

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：54101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K05525

研究課題名(和文) 相分離状態の脂質膜に外来物質が誘起する孔構造の時間・空間解析

研究課題名(英文) Tension-induced pore formation in phase-separated lipid membrane and the effect of tension on EGCg-induced pore formation

研究代表者

丹波 之宏 (Tamba, Yukihiro)

鈴鹿工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：50436911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：秩序液体相(lo相)と液晶相(ld相)の2つの相が混在する巨大な脂質膜ベシクル(GUV)に膜を引っ張る張力を印加し誘起された孔(ポア)について、その安定性を形成位置も含め検討した。lo相とld相が混在するGUVに張力を加えた場合、その安定性はld相のみで形成されたGUVと非常に良く似ており、ld相とlo相が混在する脂質膜ではld相においてポアが形成されることが示唆された。また、エピガロカテキンガラレートがld相のGUVに誘起するポアの形成メカニズムについても検討した。ポアの形成確率は脂質膜にかかる張りに依存し、印加した張力が小さいと高くなり、張力が大きいと低くなるなどの結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ある種の抗菌性ペプチドなど外来物質は細菌の細胞膜に結合し、その膜に孔(ポア)を空ける。これは最近注目されている自然免疫の一つであるが、このような外来物質がどのようなメカニズムで生体膜のバリア機能を破壊し膜中にポアを形成するのか、またどのような構造のポアを誘起するのかについては不明な点が多い。本研究では実際の生体膜を模した物性の異なる相が混在する脂質膜におけるポア形成に着目し、その形成位置や安定性を検討した。また、フラボノイドの一種、茶カテキン・エピガロカテキンガラレート(EGCg)が、このような脂質膜に形成するポアについてその形成メカニズムを検討した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the stability of giant unilamellar vesicles (GUVs) with coexisting liquid-disordered (ld) and liquid-ordered (lo) phases of lipid membranes. Using micropipet aspiration method, the rate constants of tension-induced pore formation in the phase-separated membranes were obtained. The line tension of the pore of lo and ld coexisting phase membrane was almost the same as that of ld phase membrane. Next, we examined the effect of the tension on the EGCg-induced burst of GUVs as a result of pore formation in ld phase membrane using micropipete aspiration method. The fraction of burst of GUVs decreased with increasing the applied tension in the range of low tension which did not induced rupture of aspirated GUVs. We also examined the EGCg-induced fractional change in area of the membranes. Based on these results, we discuss the mechanism of the EGCg-induced pore formation in the ld phase membrane.

研究分野：生物物理

キーワード：GUV ポア形成 張力

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ある種のペプチド、例えば抗菌性ペプチドなどの外来物質は標的細胞の細胞膜に結合し、その膜に孔(ポア)を空ける。これにより、標的とされた細胞は細胞内外の電位差を失い細胞としての機能を損う。外来物質がどのようなメカニズムで生体膜のバリア機能を破壊し膜中にポアを形成するのか、またどのような構造のポアを誘起するのかが興味深く、その脂質膜との相互作用の研究が活発に行われてきたが未だ不明な点が多い。その困難の一つは脂質膜中に形成される孔が多くの場合数十から数 nm と微小で、また非常に短時間で形成される点にある。一方、フラボノイドの一種、茶カテキン・エピガロカテキンガレート(EGCg)と脂質膜の相互作用では、EGCg により巨大な単一膜ベシクル(GUV)の脂質膜に直径数 μm の巨大なポアが誘起され、ポアの形成初期段階からの動的構造の詳細が明らかになりつつある。さて、脂質膜ベシクルを細胞膜モデルとするポア形成の研究では脂質膜の組成を空間的に均一な系として扱うことが多く、これは現実の生体膜と異なる。脂質膜は、その膜内での脂質分子の並進拡散係数やアシル鎖の運動性など物性を異にする幾つかの相をとることが知られており、多種の脂質からなる膜ではそれらの相の混在が膜中で起こり、これが生理的に重要な役割を果たすとの指摘がある。

2. 研究の目的

本研究では実際の生体膜を模した物性の異なる相が混在する脂質膜におけるポア形成に着目し、外来物質や外力により形成されたポアの形成位置や脂質膜の状態、ポアの安定性や動的構造を検討する。外来物質としてはポアの形成位置や動的構造が観測可能な EGCg を用いる。また外力としてはマイクロピペット吸引法により GUV の脂質膜に張力を印加しポアの形成を誘起する。これらの計測を通し、相分離状態にある脂質膜の力学的安定性や、さらには EGCg によるポア形成のメカニズムを明らかにしていく。

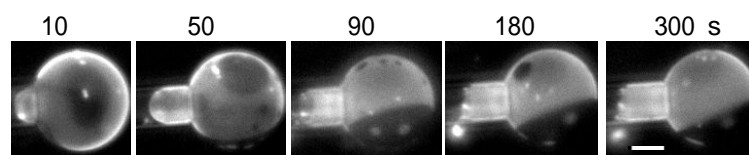
3. 研究の方法

生体膜/脂質膜と外来性物質の相互作用の研究では直径数百 nm 程度の脂質膜の袋状の構造体である脂質膜ベシクル(LUV)を多数含む懸濁液を用い行われるのが一般的である。しかし、この方法は集団平均の測定であるため個々のベシクルについての情報を直接的に得ることができない。そこで本プロジェクトでは、1 個のベシクルに誘起されるポアの動的な構造変化や脂質膜の状態を計測できる直径 $10\mu\text{m}$ 以上の巨大な単一膜ベシクル(GUV)を用い外力や外来物質が誘起するポアの安定性やその形成メカニズムを調べていく。さて一般に、脂質膜が室温においてとる相はその組成に依存し、不飽和脂質は液体に近い液晶相(l_d 相)の膜、飽和脂質は固体に近いゲル相の膜、飽和脂質とコレステロールの混合脂質は液晶相とゲル相の中間の性質を持つ秩序液体相(l_o 相)の膜を形成する。本研究では不飽和脂質である DOPC、飽和脂質である DPPC およびコレステロール chol の 3 成分の混合脂質膜からなる GUV を PEG-lipid 法を用い作成し、この脂質膜の安定性を位相差蛍光微分干渉顕微鏡により計測していく。

4. 研究成果

(1) l_o 相と l_d 相が混在する巨大単一膜ベシクルに張力が誘起するポア

まずマイクロピペット吸引法を用い GUV の脂質膜に一定の引っ張り張力を印加し、それにより誘起されるポアの安定性を計測する実験系を確立した。次に蛍光ラベルされた脂質 TexasRed-DHPE を 0.4mol%含む DOPC/DPPC/chol をモル比で 3/4/3 で混合した脂質膜からなる GUV を 37 °C で作成した。この脂質の成分比で DOPC/DPPC/chol 膜が l_o 相と l_d 相に相分離することは既に知られており、GUV の水溶液を室温の観測用チャンパーに移した時点で既に GUV の脂質膜の一部は蛍光を発し、他一部は暗くなっていた。TexasRed-DHPE は l_d 相に分配され蛍光を発するドメインは l_d 相を指す。さて、この相分離は最初小さなドメインが多数散らばっている状態であったが、時間の経過とともに l_o 相あるいは l_d 相の安定で大きなドメインを形成した。次に、マイクロピペット吸引法を用いてポアの安定性を計測するのに近い 5mN/m の張力を GUV の脂質膜に印加し、相分離の状態を観測した(下図)。画像の左側からマイクロピペットで GUV を吸引しその先端に GUV を保持している。このとき脂質膜にかかる張力はマイクロピペット内外の圧力差および GUV の形状から評価できる。また図上の数字は吸引を開始してから時間を示している。張力が加わっていない GUV と同様に相分離は最初、ドメインがいくつか散らばっていたが(下図 10 秒)、時間経過とともに l_d 相と l_o 相はそれぞれのドメインに集まっていき、安定で大きなドメインに成長した(下図 300 秒)。



次に相分離した脂質膜の力学的安定性を調べるために、DOPC/DPPC/chol (3/4/3)-GUV をマイクロピペットで吸引し、脂質膜に一定の張力 σ を与えた。GUV の脂質膜は蛍光ラベルせず、その脂質膜の状態は位相差顕微鏡により観測した。吸引した GUV ははじめ安定していたが、突然に破裂

し、その脂質膜はマイクロピペットの内部に吸い込まれた。この破裂は GUV の脂質膜にポアが形成されたことを意味する。GUV の破裂にかかる時間は、同一の張力でもバラつきがあり、破裂の起きていない GUV の割合は時間に対し一次減衰した。これは張力によるポア形成は 2 状態転移モデルに従い起こることを示唆しており、ある印加張力におけるポア形成の速度定数を見積もることができた。ポア形成の速度定数は加えた張力の増大とともに大きくなった。比較のため、同様の測定を l_d 相の脂質膜、DOPC-GUV、あるいは l_o 相の脂質膜、DPPC/cho1-GUV についても行った。同程度のポア形成の速度定数を示すのに必要な張力は、 l_o/l_d 相が混在する脂質膜と l_d 相の脂質膜では同程度であったのに対し、 l_o 相の脂質膜においては 1.7 倍程度の大きな張力を必要とし、 l_d 相の脂質膜に対し安定であることが分かった。以上の結果をより定量的にあつかうため、ポアの力学的安定性モデルに基づき、張力に対するポアの形成速度の分布からポアの縁にはたらく線張力を導出した[A]。張力がポアを拡大させる要因になるのに対し、線張力はポアの縁に脂質のアシル鎖が露出する不安定性に起因して生じ、ポアを閉じる向きにはたらく。また、これはポアを形作る脂質分子の状態に依存するため、ポアの形成位置を知る手がかりとなる。 l_o/l_d 相が混在する脂質膜に形成されたポアの線張力は、 l_d 相のみの脂質膜にポアが形成された場合と概ね同じ値を示し、一方、 l_o 相の脂質膜におけるポアの線張力はそれらの 1.3 倍ほど大きな値となった。以上の解析は、 l_d 相と l_o 相が混在する脂質膜においては、 l_d 相においてポアが形成されることを示唆するが、脂質膜の安定性は膜に含まれる微量の混在物の影響を強く受けるため、その詳細の解明にはさらなる検討が必要である。

[A] Langmuir, 29 (2013) 3848

(2) 緑茶由来フラボノイド、EGCg が誘起する GUV の破裂の張力依存性

エピガロカテキンガレート(EGCg)は緑茶由来のフラボノイドであり抗菌活性や抗酸化活性など多様な生理活性を持つ。このような芳香族炭化水素と脂質膜との相互作用には未だ不明な点が多いが、EGCg は脂質膜との間にも強い相互作用を示し、EGCg により GUV の破裂・収縮が誘起されることが報告された[B]。さらにこの破裂の高時間空間分解観測によると EGCg により脂質膜にポアが形成され、それが拡大縮小する過程で GUV の直径は収縮し脂質膜の塊へと変化するとの結果が示された。さて、本プロジェクトでは l_d 相や l_o 相といった物性の異なるドメインが混在する脂質膜に形成されるポアの安定性の解明を主な目的においているが、その前段階として l_d 相の DOPC-GUV の脂質膜に EGCg が与える影響の詳細を検討した。まず、EGCg が GUV の脂質膜に結合した際に誘起される脂質膜面積の変化をマイクロピペット吸引法でもって測定した。DOPC-GUV をピペット先端に保持し、その GUV の周囲をもう一つのマイクロピペットを用い EGCg の水溶液で置換した。その際の脂質膜面積の変化は、ポア形成前の GUV の体積が一定と仮定すると、マイクロピペットに保持された GUV の形状の変化から算出することができる。その結果を以下に記す。GUV にかかる張力が張力によるポア形成が誘起されない程度に低い範囲に限る結果ではあるが、EGCg による脂質膜面積の変化は張力の大きさに依存した。張力が大きい場合は、脂質膜面積は時間とともに増大しやがて一定の値をしめした。一方、張力が低い場合は、脂質膜面積は EGCg との相互作用の直後は増大し、ついで減少に転じ元の面積よりも小さな値を示すとの結果を得た。この測定の間、しばしば EGCg により GUV の破裂も観測され、GUV はピペット内部に吸引された。これは先に記したように GUV 膜にポアが形成されたことに対応する。そこで、EGCg が脂質膜に誘起するポアの形成確率に張力が与える影響も同様に調べたところ、印加した張力が小さいほどポアの形成確率は高くなり、張力が高いほどポア形成の確率は低くなるとの結果を得た。ここで GUV の脂質膜に印加した張力は、膜面積変化の場合と同じく、張力によるポア形成が誘起されない低い値の範囲にある。さて一般に張力のかかっていない GUV の脂質膜は揺らぎが大きい、張力がかかるにつれ揺らぎは減少し概ね消失する。すなわち、以上の結果は脂質膜の揺らぎが EGCg の誘起するポア形成に重要な役割を果たすことを示唆しており、そのポアの形成メカニズムを考える上での貴重な知見となった。本研究プロジェクトは、今後も継続し、EGCg が l_o/l_d 相の混在する脂質膜に誘起するポアや脂質膜の安定性についても調べていく。

[B] Biophys. J., 92, 3178-3194 (2007)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mika Terada, Yukihiro Tamba
2. 発表標題 Effect of lateral phase separation on mechanical stability of lipid membrane
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukihiro Tamba, Mika Terada, Naoya Sugita, Masahito Yamazaki
2. 発表標題 Mechanism of the burst of giant unilamellar vesicles induced by epigallocatechin gallate
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丹波之宏, 寺田美花, 杉田直哉, 山崎昌一
2. 発表標題 エピガロカテキンガレートが誘起するGUVの破裂のメカニズム
3. 学会等名 日本物理学会 春季
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoya Sugita, Mika Terada, Yukihiro Tamba and Masahito Yamazaki
2. 発表標題 Epigallocatechin gallate induces the burst of giant unilamellar vesicles in the tension-dependent manner
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap
<https://researchmap.jp/read0101559/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----