

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05556

研究課題名(和文)新規細胞膜シートを用いた生体膜反応場における膜タンパク質機能の1分子計測

研究課題名(英文)Single molecule analysis of membrane protein in the cell membrane using new model cell membrane sheet

研究代表者

奥野 貴士 (Okuno, Takashi)

山形大学・理学部・准教授

研究者番号：80411031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜は、僅か10nmの膜構造体であるが、膜の表裏でその機能が異なる。生体膜機能を理解するにはそれぞれのサイドからの物理量計測が必要である。本研究は、細胞膜の裏側の生命現象に注目し、物理量計測を計測し、膜機能の解明を目的とした。研究を実施した結果、培養細胞からタンパク質の機能を維持した状態で細胞膜を試験管に切り出すことに成功し、さらにそれら細胞膜を基板支持状態の構造体の作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：Detail analysis of cell plasma membrane surface from the cytoplasmic side is difficult, because cytoplasm components and membrane orientation prevent it. Development of appropriate model cell membrane is required for observation of plasma membrane function from cytoplasmic side. In this study, we developed new method for preparation of model cell membrane, on which detail analysis can be performed from cytoplasmic side. We succeeded in preparing a spherical cell membrane from cultured cell. We found that the spherical cell membrane, fixed with the cytoplasmic side facing up, can be prepared from the spherical cell membrane. The membrane proteins diffusion in the model membrane fixed on glass surface can be monitored by using total internal reflection fluorescence microscope.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞膜 膜タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜は、僅か 10nm の膜構造体であるが、膜の表裏でその機能が全く異なる。例えば薬剤排出の反応では、排出を受ける薬剤が、細胞膜の細胞質側(裏側)からアクセスし、排出ポンプにより細胞外に排出される。また、シグナル伝達では、細胞外の物質が GPCR に結合し、細胞質側の GPCR に細胞内因子である G タンパク質が結合し、シグナルが下流に伝達される。細胞膜の表と裏では、まったく異なる反応が進行している。つまり、細胞膜でおきる反応は細胞の表側と裏側では全く異なり、それぞれのサイドからの物理量計測(反応速度、結合定数など)を必要である。しかし、特に細胞裏側でおきる反応の計測には、細胞質物質が定量的な計測を妨げ、直接的な計測は特に困難である。

### 2. 研究の目的

本研究は、細胞膜の裏側の生命現象の物理量計測を計測し、これまで明らかにされていない、膜機能の解明を目的とした。申請者はこれまでに、ヒト培養細胞から、膜機能を維持した状態で細胞膜を小胞上に切り出し、細胞膜裏側を上に向けた状態でガラス基板に貼り付けた細胞膜シート作製技術を確立した。(特願:2013-228766)。本研究はこの細胞膜シートを用いて、「物質輸送」と「シグナル伝達」に焦点を絞り、細胞裏側からの基質排出やシグナル因子結合に関する物理量計測を検討した。

### 3. 研究の方法

本研究は、数  $\mu\text{m}$  程度の凹構造の微細加工を施した基板を覆うようにして、培養細胞から調製した細胞膜を固定し、細胞膜を介した物質輸送、情報伝達を計測する方法の確立を目指した。微細加工基板上に貼り付ける細胞膜は、培養細胞から  $10\ \mu\text{m}$  程度の小胞状に切り出した giant plasma membrane vesicles (GPMVs)を用いた。GPMVs の膜は細胞骨格系のタンパク質が膜から解離しているため、脂質

膜の表面張力により球状を呈する。微細加工基板表面に貼り付ける為には、細胞膜と基板表面を未着させる必要があり、本研究では GPMVs を基板に固定する材料として採用した。

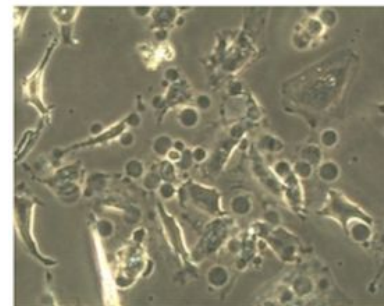
研究期間においては、薬剤排出ポンプである P 糖タンパク質発現細胞の準備とそこから調製した GPMVs の微細加工基板への固定方法の確立を主に実施した。また、ATP 依存性のポンプと比較し、物質輸送速度が早いインフルエンザ由来のプロトンチャンネルについても並行して準備を進めた。

### 4. 研究成果

#### [各種培養細胞からの GPMVs 調製の検討]

研究開始時点において、当研究室で確立した金属塩を含む緩衝液で処理による GPMVs 作製方法は、ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞でのみ確立していた。標的膜タンパク質を高効率に発現する細胞等への変更が必要であった。そこで、HEK293T, MDCK, Caco-2 等の培養細胞での GPMVs 調製方法についてプロトコル確立を検討した。基本的なプロトコルとして、8~90%程度のコンフルエント状態の細胞を準備し、細胞を緩衝液 A(20 mM  $\text{ZnCl}_2$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM NaCl, 300 mM Tris/HCl pH8.5)で 30 分程度インキュベートする。続けて、緩衝液 B(50 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH8.5)に置換し、30 分程度インキュベートする。ボルテックス等で振動を加えることで、細胞から生じた bleb が GPMVs として上清に得られる。今回、HEK293T および Caco-2

細胞に関しては、播種した細胞数と同程度の GPMVs を



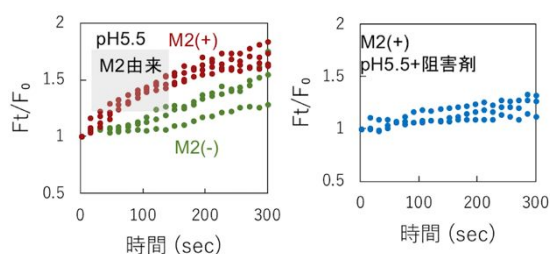
上清液に **細胞から得られる GPMVs** 回収する条件を確立することができ、十分に

実験に使用できた。HEK293T 細胞は、GPMVs を得ることはできるが、得られるサイズが小さく、また剥離する細胞が多く、実験に使用するに十分な数および純度の GPMVs を得ることがこんなんであった。HEK293T に関しては、細胞の剥離を抑えながら GPMVs を調製するプロトコルの確立が課題である。また、これまで GPMVs 作製には金属イオンを含む緩衝液を必要として、それら金属イオンが膜タンパク質活性を評価する指示薬等を阻害もしくは反応し、使用できない問題が生じた。そこで、アンモニウムイオン等を用いた新たな GPMVs 作製方法の開発に成功した。

### [モデル膜中の膜タンパク質活性評価]

培養細胞から調製した GPMVs を基板に固定する前段階として、GPMVs 中の膜タンパク質の活性を保証する必要がある。本研究では、単位時間当たりの分子輸送数と輸送分子の検出方法の簡便性から、活性評価に A 型インフルエンザウイルス由来のプロトン(H<sup>+</sup>)チャネル(M2)を用いることとした。一過的に M2 を発現した培養細胞から GPMVs を調製し、M2 依存性的に GPMVs 内部へのプロトン輸送活性を pH 依存性の蛍光指示薬での検出を試みた。

その結果、M2 を一過的に発現した HeLa 細胞に pH 指示薬を内封した GPMVs を調製した。GPMVs の膜に M2 がトポロジーを維持して配向されているか、免疫染色法により確認することができた。



GPMVs中のM2プロトンチャネルの活性評価

調製した GPMVs の外液を pH5.5 に置換し、GPMVs 内部へのプロトン取り込みを蛍光増加としてモニターした(下図)。

M2 を発現した細胞由来の GPMVs を pH5.5 の

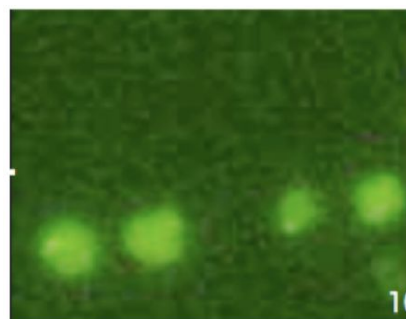
緩衝液に浸すと pH 低下に伴う GPMVs 内の蛍光強度の増加を示す GPMVs を確認した。その蛍光強度の増加は、M2 選択的な阻害剤の添加で観察されなくなった。以上の結果より、塩化亜鉛で細胞から調製した GPMVs 中の M2 のプロトンチャネル活性が保持されていることが示唆された。研究期間終了時点において、GPMVs に保持されたレセプターの基質結合を確認できた。GPMVs を培養細胞から調製する場合、作製時に使用するフォルムアルデヒドによる、膜機能の失活がモデル膜として課題であったが、本研究で作製した GPMVs は少なくとも、プロトンチャネル活性を保持しており、GPMVs のモデル膜としての利用範囲を広げることができた。研究期間終了時点において、ATP 依存的なポンプや P2X 等の ATP 依存的なカルシウムチャネル等の活性は確認されなかった。膜タンパク質活性計測が上手くいかなかった理由として、膜電位を要する膜タンパク質であったり、亜鉛イオンによる反応系阻害が原因として考えられ、現状の実験系の改良が必要であることがわかった。

### [GPMVs から基板支持細胞膜の調製方法]

これまでに化学処理、超音波による膜崩壊に誘起される基板支持膜作製に成功してきたが、成膜効率が低く、特に成膜時に微細孔上に貼った細胞膜が破れるため、本プロジェクトの目標達成のボトルネックとなった。そこで、これまでとは全く異なる新たな成膜方法の開発が重要なステップとなった。

我々は基板上に吸着した GPMVs を壊して成膜する

様々な試みを実施した結果、溶液中に発生させた気泡で成膜した基板支持状態の細胞膜気泡が、上手く基板上の GPMVs を壊して基板



支持状態の細胞膜に変換することを発見した(前項の図)。研究期間終了時点において、超音波処理等の方法と比較して、成膜効率が低くなく、微細加工基板上での成膜効率の検証には至っていないが、気泡の大きさや処理時間の至適条件を検討により、成膜効率の向上が大いに期待される方法であり、継続して検討している。

#### [薬物排出ポンプの評価系構築]

薬剤排出ポンプの機能評価のために、本研究では Caco-2 を用いた。前述のように研究期間内において、Caco-2 細胞からの GPMVs 調製に成功し、予定通り試料準備に成功した。GPMVs 中の ATP 依存性の P 糖タンパク質の活性評価については、GPMVs 内の ATP が枯渇状態にあるため、排出活性評価には残念ながら至らなかった。今後、GPMVs 内への ATP 供給方法等を構築し、機能解析を実施する予定である。

#### [膜を介したシグナル伝達の評価系構築]

本研究では、P2X 受容体に注目し評価系構築を実施した。P2X は細胞外の ATP をセンス、活性化されるイオンチャネルである。HeLa 細胞にも発現しており、ATP 依存的に一過的に細胞内の ATP レベルが上昇する。様々な条件で GPMVs 作製し、それら GPMVs を用いて ATP 依存的なカルシウムイオン取り込みを評価したが、現時点で GPMVs 中の P2X 活性を確認できていない。原因として膜電位依存的に機能する膜タンパク質の場合、GPMVs 中での機能を再現するのは、膜電位を厳密に制御する必然性があると考えられる。膜電位を調製しながら、P2X 活性を計測する実験系の構築が必要であり、今後の課題である。

#### [まとめ]

本研究により、これまで GPMVs は膜タンパク質活性計測等に用いることにいくつかの制限があったが、亜鉛等の金属イオンやアン

モニウムイオン等を用いて GPMVs を調製することで、膜タンパク質の活性評価として利用できる可能性を見いだすことができた。また、気-液界面を利用した新たな GPMVs からの細胞成膜方法を確立するに至った。また、活性を計測可能ないくつかのモデル膜タンパク質の準備も終了した。

しかし、微細加工基板上に細胞膜を固定する効率を向上させることが本研究全体のボトルネックとなり、研究進度が当初の計画よりも遅れた。最終的な研究目標達成のために、微細加工基板上に細胞膜を効率的に固定する新たな方法の確立していく。

#### 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)

該当なし

[学会発表](計 5 件)

岡崎美紀, 奥野貴士: ガラス基板上に固定した細胞膜中の脂質と膜タンパク質の電気泳動, 第 55 回日本生物物理学会年会, 9 月, 2017, 熊本

坂本知由子, 中谷博幸, 坂根礼文, 奥野貴士: 細胞膜機能解析へ向けた細胞膜試料マニピュレーション, 第 12 回トランスポーター研究会年会, 7 月, 2017, 仙台

若松駿, 羽鳥晋由, 奥野貴士: The binding of actin filament on the cell membrane flat sheet, 第 54 回日本生物物理学会年会, 11 月, 2016, つくば

坂本知由子, 中谷博幸, 坂根礼文, 南祐太, 奥野貴士: 細胞膜を介した物質輸送評価のための微細加工石英-細胞膜ハイブリッドデバイス開発, 第 11 回トランスポーター研究会年会, 7 月, 2016, 京都

坂本知由子, 中谷博幸, 坂根礼文, 南祐太, 奥野貴士: Development of micro-patterned quartz and cell membrane hybrid device for monitoring of molecular transport via cell membrane, 第 39 回分子生物学会年会, 11 月, 2016, 横浜

[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〕

ホームページ等

<http://www.sci.yamagata-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥野 貴士 (OKUNO, Takashi)

山形大学・理学部・准教授

研究者番号：80411031

### (2) 研究分担者

櫻井 敏彦 (SAKURAI, Toshihiko)

鳥取大学・工学研究科・准教授

研究者番号：10332868