

細胞膜タンパク質機能の高感度イメージング解析技術の開発

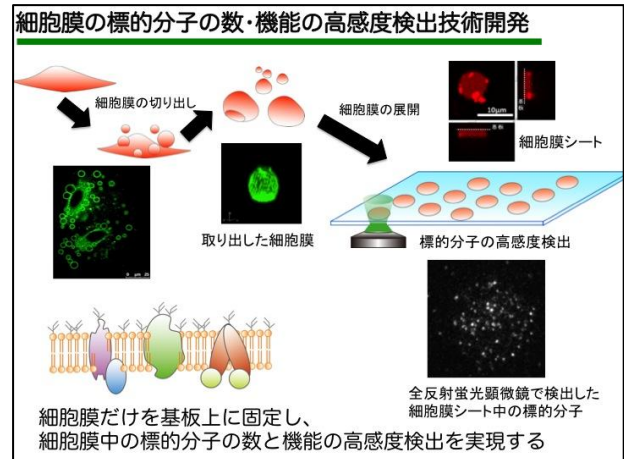
研究代表者

奥野 貴士 山形大学理学部



1. 研究の背景と達成目標

抗がん剤を用いた薬物治療において、薬効/副作用の個人差が大きく、計画的な薬物治療を困難とさせている。将来、生検等で得た僅かな細胞試料を用いて標的細胞への薬効を数値化し、薬物治療に有効な抗がん剤を予測するオーダーメイドの薬効診断は、患者のQOL(quality of life)を飛躍的に向上することが期待される。微量の細胞試料による薬効診断を実現するには、細胞膜を介した薬物輸送を担うタンパク質数と活性を高感度に検出/数値化する技術開発を必要とする。本研究は、膜タンパク質を定量的かつ高感度に検出する新しい細胞膜調製技術の開発を目指した。



研究期間内においては、細胞試料から細胞膜だけを機能を保ったまま、基板上に貼付けた細胞膜シートの調製法確立と細胞膜シート中の標的分子の高感度検出を目標とした。そして東北地方に拠点を置く国内企業との共同開発をさせていただき、キラッと光る技術を”東北から“の発信することを目指した。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

「産業基盤の創生」を目指し、コアとなる基盤技術の開発と東北で活躍する国内企業との共同研究開発に取り組んだ。

- ・ 細胞膜機能を維持する条件で、試験管に細胞膜を取り出す技術開発に成功した。
- ・ 切り出した細胞膜を硝子基板に貼付けた細胞膜シートの開発に成功した。
- ・ 切り出した細胞膜を基板上的狙った位置にマニピュレートする新しい観察器具を開発した。
- ・ 基板上に展開した細胞膜シートの膜機能を損なわない微細加工基板の開発に成功した。
- ・ 国内企業合計4社との共同研究/開発を実施し、細胞膜解析のシステム開発と製品化を視野に入れた研究開発にも着手している。

3. 研究成果

<細胞膜を切り出す技術の確立>

細胞膜機能失活を低減した状態で、細胞膜を切り出す技術を開発し特許出願に至った(図1)。既存の方法では、切り出し処理に細胞内の酵素活性がほぼ失活したが、開発した方法では、約7~80%の酵素活性を維持できる事が分かった。

<切り出した細胞膜から細胞膜シートの調製>

切り出した球状の細胞膜をガラス基板に吸着し、基板上に細胞由来の細胞膜シートの調製方法を確立した(図2)。細胞膜シートは細胞質側を上向きにした状態で基板に固定され、細胞由来の膜タンパク質を含む事が明らかとなり、標的分子の定量に有効である事を確認した。約 10^4 個の細胞からの製膜に成功し、検出容器の小型化により 10^2 個程度の細胞試料からの検出に目処がたった。さらに、細胞膜への基板の物理的な接触による膜機能失活を低減するために、凹構造上に細胞膜を張る方法を確立した(図3)。

<細胞膜シートにおける標的分子の検出システム>

GFP 融合タンパク質および蛍光抗体を用いて、細胞膜シート中の1分子観察による標的分子の検出を試みた。その結果、細胞膜シート中の標的分子由来の蛍光標識分子の1分子観察が可能である事を見だし、極めて少ない標的分子の単位面積辺りの分子数を計測出来ることを見いだした(図4)。研究の一つの目標である、高感度に標的分子数をカウント出来る技術開発を達成した。

<切り出した細胞膜をマニピュレートする技術>

診断技術への応用には、細胞膜シート調製から検出までのハイスループット化が必要である。細胞から切り出した細胞膜を基板上の狙った位置に並べる方法の確立に成功した。蜂の巣状に約 $10\mu\text{m}$ の構造を施して、球状の細胞膜をそこに落とし込み並べる事に成功した(図5)。また、東北に拠点を有する国内企業との共同研究を実施し、微細孔に並べた細胞膜を安定して蛍光顕微鏡で観察する器具開発に成功し、特許出願に至った。

4. 今後の展開

本研究期間において、細胞から細胞膜を直接基板上に展開出来る技術開発に成功し、基盤技術の確立をほぼ終えた。今後、システムの産業化に向けたアプリケーションの確立が課題となり、国内企業との共同研究を頂く事ができれば産業化に向けた研究を加速させていきたい。また、開発した細胞膜シートは、イメージング観察の対象として、幾つかの研究分野より興味を持って頂いており、細胞膜機能解析の新しいプラットフォームとしての応用にも期待される。

5. 発表実績

特許出願(合計2件)

・特願 2013-228766、2014-015080

学会発表(合計7件)

(1)南祐太, 飯沼博章, 櫻井敏彦, 奥野貴士: ベシクル状に切り出した細胞膜を基板上に展開する研究。「細胞を創る研究会 5.0」(東京), 2012.11.

(2)南祐太, 飯沼博章, 櫻井敏彦, 奥野貴士: Development of a new method for preparation of cell membrane flat sheet on glass surface, 第51回日本生物物理学会年会,(京都),2013.10.

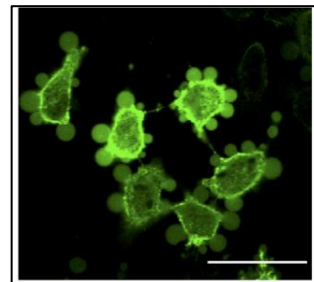


図1 細胞膜を切り出す様子

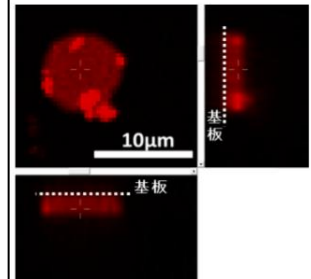


図2 基板上的細胞膜シート

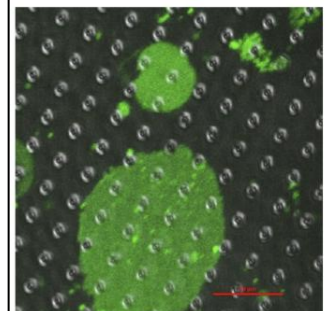


図3 微細孔上に張った細胞膜

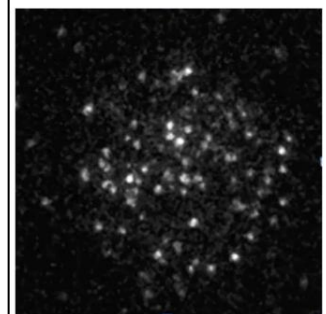


図4 細胞膜シート中の標的タンパク質の1分子観察像

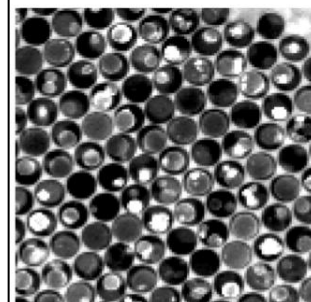


図5 細胞膜をマニピュレートする微細加工パターン