

リポソームを用いた細胞モデルの創成

オーガナイザー：山中 透（京都大・理）

講演者：宝谷 紘一（科学技術支援機構・ソフトナノマシン領域）

生命、我々が今こうして考えていること自体が奇跡である。

我々にとって一番身近な生命。生命一単位としての現象から細胞レベルまで、現象の理解が進んできたが、その物理的メカニズムについてはいまだ未解明なところが多い。

我々は生命現象に直面したとき、その美しさを思い興奮する。さらにそのメカニズムを解明したとき、さらなる興奮を覚える。そして、生命により近づきたい知的興奮に駆り立てられ、生命の虜となる。

これまでの研究では、細胞が成長、分裂、融合、形態変化などの現象が取り出され、細胞内での nm スケールから μm スケールの現象が明らかになってきた。

ここで、ふと疑問に思う。これらの現象は、果たして細胞に限ったことなのか。どこまでが細胞を構成する要素に依っていて、どこまでが自然法則に依るのか。我々は、生命現象に秘められた自然法則の解明を切に願う。

宝谷先生はリポソームを用いた構成的手法により、細胞自体の直接観察では隠されていた膜自身の形態変化能を明らかにされました。さらにリポソーム内部で、細胞骨格である微小管やアクチン線維を再構成させ、より細胞に近い実験系を創成されました。この実験系を用いて、細胞骨格の成長による形態変化に成功され、膜小胞の場合、構成要素は形態変化の主因ではないことを示されました。

このように、宝谷先生は実際の細胞より単純な実験系において、生命現象の本質の一端を解明されました。こうした構成的手法は今後も、生命の本質を切り出すのに有用であると言えます。

今回の講演では、生命現象に隠された自然法則を解明するこの興奮を皆様といっしょに味わいたいと思います。皆様の参加をお待ちしております。

リポソームを用いた細胞モデルの創成

科学技術振興機構・ソフトナノマシン領域 宝谷紘一

はじめに

すべての生き物は細胞から構成されている。その細胞が生命活動を維持するためには、細胞中に存在する多様なコンパートメント（膜小胞）での生化学反応とそれらの小胞を三次元的に制御する細胞骨格が必須である。そこでリポソームの内部で、代表的な細胞骨格である微小管やアクチン線維を再構成させて、細胞モデルを創った。細胞骨格の成長により、リポソームは細胞類似型を含む様々な形に変化した。その形態形成の主要因はタンパク質による細胞骨格線維の連結様式と膜の物理的性質であった。このモデルは将来、赤血球に見られるような単一機能細胞の構築を目指したプロトタイプとして有力になると考えられる。

1. 細胞モデルとは

1.1 細胞は膜で囲まれた小空間である

昔から“細胞は生命の基本単位である”と言われてきた。実際に細胞自身が生物としての特性を備え、自己増殖をする最小単位になっている。細胞の基本的な特徴は、膜によって外界から区切られた3次元的空间になっていることである。その内部では休むことなく何千種類もの生化学反応が自律的に行われている。これらの諸反応が停止することは細胞の死、つまり非生物への移行を意味する。生命体にとっては、その動的特性を維持することは最も基本的な課題であり、そのために生物は多くの巧妙な仕掛けをあみだしてきた。

細胞内の諸反応の間には複雑で巧妙な相互作用があり、その結果、全体的な秩序が形成されている。細胞は外界からエネルギーと物質を取り込み代謝することによって、必要な化合物を合成し、細胞内の様々の構造を構築する。生命がエントロピー減少系だといわれるゆえんである。つまり膜で囲まれた空間は、外側の自然環境とは著しく異なっているのである。生命界と非生命界を区切っているのが、その厚さわずか5~10 nmの膜なのである。もちろん生体膜は単なる仕切りではなく、外界とエネルギーや物質や情報をやりとりする機能が不可欠である。つまり、細胞を構築するためにまず肝心なことは、半透性の膜に囲まれた小空間を作ることである。

1.2 細胞動態を支える素子：膜小胞と細胞骨格

生化学反応を継続し、さらに成長・増殖するシステムを実現化するためには、エネルギー消費はもちろん必要であるが、それだけでは十分ではなく、さらに空間的不均一性が必要になる。実際に細胞は、その内部に多種多様なコンパートメント（膜小胞

）を構築し、トポロジー（位相幾何学）的な不均一性を作り出している。さもないければ細胞のような微小空間では、ブラウン運動によってあらゆる生体分子が混ぜ合わされて、すぐに均一濃厚溶液になってしまう。各々のコンパートメントでは、それぞれに特異的な環境が保たれ、独自の反応が効率よく遂行されている。さらにそれらの諸反応が相互作用し合って、秩序ある生命活動が保たれている。そのために細胞内のコンパートメントは常時、分裂、融合、移動、変形、増殖、消滅など、ダイナミックに変化している。

これらの構造変化を支援し、具体化させている装置が、微小管やアクチン線維から成るネットワークであり、細胞骨格と呼ばれている（図1）。その上を走行するミオシンやダイニン、キネシン等のさまざまなモータータンパク質の働きにより、膜小胞は変化する。この様相こそが細胞動態の根幹である。したがって、これらの線維は“骨格”という名前から浮かんでくるような静的なものであり得るはずはない。実際にこれら2種の細胞骨格線維は、生命のダイナミックスを維持する器官として細胞に普遍的に存在し、多機能性を発揮している。

例えば、微小管は細胞周期や細胞の生理的条件に応じて形成・解体を繰り返している。細胞は微小管が必要になった時には、サブユニットであるチューブリンを重合させて微小管を形成する。一方、生理的条件が変化して不必要になると、その微小管を素早く脱重合させて再び個々のチューブリンにする。脱重合したチューブリンはアミノ酸まで分解されるのではなく、つぎの微小管形成の際の構成要素として利用される。すなわち、チューブリンは細胞内でリサイクルしているのである。

1.3 細胞と膜器官の形

各種の細胞はそれぞれの機能に応じて特異的な形態をしている。神経細胞は通信ケーブルの役割を果たす極めて細長い管をもっている。上皮性細胞は多方向に伸展して平たくなり、覆う面積を増やしている。小腸の細胞はその表面に、絨毛と呼ばれる無数の突起を出して吸収の効率を上げている。

さらに細胞内部にはいろいろな形の膜小胞がぎっしり詰まっている。その膜小胞にはたくさん種類があって、それぞれが独自の機能をもっている。さらに、それぞれの膜小胞が分裂したり、別の膜小胞と融合したりする。そして、小さな膜小胞が大きな膜小胞間を行ったり来たりしている。たとえば、小胞体とよばれる膜小胞では蛋白質が合成されるが、作られたタンパク質はゴルジ体とよばれる膜小胞へ、小さな膜小胞に詰められて運ばれる。ゴルジ体の中でタンパク質は仕分けされる。細胞内に残れ、あるいは外へ出せ、あるいは分解せよとか、いろいろな命令にしたがってタンパク質はそれぞれの部位へ運ばれる。このように分裂・融合をくりかえしているために、ある膜小胞を染めて可視化すると、1分後には形も大きさも変わっているというぐらいダイナミックである。

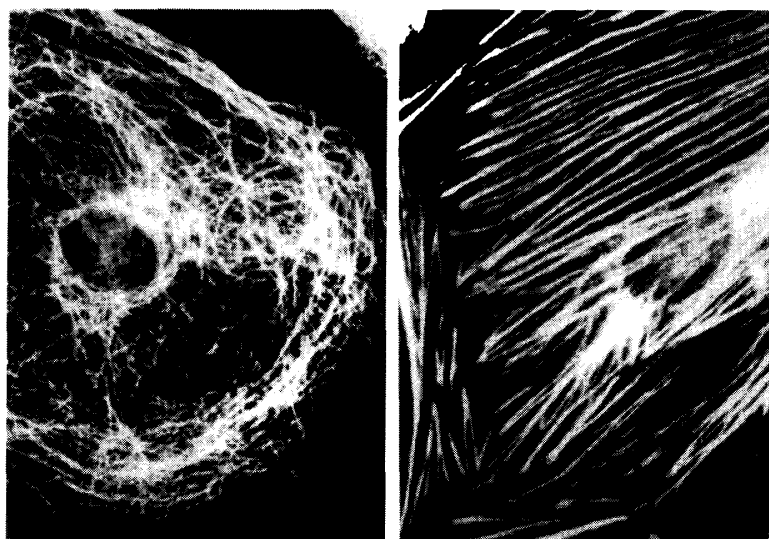


図1. 生細胞の細胞骨格ネットワーク。 微小管のネットワーク（左図）。
アクチン線維束のネットワーク（右図）。

1.4 細胞モデル創成へのアプローチ

人工細胞へのアプローチは、その目的によって多くの方法が考えられる。例えば生細胞を遺伝子操作技術によって改変したり、細胞融合を使って新しい細胞を作成することも一つの方法である。しかし、ここでは、最近精力的に開発されているリポソームを使った方法を紹介する(1~3)。つまり、細胞骨格と細胞骨格結合タンパク質によってリポソームの形を制御する方式について述べる(図2)。

リポソームを人工細胞のモデルとして用いる場合、まず物理的脆弱性を克服しなければならない。そのために多糖類を含む脂質を混ぜ、リポソーム表面を多糖類で覆うことによって強化したり、あるいは化学的感応基を持った脂質によってリポソームを作り、脂質分子同士を共有結合で架橋して強化することも試みられている。さらには、有機合成によって得られた脂質類似化合物からリポソームを作り、より丈夫にする試みもある。一方、リポソームに生理的活性を持たせるために、機能性タンパク質を膜に取り込ませることも行われている。小胞の内外に水素イオンの濃度勾配を作るプロトンポンプやイオンを透過させるイオンチャンネルがこの例である。

1.5 細胞膜モデルとしてのリポソーム

脂質分子は、溶液中では疎水基同士を内側にし、親水基を両表側つまり溶液に露出することによって自動的に集合して脂質二重層膜を形成する。その膜は自然に閉じて閉鎖空間つまりリポソームになる。そしてこの膜は基本的に細胞膜と同様の物理的性質を持っている。そこで、膜小胞のモデルとしてリポソームを用いることにした(1)。この膜は2次元液晶であり、脂質分子はこの脂質二重層膜の単層内を自由に移動することが出来る。細胞膜では、この2次元液晶の中に様々なタンパク分子が浮遊してい

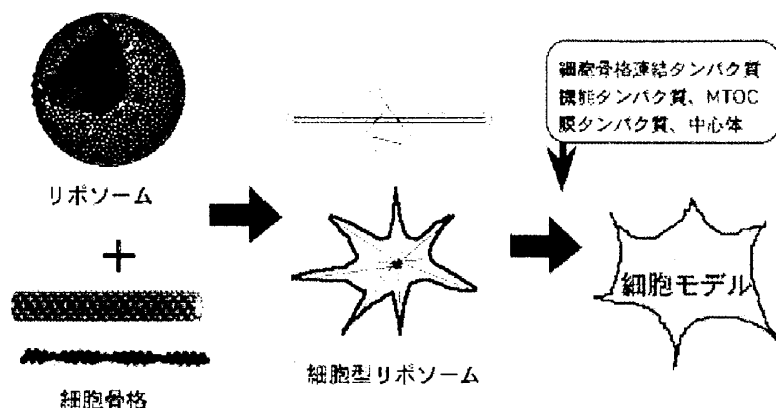


図2. 細胞モデル創成アプローチ。

る。もちろん、これらのタンパク分子が勝手に動きまわったのでは十分な機能を発揮できない。そこで、タンパク質である膜骨格が細胞膜内面にあり、それらが、膜タンパク質の動きを制御し、細胞自体の形態を維持する働きをしている。

リポソームはくびれて2つに分裂したり、逆に2つのリポソームが膜融合して一つのリポソームへと合体したりする能力を持っている。また、球状から管状や扁平状へと自在に変形できる。その多様な形態変換能は驚異的であり、細胞とはリポソームの特性が作り出した産物ではないかと思えるぐらいである。

1.6 リポソーム自身の自律的形態形成能

水溶液中のリポソームは不定形ではなく、図3に示したように多様ではあるが規則的な形をしていることが分かった4)。単純な脂質組成のリポソームがこのような幾何学的対称性の高い形をしているのは驚きである。

これらのリポソームを持続的に観察していると、それらの形は安定したものではなく、どんどん変化してゆくものであることが明らかになった。個々のリポソームについて詳しく変換過程を追ったところ、図3に現れた様々な形は、実は数種の形態変換経路（パスウェイ）の中間体であることが分かった。多数のリポソームの変換過程を録画し、それを集約すると図4が得られる。この結果より以下の2つの事が明らかになった。

(1) 形態変換は無規則に起こるのではなく、球型から赤血球型へ、赤血球型から多角形板状、突起のある板状、枝分かれした管状へと順次的に進行し、数種類の主要なパスウェイがある。

(2) いずれのパスウェイを経るにせよ、最初の形は球型ないし赤血球型であり、最終的にたどりつく形は柔軟な線維状細管型か小球型のいずれかである。あきらかに、リポソーム自身が自律的に形態を形成し制御する能力を持っているのである。

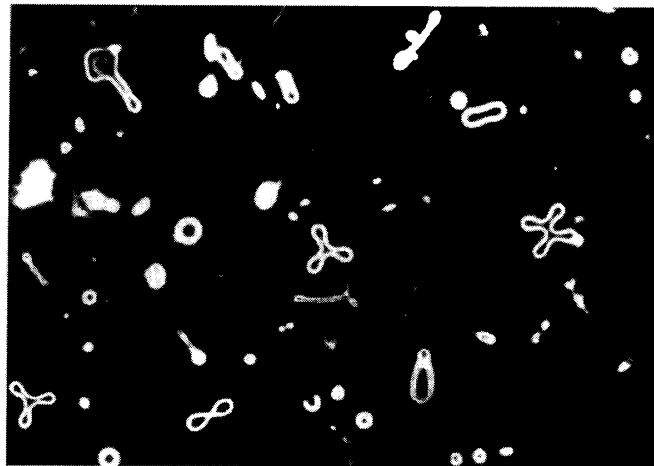


図3 溶液中の多様なリポソームの形。暗視野光学顕微鏡ではリポソームの断面像が得られる。

1.7 自律的形態変換の駆動力

試験管内のリポソームは、数日経っても形は変わらない。したがって光顕観察中に生じる変換の原因は、試料から徐々に水分が蒸発してゆき、塩濃度が上昇し、その結果リポソーム内外に浸透圧差が生じるためと推察できる。実際、リポソーム溶液に1～2 mMの塩や糖を加えると、小胞状のリポソームはパスウェイの最終形態である線維型か小球型にただちに変換する。

脂質二重層膜は半透性なので、水はゆっくりであるが透過する。したがって、溶液の浸透圧上昇にともなってリポソーム内の水が外に出てゆき、体積が減少するはずである。形態変換中のリポソームのビデオ画像から体積と表面積を求めた。予想どおり、形態変換の進行とともに体積は顕著に減少するが、表面積はほとんど変化しない。つまり、膜自体の基本構造の変化ではなく、体積の減少に伴いリポソームの形のみが変化するのである。

ところで、細胞内膜器官の多くの形はリポソームで見られる形を組み合わせることによって創り出せる。例えば、ゴルジ体は薄い赤血球型の集まりであり、小胞体は枝分かりした管状小胞のネットワークである。また、そのダイナミックな変形の様子もリポソームの挙動と良く似ている。つまり細胞内膜器官は、脂質自身がもつ形態形成能を取捨選択しながらフルに利用しているのである。

2. 微小管成長によるリポソームの形態制御

2.1 二極性リポソームの形成

細胞内膜器官の場合は、膜小胞の自律的な形態形成能によって造形可能である。しかし細胞本体になると、その大きさと複雑さからして、骨格が必要になってくる。細胞骨格の働きを探るために、リポソーム中で微小管の構成タンパク質であるチューブ

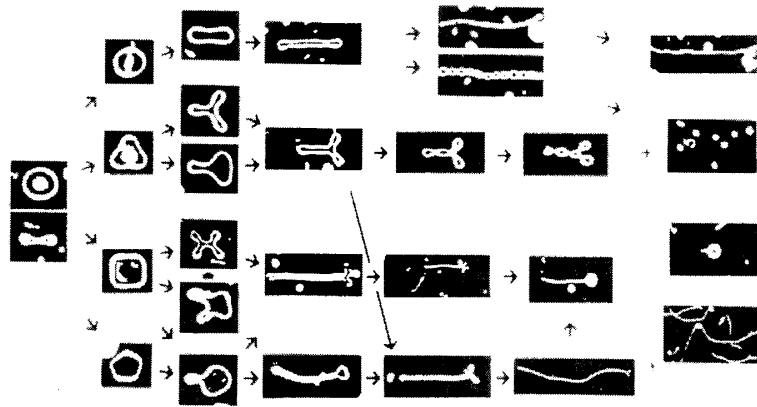


図4 リポソームの多様な順次的形態変換パスウェイ

リンを重合させて微小管を再構成させた5,6)。微小管の成長に伴って球形リポソームは、まずレモン型に変形する。次にレモン型の両端から膜管が突出し、中心球と2つの管から成る二極性のリポソームへと変形する（図5,6）。この結果はチューブリンの重合反応が脂質2重層膜の形態変化を起こすのに十分な大きさの物理的力を発生していることを示している。また、脂質膜が力によって、明確に区別できる管状部と球部に自律的に形態分化できる性質をもっていることも注目値する。ゴムのような通常物質の膜ではこのような形態分化は不可能である。

しかしながら、これらの形は普通の細胞の形からはほど遠い。この原因はリポソーム内部で、直線状の微小管が同一方向にそろって成長するためである。浮遊しているリポソームの中では各微小管は自由に軸方向を変えられるので、成長のに対して抵抗の少ない長軸方向に自然に向くのである。そこで、微小管の重合開始前にリポソームをガラス表面に吸着させて、内部の微小管の移動を抑制させてから成長させてみた。予想どおり各微小管は別々の方向へ成長し、その力によって様々な方向に膜を突出させた。それらのリポソームは培養細胞と区別のつかないくらい似た形になった（図7）。実際に、生細胞の成長にはシャーレー等の細胞が吸着するための表面が必要である。その原因はこれと類似の物理的な要因であると推測できる。

2.2 二極性リポソーム形成のシミュレーション

脂質膜は2次元液晶とみなせるので、膜面に平行な変形に対する弾性はゼロであるが、曲げ弾性のエネルギーは蓄積することができる。なぜなら、リポソームの膜は脂質二重層構造であるが、これらの両層間での脂質分子の移動はまず起こらないからである。そこで、与えられた体積と表面積が一定の条件で、小胞全表面の曲げ弾性エネルギーが最小になるような形を計算機によって求めた7)。

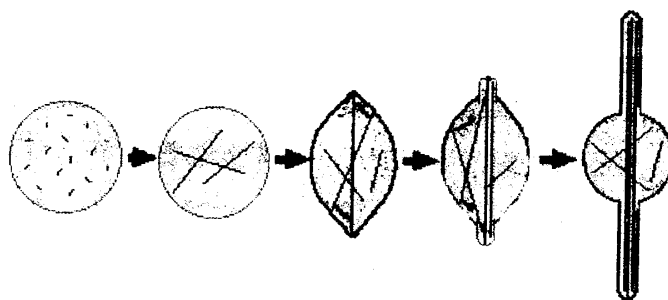


図 5 二極性リボソームの形成過程模式図。リボソーム中での微小管の重合成長によって球形リボソームが二極性リボソームへと形態変換する。

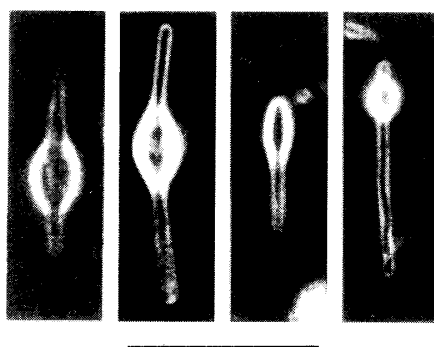


図 6. リボソーム内での微小管成長によって形成された二極性リボソーム。
縮尺：10 μm 。

細胞骨格による二極性リボソーム形成の場合は、両端の2点に内部から押す力を与え、曲げ弾性につり合わせ、リボソーム全体の曲げ弾性エネルギーを最小にする形を計算機で求めた（図8）。その結果、レモン型や球部を持つ二極性リボソームを作らせるためには、リボソームの内圧が不可欠であることが解った。等圧の場合には、押す力を増して両端間距離を伸ばすと、回転楕円形の形を経て管状になるだけで、中央の球形膨らみは生じない。しかし内圧があれば、なぜ管部と球部に形態分化するのであろうか。内圧存在下では、体積を減らすことは仕事をするを意味するので、出来るだけ体積を減少させないようにしながら、両端距離を伸ばす必要がある。つまり、球部で体積を稼ぎながら、管部で長さを稼いでいるのである。

2.3 二極性リボソーム上での球状部の揺動

細胞内で細胞骨格が安定なネットワークを構築するために、細胞膜との相互作用が働いている。実際に、アクチン線維の場合には膜に結合させるための様々なタンパク質が同定されている。一方、微小管の場合にはどのようなタンパク質が膜との結合に介在しているかは未だに明らかではない。

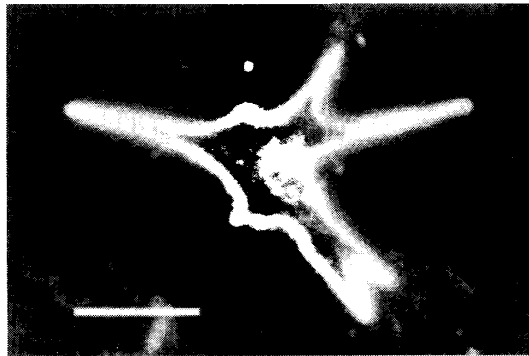


図7. 細胞類似型多極性リポソーム。ガラス表面に吸着したリポソーム内での微小管成長によって形成される。縮尺: 5 μm

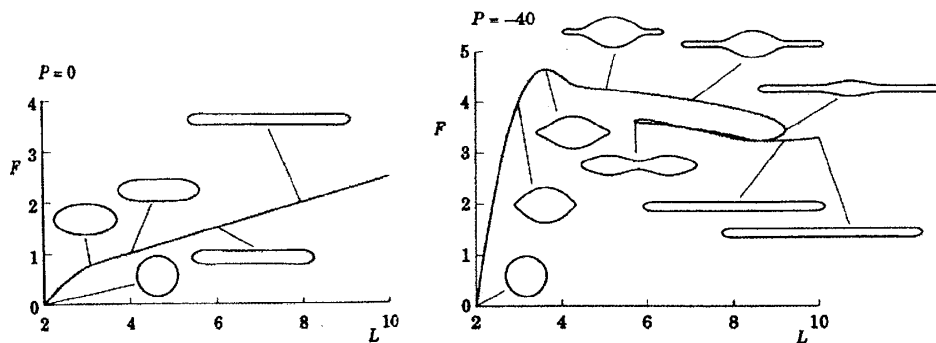


図8. 二極性リポソーム形成過程のシミュレーション。F: 両極に働く力。
L: 両端間距離。左図: 内圧無し、右図: 内圧有り。

上記の二極性リポソーム形成に用いられたチューブリンには微小管結合タンパク質 (MAPs) が含まれている。そこで、形態形成における MAPs の作用を知るために、MAPs を除いた純粋なチューブリンを用いて二極性リポソームを形成させた⁶⁾。意外なことに、この二極性リポソームの球状部は、管状部に沿って移動するゆらぎ運動 (揺動) を示した (図9)。この時、球状部の移動にもかかわらず2つの管状部を合わせた全長も、球部の大きさも一定に保たれたままであった。そして、揺動によって球状部が一端にまで達し、1個の球部と1本の管部の形 (一極性リポソーム) になると、揺動は止まり、再び二極性リポソームに形態復帰することはなかった。復帰出来ない理由は、球部と管部の既存の境界を移動させるのに必要な力は、熱運動程度で充分であるが、境界を新たに造るためには大きな力が必要になるためだと推察される。このことは先のシミュレーションで、レモン形から管部が突出する際に最大の力が要ることによっても支持されている。揺動の事実は膜小胞の形が、全体の総和エネルギーによって決定されることを示唆している。二極性リポソームの場合、両管部の全長と球部の形が一定であれば、球部の位置は何処であっても全エネルギーはほとんど変わらないのである。また、同じ脂質分子から出来ている膜が管状にも球状にも自在に相互

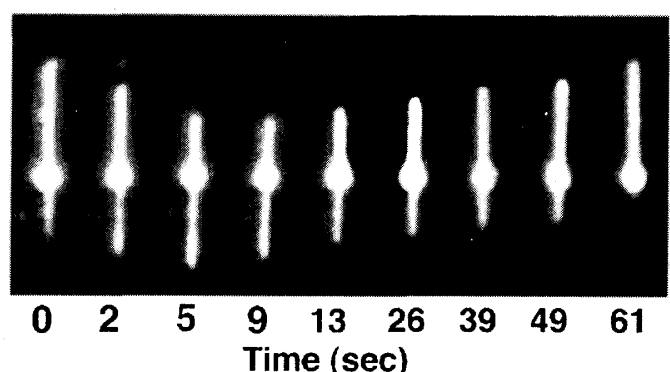


図9. 二極性リポソームの形態的揺らぎ。球状部の相対的位置が管状部に沿って揺動している。暗視野光顕ビデオ像。縮尺：5 μm 。

変換できることをも示している。つまり膜小胞の場合は、構成要素は形を決めるための主因ではないのである。この点では、同じ自己集合原理によって形成されるとはいえ、タンパク質超分子とは大きく異なる。

2.4 MAPs による揺動の抑制

球状部の揺動の結果、二極性リポソームは時間とともに一極性リポソームに変化する。微小管成長開始30分後には、MAPs 存在下では形態変化したリポソームの80%以上が二極性であるが、純粋チューブリンの場合は100%近くが一極性になっていた。そこで、MAPs のリポソーム形態の安定化能を確かめるために、純粋チューブリンにMAPs を加えて、リポソームの中で微小管を形成させた。その結果、加えるMAPs の濃度の上昇にともなって、予想どおり二極性リポソームの割合が増加した6)。つまり、MAPs が球部の移動を抑制する作用を持っているのである。

2.5 光ピンセットによる力学的解析

膜管形成現象は脂質膜に特徴的な現象であり、この現象の解析を通して脂質膜の形態形成メカニズムにせまることが出来る。しかし、これまでのような微小管成長によるリポソームの変形では、長さや成長速度などの制御が不可能であり、何よりも変形に必要な力の測定が出来ない。また溶液条件が、微小管が成長するための条件によって決まっているため、物理化学的解析は困難であった。

上述の制約から解放するために、光ピンセットを用いて、リポソームに任意の力を加える新しい実験系を考案した8)。内部に2個ポリスチレンビーズをもつリポソームを調製する方法を探索し、それぞれのビーズを別のレーザー光で捕捉する系を構築した。一方のレーザーを固定し、他のレーザー位置を等速で移動させて、リポソームに力学的張力を加えて変形させた。その変形過程は微小管による場合と同じく、まず球形からレモン形に、さらに変形が進むとレモン形の端から膜管が生じた(図10)。この変形過

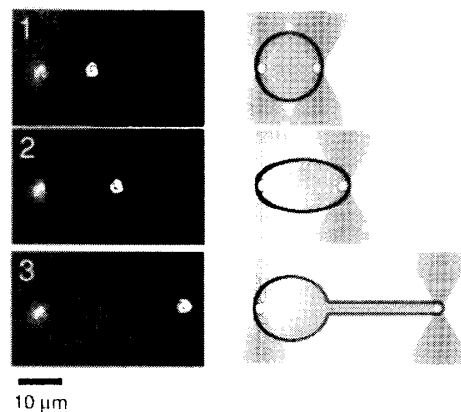


図 10 張力によるリポソームの形態変換。リポソーム内のビーズを光ピンセットによって移動させた。左図：位相差光顕像。右図：左図の解説模式図。

程を映像記録し、固定レーザに補足されたビーズの補足位置のずれを計測して、リポソームに負荷されている力を測定した。変形に必要な力は、球形のリポソームからレモン形に変形している間は徐々に上昇し、膜管形成の直前まで上昇する (~ 15 pN)。膜管が形成されると直ちに減少し、それ以後は膜管を伸長させたにも関わらず、必要な力は ~ 3 pN で一定であった(図 11)。この力は突起の形態維持に必要な力だと考えられる。膜管形成後、レーザ位置を変形前の位置へ徐々に戻すと、膜管形成の逆の過程を経て球形へと復帰した。この時、膜管は短縮してるにもかかわらず、張力は膜管がなくなるまで一定値を取り (~ 3 pN)、レモン形から球形へ復帰するとき徐々に減少した(図 11)。ただし、突起が一定長 ($2\sim 3\ \mu\text{m}$) より短くなると球状部が突然拡張し、これに伴って ~ 5 pN の力が発生した。さらに、突起形成直後と突起消失直前の球状部の長径はほぼ等しかった。

この実験系の利点はリポソームの形態を直接観察しながら各形態の形成や維持に必要な力を測定できること、レーザ位置の機械的制御により、任意の速度で変形できること、リポソームの脂質組成や溶液条件を広範に変化させることであり、脂質膜の物性や形態形成メカニズムを知る上での様々な解析が可能である。

3. アクチン線維成長によるリポソームの変形

3.1 アクチン線維は柔らかい

微小管とともに、細胞の動的性質を担っているもう一つの細胞骨格であるアクチン線維(直径: 約 7 nm)は微小管(直径: 24 nm)とは異なり、きわめて細く柔らかい。実際に暗視野光学顕微鏡による観察では、微小管は常に直線状で固い。しかしアクチン線維は細すぎて、暗視野光顕では観察出来ない。そこで、蛍光光顕を用いる。その結果、蛍光アクチン線維は常時熱運動による不規則な曲げ変形をおこなっていることが分かった。このような柔らかい線維が単独で、リポソームの膜を押して変形さ

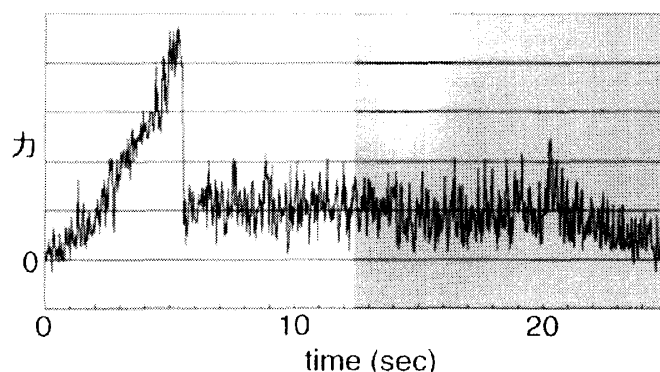


図 11 リポソームを形態変化させた時に伴う張力。ビーズを定速度で移動させているので、横軸は移動距離と関連している。白色の範囲はリポソームの伸長過程であり、灰色範囲は復帰短縮過程である。

せ得るとは考えにくい。事実、細胞内では多数のアクチン線維が束となり、ストレスファイバーとよばれる構造を作ることによって細胞骨格の役割を果たしている。そこでまず、リポソーム内部でアクチンのみを重合させた 9)。その結果、リポソームの形は円盤型もしくは両杓子型へと変形した (図 12)。暗視野光顕に加えて蛍光光顕や偏光光顕を使うことによって、それらの変形したリポソーム内部ではアクチン線維が膜周辺に沿って自立的に束を形成して並んでいることが判った。そして、円盤形や両杓子型は、これらのアクチン線維束の曲げ弾性エネルギーを最小にする形として説明出来る。

3.2 アクチン結合タンパク質の役割

細胞骨格のネットワークが細胞の形態形成の鍵になっていることは明かである。アクチン線維の場合には、そのネットワークを制御するアクチン結合タンパク質が多数知られている。そこで、数種の代表的なアクチン結合タンパク質を加えた系でアクチンを重合成長させて、リポソームの形態を観察した 10)。

まず、強い束化因子であるファッシンをあらかじめアクチンに加えた系でリポソームを変形させたところ、予想どおり二極性リポソームが形成された (図 13A)。これは柔らかいアクチン線維でも密な束になれば、微小管の場合と同じように重合成長によって物理的な押力を発生できることを示している。

α -アクチニンと比較的ルーズなアクチン線維束を作ることが知られている。 α -アクチニンを加えたりリポソーム内でアクチンを重合成長させたところ、変化したリポソームの大部分は円盤型や両杓子型であり、アクチン単独の場合と同様であった。ごくまれに二極性リポソームも形成されたが、その時でも 2 つの管状部は、一直線ではなく折れているケースが多く、全体の形も脆弱であった (図 13C)。つまり、ルーズな

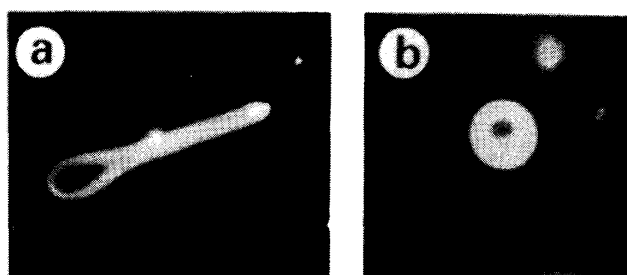


図 12. リポソーム内でのアクチン線維成長によって形成された円盤型 (a) と両杓子型 (b) リポソーム。

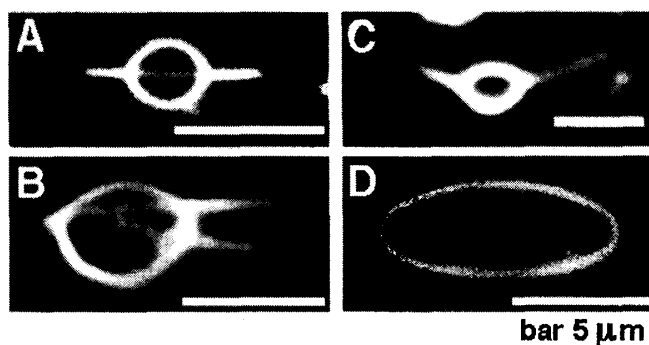


図 13. アクチン結合タンパク質存在下での、アクチン線維成長によるリポソームの形態形成。各々、(A) ファッシン、(B) ファッシン+ Mg^{2+} 、(C) α アクチニン、(D) フィラミンの場合。

アクチン線維束では物理的強さが不足であり、十分に膜を押すことができないのである。

アクチン結合タンパク質の中には束化作用ではなく、立体的なネットワークを形成するものがあり、その代表がフィラミンである。フィラミンを加えた場合のリポソームの形はどうなるであろうか？ その大部分は丸いおにぎり型やナッツ型になり（図 13D）、その形は極めて固く、安定になる。また、その内部にはアクチン線維が一様に分布していることが判った。

まとめると、アクチン線維に対する架橋様式がリポソームの形を決めるのである。すなわち、ファッシンは単量体としてアクチン線維を架橋するために、極めて密着した線維束を形成する。 α -アクチニンは二量体となり、細長い分子としてアクチン線維を架橋するので、ファッシンの場合よりもルーズな束を作る。フィラミンも二量体として、さらに伸びた柔らかい線維状分子としてアクチン線維を多方向に架橋する様式をとる。

4. リポソームのトポロジー変換



図 14. タリンによるリポソームの可逆的変形過程。(A→H) 球からシート型への変形過程。(I→L) タリン濃度減少による球への復帰変形過程。

4.1 タリンによるリポソームの安定穿孔

生体膜の融合と分裂は生命活動に必須の現象である。例えば、細胞の増殖分裂やシナプスでの情報伝達物質の放出などに見られるように、細胞膜はトポロジを頻繁に変えている。また、細胞内膜器官はタンパク質を分泌する際、つねに融合と分裂を繰り返している。これらのトポロジ変換のメカニズムを探るために、モデル系としてリポソームを用いた。

生体膜と細胞骨格を結合させるために働いていると考えられているタンパク質タリンがリポソーム膜を穿孔し、脂質二重層膜の開放端を形成してそれを安定化する能力を持つことが分かった 11)。リポソームにタリンを加えると、はじめは球型のリポソームに一つの大きな穴が開いてカップ型となり、しだいに開口部が広がってゆき、最終的にシートに変形する過程が明らかになった (図 14)。タリンによってカップ型やシート状に変形したリポソームに対して、徐々にタリン濃度を下げていったところ、シートは次第にカップ型にもどり、カップの開口部はさらに縮小し、ついには球型のリポソームへと変形復帰した。つまり、タリンによるリポソームの形態変化は可逆的であった。この過程の理論的解析も行われている 12)。

4.2 リポソームに生体分子を封入する技術

細胞モデルを構築する際、リポソームに様々な生体分子を封入する技術の確立が肝要である。我々は、リポソームの形成時にタンパク質を封入する方法についてはおおむね確立したと考えている。しかし、一旦形成されたリポソームに新たに大きな超分子を挿入する方法は未だ確立していない。リポソームは物理的に極めて柔らかく、安定に穿孔する方法が無いからである。電気穿孔のような技法を用いて瞬間的に小さな穴を開けても、瞬時にして修復されてしまう。そもそも、疎水基を水から遮へいする

ために脂質二重層膜が自然に形成され、しかもそれがトポロジ的に閉じられるぐらいだから、疎水基が水に曝されることになる穴など安定に存在するはずはないのである。しかし今や、タリンの濃度を調節することによってリポソームに任意の大きさの穴をあけることが可能になった。単に巨大な生体構造を入れるためだけではなく、リポソームにさまざまな超分子などを封入する技術として、医学方面の利用を含めてこの系は将来有用になるものと思われる。

4.3 界面活性剤によるリポソームのトポロジ変換

膜小胞の融合や分裂の作用機構は脂質二重層構造を局部的に不安定化させることだと考えられる。そこで、膜を不安定化させるために界面活性剤を用いることを試みた。その結果、脂質組成、活性剤の種類、溶液条件等を制御することによってリポソームのトポロジを自在に変化させ得ることがわかった(13)。タリンの場合と同様に安定な穿孔能はもちろんであるが、リポソーム同志の融合、内部小胞の直接放出(図15)、小胞の多重化、小胞の持続的縮小、小胞の内外側反転(図16)など、膜小胞は予想を越える極めてダイナミックなトポロジ変換能を持つことが解った。

例えば、非イオン性界面活性剤 Triton X-100 を egg PC から調製したリポソームに作用させると、リポソームは球形を維持しながら、時間の経過とともに大きさを徐々に減少させた。そして、この縮小過程は、球状の安定な状態と膜が激しく振動している状態とを、交互に繰り返しながら縮小していった。

5. 人工細胞への挑戦

5.1 構成的方法の利点と弱点

生物学では、試験管内実験はいつもその生理的あるいは生物学的意義を問われる。したがって、生物学における構成的方法などは邪道の極ということになる。しかし、工学の諸分野では構成的方法はもちろん王道である。他の自然科学、例えば物理学において研究内容の評価はあっても、その物理学的意義を問われることはまず無い。そこで、「生物学的意義」をひとまず横に置いて、代わりに「知的好奇心」を据える。すると、構成的方法はなかなか魅力的になり、生のシステムでは隠されていた事柄が続々見えてくる。

例えば、細胞の成長、分裂、融合、形態分化などの現象が、脂質膜自体に予め備わっている性能であることが明確に解る。さらに、内部小胞の直接放出、膜小胞の表裏反転など予期しない特性が次々と見つかる。生物は脂質二重層膜のあまりにも激しい性質を懐柔するために膜骨格を導入し、制御するために細胞骨格ネットワークをあみ出したことがはっきりする。また、上述の二極性リポソームのような構成系ではシミュレーションが可能で、何が形態形成の要因であるかが解ってくる。

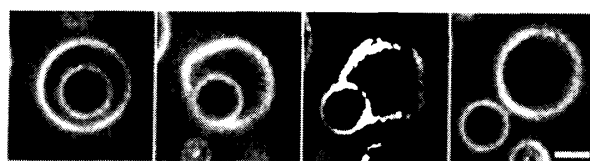


図 15. 内部リポソームの直接放出過程。縮尺：5 μm 。

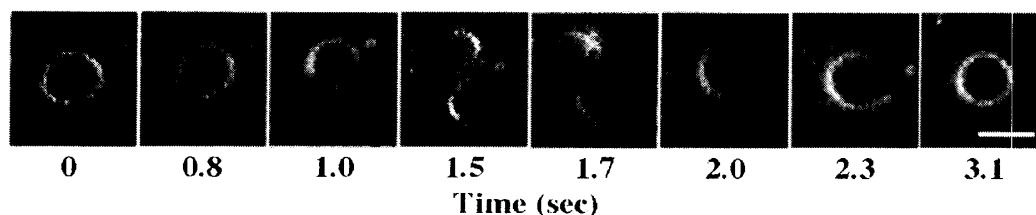


図 16. リポソームの表裏反転過程。縮尺：5 μm 。

5.2 人工細胞の利点と応用

生体細胞は状況の変化に即応して生き残り、増殖することを使命としている。そのために極めて多種類のセンサーとその情報処理システムを持っている。さらに環境の激変に備えて多くの非常時反応系やバイパスを用意している。また、これらの系を発現させるための膨大な遺伝子情報とタンパク質生合成系が用意されている。そして、これらのシステムを働かせるためには高効率のエネルギー獲得システムとエネルギー変換系が必要である。これらの諸機能がバランス良く働いてこそ、細胞システム全体としての増殖率を上げることができる。このため多くの場合、単一生体機能の極限化はシステムのバランスを壊し、増殖系全体としての効率を下げ、むしろ有害なケースが多い。

もし、人工的に安定な環境とエネルギー物質を用意し、増殖能も不要ということになれば、極限化された単機能細胞を創製することはあながち夢ではない。生体において実際にこの方針に従っている例の一つが赤血球である。酸素運搬という単機能のためにヘモグロビンのみを超高濃度に詰め込み、他の機能を犠牲にし、ついには増殖能までも喪失している。極限化された単機能人工細胞は、生体外での高率タンパク質合成系やニューロシステム、あるいは生体内においても赤血球や白血球の役割をはたす人工細胞などさまざまな応用が考えられる。

参考文献

- 1) 宝谷紘一：生体膜—生命の基本形を形づくるもの（葛西道生、田口隆久編）吉岡書店 153-161. (1996)
- 2) 本田誠、瀧口金吾、金子智行、宝谷紘一：生物物理、39、14-17

(1999)

- 3) 宝谷紘一：人工細胞、細胞モデルの構築、(株)エヌ・ティー・エス 141-171 (2002) .
- 4) H. Hotani: J. Mol. Biol., **178**, 113-120 (1984) .
- 5) H. Miyamoto and H. Hotani: Dynamics of Microtubules. ed. by H. Hotani, Taniguchi Foundation Pub. pp.220-242, (1988).
- 6) T. Kaneko, T. J. Itoh and H. Hotani: J. Mol. Biol. **284**, 1671-1681 (1998).
- 7) T. Umeda, H. Nakajima and H. Hotani: J. Physical Soc. Japan, **67**, 682-688 (1998).
- 8) T. Inaba *et al.*: J. Mol. Biol. in press. (2005)
- 9) H. Miyata and H. Hotani: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 11547-11551 (1992).
- 10) M. Honda *et al.*: J. Mol. Biol. **287**, 293-300 (1999).
- 11) A. Saitoh *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 1026-1031 (1998).
- 12) Y. Suezaki, H. Ichinose, K. Takiguchi and H. Hotani: Biophys. Chem. **80**, 119-128 (1999)
- 13) F. Nomura: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 2340-2345 (2001).