トピックス

巨大リポソームによるエンド／エクソサイトーシス系のモデル開発

平嶋尚英, 田所 哲 名古屋市立大学大学院薬学研究科生体超分子システム解析学分野

1. はじめに

近年、直径が10 μm をこえるような細胞サイズの巨大リポソーム (GUV: giant unilamellar vesicle) を比較的簡便に作製する方法がいくつか開発され、これを用いて様々な研究がなされるようになってきた^{1), 2)}。我々は、神経伝達物質の放出や種々のホルモンや生理活性物質の細胞外への放出機構であるエクソサイトーシス (開口放出) について研究を行ってきた。エクソサイトーシスとは、細胞内にある分泌小胞 (顆粒) と呼ばれる脂質2重層膜で囲まれた小胞が細胞膜と膜融合することで、小胞内の内容物を細胞外に分泌する現象である。我々はこの現象を主にマスト細胞という実在の分泌細胞を用いて研究を行ってきたが、エクソサイトーシスの詳細な機構を解明するには、細胞膜や小胞膜を構成する脂質の成分、細胞内のイオン濃度、膜融合に関与するタンパク質の有無や濃度などを自由に変えられる系の必要性を痛感した。まずは、微小なリポソーム (SUV: small unilamellar vesicle) に、細胞膜と分泌小胞膜に存在するタンパク質を再構成した系で研究を行ったが^{3), 4)}、やはり実在の分泌細胞により近い系の構築が望まれた。そこで我々は、細胞サイズの巨大リポソーム内に、分泌小胞に相当する微小なリポソームを内封して、エクソサイトーシス様の分泌を行う人工の分泌細胞をつくることを試みた。その結果、ある条件下では、タンパク質なしに、脂質成分だけでエクソサイトーシス様の分泌を誘導できることを見いだした⁵⁾。また、最近エクソサイトーシスの逆の過程、すなわち、細胞外部のものを膜で包み込み、小胞として細胞内に取込む過程であるエンドサイトーシスのモデル系⁶⁾も構築したのでこれについても紹介する。

2. 人工エクソサイトーシス系の構築

エクソサイトーシスのモデルとなる人工分泌細胞には、最低限細胞膜と分泌小胞に相当するものが要で

ある。そこで、膜の脂質成分に水溶性高分子の PEG (polyethyleneglycol) 修飾脂質を用いる Yamazaki らのグループの方法⁷⁾で細胞サイズの GUV をつくった。この時、予め調製しておいた SUV を、リン脂質薄膜 (GUV の膜となる) を水和させる水溶液にいておくと、SUV が GUV 内に封入される。もちろん、GUV に SUV を封入しただけでは、エクソサイトーシス様の分泌はおこらない。一般に、エクソサイトーシスは細胞刺激によって生じる、細胞内の Ca^{2+} イオン濃度上昇がトリガーとなっておこる。そこで、我々は外液に Ca^{2+} イオンが存在する条件下で Ca^{2+} イオノフォアであるイオノマイシンを添加することで GUV 内の Ca^{2+} イオン濃度上昇を引きおこし、エクソサイトーシス様の分泌を誘導することを試みた。酸性のリン脂質であるホスファチジルセリン (PS) を含むリポソームは、2価のカチオンにより膜融合が誘導されることが知られているので、PS を SUV と GUV の膜成分に加えておけば、イオノマイシンによる GUV 内の Ca^{2+} イオン濃度上昇によって、SUV と GUV の融合、すなわちエクソサイトーシス様の分泌がおこると期待された。

一方、エクソサイトーシス様の分泌がおこったかどうかの検出も行わなければならない。エクソサイトーシスは小胞膜と細胞膜の融合によっておこる分泌であるので、膜融合と分泌の両方を検出する必要がある。そこで、SUV の構成脂質として NBD で蛍光標識したリン脂質を加え、さらに SUV 内に水溶性の蛍光色素であるスルホローダミンを封入した。エクソサイトーシス様の分泌がおこれば、SUV 膜にある NBD 標識したリン脂質は膜融合により GUV の側に移行し、GUV 膜が NBD の蛍光をもつようになり、同時に SUV 内に封入されたローダミンは GUV の外に放出され、GUV 内のローダミンの蛍光は減少するはずである。

以上の系で、イオノマイシン刺激によって GUV 内で Ca^{2+} イオン濃度が上昇することを Ca^{2+} 感受性蛍光色素で確認した上で、エクソサイトーシスの誘導を試み

Development of Artificial Model System for Exocytosis and Endocytosis Using Cell-sized Giant Liposomes
Naohide HIRASHIMA and Satoshi TADOKORO
Department of Cellular Biophysics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

※図1, 図2は、電子ジャーナル (<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/>) ではカラー版を掲載しています。

図1 蛍光標識した人工エクソサイトーシス系。イオノマイシン刺激前(a)と刺激後(b)の共焦点蛍光画像およびGUV内部とGUV膜領域の蛍光強度の時間経過(c)。

たが、エクソサイトーシス様の分泌は検出されなかった。そこで、膜融合の駆動力として、SUV内とGUV外に浸透圧差をかけることによって膜融合をドライブすることを試みた。図1は、GUV内液の浸透圧(SUV内も同じ)に対して、GUV外液の浸透圧を4倍にした場合の例で、イオノフォア刺激の前にはGUV膜の領域にはNBDの蛍光が見られないが(図1a)、刺激後にはNBDによってGUVの輪郭が明確になり、直径も10%ほど増大した(図1b)。実際、蛍光強度の経時変化を見るとGUVの輪郭部分の蛍光強度(緑色)が上昇し、それと同時にGUV内部のローダミンの蛍光強度(赤色)が減少するのがわかる(図1c)。

条件をいろいろ検討した結果、このタンパク質を含まない系では、エクソサイトーシス様の分泌をCaイオンで誘導するには、酸性リン脂質のPSと4倍以上程度の浸透圧差が必要であることがわかった。浸透圧差による水の流れが膜融合を促進するものと考えられる。また、画像から判断すると、膜融合はずっと続くわけではなく、おもにGUVの膜に近い部分にあるSUVのみがGUVと融合し、それ以後はあまり進行しないようである。今後は、脂質の種類の影響、pH、コレステロールの影響、ラフト様構造、脂質2重層間の脂質の非対称分布などの関与の検討を行うとともに、実在の細胞で見られる膜融合に関与するSNAREタンパク質を膜に再構成した場合も調べていく予定である。

3. | 人工エンドサイトーシス系の構築

エンドサイトーシスはエクソサイトーシスとは逆の過程で、細胞膜が陥入して細胞外の物質を取り込みな

図2 GUVによるPLGA粒子のエンドサイトーシス様の取込み。GUV(ローダミンPE標識;赤色)とPLGA粒子(クマリン標識;緑色)が接触(0秒;a左矢印)し、GUV内に取り込まれた(24秒後;a右)。多くの粒子がとりこまれた例(b、左からクマリン、ローダミン、マージ画像)。bの白線上(c上)および矢印の粒子の部分(c下)の蛍光強度をプロットした。緑の蛍光(粒子)を赤い蛍光(GUV由来の膜)がとり囲んでいる。

がら小胞状にくびれて、引きちぎれ、小胞となって細胞内に取り込まれる現象である。関与するタンパク質はエクソサイトーシスとはまったく異なるが、膜の動きはほぼまったく逆向きといえる。では、細胞サイズのGUVでエンドサイトーシスが再現できるであろうか。もちろんGUVだけを放置しておいてGUV膜の陥入がおきることは観察されない。そこでGUVが取り込む細胞外物質として、調製や表面修飾が容易で、ドラッグデリバリーにもよく用いられるポリ乳酸・グリコール酸(PLGA)粒子を用いて、GUVのエンドサイトーシス様の取りこみについて、その可能性を探った。PLGA粒子は直径が220 nm程度で、表面が負電荷を帯びている(ζ電位が-27 mV程度)。これをカチオン性のポリマーであるキトサンで表面をコートすると、粒子の直径は350 nm程度の粒径となり、表面電荷も正となる(ζ電位が+27 mV程度)。細胞サイズのGUVとこれらの粒子を共存させると、特にキトサンでコートしたものは負電荷を帯びたGUV膜と静電的に相互作用して、GUV内に取り込まれることが期待された。しかしながら、確かにキトサン修飾によってGUVとの吸着はおこるが、エンドサイトーシス様の取り込みはほとんど観察されなかった。そこで、非イオン性の界面活性剤であるP80で表面をコートしたPLGA粒子を用いてみた。界面活性剤がGUVの局所的な変形を誘導することが報告されていたからである。P80で表面をコートしたPLGA粒子の粒径は210 nm程度で、ζ電位は-28 mV程度であった。GUVに加えると、P80修飾した粒子は、GUV内に取り込まれるのが観察された(図2)。PLGA粒子を6-クマ

リンで蛍光標識し、GUV膜をローダミン標識したホスファチジルエタノールアミン（PE）で蛍光標識しておく、GUV内に取り込まれたPLGA粒子（緑色）はGUV膜由来の膜（赤色）で取り囲まれていることがわかった。このことは、粒子がエンドサイトーシス様に取り込まれたことを意味する。

キトサン修飾粒子は、粒子径が大きいのでGUVとの接触面積が大きく、また、静電的にもGUVとの相互作用が強いと思われるが、エンドサイトーシス様の取り込みはおきなかった。GUV内に取り込まれる以上、粒子とGUVの接着は必要であるが、それよりもP80のもつ局所的な膜変形能や膜物性への影響が大きいことが示唆された。さらにエンドサイトーシス様の取り込みが完了するには、粒子を取り囲んだGUV由来の膜がくびれて融合し、切り離される（pinch-off）必要があるが、界面活性はこの膜融合の促進にも寄与していると思われる。

4. おわりに

ここで示したエクソサイトーシスやエンドサイトーシスのモデル系は、タンパク質をまったく含まない、脂質のみの系であるので、実在の系とはかなり異なったものであり、したがって、観察される現象は似ていても、背景にあるメカニズムは当然異なるものである。しかしながら、脂質だけでできることと、できないことを明らかにしていくこと、そして、なぜ脂質だけでできるのか、できないのか、を解析していくことは、エクソサイトーシスやエンドサイトーシスのメカニズムの解明や理解に役立つものと思われる。

また、脂質のみからなる単純な系において、外界と

の物質のやり取りが、単なる物質の膜中拡散だけで行われるのではなく、膜小胞を介して行われ得ることは、エクソサイトーシスやエンドサイトーシスのメカニズムの進化、もっと大きくは、生命の進化にも関係しているのではないかと期待している。

文 献

- 1) 野村 M 慎一郎ら (2008) 生物物理 **48**, 174-179.
- 2) 山田彩子ら (2009) 生物物理 **49**, 256-259.
- 3) Sakiyama, H. *et al.* (2009) *Inflamm. Res.* **58**, 139-142.
- 4) Nagai, Y. *et al.* (2011) *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 2435-2439.
- 5) Sasai, M. *et al.* (2010) *Langmuir* **26**, 14788-14792.
- 6) Tahara, K. *et al.* (2012) *Langmuir* **28**, 7114-7118.
- 7) Yamashita, Y. *et al.* (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1561**, 129-134.

平嶋尚英

平嶋尚英（ひらしま なおひで）

名古屋市立大学大学院薬学研究科教授
東京大学大学院薬学系研究科修士課程修了。九州大学、東京大学薬学部助手、名古屋市立大学薬学部助教授を経て、2006年から現職。博士（薬学）。
研究内容：生物物理学，人工細胞
連絡先：〒467-8603 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通 3-1

E-mail: hirashim@phar.nagoya-cu.ac.jp

URL: <http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ybu/HP/index/>

田所 哲

田所 哲（たどころ さとし）

名古屋市立大学大学院薬学研究科助教
名古屋市立大学大学院薬学研究科修士課程修了。広島国際大学薬学部助教を経て、2006年から現職。博士（薬学）。
研究内容：生物物理学，アレルギー

連絡先：同上

E-mail: s-tadoko@phar.nagoya-cu.ac.jp

URL: 同上