

た場合には有意な変化は認められなかったが、好中球を移入した場合には CD69-KO マウスでも wild type と同程度に関節炎を発症した。したがって、関節炎の発症には CD69 分子に依存した好中球の役割が重要であることが明らかとなった。また好中球の遊走に関与するケモカインである CXCL1 と MCP-1 の発現レベルの上昇が CD69-KO マウスでは有意に低かったことから、関節部位への好中球の浸潤にこれらのケモカインが関与している可能性が示唆された。

関節炎の発症において好中球上の CD69 分子が果たす役割については、2つの可能性が考えられる。1つは、CD69 が c-type lectin family に属する糖蛋白で、接着分子としての役割が示唆されていることから、好中球が抗体の結合したコラーゲン部位へ接着するのに重要な役割を果たしているという可能性である。またもう1つの可能性として、CD69 がコレセプターとして T 細胞の細胞応答に関与するという報告があることから、好中球が関節部位において活性化するのに CD69 を介したシグナルが必要であるという可能性が考えられる。関節炎の発症における CD69 分子の役割については、そのリガンド分子の発見も含め、さらなる研究が望まれる。

E. 結論

本協力研究により、微小循環障害に関わる生体内の血小板機能に CD69 分子が関与することが明らかとなった。

また、関節炎の発症における CD69 分子の関与が明らかとなり、特に浸潤している好中球での役割が示唆された。将来的に CD69 の作用を制御することにより、慢性関節リウマチなどの関節炎を治療できる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Taniguchi, M., Harada, M., **Nakayama, T.**, and Wakao, H.: The regulatory role of V α 14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Ann. Rev. Imm.* 21:483-513 (2003).
2. Kamata, T., Yamashita, M., Kimura, M., Murata, K., Inami M., Shimizu, C., Sugaya, K., Wang C.-R., Taniguchi, M., and **Nakayama, T.**: src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase SHP-1 controls the development of allergic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 111:109-119 (2003).
3. Kubo, S., **Nakayama, T.**, Matsuoka, K., Yonekawa, H., and Karasuyama, H.: Long term maintenance of IgE-mediated memory in mast cells in the absence of detectable serum IgE. *J. Immunol.* 170:775-780 (2003).

4. Kondo, E., Wakao, H., Koseki, H., Takemori, T., Kojo, S., Harada, M., Takahashi, M., Sakata, S., Shimizu, C., Ito, T., **Nakayama, T.**, and Taniguchi, M.: Expression of recombination-activating gene in mature peripheral T cells in Peyer's Patch. *Int. Immunol.* 15:393-402 (2003).
5. Akbari, O., Meyer, E., Stock, P., Kronenberg, M., Sidobre, S., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., Grusby, M. J., DeKruyff, R. H., and Uematsu, D. T.: Critical role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* 9:582-588 (2003).
6. Fukuda, K., Yoshida, H., Sato, T., Furumoto, T., Mizutani-Koseki, Y., Suzuki, Y., Saito, Y., Takemori, T., Kimura, M., Sato, H., Taniguchi, M., Nishikawa, S., **Nakayama, T.**, and Koseki, H.: Mesenchymal expression of Fok1, a winged helix transcriptional factor, regulates generation and maintenance of gut-associated lymphoid organs. *Developmental Biol.* 255:278-289 (2003).
7. Ashcroft, G. S., Mills, S. J., Lei, K., Gibbons, L., Burow, M., Jeong, M.-J., Taniguchi, M., Horan, M. A., Wahl, S. M., and **Nakayama, T.**: Estrogen modulates cutaneous wound healing by down-regulating macrophage migration inhibitory factor. *J. Clin. Invest.* 111:1309-1318 (2003).
8. Shirai, T., Magara, K. K., Motohashi, S., Yamashita, M., Kimura, M., Suwazomo, Y., Nogawa, K., Kuriyama, T., Taniguchi, M., and **Nakayama, T.**: Th1-biased immunity induced by exposure to Antarctic winter. *J. Allergy Clinical Immunol.* 111:1353-1360 (2003).
9. Nakamura, Y., Yasunami, Y., Satoh, M., Hirakawa, E., Katsuta, H., Ono, J., Kamada, M., Todo, S., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., and Ikeda, S.: Acceptance of islet allografts in the liver of mice by blockade of an inducible costimulator. *Transplantation* 75:1115-1118 (2003).
10. Shimonaka, M., Katagiri, K., **Nakayama, T.**, Fujita, N., Tsuruo, T., Yoshie, O., and Kinashi, T.: Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J. Cell Biol.* 161:417-427 (2003).
11. Shimizu, T., Abe, R., Nishihara, J., Shibaki, A., Watanabe, H., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., Ishibashi, T., and Shimizu,

- H.: Impaired contact hypersensitivity in macrophage migration inhibitory factor (MIF)-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 33:1478-1487 (2003).
12. Sakamoto, M., Hasegawa, A., Sugaya, K., Hashimoto, K., Kimura, M., Yamashita, M., Suzuki, K., and **Nakayama, T.**: Distinct calcium response induced by T-cell antigen receptor stimulation in thymocytes and mature T cells. *Bioimages* 11:1-8 (2003).
13. Zhang, G., Nichols, R. D., Taniguchi, M., **Nakayama, T.**, and Parmely, M. J.: Gamma interferon production by hepatic NK T cells during Escherichia coli infection is resistant to the inhibitory effects of oxidative stress. *Infect. Immun.* 71:2468-2477 (2003).
14. Murata, K., Inami, M., Hasegawa, A., Kubo, S., Kimura, M., Yamashita, M., Hosokawa, H., Nagao, T., Suzuki, K., Hashimoto, K., Shinkai, H., Koseki, H., Taniguchi, M., Ziegler, S. F., and **Nakayama, T.**: CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-Type II collagen antibodies. *Int. Immunol.* 8:987-992 (2003).
15. Omori, M., Yamashita, M., Inami, M., Ukai-Tadenuma, M., Kimura, M., Nigo, Y., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Taniguchi, M., and **Nakayama, T.**: CD8 T cell-specific downregulation of histone hyperacetylation and gene activation of the IL-4 gene locus by ROG, repressor of GATA. *Immunity* 19:281-294 (2003).
16. Nishikawa, H., Kato, T., Tanida, K., Hiasa, A., Tawara, I., Ikeda, H., Ikarashi, Y., Wakasugi, H., Kronenberg, M., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., Kuribayashi, K., Old, L. J., Shiku, H.: CD4⁺ CD25⁺ T cells responding to serologically defined sutoantigens suppress antitumor immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:10902-10906 (2003).
17. Ito, H., Ando, K., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., Ezaki, T., Saito, K., Takemura, M., Sekikawa, K., Imawari, M., Seishima, M., and Moriwaki, H.: Role of V α 14 NKT cells in the development of impaired liver regeneration *in vivo*. *Hepatology* 38:1116-1124 (2003).
18. Kawakami, K., Yamamoto, N., Kinjo, Y., Miyagi, K., Nakasone, C., Uezu, K., Kinjo, T., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., and Saito, A.: Critical role of V α 14⁺ natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur. J. Immunol.*

33:3322-3330 (2003).

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし

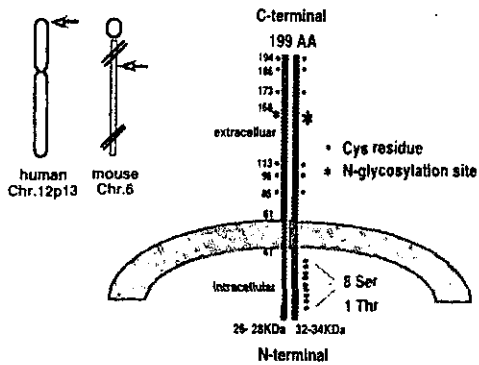


図1 CD69 の分子構造

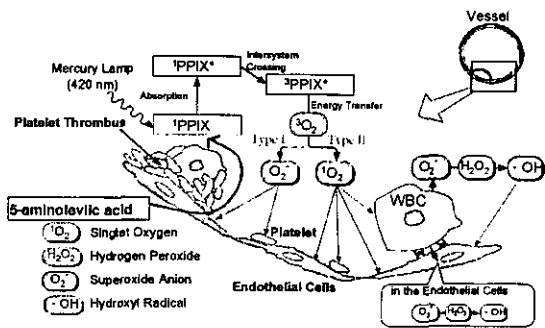


図2 光化学反応による血小板血栓形成機序

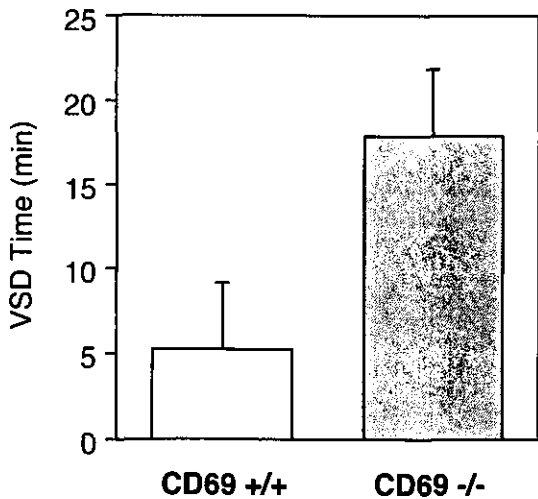
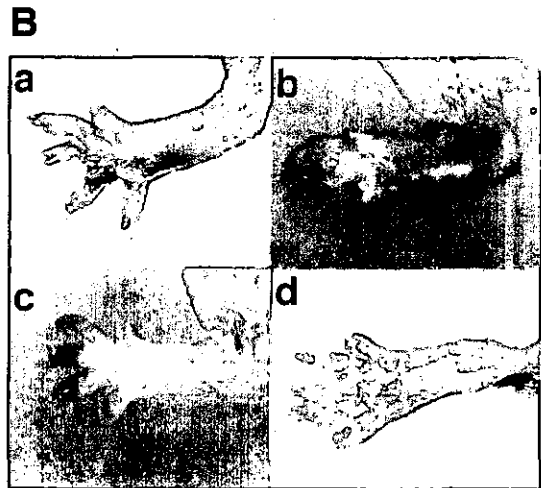
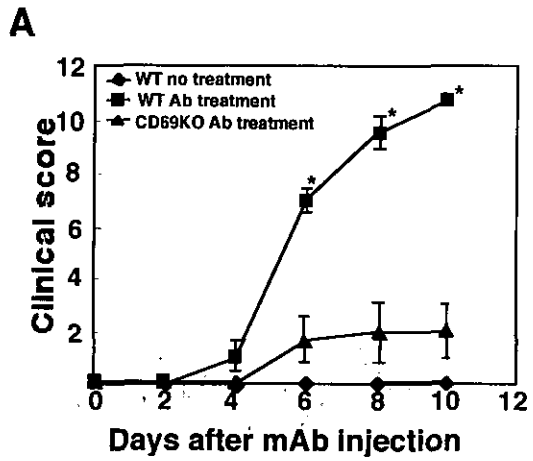


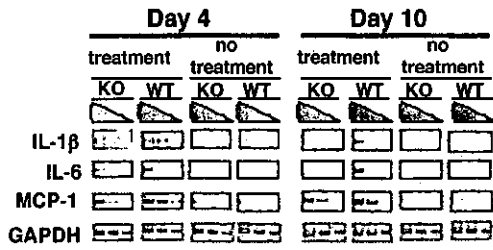
図3 光化学反応によって誘発される血小板血栓によって血流が停止するまでの時間



a: wild type, no treatment; b: wild type, antibody treatment; c: CD69-KO, no treatment; d: CD69-KO, antibody treatment

図4 抗タイプ II コラーゲン抗体投与による関節炎の発症

A



B

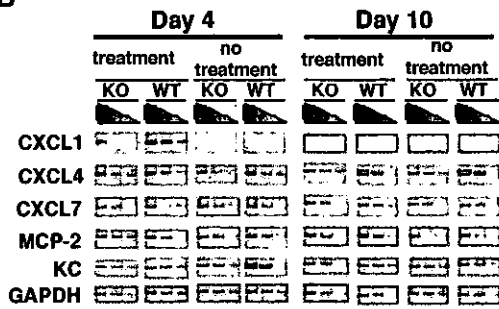


図5 関節部位でのサイトカイン及びケモカインの発現レベル

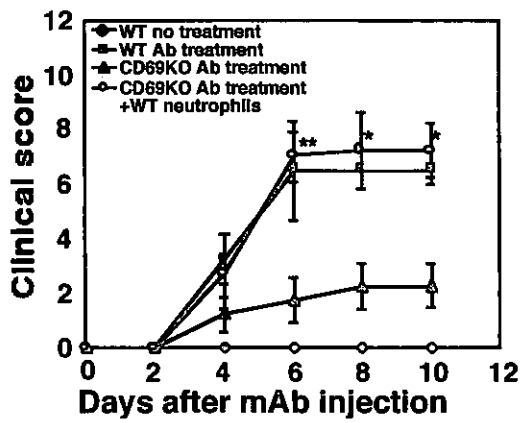


図6 wild type マウスの細胞を移入した場合の関節炎の発症

標識モノクローナル抗体による神経障害防御機構の解析と診断治療への応用

分担研究者 新井孝夫 東京理科大学工学部応用生物科学科教授

研究協力者 大内 敬 東京理科大学工学部応用生物科学科助手

研究要旨

活性酸素による神経細胞死を防御物質として得られた微生物代謝産物ネオエキヌリン A の性質を調べ、この物質がペルオキシナイトライト特異的な消去能とともに、抗アポトーシス活性、神経栄養因子様活性をあわせもつことを明らかにした。また、カチン性リポソーム法を応用して、アゴニスト・アンタゴニスト抗体の新たな活性測定法を開発した。

A. 研究目的

分担研究者と協力者は、活性酸素による神経細胞死の防御効果を有する物質のスクリーニング系を確立し、このような活性をもつモノクローナル抗体と微生物代謝産物を探索してきた。そして、ペルオキシナイトライトによる神経細胞死を特異的に防御する微生物代謝産物ネオエキヌリン A を得、この物質がペルオキシナイトライトを特異的に消去することを明らかにしてきた。また、カチオン性リポソーム法による標識抗体の生細胞内導入法を応用して、活性酸素障害研究のための基礎技術を開発してきた。前年度は、神経障害のイメージングのための基礎的技術を確立している。

本年度の目標は、(1)微生物代謝産物ネオエキヌリン A の神経細胞防御能の研究をさらにすすめるとともに、(2)神経細胞障害の研究に有用な標識アゴニスト・アンタゴニ

スト抗体の活性測定法を開発することである。

B. 研究方法

1. 活性酸素による細胞死とその防御能の測定

NGF で分化させた PC12 細胞を 96 ウェルプレートにまき、以降の実験に使用した。細胞死は、ペルオキシナイトライト供与剤 SIN-1 で誘導し、生細胞数は細胞数計測キット (kit-8) をもちいて測定した。

2. カチオン性リポソーム法による抗体の細胞内導入

モノクローナル抗体とカチオン性脂質リポフェクトアミン (1%) を導入溶液 OPTI-MEN 中で室温、1 時間混合した。次に、繊維芽細胞株 3Y1 細胞を OPTI-MEN で洗浄後、モノクローナル抗体・リポフェク

トアミン混合液を加え、炭酸ガスインキュベーター中 (37°C, 5% CO₂) で1時間反応させた。さらに2日間培養したのち、導入した抗体による増殖阻害は、細胞数カウントキットをもちいることにより調べた。

(倫理面への配慮)

実験動物の動物愛護上の配慮は、本大学実験施設の指針に基づいて行った。

C. 研究結果

1. ネオエキヌリン A の神経細胞防御能の測定

昨年度、ネオエキヌリン A がペルオキシナイトライト特異的な消去能をもつことを報告した。図1は、分化 PC12 細胞をネオエキヌリン A で1日処理したのちにこの物質を除去し、SIN-1 添加後の生細胞数を測定したものである。前処理のネオエキヌリン A 濃度に依存して生細胞数が増加することは、この物質がスカベンジャー以外の活性をもつことを示唆している。この可能性を調べるために、SIN-1 によるカスパーゼ-3 の活性化に対するネオエキヌリン A の影響を調べたのが図2である。この物質がカスパーゼ-3 の活性化を抑制することから、抗アポトーシス活性を有していると考えられる。また、NGF や bFGF と同様にミトコンドリア NADH-デヒドロゲナーゼ活性を上昇させることから (図3)、神経栄養因子様活性ももっていると考えられる。

2. アゴニスト・アンタゴニスト抗体の活性測定法

抗 α -チューブリン抗体 D2D6 は、ウニ卵にマイクロインジェクション法で導入した

場合、その卵割を阻害することが知られている。D2D6 と卵割を阻害しない抗 β -チューブリン抗体 E1 をカチオン性リポソーム法により 3Y1 細胞に導入し、その増殖阻害効果を調べたのが図4である。この図は、D2D6 は増殖阻害するのに対し、E1 は阻害しないことを示している。

D. 考察

EGb761 (Ginkgo extract) は、種々のテルペノイド、フラボノイドなどの化学物質を含み、スカベンジャー活性と抗アポトーシス活性などをあわせもつ強い神経細胞防御能をもつことが知られている。ネオエキヌリン A の性質も EGb761 と類似しているが、ネオエキヌリン A が単一の化学物質であるという点にその特徴がある。さらに、この物質は、スカベンジャー活性も神経細胞防御活性もペルオキシナイトライトに特異性が高いという特徴も有している。ペルオキシナイトライトの生成に関係する NO は重要な生理的役割をはたしているケースが多いこと、ペルオキシナイトライトは特に神経疾患における細胞死との関連が強いと考えられていることを考慮すると、ネオエキヌリン A のこのような性質は、神経障害の診断と治療に有用であると思われる。

本研究で示されたようにカチオン性リポソームによるモノクローナル抗体導入法をもちいれば、抗体導入に伴う細胞内の酵素活性の変化などを追うことが可能となり、神経障害の診断と治療に有用な方法となる。

E. 結論

ネオエキヌリン A は、スカベンジャー能

と抗アポトーシス活性をあわせもつことを示した。また、カチオン性リポソームによる抗体導入を利用したアゴニスト・アンタゴニスト抗体の新しい測定法を確立した。この物質と方法は、神経障害の診断と治療に有用と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Namekawa, S., Hamada, F., Sawado, T., Ishii, S., Nara, T., Ishizuka, T., Ohuchi, T., Arai, T., and Sakaguchi K: Dissociation of DNA polymerase α primase complex during meiosis in *Coprinus cinereus*, *Eur. J. Biochem.*, 270, 2137-2146 (2003)

2) 大内敬、新井孝夫：リポソームを用いたモノクローナル抗体の生細胞導入法の開発とその応用、ナノバイオテクノロジーの最前線（監修：植田充美）、pp 258-265、シーエムシー出版、2003年10月

3) Toshiyuki Matsuoka Kaoru Kato, Nao Hoshino Tiichiro Matsunaga, Noriko Saito, Masahiro Yamada, Naoki Shimojo, Yoichi Kono, Takao Arai, and Kazuo Suzuki: Disorganization of Actin Polymerization in Neutrophils of Patient with Leukocyte Adhesion Dysfunction: A Bioimaging Analysis System using a Polarized Microscopic System LC-Pol Scope, *Bioimages*, in press

2. 学会発表

1) 鳥飼祐介、石川広平、大谷圭司、栗原傑、

大内敬、新井孝夫、抗 Thy-1 抗体 2E11 誘因による PC12 細胞の突起伸展を阻害するモノクローナル抗体の作製、第 56 回日本細胞生物学会大会、大津、2003 年 5 月

2) 大内敬、柴田麻衣、前川原淳、新井孝夫、カチオン性リポソームによるモノクローナル抗体導入法を用いた細胞内タンパク質の機能解析、第 56 回日本細胞生物学会大会、大津、2003 年 5 月

3) 新井孝夫：モノクローナル抗体による分子機能解析、日本バイオイメーキング学会と化学工学会の連携による「ナノとバイオの融合学理構築、産業基盤形成」シンポジウム、松島、2003 年 9 月

4) Y. Shibata, K. Maruyama, K. Yoshida, T. Ohuchi, T. Arai: Neuroprotective effect of neoechinulin A on peroxyinitrite treated PC12 cells, 第 76 回日本生化学会大会、横浜、2003 年 10 月

5) Y. Okada, A. Suzuki, K. Ishikawa, T. Ohuchi, T. Arai: Polyglutamylolation of tubulin during the neuronal differentiation of neural precursor cells induced by retinoic acid and BDNF, 第 76 回日本生化学会大会、横浜、2003 年 10 月

6) 新井孝夫、大内敬：タンパク質の機能解析に有用なモノクローナル抗体の作製戦略と応用技術の開発、第 12 回日本バイオイメーキング学会学術集会、東京、2003 年 10 月

7) 眞島利和、大谷圭司、富江俊尚、大内敬、新井孝夫：細胞外マトリックスの X 線イメーキング、第 12 回日本バイオイメーキング学会学術集会、東京、2003 年 10 月

8) 清水一生、大内敬、新井孝夫：生細胞中の微小管と結合するモノクローナル抗体の

リポソーム法によるスクリーニング、第 12
回日本バイオイメージング学会学術集会、
東京、2003 年 10 月

9) 石川広平、鳥飼祐介、新井孝夫：神経幹
細胞からアストロサイトへの分化における
Thy-1、integrin 分子の役割、第 12 回日本
バイオイメージング学会学術集会、東京、
2003 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

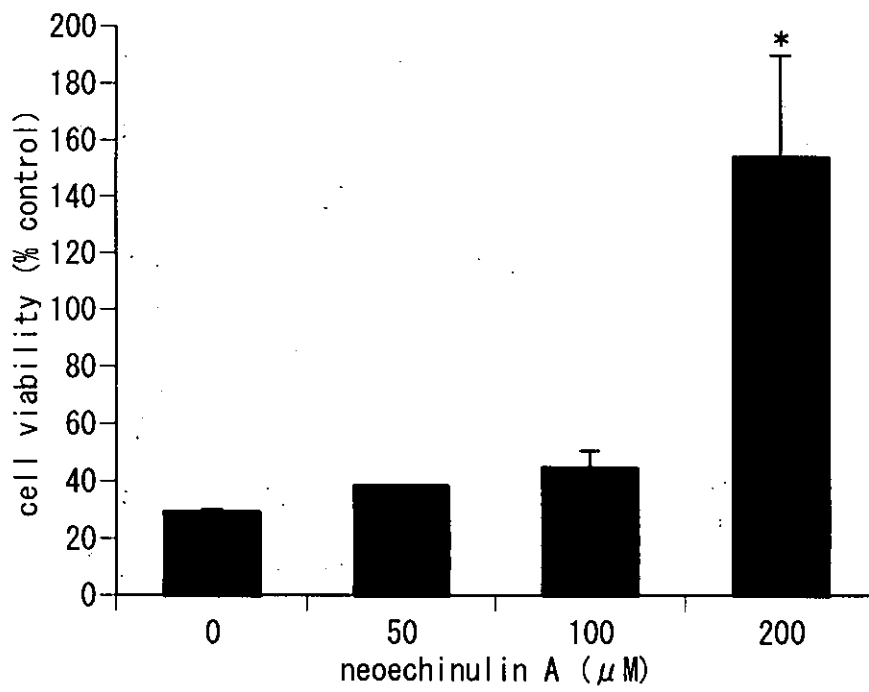


図1 ネオエキヌリンAの神経細胞防御活性

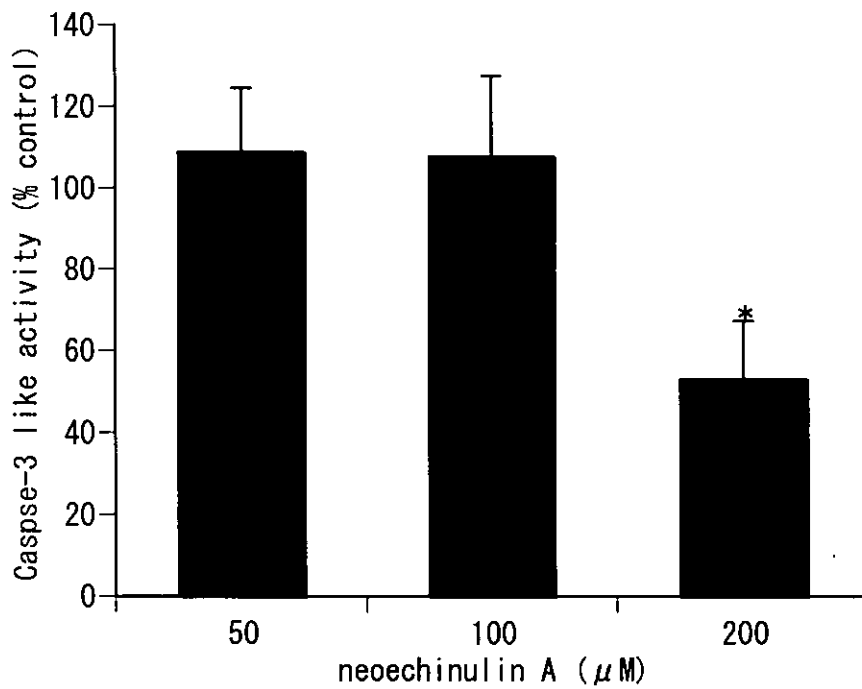


図2 ネオエキヌリンAの抗アポトーシス能

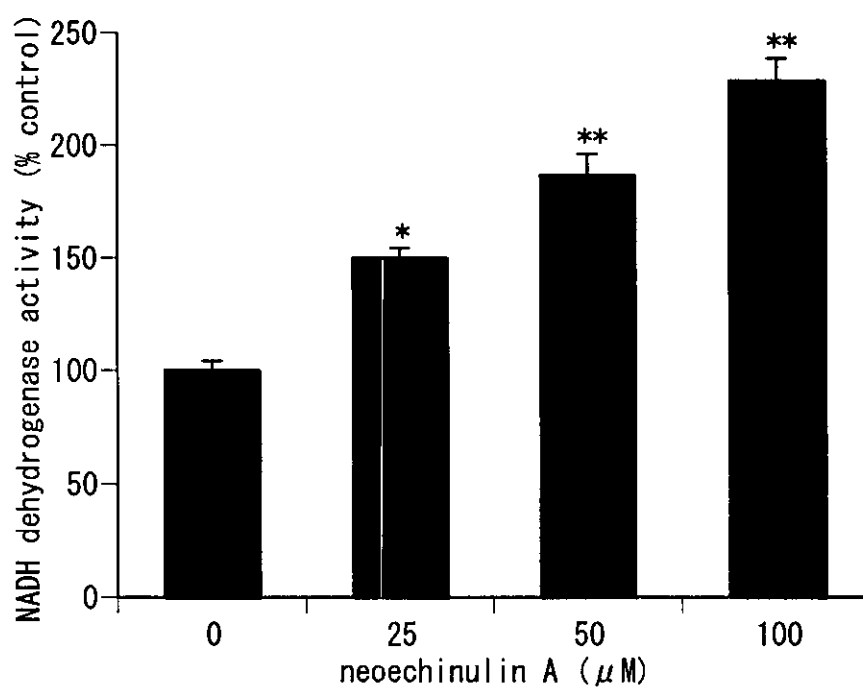


図3 ネオエキヌリンAによるNADHデヒドロゲナーゼ活性の増加

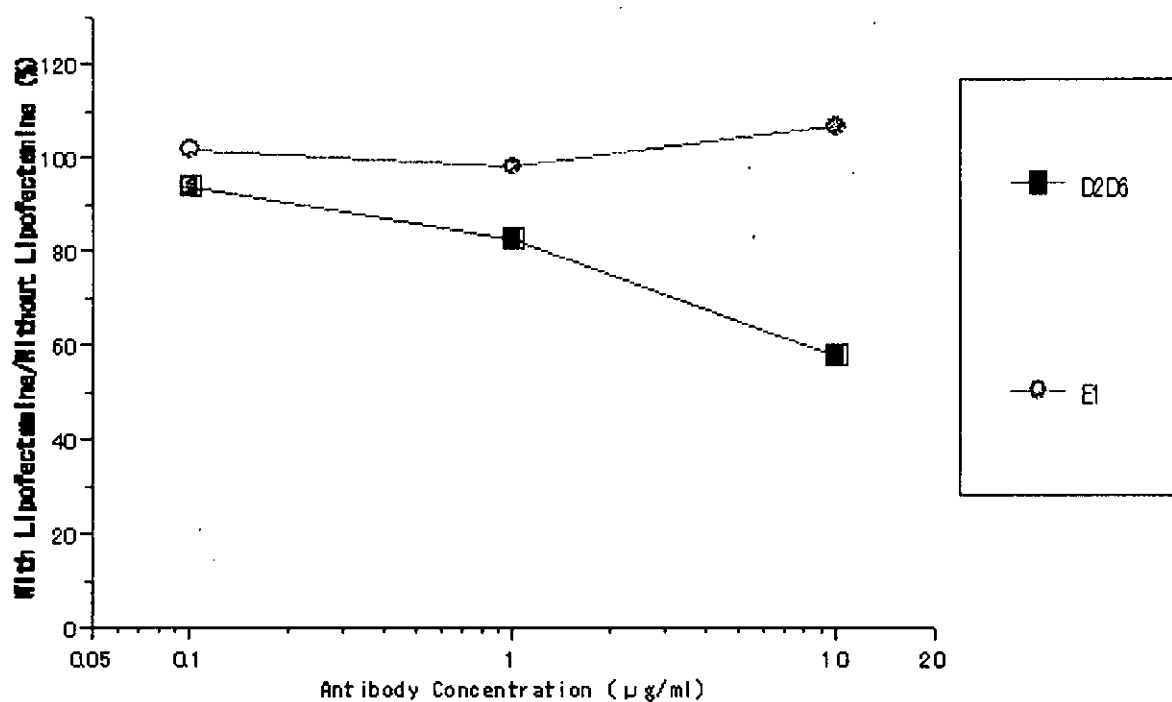


図4 リポソーム法で導入した抗チューブリン抗体D2D6による3Y1細胞の増殖阻害

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 東京大学大学院薬学系研究科 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。その具体例として、mRNAの核内運動の1分子蛍光イメージングを行った。

A. 研究目的

mRNAは核でDNAから転写された後、様々なプロセッシングを経て成熟し、最終的に核膜上にある核膜孔複合体(NPC: Nuclear Pore Complex)を通して細胞質へと核外輸送される。高等真核生物では通常 mRNA 前駆体が細胞質に輸送されることは無く、スプライシングを受けて成熟 mRNA になって初めて核外へと移行できるようになる。一方、XIST RNA や omega-n RNA のように、細胞質に輸送されず核内に留まる RNA 分子種も知られている。これらの事実は、mRNA が転写されてから核外輸送されるまでの機構が高度に制御されており、遺伝子発現制御に重要な役割を果たしている事を示唆する。しかし、新しく転写された mRNA がどのような機構で核膜孔へと移動していくかについては、あまり詳細には調べられてきてなかった。移動の機構には主に2つの説がある。一つは、mRNA がクロマチンの隙間を拡散で運動していくとする"拡散説"。もう一つは、何らかの機構により能動的に

輸送されているとする"能動説"である。

今回、我々は共焦点顕微鏡を用いて生きて細胞核内で mRNA の1分子イメージングを行い、mRNAは何らかの核内構造物と結合解離を繰り返しつつ、制限された領域間を jump しながら核内を移動し、核膜孔へ到達するという描像を得た。このような拡散運動で転写部位から核膜孔へと移動することで、転写後調節の機会が作られているのかもしれない。

B. 研究方法

cap、polyAを含む β -globin (405塩基)、EGFP(800塩基)、mTAK(1700塩基)の mRNA を *in vitro* で合成した。これに、1分子あたり平均10~15分子の蛍光色素 Cy3 を結合させた。この 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個1個の mRNA の軌跡を解析し、光学切片中の滞在時間を調べたところ、短く滞在する分子と、長く滞在する分子がいた。2個の指数関数の和で近似すると、時定数は、それぞれ以下のとおりであった (β -globin: 9 cells $n=453$) fast (94%): 5.5 s^{-1} 、slow: 0.23 s^{-1} 、(EGFP: 7 cells, $n=322$) fast (91%): 6.7 s^{-1} 、slow: 0.23 s^{-1} 、(mTAK: 14 cells, $n=520$) fast (79%): 5.7 s^{-1} 、slow: 0.31 s^{-1} 。短い滞在時間の分子の見かけの拡散定数を出すために、滞在時間が1秒未満の全分子の x-y 平面における軌跡から平均二乗変位を計算した。すると、いずれの長さの mRNA も平均二乗変位は時間に比例し、拡散運動をしている事がわかった。また、算出された x-y 方向の拡散定数 $D_{x,y}$ は β -globin、EGFP、mTAK がそれぞれ $0.21, 0.18, 0.22 \mu \text{ m}^2/\text{s}$ であった。

これらの短い滞在時間の運動が拡散運動による事は次の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 は運動をしつづけていた。また、 23°C と 30°C で mRNA の運動を測定したところ、温度による水の粘性係数の分だけ見かけの拡散定数が変化した ($23^\circ\text{C}: 0.38 \mu \text{ m}^2/\text{s}$ 、 $30^\circ\text{C}: 0.5 \mu \text{ m}^2/\text{s}$)。

より詳細に拡散運動を解析する為に、輝点を1秒未満の滞在の分子(以下:短い滞在分子)と、1秒以上の滞在の分子(以下:長い滞在分子)の2つにわけ、時間間隔を変えて、変位の分布を調べた。

[1] まず、短い滞在分子の変位の分布を調べるところ、時間間隔が広がるにつれて、分布が広がっていった。これらの分布を次

の式で fitting した。

$$P(r+r',t) dr = \sum_n f_n \frac{1}{4\pi D_n t} e^{-r'^2/4D_n t} 2\pi r' dr$$

ここで、 P :確率密度、 f_n :第 n 成分の割合、 D_n :第 n 成分の拡散定数、 dr :ビンの幅、また $4D_n t = \text{MSD}$ (平均二乗変位)である。すると、1つのガウス成分で近似する事は難しく、少なくとも2つの成分が必要であった。それぞれの成分の MSD(平均二乗変位)は時間に比例して増えていき、平均二乗変位から見積もられた x-y 方向の拡散定数 D_{x-y} はほとんど長さによらず、それぞれ β -globin: $D1=0.3 \mu \text{ m}^2/\text{s}$ 、 $D2=0.044 \mu \text{ m}^2/\text{s}$ 、EGFP: $D1=0.273 \mu \text{ m}^2/\text{s}$ 、 $D2=0.052 \mu \text{ m}^2/\text{s}$ 、mTAK: $D1=0.28 \mu \text{ m}^2/\text{s}$ 、 $D2=0.035 \mu \text{ m}^2/\text{s}$ であった。割合はどの成分も5割程度であった。

用いた3種類の mRNA の水中と核中の拡散定数の比較した。60%ショ糖溶液中 ($53\text{mPa} \cdot \text{s}$)で測定し、水中の値に換算したところ、 β -globin、EGFP、mTAK の水中での拡散定数はそれぞれ、 $34, 26, 18.3 \mu \text{ m}^2/\text{s}$ で長さの -0.43 乗に比例した。核内の拡散定数として、 $D1$ 成分を用いると、その拡散定数は長さに依存せず、また、水中のほぼ $1/65(\text{mTAK}) - 1/113(\beta\text{-globin})$ であった。

[2] 続いて長い滞在分子の分布を調べたところ、時間間隔が広がっても、分布の広がりには緩やかであった。これも1つのガウス成分で近似する事は難しかった。また、2つの成分で近似すると、時間間隔が長くなるにつれて、割合が変動したことから、少なくとも3つの成分が必要であった。1番早い成分の MSD($D1$)は時間間隔に比例して変動していったが、一番遅い成分($D3$)は時間間隔が長くなっても、測定限界以下の変動しかしていなかった。そこで、一番遅い

成分は止まっていると判定した。平均二乗変位から見積もられた x-y 方向の拡散定数 D_{x-y} は、明確な長さ依存性がなく、それぞれ β -globin: $D1=0.12 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D2=0.008 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D3=0.002 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 、EGFP: $D1=0.09 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D2=0.011 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D3=0.003 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 、mTAK: $D1=0.12 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D2=0.016 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D3=0.004 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であった。D1 の割合は β -globin が $12.8\pm 3\%$ 、EGFP が $19.1\pm 6.7\%$ 、mTAK が $21.5\pm 3.8\%$ と違いがあった。

D. 考察

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

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) Zhang, G., T. Tanii, T. Zako, T. Funatsu, and I. Ohdomari. 2004. The immobilization of DNA on microstructured patterns fabricated by maskless lithography. *Sensors and Actuators B*. 97: 243-248
- 2) Zhang, G.-J., T. Tanii, T. Funatsu, and I. Ohdomari. 2004. Patterning of DNA nanostructures on silicon surface by electron beam lithography of self-assembled monolayer. *Chem Comm.* in press
- 3) Kanai, M., D. Uchida, S. Sugiura, Y. Shirasaki, J.S.Go, H. Nakanishi, T. Funatsu, and S. Shoji. 2003. PDMS microfluidics devices with PTFE passivated channels. *Micro Total Analysis System 2003*, pp429-432.
- 4) Shoji, S., K. Tashiro, T. Sekiguchi, H. Sato, N. Honda, and T. Funatsu. 2003 "Particles and molecules handling in micro channels" in *Lab-on-a-Chip. Miniaturized Systems for (Bio)Chemical Analysis and Synthesis.* (R. Edwin Oosterbroek, and Albert van den Berg eds.) Elsevier B. V. pp 205-214.
- 5) 上野 太郎、多田 隈尚志、船津高志 2003・4 「シャペロン機能の 1 分子蛍光イメージング」 *センサマイクロマシーン準部門誌* 123 巻 4 号
- 6) 多田 隈尚史 船津高志 2003 「5 章 タンパク質を計測する 4 タンパク質の相互作用と機能」 *ナノテクノロジーハンドブック (I~IV) IV編 バイオ・化学へ使う* pp.94~99 総ページ 213 (オーム社: ナノテクノロジーハンドブック編修委員会編) 2) "蛋白質を計測する 蛋白質の相互作用と機能"

- 7) 船津高志 2003 「単一分子計測とバイオフォトニクス」 応用物理 第 72 巻 第 6 号 pp.727-730
- 8) 多田隈尚史、船津高志、谷時雄 2003 「mRNA 核外輸送の可視化」蛋白質核酸酵素 vol.48 pp.421-429 (共立出版)
- 9) 船津高志 2003 2 章「バイオのナノ構造」 ナノテクノロジー基礎シリーズ バイオナノテクノロジー (オーム社 堀池靖浩、片岡一則 編) pp.222
- 10) 上野太郎、多田隈尚史、船津高志 2003 「1 分子イメージングによるシャペロン研究」細胞における蛋白質の一生 (共立出版 小椋光、遠藤斗志也、森正敬、吉田賢右 編)
- 11) 多田隈尚史、座古保、船津高志 2003 「蛍光分子イメージングを用いたナノ分子の検出と機能解析」ナノバイオテクノロジーの最前線 (シーエムシー出版) 6 章 4 節ナノバイオテクノロジー p p.371~379
2. 学会発表
- 1) 木脇圭一、東條正、シルビアイスカンダル、青木大輔、多田隈尚史、船津高志 2003. 多量体形成は走化性因子受容体に共通する特性である～1 分子蛍光イメージングによる研究～ 第 56 回日本細胞生物学会大会 2003 年 5 月 14 日～16 日 滋賀県大津市ピアザ 淡海滋賀県立県民交流センター
- 2) 座古保、飯塚怜、大河内美奈、上野太郎、養王田正文、船津高志 2003. 「蛍光顕微鏡を用いた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」日本蛋白質科学会第 3 回年会 2003 年 6 月 23 日～25 日 北海道札幌市札幌コンベンションセンター
- 3) 上野太郎、田口英樹、多田隈尚史、吉田賢右、船津高志 2003. 「FRET による GroEL 内部での基質タンパク質の運動解析」日本生物物理学会第 4 1 回年会 2003 年 9 月 23 日 (火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ
- 4) 開田奈津来、座古保、船津高志 2003. 「プロリン変異体を用いた GFP フォールディングの解析」日本生物物理学会第 4 1 回年会 2003 年 9 月 23 日 (火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ
- 5) 細野和彦、上野太郎、座古保、田口英樹、吉田賢右、船津高志 2003. 「GroEL 変異体 AEX のキャラクタリゼーション」日本生物物理学会第 4 1 回年会 2003 年 9 月 23 日 (火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ
- 6) 座古保、飯塚怜、大河内美奈、上野太郎、養王田正文、船津高志 2003. 「蛍光顕微鏡を用いた、高熱菌由来プレフォルディンと基質タンパク質の相互作用解析」日本生物物理学会第 4 1 回年会 2003 年 9 月 23 日 (火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ
- 7) IskanderSilvia、木脇圭一、青木大輔、東條正、多田隈尚史、船津高志 2003. 「ケモカイン受容体 CXCR4 はリガンド非依存的に多量体を形成する」日本生物物理学会第 4 1 回年会 2003 年 9 月 23 日 (火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ
- 8) 亀井保博、渡邊建二郎、船津高志、田口隆久、弓場俊輔 2003. 「遺伝子発現用赤外線レーザー顕微鏡の開発」日本生物物理学会第 4 1 回年会 2003 年 9 月 23 日 (火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ
- 9) 小玉優哉、白崎善隆、船津高志 2003. 「高

- 速溶液交換システムを備えた顕微観察法の開発」日本生物物理学会第41回年会 2003年9月23日(火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ
- 10) 石浜陽、多田隈尚史、谷時雄、船津高志 2003. 「多波長蛍光同時計測による mRNA スプライシング反応の可視化」日本生物物理学会第41回年会 2003年9月23日(火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ
- 11) 白崎善隆、田中純一、関口哲史、庄子習一、月田承一郎、船津高志 2003. 「昇温型温度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41回年会 2003年9月23日(火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ
- 12) 鞍馬秀輝、貴家康尋、多田隈尚史、永川豊広、船津高志、原慶恵 2003. 「 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41回年会 2003年9月23日(火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ
- 13) 奥村政章、多田隈尚史、石浜陽、船津高志 2003. 「量子ドットを用いた mRNA 核外輸送の一分子蛍光リアルタイムイメージング」日本生物物理学会第41回年会 2003年9月23日(火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ
- 14) 寺田尚史、奥村政章、河内康明、山口淳一、花木賢一、山本健二、船津高志 2003. 「半導体ナノ粒子のプリンキングを制御する」日本生物物理学会第41回年会 2003年9月23日(火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ
- 15) Funatsu, T. 2003. "Single Molecule Imaging of Biological Functions and Handling of Biomolecules in Micro Channels" (1分子蛍光イメージングによる生体分子機能解析と微小流路による生体分子ハンドリング) 第2回 NSF-文部科学省合同シンポジウム US-Japan Symposium on Nanotechnology in Advanced Therapy and Diagnosis 2003年10月10日(金) - 11日(土) 横浜プリンスホテル 招待講演
- 16) 白崎善隆、船津高志 2003 "A Novel Biomolecule Sorter Using Thermosensitive Hydrogel in Micro Flow System" 第2回 NSF-文部科学省合同シンポジウム US-Japan Symposium on Nanotechnology in Advanced Therapy and Diagnosis 2003年10月10日(金) ~ 11日(土) 横浜プリンスホテル
- 17) Sirasaki, Y., and T. Funatsu 2003 "Biomolecule Sorting in Micro Flow System Using Thermal Gelation" Okinawa International Symposium "New Horizons in Molecular Sciences and Systems: An Integrated Approach" October 16-18, 2003. Bankoku Shinryokan Nago City, Okinawa (沖縄国際シンポジウム "New Horizons in Molecular Sciences and Systems: An Integrated Approach" 2003年10月16日 ~ 18日 沖縄県名護市 万国津梁館) ポスター発表
- 18) Hosono, K., T. Ueno, H. Taguchi, F. Motojima, T. Zako, M. Yoshida, and T. Funatsu 2003 "Conformational Change of GroEL studied by Tyrosine Fluorescence" The Fourth East Asian Biophysics Symposium (EABS) November 3-6, 2003. Grand Hotel, Taipei, Taiwan ポスター発表
- 19) Kinowaki, K., S. Iskandar, T. Tojo, D.

Aoki, H. Tadakuma, and T. Funatsu 2003
“Single molecule imaging reveals
oligomerization of chemoattractant receptors
PI01” The Fourth East Asian Biophysics
Symposium (EABS) November 3-6,2003.
Grand Hotel, Taipei, Taiwan ポスター発
表

20) Shirasaki, Y., H. Makazu, K. Tashiro², S.
Ikeda², T. Sekiguchi², S. Shoji, S. Tsukita³,
and T. Funatsu “A Novel Biomolecule
Sorter Using Thermosensitive Hydrogel in
Micro Flow System” The Fourth East Asian
Biophysics Symposium (EABS) November
3-6,2003. Grand Hotel, Taipei, Taiwan ポス
ター発表

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

密着型フラッシュ軟X線顕微鏡による細胞外マトリックス様構造の解析と 密着型紫外線顕微鏡による細胞観察

分担研究者：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
研究協力者：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：新井孝夫 東京理科大学理工学部応用生物科学科 教授
研究協力者：雨宮邦招 東京大学工学部システム量子工学科 助手

研究要旨 超高感度バイオイメージング技術・機器の開発に向けて、1) 密着型フラッシュ軟X線顕微鏡による培養細胞の生理的条件下（培地中）での高分解能観察法の開発と細胞外マトリックス観察への適用、および、2) 重粒子線を用いた選択的癌治療における高エネルギー粒子の細胞内飛跡の高精度計測法の開発とその汎用化技術の開発をおこなった。産業技術総合研究所で研究・開発を行っている密着型フラッシュ軟X線顕微鏡は、レーザー生成プラズマをフラッシュX線源とする卓上型軟X線顕微鏡で、培養細胞などを生理的条件下（培養液中）で高分解能観察（分解能40ナノメートル程度）できる。イメージング原理は、試料を構成している炭素の密度分布の画像化である。水中にある試料の炭素イメージングが可能なこの装置の利点を生かして、電子顕微鏡や光学顕微鏡では観察が困難な細胞外マトリックスを観察した。軟X線顕微鏡で観察した培養3Y1細胞の形態的な特徴としては、1) 細胞密度が低く他の細胞との接触がない場合には、多くの3Y1細胞はバイポーラー型の形態を示す、2) 細胞密度が増加して細胞間の相互接触が始まると、マルチポーラー型の形態を示す、3) 細胞間の空間に炭素密度の低いゲル状の構造体や繊維状の構造体が形成されていることなどがあげられる。細胞外マトリックスの特徴ある形態が軟X線顕微鏡により観察できることが示された。また、ラット脳腫瘍を対象とした重粒子線による選択的癌治療における高エネルギー粒子の細胞内飛跡の高精度計測法の開発とその汎用化技術の開発においては、密着型フラッシュ軟X線法を用いてラット脳腫瘍組織を飛跡検出器CR-39上に転写することにより、従来は困難であった高エネルギー粒子の細胞内での飛跡位置の正確な計測が可能であることを実証した。これをもとに、レーザー生成プラズマに由来するX線に代わる汎用的な光源による組織切片像の転写・記録方法として、民生用の紫外線光源を用いた密着型紫外線顕微鏡法を開発した。

A. 研究目的

超高感度バイオイメージング技術・機器の開発に向けて、1) 密着型フラッシュ軟X線顕微鏡による培養細胞の生理的条件下（培地中）での数10nmオーダーでの高分解能イメージング技術の開発と電子顕微鏡では実現が困難な生きている細胞の生理的条件下（培地中）での観察への適用、および2) 重粒子線による選択的癌治療における基礎的データをして重要である高エネルギー粒子の細胞内飛跡の高精度計測法の開発とその汎用化技術の開発をおこなった。

細胞外マトリックスは、細胞をとりまくゲル

状の構造体で、細胞とその周りの外部環境とのインターフェースとして近年その生理的役割・機能が注目され、分子生物学的研究が進められているが、ヒアルロン酸など水を潤沢に含む多糖質や多種類のタンパク質から構成されるゲル状構造であるため脱水を必要とする電子顕微鏡観察では観察が難しく、光学顕微鏡ではコントラストが低く分解能が不足しているため生理的条件下での構造的データは不足しているのが現状である。密着型フラッシュ軟X線顕微鏡により細胞の移動や分化、ガン化と密接に関連していると見られる細胞外マトリックスの生理的条件下での構造・形態観察が可

能になれば、現在おこなわれている細胞核の形状観察を中心とした細胞の病理診断に、細胞外マトリックスの形状などの情報を加えた新たな細胞診断技術を提供できると期待される。

一方、選択的ガン治療法として重粒子線を用いた研究がおこなわれているが、これまで細胞内での高エネルギー粒子の通過位置を正確に評価する適切な方法がなかった。高エネルギー粒子の細胞内での通過位置の正確な評価をおこない細胞内でのその粒子分布を詳しく知ること、重粒子線を用いた腫瘍治療法の効果を検証する上で重要である。このため密着型フラッシュ軟X線顕微鏡を用いて組織切片像を飛跡検出器 CR-39 上へ転写をおこない、高エネルギー粒子の細胞内通過位置の正確な評価をおこなう方法を開発した。また、この技術の汎用化を図るため露光光源として民生用紫外線光源を用いた密着型紫外線顕微鏡法を開発した。

B. 研究方法

1. 密着型フラッシュ軟X線顕微鏡

産業技術総合研究所で研究・開発した密着型フラッシュ軟X線顕微鏡は、レーザー生成プラズマをフラッシュX線源とする卓上型軟X線顕微鏡である。この装置の特徴は、テーブルトップタイプであり一般の実験室内で使用できること、および培養細胞などを生理的条件下（培養液中）で無染色・高分解能観察（分解能40ナノメートル程度）できる点である。

イメージングの原理は、試料を構成している炭素の密度分布を画像化するものである。軟X線領域にある炭素と酸素の軟X線吸収端の間の波長領域では、炭素の軟X線吸収係数が酸素の軟X線吸収係数をほぼ一桁上回っているため、水分子を構成する酸素による軟X線吸収の影響を抑えて、水の中の生物試料をそれを構成している炭素の密度分布として画像化できる。

一般に、生物試料はX線照射に敏感であり、照射により損傷を受ける。炭素に吸収される軟X線を照射した場合、試料に吸収されたX線のエネルギーは熱エネルギーに変わり試料の熱変性・膨張・形状変形などをひきおこす。このため、露光時間が長くなると試料の変性・変形過程も含めて画像化されるため、得られたX線像の画質は低下することは避けられない。他方で、分解能の高いきれいなX線像を得るためには一定量のフォトン数が必要であり、ここで使用している条件下では、生物試料に影響を及ぼす Dose の 10^4 倍以上の線量が必要である。

試料に吸収されX線のエネルギーが熱エネルギーに変わり試料の熱変性を引き起こすには20ナノ秒程度の時間がかかるため、ここで使用している実験装置ではフラッシュ露光を採用し、3ナノ秒間の露光時間の間にX線像の形成に必要なフォトン数を供給することにより試料の熱変性の始まる前にX線像の撮影を終えることで、画質のよいX線像を得ている。

2. 3Y1細胞の培養

ラット由来の線維芽細胞である3Y1細胞は、シリコンウエハー上にスピコートした軟X線像記録媒体であるポリメチルメタクリレート（PMMA）薄膜の上で培養した。細胞培養に先立ちPMMA表面をポリLリジンで処理をおこなったのち、培養用のディッシュに収め3Y1細胞を蒔き、定法にしたがい培養した。これを試料として培養細胞の軟X線イメージングをおこなった。

3. 密着型紫外線顕微鏡

腫瘍の治療に用いられるホウ素中性子捕捉療法においては高エネルギー粒子線の細胞内線量分布が治療効果を判定する基準のひとつになると考えられるが、これまで細胞内での線量分布を正確に測定する有効な手段がなかったのが実情である。主たる理由は、組織切片内を通過した高エネルギー粒子の飛跡である α トラックを飛跡検出器 CR-39 上に記録することはできるが、 α トラックの位置を組織切片の正確な位置と対応付けることができなかったためである。本研究では、高精度診断技術開発の一環として、治療手段評価の基礎となる「高分解能 α トラック法による細胞内硼素分布測定法」の開発をおこなった。

飛跡検出器 CR-39 上に記録された α トラックの位置を組織切片内の各部位と正確に対応付けるために、中性子照射後の試料に軟X線を照射しCR-39上に組織切片像を転写した。また、軟X線の代わりに紫外線による露光をおこなった。これにより、飛跡検出器 CR-39 とAFMを用いた高分解能 α オートラジオグラフィの汎用化が可能となった。

4. 紫外線照射による細胞像記録

ホウ素化合物を脳腫瘍内に取り込ませたラットから摘出した腫瘍標本を切片にスライスし、飛跡検出器 CR-39 上にのせ中性子照射をおこなった。この試料に軟X線を照射し、試料切片像を飛跡検出器 CR-39 上に転写した。これら