

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：82718

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05493

研究課題名(和文)リン脂質非対称膜リポソームを基盤とした人工トランスロコンの創出

研究課題名(英文) Interaction of membrane proteins on asymmetric lipid membrane toward creation of artificial translocon

研究代表者

神谷 厚輝 (Kamiya, Koki)

地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所・人工細胞膜システムグループ・研究員(任期有)

研究者番号：70612315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、真核細胞の細胞膜のリン脂質組成非対称膜リポソーム膜上でのペプチドや膜タンパク質等の生体分子の相互作用観察を通して、リン脂質非対称膜の重要性の検討を目的とした。本研究課題では、大きく分け3つの成果を挙げた。1つ目は、あるリン脂質非対称膜組成であると、膜タンパク質の再構成量が増大した。2つ目は、1つのデバイスで逐次的に様々なリン脂質を持った非対称膜リポソームが作製可能なデバイスを構築した。3つ目は、リポソームの経時観察時は、ブラウン運動を抑制するためにリポソームを固定化する必要があり、静水圧で細胞やリポソームを所望の形状・順番で固定化するデバイスを開発した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I investigated interactions between asymmetric lipid membranes and biological molecules (peptides or membrane proteins). The asymmetric lipid vesicles were generated from a planar lipid bilayer by applying the pulsed jet flow. I achieved three items. First, I found that the reconstruction amounts of the membrane proteins into the lipid membranes changed by the lipid compositions. Second, I developed a device for sequentially generating various types of asymmetric lipid vesicles. Third, I developed a well-controlled cell or liposome-trapping device.

研究分野：生体関連化学、生物物理学

キーワード：リポソーム リン脂質非対称膜 膜タンパク質 マイクロ流体デバイス 人工細胞モデル

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の細胞膜は、内膜と外膜のリン脂質組成が異なっている(リン脂質非対称膜)。例えば、動物細胞の形質膜の場合、外膜にはホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンが多く存在し、内膜にはホスファチジルセリンやホスファチジルエタノールアミンが多く存在している。細胞サイズの球状人工細胞膜のリポソームは容易に作製可能である。したがって、光学顕微鏡でこの大きさのリポソームは観察可能であるため、リン脂質の生物物理的な特性や膜タンパク質の機能解析研究等にリポソームは用いられてきた。リポソームの古典的な作製法の1つの静置水和法は以下の方法である。クロロホルムに溶解したリン脂質をアルゴンガス気流下で乾燥させ、リン脂質フィルムを形成させる。そして、このリン脂質フィルムに緩衝溶液を添加し、自己組織的にリポソームが形成される方法である。この方法は、リポソームを大量に作製可能であるが、多重膜リポソームや凝集物が多数観察される。リポソームのサイズも不均一である。また、リン脂質フィルム形成時にリン脂質を混和するため、静置水和法では原理上真核細胞のようなリン脂質非対称膜の形成は不可能である。

近年、マイクロ流体デバイスを用いたリポソーム作製法が国内外で開発され、均一サイズで単層膜のリポソームが作製可能になった。また、リン脂質非対称膜をもつリポソームの作製にも成功している。しかし、多くのマイクロ流体デバイスを用いたリポソーム作製法では、不安定なリポソームが多く形成される問題点がある。そこで、私は安定的なリン脂質非対称膜リポソームの形成可能なシステムの開発に成功した。このリン脂質非対称膜リポソームは下記の手順で作製される。異なるリン脂質で構成される液滴を接触させるとその接触界面に平面リン脂質非対称膜が形成される。そして、この平面膜にジ

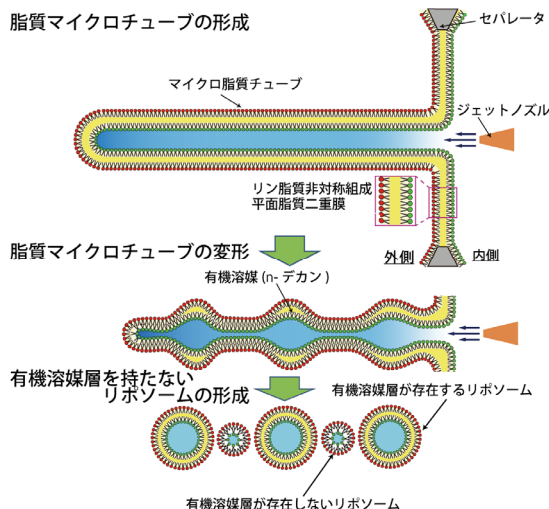


図1. マイクロデバイスによるリン脂質非対称リポソーム作製

ェット水流を印加すると、リン脂質のマイクロチューブが形成され、最終的には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により、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。

2. 研究の目的

真核細胞の細胞膜はリン脂質非対称膜を形成している。しかし、細胞膜のリン脂質非対称膜組成の生物学的な意義は明確には理解されていない。そこで、本研究では、無細胞タンパク質発現系により膜タンパク質(コネクシン)を発現させ、様々なリン脂質非対称膜リポソームへの再構成挙動を観察した。そして、コネクシンの機能観察も行い、リン脂質非対称膜の意義について考察をした。また、様々な組成のリン脂質非対称膜リポソームが作成可能なデバイスを開発した。さらに、細胞やリポソームをデバイス上に任意の順番や形状で固定化可能なデバイスの開発にも成功した。

3. 研究の方法

3. 1. 様々な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

様々なリン脂質非対称膜リポソームを作製し、EGFPをC末端に付加したコネクシンを無細胞タンパク質発現系で発現させ、リポソーム膜への取込みを観察した。取込み量は、リポソーム膜上のEGFPの蛍光輝度により判断した。また、コネクシンは6量体を形成し、ポアを形成することが知られている。そこで、リポソームに再構成されたコネクシンがポアを形成しているかを、リポソームに蛍光色素を封入し蛍光色素の漏れを経時的に顕微鏡観察を行った。

3. 2. 様々なリン脂質非対称膜リポソーム作製デバイス

現在のリン脂質非対称膜リポソーム作製デバイスでは、1つのデバイスで1種類のリン脂質非対称膜リポソームしか作製できない。したがって、リン脂質非対称膜組成を振る条件検討を行う際、非常に効率が悪い。そこで、1つのデバイスで複数種のリン脂質非対称膜リポソームを作製できるデバイスを開発した。このデバイス機構として、リン脂質単分子膜を形成させたウェルを張り合わせることで、平面リン脂質2重膜を形成させて、ジェット水流を印加しリポソームを形成させる。形成後、別のウェルを張り合わせることで、新しい平面リン脂質2重膜を形成し、リポソームを形成させる。

3. 3. 細胞やリポソームの固定化デバイスの開発

細胞は隣合った細胞とコミュニケーションをして生体機能を発現している。したがって、細胞間相互作用の詳細を観察するためには、細胞の順番や形状の制御が重要になってく

る。そこで、順番や形状を制御して細胞を固定化可能なデバイスを作製した。薄い高分子フィルムにMEMS技術により、レール状のマイクロサイズの孔をあけた。そして、この高分子フィルムの下にスリット配置した。スリットを開くとレール状のマイクロ孔の上面から下面へ水流が生じ、細胞がスリットに引っかかり、細胞が固定化される。徐々にスリットを動かして別の細胞を固定化することにより細胞の固定化順を制御する。

4. 研究成果

4. 1. 様々な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 [雑誌論文④]

負電荷を持つリン脂質のフォスファチジルセリン(PS)と電気的中性のリン脂質のフォスファチジルコリン(PC)を用いてリン脂質非対称膜リポソームを形成した。そして、リポソームの外側から無細胞タンパク質発現系にてコネキシン-EGFPを発現させ、リポソーム膜上のEGFPの蛍光輝度より、コネキシンのリポソーム膜上への取り込まれやすさを評価した。その結果、外膜にPS/PC、内膜にPCのリン脂質非対称膜リポソームであるとコネキシンの取込みが増大することがわかった。また、外膜のPS濃度が50%以上であるとコネキシンのリポソーム膜への取込みが増大することもわかった。この実験だけでは、リポソーム膜に正しいフォールディングでコネキシンが再構成されているかは分からない。そこで、リポソーム内に蛍光色素を封入し、コネキシンナノポアを介した蛍光漏出を観察した。その結果、外膜にPS/PC、内膜にPCの組成を持ったリン脂質非対称膜リポソームが、最も蛍光漏出が観察された。

4. 2. 様々なリン脂質非対称膜リポソーム作製デバイス [雑誌論文②]

1つのデバイスで複数組成のリン脂質非対称膜リポソーム作製デバイスの作製を開発した。デバイスの構造は、6つのウェルを持った回転テーブルとジェット水流ノズルが存在する1つの固定ウェルからなる。各回転テーブルのウェルにリン脂質のDOPCをベースとして、Rhodamine-DOPEやBODIPY-DHPEを含んだ単分子膜を作製した。そして、回転テーブルを回転させることにより、平面リン脂質非対称膜をさせ、ジェット水流を印加し、リポソームを形成させた。図2は、6つのウェルをもつ回転テーブルを1回転させたときの、各ウェルで形成されたリポソームの蛍光輝度を示している。例えば、Rhodamineの蛍光を持つウェルからは、Rhodamineの蛍光を持つリポソームが形成された。また、Rhodamine, BODIPY両方の蛍光を持たないウェルからは、RhodamineとBODIPY両方の蛍光が観察されないリポソームが作製された。この結果より、ウェルの回転によるリン脂質の混和が起きずにリン脂質非対称膜リポソームが形成されることが

しめされた。したがって、このデバイスは、様々なリン脂質非対称膜リポソームをハイスループットに作製することに有効である。

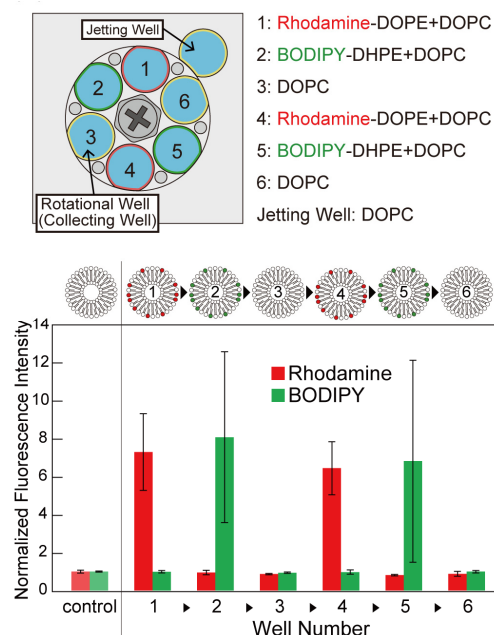


図2. 回転デバイスによるリン脂質非対称膜リポソームの逐次的作製。回転デバイスを回転させることによりリポソームの外膜の組成を変えることができる。1回転で各ウェル内に作製されたリポソームの蛍光輝度。

4. 3. 細胞やリポソームの固定化デバイスの開発 [雑誌論文①]

リポソーム膜の分子運動やリポソーム内での生化学反応の経時観察のため、リポソームの固定化は必要である。また、細胞コミュニケーション観察には、隣接する細胞の種類や配列や形状が非常に重要になってくる。したがって、細胞やリポソームを任意の形状や順番で固定化可能なデバイスを作製した。デバイスの詳細な機構は、研究の方法3.3.

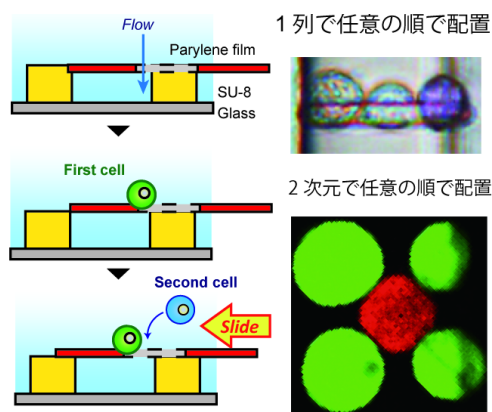


図3. 本デバイスの機構の概略図と本デバイスによる細胞を任意の順番で直線上に配置とX字に配置。

に記載した。任意の順番で固定化可能なデバイスを用いて、3色に色分けをした細胞を任意の順番で配列させた(図3)。本デバイスの機構を持たない場合と比べて、約40倍正しい配列で並んだ。また、並んだ細胞に対して、コネキシンを介した蛍光色素の輸送が観察されたことから細胞は接触して並んでいることがわかった。高分子フィルムの形状を変えるだけで、直線上から”X”字のような2次元的に細胞を配列されることにも成功している。

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4件) すべて査読有

- ① Koki Kamiya[†], Yuta Abe[†], Kosuke Inoue, Toshihisa Osaki, Ryuji Kawano, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi, “Well-controlled cell-trapping systems for investigating heterogeneous cell-cell interactions”, *Advanced Healthcare Materials*, Vol.7, 1701208, 2018. DOI: 10.1002/adhm.201701208 (†: equal contribution)
- ② Masahide Gotanda[†], Koki Kamiya[†], Toshihisa Osaki, Satoshi Fujii, Nobuo Misawa, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi, “Sequential generation of asymmetric lipid vesicles using a pulsed-jetting method in rotational wells”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol.261, pp.392-397, 2018. DOI: 10.1016/j.snb.201801.149 (†: equal contribution)
- ③ Koki Kamiya and Shoji Takeuchi, “Giant liposome formation toward the synthesis of well-defined artificial cells”, *Journal of Materials Chemistry B*, Vol.5, pp.5911-5923, 2017. DOI: 10.1039/C7TB01322A
- ④ Koki Kamiya, Ryuji Kawano, Osaki Toshihisa, Kazunari Akiyoshi, and Shoji Takeuchi, “Cell-sized asymmetric lipid vesicles facilitate the investigation of asymmetric membranes” *Nature Chemistry*, Vol. 8 (2016) pp.881-889. DOI: 10.1038/nchem.2537

[学会発表] (計17件)

- ① 神谷厚輝、大崎寿久、藤井聡志、三澤宣雄、竹内昌治、“マイクロデバイスを用いたリポソーム作製”, 第1回分子ロボティクス年次大会(併催・分子ロボット倫理シンポジウム), March 6, 2018.
- ② Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Satoshi Fujii, Nobuo Misawa, and Shoji Takeuchi, “NANO-SIZED ASYMMETRIC LIPID

VESICLES FOR DRUG CARRIER APPLICATIONS”, *MEMS 2018*, January 24, 2018.

- ③ 五反田真秀、神谷厚輝、大崎寿久、藤井聡志、三澤宣雄、三木則尚、竹内昌治、“非対称人工細胞膜間における生体分子の拡散運動観察ため手法開発”, 第8回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, October 31, 2017.
- ④ Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Satoshi Fujii, Nobuo Misawa, and Shoji Takeuchi, “FORMATION OF A GIANT LIPID VESICLE CONTAINING TWO TYPES OF LIQUID SOLUTIONS USING A THETA-GLASS CAPILLARY”, *MicroTAS 2017*, October 24, 2017.
- ⑤ Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Ryuji Kawano, Shoji Takeuchi, “Reconstitution amount of membrane proteins was controlled by components of asymmetric lipid vesicles”, 第55回日本生物物理学会年会, September 19, 2017.
- ⑥ Masahide Gotanda, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Satoshi Fujii, Nobuo Misawa, Norihisa Miki and Shoji Takeuchi, “SEQUENTIAL PRODUCTION OF VARIOUS TYPES OF ASYMMETRIC LIPID VESICLES USING PULSE JET FLOW”, *TRANSDUCERS 2017*, June 21, 2017.
- ⑦ Koki Kamiya, “Artificial Cell Assembly Using Bottom-Up Approach”, *23rd iCeMS International Symposium “Emerging Science for Unlocking Cell's Secrets”*, May 30, 2017.
- ⑧ 神谷厚輝、大崎寿久、川野竜司、竹内昌治、“細胞膜相互作用観察可能な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作製”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第35回研究会, May 23, 2017.
- ⑨ 五反田真秀、神谷厚輝、大崎寿久、藤井聡志、三澤宣雄、三木則尚、竹内昌治、“脂質膜組成交換デバイスによる非対称人工細胞膜間の分子運動観察”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第35回研究会, May 23, 2017.
- ⑩ 五反田真秀、神谷厚輝、大崎寿久、藤井聡志、三澤宣雄、三木則尚、竹内昌治、“人工細胞膜内の生体分子運動を観察可能とする非対称膜リポソームの連続的作製法の開発”, ロボティクス・メカトロニクス講演会 2017, May 11, 2017.
- ⑪ 神谷厚輝、大崎寿久、竹内昌治、“細胞膜を模倣したリン脂質非対称膜と生体分子の相互作用観察”, 第39回日本分子生物学会年会, December 1, 2016.
- ⑫ 神谷厚輝、大崎寿久、竹内昌治、“リン脂質非対称膜リポソームによる膜タン

パク質の取り込み挙動の観察”, 「**細胞を創る**」研究会 9.0, November 21, 2016.

- ⑬ 五反田真秀、神谷厚輝、大崎寿久、藤井聡志、三澤宣雄、三木則尚、竹内昌治、“多種類の非対称膜組成リポソームの連続作製法の開発”, 「**細胞を創る**」研究会 9.0, November 21, 2016.
- ⑭ 神谷厚輝、大崎寿久、竹内昌治、リン脂質非対称膜リポソームへの無細胞発現系で発現させた膜タンパク質の再構成、**日本化学会第 96 春季年会**, March 27, 2016.
- ⑮ 神谷厚輝、竹内昌治、“膜タンパク質やリン脂質非対称膜を再構成した人工細胞膜の作製”, 「**細胞を創る**」研究会 8.0, November 12, 2015.
- ⑯ Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi, "Observation of lipid motion in asymmetric giant vesicles", *MicroTAS 2015*, October 24, 2015.
- ⑰ Koki Kamiya, "Preparation of artificial cell models by ", **第 53 回日本生物物理学会年会**, September 13, 2015.

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 吉田昭太郎、神谷厚輝、竹内昌治 “マイクロ・ナノデバイスによる膜系システムの理解” **人工細胞の創製とその応用 CMC 出版** (2017) pp.85-93.

〔その他〕

ホームページ等

神奈川県立産業技術総合研究所 人工細胞膜システムグループ

https://www.kanagawa-iri.jp/r_and_d/project_res/labo_intro/takeuchi_project/

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)

神奈川県立産業技術総合研究所

人工細胞膜システムグループ

研究者番号 : 70612315