

HTS 創薬のための人工細胞膜チャンバ

Artificial Cell Membrane Chambers for High Throughput Drug Screening

*鈴木宏明, **田端和仁, **野地博行, *竹内昌治

*東京大学 生産技術研究所, **大阪大学 産業科学研究所

1. はじめに

ポストゲノム研究において、タンパク質の機能・構造解析は非常に大きな課題である。細胞膜などの生体膜はリン脂質の二重膜構造から成っているが、この膜中にあるタンパク質が細胞の外部から来る様々な刺激を受容し、信号伝達や、イオンや他の化学物質の輸送などを担っており、膜タンパク質と呼ばれている。これらは、その機能によってイオンチャンネル、ポンプ、トランスポーター、レセプターなどに分類され、膜の片側に埋まっているもの、表面に結合しているものや、貫通しているものなどがある。処方薬の6割以上が、膜タンパク質をターゲットとしており、医学・薬学の分野でもそれらの機能の解明が急ピッチで進められている。膜タンパク質は、通常の水溶性のタンパク質と異なり、脂質二重膜に組み込まれた状態で存在するため、取り扱いが非常に難しく、機能や構造などいまだ未解明の部分大きい。

膜タンパク質の機能を、顕微鏡下において分子レベルで調べるには、大きくわけて二つの方法がある。ひとつは、培養細胞に発現した膜タンパク質を直接調べる方法、もうひとつは、精製したタンパク質を人工的に再構成した脂質二重膜に組み込んで調べる方法である。現在の研究の主流は前者で、生細胞で働いている膜タンパク質を直接調べることができる反面、細胞膜には他の様々な膜タンパク質や細胞骨格などが存在するため、ひとつの膜タンパク質だけの情報を抽出するのが難しいという問題がある。後者は、膜タンパク質を抽出し再構成する作業が大きな難関であるが、一種類の膜タンパク質の機能を詳細に調べることができる。

我々の研究室では、従来、人工の脂質二重膜を、マイクロチップ上で効率よく再構成する方法について研究を行ってきた。例えば、図1に示すアクリルプラスチック製のマイクロチップでは、流路システム内に設けた直径100~150 μm の小孔に、人工脂質二重膜を9割以上の成功率で再構成することができる。従って、複数の脂質二重膜を同時に形成することも可能になってきた。この方法は、将来的には膜タンパク質の機能解析を高速化する技術に発展する可能性がある。なお、このチップを用いて、イオンチャンネルタンパク質一分子を通過するイオン電流を計測できることも確認している。

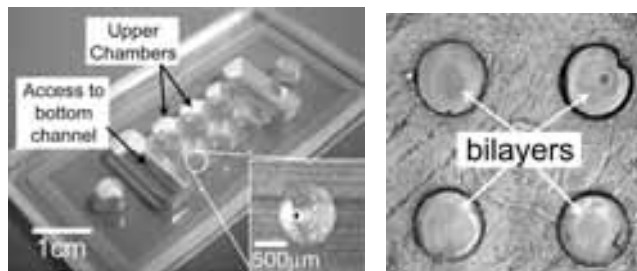


図1：(左)人工脂質二重膜再構成のためのアクリルプラスチック製マイクロチップ。(右)マイクロチップ内で4つ同時に再構成された人工脂質二重膜。

2. 本研究の概要

今回開発したシステムは、上記の人工脂質二重膜を用いて、膜輸送タンパク質（トランスポーター）の機能を定量的に計測するシステムである。例えば、イオンチャンネルやイオンポンプといった膜タンパク質群は、イオンを輸送するため、膜を通過する電流を計測することにより評価できる。しかし、他の薬剤や信号伝達物質を輸送する膜タンパク質（トランスポーター）の機能を、定量的かつ精密に評価するのに適した手法はなかった。

本研究では、図2に示すような実験系を構築した。まず、直径数~数十 μm 、深さ数 μm のマイクロチャンバレイをカバーガラス上に作製する。次に、別途再構成した脂質二重膜を、マイクロチャンバレイの上に押付ける（図2左）。これにより、体積がフェムトリットル(10^{-15}L)~ピコリットル(10^{-12}L)という非常に微小な空間が脂質二重膜によって蓋をされた状態が形成される。輸送膜タンパク質を脂質二重膜に再構成し、上側のチャンバに輸送される分子（輸送器質）を加えると、輸送基質は下側の微小チャンバ群に蓄積され、急速に濃度が上昇し、非常に微量な輸送量でも検出可能となる。例えば、蓄積される空間の体積が1 mL である実験系に比べると、この系では超微小空間(1 pL)に物質が蓄積し、濃度が急速に上昇するため、 10^9

倍以上の超高感度で輸送基質が検出可能となる。なお、本研究では、輸送基質の検出は主に蛍光イメージングを用いて行っている。

本システムのもうひとつの特徴は、図2左図にあるように、電気生理計測(膜電位・膜電流計測)も同時に行えることにある。このため、膜輸送とイオンやプロトンの輸送を共役して行っている膜タンパク質の性質も、イメージングと電気生理計測を同時に行うことにより、解明できる可能性もある。

図3に、パリレンという樹脂で製作したマイクロチャンバーアレイを、図4に、人工脂質二重膜をマイクロチャンバーアレイに押付けた様子を示す。

最後に、細胞膜に内径 1.5nm のポア（貫通穴）を形成する抗生物質である α -ヘモリジンを導入し、膜輸送計測のテスト評価を行った。 α -ヘモリジンを導入した場合、蛍光物質がマイクロチャンバーに蓄積されるのに伴って、蛍光輝度が上昇していく様子が確認できた。

今後は、本システムの検出感度などの詳細な評価を行うとともに、例えば抗がん剤を細胞内から排出するトランスポータなど、実用的にも重要度の高い膜タンパク質の評価への適用を考えている。将来的には、このような膜輸送タンパク質をターゲットとした薬剤のハイスループットスクリーニング（HTS）システムへの応用が期待される。

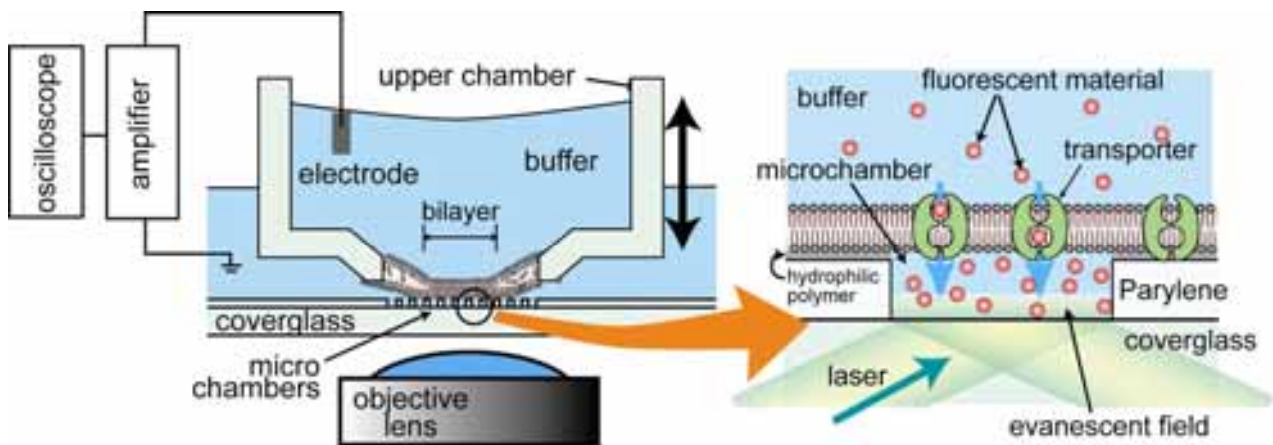


図2. 膜輸送計測のための脂質二重膜マイクロチャンバーアレイシステムの模式図

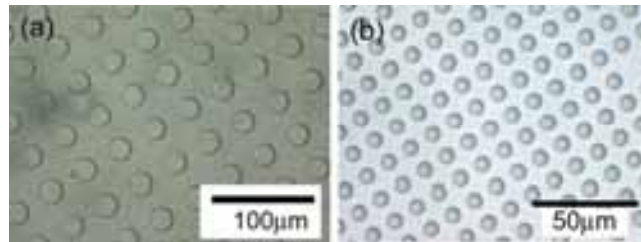


図3 : カバーガラス上に形成されたパリレン製マイクロチャンバーアレイ

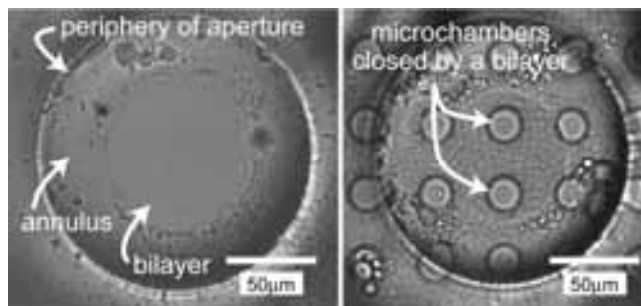


図4 : 人工脂質二重膜（左）を、マイクロチャンバーアレイに押付けた様子（右）。