JAIST Repository

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

Title	細胞サイズリポソームの新しい作製法とその応用				
Author(s)	山田,彩子;濱田,勉;吉川,研一				
Citation	生物物理,49(5):256-259				
Issue Date	2009				
Туре	Journal Article				
Text version	author				
URL	http://hdl.handle.net/10119/9889				
Rights	Copyright (C) 2009 日本生物物理学会. 山田彩子, 濱 田勉, 吉川研一, 生物物理, 49(5), 2009, 256-259. http://dx.doi.org/10.2142/biophys.49.256				
Description	CiNiiへのリンク http://ci.nii.ac.jp/naid/10025975941				



Japan Advanced Institute of Science and Technology

^{理論/実験 技術} 細胞サイズリポソームの新しい作成法とその応用

山田彩子¹, 濵田勉², 吉川研一³

1フランス高等師範学校化学研究科

²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

³京都大学大学院理学研究科

1. はじめに

両親媒性のリン脂質分子がシート状にずらりと並 び、それが二枚、疎水部を内側に、親水部を外側に してサンドイッチ状の向かい合わせになったもの が,リン脂質二分子膜(厚さは約5nm)である.こ の構造が,細胞膜やオルガネラ膜の主要な構成要素 であり,細胞および細胞器官の内外を隔てる役割を し、膜タンパク質が動き回る流動的な場を提供して いる.このリン脂質二分子膜が,水中で nm-μm ス ケールの小胞となったものをリポソームとよぶ.中 でも特大サイズ(直径1-100 µm 程度)のジャイアン ト・リポソームは、細胞と同程度の大きさの閉じた 微小空間であり,最も単純な細胞モデル,あるい は、細胞モデルの"器"として長く興味をひきつけ てきた¹⁾.しかし,特に生理学的な溶液条件下で は,細胞サイズのリポソーム作製には時間と手間が かかり、生成効率も総じて高いとはいえなかったた め、細胞機能を模倣するモデルとしてはかなり単純 なものにとどまっていた.ところが近年,新たな手 法が続々と試され, DNA やタンパク質などを任意 に封入することが可能となり、これを利用して細胞 機能を人工的に再構成する試みが発展しつつある. 本稿では、筆者らのものを中心に、これらの手法に ついて紹介したい.

2. 新たな方向性

従来,ジャイアント・リポソームは,有機溶媒を 揮発させたあとに形成されるリン脂質の乾燥フィル ムを,自発的に,あるいは交流電場をかけながら, 水和・膨潤させて得るのが主流であった.しかし近 年, Pautot らが, リン脂質を溶かした油中に水を分 散させて、界面がリン脂質に覆われた微小な油中水 滴を得,これを遠心力でマクロな水相に落とし込む ことで,ジャイアント・リポソームの作製に成功し た²⁾.同手法を用いて, Noireaux らは内部で膜タン パク質を発現し、機能させるリポソームの作製³⁾, またPontaniらはリポソーム内部でのアクチンコルテ ックスの形成を実現している⁴⁾.これらの例におい て膜タンパク質α-hemolysinが機能していることか ら,得られた二分子膜の実用性が確認されている. さらに, サイズ制御を目的として, マイクロ流路を 用いた研究も活発化した. Funakoshiらは, リン脂質 に覆われた油水界面同士を接触させ、そこに形成さ れる二分子膜にジェット水流を吹きつけることで, 均一サイズのジャイアント・リポソームを作製して いる⁵⁾.また,Sugiuraらは、均一サイズの油中水滴 を流路を用いて効率よく生成し、内部を凍結させた のち、界面活性剤をリン脂質へ、油相を水相へ、そ れぞれ置換してジャイアント・リポソームを得る手 法を開発した^の.

上に挙げた手法に共通するのは、リン脂質二分子 膜を得る過程で油水界面を援用しているという点で あり、ジャイアント・リポソーム作製の新たな方向 性と言えるだろう.筆者らは、Pautot らと同じくリ ン脂質に覆われた油中水滴をリポソームのテンプレ ートとしているが、遠心力を用いない最も簡便な手 法を用いている.次節に概要を述べるので、興味を 持たれた読者はぜひ試されたい.

3. 液滴からリポソームへの自発的転移現象

Ayako Yamada¹, Tsutomu Hamada², and Kenichi Yoshikawa³

A novel way to make giant liposomes: the spontaneous transfer method

¹Department of Chemistry, Ecole Normale Superieure,

²School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology,

³Department of Physics, Kyoto University



図 1

実験の概要図. PDMS に直径4mm程度の穴を開け たチャンバー内に,油水界面を形成させ,細胞サ イズの油中水滴を加える(左図).油中水滴は重 カによって油水界面まで達し,自発的に水相へと 移行する.油水界面はあらかじめ油中に溶解した リン脂質によって覆われており,水相内でリポソ ームを形成する(右図,左は位相差顕微鏡像).

筆者らの手法では,顕微鏡観察下,油中水滴を自 発的に水相へと移行させてリポソームを得ることが できる⁷.

実験の概要図を図1に示す.厚さ5mm 程度の poly-(dimethylsiloxane) (PDMS)シートに直径 4mm 程度の穴を開け、カバーガラスに密着させた ものをチャンバーとして用い,まず,この中に水平 な油水界面を形成させる(図1左).このとき,油 相にリン脂質を溶解させておくことにより,油水界 面は直ちにリン脂質膜に覆われる.次いで,リポソ ーム内に封入したい溶液数山を,エッペンチューブ 内などでリン脂質を含む油中に滴下して乳化させ, 細胞サイズの油中水滴を得る.この油中水滴相を顕 微鏡観察下,チャンバー内の油水界面上に滴下する と、油中水滴が重力によって油水界面に到達し、自 発的に界面を越え、水相へと移行してリポソームを 形成する(図1右). すなわち, チャンバー内にあ らかじめ静置された水相がリポソームの外部を満た す溶液相となり、油中水滴に封入された溶液がその ままリポソーム内部となる.

本手法では,生理学的な塩濃度の溶液であっても リポソーム内に容易に封入することができ,リポソ ーム内外の溶液は,浸透圧さえ等しければ自在に選 ぶことができる.また,リポソームに封入するサン プル量は数μと少量でよいといった利点がある.さ らに,乳化からリポソーム形成に要する時間は数分 程度と短いため,生化学反応系を封入した場合な ど,反応開始直後からの観察が可能である.本手法 によって得られるリポソームは,上部が油水界面に 接着しているため,多数のリポソームが同時に観察 され,各々のリポソームの時間変化を追うことが可 能となる.また,内外溶液の比重を変えれば,重力 によって自発的に油水界面から引き剥がすこともで きる[®].さらに,次節に述べるように,チャンバー



非対称リポソームの相分離.外層膜のみ(A) お よび内層膜のみ(B)に,蛍光色素を加えてドメ イン構造を可視化している.染色には,流動性の 低いドメイン領域を避けて膜内に分布する蛍光色 素を用いた.(図はACS,J.Phys.Chem.Bより許可 を得て改変.Copyright 2008 American Chemical Society)

内の油水界面を覆うリン脂質,油中水滴表面を覆う リン脂質に,それぞれ別のものを用いれば,リポソ ームの内・外層膜の脂質組成が異なる「非対称リポ ソーム」を作製することができる.

このように、本手法によって、従来法では困難で あった様々な条件のジャイアント・リポソームを得 ることができる.しかしながら、膜間にわずかに油 が残存している可能性が排除できないことから、目 的によっては適さないこともあるだろう.改良の余 地は多分にあり、また従来法も、着々と工夫が重ね られてきている.様々な手法を比較して、目的に適 ったものを選ばれたい(オンラインジャーナル電子 付録の比較表参照).

4. 応用

4.1 非対称な"脂質組成"を有するリポソーム上

での膜ミクロドメイン形成

筆者らは、本手法の原理を利用して、リポソーム の内層膜と外層膜との脂質組成が異なる細胞サイズ 非対称リポソームを作製し、非対称膜上でのミクロ ドメイン観察に成功している⁸⁾.図1に示したよう に、本手法では、油水界面の単分子膜が油中液滴を 覆っていた単分子膜と結合し、二分子膜であるリポ ソームが形成される.よって、異なる脂質組成の単 分子膜を用意することで、非対称な二分子膜を備え たリポソームを作り出すことができる.図2は外層 膜が単一脂質、内層膜が3成分脂質(飽和脂質、不 飽和脂質、コレステロール)から成る非対称リポソ ームの蛍光像である.この3成分系では、相分離に より膜ミクロドメインが形成される.生細胞膜で は、受容体タンパク質等が膜ミクロドメイン(例え ば脂質ラフト)に集積し、シグナル伝達の場として 機能すると考えられている.外層膜のみ(図 2A) および内層膜のみ(図 2B)に蛍光色素を加えた顕 微観察から,内層膜にのみドメイン構造が形成され ていることが確認できる.このように本手法を用い て,細胞膜内外層の「縦」の非対称性と,膜ミクロ ドメインに代表される「横」の非対称性を同時に再 構成することに成功した.細胞膜インターフェイス におけるシグナル変換プロセスが機能するには,非 対称な脂質組成の内・外層膜で形成される膜ドメイ ンが協同的に働く必要がある.縦横の非対称性のカ ップリング機構の解明は,今後の重要な課題であ る.また,これまで困難であった,非対称リポソー ムの力学的性質や膜ダイナミクスの解析実験が可能 となることで,複雑な生細胞膜の物性理解の進展が 期待される.

4.2 アクチンフィラメントとHMMの共封入

細胞骨格の主要な構成要素の一つであるアクチン は,細胞が形作られ,変形し,動くために,モータ ータンパク質と協同して重要な役割を担っているこ とが知られている.種々の複雑な細胞機能からこの 機構のみを抽出して理解するためには,最小限の要 素を封入した細胞サイズリポソームをモデルとし た,構成論的なアプローチが有効であると考えられ る. そこで, Takiguchiおよび筆者らは, 従来は困難 であった,高濃度のアクチンフィラメントとモータ ータンパク質の同時封入を,本手法を用いて試みた (図3)⁹⁾. その結果, 5 mM MgCl₂ ・ 50 mM KCl 存在下,細胞内と同程度の濃度(200 µM)のアク チンフィラメントを封入することができただけでな く, ミオシン II から得たモータータンパク質 heavy meromyosin (HMM) および S-1 を同時封入するこ とに成功した.アクチンフィラメントのみ封入した リポソーム内では,アクチンは均一に分布し,リポ ソームの変形は見られなかった(図 3A).また, アクチン結合部位を一つしか持たない S-1 を過剰に 加えて封入した場合にも、同様に変化は見られなか った(図 3B). それに対し, アクチン結合部位を 二つ有する HMM を共に封入した場合には,アクチ ンフィラメントの東化が起こり,それに伴ってリポ ソームの変形が引き起こされた(図 3C).この系 を足がかりとし、リポソームの変形だけにとどまら ず,モータータンパク質を駆動させることによる自 発的な運動など、さらなる細胞骨格・細胞運動のモ デルへの発展が期待される.



図 3

(上) モータータンパク質ミオシン II および本実 験に用いられた部位 HMM, S-1 とアクチンフィラ メント(FA)の模式図.(下)FAのみ(A), FA と S-1 を同時封入したリポソーム(B)では,内 部のFAが均一に分布し,リポソーム像も円形を保 ったままであるのに対し,FAとHMMを共に封入し たリポソーム(C)内では,FAが不均一に束化 し,リポソームの変形が認められた.並列した画 像左はアクチンの蛍光顕微鏡像,右は透過光像. スケールバーは10 μm.(図は ACS, Langmuirより許 可を得て改変. Copyright 2008 American Chemical Society)

4.3 遺伝子発現キネティクスのリアルタイム観察

本手法ではリポソームへの試料封入に要する時間 が短く、同時に多数のリポソームを観察することが できる.この特長を生かし、Saitoおよび筆者らは、 多数のリポソーム内での遺伝子発現キネティクス を、反応開始直後からリアルタイムで計測すること に成功している(図4)¹⁰⁾.必要最小限の要素を精 製・再構成した無細胞発現系を用い、DNA および mRNAをテンプレートとして、発現および翻訳反応 それぞれについて、キネティクスを多数のリポソー ムから同時に得、比較検討を行うことが初めて可能 となった.その結果、全体平均では、バルク中での 反応と同様のキネティクスを示すが、µm スケール



図 4

多数のリポソーム内での EGFP (enhanced green fluorescent protein)発現の同時観察.発現反応開始か ら、リポソームへの封入、観察を始めるまでに要 する時間は数分程度であり、個々のリポソーム内 での発現キネティクスを追うことができる.画像 は、反応開始から 135 分後の共焦点蛍光顕微鏡 像.スケールバーは 100 μm.

で個々のリポソームについて見ると,広いばらつき があることが明らかとなった.

5.おわりに

本稿では、細胞サイズリポソームの新しく簡便な 作製法を紹介した.本稿が、細胞モデル構築、ひい ては細胞機能の構成論的研究の一助となれば幸いで ある.近年、国際的に見て、こうした試みが非常に 活発になっており、より"細胞らしい"構造や機能 を持つモデルが構築できるような時代に来ていると 思われる.今後の進展が楽しみである.

謝辞

本稿で紹介した研究成果の共同研究者である名古 屋大学の瀧口金吾博士,瀧口陽子博士,京都大学の 齋藤博英博士,根岸真紀子氏,山中透氏,長谷政彦 氏,北陸先端科学技術大学院大学の高木昌宏教授に 深く感謝の意を表する.また,日頃より貴重な議論 をしていただいているフランス高等師範学校の Damien Baigl博士,京都大学の野村 M.慎一郎博 士,本稿を精読くださった京都大学の柳沢実穂博 士,辻明彦博士に感謝申し上げる.本研究は,JST のICORPプロジェクト,科研費学術創成および特定 領域研究助成の下行われた.

文 献

- 野村M.慎一郎,山田彩子,吉川研一 生物物 理 48,174-179,およびその引用文献.
- Pautot, S., Frisken, B. J. and Weitz, D. A. (2003) *Langmuir* 19, 2870-2879.
- Noireaux, V. and Libchaber, A. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 101, 17669-17674.
- Pontani, L.-L., van der Gucht, J., Salbreux, G., Heuvingh, J., Joanny, J.-F. and Sykes, C. (2009) *Biophys. J.* 96, 192-198.
- Funakoshi, K., Suzuki, H. and Takeuchi, S. (2007) J. Am. Chem. Soc. 129, 12608–12609.
- Sugiura, S., Kuroiwa, T., Kagota, T., Nakajima, M., Walde, P., Sato, S., Mukataka, S. and Ichikawa, S. (2007) *Langmuir* 24, 4581-4588.
- Yamada, A., Yamanaka, T., Hamada, T., Hase, M., Yoshikawa, K. and Baigl, D. (2006) *Langmuir* 22, 9824-9828.
- Hamada, T., Miura, Y., Komatsu, Y., Kishimoto, Y., Vestergaard, M. and Takagi, M. (2008) *J. Phys. Chem. B* 112, 14678–14681.
- Takiguchi, K., Yamada, A., Negishi, M., Tanaka-Takiguchi, Y. and Yoshikawa, K. (2008) *Langmuir* 24, 11323-11326.
- Saito, H., Kato, Y., Le Berre, M., Yamada, A., Inoue, T., Yosikawa, K. and Baigl, D. *ChemBioChem* in press.



山田 彩子(やまだ あやこ) 日本学術振興会海外特別研究員 2008年京都大学大学院理学研究科博士 課程修了 . 理学博士. 06-07 年度日本 学術振興会特別研究員 研究内容:構成論的手法による動的細 胞機能の研究 連絡先: Department of Chemistry, Ecole Normale Superieure, 24 rue Lhomond, 75005 Paris. France E-mail : ayako.yamada@ens.fr 濵田 勉(はまだ つとむ) 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 2006年京都大学大学院理学研究科博士 課程修了.理学博士.04-05年度日本 学術振興会特別研究員を経て, 06年よ り現職 研究内容:細胞モデル小胞の秩序構造 形成と動的膜挙動 連絡先:〒923-1292石川県能美市旭台 1丁目1番地 E-mail : t-hamada@iaist.ac.ip http://www.jaist.ac.jp/~t-hamada/index.html 研一(よしかわ 吉川 けんいち) 京都大学大学院理学研究科教授 1976 年 京 都 大 学 大 学 院 工 学 研 究 科 博 士 課程修了.工学博士.徳島大学,名古 屋大学を経て、98年より現職. 研究内容:生命現象の物理学・非線形 科学 連絡先:〒 606-8502 京都市左京区北白 川追分町 E-mail : yoshikaw@scphys.kyoto-u.ac.jp http://www.yklab.jp/

Appendix

ジャイアント・リポソーム作製法の比較

作製法	Natural swelling ¹	Electro-formation ²	Centrifugation ³	Spontaneous transfer ⁴ (本手法)	Microfluidics ⁵
概要	リン脂質乾燥フィルムに 試料溶液を加え,静置す る.	リン脂質乾燥フィルムに 試料溶液を加え,交流電 場をかける.	リン脂質に覆われた油中 水滴をテンプレートと し、遠心力で水相へ落と し込む.	リン脂質に覆われた油中 水滴をテンプレートと し、自発的に油水界面を 越えさせる.	マイクロ流路を用いて均 ーサイズのリポソーム, あるいはテンプレートと なるダブルエマルション や油中水滴を作成する.
難易度	易	易	易	易	難
試料封入に要する時間	長	やや長	短	短	やや短
試料の必要量	数 10 - 100 μl	数 10 - 100 μl	数 μΙ	数 μΙ	数 10 - 100 μl
生理学的塩濃度での作成	やや難ら	葉推 ⁷	易	易	易
内外で異なる溶液組成	不可 (要外液交換)	不可 (要外液交換)	ЪĴ	нĴ	म]
非対称膜リポソーム	不可	不可	可 8	可 9	不可
サイズ制御	不可	やや可 ¹⁰	不可	やや可 ⁹	пĴ
その他	細胞モデル研究に最もよ く使われ,広く適用可能 な手法.高塩濃度では生 成効率が低かったが, 種々の新手法が開発され ている ⁶ .多重膜になりや すい.	 一重膜のリポソームが多量に得られる.塩濃度が 10 mM 以上になると作製が困難だが,様々な工夫がなされている⁷. 	試料の封入が短時間で簡 単にできる.リポソーム が溶液中に分散されるため,観察視野内に得られ るリポソーム数は少ない.膜間に油残存の可能 性あり.	試料の封入が短時間で簡 単にできる.多数のリポ ソームが油水界面に接着 しており,作製直後から のリアルタイム観察が可 能.内外溶液の比重を変 え,重力で油水界面から 剥がすことも可能 ⁹ . 膜間 に油残存の可能性あり.	均一サイズのリポソーム が得られる.マイクロ流 路技術が必要.膜間に油 残存の可能性あり.

文 献

- 1) Bangham, A. D., Standish, M. M. and Watkins, J. C. (1965) J. Mol. Biol. 13, 238-252.
- 2) Angelova, M. I. and Dimitrov, D. S. (1986) Faraday Discuss. Chem. Soc. 81, 303-311.
- 3) (a) Pautot, S., Frisken, B. J. and Weitz, D. A. (2003) Langmuir 19, 2870-2879. (b) 手法の初出は、ナノメートルサイズのリポソーム作製における Zhang, L., Hu, J. and Lu, Z. (1997) J. Colloid Interface Sci. 190, 76-80.
- 4) Yamada, A., Yamanaka, T., Hamada, T., Hase, M., Yoshikawa, K. and Baigl, D. (2006) Langmuir 22, 9824-9828.

Appendix

- (a) Funakoshi, K., Suzuki, H. and Takeuchi, S. (2007) J. Am. Chem. Soc. 129, 12608–12609. (b) Shum, H. C., Lee, D., Yoon, I., Kodger, T. and Weitz, D. A. (2008) Langmuir 24, 7651-7653 (c) Sugiura, S., Kuroiwa, T., Kagota, T., Nakajima, M., Walde, P., Sato, S., Mukataka, S. and Ichikawa, S. (2007) Langmuir 24, 4581-4588.
- 6) (a) Horger, K. S., Estes, D. J., Capone, R. and Mayer, M. (2009) J. Am. Chem. Soc. 131, 1810-1819. (b) Yamashita, Y., Oka, M., Tanaka, T. and Yamazaki, M. (2002) Biochim. Biophys. Acta 1561, 129–134.
- 7) (a) Pott, T., Bouvrais, H. and Meleard, P. (2008) Chem. Phys. Lipids 154, 115-119. (b) Estes, D. J. and Mayer, M. (2005) Biochim. Biophys. Acta 1712, 152–160.
- 8) Pautot, S., Frisken, B. J. and Weitz, D. A. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 10718-10721.
- 9) Hamada, T., Miura, Y., Komatsu, Y., Kishimoto, Y., Vestergaard, M. and Takagi, M. (2008) J. Phys. Chem. B, 112, 14678–14681.
- 10) Diguet, A., Le Berre, M., Chen, Y. and Baigl, D. (2009) Small, in press. (doi: 10.1002/smll.200900368)