

ナノセルを用いた膜蛋白質の物質輸送活性の1分子計測技術の開発

東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻

渡邊力也

要旨

膜輸送体は、細胞内外のイオンや分子を輸送する膜蛋白質であり、その生理的重要性から、薬剤標的として近年注目されている。膜輸送体を創薬の標的とする場合、その輸送活性を定量的かつ高感度に計測することが、薬効を評価する上で重要であるのだが、従来汎用されてきた手法では、検出感度の問題と計測対象の制限などから、大半の膜輸送体の活性を計測することは極めて困難であった。そこで、本研究では、人工生体膜で被われた微小反応容器(ナノセル)を高密度に集積させた人工生体膜チップを新規開発し、多種多様な膜輸送体の活性を1分子単位で検出できるほどの超高感度計測技術を確立した。本開発技術は、膜輸送体を標的とした創薬候補物質の高速かつ大規模な探索に最適な技術であり、今後の創薬における応用展開が強く期待される。

1. 研究目的と成果

本研究では、膜輸送体の活性計測を高感度・定量化するため、人工生体膜チップの新規開発と、これを用いた膜輸送体の超高感度活性計測技術の確立を目指した。具体的には、独自の人工生体膜の量産技術を応用して、人工生体膜で被われた微小反応容器(ナノセル)を高密度に集積した超高密度人工生体膜チップを開発した [1,2]。そして、ナノセルを検出器として用いることで、膜輸送体の輸送活性が低くても、輸送基質の濃度変化を劇的に増大させることに成功し、膜輸送体の超高感度・定量活性計測を可能にした [1,2]。

2. 結果及び考察

➤ 超高密度人工生体膜チップの新規開発

人工生体膜で被われた容積0.2~7 fLのナノセルを約10万個集積した超高密度人工生体膜チップを新規開発した(図1) [1,2]。ちなみに、このチップでは、従来法と比較して約1,000倍高い集積度を実現している。また従来の人工生体膜は、輸送基質が数分の内に透過することから、輸送活性を正確に計測できない問題があったが、本研究で開発した人工生体膜チップは、2時間以上にわたり基質の透過を抑えることに成功しており、すなわち、膜輸送体の活性を高感度かつ定量的に計測する上で最適な基盤技術といえる。

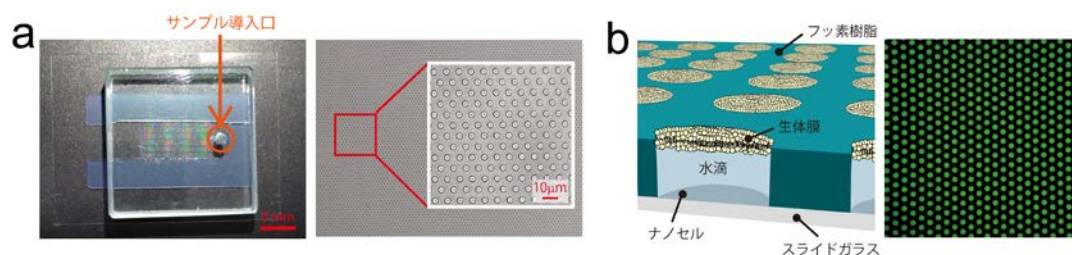


図1 超高密度人工生体膜チップの写真および模式図

(a) 超高密度人工生体膜チップの外観、(b)チップ内のナノセルの構造 (左図：模式図、右図：蛍光画像)

➤ 膜輸送体の高感度活性検出技術の確立

新規開発した超高密度人工生体膜チップを用いて、膜輸送体の高感度活性計測技術を確立した (図 2) [1,2]。まず、活性の計測のため、微小水滴の上にある人工生体膜へ膜輸送体を組み込み、膜輸送体を介して輸送基質を水滴のなかへ取り込ませる (図 2a)。輸送基質は、微小な水滴のなかで濃縮されるため、膜輸送体の働きが弱くても、基質の濃度変化は顕著に増大する。すなわち、基質の濃度変化に応答する蛍光指示薬を利用すると、膜輸送体の活性を高感度かつ定量的に検出できるようになる。現在までに、F 型 ATP 合成酵素や α 溶血素などを含む多種多様な膜輸送体の活性を 1 分子単位で検出できるほどの高感度化に成功しており、毎秒 2 個程度しか基質が輸送されなくても、輸送活性を定量的に計測できるようになった (図 2b,c)。このように、超高密度人工生体膜チップにより検出感度が従来法と比較して約 100 万倍向上し、多くの膜輸送体の活性を超高感度かつ定量的に計測できるようになった。

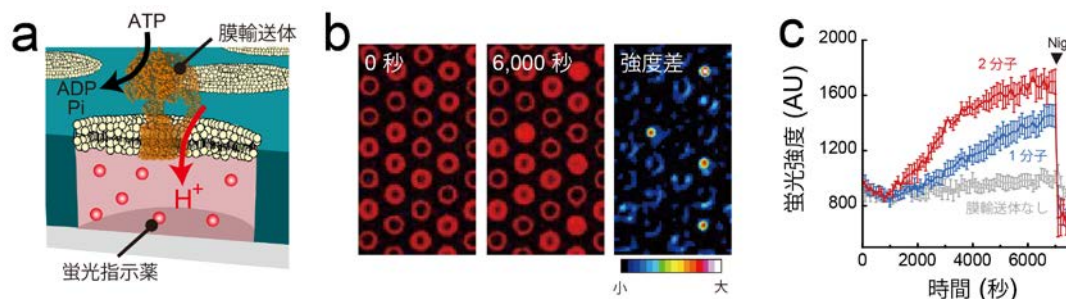


図 2 人工生体膜チップを利用した膜輸送体(F 型 ATP 合成酵素)の高感度活性計測例

(a) ナノセルを利用した膜輸送体のプロトン輸送活性の検出模式図

(b), (c) プロトン輸送に伴った pH 指示薬の蛍光強度の経時変化

3. まとめと課題

本研究では、超高密度人工生体膜チップを新規開発し、様々な膜輸送体の輸送活性を 1 分子単位で高感度・定量計測できる汎用性の高い技術を確立した。本技術は、類似技術に対して圧倒的な優位性を持つため、今後、膜輸送体研究の基幹計測技術になるのではないかと期待している。また、本技術ではナノセルが高密度に集積しているため、それらを並列利用すると、膜輸送体の大規模な 1 分子機能解析が可能となる。すなわち、1 分子解析の質の良さと計測の効率化を兼ね備えた研究を推進できるため、多種多様な膜輸送体を標的とした創薬候補物質の高速かつ大規模な探索に最適な基盤技術になると強く期待される。

今後の課題としては、技術の汎用性を更に高めるため、生理条件により近い状態を人工生体膜チップ上で再現する必要があると考えている。その実現のため、現在、脂質組成の非対称な生体膜の形成技術や、膜輸送体の主要な駆動源である電圧を定量的に制御できる微小電極の開発などを進めている。また、薬剤探索技術の確立のため、マイクロ流体技術を応用した第二世代の人工生体膜チップの開発も必要であると考えている。

発表論文

[1] Watanabe, R., Soga, N. et al., *Nature Communications* (2014) 5, 4519

[2] Watanabe, R., Fujita, D. et al., *Proceedings of μ TAS2013* (2013) 1, p1314-1316