

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650022

研究課題名(和文) ナノ粒子と質量分析装置を用いて脂質ラフトの有無や大きさを測定する方法の開発

研究課題名(英文) Development of a new method to detect or measure lipid raft by nanoparticles and mass spectrometry.

研究代表者

妹尾 圭司 (Seno, Keiji)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50283908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜には脂質ラフトなど構成脂質の不均一な分布があり、タンパク質などの働きを支えていると考えられているが、その分布を直接分析する方法が無かった。本研究では抗体を結合させた金属ナノ粒子と質量分析装置を用いて抗原タンパク質周辺の脂質の分析を行う方法の開発を目指した結果、金粒子から抗原分子まで共有結合で結び、抗原分子周辺の脂質の脂肪酸を分析することができた。

研究成果の概要(英文)：In a biomembrane, there are heterogeneous lipid composition like lipid raft. These heterogeneity supports many proteins' functions. Despite the importance of this heterogeneity, there are no direct method to detect these lipid heterogeneity. In this research, we have used antibody labeled nanoparticles and mass spectrometry to develop a new method that analyze the lipids surrounding the antigen proteins. As the results, we detected fatty acids which composing phospholipids which surrounds the antigen proteins by using gold nanoparticle, antibody and antigen complex linked covalently each other.

研究分野：分子生理学，生物物理学

キーワード：脂質ラフト 質量分析 ナノ粒子 生体膜 視細胞 ロドプシン

1. 研究開始当初の背景

細胞膜をはじめ様々な生体膜は、リン脂質を主成分としているが、これらの脂質成分は一様に広がっているわけではなく、脂質ラフトに代表されるように、単一の膜上であっても組成の異なる領域が組み合わさっていると考えられている。そしてその性質の違いを利用して、特定の機能タンパク質などの配置をコントロールすることによって情報伝達などの様々な生命現象に関与していると報告されている。しかし、その分析は、間接的な方法が主であり、技術的にも難しいものが多く、それらの結果に対する疑問も呈されてきた。このため、実際に特定タンパク質周辺に存在する脂質成分を分析することのできる手法の開発が期待されてきたが、脂質は化学固定に適さないため、通常の化学固定を介した顕微鏡観察の対象とはならない。また、脂質ラフトなどは nm オーダーの非常に狭い範囲である場合も多いと考えられており、光学顕微鏡での観察は不可能である。蛍光ラベルした脂質分子を用いる方法も提案されているが、蛍光ラベルによって分子挙動が変化し、本来と異なる状態の観察になる場合が多いとされている。本研究で用いる質量分析装置に関しては、例えば MALDI TOF MS 装置では照射するレーザー光のスポットの直径が脂質ラフトよりも何桁も大きく、そのままでは分析に適さない。二次イオン質量分析装置では nm オーダーまで分析範囲を絞ることができるが、原子レベルまで対象分子が分解されるため、同位体ラベルした脂質分子を合成し、これを人為的に目的の生体膜に導入し、分析する必要があるため、非常にコストが高いうえ、元々細胞に存在する分子を解析できないなどの問題があるなど、既存の方法で実際に標的分子周辺の脂質分子を検出する適切な方法が存在しない状態であった。

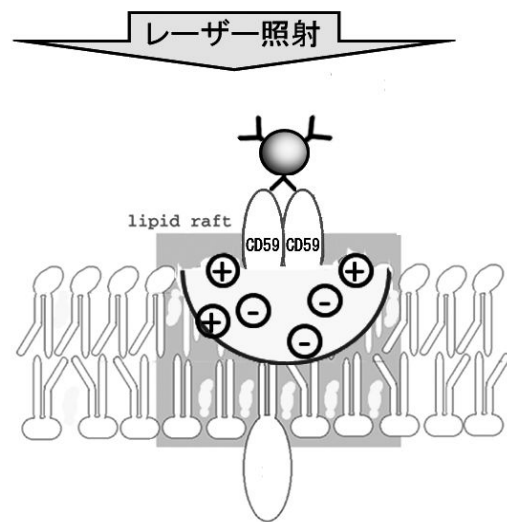
2. 研究の目的

生体膜上の特定の機能タンパク質の働きと、その周辺の脂質組成の関係を検討するために、これまでの間接的な方法に代わり、実際に特定タンパク質周辺に存在している脂質を直接分析することが望ましい、そこで質量分析装置を用いて、特定タンパク質周辺の脂質を分析することで、そのタンパク質が脂質ラフト中に分布するのか、あるいは脂質ラフトから排斥されるのかを比較的簡便に検出する方法を開発する事を目的とした。

3. 研究の方法

MALDI-TOF MS 装置を用いた質量分析法では一般的に α -シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸のような比較的 low molecular weight の有機化合物をマトリックスとしてサンプルに混合する、あるいは表面に塗布するなどの方法で、レーザー照射した部分の分子を分解しないようにソフトにイオン化し、電場の中を飛ばすことによって分析の対象とする。このマトリックスは、

分析したい分子の種類などによって特性の異なる様々な種類があり、適宜選択して使用している。そのマトリックスの特殊な例として、有機分子ではなく、金などの金属のナノ粒子を用いる方法がある。多くの場合、サンプルと重層し、サンプル中の成分を検出することに利用されたり、あるいは組織切片に一樣にナノ粒子を散布し、レーザーでスキャンすることによりどの部位にどのような成分が存在するか分析するイメージング研究などに用いられている。一方で金ナノ粒子の生物学分野における最も一般的な使用法は、抗体と結合させることによって、電子顕微鏡観察の際に抗原タンパク質を検出するなどの免疫学的方法での使用である。我々は、これらの方法を組み合わせることで、特定タンパク質周辺に存在する脂質を比較的簡便に検出するというこれまでにない全く新しい分析方法が開発できるのではないかと考えた。そこで金属ナノ粒子に特異抗原を結合させ、この粒子を抗原タンパク質の存在する生体膜に加え、抗原と結合させる。このサンプルを瞬間凍結し、凍結乾燥後、学内共同施設の MALDI-TOF MS 装置 (QSTAR) でレーザー照射により金属ナノ粒子周辺の脂質分子をイオン化し、脂質分子を検出ことにした。



研究対象となる生体膜と抗体の組み合わせとしては、2種類用いた。一つはウシガエルの視細胞外節 (ROS) の円盤膜と、そこに存在する光受容タンパク質であるロドプシンに対する抗体。もう一つはヒト膀胱ガン由来の培養細胞である T24 細胞の細胞膜と、そこで発現している GPI アンカー型タンパク質である CD59 タンパク質に対する抗体である。

これらの分析方法を確立するためには、いくつかの問題をクリアする必要がある。まず、適切な金属ナノ粒子の選択。金属ナノ粒子と抗体を適切に結合させること。

生体膜試料と抗体を結合させた金属ナノ粒子の適切な結合。それぞれの分子間の配置を保ったまま凍結乾燥を行う。適切に質量分析を行う条件。これらを適切に行うためにどのような条件で分析を行えばよ

いかを明らかにするために、様々な検討を行った。

さらに、レーザー照射によって金属ナノ粒子周辺のどの程度の範囲がイオン化されるのかを確かめるために、分析後の試料の走査型電子顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

金コロイドと銀コロイドについては、抗体の結合に関する報告と質量分析に関する報告の両方があることから、この2種類を中心に検討を行った。質量分析に使用することを考えると、銀コロイドは、質量分析装置を用いて、コレステロール（脂質ラフトの重要な構成成分である）やリン脂質を構成している脂肪酸を検出出来るという報告があり、本研究に適していると考えられる。一方で、抗体を結合させることに関しては、金コロイドを用いた報告が圧倒的に多く、また、表面処理によって抗体を共有結合させるものなど様々な選択肢が存在しており、抗体結合に関しては優れていると言える。そこでいくつかの種類の金コロイドと銀コロイドを入手し、質量分析の条件を検討した。いくつかの論文では、銀コロイドを用いることでコレステロールが検出出来ることとされていたが、かなりの長期間を費やして様々な条件を試したものの、予想された m/z のピークは見られず、論文を出したチェコのグループにコンタクトを取るなど様々な検討を行った結果、focusing potential というパラメーターを調節することにより、検出出来るということが明らかになった。さらに、これまでの報告では脂肪酸の検出には銀コロイドを用いるとされていたが、focusing potential を調節することにより、金コロイドを用いても脂肪酸を高感度に検出出来ることを明らかにすることができた。また、適切な条件下で銀コロイドを用いることで、脂肪酸のみではなく、リン脂質やスフィンゴミエリンを脂肪酸に分解することなく、分子全体を検出することができる事を示唆するデータが得られている。脂肪酸全体のピークが得られるということは、MS/MS 法を用いることで、リン脂質とその構成脂肪酸の両方を分析できると考えられることから、今後の脂質ラフト研究に大いに役立つと予想され、今後さらに研究を進める予定である。

抗体の結合に関する検討であるが、まず電子顕微鏡観察に良く用いられている方法で銀コロイドに抗体を結合させた。本研究では、最終的に質量分析装置を利用する。質量分析装置では、サンプルは高真空下に置いてレーザー照射を行う。そのために、試料にナノ粒子を結合後、凍結乾燥を行うことを予定していたため、抗体とナノ粒子の結合も凍結乾燥に耐えなければならぬ。そこで、抗体を結合させたナノ粒子を凍結乾燥し、高濃度の BSA の存在下で再生したところ、ナノ粒子から抗体が分離していることを示すデータが

得られた。質量分析を行う際に金属ナノ粒子が標的である抗原分子から離れていては、的確な分析ができない。そこで、分析能力では銀に劣るが、共有結合によって抗体分子と結合させることができる様に表面処理された金コロイド粒子を用いることにした。このようにして抗体と金ナノ粒子を結合させ、細胞試料に添加し、さらに抗体と抗原の結合が凍結乾燥に耐えうるように架橋剤を添加して共有結合によって結合させた。このようにして得られたサンプルを急速に凍結し、凍結乾燥を行うわけであるが、脂質分子の膜内での移動の速さを考慮すると、メタルコンタクトによる急速凍結が適していると考えられた。そこで、液体窒素温度に冷やした銅ブロックを用いて凍結したが、本研究で必要な細胞膜の外膜のかなりの成分が銅ブロックの表面に吸着されている様子であった。文献等によると、メタルコンタクトを行うと、脂質二重層の間の疎水面で分離することが多いとされていることから、本研究にそのままメタルコンタクトを使用することは困難であるという結論に達した。そこで、現状ではサンプルを直接液体窒素中に浸けて凍結を行っている。

これまでの金コロイドを用いた測定の結果、ROS 中のロドプシンの周辺の脂質の組成に関して、ROS 膜をそのまま用いた場合と、コレステロールを低下させる試薬である MCD で処理した ROS 膜について比較した所、あまり大きな差は得られていない。MALDI TOF MS は定量性が低く、細胞濃度などの条件によっても脂質を示す m/z のピークの相対比に変化が出ることがあったため、条件設定などをさらに見直す必要が有ると考えている。また、培養細胞を用いた CD59 タンパク質周辺の脂質組成に関しては、抗体を結合していない金コロイドと、抗体を結合した金コロイドを用いたときの違いを比較した所、ラフトを形成していると考えられる CD59 周辺には不飽和脂肪酸の量が少ないことを示唆するデータが得られている。これは脂質ラフトの性質と合致するデータである。

脂質ラフトの大きさの測定に関しては、質量分析後の試料を電子顕微鏡観察したが、これまでの所、ナノ粒子周辺のイオン化による見られる表面形状の変化を捉えることができていない。今後さらなる条件検討が必要であると考えている。

今後、脂質ラフトの構成要素として重要なコレステロールやスフィンゴミエリンに関する検出を目指したいと考えているが、本プロジェクト期間の終了後、銀コロイドに関しても、抗体を共有結合させるキットが販売された。今後これを用いることで銀コロイドの持つ抗体結合の不安定性をクリアでき、その長所である様々な脂質の検出ができるようになることが期待されることから、本研究の萌芽的アイデアが実用に向けて展開できるものと考えている。

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)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

妹尾圭司 (SENO, Keiji)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50283908

(2)研究分担者

山濱由美 (YAMAHAMA, Yumi)
浜松医科大学・医学部・教務員
研究者番号：90242784

(3)連携研究者

()

研究者番号：