

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22650105

研究課題名（和文）細胞由来リポソームを用いたバイオセンシング技術の構築

研究課題名（英文）Development of biosensing technology using cell-derived liposomes

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・准教授

研究者番号：80270883

研究成果の概要（和文）：微小孔アレイデバイス上で薬剤刺激を行うことで、ヒトリンパ球細胞からリポソームを生成分離する新規技術を開発し、リポソームの生成量と分離効率を大きく増加させることに成功した。また、遺伝子導入により所望の膜タンパク質を発現させたヒトリンパ球細胞よりリポソームを生成し、このリポソームを QCM（Quartz Crystal Microbalance、水晶振動子マイクロバランス）電極上に固定化することで、リポソーム上の膜タンパク質とそのリガンドの結合を検出する新規センシング技術を開発した。

研究成果の概要（英文）：Liposomes were produced and separated from human lymphocytes using chemical stimulation in a microhole array device, and the number of produced liposomes and the separation efficiency were dramatically increased. Also, liposomes having specific membrane proteins that were expressed in the host lymphocytes by gene transfection were immobilized on an electrode of a QCM (quartz crystal microbalance) sensor, and interactions between the membrane proteins and their ligands were detected.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	2,800,000	480,000	3,280,000

研究分野：バイオマイクロデバイス

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：リポソーム、膜タンパク質、GPCR、QCM、マイクロ流路、リンパ球細胞、バイオセンサ

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、ヒトリンパ球細胞に対して酪酸ナトリウムを作用させることで、細胞からリポソームを生成させる新規手法を導出した。この手法を用いれば、予め遺伝子導

入により細胞に所望の膜タンパク質を発現させることで、その膜タンパク質を本来の構造と機能を維持した状態でリポソーム膜上に確実に得ることができる。これに対して、リン脂質溶液から合成される従来のリポソームでは、その合成時もしくは合成後に膜タ

ンパク質が膜内に導入されるため、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。また、従来法では膜タンパク質を単離・精製する必要があるが、それが可能な膜タンパク質の種類は限られる。例えば、細胞外の神経伝達物質やホルモンを受容してそのシグナルを細胞内に伝える GPCR (G タンパク質共役型受容体) は疾病と密接な関連があるため医薬品開発の最も重要な標的であるが、その構造の複雑さと不安定さゆえに精製法は未だに確立されていない。したがって、従来法ではこの GPCR をリポソーム膜上に発現させることはできない。研究代表者らの手法は、従来法が有するこれらの大きな問題を解決する極めて斬新な技術である。すなわち、遺伝子導入により例えば GPCR を親細胞の膜上に大量に発現させることで、リポソーム膜上にも本来の構造と機能を有する GPCR を大量かつ確実に獲得することができる。本研究課題では、このような細胞由来リポソームをバイオセンシング技術に応用するものであり、これにより従来では不可能であったような膜タンパク質をセンサプローブとして利用することが可能になる。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、薬剤刺激により細胞からリポソームを生成する技術に関して、マイクロデバイスを用いて寸法の揃った大量のリポソームを効率良く分離抽出する技術を構築することである。第二の目的は、このようにして生成したリポソームを QCM (Quartz Crystal Microbalance、水晶振動子マイクロバランス) の電極上に固定化し、リポソーム上に発現した膜タンパク質を利用した新規バイオセンシング技術を構築することである。

3. 研究の方法

(1) 微小孔デバイスを用いた細胞由来リポソームの生成分離

リポソームを生成分離するデバイスを製作した。デバイスは 4×4 個のマイクロウェル、2 個の PDMS (Polydimethylsiloxane) 製チャンバー、ガラス基板で構成される (図 1)。マイクロウェルは Si 基板の異方性エッチングで製作される。また、ウェル底面は膜厚 1 μm の SiN 製の透明自立膜より成り、24×24 個の孔径 5 μm の微小孔が SiN 膜を貫通する形で形成されている。微小孔の周辺に、細胞膜に貫入することで細胞保持効果を示す細

胞膜アンカー分子 (日油 OE-040CS) を修飾した。ヒトリンパ球細胞は基質接着能が低いため浮遊状態で増殖するが、細胞膜アンカー分子を修飾することで、その分子末端のオレイン酸基が細胞膜のリン脂質と疎水結合を形成することで、細胞が微小孔上面に固定される (図 2(a))。そして、10mM の酪酸ナトリウム (Sodium butyrate, NaB) によりヒトリンパ球細胞を薬剤刺激すると、細胞より突出した細胞膜が微小孔を通過しながらリポソームを形成する (図 2(b))。このとき、細胞はマイクロウェル内に留まるため、リポソームは生成されるとともに細胞から分離される。

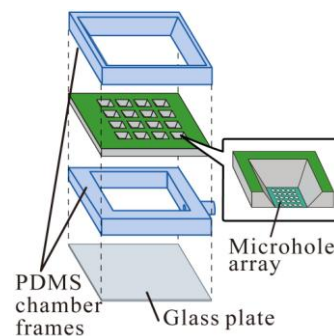


図 1 リポソーム生成分離デバイス

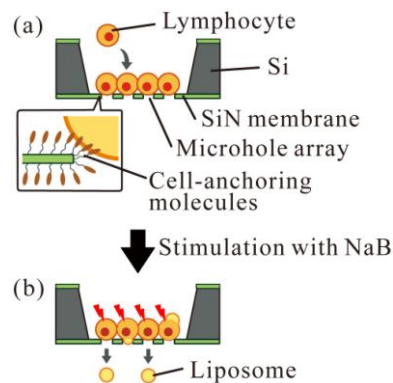


図 2 リポソーム生成分離方法

微小孔を用いて細胞とリポソームを分離するには、細胞の径が微小孔より大きくなければならない。しかし、細胞が分裂途中にあると、核を構成する核膜が消失することで細胞形態の可変性が上がり、細胞が変形しながら微小孔を通過してしまう可能性がある。そこで、細胞周期を揃える同調培養を行い、分裂直前の細胞を除去することにした。具体的には、細胞周期制御薬剤ヒドロキシ尿素を培地に添加して DNA 複製を抑制し、全ての細胞の細胞周期を S 期に揃え、その後にリポソーム誘導を行った。

(2) 細胞由来リポソームを用いた膜タンパク質-リガンド相互作用の QCM 計測

ヒトリンパ球細胞が定常発現している膜タンパク質 BCR (B-cell receptor) をプローブ分子として、以下の方法で QCM センサを構築した。まず、ヒトリンパ球細胞を酪酸ナトリウムで刺激することで BCR を表面に担持したリポソームを取得した後に、超音波照射処理により直径 $1\mu\text{m}$ 以下のリポソームに微粒化した。次に、QCM システム (日本電波工業 NAPICOS PSA10A) 付属のセンサチップの金電極表面に、システアミンと細胞膜アンカー分子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し、リポソームを電極表面に固定化した (図 3)。なお、膜タンパク質と細胞膜アンカー分子の間に結合は形成されないため、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。

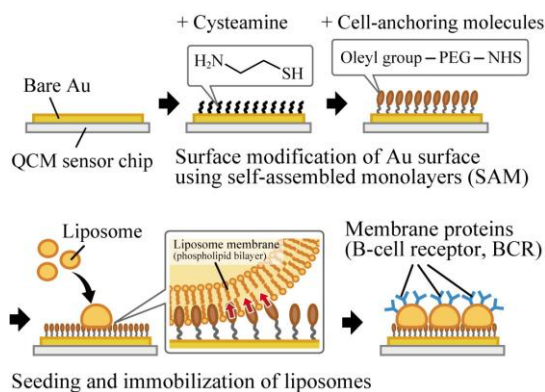


図 3 QCM センサ電極上へのリポソーム固定

製作したセンサの検出能を下記の方法で評価した。QCM センサチップに PDMS 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た (図 4)。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った。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。

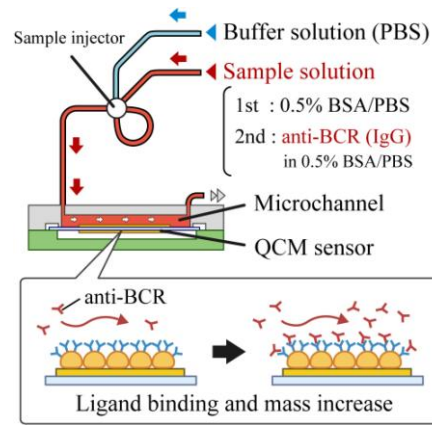


図 4 QCM センサの概要

さらに、遺伝子導入によりヒトリンパ球細胞の細胞膜上に GPCR の一つである BB2R (ブラジキニン B2 レセプタ) を発現させた。この細胞を薬剤刺激することで、BB2R を担持したリポソームを取得した。このリポソームを回収・微粒化した後に QCM センサ電極上に固定化した (図 5)。マイクロ流路中にセンサを設置し、BB2R のリガンドであるブラジキニンを含む PBS 溶液 ($1\text{mg}/\text{ml}$) を導入し、QCM の共振周波数変化を計測した。

Transfection and expression of bradykinin B2 receptor (BB2R) gene

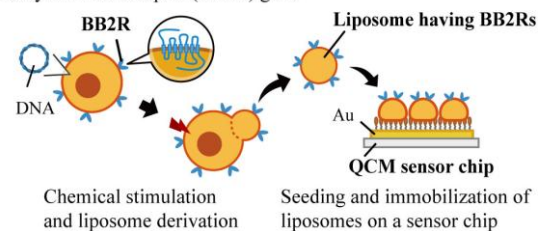


図 5 遺伝子導入からセンサ構築までの手順

4. 研究成果

(1) 微小孔デバイスを用いた細胞由来リポソームの生成分離

細胞周期制御により同調培養を施した細胞と未処理細胞をそれぞれ微小孔上に播種し、微小孔を通過してウェル直下に沈降した細胞の数を計測した。同調培養を施さなかった場合には、時間経過とともに大量の細胞が微小孔を通過した。一方、同調培養を施した細胞では、細胞の微小孔通過が約 90%抑制された。ただし、同調培養を施した場合でも少量の細胞通過が認められた。これは、同調培養による分裂直前細胞の除去が完全でないことが原因であると思われる。

生成分離後のリポソームを観察した (図 6)。

デバイス表面が未処理の場合 (a)、及び水溶性ポリマーのポリエチレングリコール (PEG) を修飾処理した場合 (b) では、リポソーム生成量が少なかった。これに対して、細胞膜アンカー分子を修飾すると、リポソームの生成量が著しく増加した (c)。しかし、多くの細胞が混入し、分離効率 (リポソーム数/リポソームと細胞の総数) は 90%程度であった。一方、同調培養を行った細胞からリポソーム生成を誘導した場合には、細胞の混入が著しく減少し、リポソームの分離効率が 99%まで向上した (d)。このとき、リポソームの粒径分布は $3\mu\text{m}$ 付近にピークをもった (図 7)。同調培養を行わなかった場合には、粒径 $10\mu\text{m}$ 近くの大きなリポソームが多く形成された。この大きなリポソームは、微小孔を通過した細胞から生成されたものと思われる。

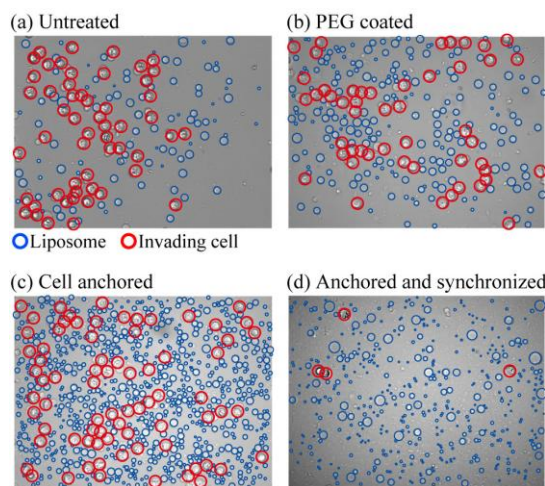


図 6 生成分離後のリポソームの写真

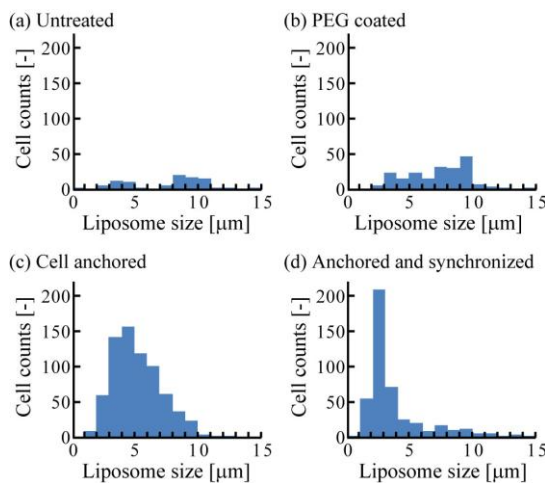


図 7 リポソームの粒径分布

(2) 細胞由来リポソームを用いた膜タンパク質-リガンド相互作用の QCM 計測

ヒトリンパ球細胞より取得したリポソームの表面に BCR 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。すなわち、FITC (Fluorescein isothiocyanate) 修飾抗 BCR 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、リポソーム上の BCR に蛍光抗体を結合させた。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、ヒトリンパ球細胞も同様の手法で蛍光染色した。その結果、リポソームの蛍光強度は細胞のそれと比較すると低くなったものの蛍光が認められたことから、リポソーム表面に BCR が存在することを確認するに至った。

次に、リポソーム上の BCR とサンプル溶液中の抗 BCR 抗体との結合反応に伴う 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に成功した。図 8 に、抗 BCR 抗体溶液の希釈系列 ($10, 20, 30, 40, 60, 80, 100\mu\text{g/ml}$) を作用させて得られた周波数変化を示す。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量から BCR に結合した抗 BCR 抗体の質量を Sauerbrey の式を用いて算出し、サンプル溶液の抗 BCR 抗体濃度と結合した抗 BCR 抗体質量の関係をプロットした (図 9)。この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い、そのフィッティングカーブと Michaelis-Menten の式を比較することで、解離定数 $K_d=1.5\mu\text{M}$ を導出した。この解離定数の値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。

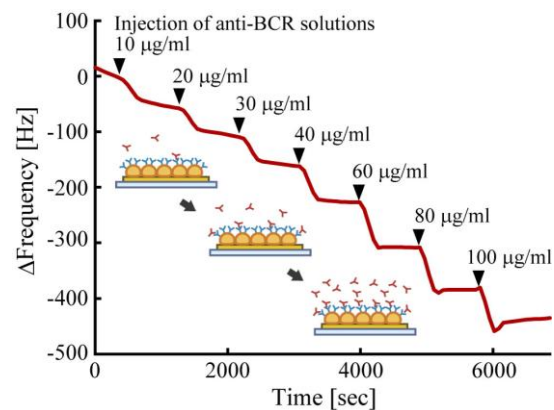


図 8 抗 BCR 抗体に対する QCM 応答

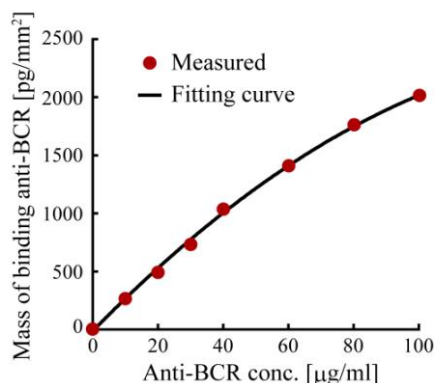


図9 抗BCR抗体の結合特性の評価

さらに、BB2Rを有するリポソームを電極上に固定化したQCMセンサ上にマイクロ流路を設置し、BB2Rのリガンドである低分子量オリゴペプチドのブラジキニンを含むPBS溶液を導入した。その結果、ブラジキニン溶液（1 mg/ml）の作用に対し、有意な周波数減少が認められた（図10）。また、センサ表面のBB2Rに対するブラジキニン結合量は、Sauerbreyの式より約58 pg/mm²と算出された。以上のように、構造が複雑で不安定なGPCRを、その本来の構造と機能を維持した状態でリポソーム膜上に獲得し、このGPCRをプローブ分子として用いた新規バイオセンシング技術を構築することに成功した。

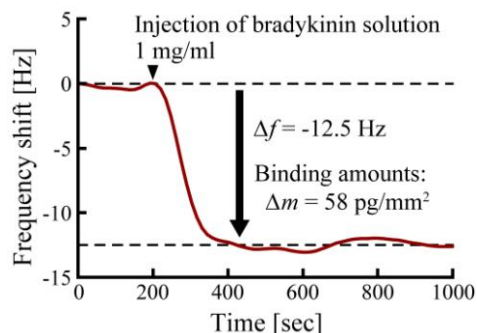


図10 ブラジキニンに対するQCM応答

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, pp.155-156, 2013, 査読有, DOI: 10.1541/ieejsmas.133.155

〔学会発表〕（計12件）

- ① 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 (μ TAS 2012), 沖縄コンベンションセンター（沖縄県）, 2012年10月29日
- ② 山中誠, 安田隆, 細胞由来リポソームを用いた膜タンパク質-リガンド相互作用のQCM計測, 第29回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 北九州国際会議場（福岡県）, 2012年10月24日
- ③ 山中誠, 安田隆, 微小孔デバイスを用いたヒト細胞由来リポソームの生成分離, ナノ学会第9回大会, 北海道大学（北海道）, 2011年6月3日
- ④ Makoto Yamanaka, Takashi Yasuda, Microhole Device for Derivation and Separation of Liposomes from Human Lymphocytes with Synchronized Culture, The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2010), Groningen（オランダ）, 2010年10月6日

〔その他〕

研究紹介「リポソーム・デバイス」

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

6. 研究組織

(1) 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・准教授

研究者番号：80270883