

# ナノスケールすきま制御技術を用いた

## 脂質輸送評価系の構築を目指して

### Challenge to reproduce lipid transport at membrane contact sites utilizing nanoscale gap regulation technology

国立感染症研究所 水池 彩



真核細胞のオルガネラ（細胞小器官）間コミュニケーション機構の一つとして、オルガネラ膜同士が数十ナノメートル程度以内まで近接した領域であるメンブレンコンタクトサイトが知られる。コンタクトサイトは、脂質やカルシウムイオン等の分子の輸送や情報伝達の間として働くなど様々な役割を有し<sup>1)</sup>、オルガネラや細胞の機能を発現・維持するうえで極めて重要な機能場である。膜間距離が数～数十ナノメートルとなる空間は、タンパク質分子が一～数個存在できる程度のスケールであり、いわゆる試験管内（*in vitro*）実験が行われるバルク空間とは環境が大きく異なる。このスケールの空間は、液相から孤立系の単一分子へ移行する過渡的な領域であり、分子の振る舞いが壁面の静電的影響を受けるようになる特異的な環境であることから、特に物理化学分野において高い学術的関心を集めてきた<sup>2)</sup>。コンタクトサイトで働くタンパク質も、このスケールの空間の特異的な環境の影響下にあると考えられるが、コンタクトサイトの空間サイズを規定する膜間距離が空間の環境に及ぼす影響の重要性や意義についての知見は極めて少ない。我々はコンタクトサイトで働く脂質輸送タンパク質を研究対象としてきたが、脂質輸送活性の評価系は試験管内での膜小胞を用いた手法が主流であり、膜間距離に依存した特異的な環境がタンパク質に与える影響は無視されてきた。そこで本研究は、機械工学分野で実現されてきたナノスケールのすきまを精密に制御できる技術を応用してコンタクトサイトを模倣する系を確立し、コンタクトサイト再現系におけるタンパク質の挙動の観察や脂質輸送を評価することを目的とした。

ナノスケールすきま制御技術では、ピエゾアクチュエータに固定したガラス基板を顕微鏡系に組み込み、ナノメートルオーダーで距離を計測・制御する。そこで、ピエゾに固定する基板およびステージに設置する基板の表面に脂質二重層膜（supported lipid bilayer）を形成することを目指した。脂質輸送タンパク質のリガンドとなる蛍光標識脂質を 5 mol%含む膜小胞を用いたベシクル融合法によりガラス基板上に均一な脂質二重層膜を形成する条件を検討した。比較的均一に支持脂質二重層膜を形成できる膜脂質の組成を見出し、形成できた膜が流動性をもっていることが確認できた。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の脂質輸送タンパク質 Sec14 の精製タンパク質を支持脂質二重層膜に作用させたところ、一部の領域で膜が不安定化する様子が観察され、上清中の蛍光量が増加していた。検出感度の問題により過剰量の Sec14 を加えていたため、支持脂質二重層の一部が崩壊したと考えられた。これにより、支持脂質二重層膜からも脂質輸送タンパク質は脂質分子を引き抜くことができると示唆された。支持脂質二重層膜は乾燥により崩壊しやすいため、基板表面が水層で覆われた状態を維持したまま顕微鏡系に組み込む必要があるという課題に現在は取り組んでいる。

【キーワード】 コンタクトサイト、ナノスケール空間

【参考文献】

- ・ 1) Salvador-Gallego et al., *Cell* **171**, 1224, (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.005>
- ・ 2) 拡張ナノ流体工学: [https://webpark1390.sakura.ne.jp/cms/?page\\_id=169](https://webpark1390.sakura.ne.jp/cms/?page_id=169)