

リン脂質非対称組成の人工細胞膜作製と生体分子相互作用観察

神谷 厚輝¹, 竹内 昌治^{1,2}

1. はじめに

細胞膜は、両親媒性分子のリン脂質が会合し厚さ5nmほどのリン脂質二重膜を形成し、細胞内外を隔てている。細胞膜上では、エネルギー変換、シグナル伝達や物質輸送等の細胞活動に重要な反応が行われている。また、細胞膜のリン脂質分布をよく観察すると、真核生物の形質膜の場合、外膜にホスファチジルコリン (phosphatidylcholine: PC) やスフィンゴミエリンが多く存在し、内膜にホスファチジルセリン (phosphatidylserine: PS) やホスファチジエタノールアミン (phosphatidylethanolamine: PE) が存在するリン脂質組成非対称膜を形成している。

人工細胞膜のリボソームは、細胞膜と同様なリン脂質から構成されリン脂質二重膜を形成している¹⁾。このようにリボソームは、細胞膜と同様な成分から構成されているため、細胞との親和性が高いことが知られている。たとえば、直径約100~300nmのリボソームはドラッグデリバリーシステムの担体や化粧品等に使用されている。光学顕微鏡で観察可能なサイズ(直径1μm以上)のリボソームは、酵素反応や膜タンパク質の機能解析、脂質二重膜の物理的挙動についての人工細胞モデルとして使用されている²⁾。このような研究で用いられているリボソームの多くは、静置水和法やエレクトロフォーメーション法で作製されている。静置水和法は、手軽に多くの量のリボソームを作製できるが、サイズ制御や生体分子の高濃度封入は難しい。また、真核生物の細胞膜のようにリン脂質組成非対称膜を作製することは作製過程上困難である。したがって、リボソーム研究では、細胞膜とはかけ離れたリン脂質対称膜で研究が行われており、実際の細胞膜環境が再現できて

いるかは不明である。

近年、微小電気機械システム (micro electro mechanical systems: MEMS) 技術を利用することにより、静置水和法の問題点を解決するリボソーム作製法が国内外で開発されている。MEMSは、主に機械要素部品、センサ、アクチュエータを一つのシリコン基板、ガラス基板に集積したマイクロサイズの微細なシステムである。マイクロ・ナノメートルオーダーの流路や反応器によって、気体や液体を微量でも分析できるという利点を持つため、近年、MEMS技術は化学や生物分析分野に盛んに応用されている³⁾。国内外で、MEMS技術を用いたマイクロデバイス内でマイクロサイズのリボソームを作製する方法が考案されている⁴⁾。作製法の一例としては、有機溶媒に溶解したリン脂質を用意し、マイクロ流路内で油中液滴を作製する方法がある。マイクロ流路内において、この油中液滴がオイル相から水相へ移動する際に、リン脂質を貼り合わせることによりリボソームが形成される。この方法は、エマルションのリン脂質と貼り合わせるリン脂質の組成を変えることにより、リン脂質非対称組成を持ったリボソームが形成される⁵⁾。また、マイクロデバイスを用いたリボソーム作製法により、リボソームの単分散性やリボソームへの生体分子の封入効率が向上した⁴⁾。マイクロデバイスにより制御された人工膜作製により、精密に制御された人工細胞モデルの構築が可能になると考える。しかし、多くのマイクロデバイスによるリボソーム作製法では、リボソーム作製時にリン脂質を溶解する有機溶媒 (*n*-デカンや*n*-ヘキサデカン等) がリボソーム膜内に残留し、リボソームの安定性や膜の流動性に影響を及ぼすことが示唆されている⁶⁾。そこで、残留有機溶媒がきわめて少ないリボソーム作製法が求められている。本稿は、我々が開発したマイクロデバイスによる残留有機溶媒がきわめて少ないリン脂質組成非対称膜リボソーム作製と、このリン脂質非対称膜での生体分子の相互作用観察を紹介する⁷⁾。

2. リン脂質組成非対称膜リボソームの形成

リン脂質組成非対称膜リボソームを作製するために、まず、平面リン脂質組成非対称膜を作製する。平面リン脂質膜は、我々が開発した液滴接触法で形成される⁸⁾。液滴接触法は、「∞」状のデバイスの二つのウェルへ有機溶媒

¹ 神奈川県立産業技術総合研究所人工細胞膜システムグループ (神奈川県川崎市高津区坂戸3-2-1 KSP 東棟303)

² 東京大学生産技術研究所 (東京都目黒区駒場4-6-1 Fw205)

Asymmetric lipid artificial membrane formation and biomolecule interaction investigation

Koki Kamiya¹ and Shoji Takeuchi^{1,2} (¹Artificial Cell Membrane Systems Group, Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology, KSP EAST 303, 3-2-1 Sakado, Takatsu-ku, Kawasaki Kanagawa, ²Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900225

© 2018 公益社団法人日本生化学会

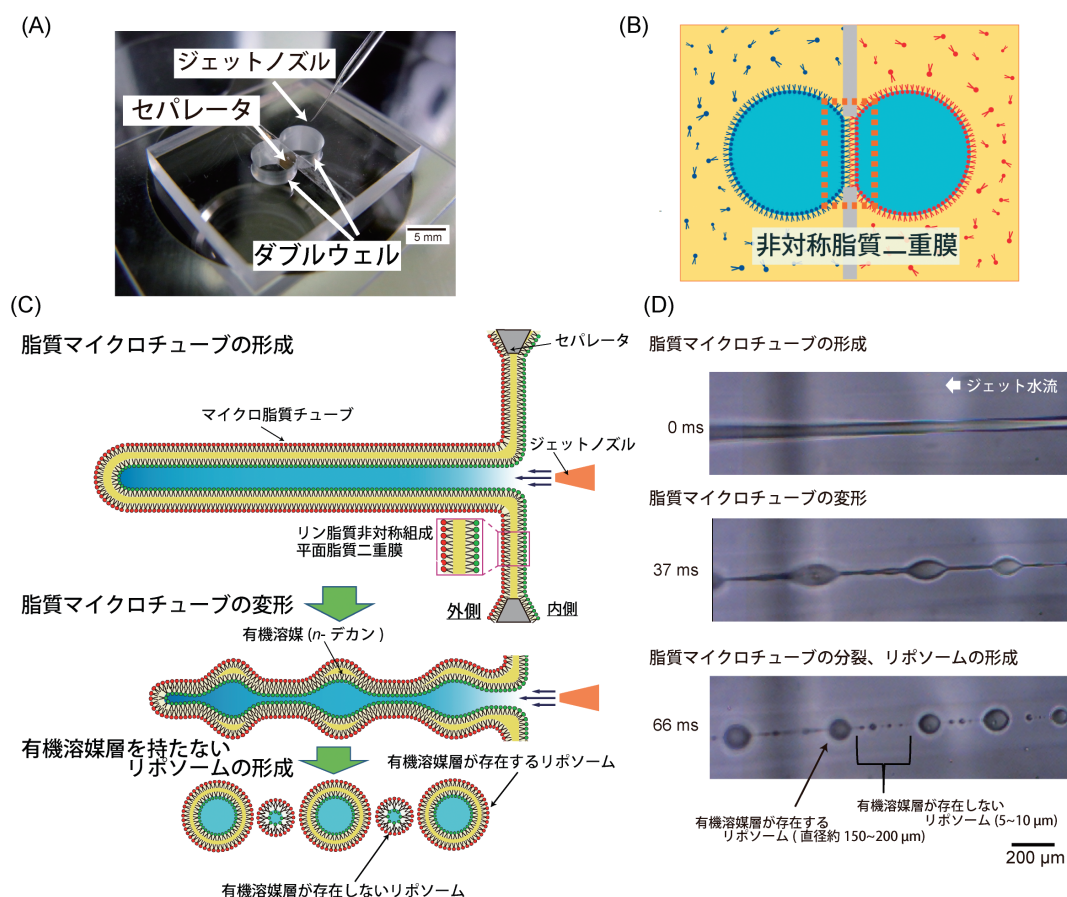


図1 リン脂質組成非対称膜リボソームの作製

(A) デバイス写真. (B) 液滴接触法による平面リン脂質非対称膜. (C) ジェット水流によるリボソーム作製の模式図. (D) リボソーム作製の高速カメラ像 (文献7より改変).

(n-デカン) に溶解したリン脂質を加える. そして, それぞれのウェルへ溶液を滴下することにより, 液滴の輪郭周りにリン脂質の単分子膜が形成され, 液滴間の接触界面にはリン脂質二重膜が形成される. 平面リン脂質組成非対称膜を形成するために, 二つのウェル間にセパレータを配置し, ウェル間でのリン脂質混和を防いだ. このセパレータには直径100~500 μmの孔があり, その孔に平面リン脂質組成非対称膜が形成される仕組みである (図1A, B). そして, この平面膜にガラスキャピラリーからある強さのジェット水流を印加すると, 脂質チューブが形成される. そして, 脂質チューブが不均一な変形を起こし, やがて大きなサイズのリボソーム (直径約150~200 μm) と小さなサイズのリボソーム (直径約5~10 μm程度) に分裂する (図1C, D). この大きなサイズのリボソームは, リン脂質二重膜内に作製時に使用した有機溶媒が多く残留し不安定である. 一方, 小さなサイズのリボソームはちょうど細胞サイズであり, 残留有機溶媒もきわめて少なく安定なリボソームである (7日間程度). このリボソーム形成には, キャピラリー不安定性といわれる物理現象が支配的に関

わっており, 不均一なチューブ変形が生じる. その際, リン脂質二重膜内の有機溶媒がラプラス圧により大きなリボソーム膜へ移動することにより, 小さなサイズのリボソームにはきわめて微量な有機溶媒しか含まれないと推測される. ラマン顕微鏡により, 小さなサイズのリボソームにはn-デカン由来のピークがほとんど存在しないことが明らかになった. したがって, 我々の方法で作製されたリボソームは, 残留有機溶媒量がきわめて微量である.

このリボソーム膜のリン脂質非対称性の確認は, 蛍光が付加されたAnnexin Vのリボソームへの結合の有無で判断した. Annexin Vはリン脂質のPSと特異的に結合することが知られている. そこで, リボソームの外側の溶液にAnnexin Vを加え, リボソーム膜上におけるAnnexin V由来の蛍光を観察した. その結果, 外膜にPSが存在する場合のみに, Annexin V由来の蛍光が観察されたことから, この方法でリン脂質組成非対称膜リボソームが作製できることを確認した.

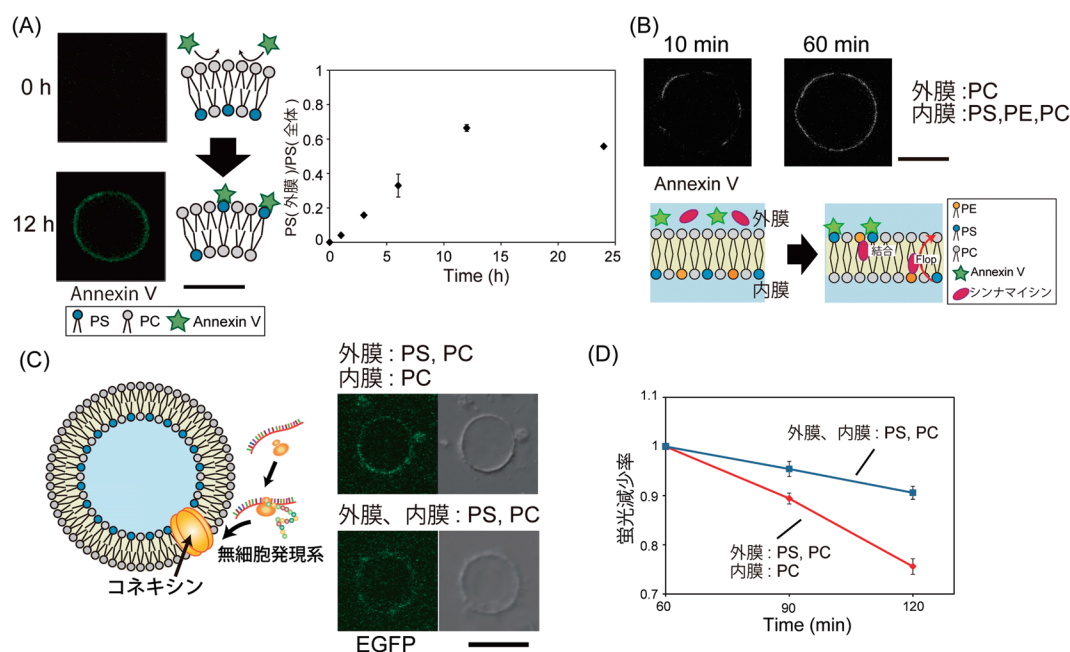


図2 リン脂質組成非対称膜リポソームによる生体分子相互作用観察 (A) リン脂質の分子運動. (B) シンナマイシンと非対称膜の相互作用. (C) コネキシンの非対称膜への再構成. (D) コネキシンのリポソームによるローダミン漏出実験. スケールバー: 10 μ m (文献7より改変).

3. リン脂質組成非対称膜リポソームによる分子相互作用

このリン脂質組成非対称膜リポソームを用いて、リン脂質の分子運動の一つであるフリップ-フロップの観察を行った。フリップ-フロップはリン脂質運動の一つで、脂質二重膜の内膜と外膜間のリン脂質の反転運動である。たとえば、外膜にPC、内膜にPC、PSを持ったリン脂質組成非対称膜リポソームを用意する。先ほどと同様に、リポソームの外側の溶液に蛍光が付加されたAnnexin Vを加え、リン脂質非対称膜上でのPSの結合挙動を顕微鏡にて観察した。はじめは、PSが内膜に存在するため、リポソーム膜上にAnnexin V由来の蛍光は観察されなかった。このリン脂質非対称組成リポソームを37°Cで数時間保存すると、リポソーム上にAnnexin Vの蛍光が観察された(図2A)。このことから、内膜に存在したPSが熱運動により、外膜に露出したことがわかった。また、約10時間程度でリン脂質非対称性が完全に崩れることが明らかになった。

次に、膜と相互作用するペプチドとリン脂質組成非対称膜リポソームの相互作用を顕微鏡下で観察した。シンナマイシンと呼ばれる抗菌活性を有するペプチドを使用した。シンナマイシンは、PEと特異的に結合することが知られている。そこで、動物細胞の形質膜を模倣したリン脂質組成非対称膜リポソーム(外膜: PC, 内膜: PC, PS, PE)を作製し、シンナマイシンと同時にAnnexin Vもリポソーム外液に加え、シンナマイシンと非対称膜の相互作用を顕微鏡により観察した。シンナマイシンを加えるとすぐに、リ

ポソーム膜に結合することがわかった。さらに、Annexin V由来の蛍光の観察から、PEが存在しない非対称膜組成リポソーム(外膜: PC, 内膜: PC, PS)に比べ、PS分子が内膜から外膜へ移動する速さが約10倍程度早くなった(図2B)。したがって、シンナマイシンはPEと特異的に結合するだけでなく、リン脂質二重膜を攪乱する(膜組成の均一化を促進する)働きを持っていることが明らかになった。リン脂質組成非対称膜リポソームは、従来の対称膜リポソームと比べ、実際の細胞膜に近い構造を有することから、細胞膜における反応をよりよく模倣できると考えられる。細胞と異なり、人工系であるリン脂質組成非対称膜リポソームは、膜タンパク質や裏打ちタンパク質の影響を受けずにペプチドやタンパク質等の生体分子とリン脂質組成非対称膜の相互作用の反応が観察可能である。さらに、リン脂質組成や非対称性を自由に変えて実験することが可能であることもまた、人工系の利点である。具体的には、たとえば新規の抗菌活性を持つ物質探索等のスクリーニングとして活用可能である。

4. リン脂質非対称膜リポソームへの膜タンパク質の再構成

リン脂質組成非対称膜が細胞機能にどのように影響するかは、現在のところ明確には理解されていない。そこで、さまざまな組成のリン脂質非対称膜リポソームの外側から無細胞タンパク質発現系により膜タンパク質を発現さ

せ、リポソームへの再構成を観察した。膜タンパク質はコネキシンを使用した。コネキシンは、4回膜貫通タンパク質で、六量体を形成する。リポソーム膜への取り込みは、コネキシンのC末端にEGFP (enhanced green fluorescent protein) を結合し、リポソーム膜上のEGFPの蛍光強度によって評価した。その結果、外膜にPC, PS, 内膜にPCを持つリン脂質組成非対称膜リポソームがコネキシン再構成に有利に働くことがわかった (図2C)。また、PSの量に依存してコネキシンの再構成量も変化することが明らかになった。しかし、この実験だけではコネキシンが機能を持った状態でリポソーム膜に再構成されているかはわからない。そこで、リポソーム内に蛍光色素のローダミンを封入し、先ほどと同様に、リポソーム外液からコネキシンを無細胞タンパク質発現系で発現させた。そして、コネキシンを介したローダミン (分子量490.59) のリポソーム内からの漏洩を観察した。先ほどの実験と同じ組成のリン脂質組成非対称膜リポソーム (外膜: PC/PS, 内膜: PC) で、最もローダミンの漏出が観察された (図2D)。しかし、デキストリンが付加されたローダミン (分子量4400) をリポソームへ封入し、同様な実験を行ったところ、ローダミン-デキストリンの漏出は観察されなかった。これは、コネキシンのポアを通過できる分子サイズが約1000~1800kDaであるからである⁹⁾。この結果より、リン脂質組成非対称膜リポソームに再構成されたコネキシンは、正しい構造で再構成されていることが示唆される。

5. 複数種類のリン脂質組成非対称膜リポソーム作製デバイスの開発

生体分子とリン脂質非対称膜との相互作用実験の条件検討には、非常に多種類のリン脂質組成非対称膜リポソームが要求される。そこで、我々は一つのデバイスで複数種類のリン脂質組成非対称膜リポソームが作製可能なデバイスを開発した¹⁰⁾。デバイスの構造は、六つのウェルを持った回転可能テーブルとジェット水流を印加する固定ウェルからなる (図3A)。先行研究からウェル内で形成したリン脂質単分子膜を持った液滴どうしを回転等により接触させ、リン脂質二重膜の形成に成功している¹¹⁾。そこで、本デバイスで多種類のリン脂質組成非対称膜リポソームが逐次的に形成できるかを検証した。回転テーブルの各ウェルにローダミンを付加した脂質、BODIPYを付加した脂質やPCで液滴を形成した。そして、回転テーブルのウェルを回転させ固定ウェルに接触させることにより、平面リン脂質組成非対称膜を形成させる (図3B)。そして、ジェット水流印加によってリポソームを形成させた。次に、回転テーブルのウェルを回転させリポソームを作製する。図3Cは回転テーブルを1回転させたときの、ウェルごとに形

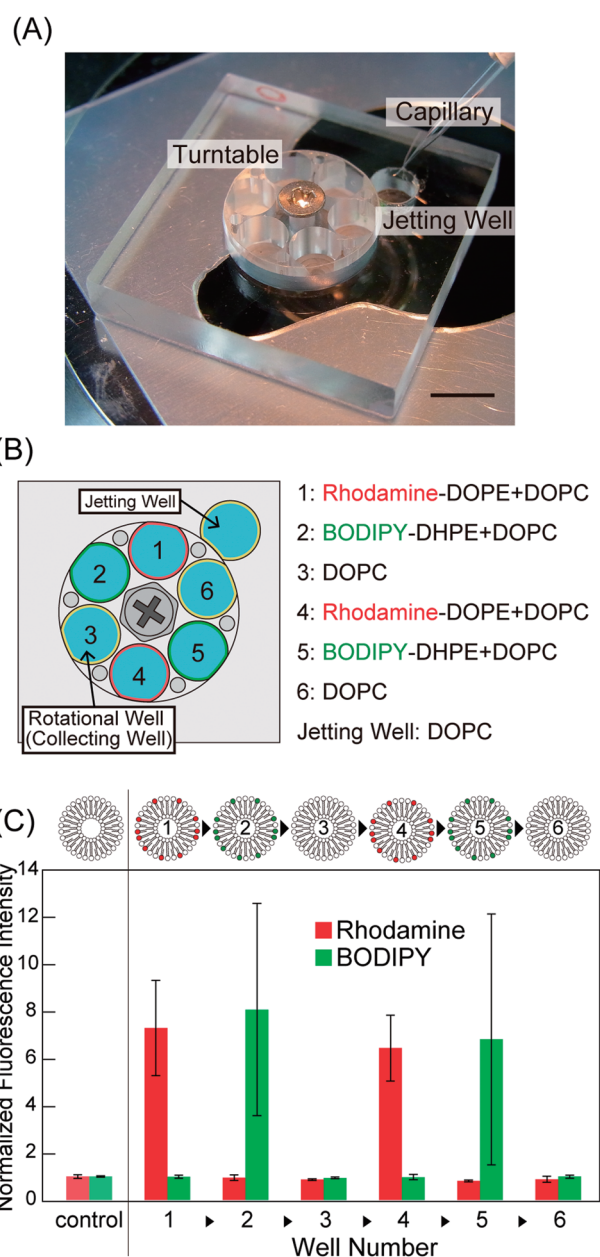


図3 複数種類のリン脂質組成非対称膜リポソーム作製デバイスの開発

(A) デバイス写真。スケールバー: 5 mm。 (B) 各ウェルの脂質組成。 (C) 各ウェルで作製させたリポソームの蛍光強度。ローダミン (Rhodamine)-DOPE: 赤色, BODIPY-DHPE: 緑色 (文献10より改変)。

成したリポソームの蛍光強度を示したグラフである。回転テーブルのウェルに存在している蛍光色素と同様の蛍光脂質のみを持つリポソームが形成された。たとえば、回転テーブルのウェルにローダミン脂質が存在している場合は、外膜にローダミン脂質を持つリン脂質組成非対称膜リポソームが形成された。最後に、蛍光色素を含んでいない6番目のウェルを接触させリポソームを形成したとこ

ろ、リボソームから蛍光が観察されなかった (図3C)。これは、逐次的にさまざまな組成でリボソームを作製してもリン脂質の混和が起らず、ウェル間で独立した組成のリボソームが形成可能なことを示唆している。したがって、このシステムを自動化することにより、多種類のリン脂質組成非対称膜リボソームがハイスループットに作製が可能になる。

6. おわりに

我々が考案したマイクロデバイスを用いたリン脂質組成非対称膜リボソームは、安定的な細胞サイズのリボソームであり、また、リン脂質二重膜内の残留有機溶媒が非常に少ないリボソームである。したがって、真核細胞の細胞膜に近いリン脂質組成非対称膜リボソームによる生体分子 (リン脂質、ペプチド、膜タンパク質) の相互作用観察に初めて成功した。このリン脂質組成非対称膜リボソームを用いることにより、リン脂質組成非対称膜の生物学的意義の解明や膜タンパク質等の未知機能や活性条件の発見が期待される。また、細胞を精密に模倣した人工細胞モデル構

築研究における基盤技術に貢献できると考える。

文 献

- 1) Walde, P., Cosentino, K., Engel, H., & Stano, P. (2010) *ChemBioChem*, **11**, 848–865.
- 2) Kamiya, K., Tsumoto, K., Yoshimura, T., & Akiyoshi, K. (2011) *Biomaterials*, **32**, 9899–9907.
- 3) Abe, Y., Kamiya, K., Osaki, T., Sasaki, H., Kawano, R., Miki, N., & Takeuchi, S. (2015) *Analyst (Lond.)*, **140**, 5557–5562.
- 4) Kamiya, K. & Takeuchi, S. (2017) *J. Mater. Chem. B*, **5**, 5911–5923.
- 5) Hu, P., Li, S., & Malmstadt, N. (2011) *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **3**, 1434–1440.
- 6) Funakoshi, K., Suzuki, H., & Takeuchi, S. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 12608–12609.
- 7) Kamiya, K., Kawano, R., Osaki, T., Akiyoshi, K., & Takeuchi, S. (2016) *Nat. Chem.*, **8**, 881–889.
- 8) Funakoshi, K., Suzuki, H., & Takeuchi, S. (2006) *Anal. Chem.*, **78**, 8169–8174.
- 9) Liu, Y.J., Hansen, G.P., Venancio-Marques, A., & Baigl, D. (2013) *ChemBioChem*, **14**, 2243–2247.
- 10) Gotanda, M., Kamiya, K., Osaki, T., Fujii, S., Misawa, N., Miki, N., & Takeuchi, S. (2018) *Sen. Actuators B Chem.*, **261**, 392–397.
- 11) Tsuji, Y., Kawano, R., Osaki, T., Kamiya, K., Miki, N., & Takeuchi, S. (2013) *Anal. Chem.*, **85**, 10913–10919.

著者寸描

●神谷 厚輝 (かみや こうき)



神奈川県立産業技術総合研究所研究員。博士 (理学)。

■略歴 1981年生。2011年3月東京医科歯科大学大学院生命情報教育部博士課程修了。同年4月より現職。13年10月～17年3月JSTさきがけ研究員 (兼任)。

■研究テーマと抱負 マイクロデバイスを利用した人工細胞モデル構築。人工細胞膜から生命の起源を知る。

■ウェブサイト <http://www.hybrid.iis.u-tokyo.ac.jp>

●竹内 昌治 (たけうち しょうじ)



東京大学生産技術研究所教授。博士 (工学)。

■略歴 1972年生。2000年3月東京大学大学院工学研究科機械情報工学専攻博士課程修了。同年日本学術振興会特別研究員 (PD)。01年より東京大学生産技術研究所講師。助教授。准教授を経て、14年4月より現職。その間04年ハーバード大学化学科客員研究員、05年JSTさきがけ

研究員 (兼任)、09年神奈川科学技術アカデミープロジェクトリーダー (兼任)。10年JST ERATO研究統括 (兼任)。

■研究テーマと抱負 MEMS、バイオマイクロシステム。

■ウェブサイト <http://www.hybrid.iis.u-tokyo.ac.jp>