

ナノプローブを用いた単一分子レベルの細胞内生体機能解析と病理診断への応用

研究分担者： 船津 高志 早稲田大学理工学部物理学科 教授

研究要旨：組織障害を高感度に検出する技術の開発は、障害・病態の診断に重要な意味をもつ。このための要素技術として、有機蛍光色素や量子ドットに代表されるナノプローブを用いて細胞内の生体内分子機構を1分子レベルでイメージングする技術開発を行った。その具体的な応用例として、以下の2つに注目して研究を行った。(1) Gタンパク質共役型受容体(GPCR)の1分子蛍光イメージング、(2) mRNAの核内運動の1分子蛍光イメージング、を中心に開発研究を行った。その結果、GPCRがリガンド非依存的に2~4量体を構成していることが示された。また、mRNAが核内構造物とダイナミックな結合解離を繰り返しながらブラウン運動によって核膜孔に到達することが示された。以上のように、細胞内の生体分子機能を1分子レベルでイメージングする技術基盤が整った。

A. 研究目的

組織障害を高感度に検出する技術の開発は、障害・病態の診断に重要な役割を果たす。このための要素技術として、有機蛍光色素や量子ドットに代表されるナノプローブを用いて細胞内の生体内分子機構を1分子レベルでイメージングする技術開発を行った。このためのモデル研究として、以下の2つの研究を行った。

1. Gタンパク質共役型受容体(GPCR)の1分子蛍光イメージング

臨床で治療に用いられている薬の5~7割は、GPCRを標的としていると言われている。GPCRは免疫、神経、循環器調節など、生体の多様な機能調節に関与しており、恒常性維持機構の重要な担い手である。神経伝達物質、ホルモン、有名なところではレニン-アンジオテンシン系などの受容体としてGPCRは生体の恒

常性維持に欠かせない役割を果たしている。従来、GPCRは単量体で機能していると考えられていた。ところが最近、分子生物学的生化学的解析の結果から、GPCRは多量体を形成しているとの報告がなされつつある。多量体形成がGPCRのシグナリングにどのように関与するのかを明らかにすることは、新薬開発や病態解明に寄与することが期待される。本研究では、GPCRの一つで走化性因子受容体であるFPR1(フォルミルペプチド受容体)、CXCケモカイン受容体の代表としてCXCR1、CCケモカインファミリー受容体の代表としてCCR5について、エバネッセント蛍光顕微鏡を用いて一分子イメージングを行い、GPCRの多量体形成の観察を試みた。

2. mRNAの核内運動の1分子蛍光イメージング

真核生物では、遺伝情報を蓄えている DNA と、その遺伝情報を基に蛋白質を作るリボソームが存在する細胞質が核膜により区画されている。そのため、真核生物の遺伝情報が核から細胞質へ mRNA によって伝えられる必要がある。mRNA のプロセッシングと輸送のメカニズムを研究するための第一歩として、細胞の核内で1分子の mRNA の動きをイメージングする蛍光顕微鏡技術を開発し、mRNA の運動を解析した。

B. 研究方法

1. GPCR の1分子蛍光イメージング

受容体のC末端側にEGFP(緑色蛍光蛋白質)を融合した発現ベクターを、FPR1、CXCR1、CCR5 の3つの受容体について作製した。これらの発現ベクターを用い、安定発現細胞株(CHO 細胞)を作製した。この細胞をエバネッセント蛍光顕微鏡で観察し、GPCR が何量体になっているか解析した(図1)。

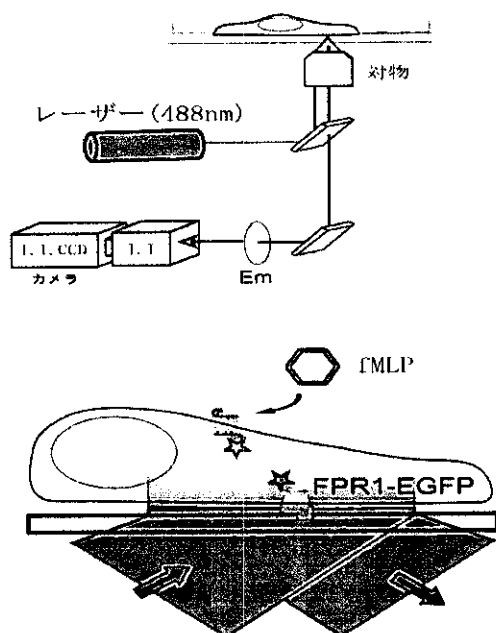


図1 対物型エバネッセント蛍光顕微鏡を用いた蛍光標識受容体の1分子観察(模式図)

さらに、FPR1 のリガンドであるフォルミルペプチドを蛍光色素、Alexa594 で標識し、ヒト末梢血好中球に加えて FPR1 との結合の様子

を1分子蛍光イメージングした。

2. mRNA の核内運動の1分子蛍光イメージング

mRNA を次の2つの方法を用いて蛍光標識した。(1) ヒト β -globin 部分遺伝子の mRNA (2つのエキソン、1つのイントロン、cap、polyA を含む 540 塩基、) を調製し、平均 10~15 分子の Cy3 で蛍光標識した。(2) 1分子のテトラメチルローダミン (TMR) が結合しているオリゴ DNA「TMR-S-Oligo-dT」を調製し、内在性の mRNA に結合させた。それぞれの mRNA を *Xenopus* A6 細胞の核にマイクロインジェクションし、超高感度ビデオカメラを搭載した共焦点顕微鏡 (CSU10) を用いて観察した。

C. 研究結果

1. GPCR の1分子蛍光イメージング

FPR1-EGFP、CXCR1-EGFP、CCR5-EGFP のそれぞれについて、EGFP が結合しても GPCR の機能が保全されていることを、リガンド依存的細胞内カルシウム濃度上昇を指標として確認した。

安定発現細胞株のひとつ、FPR1-EGFP 発現 CHO 細胞の細胞膜を、対物型エバネッセント蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、細胞膜内で側方拡散する輝点が多数認められた(図2)。

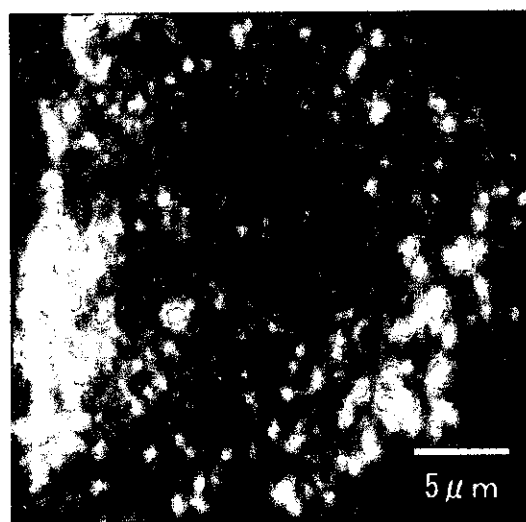


図2 CHO 細胞に発現させた FPR1-EGFP の蛍光顕微鏡写真

この輝点の蛍光強度時間変化をプロットすると、量子的退色が認められ、本研究で用いた顕微鏡システムが EGFP 一分子を捉えていることが示された (図3)。輝点の蛍光強度分布から、FPR1-EGFP はリガンド非存在下であるに関わらず、2~4量体を中心とする多量体を形成していることが示された。同様に、CXCR1-EGFP、CCR5-EGFP 発現 CHO 細胞においても2~4量体を中心とする多量体形成が認められた。

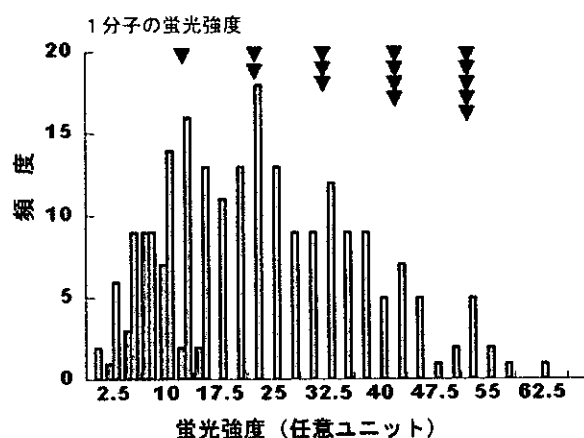


図3 1分子のEGFPの蛍光強度分布(緑色)とCHO細胞に発現させたFPR1-EGFPの蛍光強度分布(青色)

これらの結果はGPCRのうち、少なくとも走化性因子・ケモカイン受容体に分類される受容体ファミリーは構成的に多量体を形成する、ということを示唆している。FPR1-EGFP発現CHO細胞に、十分な量のリガンドを投与すると、時間依存的にFPR1-EGFPは細胞膜のいたる所に凝集し側方拡散が止まることが確認された。しかし、まだ凝集せずに側方拡散しているFPR1の輝点の蛍光強度分布を調べたところ、リガンド非存在下での輝点の蛍光強度分布と統計的有意差(有意水準5%)を認めなかった。これらの実験結果はFPR1はリガンド非存在下で既に多量体を形成しており、リガンド結合はFPR1多量体形成に関与しないことが示唆された。さらに我々は、Alexa594で標識したフォ

ルミルペプチドを用いて、ヒト末梢血好中球に発現しているFPR1に結合したリガンドの1分子イメージングを行った。実験に使用した好中球はフォルミルペプチド濃度勾配を感知し、顕微鏡観察下で蠕動運動を呈した。FPR1に結合したリガンドの蛍光強度の分布を解析したところ、2~4分子の多量体を形成していることを示す結果を得た。

2. mRNAの核内運動の1分子蛍光イメージング

A6細胞の核内に蛍光標識したmRNAをインジェクションすると、mRNAの輝点が核内に現れた(図4)。

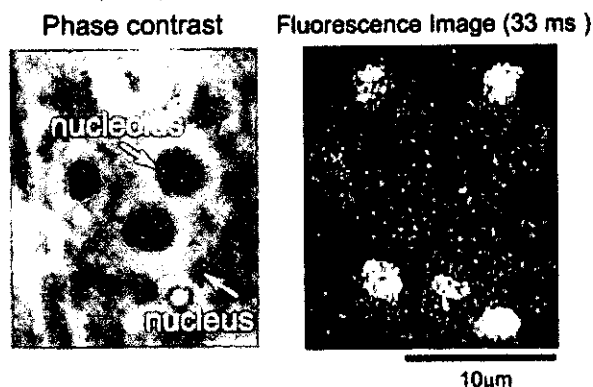


図4 mRNAの顕微鏡像

個々の蛍光mRNAを観察すると、動いているmRNAと止まっているmRNAがいることが明らかになった。個々のmRNAの運動をビデオの1フレーム(33ms)毎に解析し、動いているmRNAと止まっているmRNAの割合を求めたところ、両者はほぼ同じになった。この割合は、mRNAをインジェクションしてから1.5時間後まで変らなかった。次に、止まっていたmRNAが動き出すまでの時間をヒストグラムにして解析した結果、平均約30秒の指数関数分布になった。このmRNAは何らかの核内構造物に結合していると考えられる。続いて、運動しているmRNAを解析した。水平方向(x,y方向)の変位の2乗(平均二乗変位: $\Delta x^2 + \Delta y^2$)を時間に対してプロットすると、直線になった。このことからmRNAの運動はブラウン運動で

あることが示唆された。拡散定数を算出すると $0.4\mu\text{m}^2/\text{s}$ となった。この拡散定数は同じ mRNA を純水中で計測した場合の約 1/100 であった。また、mRNA の長さを 2 倍(EGFP mRNA 800nt)、4 倍(mTAK mRNA 1700nt)と変えても同様の結果が得られた。一方、オリゴ dT が結合した内在性の mRNA についても同様の動きが観察された。いずれも mRNA の核内輸送が拡散によるものであることを支持する結果となった。

GFP を核内にインジェクションして拡散定数を測定したところ、核内では純水中の 1/4 であった。従って、mRNA の拡散が遅いことは、単純な粘性では説明できない。mRNA が mRNA 結合タンパク質と巨大な複合体を形成したり、非常に早い結合・解離を繰り返しながら拡散している可能性が考えられる。mRNA の運動がブラウン運動であることは次の 2 つのコントロール実験からも支持された。まず、アジ化ナトリウムとデオキシグルコースを培地に加えて ATP を欠乏させても mRNA の運動に変化はなかった。また、23 度と 30 度で mRNA の運動を測定したところ、温度による粘性係数の分だけ拡散定数が変化した。

D. 考察

1. GPCR の 1 分子蛍光イメージング

走化性因子・ケモカイン受容体に代表される GPCR は構成的に多量体を形成することを、1 分子蛍光イメージング法を用いて明らかにした。GPCR-EGFP の蛍光強度の分布から、主として 2~4 量体を構成している GPCR が多いことが示された。また、GPCR の多量体形成に、リガンド結合は関与しないことも示された。GPCR の多量体化と機能の関係を明らかにすることが今後の課題である。これによって、GPCR の多量対化を抑制する化学物質の開発などを通して、臨床に有効な薬剤を開発できるかもしれない。

2. mRNA の核内運動の 1 分子蛍光イメージン

グ

mRNA は核内構造物とダイナミックな結合・解離を繰り返しながらブラウン運動していた。A6 細胞の核の直径は $10\sim 15\mu\text{m}$ なので、mRNA は測定された拡散運動では数分で核膜孔に到達できると予想される。一方、mRNA の核外輸送には 1 時間を要していた。このことは、核外輸送因子の結合や核膜孔複合体への結合が核外輸送の律速過程になっている可能性が示唆される。

E. 結論

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の 1 分子蛍光イメージングと、mRNA の核内運動の 1 分子蛍光イメージングの研究結果が示すように、生きている細胞内で個々の生体分子の可視化しながら、その機能を 1 分子レベルで解析する技術基盤を整えることができた。今後は、量子ドットによる生体分子の標識を評価し、生体分子機能の長時間にわたる追跡の実現を目指す。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Funatsu, T., Taniyama, T., Tajima, T., Tadakuma, H., and Namiki, H. Rapid and Sensitive Detection Method of A Bacterium Using GFP Reporter Phage. *Microbiol. Immuno.* **46**: 365-369. (2002)
- 2) Fujiwara I., Takahashi, S., Tadakuma, H., Funatsu, T., and Ishiwata, S. Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nature Cell Biol.* **4**: 666-673. (2002)
- 3) Y. Shirasaki, H. Makazu, K. Tashiro, S. Ikeda, T. Sekiguchi, S. Shoji, S. Tsukita, and T. Funatsu

“A Novel Biomolecule Sorter Using Thermosensitive Hydrogel in Micro Flow System” *Micro Total Analysis System* 2002, pp925-927, (2002).

- 4) 船津高志 「1分子蛍光イメージング技術による生命現象の解析」*可視化情報学会誌* vol. 22 pp. 18-21. (2002)
- 5) 座古保、船津高志 「生体機能を1分子レベルで探る - 1分子蛍光イメージング-」*分光研究* vol. 51 No.1 pp.3-14. (2002)
- 6) 船津高志 「1分子蛍光イメージング法」*感覚器官と脳内情報処理* (共立出版: 御子柴克彦、清水孝雄 編) pp. 192-199. (2002)

2. 学会発表

- 1) 船津高志 「1分子の蛍光観察とポストゲノム時代」*日本電子顕微鏡学会関東支部第26回講演会イメージングの最先端とその技術 要旨集* pp.12-17 (2002)
- 2) 船津高志 「mRNAの核内運動の1分子蛍光イメージング」 第107回日本解剖学会総会全国学術集会抄録号 SJ2-2 (2002)
- 3) 船津高志 「1分子蛍光イメージング法による生体分子機能解析」*日本化学会第81回春季年会* (2002)
- 4) Funatsu, T. “Single-molecule imaging of biological functions” *Five International Biophysics Congress. Abstracts* pp.55. (2002)
- 5) 船津高志 「1分子蛍光イメージングの現状と展望」 第55回日本細胞生物学会大会細胞生物学会・発生生物学会合同大会 (2002)
- 6) 船津高志 「1分子蛍光イメージング」*レーザー顕微鏡研究会第28回講演会* (2002)
- 7) 船津高志 特別講演 「1分子蛍光イメージング法による生体分子機能解析」*日本分光学会 医学生物学部会シンポジウム2002『光ナノテクノロジー・生命科学への展開』* (2002)
- 8) M. Yoshida, H. Taguchi, Y. Watanabe, F. Motojima, H. Tadakuma, T. Ueno, T. Funatsu. Rescue of unfolded or aggregated proteins by molecular chaperones 第75回日本生化学会大会 抄録集 pp631 (2002)
- 9) 田口英樹、上野太郎、多田隈尚史、船津高志、吉田賢右 「シャペロニンGroELのATP加水分解サイクル」第75回日本生化学会大会 (2002)
- 10) 船津高志 「1分子蛍光イメージング法による生体分子機能解析」第11回日本バイオイメージング学会学術集会 (2002)
- 11) 座古保、飯塚怜、大河内美奈、上野太郎、養王田正文、船津高志 「古細菌由来プレフォルディンと、基質タンパク質、シャペロニンとの相互作用について」*日本生物物理学会第40回年会* (2002)
- 12) 上野太郎、田口英樹、多田隈尚史、吉田賢右、船津高志 「GroELのATP加水分解サイクルにおけるヌクレオチド状態」*日本生物物理学会第40回年会* (2002)
- 13) 細野和彦、上野太郎、田口英樹、元島史尋、座古保、吉田賢右、船津高志 「チロシンの蛍光郷土変化を指標としたGroELの構造変化検出」*日本生物物理学会第40回年会* (2002)
- 14) 東條正、青木大輔、木脇圭一、シルヴィア イスカンダル、多田隈尚史、石渡信一、船津高志 「Gタンパク質共益型受容体・FPR1はGFPの有無に関わらず多量体形成する: 蛍光一分子観察による解析」*日本生物物理学会第40回年会* (2002)
- 15) 鞍馬秀輝、貴家康尋、多田隈尚史、永川豊広、船津高志、原田慶恵 「蛍光標識β-actin mRNAの細胞内輸送と局在のイメージング」*日本生物物理学会第40回年会* (2002)
- 16) 白崎善隆、真一弘士、田代浩一、池田晋吾、関口哲史、庄子習一、月田承一郎、船津高志 「熱感受性ハイドロゲルを用いた生体分子ソーターの開発」*日本生物物理学会第40回年会* (2002)

- 17) 刈間理介、東條正、灰野誠、船津高志、松島綱治 「全反射レーザー顕微鏡 (エバネッセント顕微鏡)による LPS の細胞膜における分子挙動の観察」 第 32 回日本免疫学会総会・学術集会 (2002)
- 18) 東條正、青木大輔、木脇圭一、シルヴィア イスカンダル、多田隈尚史、石渡信一、船津高志 「G蛋白質共役型受容体・FPR1 は GFP の有無に関わらず多量体形成する: 蛍光一分子観察による解析」 第 25 回日本分子生物学会年会 Annual Meeting of MBSJ (2002)
- 19) S. Shoji, N. Honda, H. Sato, M. Kanai, M. Ishizuka, T. Funatsu. Micro Flow Devices/ Systems and Biomolecules Handling in Micro Flow Channels, 1st Int. Meeting on Microsensors & Microsystems, pp17-23 (2003)
- 20) 船津高志 「1 分子蛍光イメージング法による生体分子機能解析」第 227 回 CBI 学会研究講演会「タンパク質研究の最前線」(2003)
- 21) 船津高志 「レーザー顕微鏡による生体分子イメージングと操作」レーザー学会学術講演会第 23 回年次大会 (2003)
- 22) T. Tojo, D. Aoki, K. Kinowaki, S. Iskandar, H. Tadakuma, S. Ishiwata, T. Funatsu. Oligomerization of FPR1, a G-protein-coupled receptor, is independent of ligand binding in living cells; An analysis using single molecule imaging techniques. Biophysical Society 47th Annual Meeting in San Antonio, Texas, USA (2003)
- 23) T. Zako, R. Iizuka, M. Okochi, T. Ueno, M. Yohda, T. Funatsu. Fluorescence detection and kinetic analysis of interaction between Pyrococcus prefolidin and substrate protein. Biophysical Society 47th Annual Meeting in USA (2003)
- 24) H. Tadakuma, T. Shibuya, Y. Ishihama, T. Tani, T. Funatsu. Imaging of Single mRNA Molecules Moving within a Nucleus of Living Cells Biophysical Society 47th Annual Meeting in USA (2003)
- 25) T. Ueno, H. Taguchi, H. Tadakuma, M. Yoshida, T. Funatsu. Nucleotide state in ATP hydrolysis cycle of GroEL. Biophysical Society 47th Annual Meeting in USA (2003)

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 特願 2002-319577 マイクロシステム 発明者 船津高志、庄子習一、和田添雄、筒井謙、水野潤、白崎善隆 特許出願人 早稲田大学
- 2) 特願 2003-40330 マトリックス型可変マイクロ流路及びそのシステム 発明者 船津高志、庄子習一、白崎善隆 特許出願人 早稲田大学

局所選択的診断治療用リポソーム粒子包含ナノ粒子の開発

分担研究者 松村 英夫 独立行政法人 産業技術総合研究所光技術研究部門主任研究員

研究協力者 古澤 邦夫 独立行政法人 産業技術総合研究所客員研究員

研究協力者 眞島 利和 独立行政法人 産業技術総合研究所光技術研究部門主任研究員

研究要旨

リポソームは脂質2分子膜の微粒子であり、その内部や膜内に種々の生体機能性の分子を保持できることから、薬物やセンサー試薬等を配達するキャリアーとして研究されている。我々はこの分子を輸送する機能をもつリポソームと他の機能をもつ微粒子の複合化をすることで、より高機能をもち医学・医療に貢献できると期待される複合微粒子の研究開発を進めている。手始めとして、磁性をもち外部磁場によりその存在場所がコントロールできる磁気微粒子との複合化を目指し、複合化の方法とこれに用いる磁気微粒子、リポソーム微粒子の特性について研究した。複合化の方法はタンパク質を仲立ちとするブリッジング法が良好な結果を与えること、金平糖型複合微粒子「マグネト・リポソーム」には磁気微粒子としてヘマタイトが良いことなどの研究成果を得た。

A. 研究目的

現在までに研究開発されてきた微粒子の利用法としては生体成分分離用、イメージング用（造影剤等）、デリバリー用（薬物輸送）、物理的治療用などがあげられる。これらはそれぞれの効果をあげているが、将来の医療工学にはさらに進んだ機能をもつ微粒子系が望まれると思われる。例えば、センシングあるいはイメージングなどの検出機能と同時に治療やオペレーションの補助に利用可能な微粒子系の開発などが考えられる。

われわれは、最初に、試薬のターゲティング輸送と制御リリースの両方の特性を持つ微粒子開発を試みた。すなわち、任意の場所で任意の時間に試薬（プローブ分子や薬物）を放出、供給するツールの開発である。磁気微粒子とリポソームから構成される複合微粒子（マグネト・リポソーム）の開発である。この新型のマグネト・リポソームは中心に磁気微粒子を、周囲に脂質の二分子膜微粒子であるリポソームを配置したものである。

B. 研究方法

1. 磁気微粒子

作製方法：塩化鉄を原料にヘマタイト微粒子を合成する。各種濃度の FeCl_3 水溶液を密栓瓶中で 100°C で各時間処理した。粒子サイズは濃度と反応時間で決る。粒子サイズを揃えるために沈降分離処理を数回繰り返した。ヘマタイト粒子の水中での単粒子としての分散性を上げるために、表面にシリカ層を合成し、負の表面電荷量を増加させた。シリカ層合成はテトラエトキシシランを加水分解することで行った。

2. リポソーム

作製方法：

リポソームはリン脂質（卵黄ホスファチジルコリン：Sigma 社から購入）を、まず、エタノール溶液から窒素ガス風乾により試験管壁面に付着させた後、高速攪拌により純水に分散した。その後フィルタリングやエクストルージョン法により約 200nm サイズまで粒子サイズを下げた。

電場応答によるリポソーム膜の内包分子透過能変化を調べる実験では、上で述べた純水の代わりにリポソーム内側にトラップする分子（Quin 2 あるいは CaCl_2 ）の水溶液を使用した。

3. 複合微粒子作製

中心に磁気微粒子、その周りに多くのリポソーム微粒子をもつ、金平糖型複合微粒子（図1）の作製は、それぞれの微粒子表面の電荷が反対になる溶液条件でのヘテロコアグラーションやタンパク分子を橋とするブリッジング法で行った。

4. 微粒子のキャラクタリゼーション

各種微粒子表面や複合粒子の静電的特性についてはゼータ電位測定（顕微鏡電気泳動

装置）で行った。粒子サイズについては動的光散乱法や光学顕微鏡法を併用した。

複合微粒子の形成は光学顕微鏡やX線顕微鏡で行った。

5. リポソーム粒子膜の透過特性評価：

マグネト・リポソームのバイオ・メチカル領域への応用の際必要となる電場印加による内包試薬の放出特性をしらべた。電場は矩形波交流の $10-100\text{kHz}$ を用い、電場強度は最大ピーク間電圧 140V を 1mm 間隔の白金電極に加えた。電場印加されるリポソーム分散サンプル量は約 3ml でマグネチックスターラーで常時攪拌すると共に、水浴にて温度コントロールを施された。この実験に用いたリポソーム試料は、リポソーム内相に Ca イオンと結合して蛍光強度が増大する蛍光分子 Quin 2 を封入し、外相溶液に Ca イオンを含む水溶液を用いた。また、この逆の組み合わせの試料系も実験に用いた。内相に封入した分子が電場印加によりリポソーム膜を透過し外相に流出した結果生じる Quin 2— Ca イオンコンプレックスの量は増大する蛍光強度の測定にて行った。この測定は通常の蛍光分光光度計を用いた。

C. 研究結果

1. 磁性微粒子の作製：

ヘマタイトは超常磁性微粒子であるため磁氣的相互作用による自己凝集が少なく、外的磁場がかからない限り単粒子として水中に分散する傾向にある。しかし、水中でより高安定に単粒子分散させるために、ヘマタイト表面にシリカ層を合成し粒子表面電荷密度を高め静電的反発力を増すことを試みた。

磁気微粒子としてはヘマタイトの数百 nm - 1 μm がえられているが、観察の容易さから 0.7 μm の粒子で検討した。この磁気微粒子は均一磁場により会合することが確認され (図 2)、また勾配磁場による磁場強度の大きい所への泳動挙動から、磁気泳動速度係数として約 0.01 (cm/s) (T/cm) 程度のものであることが判った。ここで、T は磁場強度テスラを現す。図 3 にヘマタイト、シリカ、シリカ層を持つヘマタイトの表面電位 (ゼータ電位) の pH 依存性を示す。透析を行い表面をきれいにしたシリカ層を持つヘマタイトはシリカ粒子とほぼ同じ等電点を示し、シリカコーティングが完成されている事がわかった。pH 中性領域では十分な負電荷を持ち粒子間反発力を持つことが確認された。さらに、シリカ層を表面に合成した粒子は光学顕微鏡観察により非常によい単粒子状態で水中に分散することも確認された。また、X 線顕微鏡 (図 4) や透過型電子顕微鏡により、シリカ層が滑らかにヘマタイト粒子表面に形成されていることについても確認した。

2. 複合微粒子マグネット・リポソームの形成:

シリカ層コーティングされた磁気微粒子表面上にさらにリポソーム粒子を付着させる方法としてヘテロ凝集法やタンパク質を架橋分子としたブリッジング法を使った。タンパク質は種々の表面に物理吸着しその過程は多くの場合不可逆吸着であることが知られている。これは安定な複合粒子作製やまた生体適合性の観点からも有用である。タンパク質としては Cytochrom C や Lysozyme を用いた。タンパク質濃度 1 mg / ml の水溶液とシリカコーティング磁気

微粒子を混合し、タンパク吸着されたこの微粒子を沈降分離を繰り返し上澄みをそのつど除去しタンパク吸着微粒子試料とした。これを更にリポソーム分散液と混合し複合微粒子マグネット・リポソームを作製した。作製プロセスを確認するため、各ステップで形成される微粒子表面の電荷符合の測定を電気泳動測定法でしらべると、表面に付く分子や粒子の種類に対応して表面電荷 (および表面電位) の正負が変わることが示され、目的のものが出来たことが確認された (図 5)。光学顕微鏡観察を容易にするためにさらに 0.4 ミクロン程度のシリカ粒子を外側に付着させたものの像を図 6 に示す。

3. リポソーム粒子の特性評価:

電場印加によるリポソーム内包試薬の放出特性をしらべると、明らかな周波数依存性が見られた (図 7)。1 kHz に極小をもち両サイドで蛍光強度の増加量は増えている。より低周波、より高周波において膜透過性が大きいことを示した。

D. 考察

今回作製したヘマタイトを核とする磁気微粒子系は外部磁場に充分応答すると共に、単一粒子として水溶液中に分散することから十分応用に耐えられるものと思われる。リポソームを磁気微粒子系に付着する方法として塩基性タンパク質によるブリッジングを用い良好な結果がえられているが、さらに安定なリポソームを含む複合微粒子を作製するにはタンパク種類やその組み合わせも研究対象と考えられる。リポソームについては、電場応答性を中心に研究したが、膜透過能の周波数依存性は低周波での増加

が電極による電気分解効果の結果起こるサンプル溶液の実効電気伝導度の増加によるもの、また、高周波側での増加は微粒子の表面に形成されている電気二重層による表面電気伝導が大きな役割をはたすコロイド分散系の実効電気伝導度の周波数依存性によると解釈することができる。すなわち、膜のエレクトロ・ポレーション（膜穴の開閉）の確率的平衡反応（図8）が電場エネルギーの消費に基づき結果として温度（T）上昇が起こり開側へシフトした結果であると解釈できる。これは、局所領域でのジュール熱の発生が主な原因になっている可能性を意味していて、電場強度（U）そのものが必ずしも大きいことが必要でないことを示唆している。

E. 結論

今回試みたリポソームを含む複合微粒子の作製法は良好な結果を示した。今後は、より高性能なリポソーム膜の開発が一つの鍵となると思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究成果

1. H.Matsumura, K.Furusawa, Aggregation of Liposomes and Effects of Electric Fields on it., in *Interfacial Electrokinetics and Electrophoresis*, ed. A.Delgado, Marcel Dekker, 2002, pp971-982.
2. M.Dimitrova, H.Matsumura, N.Terezova, V.Neytchev, Binding of globular proteins to lipid membranes studied by isothermal titration calorimetry and fluorescence, *Colloid &*

Surfaces B, 24(2002)53-61.

3. V.Neytchev, N.Terezova, H.Matsumura, T.Tomov, Membrane electropermeabilization effects of frequency and membrane surface order on liposomes leakage, *Histol Histopathol*, 17(2002)649-656.
4. K.Furusawa, H.Matsumura, Electrokinetic characterization of colloid particles for composite preparation, *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Marcel Dekker, in press.
5. K.Furusawa, H.Matsumura, T.Majima, Characterization of Silica Coated Hematite and Application to the Formation of Composite Particles Including PC Liposomes, *J. Colloid Interface Sci.*, in press.
6. Bo Yang^a, Kunio Furusawa^b, and Hideo Matsumura^{c*} Adsorption state of PC vesicles on solid colloidal particles and their aggregation behavior induced by the PC vesicle, *Langmuir*, in press..

H. 知的財産権の出願・登録状況

マグネト・リポソームの特許を保持（特許第 3200704 号）。

今期はない。

謝辞

微粒子形態の光学顕微鏡観察に日ごろ協力いただいている産総研脳神経情報研究部門の加藤薫氏に感謝いたします。また、磁性微粒子について議論していただいている横浜市大の尾崎正孝氏やリポソーム膜透過性について議論を重ねているブルガリヤ生物物理研究所の V. Neytchev 氏 I. Tsoneva 氏に感謝いたします。

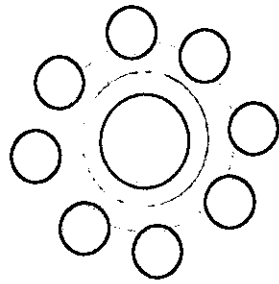


図1. 複合微粒子マグネット・リポソームの模式図。中心から順に、磁性微粒子、シリカ層、タンパク吸着層、多くのリポソーム微粒子を表わす。

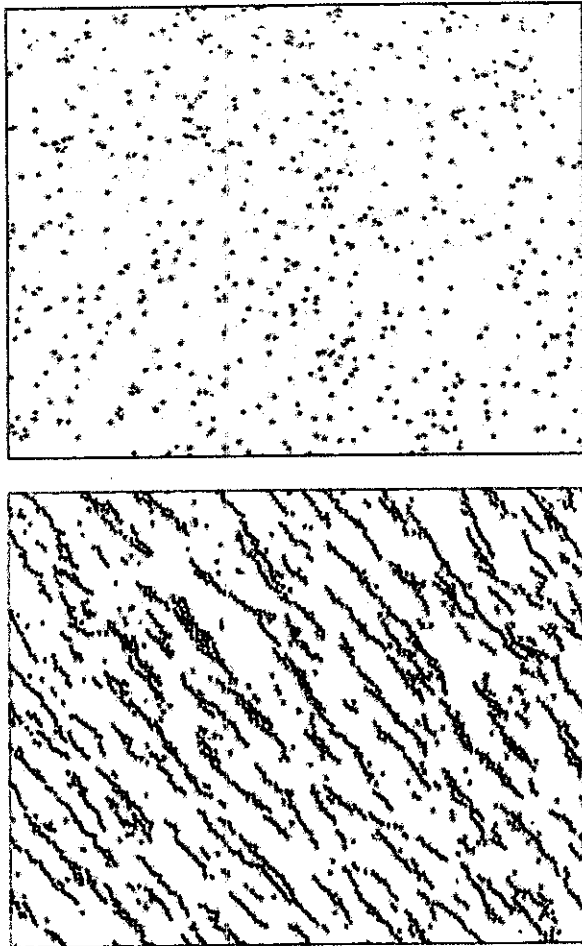


図2. シリカをコートしたヘマタイト。上：磁場がかかっていないとき。下：数百ガウス程度の磁場による磁気微粒子の集積と配向。

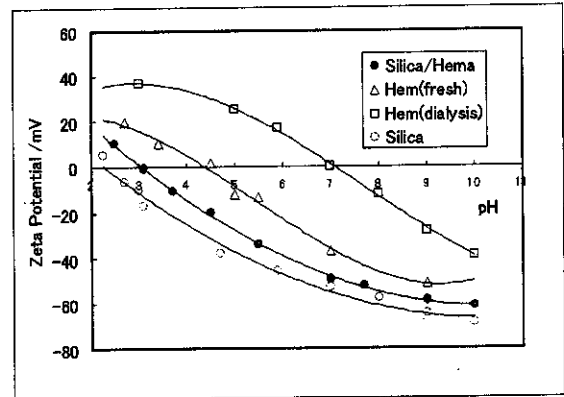


図3. ゼータ電位。ヘマタイト: Hem(fresh)は合成直後、Hem(dialysis)は純水で長時間透析した後、シリカ (Silica)、シリカ層を持つヘマタイト (Silica/Hema)。

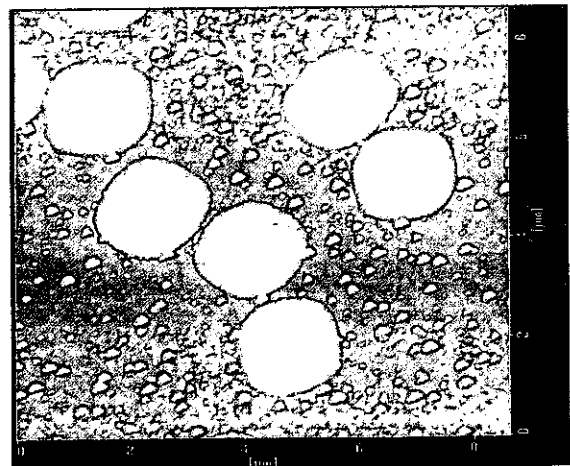


図4. シリカコートしたヘマタイト粒子のX線顕微鏡像。密着型X線透過像をPMM A樹脂のレプリカをAFMで読み出した像。

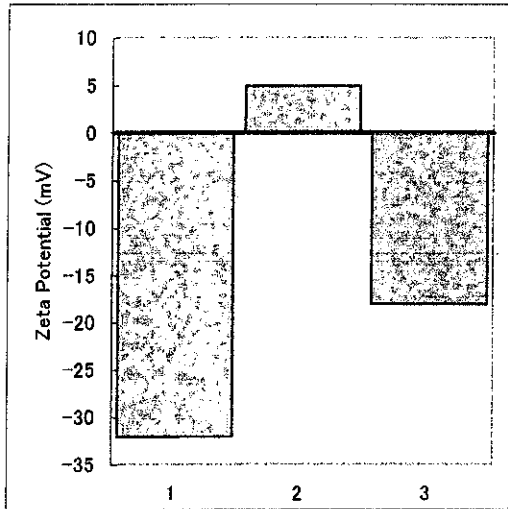


図5. 複合微粒子作製過程の各ステップにおける粒子表面の表面電位。1: シリカコーテッドヘマトイト、2: タンパク吸着後、3: リポソーム吸着後。

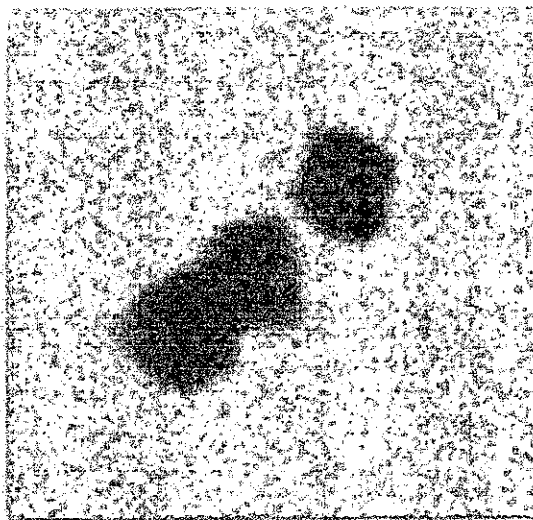


図6. ヘマトイト粒子・リポソーム・シリカの3層構造のマグネト・リポソームの光学顕微鏡像。中心のヘマトイトは0.7マイクロン。

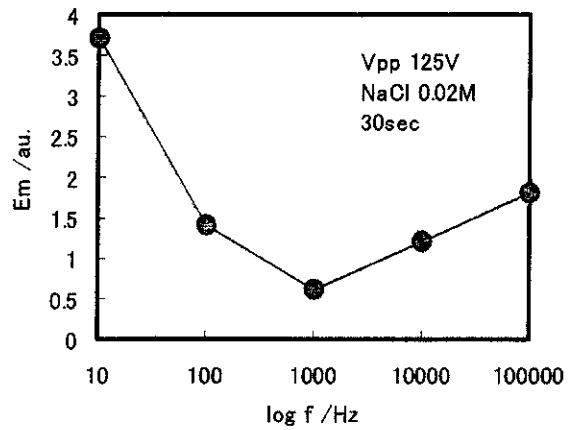


図7. 電場印加後の試料溶液の蛍光強度増加量の電場周波数依存性。印加電圧125 V p-p、外液のNaCl濃度0.02M、印加時間30秒。

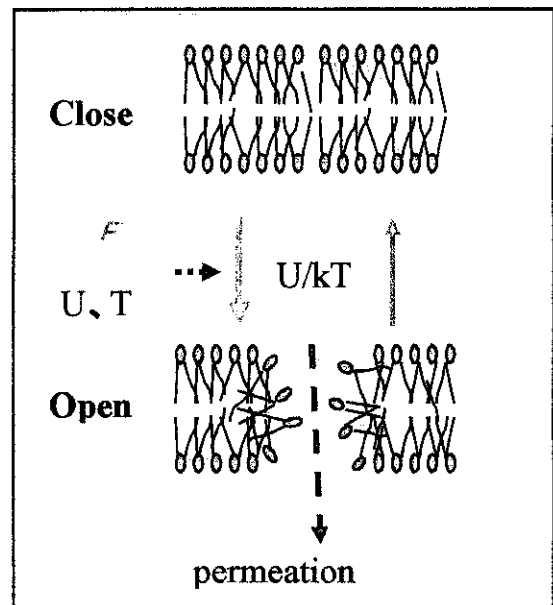


図8. エレクトロポレーションの確率的平衡モデル。

量子ドットの多臓器不全診断治療への応用

分担研究者 山本 健二 国立国際医療センター 部長

研究要旨

本研究の目的は、ナノプローブの開発とその利用による生体組織、培養細胞内の可視化技術の開発、次年度は各種イメージングシステムの改良と新規開発により組織障害の局所高感度診断を遂行、最終年度は組織障害の再生・治癒過程の解析を行い、超極限分子プローブを用いたナノメディシンの診断治療指針を示す。本年度は、その準備段階として、既に合成手法が確立されている5 nmの Cd/Se の半導体ナノ粒子(量子ドット)を利用し、蛍光顕微鏡を用いそのプローブの細胞内動態評価手法確立し、その *in vitro* の有用性を確認した。

A. 研究目的

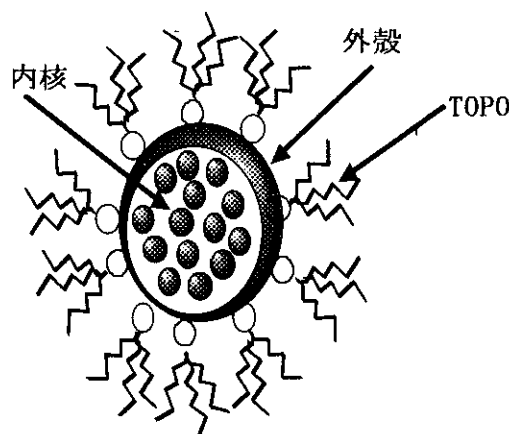
大きさが1nm~10nm程度の金属微粒子集団(量子サイズドット; QD)の比熱、磁化率などの物性は、マクロサイズのふつうの金属としてのものと著しく異なることが1961年久保亮五によって理論的に示され、(量子サイズ効果)。その後、久保理論の定量的検証は困難であるが、定性的にはこの効果の存在が認められ、微粒子系物理の大原理として国際的に認められた。この金属微粒子集団(QD)の物性は、そのサイズにより異なる性質があることから、その後の工学的応用は、QDのサイズをいかにして一様に製造できるかが問題であった。Alivisatosらは1998年半導体を用いこれを可能とした。半導体QD(半導体ナノ粒子)は、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が親水性に乏しく、また塩濃度、pHなどにより、細胞培養条件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。そのような観点に立ち立生物材料などを通じた、バイオナノ工学的に自己組織化法による蛍光ナノ粒子の合成を行ない、超極限分子プローブとして生物・医療応用を行う事を目的としている。

B. 研究方法

1. 合成方法

カドミウムとセレンからなる半導体ナノ粒子(Cd/Se量子ドット)は、トリオクチル・フォスフィン・オキシサイド(TOPO)を3

00度以上に加熱したものに酸化カドミウム等とセレン化合物を一挙に導入し、その後析出してくるものとして製造される(TOPO法)。析出時間を制御することにより、赤、橙、黄、緑等の蛍光物質を製造することができる。その構造を安定化するために、硫化亜鉛(ZnS)で皮膜を作成する。このようにして製造された一桁ナノサイズの粒子は、中核(コア)がCd/Seの半導体で外殻(シェル)がZnSの大きさが凡そ5nmの粒子である。研究に用いている半導体ナノ粒子はセレン化カドミウムを核、硫化



亜鉛を殻とする
コア・シェル型ナノ粒子である。

2. 表面加工

上述のようにして製造された半導体ナノ粒子は、IT分野においては、メモリーとし

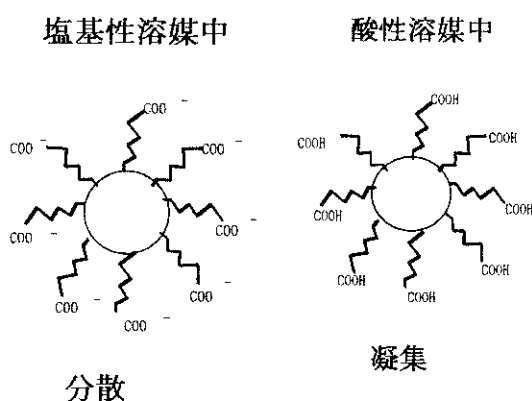
て、光工学的には、超小型のレーザー発生デバイスとして、国の内外でしのぎを削って開発されている。ところが、上述の方法で製造された半導体ナノ粒子は、トルエンなどの有機溶媒には溶解可能であるが、このままでは、水に溶解しない。これについては、現在までに水に溶けるための様々な親水加工法が開発されている。例えば、珪酸で半導体ナノ粒子の表面を覆いその被覆した珪酸分子どうしを架橋する。それが丁度半導体ナノ粒子を覆う籠のようなものとなり、親和性が高くなり水に安定に溶解する。他の方法としては、同様の概念で、珪酸の代わりにポリアクリル酸を使う方法がある。半導体ナノ粒子の表面を覆いその被覆した表面を光で架橋する方法である。これらとは少し異なる方法として、前述のようにして (TOPO 法によって) 製造された半導体ナノ粒子は、その表面が TOPO で覆われている (図 3)。TOPO のアルキル基が親水性でないため水に溶けないので、この代わりに、カルボン酸で置き換える方法である。この方法では、カルボキシル基の反対側をメルカプト基とし、シェルと安定に結合させる。このようにして表面加工された半導体ナノ粒子は、ナトリウム塩や、カリウム塩として水に溶かすことができる。疎水性化合物であるが、11-メルカプトウンデカン酸と硫化亜鉛とを結合させて粒子表面にカルボキシル基を出させることによって親水性粒子としている。この置換方法は、まず 11-メルカプトウンデカン酸を 80℃ に加熱し恒温に保つと熔融しており、この熔融した 11-メルカプトウンデカン酸に前述の量子ドットを溶かしこみ数時間放置することにより置換し、さらにナトリウム塩又は、カリウム塩として親水性を示すようになる。

3. 表面修飾

ところがこのままでは、中性または、塩基性水溶液には分散できるが、下の図に示すよう酸性酸い溶液中または高塩濃度において凝集し析出してくると言った欠点がある。

半導体ナノ粒子の親水化は既報の研究ではカルボン酸によるものがほとんどである。このカルボン酸で親水化した半導体ナノ粒子は中性から塩基性水溶液では分散安定で

あるが、酸性または中性であっても生理食塩水や動物細胞用培地のように塩を含むものでは凝集体を形成してしまう。ナノスケールにおける凝集は分子間力によっても強固で、再分散させることは困難である。そして、生体内では塩を含み酸性である場合がほとんどのため、現行のカルボン酸で表面修飾した半導体ナノ粒子は応用が難しい。酸性下での分散安定な半導体ナノ粒子を調製するため、現在、アミノ基を出すような表面修飾の開発を検討している



現在はこのカルボン酸の dendrimer となる量子ドットをさらに表面修飾し生物・医療用途に利用可能と成るように両親倍性物質で表面修飾を施してある。

C. 研究結果

このナノ粒子はセレン、カドミウムという重金属を主成分として含むため、その安全性については関心の集まる場所であるが、現在までのところそれに言及した発表は皆無である。セレン化カドミウム自身はカドミウムレッドに代表される赤色系顔料として 1920 年頃から用いられており、現在も絵の具、ガラスや陶器などの彩色に使われている。しかし、その毒性のため医薬品害毒物に指定されている。一方、半導体ナノ粒子のセレン化カドミウムは硫化亜鉛に強固に封入されているため、カドミウムレッドに比べて毒性は低いと思われる。しかし、硫化亜鉛に未封入または不完全封入のセレン化カドミウム粒子の夾雑は排除できないために、その毒性評価は重要である。現在研究に用いている半導体ナノ粒子は実験室

レベルで合成されたもので、動物個体での毒性評価を行うためには量的に潤沢でない。そのため、動物培養細胞を用いて合成ロット毎に毒性評価を行っている。

半導体ナノ粒子の親水化は既報の研究ではカルボン酸によるものがほとんどである。このカルボン酸で親水化した半導体ナノ粒子は中性から塩基性水溶液では分散安定であるが、酸性または中性であっても生理食塩水や動物細胞用培地のように塩を含むものでは凝集体を形成してしまう。ナノスケールにおける凝集は分子間力によっても強固で、再分散させることは困難である。そして、生体内では塩を含み酸性である場合がほとんどのため、現行のカルボン酸で表面修飾した半導体ナノ粒子は応用が難しい。酸性下での分散安定な半導体ナノ粒子を調製するため、現在、アミノ基を出すような表面修飾の開発を検討している。

一方、カルボン酸で表面修飾した半導体ナノ粒子は、非特異的に血清アルブミンと複合体を形成する。その複合体は生理食塩水または動物細胞用培地中でも分散安定である。そして、その複合体はヒト肝細胞やアフリカミドリザル腎由来の Vero 細胞に貪食されて、エンドソームに蓄積される。その様子は蛍光顕微鏡下で半導体ナノ粒子の蛍光を観察することで容易に確認することができる。エンドソームマーカーとしては、一般にフルオレセインやローダミンといった有機系蛍光色素標識アルブミンやデキストランが用いられているが、半導体ナノ粒子の高い光量と耐光性という特質によりカルボン酸で表面修飾した半導体ナノ粒子と血清アルブミンの複合体は既存のエンドソームマーカーに代わるものとしてその応用が期待される。

D. 考察

1) 達成度について

我が国において、はじめて量子ドットを使った生物学・医学応用が本年度我々の研究でなされた。特定細胞の標識およびその標識された細胞の生体内導入に必要な準備がなされたと言える。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

半導体ナノ粒子の研究開発は米国におけるナノテクノロジー研究の最重要課題の一つ

とされている量子サイズ効果 (Quantum Dot Effect) 理論に基づく新規な化合物で、粒子サイズにより発光色が変化し、発光強度と耐光性が既存の有機系蛍光色素をはるかに凌駕することが知られている。半導体ナノ粒子はまた、表面加工により様々な機能を賦与することが可能である。そこで、生体に安全な半導体ナノ粒子を開発し、開発した半導体ナノ粒子に様々な薬剤を結合させ、薬物動態を半導体ナノ粒子の可視光観察によって細胞・組織・臓器・生体レベルで解析する事は国際的に極めて重要である。また量子ドットにより特定細胞に標識しその標識された細胞を正常マウスに導入する事によりその生体内動態を明らかにしホストとの相互作用を見る事により、血管炎による多臓器不全について解析する事は、国民医療における難病を克服する事は、社会的にも意義が大きいと考える。

3) 今後の展望について

次年度以降は、細胞内動態解析のために必要な表面加工法を開発するとともに、実際開発された方法を利用して、細胞内分布や生体分布について実際に応用し新しいナノプローブの性能を評価する予定である。

近年多くの新規機能材料が設計・製造され使用され廃棄されている。また今後増々加速度的に新しい製造方法とともに世に出てくるだろうと考える。まず設計段階では、技術、ニーズなどのレベルでは異分野の交流が必要となる。また製造段階、使用段階、廃棄を通じて安全性について十分検討する必要がある。それらの全ての過程について技術者の養成が必要でありそのための訓練マニュアルを必要とする。

E. 結論

以上のように、本研究を通じて、半導体ナノ粒子がタンパク質やその他の生体分子に結合させその細胞内動態を観察するのに十分な特性を有する事がしめせた。更に、*in vitro*, *in vivo* のみならず *EX-vivo* および生体内動態について広範な動態解析する事も可能と成るといふ極めて特徴的な性質を有するため、生物・医療において今後の展開に向けての素地が築かれたと言える。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及

ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Hanaki, A. Momo, T. Oku, A. Omoto, Y. Yamaguchi and K. Yamamoto. Semiconductor quantum dot/albumin complex Is a long-life and highly photostable endosome marker, B.B.R.C. (In press).
- 2) J. Kizu, M. Arakawa, K. Yamamoto, Is There Relation between Antibiotic Sensitivity of Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus and Consumption of Antibiotics in a Hospital?: A Study in April 1993 - March. Jpn. J. Infect. (2002) 55 : 65-67.
- 3) Takeuchi, F., Futamura, Y., Yoshikura, H., Yamamoto, K. Statistics of trinucleotides in coding sequences and evolution, J. Theor. Biol., (In press).
- 4) Baba T., Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA, Lancet (2002) 359, 1819-1827

2. 学会発表

- 1) 花木賢一 桃あさみ 山本健二、エンドソームマーカーとしての半導体ナノ粒子の応用、第11回日本バイオメーキング学会学術集会、2002.10.31
- 2) 山本健二、半導体ナノ粒子の生物・医療応用、第16回日本ME学会、分子・細胞療法におけるME研究会(招待講演)
- 3) 栄羽範子, 前之園信也, 山本健二, 山口由岐夫, 半導体ナノ粒子水溶液の蛍光強度振動現象の非線形反応解析, 物理学会, 秋季大会(2002), 愛知県春日井

- 4) 栄羽範子, 前之園信也, 山本健二, 山口由岐夫, 半導体ナノ粒子水溶液の蛍光振動解析, 化学工学会, 第35回秋季大会(2002), 神戸

H. 知的所有権の出願・取得状況

- 1) なし

好熱メタン菌の FKBP の立体構造に関する研究

分担研究者 田之倉 優 東京大学農学生命科学研究科応用生命化学専攻 教授

研究協力者: 永田宏次、鈴木倫太郎

研究要旨

好熱メタン菌の FKBP は PPIase 活性とシャペロン活性の二つの活性を持つ。我々は本酵素の立体構造と PPIase 活性を NMR により解析した。本酵素はヒトの FKBP と相同のドメインの他に新しいドメインを有した。二つのドメインの相対配置が変化して様々な蛋白質に結合し、シャペロン活性を実現すると思われる。また、本酵素の PPIase 活性は高温でも十分に高く、両活性が協調してフォールディングを助けると考えられる。

A. 研究目的

好熱古細菌 *Methanococcus themolithotrophicus* の FK506 結合タンパク質 (MtFKBP17) は peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) 活性とシャペロン活性の二つの活性を持つ酵素である。詳しい研究が進んでいるヒトの FKBP (HsFKBP12) はシャペロン活性を示さないとされている。MtFKBP17 のアミノ酸配列は HsFKBP12 とくらべると、2箇所 42 残基と 13 残基の挿入配列があり、逆に HsFKBP12 の β 1 ストランドにあたる配列を欠いている。

二つの挿入配列がどのような構造をとり、MtFKBP17 のシャペロン活性および PPIase 活性に関わっているかは知られていない。また、本菌の生育至適温度は 65 度であるが、プロリンの異性化は温度が高くなると速くなるため、このような高温では PPIase 活性の寄与は相対的に小さくなると考えられる。

しかし、これも実験的には確かめられておらず、MtFKBP17 の PPIase 活性が生理的な意味を持つかどうかはわかっていない。

また、*M. themolithotrophicus* の生育至適温度は 65 度であるが、プロリンの異性化は温度が高くなると速くなるため、このような高温では PPIase 活性の寄与は相対的に小さくなると考えられる。しかし、これまで高温での PPIase 活性測定が困難であったため、実験的には確かめられていない。そのため、MtFKBP17 の PPIase 活性が生理的な意味を持つかどうかはわかっていない。

本研究は MtFKBP17 の立体構造を明らかにし、また高温での PPIase 活性測定を行うことにより、本酵素の二つの活性の生理的な意味および作用機構を明らかにする事を目的とする。

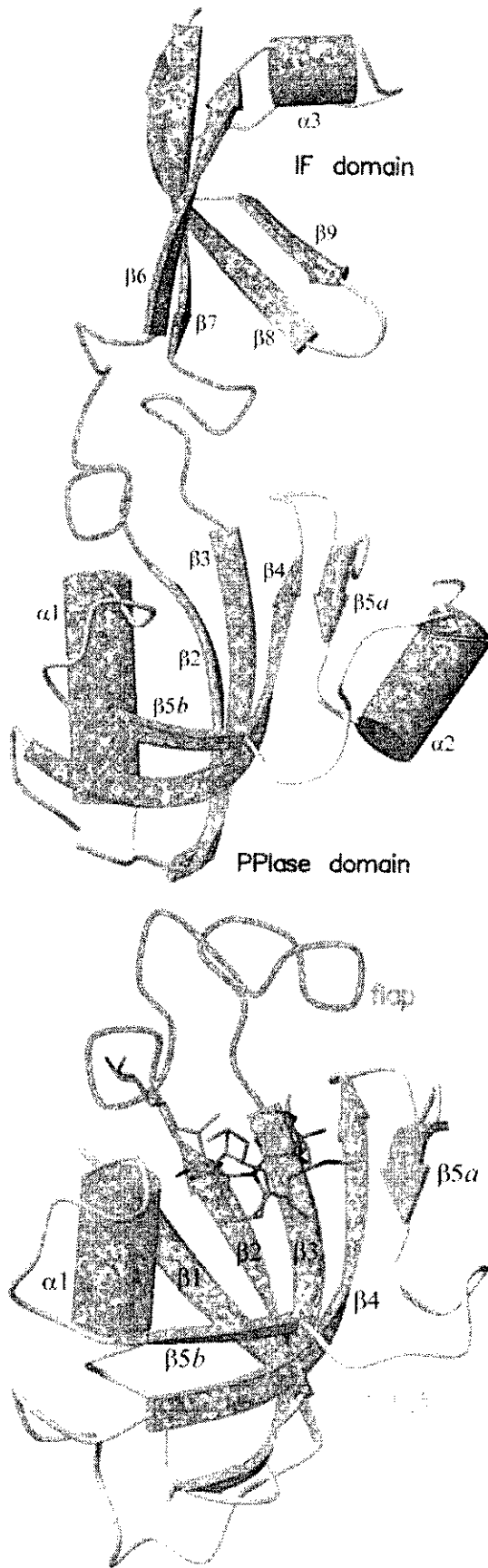


図 1. MtFKBP17(上)とヒトの FKBP(下)の立体構造

B. 研究方法

MtFKBP17 は大腸菌株 BL21(DE3)pLysS を用いて大量発現を行った。 ^{15}N および ^{13}C , ^{15}N ダブルラベル体の作成に際しては $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, ^{13}C -D-グルコースおよび ^{15}N -または ^{13}C , ^{15}N -Algal amino acid mixture(クロレラ工業)を培地中に加えた。IPTG 添加により MtFKBP17 を誘導後、集菌、超音波破碎して細胞内容物を抽出した。抽出後 80 度 30 分の高熱処理により大腸菌由来のタンパク質を沈殿させ、MtFKBP17 を主とする上清画分を回収した。さらに硫酸沈殿を行い、濃縮した粗抽出液を疎水性クロマトグラフィーにより精製した。

NMR 測定には Varian INOVA500 を用いた。NMR スペクトルを測定するためのパルスシーケンスは ProteinPack (Varian)に含まれるものを用いた。主鎖の帰属には ^{15}N -HSQC、HNCA、CBCA(CO)NH、HNCACB、HNCO、(HCA)CO(CA)NH の各スペクトルを用いた。側鎖の帰属には H(CCO)NH、C(CO)NH、HCCH-COSY、HCCH-TOCSY、NOESY-HSQC、TOCSY-HSQC を用いた。主鎖二面角情報は HNHA から、水素結合情報は water presaturation による ^{15}N -HSQC スペクトルのピークの変化から求めた。距離拘束は 3D ^{13}C -NOESY-HSQC および 3D ^{15}N -NOESY-HSQC スペクトルの NOE 強度から求めた。

構造計算プログラム DYANA を用いて求めた構造情報から MtFKBP17 の 3 次元立体構造を計算した。

高温での活性測定には、EXSY スペクトルを用いた。得られた EXSY スペクトルの *cis*-基質ペプチドと *trans*-基質ペプチド間の交換ピークのピーク強度から異性化反応の

速度を計算した。

C. 研究結果

我々は MtFKBP17 の立体構造と高温での PPlase 活性を NMR により明らかにした。その結果、一つのドメインからなる HsFKBP12 とは異なり、MtFKBP17 は二つのドメインからなるタンパク質であることがあきらかになった。(図 1)

また、42 残基の挿入配列は HsFKBP12 でフラップ領域と呼ばれる部分にあり、4 本の β ストランドと 1 つの α ヘリックスから

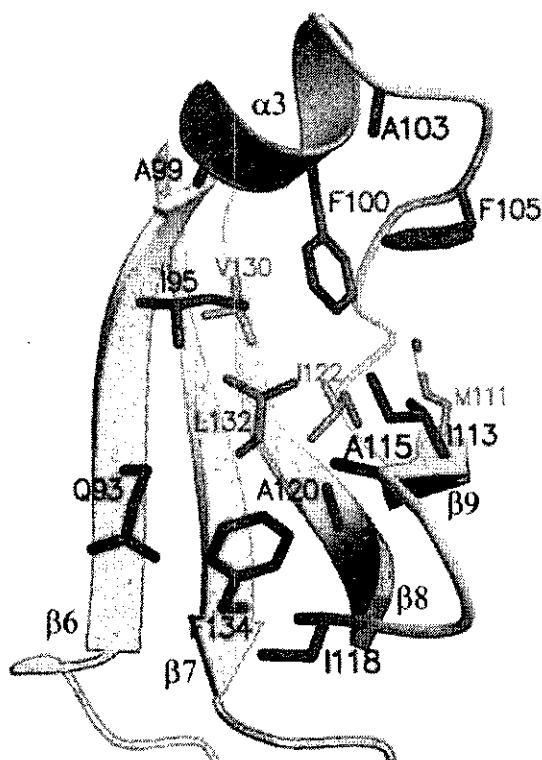


図 2. フラップの挿入配列ドメインの構造

なる $\alpha+\beta$ ドメインを形成していた。フラップの挿入配列ドメインの表面は疎水性の高い残基が露出していた(図 2)。FKBP 相同ドメインの構造は $\beta 1$ ストランドを除いて HsFKBP12 とよく似ていた。

FKBP 相同ドメインとフラップの挿入配列ドメインの間には NOE が観測されず、これらの相対配置は決定できなかった。(図 3)

13 残基の挿入配列はヒトの FKBP (HsFKBP12) でバルジ領域と呼ばれる部分に存在する。この挿入配列の N 末端側には α ヘリックスがあり、 $\beta 5$ ストランドと疎水性コアを形成していた(図 4)。

一方、2D EXSY NMR により MtFKBP17 の PPlase 活性を測定したところ、MtFKBP17



図 3. ドメイン間の位置関係

の *M. thermolithotrophicus* 細胞内濃度と同等と考えられる数 μM では、本菌の生育温度である 65 度で高い PPlase 活性を持つことが示唆された。(図 5)

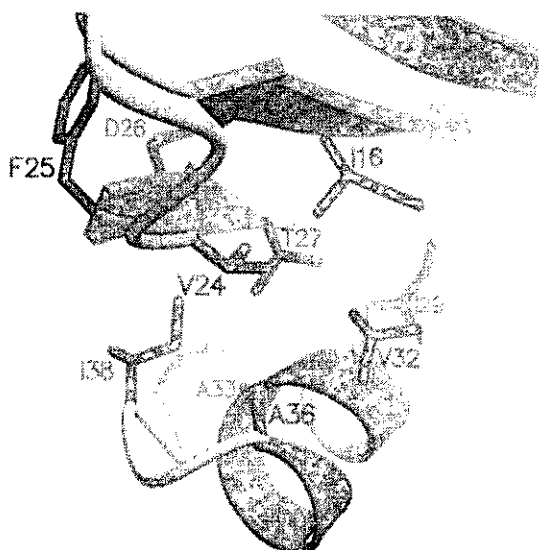


図 4. バルジ領域の疎水性コア

D. 考察

一般にシャペロンは変性タンパク質の疎水性残基に結合して誤ったフォールディングからタンパク質を保護するものであり、またフラップの挿入配列を欠損した MtFKBP17 はシャペロン活性を失うことが知られている。したがって MtFKBP17 のフラップ挿入配列のドメインに見られる疎水性表面は MtFKBP17 のシャペロン活性に関わると考えられる。FKBP 相同ドメインの PPIase 活性部位も同じく疎水性に富んでおり、フラップの挿入配列ドメインと FKBP 相同ドメインが様々な新生タンパク質や変性タンパク質の疎水性部分に結合し、シャペロン活性を実現すると推測される。

一方、MtFKBP17 は高温でも PPIase 活性によりプロリンの異性化を促進することができることが明らかになった。様々な PPIase、シャペロンを持つ真核生物や真正細菌とくらべ、古細菌ではこれらの種類は極めて少ない。MtFKBP17 はシャペロン活性と PPIase 活性をともに持ち、これらを協調させてタ

2D EXSY NMR
(4.5 μ M MtFKBP17)

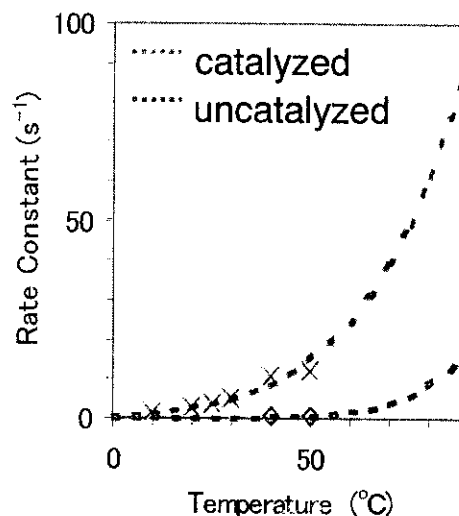


図 5. プロリン残基の異性化速度の温度依存性と MtFKBP17 による促進

ンパク質のフォールディングを促進すると考えられる。

E. 結論

MtFKBP17 はヒトの FKBP と相同のドメインの他に新しいドメインを持ち、これらのドメインの相対配置が変化して様々な蛋白質に結合し、シャペロン活性を実現すると思われる。また、本酵素の PPIase 活性は高温でも十分に高く、両活性が協調してフォールディングを助けると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yusuke Kato, Mie Ito, Kunji Kawai, Koji Nagata and Masaru Tanokura: