

単一巨大リポソーム法による脂質膜にフラボノイドが誘起した孔構造の可視化の研究

[1] 組織

代表者：丹波 之宏

(鈴鹿工業高等専門学校)

対応者兼分担者：山崎 昌一

(静岡大学電子工学研究所)

[2] 研究経過

ある種のペプチドや小分子は、脂質膜の構造変化を誘起し脂質膜に孔（ポア）を形成させる。これらの外来物質がどのようなメカニズムで生体膜のバリア機能を破壊し膜中にポアを形成するのか、またどのような構造のポアを誘起するのかは興味深く、その脂質膜との相互作用の研究が活発に行われてきたが未だ不明な点が多い。一般に外来物質と生体膜/脂質膜の相互作用の研究は、直径数百 nm 程度の脂質膜の袋状の構造体、リポソーム あるいはベシクル(LUV)を多数含む懸濁液を用いて蛍光分光法などの測定により行われる。しかし、この方法では多数の LUV についての集団平均の測定となるため、リポソーム 1 個の構造や物理量の変化といった素過程の情報は得ることができない。そのため、これを脂質膜に誘起されたポア構造の探求といった研究に用いるには限界がある。一方、近年、直径 10 μm 以上の巨大なリポソーム (GUV) を利用した方法論である単一 GUV 法が、脂質膜と外来物質の相互作用の研究に有用である事が示された。単一 GUV 法では、GUV 一個の構造や物理量の変化を、多くの“一個の GUV”に対して測定し、それらの物理量を統計的に解析することで生体膜の構造・機能・ダイナミクスを明らかにする。従って GUV の脂質膜に形成されるポアの動的構造をイメージングできれば、単一 GUV 法により外来物質によるポア形成のメカニズムの詳細を明らかにできる。

従来このような研究に困難があった点は次の 2 点にある。1 つは外来物質が脂質膜に誘起するポアの直径が多くの場合数十 nm~数 nm と微小であり、その構造の詳細が得難かったこと[1]。もう 1 つは、ポア形成の初期段階が 33ms 以下で起きるなど非常に高速であったため通常の計測方法ではポアの動的構造を捉えきれなかった事があげられる。これらの

困難のうちポアの大きさについては、我々が発見したフラボノイドの一種であるエピガロカテキンゲレート (EGCg) が脂質膜に誘起するポアは直径数 μm と巨大であり[2]、光学顕微鏡によるポア構造のイメージングが可能である。そこで本プロジェクトでは、非常に高速で起こるポアの形成初期段階を含めた EGCg が脂質膜に誘起するポアの動的構造を可視化する。

本プロジェクトは本年度が初年度であった。その研究活動状況の概要を記す。まず、数 ms の時間分解能で GUV の脂質膜の状態をイメージングする測定系を作り上げた。これは、脂質膜に少量の蛍光プローブが混合された GUV を作成し、これを蛍光顕微鏡を介した高解像度、高速撮影が可能な CMOS カメラにより測定する事で可能にした。次いで、単一 GUV 法により脂質膜と EGCg の相互作用を測定し、EGCg が脂質膜に誘起したポア構造を、形成初期段階から視覚化することに成功した。その相互作用の詳細は検討中であるが、この結果は EGCg が脂質膜に誘起したポアの形成メカニズムを考える上のみではなく、脂質膜の安定性を考える上でも非常に示唆に富んだものとなった。なお、以上の研究打ち合わせには、電子メール等を用いた。

[1] J. Phys. Chem. B, 114, 12018-12026 (2010)

[2] Biophys. J., 92, 3178-3194 (2007)

[3] 成果

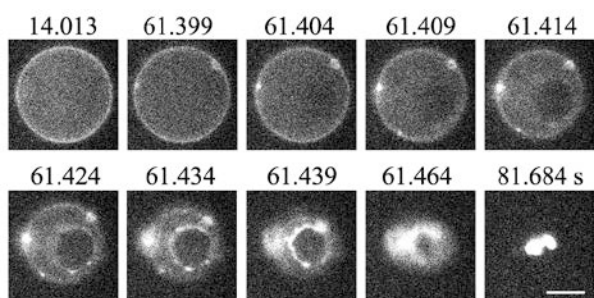
(3-1) 研究成果

観察に用いた GUV には、蛍光標識された脂質である TexasRed-DHPE を 0.2mol%混合させた。脂質膜中の蛍光プローブの含有量が高いほど、脂質膜を蛍光顕微鏡で観測した際のコントラストは良くなる。しかしそれと相反して、調べたい脂質膜の物性が変わってしまう。0.2mol%の含有量は一般的な脂質膜の蛍光観察で用いられる量と比較し十分に低濃度である。また、使用した冷却 CMOS カメラの量子効率波長 600nm 辺りで最大値をとり 70%以上を示す。TexasRed の励起波長は 595nm、蛍光波長は 615nm であるので、TexasRed は今回の目的に最も適した蛍光プローブの一つである。なお、蛍光プ

ローブはその励起状態において化学的な反応性が高くなり、徐々に退色していく。これを防ぐため、想定している5分間程度の観測で退色が十分無視できるほどに励起光の光量を十分に落とした。

数msの時間分解能でのGUVの観測にあたっては、大きな問題があった。一般的な水銀ランプおよびその電源を光源としたところ、その高い時間分解能がゆえに、撮影した画像には水銀ランプの60Hzノイズが如実に表れてしまった。すなわち、CMOSセンサーの画素読み出し方向に沿った弱い輝度差が生じた。これは通常大きな問題とならないが、今回の実験系の場合、露光時間の短さ、脂質膜中の蛍光プローブの含有量の低さ等から、脂質膜の観測のためにコントラストを極端に上げる必要があった。そこで60Hzノイズの低減のために、顕微鏡の視野下で数pAの電流測定を行うパッチクランプ法の用途にも耐える水銀ランプと電源を用いた。これにより蛍光プローブとバックグラウンドの輝度差が得られない条件下での脂質膜の観測が可能となった。一方、本実験系では、高時間分解能の計測に伴い最大800Mbyte/sの大容量データが発生する。これには500Mbyte/sの書き込み速度を持つソリッドステートドライブ(SSD)を4つ用いたRAID0を構築し対応した。高性能なワークステーションと組み合わせることで画像データを欠落させずに記録する事が可能となった。

次に、EGCgが脂質膜に誘起するポアの観測を試みた。中性のリン脂質膜からなるGUVを作成し、pH7.4の条件下でマイクロピペットを用いてGUVの周辺の溶液を100 μM EGCg水溶液に置換した。下にその蛍光観察の結果を示す。



画像の上にある数字は、EGCgとの相互作用を開始してから秒数である。スケールバーは10 μm。輝度の高さは、脂質膜に含まれる蛍光プローブTexasRedによるもので脂質膜の分布を示している。GUVは様々な形状をとるが、測定では球形のGUVとEGCgとの相互作用を調べた。測定には40倍の対物レンズを用いており、その被写界深度に由来して円形状に輝度の高い分布がみられた。EGCgとの相互作用を開始してから61.399 s後までは、GUV

の外周に輝点が確認される他に目立った変化は見られなかった。ところが、その5 ms後の61.404 s後、突然膜中に脂質の密度が薄い領域が観測された。それに伴いGUV外周の輝点は急速に輝度を増した。61.414 s後には脂質膜の欠損も明瞭になり明確なポアとして観測された。ポアの縁の輝度も次第に大きくなり、それにつれてGUVは、その直径を小さくし、やがて小さな脂質の塊となった。以上のように、EGCgが脂質膜に誘起するポアをその形成初期段階からイメージングする事に成功した。

(3-2) 波及効果と発展性など

以上の結果はEGCgが脂質膜に誘起するポアの形成メカニズムや脂質膜の安定性を考える上で非常に有益な情報を与えた。まずX線の小角散乱の実験よりEGCgにより脂質膜どうしが密着し、その膜間距離が非常に小さくなることが知られている。EGCgによりポア形成がなされた後の輝点は、このEGCgと脂質膜の複合体を示していると考えられる。今回の測定結果は、GUVの脂質膜が折りたたまれコンパクトな構造へ転移する過渡的な現象を捉えている。複合体の形成は、脂質膜に引っ張り張力をあたえるが、一方で脂質膜は欠損領域があるとエネルギー的に不安定になるため引っ張り張力に逆らうような線張力(脂質の欠損領域を塞ぐ向き)を発生する。この力学的なバランスが崩れた時、協同現象的に一気に複合体の形成が進む。この際に脂質膜にポアが形成されるが、それは脂質の拡散速度よりも早く、欠損領域が明瞭なポアとして観測されるのは力学的なバランスが崩れてから10 msほど後となる。

脂質膜に人為的な引っ張り張力を与えた際にできるポア構造に関しては詳細な力学モデルが提出されているが、外来物質が脂質膜に誘起するポアの動的構造や、その力学的安定性は、ほとんど明らかにされてこなかった。さらに、ポア形成は非常に高速で起こるため、外来物質による場合はもちろん、膜に人為的な張力を加えた場合についても、その構造変化の詳細は不明なままであった。本プロジェクトで明らかにされたポア形成直前に存在する脂質膜欠損領域の存在は、従来のEM-CCDカメラによる実験系では捉える事が出来なかった事象である。時間・空間分解能により優れた冷却CMOSカメラによる実験系の構築により初めて観測が可能になった。本実験系は、ポアの形成メカニズムや脂質膜の安定性を調べる上での強力なイメージング手法を提供する。

[4] 成果資料

本プロジェクトの成果は、さらなる詳細な検討を踏まえ学術雑誌に速やかに投稿をする予定である。

3ページ目：1段組

出張報告（特別教育研究経費を使用した場合）

使用なし