

200400200A

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

(H14-ナメ025)」に関する研究

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者・松村 一成

平成17(2005)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 -----	06
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	07

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、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。

本年度は前年度までに最適化したリポソーム固定化ペプチドを水晶発振子マイクロバラン(s(QCM)センサー上へ化学吸着させ、実際のリポソーム吸着能を評価した。また、フォスファチジルセリンやコレステロールの脂質膜内濃度が与える吸着能の変化なども追跡した。さらに、膜タンパク質の発現系で用いられるバキュロウイルスの FIB 加工面への吸着現象を観察し本技術の応用性を検討した。

これらの成果から前年度に引き続き、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、生命科学上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評価・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、そのバイオチップへの応用展開は、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ガンド、特異的リガンド、金-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材料表面カップリング、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て適用するものである。そこで現段階では固定化対象としてリポソームを用い、
i) FIB 技術を用いたリポソーム吸着場の創製と ii) 固定化に適した短鎖ペプチドのリポソーム吸着能の評価と 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 FB-2000A) による微細加工と材料表面の化学修飾を組み合わせて適用し、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。微細加工、微細領域の化学修飾、リポソーム、バキュロウイルスの吸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) においてはリポソームを細胞・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ジルコリン (PC)、アニオン性リン脂質としてホスファチジルセリン (PS) および蛍光修飾脂質としてローダミン誘導体 Diacyl Phosphatidyl ethanolamine-N-Lissamine Rhodamine B Sulfonyl : N-Rh-PE) を用いてリポソームを作製した。リン脂質薄膜形成後、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ポソームを作製した。

リポ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、蛍光自動偏光分析装置を用いて、吸

着時のリポ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宜必要な配列のものを合成した。

(倫理面への配慮)

本研究は、バ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、人体実験等は実施していない。また、リポ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

a) 基盤材料に対するプラズマ重合生膜処理と FIB 加工処理によるウイルス吸着場の生成

金基板上にアセトニトリルモノマーをプラズマ重合させて膜厚100nmの重合体を形成させた。その後、FIB加工をもって $5\mu \times 5\mu$ の凸部を配列的に生成させた。

得られた単純な構造のウイルス吸着場上にバキュロウイルスを滴下し、洗浄処理を行ったところ、ウイルス粒子が単層で吸着場上に固定化されていることが確認された(資料 図1)。

b) 短鎖ペプチドの QCM 電極上でのリポ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、前年度より引き続いて合成オリゴペプチドの細胞膜との親和性を検討した。前年度高い親和性を示したアミノ酸配列のペプチドを、自己組織化膜生成能を持つ長鎖チオールと複合体化させ、QCM金電極上に固定化させた。そのセンサーチップ上でリポソームの吸着現象を追跡したところ、単なる自己組織化ペプチドにくらべ非常に高い吸着能を示した(資料 図2)。

また、各アミノ酸配列のペプチドが示す吸着能がフォスファチジルセリンやコレステロールの脂質膜内濃度によってどのように変化を

するかを追跡した。

c) 自己組織化膜の FIB 加工による配列性の付加

金基板上にチオール基を持つ長鎖カルボン酸にて自己組織化膜を形成させ、FIB加工によって位置選択的に除去させた。その後、b)と同様のチオール-短鎖ペプチド複合体を除去部分にて自己組織化膜を生成させることで、配列的吸着場を形成させた。

位置特異的なペプチド自己組織化膜の生成が蛍光顕微鏡で確認され、またこの吸着場がリポソームを配列的に固定化することも同様に確認できた。

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) 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の形成は、前年度に提示している。今回は化学的吸着作用と、物理形状による凝集性の制御を組み合わせた結果を提示したものである。凝集性の高いウイルス粒子を面上に固定吸着させるのは従来困難であったが、微細加工で吸着面を区切ることで凝集体が洗浄処理で除去でき、吸着面で強く化学吸着した粒子のみが残っていることが確認された。

b) 短鎖ペプチドを基板上に固定化する方法として、金-チオール結合を利用した。立体障害による固定化率の低下などもなく、吸着場として機能していることが確認でき、c)で用いたような位置特異的な化学修飾にも適用することが出来た。

また、対象となる細胞・ウイルスにおける脂質膜成分での知見を広げるために、フォスファチジルセリンやコレステロールの膜内濃度の影響を検討した。これらの影響は、主に短鎖ペ

プチド内の静電相互作用セグメントの作用に対して現れていることが示されており、現在より詳細な検討を進めている。

c) 従来、位置特異的な自己組織化膜の生成は、Whitesides が開発したソフトリソグラフィの手法を用いるのが一般的であった。従来法は生産性に優れるが、フォトマスクを用いたマスターパターンの形成に一定の作業工程を要する。

今回、有機膜を直接的に除去し、基盤材料に影響を与えないような FIB 照射条件で微細加工することで、同様の処理が可能であることを実証した。本法は、ソフトリソグラフィ法より自在性に優れておりパターンのプロトタイプ生成などに利用できると考えている。

E. 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（キャッピング）と FIB による微細加工を組み合わせ適用して、ウィルス吸着場が生成されたことが示された。前年度までの成果を併せて、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・ウィ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、これまで検討してきた吸着分子である短鎖オリゴペプチドに自己組織化能を付与することで、QCM センサー上での評価を可能にした。さらに FIB 加工法を適用することで、短鎖ペプチドによる位置特異的な吸着場を形成させ、その特異的吸着能を確認した。

以上より、新規バ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ができた。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 学会発表

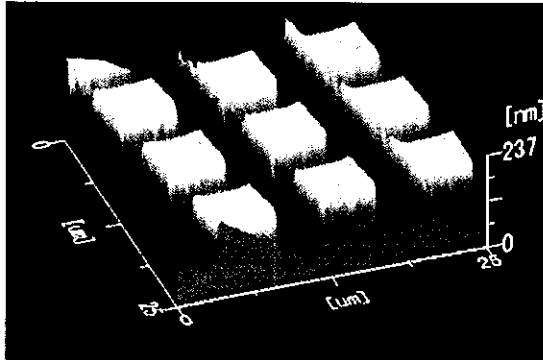
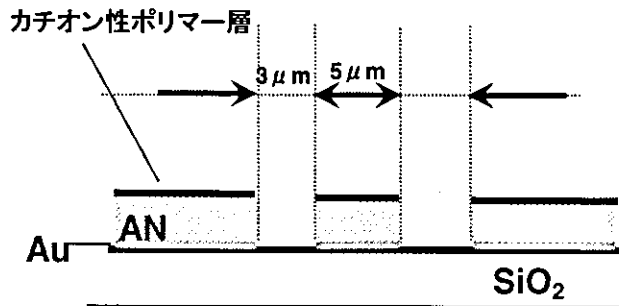
○粕谷有造、徳田優子、平居尚記、池田泰之、松村一成

短鎖オリゴペプチドによるリポソーム吸着場の構築(3)ペプチドの脂質膜局在位置と吸着能、第 57 回コロイドおよび界面化学討論会要旨集、66-66

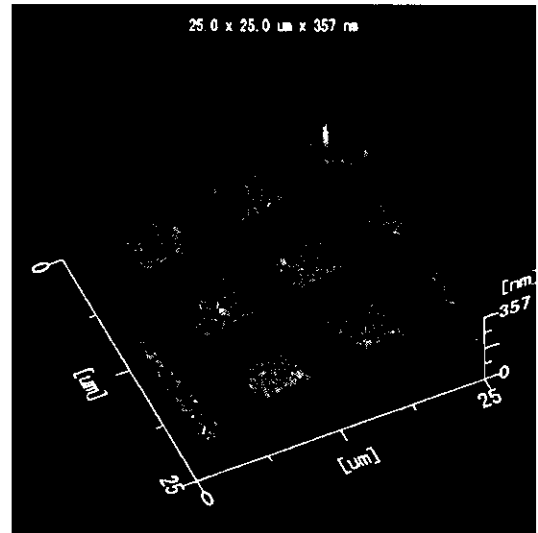
水戸裕、○田森紘一、池田泰之、松村一成
Bisphenol-A 分解反応系におけるシクロデキストリンの効果、環境ホルモン学会第 7 回研究発表会要旨集、409-409

H. 知的財産権の出願・登録状況

今年度は無し



FIB加工形状観察像



バキュロウイルス吸着処理後のAFM観察像

図1. プラズマ重合-FIB加工によるウイルス吸着場の構築

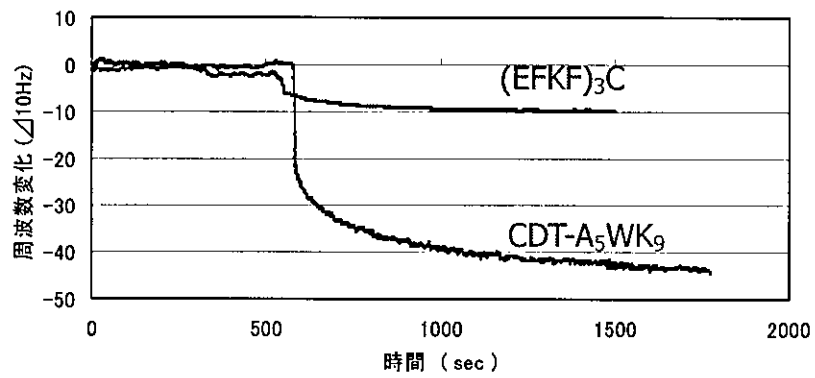


図2. QCMプローブ上でのリポソーム吸着曲線

研究成果の刊行に関する一覧表

学会発表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
粕谷有造、徳田優子、平居尚記、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(3)ペプチドの脂質膜局在位置と吸着能	第57回コロイドおよび界面化学討論会要旨集		66-66	2004
水戸裕、田森紘一、池田泰之、松村一成	Bisphenol-A 分解反応系におけるシクロデキストリンの効果	環境ホルモン学会第7回研究発表会要旨集		409-409	2004

《緒言》

リポソームや細胞・ウイルス等の小胞体を材料表面上に固定化する手法はバイオセンサーを構築する重要な基盤技術である。表面プラズモン共鳴法や水晶振動子マイクロバランス法を活用したバイオセンサーが広く利用されるようになり、それに伴って固定化手段の高効率化や機能化が望まれている。短鎖ペプチドによる固定化法は機能設計の自由度の点から有用であるが、用いるアミノ酸配列を *de novo* 設計するための知見は未だ不十分である。本研究は、各種アミノ酸配列の短鎖ペプチドのリポソーム吸着能と脂質膜内挙動を測定し、その関連性の検討を目的とする。

《実験方法》

各種アミノ酸配列のペプチドを固相合成し、その担体に対するリポソームの吸着量を定量した(Fig1)。用いたペプチドのアミノ酸配列は、膜貫通型・接触型という脂質膜への作用形態の異なる2種類のモチーフを設計し、構成アミノ酸は、リシン(K)、アラニン(A)、トリプトファン(W)の3種類に単純化した。同配列のペプチドを別途遊離ペプチドとして合成・精製し、ペプチド-脂質二重膜の相互作用を蛍光自動偏光分析や蛍光消光解析を用いて行った。固定化対象のリポソームはホスファチジルコリンを主成分とし、ホスファチジルセリン(10 mol%)及び蛍光修飾脂質を含むものであり、押し出し法によって粒径50nm~5000nmに調整して使用した。

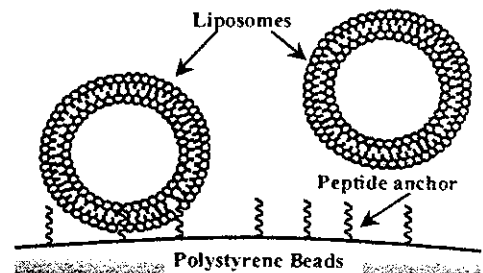


Fig 1. Schematic representation of immobilized liposomes on the peptide-modified polymer

《実験結果及び考察》

固相上のペプチドのリポソーム固定化能はリシン残基数が多く、トリプトファン残基が中央に位置するペプチドほど固定化能が優れるというアミノ酸配列依存性が明らかとなった。又、貫通型ペプチドに関してはリポソーム粒径100 nmにおいて最大の吸着を示す特徴的なベル型の粒径依存性が見出された。一方、接触型のペプチドは粒径の増大と共に固定化量が増加し、5000 nmでは著しく減少する傾向を示した。

ペプチド-脂質二重膜間相互作用測定のために、リポソーム存在下での遊離ペプチドの水溶性消光剤による蛍光消光の解析を行った。解析結果より、貫通型のK9WA5ペプチドが最も水相との接触の無い脂質二重膜深部に局在化する事が明らかとなった。その他の配列に関しては同様にトリプトファン残基が中央に位置するK4WA5、ペプチド鎖先端に位置するWK4A5ペプチドと続く結果となった。さらに、各々のペプチドに対してリポソーム粒径依存性を検討したところ、いずれも粒径100 nmの際に蛍光消光が高効率で阻害される結果となった。以上の事から、固相上のペプチドのリポソーム吸着能と遊離ペプチド-リポソーム間相互作用との間に相関関係がある事が明らかとなり、ターゲットとなる脂質膜に対して短鎖オリゴペプチドの機能設計を行う事で固定化能の制御が可能である事が示唆された。

Development of liposome immobilizing material with small peptide(3) interfacial location of peptides and efficiency of immobilizing liposome

Yuzo Kasuya, Yuko Tokuda, Naoki Hirai, Yasuyuki Ikeda, Kazunari Matsumura.

(Graduate School of Material Science and Engineering, Shibaura Institute of Technology., m203102@sic.shibaura-it.ac.jp)

We have quantitated the amount of liposome bound to the various oligopeptides on the polymer beads. Both hydrophobic and hydrophilic segments contribute to the activity of immobilizing liposome, but cause different liposome size dependence. In this study, we investigated interaction between small peptide and lipid bilayer based on fluorescence quenching. The peptides which have a Trp residue and several Lys were located in the hydrophobic region of the bilayer. We observed a bell-shaped profile for the dependence of the inhibition effect against a quencher on liposome size, with a maximum at 100 nm. These results correspond to the amount of immobilizing liposome on the peptide-modified solid supports. Therefore, there is positive correlation between interfacial location of peptides and activity of immobilizing liposomes.

Bisphenol-A の分解反応系におけるシクロデキストリンの効果

水戸裕* ○田森紘一** 池田泰之** 松村一成*

*芝浦工業大学 工学部, **芝浦工業大学 大学院 工学研究科

《目的》エストロゲン様作用物質の高効率な分解反応系は、高選択的吸着場と共に環境ホルモン対策技術の主要な要素である。触媒を用いた化学的分解反応系は、酵素による生化学的分解反応系とは異なった利点を持ち、その開発に向けた知見の蓄積が求められている。

我々は、硝酸アンモニウムセリウム (IV) (^{IV}CAN)を用いて Bisphenol-A (BPA)の分解反応系を構築し、その速度論的評価を行っている。今回、BPA に対して包接能を持ち吸着場の構成分子として利用されているシクロデキストリン(CD)の、BPA 化学分解反応系における効果について検討を行った。

《実験方法》BPA 濃度 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ の水/アセトニトリル (AN) (96:4 v/v)溶液を調製し、 ^{IV}CAN ($5 \times 10^{-4} \text{M}$) 及び各種 CD の存在下で室温にて反応を行った。反応時間は 4h までの BPA 濃度及び BPA 分解生成物濃度の経時変化を HPLC を用いて追跡し、BPA の減少速度定数を決定した。HPLC 分析は、ODS 逆相カラムを用いアセトニトリル/水系の勾配溶出法にて行った。

《結果及び考察》 $^{IV}\text{CAN}/\text{CD}$ 混合系による BPA 分解反応系の擬一次反応速度プロットを図 1 に示す。

CD として β -CD、 γ -CD を添加したいずれの反応系も ^{IV}CAN 単独の反応系に比べて初期減少速度が 1/2 から 1/3 となった。しかしながら基質に対して 2 等量の CD 濃度条件では等量の濃度条件よりも BPA の減少速度が高かった。

BPA の分解反応はフェノール基が Ce (IV)イオンに配位した複合体形成から進行すると考えられる。また、この濃度条件では CD は BPA に対してほぼ等量的に会合している。すなわち、上記の結果は、CD 上の水酸基が BPA と競争的に Ce (IV)イオンに配位し、CD 上の Ce (IV)イオン

によるホスト-ゲスト分子間反応の反応性は低くなるが、過剰 CD 上の Ce (IV)イオンと包接 BPA との反応性は保持されていると考えられる。このことから、CD に金属配位部位を修飾した機能分子の触媒としての有効性が予想される。また、CD 単独でも水相/油相の 2 相反応系では相間移動触媒として作用することが期待され、現在その検討を行っている。

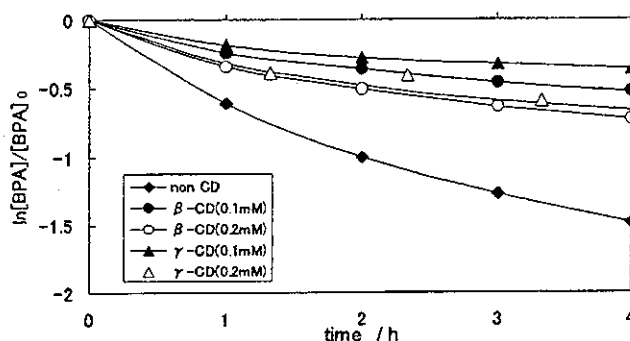


Figure 1 Pseudo first order kinetics plots of bisphenol A degradation with Ce(IV) / cyclodextrin.

Effect of Cyclodextrin on Bisphenol A degradation rate in the Ce(IV)-induced reaction system

Yu Mito, ○Kouichi Tamori, Yasuyuki Ikeda, Kazunari Matsumura

Shibaura Institute of Technology, 3-9-14, Shibaura, Minato-ku, Tokyo 108-8548, Japan

The cerium(IV)/cyclodextrin-induced degradation of bisphenol A (BPA), a representative endocrine disruptor, was carried out. Cerium (IV) ammonium nitrate (^{IV}CAN) efficiently degrades BPA as clearly evidenced by HPLC. Although β - or γ - cyclodextrin reduce the degradation rate because of stereochemical effect, neither complexation of cerium ion and the hydroxy residue nor inclusion of BPA in cyclodextrin suppress the degradation. Thus, this efficient degradation reagent will be more active by adding the function to bind the substrate within the catalytic core using cyclodextrin. These results are the pertinent findings to the development of synthetic BPA degradases.