生体分子情報 システムの 研究方法論の構築

■提案代表者

宇理須恒雄 生命錯体分子科学研究領域生体分子情報研究部門 教授

■共同研究者

寬 東北大学医学部生命科学研究科脳機能解析分野 教授 八尾 田中 基彦 核融合科学研究所連携研究推進センター 准教授 牧村 哲也 筑波大学大学院数理物質科学研究科 准教授

森口 裕之 東京大学新領域創成科学研究科 助教

森垣 憲一 産業技術総合研究所関西センター 研究員 産業技術総合研究所関西センター 特別研究員 岡崎 敬

安藤あゆみ 大阪大学大学院工学研究科原子分子イオン制御理工学センター 特任研究員

永廣 武士 東北大学電気通信研究所 研究生

はじめに

人類と病原体との戦いの歴史を見て みると分子科学の観点からも大変興味 深いことに気がつく。たとえばペスト については、この病気の病原体は大き 1~3ミクロンほどの細菌で、日本人の 北里柴三郎とフランスのアレキサンド ル・エルサンがほぼ同時期(1894年) に発見したとされている。この時期は 沢山の病原菌が発見された時代で、い わゆる近代細菌学が誕生した医学史に おける黄金期の時期です。その後19世 紀末から20世紀の初期にかけ細菌とは 異なる分子の性質を持った病原体の存 在が人類を悩ますようになり、"生命を 持った感染性の液体"と呼び、この病 原体が分子であると考え、分子が細胞 に感染して増殖すると多くの研究者が 主張していた。1935年にアメリカの ウエンデル・スタンレーがタバコモザ イクウイルスの結晶化に成功し、この 結晶が感染能を持っていることを示し、 化学物質のように結晶化できる生物の 存在がはじめて示された。

このような病原体の大きさという 観点で最近の難病と呼ばれる疾患を見 てみると興味深いことに気づく。アル ツハイマー、狂牛病などの神経変性疾 患はまだ、その原因が不明だが、病気

と密接に関連している物質は明らかに なってきている。それぞれ、アミロイ ドベータ (Aβ) およびプリオンとよば れるタンパク質で、ウイルスと異なり、 DNAもRNAももっておらず、100% 物質で、生体内に入ると病原体のよう な振る舞いをする物質です。病原体と 呼んでよいかもまだはっきりしていな いのだが、これらの生体内での分子構 造や他のタンパク質や生体膜との相互 作用を詳細に調べることがこれらの難 病を克服する上での一歩であることは 間違いなく、私はこのような研究は、 分子科学者の責任であり、分子科学の 新しい学術領域を開く活動であると考 え、本研究課題に取り組んでいる。し かし、対象はこれまで分子科学者があ まり取り組んだことの無い、生きた脳 や生体組織なので、新しい研究方法の 開発から着手する必要があると考え本 研究課題を提案した。このような研究 を進める上で、生命科学や医学分野の 情報は極めて重要である。この観点に 立ったとき、年間1万報近い研究報告 のあるアルツハイマー病は研究対象と して極めて有利で、我々はアルツハイ マー病に標的をしぼって研究を進めて いる。研究はまだ途上であるが、この2 年間の研究成果を以下に報告する。

1. 平面脂質二重膜と Aβ との相 互作用

Aβの凝集がアルツハイマー病の特徴 とされ、最終的には神経細胞死に至る こと。および、神経細胞膜の成分であ るganglioside GM1 (GM1) がAβ の凝集を促進することが言われている ことから、神経細胞膜の主要成分であ る、GM1、sphingomyeline (SM)、 cholesterol (Chol) からなる脂質二 重膜を形成し、Aβとの相互作用を原子 間力顕微鏡 (AFM) および蛍光顕微鏡 (FM) により調べた。

(1) マイカ表面におけるGM1/SM/ Chol平面脂質二重膜のユニークな相分離

Gm1/SM/Chol (20:40:40 mol%) からなる平面脂質二重膜をSiO2基板お よびマイカ基板表面にベシクルフュー ジョン法により形成しAFMで調べた (図1)。マイカ表面の場合、ユニーク なドメイン構造が形成後12時間ほど すると現れ、且つその構造が時間とと もに変化することが観察された(図1 a,b,c)。他方SiO2基板の場合は均一な 安定な二重膜が形成される。多くの場 合第二層目の二重膜が形成される(図1 d)。

(2) Amyloid beta-40の高速凝集 反応を誘起するganglioside GM1

形成したGM1/SM/Chol平面脂質 二重膜とA β 40との相互作用を原子間 力顕微鏡により観察し、マイカ基板表面の場合とSiO2基板表面の場合とで様子が全く異なることを発見した。マイカ表面の場合、A β 40の異常な早い凝集反応が観察され成長方向のそろったフィブリル状の凝集体が形成される(図2 α ,c)。他方、SiO2表面の場合は、凝集速度は遅く、凝集体もグロビュラーな形状である(図2 α ,c)。

Aβの凝集反応はアルツハイマー病の 重要な特徴と考えられていること、ま たGM1分子はシナプス細胞膜表面の カベオレなどの情報伝達において重要 な働きをする細胞膜ドメインの主要成 分脂質分子であり、色々な神経変性疾 患への関与が予想されることから、上 記の発見が重要な意味を持つ可能性が あると考え、このような凝集反応がな ぜ現れるのか、それに関与する分子の 分子構造はどのようかなどの問題を解 明する研究を進めた。

生理的条件の溶液下で、生体膜に近い各種の組成についてマイカ表面とSiO2表面で平面脂質二重膜を形成して調べた結果。マイカ表面ではいずれの組成においてもユニークな相分離が観測される。一方SiO2表面では相分離は観測されない。蛍光色素を標識したNBD-SMを1%添加して、FRAPで調べた結果、いずれの表面でも形成される二重膜は液体相である事がわかった(図3 e,f)。

また、NBD-SM以外に、GM1を認識するコレラトキシンBに蛍光標識したAlexa-555-CTBXの緩衝溶液を二重膜形成後添加しこれらの蛍光標識の空間分布を調べた結果、マイカ表面での相分離については、三角形のドメインの内部はSMリッチ、外側はGM1リッ

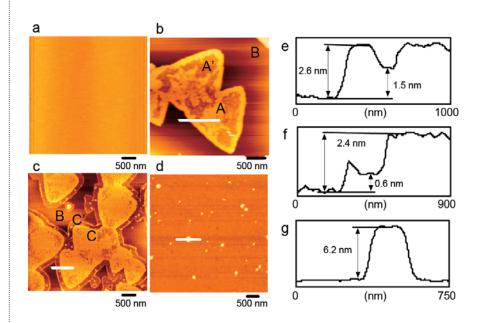


図1 マイカおよびSiO2基板表面に形成された GM1/SM/Chol (20:40:40 mol%) 平面脂質二重膜のAFM観察像。a,b,c: マイカ表面、形成直後(a), 12 時間後(b), 36時間後(c)。d: SiO2基板表面。形成直後。時間とともに変化しない。e,f,g: それぞれd,e,f内の白線に沿った高さプロファイル。

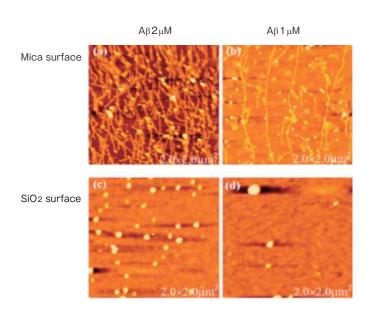


図2 マイカおよびSiO2基板表面に形成したGM1/SM/Chol (20:40:40 mol%) 平面脂質二重膜にAβ40の緩衝溶液を添加し、37℃、37時間保温した後常温でAFM観察。

チである事が解った (図3 α-d)。Aβ の凝集は三角形のドメインの外側 GM1 リッチの領域で起こる。また、この三 角形の外側の領域の二重膜の厚みは GM1リッチであるにもかかわらず、4 nm程度と非常に薄い。マイカ表面に ついて、二重膜のドメイン構造とAB の凝集との関係を調べた結果、三角形 のドメイン内では凝集は起こらないが、 ドメイン外では顕著な凝集が起こる事 がわかった (図4 a,b,c,d)。GM1/ Chok (50:50 mol%) の二重膜につい てもマイカ表面で形成すると、他の組 成の場合と同様に高速にフィブリル状 の凝集体が形成される(図4e)。

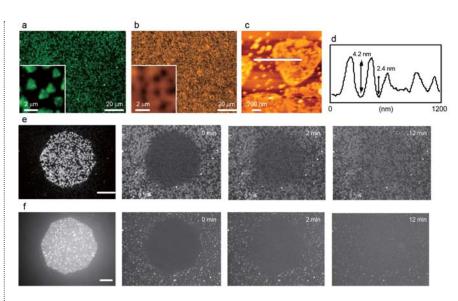


図3 マイカ表面の場合について蛍光色素を標識したSMを1%添加して形成した脂 質二重膜について蛍光顕微鏡で観察(a)また、脂質二重膜形成後、 GM1を 認識することが知られている、コレラトキシンBに蛍光色素(Alexa555)を 標識し、二重膜に添加し蛍光顕微鏡観察(b)とAFM観察(c,d)を行なった。 さらに、これら二重膜の流動性をしらべるためのFRAP観察をおこなった(e,f)。

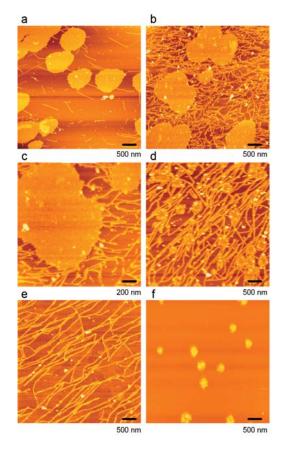


図4 マイカ表面の脂質二重膜にΑβ40を添加し、凝集の時間経過、組成依存性を 調べた。マイカ表面にGM1/SM/Chol(20:40:40 mol%) 二重膜を形成し、 三角形のドメイン形成後に2 μmのAβ40緩衝液溶液を添加し、37 °C 1時間 後 (a)、12時間後 (b)、(b) を2.5倍に拡大 (c)、37時間後 (d)。さらに 組成をかえGM1/Chol (50:50 mol%) で形成した脂質二重膜に形成後37 ${\mathbb C}$ 12時間加熱後に2 μm の $A\beta$ 40緩衝液溶液を添加(e)。(f) は比較のため、 GM1/Chol (50:50 mol%) の形成直後に測定したもの。

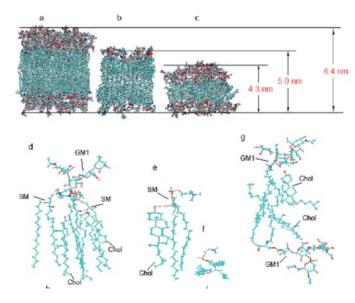


図5 SiO2表面上の(a) GM1/SM/Chol(20:40:40 mol%)、(b) GM1/SM(50:50 mol%)、安定な平面脂質二重膜の構造。(c)マイカ表面上のGM1/Chol(50:50 mol%)の安定な脂質二重膜の構造。d,e,fはそれぞれ、a,b,c の局所的に拡大 した部分の分子構造。

(3) 計算機シミュレーションにより脂質二重膜及びGM1の分子構造を決定

(a) SiO表面、マイカ表面のSMリッチの領域とGM1リッチの領域それぞれの脂質二重膜の分子構造を計算機シミュレーションにより解明した。計算はNAMDにより10 ns行ない安定な平衡状態がえられた場合に正しい構造とするという判定基準によった。

(b) マイカ表面と脂質二重膜の相互作用 マイカ表面は、ヘキサゴナルな対称 性を有し、この中央のくぼみに水分子 が吸着した表面構造を有することが報告されている。この吸着水分子と脂質 二重膜が相互作用すると考えてモデルを製作しシミュレーション計算を行ない、この表面との相互作用により三角形のドメインの外側では、ユニークな、interdigitatd disorder phase (図5g) が形成されることがわかった。Αβの凝集を異常に加速しているのは此の構造をしたGM1と考えられる。

2 神経細胞ネットワーク素子形成にむけた進展

シナプスでの情報伝達にかかわる 細胞膜表面反応の研究など分子科学研究にむいたツール開発として神経細胞 ネットワーク素子の開発を進めた。細胞外マトリックスを印刷する技術を開発し、このパターンにそって神経細胞がネットワークを形成する技術を確立した。まずマイクロコンタクトプリンテイングによる細胞外マトリックスパタン形成技術を開発した(図7)。

形成したECMパタン、およびこのパタンにそって培養により形成した神経細胞のパタンを図8に示す。

昨年度開発に成功した培養型イオ ンチャンネルバイオセンサーのSi基板

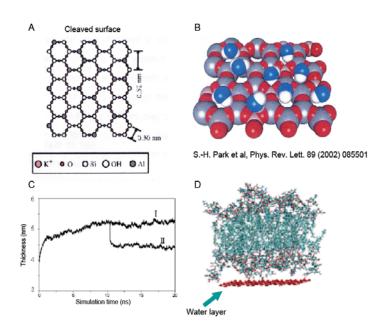


図6 マイカ表面の構造(A,B)と、この表面と脂質二重膜との相互作用を考慮したモデル(D)とこれにより計算した場合の二重膜の膜厚の計算時間依存性(C)。相互作用を考慮するとすぐに膜厚が低下する。

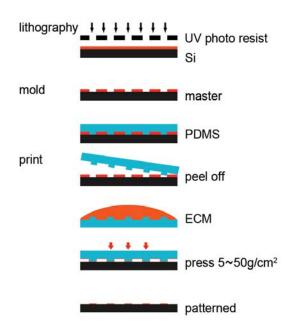


図7 開発したマイクロコンタクトプリンテイングのプロトコル。これにより、細胞が生きて行く上で必要な細胞外マトリックス (ECM) を所望のパタンで印刷できる

表面に上記の技術を用いて細胞外マト リックス (フィブロネクチン) のパタ ンニングを行ない、これによりTRPV1 を発現したHEK293細胞(統合バイオ 富永研提供) を配列し、カプサイシン をリガンドとするホールセルチャンネ ル電流を検出することに成功し、細胞 外マトリックスのパターンニングがバ イオセンサーの安定な形成に有効であ ることを確認した(図9)。

さらに、これまでのリガンドゲート 型のイオンチャンネルに替えて光受容 体型、即ち光励起によりチャンネルを 開く、チャンネルロドプシンを発現し た細胞、C2C12を培養型イオンチャ ンネルバイオセンサーに導入し、半導 体ダイオード照射(波長480 nm)に よりホールセルチャンネル電流を観測 することに成功し、今後神経細胞ネッ トワーク形成において、活動電位発生 にこの光励起を応用する手がかりを得 た (図10)。

3 今後の計画

平面脂質二重膜とAβの反応を原子 間力顕微鏡と計算機シミュレーション で解析し分子科学の立場でアルツハイ マー発症機構解明を目指す研究と、こ の結果を、神経細胞ネッットワーク素 子を形成しその特性を測定し、上記の 人工細胞膜表面反応の研究成果を、生 きた神経細胞膜表面反応の研究に適応 し、アルツハイマー発症機構解明とい う具体的な目標のもとに新しい医療分 子科学とでも言える新学術領域の開発 を目指す研究をこれまで進めてきた。 最近のアルツハイマー研究を概観する と、本研究の重要性を強く感ずる。

この1-2年のアルツハイマーに関す る研究成果を見ると、遺伝子の異常に よりAβの凝集が一応説明のできる家 族性の疾患から、解明の遅れている後

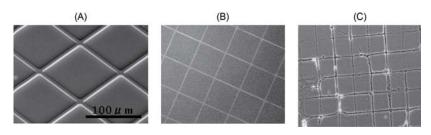


図8(A) PDMSスタンプ、(B) PDMSのパタンを用いてSi表面上に細胞外マトリッ クスを印刷、(C) 印刷した細胞外マトリックスパタンによってマウス神経細胞 のネットワークを形成。

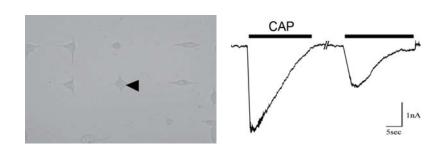


図9 マイクロコンタクトプリンテイングによりイオンチャンネルバイオセンサー基 板表面の所定のところにフィブロネクチンの格子パタンを印刷し、この上で TRPV1チャンネルを発現したHEK293細胞を培養し、この細胞をセンサーの微 細貫通孔におくことに成功。さらにこれによりカプサイシンをリガンドとする ホールセル電流を検出。

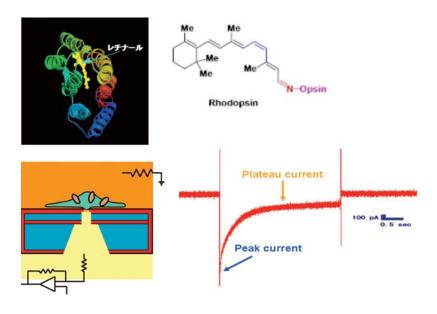


図10 チャンネルロドプシンを発現したC2C12細胞を培養型イオンチャンネルバイ オセンサーに搭載し、LEDからの480nm光を照射し、イオンチャンネル電流 を検出。

発性の疾患の研究に興味の中心が移行 しつつ有る。その中での注目すべき報 告をあげると、(i) 水溶性のAβダイ マーなどのオリゴマーが強い毒性を示 し、アルツハイマー発症の原因となっ ている、(ii) アミロイド前駆体タンパ ク (APP) とそれを分解してAβを形成 するβセクレターゼとが通常異なるド メインに存在し、コレステロールの増 大によりこのドメインの融合(micro domain switching) 起こり、APPと βセクレターゼの相互作用が誘起され Aβ濃度が増大する、(iii) アルツハイ マー病患者のendosomeに異常な肥 大が見られ、Aβの凝集との関連を調べ る必要が有る、などである。これらの 多くの注目される研究報告にも Aβオリ ゴマーがどのようにして形成されるの か? どのような反応機構で神経細胞 毒性を発現するのか? などの化学者 から見て単純な基本的なことが不明の ままである。このような事態にある原

因は、細胞膜表面反応についての分子 科学あるいは表面科学的アプローチが 全く欠如していることによるものであ ると考える。必然か偶然か解らないが、 シナプスの信号伝達に直接関わる(iii) の問題、即ちendocytosisについては、 GM1 が局在するカベオレが関与してい るだけでなく、一般的にこのような細 胞膜の陥入現象のような曲率の変化に はGM1やコレステロールが密接に関 係していると推定されるので、最近我々 が発見したGM1の分子構造とAβの凝 集の密接な関係は、同様な視点で生き た神経細胞のシナプス細胞膜表面反応 を表面科学の視点で調べることの重要 性を示すと考える。この考えに基づい て、平成21年度は以下の研究を進める。

(A) $A\beta$ の凝集を加速すると予想される GM1の分子構造が判明したことを受け、GM1- $A\beta$ の相互作用を計算機シミュレーションにより解析する。これにより、水溶性 $A\beta$ オリゴマーの形成

機構が判明するのではないかと考える。

(B) マイカ表面のGM1/SM/Cholの平面脂質二重膜の系において、凍結乾燥によりドメイン構造が保持されることを見い、これを飛行時間型の高空間分解能SIMSによりGM1の分布が測定できる見通しを得たことから(以下この手法を凍結乾燥SIMS分析とよぶ)、GM1/SM/Cholの平面脂質二重膜の系での凍結乾燥SIMS解析を進め特性を把握した後、生きた神経細胞ネットワークの系のシナプス部位に着目して、凍結乾燥SIMSによる細胞膜表面の解析技術を開発し、endocytosiおよびendosomeの異常を表面科学の立場で解析することを試みる。

(C) 我々が世界に先駆けて開発した培養型イオンチャンネルバイオセンサーをベースとする神経細胞ネットワーク素子を完成させ、Aβの凝集やendosomeの異常がシナプス信号伝達にどのように影響するかを調べる。

参考文献

- [1] Md. Abu Sayed, Hidetaka Uno, Kensuke Harada, Keiichi Tanaka, Yong-Hoon Kim, Yuichiro Nakaoki, Koji Okumura, Ryugo Tero and Tsuneo Urisu, "New Infrared reflection absorption spectroscopy (IRRAS) system for observation of solid-solution interface biomaterials" *Chem. Phys. Lett.* in printing.
- [2] Ryugo Tero, Toru Ujihara and Tsuneo Urisu, "Lipid Bilayer Membrane with Atomic Step Structure: Supported Bilayer on a Step-and-Terrace TiO₂(100) Surface" *Langmuir*, 24 (2008) 11567-11576.
- [3] Toshifumi Asano and Tsuneo Urisu, "Noise Property of Incubation Type Planar Ion Channel Biosensor", Jpn. J. Appl. Phys. accepted.
- [4] Takashi Okazaki, Takehiko Inaba, Yoshiro Tatsu, Ryugo Tero, Tsuneo Urisu, and Kenichi Morigaki, "Polymerized lipid bilayers on solid substrate: Morphologies and obstruction of lateral diffusion", *Langmuir* in printing.
- [5] Yanli Mao, Ryugo Tero, Yosuke Imai, Tyuji Hoshino, Tsuneo Urisu, "The morphology of GM1_x/SM_{0.6-x}/Chol_{0.4} planar bilayers supported on SiO₂ surfaces", *Chem. Phys. Lett.* 460 (2008) 289-294.
- [6] Tsuneo Urisu, Toshifumi Asano, Zhenlong Zhang, Hidetaka Uno, Ryugo Tero, Han Junkyu, Isoda Hiroko, Yusuke Arima, Hiroo Iwata, Koji Shibasaki, Makoto Tominaga, "Incubation type Si-based planer ion channel biosensor", Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391 (2008) 2703-2709.
- [7] Toshifumi Asano, Hidetaka Uno, <u>Koji Shibasaki</u>, <u>Makoto Tominaga</u> and Tsuneo Urisu" Development of Cell Culture Type Planar Ion-Channel Biosensor" Transaction of Materials Research Society 33 (2008) 767-770.