

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560204

研究課題名(和文)細胞由来リポソームを用いたトランスポーター型膜タンパク質の機能解析技術

研究課題名(英文)Technique for function analysis of membrane transport proteins 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・教授

研究者番号：80270883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤刺激によりヒトリンパ球細胞から生成された細胞サイズのリポソーム(細胞外ベシクル)を用いて、トランスポーター型膜タンパク質を解析するための新規マイクロデバイスを開発した。SiN(窒化シリコン)製ダイアフラムに形成した微小孔上にリポソームを固定化した後に、界面活性剤を作用させてリポソーム膜を部分的に溶解した。これにより、微小孔がリポソーム膜切片で覆われた状態を作り出すことに成功した。そして、リポソーム膜上に存在するグルコーストランスポーター1(GLUT1)により輸送される蛍光標識グルコース(2-NBDG)を、FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)を用いて検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel microdevice for transport protein analysis using a cell-sized liposome (extracellular vesicle) which was derived from a human lymphocytic cell with chemical stimulation. A liposome was immobilized on a microhole which was fabricated in a SiN (silicon nitride) diaphragm. Then, the liposome membrane was partially dissolved by surfactant treatment, which permitted the microhole to be covered with a portion of the membrane. The use of FRET (fluorescence resonance energy transfer) enabled detection of fluorescently-labeled glucose (2-NBDG) molecules which were transported by glucose transporter 1 (GLUT1) proteins present in a liposome membrane.

研究分野：バイオマイクロデバイス

キーワード：リポソーム 膜タンパク質 トランスポーター リンパ球細胞 微小孔 マイクロ流路 蛍光共鳴エネルギー移動

## 1. 研究開始当初の背景

細胞表面に存在する膜タンパク質は、細胞間や細胞内外の情報伝達において非常に重要な働きを担うことから、様々な疾病に深く関与している。したがって、医薬品を開発する上では、薬剤候補分子が膜タンパク質と結合する強度や結合・解離の特性などの分子間相互作用を詳細に解析することが求められる。この解析を行う際には、対象となる膜タンパク質を正常な機能や構造を保ったまま細胞外に取り出すことが非常に重要である。しかし、トランスポータなどの膜タンパク質は、細胞膜を複数回貫通するような複雑な構造を有するとともに、疎水性部位を多くもつため水溶液中での取り扱いが困難であることが、膜タンパク質の分離・精製の大きな障害となっている。

一方、研究代表者らは、ヒトリンパ球細胞を薬剤刺激することで、細胞から細胞サイズのリポソーム(細胞外ベシクル)を生成する技術をすでに構築している。この技術は、基本的な細胞培養手法のみで実施可能であり、培養スケールを上げることでリポソームを容易に大量生産することが可能である。また、取得したリポソームは、親細胞の細胞膜と同じ組成の膜成分を有しているため、親細胞より引き継いだ完全なヒト膜タンパク質を本来の構造と機能を維持したまま保持している。そして、この細胞由来リポソームを微小孔上で展開固定すれば、リポソーム膜に存在するトランスポータ型膜タンパク質の機能解析が可能となる。

## 2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、ヒトリンパ球細胞の化学刺激により生成した細胞由来リポソームを、半導体微細加工技術で製作した内径数ミクロンの微小孔上に展開して固定し、微小孔内にリン脂質二分子膜で保持された正常なトランスポータ型膜タンパク質を獲得する技術を構築することである。第二の目的は、トランスポータ型膜タンパク質により生体分子が輸送される様子を、微小孔内でモニタリングする技術を構築することである。これら二つの目的の達成により、新規の膜タンパク質機能解析技術の基盤を創出する。

## 3. 研究の方法

(1) リポソームの生成方法について説明する。まず、ヒトBリンパ球細胞株 Ramos (RA1) に対して、培養培地に酪酸ナトリウム (NaB) を添加して薬剤刺激培養を行い、リポソームの形成を誘導した。このとき、細胞にはアポトーシスが生じ、同時に細胞膜が突出して膨張し小胞を形成する。その後、小胞が十分に大きくなると膜が閉じ、リポソームが形成される。そして、形成されたリポソームは細胞

から自然に乖離する。このようにして生成したリポソームは、細胞と同程度の約 10 $\mu$ m の直径を有し、刺激開始からリポソーム形成までに約 20 時間を要した。

MEMS 加工を利用して、以下のようにして微小孔を有するダイアフラムを製作した。まず、プラズマ CVD によりシリコン基板の両面に厚さ 1.5 $\mu$ m の SiN 膜を形成した。次に、CF<sub>4</sub> プラズマによるドライエッチングにより SiN 膜を部分的に除去することで、片面に直径 2 $\mu$ m の微小孔を、他面にエッチング用の窓を形成した。そして、シリコンの結晶異方性エッチングを行い、基板が貫通するまでエッチングを進め、微小孔を有する SiN 製のダイアフラムを形成した。

細胞から直接生成されたリポソームは、強い弾力を有しており、マニピュレータなどによる機械的な作用で膜を微小孔上に展開することは困難であった。そこで、膜タンパク質の変性が少ないと思われる非イオン性界面活性剤を作用させることでリポソーム膜を溶解する方法を用いた。以下に、微小孔上にリポソーム膜を取得する手順を説明する(図1)。まず、微小孔を有する SiN ダイアフラム表面に APTES (3-Aminopropyl triethoxysilane) を反応させ、アミノ基を有する自己組織化単分子膜を形成した。次に、細胞膜アンカー(日油, OE-040CS) を反応させて、リポソーム保持機能を付加した。そして、リポソームを播種し、細胞膜アンカーの働きによりリポソームを固定化した。最後に、界面活性剤 Triton X-100 によってリポソーム膜を部分的に溶解し、リポソーム膜の一部を細胞膜アンカーで保持した状態で微小孔上に取得した。

最適な界面活性剤の濃度及び処理時間を導出するために、事前に以下の基礎実験を行った。ガラス基板上に幅 500 $\mu$ m、高さ 100 $\mu$ m の PDMS (polydimethylsiloxane) 製のマイクロ流路を接着した後に、上記と同様の手順によりマイクロ流路内のガラス基板表面にリポソームを固定化した。このリポソームに対して濃度 0.001~1.0% の Triton X-100/PBS 溶液を作用させて、時間経過に伴うリポソーム及び残留膜の変化を観察した。

次に、リポソーム膜が溶解し、その一部が基板上に残留したことをより明確化するために、以下の実験を行った。まず、リポソーム膜を蛍光色素 DiI で染色し、リポソーム内部に蛍光色素 Calcein を包含させた。そして、このリポソームを上述のマイクロ流路内に固定化し、濃度 0.03% の Triton X-100/PBS 溶液を作用させて、時間経過に伴う 2 種類の色素の蛍光強度変化を計測した。リポソーム膜が溶解すれば、内包されていた Calcein 分子が外部に放出され拡散により濃度が薄まるため、Calcein の蛍光強度が低下するはずである。一方、リポソーム膜が基板の上に残留すれば、膜に結合した DiI の蛍光強度の変化は小さいはずである。

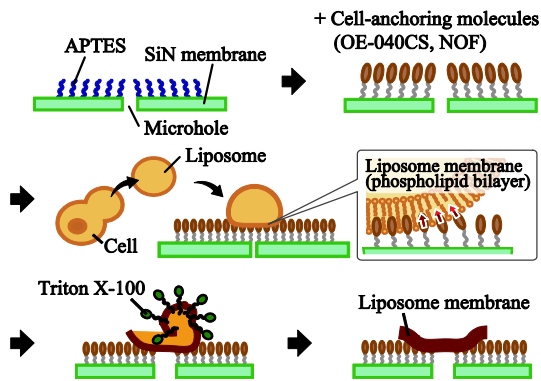


図1 リポソーム膜の固定手順

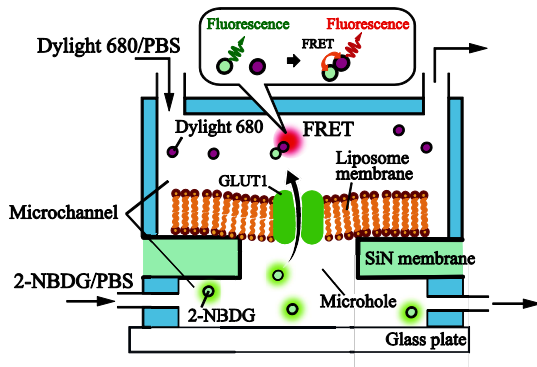


図2 FRETを用いたグルコース輸送観察

(2) グルコーストランスポーターの一つである GLUT1 は、細胞内外のグルコース濃度に応じてグルコースの取り込みや放出を行う膜タンパク質であり、ほとんどの細胞の細胞膜に存在する。したがって、本研究で取得したリポソームの膜表面にも GLUT1 が存在することが期待できる。そこで、リポソーム膜上の GLUT1 により蛍光標識グルコース (2-NBDG) が輸送される様子を、微小孔上で蛍光観察することを試みた。ただし、本研究の実験系では透明なリポソーム膜及び SiN ダイアフラムに垂直な方向から蛍光観察を行うことになるので、2-NBDG の蛍光を直接観察したのでは、GLUT1 を通過する前の 2-NBDG がバックグラウンドで蛍光を発するため、GLUT1 を通過した後の 2-NBDG のみを観察することは困難である。そこで、2-NBDG が発する蛍光によって励起し得る蛍光色素 Dylight 680 を選定し、以下に説明するように両分子間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET, Fluorescence resonance energy transfer) を利用することにした。

実験概要を図 2 に示す。まず、リポソーム膜を保持した SiN ダイアフラムの上下に PDMS 製マイクロ流路を取り付ける。次に、上部流路を濃度  $1 \mu\text{g/ml}$  の Dylight 680/PBS 溶液で満たす。そして、下部流路に濃度  $1 \text{ng/ml} \sim 1 \mu\text{g/ml}$  の範囲の 2-NBDG/PBS 溶液を導入する。すると、グルコースの濃度勾配によって 2-NBDG が GLUT1 を通過し、上部流路へ拡散する。このとき、励起光を照射して 2-NBDG 分

子を励起すると、上部流路内では近接する Dylight 680 分子と FRET が起こる。すなわち、2-NBDG 分子の蛍光エネルギーが Dylight 680 分子の励起エネルギーとして移動し、励起された Dylight 680 分子が蛍光を発する。この Dylight 680 の蛍光強度を測定することで、GLUT1 を通過し上部流路に達した 2-NBDG のみを検出することができる。

#### 4. 研究成果

(1) 界面活性剤 Triton X-100 の各濃度において、Triton X-100 の作用開始からリポソーム膜の固定までに要した最短時間を調べた。リポソームは、Triton X-100 濃度  $0.03 \sim 0.1 \%$  の範囲で溶解し、その膜の一部が基板に残留した。一方、 $0.03 \%$  より低い濃度では溶解が起こらず、 $0.1 \%$  より高い濃度ではリポソーム膜が全て溶解し基板上に膜を取得できなかった。また、リポソームを溶解しその膜の一部を基板上に取得できた場合であっても、Triton X-100 の作用を継続すると、残留膜が損傷を受け、その寸法が次第に小さくなり、最終的には消失した。そこで、各濃度において取得した膜の面積の経時変化について調べた。Triton X-100 の濃度が高いほどリポソーム膜が急速に消滅したことから、リポソーム膜及び膜タンパク質の損傷を最小限に抑えるには、Triton X-100 の濃度をできるだけ低く、かつその作用時間をできるだけ短くする必要があることが分かった。以上の結果から、最適な Triton X-100 の濃度と処理時間を  $0.03 \%$  及び 3 分とした。

リポソーム膜を DiI で染色し、Calcein を内包させたリポソームをガラス基板上に固定化し、濃度  $0.03 \%$  の Triton X-100 の作用でリポソームを溶解した際の、それぞれの蛍光色素の蛍光強度変化を図 3 に示す。Triton X-100 を作用させると Calcein の蛍光強度が低下したことから、リポソーム膜の溶解が起こったと推測される。一方、DiI の蛍光強度の低下は小さいため、リポソーム膜が基板上に残留したと判断することができる。

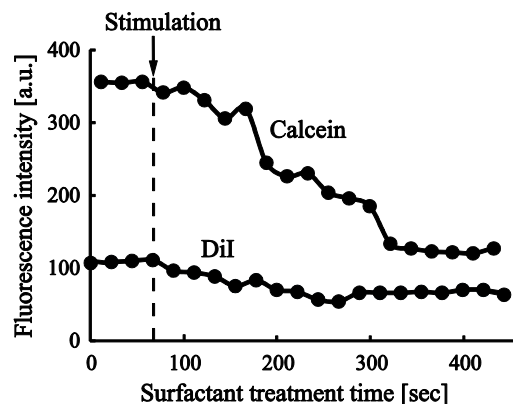


図3 界面活性剤処理に伴う2種類の色素の蛍光強度変化

(2) 下部流路に異なる濃度の 2-NBDG を導入した際に、上部流路で FRET により測定された Dylight 680 の蛍光強度を図 4 にマークでプロットした。同時に、リポソーム膜が固定されていない微小孔においても同様の計測を行い、同じグラフ内にマークでプロットした。微小孔上にリポソーム膜が存在しない場合、2-NBDG は微小孔の上下の濃度差に応じて拡散するため、濃度が高いほど蛍光強度が増加した。一方、微小孔上にリポソーム膜が存在する場合には、蛍光強度は 2-NBDG の濃度に応じてわずかに上昇したものの、その変化量はわずかであった。この結果より、リポソーム膜は微小孔上に隙間なく固定され、2-NBDG は GLUT1 の有するグルコース輸送速度に従って輸送されたものと考えられる。

さらに、GLUT1 の直接阻害剤であるフロレチンを濃度  $1\mu\text{g/ml}$  の 2-NBDG/PBS 溶液中に  $0.5\text{mM}$  ( $137\mu\text{g/ml}$ ) となるように添加した。フロレチン添加による Dylight 680 の蛍光強度変化を計測したところ、フロレチン添加により蛍光強度の減少が見られたことから、本技術により GLUT1 のグルコース輸送能の解析が可能であることが分かった。

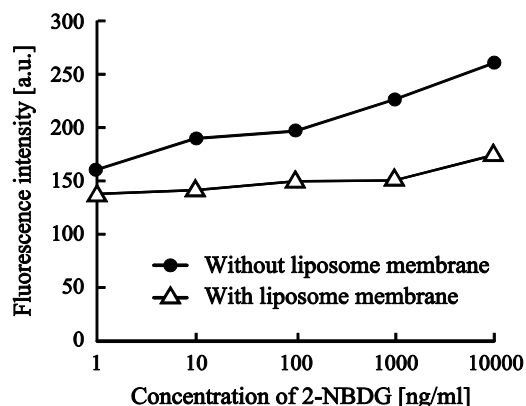


図 4 グルコース濃度と蛍光強度の関係

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計6件)

安田隆, バイオ MEMS による細胞解析・生体分子計測, 新化学技術推進協会 ライフサイエンス技術部会・材料分科会講演会, 新化学技術推進協会(東京都千代田区), 2015年4月7日(招待講演)

安田隆, 微小孔アレイデバイスを用いた細胞解析技術の構築, バイオアセンブラ第7回シンポジウム, 東京大学駒場キャンパス(東京都目黒区), 2014年7月4日(招待講演)

永山賢太, 山中誠, 安田隆, ヒト細胞

由来プロテオリポソームを用いたトランスポート解析デバイス, 平成 26 年度電気学会センサ・マイクロマシン部門総合研究会 バイオ・マイクロシステム研究会, 東京大学生産技術研究所(東京都目黒区), 2014年5月27日

永山賢太, 山中誠, 安田隆, 膜タンパク質解析のための細胞由来リポソームの展開固定, 日本機械学会 第26回バイオエンジニアリング講演会, 東北大学(宮城県仙台市), 2014年1月11日

[その他]

九州工業大学 大学院生命体工学研究科 生体機能応用工学専攻 安田研究室ホームページ

<http://www.life.kyutech.ac.jp/~yasuda/jp/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・教授

研究者番号: 80270883