

メンブレン・ストレス応答ダイナミクスの モニタリング技術の開発

島内 寿徳・森田 誠一・久保井亮一*

生体細胞は、pH、温度、浸透圧など、種々の環境因子の変化（外乱、ストレス）に晒された時、細胞膜および各種生体素子が協同的・自律的な会合・解離を通じて、合目的的に既存の、しかし潜在する細胞機能を誘導・発現し、損傷を修復すると共に恒常性を維持してきた。¹⁾ このように既存のシステムで十分対応可能な外乱を第1種のストレス負荷と呼ぶならば、既存のシステムによる対応が不可能な外乱は第2種のストレス負荷であり、膜融合・溶解を含む細胞膜全体のダイナミックな変化や構造や機能の進化を伴うため、問題はきわめて複雑である。

ストレス応答に関する生理学的、分子生物学的研究の発展に伴うストレスバイオテクノロジーの必要性はすでに論じられてきた。¹⁻⁴⁾ 現在検討されている細胞の“品質管理システム”は、細胞の機能復元や恒常性維持には有効であるが、新機能獲得を含めたストレス介在型進化を説明するものではない。生体細胞が千差万別のストレス条件に晒された時、それが細胞自身の運命をいかに決定づける外的因子であるか（第1種あるいは第2種のストレス負荷の判別）が問題になる。これまでの研究は、レセプターなどシグナル伝達に関わる各種の生体素子、すなわち“どのような生体素子が”に研究が偏っており、細胞膜全体として“どのように”判定し、応答しているのかについて明確な回答がなされていないのが現状である。最近では、レセプターのみならず、特定のリン脂質や各種の生体素子との協同的な会合・解離・ラフト形成・崩壊がストレス応答を担うとの示唆もある。⁵⁾ 我々は大腸菌の熱ストレス応答により β -galactosidase のペリプラズム輸送を報告し、全体としての膜（“メンブレン”）を基盤にしたストレス応答ダイナミクスの重要性について指摘した。⁶⁾ モデル細胞膜（リポソーム）による膜透過や変性タンパク質の巻き戻り（リフォールディング）⁷⁾ なども報告してきた。細胞膜に対するホスホリパーゼ群の作用も重要である。これらは、細胞膜特性を支配するリン脂質の化学的変化などの一次的作用にとどまらず、 Ca^{2+} 動員、それに伴うホスホリパーゼ D やホスホキナーゼ C の活性化など、他の分子に対する二次的作用も誘起し、膜上での物理・化学的変化をシグナルとして利用している。細胞膜が示す、膜融合・分裂・溶解を含むスト

レス応答ダイナミクスの理解のためには、根底にある、細胞膜上であるいは、（モデル）細胞膜全体が示すシグナルの定量的把握がきわめて重要な課題となる。そこで本稿では、ストレス負荷による（モデル）細胞膜のストレス応答の重要性と検出手法に関する最近の研究成果の一端を紹介する。

ストレス応答モニタリングのこれまでの流れ

メンブレン・ストレスバイオテクノロジーにおいて、ストレス負荷条件でのタンパク質のダイナミックな構造変化やメンブレンとの相互作用をモニタリングし、定量的に評価する手法の開発が求められている。筆者らは、リポソームの膜特性の変化を検出原理とした、新規なメンブレンタンパク質間相互作用の解析手法の開発によって、タンパク質の構造変化を評価することが可能であることを報告してきた（図1）。^{8,9)}

（モデル）細胞膜が示すメンブレン・ストレス応答ダイナミクスは、外来ストレス因子による一次的応答とストレス因子-メンブレン間、メンブレン間の相互作用によって誘起される二次的応答とが複雑に絡み合った非平衡応答を示すので、プローブによる二次情報の解析では本来のメンブレン中を伝達するシグナル計測は困難であり、非侵襲・非破壊のオンライン計測が重要となる。

最近のセンサ開発の焦点は、レセプターの特異的相互作用を利用した μ -TAS（マイクロトータルアナライジングシステム）に向いている。微量の対象分子を高感度で

[カラー頁参照]

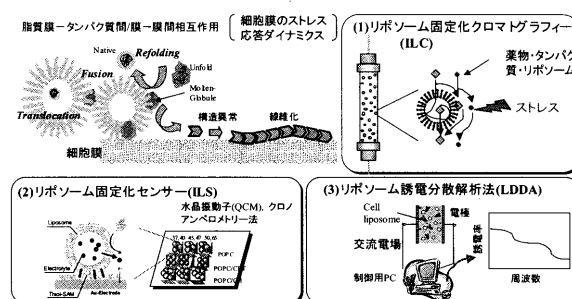


図1. 細胞膜のストレス応答ダイナミクスのモニタリングツールに関する概要

* 著者紹介（代表） 大阪大学大学院基礎工学研究科物質創成専攻化学工学領域（教授） 〒560-8531 豊中市待兼山町1-3
TEL. 06-6850-6285 FAX. 06-6850-6285 E-mail: kuboi@cheng.es.osaka-u.ac.jp

検出するため、表面プラズモン共鳴法 (SPR) や Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA 法) が検討されている。ELISA 法は、抗原または抗体・レセプターを酵素で標識化して対象物質を高感度で検出する方法で、“どのような生体素子が” の研究に大きな威力を発揮しており、主に臨床検査や環境アセスメントに使用されている。また、SPR (BIA-CORE システム)¹⁰⁾ やリフラクトメーター¹¹⁾、水晶振動子¹²⁾ などでは、タンパク質や DNA、メンブレンなどをセンサ素子に固定化して、生体分子-固定化分子間相互作用に基づく対象物質検出手法の開発が行われてきた。しかし、(モデル) 細胞膜を固定化した従来の測定手法¹²⁾ は、固定化による膜特性の変化 (しなやかさの喪失) を考慮していないため、しなやかに応答する細胞膜全体の調和のとれた特性を適切に評価するには至っておらず、冒頭で述べた目的に適った解析手法の検討はほとんど行われていないのが現状である。それゆえ、細胞膜全体の応答をモニタリングする要素技術 (図 1) が求められている。

メンブレン・ストレス応答ダイナミクスに基づく ストレスモニタリングシステムの開発

上記の問題点を克服するためには、しなやかさを維持したメンブレン固定化技術の開発が望まれる。これまでに多くのグループでリポソームをゲルや固体表面上へ固定化する手法が提案されている。^{8,13-17)} その用途としては、原子間力顕微鏡での観察を目的としたもの¹³⁾ から、バイオリアクターとしての利用¹⁴⁾、検出感度向上のためのセンサー増感剤としての利用^{8,11)} まで幅広い。しかし、特定の組成であるが、リポソーム懸濁液を固体表面上に滴下すると、リポソームが自壊していく過程が原子間力顕微鏡で観察されており、¹³⁾ その特性を維持したまま固定化するには何らかの工夫が必要である。現在、大きく分けて 4 つの手法が提案されている。(1) 抗原-抗体反応による固定化、(2) 共有結合法、(3) 疎水結合法、および微細な細孔を有する担体などの材料の場合、(4) 立体的な封じ込め、などがある。

森田らは、水晶子マイクロバランス法 (QCM) に用いる水晶振動子表面へのリポソームの固定化を検討している。¹⁶⁾ リポソームのしなやかさを失わないために、金電極をカルボキシチオール溶液に浸潤させ、チオール自己集合膜を形成させた後、表面のカルボキシル基を活性化させ、アミノ修飾した 1-パルミトイル-2-オレオイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン (POPC) / ホスファチディルエタノールアミン (PE) リポソームを固定化した。この

ような固定化手法を活用することで、細胞膜全体の応答を、リポソームと対象分子間の相互作用に基づいて簡便に評価できる可能性がある。以下では、リポソームを固定化する固定化リポソームクロマトフィー (ILC)、リポソーム固定化センサー (ILS)、リポソーム誘電分散解析法 (LDDA) による結果を概説したい。

メンブレン-タンパク質間相互作用のモニタリング

ゲル担体にリポソームの特性を維持したまま固定化したリポソーム固定化クロマトグラフィー (ILC) を用いて、タンパク質-モデル細胞膜間相互作用の定量的・網羅的な検討も進められている。^{7,17,18)} この手法は、タンパク質の溶出挙動がリポソームとの相互作用の強さに依存することに基づいている。したがって、ストレス条件下での溶出挙動の変化を、メンブレン-タンパク質間相互作用の指標として解釈することができる。ストレス負荷によるタンパク質の構造変化により、局所的疎水性の増大に伴うメンブレンとの相互作用の増加が確認されている。特に、膜融合や膜透過現象が誘導されるのは強い相互作用が働いたときであり、第 2 種のストレス負荷によって誘導される細胞膜上での各種相互作用がメンブレンを中心に非常に強いものであることが予想される。低分子量物質の場合でも、物質の疎水性に起因するバルク相-メンブレン間の分配挙動が溶出挙動と相関することが報告されており、脂質膜に対するタンパク質の分配挙動が (局所的) 疎水性に支配されることがこれまでの研究から分かっている。¹⁷⁾ さらに、本手法はメンブレン間相互作用にも適用され、凝集・膜融合現象に関する体系的な理解が進んでいる。¹⁹⁾

蛍光物質を封入したリポソームを固定化すると、対象物質との相互作用により引き起こされる膜攪乱効果により蛍光物質の漏出が起きる。これを利用して、溶出挙動をより高感度に検討する試みがなされている。¹⁷⁾ 一方、蛍光物質の代わりにフェロシアン化鉄などの電解質を封入した場合、電気化学的手法でリポソーム-タンパク質間相互作用を検出できる。⁸⁾ ゲル担体ではなく電極表面上に共有結合法で固定化したリポソーム固定化センサー (ILS) の場合、電極表面での電解質漏出量をクロノアンペロメトリー法による電流値により計測できる (図 2 (a))。電流値 ($I_{\max}/C_{pr}$) と脂質膜-タンパク質間相互作用の強さ是对応し (図 2 (b))、パターン解析によりストレス負荷条件でのタンパク質の構造状態を同定できる (図 2 (c))。詳しくは原著論文⁸⁾ を参考されたい。上記の手法は、相互作用によるメンブレンへの攪乱・劣

[カラー頁参照]

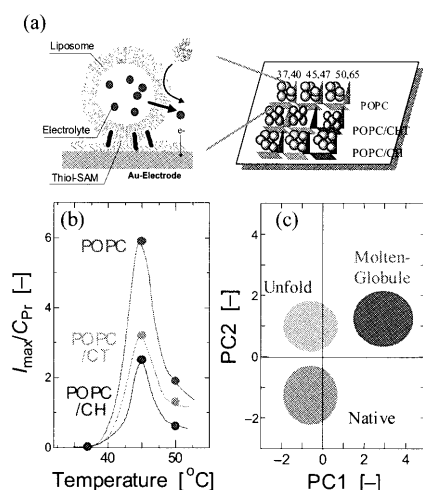


図2. リポソーム固定化センサ (ILS) によるタンパク質のストレス応答のモニタリング (文献7). $I_{\max}/C_{pr}$ は添加タンパク質あたりの電流値. PC1, PC2 はパターン解析で得られるパラメータ.

化効果を検討している. 水溶性蛍光プローブの透過性が一般的に低いのは, 漏出過程においてメンブレン表面に形成される静電的な透過障壁を超えなければならないからである. タンパク質による膜攪乱はそのバリアー能を物理的に低下させ, 劣化を誘起し, メンブレン間相互作用による凝集・膜融合が誘導される. 生体内では, 劣化部位のリン脂質をホスホリパーゼ群によって化学分解され, リサイクルされることでメンブレン組成・恒常性が維持されることがすでにわかっている. また, ジャイアントベシクル (粒径がマイクロオーダーのリポソーム) を用いて顕微鏡下で可視化すると, タンパク質との相互作用でジャイアントベシクルの生成過程が加速されることが, 粒径変化からも確認されている.²⁰⁾ したがって, 膜攪乱による劣化の過程でメンブレンに何らかの修飾・変化 (シグナル) が生じたことが予想される.

リポソーム誘電分散解析法によるメンブレンのストレス応答ダイナミクスの評価

細胞膜全体としての特性変化をシグナルとして検出するため, メンブレンの構成成分であるリン脂質分子の並進・回転運動などを検出できる計測手法が必要である. これらの情報はリポソーム誘電分散解析法 (LDDA) やナノ秒分解蛍光分光法, ESR などでも得ることができる. 特に我々は, 非浸襲性・非破壊である LDDA を用いて検討している. 劣化の一つのモデルとしてタンパク質の膜透過に着目した結果, 図3に示すように, メンブレ

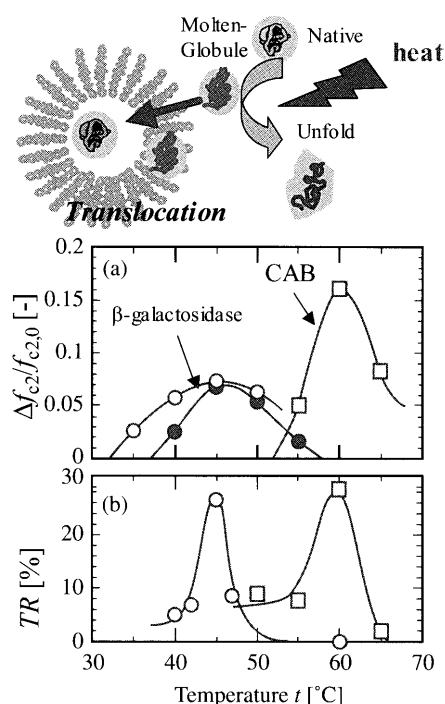


図3. 誘電分散解析によるタンパク質の膜透過現象のモニタリング (文献8). $f_{c2}, f_{c2,0}$: タンパク質共存/非共存条件下でのリポソームの緩和周波数. ここで, $\Delta f_{c2} = f_{c2} - f_{c2,0}$ である. TR: 膜透過量

ンへのタンパク質の挿入によるリン脂質の運動の低下 ($\Delta f_{c2}/f_{c2,0}$) が観測された.⁹⁾ β -galactosidase の場合, 45°C 付近で, ウシ炭酸脱水酵素 (CAB) の場合, 60°C 付近で, リン脂質分子の並進・回転運動の減少が最も大きく, 膜透過量 (TR) が最大になることと対応していた. CAB の場合, 60°C 付近で局所的疎水性が最大になり, 一種の中間状態 (molten-globule 状態) であると考えられている. これは, 疎水性蛍光プローブによる結合実験や円二色性分光法などの実験事実からも支持されている. この構造状態ではメンブレンと相互作用しやすいことが, 前述の ILC や ILS などによる実験において確認されている. したがって, メンブレン・タンパク質間相互作用によるタンパク質のメンブレンへの配向は, リン脂質分子の運動を阻害するものと考えられ, (モデル) 細胞膜全体としての特性 (流動性など) の変化・シグナルを検出できたと考えられる.

これらの知見は, 膜タンパク質をリポソームに組み込んだプロテオリポソームの調製におけるストレス負荷の有効利用にもつながると考えられ, 知見が蓄積されつつある.

細胞膜上でのストレス応答ダイナミクスのモニタリングに関するこれまでの知見の一端を紹介したが, 最近,

金属イオンによる酸化ストレスが細胞膜やタンパク質に重篤な影響を及ぼし、アルツハイマー症などの構造異常疾患を誘発している可能性が報告されている。細胞膜周辺での金属イオンの影響は、金属と錯体を形成するリガンドを修飾したリポソームを ILC などの各種モニタリング手法に応用することで解明に近づくであろう。またメンブレン-タンパク質間相互作用に及ぼす水素結合強度についても検討が進められている。²¹⁾ 詳細は別稿に譲るが、これらの知見に基づき、細胞膜が発現するストレス応答ダイナミクスに立脚した新規な薬物送達戦略の創出²²⁾や機能材料設計・開発への展開が“メンブレン・ストレスバイオテクノロジー”の今後の一つの方向性であると考えている。

文 献

- 1) 久保井亮一: ケミカルエンジニアリング, **47**, 742 (2002).
- 2) 島内寿徳ら: ケミカルエンジニアリング, **47**, 748 (2002).
- 3) 久保井亮一ら: 生物工学, **82**, 201 (2004).
- 4) Kuboi, R.: *Proc. of 3rd Int'l 21 COE Symp. on Integrated EcoChemistry*, O02 (2004).
- 5) Suzuki, K. *et al.*: *Biophys. J.*, **82**, 348 (2002).
- 6) Umakoshi, H. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **14**, 909 (1998).
- 7) Yoshimoto, M. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **15**, 689 (1999).
- 8) Jung, H.-S. *et al.*: *Solv. Extr. Res. Dev. Jpn.*, **10**, 123 (2003).
- 9) Morita, S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 252-256 (2003).
- 10) 山口哲志ら: 化学工学論文集, **27**, 191 (2001).
- 11) Baeumner, A. J. *et al.*: *Anal. Chem.*, **74**, 1442 (2002).
- 12) Fernandez, A. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2391 (2003).
- 13) Kanno, T. *et al.*: *Anal. Chemistry*, **309**, 196 (2002).
- 14) Yang, Q. and Lundahl, P.: *Biochemistry*, **34**, 7289 (1995).
- 15) Beigi, F. *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **704**, 315 (1995).
- 16) 森田誠一, 久保井亮一: ケミカルエンジニアリング, **47**, 45 (2002).
- 17) Liu, X.-Y. *et al.*: *J. Chromatogr. B.*, **750**, 51 (2001).
- 18) 久保井亮一ら: ぶんせき, **11**, 636 (2003).
- 19) Menayame, M. F. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 498 (2002).
- 20) Shimanouchi, T. *et al.*: *Giant Vesicle* (Walde, P. and Luisi, P. L.), p. 369, John & Wiley (1999).
- 21) Hong, D.-P. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 8427 (1999).
- 22) 久保井亮一ら: ケミカルエンジニアリング, **49**, 255 (2004).