変化によるエネルギー散逸を示す。また、式 8 中の全項が単位膜面積あたりとなるように、末項は $A_{\text{total}} (= 2A_{\text{bound}} + A_{\text{swell}})$ で除している。したがって、 I と η は単位膜面積当たりの量となっている。式 8 は無次元化変数を用いて次のように書き換えることができる。

$$y^* = \frac{\partial H_{\text{bound}}^*}{\partial t^*} \quad (9a)$$

$$\frac{\partial y^*}{\partial t^*} = -y^* - \frac{\alpha_{\text{bound}}^* I^*}{2} \frac{\partial E^*}{\partial H_{\text{bound}}^*} \quad (9b)$$

ここで、無次元パラメータは $\alpha_{\text{bound}}^* = A_{\text{bound}} / A_{\text{total}}$ 、 $t^* = t\eta / I$ 、 $I = I\kappa_{\text{swell}} / \eta^2$ として定義した。式7を式9bに代入すると運動方程式が得られる。 $\xi^*(t^*)$ によって決まる平均pHがベシクル膜に与える効果は H_{bound}^* に関する微分によって消えるため、pH勾配のみが形状の変化をおこす要因となる。

次に、Fig. 2.8aの結果に基づけば、 V_{swell} と A_{total} が運動中におおよそ保存されている。したがって、 A_{bound} 、 A_{swell} 、 H_{bound} は、構造変化中の V_{swell} と A_{total} を保つように変化し独立ではない。この結果、次の2つの式を得た。

$$\alpha_{\text{bound}}^* = \frac{r_{\text{A}}^*}{1 + 2r_{\text{A}}^*} \quad (9c)$$

$$r_{\text{A}}^* = \frac{s_{\text{A}}^{*3}(1 - 2\alpha_{\text{bound}}^*)^3}{64\pi^3} \frac{1}{1 - H_{\text{bound}}^*{}^2}, s_{\text{A}}^* = \frac{A_{\text{total}}}{V_{\text{swell}}^{2/3}} \quad (9d)$$

式9cは膜面積の保存則 $2A_{\text{bound}} + A_{\text{swell}} = A_{\text{total}}$ ($\alpha_{\text{swell}}^* + 2\alpha_{\text{bound}}^* = 1$) に由来する。また、 $A_{\text{bound}} / A_{\text{swell}}$ で定義される r_{A}^* は $\alpha_{\text{bound}}^* / \alpha_{\text{swell}}^*$ として書きかえることができ、 $\alpha_{\text{swell}}^* = A_{\text{swell}} / A_{\text{total}}$ となる。

計算は次のように行う。まず、Fig. 2.8bより運動期間中、 s_{A}^* はほぼ一定であるので、 s_{A}^* はその値を用いる。 s_{A}^* と H_{bound}^* が与えられれば、 r_{A}^* と α_{bound}^* は式9cと9dの連立方程式から求めることができる。次に、結合部の曲率の初期値 $H_{\text{bound}}^*(0)$ は実験結果と合うように選んだ。これらの値がわかっているならば、 κ^* と I^* を適当に仮定することで、式9aと9bを差分化することで微小時間 Δt^* 後の H_{bound}^* を得ることができる。このようにして、得られた $H_{\text{bound}}^*(\Delta t^*)$ は式9cと9dから $t^* = \Delta t^*$ での α_{bound}^* と r_{A}^* を与える。このようにして $H_{\text{bound}}^*(t^*)$ の関数を得ることができる。

2-4.2 計算結果と考察

実験では、pH 勾配がほとんどないとき、ベシクルは 2 重球構造で安定である。本モデルではこの状態は結合部と膨潤部の弾性定数の比である κ^* が小さいとき、すなわち、結合部の膜の弾性の寄与が小さいときに現れる。(詳細は Fig. 2.15b で考察する。) この閉じた 2 重球構造では、膨潤部の曲率は最小値となる。逆に、結合部の膜の弾性の寄与が大きいつきは κ^* が大きいときであり、これも後述の Fig. 2.15b で考察する。本モデルでは、このようにベシクルの形状について、2 種類の弾性定数の比を用いて理解することができる。

次に本モデルにおいて、pH 勾配がどのように考慮されているかについて考察する。 $\lambda^* = 0$ のとき、すなわち、式 6 の $\lambda = 0$ のとき、式 7 によれば、膜の弾性エネルギーは pH 勾配が存在しないので、ベシクルの向きに関係なく H_{bound}^* の絶対値に依存する。一方、 λ^* が 0 でないとき、すなわちベシクルが pH 勾配下にあるとき、式 6 の E_h の値は pH 勾配の向きと小孔の位置関係に依存するようになっている。すなわち、前節 2-4.1 の式 6 では、高 pH 側に存在する小孔の E_h は低 pH 側に存在する E_h よりも大きくなるようになっており (Fig. 2.14a)、この結果、小孔が高 pH 側に位置するとき (このとき H_{bound} は正の曲率と定義している)、式 6 の E_h は H_{bound} が負のときに比べて大きい値をとる。このように、 λ^* が 0 でないとき、小孔が低 pH 側に位置した方が、式 7 のエネルギーの値は低くなるようになっている。

このようなモデルを用いて、 H_{bound}^* の時間変化を計算するためには、 s_A^* 、 α_{bound}^* 、 r_A^* の値を知る必要がある。 s_A^* については、Fig. 2.8b の結果では、約 8 であるが、実際に計算をおこない実験結果を再現するように試みたところ、 $s_A^* = 9$ が最も適切であったため、この値を用いた。

適当な初期値 α_{bound}^* 、 r_A^* 、 H_{bound}^* とパラメータ I^* と κ^* 、 λ^* を用いて計算した結果を Fig. 2.15a に示し、Fig. 2.6a と 2.6b 中に実線で重ねた。ここでは、式 9a - 9d を 1 組の I^* と κ^* を用いて計算している。Fig. 2.6 では、Fig. 2.6a を説明できる λ^* と 2.6b を説明できる λ^* の間で λ^* 値を変え、さらに t^* を実験結果に合うように適切にスケールしている。このモデルによって算出された曲線のパターンはゆるやかな誘導期間の後に急な減少がおこり、実験結果と傾向的に一致した。

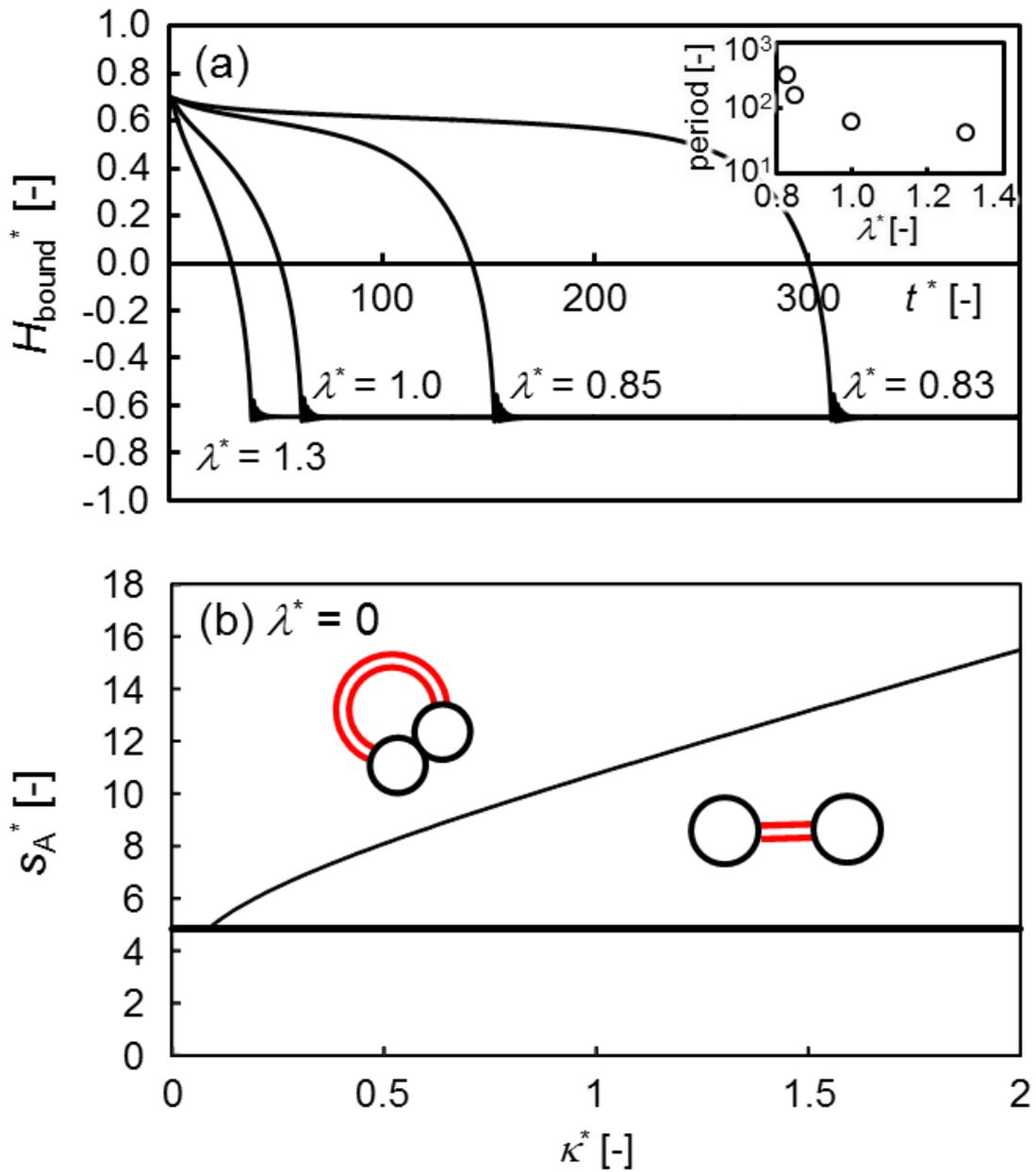


Fig. 2.15 (a) H_{bound}^* calculated with $s_A^* = 8$, $\kappa^* = 0.3$, and $\lambda^* = 1$. The λ^* values used in the calculations are shown. The period for a single transformation is shown in the inset as a function of λ^* . (b) Domain of the stable shape in a map of s_A^* and κ^* . Other parameters do not affect the results of this mapping.

結合部の膜は周囲に膨潤部が存在するために完全な球を形成できず、したがって、Fig. 2.6 に示された実験結果の結合部の曲率の最大値と最小値が 1 と異なるのは、2 重球構造における膨潤部の存在のためであり、 H^*_{bound} はベシクルが 2 重球構造（小孔を完全に閉じた状態）の場合でも 1 には達しない。モデルでは、 H^*_{bound} の初期値（最大値）を計算結果が実験結果に合うように選んでいるが、時間が経過した後の H^*_{bound} の最小値は計算結果の最小値と一致しなかった。しかし、本モデルの単純さを考慮すると、計算した H^*_{bound} は実験中に観察される結合部の曲率変化の傾向を十分に示し、ベシクルの反転に関する構造変化は小孔の周りに蓄積するようなエネルギーと膜弾性によって説明することができる。

Fig. 2.7 に示された実験結果では、pH 勾配が大きいほど 1 周期の変形にかかる時間が減少することを示している。本モデルでは、pH 勾配は大きいほど λ^* の値は大きくなる。 λ^* 値が大きいときには、結合部の曲率の H^*_{bound} 値が同じであっても、式 6 中の E_h の値は大きくなる。この影響により、 H^*_{bound} の変化速度はより大きくなる。Fig. 2.15a に示された計算結果では、1 周期分の変形に要する時間が λ^* の増加（ベシクル溶液に加えらるる塩基溶液の pH の増大）にともなって減少し、1 回の変形にかかる時間が λ^* 、すなわち pH 勾配の関数として実験結果と整合するように表現できていることを示している (Fig. 2.15a 右上)。

2 重球状態のベシクルは、運動が停止した後に Fig. 2.3B (i) のようなフラットな形状で安定する。この挙動を本モデルを用いて考察する。このため、pH 勾配はない ($\lambda^* = 0$) とする。いま、式 9a と 9b は $y^* = 0$ と $\partial y^* / \partial t^* = 0$ で定常点を与える。これらの式は、 $\lambda^* = 0$ のとき、 $H^*_{\text{bound}} = 0$ と $y^* = 0$ を定常点として与える。この定常点の近傍を考えるとして、 $\partial y^* / \partial H^*_{\text{bound}} > 0$ のとき、 H^*_{bound} が増加すると y^* も増加する。いま、 y^* は H^*_{bound} の増加速度を表しているため、 $\partial y^* / \partial H^*_{\text{bound}} > 0$ のとき、 H^*_{bound} が僅かでも増加すると H^*_{bound} の増加速度が増大することになる。このとき、 H^*_{bound} におこった僅かな揺らぎは増幅されることになり、 $H^*_{\text{bound}} = 0$ の定常点は不安定となる。したがって、定常状態 $H^*_{\text{bound}} = 0$ が安定であるのは、 $\partial y^* / \partial H^*_{\text{bound}} < 0$ のときである。定常状態では、式 9b より $y^* = -(\alpha^*_{\text{bound}} I^* / 2) \times (\partial E^* / \partial H^*_{\text{bound}})$ が成り立つ。 $\lambda^* = 0$ を考慮して、式 7 で与えられる E^* をこの式に代入すると、次式を得る。

$$\kappa^* > \pi^2 r_A^* - \frac{s_A^{*3}}{64\pi} \frac{1}{(1+2r_A^*)^2(1+8r_A^*)} \quad (10a)$$

したがって、式 10a の不等式が満たされる範囲では、 $H^*_{\text{bound}}=0$ の定常点は安定であり、フラットな構造のベシクルが安定である。一方、式 10a の不等式が満たされない領域では、フラットな構造は不安定であり、ベシクルは丸まった 2 重球構造をとる。

式 10a の s_A^* と r_A^* は式 9c と 9d で関係づけられており、 $H^*_{\text{bound}}=0$ のとき、それは式 10b で表せられる。

$$\frac{s_A^{*3}}{64\pi^3} = r_A^*(1+2r_A^*)^3 \quad (10b)$$

これを用いると式 10a を κ^* と s_A^* で表すことができる。この結果を κ^* と s_A^* の平面に図示したものが Fig. 2.15b である。なお、幾何学的に $s_A^* > (36\pi)^{1/3}$ の範囲のみが実現可能である。

Fig. 2.15b より、ベシクルの小孔が完全に閉じている 2 重球構造は、 κ^* がより小さいときに安定である。 κ^* が小さいときには、膨潤部の膜弾性の影響が結合部の膜弾性の影響よりも大きいため、膨潤部がより大きな直径（小さな曲率）を持つ構造が安定となる。内水相体積 V_{swell} は保存されるため、膨潤部断面の直径はベシクルがフラットなときよりも 2 重球状態にあるときに大きくなる。したがって、Fig. 2.15b に示すように 2 重球構造は κ^* が大きいときに形成する。また、Fig. 2.15b によれば 2 重球構造のベシクルは、 s_A^* 値が大きいときに安定である。 s_A^* が大きい状態は、膜面積に比べて内水相体積が小さな状態であることを考慮すると、膨潤部の内水相体積が小さければ、式 4 により H_{swell} は大きくなり、膨潤部の持つ相対的な膜弾性エネルギーが増加することから、 s_A^* が大きいときにフラットな構造が安定になると考えられる。これらの傾向は Fig. 2.3B (d) や (h)-(l) の観察結果と一致する。

Fig. 2.3B (d)-(l) の構造変化にはさほど時間がかかっていないため、Fig. 2.3B (d)-(f) や (h)-(l) の各ベシクルは同じような膜面積であるにもかかわらず、Fig. 2.3B (d)-(f) のベシクルは小孔を Fig. 2.3B (f) で一時的に閉じるのに対して、Fig. 2.3B (h)-(l) のベシクルは閉じずにフラットな形状へと向かっている。Fig. 2.3B のベシクルを詳しく観察すると、Fig.

2.3B (h)-(l)のベシクルは Fig. 2.2-B (d)-(f)のベシクルよりも膨潤部の体積が大きくなっている。この変化は s_A^* の値を小さくする。Fig. 2.15b によれば、このときベシクルはフラットな構造となり、Fig. 2.3B の観察結果と一致する。

本モデル式において、慣性項は式 8 に含まれているが、慣性の大きさを表す I に非常に小さな値を用いても、緩やかな誘導期間とそれに続く急な減少から成る結合部の曲率変化を得ることができた。

2-5 pH 勾配下でのベシクルの回転

ベシクルはその膨潤部（プラス端）を高 pH 側へ向けるように回転すると 2-3.1 節で述べたが、この回転は Fig. 2.5 と Fig. 2.11 (d)→(i)で明瞭に見られ、pH 勾配によって生じる熱力学的力（泳動力の一種）が存在していることを示している。膨潤部は結合部よりも多くイオン化されたヘッドグループを含むと考えられるため、ベシクルは回転することでベシクル自体の自由エネルギーを下げていると考えられる。したがって、ベシクルの回転には化学ポテンシャル勾配から生じる泳動力 ζ を考慮する必要があるが、この力は膨潤部を高 pH 側へと動かす。本章の実験系ではおそらく、ベシクルは周囲の分子集合体や溶液の粘性によって並進運動が妨げられるが、この泳動力はベシクル自体を回転させることはできると考えられる。

Fig. 2.16 は泳動力によって生じるトルク N を説明するためのベシクルの概略図である。ここで、pH 勾配 (y 軸) から僅かな角度 (θ) だけ反時計回りに傾くベシクルを考えると、膨潤部が高 pH 側に位置するとき (Fig. 2.16a)、反時計回りの回転を生むトルク N は $N = 2\zeta \sin \theta (L - a \cos \alpha)$ で表せられ、同様に膨潤部が低 pH 側に位置するとき (Fig. 2.15b) は $N = 2\zeta \sin \theta (a \cos \alpha - L)$ で表すことができる。ここで、トルクの式中の各記号は Fig. 2.15 中に記している。トルクが負のとき、傾いていた角度は減少し、ベシクルは回転しない。

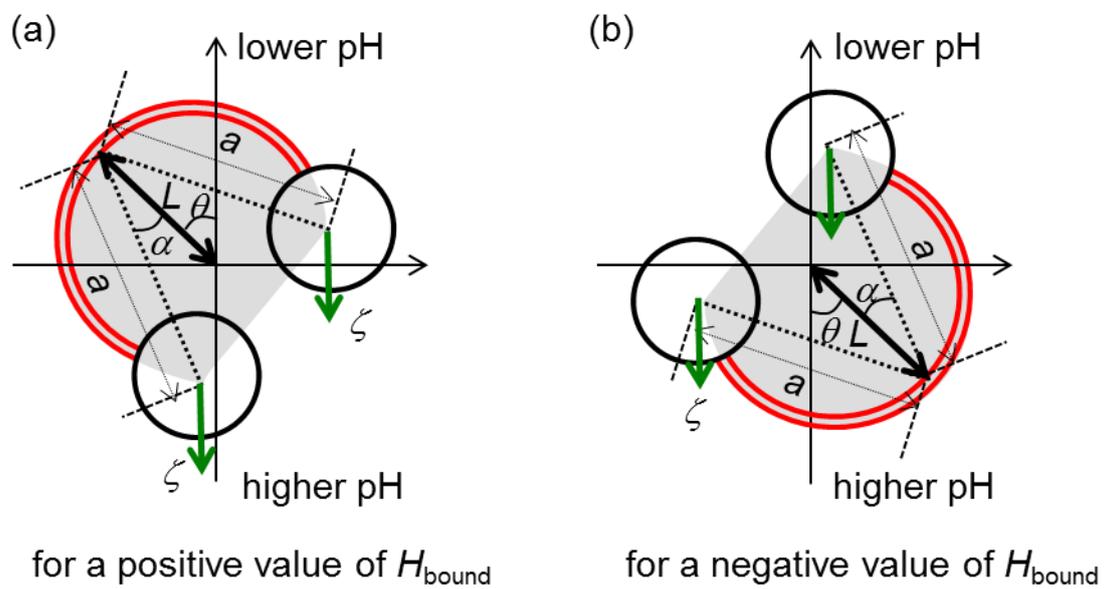


Fig. 2.16 Illustration for the calculation of torque caused by the phoretic force. We assumed that the phoretic force affects the swollen part to move it toward the higher-pH side. The grey area is the projection of a vesicle part that may be attached onto the surface of a microslide cell.

一方、トルクが正のときベシクルは回転する。これは僅かに傾いていた角度を巨視的な回転へと増幅するような不安定性の一種であると考えられる。膨潤部が高 pH 側に位置するとき (Fig. 2.15a)、不安定性に必要な条件は $L > a \cos \alpha$ (N の式中の $\sin \theta$ は正) であるが、回転の中心は Fig. 2.15a 中の灰色箇所を示されるベシクルの投影内にあり、中心が投影範囲内に存在していれば、常にこの不等式は満たされない。したがって、このとき泳動力ではベシクルを回転させることができない。一方、膨潤部が低 pH 側に位置するとき (Fig. 2.15b)、不安定性に必要な条件は $L < a \cos \alpha$ であるが、Fig. 2.15b の灰色で示す投影範囲はベシクルの閉じる度合いにともなって増加するため、ベシクルの中心位置を考えれば、この条件はベシクルの小孔が十分に閉じているときにのみ満たされる。したがって、ベシクルは低 pH 側で小孔が十分に閉じた後に回転し始める。すなわち、泳動力は常に働いているが、ベシクルが負の曲率を持ち、なおかつ小孔が閉じた状態にあるときにのみ、泳動力はベシクルを回転させることができると考えられる。また、この回転の断続性がベシクルの周期的な変形を生み出すと考えられる。

おそらく泳動力は常に働いており、それは式 9a と 9b によって表せられる運動にも影響すると考えられるが、それがベシクル変形に与える影響は弾性エネルギーの影響よりも弱いと考えられる。したがって、式 9a - 9d で計算された H^*_{bound} は泳動力からほとんど影響を受けないとしても良いといえる。しかし、小孔が低 pH 側にあるとき、ベシクル方向の小さな揺らぎは不安定性によって回転へと増幅されるため、弱い泳動力でも十分にこの回転を引き起こすことが可能であるといえる。

このような回転不安定性を、式 9a - 9d による結合部の曲率変化とともにモデル化することも可能であると考えられるが、そのためには泳動力と回転の中心点に関してさらにパラメータを導入しなければならない。そのうえ慣性モーメントはベシクル形状に対して敏感に依存する。したがって、回転不安定性と結合部の曲率変化に別々の議論を用いて構造変化を理解する方がより適切であると考えた。

2-6 結言

pH 勾配下におけるベシクル構造の周期的変化について研究した。このベシクルはオレイン酸とオレイン酸ナトリウムによって形成されている。本研究において観測された様々な形状のベシクルの内、2つの異なる構造の部位をもつベシクル(2重球ベシクル)が周期的な運動を示した。一方は pH 勾配の高 pH 側を向き、内部に緩衝液を含み(膨潤部)、もう一方は勾配の低 pH 端を向き、緩衝液を含まなかった(結合部)。膨潤部に存在する小孔は OH⁻の拡散とともに開き、ベシクルは結合部の膜を中央に持つトーラス型の形状に変形した。結合部の膜の曲率は減少し、平面的な構造を経た後、ベシクルは逆向きの2重球構造を形成するように再度小孔を閉じた。この状態では、ベシクルの向きは初めの向きとは反対となっており、その後、ベシクルはその向きを初めの向きに戻すように回転した。このような構造変化は、大きなサイズ減少を伴わずに何度も繰り返され、さらに、2重球ベシクルの周期的構造変化によって pH 勾配に沿った物体の輸送が可能であった。また、本章では周期的構造変化を表現するシンプルなモデルを提案し、それによれば、この運動は2種類の力によって説明できることがわかった。その内の一方は膜弾性であり、もう一方は pH 勾配によって生じる泳動力である。結合部と膨潤部の膜はどちらも曲率の小さい状態を好むため、トーラス形状を持つ膨潤部の膜は曲率が高くエネルギー的に不安定である。ベシクルが小孔を完全に閉じるとき膨潤部の膜は最小曲率となり、膨潤部の膜弾性が強ければ小孔を閉じたベシクル(すなわち、2重球構造)が形成する。しかし、この閉じた構造は結合部の膜の曲率を大きくするため、その弾性エネルギーを増加させる。ベシクルの形状安定性はこれらの2種類の弾性エネルギーの競り合いによって決定されていると考えられる。また、小孔は膨潤部に存在し、この孔は低 pH レベルでより安定であると考えられる。このため、高 pH の化学種が孔に接触したとき、孔は開き、それは正の曲率から負の曲率への膜の変形を引き起こすきっかけになり、膨潤部はこのような構造変化を経て低 pH 側へ移動すると考えられる。負の曲率で小孔が完全に閉じると、回転不安定性が pH 勾配による泳動力によって引き起こされ、その結果ベシクルは初めの状態に戻るために回転する。本ベシクル変化のメカニズムは最終的に pH 勾配を仕事に変換する分子集合体機械につながる可能性を秘めていると考えられる。

References

1. J. Solon, P. Streicher, R. Richter, F. Brochard-Wyart and P. Bassereau, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103, 12382 (2006).
2. P. A. Giardini, D. A. Fletcher and J. A. Theriot, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 6493 (2003).
3. A. Upadhyaya, J. R. Chabot, A. Andreeva, A. Samadani and A. van Oudenaarden, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 4521 (2003).
4. F. Brochard-Wyart, P. G. de Gennes and O. Sandre, *Physica A*, 278, 32 (2000).
5. F. Nomura, M. Nagata, T. Inaba, H. Hiramatsu, H. Hotani and K. Takiguchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 2340 (2001).
6. T. Umeda, F. Nomura, T. Inaba, K. Takiguchi and H. Hotani, *ChemPhysChem*, 6, 1047 (2005).
7. S. Takeda, A. Saitoh, M. Furuta, N. Satomi, A. Ishino, G. Nishida, H. Sudo, H. Hotani and K. Takiguchi, *J. Mol. Biol.*, 362, 403 (2006).
8. T. Hamada, Y. Hirabayashi, T. Ohta and M. Takagi, *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 80, 051921 (2009).
9. T. Miura, H. Oosawa, M. Sakai, Y. Syundo, T. Ban and A. Shioi, *Langmuir*, 26, 1610 (2010).
10. M. Kaga and T. Ohta, *J. Phys. Soc. Jpn.*, 76, 094003 (2007).
11. M. M. Hanczyc, T. Toyota, T. Ikegami, N. Packard and T. Sugawara, *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 9386 (2007).
12. F. Takabatake, N. Magome, M. Ichikawa and K. Yoshikawa, *J. Chem. Phys.*, 134, 114704 (2011).
13. U. Seifert, *Adv. Phys.*, 46, 13 (1997).
14. F. M. Menger and K. D. Gabrielson, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 34, 2091 (1995).
15. M. Ishimaru, T. Toyota, K. Takakura, T. Sugawara and Y. Sugawara, *Chem. Lett.*, 34, 46 (2005).
16. K. Kano and J. H. Fendler, *Biochim. Biophys. Acta*, 509, 289 (1978).
17. W. F. Paxton, K. C. Kistler, C. C. Olmeda, A. Sen, S. K. St. Angelo, Y. Cao, T. E. Mallouk, P. E. Lammert and V. H. Crespi, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 13424 (2004).

18. W. F. Paxton, P. T. Baker, T. R. Kline, Y. Wang, T. E. Mallouk and A. Sen, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 14881 (2006).
19. S. Sundararajan, P. E. Lammert, A. W. Zudans, V. H. Crespi and A. Sen, *Nano Lett.*, 8, 1271 (2008).
20. I. Theurkauff, C. Cottin-Bizonne, J. Palacci, C. Ybert and L. Bocquet, *Phys. Rev. Lett.*, 108, 268303 (2012).
21. M. Manjare, B. Yang and Y.-P. Zhao, *Phys. Rev. Lett.*, 109, 128305 (2012).
22. J. S. Bader, R. W. Hammond, S. A. Henck, M. W. Deem, G. A. McDermott, J. M. Bustillo, J. W. Simpson, G. T. Mulhern and J. M. Rothberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96, 13165 (1999).
23. R. Eichhorn, J. Regtmeier, D. Anselmetti and P. Reimann, *Soft Matter*, 6, 1858 (2010).
24. C. Reichhardt and C. J. Olson Reichhardt, *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 73, 011102 (2006).
25. J. T. Ok, E. Lopez-On, D. E. Nikitopoulos, H. Wong and S. Park, *Microfluid. Nanofluid.*, 10, 1045 (2011).
26. K. Morigaki and P. Walde, *Langmuir*, 18, 10509 (2002).
27. M. L. Rogerson, B. H. Robinson, S. Bucak and P. Walde, *Colloids Surf., B*, 48, 24 (2006).
28. K. Morigaki and P. Walde, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 12, 75 (2007).
29. J. A. Hamilton, *J. Lipid Res.*, 39, 467 (1998).
30. I. A. Chen and J. W. Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, 7965 (2004).
31. T. Haines, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 80, 160 (1983).
32. S. Salentinig, L. Sagalowicz and O. Glatter, *Langmuir*, 26, 11670 (2010).
33. R. D. Kulkarni and P. Somasundaran, *Colloids Surf.*, 1, 387 (1980)

第2章 補遺

ベシクルに含まれている緩衝液のおおよその体積は次式で表せられる。

$$V_{\text{swell}} = \pi r_{\text{swell}}^2 \times 2\pi r_p = 2\pi^2 \left(\frac{1}{2H_{\text{swell}}} \right)^2 r_p \quad (\text{s1})$$

パラメータ r_{swell} と r_p は Fig. 2.14 中に示す。よって、 E_{swell} は次式のように変形できる。

$$E_{\text{swell}} = \kappa_{\text{swell}} \frac{\pi^2 r_p}{2V_{\text{swell}}} A_{\text{swell}} \quad (\text{s2})$$

また、 H_{bound} と r_p は幾何学的な制限によって互いに依存していることを次式で表す。

$$r_p = \left(\frac{A_{\text{bound}}}{\pi} \right)^{1/2} \left(1 - \frac{A_{\text{bound}}}{4\pi} H_{\text{bound}} \right)^{1/2} \quad (\text{s3})$$

ここで、以下の2つの式と、

$$\sin \theta = \frac{r_p}{r_{\text{bound}}}, \quad A_{\text{bound}} = 2\pi r_{\text{bound}}^2 (1 - \cos \theta)$$

式9を用いると E_{swell} と E_h は次式のように変形できる。

$$E_{\text{swell}} = \kappa_{\text{swell}} \frac{\pi^{3/2} A_{\text{swell}} A_{\text{bound}}^2}{2 V_{\text{swell}}} \left(1 - \frac{A_{\text{bound}}}{4\pi} H_{\text{bound}} \right)^{1/2} \quad (\text{s4})$$

$$E_h^{-1} = \left(\lambda (H_{\text{bound}} + H_{\text{bound,max}}) \right)^{-1} r_p \left\{ 1 - \left(\frac{V_{\text{swell}}}{2\pi^2} \right)^{1/2} \left(\frac{A_{\text{bound}}}{\pi} \right)^{-3/4} \left(1 - H_{\text{bound}}^* \right)^{-3/4} \right\} \quad (\text{s5})$$

ベシクル膜の持つ全エネルギー E^* を $E^* = (E_{\text{bound}} + E_{\text{swell}} + E_h) / (2\pi\kappa_{\text{swell}})$ として次式 s6 を導いた。

$$\begin{aligned}
E^* &= \frac{E_{\text{bound}} + E_{\text{swell}} + E_{\text{h}}}{2\pi\kappa_{\text{swell}}} \\
&= 2\kappa^* H_{\text{bound}}^{*2} + \frac{\sqrt{\pi}}{4} p_{\text{A}}^* (1 - H_{\text{bound}}^{*2})^{1/2} \\
&+ \frac{\lambda^* (H_{\text{bound,max}}^* + H_{\text{bound}}^*)}{2\pi (1 - H_{\text{bound}}^{*2})^{1/2}} \frac{1}{1 - \frac{1}{\pi^{1/4}} \frac{1}{(2r_{\text{A}}^* p_{\text{A}}^*)^{1/2}} (1 - H_{\text{bound}}^{*2})^{-3/4}} \quad (\text{s6})
\end{aligned}$$

導出に用いた無次元パラメータは以下のとおりである。

$$\begin{aligned}
H_{\text{bound}}^{*2} &= \frac{A_{\text{bound}} H_{\text{bound}}^2}{4\pi}, H_{\text{bound,max}}^{*2} = \frac{A_{\text{bound}} H_{\text{bound,max}}^2}{4\pi}, \\
\kappa^* &= \frac{\kappa_{\text{bound}}}{\kappa_{\text{swell}}}, p_{\text{A}}^* = \frac{A_{\text{swell}} A_{\text{bound}}^{1/2}}{V_{\text{swell}}}, \lambda^* = \frac{\lambda}{\kappa_{\text{swell}} A_{\text{bound}}}, r_{\text{A}}^* = \frac{A_{\text{bound}}}{A_{\text{swell}}}
\end{aligned}$$

Fig. 2.8 の結果より、式7で与えられた V_{swell} は保存されることから、式 s1 と式 s3 から次式が得られる。

$$r_{\text{swell}} = \frac{1}{2H_{\text{swell}}} = \frac{V_{\text{swell}}^{1/2}}{\sqrt{2}\pi} \left(\frac{A_{\text{bound}}}{\pi}\right)^{-1/4} \left(1 - \frac{A_{\text{bound}}}{4\pi} H_{\text{bound}}^2\right)^{-1/4} \quad (\text{s7})$$

さらに、式 s3 と式 s7 を用いて次式を得る。

$$A_{\text{swell}} = 2\pi r_{\text{swell}} 2\pi r_{\text{p}} = 2\sqrt{2}\pi V_{\text{swell}}^{1/2} \left(\frac{A_{\text{bound}}}{\pi}\right)^{1/4} \left(1 - \frac{A_{\text{bound}}}{4\pi} H_{\text{bound}}^2\right)^{1/4} \quad (\text{s8})$$

一方、無次元パラメータと式 s8 からは次式が与えられる。

$$p_{\text{A}}^* = 8\sqrt{\pi^3} r_{\text{A}}^* (1 - H_{\text{bound}}^{*2})^{1/2} \quad (\text{s9})$$

この式 s9 を式 s6 の p_{A}^* に代入すると次式を得ることができる。

$$\begin{aligned}
E^* &= 2\kappa^* H_{\text{bound}}^{*2} + 2\pi^2 r_A^* (1 - H_{\text{bound}}^{*2}) \\
&+ \frac{\lambda^* H_{\text{bound,max}}^* + H_{\text{bound}}^*}{2\pi (1 - H_{\text{bound}}^{*2})^{1/2}} \frac{1}{1 - \frac{1}{4\pi r_A^*} \frac{1}{1 - H_{\text{bound}}^{*2}}} \quad (\text{s10})
\end{aligned}$$

これより、無次元の全膜エネルギーは本文中の式7のように表される。

第3章 pH 勾配下におけるベシクルの

走化性を示すアメーバ的変形

Chemotactic amoeboid-like shape change of a vesicle

under pH gradient

3-1 緒言

生物は自らの高度な機能を発現するために化学ポテンシャル勾配を利用するが[1, 2]、このような化学ポテンシャル勾配は、人工系とは対照的に、適切な化学反応によって自発的に形成されている[1, 2]。例えば、ミトコンドリア内膜の ATP (アデノシン三リン酸) の加水分解は膜の内外に pH 勾配を形成し、十分に形成された pH 勾配は ATP 合成酵素の分子モーターを駆動させる[3]。すなわち、その化学ポテンシャル勾配 (pH 勾配) は生体システムの中で仕事を生み出しているといえる。化学ポテンシャル勾配から仕事を生み出す他の例として、白血球が炎症箇所からの化学刺激物質を検出することでその炎症部へと向かって移動することや[4]、バクテリアから放出された化学種の濃度勾配を追従することで白血球がバクテリアを追いかけることなどが挙げられる[5]。このように化学ポテンシャル勾配を利用して活発に運動するソフトマターをつくることができれば、それはドラッグデリバリーシステム[6]や能動輸送の設計[7, 8]におけるターゲティング技術にとって重要なものであり、さらに、そのような研究は化学走性の物理化学に対して重要な知見を与えると期待される。また、化学ポテンシャル勾配から効率的に仕事を生み出す系を簡単なメカニズムから構築することは、シンプルかつ生体模倣的特徴をもつソフトマターの設計において重大な課題になるといえる。

今日までに、pH 勾配に沿った液滴や微粒子の運動は多岐にわたって研究されてきており、それらは走化性をともなう場合がある [9-11]。これらの運動のほとんどはマランゴニ効果によって駆動され、それは界面エネルギーの勾配によって生じるが、この勾配は十分な界面エネルギーを持つ界面でのみ形成する。一方で、ベシクルは 2 分子膜や多層膜で構成され、ベシクル膜の内側と外側は双方水相である。ほとんどの場合、その 2 相 (内水相と外水相) の化学組成にはほとんど差がない。よって、一般的には、ベシクルの内外でマランゴニ効果による対流はめったに起こらない。したがって、走化性を示すようなベシクル運動を実現することは液滴や微粒子の系に比べて困難であるが、前章において pH 勾配下で振動的形状変化を示すベシクルを報告した[12]。このベシクルは pH 勾配から仕事を連続的に生み出している。

前章ではベシクルはオレイン酸 (acid/soap) から作製されていた。一般的にオレイン酸 (acid/soap) は広い pH 範囲で様々な種類のベシクルを形成することが報告されているが[13-15]、前章のベシクルは周囲に pH 勾配が形成される前は 2 重球 (ストマトサイ

ト型に類似している)であり、水相を含む膨潤部と脱水された膜(結合部)という2つの部分から構成されていた。このベシクルはサイズの減少を伴わずに振動的構造変化を何度も繰り返し、その構造変化は2種類の運動で構成されていた。1つ目はベシクル構造の反転で、2つ目は反転の後に続くベシクルそのものの回転である。前章で述べたように、この回転運動はベシクルを高 pH 側へ引っ張るような泳動力の存在を示唆しており、その泳動力は特に膨潤部に強く働いているように見えたことから、ベシクルにかかる力の偏りが回転不安定性を誘発していると考えられた。このように、このオレイン酸(acid/soap)ベシクルは pH 勾配から運動エネルギーを生み出すことができる。また、泳動力によって生じるベシクルの並進運動が制限されるときにだけ回転不安定性は発生した。前章では、ベシクルの周囲にある多数の分子集合体や溶液の粘性がその並進運動を妨げていたが、この泳動力に着目すれば、ベシクルは周囲の環境に依存して、pH 勾配下で様々な運動を示すと予想され、pH 勾配下におけるこれらの運動の解明は pH 勾配下で有用な運動機能を示すベシクルの設計に至るといえる。

本章では、pH 勾配下で擬足状の構造の伸縮を示すベシクルについて報告する。このベシクル運動はアメーバの運動と似ており[16, 17]、擬足状の構造がベシクルから高 pH 側に向かって伸ばされ、続いて収縮した。この伸縮は何度も繰り返され、またその伸びた擬足はしばしばパーリング不安定性[18]を示した。Sanborn らは 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC)、スフィンゴミエリンとコレステロールから構成されるベシクルがスクロースの拡散下でパーリングを生じる不可逆的な伸長を示すことを報告した[18]。この変形はベシクルの外側に存在するスクロースによる膜内外の浸透圧差によって生じる[18]。浸透圧差が形成されると、ベシクルの内水相が外側へと排出され、ベシクルの比表面積が増加し、その結果ベシクルは変形する。このように、既存の研究において、円筒構造の伸長とパーリング不安定性は膜内外の浸透圧差に基づいて議論されているが、そのダイナミクスは、本質的に安定な平衡に向かって単調に緩和するような挙動であるとして論じられている[18, 19]。一方、著者の知る限りでは、シンプルなベシクルで伸長と収縮(伸縮)を含んだ振動的形状変化を示すものは現在までに報告されていない。

また、本章のベシクルの擬足の伸長方向は pH 勾配の方向によって決まっている。これは、Sanborn らの報告した POPC ベシクルの単調な伸長とは全く異なっており、Sanborn らのベシクルの伸長方向は特に決まった方向をもたない[18]。このように、周囲の pH 変

化に応答して擬足構造を連続的に形成するベシクルはアメーバ運動を模倣した分子集合体の設計に至ると考えられる。

3-2 実験方法

3-2.1 試薬

以下に本研究で用いた試薬を記す。また、Table 3.1中の試薬の構造式は第2章のFig. 2.1に示している。

Table 3.1 Reagent of experiment

試薬		製造元
	> 97.0 %	東京化成工業(株)
Sodium oleate (特級)	> 95.0 %	SIGMA-ALDRICH
	> 60.0 %	和光純薬工業(株)
Bicine (特級)		SIGMA-ALDRICH
Sodium hydroxide 1M (容量分析用)		和光純薬工業(株)
Sodium chloride (特級)	> 99.5 %	和光純薬工業(株)
Polybead®		テクノケミカル(株)

以下、Sodium oleate をオレイン酸ナトリウム、Bicine をビスシン、Sodium hydroxide を NaOH、Sodium chloride を NaCl、Polybead®をポリビーズと記す。

3-2.2 実験手順

本実験方法は2章のものと本質的には同じである。まず、37.5 mg のオレイン酸ナトリウムを 5 mL のビスシン緩衝液に溶かし、超音波を当てた。この緩衝液には NaOH を用いて pH 8.4 に調整されているものを使用した。ベシクルは、スぺーサーを用いたスライドガラスとカバーガラスの間にオレイン酸ナトリウム溶液 (pH = 8.4) を注入して 5 時間静置することによって形成させた (Fig. 3.1)。このとき、ベシクル溶液を保持するためにシリコンシートを切り抜いた枠を用いた。pH 勾配は、ベシクル溶液の片側に数 μL の NaOH 水溶液をベシクル溶液中对流を発生させないように注意しながら注入することによって形成させた。このときのベシクルの形状変化を NaOH 溶液の拡散のあ

とに光学顕微鏡 (Olympus IX-71) を用いて観察した。また、本実験において pH 指示薬 (チモールブルー) や蛍光物質 (ピラニン) を用いて顕微鏡画像中の局所的な pH の決定を試みたが、ピシン緩衝液の緩衝効果によってベシクルの周囲で変動する pH 幅は非常に狭いためその決定は困難であった。本実験において、ベシクル作製のために 3 種類 (東京化成工業株式会社 (> 97.0%)、SIGMA-ALDRICH (> 95.0%)、和光純薬工業株式会社 (> 60.0%)) のオレイン酸ナトリウムを用いたが、観察される運動には違いはなく、製造元に対する依存性は観られなかった。

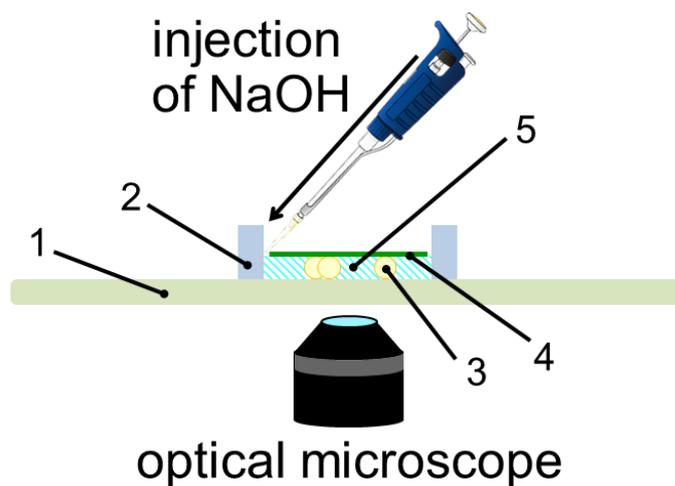


Fig. 3.1 Experimental setup: 1. slide glass; 2. silicon wall; 3. Polybeads® (polystyrene microspheres with 45 μm diameters); 4. cover glass; 5. vesicle solution.

3-3 結果と考察

3-3.1 ベシクルの形状変化

前章でも述べたように、前述の実験方法を用いて様々な構造のベシクルが観察された。本章では、その中でも2重球ベシクルから始まる扁平状ベシクルが擬足を伸縮させる可逆的運動について記述する。

Fig. 3.2 に 100 mM の NaOH を拡散させたときのベシクルの変形の様子を示す。NaOH 水溶液は各顕微鏡画像の上部から注入されている。Fig. 3.2 で示される画像は NaOH 水溶液の注入後およそ 20 分経ってから撮られており、その観察開始時間が Fig. 3.2 の 0 s として記されている。Fig. 3.2 の 4 s で、ベシクルが pH 勾配に沿って擬足状の構造を伸長している様子が観察された。その後、このような擬足の伸縮は 4–212、230–266、266–296、296–360、360–474 s で何度も繰り返されていた。このとき、これらの擬足構造が周囲の高 pH 側へ向かって伸ばされるように見えることから、Fig. 3.3 に重心からの擬足状構造の先端の位置を示した。この結果から、Fig. 3.2 の pH 勾配下のベシクルが全ての擬足構造を高 pH 側に向かって伸ばしていることがわかる。

オレイン酸は高 pH 側でよりイオン化されるため、ベシクルが OH⁻にさらされたとき、より高 pH 側に位置する膜の弾性が低下し、柔軟な膜になると考えられる。すなわち、NaOH による浸透圧の影響はベシクルの高 pH 側（より柔軟な膜上）で現れやすいと考えられる。これが擬足の伸長方向を決定していると考えられ、本章のベシクルの pH 応答性につながっている[20]。pH 勾配の影響を検証するために、拡散物質を NaOH から HCl に変えて実験したところ、HCl 系においても擬足は高 pH 側（拡散源とは反対側）に向かって伸びた。詳細は第 5 章の Fig. 5.2 で記載する。このように、オレイン酸で作製されたベシクルは周囲の pH 環境を検出し、それに応じて伸長方向を選択することができるといえる。

次に、ベシクル (Fig. 3.2 とは別のベシクル) の変形の観察中にベシクルが回転し、ベシクルに対する観察方向 (視点) が変わった例を Fig. 3.4 に示す。Fig. 3.4 の 205 s で観察された 2 重球ベシクルの内円部分は 291 s で見えなくなり、その後、ベシクルは観察平面に平行な軸を回転軸とするような回転をおこなった (326 s)。このとき、このベシクルはダンベルのような形状に観えた。したがって、このとき観察方向は Fig. 3.5 で描かれているように視点 A から視点 B にシフトしたと考えられる。

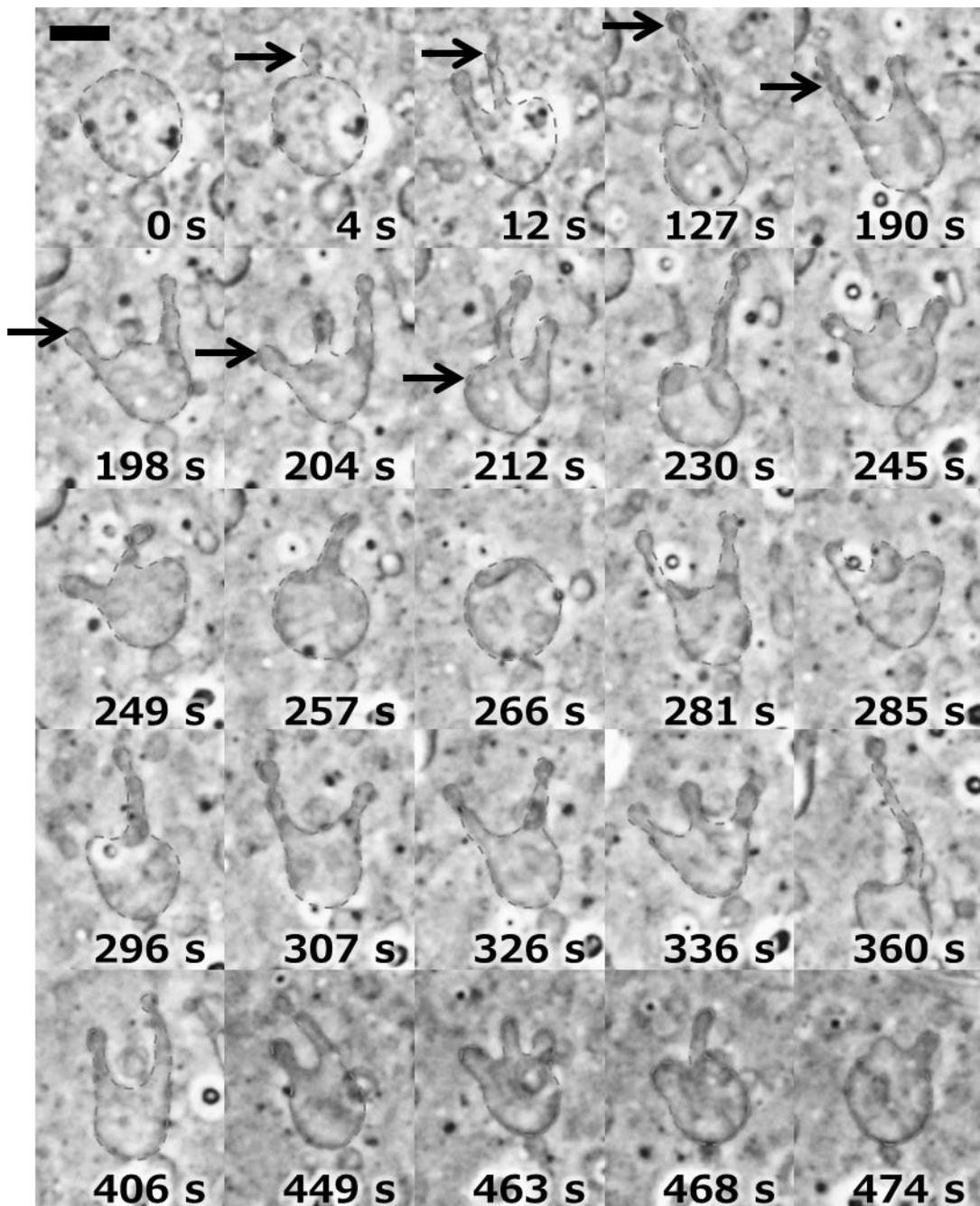


Fig. 3.2 Vesicle motion under a pH gradient in bicine buffer. 100 mM NaOH were diffused from the upper side of each image. A scale bar is 10 μm . The distance from the injection point of NaOH to the observation point is approximately 5 mm.

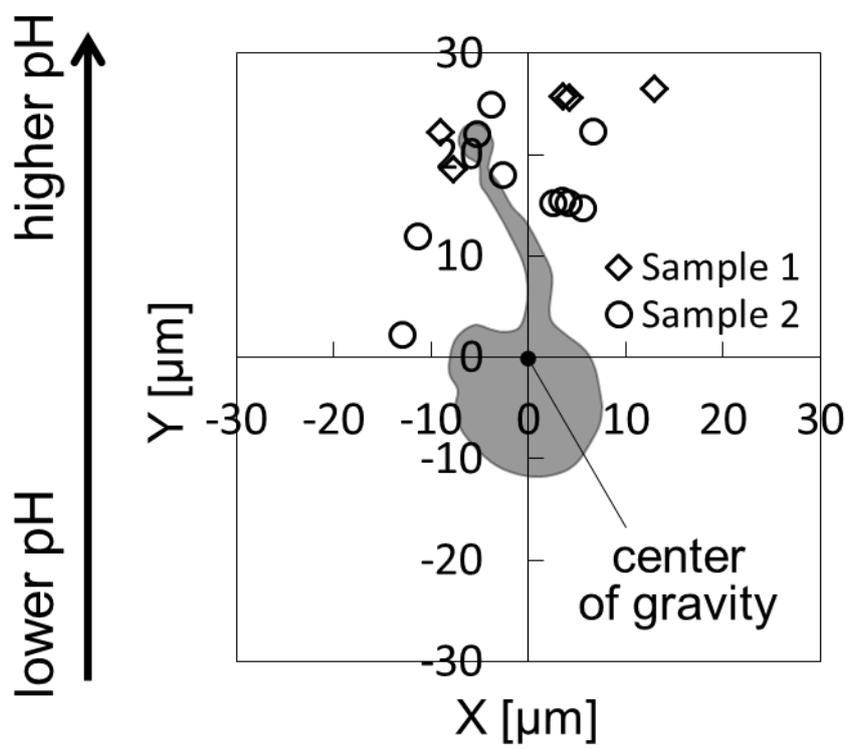


Fig. 3.3 The pseudopod-like extrusion of Fig. 3.2 under a pH gradient. An example of a pseudopod head is shown in the central gray figure.

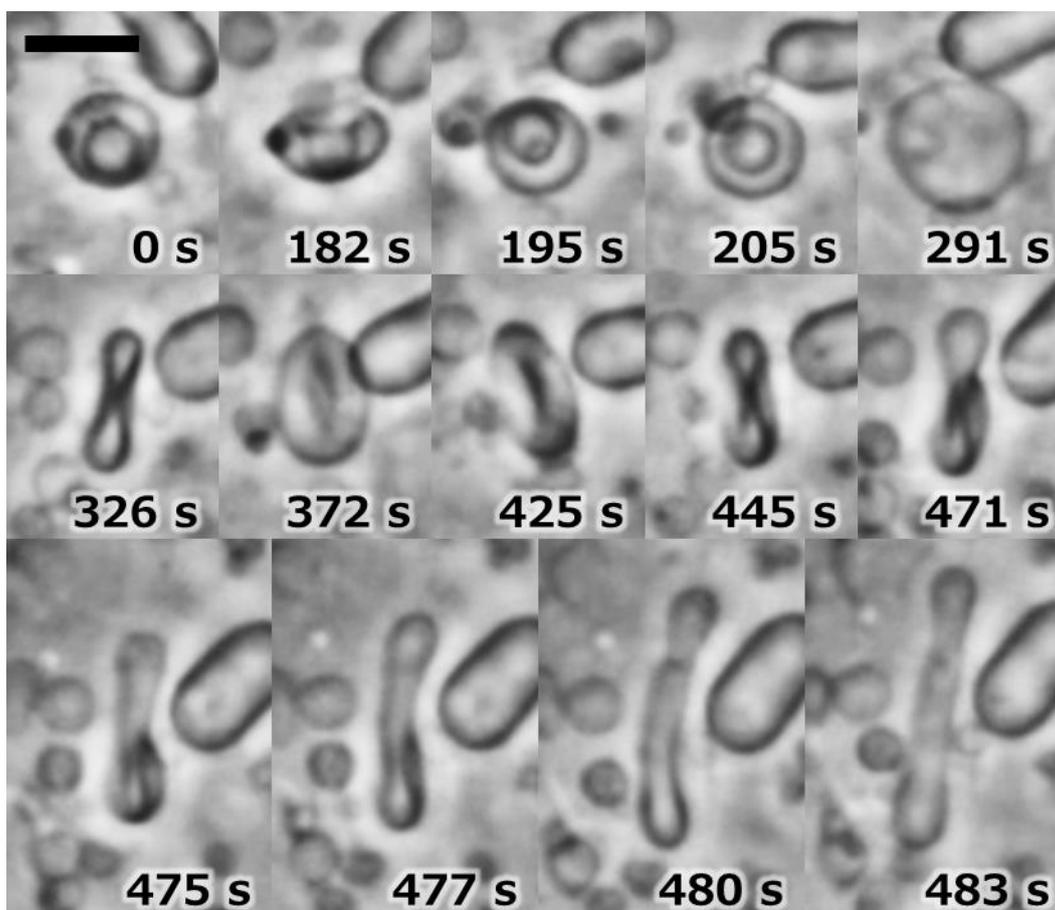


Fig. 3.4 Vesicle motion under a pH gradient in bicine buffer. 100 mM NaOH were diffused from the upper side of each image. The vesicle is not the vesicle shown in Fig. 3.2. A scale bar is 10 μm . The distance from the injection point of NaOH to the observation point is approximately 5 mm.

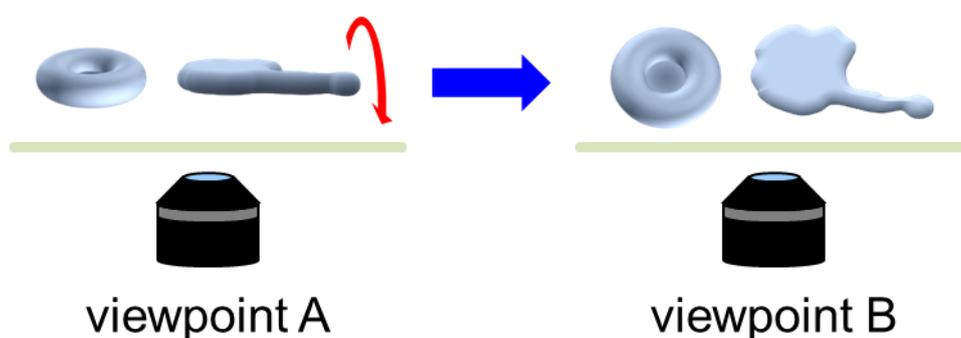


Fig. 3.5 Illustration of the observation angle of vesicle in Fig. 3.4.

その後、ベシクルが高 pH 側に向かって伸びる様子が観察された (471-482 s)。この結果から、Fig. 3.4 のベシクルは、291-445 s で視点 A では円形状、視点 B ではダンベル状に見えることから、その構造はディスク状であると考えられ、Fig. 3.4 の 445-483 s ではディスク状から Fig. 3.2 の 4 s で観察されるような擬足を形成させた形状であると考えられる。したがって、Fig. 3.4 の結果は、Fig. 3.2 (例えば 190 s) に映るベシクルが擬足をもつパンケーキのような構造 (扁平状) をしており、それを視点 A から観察している状態であることを示唆している。この特徴は後述の Fig. 3.12 でより詳細に考察する。

また、Fig. 3.4 の 0 s のベシクルは 2 重球構造であり、その特徴は前章ですでに述べたとおりである[12]。これらのベシクルはストマトサイト形状[21]に似ており、その断面の概略図を Fig. 3.6 に示す。本章でも前章と同様に Fig. 3.6 で示される各部分を結合部、膨潤部、小孔としている。pH 勾配下で可逆的な擬足の変形を示すベシクルのほとんどは NaOH の拡散前は Fig. 3.6 のような 2 重球構造であった。

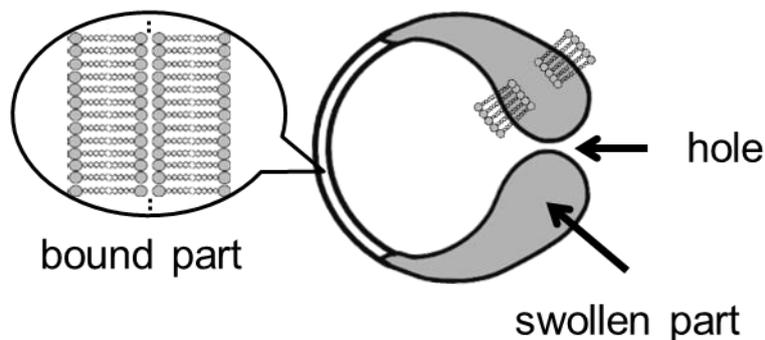


Fig. 3.6 Schematic representation of a double-spherical vesicle at 0 s in Fig. 3.4, which was deduced from chap. 2 of this thesis.¹²

ベシクルの擬足形成の NaOH 濃度に対する依存性を検討するため 2 種類の NaOH 溶液をベシクルに拡散させた。まず、10 mM の NaOH を拡散物質に用いたとき、ベシクルの擬足伸縮は見られず、拡散の約 1 分後には様々な構造を持っていたベシクルが、拡散源に近いものほど（周囲の pH が高くなるほど）より球形に変形している様子が観察された (Fig. 3.7)。一方、1 M の NaOH をベシクル溶液に注入したとき、多数のベシクルが数本の擬足を同時に伸ばす様子が観察された。それぞれの擬足は 100 mM の NaOH を用いたときに観察されたものと似ていたが、これらの擬足は伸長のあとに収縮をおこなさなかった (Fig. 3.8)。また、1 M の NaOH の拡散下では、ほとんどの擬足が伸長の後にパーリング不安定性を示した[18]。

次に、ベシクルの擬足形成の拡散する化学種に対する依存性を検討するため 1 M の NaCl をベシクルに拡散させた。Fig. 3.9 はそのときのベシクルの変形の様子を示している。NaCl 水溶液は各顕微鏡画像の上部から注入されている。0 秒として記されている画像は 1 M NaCl の注入から約 10 分後に観察されたものである。この実験では、ほとんどのベシクルは小さな凝集体へとしぼんだ。しかし、いくつかのベシクルは Fig. 3.9 のように円筒状の構造を伸ばし、それは縮まらずに伸びたままであった。NaCl 濃度を 100 mM にしたときにも同様の不可逆的な円筒構造の伸長が観察された。NaCl 系では、浸透圧によって、ベシクルはより高い NaCl 濃度に晒されている膜側から凹み、結果として Fig. 3.9 の 45.0 s のような V 字型の形状になったと考えられる。

このように、拡散溶液によってベシクルの変形過程は異なるが、その可逆的変形と不可逆的変形の違いは拡散溶液の化学種 (OH⁻や Cl⁻) や濃度の違いによって生じていると考えられる。Fig. 3.9 の 60.3 s に見られるベシクルが伸びきった構造は少なくとも数分間維持され、続いて、そのベシクルは小さな凝集体へとしぼんだ。本章の実験においては、1 M の NaOH と NaCl の拡散下でのベシクルの不可逆的な変形は、3-1 節で述べた Sanborn らによる POPC ベシクルの浸透圧差による変形[18]と同じメカニズムで生じているものと考えられる。しかしながら、著者が知る限り、これまでに 100 mM の NaOH を拡散させたときのような、擬足の伸縮をとまなうベシクルの可逆的な変形 (Fig. 3.2) は報告されていない。そのうえ、本章の可逆的に擬足を形成させるベシクルは NaOH の拡散前は 2 重球に近い形状であり、2 章で述べたような周期運動をおこなった後に擬足の伸縮をおこなった。

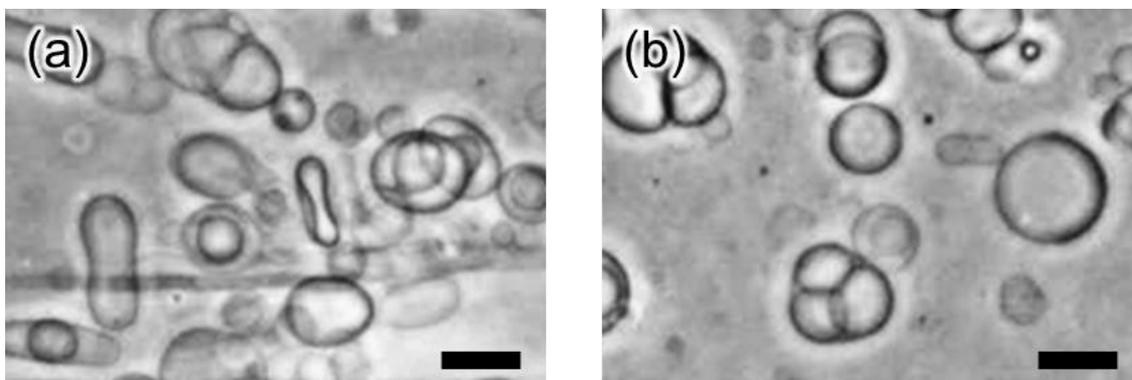


Fig. 3.7 Vesicles under the diffusion of 10 mM NaOH. (a) Lower pH side; (b) higher pH side. Scale bars are 10 μm . NaOH was diffused from the right side of each image. The distances from the injection point to the observation point are approximately 6 mm (a) and 5 mm (b).

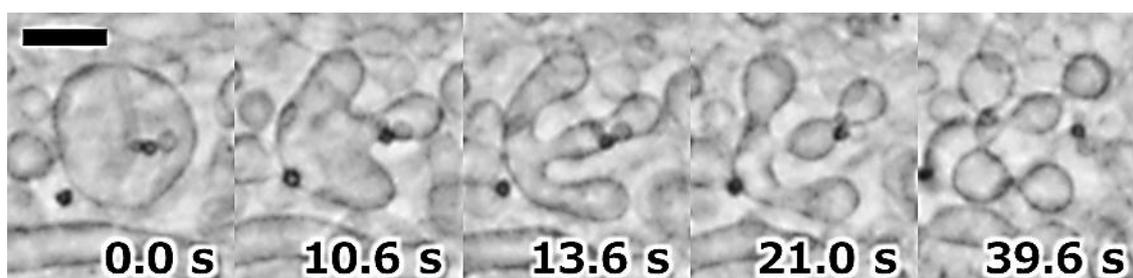


Fig. 3.8 Vesicles under the diffusion of 1 M NaOH. Scale bar is 10 μm . NaOH was diffused from the right side of each image. The distance from the injection point to the observation point is approximately 5 mm.

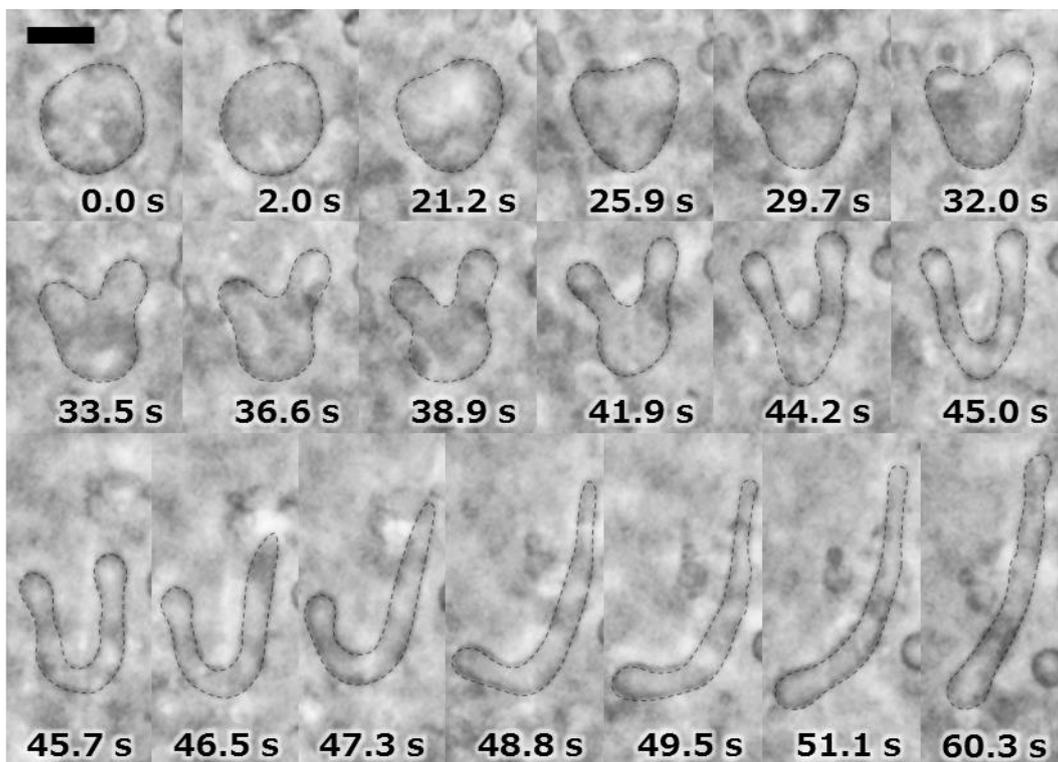


Fig. 3.9 Vesicle motion under a pH gradient in bicine buffer. 1 M NaCl were diffused from the upper side. A scale bar is 10 μm . The distance from the injection point of NaCl to the observation point is approximately 5 mm.

すなわち、この可逆的な変形が生じるためには2重球ベシクルの反転と回転の構造変化[12]が停止した後でも、そのベシクル周囲に適切な pH 勾配が存在している必要があると考えられ、また、10 mM や 1 M の NaOH を拡散させた際に擬足の伸縮運動がほとんど観察されなかったことから、pH 勾配は緩やかすぎても急すぎても可逆的な擬足の変形はおこらず、狭い pH 勾配の範囲内でのみ生じることがわかる。

前章では、Fig. 3.10 (A-D)で示すような pH 勾配下での特徴的な周期運動について述べた[12]。pH 勾配を形成させるために 1 M NaOH や炭酸塩緩衝液のような塩基性溶液を用いたとき、全ての2重球ベシクルは膨潤部 (Fig. 3.7 参照) を高 pH 側に向けるように回転し (Fig. 3.10 (A))、その回転の後、ベシクルは小孔を開き、反転運動 (Fig. 3.10 (B-C)) をおこす。このとき、膨潤部と結合部の位置関係は入れ替わるため、その結果として、膨潤部は低 pH 側に向く (Fig. 3.10 (D))。続いて、ベシクルは回転し、膨潤部と結合部の位置関係は初めの状態に戻る (Fig. 3.10 (D-A))。この周期運動はベシクルのサイズ減少をほとんど伴わずに何度も繰り返され、その後止まったときベシクル形状は Fig. 3.10 (B)に示すようなフラットな状態で安定した。この最終形状を Fig. 3.10 (B')として示す。この2重球からディスク状ベシクル (Fig. 3.10 (B')) への変形は前章ですでに述べたとおりである[12]。

このような反転と回転からなる周期的構造変化は 100 mM の NaOH の拡散下でも観察されたが、この NaOH 濃度ではさらに、いくつものベシクルが反転回転運動の後に擬足の伸縮を起こした。このときのベシクルの構造変化として、初めに、もともと反転と回転をおこすために結合部に十分な面積をもっていた2重球ベシクル (Fig. 3.6) が、反転回転サイクルの間に、その結合部膜面積を減少させ、最終的にディスク状ベシクル (Fig. 3.10 (B')) に変形したと考えられる[12]。その後のディスク状ベシクルからの一連の変形の概略図を Fig. 3.10 (B'-G)に示す。まず、結合部の膜面積が十分に減少した後、ディスク状のベシクル (Fig. 3.10 (B')) が形成される。Fig. 3.10 (B')から(E)では、NaOH によるオレイン酸のイオン化によって結合部の膜同士が剥がれ、そこへ膨潤部 (あるいはベシクル周囲のバルク) から水相が注ぎ込まれるために、結合部の膜面積がさらに減少する (例えば、Fig. 3.4 の 326-445 s)。このとき、パンケーキのようにほぼ均一な厚みを持ったベシクル (扁平状ベシクル) が形成されると考えられる (Fig. 3.10 (F))。

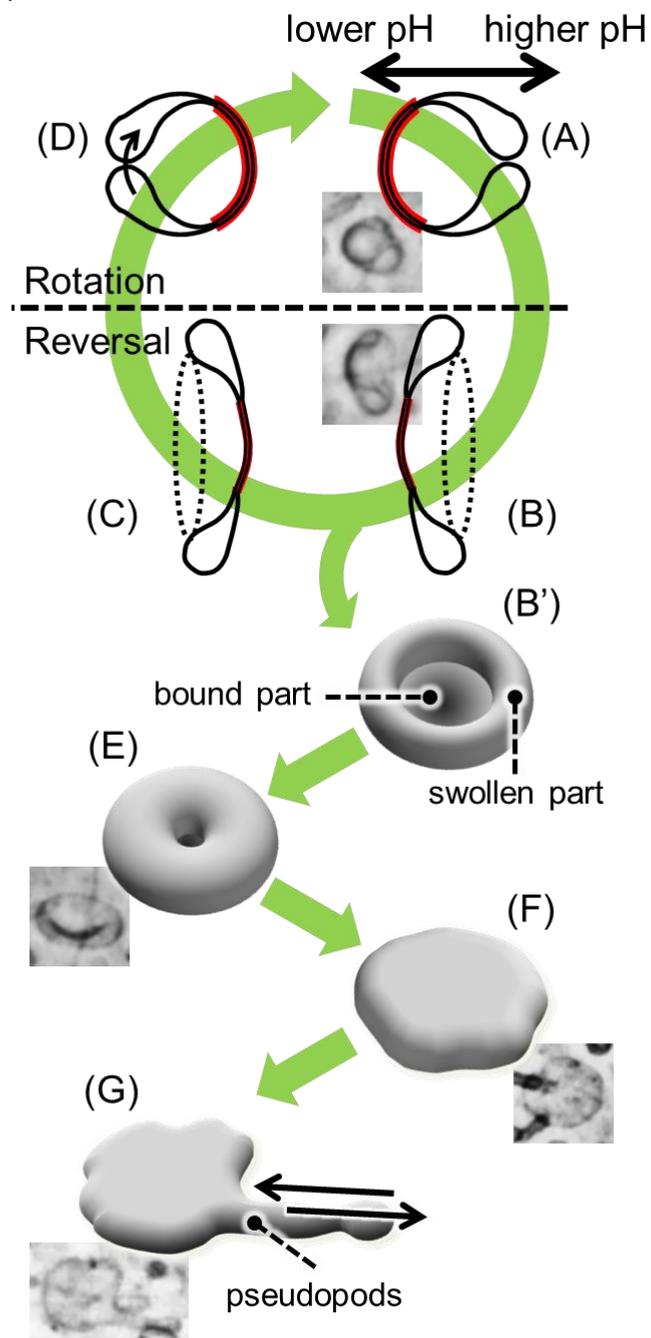


Fig. 3.10 Schematic representation of a double-spherical vesicle. A-D: the transformation of a double-spherical vesicle under a pH gradient reported in chap. 2 of this thesis.¹² B'-G: A three-dimensional view of the transformation of the vesicle. B' is a three-dimensional view of B that no more become the double spherical structure.

この変形の後、ベシクルは Fig. 3.10 (G)に示されるように擬足を伸ばす（例えば、Fig. 3.2 の 0-212 s や Fig. 3.4 の 471-483 s）。このとき、擬足の直径は扁平部分の厚みと同じであると考えられる。

このように推定した 2 重球から擬足の形成までの変形過程を考察するため、次の 2 点について検討した。1 点目に、ベシクルが Fig. 3.10 (B)のようなフラットな状態になる直前の反転回転サイクル 8 周期分の結合部面積を計算した。その結果を Fig. 3.11 に示す。これらの結合部面積は Fig. 3.11 中の 0 s のときの結合部面積で規格化されている。各面積はベシクルが Fig. 3.10 (B-C)に示すような反転中のフラットになったときの 2 重球ベシクルの結合部について測定されており、 $\pi d^2/4$ の 2 倍として計算された。ここで d は Fig. 3.11 中の点 A から B までの距離である。Fig. 3.11 に示されるように、結合部の面積は NaOH の存在下で時間とともに（周期を追うごとに）減少し、最後はディスク形状になる。これは可逆的擬足変形が始まる条件であると考えられる。

2 点目として、Fig. 3.2 のベシクルは、あくまで 2 次元的に観察されたものであり、その立体構造については定量的に評価する必要がある。擬足を伸縮させるベシクルが Fig. 3.10 で推定したような 3 次元構造を持つと仮定すると、Fig. 3.10 (G)の形状時で算出されるベシクルの膜の総面積は、その直前の 2 重球ベシクル時に算出される膜の総面積と一致しなければならない。Fig. 3.12 はこれらの 2 つの状態時の膜面積を比較したグラフである。Fig. 3.12a に計算に用いた 2 重球（左）と擬足を形成した扁平状（右）のベシクルの断面図を示す。計算に使われるベシクル膜は Fig. 3.12a 中に破線で示される。Fig. 3.12a（左）は回転体の断面であると仮定した。回転軸は Fig. 3.12a（左）中に X として示される。2 重球ベシクルの膜面積はこの仮説のもとで計算され、2 つの球殻の合計であるとした。Fig. 3.12a（右）の扁平状ベシクルでは、破線は計算に用いられた底面を表し、その厚みは Fig. 3.12a（右）で示される擬足の直径であると仮定し、膜面積はこの幾何学形状に基づいて計算された。このようにして算出された 2 重球と扁平状ベシクルの膜面積を Fig. 3.12b に示す。Fig. 3.12b 中のエラーバーは画像解像度上生じる誤差を表している。各膜面積は変形の間、実験誤差の範囲内でおよそ一定に近いと考えられるが、この結果は、光学顕微鏡画像から推定された 3 次元構造や 2 重球から擬足の形成までの変形過程の 3 次元的な構造の推定が合理的であったことを示すと考えられる。

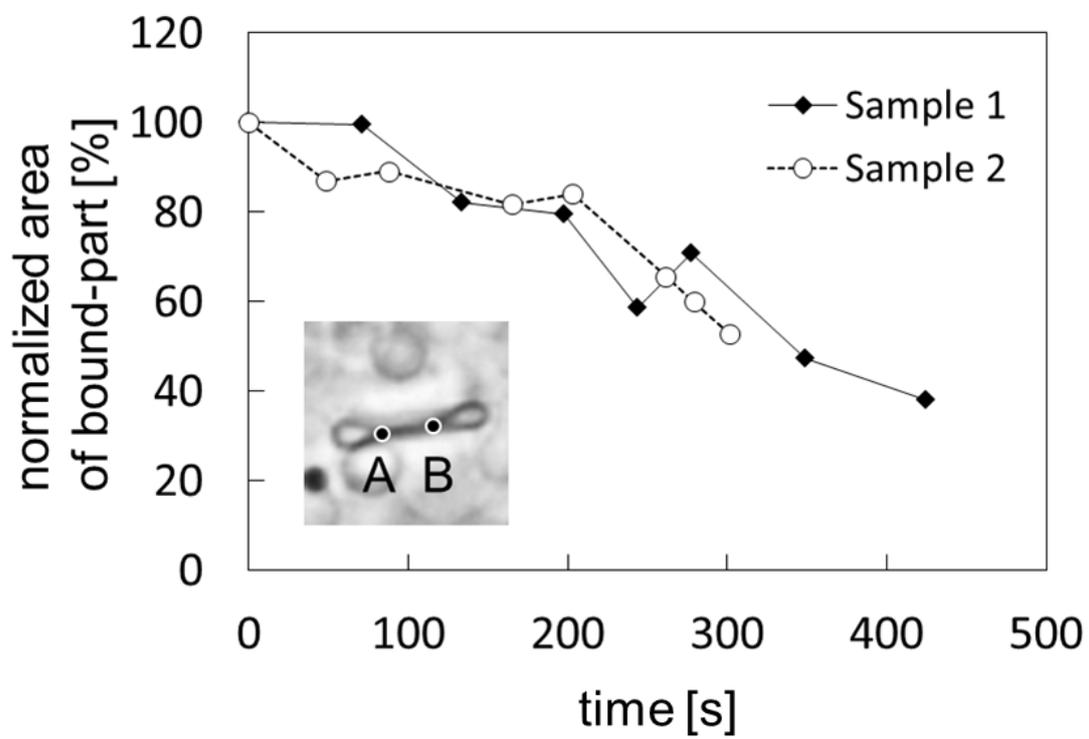


Fig. 3.11 The change in the bound part of a double-spherical vesicle. Each area is normalized by the bound part at 0 s.

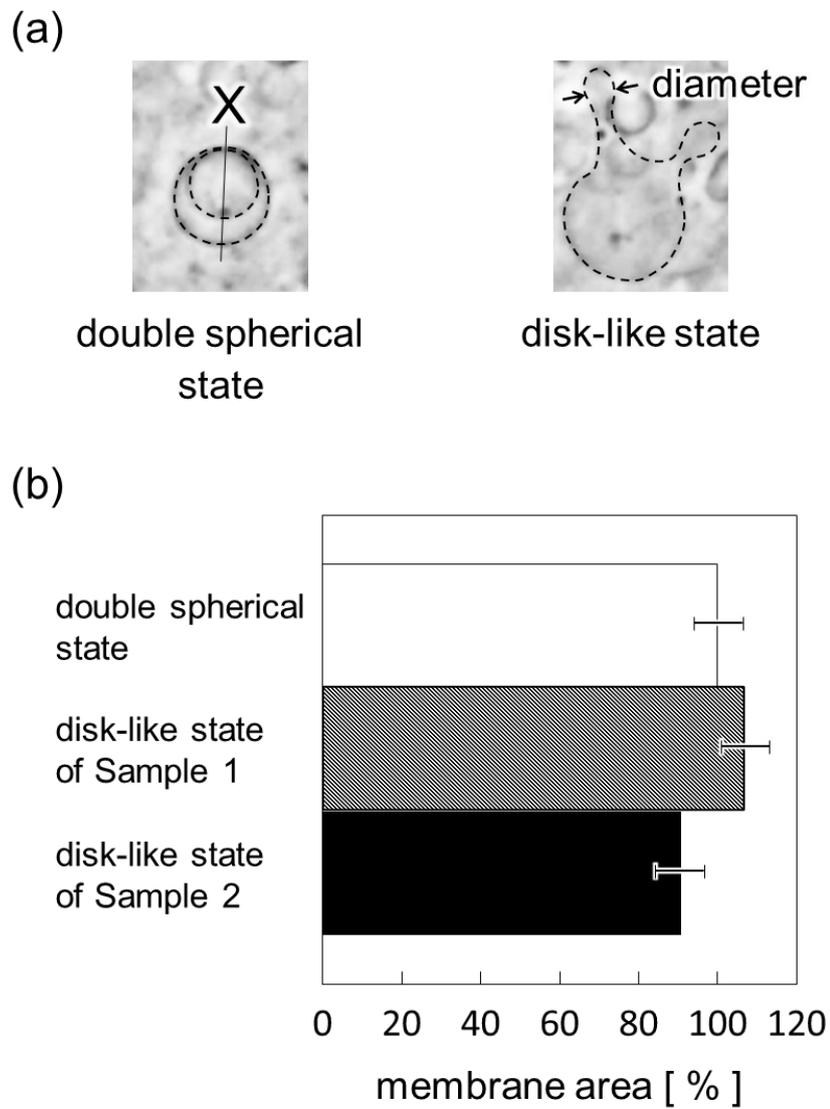


Fig. 3.12 Membrane area calculated for double-spherical and disk-like vesicles. (a) An example of double-spherical and disk-like vesicles used for the calculation. (b) Comparison of the membrane areas of two samples.

3-3.2 変形中のベシクルの定量的評価

前節で用いた計算方法に基づいて 100 mM NaOH の拡散下におけるベシクルの幾何学量を計算した。ベシクルの膜面積と内水相体積の時間変化を Fig. 3.13a-1、擬足の長さ L を Fig. 3.13a-2、擬足の直径 δ と扁平部の半径 r を Fig. 3.13a-3 にそれぞれ示す。同様に、1 M NaCl の拡散下におけるベシクルの各量を Fig. 3.13b-1、2、3 に示す。これらの幾何学量を算出するために、顕微鏡画像から各ベシクルの投影図を作成し (Fig. 3.14)、擬足の長さおよび扁平部の半径はこれらの投影図から算出した。

Fig. 3.13a-1 から 100 mM NaOH 系では膜面積と内水相は長時間スケールで見ると僅かに減少していることがわかる。これらの減少は NaOH の拡散によるオレイン酸の溶解 (イオン化) [22] とベシクル膜内外の浸透圧差による水相の排出 [18, 19] によるものであると考えられる。一方、Fig. 3.13a-2 は擬足の長さが可逆的に変化していることを示している。Fig. 3.13a-1 と 3.13a-2 を対応させたとき、膜面積も内水相体積も一回の擬足の伸縮の時間内ではほぼ一定であることがわかった。

1 M NaCl 系では、Fig. 3.9 に対応する 3 次元変形は Fig. 3.2 (例えば 190 s) の変形と似ていることから、Fig. 3.10 (F-G) で記述した変形と同じであると考えられる。しかし、1 M の NaCl を用いたとき、引き伸ばされた形状のベシクルは縮まなかった (Fig. 3.13b-2)。擬足長の増加と同様に、内水相体積は単調に減少し、膜面積は徐々に増加している様子が観察された。しかし、外部の NaCl によって、このベシクルには内水相を排出させるような浸透圧がかかっていることから、膜面積の増加はベシクル形状を単純化して計算したことによる人為的な誤差によるものであると考えられる。したがって、擬足構造の伸長は既存の研究 [18] で報告されているような浸透圧差による比表面積の増加によって生じると考えられ、Fig. 3.13b-2 中のベシクルの伸長も同様のメカニズムによって生じていると考えられる。

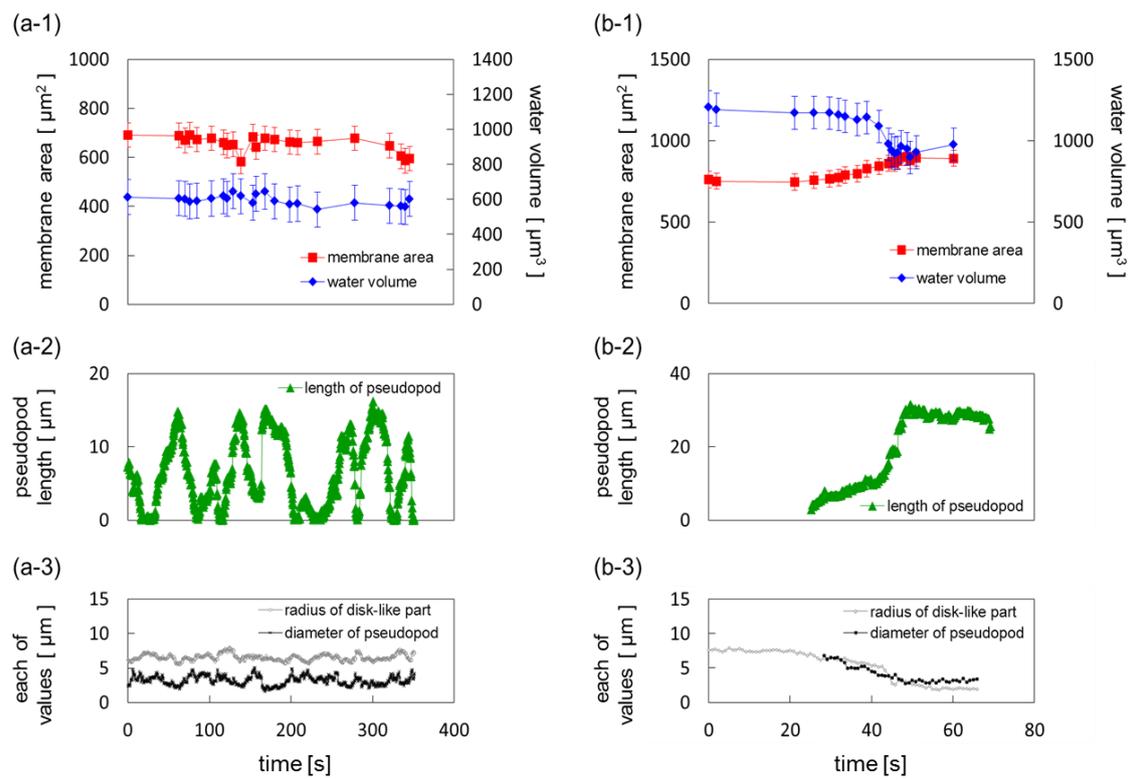


Fig. 3.13 Quantitative estimation of vesicle shape under diffusion of NaOH (a) and NaCl (b). (1) Membrane area and inner water volume; (2) pseudopod length; (3) pseudopod diameter and radius of the disk-like part.

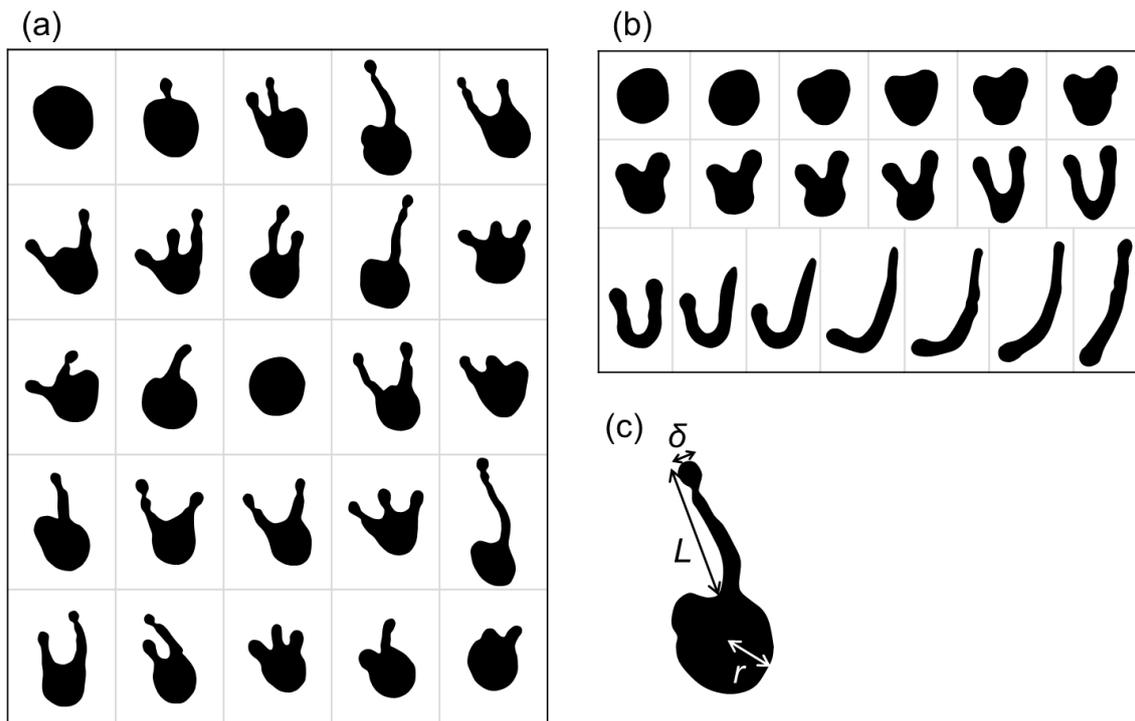


Fig. 3.14 Projective images of the time course of a vesicle. (a) and (b) are projective images of Figs. 3.2 and 3.9, respectively. (c) Schematic representation of the length of the pseudopod (L), diameter of pseudopod (δ), and radius of the disk-like part (r).

3-4 ベシクル変形の数学的モデル

前節の考察のように、浸透圧差によって擬足構造は伸長できる[18,19]。しかし、擬足が収縮することから、本章の擬足構造の可逆的変形は浸透圧の効果のみでは説明できない。

Fig. 3.3において、ベシクルは同時に数本の擬足を伸長している様子が観察されたが、一本の擬足の可逆的変形が観察されていることから、それぞれの擬足は独立して伸縮していると考えられる。したがって、一本の可逆的運動を示す擬足の一回の伸縮をシンプルな数理モデルを用いて考察した。Fig. 3.15 に示すように扁平部 (disk part) と円筒部 (cylinder) からなる立体構造を考える。これはそれぞれベシクルの扁平部と擬足に相当する。このとき、円筒部の直径 (δ) は扁平部の厚みと等しく一定であるとした。したがって、Fig. 3.15 の立体の体積 V と面積 A は次式で与えられる。

$$V = \pi r^2 \delta + \frac{\pi}{4} \delta^2 L, \quad A = 2\pi r^2 + 2\pi r \delta + \pi \delta L \quad (1)$$

Fig. 3.13 の実験結果で、一回の擬足の伸縮時間内ではベシクルの体積と面積はほとんど維持されていると述べたが、数理モデルにおいて式 1 を用いると Fig. 3.15 の立体が面積 A と体積 V を維持したまま形状を変化することは不可能である。式 1 を満たしながらこの立体が変形するためには、面積 A と体積 V のうち少なくともどちらか一方の量に変化しなければならない。これまでの結果から、面積 A は膜が溶出することによって変化する。一方、面積 A が維持されるとき体積 V は膜内外を移動する水相によって変化する。ここでは Fig. 3.12 の結果を考慮し、数理モデルで考える立体の変形は、膜の溶出速度をゼロとして、面積 A を保存するように体積 V が変化する系を考えることにする。表面積が A で保存されるとき、ベシクルの形状は蓄積された膜の力学的エネルギー (E) を単調に減少させるように変化する。この条件は次式で表せられる。

$$\left(\frac{\partial E}{\partial t}\right)_A = \left(\frac{\partial E}{\partial r}\right)_A \left(\frac{\partial r}{\partial t}\right)_A < 0 \quad (2)$$

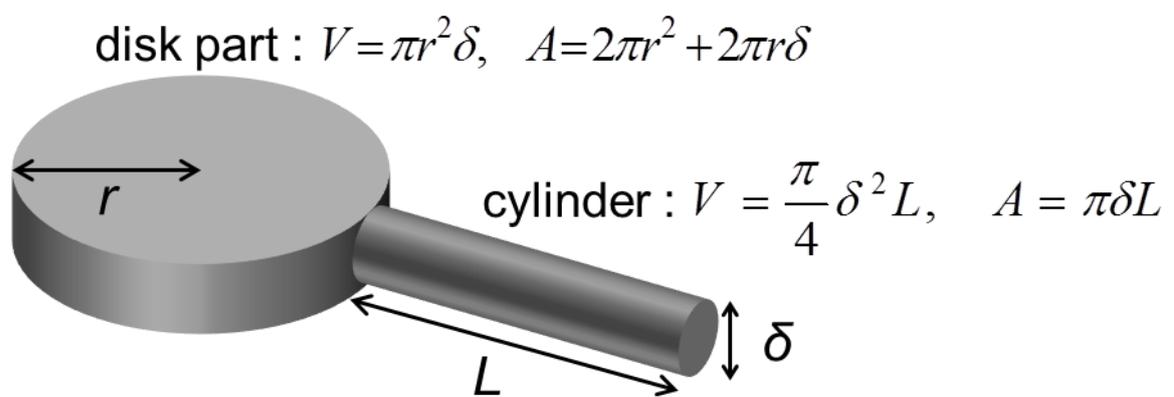


Fig. 3.15 Schematic representation of a model vesicle which is used for the calculation of the geometric size of a model.

δ は定数としており、表面積の保存されるとき L は r によって決まってしまう。したがって、独立変数は r (もしくは L) のみである。次式は式 2 の不等式を満たすもっとも単純な式である。

$$\left(\frac{\partial E}{\partial t}\right)_A = -\eta^{-1} \left(\frac{\partial E}{\partial r}\right)_A \quad (3)$$

ここで、 η は膜の粘性効果に起因する定数である。エネルギー E を計算する際には様々なモデルや形状を考えることができるが[21]、本章のモデルでは、 E が最も低くなる形状を擬足のともなわない扁平形状であるとした。次の式 4 をこの推定を満たす弾性膜エネルギーを表す式として用いる。

$$E = \kappa \left(\frac{1}{2r}\right)^2 \times 2\pi r \delta + \kappa \left(\frac{1}{\delta}\right)^2 \times \pi \delta L \quad (4)$$

ここで、 κ は膜の弾性定数である。 E が最も低くなる時 (自然な状態) の曲率はゼロであるとしている。

浸透圧差 ΔP が膜内外に働くことによる体積 V の変化と、ベシクル膜が水相に溶解すると仮定したときの面積の変化 A を次の式 5 で表す。

$$\frac{dV}{dt} = -k_w \Delta P_0 \exp(-kt) A, \quad \frac{dA}{dt} = -k_A A \quad (5)$$

ここで、 k_w は浸透圧差によって膜内外を移動する水相の透過速度定数で、 ΔP_0 は浸透圧差の初期値である。膜を通る水相のモル流束は表面積に比例する。水相中に存在する電解質は膜を通過して浸透圧差を減少させていく。したがって、 $\Delta P_0 \exp(-kt)$ は時間 t における浸透圧を表す。一方、NaOH の拡散はオレイン酸をイオン化して溶解させるため、結果としてベシクル膜を構成するオレイン酸イオンは緩衝液に溶出していく。このように、 k_A は OH⁻ の拡散によるベシクル膜の溶出速度定数を表し、膜への NaOH の影響は k_A の変化として現れる。したがって、NaCl の拡散では、 $k_A = 0$ である。

表面積 A が保存されるとして、式 4 を式 3 に代入すると、次式を得ることができる。

$$\left(\frac{\partial r}{\partial t}\right)_A = \eta^{-1} \left\{ \frac{\pi\kappa}{2} \frac{\delta}{r^2} + \frac{2\pi\kappa}{\delta} \left(1 + 2\frac{r}{\delta}\right) \right\} \quad (6)$$

L の変化は表面積の保存を用いて式 1 から次式のように表せられる。

$$\left(\frac{\partial L}{\partial t}\right)_A = -2 \left(\frac{\partial r}{\partial t}\right)_A \left(1 + 2\frac{r}{\delta}\right) = -2\eta^{-1} \left\{ \frac{\pi\kappa}{2} \frac{\delta}{r^2} + \frac{2\pi\kappa}{\delta} \left(1 + 2\frac{r}{\delta}\right) \right\} \left(1 + 2\frac{r}{\delta}\right) \quad (7)$$

式 1 を r または L の独立変数として、それぞれについて t で全微分し、式 5 の右辺に代入して、 dr/dt と dL/dt の連立方程式として解くと次の式 8、9 が得られる。

$$\frac{dr}{dt} = -\frac{k_W \Delta P_0 \exp(-kt) - \frac{k_A}{4} \delta}{\pi r \delta - \frac{\pi}{2} \delta^2} A \quad (8)$$

$$\frac{dL}{dt} = \frac{4 \left(r + \frac{\delta}{2}\right) k_W \Delta P_0 \exp(-kt) - \frac{k_A}{2} \delta r}{\delta^2 \left(r - \frac{\delta}{2}\right)} A \quad (9)$$

したがって、弾性エネルギーと浸透圧と膜溶出の効果によって変化する r と L は、式 6-9 を用いて次の式 10、11 で表すことができる。

$$\frac{\partial r}{\partial t} = \eta^{-1} \left\{ \frac{\pi\kappa}{2} \frac{\delta}{r^2} + \frac{2\pi\kappa}{\delta} \left(1 + 2\frac{r}{\delta}\right) \right\} - \frac{k_W \Delta P_0 \exp(-kt) - \frac{k_A}{4} \delta}{\pi r \delta - \frac{\pi}{2} \delta^2} A \quad (10)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial L}{\partial t} = & -2\eta^{-1} \left\{ \frac{\pi\kappa}{2} \frac{\delta}{r^2} + \frac{2\pi\kappa}{\delta} \left(1 + 2\frac{r}{\delta}\right) \right\} \left(1 + 2\frac{r}{\delta}\right) \\ & + \frac{4 \left(r + \frac{\delta}{2}\right) k_W \Delta P_0 \exp(-kt) - \frac{k_A}{2} \delta r}{\delta^2 \left(r - \frac{\delta}{2}\right)} A \end{aligned} \quad (11)$$

無次元パラメータを $r^* = r/\delta$, $L^* = L/\delta$, $k^* = k/(\eta^1 \kappa/\delta^2)$, $t^* = (\eta^1 \kappa/\delta^2)t$, $A^* = A/\delta^2$, $f_w^* = k_w \Delta P_0 \delta /(\eta^1 \kappa)$, $k_A^* = k_A \delta^2/(\eta^1 \kappa)$ として定義し、式 10 と 11 を整理すると次の式 12 と 13 が得られる。

$$\frac{\partial r^*}{\partial t^*} = \frac{\pi}{2} \frac{1}{r^{*2}} + 2\pi(1 + 2r^*) - \frac{f_w^* \exp(-k^* t^*) - \frac{k_A^*}{4}}{\pi \left(r^* - \frac{1}{2}\right)} A^* \quad (12)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial L^*}{\partial t^*} = & -2(1 + 2r^*) \left\{ \frac{\pi}{2} \frac{1}{r^{*2}} + 2\pi(1 + 2r^*) \right\} \\ & + \frac{4 \left(r^* + \frac{1}{2}\right) f_w^* \exp(-k^* t^*) - 2k_A^* r^*}{\pi \left(r^* - \frac{1}{2}\right)} A^* \quad (13) \end{aligned}$$

r^* と L^* の時間変化は 3 つのパラメータ f_w^* , k_A^* , k^* と式 12、13 を用いて計算される。これらのパラメータはそれぞれ膜を通る初期の水相浸透流束、膜の溶出速度定数、膜を通る電解質の浸透速度定数を表す。また、このモデルでは、 r^* の変域は $1/2 \leq r^* \leq r_{\max}$ である。 r^* が $1/2$ より小さいとき、 δ は $2r$ より大きくなり、これは円筒部の直径が扁平部の直径よりも大きくなることを意味し、この条件は幾何学的に成立しない。 r_{\max} は L がゼロのときに式 1 の膜面積を満たす値である。式 12、13 は浸透圧の影響 ($f_w^* = 0$) が無いときにはベシクルが最終的にシンプルな扁平形状 ($r^* = r_{\max}$, $L^* = 0$) になることを示している。

浸透圧が van't Hoff の式に従うとすれば、ベシクル内外の浸透圧差に比例する f_w^* は、電解質の化学種に依らず拡散溶液（電解質溶液）の濃度に比例しなければならない。したがって、同じ濃度の溶液を拡散させるとき f_w^* は同じ値になると考えられる。本モデルでは拡散溶液の濃度が 10 mM で $f_w^* = 4$ 、100 mM で $f_w^* = 40$ 、1 M で $f_w^* = 400$ として計算した。Fig. 3.9 の結果から膜面積は一回の可逆的変形の時間内ではほとんど維持されるため、NaOH 系においても $k_A^* = 0$ とした。 k^* について、プロトンはフリップフロップ[23]によって比較的素早く acid/soap の 2 分子膜を浸透するが、 Na^+ のような他のカチオンはほとんど膜を通らない。本章の系では、 H^+ が膜を透過すると、水のイオン積を満たすために結果的にベシクル内外の OH^- の濃度差が減少するため、浸透圧差は NaOH を用いる実験では素早く解消されると考えられる。一方、NaCl 系では、 Na^+ が膜を通らな

いために一度膜内外に形成された浸透圧差は維持される。したがって、NaOH を用いたときの k の値には NaCl 系より非常に大きい値を用いた。

Fig. 3.16a と 3.17b は f_w^* を 4 から 400 の間で変化させたときの $k^* = 1200$ (NaOH) と 0 (NaCl) で計算された L^* を示している。Fig. 3.16a の $k^* = 1200$ の系では、擬足の長さ (L^*) は f_w^* 値が小さいとき ($f_w^* = 4$) には劇的な変化はしない。 f_w^* を増加させていくと、 $f_w^* = 16 \sim 80$ のあたりで L^* は可逆的な変化を示した。さらに、 f_w^* を増加させると L^* の不可逆な伸長を表現することができた。Fig. 3.16b の $k^* = 0$ の系では、 L^* は常に単調に増加するが、 f_w^* の増加にしたがって伸長速度も増加する。

実験結果と計算を比較するために、実験で得られた擬足長を Fig. 3.17 に時間の関数として示した。Fig. 3.16a の $f_w^* = 40$ と $f_w^* = 400$ の結果は Fig. 3.17 の 100 mM NaOH (赤線) と 1 M NaOH (青線) の結果と同じ傾向を示しているといえる。このように、NaOH 系で観察される一回の可逆的な擬足の変形は本モデルを用いて表現することができた。Fig. 3.13a-2 で示される実験結果では、可逆的な変形が何度も繰り返されている。本章の実験ではベシクルの周囲に形成される pH 勾配は非定常なものであり、時間とともに pH レベルは上昇する。すなわち、連続的な NaOH の拡散によって、平均的な pH のレベルが上がっていくような pH 勾配に常に晒されているため、擬足の伸縮も繰り返されると考えられる。したがって、何度もおこる擬足の可逆的な変形は、それぞれが独立した一回のイベントの繰り返しであるといえる。

Fig. 3.16b (例えば $f_w^* = 400$) の結果は Fig. 3.17 の 1 M NaCl (緑線) の結果と一致している。モデルで算出された擬足の長さは、 k^* をゼロとしているためにその伸長速度は非常に速いが、単調に増加し、時間に対して S 字パターンを示している。これらの特徴は Fig. 3.17 の実験結果と一致している。

このように、本モデルは NaOH 系と NaCl 系の擬足伸長のダイナミクスの特徴を半定量的に説明できたといえる。本モデルにおいては、膜を横切るイオン透過性の差が本質的に重要であり、伸長運動の NaOH 濃度への依存性も同様に本モデルを用いて説明することができた。

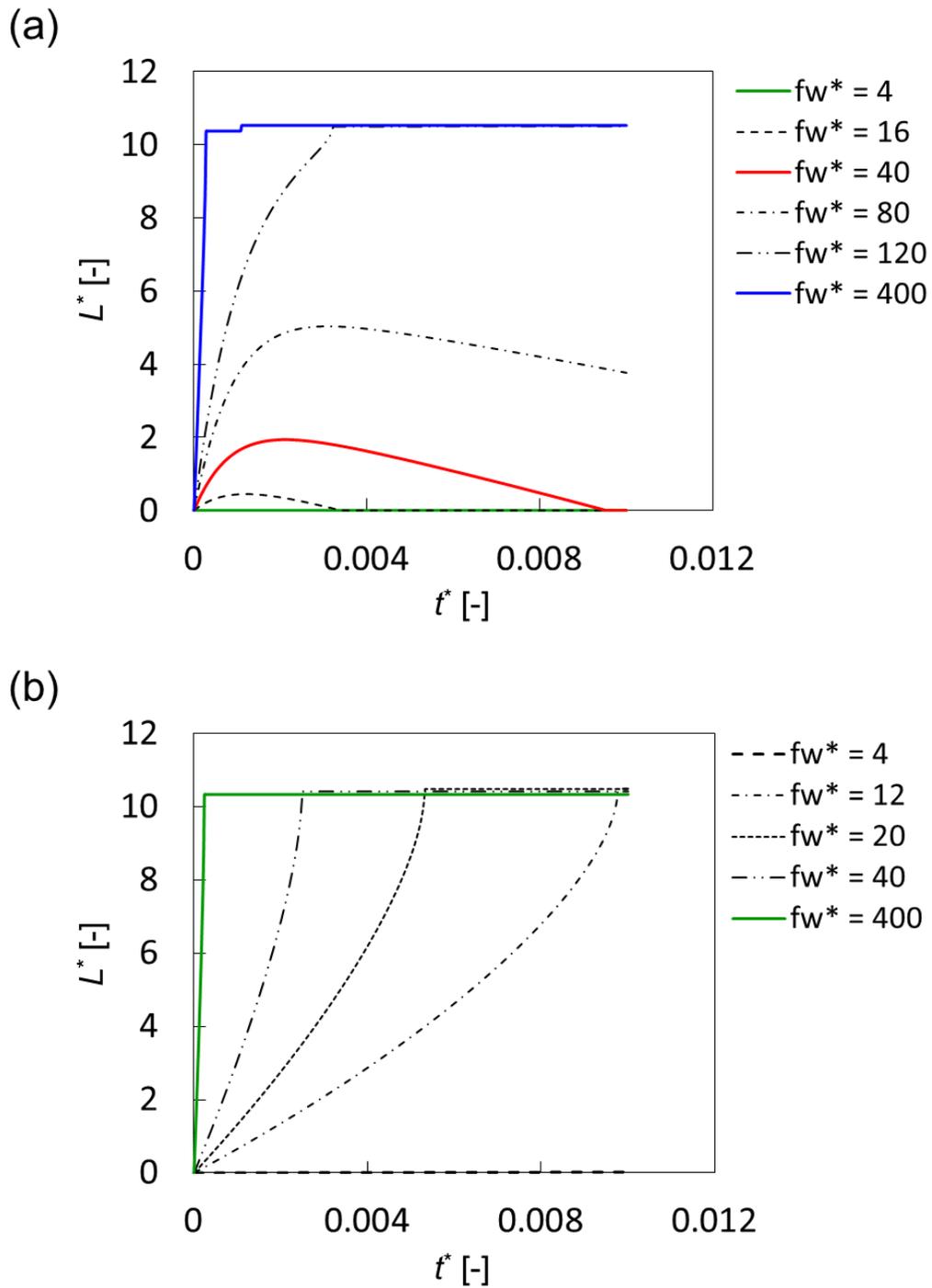


Fig. 3.16 Calculation of the geometric size of a model. Calculated values of L^* with $k^* = 1200$ (a) and $k^* = 0$ (b), corresponding to NaOH and NaCl diffusion, respectively.

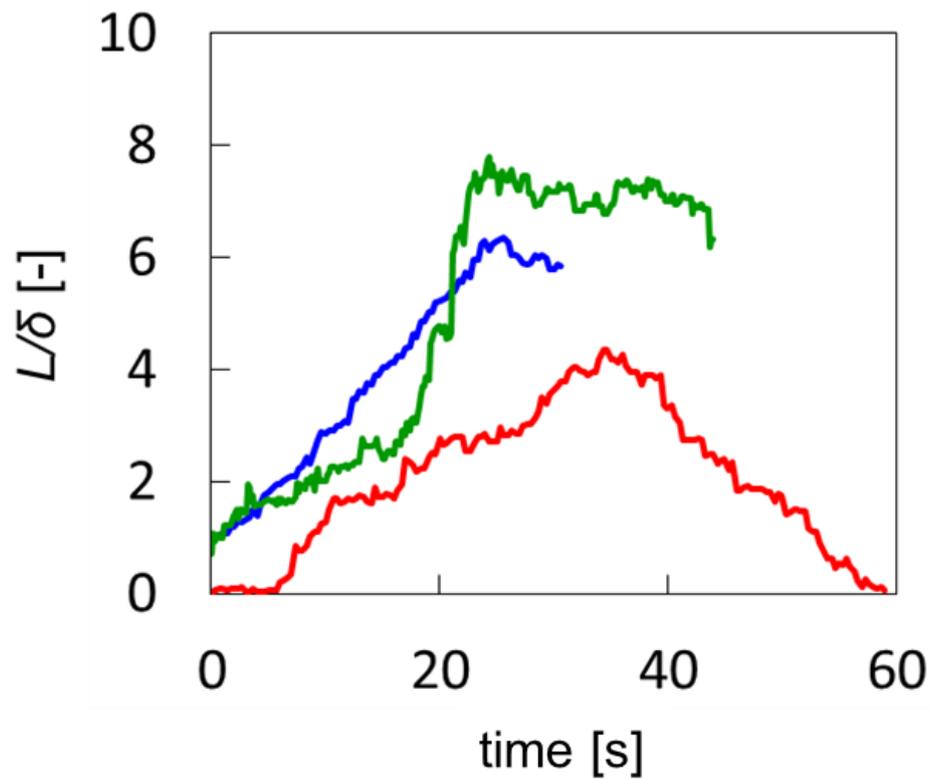


Fig. 3.17 The pseudopod length under the diffusion of NaOH and NaCl. The length is divided by the average of diameter of the pseudopod. The red, blue, and green lines represent the results obtained with 100 mM NaOH (Fig. 3.16a), 1 M NaOH (Fig. 3.16a), and 1 M NaCl (Fig. 3.16b), respectively. The pseudopod corresponding to the blue line exhibited pearling instability at 30 s and maintained the pearling structure for at least 10 s.

3-5 結言

pH 勾配下で擬足構造の伸縮を示すベシクルについて研究した。このベシクルは周囲に pH 勾配がなければ見かけ上 2 重球の形状をとっている。100 mM の NaOH を拡散させたとき 2 重球ベシクルは反転回転サイクルを何度も繰り返した後、扁平形状に変形する。擬足構造の伸長はベシクル膜内外に生じる浸透圧差によって起こる。その後、擬足構造は収縮し、伸長と収縮は周期的に繰り返される。このとき、可逆的な擬足の変形の方法はベシクル周囲の pH の揺らぎによってコントロールされていると考えられる。一方、NaCl を拡散させた場合では単調なベシクルの伸長が観察された。

NaOH 系と NaCl 系の違いは、膜を横切る H^+ と Na^+ のカチオンの透過性の差によって説明された。 H^+ の高い透過速度は浸透圧差を減少させる。浸透圧差が減少すると、擬足の変形によって蓄積された膜弾性エネルギーによって収縮が生じる。

このような可逆的もしくは周期的な変形を示すベシクルは生体模倣的な特徴を持つ両親媒性分子集合体の設計につながり、生体的な運動に対する知見を与えていると考

References

1. R. Phillips, J. Kondev and J. Theriot, "Physical Biology of the Cell," Taylor & Francis Group, Abingdon, (2008).
2. G. Pocock and C. D. Richards, "Human Physiology: The Basis of Medicine Third edition," Oxford University Press, Oxford, (2006).
3. T. Elston, H. Wang and G. Oster, *Nature*, 391, 510 (1998).
4. A. J. Ridley, M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons and A. R. Horwitz, *Science*, 302, 1704 (2003).
5. R. I. Gamow, B. Böttger and F. S. Barnes, *Biophys. J.*, 11, 860 (1971).
6. Y. Y. Won and H. Lee, *J. Control. Release*, 170, 396 (2013).
7. R. Eichhorn, J. Regtmeier, D. Anselmetti and P. Reimann, *Soft Matter*, 6, 1858 (2010).
8. C. Reichhardt and C. J. Olson Reichhardt, *Physical Rev. E*, 73, 011102 (2006).
9. I. Lagzi, S. Soh, P. J. Wesson, K. P. Browne and B. A. Grzybowski, *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 1198 (2010).
10. A. M. Reynolds, *Phys. Rev. E: Stat. Nonlinear Soft Matter Phys.*, 81, 062901 (2010).
11. K. Suzuno, D. Ueyama, M. Branicki, R. Toth, A. Braun and I. Lagzi, *Langmuir*, 30, 9251 (2014).
12. E. Nawa, Y. Nishigaki, D. Yamamoto and A. Shioi, *Soft Matter*, 9, 7832 (2013).
13. M. Ishimaru, T. Toyota, K. Takakura, T. Sugawara and Y. Sugawara, *Chem. Lett.*, 34, 46 (2005).
14. I. Lagzi, D. Wang, B. Kowalczyk and B. A. Grzybowski, *Langmuir*, 26, 13770 (2010).
15. K. Morigaki and P. Walde, *Langmuir*, 18, 10509 (2002).
16. M. K. Driscoll, C. McCann, R. Kopace, T. Homan, J. T. Fourkas, C. Parent and W. Losert, *PLoS. Comput. Biol.*, 8, e1002392 (2012).
17. P. J. Van Haastert, *PLoS. One*, 6, e27532 (2011).
18. J. Sanborn, K. Oglęcka, R. S. Kraut and A. N. Parikh, *Faraday Discuss.*, 161, 167 (2013).
19. F. Nomura, M. Honda, S. Takeda, T. Inaba, K. Takiguchi, T. J. Itoh, A. Ishijima, T. Umeda and H. Hotani, *J. Biol. Phys.*, 28, 225 (2002).
20. A. F. Bitbol, N. Puff, Y. Sakuma, M. Imai, J. B. Fournier and M. I. Angelova, *Soft Matter*, 8, 6073 (2012).

21. U. Seifert, *Adv. Phys.*, 46, 13 (1997).
22. R. D. Kulkarni and P. Somasundaran, *Colloids Surf.*, 1, 387 (1980).
23. F. Kamp and J. A. Hamilton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 11367 (1992).

第 4 章 グルコースの分解反応を利用したベシクルの
可逆的な変形運動および分裂

Reversible-transformation and division of a vesicle
by glucose oxidation

4-1 緒言

生物は自発的な運動性を利用して高効率な機能を実現させている[1, 2]。そのような生体的な機能を模倣した化学システムを人工的に創成できれば科学技術の進歩への影響は極めて大きい。そのような観点から、これまでに物理的あるいは化学的な刺激に反応するようなベシクルの自発的変形などの様々なダイナミクスが研究されてきており、いくつかの研究グループがベシクルの単調なサイズ減少をともなう振動的・可逆的な変形について報告している[3-5]。これらの研究では、ベシクルの変形は化学平衡に向かうような単調なエネルギー緩和の結果としておこる。対して、著者らは第2章、第3章でpH勾配下におけるベシクルの振動的もしくは可逆的な変形について報告している[6,7]。これらのベシクルはオレイン酸 (acid/soap)から作製されており、周囲のpH変化に対して柔軟に変形し、第2章では周期的な構造変化[6]、第3章では可逆的な擬足の伸縮運動[7]について検討した。これらのベシクルは変形の間サイズを維持しており、サイズの減少をともなう既存のベシクルの変形と全く異なるものである[3-5]。

これまでの研究では、pH勾配はベシクル溶液に直接的に酸や塩基を加えて形成されていたが、生体システム内では、自らがシステムに必要なpH勾配を生み出している[1,2]。このような観点から、ベシクルが化学反応を利用して周囲にpH分布を自発形成させることで、周期的変形運動を起こすような系をつくることは、生体模倣的な分子集合体の設計の観点から非常に興味深い。本研究では、オレイン酸 (acid/soap)を用いて、このような機能を有するベシクルの自己運動系を提案することを目的とした。本研究では、そのための化学反応としてFig. 4.1に示すようなグルコースオキシダーゼ (GOx) によるグルコースの分解反応を用いた。

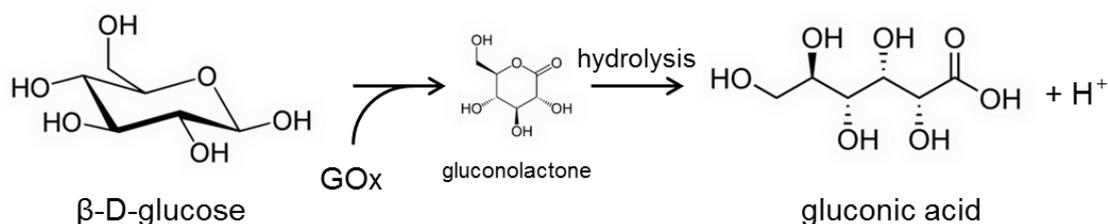


Fig. 4.1 Oxidation of glucose by GOx.

この反応ではグルコースオキシダーゼが触媒となってグルコースから最終的にグルコン酸とプロトンが生成されるため、グルコースオキシダーゼを含むベシクルの周囲にグルコースが存在していれば、化学反応によってベシクル周囲のpHが徐々に下がる。このとき、pHの低下速度はベシクル周辺で厳密に均一になるとは考えられず、ベシクル周囲に過渡的なpHの分布が形成されると考えられる。

このような系で発生するベシクルの変形・運動においては、ベシクルは、その変形エネルギーを生物と同じくグルコースの分解から得ているため、これは生体細胞のモデルとして興味深いと考えられる。さらに、このような考え方で、単調ではない変形・運動をおこすベシクルを作製できれば、このことは、様々な化学反応から仕事を得るようなベシクルの設計にもつながると考えられる。このような観点から、本研究ではグルコースの分解反応場に存在するベシクルの構造変化を観察し考察した。

4-2 実験方法

4-2.1 試薬

以下に本研究で用いた試薬を記す。また、Table 4.1中のSodium oleateとBicineの構造式は第2章のFig. 2.1に示している。Table 4.1中のD-(+)-Sucroseの構造式は後述のFig. 4.4に、 β -D-Glucoseの構造式は前述のFig. 4.1で示す。

Table 4.1 Reagent of experiment

試薬	製造元
Sodium oleate (特級) > 97.0 %	東京化成工業(株)
Bicine (特級) > 99.0 %	SIGMA-ALDRICH
D-(+)-Sucrose (特級) > 98.0%	東京化成工業(株)
β -D-Glucose (特級) > 98.0%	和光純薬工業(株)
Glucose oxidase (生化学用)	和光純薬工業(株)

以下、Sodium oleate をオレイン酸ナトリウム、Bicine をビシン、D-(+)-Sucrose をスクロース、 β -D-Glucose をグルコース、Glucose oxidase をGOx と記す。

4-2.2 実験手順

pH を 8.4 に調整したピシン緩衝液 10 mL にオレイン酸ナトリウム、GOx、スクロースをそれぞれ 12.3 mM、約 5.38×10^{-8} M、100 mM/75 mM/50 mM になるように超音波振動を用いて溶解させて、含んでいるスクロース濃度の異なる 3 種類の混合溶液を作製した。この混合溶液をガラスボトムディッシュに注入し 5 時間静置させることでベシクルを形成させた (ベシクル溶液)。また pH を 8.4 に調整したピシン緩衝液 10 mL にグルコースを 100 mM になるように溶解させ、ガラスボトムディッシュ (Matsunami Glass Ind., Ltd.) に注入した。ピシン緩衝液の調製方法は 2 章のものと同じである。

作製されたオレイン酸ベシクル溶液中から数個のベシクルを周囲の溶液と共にマニピュレータ (IM-9C, NARISHIGE Co., Ltd.) を用いてマイクロキャピラリー (Polar body biopsy tip MML, Eppendorf Co., Ltd.) 内に吸い、グルコース溶液中に放出した。ベシクル溶液に含まれているスクロースは、このときにベシクル内外に浸透圧差が発生しないようにするために加えている。吸い込んだ溶液中にはグルコースオキシダーゼが含まれており、これがグルコース溶液中に放出されるとグルコースの分解反応が進む。このときのベシクルの様々な形状変化を光学顕微鏡 (IX-71, Olympus Co.) を用いて観察した (Fig. 4.2)。

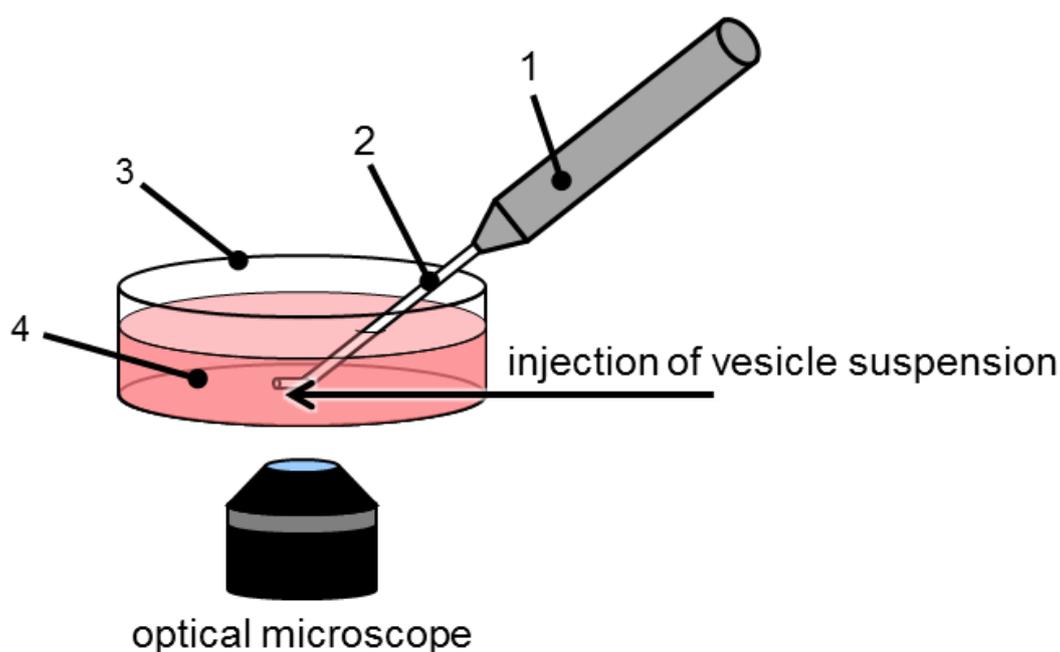


Fig. 4.2 Experimental setup: 1. manipulator; 2. micro capillary; 3. glass-bottomed dish; 4. glucose solution.

4-3 結果と考察

4-3.1 ベシクルの運動

本研究において、2種類の2重球ベシクル (Fig. 4.3A と 4.3B の 0 s) の構造変化が観察された。この2重球ベシクルは第2章の研究からストマトサイト状のベシクルが丸まった形状をしていると考えられる[6]。Fig. 4.3 のベシクル溶液に用いたスクロース濃度は A、B ともに 100 mM であった。1つ目の構造変化を Fig. 4.3A に示す。マニピュレータからグルコース溶液中に放出された直後 (Fig. 4.3A 0 s) は2重球であったベシクルが、4 min 10 s 後に扁平になり、4 min 26 s から等方的に6本の擬足構造が伸び始め、5 min 37 s で擬足はパーリング[7]を起こす。その後、これまでの構造変化を逆に戻るようにして再び2重球構造になる (Fig. 4.3A 7 min 49 s)。Fig. 4.3A の実験では、この一連の可逆的变化がもう一度繰り返された (Fig. 4.3A 8 min 43 s - 16 min 44 s)。Fig. 4.3A の 4 min 10 s や 9 min 21 s のベシクルが扁平形状であることは Fig. 4.3A からは分かりにくい。第3章の結果から、そのように推定される[7]。2つ目の構造変化を Fig. 4.3B に示す。この2重球ベシクルは、グルコース溶液中に放出された後、2 min 3 s かけて複数のベシクルに分裂している。その他にも法則性はないが周囲の環境に応じて二重球が不規則に変形しながら収縮する様子が観察された。1つ目に挙げた変形運動は、2つ目に挙げた不規則な変形 (収縮型) に比べ観測される確率が低い。変形が可逆的で単調でないという点で興味深い。また、可逆的変形運動はベシクル溶液に用いたスクロース濃度が 75 mM のとき最も再現性が高かった。スクロースは酸性溶液中で Fig. 4.4 に示すような加水分解が起こることが知られている。本実験系の pH 領域はピシン緩衝液の pH の 8.4 前後であるため、この pH 領域では普通スクロースの加水分解はほとんど起こらない。しかし、本実験系ではスクロースが僅かに加水分解しグルコースが生成されると、そのグルコースはベシクル溶液に含まれる GOx によって分解され消費される。そのため、スクロースの加水分解はベシクルが形成する間 (静置している間) に消費された分のグルコースを補うように徐々に進むと考えられる。スクロース濃度が 75 mM のときに可逆的変形の再現性が高かったのは、この濃度において、ベシクル内外の浸透圧が等しくなった結果ではないかと推定している。

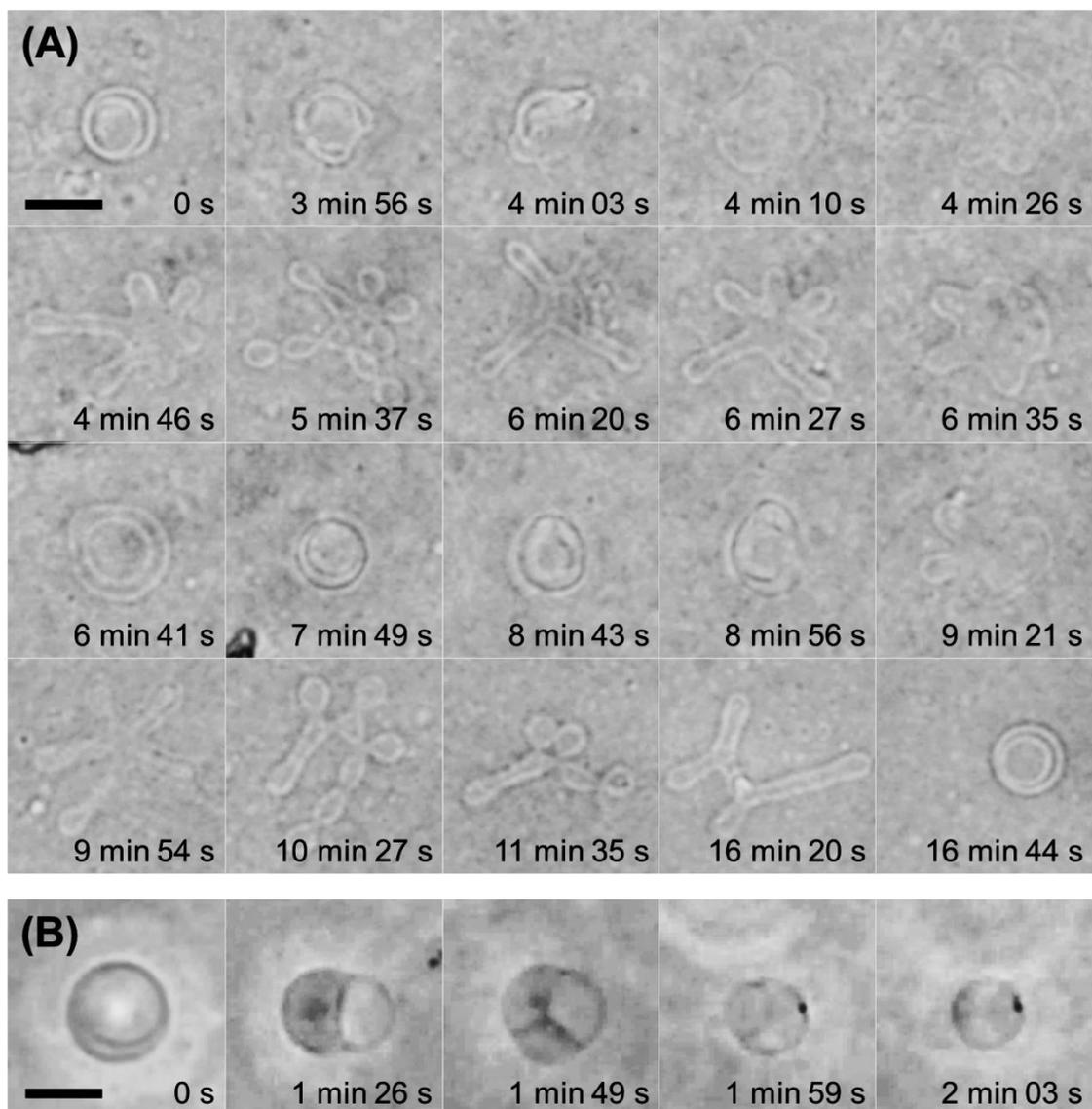


Fig. 4.3 Two types of structural change of a vesicle. A: The reversible transformation of a double-spherical vesicle. B: The irregular deformation to smaller vesicles. The scale bars are 10 μm in both.

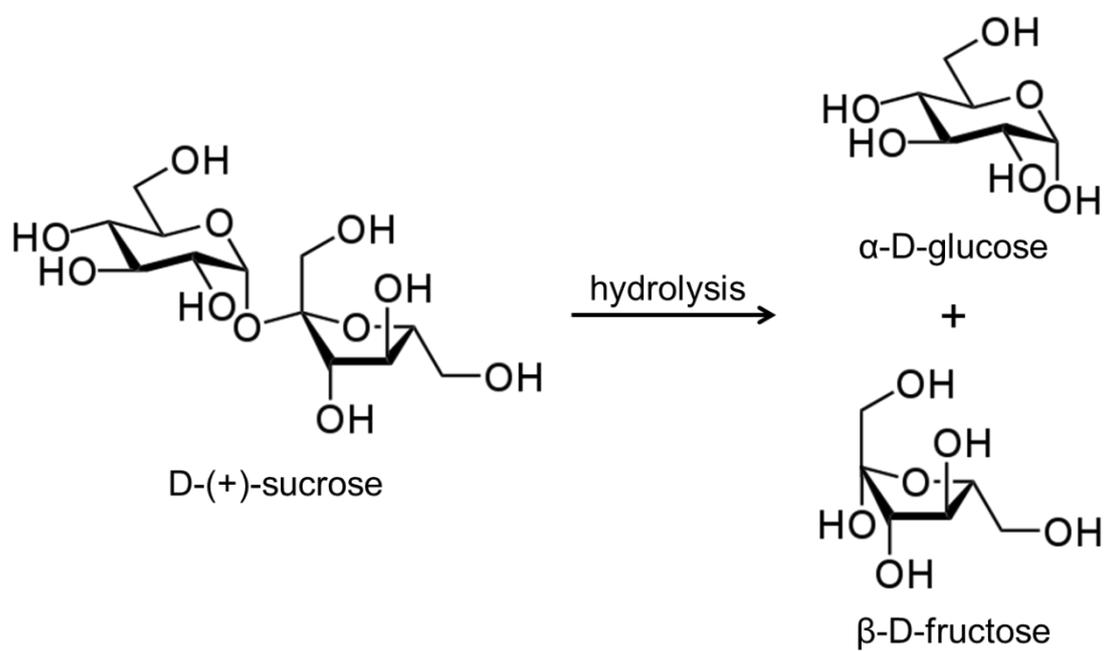


Fig. 4.4 Hydrolysis of sucrose.

第3章では、pH 勾配下におかれた扁平状ベシクルが擬足構造を伸縮させる運動について報告している。そのときの pH 勾配はベシクル溶液に塩基を含む水溶液を拡散することで形成されていたため、pH 勾配はベシクルに対して特定の方向にのみ形成されていた。その結果、擬足構造は空間的な pH 勾配に沿って伸縮するものであった[7]。一方、本実験系で形成される可能性のある pH 分布は溶液内の化学反応で形成されるものであり、系統的な pH 勾配は形成されていない。Fig. 4.3A において擬足が等方的に伸びているのは、このような pH 分布の特性を反映している可能性がある。今回、ベシクル周辺の局所 pH の分布を pH 指示薬 (BTB 溶液) およびピラニン[8]による蛍光分析で検出することを試みたが、定量的な pH 変化の検出は困難であった。

4-3.2 グルコースの分解反応によるグルコース溶液の pH 変化

グルコースの分解反応によるベシクル周辺の pH の変化について検討するため、100 mM のグルコース溶液 30 mL に 8.06×10^{-12} mol の GOx を加えたときの pH 変化を、ピシンを含まないとき (初期の pH 6.1)、およびピシン緩液中 (初期の pH 8.4) におけるときとで比較した。その結果を Fig. 4.5 に示す。緩衝成分であるピシンを含まないグルコース水溶液の pH は時間とともに下がり、5 時間後の水溶液の pH は 3.92 であった (Fig. 4.5 実線)。一方、ピシン緩液にグルコースを溶解させたものを用いた実験では pH は 5 時間後でも 8.4 でありほとんど変化しなかった (Fig. 4.5 破線)。純水中では GOx によってグルコースから生成されたグルコン酸のために溶液の pH が下がっていると考えられる。一方、ピシン緩液中ではグルコン酸が形成されてもピシンの緩衝効果によって溶液全体の pH はほとんど変化しなかったものと考えられる。したがって、Fig. 4.3 の実験で示したピシン緩液中のベシクル周囲には、巨視的な pH の変化が生じるとは考えにくく、Fig. 4.3 で観測されたベシクルの構造変化が、GOx の存在による pH 変化に由来するのかを 4-3.3、4-3.5 で検討する。

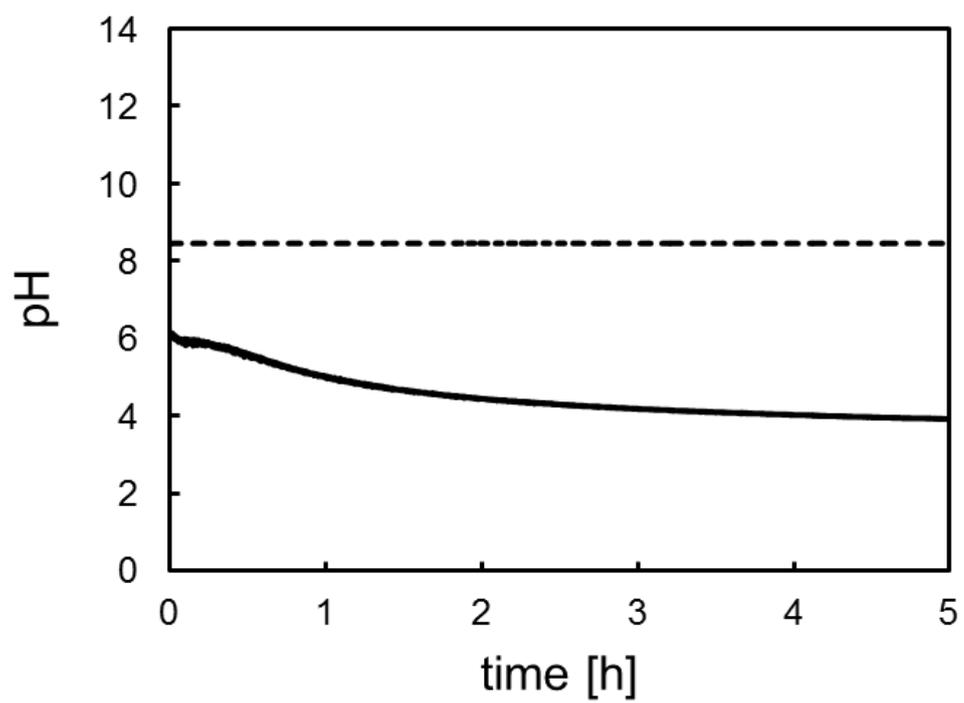


Fig. 4.5 pH change of glucose solution through oxidation by glucose oxidase for 5 h. Solid and dashed curves represent the glucose solution without bicine and with bicine, respectively.

4-3.3 ベシクルの変形に対するグルコースオキシダーゼの影響

Fig. 4.3 の変形・運動に GOx が必要かどうかを検討するために、GOx を含まないベシクルを作製し、それをグルコース溶液に放出して観察した。この条件では、グルコースの分解反応はほとんど進まない。このときのベシクルの様子を Fig. 4.6 に示す。ベシクルは少なくとも 16 min 43 s の間はサイズや構造を維持したままグルコース溶液中を漂っており、可逆的構造変化や分裂を示さなかった。したがって、Fig. 4.3 で示したベシクルの変形・運動には GOx が必要であると考えられる。

4-3.4 ベシクルに対する浸透圧の影響

Fig. 4.3 で示したベシクルの変形・運動には GOx が必要であることが前節でわかったが、ベシクル周囲の pH 変化は明確には観測されなかったことから、GOx によるグルコースの分解が生み出す浸透圧の変化がベシクル構造に及ぼす影響を検討した。一般に、ベシクル膜内外に浸透圧差が発生すればベシクルの構造が様々に変化することが知られている[9-11]。

今回の実験で用いたベシクルへの浸透圧差の影響を検討するため、ベシクル溶液に含まれるスクロース濃度を 200 mM、このベシクル溶液を放出する溶液のグルコース濃度を 600 mM とし、スクロース濃度をグルコース濃度よりも低くしたところ、ベシクルから内水相が排出され、27 s 後にベシクルが縮小する様子が観察された (Fig. 4.7)。これらの浸透圧差によるベシクルの構造変化は Fig. 4.3 に示すものとは全く異なっており、Fig. 4.3 に示す擬足の突出は、単純な浸透圧差の結果ではないと考えられる。したがって、グルコースの分解反応によってベシクル周囲に非常に小さな pH 変化が発生し、それが影響しているものと推定される。



Fig. 4.6 Condition of a vesicle without glucose oxidase under presence of glucose. Concentrations of sucrose and glucose were 200 mM in this experiment. The time shown in each photograph is that after the release of vesicle. The scale bar is 20 μm .

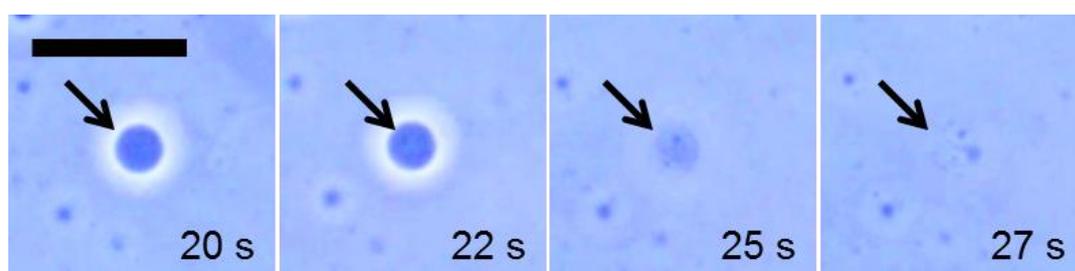


Fig. 4.7 Condition of a vesicle without glucose oxidase under presence of 600 mM glucose. Concentration of sucrose was 200 mM. The time shown in each photograph is that after the release of vesicle. The scale bar is 20 μm .

4-3.5 グルコースオキシダーゼの分配

GOx は水溶性であるが、疎水的な部分も有しており、GOx がバルク水溶液とベシクル膜に、ある割合で分配していると考えられる。この分配について検討するため、次のような実験を行った。まず、ピシン緩衝液を使わずに、オレイン酸ナトリウム水溶液の pH を塩酸を用いて pH 9.24 に調整することで、GOx を含むベシクル溶液を作製した後、それを遠心分離器にかけ、ベシクルを溶液上部に移動させた。その後、下側に残った溶液（溶液 A）100 μ L を 100 mM のグルコース水溶液 30 mL に加え、その pH を測ったところ、添加して 12 時間後の pH は 3.83 であった。その結果を Fig. 4.8 の赤線に示す。

ベシクル溶液を作るときに用いた GOx 濃度は 8.06×10^{-8} M であったが、水溶液中とベシクル膜中における GOx の分配比が 1 ならば、ベシクルが分離された後の溶液 A にも、これと同じ濃度の GOx が含まれているはずである。しかし、これと同じ濃度の GOx を含む水溶液（溶液 B）を新たに作製してグルコース水溶液に加え pH 変化を測定したところ、12 時間後の pH は 3.61 となり、同じ時間での溶液 A の pH よりも低かった（Fig. 4.8 青線）。この理由として、次の 2 つの可能性が考えられる。一つ目は、GOx がベシクル膜に多く分配していたために、ベシクルが分離された溶液 A に含まれている GOx 濃度が仕込み濃度よりも低くなった結果、生成したグルコン酸の濃度が低かったというものであり、もう一つは、溶液 A にはベシクルが分離された後でも、わずかなオレイン酸ナトリウムが含まれているために全体の pH が高くなったというものである。

これらについて検討するために、溶液 A と同じ濃度となるようなオレイン酸ナトリウムを含み、かつ仕込み濃度の GOx (8.06×10^{-8} M) を含むように 100 mM のグルコース水溶液 30 mL を作製し、その pH 変化を測定することを考えた。このために、まず GOx を含まないベシクル溶液を遠心分離器にかけ、ベシクルを溶液上部に移動させ、その下側に残った溶液（溶液①）に仕込み濃度である 8.06×10^{-8} M になるように GOx を溶かした（溶液 C）。この溶液をグルコース水溶液に加え、pH を測定したところ、12 時間後の pH は 3.62 となり、溶液 B の最終 pH とほとんど一致した（Fig. 4.8 緑線）。したがって溶液 A の最終 pH が高いのはオレイン酸ナトリウムによる影響ではなく、GOx がベシクル膜に多く分配したために、溶液 A の GOx 濃度が仕込み濃度よりも低くなった結果であると考えられる。

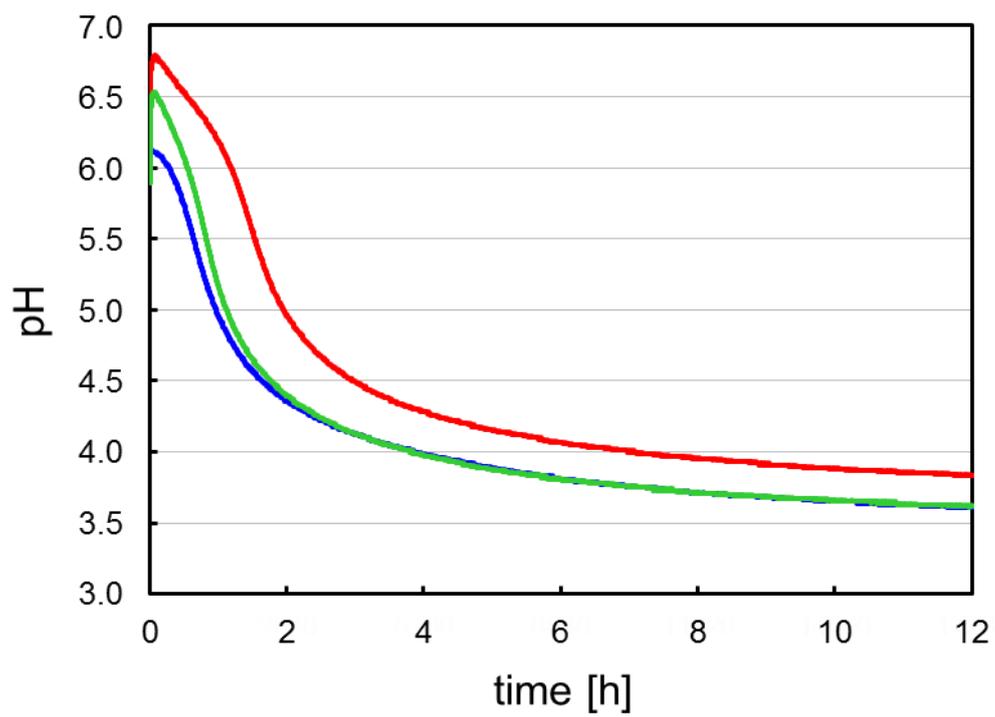


Fig. 4.8 The pH change of glucose solution (100 mM) for 12 h since mixing with GOx solution. Red, blue and green line are solution A, B and C, which are explained in text, respectively.

この結果から、溶液①に適当な量の GOx を加え 12 時間後の pH がほぼ 3.83 となる GOx 濃度を求めることができれば、それが溶液 A に含まれていた GOx 濃度であると推定できることになる。このために、様々な GOx 濃度を含む溶液①を作製し、これらの溶液をそれぞれ 100 mM のグルコース水溶液 30 mL に加え、12 時間後の pH を測定した。この結果を用いて pH に対する GOx 濃度の検量線を作成した。その結果を Fig. 4.9 に示す。この検量線を用いると、pH が 3.83 となる GOx 濃度は 4.03×10^{-8} M であった。

ベシクル膜、バルク水溶液のそれぞれに含まれる GOx の濃度をそれぞれ C_B 、 C_M とすると、GOx の分配係数 γ は $\gamma = C_M/C_B$ で与えられる。一方、溶液中の GOx の平均濃度（仕込み濃度）を C_{B0} とすると GOx の物質収支から次式が成り立つ。

$$C_B(V - V_{OA}) + C_M V_{OA} = C_{B0}V \quad (1)$$

ここで、 V は溶液の体積であり、 V_{OA} はベシクル膜部分の体積を表している。これらの関係より、次式を得ることができる。

$$\frac{C_B}{C_M} \left(1 - \frac{V_{OA}}{V}\right) + \frac{V_{OA}}{V} = \frac{C_{B0}}{C_M} = \frac{C_{B0}}{C_B} \frac{C_B}{C_M} \quad (2)$$

ここで $a = C_{B0}/C_B$ としたとき、式 2 は次式に変形できる。

$$\gamma = 1 + (a - 1) \frac{V}{V_{OA}} \quad (3)$$

今回の実験条件として $C_{B0} = 8.06 \times 10^{-8}$ M と Fig. 4.9 から算出した溶液 A に含まれる GOx 濃度の $C_B = 4.03 \times 10^{-8}$ M を $a = C_{B0}/C_B$ に代入すると、 $a = 2.04$ となった。これから式 3 を用いると $\gamma \sim 300$ となった。ただし、 V_{OA} は溶液中に含まれるオレイン酸分子が全て液体のオレイン酸（油）となったときの体積とした。

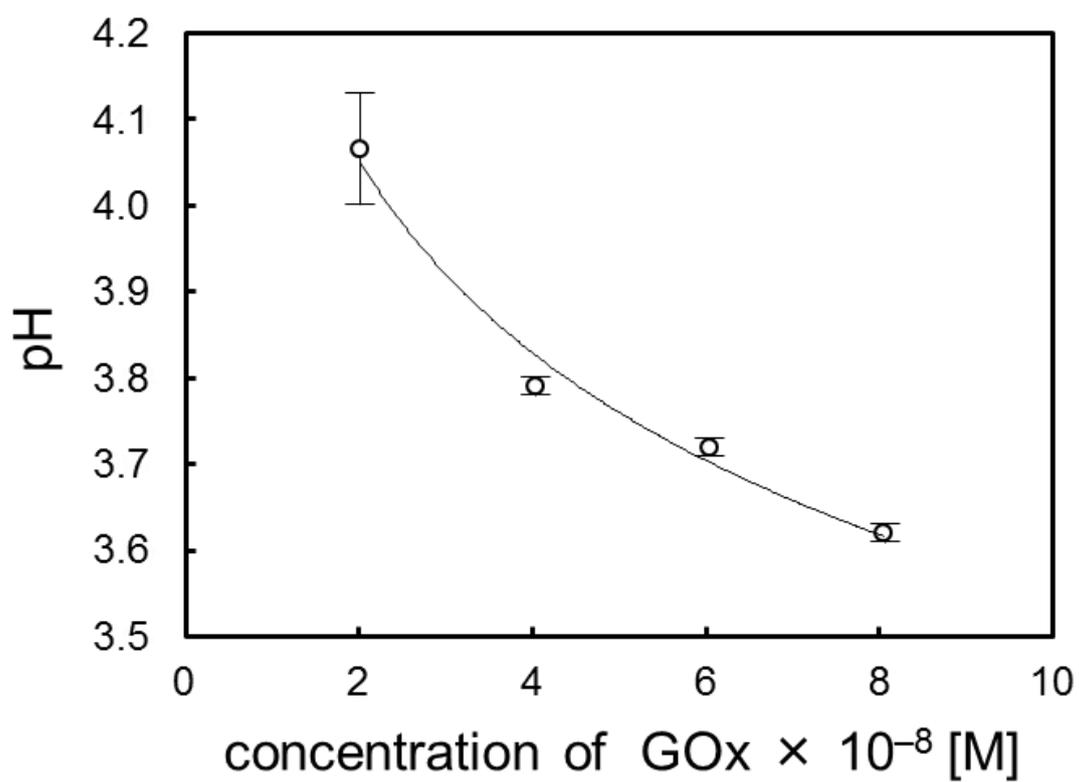


Fig. 4.9 The pH of glucose solution (100 mM) 12 h after mixing with GOx solution, the concentration of which is shown in abscissa.

したがって、ベシクル膜にはバルク水溶液中の約 300 倍の濃度の GOx が分配されていると考えられ、ベシクル近傍を考える限り、グルコースを分解する GOx のほとんどはベシクル膜に存在しているといえる。すなわち、GOx を含むベシクル自身が周囲のグルコースを分解して周囲に pH 分布を形成させ、変形・運動を起こしているということができ、ベシクルがバルク溶液中の GOx がおこす pH 変動に追随しているのではないと考えることができる。

4-3.5 ベシクルの変形メカニズム

これまで結果から、ベシクルの変形メカニズムを考えると、まず、本実験ではグルコースはベシクルの外側に存在するので、それがグルコン酸になりイオン解離すれば、見かけ上ベシクルの外側の様々な方向から酸を拡散させたのと同じ状況になる。一方、オレイン酸からできる 2 重球ベシクルに、外から塩酸を拡散させると、塩酸が拡散してくるのとは逆の高 pH 側に可逆的に擬足を出す、という結果が得られている（第 3 章 3-3.1、第 5 章 5-3.1）。この結果を踏まえると、ベシクル周囲のいたるところで低 pH 部分が形成されていれば、Fig. 4.3A のように複数個所から可逆的に擬足が出ると考えられる。

擬足の可逆的形成の機構については、第 3 章ですでに論じているが[7]、この考え方を本系に適応すれば、次のように要約することができる。オレイン酸で作製された 2 重球ベシクルの周囲でグルコースが酸化されると、扁平形状に変化した後、高 pH 側に可逆的に擬足を出す。擬足の突出は、外部のグルコン酸のイオン解離による浸透圧により内水相が排出されて、膜面積が余剰になることによるものと考えられ、擬足が戻るのは、プロトンがオレイン酸膜を通過しやすい[12]ことによって浸透圧差が消失するからであると考えられる。

Fig. 4.3B のベシクルの分裂については、反応後の安定状態に単調に緩和している挙動であると考えられるが、グルコースの分解によってベシクルが可逆的に擬足を形成するのか、分裂するのかを決定している要因については現段階では明確ではない。現時点では、変形前のベシクルの構造に十分な余剰膜面積があれば、膜内外の浸透圧差で水が排出されたときに可逆的に擬足を形成させることができるが、それが十分でないときには、増加した比表面積を維持するために、ベシクルが小さく分裂するのではないかと考えている。

4-4 結言

ピシン緩衝液の影響によってグルコース溶液、ベシクル溶液の全体のpHはほとんど変わっていないにも関わらず、グルコースの分解反応を用いて2重球構造のベシクルの変形が観察された。このとき、ベシクル膜には近辺のバルクよりも約300倍の濃度のGOxが含まれていたことがわかった。したがって、ベシクルの変形や運動に必要なpH分布は、GOxを含むベシクル自身が周囲のグルコースを反応で消費して形成しているといえる。変形前のベシクルの構造に十分な余剰膜面積があれば、膜内外の浸透圧差によって可逆的に擬足を形成させることができ、それが十分でないときには、比表面積の増加に応じてベシクルが小さく分裂するのではないかと考えられる。

References

1. R. Phillips, J. Kondev and J. Theriot, "Physical Biology of the Cell," Taylor & Francis Group, Abingdon, (2008).
2. G. Pocock and C. D. Richards, "Human Physiology: The Basis of Medicine Third edition," Oxford University Press, Oxford, (2006).
3. F. Nomura, M. Nagata, T. Inaba, H. Hiramatsu, H. Hotani and K. Takiguchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 2340 (2001).
4. T. Umeda, F. Nomura, T. Inaba, K. Takiguchi and H. Hotani, *ChemPhysChem*, 6, 1047 (2005).
5. T. Hamada, Y. Hirabayashi, T. Ohta and M. Takagi, *Physical Rev. E*, 80, 051921 (2009).
6. E. Nawa, Y. Nishigaki, D. Yamamoto and A. Shioi, *Soft Matter*, 9, 7832 (2013).
7. E. Nawa, D. Yamamoto and A. Shioi, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 88, 1536 (2015).
8. K. Kano and J. H. Fendler, *Biochim. Biophys. Acta.*, 509, 289 (1978).
9. J. Sanborn, K. Oglęcka, R. S. Kraut and A. N. Parikh, *Faraday Discuss*, 161, 167 (2013).
10. F. Nomura, M. Honda, S. Takeda, T. Inaba, K. Takiguchi, T. J. Itoh, A. Ishijima, T. Umeda and H Hotani, *J. Biol. Phys.*, 28, 225 (2002).
11. K. Oglęcka, J. Sanborn, A. N. Parikh and R. S. Kraut, *Front. Physiol*, 3, Article 120 (2012).
12. F. Kamp and J. A. Hamilton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 11367 (1992).

第 5 章 局所的な pH 勾配下におけるベシクルの構造変化

Structural change of a vesicle under a local pH gradient

5-1 緒言

第2、3章では、pH 勾配を仕事に変換して運動するベシクルの挙動とそのメカニズムについて論述してきた。生体内においては、ポテンシャル勾配は様々な生体機能を発現するために仕事へ変換されることがあり[1,2]、既存の研究においては、ポテンシャル勾配を利用したコロイドサイズの物体の自律運動に関する例として迷路を解く微粒子[3,4]や液滴[5]がある。この微粒子や液滴の運動はポテンシャル勾配によって生じたマランゴニ効果を利用したものである。

このように、コロイドサイズの物体の自律運動ではポテンシャル勾配が大きく影響することがあり、オレイン酸とこれがイオン化した物質で構成されている第2、3章のベシクルは、周囲の pH によって様々な構造に変化することを示した[6-8]。ただし、厳密に考えれば、これらの研究では pH 勾配を形成するために塩基性溶液を拡散させているため、観察されたベシクルの変形が pH の勾配による影響ではなく、pH の絶対値の変化によって誘起された可能性を排除できない[9-11]。したがって、この点については議論する必要がある。

このような観点から、本章では pH 勾配を酸性溶液と塩基性溶液の拡散によって形成し、それぞれの pH 勾配下における 2 重球ベシクルの周期的・可逆的構造変化を観察し比較することで、これらの運動と pH 勾配との関係について、さらに検討した。また、ベシクルに対する pH 勾配の方向と拡散源からの距離をより詳細に観察するために、本章ではマニピュレータを用いて酸性溶液または塩基性溶液を拡散することで pH 勾配を局所的に形成させた。

5-2 実験方法

5-2.1 試薬

以下に本研究で用いた試薬を記す。また、Table 5.1 中の試薬の構造式は第 2 章の Fig. 2.1 に示している。

Table 5.1 Reagent of experiment

試薬	製造元
Sodium oleate (特級)	東京化成工業(株)
Bicine (特級)	和光純薬工業(株)
Sodium hydroxide 1M (容量分析用)	和光純薬工業(株)
Hydrochloric acid 1M (容量分析用)	和光純薬工業(株)

以下、Sodium oleate をオレイン酸ナトリウム、Bicine をピシン、Sodium hydroxide を NaOH、Hydrochloric acid を HCl と記す。

5-2.2 実験手順

37.5 mg のオレイン酸ナトリウムを pH 8.4 に調整したピシン緩衝液 5 mL に溶かし、超音波を当てた。ベシクルは、シリコンシートを切り抜いた枠をスライドガラスに設置して作製した容器にオレイン酸ナトリウム溶液 (pH = 8.4) を注入して 5 時間静置することによって形成させた (Fig. 5.1)。ピシン緩衝液の調製方法は 2 章のものと同じである。作製したベシクル溶液にマニピュレータで酸性溶液または塩基性溶液を注入し、局所的な pH 勾配下におけるベシクルの運動を光学顕微鏡 (Olympus IX-71) を用いて観察した。酸性溶液には 1 mM の HCl、塩基性溶液には 100 mM の NaOH を用いた。これらの濃度は、マニピュレータを用いた実験で、第 2、第 3 章で観測されたベシクルの形状変化が観測されたために用いた。

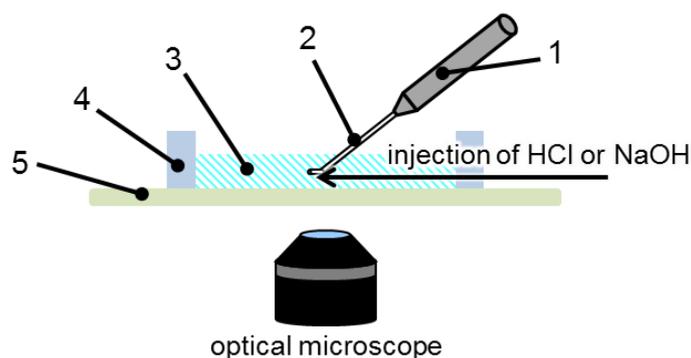


Fig. 5.1 Experimental setup: 1. manipulator; 2. micro capillary; 3. vesicle solution; 4. silicon wall; 5. slide glass.

5-3 結果と考察

5-3.1 酸性溶液による局所的 pH 勾配下におけるベシクルの運動

pH 8.4 のベシクル溶液に 1 mM の HCl を拡散したときの顕微鏡画像を Fig. 5.2 に示す。Fig. 5.2 中において、第 2 章で示したような周期的構造変化をおこなっていたベシクルについては緑の破線で囲み、小孔が開く方向を緑矢印で記した。また、同様に擬足構造の可逆的伸縮をおこなっていたベシクルについては赤の破線で囲み、擬足の伸長方向は赤矢印で記した。周期的構造変化をおこなったベシクルは、2 章で述べた構造変化と同様に、全てにおいて溶液拡散源（マニピュレータの先端）から遠い高 pH 側から小孔が開き、拡散源に近い低 pH 側に向かって反転し小孔を閉じる、その後再び初期状態に戻るように回転した (Fig. 5.3a, b)。第 3 章で示したような可逆的な擬足の伸縮をおこなうベシクルも見られたが、これについても、3 章で述べた形状変化と同様に、全てにおいて高 pH 側に擬足構造を伸ばし、続いて収縮した (Fig. 5.4)。本実験では酸がマニピュレータ先端から放射状に拡散しているが、このため、Fig. 5.2 中の矢印はベシクルの運動の種類に関係なく拡散源を中心としてほぼ放射状に伸びている。

Fig. 5.3 の 2 つのベシクルを比較すると、拡散源からの距離によって 1 周期分の構造変化に要する時間が違うことがわかる。このことから、ベシクルの変形速度は拡散源からの距離によって変化すると考え、Fig. 5.2 中の周期的構造変化をおこなうベシクルに関して、拡散源からの距離に対する 1 周期に要する時間を測定した。その結果を Fig. 5.5 中に緑のプロットで示す。

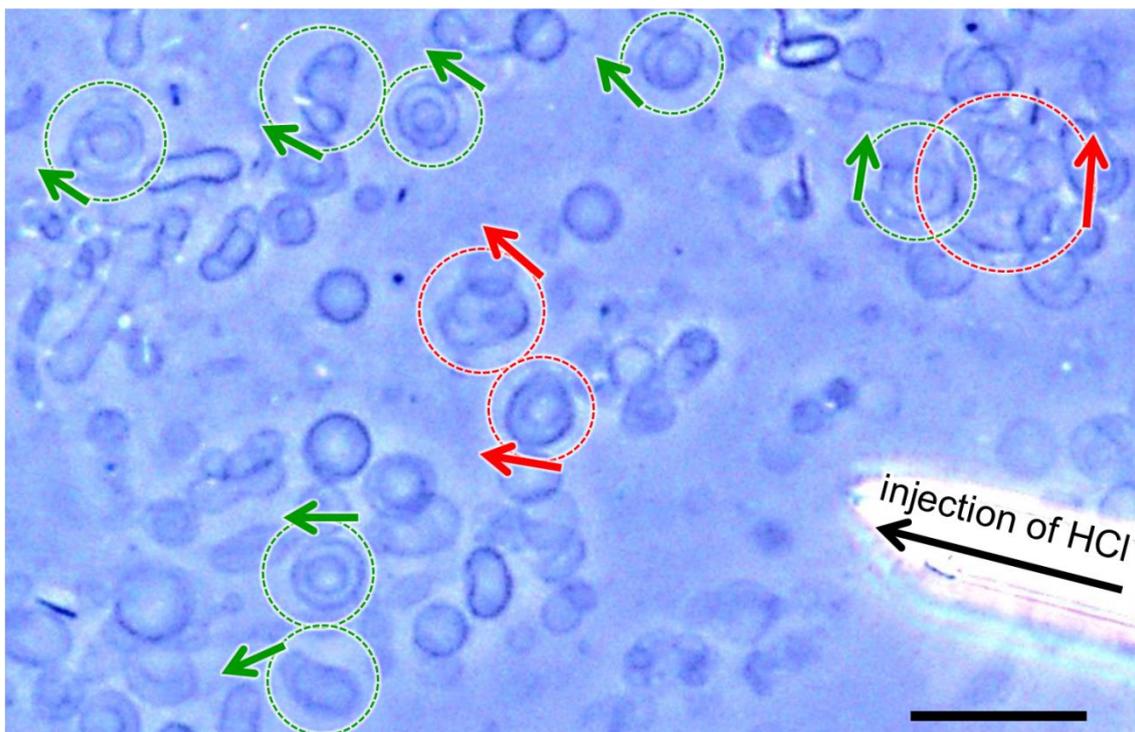


Fig. 5.2 Vesicles under the diffusion of 1 mM HCl. HCl was diffused from the tip of injector. Each vesicle in green dashed line exhibits rhythmic shape change and that in red dashed line exhibits reversible transformation of pseudopods. Scale bar is 20 μm .

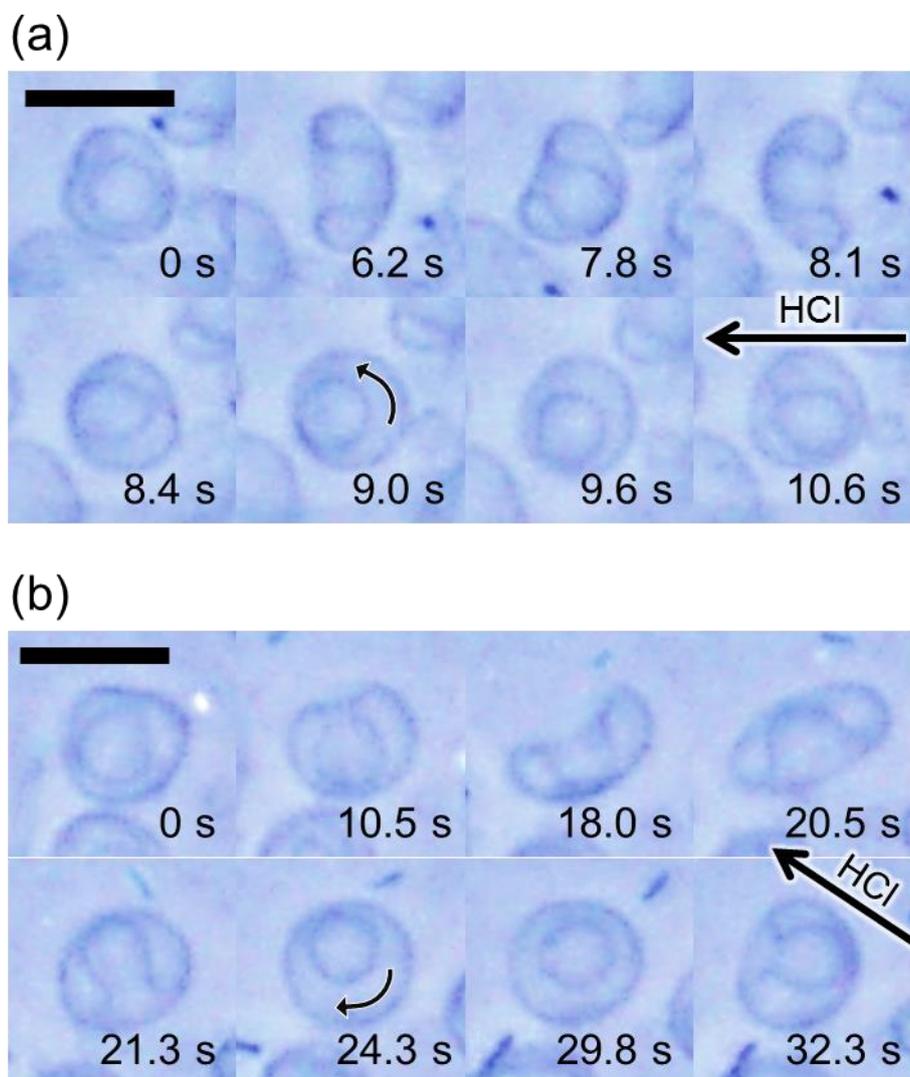


Fig. 5.3 Vesicles under the diffusion of 1 mM HCl. Each arrow in images exhibits a direction of diffusion of HCl. The distances from the injection point of HCl to the observation point is approximately (a) 50 μm and (b) 70 μm . Scale bars are 10 μm .

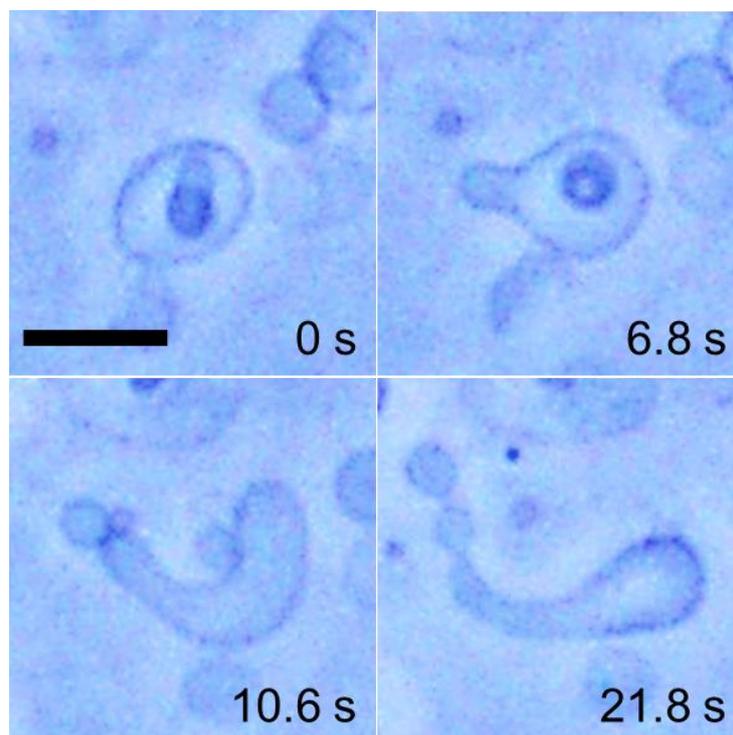


Fig. 5.4 Vesicles under the diffusion of 1 mM HCl. HCl was diffused from the right side of each image. The distance from the injection point of HCl to the observation point is approximately 30 μm . Scale bar is 10 μm .

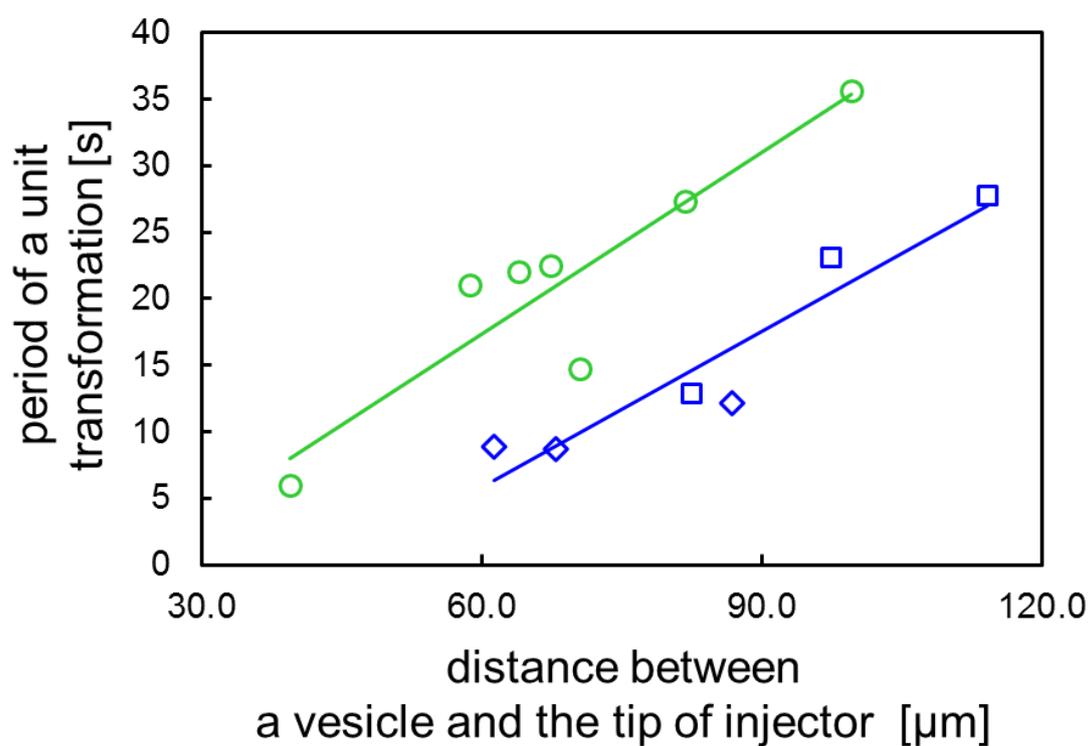


Fig. 5.5 Period of rhythmic shape change of each vesicle in Fig. 5.2 and 5.6. Green line and plots are the result of 1 mM HCl system (Fig. 5.2). Blue line and plots are the result of 100 mM NaOH system (Fig. 5.6). Square and diamond represent the results of experiments that were performed on different days.

Fig. 5.5 から、HCl 系において、ベシクル位置の拡散源からの距離が長くなるほど、ベシクルの周期変化に要する時間が長くなることがわかる。このことから、ベシクルの変形速度は拡散源からの距離に依存すると考えられる。

5-3.2 塩基性溶液による局所的 pH 勾配下におけるベシクルの運動

HCl の系と同様に、pH 8.4 のベシクル溶液に 100 mM の NaOH を拡散したときの顕微鏡画像を Fig. 5.6 に示す。Fig. 5.6 中において、2 章で述べたように周期的構造変化をおこなっていたベシクルについては青の破線で囲み、小孔が開く方向を青矢印で記した。また、3 章で述べたのと同様の擬足構造の可逆的伸縮をおこなっていたベシクルについては黄色の破線で囲み、擬足の伸長方向は黄矢印で記した。このとき、Fig. 5.6 中の矢印はベシクルの運動の種類に関係なくほぼ拡散源に向かうように伸びているが、これはマニピュレータから放射状に塩基が拡散しているからであると考えられる。

NaOH 系においても HCl 系と同様に、Fig. 5.6 中の周期的構造変化をおこなうベシクルに関して、拡散源からの距離に対する 1 周期に要する時間を測定した。ただし、NaOH 拡散時には変形運動の観測数が少なかったため、同じ実験を別の日におこなったときの結果も合わせて示している。その結果を Fig. 5.5 中に青のプロットで示す。キーの違いは実験日時の違いを表しているが、これは変形周期の拡散源からの距離に対する依存性には影響を与えていない。Fig. 5.5 から、NaOH 系においてもベシクル位置の拡散源からの距離が長くなるほど、ベシクルの周期変化に要する時間が長くなることがわかる。このことから、ベシクルの変形速度は拡散源からの距離に依存すると考えられる。

HCl 系と NaOH 系の結果を考慮すると、Fig. 5.2 と 5.6 中の矢印の方向はベシクルが存在する場所での pH 勾配の方向を近似的に表しているものと考えられ、この結果から周期的・可逆的に運動するベシクルは pH がもとの緩衝溶液の pH より低いか高いかには関係なく pH 勾配そのものを感知しているものと考えられる。

Fig. 5.5 から、拡散溶液の種類に関わらず、ベシクルの位置が拡散源から遠くなるほど、ベシクルの周期変化に要する時間が長くなることがわかる。また、Fig. 5.5 でマニピュレータからの距離が同じである場合、拡散溶液に 1 mM の HCl を用いた場合の方が 100 mM の NaOH を用いた場合よりも周期が長く、変形速度が遅いことがわかる。

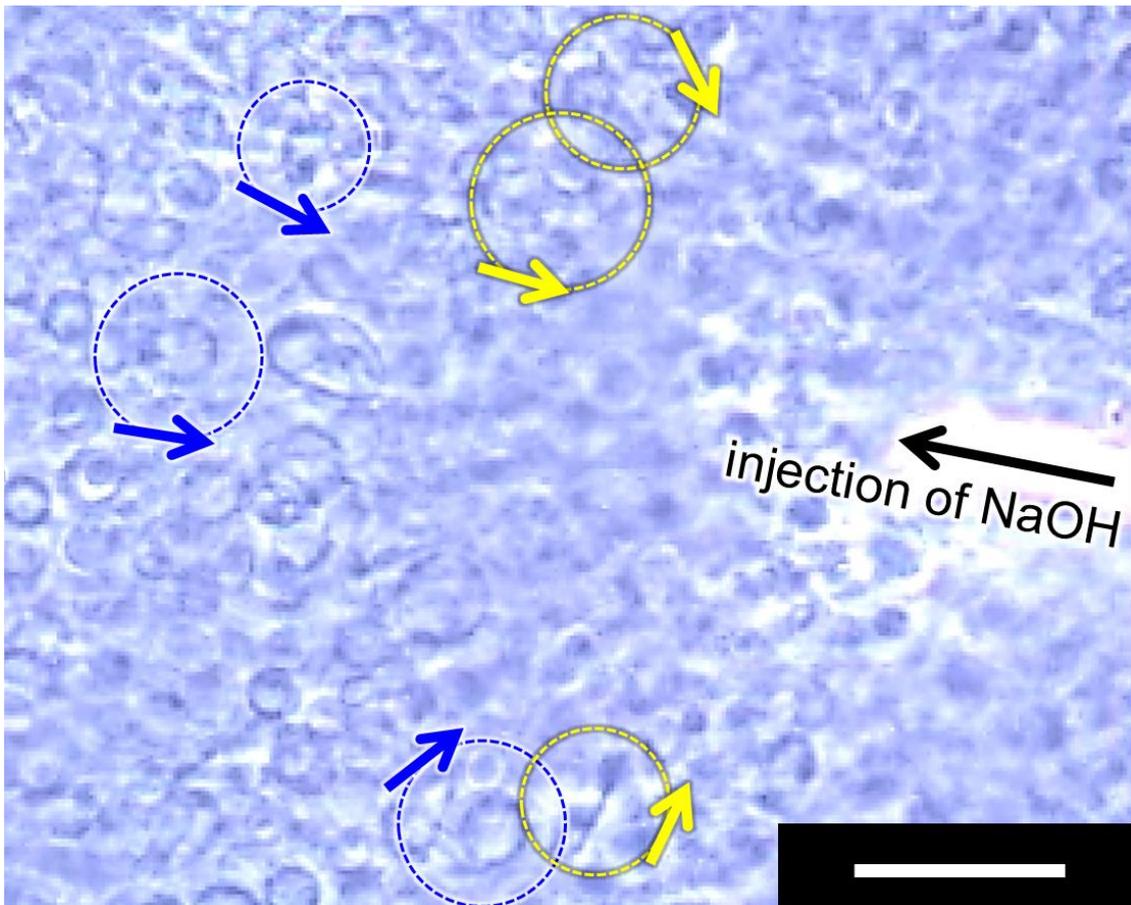


Fig. 5.6 Vesicles under the diffusion of 100 mM NaOH. NaOH was diffused from the tip of injector. Each vesicle in blue dashed line exhibits rhythmic shape change and that in yellow dashed line exhibits reversible transformation of pseudopods. Scale bar is 30 μm .

5-3.3 ベシクル変形運動の周期についての考察

pH 勾配に対するベシクルの変形速度の依存性を検討するため、周期的構造変化を起こすベシクルの周囲の局所的な pH を測定することを、pH の変化を輝度変化として観測できる蛍光物質である 8-Hydroxypyrene -1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (ピラニン) [12]や pH 指示薬 (チモールブルー、BTB (Bromothymol blue) 溶液) を用いて試みたが、ベシクル周囲の狭い範囲における pH の正確な測定は困難であった。

一方、ベシクル溶液に 100 mM の NaOH を多量に注入したときの結果を Fig. 5.7 に示す。このとき、マニピュレータの周囲に 2 章の Fig. 2.10 で述べたような、ベシクルが存在する領域と拡散する NaOH によってベシクルが溶解した領域の境界が観察された。2 章の結果から、ベシクルを構成するオレイン酸 (acid/soap) は pH がおよそ 10 以上のときにイオン化すると考えられる。Fig. 5.7 に見られる円形状の境界の内側は、このような高 pH 領域であると考えられるが、このような境界の近傍ではベシクルの周期的運動や可逆的変形を観察することは困難であった。Fig. 5.6 ではこのような境界が見えないような場所、すなわち、pH が 10 より十分に小さい場所でベシクル運動が観測されており、塩基によって変化したベシクル溶液の pH は 8.4 (緩衝液の pH) から 10 の間であることがわかる。また、オレイン酸は約 pH 6 以下で油になることが知られているが[13]、Fig. 5.2 中ではベシクルが形成しているので、酸によって変化したベシクル溶液の pH は 8.4 から 6 の間であることがわかる。

本実験系では、マニピュレータの原理上、ベシクル溶液にはマニピュレータから拡散溶液が注入され続けていた。このことから、ベシクル溶液を作製するときに用いるのと同じオレイン酸ナトリウム溶液に HCl や NaOH を滴下し、このときの pH 変化を測定することで、ベシクル溶液中に形成する pH 勾配の大きさを半定量的に検討することを考えた。pH 測定は、ピシンを含む pH 8.4 のオレイン酸ナトリウム溶液 10 mL に 1 mM の HCl または 100 mM の NaOH を滴下しておこなった。オレイン酸ナトリウム溶液の体積を V 、酸や塩基の滴下量を v とし、注入した溶液の全溶液に対する体積分率 ($\phi = v / (v + V)$) を横軸にとり、体積分率に対する pH の変化量 ($d(\text{pH}) / d\phi$) の絶対値を縦軸にとり、酸と塩基についてそれぞれ Fig. 5.8a と 5.8b に示す。ただし、Fig. 5.8 の第 2 軸として、体積分率に対する pH の値も示している。 $d(\text{pH}) / d\phi$ の値は、その時間における前後 5 点分の平均値をとっている。



Fig. 5.7 The circular border between vesicle solution (outside the circle) and an aqueous solution where vesicles are completely dissolved (inside the circle). The pH of bicine buffer (outside the border) was 8.4. Scale bar is 50 μm .

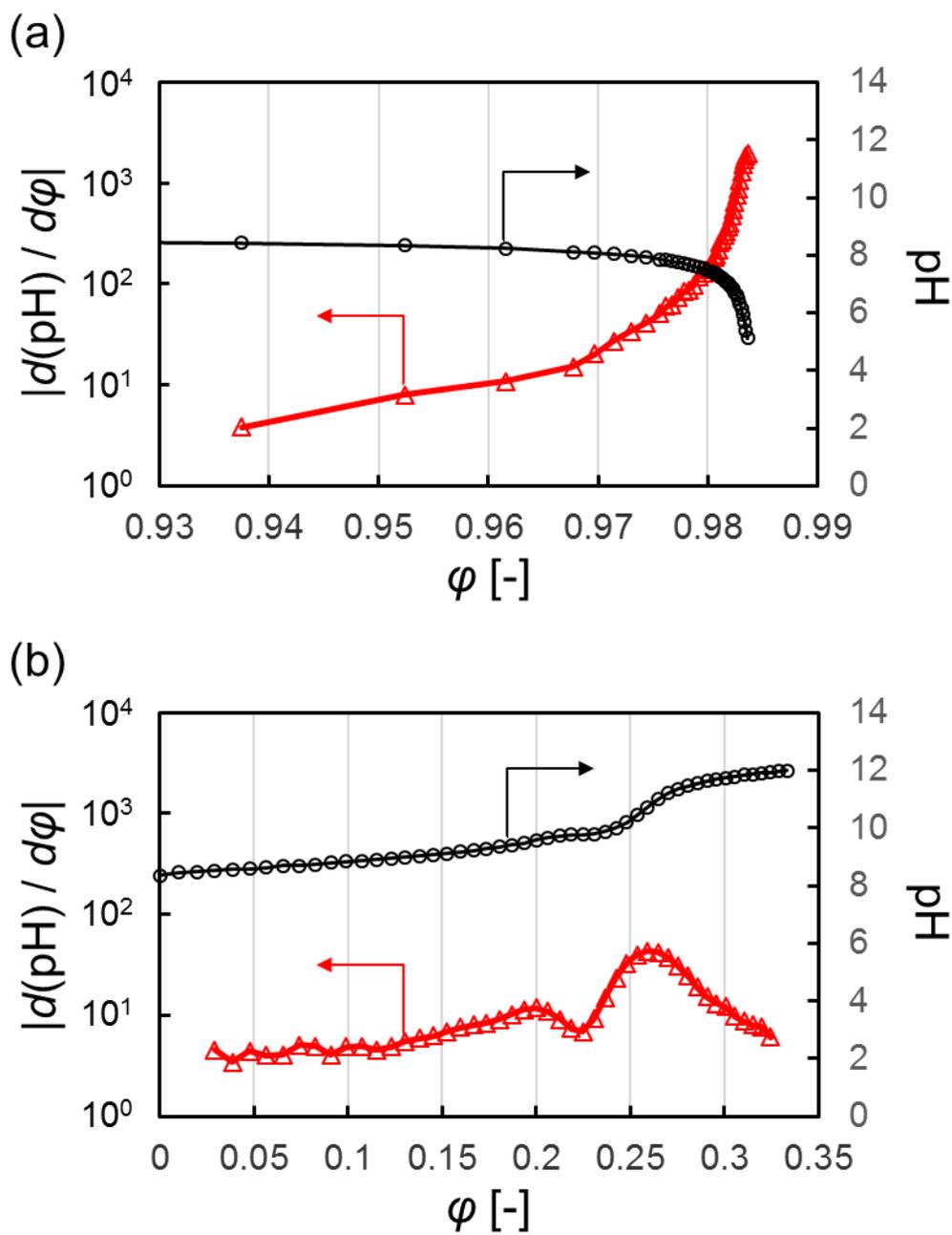


Fig. 5.8 Titration curve for a sodium oleate solution containing bicine buffer with (a) 1 mM HCl and (b) 100 mM NaOH. The red line and plots is $|d(\text{pH}) / d\phi|$ and black line and plots is pH.

マニピュレータからベシクルまでの距離を x としたとき、ベシクル溶液中における注入した溶液の体積分率 $\varphi(x,t)$ は拡散溶液の種類に依らず、ほとんど同じ関数になると考えられる。また、時間 t におけるベシクル溶液中の pH 勾配は $\partial(\text{pH}) / \partial x$ で表せられるが、これは次式で表すことができる。

$$\frac{\partial(\text{pH})}{\partial x} = \frac{d(\text{pH})}{d\varphi} \frac{\partial\varphi}{\partial x}$$

$\varphi(x,t)$ は時間 t における混合状態の距離に対する依存性であり正確に評価することは困難であるが、マニピュレータからは、常に一定の流量の溶液を流していることを考慮すれば、 $\partial\varphi(x,t) / \partial x$ の値は、あらゆる時間で x にそれほど強く依存しないのではないかと推定される。ここでは、近似的に $\partial\varphi(x,t) / \partial x$ が一定であると考え、pH 勾配の大きさは $d(\text{pH}) / d\varphi$ の値で評価できることになる。

Fig.5.8b で φ が 0.2-0.25% のとき、 $d(\text{pH}) / d\varphi$ の値が下がっているところ、すなわち、pH が S 字状に増大しているところでは、ベシクルからミセルへの相転移が進行していると考えられ、 φ が 0.25-0.3% のとき、初めは白濁していたオレイン酸ナトリウム溶液が透明になった。したがって、このとき溶液中では、ほとんどのベシクルがミセルへと相転移したと考えられる。したがって、ベシクルが確認できる Fig. 5.6 の実験では、 φ が 0.0-0.2% の範囲の結果で議論できるといえる。Fig.5.8b によれば、 $0.0\% \leq \varphi \leq 0.2\%$ で φ の大きいほど、すなわち、マニピュレータに近いほど、 $d(\text{pH}) / d\varphi$ の値は大きくなっている。したがって pH 勾配はマニピュレータに近いほど大きいといえる。一方、マニピュレータに近いほど、pH の値そのものも高くなる。したがって、変形周期がマニピュレータ近傍ほど短くなるのは、pH 勾配が大きいのか、pH 自体が高いからかのどちらかであると考えられる。

一方、塩酸を拡散させた Fig.5.8a において同様に考えると、マニピュレータに近いほど、pH 勾配は大きく、pH 自体は低い。したがって、この結果からは、変形周期がマニピュレータ近傍ほど短くなるのは、pH 勾配が大きいのか、pH 自体が低いからかのどちらかであると考えられる。

したがって、HCl 系と NaOH 系の両方の結果を考慮すると、変形周期は pH 勾配が大きいほど短くなるといえる。HCl と NaOH 系を比べると、NaOH 系のほうが

周期が短い、Fig.5.8によると $d(\text{pH})/d\phi$ の値は、両系で大きくは異なる。したがって、HCl系とNaOH系の周期の違いには、pHの絶対値の違いが影響している可能性が高い。これらを総合すると、pHの変化幅が0.5から1程度の狭い領域では、変形周期はpH勾配に強く依存しているが、pHの変化幅がそれを超えると、変形周期に対するpHの影響が強く現われるものと考えられる。

5-4 結言

HClを用いたときに形成した局所的なpH勾配下で、2重球ベシクルが拡散源とは反対側から小孔を開き、拡散源に向かって反転し閉じる様子や、擬足構造を拡散源とは反対側に向かって伸長させる様子が観察された。この実験では拡散源に近づくほど溶液のpHは低くなっているため、2重球ベシクルは高pH側から開き、擬足構造は高pH側に向かって伸長している。したがって、HClによるpH勾配においても、ベシクルの変形や運動は2章や3章で論じた運動機構を用いて理解することができるといえる。

また、ベシクル溶液を作製するときに用いるのと同じpHのピシン緩衝液をHClまたはNaOHを用いて滴定することで、マニピュレータからの距離とベシクル溶液中のpHならびにpH勾配の関係を検討した。この結果によると、pHの変化幅が0.5から1程度の狭い領域では、変形周期はpH勾配に強く依存しているが、pHの変化幅がそれを超えると、変形周期に対するpHの影響が強く現われることがわかった。ベシクルの運動に対するpHの絶対値の影響を検討するための有効な方法として、定常的なpH勾配を形成する装置を用いてベシクルの運動を観察することが考えられる。

References

1. T. Elston, H. Wang and G. Oster, *Nature*, 391, 510 (1998).
2. R. I. Gamow, B. Böttger and F. S. Barnes, *Biophys. J.*, 11, 860 (1971).
3. I. Lagzi, S. Soh, P. J. Wesson, K. P. Browne and B. A. Grzybowski, *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 1198 (2010).
4. K. Suzuno, D. Ueyama, M. Branicki, R. Toth, A. Braun and I. Lagzi, *Langmuir*, 30, 9251 (2014).
5. P. Lovass, M. Branicki, R. Tóth, A. Braun, K. Suzuno, D. Ueyama and I. Lagzi, *RSC Adv.*, 5, 48563 (2015).
6. M. Ishimaru, T. Toyota, K. Takakura, T. Sugawara and Y. Sugawara, *Chem. Lett.*, 34, 46 (2005).
7. I. Lagzi, D. Wang, B. Kowalczyk and B. A. Grzybowski, *Langmuir*, 26, 13770 (2010).
8. K. Morigaki and P. Walde, *Langmuir*, 18, 10509 (2002).
9. U. Seifert, *Adv. Phys.*, 46, 13 (1997).
10. J. Sanborn, K. Oglęcka, R. S. Kraut and A. N. Parikh, *Faraday Discuss.*, 161, 167 (2013).
11. F. Nomura, M. Honda, S. Takeda, T. Inaba, K. Takiguchi, T. J. Itoh, A. Ishijima, T. Umeda and H. Hotani, *J. Biol. Phys.*, 28, 225 (2002).
12. K. Kano and J. H. Fendler, *Biochim. Biophys. Acta*, 509, 289 (1978).
13. R. D. Kulkarni and P. Somasundaran, *Colloids Surf.*, 1, 387 (1980)

第 6 章 結論

Conclusion

本論文では、pH 勾配下における様々な構造をもったオレイン酸系ベシクルの周期的・可逆的な運動を実現し、その運動メカニズムの解明を通して生体機能を模倣するようなベシクルを設計するためのモデル系として確立することを目的として、実験および数理モデルによる検討をおこなった。ベシクルの運動機構を物理的に理解するとともに、これらの知見に基づいて、化学反応を利用してベシクル自体が周囲に pH 変動を生み出し運動する系を見出した。さらに、本論文のベシクルの運動には pH そのものよりも pH 勾配の大きさが与える影響が大きいことを示した。

本研究の意義と目的を述べた第 1 章に続く第 2 章で、pH 勾配下におけるベシクル構造の周期的変化について検討した。このベシクルはオレイン酸とそれがイオン化した物質 (acid/soap) によって形成されており、観測された様々な形状のベシクルの内、2 つの異なる構造の部位をもつベシクル (2 重球ベシクル) が周期的な運動を示した。その内水相は 2 重球ベシクルの片側に局在しており (以下、膨潤部)、逆側は水分をほとんど含まない (以下、結合部)。膨潤部に存在する小孔は OH^- の拡散とともに開き、この結果、ベシクルは結合部を中央にもち、結合部の周囲に膨潤部が存在するようなトラス形状へと変化した。その後、ベシクルは初期状態と反対の曲率を持った 2 重球へと再び閉じた。この状態では、ベシクルの向きは初めの向きとは反対となっており、その後、ベシクルはその向きを初めの向きに戻すように回転した。この周期的な構造変化は何度も繰り返されるが、ベシクルのサイズは運動が繰り返される間、ほとんど一定に維持された。さらに、2 重球ベシクルの周期的構造変化によって pH 勾配に沿った物体の輸送が可能であった。また、2 章では周期的構造変化を表現するシンプルなモデルを提案し、この運動は 2 種類の力によって説明できることがわかった。その内の一方は膜弾性であり、もう一方は pH 勾配によって生じる泳動力である。結合部と膨潤部の膜はどちらも曲率の小さい状態を好み、ベシクルが小孔を閉じるか開くかの形状安定性は 2 種類 (結合部と膨潤部) の弾性エネルギーの競り合いによって決定されていると考えられる。また、小孔は低 pH レベルでより安定であると考えられるが、pH の低い側で小孔が完全に閉じると、pH 勾配による泳動力によって回転不安定性が発現するため、ベシクルは初めの状態に戻るよう回転する。本構造変化のメカニズムは最終的に pH 勾配を仕事に変換する分子集合体機械につながる可能性を秘めていると考えられる。

第 3 章では、pH 勾配下でアメーバのように擬足構造を伸縮させるベシクルについて検討した。このベシクルも第 2 章と同様にオレイン酸 (acid/soap) で構成されており、

NaOH 拡散下で第 2 章で説明したような 2 重球の反転回転サイクルを数回起こした後、2 重球構造から扁平構造に変化した。さらなる NaOH の拡散下で、擬足構造はベシクルから高 pH 側へ向かって伸長し、続いて収縮した。このとき、可逆的な擬足の変形の方法はベシクル周囲の pH 勾配の方法によってコントロールされていると考えられる。この可逆的な運動は何度も繰り返されるが、NaCl の拡散下は単調で不可逆的な伸長しかおこさない。この 2 つの系の違いは膜を通る H^+ と Na^+ のカチオンの透過性の違いによって説明することができた。 H^+ の高い透過速度は浸透圧差を減少させ、浸透圧差が減少すると、擬足の変形によって蓄積された膜弾性エネルギーによって収縮が生じると考えられる。このような特徴を表現するために構築された数理モデルは実験結果を半定量的に再現することができた。また、このベシクルはアメーバ的な“擬足”の伸縮を示すが、このような運動は生体模倣的性質をもつ両親媒性分子集合体を設計するうえで重要であると考えられる。このように変形の方法を選択するようなベシクルの例はこれまでにほとんどなかったが、第 3 章で報告されたベシクルの運動は、生体模倣型のベシクルを設計するための 1 つのモデル系になるといえる。

第 4 章では、グルコースの分解反応によるベシクルの構造変化について検討した。第 2、第 3 章では、pH 勾配はベシクル溶液に直接的に塩基を加えることで形成されていたが、第 4 章では化学反応を用いてベシクルが自ら周囲に pH 変動を形成する系を考えた。ベシクルの構成成分には第 2、第 3 章と同様にオレイン酸 (acid/soap) を用いた。化学反応にはグルコースオキシダーゼによるグルコースの分解反応を用いた。この反応ではグルコースから最終的にグルコン酸が生成される。第 4 章では、主として、ベシクルから等方的に伸びる可逆的な擬足構造の伸縮について検討した。ビシン緩衝液の影響によってグルコース溶液、ベシクル溶液の全体の pH はほとんど変わっていないにも関わらず、グルコースの分解反応を用いて可逆的な擬足の伸縮運動が観察された。ベシクル膜にはバルク溶液中よりも約 300 倍の濃度の GOx が含まれていたが、これより、ベシクルの変形や運動に必要な僅かな pH 分布が、GOx を含むベシクル自身が周囲のグルコースを反応で消費して形成しているといえる。この構造変化は生物と同様にグルコースを燃料としている点でも興味深いと考えている。また、第 4 章の結果から、ベシクル周囲に直接的な pH 変動を与えなくても、pH 変動を形成するような任意の化学反応を用いてベシクルの可逆的な構造変化を発生させることができる可能性を示した。

第 5 章では、局所的な pH 勾配下における 2 重球ベシクルの周期的構造変化および扁

平型ベシクルの可逆的な擬足の変形を観察し、ベシクルの運動に対する pH および pH 勾配の影響について検討した。ベシクルの構成成分には第 2 から 4 章と同様にオレイン酸 (acid/soap) を用いた。局所的 pH 勾配はマニピュレータを用いてベシクル溶液に酸や塩基を拡散させることで形成した。第 2、第 3 章では、pH 勾配の形成には塩基を用いていたが、第 5 章では酸を用いた pH 勾配下でもベシクルが運動することを確認し、またその運動周期はマニピュレータ先端からの距離に依存した。また、ベシクル溶液を作製するとき用いたものと同じ pH のピシン緩衝液を HCl または NaOH を用いて滴定することで、マニピュレータからの距離とベシクル溶液中の pH ならびに pH 勾配の関係を検討すると、pH 勾配が大きくなるほどベシクルの 1 周期分の構造変化に要する時間が短くなっていた。本章の結果から、pH の変化幅が 0.5 から 1 程度の狭い領域では、変形周期は pH 勾配に強く依存しているが、pH の変化幅がそれを超えると、変形周期に対する pH の影響が強く現れるものと考えられた。

以上、本論文は pH 勾配下で周期的・可逆的に運動するベシクルを実現し、これを生体模倣型ベシクルのモデル系として確立することを目的として、運動メカニズムの解明をおこなった。これまで、報告されてきたベシクルの周期的運動は単調にサイズを減少させていくものが多かったが、本研究でサイズを維持しながらもポテンシャル勾配を連続的に仕事に変換するベシクルを実現し、その運動メカニズムを数理モデルを用いて物理的に理解することができた。また、反応によって pH を変動させる反応系を用いれば、様々な化学反応をベシクル自体が誘起し運動できることを示した。現在の実験系で形成される pH 勾配は過渡的なものであり、時間とともに全体の pH レベルが変化してしまうものである。今後、定常濃度勾配を形成できる装置 (Fig. 6.1) を用いれば、時間に依らず空間的に定常な pH 勾配下でベシクルを観察することが可能となり、ベシクル周囲の pH の値を知るとともにベシクルの運動に pH の絶対値がどのように影響するかを検討することができる。と期待できる。

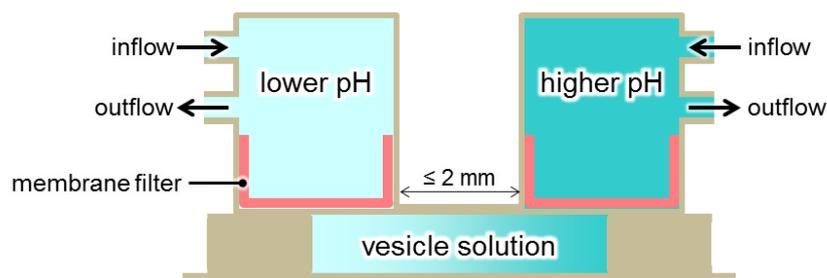


Fig. 6.1 Experimental setup that is able to form a steady-state pH gradient.

また、本研究のベシクルに関して、周囲の pH 変化に応じた膜分子の化学的性質の変化や、構造が揃った状態でベシクル運動と構造の関係について検討することは重要であると考えられる。

謝辞

本論文を執筆するにあたり、実に多くの方々にご指導とご鞭撻を賜りました。始めに、同志社大学理工学部 of 塩井章久教授には、本研究を進めるにあたり終始温かい激励のお言葉と共にきめ細やかなお心遣いにご指導ならびに多大なるお力添えを頂きました。深く御礼を申し上げます。塩井先生は研究を通して物事に対する様々なアプローチの仕方をご提示くださり、その時々において丁寧にご指導くださいました。その中で一研究者・社会人としての姿勢等につきましてもご教授くださり、ここに敬意と感謝の意を表しますと共に、そのご指導を励みに今後の人生に尽力いたしますことを表明いたします。

本論文を作成するにあたり、貴重なご助言とご高閲を賜りました同志社大学生命医科学部の吉川研一教授（京都大学名誉教授）、同志社大学理工学部の松本道明教授、小寺政人教授、土屋活美教授に心から感謝申し上げます。

同志社大学理工学部の山本大吾助教には、研究全般において細やかにご指導を頂きました。特に数理解析に用いるプログラミングや各学会における効果的なプレゼンテーションの方法などに関してご指導くださり、日常においては様々な相談に対して快くお時間を割いてくださいました。心より御礼申し上げます。さらに、わたくしの参加させて頂いた各学会で数々のご指摘やアドバイスをくださった先生方ならびに研究者の皆様へ深く感謝いたします。また、同志社大学理工学部の加納船治名誉教授と北岸宏亮准教授には、ピラニンによる蛍光観察に関して文献のご提供ならびに貴重なご意見とご指導を賜りました。ここに心から敬意と感謝の意を奉げます。

6年間の研究全般にわたって、分子化学工学研究室の先輩方、同輩ならびに後輩にもご指導とお力添えを頂きました。特に、西垣慈治氏（2009年度大学院博士前期課程修了）、津崎庄平氏（2011年度卒）、坂下大知氏（2014年度卒）、濱口琴美氏（2014年度卒）、大脇健太郎氏（大学院理工学研究科博士前期課程2回生）、酒井雅史氏、富松奎佑氏（理工学部化学システム創成工学科4回生）は、本論文をまとめるにあたり数々の研究を共に遂行して下さり、また、本研究においては互いに意見する中で多くの有益なご助言とご協力を頂きました。皆様にはお手数やご苦勞をおかけすることが多かったかと存じますが、本論文の作成においては皆様のお力添えによるところも多くございました。この場をお借りして深く御礼申し上げます。

最後になりますが、わたくしの研究を温かく見守り、心底応援して下さった家族ならびに友人に心よりの謝意を奉げます。誠にありがとうございます。

本研究に関する著者の発表論文

第2章

E. Nawa, Y. Nishigaki, D. Yamamoto and A. Shioi, “Rhythmic shape change of a vesicle under a pH gradient”, *Soft Matter*, 9, 7832 (2013).

第3章

E. Nawa, D. Yamamoto and A. Shioi, “Chemotactic Amoeboid-like Shape Change of a Vesicle under pH Gradient”, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 88, 1536 (2015).

第4章

E. Nawa, K. Owaki, D. Sakashita, D. Yamamoto and A. Shioi, “Reversible transformation of a vesicle by glucose oxidation”, *Colloid and Interface Science Communications*, 8, 10, (2016).

第5章

E. Nawa, D. Yamamoto and A. Shioi, “Structural change of a vesicle under a local pH gradient”, in preparation

本研究（第2章）に関する総説論文

D. Yamamoto, E. Nawa and A. Shioi, “The Autonomously Moving Interface and Colloidal Objects”, in *Chemoresponsive Materials: Stimulation by Chemical and Biological Signals*, ed. Hans-Jorg Schneider, *RSC Smart Materials*, (RSC publishing), Chap.17, 483 (2015)