

Ionic Polymer Bead-Supported Bilayer Membrane Systems (イオン性ポリマ粒子に支持された脂質二分子膜システム)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 Samuel Osei-Asante

[目的] 生体膜を構成する脂質二分子膜は、高い配向性、双性的表面荷電、流動性などの特性を備えており、単なるバリア機能だけではなく、生体機能発現のための高度な認識環境を提供していることが、近年明らかにされてきた。そのような生体膜機能の解析には、*in situ* の生化学的手法だけではなく、リポソームをはじめとする生体模倣膜システムを使った手法も多大な貢献を果たしている。リポソームの脂質二分子膜は流動性に富んではいるが、その低い物理的強度は、水晶発振子マイクロバランスなどの有力な解析機器の使用を制限している。他方、リポソームのそのような欠点を補う目的で、脂質分子や二分子膜を固定化したシステムが開発されてきたが、それらの多くは脂質二分子膜の特性が失われている。著者は、イオン性ポリマ粒子に支持された脂質二分子膜システム (Figure 1) を用いた生体模倣膜の構築を試みた。本システムでは、ポリマ粒子と脂質分子との静電的相互作用が、ポリマ粒子上に脂質分子を固定するための“分子接着剤”として作用し、脂質二分子膜が非共有結合的に固定化されると考えられている。また、ポリマ粒子が二分子膜との界面に高度に水和された環境を提供できることは大きな利点である。本研究では、まず、生体膜を構成するリン脂質を用いて、イオン性ポリマ粒子上でのリン脂質二分子膜の構築を行った。さらに、実際の膜蛋白質を含む生体膜のイオン性ポリマ粒子上での直接再構成を試みた。

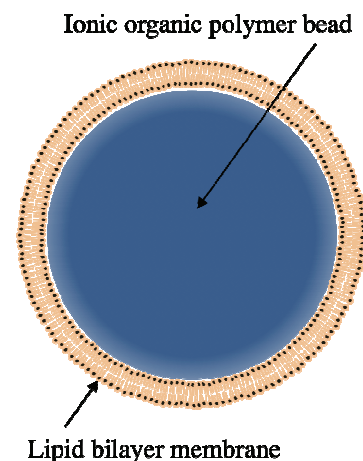


Figure 1. Schematic drawing showing an ionic organic polymer-supported system

[実験方法] イオン性ポリマには、非多孔性の四級アンモニウム型陰イオン交換樹脂 SA11A (直径: 0.35–0.55 mm) を用いた。種々のモル比で混合した phosphatidylcholine (PC) と phosphatidylserine (PS) を 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) 中に分散させた後、プローブ型超音波発信装置で処理し、小型一枚膜ベシクル (直径: 40–90 nm) を調製した。予め同緩衝液で膨潤させた SA11A とリン脂質ベシクル溶液混合物を、55°C で 30 分間振とうし、リン脂質-SA11A 複合体を得た。赤血球 (RBC) 膜ゴーストは、3–5 週齢雄性 Wistar ラットの血液から、常法に従い単離精製した。RBC 膜ゴーストと SA11A を 5 mM リン酸ナトリウム水溶液 (pH 8) 中で混合した後、25°C で 30 分間振とうし、RBC-SA11A 複合体を得た。共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡による試料の観察には、Carl Zeiss 社製 LSM 710 を使用した。

[結果および考察] リン脂質ベシクル中の PS の比率が増加するに伴い、複合体中のリン脂質量は増加した。このことは、アニオン性の PS とカチオン性の官能基を有する SA11A の間の静電的相互作用が、複合体形成に重要な役割を果たしていることを示していた。また、固定された脂質二分子膜の位置を調べるため、複合体調製時にリン脂質に蛍光性膜プローブ octadecylrhodamine B (ODR) を混合し、蛍光断層像を観察したところ、SA11A の輪郭に沿って ODR 由来の際立った蛍光が観察された。ODR に替えて蛍光性膜プローブ 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (NBD-PE) を使って蛍光断層像を撮像し、それらを重ね合わせると、SA11A の外表面には、均一な強度の蛍光が切れ目なく分布していた。次に、複合体表面における脂質二分子膜の被覆状態を、細胞培養実験で生細胞の計数の際に広く用いられるトリパンプル (TB, 分子量 960.82) を使って検証した。スルホン酸基を有する TB は、支持体である SA11A の四級アンモニウム基との強い静電的相互作用によって結合するため、SA11A はその内部まで青色に染色された。一方、複合体は、TB 溶液に浸漬しても、TB によって青色に染まることはなかった。この観察結果は、SA11A が、TB 分子を排除するに十分な緻密さを持った脂質二分子膜によって、完全に覆われていることを示していた。さらに、複合体中の二分子膜の流動性を評価するため、共焦点レーザー顕微鏡を使って Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) 実験を行った。NBD-PE で標識された複合体の膜の標的領域 (円形、 $\sim 50 \mu\text{m}^2$) に、高出力のレーザーを照射して光脱色させた後、脂質分子の側方拡散などの運動により蛍光強度が回復する様子を観察し、膜流動性の指標とした。検討したすべての複合体において蛍光強度の回復が観察され、高いものでは脱色 20 分後に脱色前の約 90% まで回復した (Figure 2)。したがって、複合体表面の脂質二分子膜は、流動性を有していることがわかった。上記の検討結果から、イオン性ポリマ粒子に支持された脂質二分子膜システムを利用して、脂質二分子膜の特性を備えた生体模倣膜を構築できることが示された。

次に、本システムを利用した生体膜の直接再構成に取り組んだ。生細胞における微小管やアクチン線維等の骨格タンパク質のように、イオン性ポリマが物理的に脆弱な脂質二分子膜を裏打ちし補強することによって、細胞膜に近いモデルシステムになりうると期待した。得られた RBC-SA11A 複合体は無色透明であり、実体顕微鏡下で未処理の SA11A と比較しても、両者の差異は全く見出されなかった。また、NBD-PE で蛍光標識した RBC 膜ゴーストを用いて RBC-SA11A 複合体を調製し、その蛍光断層像を観察すると、RBC 膜はポリマ表面に位置していた (Figure 3)。生体膜の場合には脂質分子だけでなく、他の膜成分と SA11A

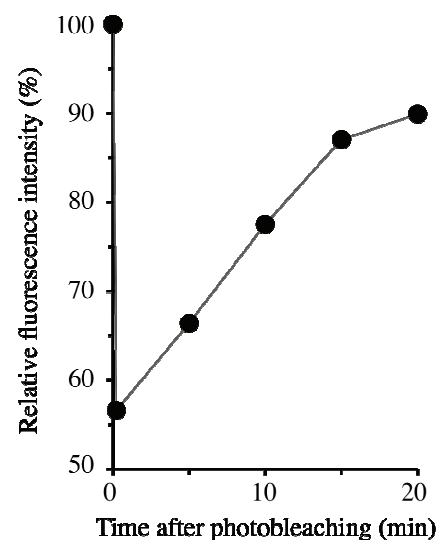


Figure 2. FRAP of NBD-PE labeled phospholipid bilayer membrane immobilized on SA11A

との相互作用により、膜ゴーストの構造および機能変化が生じることも予想された。はじめに、複合体中のリン脂質とタンパク質の重量比を測定した。RBC 膜ゴーストのリンとタンパク質の重量比は 1:8.6 であったのに対し、複合体中のそれは 1:3.2 であった。この変化は、複合体形成時にゴースト膜中のタンパク成分が脱離したことを推察させた。次に、複合体中の RBC 膜ゴーストの配向を調べた。RBC 膜の細胞質側に存在する二つの膜表在型 acetylcholinestrace と NADH-cytochrome c oxidoreductase の酵素活性を測定したところ、活性はほとんど観察されず、これらの酵素は複合体の最外表面には存在しないものと考えられた。続いて、RBC 膜の主要な膜貫通型タンパク質で

ある glycoporphin A (GPA) の細胞外の領域を認識する抗 GPA 抗体とフルオレセイン標識二次抗体を使って、GPA の配向を調べた。明確なフルオレセインの蛍光が RBC-SA11A 複合体の輪郭に沿って検出されたことから、GPA は native な配向で SA11A 上に固定化されていると考えられた。さらに、複合体中の膜貫通型タンパク anion exchanger 1 (AE 1) の機能を調べた。5 mM リン酸水溶液 (pH 8) 中で亜セレン酸 (SA, 8 μ M) と複合体を 10 分間混合すると、約 30% の SA が複合体に取込まれた。この SA の取込みにおける、AE1 の寄与を検証するため、AE1 阻害剤 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbene disulfonate (DIDS) を使って検討

を進めた。DIDS で前処理 (50 μ M, 55°C, 10 分間) した RBC から得た膜ゴーストを使って調製した複合体では、約 50% の取込み阻害が観察された。Native RBC を同じ条件で DIDS 処理すると、SA の取込みは約 80% 阻害されたことを加味すると、複合体中への SA の取込みには AE1 の機能が関与しているものと考えられた。以上の結果より、本システムは、生体膜をモデルシステムへ再構成させるための簡便かつ有効な手段であると考えられた。

[基礎となった学術論文]

1. Osei-Asante S., Haratake M., Fuchigami T., Nakayama M.: An ionic polymer bead- supported lipid system using naturally occurring phospholipids. *J. Bioact. Compat. Polym.*, **25**, 455–464 (2010).
2. Osei-Asante S., Haratake M., Fuchigami T., Nakayama M.: One-step direct reconstitution of biomembranes onto cationic organic polymer bead supports. *J. Colloid Interface Sci.*, **351**, 96–101 (2010).

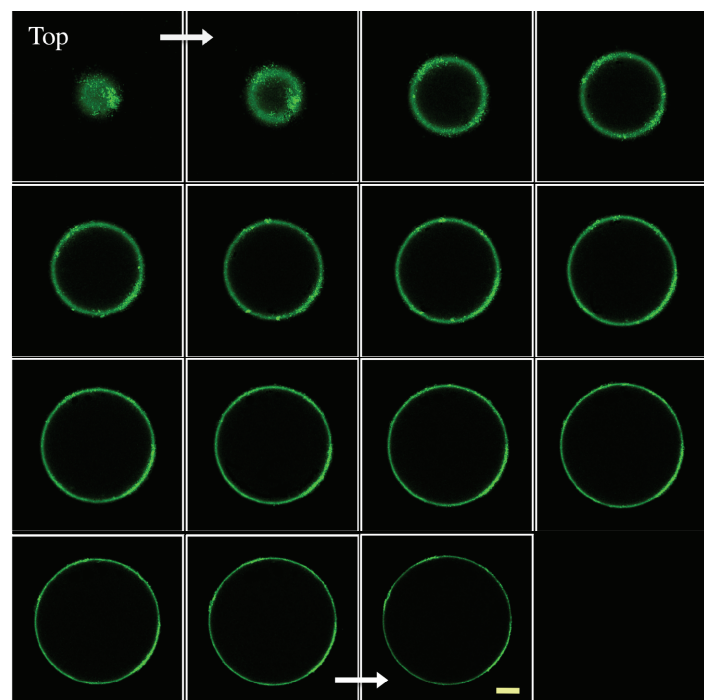


Figure 3. Cross-sectional fluorescence images of RBC membrane-SA11A complex labeled with NBD-PE. NBD-PE concentration: 0.1 mol% for phospholipids in the RBC ghost membrane. Scale bar in this panel represents 100 μ m.