

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26288067

研究課題名(和文) 脂質支持膜への細胞融合法の開発と膜タンパク質計測への応用

研究課題名(英文) Development of a method for fusion of biological cells onto supported lipid bilayers and its application to membrane protein analyses

研究代表者

金田 隆 (KANETA, Takashi)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：20243909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞膜に局在する膜タンパク質を計測するための新しいサンプリング法として、基板上に作製した脂質二分子膜に生体細胞を融合させる技術確立し、その手法を活用した細胞膜の膜タンパク質分離、並びに計測方法を開発することを目的とした。基板上に細胞膜を展開し、それを観測するための全反射蛍光観測システムを作製し、それをを用いた脂質固定化膜形成の観察、平面化した細胞膜の観察を行い、細胞膜に局在する膜タンパク質の計測法開発を行った。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed the development of the method to incorporate membrane proteins in real biological cells into supported lipid bilayers and its application to the separation and determination of the membrane proteins. We constructed a system for observing total internal reflection fluorescence. We fabricated the supported lipid bilayers and incorporated biological cells into the supported lipid bilayers in order to develop the analytical method of the membrane proteins localized in biological cell membranes.

研究分野：分析化学

キーワード：膜タンパク質 単一細胞計測 細胞融合 電気泳動 単一分子検出 マイクロ流体デバイス

1. 研究開始当初の背景

(1) 膜タンパク質計測の重要性

膜タンパク質は生体細胞の構造維持、物質移動、情報伝達などの様々な役割を果たす極めて重要なタンパク質である。例えば、細胞内のイオン濃度を調節するイオンチャンネルや異物を排出する膜輸送体はいずれも膜タンパク質であり、細胞の生命維持に重要な役割を果たしている。したがって、生命活動の機構解明には、機能を維持したままで膜タンパク質を計測、分離する方法を開発することが重要な課題である。

(2) 従来の計測法とその問題点

従来法の問題点は、いずれの方法でも膜タンパク質を界面活性剤により変性させなければならない点にある。現在、主流となっている膜タンパク質の計測法は、界面活性剤により膜タンパク質を可溶化し、ウエスタンブロットティングなどにより測定するものである。しかし、この方法では、膜タンパク質は変性してしまうため、その機能を評価することはできない。我々もまた、キャピラリー電気泳動/レーザー励起蛍光検出法に基づくがん細胞の膜輸送体タンパク質、MRP1の分析法に関する研究を行ってきたが、MRP1の抽出は変性条件で行わなければならない、機能評価の研究に発展させることはできなかった。

一方、膜タンパク質の分離精製の多くは、遺伝子工学的な手法を用いるものである。この方法は、目的とする膜タンパク質にヒスチジンタグ (His-tag) を融合した組換え膜タンパク質を大腸菌などで発現させ、可溶化、精製、リポソームへの再構成などを行うものである。この方法は目的とする膜タンパク質のみをHis-tagにより捕捉して精製するため、純度の高い膜タンパク質を得ることはできるが、操作が煩雑、高度な技術が必要でコストが高い、構造が実際の発現タンパク質と完全に同じではない、などの問題点がある。また、遺伝子工学を用いる場合でも、抽出には界面活

性剤による可溶化が必要であり、変性を生ずる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、膜タンパク質分析における障害となっている界面活性剤での可溶化法を用いず、細胞膜にある状態のままに基板上に作製した脂質二分子膜に融合させ、分離、計測する方法を開発する。すなわち、基板上に作製した脂質二分子膜に、直接、細胞を融合させる方法を開発し、その膜内で細胞膜タンパク質を分離、計測する方法を確立する。

脂質二分子膜を利用した脂質や脂質結合タンパク質の分離法として、近年、流体力学的な駆動力や電気泳動現象を利用して分離や濃縮を行う方法が考案されている。例えば、Tanaka らはガラス基板上の高分子薄膜上に脂質単分子膜を積層し、脂質膜に埋め込んだタンパク質を流体力学的に移動させることに成功した[1]。一方、Graves ら[2]や Monson ら[3]は、基板に保持した脂質二分子膜上に脂質結合タンパク質を分散させ、電気泳動により移動できることを示している。しかし、実際に細胞の膜タンパク質を分離した例はなく、いずれの場合も、モデル化合物に限られている。これは細胞膜の膜タンパク質を直接サンプリングする方法がないことに起因する。事実、これまで、脂質二分子膜に細胞を融合させる研究は行われていない。したがって、本研究で初めて、細胞融合により膜タンパク質をサンプリングする研究に取り組んだ。

3. 研究の方法

プリズムを利用した全反射照明蛍光観察システムを作製し、これを利用して、ガラス表面での脂質支持膜形成、脂質支持膜に細胞小胞が取り込まれる様子を観察した。脂質支持膜形成はリポソームによる自己組織化を利用して行った。蛍光脂質で標識したリポソームを調製し、これを観察セル内に導入し、観察

セルのガラス基板表面に脂質膜が形成される様子を観察した。

作製した脂質支持膜に細胞膜を融合させるために、細胞を小胞化し、リポソームと混合することで、リポソームと同時に細胞小胞をガラス基板上に平面化させる方法を検討した。また、新たな方法として、ガラス基板上に培養した細胞を高濃度の塩溶液に浸し、浸透圧により細胞内部の水を放出させて細胞を平面化する方法について検討した。

4. 研究成果

細胞膜に局在する膜タンパク質を計測するための新しいサンプリング法として、ガラス基板上に作製した脂質二分子膜に生体細胞を融合させる方法について検討した。まず、ガラス基板上に脂質二分子膜を作製するために、リポソームを利用した自己組織膜の作製法について検討した。自作の全反射蛍光顕微鏡を用い、リン脂質であるジパルミトイルフォスファチジルコリン(DPPC)と蛍光標識脂質であるローダミン修飾フォスファチジルエタノールアミンから成るリポソームを作製し、これを用いてベシクル融合法により基板表面に脂質支持膜を作製した。脂質支持膜形成のためのリポソーム量の最適化を行った結果、最適条件は、蛍光脂質含有率が1%以下、脂質濃度が10 mM 以上であることがわかった。

この脂質支持膜への細胞の融合を蛍光観察するために、細胞をオクタデシルローダミンB (R18)で染色し、細胞の小胞化と脂質支持膜への融合実験を行ったが、融合を確認することはできなかった。これは細胞膜と脂質支持膜の脂質組成が異なるためであると予想された。そこで、実験に用いているHeLa細胞の細胞膜組成に近い脂質を用いてリポソームを作製し、これを用いた脂質支持膜の作製について検討した。フォスファチジルコリン、フォスファチジルセリン、フォスファチジン酸、コレステロールを混合した脂質を用いて脂質支持膜の作製を行ったところ、フォスファチジ

ルコリン単独の場合よりも早い膜形成が確認された。

次に、細胞を小胞化し、細胞膜と同じ組成の脂質支持膜上に細胞小胞を融合させる方法について検討した。しかしながら、培養したHeLa細胞を小胞化して脂質支持膜上に展開した結果、融合を確認することはできなかった。さらに小胞作製の際にリポソームを添加し、細胞小胞にリポソーム形成用の脂質を取り込むことで、リポソームと細胞小胞から成る膜の形成を試みたが、膜形成には至らなかった。この原因は、細胞小胞とリポソーム間の相互作用が弱いためであると予想された。

そこで新たな手法として、ガラス基板上に付着させたがん細胞に高濃度の電解質溶液を加え、浸透圧により細胞内部の水を排除し、平面化する方法について検討した。明視野観察下で、ガラス基板に付着させた細胞に5 M NaCl水溶液を添加したところ、細胞内の水が細胞外に放出され、平面化する様子が確認できた。そこで、長鎖アルキル基をもつ蛍光性分子(C18-Rhodamine)で細胞膜を染色し、暗視野で観察したところ、細胞表面からの均一な蛍光信号を得ることができなかった。この結果は、細胞の平面化が不十分であるため、エバネッセント光が細胞表面まで到達できないことを示している。すなわち、高濃度電解質溶液による平面化では、細胞の厚みがエバネッセント光の染み出し距離よりも暑いことを示唆している。

一方、C18-Rhodamineで染色した細胞を、純水で処理して細胞内に水を吸収させて球状化させたところ、驚くことに細胞表面全体から強い蛍光信号が確認された。水を吸収させた細胞は、エバネッセント光の染み出し距離よりも十分に膨らんでいるにもかかわらず、細胞表面のC18-Rhodamineを励起することが可能であった。この現象はおそらく、全反射したレーザー光がWhispering Gallery Modeのような伝搬モードにより、球状化した細胞の

細胞膜を伝搬し、細胞膜内に光が封じ込められた結果によるものと予想されるが、現段階ではその機構は明らかではない。今後、この偶然に発見した興味深い現象について、調査を進めていく予定である。

この一連の研究によって得られた結果は、新しい研究手法により得られたものであり、リポソームと細胞小胞の融合には、結合タンパク質などを利用した能動的な結合形成が必要であることを示唆するものである。すなわち、細胞膜内に存在する膜タンパク質が細胞の融合における重要な役割を果たしていることを示すものであり、細胞膜の平面化のためには、細胞膜内のタンパク質と結合する物質をリポソーム内に埋め込むことが有効であるものと予想される。この方法を実現することで、細胞膜の脂質支持膜への融合が可能になるものと期待される。また、本研究により、球状化した細胞にエバネッセント光を照射することで、細胞膜表面に光を封じ込めることができる可能性が示唆された。その機構は未解明であるが、これは新しく発見された極めて興味深い現象であり、今後の研究の展開が期待される。

<引用文献>

- [1] M. Tanaka, J. Hermann, I. Haase, M. Fischer, S. G. Boxer, *Langmuir*, 23, 5638-5644 (2007).
- [2] J. T. Groves, C. Wülfing, S. G. Boxer, *Biophys. J.*, 71, 2716-2723 (1996).
- [3] C. F. Monson, H. P. Pace, C. Liu, P. S. Cremer, *Anal. Chem.*, 83, 2090-2096 (2011).

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12件)

Manami Mitsunobu, Sakurako Kobayashi, Nobuyuki Takeyasu, Takashi Kaneta, Temperature-Induced Coalescence of Droplets Manipulated by Optical Trapping in an Oil-in-Water Emulsion, *Analytical Sciences*, 査読有, 2017, accepted.

Waleed Alahmad, Kanchana Uraisin, Duangjai Nacapricha, Takashi Kaneta, Miniaturized chemiluminescence detection system for a microfluidic paper-based analytical device and its application to the determination of chromium (III) *Analytical Methods*, 査読有, 8, 2016, 5414 – 5420, DOI: 10.1039/c6ay00954a.

Shingo Karita, Takashi Kaneta, Chelate Titrations of Ca²⁺ and Mg²⁺ Using Microfluidic Paper-Based Analytical Devices, *Analytica Chimica Acta*, 査読有, 924, 2016, 60–67, DOI: 10.1016/j.aca.2016.04.019.

Airi Harada, Keiko Sasaki, Takashi Kaneta, Direct determination of lignin peroxidase released from *Phanerochaete chrysosporium* by in-capillary enzyme assay using micellar electrokinetic chromatography, *Journal of Chromatography A*, 査読有, 1440, 2016, 145–149, DOI: 10.1016/j.chroma.2016.02.062.

Kazuma Ogawa, Takashi Kaneta, Determination of Iron Ion in the Water of a Natural Hot Spring Using Microfluidic Paper-Based Analytical Devices, *Analytical Sciences*, 査読有, 32, 2016, 31–34, DOI: 10.2116/analsci.32.31.

Julius Mbuna, Takashi Kaneta, Capillary Electrophoresis with Laser-induced Fluorescence Detection for Application in Intracellular Investigation of Anthracyclines and Multidrug Resistance Proteins, *Analytical Sciences*, 査読有, 31, 2015, 1121–1128, DOI: 10.2116/analsci.31.1121.

Shingo Karita, Takashi Kaneta, Acid-Base Titrations Using Microfluidic Paper-Based Analytical Devices, *Analytical Chemistry*, 査読有, 86, 2014, 12108–12114, DOI: 10.1021/ac5039384.

Naoki Higashidani, Takashi Kaneta, Nobuyuki Takeyasu, Shoji Motomizu, Naoko Okibe, Keiko Sasaki, Speciation of arsenic in a thermoacidophilic iron-oxidizing archaeon, *Acidianus brierleyi*, and its culture medium by inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy combined with flow injection pretreatment using an anion-exchange mini-column, *Talanta*, 査読有, 122, 2014, 240–245, DOI: 10.1016/j.talanta.2014.01.057.

[学会発表](計42件)

金田 隆, 光圧によるエクソソームの高効率捕集とがん診断法への応用, 「光圧によるナノ物質操作と秩序の創生」第1回公開シンポジウム, 2017年1月18日, 千葉大学(千葉).

Mika Isoyama, Observation of cell blebs immobilized on a glass substrate by total internal reflection fluorescence microscopy, *Asianalysis XIII*, 2016, December 11, Chaing Mai (Thailand).

Mai Kuboi, Collection of nano-vesicles using radiation pressure, Asianalysis XIII, 2016, December 11, Chaing Mai (Thailand).

Airi Harada, Enzyme assay of manganese peroxidase by capillary electrophoresis, Asianalysis XIII, 2016, December 11, Chaing Mai (Thailand).

Takashi Kaneta (Invited), Paper-based analytical devices for titrations in environmental chemistry and food chemistry, Asianalysis XIII, 2016, December 10, Chaing Mai (Thailand).

金田 隆, キャピラリー電気泳動によるマンガンペルオキシダーゼの酵素アッセイ, 第36回キャピラリー電気泳動シンポジウム (SCE2016), 2016年11月10日, 徳島大学 (徳島).

金田 隆 (依頼講演), ペーパー分析デバイスで何が出来るか, 日本分析化学会第65年会, 2016年9月16日, 北海道大学 (札幌).

磯山 美華, ガラス基板上への細胞小胞固定の全反射蛍光顕微鏡観察, 日本分析化学会第65年会, 2016年9月16日, 北海道大学 (札幌).

原田 愛梨, キャピラリー電気泳動法によるマンガンペルオキシダーゼの活性測定法の開発, 日本分析化学会第65年会, 2016年9月14日, 北海道大学 (札幌).

久保井 麻衣, レーザー光の輻射圧を利用する小胞の捕集, 日本分析化学会第65年会, 2016年9月14日, 北海道大学 (札幌).

金田 隆, マイクロペーパー分析デバイス用小型化学発光検出器の開発, 第76回分析化学討論会, 2016年5月29日, 岐阜薬科大学 (岐阜).

Shingo Karita, Chelate titrations using microfluidic paper-based analytical devices, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, 2015, December 19, Honolulu (USA).

Kazuma Ogawa, Determination of Fe(III) in hot spring water using microfluidic paper-based analytical devices, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, 2015, December 19, Honolulu (USA).

Takashi Kaneta, (Invited), Paper-based analytical devices for rapid titrations, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, 2015, December 19, Honolulu (USA).

Manami Mitsunobu (Invited), Fusion of oil droplets in a microfluidic device using optical tweezers, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, 2015, December 16, Honolulu (USA).

原田 愛梨, キャピラリー電気泳動法によるリグニンペルオキシダーゼの活性測定法の開発, 2015年日本化学会中国四国支部大会, 2015年11月15日, 岡山大学 (岡山).

島田 雄飛, 単一細胞計測のための光渦を用いた油相中水滴の捕捉, 2015年日本化学会中国四国支部大会, 2015年11月15日, 岡山大学 (岡山).

光延 愛美, 光ピンセット法を用いたマイクロ流体デバイス内での油滴融合, 2015年日本化学会中国四国支部大会, 2015年11月15日, 岡山大学 (岡山).

苅田 真吾, キレート滴定用マイクロペーパー分析デバイス (μ PAD) の開発, 2015年日本化学会中国四国支部大会, 2015年11月14日, 岡山大学 (岡山).

尾川 冬馬, マイクロ流体ペーパー分析デバイスによる天然水の簡易計測, 2015年11月14日, 岡山大学 (岡山).

[図書] (計2件)

Takashi Kaneta, Springer, Capillary Electrophoresis of Proteins and Peptides, Methods and Protocols, 2016, 11-24.

金田隆, 日本分析化学会, ぶんせき, 2015, 499-500 (2015).

[産業財産権]
なし

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 隆 (KANETA, Takashi)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号: 20243909

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

笹木 圭子 (SASAKI, Keiko)

九州大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号: 30311525

武安 伸幸 (TAKEYASU Nobuyuki)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号: 90373323

(4) 研究協力者

東谷 直樹 (HIGASHIDANI, Naoki)

金地 啓介 (KANAJI, Keisuke)

小林 桜子 (KOBAYASHI, Sakurako)

牧 朋美 (MAKI, Tomomi)

尾川 冬馬 (OGAWA, Kazuma)

苅田 真吾 (KARITA, Shingo)

光延 愛美 (MITSUNOBU, Manami)

島田 雄飛 (SHIMADA, Yuhi)

原田 愛梨 (HARADA, Airi)

工藤 すみれ (KUDO, Simire)

磯山 美華 (ISOYAMA, Mika)

久保井 麻衣 (KUBOI, Mai)

藤井 達也 (FUJII, Tatsuya)

三木 笙子 (MIKI, Shoko)