

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05506

研究課題名(和文) 表面プラズモン共鳴を利用した新規生体潤滑分子スクリーニング法の構築

研究課題名(英文) Development of a Screening Method for Novel Biotribological Molecules using Surface Plasmon Resonance

研究代表者

山本 浩司 (YAMAMOTO, KOJI)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号：70536565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、関節の潤滑に関わるルブリシンやヒアルロン酸を軸に、それらと生物・化学的な相互作用を有するタンパク質を選定し、更に力学特性に関わる新規分子を同定するべく、表面プラズモン共鳴を利用した界面間分子相互作用の動的変化および界面間粘弾性特性の同時検出を可能とするシステムの開発を行った。未知の分子間相互作用に対する経時変化をリアルタイムに検出するために、プラズモン共鳴角の機械的走査を必要としない系を構築し、自己組織化単分子膜により金薄膜上に一方の分子をグラフトすることで、未知の相互作用に対するプラズモン共鳴の検出と力学特性の同時計測を可能とした。

研究成果の概要(英文)：To identify novel biotribological molecules for articular cartilage, a newly system which is able to detect both bio-chemical and physical interactions between them was developed using surface plasmon resonance (SPR). In this system, molecules involving in articular lubrication which can interact with lubricin or hyaluronic acid were initially identified using molecular biological methods, and then selected according to whether those molecules can affect mechanical interactions at the material interface. To detect unknown time-dependent interaction between molecules in real-time using SPR, the incident light had a certain distribution of incident angle, which could avoid a delay attributed to the mechanical scanning of the SPR angle. In addition, to concurrently detect the mechanical interaction between molecules on this SPR device, grafted molecule on the gold film using self-assembled monolayer was applied.

研究分野：機械工学

キーワード：表面プラズモン共鳴 関節 バイオトライボロジ ルブリシン

1. 研究開始当初の背景

世界に先駆けて超高齢社会に突入した我が国において、高齢者の日常動作や Quality of Life(QOL)をいかに維持・向上させるかは重要なテーマである。QOL が著しく低下した要介護状態となる要因の一つは、骨折や転倒あるいは関節疾患に伴う運動器の障害である。疼痛の有無を問わなければ、変形性関節症の潜在的罹患者数は国内だけで数千万人にのぼるとも言われている。初期の変形性関節症には運動療法や保存治療としてヒアルロン酸の関節内注射などが行われているが、関節破壊の早期抑制、あるいは損失した潤滑機能の恒常的回復までには至っていない。今後加速的に罹患者が増加すると予想される関節疾患に対し、より効果的・効率的な治療法の開発、あるいは新規治療薬の創製につながる知見を得ることは、健康長寿を求める上で極めて重要かつ喫緊の課題となる。

関節の潤滑機構を考えると、分子生物学的手法によって同定した関節表層分子が必ずしも工学的な潤滑に寄与するとは限らないという難しさがある。また、同定された分子同士の相互作用が潤滑機能に及ぼす影響も考慮する必要がある。実際、我々はこれまで遺伝子改変マウスを作製して関節表層に発現する遺伝子の網羅的解析を行ってきたが、そこで発現する分泌系分子すべてが潤滑に寄与しているわけではないという結果を得ている。また、Israelachvili らのグループは、ヒアルロン酸と関節液の糖タンパク分画成分から単離されたルブリシンとの分子間相互作用に着目し、試料界面間に形成された粘弾性ゲル膜が試料間の摩擦抵抗減少に繋がったことを報告している(Das S et al., *Biomacromolecules*, 2013)。以上から明らかなように、生体の潤滑機構に着目し、より効果的な治療法開発を目指すためには、生物学的な分子機能の理解を深化させることに加え、潤滑特性に影響を与える新規分子の探索や、分子間相互作用の更なる解明が必要である。

これらの課題にアプローチする上で重要なことは、発生学や分子生物学に基づく情報と摩擦や潤滑など工学に基づく情報との関連性を明らかにすることである。即ち、タンパク質間相互作用という生物的・化学的情報を検出でき、且つそれらの相互作用が界面間に作用する力学的な情報に及ぼす影響を定量的に評価できるシステムの構築が求められていると言えよう。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、研究代表者はこれまで関節のトライボロジー特性に関する研究に加え、関節表層に発現する遺伝子の網羅的解析や遺伝子の生体内動態解析を進めてきた。本研究ではこれらのデータベースや手法

を活かし、関節のトライボロジー特性に影響を与え得る新規分子の同定、並びに分子間相互作用を検出・定量できるシステムの確立を目的とした。分子間相互作用の検出においては表面プラズモン共鳴 (SPR: Surface Plasmon Resonance) に着目した。SPR 現象は極微量で界面近傍の状態を高感度にセンシングできる技術として、生化学分野では免疫反応やタンパク吸着の検出などに実用化されている。本研究では、まずアルロン酸やルブリシンといった生体関節の潤滑機能に関わる分子を軸に、これらと相互作用しうる分子を生化学的手法により同定し、人工的に合成することを目指した。次に未知の分子間相互作用が検出可能となるよう、広範な共鳴角変化に対応できる SPR 検出システムの構築、およびそれらの分子群が界面に存在する場合に生じる界面間力学的特性を計測できる系の構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ルブリシンと相互作用し、潤滑に関与しうるタンパク質群の抽出

研究代表者らが以前に開発したバイオリアクター (Yamamoto K. et al., *Tribology online*, 2008) を用いると、培養条件によって潤滑能の成熟度合およびルブリシン発現量が異なる培養軟骨の作製が可能である。組換え DNA 技術により、ルブリシンに対してポリペプチドタンパク質タグを付加することでルブリシンタンパク質複合体のアフィニティー精製を行う。精製された複合体のプロテオーム解析により、軟骨組織内で潤滑能と連動してルブリシンと相互作用しうるタンパク質群を同定する。細胞には軟骨様形質を示すマウス株化細胞もしくはマウス関節軟骨より採取した軟骨細胞を用い、タグタンパク質を付加したルブリシンの遺伝子導入を行う。

(2) 未知の分子間相互作用変化を検出する SPR 評価系の構築

上記の生化学的手法によって同定した分子群に対して、それらが試料間の界面に存在するとき、界面間力に及ぼす影響を評価する。SPR を利用して分子間相互作用の変動を捉える場合、SPR 共鳴角の変化をリアルタイムに検出するためには、反射光強度の入射角度依存性を機械走査を経ずに計測できる系が必要である。本研究では入射光に波長 632.8 nm の He-Ne レーザーを用い、エキスパンダーによるビーム径拡大後、50 倍の長作動対物レンズ (シグマ光機, PAL-50-L-A: 集光角 $\pm 24.8^\circ$) により、金属蒸着面に対して約 30° の入射角度幅を有する Kretschmann 配置の光学系を構築する。また、界面間の力学評価には平行平板ばねを利用し、粘弾性特性の計測を行う。静電容量型変位センサ (メステック, M-2218) による変位計測およびピエゾアクチ

ユエータ(メステック, MC-140L)による界面間距離、移動速度の制御系を組み込む。

4. 研究成果

(1) マウスルプリシンの全長 cDNA クローニングは成功したものの、巨大な多糖タンパクであるムチン様ドメインの影響で、Flag タグカラムアフィニティー精製による複合体抽出は困難であった。そこでバイオリクターによるルプリシン発現上昇の系において、アデノ随伴ウイルスによる shRNA を用いて強制的にルプリシン上昇を抑制する系を構築した。本システムでは直接的にルプリシンと相互作用するタンパク質の抽出とはならないが、ネガティブコントロール shRNA との比較、および関節表層遺伝子のプロファイル(基盤研究 B:15H05506)により、ルプリシンと相互作用するタンパク質の検証を進めている。

(2) 図 1 に光学系部分の外観写真を示す。またプリズム領域への入射光および反射光の概略を図 2 に示す。本研究では金属面はバイオセンサの役割を果たすため、取り換え可能な機構として、プリズムと金属蒸着ガラスの間に同屈折率のマッチングオイルを介して金属蒸着ガラスを設置した。金属薄膜には 5nm の Ti 層の上に 47nm の Au を蒸着した。またプリズムは高分解能ステップングモーターによる位置制御可能なステージ上に設置した。

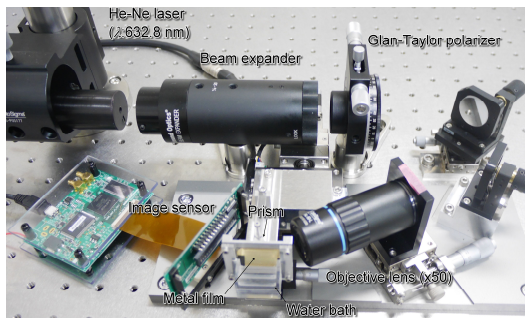


図 1 光学系の外観写真

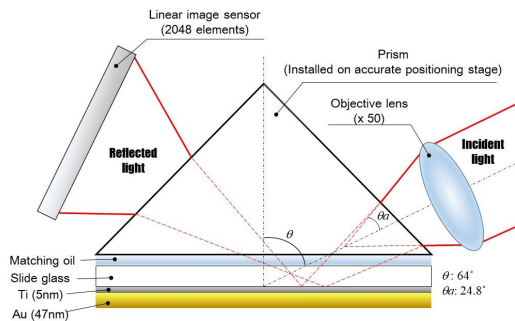


図 2 プリズム領域の光路概略図

図 2 に示す光学系において、プリズムおよびスライドガラスに BK7(屈折率:1.515)を用い、

大気圧雰囲気下で入射角 反射率の関係をフレネルの式によって求めた結果を図 3 に示す。なお Ti および Au の複素屈折率はそれぞれ 2.153-i2.923 および 0.181-i3.068 とした。



図 3 入射角 反射率の理論値

図 4、図 5 はそれぞれ本装置における P 偏光、S 偏光の反射光量 - 入射角の関係を示している。理論上、本装置における入射角は BK7 を用いた場合、約 40° ~ 71° の範囲であり、エッジの影響が出ているものの、共鳴角および減衰率は図 3 で示す計算値とほぼ一致している。また S 偏光ではディップが現れないこと、および図 6 で示すように偏光に関係なく生じるノイズを相殺する操作を行うと、ディップが先鋭化し、図 3 に近づくことから本装置でプラズモン共鳴の検出が可能である。



図 4 入射角 反射光量の関係(P 偏光)

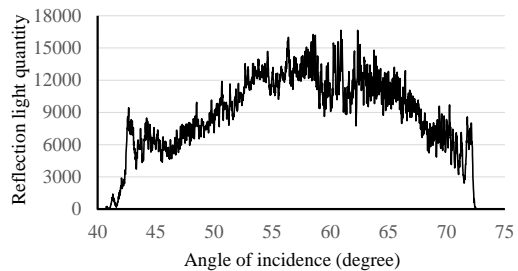


図 5 入射角 反射光量の関係(S 偏光)



図 6 相対反射光量

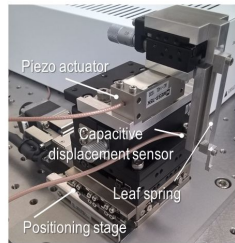


図7 力学系の外観写真

図7は本実験系における力学系の外観写真である。本装置は自動位置決めステージの上に設置されており、微小変位はピエゾアクチュエータ(ストローク:180 μm , 変位分解能:0.2 nm)によって達成している。板ばねの力の分解能は5.4 nN~43 nNのものを用いており先端は直径1 mmもしくは2 mmの球を設置している。分子の相互作用を検出するにあたり、ヒアルロン酸もしくはルプリシンを金薄膜上にグラフトするために、本研究では自己組織化単分子膜(SAM: Self-Assembled Monolayers)を使用する。アルカンチオール誘導体には $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$ を用い、ヒアルロン酸やルプリシンをグラフトするためにそれらにエポキシ化処理を施す。また溶液中では大気圧雰囲気下と異なり、共鳴角が高い値にシフトするため、プリズムはより屈折率の高いN-SF11(屈折率:1.784)相当のものを使用する。本研究期間中に当初計画していたプラズモン共鳴による新規のタンパク質間相互作用と力学的相互作用の関係をj得る十分なデータは得られなかったが、一連のスクリーニング方法および評価装置を構築した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

山本土紀, 森田有亮, 仲町英治, 山本浩司, 表面プラズモン共鳴を利用した界面間分子の化学的・力学的相互作用検出システムの開発, 日本機械学会関西学生会平成28年度学生員卒業研究発表講演会, 2017年3月11日.

山本浩司, 秋山治彦, 松田秀一, 軟骨細胞におけるメカノチャネルの機能, 第42回日本臨床バイオメカニクス学会, 2015年11月13日.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕 無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 浩司 (YAMAMOTO KOJI)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号: 70536565

(2) 研究分担者 無

(3) 連携研究者 無

(4) 研究協力者 無