



平成 27 年 3 月 27 日
科学技術振興機構 (JST)
Tel : 03-5214-8404 (広報課)
理 化 学 研 究 所
Tel : 048-467-9272 (広報室)
大 阪 大 学
Tel : 06-6850-5280 (理学研究科庶務係)

脂質の分布をありのままに観察する新技術 ～小さな目印をつけて直接観察することに成功～

ポイント

- 脂質の分布は生命現象や疾患のメカニズムを知るうえで重要な情報だが、脂質本来の性質を失わずに観察することは難しかった。
- 脂質分子に小さな目印をつけることで、人工脂質膜における正確な分布の観測に初めて成功。
- 人工脂質膜の内部で脂質分子が濃淡分布を持つことを新たに発見、脂質膜の分析や動態の解明への貢献に期待。

JST 戦略的創造研究推進事業において、理化学研究所の袖岡 幹子 主任研究員と大阪大学 大学院理学研究科の村田 道雄 教授らは、脂質ラフト^{注1)}の重要な構成成分であるスフィンゴミエリン^{注2)}に小さな目印を付けることで、その分布の正確な観察に成功しました。

脂質ラフトは細胞膜中の微小領域で、免疫細胞応答やウイルスの侵入、シグナル伝達といった生体現象に関与し、スフィンゴミエリンなど特定の脂質分子が特異的に集合することで形成されます。これらの脂質分子に膜たんぱく質が結びつき働くことでシグナル伝達などが促進されるため、脂質の分布は生命現象や疾患のメカニズムを知る上で重要な情報です。これまで、目的の脂質分子に蛍光分子を結合させた蛍光脂質^{注3)}を観測することで可視化されてきましたが、大きな蛍光分子との結合により脂質本来の性質を失うことが問題でした。本研究ではラマン散乱顕微鏡^{注4)}に着目し、アルキン^{注5)}を観測の目印としてスフィンゴミエリンに結合させることで、スフィンゴミエリンのみを検出し、脂質本来の性質を失うことなくその空間分布を正確に観測することができました。

本研究では大阪大学 大学院工学研究科の藤田 克昌 准教授らが開発した高速・高感度なラマン散乱顕微鏡を用い、単分子の人工脂質ラフト膜^{注6)}におけるスフィンゴミエリンの分布の観察に成功しました。また、ラフトに相当する領域内では均一に分布していると思われていたスフィンゴミエリンの濃度が、中心から周辺にかけて徐々に変化していくという新たな知見が得られ、脂質膜の分析や動態の解明への貢献が期待されます。

本研究成果は、2015年3月30日(米国東部時間)の週に米国科学アカデミー紀要(PNAS)のオンライン速報版で公開されます。

本成果は、以下の事業・研究プロジェクトによって得られました。

戦略的創造研究推進事業 総括実施型研究 (ERATO)

研究プロジェクト:「袖岡生細胞分子化学プロジェクト」

研究総括: 袖岡 幹子 (理化学研究所 袖岡有機合成化学研究室 主任研究員)

研究期間: 平成20年10月～平成26年3月

上記研究課題では、生命の根幹を担う現象である「細胞死」の仕組みを、細胞死を制御する低分子化合物「細胞死制御分子」と新しい化学的解析手法の開発を行い、これらを組み合わせることで分子レベルでの解明を目指します。

研究プロジェクト:「村田脂質活性構造プロジェクト」

研究総括: 村田 道雄 (大阪大学 大学院理学研究科 教授)

研究期間: 平成22年10月～平成28年3月

上記研究課題では、脂質分子の構造解析を通じて、膜脂質や膜タンパク質の構造や動態を解明するための学術的基盤を作ることを目指しています。

＜研究の背景と経緯＞

ヒトを構成する細胞の一つ一つは、外部と内部を隔てる膜に包まれています。この膜は脂質二重膜と呼ばれる構造をとっており、多種多様な脂質分子とたんぱく質から構成され、細胞や細胞内器官の環境を規定するとともに、情報伝達、物質輸送、エネルギー生成などの中心的役割を担っています。従来、その機能の大部分は膜たんぱく質が担っており、膜脂質は二重膜の材料であると考えられてきましたが、近年、膜脂質がたんぱく質との相互作用を介して特異的かつ多様な生理機能を担うことが明らかになってきました。なかでも、細胞膜にコレステロールやスフィンゴミエリンなどの特定の脂質分子が集合して形成される脂質ラフトは、免疫細胞応答やウイルスの侵入、シグナル伝達といった種々の細胞プロセスに関与していると考えられています。その重要な構成成分であるスフィンゴミエリンの分布や動態の解明は脂質ラフトが関与する疾患の解明や病態の診断などに寄与することが期待されます。目的の分子の分布を可視化するためには蛍光物質を付け、蛍光顕微鏡で観察することが一般的ですが、スフィンゴミエリンの場合には、大きな蛍光分子を結合することにより、その性質が変化するため、正確な観察は難しいのが現状です。

＜研究の内容＞

本研究グループは、脂質膜におけるスフィンゴミエリンのありのままの分布を観察するため、ラマン分光法に注目しました。物質に光を照射すると、光と物質の相互作用により、反射、屈折、吸収のほかに、散乱という現象が起こります。散乱光の中には、入射した光と異なる波長となる光があり、これをラマン散乱光と呼びます。物質に固有のラマン散乱光の性質を調べることで、物質の分子構造や結晶構造を知る手法がラマン分光法です。

ラマン散乱顕微鏡は、原子の結合状態（分子の振動）を識別して、その空間分布を検出できるため、蛍光物質を付加することなく、目的の分子の分布を直接観察できます。まず、小さな目印となるアルキン（ $\text{C}\equiv\text{C}$ ）を、スフィンゴミエリンに結合し、ジインースフィンゴミエリン^{注7)}を作成しました。生体物質に含まれない炭素間三重結合を持つアルキンを結合させ、ラマン顕微鏡を用いることで、分子構造の似通った複数種の脂質が複雑に混ざり合った膜の中でも、スフィンゴミエリンのみを選択的に検出し、正確に観測することができます。

このジインースフィンゴミエリンと天然型スフィンゴミエリンの性質の類似性を調べた結果、分子の構造や大きさ、コレステロール存在下での運動性など、お互い非常に良く似た性質を示しました。すなわち、ラマン散乱顕微鏡で検出できるジインースフィンゴミエリンはスフィンゴミエリンの代わりに使用できることを示します。そこで、ジインースフィンゴミエリンを用いて単層人工脂質ラフト膜を形成したところ、ラマン散乱顕微鏡でジインースフィンゴミエリンの分布を観察することができました。これは、人工脂質ラフト膜で初めてスフィンゴミエリンの分布の詳細を明らかにした例といえます。単層脂質膜は非常に薄く、また、ラマン散乱光は極めて微弱であるため、可視化することは不可能と考えられてきました。本研究グループはラマン錯乱顕微鏡の観測結果を、従来の100倍以上高速に画像化できる技術（スリット走査による高速ラマンイメージング^{注8)}）を用い、単層脂質膜を観察することに成功しました。

細胞膜における脂質分子の分布は均質ではなく、一部の脂質分子が特異的に集まって、脂質ラフトとなる領域を形成しています。これまで、脂質ラフト膜は、スフィンゴミエリンが多い領域（ラフトドメイン）と、スフィンゴミエリンが少ない領域（非ラフトドメイン）とに、明確に分かれていると想定されてきました（ドメイン共存モデル）（図1）。しかし、安藤 潤 博士研究員、木下 祥尚 特任助教（現 九州大学 助教）は、ラマン散乱顕微鏡を用いた観察により、人工脂質ラフト膜におけるジインースフィンゴミエリンの濃度は、ラフトドメインの中心からその周辺にかけて“徐々に”減少することを見いだしました（図

2)。この結果は、スフィンゴミエリン濃度を徐々に変化させることで、ラフトドメインと非ラフトドメイン間で膜の厚さに差が生じないようにしていることを示唆しています。本研究成果は、ドメイン共存モデルとは異なる、新たな脂質ラフトのモデルを提起するもので、単一のラフトドメイン内でも、場所ごとに異なる機能や役割を持つ可能性を示します。

＜今後の展開＞

本研究グループは、高速画像化が可能なラマン散乱顕微鏡とジインースフィンゴミエリンを用いることで、脂質膜の性質を変えることなく、非常に薄い単層脂質膜レベルの観測を可能としました。さらに、ジインースフィンゴミエリン濃度がラフトドメインの中心から外側の非ラフトドメインにかけて“徐々に”減少していく様子を可視化することにも成功しました。この結果は、これまで想定されてきたドメイン共存モデルとは異なる、新しい脂質ラフトのモデルを提起するものです。これらの研究成果は、脂質膜の分析や脂質ラフトの研究を加速させると期待されます。

生体膜に存在する脂質ラフトは人工脂質ラフト膜とは異なり、動的な構造です。今後は、脂質分子の分布を時系列で観察するためのラマン顕微鏡の感度と画像化速度のさらなる向上や、より優れた脂質プローブの開発が望まれます。

なお、ラマン分光と脂質分子を標的とする本研究は、戦略的創造研究推進事業 チーム型研究（CREST）の研究領域「疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出」における研究課題「生理活性代謝物と標的タンパク質同定のための基盤技術の創出」（平成25年10月～平成31年3月）の中で引き続いて進められています。

<参考図>

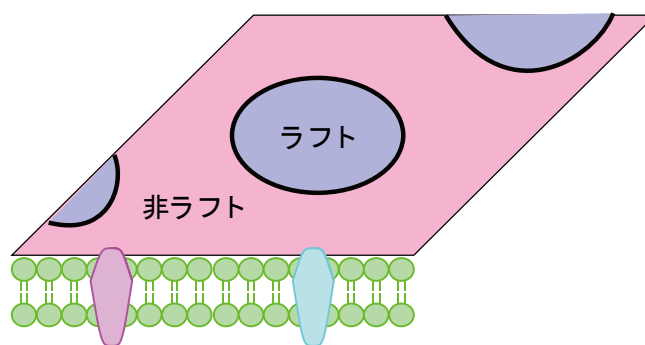


図1 ドメイン共存モデル

細胞膜における脂質分子の分布は均質ではなく、一部の脂質分子が特異的に集まって、脂質ラフトとなる領域を形成している。これまで、脂質ラフト膜は、スフィンゴミエリンが多い領域（ラフトドメイン）と、スフィンゴミエリンが少ない領域（非ラフトドメイン）とに、明確に分離していると想定されていた。

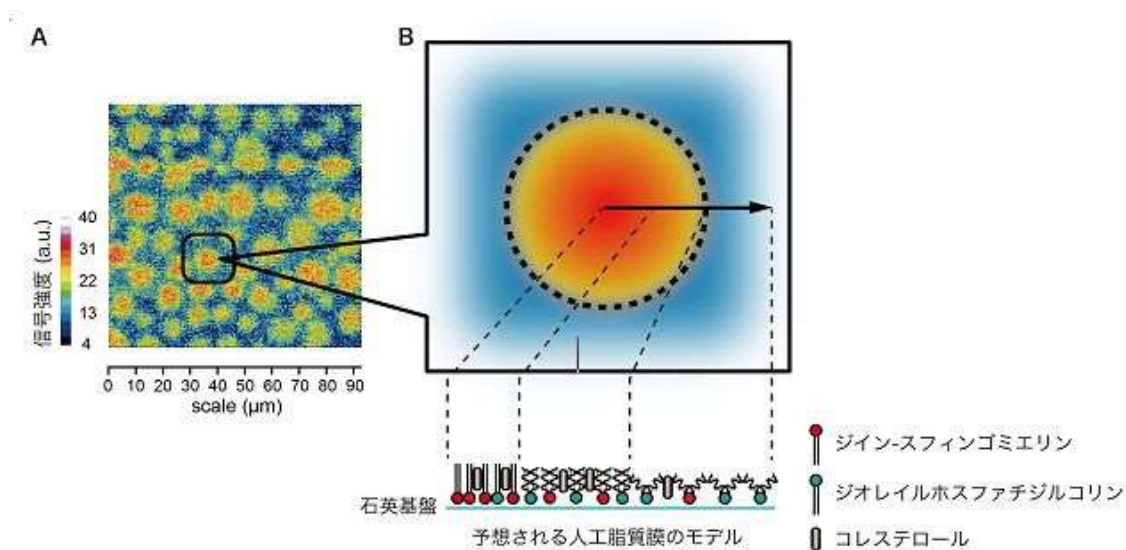


図2 ジーン-スフィンゴミエリンの分布解析

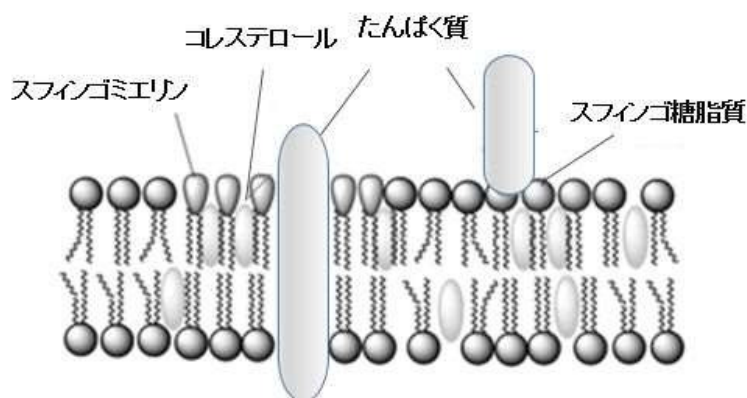
(A) ジーン-スフィンゴミエリン／ジオレイルホスファチジルコリン／コレステロールをモル比 1 : 1 : 1 で混合した三成分人工脂質膜におけるジーン-スフィンゴミエリンの分布をラマン顕微鏡で分析。アルキンに由来するラマン散乱の強度（信号強度）をプロットした。信号強度が高いほど、ジーン-スフィンゴミエリンの濃度が高い。

(B) は(A) のモデル図。スフィンゴミエリン濃度が徐々に変化することで、ラフトドメインと非ラフトドメインという膜の厚さが違う領域がなめらかにつながっていると考えられる。

<用語解説>

注1) 脂質ラフト

スフィンゴミエリンに代表されるスフィンゴ脂質とコレステロールを主要脂質とする、細胞膜上の微小領域。脂質ラフトはゲル相と液晶相の間間的な性質を持っており、人工脂質膜では秩序液体相と呼ばれる。



脂質ラフトの模式図

注2) スフィンゴミエリン

細胞膜を形成する重要な脂質。スフィンゴ脂質の代表としてスフィンゴミエリンがある。

注3) 蛍光脂質

蛍光分子を結合した脂質。蛍光分子は特定の波長の光を吸収し、蛍光を放つ性質を持つ。蛍光顕微鏡を用いて、観察したいサンプルに光を当て、放たれる蛍光の分布を観察する。

注4) ラマン散乱顕微鏡

単色（単一の振動数）の光を分子に入射すると、入射光のエネルギーの一部が分子の振動に奪われることで、色（振動数）の違いが生じる。この入射光と異なる色（振動数）を呈する光散乱をラマン散乱と呼ぶ。ラマン散乱は物質により固有なものであるため、分子の指紋とも呼ばれ、その性質を調べるラマン分光法は、物質の組成や結晶構造の分析に広く用いられている。

試料各点からのラマン散乱光を順次計測し、その光強度を画像化するための顕微鏡がラマン散乱顕微鏡である。分子の空間分布とスペクトルの、3次元的な情報を与える。任意の分子振動に帰属されるラマンシフトを選択し、2次元画像を構成することで、試料中の目的の分子の空間分布が得られる。

注5) アルキン

2個の炭素原子が三重結合（炭素間三重結合）でつながった微小な分子構造のこと。アルキンの中で最も小さな分子は $\text{H-C}\equiv\text{C-H}$ のアセチレンである。アルキンは、生体物質にほとんど含まれない。さらに、生体分子が散乱光を生じない領域に強いラマン散乱光を示すため、周辺からの背景光に埋もれることなく、特異的に識別できる。

注6) 人工脂質ラフト膜

スフィンゴミエリン、コレステロールそしてジオレイルファチジルコリンを混合するこ

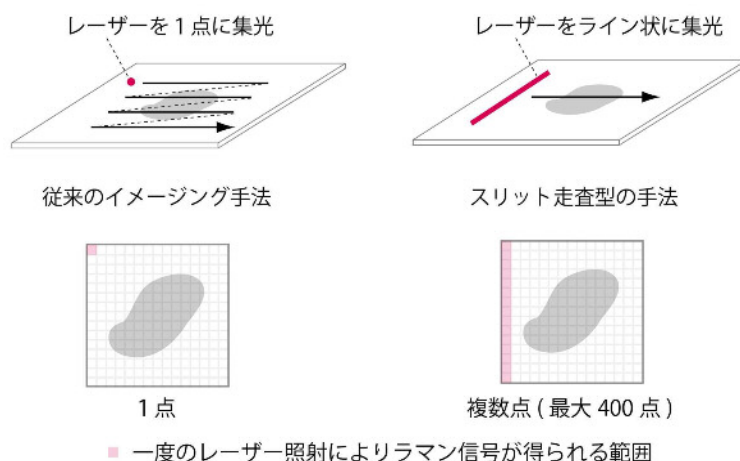
とによって形成される膜。膜の中で脂質密度の高い領域を人工ラフトドメイン（秩序相）、少ない領域を人工非ラフトドメイン（非秩序相）と呼ぶ。秩序相ではスフィンゴミエリンとコレステロールの密度が高い。

注7) ジインースフィンゴミエリン

スフィンゴミエリンの末端に小さなアルキンを結合させた脂質。アルキンの中でも、炭素-炭素三重結合が2個連結したジインを採用した。炭素間三重結合を2個連結させると、1個の時と比較してラマン散乱強度が4～10倍程度増大する。

注8) スリット走査による高速ラマンイメージング

レーザー光をライン状に引き伸ばして試料に照射し、そこから発生したラマン散乱を同時並行で分光検出する計測手法。レーザー光を1点に集光して走査する従来のラマンイメージング法と比較して100倍以上高速にラマン像を取得できる。



高速イメージングを実現する仕組みの模式図

<論文タイトル>

“Sphingomyelin distribution in lipid rafts of artificial monolayer membranes visualized by Raman microscopy”

（人工ラフト膜内におけるスフィンゴミエリンの不均一な分布を可視化～ラマン顕微鏡が明らかにする脂質分布の不均一性～）

doi: 10.1073/pnas.1418088112

安藤 潤^{1, 2, 3, 4}, 木下 祥尚^{5, 6, *}, Jin Cui^{5, 7}, 山越 博幸^{1, 4}, 閼 閼 孝介^{1, 2, 4}, 藤田 克昌^{1, 2, 3}, 村田 道雄^{5, 6, 7}, 袖岡 幹子^{1, 2, 4}

1. 科学技術振興機構 ERATO袖岡生細胞分子化学プロジェクト
2. 科学技術振興機構 CREST
3. 大阪大学 大学院工学研究科

4. 理化学研究所 袖岡有機合成化学研究室
 5. 科学技術振興機構 E R A T O 村田脂質活性構造プロジェクト
 6. 大阪大学 大学院理学研究科 附属基礎理学プロジェクト研究センター
 7. 大阪大学 大学院理学研究科 *
- * 現所属 九州大学 大学院理学研究院

<お問い合わせ先>

<研究に関すること>

袖岡 幹子 (ソデオカ ミキコ)

理化学研究所 袖岡有機合成化学研究室 主任研究員

〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

Tel : 048-467-9373 Fax : 048-462-4666

E-mail : sodeoka@riken.jp

村田 道雄 (ムラタ ミチオ)

大阪大学 大学院理学研究科 教授

〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1

Tel/Fax : 06-6850-5845

E-mail : murata@chem.sci.osaka-u.ac.jp

<JSTの事業に関すること>

中村 幹 (ナカムラ ツヨシ)、大山 健志 (オオヤマ タケシ)

科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部

〒102-0076 東京都千代田区五番町 7 K's 五番町

Tel : 03-3512-3528 Fax : 03-3222-2068

E-mail : eratowww@jst.go.jp

<報道担当>

科学技術振興機構 広報課

〒102-8666 東京都千代田区四番町 5 番地 3

Tel : 03-5214-8404 Fax : 03-5214-8432

E-mail : jstkoho@jst.go.jp

理化学研究所 広報室 報道担当

〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

Tel : 048-467-9272 Fax : 048-462-4715

E-mail : ex-press@riken.jp

大阪大学 理学研究科 庶務係

〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1

Tel : 06-6850-5280 Fax : 06-6850-5288

E-mail : ri-syomu@office.osaka-u.ac.jp