

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82704

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620138

研究課題名(和文)膜作用物質の反応場となる膜タンパク質搭載非対称膜リポソームモデルの作製と機能

研究課題名(英文)Preparation and function of the membrane protein-reconstituted asymmetric liposomes

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・人工細胞膜システムグループ・研究員

研究者番号：70612315

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)：本研究は、膜と相互作用するペプチド(シンナマイシン)を我々が開発したリン脂質組成非対称膜リポソームに作用させ、リン脂質分子の運動を観察した。観察の結果、シンナマイシンはホスファチジルエタノールアミンを持った非対称膜リポソームに結合し、フリップ-フロップを促進した。次に、細胞膜でリン脂質の非対称性を維持する膜タンパク質の非対称膜リポソームへの再構成に成功している。さらに、この膜タンパク質の機能観察にも成功している。よって、このリン脂質非対称膜リポソームを用いて、タンパク質-脂質の素反応の観察に大いに役立つと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the flop dynamics of lipid asymmetric GV membranes in the presence of a membrane-interacted peptide. Our lipid asymmetric GVs were generated by a pulsed jet flow applied to a planar lipid bilayer. We observed that the DOPS-flop in asymmetric GV membranes was promoted in the presence of the peptides. Next, we successfully reconstituted flippases into the asymmetric GVs of phosphatidylserine. Finally, we observed the translocation of lipids from the extracellular leaflet to the cytoplasmic leaflet which was catalyzed by flippases. The asymmetric GVs will be useful for the study of elementary lipid-lipid or lipid-protein interactions.

研究分野：生体関連化学

キーワード：リポソーム 人工細胞モデル 膜タンパク質 フリップ-フロップ 非対称膜 ベシクル

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。その中でも、細胞サイズ(10-30 μm)のリポソーム(巨大リポソーム)が光学顕微鏡下においてリアルタイムな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。静置水和法は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大量に作製できるが、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)を作製することは原理的に難しい。また、サイズが揃わず、生理的な溶液条件下ではリポソーム生成効率が低い。そこで本研究では、リン脂質非対称膜リポソームを用い、細胞膜環境に近い条件下における脂質分子運動を観察した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、リン脂質非対称膜リポソーム上でのリン脂質の分子運動の観察及び、リン脂質の非対称性に係る膜タンパク質を再構成することにより高次元細胞膜模倣を目指した。

近年、微小電子機械システム(Micro Electro Mechanical system; MEMS)を用いたリン脂質非対称膜リポソーム作製法が考案されている。これらの作製法のリポソームには、リン脂質二重膜作製時に使用したオイル(n-decane 等)がリン脂質膜内に混入し、リポソームの安定性やリン脂質分子運動の妨げになっていると言われている。そこで、我々は、脂質二重膜に残留しているオイルが極力少ないリン脂質非対称膜リポソーム作製に成功している。このリポソーム作製法は以下のとおりである(図1)。リン脂質に覆われた液滴を接触させ、その接触界面の平面リン脂質非対称膜を得る。そして、この平面リン脂質非対称膜にジェット水流を吹き付けることにより、細胞サイズのリリン脂質非対称膜リポソームを作製した。ラマン顕微鏡により本作製法で作製されたリポソーム膜内には、オイル層が無いことを示唆する結果を得て

いる。本研究は、このリン脂質非対称膜リポソームを用いて研究を行った。

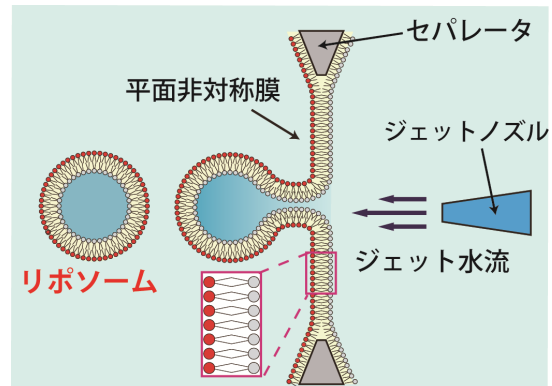


図1. ジェット水流によるリン脂質非対称膜リポソーム作製の概略図

平面リン脂質非対称膜へ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ン脂質非対称膜リポソームを形成

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、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン;DOPE)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 μm と10 μm 程度のリポソームが順に並んで形成した。直径150-200 μm 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 μm 程度のリポソームは形成後緩衝液中に存在している。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)ペプチドによるリン脂質非対称膜上におけるリン脂質の分子運動

これまでに、このリン脂質非対称膜リポソームを用いて、熱運動によるリン脂質の分子運動(フリップ-フロップ)の観察に成功している。今回は、膜と相互作用するペプチド(シンナマイシン)をリン脂質非対称膜に作用させ、このペプチドのリン脂質非対称膜上での挙動を観察した。このシンナマイシンは細胞膜では、ホスファチジルエタノールアミン(PE)に結合しフリップ-フロップを促進することが知られている。外膜にDOPC、内膜にDOPC/DOPS/DOPEを配向させたリン脂質非対称膜リポソームを用い、シンナマイシンとの相互作用を観察した。DOPE非対称膜リポ

ソームでは、1時間ほどで DOPS が完全に混和された。しかし、DOPE を持たない非対称膜リポソームでは、シンナマイシンを加えてもフリップ-フロップの促進は観察されなかった。よって、シンナマイシンは DOPE と相互作用しフリップ-フロップを促進していると考え(図 2)。この細胞膜に近いリン脂質非対称膜リポソームを用いることにより、細胞膜と相互作用するペプチドやタンパク質の相互作用の素反応を観察できる。

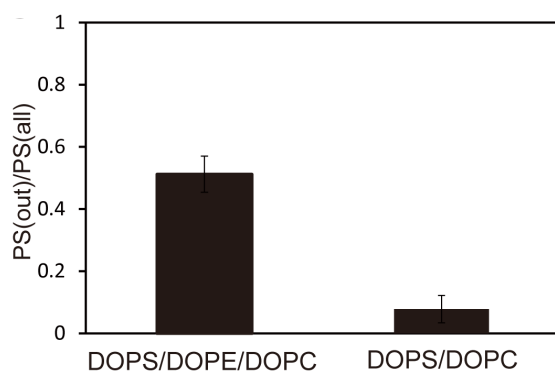


図 2. シンナマイシンによるフリップ-フロップの促進
DOPE を含む非対称膜リポソームはシンナマイシンにより、DOPS 分子を内膜から外膜への移行を促進。

(2)非対称膜リポソームへの膜タンパク質の再構成

我々の作製した非対称膜リポソームをさらに細胞膜に似せるために、細胞膜の非対称膜維持に關与する膜タンパク質の再構成を目指した。この膜タンパク質はバキュロウイルス発現系によって発現させた。そして、非対称膜リポソームに再構成した結果、非対称膜が維持されるという定性的なデータの取得に成功している。現在、定量的なデータを取手中である。

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)

Koki Kamiya, Ryuji Kawano, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi, “Reconstitution and function of membrane proteins into asymmetric giant liposomes by using a pulsed jet flow” *Proceedings of IEEE MEMS2014* (2014) pp.288-289.

Koki Kamiya, R. Kawano, T. Osaki and S. Takeuchi, “Protein expression inside oil-free giant vesicles by using pulsed jet flow method”, *Proceedings of MicroTAS 2013* (2013) pp.611-613.

[学会発表](計 8 件)

神谷厚輝、大崎寿久、竹内昌治、人工細胞作製に向けたリン脂質非対称膜リポソームの作製、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日-27 日、横浜

Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Ryuji Kawano, Minato Akiyama, Kazunari Akiyoshi, Shoji Takeuchi, Single-Channel Current Measurement of a Connexin Hemichannel Expressed Using an In Vitro Protein Synthesis System, MicroTAS 2014, 2014 年 10 月 26 日-10 月 30 日 San Antonio, America

神谷厚輝、大崎寿久、柴崎宏介、竹内昌治、細胞サイズリン脂質非対称膜リポソームによる膜ダイナミクスの観察、第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 25 日-27 日、札幌

神谷厚輝、大崎寿久、川野竜司、竹内昌治、リン脂質非対称膜リポソームへの膜タンパク質の再構成、日本化学会第 94 春季年会、2014 年 3 月 27 日-30 日、名古屋
Koki Kamiya, Ryuji Kawano, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, Reconstitution and function of membrane proteins into asymmetric giant liposomes by using a pulsed jet flow, MEMS 2014, 2014 年 1 月 26 日-1 月 30 日 San Francisco, America

Koki Kamiya, Ryuji Kawano, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, Protein Expression Inside Oil-Free Giant Vesicles by using Pulsed Jet Flow Method, MicroTAS 2013, 2013 年 10 月 27 日-10 月 31 日 Freiburg, Germany

神谷厚輝、川野竜司、大崎寿久、竹内昌治、細胞サイズリン脂質非対称膜リポソームによるタンパク質-脂質相互作用観察、第 7 回バイオ関連化学シンポジウム、2013 年 9 月 27 日-29 日、名古屋

神谷厚輝、人工細胞は創れるか? -膜タンパク質再構成法とリン脂質非対称膜作製法-、日本機械学会北海道支部バイオメカニクス懇談会第 13 回講演会(招待講演) 2013 年 7 月 24 日、札幌

[図書](計 3 件)

Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Shoji Takeuchi, Cell-like liposomes integrated with microfluidic technology for synthetic biology, *Synthetic Biology*, 2014, pp.275-291

神谷厚輝、人工細胞モデル創成、生体の科学、2014、pp.492-493

神谷厚輝、ポソームはどれだけ細胞に近づけられるか、日本化学会生体機能関連化学部会ニューズレター、2013、vol.28、No.1、pp.3-6

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：リポソーム集団の製造方法
発明者：神谷厚輝、竹内昌治、大崎寿久、
川野竜司
権利者：神谷厚輝、竹内昌治、大崎寿久、
川野竜司
種類：特許
番号：特願 2014-118365
出願年月日：2014 年 6 月 9 日
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等
神奈川科学技術アカデミー人工細胞膜シス
テムグループ
https://www.newkast.or.jp/innovation/lab/takeuchi_project.html
竹内昌治研究室
<http://www.hybrid.iis.u-tokyo.ac.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・人工細胞膜システムグループ
・研究員
研究者番号：70612315