ナノすきま制御技術を用いた細胞内生体膜間距離の意義の解明

Elucidation of the significance of the distance between organelle membranes at the contact sites with nano-scale gap regulation technology

（日本脂質生化学会推薦）

代表研究者	国立感染症研究所	水池　彩	National Institute of Infectious Diseases	Aya MIZUIKE
協同研究者	名古屋大学	東　直輝	The Nagoya University	Naoki AZUMA

Membrane contact sites are a major mode of inter-organelle communication in eukaryotic cells, where organelle membranes are positioned within several to several tens of nanometers of each other. These sites serve as platforms for molecular transport and signaling and are essential for organelle and cellular functions. At this length scale, the intermembrane space can accommodate only one to a few protein molecules, creating an environment fundamentally different from the bulk conditions typically used in vitro. In physical chemistry, spaces of several tens of nanometers are regarded as transitional regimes between liquid-phase ensembles and isolated single molecules, where molecular behavior can be influenced by electrostatic effects from surrounding surfaces. In this study, we aimed to establish an experimental system that mimics membrane contact sites by applying engineering technologies capable of precisely controlling nanoscale gaps, and to quantitatively analyze lipid transport within this confined space. We successfully formed a fluid lipid bilayer on a substrate and confirmed that a lipid transport protein could extract lipid molecules from the membrane. Although technical and structural challenges remain in integrating the substrate into the microscopy system, these findings provide an important basis for developing a microscopy-compatible platform to analyze lipid transport in nanoscale confined spaces.

研究目的

真核細胞のオルガネラ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主に、脂質やカルシウムイオンなどの分子の輸送やシグナリングの場として働き、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。近年、同一の組み合わせのオルガネラで形成されるコンタクトサイトにおいても、膜間距離が異なる領域が存在することが報告されはじめているが、その距離の重要性や意義についての知見は極めて少ない。

膜間距離が数－数十ナノメートルという空間は、タンパク質分子が一～数個程度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大きく異なる環境である。物理化学分野においては、数十ナノメートルというスケールの空間は、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、学術的関心が高い。コンタクトサイトで機能するタンパク質も、この空間の特異的な環境の影響下にあると考えられる。

コンタクトサイトを利用する因子として、脂質輸送タンパク質が研究されてきた。現在まで、脂質輸送タンパク質の輸送活性を評価する系としては、人工膜小胞を用いた手法が主流である。しかし、試験管内の膜小胞は溶液中をブラウン運動により拡散しており、生体膜間距離というパラメータがタンパク質に与える影響は無視されてきた。そこで本研究では、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、その中で生じる脂質輸送を定量的に解析することを目的とする。それにより、コンタクトサイトで働く因子によって機能・活性に最適な生体膜間距離（至適膜間距離）が存在するかという仮説の検証を目指す。

研究経過

1）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。ピエゾに固定した基板およびステージに設置した基板の表面にそれぞれ異なる脂質組成の膜を形成し、蛍光標識脂質の輸送を蛍光共鳴エネルギー移動（Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET）により評価する系の構築を目指した。

まずは、ガラス基板上に脂質二重層膜を形成することを試みた。固体表面に吸着させた脂質二重層膜は支持脂質二重層膜（supported lipid bilayer）と呼ばれ、ベシクル融合法など形成手法が開発・報告されているが、膜を構成する脂質の組成によっては均一に膜を形成することが困難であることが知られる。一方で、脂質輸送タンパク質がリガンド脂質分子を膜から引き抜き、挿入できる性状の膜である必要があるため、組成の検討を進めた。

FRET を利用するために、リガンド脂質として、脂質分子の疎水性炭化水素鎖に蛍光団として NBD を導入した脂質を選択した。NBD の消光には、脂質分子の親水性頭部に蛍光団として lissamine rhodamine B を導入した脂質を用いる。NBD 標識脂質と rhodamine 標識脂質の両方が含まれる膜においては、NBD の蛍光は隣接する rhodamine により消光されるが、NBD 標識脂質が脂質輸送タンパク質によって rhodamine 標識脂質を含まない膜に輸送されると、NBD の蛍光が消光されないため、増強する。すなわち、NBD の蛍光強度の増加度により輸送を評価できる。また、NBD 標識脂質でも炭化水素鎖長が短い C6-NBD 脂質は、膜から自発的に抜けて近接した疎水性環境に再挿入されると報告されている[1]。膜同士を数～数十ナノメートルに近接させる系で用いるには不適であるため、そのような現象の起こりにくい鎖長である C12-NBD 標識脂質を選択した。

現在までに報告のある支持脂質二重層膜はグリセロリン脂質で構成されたものが主流である。そこでまずはグリセロリン脂質のみで構成される脂質二重層膜から着手した。ホスファチジルコリン（phosphatidylcholine, PC）を主体に、リガンド脂質として NBD 標識 PC を 1 mol%含む膜小胞（ベシクル）を作製し、ベシクル融合法によりガラス基板表面に吸着させることを試みた。ガラス基板には、UV/オゾン処理によりスライドガラス表面を親水化したものや、アミノシランコートスライドガラスを用いた。原子間力顕微鏡により基板表面を観察したところ、脂質二重層膜と同等の 5 nm 厚さの構造がみられたが、膜が形成できていない領域や多層になっている領域が多く、均一ではなかった。小胞の直径を μm オーダーまで大きくした giant unilamellar vesivle (GUV)を用いても同様で、不均一なままであった。

原子間力顕微鏡観察のためにサンプルを乾燥させていたが、支持脂質二重層膜は乾燥により壊れやすいという指摘が受けたため、分解能は下がるが、蛍光顕微鏡観察により膜形成の均一性を確認することとした。また、基板表面の親水化処理の甘さが不均一性の原因となるとの助言を得て、アンモニア・過酸化水素水溶液を用いた洗浄・エッチング工程[2]を加えた。以降は、洗浄操作を行いやすいカバーガラスあるいはシリコンウエハーを基板として検討を進めた。

輸送リガンドとして NBD 標識 PC を 5 mol%含む小胞の組成の検討を進めた。疎水性炭化水素鎖に蛍光団を導入した脂質を含む膜では、従来用いられてきた極性頭部に蛍光団を導入した脂質を含む膜と比較して、小胞の開裂しやすさが異なる可能性が考えられる。そこでまずは小胞の基盤となる非標識 PC について、DOPC（1,2-dioleoyl-PC）と POPC（1-palmitoyl-2-oleoyl-PC）を比較した。DOPC:NBD-PC＝95:5 で調製した小胞を基板に融合させ、純水による洗浄後に蛍光顕微鏡で観察すると、膜が形成できていると考えられる像が得られたものの、基板表面に吸着した未開裂の小胞が多く残っており、輸送解析に用いるには不適当であると考えられた。POPC:NBD-PC = 95:5 で調製した小胞を用いた場合には、未開裂の小胞らしき蛍光シグナルはほとんど見られなかったことから、POPC の方が適していると考えられた。一方で、極性頭部に蛍光団を導入した lissamine rhodamine B 標識脂質を 1 mol%となるように加えた場合では、未開裂の DOPC 小胞はほとんど見られなかった。いずれの組成の小胞を用いた場合でも、光褪色させた領域において経時的に蛍光が回復する様子がみられ

たことから、流動性をもった膜が形成できていると考えられた。

流動性をもった支持脂質二重層膜が形成できるようになってきたことから、この膜から脂質輸送タンパク質がリガンド脂質を引き抜くことができるかを検討したいと考えた。NBD-PC を引き抜くことができる脂質輸送タンパク質として、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Sec14 を用いることにしたが、Sec14 は非標識 PC を膜から引き抜くことができるため、POPC:NBD-PC = 95:5 の膜を用いると、蛍光標識脂質の引き抜き効率が低く、検出が困難になると考えられた。そこで、Sec14 がほとんど結合しないホスファチジルエタノールアミン（phosphatidylethanolamine, PE）を加えることにした。DOPE（1,2-dioleoyl-PE）は、極性頭部が小さいという構造の特徴から、含有量が高いと脂質二重層膜小胞を形成しなくなるため、30 mol%で加えることとした。DOPE を加えた膜小胞は基板表面で開裂しづらく、支持脂質二重層膜形成効率が悪いとの報告 [3] があったことから、同論文において DOPE 添加による影響を打ち消すことができると示された lyso-PC（1-oleoyl-2-hydroxy-PC）を 10 mol%で加えた膜小胞も作製し、比較することにした。POPC:DOPE:NBD-PC = 65:30:5 の膜小胞を用いると、流動性をもった膜が一部形成できたものの、未開裂の小胞が多く吸着しているのか、基板表面の蛍光シグナルは不均一であった。一方、POPC:DOPE:lyso-PC:NBD-PC = 55:30:10:5 の膜小胞では、lyso-PC を含まない膜と比較して均一性が高かった。

これまで、ベシクルを基板に融合させた後の洗浄には純水を用い、その後も純水で膜表面が覆われた状態で顕微鏡観察を行なっていたが、タンパク質を作用させるためには、純水よりも緩衝液を用いる方が好ましい。そこで、PBS を用いて洗浄したところ、膜を形成できていない領域が多く生じてしまった。純水による洗浄後に基板を緩衝液中に沈め、緩衝液に置換する方が良いことが判明した。また、乾燥による支持脂質二重層膜の不安定化・崩壊についても、洗浄後に水をデキャンテーションで除去してから観察すると不均一性が上がっていたことから、実際に確認できた。

基板上に形成した支持脂質二重層膜を覆う純水あるいは緩衝液中に Sec14 を過剰量添加し、経時的に観察したところ、一部の領域で膜が不安定化する様子がみられ、上清を回収して蛍光プレートリーダーで検出したところ、Sec14 非添加の上清と比較して高い蛍光値を示した。過剰量の Sec14 が膜から（蛍光修飾・非修飾問わず）脂質分子を引き抜いたことで、膜の一部が崩壊したと考えられた。

2）コンタクトサイトではたらく脂質輸送タンパク質の細胞内の挙動の解析

哺乳動物細胞のコンタクトサイトではたらく脂質輸送タンパク質には、オルガネラ膜を認識・結合するドメイン、脂質を結合・輸送するドメイン等の間を天然変性リンカーが繋いだ構造をとるものが多い。タンパク質によってリンカーの長さは異なるが、同じ遺伝子にコードされているタンパク質でもスプライシングバリアントで異なるリンカー長となることもある。そのような構造をもつ脂質輸送タンパク質のなかで、小胞体とゴルジ体の間で働くセラミド輸送タンパク質とコレステロール輸送タンパク質は、協調して機能すると推定されてきた。類似の構造をもつこれらタンパク質の局在を、誘導放出抑制顕微鏡（STED）を用いて超解像度で観察したところ、一部のみしか共局在を示さなかった。今後、これらが局在するコンタクトサイトの膜間距離の計測方法を検討する。

小胞体ーゴルジ体間コンタクトサイトではたらく脂質輸送タンパク質の多くは、ゴルジ体膜上で合成される脂質ホスファチジルイノシトール 4-リン酸（phosphatidylinositol 4-phosphate, PI4P）との相互作用を利用する。そこで、PI4P の超解像観察を可能とする可視化法の検討を進めた。抗 PI4P 抗体を用いたゴルジ体 PI4P の染色法の最適化を進め、ゴルジ体の *cis* 領域よりも *trans* 領域に PI4P が豊富であるというこれまでの知見を支持する観察結果が得られた。一方で、抗 PI4P 抗体は IgM であるため分子サイズが大きく、コンタクトサイトの PI4P の検出に最適とはいえない。既存の PI4P プローブは蛍光タンパク質と融合して用いられることが多いが、蛍光強度が STED による観察に耐えられないため、分子サイズの小ささと蛍光の強さ・耐久性を兼ね備えたプローブの設計を進めている。また、脂質染色法の最適化を進めたものの、脂質分子の水平拡散を抑えることのできる固定化法は未だ確立できていないため、今後も検討を続ける。

考察

基板上に目的の組成をとる支持脂質二重層膜を形成させることが可能になってきた。基板上に形成した膜は流動性をもち、脂質輸送タンパク質が脂質分子を引き抜くことができる性状を維持していると考えられた。

今回、膜からの脂質分子の引き抜きを確認する際に過剰量の脂質輸送タンパク質を作用させたことで、支持脂質二重層膜の一部が崩壊する現象がみられた。リコンビナントタンパク質の発現に用いた大腸菌には Sec14 の固有の結合脂質（PC および phosphatidylinositol, PI）が存在しないため、Sec14 の多くが脂質結合ポケットに脂質分子を挿入していない状態で精製されたと考えられる。Sec14 が支持脂質二重層膜から一方的に脂質分子を引き抜いたために膜が不安定化したと考えられた。二枚の膜を近接させた条件で適正量の脂質輸送タンパク質を系に導入した場合には、膜間で脂質分子の交換が起こるため、膜の不安定化は生じにくいと推定できる。

以上のことから、作製した支持脂質二重層膜を脂質輸送の評価系に用いることは可能だと考えられ、輸送評価系の構築に重要な基盤を設計することができた。しかし、乾燥に弱いという特性から、膜が濡れた状態を維持しながらピエゾアクチュエータに固定する必要があることがわかった。今後、基板の固定方法や、膜の側方安定化による乾燥耐性の付与などを検討することで、脂質輸送評価系の構築に繋げていく。

本研究を進めるなかで、小胞体ーミトコンドリア間のカルシウムイオン輸送において、小胞体ーミトコンドリア間の距離が重要であることを示す論文が発表された[4]。当該論文では、オルガネラ間が近ければ近いほど輸送効率が高いわけではなく、適切な距離となるよう制御する必要があると示唆されたが、詳細な機構は未解明である。本研究で構築しつつあるコンタクトサイト模倣系を引き続き改良していくことで、細胞内の様々な領域で構築されるナノスケール空間の特異的環境を規定する生体膜間距離の意義の解明に繋がると期待される。

参考文献

1. Sumi et al., *Sci Rep*, **7**, 2900, 2017
2. Nagai et al., *Adv Biol*, **5**, 2100636, 2021
3. Hamai et al., *Biophys J*, **90**, 1241–1248, 2006
4. Dematteis et al., *Commun Biol*, 7, 1294, 2024

研究の発表

口頭発表

1. 水池　彩：多様な技術で解き明かす生体膜ダイナミズム、第 47 回日本分子生物学会大会、福岡、2024 年 12 月
2. 水池　彩：オルガネラコンタクトを介した脂質動態制御機構、第 48 回日本分子生物学会大会、横浜、2025 年 12 月

誌上発表

1. なし