

疾患モデルマウスの血清とP450酵素との相互作用を利用した炎症性疾患診断法の開発

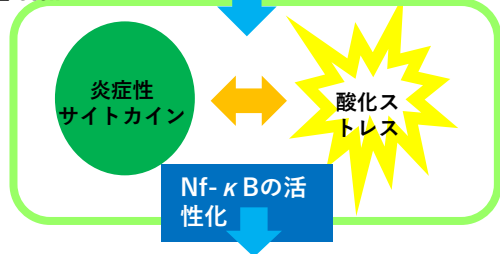
研究期間: 2018-2019年

研究背景・目的

炎症反応によるP450の調節 (例)

Zordoky et al. Curr. Drug Metab. 2009 ;10(2):164-78

炎症性腸疾患、関節リウマチ、がん、糖尿病、腎疾患、うつ病、心不全 etc..



P450の発現量・活性の調節

現在、糖尿病の診断には、多数の検査項目を実施する必要があることから、時間とコストを要する。また、一部には患者への負担が大きい検査手法も行われていることから、より簡便な診断手法が望まれている。

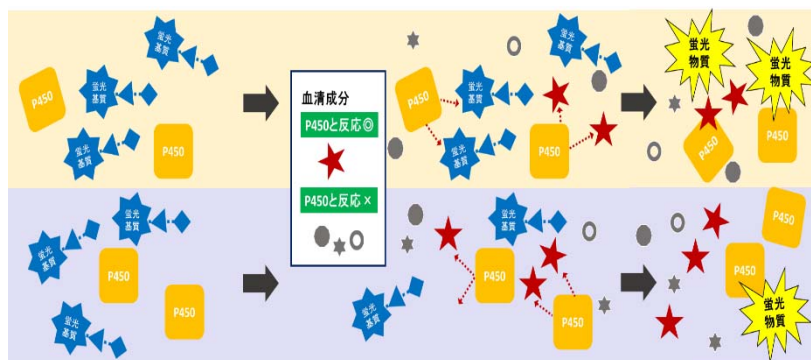
先の研究から、炎症性疾患時には疾患特異的にP450の発現量や酵素活性値が変化する事が知られている (Chaluvadi MR et al, 2008)。

そこで本研究では、ヒトP450酵素と蛍光性P450基質との反応系に対して、1型糖尿病モデルマウス血清を競合させることで、疾患特異的なバイオマーカーの開発を行った。

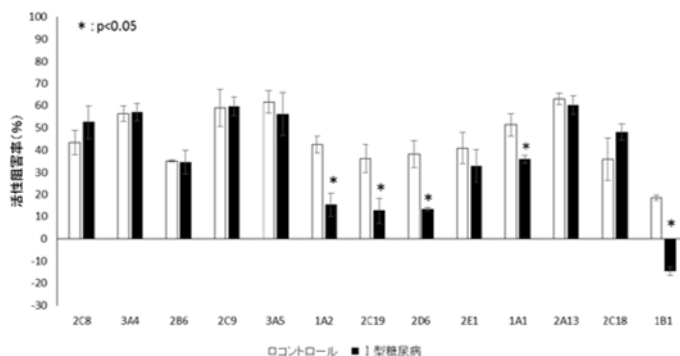
実験概要



1. P450によって代謝される、血清成分中のP450反応物質と蛍光基質が競合
2. 蛍光強度の測定により、血清成分中のP450反応物質を検出



結果と考察



健常マウスと疾患マウスでは、1型糖尿病発症時にCYP1A1において異なるP450蛍光パターンが見られた。よって、本手法が1型糖尿病のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

人工生体膜を利用した高感度生体分子計測技術

研究期間: 2009~2018年

研究背景・目的

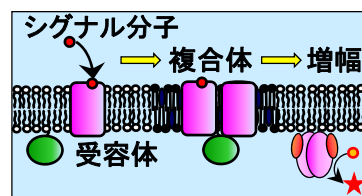
環境中や血液のように高濃度に夾雑分子が存在する条件下で特定の生体分子を高感度計測することは、困難である。我々は、生体膜を模倣した人工生体膜とナノ空間を組み合わせることで、高濃度に夾雑分子が存在する条件下でも生体分子を高感度で計測できる技術を開発した。将来的には、生理的条件下でも、個々の分子を計測し(1分子計測)、診断に利用することが可能になるものと期待される。

超高感度検出



カイコ: *Bombyx mori*

生体膜の情報伝達機構



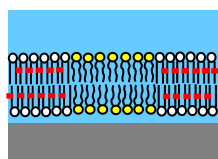
生体膜の特徴

- 流動性(分子の2次元拡散)
- 非特異的吸着の抑制

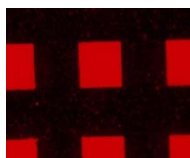
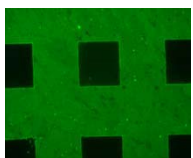
生体膜とナノ空間を組み合わせた新しい生体分子計測技術

実験概要

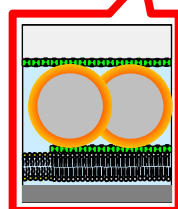
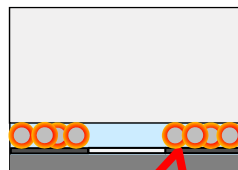
パターン化人工生体膜



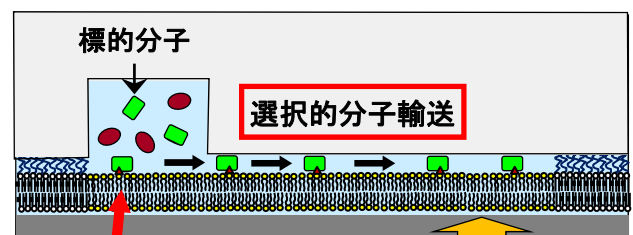
ポリマー脂質膜 生体脂質膜



厚さ数十ナノメートルの接着層を用いた、膜とPDMSの接合



ナノギャップ構造を用いた生体分子計測

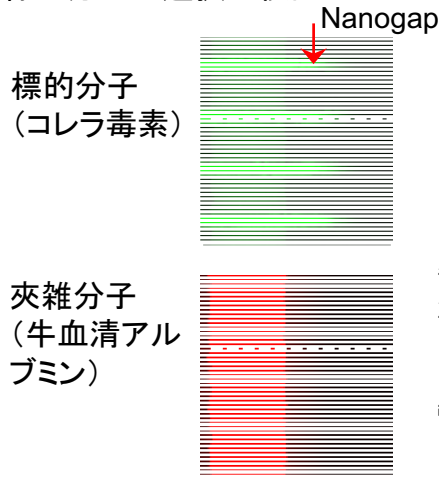


分子認識による選択的結合

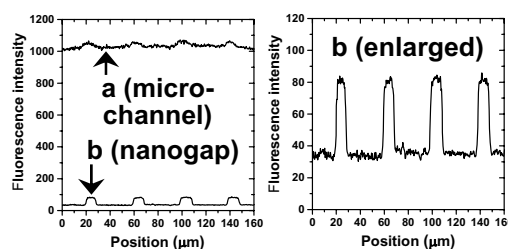
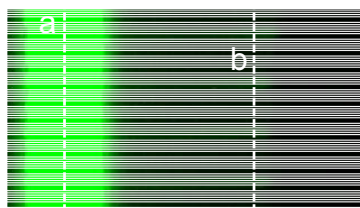
高感度検出(蛍光)

結果と考察

標的分子の選択的検出



Micro-channel Nanogap



主要な結果と展望:

- 高濃度な夾雑分子(牛血清アルブミン)が存在する溶液中で、標的分子(コレラ毒素)を選択的かつ高感度に検出された。
- 「パターン化人工生体膜」と「ナノギャップ構造」は、生体膜の特性とナノ空間を融合することで、生体分子の超高感度計測を可能にし、環境中物質や体内の疾患マーカーの検出を実現する。

発表論文

1. Tanabe, M., Ando, K., Komatsu, R., Morigaki, K. "Nanofluidic biosensor created by bonding patterned model cell membrane and silicone elastomer with silica nanoparticles", *Small* **14** (49), 1802804, (2018)
2. Nishimura, T., Tamura, F., Kobayashi, S., Tanimoto, Y., Hayashi, F., Sudo, Y., Iwasaki, Y., Morigaki, K. "Hybrid model membrane combining micropatterned lipid bilayer and hydrophilic polymer brush", *Langmuir* **33** (23), 5752-5759, (2017)
3. Ando, K., Tanabe, M., Morigaki, K. "Nanometric gap structure with fluid lipid bilayer for the selective transport and detection of biological molecules", *Langmuir* **32** (31), 7958-7964, (2016)
4. Tanimoto, Y., Okada, K., Hayashi, F., Morigaki, K. "Evaluating the raftophilicity of rhodopsin photoreceptor in a patterned model membrane", *Biophys. J.* **109** (11), 2307-2316, (2015)
5. Yamada, M., Imaishi, H., Morigaki, K. "Microarrays of phospholipid bilayers generated by inkjet-printing", *Langmuir* **29** (21), 6404-6408, (2013)
6. Morigaki, K., Mizutani, K., Saito, M., Okazaki, T., Nakajima, Y., Tatsu, Y., Imaishi, H. "Surface functionalization of a polymeric lipid bilayer for coupling a model biological membrane with molecules, cells, and microstructures", *Langmuir* **29** (8), 2722-2730, (2013)
7. Morigaki, K., Mizutani, K., Kanemura, E., Tatsu, Y., Yumoto, N., Imaishi, H. "Photo-regulation of cytochrome P450 activity by using caged compound", *Anal. Chem.* **84** (1), 155-160, (2012)
8. Okazaki, T., Inaba, T., Tatsu, Y., Tero, R., Urisu, T., Morigaki, K. "Polymerized lipid bilayers on solid substrate: Morphologies and obstruction of lateral diffusion", *Langmuir* **25** (1), 345-351, (2009)

学会発表

1. Morigaki, K. "Reconstituting Membrane Proteins in a Patterned Model Membrane", Workshop on Proteins in Artificial Membranes, 2018年5月30日, Tulln, Austria
2. Morigaki, K., Tanabe, M., Komatsu, R., Ando, K. "Nanometric gap structure for selective biosensing created with patterned lipid bilayer, silicone elastomer, and silica nanoparticles", 255th American Chemical Society National Meeting, 2018年3月18-22日, New Orleans, USA

特許

特許6400483号、発明者：森垣 憲一「ナノギャップ構造型基板」、登録日：2018年9月14日

特許5713318号、発明者：森垣 憲一、達吉郎、常鋼、今石浩正「多様なチトクロムP450分子種の酵素活性を網羅的かつ高効率で測定する方法及びキット」、登録日：2015年3月20日

特許5532229号、発明者：森垣 憲一、岡崎敬、達吉郎、中島芳浩「ポリマー脂質二分子膜を用いた機能性基板」、登録日：2014年5月9日

特許4150793号、発明者：森垣 憲一、「光重合性脂質膜による膜内分子の水平拡散制御」、登録日：平成20年7月11日、出願日：平成16年3月12日

共同研究先

京都大学ウイルス・再生医科学研究所、 岐阜大学研究推進・社会連携機構 生命の鎖統合研究センター
大阪大学大学院基礎工学研究科、 広島大学大学院理学系研究科、 兵庫県立大学大学院工学研究科
サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所、 University of Siegen