

Title	2次元・3次元リポソームダイナミクスの観察による生理応答の可視化
Author(s)	中谷, 祐将
Citation	
Issue Date	2023-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10119/18436">http://hdl.handle.net/10119/18436</a>
Rights	
Description	Supervisor:高木 昌宏, 先端科学技術研究科, 博士

氏名	中谷 祐将		
学位の種類	博士 (マテリアルサイエンス)		
学位記番号	博材第 560 号		
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 24 日		
論文題目	Visualization of Physiological Responses by Observing 2D and 3D Liposome Dynamics		
論文審査委員	高木 昌宏	北陸先端科学技術大学院大学	教授
	藤本 健造	同	教授
	濱田 勉	同	准教授
	山口 拓実	同	准教授
	金原 数	東京工業大学	教授

## 論文の内容の要旨

### 【Background】

Cells sense the extracellular environment and initiate physiological responses to maintain homeostasis. Membrane receptors convert extracellular information into intracellular information by interacting with signal molecules. Dysregulation of signal transduction causes various diseases. Obesity and aging, which are abnormal states of lipid quality and quantity, are major risk factors for various diseases. Thus, it is possible that changes in lipidome affect the interaction between lipids and biological membrane properties and disturb signal transduction, eventually causing various diseases. However, the effect of lipid interactions and membrane properties on signal transduction is poorly understood. Lipid interactions and properties affect membrane dynamics. There are many kinds of membrane dynamics. We have classified these membrane dynamics into 2 types; 3D membrane dynamics (endocytosis, autophagy, exocytosis) and 2D membrane dynamics (lipid rafts). However, the biological membrane is not suitable for the analysis of lipid interaction because the components of the biological membrane are very complicated. Thus, in this thesis, we used biomimetic membranes (liposomes) because they can be prepared with simple compositions and are large enough to be observed by microscopy. We have studied 2D and 3D liposome dynamics. We have shown that liposomes cause deformation by adding surfactants and classified the 3D membrane dynamics depending on the strength of irritation. The evaluation method enables us to evaluate the irritancy of surfactants even when the irritancy of the surfactants is low. Liposomes can be changed their lipid compositions and phase-separated structures can be formed; liquid-ordered phase (Lo) rich in saturated lipids and cholesterol, liquid-disordered (Ld) phase rich in unsaturated lipids, and solid-ordered (So) phase rich in saturated lipids. This phase separation can be found in living cells. The So phase occurs in cholesterol (Chol)-poor endoplasmic reticulum (ER) and the Lo phase occurs in cholesterol-rich membranes such as cell membranes.

### [Objective]

The purpose of this study was to visualize physiological responses using biomimetic membranes.

In chapter 2, we investigated the irritation of sodium cocoyl glutamate by an irritating evaluation system with 3D membrane dynamics. Furthermore, we examined the correlation between the irritancy evaluation system and the stinging test. In particular, the relationship between the carbon chain length of sodium glutamate and irritancy was examined. In chapter 3, we regarded So/Ld and Lo/Ld liposomes as ER membrane-model and raft model, respectively, and investigated the effect of two forms of vitamin E,  $\alpha$ -Tocopherol(Toc) and  $\alpha$ -Tocotrienol(Toc3), on amyloid  $\beta$  adsorption on these model membranes.

### [Results]

In chapter 2, by observing membrane dynamics after adding amino acid surfactant to liposome solution, we found that comparing the irritancy of sodium cocoyl glutamate with that of its main component, sodium lauroyl glutamate, it was

found in both liposome and stinging test that sodium lauroyl glutamate was the more irritating. The irritancy of sodium lauroyl glutamate was reduced by amphoteric surfactants. Furthermore, we established an evaluation system for Flip-Flop rate, which is important for membrane deformation. In chapter 3, we found that Toc and Toc3 do not affect the Lo/Ld phase separation. DSC measurements suggested that affinity between Chol and VE (Toc and Toc3) is low, and VE is mainly incorporated into Ld phase in raft model membrane. Furthermore, DPH anisotropy measurement shows that VE increased the order of Ld phase. As the result, line tension of Lo/Ld phase boundary was decreased by adding VEs. Toc and Toc3 decreased the phase separation of So/Ld phase separation. DSC measurement using DPPC/VE binary system suggested that VE decreased the interaction between DPPCs. The effect was more strongly for Toc3 than Toc. Thus, the amount of Toc which is incorporated into So phase was larger than Toc3. We found that inhibition of So phase by Toc and Toc3 decreases amyloid  $\beta$  adsorption onto ER membrane model. Our experimental results show that changes in lipids interactions are closely related to physiological responses, and that visualization by 2D and 3D membrane dynamics can serve as a model system for various physiological responses. Furthermore, combined with superior image processing systems, we will be able to understand physiological responses in even greater detail.

[Keyword]

Liposome, Membrane deformation, Surfactant, Phase separation, Amyloid- $\beta$

## 論文審査の結果の要旨

**(第一章：背景)** 細胞は様々な環境に適するため、生存や増殖、死滅を選択し、組織、器官、個体を維持する。細胞外の情報は膜受容体タンパク質により感知され、細胞内部へと伝えられる。この情報伝達経路に異常が起こると、細胞は増殖や細胞死の制御ができなくなり、様々な疾患が引き起こされると考えられている。20世紀末に、受容体が含まれる細胞膜に、秩序の高い相分離構造が形成されるというラフト仮説が提唱され、生体膜相分離構造や膜形態変化が情報伝達経路に関与することが考えられるようになった。ここでは、膜相分離構造（2次元膜ダイナミクス）や膜構造変化（3次元膜ダイナミクス）と情報伝達との関連に着目して、細胞サイズのリポソームを人工モデルとして用いて、以下に述べる研究を行った。

**(第2章：皮膚刺激評価モデル膜3次元ダイナミクス)** ここでは不飽和脂質のみで細胞サイズリポソームを作成し、界面活性剤添加の刺激性を調べた。我々は、これまでに刺激性に応じた膜ダイナミクスが存在することを明らかにしている。この評価系は従来困難であった低刺激性界面活性剤の刺激評価を行うことができる。そこで、低刺激性であるアミノ酸界面活性剤の刺激性を調べ、アミノ酸系界面活性剤を構成する炭素鎖の長さが刺激性に影響を与えることを示した。また、両性界面活性剤による刺激の低減効果を見出し、これらの結果がヒト試験と有意な相関がみられる事、動物実験代替法として用いられる事を明らかにした。

**(第3章：小胞体ストレスモデル膜2次元ダイナミクス)** アルツハイマー病は、アミロイド $\beta$  ( $A\beta$ )が細胞小器官である小胞体のストレスを引き起こすために発症し、その予防に VitaminE(VE) が効果的である事が分かっている。小胞体膜は、コレステロール含量が少ないため、硬い相分離構造（固体秩序相:So）を形成する。そこで飽和脂質/不飽和脂質の2成分系でSo相を形成する小胞体膜モデルを作製した。疎水部構造の飽和状態のみ異なるVEである $\alpha$ -Tocopherol(Toc),  $\alpha$ -Tocotrienol(Toc3)の相分離への影響を調べた。その結果、Toc、Toc3いずれも、So相の形成を阻害し、TocはToc3よりも強くSo相形成を阻害した。 $A\beta$ の膜吸着を調べたところ、So相に吸着していたアミロイドはVEにより、減少することがわかった。このことから、VEはAmyloid $\beta$ -膜相互作用を阻害する事で、小胞体ストレス、アルツハイマー病リスクの軽減へ効果がある考えられた。

**(総括)** 本研究では、生体膜の機能に着目し、膜の2次元、3次元ダイナミクスに着目し、刺激性評価系

を完成させ、また、アルツハイマー病の原因となる小胞体ストレスと膜相分離構造との関係性について、重要な知見を得ることができ、学術的に貢献するところが大きい。よって博士（マテリアルサイエンス）の学位論文として十分価値あるものと認めた。