

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 2011～2012
 課題番号： 23770222
 研究課題名（和文） 細胞サイズリポソームへの最少要素シグナル伝達経路の構成と作用因子解析
 研究課題名（英文） Constitution of a signal pathway with a small number of protein components on cell-sized liposomes and the application for analysis of the ligand agents
 研究代表者
 湊元 幹太（TSUMOTO KANTA）
 三重大学・大学院工学研究科・講師
 研究者番号： 80362359

研究成果の概要（和文）：膜タンパク質要素を巨大リポソーム（GUV）に組換えバキュロウイルス粒子（BV）との膜融合により組み込んだ。最少要素からなるシグナル伝達古典経路の再構成を、GPCR・Gタンパク質・アデニル酸シクラーゼ（ADCY）の要素組み込みによって試みた。生化学アッセイには課題が残ったものの、単一 GUV への要素取込は共焦点レーザー蛍光顕微鏡による可視化で確認した。これと並行し、GUV ベースの人工細胞系実験に資する技術を開発した。

研究成果の概要（英文）：Membrane protein components were incorporated into membranes of giant liposomes (giant unilamellar vesicles, GUVs) by fusing recombinant baculovirus budded virus (BV) envelope particles that displayed (or expressed) the target membrane proteins with membranes of the giant liposomes. In this study, we tried to constitute a classical and fundamental pathway of signal transduction from three kinds of membrane proteins (G-protein coupled receptor, GPCR; G protein; adenylate cyclase, ADCY). The incorporation of single polypeptides of these proteins was observed using a confocal laser scanning microscope on a single GUV level. On the other hand, however, we were faced with a problem to be solved as to reproducibility of biochemical assay of signal transduction (production of cAMP). For promotion of the study related to artificial cell systems, we also successfully developed a novel experimental procedure based on single giant liposomes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：人工細胞モデル、巨大リポソーム、シグナル伝達、膜タンパク質再構成、バキュロウイルス、GUV (Giant Unilamellar Vesicle)、少数要素による構成実験、細胞情報

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞を構成するタンパク質や核酸などの生体構成分子が、今日、比較的良好に入手でき扱える。一方、生物情報の蓄積が進み、コンピューター上での生命モデルの構築などの研究も盛んとなっている。実世界では、人工細胞システム構築の実験として、 $\sim 10 \mu\text{m}$ のリン脂質 2 分子膜ベシクル（細胞サイズリポ

ソーム）の利用が行われており、研究代表者もこれまで研究に携わってきた。ただ、情報・物質授受伝達等が起こる細胞膜の機能を再現した人工細胞モデルの構築は、当初も大きな課題の 1 つであった。研究代表者らは、組換え膜タンパク質をリポソーム膜へ組み込む手法を、バキュロウイルス/昆虫細胞遺伝子発現系を基礎に開発してきた経緯があ

り、人工細胞システムの膜機能を、この手法を使って再構成できないかと考えた。シグナル伝達経路の要素タンパク質を、なるべく少なく選んで、細胞サイズリポソームに載せ、伝達機能の発現を企図した。

(2) 細胞サイズリポソームを用いた機能解析の研究方法は、多くの研究者が、従来広く進めているものであるが、未だ、多くの新研究が提案され続けている、ホットなテーマでもある。自分たちの目的に合う単一細胞サイズリポソームを用いた顕微鏡観察方法を、併行して考案・研究していくことは研究課題遂行において有用となる。

2. 研究の目的

(1) 細胞のシグナル伝達経路を構成する要素は、膜タンパク質要素、脂質要素（イノシトールリン脂質等）、そして細胞質要素（タンパク質キナーゼ等）である。これら要素を、人工ベシクル（細胞サイズリポソーム）に個別に組み込んだシステムを作製するため、Gタンパク質共役受容体（GPCR）、その下流タンパク質である、Gタンパク質各サブユニット、アデニル酸シクラーゼについて、組換え遺伝子から個別に発現・提示させたバキュロウイルス粒子を担体に用いて、リポソームと膜融合させ、要素を組み込んでいき、タンパク質レベルでの搭載を確認することをめざした。当初は、シグナル応答挙動を変動させる作用因子（タンパク質組合せ、脂質組成、膜ドメイン、膜流動性）に関する新知見を得るところまで計画した。微小空間における最少要素による機能発現条件を、予めリポソーム内部に封入した、シグナル伝達で活性化される蛍光反応の可視化解析で探索することも視野に入れて目的を立てた。

(2) 当初計画では、自分たちの目的に合う単一細胞サイズリポソームを用いた顕微鏡観察方法も、同時に提案していくことを申請しており、系の設計ならびに実験により、人工細胞システムの解析で重要ないくつかの膜現象を捉えられるか、検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シグナル伝達経路の既知の各要素を、“組換えバキュロウイルス/昆虫細胞遺伝子発現系を用いたリポソーム膜への膜タンパク質再構成法”（膜タンパク質搭載出芽ウイルス粒子を回収、酸性リン脂質リポソームと膜融合）を用いて細胞サイズリポソーム膜へ再構成し、外部刺激に応答する人工細胞 hシステムを構築することとした。2つの実験に取り組んだ。

①シグナル伝達経路要素から、膜受容体（GPCRのうち、アドレナリンβ受容体（ADRB）、CRF受容体（CRHR））・Gタンパク質αサブユ

ニット（Gαs）、β/γサブユニット（Gβ・Gγ）・アデニル酸シクラーゼ（ADCY）の遺伝子をオープンパイオリソースから入手した。各膜タンパク質のC末端に各種タグ遺伝子（His×6、TagGFP2、TagRFP等）を融合したコンストラクトを、組換えバキュロウイルス作出のためのトランスファーベクターベースに構築し、ウイルスゲノムDNAと昆虫由来培養細胞（Sf9細胞）にコトランスフェクションすることで、各タンパク質を搭載したBVエンベロープ粒子を作るための組換えウイルス株を得た。各ウイルス粒子は、超遠心分離など、ウイルス粒子を回収・精製する常法によって、回収した。BV粒子に含まれる目的タンパク質の存在は、タグの特異的蛍光やウエスタンブロッティング（WB）により確認した。巨大リポソームは、中性と酸性のリン脂質（DOPCとDOPG）の混合物のクロロホルム溶液を留去し薄膜を得て緩衝液で水和する静置水和法で作製した。酢酸緩衝液（pH4-5程度）中でBV粒子と細胞サイズの巨大リポソームとを混合することで膜融合を誘起し、組換えタンパク質が移行するかを共焦点レーザー顕微鏡により確認した。

②この実験系を用いた、最少要素 GPCR 経路がもつ基底活性の検出を試みるため、ADCYによる巨大リポソーム内部でのATPからのcAMP産生を検出することを試みた。検出の方法としては、抗cAMP抗体を利用したデザインの競合アッセイキット、および、ピロリン酸産生を検出する生化学アッセイキットによって行った。当初、ADCY活性の亢進を蛍光顕微鏡による可視化により検出することをめざすため、既知のcAMP検出蛍光センサー（FRET-PKA系、分断酵素再生系等）の封入を検討しようとしたが、後者の系を試みたが活性検出にはまだ至っていない。一方、当初計画で言及した、cAMP等に応答する膜受容体チャネルタンパク質については、この期間中に、サブユニットの選択を行いバイオリソースから遺伝子の配布を受け、組換えバキュロウイルスの作出とBVエンベロープ粒子上への発現の確認を行った。

(2) 単一の細胞サイズリポソームを用いた膜特性変化や封入酵素反応の時間経過モニタリングが可能となる、簡便な実験手法を、巨大リポソームをアガロースゲルへ包埋することで実現可能か、検討した。リポソームを含むアガロースゲルブロックを共焦点レーザー蛍光顕微鏡（CLSM）ステージにセットし、ブロック上面から、界面活性剤や基質を添加し、ターゲットとした巨大リポソーム膜近傍へ拡散することによる影響をモニタリングできるか、検討した。また、内水相への物質封入効率を著しく上昇させる方法も本研究に有用と考え、水和時のpHを転換させることによるタンパク質封入の促進方法を

巨大リポソームに適用した。

4. 研究成果

(1) 膜タンパク質要素、脂質要素、細胞質要素を、人工ベシクル(細胞サイズリポソーム)に個別に組み込んだシステムを作製し、微小空間における最少要素からなるシグナル伝達経路での機能の発現を捉えることを試みた。ターゲットとしては、古典的かつ重要な GPCR シグナル伝達経路を構成する膜タンパク質遺伝子 ADRB2、CRHR1、GNAS、GNB1/GNG2、ADCY6、を選び、これらを搭載した組換え BV 粒子を作成した。粒子上への個々のタンパク質の搭載または膜融合後のリポソームへの移行は、各抗体による WB または CLSM により検出しているが、しかしながら、阻害剤、活性化リガンド、ホルモンなどが共存したプロテオリポソーム内部における cAMP 産生について生化学アッセイによる検出を試みたところ、組み込まれた要素からなる経路でのシグナル伝達は予備試験的に予見はされたものの、有意な活性検出はできていない(現在、より詳細に検討を継続中である)。そのため、試料全体から抽出するアッセイであるため、巨大リポソームが集まったアンサンブルのアッセイでない、個別の巨大リポソーム(単一リポソーム)をアッセイの対象とすることが重要との見解に至った(後述(2))を進める動機づけとなった。

今回、以降の可視化解析での利便性を考えて、膜タンパク質各要素の遺伝子について、蛍光タンパク質や His×6 を C 末端タグ(既報文献を参照し、タグ融合配列は、GNAS は内部のループ部分 in fusion cloning、 β/γ にあつては GNB1 の N 末端とした)として導入したもの、順次構築し、BV 粒子を得て、粒子上での発現を確認できた。このうち、GPCR、ADCY6 については、巨大リポソーム膜と融合させ、プロテオリポソームとする実験を行って、組み込まれていることを確認できた(GPCR の例を図 1 に示す)。

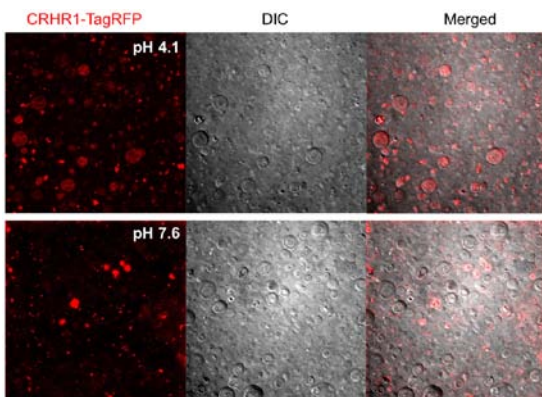


図 1. 巨大リポソームへの CRHR1/TagRFP(赤色蛍光)の組み込み:弱酸性および中性で処理した BV と巨大リポソームの混合試料を CLSM 観察した

これ以外の膜貫通型タンパク質についても、この方法の有用性を示す研究が蓄積しはじめつつある(5. 雑誌論文(2))。以上の結果は、既に項目 5. の学会発表等で報告している。また、当初の計画では、再構成を試みるシグナル伝達経路に $G\alpha_q$ タンパク質を介する PLC 経路を考慮していたが、cAMP に注力し、その検出に有用なゲート開閉チャンネルを考案して、この組換え遺伝子を組み込んだ BV 粒子作出も行き、発現を確認できた。

(2) 人工細胞モデル研究の進展に役立つよう、単一の巨大リポソームを用いる、自身の目的に合わせた実験法への改良の試みにも取り組んだ。まず、アガロースゲルを用いた、ゲル包埋型の巨大リポソームを作製する条件を検討し、好適なゲルの特性(低融点ゲル、1%)を見出し、包埋による粒径分布の変化もほとんどないことが分かった。さらに、膜流動性などに瑕疵がないことが CLSM の蛍光消光実験で分かった。界面活性剤が膜動態に与える影響が追跡でき、膜透過と膜崩壊が明確に区別できる現象であることを確認した(図 2 に浮遊と包埋型との巨大リポソーム膜の特性の差を示す)。

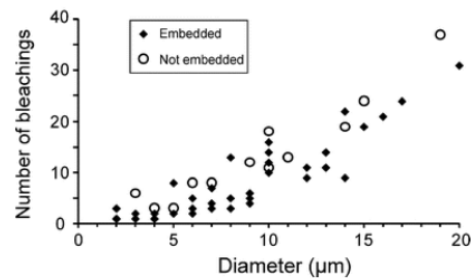


図 2. CLSM によるゲル包埋巨大リポソーム膜(rhodamine-DOPE 染色)の完全消光までのレーザー照射回数。膜上の一点のみに照射し、全体の蛍光が消えるまでの照射回数が粒径に依存し、かつ、包埋と浮遊とで差が無い

ゲル包埋型の利点として、膜形状の動的変化を比較的明瞭に観察できることが示唆され、膜陥入の、“Q 状態”を含む中間の過程をスナップショット的に捉えることができた(図 3)。さらに、人工細胞モデル実験で重要となる、内部酵素反応のモニタリングは、内水相に酵素を封入した任意の巨大リポソームに狙いを定め、投与した基質の加水分解の検出で基質濃度依存的に反応進行のモニターに成功した(図 4)(5. 雑誌論文(1))。

さらに、内水相への物質取込みの促進も、今後の実験系の改良・準備に重要な課題の一つと考え、特にタンパク質の要素の取込効率を高める手法を研究した。静置水和法において水和溶液の pH 転換を巨大リポソーム系に適用して取込促進が行える条件を見出し、現在、さらに検討を加えているところである。

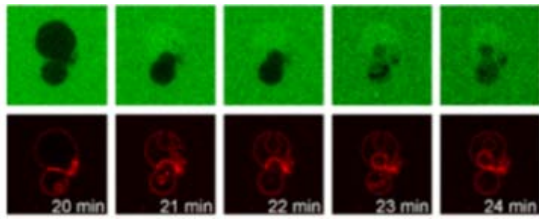


図 3. ゲル包埋巨大リポソームへの界面活性剤投与の CLSM モニタリング: 上は外部より投与した水溶性蛍光分子(カルセイン)の画像。下は、膜(rhodamine-DOPE)の画像。表示時刻は、投与開始後からの時刻。上部の巨大リポソームに



注目すると、20 分目から 21 分目に物質透過が起こった。21 分目に観察された Ω 構造の出現が原因であろう。その後、24 分目で内部へ小ベシクルの陥入が終了した

図 4. ゲル包埋巨大リポソームに捕捉した酵素 (β グルコシダーゼ) による加水分解反応の CLSM モニタリング。ターゲットリポソームに対し、蛍光基質(レゾルフィン β グルコシド)を投与し、1 分毎に画像取得

今後、これらの手法と、上記の要素組み込み技術とを組合せて、少数要素シグナル伝達経路構成実験系の改良をめざしていく。なお、以上の結果の一部は、既に項目 5 の学会発表等で報告している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) Kanta Tsumoto, Masahiro Oohashi, Masahiro Tomita, Monitoring of membrane collapse and enzymatic reaction with single giant liposomes embedded in agarose gel, Colloid and Polymer Science, 査読有、Vol. 289, 2011 年、1337-1346

DOI: 10.1007/s00396-011-2463-3

(2) Koki Kamiya, Kanta Tsumoto, Tetsuro Yoshimura, Kazunari Akiyoshi, Cadherin-integrated liposomes with potential application in a drug delivery system, Biomaterials, 査読有、Vol. 32, 2011 年、9899-9907

DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.008

[学会発表] (計 13 件)

①西上美佐子、他、界面通過法を用いた膜貫通型タンパク質提示巨大プロテオリポソーム、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14 日～16 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡市)

② K. Tsumoto、他、Application of the Baculovirus-Liposome Membrane Fusion to Reconstitution of Membrane Protein Systems toward Functional Artificial Cells、6th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2012) (招待講演)、2012 年 11 月 29 日～12 月 1 日、Shimane Prefecture Convention Center Kunibiki Messe (松江市)

③ Takaaki Mori、他、Reconstitution of an integrated membrane protein system on giant liposomes using the baculovirusliposome fusion technique、The 2nd International Symposium for Sustainability by Engineering at MIU、2012 年 11 月 1 日～2 日、三重大学 (津市)

④ Misako Nishigami、他、Confocal microscopic observation on baculovirus budded virus envelops and liposome membranes using cell-sized artificial artificial lipid vesicles prepared with a droplet-transfer method、The 2nd International Symposium for Sustainability by Engineering at MIU、2012 年 11 月 1 日～2 日、三重大学 (津市)

⑤ Kanta Tsumoto、他、Size, morphology and lamellarity of giant liposomes generated from solute-containing lipid films、日本生物物理学会第 50 回年会、2012 年 9 月 22 日～24 日、名古屋大学 (名古屋市)

⑥ 湊元幹太、バキュロウイルスを用いる人工細胞構築: 少数要素による細胞的機能の発現をめざして、日本化学会生体機能関連化学部会若手の会第 24 回サマースクール (招待講演)、2012 年 7 月 9 日～10 日、休暇村志賀島 (福岡市)

⑦ 森貴昭、他、界面通過法 GUV を用いたバキュロウイルス-リポソーム間の膜融合の可視化解析、第 76 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2012 年 5 月 26 日、自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター (岡崎市)

⑧ K. Tsumoto、他、Attempts to Utilize Giant Liposomes as Artificial Cell Models with Membrane Proteins、5th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2011)、2012 年 3 月 16 日、名古屋大学 (名古屋市)

⑨ Kanta Tsumoto、他、Giant Liposomes as Microcapsules with Large Trapping Volumes: Downsizing through Various Membrane Filters and Analysis with a Calcein Quenching Method、IEEE International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2011)、2011 年 11 月 8 日、名古屋大学 (名古屋市)

⑩ Kanta Tsumoto、他、Enhancement of encapsulation within giant vesicles by

changing the pH or osmotic pressure、「細胞を創る」研究会4.0、2011年10月27日、千里ライフサイエンスセンター（吹田市）

①大田亜由、他、組換えバキュロウイルス-膜融合により巨大リポソーム膜へ構成したシグナル伝達経路タンパク質とその局在、第84回日本生化学会大会、2011年9月24日、京都国際会館（京都市）

②湊元幹太、他、アガロース埋込巨大リポソームを用いた動的形態変化と酵素反応のモニタリング：顕微鏡観察のための簡便な人工細胞膜モデル、第84回日本生化学会大会、2011年9月24日、京都国際会館（京都市）

③清水貴博、他、人工細胞モデルへの応用をめざしたpH転換による巨大リポソームへのタンパク質高封入、第75回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2011年5月28日、静岡県立大学（静岡市）

〔図書〕（計1件）

（1）湊元幹太、富田昌弘、シーエムシー出版、次世代ハイブリドーマテクノロジー（次世代医薬開発に向けた抗体工学の最前線（熊谷泉 監修））、2012、197-202

〔その他〕

ホームページ等

研究代表者業績リスト

<http://scholar.google.com/citations?user=HesLhbwAAAAJ&hl=en>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湊元 幹太 (KANTA TSUMOTO)

三重大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号： 80362359