

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：82704

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23850022

研究課題名（和文）小胞輸送モデルリポソームを用いた人工シナプスリポソームアレイの構築

研究課題名（英文）Construction of artificial synapse liposome array using the vesicular transport liposome model

研究代表者

神谷 厚輝 (KAMIYA KOKI)

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・バイオマイクロシステムプロジェクト・研究員

研究者番号：70612315

研究成果の概要（和文）：

本研究は人工シナプス作製のため、より生体膜に近い構造(リン脂質非対称)のリポソーム作製法を考案した。この方法はリン脂質非対称膜へジェット水流を印加することにより非対称膜リポソームを作製する。そして、この非対称膜を用いリン脂質運動(フリップ-フロップ)の観察を行った。この非対称膜リポソームは人工細胞モデル研究や DDS 分野等に大いに役立つと考える。

研究成果の概要（英文）：

This study conducted the preparation of asymmetric cell-sized lipid vesicles from a planar lipid bilayer using pulsed jet flow. First, cell-sized vesicles (diameter of 5  $\mu\text{m}$  in over 1 day) were stably formed using an improved double-well device wherein a separator with a 150- $\mu\text{m}$ -hole diameter, was mounted between the wells. Moreover, asymmetric vesicles of phosphatidylserine lipids were successfully formed on each leaflet using this device. The asymmetric cell-sized lipid vesicles will create new opportunities for artificial cell research model such as the interactions between lipid membranes and proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2011 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2012 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |

研究分野：化学

科研費の分科・細目：生体関連化学

キーワード：リポソーム、リン脂質、人工細胞モデル、タンパク質、ベシクル、非対称膜

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜のリン脂質組成は内膜、外膜で非対称に分布している。真核生物の形質膜の場合は、外膜にはホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン等が多く分布し、内膜にはホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン等が多く分布している。このリン脂質非対称性はシグナル伝達、細胞分裂やエンド/エキソサイトーシス等の基礎的な細胞機

能の役割を果たしている。

リポソーム(ベシクル)はリン脂質二分子膜から構成され細胞膜と類似な構造を持っており、生体適合性が高いため薬物担体や化粧品等に利用されている。中でも、細胞サイズ(10-30  $\mu\text{m}$ )のリポソーム(巨大リポソーム)が光学顕微鏡下でリアルタイムの可視化による膜挙動解析ができる唯一のリポソームとして、近年、生命科学分野の細胞膜構

造や膜タンパク質研究に人工細胞モデルとして積極的に取り入れられるようになった。現在、巨大リポソーム作製法で最も使用されている方法は静置水和法である。クロロホルムに溶解したリン脂質をアルゴン気流下で乾燥させ、蒸留水等を加え、自己組織的にリポソームを形成させる方法である。簡便に巨大リポソームが作製できるが、細胞膜のように外膜と内膜を異なる組成のリン脂質膜(リン脂質非対称膜)を作製することは困難である。また、サイズが揃わなく、生理的な溶液条件下ではリポソーム生成効率が高くない。さらに、タンパク質などの高分子においては封入率の低下という問題点がある。

## 2. 研究の目的

近年、微小電子機械システム (Micro Electro Mechanical System; MEMS) を用いた効率的な巨大リポソーム作製法が盛んに研究されている。例えば、マイクロ流路内で W/O エマルジョンを油相から水相通過時にリポソーム形成させる方法やマイクロ流路内に平面脂質膜を形成させ 2 方向から水流を与えることによりリポソームを形成させる方法が挙げられる。本研究室で開発された平面脂質二重膜を手軽に形成する方法「接触法」はピペットによる溶液の滴下のみで膜が形成できる簡便性・再現性・安定性に優れた平面脂質二重膜形成法である。先行研究において、平面脂質膜にジェット水流を印加することによりリポソーム形成が見出されているが、平面膜形成時に使用した有機溶媒がリン脂質二重膜内に残留し、リポソームが不安定である(図 1)。そこで、残留デカンが少ない安定な細胞サイズリポソームを作製するために、直径 150  $\mu\text{m}$  の穴が開いたセパレータをウエルの間に挟み込み、平面脂質二重膜にジェット水流を印加することにより、均一サイズの細胞サイズリン脂質非対称リポソーム作製を行った(図 2)。

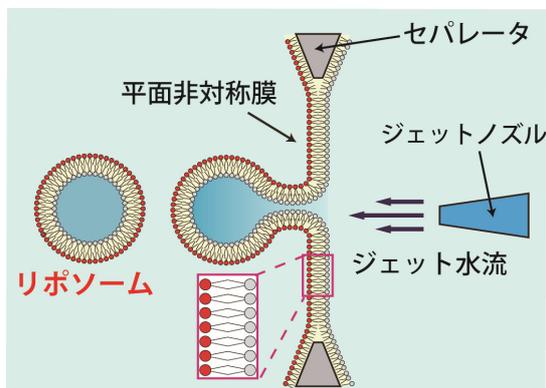


図 1. ジェット水流によるリポソーム作製の概略図  
平面リン脂質二重膜にキャピラリーからジェット水流を印加させることによりリポソームを形成

リポソーム作製条件の検討としてジェット水流印加時間、キャピラリーの内径等を変化させた。並びに、リポソーム安定性も検討した。さらに、異なるリン脂質組成から成る液滴を接触させ、ジェット水流を印加させることにより非対称な脂質二分子膜をもつリポソーム作製も検討した。

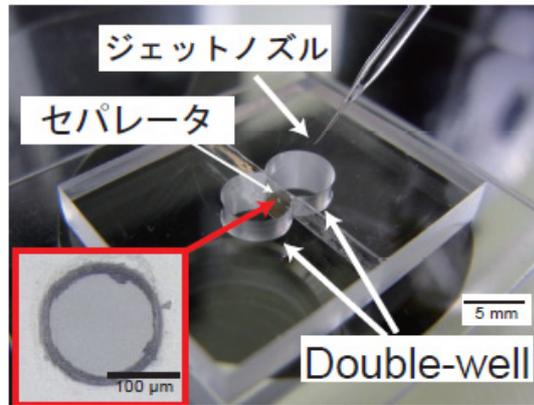


図 2. ジェット水流によるリポソーム作製デバイス  
液滴形成ウエルの間に直径 150  $\mu\text{m}$  の穴が開いたセパレータを挿入し、平面リン脂質二重膜を形成

## 3. 研究の方法

平面リン脂質二重膜はデカンに溶解したリン脂質(ジオレオイルホスファチジルコリン;DOPC、ジオレオイルホスファチジルセリン;DOPS)を平面脂質二重膜作製デバイスに加えた。そしてスクロールまたはグルコース含有リン酸緩衝生理食塩水を加え、平面リン脂質二重膜を形成させた。そして、平面リン脂質膜に対して垂直にキャピラリーを配置し、ジェット水流を平面リン脂質膜に与えることによるリポソーム形成を観察した。まず、高速度カメラを用いジェット水流からのリポソーム形成過程を観察した。ジェット水流からリポソーム形成の観察に成功し、直径 150-200  $\mu\text{m}$  と 10  $\mu\text{m}$  程度のリポソームが順に並んで形成した。直径 150-200  $\mu\text{m}$  のリポソームは形成後すぐに、リン脂質が溶解しているオイル層へ融合し崩壊する。しかし、直径 10  $\mu\text{m}$  程度のリポソームは形成後緩衝液中に留まった。このリポソームを回収し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。

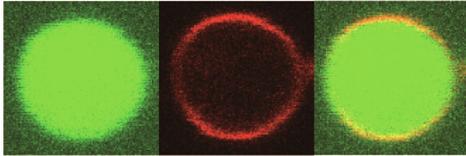
## 4. 研究成果

### (1) 細胞サイズリポソームの作製

水溶性蛍光色素であるカルセインをキャピラリー側のウエルへ加え、ジェット水流を平面二重膜に印加しリポソームを形成させたところ、カルセインが封入された比較的大小が揃ったリポソームが観察された。また、リポソーム形成 24 時間後においてもカルセインの封入を確認した(図 3)。さらに、リポ

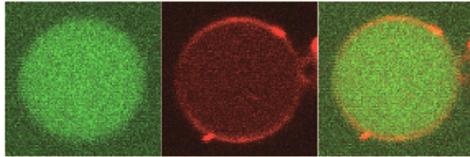
作製直後

Calcein Rhodamine Merge



作製24 時間後

Calcein Rhodamine Merge



5 μm

図 3. ジェット水流による細胞サイズリポソームの顕微鏡像

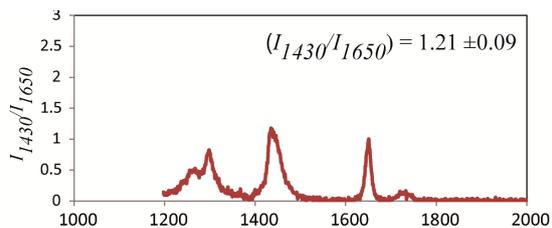
リポソーム内に水溶性蛍光色素である calcein を封入し、リン脂質膜は蛍光色素の rhodamine を用いた

ソームの直径も変化がないことからこのリポソーム作製法を用い安定な巨大リポソーム作製に成功した。さらに、平面リン脂質二重膜形成面積やジェット水流の印加時間等を変化させることにより、リポソームのサイズの制御も可能である。

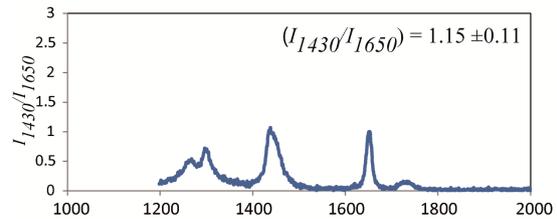
(2) リポソーム内の残留デカンの推定

リポソーム内の残留デカンの推定はレーザラマン顕微鏡を用いた。DOPC 由来の 1650  $\text{cm}^{-1}$  付近に存在する C=C のピークと DOPC、デカンの 1430  $\text{cm}^{-1}$  付近に存在する C-C のピークの比を取ることで残留デカンの有無の推定を行った。本作製法では  $I(1430 \text{ cm}^{-1})/I(1650 \text{ cm}^{-1})=1.21 \pm 0.09$  であり、デカンを含まないリポソーム作製法である静置水和法で作製したリポソームでは、 $I(1430 \text{ cm}^{-1})/I(1650 \text{ cm}^{-1})=1.15 \pm 0.11$  の値を示した。一方、残留デカンが多く含まれているとされている従来法は、 $I(1430 \text{ cm}^{-1})/I(1650 \text{ cm}^{-1})=2.19 \pm 0.73$  の値を示した(図 4)。本方法の値は、デカンを含まない静置水和法と類似した値であることから、本方法のリポソームは残留オイルのないリポソームであると分かった。

本方法



静置水和法



従来法

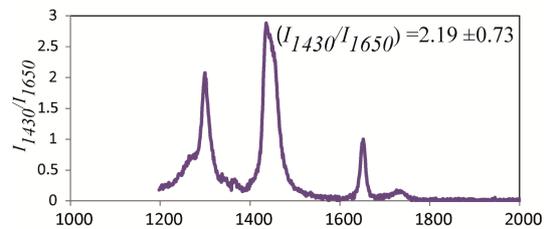
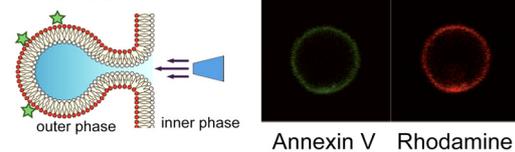


図 4. 種々の作製法によるリポソームのラマンスペクトル

(3) リン脂質非対称膜リポソームの作製

次に異なるリン脂質で内外膜が形成される、リン脂質非対称膜リポソーム作製に試みた。各ウェルに異なるリン脂質を加えることにより、リン脂質非対称平面二重膜を形成した。ホスファチジルセリン(PS)と特異的に結合する annexinV 添加することによりリン脂質非対称膜リポソーム作製の検討を行った。その結果、PS が外膜に存在するときのみに annexinV 由来の蛍光がリポソーム膜に観察された(図 5)。よって、残留デカンの混入のない細胞膜を模倣したリン脂質非対称膜リポソーム作製に成功した。

PS 外側



PS 内側

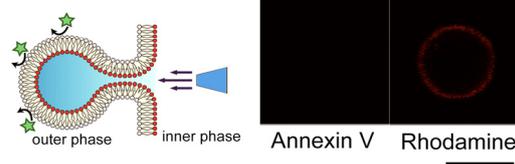


図 5. リン脂質非対称リポソームの顕微鏡像

AnnexinV(星)はホスファチジルセリン(赤)がリポソーム外膜存在時のみに特異的に結合

(4) リン脂質非対称膜リポソームのリン脂質分子運動の観察

リン脂質の分子運動(フリップ-フロップ)の観察は赤血球膜や対称膜リポソームのみで行われ、細胞膜を模倣した非対称膜リポソ

ームでは観察されていなかった。そこで、今回、リン脂質非対称膜リポソームを用い、ホスファチジルセリン(PS)のフリップ-フロップ挙動を観察した。PSはアポトーシスやシグナル伝達に関与している重要なリン脂質の1つである。PS非対称膜リポソームを作製し、37度でリポソームをインキュベートし、annexinVの蛍光輝度によりPSのフリップ-フロップ運動の観察を行った。はじめ、PSが外膜に存在するリポソームでは時間が経過するにしたがって、annexinVの蛍光が減少した。また、PSが内側に存在するリポソームでは時間が経過するにしたがってannexinVの蛍光が増大した。非対称膜リポソームでPSのフリップ-フロップの観察に成功した。また、このフリップ-フロップの速度は細胞のアポトーシスの速度と似ていることも分かった。

この様に細胞膜の構造を模倣したリポソーム作製に成功し、リン脂質分子の運動の観察にも成功している。この非対称膜リポソームを用い、高次な人工細胞モデルやDDS担体等に応用可能であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Koki Kamiya, Ryuji Kawano, Toshihisa Osaki, Syoji Takeuchi, Vesicles in a vesicle: Formation of a Cell-Sized Vesicle Containing Small Vesicles from Two Planar Lipid Bilayers Using Pulsed Jet Flow, Proceedings of the 26<sup>th</sup> IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 2013, pp.935-936.査読あり

② Koki Kamiya, Ryuji Kawano, Toshihisa Osaki, Syoji Takeuchi, Formation of Cell-Sized Vesicles with Asymmetric Lipid Bilayer using Pulsed Jet Flow, Proceedings of Micro TAS2012, 2012, pp.1597-1599.査読あり

[学会発表] (計6件)

① 神谷厚輝、川野竜司、大崎寿久、竹内昌治、リン脂質非対称巨大リポソームを用いた脂質膜挙動観察、第93春季日本化学会年会、2013年3月22日-25日、滋賀

② Koki Kamiya, Ryuji Kawano, Toshihisa Osaki, Syoji Takeuchi, Vesicles in a vesicle: Formation of a Cell-Sized Vesicle Containing Small Vesicles from Two Planar Lipid Bilayers Using Pulsed Jet Flow, The 26<sup>th</sup> IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 2013年1月20日-24日, Taipei, TAIWAN

③ 神谷厚輝、川野竜司、大崎寿久、竹内昌治、ジェット水流による細胞サイズリポソ-

ム作製、「細胞を創る」研究会5.0、2012年11月21日-22日、横浜

④ Koki Kamiya, Ryuji Kawano, Toshihisa Osaki, Syoji Takeuchi, Formation of Cell-Sized Vesicles with Asymmetric Lipid Bilayer using Pulsed Jet Flow,  $\mu$ TAS 2012, 2012年10月28日-11月1日 Okinawa, JAPAN

⑤ 神谷厚輝、川野竜司、大崎寿久、竹内昌治、ジェット水流による細胞サイズリポソーム作製、「細胞を創る」研究会5.0、2012年11月21日-22日、横浜

⑥ 神谷厚輝、川野竜司、大崎寿久、竹内昌治、リン脂質非対称膜リポソームの作製、第61回高分子討論会、2012年9月19日-21日、名古屋

[その他]

ホームページ等

<http://www.newkast.or.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

神谷 厚輝 (KAMIYA KOKI)

公益財団法人 神奈川科学技術アカデミー・バイオマイクロシステムプロジェクト・研究員

研究者番号：70612315

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：