

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23681021

研究課題名(和文)新規脂質ナノチューブ構築法の確立と細胞機能制御

研究課題名(英文)Construction lipid nanotubes for control of cellular functions

研究代表者

佐々木 善浩(Sasaki, Yoshihiro)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90314541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、脂質から形成されるナノチューブが遠距離の細胞間を連結することで細胞間コミュニケーションを制御していることが明らかになっていが、この脂質ナノチューブを人工系で容易かつ大量に作製する手法は見出されていない。

本研究では、脂質ナノチューブを用いた細胞膜の連結手法を確立し細胞内機能の制御とその解明を実現することを研究全体の目的とした。その中で、人工細胞間の脂質ナノチューブによる連結およびその手法の最適化を行い、区画化された微小流路中へのリポソームの固定化手法を確立し、これらの脂質ナノチューブによる連結を実現した。また、リポソーム-細胞間の脂質ナノチューブによる連結が可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Lipid nanotubes are nanoscale cylindrical objects formed with lipid bilayer membranes and have attracted remarkable attention due to their applications in biotechnology and nanotechnology. Biological lipid nanotubes, known as tunneling nanotubes, that connect biological cells over a long distance were recently investigated as a new cell-to-cell communication system. Here, novel methods were established to prepare tailor-made lipid nanotubes, which can be used to transport biological molecules and incorporate membrane proteins. By applying various external stimuli including electric and magnetic field to immobilized liposomes, we obtained long range membrane-bound lipid nanotubes arranged in a well-controlled direction. The lipid membrane engineering provides a novel and facile fabrication strategy for liposomal network array inter-connected via the lipid nanotubes.

研究分野：生体関連高分子化学

キーワード：脂質ナノチューブ ナノ粒子 細胞間コミュニケーション 人工細胞膜 リポソーム

### 1. 研究開始当初の背景

近年、脂質から形成されるナノサイズのチューブ（脂質ナノチューブ）が遠距離の細胞間を連結することで細胞間コミュニケーションに関与し、高度な生命活動を制御していることが明らかになってきた。この脂質ナノチューブは細胞間コミュニケーションを理解するための新しい機構として基礎生物学的、医学・薬学的に極めて重要であるが、膜タンパク質を解析する場合に用いられる人工細胞（リポソーム）のように、脂質ナノチューブを人工系で容易かつ大量に作製する手法は未だ見出されていなかった。本研究では脂質ナノチューブを簡便かつ大量に作製する手法を確立するとともに、これを実際の細胞系に適用することで、脂質ナノチューブが関与する細胞間コミュニケーションを人工系で再構築し、その機構解明と細胞機能制御に利用できるものとの着想に至り本研究を立案した。

### 2. 研究の目的

本研究では、ナノ微粒子の泳動現象を利用し、脂質ナノチューブの革新的な人工合成法の確立を目指す。さらに、この脂質ナノチューブが関与する細胞間コミュニケーションを再構築することでその機構解明と細胞機能制御を行う。本研究で開発する手法は、生体膜を含め、原理的にはあらゆる脂質膜系へ適用しうる点が学術的な特色である。また、電場などの外部場を用いたトップダウン的なナノ粒子の操作と、脂質のボトムアップ的な自己組織化能とをうまく融合させることで脂質チューブ形成を制御するアプローチは国内外を通して全く例がなく本研究の独創的な点である。

### 3. 研究の方法

本研究の第一段階として、脂質ナノチューブ作製法を確立する。電場、磁場などにより、ナノ微粒子を泳動させ、チューブを作製する手法を確立する。外部場強度、粒子サイズ、脂質膜組成とチューブ形成との相関について網羅的に明らかにし、脂質ナノチューブ形成のメカニズム解明を行う。また、脂質ナノチューブによる細胞間連結と、細胞間での脂質ナノチューブを介した物質、情報輸送システムの実現に重点をおいて研究を推進する。脂質ナノチューブを介した DNA の細胞内導入に基づく細胞内蛋白質発現や、細胞からリポソームへの脂質チューブを介した細胞内物質の抽出、細胞間の脂質チューブを介した物質、情報伝搬による細胞機能解析および制御を実現する。

具体的には以下のような実験をおこなった。薄膜法を用い、リン脂質からなるリポソーム溶液（1 mM）を調製した。ここで、負電荷を有するポリスチレン微粒子溶液により脂質薄膜の水和を行うことでリポソームに種々の粒径の荷電微粒子を内包した。任意の

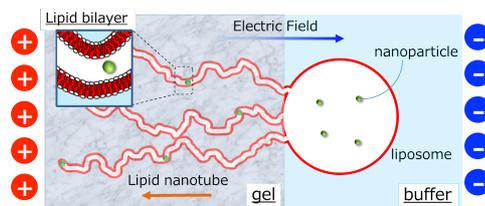


図 1 ナノ微粒子の電気泳動による脂質ナノチューブ作成の模式図

重量濃度のアガロースゲルを作製し、チャンバー（ibidi  $\mu$ -Slide Chemotaxis3D）中の空隙に固定化した。ゲルの片側に荷電微粒子を内包したリポソーム溶液を、もう片側には緩衝液を加え、緩衝液側が正となるように電圧を印加した。（図 1）。共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いた光褪色後蛍光回復法（FRAP）により、ナノチューブを形成する脂質膜の流動性の評価を行った。またナノチューブの直径を測定するため、フリーズフラクチャーレプリカ法による透過型電子顕微鏡観察や、STED（誘導放出制御）顕微鏡などによる蛍光観察を行った。細胞への応用として、アガロースゲル中に固定化した細胞に対して上記と同様のナノチューブ形成を行い、リポソームと細胞をナノチューブで接続する方法についても検討した。

### 4. 研究成果

ナノチューブを形成する要因としてゲル濃度、電圧、ナノ粒子の粒径の3つのパラメーターに着目し、蛍光顕微鏡によりその形成挙動の観察を行った。

まず、アガロースゲルの重量濃度を 0.5 から 2 wt%まで変化させ、200 nm の荷電微粒子を含有したリポソームに 50 V の電圧を 5 分間印加した後、ゲル中の脂質ナノチューブを蛍光顕微鏡観察により評価した。145×110  $\mu$ m 中に存在するナノチューブの平均長および 40  $\mu$ m 四方に存在するチューブ本数を評価した結果を図 2 に示す。まずゲル濃度が 1 wt% においては、ゲルの網目構造に沿って長く伸長した脂質ナノチューブが形成されていることがわかった（図 2a）。一方、ゲル濃度を 2 wt%まで増加させると、そのチューブ本数が大幅に増加するものの、長さの短いナノチューブが形成されることがわかった（図 2a および b）。この結果は、2 wt%のゲルにおいては、その網目のサイズが比較的小さいため、長いチューブが伸長することができず、切断されたナノチューブが多数生成したものと解釈される。

またナノチューブ形成の電圧依存性について検討を行ったところ、電圧の増加に伴いチューブの本数、長さ共に増加することから、このナノチューブが確かに微粒子の泳動により形成されていることが示された。しかしながら、40 V 以上の高電圧を印加すると、その本数および長さも減少することがわかった。これは高電圧下では、形成されたナノチューブの崩壊が引き起こされていることを

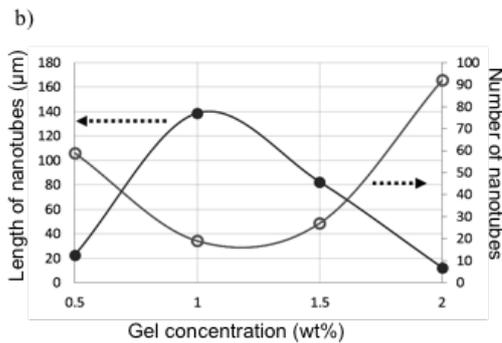
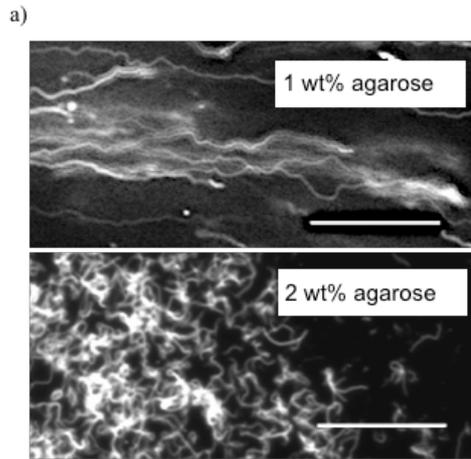


図2 (a) 1 wt% および 2 wt% のアガロースゲル中に作製された脂質ナノチューブの共焦点レーザー顕微鏡観察像。Bar = 20  $\mu\text{m}$ 。(b) 形成される脂質ナノチューブの長さ(●)および本数(○)のアガロースゲル濃度依存性。

示唆している。さらに、異なる粒径(100, 200, 500 nm)を有する荷電ナノ粒子を用い、粒径とナノチューブ構造との相関について検討したところ、いずれの粒径の粒子を用いた場合でもナノチューブの伸長が観察された。またここで得られるナノチューブの輝度には大きな変化は見られなかったことから、ナノチューブ径は用いる粒子の粒径には依存しないこともわかった。フリーズフラクチャーレプリカ法によるTEM観察結果からはその直径が50~150 nmであること、さらにFRAP測定の結果、消光後に蛍光の回復が見られたことから、このナノチューブが確かに流動性のある脂質二分子膜によって形成されていることも示された。以上の結果から、比較的簡便な手法で脂質ナノチューブを効率的かつ大量に得られること、さらにゲル濃度や電圧を変化させることで、脂質ナノチューブ長および数を制御しうることが明らかとなった。

さらに、ここで得られた脂質ナノチューブについて、凍結切断レプリカ法を用いた透過型電子顕微鏡(TEM)によりそのモルフォロジーを観察したところ、得られるナノチューブの直径が50~150 nmであることが示された。本手法により得られるナノチューブは脂質二分子膜から形成されているものと考えら

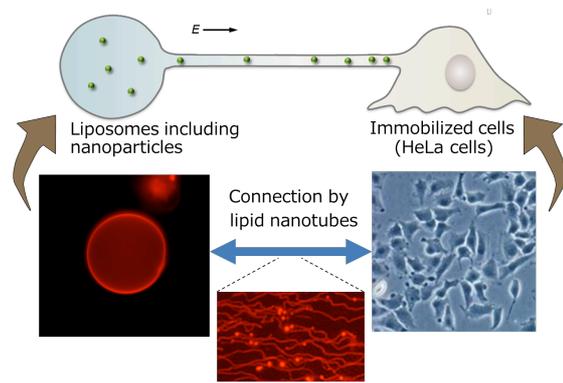


図3 脂質ナノチューブによる人工細胞(リポソーム)と天然細胞との連結の概念図。

れるが、この点について検討を行うため、脂質二分子膜の重要な特性の一つである脂質分子の側方拡散に伴う膜の流動性について検討をおこなった。光褪色後蛍光回復測定により膜の流動性を評価したところ、消光後に10秒前後でナノチューブ由来の蛍光の回復が見られたことから、このナノチューブが流動性のある脂質二分子膜によって形成されていることが示された。

HeLa細胞と荷電微微粒子を内包したリポソームを同一基板上に固定化して電圧を印可することで、リポソームから伸長した脂質ナノチューブによる細胞間の連結を試みた(図3)。HeLa細胞を37°Cでインキュベートして基板に固定化した後、アビジン-ビオチン相互作用を用いてこの基板にさらにジャイアントリポソームを固定化した。このように細胞とジャイアントリポソームが固定化された基板に対して、電圧を印加すると、リポソームから伸長したナノチューブがHeLa細胞に接続することが確認された。この結果は、細胞のviabilityや内水相の物質輸送の有無など、検討すべき点はあるが、脂質ナノチューブにより天然の細胞を連結できる手法を予備的に確立した点で興味深い。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Y. Sekine, Y. Moritani, T. Ikeda-Fukazawa, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, "A Hybrid Hydrogel Biomaterial by Nanogel Engineering: Bottom-Up Design with Nanogel and Liposome Building Blocks to Develop a Multidrug Delivery System" *Adv. Healthcare Mater.* **2012**, 1(6), 722-728. (査読有)
- ② Y. Sekine, K. Abe, A. Shimizu, Y. Sasaki, S. Sawada, K. Akiyoshi, "Shear Flow-Induced Nanotubulation of Surface-Immobilized Liposomes" *RSC Advances* **2012**, 2, 2682-2684. (査読有)
- ③ M. Mukai, K. Maruo, Y. Sasaki, J. Kikuchi, "Intermolecular Communication on a Liposomal Membrane: Enzymatic

Amplification of a Photonic Signal with a Gemini Peptide Lipid as a Membrane-Bound Artificial Receptor" *Chem-Eur. J.* **2012**, 18, 3258-3263. (査読有)

- ④ M. Mukai, Y. Sasaki, J. Kikuchi, "Fusion-Triggered Switching of Enzymatic Activity on an Artificial Cell Membrane" *Sensors* **2012**, 12, 5966-5977. (査読有)
- ⑤ Y. Sasaki, S. Yamane, K. Kurosu, S. Sawada, K. Akiyoshi, "Templated Formation of Hydroxyapatite Nanoparticles from Self-Assembled Nanogels Containing Tricarboxylate Groups" *Polymers* **2012**, 4, 1056-1064. (査読有)
- ⑥ Y. Sasaki, K. Akiyoshi, "Self-Assembled Nanogel Engineering for Advanced Biomedical Applications" *Chem. Lett.* **2012**, 41, 202-208. (査読有)
- ⑦ K. Katagiri, K. Ohta, K. Koumoto, K. Kurosu, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, "Templated nucleation of hybrid iron oxide nanoparticles on polysaccharide nanogels" *Colloid Polym. Sci.* **2013**, 291(6), 1375-1380. (査読有)
- ⑧ M. Yokota, Y. Kobayashi, J. Morita, H. Suzuki, Y. Hashimoto, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, K. Moriyama, "Therapeutic effect of nanogel-based delivery of soluble FGFR2 with S252W mutation on craniosynostosis" *PLoS ONE*, **2014**, 9(7): e101693. doi:10.1371/journal.pone.0101693. (査読有)
- ⑨ Y. Sasaki, Y. Tsuchido, S. Sawada, K. Akiyoshi, "Protein nanogelation with vitamin B6-bearing pullulan as a bio-crosslinker" *Polymer J.* **2014**, in press (査読有)
- ⑩ K. Katagiri, K. Ohta, K. Sako, K. Inumaru, K. Hayashi, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, "Development and potential theranostic applications of a self-assembled hybrid of magnetic nanoparticle clusters with polysaccharide nanogels" *ChemPlusChem*, **2014**, in press (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

- ① Y. Sasaki, Tailor-made lipid membrane engineering: Soft nanotubes formation controlled by external field, Asian International Symposium - Colloid and Surface Chemistry - The 94th Annual Meeting of CSJ, Nagoya University (Nagoya City), Japan, Mar. 28. 2014.
- ② 佐々木善浩, 脂質膜プロセッシングによるバイオマテリアルの創成, 第17回生命化学研究会 ~生命化学の大海原を探る~, 三翠園(高知市), 2015年1月7日.
- ③ 佐々木善浩, テーラーメイド脂質膜工学:脂質膜ナノチューブの形成制御, 第12回バイオテンプレート研究会, 東京工業大学(東京都), 東京, 2013年6月7日
- ④ Y. Sasaki, Tailor-made Lipid Membrane

Engineering: Lipid Nanotube Networks for Nanofluidics, Bio4Apps 2013, Tokyo Medical and Dental University (Tokyo), Japan, Oct. 30, 2013.

- ⑤ Y. Sasaki, Nano-tubulation of surface immobilized liposomes for networked artificial cell membrane, The 6th International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology, Ha Long City, Vietnam, Oct. 30-Nov. 2 2012.
- ⑥ Y. Sasaki, Hybrid Organic-Inorganic Polysaccharide Nanogels toward Biomedical Applications, KIFEE-Symposium 2012, Trondheim, Norway, Sep. 10-13 2012.
- ⑦ 佐々木善浩, バイオチップ創製に向けたリポソームネットワークアレイの構築, 東海高分子研究会, 名古屋大学(名古屋), 2012年6月2日
- ⑧ 佐々木善浩, リポソームによる人工細胞の創成. 次世代の物質科学・ナノサイエンスを探る, 北海道大学, 北海道, 2012年1月6日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 善浩 (SASAKI, Yoshihiro)  
京都大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号 : 90314541