

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：82704

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25706015

研究課題名(和文)物質・情報・エネルギー交換機能を付与した細胞サイズプロテオリポソームアレイの構築

研究課題名(英文) Integration of Transport Functions into Arrayed Cell-Sized Proteoliposomes

研究代表者

大崎 寿久 (OSAKI, TOSHIHISA)

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：50533650

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)：従来の人工細胞研究において「膜」はバリア性のみ脂質二重膜小胞(リポソーム)が多く用いられてきた。これに対して本研究では、さまざまな機能を担う膜タンパク質をリポソーム膜に組み込んだ「均一で細胞サイズのプロテオリポソームアレイ」を実現することを目的とした。申請者の先行研究成果(若手B 平成23～24年度)を基盤として、膜タンパク質が再構成された細胞サイズの均一直径プロテオリポソームアレイ形成技術を提案し、また再構成された膜タンパク質の基質結合・輸送機能の活性評価を行った。今後、本成果を展開し、外部刺激に対して連続的に応答するモデル生体膜の作成へと発展させていきたい。

研究成果の概要(英文)：In former works, liposome, formed with a lipid bilayer, has been applied for the membrane of cell models; the membrane passively diffuses membrane-soluble molecules or water but unable to respond to the external stimuli. In this study, we therefore developed an array of functional proteoliposomes with a controlled cellular size. Our previously developed method, the precise micropatterning of lipids on a substrate, was further adjusted for the proteoliposome formation. The functions of membrane proteins were examined on the proteoliposome array obtained. As the next step, we plan to implement stimuli-responsive behavior into the proteoliposome array.

研究分野：脂質膜、材料・表面化学、微細加工技術

キーワード：生体機能模倣 生体分子(膜タンパク質) 脂質 マイクロ・ナノデバイス 合成生物学

### 1. 研究開始当初の背景

脂質分子は、親水・疎水性（両親媒性）を持つ棒状の分子であり、水溶液中では疎水性相互作用によって疎水性部分が自己組織的に集合した膜上の構造をとる。この脂質二重膜は、細胞や細胞内小器官を覆い、形作る構成要素として不可欠である。

ジャイアントリポソームは、脂質二重膜の形状の一つで、直径が数～数百マイクロメートルのカプセル状の小胞である。構成分子と構造・サイズが細胞膜に類似しており、モデル生体膜として生体模倣化学や生体膜物理、合成生物学分野で研究が行われている。

ジャイアントリポソームを形成する従来法として水和法とエレクトロフォーメーション法がある。水和法は、クロロホルムのような揮発性溶媒に溶かした脂質をガラス基板上で乾燥させ、水を加える（水和すること）でリポソームを形成する。エレクトロフォーメーション法は、水和時に低周波交流電圧を加えることでリポソーム形成を促進する方法である。両者とも簡便だが、リポソームの形状やサイズ、膜の単層・多層構造を制御できないといった点が、モデル生体膜の研究において課題となっている。これに対し、近年、遠沈法と呼ばれる手法が提案されている。遠沈法は、脂質を溶かした油中水滴エマルジョン（不揮発性溶媒中に微小水滴を分散）を水溶液の上に静かにのせ、水滴が密度差によって油中から水中に沈殿・移行してリポソームとなる方法である。しかし、油相から水相への移行時に脂質膜内部に溶媒が残存する点が課題として挙げられている。そこで研究代表者は、パターンニング技術にもとづくリポソーム形成法を提案した（研究代表者の若手研究 B 成果）。基板の微細加工とエレクトロスプレー法による脂質塗布を組み合わせ、脂質を正確に微細パターンニングすることに成功した。この乾燥状態の脂質を水和するだけで均一直径のアレイ化されたリポソームを得ることができる。残存溶媒の問題もなく、変動係数 10% 以下のリポソームを配列化できる技術はこれまで例がなく、高い注目・評価を得た。

近年、人工細胞研究におけるモデル生体膜には膜内外を隔てるバリア性（脂質膜）に加え、細胞が本来持っている分裂能や物質・エネルギー・情報などを選択的に交換できる機能（膜タンパク質）が求められるようになってきている。しかし、細胞サイズのリポソームに対する膜タンパク質の再構成手法は確立していないため、こうした機能を備えた研究報告例は少ない。そこで本研究では、膜タンパク質をリポソーム膜に組み込んだプロテオリポソームアレイの形成手法について研究を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では、モデル生体膜として利用される脂質二重膜小胞（リポソーム）に対して、

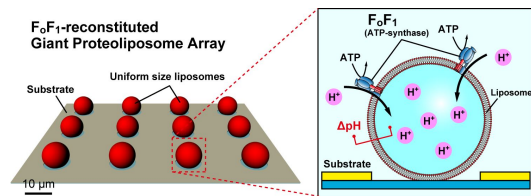


図1 本研究で目的とする均一で細胞サイズのプロテオリポソームアレイ概略図。

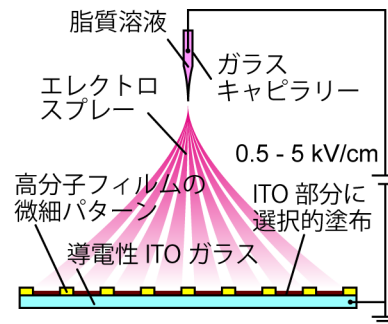


図2 エレクトロスプレー法。基板の絶縁性マスク（高分子フィルム）がない導電性部分にのみ物質を塗布できる。

膜タンパク質が再構成された「均一で細胞サイズのプロテオリポソームアレイ」を実現することを目的とした（図1）。

### 3. 研究の方法

研究代表者の先行研究成果から、脂質と膜タンパク質を基板上に正確にパターンニングできれば、その脂質・膜タンパク質パターンを水和することで形状・サイズの整った細胞大のプロテオリポソームが形成できると推察された。そこで本研究では、まず上記の推察にもとづき膜タンパク質を組み込んだリポソームの形成技術について研究を行った。次に、作成したプロテオリポソームにおいて、膜タンパク質の活性評価を行うことで検討手法に対する評価を行った。

#### (1) 複合材料基板の作製

ITO（酸化インジウムスズ；透明電極）ガラス上に poly(chloro-*p*-xylylene)高分子フィルムを化学気相蒸着（CVD）法によって厚さ 1 μm 積層した。次に一般的フォトリソグラフィプロセスを用いて、高分子フィルムに直径 10 μm のマイクロ孔をアレイ状に形成した。

#### (2) ベシクル水溶液のエレクトロスプレー

プロテオリポソームアレイを作成するため、膜タンパク質が再構成されたプロテオベシクル（直径 100 nm 程度）の分散水溶液のエレクトロスプレーを行った（図2）。ガラスキャピラリーを先端にもつシリンジにベシクル溶液を封入し、このキャピラリーと複合基板との間に直流高電圧を印加することでキャピラリー先端からプロテオベシクルを

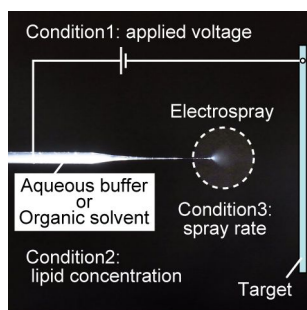


図 3 ベシクル水溶液のエレクトロスプレー条件検討項目。印加電圧と溶液の濃度、スプレー速度の条件がベシクルパターンニングの成否に影響した。

表 1 エレクトロスプレーの最適条件

	Aqueous	Organic (CHCl <sub>3</sub> )	
Voltage	> 1.5	< 1	kV/cm
Lipid conc.	2 - 2.5	0.5	mg/mL
Spray rate	0.1	0.4	μL/min
Total lipid	10 - 20	10	μg/mm <sup>2</sup>

スプレーする。スプレーされたベシクルは基板の導電性部分である ITO が露出した表面にのみ堆積し、高分子フィルムによりマスクされた部分は回避される。膜タンパク質として、ATP 依存的に基質（水素イオン）を輸送する F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> を用いた。F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> は、東京大学野地教授・飯野講師（現自然科学研究機構教授）より提供を受けた。

### (3) プロテオリポソーム形成

プロテオリポソーム形成は、エレクトロスプレーによりパターンニングされたベシクルを、静置水和することによって行った。プロテオリポソーム形成の様子や膜タンパク質の活性評価などは倒立型共焦点顕微鏡により行った。

## 4. 研究成果

### (1) ベシクル水溶液のスプレー条件

先行研究においては、スプレー時の溶媒として有機溶媒（クロロホルム等）を使用していた。クロロホルムは脂質の溶解に適するとともに、エレクトロスプレーにおいて必須となるキャピラリー先端での電解集中が起こりやすい。しかしながら、これら有機溶媒はタンパク質を変性・失活させるため本研究では使用できない。また、膜タンパク質自体は水に不溶であることも問題であった。そこで、膜タンパク質が再構成されたプロテオベシクルを電解質水溶液に分散し、スプレーする手法を検討した（図 3）。電解質水溶液は有機溶媒と異なり電解集中が起こりにくく、霧状のスプレーが得られにくい。スプレー条件として、印加電圧、脂質濃度やスプレー速度な

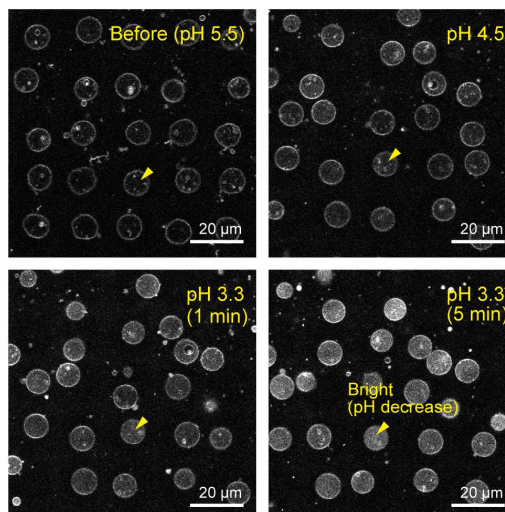


図 4 pH 応答性リポソームの形成。リポソーム外部溶液の pH 低下とともにリポソーム内部の蛍光輝度が上昇している。

どの条件の絞り込みを行った。印加電圧は有機溶媒時に比べ高い 1.5 kV/cm 以上、スプレー速度は逆に遅く、0.1 μL/min 以下である必要があった（表 1）。

### (2) pH 応答性リポソーム

前述の通り、F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> は ATP の存在下で水素イオンを能動輸送する。作成したプロテオリポソームアレイの機能を評価するため、リポソーム内部での pH 低下を評価する実験系の構築を行った。

pH 蛍光指示薬として、多糖類（デキストラン）を骨格構造に持つ pHrodo<sup>TM</sup> (Molecular Probe 社) を用いた。この pH 指示薬をリポソーム形成時の水溶液に加えることで、リポソーム内部に指示薬を担持させた。リポソーム膜上にナノ孔を形成する α-hemolysin 膜タンパク質を再構成することで、外部の pH 低下に伴い水素イオンがリポソーム内部へ拡散し、pH 指示薬によって蛍光輝度が上昇することを確認できた（図 4）。ここで、pH 指示薬は高分子量であるためリポソーム外部へは漏出しにくい。

### (3) F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> 再構成リポソームの形成と評価

エレクトロスプレーによって複合基板上にパターンニングされた F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> プロテオベシクルは、水和によって均一直径のリポソームを形成することが分かった。ただし、水溶液を用いたエレクトロスプレーはパターンニング精度が低く、径の均一性や再現性については有機溶媒を使用した場合に比べ改善の余地があることが分かった。

次に、膜上に F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> が存在することを確認するため、F<sub>1</sub> の β サブユニットに組み込んだ biotin 標識を蛍光 streptavidin によって同定した。図 5 に示すようにリポソーム膜表面のみでこの標識化が起こっていることから、リ

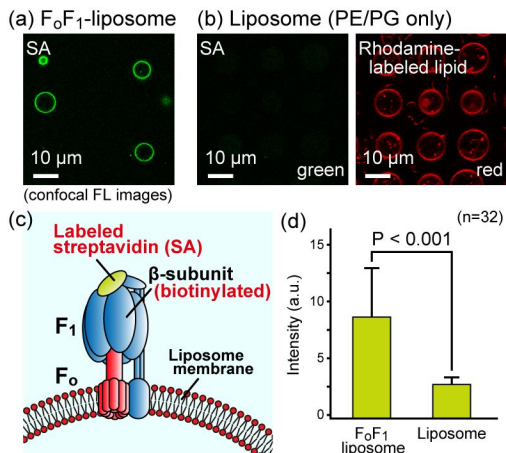


図5 リポソーム膜上に  $F_0F_1$  が局在していることを蛍光標識により確認した。(a, b)  $F_0F_1$  ベシクルをスプレーした場合にのみ、蛍光 streptavidin により膜が標識出来ている。(c) 標識の模式図。(d)  $F_0F_1$  ベシクルと  $F_0F_1$  を含まないリポソームの蛍光輝度の差。

ポソーム表面に  $F_0F_1$  が存在していると考えられた。

更に、リポソーム膜上の  $F_0F_1$  の機能(活性)を確認するため、プロテオリポソーム外部に ATP を添加し、リポソーム内部の pH 蛍光指示薬の反応を観察した。その結果、 $F_0F_1$  プロテオリポソームに対して ATP を加えた場合にのみ蛍光強度の明確な上昇が得られることが分かった(図6)。このことから、本研究における提案手法によって、均一・細胞サイズで、膜タンパク質の機能を一定程度保持したプロテオリポソームを形成できることが明らかとなった。

本法を応用することで、これまで難しかった細胞サイズのプロテオリポソームアレイの形成と経時的な機能評価ができるようになると期待される。今後、本成果を展開し、外部刺激に対して応答するモデル生体膜の構築へと発展させていきたい。

## 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3件)

Yuta Abe, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Hirotaka Sasaki, Ryuji Kawano, Norihisa Miki, Shoji Takeuchi, Nonlinear concentration gradients regulated by the width of channels for observation of half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of transporter proteins, *Analyst*, 2015, 140, 5557-5562. (査読有)

DOI: 10.1039/c4an02201g

神谷厚輝、大崎寿久、竹内昌治、液滴接触法による人工細胞膜上でのチャネルタンパク質機能の解析と応用、分析化学、

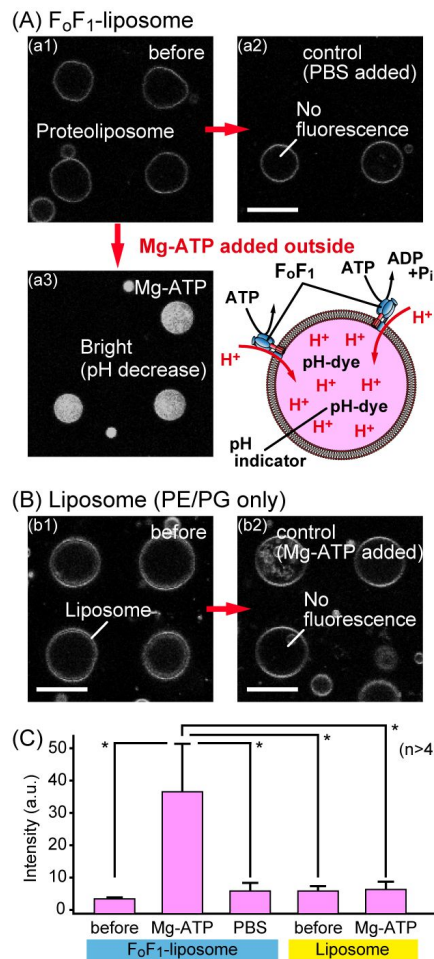


図6 ATP 依存的に  $F_0F_1$  再構成リポソームが水素イオンを輸送していることが確認できた。(A)  $F_0F_1$  再構成リポソームに対して、PBS を加えた場合(a2)と、ATP を加えた場合(a3)。(B)  $F_0F_1$  を含まないリポソームに対して ATP を加えた場合。(C) 蛍光輝度の比較。図中のスケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

2015, 64, 441-449. (査読有)

DOI: 10.2116/bunsekikagaku.64.441

神谷厚輝、大崎寿久、竹内昌治、人工細胞膜作製とシングルイオンチャネル計測、*Electrochemistry*, 2015, 83, 1096-1100. (査読有)

DOI: 10.5796/electrochemistry.83.1096

[学会発表](計11件)

Toshihisa Osaki, Microfluidics for biosensing and healthcare applications, ISPlasma2016/IC-PLANTS2016, 2016年3月8日 名古屋大学(愛知・名古屋) (招待講演)

Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Satoshi Fujii, Shoji Takeuchi, MicroRNA Diagnosis Using Complementary DNA That Brakes Transit Events Through A Biological Nanopore, The 29th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 2016年1月26日 上海(中国)

Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Shoji Takeuchi, Non-Spherical Liposomes Formed By Molecular Structure And Deposition Micropattern, The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2015年10月28日 慶州(韓国)

大崎寿久、生体膜デバイスの創薬・センサ応用、第14回国際バイオテクノロジー展、2015年5月13日 東京ビッグサイト(東京・江東区)

Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Kosuke Shibasaki, Shoji Takeuchi, Artificial Cell Membrane Devices for Pharmaceutical Applications, 8th International Symposium on Nanomedicine, 2014年12月5日 愛媛大学(愛媛・松山)(招待講演)

Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Shoji Takeuchi, pH and Temperature Sensors Mounted into Giant Lipid Vesicles for an Environmentally Responsive Platform, The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2014年10月29日 サンアントニオ(米国)

Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Ryuji Kawano, Shoji Takeuchi, Batch Release of Monodisperse Liposomes Triggered by Pulsed Voltage Stimulation, The 27th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 2014年1月28日 サンフランシスコ(米国)

Hiroshige Hamano, Taishi Tonooka, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, Highly Packed Liposome Assemblies Toward Synthetic Tissue, The 27th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 2014年1月27日 サンフランシスコ(米国)

Toshihisa Osaki, Artificial Cellular Membrane Platforms for Membrane Protein Assays, Invited Lecture in IPF Dresden, 2013年11月1日 ドレスデン(ドイツ)(招待講演)

Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Ryuji Kawano, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, Shoji Takeuchi, Uniform-sized Proteoliposome Formation By Using Electrospray For Microscopic Membrane Protein Assays, The 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2013年10月30日 フライブルグ(ドイツ)

大崎寿久、膜輸送機能解析のためのリポソームアレイ化技術、第3回分子モーター討論会、2013年7月19日 東京大学(東京・文京区)

〔図書〕(計2件)

Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Shoji Takeuchi, Synthetic Biology Volume 1, The Royal Society of Chemistry, 2014, 275-291.

外岡大志、大崎寿久、竹内昌治、生体の科学、医学書院、2014、500-501.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：リポソームの剥離方法

発明者：大崎寿久、竹内昌治、川野竜司、神谷厚輝

出願人：公益財団法人神奈川科学技術アカデミー

種類：特許

番号：特願 2013-240444

出願年月日：2013年11月20日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.newkast.or.jp/innovation/lab\\_o/takeuchi\\_project.html](http://www.newkast.or.jp/innovation/lab_o/takeuchi_project.html)

[https://www.researchgate.net/profile/Toshihisa\\_Osaki](https://www.researchgate.net/profile/Toshihisa_Osaki)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大崎 寿久 (OSAKI, Toshihisa)

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：50533650