

ットから試験管内再構成を行い、複合体試料を得た。

結晶化: TmのTn結合部とTn全体を含むTn/Tm複合体の結晶化に取り組んだ。また、ヒト心筋TnIリン酸化型変異体を含むTn三量体を調製し、結晶化を行った。結晶化条件のスクリーニングは蒸気拡散法により行い、それぞれの試料について約500条件程度の検索を行った。得られた結晶についてさらに結晶化条件の最適化を進め、回折データの収集の行える単結晶を得た。

X線回折実験: 得られた結晶について大型放射光SPring-8の共用ビームライン (BL38B1) および理研ビームライン (BL45PX, BL44B2) を用いて回折データの収集を行った。

ii) イオン交換輸送体調節因子複合体

CHP/NHE複合体の発現および精製: タンパク質の発現は大腸菌発現ベクターであるpETの系を用いて行った。アンピシリン耐性pETにCHPの二つのアイソフォームCHP1とCHP2に対するcDNAを組み込み、常法に従って大腸菌 (BL21-star) にトランスフォームした。また、同じ細胞にカナマイシン耐性pETにNHEのCHP結合部位断片(アミノ酸503から545)を組み込んだベクターをトランスフォームし、両方のタンパク質を共発現する大腸菌を作成した。

大腸菌をソニケーションによって破碎し、CHP/NHE複合体をNi²⁺カラム、イオン交換、ゲルろ過カラムによって精製した。

NHEの結晶化と構造解析: 精製したタンパク質について、1000を超える結晶化条件のスクリーニングを蒸気拡散法により行った。得られた結晶についてさらに結晶化条件の最適化を進め、回折データの収集の行える単結晶を得た。

NHEの機能解析: NHEの機能解析については、NHEをコードするcDNAを組み込んだ動物細胞発現ベクターpECEを用いて、PCR法により変異を導入し、NHEを持たない変異繊維芽細胞PS120にトランスフェクトした。安定発現細胞株を樹立したのち、機能解析を行った。

iii) プロスタグランジン関連タンパク

膜結合型PGE合成酵素(mPGES)、FLAPおよび核内受容体PPARαの発現は大腸菌発現ベクターであるpET系を用いて検討した。さらにこれら膜タンパク質(mPGES, FLAP)の大量培養を行うために、種々の大腸菌を検討したところ、膜タンパク質に対するプロテアーゼ欠損の大腸菌を用いることで、大量発現させることができた。

iv) 細胞内情報伝達分子

新規アクチン束化タンパク質ファミリーに属するBAIAP2 (Brain angiogenesis inhibitor 1 associated protein 2) やMIM (Missing in metastasis protein) の全長および部分について大腸菌による大量発現をpGEX6Pベクターを用いて行い、Prescission proteaseによりGSTより切り出し、単離・精製した。これらの精製タンパク質の結晶化を蒸気拡散法により試みた。そのうちBAIAP2のアクチン束化・低分子GTP結合タンパク質結合ドメインの結晶化に成功し、SPring-8のビームラインを用いて回折データの収集を行った。重金属置換法により構造解析を行った。

C. 研究結果

構造解析の対象となるタンパク分子ごとにその研究結果を要約する。

i) 心筋収縮タンパク調節分子

Tn/Tm複合体: これまで得られた結晶の分解能が十分でないことから、結晶化試料のデザインと発現系の改良を行なった。今後は新たな試料を用いての結晶化条件の検索を進めることと、理研播磨研究所と共同で部位限定的なNMRによる構造解析も視野に入れて研究を進める予定である。

心筋Tnリン酸化型変異体: PKAによるリン酸化状態を模する変異体TnI (S23D, S24D) を調製し、TnI/TnC/TnI三量体として再構成した試料の結晶化条件のスクリーニングを行ない、再現良く結晶が得られつつある。今後、SPring-8でのデータ収集を行い、構造解析を進める予定である。

Tnコアドメイン: Tnのコアドメイン2種について、それぞれ2.6および3.3Å分解能で結晶構造を得た。得られた成果がNature誌にArticleとして掲載された。

ii) イオン交換輸送体調節因子複合体

いくつかの結晶化候補タンパク質のうち、CHP2/NHE1複合体に関しては、ある種の金属イオンが結晶化に極めて有効であることを発見した。現在、実験室レベルのX線発生装置によって、3.5Å分解能の解像度の回折像が得られており、構造決定を進めているところである。また、NHEの機能解析においては、NHEのpHセンサーを制御する重要なアミノ酸残基(Arg440/Gly455/Gly456)を同定した。また、NHEの制御機構に重要な役割を果たす細胞内pHセンサーの存在とその性質に関する詳細な解析を行った。

iii) プロスタグランジン関連タンパク

膜結合型PGE合成酵素(mPGES): pET系発現ベクターを種々検討したところ、N末にHis-tagを持つpET14bにより大量発現できることがわかった。この場合は

膜タンパク質に対するプロテアーゼ欠損の大腸菌を用いて、最も効率の良い発現が可能であることがわかった。さらに1)このタンパク質がPGE産生活性を有する活性型のタンパク質であること、2)アミノ酸分析の結果、予想されるタンパク質の配列を有することがわかった。

FLAP: pET系発現ベクターを種々検討したところ、C末にHis-tagを持つpET21aを用いることで大量発現できることがわかった。この場合も膜タンパク質に対するプロテアーゼ欠損の大腸菌によって最も効率の良い発現が認められた。さらに、1)このタンパク質が脂肪酸に対する結合活性を持つこと、2)アミノ酸分析の結果、予想されるタンパク質の配列を有することがわかった。現在、結晶化に向けて結晶条件の検討を行っている。

核内受容体PPAR α : 上記、mPGESおよびFLAP両方の標準的な阻害剤としてMK-886が同定されているが、このMK-886は同時に核内PPAR α のアンタゴニストであることが報告された。そこでmPGES、FLAP、PPAR α それぞれに選択的阻害剤を開発するためにはそれぞれの立体構造を明らかにする必要がある。また一方で赤ワインに含まれるポリフェノール/レスベラトロールが1)PPAR α により選択的に活性化すること、2)脳保護効果がPPAR α を介して持つことを明らかにしたので、PPAR α に関しても大腸菌での発現系を構築し、大量発現を行った。

iv) 細胞内情報伝達分子

BAIAP2のアクチン束化・低分子GTP結合タンパク質結合ドメインの分子構造を2Å分解能で明らかにした。BAIAP2とRacの複合体の結晶化に成功した。

D. 考察

構造解析の対象となるタンパク分子ごとに考察を要述する。

i) 心筋収縮タンパク調節分子

筋肉の収縮弛緩は細胞内カルシウムイオン濃度により制御されている。その制御はカルシウム結合タンパク質トロポニン (Tn) ・トロポミオシン (Tm) 複合体が本質的な役割を担っており、モータータンパク質ミオシンとアクチン繊維との相互作用、すなわち滑り運動を制御している。本研究ではこの制御機構の分子メカニズムの理解を目的として、Tn/Tm複合体の結晶構造の解明を目指す。心筋TnにおいてはPKAによるTnIリン酸化が重要な生理機能を担うこと、Tn遺伝的変異が心筋症の発症原因の一つと考えられることなどからこれらの点に着目して構造研究を進める。これらは創薬の対象としても重要である。

ii) イオン交換輸送体調節因子複合体

タンパク質の結晶構造解析は、分子の機能をナノレベルの構造基盤から理解するうえで重要であると同時に、将来の創薬の基盤情報である。今年度はCHP/NHE複合体を大量精製し、かなり良質の結晶(3.5オングストローム分解能)を作成することに成功した。また機能解析では、NHEには輸送部位とは異なるpHセンサーが存在すること、そのセンサーの制御にNHEの5番目の細胞内ループがCHPを含めたC末細胞質ドメインと構造的・機能的にカップルすることによって制御されることを明らかにした。

iii) プロスタグランジン関連タンパク

大量発現系の構築が難しいとされる膜タンパク質mPGES、FLAPについて、結晶化を目指した大量発現系の構築に成功した。現在の結晶化に向けて、その条件検討に入ったが、同時に阻害剤との結合など、その生化学的な性質、発現ベクターの微調節などを検討する。

iv) 細胞内情報伝達分子

内皮細胞の新規流れ応答遺伝子MIMはBAIAP2などと進化的に保存されたドメインを共有する、新規アクチン束化たんぱく質ファミリーをなしており、今後これらの活性調節、機能、病態との関連を明らかにする必要がある。結晶解析で得られたBAIAP2のアクチン束化・低分子GTP結合タンパク質結合ドメインの分子構造から、これらのアクチン束化タンパク質がダイマーとして存在することが明らかとなった。また、アミノ酸配列の比較からは見出せなかった構造的類似性があることが明らかになり、このファミリーがより広いタンパク質ファミリーの一部である可能性が示唆された。

E. 健康危険情報

なし。

F. 結論

心筋収縮タンパク調節分子に関しては、TnとTmの相互作用の詳細、すなわちTn/Tm複合体の結晶構造を解明することで、筋収縮制御機構の本質的な問題に迫れるであろう。

イオン交換輸送体調節因子複合体に関してはタンパク質の大量発現・大量精製、良質の結晶の作成に成功した。また、また機能解析では、NHEにおけるpHセンサーの存在とそれを制御する重要なアミノ酸残基を同定した。

プロスタグランジン関連タンパクに関しては膜結合型PGE合成酵素(mPGES)、5リポキシゲナーゼ活性化蛋白質(FLAP)、およびそれらのタンパク質と関連する核内受容体PPAR α に関して大量発現させることに成功した。現在、結晶化に向けて、発現コンストラクトのリファイニング、精製、結晶条件などを検討中である。

細胞内情報伝達分子に関しては、低分子GTP結合タンパク質との複合体や全長の結晶構造を明らかにすることにより、その活性調節機構を明らかにすることが期待される。また、F-アクチン結合体の電子顕微鏡観察により、アクチン束化の分子機構を明らかにすることが期待される。

G. 研究発表

(研究業績「欧文」)

【原著】

- 1) T. Pang, H. Mori, S. Wakabayashi et al. : Role of Calcineurin B Homologous Protein in pH Regulation by the Na⁺/H⁺ Exchanger 1: Tightly Bound Ca²⁺ Ions as Important Structural Elements. *Biochemistry*, 2004 (in press).
- 2) S. Wakabayashi, et al.: Kinetic dissection of two distinct proton binding sites in Na⁺/H⁺ exchangers by measurement of reverse mode reaction. *J. Biol. Chem.* 43580-43585, 2003.
- 3) S. Wakabayashi, et al. : Evidence for involvement of the putative first extracellular loop in differential volume-sensitivity of the Na⁺/H⁺ exchangers NHE1 and NHE2. *Biochemistry* 42: 1086-1094, 2003.
- 4) S. Wakabayashi, et al.: Expression of Calcineurin B Homologous Protein 2 Protects Serum Deprivation-Induced Cell Death by Serum-Independent Activation of Na⁺/H⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.*, 277: 43771-43777, 2002.
- 5) S. Wakabayashi, et al.: Mutations of Arg440 and Gly455/Gly456 Oppositely Change pH-Sensing of Na⁺/H⁺ Exchanger NHE1. *J. Biol. Chem.* 2003(in press).
- 6) H. Inoue, Y. Taba, Y. Miwa, C. Yokota, M. Miyagi, T. Sasaguri : Induction of cyclooxygenase-2 expression by fluid shear stress in vascular endothelial cells. *Adv Exp Med Biol.* 525: 141-144, 2003.
- 7) C. Yokota, Y. Kuge, H. Inoue, M. Tagaya, G. Kito, T. Susumu, N. Tamaki, K. Minematsu :

- Post-ischemic cyclooxygenase-2 expression is regulated by the extent of cerebral blood flow reduction in non-human primates. *Neurosci. Lett.* 341: 37-40, 2003.
- 8) Y. Taba, M. Miyagi M, Y. Miwa, H. Inoue, F. Takahashi-Yanaga, S. Morimoto, T. Sasaguri : 15-Deoxy-D12,14-prostaglandin J2 and laminar shear stress stabilize c-IAP1 in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285: H38-H46, 2003.
 - 9) C. Yokota C, H. Inoue, Y. Kuge, T. Abumiya M. Tagaya, Y. Hasegawa, N. Ejima, N. Tamaki, K. Minematsu : Cyclooxygenase-2 expression associated with spreading depression in a primate model. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23: 395-398, 2003.
 - 10) S. Han, H. Inoue, L.C. Flowers, N. Sidell : Control of COX-2 gene expression through peroxisome proliferator-activated receptor γ in human cervical cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 9: 4627-4635, 2003.
 - 11) H. Inoue, X. Jiang, T. Katayama, S. Osada, K. Umesono, S. Namura : Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires peroxisome proliferator-activated receptor α in mice. *Neurosci. Lett.* 352: 203-206, 2003.
 - 12) Takeda, A. Yamashita, K. Maeda, and Y. Maeda : Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca²⁺-saturated form. *Nature*, 424: 35-41, 2003.
 - 13) Ogita H, Kunimoto S, Kamioka Y, Sawa H, Masuda M, Mochizuki N.: EphA4-mediated Rho activation via Vsm-RhoGEF expressed specifically in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 93:23-31, 2003.
 - 14) Kogata N, Masuda M, Kamioka Y, Yamagishi A, Endo A, Okada M, Mochizuki N. : Identification of Fer tyrosine kinase localized on microtubules as a platelet endothelial cell adhesion molecule-1 phosphorylating kinase in vascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* 14:3553-64, 2003.
 - 15) Yamagishi A, Masuda M, Ohki T, Onishi H, Mochizuki N.: A novel actin-bundling/filopodium-forming domain conserved in insulin receptor tyrosine kinase substrate p53 and missing in metastasis protein. *J Biol Chem*, 2004 Jan 29 (Epub ahead of print).
 - 16) H.Kitagawa, T.Yamazaki, T.Akiyama H.Mori, K.Sunagawa: Effects of ketamine on exocytotic and non-exocytotic noradrenaline release. *Neurochemistry International*, 42: 261-267, 2003.
 - 17) H.Kasahara, E.Tanaka, N.Fukuyama, E.Sato,--H.Mori: Biodegradable Gelatin Hydrogel Potentiates the Angiogenic Effect of FGF4 Plasmid in Rabbit Hindlimb Ischemia. *JACC*, 41: 1056-1062, 2003.
 - 18) N.Nagaya, M.Kanda, M.Uematsu, N.Fukuyama, T.Horio, --- H.Mori: Hybird

cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation*, 108: 889-895, 2003.

- 19) T.Akiyama, T.Yamazaki, H.Mori, K.Sunagawa: Inhibition of cholinesterase elicits muscarinic receptor-mediated synaptic transmission in the rat adrenal medulla. *Auton Neurosci*, Sep30:107(2): 65-73, 2003.
- 20) E.Sato, Y.Hayasi, R.Gemer, E.Tanaka, H.Mori, et al.: Intense characteristic x-ray irradiation from weakly ionized linear plasma and applications. *Jpn J Med Imag Inform Sci*, 20: 154-161, 2003.
- 21) E.Sato, Y.Hayasi, R.Gemer, E.Tanaka, H.Mori: Irradiation of intense characteristic x-rays from weakly ionized linear molybdenum plasma. *Jpn J Med Phys*, 23(2): 123-131, 2003.
- 22) N.Tokunaga, T.Yamazaki, T.Akiyama, S.Sano, H.Mori: In vivo monitoring of norepinephrine and its metabolites in skeletal muscle. *Neurochemistry International*. 43: 573-580, 2003.
- 23) M.Shirai, J.T.Pearson, A.Shimouchi, N.Nagaya, H.Tsuchimochi, I. Ninomiya and H. Mori: Changes in functional and histological distributions of nitric oxide synthase caused by chronic hypoxia in rat small pulmonary arteries. *Brit J Pharmacol*. 139: 899-910, 2003.
- 24) N.Nagaya, H.Okumura, M.Uematsu, W.Shimizu, F.Ono, M.Shirai, H.Mori, et al. : Repeated inhalation adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats. *Am J Physiol Heart circ Physiol*. 54(5): 2125-2131, 2003.
- 25) N.Tokunaga, T.Yamazaki, T.Akiyama, H.Mori: Detection of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol in rabbit skeletal muscle microdialysate. *J Chromatogr*, 798:163-166, 2003.
- 26) E.Sato, Y.Hayasi, R.Gemer, E.Tanaka, H.Mori, et al.: Quasi-monochromatic flash x-ray generator utilizing weakly ionized linear copper plasma. *Rev.Sci.Instrum*. 74: 5236-5240. 2003.
- 27) N.Tokunaga, T.Yamazaki, T.Akiyama, S.Sano, H.Mori: Acute limb ischemia does not facilitate but inhibits norepinephrine release from muscle sympathetic nerve endings in anesthetized rabbit. *J.Cardiovasc Pharmacol*. 42(Suppl.1): S7-S10, 2003.

【総説】

なし

【著書】

S.Wakabayashi, et al.: Two Fundamental Regulatory Factors of the Na⁺/H⁺ Exchangers: The Proton and CHP. In "The Sodium-Hydrogen Exchange. From Molecule to its Role in Disease" Kluwer Academic Publishers, 2003 (in press).

(研究業績「和文」)

【原著】

- 1) 井上 裕康: 核内受容体 PPAR を介する誘導型シクロオキシゲナーゼの発現調節に関する研究. *ビタミン*, 77: 449-458, 2003.
- 2) 増田道隆: ざり応力センサー分子としての PECAM-1. *血管医学*, 4:259-266, 2003.

【総説】

- 1) 武田壮一: 筋収縮・弛緩を調節するタンパク質トロポニンの結晶構造. *メディカルドゥ Bio Medical Quick Review Net*, No.008,2003.
- 1) 前田雄一郎、武田壮一、森本幸生、大槻馨男: トロポニンの結晶構造とカルシウム調節のメカニズム. *蛋白質・核酸・酵素*, Vol. 48 No. 14:1877-1889, 2003.
- 2) 武田壮一、前田雄一郎: トロポニンの結晶構造と筋収縮調節機構. *生化学*, ミレビュ第 75 巻 第 12 号: 1540-1545. 2003.
- 3) 武田壮一、前田雄一郎: ヒト心筋トロポニンの結晶構造. *SPring-8 利用者情報 最近の研究から*, Vol.8 No.5: 348-352, 2003.
- 4) 河合敏昭、鈴木克彦、高瀬欣治、川上博己、望月亮、山口孝一、田中越郎、笠原啓史、福山直人、篠崎芳郎、盛英三、東将浩、西上和宏、田中良一、内藤博昭: 微小血管撮影装置開発と再生血管の可視化. *RADIOISOTOPES*, 52 : 53-56, 2003.
- 5) 秋山剛、山崎登自、盛英三: 虚血部心臓交感神経週末におけるノイエピネフリン動態. *医学書院呼吸と循環*, 3 : 269-275, 2003.

【著書】

- 1) 知久正明、西上和宏、佐藤英一、盛英三: 放射光および普及型X線源を用いた微小血管造影による再生血管の評価. *機能代謝画像診断法と分子画像*, 西村恒彦編、南山堂:177-186, 2003.
- 2) 藤井隆文、永谷憲歳、盛英三: ゼラチンによる遺伝子の徐放化と細胞-遺伝子ハイブリッド治療への応用. *遺伝子医学別冊・ドラッグデリバリーシステムDDS技術の新たな展開とその活用法*, 田畑泰彦編、メディカルドゥ:194-199, 2003
- 3) 國本聡、笠原啓史、福山直人、田中越郎、知久正明、永谷憲歳、西上和宏、岩畔英樹、増田治史、浅原孝之、盛英三: 遺伝子による血管新生. *ここま*

で進んだ再生医療の実際、田畑泰彦編、羊土社:116-123、2003

2. 学会発表

- 1) S. Wakabayashi, T. Pang, T. Hisamitsu, Y. Ben Ammar, M. Shigekawa: Intracellular pH Regulation by the Na^+/H^+ Exchanger: Calcineurin Homologous Protein 2 as a Potential Target for Anticancer Therapy : 第76回日本生化学会、シンポジウム、2003年10月、パシフィコ横浜
- 2) T. Pang, T. Hisamitsu, M. Shigekawa, S. Wakabayashi: Role of Calcineurin B Homologous Protein in pH Regulation by the Na^+/H^+ Exchanger : 第76回日本生化学会大会、2003年10月、パシフィコ横浜
- 3) T. Hisamitsu, T. Pang, M. Shigekawa, S. Wakabayashi: Homodimer of the Na^+/H^+ Exchanger Detected by Symmetric Cross-linking at the Extracellular Sites : 第76回日本生化学会大会、2003年10月、パシフィコ横浜
- 4) 若林繁夫、久光隆、パン・テンシヤン、ヨセフ・ベンアマー : 動物細胞 Na^+/H^+ exchangerのpHセンシング機構、第29回生体エネルギー研究会 : 2003年12月、東工大
- 5) 久光 隆、パン・テンシヤン、若林繁夫 : 動物細胞 Na^+/H^+ exchangerのオリゴマー形成と活性調節 : 第29回生体エネルギー研究会、2003年12月、東工大
- 6) 若林 繁夫 : イオントランスポータの最前線 : Na^+/H^+ アンチポータを中心に : 第22回聴覚生理研究会、2003年10月、幕張メッセ
- 7) Shigeo Wakabayashi : Structure, Function and Regulation of the Na^+/H^+ Exchanger: Role of Interacting Proteins : the 9th Southeast Asian-Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists (第9回東南アジア西太平洋地域・薬理学会)、2003年8月、韓国釜山
- 8) 武田壮一、山下敦子、前田佳代、前田雄一郎 : 「トロポニンの結晶構造と筋収縮制御の分子機構」 : 第3回日本蛋白質科学会年会(2003)
- 9) 前田雄一郎、武田壮一、小田俊郎「原子構造から見たアクチンフィラメントの柔らかさ」第41回生物物理学会年会シンポジウム、2003
- 10) 南方志帆、武田壮一、若林克三、前田雄一郎 : 「トロポニンTI/トロポミオシン複合体の結晶化」第41回日本生物物理学会年会、2003
- 11) 松原孝宜、五十嵐智子、武田壮一、前田雄一郎、盛 英三「心筋トロポニンのリン酸化型変異体の結晶構造解析」第41回日本生物物理学会年会、2003
- 12) 武田壮一、前田雄一郎 : 「トロポニンの結晶構造と筋収縮制御機構」 : 日本結晶学会年会(2003)
- 13) Soichi Takeda “Crystal structure of troponin and the molecular mechanism of muscle regulation” International Symposium on the creation of novel nanomaterials(ISCNN),2004, Osaka (invited lecture).
- 14) 盛 英三他 : ナノレベルイメージングによる分子の機能および構造解析 : ナノメデイシンフォーラム2004
- 15) 盛 英三他 : 第68回日本循環器学会総会プレナリーセッション日本型移植医療をどう作るかー細胞・組織・臓器ー(2004)

H 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

原子間力顕微鏡等を用いたナノレベルイメージングによる分子の構造解析

分担研究者 土屋 利江 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部長
（協力研究者：中澤憲一、山越葉子、中岡竜介、柳楽 勤、矢上 健）

研究要旨 原子間力顕微鏡（AFM）を利用してイオン・チャネル形成型の ATP 受容体（P2X2 受容体）タンパク質の像を初めて得ることができた。変異型 ATP 受容体を作製し、受容体の構造-機能相関から、N 末側の 9 番目のシステイン残基が酸化状態にあり、細胞外領域のジスルフィド結合下流領域が β シート構造を取ることが示唆された。ナノ粒子フラーレンのグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）阻害活性に着目し、活性向上と活性阻害部位特定のための光ラベル化剤の合成を行った。タンパク質イメージングの解像度向上を目指し、既存の AFM 探針の先端を修飾する有機分子の合成を試みた。種々の官能基を導入した多糖類高分子電解質錯体（Polyelectrolyte complex: PEC）上に正常ヒト骨芽細胞を培養し、機能への影響を検討した。陰イオン修飾ヒアルロン酸は、正常ヒト表皮角化細胞の分化を著しく促進し、細胞間連絡機構を亢進し、ヒト間葉系幹細胞の分化も促進した。プロテオミクス手法による細胞発現蛋白・アレルゲンの同定を試みた。

A. 研究目的

原子間力顕微鏡（AFM）は水溶液中の“生きた”タンパク質を個別に観察するという利点を有している。これは、AFM がカンチレバーと呼ばれるプローブで観察対象に直接接触することにより、その姿を描き出すことができるためである。カンチレバーに修飾をほどこすことにより 1 個の受容体タンパク質と 1 分子の薬物との相互作用様式を測定することが可能である。多数の均一な分子集団として受容体を扱ってきたが、AFM は、1 分子レベルの“ナノ”の視点を導入することにより、医薬品開発に新たな視界を与える。受容体としては神経、筋、免疫等広く存在が知られている細胞外 ATP 受容体を研究対象とする。本年度は、AFM の観察に利用できる精製度の高い受容体タンパク質試料の作製と、分子生物学的手法を用いた受容体タンパク質の構造-機能相関の研究の発展を目指した。

ナノ粒子 C_{60} は、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）の阻害活性を示す。GST と C_{60}

結合部位の詳細な検討を、コンピュータシミュレーション（Molecular Dynamics を用いた docking study）による阻害メカニズム解析を行うため、光ラベル化 C_{60} 誘導体を合成する。医薬品候補物質となりうる GST 阻害強度の高い C_{60} 誘導体の合成を目的とする。

嵩高く電導性が期待できないタンパク質等の試料に関しては、微小なプローブを先端に持つ AFM のカンチレバーを介してサンプルとプローブの原子間力を測定する。プローブの鋭利さによって AFM のイメージング画像の解像度は左右される。本研究においては、AFM プローブの先端を細長い有機分子で修飾し、AFM によるタンパク質画像化の向上を図ることを目的とする。

テクノロジーの進歩により生体を構成するタンパク質の詳細な構造が明らかになってきているが、材料表面に吸着したタンパク質の構造変化とその材料特性との関連について検討したものは少ない。生体内の細胞は、材料表面に吸着したタンパク質の構造を認識して

生体反応を行う。材料特性とタンパク質構造変化との関連を見出し、医用材料を改良する手段を生み出すことが目的である。特定の組織構築に必要な生体成分の機能を最大に発揮するナノ材料ができれば、新規な医用材料の開発に繋がる。昨年度は、材料表面と細胞の相互作用により細胞が受ける影響について調べるために、種々の官能基を持つ表面を調製し、培養した細胞の観察および機能変化を検討した。今年度は、骨分化の促進が見られた硫酸基およびリン酸基を導入した多糖を構成成分にもつ高分子電解質錯体 (Polyelectrolyte complex: PEC) を用いて、細胞機能への影響について検討した。

再生医療で使用される生体由来材料には、病原体による感染リスクがある。この感染リスク軽減化のために、人工素材を開発する。細胞内分子挙動を制御し、効率的に組織再生を行う機能性物質の開発も目的とする。また、材料と接触することで、変動する細胞中のマーカータンパク質群を見だし、その挙動を可視化する。

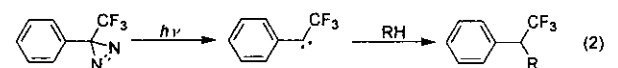
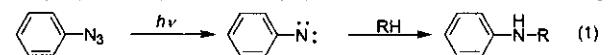
B. 研究方法

1) ATP 受容体 (ラット P2X2 受容体) の cDNA は米国の研究者より入手し、pVL-1393 ウイルスベクター (BD Bioscience Clontech 社) にサブクローニングした。この再構築ウイルスを昆虫由来細胞株 Sf9 に感染させ、細胞を培養した。培養した細胞を遠心により沈澱採取し、Triton X-100 を含む溶解バッファーに懸濁した。この液を遠心し、上清をポリアクリルアミド・ゲル上で電気泳動し、抗ヒスチジン・タグ抗体により受容体タンパク質の存在を確認した。受容体タンパク質の精製はキレーティング・セファロース FF カラムで行なった。ニッケルを結合させたカラムに試料を浸透させ、結合した受容体タンパク質をイミダゾール濃度を漸次増加させたバッファーを用いて溶出した。タンパク質量は 595 nm の吸光度より求めた。AFM 観察では、タンパク質溶液は水

で適切な濃度に希釈し、劈開した雲母表面上に滴下した。滴下溶液を減圧下で乾燥させ、この標本を観察に供した。観察は Digital Instruments 社の MultiMode Nanoscope III を用いて、タッピング・モードで行なった。

分子生物学的手法を用いた受容体の構造-機能相関の研究では、P2X2-BS II を用いて変異導入 (アミノ酸残基置換) をクイック・チェンジ部位特異的変異導入キットまたはエクサイト部位特異的変異導入キット (いずれも Stratagene 社) を用いて PCR 法で行なった。変異導入の成否は塩基配列解析で確認した。野生型、変異型受容体の RNA はそれぞれのプラスミドを Not I で直鎖化し、これを鋳型としてインビトロ合成した。コラゲナーゼ処理により濾胞細胞を除去したアフリカツメガエル卵母細胞に、実体顕微鏡下、RNA を注入し、受容体を発現させた。この卵母細胞に双ガラス電極膜電位固定法を適用し膜電流測定を行なった。

2) 光ラベル化官能基としては、フェニルアジド基とフェニルジアジリン基を用いた。これらの官能基は、特定の波長の光を照射すると、次式 (1), (2) に示すようにそれぞれナイトレンやカルベンと言った活性種を生じ、近傍のアミノ酸と共有結合を形成して結合するため、有用な光ラベル化剤として知られている。



本研究においては、フラーレンに対応するアミノ酸とアルデヒドを反応させてできる誘導体フレロピロリジン为原料に、酸クロライドやヤマグチ試薬を反応させ、フェニルアジド誘導体や、フェニルジアジリン誘導体を合成した。

AFM プローブの先端に結合させる有機分子としては先端にアセチレン骨格を有する化合物を考えた。また、プローブへの接着に関しては、チオール基を用い金でコートしたプロ

ープへの非可逆的結合を期待している。

3) PEC は信州大学繊維学部、阿部康次教授の研究室より提供を受けた。PEC はポリアニオンとポリカチオンからなる複合体で、本研究では多糖からなる PEC を使用し、いずれの PEC においてもポリカチオンにはアミノ基を持つキトサンを使用した。ポリアニオンとしては、昨年の研究結果を基に、主に硫酸基およびリン酸基を導入した多糖を使用した。具体的には、硫酸化 (S-)、リン酸化 (P-) およびカルボキシメチル基 (CM-) を導入したキチン (Chitin) と、ヒアルロン酸 (HA) および硫酸化ヒアルロン酸 (SHA) を用いた。

各ポリアニオン及び PEC に関しては、阿部研究室で既報通り、35mm 細胞培養用ディッシュ及び 24well 細胞培養用プレート上に調製後、滅菌したものの提供を受けた。

細胞には、市販の正常ヒト骨芽細胞 (NH0st、BioWhittaker 社) を使用した。培地には 20% の牛胎児血清 (FCS) を含んだ α -Minimum essential medium (α -MEM) を継代用に、さらに 10mM の β -Glycero phosphate を含んだ α -MEM を細胞分化実験用に用いた。

24 well プレート内の PEC に、NH0st を 10mM glycero phosphate を含んだ α -MEM に懸濁した細胞分散液を 500 μ l ずつ加え、2 日毎に培地交換を行い 1 週間培養を行った。各材料上での NH0st の接着状態は、毎日位相差顕微鏡で観察し、必要に応じて写真撮影を行った。培養終了後、培地中に Tetracolor One (生化学工業) を 10 μ l 添加し 2 時間培養した後の上清の 450nm での吸光度を測定して、細胞の増殖度を評価した。材料表面を Phosphate buffer saline (pH 7.4、PBS) で洗浄後、4mM p-nitrophenyl phosphate disodium salt、MgCl₂ ZnCl₂ を含んだ Glycine buffer を 500 μ l 加え所定時間経過後の 405nm での吸光度を測定して、細胞内のアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を評価した。さらに、細胞をホルマリン固定後、PBS で洗浄、0.1N HCl を加えて沈着したカルシウムを抽出し、そのカルシ

ウム量をカルシウム C テストワコー (和光純薬) により定量することで、NH0st の分化程度を評価した。

細胞や組織の恒常性維持に重要な役割をもち、殆どの細胞に共通の機能である細胞間連絡機能に対して、材料表面の官能基が与える影響を検討した。35mm ディッシュ上の PEC に、分化実験と同濃度の NH0st 懸濁培地を 2.5ml 加えることで材料上に NH0st を播種し、1 日後および 7 日後に機能評価を行った。細胞同士が隣接している場合、正常であればその接触している部分 (tight junction) に、低分子量の分子が通過できる穴であるギャップジャンクションが形成される。機能評価の方法は昨年度と同様に、FRAP 法 (Fluorescence recovery after photobleaching) を用いた。以下に、FRAP 法による測定手順を示す。まず、所定期間 NH0st を培養した PEC を、カルシウムおよびマグネシウムイオンを含む PBS (PBS(+)) で洗浄した。その後、蛍光試薬である 5,6-carboxyfluorescein diacetate (励起波長 488nm、蛍光波長 515nm) を含む PBS(+) を添加し、材料上の全ての NH0st 内にその蛍光色素を取り込ませた。取り込まれなかった蛍光色素は、PBS(+) で洗浄して取り除いた。PBS(+) を加えた PEC 入りディッシュを共焦点レーザー顕微鏡 ACAS (Meridian Instruments 社) に設置し、蛍光像を所得した。隣接した細胞が複数ある細胞を選び、レーザーを全出力で短時間照射し、細胞内の蛍光を消光させ経時的に同じ細胞の蛍光像を所得した。その画像解析から、選んだ細胞の蛍光強度の初期回復速度を算出し、各種 PEC 上での NH0st の細胞間連絡機能を評価した。

陰イオン修飾ヒアルロン酸をコーティングした培養ディッシュ上で正常ヒト表皮角化細胞を培養し、DNA チップおよびプロテオミクス技術により細胞内分子の挙動を解析し、細胞を精密に制御する技術の開発を試みる。

ダイファレンシャルディスプレイ法にフォーカストプロテオミクスの概念を組み

合わせて、ヒト皮膚繊維芽細胞に発現している可溶性リン酸化タンパク質に焦点を当て、プロテオミクス手法で調べた。

天然ゴムラテックスから抽出したタンパク質を、等電点電気泳動に続く SDS-PAGE で2次元に展開した。次にタンパク質を膜上に転写した後、ラテックスアレルギー血清を用いて IgE-immunoblotting を行った。続いて IgE 結合性と判断されたタンパク質のスポットをゲルから切りだし、トリプシンを用いてタンパク質を消化後、断片化ペプチド群を MALDI-TOF/MS スペクトルおよび MS/MS スペクトルを測定した。質量分析の結果を元に、データベース検索により、IgE 結合性タンパク質の同定をおこなった。

C. 研究結果

1) ニッケルを結合させたキレーティング・セファロース FF カラムよりイミダゾール含有バッファーで溶出を行なったところ、10 および 20 mM イミダゾール分画にヒスチジンタグ付き P2X2 受容体タンパク質の存在が認められた。アクリルアミドゲル泳動後の総タンパク質染色の結果より、この受容体タンパク質の含量は全タンパク質の 90%以上と考えられた。この精製度は AFM の試料として充分であると判断され、10 mM イミダゾール分画を観察に供した。なお、アフリカツメガエル卵母細胞を発現系にしたヒスチジンタグ付き P2X2 受容体の発現精製も試みたが、十分な精製度の試料を得ることはできなかった。

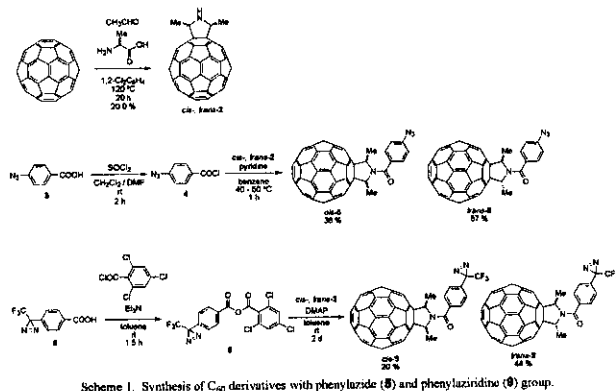
先に行なったアミロイド Aβ タンパク質の観察の結果より、大気中での観察において試料の濃度は 0.1 - 10 nM が適当であることが判明している。よって、この濃度となるよう、P2X2 受容体の試料を純水で希釈した。また、比較のため、P2X2 受容体と分子量が同程度で水溶性のタンパク質であるヒトアポトランスフェリン (分子量 80 kD) についても同様の濃度の水溶液を作製した。希釈した水溶液を雲

母上に滴下し、減圧乾固した標本を観察したところ、トランスフェリンでは直径 20 - 30 nm 程度の粒状の像が認められた。高さは 2 nm 程度であった。一方、P2X2 受容体では直径 20 nm 程度の粒状の像に加え、径が数 100 nm 以上の“島”のような像が観察された。断面図を調べた結果、“島”は高さが 4 nm 程度のほぼ均一な台地状であることが判明した。この高さは粒状の像とほぼ同一であった。“島”の表面を拡大して観察を行なったところ、径が 15 nm 程度の円形の構造が比較的規則正しく並んでいる像が得られた。

分子生物学的手法を用いた変異体作製で P2X2 受容体の構造と機能の関係について検討する研究では、まず、細胞内にある 2 つのシステイン残基の役割を検討した。還元剤であるジチオトレイオール (DTT) を野生型の P2X2 受容体を発現させたアフリカツメガエルの卵母細胞に注入することにより細胞内から作用させたところ、ATP に対する反応性の低下が認められた。酸化剤である銅/フェナントロレン (Cu/Phe) で同様の処置を行なった場合には、反応性に変化は認められなかった。9 番目および 430 番目のシステイン (Cys9, Cys430) を別々にアラニンで置換したところ、Cys9 の置換 (C9A) で ATP に対する反応性の低下が認められた。C9A 変異体について DTT 処置した場合や新たに Cys430 のアラニン置換を施した場合には、それ以上の反応性の低下は認められなかった。次に細胞外領域のイオン・チャネル活性に必須なジスルフィド結合の下流領域のアミノ酸配列に変異を加えた場合の受容体の性質の変化について検討を加えた。このジスルフィド結合を形成する Cys224 および隣接する Pro225 をアラニンに変えた場合、ATP に対する反応性は消失した。Ile226 を他の疎水性アミノ酸残基に置換した場合、ATP に対する反応性は低下または消失した。Phe227 をロイシンまたはイソロイシンに置換した場合、ATP に対する反応性は消失した。Arg228 をアラニン置換した場合には ATP に対する反応性は中

程度低下したが、Leu229 をアラニン置換した場合には反応性は著明に低下した。Gly230 をアラニン置換した場合には、ATP に対する感受性は低下したが、最大反応は影響を受けなかった。

2) 結果として Scheme 1 に示すように収率よくフレロピロリジン (2) を得、これを原料にまず酸クロライド (4) を反応させ、フェニルアジド誘導体 (*cis*-5, *trans*-5) を得た。原料段階では *cis*, *trans* の異性体の分離は困難であったが、フェニルアジド誘導体はシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離が容易であった。また、フェニルジアジリン誘導体 (*cis*-9, *trans*-9) の合成においては最初フェニルアジド誘導体の場合と同様に酸クロライドを用いたが反応しなかったため、ヤマグチ試薬 (8) を用いたところ対応する誘導体を得られた。現在これらの化合物の光反応性、および、GST 阻害活性に関して検討中である。



アセチレン骨格を有する炭素炭素結合の代表的な反応であるソノガシラカップリング反応を繰り返して、アセチレン骨格と基本骨格となるアダマンタン骨格をつなげ、目的の化合物を得る合成の数ステップ前まで来ているところである。

3) NH₂Ost を各種 PEC に播種し 2 日および 7 日経過した光顕像において、コントロールとして用いたコラーゲンコート表面上には、細胞がよく接着・伸展し、2 日目の段階からほぼディッシュ底面全てを覆うほど増殖していた。硫酸基を導入した S-Chitin 及び SHA を用いた PEC では、やや細胞密度が低いものの、細胞は

コントロールと同様によく接着し伸展していることが確認された。P-Chitin を使用した PEC の場合には、それらと異なり、接着した細胞層の上に細胞凝集塊がいくつか認められた。さらに、カルボキシル基を持つ CM-Chitin および HA を用いた PEC では、接着した細胞は伸展せず、凝集して存在していることが認められた。リン酸基を除いて、これらの傾向は 7 日培養を行っても変わらなかった。CM-Chitin および HA を用いた PEC では、培養 7 日後も細胞は伸展せず凝集塊を形成したままで、その上や近辺に沈着したカルシウムと考えられる黒い像が観察された。硫酸基、あるいはリン酸基を含む PEC の場合には、細胞が PEC 全面に伸展して存在しており、カルシウムの沈着と見られる黒い像も全面に散らばるように観察された。しかし、コントロールであるコラーゲンディッシュと比較すると、カルシウムと見られる黒い点の密度は疎らであった。尚、比較のために PEC を形成しないままのキトサン (CS) をコートしたものの上でも同様の観察を行ったが、細胞接着やその形態にはコントロールと比べて大きな変化は認められなかった。

各種 PEC 上で培養した NH₂Ost の細胞間連絡機能は、1 日目、7 日目それぞれのコントロールグループでの初期蛍光移動速度を 1 として比較した。細胞が凝集した CM-Chitin および HA においては、その形態の変化から機能に影響があることが予想されたが、実際に機能の変化が見られたのは CM-Chitin のみであった。この PEC 上で培養 1 日経過した NH₂Ost の細胞間連絡機能はコントロールの約 7 割に低下することが観察された。それ以外の PEC では、培養 1 日後の NH₂Ost の細胞間連絡機能への影響は認められなかった。尚、参考として用いた CS 上では培養 1 日後および 7 日後においてもその機能が抑制されることが示された。さらに、培養開始から 7 日経過した場合には、1 日目に機能が抑制された CM-Chitin を含む PEC で、その機能がコントロールと同程度に回

復していることが認められた。また、S-Chitin、P-Chitin を用いた PEC では、この機能が亢進されることが認められた。しかしながら、同じく硫酸基を導入した SHA の場合には、機能の変化は認められなかった。

各種 PEC 上で1週間培養した NH0st の増殖、ALP 活性および沈着したカルシウム量を測定した。昨年度と同様に、細胞増殖を Tetracolor One で得たコントロールでの吸光度を 100%とし、各種 PEC で得た吸光度をコントロールとの比として算出した。ALP およびカルシウム量はある一定の細胞数あたりの比および値とした。細胞増殖は1週間後の細胞数の比で示し、細胞が凝集したカルボキシル基を持つ CM-Chitin および HA 上では、コントロールの 6-8%程度の細胞しか存在せず、著しく細胞の増殖が抑制された。硫酸基を持つ S-Chitin および SHA を用いた PEC では 70-80%の細胞が存在することから、これらの材料上では細胞の増殖がやや抑制されることが明らかとなった。培養2日目に細胞層の上に所々凝集塊が観察された P-Chitin を含む PEC では、細胞数がコントロールの 130%となっており、細胞増殖が促進されることが示された。細胞分化の指標のうち、ALP 活性に着目すると、硫酸基導入多糖を用いた場合には活性はコントロールと同程度かむしろ増強されることが示された。それに対して、リン酸基を含む PEC においては、その活性が著しく抑制された。また、カルボキシル基を導入した多糖を用いた場合には、HA の場合にはコントロールの 52%、CM-Chitin の場合には 5%と抑制されることが観察された。しかしながら、単位細胞当たりの沈着カルシウム量に着目すると、ALP 活性が抑制されているにも関わらず、カルボキシル基導入多糖を用いたものではその量が増強されていた。ALP 活性が抑制を受けていない硫酸基導入多糖を用いた場合、S-Chitin ではカルシウム量の増強が、SHA ではその抑制は認められなかった。なお、CS 上では、細胞増殖がやや抑制されるが、ALP 活性及びカルシウム量については

特に影響は認められなかった。

陰イオン修飾ヒアルロン酸をコーティングした培養ディッシュは、正常ヒト表皮角化細胞の分化を著しく促進し、増殖を抑制していた。細胞は、ヒアルロン酸をコーティングした培養ディッシュには接着しない。陰イオン修飾ヒアルロン酸はさらに細胞間連絡機構を亢進した。また、陰イオン修飾ヒアルロン酸を培地に添加することで、ヒト間葉系幹細胞の分化を著しく促進した。

ヘパリン誘導体と bFGF の共存下、ヒト皮膚繊維芽細胞を培養し、2次元電気泳動で発現誘導されたリン酸化タンパクのスポットの各タンパクを In-gel Digestion し、得られた断片化ペプチドの MALDI-TOF/MS スペクトルをポジティブイオンモードで測定した。得られたデータを MASCOT のペプチドマスフィンガープリントモードに入力し、候補蛋白を検索した結果、細胞骨格調節タンパク質が同定された。ラテックスアレルゲンプロテオミクス手法で解析した結果、ラテックスアレルゲンとして報告されている Hev b9 や Hev b7、等が IgE 結合性タンパク質として同定された。そのほかにも、いままで知られていなかったタンパク質が IgE 抗体により特異的に認識されることも明らかになった。

D. 考察

1) 昆虫由来の株細胞である Sf9 を発現系とすることにより、精製度の高いヒスチジンタグ付き P2X2 受容体タンパク質の試料を得ることができた。昨年度の大腸菌および今年度のアフリカツメガエル卵母細胞を発現系とした場合ではこのような試料を得ることができなかったことから考えて、P2X2 受容体のようにカルシウム透過型のイオン・チャネルを形成する致死性の膜タンパク質の発現には昆虫細胞が相応しい可能性が示唆された。

調製した P2X2 受容体タンパク質の大気中における AFM 観察では、径 20 nm、高さ 4 nm ほどの粒子の像が得られた。トランスフェリン

の像との比較から考えてこれは個々の受容体タンパク質であると考えられる。また、粒子像に加えてこれよりもかなり大きな“島”のような像も得られたが、高さが粒子と同程度であること、及び拡大した表面に粒子様の構造が認められたことからこれは受容体タンパク質の集合体であると考えられる。この集合体は受容体タンパク質が凝集する性質を有することを示している。このことはこの受容体の細胞膜上における多量体構造、あるいはクラスタリングがタンパク質そのものの性質に起因することを示唆する結果である。ただし、この凝集が水溶液中における性質に起因するものであるか、あるいは減圧乾固の過程における濃縮の結果生じるものであるかは現在のところ断定できない。

分子生物学的手法を用いた P2X2 受容体タンパク質の細胞内システイン残基の役割を検討する研究では、還元剤である DTT の細胞内処置および 9 番目のシステイン残基 (Cys9) のアラニン置換により ATP に対する反応性の低下が認められた。このアラニン置換体に DTT を処置しても無効だったことから考えて、Cys9 が通常酸化状態にあり、ATP に対する正常な応答性の維持に関わっていると推察される。P2X2 受容体は三量体構造を取ると予想されている。Cys430 のアラニン置換は無効であったことから、Cys9 とジスルフィド結合を形成するのは Cys430 ではなく、三量体中の他のサブユニットタンパク質の Cys9、あるいは受容体以外のタンパク質のシステイン残基と考えられる。

P2X2 受容体タンパク質の細胞外領域のイオン・チャネル活性に必須なジスルフィド結合の下流領域にアミノ酸置換を施した実験からは、奇数番号のアミノ酸残基を置換した場合の方が偶数番号のアミノ酸残基を置換した場合より ATP に対する反応性の変化が大きく、また奇数番号間、偶数番号間でそれぞれ比較した場合には、ジスルフィド結合に近いほど変化が大きいことが示された。奇数番号と偶

数番号で置換効果に差があるという結果は、この領域が β シート構造を取るという Protein Data Bank を用いた構造予測の報告を実験的に支持するものである。

2) 光ラベル化 C60 誘導体の合成に成功し、光反応性および GST 阻害活性に関して検討しているところである。

AFM プローブの先端に結合させる有機分子に関しては、最終目的化合物の合成は済んでいないが、アセチレン部分に光スイッチ化合物アゾベンゼンを搭載することで、解像度の変化を検出することを期待している。

3) 昨年度の自己組織化膜 (SAM) を利用した種々の官能基表面上での正常ヒト骨芽細胞 (NH0st) の増殖、分化および細胞間連絡機能の変化検討より、骨芽細胞の分化には、増殖はやや抑制されるものの硫酸基あるいはリン酸基表面が効果的であることを示唆する結果を得た。実際に、臨床に用いる材料として、表面が金でチオール基を持つ化合物を反応させたものを調製することは現実的でない。それよりも、現在までに研究されている天然あるいは合成高分子を基にして材料を合成する方が、種々の官能基を望む密度で導入可能であり、たとえ単一の官能基を導入する場合でも多種多様の材料を調製することができる。本年度は、現在までに研究が行われている材料のうち、硫酸基、リン酸基及びカルボキシル基が導入可能である多糖からなる高分子電解質錯体 (PEC: 信州大学繊維学部 阿部研究室製) を選んで検討を行った。

今回、使用した PEC はキトサンをポリカチオンに、上に挙げた官能基を導入したキチンやヒアルロン酸をポリアニオンに用い、混合して静電的相互作用により不溶化したものである。PEC の特長としては、ハイドロゲルで、ミクロドメイン構造を持ち、全体では電気的に中性であるものの電荷を持つ官能基が密に存在している。膜状のみならず、カプセル状、スポンジ状ハイドロゲルへの整形も可能で、再生医療を含む医療用材料としての応用を期

待できる。信州大学・阿部研究室では、この材料を用いて歯根膜細胞や繊維芽細胞を培養した結果、その形態や機能、細胞内シグナルなどに影響を及ぼすことを見いだしている。

今年度も、昨年度に引き続き、より臨床を想定できるようにモデル細胞として正常ヒト骨芽細胞である NH0st を用いている。この細胞が種々の PEC 上でどのような挙動を示しその機能にどのような影響があるのかを検討した。まず、種々の PEC 上での NH0st の接着形態を観察したところ、カルボキシル基を持つ CM-Chitin と HA を用いた PEC 上で細胞が凝集塊を形成することが認められた。以前より、カルボキシル基を持つ多糖を用いた PEC 上で細胞が凝集塊を形成することが認められており、本研究で見られた結果と一致する。すなわち、細胞の種類に関わらず、カルボキシル基を含む PEC では細胞の PEC への接着が弱く、細胞同士が引き合う力のほうがより強いため、凝集塊を形成すると考えられる。昨年度、SAM によるカルボキシル基表面では細胞の凝集は認められなかったが、この細胞の凝集には以下の可能性が考えられる。カルボキシル基の導入により表面電荷はマイナスに傾いており、マイナスの電荷を帯びている細胞表面との相互作用はもともと弱い。その上、PEC はハイドロゲルであるため、その上での細胞接着も弱い。これらの相乗効果で PEC 表面への細胞接着力がより低下し、細胞が凝集したと思われる。また、この PEC には、官能基としてカルボキシル基だけではなくアミノ基および水酸基も存在する。この3者の組み合わせが細胞接着に何らかの障害を生じた可能性もあるが、この官能基の組み合わせ効果に関しては、SAM を用いてさらに検討を加えていく必要がある。

細胞間連絡機能に関しては、カルボキシル基を導入した CM-Chitin においてのみ1日目に抑制が見られたが、前年度、SAM によるカルボキシル基表面でもその機能が抑制される傾向が認められた。このことは、カルボキシル基が細胞間連絡機能を抑制しうることを示す

ものであるが、同じくカルボキシル基を持つ HA では CM-Chitin で見られたような大きな機能抑制は見られなかった。同じカルボキシル基を含む PEC でこのような差が見られたのは、もともとの多糖骨格にカルボキシル基が存在している場合と反応により導入した場合とではその官能基による影響が異なると考えられる。すなわち、既に存在している他の官能基の影響も含めて、もともとの多糖の組成および構造に由来する細胞への影響が、さらに導入された官能基による影響を受けていると考えられる。PEC を形成していない CS 上での細胞間連絡機能変化の結果からも示唆されている。

CS はアミノ基を持っているため、水溶液中ではポリカチオンとして振舞う。この上に NH0st を培養すると、1日目および7日目でも細胞間連絡機能は抑制される傾向が認められ、7日目経過した細胞の方が抑制の度合いも大きかった。これに対して、アミノ基を持つ SAM 表面では、NH0st の細胞間連絡機能は培養1日目において機能が僅かながら亢進されるが、CS と同様7日目では機能が低下し、コントロールと同程度になることが示されている。このことから、多糖が細胞に与える影響は、もともとの多糖が与える影響と導入された官能基が与える影響との兼ね合いになることが示唆されている。リン酸基に関しては、培養7日目に細胞間連絡機能が亢進されることが認められたが、SAM での検討においては培養7日目に培養した細胞が表面から剥離し易くなっており、未だに正確な測定を行えていないため比較検討ができない。この考察をさらに裏付けるために、来年度もリン酸基を持つ SAM 表面での細胞間連絡機能測定を試みていく。尚、硫酸基を導入した多糖を用いた PEC では、培養した NH0st のこの機能への大きな影響は認められなかった。前年度の硫酸基 SAM 表面では機能が9割程度抑制される傾向が認められたが、有意差があるものではなかったことから、本実験において影響が認められなかつ

たことは前年度の結果と矛盾する結果ではないと現時点では考えている。

これらの PEC 上で NH0st を 7 日間培養した後の増殖、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性および沈着カルシウム量に着目すると、凝集塊を形成した CM-Chitin と HA では細胞増殖が著しく阻害されることが認められた。それに対して、単位細胞当たりの沈着カルシウム量は、コントロールであるコラーゲンコートディッシュを含む他の試料のどれよりも大きい値を示した。細胞が存在しない PEC に培地を入れて 1 週間培養器に放置しても、カルシウムは沈着しないことは確認しているため、この沈着は NH0st の働きによるものと考えられる。しかしながら、骨芽細胞の分化指標の 1 つである ALP の活性は、いずれの場合もコントロールよりも低い値であり、特に CM-Chitin の場合にはコントロールの 5 % の活性しか認められなかった。これらの PEC では、培養開始 7 日後では分化状態が他のものよりも遙かに亢進した結果 ALP 活性が既に低下した可能性がある。これに関しては培養直後の ALP 活性を測定することで明らかになっていくであろう。しかしながら、分化状態がより亢進していたとしても、これらの材料上での細胞増殖が著しく抑制されていることは問題である。一般的には、細胞が分化に向かうと増殖は抑制されるが、昨年度の結果と比較しても、この増殖抑制の度合いは著しく、これらを実際に臨床応用するにはこの点を改善する必要があると考えられる。これに対して、当初、細胞分化を亢進すると期待されていた硫酸基およびリン酸基を持つ PEC を見ると、NH0st の分化はあまり亢進されていない。特に、リン酸基を持つ P-Chitin による PEC 上では、細胞分化の指標である ALP 活性が抑制され、カルシウム量の増大も見られなかった。反面、細胞増殖は促進されており、当初の予想とは全く逆の結果となった。硫酸基を含む PEC に着目しても、期待された程度の分化促進はこの段階では認められなかった。しかしな

がら、これらにおける細胞増殖はコントロールの 70-80% で、ALP 活性も S-Chitin ではほぼ維持され、SHA では増強されていた。S-Chitin における沈着カルシウム量は増強されたことから、硫酸基を含む PEC に関しては時間の経過とともに分化をより促進することも期待できる。これらのように、当初の期待とは異なる結果が得られたものの、硫酸基に関してはその存在により NH0st の分化を促す可能性が示唆された。今回、昨年度の SAM の結果から予想されるものと異なる結果が得られた原因の一つは、細胞の接着形態と同様に、PEC 材料が電氣的に中性の複合体であることが考えられる。すなわち、同一材料中に複数の官能基が存在し官能基効果が複雑に絡み合っていること、電氣的に中性になっているため期待された官能基の影響を打ち消していることが考えられる。また、基本骨格である多糖の Chitin あるいは HA 自体も、細胞への何らかの影響を及ぼしていると思われ、その効果との複合化により予想された結果が得られなかったと考えられる。事実、複合化していないキトサンのみをコートした表面上での細胞分化を検討すると、昨年度の SAM によるアミノ基表面と同程度の細胞増殖、ALP 活性およびカルシウム沈着量が得られた。このことは、細胞間連絡機能とは異なり、複合体を形成していない場合は、細胞分化には基本骨格よりも骨格中に存在する官能基の影響の方が大きいことを示唆している。それが、静電的な相互作用により複合体を形成すると、官能基による効果が予想されたものとは異なってしまふことから、複合体中の官能基効果は上述したような影響からより複雑になっているに違いない。リン酸基を含む PEC において、細胞増殖が亢進したのはその端的な例を示すものと考えられる。

いずれにせよ、導入した官能基による材料の細胞への影響は、材料の組成や構造が複雑になるにつれてより複雑になってしまうことが明らかとなった。官能基から期待される効

果をそのまま材料に付与するには、材料がある程度単純な構造でなければいけないのではないだろうか。その意味では、来年度からは、アルギン酸のように複合体を形成しなくてもカルシウムイオンの存在下でハイドロゲルを形成する分子を材料として用い、カチオン性とアニオン性官能基が同時に存在しない環境で、分子修飾による官能基などの影響を検討する必要がある。しかしながら、官能基のみで細胞の機能を積極的に高めることは難しいことがこれまでの検討から示されているため、さらに積極的に細胞機能を高める材料を開発するためには、別の手段を考えていく必要がある。その点、今年度検討した PEC も、増殖因子や分化促進因子との複合化を行うことで、より効果的に骨再生を促進する医用材料として使用できると考えられる。例えば、リン酸基とカルボキシル基あるいは硫酸基とを同一の糖鎖に導入する、あるいは硫酸基、リン酸基を含む PEC に分化促進因子である BMP を組込む、カルボキシル基を含む PEC に TGF-beta、bFGF や IGF を組込むなど、様々な増殖因子との組み合わせが考えられる。さらに、増殖因子との複合化以外には、細胞接着ペプチドによる材料の修飾が考えられる。細胞接着に関連するインテグリンからのシグナル伝達が細胞機能に大きな影響をもたらすことは既に知られており、近年、細胞接着タンパク質であるフィブロネクチンとインテグリンとの結合には、従来から知られている RGD 配列だけでなく PHSRN 配列も重要であることが報告されてきている。よって、数多く行われてきた RGD ペプチドの修飾だけではなく、これら2種類のペプチドを材料に修飾させることで、新たな材料を開発できる可能性がある。これらの複合化材料を開発することで、従来とは異なる骨組織の再生を促す新規医用材料が開発できるであろう。

以前、粒子状の材料では、NH0st の培養初期の細胞間連絡機能の度合いと骨分化の程度に関連が見いだせた。このことから、今年度も、

同じ材料上でこれら2つの細胞機能を測定したが、昨年度同様に、それらの機能の間に相関は見いだせなかった。よって、粒子状物質が細胞に対して与える影響と、細胞より大きい材料表面が与える影響とは、細胞内でのその経路が異なることが示唆された。すなわち、細胞膜全体が材料表面を認識した場合と、細胞膜の一部が材料を認識した場合には、その後生じる細胞への影響が異なっていることが示された。このことは、材料の細胞への影響を考慮する場合に、材料によっては、細胞間連絡機能の程度を評価するだけでなく、その材料を実際に使用する部位に関連した他の細胞機能への影響を評価する必要があることが示された。

4) 陰イオン修飾ヒアルロン酸は、異なる細胞種の分化を促進し、さらに組織再生において重要な細胞間連絡機構を賦活する機能性物質であり、再生医療において重要な働きをする有望な機能性物質であると考えられる。

ヒト皮膚繊維芽細胞は、あらたな治療効果が期待されるヘパリン誘導体と bFGF 共存下において、複数の蛋白質群を発現誘導した。可溶性のリン酸化タンパク質の発現に着目して解析した結果、細胞骨格制御タンパク質の種類と発現量がヘパリン誘導体の構造と密接に関連していると思われた。ラテックスアレルゲンの中には、データベース検索では、明確に同定できないラテックス抗原も数多く、存在した。Hevea brasiliensis (ゴムの木) など遺伝子、タンパク質の配列がデータベースに多く登録されていない種については、通常の検索によるタンパク質抗原の網羅的同定に困難が伴うこともわかった。

E. 結論

本年度の研究により、AFM 観察に必要な構造を有する ATP 受容体タンパク質を発現/精製するためには、昆虫細胞発現系の利用が適していることが示された。そして、精製した試料を用いて、ATP 受容体タンパク質の AFM 観察

像を初めて得ることができた。また、分子生物学的手法を用いたATP受容体の構造-機能相関の研究では、細胞内にある9番目のシステイン残基が酸化状態にあり、正常なATP応答性に関与すること、および、細胞外のイオン・チャンネル活性に必要なジスルフィド結合の下流領域がβシート構造を取ることが示された。

C₆₀のGST阻害活性のメカニズムの検討および活性向上を目的とした光ラベル化誘導体2種の合成に成功した。また、タンパク質の高精度イメージングのためのAFMプローブ修飾分子の合成を試みた。

正常ヒト骨芽細胞の分化を促進する傾向が見られた硫酸基及びリン酸基の影響をさらに検討するために、多糖からなる高分子電解質錯体(PEC)を用いて検討を行った。今回用いたPECは、ポリアニオンとポリカチオンの複合体であることから、単純に導入された官能基から予想される効果は見いだせず、骨格となる材料の組成、存在する他の官能基にも大きく影響を受けることが示唆された。今後は、複合化を必要としない材料も用いるとともに、官能基類の組み合わせも考慮して材料を設計、調製する。官能基の影響をより詳細に検討するため、昨年度作成した自己組織化膜表面での細胞の接着に関わるタンパク質類の表面への接着挙動やその状態を、原子間力顕微鏡等を利用した手法を用いて検討していく。

陰イオン修飾ヒアルロン酸は、異なる細胞種の分化を促進し、さらに組織再生において重要な細胞間連絡機構を賦活する機能性物質であり、再生医療において重要な働きをする有望な機能性物質であると考えられる。

プロテオミクスの手法により、リン酸化タンパク質およびタンパク質抗原を迅速に検出・同定できることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(研究業績「欧文」)

【原著】

- 1) Sato, K., Matsuki, N., Ohno, Y. and Nakazawa, K.: Estrogens inhibit L-glutamate uptake activity of astrocytes via membrane estrogen receptor α . *J. Neurochem*, 86: 1498-1505, 2003.
- 2) Nakazawa, K., Ojima, H., Ishii-Nozawa, R., Takeuchi, K. and Ohno, Y.: Intracellular disulfide bond that affects ATP responsiveness of P2X₂ receptor/channel. *Eur. J. Pharmacol*, 474: 205-208, 2003.
- 3) Nakazawa, K. and Ohno, Y. Block by phytoestrogens of recombinant human neuronal nicotinic receptors. *J. Pharmacol. Sci.*, 93: 118-121, 2003.
- 4) Nakazawa, K., Ojima, H., Ishii-Nozawa, R., Takeuchi, K. and Ohno, Y. Amino acid substitutions from an indispensable disulfide bond affect P2X₂ receptor activation. *Eur. J. Pharmacol*, 2003, in press.
- 5) Akaishi, T., Nakazawa, K., Sato, K., Saito, H., Ohno, Y., and Ito, Y.: Hydrogen peroxide modulates whole cell Ca²⁺ currents through L-type channels in cultured rat dentate granule cells. *Neurosci. Lett.*, 2003, in press.
- 6) Akaishi, T., Nakazawa, K., Sato, K., Saito, H., Ohno, Y., and Ito, Y.: Modulation of voltage-gated Ca²⁺ current by 4-hydroxynonenal in dentate granule cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 2004, in press.
- 7) Okada E, Komazawa Y, Kurihara M, Inoue H, Miyata N, Okuda H, Tsuchiya T, Yamakoshi Y.: Synthesis of C₆₀ Derivatives for Photoaffinity Labeling. *Tetrahedron Lett.*, 45: 527 – 529, 2004.
- 8) Azov V A, Skinner P J, Yamakoshi Y., Seiler P, Gramlich V, Diederich F: Functionalized and Partially or Differentially Bridged Resorcine[4]arene Cavitands. *Helv. Chim. Acta*, 86: 3648 – 3670, 2003.

- 9) Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu A, Arakane K, Miyata N, Goda Y, Masumizu T, Nagano T: Active Oxygen Species Generated from Photoexcited Fullerene (C60) as Potential Medicines, *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 12803 – 12809, 2003.
- 10) Nishikawa K, Yamakoshi Y, Uemura I, Tominaga N: Ultrastructural Changes in *Chlamidomonas acidophila* (Chlorophyta) Induced by Heavy Metals and Polyphosphate Metabolism. *FEMS Microbiol Ecology*, 44: 253-259, 2003.
- 11) Kai Y, Komazawa Y, Miyajima A, Miyata N, Yamakoshi Y.: [60]Fullerenes as a Novel Photoinduced Antibiotic. *Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 11: 79-87, 2003.
- 12) Tsuchiya, T..: A useful marker for evaluating the safety and efficacy of tissue engineered products. *ASTM*, in press.
- 13) Nagahata M., Tsuchiya T., et al. : A novel function of N-adherin and Connexin 43: Marked enhancement of alkaline phosphatase activity in rat calvarial osteoblast exposed with sulfated hyaluronan. *Biochem, Biophys. Res. Commun* accepted.
- 14) Matsuoka A., Tsuchiya T..: Gene expression changes in Balb/3T3 transformants induced by poly(L-lactic acid) or polyurethane film. *J. Biomed. Mater. Res.*, in press.
- 15) Ahmed, S. and Tsuchiya, T..: Different expression on Gap junctional protein connexin43 in two strains of mice after one-month Implantation of Poly-L-Lactic acid. *Animal cell technology*, accepted.
- 16) Park, J. U. and Tsuchiya, T..: Evaluation of the cornea cells affected by multi-purpose solutions for contact-lens. *Animal cell technology*, accepted.
- 17) Tsuchiya T., Sakai M, Ikeda H, Mashino T, Banu Y.: Biocompatible biomaterials for the human chondrocyte differentiation estimated by RT-PCR method. *Animal cell technology*, in press.
- 18) Yang, J., Ichikawa, A., Tsuchiya, T..: Change of the cellular function by connexin gene transfection in a hepatoma cell line. *Animal cell technology*, in press.
- 19) Yang J, Ichikawa A, Tsuchiya, T..: A novel function of connexin32: marked enhancement of liver function in a hepatoma cell line. *Biochem, Biophys. Res. Commun*, 307: 80-85, 2003.
- 20) Nakaoka R., Tsuchiya T., Nakamura A.: Neural differentiation of midbrain cells on various protein-immobilized polyethylene films. *J Biomed Mater Res*, 64A: 439-446, 2003.
- 21) Isama K, Tsuchiya, T..: Enhancing effect of poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Biomaterials*, 24: 3303-3309, 2003.
- 22) Sumide, T., and Tsuchiya, T..: Effect of multi-purpose solutions (MPS) for hydrogel contact lenses on gap-junctional intercellular communication (GJIC) in rabbit corneal keratocytes. *J. Biomedical Materials Research Applied Biomaterials*, 64B: 57-64, 2003.

(研究業績「和文」)

【原著】

山越葉子: 単分子アノマニピュレーションを目指した超化学分子とナノテクノロジーを用いた解析. 機能性人工レセプターMolecular Gripper の設計合成及び画像化. 季刊フラーレン, Vol. 11 No. 2, 169-177, 2003.

(学会発表)

1) 中澤憲一, 山越葉子, 生島裕恵, 土屋利江, 大野泰雄 “P2X2 受容体タンパク質の調製および原子間力顕微鏡による観察” 第 77 回日本薬理学会年会 2004 年 3 月

- 2) 佐藤薫, 中澤憲一, 松木則夫, 大野泰雄 “アストロサイトにおけるエストロゲンのグルタミン酸取り込み機構に対する抑制” 第77回日本薬理学会年会 2004年3月
- 3) 生島裕恵, 中澤憲一, 野澤(石井)玲子, 竹内幸一, 大野泰雄 “P2X2受容体のATP反応性に対する細胞内システイン残基の役割” 第77回日本薬理学会年会.2004年3月
- 4) 赤石樹泰, 中澤憲一, 佐藤薫, 齋藤洋, 大野泰雄, 伊藤芳久 “脂質過酸化由来物質4-hydroxynonenalがラット歯状回顆粒細胞のホールセルCa²⁺電流に及ぼす影響” 第77回日本薬理学会年会. 2004年3月
- 5) Nishikawa, K.; Tominaga, N.; Otomo, R.; Yamakoshi, Y.: Polyphosphate Metabolism in *Chlamydomonas acidophila* in Phosphate-limited Conditions under Heavy Metal (Cd) Stress. The 2003 Annual meeting of the American Society of Plant Biologists. (Honolulu, July, 2003.).
- 6) 山越葉子, 甲斐陽子, 宮島敦子, 土屋利江: フラーレン(C60)の微生物増殖阻害活性について. 日本薬学会第123年会. (長崎, March, 2003.)
- 7) Nishikawa, K.; Tominaga, N.; Yamakoshi, Y.; Otomo, R.: Change of the Ultrastructure and Accumulation of Polyphosphate in *Chlamydomonas acidophila*. The 10th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*. (Vancouver, June, 2002.)
- 8) 矢上 健、配島由二、土屋利江ら、: ラテックシアレルゲンとしての isoflavone reductase 第53回日本アレルギー学会総会 (23-25、Oct, 2003)
- 9) 柳楽 勤、土屋利江、阿部康次、長幡 操: 陰イオン修飾ヒアルロン酸による正常ヒト表皮角化細胞の分化促進効果, 第6回日本組織工学会大会 (12-13June,2003)
- 10) 柳楽 勤、土屋利江、阿部康次、長幡 操, 表皮角化細胞の分化促進及び細胞間連絡機構亢進効果, 第25回日本バイオマテリアル学会, (16-17,Dec.2003)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
特願 2001-311484 ギャップ機能亢進剤
特願 2001-311485 ギャップ機能抑制剤
特願 2003-8855 ギャップ機能抑制剤
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表 (分子機能イメージング循環系)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Kogata N, Masuda M, Kamioka Y, Yamagishi A, Endo A, Okada M, Mochizuki N	Identification of fer tyrosine kinase localized on molecule-1 phosphorylating kinase in vascular endothelial cells	Mol. Biol. Cell	14	3553-3564	2003
Ogita H, Kunimoto S, Kamioka Y, Sawa H, Masuda M, Mochizuki N	EphA4-mediated Rho activation via Vsm-RhoGEF expressed specifically in vascular smooth muscle cells	Circ. Res	93	23-31	2003
Yoshizaki H, Ohba Y, Kurokawa K, Itoh RE, Nakamura T, Mochizuki N, Nagashima K, Matsuda M	Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes.	J. Cell Biol.	162	1-10	2003
Endo A, Fukuhara S, Masuda M, Ohmori T, Mochizuki N.	Selective inhibition of vascular endothelial growth factor receptor-2(VEGFR-2) identifies a central role for VEGFR-2 in human aortic endothelial cell responses to VEGF	J. Receptor Signal Transduction	23	239-254	2003

研究成果の刊行に関する一覧表 (分子機能イメージング神経系)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hoshino M, Nakamura S	Small GTPase Rin Induces Neurite Outgrowth through Rac/Cdc42 and Calmodulin in PC12 Cells.	J. Cell Biol.	163	1067-1076	2003
Kohara K, Kitamura A, Adachi N, Mishida M, Itami C, Nakamura S, Tsumoto T	Inhibitory but not excitatory cortical neurons require presynaptic Brain-derived neurotrophic factor for dendritic development, as revealed by chimera cell culture.	J. Neurosci.	23	6123-6131	2003
Itami C, Kimura F, Kohno T, Matsuoka M, Ichikawa M, Tsumoto T, Nakamura S	Brain-derived neurotrophic factor-dependent unmasking of "silent" synapses in the developing mouse barrel cortex.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	100	13069-13074	2003
Harada T, Harada C, Wang Y.L, Osaka H, Amanai K, Tanaka K, Takizawa K, Setsuie R, Sakurai M, Sato M, Noda M, Wada K	Role of ubiquitin carboxy terminal hydrolase-L1 in neural cell apoptosis induced by ischemic retinal injury in vivo.	Am. J. Pathol.	164	59-64	2004
Amada K, Santo-Yamada Y, Wada K	Stress-induced impairment of inhibitory avoidance learning in female neuromedin B receptor-deficient mice.	Physiol. Behav.	78	303-309	2003
Nishikawa K, Li H, Kawamura R, Osaka H, Wang Y.L, Hara Y, Hirokawa T, Manago Y, Amano T, Noda M, Aoki S, Wada K	Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants.	Biochem. Biophys. Res. Comm.	304	176-183	2003