

■原 著■ 2018 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

紫外線照射下におけるケージドオレイン酸油滴封入ベシクルの巨視的運動

鈴木健太郎^{1,2} 村山栄貴¹ 中山直之¹ 菅原 正¹ 山口和夫¹

Macroscopic Motion of Giant Vesicle Containing Oil-Droplets Composed of Caged Oleic Acid Under UV Irradiation

Kentaro Suzuki^{1,2}, Hiroki Murayama¹, Naoyuki Nakayama¹,
Tadashi Sugawara¹ and Kazuo Yamaguchi¹

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: suzuken@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: For constructing a self-propelled giant vesicle (GV) containing a driving source inside, a phospholipid GV encapsulating oil-droplets composed of caged oleic acid, 2-nitrobenzyl oleate (NBO), was prepared the centrifugal precipitation. Encapsulation of several number of the NBO droplets in a unilamellar GV was confirmed under phase-contrast and fluorescence microscopy. Major dynamics of the GVs containing NBO droplets under UV irradiation were a self-propelled motion (76%, $N = 84$), and the migration direction was independent of the position of the UV light source, unlike in the free NBO droplet. The appearance of the photo-triggered rupture of the GV containing a large number of NBO droplets suggested that the origin of the motion was anisotropic modulation of the surface tension of the vesicular membrane caused by dissolving the photo-generated oleic acid from the NBO droplet.

Keywords: self-propelled motion, giant vesicle, caged compound, oil-droplet

序論

「動き」は、生命現象を特徴付ける重要なダイナミクスである¹⁾。たとえば、ボルボックスやミドリムシのような光合成を行う水生微生物は、日差しの強い環境に自ら移動することで、生育に有利な状況を自ら作り出す²⁾。また、植物にもみられる小胞輸送では、単純拡散では実現困難な能動的物質輸送を細胞内で実現する³⁾。そこで生物を参考に、自ら動きを示す人工の分子システムを実現することができれば、生命現象を支える物理現象の理解が深まるだけでなく、従来の物質科学にはない新しい方法論に基づく物質輸送システムの構築につながり興味深い。

そのような観点から我々は、化学反応を起こす分子からなる油滴が自らつくり出す「動き」に関する研究を進めてきた⁴⁻⁶⁾。例えば、オレイン酸無水物を主成分とする油滴では、油滴表面で起こる加水分解反応により生じたオレイン酸が、油滴表面に表面張力勾配を作り出し、これが方向性ある運動を引き起こ

す⁵⁾。また、紫外線照射下でのみ化学反応を行うケージドオレイン酸 (図 1a) を油滴構成分子として利用することで、紫外線照射による動きの開始/停止の制御だけでなく、その運動方向も制御できることが確認された (走光性ダイナミクス)⁶⁾ (図 1 b)。

生物が作り出す動きは、一般に分子モーターのような運動器官が作り出しており³⁾、言い換えれば、運動器官がその身体全体を動かし、さらには、他者を動かすこともできる。それに対して既存の自走性油滴系では、油滴全体が動きを作り出し、さらにその動きは自分自身を動かすことのみに使われる⁷⁾。もし、生物と同じように、駆動源が動きを作り出す自己駆動系が実現されれば、幅広く動きを利用可能な新しい分子システムの実現へと繋がる。

そこで本研究では、光照射下の分解反応によってオレイン酸を生じるケージドオレイン酸からなる油滴を、駆動性のない標準的なリン脂質からなるジャ

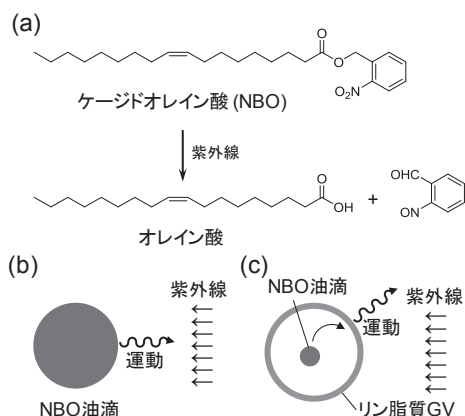


図1. (a) 紫外線照射下でオレイン酸を生ずるケージドオレイン酸 NBO. (b) NBO 油滴の紫外線照射下での走光性. (c) 封入した NBO 油滴によるベシクルの駆動.

イアントベシクルの内水相に封入し、内封油滴を駆動源とする自己駆動ベシクルの実現を目指した (図1c)。先に示したように、ケージドオレイン酸油滴単独では、照射された紫外線の方向に自走する走光性ダイナミクスを示す⁶⁾が、それと同時に、光分解生成物であるオレイン酸が油滴周辺に溶出する。このオレイン酸が、油滴を封入しているジャイアントベシクルの膜状態を変調することで、ベシクル全体の動きが生み出される可能性がある。

材料と方法

試薬

ベシクル内部に封入する光応答性油滴の構成分子であるケージドオレイン酸 NBO (オレイン酸 2-ニトロベンジル) は、すでに報告した方法⁶⁾により合成したものをを用いた。蛍光染色用のクロロフィルは、緑色植物抽出物 (C0870, 東京化成株式会社) より、クロロホルム抽出したものをを用いた。その他の試薬および溶媒は市販のものをそのまま利用した。

遠心沈降法による油滴封入ベシクルの調製

ケージドオレイン酸油滴が封入されたジャイアントベシクルの調製は、すでに報告している遠心沈降法⁸⁾を利用した二重ベシクル (内部に小ベシクルが封入されたジャイアントベシクル) 調製法⁹⁾を参考に行った。オレイン酸 (2 wt%) と抽出クロロフィル (1 wt%) を含む油状の NBO 1 μL を、1 mL のホウ酸塩 pH 標準液 (JIS 規格, pH 9.2) に加え、緩やかに震盪することで、粒径数 μm から数 10 μm の NBO 油滴を含む、o/w エマルジョンを調製した。この o/w エマルジョン 100 μL を、4:1:1 のモル比の 1-パルミトイル-2-オレオイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン (POPC)、1-パルミトイル-2-オレオイル-*sn*-グリセロ

-3-ホスホグリセロール Na 塩 (POPG)、およびコレステロールを完全に溶解させた流動パラフィン (総濃度 1 mM) 1 mL に加え震盪することで、NBO 油滴封入水滴を流動パラフィン中に分散させた o/w/o エマルジョンを調製した。この o/w/o エマルジョン 300 μL を、容量 1.5 mL のエッペンドルフチューブ中に入れたホウ酸塩 pH 標準液 (600 μL) 上に浮かべ、マイクロ遠心機 (1-16, sigma) を用いて約 20,000 g の遠心加速度を 15 分間印加し、下層の緩衝液中に、油滴封入ジャイアントベシクルを形成させた。

油滴封入ベシクルへの紫外線照射とその観察

油滴封入ジャイアントベシクルの紫外線照射下におけるダイナミクスの観察は、すでに報告している論文の観察システム⁶⁾を用いた。調製した油滴封入ベシクル分散液を、内容量 26 μL のチャンバーに封入した。これを、倒立型位相差顕微鏡 (IX70, オリンパス) のステージ上に置き、試料側方から LED 型単色 UV 光源 (OminiCure LS405S, U-VIX) を用いて、波長 $365 \pm 5 \text{ nm}$ の単色紫外線 (油滴位置での照度 30 mW cm^{-2}) を照射した場合の挙動を、顕微鏡に搭載された CCD カメラユニット (AdvanCam LP2, Advision) を用いて撮影し、動画および静止画としてコンピュータ上に記録した。得られた画像データの解析は、主に Power Point (Microsoft) 上で行った。

結果と討論

NBO 油滴封入ジャイアントベシクルの調製

位相差顕微鏡観察により、粒径数 μm の油滴が複数個封入された、粒径数 10 μm のジャイアントベシクルが形成されたことが確認された (図2a, c)。遠心沈降法で形成されたジャイアントベシクルは、その原理上、ユニラメラベシクル (一層の脂質二分子膜からなるベシクル) ができやすいことが知られている⁸⁾。観察されたベシクル膜に関するコントラストが小さいことは、今回形成されたベシクルが、ユニラメラベシクルかそれに近い薄い膜からなる膜構造を持つことを示唆する。一方で、内水相に封入された油滴は、ベシクル調製時に用いる流動パラフィン由来のものである可能性も考えられ、位相差顕微鏡による観察だけからでは、目的通り NBO 油滴が封入されているかを判断できない。そこで、NBO 油滴を調整する際、NBO の光分解反応に適した波長 365 nm 付近の紫外線に対する吸光係数が小さいクロロフィルで染色することで、NBO 油滴とそれ以外の油滴とを区別できるようにした (図2b, d)。蛍光顕微鏡により観察を行ったところ、ベシクルに封入された油滴は、蛍光性のものでないものが

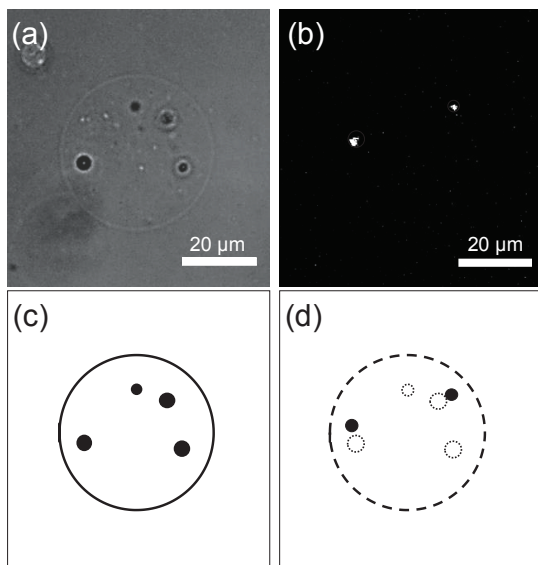


図 2. (上段) NBO 油滴封入ジャイアントベシクルの位相差顕微鏡像 (a) および、油滴を染色した蛍光色素に基づく蛍光顕微鏡像 (b). (下段) 各顕微鏡像における観察物を示す模式図 (c) (d). なお、図 d 中の破線で示された円形は、位相差顕微鏡で観察されたベシクルおよび油滴の位置を示す。位相差顕微鏡と蛍光顕微鏡での観察の間にはタイムラグがあるため、ブラウン運動の影響により、同一油滴であっても両測定間に若干の位置のずれが生じる。

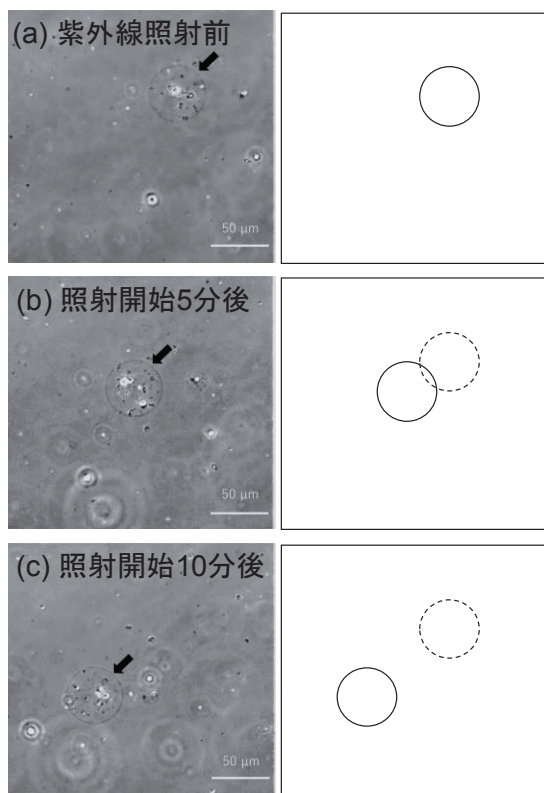


図 3. 紫外線照射下における、NBO 油滴封入ジャイアントベシクルの位相差顕微鏡像 (左) および、その画像中のベシクル位置を示した図 (右). (a) 紫外線照射前、(b) 紫外線照射 5 分後、(c) 紫外線照射 10 分後. 図 b および c の右図中に示される破線で示される円形は、初期のベシクル位置を示す。なお紫外線は、紙面右上方向より照射した。

混在することが明らかとなり、これらのうち前者は NBO 油滴であり、後者は流動パラフィン油滴であると考えられる。従って、本方法により、目的とする NBO 油滴が封入されたジャイアントベシクルが形成されたことが確認された。

NBO 油滴封入ジャイアントベシクルの紫外線照射下のダイナミクス

蛍光顕微鏡観察により、NBO 油滴の封入が確認されたジャイアントベシクルに対し、観測視野側方からの紫外線照射を行った際の巨視的な変化を、位相差顕微鏡により観察した (図 3)。観測した 84 個の NBO 油滴封入ジャイアントベシクルのうち、64 個 (76%) については、10 分程度の紫外線照射に対して、初期位置からの移動が確認された。なお、アインシュタイン-ストークスの関係式より、数 $10 \mu\text{m}$ 以上の大きさのベシクルに対するブラウン運動はベシクル全体を動かすほど大きくないと見積もられることから、この光照射下にみられる動きは、ブラウン運動とは区別され、内部に封入された油滴による影響であると考えられる。実際に、NBO 油滴を含まないベシクルに紫外線照射しても、運動性はみられない。ベシクルの移動速度は、サンプルごとのばらつきが見られるものの、概ね数 $\mu\text{m min}^{-1}$ 程度であった。ベシクルの運動には直線性がみられるが、その方向は試料によって完全にランダムであり、この点は、紫外線に対する走光性がみられる単独の NBO 油滴場合とは異なる。

NBO 油滴から生成されたオレイン酸のベシクル膜への影響

光反応によって、ベシクル内部で油滴より生成したオレイン酸が、ベシクル膜へと与える影響を確認するために、通常約 10 倍量の NBO 油滴が封入されたジャイアントベシクルを別途調製し、このベシクルに、他と同様の紫外線 (波長 365 nm , 照度 30 mW cm^{-2}) を 10 分間照射したところ、ベシクルが崩壊するダイナミクスが観察された。崩壊時間に幅はあるものの、十分量の油滴が封入されたベシクルで、このダイナミクスは再現性よく観察された。

オレイン酸/オレイン酸ナトリウムは数 mM の臨界ミセル濃度 (cmc) を有することから¹⁰⁾、光照射により NBO 油滴上に生じたオレイン酸の一部は、単分散分子あるいはミセルのかたちでベシクル内水相に溶出できるものと考えられる。弱塩基条件で洗剤としても利用されるオレイン酸は、リン脂質からなる脂質二分子膜に不安定化をもたらすことはよく知られており、この崩壊は、内水相を介したオレイ

ン酸によるものと解釈される。

光分解反応で生成したオレイン酸がベシクル膜へと与える影響を考慮して、比較的少数の NBO 油滴が封入した際にジャイアントベシクルが見せる駆動の発現機構を、以下のように推測した。光分解反応により生じたオレイン酸は、内水相を介して脂質二分子膜の内膜（インナーリーフレット）に達すると、膜内で分子が反転するフリップフロップ機構¹¹⁾によって、内膜から外膜（アウトターリーフレット）へとオレイン酸が移動する。一般的なリン脂質の場合、フリップフロップの速度は数日の時定数を持つことが知られているが¹²⁾、オレイン酸の場合は、酸解離平衡により界面活性のあるオレートの状態と疎水性のオレイン酸状態をとることができるので、速やかなフリップフロップが可能であると考えられる。外膜に達したオレイン酸は、ベシクル外側の表面張力を低下させるが、このとき、ベシクル中の油滴の位置の中心からの偏りなどにより、表面のオレイン酸濃度に不均一性が生じれば、他の自己駆動系同様にマランゴニ効果^{5, 6, 13)}による駆動が生じうると考えられる。

結論

本研究において、光照射下で化学反応を行うことができる油滴を駆動源として用いることで、動きを持たないジャイアントベシクルを駆動させる新しい自己駆動系の構築が実現しうることを示した。その駆動の原因は、光反応により生成したオレイン酸が、ベシクル内水相を介してベシクル膜に達し、これによって生じた表面張力の偏りに関連付けられる。今後は、ダイナミクス中での、ベシクル内外の水の動きや分子移動などを明確にする実験を行い、より詳細な機構の解明を目指すとともに、本系を利用して物質輸送系の構築を行いたい。

謝辞

本研究は、JSPS 科研費 JP16K05759 および、研究課題「内部での化学反応を利用して動くベシクルの構築」に対する 2018 年度神奈川大学総合理学研究所

共同研究助成の助成金（RIIS201804）を受けて行われた。

文献

- 1) Hanczyc MM (2014) Metabolism and motility in prebiotic structures. *Philos. Trans. R. Soc. London B*, **366**: 2885-2893.
- 2) Carlile MJ (1975) *Primitive Sensory and Communication Systems, The Taxes and Tropisms of Micro-Organism and Cells*. Academic Press, London.
- 3) Soh S, Bytrska M, Landere-Grzybowska K and Grzybowski BA (2010) Reaction-diffusion system in intercellular molecular transport and control. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**: 4170-4198.
- 4) Suzuki K, Toyota T, Takakura K and Sugawara T (2009) Sparkling morphological changes and spontaneous movements of self-assemblies in water induced by chemical reactions. *Chem. Lett.* **38**: 1010-1015.
- 5) Hanczyc MM, Toyota T, Ikegami T, Packard N and Sugawara T (2007) Fatty acid chemistry at the oil-water interface: Self-propelled oil droplets. *J. Am. Chem. Soc.* **129**: 9386-9391.
- 6) Suzuki K and Sugawara T (2016) Phototaxis of oil droplets comprising a caged fatty acid tightly linked to internal convection. *ChemPhysChem* **17**: 2300-2003.
- 7) Ryazantsev YS, Velarde MG, Rubio RG, Guzmán E, Ortega F and López P (2017) Thermo- and solute-capillary: Passive and active drops. *Adv. Colloid Interf. Sci.* **247**: 52-80.
- 8) Pautot S, Frisken BJ and Weitz DA (2003) Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion. *Langmuir* **19**: 2870-2879.
- 9) Suzuki K, Machida K, Yamaguchi K and Sugawara T (2018) Photo-triggered recognition between host and guest compounds in a giant vesicle encapsulating photo-pierceable vesicles. *Chem. Phys. Lipids* **210**: 70-75
- 10) Heß K (1942) Die röntgenographische und viskosimetrische Untersuchung von Seifenlösungen. *Fette Seifen Anstr.* **49**: 81-88.
- 11) Israelachvili JN (2011) *Intermolecular and Surface Forces, Third edition*. Academic Press, Amsterdam.
- 12) McConnell MH and Kornberg RD (1971) Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes. *Biochem.* **10**: 1111-1120.
- 13) Kitahata H, Yoshinaga N, Nagai KH, Sumino Y (2013) Dynamics of Droplets. In: *Pattern Formations and Oscillatory Phenomena*. Kinoshita S, ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 85-118.