

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
Type	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

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, 濱田勉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5 nm）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- μ m 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 μ m 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レ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⁶。

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

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

Ayako Yamada¹, Tsutomu Hamada², and Kenichi Yoshikawa³

¹Department of Chemistry, Ecole Normale Supérieure,

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

³Department of Physics, Kyoto University

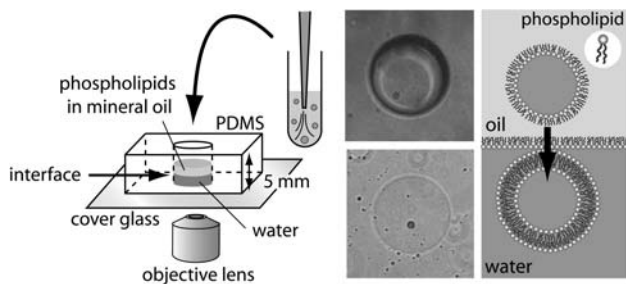


図 1

実験の概要図。PDMS に直径 4 mm 程度の穴を開けたチャンパー内に、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）。油中水滴は重力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 5 mm 程度の poly-(dimethylsiloxane) (PDMS) シートに直径 4 mm 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パーとして用い、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 μl 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、チャンパ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、チャンパ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 μl 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⁸⁾。さらに、次節に述べるように、チャンパー

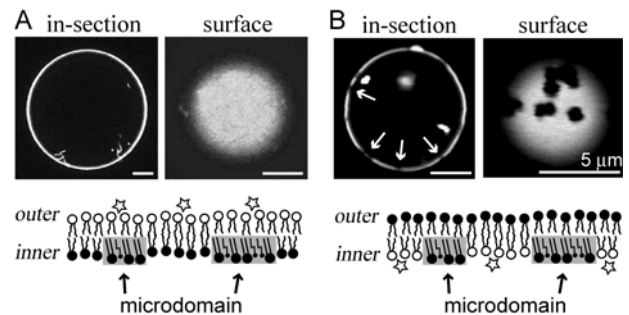


図 2

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、目的に合ったものを選びたい（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の膜マイクロドメイン形成

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、非対称膜上でのマイ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、相分離により膜マイ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マイクロドメイン（例えば脂質ラフト）に集積し、シグナル伝達の場合として

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，膜マイ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束化が起こり，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．

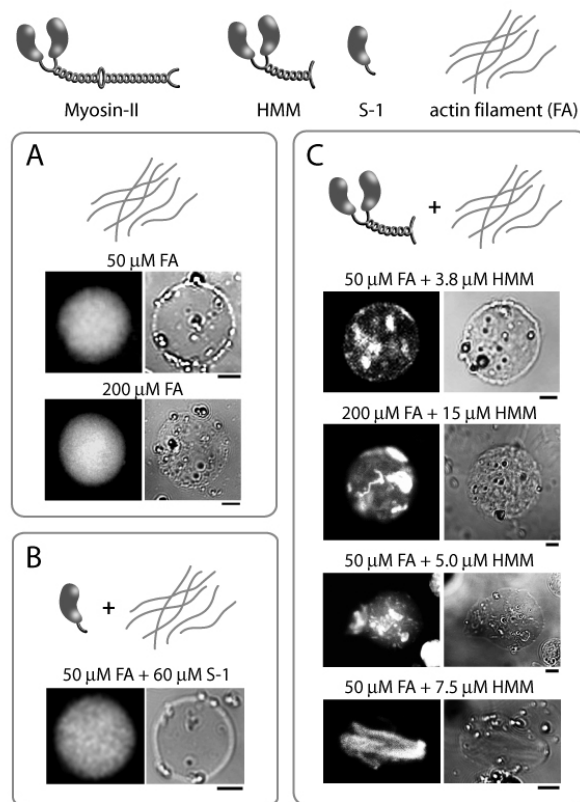


図 3
（上）モータータンパク質ミオシン II および本実験に用いられた部位 HMM，S-1 とアクチンフィラメント（FA）の模式図．（下）FAのみ（A），FAと S-1 を同時封入したリポソーム（B）では，内部のFAが均一に分布し，リポソーム像も円形を保ったままであるのに対し，FAとHMMを共に封入したリポソーム（C）内では，FAが不均一に束化し，リポソームの変形が認められた．並列した画像左はアクチンの蛍光顕微鏡像，右は透過光像．スケールバーは10 μm．（図は ACS，Langmuir より許可を得て改変．Copyright 2008 American Chemical Society）

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

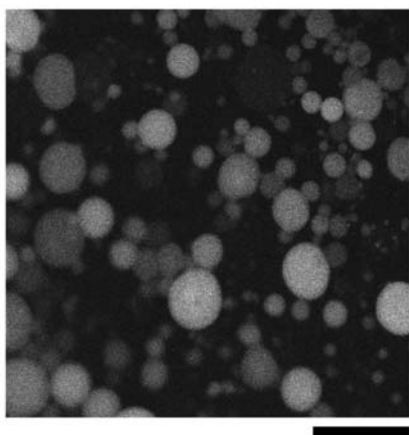


図 4

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。

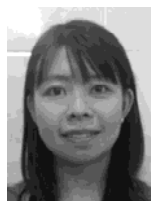
謝辞

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。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

- 1) 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.
- 2) Pautot, S., Frisken, B. J. and Weitz, D. A. (2003) *Langmuir* **19**, 2870-2879.
- 3) Noireaux, V. and Libchaber, A. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 17669-17674.
- 4) Pontani, L.-L., van der Gucht, J., Salbreux, G., Heuvingh, J., Joanny, J.-F. and Sykes, C. (2009) *Biophys. J.* **96**, 192-198.
- 5) Funakoshi, K., Suzuki, H. and Takeuchi, S. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 12608-12609.
- 6) Sugiura, S., Kuroiwa, T., Kagota, T., Nakajima, M., Walde, P., Sato, S., Mukataka, S. and Ichikawa, S. (2007) *Langmuir* **24**, 4581-4588.
- 7) Yamada, A., Yamanaka, T., Hamada, T., Hase, M., Yoshikawa, K. and Baigl, D. (2006) *Langmuir* **22**, 9824-9828.
- 8) Hamada, T., Miura, Y., Komatsu, Y., Kishimoto, Y., Vestergaard, M. and Takagi, M. (2008) *J. Phys. Chem. B* **112**, 14678-14681.
- 9) Takiguchi, K., Yamada, A., Negishi, M., Tanaka-Takiguchi, Y. and Yoshikawa, K. (2008) *Langmuir* **24**, 11323-11326.
- 10) 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 Supérieure, 24 rue Lhomond, 75005 Paris, France

E-mail : ayako.yamada@ens.fr

濱田 勉 (はまた 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@jaist.ac.jp

<http://www.jaist.ac.jp/~t-hamada/index.html>

吉川 研一 (よしかわ 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一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ジ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 μ l	数 10 - 100 μ l	数 μ l	数 μ l	数 10 - 100 μ l
生理学的塩濃度での作成	やや難 ⁶	難 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)	可	可	可
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	可
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

- 5) (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/sml.200900368)