

機関番号：13302

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20360370

研究課題名（和文）細胞膜倣巨大リポソームの動的構造解析と細胞情報伝達

研究課題名（英文）Dynamics of giant liposomes and cellular signal transduction

研究代表者 高木 昌宏 (TAKAGI MASAHIRO)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・教授

研究者番号：00183434

## 研究成果の概要（和文）：

細胞膜中には、飽和脂質やコレステロールが豊富な秩序相からなるマイクロドメイン（ラフト）の存在が示唆されている。我々は、直径  $10\mu\text{m}$  の細胞サイズリポソームを用いて、秩序液体相（ラフト様ドメイン）特異的なエンドサイトーシス様動的構造変化、生細胞膜を模倣した非対称2層膜リポソームの構築(J. Phys. Chem. B 2008)、アミロイド $\beta$ の膜局在、膜挙動 (J. Phys. Chem. Lett. 2010, Biophys. Chem. 2010))に関する研究を進めた。さらに、光により非接触的に膜内の分子構造を変化させ、膜構造を円盤状から球状へと可逆的に変化させる事 (J. Am. Chem. Soc. 2010)、培養細胞におけるラフト領域特異的なエンドサイトーシスを直接観察する事もでき、モデル系と細胞系の融合により多くの知見を得ることができた。

## 研究成果の概要（英文）：

Rafts are dynamic clusters composed largely of cholesterol and sphingolipids. Microdomains are expected to function as platforms of endocytic carriers. Along these lines, giant multicomponent liposomes, raft-exhibiting model membranes, are efficient tools for studying the physicochemical properties of microdomains. We have shown that some simple stimuli (osmosis or detergents) may induce bud formation of raft domains in model membranes. We also showed interaction between amyloid beta ( $A\beta$ ) and model membranes. Moreover, morphological changes might be related to the neurotoxicity in the pathology of Alzheimer's disease (AD). We used both liposomes and actual living cells for studies of dynamic movement of membrane structure.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	12,300,000	3,690,000	15,990,000

研究分野：プロセス工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス・

キーワード：リポソーム、ダイナミクス、細胞信号伝達

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜は細胞と外界とを隔てているだけでなく、増殖、分化、死滅など極めて広範な生命現象に、分裂、エンドサイトーシスなど動的な構造変化を介して関わっている。我々は、膜構造の動的な構造変化に、膜マイクロドメイン（脂質ラフト）が重要な役割を担っていることを、従来のリポソーム（直径50nm以下）よりも大きい巨大リポソーム（直径約10 $\mu$ m）を用いた試験管内実験で示している。

### 2. 研究の目的

上述の実績を発展させ、培養細胞を用いた実験系と連携させ膜マイクロドメインの動的構造と細胞信号伝達との関係を調べるために、以下の目的を設定した。

#### (1) 巨大リポソームのダイナミクス解析

細胞に近い脂質組成を有する非対称巨大リポソーム（直径約10 $\mu$ m）を作製し、脂質ラフト領域の運動性（二次元的性質）およびドメイン誘起の膜変形（エンドサイトーシス小胞形成）のメカニズムを解析し、細胞膜構造の動的変化に関する物理化学的研究を行う。

#### (2) 膜・ペプチド相互作用による構造変化

膜構造とタンパク質の相互作用によるタンパク質構造変化を解析する。相互作用による膜ドメイン構造の安定性、タンパク質構造の変化や膜中の移動、線維（アミロイド）・凝集形成、信号伝達に関わる膜受容体との相互作用をタンパク質、膜双方の構造変化と関連づけて理解する。

#### (3) 細胞を用いたシグナル伝達の解析

巨大リポソームのドメイン構造に関する知見が、実際の細胞におけるシグナル分子の生成や情報伝達と相関しているかを、免疫系の培養細胞を用いた実験により明らかにする。脂質ラフト構造の安定性に関与する刺激・添加物が実際の細胞の信号伝達においても反映されるかを調べる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 巨大リポソームのダイナミクス解析

実際の細胞膜は、多くリポソームの研究者が用いている単純な膜構造ではなく、細胞の内側と外側とでその組成の異なる非対称な構造をしている。本研究課題で我々は、非対称な組成を持つラフト含有巨大リポソーム（直径約10 $\mu$ m）を作製し、脂質ラフト領域の動的変化に関する物理化学的研究を行う。

#### (2) 膜・ペプチドの相互作用

膜構造とタンパク質の相互作用による膜・タンパク質双方の構造の変化やラフトやタンパク質の膜中での移動、構造変化、タンパク質の線維構造（アミロイド）形成や凝集形成、信号伝達に関わる膜受容体に関して、蛍光相関、一分子解析の手法を中心に研究を行う。

#### (3) 細胞を用いたシグナル伝達の解析

ラフト構造とその安定性は、細胞間の接着、輸送、あるいは信号伝達において、重要な役割をになっていると考えられている。免疫T細胞系の細胞を用いて、ラフト構造を観察し、その安定性を上述のリポソーム研究と連携させながら考察することは極めて重要である。膜レセプターによる信号伝達系が良く研究されている培養細胞であるT細胞（Jurkat）を用いて、ラフト構造の形成とその安定性を観察する。刺激を加える方法として、マメ科タンパク質であるコンカナバリンを用いて信号伝達のON, OFFを行う。細胞のラフト構造を特異的に認識するプローブを用いて観察することができるので、ラフトの安定性と信号伝達、特にT細胞活性化プロセス（細胞内カルシウムイオン濃度変化やIL-2発現量変化）に焦点を当てて新たな知見を得る。

### 4. 研究成果

#### (1) 巨大リポソームのダイナミクス

生体膜では、内層と外層の組成が著しく異なっている（非対称性）。

生体膜非対称性の理由は未解明だが、我々は生体膜の非対称性を模倣したリポソームの形成実験を試みた。チャンパー中に水相と

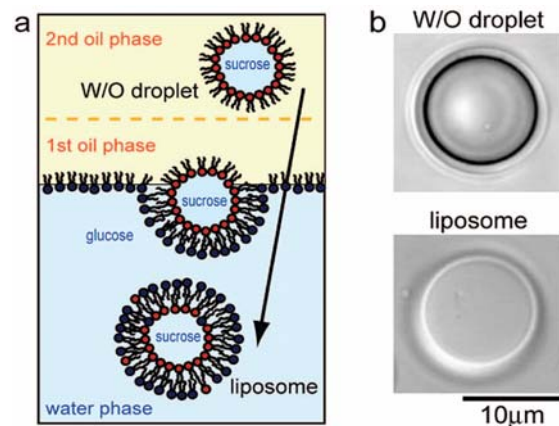


図1：液滴法による非対称リポソーム作製法

リン脂質が溶けたオイル相を乗せ、油水界面に単分子膜を作製する。その後、オイル相のリン脂質液滴を水油間の比重により油水界面の単分子膜介して水相へ移行させ、非対称リポソームを作製した（図1）。非対称リポソームのラフトサイズは、小さい状態が保たれており、膜の非対称性がラフト領域の安定性に関与していると考えられた。さらに光による脂質構造の変化が膜ダイナミクスにあたる影響について調べた。光異性化反応により非接触的に膜内の分子構造を変化させることで、分子間相互作用を変化させた。分子構造の違いが膜ゆらぎを変化させ、膜構造を円盤状から球状へと可逆的に引き起こさ

せること、そして、膜小胞形状の曲率安定性を理論モデルにより予測した。この事は、分子レベルでの微細な脂質構造変化が、メソスコピックなレベルで大きな構造変化を生むことを示している。

## (2) 膜構造とペプチドの相互作用

アミロイドβ (Aβ) はアルツハイマー病の原因タンパク質である。Aβの凝集や神経細胞毒性に、膜脂質の関与が示唆されている。そこで巨大リポソームを用い、Aβと脂質膜との相互作用による膜の動的構造変化(ダイナミクス)を解析した。

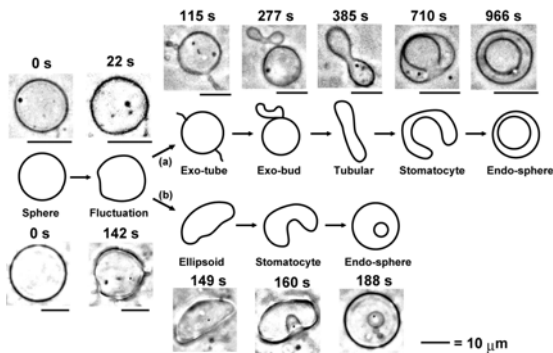


図2 : アミロイドβが引き起こす膜ダイナミクス

その結果、Aβと膜の相互作用により膜は揺動し、形態変化のプロセスにAβの凝集状態が影響していた。揺動後の形態変化には、短時間で内部小胞を生ずる場合と、長時間かけて内部小胞を生ずる2パターンがあり、これらの結果はAβと膜脂質の相互作用、そしてアミロイドが引き起こす神経細胞毒性とも関連していると考えられた(図2)。

細胞膜の動的構造変化によって起こる出芽やエンドサイトーシスは、信号伝達において重要である。ラフト領域を含有する巨大リポソームが、外部刺激に反応して動的に構造変化を起こすかについて調べた。

結果、外部刺激(例えば浸透圧)を加えると、ラフトドメインが出芽(エンドサイトーシス)することを見いだした。出芽小胞形成過程には、「ドメイン陥入による出芽」と「ドメイン境界からの連続的小胞放出」の2パターンが存在し、それらが膜電荷に依存していることを示した。

リポソームのみでラフト依存型エンドサイトーシスの現象が認められたのは、信号伝達を考える上でも重要である。

## (3) 細胞を用いた信号伝達の解析

我々は、T細胞を用い、細胞膜(特にラフト)の動的挙動のメカニズムと、細胞内信号伝達との関係性を明らかにすることを目的

として研究を行っている。T細胞活性化には、抗原提示細胞の代わりに情報分子としてレクチンタンパク質 Concanavalin A (ConA) を用いた。そして、ConA添加後の細胞膜(ラフト)の動的挙動の観察を行った。

さらに、細胞膜構成脂質の一種であるコレステロールを枯渇させた細胞でも、同様の観察を行った。

具体的には、ヒト白血病性T細胞株 Jurkat を使用し、RPMI1640 培地(10% FBS)を用いて37°C、CO<sub>2</sub>濃度5%の条件下で培養した。

ラフトの局在を調べるため、まず、ラフトの可視化を行った。可視化にはラフトに局在するガングリオシド GM1 と結合する Cholera toxin subunit B の Alexa Fluor488 conjugate (CT-B-488) を用いた。可視化した細胞を、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV1000-D, OLYMPUS) で観察した。顕微鏡観察したところラフトは細胞膜上に散在していた(図3A)。

そこに情報分子 ConA を添加すると、ラフトのクラスターリングが観察された(図3B)。

このことから、ConA 添加によって、散在していたラフトが集合することが分かった。

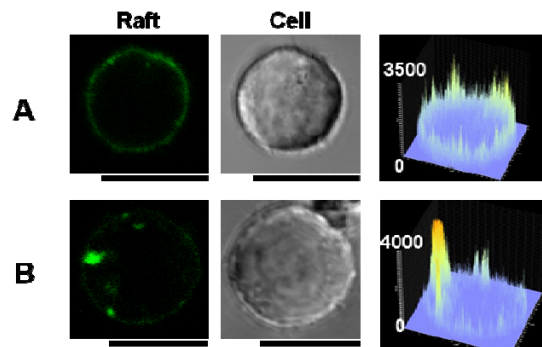


図3 : Cholera toxin subunit B によるラフトの可視化

(A) ConA 刺激前、(B) ConA 刺激後

次に、刺激時のラフトと ConA の局在を調べた。CT-B-488 と ConA-555 を用いて細胞を蛍光二重染色し、観察を行った。前述のラフトを可視化した細胞に ConA を添加した場合と同様に、ラフトのクラスターリングが観察された。ラフトと ConA の局在が一致していることが確認できた(図4)。

散在していたラフトが情報分子添加によって集まったこと、ラフトと ConA の局在が一致したことから、Jurkat 細胞に情報分子 ConA を添加した場合、小さいラフトに包含されていた受容体が、刺激に伴い大きなラフト形成へと進むことが考えられた。

その後、詳細にクラスターリングの位置を調べた結果、細胞の表面ではなく、内部に集積している状態が観察できている。

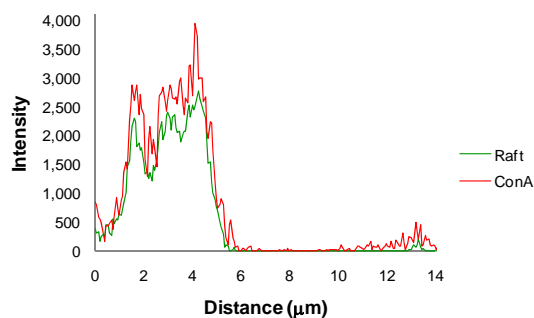
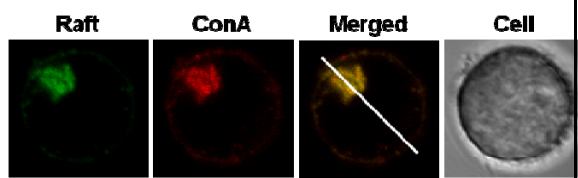


図4：ラフトと情報分子 (ConA) の局在  
それぞれの局在箇所は、ほぼ完全に一致している。

#### 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 20 件) 以下代表論文

- (1) "Membrane disc and sphere: controllable mesoscopic structures for the capture and release of a targeted object"  
T. Hamada, R. Sugimoto, M. Vestergaard, T. Nagasaki, and M. Takagi  
**J. Am. Chem. Soc.**, **132**, 10528-10532 (2010). (査読有)
- (2) "Biomimetic microdroplet membrane interface: detection of the lateral localization of amyloid beta peptides"  
T. Hamada, M. Morita, Y. Kishimoto, Y. Komatsu, M. Vestergaard, M. Takagi  
**J. Phys. Chem. Lett.**, **1**, 170-173 (2010). (査読有)
- (3) "Real-time observation of model-membrane dynamics induced by Alzheimer's amyloid beta" M. Morita, M. Vestergaard, T. Hamada, M. Takagi  
**Biophys. Chem.**, **147**, 81-86 (2010). (査読有)
- (4) "Rhythmic pore dynamics in a shrinking lipid vesicle" T. Hamada, Y. Hirabayashi, T. Ohta, M. Takagi  
**Phys. Rev. E**, **80**, 051921 (2009). (査読有)

(5) "Rhythmic pore dynamics in a shrinking lipid vesicle"  
T. Hamada, Y. Hirabayashi, T. Ohta, M. Takagi

**Phys. Rev. E**, **80**, 051921 (2009). (査読有)

(6) "Reversible Control of Exo- and Endo-Budding Transitions in a Photosensitive Lipid Membrane"

K. Ishii, \*T. Hamada, M. Hatakeyama, R. Sugimoto, T. Nagasaki, M. Takagi

**ChemBioChem**, Vol.10, 251-256, 2009.

(査読有)

(7) "Construction of asymmetric cell-sized lipid vesicles from lipid-coated water-in-oil micro-droplets"

T. Hamada, Y. Miura, Y. Komatsu, Y. Kishimoto, M. Vestergaard, M. Takagi

**J. Phys. Chem. B**, Vol.112, 14678-14681 (2008) (査読有)

(8) "Alzheimer's Amyloid Beta-42 Assembly: Observing and Capturing Molecular Trails of Individual Assemblies" M. Vestergaard, T. Hamada, M. Saito, Y. Yajima, M. Kudou, E. Tamiya, M. Takagi

**Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Vol.377, 725-728 (2008) (査読有)

(9) "Effect of Phospholipids on conformational structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) and its thermolabile mutants"  
N. Izumikawa, S. Nishikori, M. Vestergaard, T. Hamada, Y. Hagihara, N. Yumoto, K. Shiraki, \*M. Takagi

**Biopolymers**, Vol.89, 873-880 (2008)

(査読有)

[学会発表] (計 72 件) 以下代表例

- (1) 依田 毅 VESTERGAARD Mun'delanji . 濱田 勉 赤澤 (小川) 陽子 吉田 康一 高木 昌宏  
酸化コレステロール含有細胞モデル膜の熱応答ダイナミクス  
平成22年度日本化学会北陸地区講演会・研究発表会 2011年11月19日 富山
- (2) 上田琴美、山口健太郎、白京玉 濱田勉、高木昌宏 細胞膜ラフトドメインの動的構造変化と信号伝達の関係性の解明  
平成22年度日本化学会北陸地区講演会・研究発表会 2011年11月19日 富山
- (3) 天童裕衣子、濱田勉、森田雅宗、岸本裕子、小松佑規、Vestergaard Mun'delanji、高木昌宏 細胞模倣膜を用いたアミロイドβペプチドの膜局在解析  
平成22年度日本化学会北陸地区講演会・研究発表会 2011年11月19日 富山

- (4) 濱田勉  
細胞モデル小胞の光による動的構造制御  
「細胞を創る」研究会 3.0 2010年11月  
12日 東京
- (5) 宮川真紀代 森田雅宗 杉本涼子 濱田  
勉 高木昌宏 細胞サイズリポソームを  
用いたナノ粒子の膜局在解析  
第4回バイオ関連化学シンポジウム 2010  
年9月26日 大阪
- (6) 森田雅宗 Mun' delanji Vestergaard 濱  
田勉、高木昌宏  
脂質膜挙動によるアミロイドβの毒性解  
析  
第4回バイオ関連化学シンポジウム  
2010年9月25日 大阪
- (7) 濱田勉 杉本涼子 石井健一 長崎健 高  
木昌宏 Reversible photocontrol  
of membrane vesicle structures  
第48回日本生物物理学会年会  
2010年9月20日 仙台
- (8) 依田毅 VESTERGAARD Mun' delanji 濱  
田勉 小川陽子 吉田康一 高木昌宏  
酸化コレステロール含有膜小胞の熱応答  
ダイナミクス  
日本生物物理学会 48会年会  
2010年9月20日 仙台
- (9) T. Hamada, R. Sugimoto, K. Ishii T.  
Nagasaki, M. Takagi Reversible  
photo-switching in fluid vesicles:  
morphology, topology, and lateral  
domains  
The ISSP International Workshop on Soft  
Matter Physics 2010年8月24日  
東京
- (10) T. Hamada, Y. Hirabayashi, T. Ohta,  
M. Takagi Oscillatory pore motion of  
fluid vesicles  
International Symposium on  
Non-Equilibrium Soft Matter 2010  
2010年8月18日 奈良

[図書] (計3件)

- (1) “第3章 細胞内生体分子群の実測定量解  
析/第3節 細胞模倣非対称2分子膜リポ  
ソームの構築” 濱田勉, 小松佑規, 高木  
昌宏, シングルセル解析の最前線 (シ  
ーエムシー出版), pp.149-157  
(2010/3).
- (2) “細胞サイズリポソームの新しい作成法  
とその応用” 山田彩子, 濱田勉, 吉川研  
一, 生物物理, 生物物理学会 Vol.49,  
pp. 256-259 (2009).
- (3) “巨大リポソームの顕微鏡直接観察” 濱  
田勉 生命化学研究レター「生命化学研  
究法」, 日本生化学会 No. 28, pp. 27-31  
(2008).

[産業財産権]

○ 出願状況 (計3件)

名称:「光応答性リポソーム及び光応答性リポ  
ソームを利用した物質の運搬方法」

発明者: 濱田勉 長崎健 高木昌宏

権利者: 北陸先端科学技術大学院大学

番号: 特願 2010-42688

出願年月日: 2010年2月26日

国内

名称:「マイクロ液滴の作製方法」

発明者: 濱田勉 高木昌宏 小松佑規

権利者: 北陸先端科学技術大学院大学

番号: 特願 2009-234643

出願年月日: 2009年10月8日

国内

名称:「リポソーム及びその作製方法」

発明者: 高木昌宏 濱田勉 三浦陽子

権利者: 北陸先端科学技術大学院大学

番号: 特願 2008-110455

出願年月日: 2008年4月21日

国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者: 高木昌宏

(TAKAGI MASAHIRO)

北陸先端科学技術大学院大学・

マテリアルサイエンス研究科・教授

研究者番号: 00183434

(2) 研究分担者: 濱田勉

(HAMADA TSUTOMU)

北陸先端科学技術大学院大学・

マテリアルサイエンス研究科・助教

研究者番号: 40432140