

研究シーズ探索プログラム 研究課題別評価書

1. 研究課題名

原子間力顕微鏡を利用した力学的生物界面のナノスケール現象解析

2. 研究代表者

荻野 千秋（神戸大学 工学研究科 准教授）

3. 研究シーズ探索成果の概要

本研究グループでは AFM を用いた生細胞表層レセプター分子ーリガンド分子間相互作用の検出、AFM を用いた新規 DNA アプタマー選抜法の開発について研究を行った。AFM を用い、生細胞表層レセプター分子ーリガンド分子間相互作用の検出において酵母を用いて酵母表層のレセプター Ste2 とそのリガンドである α -factor との間に働く分子間相互作用の検出を目指し、研究を行った。その結果、酵母の形態変化が確認され、Ste2p が存在する酵母において、 α -factor を修飾したカンチレバーと酵母表面との間に働く特異的な力が検出された。

DNA アプタマーの選抜について、標的分子をトロンビン及び L-バリンとし研究を行った結果、目的のアプタマーの選抜に成功し、さらに既存のアプタマーの選抜法と比較して非常に効率的にアプタマーの取得が可能であることが確認された。

4. 研究シーズ探索のねらい

本研究では、生体分子と細胞の分子間相互作用を解析するために、原子間力顕微鏡(AFM)を適用する。AFM のカンチレバー先端への生体分子修飾し、「7 回膜貫通型受容体認識機能性核酸分子の探索」を行い、生体分子によるナノスケール(細胞空間)における機能創発の制御を目指す。更には、これまでの「リガンドによる細胞全体への一様な刺激」では捉えることが出来なかった、新しい情報伝達機構に関して解析を目指す。

5. 研究シーズ探索の方法と成果

5.1 方法

AFM を用いた細胞表層レセプターーリガンド間相互作用の評価系の構築

細胞の表面には様々な蛋白質が存在すると言われ、疾病の治療薬の標的となるレセプターや、抗体も多数存在することが報告されている。しかし細胞上に着目したとき、そこに存在する蛋白質の明確な分布や、細胞表面に存在する蛋白質に働く生体分子間相互作用についてはまだはっきりと分かっていない。そのため細胞表面の蛋白質へ薬剤等を局所的にアプローチさせ、それともなう細胞応答や生体分子間の相互作用を明らかにすることは、今後細胞表面の蛋白質分布の検出や、薬剤の細胞に対する影響の評価への応用が可能と考えられている。そ

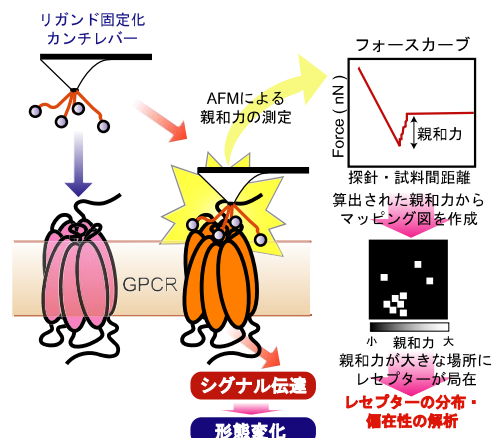


Fig.1 AFM を用いた細胞表層レセプターーリガンド間相互作用の評価系

ここで本研究では、原子間力顕微鏡(AFM)を用いた細胞表面レセプター-リガンド間相互作用及び細胞応答の検出系の構築を目的とし研究を行った(Fig. 1)。本研究では細胞として最も扱いやすく、遺伝子組み換え方法が確立されている酵母を用い、酵母をアガロースにより固定化しAFMにより、Ste2p と α -factor との相互作用及び細胞応答の検出系の構築を目指した。

AFMを用いたDNA アプタマーの選抜系の構築

分子認識能を持つ機能性核酸分子アプタマーは SELEX 法と呼ばれる手法を用いて選抜される。しかしながら、既存の SELEX 法ではアプタマーの取得に時間がかかりさらに標的分子に対する結合力を操作する事ができないなどの欠点がある。そこで本研究では、AFMを用いたDNA アプタマーの選抜法の開発を目的とし研究を行っている(Fig. 2)。具体的には試料(金基盤)にアビジンを介してDNAを固定化し、カンチレバー表面に標的分子を固定化し、AFMに適応する。カンチレバーと試料が接触した際、一本鎖 DNA と標的分子との間で結合が起こりその結合力が非常に強いものであればその一本鎖 DNA は試料表面から離れ、カンチレバーに吊り上げられると考えられる。カンチレバーに残ったDNAを回収し、PCRにより増幅し、次のラウンドに用いる。この SELEX 法を用いれば、標的分子に対し結合親和力の強いDNA アプタマーの取得が可能となると考えられる。本研究ではアミノ酸の一種である L-バリンを標的分子として実験を行った。

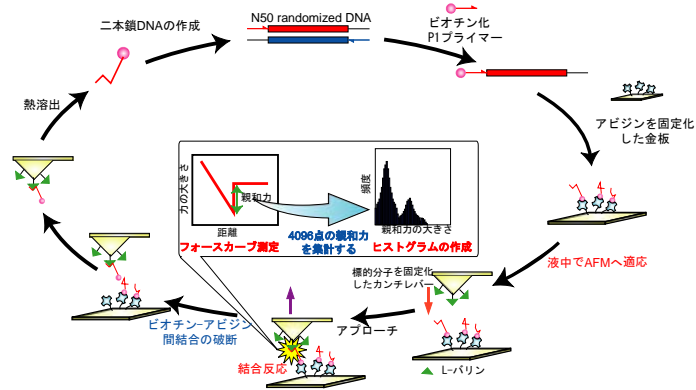


Fig.2 AFMを用いたDNA アプタマーの選抜

AFMを用いた新規バイオセンシング技術の開発

本研究グループではこれまで AFM を用いて生体分子間相互作用の測定を可能としてきた。この知見を活かしAFMを用いたアプタマーによるタンパク質の検出・定量方法の開発を行っている。カンチレバーにトロンビンを修飾し、試料表面にトロンビン結合性アプタマー(TBA)を固定化する。TBA を固定化した試料表面に各濃度に調整したトロンビン溶液を添加し結合させた後、AFMにより親和力を測定する。試料へ添加されたトロンビン濃度が大きいほど親和力が低く、小さいほど親和力が高くなると考えられる(Fig. 3)。

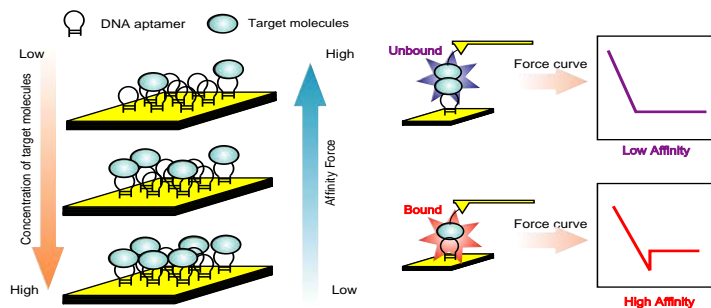


Fig.3 AFMを用いた新規バイオセンシング技術

5. 2 成果

AFMを用いた細胞表面レセプター-リガンド間相互作用の評価系の構築

酵母を失活させることなく AFM により観察を可能にする必要がある。そこで本研究では酵母をアガロースで固定化を行い、培養を行ったところ酵母の増殖を確認が確認された。また酵母が持つGPCRの一種 Ste2pに作用するリガンド α -factor を酵母を固定化したアガロースに添加しAFMにより観察したところ、酵母の形態変化を捉えることにも成功している。このことからアガロースで

酵母を固定化することにより、失活させることなくAFMでの観察可能になったと考えられる。またこれまで α -factor のカンチレバーへの固定化や、アビジン分子を介することで DNA のカンチレバーへの固定化も可能となっている。

これらの成果を基に、AFM を用いて酵母表層に存在する GPCR の一種 Ste2p と α -factor との相互作用の力学的な検出をめざし研究を行った。その結果、 α -factor を修飾したカンチレバーにより、酵母表層を走査を行った場合 991 pN の平均親和力が検出された(Fig. 4-a)。これは α -factor が未修飾のカンチレバーで走査した場合(118 pN)と比較して明らかに大きなものである(Fig. 4-b)。以上のことから酵母表層に提示されたレセプター分子とカンチレバーに修飾されたリガンドとの間に働く親和力を検出することが可能になったと考えられる。

さらに形態変化を指標にカンチレバー上に固定化したリガンドと酵母表層上のレセプター分子が結合した際の細胞応答の観察を試みた。本プロジェクトでは酵母表層に提示したヒト由来のレセプターである SSTR に対し結合性のみならず作動性を有するアプタマーの取得が最終目標の一つである。したがって、結合親和力のみならずリガンド-レセプター間の結合の際の細胞応答性を同時に測定できる系の開発は作動性を有する DNA アプタマーの取得に役立つと考えられる。

実験はリガンドである α -factor を修飾したカンチレバーを用い、酵母を固定化したアガロース試料上 20 μ m 四方を走査した。結果として走査し始めて 60 min 後、酵母から突起が発生し、形状に変化が見られた(Fig. 5)。このことからリガンドを修飾したカンチレバーにより、結合親和力のみならずリガンド-レセプター間の結合の際の細胞応答性を同時に測定できる系の構築に成功したと考えられる。

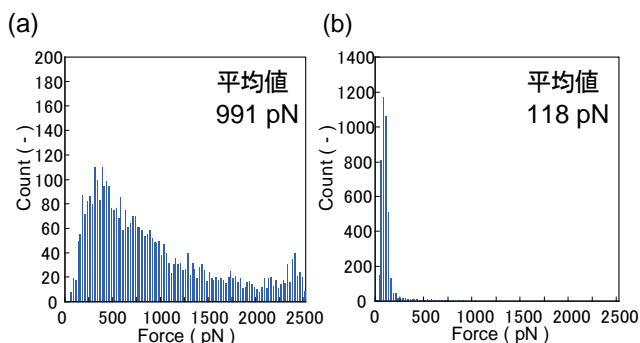


Fig 4 Ste2- α -factor 間の親和力のヒストグラム
(a) α -factor を修飾したカンチレバー
(b) α -factor 未修飾のカンチレバー

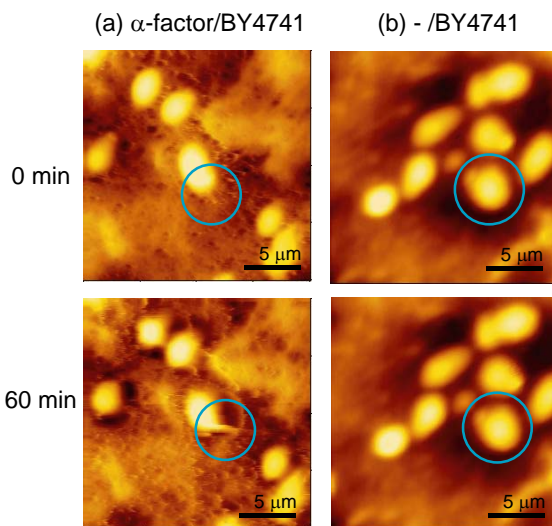


Fig. 5 AFM による酵母の形態変化の観察

AFM を用いた DNA アプタマーの選抜系の構築

本研究で提案する AFM を用いる SELEX 法の概念図を Fig. 2 に示す。本研究ではアミノ酸の一種 L-バリンを標的分子として、このサイクルを 3 回繰り返し、ラウンドを重ねるごとに一本鎖 DNA 群とバリンとの間に働く結合親和力の上昇が確認された(Fig. 6)。このことから AFM-SELEX サイクルを繰り返すたびに L-バリンに対し、結合性を示す DNA アプタマーの存在量がぞうかしていることが示唆された。また既存の SELEX 法においてはサイクルを 8-10 サイクル繰り返す必要があったが、AFM-SELEX 法では僅か 3 サイクルで大きな結合性を有する DNA アプタマーが取得されている。このことから AFM-SELEX は既存の SELEX 法と比較して効率的にアプタマーの取得が可能になることが示唆された。

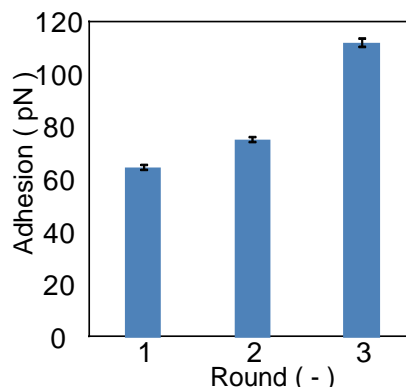
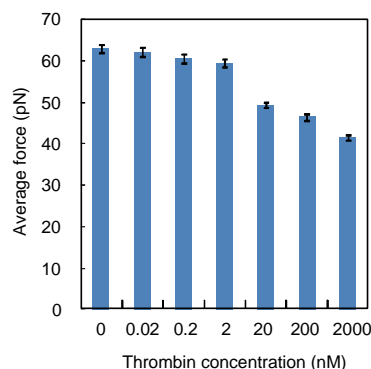


Fig. 6 Round 毎の平均親和力

この技術が確立されれば、GPCR の一種 SSTR のそれぞれのサブタイプに特異的なアプタマーの取得が可能となると考えられる。

AFM を用いた新規バイオセンシング技術の開発

本研究課題ではトロンビンと結合する DNA アプタマー(TBA)をセンサ素子として AFM を用いた新規バイオセンシング技術の開発を目標として研究を行った。TBA を固定化した金基盤にトロンビン濃度を 200 pM-2 μ M に調製し滴下した。その後、トロンビンを修飾したカンチレバーを用い、AFM にて親和力の測定を行ったところ、トロンビンの濃度依存的に平均親和力の減少が確認された(Fig. 7)。このことから AFM を用いてタンパク質分子のセンシングが行うことが可能であることが示唆された。この技術が確立されれば、細胞表面のレセプターの存在量や密度の同定が可能となると考えられる。



6. 自己評価

本研究課題では最終目標である AFM-SELEX による酵母表面 SSTR に対する DNA アプタマーの選抜には至らなかった。しかしながら本研究では酵母表面レセプターとリガンド間の相互作用の検出及びリガンド作動性の測定系の構築に成功した。新規薬剤などを評価する際、従来の評価系では不可能であった結合性の有無を評価とその薬剤による細胞の応答性を同時に計測可能な評価系を構築できたと考えられる。この成果により、新規薬剤を迅速に評価することが可能となると考えている。

また本研究において行った AFM を用いた DNA アプタマーの選抜は従来の手法と比較して繰り返すサイクル数を大幅に短縮でき、さらに取得されるアプタマーの親和性を高めることができることが確認された。DNA アプタマーを抗体の代替分子として応用する研究が行われているが、現在アプタマーの標的分子に対する親和性の低さがネックとなっている。したがって、本研究で提案した AFM-SELEX によりこれらの問題点が解消され、アプタマーの診断薬、治療薬への応用が可能となり、医療の進歩に大きく貢献するものと確信している。

現在、AFM はナノレベルでの画像を取得する顕微鏡としてのみならず、分子間相互作用の測定ツールとしても注目されている。本研究での成果は AFM のこれらの応用法にさらに分子探索のツールとしての可能性を切り開くことができたと考えている。

7. PO の見解

本研究は原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、生体分子修飾カンチレバーを用いて GPCR 認識核酸の検索、GPCR の局所刺激、細胞内シグナル誘導の制御などをはかるもので、カンチレバーと酵母表面との間に働く特異的な力を検出している。また、DNA アプタマーの選抜に応用して、効率的にアプタマーの取得が可能であることを確認している。しかしながら細胞内情報の制御については十分な成果を得ることができなかった。

生きた状態での培地中の細胞観察を精度よくできれば生物学、医学分野での広い応用が考えられる。リガンド、GPCR ともに二量体、多量体を作って作用する場合があります。GPCR の一部のみを刺激する本手法の生理学的意味は検討が必要であろう。結晶体以外に AFM を応用し、生体関連分子、細胞等の観察への道を拓いたことは評価できる。しかし、酵母等が動きうることから精密測定のためには、計測経験を積み、ノウハウの蓄積が必要とされる。

8. 研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

Miyachi, Y., Shimizu, N., Ogino, C. and Kondo, A.: Selection of DNA aptamers using atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res.*, doi:10.1093/nar/gkp1101 (2010)

Miyachi, Y., Ogino, C., Hayase, T. and Kondo, A.: Selection of DNA aptamers against amino acid using atomic force microscopy. In preparation.

Miyachi, Y., Ogino, C., Amino, T. and Kondo, A.: Development of AFM-biosensor using DNA aptamer. In preparation.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3)口頭発表

①学会

国内 1 件, 海外 2 件

○学会発表

学会名: 化学工学会 第 42 回秋季大会

講演題目: 力学的指標による生細胞表面におけるリガンド-受容体の相互作用解析

発表者: 野坂 和輝、宮地 佑典、石井 純、荻野 千秋、近藤 昭彦

発表日: 2010年9月6日

場所: 同志社大学 今出川キャンパス

学会名: The 16th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC2010)

講演題目: Selection of DNA aptamers using atomic force microscopy

発表者: C. Ogino, Y. Miyachi, K. Nosaka, T. Hayase, A. Kondo

発表日: 2010 年 11 月 21 日

場所: 元智大学 (Yuan Ze University: 台湾桃園県中レキ市)

学会名: 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem)

講演題目: Selection of DNA aptamers using atomic force microscopy

発表者: C. Ogino, Y. Miyachi, K. Nosaka, T. Hayase, A. Kondo

発表日: 2010 年 12 月 18 日

場所: Kamehameha Halls II and III (Convention Center, Hawaii)

②その他

国内 0 件, 海外 0 件

(4)その他の成果(受賞、著書、招待講演、特記事項等)

なし