

201003010A

---

厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

マラリア感染細胞表面のタンパク質一分子計測と異常ヘモグロビンの  
マラリア耐性メカニズムの解明に関する研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 有江 隆之

平成23(2011)年 5月

---

---

201003010A

厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

マラリア感染細胞表面のタンパク質一分子計測と異常ヘモグロビンの  
マラリア耐性メカニズムの解明に関する研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 有江 隆之

平成23（2011）年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
マラリア感染細胞表面のタンパク質一分子計測と異常ヘモグロビンの マラリア耐性メカニズムの解明に関する研究	----- 1
有江隆之	

マラリア感染細胞表面のタンパク質一分子計測と異常ヘモグロビンの  
マラリア耐性メカニズムの解明に関する研究

研究代表者 有江 隆之 大阪府立大学工学研究科助教

**研究要旨** 遺伝性疾患であるヘモグロビン異常がマラリアに耐性を有することは広く知られているが、そのメカニズムは明らかにされていない。本研究では原子間力顕微鏡を用い、感染赤血球表面上の突起状構造が、血管内壁細胞へ接着するプロセスを一分子レベルで解明することに加え、本年度はカーボンナノチューブを用い、タンパク質間の相互作用を一分子レベルで計測するための要素技術を開発した。マラリア感染細胞表面に局在するマラリア由来のタンパク質のレセプターCD36の分子間/分子内相互作用を測定したところ、およそ150pNであった。これまでの原子間力顕微鏡を用いた分子計測の結果から、これはタンパク質間の弱い結合力の測定に成功したと言える。次年度では実際に細胞表面のタンパク質との相互作用力を計測し、ヘモグロビンの種類による結合力の違いを解明するとともに、原子間力顕微鏡による表面分布の違い、さらには遺伝子配列との相関を明らかにすることで、総合的にヘモグロビン異常によるマラリア耐性メカニズムを解明する。

### A. 研究目的

マラリアは結核、HIV/AIDSと共に世界三大感染症の一つで、アフリカ、東南アジアを中心に主に熱帯、亜熱帯地方で流行している感染症である。ヒトに感染する寄生虫の中で、特に重篤なケースをもたらすものが *Plasmodium falciparum* であり、感染赤血球表面にノブと呼ばれる突起状構造を発現し、脳や各器官の毛細血管内壁に接着することで血流を阻害、最悪のケースではヒトを死に至らしめる。これまでアフリカや東南アジアの特定の地域で見られる、ヘモグロビンSやヘモグロビンCに代表される遺伝性疾患であるヘモグロビン異常が、重篤なマラリアになるリスクを低減させるという報告があり[1]、我々はヘモグロビン異常が、赤血球表面のノブの形状を大きく変化させることを発見し、この形状変化が重篤なマラリアの発症を引き起こすリスクを低減させるというモデルを提案してきた[2]。このモデルでは表面形状の違いにより、寄生虫由来の赤血球表面に発現するタンパク質である PfEMP-1 による細胞接着が低減され、感染細胞が免疫システムにより除去されるのを促進するというものである。およそ60の var 遺伝子からエンコードされる PfEMP-1 は、短期間にその発現形態を変化させるため、免疫システムからの除去や感染赤血球をターゲットにしたワクチンの開発を困難にしてきた。これらを明らかにするためには発現後に分子レベルで計測することが必要不可欠であるが、生物化学的手法では現在のところ不可能である。本研究では原子間力顕微鏡 (AFM) を用い、PfEMP-1 と血管内壁細胞上のレセプターとの相互作用を一分子レベルで計測することを目的とする。

カーボンナノチューブはグラファイトシートを丸めた円筒構造をとり、機械的な強度が高く、物理的・化学的に非常に安定な炭素からなる物質である。本研究では、AFMを用いた相互作用力計測に加え、カーボンナノチューブ片持ち梁を用いた、全く新しい一分子計測技術を開発した。ナノチューブのバネ定数はおよそ  $10^{-4}$  N/m オーダーであり、一般的なAFM

で用いられるシリコンやシリコンナイトライドカンチレバーと比較して2桁小さい。バネ定数が小さいほど、力を受けたときに撓む距離が大きくなるので、検出が容易となり、一分子計測に適している。さらに光学顕微鏡下で観察を行うので、タンパク質を蛍光標識し可視化した状態での相互作用力計測が可能である。ナノチューブ先端はグラファイトで閉じた構造を有するが、開端する事により、特異的にタンパク質一分子を捕捉することができる。ここで固定する分子を変更すると、様々な分子間相互作用を単一分子レベルで計測することが可能となり、あらゆる病原体やウイルスと細胞との相互作用を明らかにするための知見を供することが期待される。

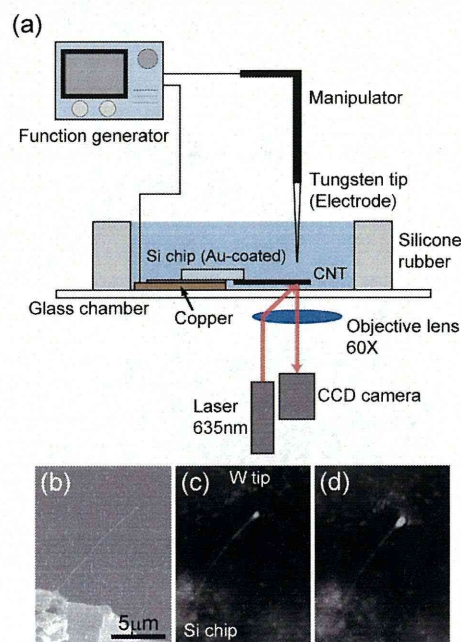


図1 (a)システムの概略図 (b)(c)(d)用いた片持ち梁ナノチューブの電子顕微鏡と光学顕微鏡写真

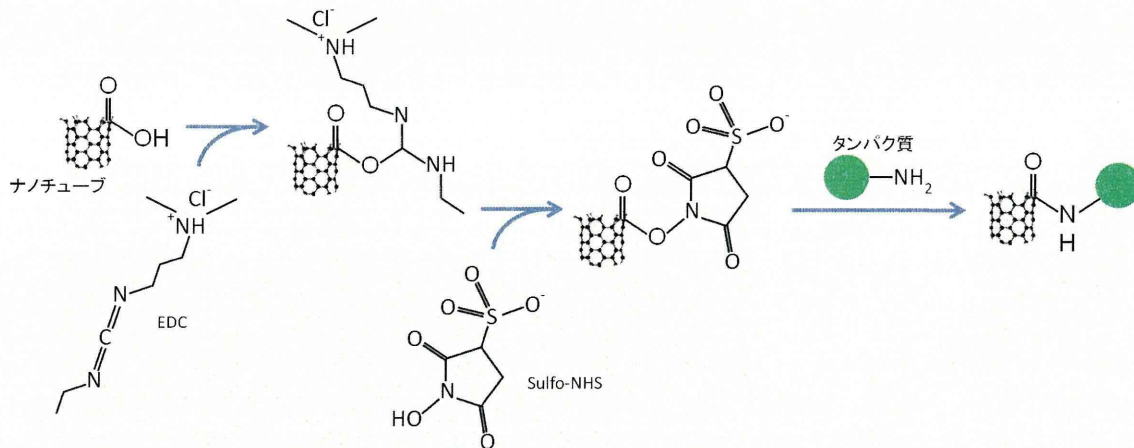


図2 EDC と sulfo-NHS を用いた、タンパク質のナノチューブ先端への部位特異的結合反応

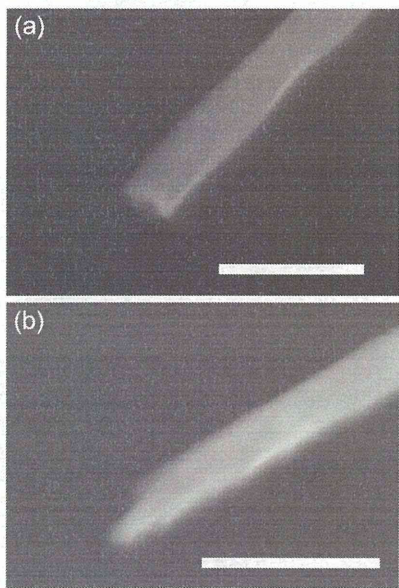


図3 開端前後のナノチューブ先端の電子顕微鏡写真

## B. 研究方法

図1に測定装置の概略、また実際に作製したナノチューブ片持ち梁の電子顕微鏡・光学顕微鏡画像を示す。用いたナノチューブは化学気相成長法により合成し、1500°Cで熱処理を施し結晶性を高めたものである。片持ち梁状にしたナノチューブ先端をレーザー光により照射し、先端のみを開端し酸化する。カルボキシル基化されたナノチューブ先端を1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide HCl (EDC) と N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS)の混合液に反応[3]させることで、タンパク質結合サイトとなる、sulfo-NHSエステルをナノチューブ先端のみに作成する(図2)。図3に開端前後のナノチューブ先端の電子顕微鏡写真を示す。先端が蒸発し開端している様子が分かる。

分子間相互作用力計測は、ナノチューブ表面にレーザー光を照射し、反射した光をCCDカメラで撮影して行った。ナノチューブは長さと比較して直径が極端に小さい擬一次元構造をとるので、ナノチューブからの反射光は理想的なガウス関数でフィッティングすることが出来る。タンパク質を固定したタンダステンプローブをナノチューブ片持ち梁先端に接

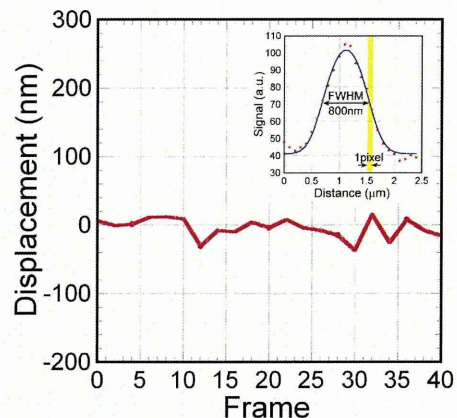


図4 ナノチューブ片持ち梁からの反射光の輝度プロファイルと時間安定性

触させナノチューブ先端にタンパク質を固定する。その後タンダステンプローブを引き離すときのナノチューブの撓みを計測する。バネ定数はおおよそナノチューブの形状のみに依存するので、この撓みから相互作用力を算出することが出来る。

## C. 研究結果と考察

正確に相互作用力が計測可能かを調べるために、まず測定系の安定性と感度を測定した。図4に反射光のガウス型関数へのフィッティングと、静止したナノチューブからの信号の時間依存性を示す。ナノチューブからの反射光は、ナノチューブの直径が小さいためにガウス型の関数でフィッティングする事が出来、ピークの変位からナノチューブの変位を算出する事が可能である。図4挿入図の反射高輝度プロファイルから、半値全幅はおおよそ800nm、CCDの1ピクセル幅は焦点面で100nmであった。ピークの時間安定性では、標準偏差がおおよそ14nmとなった。本研究で用いたナノチューブのヤング率がおおよそ100~700GPaである[4]ので、そこからバネ定数を算出すると $5.0 \times 10^{-4} \sim 3.4 \times 10^{-3} \text{N/m}$ 、本システムの力分解能は6.8~48pNと見積もられた。

次に実際ナノチューブ片持ち梁先端を図2に示した反応で活性化したあとCD36を固定し、実際にCD36の結合が切れたときのナノチューブの撓みを

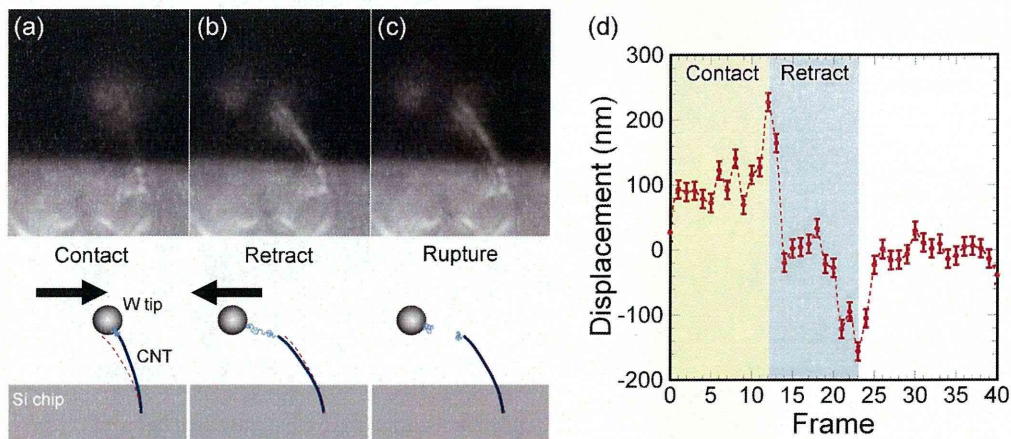


図5 ナノチューブ片持ち梁を用いた相互作用力計測の様子(a)タンパク質をナノチューブ先端に固定(b)固定後、タングステンプローブを引き離すとナノチューブが撓む(c)結合が切れた直後、ナノチューブが元の位置に戻る様子(d)a~cの一連の行程中のナノチューブの撓みの時間依存性

測定した。図5に一連の行程を示す。まず図5(a)のようにタンパク質を結合させたタングステンプローブをナノチューブに接触させ、タンパク質と活性化させたナノチューブを結合させる。その後タングステンプローブを引き離すことでタンパク質を伸張させる(図5(b))。タンパク質間/タンパク質内の結合が切れるとナノチューブが元の位置に戻る(図5(c))が、元に戻る直前の撓みを計測することで、結合力を測定する。図5(d)にナノチューブからの反射光をガウス型関数でフィッティングし、検出したピーク位置の時間依存性を示す。黄色の範囲がナノチューブが押されている領域、青色がナノチューブが引っ張られている領域を表す。図より結合が切れる直前のナノチューブの変位が156nmと見積もることが出来た。ナノチューブの直径が70nm、長さが9 $\mu$ mであり、ここからバネ定数はおよそ1.0mN/mと算出されることから、このときの結合力はおよそ150pNである。ナノチューブとタンパク質間に働く共有結合力は6.5nNである[3]ので、この結合は共有結合よりもむしろ、イオン結合や静電気力などの弱い結合を計測したものと考えられる。

#### D. 結論

本研究ではカーボンナノチューブ片持ち梁を用い、タンパク質間の相互作用を光学顕微鏡下で測定する手法を開発した。これまでの原子間力顕微鏡や光マニピュレーションを用いた手法に比べ、簡便で計測中にタンパク質の挙動を観察することも可能である。

次年度では実際に細胞表面のタンパク質との相互作用力を計測し、ヘモグロビンの種類による結合力の違いを解明するとともに、原子間力顕微鏡による表面分布の違い、さらには遺伝子配列との相関を明らかにすることで、総合的にヘモグロビン異常によるマラリア耐性メカニズムを解明する。

#### E. 参考文献

- [1] Fairhurst R.M. et al., Nature, 2005, 435, 1117-1121.
- [2] Arie T. et al., J. Struct. Biol. 2005, 150, 163-169.
- [3] Maruyama H. et al., J. Appl. Phys. 2007, 102, 094701-094705.
- [4] Sawaya S. et al., Nanotechnology, 2011, 22, 165702.

#### F. 健康危険情報

該当無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

S. Sawano, S. Akita, and T. Arie

Displacement measurement of a multiwall carbon nanotube cantilever in liquid for protein interaction force sensing (投稿準備中)

##### 2. 学会発表

澤野峻一、有江隆之、秋田成司

生体分子相互作用力計測に向けた片持ち梁カーボンナノチューブの変位検出

第71回応用物理学会学術講演会、講演要旨集17-156。

S. Sawano, T. Arie, and S. Akita

Displacement measurement of carbon nanotube in liquid toward interactive force sensing of biological molecules

MNC2010, 23th International Microprocesses and Nanotechnology Conference

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

