

厚生労働科学研究費補助金

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 15 年度 総括研究報告書

主任研究者 松村 一成

平成 16 (2004) 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 ----- | 01 |
| 松村一成 | |
| (資料) 研究結果の補足図 | |
| II 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- | 09 |
| III 研究成果の刊行物 別刷 ----- | 10 |

厚生労働科学研究費補助金(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)を用い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ト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、加工形状や基盤材料の自由度の高いFIB(集束イオンビーム)による微細加工と化学的表面処理を組み合わせることで、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。

本年度はポリフチレンテラフタレートを基盤材料として用い、FIB加工とポリリンノのカノフリックによる化学修飾を組み合わせることで、膜成分選択的なリホノーム吸着場を構築されていることを蛍光修飾リホノームで確認した。すなわち、本研究の手法を用いることで高効率性と高選択性を兼ね備えたハイオコロイト吸着場を形成させることが可能であることが示された。

また、固相結合ペプチドのリホノーム吸着能の評価やカチオン性脂質リホノームの凝集・融合現象の追跡を行った。その結果アミノ酸配列による吸着能の変化や、吸着量に対するリホノームの粒径依存性から、固定化モチーフとしてのペプチドの性質を明らかにした。

また、これら基盤的知見の獲得とともに、水晶発振マイクロバランス(QCM)センサーチップの基盤上にリボソームの配列的吸着場を生成させたハイオセンサーの試作を行なった。

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必要な基礎技術が得られた。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フレックスルーとなると考えている。

A 研究目的

膜タンパク質のリカント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「生命科学」の手法として発展してきた。

しかしながら、その技術そのものは学術的計画・助成を受けづらいものであり、従来技術はあくまでも学術研究上の需要を満たすものであった。医薬開発に適用できるような、言い換えればシステム化が容易な細胞・ウイルス固定化技術の開発および、そのハイオチノフへの応用展開は、基盤的技術であるにもかかわらず厚生労働行政の支援を必要とする分野である。

今日まで用いられてきた細胞・ウイルス固定化モチーフは膜貫通型分子や細胞接着性リカント・特異的リカント、全-タンパク接着、His-tag/Ni 錯体などである。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向きである。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、水晶共振マイクロバランス (QCM) センサーなどの適用を可能にするには、細胞接着場を「面」で制御することか不可欠である。

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、従来にはない細胞・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材料表面カノプリック・非特異的な細胞膜接着分子による分子インプリントな

と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

本研究で行うウイルス・細胞固定化材料の構築法は、基盤材料に対して「FIB加工」と化学修飾を組み合わせるものである。そこで現段階では固定化対象としてリボソームを用い、(i) FIB 技術を用いたリボソーム接着場の創製と (ii) 固定化に適した化学修飾モチーフの探索の2つに分けて研究を行った。

(i) は、材料表面に FIB 加工装置 (日立製作所 FIB-2000A) による微細加工と材料表面の化学修飾を組み合わせることで適用し、細孔内に細胞を固定化するリンカー (アンカー) 分子を導入するという工程である。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かでき、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。微細加工・微細領域の化学修飾、リボソーム (以下述べる) の接着などの各段階の結果を蛍光顕微鏡、プローブ型顕微鏡などで評価した。

(ii) においてはリボソームを細胞・ウイルスの模倣体として用いた。中性リン脂質としてホスファチルコリン (PC)、アニオン性リン脂質としてホスファチルセリン (PS) および蛍光修飾脂質としてロータミン誘導体 Diacyl Phosphatidyl ethanolamine-N-Ethylamine Rhodamine B Sulfonate (N-Rh-PI) を用いてリボソームを作製した。リン脂質薄層形成後 HEPES バッファー (pH 7.00) および塩化ナトリウム水溶液を使用しリボソームを作製した。

リボソームの吸着量の評価を蛍光分光光度計および QCM センサーで分析することで行っ

た。また、蛍光偏光分析装置を用いて、吸着時のリボソームの膜流動性を計測した。吸着モチーフとしてのオリゴペプチドは、固相合成法を用いて適量必要な配列のものを合成した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ハイオセンサーチップに関する基盤的開発を目指したものであり、人体実験等は未実施していない。また、リボソームなどの生体関連物質もすべて試薬より調製しており、実験動物等も用いていないので、倫理面の問題は無いと判断した。

C 研究結果

以下に示す本年度の研究成果の a) は研究方法の d) に、b)・c) は n) に対し、最終年度でこれらの技術を組み合わせて配列的固定化材料を構築する計画である。

a) FIB 加工と化学修飾による膜成分選択的なリボソーム吸着場の創製

カルボキシル基をアミノ基で保護し、全基着したポリブチレンテレフタレート材料を基盤材料として、FIB加工装置にて加工した。100 nm×100 nm、1×1 μm、5×5 μm などの大きさ(深さ方向2 μm)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ンをカフリンクさせてリボソーム吸着能を付与した。ホスファチルコリン/ホスファチルセリンを組成とした蛍光修飾リボソームが効率的に吸着されていることか蛍光顕微鏡観察によって示された、さらに直径5 μm のアルキル鎖修飾シリカヒースに自己組織化脂質膜を生成した細胞模倣体か細孔に吸着させた結果を走査型フロー顕微鏡で観察した。

上記吸着場は、PC/PS という脂質組成のリボソームをターゲットにしたものである。一方、他の膜成分のリボソームとの混合系で吸着反応を進行したところ、ターゲットのリボソームが優先的に吸着されたことか確認された(資料

図1)

b) 固相結合ヘフチドのリボソーム吸着能の評価

細胞ウイルス固定化分子の機能評価を目的として、合成オリゴヘフチドの細胞膜との親和性を検討した。ポリスチレン(PS)粒子にFmoc法で各種配列のヘフチドを合成し、蛍光修飾リボソームを、50nm、100nmなどに孔径制御して調製した。ヘフチド修飾PS粒子にリボソームを吸着反応後、非吸着リボソームを蛍光分光光度計で定量することで固相ヘフチドのリボ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ヘフチドと同様のアミノ酸構成の短鎖(10mer-15mer)ペプチドでリボ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ボソームの孔径依存性やアミノ酸配列依存性が存在することか示された(資料 図 2)

また、リボソーム膜の流動性は、膜貫通性のヘフチドの存在によって上昇し、その量はリボソームの吸着量と正の相関があることか示された。

c) カチオン性脂質リボソームの凝集・融合現象の追跡

カチオン性脂質の自己組織化膜を細孔表面の化学修飾モチーフとして利用することを目的として、リボソームの凝集・融合反応を蛍光修飾リボソームの FRET や蛍光異方性で追跡した。すなわち、多重蛍光染色したリボソーム内の蛍光分子の FRET 現象、蛍光異方性から、リボソームの融合速度を得た。オリゴリン、オリゴヒスチン存在下による加速効果の pH 依存性(資料 図 3、4)を得た。同じ反応系を蛍光顕微鏡で観察することによって、凝集・融合現象の場合分けを行なった。

また、a)、b)、c) の結果を組み合わせる前段階として、QCMセンサーチップ上にリボソーム

吸着場を配列的に生成させたハイオチーフを試作した(資料 図5) センサーチップの基板にアセトニトリルをモノマーとしてフラスコ重合させ、高分子膜を形成させた後にFIB加工を施して、方形状の凹部を配列的に形成させた。これにc)で用いているような吸着場を形成させるためにカチオン性脂質膜をチップの細孔内に生成させた。その結果を蛍光顕微鏡で確認した。

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を確認された。細孔という物理的形狀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。

また、脂質膜成分に対して選択性を持つような吸着能が発揮されていることも確認された。すなわち、本法において立体形状と化学的処理を組み合わせること、高効率性と高選択性を兼ね備えたハイオコロイト吸着場を形成させることが可能であることが示された。

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になされていなかった。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2)。すな

わち、短鎖オリゴペプチドの鎖端の疎水部分が普遍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。

上記の考察は、リポソーム膜の流動性が膜貫通性のペプチドの存在によってその吸着能に依って上昇することからも支持される。すなわち、短鎖ペプチドの膜貫通現象は脂質膜の流動性の上昇として追跡できることを示している。

現在、膜流動性を変化させるコレステロールを膜成分として導入すること、さらなる検討を行なっている。対象となる細胞・ウイルスにおける脂質膜成分により近似した知見であり、かつコレステロールの添加による吸着量、リポソームの粒径に依存して大きく変化するという興味深い結果が得られている。

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。オリゴヒスチニンかオリゴリニンに比して高い膜融合能を持つ原因は、ヒスチニン残基の膜貫通性にあると考えられる(資料 図3、図4)。また融合現象のpH依存性から、静電場と膜貫通性の両者が共同的に作用すること、重要であることが示された。さらに、a)で用いたオリゴリニンか膜貫通性はないものの、静電場作用からリポソーム収集能を持つことが確認された。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点で、実際に応用する形態に近い物であり、今後も引き続き検討を行う予定である。

a)~c)の知見を用いて試作した図5に示すQCMチップは、アセトニトリルをモノマーとする親水的ポリマーを母材とすることで、リポソームの非特異的な吸着を阻害し、かつ細孔内には吸着性脂質膜を形成させたもので

ある リボソームの基盤材料の吸着は、想定
とおり阻害されたか、高効率でチップ上にリ
ボソームを配列化させる条件は今後の検討
課題として残っている

L 結論

高分子材料を主とする基盤材料に対して
表面化学処理（キャノヒンク）とFIBによる
微細加工を組み合わせて適用して、リボソ
ームが選択的に吸着することを確認された。す
なわち、このアプローチで、高効率性と高選
択性を兼ね備えた細胞・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、吸着場を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
効果を示された。

また、QCMセンサーチップ上にリボソーム
の配列的吸着場を生成させたハイオセンサ
ーの試作を行なった。

以上より、新規ハイオセンサーチップの創
製に必要な基盤的知見を得ることかできた。

F 健康危険情報

特に無し

G 研究発表

1 論文発表

Kasuya, Y, Endo, M, Ogawa, H, Hirai, N,
Ikeda, Y, Matsumura, K, Development of
Liposome Immobilizing with Small Peptide
(2) - Peptide Mobilities in Lipid Bilayer,
Peptide Science (2003), 35-36

2 学会発表

小山徹、女井克輝、池田泰之、○松村一成、
FIB 技術を用いた高分子微細加工と応用 (1)
配列的なりボソーム吸着場の構築、第 32 回医
用高分子シンポジウム要旨集 9-10

○相谷有造、遠藤めぐみ、池田泰之、松村一成
短鎖オリゴペプチドによるリボソーム吸着場
の構築 (1) リボソーム吸着能のアミノ酸配列依
存性、第 32 回医用高分子シンポジウム要旨集
29-30

○菅生悠樹、脇田貴之、池田泰之、松村一成
オリゴペプチドによるリボソームの挙動制
御、第 56 回コロイドおよび界面化学討論会
364-364

○松村一成、生理活性物質の人工認識・触媒
系の構築-生理人類学とのかかわり日本生理
人類学会システムハイオジュニアリンク
研究部会第 1 回会合、2-2

○粕谷有造、遠藤めぐみ、小川洋樹、平居尚
記、池田泰之、松村一成、短鎖オリゴペチ
ドによるリボソーム吸着場の構築 (2) 脂質膜
におけるペプチドの運動性、第 40 回ペプチ
ド討論会講演要旨集、7-7

○小山徹、町田景吾、池田泰之、松村一成、
FIB 技術を用いた高分子微細加工と応用 (2)
形状加工と化学修飾を組み合わせたリボソ
ーム吸着場、第 25 回日本ハイオマテリアル
学会大会要旨集、222-222

3 新聞報道

2003 年 8 月 22 日 日刊工業新聞 第 5 面
表面に膜たんぱく質を持つ細胞基板上に固
定化 細胞チップに応用へ

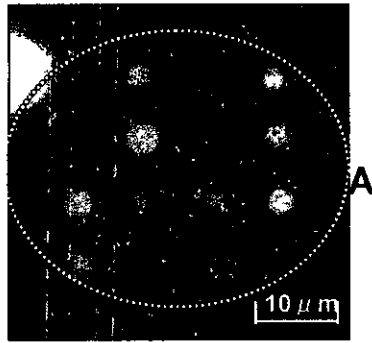
H 知的財産権の出願・登録状況

1 特許出願

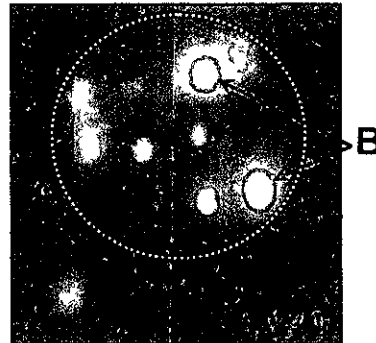
出願日 平成 16 年 1 月 30 日
出願番号 特願 2004-24622
発明者 松村一成
特許出願人 学校法人芝浦工業大学

発明の名称 ハイオチノフの作製方法及びハイ
オチノフ、並びに、フレ ハイオチノフの作製
方法及びフレ ハイオチノフ

- A アニオン性脂質膜粒子 (フォスファチジルセリン
Rh-PE (ex=550, em=590))
- B カチオン性脂質膜粒子 (ジアシルトリメチルアンモニウムプロパン
NBD-PC (ex=460, em=534))



A粒子吸着系の顕微鏡写真
(ex=530-550, em=590-)



A,B粒子混合物の吸着系の顕微鏡写真
(ex=360-370, em=420-)

図1 膜成分選択的な脂質膜粒子吸着場の顕微鏡観察結果

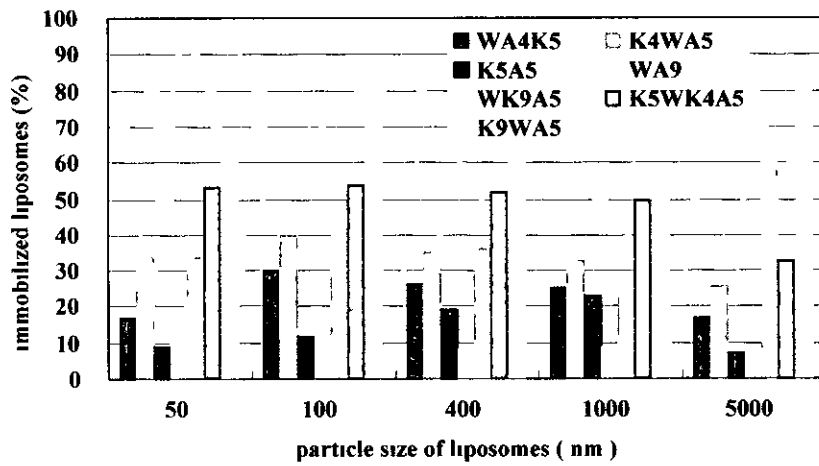


図2 各種オリコペプチドのリポソーム吸着反応のリポソーム粒径依存性

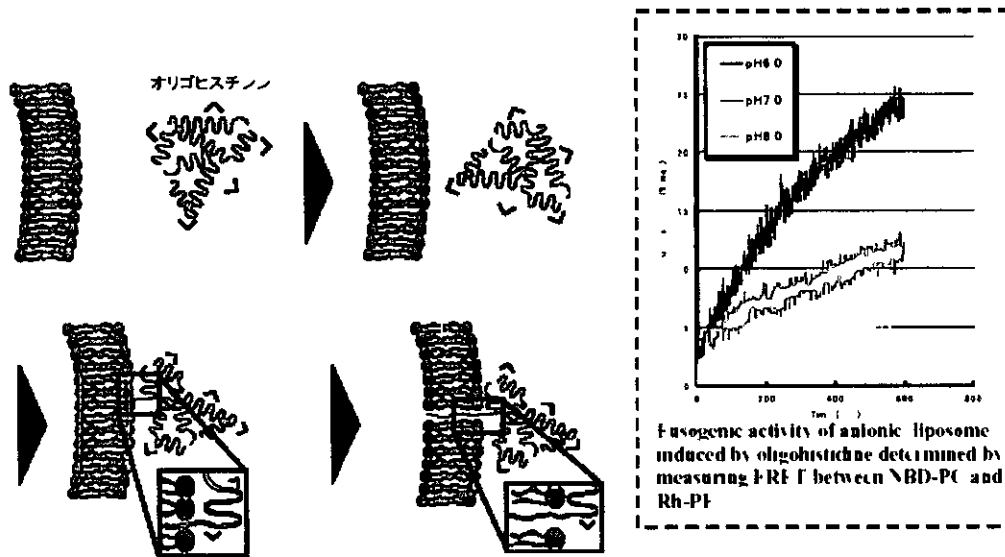


図3 オリゴヒスチン存在下でのリポソーム中電光脂質のFRET増加曲線

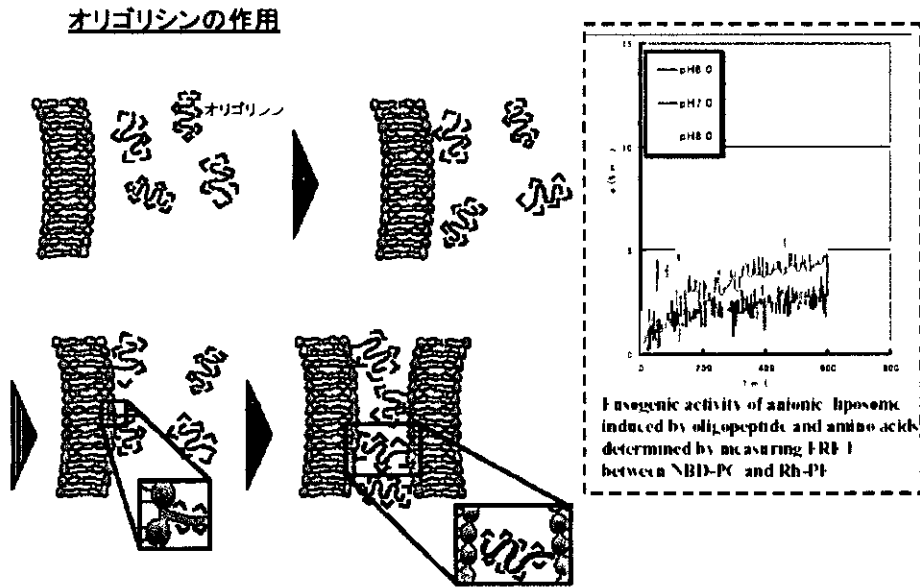
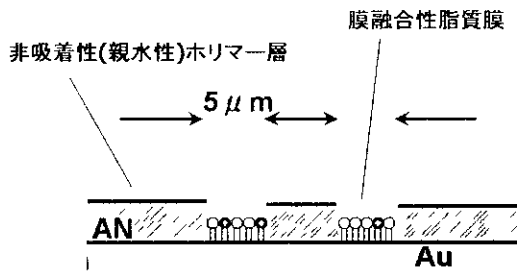
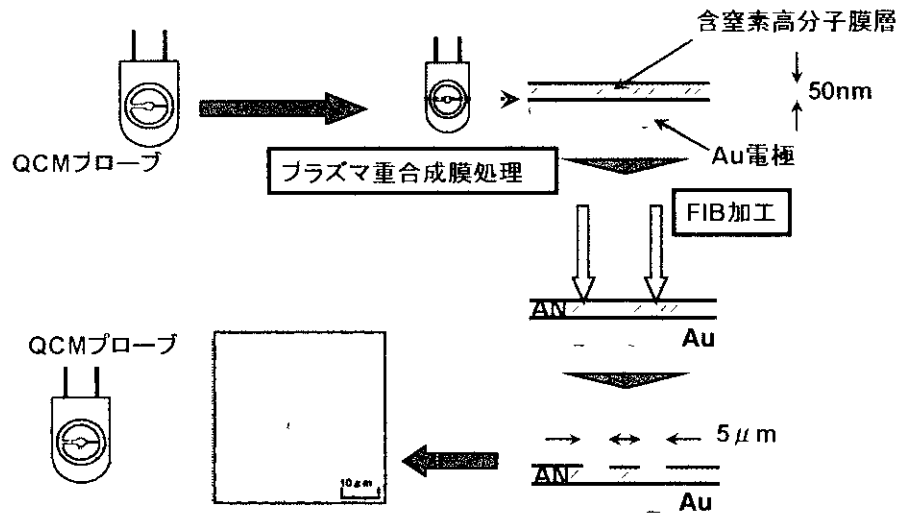


図4 オリゴリシン存在下でのリポソーム中蛍光脂質のFRET増加曲線



凹部脂質膜の蛍光顕微鏡観察 (ex=530-550, em=590-)

図5 リポソーム吸着場を持つ新規QCMセンサーチップの作成スキーム

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の 編集者名 | 書 籍 名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|---|---|---------------|--------------------|---------------------------------------|-----------------|------|-------|
| Kasuya, Y Endo, M. Ogawa H Hirai, N Ikeda, Y Matsumura K | Development of Liposome Immobilizing with Small Peptide (2) - Peptide Mobilities in Lipid Bilayer | Ueki, M | Peptide Science | The Japanese Peptide Society | Osaka, Japan | 2003 | 35-36 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|------------------------------|--|----------------------------------|----|---------|------|
| 小山徹、安井克 輝、池田泰之、松 村一成 | 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 | 第32回医用高分子 シンポジウム講演 要旨集 | | 9-10 | 2003 |
| 粕谷有造、遠藤め くみ、他田泰之、 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 | 第32回医用高分子 シンポジウム講演 要旨集 | | 29-30 | 2003 |
| 菅生悠樹、脇田 貴之、池田泰之、 松村一成 | オリゴペプチドによ るリポソームの挙動 制御 | 第56回コロイドお よび界面化学討論 会 講演要旨集 | | 364-364 | 2003 |
| 小山徹、町田景 吾、他田泰之、 松村一成 | FIB 技術を用いた高 分子微細加工と応用 (2) 形状加工と化学 修飾を組み合わせた リポソーム吸着場 | 第25回日本ハイオ マテリアル学会大 会予稿集 | | 222-222 | 2003 |

20030633

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。