

研究課題別評価

1 研究課題名: バイオナノポアを用いた1分子センサーの開発

2 研究者氏名: 井出 徹

研究員: 青木 高明 (研究期間 H.15.1~H.18.3)

技術員: 竹内 裕子 (研究期間 H.15.1~H.18.3)

3 研究のねらい:

ナノテクノロジーは、21世紀の最も重要な技術の一つと期待され、世界中で精力的に研究、技術開発が進められている。生物科学の分野でも、微細加工、操作、計測等の技術が様々な形で応用されている。特に、天然のナノ構造体であるタンパク質や核酸分子を1分子ずつ操作、観測する技術の開発は、我々を含む、日本の研究者によるところが大きく、現在、この分野では、明らかに我が国が世界をリードしているといえる。しかし、残念ながら、ナノテクノロジーのバイオ分野への応用において我が国の取り組みは明らかに遅れており、我々が開発した1分子計測技術も欧米の研究者、企業を利している場合が多い。本研究計画は、我々が基礎研究を目的に開発した技術を基に、実用的な新技術を世界に先駆けて発展させることを目指した。

医薬品開発、遺伝子診断など多くの分野において、高感度で、コンパクトなセンサーの開発が強く望まれている。本研究では、我々が開発したチャネルタンパク分子1分子のイメージング・操作技術を応用して、極めて感度の高い、微小なセンサーを作成することを目指した。本研究のセンサーは、チャネルタンパク1分子の構造揺らぎを電気・光学的に捉え、揺らぎの変化を解析することによりセンシングを行うもので、多分子からの情報を加算、平均化して用いる従来型のセンサーとは全く異なる新しい原理に基づく。研究の主眼は、電気・光学測定装置の改良(小型化、高効率化)、及びセンサー素子となるチャネルタンパクの遺伝子操作等による「作成」に置いた。また、生体膜上で起こる信号伝達を人工膜上に再構成し、このセンサーを用いて1分子レベルで観測することも試みた。

4 研究成果:

【チャネルタンパク1分子計測装置の小型化、高効率化】

我々は既に、チャネルタンパク1分子を電氣的、光学的に同時計測する装置を開発していたが、従来型の装置は大型であること、計測に熟練を要することなど、幾つかの問題があった。そこで、装置の小型化、高効率化を目指して装置の改良を行った。測定効率を下げる原因となっていた、人工膜形成に要する時間を大幅に短縮するために、人工膜に加圧し薄化する方法を開発した。これにより、測定(準備)に要する時間を従来の数十分の一から数百分の一程度に短縮することに成功した。また、これにより必要とする測定溶液も、従来型の千分の一程度まで減少させることが出来るようになった。小型化された装置を用いて、センサーアレイ(現在のとこ

ろ4チャンネル)を試作することにも成功している。

【新しい光学的・電気的同時計測のための実験装置の開発】

我々が開発した人工膜による計測法は、膜容量が大きく、急速な電位変化に対するチャンネルの応答を見る必要がある場合など、ある種のチャンネルに対しては適用が難しい場合がある。そこで、従来型の計測装置の改良に加えて、新しい手法の開発も試みた。

全反射型蛍光顕微鏡法と Tip-Dip 法を融合させた新しい同時計測用顕微鏡を開発した。気液界面に展開した単層膜を Tip-Dip 法を用いてすくい取ることにより脂質二重膜を形成し、グラミジシン分子の単一チャンネル電流を計測することにより正常な構造を保っていることを確認した。また、蛍光標識した脂質分子の運動をエバネッセント照明により観察することが出来た。これらにより、ガラスピペットを用いた新しい光学的・電気的同時計測のための実験装置の開発に成功したと言える。

【アセチルコリン受容体チャンネル(nAChR)の電気・光学的1分子同時計測】

アミノ基反応性の Cy5 を用いて標識した nAChR を再構成したベシクルを気液界面に展開し、ピペット先端の二重膜に取り込んだ上でエバネッセント観察することにより、nAChR1分子の輝点を観察することが出来た。標識した nAChR の単一電流を計測したところ、確率は低いながらも単一チャンネル電流を計測することが出来た。よって nAChR の電気・光学的同時計測実験の基礎的な手順は開発できたと言える。また、蛍光性アセチルコリン誘導体を合成する手順を考案した。有機化学合成は、さがけ研究同領域の北陸先端大・藤本研究室との共同研究として行われ、現在までにアルキル鎖長 $n=5$ の Cy3 標識分子種の合成が終了した。ベシクル上の nAChR との相互作用を観察したところ、結合解離に伴う離散的な蛍光強度変化を観察することに成功している。よって1分子レベルでのアゴニスト相互作用を実時間計測できる蛍光誘導体の作製に成功したと言える。

【AmB-ステロール連結体の単一電流計測】

AmB のコレステロールまたはエルゴステロール連結体(阪大化学・村田研作成)の単一チャンネル電流 Tip-Dip 法を用いて計測したところ、エルゴステロール連結体において高い開確率となり、コレステロール連結体においては非常に低いチャンネル活性を観測した。これにより AmB は動物などの細胞膜中に多いコレステロールではなく真菌細胞膜中に多いエルゴステロールと相互作用してチャンネル構造を形成することにより選択的毒性を発現するという仮説を単分子レベルで直接検証することに成功した。また、人工膜の脂質置換法を開発し、これによってチャンネルに対する脂質分子の作用も継時的に観測可能となった。

【ヘモリシンチャンネルの1分子センサー系への応用】

Tip-Dip 法を用いて α -ヘモリシンの単一チャンネル電流を計測することに成功した。また、ビオチン化した poly-dA(100)をアビジンに結合させた分子複合体を添加することにより、定常的なチ

ヤネル電流が激しくゆらぐ現象を観察できた。これは強く負に帯電した poly-dA が電位勾配に従って移動する際にチャンネルポアを塞ぐような形になることにより起こると考えられる。すなわち、この系をチャンネルとアゴニストとの相互作用を直接検出するための手段として用いることが可能なことを示しており、検体を高感度に検出するための1分子センサー開発への応用が期待される。また、蛍光標識した α -ヘモリシン分子を合成し、電気・光学的1分子計測を行った。通常分子と同様のチャンネル活性を確認したが、アミノ基反応性の蛍光色素によりチャンネルを直接修飾した影響と思われる電流のふらつきが見られた。これらの結果により、ヘモリシンチャンネルを用いた電気・光学的1分子センサー(特に DNA センサー)の開発が可能となったと言える。

【Ca 依存性 K チャンネルの電気・光学的1分子計測】

開発したセンサーを応用し、細胞内で起こる信号伝達を1分子レベルで観測することを試みた。気管平滑筋 BK チャンネル(Ca 依存性 K チャンネル)を蛍光標識し、人工膜に再構成することによって、機能しているチャンネル分子の1分子光学計測に世界で初めて成功した。次に、チャンネルと薬剤との相互作用を1分子レベルで可視化するために、チャンネルの特異的阻害剤である IbTX の蛍光誘導体を合成した。また、チャンネル分子-阻害剤相互作用の1分子可視化のためには、チャンネルの拡散を抑えることが不可欠であったため、チャンネルタンパクの膜内固定(拡散阻害)法を開発した(ポリエチレングリコールによってチャンネルをガラス表面に固定する方法、及び膜結合蛋白アネキシン5により脂質の流動を止める方法)。現時点では、相互作用の1分子検出には至っていないが、測定準備は完全に整ったと言える。

【リアノジン受容体とリアノジンの結合解離の1分子計測】

チャンネルタンパク1分子の光学的検出のために、リアノジン受容体に蛍光色素(eGFP)を組み込んだり、タグをつけた組み換え体を作成した。筋肉型リアノジン受容体(RyR1)の N 末、C 末、DR2 領域それぞれに eGFP 遺伝子を組み込んだ cDNA を、哺乳動物培養細胞 HEK に発現させることに成功した。発現効率は、N 末> DR2 > C 末の順であり、confocal 顕微鏡観察により、組み換え RyR は、HEK 細胞の核膜周辺や細胞内小胞構造に発現していることを確かめた。また、これらの発現細胞から得られた ER 分画は、RyR1 及び eGFP を含むことを、それぞれの抗体を用いた western blotting 法で確認した。また RyR1 を発現した細胞は、カフェイン刺激によってカルシウム上昇が見られることを、カルシウム感受性蛍光色素を用いて確かめた。これらを用いて、リアノジン受容体とリアノジン分子との結合解離を調べた。その結果、1分子レベルで高親和性と低親和性の結合が存在していることを示すことが出来た。ガラス表面に接着したベシクル中の心筋型 RyR とリアノジンの結合を、1分子で可視化した。RyR を含まないリポソーム膜を用いると、リアノジンは1秒以下の短い結合時間で非特異的に結合していた。またチャンネルが開かない PCa3 の条件下では RyR とリアノジンの間に、長い結合は見られなかった。一方、チャンネル活性がある PCa5 では RyR に結合するリアノジンは数秒間結合しているものも多く見られ、中には数十秒以上という長い結合もあることがわかった。これは高親和性と低親和性結合の違いを1分子レベルで示しているものと考えられる。チャンネルが機能している状態で少なくとも2つ

以上の結合状態があることがわかった。Open lock 状態になると思われるリアノジン濃度(1 nM から 100 nM)では、結合時間は大きく変化することはなかった。

さらに、リアノジンの結合解離を電気・光学的に1分子同時計測するために、前述のアネキシンによるチャネルタンパクの拡散阻害法を開発した。酸性リン脂質である phosphatidylserine (PS)を含む人工脂質平面膜中でBODIPY - DHPEとCy5-RyR2の一分子の拡散を直接観察し、様々なアネキシン 5 の濃度での拡散を測定した。その結果、1 μ M のアネキシン 5 存在下ではPE、RyR ともにアネキシン 5 が存在しないときに比べて拡散係数を 1/200 以下に減少させることがわかった。また、RyR2 の機能へのアネキシン 5 の効果を測定し、アネキシン 5 が少なくともRyR2 の機能に大きな影響を与えないことを明らかにした。

5 自己評価:

大別して2つの目標を設定し、研究を遂行した。

一つは、実用的なセンサー作製に向けたチャネルタンパクの1分子計測系の改良であり、これについては、当初の目標を完全に遂行しえたと考えている。人工膜を用いた単一チャネル測定系の解決すべき問題点は、装置が大きいこと、測定に要する人手(熟練者が必須)や時間がかかることなどであったが、本研究で開発した方法により、何れの問題も解決されたと考えられる。つまり、数千分の一のサイズダウン、数百分の一の迅速化に成功し、測定の自動化への道も開かれた。但し、研究員に微細加工の専門家がいなかったため、当初予定していた装置のマイクロメートルサイズへの小型化までには至らなかった。これについては、現在、他研究室との共同研究という形で実現しつつある。

次に、二つ目の目標として、開発したセンサーを用いた信号伝達(チャネル-他分子相互作用)の1分子観測を挙げた。チャネルタンパク1分子の機能計測法(単一チャネル記録法)が開発されてから 30 年になるが、他の分子(例えば、阻害剤や賦活剤)との相互作用については、多分子系の実験に依らざるを得なかった。重要性は認識されながら 30 年来手つかずであった問題であり、非常にチャレンジングで困難極まりない技術開発であったと感じている。しかしながら、最終年度に入って、最も大きな問題の一つであったチャネル分子の拡散制御法の開発に成功し、これによってチャネルタンパクと薬剤との相互作用検出に世界で初めて成功した(未発表)。現在、さらに精度を上げるべく手法の改良中であるが、生理学上の新しい手法を開発したものと自負している。

6 研究総括の見解:

チャネル分子の1分子計測を可能とする人工膜を用いた再構成系による測定デバイスの開発に成功したことが高く評価できる。実用化を可能にするような頑健かつ安定なシステムの開発も求められる一方で、この1分子認識系を用いて何を測定できるかの展開が今後の鍵になる。例えば、1分子の測定系において観察された現象がどれだけ生理的な現象を反映しているのか明らかにできるとよい。領域内の他の研究者との良好な協力関係を築いたことも評価

できる。

7 主な論文等:

【論文】

- [1] T. Ide, Y. Takeuchi, T. Aoki, and T. Yanagida (2002)
Simultaneous optical and electrical recording of a single ion-channel.
Jpn J. Physiol. 52(5): 429-34
- [2] Nobuaki Matsumori, Noritsugu Eiraku, Shigeru Matsuoka, Tohru Oishi, Michio Murata, Takaaki Aoki, and Toru Ide (2004)
Amphotericin B-Ergosterol Covalent Conjugate Bearing Powerful Membrane Permeabilizing Activity
Chemistry and Biology 11, 673-679
- [3] T. Ide, T. Ichikawa (2005)
A Novel Method For Lipid-Bilayer Formation: An Approach to the Development of Optical and Electrical Single Ion-Channel Biosensors.
Biosens. Bioele. 21: 672-677
- [4] T. Aoki, Y. Sowa, T. Yanagida, T. Ide (2005)
Non-contact surface force microscopy for molecular interaction study
J. Surf. Sci. Nanotech. 3: 46-50
- [5] T. Ichikawa, Y. Takeuchi, T. Aoki, T. Ide (2005)
Annexin 5 decreases the diffusion of lipid and channel molecules in an artificial lipid bilayer.
J. Surf. Sci. Nanotech. 3: 213-217

他8報(含投稿中)

【特許】

- [1]人工脂質二重膜における脂質置換方法、その脂質置換方法を用いて得られる人工脂質二重膜、その人工脂質二重膜を製造する装置、および、イオン透過測定装置。井出 徹、平成 15 年 9 月 4 日、特願 2003-313203
- [2]人工脂質二重膜の形成装置および人工脂質二重膜の形成方法、並びにその利用、井出 徹、平成 15 年 9 月 19 日、特願 2003-328651
- [3]人工脂質二重膜を有する電流測定装置、井出 徹、平成 15 年 9 月 19 日、特願 2003-328696

【受賞】

2002 年度 日本生理学会入沢記念優秀論文賞

【招待講演】

- [1] T. Ide, T. Aoki, Y. Takeuchi, T. Yanagida (2002)

Simultaneous optical and electrical recording of a single ion-channel.

International Symposium on Dynamics and Function of Nano-Biomachines

[2] T. Ide (2003)

Single molecule physiology of ion channels.

80th Annual meeting of Jpn Physiol. Soc.

[3]T. Ide (2003)

Simultaneous optical and electrical recording of single ion-channel proteins

NanoSpec2003

[4] T. Ide, T. Aoki, Y. Takeuchi (2003)

Simultaneous optical and electrical recording of a single ion channel.

International symposium on single-molecule bioanalysis and nano-biodevice

[5]T. Ide, T. Ichikawa, Y.Takeuchi, T. Aoki (2005)

Simultaneous optical and electrical recording of single ion-channels.

Molecule-based information transmission and reception

他3件

【口頭発表】

国際会議 11件、 国内会議 26件