

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。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 33 ms 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。しかしポア構造の動的なイメージングが可能となればポア形成のメカニズムに関して多くの情報を得られると期待される。

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。しかし近年、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。先に記した2つ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ガレート (EGCg) が GUV の脂質膜に誘起するポアは直径数 μm と巨大であり[2]、光学顕微鏡によってポア構造の直接的な観測が可能である。そこで本プロジェクトでは、単一 GUV 法に基づき脂質膜に形成されるポア構造の形成初期段階からのイメージングおよび、その解析を試みた。

本プロジェクトは今年度で2年目となる。昨年度はまず、5 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。脂質膜に少量の蛍光プローブを混合させた GUV を蛍光顕微鏡を介した高解像度、高速撮影が可能な冷却 CMOS カメラにより測定する系である。この実験系と単一 GUV 法を用い脂質膜と EGCg の相互作用を測定し、EGCg が脂質膜に誘起したポアの動的構造を得ることに成功した。しかしポア形成のメカニズムを論ずるには、より鮮明に脂質膜の状態を計測し時間分解能も上昇させる必要があった。そこで今年度は実験系を改良し、より高時間分解能での測定を試み成功した。これによりポアの形成初期段階からの高時間分解イメージングが可能となり、詳細なポアの動的構造の解析が行えるようになった。そこで脂質膜のコレステロール (Chol) 含有量を変え、脂質膜の物性がポアの動的構造に与える影響を調べた。この解析結果は脂質膜に EGCg が誘起するポアの形成メカニズムや安定性を考える上で示唆に富むものになった。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)

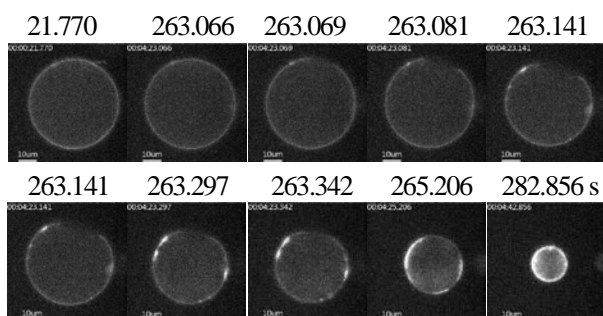
[3] 成果

(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。脂質膜物性への影響を考慮すれば、含有させる蛍光プローブはなるべく低濃度としたい。しかし時間分解能を向上させるため TexasRed-DHPE の含有量を昨年度に実験系を立ち上げた際に用いた 0.2mol% から 0.4mol% と

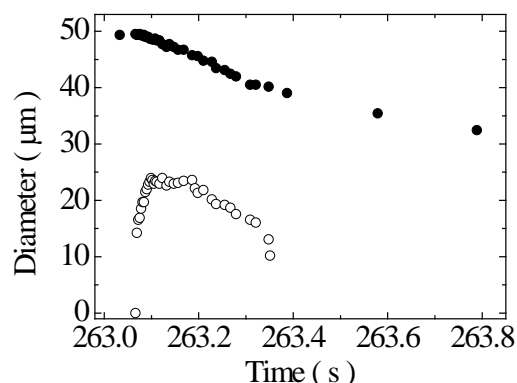
した。また、ポア構造を鮮明に撮影するためには焦点深度を深くする必要があった。これに最も影響を及ぼすのは対物レンズの倍率であるが、GUV の大きさと空間分解能の兼ね合いから、主に 40 倍の対物レンズを昨年度と同様に用いる事となった。焦点深度、空間分解能、時間分解能、撮影された画像のコントラストはそれぞれ相反する課題であり、現状でも実験系を改良するための余地がある。実験系における他の要素、冷却 CMOS カメラの使用、および記録用のドライブとしてソリッドステートドライブ (SSD) 4 基からなる仮想ディスク (RAID0) を用いたこと等に大きな変更点はない。

次に EGCg が脂質膜に誘起するポアの観測結果を示す。GUV は中性のリン脂質膜からなる。EGCg との相互作用は pH 7.4 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 水溶液に置換することで行った。



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。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。EGCg との相互作用を開始してから 263.066 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 3 ms 後の 263.069 s 後、突然、脂質膜中にポアが形成された。その後、ポアの直径は大きくなり成長を続けた。一方、GUV 外周の輝点の輝度が高くなり始めると、それにつれて GUV は小さくなり始めた。これに伴い成長を続けていたポアは一転して、その直径を小さくしていった。GUV は最終的には小さな脂質の塊となった。以上の GUV とポアの直径の経時変化を右上のグラフに示した (●, GUV の直径; ○, ポアの直径)。

続いて GUV の脂質膜に Chol が含まれる場合についても同様な方法で EGCg が誘起するポア構造のイメージングを試みた。Chol 含有脂質膜においては EGCg によるポアの形成確率が著しく低下する。従って、形成されるポアは不安定で、その寿命が短くすると予想された。しかし、さらなる検討が必要な段階ではあるが、ポア形成後のポアの成長速度は Chol 含有



脂質膜の方が高い数値を示し、脂質膜には急激に巨大なポアが出現した。

(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。Chol の存在は、この線張力を増大させるため、ポア形成を著しく阻害する。しかし線張力に勝る引っ張り張力が発生した場合はポアの形成がなされる。ポアの安定性の古典的なモデルによると、ポアの安定性には引っ張り張力がポア半径の 1 乗で、線張力はポア半径の 2 乗で寄与する。そのため、一度ポアが形成されれば、Chol を含有した脂質膜におけるポアの方が急激な成長を示したものと考えられる。

以上の結果は従来のイメージング技術では得られなかったものである。ビデオレートの 10 倍以上の時間分解能をもつ本実験系において始めて明らかになった。また外来物質が誘起するポアの動的構造を、その形成初期段階から詳細にイメージングした例もかつてない。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

(1) The 52th Annual Meeting of Biophysical Society of Japan, 2P216

(2) 第 11 回 日本カテキン学会 年次学術大会 抄録集 C11-10