

## 膜融合を介した脂質ベシクル間の分子交換 Inter-vesicle Molecular Exchange via Membrane Fusion

豊橋技科大<sup>1</sup>, 後藤 あい<sup>1</sup>, 広瀬 侑<sup>1</sup>, <sup>○</sup>手老 龍吾<sup>1</sup>

Toyohashi Univ. Tech.<sup>1</sup>, Ai Goto<sup>1</sup>, Yu Hirose<sup>1</sup>, <sup>○</sup>Ryugo Tero<sup>1</sup>

E-mail: tero@tut.jp

細胞膜の基本骨格は、リン脂質などの両親媒性分子が構成する二分子層膜であり、この脂質二重膜内の組成や物理的性質は、細胞内外の物質輸送や情報伝達などの反応場の on/off や効率を決める要因である。我々はこれまでに、多価不飽和脂質、一価不飽和脂質、cholesterol (Chol)からなる脂質二重膜内において、多価不飽和脂質に富むマイクロドメインが形成され、膜融合を促進するサイトとして働くことを報告した<sup>1)</sup>。多価不飽和脂質の不飽和度が高いほど、また全不飽和度が同じ場合は sn-1, sn-2 位のアシル鎖に二重結合が分かれて存在するほど、ドメインが形成されやすい。本研究では、不飽和度の異なる phosphatidylethanolamine (PE), 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC), Chol からなるベシクルを用いて、膜融合を介したベシクル間での脂質分子の混合と交換を、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)法により評価した。

PE (1,2-dilinolenoyl-PE (18:3PE), 1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl-PE (16:0-22:6PE)または 1,2-dioleoyl-PE (18:1PE)), POPC, Chol と蛍光標識脂質 (Bis-Bodipy-FL-PC (Ex/Em: 488/512 nm)または TopFluor-TMR-PC (Ex/Em: 544/571 nm))を  $C_{PE}:(67-C_{PE}):33:1$  (モル比,  $C_{PE}$  は PE のモル割合)で混合した脂質フィルムを真空乾燥後、緩衝液(120 mM KCl, 10 mM HEPES/KOH [pH 7.2])を加え、攪拌と超音波処理を行うことでベシクル懸濁液を調製した。 $C_{PE} = 0 - 22$  (mol%)の Bis-Bodipy-FL-PC 含有ベシクルと TopFluor-TMR-PC ベシクルの懸濁液を、超音波処理終了から 5 分後に 1:1 (v/v)で混合し( $t = 0$  (s)), 励起光 480 nm で 500 - 650 nm の範囲で 60 s 間隔で蛍光スペクトル測定を行った。

18:3PE を含む  $C_{PE} = 12$  (mol%)のベシクル懸濁液を混合すると、 $t = 60 - 1260$  (s)のあいだで時間とともに Bodipy-FL (512 nm)の蛍光強度( $I_d(t)$ )が減少し、TopFluor-TMR(571 nm)の蛍光強度( $I_a(t)$ )が増加した。これはドナーである前者からアクセプターである後者への FRET によるものであり、別々のベシクル内に存在していた両者が脂質二重膜内で混合したことを示している。一方、同じ時間範囲でベシクル粒径はほとんど変化しなかったことから、ベシクル同士が完全融合することなく、ベシクル間での脂質交換が行われていることが示唆される。蛍光強度比  $I_a(t)/I_d(t)$ を混合前のベシクルの強度比で規格化した  $R$  を脂質交換の指標とした。PE を含まない POPC+Chol ベシクル( $C_{PE} = 0$  (mol%))でも混合後に  $R$  が増加したが、18:3PE を添加したベシクル( $C_{PE} \geq 3$  (mol%))では  $R$  の初期増加速度が上昇し、 $R$  の増加が緩やかになるまでの時間が短くなった。これらの効果は  $C_{PE}$  が高いほど大きくなる傾向が見られた。これらの効果は(16:0-22:6PE)では小さく、18:1PE ではほとんど見られなかった。ベシクルの半融合と脱離によってベシクル間の分子交換が起きており、多価不飽和 PE は半融合状態を形成しやすくし安定化することで脂質交換を促進したと考えられる。

1) M. W. S. Goh and R. Tero, Colloids Surf. B: Biointerfaces **210**, 112235 (2022); M. W. S. Goh and R. Tero, e-J. Surf. Sci. Nanotechnol. **20**, 90 (2022); H. Doi, et al., Appl. Phys. Express **17**, 055001 (2024).