

研究報告書

「生体膜分子の力学的理解とナノバイオデバイスへの新展開」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 村越 道生

1. 研究のねらい

全ての生命現象は突き詰めていくと、AGTC のたった 4 つの塩基の組み合わせからなる遺伝子に帰着する。近年盛んに遺伝子治療に関する研究がなされているものの、60 兆個の細胞からなるヒトの体に組み込まれた 30 億の塩基対である遺伝子を治療しようとするこのアプローチには依然解決すべき課題が多く、その確立には多くの時間を要すると予想される。

機械工学の視点からヒトの体を考えると、設計図である遺伝子よりむしろ設計図から生成されるタンパク質と糖鎖や脂質、細胞膜などとの相互作用、その中でも力学的相互作用の意義は極めて大きく、これを解明することが上記問題のブレークスルーとなる可能性が高い。しかしこれら要素の中で機能部品として働くタンパク質の構造や動的な振る舞いの解析は容易ではない。特に膜タンパク質については、最初にその構造が解析されてから約 30 年経った現在までに、構造が解かれた可溶性タンパク質が約 9 万個あるのに対し、構造が解かれた膜タンパク質の数はその約 3%にあたる 2,500 個程度であり、独立な構造を有するものは 180 個程度にすぎない。タンパク質の構造はその機能と表裏一体であり、これを自在に捉える計測技術なしにはポストゲノム研究に新たな展開はない。信頼性ある計測技術の確立は急務である。

本研究課題では、力学的理解に立脚した生体膜分子操作技術および計測技術の構築を入口として、生体膜分子の構造解析と生命現象の解明を試みる。具体的には、内耳において音の増幅機構を担っている感覚細胞(外有毛細胞)の細胞膜表面に発現するタンパク質モーター“プレスチン(prestin)”を対象とし、原子間力顕微鏡を用いて prestin 分子と人工脂質膜間に生じる結合力を計測することで prestin の膜貫通構造を解析する技術を確立する。さらに、外有毛細胞に見られる機械-電気変換プロセスおよび電気-機械変換プロセスを人工脂質膜を用いて再現することで prestin の構造と機能を自在に制御する技術を開発する。これにより、これまで断片的にしか理解されてこなかった prestin の構造と機能の関係を相互に関連付けて統合的に解明する。さらに、得られた知見を基に、prestine のユニークな機能を応用した高感度バイオ変位センサーなどのナノバイオデバイスの創出という出口に向かって研究を推進する。

2. 研究成果

(1) 概要

Prestin はおよそ 12 回貫通型の比較的大きな膜タンパク質である。このような大型生体膜分子の操作技術および計測技術は発展途上であり、そのため prestin の構造と機能は解明されていない。本研究では、精製した prestin 分子を人工脂質膜に再構成し、ピコニュートンレベルの力負荷によって伸展させ、分子反力と伸展距離から分子構造を解析する(単分子間力顕微鏡法)ことで、prestine のような高分子量(81.4 kDa)の膜タンパク質であっても、比較的少量(～1 mg)かつ結晶化なしに分子構造を捉えることができる独自技術の提案を試み、これら技

術をもとに新機能を実現するナノバイオデバイスの開発について検討した。

まず、構造・機能解析およびデバイス化を見据え、目的別に4種類(6系統)の prestin 発現系を構築した。CHO 細胞にリポフェクション法により遺伝子導入し、高発現細胞株を獲得した。これら細胞株から、タンパク質工学的手法によりさらに高発現クローンを抽出した。

次に、構造解析用(Aviタグ)発現ベクターで作製した prestin 発現細胞の単離細胞膜を用いて、原子間力顕微鏡による引抜試験を実施し、prestins の膜貫通構造解析を試みた。C 末端細胞内領域や、単一もしくは複数の膜貫通領域の引き抜きに起因すると考えられる力が検出され、12 回膜貫通モデルを強く示唆する結果を得た。

Prestin の変形状態を制御し、その機能を評価するため、細胞膜電位を制御できるデバイスの開発に取り組んだ。シリコン樹脂(PDMS)製チャンバーおよび細胞径よりも小さな微小孔(直径 2 μm)を一つだけ有するテフロン樹脂製薄膜基板の作製技術、さらにその孔に prestin を再構成するための人工脂質膜を形成する技術を開発した。また、prestins 安定発現細胞株の大量培養と精製条件について検討した結果、2L の培養液中に培養した細胞から約 84 μg の prestin を精製することができた。さらに等温滴定カロリーメーターによる熱力学的解析によって、精製後も prestins が機能を保持している可能性が明らかとなり、今後のデバイス化に必須の要素技術確立に目処が立った。

(2) 詳細

研究テーマ A「高密度 prestin 脂質膜の作製」

目的に応じて自在に prestin 分子を操作するため、本テーマでは、大量発現用(CMV および EF1 α プロモーター)、高効率精製用(大量発現用+His タグ)、多機能化用(GFP および FLAG タグ)、構造解析用(Avi タグ)の4種類(6系統)の動物細胞用発現ベクターを構築した。これらベクターをチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞にリポフェクション法により遺伝子導入し、薬剤選択の後(図 1)、mRNA による発現確認(図 2)によって、高発現が期待できる株を獲得した。これらクローンに対し、免疫蛍光顕微鏡法および SDS-PAGE/ウェスタンブロッティングによって、タンパク質レベルで発現を確認した。さらにフローサイトメトリーにより発現量の高いクローンの抽出に成功した(図 3)。現在、prestins 発現量の定量解析に取り組んでいるところである。また精製 prestins の脂質膜への再構成の至適条件についても検討していく。本テーマについて、ボトルネックであった細胞株構築に当初見込みより多くの時間を要し、研究全体の進捗を遅らせた。この点を反省し、ここまで得た知見を活用しつつ、今後はさきがけ研究を通じて構築した共同研究先と連携し、進捗の加速を図る。

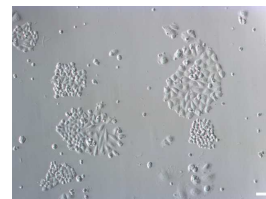


図 1. 高効率精製用ベクターを導入した CHO 細胞の薬剤選択。薬剤選択開始から 26 日後。スケール: 50 μm 。

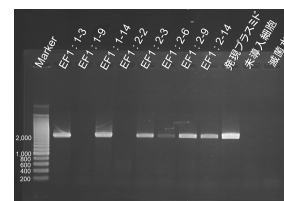


図 2. 逆転写 PCR の結果。複数のクローンから prestins を示すバンド(2232bp)が確認された。

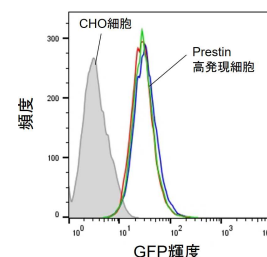


図 3. フローサイトメトリーによる発現確認。GFP 輝度をマーカーに prestins 発現量を推定した。

研究テーマB「AFMによるprestinの膜貫通構造の解析」

膜タンパク質である prestin の細胞膜内分子構造を推定するため、本テーマでは上述テーマ A で開発した構造解析用(Avi タグ)発現ベクターで作製した prestin 発現細胞の単離細胞膜を用いて、原子間力顕微鏡による引抜き試験を実施した(図 4(a)). 引き抜きの際に得られる force-extension curve (FE カーブ)にのこぎり状波形が観察され、ミズ鎖モデルによる解析を試みたところ、C 末端細胞内領域や、単一もしくは複数の膜貫通領域の引き抜きに起因する力が検出され(図 4(b)), さらに N 末端側から 192 番目(もしくは 196 番目)のシステイン(C)および 415 番目のシステイン(C)間が一度に引き抜かれたことを示す力が確認され、これらシステイン間がジスルフィド結合によって結合している可能性が示された。これらの結果より、prestin は 10 個の膜貫通部と、2 個の半貫通部を有していることが示唆された(図 4(a)). 本テーマは、当初上述テーマ A で作製する試料を使って実施する計画であったが、テーマ A の進捗遅れのため実施できない状況が続いていた。しかし領域会議の中で有益なディスカッションをいただき、計画を上記のように変更することで、成果が出始めた。さらなるデータの取得と解析をすすめるとともに、テーマ A の達成と当初の計画の実施についても検討していく。

研究テーマC「Prestinの変形状態制御および機能評価」

Prestin 分子の機能を制御しながらその構造を解析し、さらにその技術をデバイス化に応用するため、本テーマでは細胞膜電位と細胞内外溶液組成を制御できるデバイスの開発に取り組んだ。シリコン樹脂(PDMS)を用いたチャンバー部および細胞径よりも小さな微小孔(直径 2 μm)を有するテフロン樹脂薄膜の基板部(図 5)からなるデバイスを開発し、さらにその孔に prestin を再構成するための人工脂質膜を形成する技術を確認した(図 6)。本テーマについては、テーマ A の進捗遅れによって現在のところ目標達成にはいたっていない。しかし、要素技術開発については着実に達成してきており、達成に向けて引き続き取り組んでいく計画である。

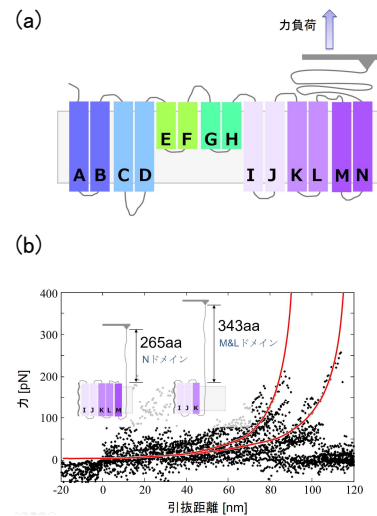


図 4. 原子間力顕微鏡による prestin 引抜き試験. (a) 試験模式図. (b) N-Mドメインにおける FE カーブ.

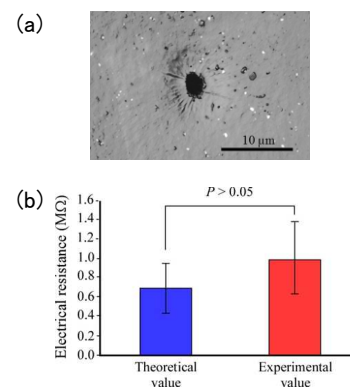


図 5. 機能評価デバイスの作製. (a) テフロン膜に形成した微小孔. (b) テフロン製基板部に作製した微小孔を介した電気抵抗値の理論値と計測値.

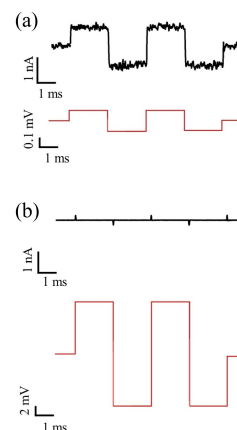


図 6. 微小孔に形成した人工脂質膜電気特性評価. (a) 人工脂質膜形成前. (b) 人工脂質膜形成後. 脂質膜形成によってギガオームシールが形成された.

研究テーマ D「Prestin を利用したナノバイオデバイスの創生」

上述テーマ A で作製した細胞株から精製した prestin 分子を変位センサー等のナノバイオデバイスに応用することを目指し、本テーマでは、まず prestin 安定発現細胞株の大量培養と精製条件について検討した。その結果、2L の培養液中に培養した細胞から約 84 μg の prestin を精製することができた(図 7)。さらに精製後も prestin が機能を保持していることが、等温滴定カロリーメトリーによる熱力学的解析で明らかとなり(図 8)、今後のデバイス化に必須の要素技術が確立されたことが示された。本テーマは、全体計画の中で出口研究として位置づけた挑戦的な内容としてデバイス化を目指していたが、目標達成にはいたらなかった。しかし、本テーマの重要課題であった、精製した prestin の機能評価について、当初計画にはなかった等温滴定カロリーメトリーによる測定を導入することで、その評価が可能となり、さらに我々の手法で精製した prestin が機能を保持している可能性が示されたことで、今後の研究進捗に重要な知見を与えることができた。

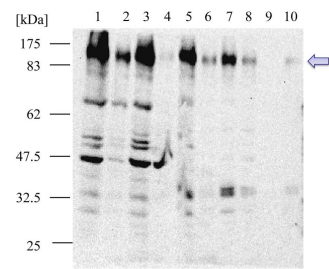


図 7. 精製 prestin のウェスタンブロットング結果。1, 全細胞; 2, 超音波破碎後の沈殿; 3, 同上清; 4, 可溶性タンパク; 5, 膜画分; 6, 非可溶性タンパク; 7, 界面活性剤による可溶性済みタンパク; 8, カラム通過試料; 9, 洗浄液; 10, 精製タンパク質。

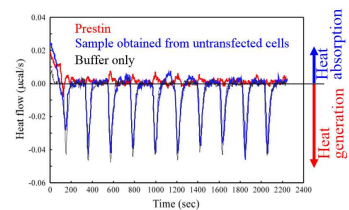


図 8. 等温滴定カロリーメトリーによる精製 prestin の機能評価。塩化物イオンの滴定による熱反応を計測した結果、精製 prestin においてのみ発熱反応が見られた。

3. 今後の展開

研究テーマ A で取り組んだ発現系の構築については、時間を要してしまったものの目標をほぼ達成した。今後は、逆転写 PCR によって mRNA の発現が確認できたすべてのクローン(異なるプロモーターごとにそれぞれ約 10 クローンずつ)について、タンパク質工学的手法による高発現株の選択を継続する。さらに、同株を使った精製系の確立と高密度 prestin 膜作製、同膜を用いた prestin 機能評価と膜貫通構造解析に取り組み、早期の高効率バイオデバイス構築につなげる。

テーマ B で取り組んだ単分子間力顕微鏡法による膜貫通構造解析では、当初計画にはなかった、Avi タグ付加 prestin を発現させた CHO 細胞の細胞膜を単離し、同タグに結合させたビオチンを、ストレプトアビジンでコートした AFM カンチレバーで引き上げるという手法によって、成果を得はじめた。今後現在の 5 倍 ($n = 400$ 程度) のデータを取り、統計解析によってデータの信頼性を高め、膜貫通構造モデルの提案を試みる計画である。さらに、テーマ A が達成した際には、当初計画していた精製 prestin を再構成した人工脂質膜を試料とし、ここで得た知見をもとに、より詳細な膜貫通構造情報を含む FE カーブが取得可能か検討をすすめる。

テーマ C で取り組んだ prestin 分子の機能制御デバイス開発については、テーマ A の進捗遅れの影響が大きく目標達成できなかったが、デバイスに必要な要素技術の開発は着実に進んできた。今後は、テーマ A の達成を急ぐとともに、もし達成が遅れたとしても本テーマの進捗が滞らないよう計画している。具体的には、さきがけ研究を通じて新たに共同研究を行うことになった、

膜タンパク質の構造解析を専門とする研究先と、本研究で得られた prestin の発現、精製に関する知見を共有し、両研究室で機能もしくは構造解析に適した prestin コンストラクトの設計と精製を進め、互いに試料を提供する計画である。

テーマDでは、精製した prestin の機能解析について、当初電気生理学的手法によって実施する計画であったが、テーマ A 及び C の遅れによって計画が遅れたため、等温滴定カロリメトリーによる熱力学的手法で解析することを試みた。これにより、精製 prestin に機能が保存されている可能性を示すことができたため、今後、prestin に対するアンタゴニストとして知られているサリチル酸を本計測系に適用し、精製 prestin の機能について更に詳細に検討をすすめる予定である。また、テーマ A で構築した大量発現細胞株を用いた大量培養系を構築することで、現状の 10 倍程度 (~0.1 mg/2L 培地) の prestin を精製できるシステムの構築を目指す。

(2) 生体膜分子のユニークな機能を利用した新機能(ナノバイオデバイス)の創生: これまでにも、酵素を利用したグルコースセンサー (Updike SJ and Hicks GP, Nature 214: 986-988, 1967) や、嗅覚受容体タンパクを利用した嗅覚センサー (Misawa N et al., Proc Natl Acad Sci USA 107: 15340-15344, 2010)、アクトミオシンを用いて再構成された ATP 駆動型バイオモータ (Sheetz MP and Spudich JA, Nature 303:31-35, 1983) など、生体分子を再構成して実現したバイオデバイスは数多く報告されている。これらデバイスにおいては、社会実装という点においては、その用途や耐久性、広く使われるための一般性などに課題が残っており、10 年スパンで実現するかどうかは未知数である。しかしながら、これらの問題を化学の視点から解決しようという研究(生体膜分子を模した合成高分子等に代表される研究)も盛んに行われており、上述(1)の技術の進展とともに、生体膜分子の構造と機能がより詳細に解明され、それらの研究への還元が軌道に乗ってくれば、加速度的に実用化が進むことが期待されると考えられる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的の達成状況: 本研究は、大きく分けて4つの研究テーマから計画していたが、当初計画に一つ大きな問題があったと考えている。上述テーマ A「高密度 prestin 脂質膜の作製」が、残りの 3 テーマの実施に不可欠であるにも関わらず、研究が進捗しなかった場合の代替策の検討が不十分であった。そのために全体計画の進捗遅れに繋がってしまった。自身にとって初めての大型研究であり、研究者としての未熟さを痛感している。しかし、さきがけ研究(特に領域会議)を通じ、多くの研究者から有益な示唆をいただけたことが幸いし、研究計画の見直しを行うことで、一部のテーマについては遅れを取り戻すことができた。

研究実施体制及び研究費執行状況: 本さきがけ研究へは、ちょうど現所属に着任した年の 10 月に採択いただき、当初は人的にも物的にも、研究スペース的にも全くゼロからのスタートであった。しかし本研究によって、学内に研究スペースを確保することができ、当研究室で実施する基本的な実験に必要な設備を一通り整備することができたため、なんとか研究室を立ち上げることができた。その間、大学院生 6 名、学部生 14 名(今年度卒業見込みを含む)が卒業しており、私自身はもちろん、これら学生の成長に多大なご支援をいただいた。また来年度には、1 名の学生が博士後期課程へ進学予定である。この場を借りて深く御礼申し上げます。ま

た、本さきがけ研究を通じて、新たに複数の研究者と共同研究を始めることができた。今後、これらの活動を活発化させ、成果を出すよう継続して共同研究をすすめる予定である。研究費執行状況については、一部研究計画の進捗を加速するための前倒執行及び実験補助者の雇用計画変更があったが、その他はほぼ当初の計画通りに執行した。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む):我々が提案した内耳に発現するモータータンパク質 prestin に関して、これまでにその構造は解明されておらず、そのためその動作メカニズムも不明である。また、これを利用したナノバイオデバイスについても開発は実現されていない。我々の研究グループでは、90年代から内耳モータータンパク質の探索を行ってきており、2000年にノースウェスタン大(米国)の Peter Dallos らのグループによって遺伝子同定では先を越されてしまったものの、現在も一貫して prestin の構造と機能に関する研究に取り組んでいる。本さきがけ研究で我々の prestin に関する知見はさらに深まったと実感しており、これを基盤に構造・機能解析及びデバイス化に向けた研究に取り組んでいきたい。もしこれが実現すれば、prestine の 100 kHz にまで及ぶ驚異的に高い応答性と人工圧電素子に比べ 1 万倍の高い電気-機械変換効率(～20 nm/mV)、ATP 非依存で細胞膜電位をエネルギー源とするなどのユニークな特性の制御・利用が可能となり、これまでにない高感度変位センサーや高精度アクチュエーター、高効率ダイナモなどのナノバイオデバイスの創出が射程に入る。これらの取り組みは、デバイス開発にとどまらず、音受容メカニズムの全容解明に向けた重要なマイルストーンとなることは間違いなく、医学の面からも、prestine 変異による遺伝性難聴や音響外傷性難聴、さらには喫緊の課題である老人性難聴のメカニズム解明とその治療法開発に貢献できると期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究は内耳の膜タンパク質プレスティンモデルに、生体膜分子の構造と機能の力学的手法による解析技術の確立とこれを応用した新規デバイス開発を目的とした。当初計画に不十分な点があり前者達成に遅れが生じたが、領域会議での指摘を受け最終年度には達成に至った。後者の達成率は低いものの、要素技術の開発に見通しがついてきており今後の進展を期待する。

膜タンパク質の構造と機能を力学的視点から解き明かすための分子技術が本研究を通じて見えつつある。世界的にも挑戦的な研究分野であり、今後本研究成果を基盤に、より強力な研究実施体制を構築し、目標をしっかりと見据えて達成してほしい。

本さきがけ研究の成果が認められ、日本機械学会部門賞の受賞や、機械工学分野以外での招待講演および共同研究の機会を得ており、研究者としての飛躍につながった。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Aithal V, Kei J, Driscoll C, Murakoshi M, Wada H. Predictive accuracy of sweep frequency impedance technology in identifying conductive conditions in newborns. <i>J Am Acad Audiol</i> , in press.
2. Murakoshi M, Sano K, Kanka N, Yoshida N, Hamanishi S, Kiyokawa H, Kakuta R, Aithal S, Aithal V, Kei J, Driscoll C, Swanston A, Mtsutani S, Kobayashi T, Wada H. Analysis by sweep frequency impedance (SFI) meter of 226-Hz and 1,000-Hz tympanometries in neonates. <i>Procedia IUTAM</i> , in press.
3. Aithal V, Kei J, Driscoll C, Murakoshi M, Wada H. Effects of ear canal static pressure on the dynamic behaviour of outer and middle ear in newborns. <i>Int J Pediatr Otorhinolaryngol</i> 82 :64–72, 2016.
4. Murakoshi M, Suzuki S, Wada H. All three rows of outer hair cells are required for cochlear amplification. <i>BioMed Res Int</i> : Article ID 727434 , 1–12, 2015.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 第 25 回瀬口賞, 日本機械学会バイオエンジニアリング部門, 2017 年 1 月 19 日.
2. 村越道生. 聴覚の工学的考察とその応用. 一般社団法人近畿化学協会エレクトロニクス部門平成 28 年度第 3 回研究会「広がりを見せる多様なナノサイズ材料とその応用最前線」, 2017 年 1 月 16 日, 大阪.
3. Murakoshi M, Wada H. Topology of prestin expressed in the CHO cell membrane –atomic force microscopy study–. The 2015 Summer Biomechanics, Bioengineering and Biotransport Conference (SB3C 2015), June 17–20, 2015, Snowbird, Utah, USA.
4. 村越道生. 次世代型補聴システムのためのリアルタイム聴覚シミュレータの開発 (Development of a real-time simulator of the human auditory system for next-generation hearing aid system). 精密工学会秋季大会関連事業「元気の出る新技術講演会—産学・産産連携への集い」, 2014 年 9 月 16 日, 鳥取.
5. Murakoshi M, Suzuki S, Wada H. Coordinated movement of three rows of outer hair cells is essential for cochlear amplification. The 12th International Mechanics of Hearing Workshop, June 23–29, 2014, Sounio, Greece.