



パターン化人工膜を用いた生体膜機能の解析

森垣, 憲一

(Citation)

生物物理, 59(4):188-191

(Issue Date)

2019-07-25

(Resource Type)

journal article

(Version)

Version of Record

(Rights)

© 2019 by THE BIOPHYSICAL SOCIETY OF JAPAN

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/90006346>



総説

パターン化人工膜を用いた生体膜機能の解析

森垣憲一 神戸大学バイオシグナル総合研究センター

Functional roles of the membrane heterogeneity such as rafts are one of the fundamental questions in cell biology. Model membranes are emerging as an important tool for understanding the biological membrane, providing quantitative information of membrane proteins and lipids. We developed a patterned bilayer composed of liquid-ordered (Lo) and liquid-disordered (Ld) phases as a model of raft, and evaluated the partition coefficients of membrane proteins between Lo and Ld phases to gauge their affinities to lipid rafts (raftophilicity). Quantitative information attained by the model membranes is critical for elucidating the membrane functions including raft, the ubiquitous yet enigmatic membrane heterogeneity.

biological membrane / raft / GPCR / model membrane / supported membrane

1. はじめに

生体膜は、脂質二分子膜を基本構造とする 2 次元の液晶であり、分子が側方拡散して会合や相互作用できることが膜機能に重要な役割を果たす。生体膜においては分子が均一に分布しているのではなく、特定の脂質とタンパク質が動的なドメイン構造を形成しているものと考えられている。特に、飽和脂質、コレステロールが濃縮した「脂質ラフト」が情報伝達など生体膜機能に重要な役割を果たすことが近年の研究より推定されている¹⁾。しかし、脂質ラフトはサイズが数ナノメートルから数十ナノメートルしかない微小かつ動的な構造であると推測され、その存在や機能的役割はまだ充分には分かっていない²⁾。細胞膜で多様な信号を受容し医薬品の主要標的分子である G タンパク質共役型受容体 (GPCR) も、機能調節にラフトが関わると考えられている^{3),4)}。しかし、GPCR のラフトとの相互作用や機能調節機構の検証はその動的かつ微小な構造ゆえに困難である。

我々は生体膜を単純化したモデル系を固体基板表面に構築して、脂質や膜タンパク質の物性や機能を定量的に評価する技術を開発してきた^{5),6)}。ガラスなどの親水性基板表面において、光重合性脂質からなる脂質二分子膜を光リソグラフィー技術でパターン化重合し天然由来の流動性を持つ脂質膜と組み合わせることで、パターン化人工膜を形成できる。その応用例として、コレステロールが濃縮し膜厚や物性がラフトに類似した膜領域への膜タンパク質の分配を計測すること

で、ラフト親和性を評価することが可能になる。この総説ではパターン化人工膜の特徴や物性を概説し、生体膜研究に活用するための可能性と課題について述べる。

2. 人工膜の系譜

生体膜を単純化したモデル系 (人工膜) は、これまで生体膜の構造や機能に対する理解に大きく貢献してきた (図 1)⁷⁾。最も初期の人工膜としては、ラングミュア単分子膜が挙げられる。脂質分子が水面 (水 / 空気界面) に形成する単分子膜は、生体膜の基本構造が二分子膜であることを推定する基礎となった。その後、閉じた球形構造を持つ脂質二分子膜 (ベシクルもしくはリポソーム) やテフロン板に微細な穴を開けて脂質膜を張った黒膜 (Black lipid membrane: BLM) を用いて、脂質膜の物質透過性、側方拡散 (流動性)、非対称性などの物性が研究され、Singer-Nicolson による流動モザイクモデルの提唱につながっている。一方、1980 年代には、固体基板表面に脂質二分子膜を物理的相互作用もしくは化学結合で平面状に吸着した人工膜 (Substrate supported planar bilayer: SPB) が開発された⁸⁾。ガラスなどの親水性基板では、物理的相互作用によって吸着した脂質膜と基板との間には水和層が存在するため⁹⁾、脂質分子が生体膜と同様に側方拡散することができる。SPB には、他の形態の人工膜と異なるユニークな特徴がある。1) 固体基板に支持されているためベシクルや BLM に比較して機械的安定

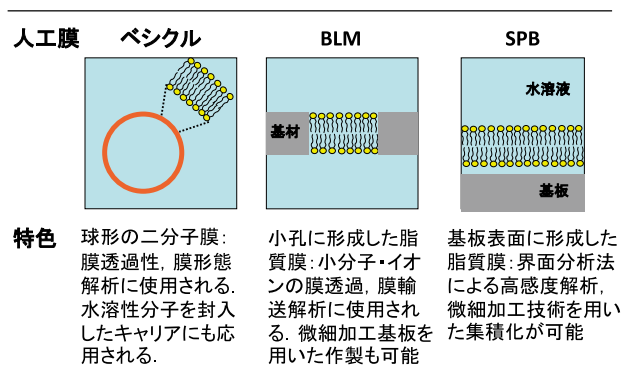


図 1 生体膜を単純化したモデル系（人工膜）の種類と特色.

性が高い, 2) 固液界面に存在するので界面分析手法 (例: 表面プラズモン共鳴 (SPR)) によって高感度に分析することが可能である, 3) 半導体微細加工技術を用いることで2次元のパターン化・集積化が可能である¹⁰⁾. そのため, これまでも SPB を用いて生体膜機能の研究が多くなされてきた¹¹⁾.

3. パターン化人工膜

SPB の高感度分析, 集積化を活用し, 脂質二分子膜の安定性を向上するため, 我々は光重合性を持つリン脂質から形成された二分子膜をパターン化重合し, 生体膜に存在する天然リン脂質二分子膜と組み合わせるパターン化手法を開発してきた (図 2)^{5), 6)}. 重合性リン脂質は, 熱や光により重合する官能基を分子中に持つ合成脂質で, リポソームを安定化して医薬品用カプセルに用いることを目的として開発されてきた¹²⁾. その中で, 我々は光重合性部位としてジアセチレン基を持つホスホコリン (DiynePC) を用いてポリマー脂質膜を作製した (図 2B). DiynePC には 1 分子あたり 2 カ所のジアセチレン基があるため, 二分子膜中で光重合すると架橋された 2 次元ポリマーができる. フォトマスクを用いて脂質膜に紫外光照射することでパターン化光重合を行い, 光照射しなかった部位からモノマー脂質膜を界面活性剤で選択的に除去すると, パターン化ポリマー膜が形成される. そして, 天然の生体膜を模倣した脂質組成を持つ脂質膜をベシクル融合法により導入することで, ポリマー脂質膜と生体由来の脂質膜がハイブリッド化される (図 2C). 生体由来の脂質膜は, 分子が側方拡散できるという生体膜の基本物性 (流動性) を保持しており, 生体膜のモデルとなる. ポリマー脂質膜は, 生体由来の脂質膜と同じ二分子膜構造を持っているため, 脂質分子の拡散障壁と

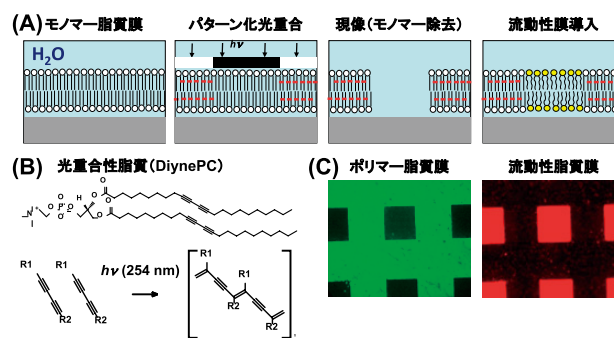


図 2 光重合性リン脂質 (DiynePC) を用いたパターン化人工膜作製技術: (A) パターン化工程, (B) 光重合性リン脂質, (C) ポリマー脂質膜と流動性脂質膜の蛍光画像 (区画サイズは 50 μm).

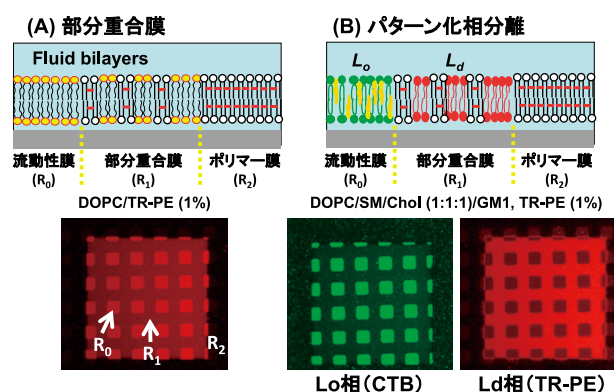


図 3 パターン化相分離膜: (A) 単一脂質膜 (DOPC/TR-PE) 導入, (B) 混合脂質膜 (DOPC/DPPC/Chol/GM₁/TR-PE) 導入による自発的パターン化相分離.

して働くだけでなく, 流動性脂質膜を側方から支持して安定化する効果がある¹³⁾.

我々は, パターン化人工膜において脂質膜のパターン化相分離を引き起こし, 脂質ラフトのモデル系を形成する技術を開発した¹⁴⁾. 光重合時に紫外光照射量を調節してポリマー脂質膜形成量を制御することで, ポリマー脂質膜と流動性脂質膜が 25 \pm 10 nm 程度のドメイン構造として混合された部分重合膜を形成できる (図 3)⁶⁾. ポリマー脂質膜を全く含まない領域 (R₀) と部分重合膜領域 (R₁) からなるパターン化ポリマー膜に, 単一脂質 (DOPC) および蛍光プローブ (TR-PE) からなる流動性脂質膜を導入した場合, R₁ では流動性脂質膜の面積がポリマー脂質膜により減少しているため, TR-PE の蛍光は R₁ よりも R₀ において強く観測される (図 3A). 一方, 脂質分子混合膜 (不飽和リン脂質 (DOPC), 飽和リン脂質 (DPPC), コレステロール (Chol)) を導入すると, DPPC と Chol が濃縮した秩序液晶相 (Liquid ordered phase (Lo)) と, DOPC が濃縮した不秩序液晶相 (Liquid disordered

phase (Ld)) がパターン化相分離することが示された (図 3B:Ld 相 マーカー (TR-PE), Lo 相 マーカー (糖脂質 G_{MI} に結合するコレラ毒素サブユニット B:CTB) を観察). Ld 相が部分重合膜に濃縮するのは, Ld 相の方が Lo 相よりも曲げ弾性率 (κ) が小さいため, ポリマー膜との境界において局所的に生じる膜ゆがみのエネルギーコストが相対的に低いことが原因であると考えられる.

4. 膜タンパク質と脂質ラフトとの親和性解析

脂質ラフトの実態はまだ解明されていないが, 膜内のタンパク質・脂質組成の動的なゆらぎによって局所的にコレステロールや飽和脂質が濃縮された部位と見なされている. 従って, パターン化相分離 Lo/Ld 相において, コレステロールが濃縮し膜厚や物性がラフトに類似した Lo 相への膜タンパク質の分配を測定することで, 生体膜における脂質ラフトとの相互作用 (ラフト親和性) の指標とすることができると考えられる¹⁵⁾. 従来はトライトン X-100 を用いた抽出における不溶画分がラフト組成と定義されてきたが, ラフト親和性の定量的評価は困難であった. パターン化人工膜を用いたラフト親和性定量を検証するため, 代表的 GPCR である光受容体ロドプシンを用い Lo/Ld 相への分配を計測した¹⁶⁾. ウシガエル (*Rana catesbeiana*) 由来のロドプシン (Rh) および G タンパク質トランスデュシン (Gt) を蛍光標識して, パターン化相分離した人工膜に再構成し, 全反射蛍光顕微鏡による 1 分子蛍光観察を行った (図 4). 膜貫通型タンパク質である Rh は, 視細胞円板膜から界面活性剤 (オクチ

ルグルコシド) を用いて可溶化し, あらかじめ形成したパターン化相分離膜表面において界面活性剤を含まないバッファーで急速希釈することで脂質膜に再構成した. 膜内で 2 次元拡散する Rh と Gt を観察することで拡散速度や Lo/Ld 相分配を決定できる. Rh と Gt が活性を維持していることは, 光照射で活性化した Rh (Rh^*) に Gt が結合して Gt の拡散速度が低下すること, さらに GTP を加えると Gt が Rh より解離して拡散速度が再度上昇することから確認した. ラフト親和性 (P^{raft}) は, Ld 相に局在することが既に分かっている Rho-PE を参照分子として用い, Lo 相および Ld 相における分子密度 (d^{Lo}, d^{Ld}) から次の式で算出した.

$$P^{raft} = d^{Lo} / (d^{Lo} + d^{Ld})$$

P^{raft} は 0 と 1 の間の数値となり, 数値が高いほどラフト親和性が高い (0 では 100% 非ラフト領域に分配, 1 では 100% ラフト領域に分配). Rh 単量体と Gt は, P^{raft} がそれぞれ 0.19, 0.27 となり, 非ラフト領域への局在を示した. これは, 従来の生化学的手法による定性的な結果と一致している¹⁷⁾. 以上の結果から, Rh と Gt をパターン化人工膜に再構成し, ラフト親和性を定量する技術を確認できた. 現在, 光シグナル伝達に關与する分子群や, ロドプシン以外の GPCR について, ラフト親和性の系統的検討を進めている. これまで定性的な知見しか得られていなかったラフト親和性を定量測定することで, シグナル伝達機能に対するラフトの影響を定量的に評価することが可能になるものと考えられる. ラフトの存在や様態が様々な角度から議論される中, このような単純化された系で得られた物性値に生物学的な意義があるか疑問視する見方もあるものと思われる. しかし, 生物における議論が複雑で混沌とした状況であるほど, 分子の物性を規格化された方法論を用いて取得し, 議論を整理することが今後重要になるものと考えられる.

5. まとめと展望:人工膜に求められるもの

生体膜は生命が長年の進化により築いてきた超分子システムであり, 多くの分子が関与するダイナミックな自己組織化現象である. その構造や機能の理解には, 分子の自己組織化をボトムアップ的に操作する人工膜が有効であり, 流動モザイクモデル, 脂質ラフトなどの重要な概念を形成してきた. 一方, 現在, 遺伝子組換えにより細胞に目的タンパク質を発現して解析する手法が主流となり, かつて大きな流れとなってい

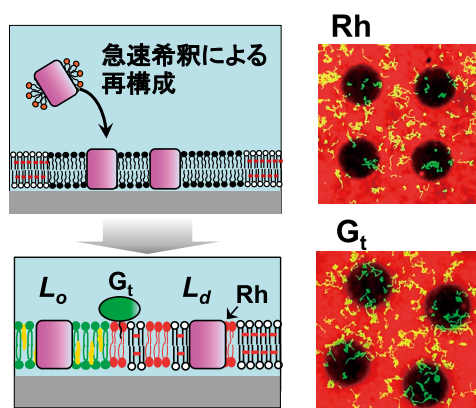


図 4 パターン化相分離膜への Rh, Gt 再構成と 1 分子蛍光観察. (左) 概念図. (右) 蛍光顕微鏡観察 (赤色:TR-PE が濃縮した R_1 , 黄色: Rh, Gt 分子の軌跡). Rh と Gt は, それぞれ Cy7, Hilyte Fluor 750 で蛍光標識した. 画像の一部は文献 15 より転載された.

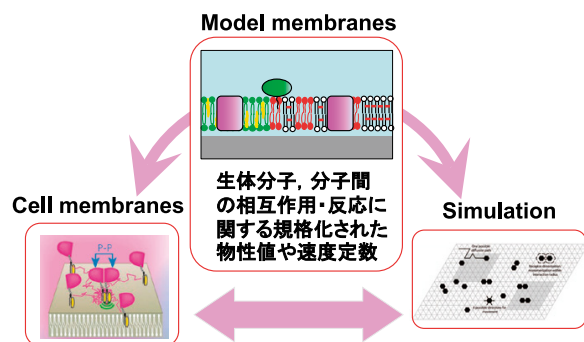


図5 生体膜機能解析のために人工膜に求められるもの（概念図）。画像の一部は文献2, 17より転載された。

た生化学的手法や再構成を用いた人工膜での解析は傍流となっている印象をうける。また、計算技術の発達に伴うシミュレーションの興隆が現在の顕著な流れになっている¹⁸⁾。そのような中で人工膜や生化学手法は、生体膜研究において、生体分子や分子間の相互作用、反応定数に関する規格化された物性値や速度定数を提供することで、細胞や生体を用いた *In vivo* 研究とシミュレーションによる *In silico* 研究をつなぐ役割を果たすのではないかと（図5）。これまでの人工膜は比較的単純な構造のものが多く、得られる情報の定量性やスループットに限界があった。現在、微細加工技術や新しい計測・イメージング技術と組み合わせられることによって、人工膜に大きな技術革新が起こり、膜タンパク質を含む膜機能を定量的に評価するための強力なツールが生まれつつある。特に、SPBは集積化、高感度分析などの特性ゆえに、今後大きな発展が見込まれる。我々がこれまでに開発してきたパターン化人工膜は、ポリマー脂質膜と生体脂質膜とを組み合わせることで安定性を確保し、形状や脂質組成を設計することで、膜機能を定量的に解析する強力なツールとなることをめざしている。今後、幅広い膜タンパク質や脂質の機能解析を行ってゆくためには、膜と基板との距離制御¹⁹⁾、膜タンパク質の再構成、ナノ空間との融合²⁰⁾など、多くの技術革新が必要である。

本研究は、科研費（#26291031, #17H03666, #17KT0024）およびひょうご科学技術協会の支援をいただき、林文夫博士、谷本泰士博士（神戸大学）との共同研究として遂行されました。ここに厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Lingwood, D., Simons, K. (2010) *Science* **327**, 46-50. DOI: 10.1126/science.1174621.
- 2) Suzuki, K. G. N. *et al.* (2012) *Nat. Chem. Biol.* **8**, 774-783. DOI: 10.1038/nchembio.1028.
- 3) Gahbauer, S., Böckmann, R. A. (2016) *Front. Physiol.* **7**, 494. DOI: 10.3389/fphys.2016.00494.
- 4) Zheng, H. *et al.* (2012) *BMC Cell Biol.* **13**, 6. DOI: 10.1186/1471-2121-13-6.
- 5) Morigaki, K. *et al.* (2001) *Angew. Chem., Int. Ed.* **40**, 172-174. DOI: 10.1002/1521-3773(20010105)40:1<172::aid-anie172>3.3.co;2-7.
- 6) Okazaki, T. *et al.* (2009) *Langmuir* **25**, 345-351. DOI: 10.1021/la802670t.
- 7) Edidin, M. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 414-418. DOI: 10.1038/nrm1102.
- 8) Sackmann, E. (1996) *Science* **271**, 43-48. DOI: 10.1126/science.271.5245.43.
- 9) Miller, C. E. *et al.* (2005) *Phys. Rev. Lett.* **94**, 238104. DOI: 10.1103/physrevlett.94.149902.
- 10) Groves, J. T., Boxer, S. G. (2002) *Acc. Chem. Res.* **35**, 149-157. DOI: 10.1021/ar950039m.
- 11) Iversen, L. *et al.* (2014) *Science* **345**, 50-54. DOI: 10.1126/science.1250373.
- 12) Mueller, A., O'Brien, D. F. (2002) *Chem. Rev.* **102**, 727-757. DOI: 10.1021/cr000071g.
- 13) Okazaki, T. *et al.* (2006) *Biophys. J.* **91**, 1757-1766. DOI: 10.1529/biophysj.105.080507.
- 14) Okazaki, T. *et al.* (2010) *Langmuir* **26**, 4126-4129. DOI: 10.1021/la9032892.
- 15) Lorent, J. H. *et al.* (2017) *Nat. Commun.* **8**, 1219. DOI: 10.1038/s41467-017-01328-3.
- 16) Tanimoto, Y. *et al.* (2015) *Biophys. J.* **109**, 2307-2316. DOI: 10.1016/j.bpj.2015.10.015.
- 17) Seno, K. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 20813-20816. DOI: 10.1074/jbc.c100032200.
- 18) Fallahi-Sichani, M., Linderman, J. J. (2009) *PLoS ONE* **4**, e6604. DOI: 10.1371/journal.pone.0006604.
- 19) Nishimura, T. *et al.* (2017) *Langmuir* **33**, 5752-5759. DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b00463.
- 20) Ando, K. *et al.* (2016) *Langmuir* **32**, 7958-7964. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b01405.



森垣憲一

森垣憲一（もりがき けんいち）

神戸大学バイオシグナル総合研究センター准教授
1998年スイス連邦工科大学（ETH）化学科博士
課程修了，同年ドイツマックスプランク高分子研
究所博士研究員，2000年ETH博士研究員，2002
年産業技術総合研究所研究員，2007年同研究所
主任研究員，2009年より現職。

研究内容：生体膜の構造・機能
連絡先：〒657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町
1-1

E-mail: morigaki@port.kobe-u.ac.jp

URL: <http://www2.kobe-u.ac.jp/~morigaki/>