

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：13302

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26289311

研究課題名(和文)細胞模倣膜2次元・3次元ダイナミクスの解析、設計と制御

研究課題名(英文)Analysis, design and control of 2D and 3D dynamics of cell mimetic membrane

研究代表者

高木 昌宏 (Takagi, Masahiro)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：00183434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の信号伝達に関して、膜受容体やチャネルのみならず、膜のダイナミックな構造変化が重要であると指摘されている。我々は、膜ダイナミクスを、2次元ダイナミクス(相分離状態の変化)と3次元ダイナミクス(小胞形成を含む形態変化)に分類して研究を行っている。ここでは、DNAと膜の相互作用、そしてアミロイドと膜の相互作用について述べる。DNAはほどけたcoil状態と凝縮したglobule状態では、相分離構造との相互作用部位が異なる事を明らかにした。アミロイドについては、酸化コレステロールの1種である、7-ケトコレステロールが、膜結合性に関わっている事をモデル膜で明らかにし、生細胞でもその結果を確認した。

研究成果の概要(英文)：With respect to cell signaling, it is pointed out that not only membrane receptors and channels but also dynamic structural changes of membranes are important. We are conducting research by classifying membrane dynamics into two-dimensional dynamics (phase separation) and three dimensional dynamics (morphological change including vesicle formation). Here we describe the interaction between DNA and membrane and the interaction between amyloid and membrane. About DNA, there is clear difference between coil state and globule state in the sites of interaction with the phase separated structure of the membrane. Regarding amyloid, the model membrane revealed that 7-ketocholesterol, a type of oxidized cholesterol, is involved in membrane binding, and the results were also confirmed in living cells.

研究分野：生物機能工学

キーワード：リポソーム ダイナミクス ラフト アミロイド DNA 生理活性物質 生物模倣

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜に関しては、構成分子が自由に拡散している“流動モザイクモデル”が考えられてきたが、近年、飽和脂質やコレステロールを豊富に含む相分離構造である“ラフト”の存在が示唆されている(Nature 387, 569-572 (1997)) (下図 1)。

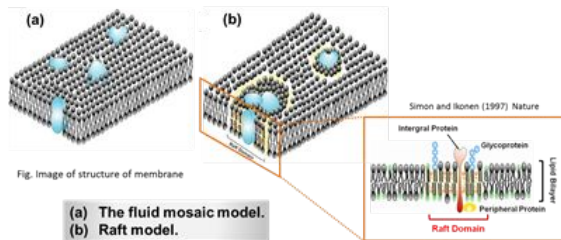


図 1 : ラフトモデル

ラフトの形成には、脂質間の疎水的相互作用が関係し、そこに膜受容体が含まれており、ラフトの動的挙動が信号伝達を調節すると考えられ、細胞生物学者を中心に活発な研究が展開されている(Mol. Biol. Cell 18, 2765-2768 (2013))。ラフト構造は、リン脂質を用いた人工系(細胞サイズリポソーム)でも再現でき、自己組織化的秩序構造として、ソフトマター物理学の分野でも注目されている(Nature 425, 821-824 (2003))。

我々は、膜のダイナミックな構造変化を、2次元ダイナミクス(相分離状態の変化)と3次元ダイナミクス(小胞形成を含む形態変化)に分類して研究を行っている(図 2, 3)。

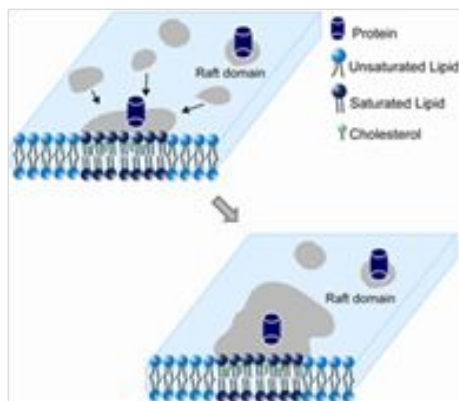


図 2 : 2次元ダイナミクス(相分離)

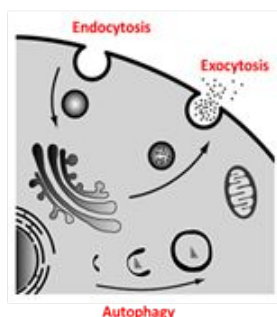


図 3 : 3次元ダイナミクス(形態変化)

その結果、現在までにラフト形成の光制御 (Soft Matter 7, 220-224 (2011))、相分離構造の多様性 (J. Am. Chem. Soc., 134, 13990-13996 (2012))、アルツハイマー病アミロイドの膜局在 (Soft Matter, 8, 2816-2819 (2012))、リポソーム形態の可逆的制御 (J. Am. Chem. Soc., 132, 10528-10532 (2010))、自己組織化イオン透過ナノポアの化学合成 (J. Am. Chem. Soc., 134, 19788-19794 (2012))等の成果を学術雑誌に発表してきた。

## 2. 研究の目的

上述の研究背景に基づいて、様々な研究を実施したが、ここでは、以下の2点の目標について、研究を行った成果を報告する。

### (1) DNAの膜相互作用について

DNAはほどけた coil 状態と凝縮した globule 状態の二種類の高次構造を取り、この可逆的な構造変化により遺伝子活性が制御される。しかし、DNAと膜との相互作用に関する研究はあまり進んでいない。そこで、ドメイン構造を再現したマイクロサイズの油中液滴(細胞モデル小胞)にDNAを封入し、蛍光顕微鏡観察によるDNA分子挙動の微小空間特性の評価を行った。

### (2) アミロイドの膜相互作用について

アルツハイマー病の原因となるアミロイドについて、膜結合性に対するコレステロールの影響、特にアミロイドの重合状態、コレステロール酸化状態と膜との相互作用や細胞信号情報伝達の関連性について、実験、考察を行う。人工細胞膜の研究と、実際の生細胞を用いた研究を並行して行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 液滴の調製方法

膜組成として飽和脂質 Dipalmitoyl-phosphocholine (DOPC) と不飽和脂質 Dioleoyl-phosphocholine (DPPC)、コレステロールの三種類を用いた。ドメインを持つ不均一な油中液滴とドメインを持たない均一な油中液滴の二種類を作製した。

DNAを凝縮させる Spermidine (SPD) と DNAの構造をほどく  $MgCl_2$  を用いて coil 状態と globule 状態の T4 フェージ DNA を用意した。各 DNA 水溶液を液滴内部に封入し、蛍光顕微鏡観察を行った。

### (2) アミロイド調製方法

$A\beta$  は蛍光標識と未標識の2種類を使用した。 $A\beta$  をアンモニア水に溶かした後、Tris buffer (pH 7.4) を加え、37 °C で  $A\beta$ -40 は 0, 24, 120 時間、 $A\beta$ -42 は 0, 12, 48 時間インキュベーションし、線維形成を行なった。各インキュベーション時間の  $A\beta$ -40、 $A\beta$ -42 を Oligomer、Pre-fibril、Fibril とした。脂質

膜は DOPC/Chol/7-keto = 100/0/0, 50/50/0, 50/40/10 で混合し作成した。

Aβ(以下の方法は、Aβ-40, 42 共通)の膜局在はレーザー共焦点顕微鏡で、膜挙動は位相差顕微鏡で観察した。Aβの重合状態は、原子間力顕微鏡(AFM)で確認した。インキュベーションした Aβを超純水で希釈し、マイカ上に添加し、真空ポンプ内で乾燥させた。その後、マイカの表面を超純水で洗浄および乾燥を2回繰り返した。このサンプルを AFM にセットし、Aβの形状を観察した。測定には 20 μm の xy-走査と 10 μm の z-走査範囲で調整された PZT-スキャナを備えた AFM ユニットを使用した。

### (3) リポソーム調製方法

脂質ストック溶液をガラス試験管内に DOPC:Chol:7-keto=50:50:0( DOPC/Chol 膜), 50:40:10( DOPC/Chol/7-keto 膜)で混合し、そこにクロロホルム:メタノールを 2:1 で混合した溶媒を添加し、窒素ガスを噴きつけて脂質フィルムを作成した。脂質フィルムを3時間以上真空ポンプ内に置き、有機溶媒を完全に飛ばした。その後、脂質フィルムに Milli Q 水を添加し、37 °C で2時間以上、静置水和しリポソームサンプルを作成した(脂質終濃度 200 μM)。

### (4) 細胞培養 (Jurkat T 細胞)

ヒト白血病性 T 細胞株 Jurkat は、10 %FBS を含む RPMI 1640 培地で 37 °C、5 %CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。ラフトの標識には、コレラ毒素サブユニット B の Alexa Fluor 488 を、細胞内 Ca<sup>2+</sup>には Fluo-3AM を、微小管の可視化には Oregon green 488 taxol を用い、共焦点レーザー走査型顕微鏡にて観察した。

## 4. 研究成果

### (1) DNA の膜相互作用について

脂質膜組成ではなく、脂質膜の流動性に依存した DNA の局在が観察された。

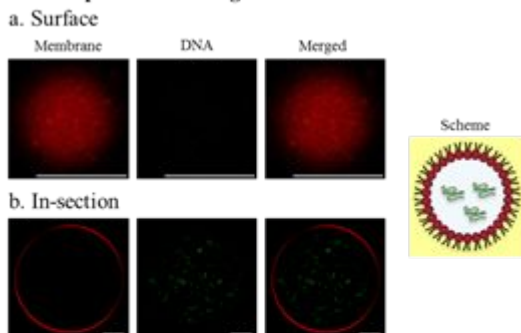
Mg<sup>2+</sup>のみを含んだ水溶液条件では、DNA は coil 状態であった。液滴内部に封入すると、均一膜からなる液滴内部では溶液中を拡散し、不均一膜からなる液滴内部では秩序相(ドメイン)の膜面に吸着した。

Mg<sup>2+</sup>は DNA を coil 状態へ解き、秩序相へ吸着させることが分かった(図4)。

SPD のみを含んだ水溶液の時には DNA は globule 状態となった。液滴内部に封入すると、無秩序相に吸着した。

水溶液組成が同一であっても DNA の構造により異なる局在を示したことから、脂質膜の流動性(エントロピー)に加えて DNA のコンフォメーションエントロピーが DNA の分子挙動に重要な働きを担っている事が明らかとなった。

### A. In a droplet with homogeneous membranes



### B. In a droplet with heterogeneous membranes

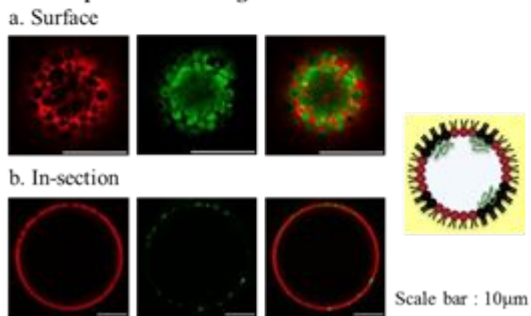


図4: DNA の油滴中での局在 単一相(A) or 二相(B) 膜の蛍光観察。10 mM MgCl<sub>2</sub> 存在下での共焦点レーザー顕微鏡像。

### (2) アミロイド の膜相互作用について

DOPC/Chol 膜において、Aβ は脂質膜に吸着した。Aβ の蛍光強度から脂質膜に対する Aβ の吸着度合を解析した。DOPC/Chol 膜は、DOPC 膜より Aβ の蛍光強度が低くなった。

また膜挙動では、DOPC/Chol 膜は DOPC 膜より形態変化を起こした割合が減少した。これは、Chol は Aβ の膜への吸着を妨げ、膜の形態変化を起こしにくくする防護的役割を示している。また、DOPC/Chol/7-keto 膜は DOPC および DOPC/Chol 膜よりも Aβ の蛍光強度が高かった。これは、7-keto が Aβ の膜への吸着を促進していることを示している(図5)。

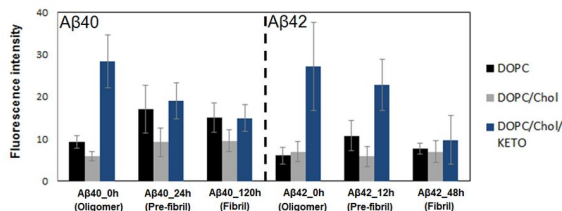


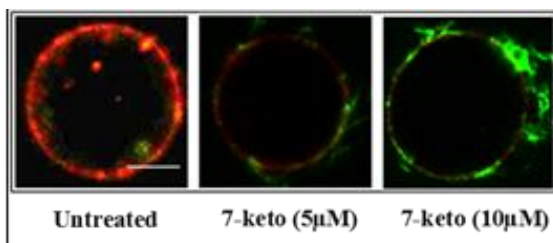
図5: コレステロール、7-ケトコレステロール含有リポソームと、Aβ の相互作用(蛍光強度)。

さらに DOPC/Chol/7-keto 膜の挙動を観察したところ、形態変化を起こす割合は DOPC/Chol 膜と同程度であったが、その経路は DOPC 膜と類似した。

以上、Aβ の膜局在・膜挙動解析から、(1)Chol は Aβ を吸着させるが、膜の形態変化を起こしにくくする防護的役割をし、(2)7-keto は Aβ の吸着量を促進し、膜毒性と

関連した形態変化を起こしやすくすることが明らかになった。

実際に培養細胞(Jurkat T cell)を用いた実験を行った場合にも、リポソーム実験と同様の、7-keto による、細胞表層への A $\beta$ 結合の促進が認められた(図 6)。



**図 6 : 7-ケトコレステロール( 5 または、10  $\mu$ M ) で処理した Jurkat T-cell 膜と、アミロイド(A $\beta$ -42)との相互作用観察。ラフト領域は、赤、A $\beta$ -42 は、緑の蛍光。スケールは、5  $\mu$ m.**

以上の結果より、液滴や細胞サイズリポソームを用いた実験と、細胞レベルでの実験を並行して行う事により、さまざまな有意義な知見を得ることができる事を明らかにすることができた。

これらの知見をさらに発展させるために、自己組織化的な細胞模倣ミクロ空間である「細胞サイズリポソーム」について、2次元(相分離構造) 3次元(形態変化)ダイナミクスのみか、さらに深く探究する。つまり、生物、物理、数学、化学の融合領域として解明し、生理応答解析、人為制御、薬物リード化合物の探索等、工学研究に発展させたい。

具体的な現在進行中の研究内容は、以下の3項目から構成されている。

膜の秩序ダイナミクスと分子間力相互作用の関係についての学理を構築する。

全ての学問領域(生物、物理、化学、数学)の融合研究として、膜ダイナミクス研究を実施する。生物工学と、ソフトマター物理、有機合成化学、数値シミュレーションを融合する。

生理活性物質の作用機序を膜内での分子間相互作用で理解する。

免疫、生体防御、血圧調節、痛み、発熱、細胞増殖など、脂質メディエーターを中心に作用機序を分子間相互作用から解明し、新たな薬効成分等、機能分子のデザインへとつなげる。

規則構造を自己組織的に構築するマテリアル工学への貢献

自己組織化規則構造の構築を膜分子素子として活かす。ブロック共重合体の自己組織化を利用した Directed Self-Assembly (DSA) 法を応用した、分子素子開発(特に Linactant) に貢献

する。肥満がリスクファクターの生活習慣病の予防、治療に役立つ化合物はもちろん、半導体等の電子材料、光学材料、刺激応答性材料分野での、スマートマテリアルの創製に貢献する。

研究成果を通して、膜研究を多くの学問分野(生物、物理、化学、数学など)の境界領域として、成立させたいと考えている。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 12 件)

(1) N. Shimokawa, R. Mukai, M. Nagata, and M. Takagi. Formation of modulated phase and domain rigidification in fatty acids-containing lipid membranes. Phys. Chem. Chem. Phys., 19, 13252-13263 (2017). DOI:10.1039/C7CP01201B (査読有)

(2) N. Sharma, K. Baek, H. T. T. Phan, N. Shimokawa, and M. Takagi. Glycosyl chains and 25-hydroxycholesterol contribute to the intracellular transport of amyloid beta (A $\beta$ -42) in Jurkat T cells" FEBS Open Bio, Open access (2017). DOI:10.1002/2211-5463.12234 (査読有)

(3) 下川直史, 高木昌宏 分子間の弱い相互作用と生体秩序・生体模倣膜の相分離構造. 「化学」, 72(2), 68-69 (2017). (査読なし)

(4) 下川直史, 高木昌宏 生物、物理、数学の境界領域としての膜研究 生物工学会誌, 94, 746-749 (2016). (査読なし)

(5) 下川直史, 高木昌宏 2次元・3次元 膜ダイナミクスと細胞信号伝達. 膜(MEMBRANE), 41, 233-239 (2016). (査読なし)

(6) N. Shimokawa, H. Himeno, T. Hamada, M. Takagi, S. Komura, and D. Andelman Phase diagrams and ordering in charged membranes: Binary mixtures of charged and neutral lipids. J. Phys. Chem. B, 120, 6358-6367 (2016). (査読有)

(7) H. Himeno, H. Ito, Y. Higuchi, T. Hamada, N. Shimokawa, and M. Takagi. Coupling between pore formation and phase separation in charged lipid membranes. Phys. Rev. E, 92, 062713 1-12 (2015) (査読有)

(8) K. Sugahara, N. Shimokawa, and M.

Takagi. Destabilization of phase-separated structures in local anesthetic-containing model biomembranes. *Chem. Lett.*, 44, 1604-1606 (2015) Open access.  
DOI:http://dx.doi.org/10.1246/cl.150636  
( 査読有 )

(9) N. Shimokawa, M. Nagata, and M. Takagi. Physical properties of the hybrid lipid POPC on micrometer-sized domains in mixed lipid membranes. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17, 20882-20888 (2015).  
( 査読有 )

(10) T.Hamada, R. Fujimoto, S.F. Shimobayashi, M. Ichikawa, and M. Takagi. Molecular behavior of DNA in a cell-sized compartment coated by lipids. *Phys. Rev. E*, 91, 062717(2015). ( 査読有 )

(11) H. T. T. Phan, M. C. Vestergaard, K. Baek, N. Shimokawa, and M. Takagi. Localization of amyloid beta (A $\beta$ 1-42) protofibrils in membrane lateral compartments: effect of cholesterol and 7-ketocholesterol. *FEBS Lett.* 588, 3483-3490 (2014). ( 査読有 )

(12) H. Himeno, N. Shimokawa, S. Komura, D. Andelman, T. Hamada, and M. Takagi. Charge-induced phase separation in lipid membranes. *Soft Matter* 10, 7959-7967 (2014). ( 査読有 )

#### 【学会発表】(計 110 件) 一部抜粋

(1) 古田 一夢、下川 直史、高木 昌宏  
負電荷脂質膜における多価カチオンによる相分離ドメインの安定化  
日本物理学会第 72 回年次大会(2017)  
3月20日(月)大阪大学 豊中キャンパス(大阪府豊中市)

(2) 山本 遼太、下川 直史、高木 昌宏  
浸透圧による膜張力が促進する荷電脂質膜の相分離：日本物理学会第 72 回年次大会(2017) 3月20日(月)大阪大学 豊中キャンパス(大阪府豊中市)

(3) 下川 直史、向井 梨恵子、長田 真理子、高木 昌宏：飽和脂肪酸添加による脂質膜ドメインの硬化：日本物理学会第 72 回年次大会(2017) 3月20日(月)  
大阪大学 豊中キャンパス(大阪府豊中市)

(4) 大井 克仁、下川 直史、高木 昌宏：  
生体模倣膜での飽和脂肪酸によるドメインの硬化：日本化学会第 97 春季年会(2017)

3月16日(木)：慶應義塾大学 日吉キャンパス(神奈川県横浜市)

(5) 菅原 恒、下川 直史、高木 昌宏  
Thermal behavior change of raft-mimetic structure by addition of local anesthetics.  
日本化学会第 97 春季年会(2017)：3月17日(金)：慶應義塾大学 日吉キャンパス(神奈川県横浜市)

(6) 【Plenary Lecture】 M. Takagi.  
Membrane: order and dynamics  
The 22nd Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community(YABEC)  
Nov. 28, 2016 シーガイヤリゾート(宮崎県宮崎市)

(7) 藪内 里実、大久保 由布、白 京玉、星野 邦秀、辻野 義雄、下川 直史、高木 昌宏：  
免疫系 T 細胞の成熟化シグナルと温感：第 68 回日本生物工学会大会：2016 年 9 月 28 日：ANA クラウンプラザホテル富山(富山県富山市)

(8) Neha Sharma, KeangOK Baek, Huong T.T.Phan, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi：Endocytic transport of protofibrillar amyloid beta (A $\beta$ -42) in the presence of oxidized derivatives of cholesterol.：第 68 回日本生物工学会大会  
2016 年 9 月 28 日：ANA クラウンプラザホテル富山(富山県富山市)

(9) 大井 克仁、下川 直史、高木 昌宏：  
リン脂質組成非対称リポソームにおける膜内外層間相互作用と相分離挙動：第 68 回日本生物工学会大会：2016 年 9 月 30 日：ANA クラウンプラザホテル富山(富山県富山市)

(10) 古田 一夢、下川 直史、高木 昌宏  
負電荷脂質を含む生体模倣膜での多価カチオン添加による相分離構造形成：第 68 回日本生物工学会大会：2016 年 9 月 30 日：ANA クラウンプラザホテル富山(富山県富山市)

(11) 山本 遼太、下川 直史、高木 昌宏  
発表標題：浸透圧印加による荷電脂質膜の張力誘起相分離：第 68 回日本生物工学会大会：2016 年 9 月 30 日：ANA クラウンプラザホテル富山(富山県富山市)

(12) 菅原 恒、下川 直史、高木 昌宏  
発表標題：局所麻酔薬による膜ラフト模倣構造熱安定性の低下：第 68 回日本生物工学会大会：2016 年 9 月 30 日：発表場所：ANA クラウンプラザホテル富山(富山県富山市)

(13) Pooja Gusain, Kunihide Hoshino, Yoshio Tsujino, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi.：

Effect of d- and l-menthol on stability of membrane heterogeneity.: 第 68 回日本生物工学会大会  
: 2016 年 9 月 30 日 : ANA クラウンプラザホテル富山 (富山県富山市)

(14) Neha Sharma, KeangOK Baek, Huong T.T.Phan, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi. :  
Interaction and internalization of amyloid beta (A $\beta$ -42) with Jurkat cells in presence of oxysterols: 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム: 2016 年 9 月 7 日: 石川県立音楽堂もてなしドーム地下イベント広場 (石川県金沢市)

(15) 古田 一夢、下川 直史、高木 昌宏:  
負電荷脂質膜への多価カチオン添加による相分離構造の形成: 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム: 2016 年 9 月 7 日: 石川県立音楽堂もてなしドーム地下イベント広場 (石川県金沢市)

(16) 山本遼太、下川 直史、高木 昌宏:  
浸透圧印可による荷電脂質膜の張力効果: 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム: 2016 年 9 月 7 日: 石川県立音楽堂もてなしドーム地下イベント広場 (石川県金沢市)

(17) 菅原 恒、下川 直史、高木 昌宏:  
局所麻酔薬による膜ラフト模倣構造熱安定性の低下: 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム: 2016 年 9 月 7 日: 石川県立音楽堂もてなしドーム地下イベント広場 (石川県金沢市)

(18) 大井 克仁、下川 直史、高木 昌宏:  
リン脂質組成非対称膜における二重膜内外層間の相互作用: 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム: 2016 年 9 月 8 日: 石川県立音楽堂もてなしドーム地下イベント広場 (石川県金沢市)

(19) Pooja Gusain, Kunihide Hoshino, Yoshio Tsujino, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi :  
Chirality dependent interaction and stabilization of d- and l-menthol in lipid rafts model. : 57th International conference on the Bioscience of lipids. : 2016 年 9 月 8 日 : Le Majestic congress center. (Mont Blanc, France)

(20) Neha Sharma, KeangOK Baek, Huong T. T. Phan, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi. :  
Enhancement of membrane interaction and endocytic transport of amyloid beta by oxidized derivatives of cholesterol. :

Alzheimer ' s Association International Conference (AAIC 2016) : 2016 年 7 月 24 日 : Metro Toronto Convention Center (Toronto, Canada)

(21) 【招待講演】 高木昌宏, 下川直史  
「膜ダイナミクスと細胞信号伝達」第 68 回日本細胞生物学会大会 シンポジウム 平成 28 年 6 月 15 日 (水) 京都テルサ (京都府京都市)

(22) 【招待講演】 高木昌宏:  
膜 2 次元, 3 次元ダイナミクスと細胞信号伝達: 日本膜学会第 38 年会 境界領域シンポジウム 平成 28 年 5 月 11 日 (水) 早稲田大学 (東京都新宿区)

### 【図書】(計 1 件)

(1) 下川直史, 高木昌宏  
第 2 章/第 7 節 膜弱秩序構造のダイナミクス 人工細胞の創製とその応用 (シーエムシー出版), p. 117-126 (2017).

### 【その他】 ホームページ等

<http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/takagi/works/index.html>

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者  
高木 昌宏 (TAKAGI, Masahiro)  
北陸先端科学技術大学院大学  
先端科学技術研究科・教授  
研究者番号 : 00183434

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
下川 直史 (SHIMOKAWA, Naofumi)  
北陸先端科学技術大学院大学  
先端科学技術研究科・助教  
研究者番号 : 20700181

(4) 研究協力者  
濱田 勉 (HAMADA, Tsutomu)  
北陸先端科学技術大学院大学  
先端科学技術研究科・准教授  
研究者番号 : 40432140