

博士論文

分裂システムの人工的構築とそのコントロール

佐藤 洋一

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 遺伝子発現制御研究室

(別所 康全 教授)

所属 (主指導教員)	遺伝子発現制御 研究室 (別所 康全)		
氏名	佐藤 洋一	提出	平成 26年 12月 19日
題目	分裂システムの人工的構築とそのコントロール		
<p>要旨</p> <p>生命とは何か？この謎を解き明かすため、昨今生命の最小単位である細胞の形から機能までを疑似的に再構築し、どのようにして生命が誕生したかその根源を探る研究が活発に行われている。この実験系の提示と理論的解明は、生物学だけでなく、物理学や化学、数理、計算機科学など、それぞれの方法論を活用することで優れた成果が生み出されてきている。合成生物学は、その研究分野の一つとして誕生した。この分野は、生物や細胞が保有するシステムに類似はしているが、自然界には存在していない分子やシステムを人工的に作りだし、これらの利用や応用そしてその解明をすることで細胞の機能との類似点を見出すことを目的としている。特に盛んな研究として、生物学的な手法を用いず、物理的作用や化学的手法のみで分裂を誘発する人工細胞の構築というものがある。具体的には、vesicle や micelle を疑似原始細胞と見立て、分裂を行うために必要なシステムの構築を独自のメカニズムで再現し、その詳細を検討することで分裂という現象を起こすために必要な最小限の要素とは何かを解明するというものである。今までの研究において、主に三つの方法によって分裂を起こすことに成功している。一つは、温度を増加させることで分裂させるというもの。二つ目は、疑似原始細胞内外の浸透圧を変化させることで分裂を誘導するというもの。三つ目は、疑似原始細胞表面を構成する界面活性剤分子を増加させることにより分裂を誘導させるというものである。しかし前者二つは人為的に分裂を誘導しているため人工細胞の構築を目指す上で不適であるとされ、以降の研究では三つめのアイディアである界面活性剤分子の増加による分裂の誘導に焦点が当てられた。</p> <p>この分裂システムの欠点は、主に二つある。一つは分裂してできた娘細胞が一向に成長しないことにある。しかし最近の研究において、vesicle 内に DNA を混入し分裂後 PCR をかけることで娘 vesicle 内にある DNA を増幅させ、それが最終的に vesicle の成長に繋がるという研究成果が報告され、一定の解決をみた。しかし二つ目の欠点である、分裂のタイプを自在にコントロールすることはいまだ達成されていない。それはつまり、この分裂のメカニズムが何の要因で支配されているのかが未だに判明していないことを意味する。そこで本研究では、分裂に関わりのありそうな要素を全て列挙し、それら进行操作することで分裂タイプのコントロールを目指し、分裂システムを支配する要因を突き止めることを目的とした。</p>			

本研究では、まず顕微鏡での観察が可能な大きさでかつ一ヶ月以上その状態を維持できるほどに安定した droplet の構築を目的として実験を行った。その結果、二種類の droplet でその目標を達成することができた。一つは、Mineral oil (MO) に Span80 と Tween80 の混合界面活性剤を添加することで作られた droplet である。もう一つは Liquid paraffin (LP) に同混合界面活性剤を添加して作られたものである。以降の実験では、主にこの二つの droplet を用いて実験を展開していった。

分裂を起こすためには、droplet の表面積増加を引き起こさねばならない。そのトリガーとして p-nitrophenyl palmitate (pNPP) の使用が考えられた。この物質は、加水分解により droplet 表面を構築することのできる界面活性剤 palmitate が産生される。この反応を利用し、droplet 表面に存在する界面活性剤分子を増加させることで表面積が増加を狙った。その結果、両者の oil で共に分裂が観察され、さらに oil の粘度、温度、droplet 内部の pH をさまざまに変えることで不等分裂、等分裂、出芽など自在に分裂のタイプをコントロールすることに成功した。このことから、分裂タイプをコントロールするためにはそれら三つの要素が重要である可能性が示唆された。さらに、これらの要素について詳細に検討した。まず droplet 内部を構成する液体の pH を 8-13 に変化させて、分裂の可否とそのタイプを調べた。その結果、droplet を作成してから 20 時間以内に LP では pH10 以上、MO では pH11 以上で分裂が見られた。しかし、pH をいかに変化させても分裂タイプはどちらも変化が見られなかった。このことから pNPP の加水分解が分裂のトリガーとなっていることが証明されたが、分裂タイプをコントロールする要因ではないことが明らかとなった。次に pH を 12 で固定し、温度を 25°C-50°C で変化させた。25°C において、LP では出芽、MP では不等分裂が見られたが、温度を上げていくとそれぞれに変化が見られた。LP では 40°C 以上で droplet が爆発したが、それ以外では分裂に変化が見られなかった。一方 MO では 30°C の時点で等分裂、40°C で出芽が見られ、45°C 以上で droplet が爆発した。この結果から、温度が分裂タイプを決める大きな要因となっていることが明らかになった。最後に温度を 25°C に固定し、粘度を変化させることで分裂タイプの変化を調べた。粘度変化は MO と LP を混ぜることで調節した。その結果、粘度の高い MO のみでは不等分裂であったのが、LP を混ぜ合わせ徐々に粘度を下げていくことで分裂のタイプは等分裂に近づいていった。これは、粘度が分裂タイプを決定する大きな要因となっていることを示している。以上これらの結果より、温度と oil の粘度が分裂タイプを決定する大きな要因となっていることが示された。

これら温度と oil 粘度が分裂の際に、droplet にどのような影響をもたらしたかを突き止めることで、分裂タイプを決定する最も重要なパラメータが判明すると考えられる、実際の細胞分裂において、突き止められたパラメータがどのような役割を果たすか？これを検討することで、最も単純な分裂システムと考えられる本分裂システムではなく現在の分裂システムを構築した答えの一つが見えてくるかもしれない。

目次

1. 序論

1.1 合成生物学 7
1.2 細胞分裂発見の歴史10
1.3 細胞質分裂10
1.4 人工分裂システム11
1.5 補足13

2. 材料と方法

2.1 試薬14
2.2 Na-phosphate buffer の作成14
2.3 両親媒性 droplet の合成14
2.4 共焦点顕微鏡を用いての droplet 観察14
2.5 palmitate 濃度の測定15
2.6 分裂に必要な最小 palmitate 濃度の測定15
2.7 droplet の直径測定15
2.8 droplet の体積と表面積の測定16
2.9 使用した oil の粘度測定16
2.10 界面活性剤 1 分子の表面積の計算17
2.11 自由エネルギー変化 ΔG の計算18
2.12 表面張力の計算19
2.13 統計解析20

3. 結果

3.1 droplet 合成21
3.2 分裂システムの構築23
3.3 各 pH ごとの粒径変化25
3.4 共焦点顕微鏡用いての分裂の観察29
3.5 palmitate 濃度上昇に伴う droplet が分裂する割合の推移33
3.6 分裂時に起こる droplet の表面積と体積それぞれの変化36
3.7 分裂直前の界面活性剤 1 分子の表面積変化38

3.8	本分裂システムを支配する物理パラメータの特定40
3.8-1	水相 pH は droplet の分裂タイプ決定にほとんど寄与しない	
3.8-2	温度は分裂タイプのコントロールに寄与する	
3.8-3	粘度は分裂タイプのコントロールに寄与する	
3.9	温度が分裂時に droplet に与える影響48
4.	考察	
4-1	分裂時、droplet の体積が元の droplet に比べ減少している49
4-2	アルカリ性 pH は pNPP の加水分解に対してのみに影響を与える49
4-3	oil の粘度は droplet の表面張力に影響を与えている50
4-4	温度は droplet の表面張力に影響をおよぼしている51
4-5	温度と oil の粘度は、droplet の表面張力に影響を与え、droplet の表面張力は droplet 膜に蓄積できる palmitate 分子の限界占有面積に影響を与えている52
4-6	表面張力と C.C.とは相関関係にあり、ひいては droplet 膜に蓄積できる palmitate 分子の限界占有面積と表面張力に相関関係がある54
4-7	本分裂システムのメカニズム54
4-8	分裂タイプ変化のメカニズム55
4-9	膜相分離により寄与される分裂への影響56
5.	本研究のまとめと今後の展望	
5-1	本研究のまとめ58
5-2	固定性分裂終了細胞群の分裂誘導60
5-3	原始の細胞が行っていた分裂システムから現在の細胞が行っている分裂システムへと変化した進化の道筋を辿る60
6.	謝辞64
7.	参考文献65

略語表

MO	Mineral oil
LP	Liquid paraffin
Span80	Sorbitan monooleate
Tween80	Polyoxyethylene sorbitan monooleate
pNPP	p-nitrophenyl palmitate
DLS	動的光散乱法
DIC	微分干渉顕微鏡
C.C.	分裂に必要な界面活性剤の最小濃度
W/O	Water in Oil
O/W	Oil in Water

1. 序論

1.1 合成生物学

生命とは何か？この謎にせまるために昨今、生命の最小単位である細胞の形から反応、機能を疑似的に再構築し、どのようにして生命が誕生したかその根源を探る研究が活発に行われている。この実験系の提示と理論的解明は、生物学だけでなく、物理学や化学、数理、計算機科学など、それぞれの方法論を活用することで優れた成果が生み出されてきている。合成生物学は、その研究分野の一つとして誕生した。

合成生物学という言葉が初めて用いられたのは 1910 年のこととされているが、当時は「合成生物学の達成すべき目標は生命体に似た形態や構造を生むことのできる物理化学的諸力や条件の認識である」として、現在とはやや異なるニュアンスで用いられていた (Le Duc, 1911)。その後、1970 年初頭に遺伝子工学的手法が確立されると、合成生物学について、現在と同様の概念が提唱されるようになった。その概念とは、「制御因子を組み込み、新しくアレンジされた新規のゲノムを作成する」というものである (Szybalski, 1974)。2000 年代に入り、分子生物学や化学、計算論などの数理的研究といった学問分野における発展を反映し、「生体システムを設計し構築する」ことを主題とする研究が盛んに行われるようになると、こうした研究分野に対して「合成生物学」の用語が当てられるようになった (Benner and Sismour, 2005)。現在、合成生物学的研究は二つの研究に大別される。一つは「創ることで生命現象を理解しようとする研究」であり、二つ目は「有用な生体システムの創出を目的とする研究」である。本研究での合成生物学的アプローチは前者を目的としたものであるが、生命現象を理解するという目的は、従来の解析的アプローチでも目的とするところである。この両者のアプローチの違いは次のような例えを用いて説明できる。未知のシステムで動く機械の仕組みを知るときに、既に完成された機械を分解し、何の部品がどのように構成され、その構成からどのような作用と効果がもたらされているのか調べる方法が従来の解析的アプローチであり、一方で合成生物学的アプローチにおける「創ることで生命現象を理解しようとする研究」とは、部品を設計して作ったり、市場に流通している部品を購入したりして、それらの部品を組み合わせることでその機械を実際につくってみることで機械のメカニズムを知る方法に該当する。解析的アプローチは従来から世界中で行われており、生命についてその構造や得られる作用効果のメカニズムなどが次々と明らかになっている。しかし、同時に解析的アプローチでは答えを得るまでの道程が長く困難であるテーマも認識されてきた。そのテーマの一つとして挙げられるのが、組織または細胞が機能するために必要な最低限のコンポーネントは何か？ということである。例えば、細胞分裂の機能には多くの構造が絡んでおり、機能実現に必要なコンポーネントがどれか理解するには、一つ一つの構造の機能抑制を行い、その機能の抑制が細胞分裂にどのような影響をおよぼしたかを精査しなければならな

いため、膨大な時間と費用が必要になるからである。このため、合成生物学的アプローチから、生命を構築する組織または細胞の機能を単純な構成で再現することを試み、機能再現に成功した構成がもたらす複数の作用のうちどの作用が該機能を再現するのに必須であったかを精査し、その機能が組織または細胞でも同様の作用をしているかを検討する。このように単純な構成がもたらす作用と生体がもたらす作用の共通点を明らかにすることで、その機能実現のための最重要な作用を理解する。これが生命の機能の最小限の要素を理解することにつながる(図 1)。

本研究では、生命の最小単位である細胞に注目した。細胞は代謝や分裂、タンパク質産生などの機能によって、その状態を維持している。それらの機能の内、単細胞生物では個体増殖につながり、多細胞生物では成長につながる、生命体にとって必須の機能とされる細胞分裂に本研究では焦点を絞り、生物学的な手法を用いず、物理的作用や化学的手法で細胞分裂の機能を再現し、そのメカニズムの解明を目指した。

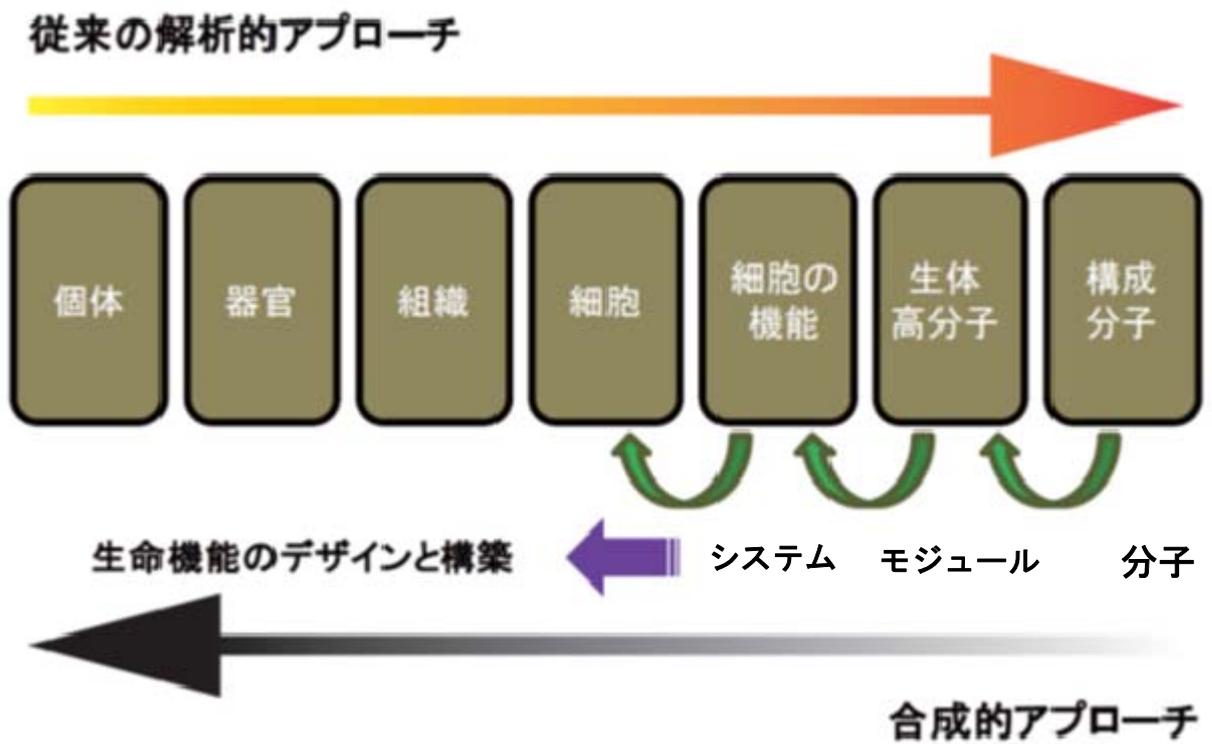


図 1. 解析的アプローチと合成生物学的アプローチの違い

1.2 細胞分裂発見の歴史

細胞分裂は、1858年にドイツ病理学者 Rudolf Virchow が「細胞は細胞分裂によってのみ生じる」と提唱することでその存在が認知された。しかし、それまで一般的に考えられていた「細胞は無定形の液体状態の物質の中に新生する」という自由細胞形成理論がその時点ではまだ大きな勢力を持っていた。この自由細胞形成理論については、1882年に Walther Flemming が報告した細胞分裂の高度に正確な記述と解釈で完全に否定された (Paweletz, 2001)。Flemming が開発した細胞を固定し染色する技術は、細胞の増殖が有糸分裂の過程によって親から娘細胞への染色体の伝達であること、細胞体の分裂が増殖の最終的なできごとであることを明らかにした。また有糸分裂の完全な記述により、染色体数が次世代に一定に保たれることが明らかになった。この有糸分裂について、1920–1970年にかけて顕微鏡観察により詳細にふるまいを追跡することで有糸分裂の大まかなメカニズムについて把握され (Bajer and Molè-Bajer, 1972; Ris, 1943; Ris, 1949; Schrader, 1953; Wilson, 1928; Östergren, 1951)、以降の研究では有糸分裂や減数分裂の研究が盛んにおこなわれた。本序論ではそこには触れず、本研究の根幹に関わる、1つの細胞が2つの娘細胞に増える、生命にとって個体の増殖や成長につながる細胞質分裂に焦点を絞って以降では説明する。

1.3 細胞質分裂

動物細胞の細胞分裂では、複製された染色体が分裂装置によって両極に運ばれた後、赤道部分の細胞膜がくびれて細胞質が二分される。くびれ部分の膜直下には、収縮環とよばれる構造体が存在する。収縮環は1968年に Tom Schroeder がクラゲの卵細胞が分裂するときにくびれ部分に微細繊維の束が存在することを電子顕微鏡で観察し (Schroeder, 1968)、1971年にその主な成分が actin filament であることを明らかにした (Perry et al., 1971)。1977年には、細胞質分裂は actin と myosin の相互作用により生じることが明らかにされた (Mabuchi and Okuno, 1977)。収縮環が収縮するメカニズムについて、収縮の可能な分裂溝の単離を行い、*in vitro* で検証したが、詳細が解明されることはなかった (Yonemura et al., 1991)。2013年に入り、分裂酵母を用いて収縮環を含む細胞ゴーストの単離に成功し、ATP の添加により収縮環が *in vivo* における速度の30倍もの速さで収縮することが報告され (Mishra et al., 2013)、収縮環が自律的に収縮する構造であることが示された。

収縮環が自律的な装置であることは、収縮環の位置決定のメカニズムからも示唆されている。さまざまな生理学実験から収縮環の位置は、細胞表層上に最初から固定されているのではなく、分裂後期の分裂システムによって決定されることが明らかにされている。このような分裂システムによる収縮環形成の空間的制御は、核分裂と細胞質分裂の協調において中心的な役割を果たしている。細胞質分裂の分裂面は、二つの星状体の中心を結ぶ線分の中点を通り、その線分に垂直であるように形成される。

これが、収縮環と分裂装置の通常的位置関係である。しかし、ウニ受精卵を使った実験で、細胞を変形させたり分裂装置の配置を変えたりすると、収縮環と分裂装置が通常とは異なる特殊な位置関係をとることがある。例えば、卵を円錐状に変形させ、紡錘体軸が円錐軸と垂直になるように分裂装置を配置すると、二つの星状体の間に、通常的位置関係を持つ分裂溝が出現する。一方で、円錐軸と分裂装置の間に、もう一つ余分な分裂溝が出現する (Rappaport and Rappaport, 1994)。その分裂面は紡錘体軸に平行であり、両者は 50 μ m ほど遠く離れていた。したがって、分裂面は必ずしも紡錘体軸に垂直ではなく、二つの星状体の中点を通っているわけでもない。また、細い管に押し込めて円筒状に変形した卵で分裂装置を連続的に往復運動させると、運動路の中点付近に分裂面を持つ分裂溝が一つ出現する (Rappaport, 1997)。つまり、分裂システムが静止していなくても、表層に働きかけて収縮環形成を引き起こすことが可能であることが判明した。このように、収縮環と分裂装置の位置関係は条件によってさまざまに変化するので、分裂酵母に備わる収縮環は細胞環境によらず自律的に収縮できる構造であることが明らかにされている。

細胞内環境に応じてフレキシブルに機能する収縮環は、単純な構造であったと考えられる初期の細胞に存在していた可能性は低く、進化の過程において後付けで生まれた構造であると考えられている。原始時代に存在していた菌は、分裂システムやそれを支える収縮環、微小管や中心体を持っておらず、外環境から加えられたせん断力などにより分裂を強いられるだけであったと推測される (Szostak et al., 2001)。実際に外環境から加えられたせん断力により、droplet が分裂したことは報告されている (Groeneweg et al., 1994; Janssen et al., 1994)。原始細胞はさまざまな分子を取り込み、現在の細胞機能のメカニズムよりもはるかに単純な機構を持ち、現在と異なるメカニズムの分裂や代謝の機能を持っていたと考えられている (Monnard and Deamer, 2002)。では、単純な機構を持った原始細胞は、どのようにして分裂を行っていたのか？そして、分裂が現在の分裂メカニズムと異なるとすれば、現在の分裂システムに進化を遂げた理由は何だったのか？本論文では、細胞分裂のための最小限のコンポーネントを探索した結果を示すとともに、その考察を最後に述べる。

1.4 人工分裂システム

合成生物学からのアプローチで分裂現象のメカニズムを解明するために、疑似原始細胞と見立てた vesicle や micelle が自律的に分裂するシステムを構築することにした。そして、vesicle や micelle が分裂するために最も重要な作用を明らかにしその作用を生じさせる最小限の要素を解明することを目指した。

これまでに、主に 3 つの方法によって vesicle や micelle を分裂させることが報告されている。一つは 1991 年に E. Sackmann により初めて報告された温度変化で分裂を誘導する方法である (Kas and Sackmann, 1991)。後の研究で、温度上昇が vesicle の表面張力を大きく減少させていることが示唆された (Baumgart et al., 2003)。二つ目は 1984 年に宝谷紘一氏により初めて報告された浸透圧変化によって分裂を誘導する方

法である (Andes-Koback and Keating, 2011; Hotani, 1984; Yanagisawa et al., 2008)。後の研究で、浸透圧をさまざまに変化させることにより、vesicle の形をチューブ状やネックレス状などに大きく形を変え、表面積を増加させたことを報告している (Zhu and Szostak, 2009; Zhu et al., 2012)。三つ目は micelle や vesicle の表面を構成する界面活性剤分子を増加させることで、表面積を増加させ分裂を誘導する方法である。1922 年に Gray が oil droplet の表面積を増加させることで分裂を誘導できることを提唱した (Gray, 1922)。その後、P. L. Luisi らによりそのアイデアが具体化された。そのアイデアとは、reverse micelle 内に化学物質を取り込ませ、その化学物質が reverse micelle 内で化学反応することを起因として自発的に分裂が生じるというものである (Bachmann et al., 1990; Bachmann et al., 1991)。数年後、同研究グループにより vesicle に加えられたオレイン酸無水物が加水分解されることによりオレイン酸を生じさせ、そのオレイン酸により誘導された分裂が微分干渉顕微鏡により観察された (Bachmann et al., 1992; Walde et al., 1994; Wick et al., 1995)。顕微鏡画像の解像度の悪さのために、報告には疑念が残るものの、分裂が誘導されたことを示唆する報告であった。解像度の問題については、以降の顕微鏡技術の進歩により明確に vesicle が分裂している像が捉えられ、解決されている (Suzuki et al., 2007; Takakura et al., 2003; Takakura and Sugawara, 2004)。

以上、vesicle や micelle を疑似原始細胞とした系で三つの分裂システムが確立された。しかし前者二つは、温度または浸透圧を急激に変化させており、環境を操作することで分裂を誘導しているため自律的な分裂とは言い難い。したがって、それ以降の研究では、三つめのアイデアである界面活性剤分子の増加による自律的な分裂の誘導が最もシンプルな自己分裂モデルと考えられた。

この分裂システムには、欠点が二つある。一つは、分裂してできた娘細胞が成長しないことである。しかし最近の研究において、vesicle 内に DNA を混入し、分裂後 PCR 反応をおこなうことで娘 vesicle 内にある DNA を増幅させ、その DNA の増幅により最終的に vesicle を成長させるという研究成果が報告され、一定の解決をみた (Kurihara et al., 2011)。しかし二つ目の問題である、分裂タイプを自在にコントロールすることについてはいまだ達成されていない。つまり、分裂タイプのコントロールが達成できていないということは、分裂のメカニズムがどのような要因に支配されているかが判明していないということである。そこで本研究では、分裂に関わる要素を全て列挙し、それらの要素を操作することで分裂タイプのコントロールを目指し、達成された場合には分裂システムを支配する最重要な要因 (作用または構成) をつきとめることを目的とした。

1.5 補足説明

以降の記述において、micelle・droplet・vesicle という単語が頻出する。それらについてあらかじめ定義する。本論文では、micelle は直径 1-499 nm、droplet は直径 500 nm 以上の一重膜の界面活性剤分子で構成された膜を持つ会合体と定義する。vesicle は大きさに関係なく二重膜構造の界面活性剤分子で構成された膜を持つ会合体と定義する。

2. 材料と方法

2.1 試薬

本研究で使用した試薬は下記メーカーより購入した。

- ・リン酸三ナトリウム・12水和物 ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、Rhodamine B、Liquid paraffin、Span80、Tween80、Isocatane は Wako Pure Chemical Industry Co. (Japan) より購入した。
- ・Mineral oil と pNPP は MP Biochemicals Inc. (U.S.A) より購入した。

2.2 Na-phosphate buffer の作成

50ml ビーカー内に、純水を 50ml 入れた。0.95g (50 mmol) のリン酸三ナトリウム・12水和物を用意した純水の中に溶かした。pH メーターを見ながらリン酸を少しずつ加え、目標の pH に調整した。顕微鏡観察をする場合、この buffer に Rhodamine B を 0.17g (0.35 mM) 加えた。

2.3 両親媒性 droplet の合成

任意の oil (LP や MP など) を 8.78g、サンプル管に入れた。その中に Span 80 を 0.21g(0.49 mM) 加え、さらに Tween 80 を 0.01g (76 μM) 加えた。そのサンプル管内に用意していた Na-phosphate buffer を 1g と、pNPP を 0.35g (1 mM) 混ぜ、室温にて Vortex-Genie 2 を使用して 3 分間程度よく攪拌した。

2.4 共焦点顕微鏡を用いての droplet 観察

顕微鏡観察には、共焦点顕微鏡 LSM-7 DUO (Carl Zeiss, Inc., Germany) を用いた。サンプルをセットする前に、外環境 (incubation chamber 内) を所定の温度 (25°C もしくは 30°C) に調整した。その後、35mm のガラスベースディッシュ (IWAKI & CO., LTD, Japan) に準備した emulsion を加え、共焦点顕微鏡にそのディッシュをセットした。droplet に存在する Rhodamin B の蛍光を観察するため、543 nm の HeNe レーザーを使用し、40 倍の水浸対物レンズ (NA 1.2) を用いて観察した。Averaging は Line mode を適用し一方向に scan し、それを 4 回施行することで行った。Imaris ver 7.00 を使い、写真は tif 形式で、動画は avi 形式で取り込んだ。

2.5 palmitate 濃度の測定

emulsion は白く濁っているため、吸光光度計が放つ光が拡散してしまい正確な測定が不可能だった。そのため、emulsion の一部を異なるサンプル管に移し、アセトンで 20-25 倍希釈し、完全に透明化させた上で測定した。測定する物質は pNPP の加水分解によって產生される p-nitrophenolate anion である。p-nitrophenolate anion は 410 nm に吸収域を持っており、この物質の濃度を測定することで等量產生される palmitate の濃度を求めた。吸光光度計は島津製作所の UV-2400 PC で測定した。p-nitrophenolate anion の吸光度 A を濃度に換算する式は以下の通りである。

$$c = \frac{A}{\epsilon l}$$

c : p-nitrophenolate anion の濃度

A : p-nitrophenolate anion の吸光度

ϵ : p-nitrophenolate anion のモル吸光係数

l : セルの光路長

このとき、 ϵ の値は文献 (Morgenstern et al., 1965) を参考に 1.8×10^4 で計算した。

2.6 分裂に必要な最小 palmitate 濃度の測定

合成した emulsion の一部を 2.4 章に記述した方法で顕微鏡観察に使用し、視野内で分裂が初めて観察されたその時点の palmitate 濃度を 2.5 章に記述した方法で測定した。この濃度を critical concentration for division (C.C.) とした。

2.7 droplet の直径測定

droplet の粒径は 2 つの方法を用いて測定された。

1. 準備した emulsion の一部を専用のサンプル管に入れ、Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, England) を用いて動的光散乱法 (DLS) により粒径を求めた。
2. 顕微鏡により撮影された emulsion の画像を image J を用いて解析し、droplet または micelle の直径を測定した。

上記の方法により測定した直径は Excel にそれぞれ別個にまとめ、一覧にした上で、統計ソフト R ver.3.01 を用いてヒストグラムにした。このとき Excel ファイルは統計ソフト R でも認識できるように拡張子 csv で出力すること。プログラミングの詳細は

以下の通りである。

1. C:/Users/... ---測定した直径一覧が掲載された Excel ファイルの場所を指定
2. d<-read.csv ("...") ---このコマンドで d を(...)と指定する。
3. hist (d) ---ヒストグラムの表示
4. par (new=T) ---グラフの上書き
5. plot (density (d)) ---密度関数の表示

4 と 5 の手順については必要に応じて行った。

上記の方法により出力されたヒストグラムを tif 形式で画像出力し、Adobe illustrator CS6 にて編集を行った。

2.8 droplet の体積と表面積の測定

共焦点顕微鏡を用いて、droplet が分裂するさまをタイムラプスと z-stack を合わせて撮影した。取得された動画から、分裂前の droplet と分裂直前の形が変形した droplet、この二つの画像を抽出した。それらの画像を image J にて 3D 化し、image J の機能である sync measure 3D を用いて解析した。

2.9 使用した oil の粘度測定

oil の粘度は Ostwald 粘度計を用いて測定した。使用した粘度計は、純水が標線を約 20.2 秒で通過するものだった。oil の温度を所望の温度とするため、恒温槽を用いた。Ostwald 粘度計に測定する oil を流し、oil が恒温槽の温度と同じになるように 30 分間放置した。その後 oil を標線上まで吸い上げ、自然落下により標線を通過するまでの時間を計測した。同様の実験を 3 回繰り返し、その時間の平均を以下の式に適用し比粘度を求めた。なお、下記の式における粘度係数とは、その液体の密度と液体が標線を通過するのにかかった時間との積である（具体的には粘度係数を η 、液体の密度を ρ 、液体が標線を通過するのにかかった時間を t とするなら、 $\eta = \rho t$ となる）。

$$\eta_r = \eta / \eta_w$$

η_r 相対粘度
η oil の粘度計数
η_w 水の粘度計数

2.10 界面活性剤 1 分子の表面積の計算

droplet の膜を構成する界面活性剤 1 分子が占める表面積を計算した。

まず溶液内に何個の droplet が存在するか計算した。これは実験で使用した水の総量 ($1 \times 10^{-6} \text{ m}^3$) を droplet の体積で割ることで算出した。

$$N_D = 1 \times 10^{-6} (\text{m}^3) \div V_D$$

次に界面活性剤分子の数を求めた。

$$N_S = M \times N_A$$

以上より求めた N_D と N_S を用いて droplet 一個あたりが保有する界面活性剤分子の数を求めた。

$$N_{SD} = N_S \div N_D$$

最後に droplet の表面積を N_{SD} で割ることで界面活性剤 1 分子あたりの表面積を求めた。

$$S_S = S_D \div N_{SD}$$

* droplet の体積と表面積は、2.8 で測定したデータを用いた。

V_D :	droplet の体積
S_D :	droplet の表面積
N_D :	溶液内の droplet の総数
N_S :	溶液内に存在する界面活性剤分子の総数
N_{SD} :	droplet 1 個あたりが保有する界面活性剤分子の数
S_S :	界面活性剤 1 分子が占める表面積
M :	界面活性剤の mol 濃度
N_A :	アボガドロ定数

2.11 自由エネルギー変化 ΔG の計算

分裂する前と後での自由エネルギー変化を計算した。グラフは Mathematica (Wolfram Research, U.S.A) を用いて出力した。

まず水相界面の自由エネルギーを求めた。この値は界面への静電的作用 (γ_{es}) と化学寄与 (γ_{ch}) の和にほぼ等しいため、これら二つの値を算出した。

γ_{es} を求めるために D.Y.C. Chan と D.J. Mitchell が完成させたコロイド粒子の界面自由エネルギーを算出する式 (1) を使用した (Chan and Mitchell, 1983)。

$$\gamma_{es} = \frac{\sigma\phi_s}{2} + K_B T \Gamma \ln\left(1 - \frac{|\sigma|}{e\Gamma}\right) \quad \dots (1)$$

しかし面電荷密度 σ と表面電位 ϕ_s が未知であるため、このままでは計算できなかった。この二つのファクターの関係式は参考文献 (Chan and Mitchell, 1983) より

$$\sigma = \frac{-e\Gamma K_a}{K_a + [H^+] \exp\left(\frac{-e\phi_s}{K_B T}\right)}$$

もう一つの参考文献 (Browne et al., 2010) より

$$\sigma = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon (1 + \kappa R) \phi_s}{R}$$

つまり

$$\frac{\phi_s \varepsilon_0 \varepsilon^* (1 + \kappa^* R)}{R} = \frac{-e\Gamma K_a}{K_a + [H^+] \exp\left(\frac{-e\phi_s}{K_B T}\right)} \quad \dots (2)$$

*

$$\varepsilon = 5321 \times T^{-1} + 233.76 - 0.9297 \times T + 0.1417 \times 10^{-2} \times T^2 - 0.8292 \times 10^{-6} \times T^3$$

**

$$\kappa = \sqrt{\frac{2C_s e^2}{\varepsilon_0 \varepsilon k_B T}}$$

水の比誘電率 ε は温度によって、その値を変える (Catenaccio et al., 2003)。よって、上記の式から所定温度における水の比誘電率を求めた。

その上で (2) 式から ϕ_s を、Mathematica を用いて数値解析した。

その値から σ を求め、表面自由エネルギーの計算式に代入した。

$$\gamma_{es} = \frac{\sigma\phi_s}{2} + K_B T \Gamma \ln(1 - \theta^*) \quad \dots (3)$$

$$* \theta = \frac{|\sigma|}{e\Gamma}$$

次に界面自由エネルギーを求めた。

$$\gamma_{ch} = \frac{k_b}{2R^2}$$

水相界面全体の自由エネルギーは以上より求めた γ_{ch} と γ_{es} を足し合わせることで求めた。

$$\gamma = \gamma_{es} + \gamma_{ch}$$

自由エネルギー変化 ΔF は、分裂前の droplet と分裂後の droplet それぞれの自由エネルギーを算出し、以下の式に代入することで求めた。

$$\Delta F = 4\pi R_0^2 \left[\frac{R_0 \gamma(R)}{R} - \gamma(R_0) \right]$$

このとき、 R_0 は分裂前の droplet の半径、 R は分裂後の droplet の半径である。

2.12 表面張力の計算

表面張力と表面自由エネルギーは、その名の通り力とエネルギーの関係だが、その単位に注目すると両者は同じものを示すということが分かる。表面張力の単位は、mN/m。一方で表面自由エネルギーは単位面積当たりの自由エネルギーなので、mJ/m²となる。定義として 1J = 1N・m であるため、表面張力の単位である mN/m の分子と分母それぞれに距離 m をかけることで単位の次元が揃うことが分かる。

$$\begin{aligned} \text{mN/m} &= \text{m} \cdot \text{mN}/(\text{m} \cdot \text{m}) \\ &= \text{m} \cdot \text{mN}/\text{m}^2 \\ &= \text{mJ}/\text{m}^2 \end{aligned}$$

ここで 2.11 にて記述した (3)式に注目したい。これは、単位面積当たりの自由エネルギー

ギーを求める計算式である。単位は J/nm^2 。よって J を mJ に nm^2 を m^2 に換算し、上記のように表面張力の単位に置き換えることで表面張力を求めた。

$$\epsilon_0 = 8.85 \times 10^{-12} (\text{真空の誘電率})$$

$$\epsilon = 78.3 \quad (25^\circ\text{C} \text{での水の比誘電率})$$

$$e = 1.602 \times 10^{-19} (\text{電気素量})$$

$$C_s = 10^{-(14 - \text{pH})} (\text{水相内の塩濃度})$$

$$\Gamma = 1 \quad (\text{droplet 膜を構築する界面活性剤の面密度})$$

$$k_B T = 1.38 \times 10^{-23} \times 298 \quad (25^\circ\text{C} \text{時の熱エネルギー})$$

$$K_a = 10^{-\text{p}K_a} (\text{酸解離定数})$$

$$H^+ = 10^{-\text{pH}} (\text{H}^+ \text{イオン濃度})$$

$$k_b \doteq 10^{-20} \quad (\text{droplet の曲げ係数})$$

$$\kappa \quad (\text{遮蔽距離})$$

$$\sigma \quad (\text{面電荷密度})$$

$$\phi_s \quad (\text{表面電位})$$

$$R \quad (\text{droplet の半径})$$

$$\gamma_{es} \quad (\text{表面自由エネルギー})$$

$$\gamma_{ch} \quad (\text{界面自由エネルギー})$$

2.13 統計解析

3 グループ間の有意差について、Excel に備わっているデータ分析ツールを使用し一元配置の分散分析を行った。

3. 結果

3.1 droplet 合成

生物の細胞膜は脂質二重膜で構成されているが、本研究では細胞分裂を生じさせる最も重要な作用を明らかにするため、より単純な構造である脂質一重膜構造の droplet を用いて細胞を再現することとした。これまでに疑似細胞を用いて分裂システムを再現した研究は多数報告されているが、用いられている疑似細胞は micelle や vesicle がほとんどで、droplet を用いての細胞分裂を再現した報告は少ない。したがって、分裂システムの構築を行う前に、安定的に顕微鏡観察可能な大きさの droplet を生成する条件を検討した。この実験では、isooctane、liquid paraffin (LP)、mineral oil (MO)、silicon oil の粘度が異なる 4 種類の oil と、3 種類の界面活性剤を検討した。isooctane には界面活性剤として Aerosol OT を、そして他の oil には界面活性剤として Span80 と Tween80 の混合液を組み合わせた (表 1)。

この実験により、oil の粘度が高くなるほど droplet の粒径が大きくなるという相関が見られた。また、LP と MO を用いた場合、それぞれ安定して顕微鏡観察可能な大きさの droplet を内在する emulsion を合成することができた。一方で、silicon oil は粘性が高すぎるため、どの界面活性剤を用いても攪拌することができず emulsion を合成することはできなかった。粘性の低い isooctane で作られた emulsion は非常に安定していたが、内在する micelle の粒径が 100 nm から 300 nm と小さすぎるために、顕微鏡で観察することが不可能であった。以上より、以降の実験では LP と MO を用いて進めた。

表 1. 合成された emulsion の物理特性

isooctane、LP、MO、silicon oil を用いて合成された emulsion の物理特性を示す。droplet または micelle の直径は DLS によって測定した平均粒径 (μm) を示す。粘度は 25°C において Ostwald 粘度計で測定した。relative viscosity については 2.9 章を参照。

*Silicon oil は粘度が高すぎるために粘度測定ができなかった。そのため公開されている情報を記載した。したがって、この値は相対粘度ではなく実粘度 (cSt) である。

	surfactant	relative viscosity	stability	diameter
Isooctane	Aerosol OT	0.72	over 1 month	0.1–0.3
Liquid paraffin	Span 80	4.965		0.8–1.1
Mineral oil	Twenn80	12.92		1.4–3.0
Silicon oil	Span 80 Twenn80	(1000)*	–	–

3.2 分裂システムの構築

疑似細胞が自発的に分裂を起こすことを報告した論文は多くある。それらの報告において、さまざまな化学反応を疑似細胞内で生じさせることで分裂を誘導しているが、すべて同じ理論に基づいている。すなわち、膜界面に存在する界面活性剤分子と同じ能力を持つ分子を化学反応により生み出し、それら新規に産生された分子が膜に取り込まれて表面積を増加させることで、疑似細胞は形を保てなくなり分裂を起こす。本研究でも、同様の理論に基づき分裂システムを構築した (図 2.a)。このとき、化学反応によって産生された界面活性剤分子の量を追跡できるようにするために、p-nitrophenyl palmitate (pNPP) を用いた。pNPP が加水分解されると、p-nitrophenolate anion と palmitate が生じる。この p-nitrophenolate anion は 410 nm に吸光ピークを持っているため、吸光度を測定し Lambert-Beer の法則を用いて計算することで(2.5 章参照)、p-nitrophenolate anion の濃度を求めることができる。pNPP 1 分子から p-nitrophenolate anion 1 分子と palmitate 1 分子が生じるので、計測された p-nitrophenolate anion の濃度は palmitate の濃度と同じである (図 2.b)。これが pNPP を使用した主な理由であり、droplet の膜に蓄積する palmitate の濃度追跡を可能としたことで、分裂に影響を与える要因を定量的に検討することが可能となった。

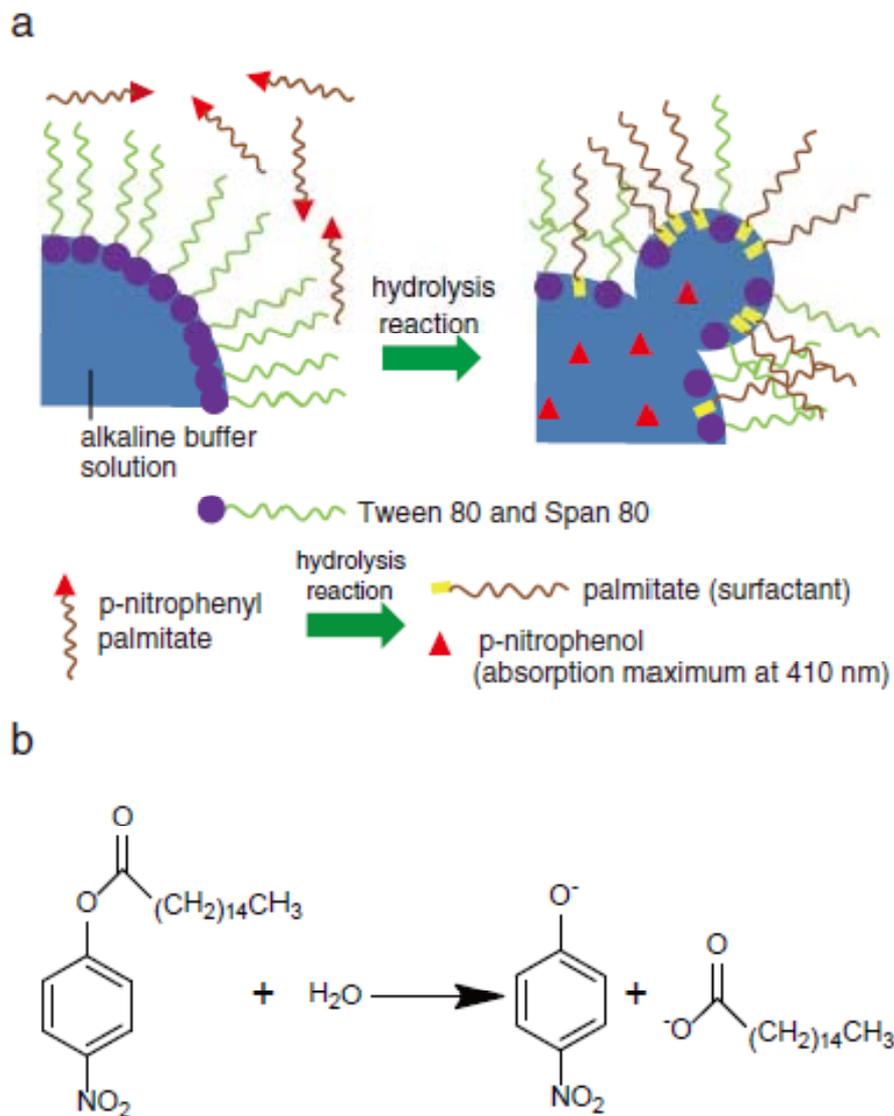


図 2. 分裂システムの概略図

a. pNPP が加水分解されて生じた p-nitrophenolate anion は vesicle 内に取り込まれ、palmitate は脂質膜に取り込まれる。脂質膜に取り込まれた palmitate は droplet 膜の表面積を増加させ、それによって vesicle の分裂がおこる。b. pNPP の加水分解を表した化学反応式。

3.3 各 pH ごとの粒径変化

emulsion 内には、大小さまざまな micelle や droplet が混在していることが考えられたので、全てのサイズの micelle や droplet の動的ふるまいを追跡するために、以下に記載する二つの手法を用いた。一つは、動的光散乱法 (DLS) を使用し粒径変化を時間毎に計測する方法であり、二つ目は顕微鏡を用いて micelle や droplet の粒径変化を計測する方法である。顕微鏡では μm サイズの droplet ならば粒径変化を追うことが可能だが、 nm サイズの micelle の粒径変化は追跡が不可能である。一方、DLS の測定可能な最小サイズが 1 nm であるので小さいサイズの micelle を計測することができる。以上より、LP と MO を用いて合成された emulsion では DLS と顕微鏡観察の両方で micelle や droplet の粒径を計測し、isooctane を用いて合成された emulsion では DLS で micelle の粒径を計測した。

DLS を用いた測定では、水相 pH を 8 から 12 までの範囲に調整し、pNPP を添加して MO、LP、または isooctane を用いて emulsion を合成して、合成直後と合成から 2 日後 (isooctane のみ) または 5 日後 (MO、LP) にそれぞれの emulsion 内の droplet または micelle の粒径を測定してヒストグラムに表した (図 3)。isooctane を用いて合成された emulsion では、いずれの水相 pH でも合成直後には直径 $150\text{-}200\text{ nm}$ 程度の粒径の小さな micelle が大半を占めた。2 日後には、水相 pH を 9 以上で $5\text{-}10\text{ nm}$ の微小 micelle 群が新たにあらわれ、合成直後に存在していた粒径の群が大きく減少しているか消失していた。また、この実験を繰り返し試行すると、合成直後の micelle の多くは直径 $130\text{-}150\text{ nm}$ を占めており、2 日後の micelle の多くが直径 $5\text{-}10\text{ nm}$ であることから、それぞれの条件で力学的に安定した粒径があると推測された。LP や MO を用いて合成された emulsion の観察からも同様の傾向が見られた。LP または MO を用いて合成された emulsion では、前者の平均粒径は $1\mu\text{m}$ 程度で、後者は $3\text{-}4\mu\text{m}$ 程度であった。emulsion 合成から 5 日後には、MO を用いて合成された emulsion では pH11 以上で、LP を用いて合成された emulsion では pH10 以上で、それぞれ粒径が大きな droplet 群の割合が減り、より粒径が小さな droplet の群が新たに現れた。一方で、水相 pH が中性の条件 (例えば pH8) では pNPP の加水分解が起きていないと考えられるが、その条件では isooctane を含めた 3 種類の emulsion で 2 日後または 5 日後に粒径が減少したケースはなかった。水相 pH が中性の条件では、2 日後または 5 日後に粒径が大きくなる傾向が見られたが、これは micelle 同士あるいは droplet 同士が接触して融合したためであると考えられる (図 3)。

次に顕微鏡観察を用いて、droplet 内部の pH が 8-13 の範囲において、dropletの中から無作為に選定した 50 個の直径を計測し、emulsion 合成直後と合成から 5 日後それぞれで大きさの分布についてのヒストグラムを作成した (図 4)。LP を用いて合成された emulsion では pH10 より高い pH において、MO を用いて合成された emulsion では pH11 より高い pH において、ほとんど全ての droplet の直径が小さくなっていた。また、droplet の分裂を顕微鏡で実際に観察することができた。これについては、後述

する (3.4 章参照)。さらに、pH に依存せず、分裂後 MO を用いて合成された emulsion では直径 9 μm 、LP を用いて合成された emulsion では直径 3 μm にそれぞれ多くの娘 droplet が分布することから、力学的に安定した droplet の粒径サイズがあると推測した。

以上より、顕微鏡観察および DLS による micelle や droplet の粒径変化の解析は、どちらも同様の結果を示した。また、高 pH において分裂が生じ、一方で中性 pH では micelle や droplet が分裂しなかったことから、pNPP の存在が droplet の分裂誘導に関与しているのではなく、本分裂システムは droplet 内部の pH 依存的に生じることが示唆された。さらに、図 3 において MO を用いて合成された droplet (平均粒径 1.5 μm) では、pH11 において 5 日後までに分裂が生じたが、isooctane を用いて合成された micelle (平均粒径 120 nm) では、pH9 において 5 日後までに分裂が生じていた。このことから、粒径の小さい droplet は分裂しやすいことが示唆された。

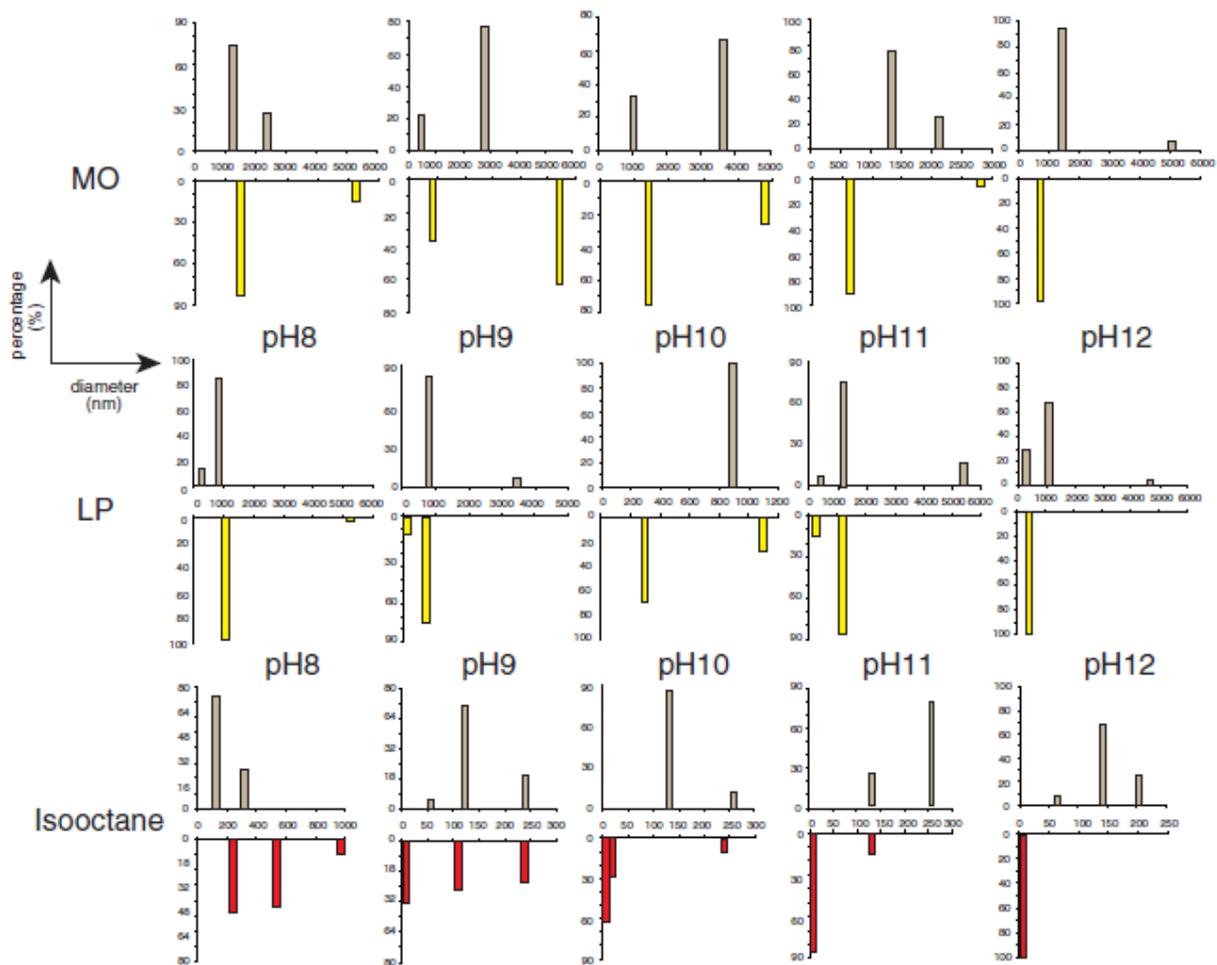


図 3. DLS 測定による粒径変化

一定時間経過後の droplet の粒径変化を DLS 測定により追跡した。MO、LP、isooctane で合成された emulsion において、それぞれ特定 pH を超えると粒径が大幅に減少した。灰色のヒストグラムは合成直後の粒径、赤色のヒストグラムは2日後、黄色のヒストグラムは5日後の粒径を示している。

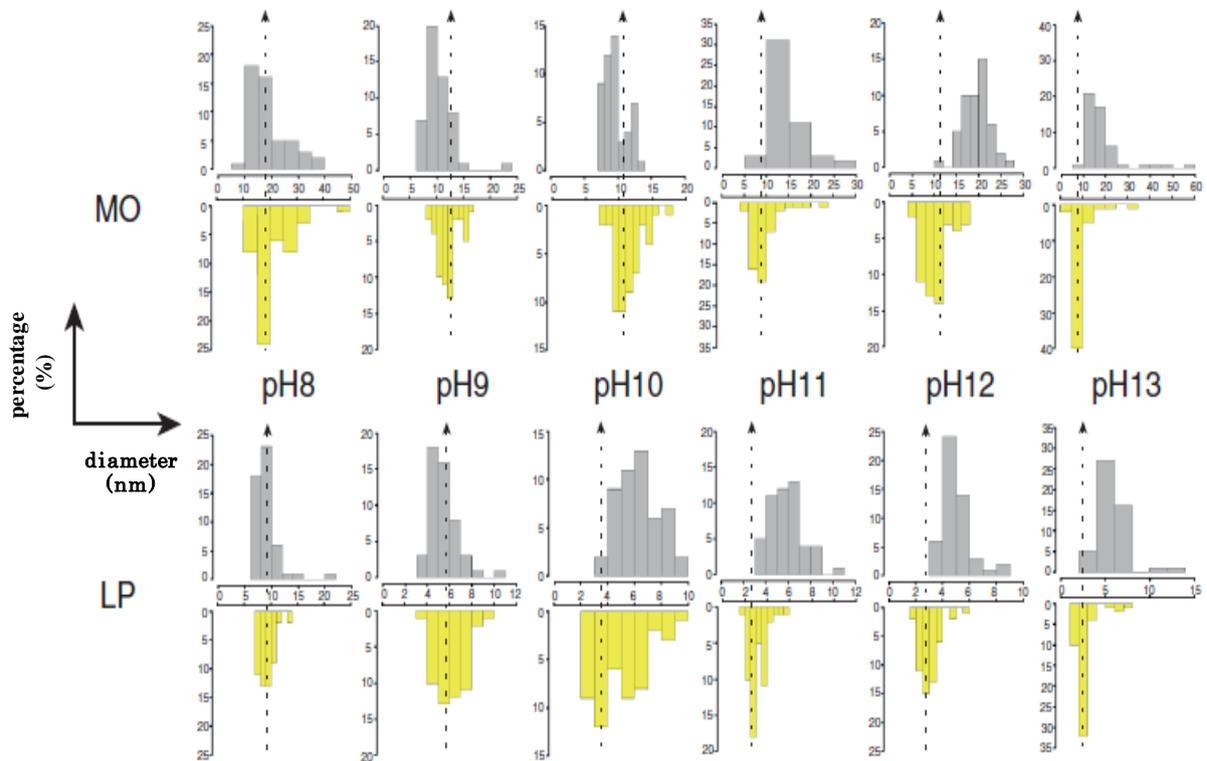


図 4. 顕微鏡視野での droplet の粒径変化

pH8 から pH12 までの条件で、顕微鏡を用い、micelle や droplet の粒径を計測した。灰色のヒストグラムは emulsion を合成直後の分布を示し、黄色のヒストグラムは合成してから 5 日後の分布を示している。破線は 5 日後に最も多く存在している粒径を表している。 $n = 50$ 。

3.4 共焦点顕微鏡を用いての分裂の観察

これまでに顕微鏡観察により擬似細胞の分裂を捉えたとする報告は数多くある。しかし、そのほとんどが微分干渉顕微鏡 (DIC) による観察である (Takakura et al., 2003; Takakura and Sugawara, 2004; Wick et al., 1995)。DIC は液体内に浮遊する vesicle の数が少なく、非染色の透明な物体を観察するのに適切な方法であるが、droplet が数多く浮遊している emulsion を使用した本研究においてその方法は不適切である (図 5)。なぜなら droplet は常にブラウン運動をしているため、時間経過により顕微鏡視野内から見えなくなる droplet、新たに視野内に現れる droplet が入り乱れ、分裂時に分裂した娘 droplet を追跡することが困難であるからである。よって本研究では droplet を Rhodamine B により着色し蛍光顕微鏡により観察することで、明暗のコントラストをはっきりさせ、droplet を明確に捉えることに成功した (図 6.a b)。

本実験では、oil の種類と温度、そして droplet 内部の水相 pH を変化させることで分裂を複数のタイプに変化させられることが判明した。まず等分裂について、MO を用いて合成された emulsion を使用し温度を 30°C、pH12 にすることで確認された (図 7.a)。不等分裂は、同じように MO を用いて合成された emulsion を使用し、温度 25°C、pH12 の条件で観察された (図 7.b)。微生物の一部が行う出芽とよく似た分裂 (以下、出芽と呼称) は、LP を用いて合成された emulsion を使用し温度 25°C、pH12 の条件で観察された (図 7.c)。また、MO を 40°C にすることでも出芽がみられた (図 7.d)。最後に MO を用いて合成された emulsion、LP を用いて合成された emulsion の両者で共通に観察されたものとして、温度 45°C 以上または pH14 の条件で、前者では pNPP の加水分解に依らず、後者ではその pNPP の加水分解速度が速すぎるために、droplet が爆発するという現象が見られた (図 7.e)。なお、どの分裂タイプにおいても、分裂はある時間を境に急激に進行する。それまでの間は、後述の図 8 に示されるように pNPP の加水分解が起こっているにもかかわらず、外見上 droplet の表面積および体積に変化は見られなかった。

一方で、対照実験として水相 pH をアルカリ性にして pNPP を加えなかった場合についても検証した。MO または LP で作られた emulsion は時間経過により水層と油層に相分離した。droplet は時間経過とともに増加し、隣接した droplet 同士が融合してサイズが増大した (図 6.a b)。以上の結果と 3.3 章の結果 (図 3、図 4) をまとめると、本分裂システムでは、高アルカリ pH 条件で pNPP が加水分解されることによって分裂が誘導されることが示唆された。

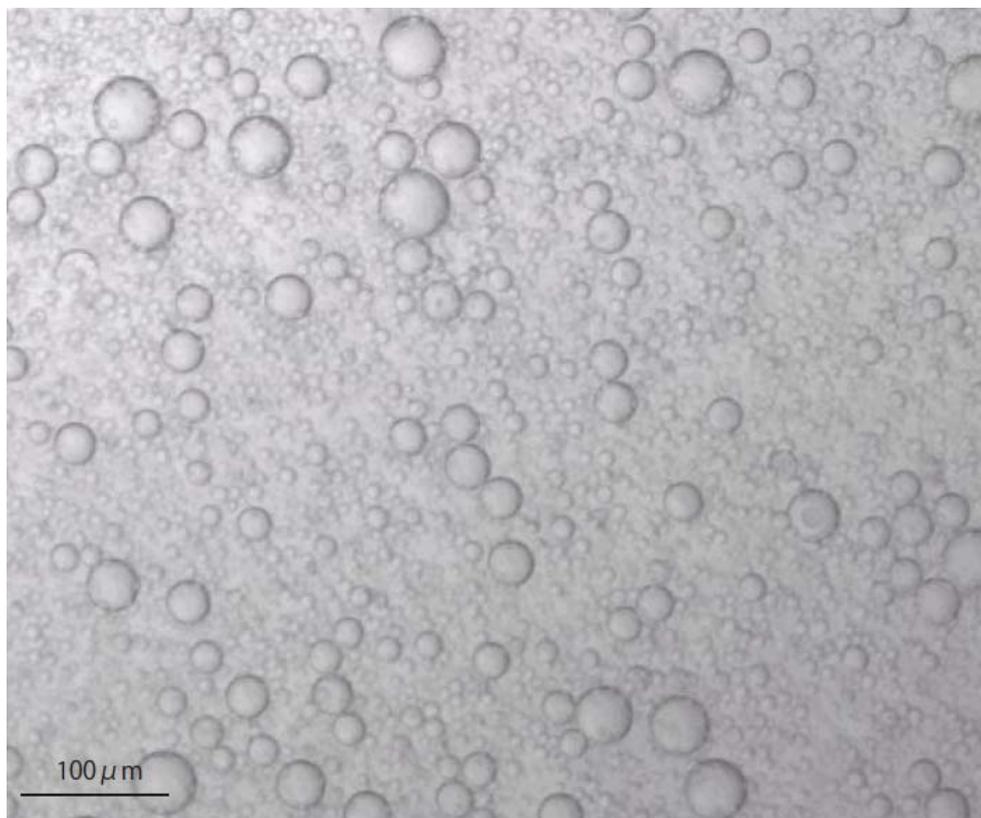
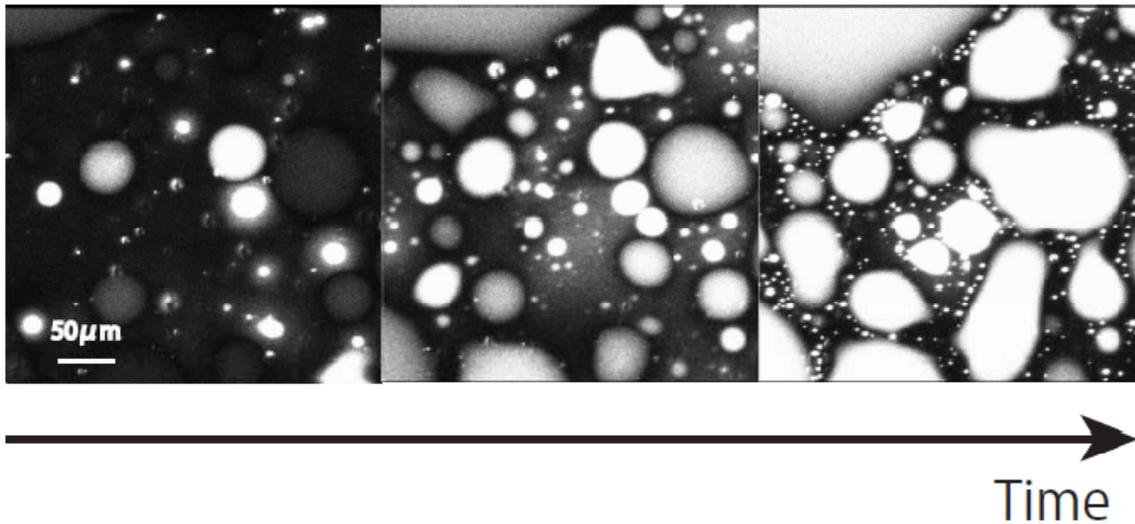


図 5. 微分干渉顕微鏡による emulsion 内部の観察

微分干渉顕微鏡により大小さまざまな droplet を観察することができた。しかし半透明化した droplet では分裂時に隣り合った droplet と娘 droplet の判別が困難であるので、本研究においてこの観察方法は不適と考えた。

a



b

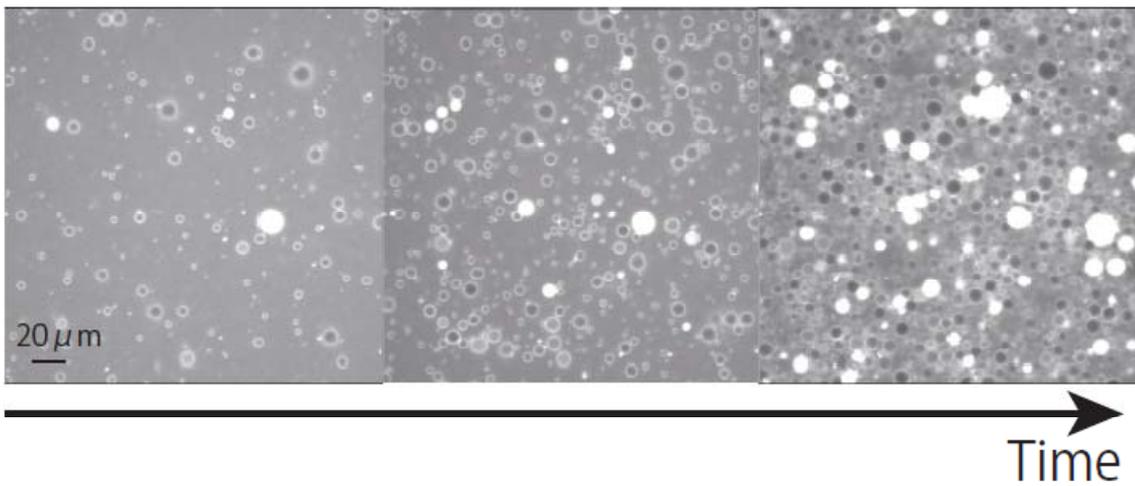


図 6. 蛍光顕微鏡による emulsion 内部の観察

Rhodamine B で着色し、emulsion 内部の droplet を蛍光観察した。a. MO を用いて合成された emulsion。b. LP を用いて合成された emulsion。a、b ともに pH12、pNPP は加えていない。

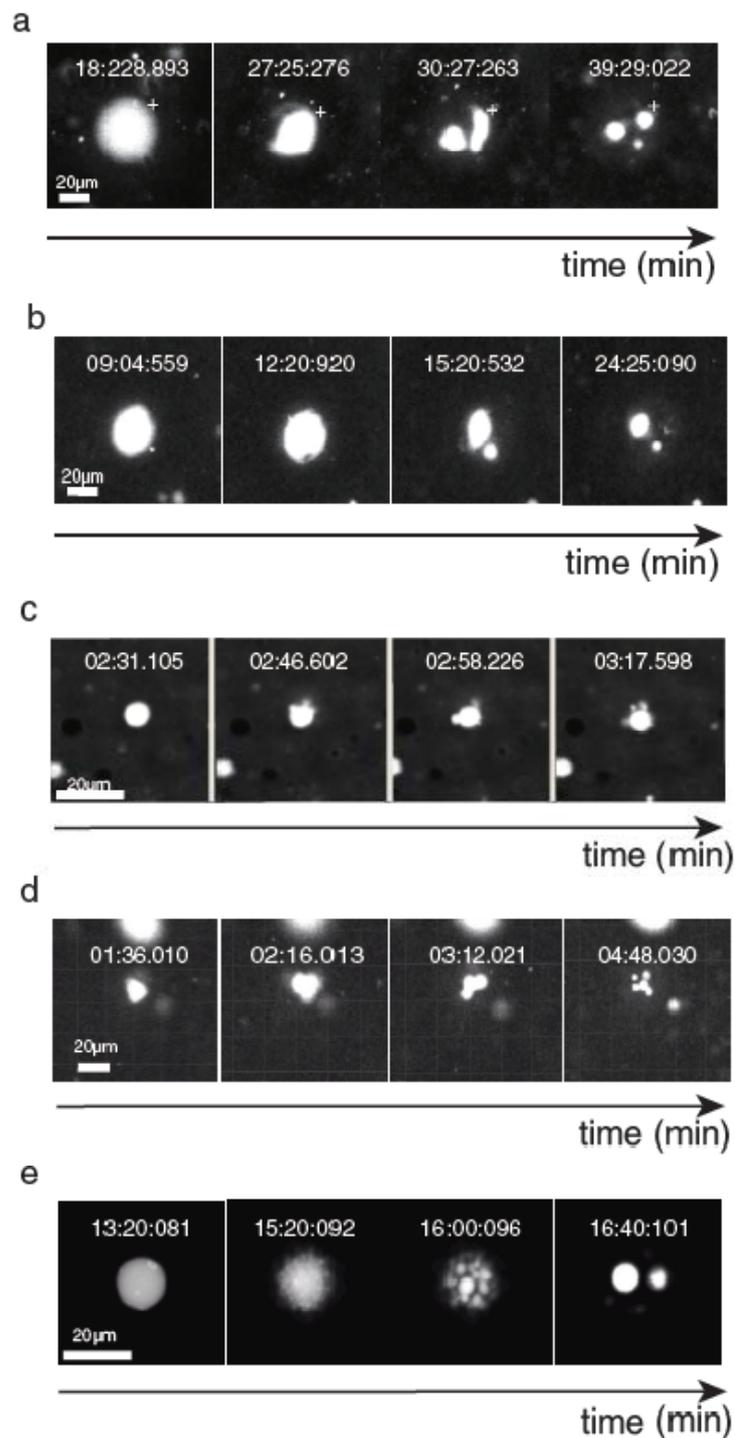


図7. 分裂タイプの変化

a.MO を用いて合成された emulsion 中で pH12、30°Cの条件で、droplet の等分裂が観察された ($n = 30$)。b.MO を用いて合成された emulsion 中で pH12、25°Cの条件で、droplet の不等分裂が観察された ($n = 31$)。c.LP を用いて合成された emulsion 中で pH12、25°Cの条件で出芽が観察された ($n = 31$)。d.MO を用いて合成された emulsion 中で pH12、40°Cの条件で c と同じ出芽と判断できる分裂を観察した ($n = 16$)。e.MO または LP を用いて合成された emulsion 中で 45°C以上、または pH14 の条件で droplet の崩壊が観察された ($n = 18$)。

3.5 palmitate 濃度上昇に伴う droplet が分裂する割合の推移

pNPP の加水分解により生じる palmitate が droplet の分裂に影響をおよぼしていることを明確にするために、emulsion 内で産生された palmitate 全体の濃度と droplet 全体の分裂の割合とに相関関係があるか否かを調べた。まず、LP を用いて合成された emulsion、MO を用いて合成された emulsion、それぞれの環境下における pNPP の加水分解のタイムコースを、吸光光度計を用いて測定した (図 8)。いずれにおいても emulsion を合成してから 13 時間以内までは、活発に pNPP が加水分解されていた。また、粘度の低い LP では粘度が高い MO よりも加水分解速度が大きかった。これは、高粘度条件では pNPP 分子の運動が小さいためであると推測できる。

droplet の分裂を観察するとき、分裂して生まれた娘 droplet が顕微鏡視野から外れてその姿を追跡できないことがある (図 9)。このため、分裂の割合を算出するとき、ある時点で急激にその体積を減少させた droplet だけを分裂したとみなした。その結果、palmitate 濃度が上昇するにつれて droplet が分裂する割合が増加することが明らかになった (図 10)。したがって、pNPP の加水分解により生じる palmitate の濃度依存的に分裂が行われることが示唆された。

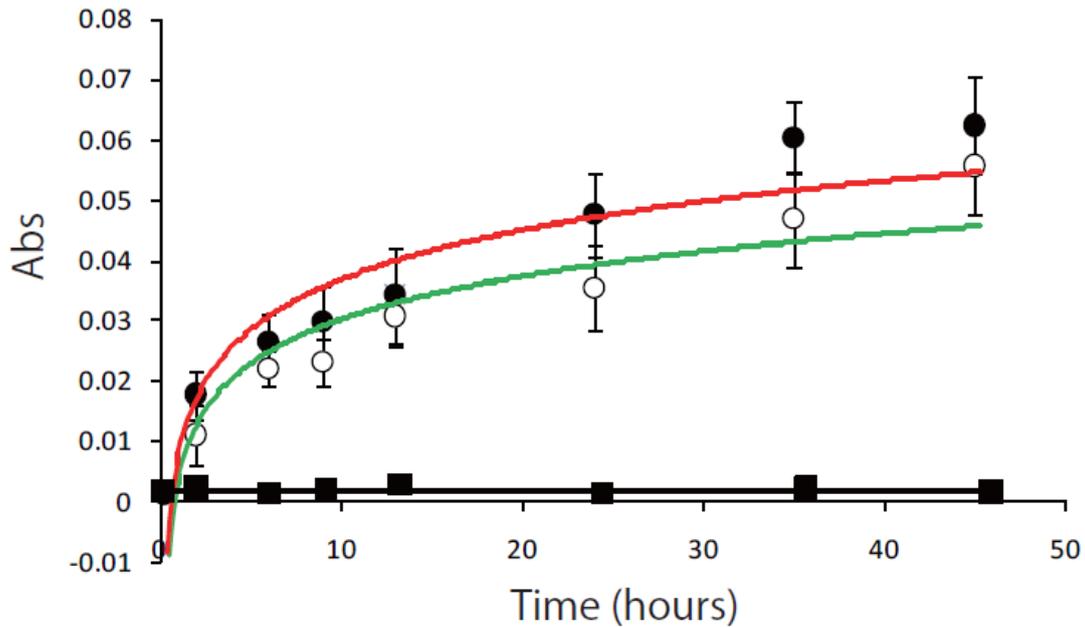


図 8. pNPP 加水分解の時間経過

LP を用いて合成された emulsion (●と赤の近似線)、および MO を用いて合成された emulsion (○と緑の近似線)における pNPP の加水分解のタイムコース。25°C、pH12 の条件で、加水分解によって生じる p-nitrophenolate anion の濃度を 410 nm における吸光度に基づき計測した。LP を用いて合成された emulsion (■と黒の近似線)において、pNPP は pH8 の条件ではほとんど加水分解されない。n = 5。

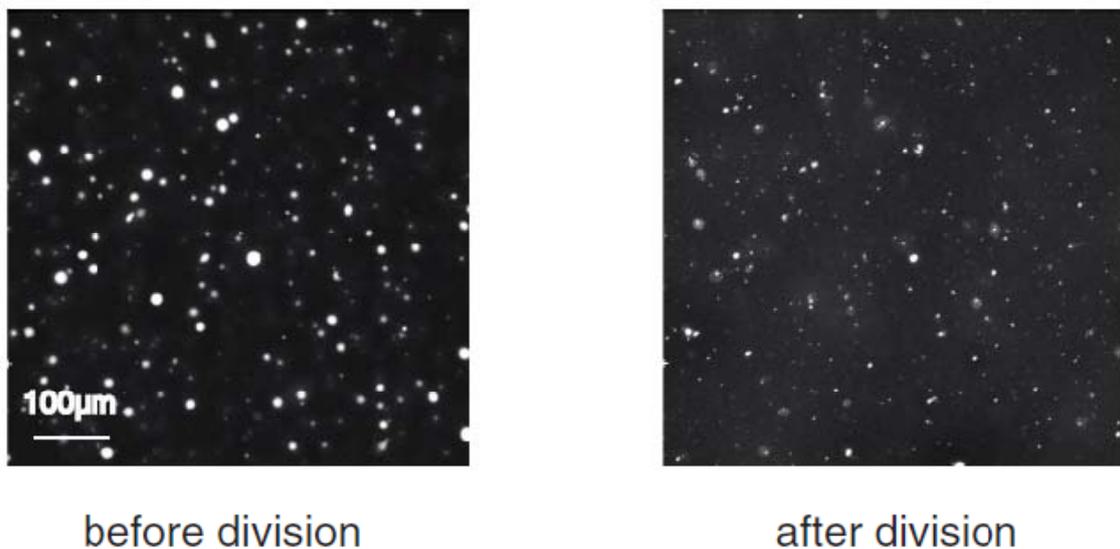


図 9. 分裂が起こったときの顕微鏡視野内の全体推移図

pH12、25°Cの条件で MO を用いて合成された emulsion の顕微鏡観察像。全ての droplet は例外なく、一定時間後に粒径を減少させた。

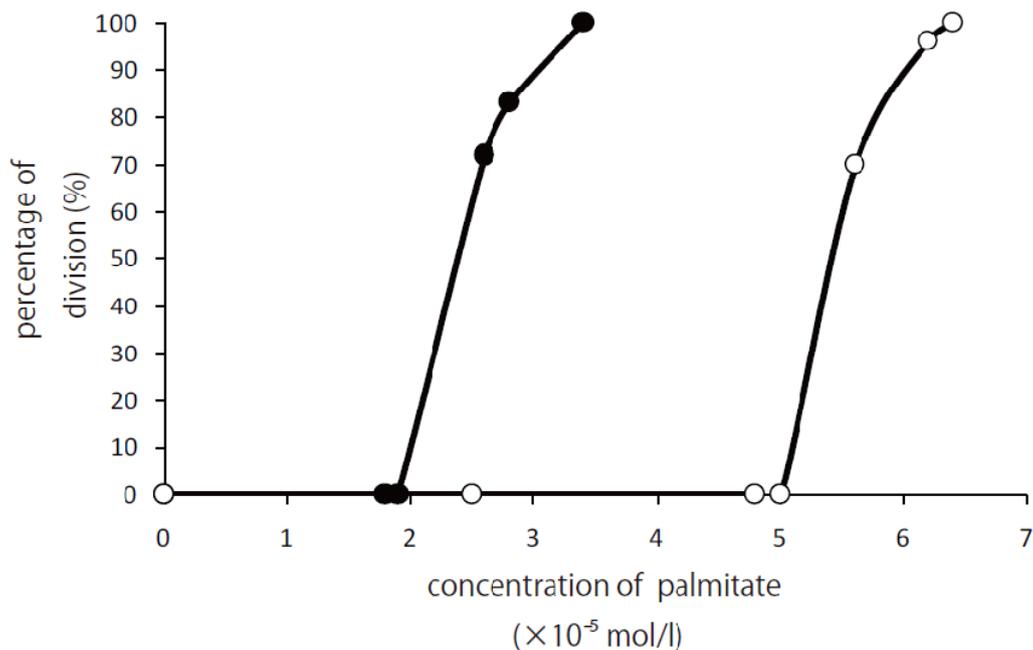


図 10. palmitate 濃度と droplet の分裂割合の相関関係

pH12、25°Cにおける MO を用いて合成された emulsion (○)と LP を用いて合成された emulsion (●)。それぞれの droplet の分裂頻度を顕微鏡観察より算出し、任意の時点で p-nitrophenolate anion 濃度を吸光光度計により計測することにより、palmitate 濃度を算出した。MO と LP では分裂に必要な palmitate 濃度が大きく異なることが示された。

3.6 分裂時に起こる droplet の表面積と体積それぞれの変化

3.4 章で観察された droplet の分裂では、droplet 内部でどのような変化が起きて droplet が分裂するに至ったか？本研究は「droplet の体積は一定のまま、表面積だけが増加し続けていくと形を保ち切れず、結果として分裂するに至る」というアイデアを軸として本実験が立案された。よって、この仮説を検証するために、droplet の表面積と体積の変化をそれぞれ検討した。

顕微鏡観察により取得された 3D stack image を解析することで、分裂前の droplet の表面積と体積を算出した (2.10 章参照)。同様に、droplet が分裂する直前に大きく形を崩した時点の droplet の表面積と体積を算出し、これら二つの表面積と体積を比較した。この比較結果より LP を用いて合成された droplet および MO を用いて合成された droplet の双方で、分裂直前に表面積が大きく増加するが、体積はほぼ一定で変化しないことが明らかになった (図 11)。この結果は、「分裂は体積を一定としたまま、表面積のみを増加させることで分裂を生じさせる」という仮説を支持している。

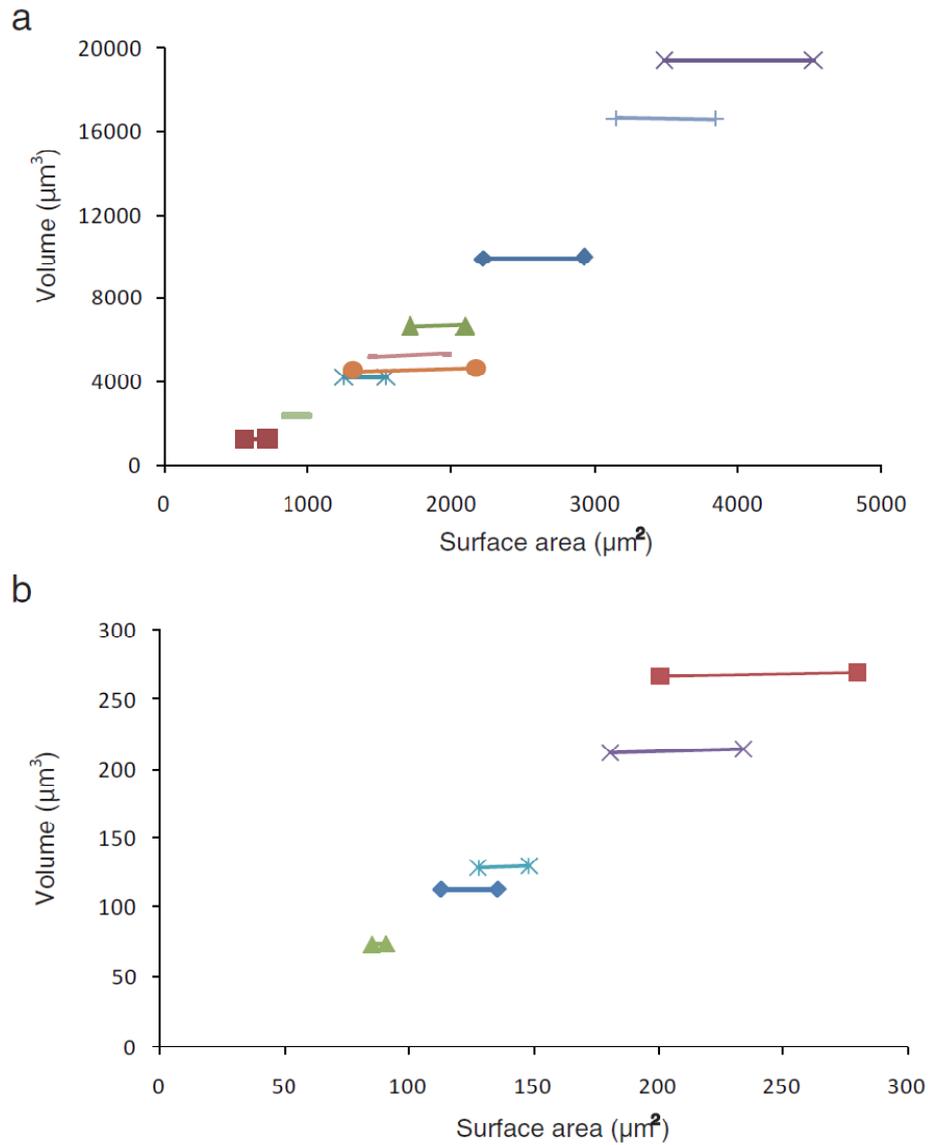


図 11. 分裂直前の droplet の体積と表面積の変化

元の droplet と分裂直前大きく形を崩した droplet それぞれの表面積と体積を測定し、比較した。a. MO を用いて合成された emulsion ($n = 9$)。b. LP を用いて合成された emulsion ($n = 5$)。pH12、25°C の条件で実験をおこなった。異なる色のラインがひとつの droplet の表面積と体積の変化を示している。ひとつの droplet の分裂前の状態が、表面積が最小値を示す点である。分裂直前に droplet は大きく形を崩すが、その状態が、表面積が最大値を示す点である。droplet の体積の変化はほとんどみられなかった。

3.7 分裂直前の界面活性剤 1 分子の表面積変化

次に、表面積の変化と palmitate の蓄積量の相関を検証した。pNPP の加水分解の進行によって蓄積された palmitate は膜に取り込まれる。しかし、droplet の体積および表面積は分裂直前まで変化しない。このことから、droplet 膜の界面活性剤の密度は時間経過と共に大きくなると考えられる。定量的に droplet 膜を構成する界面活性剤の分子数と表面積の関係を明らかにするために、界面活性剤の分子数を算出し、表面積増加との比較を試みた。droplet 膜を構成する界面活性剤の分子数は、emulsion 合成時に droplet に含まれている界面活性剤の分子数に pNPP 加水分解によって生じた palmitate の分子数を加えたものである。よって、顕微鏡観察より得られた 3D srack image から求めた droplet の表面積を界面活性剤の分子数で割ることで、そのときの界面活性剤 1 分子が占有する表面積を求め (2.10 章参照)、界面活性剤 1 分子が占有する表面積の変化を追跡した (図 12)。まず、droplet の粒径が大きいほど界面活性剤 1 分子の占有面積は小さいことが明らかになった (図 12.a)。また、pNPP の加水分解により産生された palmitate を取り込んだ droplet は、形を崩すそのときまで界面活性剤 1 分子の占有面積をしだいに小さくしていった。その後ある時点で droplet の形を崩し、以前よりも 1 分子あたりの占有面積を大きく取ることが示された (図 12.b)。また droplet の粒径が小さいほど、1 分子あたりの専有面積の変化が大きいことから、粒径が小さいほど隣り合う界面活性剤分子同士の距離を大きく取っている(界面活性剤 1 分子あたりの占有面積増加率は大きくなる)ことが示唆された。

3.4 章の結果から、droplet の体積および表面積は、分裂直前まで変化しないことが分かっている。このことから、droplet の膜は増加した palmitate を界面活性剤 1 分子あたりの占有面積を徐々に小さくすることで一定の表面積の状態を保っていると考えられる。そして、界面活性剤 1 分子あたりの占有面積が限界まで小さくなった後、droplet は形態を大きく変化させることにより、界面活性剤 1 分子あたりの占有面積を確保すると考えられる。これが droplet の急速な表面積増加のトリガーとなり、それに引き続いて分裂が起こると考えられる。この分裂のメカニズムについては、考察で詳細に論じる (4.7 章参照)。

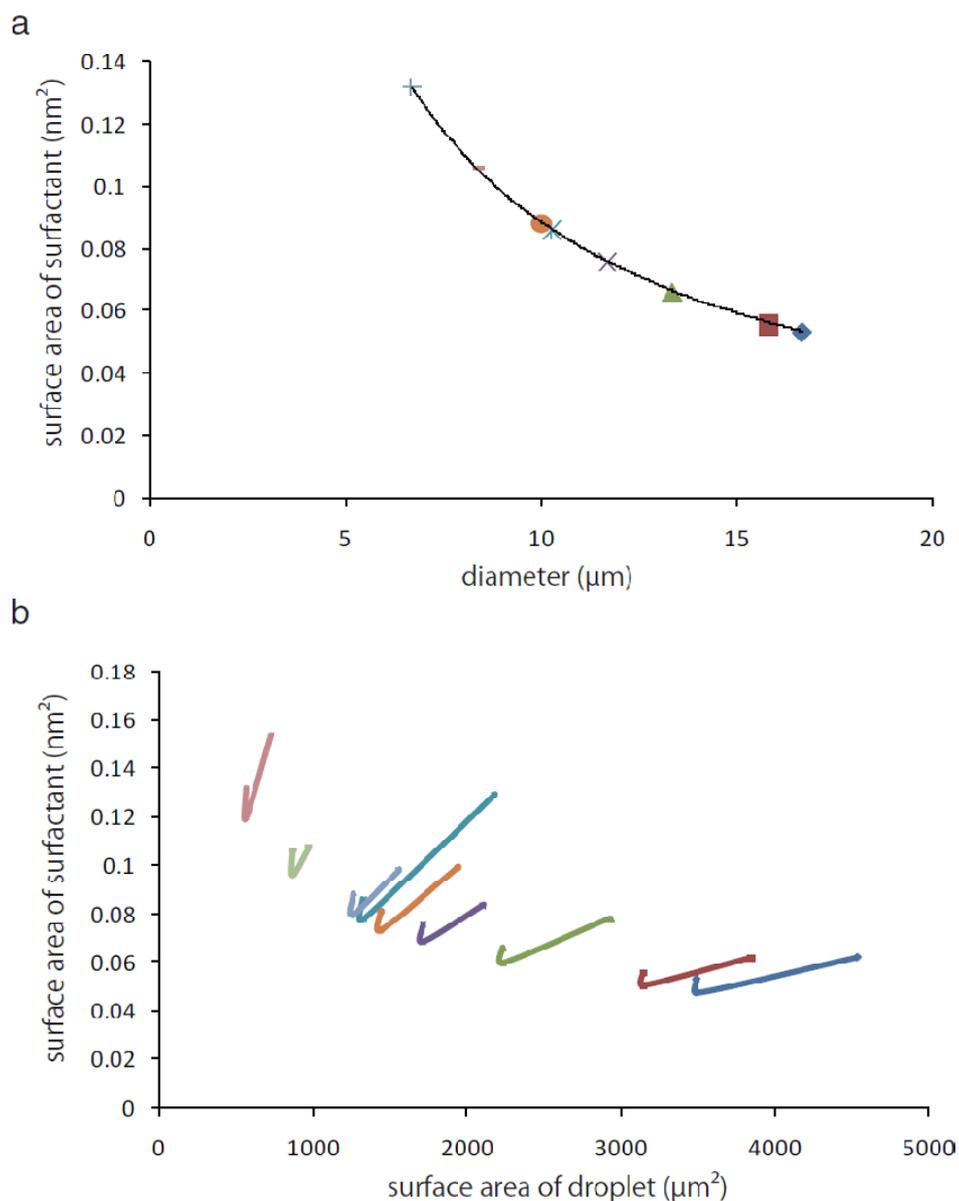


図 12. droplet 表面にある界面活性剤 1 分子の専有面積の変化

a. 各粒径の droplet について、それぞれの界面活性剤 1 分子の専有面積を計算した。b. 元の粒径時の droplet 時から分裂直前の形を崩した droplet までの期間の界面活性剤 1 分子の専有面積の変化を追跡した。MO の表面積は分裂開始まではほぼ一定である。しかし、表面積が一定であっても分裂までの間 droplet の膜は palmitate を蓄積し続け、1 分子あたりの表面積を小さくしていき、分裂する瞬間は以前の表面積よりも大きくなることが示された。

3.8 本分裂システムを支配する物理パラメータの特定

3.4 章の解析結果から、水相 pH、温度、droplet 外部の oil 粘度の 3 つの要因によって異なったタイプの droplet の分裂が誘導されることが明らかになった。よって、これら 3 つの要因が、それぞれどの程度分裂タイプの決定に寄与するかを詳細に検討した。

3.8-1 水相 pH は droplet の分裂タイプ決定にほとんど寄与しない

3.3 章～3.5 章の結果から、本分裂システムは、水相 pH 依存的に分裂が起これるので、pNPP 加水分解により生じる palmitate が droplet 膜に蓄積することで、分裂を引き起こしていることが示唆された。中性 pH では分裂が起これず、アルカリ性 pH でのみ分裂が起これるので、本分裂システムは水相 pH に依存する。しかし、水相 pH は droplet の分裂タイプに影響をおよぼすだろうか？この疑問に答えるために水相 pH の critical concentration for division (C.C.) への影響について検討した。C.C.とは分裂するのに必要な最小限の palmitate 濃度のことである。具体的には、**図 10** に示す MO を用いて合成された emulsion において、palmitate 濃度 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ を境に急激に emulsion 内の droplet が分裂している。この境界となる濃度を C.C.とする。したがって、仮に水相 pH や温度などの外環境の変化が C.C.の値を変化させるとすれば、外環境の変化が droplet 膜表面に蓄積可能な palmitate 量に変化を生じさせることを意味する。

図 4 の結果から、LP を用いて合成された emulsion では pH10 で、MO を用いて合成された emulsion では pH11 で、それぞれ droplet が分裂している。それに基づいて pH10 から pH12 までの C.C.の変化を検証した (**図 13.a**)。pH ごとに多少のばらつきはあるがほとんど同じ値を取るため、pH 変化がおよぼす C.C.への影響は小さいことが示唆された。

さらに、分裂後に分かれた二つの娘 droplet のうち小さい droplet の直径を大きい droplet の直径で割った値を ratio とし、pH ごとの ratio 変化をグラフに表すことで分裂タイプに変化があったか検証した (**図 13.b**)。つまり、ratio が 0 に近づけば不等分裂、1 に近づけば等分裂である。MO を用いて合成された emulsion では pH を大きくして pNPP の加水分解速度を上昇させても ratio は 0.27 付近でとどまった。したがって、droplet 内部の水相 pH が高いことが pNPP の加水分解には必要であるが、droplet の分裂タイプ変化は水相 pH に依存しないことが示唆された。

3.8-2 温度は分裂タイプのコントロールに寄与する

3.4章の結果から同じoilを用い、同じpHでemulsionを合成した場合においても、温度を変えることで分裂タイプが変化する場合があることから、温度は分裂タイプをコントロールする上で重要なパラメータであると考えられる。よって、温度が変化するとC.C.が変化するかを検証した(図14.a)。LPを用いて合成したemulsionでは、35°C以上でdropletが破裂する現象が見られたので、25°C-30°Cの範囲で検証した。一方、MOを用いて合成したemulsionでは、45°Cでdropletが破裂するため、25°C-40°Cの範囲でC.C.を測定した。両者ともに温度が上昇するとC.C.が減少する傾向が見られ、温度がdropletの分裂に影響を与えていることが示唆された。

MOを用いて合成されたemulsionにおいて、温度とdropletの分裂タイプの相関をグラフにまとめた(図14.b)。温度が上昇すると分裂タイプは不等分裂から等分裂へと移行することが認められた。したがって、温度はdropletの分裂タイプのコントロールに大きく寄与していることが示唆された。

3.8-3 粘度は分裂タイプのコントロールに寄与する

3.4章の結果よりMOをLPに変えるだけで不等分裂から出芽に変化するため(図7. b c)、両oil間で大きく値に隔たりがある粘度が重要なパラメータであると考えられた。粘度がC.C.におよぼす影響を検証するために、粘度の大きく異なるMOとLPをさまざまな割合で混合し、粘度の異なるoilを調整した(表2)。粘度とC.C.には正の相関があり、oilの粘度が大きくなるとC.C.が大きくなることが観察された(図16.a)。3.8-2章で温度上昇によりC.C.が減少することを明らかにした(図14.a)。温度上昇するとoilの粘度は減少するので(図15)、これらの結果はよく一致している。

また、粘度がratioに与える影響を検討した。粘度とC.C.には負の相関があり、粘度が低くなると分裂タイプは不等分裂から等分裂に変化することが観察された(図16.b)。この結果より、液体粘度が分裂時のdropletに大きな影響を与えていることが示唆された。また、この結果は3.8-2章の結果とよく一致しており、温度変化がoil粘度を変化させ、その結果、分裂タイプが変化することが示唆された。

3.8-1章から3.8-3章をまとめる。droplet内部の水相pHは分裂タイプ決定に寄与するものではない。一方で、oilの粘度や温度は分裂タイプのコントロールに寄与するものであった。また、oilの粘度と温度では、そのdropletの分裂タイプ変化に似た傾向を見出すことが出来たため、温度がoil粘度に影響をおよぼすことから、温度がoil粘度に影響を与えることで、dropletの分裂タイプのコントロールに寄与している可能性が示唆された。温度がoilの粘度以外に影響をおよぼしているか否かについては、後述する(3.9章参照)。

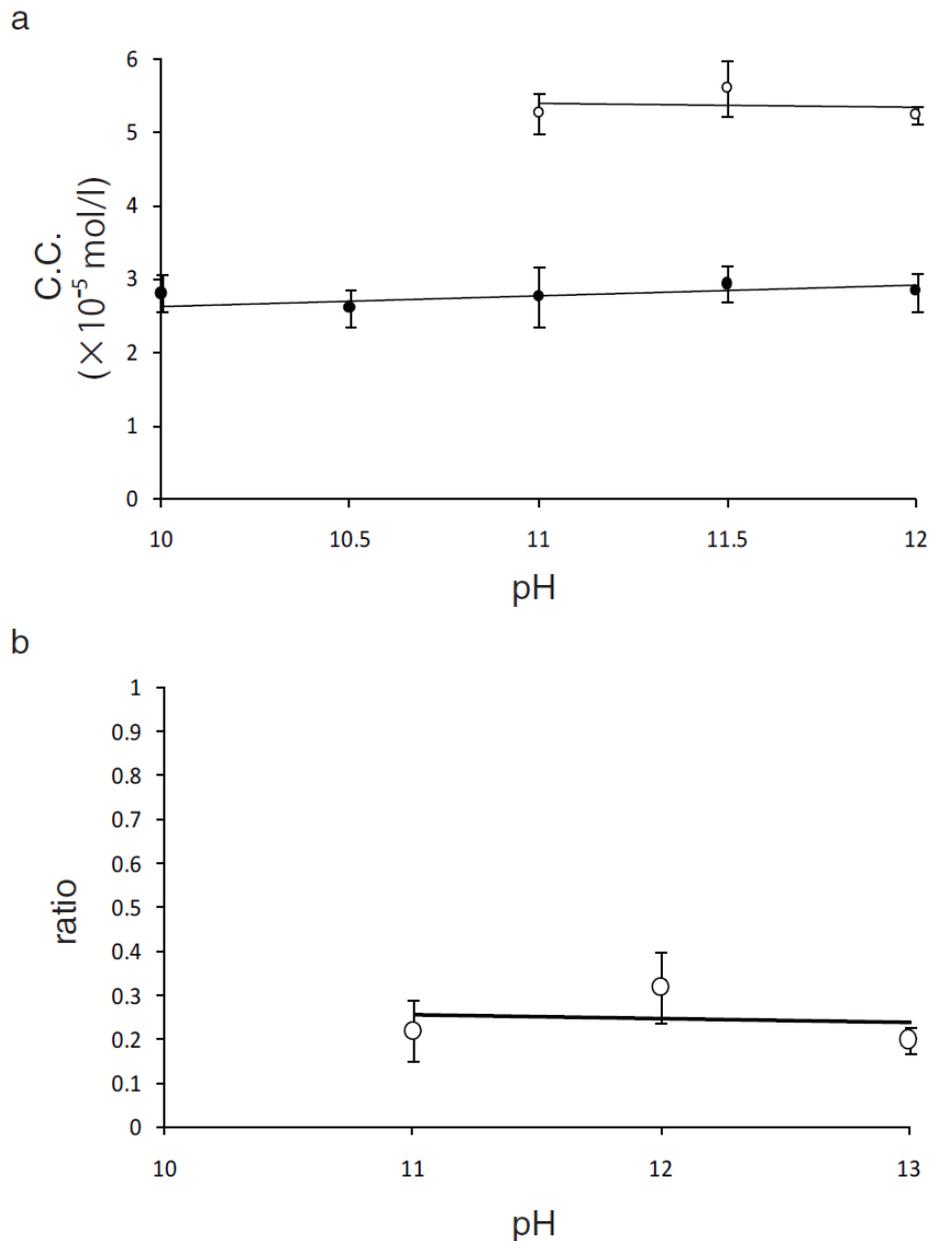
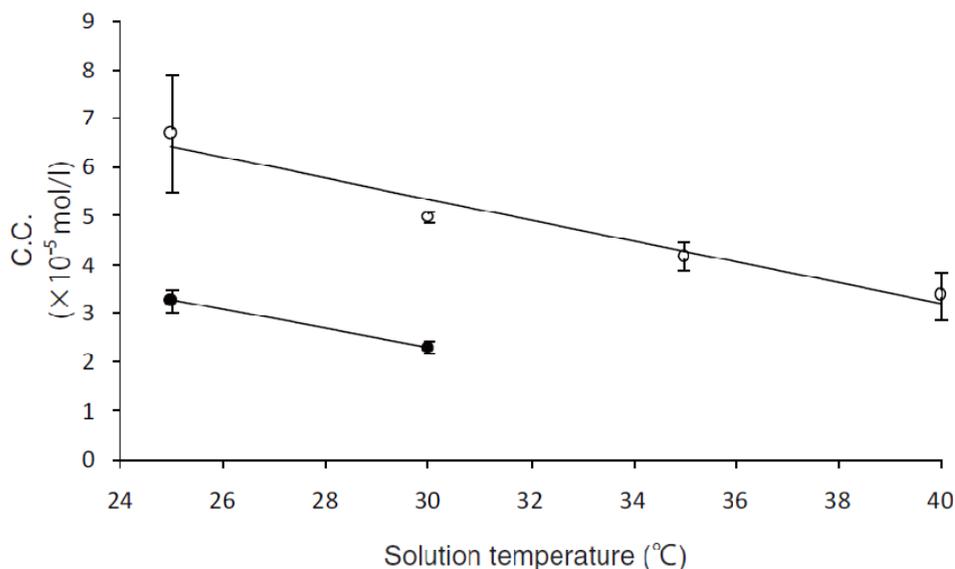


図 13. pH 変化が与える分裂への影響

- a. 顕微鏡により初めて分裂したことが確認された時点の palmitate 濃度を critical concentration for division (C.C.)とした。pH 変化は分裂するのに必要な最小限の palmitate 濃度 (C.C.)に対して影響力を持たないことが示された。なお、MO でも LP でも温度は 25°Cとしている。(○) は MO を用いて合成された emulsion、(●) は LP を用いて合成された emulsion。n = 5。pH 変化による C.C.の有意差について。One-way ANOVA test; (●) p>0.5。(○) p>0.4。 b.水相 pH が分裂タイプにおよぼす影響を検討した。分裂タイプを ratio で評価した。分裂時に生まれる 2 つの娘 droplet のうち、小さい方の droplet の直径を大きい方の droplet の直径で割った値を ratio とした。ratio が 1 に近づけば等分裂、0 に近づくほど不等分裂を示している。なお、温度は 25°Cとしている。(○) は MO を用いて合成された emulsion。n=5。One-way ANOVA test; p>0.1。

a



b

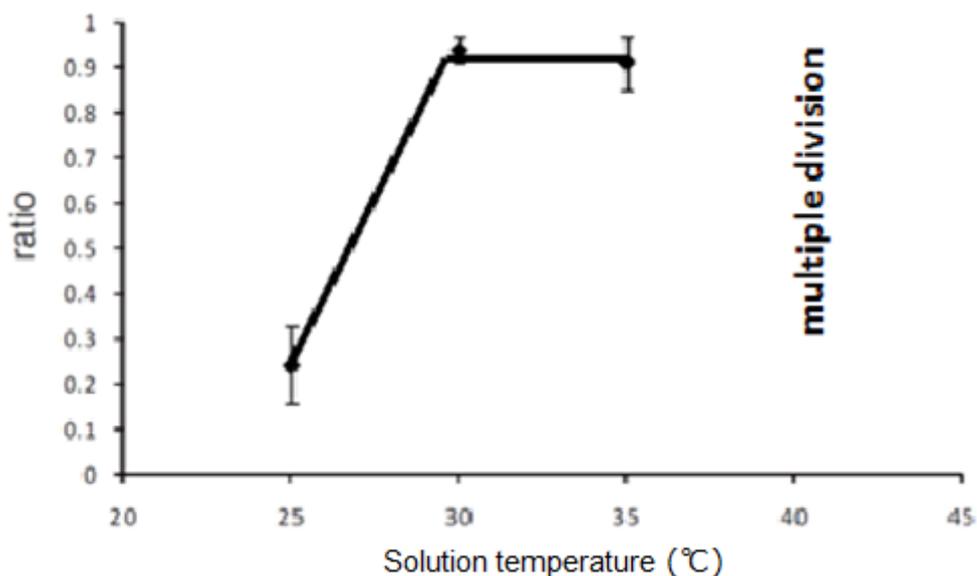


図 14. 温度が droplet の分裂タイプに与える影響

a. 温度が高すぎると droplet が崩壊するので、MO を用いて合成された emulsion では 25-40 $^{\circ}\text{C}$ の範囲で、LP を用いて合成された emulsion では 25-30 $^{\circ}\text{C}$ の範囲で、温度が C.C. に与える影響を検討した。なお、水相 pH は 12 である。(○) は MO を用いて合成された emulsion、(●) は LP を用いて合成された emulsion を示す。どちらの oil においても温度を高くすると C.C. が減少することが示された。 $n=5$ 。温度変化による C.C. の有意差について。One-way ANOVA test; (●) $p < 0.05$ 。○ $p < 0.005$ 。b. 温度が分裂タイプに影響をおよぼすか検討した。分裂タイプを ratio で評価した。水相の pH は 12。 $n=5$ 。温度変化による C.C. の有意差について。One-way ANOVA test; (●) $p < 5 \times 10^{-6}$ 。

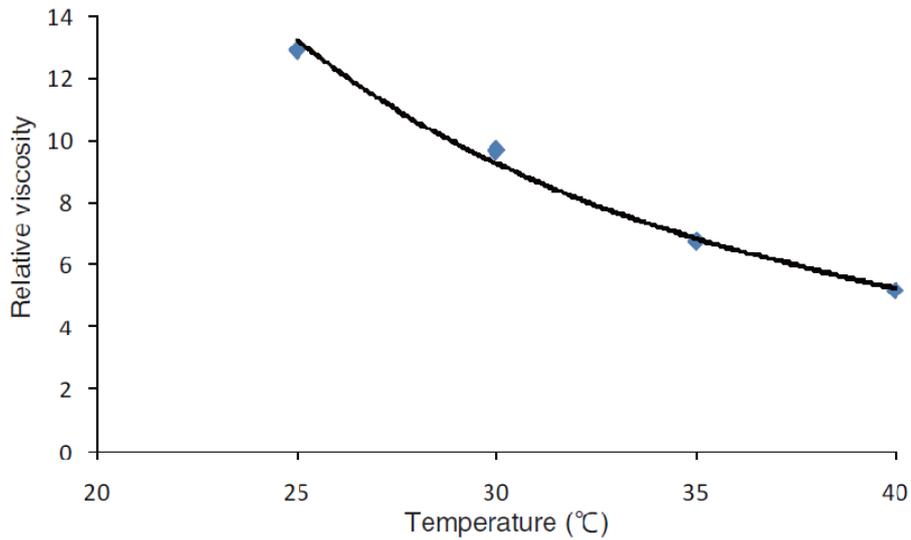


図 15. MO の温度と粘度の相関関係

温度が MO の粘度に与える影響を調べた。恒温槽により oil の調節し、oil の粘度は Ostwald 粘度計により測定した。温度上昇に伴い MO の粘度が減少していくことが示された。

表 2. 実験で使われた各種 oil の相対粘度表

	ratio		temperature (°C)	relative viscosity
	MO	LP		
Mineral oil (MO)	1	0	30	9.68
Mineral oil (MO)	1	0	40	5.23
Mineral oil (MO)	1	0	25	12.92
Mix 1	1	1		7.99
Mix 2	1	3		6.31
Liquid paraffin (LP)	0	1		4.97

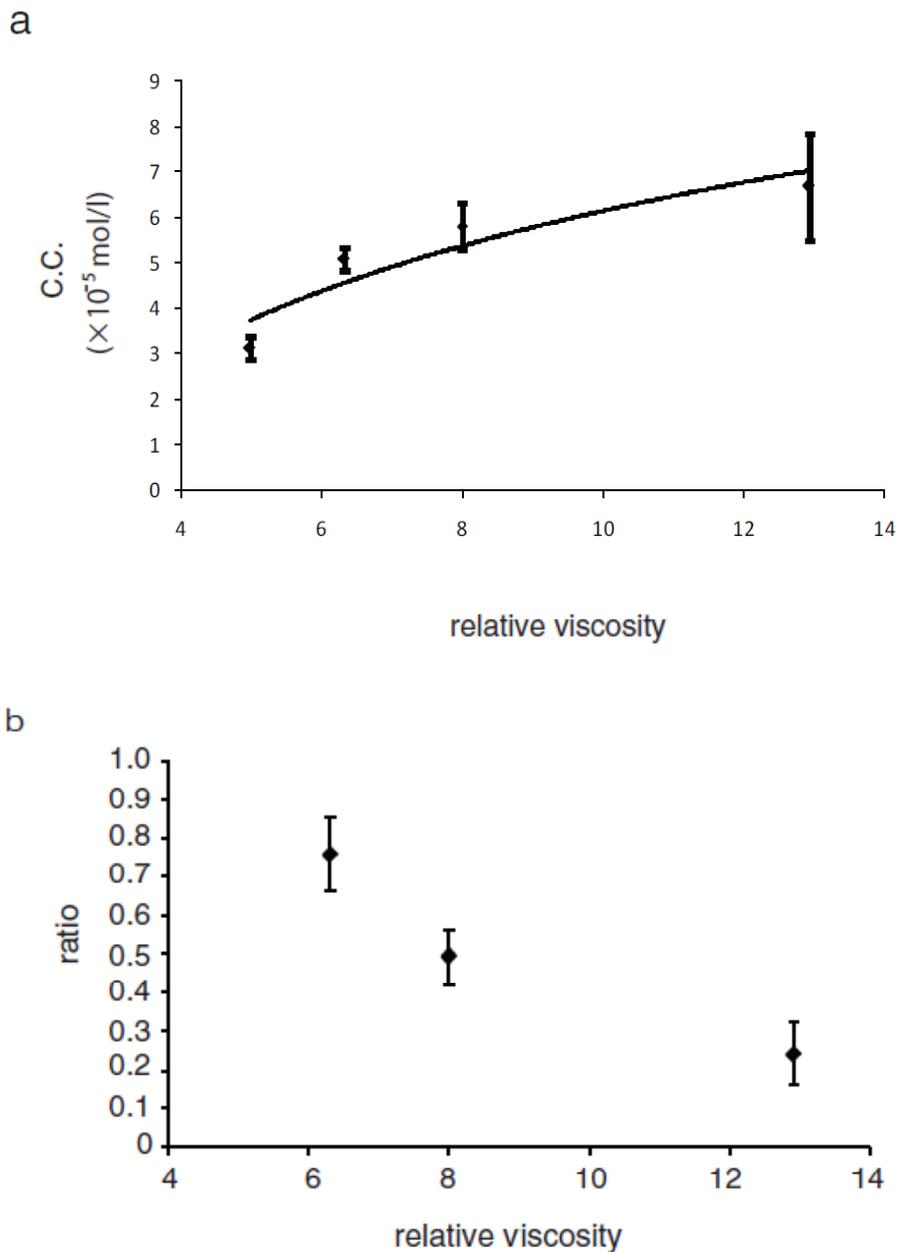


図 16. 液体粘度が分裂に与える影響

a. 粘度の大きい MO と粘度の小さい LP を混ぜ合わせ、任意の粘度の oil の調整が可能である。粘度を調節し、粘度が与える C.C. への影響を検討した。粘度が高いほどに C.C. は高くなり、粘度が低くなるごとに C.C. が減少することが示された。なお、温度は 25°C、水相 pH は 12 としている。n=3。One-way ANOVA test; $p < 0.01$ 。b. 粘度変化が分裂タイプに影響をおよぼすか検討した。ratio とは、分裂時に生まれる娘 droplet の小さい方の直径を大きい方の直径で割ったものを示す。この値が 1 に近づけば等分裂、0 に近づくほど不等分裂を示している。なお、温度は 25°C、水相 pH は 12 としている。One-way ANOVA test; $p < 5 \times 10^{-7}$ 。

3.9 温度が分裂時に droplet に与える影響

3.8-3 章にて、温度が oil 粘度に影響を与え、その oil 粘度の変化により droplet の分裂に影響を与えていることを示した。しかし、温度が影響をおよぼしているのは粘度だけなのか？MO を用いて合成された emulsion において、30°Cにおいて droplet は等分裂を生じた。このとき、30°Cにおける MO の相対粘度は 9.68 である (表 2)。25°C では MO の粘度は低下し、分裂のタイプが等分裂に近づくことを 3.8-3 章にて示した。しかし、MO と LP を混合し相対粘度が 6.31 となった oil では等分裂しなかった (図 16.b)。このことから温度が粘度にのみ作用して分裂タイプをコントロールしているのではなく、粘度以外のファクターにも作用して分裂タイプをコントロールしていると解釈できる。

温度とは物理学的には分子運動エネルギーなので、温度増加が droplet に与える影響は、droplet 内部の分子の運動の増加である。運動エネルギー上昇が droplet の分裂に影響を与えるならば、それぞれの温度で分裂前と分裂後の自由エネルギー変化 ΔF を算出することで解析できると考えた。その結果を示す。

グラフは droplet の大きさを 2 μm としたときの分裂前後の ΔF を示したものである (図 17.a)。なお、 ΔF は droplet 外部の環境を考慮せず、droplet 内部のパラメータを用いて計算した。温度を 25°C から 35°C まで変化させた場合の ΔF への影響は非常に小さかった。しかし 3.9 章で、温度が粘度にのみ作用して分裂タイプをコントロールしているのではなく、粘度以外のファクターにも作用して分裂タイプをコントロールしていると解釈したので、この小さい変化が droplet の分裂タイプの決定に影響をおよぼす粘度以外の因子かもしれない。では、この自由エネルギーの小さな変化は具体的に droplet にどのように作用しているのか？それを考察するために、自由エネルギーと相関関係にある表面張力をグラフ化した (図 17.b)。 ΔF の計算同様、droplet 外部の環境は全く考慮しておらず、droplet 内部を構成する純水が界面張力あたえる影響を表したグラフである (2.11 章参照)。また純水の表面張力は 72 mJ/m^2 (25°C 時) であるが、グラフではその値を大きく下回る数値が算出された。その理由の一つは、当実験で用いられている droplet は直径が約 5-10 μm であり肉眼で観察可能な液滴と比べ非常に小さいことである。液滴はその粒径が小さいほど、表面張力が小さくなることは過去に報告されている (Lu and Jiang, 2005; Malkin et al., 2004)。二つ目の理由は、droplet は界面活性剤に囲まれていることである。界面活性剤は純水と油の界面張力をその濃度に応じて大きく減少させる (Ferri and Stebe, 2000)。これら二つの理由により純水で構成された droplet の界面張力は、純水の表面張力の値よりも小さい値をとったと考察される。

本解析により、温度が低いほど表面張力が大きく、温度が高いほどに表面張力が小さくなることが示唆された (図 17.b)。さらに、不等分裂から等分裂へと分裂タイプを変えた 25°C から 30°C への変化は、droplet の表面張力を 0.5 mJ/m^2 程度減少させている。温度の上昇は oil の粘度を下げるほかに、droplet 内部から直接膜の表面張力を小

さくする。このことから、この表面張力減少を介して droplet の分裂タイプの決定に影響をおよぼしている可能性がある。この表面張力と droplet の分裂タイプ変化の相関については、後述する (4.8 章参照)。

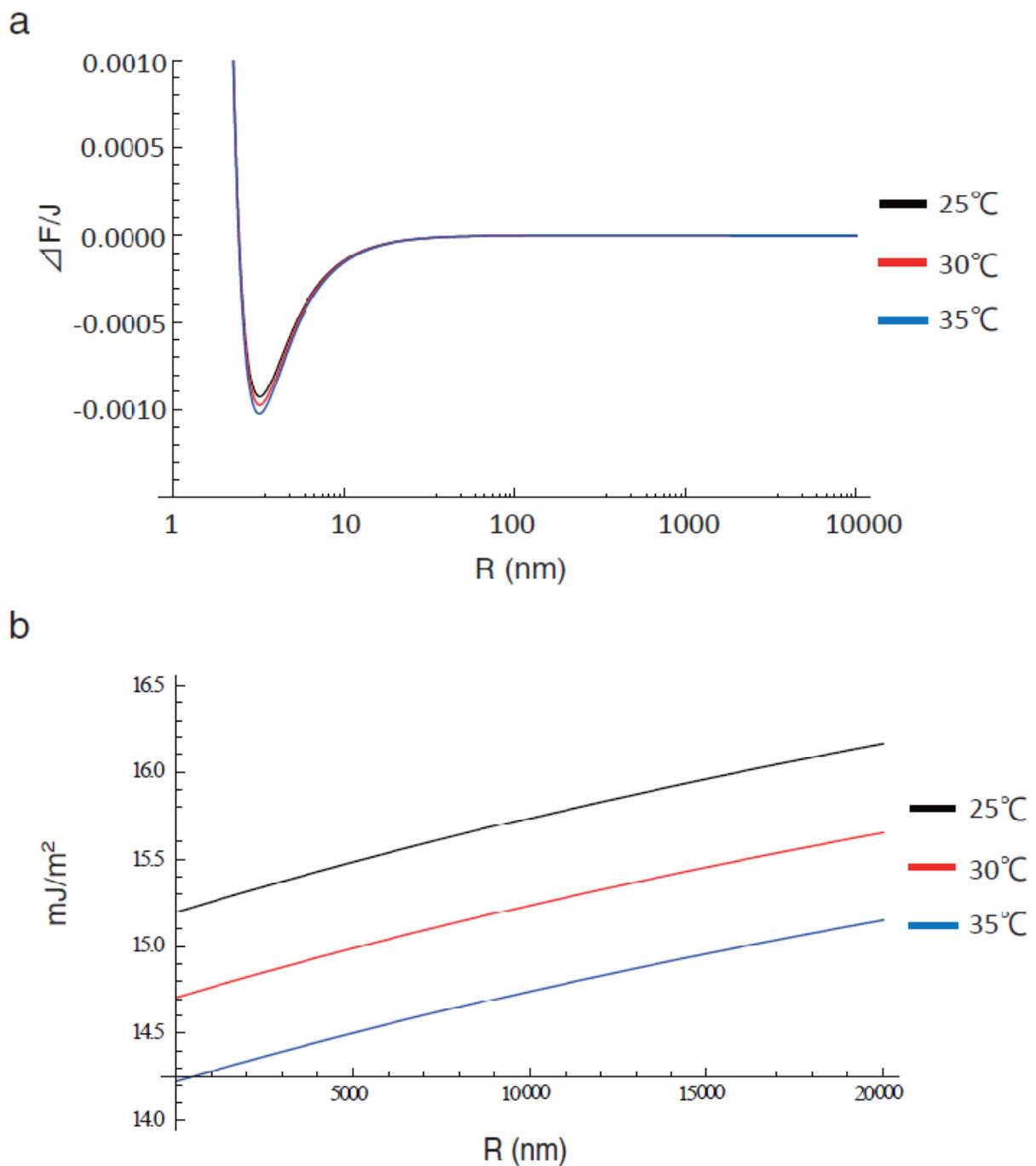


図 17. 温度変化による分裂時の ΔF と表面張力への影響

a. 温度の変化が分裂時の droplet の ΔF あたえる影響を示している。b. 温度の変化が droplet の表面張力に与える影響を示している。

4. 考察

4.1 分裂時、droplet の体積が元の droplet に比べ減少している

分裂した後の娘 droplet の体積の合計が、元の droplet の体積と比較すると減少していることがある (図 7)。これには 2 つの理由があると考えた。分裂時に一方の娘 droplet が顕微鏡視野内で観察できないケースがあったが、これは z 軸方向に娘 droplet が生まれたためと考えられる (図 9)。また、分裂後の娘 droplet の体積の合計が減少したことも、分裂時に娘 droplet の一方が顕微鏡視野から外れ、合計体積が見かけ上小さくなったと考えられた。もう一つの理由は、分裂時に顕微鏡では見えない小さな micelle が多数生産された可能性である。DLS 測定により、分裂後に直径 1 μm より小さな droplet の集団が検出されていることから、この可能性は否定できない (図 3)。

4.2 アルカリ性 pH は pNPP の加水分解に対してのみに影響を与える

DLS 測定や顕微鏡観察により、pNPP 存在下において droplet の粒径変化を追跡したところ、どちらの測定法でも pH をアルカリ性にすることで分裂が起こった (図 3、図 4)。これらの実験で中性条件では droplet が分裂しなかったことから (図 8)、pNPP の存在そのものは分裂を誘導しない。また、pNPP を添加しなければ分裂は起こらない (図 6)。これらのことから、アルカリ性 pH 条件で pNPP が変化し、droplet の分裂を誘導したことを示している。また、アルカリ性 pH 条件で、pH10 から pH12 まで pH を変化させても C.C.は変化しなかったことから、アルカリ性 pH は pNPP の加水分解を促進するだけで、droplet の分裂はアルカリ性 pH であれば pH の大きさに影響を受けるものではなかった (図 13.a)。pNPP の加水分解により産生された palmitate が分裂のトリガーになることは 3.5 章で示されている。これらのことから、pH が高いほど pNPP の加水分解は速くなるが、droplet の分裂は産生された palmitate の量に依存するので、pH は droplet の分裂速度には影響を与えるが、分裂パターンには直接影響を与えないと考察できる。

4.3 oilの粘度はdropletの表面張力に影響を与えている

本研究において、粘度の低い isooctane は粒径の小さな micelle を作り、粘度の高い MO では droplet の粒径が大きくなり、また粘度が isooctane と MO の間にある LP は isooctane より大きく、MO より小さい粒径の droplet を作った (表 1)。この粘度と droplet の粒径の関係については、過去に既に報告されており、droplet の粒径は、oil の粘度に依存する (Davies, 1985)。そして、droplet の粒径が異なると droplet 膜を取り巻く界面活性剤分子 1 分子あたりの専有面積も異なることが本研究で示唆されている (図 12.a)。この専有面積は表面張力と相互関係にある。この界面活性剤 1 分子の専有面積と表面張力の関係について、Gibbs の吸着等温式を用いて説明する (Fainerman et al., 1996; Levin and Flores-Mena, 2001)。

Gibbs の吸着等温式は、界面活性剤分子が存在する溶液表面での溶質のモル濃度と表面張力との関係を示す式である。

$$\Gamma = -\frac{c}{RT} \times \frac{d\gamma}{dc}$$

このとき、 c は mol 濃度、 RT は 1mol あたりの自由エネルギー、 γ は液滴膜の表面張力、 Γ は界面活性剤分子の単位面積あたりの mol 濃度を指す。 Γ が、界面活性剤分子の単位面積あたりの mol 濃度を示すので、 1m^2 にどれだけの界面活性剤分子が存在しているかを示しており、その逆数である Γ^{-1} は 1m^2 を界面活性剤分子の個数で割ることを意味する。つまり、 Γ^{-1} は、界面活性剤分子 1 個あたりの専有面積を示している。したがって、Gibbs の吸着等温式は界面活性剤 1 分子の占有面積と表面張力との関係性を示している。表面張力とは、膜を構成する分子同士の結合 (分子間力) の強さに依存する (Tanaka et al., 1996)。よって、分子間において占有面積を小さくすることは、分子間の距離を縮めその結合力を強めることになるため、結果として表面張力を強めることになるかと考察される。

上記の考察をまとめる。使用される oil の粘度により合成時の droplet の粒径は規定される。droplet の粒径が異なると droplet 膜を取り巻く界面活性剤分子 1 分子あたりの専有面積が異なることは、本研究結果より示唆されている。そして、界面活性剤分子 1 分子あたりの専有面積と界面活性剤により構成される droplet の表面張力とは関係がある。これらを考慮すると、oil 粘度は間接的に表面張力に影響をおよぼしていると考察される。

この考察は、O/W emulsion において oil の粘度を変化させることによって表面張力が変わったという過去の報告と一致している (Acton and Saffle, 1970)。したがって oil 粘度が C.C. に対し影響を与え (図 16.a)、droplet の分裂タイプを制御していること

(**図 16.b**)は、oil 粘度が間接的に droplet の表面張力に関与しているためであると示唆されるかもしれない。

4.4 温度は droplet の表面張力に影響をおよぼしている

3.8 章において分裂タイプのコントロールの要因は温度と粘度であることが示唆された。温度が上がると粘度は小さくなる (**図 15**)。粘度は既に議論したように表面張力に影響を与えており、温度は粘度を変化させることから、droplet の分裂に間接的に影響を与えることが推測される。しかし、**3.9 章**で述べたように、温度 30°Cにて MO を用いて合成された emulsion の droplet は等分裂したが、もし温度が粘度に影響を与えているだけならば、25°Cの場合でも LP と MO を混合して作製したさまざまな粘度の oil を用いて emulsion を合成した時に、いずれかの粘度で等分裂を観察できるはずである。しかし、実際には MO の粘度から LP の粘度に近づけるにつれて、分裂した 2 つの娘 droplet の粒径の差が明らかに小さくなり等分裂に近づいたが、完全な等分裂には至らなかった (**図 16.b**)。この結果から、温度は粘度に影響を与えるだけではなく、他の要因にも影響を与えて分裂パターンのコントロールに寄与していることが推測される。それでは、どの要因に影響を与えているのだろうか？私は、温度の上昇により droplet の分子運動が活発になった程度を自由エネルギー変化から検討した (**図 18.a**)。3.9 章で述べたように、droplet の分子の運動エネルギーは表面張力に変化をおよぼしている。表面張力は膜界面を構成する分子同士の結合力であるので、emulsion 内では colloid 粒子間で斥力を発生し安定化を図っているが (Feke et al., 1984)、高温になると ion や溶媒の分子運動が大きくなり、それにつれて電位差が増し斥力が増大する。この増大した斥力が膜を構成する分子同士の結合力に打ち勝って、表面張力を減少させていると考えられる。

以上より、温度は oil 粘度に影響を与えることで droplet の外側から間接的に表面張力に影響を与え、一方で、droplet 内部の分子運動エネルギーに影響を与え、droplet 内側から直接的に表面張力に影響を与えていることが考えられる。

4.5 温度と oil の粘度は droplet の表面張力に影響を与え、droplet の表面張力は droplet 膜に蓄積できる palmitate 分子の限界占有面積に影響を与えている

oil 粘度は droplet の外側から表面張力に影響を与え、温度は droplet の外側と内側から表面張力に影響を与えていることが考察された。3.7 章では、pNPP の加水分解により生じた palmitate が膜に取り込まれることで、droplet 表面の界面活性剤 1 分子の占有面積が限界に達するまでその占有面積を狭めていることを示した。限界に達した占有面積 (以降、限界占有面積と呼称する) の変化を追跡したグラフを **図 18** に示す。このグラフから、限界占有面積は droplet の粒径に依存して変化することが示唆される。一方で、3.9 章および 4.3 章では、droplet の粒径に依存して表面張力が変化することを示した。以上より、限界占有面積は表面張力に依存していることが導出される。

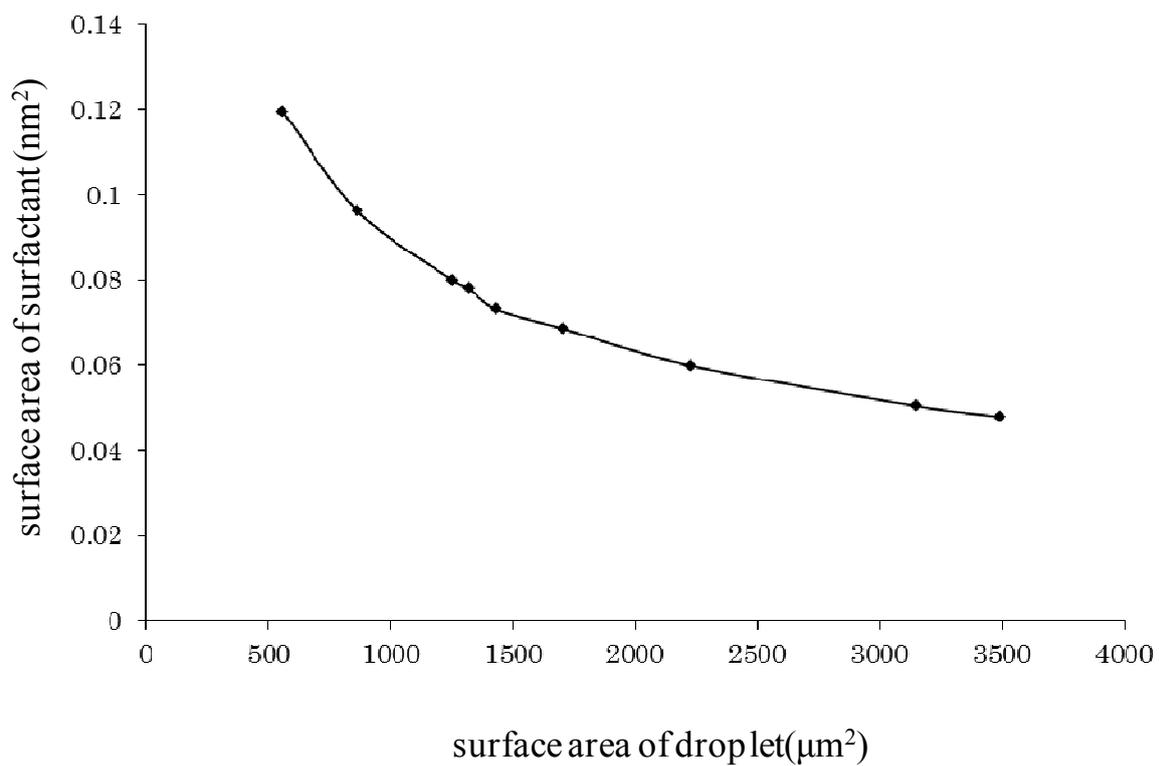


図 18. 粒径変化に依存した droplet 膜に蓄積できる palmitate 分子の限界占有面積の変遷

各粒径の droplet について、palmitate 分子を蓄積可能な占有面積の限界値を plot した。

4.6 表面張力と C.C.とは相関関係にあり、ひいては droplet 膜に蓄積できる palmitate 分子の限界占有面積と表面張力に相関関係がある

4.5 章にて、palmitate1 分子が占有できる限界占有面積は表面張力に依存していることが示唆された。このことについて、別側面から palmitate1 分子が占有できる限界占有面積と表面張力の相関関係を示す。3.3 章にて、droplet の平均粒径は小さくなると、合成後 5 日後までに分裂させるのに必要な最低 pH は低くなることが示された。低アルカリ pH では pNPP の加水分解速度は遅く、5 日後までに産生される palmitate は少なくなる。pH が分裂に影響を与えないことは 3.8 章にて C.C.が pH 依存的に変化しないことから示唆されているので、droplet の粒径が小さくなることで C.C.が減少すると考えられる。これは、**図 14.a** からも示唆される。MO と LP では droplet の粒径が異なり、LP の droplet の方が小さくなる(**表 1**)。図 14.a では、LP を用いて合成された droplet の C.C.が MO を用いて合成された droplet の C.C.よりも小さいことを示した。このため、droplet の粒径と C.C.には相関関係があると考えられる。また、3.9 章および 4.3 章にて droplet の粒径と表面張力とに相関関係があることを議論している。つまり、droplet の粒径と表面張力に相関関係があるので、C.C.と表面張力にも相関関係があると考えられる。そして C.C.とは、droplet に蓄積できる限界の palmitate の濃度である。C.C.が変化するということは、droplet 膜に存在できる palmitate の分子数が変化することを示すので、droplet の粒径に変化がない状態では、C.C.に依存して palmitate1 分子が占有できる限界占有面積は変化することになる。したがって、C.C.と表面張力には相関があり、また C.C.と palmitate1 分子が占有できる限界占有面積には相関がある。ひいては、palmitate1 分子が占有できる限界占有面積と表面張力とは相関があると考えられる。

4.7 本分裂システムのメカニズム

本分裂システムは、pNPP の加水分解により生じる palmitate が droplet に取り込まれることで、体積は一定のまま、表面積を増加させ、分裂を生じさせていた (3.6 章参照)。この分裂現象について、droplet はゆっくりと時間をかけて表面積を増やし分裂にいたるわけではない。droplet は、合成後しばらくの間、体積や表面積を一定に保ち続けていた (3.4 章参照)。そして、この間にも pNPP の加水分解は進行しており palmitate は増え続けていた (3.5 章参照)。つまり、外見上は変化がないように見られるのが、droplet の膜を構成する界面活性剤 1 分子の占有面積は、時間が経過するごとに狭くなっていた (3.7 章参照)。そして、droplet の膜を構成する界面活性剤 1 分子の占有面積が限界に達すると、占有面積を変化前の元の値よりも増加させることで、表面積を急激に上昇させ、分裂を生じさせていた。つまり、分裂を引き起こすトリガーは droplet の膜を構成する界面活性剤 1 分子の占有面積の変化にあると考えられる。また、4.5 章および 4.6 章より droplet の膜を構成する界面活性剤 1 分子の占有面積の

変化は、droplet 膜の表面張力に影響を与えることを示した。このことから、分裂を引き起こすトリガーは droplet 膜の表面張力に変化を与えることであると考えられる。

4.8 分裂タイプ変化のメカニズム

温度と oil 粘度を変化させると、droplet の分裂タイプが変化した (3.8 章参照)。温度については、温度が上昇すると分裂タイプは不等分裂から等分裂へと変化した。また、oil 粘度についてはその粘度を下げていくことで不等分裂から等分裂へと分裂タイプを変化させていた。両者に共通していえることは、droplet の分裂を等分裂に近づかせるには、droplet の表面張力をある所定値よりも小さくする必要があるということである。なぜ表面張力を小さくすることが、不等分裂を等分裂に近づけるのか？ここで、具体例として図 7.a にある等分裂をおこした条件をあげる。emulsion 合成は室温環境下で行われたものであり、顕微鏡観察時に 30°C に温度を上昇させている (2 章方法を参照)。したがって、顕微鏡観察時に 30°C に温度を上昇させた時点で droplet の表面張力は減少していることが推測される。3.7 章でも言及しているが、図 12.b において、droplet の粒径が小さくなると限界占有面積に達した後の占有面積増加率は大きくなる傾向がみられる。4.3 章の考察と併せて考えると、表面張力が小さくなると限界占有面積に達した後に生じる占有面積増加率は大きくなるということになる。つまり、顕微鏡観察時に 30°C に温度を上昇させることで droplet の表面張力は低下し、限界占有面積に達した後に生じる占有面積増加率は大きくなったために、25°C における droplet の占有面積増加率よりも大きくなり、等分裂に至ったと考えられる。また、図 7.e に示す droplet の崩壊は、温度を極端に上昇させたときに見られた。これは、温度の極端な上昇が招いた限界占有面積に達した後に生じる占有面積増加率の大幅な上昇に起因しているものと考えられる。

上記では、温度を上昇させた場合の分裂タイプ変化のメカニズムを説明したが、oil 粘度変化による分裂タイプの変化もまた同様のメカニズムである。oil 粘度減少により分裂タイプが等分裂に近づいたのは、粘度低下により droplet の表面張力の低下を招き、限界占有面積に達した後に生じる占有面積増加率を増加させたためであると考察される。

4.9 膜相分離により寄与される分裂への影響

生体膜は脂質を主体として構成される構造体である。リン脂質が主体として構成されているが、それ以外にも cholesterol や糖脂質などが脂質成分として生体膜に存在している。したがって、相転移温度が異なる脂質が生体膜には混在していることになる。この相転移とは、例えば DPPC および DPPE からなる二分子膜構造において観察される相状態は、lamella 結晶相、lamella gel 相、ripple gel 相、および液相の 4 種類が存在し、温度依存で相状態が転移する現象を指す (Matsuki and Kaneshina, 2006)。相転移温度が異なる脂質が生体膜には混在しているため、膜面内で相転移が生じた場合には秩序相と無秩序相が共存した状態が形成される。この現象を相分離とよんでいる。この相分離により形成された領域は、脂質ラフトとよばれる細胞膜上の分子認識場とほとんど同一である。この相分離現象について、最近の研究により細胞の動的ふるまい、なかでも分裂機能に大きく影響をおよぼしていることが明らかになっている。以下に、その詳細を示す。1992 年に、Lipowsky は出芽という分裂タイプについて、ある理論を提唱した (Lipowsky, 1992)。その理論を簡単に紹介する。この理論は、Helfrich の「自発曲率モデル」を参考にしたものであり (Helfrich, 1973)、自発曲率と弾性エネルギーの関係から完全に出芽を実施できる条件と出芽を不完全にしか実施できない条件を示唆している。半径 R の円形状の平坦な領域を考える。領域の外側には平坦なマトリックスがあり、領域の周辺には表面張力 σ が働いているとする。この領域が半径 $1/C$ の球面 (細胞) の一部として、出芽した状況を考える。このとき、出芽した領域の全エネルギーは以下の式となる。

$$F_d = 2\pi\kappa[(RC - RC_0)^2 + (R/l)\sqrt{1 - (RC/2)^2}]$$

ここで、 $l = \kappa/\sigma$ は陥入長 (invagination length) とよばれる長さである。 C_0 は自発曲率を示し、膜の表裏の非対称性を反映するパラメータである。このとき、完全な出芽が起こるのは RC が ± 2 となるときであり、不完全な出芽は自発曲率 C_0 が 0 ではなく、且つ R/l の値が小さくなることを指している。この理論では、完全な出芽を起こすか不完全な出芽を起こすかには表面張力が影響していることが指摘されている。

vesicle の相分離と分裂とが密接に関連していることを実験的に証明した文献がある (Baumgart et al., 2003)。この文献では、DOPC/SM/cholesterol からなる vesicle で、液液相分離が起こり、それぞれの相で特有の曲率をもつことで、複雑で多様な形状が自発的に表れることを示した。この現象は、上記で紹介した Lipowsky の理論で説明できることを後の報告で示した (Baumgart et al., 2005)。また、このような相分離する多成分を含んだ vesicle にて、塩を添加することで vesicle 内外の浸透圧を変化させ、出芽に至ったことを報告している (Yanagisawa et al., 2008)。浸透圧変化と droplet の表面張力とは、関係性があることは多くの文献で報告されることである (Kierzkowski et al., 2012; Shimizu and Nakashima, 2005)。また、ある文献では、上記と異なる構成の vesicle において、相分離した脂質と比較して相分離しない脂質では膜の荷

電の増加に伴い表面張力の増加が確認されている (Ichikawa et al., 2008)。

つまり、相分離現象により vesicle を分裂させることが可能であることが報告された。そして、この相分離現象が表面張力に影響を与えていることが示唆された。

本分裂システムと上記考察を照らし合わせると、本研究では、droplet の膜は Span80 と Tween80 の混合界面活性剤により構築されている (2.3 章参照)。また、pNPP の加水分解により生じる palmitate が droplet に蓄積されれば 3 種類の界面活性剤が droplet 膜に存在することになる。このため、分裂時、相分離現象が droplet 膜で生じていたことを示すデータこそないものの、三つの界面活性剤はそれぞれ相転移温度が異なることが推測されるため、相分離現象が生じている可能性は否定できない。仮に相分離現象が分裂時に生じていたならば、相分離現象が起こる前と比較して、droplet の表面張力は小さくなっていることが上記より推測される。4.8 章にて droplet のサイズが変わらない状態で表面張力が減少すると、界面活性剤 1 分子の占有面積増加率が増加することを記述した。よって、相分離現象が生じることで droplet 膜を構成する界面活性剤 1 分子の占有面積増加率を増加させる。したがって、相分離現象は droplet の分裂を促進させていると考えられる。

5.本研究のまとめと今後の展望

5.1 本研究のまとめ

本研究では、体積を増加させず表面積のみを増加させることで droplet の形を崩し分裂を誘導するというアイデアに基づいて分裂システムを構築し (図 2)、ねらい通りに体積を増加させず表面積のみを増加させることで droplet を分裂させることができた (図 10)。さらに、分裂を起こすまでは droplet の膜を構成する界面活性剤 1 分子の占有面積を狭めていき、限界占有面積に達すると、droplet の形態が崩れることで表面積を増加させ (図 12.b)、分裂を引き起こしていた。

本分裂について、実験環境を変化させることで、分裂タイプを等分裂、不等分裂、出芽とコントロールすることに成功した (図 19)。具体的には、MO を用いて合成された droplet において、pH12、温度 30°C の条件で等分裂が観察された。また、pH12、温度 25°C で、oil の粘度を 12.92 から 6.31 に段階的に変化させると、不等分裂から等分裂に分裂タイプが段階的に変化することが観察された。さらに MO を用いて合成された droplet において、液体の温度を 40°C に上昇させると droplet は出芽に似た分裂を生じさせた。これは、LP を用いて合成された droplet において、pH12、温度 25°C でも同様の現象が観察された。これらの結果より、私は oil の粘度、温度を変化させることで droplet の分裂タイプをコントロールすることが可能であることを示した。

本研究において、oil の粘度および温度が分裂タイプをコントロールするための重要なファクターであることが示唆された。oil の粘度は温度が高くなると減少し (図 15)、また oil の粘度が小さくなると分裂タイプが等分裂に近づくことから、温度は oil の粘度に影響をおよぼし droplet の分裂タイプ変化を導いたと推測された (3.8-3 章参照)。しかし、熱力学的解析により、温度は oil の粘度以外にも droplet に影響をおよぼしていることが示唆された (3.9 章参照)。また、熱力学的解析により、温度が高くなるとドロップレット膜の表面張力が低下する可能性が示された (図 17)。このことから、droplet の表面張力の分裂タイプに対する影響を考察し、分裂タイプ変化が生じたメカニズムを考察した。

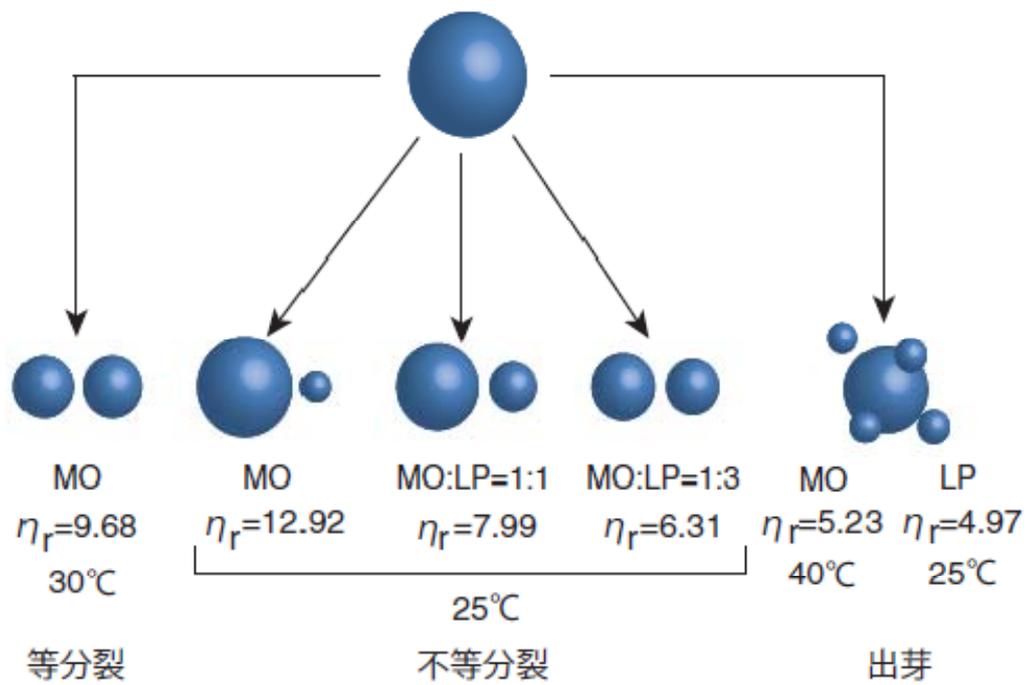


図 19. 各分裂タイプの概略図

5.2 固定性分裂終了細胞群の分裂誘導

一般に固定性分裂終了細胞群とよばれる心筋細胞、神経細胞、赤血球や白血球などの細胞は分裂することができない。しかし、最近の研究により赤血球の分裂増殖誘導の成功が報告された (Niimi et al., 2009)。その報告によると、赤血球産生を促進するホルモン、エリスロポエチンを赤血球が存在する溶液に過剰に添加することにより出芽が観察された。これはエリスロポエチンの過剰投与が赤血球膜にあるエリスロポエチン受容体を暴露させ、それに結合することにより表面積が増加し分裂したのだと考えられている。それが正しいならば、その分裂システムは本研究の分裂システムと原理的には同じである。その研究ではエリスロポエチンを投与して赤血球を分裂させているが、赤血球膜を構成するリン脂質を外部から投与することでも分裂が可能であることが考えられる。さらにエリスロポエチンによる分裂では、結合できる受容体の数が限られ表面積増加にも限度があるが、リン脂質を外部から投与すれば表面積増加に限度はなく、より効率的に分裂を誘導させられると推測される。また本研究結果から、赤血球の外環境を変化させることでその分裂も出芽に限らず不等分裂や等分裂にコントロールできる可能性がある。赤血球の分裂に成功できたならば、分裂能力を持たない他の固定性分裂終了細胞群全てに同じ方法で分裂を誘導することが期待できる。

本アイデアにより分裂を達成しても、分裂後の細胞は成長することができないために、このままでは医療技術に転用しても効果を期待することは難しい。したがって、今後の研究課題の一つとして、分裂させた細胞をいかにして能力を喪失させずにオリジナルの細胞粒径にまで成長させるかが挙げられるだろう。それが実現されて初めて、赤血球増殖では輸血の安定供給に、心筋細胞増殖では心筋梗塞や重症心不全などで壊死した心筋細胞の代用に、さまざまな医療技術に貢献できる可能性が見えてくると考える。

5.3 原始の細胞が行っていた分裂システムから現在の細胞が行っている分裂システムへと変化した進化の道筋を辿る

L型とよばれる細胞壁を失っても増殖できるバクテリアは、1935年に Emmy Klieneberger によって発見された (Klieneberger, 1935)。当初、*Streptococcus moniliformis* を純培養した際に観察された細胞壁が存在しない菌についてマイコプラズマと認識されていたが、1939年に Dienes が培地の条件を変えて、細菌から誘導できることを示した (Dienes, 1939)。以後、Klieneberger が L-form (L型菌) と名付けて研究が始まった。L型にシフトした菌は免疫細胞に殺され難くなり、普通の菌と違って体の中で長く生き延び、その結果さまざまな感染症や慢性疾患の原因となると指摘され (Domingue GJ and Woody, 1997)古くから研究されてきたが、分子生物学的な研究はほとんど行われて来なかった。なぜなら、研究室環境で人為的に L型株を分離するには、

スクロースなどの浸透圧保護剤とペニシリンやリゾチームなどの細胞壁の合成を抑制または破壊する物質を含む培地での長期間にわたる継続培養が必要であり、かつ細胞壁を失っているため壊れやすく、その扱いが大変難しい。また、安定して増殖する L 型株には遺伝的変異が必要であり、その分離は再現性に乏しい。したがって、細胞壁合成に関連していると報告のある HSP60 (McLennan and Masters, 1998) の発現が減少することで菌を L 型にシフトさせたのではないかと考えられているが、まだ完全に特定できていない。

近年、枯草菌 (*B. subtilis*) で再現性が良く効率的な L 型株の分離と培養の方法が確立され、ようやく遺伝学的な解析が可能となり、L 型が行う膜物質の過剰産生による分裂について詳細な解析が進められた。リゾチーム処理により細胞壁を破壊され L 型にシフトした *B. subtilis* は、*accDA* 合成遺伝子の過剰発現およびイソプレノイド合成遺伝子である *ispA* 遺伝子の機能抑制をもたらす遺伝子変異が起こっていることが報告されている (Domínguez-Cuevas et al., 2012; Leaver et al., 2009; Mercier et al., 2012)。*accDA* はアセチル CoA からマロニル CoA を合成する酵素であるアセチル CoA カルボキシラーゼ複合体の主要な構成タンパク質で、そのマロニル CoA は細胞膜の主要な構成成分である脂肪酸およびリン脂質の合成における基質である。また、マロニル CoA の細胞内における濃度の上昇は細胞膜合成遺伝子 (脂肪酸合成遺伝子およびリン脂質合成遺伝子) の高発現を誘導する (Schujman et al., 2006)。とはいえ、*accDA* 遺伝子の過剰発現のみで菌は表面積増加による分裂を行うかという点、それだけでは菌の膜は不安定化し、溶菌してしまう (図 20)。よって、*ispA* 遺伝子の機能抑制をすることで、溶菌を抑え安定化させる必要があった。この 2 つの遺伝子変異により、L 型は細胞膜の過剰産生を行い、細胞膜の表面積を増大させることで細胞分裂を誘導することができるのである (Mercier et al., 2013)。同様の現象を、分裂機能を抑制し更に細胞壁を壊しプロトプラスト化させた細胞に膜物質を添加することで人為的に誘導することができた (図 20)。

この FtsZ に依らない従来とは異なる分裂は、本研究のような原始的な細胞分裂を再現した単純な合成膜の自発的な分裂の機構と一致しており (Peterlin et al., 2009; Svetina, 2009; Zhu and Szostak, 2009)、細胞壁を獲得する以前の原始的な生命体は L 型と同様の方法で分裂および増殖していた可能性があると考えられ、原始生命の謎にせまりうる新しいモデルとして期待されている (Errington, 2013)。

この分裂機構について、本研究によりその分裂システムの再現とメカニズムの解明に成功している。本研究から、当分裂システムにおいて分裂タイプを決定する重要なファクターは膜の表面張力の変化であることが示唆された。また当実験結果より出芽と等分裂の表面張力の差はそれほど大きくないはずである (図 13)。よって L 型菌の表面張力が当実験で用いられた droplet と同じ表面張力を保持していなくとも、少ない粘度変化で L 型菌は出芽から等分裂に変化することが十分に予想される。そうであるならば出芽から等分裂へ分裂が移行したときの表面張力の差こそ、表面積増加を

起因とした分裂システムで等分裂を行うのに必要な変化である。しかし、原始細胞が内包していただろう単純なシステムで恒常的にその変化をもたらすことが困難であった可能性が、現在の分裂システムに進化したことから窺える。原始細胞がその変化を起こすことの困難さを思案するとともに、どのようにして分裂システムを変更させることができればその表面張力の変化を生み出すことができ、安定して等分裂を実現できるのかを推測することこそが現在の分裂システムに進化していった過程を辿る方法であると考察する。

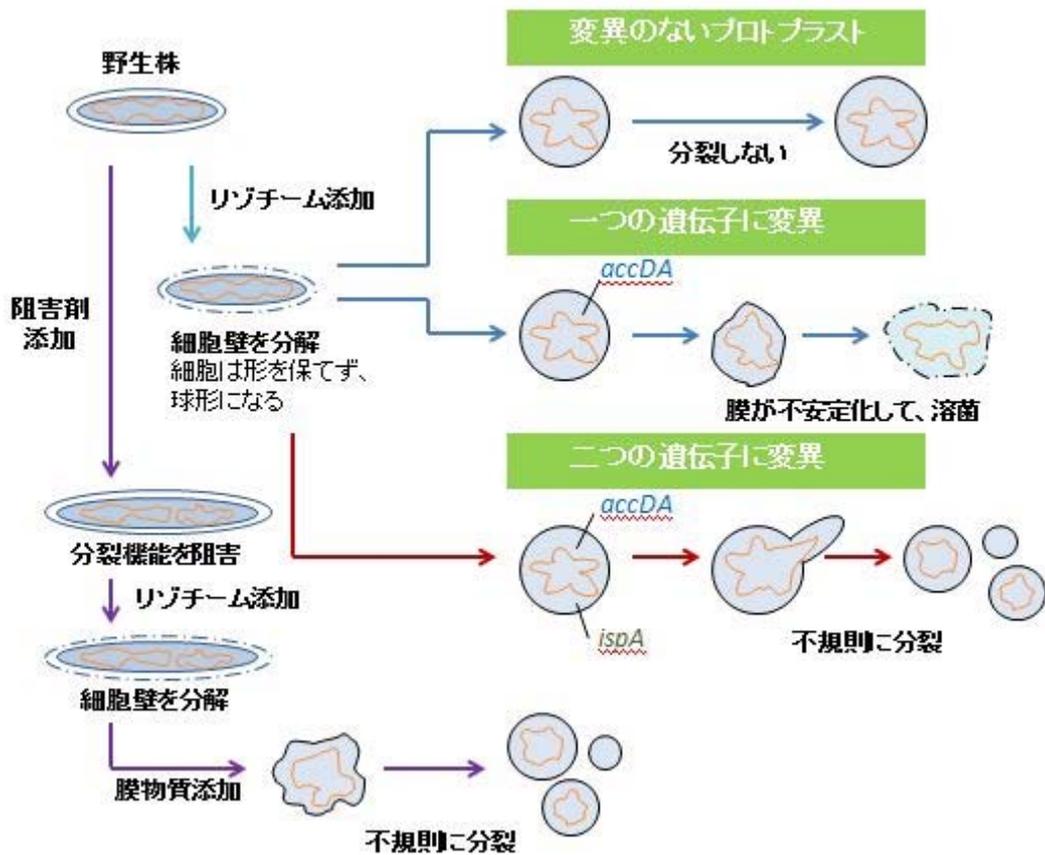


図 20. L 型菌の分裂の仕組み

6. 謝辞

本研究を行うに当たって多くの方々の御指導御尽力がありました。

特に佐藤匠徳教授および菊池純一教授、安原主馬助教に心より感謝と敬意の意を表します。この研究室で過ごした5年間は非常に刺激的で、今までの人生で一番困難に遭遇し、それに伴いやりがいに満ちたものでした。佐藤匠徳教授にはいつも良く目をかけていただき、文章の添削という細かい所からサイエンスに対するものの考え方など、多々至らないところが多くあった私に対して、最後までさまざまなことをご指導くださって大変感謝しています。また菊池純一教授には研究のアドバイスを親身にしていただき、本当にありがたく思っております。安原主馬助教には、実験手法からデータの読み方、その考察にいたるまで多くのことを学ばせて頂きました。

研究室秘書の高橋遼子さんをはじめ、何かと心配をおかけした赤沼啓志助教、浦山恭次助教、高田智夫助教にもお世話になりました。本当に有難うございます。

また同期の村越幹昭君や、そしてD2の豊田由美子さんにM2のみなさん、今まで有難うございました。辛いことや苦しいこともたくさんありましたが、それでもやってこられたのは皆さんのお陰だと思っております。

最後にこの5年間支え応援していただいた家族を含め全ての人に感謝します。

7. 参考文献

- Acton, J.C., and Saffle, R.L.(1970). Stability of oil-in-water emulsions. 1. Effects of surface tension, level of oil, viscosity and type of meat protein. *J. Food Sci.* 35, 852-855.
- Andes-Koback, M., and Keating, C.D.(2011). Complete budding and asymmetric division of primitive model cells to produce daughter vesicles with different interior and membrane compositions. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 9545-9555.
- Bachmann, P.A., Luisi, P.L., and Lang, J.(1992). Autocatalytic self-replicating micelles as models for prebiotic structures. *Nature* 357, 57-59.
- Bachmann, P.A., Walde, P., Luisi, P.L., and Lang, J.(1991). Self-replicating micelles: aqueous micelles and enzymatically driven reactions in reverse micelles. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 8204-8209.
- Bachmann, P.A., Walde, P., Luisi, P.L., and Lang, J.(1990). Self-replicating reverse micelles and chemical autopoiesis. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 8200-8201.
- Bajer, A.S., and Molè-Bajer, J.(1972). Spindle dynamics and chromosome movements (New York: Academic Press).
- Baumgart, T., Das, S., Webb, W.W., and Jenkins, J.T.(2005). Membrane elasticity in giant vesicles with fluid phase coexistence. *Biophys. J.* 89, 1067-1080.
- Baumgart, T., Hess, S.T., and Webb, W.W.(2003). Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature* 425, 821-824.
- Benner, S.A., and Sismour, A.M.(2005). Synthetic biology. *Nat. Rev. Genet.* 6, 533-543.
- Browne, K.P., Walker, D.A., Bishop, K.J., and Grzybowski, B.A.(2010). Self-division of macroscopic droplets: partitioning of nanosized cargo into nanoscale micelles. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 49, 6756-6759.
- Catenaccio, A., Daruich, Y., and Magallanes, C.(2003). Temperature dependence of the permittivity of water. *Chemical Physics Letters* 367, 669-671.

- Chan, D.Y.C., and Mitchell, D.J.(1983). The free energy of an electrical double layer. *J. Colloid Interface Sci.* 95, 193-197.
- Davies, J.T.(1985). Drop sizes of emulsions related to turbulent energy dissipation rates. *Chemical Engineering Science* 40, 839-842.
- Dienes, L.(1939). L Organisms of *Klieneberger* and *Streptobacillus Moniliformis*. *Journal of Infectious Diseases* 65, 24-42.
- Domingue GJ, S., and Woody, H.B.(1997). Bacterial persistence and expression of disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 320-344.
- Domínguez-Cuevas, P., Mercier, R., Leaver, M., Kawai, Y., and Errington, J.(2012). The rod to L-form transition of *Bacillus subtilis* is limited by a requirement for the protoplast to escape from the cell wall sacculus. *Mol. Microbiol.* 83, 52-66.
- Errington, J.(2013). L-form bacteria, cell walls and the origins of life. *Open Biol.* 3, 120143.
- Fainerman, V.B., Miller, R., Wüstneck, R., and Makievski, A.V.(1996). Adsorption Isotherm and Surface Tension Equation for a Surfactant with Changing Partial Molar Area. 1. Ideal Surface Layer. *J. Phys. Chem.* 100, 7669-7675.
- Feke, D.L., Prabhu, N.D., Mann, J.A., and Mann, J.A.(1984). A formulation of the short-range repulsion between spherical colloidal particles. *J. Phys. Chem.* 88, 5735-5739.
- Ferri, J.K., and Stebe, K.J.(2000). Which surfactants reduce surface tension faster? A scaling argument for diffusion-controlled adsorption. *Adv. Colloid Interface Sci.* 85, 61-97.
- Gray, J.(1922). *Memoirs: Surface Tension and Cell-Division*. *Quarterly Journal of Microscopical Science* s2-66, 235-245.
- Groeneweg, F., van Dieren, F., and Agterof, W.G.M.(1994). Droplet break-up in a stirred water-in-oil emulsion in the presence of emulsifiers. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects* 91, 207-214.
- Helfrich, W.(1973). Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Z. Naturforsch. C.* 28, 693-703.

Hotani, H.(1984). Transformation pathways of liposomes. *J. Mol. Biol.* 178, 113-120.

Ichikawa, M., Shitamichi, Y., and Kimura, Y.(2008). Extension and measurements on a phospholipid vesicle by use of dual-beam optical tweezers. *Micro-NanoMechatronics and Human Science*, 2008. MHS 2008. International Symposium on 71-76.

Janssen, J.J.M., Boon, A., and Agterof, W.G.M.(1994). Droplet break-up in simple shear flow in the presence of emulsifiers. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects* 91, 141-148.

Kas, J., and Sackmann, E.(1991). Shape transitions and shape stability of giant phospholipid vesicles in pure water induced by area-to-volume changes. *Biophys. J.* 60, 825-844.

Kierzkowski, D., Nakayama, N., Routier-Kierzkowska, A.L., Weber, A., Bayer, E., Schorderet, M., Reinhardt, D., Kuhlemeier, C., and Smith, R.S.(2012). Elastic domains regulate growth and organogenesis in the plant shoot apical meristem. *Science* 335, 1096-1099.

Klieneberger, E.(1935). The natural occurrence of pleuropneumonia-like organism in apparent symbiosis with *Strrptobacillus moniliformis* and other bacteria. *J. Pathol. Bacteriol.* 40, 93-105.

Kurihara, K., Tamura, M., Shohda, K., Toyota, T., Suzuki, K., and Sugawara, T.(2011). Self-reproduction of supramolecular giant vesicles combined with the amplification of encapsulated DNA. *Nat. Chem.* 3, 775-781.

Le Duc, S.(1911). *The mechanism of life* (New York: Rebman).

Leaver, M., Dominguez-Cuevas, P., Coxhead, J.M., Daniel, R.A., and Errington, J.(2009). Life without a wall or division machine in *Bacillus subtilis*. *Nature* 457, 849-853.

Levin, Y., and Flores-Mena, J.E.(2001). Surface tension of strong electrolytes. *Europhysics Letters* 56, 187-192.

Lipowsky, R.(1992). Budding of membranes induced by intramembrane domains. *J. Phys. II France* 2, 1825-1840.

Lu, H.M., and Jiang, Q.(2005). Size-dependent surface tension and Tolman's length of droplets. *Langmuir* 21, 779-781.

- Mabuchi, I., and Okuno, M.(1977). The effect of myosin antibody on the division of starfish blastomeres. *J. Cell Biol.* 74, 251-263.
- Malkin, A.Y., Masalova, I., Slatter, P., and Wilson, K.(2004). Effect of droplet size on the rheological properties of highly-concentrated w/o emulsions. *Rheologica Acta* 43, 584-591.
- Matsuki, H., and Kaneshina, S.(2006). リン脂質二分子膜相転移の熱力学. *熱測定* 33, 74-82.
- McLennan, N., and Masters, M.(1998). GroE is vital for cell-wall synthesis. *Nature* 392, 139.
- Mercier, R., Dominguez-Cuevas, P., and Errington, J.(2012). Crucial role for membrane fluidity in proliferation of primitive cells. *Cell. Rep.* 1, 417-423.
- Mercier, R., Kawai, Y., and Errington, J.(2013). Excess membrane synthesis drives a primitive mode of cell proliferation. *Cell* 152, 997-1007.
- Mishra, M., Kashiwazaki, J., Takagi, T., Srinivasan, R., Huang, Y., Balasubramanian, M.K., and Mabuchi, I.(2013). In vitro contraction of cytokinetic ring depends on myosin II but not on actin dynamics. *Nat. Cell Biol.* 15, 853-859.
- Monnard, P.A., and Deamer, D.W.(2002). Membrane self-assembly processes: steps toward the first cellular life. *Anat. Rec.* 268, 196-207.
- Morgenstern, S., Kessler, G., Auerbach, J., Flor, R.V., and Klein, B.(1965). An automated p-nitrophenylphosphate serum alkaline phosphatase procedure for the AutoAnalyzer. *Clin. Chem.* 11, 876-888.
- Niimi, G., Ohashi, K., Ide, T., and Pereda, J.(2009). Budding and direct division of adult human erythrocytes in serum-free cultures. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 86, 73-77.
- Östergren, G.(1951). The mechanism of co-orientation in bivalents and multivalents. *Hereditas* 37, 85-156.
- Paweletz, N.(2001). Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 72-75.
- Perry, M.M., John, H.A., and Thomas, N.S.(1971). Actin-like filaments in the cleavage furrow

of newt egg. *Exp. Cell Res.* 65, 249-253.

Peterlin, P., Arrigler, V., Kogej, K., Svetina, S., and Walde, P.(2009). Growth and shape transformations of giant phospholipid vesicles upon interaction with an aqueous oleic acid suspension. *Chem. Phys. Lipids* 159, 67-76.

Rappaport, R.(1997). Cleavage furrow establishment by the moving mitotic apparatus. *Dev. Growth Differ.* 39, 221-226.

Rappaport, R., and Rappaport, B.N.(1994). Cleavage in conical sand dollar eggs. *Dev. Biol.* 164, 258-266.

Ris, H.(1949). The anaphase movement of chromosomes in the spermatocytes of the grasshopper. *Biol. Bull.* 96, 90-106.

Ris, H.(1943). A quantitative study of anaphase movement in the aphid *Tamalia*. *Biol. Bull.* 85, 164-179.

Schrader, F.(1953). *Mitosis; the movements of chromosomes in cell division* (New York: Columbia University Press).

Schroeder, T.E.(1968). Cytokinesis: filaments in the cleavage furrow. *Exp. Cell Res.* 53, 272-276.

Schujman, G.E., Guerin, M., Buschiazzi, A., Schaeffer, F., Llarrull, L.I., Reh, G., Vila, A.J., Alzari, P.M., and de Mendoza, D.(2006). Structural basis of lipid biosynthesis regulation in Gram-positive bacteria. *Embo j.* 25, 4074-4083.

Shimizu, M., and Nakashima, T.(2005). 浸透圧を利用したW/O/Wエマルションの滴径制御と安定性. 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告 50, 21-27.

Suzuki, K., Toyota, T., Sato, K., Iwasaka, M., Ueno, S., and Sugawara, T.(2007). Characteristic curved structure derived from collagen-containing tubular giant vesicles under static magnetic field. *Chemical Physics Letters* 440, 286-290.

Svetina, S.(2009). Vesicle budding and the origin of cellular life. *Chemphyschem* 10, 2769-2776.

Szostak, J.W., Bartel, D.P., and Luisi, P.L.(2001). Synthesizing life. *Nature* 409, 387-390.

Szybalski, W.(1974). In vivo and in vitro initiation of transcription. *Adv. Exp. Med. Biol.* 44, 23-24.

Takakura, K., and Sugawara, T.(2004). Membrane dynamics of a myelin-like giant multilamellar vesicle applicable to a self-reproducing system. *Langmuir* 20, 3832-3834.

Takakura, K., Toyota, T., and Sugawara, T.(2003). A novel system of self-reproducing giant vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 8134-8140.

Tanaka, T., Hack, K., Iida, T., and Hara, S.(1996). Application of thermodynamic databases to the evaluation of surface tensions of molten alloys, salt mixtures and oxide mixtures. *Zeitschrift Für Metallkunde* 87, 380-389.

Walde, P., Wick, R., Fresta, M., Mangone, A., and Luisi, P.L.(1994). Autopoietic self-reproduction of fatty acid vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 11649-11654.

Wick, R., Walde, P., and Luisi, P.L.(1995). Light microscopic investigations of the autocatalytic self-reproduction of giant vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 1435-1436.

Wilson, E.B.(1928). *The cell in development and heredity* (New York: The Macmillan Company).

Yanagisawa, M., Imai, M., and Taniguchi, T.(2008). Shape deformation of ternary vesicles coupled with phase separation. *Phys. Rev. Lett.* 100, 148102.

Yonemura, S., Mabuchi, I., and Tsukita, S.(1991). Mass isolation of cleavage furrows from dividing sea urchin eggs. *J. Cell Sci.* 100, 73-84.

Zhu, T.F., Adamala, K., Zhang, N., and Szostak, J.W.(2012). Photochemically driven redox chemistry induces protocell membrane pearling and division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 9828-9832.

Zhu, T.F., and Szostak, J.W.(2009). Coupled growth and division of model protocell membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 5705-5713.