

疑似ラフト構造および疑似細胞骨格を有する人工細胞の創生
-ラフト構造と細胞骨格による膜タンパク質挙動制御へのアプローチ-
Artificial cell with pseudo-raft structure and pseudo-cytoskeleton
- Approach to membrane protein behavior by regulation of raft structure and
cytoskeleton-

奈良工業高等専門学校物質化学工学科 准教授 林 啓太

Department of Chemical Engineering, National Institute of Technology, Nara College, Keita Hayashi

要旨

リン脂質から構成されたベシクルであるリポソームはモデル細胞膜として人工細胞への応用が検討されている。リポソームに様々な分子を組み込むことで、細胞と同様に自己複製や代謝といった働きをする人工細胞が検討されている。しかし、実際の細胞膜は単一のリン脂質から構成されているのではなく、様々な種類のリン脂質や cholesterol, スフィンゴ脂質といった複数の組成より構成されており、脂質ラフトと呼ばれる他の領域よりも流動性の低い領域が存在する。脂質ラフトは膜タンパク質の足場として機能することが報告されており、より細胞に近い人工細胞を構築するためには、この脂質ラフトを正確に模倣する必要がある。また、細胞質側の細胞膜には裏打ちタンパク質と呼ばれるタンパク質が結合してネットワークを形成しており、膜タンパク質の拡散を制御している。そこで本研究では、飽和リン脂質と不飽和リン脂質の2種類から構成される単一相のリポソームに streptavidin を修飾した飽和リン脂質を添加した後、biotin を両末端に修飾した poly(ethyleneglycol) を添加することで飽和リン脂質の割合を局所的に変化させて相分離を誘導した。

1. はじめに

細胞は生物の最小単位であるが、細胞の機能を模倣したり着想を得たりした人工細胞が近年、盛んに研究されている。生物の定義はいくつか提唱されているが、そのうちの1つとして、(i) 自己と外界との境界、(ii) 自己複製、(iii) 代謝という3つ条件を満たしているものが生物である、という定義が提唱されている。例えばヒトの細胞は細胞膜によって外界と隔てられており、遺伝情報を DNA として保存して1つの母細胞は2つの娘細胞へと分裂し、取り込んだ有機物をエネルギーとして蓄え、また必要なタンパク質や脂質へと変換することから、ヒトは生物であると言える。これら3つの条件のうち

1つ以上の条件を満たしたものが人工細胞として扱われることが多い。

自己と外界との境界に関してはリン脂質ベシクル(リポソーム)によって容易に達成される。人工細胞の研究においては閉鎖小胞であるリン脂質ベシクル(リポソーム)が用いられることが多い。細胞膜はリン脂質をはじめ cholesterol (Chol) やスフィンゴ脂質といった様々な種類の脂質や多くのタンパク質から構成されており、リン脂質のみから構成されるリポソームは最も単純な細胞膜モデルといえる。リポソームは内水相と外水相を隔てることができる。つまり、リポソームを用いることで自己と外界との境界を隔てるという条件を満たすことができる。

より実際の細胞膜に近いモデルとして挙げられるのが相分離を誘導したリポソームである。細胞膜はそれぞれの脂質が均一に存在するのではなく、不均一に局在していることが知られている。最も代表的な例の1つとして脂質ラフトが挙げられる。細胞膜中には脂質ラフトと呼ばれる局所的に流動性の低い領域があり、膜タンパク質の足場として機能していることが知られている。リポソームにおいても不飽和脂質である 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC)と飽和脂質である 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), および Chol を混合することで脂質ラフトのような流動性の低い領域を有する相分離したリポソームを形成することが可能である。しかし実際の細胞において脂質ラフトは消失と形成を繰り返しており、この変化を再現することは困難である。さらに細胞膜の細胞質側は裏打ちタンパク質と細胞骨格によって細胞膜形状や細胞膜中の膜タンパク質の側方拡散は制御されており、この制御を再現することも困難である。

そこで本研究では、人工細胞における脂質ラフトの形成、および膜タンパク質の側方拡散を擬似的に再現することを目的とした。相分離は streptavidin-biotin 相互作用を用いた。複数の脂質から構成されるリポソームは相分離を形成することが報告されているが、必ずしも相分離するわけではない。例えば 25 °Cにおいて DOPC リポソームに DPPC, Chol を添加した場合、一定の割合以上の DPPC, Chol を含有していなければ相分離は誘導されず、温度を上昇させることで、相分離したリポソームは均一な相へと変化する[1]。つまり、主に DOPC から構成されるリポソームを用い、局所的に DPPC, Chol の割合が高い小さな領域を作り出すことで自発的に相分離が形成されると考えられる。DOPC,

DPPC, Chol から調製された単一相リポソームに streptavidin を修飾した DSPE (streptavidin-DSPE)を添加した。このリポソームに両末端にそれぞれ biotin を修飾した poly(ethyleneglycol) (dibiotin-PEG(2000))を添加した。Streptavidin の 4 つの結合サイトのうちの 1 つが dibiotin-PEG と結合し、複数の streptavidin が架橋されることで streptavidin-DSPE が局所的に集合し、相分離を誘導するかについて検討した。

2. 実験方法

2.1 ジャイアントユニラメラベシクル(GUV)の調製

GUV は静置水和法により調製した[2]。Chloroform 50 μ L に DOPC:DPPC:Chol=70:10:20 [mol%]の割合で脂質を溶解した。脂質の濃度は 1 mM となるように調整した。また、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (ammonium salt) (Rh-DOPE) と 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (ammonium salt) (NBD-DSPE) を 1 mM となるように chloroform に溶解し、0.5 μ L ずつ添加した。さらに methanol に溶解させた 20 mM gulucose 溶液を 25 μ L 添加した。各脂質の構造は **Figure 1** に示す。窒素中で有機溶媒を除去した。有機溶媒を完全に除去するため、一昼夜減圧乾燥を行った。その後、500 μ L の超純水を添加し、60 °Cの恒温槽で 24 h 水和し、0.1 mM GUV 懸濁液を得た。

2.2 Dibiotin-PEG(2000)の合成

Biotin 0.40 mmol を 60 °C DMF 6 mL に溶解させた。0.48 mmol NHS と 0.48 mmol *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide を添加し、60 °Cで 16 h 攪拌した。これを室温で冷却し、副生成物を沈

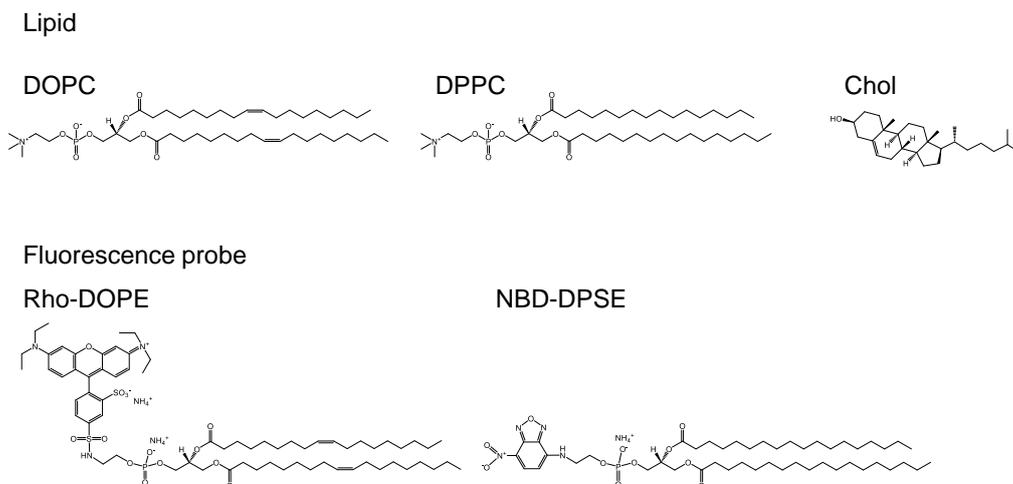


Figure 1. 各脂質，および蛍光プローブの構造.

殿させてろ過した. 多量の diethyl ether にろ液を添加することで目的物を沈殿させ, エバポレーターで溶媒を除去した. 生成物を isopropyl alcohol (IPA) で 3 回洗浄したのち減圧乾燥させ, biotin-NHS を合成した. Biotin-NHS は ^1H NMR により構造を確認した. $4.00\ \mu\text{mol}$ PEG diamine 2000 を $1.2\ \text{mL}$ acetonitrile に室温で溶解し, $48\ \mu\text{L}$ triethylamine, $600\ \mu\text{L}$ dichloromethane を添加し, これを $1\ \text{min}$ 攪拌した. $8.00\ \mu\text{mol}$ biotin-NHS を添加し, これを室温で $24\ \text{h}$ 攪拌した. 多量の diethyl ether に溶液を添加することで目的物を沈殿させ, ろ過した. 生成物を $70\ ^\circ\text{C}$ IPA に溶解して $-20\ ^\circ\text{C}$ で再結晶させ, dibiotin-PEG(2000) を合成した.

2.3 Streptavidin-DSPE の合成

Streptavidin $0.05\ \mu\text{mol}$ を超純水 $500\ \mu\text{L}$ に溶解した. そこに 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[carboxy(polyethylene glycol)-2000, NHS ester] (sodium salt) $0.05\ \mu\text{mol}$ を $5\ \mu\text{L}$ ethanol に溶解したものを添加した. これを室温で $24\ \text{h}$ 攪拌して streptavidin-DSPE を合成した.

2.4 GUV の相分離観察

$0.1\ \text{mM}$ GUV 懸濁液 $98\ \mu\text{L}$ に $100\ \mu\text{M}$ streptavidin-PEG(2000)-DSPE 水溶液 $2\ \mu\text{L}$ を添加し, $1\ \text{h}$ インキュベートした. GUV 懸濁液を $45.5\ \mu\text{M}$ に希薄した後, dibiotin-PEG(2000) を添加し, $1\ \text{h}$ インキュベートした. 蛍光顕微鏡 (IX-51-11FL/PH-S (Olympus Corp., Tokyo, Japan)) によって相分離の観察を行った.

3. 実験結果

3.1 蛍光顕微鏡による L_d/L_o 相分離の観察

異なる脂質を用いてリポソームを形成した場合, ある特定の条件で相分離することが知られている. 例えば, 不飽和リン脂質は流動性の高い相 (L_d 相) を, 飽和リン脂質は流動性の低い相 (L_o 相) を形成するが, これら 2 種類の脂質を混合することで L_d 相と L_o 相を有するリポソームが形成される. 一方, 主となる組成のリン脂質に対して異なる相を形成する脂質が十分に少ない場合, 複数の組成であったとしても均一な相のリポソームを形成する. 用いたリポソームの組成は DOPC:DPPC:Chol = 70:10:20 [mol%]

であり、均一な相を形成する。このリポソームに蛍光プローブとして Rho-DOPE, NBD-DSPE を添加して蛍光顕微鏡により観察した(**Figure 2(a)**)。Rho-DOPE と NBD-DSPE はそれぞれ L_d 相, L_o 相に分配するが、それぞれの蛍光は同じ領域で観察された。つまり、今回用いたリポソームが均一な相により構成されていることがわかる。このリポソームに dibiotin-PEG(2000) を添加して同様に観察した(**Figure 2(b)**)。その結果、異なる部分において蛍光が観察された。したがって、streptavidin-DSPE 同士が dibiotin-PEG(2000) によって架橋され、DPPC が局在化することで相分離を誘導したと考えられる(**Figure 2(c)**)。飽和リン脂質に対して、飽和リン脂質が隣接する場合と不飽和リン脂質が隣接する場合、飽和リン脂質が隣接する方がエネルギー的に安定であることが報告されている[3]。つまり、局所的な DPPC 分子の割合の増加は DOPC 分子を反発し、結果として相分離が誘導されたと考えられる。

4. まとめ

Streptavidin-DSPE と dibiotin-PEG(2000) を用いた streptavidin-biotin 相互作用によって相分離を誘導することに成功した。また、さらにこのリポソームの内水相に DNA オリガミを内包し、細胞骨格を模倣する予定であったが、研究は相分離を達成するまでとなった。核染色として用いられる 4',6-diamidino-2-phenylindole や抗がん剤として用いられる doxorubicin は DNA の二重螺旋構造に入り込むことが知られている。同様に azobenzene も DNA の二重螺旋構造に入り込むことができる。二重螺旋構造に入り込んだ *trans* 型 azobenzene に UV を照射すると *cis* 型に異性化する。この光異性化による立体障害により DNA は解かれる。時間経過とともに、DNA は再度二重螺旋構造を形成する。一部の DNA の末端に cholesterol を修飾し、cholesterol をアンカーとして DNA はリポソーム膜に組み込まれて DNA ネットワークを形成する。このリポソームに UV を照射するとともに、dibiotin-PEG(2000) を添加することで、相分離が誘導され、細胞骨格を模倣した DNA ネットワークが

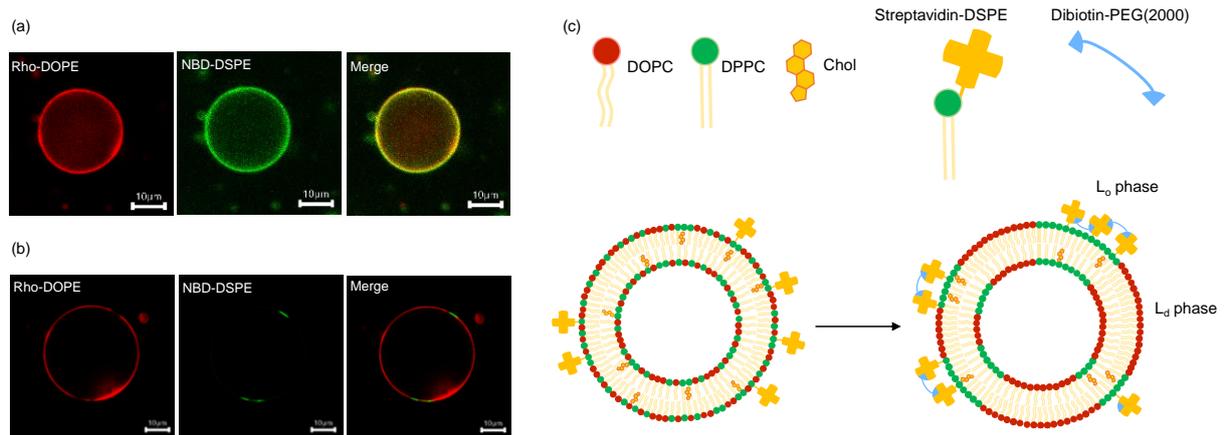


Figure 2. (a) Dibiotin-PEG(2000) 添加前、および (b) dibiotin-PEG(2000) 添加後における蛍光顕微鏡画像。 (c) Dibiotin-PEG(2000) による相分離誘導メカニズムに関する模式図。

組み変わり, L_o相のみにタンパク質を閉じ込めた状態にすることができる。これは, 現在膜タンパク質の拡散として提唱されている裏打ちタンパク質によって形成された区画内で膜タンパク質の拡散が留まる動きを再現できると考えられる。

謝辞

本研究は大阪公立大学大学院理学研究科 化学専攻 講師 三枝栄子先生との共同研究です。

また、本研究を援助していただいた公益財団法人京都技術科学センターに感謝いたします。

参考文献

- [1] S. L. Veatch, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **104** 17650 (2007)
- [2] K. Tsumoto, *et al.*, *Colloids Surf. B*, **68** 98 (2009)
- [3] C. Wang, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **137** 664 (2015)