

研究報告書

「細胞膜模倣リン脂質非対称膜による自己再生産可能な人工細胞モデルの創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 神谷 厚輝

1. 研究のねらい

人工細胞膜(リポソーム)は、細胞膜と同じ分子であるリン脂質から構成されているため薬物担体等に使用されている。特に、光学顕微鏡で観察可能な細胞サイズのリポソーム(直径約 5-20 μm)に膜タンパク質の再構成や、リポソーム内でタンパク質発現を行う人工細胞モデル研究に用いられている。細胞サイズのリポソームでこの様な細胞で起こる反応の解析や再現に成功している。しかしながら、リポソームは実際の細胞膜環境とはまだかけ離れている。一例として、真核生物の場合、細胞膜のリン脂質二重膜を構成するリン脂質分子の組成は非対称になっているが、そのようなリポソームの作製は、従来の古典的な自己組織的なリポソーム作製方法では困難である。将来、多くの機能を単一リポソームに搭載した複雑な人工細胞を作製するにあたり、細胞を模倣したリポソーム作製が必要になってくる。

本研究ではマイクロ流体デバイスを利用することに既存のリポソーム作製法で困難であった細胞膜を模倣したリポソームの作製を行い、細胞膜に似た環境下で生物学的な反応を行った。具体的には、マイクロ流体デバイスを用いて、リポソーム作製時に使用する有機溶媒が残留しないリン脂質非対称膜リポソームを作製し、様々なタンパク質を非対称膜リポソームに組み込むことにより非対称膜リポソームの機能化を目指した。特に、無細胞タンパク質発現系で発現させた膜タンパク質コネキシンは、あるリン脂質非対称膜組成であるとコネキシンの取り込みが増大した。また、バキュロウイルス-リポソームによりリン脂質非対称膜を維持する膜タンパク質を再構成し機能保持に成功している。この研究はリポソームによる複雑な人工細胞作製のする際のパーツ形成に寄与すると考える。

2. 研究成果

(1) 概要

マイクロ流体デバイスを用いたリポソーム作製法で作製したリポソームに膜タンパク質等を再構成し、機能化することにより再生産可能なリポソーム作製を目指した。再生産するような多種類の反応を単一リポソームに再構成し機能発現をさせることは難しい。よって、戦略としては、機能の要素ごとリポソームに再構成しリポソーム内での機能発現の観察を行なう。そして、最終的にはこれらのユニットを組合せ複雑な人工細胞構築を図る。

作製時に使用する有機溶媒が極めて少ないリポソームの作製に成功し、このリポソームの作製過程の詳細を高速カメラで観察を行った。そして、シミュレーションによりこのリポソームの作製過程のモデル化を行った。

このジェット水流印加によるリポソーム作製法で作製したリポソームへ、種々の膜タンパク質の再構成と機能観察を行なった。熱により非対称膜リポソームはリン脂質の分子運動が活発になり、非対称性が崩れることによりリン脂質対称膜リポソームになる。そこで、細胞膜上

で非対称膜を維持する働きを持つ膜タンパク質を再構成し、非対称膜リポソーム中でこの膜タンパク質の活性評価を行った。また、リポソームの外側から無細胞発現系で膜タンパク質であるコネキシンを発現させ、非対称膜リポソームへの再構成の観察を行った。また、非対称膜へコネキシンの取込みが増大することが分かった。さらに、再構成されたコネキシンがリポソーム膜上でポアを形成していることも明らかにした。ジェット水流を平面膜へ印加しリポソーム内に思い通りの濃度で物質をことが可能である。DNA 封入のロス の検討と無細胞タンパク質発現系を用いたタンパク質発現を行った。

リン脂質平面膜を2枚配置したデバイスを作製して、ジェット水流をこの2枚の平面膜に印加することにより、小さなリポソームが細胞サイズリポソームに内包された小胞モデルリポソーム作製に成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A 「ジェット水流印加による残留有機溶媒が少ないリポソーム作製の開発」

高速度カメラ撮影によりリポソーム形成過程の詳細を観察した。∞状のデバイス内に有機溶媒溶解したリン脂質を加え、∞状のデバイスの各ウェルに緩衝溶液を加えた。この液滴の周りにリン脂質の単分子膜が形成され、液滴の接触界面に平面リン脂質 2 重膜が形成される。このリン脂質平面膜にジェット水流を印加するとリン脂質マイクロチューブが形成される。そして、リン脂質マイクロチューブが次第に変形し、最終的には大きなサイズのリポソーム(直径約 200 μm)と小さなサイズのリポソーム(直径約 5-20 μm)に分裂し、リポソームが形成された(図 1)。小さなリポソーム膜の間に残留有機溶媒が存在しないことを明らかにしている。このリン脂質チューブの不均一な分裂の様子を数値流体力学シミュレーションにより解析したところ、レイリー・プラトー不安定性がこの分裂に支配的に関与していることが示唆された。この不均一な分裂時に、リン脂質チューブ内に存在する有機溶媒も不均一に分布し大きなリポソ-

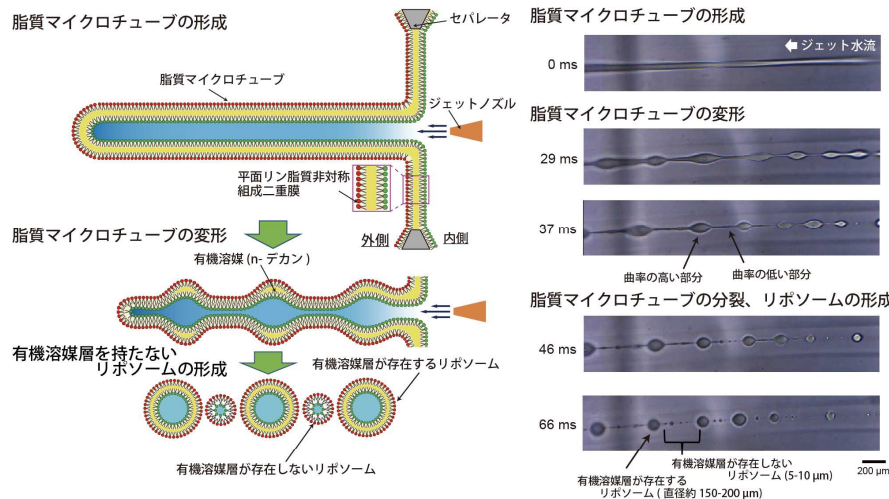


図 2. 有機溶媒層が存在しないリポソーム形成の模式図。直径約 100 から 500 マイクロメートルのマイクロ孔に接触法により、リン脂質非対称組成平面脂質二重膜を形成させる。ジェット水流を印加すると、マイクロサイズのリン脂質チューブが形成される。そして、脂質マイクロチューブが不均一に変形し、最終的に大きなサイズのリポソームと小さなサイズのリポソームに分裂する。

図 3. 本リポソーム作製法の高速度カメラ撮影。ジェット水流印加後、脂質マイクロチューブの形成が観察された。そして、この脂質マイクロチューブが徐々に変形し、曲率の高い部位と低い部分が形成された。曲率の低い部分では、有機溶媒層が存在しないリポソーム(5-10 μm)が形成され、曲率の高い部分では、有機溶媒層が存在するリポソーム(直径約 150-200 μm)が形成された。

図 1. ジェット水流印加によるリポソーム作製法の概略図と作製過程の高速度カメラ撮影。大きなサイズの小さなサイズのリポソームが形成され小さなサイズのリポソームを回収し、使用した。

ムに有機溶媒が多く存在すると考える(論文 1 参照)。

1つのデバイスチップで多種類のリン脂質非対称膜リポソームを作製できる機構を構築した。方法としては、 ∞ のウェルの片方を回転させることにより、別のリン脂質と接触することができ、多種類の平面リン脂質膜が形成される。これらの平面膜にジェット水流を印加することにより、1つのデバイスチップで多種類のリン脂質非対称膜リポソームの作製に成功した。

研究テーマ B「リポソーム内でのタンパク質発現と機能」

ジェット水流を印加してリポソームを形成する際、リポソーム内に効率良く物質を封入可能であると考えている。このリポソーム作製方法はプラスミド DNA (26 ng/ μ L)の封入効率は約 90%であった。無細胞タンパク質発現系をジェット水流でリポソーム内へ封入し、GFP の発現に成功している。次に大腸菌の分裂系の再現を目指した。無細胞タンパク質発現系によりタンパク質発現には成功したが、機能発現には至らなかった。

しかし、他の膜タンパク質をリポソームに再構成し機能発現を示している。このリン脂質非対称膜リポソームは、37°Cでインキュベートすると約 10 時間でリン脂質が完全に混和した。リン脂質非対称性を長時間維持するために、リン脂質を輸送することによりリン脂質膜の非対称性を維持する働きを持つ膜タンパク質をリン脂質非対称膜リポソームに再構成した。バキュロウイルス-リポソーム融合法を用いて、この膜タンパク質をリン脂質非対称膜リポソームに再構成した。バキュロウイルス-リポソーム融合法は、バキュロウイルスの出芽ウイルスに目的の膜タンパク質を発現させ、この出芽ウイルスをリポソームに融合させることにより、リポソームへ膜タンパク質を再構成させた。この膜タンパク質は ATP 存在下で活性化する。ATP 存在下と非存在下で脂質輸送活性が明らかに異なっていた。よって、リン脂質非対称膜リポソームに非対称膜を維持する膜タンパク質の機能の付与に成功した。

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でコネキシンを発現させ、リン脂質非対称膜の組成がコネキシンの再構成にどのような影響を及ぼすかを観察した。外膜にホスファチジルセリン/ホスファチジルコリン、内膜にホスファチジルコリンの非対称膜でコネキシンの再構成量が多くなった。また、外膜のホスファチジルセリン量を変化させた結果、外膜に 50%以上のホスファチジルセリンが存在するときに、コネキシンの再構成が増大することが分かった。コネキシンはナノポアを形成することが知られている(図 2) (論文 1 参照)。

リン脂質非対称膜リポソーム上でコネキシンの機能観察をリポソーム内に蛍光色素を封入し蛍光色素のリポソーム

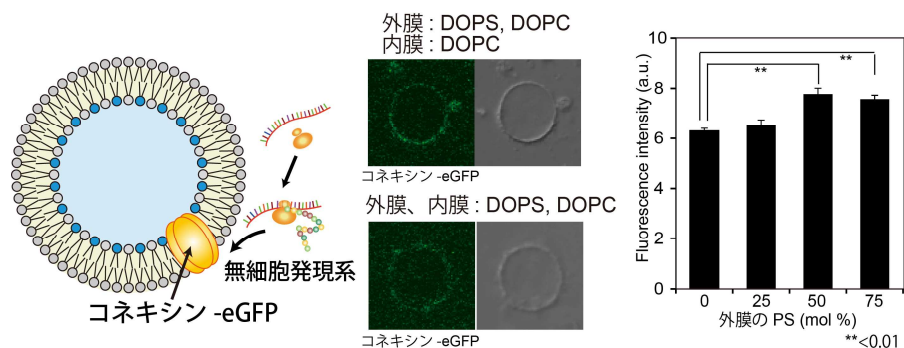


図 2. リン脂質非対称膜リポソームへの膜タンパク質の再構成。コネキシンの再構成量は eGFP の蛍光強度から判断した。

ムからの流出によって行った。その結果、リン脂質非対称膜に再構成されたコネキシンはナノポアを形成していることが分かった。また、電気生理的手法においてもコネキシンがナノポアを形成していること証明している。

研究テーマC「自己再生生産リポソームの作製」

リン脂質平面膜を2枚作製可能なデバイスを作製して、ジェット水流をこの2枚の平面膜に印加することにより、小さなリポソームが細胞サイズリポソームに内包された小胞モデルリポソーム作製に成功した。この小胞封入リポソームは、細胞の形質膜と小胞膜の関係を再現できる利点を持つ。

3. 今後の展開

リン脂質非対称膜リポソームを用いることにより膜タンパク質の再構成量の制御が可能であることが示唆された。今後の展開としては、非対称膜の影響による膜タンパク質の機能発現の差異の観察を行う。細胞膜を忠実に模倣した長期間安定なリン脂質組成非対称膜リポソームを用いることで生体分子の活性・機能評価を観察することにより、ペプチドやタンパク質の未知機能や活性条件の発見に繋がる。今回、非対称膜リポソームのハイスループット作製デバイスの構築も行った。したがって、多種類の非対称膜リポソームが作製でき、細胞膜へ与える影響を観察可能な薬剤スクリーニングに使用可能である。また、このリン脂質非対称膜リポソームは、真核生物の形質膜がなぜ非対称膜であるかという問いに対する回答が明らかできるツールになる可能性を持っている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

・研究目的の達成状況

高次な人工細胞作製に必要な技術を開発する目的で、自己再生産するリポソーム作製を目標に掲げ、それに必要なパーツを作製した。膜タンパク質が再構成可能なリン脂質組成非対称膜リポソームを作製に成功した。コネキシンに関してであるが、リン脂質非対称膜へコネキシンの再構成量の制御が可能であることが分かった。また、小胞を封入したリポソームが作製可能なデバイスや多種類のリン脂質非対称膜リポソームを作製するデバイスの構築に成功している。目標の一つに掲げた分裂するリポソームは、本リポソーム作製方法で作製したリポソーム内で分裂因子のタンパク質発現には成功したが、機能発現には至らなかった。因子の濃度や種類の選定等が必要である。

・研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

リン脂質非対称リポソームを観察するための、最新の顕微鏡システムが構築できたことで飛躍的に研究が加速した。また、このリポソーム作製の要である、ジェット水流の印加圧や印加時間を細かく設定可能なジェット水流発生装置を購入できたことで安定的な構築がなされた。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

このリン脂質組成非対称膜リポソームは、膜タンパク質が再構成できるため細胞に近い状態で膜タンパク質の素反応観察が可能になると考える。また、膜に影響をおぼすペプチドや薬剤のスクリーニングとしても利用可能であると考え。この非対称膜リポソーム研究が成熟することにより、ドラッグデリバリーの担体や食品分野への応用がなされる可能性がある。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

ジェット水流を印加することにより、1つのデバイスチップで多種類のリン脂質非対称膜リポソームの作製に成功し、独自の製法を開発した。この製法では、脂質膜の間に有機溶媒層がないことをラマン顕微鏡により確認している。そして、小さなリポソームが細胞サイズリポソームに内包された自己再生生産できる小胞モデルリポソームの作製に成功している。このように、当課題であった膜タンパク質が再構成可能なリン脂質組成非対称膜リポソームを作製できることを実証したことから、創薬スクリーニング、ドラッグデリバリーなどの多方面の研究者との連携で、その応用分野が広がることを期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kamiya K., Kawano R., Osaki T., Akiyoshi K., Takeuchi S. Cell-sized asymmetric lipid vesicles facilitate the investigation of asymmetric membranes. *Nature Chemistry*, 2016, 8, 881-889.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 日刊工業新聞(2016年6月14日)“本物並みに縮小作製 人工細胞で覆う球体“
2. 神谷厚輝「人工細胞モデルの創成」生体の科学(2014)65, 492-493.
3. 吉田昭太郎、神谷厚輝、竹内昌治、「マイクロ・ナノデバイスによる膜系システムの理解」人工細胞の創製とその応用(書籍)(2017年1月刊行予定)
4. 神谷厚輝、竹内昌治“膜タンパク質やリン脂質非対称膜を再構成した人工細胞膜の作製”細胞を創る研究会 8.0 2015年11月
5. 神谷厚輝“Preparation of artificial cell models by bottom-up approach”第53回生物物理学会年会 2015年9月