

4) ICSBP マウスの加齢にともなう MPO-ANCA の上昇

ICSBP knock-out マウスの 16, 32, 48 週齢の血清中の MPO-ANCA titer を測定した。その結果、wild type、heterotype に比べて高値を示し、加齢により増加した。以上から、加齢による MPO-ANCA 値の増加を誘導している可能性を示唆された(図 2)。また、auto-antibody production が MPO-ANCA 特異的か否かを検討するために、auto-antibody として使用される anti dsDNA antibody titer との比較も行ったが、すべての mice は陰性であった。

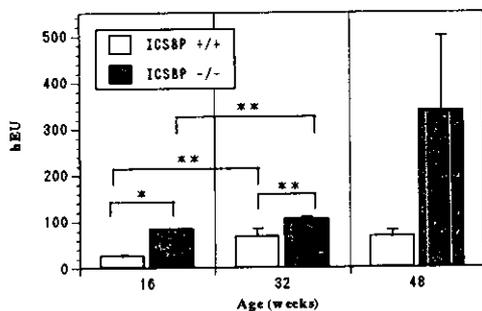


図 2. ICSBP knock-out マウスの加齢にともなう血清中の MPO-ANCA 値の上昇

5) ICSBP knock-out マウスの好中球機能異常

ICSBP-KO マウスでは、好中球の異常増加が見られ、また本研究から脾臓における CD35 遺伝子の発現が低下していることから、好中球の機能異常が考えられた。そこで、MPO release、活性酸素産生を指標として、好中球機能を解析した。

5-1) 好中球の MPO 放出と FMLP 感受性

ICSBP-KO マウスの脾臓から分離した

好中球は、ICSBP-KO マウスの末梢血から分離した好中球に比べて約 55%、ワイルドの末梢血から分離した好中球に比べて約 64%、MPO release が有意に低下していた。さらに、FMLP に対する感受性 (CB と FMLP 刺激時の MPO release/無刺激時の MPO release) を算出したところ、ICSBP-KO マウスの脾臓から分離した好中球は、FMLP に対する感受性が低下していた。

5-2) 活性酸素産生

ICSBP-KO マウスの脾臓から分離した好中球は、ICSBP-KO の末梢血から分離した好中球に比べて約 64%、ワイルドの末梢好中球に比べて約 53%、活性酸素産生が有意に低下していた。

5-3) 形態観察

ICSBP-KO マウス脾臓の好中球の形態を観察した。スライドグラス上に末梢好中球を接着させると、ワイルドでは丸形から著しく細胞の形態を変化させて、スライドグラスに接着したのに対し、ICSBP-KO マウス脾臓の好中球は、末梢好中球に比べて、細胞の形態変化が小さく丸い細胞の割合が非常に多かった。

5-4) ADVIA による細胞あたりの MPO 活性の比較形態観察

血球のプロファイルを解析するために、ADVIA により解析した。ICSBP-KO マウスの好中球を示す細胞集団が左にシフトしていることから、MPO 活性が低下していた。また、細胞あたりの MPO 活性を示す MPXi 値を比較しても、ICSBP-KO マウスでは低下していた。

D. 考察

1) CADS 誘発の冠状動脈血管炎発症への MPO の関与

野生型マウスにおいて、冠状動脈血管炎発症率と MPO-ANCA 値に、正の相関が認められたことから、CADS 抽出物誘導の冠状動脈血管炎の発症に MPO-ANCA 産生の関与が示唆された。また、MPO-KO マウスにおいて、CADS 抽出物誘導の冠状動脈血管炎の発症が低下し、血清中の MPO-ANCA が低値を示した個体が多かったことから、MPO が抗原になっていることが確認された。しかし、MPO-KO マウスにおいて、CADS 抽出物誘導の血管炎を発症し、MPO-ANCA 値の高い個体が認められたことにより、MPO-ANCA 産生には、MPO 以外の抗原の存在も示唆された。

2) 糸球体腎炎の発症 SCG/Kj マウスにおける活性化好中球の役割

腎炎の発症に無刺激の好中球からの MPO 放出が関与していた。特に、尿たんぱく 300mg/dl 以下の腎炎発症初期で高値を示し MPO の易放出性を示した。また、抹消血中の好中球数の有意の増加が認められ、腎臓障害において好中球浸潤、無刺激 MPO 放出が有意に相関した。以上のことから腎炎の発症、進行への好中球の活性化が関与している可能性が示された。また、ヒト好中球ライソゾーム酵素 MPO 放出を阻害するアセアノスタチンを SCG/Kj マウスの好中球に作用させたところ無刺激好中球の MPO 放出を阻害したことから、腎炎の治療薬の開発に応用できる可能性が示唆された。

3) 好中球分化異常を示す ICSBP-KO マ

ウス

ICSBP-KO マウスでは、myeloid cell の成熟異常が観察されていることから、顆粒球の機能異常について解析し、好中球の機能異常に関連した ANCA の産生についても検討した。脾臓には好中球が 50%程度存在し、機能的には、末梢血のそれに比べ、MPO release が約 64%、活性酸素産生では、約 53%とそれぞれ有意に低下していた。また、細胞の形態変化が小さく丸い細胞が多く、TEM 観察では、細胞内顆粒が白く抜けて見える細胞が多かった。また、好中球機能異常の結果より自己抗体は、anti dsDNA antibody titer は陰性であったが、MPO-ANCA 抗体産生は、予想どおり加齢によって上昇した。一方、血球のプロファイルを解析から、驚くべきことに、ICSBP-KO マウスでは eosinophil を示す細胞集団が欠落し、その原因が EPO gene expression の極度な低下によるものであった。以上から、ICSBP-KO マウスの脾臓中の好中球は、末梢血中の好中球より機能低下していることが示唆された。この異常が MPO-ANCA titer の加齢による上昇に関与すると推定される。また、MPO、CD11b、CD35 の遺伝子発現を RT-PCR によって半定量した結果では、正常好中球には全く検出されない MPO の mRNA の発現が、ICSBP-KO マウスの脾臓や末梢血で強く検出された。これらのことから、ICSBP-KO マウスの脾臓には形態的には成熟しているが機能的に未成熟か、機能が抑制・低下している好中球が多数が存在すること、また未成熟 MPO が存在する可能性が考えられる。

以上から ICSBP 欠損(KO)マウスでは、

MPO-ANCA 産生が加齢にともない上昇したが、活性化好中球の関与がなかったことから、発症には 1) MPO-ANCA 産生と、2) 活性化好中球の 2 ステップからなることが示唆された。

E. 結論

血管炎の治療や、病因を解析する上で、モデルマウスを用いた研究が必須であり、本研究において、3 系統の血管炎発症モデルマウスを用いて、血管炎の発症機構を解析した。1) CADs によって誘発する冠状動脈炎マウス、2) 半月体形成性糸球体腎炎を高率かつ急速に自然発症する SCG/Kj マウスを用い解析し、腎炎の発症、進行の初期段階（尿たんぱく 300mg/dl 以下）の末梢好中球は無刺激で MPO の易放出性を示し、活性化状態になっていることを示した。3) また、好中球異常を示す転写因子 IRF-8/ICSBP の欠損マウスでも MPO-ANCA が加齢とともに上昇し、好中球異常が MPO-ANCA 産生にも関与することを認めた。尚、これらのモデルマウスにおける MPO および MPO-ANCA の役割を解明するため、マウスリコンビナント MPO およびマウス MPO 特異的抗体を作成した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, Y. Hashimoto, Y. Aratani, H. Koyama, N. Maeda, S. Naoe, K. Suzuki. Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis associated with MPO-ANCA production. *Inflammation* 25: 381-387, 2001.
- 2) W.K. Dawson, K. Suzuki, and K. Yamamoto. A physical origin for functional domain structure in nucleic acids as evidenced by cross linking entropy. part II. *J. Theor. Biol.*, 213:387-412, 2001.
- 3) W.K. Dawson, K. Suzuki, and K. Yamamoto. A physical origin for functional domain structure in nucleic acids as evidenced by cross linking entropy. part I. *J. Theor. Biol.*, 213:359-386, 2001.
- 4) K. Suzuki. Neutrophil functions of patients with vasculitis related to MPO-ANCA. *International Journal of Hematology* 74, 134-143, 2001.
- 5) K. Suzuki. Bioimaging of chemotaxis/migration and adhesion for transmigration of neutrophils with special reference to neutrophil functions (Review). *Bioimages* 9:1-14, 2001
- 6) Y. Segawa., Y. Itokazu., N. Inoue., T. Saito and K. Suzuki. Possible changes in expression of a chemotaxin LECT2 mRNA in mouse livers after concanavalin A-induced hepatic injury. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 425-428, 2001.
- 7) Y. Aratani, F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, K. Suzuki, N. Maeda and M. Koyama. Differential host susceptibility to pulmonary

infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. *J. Infectious Diseases* 182, 1276-1279, 2000.

- 8) 鈴木和男 特集「血管炎の基礎と臨床」血管炎と自己抗体—抗好中球細胞質抗体を中心に— *最新医学* 55; 2636-2646, 2000

2. 学会発表

- 1) Toshiyuki Matsuoka, Yuki Hashimoto, Akiko Ishida-Okawara, Keiko Matsuo, Takuro Iwasaki, Hideki Kajiwara, Takao Arai, Keiko Ozato, and Kazuo Suzuki. Genetic inactivation of interferon consensus sequence-binding protein (ICSBP/IRF-8) is associated with a marked suppression of neutrophil and eosinophil function *Gordon Research Conference-Phagocytes*, 2001.
- 2) Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Yuki Hashimoto, 3) Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Nobuyo Maeda, Shiro Naoe, Kazuo Suzuki. Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis associate with MPO-ANCA production induced by *Candida albicans*-derived substances *Gordon Research Conference-Phagocytes*, 2001.
- 3) K. Suzuki. Arteritis related with Myeloperoxidase. *Geneva Biology of Ageing Workshop 2001-Cardiac*

ageing, heart failure and cell therapy *Geneva, Switzerland Coronary. Sept. 27-29, 2001, Geneva, Switzerland.*

- 4) 鈴木和男 *Aspergillus* 感染成立に関与する好中球の役割 *医真菌学会* 9月 26-28, 2001, 東京

2. 学会発表

- 1) Toshiyuki Matsuoka, Yuki Hashimoto, Akiko Ishida-Okawara, Keiko Matsuo, Takuro Iwasaki, Hideki Kajiwara, Takao Arai, Keiko Ozato, and Kazuo Suzuki. Genetic inactivation of interferon consensus sequence-binding protein (ICSBP/IRF-8) is associated with a marked suppression of neutrophil and eosinophil function *Gordon Research Conference-Phagocytes*, 2001.
- 2) Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Yuki Hashimoto, 3) Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Nobuyo Maeda, Shiro Naoe, Kazuo Suzuki. Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis associate with MPO-ANCA production induced by *Candida albicans*-derived substances *Gordon Research Conference-Phagocytes*, 2001.
- 4) K. Suzuki. Arteritis related with Myeloperoxidase. *Geneva Biology of Ageing Workshop 2001-Cardiac ageing, heart failure and cell therapy Geneva, Switzerland Coronary. Sept. 27-29, 2001,*

Geneva, Switzerland.

- 5) 鈴木和男 *Aspergillus* 感染成立に関与
する好中球の役割医真菌学会 9 月 26-
28, 2001, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請：

- 1) ミエロペルオキシダーゼ欠損マウス
- 2) LECT2 欠損マウス

分担研究課題：

川崎病類似マウス系統的動脈炎惹起モデルにおける動脈炎誘導遺伝子の染色体マッピング

分担研究者：高橋 啓 東邦大学医学部附属大橋病院病理学講座

研究協力者：大原関利章、直江史郎 東邦大学医学部附属大橋病院病理学講座

研究要旨：

Candida albicans (*C. albicans*) 菌体抽出物接種によるマウス系統的血管炎誘発モデルにおける、血管炎発症にかかわる関連遺伝子を明らかにするため染色体マッピングを試みた。その結果、異なるふたつの染色体上に高オッズ比を示す領域を見出した。一方で、他の染色体上には低オッズ比を示す領域がみられた。本モデルでは冠状動脈炎発生に関連する複数の遺伝子の存在と動脈炎を抑制する遺伝子の存在が推測された。

A. 研究目的

C. albicans 菌体抽出物接種によるマウス系統的血管炎誘発モデルにおける、血管炎発症にかかわる関連遺伝子を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

マウス系統的血管炎誘発モデルにおける冠状動脈炎発生率には系統差があり、C3H/HeN は高発生群であるのに対しCBA/JN のそれは著しく低い。そこでC3H/HeN には冠状動脈炎関連遺伝子が存在するという仮定のもと染色体マッピングを行った。

F1 マウス (CBA/JN x C3H/HeN) にC3H/HeN を戻し交配して得られたN1[(CBA/JN x C3H/HeN) x C3H/HeN] (4週齢、雄、n=115)を作製した。既報に従い *C. albicans* アルカリ抽出物を作製、PBS に懸濁して実験第 1,5 週に各々連続 5 日間、マ

ウス腹腔内に接種した。第 9 週にマウスを屠殺、病理組織学的に冠状動脈炎の有無を確認した。一方、genomic DNA は肝臓および尾から抽出した。C3H/HeN と CBA/JN との間で系統間較差を示すマイクロサテライトマーカー 50 個を用いて、各マーカーで指定される染色体上の領域がホモ、ヘテロのいずれを示すかをマウス個体毎に検索し、ヘテロに対するホモの冠状動脈炎発生のリスクを計算した。

C. 研究結果

冠状動脈炎発生率は、24/115 (21%)であった。これらの組織像は、これまで C3H/HeN で確認してきた冠状動脈炎と類似しており、N1 個体間でも組織学的差異は見出せなかった(Fig1)。



Fig.1 本実験系で得られるマウス冠状動脈炎

次に、染色体マッピングの結果、異なる2つの染色体上に高オッズ比 (max3.59, 95%信頼区間:1.22~10.58)を示す領域を見出した。一方、他の染色体上には、低オッズ比(0.40, 95%信頼区間:0.15~1.08)を示す領域がみられた。

D. 考察

我々は川崎病罹患児糞便由来の *C. albicans* アルカリ抽出物を用いたマウス系統的動脈炎作製実験を続けている。本実験系で惹起される動脈炎は病変分布や組織像など川崎病動脈炎に類似点が多く、川崎病動物モデルとして評価を受けている。本実験モデルは当施設で独自に開発したものであり、当施設においてのみ検索が成されている。一方、MRL/lpr等、多くの自然発症動脈炎モデルでは動脈炎関連遺伝子の解析がなされているが、これらは病変分布や組織像の点で川崎病とは大きく特徴を異にする。

本実験系における冠状動脈炎の発生率

は、マウス系統により差異があることが判明している。すなわち、C3H/HeN は高発生群であるのに対して、CBA/JN のそれは著しく低い。そこで、C3H/HeN には冠状動脈炎誘導に関連する遺伝子が存在するとの仮定のもと本遺伝子の染色体マッピングを行った。C3H/HeN と CBA/JN との間で系統間較差を示すクロモソームマーカーの登録が無かったため、検索に用いることができたマーカーは現時点で約50であるが、異なる2つの染色体上に高オッズ比を示す領域を見出した。この一方、他の染色体上には低オッズ比を示す領域がみられた。

この様に、本モデルでは冠状動脈炎発生に関連する複数の遺伝子の存在と動脈炎を抑制する遺伝子が存在することが推測される。今後、上記の候補領域を中心に詳細なマーカー設定を行い、候補領域を限局して行く予定である。さらにこれらの候補領域にコードされる遺伝子多型の検索を進める予定である。

これらが明らかになれば罹患同胞対法を用いて疾患関連遺伝子解明の試みがなされつつ未だ知見の得られていない川崎病発症に関する関連遺伝子解明の一助となり得、ひいては早期治療、発症予防対策への糸口となり得るものと考えられる。

E. 結論

本実験系における冠状動脈炎の発生には、複数の遺伝子が関与すると考えられたが、その一方で冠状動脈炎抑制遺伝子の存在も示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okawara IA, Oharaseki T, Takahashi K, Hashimoto Y, Aratani Y, Koyama H, Maeda N, naoe S, Suzui S: Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis with MPO-ANCA production, *Inflammation*25(6) : 381-387, 2001

2. 学会発表

大原関利章、橋本ゆき、亀岡洋介、倉 文明、高橋 啓、山田仁美、鈴木和男、直江史郎：川崎病類似マウス冠状動脈炎モデルにおける血管炎抑制遺伝子の染色体マッピング。第24回日本分子生物学会、横浜、2001.12

Oharaseki T, Takahashi K, Miura N, Wakayama M, Shibuya K, Okawara A, Suzuki K, Ohno N, Naoe S: Analysis of Component of *Candida albicans* Cell Wall Inducing Vasculitis in Mice. The 7th International Kawasaki Disease Symposium, Hakone, Japan, 2001.12

厚生科学研究費（特定疾患事業）
分担研究報告書

ナノ粒子プローブによる多臓器不全の解析

分担研究者氏名・所属機関名 山本健二・国立国際医療センター研究所

研究要旨

半導体ナノ粒子を表面加工し細胞培養液ににおいて凝集しないようにすることを可能とした。このプローブナノ粒子を用いヒト肝細胞に導入したところ十分な光量を得ることができまた一時間以上の蛍光を肉眼で観測できたので、多臓器不全の解析に適していると考え

A 研究目的

多臓器不全の解析を行うには、各臓器における細胞レベルでの変化を同時に解析する必要がある。ところが一つの分子についても細胞レベルで各臓器を統括的に解析することは、現在の技術では困難である。そこで本研究においてはナノサイズのプローブ分子を用いて各臓器の細胞レベルの損傷を評価し多臓器不全のメカニズムについての解析を行う目的とする。

B 研究方法

上記目的のため、蛍光を発するナノサイズの半導体を用い、その細胞内への取り込みを観測する基盤的研究を行ってきた。大きさが1nm、10nm程度の金属微粒子集団（量子サイズドット；QD）の比熱、磁化率などの物性は、マクロサイズのふつうの金属としてのものと著しく異なることが1961年久保亮五によって理論的に示

され、（量子サイズ効果）その後、久保理論は定量的検証は困難であるが、定性的にはこの効果の存在が認められ、微粒子系物理の大原理として国際的に認められた。この金属微粒子集団（QD）の物性は、そのサイズにより異なる性質があることから（同じ励起波長の光を用いながらをサイズによって蛍光色がことなるを図1に示す）、その後の工学的応用は、QDのサイズをいかにして一様に製造できるかが問題であった。Alivisatosらは1998年半導体を用いこれを可能とした。その構造模式図を図2に示す。半導体QD（半導体ナノ粒子）は、蛍光性を持ち、蛍光持続時間が長く、サイズにより異なる蛍光色を発する性質を持つ。しかし、親水性に乏しく、塩濃度、pH条件の厳しい細胞培養液では凝集し易く医薬生物学への応用が困難であった。

昨年我々は、この半導体ナノ粒子を表面加工し医療への応用が十分可能であるようにした。さらに、半導体ナノ粒子を用

い Vero 細胞にラベルし (図 3 に示す)、マウス血管内に導入しレーザーとして利用可能にした。細胞内取り込みに付いては、細胞により取り込む活性化異なる可能性もあるので、その効率について一様であるかも確認する。また元の半導体は、疎水性であるため細胞培養液では凝集するためこれを回避する必要がある。そのためナノ粒子表面を親水性になるように加工することをを行う必要性もある。

C 研究結果

材料として開発されていた直系 4.2nm サイズの疎水性半導体ナノ粒子を我々は、メルカプト脂肪酸を用いナノ粒子表面に親水加工し水溶液に溶解可能とした。さらに半導体ナノ粒子製造過程に於いて不純物 (TOPO) が混入しこれが細胞毒性を持つ事が判明したので、これを取り除く精製技術を開発した。これらのことにより、半導体ナノ粒子による医療生物学的応用を可能とした。これまでに肝細胞、Hela 細胞に取り込ませる方法を開発し、特に肝細胞に於いては、その細胞内分布を観測し、共焦点レーザー顕微鏡にて半導体ナノ粒子が endosome に集積する事を今回発見した。今後半導体ナノ粒子の表面を様々な加工をする事により細胞質に分散させたり、核等に集積する事が可能であると考えらる。

もう一つの応用として、半導体ナノ粒子を取り込ませた Hella 細胞を 8 週齢のマウスに血管内に導入し経時的に解析した。その結果 10 日以上、半導体ナノ粒子を取り込んだ Vero 細胞確認レーザーと

して応用利用できる事を示した。その他半導体ナノ粒子は、高分子に結合させることも可能で、幾つかの高分子について既に成功している。半導体ナノ粒子の表面加工に成功しヒト肝細胞に取り込みが可能となった。その他の臓器細胞にも可能である。また従来の蛍光色素より光量が強く 1 時間以上も退色しないので今後の研究に十分に役立つことが実証された

D 考察

今後多くの機能分子に結合させ多臓器不全のメカニズムを明かにすることへの道ができた。

しかしながら、半導体ナノ粒子は組織培養液中では、非常に凝集しやすく、そのため観察がうまく行かない傾向にある。一つの打開策として親水性表面加工がある。これまで、合衆国の Alivisatos らのグループで SH 基を末端にもつ脂肪酸で加工したものや Si 系を用いて親水性を高めたものが開発されてきたがいずれも長時間 (週単位) に凝集が起こってしまうため彼等の方法では、なかなか難しいことが言われている。今後その他の方法による表面加工が期待される。

また現在行われている方法による Cd/Se 半導体ナノ粒子製造法以外にも (その生成過程によりどうしてもトリオクチルフォスフィンオキサイド (TOPO) の混入が避けられず、この TOPO の細胞毒性が今後実験にどのような影響を及ぼすかは不明である) 同種の半導体ナノ粒子を生成する方法の開発が望まれる。

E 結論

半導体ナノ粒子は、従来の FITC に比べ十分な光量をはるかに長時間維持することができるため細胞レベルでの分子動態を解析するのに有用である。また今後その表面加工を如何に行うかが重要なカギをになうと考えられる。

そのためには、様々な可能性について戦略的に研究を展開する必要性があり我々の実験成果を参考にされ多くの研究者が、このような新しいバイオナノテクノロジー的手法を用いて研究をすすめていけるような基盤整理を国家プロジェクトとして行うよう希望してやまない。

F 研究発表

1 論文発表

- (1) K. Hanaki, T. Nishihara, T. Odawara, N. Nakajima, K. Yamamoto, and H. Yoshikura. RNaseA treatment of Taq and Tth DNA polymerases eliminates primer/template independent poly (dA-dT) synthesis. *BioTechniques* 31:734-739. (2001).
- (2) Yanaka Y., Hanaki K., Yoshikura H. Yamamoto K. Further simulation on survival of mutants under non-selective condition. *Jpn. J. Infect. Dis.* 54: 84-85; 2001
- (3) T. Yamazaki, T. Suzuki and K. Yamamoto, Correspondence to vaccinating Japanese schoolchildren against influenza. *The New Eng. J. of Med.* (2001).

344: 1947.

- (4) Suzuki T., Ishiwata S., Hasegawa K., Yamamoto K., Yamazaki T. Raised interleukin 6 concentrations as a predictor of postangioplasty restenosis. (2001). *Heart* 83; 578.

2 学会発表

- (1)花木賢一、山本健二 親水性半導体ナノ粒子の肝細胞内分布. 第4回肝臓生物学会 (2001) 24.
- (2)花木賢一、前之園信也、山口由岐夫、山本健二 親水性ナノ粒子の動物細胞内分布. 第10回バイオイメージング学会 (2001), (200), 190-191.
- (3) 柴羽範子、花木賢一、前之園信也、山口由岐夫、山本健二 増殖する自己組織粒子に対するパターン形成の定量解析 バイオイメージング第10回学術集会講演要旨集, (2001)(200), 180-181
- (4) 柴羽範子、前之園信也、山口由岐夫、山本健二 自己増殖するパーティクルの凝集メカニズム, 化学工学会第33回秋季大会(2000), D323
- (5) 柴羽範子、前之園信也、山口由岐夫、山本健二 自己増殖粒子の構造形成メカニズム 化学工学会第66年会(2001), A122
- (6) 高本篤史、柴羽範子、山口由岐夫、山本健二 自己増殖粒子の反応速度解析 化学工学会第34回秋季大会 (2001), T204

G 知的省有権の取得状況

- 1 特許取得
なし
- 2 実用新案登録
なし
- 3 その他
なし

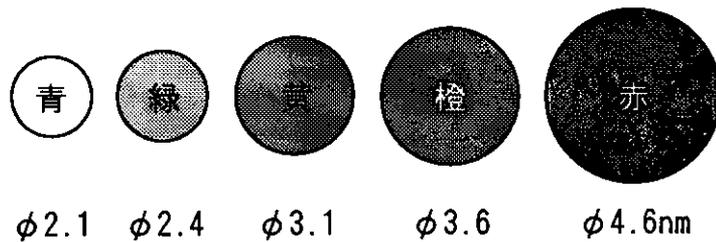


図1 CdSe 半導体ナノ粒子の蛍光波長は、量子サイズ効果により
その粒子サイズにより異なる

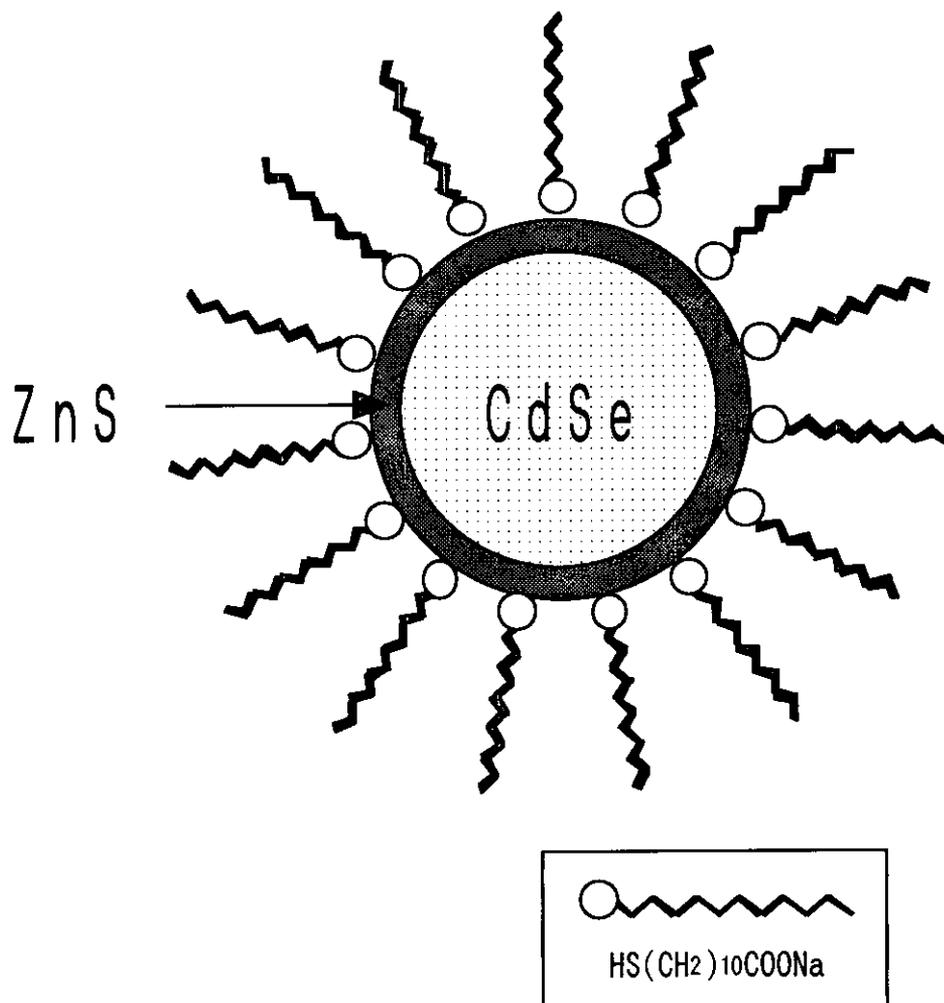


図2 親水性コアシェル型の半導体ナノ粒子の構造模式図

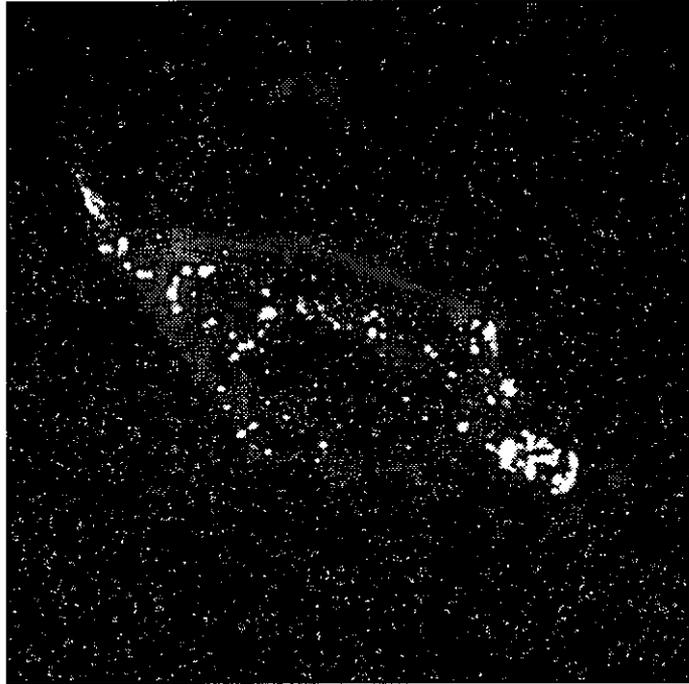


図3 Vero 細胞に半導体ナノ粒子を導入したものを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

多臓器不全因子(LECT2)の構造解析

分担研究者：田之倉 優 東京大学大学院農学生命科学研究科教授
研究協力者：鈴木倫太郎、伊藤三恵

研究概要意表：本研究では、サイトカイン LECT2(leukocyte cell-derived chemotaxin 2)の高次構造解析を、核磁共鳴スペクトル(NMR)と X線結晶構造解析を用いて行っている。慢性関節リュウマチ患者においては、LECT2 の 58 番目の Val 残基が Ile 残基に置換されている患者ほど、疾病の重篤度が高いことが明らかになった。LECT2 の機能発現に 58 番目の Val 残基のメチレン基 1 つ分の役割がいかに重要かを明らかにし、LECT2 とリュウマチとの因果関係を突きとめる為に LECT2 の立体構造を明らかにする。

- (1) NMR を用いた高次構造解析においては、安定同位体標識したサンプル調製法の確立と NMR 測定とスペクトルの解析を行った。現在までのところ、主鎖のスペクトル帰属はほぼ完了し、二次構造情報まで得られている。
- (2) X線結晶構造解析においては、本年度から着手し、動物細胞を用いた発現系の導入とサンプル調製法を確立した。X線結晶構造解析を目指した結晶化を試みた結果、結晶が得られ、X線を当てた結果、分解能 1.8 Å のデータが得られた。

A. 研究目的

慢性関節リュウマチ患者において、LECT2 の 58 番目の Val 残基が Ile 残基に置換されている患者ほど、疾病の重篤度が高いことが明らかになった (Y.Kameoka, et al., *Arthritis & Rheumatism* 43, 2000)。58 番目の Val 残基が受容体との結合に関わっているか、もしくは LECT2 自体の立体構造を維持するために重要な役割を果たしている事が考えられる。現在では、LECT2 の立体構造が明らかでない為に、LECT2 の機能発現にメチレン基 1 つ分の役割がいかに重要か特定できていない。58 番目の Val 残基の役割を明らかにし、LECT2 とリュウマチとの因果関係を突きとめるには LECT2 の立体構造を明らかにする必要がある。本研究では、野生型 LECT2 の高次構造と、Ile 型 LECT2 の高次構造解析、更

には、受容体ペプチドとの複合体の高次構造を明らかにすることを目的としている。

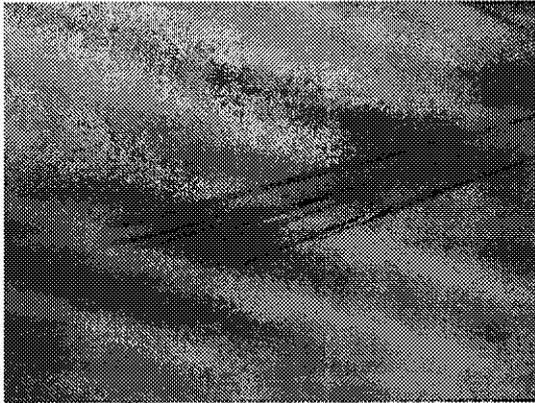
B. 研究方法・結果

(1)動物細胞 CHO 細胞による発現系を用いた LECT2 の X線結晶構造解析

培養上清に分泌発現させる系を用いた (Yamagoe S. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 237, 1997)。

CHO 細胞を宿主とし、高発現プロモーター制御下で遺伝子を発現させ。陽・陰イオン交換を組み合わせ、SDS-PAGE において単一バンドとして最終精製物を得た。2 リットル培養あたり約 10 mg の収量で

あった。調製されたタンパク溶液を用いて Crystal Screen kit I, II, Wizard I, II による結晶化を試みた。いくつか結晶が得られ (Fig.1)、X線を当てた結果、分解能 1.8Å の回折データが得られた。



(2)大腸菌を用いた発現系の構築

構造解析に足りるだけの量を血清中から精製するのはコスト、時間の面で問題があり、さらに CHO 細胞を用いた発現系よりも大量調製を目指して、より安価な大腸菌を宿主とする LECT2 の大量生産に取り組んだ。LECT2 遺伝子の N 末端に (His)₆-tag を付加し、これを T7 プロモーターを持つ pRT21(a)ベクターに挿入して発現プラス

Fig.1 LECT2 の結晶

蛋白質濃度 : 7 mg/ml (50 mM sodium phosphate (pH 7.5), 700 mM NaCl)
結晶化条件 : 0.01 M cobaltous chloride hexahydrate, 0.1M MES (pH6.5), 1.8 M ammonium sulfate

だった。そこで、封入体からの可溶化、巻き戻しを試み成功した。不溶性タンパク質に 8 M 尿素を添加して可溶化し、Ni-NTA-agarose カラムに結合させたまま尿素濃度をゆっくり下げる Ni-NTA-agarose カラム法を行った。間違った S-S 結合をかけ直すために、酸化型グルタチオン/還元型グルタチオン混合溶液中で、穏やかに Ni-NTA agarose カラム上に固定した (His)₆-LECT2 を攪拌した。樹脂からの溶出後更に一週間

の空気酸化を行った。精製後の最終収量は最小培地 1 リットル当たり約 1 mg だった。この方法で得た再生 (His)₆-LECT2 の CD 及び NMR スペクトルを、CHO 細胞から発現精製した LECT2 のものと比較したところ、CD スペクトル (Fig.2) はいずれも 230 nm にピークを持つ β 構造に特徴的なパターンを示した。さらに、NMR スペクトル (¹H-¹H NOESY) においてもシグナルが一致したことから、大腸菌由来の (His)₆-LECT2 は CHO 細胞由来の LECT2 と同じ立体構造を持つと結論づけた。

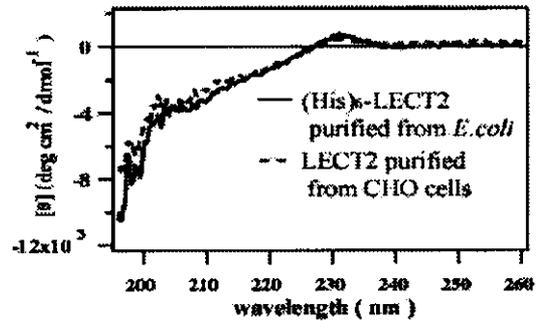
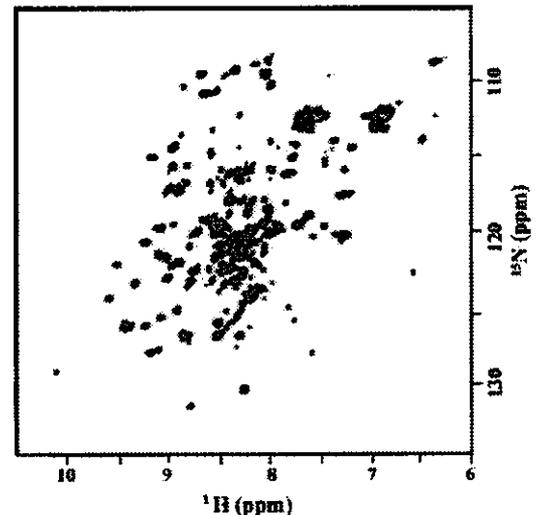


Fig.2 CD スペクトル

LECT2 (16.7 μM) from CHO cells and refolded (His)₆-LECT2 (21.3 μM) from *E. coli*.



以上の系を用いて、¹⁵N および ¹³C/¹⁵N で標識した (His)₆-LECT2 を調製

し、3核3次元 NMR の測定と解析を行った。天然型立体構造を持つタンパク質に特徴的な分離の良いスペクトルが得られ、50 mM 硫酸ナトリウム存在下で測定したスペクトル (Fig.3)を帰属した。

その結果、観測可能と期待される 130 スピン系 (140 アミノ酸-(N末端+Pro 残基9個))のうち110について帰属をすることができた。

帰属した化学シフトの値を素に、CSI (chemical shift index)を用いて二次構造の分布を明らかにした (Fig.4)。その結果、(His)₁-LECT2 はβシートに富むタンパク質であり、αヘリックスを含まないことが明らかとなった。

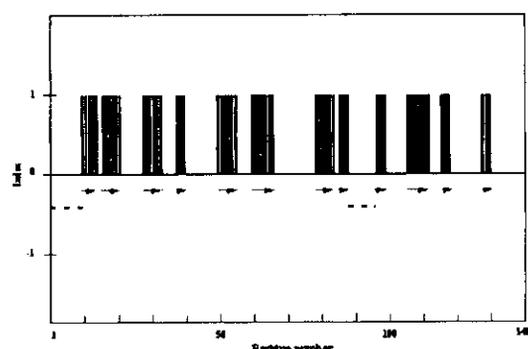


Fig.4 化学シフト ($^{13}\text{C}\alpha$, $^{13}\text{C}\beta$, $^1\text{H}\alpha$)からの二次構造予測 (→: β -strands、点線: シグナルの未帰属領域)

C. 今後の予定

(1)動物細胞 CHO 細胞による発現系を用いた LECT2 の X線結晶構造解析

高分解の回折データを得られた結晶化条件を生かし、LECT2 分子に適した重原子を化学結合させた結晶 (重原子同型置換体結晶)を作成し、重原子同型置換法を用いて位相角を決定し、構造計算を行う予定である。

(2)大腸菌を用いた発現系の構築と NMR を

用いた立体構造解析

NOE データに基づいた原子間の距離制限情報を取得し、動力学計算を行い、三次元構造を決定する予定である。

D. 研究発表

1) 論文発表

Sakai, N., Yao, M., Itou, H., Watanabe, N., Yumoto, F., Tanokura, M. and Tanaka, I. (2001.9)

The three-dimensional structure of septum site-determining protein MinD from *Pyrococcus horikoshii* OT3 in complex with Mg-ADP.

Structure 9 (9), 817-826.

Yumoto, F., Nara, M., Kagi, H., Iwasaki, W., Ojima, T., Nishita, K., Nagata, K. and Tanokura, M. (2001.12)

Coordination structures of Ca^{2+} and Mg^{2+} in Akazara scallop troponin C in solution: FTIR spectroscopy of side-chain COO^- Groups.

Eur. J. Biochem. 268, 6284-6290.

Kato, Y., Ito, M., Kawai, K., Nagata, K. and Tanokura, M. (2002.3)

Determinants of ligand specificity in groups I and IV WW domains as studied by surface plasmon resonance and model building.

J. Biol. Chem., in press.

2) 著書, 総説等

Tanokura, M. and Shirahata, S. (2001.1)

JAAC Issue. Preface.

Cytotechnology, 1-1.

千田俊哉、田中勲、田之倉優 (2001.2)

生命をとらえるー生物マシーナリー研

究.

日本結晶学会誌 43 (1), 38-44.

伊藤三恵、田之倉優 (2001.10)

キネシンモータードメイン.

生体の科学 52 (5), 415-417.

田之倉優 (分担編集) (2001.10)

英和・和英 生化学用語辞典 第2版(日本生化学会編、編集委員:大島泰郎、石浦章一、石川冬木、脊山洋右、田之倉優)、東京化学同人、東京.

Kojima, M., Ito, K., Timchenko, A., Amemiya, Y., Tanokura, M., Kihara, H., and Takahashi, K. (2001.10)

Structure refinement from X-ray solution scattering data of proteinases by molecular dynamics calculation

Photon Factory Activity Report 2000, 226.

田之倉優 (2002.2)

書評: 生体ナノマシンの分子設計.

蛋白質核酸酵素 47 (2), 192-193.

3) 学会発表等

李愚哲、櫻井雅弘、小堀俊郎、佐々木宏、

善野修平、西郷薫、田之倉優 (2001.1.12-14)

大腸菌の major nitroreductase NfsA の放射光を用いた構造解析

第14回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム講演要旨集 305、広島

田之倉優 (2001.2.6)

放射光の利用－生命科学

VSX 講習会「放射光で何がわかるか?

東京大学高輝度光源計画入門」、東京

鈴木論太郎、永田宏次、古谷昌弘、丸山正、

田之倉優(2001.3.24-26)

2D EXSY NMR による好熱古細菌の FKBP の活性測定

日本農芸化学会 2001 年度大会講演要旨集 294、京都

加茂昌之、金子直美、善野修平、西郷薫、

田之倉優(2001.3.24-26)

発光細菌 *Photobacterium luminescens* ルシフェラーゼの精製と結晶化

日本農芸化学会 2001 年度大会講演要旨集 299、京都

伊藤三恵、永田宏次、加藤有介、山越智、

鈴木和男、田之倉優(2001.3.24-26)

サイトカイン LECT2 の NMR による高次構造解析

日本農芸化学会 2001 年度大会講演要旨集 314、京都

Sadykov, Marat, 半田直史、麻見安雄、田

之倉優(2001.3.24-26)

Selfish maintenance of *BanHI* RM gene complex on *Bacillus subtilis* chromosome:

resistance to replacement through post-segregational host killing and gene duplication.

日本農芸化学会 2001 年度大会講演要旨

集 348、京都

吉川正人、村崎和美、武田篤、田之倉優
(2001.3.24-26)

ヒト SCCA 1(Squamous cell carcinoma antigen)の発現、精製、結晶化
日本農芸化学会 2001 年度大会講演要旨
集 383、京都

田之倉優(2001.6.1-6.3)

蛋白質複合体と集合系の構造生物学
第 1 回日本蛋白質科学会年会プログラ
ム要旨集 58、大阪

吉川正人、村崎和美、武田篤、田之倉優
(2001. 6.1-6.3)

ヒト SCCA 1(Squamous cell carcinoma antigen)の発現、精製、結晶化
第 1 回日本蛋白質科学会年会プログラ
ム要旨集 130、大阪

鈴木倫太郎、川上将、永田宏次、湯本史明、
古谷昌弘、根本暢明、安達恭子

丸山正、田之倉 優
好 熱 古 細 菌 *Methanococcus
thermolithotrophicus* の FKBP の構造
と機能
第 1 回日本蛋白質科学会年会プログラ
ム要旨集 193、大阪

澤野頼子、秦野賢一、村松知成、永田宏次、
田之倉優 (2001. 6.1-6.3)

パイナップル茎由来プロメラインイン
ヒビターの構造機能相関の解析
第 1 回日本蛋白質科学会年会プログラ
ム要旨集 198、大阪

伊藤三恵、永田宏次、加藤有介、山越智、
鈴木和男、田之倉優(2001. 6.1-6.3)
サイトカイン LECT2 の NMR による高次構
造解析

第 1 回日本蛋白質科学会年会プログラ
ム要旨集 199、大阪

湯本史明、永田宏次、岩崎わかな、安達恭
子、小林由枝、根本暢明、

尾島孝男、西田清義、田之倉優
(2000.6.1-6.3)

アカザラガイ閉殻筋トロポニン C の構
造解析

第 1 回日本蛋白質科学会年会プログラ
ム要旨集 241、大阪

加茂昌之、金子直美、善野修平、西郷薫、
田之倉優(2001. 6.1-6.3)

発光細菌 *Photobacterium luminescens* ル
シフェラーゼの精製と結晶化

第 1 回日本蛋白質科学会年会プログラ
ム要旨集 242、大阪

加藤有介、伊藤三恵、河合勲二、永田宏次、
田之倉 優(2000.6.1-6.3)

さまざまな WW ドメインの Surface
plasmon resonance (SPR) を用いた相互作
用解析

第 1 回日本蛋白質科学会年会プログラ
ム要旨集 427、大阪

田之倉優 (2001.6.16)

クロコウジカピ酸性プロテアーゼ A の
結晶構造と機能

日本生化学会東北支部第 67 回例会ーシ

- ンポジウム・特別講演講演要旨集、仙台
- Kobori, T., Lee, W. C., Sasaki, H., Koike, H., Zenno, S., Saigo, K., Murphy, M. E. P., Adman, E. T. and Tanokura, M. (2001.7-27-29)
Interaction of flavin reductase with its competitive inhibitors.
Keihanna International Conference on Molecular Biophysics "New Approaches to Solution Interactions of Biological Molecules" T20, Kyoto.
- 森井尚之、伊藤三重、清水隆、田之倉優 (2001.10.6-8)
モータータンパク質の stalk 領域の coiled-coil 形成能の評価
日本生物物理学会第 39 回年会講演予稿集 S194、大阪
- Hu, F. and Tanokura, M. (2001.10.10)
Structural genomics of hyperthermophile *Pyrococcus horikoshii*
International workshop on Bioactive Natural Products, Tokyo
- Lee, W. C., Kimura, S., Zenno, S., Saigo, K., and Tanokura, M. (2001.10.10)
The X-ray crystal structure of nitroreductase RdxA from gastric pathogen *Helicobacter pylori*
International workshop on Bioactive Natural Products, Tokyo
- 田之倉優, 李愚哲, 櫻井雅弘, 佐々木宏, 善野修平, 西郷薫, (2001.10.10)
酵素の構造と機能—ニトロ/フラビン還元酵素を例に—
バイオイメージング第 10 回学術集会講演要旨集 10 巻 3 号、S3-1 106、東京
- 寺内弘知、米澤直人、工藤勝康、伊東孝祐、田之倉優、三浦謹一郎、勝又敏行、中野實 (2001.10.14-17)
組換え体ブタ卵子透明帯糖タンパク質の精子結合活性
第 74 回日本生化学会大会発表抄録集 1P-079 697、大阪
- 田中俊充、中村彰男、小濱一弘、岩崎わか
な、佐々木宏、田之倉優 (2001.10.14-17)
カルシウム結合タンパク質 CBP40 の機能構造解析
第 74 回日本生化学会大会発表抄録集 1P-240 723、大阪
- 入本慶宣、永田宏次、阿部啓子、荒井綜一、田之倉優 (2001.10.14-17)
オリザシスタチンのホモダイマーの機能構造解析
第 74 回日本生化学会大会発表抄録集 1P-545 772、大阪
- 澤野頼子、秦野賢一、村松知成、永田宏次、田之倉優 (2001.10.14-17)
パイナップル (*Ananas comosus*) 茎由来プロメラインインヒビターの構造機能相関の解析
第 74 回日本生化学会大会発表抄録集 1P-546 772、大阪