

peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase and chaperone-like activities. *J. Mol. Biol.* 328, 1149-1160.

Hatano, K., Kojima, M., Suzuki, E., Tanokura, M. and Takahashi, K. (2003) Determination of the NMR Structure of Gln25-Ribonuclease T₁. *Biol. Chem.* 384, 1173-1183.

Hu, F., Furihata, K., Ito-Ishida, M., Kaminogawa, S. and Tanokura, M. (2004) Nondestructive observation of bovine milk by NMR spectroscopy: Analysis of existing states of compounds and detection of new compounds. *J. Agr. Food Chem.* 52, 4969-4974.

Kato, Y., Akai, A., Suzuki, R., Hosokawa, H., Ninomiya, H., Masaki, T., Nagata, K. and Tanokura, M. (2004) ¹H, ¹³C and ¹⁵N assignments of the tandem WW domains of human MAGI-1/BAP-1. *J. Biomol. NMR* 29, 539-540.

Ito, M., Nagata, N., Yumoto, F., Yamagoe, S., Suzuki, K., Adachi, K. and Tanokura, M. (2004) ¹H, ¹³C, ¹⁵N resonance assignments of the cytokine LECT2. *J. Biomol. NMR* 29, 543-544.

Oda, Y., Muramatsu, T., Yumoto, F., Ito, M. and Tanokura, M. (2004) Backbone ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignment of the N-terminal domain of human eRF1. *J. Biomol. NMR* 30, 109-110.

2. 学会発表

鈴木倫太郎, 永田宏次, 川上将, 根本暢明, 古谷昌弘, 足立恭子, 丸山正, 田之倉優 (2002) 好熱古細菌の蛋白質折り畳み因子 FKBP の立体構造. 日本 Archaea 研究会第 15 回講演会要旨集 37-39、浜松.

村松知成、伊藤三恵、湯本史明、足立恭子、田之倉優 (2002) 真核生物 eRF1 終止コドン認識ドメインの立体構造解析. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 1008、京都.

村松知成、小田佳史、湯本史明、伊藤三恵、田之倉優 (2002) 真核生物ポリペプチド鎖終結因子 eRF1 の構造と終止コドン認識メカニズム.

日本バイオイメージング学会 第 11 回学術集会要旨集 193-194、名古屋.

湯本史明、永田宏次、足立恭子、根本暢明、尾島孝男、西田清義、大槻磐男、田之倉優 (2002) アカザラガイ閉殻筋トロポニン I フラグメントを結合したトロポニン CC 端ドメインの溶液構造解析. 第 41 回 NMR 討論会講演要旨集 198-199、東京.

小田佳史、伊藤三恵、山越智、永田宏次、山本健二、鈴木和男、田之倉優 (2002) NMR および X 線による LECT2 の構造解析. 生体防御機能異常ワークショップ・2002-講演要旨集 3-4、京都.

Tanokura, M., Suzuki, R., Nagata, K., Yumoto, F., Kawakami, M., Nemoto, N., Furutani, M., Adachi, K. and Maruyama, T. (2002) Solution structure of an archaeal FKBP with a dual function of proline *cis-trans* isomerase and chaperone-like activities. Program and Abstracts of the 21st Century COE Program for Frontier in Fundamental Chemistry, The University of Tokyo - University Louis Pasteur Joint Symposium "Frontiers in Molecular Science" 29, Tokyo.

Yumoto, F., Nagata, K., Adachi, K., Nemoto, N., Ojima, T., Nishita, K., Ohtsuki, I. and Tanokura, M. (2002) Solution structure of troponin C C-domain complexed with troponin I fragment from Akazara scallop striated muscle. Structural Biology & Functionnal Genomics, Singapore.

湯本史明、永田宏次、足立恭子、根本暢明、尾島孝男、西田清義、大槻磐男、田之倉優 (2003) アカザラガイ閉殻筋トロポニン CC 端ドメインのトロポニン-ペプチド複合体の構造. 2003 年生体運動研究合同班会議、福岡.

村上健次、湯本史明、大木進野、田之倉優 (2003) トロポニン TCI 複合体の NMR による解析. 2003 年生体運動研究合同班会議、福岡.

湯本史明、永田宏次、足立恭子、根本暢明、尾島孝男、西田清義、大槻磐男、田之倉優 (2003) アカザラガイ閉殻筋トロポニン C-トロポニン I

フラグメント複合体の NMR 構造. 2003 筋生理の集い、慈恵医大.

Yumoto, F., Nagata, K., Adachi, K., Nemoto, N., Ojima, T., Nishita, K., Ohtsuki, I. and Tanokura, M. (2003) NMR structural study of troponin CC-domain complexed with troponin I fragment from scallop striated muscle in solution. *Biophys. J.* 84 Part 2, Suppl. S, 565A-566A.

湯本史明、永田宏次、足立恭子、根本暢明、尾島孝男、西田清義、大槻磐男、田之倉優 (2003) アカザラガイ閉殻筋トロポニンIペプチドを結合したトロポニンC C端ドメインの溶液構造. 日本農芸化学会 2003 年度大会講演要旨集 88、藤沢.

片山秀和、永田宏次、大平剛、湯本史明、田之倉優、長澤寛道 (2003) 甲殻類の脱皮抑制ホルモンの機能部位の解析. 日本農芸化学会 2003 年度大会講演要旨集 119、藤沢.

永田宏次、石橋純、山川稔、湯本史明、田之倉優 (2003) 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.

胡芳宇、降旗一夫、石田三恵、澤崎徹、田之倉優 (2003) 牛乳の NMR による非破壊測定. 日本農芸化学会 2003 年度大会講演要旨集 208、藤沢.

鈴木倫太郎、永田宏次、湯本史明、川上将、根本暢明、古谷昌弘、足立恭子、丸山正、田之倉優 (2003) 好熱古細菌の蛋白質折り畳み因子 FKBP の構造と機能. 日本 Archaea 研究会第 15 回講演会要旨集 15-17、横須賀.

鈴木倫太郎、永田宏次、湯本史明、川上将、根本暢明、古谷昌弘、足立恭子、丸山正、田之倉優 (2003) 古細菌の FKBP の 2 つの機能の分子機構. 第 3 回日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨集 45、札幌.

永田宏次、石橋純、山川稔、湯本史明、田之倉優 (2003) 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. 第 3 回日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨

集 47、札幌.

村上健次、湯本史明、大木進野、田之倉優、若林健之 (2003) トロポニン T₂CI 複合体中におけるトロポニン C の NMR 解析. 第 41 回日本生物物理学会年会講演予稿集 S122、新潟.

村松知成、小田佳史、湯本史明、伊藤三恵、田之倉優 (2003) 真核生物ポリペプチド鎖終結因子 eFR1 の構造解析. 日本バイオイメーjing学会学術集会要旨集 29、横浜.

Yasui, K., Kogo, H., Yumoto, F., Tanokura, M., Kojima, M. and Takahashi, K. (2003) Structural analysis of aspergillopepsin II by multidimensional NMR. International Conference on Aspartic Proteases and Inhibitors 2003 P-3, Kyoto.

村松知成、小田佳史、湯本史明、伊藤三恵、田之倉優 (2003) 真核生物ポリペプチド鎖終結因子 eFR1 の構造解析. 第 26 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 174、神戸.

矢島洋介、片山秀和、田之倉優、長澤寛道 (2004) 組換え体血糖上昇ホルモンの調製とコンフォメーション解析. 日本農芸化学会 2004 年度大会講演要旨集 185、広島.

胡芳宇、降旗一夫、石田三恵、澤崎徹、田之倉優 (2004) ³¹P-NMR による牛乳成分の分析. 日本農芸化学会 2004 年度大会講演要旨集 210、広島.

Katayama, H., Ohira, T., Nagata, S., Nagata, K., Tanokura, M. and Nagasawa, H. (2004) Solution structure and structure-activity relationship of the crustacean molt-inhibiting hormone. Programs & Abstracts of The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science 200, Yokohama.

Nagata, K. and Tanokura, M. (2004) Cardioacceleratory peptide (CCAP) of the fruit fly *Drosophila melanogaster*: Solution structure analysis and docking simulation to the receptor CG6111. 1st Asia-Pacific International Peptide Symposium/ 41st Japanese Peptide Symposium 2004 P-1-085、福岡.

田之倉優 (2004) 高感度 ^{31}P NMR プローブの開発と生きた細胞への応用. 厚生労働科学研究費萌芽的先端医療医療技術推進研究事業 ナノメディシン分野「超極限分子プローブによる組織傷害の再生・治癒機構の解析と高精度局所診断技術の開発」研究報告会 ナノメディシン公開シンポジウム「ナノバイオイメーjingで切り開く先端的生体機能解析ー血管炎と微小循環血流障害における分子生理機能を解き明かすー」抄録集、東京.

村上健次, 湯本史明, 大木進野, 安永卓生, 田之倉優, 若林健之 (2004) トロポニンのアクチン結合の構造的基盤. 第 42 回日本生物物理学会年会講演予稿集 S66、京都.

湯本史明, 廬群偉, 永田宏次, 森本幸生, 田之倉優, 大槻磐男 (2004) 拘束型心筋症原因トロポニン I の構造および機能解析. 第 42 回日本生物物理学会年会講演予稿集 S72、京都.

村上健次, 湯本史明, 大木進野, 安永卓生, 田之倉優, 若林健之 (2005) トロポニン・アクチン結合部位でのカルシウム制御の機構. 2005 年生体運動研究合同班会議プログラム 講演番号 60、大阪.

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

ヒトポリペプチド鎖終結因子 eRF1 の動的構造解析

分担研究者 村松 知成 理化学研究所ゲノム科学総合研究センター 上級研究員

研究要旨

遺伝子から mRNA 上に写し取られた遺伝暗号はリボソーム上でアミノ酸配列に変換される。このとき、翻訳終止を指定する終止コドンは tRNA ではなくポリペプチド鎖終結因子(Release factor)とよばれるタンパク質性の因子により認識される。真核生物では終止コドンを直接認識する因子は eRF1 一種類で、3 種の終止コドン(UAA、UAG、UGA)全てを認識している。このメカニズムの解明をめざし、ヒト eRF1 のコドン認識ドメイン(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た。¹⁵N-および ¹³C/¹⁵N-標識体を調製し、三核三次元核磁気共鳴 (NMR) 等の測定を行い、分離のよいスペクトルを得て、主鎖の帰属ならびに側鎖の帰属をほとんど完了し、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

染色体上の遺伝子より mRNA として写し取られた遺伝情報はリボソームにおいてタンパク質に変換される。このとき、mRNA のコドンとタンパク質のアミノ酸を対応させるアダプター分子は tRNA であるが、翻訳終止を指定する終止コドンに関しては、タンパク質因子(ポリペプチド鎖終結因子、RF、eRF)が終止コドンの直接認識と、P 部位のペプチジル tRNA からのポリペプチド鎖の脱離に関与している。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。

一方、遺伝暗号は普遍的でなく、いくつかの生物や、動物ミトコンドリアなどで普遍暗号表から逸脱した遺伝暗号を用いている生物が知られている。翻訳終止を指定する終止コドンについても、マイコプラズマ類(原核生物)、いくつかの繊毛虫類(真核生物)、哺乳動物のミトコンドリア(オルガネラ)などで変則的終止コドンを私用していることが知られている。我々は、真核生物 eRF1 について、これらの繊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た (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'GGTGGTTGCTCTTCCAAAGGCCGCATG GCGGACGACCCAGT3' と 5'GGTGGTTGCTCTTCCGCACATATCTGAA AGTAGTGCTGTAAGAGCCTC3' 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 SapI で切断し、pTWIN1 (New England Biolabs.) の SapI 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た。

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、

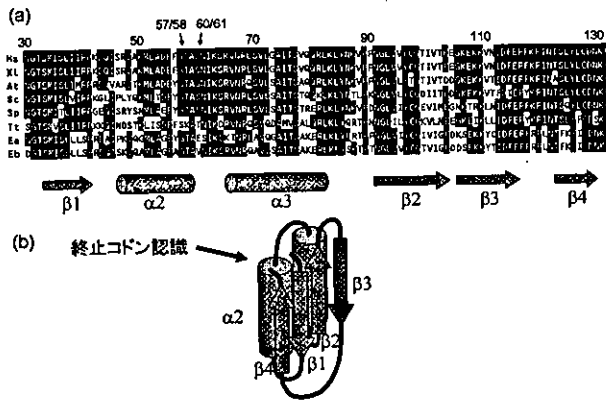


図1. 真核生物クラスI 翻訳終結因子の構造。(a) eRF1 のアミノ酸配列の比較(ドメイン1の一部)。Hs, *Homo sapiens* (accession number X81625); Xl, *Xenopus laevis* (Z14253); At, *Arabidopsis thaliana* (X69375); Sc, *Saccharomyces cerevisiae* (X04082); Sp, *Schizosaccharomyces pombe* (D63883); Tt, *Tetrahymena thermophila* (AB026195); Ea, *Euplotes 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。

織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、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)。

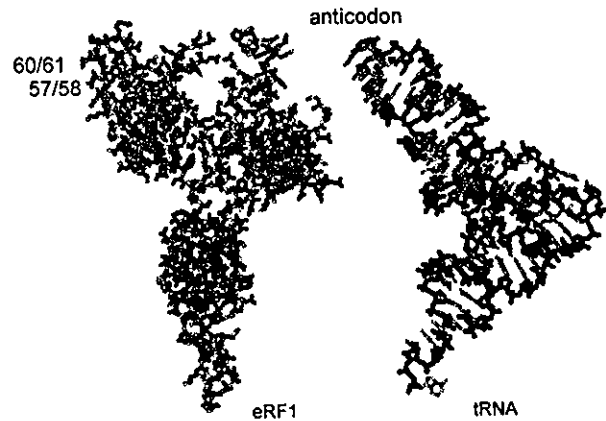


図2. eRF1 と tRNA の立体構造の比較。Protein Data Bank (ヒト eRF1: 1DT9, 酵母 tRNA^{Phe}:1EVV)の構造データを用い、Cn3D version 3.0 for Windows (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)で作図した。)

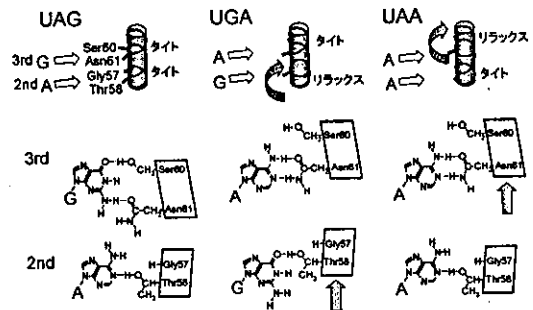


図3. 真核生物 eRF1 の終止コドン認識のメカニズム(仮説)。アミノ酸残基の塩基に対する水平移動(下のパネルの灰色矢印)は、これを含むヘリックス構造の局所的な緩みにより生じる。

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種の終止コドン进行を認識するとした。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。

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

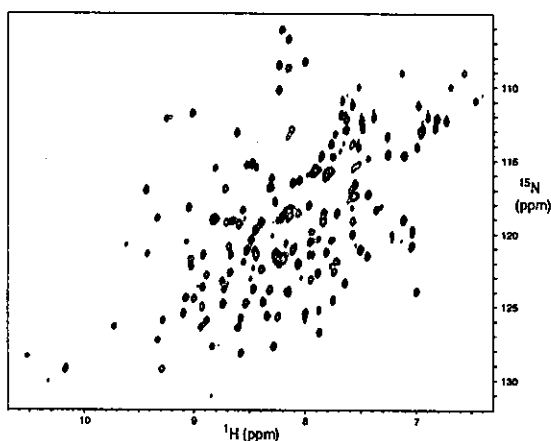


図4. ヒト eRF1 ドメイン1の ^{15}N - ^1H HSQC スペクトル

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 測定用のサンプルとした。

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た。

さらに、 ^{15}N - ^1H 間の NOE を測定し、各残基の運動性の解析を行った(図5)。各残基の運動性は均一ではなく、残基間の差異は認められるものの、今のところ、Gly58~Asn61 の領域が特に柔軟に富むとの結論を出すことはできない。今後、温度依存性の測定、コドントリプレット (UGA、UAA、UAG) の添加、などを行い、この領域の柔軟性の変化を検討する予定である。

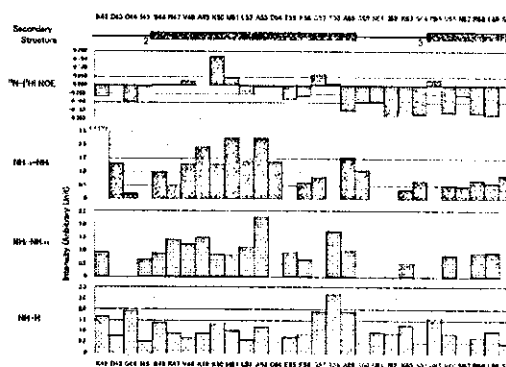


図5. ヒト eRF1 ドメイン1各残基の運動性の解析

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ことが考えられる。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 の終止コドン認識メカニズムの解明が可能であると考えている。

D. 結論

翻訳過程で終止コドン認識するポリペプチド鎖終結因子は、生物に必須であるだけでなく、発がんとの関連性も指摘されている医学的にも重要なタンパク質である。その機能であるコドン認識のメカニズムは、動的な立体構造に基づ

いて解明されるべきであると考えられる。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

(1) 論文発表

1. Kim, Y.-T., Kurita, R., Kojima, M., Nishii, W., Tanokura, M., Muramatsu, T., Ito, H., Takahashi, K. Identification of arginine residues important for the activity of *Escherichia coli* signal peptidase I. *Biol. Chem.* 385: 381-388, 2004.
2. Muramatsu, T., Oda, Y., Yumoto, F., Ito, M., Tanokura, M. Analysis of dynamic structure of eukaryotic release factor 1 (eRF1). *Bioimages* 12: 37-37, 2004.
3. Oda, Y., Muramatsu, T., Yumoto, F., Ito, M., Tanokura, M. Backbone ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the N-terminal domain of human eRF1. *J. Biomol. NMR* 30: 109-110, 2004.
4. Sasaki, H., Nakagawa, A., Muramatsu, T., Suganuma, M., Sawano, Y., Kojima, M., Kubota, K., Takahashi, K., Tanokura, M. The three-dimensional structure of aspergilloglutamic peptidase from *Aspergillus niger*. *Proc. Japan Acad.* 80(B): 435-438, 2004.

(2) 学会発表

1. Nishii, W., Suzuki, T., Muramatsu, T., Takahashi, K. Cleavage mode and specificity of *Escherichia coli* ATP-dependent Lon protease toward ribosomal S2 protein. 第77回日本生化学会大会, 2004年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

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

薬物や機能試薬等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）として複合微粒子リポソームの開発を試みた。複合微粒子母体として磁気微粒子を用いることで外部磁場（磁針）により存在場所のコントロールを、針電極を用い電場を印加することで任意の時間に薬物等の供給を可能とするものである。これまで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、また、電場印加による機能性分子のリポソーム内部からの放出機構が電気エネルギーのリポソーム粒子界面での消散によると判断できる結果を得た。今年度は、リポソーム粒子表面に荷電分子を配置することで特性改良の可能性を追求した。リン脂質分子と荷電を持つ界面活性分子との混合膜をもつリポソームを作製し電場効果と膜安定性を研究した。

A. 研究目的

この研究では磁針により集積可能なリポソーム複合微粒子の作製と電場により物質透過が促進されるリポソーム粒子について研究した。これは現在行われているエレクトロ・ケモセラピーへの応用展開を志したものである（図1）。

研究の個別課題としてあげた項目を以下にあげる。

(1) 多数のリポソーム粒子を磁性粒子周囲に配す金平糖型複合微粒子の作製

A) 磁性粒子の選択（分散性と磁気の兼ね合い）----- 1ミクロン前後のヘマタイト粒子の利用で解決した。

B) 中心粒子の単一粒子としての水中分散性の向上-----磁性微粒子表面のシリカ層

コーティング処理で解決。

C) 中心粒子とリポソーム粒子の接合
-----血清タンパク質（リゾチーム等）をバインダーとして利用

(2) 電場により物質を放すリポソーム

A) リポソーム膜の矩形波電場による物質透過能変化のメカニズムの解明

(周波数依存性、電圧依存性など)-----
電気エネルギーの消散による物質透過能変化（伝導度増加が有効）であることが判明。

B) 電気伝導度を増加させるリポソーム粒子の開発-----当期の目的。

当期は昨年来問題が未解決であるリポソーム膜の表面電流量の増加を目指し、種々のイオン性脂質を混在させることで表面電荷量の増加を試みた（図2）。

図 1.

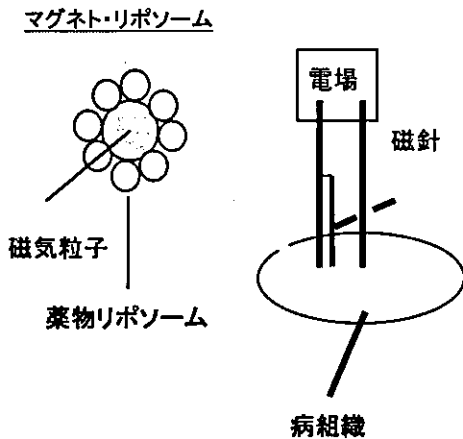
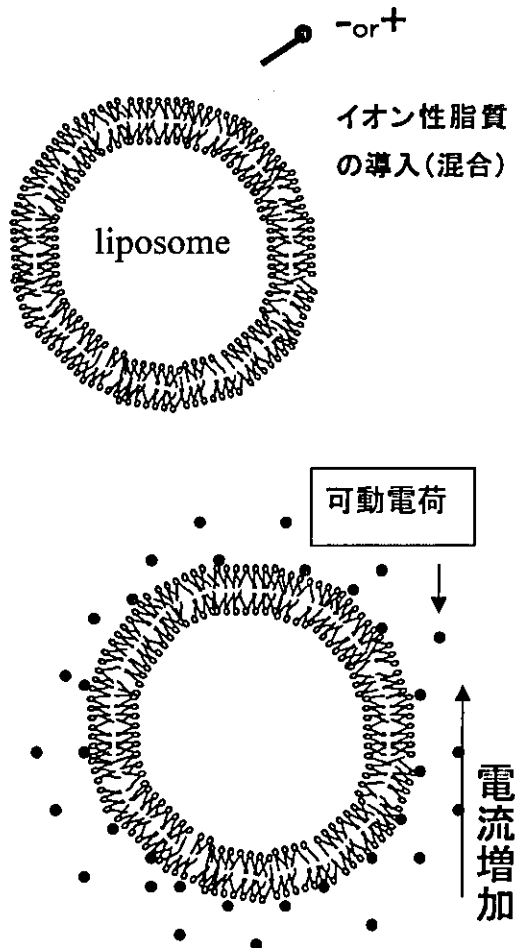


図 2



B. 研究方法

1. イオン性脂質を混合したリポソームの作製

昨年度用いたイオン性脂質（アルキル四級アンモニウム塩）は膜表面電荷増加を目的とした混合量増加に際し、親水基部分のかさ張りが原因と思われる膜パッキング不協を起し内包分子の漏れが大きいことが判明した。これを避けるため、今年度はアルキル一級アンモニウム塩などを混合脂質として用いその効果を調べた。

リポソーム試薬として市販されている Coatsome E (日油リポソーム社)の3種を用いると同時にリン脂質(卵黄 phosphatidylcholine (EPC) : Avanti polar 社や di-palmitoylphosphatidylcholine (DPC) : Sigma 社) とアルキル一級アンモニウム (stearylamine) やコレステロールとの混合系を用いた。Coatsome はCaイオン0.2Mの水溶液に混合攪拌することで分散した。また、後者はそれぞれをエタノールに溶かし混合し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)や超音波分散法によりサイジングを行った。外相からCaイオンを取り除くため、透析チューブ(分画分子量10,000)で蒸留水に対して4°C下で透析を5-6回繰り返した。

2. リポソーム膜表面の電荷量測定

種々のリポソームサンプルの表面電荷量の評価は顕微鏡電気泳動測定法により行い、ゼータ電位の大小で評価した。また、リポ

ソームの粒子径測定は動的光散乱法で行った。

3. リポソーム膜安定性評価

内相にCa²⁺イオンを閉じ込めたリポソームを冷蔵庫中に放置しCa²⁺の外相への自然流出の有無を調べた。リポソームから外溶液中へのCa²⁺イオン流出の程度は外相に加えたCa²⁺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。

3. 電場印加法

電場印加法は昨年と同様である。以下に略記する。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針状電極に印加した。周波数は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間隔の白金線電極を用いリポソーム分散液約3mlに印加した。標準的な実験のプロトコルは100kHz矩形波の1秒間のON, 5秒間のOFFを7回繰り返すことである。

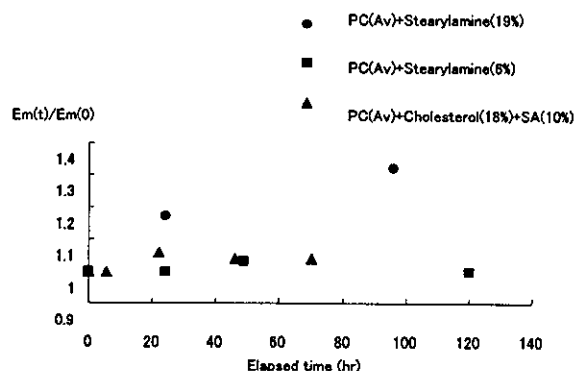
C. 研究結果

はじめに、膜電荷の増加のためにstearylamineを膜強度増加のためにコレステロールをEPCに混合しCa²⁺の自然リークや他の特性を測定した。次の3種類の膜について自然リークの結果を図3に示す。

①EPC+Stearylamine(19%):ゼータ電位+65mV、②EPC+Stearylamine(6%):ゼータ電位+50mV、③EPC+Cholesterol(18%)+Stearylamine(10%):ゼータ電位+55mV。

いずれも表面電荷量としては大きな違いはないが、stearylamineが少量混合したものやコレステロールが入ったものは自然リークはほとんどないことが示された。

図3.



Stearylamineが十分に表面電荷を与えることやコレステロールが膜安定化機能をもつことが確認されたので、同様な組成をもつ市販のリポソーム試薬で可能性を追求した。Coatsome Eは簡便にリポソームが作製できる試薬であるが電場応答性についての報告はこれまで見られない。3種のCoatsome Eによるリポソームを作製し電場によるCa²⁺放出すなわちElectro-permeation (EP)を測定した。それぞれのリポソームの組成と特性は表1.に示した。

表1.

*Coatsome 赤(R), 黄(Y), 緑(G)の利用

R): A=52mM, B=40, C=8, 粒子径(244nm)

Y): A=54mM, B=40, D=6, 粒子径(234nm)

G): A=30mM, B=40, D=30, 粒子径(241nm)

A: L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine

B: Cholesterol

C: stearylamine

D: di-palmitoylphosphatidylglycerol

	zeta-電位	蛍光増加 by EP
(R)	+30mV,	○,
(Y)	-30mV,	○,
(G)	-30mV,	?, (経時リーク)

3種ともゼータ電位から見る限り表面電荷量はそれほど多くない。RやYではEPが観測されるが、Gでは自然リークの影響がすでにあり定かではない。イオン性脂質の混合量が大きいといずれにしろ膜の不安定化があるようである。表2に示すようにRはかなりEP効果が大きく現れる。Gは試料製作後10日では既にCaのリークが激しい。

表2. 試料作製後約10日、標準Vの回数とEm, ,

	0回,	1回目,	2回目,	3回目
(R)	2.6,	3.2,	3.7,	3.9
	2.8,	3,	3.2,	3.3
	2.5,	2.7,	2.7,	(効果大)
(Y)	2.7,	2.8,	2.8,	
	2.7,	2.8,	2.9,	
	2.7,	2.8,	2.9,	
(G)	4.4,	4.5,	4.6,	
	4.2,	5.3,	6,	(自然リーク)
	4.3,	4.5,	4.6,	

表3には前記Rと同様な系でStearylamineの混合割合を変えた時の効果を示す。

Stearylamine 混合割合20%まで安定でEP効果も大きいことが示された。

表3.

- (A) L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine,
 (B) Cheoresterol (40%固定),
 (C) Stearylamine

(C) の mol %	zeta 電位	蛍光増加 by EP	
		n=14,	n=21
5, (径 280nm)	+80mV,	0.2,	0.2,
10, (径 280nm)	+65mV,	0.2,	0.1,
20, (径 280nm)	+80mV,	0.2,	0.4,
		0.2,	0.5,

D. 考察

EP効果の促進のためにイオン性脂質Stearylamine (表面電荷量増加による) を混合することを、また膜安定性を増加するためにCheoresterolを混合に利用することが有効であると考え。

E. 結論

EP効果を促進する系として表面電荷量が多い系が望ましいが、膜構造の安定性との兼ね合いを充分考慮する必要がある。

F. 健康危険情報: 特になし。

G. 研究成果

1. K.Furusawa and H.Matsumura, Colloidal Nanoparticles: Electrokinetic Characterization, *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, (2004) 773-786.
2. 「複合微粒子マグネット・リポソームとエレクトロ・パーミエーション」松村英夫 第10回油化学つくば交流会 (2004. 4. 23)
3. 「リン脂質リポソーム膜のエレクトロ・パーミエーション」松村英夫 第56回コロイドおよび界面化学討論会 (2004. 9. 10)
4. 「複合粒子の生成とコロイドの動電現象」古澤邦夫、松村英夫 第56回コロイドおよび界面化学討論会 (2004. 9. 10)

H. 知的財産権の出願・登録状況: なし。

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・副所長
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 真鍋 義則 国立国際医療センター研究所・研究生
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
協力研究者 塩原あまね 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、細胞の核、およびミトコンドリアを特異的に染色するプローブを新規に製造した。

A. 研究目的

半導体ナノ粒子は、量子サイズ効果によって、強力な蛍光を出すことが可能であるため、細胞内レベルから生体レベルまで、その動体を追跡することが可能である。我々は、これまでに細胞内小器官であるライソゾームのマーカーとなる蛍光プローブを開発している。また細胞質全体を量子ドットで染色する方法を開発している、さらに本年度は特に細胞の核とミトコンドリアを特異的に染色する方法を開発することを目的に研究を進めた。

B. 研究方法

細胞内小器官の染色については、本研究初年度アルブミンとの結合より、ライソゾームへの伝達に成功している。また2年度には、リボソームにより細胞質への伝達が可能と成った。本年度は、まず、上記のようにして得られた量子ドットに、アダプター分子を作成し、それを介してシグナルペプチドを結合させることを行っている。この方法により、安定に量子ドットとシグナルペプチドが結合され、また水溶液中にて分散可能となる。

1) シグナルペプチド

核やミトコンドリアに特異的に局剤化するシグナルペプチドを何本か合成しそれを用いて量子ドットに結合させた。実際にいくつか試し成功した例を以下に示す。

2) 量子ドット作成

現在量子ドットは、赤、黄色、緑が作成できる。これを利用し同時に異なる細胞小器官を染色することがかのである。

3) 安全性

量子ドットの安全性は、MTTアッセイ、コメットアッセイを用いて行った。

4) シグナルペプチドのタグging

シグナルペプチドを量子ドットにタグgingする方法は、まず量子ドットの方をメルカプト有機酸あるいはメルカプトアミンで水溶液中に分散させ特別なアダプター分子を介してカルボキシル端あるいは、アミノ端に結合させている。

C. 研究結果

安全性についての検討は、本年度 MTT アッセイ法を用いてミトコンドリアの呼吸能力を計測することにより行った(A.

Shiobara et al., Microbiol. Immunol 2004)。この研究により、細胞毒性については、閾値が存在することを明らかにした。これにより安全基準を設定することが可能となり、医療応用および産業化において重要な一歩をクリアしたことになった。また本年度さらにこの細胞毒性は、ナノ粒子の表面加工に深く依存し様々な表面加工により生物・医療応用に最適な表面加工およびその製造過程を明らかにした(A. Hoshino et al., Nano Letters (2004))。

実際に成功した例を以下に示す。

1) 細胞の核特異的マーカー

前述した方法により量子ドットによる核特異的染色した動物細胞を図1に示す。図1は、経時的に観察している。共焦点顕微鏡によって核に局在していることを核認している。

2) 細胞のミトコンドリアマーカー

前述した方法により量子ドットによるミトコンドリア特異的染色した動物細胞を図2に示す。図2は、緑の量子ドットによるミトコンドリア特異的染色と、従来法による有機赤色素によるミトコンドリア染色を重ね合わせ黄色になっていることから両者が同じ場所にあることを示している。

D. 考察

1. 達成度について

量子ドットの製造法の改善により、当初の30倍を一度に生産可能と成り、製造・精製プロセスを改良した結果、安全性が飛躍的改善され、動物に使用可能と成った。また、細胞内小器官は、ライソゾーム、ミトコンドリア、核、サイトゾルなどを特異的に染色する方法が開発できるまでに至った。大きな成果を得ることができた。これにより当初の計画を十分に達成し、さらに今後複数の染色をすることが可能と成り、同時多色、多種の細胞をトレーシングできる技術開発も今後行える可能性が出て来た。

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、この技術および成果を利用して生きた動物で細胞、分子などを生体内で観測する事は、血管炎など疾病のメカニズムを解析する上に於いても極めて重要である。さらにこの研究成果により、患者の負担を軽減し国民医療のみならず、社会的にも意義が大きく成ることを期待する。

3) 今後の展望について

本年度は、細胞レベルでのミトコンドリアの機能におよぼす影響およびアポトーシスについて詳しく検討した。次年度は、変異源性、腫瘍源性などについて細胞と動物両方もちいて検討し、その結果によりヒトへの臨床応用に近付けることができる。

本年、我々は、核移行、或は、ミトコンドリア移行のシグナルペプチドを用いて量子ドットに結合させると、非常に高い効率で細胞内に侵入し、各々、ミトコンドリア、核に局所的に集積したことから、この量子ドットを用いて細胞内小器官特異的に染色するシステムを開発した。特に核移行シグナルを用いて核特異的に薬物を伝達できるシステムについては、DNA

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安全に動物に投与することが可能と成った。また細胞レベルでは、ライソゾーム、サイトゾル、ミトコンドリア、核に伝達できる量子ドットドットキャリアーを開発した。

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) Akiyoshi Hoshino, Kouki Fujioka, Taisuke Oku, Masakazu Suga, Yu F. Sasaki, Toshihiro Ohta, Masato Yasuhara, Kazuo Suzuki, and Kenji Yamamoto; Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on Their Surface Modification,

- Nano Letters 2004;4(10):2163-2169
- 2) Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Nakamura S, Suga M, Yamaguchi Y, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K. Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells. *Microbiol Immunol.* 2004;48:985-994
 - 3) Akiyoshi Hoshino, Ken-ichi Hanaki, Kazuo Suzuki, and Kenji Yamamoto; Application of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314 (2004) 46-53
 - 4) Amane Shiohara, Akiyoshi Hoshino, Ken-ichi Hanaki, Kazuo Suzuki, and Kenji Yamamoto; On the Cyto-Toxicity Caused by Quantum Dots, *Microbiol. Immunol.*,48(9)(2004), 669-675
 - 5) Kenji Yamamoto and Noriyoshi Manabe, Randomness and Organization of the Bio-Nano-Particles into the Functional Structure. *Applied Mechanics, Science Council of Japan, Theoretical and applied Mechanics, Japan (Vol.53)*, 111-114.
 - 6) A. Aringazin A.K., Dahnovsky Yu., Krevchik V.D., Semenov M.B., Veremyev V.A., Ovchinnikov A. A., Yamamoto K. Two-dimensional tunnel bifurcations with dissipation, *Hadronic Journal.* - 2004, - v. 27, N 2. - P. 115-150
 - 7) Yayoi Otsuka, Ken-ichi Hanaki, Jizi Zhao, Ryuji Otsuka, Kiminori Toyooka, Hiroshi Yoshikura, Tadatashi Kuratsuji, Kenji Yamamoto, Teruo Kirikae, Detection of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin using Quantum Dot immuno-conjugates. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57 (2004) 183-184
 - 8) Kenji Yamamoto, Noriyoshi Manabe, Randomness and organization of the bio-nano-particles into the functional structure. *Theoretical and Applied Mechanics Japan* 53 (2004) 111-114.
- (総説)
- 1) 星野彰芳、山本健二、カンタムドットナノ粒子を用いた蛍光イメージング素材の開発「医学のあゆみ」2004;210(3);183-186
 - 2) 星野昭芳、山本健二 量子ドット蛍光を用いた細菌毒素の1分子抗原抗体反応検出システム *BioClinica*2005;20(1):23-262.
 - 3) 山本健二、山屋俊一、「一般細菌以外の培養同定困難な菌」臨床検査データブック2005—2006 高久史監修、医学書院(2005)
 - 4) 山屋俊一、山本健二 広範囲血液・尿化学検査免疫学的検査(ノイラミン酸・シアル酸) *日本臨床* 62 (2004)
 - 5) 山本健二、「治療技術の進歩」最近の化学工学56:先端医療における化学工学、化学工学会(2004) p1-p8.
- 2 学会発表
(国内学会)
- 1) 真鍋法義, 星野昭芳, 梁一強, 後藤知将, 加藤規弘, 山本健二 Quantum dotsと薬剤の結合による *in vivo* での効果、日本薬学会第125年会(2005年3月、東京)
 - 2) 二村 泰弘、後藤 知将、山本 健二 アミノ酸からの蛍光物質の水熱合成 化学工学会第70年会(2005年3月、名古屋)
 - 3) 星野昭芳、村山研、大川原明子、三浦典子、大野尚仁、安原真人、山本健二、鈴木和男: 血管炎発症に関わる活性化好中球MPO分子の蛍光ナノ粒子による検出 第13回バイオイメージング学会学術集会 京都医科大学(2004年11月)
 - 4) 道尊宇遠、二村泰弘、山本健二、河合剛太 RNAの二次構造予測, デザインおよびフォールディングダイナミクスへの新しいアプローチ、第6回日本RNA学会年会(2004年8月、熊本)
 - 5) 後藤 知将、二村 泰弘、山口 由岐夫、山本 健二 断熱膨張を用いた亜臨界・超臨界水リアクターによるアミノ酸の縮合反応 化学工学会第69年会(2004年4月、大阪)
 - 6) Hoshino A, Toyama-Sorimachi N, Dohi T: Specific recruitment of peritoneal macrophages into perforating ulcers in murine trinitrobenzen sulfonic acid (TNBS)-induced colitis. 第34回日本免疫学会総会(札幌, 2004.12)

- 7) Kazumi Omata, Kenji Yamamoto. Theoretical study on the structure of super critical fluids、第54回力学応用講演会(2004年1月東京)
 - 8) Wayne Dawson, Kenji Yamamoto. Applying the principles of chaperons to material designs in nanotechnology applications、第54回力学応用講演会(2004年1月東京)
 - 9) Fumihiko Takeuchi, Kenji Yamamoto. Effectiveness of vaccination strategies for infectious diseases according to human contact networks 第54回力学応用講演会(2004年1月東京)
- (国際学会)
- 1) Kazumi Omata, Yasuhiro Futamura and Kenji Yamamoto, SUPERCRITICAL FLUIDS STUDIED BY MONTE CARLO SIMULATIONS, The 3rd International CIMTEC Conference "COMPUTATIONAL MODELING AND SIMULATION OF MATERIALS" (May, 2004, Acireale, Sicily, Italy).
 - 2) Tomomasa Goto, Yasuhiro Futamura, Kenji Yamamoto, "Synthesis of Oligopeptide under Hydrothermal Conditions with Adiabatic Expansion Cooling" The 5th Green & Sustainable Chemistry Symposium (Mar, 2005, Tokyo)
 - 3) Yasuhiro Futamura, Tomomasa Goto, Kenji Yamamoto, "Prebiotic Biopolymer Synthesis under Hydrothermal Conditions with Adiabatic Expansion Cooling: Volcanic Eruption from Hydrothermal Environment into the Atmosphere" The 1st International Symposium (MISASA-1): Origin Evolution and Dynamics of the Earth (Mar. 2005 Misasa, ToTTori)
 - 4) Tomomasa Goto, Yasuhiro Futamura, Yukio Yamaguchi, Kenji Yamamoto, "Reaction of amino acids in a subcritical and supercritical water flow reactor with adiabatic expansion cooling" The 10th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering (APCCHE) Congress (Oct. 2004, Kita-Kyushu)
 - 5) Kenji Yamamoto, Toward the cell delivery system with the quantum dots (No. 29-5P10): The 4th International Peroxidase Meeting, Oct. 2004, Kyoto, Japan
 - 6) Akiyoshi Hoshino, Ken Murayama, Akiko Ishida-Okawara, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Noriko N. Miura, Naohito Ohno, Masato Yasuhara, Kenji Yamamoto, and Kazuo Suzuki MPO. Expressed on the Surface of Activated Neutrophils with Quantum Dot-conjugated Antibody. 4th International Peroxidase Meeting, Palulu Plaza Kyoto, Kyoto (2004.10)
 - 7) Akiyoshi HOSHINO, Masato YASUHARA, Taeko DOHI, Kazuo SUZUKI, and Kenji YAMAMOTO. Fluorescent labeling of cells and biomolecules with nanocrystal quantum dots. 4th International Peroxidase Meeting, Palulu Plaza Kyoto, Kyoto (2004.10)
 - 8) N. Manabe, A. Hoshino, Y. Q. Liang, T. Goto, N. Kato and K. Yamamoto. Quantum dots conjugated with captopril while remained effect in vivo. The International Society for Optical Engineering (Jan. 2005 U.S.A.)
 - 9) A. Hoshino, K. Fujioka, M. Suga, Y. F. Sasaki, T. Ohta, M. Yasuhara, K. Suzuki, K. Yamamoto. Fluorescent labeling of cells and biomolecules with nanocrystal quantum dots. SPIE Biomedical Optics Meeting, San Jose Intl. Convention Center, San Jose, CA (2005.01)
 - 10) Kenji Yamamoto, The fluorescence intensity of the quantum dots in the water depends on the surface processing. SPIE Biomedical Optics Meeting, San Jose Intl. Convention Center, San Jose, CA (2005.01)
 - 11) Hoshino A, Yamamoto K. Fluorescent Nanocrystal Quantum Dots for Medical Applications 5th International Symposium on Future Medical Engennering based on Bio-Nanotechnology. Tohoku University School of Medicine, Sendai (2005.2)
 - 12) Noriyoshi MANABE, Akiyoshi HOSHINO, Yi-qiang LIANG, Tomomasa GOTO, Norihiro KATO and Kenji YAMAMOTO. Quantum dots conjugated with captopril while remained effective in vivo. The Second International Conference on Advanced Materials and Nanotechnology. Queenstown, New Zealand (Feb. 2005)
 - 13) Amane Shiohara, Noriyoshi Manabe and

Kenji Yamamoto. Novel surface processing with sulfonic acid for quantum dot and its characters, The Second International Conference on Advanced Materials and Nanotechnology. Queenstown, New Zealand (Feb. 2005) .

- 14) Tomomasa Goto, Yasuhiro Futamura, Kenji Yamamoto, "Process of Novel Hydrothermal Flow-Reactor with Adiabatic Expansion Cooling: Toward Production of Functional Biopolymer" International Conference on Advanced Materials and Nanotechnology (AMN-2) Queenstown, New Zealand (Feb. 2005) .
- 15) Wayne Dawson, Kenji Yamamoto Kazuo Suzuki. 3D-Structural Model Building of LECT2 by Way of a Hybrid Experimental and Theoretical Strategy, GIW , Tokto (Dec. 2004)

H. 知的所有権の出願・取得状況)

1) 特許

なし

3) その他なし

図1 赤色量子ドットによる各染色

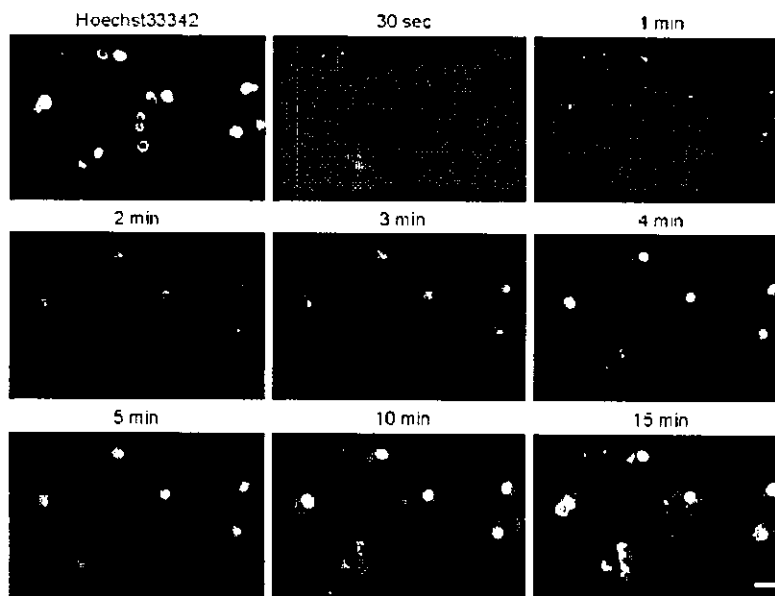
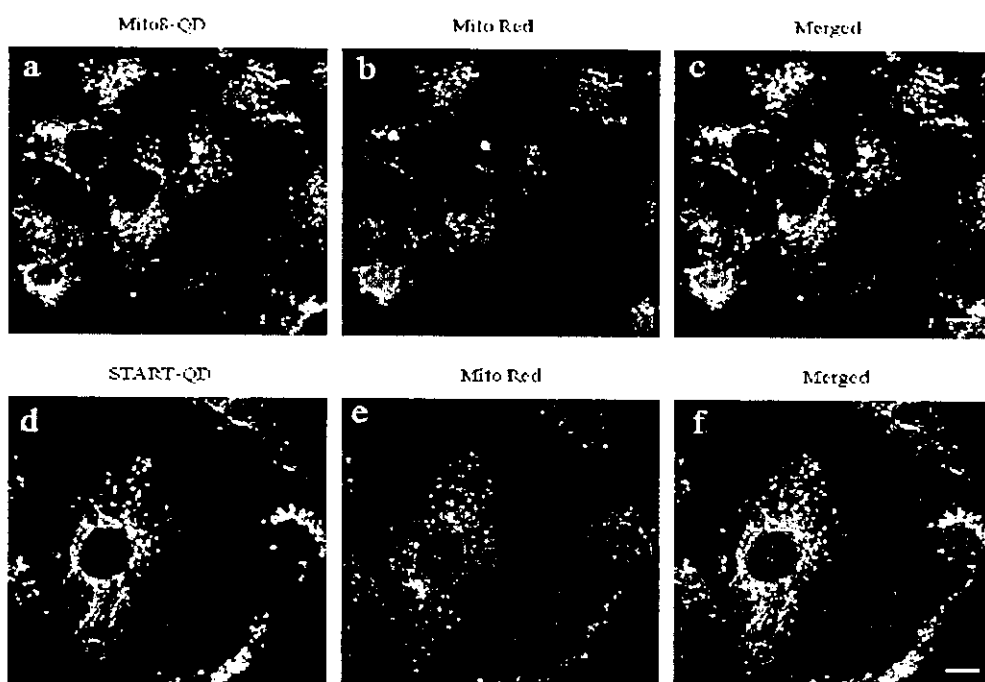


図2 量子ドットによるミトコンドリア特異的染色

上段左緑のミトコンドリア特異的両子ドットマーカー、上段中赤色の有機ミトコンドリアマーカー、上段右重合わせ像
 下段ネガティブコントロール



神経細胞再生因子の解析

分担研究者 霜田幸雄 東京女子医科大学 総合研究所 研究部

研究協力者 桑原三佳子 東京女子医科大学 総合研究所 技術科

研究要旨

魚類の視神経は完全に切断された状態でも形態的には1週間ほどで再生することが認められた。切断という非常に極端な損傷を受けたあとでも視神経軸索は再生する能力があるという点で興味深いものである。切断後の神経軸索の標本を TOFMS を用いて解析した結果、切断した神経軸索から分子量約 14,000 の物質が特異的に検出された。また、この物質は時間とともに細胞体に近い方で検出されるようになり、軸索末端側から細胞体に向かって移動することが確認できた。この物質を SDS-PAGE(CBB 染色)により解析しアミノ酸配列の解析を試みた。約 15kDa 付近に出現した濃いバンドがについてタンパク質の同定を行った。分子量約 16,600 および 15,500 については MASCOT によるデータベース NCBI の結果から、それぞれ β -グロビンと α -グロビンであることが見出された。分子量 14,000 のタンパクに関してはデータベースへの登録がなく、デノボシーケンス解析を試みた。その結果、このタンパクが、ミエリン鞘(シュワン細胞)由来のものである可能性が示唆された。魚類の視神経は全て有髄神経であるので、ミエリン鞘由来のタンパクが存在しても当然と考えられる。切断という損傷でこのタンパクが放出あるいは合成され細胞体まで移動し損傷部位の再生が行われたと推察された。

A. 研究目的

神経細胞は一度損傷を受けると再生あるいは増殖しないと言われてきたが、近年の研究では多くの神経細胞で神経軸索の再生が見出され、特に神経成長因子(nerve growth factor, NGF) などの存在下で軸索の成長が促進されることも知られるようになってきている。神経細胞に限らず細胞が再生あるいは増殖するには、細胞体での物資の合成が必要不可欠である。このことは損傷の情報を細胞体に伝達する、言い換えれば、物質の合成を促す因子が必要であると考えられる。魚類の視神経では神経軸索を切断すると言うような極端な損傷を与えても神経軸索は容易に再生する。本研究の目的は、神経軸索の切断という刺激

が切断端で引き起こす事象について明らかにし、この刺激がどのような物質によって細胞体まで移動するかを明らかにすることにある。切断により生じる最初の現象は損傷電流による脱分極と思われるが、電気刺激などによって再生が促進されることは無かったので、この脱分極が神経の再生に対して影響を及ぼしているとは考えにくい。次に、切断端から何らかの物質が放出あるいは合成され、これが細胞体に運ばれることが考えられる。切断端の軸索を切り出して、軸索全体を TOFMS(飛行時間型質量分析器)で分析すると分子量約 14,000 の物質が検出される。さらに、この物質は切断後時間を経るにしたがい軸索末端側から細胞

体側へ移動した。SDS-PAGE によってこの物質の解析を試みた。さらにデノボシーケンスにより、このタンパク質のアミノ酸解析を行った。

B. 研究方法

前年度までで切断した神経軸索からは分子量約 14,000 の物質が検出されたが、本年度も同様の方法でコイの網膜や視神経軸索を用いて実験を行った。魚類の眼球は視神経の再生を研究するのに有利な形態的特徴を持っている。ほ乳類などでは眼球内を還流する動・静脈は視神経束の中を走行しているが魚類では視神経束の外側を走行している。したがって、血管を残し視神経だけを切断することが容易である(図1)。実験には体長 15cm ほどのコイ(*Cyprinus carpio*) 用いた。動物を冷血動物用の麻酔薬 FA100 にて麻酔させ、眼球をわずかに引き出し視神経を切断した。

分子量 14,000 の物質の軸索内での移動を見るために視神経切断直後の軸索を摘出した後しばらく放置し切断端から 0.5mm の長さで切り、それぞれの切片を蒸留水中で粉碎し遠心した。その後、TOFMS (Shimadzu/Kratos Maldi TOFMS) にてマスペクトルを記録した。また、軸索は形態的には 10 日間程度で再生しているので、視神経を切断したコイの一部は水槽に戻し 7 から 10 日間飼育した。光刺激が再生に与えることはすでに報告しているが、飼育には 12 時間ごとの明暗の交替という環境で飼育した。飼育したコイもその後前述と同様の方法で軸索を切り出し TOFMS にて分子量の解析を行った。コントロールのために断頭した後、死後 2 時間以上経過した視神経についても同様の方法で解析した。

本実験で使用したマトリックス溶液は 1%TFA (トリフルオロ酢酸) 350 μ l と 100%アセトニトリル 150 μ l の混合液に 5mg の DHA (シナピン酸) を溶解したものをを用いた。この溶液 5 μ l をエッペンドルフチューブに採り、この中に切断した神経軸索を入れた。マトリックス溶液は細胞内液に比較して低張であるから細胞内液は溶液中に浸潤す

すると考えられた。

C 研究結果

1) 視神経切断端のマスペクトル

コイの視神経を切断した直後に視神経を摘出し、切断端部約 1mm の切片を作りマトリックス溶液に浸潤させマスペクトルを記録した。分子量 200 から 20,000 の分子量を観察した。20,000 以上の分子に関してはほとんど観察できなかった。したがって、図には分子量 5,000 から 15,000 の範囲を示した。切断端付近の視神経には分子量約 14,000 のピークが出現した(図2)。このピークは切断した神経のみに特徴的に現れ、神経の切断という刺激によって生じたものと考えられた。

2) 切断端からの移動

視神経を切断した後、2時間経過してから同様の実験を行った。切断端から 0.5mm の部分で視神経の標本を作製した。図3に示すように、切断時に観察された分子量 14,000 の物質が観察された。すなわち、この物質は少なくとも 1 時間で 0.5~1mm で細胞体側に移動していることが示唆された。

3) SDS-PAGE による分子の同定

切断端部を蒸留水中で破碎し遠心した後に SDS 電気泳動をおこなった。CBB 染色の結果を図4に示す。14kDA 付近に濃いバンドが確認できた。ついで、トリプシン処理し脱塩後、TOF 測定および MAS/MAS 測定を行った。これらをデータベース NCBI nr で検索した。その結果、同定されたタンパク質はコイの β -グロビン (mw: 16,645) および α -グロビン(mw: 15,451) が含まれていた。さらに、分子量 14,000 のタンパク質が同定されたが、データベースで検索することはできなかった。このタンパク質についてデノボシーケンス解析を行った結果、以下の3種類のアミノ酸配列を解析することができた(図5)。