

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19157

研究課題名（和文）細胞膜表面を模倣したリポソームにおける生体分子活性の理解

研究課題名（英文）Investigation of biomolecular activity in liposomes mimicking the surface of cell membranes

研究代表者

神谷 厚輝（Kamiya, Koki）

群馬大学・大学院理工学府・助教

研究者番号：70612315

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：これまでに、研究代表者はマイクロデバイスを用いたリン脂質非対称膜リポソームの作製に成功している。マイクロデバイス内で平面リン脂質非対称膜を形成し、ジェット水流をこの平面リン脂質非対称膜に印加することにより、リン脂質非対称膜リポソームが形成される方法である。この方法を応用して、リン脂質非対称膜リポソームに細胞膜に存在する膜ドメインや糖鎖を導入してさらなる真核生物の細胞膜を模倣したリン脂質非対称膜リポソームを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜ドメインや糖鎖を導入した細胞膜を模倣したリン脂質非対称膜上で、ペプチドや膜タンパク質等の生体分子の相互作用を観察することで、これらの生体分子の素反応を理解できる。よって、精密な生体分子の素反応の理解は、細胞システムのメカニズムの解明や薬剤の活性部位の特定に役立つ。

研究成果の概要（英文）：Giant lipid vesicles with asymmetric lipid bilayer which mimics a plasma membrane of eukaryotic cells were generated by applying a jet flow against a planar asymmetric lipid bilayer (pulsed jet flow method). The plasma membranes are also composed of microdomains and glycolipids. In this study, to improve emulations of the plasma membrane of eukaryotic cells, cell-sized asymmetric lipid vesicles with microdomains and glycolipids were generated by the pulsed jet flow method.

研究分野：生体関連化学

キーワード：リポソーム リン脂質二重膜 リン脂質非対称膜 膜タンパク質 マイクロドメイン マイクロデバイス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞の細胞膜はリン脂質二重膜から形成されており、内膜と外膜でリン脂質の組成が異なるリン脂質非対称膜を形成している。このようなリン脂質非対称膜は、膜タンパク質の配向性や細胞膜の形態変化に関与されているとされている。特に球体の人工細胞膜はリポソームと呼ばれており、細胞膜と同様にリン脂質二重膜を形成している。したがって、細胞膜と同様なリン脂質二重膜から構成されており細胞膜との親和性が高いため、ナノサイズのリポソームはドラッグデリバリーシステムの担体として用いられている。細胞サイズのリポソームは、細胞膜と生物物理的な物性が酷似しているため、細胞模倣モデルとして用いられている。例えば、リポソーム膜上にマイクロドメイン(脂質ドメイン)を形成させそのマイクロドメインの生物物理的な物性の解析や、リポソーム内に酵素や無細胞タンパク質発現系溶液を封入し効率的な酵素反応やタンパク質の発現の実現、膜タンパク質をリポソーム膜上に再構成しその膜タンパク質の機能を解析する研究が行われている。さらに、近年ではリポソーム内に様々な生体分子を再構成して、複雑な反応を生じるリポソームの形成に成功している。

細胞サイズリポソームの古典的な作製法に静置水和法がある。この方法は、ガラス基板上にクロコホルムに溶解したリン脂質を乾燥させ、リン脂質フィルムを形成させる。そして、緩衝溶液を加えることにより自己組織的にリポソームが形成される。手軽に大量に細胞サイズリポソームが形成可能であるが、真核生物の細胞膜を模倣したリン脂質非対称膜の形成は原理上困難である。そこで、マイクロ流体デバイスを用いたリン脂質非対称膜をもったリポソームを形成する方法が国内外で発表されている。研究代表者も下記のような方法でマイクロデバイスを用いたリン脂質非対称膜リポソームの形成に成功している[1]。まず、マイクロデバイス内で平面リン脂質非対称膜を形成し、ジェット水流をこの平面リン脂質非対称膜に印加することにより、リン脂質非対称膜リポソームが形成される(図 1)。このリン脂質非対称膜リポソームはリン脂質二重膜内に残留オイルが存在しないため、長時間安定なリン脂質非対称リポソームである。このリン脂質非対称リポソームを用いて、リン脂質分子の運動、ペプチドや膜タンパク質の相互作用観察に成功している。このリン脂質非対称膜リポソームに脂質ドメインや糖鎖を付加し、さらなる真核生物の細胞膜の模倣を行う。

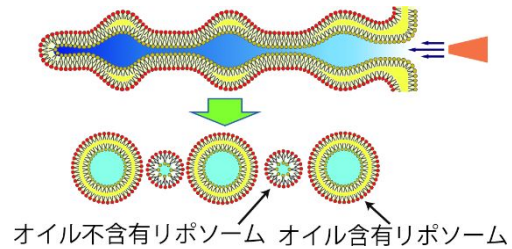


図 1 ジェット水流印加によるリン脂質非対称膜リポソームの形成

## 2. 研究の目的

これまで、研究代表者はリン脂質非対称膜リポソームの作製に成功している。そして、ペプチドや膜タンパク質の相互作用観察に成功している。リン脂質非対称膜リポソームにおいて、ある膜タンパク質は多くリポソーム膜へ再構成され、正しい構造を保っていることを確認している。

したがって、リン脂質非対称膜リポソームに細胞膜に存在する膜ドメインや糖鎖を導入してさらなる真核生物の細胞膜を模倣したリン脂質非対称膜リポソームを作製することで生体分子の機能が細胞膜上と同様に得られることが期待される。また、この細胞膜を模倣したリン脂質非対称膜上で、ペプチドや膜タンパク質等の生体分子の相互作用を観察することで、これらの生体分子の素反応を理解できる。よって、精密な生体分子の素反応の理解は、細胞システムのメカニズムの解明や薬剤の活性部位の特定に役立つ。

## 3. 研究の方法

字のデバイス内に有機溶媒の *n*-デカンに溶解させたリン脂質と緩衝溶液を加えることで液滴の同士の界面に平面リン脂質二重膜が形成される(図 2)。そして、この平面リン脂質二重膜にジェット水流を印加すると細胞サイズのリポソームが形成できる。また、字のデバイスの片側に異なったリン脂質種を加えることにより平面リン脂質非対称膜が形成され、ジェット水流印加で細胞サイズのリポソームが作製できることを発表している。本研究では、マイクロドメインを形成するリン脂質組成にて平面リン脂質非対称膜を形成し、マイクロドメインをもつリン脂質非対称膜リポソームを形成する。作製したマイクロドメインをもつリン脂質非対称膜リポソームの形成を共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。さらに、糖脂質をもったリン脂質非対称膜リポソームの作製も行い、リン脂質非対称膜リポソームの形成の有無を共焦点レーザー顕微鏡観察にて観察を行った。

## 4. 研究成果

### 4.1. マイクロドメインをもつリン脂質非対称膜リボソームの形成

まず、ジェット水流法でマイクロドメインを持ったリボソームが形成可能かを検討した。不飽和リン脂質、飽和リン脂質、コレステロールの混合脂質をデカンに溶解させ、字のデバイスに添加し、この混合リン脂質で平面膜を作製しジェット水流印加でリボソームを作製した。共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。その結果、マイクロドメインを持った細胞サイズリボソームが観察されたことから、この方法でマイクロドメインを持つリボソームが形成可能であることが分かった。

次に、片側のみにマイクロドメインを形成する混合リン脂質を字のデバイスに添加し、平面膜を形成しジェット水流を印加しリボソームを作製した。その結果、リン脂質非対称膜上でもマイクロドメインを持ったリボソームが観察された。このリン脂質非対称膜リボソーム作製法を用いて、自由にリン脂質二重膜の片側にマイクロドメインの形成が可能になった。これにより、マイクロドメインを持った詳細な条件を作り出すことができるため、ペプチドやタンパク質等の生体分子との相互作用の詳細が明らかになる可能性がある。

### 4.2. 糖脂質をもつリン脂質非対称膜リボソームの形成

糖脂質をもつリン脂質非対称膜リボソームの形成の戦略としては、平面对称リン脂質二重膜に糖脂質をもつナノサイズリボソームを融合し、ジェット水流印加で糖脂質をもつリン脂質非対称膜リボソームを作製する。まず、ナノサイズリボソームが平面リン脂質二重膜に融合するかを確認した。ナノサイズリボソームは直径 100 nm の孔があいたメンブレンに通すことによって、均一なナノサイズリボソームを得た。そして、このナノサイズリボソームを用いて、ナノサイズリボソームと平面リン脂質二重膜の電荷の変化や融合

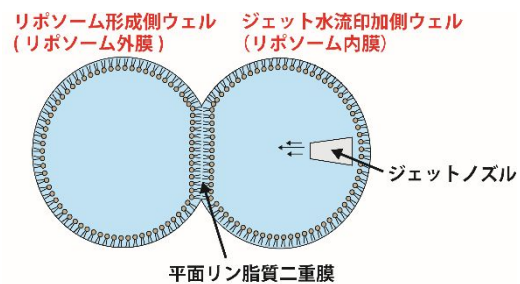


図2 字のデバイスの概略図

時間を変化させ融合の最適化を行った。その結果、ナノサイズリボソームや平面リン脂質二重膜に正電荷脂質や負電荷脂質を加えリン脂質膜表面に電荷を与えたほうが、ナノサイズリボソームが平面リン脂質二重膜へ融合することが分かった。また、融合時間は最大 30 分までしか静置していないが、融合時間が長いほどナノサイズリボソームが平面リン脂質二重膜に融合することが分かった。ナノサイズリボソームの直径が平面リン脂質二重膜への融合に与える影響はあまり明確な差が確認できなかった。もっと極端な直径のナノサイズリボソームで融合実験を行うことで融合挙動に明確な差が生じる可能性もある。

また、字型のデバイスの片側にナノサイズリボソームを加えたときは、ナノサイズリボソームが加えた側の平面リン脂質二重膜のみに融合するかが不明である。そこで、ジェット水流印加側またはリボソーム形成側の片側のみにナノサイズリボソームを添加し融合させ、ジェット水流を印加し細胞サイズリボソームを形成し顕微鏡観察を行った。また、ジェット水流印加側とリボソーム形成側の両方にナノサイズリボソームを添加し融合させ、ジェット水流を印加し細胞サイズリボソームを形成し顕微鏡観察を行った。この両者の条件の細胞サイズリボソームに含まれる蛍光脂質の輝度を測定した。その結果、ナノサイズリボソームを両方のウェルに添加して作製した細胞サイズリボソームの方が、ナノサイズリボソームを片側のウェルに添加して作製した細胞サイズリボソームよりも蛍光輝度が 2 倍ほど高かった。したがって、この結果は、ナノサイズリボソームを添加した側のウェルのみに、ナノサイズリボソームが融合していることが示唆される。

このようにナノサイズリボソームを片側の平面リン脂質二重膜へ融合させリボソームを形成すると、細胞サイズのリン脂質非対称膜リボソームが作製可能であると考えた。そこで、糖脂質を含んだナノサイズリボソームをジェット水流印加側あるいはリボソーム形成側ウェルへ添加し、ジェット水流を印加して細胞サイズのリン脂質非対称膜リボソームの形成を確認した。リボソーム形成後、糖脂質に結合するタンパク質をリボソームの外液に添加した。この結合タンパク質は蛍光物質が標識されているため、リン脂質非対称膜リボソームの形成の有無を確認できる。ジェット水流印加側へナノサイズリボソームを添加した(図2)、いわば、リン脂質非対称膜リボソームの外膜にあたる側のみに、糖脂質結合タンパク質由来の蛍光が観察された。したがって、本方法でリン脂質非対称膜リボソームの形成が可能であることが分かった。

#### <引用文献>

1. K. Kamiya, R. Kawano, T. Osaki, K. Akiyoshi, S. Takeuchi, *Nature Chemistry*, **2016**, 8, 881-889.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 神谷厚輝	4. 巻 72
2. 論文標題 リン脂質非対称膜リボソームの形成と機能観察	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 化学と工業	6. 最初と最後の頁 1049-1050
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Koki Kamiya
2. 発表標題 Asymmetric lipid vesicle generation for creating complex artificial cells
3. 学会等名 MARSS2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神谷厚輝
2. 発表標題 マイクロデバイスによる細胞膜模倣型人工細胞膜の創成と機能観察
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第39回研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神谷厚輝
2. 発表標題 複雑な生命現象の理解に向けた細胞膜模倣型人工細胞膜の創成
3. 学会等名 群馬大学第26回生命科学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蟻坂知佳、神谷厚輝
2. 発表標題 ナノサイズリボソームの平面膜への融合条件の検討
3. 学会等名 日本化学会関東支部群馬地区研究交流会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蟻坂知佳、神谷厚輝
2. 発表標題 平面膜に対する小胞融合の最適条件の模索
3. 学会等名 第6回サイボウニクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi
2. 発表標題 FORMATION OF CELL-SIZED ASYMMETRIC LIPID VESICLES WITH LIPID MICRODOMAINS
3. 学会等名 MicroTAS2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神谷厚輝
2. 発表標題 細胞膜環境を模倣した人工細胞膜の創出
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学 大学院理工学府 分子科学部門 神谷研究室  
<http://kamiya.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/index2.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----