

マイクロチップが実現した脂質輸送体の1分子計測

渡邊 力也

1. はじめに

近年、半導体製造技術により、生体分子と親和性の高いマイクロチップが開発され、それらを基盤とした革新的なバイオ分析技術が実現してきている。そのなかでも、生体膜を実装したマイクロチップ（生体膜マイクロチップ）は、膜タンパク質の超高感度な機能解析を実現するだけでなく、ナノポアDNAシークエンサーなどの革新的なバイオ分析装置の基盤技術として、創薬・医療分野での産業応用の道筋を拓きつつある^{1,2)}。現在、生体膜チップを利用したバイオ分析における最大の課題は、分析対象が“親水性分子”を基質とした反応に制限されることであるが、その問題点を解決すべく、“疎水性分子”（たとえば、脂質や薬剤）への汎用性の拡張を目指した技術開発が盛んに行われている。今回は、近年我々が開発した新しい“人工生体膜チップ”に焦点をあて、それらを基盤とした膜タンパク質による脂質輸送の1分子計測について紹介する。

2. 膜タンパク質の機能分析の現状

我々の細胞は生体膜によって覆われており、その膜上には、多様な膜タンパク質が存在する。膜タンパク質は、機能の多様性だけでなく、その生理的な重要性から、実に市販薬の約70%が膜タンパク質を標的として開発されている³⁾。そのため、膜タンパク質の機能分析による作動機構の理解は、生物学だけでなく、薬医学的観点からも近年重要性がますます高まっている。膜タンパク質は、機能に基づいて、主として、“受容体”、“酵素”、“膜輸送体”に分類することができる。本稿では、膜タンパク質のなかでも分

子の輸送を担う“膜輸送体”の機能分析に焦点を絞り、その現状を紹介する。

膜輸送体は、特に注目される薬剤標的であり、その輸送活性を高感度かつ定量的に計測することで、作動機構を正確に理解する試みがなされている。これまでに、バイオインフォマティクスなどを利用して、多数の膜輸送体が遺伝学的に推定されてきたが、実験的に機能が計測・同定されているものは全体の10%以下である。これは二つの理由に起因している。一つは、従来の機能計測手法の感度が低かったこと、もう一つは、計測手法が細胞に立脚したものであり、夾雑物の影響から定量計測が困難だったためである。ゆえに、生理的重要性の高さにもかかわらず、膜輸送体の作動機構に関しては不明な点が多い。

この膜輸送体研究の問題を解決すべく、筆者らは、近年、均一な大きさの人工生体膜を形成・集積化した“人工生体膜チップ”を開発した⁴⁾（図1、詳細は後述する）。このチップを利用すると、イオンなどの親水性分子の輸送に関して、検出感度が従来法の約100万倍向上するため、1分子単位での輸送計測が可能となる。しかし、疎水性分子の輸送に関しては、技術的な障壁から、依然として高感度化・定量化を実現することはきわめて困難であった。

膜タンパク質が輸送する疎水性分子の代表として“リン脂質”があげられる。リン脂質は生体膜の主成分であり、生体膜を構成する2層構造に異なる組成で存在すること（非対称性）が知られている。この脂質組成の非対称性の維持・崩壊は、輸送様式の異なる多様な脂質輸送体（例：flippase, floppase, scramblase）の働きにより実現しており、また、さまざまな生理機能に深く関与している（図2）。たとえば、リン脂質の一種であるホスファチジルセリン（PS）は、通常、生体膜中で非対称に存在しているが、外部のシグナルに応答して脂質輸送体が活性化すると、その輸送によりPSの非対称性は崩壊する⁵⁾。この非対称性の崩壊に伴い、アポトーシスを起こした細胞では、自らが死んでいるというシグナルを外部に発信し、また、血小板では、血液の凝固を促進する。これら生理機能に関わる脂質輸送体に対する我々の理解を促進するためには、現状の技術障壁を打破すべく、疎水性分子の輸送を高感度かつ定量的に計測できる新規技術の開発が急務とされていた。

理化学研究所・渡邊分子生理学研究室（〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1）

Microsystems allow single molecule analysis of phospholipid transport protein

Rikiya Watanabe (Molecular Physiology Laboratory, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910272

© 2019 公益社団法人日本生化学会

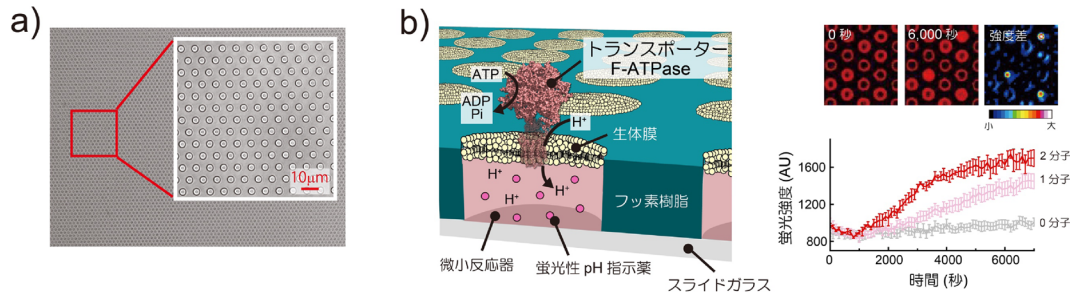


図1 筆者らが開発した人工生体膜チップと膜輸送体の1分子機能計測
(a)生体膜チップの外観, (b)一性性能動輸送体の輸送活性の1分子計測系の模式図と計測結果.

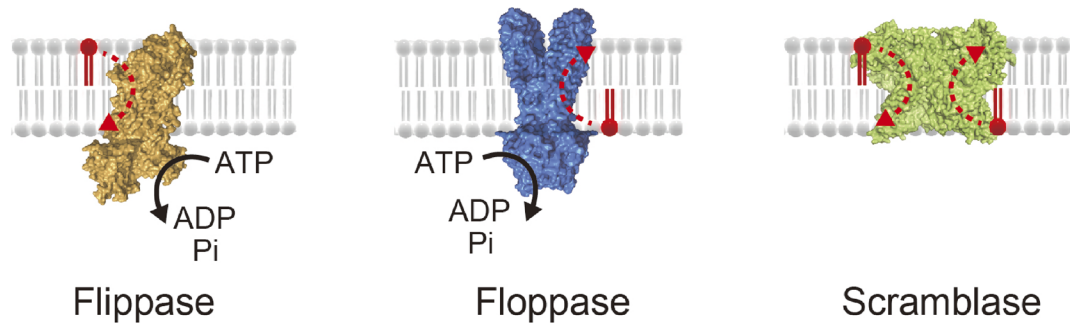


図2 生体膜内で脂質の輸送を担う輸送体
ATPの加水分解を駆動力とし, flippaseは外層から内層へ, floppaseは内層から外層へ方向性を持って脂質を輸送する. 一方, scramblaseは濃度勾配に応じて, 両方向に脂質を輸送する.

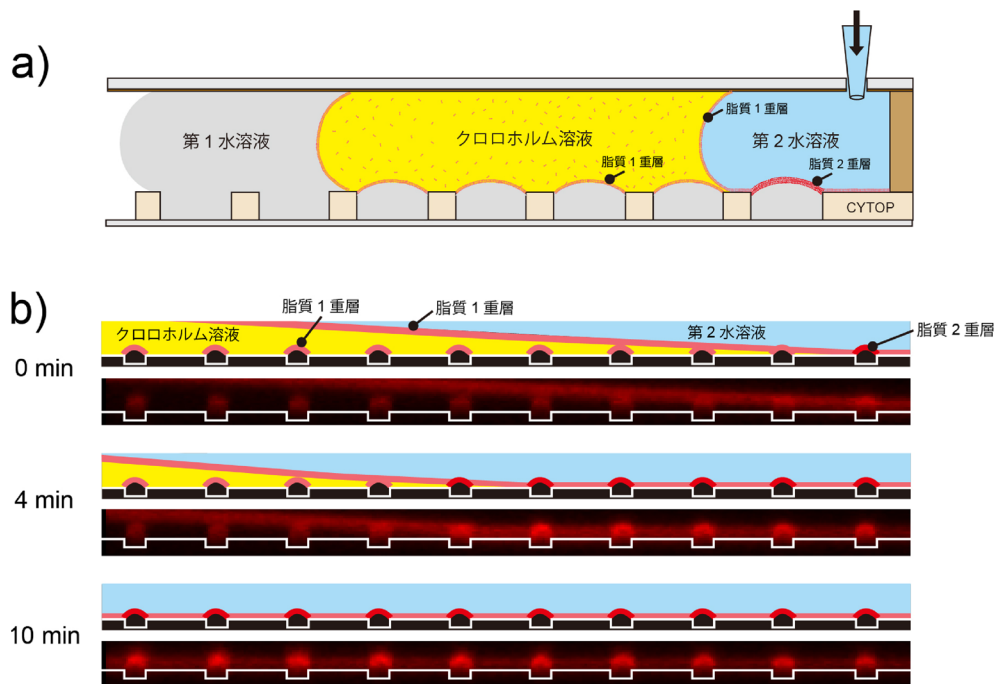


図3 マイクロチップ上での生体膜(脂質2重層)の形成
(a)チップの断面図と生体膜の形成原理. 二つの脂質1重層が試験管の開口部で重なり合うことで脂質2重層が形成される. (b)生体膜の形成過程の共焦点蛍光顕微鏡画像. 赤色: 蛍光脂質.

3. 非対称な脂質組成を持つ人工生体膜チップの開発

脂質輸送体による生体膜中の脂質の輸送を定量的に解析するためには、均一な大きさの人工生体膜を実装した計測システムが必要不可欠となる。従来、脂質の輸送を定量解析するためには、リボソームや平面膜などの人工生体膜システムが利用されてきたが、それらにおいては、均一な生体膜を量産することが技術的に非常に難しく、熟練した技術者を必要としていた。この問題点を解決すべく、近年、筆者らは、均一な大きさの人工生体膜を同時に約10万枚形成できる“人工生体膜チップ”を開発した^{4,6)}。このチップでは、開口部の直径が4 μm の均一な大きさの試験管が10万個集積化されており、生体膜の形成には溶媒膜法を用いる。具体的な生体膜の形成手順を図3aに示す。

まず、チップ上の流路に第1水溶液を導入し各試験管を満たす。次に、リン脂質を含むクロロホルム溶液を流路に導入する。各試験管は、壁と底面が親水的、開口部のみが疎水的であるため、クロロホルム溶液は試験管の内側に侵入することなく、開口部に水溶液との界面を形成する。この際、クロロホルム中のリン脂質は、水溶液との界面において自発的に集積し、脂質1重層を形成する。最後に、第2水溶液を流路に導入する。第2水溶液とクロロホルム溶液の界面には1枚の大きな脂質1重層が形成され、水溶液の導入に従ってチップの表面全体を覆う。そして、試験管の開口部では、クロロホルム溶液の導入時に形成された脂質1重層と、第2水溶液との界面に形成される脂質1重層とが、ファスナーを閉める要領で重なり合い、脂質2重層である生体膜が形成される(図3b)。以上のように、当該チップを利用すると、試験管の開口部に蓋をする形で生体膜が形成されるため、形成される生体膜の大きさは開口部の大きさ(直径4 μm の円形)と同じとなる。また、チップには約10万個の試験管が集積化しているため、約10万

枚の生体膜を同時形成することが可能となり、すなわち、当該技術を用いると、均一な大きさを持つ生体膜を簡便かつ高効率に形成することが可能となる。

また一方、脂質輸送体の輸送を計測するためには、生体内と同様に、内層と外層で異なる脂質組成(非対称性)を持つ人工生体膜を形成する必要がある。従来、脂質組成の非対称性を形成するためには、異なる2種類の脂質溶液を用いて個別に脂質1重層を形成し、それらを貼り合わせる必要があったが、その手法は非常に複雑であり、また脂質組成の非対称性が自発的に崩壊することから、脂質輸送の定量的な計測に利用することは困難であった。この問題点を解決すべく、筆者らは、上述の人工生体膜チップを基盤とし、光操作で脂質組成の非対称性を形成する新規技術を開発した⁶⁾。脂質組成の非対称性を形成する手順を図4aに示す。

まず、蛍光色素(TopFluor-TMRまたはNBD)が標識された脂質を用いて人工生体膜チップを作製する。上述のように、試験管の開口部には脂質2重層が、その他のチップの表面には脂質1重層が形成されるため、共焦点蛍光顕微鏡で観察すると2重層の蛍光強度は1重層の約2倍となる(図4b)。ちなみに、2重層の外層とチップ表面上の1重層は連結しているため、脂質は自由に側方拡散できる。次に、強力なレーザー光を照射して、試験管上の2重層に存在する蛍光脂質を退色させる。外層の脂質は側方拡散できるため、周囲の1重層に存在する退色していない蛍光脂質と混ざり合い、外層の蛍光強度は回復する。また、内層は周囲から孤立しているため蛍光強度は回復せず、2重層の蛍光強度は周囲の1重層とほぼ同じとなる(図4b)。すなわち、“退色していない蛍光脂質”が外層にのみ存在する非対称な人工生体膜を形成することが可能となる。ちなみに、従来法では、同一の生体膜に対して、脂質組成の非対称性を繰り返し形成することができなかったが、本手法を利用すると、光の照射によって繰り返し非対称性を形成す

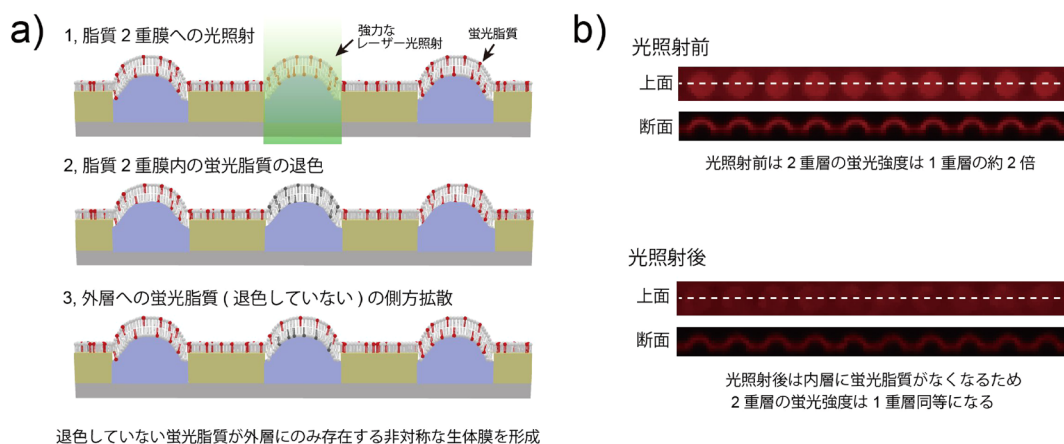


図4 脂質組成の非対称性の形成

(a)チップの断面図と脂質組成の非対称性の形成原理。(b)光照射前後の共焦点蛍光画像。赤色：蛍光脂質。

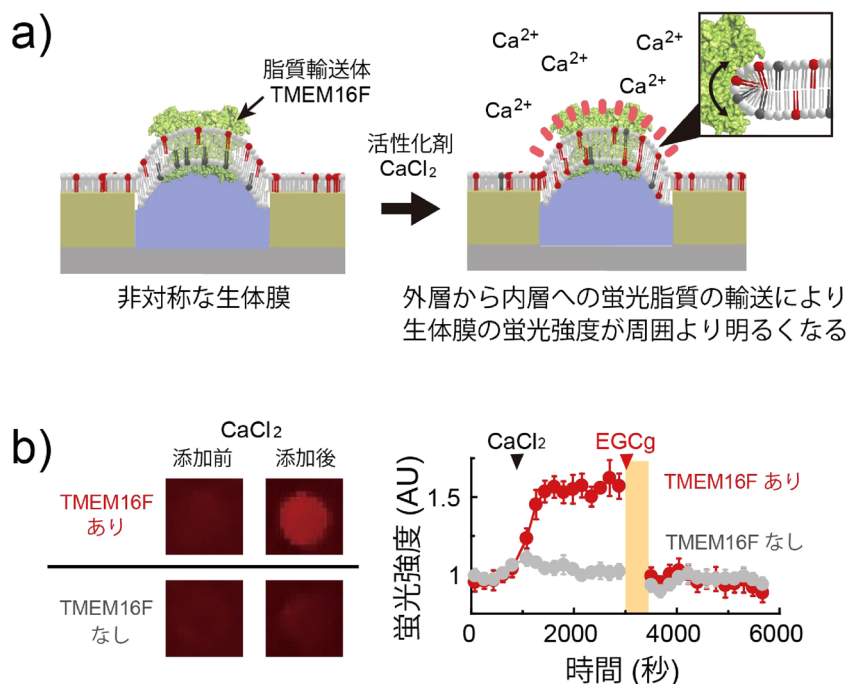


図5 脂質輸送体 (TMEM16F) の1分子機能計測

(a) 脂質輸送の計測原理. (b) CaCl_2 添加前後の共焦点蛍光画像および蛍光強度の経時変化.

ることが可能なため、その前後の機能解析や薬効の評価などに活用することができるのも利点であるといえる。

4. 脂質輸送体の1分子輸送計測

脂質輸送体の高感度機能分析の最たるものが、輸送機能の1分子計測である。以下に、上述の人工生体膜チップを利用した脂質輸送体の1分子計測を紹介する(図5a)。脂質輸送体の輸送機能の1分子計測では、チップ上の脂質2重層に対して、確率的に1個以下の脂質輸送体を組み込み、蛍光脂質を外層から内層へ輸送させる。輸送された脂質分子は微小な生体膜の内層に濃縮されるため、輸送体の働きが弱かったとしても、その濃度変化は顕著に増大し、それに追従して生体膜の蛍光強度が上昇する。すなわち、2重層の蛍光強度の検出から、1分子の脂質輸送体を標的として、その輸送機能を高感度かつ定量的に計測することができるようになる。

今回の脂質輸送計測には、Scramblaseの1種であるTMEM16Fを用いた。TMEM16Fは共同研究者である長田教授ら⁷⁾により2010年に同定された脂質輸送体であり、 Ca^{2+} との結合により活性化する性質を持つ。上述のチップに1分子のTMEM16Fを埋め込み、 CaCl_2 を添加し活性化させたところ、経時的に脂質2重層の蛍光強度が上昇した(図5b)。また、蛍光強度が上昇した2重層に対して、TMEM16Fの阻害剤であるEGCgを添加し、再度、光照射により脂質組成の非対称性を形成したところ、蛍光強度は

一定のまま上昇しなかった。このことから、蛍光強度の上昇として、TMEM16Fの脂質輸送活性を単分子単位で測定できることが判明した。ちなみに、従来の計測系では、脂質輸送の検出のため100分子以上の脂質輸送体を再構成する必要があったことを考えると、100倍以上の計測感度の向上を達成したといえる。

次に、脂質の輸送速度を定量するため、様々な面積の脂質2重層を利用して、蛍光強度の経時変化を観察した。図6aに示すとおり、脂質2重層の面積が大きくなるに従い、蛍光強度の上昇速度は遅くなるが、すべての条件で一定の値に収束した。ここで、脂質2重層の両方向に脂質を輸送する性質を鑑み、TMEM16Fによる脂質輸送を以下のシンプルな物理モデルで記述する。

$$[\text{Lipid}_{\text{out}}] \xrightleftharpoons[k]{k} [\text{Lipid}_{\text{in}}] \quad (1)$$

k は脂質の輸送速度、 $[\text{Lipid}_{\text{out}}]$ および $[\text{Lipid}_{\text{in}}]$ は、外層および内層における“退色していない蛍光脂質”の濃度を表す。ちなみに、脂質2重層の外層はチップ表面全体を覆っている脂質1重層と連結しているため、 $[\text{Lipid}_{\text{out}}]$ は一定であるとみなすことができる。ここで、蛍光脂質の濃度と蛍光強度の間に線形の関係があることを考慮に入れて式1を解くと、以下の脂質2重層における蛍光強度 (FI) の時間発展式を導くことができる。

$$FI = FI_{\text{out}} + FI_{\text{in}} \cdot [1 - \exp(-k \cdot t)] \quad (2)$$

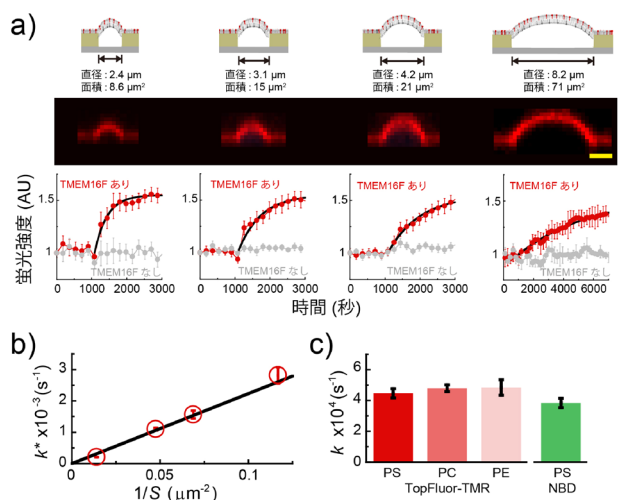


図6 脂質輸送速度の定量と脂質組成の影響評価
(a)生体膜の面積と蛍光強度の変化。(b)蛍光強度の上昇速度と生体膜の面積。(c)脂質輸送速度と蛍光脂質の種類。

$$k^* = \frac{k}{\eta} \cdot \frac{1}{S} \quad (3)$$

FI_{out} , FI_{in} は外層および内層の蛍光強度, S は脂質2重層の面積, η は1重層中の脂質密度 ($\sim 2.0 \times 10^6 / \mu\text{m}^2$) を表す。図6aに示すとおり, 蛍光強度の経時変化は式2でよく近似することができ, 近似パラメーターとして k^* を導出することができる。式3で予想されたとおり, k^* は脂質2重層の面積の逆数に比例しており (図6b), したがって, 直線近似の傾きから脂質の輸送速度を導出することができる。導出された脂質輸送速度は, 25°C で毎秒 4.5×10^4 個であり, 蛍光脂質をホスファチジルコリン (PC), ホスファチジルセリン (PS), ホスファチジリエタノールアミン (PE) に変化させても, ほぼ一定であった (図6c)。また, 脂質輸送速度の温度依存性を調べたところ, 16°C では毎秒 1.4×10^4 個, 35°C では毎秒 7.1×10^4 個であった。アレニウス解析により, 活性化自由エネルギー (ΔG^\ddagger) を求めたところ 47 kJ/mol であり, これは脂質2重層中での脂質の自発的な flip-flop ($\Delta G^\ddagger = \sim 100 \text{ kJ/mol}$) と比較して大幅に減少していることが判明した⁸⁾。以上のように, 今回開発された新規技術基盤により, 脂質輸送体の1分子機能計測から, 輸送速度の定量だけでなく, 脂質組成の依存性や温度依存性などのさまざまな物理化学パラメーターの決定への道筋が拓かれたといえる。

5. 人工生体膜チップの近未来像

筆者らは人工生体膜チップの開発により, 1分子の膜輸送体を標的とした高感度な生化学分析技術を確立しつつある。今回の研究により, 水溶性分子だけでなく疎水性分子の輸送計測への道筋も拓かれ, 今後の膜輸送体研究におい

て, 人工生体膜チップが高感度かつ定量的な生化学計測システムとして汎用されることが強く期待される。また, 一方, 人工生体膜チップ上に集積化した試験管を並列に利用することで, 将来的には, ハイスループットな生化学計測システムとしても活用されることが期待される。たとえば, 試験管を並列利用すれば, 1回の実験で, 基質濃度を変化させながら, さまざまな変異体の機能を同時に分析することができるため, わずかなアミノ酸配列の違いが機能に及ぼす影響などを網羅的に調べることができる。昨年, 筆者らは, チップ上の各試験管に異なる濃度の基質を定量的に封入する技術を確立し, ハイスループットな生化学計測の第一歩を踏み出した⁹⁾。今後は, さらなるハイスループット化を実現するとともに, 人工生体膜チップの汎用性の拡張および社会実装を目指したいと考えている。

謝辞

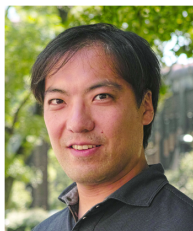
本研究は, 大阪大学長田重一教授, 櫻木崇晴氏, 京都大学鈴木淳教授との共同研究の成果であり, ここに感謝の意を表します。

文 献

- 1) Zagnoni, M. (2012) Miniaturised technologies for the development of artificial lipid bilayer systems. *Lab Chip*, **12**, 1026–1039.
- 2) Branton, D., Deamer, D.W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S.A., Butler, T., Di Ventra, M., Garaj, S., Hibbs, A., Huang, X., et al. (2008) The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat. Biotechnol.*, **26**, 1146–1153.
- 3) Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A.P., Donadi, R.S., Bologa, C.G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T.I., et al. (2017) A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **16**, 19–34.
- 4) Watanabe, R., Soga, N., Fujita, D., Tabata, K.V., Yamauchi, L., Hyeon Kim, S., Asanuma, D., Kamiya, M., Urano, Y., Suga, H., et al. (2014) Arrayed lipid bilayer chambers allow single-molecule analysis of membrane transporter activity. *Nat. Commun.*, **5**, 4519.
- 5) Nagata, S., Suzuki, J., Segawa, K., & Fujii, T. (2016) Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ.*, **23**, 952–961.
- 6) Watanabe, R., Sakuragi, T., Noji, H., & Nagata, S. (2018) Single-molecule analysis of phospholipid scrambling by TMEM16F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 3066–3071.
- 7) Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P.J., & Nagata, S. (2010) Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*, **468**, 834–838.
- 8) Anglin, T.C. & Conboy, J.C. (2009) Kinetics and thermodynamics of flip-flop in binary phospholipid membranes measured by sum-frequency vibrational spectroscopy. *Biochemistry*, **48**, 10220–10234.
- 9) Watanabe, R., Komatsu, T., Sakamoto, S., Urano, Y., & Noji, H. (2018) High-throughput single-molecule bioassay using micro-reactor arrays with a concentration gradient of target molecules. *Lab Chip*, **18**, 2849–2853.

著者寸描

●渡邊 力也（わたなべ りきや）



理化学研究所渡邊分子生理学研究室主任
研究員。博士（工学）。

■略歴 1981年静岡県生まれ。2009年
大阪大学大学院工学研究科博士課程修了
（博士（工学））。同年大阪大学産業科学
研究所博士研究員。11年東京大学大学院
工学系研究科助教。13年JSTさきがけ研
究員（兼任）。16年東京大学大学院工学
系研究科講師を経て現職。

■研究テーマと抱負 現在の研究テーマは、膜タンパク質のた
めの先端計測システムの開発と1分子生物物理研究。将来は、
生体分子の構造や機能の解析結果を参考に、人工分子機械や人
工細胞の設計・開発を行いたい。

■ウェブサイト <http://nanobio.riken.jp>

■趣味 自転車、スポーツ観戦、神社仏閣めぐり。