

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651134

研究課題名(和文) 脂質二重膜の安定性の破れのリアルタイム観察および理論解析

研究課題名(英文) Real-time observation and biophysical analysis of the stability of lipid bilayer membrane

研究代表者

瀧口 金吾 (Takiguchi, Kingo)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20262842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脂質二重膜は、微小空間の区画化に非常に優れた素材の1つである。生体膜の基本構造も脂質二重膜である。本課題では、変形のし易さや、穿孔または破れの起き易さなど、その動態や安定性を直接観察し、結果を理論解析した。

観察の結果、脂質二重膜を構成するリン脂質に占める負電荷を持つ酸性リン脂質の含有比が、その膜の特性を大きく支配することが明らかになった。酸性リン脂質の比率が多くなる程、膜は変形し難くなる。一方、ペプチドや蛋白質などの生体因子との相互作用が強まり、その作用によって膜穿孔や溶解、あるいは突起形成の様な特定の変形が起こり易くなる。解析の結果、それらが静電的相互作用で説明できることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Lipid bilayer membrane is one of the most suitable material to partitioning of the micrometer-sized space, and which is the basic structure of biological membranes. In this issue, the dynamics and stability of lipid bilayer has been studied by direct real-time observation and theoretical analysis.

As a result, the content of the acidic phospholipids with a negative charge in the total phospholipids constituting the lipid bilayer is revealed that largely determine the properties of the membrane. As the content of acidic phospholipids is increased, the membrane becomes difficult to deform. On the other hand, by higher affinity interaction with biological factors such as peptides and proteins, various changes, for examples, pore formation or solubilization, or a specific morphogenesis such as projection formation, are likely to be induced. The theoretical analysis revealed that it could be explained by the electrostatic interaction.

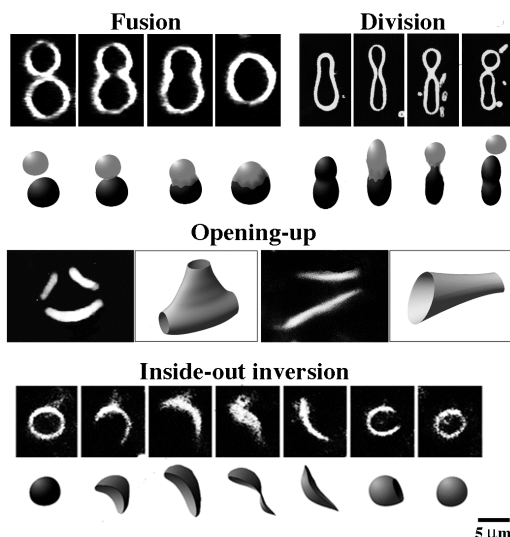
研究分野：生物物理学

キーワード：脂質二重膜 生体膜 リポソーム 光学顕微鏡 リアルタイムイメージング 膜動態 膜安定性 膜の力学特性

1. 研究開始当初の背景

(1) 脂質二重膜は、リン脂質の様な両親媒性分子が水溶液中で自己集合して出来る。リン脂質自体は簡単な構造をした小さな分子であるが、それが集まって出来た脂質二重膜、あるいはそれがさらに自然に袋状に閉じて出来た膜小胞は様々なサイズを持ち、多様な形態・動態を示す。その理由から、人工的に形成された脂質の膜小胞(リポソーム)は、微小空間の区画化に非常に優れた素材の1つであり、優れたソフトマターの例として古くから多くの研究がなされてきた。生体膜の基本構造も脂質二重膜であり、細胞や細胞内小器官の外界との境界となつて、それらの機能・恒常性を保つのに必須であると同時に物質や情報の交換の場でもある。従ってリポソームの性質や挙動を決めている要因を物理、化学、生物学の様々な視点から調べその詳細を知ることは、生命システムを理解する上でも、膜を医薬工学の広い分野で応用する上でもとても重要である。

(2) 長年、特に生物学の分野では、脂質二重膜は、界面活性剤による可溶化を除けば基本的に安定・静的で、周囲との相互作用や膜内の構成脂質分子の特性に依存して、その形・曲率を変化させたり、流動性などの状態を変化させたり(相転移やドメイン形成)する程度に考えられてきた。しかし近年、我々のリアルタイム観察を用いた実験によって、蛋白質や界面活性剤との相互作用や浸透圧ストレスの付加などが、融合分離や膜穿孔といったトポロジー変化も伴う劇的な変化をリポソームに引き起こすことが明らかになった(下図)[文献1]。



<引用文献>

Kingo Takiguchi, Fumimasa Nomura, Takehiko Inaba, Shuichi Takeda, Akihiko Saitoh, Hirokazu Hotani, Liposomes possess drastic capabilities for topological transformation. ChemPhysChem 3, 571 - 574 (2002).

2. 研究の目的

脂質二重膜の持つダイナミックな性質は、生体膜が周囲の環境やシグナルに応答して形を変化させたり物質を透過させたりする場合には有利に働く側面もあるが、膜の最も重要と思われる境界としての機能を失わせる非常に危険な特性でもある。本研究の目的は、膜のその諸刃の剣と言うべきそのような性質がどのような機構で担われているのか、光学顕微鏡で観察可能な、生きた細胞と同等のμm オーダーのサイズを持つ巨大リポソームを直接観察して得られた実験結果と、膜内に働く弾性や張力をシミュレーションして得た理論計算の結果とを比較検討することによって理解することである。

3. 研究の方法

(1) 実験観察に用いる巨大リポソームは phosphatidylcholine をベースにした精製リン脂質の混合フィルムから、目的や条件に合わせ、静置水和法、Electroformation 法、界面通過法などの手法で作製する。なお、界面通過法は、脂質を溶解させた油中で形成させた水溶液の液滴が油水界面を通過すると脂質二重膜の小胞が形成されることを利用した巨大リポソームの作製方法である。

膜に作用することによって生理活性を示す化合物(溶血性ハチ毒メリチンや膜穿孔活性を持つ細菌の毒素、または生体由来の抗菌物質など)は、既に広く市販されている場合は購入したものを、されていない場合のものや蛋白質は大腸菌の発現系で調製した標品を用いる。

(2) 蛋白質、ペプチド、その他の生体由来因子との相互作用によって引き起こされる巨大リポソームの形状変化を、高感度カメラを装着した暗視野光学系やその他の顕微鏡法でリアルタイム観察する。リポソーム上の蛋白質の分布の観察には蛍光顕微鏡を用いる。

(3) 得られた観察結果を元に、リポソームが安定性を失って変化する機構の力学的シミュレーションを試みる[文献2]。その過程で創出されたモデルや仮説は適宜実験系にフィードバックして検証洗練する。

<引用文献>

Tamiki Umeda, Yukio Suezaki, Kingo Takiguchi, Hirokazu Hotani, Theoretical analysis of opening-up vesicles with single and two holes. Physical Review E 71, 011913 (2005).

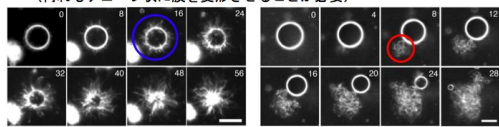
4. 研究成果

(1) F-BAR ドメイン蛋白質ファミリーに属する蛋白質は多数存在するが、全てエンドサイトーシスやエクソサイトーシス、その他の細胞内膜小胞輸送に機能しており、管状の膜突起を形成させる活性を持つ。F-BAR 蛋白質を添加作用させたりリポソームのリアルタイム観察から、その膜突起形成反応過程が蛋白

質毎に異なっており（下図） それに基づいて蛋白質を大きく2群に分類できること、形成された膜突起の曲げ弾性も蛋白質毎に異なっており、固い物と柔らかい物の2種類に分けられること、を発見した。この結果は、F-BAR ファミリーに多数の蛋白質が存在する理由が、単なる相互の相補系の形成だけでなく、多様な生理学的役割を分担して果たすことにもあることを示唆している。なお、F-BAR 蛋白質の作用が、リポソーム膜の酸性リン脂質の含有比に依存することも観察され、蛋白質と膜との間の静電的相互作用の重要性も確認された。

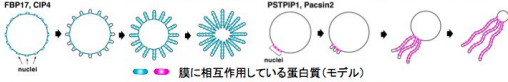
F-BAR ドメイン蛋白質ファミリーによる膜突起形成

F-BAR ドメイン蛋白質は、エンドサイトーシスやエクソサイトーシス、細胞内での膜小胞輸送などに働いていると考えられている。（何れもチューブ状に膜を変形させることが必要）



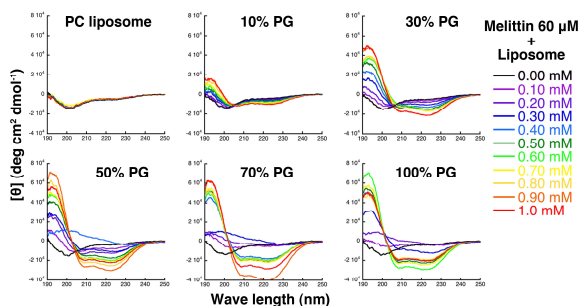
各パネルの数字は変形開始からの経過時間（秒）。スケールバー 10 μm。

暗視野顕微鏡でリアルタイムで観察された蛋白質による膜の変形の様子。



同じファミリーに属する蛋白質でも変形過程が異なる！
リアルタイム観察によって初めて明らかにされた成果

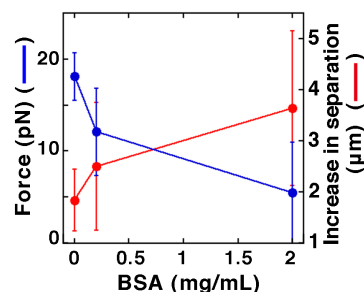
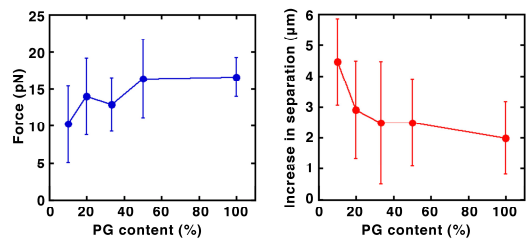
（2）ミツバチの溶血毒の主成分であるメリチンは26残基からなる両親媒性ペプチドで、その単純な構造ながら、溶解、穿孔、融合等、様々な反応を脂質二重膜に生じさせる。この理由から、メリチンと膜との相互作用については古くから非常に多くの研究が行われて来た。我々は、メリチンが膜に引き起こす様々な現象を、個々の脂質二重膜に起きている変化を直接リアルタイムで観察した結果に基づいて分類した。その分類に沿って観察結果を円偏光二色性測定、共沈結合実験、電子顕微鏡観察などから得られた情報と比較することによって、メリチンがどのような二次構造を取り（下図、円偏光二色性測定の結果）、どのような結合を膜としている時に、膜がどのような変化を示すかを対応付けることに成功した。得られた事実は、同じペプチドが脂質二重膜に作用する場合でも、膜の脂質組成の違いや周囲の環境や条件の違いに依存して、膜に引き起こされる形態や動態の変化が異なってくることを示している。



またメリチンの添加によって引き起こされるリポソームの変化の程度が、膜中の酸性リン脂質 phosphatidylglycerol (PG) の含有比に依存して強くなることから、このペプチドと膜との間の相互作用も静電的なものが重要であることが示唆された。

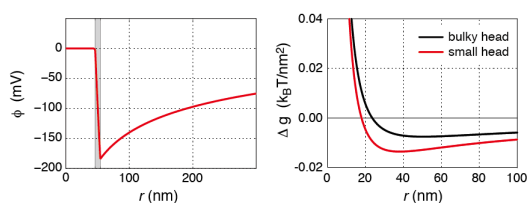
（3）生物の運動は、細胞の内部と外界との境界を成す生体膜と、アクチンや微小管、これら蛋白質線維と共同して働く分子モーター、そして様々なそれらの制御調節蛋白質とから構成される細胞骨格系とが連携して働くことで実現される。その連携機構を明らかにするために、生体から単離精製して得たアクチンとミオシンを内部に封入再構成した巨大リポソームを界面通過法によって調製し、細胞サイズの脂質膜で区切られた閉じた空間内での細胞骨格系の動態を直接観察し解析した。リポソーム内部で再構成された細胞骨格系の動態は、バルクの溶液中に存在する時とは異なる挙動を示し、その違いが細胞と同等サイズの閉空間内に封入されたことによって現われる排除効果や混雑効果の影響であることを明らかにした。

（4）我々の先行研究から、脂質二重膜を変形させるために必要な力が十から数十 pN の大きさであることが分かっていた。しかし、その力学的な性質が、膜の脂質組成や周囲の溶液環境によってどのような影響を受けるかについては不明であった。今回、ビーズを内部に封入されたリポソームを様々な脂質組成で作製し、これを異なる溶液条件下で光ピンセットを用いて操作し、変形具合を観察しながら力測定も行った。この観察と測定によって、膜に PG に代表される酸性リン脂質が含まれていると、その含有比に依存して膜が変形し難くなること（次図上）、リポソーム内外の水溶液に BSA の様な蛋白質が含まれていると膜が変形し易くなること（次図下）を明らかにした。両図中とも、青線はリポソームを変形させるのに必要な力の大きさを、赤線はリポソームの変形の程度を示している。



(5) リポソームを高張液に晒すと、浸透圧によって内部の水が放出されることによって容積は減少するが、表面積は不変のため、膜は内側に向かって陥入を起こす。この陥入部の形状が、脂質組成や溶液条件に依存して異なることが見出された。特に、膜に酸性リン脂質が含まれ、外液に塩が含まれている場合、膜の陥入部は、生きた細胞で見られるエンドサイトーシスと同じ様に、チューブ状になることが分かった。

負電荷を持つ酸性リン脂質分子と溶液中の塩の分布を考慮した計算機シミュレーションの結果、脂質分子の形状と脂質二重膜内におけるパッキングの状態によっては、チューブ内外に電位分布が生じ(下図左)、半径数十 nm の膜チューブが安定となる場合があること(下図右)が明らかになった。このことは、観察されるチューブ状の構造が脂質二重膜と塩との静電的相互作用により生じていることを示している。



脂質分子が集合して脂質二重膜が形成される時、疎水性相互作用が非常に重要な役割をする。一方、以上の研究成果は、脂質二重膜が化合物あるいは蛋白質やペプチド等と相互作用することによってその形状や性質を大きく変えるとき、酸性リン脂質の持つ負電荷に起因する静電的相互作用が重要な役割をしていることを明らかにした。

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 4 件)

Yohko Tanaka-Takiguchi, Toshiki Itoh, Kazuya Tsujita, Shunsuke Yamada, Miho Yanagisawa, Kei Fujiwara, Akihisa Yamamoto, Masatoshi Ichikawa, Kingo Takiguchi, Physicochemical analysis from real-time imaging of liposome tubulation reveals the characteristics of individual F-BAR domain proteins. *Langmuir*, 査読有、29, 328 - 336 (2013). DOI:10.1021/la303902q

Tomoyoshi Takahashi, Fumimasa Nomura, Yasunori Yokoyama, Yohko Tanaka-Takiguchi, Michio Homma, Kingo Takiguchi, Multiple membrane interactions and versatile vesicle deformations elicited by melittin. *Toxins*, 査読有、5, 637 - 664 (2013). DOI:10.3390/toxins5040637

Kingo Takiguchi, Makiko Negishi, Yohko Tanaka-Takiguchi, Hayashi Masahito, Kenichi Yoshikawa, Specific transformation of assembly with actin filaments and molecular motors in a cell-sized self-emerged liposome. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 査読有、44, 325 - 329 (2014).

DOI: 10.1007/s11084-014-9395-0

Nobuhiko Kato, Akihiko Ishijima, Takehiko Inaba, Fumimasa Nomura, Shuichi Takeda, Kingo Takiguchi, Effects of lipid composition and solution conditions on the mechanical properties of membrane vesicles. *Membranes*, 査読有、5, 22 - 47 (2015).

DOI:10.3390/membranes5010022

[学会発表](計 14 件)

Yohko Tanaka-Takiguchi, Toshiki Itoh, Kingo Takiguchi, Real-time observation of liposome tubulation by F-BAR., 日本生物物理学会、2012 (平成24)年9月23日、名古屋大学(名古屋市)

滝口陽子、伊藤俊樹、辻田和也、柳澤美穂、藤原 慶、山本暁久、市川正敏、山田駿介、手老龍吾、瀧口金吾、F-BAR ドメイン蛋白質による膜突起形成過程のリアルタイムイメージング解析、日本膜学会、2013 (平成25)年5月21日、早稲田大学(東京都)

滝口陽子、伊藤俊樹、辻田和也、柳澤美穂、藤原 慶、山本暁久、市川正敏、山田駿介、瀧口金吾、F-BAR 蛋白質による膜突起形成反応のリアルタイムイメージング解析、日本細胞生物学会、2013 (平成25)年6月20日、ウイック愛知(名古屋市)

Takiguchi Kingo, Hayashi Masahito, Construction of motile artificial cell model using actomyosin and cell-sized giant liposome.(招待), 日本生物物理学会、2013 (平成25)年10月28日、京都国際会議場(京都市)

Tamiki Umeda, Numerical studies of protein-induced shape changes of liposomes., 情報計算化学生物学会、2013 (平成25)年10月29日、タワーホール船堀(東京都)

Takiguchi Kingo, Hayashi Masahito, Construction of artificial motile cell model., MHS2013 Micro-Nano Mechatronics and Human Science., 2013 (平成25)年11月12日、名古屋大学(名古屋市)

Kingo Takiguchi, Makiko Negishi, Yohko Tanaka-Takiguchi, Hayashi Masahito, Kenichi Yoshikawa, Specific transformation of assembly with actin filaments and molecular motors in a cell-sized self-emerged liposome., OPEN QUESTIONS ON THE ORIGIN OF LIFE 2014, 2014 (平成26)年7月12日、国際高等研究所(京都府木津川市)

林 真人、西山雅祥、風山祐輝、豊田太郎、瀧口金吾、チューブリン封入ジャイアントリポソームの温度・静水圧変化による可逆的形

態制御、日本生物物理学会大会、2014（平成26）年9月26日、札幌コンベンションセンター（札幌市）

高橋知嘉、野村典正、横山泰範、滝口陽子、滝口金吾、メリチンが持つ多才な膜小胞変形能力、日本生物物理学会大会、2014（平成26）年9月27日、札幌コンベンションセンター（札幌市）

梅田民樹、滝口陽子、滝口金吾、静電効果によるジャイアントリポソームの膜チューブ形成、日本生物物理学会大会、2014（平成26）年9月27日、札幌コンベンションセンター（札幌市）

Tamiki Umeda, Yohko Tanaka-Takiguchi, Kingo Takiguchi, Theoretical analysis of the formation of membrane tubes in giant liposomes induced by electrostatic effect.、情報計算化学生物学会、2014（平成26）年10月28日、タワーホール船堀（東京都）

林真人、滝口金吾、チューブリン封入ジャイアントリポソームの温度・静水圧変化による可逆的形態制御、「細胞を創る」研究会、2014（平成26）年11月14日、東京大学（東京都）

林 真人、西山雅祥、風山祐輝、豊田太郎、滝口金吾、チューブリン封入ジャイアントリポソームの温度・静水圧変化による可逆的形態制御、生体運動合同班会議、2015（平成27）年1月9日、学習院大学（東京都）

滝口金吾、根岸真紀子、坂上貴洋、吉川研一、細胞サイズの閉空間内部に再構成された生体由来の高分子（招待）日本細菌学会総会、2015（平成27）年3月26日、長良川国際会議場（岐阜市）

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

名古屋大学院理学研究科、生命理学専攻、超分子構造学グループ

<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/laboratory/sms.html>

構造生物学研究センター、成田グループ

<http://str.bio.nagoya-u.ac.jp:8080/Plone/6210753030eb30fc>

神戸大学大学院海事科学研究科

http://kuid.ofc.kobe-u.ac.jp/InfoSearch/html/researcher/researcher_ikwmh1xU_Hj0-1BQ3mbe3w_ja.html?

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝口金吾 (TAKIGUCHI, Kingo)

名古屋大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：20262842

(2) 研究分担者

梅田民樹 (UMEDA, Tamiki)

神戸大学・大学院海事科学研究科・准教授

研究者番号：90243336