

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620141

研究課題名(和文)細胞膜の内外層を選択的にイメージングする手法の開発

研究課題名(英文)Development of a method for selectively imaging the inner and outer layers of the cell membrane

研究代表者

城田 幸一郎 (Shirota, Koichiro)

国立研究開発法人理化学研究所・小林脂質生物学研究室・先任研究員

研究者番号：00291071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜の脂質分子は、内外層で異なっており、特定の脂質分子が集合してドメインを形成している。このようなドメインの中でも、比較的「かたい」脂質であるスフィンゴ脂質とコレステロールが形成する脂質ラフトと呼ばれるドメインが特に注目されている。代表的な「ラフト脂質」であるスフィンゴミエリン(SM)には、分子内に水素結合のドナーとアクセプターが共に存在するので、分子間で水素結合を形成することができる。ラマン分光は、水素結合のような分子間相互作用を検出することができるので、SM分子の分布状態をラマン分光により解析した。

研究成果の概要(英文)：Lipid molecules of cell membranes are different in the inner and outer layers, and form domains in which the specific lipid molecules aggregate. In particular, the domains on the plasma membrane made of sphingolipid and cholesterol, which are termed lipid rafts, are drawing attention. Sphingomyelin (SM), which is typical "raft lipids", has both donor and acceptor of hydrogen bonds in the molecule, and can form hydrogen bonds between the molecules. Since Raman spectroscopy is a powerful analysis method for detecting intermolecular interactions such as hydrogen bonding, we applied it to determine the membrane distribution of SM molecules.

研究分野：有機材料光物性、液晶、ナノフォトニクス

キーワード：脂質 リポソーム ラマン分光

1. 研究開始当初の背景

生体膜は、主としてタンパク質、脂質から構成されており、膜上で脂質が非対称に配列していることはよく知られているが、詳細に調べられている例は非常に限られている。その理由は、脂質の分子量は小さいので、可視化するためには構造を大きく変える必要がある上、遺伝子の直接的な産物でないため改変が困難であり、特定の脂質を認識するプローブが限られているので生化学的手法で見るのが難しいためである。そこで、光トラップした金属ナノ粒子をプローブとして、膜の見たい場所にプローブを移動し、そこでの表面増強ラマン散乱 (SERS) を測定すれば直接的に膜情報を得られるのではないかという物理的着想に至った。

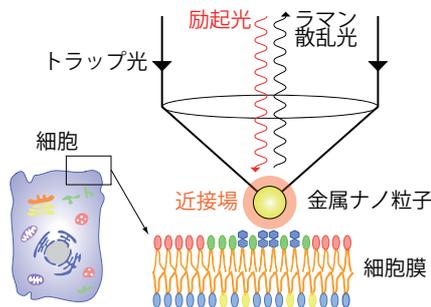


図1 非対称な細胞膜を見る概念図

2. 研究の目的

生体膜を形成している脂質は数千種類に及び、これらの脂質は膜上でランダムに分布しているのではなく、特定の脂質が作るナノドメインが細胞の機能に重要な役割を果たしていると考えられている。特定の脂質に結合するタンパク質を用いて、透過型電子顕微鏡で脂質分布を直接見ると、ナノメートルレベルで脂質の分布に不均一性があることが分かるが、コレステロール感受性の本質に迫るのは難しい。一方、細胞膜の外層と内層の脂質分布が異なっていることは、赤血球を用いた生化学的手法によって良く調べられている。しかし、生化学的手法により脂質の非対称性を調べることでできる膜の種類は限られている。結局、生体膜ナノドメインの機能を理解するためには、ナノメートルスケールで、生体膜内外層での脂質分布の時間変化を知る必要がある。生体膜ナノドメインに関する我々の現在の理解を深耕するためには、「脂質を見る」ための道具の開発が求められており、本課題の当初の目的は、これを実現する顕微鏡を開発することであった。

申請時に保有していた顕微鏡ラマン光学系に、近赤外レーザー (1064 nm) 光を同軸で入射できるようにし、光ピンセットシステムを構築する。これにより、近赤外光でトラップした金属ナノ粒子による SERS が測定できるようにする。手始めにペシクル、リポソームをサンプルとして測定を始め、最終的には

培養細胞の細胞膜の測定をする予定であった。ナノメートルスケールで、生体膜内外層の脂質分布の時間変化を観測し、特定の脂質が作るナノドメインの細胞機能を理解するのが最終目標とした。

3. 研究の方法

(1) 光ピンセット光学系の追加

現在使用しているラマン顕微鏡に光ピンセット用の光学系を追加して、最終的には図2に示したシステムにする。既にラマン顕微鏡としては稼働しており、培養細胞のラマン測定が可能になっている。その顕微鏡の右サイドポートから波長 1064 nm の YVO₄ レーザー光を導入して、高開口数の対物レンズで集光することで、勾配力 (gradient force) により金属ナノ粒子を光トラップできるようにする。

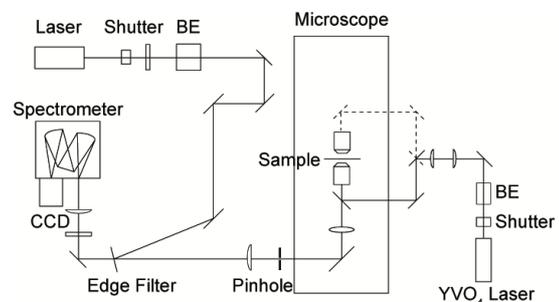


図2 実験光学系

(2) 金属ナノ粒子の準備

局在表面プラズモンの共鳴波長は金属の種類で異なり、粒径にも依存するので、実験条件に最適な選択を行う。粒径 10 nm を超える金ナノ粒子を作製するには、塩化金酸をクエン酸 3 ナトリウム 2 水和物を還元剤として用いる Frens 法によって作製する。それより小さい金ナノ粒子は、Burst 法で作製する。粒径は、動的ラマンによる粒径測定装置 (ZetasizerNanoS) および透過型電顕 (JEM-2100F) を用いて確認する。

(3) リポソームのラマン測定

表面増強ラマンの準備中に通常のラマン分光で、非対称でない通常のリポソームを手始めに観察する。静置水和法により、試験管内に作製した脂質フィルムに水を加え静置して作製したリポソームを濃縮したものを測定試料とした。ガラスボトムディッシュに入れた試料をラマン顕微鏡のステージに置き測定する。励起光源には、波長 532nm の Sapphire 532-SF-150 (Coherent) を使用する。

(4) スフィンゴミエリンリポソームのラマン測定

代表的な「ラフト脂質」であるスフィンゴミエリン (SM) には、分子内に水素結合のドナーとアクセプターが共に存在するので、

分子間で水素結合を形成することができる。また、SM とホスファチジルコリンの混合膜では、ホスファチジルコリンの脂肪酸組成によって SM の膜分布が異なることが知られている。ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC) のような相転移温度の低い「やわらかい」脂質中では、SM はドメインを形成し、一方、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) のような相転移温度の比較的高い「かたい」脂質とは良く混ざり合う。ラマン分光は、水素結合のような分子間相互作用を検出することができるので、SM 分子の分布状態をラマン分光により解析することを試みる。

次の研究成果で報告するが、通常のラマン分光により SM 分子の分布状態の情報が得られることが判明したために、当初の計画を変更し、通常のラマン分光により SM リポソームの分布状態を研究する方針にした。

4. 研究成果

(1) 光ピンセット光学系の追加

自作のラマン顕微鏡の光学系に、図 2 のように光ピンセットの光学系を追加した。このセットアップを用いて、粒径 $1\ \mu\text{m}$ のシリコンビーズをトラップした様子を図 3 に示す。赤丸の中心付近が対物レンズの集光位置であり、この程度の粒子密度がある試料をしばらく放置していると沢山の粒子がトラップされるのが観察された。これにより装置的な準備は完了したことになる。

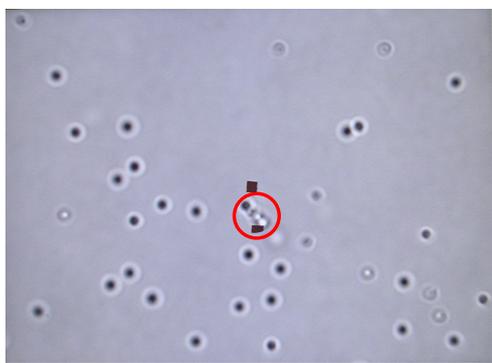


図 3 トラッピングの様子

(2) 金属ナノ粒子の準備

実験の容易さと再現性を考慮して、光トラップした単一球をプローブとして、リポソームの SERS 測定を行うための金属ナノ粒子を作製した。金ナノ粒子の場合には、粒径を大きくすることで増強度を上げることができるが、面内分解能の低下が予想されるので、最適な実験条件を探る必要がある。各種ナノ粒子調製法をもちいることで、粒径 $2\sim 15\text{nm}$ の金ナノ粒子を用意した。

また、生体膜に対する SERS の効果を確認するために、市販の 2 種類の SERS 基板 (ニデック社製の Wavelet と Renishaw 社製の

Klarite) を入手し、予備的な確認を試みようとした。Wavelet は、動的斜め蒸着法を使って作製された金ナノロッドアレイ基板である。Klarite には、直径 $1.5\ \mu\text{m}$ のピラミッドが均一にエッチングされており、ピラミッドの内壁に $20\ \text{nm}$ 程度の金の凹凸が形成されている。この金のナノ構造によりラマン信号が増強される。Klarite は、励起波長 $633\ \text{nm}$ および、 $785\ \text{nm}$ で使用できるとされている。しかし、現在ラマン顕微鏡に使用している倒立顕微鏡では、透過照明を用いて試料を観察しているため、SERS 基板の金ナノ構造により透過では観察が難しい。特に、Klarite の場合は、透過では全く観察することができず、予備的に行った SERS 基板を用いたリポソームの実験では、SERS 効果を確認することはできなかった。

(3) リポソームのラマン測定

EggPC [L- α -phosphatidylcholine (Egg, Chicken)] や DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine) などのリポソームを作製し、ラマン測定を試みた。試料は、 $50\ \text{mM}$ リポソームを $50\ \text{mL}$ 調製し、ガラスボトムディッシュに $20\ \mu\text{L}$ 滴下したものである。測定条件は、励起波長 $532\ \text{nm}$ 、レーザー出力は $15\ \text{mW}$ 、測定時間は $30\ \text{s}$ である。代表例として、EggPC ラマンスペクトルを図 4 に示した。

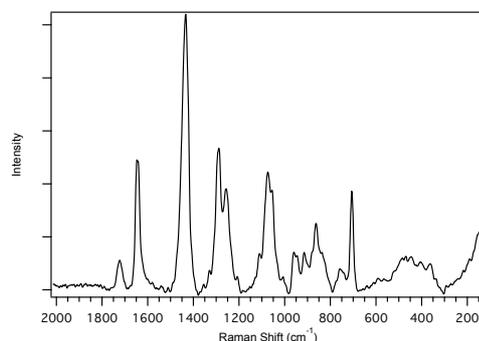


図 4 EggPC リポソームのラマンスペクトル

主なバンドのアサインは、 $1733\ \text{cm}^{-1}$ C=O str、 $1650\ \text{cm}^{-1}$ C=C str、 $1444\ \text{cm}^{-1}$ CH def、 $1300\ \text{cm}^{-1}$ CH₂ twist、 $1125\ \text{cm}^{-1}$ CC str (*trans*)、 $1085\ \text{cm}^{-1}$ CC str (*cis*)、 $1062\ \text{cm}^{-1}$ CC str (*trans*)、 $715\ \text{cm}^{-1}$ N⁺(CH₃)₃ sym str であり、EggPC リポソームのスペクトルが得られている。他のリポソームについても同様に試料に由来するスペクトルが得られた。

(4) スフィンゴミエリンリポソームのラマン測定

当初、膜の非対称性を観察しようとした目的は、特定の脂質が作るナノドメイン (脂質ラフト) の形成を探るのが目的であった。そして、非対称ではない通常のリポソームのラマンスペクトルは容易に測定できることが研究成果 (3) で分かった。そこで、脂質ラフトを形成するリポソームのラマン測定を行

うことで、ドメイン形成の情報が得られるのでないかと研究を進めたところ、スフィンゴミエリンと呼ばれるラフト脂質の凝集状態をあるラマンバンドから判別できることを見出した。そこで、このラマンバンドを用いた膜分布の研究を本萌芽研究の主題にすることにした。

細胞膜の脂質分子は、内外層で異なっており、単にランダムに分布しているのではなく、特定の脂質分子が集合してドメインを形成している。このようなドメインの中でも、比較的「かたい」脂質であるスフィンゴ脂質とコレステロールが形成する脂質ラフトと呼ばれるドメインが特に注目されている。代表的な「ラフト脂質」であるスフィンゴミエリン (SM) には、分子内に水素結合のドナーとアクセプターが共に存在するので、分子間で水素結合を形成することができる。また、SM とホスファチジルコリンの混合膜では、ホスファチジルコリンの脂肪酸組成によって SM の膜分布が異なることが知られている。ジ DOPC のような相転移温度の低い「やわらかい」脂質中では、SM はドメインを形成し、一方、DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) のような相転移温度の比較的高い「かたい」脂質とは良く混ざり合う。ラマン分光は、水素結合のような分子間相互作用を検出することができるので、SM 分子の分布状態をラマン分光により解析することを試みた。

SM のラマンスペクトルには、図 5 の実線で示したように 1645 cm^{-1} 付近に主に C=O 伸縮振動によるバンド (アミド I) が顕著に現れる。このバンドは、SM と DOPC を混合したリポソームの場合には、肩となって存在する (点線)。一方、SM と DPPC を混合したリポソームでは、ほぼ消失することが分かった (一点鎖線)。このバンドがアミド I に由来することは、カルボニル基の炭素を同位体置換した試料を用いて確認した。さらに、密度汎関数法により計算した会合体の振動スペクトルから、このバンドの起源は、水素結合による SM の数分子会合体による可能性が高いことが分かった (詳細は発表論文①)。これは、SM 分子は水素結合により、数分子が会合しやすい性質を持っており、「やわらかい」DOPC 分子と混合すると非相溶性から会合体を形成するが、良好な相溶性を有する「かたい」DPPC 分子と混合した場合には、会合体を形成しないことと一致する。また、SM と頭部が異なる CerPE (N-(dodecanoyl)-heptadecasping-4-enine-1-phosphoethanolamine) においても同様な測定を行い、分子間相互作用の変化を検討した。

本研究の結果はラマン分光法により SM の分布状態を判別することができるとともに、脂質分子間の相互作用を探ることができることを示唆している。なお、この結果は現在論文投稿中である。

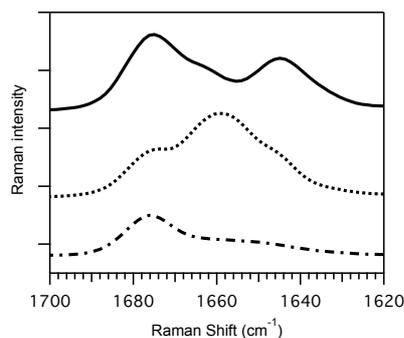


図 5 SMリポソームのラマンスペクトル
スフィンゴミエリン (SM) (実線)、SMとジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC) (点線)、SMとジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) (一点鎖線)

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 1 件)

① Kiyoshi Yagi, Pai-Chi Li, Koichiro Shirota, Toshihide Kobayashi and Yuji Sugita, Weight Averaged Approach for Predicting Amide Vibrational Bands of a Sphingomyelin Bilayer, Phys. Chem. Phys. Chem., Vol. 17, 2015, 29113-29123. 査読有 DOI: 10.1039/c5cp04131g

[学会発表] (計 3 件)

① 城田幸一郎, 八木清, 稲葉岳彦, Li Pai-Chi, 杉田有治, 小林 俊秀, 「ラマン分光法によるスフィンゴミエリンの膜分布に関する研究」, 第53回日本生物物理学会年会, 2015年9月15日, 金沢大学角間キャンパス自然科学本館 (石川県金沢市)

② Pai-Chi Li, Kiyoshi Yagi, Koichiro Shirota, Toshihide Kobayashi, Yuji Sugita, "Probing the sphingomyelin clusters in pure and mix lipid bilayer by the Raman spectroscopy: A theoretical study", 第52回日本生物物理学会年会, 2014年9月26日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

③ 城田幸一郎, 稲葉岳彦, Li Pai-Chi, 八木清, 杉田有治, 小林 俊秀, 「ラマン分光法によるモデル膜におけるスフィンゴミエリン会合体の研究」, 第52回日本生物物理学会年会, 2014年9月26日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城田 幸一郎 (SHIROTA KOICHIRO)

国立研究開発法人理化学研究所・小林脂質
生物学研究室・前任研究員

研究者番号：00291071

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし