

単一 GUV 法を用いた生体膜の構造・機能・ダイナミクスの解析

静岡大学・創造科学技術大学院・統合バイオサイエンス部門

山崎 昌一

smyama@ipc.shizuoka.ac.jp

<1> 生体膜や脂質膜の構造・機能を制御する分子間相互作用 [1-4]

生体膜は種々の脂質や蛋白質が弱い分子間相互作用で自己集合した超分子集合体である。従って、生体膜やそのモデル膜である脂質膜の構造・機能・ダイナミクスを理解するためには種々の分子間相互作用を理解することが重要である。特に、生体膜/脂質膜の膜界面の構造や機能、および蛋白質やペプチドなどの外来分子の脂質膜界面への結合は、生体膜のドメインの形成や細胞内の情報変換の制御、それらの膜への挿入、および膜構造の変化などで重要な役割をしている。これらは脂質膜の界面と外来分子の間の分子間相互作用でその特性が決まっている。一方、細胞の内部では複雑な静的構造をもつ多様な生体膜が存在し、それらは内外の刺激に応じてすばやい生成・消滅を繰り返しており、またベシクルの会合、膜融合、膜分裂など生体膜の動的構造変化もたえず起こっている。これらの生体膜の構造のダイナミクスは基本的には生体膜を構成して脂質膜の物性に基づいており、蛋白質や他の分子と脂質膜との相互作用がそれをコントロールしていると考えられる。さらに、キュービック相などの非二分子層膜と通常的二分子層膜の間の構造転移も、生体膜のダイナミクスを考える上でも重要である[5-7]。この講演ではまずこれらの分子間相互作用の基本的な内容を解説し、次に筆者が最近提案した単一 GUV 法の原理と生体膜研究への展開を解説する。

<2> 単一 GUV 法を用いた生体膜の構造・機能・ダイナミクスの解析 [8-10]

厚さ4 nm の生体膜や脂質膜のシートが閉じて袋状の構造(球殻構造が多いが、楕円体やチューブなどのさまざまな構造がある)を形成したものはリポソーム(またはベシクル)と呼ばれ、生体膜の基礎研究や、薬品や遺伝子のデリバリーシステム(DDS)、およびバイオセンサーなどの応用研究で多用されている。従来の生体膜/脂質膜のリポソームの研究では、小さな直径(50-500 nm)のリポソーム(SUV や LUV)や多重層リポソーム(MLV)がたくさん存在する水溶液を用いた研究が蛍光分光法、ESR、光散乱法やX線小角散乱法などにより行われてきた。その結果、リポソームの大きさ、形、蛍光強度などの1個のリポソームが持つ物理量は、多くのリポソームの間で平均化された物理量(集団平均)として測定されるため、多くの情報が失われてきた(この方法を LUV 懸濁液法と呼ぶ)(図1参照)。LUV 懸濁液法を用いた研究の具体例を考えよう。蛋白質やペプチド、および低分子物質が LUV と相互作用するとき、LUV の構造や形の変化、蛍光特性などの物性の変化、2個の LUV 間で生じる会合や膜融合などが生じる。これらの現象は多くの LUV で同期して起こらないので、LUV 懸濁液法による測定では現象のさまざまな段階の平均値を観測することになり、現象の素過程を捉えることはできない。特に、LUV 懸濁液法を用いたリポソーム内部からの物質(蛍光プローブや蛋白質など)の漏れの測定とその解析法は、薬品、抗菌性物質、膜融合活性を持つ物質、および蛋白質/ペプチドなど多くの物質と生体膜/脂質膜の相互作用を高感度に検出する方法として重要であり、広く活用されてきたが、それらの素過程を解析することは不可能であった。

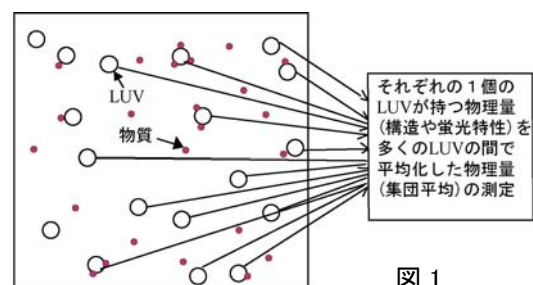


図1

一方、直径が10 μm 以上の生体膜/脂質膜1枚から作られたリポソームは、巨大リポソーム (GUV; Giant Unilamellar Vesicle)と呼ばれる。水や緩衝液中の1個のGUVを光学顕微鏡で観察することが可能であるために、膜の弾性率測定などの物理的測定や人工細胞の構築などの研究に用いられてきた。筆者らは最近、「単一巨大リポソーム法(単一 GUV法)(the single GUV method)」という新しい生体膜の研究方法を提案し、ペプチドなどの外来分子と脂質膜の相互作用や生体膜のダイナミクスの研究に応用している(図2)。この方法では、1個のGUVの構造や物理量の変化をリアルタイムで測定し、それらの物理量を多くの“1個のGUV”に対して測定して統計的な解析をする。我々はこの新しい方法により、抗菌性ペプチドによる脂質膜中のポア(小孔)形成(図3A)[11]、抗菌性物質によるリポソームの破裂(図3B)[12]、膜融合(図3C)[13]や膜分裂(図3D)[14,15]などで新しい情報を得ることに成功している。単一GUV法により、現象の素過程が詳細に明らかになり、素過程の速度定数なども求めることができる。現段階の単一GUV法の実験方法はまだ問題点が多いが、今後の方法論の発展にともない、更なる発展が期待される。この講演では、単一GUV法の応用例として、抗菌性物質と脂質膜の相互作用や膜融合・膜分裂の研究を紹介する。

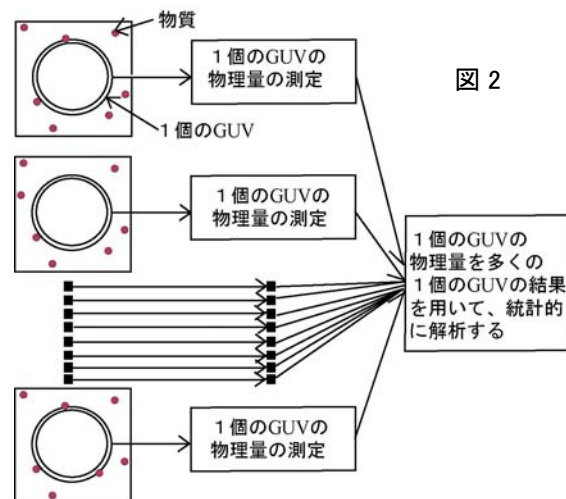
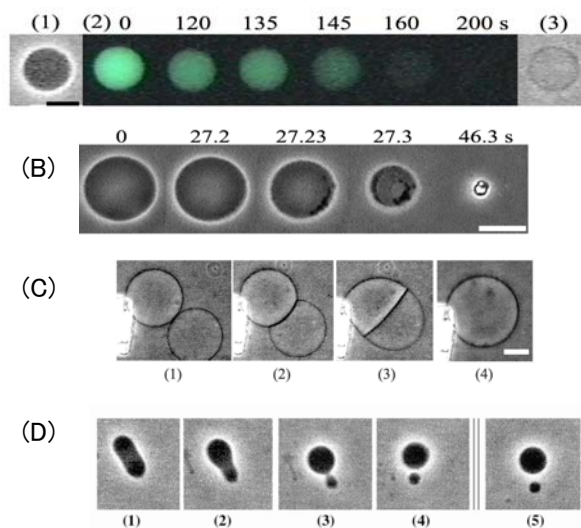


図3 (A)



参考文献

- [1] 山崎:シリーズ・ニューバイオフィジックスII (4)生体膜のダイナミクス、共立出版、pp.63-81, 2000, [2] 山崎:シリーズ・ニューバイオフィジックスII (2)水と生命、共立出版、pp.79-96, 2000, [3]山崎:リポソーム応用の新展開—人工細胞の開発に向けて、(株)エヌ・ディー・エス、pp. 154-166, 2005, [4] (入門書)古川、森垣、山崎: ナノテクノロジー入門シリーズ I: ナノテクのためのバイオ入門、共立出版、pp.130-151, 2007, [5] S.J. Li, M. Yamazaki, et al. *Biophys. J.* 81, 983-993, 2001, [6] S.M. Masum, M. Yamazaki, et al. *Langmuir*, 19, 4745-4753, 2003, [7] Y. Okamoto, M. Yamazaki, *Langmuir*, 24, 3400-3406, 2008, [8] M. Yamazaki, *J. Surface Science of Nanotechnology*, 3, 218-227, 2005, [9] 山崎: ナノメディスン、オーム社、pp. 306-318, 2008 [10] M. Yamazaki, *Adv. Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, Vol. 7, Elsevier, pp. 121-142, 2008, [11] Y.Tamba, M.Yamazaki, *Biochemistry* 44, 15823-15833, 2005, [12] Y. Tamba, M. Yamazaki, et al. *Biophys. J.* 92, 3178-3194, 2007, [13] T. Tanaka, M. Yamazaki, *Langmuir*, 20, 5160-5164, 2004, [14] T. Tanaka, M. Yamazaki, et al. *Langmuir*, 20, 9526-9534, 2004, [15] Y. Inaoka, M. Yamazaki, *Langmuir*, 23, 720-728, 2007