

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21903

研究課題名(和文)細胞外ベシクルと微小孔デバイスを用いた膜タンパク質の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of membrane protein function using extracellular vesicles and microhole devices

研究代表者

安田 隆 (YASUDA, Takashi)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・教授

研究者番号：80270883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：膜厚約1 μm の窒化ケイ素製自立膜に、直径数 μm の微小貫通孔をアレイ状に形成した。この膜上にヒトBリンパ球様細胞を固定した。酪酸ナトリウムを作用させて細胞にアポトーシスを誘導し、直径10 μm 以上の巨大な細胞外ベシクルを微小孔から下方に突出させるように生成した。次に、約5 μm の間隙を設けて、微小孔アレイ膜2枚を上下に配置した。上側の膜の上面に細胞を固定し、膜間に挟むように巨大ベシクルを生成させた。上下の膜を分離することで、下側の膜の上面にベシクル膜を転写した。以上のようにして、正常な構造と機能を有する膜タンパク質を、ベシクル膜に保持した状態でデバイスの微小孔内に取り出す技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質は、細胞間情報伝達などで重要な役割を果たしていることから、有力な創薬ターゲットである。薬効と安全性が高い革新的な新薬を開発するには、膜タンパク質の機能をより詳細に解析する必要がある。しかしながら、構造が複雑で多様な膜タンパク質をその構造と機能を維持した状態でデバイス上に取得し、その機能を解析することは極めて困難であった。本研究の成果はこの課題を解決するものであり、創薬研究に新たな手法を提供し、新薬開発への大きな貢献を期待できる。

研究成果の概要(英文)：An array of microholes with a diameter of several μm was formed on a silicon nitride membrane with a thickness of approximately 1 μm . Human B lymphocyte cells were immobilized on the membrane. Sodium butyrate was applied to induce apoptosis of the cells, which permitted giant extracellular vesicles of more than 10 μm in diameter to be generated from the cells and protrude downward from the microholes. Next, two microhole array membranes were placed above and below each other with a gap of approximately 5 μm . Cells were immobilized on the top surface of the upper membrane, and giant vesicles were generated and sandwiched between the membranes. After the upper and lower membranes were separated, the vesicle membranes were transferred to the top surface of the lower membrane. In this way, we developed a technique to equip the microholes of a device with membrane proteins having normal structure and function while holding them on vesicle membranes.

研究分野：バイオマイクロデバイス

キーワード：細胞外ベシクル 微小孔 マイクロデバイス

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質は、細胞間情報伝達などで重要な役割を果たしていることから有力な創薬ターゲットであり、現在の医薬品開発の 60%以上が膜タンパク質を対象としている。このような医薬品の治療効果をさらに向上させ、安全性を高め、より革新的な新薬を開発するには、膜タンパク質の機能をより詳細に解析し、医薬品の候補物質の効果を膜タンパク質レベルで評価する必要がある。しかしながら、膜タンパク質は非常に複雑な構造を有するとともに、疎水性部位を多く持ち水溶液中での取扱いが困難であることから、単離・精製することが困難なものが多い。また、リポソームなどの人工のリン脂質二分子膜に膜タンパク質を導入する際には、膜タンパク質の構造破壊や配向エラーに伴う機能低下や失活が大きな問題となる。本研究では、巨大細胞外ベシクルと微小孔デバイスを用いて、以上の問題を解決する。

2. 研究の目的

ヒトリンパ球細胞より生成した直径 10 μm 以上の細胞外ベシクルを、半導体加工により形成した微小孔上に展開して固定し、ベシクル膜表面に存在する膜タンパク質の機能を解析するデバイス技術を構築する。これにより、構造が複雑で多様な膜タンパク質をその構造と機能を維持した状態でデバイス上に取得し、ベシクル膜内外の溶液の入れ替え操作、膜内外面の顕微観察、膜近傍への測定系の構築などにより、膜タンパク質周辺的环境を制御しながら、電気的・電気化学的・光学的計測によりその機能を高精度かつ高速に解析することが可能になる。さらに、細胞への遺伝子導入により所望の膜タンパク質を細胞膜上に発現させた後に、その膜タンパク質を有するベシクルを生成すれば、これを微小孔上に展開固定することで、多種多様な膜タンパク質の解析技術を構築することが可能になる。

3. 研究の方法

(1) 半導体加工技術を利用して Si 基板に深掘りエッチング加工を施すことで矩形ウェルを形成し、ウェルの底面を 8×8 個の微小孔を有する窒化ケイ素 (Silicon nitride; SiN) 製の自立膜 (300 $\mu\text{m} \times 300 \mu\text{m} \times$ 厚さ約 1 μm) で構成した。その後、SiN 膜裏面に蛍光観察時の遮光のため Ti 膜を形成した。SiN/Ti 膜の両面に(3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES, Sigma-Aldrich, A3648)を作用させてアミノ基を導入した後に、細胞膜アンカー (日油, SUNBRIGHT OE-020CS) を修飾した。アポトーシス誘導剤として酪酸ナトリウム (Sodium butyrate; NaB, Sigma-Aldrich, B5887) を含有した培地にヒト B リンパ球様細胞 Ramos (医薬基盤・健康・栄養研究所, JCRB9119) を分散させ、その細胞懸濁液をウェル内に導入した。このとき、細胞膜アンカーのオレイル基が疎水性相互作用により細胞膜に挿入されることで SiN 膜面上に細胞が固定され、そのうちの多くの細胞が微小孔上に配置される (図 1a)。NaB の作用により細胞のアポトーシスが生じ、細胞膜アンカーの挿入により柔軟化した細胞膜より微小孔内に膜が突出する。このとき、Ti 膜面上に修飾した細胞膜アンカーの作用により、微小孔内に突出した膜が Ti 膜表面に接着しながら広がり、その結果、巨大なベシクルが微小孔直下にぶら下がった状態で形成される (図 1b)。なお、蛍光観察によりベシクルの生成数と寸法を評価するために、予め蛍光色素 DiI (Invitrogen, V22885) を Ramos の細胞膜に結合させ、膜が染色されたベシクルを得た。

(2) ベシクル膜を微小孔上に転写するために、上記で使用したベシクル生成用の微小孔アレイ

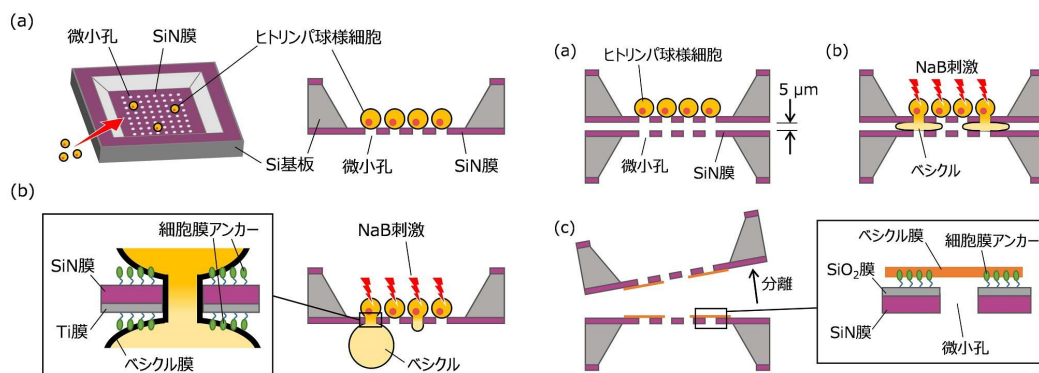


図 1 巨大ベシクル生成方法

図 2 ベシクル膜の転写方法

膜（微小孔径 $4\ \mu\text{m}$ ）の下に、別の SiN 製の微小孔アレイ膜（微小孔一辺 $5\ \mu\text{m}$ ）を設置した（図 2a）。この際に、上下の膜の間に培地を挟むことで、約 $5\ \mu\text{m}$ の間隙を形成した。下側の SiN 膜表面には SiO_2 膜を形成した後に、細胞膜アンカーを修飾した。NaB で刺激した細胞 Ramos の懸濁液を上側の微小孔アレイ膜の上面に導入し、細胞を膜上面に固定した。細胞から生成されたベシクルが微小孔から下方に突出し、上下の膜に挟まれるようにして成長した（図 2b）。次に、上側の微小孔アレイ膜上の細胞をピペットで吸引した後に、上側の微小孔アレイ膜と下側の微小孔アレイ膜を分離することで、下側の微小孔アレイ膜上にベシクル膜を転写した（図 2c）。上下の微小孔アレイ膜の間に生成されたベシクルの蛍光画像と、下側の微小孔アレイ膜上に転写されたベシクル膜の蛍光画像を撮影し、転写されたベシクル膜の数を生成されたベシクルの数で除することでベシクル膜転写率を導出した。なお、下側の微小孔アレイ膜の代わりにガラス基板を用いて同様の転写実験を行い、転写率の比較を行った。

4. 研究成果

(1) 直径 $4\ \mu\text{m}$ の微小孔を用いて薬剤刺激 5 時間後に生成されたベシクルの蛍光観察画像を図 3 に示す。直径 $10\ \mu\text{m}$ を越えるベシクルが複数形成されていることが分かる。次に、直径 2、5、 $7\ \mu\text{m}$ の微小孔をそれぞれ有する 3 種類のウェルを用いてベシクル生成実験を行った。各微小孔径毎に、9 個のウェルにおいて薬剤刺激 3 時間後に蛍光観察を行い、その蛍光画像から直径 $10\ \mu\text{m}$ 以上のベシクルの数と直径を計測した。各微小孔径におけるベシクル径の分布を図 4 に示す。その結果、微小孔径が大きくなるほど、一つの微小孔から複数のベシクルが形成され、ベシクル数が増加することが分かった。また、微小孔径が大きいくほど平均ベシクル径が大きくなり、直径 $7\ \mu\text{m}$ の微小孔においては最大ベシクル径が約 $30\ \mu\text{m}$ に達した。

(2) ガラス基板と微小孔アレイ膜にそれぞれ転写したベシクル膜の蛍光写真を図 5 に示す。9 個のウェルにおけるベシクル膜転写率の平均値は、ガラス基板において約 31%、微小孔アレイ膜において約 24%であった。微小孔アレイ膜における転写率がガラス基板よりも低い値となった理由は、微小孔アレイ膜においては細胞膜アンカー分子の修飾面積が小さいために、ベシクル膜を保持する効果が小さくなったからであると考えられる。また、下側の微小孔アレイ膜の SiN 表面に直接細胞膜アンカー分子を修飾したところ、転写率の平均値は約 12%まで低下した。この原因は、SiN 表面への細胞膜アンカー分子の修飾量が SiO_2 表面よりも低下したためと思われる。以上の結果から、ベシクル膜の転写率の改善のためには、微小孔アレイ膜表面におけるベシクル膜保持力の向上が必要であることが分かった。

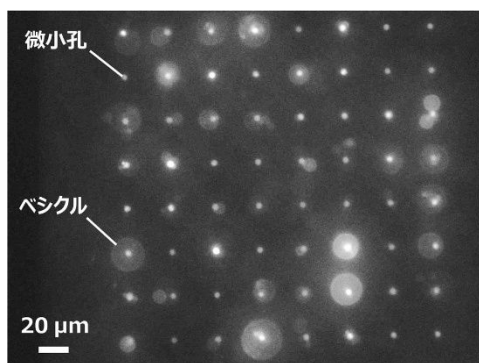
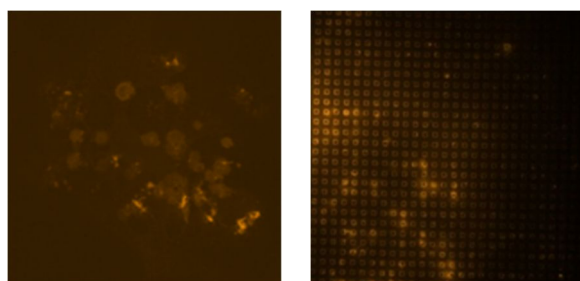


図 3 巨大ベシクルの蛍光観察画像



(a) ガラス基板上 (b) 微小孔アレイ膜上

図 5 転写したベシクル膜

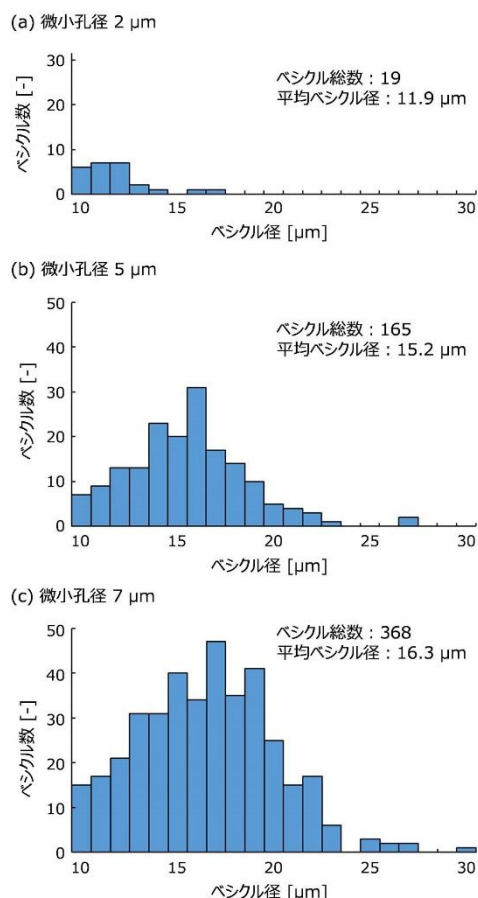


図 4 巨大ベシクル径の分布

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 妹尾真希, 安田隆
2. 発表標題 微小孔を通じた細胞からの巨大ベシクル突出生成
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第42回研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 妹尾真希, 安田隆
2. 発表標題 ヒト細胞からの巨大ベシクル生成方法の提案
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会 13.0
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 入澤侑人, 安田隆
2. 発表標題 微小孔アレイデバイスを用いたベシクル膜転写技術の開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第46回研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 安田隆, 妹尾真希	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 3
3. 書名 月刊「細胞」2022年4月号（「ヒト細胞からの巨大ベシクル生成」を担当）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州工業大学 大学院生命体工学研究科 安田研究室ホームページ
<http://www.life.kyutech.ac.jp/~yasuda/jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------