

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15765

研究課題名(和文)試験管内一分子解析法による小胞体Ca²⁺-ATPアーゼの詳細機能解明

研究課題名(英文) Toward elucidation of molecular mechanism of SERCA by single molecule analysis

研究代表者

篠田 肇 (Shinoda, Hajime)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・研究員

研究者番号：90846643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜マイクロチップ技術と蛍光イメージング技術を融合することで、小胞体Ca²⁺-ATPアーゼ(SERCA)の機能を多角的かつ網羅的に一分子解析するための技術開発を行った。蛍光タンパク質ベースのセンサーのデバイスへの非特異的吸着の抑制するためにマイクロチップの高分子ソフトマテリアルコーティングを行い、膜タンパク質の一分子アッセイのハイスループット化に向けた大型マイクロチップデバイス、自動化プラットフォーム開発することで、SERCAを含む膜タンパク質の一分子機能解析が可能となる基盤技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SERCAを介して制御される、細胞質Ca²⁺濃度の時空間的なダイナミクスは、筋収縮や神経伝達など多岐にわたる生命現象の基盤である。一方で、SERCAの活性/抑制化の分子機構の詳細は未だに明らかになってないことがあり、本研究で開発した膜タンパク質の一分子計測技術基盤は、それらの解明に迫り、SERCAの異常により引き起こされる心不全や精神疾患などの疾患原理の解明も期待される。SERCA以外の種々の膜タンパク質の機能解明への展開も期待できる。

研究成果の概要(英文)：For comprehensive single molecule analysis of the function of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA), I integrated biomembrane microchip technology with fluorescence imaging technology. Polymeric soft material coating was performed on the microchips to inhibit nonspecific adsorption of fluorescent protein-based sensors on the devices. Large microchip devices for high-throughput single molecule assays of membrane proteins, and the automated platform was also developed.

研究分野：生物物理

キーワード：タンパク質一分子の網羅的解析

1. 研究開始当初の背景

小胞体 Ca^{2+} 膜輸送体を介して制御される、細胞質 Ca^{2+} 濃度の時空間的なダイナミクスは、筋収縮や神経伝達など多岐にわたる生命現象の基盤となる。小胞体 Ca^{2+} -ATP アーゼ (SERCA) は、ATP 加水分解により得たエネルギーを用いて、細胞質から小胞体へと Ca^{2+} を回収する。細胞質の Ca^{2+} 濃度を恒常的に低く維持することで、細胞質で Ca^{2+} 依存的反応が常時おこらないよう、必要な時にだけ起こるよう制御している。アミノ酸変異に伴う SERCA の機能異常は、心不全や精神疾患などの重篤な病気の一因となるため、SERCA 研究は基礎医学分野においても関心を持たれている。近年、SERCA の活性状態が、種々のマイクロペプチドによって制御されること、生体二重膜の構成脂質の種類によって大きく異なることなど、 Ca^{2+} 伝達システムのチューニング機構が見つかってきた。一方、マイクロペプチド/脂質と SERCA の結合・解離速度等の物理化学的性質や、ペプチド/脂質種ごとの SERCA の活性/抑制化の分子機構の詳細は未だほとんど判明していない。

2. 研究の目的

現在までに、SERCA に関する知見の多くは、特定の分子種を機能欠損させた細胞の表現型解析、リポソームなどの人口脂質膜上での *in vitro* 評価など、多数の平均値を扱う手法により得られてきた。しかし、細胞や人工脂質膜の中に含まれている SERCA 分子は、活性や機能状態が同一でない、あるいは配向が不揃いであるため、SERCA 一分子あたりの正確な性能を平均値から評価することができない。同様に、機能や反応状態の異なる個々の SERCA 分子の詳細解析には限界がある。そのため今後は、多数の平均値ではなく、一分子計測を行うことで、SERCA の物理化学性能と機能ダイナミクスを明らかにする必要性に迫られている。

申請者の所属研究室では、膜輸送体の一分子解析を可能にする、生体膜マイクロチップ技術を開発した (渡邊ら, Nat. Commun., 2014)。生体膜マイクロチップは、フェムトリットルからピコリットル容積 (fL-pL : 10^{-15} - 10^{-12} L) の試験管を集積させた基板である。試験管内部に pH 感受性の蛍光色素を封入し、試験管の開口部を脂質二重膜で蓋をし、膜に膜輸送体一分子を導入する。本研究提案では、以前開発した生体膜マイクロチップに、申請者の研究背景である蛍光イメージング技術を最大限に活用することで、SERCA の物理化学性能と機能ダイナミクスを多角的・高感度・網羅的で計測可能な技術革新を行う。現在確立されている H^{+} 濃度変化に加えて、 Ca^{2+} 検出のための Ca^{2+} 反応性の蛍光色素や、生体分子である ATP 検出のための蛍光タンパク質センサーを組み合わせ、SERCA の $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ といった三者の輸送活性を測定する。

3. 研究の方法

Ca²⁺や ATP 濃度変化を高感度で検出できる蛍光タンパク質ベースのセンサーを応用することで、小胞体 Ca²⁺-ATP アーゼによる Ca²⁺輸送や ATP 輸送活性を特異的かつ高感度に計測できると期待できる。一方、蛍光タンパク質ベースのセンサーはマイクロチップに非特異的に吸着することが判明し、デバイス内でセンサーが正しく機能しないことが示唆された。そこで、マイクロチップを高分子ソフトマテリアルでコーティングすることで、センサーのデバイスへの非特異的吸着の抑制をまず図った。結果、蛍光タンパク質の吸着を大幅に抑えることに成功した。

続いて、膜タンパク質の一分子アッセイのハイスループット化に向けた技術開発を行った。従来法ではマイクロチップデバイスを一つ一つ準備し、アッセイを行うのに時間がかかることが問題点であった。(例えば、1つのデバイスを作製しアッセイを行うのに1時間以上要する。)これを解決するために、従来よりも10倍大きい~10cm角サイズの大型マイクロチップデバイス、ならびにそれに合わせたマイクロ流路系を開発した。デバイス作製時においては、スピコート処理方法や、エッチング条件の最適化などを繰り返し行うことで、デバイスのほぼ全面にわたってマイクロチャンバーの大きさをほぼ均一にすることができ、量産も可能になった。

4. 研究成果

大型デバイスを使用することで、一デバイスあたり15サンプルのアッセイを行なえるようになった。大型デバイスと電動ピペットを組み合わせることで、マイクロチャンバー上に脂質膜を形成できること、フェムトリットルサイズの反応空間を形成できることを確認できた。

さらなるスループットの向上のために、マイクロチップを用いた膜タンパク質の一分子計測の自動化にむけた技術開発にも取り組んだ。申請者らは昨年度、水溶性タンパク質の CRISPR-Cas13a とマイクロチップを用いた、RNA の一分子検出技術の自動化プラットフォームの開発に成功した(篠田ら, *Commun. Biol.*, 2022)。本自動化プラットフォームでは、一分子アッセイの前処理(溶液の混合)、マイクロチャンバーへの溶液の封入、共焦点顕微鏡による一分子イメージング、画像データの解析、といった一連のプロセスを全自動化することができている。本自動化プラットフォームを膜タンパク質の一分子解析にも展開し、1つのデバイスで15サンプルのアッセイを全自動で行うために、膜タンパク質用の自動分注機のノズル設計や、デバイスと顕微鏡との接続箇所の治具の作製などを行い、一分子解析のハイスループット化に向けた技術開発を進めた。目標とした SERCA の分子機能の一分子解析は達成できなかったが、本研究により開発した一分子測定技術をさらに洗練化させ、SERCA の一分子解析へとつなげるべく引き続き研究を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------