

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23740316

研究課題名(和文)相分離ベシクルの張力誘起構造転移と単分子膜結合挙動

研究課題名(英文)Tension-induced transition and bilayer coupling in a phase-separated vesicle

研究代表者

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・准教授

研究者番号：40432140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：シグナル伝達や物質輸送の機能に関わる細胞膜ドメインの物理化学的性質の解明を行った。浸透圧により人工細胞膜の張力を変化させ、膜ドメインの構造変化を光学顕微鏡で観察した。張力が増加するにつれ、膜面が分離しドメインが生じることを発見した。これにより、膜の張力変化が、細胞膜ドメインの構造を調節する重要な制御因子であることが分かった。加えて、人工細胞膜とナノ粒子の相互作用の観察を行った。粒子サイズ200nmを境に、小さい粒子はドメインに、大きい粒子は周囲のドメイン以外の領域に選択的に吸着することを発見した。この成果は、ナノ物質の生体や人体に対する影響を客観的に評価する基準として応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the physico-chemical properties of membrane domains that function signal transduction and molecular trafficking of cells. Under the control of the membrane tension by osmotic pressure, we observed a change in domain structures. We determined a quantitative phase diagram of phase organization with respect to the applied pressure and temperature. The results indicate that membrane tension can induce phase separation in homogeneous membranes. In addition, we investigated the interaction between domains and nanoparticles. We found that lateral heterogeneity in the membrane mediates the partitioning of nanoparticles in a size-dependent manner: small particles with a diameter of <200 nm were localized in an ordered phase, whereas large particles preferred a fluidic disordered phase.

研究分野：ソフトマター物理学

科研費の分科・細目：物理学、生物物理・化学物理

キーワード：生体膜 相分離 脂質ラフト ベシクル

1. 研究開始当初の背景

生細胞膜の基本構造は、脂質分子が疎水部を内側に向けて並んだ2分子膜構造である。「秩序液体(order)相」をとる脂質ラフトと呼ばれる膜ドメインが、周囲の「無秩序液体(disorder)相」の膜から分離した状態で存在すると考えられている。このドメイン構造は、受容体等の膜タンパク質を選択的に取り込むことで、シグナル伝達や膜輸送などの重要な生体機能を担っている。細胞は膜ドメインの生成・消滅を動的に制御しているが、その物理メカニズムは分かっていない。過去の膜ドメイン形成メカニズムに関する研究では、温度をパラメータとして相分離構造の安定性が調べられてきた。しかし、等温条件下で生きている細胞が実際に温度をパラメータとして膜ドメイン構造を制御しているとは考えにくい。そこで、もう一つの熱力学パラメータである圧力(膜張力)が生体環境因子として重要になると考えた。生細胞膜の膜張力は、裏打ち構造である細胞骨格により制御され、膜分子の流動性が変化することが分かっている。加えて、生細胞膜の構造的特徴である2分子膜内外層の膜分子成分の非対称性も、これまでのベシクル実験では考慮されてこなかった。異なる組成(異なる相分離構造)の単分子膜が結合した2分子膜においては、相分離構造の安定性やダイナミクスが大きく変化することが考えられる。内外層非対称膜における相分離構造の結合挙動は、物理学的かつ生物学的に重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では、2分子膜内の「張力」に着目し、相分離構造の物性解析を行う。そして、任意の単分子膜を結合した非対称2分子膜ベシクルを作製し、2分子膜相分離特性を単分子膜結合系として統一的に解析する。これらにより、膜ドメインの生命機能を物理学的に理解する。

3. 研究の方法

(1)張力による相分離構造転移: 2分子膜張力をコントロールし、相分離構造転移を引き起こす。張力をパラメータとする相図構築および相分離ダイナミクスの解析から、ベシクル相分離構造の張力依存性を明らかにする。
(2)非対称ベシクルの相分離解析: 2分子膜内外層における組成の非対称性を備えたベシクルを開発し、膜の非対称性が相分離構造に与える影響を明らかにする。
(3)膜ドメインと物質・分子の相互作用解析: 相分離した膜表面へのナノ物質の吸着ダイナミクスを観察し、膜が持つ物質認識機能の物理メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

(1)三成分脂質(コレステロール・飽和脂質・不飽和脂質)から成るベシクルを作製し、浸透圧により膜張力を変化させた際の膜ドメ

イン構造形成を解析した。顕微鏡観察実験の結果、張力が増加するにつれ、膜面が分離しドメインが生じることを発見した。また、高張力・低温条件下では、ドメインが液体から固体へ相転移することを見出した。そして、張力をパラメータとする膜ドメイン安定性の相図を構築し、張力によるドメイン制御機構を明らかにした。これにより、膜張力変化が、細胞膜の組織化構造を調節する重要な制御因子であることが分かった。

(2)相分離ベシクルを作製し、直径50~1000nmのポリスチレンナノ粒子との相互作用を蛍光顕微鏡で観察した。粒子サイズ200nmの境に、小さい粒子はドメイン(秩序相)に、大きい粒子は周囲の非ドメイン領域(無秩序相)に選択的に吸着することを見出した。さらに、ナノ粒子吸着に伴う膜の自由エネルギーを計算し、サイズ依存的な粒子の分配挙動を説明する物理モデルの構築に成功した。生細胞膜において膜ドメインはエンドサイトーシス小胞を形成する場として考えられており、この実験結果は、小さいナノ粒子はドメインを介して細胞内に取り込まれやすい事を示唆している。この成果は、近年開発が進んでいるナノサイズの物質の生体や人体に対する影響(ナノリスク)の客観的評価基準の確立に役立つことが期待できる。成果は、プレリリースされ、新聞に掲載された(北國新聞「ナノ粒子小さいほど細胞内へ」、日刊工業新聞「ナノ粒子細胞吸着の観察成功」等)。

(3)非対称膜ベシクルの形成プロセスである油中水滴法の速度論的解析を行い、理論と実験の両面から小胞の移行メカニズムを明らかにした。細胞と同じ約10マイクロメートルのサイズが、最も液滴からベシクルに移行しやすいことが発見された。成果は、掲載雑誌の表紙を飾った。

(4)相分離ベシクルとアルツハイマー病に関わるアミロイドペプチドとの相互作用を解析した。光学顕微鏡観察の結果、ペプチドはリポソーム膜面の柔らかい領域(disorder相)に選択的に局在することが分かった。そして、リポソームはドメイン領域(order相)を出芽させる変形ダイナミクスを示した。この出芽ダイナミクスは、細胞の物質輸送であるエンドサイトーシス機能を人工的に再現したものである。また、リポソーム膜面でブラウン運動する膜ドメインの挙動を解析したところ、ドメイン拡散係数の減少および膜の粘性増加がペプチドにより引き起こされることを見出した。また、このアミロイドペプチドは自己会合特性を持つが、オリゴマー状態のペプチドが最も膜変形を引き起こすことが明らかとなった。

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14件)

(1) M. Morita, T. Hamada, M. C. Vestergaard, M. Takagi "Endo- and Exocytic Budding Transformation of Slow-Diffusing Membrane Domains Induced by Alzheimer's Amyloid Beta" *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16, 8773-8777 (2014). 査読有り
<http://dx.doi.org/10.1039/C4CP00434E>

(2) 濱田勉、市川正敏 "人工細胞システムの創成と構造制御" *生化学*, Vol.86, No.2, pp.209-213 (2014). 査読無し

(3) H. Ito, T. Yamanaka, S. Kato, T. Hamada, M. Takagi, M. Ichikawa, K. Yoshikawa "Dynamical formation of lipid bilayer vesicles from lipid-coated droplets across a planar monolayer at an oil/water interface" *Soft Matter*, 9, 9539-9547 (2013). 査読有り
<http://dx.doi.org/10.1039/C3SM51766G>

(4) H. Thi Thanh Phan, T. Hata, M. Morita, T. Yoda, T. Hamada, M. C. Vestergaard, M. Takagi "The effect of oxysterols on the interaction of Alzheimer's amyloid beta with model membranes" *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1828, 2487-2495 (2013). 査読有り
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmem.2013.06.021>

(5) M. C. Vestergaard, M. Morita, T. Hamada, M. Takagi "Membrane fusion and vesicular transformation induced by Alzheimer's Amyloid beta" *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, Vol.1828, 1314-1321 (2013). 査読有り
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmem.2013.01.015>

(6) 濱田勉 "ナノ粒子 - 生体膜相互作用の解析:細胞サイズリポソームを用いた物理化学的アプローチ" *BIO INDUSTRY*, 特集「ナノメディシン最前線」(シーエムシー出版), Vol.30, No.6, pp.48-53 (2013). 査読無し

(7) 濱田勉 "脂質膜はナノ物質をサイズ依存的に識別する" *生物物理*, Vol.53, No.4, Vol.53, No.4, pp.210-211 (2013). 査読無し
https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophys/53/4/53_210/_pdf

(8) T. Hamada, M. Morita, M. Miyakawa, R. Sugimoto, M. C. Vestergaard, M. Takagi "Size-dependent partitioning of nano/micro-particles mediated by membrane

lateral heterogeneity" *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 134, 13990-13996 (2012). 査読有り
<http://dx.doi.org/10.1021/ja301264v>

(9) T. Hamada, K. Yoshikawa "Cell-Sized Liposomes and Droplets: Real-World Modeling of Living Cells" *Materials*, Vol. 5, 2292-2305 (2012). 査読有り
<http://www.mdpi.com/1996-1944/5/11/2292>

(10) T. Hamada, H. Hagihara, M. Morita, M. C. Vestergaard, Y. Tsujino, M. Takagi "Physicochemical profiling of surfactant-induced membrane dynamics in a cell-sized liposome" *J. Phys. Chem. Lett.*, Vol. 3, 430-435 (2012). 査読有り
<http://dx.doi.org/10.1021/jz2016044>

(11) T. Muraoka, T. Shima, T. Hamada, M. Morita, M. Takagi, K. V. Tabata, H. Noji, K. Kinbara "Ion Permeation by a Folded Multiblock Amphiphilic Oligomer Achieved by Hierarchical Construction of Self-Assembled Nanopores" *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 134, 19788-19794 (2012). 査読有り

(12) M. Morita, T. Hamada, Y. Tendo, T. Hata, M. C. Vestergaard, M. Takagi "Selective localization of Alzheimer's amyloid beta in membrane lateral compartments" *Soft Matter*, Vol. 8, 2816-2819 (2012). 査読有り
<http://dx.doi.org/10.1039/C2SM07185A>

(13) 濱田勉 "ジャイアントリポソームを用いた細胞機能解析" *薬剤学*, Vol.72, No.4, pp.211-214 (2012). 査読無し

(14) T. Hamada, Y. Kishimoto, T. Nagasaki, M. Takagi "Lateral phase separation in tense membranes" *Soft Matter*, Vol. 7, 9061-9068 (2011). 査読有り
<http://dx.doi.org/10.1039/C1SM05948C>

〔学会発表〕(計14件)

(1)日本物理学会第69回年次大会(東海大学)"細胞モデル膜小胞の時空間ダイナミクスと機能制御" 濱田勉 2014/3/28

(2)情報計算化学生物学会 2013年大会(タワーホール船堀、東京都)"Synthetic cellular membrane systems" Tsutomu Hamada 2013/10/29

(3)International Symposium on Advanced Materials Science 2013(北陸先端科学技術大学院大学、石川県)"Organization and manipulation of a biomimetic soft

interface" Tsutomu Hamada 2013/10/17

(4) International Workshop "From Soft Matter to Protocell" (東北大学) "Membrane lateral heterogeneity mediates the partitioning of nanocolloids in a size-dependent manner" Tsutomu Hamada 2013/9/20

(5) 第 64 回コロイドおよび界面化学討論会 シンポジウム「バイオ(ミメティック)インターフェースにおける分子膜科学の最前線」(名古屋工業大学) "人工細胞の創出に向けた脂質膜インターフェース設計" 濱田勉 2013/9/18

(6) バイオ・高分子研究会(加賀温泉、石川県) "人工細胞の設計 -細胞の動的機能を人工的に創り出す-" 濱田勉 2013/9/14

(7) 第 86 回日本生化学会大会 シンポジウム「生体膜の動態から見える新たな膜生物学」(パシフィコ横浜) "膜機能システムの人工構築" 濱田勉 2013/9/13

(8) サントリー生命科学財団・生物有機化学研究所シンポジウム「生体膜における生命現象解明の新展開」(サントリー生物有機化学研究所、大阪府) "膜の動態システムを設計する" 濱田勉 2013/7/17

(9) メディショナルナノテク研究会(キャンパスプラザ京都) "人工脂質膜を用いたナノ粒子 - 生体膜相互作用の解析" 濱田勉 2013/6/28

(10) 第 50 回日本生物物理学会年会(名古屋大学) "脂質膜ヘテロ界面はナノ物質をサイズ依存的に識別する" 濱田勉 2012/9/22

(11) Phase Transition Dynamics in Soft Matter (京都大学) "Photo-induced morphological transition of lipid vesicles" Tsutomu Hamada 2012/2/20

(12) 日本物理学会・2011 年秋季大会(富山大学) "相分離膜面におけるナノコロイド挙動" 濱田勉、宮川真紀代、Le Thi Minh Phuc、森田雅宗、高木昌宏 2011/9/22

(13) 第 63 回コロイドおよび界面化学討論会(京都大学) "ヘテロな脂質膜界面におけるナノ粒子挙動" 濱田勉、宮川真紀代、Le Thi Minh Phuc、森田雅宗、高木昌宏 2011/9/8

(14) 第 1 回ソフトマター研究会(キャンパスプラザ京都) "ヘテロな脂質膜界面におけるナノコロイド挙動" 濱田勉、森田雅宗、宮川真紀代、Le Thi Minh Phuc、高木昌宏 2011/8/4

〔図書〕(計 1 件)

(1) M. C. Vestergaard, M. Morita, T. Hamada, M. Takagi "Lipids, Cholesterol, and Oxidized Cholesterol in Alzheimer Amyloid Beta-Mediated Neurotoxicity" Metabolic syndrome and neurological disorders (Wiley), pp.163-178 (2013).

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ
<http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/hamada/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
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・准教授
研究者番号：40432140

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：