JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	ジャイアントリポソームを用いた細胞機能解析
Author(s)	濱田，勉
Citation	薬剤学，72(4)：211-214
Issue Date	2012-07-01
Type	Journal Article
Text version	publisher
URL	http://hdl.handle.net/10119/10908
Rights	Copyright (C) 2012 日本薬剤学会．濱田勉，薬剤学，72(4)，2012，211-214．
Description	

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

薬 剤 学, **72** (4), 211–214 (2012)

≪R & D≫

ジャイアントリポソームを用いた細胞機能解析

濵 田 勉* Tsutomu Hamada
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

1. は じ め に

脂質膜小胞（リポソーム）は，生体親和性の高い薬物カプセルとして，これまで数多くの研究開発が行われてきた．このとき用いられるリポソームのサイズは，数十〜百 nm である．これに対して，近年，細胞サイズ（数十 μm）のジャイアントリポソームに関する研究が発展し（図 1），細胞機能を解析するためのツールとして利用が進んでいる．すなわち，生体系に対してリポソームを作用させるのではなく，リポソームそのものを細胞のモデルとした研究である．

本稿では，我々が進めているジャイアントリポソーム研究の最新の知見について紹介したい．先ず，ジャイアントリポソームの作製および光学顕微鏡観察について簡単に述べる．そして，本実験系が可能とする代表的な研究例として,「膜ダイナミクスの創出」および「ナノ物質の膜作用解析」について説明する．

1.1 ジャイアントリポソームの作製

ジャイアントリポソームの作製は，脂質積層膜を水和する手法が一般的に用いられる [1]．脂質分子を溶かした有機溶媒を乾燥させ，試験管の底に積層した脂質膜を作る．ここに水溶液を加えると，積層していた膜が離れて小胞化し，リポソームが得られる．有機溶媒の乾燥過程で形成される積層膜は，数十 μm のテラス構造を形作っており，この前駆膜構造がジャイアントリポソーム形成に重要となる．また，近年，油中水滴（エマルション）を水中に移行させてリポソームを作製する手法が開発されている [1,2]．水滴がリポソームに移行する過程で小胞内の水相が保存するため，リポソーム内部に目的物質を封入することができる．また，任意の単分子膜どうしを結合させた非対称な脂質組成を持つ 2 分子膜リポソームが形成できる．しかし，脂質組成や溶液条件により，ジャイアントリポソームの形成率は大きく影響を受ける．この段階で，いかに‘きれいな’リポソームを作るかが，その後の顕微鏡観察実験のキーとなる．

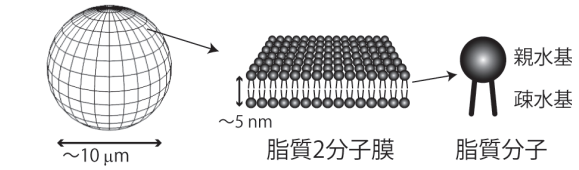

図 1 ジャイアントリポソームの模式図

1.2 ジャイアントリポソームの光学顕微鏡観察

脂質 2 分子膜の膜厚はわずか 5 nm 程度であるため，光の吸収量がコントラストに変換される明視野観察では見ることが出来ない．そこで，物質の屈折率の違いをコントラストに変換する位相差観察が用いられる [1]．また，脂溶性の蛍光プローブを混合し膜面を光らせる蛍光観察や，膜面からの光の散乱を検出する暗視野観察が，高コントラスト像を得る方法として利用される．これら光学顕微鏡の利点は，‘リアルタイム’かつ‘直接’観察出来ることである．すなわち，ある刺激が与えられた際のリポソー

*2001 年大阪大学理学部物理学科卒，2006 年京都大学大学院理学研究科物理学・宇宙物理学専攻終了，2006 年より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助教，2011 年より同研究科准教授．専門：脂質膜の物理．連絡先：〒923–1292 石川県能美市旭台 1–1 E-mail: t-hamada@jaist.ac.jp

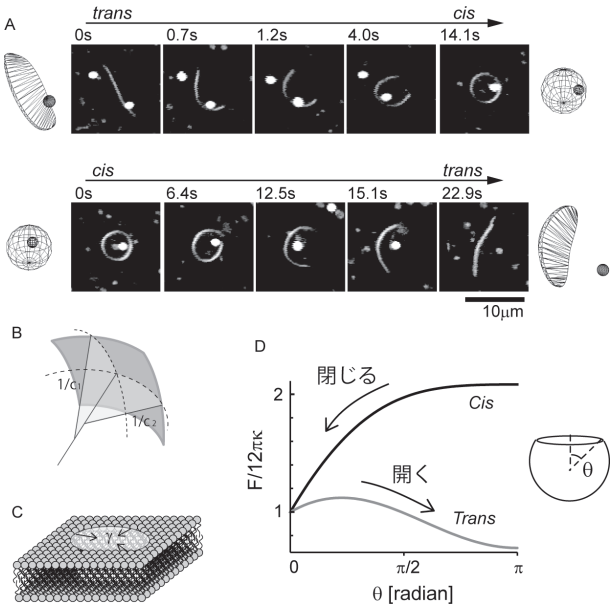

図 2　（A）リポソーム開閉の光マニピュレーションとナノ粒子トラップ[3]．（B）膜の曲げ変形．c_1 と c_2 は膜面の主曲率を表す．（C）2 分子膜のふちを閉じる力（線張力 γ）．（D）トランス・シス体それぞれに対応する膜の自由エネルギー F[3]．横軸は，リポソーム開口角 θ．（Reprinted with permission from *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 10528–10532 (2010). Copyright 2010 American Chemical Society.）

ム 1 個体の状態の移り変わりや，外部物質との相互作用の様子を可視化できる．

2. 膜ダイナミクスの創出

次に，我々が開発したリポソーム開閉の光操作システムを紹介し，その設計機構を膜物性の観点から説明したい[3]．リポソーム小胞の開閉および内容物質のリリース制御は，薬剤カプセル開発の重要な技術基盤である．また，この様な膜の開閉挙動は，細胞内ではオートファジー小胞（不要なタンパク質を包み込み，分解へ導く膜動態）として知られている．

通常，脂質 2 分子膜はふちを無くすように自己集合し，袋状のリポソームが形成される．よって，袋が開いた形態（カップや円盤など）を得ることは難しい．これは，脂質膜のふちを閉じる力（線張力）が大きい（約 10 pN）ことが原因である．そこで我々は，2 分子膜のふちにフィットする逆コーン型（親水基の大きい）両親媒性分子を添加し，線張力を下げることを考えた．さらに，アゾベンゼン基を分子に導入し，分子のパッキング状態を光コントロール可能とした．この光応答性両親媒性分子をリン脂質と混合しリポソームを作製すると，マイクロメートルサイズの円盤型の膜が形成された．そして，紫外光照射によりトランス体からシス体に異性化させると，円盤膜のふちが閉じて，小胞化した．緑色光にて分子形状をトランス体に戻すと，小胞が開き，再び円盤型の膜構造に戻った．この可逆的なリポソーム開閉は，10 回以上連続して繰り返し操作が可能であった．そして，この光制御システムを利用して，溶液中のナノ粒子をリポソーム内部にトラップし，再度リリースすることに成功した（図 2A）．

このリポソーム開閉操作のメカニズムは，膜物性の観点から説明できる．リポソーム形状の安定性を支配する主なエネルギーは，膜が曲がることにより発生する曲率弾性エネルギー（図 2B）と，膜のふちに生じる線張力エネルギー（図 2C）である．この実験では，トランス・シス体間の異性化の際に，膜の線張力がスイッチされていると考えられる．そこで，円盤膜のふちの熱ゆらぎ挙動を解析し，線張力値を実験的に導出した[3]．結果，トランス膜では 5.0×10^{-2} pN，シス膜では 1.5×10^{-1} pN となり，シス膜の方がふちを閉じる線張力が大きいことが分かった．さらに，膜の全自由エネルギー F を計算し，膜形態の安定性を定量的に解析した．

$$F=\int\left[\frac{\kappa}{2}\left(c_1+c_2-c_0\right)^2+\kappa' c_1 c_2\right]dA+\gamma\int dl$$

一項目が曲率弾性エネルギー，二項目が線張力エネルギーである．自由エネルギーをリポソームの開口角 θ の関数として表すと，トランス・シス間の光異性化により，安定な形状が変化していることが分かる（図 2D）．シス膜の場合，最も低いエネルギーを示す θ＝0 の閉じた小胞形態が安定である．これに対して，トランス膜では，θ＝π の円盤形態が安定となる．

次に，これら膜物性の変化をもたらしている分子論的要因について考察する．リポソームはリン脂質と光応答性分子から形成されているが，トランス・シス体それぞれの光応答性分子は，膜中にてリン脂質と異なる親和性を示すことが考えられる．トランス体は分子どうしが密に接することができるため，分子間相互作用が強く膜内で分子が集積する傾向が強い．これに対して，シス体はバルクな形状のため分子間相互作用が弱く，エントロピー効果に負けて，

リン脂質と混合する．よって，トランスからシス体に分子形状が変化すると，膜のふちにおける光応答性分子の集積度が下がる．その結果，線張力が増加し，閉じた小胞構造が安定となる．このように，ナノ空間領域における分子異性化を操作することで，膜物性（線張力）を変換させ，リポソームの開閉ダイナミクスを誘導した．また，リポソームを構成する脂質成分や水溶液の条件を調整することで，線張力とは異なる膜物性を操作することも可能である．我々はこれまでに，エンドサイトーシス様出芽変形[2]や膜ドメイン形成などの光制御を報告している．

3. ナノ物質の膜作用解析

3.1 膜ドメイン

細胞膜表面に対する物質分子の作用機構の解明は，医薬学，バイオマテリアル，ナノテクノロジーなどの幅広い分野において重要な研究開発テーマである．我々は，ジャイアントリポソーム実験を，細胞表面とナノ物質との相互作用解析に関する研究へと展開を進めている．

細胞膜は多成分の脂質分子から構成されるが，これら構成分子は膜面で一様に分散してはいない．膜面には，飽和アシル基を持つスフィンゴ脂質とコレステロールから成る膜ドメイン（脂質ラフト）が存在すると考えられている．膜ドメインは受容体タンパク質等を選択的に局在させる性質を持つことから，シグナル伝達や小胞輸送などの場として機能する．膜物性の観点から見ると，ドメイン内の脂質分子はアシル基の運動性が抑えられた「秩序相」状態にあり，周囲は流動性の高い「無秩序相」状態である（図 3A）．

このような細胞膜のヘテロ界面は，コレステロール・飽和脂質・不飽和脂質から成るリポソームで再現することが出来る（図 3B）[4]．流動性の高い膜領域（ドメイン以外の領域）に局在する蛍光色素を用いることで，リポソーム表面のヘテロ構造を可視化している．リポソーム上に形成される膜ドメインは，主に 2 種類の物性（液体と固体）を示す．コレステロールが枯渇したり，膜に張力が作用したりすると，液体ドメインは固体ドメインへと変化する[4]．このドメイン含有リポソームを用いて，膜ドメインの動的機能を解析することが可能である．例えば，我々は，ジャイアントリポソーム上にて膜ドメインのエンドサイトーシス挙動を人工的に再現し，そのメカニズムを定式化している[2]．

A

	無秩序相	秩序相	
	（ドメイン以外）	液体ドメイン	固体ドメイン
炭化水素鎖の内部回転（トランス⇔ゴーシュ）	○	×	×
膜面上の側方拡散	○	○	×

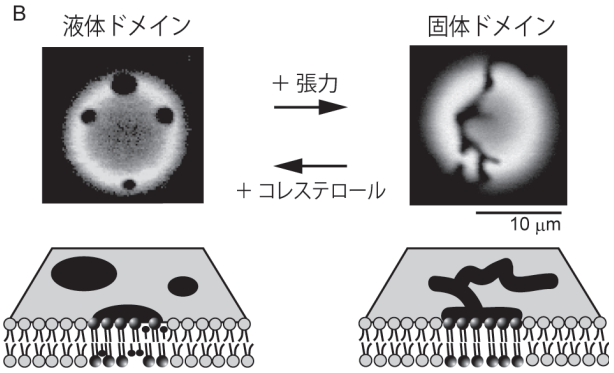

図 3 （A）脂質膜の相状態．（B）リポソーム膜表面におけるドメイン形成[4]．

3.2 ペプチド局在

次に，この膜ドメイン含有リポソームを用いた，ナノ物質の膜作用解析について紹介する．膜ドメイン領域はエンドサイトーシスの場であることから，ヘテロ膜界面における物質の吸着挙動は，その後の細胞内部への取り込まれ方に密接に関係している．ここでは作用物質として，アルツハイマー病原因分子として知られるアミロイドβペプチドを用いた．実験では，膜ドメインの可視化とは異なる波長の蛍光基付ペプチドを用意することで，ヘテロ膜表面でのペプチド局在を二重蛍光観察している[5]．アミロイドβペプチドは溶液中で自発的に重合し，繊維構造を形成することが知られている．そこで，インキュベーション時間を調整し，オリゴマーおよび繊維構造のペプチドを用意した．また，リポソームは，コレステロール含有量を調整し，液体および固体ドメインを形成させた．顕微鏡観察の結果，ペプチド重合度およびドメイン物性に依存して，ヘテロ膜界面におけるペプチドの局在領域が変化することを見出した[5]．図 4 に示したように，オリゴマー構造のペプチドは，主に膜ドメイン以外の領域に分布した．これに対して，繊維構造のペプチドは，膜ドメインの物性に依存して，吸着挙動を変化させた．これは，

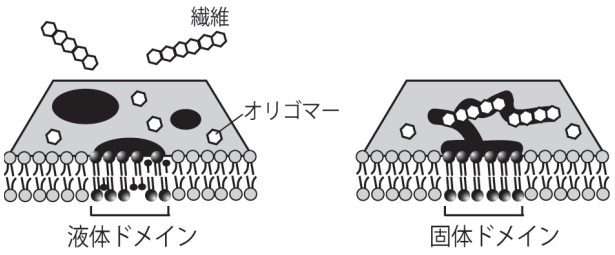

図 4　ヘテロな脂質膜界面に対する，アミロイドβペプチドの作用[5]．オリゴマーはドメイン以外の領域に局在する．繊維は，液体ドメイン含有膜には吸着しないが，固体ドメイン含有膜のドメイン領域に局在する．

外部環境により引き起こされる細胞膜上のドメイン状態変化が，ペプチド–膜間の相互作用に影響することを示している．

これらのメカニズムは，ペプチドと膜との主な相互作用方式が，オリゴマーと繊維構造で異なることが原因である．オリゴマーは 2 分子膜に挿入されるが，大きなサイズの繊維は膜表面上に吸着する．ペプチドが挿入される際には膜を拡張する必要があるため，流動性が高く圧縮拡張率の小さい膜ドメイン以外の領域（無秩序相）が好まれる．これに対して，膜表面上に吸着する際には，吸着により損する膜のエントロピーを考慮する必要がある．流動性の高い膜面は大きな熱ゆらぎ運動を示しており，物質吸着によりゆらぎ挙動が制限されると，エントロピーが減少してしまう．よって，熱ゆらぎ挙動の少ない低流動性領域の固体ドメイン上にのみ，ペプチド繊維が吸着できたと考えられる．

このようにジャイアントリポソーム表面を光学顕微鏡で直接観察することで，ヘテロ膜界面における物質局在を可視化できる．我々の結果は，鍵と鍵穴の特異的分子結合に加えて，より一般的な膜の物理化学的特性が，細胞膜の物質認識機能にとって重要な役割を果たしていることを示している．さらに我々は，ペプチドに加えて，ナノ粒子や DNA 分子などの膜ドメイン局在の観察を進めており，様々な物質分子と膜との相互作用の一般原理を明らかにしたいと考えている．

4. お　わ　り　に

本稿では，ジャイアントリポソームの光学顕微鏡観察に基づく細胞機能解析について紹介した．ここで用いたリポソームは，非常に単純な成分から成るシステムである．しかし，脂質膜の物性を活用することで，小胞開閉やペプチド局在などの機能を発現・制御できることを示した．すなわち，脂質膜は，タンパク質を埋め込む単なる場ではなく，膜そのものが‘機能性’界面であると言える．我々は，このリポソーム実験系をさらに発展させ，より複雑な細胞構造を再構成した人工細胞リポソームの構築を進めている．2 分子膜の内外層の脂質組成の非対称性の再現，荷電脂質や膜電位の導入，細胞骨格や DNA を内部に含むリポソームの構築である．これにより，多様な細胞機能を発現したリポソームを創出し，高次細胞機能の作動原理を明らかにすることを目指している[2]．このように，ジャイアントリポソーム実験は，細胞の動的機能や，様々な物質の細胞膜作用を解析する強力なツールとして発展しており，薬学・医療分野へも今後ぜひ貢献出来ればと考えている．

本稿で紹介した研究成果の共同研究者である北陸先端科学技術大学院大学の高木昌宏教授，大阪市立大学の長崎健教授に深く感謝の意を表する．本研究は，科研費およびサントリー生命科学財団の助成で行われた．

研究室のホームページから，ジャイアントリポソームの光学顕微鏡観察の動画がご覧頂けます．

http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/hamada/

引　用　文　献

1) 濵田　勉，巨大リポソームの顕微鏡直接観察，生命化学研究レター，**28**, 27–31 (2008).
2) 濵田　勉，脂質ベシクルの形状安定性と変形ダイナミクス，機能材料，**30** (7), 50–55 (2010).
3) T. Hamada, R. Sugimoto, M. Vestergaard, T. Nagasaki, M. Takagi, Membrane disc and sphere: controllable mesoscopic structures for the capture and release of a targeted object, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 10528–10532 (2010).
4) T. Hamada, Y. Kishimoto, T. Nagasaki, M. Takagi, Lateral phase separation in tense membranes, *Soft Matter*, **7**, 9061–9068 (2011).
5) 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*, **8**, 2816–2819 (2012).