

20020775

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

微細加工技術 (FIB) を応用した細胞配列化チップの創製

平成 14 年度 総括研究報告書

主任研究者 松村 一成

平成 15 (2003) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告

微細加工技術(FIB)を応用した細胞配列化チップの創製 -----	1
松村一成	
(資料) 研究結果の補足図-----	6

厚生労働科学研究研究費補助金(萌芽的先端医療技術推進研究事業)
総括研究報告書

微細加工技術(FIB)を応用した細胞配列化チップの創製

主任研究者 松村一成 芝浦工業大学工学部材料工学科 講師

研究要旨

膜タンパク質のリガンド探索は創薬のキーテクノロジーであり、その中で重要な要素技術のひとつはターゲットとなる膜タンパク質をもつ細胞をチップ上に非破壊的に配列化する技術である。本研究は、FIB（集束イオンビーム加工装置）による有機高分子の直接的微細加工を用いて、細胞・ウイルスの配列化を可能にする全く新しい吸着チップの構築を目標とする。

本年度はポリブチレンテレフタレートを基盤材料として用い、FIB加工と表面化学処理をもって微細領域上にアンカー分子であるポリリシンをカップリンクした。微細領域での化学修飾を検証するために、材料表面を多重蛍光修飾し蛍光顕微鏡で観察した。また、蛍光修飾したリポソームが配列的に吸着されたかどうかを蛍光顕微鏡、走査型プローブ顕微鏡で観察した。その結果、リポソームが材料表面上の微細加工した領域に吸着されていることが確認された。すなわち、このアプローチで微細に吸着場が制御された細胞・ウイルス配列吸着チップの構築が可能であることを実証した。同時に、電気化学的操作も可能なITO導電性ガラスの微細加工及びリポソームの吸着実験を行い、同様に配列的に吸着がなされていることが確認された。

上記の検討と同時に、吸着場に使用する化合物として短鎖オリゴペプチドやカチオン性脂質の機能評価を蛍光修飾リポソームと蛍光分光光度計で行った。その結果、細胞膜吸着分子中の残基の膜貫通効果と静電効果の共同効果が示された。

これらの成果から高度に制御された細胞・ウイルス配列チップの構築における基盤的知見が得られた。この研究を発展させれば、医療、創薬の現場で特に重要な細胞膜上のタンパクの機能評価を劇的に容易にするブレークスルーとなると考えている。

A. 研究目的

膜タンパク質のリガンド探索や機能解明の研究は、創薬を始めとする産業応用上極めて重要な分野である。その研究分野で必要とされる要素技術の一つである、ターゲットとなる膜タンパク質をもつ特定の細胞やウイルスを固相上に固定化するような技術は、すでに様々な展開がはかられている。すなわち、膜貫通型分子や細胞接着性リガンド、特異的リガンド、金タンパク接着、His-tag/Ni 錯体など、様々な結合因子をモチーフとした細胞固定化技術が開発されている。

しかし、これら材料平面に強固な結合因子を固定化したものでは細胞の形態変化や、対象となる膜タンパクの失活を伴う。また、「点」のみの結合因子による細胞固定化手法は、生体膜が持つ流動性により不安定である。走査型プローブ顕微鏡(SPM)による膜タンパクの直接観察や、表面プラズモン共鳴(SPR)センサー、水晶発振 QCM)センサーなどの適用を可能にするには、細胞吸着場を「面」で制御することが不可欠である。

本研究は、材料微細加工技術を用いて上記の課題を解決し、従来にない細胞・ウイルスチップの構築技術の創製を目指す。具体的には、集束イオンビーム(FIB)による材料微細加工とリンカー分子の表面カップリング、非特異的な細胞膜吸着分子による分子インプリントなどを組み合わせることにより、細胞・ウイルスに影響を与えず材料上に安定に固定化する技術の確立を目標とする。

B. 研究方法

本研究で行う細胞吸着材料の構築法は、i) 材料表面に FIB 加工と化学修飾を適用し、細

孔内に細胞を固定化するリンカー(アンカー)分子を導入する ii) 材料にリポソームを吸着させ、そのリポソームを鋳型として細胞吸着分子を材料表面上に修飾する iii) 鋳型リポソームを破壊、除去して細胞を配列化可能な吸着材料を得る、というものである。この方法で、リンカー分子の密度と修飾面積を最低限度に制御することができ、かつ SPM や QCM などの分析法が適用可能な安定な細胞の配列的固定化を実現する。以上のような微細加工、微細領域の化学修飾、リポソームの吸着など、各処理の結果を蛍光顕微鏡、プローブ型顕微鏡で観察・検証した。また、リポソームを細胞・ウイルスの模倣体として、その吸着挙動の評価を蛍光分光光度計で分析することで行った。

C. 研究結果

本年度の研究成果の概要は次の通りであり、a)は研究方法 B の i)-ii)、b)、c)は上記 ii)の段階に対する端緒的成果である。

a) FIB 加工による材料加工と化学修飾によるリポソーム吸着能の付与

カルボキシル基をアミノ基で保護し、金蒸着したポリブチレンテレフタレート材料を FIB 加工装置(日立製作所 FB-2000A)を用いて加工し、 $100\text{nm} \times 100\text{nm}$ 、 $1 \times 1 \mu\text{m}$ 、 $5 \times 5 \mu\text{m}$ などの大きさ(深さ方向 $2 \mu\text{m}$)の方形細孔を配列的に生成した。その後細孔部分にポリリシンをカップリングさせてリポソーム吸着能を付与した。ホスファチジルコリン/ホスファチジルセリンを組成とし、ローダミン部分分子を持つ脂質で蛍光修飾したリポソームを吸着させた後、蛍光顕微鏡観察することによって細孔にリポソームが吸着していることが確認できた。さら

に直径 5 ミクロンのアルキル鎖修飾シリカビーズ上に自己組織化脂質膜を生成した細胞模倣体が細孔に吸着させた結果を走査型プローブ顕微鏡で観察した(資料 図 1)。また、FIB 加工材料片に直接的な蛍光修飾を行い、細孔内、細孔外の選択的化学修飾を確認した。

同様の手法をもって ITO(インジウム・スズ酸化物)導電性ガラスを FIB 加工し、細孔内部分にポリリシンを修飾させた導電性リポソーム吸着材料の構築も行った。

b) 固相结合ペプチドのリポソーム吸着能の評価

細胞・ウイルス吸着モチーフとして、短鎖オリゴペプチドを候補として考え、以下に述べるような合成オリゴペプチドの細胞膜との親和性の評価系を構築した。ポリスチレン(PS)粒子上に Fmoc 法で各種配列のペプチドを合成し、蛍光修飾リポソームを、50nm、100nm などに粒径制御して調製した。ペプチド修飾 PS 粒子にリポソームを吸着反応後、非吸着リポソームを蛍光分光光度計で定量することで固相ペプチドのリポソーム吸着量を決定した。細胞膜リンカーのモデル分子である長鎖ペプチドと同様のアミノ酸構成の短鎖(10mer-15mer)ペプチドでリポソーム吸着能を有しているか検討した。短鎖ペプチドからなる吸着場はその吸着能にリポソームの粒径依存性や、アミノ酸配列依存性が存在することが示された(資料 図 2, 図 3)。

c) カチオン場へのリポソームの吸着評価系の構築

カチオン性脂質の自己組織化単分子層を細孔表面の細胞吸着場に利用することを目的として、上記リポソームのカチオン導入リポソームへの吸着・膜融合反応を Tb(III)-ジピコリン酸

錯体の蛍光挙動を利用して評価する分析系の構築を行った(資料 図 4)。その結果から、オリゴヒスチジンがオリゴリシンに比して高い膜融合能を持つことが示された。

D. 考察

本年度の研究結果に対する考察を「C. 研究結果」と同様に三項にわけて以下に示す。

a) 高分子材料および導電性材料表面上にリンカー分子を結合させた微細孔を配列的に生成し、その細孔内にリポソームが吸着することが確認された。細孔という物理的形状と化学的な吸着作用を組み合わせた小胞体吸着モチーフというのは本研究で初めて成された新規の手法であり、FIB というナノテクノロジーを代表する加工法を用いることで可能となった。今後さらに分子インプリント法を適用して吸着能や、吸着小胞体の粒径特異性などの向上が期待される。細孔上の化学修飾の効率は ITO ガラスにおいては比較的良好であったが、有機高分子材料ではまた不十分であり、化学修飾の方法の探索も課題として残っている。

b) 天然の膜貫通タンパク質に対する興味から、長鎖オリゴペプチドの生体膜に対する相互作用は以前より調べられていたが、非貫通性の短鎖オリゴペプチドに対する配列網羅的な研究は今までなされていなかった。今回、短鎖オリゴペプチドのリポソーム吸着量を検討したところ、そのアミノ酸配列依存性から、静電的吸着場を提供するリシン残基と膜貫通性を有するトリプトファン残基の共同効果による吸着効果を示していることが確認された(資料 図 3)。すなわち、短鎖オリゴペプチドの鎖端の疎水部分が半貫通的に作用するような配列設計

が良好な吸着能には必要であることが明らかとなった。また、その吸着能は小胞体の粒径に依存するため、ターゲットの細胞・ウイルスの大きさもオリゴペプチドの配列設計で考慮する因子となる(資料 図 2)。粒径依存性の完全な説明は今後の課題であるが、吸着力の静電場効果と膜貫通効果との寄与度と強い関連性があることが示されている。

c) 膜融合は膜同士の吸着反応を経て進行する物であり、b)と同様に膜吸着能に対する重要な知見となった。オリゴヒスチジンがオリゴリシンに比して高い膜融合能を持つ原因は、ヒスチジン残基の膜貫通性にあると考えられる。またその pH 依存性(資料 図 4)から、静電場と膜貫通性の両者が共同的に作用することが重要であることが示された。c)で分析した評価系は、小胞体に対する吸着場が面状であるという意味で、実際に応用する形態に近い物であり、今後も引き続いて検討を行う予定である。

E. 結論

高分子材料および導電性材料の表面処理(キャッピング)と FIB による微細加工を行い、リポソームが吸着することが確認された。すなわち、このアプローチで、微細に吸着場が制御された細胞・ウイルス配列吸着チップの構築が可能であることを実証した。同時に、吸着場に使用する化合物として短鎖オリゴペプチドやカチオン性脂質の機能評価を行い、残基の膜貫通効果と静電効果の共同効果が示された。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

学会発表登録状況

第 32 回医用高分子シンポジウム(高分子学会)

7 月 31 日 (木) - 8 月 1 日 (金)(上智大学)

FIB 技術を用いた高分子微細加工と応用 (1)
配列的ナリポソーム吸着場の構築

○小山徹、安井克輝、池田泰之、松村一成

短鎖オリゴペプチドによるリポソーム吸着場の構築(1)リポソーム吸着能のアミノ酸配列依存性

○粕谷有造、遠藤めぐみ、池田泰之、松村一成

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願予定

「微細領域の化学修飾を用いた細胞/ウイルスアレイの構築法」(発明者 松村 一成)

