

平成 29 年度 TIA 連携プログラム探索推進事業「かけはし」 調査研究報告書(公開版)

【研究題目】 「ナノニードルを用いた細胞内小胞の選択的単離」

【整理番号】 TK17-030

【代表機関】 国立研究開発法人物質・材料研究機構

【調査研究代表者(氏名、連絡先 TEL & Mail)】

山崎智彦、029-859-2345, Yamazaki.Tomohiko@nims.go.jp

【TIA 内連携機関：連携機関代表者】

国立研究開発法人産業技術総合研究所 中村 史

【TIA 外連携機関】

【報告書作成者】 山崎智彦

【報告書作成年月日】 平成 30 年 3 月 26 日

【連携推進(具体的な連携推進活動内容とその活動の効果等)】

ナノニードルを用いた細胞内小胞の選択的単離を行う技術開発を目指し、NIMS 山崎と産総研中村が発起人として研究会を平成 29 年 2 月に立ち上げた。その後、2 ヶ月毎に研究会を開催し、双方の進捗状況の確認と研究展開について打合せを行った。研究会は計 6 回開催し、平成 30 年 3 月に開催した第 6 回の研究会においては、本年度に得られた成果をもとに連携機関の拡大を視野に入れ、TIA 外機関の大学教員を招き、研究成果の報告ならびに来年度に向けた共同研究の可能性についての打合せを行った。

また、産総研中村は本研究内容について、連携機関の拡大を視野に入れ、TIA 内 1 機関ならびに TIA 外 2 機関とともに平成 29 年度 JST 未来社会創造事業の探索加速型・重点公募テーマに応募した。採択には至らなかったが、調査研究の発展への布石となる申請であった。

【調査研究内容(実験等中心に背景・課題と実行された課題解決の内容と結果)】

1. 研究背景・課題

本調査研究では生細胞からエンドソームやライソソームなどの小胞を選択的に細胞外に取り出すという世界初の技術を開発することを目標としている。

細胞内に存在する小胞であるエンドソームやライソソームはエンドサイトーシスなどによる細胞外因子の取り込み、細胞内での細胞外因子の分解・代謝、ならびに細胞質にある蛋白質やマイクロ RNA などの細胞内因子の細胞外への排出に関わっている細胞小器官である。近年、細胞間の情報伝達手段として癌の転移や診断において広く着目されているエクソソームは後期エンドソーム中に出芽することによって

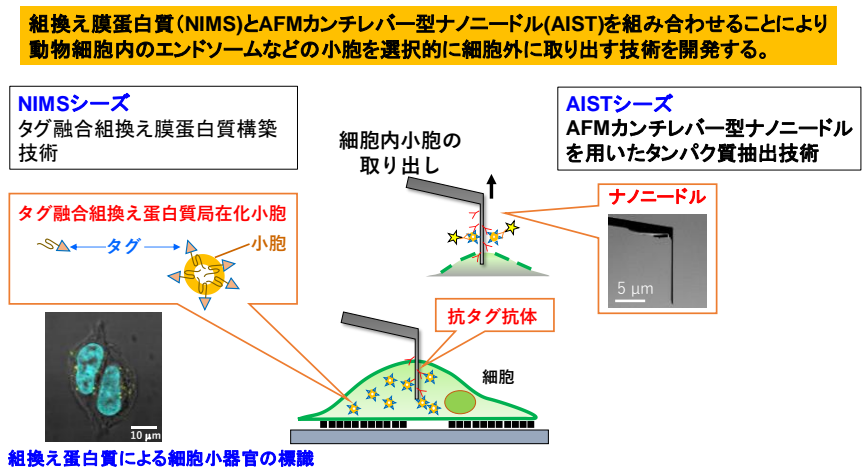


図1 ナノニードルを用いた細胞内小胞の選択的単離概要

形成される小胞内小胞であり、細胞内因子の細胞外への放出とそれに伴う細胞間での情報伝達においても小胞は重要な役割を果たしている。

しかしながら細胞内部に存在し機能する小胞の解析方法には細胞内に存在するがゆえの限界があり、現在は蛍光標識した抗体を用いた顕微鏡下での間接的な解析方法が主に用いられている。即ち小胞を直接取り出し、解析する技術は確立されていない。そこで、本調査研究では、細胞内の小胞を選択的に細胞外に取り出す技術の開発を行った。具体的には図1に示すように、小胞に特異的に発現している膜蛋白質の膜外ドメインにタグ配列を追加した組換え蛋白質を発現させ、タグ配列に対する抗体を固定した AFM カンチレバー型ナノニードルを用いて小胞を選択的に細胞内から釣り上げることを試みた。

①小胞に局在するタグ融合組換え蛋白質の構築

細胞内には複数種類の小胞が存在し、小胞の形成や小胞間の物質移動には膜タンパク質が関わっている。Ras-related protein (Rab 蛋白質) は、Ras スーパーファミリーに属する低分子量 G タンパク質であり、人では数十種類が報告されている。これらの Rab 蛋白質は特異的なメンブレントラフィックに参与しており、小胞の膜内に可逆的に結合する。いくつかの Rab 蛋白質は、エクソソームが内部に存在する多胞体に特異的に発現していることが知られている。NIMS 山崎は Rab 蛋白質とクラゲ由来緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合した蛋白質を発現するプラスミドベクターを構築し、動物細胞内で発現させることにより Rab 蛋白質局在小胞を特異的に標識することに成功した(図2)。

②Rab 蛋白質局在小胞の AFM カンチレバーを用いた生細胞からの選択的抽出

抗 GFP 抗体をナノニードル (直径 200 nm 長さ 15 μm) に固定化し、GFP-Rab 蛋白質を抗体で認識することにより、Rab 蛋白質が膜に埋め込まれた小胞を生細胞から抽出することを試みた。動物細胞としてヒト胎児腎細胞株である HEK293 細胞ならびに HeLa 細胞を用いて、NIMS で構築した GFP-Rab 蛋白質発現ベクターをトランスフェクションし、GFP-Rab 蛋白質が埋め込まれた小胞の単離を行い、GFP 由来の蛍光を指標に抽出を評価した。その結果、細胞に挿入、抜去したナノニードル表面に GFP-Rab 蛋白質を提示した小胞が単離できたことが示された。また取り出された小胞に対し後期エンドソーム・多包体のマーカー蛋白質の一つである抗 Syntaxin7 抗体を用いて免疫染色したところ、GFP と Syntaxin7 の共局在が確認されたことから、目的の小胞が単離できたことが示唆された。

【今後の活動予定】

1. 調査研究計画

GFP-Rab 蛋白質を介して AFM カンチレバーを用いて取り出された小胞の同定ならびに内部にある物質(エクソソーム、マイクロ RNA、蛋白質など)の同定を進めるとともに、小胞内のエクソソーム内に含有されている蛋白質やマイクロ RNA の検出技術を開発する。

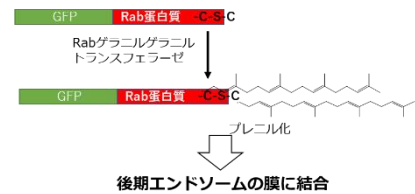
2. 連携推進

本調査研究を具体化するために、ラマン顕微鏡を用いた小胞脂質解析、微量マイクロ RNA 解析を専門としている TIA 内外の研究チームを加えた研究会を開催し、連携拡大を計画している。

3. 資金獲得の方針

本年度に引き続き、JST 戦略的創造研究推進事業、未来社会創造事業、JSPS 科学研究費助成事業に研究連携組織体としての応募を計画している。

A. GFP-Rab蛋白質の膜への局在機構



B. GFP-Rab蛋白質の小胞膜への局在観察

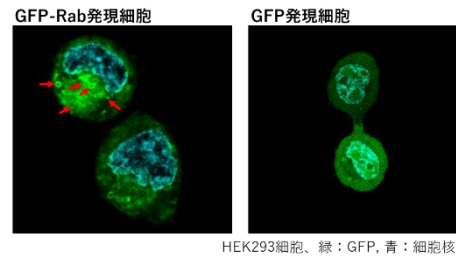


図2 GFP-Rab 組換え蛋白質の構築と細胞内での局在確認

GFP のみでは細胞質全体観察されるが、GFP-Rab 蛋白質は小胞に局在していることが示された。

以上