

平成 2 6 年 6 月 6 日現在

機関番号： 1 7 1 0 4

研究種目： 研究活動スタート支援

研究期間： 2012 ～ 2013

課題番号： 2 4 8 1 0 0 1 9

研究課題名（和文）細胞由来リポソーム上の膜タンパク質を利用したバイオセンシング技術の構築

研究課題名（英文）Development of a biosensing technique using membrane proteins on cell-derived liposomes

研究代表者

山中 誠（Yamanaka, Makoto）

九州工業大学・バイオマイクロセンシング技術研究センター・研究員

研究者番号： 8 0 6 3 7 4 5 5

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円、（間接経費） 690,000 円

研究成果の概要（和文）：ヒトリンパ球細胞の薬剤刺激により取得した細胞由来リポソームを応用する事で、新規バイオセンシング技術を構築した。細胞由来リポソームは、細胞膜と同じ組成の膜成分を有しており、親細胞より引き継いだ完全なヒト膜タンパク質を表面に保持している。リポソームを修飾することで構築したQCM（水晶振動子微量天秤）センサを用いてリポソーム膜上の膜タンパク質とリガンド間の分子間相互作用計測の検証を行った。また、遺伝子操作技術を適用し、Gタンパク質共役受容体であるブラジキニンB2レセプタを有するリポソームの取得、及び、これを用いて構築したセンサによるブラジキニン検出に成功した。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel technique to produce cell-derived liposomes which have specific membrane proteins expressed in human cells, and applied those liposomes to a QCM (quartz crystal microbalance) sensor for detecting interactions between membrane proteins and their ligands. Using this technique and gene transfection, we succeeded in producing liposomes which have Bradykinin B2 receptors, GPCRs for bradykinin, and detecting bradykinin using the sensor where the liposomes were immobilized.

研究分野： 工学

科研費の分科・細目： ケミカルバイオロジー

キーワード： 生体分子計測 ヒト膜タンパク質 リポソーム バイオセンサ GPCR

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重要な役割を担うことから有力な創薬ターゲットである。近年では、疾患に関連する膜タンパク質に直接結合することで、従来の薬剤よりも非常に高い治療効果や従来対応出来なかった難病に対する治療効果を得られるレセプタ標的治療薬の研究開発が盛んに進められている。一方、これらの研究開発を行うには膜タンパク質が大量に必要となる。膜タンパク質は細胞膜に存在し、疎水性を持つことから本来の機能を維持した状態で細胞から抽出することは難しく、また、市場を介した入手も困難とされている。さらに、レセプタ標的治療薬は分子レベルでの相互作用の評価が重要となるため、ヒト由来細胞から生産されてヒト特有の糖鎖修飾が施された完全ヒト型膜タンパク質を用いる必要がある。

従来法においては、膜タンパク質は人工合成したリポソーム（細胞膜と同様のリン脂質二分子膜より構成される球状体）に保持して研究が行われている。しかし、このリポソームを作成する間に膜タンパク質は損傷し、本来の機能と構造が失われる問題が生じる。近年、膜タンパク質を損傷なくリポソームに保持する手法が研究されているが、利用可能な膜タンパク質の種類は非常に限定され、取得可能量も非常に少ない。さらに、細胞膜はリン脂質、タンパク質、糖脂質、コレステロールなどの中性脂質の多種類の成分より構成される。これらは膜タンパク質の挙動に関与する重要要素であるが、容易に変質するものも含まれており、人工合成による再現は困難である。従って、ヒト細胞から直にリポソームを生成し、その膜上に正常なヒト由来膜タンパク質を大量取得できれば、今後の創薬研究を支える重要な基幹技術となる。

2. 研究の目的

本研究課題では、膜タンパク質の取得方法として新たに確立した細胞由来リポソーム技術を用いる。この独自技術により、ヒト由来リンパ球細胞に対して酪酸ナトリウム (NaB) を作用させることで細胞サイズの細胞由来リポソームを大量に生成する (図1)。こうして得られた細胞由来リポソームの表面に細胞由来の膜タンパク質が存在することを確認した。また、予め細胞に遺伝子導入を行うことで所望の膜タンパク質を担持することにも成功した。このような膜タンパク質は正常な構造や機能を維持する可能性が非常に高く、様々な創薬研究への利用が期待出来る。

本技術によれば、7回膜貫通型受容体である G タンパク質共役型受容体 (GPCR) やより複雑な構造を有するトランスポーター型膜タンパク質も取得可能であり、従来では取得不可能であったような膜タンパク質の利用が可能になる。

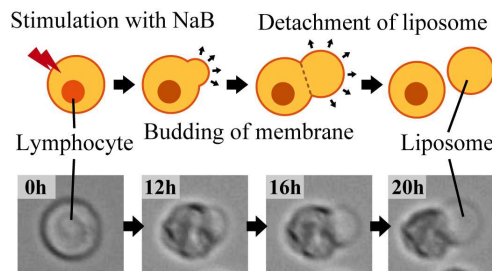


図1 リポソーム形成プロセス

そこで、細胞由来リポソームを用いたバイオセンシング技術が可能である事を検証する。そのために、細胞由来リポソームの有するレセプタ型膜タンパク質をプローブ分子に用いたリアルタイム検出型のバイオセンサを構築する。同時に、培養細胞のレセプタ刺激実験を行い、これらの結果を比較することで製作したレセプタ型バイオセンサの有効性を明らかにする。さらに、本技術と遺伝子導入技術を融合することで、所望するレセプタをプローブ分子として用いたセンサを構築する (図2)。

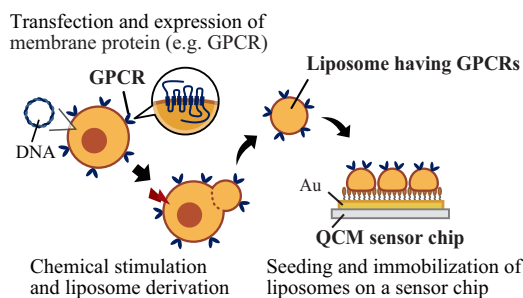


図2 リポソーム修飾センサ構築の概要

3. 研究の方法

(1) センサを以下の方法で製作した。また、結合反応を計測する対象分子として、ヒト B リンパ球細胞 Ramos が定常発現している膜タンパク質である BCR (B-cell receptor) を選択した。まず、Ramos を 10 mM 酪酸ナトリウム (Sodium butyrate, NaB) 添加培地で薬剤刺激培養することで BCR を表面に担持したリポソームを取得した (図 3(a))。次に、孔径 5 μm のメンブレンフィルターを用いて細胞培養液より細胞を除去し、リポソームのみを取得した (図 3(b))。さらに、超音波照射処理をすることで直径 1 μm 以下のリポソームに微粒化した (図 3(c))。リポソームの微粒化処理は、以下の理由から必須である。1. 巨大なリポソームはリポソーム自体の粘弾性の影響が大きくなり測定誤差が生じる。2. 巨大なリポソームは大きな流体力を受けて変形及び振動し、これがノイズを発生させセンサの安定動作を阻害する。3. 取得したセルサイズリポソームは個々が膜タンパク質保有量が異なるので、これを微粒化してから電極表面に固定化することで、電極表面の膜タンパク質分布を均一化する必要がある。

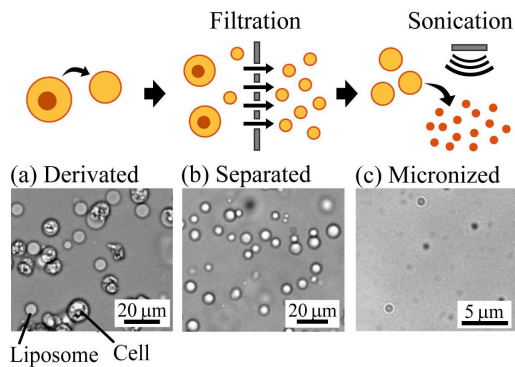


図3 リポソーム調製の概要と写真

リポソームを固定するために、QCM システム（日本電波工業，NAPiCOS PSA10A）付属のセンサチップの Au 電極表面に、システアミンと細胞アンカー分子（日油、OE-040CS）による自己組織化単分子膜（Self-assembled monolayer, SAM）を形成した。この SAM を形成した電極上に微粒化したリポソームを播種すると、細胞アンカー分子末端のオレイン酸基がリポソーム膜のリン脂質と疎水結合を形成し、リポソームは電極表面に強固に固定される（図 4）。一方で、膜タンパク質と細胞膜アンカーの間に結合は形成しないため、膜タンパク質が変性する恐れはない。こうして製作したセンサは表面に BCR が提示されており、BCR のリガンドの検出が可能となる。

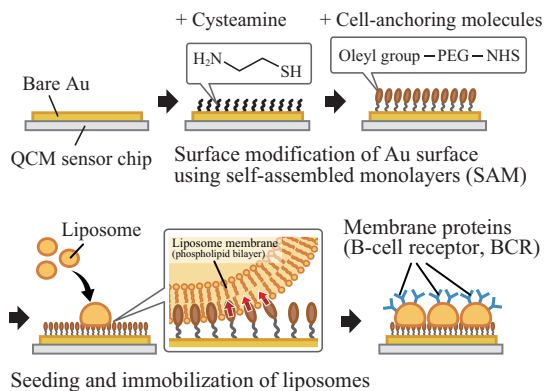
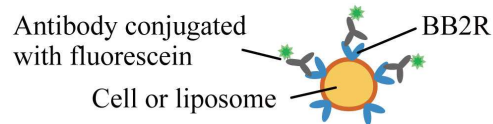


図4 QCM センサ Au 電極へのリポソーム固定

(2) ヒトリンパ球細胞 Ramos に対して BB2R 遺伝子を含むプラスミド DNA を電気穿孔法により導入し、BB2R を発現させた。次に、取得した BB2R 発現細胞を薬剤刺激培養することで BB2R を表面に担持したリポソームを取得した。

取得したリポソームの表面に BB2R が担持されていることを、蛍光抗体染色法により確認した。本研究で使用した BB2R は細胞外領域に識別を容易にするために FLAG（タンパク質タグ）が付加されている。この FLAG に結合する FITC（Fluorescein isothiocyanate）修飾抗 FLAG 抗体を含む 10% FBS（Fetal bovine serum）/PBS（Phosphate buffered

saline）溶液をリポソームに作用させることで、リポソーム表面の BB2R を蛍光標識した。そして、余分な蛍光抗体を PBS で洗浄除去した後に、蛍光染色したリポソームを蛍光顕微鏡で観察した。また、比較実験のために、BB2R 発現細胞も同様の手法で蛍光染色した。その結果を図 5 に示す。細胞と同等の強い蛍光が認められたことから、リポソーム表面に BB2R が高密度に存在することを確認した。



• Fluorescent image

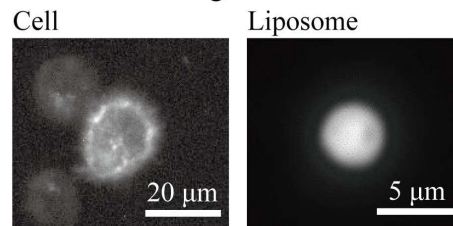


図5 細胞とリポソームにおける BB2R の存在確認

取得した BB2R 保持リポソームを処理してセンサを製作した。製作したセンサは表面に BB2R が提示されており、ブラジキニンの検出が可能となると考えられる。また、ネガティブコントロールを得るために、BB2R リポソーム固定電極に隣接する参照電極に BB2R を持たない細胞由来リポソームを固定した。反応電極から参照電極の信号を減算することで、非特異的結合による周波数変化や振動ノイズなどは信号から除去される（図 6）。

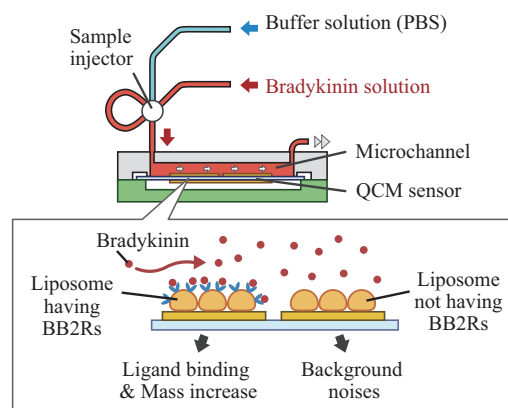


図6 検出系全体の概要

4. 研究成果

(1) 製作したセンサの検出能を下記の方法で評価した。検出システムは、センサチップに PDMS（Polydimethylsiloxane）製マイクロ流路と HPLC（High-performance liquid chromatography）用サンプルインジェクタを接続して構成される。これにより、流路内の

流速や圧力の変化を抑えつつ、複数濃度のサンプル溶液の連続導入が可能となる。また、BCR のリガンドとして抗 BCR 抗体を使用し、流路壁面や電極表面への抗体の非特異吸着を抑制するブロッキング剤として BSA (bovine serum albumin) を使用した。BSA と抗 BCR 抗体の溶液を流速 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 10 分間連続的にマイクロチャンネルに導入して、リポソームが固定された電極表面に作用させた。そのときの QCM センサの共振周波数を QCM システムの周波数カウンタで計測した。その結果、結合反応に伴う QCM センサの共振周波数減少をリアルタイム計測することができた。図 7 に抗 BCR 抗体溶液の希釈系列(10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を作用させて得られた周波数変化を示す。

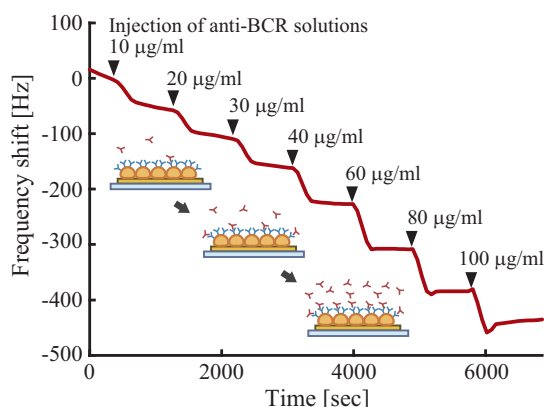


図 7 抗 BCR 抗体溶液の各濃度における周波数減少

BCR-抗 BCR 抗体間の分子間相互作用の特性を評価するために、得られた周波数減少より BCR に結合した抗 BCR 抗体の質量を Sauerbrey の式を用いて算出した。Sauerbrey の式は以下の式で定義される。

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}}\Delta m = -2.86 \times 10^{10}\Delta m \quad \text{.....(1)}$$

ここで、 Δf は QCM センサに物質が結合することで生じた水晶振動子の共振周波数の変化量、 Δm は結合した物質の質量である。また、 f_0 は水晶振動子の基本発振周波数、 A は水晶振動子を形成する Au 電極の面積である。 ρ_q 、 μ_q はそれぞれ AT カット水晶振動子の密度とせん断弾性係数である。この式に QCM センサの周波数変化量を代入することで、センサに結合した物質の質量を算出できる。また、レセプターリガンド間の結合反応が平衡状態にあるときのリガンドの結合量と溶液濃度の関係は以下の Michaelis-Menten の式で表現される。

$$\Delta m = \frac{\Delta m_{\max} L}{K_d + L} \quad \text{..... (2)}$$

ここで、 Δm はレセプタに結合した単位面積当たりのリガンドの質量、 $\Delta m_{\max}$ は単位面積当たりのリガンドの飽和結合量である。また、 L はリガンド溶液濃度、 K_d は解離定数である。実際に BCR-抗 BCR 抗体の結合特性プロットに対して非線形回帰計算による曲線フィッティングを行うことで、 $K_d = 1.5 \mu\text{M}$ 、 $\Delta m_{\max} = 6.7 \text{ ng}/\text{mm}^2$ を得た(図 8)。この解離定数 K_d が細胞間の情報伝達で生じる結合の解離定数と同じ μM オーダーであることから、このセンサ上では生体内に極めて近い反応が生じている可能性がある。このことは、医薬品開発に応用する際に極めて有利に働くものと考えられる。

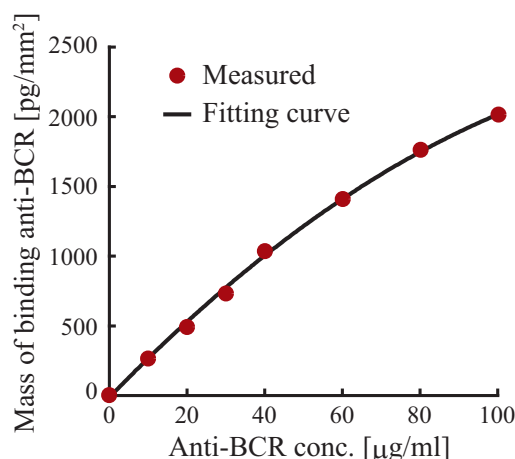


図 8 抗 BCR 抗体の結合特性

(2) ブラジキニン溶液を流速 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ でマイクロチャンネルに導入して、リポソームが固定された電極表面に作用させた。そのときの QCM センサの共振周波数を QCM システムの周波数カウンタで計測した。その結果、BB2R-ブラジキニン間の結合反応に伴う QCM センサの共振周波数減少をリアルタイム計測することができた。図 9 にブラジキニンを 1 mg/mL の濃度で含む PBS 溶液を作用させて得られた周波数変化を示す。Sauerbrey の式より、得られた周波数減少から BB2R に結合したブラジキニンの質量を算出すると 58 pg/mm^2 であった。

本実験で製作したセンサで得られた周波数減少量は、ヒトリンパ球細胞 Ramos が元より発現する膜タンパク質 BCR (B-cell receptor) に抗 BCR 抗体 (分子量約 15 万) を結合させた場合と比較して 1/100 程小さいものであった。この原因は、ブラジキニンが分子量 1060 の低分子オリゴペプチドであることから、結合により生じる質量変化が小さくなったからである。また、細胞の BB2R 発現量にばらつきがあり、これらより取得したリポソームに BB2R 保持量が小さいリポソームが含まれていたことも原因の一つと考えられる。今後、センサ感度を高めるためには、目的の膜タンパク質を細胞に確実に生産させる遺伝子導入技術と、取得したリポソーム

から膜タンパク質を大量に保持するリポソームを選別する分離技術が必要となると考えられる。

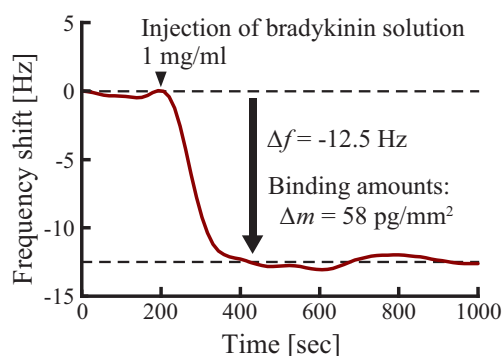


図9 ブラジキニンの結合で生じた
周波数減少

(3) 本研究課題で構築した細胞由来リポソームを用いたセンシング技術は、導入する遺伝子を変更することで、GPCRのみならず様々な膜タンパク質に対応する事ができる。これは、疾患関連レセプタに効果のあるペプチド医薬や抗体医薬などの開発において非常に有効な手段となることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① 山中 誠, 安田 隆, 細胞由来リポソーム上の膜タンパク質を利用した QCM センサ, 電気学会論文誌 E, Vol. 133, No. 5, 155-156, 2013. 査読有

〔学会発表〕(計8件)

- ① Makoto Yamanaka, Shinji Sueda, Takashi Yasuda, QCM DETECTION OF GPCR-LIGAND BINDING USING CELL-DERIVED LIPOSOMES, The 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2012), Okinawa, October 27, 2013. 査読有
- ② Makoto Yamanaka, Shinji Sueda, Takashi Yasuda, QCM Detection of BB2R-Bradykinin Binding Using Cell-Derived Liposomes, The 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (IEEE EMBC 2013), Osaka, July 3, 2013. 査読有
- ③ Makoto Yamanaka, Takashi Yasuda, QCM DETECTION OF MEMBRANE PROTEIN-LIGAND INTERACTIONS USING CELL-DERIVED LIPOSOMES, The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2012), Okinawa, October 28, 2012. 査読有

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.life.kyutech.ac.jp/~yasuda/jp/research/liposome/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中 誠 (YAMANAKA, Makoto)

九州工業大学・バイオマイクロセンシング
研究センター・研究員

研究者番号：80637455