

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14235

研究課題名(和文)細胞を殺さずに細胞内分子を抜き取る

研究課題名(英文)Extraction of cellular component without killing cells

研究代表者

岡本 行広 (Okamoto, Yukihiro)

大阪大学・基礎工学研究科・准教授

研究者番号：50503918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の特定分子を認識し、抽出可能とする前処理プロセス法の構築を目指した。その結果、脂質膜を抽出場とする簡便な抽出法、重合性脂質により作製されたリポソームによる、キラル認識能の創発に成功した。さらに、脂質膜場を電気泳動場とし、抽出した膜タンパク質の電気泳動分離を達成した。そして、細胞膜中の生体分子の高感度検出をin situで合成された銀ナノ粒子を活用した表面増強ラマン検出により達成した。以上のように、特定の分子認識ならびに抽出を可能とし、さらに分離・高感度検出を可能とするプロセスの構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：This research purpose is the development of pretreatment process, which enables the specific biomolecular recognition and the extraction of specific cellular components. To attain this purpose, selective labeling of cell membrane was possible with hydrophobic quantum dots. Furthermore, high sensitive detection of biomolecules was attained by surface enhanced Raman analysis and in situ nano-particle preparation. As a extraction and separation, an easy biomolecular extraction method was attained with fatty acid immobilized beads. Furthermore, chiral recognition ability was induced by polymerization of polymerizable lipid and chiral selective adsorption was attained. To further purify and analyze membrane proteins, electrophoretic separation method in lipid nano membrane was attained in nature state. Thus, Our developed method would attribute to single cell analysis.

研究分野：分析化学

キーワード：脂質膜場 DNA RNA 抽出 膜タンパク質 電気泳動

1. 研究開始当初の背景

単一細胞解析の重要性が認識され国を挙げて研究に取り組み始めているが、単一細胞解析を容易に実施することは不可能である。なぜなら、単一細胞ハンドリング・細胞溶解・細胞内分子抽出などの単一細胞解析に必須の前処理プロセスは煩雑かつ熟練した技術が必要としているためである。そこで新たな発想に基づく前処理プロセスが切望されている。また、同一細胞の継時的な発現分子解析は細胞の一生を分子という言葉で理解する上で重要であると考えられるが、これは現状の前処理プロセスでは達成不可能なため未踏の解析事例となっている。

2. 研究の目的

単一細胞解析研究を加速するため、新たな前処理プロセスを確立することを目的とする。このために、抽出場としての細胞膜に焦点を当てる。細胞の優れた分子認識能は、膜タンパク質などの個々の分子の存在に起因するのはもちろんであるが、これらの分子がその分子認識能を発揮するためには細胞膜（脂質分子集合体）という足場の存在が必須である。また、細胞膜自体も高い分子認識能を有していると考えられる。そこで、上記の目的を達成するために、細胞膜自体を抽出場として活用することを発想した。そして、この発想の可能性を検討するために、疑似細胞膜（リポソーム）と各種生体分子（キラル分子や膜タンパク質など）との相互作用の解明、疑似細胞膜の高い分子認識能の実証、そして細胞膜上に抽出された生体分子の高感度検出方法に関して検討を行った。

3. 研究の方法

疑似細胞膜として、脂質二分子膜を固定化した粒子、脂質小胞体、平面脂質二分子膜を活用した。これらの物性（流動性や疎水など）を蛍光プローブ、原子間力顕微鏡、自作の電気泳動装置、共焦点蛍光顕微鏡を駆使して解

析した。相互作用解析ならびに吸着能評価はこれら疑似細胞膜とターゲットサンプルを限外濾過により分離し、その吸着量を評価した。さらに、膜タンパク質の分離性能の評価に関しては、自作の電気泳動装置そして蛍光顕微鏡を活用した FRAP 解析により実施した。

4. 研究成果

蛍光測定より、中空微粒子に脂質・脂肪酸膜を固定化可能であることを確認した。そして、固定化された脂肪酸は、脂肪小胞体とほぼ等しい流動性・極性（疎水性）を示した。この結果より、脂肪酸の特性を損失することなく中空粒子に脂肪酸を固定化可能であることを実証した。この脂肪酸固定化された中空粒子を活用すると、水溶液中の色素（モデル生体分子）を簡便に吸着・回収可能であることを実証した。

続いて、単一細胞解析に即した抽出法として、細胞膜上での生体分子の抽出を視野に入れ、細胞膜の分子認識に関して検討を実施した。細胞膜には、脂質ラフトと呼ばれる相分離したナノドメインが存在する。この脂質ラフトに膜タンパク質が集積し、分子認識等が行われていると考えられている。一方で、脂質ラフトのみでも分子認識に関与していると考えられる。そこで、脂質ラフトの分子認識能の解明のため、重合性の脂質を活用し、脂質小胞体（リポソーム）を作製することを検討した。光照射により重合性脂質が架橋し、重合ドメインが形成される。実際に UV-VIS 測定、蛍光測定結果より、重合により吸光度・蛍光強度が重合時間とともに増加することを明らかとした。また、CD 測定より、重合後、キラリティーが発現することを確認した。さらに、DSC 測定結果より、重合度を評価し、重合率が 30% 台であることを明らかとした。そして、重合に伴い、膜自体の疎水性は向上することを明らかとした。今回は、生体モデ

ル試料として、キラル化学物を用い、この疑似ラフト構造を有するリポソームのキラル分離性能を評価した。比較対象として、重合前後のリポソームならびに重合性脂質の割合を調整したリポソームを用いた。その結果、重合前では、どの組成のリポソームでもキラル認識能を示すことはなかった。一方、重合したリポソームでは、重合性脂質の割合が増加するに連れて、キラル認識能が発現した。しかし、重合性脂質のみから構成されるリポソームではキラル認識能は発現しなかった(図1)。

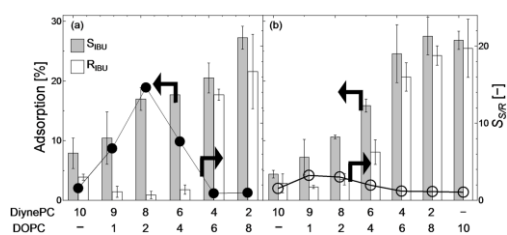


図1. 重合前後の各種組成のリポソームのキラル分離性能

以上の検討結果より、疑似ドメインが形成されることで、キラル認識能が発現することを明らかとした。つまり、脂質のみのラフトも分子認識に寄与していると示唆される。この分子認識能の発現は、重合によるドメイン形成により、流動性の低いドメインが形成されること、ならびにドメイン境界でのキラル認識部位の形成が関与していると考えられる。事実、流動性の低い環境では、キラル認識に必須の多点の相互作用が効果的に働くことを明らかとしている。また、ドメイン境界では疎水性ミスマッチを低減するため、物質の吸着が促進されるが、このケースでは、この吸着促進にキラル認識が加わったものと結論づけられる(図2)。次に、このキラル認識に関与している分子間力を検討した結果、脂質ヘッドグループとキラル分子の静電相互作用ならびに水素結合、そしてキラル分子と

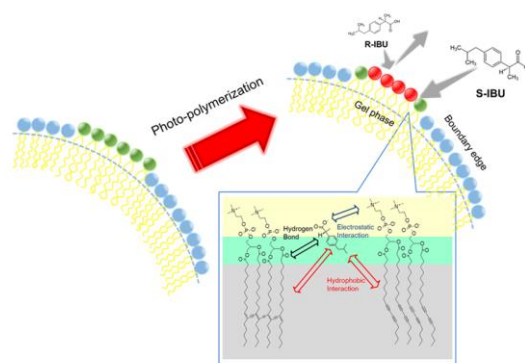


図2. 重合後のリポソームのキラル認識メカニズム

脂質分子との疎水性相互作用が関与していることを明らかとした。また、今回のように重合性脂質は、架橋(重合反応)により有機溶媒に耐性となることが期待できるため、本材料は、HPLCの固定相としての利用も期待できる。

次に、抽出した生体分子の分離を検討した。この際、膜タンパク質を変性させることなく、電荷量と脂質膜場との相互作用で分離可能とする脂質膜場電気泳動法を検討した。Vesicle fusion法により作製した基板上の平面脂質二分子膜では、膜タンパク質はガラス基板との相互作用が強固であり、電気泳動は観察されなかった。そこで、脂質多層平面膜を作製した。その結果、膜タンパク質の吸着を抑制し、電気泳動が可能となった。さらに、脂質膜中で、膜タンパク質が未変性状態を維

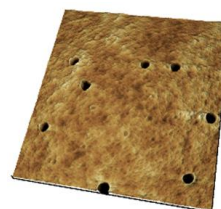


図3. 脂質多層平面膜内での膜タンパク質のAFM画像

持可能か否か、AFM観測を行った結果、脂質多層平面膜では、膜タンパク質は、未変性状

態を維持し、ポアを形成していることを明らかとした(図 3)。続いて、分離場としての脂質多層平面膜の特性を解明した。FRAP 解析の結果、脂質多層平面膜内での膜タンパク質の拡散定数は、水溶液中と比較し、低い値を示した。これは、脂質多層平面膜で電気泳動を実施すると、分離されたサンプルのバンドが拡散により広がりにくい、すなわち、高い理論段数を得ることが可能であることを示唆している。そして、膜タンパク質と膜挿入ペプチドの電気泳動分離を検討した結果、電気泳動による分離を可能とした。以上の結果より、脂質膜場電気泳動法は、生体分子の分離法として有効であることを実証した。今後は、膜場の物性から予測される分離性能を発揮するための操作方法・装置構成・試料導入を検討することで、脂質膜場電気泳動法の改善を検討していく予定である。

次に、分離された細胞成分の高感度検出法を検討した。表面増強ラマン (SERS) は一分子から検出可能な高感度検出法である。そこで、これを先ほどの脂質膜場電気泳動法で分離された生体分子あるいは、細胞膜で抽出された生体分子に適用する意図で、細胞膜を構成する生体分子の SERS による高感度検出を検討した。その結果、in situ で金属ナノ粒子を細胞膜上に形成することに成功した。また、この金属ナノ粒子の電場増強効果によるラマンシグナルの活性により、高感度検出を達成した。

このように、本研究期間を通じて、分離場としての脂質膜の特性ならびに分離性能を解明するとともに、新たな分離材料・分離法の確立に成功した。今後は、これらの成果をもとに、上記に記載した単一細胞解析のための前処理プロセスを検討していく予定である。

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 7 件) すべて査読あり

1. Yukihiro Okamoto, Development of Separation Sciences Utilizing the Specific Properties of Microscopic Separation Fields, *Chromatography*, **2018**, 39,1-6.
査読あり
2. Yukihiro Okamoto, Yusuke Kishi, Keishi Suga and Hiroshi Umakoshi: Induction of Chiral Recognition with Lipid Nano-Domains Produced by Polymerization. *Biomacromolecules*, **2017**, 18 (4), 1180-1188.
査読あり
3. Yukihiro Okamoto, Shigenori Sugisaki, Keishi Suga and Hiroshi Umakoshi: Development of Time Course Oxygen Binding Analysis for Hemoglobin Based Oxygen Carriers. *Anal. Sci.*, **2017**, 33, 953-956.
査読あり
4. Yukihiro Okamoto, Yusuke Tsujimoto, Hiroshi Umakoshi, Electrophoretic Separation Method for Membrane Pore Forming Proteins in Multilayer Lipid Membranes, *Electrophoresis*, **2016**, 27, 1031-1040.
査読あり
5. Yukihiro Okamoto, Yusuke Kishi, Takaaki Ishigami, Keishi Suga, Hiroshi Umakoshi, Chiral Selective Adsorption of Ibuprofen on a Liposome Membrane, *J. Phys. Chem. B*, **2016**, 120, 2790-2795.
査読あり
6. Yukihiro Okamoto, Takumi Ikeda, Keishi Suga, Hiroshi Umakoshi, Development of *in situ* Cell Surface Modification for Surface Enhanced Raman Analysis of Cell Membrane, *Chem. Letters*, **2016**, 45, 622-625.
査読あり
7. Yukihiro Okamoto, Yu Mine, Daiki Wada, Hiroshi Umakoshi, Development of Low Energy Consumption, Easy and Harmless Water Cleanup Method by Self-Flotation of Fatty Acid Coated Hollow Glass Beads, *Chem. Letters*, **2016**, 45, 544-546

[学会発表] (計 23 件) 依頼講演

1. Yukihiro Okamoto, Lipid Nanotechnology for Nanomedicine, Pacific Rim Nano Medicine

Symposium2018 (招待講演) ,2018

2. 岡本行広, リピドナノテクノロジーによる分離法の創成, 日本分析化学会、第77回分析化学討論会 (招待講演) , 2017年
3. 岡本行広, 気弱な分離膜; そのもろさの意味がある!?, すぐには役に立たない? 研究講座、(主催) 分子・物質合成プラットフォーム (招待講演) , 2017年
4. Yukihiro Okamoto, Yusuke Kishi, Keishi Suga, Hiroshi Umakoshi, Induction of Chiral Recognition with Lipid Nano-Domains Produced by Polymerization for High Performance Chiral Separation, 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2017
5. Yukihiro Okamoto, High Performance Separation Utilizing Specific Properties of Lipid Membrane, 13th IUPAC International Conference on Novel Materials and their Synthesis (招待講演) , 2017
6. 岡本 行広, 『微小分離場の特性を活用する分離科学の創成』, 第28回クロマトグラフィー科学会議、クロマトグラフィー科学会 (招待講演) , 2017
7. Yukihiro Okamoto, Lipid Nanotechnology for Nanomedicine, 11th International Symposium on Nanomedicine (招待講演) , 2017
8. 岡本行広, 分子分析科学のためのリピドナノテクノロジーの創成, 第36回キャピラリー電気泳動シンポジウム (SCE2016) (招待講演) , 2016
9. 岡本行広, 分子分析科学のためのリピドナノテクノロジー, 日本分析化学会第65年会 (招待講演) , 2016
10. Yukihiro Okamoto, Development of DNA and/or RNA extraction method from single cell, PITTCON 2016 Conference & Expo (招待講演) , 2016

[図書] (計3件)

1. 岡本行広, ナノ粒子 in 脂質ナノ粒子, 生物

工学会誌, 2017, 95(2), 86

2. 岡本 行広, 脂質膜の曲率を利用した脂質ソーティング法, ぶんせき, 2015, 504
3. 岡本 行広, マイクロ・ナノ空間/ナノ材料の特性を利用した分離分析法の創成, 東海化学工業会誌, 2015, 287, 2-5.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
岡本 行広 (Yukihiro OKAMOTO)
大阪大学大学院・基礎工学研究科・准教授
研究者番号:
50503918

(2) 研究分担者
馬越 大 (Hiroshi UMAKOSHI)
大阪大学大学院・基礎工学研究科・教授
研究者番号:
20311772

(3) 連携研究者
()

研究者番号:

(4) 研究協力者
()