

1S5p03 生体膜ダイナミクスを探る・操る・創る

○高木 昌宏, 濱田 勉, フェスタガード ムンデルランジ
(北陸先端院・マテ)
takagi@jaist.ac.jp

【緒言】生体膜の構成成分は、膜内で一様に分布していると信じられてきた(流体モザイクモデル)。近年、飽和脂質やコレステロールが豊富な秩序相からなるミクロドメイン(ラフト)の存在が示唆され、機能発現の場として注目を集めている(1)。細胞と同じ大きさの直径10 μ m以上の巨大リボソームを、飽和脂質と不飽和脂質、コレステロールを混合して作製すると、顕微鏡で直接ラフト様のドメインを観察することができる。ここでは、細胞サイズリボソームを用いた膜ダイナミクス(膜局在・膜挙動)研究と、生きた細胞を用いた研究の両方について紹介し、生体膜の構造変化と細胞シグナル伝達について論じてみたい。

【探る】生きている細胞(免疫系T細胞)を用いて、脂質ラフトの膜上での移動や融合などの「2次元的な動き」、膜内での小胞形成や輸送などの「3次元的な動き」と、免疫細胞の成熟化シグナルの関係についてしらべた。ヒト白血病性T細胞株 Jurkat を培養し、免疫信号の活性化に、レクチンのコンカナバリン(ConA)を、ラフトの標識には、コレラ毒素サブユニットB(CT-B)を、アクチンの標識には Rhodamine phalloidin を、細胞内カルシウムには、Fluoro-3を用い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。ConA刺激により、アクチンの再構成、脂質ラフトを中心とした小胞(endosome)の形成が認められた。小胞は、アクチンと共に移動し、細胞内部に集積(clustering)した。T細胞成熟化信号に於いて、ラフト依存小胞形成、小胞輸送が重要で、そこに細胞骨格が関与している新たなモデルを作成した。

【操る】細胞膜の動的構造変化によって起こる出芽やエンドサイトーシスは、信号伝達において重要である。我々は、ラフト領域を含有する巨大リボソームに対して、外部刺激を与えることで動的構造変化を起こすことができるかについて調べた。外部刺激(例えば浸透圧)を加え、ラフトドメインの出芽(エンドサイトーシス)を起こすことができた。出芽小胞形成過程には、「ドメイン陥入による出芽」と「ドメイン境界からの連続的小胞放出」の2パターンが存在した。リボソームのみでラフト依存型エンドサイトーシスの現象を再現できた(2)。

【創る】生体膜では、内層と外層の組成が著しく異なっている(非対称性)。我々は生体膜の非対称性を模倣したリボソームの形成実験を試みた。チャンパー中に水相とリン脂質が溶けたオイル相を乗せ、油水界面に単分子膜を作製する。その後、オイル相のリン脂質液滴を水油間の比重により油水界面の単分子膜介して水相へ移行させ、非対称リボソームを作製した(3,4)。さらに光による脂質構造の変化が膜ダイナミクスに与える影響について調べた。光異性化反応により非接触的に膜内の分子構造を変化させることで、分子間相互作用を変化させた。分子構造の違いが膜ゆらぎを変化させ、膜構造を円盤状から球状へと可逆的に引き起こさせること、そして、膜小胞形状の曲率安定性を理論モデルにより予測した(5)。この事は、分子レベルでの微細な脂質構造変化が、メソスコピックなレベルで大きな構造変化を生むことを示している。

【まとめ】人工膜系(巨大リボソーム)研究と、細胞信号伝達研究が歩み寄ること、膜のダイナミクスと細胞信号伝達の関係が、今後さらに解明され、あらたなテクノロジーのシーズともなうと考えている。

【参考文献】

- (1) Simons, K. and Ikonen, E.: Nature 387, 569-572 (1997)
- (2) Hamada, T. et al.: J. Phys. Chem. B, 111, 10853-10857 (2007)
- (3) Hamada, T. et al.: J. Phys. Chem. B, 112, 14678-14681 (2008)
- (4) 特願2008-110455 リボソーム及びその作製方法
- (5) Hamada, T. et al.: J. Am. Chem. Soc., 132, 10528-10532 (2010)

1S5p04 ペプチドアレイを用いた機能性分子の探索と食物アレルギー解析への展開

○大河内 美奈, 本多 裕之
(名大院・工・生物機能)
okochi@nubio.nagoya-u.ac.jp

ペプチドアレイは、DNAマイクロアレイとプロテインアレイの間をつなぐ大量解析が可能なバイオチップとして捉えることができ、抗体エпитープ解析をはじめ、主にタンパク質の機能解析ツールとして利用されている。DNAアレイでは、網羅解析により疾患関連遺伝子の取得は可能だが、タンパク質の発現には翻訳過程を経るため、必ずしも診断や創薬に結びつかないというジレンマがあった。一方、プロテインアレイは、タンパク質発現やその相互作用ネットワークを調べる上で有用であるが、その安定性や構造変化、検出感度の問題などがあり、2次元電気泳動/LC/MS/MSをもってしても難しい点も多い。ペプチドは、化学合成が可能であり、タンパク質のアミノ酸配列に基づいた機能の一端を保持する機能性分子である。タンパク質に比べて安定性が高く、タンパク質や細胞の機能制御に関与することから、機能性食品や創薬分野をはじめ、ナノ機能性材料としても注目されている。ペプチドアレイは従来から利用されてきたタンパク質の相互作用部位の解析をはじめ、機能性ペプチドの探索や臨床分野における利用などの展開が期待されている。

ペプチドは構成成分であるアミノ酸が20種類と多く、バリエーションが豊富なことから、有効な機能性ペプチドの探索は難しい。我々は、Fmoc固相合成を利用したOn chip spot合成法によりペプチドアレイを作製し、情報解析を組み合わせた目的指向的な探索法を開発し、細胞接着ペプチド、細胞分化誘導ペプチド、細胞死誘導ペプチドなどの細胞制御に関与するペプチドを探索した。また、アミラーゼ活性阻害ペプチドやコレステロール低下ペプチドなどの健康を志向したメタボ予防ペプチド、酸化亜鉛や銀などの金属ナノ粒子に特異的に結合するペプチドなどを見出した。

ペプチドアレイの臨床分野への応用に関しては、ミルクアレルギーに着目し、患者のアレルゲンエпитープ解析によるアレルギー診断法の開発について進めている。アレルギー疾患は近年増加の一途をたどり、食物アレルギーでは乳児の10%に達する。現行のタンパク質レベルでの抗原特異的IgE抗体検査では、偽陽性が多く回避すべき抗原の判断が難しいのが現状である。我々は、ミルク主要抗原であるalphaS1-カゼイン、alphaS2-カゼイン、beta-カゼイン、kappa-カゼイン、alpha-ラクトアルブミン、beta-ラクトグロブリンのアミノ酸配列に基づいたペプチドライブラリーをアレイ上に固定化したミルクペプチドアレイを作製した。愛知県内の病院を受診した患者について患者血清中のIgE及びIgG4エпитープを同時検出した結果、アレルギー患者において有意な抗体エпитープが複数見出され、ペプチドアレイを用いた各患者の抗体エпитープ解析が可能であることが示唆された。そこで、患者及び高IgE陰性検体におけるIgEとIgG4の結合パターンを比較した。IgG4は、IgEと同じ機構で産生される抗体であり、アレルギーを抑制する中和抗体として機能すると示唆されている。各ペプチドにおけるIgE結合量に対するIgG4結合量をプロットした結果、陽性検体ではIgE高結合、陰性検体ではIgG4高結合の傾向が見られ、従来のタンパク質レベルでのアレルギー検査法と比較し高い正診率が得られた。ペプチドアレイを臨床検査分野に利用することにより、エпитープ情報を詳細に得ることができ、新たな検査・治療法の確立が可能となるものと期待される。

Analysis, control and creation of cell membrane dynamics

○Masairo Takagi, 勉 濱田, Vestergaard Mun'delanj
(Sch. Mat. Sci., JAIST)

Peptide array-based screening of functional molecules and its application to analysis of food allergy

○Mina Okochi, Hiroyuki Honda
(Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words lipid, raft, dynamics

Key words peptide chip, allergy, allergen, microarray