

の操作により、中性子照射により発生した高エネルギー粒子の α トラックの飛跡検出器CR-39上での記録と重ね合わせて試料切片像の記録をおこなった。CR-39を水酸化ナトリウム溶液で現像することにより、 α トラックと試料像とをCR-39上に顕在化させ、原子間力顕微鏡(AFM)で観察をおこなった。さらに、「高分解能 α トラック法による細胞内硼素分布測定法」の汎用化のために、民生用の紫外線光源を用いた試料露光法を開発した。

C. 研究成果

1. 3Y1細胞の細胞外マトリックスの観察

3Y1細胞は培養基質表面に接着して増殖するため、細胞を培地に浮遊させた状態では基質に接着させた状態とは異なった形態や生理状態にあると考えられる。このため、X線像の記録媒体であるPMMA薄膜の表面をポリリジンで処理をおこない、表面電荷を細胞培養に適した状態に調整したのちに3Y1細胞をPMMA薄膜表面で培養した。

細胞密度が低い状態では、3Y1細胞はPMMA上に分散しており、それぞれの細胞は二極性の形状を示した。細胞密度が増加して細胞が互いに接触する状態になると、細胞は多極性の形態を示した。

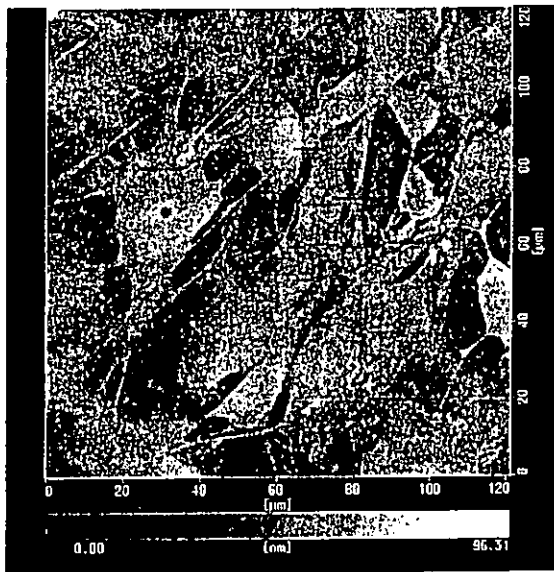


図1. 3Y1細胞の軟X線像

細胞が増殖すると、細胞間マトリックス構造が発達してくる。この状態の試料の軟X線像が図1に掲げたものである。細胞間マトリックスに該当する部分にみられる形態的な特徴は、

1) 無定形な網目状に広がった炭素密度の低い構造体、2) これらの間に広がる大小の穴状の空間、3) 繊維状の構造体、などである。拡大観察した像では、網目状の構造体が層状に広がりをもち、重なり合って発達している様子が見られる。形態観察からは、網目状の構造体は比較的厚みがあるものと、薄く広がっているものがあるように見える。また、網目状に広がった構造体や繊維状の構造体が互いに引っ張り合うように相互作用をした結果として、大小の穴状の空間が細胞間に形成されたように見受けられる。これらの構造体が細胞外マトリックスのどのような成分によって構成されているのかについて、同定を試みている。

2. UVによるCR-39上への細胞像の焼付

昨年度来の研究で、軟X線によるCR-39上への細胞像の転写が「高分解能 α トラック法による細胞内硼素分布測定法」の開発に有効であることが判明したため(図2)、装置コストの高い軟X線源に代えて、汎用化の可能な照射線源の利用を考え、民生用紫外線源を用いた組織像の転写技術を開発し、その有効性を実証した。

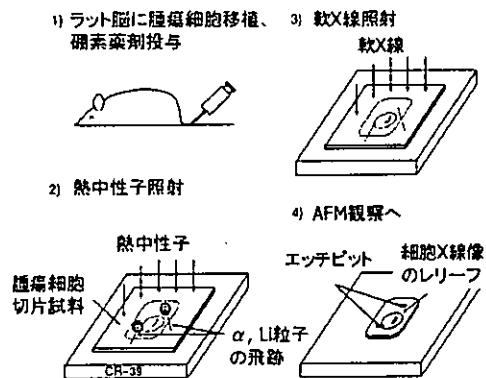


図2. エッチピットと細胞像の同時記録

D. 考察

電子顕微鏡は、生体試料をナノメートル(nm)オーダーの高分解能で観察できる代表的な汎用装置であるが、観察には生物試料の固定・脱水処理や、樹脂に包埋し超薄切片に加工する必要がある。このため、生きている状態のままの観察はできない。新たなナノイメージング法として光学顕微鏡による一分子イメージング法や光ピンセットによる一分子操作法が開発されている。これらの技術は細胞内で特定の分子を対象として扱うには有力であるが、細胞全

体を高分解能で観察するには必ずしも適切ではない。

X線を用いたイメージング法は、レントゲン検査やX線CTスキャンなど非破壊検査を主とする医療診断法として生体を対象に幅広く用いられている。X線の中でも波長が短く透過性の高い硬X線を用いるこれらの方法は、波長が長い軟X線を用いる場合に比べ生体試料に損傷を与えにくいことが特徴であるが、炭素や窒素などの軽元素を中心とする生物試料では得られるX線像にコントラストがつきにくい。

これに対して、軽元素に吸収されやすい軟X線を用いるイメージング技術は、フラッシュ露光によってX線照射時間を数ナノ秒以下に抑えれば、軟X線吸収による生物試料の損傷(熱変性・変形)によるイメージング画像の画質の低下を避けて、水中で生きたままの状態の生物試料を数10nmの高分解能で観察できる手法であることが示された。

培養3Y1細胞の軟X線像に見られる細胞外マトリックスの形態的な特徴として、1) 無定形な網目状に拡がった炭素密度の低い構造体、2) これらの間に広がる大小の穴状の空間、3) 繊維状の構造体、などがあげられる。拡大したX線像では、網目状の構造体が層状に広がり、重なり合って発達している様子が観察される。また、形態観察からは、網目状の構造体は比較的厚みがあるものと、薄く拡がっているものがあるように見えるなど、培養液中での無固定・無染色観察が可能な軟X線顕微鏡によらなければ観察できない情報が得られており、密着型フラッシュ軟X線顕微鏡の新たなイメージング手法としての有用であると考えられる。

密着型フラッシュ軟X線顕微鏡法は、生物試料をX線像記録媒体に密着させて置き、その上から軟X線露光をおこなう点で生物試料をマスクとして用いた軟X線リソグラフィ法を考えることができる。この点に着目して、研究分担者らはこれまでに、密着型フラッシュ軟X線顕微鏡法を適用することにより重粒子線を用いた選択的なガン治療法のひとつである硼素中性子補足療法における重粒子線の細胞内粒子飛跡マッピングを高精度でおこなえることをあきらかにしてきた。今年度はこれを発展させ、汎用的で簡便な方法として軟X線の代わりに紫外線を用いた密着型紫外線顕微鏡法による組織切片の転写技術を開発した。これによる重粒子線の細胞内粒子飛跡マッピング法を実施し、この手法が140nm以下の分解能を有し、細胞内での重粒子飛跡マッピングに有

用であることを明らかにした。

重粒子線の治療効果に関しては、今回精密測定が可能になった細胞内通過位置よりも、細胞内へのエネルギー放出が大きいと考えられる制動停止位置が重要とする見解もあるが、薬剤の細胞内分布を正確に反映した情報が得られる本方法を用いることにより、定量的な治療手段評価がおこなえると考えられる。

E. 結論

疾病罹患による細胞の形態的・機能的変化、投薬等による状態変化、および障害からの再生・治癒過程などを的確に捉えることは、高精度局所診断技術の開発における重要な課題である。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観察への適用、および2) 中性子補足療法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。

これらにより、密着型フラッシュ軟X線顕微鏡が水中でのナノスケールイメージング技術としての可能性をもつこと、および紫外線による細胞像の転写技術が細胞内重粒子飛跡マッピング法の高精度化に寄与することが明らかにされた。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Toshikazu Majima, Toshihisa Tomie, Hideaki Shimizu

Comparative Studies of X-ray Images and Fluorescence Images of the Same Specimens
Journal de Physique IV 104, 157-160 (2003)

Kunio Furusawa, Hideo Matsumura, and Toshikazu Majima

Characterization of silica-coated hematite and application to the formation of composite particles including egg yolk PC liposomes
Journal of Colloid and Interface Science. 264, 95-100 (2003)

Kuniaki AMEMIYA, Hiroyuki TAKAHASHI, Toru NARUSE, Masaharu NAKAZAWA,

Yoshinobu NAKAGAWA, Toshikazu MAJIMA,
Teruyoshi KAGEJI, Yoshinori SAKURAI,
Tooru KOBAYASHI, Nakahiro YASUDA,
Mikio YAMAMOTO, Koichi OGURA
High-resolution alpha-autoradiography with
contact microscopy technique
the Journal of Nuclear Science and Technology
(to be published)

Toshikazu Majima, Keiji. Otani, Toshihisa.
Tomie, Takashi. Ohuchi, Takao. Arai
X-ray Imaging of Extracellular Matrix
Nanotechnology
(to be published)

2. 総説・その他

眞島利和
X線顕微鏡による生体系の観察
現代化学 No. 386. 51-55 (2003)

眞島利和
軟X線顕微鏡による生きている細胞の高分
解能イメージング
高分子学会予稿集 52巻 13号 「バイ
オ・ナノテクノロジーによる応用展開」
3828-3829 (2003)

眞島利和、雨宮邦招
密着型フラッシュ軟X線顕微鏡
RADIOISOTOPES 印刷中

3. 学会発表
国際会議発表
T. Majima, K. Otani, T. Tomie, T. Ohuchi, T.
Arai
X-ray Imaging of Extracellular Matrix
The 1st International Symposium on Active
Nano-Characterization and Technology
Tsukuba, JAPAN, Nov. 12~14, 2003

K. Amemiya, H. Takahashi, T. Naruse, M.
Nakazawa, Y. Nakagawa, T. Majima, T. Kageji,
Y. Sakurai, T. Kobayashi, N. Yasuda, K. Ogura
High-resolution alpha-autoradiography with
contact microscopy technique
The Second iTRS International Symposium on
Radiation Safety and Detection Technology
(ISORD-2)
Tohoku University, Sendai, JAPAN July 24-25,
2003

K. Amemiya, H. Takahashi, T. Naruse, M.
Nakazawa, H. Yanagie, T. Hisa, M. Eriguch, Y.
Nakagawa, T. Majima, T. Kageji, N. Yasuda, K.
Ogura
Simultaneous visualization of contact
microscopic image and energetic charged
particle tracks and its application to medicine
SPIE Photonics West 2004 BiOS 2004
San Jose Convention Center, CA, USA 24-29,
Jan, 2004"

国内学会等発表
密着型フラッシュ軟X線顕微鏡による培養細
胞の観察
眞島利和、大谷圭司、大内敬、新井孝夫、富江
敏尚
日本顕微鏡学会第59回学術集会
札幌コンベンションセンター
2003年6月7日~9日

3Y1細胞の密着型フラッシュ軟X線顕微鏡
観察
大谷圭司、眞島利和、富江敏尚、大内敬、新井
孝夫
第41回日本生物物理学会年会
朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター
2003年9月23日~25日

細胞外マトリックスのX線イメージング
眞島利和、大谷圭司、富江敏尚、大内敬、新井
孝夫
第12回日本バイオイメージング学会
慶應義塾大学日吉キャンパス
2003年10月29-30日

細胞機能を調べるX線顕微鏡
眞島利和
公開シンポジウム「ナノとバイオの融合学理構
築と産業基盤形成」
ホテル大観荘 (松島)
2003年9月10日~11日

軟X線顕微鏡による生きている細胞の高分解
能イメージング
眞島利和
高分子討論会シンポジウム「バイオ・ナノテク
ノロジーによる応用展開」
山口大学工学部
2003年9月24日~26日

フラッシュ軟X線イメージングの細胞診断への応用と可能性

眞島利和

シンポジウム「ナノとバイオイメージングの融合と医用への展開」

国立感染症研究所（東京）

2004年1月9日～11日

X線顕微鏡による細胞の機能イメージング

眞島利和

シンポジウム「ナノバイオテクノロジーの最線」－出版記念講演会－

2004年2月2日～3日

東京大学山上会館

細胞内ホウ素分布測定のための高分解能 α オートラジオグラフィ法の改良

雨宮邦招、成瀬徹、高橋浩之、梶本剛志、中沢正治、中川義信、柳衛宏宣、久智行、江里口正純、笠岡敏、丸山一雄、影治照喜、眞島利和、櫻井良憲、古林徹、安田仲宏

第1回日本中性子捕捉療法研究会

キャンパスプラザ京都 2003年8月30-31日

CR-39を用いた粒子飛跡・細胞同時高分解イメージングとその医学・生物学的応用

雨宮邦招、成瀬徹、高橋浩之、中沢正治、柳衛宏宣、久智行、江里口正純、中川義信、眞島利和、小西輝昭、安田仲宏、櫻井良憲、古林徹

2003年秋季第64回応用物理学会学術講演会

福岡大学 2003年8月30日-9月2日

密着型紫外線顕微鏡による細胞観察

梶本剛志、雨宮邦招、成瀬徹、高橋浩之、中沢正治、柳衛宏宣、久智行、江里口正純、中川義信、眞島利和、影治照喜、櫻井良憲、古林徹、安田仲宏

日本バイオイメージング学会第12回大会

慶應義塾大学日吉キャンパス

2003年10月29-30日

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

梶本剛志、雨宮邦招、成瀬徹、高橋浩之、中沢正治、柳衛宏宣、久智行、江里口正純、中川義信、眞島利和、影治照喜、櫻井良憲、古林徹、安田仲宏

第12回東京大学原子力研究総合センターシ

ンポジウム

東京大学山上会館 2003年12月11-12日

ホウ素中性子捕捉療法における細胞内線量分布測定

雨宮邦招、梶本剛志、中沢正治、高橋浩之、柳衛宏宣、久智行、江里口正純、中川義信、眞島利和、安田仲宏、櫻井良憲、古林徹、香川満夫

第1回化学放射線治療科学研究会

東京大学医学部付属病院

高分解能 α トラック法による細胞内硼素分布測定－各種試料への適用－

雨宮邦招、梶本剛志、高橋浩之、中沢正治、中川義信、柳衛宏宣、久智行、江里口正純、笠岡敏、丸山一雄、影治照喜、宮武伸一、川端信司、香川満夫、櫻井良憲、古林徹、眞島利和、小西輝昭、安田 仲宏

平成15年度京都大学原子炉実験所専門研究会「中性子捕捉療法システムの高度化」専門研究会

京都大学原子炉実験所

2004年2月18-19日

密着型紫外線顕微鏡による細胞観察

梶本剛志、雨宮邦招、成瀬徹、高橋浩之、中沢正治、柳衛宏宣、久智行、江里口正純、中川義信、眞島利和、影治照喜、櫻井良憲、古林徹、小西輝昭、安田仲宏

2004年（平成16年）春季 第51回応用物理学関係連合講演会

東京工科大学

2004年3月28-31日

ホウ素中性子捕捉療法における細胞内 α トラック分布測定法の開発

雨宮邦招、梶本剛志、高橋浩之、中沢正治、中川義信、柳衛宏宣、久智行、江里口正純、眞島利和、櫻井良憲、古林徹、宮武伸一、香川満夫

日本原子力学会 2004年春の年会

岡山大学

2004年3月29-31日

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

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

研究要旨

種々の薬物や機能試薬等の分子を任意の場所で特定の時間に供給する運搬体（キャリアー）として、リポソーム微粒子と磁気微粒子との複合体の作製を行っている。磁気微粒子を用いることにより外部磁場（磁性針）によりその存在場所のコントロール、また、任意の時間に針電極を用いて電場を印加することにより、リポソーム内部に保持していた種々の生体機能性の分子の放出を可能とするものである。昨年度において両者の複合体である金平糖型複合微粒子「マグネト・リポソーム」の作製方法を実現した。今年度は、中心磁気微粒子の周囲に付加するリポソームの特性改良を目指した研究を展開した。すなわち、電場が印加されたときのみ不安定化し内部から機能性分子が放出されるようなリポソームの実現である。そのため、まず、電場によるリポソーム膜の物質透過能変化のメカニズムの解明を試みた。膜微粒子近傍での電気エネルギーの消散が主因であると解釈できた。

A. 研究目的

磁気微粒子の周りに試薬を含むリポソーム微粒子を持つ複合微粒子は、磁性針を用いることによりその存在場所がコントロール可能となる。さらに、任意の時間に針電極により電場を印加することにより、希望する特定の時間にリポソーム内部に保持していた種々の生体機能性分子の放出を可能とする。これまでに磁気微粒子とリポソーム微粒子から形成される複合微粒子の作製を実現した。今年度から、通常は丈夫で安定な構造をもち、充分長時間生体機能分子をその内相に保持できるとともに、電場印加時にはリポソーム膜の分子透過機能が増大する電場感受性リポソームの開発を始めた。

B. 研究方法

Caイオンを内相に含むリポソームを作製し、電場印加によるCaイオンのリポソームからの流出のメカニズムについて、種々の実験条件において調べた。また、冷暗所に放置保存したリポソーム試料の内相から流出してくるCaの量の経時変化を測定することによりリポソーム膜の安定性を評価した。

1. 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）を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Caイオン0.2Mの水溶液に分散した。その後、フィルタリングとエクストルージョン

法（1ミクロンと0.2ミクロンポア径のメンブランフィルターを使用）によりサイジングを行った。さらに $-20^{\circ}\text{C} \leftrightarrow +40^{\circ}\text{C}$ の温度履歴を2回施し、膜パッキングの安定化をはかった。外相液からCaイオンを取り除くため、透析チューブ（分画分子量10,000）を用い蒸留水に対して透析を 4°C 下において5~6回繰り返した。リポソームの粒子径の確認は動的光散乱法で行った。粒子径は約200nmである。

Ca自然流出：内相にCaイオンを閉じ込めたリポソームを冷蔵庫中に放置し、Caイオンの外相への流出の有無を調べた。リポソームから外溶液中へのCaイオン流出の程度はCa選択性蛍光分子（Quin2）との反応による蛍光強度増加で検出した。測定は通常の蛍光分光光度計を用いた。励起波長は339nm、観測波長は492nmである。

2. 電場印加法

電極構造や電場波形の選択は、*in vivo*（エレクトロ・ケモセラピー）で使用されている形式を参考に針状電極を使用した。電場波形はmono-polar型パルス（米国Genetronics社等）のよりもBi-polar型の効率が良いというブルガリヤDaskalov教授の報告を参考にして、ここでは交流矩形波で行った。ファンクション、ジェネレータで発生させた矩形波信号をバイポーラー電圧・電流増幅器で増幅した。周波数は10Hzから100kHzを用いて実験をすすめているが、100kHzで効果が大きいという昨年までの結果をうけ、ほとんどの場合、100kHzに固定して行った。電場強度はピーク間電圧140Vで、これ

を1mm間隔の白金線電極に加えた。白金線の径は1mmである。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により常時攪拌すると共に、水浴にて温度コントロールした（水浴温度は 7°C ）。交流矩形波のturn onとturn offを繰り返すことで過剰な温度上昇は避けた。標準的な実験のプロトコルは100kHz矩形波で1秒間のON、5秒間のOFFの繰り返しを7回行った（図1参照）。試料溶液の温度上昇は電子温度計を投入して計った。

C. 研究結果

電場による膜透過機能変化：

これまで膜透過能の周波数依存性が1kHzに極小をもち両サイドで増加することを観測し、サンプルによる電気エネルギー消費すなわちサンプルの実効電気伝導度の周波数依存性によると解釈できる結果を得た。この解釈を確認するため、膜透過能の電圧強度依存性を調べた。図2aに示すように蛍光強度の変化分（すなわちリークCa濃度）が電圧の2乗に比例するという結果が得られた。同様に、試料セル全体の温度上昇も電圧の2乗に比例した結果が得られた（図2b）。

ところが、電場印加のturn off時間を变化させて同様な実験を行うと異なった結果が得られた。図3a,bに蛍光強度変化と温度上昇のOFF時間依存性を示す。膜透過能はOFF時間を長くしても蛍光強度の変化分は不変であるが、温度上昇は減少する傾向を示した。

リポソーム膜の安定性評価：

前節の結果から、電場により容易に膜透

過能が変化するリポソームの作製に関しては、電気エネルギーの消費が大きいリポソーム粒子が望ましいと考えられる。一つのアイデアとしてはリポソーム粒子表面の電気伝導性を高めることである。表面にプラスイオン荷電をもつカチオン性脂質（ジオクタデシルジメチルアミン）を膜へ導入することにより高膜表面電荷の付加を試みて膜安定性を調べた。図4に3種類のリポソームについての蛍光強度の経時変化の様子を示す。カチオン性脂質の混合がないものは長期安定性を持つが、混入量が増えるに従い長期安定性に欠ける様子が見られた。

D. 考察

電気エネルギーの消費（SAR）が実効電気伝導度と電場2乗の積で与えられることを考えると、図2に示されるような膜透過の効率が電圧の2乗に比例するという結果は、電気エネルギー消費が主因であると考えてよいと思われる。これで以前に得られている膜透過効率の周波数依存性の結果の解釈が裏付けられた。さらに、図3bの結果は電場印加で発生する熱は周囲への熱拡散に十分な時間間隔をとれば、温度上昇を押さえて充分効果のある膜透過機能変化を与えるプロトコルが存在ということを示している。すなわち、膜透過能はマイクロな領域でのエネルギー消費と密接な関係にあることが示唆された。そこで、電気感受性の高いリポソームを開発するためにはリポソーム粒子の実効電気伝導度を上げること、すなわち、高い粒子表面伝導度をもつリポソームの開発を進めた。方法としては、電荷を帯びた脂質のリポソーム膜への混合である。しかし、現在のところ理想的な系は見つかっていない。図4.に示すように、他

の分子との混合膜は膜不安定性を起こす、すなわち、長期的Caイオンの保持能力を低下させる場合が多い。この問題の解決が今後の研究課題である。

E. 結論

リポソームの膜透過能変化が外部から与えた電気エネルギーの消費が原因であるということが示された。

F. 健康危険情報： 特になし。

G. 研究成果

1.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., 264 (2003) 95-100.

2.Bo Yang, Kunio Furusawa, and Hideo Matsumura. Adsorption state of PC vesicles on solid colloidal particles and their aggregation behavior induced by the PC vesicle, Langmuir, 19 (2003) 9023-9027.

3.Hideo Matsumura, Vassil Neytchev, Nelly Terezova, Inana Tsoneva, Ca ion permeation through liposome membranes with heat generation by square wave electric field, Colloids & Surfaces B, in press.33 (2004) 243-249.

4.松村英夫「ナノバイオテクノロジーの最前線」 分担執筆 シーエムシー出版 71-77 (2003) .

5. 松村英夫、「薬物キャリアーの新しいイメージ：複合微粒子マグネトリポソームの開発」自動車技術,57 5 99-100 (2003).

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

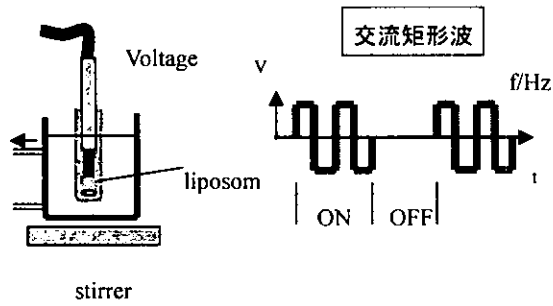


图 1.

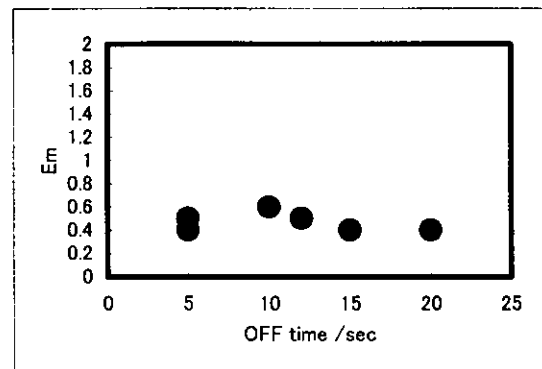


图 3a.

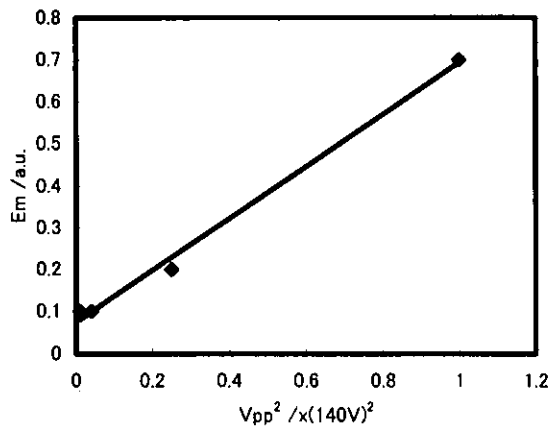


图 2 a.

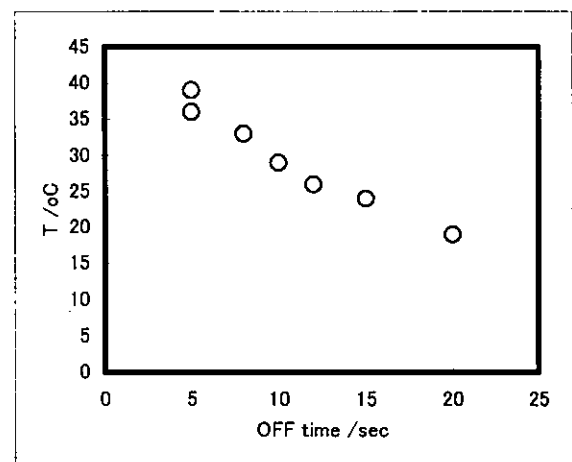


图 3b.

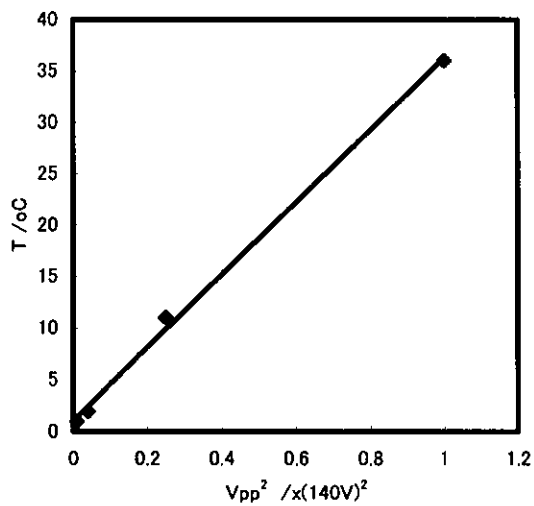


图 2 b.

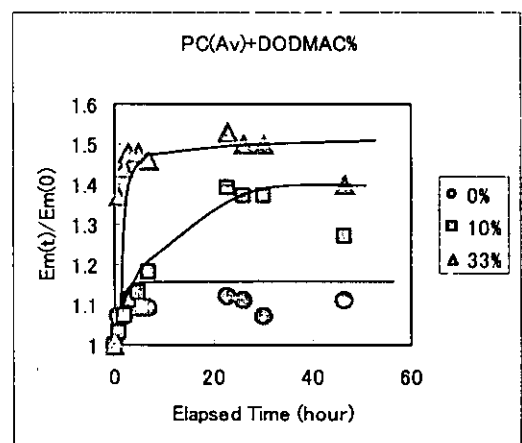


图 4.

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 研究所・部長
協力研究者 星野 昭芳 国立国際医療センター研究所・流動研究員
協力研究者 藤岡 宏樹 国立国際医療センター研究所・研究生

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、実際に細胞を量子ドットで標識しその細胞をマウス生体内に導入し、その生体内動態を観察した。その結果、尾静脈から注入された、量子ドット標識化リンパ球系株化細胞 (EL4) は、導入後5日間、血管中に存在し、7日後には消失する事を観測した。この事からこの細胞の生体導入後動態解析システムの有用性を確認した。

A. 研究目的

細胞療法など、機能有る細胞を生体に導入し、その細胞を患部臓器まで伝達し、そこで疾患患部を治療する方法が様々な臓器に於いて考えられている。その例として心臓や脳等において実際に研究が進み、動物実験によって一定の成果を得ている。

一方、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に変化し、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。この新規材料を用い、IT分野における記憶装置の開発は、我が国に於いても材料ナノテクノロジー分野にて国家プロジェクトとして精力的に開発研究が進んでいる。本研究で現在用いている半導体ナノ粒子のサイズは、4nm-5nmであり、この材料を用いての薬剤伝達システムをはじめ、その他の医療応用に、日米でしのぎを削っている。

本研究はバイオナノ工学的立場にち自己組織化法による蛍光ナノ粒子の合成を行ない、安全で有効な、薬剤伝達システムの開発のために利用することを目的に研究を進

める。また、細胞に取り込ませる加工を行い、細胞を標識し、生体に導入しその動態を観測および、その解析を行う。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. 量子ドットの合成と表面加工

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。この粒子はトリ・オクチル・フォスフィン・オキサイド (TOPO) とする有機溶媒を350℃に加熱し、溶融させた状態で合成されている。則ち、その溶融した TOPO に酸化カドミウムとセレンを同時に打ち込み単分子分散させる。分散した時に、溶媒の温度が270℃程度の一且低下するが、さらに加熱し300℃にて一定に保つと、TOPO 溶媒内で半導体ナノ粒子が自己組織化する事により生成されてくる。半導体ナノ粒子は、量子サイズ効果を持っているためこのように非常に均質な粒子直径を持つように製造される必要がある。

前述の記述のようにして合成された量子ドットは、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溶解しており、この溶解した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帯びようになる。

2. 表面修飾

上記のようにして表面加工された量子ドットは、水によく分散する。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、酸性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

C. 研究結果

前年度は、細胞内に安定して導入する技術を開発したがそれに引き続き、今年度は半導体ナノ粒子を導入した細胞を、マウス生体内に導入し、その生体内動態を、解析した。また一方では、半導体ナノ粒子の安全性について評価した。

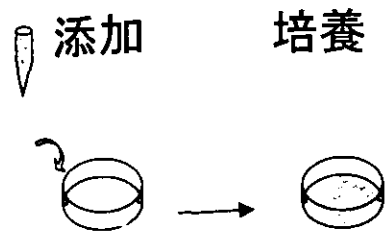
1. 量子ドットに標識された細胞による生体内動態の解析

具体的には、半導体ナノ粒子の細胞内安定性を見るため、まず *in vitro* において、シャーレで培養したマウスリンパ球系株化細胞 (EL4) に、赤色半導体ナノ粒子 (Cd/Se; 蛍光波長 560nm) を導入した。導入方法としては、羊アルブミンを同じモル濃度赤色半導体ナノ粒子と混和し、それを培地に入れ、しばらく取り込ませた後、洗い流し、培養しながら蛍光顕微鏡 (オリンパス) にて観測した。

表面加工した、量子ドットを、培養液に添加し、しばらく培養を続ける。その後細胞を撒き直して染色した細胞を観測する。

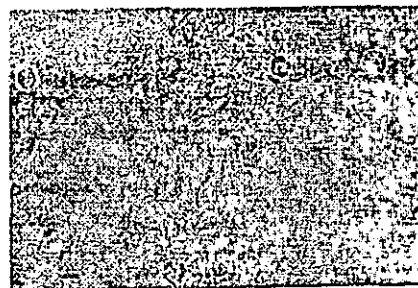
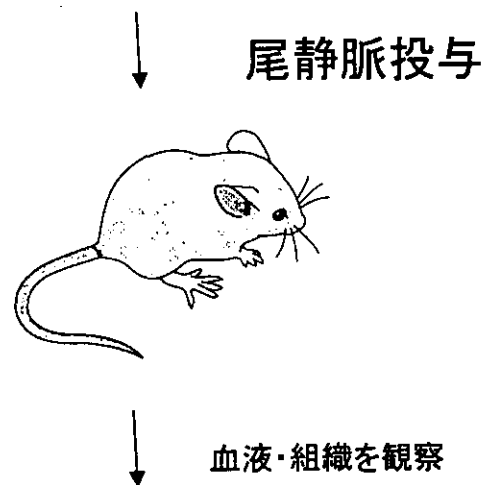
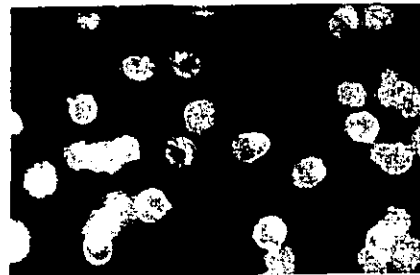
この時、温度が関係する。

図1



Culture media (serum free) に添加するとエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる

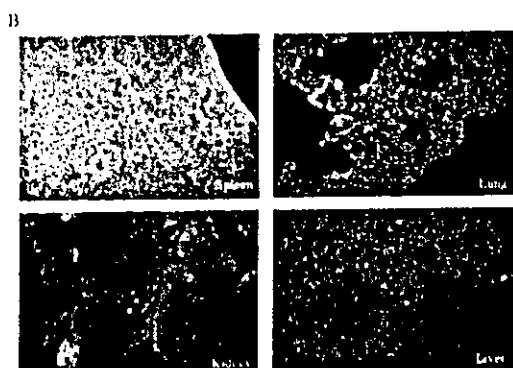
図2



すなわち、37度Cでは、下図に示すように、細胞に取り込まれ、ライソゾームに顆粒状に量子ドットが蓄積されていることが観察できるが、4度Cで同じ細胞を使って実験してみると、ほとんど変化なく、量子ドットが細胞へ取り込まれている痕跡はないことが判明した。このことにより、量子ドットは、細胞の持つ生理的な輸送経路により積極的に取り込まれていることが判る。上の図にその概略を示す。さらに実際のデータを以下示す。

染色1日後には、導入した細胞の97%は、末梢血管内に存在するが、5日後には、38%、7日後には、32%、10日後には、14%となっている。10日後のマウスの臓器について、病理切片を作成し半導体ナノ粒子に染色された細胞の臓器内分布を解析した(図3)。その結果大部分は、肺に存在し、その他は、脾臓に存在し、肝臓や腎臓には、ほとんど存在しなかったことが判明した。

図3



Heehino et al Fig.7B

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に実際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。

E. 結論

以上のように、本研究を通じて、半導体ナノ粒子によって標識された、細胞を用いて、マウス生体内における、細胞動態解析に応用することが可能である事が判明した。昨年度我々は、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を示した事と合せ、分子の細胞内動態から、細胞の生体内動態まで観測できるシステムを構築した。このように、量子ドットは、極めて特徴的な性質を有するため、血管炎などを解明するため蛍光ナノプローブを用いて細胞に標識し、その標識された特定細胞を解析し、疾患メカニズムを明らかにするなどの生物・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) A. Hoshino, K. Hanaki, K. Suzuki and K. Yamamoto, Application of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body, B.B.R.C. (in press).
- 2) J. Kitagawa, Y. Futamura and K. Yamamoto. Analysis of the conformational energy landscape of human snRNA with a metric based on tree representation of RNA structure. Nucleic Acids Research. 31, 2006-2013 (2003).
- 3) A.K. Aringazin, Yuri Dahnovsky, VD Krevchik, M.B. Semenov, A.A. Ovchinnikov, K. Yamamoto, Two-dimensional tunnel correlations with dissipation, PHYSICAL REVIEW B 68: 155426-1-12, (2003).
- 4) A. Komoto, K. Hanaki, S. Maeno, J. Y. Wakano, Y. Yamaguchi, K. Yamamoto, Growth dynamics of Bacillus circulans colony, J. Theoretical Biol., 25:91-97, (2003).
- 5) F. Takeuchi, Y. Futamura, H. Yoshikura, K. Yamamoto, Statistics of Trinucleotides in Coding Sequences and Evolution J. Theoretical Biol., 222: 139-149, (2003).

(総説)

- 1) 山本健二 生物学領域におけるナノテクノロジーの応用と展望に迫る。21, 2121-2124, (実験医学) 2003
- 2) 山本健二 光を用いた細胞・組織のバリデーションとその展開。25, 545-548. O PULSE(新技術コミュニケーション) 2003

1) 学会発表

(国内学会)

- 1) 山本健二 蛍光ナノ粒子を用いた診断、化学工学会、日本バイオイメージング主催「ナノとバイオの融合学理構築と産業基盤形成」宮城県

松島(2003)

- 2) 山本健二、生体分子トレーサーとしての量子ドット、4-19-S-1、第26回医学会総会 福岡(2003)
- 3) 山本健二、ナノ粒子の機能分子のデリバリーシステムと解析、日本バイオイメージング学会主催「バイオイメージングとナノテクノロジー」東京フォーラム(2003)
- 4) 山本健二、量子ドットの生物医療応用、ナノバイオテクノロジーの最前線。化学工学会バイオナノ委員会主催、バイオイメージング学会共催(2004)、東京大学山上会議場
- 5) 山本健二、星野昭芳、藤岡宏樹、量子ドットによる、Cell Delivery System および Drug Delivery System の開発、細胞機能を視る、測る、解析する技術の開発—蛍光プローブの創薬への応用—、ヒューマンサイエンス振興財団、メルパルク東京(2004)
- 6) 山本健二、水溶液中のナノ粒子のランダム性と自己組織化について、第53回理論応用力学講演会(NCTAM2004)、日本学術会議(2004)

(国際学会)

- 1) K. Yamamoto and A. Shiohara. Quantum Dot and cytotoxicity. TOP NANO 21, St. Gallen · Switzerland (2003)
- 2) K. Yamamoto. Semiconductor nano-particle and the application for the bio-medical engineering. International Symposium on Advanced Life Science on the Base of Bioscience and Nano-technology. S3-pp.61. Sapporo (2003)

(知的所有権の出願・取得状況)

1) 特許

特願2003-200778

蛋白質の検出方法

2) その他なし

超高感度 ^{31}P -NMR プローブの開発

分担研究者 田之倉 優（東京大学大学院農学生命科学研究科）

研究協力者：小田佳史、胡芳宇、湯本史明

研究要旨

タンパク質は生体内で非常に重要な役割を果たしているにもかかわらず、実際にその分子が存在する環境すなわち個体や細胞そのものの中での性質あるいは挙動を調べることができる手法は少ない。そこで本研究では、NMR を用いた非破壊的な観測に向けて超高感度 ^{31}P -NMR プローブの開発を行い、牛乳の解析を行った。

A. 研究目的

タンパク質の機能を明らかにすることは、生命現象の理解において非常に重要である。また、タンパク質は、他のタンパク質、核酸、脂質、糖などをはじめ、さまざまな生体分子と相互作用しながら、生命活動を支えている。しかしながら、分子が実際に存在する環境すなわち個体や細胞そのものの中での性質あるいは挙動を調べることができる手法は少ない。この点、非破壊的な観測法であり、個体や細胞あるいは様々な分子が混在した溶液から観測したいものの情報だけを原子レベルで得ることが可能な NMR は極めて有用な手法である。NMR を用いると、生きた個体の中で観測したい生体分子を追跡することや、どのような状態で存在するのかについても調べることが可能である。

そこで本研究では、主要な生体構成元素の中の1つであるリンに注目し、超高感度 ^{31}P -NMR プローブの開発を行うことを目的とした。

B. 研究方法

プローブ開発では、“液体窒素による回路およ

び素子の冷却”ならびに“検出コイルの方向を変えることによる巻き数の増加”などの方法が考えられるが本研究では、検出コイルの方向を変えることによる巻き数の増加により、従来型 ^{31}P -NMR プローブに対して感度の向上を試みた。

また、生理的環境を灌流によって作り出した上で直接モニターするための専用セルの開発も行った。さらに並行して、本プローブでの検出対象となる生体物質の混合物の例として牛乳について解析を試みた。

C. 研究成果

本研究で開発したプローブを図1に示す。

このプローブは、特に、短い横緩和時間に対応できる様に、測定用パルス、レシーバーのゲーティング・ダイナミックレンジを重点的に向上できるものとなっている。

また、牛乳の解析においては、1次元 ^{31}P -NMR 測定に加え、2次元 ^1H - ^{31}P NMR 測定法を適用することで、前処理を行うことなく、牛乳中に含まれるリン酸化合物成分について同定することに成功した。

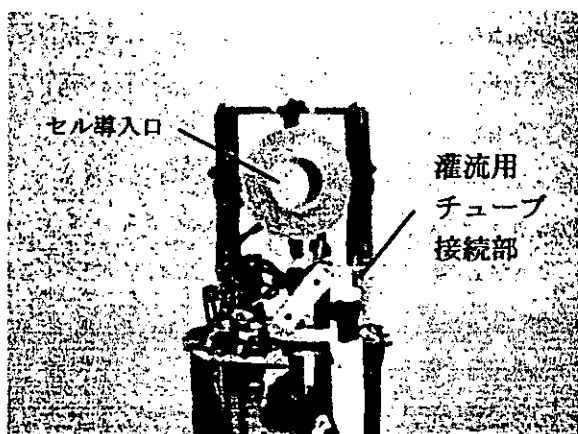
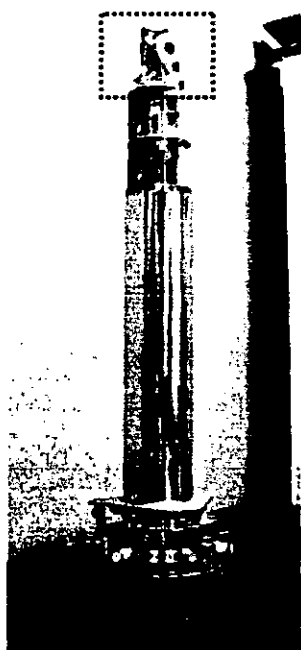


図1 本研究で開発したプローブの全体図(上)と点線部の拡大図(下)

D. 考察

本研究において、混合物である牛乳を非破壊的に観測することに成功した。この方法を応用することにより、他の混合物についてもNMRを用いた非破壊的解析を行うことが可能であると考えられる。

E. 結論

超高感度 ^{31}P -NMR プローブの開発に成功した。これにより、実際に細胞や組織を生きた状態で長時間保持しながら、 ^{31}P -NMR スペクトルを測定することが可能となった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Katayama, H., Nagata, K., Ohira, T., Yumoto, F., Tanokura, M. and Nagasawa, H. (2003) The solution structure of molt-inhibiting hormone from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *J. Biol. Chem.* 278(11), 9620-9623.

J. Biol. Chem. 278(11), 9620-9623.

- 2) Suzuki, R., Nagata, K., Yumoto, F., Kawakami, M., Nemoto, N., Furutani, M., Adachi, K., Maruyama, T. and Tanokura, M. (2003)

Three-dimensional solution structure of an archaeal FKBP with a dual function of peptidyl prolyl cis-trans isomerase and chaperone-like activities.

J. Mol. Biol. 328(5), 1149-1160.

- 3) Hatano, K., Kojima, M., Suzuki, E., Tanokura, M. and Takahashi, K. (2003)

Determination of the NMR Structure of Gln25-Ribonuclease T1.

Biol. Chem. 384(8), 1173-1183.

2. 学会発表

- 1) 田之倉優 (2002.1.21)

食品と生体のNMR

平成13年度第2回食品免疫学研究会、東京

- 2) 永田宏次、石橋純、山川稔、湯本史明、田之倉優 (2003.4.1-3)
タイワンカブトムシの体液中ペプチド、オリクチンの NMR による立体構造解析。
日本農芸化学会 2003 年度大会講演要旨集 151、藤沢。
- 3) 永田宏次、石橋純、山川稔、湯本史明、田之倉優 (2003.6.23-25)
タイワンカブトムシの体液中ペプチド、オリクチンの NMR による立体構造解析。
日本蛋白質科学会要旨集 47、札幌。
- 4) 村上健次、湯本史明、大木進野、田之倉優、若林健之 (2003.9.23-25)
トロポニン T2CI 複合体中におけるトロポニン I の NMR 解析。
日本生物物理学会 S122、新潟。

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

真核生物ポリペプチド鎖終結因子 eRF1 の動的構造の解析

分担研究者 村松 知成 国立がんセンター研究所生物物理部量子化学研究室 室長

研究要旨

eRF1 は遺伝情報の翻訳過程において、mRNA 上の終止コドンの直接認識を行っている因子で真核生物に必須である。その認識メカニズムの解明をめざし、ヒト eRF1 のコドン認識を行っていると考えられるドメイン(ドメイン1: 142 アミノ酸残基)の大腸菌での発現系ならびに精製系を作成し、¹⁵N-および ¹³C/¹⁵N-標識体を調製し、三核三次元核磁気共鳴 (NMR) 等の測定を行った。これまでに、分離のよいスペクトルを得て、主鎖および側鎖の帰属を完了し、現在、各残基の運動性の解析を行っている。

本研究は、田之倉優教授（東京大学大学院農学生命科学研究科）との共同研究である。

A. 研究目的

遺伝情報の翻訳過程において、終止コドンは tRNA ではなくタンパク質(ポリペプチド鎖終結因子、RF、eRF)により認識される。原核生物では2種類の因子、RF1 と RF2 が3種の終止コドン(UAA, UAG, UGA)認識を分担して行っているが、真核生物では唯一の因子である eRF1 が3つのコドンすべてを認識している。

eRF1 の発現量の低下やアミノ酸置換などの原因により、この機能の低下が生ずると、細胞内のタンパク質合成に影響を及ぼし、終止コドンの読み飛ばし(ナンセンスサプレッション)が起こりやすくなると考えられる。実際、ヒト白血病の中には eRF1 遺伝子が片アレル欠失している例も多く見られ、それらでは、何らかのタンパク質遺伝子において終止コドンの読み飛

ばしが起こり、異常型タンパク質が生じることが原因ではないかと、考えられている。このことから、eRF1 による終止コドンの認識のメカニズム解明は重要である。

われわれは、変則的終止コドン使用を行っている絨毛虫類を含む各種真核生物 eRF1 のアミノ酸配列を比較し、既に報告のあるヒト eRF1 の結晶構造と照らし合わせるにより、これを説明する終止コドン認識メカニズムモデルを提出している (Muramatsu et al, *FEBS Lett.* 488, 105-109 (2001))。この仮説では、コドン認識は eRF1 のドメイン1の先端部分で行われているが、3種類の終止コドンに対応するために、この部分が立体構造上いくつかの構造をとりうる柔軟性を持ち合わせていることを予測している。この仮説の真偽を確かめるために、この領域の動的性質 (ダイナミク

ス) を調べることを目的とした。

B. 研究方法

1. ヒト eRF1 ドメイン 1 の発現プラスミド

ヒト胃全 RNA(BD Biosciences)を鋳型とし、オリゴデオキシリボヌクレオチド 5'GGTGGTTGCTCTTCCAAAGGCCGCATGGCGGACGACCCCACT3' と 5'GGTGGTTGCTCTTCCGCACATATCTGA AAGTAGTGCTGTAAGAGCCTC3' をプライマーして用い、RT-PCR 反応によりヒト eRF1 の Met1 から Asp142 まで(ドメイン 1) に対応する領域を増幅した。これを SspI で切断し、pTWIN1 (New England Biolabs.) の SspI 部位に挿入した。このプラスミドは T7 RNA ポリメラーゼを発現している大腸菌において、N 末端側と C 末端側の双方にキチン結合ドメインを融合したかたちで eRF1 ドメイン 1 を発現するようにデザインされている。N 末端側および C 末端側の両キチン結合ドメインと eRF1 ドメインの間はインテイン由来の自動切断配列により連結されており、これらはタンパク質精製の際に温度(N 末端側)およびジチオスレイトール(C 末端側)で切断することができる。

2. eRF1 ドメイン 1 の発現誘導

1. で作成したプラスミドを Origami(DE3)pLacI (Novagen)に導入した。この宿主大腸菌は IPTG 添加により T7 RNA ポリメラーゼを発現する。プラスミドを導入した大腸菌の 24 時間培養液を $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識 C.H.L.培地(クロレラ工業)2L に 1/500 容量添加し、37°C、18 時間、振盪

培養した(fresh culture)。これに IPTG(最終 0.5 mM)、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ アミノ酸混合物 0.5 g(クロレラ工業)を加え、15°C、40 時間、振盪培養して融合タンパク質の発現誘導をおこなった。

3. ヒト eRF1 ドメイン 1 の精製

融合タンパク質を発現している大腸菌培養液より遠心分離により菌体を得て、超音波破碎を行った後、遠心分離で得られた抽出液をキチン樹脂(New England Biolabs.)を用いたカラムに結合し、New England Biolabs.のマニュアルに従って、洗浄、N 末端側キチン結合ドメインの切断除去、洗浄、C 末端側キチン結合ドメインの切断除去を行い、ヒト eRF1 ドメイン 1 を溶出した。これを、さらに MonoS カラム(Amersham Biosciences)を用いて精製し、NMR 用の試料とした。

4. NMR 測定

NMR 測定は共同研究者である東京大学大学院農学生命科学研究科田之倉優教授の研究室で行われ、各アミノ酸残基のシグナルの帰属、ならびに運動性の評価を行っているところである。

C. 研究結果

1. 終止コドン認識に関わる真核生物 eRF1 のアミノ酸残基の推定

遺伝暗号の翻訳過程では、mRNA 上のコドンは tRNA 上のアンチコドンと塩基対形成を行うことにより認識されているが、終止コドンだけは例外的にタンパク質性因子であるポリペプチド鎖終結因子(翻訳終結因子、class I release factor)により認識

される。とくに、真核生物ではこの認識に関与する因子は1種類のみであり(eRF1)、これが3種の終止コドン(UAG、UAA、UGA)の認識をすべて行っている。ところが、これらを認識しながら他のコドン、特にトリプトファンのコドン UGG を除外するメカニズムについては解明されていない。

この認識に関与するアミノ酸残基を推定するために、普遍遺伝暗号表に従う終止コドン使用をしている生物種の eRF1 のアミノ酸配列と、絨毛虫類を含む各種真核生物 eRF1 のアミノ酸配列を比較し(図1)、既に報告のあるヒト eRF1 の結晶構造(図2)と照らし合わせることで、Gly57/Thr58 が終止コドン2字目、Ser60/Asn61 が終止コドン3字目の認識に直接関与していると推定した(図1および図2)。

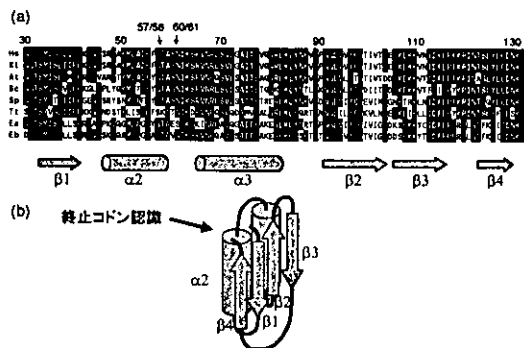


図1. 真核生物クラスI 翻訳終結因子の構造。(a) eRF1 のアミノ酸配列の比較(ドメイン1の一部)。Hs, *Homo sapiens* (accession number X81625); Xl, *Xenopus laevis* (Z14253); At, *Arabidopsis thaliana* (X69375); Sc, *Saccharomyces cerevisiae* (X04082); Sp, *Schizosaccharomyces pombe* (D63883); Tt, *Tetrahymena thermophila* (AB026195); Ea, *Euplotes octocarinatus* eRF1a (AJ272501); Eb, *E. octocarinatus* eRF1b (AF245454)。保存性の高いアミノ酸は反転表示してある。アミノ酸残基の番号付けはヒト eRF1 の N 末端のメチオニンを1として表記している。(b)ヒト eRF1 の結晶構造(PDB:1DT9)に基づくドメイン1の三次元構造の模式図。

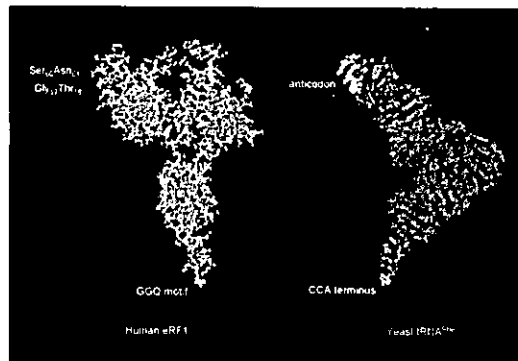


図2. eRF1 と tRNA の立体構造の比較。Protein Data Bank (ヒト eRF1: 1DT9, 酵母 tRNA^{Phe} :1EVV)の構造データを用い、Cn3D version 3.0 for Windows (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)で作図した。

2. eRF1 による終止コドン認識メカニズム(仮説)とそれに必要とされる eRF1 の動的立体構造

eRF1 による終止コドン2字目および3字目の認識のメカニズムを図3のように推定した。この仮説では、Gly57/Thr58 および Ser60/Asn61 付近のヘリックス構造が、それぞれ relaxed (α ヘリックス様)と tight (3_{10} ヘリックス様)の2通りの構造をとることができ、その組み合わせにより UAA、UAG、UGA の3種の終止コドンを認識するとした。UGG を認識することのできる構造はとれないことも説明できる。

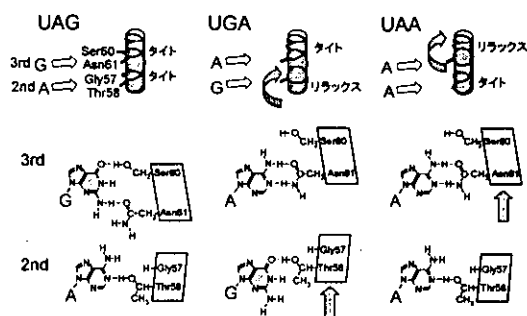


図3. 真核生物 eRF1 の終止コドン認識のメカニズム(仮説)。アミノ酸残基の塩基に対する水平移動(下のパネルの灰色矢印)は、これを含むヘリックス構造の局所的な緩みにより生じる。

しかし、この仮説では、この領域が柔軟性に富むことが必要とされる。このことは立体構造中での疎水性アミノ酸残基の分布が、 3_{10} ヘリックスを安定化することにより実現していると予測しているが、実験的に確認する必要がある。

3. eRF1 ドメイン1の発現・調製とその動的立体構造の解析

ヒト eRF1 の結晶構造は既に報告されており、3つのドメインからなることが明らかとなっている(図2参照)。このうち、われわれが終止コドン認識に関与していると推定した Gly58/Thr59、Ser60/Asn61 はドメイン1に存在する。そこで、ドメイン1の動的立体構造を NMR で調べることをめざし、その調製系の構築をした(B2、B3項)。ヒト eRF1 ドメイン1がN末端側、C末端側双方にキチン結合ドメインを結合した形で発現するようにデザインされたプラスミドを作製した。これを発現用の宿主大腸菌に導入し、それを $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識用培地で培養し、融合タンパク質を発現させた後、細胞抽出液をキチンカラムに結合させ、カラム上で両側のキチン結合ドメインを除去し、eRF1 ドメイン1の $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識体を得た。これを、さらに陽イオン交換カラムで精製し、NMR 測定サンプルとした。

4. eRF1 ドメイン1の NMR 解析

得られたサンプルの三核三次元核磁気共鳴 (NMR) 等の測定を行った。これまでに、分離のよいスペクトルを得て(図4)、主鎖および側鎖の帰属を完了し、現在、各残基の運動性の解析を行っている。

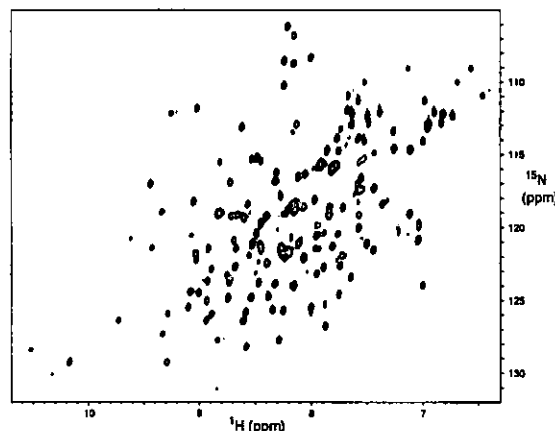


図4. ヒト eRF1 ドメイン1の ^{15}N - ^1H HSQC スペクトル

D. 考察

ヒトを含む真核生物では、3種の終止コドンすべてが1種類のタンパク質性因子 eRF1 により直接認識されていることから、eRF1 はすべての真核生物で必須とされると考えられる。また、ヒトの白血病の中には、eRF1 の細胞内含量の低下が原因となっていると考えられるものがあることなど、がん研究にとっても重要である。これは、eRF1 の細胞内含量低下により、終止コドンの読み飛ばし (ナンセンスサプレッション) が起きやすくなり、特定のタンパク質の特定の終止コドンの読み飛ばしにより生じた異常タンパク質ががん化の原因となるためであると思われる。eRF1 による終止コドン認識のメカニズムが解明されれば、たとえば、UAA、UGA、UAG の3種の終止コドンのうち、どれか1つだけ認識できなくなった eRF1 を作成し、細胞内の eRF1 置き換えを行えば、UAA、UAG、UGA いずれの終止コドンのサプレッションががん化につながるのかがわかり、その結果、白血病発症に関与する新規がん原遺伝子が見出されることも考えられる。

このようなことから、eRF1 の終止コードン認識メカニズムの研究を進めている。この研究は、タンパク質生合成過程の本質的な部分に属するために、従来の遺伝学的、細胞生物学的手法には限界があり、このタンパク質の物理化学的性質からのアプローチが必要であると考え、NMR による構造解析を行っている。われわれの作成した NMR サンプルは性質も良いため、その動的立体構造の解析から、eRF1 の終止コードン認識メカニズムの解明が可能であると考えている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tomonari Muramatsu, Yoshifumi Oda, Fumiaki Yumoto, Mie Ito, Masaru Tanokura: Molecular Mechanism of Stop Codon Recognition by Eukaryotic Release Factor 1 (eRF1), *Bioimages* 11, 44-44 (2003)

2. 学会発表

1) Yoriko Sawano, Ken-ichi Tatano, Tomonari Muramatsu, Koji Nagata, Masaru Tanokura: Analysis of processing and inhibitory mechanism of bromelain inhibitor from pineapple (*Ananas comosus*), 第 76 回日本生化学会大会, 2003 年 10 月

2) Taichiro Suzuki, Wataru Nishii, Tomonari Muramatsu, Kenji Takahashi: Determination of the cleavage sites of ribosomal S2 protein by ATP-dependent Lon protease from *E. coli*, 第 76 回日本生化学会大会, 2003 年 10 月

3) 村松知成, 小田佳史, 湯本史明, 伊藤三

恵, 田之倉優: 真核生物ポリペプチド鎖終結因子 eRF1 の構造解析, 第 12 回日本バイオイメージング学会学術集会, 2003 年 10 月

4) Tomonari Muramatsu, Yoshifumi Oda, Fumiaki Yumoto, Koji Nagata, Masaru Tanokura: Molecular mechanism of stop codon recognition by eRF1, RNA2003 Kyoto "The New Frontier of RNA Science", 2003 年 11 月

5) 村松知成, 小田 佳史, 湯本 史明, 伊藤三恵, 田之倉 優: 真核生物ポリペプチド鎖終結因子 eRF1 の動的構造, 第 26 回日本分子生物学学会年会, 2003 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし