

生命化学研究レター

目次

1.	巻頭言	2
	結論の先送り、結果として生じる責任	
	菊地 和也 (大阪大学大学院工学研究科)	
2.	関連シンポジウム紹介	3
	日本化学会第 87 春季年会アドバンステクノロジープログラム	
	バイオケミカルテクノロジーセッション	
3.	研究紹介	
	疾患モデル細胞の創製を目指して	4
	斉藤美佳子 (東京農工大学大学院共生科学技術研究院)	
	内外の表面の異なる脂質ナノチューブとそのホスト-ゲスト科学	10
	増田 光俊 (産業技術総合研究所	
	界面ナノアーキテクトニクス研究センター)	
4.	論文紹介「気になった論文」	17
	池田 将 (京都大学大学院工学研究科)	
	山根 説子 (東京医科歯科大学大学院生体材料工学研究所)	
	山吉 麻子 (京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科)	
5.	生命化学研究法	25
	アポトーシス確認法	
	~ 新規化合物がもつアポトーシス誘導効果の評価方法 ~	
	東 秀紀 (大阪市立大学大学院工学研究科)	
6.	スイス連邦工科大学ローザンヌ校(EPFL)留学中体験記	29
	中田 栄司 (徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス部)	
7.	シンポジウム等会告	32
8.	お知らせコーナー	35
	受賞のお知らせ	
	会員異動のお知らせ	
	編集後記	

巻頭言

結論の先送り、結果として生じる責任



大阪大学大学院工学研究科

菊地 和也

最近では *J. Am. Chem. Soc.* や *Org. Lett.* 等の雑誌に蛍光プローブ(米国人はセンサーと呼ぶ場合が多い)の論文が非常に多く掲載されるようになった。当然ながら、批判も多く出てくる。実際に、Editor から論文審査時にこの論文は本当に意味があるかどうか分野でのはっきりした位置づけを、Editor のみ読むコメントに書いてくれと依頼される場合も数回あった。この状況を、この分野の最大権威の米国人(誰か分かるでしょ)に聞いたところ、「実際に細胞内で働く可能性のないものまで掲載されると分野がレベルダウンする。今の状況は painful だ。自分はこの分野のほとんどの論文は negative な内容だと考えている。」と言われたことがある。確かにその通りである。しかし、私自身ではそこまで言い切るには確信がない、というか自信がない。偽善者にならないために白状すると、実際に内容に納得していないすべての論文審査に reject とコメントしているわけではない。そうなると今の状況を肯定するのが自分の意見だろうか? 難しいがどちらかと言われれば、はっきり否定はできない。ということは、肯定派になる。特に、この手の話をするときには中間派という意思表示は、無責任に映りとるべき態度ではないと思っている。この場合は中間的な態度をとろうにも結局はどちらかに流れ、“It depends.”で済まないところの意見を求められるからだ。肯定派になったからには責任が生じる。何でも責任をとれるわけではないが、この状況を否定しないためには肯定的な結果が必要になる。例えば、この分野の論文が増えることで競争がきつくなり、その結果本物志向の研究が出てくるかもしれない。分野の論文数が増えれば参加者も増え分野が盛り上がることは間違いない。研究人口が増えれば本当に役に立つ研究が出てくる可能性(分母が研究数で良い研究数を割ったなら下がるでしょう)も高くなるかもしれない。これが、助け合いになってしまうところが問題だが、ある程度民主主義で動くので仕方ないところはある。民主主義の悪弊があるなら、それに負けない良いところ(参加者の自覚)を出さなければいけない。それは、この分野に参加している人々が分野を高める意識を持って、次の目標に到達できるように切磋琢磨することである。5年後、10年後にこの分野から本当に使えるものが出てくれば今の状況は正しかったことになる。分野内の人間はその責務を負っていると考えなくてはいけないのだろう。今の状況の影響で、良い研究を目指してついてくる結果を高レベルにしなくてはならない、という当たり前のことを改めて考える機会を持った。

(きくち かずや kkikuchi@mls.eng.osaka-u.ac.jp)

関連シンポジウム報告



日本化学会第87 春季年会 (2007) アドバンスト・テクノロジー・プログラム (ATP) ～ バイオケミカルテクノロジー～ 報告

東京工業大学大学院生命理工学研究科
三原 久和

平成19年3月25日(日)～3月26日(月)の2日間、日本化学会第87春季年会(関西大学千里山キャンパス)にて、通常のアカデミックプログラムと平行して、アドバンスト・テクノロジー・プログラム(ATP)～バイオケミカルテクノロジー～が、開催されました。日本化学会ATPは、2005年の第85春季年会から材料分野において、「化学の応用」、「実用化」、「事業化」を中心とする産学連携のための新しい企画 Advanced Technology Program(ATP)として実施されています。当該分野のトップランナーによるオーガナイズならびに基調・招待講演などにより、活発な討論が行われ会場は活気あふれたものになり、多くの参加者から好評をいただくことができ、春季年会の新機軸として成功を収めてきています。2007年から新たにATPバイオの部門が生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、生命化学研究会が協賛し開始されました。

今年度は、T7 グリーンバイオとT8 フロンティア・バイオの2つのセッションでスタートし、それぞれ下記の4つのサブセッションを設けました。

T7 グリーンバイオ(A: バイオコンバージョン、B: バイオマス利用、C: バイオポリマー、D: 植物バイオテクノロジー)、T8 フロンティア・バイオ(A: ナノバイオ分子構築、B: バイオマテリアル、C: バイオ計測、D: 先端医工学)

バイオとしては初の試みで、参加者数など大変心配していましたが、一部の時間帯を除き立ち見の出るほどの大盛況で、オーガナイザー一同大変喜んでいる幸いです。皆様のご参加・ご発表に感謝いたします。今年度は、初の試みということもあり、講演は招待・依頼のみとし、一般発表はポスターのみとさせていただきます。ATPバイオでは、基調講演2、招待講演16、依頼講演23、ポスター64件で、産と学の約半数ずつの発表でした。ATP全体では436件の発表があり、春季年会全体約6000件の7%に当たる件数です。ATP開始により、春季年会の参加者は約600名増加の8600名、講演件数は約400件増加し6000件を超えています。来年も2008年3月26日～30日(立教大学)の日本化学会第88春季年会にて同様の企画にてATPバイオを開催しますので、産学連携の重要な機会として、皆様の積極的なご参加、ご発表、ご討論を期待しております。よろしくお願いいたします。

生命化学研究会 ATPバイオ担当 三原久和

ATPバイオ(2007)のオーガナイザー(敬称略)

T7 グリーンバイオ:大橋武久(カネカ)、鴻池敏郎(塩野義製薬)、三原久和(東工大院生命理工)、福居俊昭(東工大院生命理工)

T8 フロンティア・バイオ:杉本直己(甲南大先端生命工学研)、渡邊英一(三菱化学/東大ナノマテリアルセ)、浜地 格(京大院工)、磯部直彦(住友化学)

疾患モデル細胞の創製を目指して

東京農工大学 大学院共生科学技術研究院
生命機能科学部門

齊藤美佳子

(mikako@cc.tuat.ac.jp)



1. はじめに

種々の疾患に対する薬剤や治療法の開発において、その有効性を評価する疾患モデルは極めて重要である。疾患モデルというとき、通常は疾患モデル動物を指す。疾患モデル動物は、従来は、偶々自然発症した動物を飼育する以外は、疾患の原因遺伝子を標的とした改変試薬(アンチセンス核酸、相同組換え遺伝子、など)を卵細胞に導入してトランスジェニック動物として作製されてきた。したがって人為的に疾患モデルを作製する出発点は、その原因遺伝子の究明であり、実際、今日までに約 4,000 個の遺伝子が疾患原因遺伝子あるいは疾患関連遺伝子として同定されている[1-3]。しかし、疾患の原因遺伝子が特定の

一つの遺伝子であるとは限らず、また、逆に、特定の遺伝子の異常が、異なる疾患の原因になっている場合もあると考えられる。さらに、異常遺伝子が同じでも、その転写レベル、翻訳レベルまで同じとは限らず、したがって、遺伝子構造の違いだけでは疾患との関係を論じられない場合も多くあると予想される。



図1 疾患モデル細胞の基本的考え方

このような観点から、疾患から遺伝子を究明するのではなく、その逆の調べ方、すなわち、配列既知の遺伝子を改変した場合にどのような疾患の症状が起こるかを網羅的に調べることも極めて重要であると認識されている(図1)。遺伝子操作による表現型の変化は、個体レベルのみならず、細胞レベルに関しても重要であることが認識されつつある。

網羅的に cDNA 情報が得られても、その一つ一つを改変した細胞を網羅的に創製することは容易ではない。膨大な数の遺伝子改変細胞を簡便迅速に創製できるようにできないか。同時に複数の遺伝子を改変したり、逆に新規遺伝子を導入する際にその導入量を変化させたり、想定される遺伝子改変条件を考慮すると、マイクロ

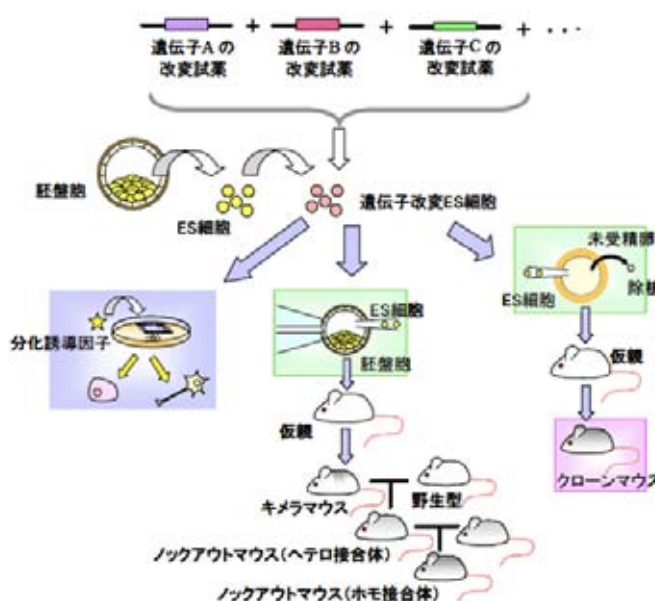


図2 単一細胞から個体作出に至る細胞操作技術の全貌

インジェクションを基本とした直接導入法が最適である。さらに、このような発想で創製される細胞群が、実際、薬剤や治療法の開発にも利用できるような疾患モデル細胞になりうるか、ということ在具体例で示すことが必要である。そこで、単一細胞の遺伝子改変を出発点として、これを組織に分化、成長させ、さらに個体作出にいたるまでの細胞操作技術の開発、細胞機能解析、などを行うことが必要である。図2は、現在進めている単一細胞から個体作出にいたる細胞操作技術の全容である。そこで、我々は、ES細胞において疾患関連遺伝子の機能を阻害した「疾患モデル細胞」を創製することを究極の目的としている。

本稿では、ES細胞の遺伝子改変法として、複数の遺伝子改変試薬を同時に導入することができるマイクロインジェクション法に着目しこれを高効率化する試みと、疾患として糖尿病に着目し、糖尿病関連遺伝子として選んだ8種類の遺伝子におけるノックダウン ES細胞の開発について述べることにする。

2. 単一細胞操作支援ロボットの開発のコンセプト [4]

マイクロインジェクション法は、遺伝子改変試薬のみならず、抗体、細胞活性分子やイオンなど様々な物質を細胞に導入するために極めて有用な方法である。特に、それらの複数の成分を定量的に導入できること、また導入するタイミングも任意に決められることなど他に勝る方法はない。しかし、マイクロインジェクション法は煩雑で熟練を要するため、単位時間に導入できる細胞数が極めて少なく、従来およそ実用的な方法とは考えられなかった。

マイクロインジェクションの作業の流れを、接着性細胞の場合に即して説明する。図3に示すように、顕微鏡を覗きながら行う作業 (on-microscope operation; On-MO) と、顕微鏡から目を離して行う作業 (off-microscope operation; Off-MO) が複雑に組み合わさっていることが理解していただけると思う。

はじめは対物レンズの高さ(Z)調節による焦点合わせであるが、粗動による高さ調節はOff-MOであるが微動による焦点合わせはOn-MOである。次は細胞の選択である。ステージを操作して、適当な細胞が視野中心に来るようにするが、これもOn-MOである。次は、インジェクション用のキャピラリーの操作である。キャピラリー先端が顕微鏡視野に収まる位置にくるように見当をつけるために、はじめはOff-MOである。見当をつけたら、On-MOに切り替えてキャピラリー先端を視野に入るようにし、さらに細胞に近接させる。こうして、いよいよ刺入作業になる。細心の注意と操作を要求される。刺入したらその状態で加圧して遺伝子などの導入をする。これで、細胞一個の操作が終了する。引き続き次の細胞の選択に移る。

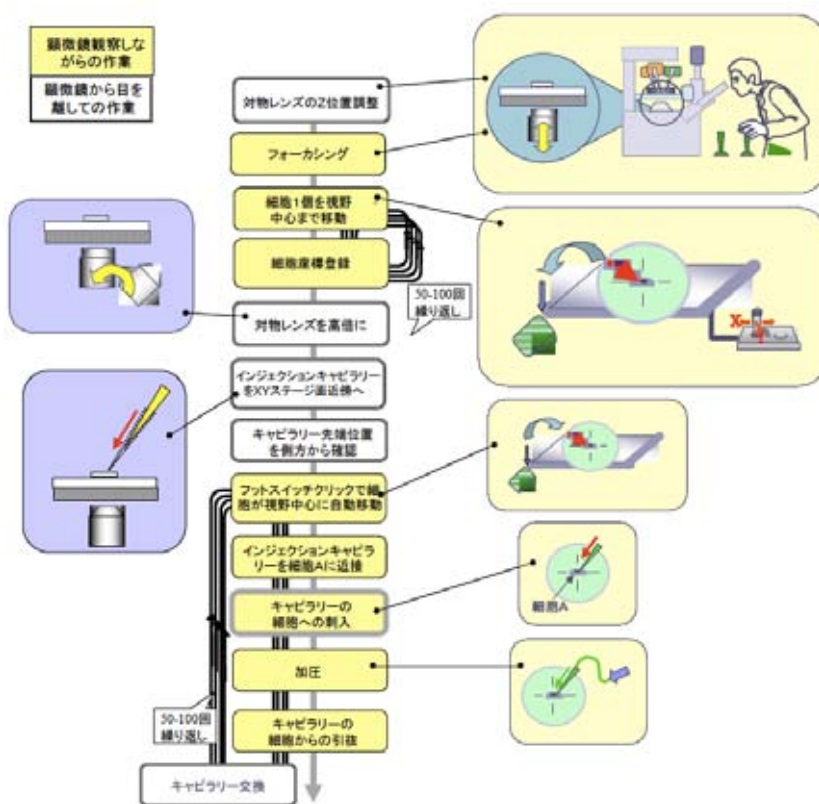


図3 マイクロインジェクションの作業の流れ

こうして、Off-MOとOn-MOを繰り返しながら、何百個の細胞へのインジェクションを行う。時間もかかるし集中力も要求される過酷な作業である。どうしたら、これを軽労化できるか？その答えが、「インジェクションのみに集中できるように、それ以外の作業をできるだけ自動化、半自動化する」、という考えであった。この発想に基づいて構築されたものが、単一細胞操作支援ロボット (Single-cell Manipulation Supporting Robot; SMSR) である(図4)。



図4 単一細胞操作支援ロボット(SMSR)

SMSRはオートステージと1対の3次元マニピュレーターの操作を手元のジョイスティックで集中制御できるようになっている。駆動スピードも実際の細胞実験に基づいて適切なスピードレンジへの切り替えが手元スイッチで出来るようになっていて、インジェクション時のキャピラリー先端のプレを極力押さえ、刺入時のキャピラリー先端の動きが実験者の手の動きを鋭敏に反映するように設計されている。また、細胞の位置座標登録機能も新規開発された。そのためにはディッシュごとに、基準座標を設けておく必要があるので、図5のようなチップを作製してディッシュ底面に接着した。このようなディッシュを使用することによって、各細胞の座標が登録され、一旦、顕微鏡ステージから降ろして培養した後、再び顕微鏡観察する場合でも、各細胞を瞬時に視野中心に持ってくる事が出来る。1ディッシュあたり512個の細胞座標を登録することが出来る。

連続してインジェクションする場合は、フットスイッチをクリックする度に、次々に細胞が視野中心に来るので、実験者はその細胞へのインジェクション作業のみに集中することが出来る。その結果、1時間で100~200個の細胞へのインジェクションがリズムカルにできるようになった。また、TVモニター上の細胞リストの細胞番号、あるいはディッシュイメージ上の細胞マークをマウスでクリックすると、順番に関係なく、その細胞が視野中心に来る。そのような操作モードに必要な細胞だけへのインジェクションもスピーディにできる。さらに、インジェクション時の条件や刺入状況などを、細胞ごとにメモしておくことが出来るようになっている。

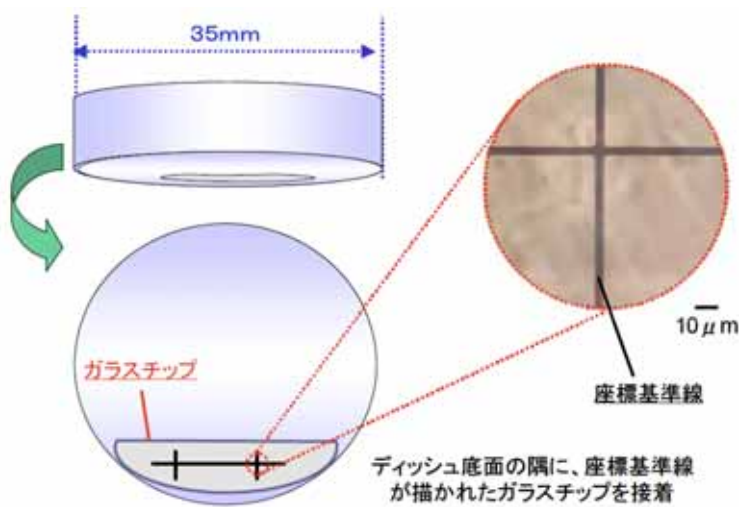


図5 ディッシュ固有座標系の設定法

3 . SMSR によるマウス ES 細胞への高効率マイクロインジェクション [4-6]

SMSRを使用することで、接着性の細胞へのマイクロインジェクションを行ったところ、従来、1時間に高々数個しかインジェクションできなかったことが、1時間で100個の細胞にインジェクションできるようになり、従来に比べ20~30倍高速に処理できるようになった。また、マウスES細胞へpCMV-EGFP(CMVプロモーターをもつ緑色蛍光タンパク発現ベクター)あるいはpCAG-EGFP(CAGプロモーターをもつ緑色蛍光タンパク発現ベクター)インジェクションしたところ、インジェクションから24時間後の遺伝子発現が約20%という高い発現率を得ることができた。

疾患モデル細胞の開発には、同時に複数遺伝子の導入が必要である。そこで次に、マウス ES 細胞へ2つの遺伝子の同時導入を試みた。導入する遺伝子として、EGFP と DsRed を用いた。プラスミド pCAG-EGFP、pCAG-DsRed の混合溶液(DNA 濃度はそれぞれ、50 ng/μl)を、インジェクション用ガラスキャピラリーに充填しインジェクションを行い、24 時間後に顕微鏡により観察した。その結果、図6に示すように、プラスミド pCAG-EGFP、pCAG-DsRed の混合溶液を同時導入することができ、かつ、導入された遺伝子が機能したことが確認できた。pCAG-EGFP の発現による蛍光は、細胞全体で均一に観察され、一方、pCAG-DsRed の蛍光は、細胞全体で観察されたものの、細胞内の一部において、特に強い蛍光が観察された。これは発現した蛍光タンパク質が細胞内の特定部位に局在する傾向にあることを示している。

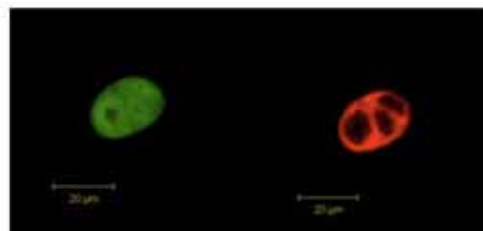


図6 マウスES細胞に対する2種類遺伝子の同時導入に伴う遺伝子発現

以上の結果より、ES 細胞に対しても複数遺伝子の同時導入が可能であることが示された。

4. 定量的遺伝子導入 [7]

同様に EGFP を導入する遺伝子として用い、マウス ES 細胞への定量的遺伝子導入を検討した。実際にはプラスミド pCAG-EGFP (DNA 濃度は 1 ~ 100 ng/μl) を、インジェクション用ガラスキャピラリーに充填し、各条件につき 100 個の ES 細胞へ加圧法によりインジェクションを行った。24 時間後に顕微鏡により観察した。その結果、図7に示すように、最適加圧条件下でプラスミド pCAG-EGFP を導入したところ、各コロニーにおける蛍光強度は、キャピラリー内の DNA 濃度に依存して、増加することがわかった。1

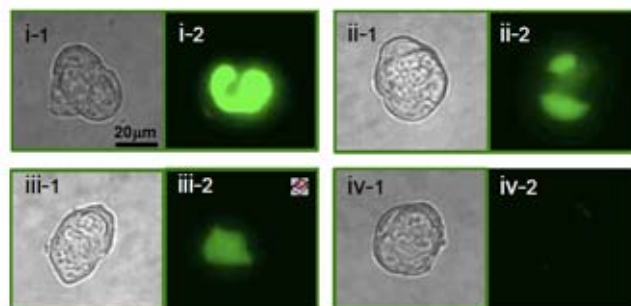


図7 マウスES細胞に対するEGFP遺伝子の半定量的発現
DNA濃度は、(i)100, (ii)50, (iii)10, (iv)1 ng/ml.
(i-1 ~ iv-1)位相差像、(i-2 ~ iv-2)蛍光像

ng/μl の DNA 濃度の場合でも、わずかに EGFP の蛍光を確認することができた。その蛍光強度は、100 ng/μl の DNA 濃度の場合の 1/50 程度であった。以上のことから、キャピラリー内の DNA 濃度をコントロールすることで、半定量的に遺伝子発現を制御できる可能性を示した。

5. 糖尿病関連遺伝子を標的としたノックダウン ES 細胞の開発

糖尿病関連遺伝子として、IRS-1 (インスリン受容体の基質)、IRS-2 (インスリン受容体の基質)、Pdx-1 (インスリン遺伝子の転写に關与する転写因子)、Glucokinase (GK) (解糖系の律速酵素)、Kir6.2 (ATP 依存性カリウムチャネルを構成するサブユニットでありインスリン分泌に關与)、SHP (肥満の原因遺伝子)、HNF-1α (転写因子)、HNF-1β (転写因子) の 8 種類を選んだ。ICR マウスの肝臓および心臓から RNA を精製したのち、各遺伝子に特異的なプライマーを用いて、RT-PCR を行い、8 種類の遺伝子をクローニングした。配列を確認後、CAG をプロモーターとし EGFP を有するプラスミドにインサートして ES 細胞導入用のプラスミドを構築した。構築された各プラスミドをエレクトロポレーション法により ES 細胞に導入し、EGFP を均一に恒常的に発現している ES 細胞を選択した。これにより、RNAi 法においてより高い発現阻害を示す siRNA 配列を検索することが容易に行えるようになる。

次に、8 種類の遺伝子それぞれをターゲットとした数種類の siRNA 配列を設計し、リポフェクション法により、上記で作製した ES 細胞内に導入し、EGFP の蛍光強度の変化からその RNAi 効果を検討した。その結

果、各遺伝子について高い RNAi 効果を持つ siRNA 配列を1つずつ確認することができた。これらは、作用させる siRNA の濃度に依存して効果が大きくなり、100 nM で 80% 程度の発現阻害を示した。同様な結果は、半定量 PCR によっても確認された。

そこで、最も高い阻害効果を示した siRNA 配列を決定した後、さらに、H1 プロモーターを持つ siRNA 発現ベクターの構築を行い、ES 細胞へ導入し、持続的な RNAi 効果を有する ES 細胞の樹立を試みた。その結果、siRNA を作用させたときのノックダウン率と同程度のノックダウン効果を示さなかった遺伝子もあったが、どの遺伝子についても、ある一定の阻害効果を有する ES 細胞を樹立することができ、その阻害効果は 30% ~ 90% であった(図8)。

そこで、さらにノックダウン効果が見られた細胞株のうち、Pdx-1 と Kir6.2 ノックダウン ES 細胞について、ES 細胞からインスリン産生細胞へ分化誘導させた。つまり、ES 細胞を 4 ~ 5 日浮遊培養を行い胚様体を形成させた。形成した胚様体を 2 日間接着培養後、4 ~ 7 日間ネスチン陽性細胞を選択増殖させた。選択された細胞を B27、KGF、EGF、bFGF、ニコチンアミド添加 N2 培地で 6 ~ 8 日間培養し、膵島様クラスターを形成させインスリン産生細胞へと分化させた。その結果、

どちらの場合も、インスリン産生細胞へ分化させることができ、RT-PCR 法により遺伝子発現阻害効果を調べたところ、ES 細胞でノックダウンさせた効果を持続してインスリン産生細胞へ分化したことがわかった。

さらに、Pdx-1 遺伝子と IRS-1 遺伝子を同時にノックダウンさせたダブルノックダウン ES 細胞も作製し、これをインスリン産生細胞へ分化誘導させてノックダウン効果とインスリン分泌能を調べた。Pdx-1、IRS-1 に対する

2 種類の siRNA 発現ベクターを導入した細胞株を分化誘導したところ Pdx-1 遺伝子、IRS-1 遺伝子共に最大約 65% のノックダウン効果がみられた。また、膵臓特異的な遺伝子発現の低下、インスリン分泌量の測定や免疫染色(図9)から膵機能の低下が示され、更に各遺伝子のノックダウン効果の組み合わせが異なることにより膵機能の低下に差がみられた。

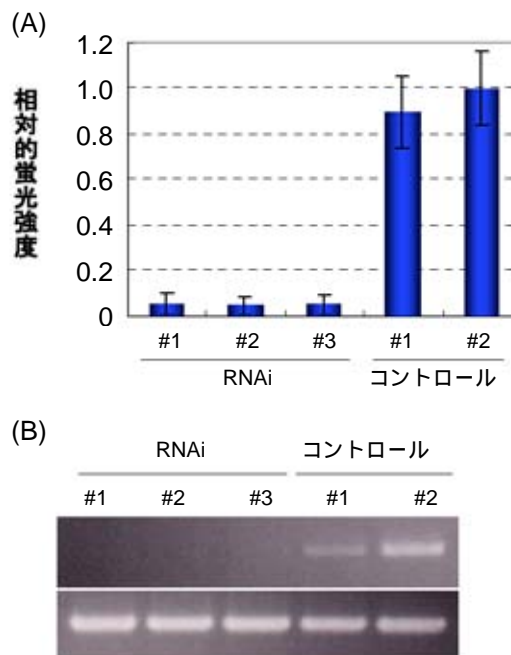


図8 siRNA発現ベクター導入によるKir6.2遺伝子発現阻害 (A)EGFPの蛍光強度変化 (B)RT-PCRによる発現量の比較

る 2 種類の siRNA 発現ベクターを導入した細胞株を分化誘導したところ Pdx-1 遺伝子、IRS-1 遺伝子共に最大約 65% のノックダウン効果がみられた。また、膵臓特異的な遺伝子発現の低下、インスリン分泌量の測定や免疫染色(図9)から膵機能の低下が示され、更に各遺伝子のノックダウン効果の組み合わせが異なることにより膵機能の低下に差がみられた。

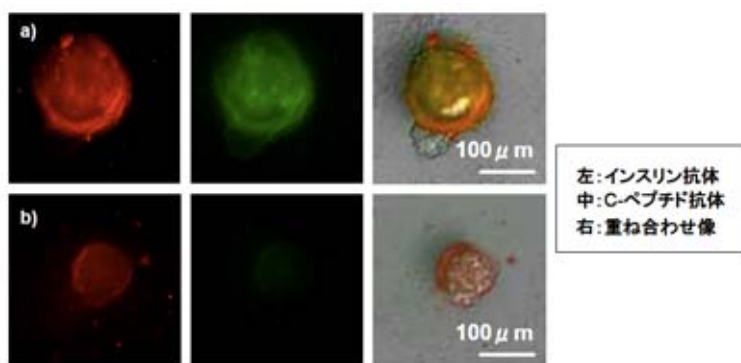


図9 ダブルノックダウン細胞のインスリン産生細胞における免疫染色像 a)コントロール b)ダブルノックダウン株

6. おわりに

筆者は、もともと植物細胞を用いた単一細胞研究を行ってきた。その過程で、マイクロインジェクションは基本的な実験手段であった。先人が行ってきた方法を習って、ひたすら注意深さと根気で実験を重ねてきたものの、再現性のあるデータを十分量蓄積することは、至難の業であった。さらに、2、3年前から ES 細胞が新たな標的細胞となったが、ここに至って、マイクロインジェクションは絶望的に思われた。それでも、この方法論が持つ潜在的な有用性は捨てがたく、何とか実用的レベルに出来ないか、と考え、現在に至って

る。これらの技術を駆使して、ES 細胞を用いて遺伝子を様々に改変した疾患モデル細胞を開発することができれば、それらを用いて、種々の組織細胞へ分化させることも可能となり、また、個体を作出することもできるなど、再生医工学への応用が期待できる。

参考文献

- [1] M. R. Capecchi, *Science*, **244**, 1288-1292 (1989).
- [2] T. J. McHugh, K. I. Blum, J. Z. Tsien, S. Tonegawa, and M. A. Wilson, *Cell*, **87**, 1339-1349 (1996).
- [3] H. Shibata, K. Toyama, H. Shioya, M. Ito, M. Hirota, and S. Hasegawa, *Science*, **278**, 120-123 (1997).
- [4] H. Matsuoka and M. Saito, *Electrochemistry*, **74**, 12-18 (2006).
- [5] H. Matsuoka, T. Komazaki, Y. Mukai, M. Shibusawa, H. Akane, A. Chaki, N. Uetake, and M. Saito, *J. Biotechnol.*, **116**, 185-194 (2005).
- [6] H. Matsuoka, S. Shimoda, Y. Miwa, and M. Saito, *Bioelectrochemistry*, **69**, 187-192 (2006).
- [7] H. Matsuoka, S. Shimoda, M. Ozaki, H. Mizukami, M. Shibusawa, Y. Yamada, and M. Saito, *Biotechnol. Lett.*, **29**, 341-350 (2007).



内外の表面の異なる脂質ナノチューブ とそのホスト - ゲスト科学

産業技術総合研究所
界面ナノアーキテクニクス研究センター

増田光俊

(m-masuda@aist.go.jp)



1. はじめに

分子の自己集合はボトムアップ型の構造構築手法の一つである。私は脂質分子の自己集合によってナノファイバーやナノチューブなどのナノ構造の構築を研究してきた。このナノチューブは名前の通り数nm～数百nmの中空シリンダー構造を内部に持つ。さらにこのナノ空間はチューブ両端で外空間とつながっており、これが閉じたナノ空間を有するベシクルにはない特徴である。現在、当研究センターではこれらのナノチューブを「ホスト」、バイオ系高分子を「ゲスト」とした応用研究を目指している。今回は、脂質ナノチューブの背景と我々の構築してきた内表面と外表面の異なる脂質ナノチューブの特徴、その利用について紹介する。

2. 脂質ナノチューブの歴史と研究背景

ナノチューブといえば1991年に報告されたカーボンナノチューブ(CNT)¹を想像する人が多い。しかし、歴史的には脂質分子が自己集合してナノチューブ(脂質ナノチューブとよぶ)を形成することが、これにさかのぼる1984年に日米の3グループ²⁻⁴でほぼ同時に報告されている。当初からナノ構造の鑄型や薬剤の徐放性など内空間の利用に対する期待があったが、脂質ナノチューブを形成可能な脂質が数種類に限られるために関連研究は多くなかった⁵。ところが近年、ナノテクノロジーの趨勢とともに再び注目を集めている⁶。有機化学の手法でナノチューブのサイズや特性を制御可能できること、また高い生体適合性や生分解性が期待されることなどのCNTにはない特徴をもつためである。

ナノチューブの内空間はバイオ系高分子に魅力的なサイズをもっている。すなわち自己集合に用いる分子の構造やpHなどの自己集合条件によって、その内径を約10 nm～1000 nmくらいの領域で制御できる。またこの領域にはタンパク質(約3-20 nm)、DNA(幅2 nm, 長さは任意)、ウイルス(約20-300 nm)などの興味深いゲストが分布する。

脂質ナノチューブの形成メカニズム:細胞膜の構成要素である脂質分子は、二分子膜構造からなる球状のベシクルを形成する。ある脂質ではこのベシクルをゲル

液晶相転移温度($T_{gel-liq}$)以下に冷却すると、固体状態のテープやねじれをもつヘリカルコイル構造に変化し、最終的にナノチューブを与えることがある。これを再加熱して液晶状態にすると、可逆的に元のベシクルに戻る(図1)。ではどのような脂質分子がこの様なナノチューブ構造を形成するのであろうか? その第一の要素は水素結合やスタッキングなどの一次元的な分子間相互作用である。これによりテープなどの高軸比のナノ構造形成を促進する。

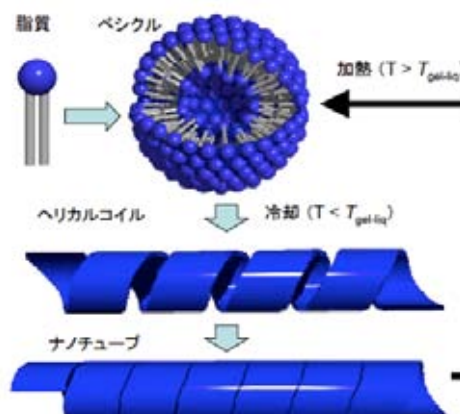


図1 脂質のつくる自己集合構造と形態変化。

第二の要素は不斉炭素などの分子のキラリティである。これは分子が並列して膜状に集合する際、同一方向に少しずつねじれを与えて膜の湾曲を生じる⁶。この湾曲がヘリカルコイル構造を誘起し、さらに巻き上がりながら成長してナノチューブに収束すると考えられている。このメカニズムについての理論的な研究も行われているが、液晶の弾性体理論に基づくベクトル的な解析手法であるため、実際にどのような分子構造がナノチューブを形成するのかという化学構造との関連性については未だ不明の点が多い。

3. くさび形脂質が形成する内外表面が異なる非対称脂質ナノチューブ

我々はゲスト包接によるナノバイオ応用に向けて、内表面を機能化できる、つまり内外の表面が異なる脂質ナノチューブ(「非対称脂質ナノチューブ」と呼ぶ)の構築を目指した。後述するように分子の形とその配列制御が非対称脂質ナノチューブ形成の鍵となる。従来の脂質ナノチューブではチューブ内外の表面が同じ官能基で被覆されているために表面選択的な機能化は困難であった。そこで非対称脂質ナノチューブを構築するために、くさび形を有する脂質を利用することを考えた(図2)。もし分子が図のように平行にパッキングすれば、二

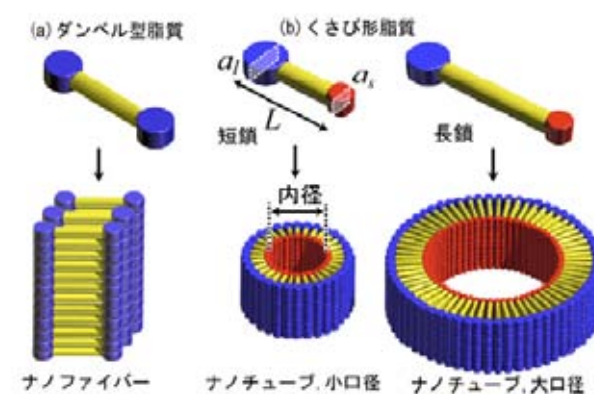


図2 ダンベル型脂質とくさび形脂質とその自己集合でできるナノファイバーと非対称脂質ナノチューブ。

つの親水性の頭部のサイズの差によって膜が自発的に湾曲し、最終的にはチューブ構造を形成するはずである。このようなくさび形状の分子を用いたナノチューブ形成の例としては、我々の知る限り2例しかなかった^{7,8}。またこれらの研究には分子パッキングの実証がなく、チューブ状構造が得られることを報告しているだけであった。天然にはこのようなくさび形を利用してチューブ状構造を構築している例がある。タバコモザイクウイルスのつくるナノチューブである。このウイルスはRNAを鋳型として、その周囲にくさび形のタンパク質が巻き上がってチューブ状構造を構築している。チューブ内表面にはタンパク質由来のアスパラギン酸、グルタミン酸といったアニオン性残基が、外表面にはリジンやアルギニンなどのカチオン性残基が偏在する非対称ナノチューブである。この内空間を鋳型として用いた無機ナノロッドの構築例も報告されている^{9,10}。

実際の分子デザインには我々の研究背景であるダンベル型脂質の自己集合ナノファイバーの構築が参考となった¹¹。ダンベル型脂質はアルキル鎖の両端に嵩高い糖残基を持つ脂質分子であるため、片側の糖残基を取り除けばくさび状になる(図2)。このような単純な発想・デザインに基づいてくさび形の糖脂質 $1(n)$ ($n = 12, 14, 16, 18, 20$)の自己集合を検討した結果、期待通りチューブ状構造を形成することを見いだした(図3)。実際の自己集合は脂質分子を水中で加熱溶解後、徐冷するといった簡単な操作である。得られたナノチューブは単結晶ではないため、精密な分子パッキングの解明はできない。しかしナノチューブを構成している単分子膜の繰り返し周期の厚さと分子の長さを比較することで、分子の平行・逆平行などのパッキングを区別できた。これらはそれぞれ粉末X線回折や分子モデルから簡便に見積もることができる。解析の詳細は割愛するが、ご興味があれば文献を参照されたい¹²。最終的に自己集合によって目的通りに分子が配列し、内部にカルボン酸が、外表面に嵩高いグルコース残基が配列した構造をもつことがわかった。また内表面を向くべき官能基をカルボン酸からアミノ基に換えた脂質2でも自己集合により同様なパッキングをもつナノチューブを与えることが可能であり¹³、内表面がアニオン性あるいはカチオン性の両タイプの非対称脂質ナノチューブが構築できた。

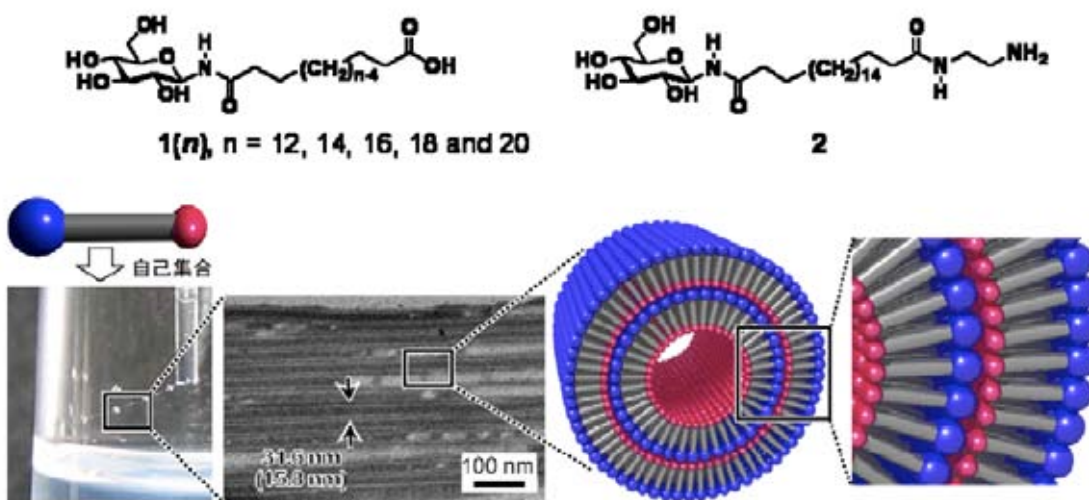


図3 くさび形脂質の構造式と自己集合によってできる非対称脂質ナノチューブの TEM 像とチューブ内での分子パッキング。

くさび形脂質1(*n*)が形成する非対称脂質ナノチューブでは、分子のくさび角を変えるという新しいアプローチで内径制御ができる(図2)。これはゲストのサイズにあわせてチューブ内径を精密に制御できるという点で非常に重要な意味をもつ。くさび状脂質が図2のようなパッキング構造を持っていれば次の様な式を用いることでチューブ内径が規定できる。すなわち二つの親水部の断面積 a_l と a_s とその分子長 L から

$$\text{内径 } D = 2 a_s L / (a_l - a_s)$$

のように表される。実際には分子長 L を変えるために脂質のメチレン鎖を伸長させたところ、ある鎖長範囲では炭素2個あたり平均内径で約 1.5 nm ずつ内径が増加することがわかった(図4)。従来、分子の形から得られるチューブの内径を予測することは非常に困難であったが、この非対称脂質ナノチューブでは上述の数式からある程度予測可能となり、チューブ内径に注目した分子設計が可能となった。

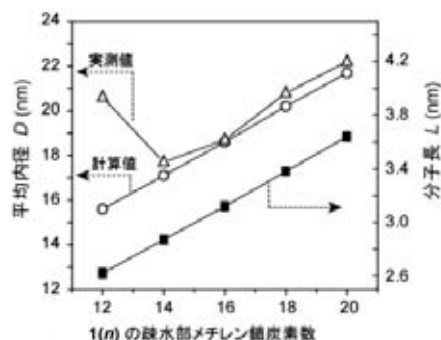


図4 くさび形脂質1(*n*)のつくる脂質ナノチューブの内径とその予測。

分子配列の制御手法: 多くの自己集合系では、分子のパッキングの多様性(多形とよぶ)に由来する様々な自己集合体の混合物を与え、しばしば問題となる。本系においても同様な現象が見られたが、自己集合前の固体中での分子の配列を制御することで、選択的に非対称脂質ナノチューブを得られることがわかった。具体的には、脂質2を有機溶媒に溶解・除去する前処理によって目的の分子パッキングをもつ固体にした。次に改めてこれを水中で加熱冷却して自己集合させることで、必要なナノチューブ構造を定量的に得ることができた(図5)¹⁴。この理由として、くさび形脂質の場合、集合体の膜構造が流動状態(液晶状態)になっても、分子の反転(フリップ フロップ)が起こりにくい特徴をもつ。つまり前の状態を履歴として保持しているのである。このため、このような初期状態の反映が可能となり配列制御ができたのである。

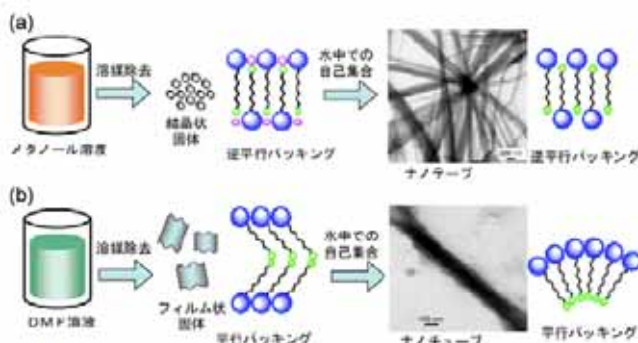


図5 (a)メタノールおよび(b)DMF から得た脂質2の固体中のパッキングと水中での自己集合によって得られる形態。

4. チューブを使ってみる、調べてみる

次にこの非対称脂質ナノチューブを宿主、タンパク質やDNAなどのバイオ系高分子をゲストと見立てた新規なナノメートルスケールの宿主-ゲスト科学への展開について述べる。目指す応用像のひとつは、例えばマイクロ流路分析をさらに小型化した一本のナノチューブ内で分析をすることである(図6)。このためには、(1)非対称脂質ナノチューブへの積極的かつ選択的なゲストの内包化と(2)その検出、また(3)ナノチューブ内空間の特性の解明が必要となる。そこで、得られた非対称脂質ナノチューブを使って以上の3課題についての研究を行った。

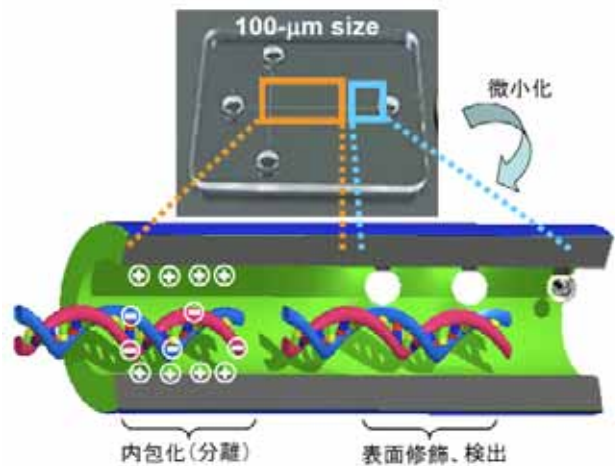


図6 脂質ナノチューブを使った分離分析デバイスのイメージと研究要素。

すでに無機ナノチューブ^{15,16}や流動性の脂質ナノチューブを用いて¹⁷、ナノ流路での分析を目指すという例も報告されている。前者は疎水性の内壁を親水性に変換する必要がある。また後者はネットワークを容易に形成できる特徴を持っているが、流動性のある柔らかいチューブのため比較的不安定であった。

ナノチューブへのゲストの取り込み: 正および負の内表面をもつ非対称脂質ナノチューブを用いることで、ナノチューブへのゲスト内包化にはチューブ内表面との静電引力が不可欠であることがわかった。用いた非対称脂質ナノチューブは、中性付近でアニオン性の内表面をもつNT20-(-)¹²、カチオン性内表面を持つNT80-(+), NT20-(+)^{13,14}である。この数字と符号は内径サイズと中性での内表面電荷を表している。ゲストとして用いた鉄貯蔵タンパク質のフェリチンやその誘導体でDNAと結合するタンパク質(DPS)は、中性付近でそれぞれマイナスあるいはプラスの表面をもつ(表1)。これらのタンパク質分散液にナノチューブ分散

表1 非対称脂質ナノチューブ群とそのゲスト包接挙動(NTの後の数字はチューブ内径(nm)、括弧内は中性付近での表面電荷を表す。ゲストに関しても同様。また各カラムのナノチューブとゲストの組み合わせは下図のTEM像と対応している)。

ナノチューブ	NT80-(+)	NT80-(+)	NT20-(+)	NT20-(+)	NT20-(-)	NT20-(-)
ゲスト	フェリチン(-)	DPS(+)	フェリチン(-)	DPS(+)	フェリチン(-)	DPS(+)
内包化	○	×	○	×	×	○

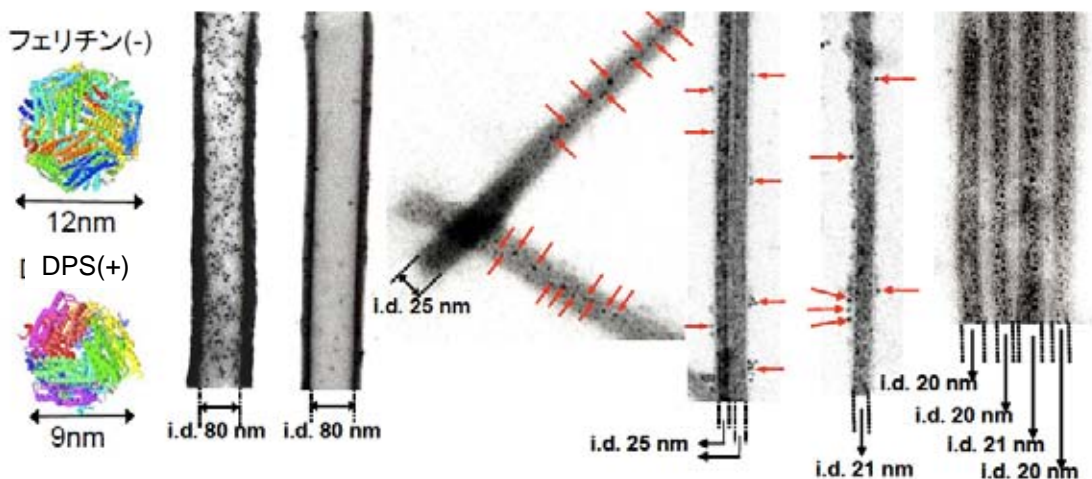


図7 TEM観察によるゲスト内包化の評価。チューブとゲストと組み合わせは表1に対応している。

液を混合した後、TEM観察により内包化特性を検討した。

TEM像からわかるようにナノチューブ内表面とは反対の電荷をもつゲストタンパク質が効率的に取り込まれており、静電引力が支配的であることが明らかである(図7)。逆に同符号のホスト-ゲストの組み合わせでは静電斥力のため内包化が起こらない。ちなみにTEM像で見えている黒いドットがフェリチンやDPSの内部の酸化鉄コアであり、TEM像では見えないがコアの外側にタンパク質の外殻が存在する。タンパク質以外ではDNAもカチオン性のナノチューブに静電引力によって取り込まれることを確認しており、遺伝子ベクターとしての応用も興味深い。

これまでも電荷を持たない脂質ナノチューブへのタンパク質の内包化が試みられたが、毛細管現象以外に有効な手段はなかった¹⁸。つまりナノチューブを凍結乾燥して内部の水を完全に除去した後、ゲスト分散液を添加することで初めてゲストの内包化が可能であった¹⁸。今回の非対称脂質ナノチューブでは、単にナノチューブとゲストタンパク質の各々の分散液を混合するだけで、静電引力により効率的かつ選択的な内包化が達成できた。詳細は検討中であるが、ナノチューブへの内包化特性は、このような研究を通じてはじめてわかってきたことである。今後これらの特性をうまく利用することによって、インテリジェントなDDSや遺伝子ベクターとしての応用が期待される。

タンパク質をナノ空間に閉じこめる関連研究では、無機材料であるメソポーラスシリカ¹⁹やシリカゲルナノ空孔²⁰への酵素の内包・安定化などの研究が挙げられる。これらに対して脂質ナノチューブは生体材料である脂質からなり、より細胞内の環境に非常に近い状態となるため、さらにタンパク質を安定化できると考えられる。また孤立分散系であるという特徴も持つ。

チューブ内表面の修飾: アミン性のくさび形脂質2が形成するナノチューブは内表面に反応性の高いアミノ基を持つため、様々な官能基(プローブ)を選択的に導入することが可能である。例えば、アミンと反応して初めて蛍光性となる蛍光物質前駆体のNBD-Fをこのナノチューブに添加すると、アミン性の内表面がNBDで修飾され、ナノチューブがNBD由来の蛍光を与える¹³。これまでに自己集合体への共有結合形成による修飾は、安定性などの問題からほとんどなされていなかったが、このナノチューブは安定性が高く、このような修飾が可能となることがわかった。

ナノチューブへの内包化の検出とナノ空間流体挙動: 上述の蛍光修飾ナノチューブ(蛍光ナノチューブ)へのゲストの内包化現象を、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)現象により可視化することに成功した。FRETとは、ある波長で励起された蛍光分子のそば(通常10 nm以内)に別の分子があって発光スペクトルと吸収スペクトルに重なりがあると、蛍光分子の励起エネルギーが別の蛍光分子へ移動する現象である。そこでゲストとして用いるフェリチンの表面に、NBDの蛍光をFRETで消光する色素(QSY)を修飾し、蛍光ナノチューブへの内包化を検討した(図8)。その結果、チューブ両端の開口部からQSY-フェリチンが徐々に中空シリンダー内に入り、チューブ内表面にあるNBDの蛍光をFRETによって消光することがわかった(図9、図中、右上の数字はQSY-フェリチン添加後の経過時間を表す)。

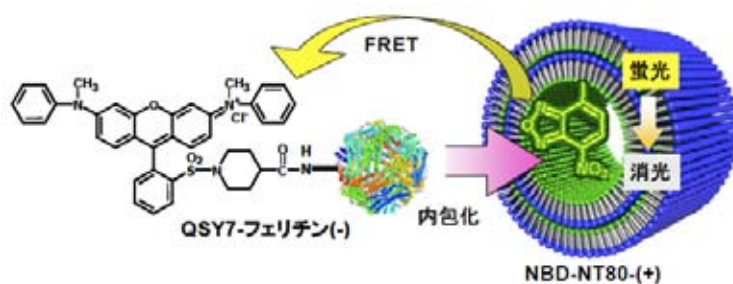


図8 蛍光ナノチューブと FRET によるゲスト内包化検出。

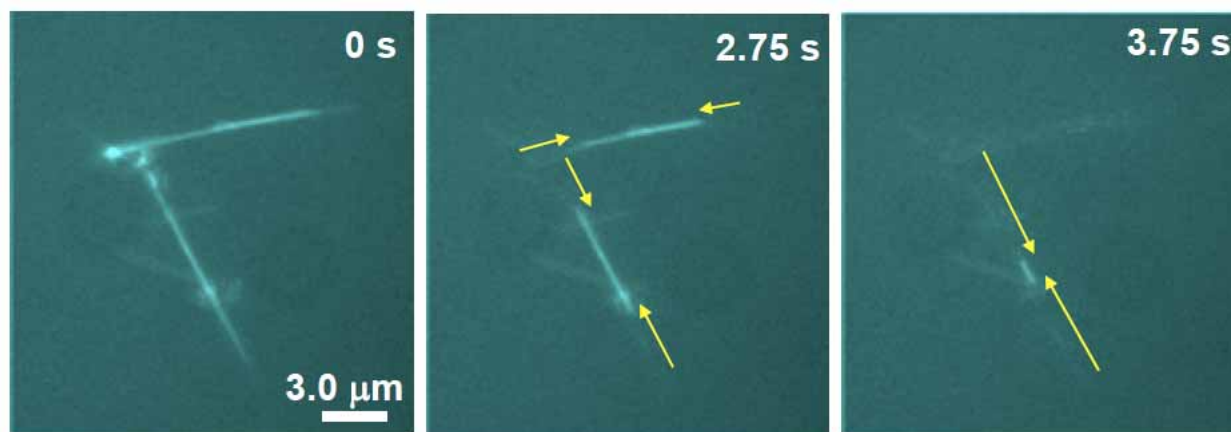


図 9. QSY-フェリチンの蛍光ナノチューブへの内包化と FRET によるその検出。

チューブへのゲスト内包化の可視化によって、ナノチューブ内部の空間では物質の拡散速度が低下するという興味深い物性がわかってきた。実際、消光の移動速度から見積もったナノチューブ内でのゲストの拡散係数は、バルク中の約 1 / 5 程度であった(表2)。由井らは蛍光色素を用いた別の研究により、チューブ内部の水はバルクの水とは異なり、粘性が上昇し極性がイソプロパノール程度まで減少することを報告している²¹。またIR分光法により、内表面から数nmの距離までの水分子が、表面の親水基と水素結合して氷状の構造に変化していることも明らかにしている²²。このようにナノチューブ内部の水の状態が変化しており、このために内包化されたゲストの拡散係数が低下したと考えている。現在、このようなナノチューブ内部の特性を積極的に生かした応用について検討中である。またゲストのサイズを変えると、アインシュタイン - ストークスの式に従ってその拡散速度が変化することがわかった。つまり、バルクの系と同様に小さな分子ほど大きな拡散係数を持ち、その大きさはゲストのサイズに反比例する。言い換えると、小さな分子ほど内部に取り込まれる速度が速くなる。詳細な検討はまだ行っていないが、ゲスト内包化におけるゲストやチューブのサイズ、塩効果、定量方法などまだまだ不明の点も多い。

表 2 各空間中でのゲストの拡散係数の違い。

ゲスト	空間の種類	拡散係数 (m ² s ⁻¹)
フェリチン (12nm)	チューブ内 (内径 80nm)	0.7X10 ⁻¹¹
フェリチン (12nm)	バルク水中	3.4X10 ⁻¹¹
金微ナノ粒子 (1.4nm)	チューブ内 (内径 80nm)	61.8X10 ⁻¹¹
ナノ微粒子 (30nm)	チューブ内 (内径 100nm)	0.9X10 ⁻¹¹ (理論値) ²³

5. 最後に

以上述べたようにナノチューブの内表面を制御することで、これまでにわからなかったゲスト内包化の一部を垣間見ることができた。しかし長さや配向、空間配置などの制御、さらには安価な物質からの大量合成などテイラーメイド化に向けた様々な課題が山積している。またナノチューブを使ったナノスケールホストゲスト科学については、始まったばかりであり不明な点が多い。

自分の研究は、いわゆるコテコテの自己集合である。つまりダンベル形脂質の形成するナノファイバーから出発したのだが、分子の形をかえることでナノチューブに出会い、さらに様々な制御を試みながらようやくここまで辿り着いた。「低分子の自己集合体の構築が何の役に立つのか？」とよく言われてきたし、自分でもしばしば問いかける疑問である。しかし、ここへきて従来にないユニークなナノ構造と特性を有するナノチ

チューブ構造が得られ、様々な分野融合が進み、新しい応用分野が生まれつつある。個人的にはバイオ分野への応用が興味深いのではと思っている。この研究紹介をきっかけに、生命化学の方との様々な出会い、新たな研究の出発があることを期待している。

6. 文献

- 1) S. Iijima, *Nature*, **354**, 56-58 (1991).
- 2) P. Yager and P. Schoen, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **106**, 371-381 (1984).
- 3) K. Yamada, H. Ihara, T. Ide, T. Fukumoto, and C. Hirayama, *Chem. Lett.*, 1713-1714 (1984).
- 4) N. Nakashima, S. Asakuma, J.-n. J.-M. Kim, and T. Kunitake, *Chem. Lett.*, 1709-1712 (1984).
- 5) J. M. Schnur, *Science*, **262**, 1669-1676 (1993).
- 6) T. Shimizu, M. Masuda, and H. Minamikawa, *Chem. Rev.*, **105**, 1401-1443 (2005).
- 7) J.-H. Fuhrhop, D. Spiroski, and C. Boettcher, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 1600-1601 (1993).
- 8) R. C. Claussen, B. M. Rabatic, and S. I. Stupp, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 12680-12681 (2003).
- 9) E. Dujardin, C. Peet, G. Stubbs, J. N. Culver, and S. Mann, *Nano. Lett.*, **3**, 413-417 (2003).
- 10) M. Knez, M. Sumser, A. M. Bittner, C. Wege, H. Jeske, T. P. Martin, and K. Kern, *Adv. Funct. Mater.*, **14**, 116-124 (2004).
- 11) T. Shimizu and M. Masuda, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 2812-2818 (1997).
- 12) M. Masuda and T. Shimizu, *Langmuir*, **20**, 5969-5977 (2004).
- 13) N. Kameta, M. Masuda, H. Minamikawa, N. V. Goutev, J. A. Rim, J.-H. Jung, and T. Shimizu, *Adv. Mater.*, **17**, 2732-2736 (2005).
- 14) N. Kameta, M. Masuda, H. Minamikawa, and T. Shimizu, *Langmuir*, **23**, 4634-4641 (2007).
- 15) J. Goldberger, R. Fan, and P. Yang, *Acc. Chem. Res.*, **39**, 239-248 (2006).
- 16) K. Jayaraman, K. Okamoto, S. J. Son, C. Lueckert, A. H. Gopalani, S. B. Lee, and D. S. English, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 17385-17392 (2005).
- 17) A. Karlsson, M. Karlsson, R. Karlsson, K. Sott, A. Lundqvist, M. Tokarz, and O. Orwar, *Anal. Chem.*, **75**, 2529-2537 (2003).
- 18) H. Yui, Y. Shimizu, S. Kamiya, I. Yamasita, M. Masuda, K. Ito, and T. Shimizu, *Chem. Lett.*, **34**, 232-233 (2005).
- 19) 高橋治雄, *ナノバイオテクノロジーの最前線*, シーエムシー出版: 東京, 2003; pp 113-124.
- 20) A. P. Minton, *J. Biol. Chem.*, **276**, 10577-10580 (2001).
- 21) H. Yui, Y. Guo, K. Koyama, T. Sawada, G. John, B. Yang, M. Masuda, and T. Shimizu, *Langmuir* **21**, 721-727 (2005).
- 22) T. Tsukahara, A. Hibara, Y. Ikeda, and K. Kitamori, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 1180-1183 (2007).
- 23) H. Brenner and L. J. Gaydos, *J. Coll. Int. Sci.*, **58**, 312-356 (1977).

7. 謝辞

本研究は、以下の産総研界面ナノアーキテクトニクス研究センターの方々を中心としたグループ研究としてなされている。すなわち清水敏美博士(産総研、界面ナノアーキテクトニクス研究センター長)や南川博之博士(同センター主任研究員)の指導・助言が必要不可欠であった。またアミン性ナノチューブ構築やナノチューブ応用に関しては亀田直弘博士(JST研究員)の優れたアイデアとその実践によってなされたものである。フェリチンタンパク質に関しては奈良先端科学技術大学院大学、山下一郎教授の協力をいただいた。以上の方々に深謝します。

気になった論文



池田 将(いけだ まさと) 京都大学工学研究科 助教
ikedata@sbchem.kyoto-u.ac.jp

この度は執筆機会を頂き感謝致します。2007年3月より京都大学工学研究科合成・生物化学専攻の浜地研究室の助教として研究中の池田将と申します。現在、超分子科学をベースに生命科学との融合を目指したマテリアルの創製に取り組んでいます。

超分子化学の領域では、生体の精緻な構造や機能を目指して、比較的小さな分子を設計し、分子集合体を組み上げ、その構造と階層化の解析および機能の評価を主流にしています。近年、このコンセプトをもとに、興味深い物性を示す様々な新規超分子マテリアルが構築されています。このような自由度の高い設計に裏打ちされた機能性超分子を、洗練された機能を有する生体分子および生体系と融合させるためには、デザインした超分子を水の中に持ち込む必要があります。しかし、超分子化学システムは、水中に限ると依然として選択肢が少なく未成熟であり(クラシカルなシステムの多くが水素結合をモチーフにしていたため)、改良と発展の余地が残されています。

今回は、「生命科学との融合を指向した水中での超分子化学」という視点で、最近の論文 3 報について概説させて頂きたいと思います。

Carbohydrate-Coated Supramolecular Structures: Transformation of Nanofibers into Spherical Micelles Triggered by Guest Encapsulation

J. H. Ryu, E. Lee, Y. B. Lim, and M. Lee

J. Am. Chem. Soc., **129**, 4804–4814 (2007).

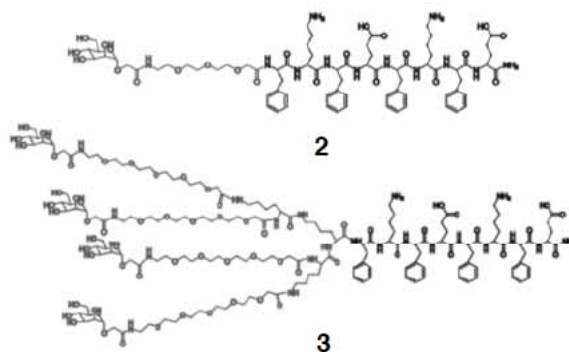
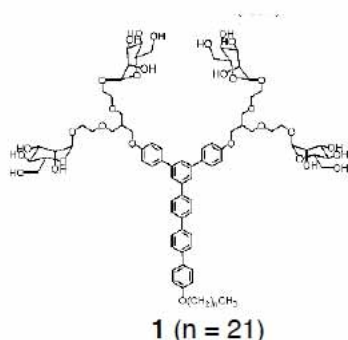
Glycoconjugate Nanoribbons from the Self-Assembly of Carbohydrate-Peptide Block Molecules for Controllable Bacterial Cell Cluster Formation

Y. B. Lim, S. Park, E. Lee, H. Jeong, J. H. Ryu, M. S. Lee, and M. Lee

Biomacromol., **8**, 1404–1408 (2007).

Myongsoo Lee教授は、韓国Yonsei大学の新進気鋭の研究者で、オリゴエチレングリコール鎖とオリゴフェニレンを様々な様式で連結し、水中での超分子集合体形成に関する研究を精力的に行っています。今回紹介する2報の論文では糖(マンノース)を修飾した自己集合性分子1 (*JACS*) および 2 と 3 (*Biomacromolecules*) を用いて、それぞれの水中における超分子集合体形成と大腸菌捕捉の検討を行っています。

まず、*JACS*の論文において、化合物1は、自己集合部位としてオリゴフェニレンを有しており、疎水相互作用に



よって直径8 nm、長さ数百nmのシリンダー型ミセルを形成することが、TEM(電子顕微鏡)観察およびDLS(動的光散乱)測定の結果から明らかになっています。興味深いことに、このシリンダー型ミセルは、Nile Red(色素分子)を加えると球状ミセルへと可逆的に形態を変化させます。彼らは Nile Red が疎水的な芳香族化合物であるため、化合物 1 の超分子集合体中におけるパッキングをルーズにすることが形態変化の駆動力であると考えています。

Concanavalin A(Con A)を用いた沈殿アッセイから、1のシリンダー型ミセル、球状ミセルは共にマンノースが高密度に集積しているため、マルチバレント効果により糖結合タンパク質と高い結合能を有する事を明らかにしています。そこで、これらの超分子集合体を、マンノース結合タンパク質(MBP)を鞭毛に有する大腸菌(ORN 178)に加えるという実験を行っています。その結果、鞭毛部分と特異的に相互作用することがTEM観察から明らかになっています(図1)。ネガティブコントロールとして、マンノースを有さない超分子集合体およびMBPを有さない大腸菌(ORN 208)を用いた実験を行い、その特異性を裏付けています。また興味深いことに、蛍光顕微鏡観察により大腸菌(ORN 178)の運動性を調べたところ、その大きさの違いから予想されるように、シリンダー型ミセルが球状ミセルより大腸菌の運動を抑制していることが明らかになっています。以上の研究結果をサイズの観点から観たとき、Con Aなどのタンパク質は糖を修飾した超分子ナノ構造の違いをほとんど識別しないが、大腸菌はその違いを認識していると言えます。

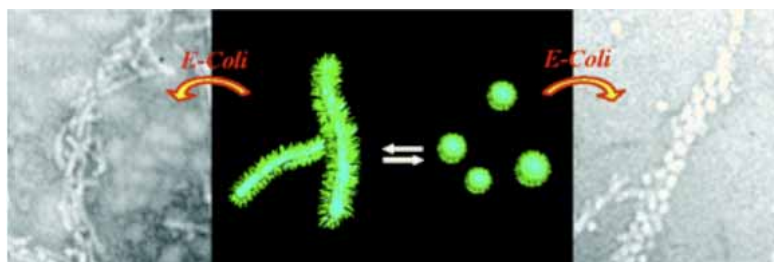


図1 化合物 1 の超分子集合体が大腸菌(ORN 178)の鞭毛に特異的に集積したTEM像

*Biomacromolecules*の論文では、自己集合部位として β シートを形成するペプチドを導入した化合物 2 および 3 を用いています。その構造解析の詳細は割愛しますが、化合物 2 は幅5 nm、長さmmオーダーの非常に長いファイバーを、化合物 3 は幅7 nm、長さ数十nmの短いファイバーを形成します。この長さの違いは、化合物の構造上の嵩高さの違いによると考察されています。先の論文と同様、これらの超分子集合体を大腸菌(ORN 178)と混合したところ、化合物2の長いファイバーはORN 178の鞭毛を架橋し、クラスターを形成することでORN 178の運動を抑制している事が顕微鏡観察から明らかにされています。これに対して、化合物 3 の短いファイバーはクラスターを形成することなく、運動の抑制も観測されていません。以上から、超分子構造の制御によりバクテリアの運動特性が制御可能であることが示されています。

これまでに糖を修飾した超分子としては、青山安宏先生らの糖修飾カリックスレゾルカレンや小林一清先生らの糖鎖修飾ポリマーを用いた研究など先駆的な例があります。また、最近では藤田誠先生らによる糖修飾ナノケージ(*JACS*, 2007, 129, 3816–3817)やKimoon Kim教授らによる糖修飾ベシクル(*JACS*, 2005, 127, 5006–5007)などが報告されています。今後、精巧な超分子材料に糖を修飾することで化学–バイオ融合領域におけるさらに面白い展開があるかもしれません。

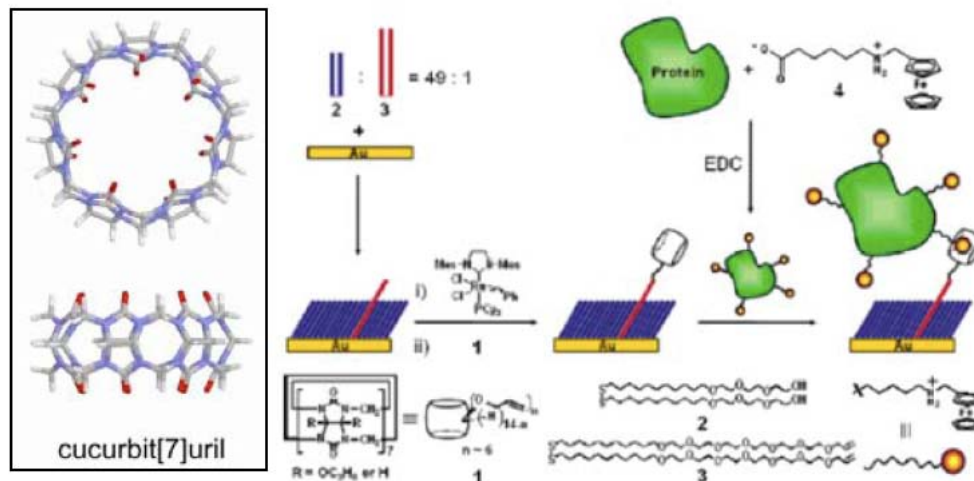
Noncovalent Immobilization of Proteins on a Solid Surface by Cucurbit[7]uril-Ferrocenemethylammonium Pair, a Potential Replacement of Biotin-Avidin Pair

I. Hwang, K. Baek, M. Jung, Y. Kim, K. M. Park, D. W. Lee, N. Selvapalam, and K. Kim

J. Am. Chem. Soc., **129**, 4170–4171 (2007).

最後に、同じく韓国から、Kimoon Kim教授のグループの報告で、Cucurbiturilを用いた研究を紹介したいと思います。

これまでにKimoon Kim教授のグループは、Cucurbiturilのもつ分子認識能を利用した美しい超分子を数多く報告しています。今回は、その分子認識能をタンパク質のTagとして利用することを提案しています。



彼らは、既にCucurbit[7]uril (CB[7])が、水中で極めて強くフェロセンメチルアンモニウム (FA)と結合すること($K_a \sim 10^{12} \text{ M}^{-1}$!)を明らかにしています。今回は、この結合がタンパク質の基板への固定化に利用できるかを検討しています。実際には、CB[7]をGrubbs触媒によって金基板の自己組織化単分子膜にアンカーリングさせ、タンパク質は、1-エチル3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC)でのカップリング反応によりフェロセンメチルアンモニウムで修飾しています。表面プラズモン共鳴 (SPR) からFAを修飾したグルコースオキシダーゼ (GOx) が特異的に基板に固定化されることを明らかにし、また、同時にその基板がグルコースセンサーになることも示しています。

現在、生体分子間もしくは生体分子・人工物質間のペアリング方法としてはビオチン-アビジン pairの利用が圧倒的なシェアを占めていますが、水中で進行するClick Chemistryが爆発的に広まったことから推測されるように、生命科学は、人工的な結合・相互作用を水中で特異的に行うことを切実に求めているように思います。本系をすぐに実用とはいかないかもしれませんが、今後このような成果の蓄積が新しい技術として生命現象解明の一役を担う可能性を信じています。

以上、いずれも精密な超分子化学に立脚しつつ、優れた研究成果と独自性をもとに生体系との融合を目指した研究であると思います。今後、水中での超分子科学の発展に伴い、生命科学との接点において実用化を目指し、より洗練されたシステムが創製されるものと期待できます。



山根 説子(やまね せつこ)

東京医科歯科大学大学院 生体材料工学研究所 有機材料分野 博士課程二年

syam-org@tmd.ac.jp

この度は生命科学研究レターへの投稿機会を頂き感謝いたします。私は東京医科歯科大学の秋吉一成教授のご指導のもと、ナノゲル/リン酸カルシウム複合材料の研究に従事しております。今回は磁性粒子を用いた有機/無機複合材料についての論文2報とヒドロゲルを用いた新規アレイの開発についての論文1報紹介させていただきます。

Encapsulated Magnetic Nanoparticles as Supports for Proteins and Recyclable Biomaterials

A. R. Herdt, B. S. Kim, and T. A. Taton, *Bioconjug. Chem.*, **18**, 183–189 (2007).

磁性粒子は磁場を利用したターゲティングやタンパク質精製、バイオイメーキングなど幅広い分野に応用されています。著者らは以前、水中で分散が困難である磁性粒子(γ - Fe_2O_3 , 直径10 nm)をポリスチレンとポリアクリル酸からなるブロック共重合体ミセルに内包させたMagnetomicelle (図1)が、分散したことを報告しています(*Nano. Lett.*, 2005, **5**, 1987-1991)。本論文ではその応用として、Magnetomicelleへのタンパク質の固定化と分離、磁場による回収およびMagnetomicelle固定化T7 RNA Polymeraseの再利用を調べました。Magnetomicelleにタンパク質を固定する手段として、Magnetomicelleの表面にHis₆-tagと特異的に配位結合するCu²⁺-iminodiacetic acid (IDA)を修飾しました。His₆-tagタンパク質であればMagnetomicelleへの固定化が可能と考えられます。実際に、Cu²⁺-IDA MagnetomicelleとHis₆-tag T4 DNA Ligaseは混合するだけで結合し、複合体を形成しました(図1)。イミダゾール添加により複合体からのHis₆-tagT4DNALigaseが抽出できました。Magnetomicelleに固定したT7 RNA Polymeraseを用いて転写反応を行ったところ、フリーのT7 RNA Polymeraseに対して少し転写量が低下しました。しかし、T7 RNA Polymeraseの固定化量を増やすことでフリーのT7 RNA Polymeraseと同等の転写量を得ることができました。Magnetomicelle-T7 RNA Polymeraseが再利用できるか調べるため、まず155 bpのテンプレートDNAの転写反応を行いRNAの合成を確認しました。その後、磁石にてMagnetomicelle-T7 RNA Polymeraseのみを回収しました。回収したMagnetomicelle-T7 RNA Polymeraseを用いて3.4 kbpテンプレートDNAの転写反応を行ったところ、再びRNAの合成が確認できました。以上の結果よりMagnetomicelleに固定化したタンパク質は活性状態を維持し、磁場による回収および捕集、そして再利用が可能であることが示されました。論文を見ていただければ分かると思いますが、ミセルの中に酸化鉄がごろごろ入っている磁性粒子/ミセルコンポジットのTEM像はとてもきれいです。著者らは他にも、カーボンナノチューブや金ナノ粒子、量子ドットなどをミセルに内包させた、様々な有機/無機ナノコンポジットを報告しています。私が行っているミネラルゼーションによる有機/無機複合化に比べて、構造が明確なコンポジットは機能評価が比較的容易に感じられました。ナノコンポジットを用いたバイオイメーキングなど、著者らの今後の展開が楽しみです。

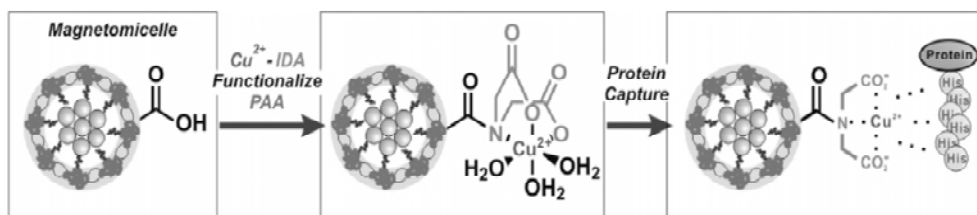


図1 Magnetomicelle-His₆-tag タンパク質 論文より抜粋

Targeting of Cancer Cells with Ferrimagnetic Ferritin Cage Nanoparticles

M. Uchida, M. L. Flenniken, M. Allen, D. A. Willits, B. E. Crowley, S. Brumfield, A. F. Willis, L. Jackiw, M. Jutila, M. J. Young, and T. Douglas, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 16627-16633 (2006).

磁性粒子は自身の大きさに依存して特性が変化するため粒径制御が重要です。著者らはナノ空間を有し、鉄イオンとの親和性が高いフェリチン(Fn)を用いることにより、MRIなどのバイオイメージングに利用できるサイズの磁性粒子を作製し、ガン細胞への集積を調べました。cage proteinとして知られているFnは、通常24個のサブユニット (Heavy鎖とLight鎖) から構成され、外径 12 nm・内径 8 nmの美しいナノ空間を有します。Fnは生体内においてナノ空間を利用して鉄イオンの貯蔵や放出を行い、体内の鉄イオン濃度を一定に保ちます。本論文では鉄酸化活性部位を有するH鎖のみで構成されたHFnを用い、ガン細胞表面で特異的に発現する $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの標的ペプチドCDCRGDCFC (RGD-4C)を導入しました(RGD-4CHFn)。RGD-4CHFn 1分子に対して3000当量のFe(II)を加えて複合化を行ったところ、粒径 5.5 ± 0.9 nmの単分散な超磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子が得られました。RGD-4CHFnの内部に Fe_3O_4 が生成したことをサイズ排除ゲルクロマトグラフィーと交流磁化測定より確認しました。調製したRGD-4CHFn/ Fe_3O_4 に蛍光をラベルし、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを有するC32細胞(ヒトメラニン欠乏性黒色種細胞)培養上清に添加したところ、RGD-4CHFn/ Fe_3O_4 の細胞への集積が認められました。しかし標的ペプチドが無いHFn/ Fe_3O_4 においてもRGD-4CHFn/ Fe_3O_4 の1/3程度の細胞集積が見られました。 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンがないT細胞にもRGD-4CHFn/ Fe_3O_4 を添加しましたが、C32細胞よりも集積量は低下しました。競争的結合を調べるため、あらかじめC32細胞に蛍光をラベルしたRGD-4CHFn/ Fe_3O_4 を結合させ、そこへ蛍光ラベルしていないRGD-4CHFn/ Fe_3O_4 またはHFn/ Fe_3O_4 を添加しました。その結果RGD-4CHFn/ Fe_3O_4 でのみ、添加量の増加と共に蛍光ラベルRGD-4CHFn/ Fe_3O_4 の細胞集積量が減少していきました。最初に結合していた蛍光ラベルRGD-4CHFn/ Fe_3O_4 と入れ替わってRGD-4CHFn/ Fe_3O_4 がC32細胞に結合したと考察できます。以上の結果からRGD-4CHFn/ Fe_3O_4 が $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを介して細胞へ集積されたことが確認されました。MRIをはじめとするバイオイメージングへの応用に期待したいと思います。

Feature Multiplexing-Improving the Efficiency of Microarray Devices

M. J. Schmid, K. Manthiram, S. M. G. Grayson, J. C. Willson, J. E. Meiring, K. M. Bell, A. D. Ellington, and C. G. Willson, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 3338-3341 (2006).

この論文では少ない基盤(足場)で多種類の DNA を見分けられる、新規 SNPs 解析の手法を紹介しています。従来の DNA マイクロアレイは、一つの平面基盤上に一種類のプローブ DNA が固定されています(図 2a)。著者らは PEG ヒドロゲルを足場として利用することによりプローブ DNA の固定量および種類を増加させ、図 2b に示した“multiplex アレイ”を作製しました。実際にガン抑制遺伝子である p53 に対応する 29 種類のプローブ DNA を様々な組み合わせで 5 種類の PEG ヒドロゲルに固定しました。作製した Multiplex アレイに 29 種類のプローブ DNA のどれかに対応する蛍光をラベルしたターゲット DNA を添加し、洗浄した後、ターゲット DNA との相互作用を蛍光観察にて検出を行いました。その結果、ターゲット DNA との相補鎖をもつヒドロゲルでのみ蛍光を確認できました。光ったゲルの組み合わせによりター

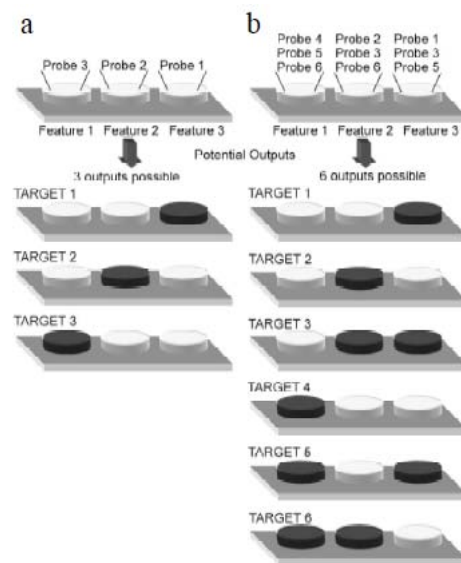


図 2 従来のアレイ vs Multiplex アレイ
論文より抜粋

ゲットDNA が同定でき、multiplex アレイが SNPs 検出に有効であることが示唆されました。著者らは今回報告した multiplex アレイが従来のマイクロアレイが目指しているデバイスの最小化やコストの改善につながると考えています。PEG や DNA などのありふれた材料も、工夫次第で興味深いデバイスがつけられることを示した論文だと思えます。



山吉 麻子(やまよし あさこ)

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科 生体分子工学部門 助教

asakoy@kit.ac.jp

この度は、論文紹介の機会を与えて頂き、ありがとうございました。簡単に自己紹介いたしますと、私は、この3月に同大学に赴任し、生体高分子情報研究室にて村上章教授のもと研究を始めました。現在は、化学の立場から、核酸医薬開発について研究を行っております。

私は学生時代、アンチセンス法について研究を行っておりました。一時は精力的に研究されたアンチセンス法でしたが、米国FDAに認可されたアンチセンス核酸医薬は唯一『Vitravene』(Isis Pharmaceuticals)だけで、siRNAの登場とともに衰退したような感を受けておりました。しかし最近になって、これまではジャンクDNAと呼ばれていた遺伝子以外のゲノム領域から、蛋白質に翻訳されない大量のnon-coding RNA (ncRNA)が発現して機能していることがわかり、その1つであるmicro-RNA (miRNA)の機能をアンチセンス核酸で制御するという新しいアプリケーションが生まれ、見直されつつあります。現在所属しております村上研究室は、実は私の出身研究室でもあり、数年ぶりに戻ってきたこともあって、私自身も久々にアンチセンス核酸研究について見直したいと考えておりました。そこで本論文紹介では、miRNAなどの機能性ncRNAの機能発現をアンチセンス核酸で制御する研究に焦点を当て、ご紹介したいと思います。

Double-stranded regions are essential design components of potent inhibitors of RISC function

A. Vermeulen, B. Robertson, A. B. Dalby, S. Marshall, J. Karpilow, D. Leake, A. Khvorova, and S. Baskerville, *RNA*, **13**, 723-730 (2007).

周知の通り、miRNA は内在性に存在する22塩基前後の小さなRNAです。miRNA はまず、miRNA遺伝子から長い一次転写産物として転写されます (primary miRNA: pri-miRNA)。pri-miRNA の中の、ヘアピン状の高次構造をとっている部分がDroshaという酵素によって切り出され (前駆体miRNA: pre-miRNA)、細胞質でDicerによってプロセッシングを受け、成熟したmiRNA になります。miRNA は Argonaute などのタンパク質とともにRISCを形成して、標的RNAを認識するガイド分子として働きます。ヒトを含めて動物、植物、ウイルスなど様々な種でmiRNA の存在が確認されており、ガンなどの疾患で異常発現しているonco-miRNA などと呼ばれるものも見つかっているそうです。

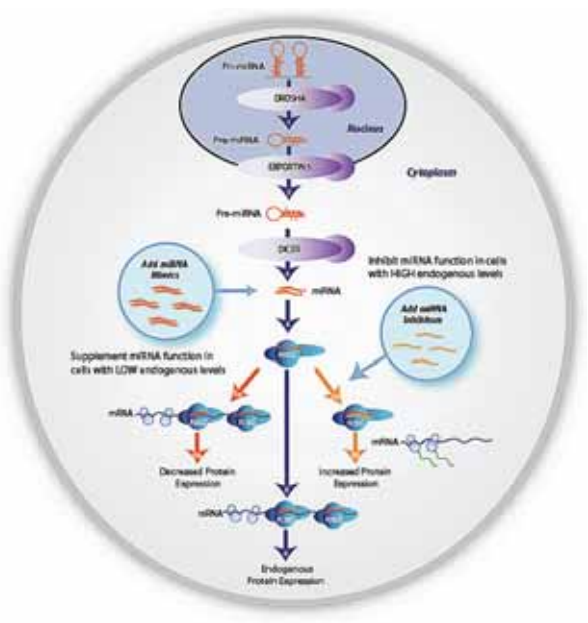


図1. miRNA の作用機構図

この論文は、miRNA の機能制御に様々なアンチセンス核酸を用いてその効果を検討しているものです。オリゴ核酸として、成熟したmiRNA に相補的なアンチセンス配列をコアにして、pri-miRNA を両端につけたオリゴ核酸を用いて実験を行ってます。しかも、その両端を、2重鎖にしたりHairpin構造にしたりしていません。なぜそんな配列を付けてみようと思ったのか？ 真意は論文を読んでも謎でした。が、とにかく、効いてるんですね！ 一体、何故なんでしょう？？ ただ pri-miRNA に相補的な配列をプラスただけのものが効くのはわかる気がします(プロセッシング段階を阻害するでしょうし)。でも、そこを二重鎖にしたり、ダンベルにしたものが効くというのが、よくわかりませんよね。さらに、もはや pri-miRNA に相補的な配列でなくても、とにかくコア配列の両端を鎖伸長すれば、miRNA 機能阻害活性が上がるというデータもありました(ちなみに、ランダムに配列を伸ばすよりは、ポリピリミジンの方が良いということです)。

この現象は何を示しているのでしょうか？ 理由の1つとして筆者らは、コア配列の両端を鎖伸長したり、Hairpinにすることによって、ヌクレアーゼ耐性が上がって効果が向上するのではないかと可能性提案しています。しかし、鎖伸長した部分に化学修飾を入れたものは、それほど効果を上げないということで、ヌクレアーゼ耐性がダイレクトな原因では無さそうです。もう一つの可能性として、コア配列両端部分の二次構造が miRNA-RISC 間の相互作用を抑制しているのではという仮説を筆者らは挙げています。この提案は仮説で終わっています。が、これが本当だとしたら、RISCと複合体形成していない miRNA が細胞質の中にたくさんあって、RISCと複合体形成しているものは少数派ということなのではないでしょうか？？ それならば、miRNA の機能を阻害する核酸を設計するには、とにかく両端にbulkyなものをアンチセンス核酸の両端に

導入したら良いということになるのでしょうか？また、それなら、アンチセンス核酸の両端部分は核酸である必要もないということですよ？ miRNA にはまだ未知の機構がたくさん隠されている様に感じられた論文でした。

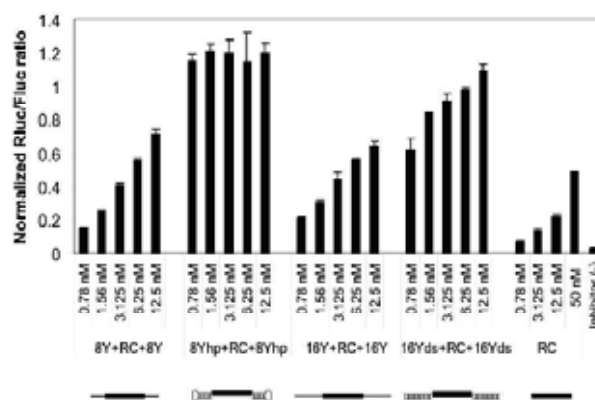


図2. miRNA 機能阻害実験。miRNA の機能を阻害すると、ルシフェラーゼ遺伝子上流の配列が切断を受けなくなるので、活性が高くなる。太いバーが mature-miRNA に相補的な配列を示す(論文中より抜粋)

Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs

J. Krützfeldt, S. Kuwajima, R. Braich, K. G. Rajeev, J. Pena, T. Tuschl, M. Manoharan, and M. Stoffel, *Nucleic Acids Research*, **35**, 2885-2892 (2007).

次に紹介するのは、miRNAの機能を阻害するアンチセンス核酸(筆者らはantagomirsと呼んでいますが)に化学修飾を色々施して、どういった修飾体がanti-miRNA効果があるか検証している論文です。共著者の1人であるManoharan博士は、Alynlam PharmaceuticalsというsiRNA医薬創製を目指したベンチャー企業の重役で、実はアンチセンス法への関わりも深い人です。

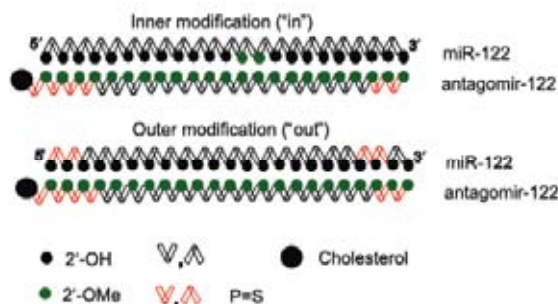


図3. miRNA (miR-122) の中央あるいは両端部位を化学修飾して、antagomirによってmiR-122が切断を受けるか検証していた(論文中より抜粋)。

Manoharan博士の前職はIsis Pharmaceuticalsであり、アンチセンス医薬創製を行っていたベンチャー企業でした。唯一認可されたアンチセンス医薬である『Vitravene』も、Isisで開発されたものです。Manoharan博士は核酸を修飾して医薬品候補を模索するスペシャリストであり、その人の手がけた論文ということで興味深く読ませて頂きました。

実は論文中の化学修飾の検討は、市販の修飾体を使って anti-miRNA 効果を検討するという感じで新鮮味は感じられませんでした。が、論文中のデータの1つに、標的であるmiRNAの方に化学修飾を施して、それがantagomirによって切断を受けているのか、antagomirが結合したままintactな状態で存在しているのかどうか検討している実験がありました。標的miRNAの中央あるいは両端部位に化学修飾を施して、miRNAの切断の有無を検証しています。その結果、どちらの修飾体も、antagomirによって切断(分解?)を受けているデータが示されていました。これは非常に意外に感じられませんか?(そう思うのは私だけかもしれませんが)逆のパターンなら、素直に受け止められたと思うのですが。すなわち、既にRISCにとりこまれているmiRNAにantagomirが結合し、antagomirがmiRNAに切られるのは、miRNAが標的RNAの機能を阻害するのと同様に類推出来るのですが、miRNAの方が切断を受けるのは不思議な気がするのです。これは、細胞外から導入したantagomirがRISCと複合体形成し、miRNAを切断しているということでしょうか?それならば1本鎖RNAでRNAiの様な効果を出す手法が考案されそうですが……。と、想像を膨らました1報でした。

Improved targeting of miRNA with antisense oligonucleotides

S. Davis, B. Lollo, S. Freier, and C. Esau, *Nucleic Acids Research*, **34**, 2294-2304 (2006).

最後に紹介するのは、前報と同様、miRNAの化学修飾を色々と施して、どういった修飾体がanti-miRNA効果があるか検証している論文です。この論文は私が読んだ文献の中で、miRNAに対するアンチセンス核酸の化学修飾について最もじっくり検討してる気がしてご紹介しました。核酸誘導体としては、定番の2'-O-methyl(2'OMe)型やLNA、2'-methoxyethyl(2'MOE)型、2'-fluoro型などを骨格に、リン酸ジエステル結合の修飾の代表的なものとしてホスホロチオエート型結合を組み合わせ、とにかく手当たり次第やっている感があります。手当たり次第やって効く修飾をサーチしているだけの論文と言ってしまうまでもありますが、研究にしつこさは大事と思います。結局、最も効果のみられた修飾は、全て2'MOE型でリン酸ジエステル結合のもの、というシンプルな結果(?)でした。他の文献を見ておりましたが、ホスホロチオエート型結合はアンチセンス核酸の片末端あるいは両末端に数塩基入れるのが妥当の様です。

以上、なんだか私の独断と偏見の趣味の論文紹介となってしまった気がしますが、核酸を扱っている方、これから使われる方の足がかりとしてご活用して頂ければ幸いです。



生命化学研究法

アポトーシス確認法

～ 新規化合物がもつアポトーシス誘導効果の評価方法 ～

大阪市立大学大学院工学研究科化学生物系専攻 東 秀紀

azumah@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

アポトーシスとは？ アポトーシスは多細胞生物が生命活動を維持する上で不要細胞を安全に除去するための遺伝子によって高度に制御された細胞死であり、特に発生過程で重要なプロセスである。例えば、指の形成では指間の細胞がアポトーシスで除去されることでできあがる。また、突然変異や障害を受けて細胞が異常を起した場合もアポトーシスによって除去される。よってアポトーシスは単なる細胞の“死”ではなく、多細胞生物が“生きる”ために積極的に“死ぬ”プロセスと言える。

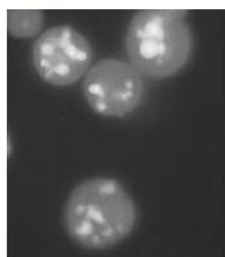
アポトーシスの形態学的特徴を図1に示す。まず、核内でクロマチンの凝縮が起こり、細胞質が収縮する。次に核の断片化が起こり、細胞自体も断片化してアポトーシス小体を形成する。その後、周辺組織による食作用等で速やかに除去される。



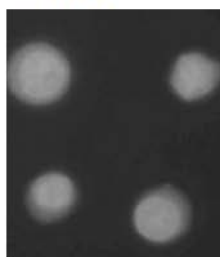
図1. アポトーシス時の形態変化

アポトーシスは通常、細胞表面に存在するデスレセプターにデスリガンドが結合することで細胞内にアポトーシスシグナルが伝達される。細胞内でのアポトーシスシグナル伝達物質の一つにセラミドと呼ばれる脂質分子がある。セラミドが次にどこにシグナルを伝達するかは未だ不明であるが、細胞内でセラミドが蓄積することでアポトーシスが起きることが知られている。また、アシル側鎖を短くした短鎖セラミドは細胞外からでも直接アポトーシスを誘導することが可能である(図2)。無限に増殖するガン細胞でさえアポトーシスを誘導することができるため、セラミドをモチーフにした抗ガン剤の研究が活発に行われている。我々の研究室ではこのセラミドに注目し、様々な類縁体を合成してガン細胞、特に血球系のガン細胞であるHL-60細胞(ヒト前骨髄性白血病由来)に対するアポトーシス誘導効果を評価している。今回、その方法を紹介する。

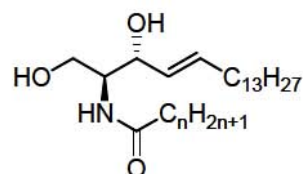
A. セラミド処理



B. 未処理



短鎖セラミド(C2-Cer)でHL-60細胞を6時間処理後、核をDAPI染色して顕微鏡観察した図。アポトーシスを起こした細胞(A)ではクロマチンの凝縮が確認できる。



天然型セラミド: $n = 15-17$
短鎖セラミド: $n = 1-7$
(特に $n = 1$ の場合、C2-Cer)

図2. アポトーシス時の形態変化の例¹⁾

アポトーシスの検出法

1) MTT法による細胞死誘導活性の評価

新規に合成した化合物がアポトーシスを誘導するかを調べる前に、我々の研究室ではまず、MTT 法によるスクリーニングを行っている(図 3)。²⁾ この方法はミトコンドリア内脱水素酵素の活性を指標に細胞の生存率を測定する簡便な方法で一度に多くのサンプルの細胞死誘導効果を評価するのに最適である。まず、一定数の細胞を 96 穴プレートでサンプルと共に培養し、測定 2 時間前に MTT 溶液を加える。所定時間後、反応停止液(0.04M HCl を含むイソプロパノール溶液)を加えてピペティングし、マイクロプレートリーダーで 570 nm と 630 nm の吸光度差を求め、コントロール(未処理の細胞)と比較して細胞生存率(%)とする。

図4はHL-60細胞を各サンプル(濃度:1~20 μM)で6時間処理したときの細胞生存率のグラフである。標準的なセラミドであるC2-Cerに比べ、サンプルA及びCは極めて活性が高いことがわかる。但し、生存率の低下が必ずしもアポトーシスによるものとは限らないため、アポトーシスかどうかは別の方法で確認する必要がある。

2) アガロース電気泳動によるDNA断片化の検出

アポトーシス特有の現象の一つにDNAの断片化が挙げられる。DNAは核内でヒストンに巻き付いたヌクレオソームが連なった状態(クロマチン)で存在しているが、アポトーシスを起こした細胞ではDNアーゼの活性化によりヌクレオソーム単位(約180 bp)での断片化が起こる。実際、サンプルA及びCで所定時間処理したHL-60細胞からDNAを抽出し、電気泳動を行うと図6のような“ラダー”の像が得られ、誘導された細胞死がアポトーシスであることがわかる。

このように前述のMTT法とDNA断片化の検出により、アポトーシス誘導活性の評価が可能である。しかしながら、一言でアポトーシスといっても実際には様々なシグナル伝達機構が存在しているため、実際にどのような伝達機構で起こっているかを調べるにはウエスタンブロットングによる分子レベルでの評価が必要である。



図 3. MTT 法の原理²⁾

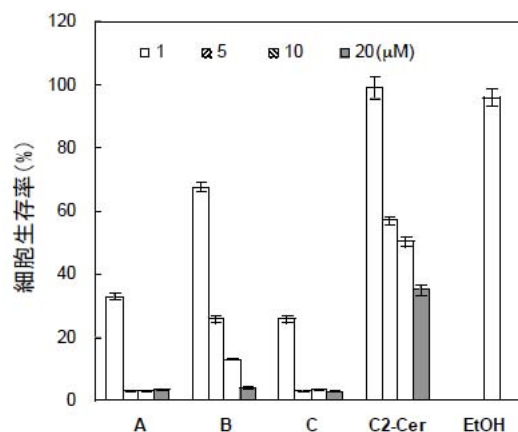


図 4. MTT 法による細胞死誘導活性の測定例³⁾

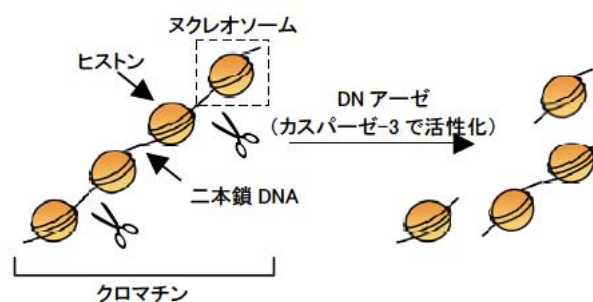


図 5. DN アーゼによる DNA ラダーの形成

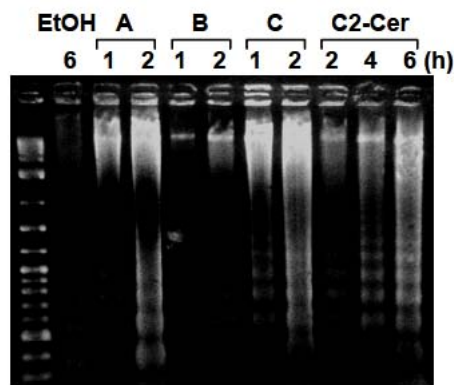


図 6. 電気泳動法による DNA 断片化の検出例³⁾

3) ウェスタンブロッティングによるアポトーシス関連因子の検出

カスパーゼ-3はアポトーシス実行因子として知られ、通常、不活性な二量体(プロカスパーゼ-3)として細胞質に存在している。アポトーシス刺激によりカスパーゼ-8もしくはカスパーゼ-9が活性化されるとこれらの酵素によりプロカスパーゼ-3は切断され、活性化する。そのため、抗カスパーゼ-3抗体を用いたウェスタンブロッティングを行い、切断された(活性化した)カスパーゼ-3を検出することでアポトーシスかどうかを判断することができる。また、カスパーゼ-3が切断する基質の一つとしてPARP(ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ)と呼ばれるタンパクが知られており、抗PARP抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、切断されたPARPを検出することでカスパーゼ-3の活性化を間接的に調べることもできる。

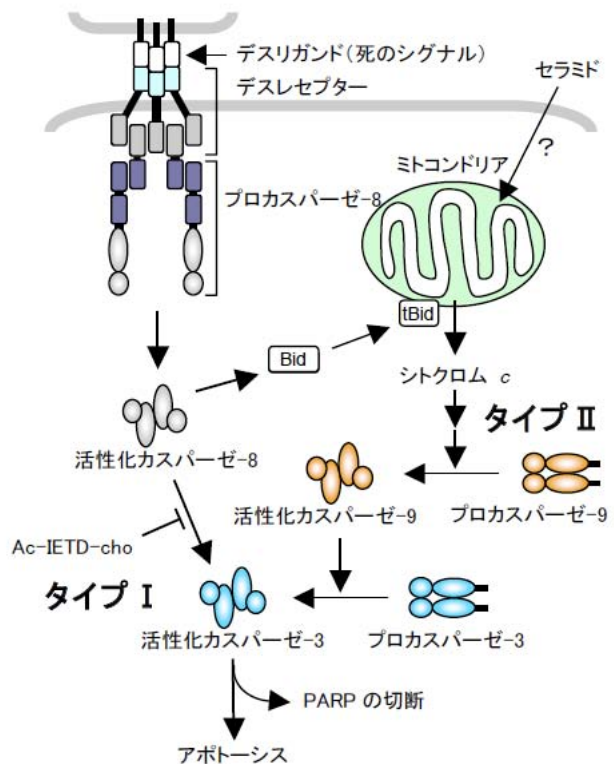


図 7. アポトーシスシグナルの流れ⁴⁾

カスパーゼ-3の活性化機構にはアポトーシスシグナルがミトコンドリアを経由しているかどうかで大きく2通りに分けられる。⁴⁾ ミトコンドリアを経由しないタイプはカスパーゼ-8が活性化され、これが直接カスパーゼ-3を活性化する。ミトコンドリアを経由するタイプではミトコンドリアから細胞質へのシトクロムcの放出がトリガーとなり、カスパーゼ-9を活性化、続いて活性化カスパーゼ-9がカスパーゼ-3を活性化する。新規に合成した化合物によるアポトーシスがタイプかタイプかどうかを確認するために、我々の研究室では以下の実験を行っている。

4) タイプ I もしくはタイプ II アポトーシスの確認

ミトコンドリアが関与しないタイプ I の場合、デスレセプターにシグナルが伝わり活性化されたカスパーゼ-8が直接カスパーゼ-3を活性化する。よってカスパーゼ-8の阻害剤(Ac-IETD-cho)で予め細胞を処理しておくことでアポトーシスが抑制できればタイプ II の可能性がある。但し、カスパーゼ-8はBidと呼ばれるタンパクを介してミトコンドリアへシグナルを伝える場合もあるのでタイプ II かどうかは検討する必要がある。

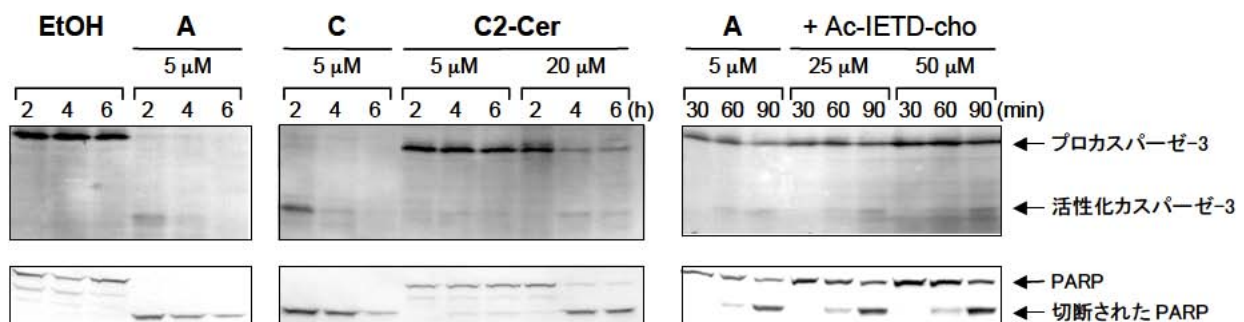


図 8. ウェスタンブロッティングの例(カスパーゼ-3 及び PARP の場合)³⁾

左図よりサンプル A 及び C では 2 時間でカスパーゼ-3 が完全に活性化していることがわかる。また、右図より Ac-IETD-cho が存在していてもカスパーゼ-3 の活性化には影響していない。

ミトコンドリアが関与するタイプ の場合、ミトコンドリアから細胞質へのシトクロムcの放出が起こる。これはアポトーシスを誘導した細胞を細胞質成分とミトコンドリアに分画し、それぞれを抗シトクロムc抗体を用いてウエスタンブロットングを行うことで確認できる。サンプルA及びCについてはカスパーゼ-8阻害剤によるカスパーゼ-3活性化への阻害効果がみられず(図8)、かつミトコンドリアからのシトクロムcの放出が確認されたことから(図9)、タイプ アポトーシスであることがわかる。

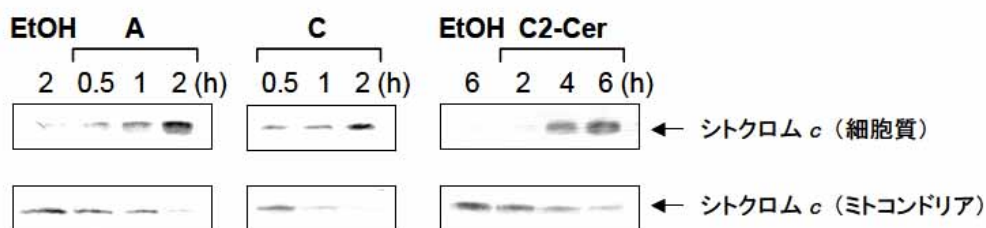


図9. ウエスタンブロットングの例(シトクロムcの場合)³⁾

サンプルA及びCでは時間が経過するにつれてミトコンドリアのシトクロムcが減少し、逆に細胞質側で増加している。

以上、今回解説したアポトーシス確認方法の一連の流れをまとめると図10のようになる。今回はタイプかタイプかの判別までを解説したが、アポトーシス関連因子に対する抗体や阻害剤等は数多く市販されているため、それらを用いてウエスタンブロットングを行うことにより、より詳細なシグナル伝達機構を解析することが可能である。

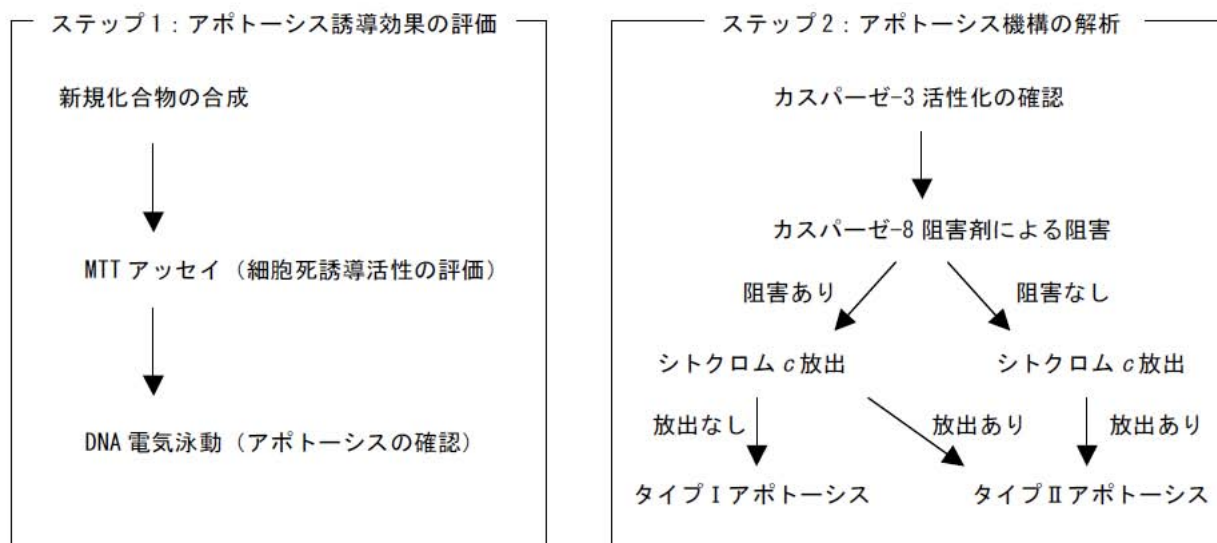


図10. アポトーシス確認法(一連の流れ)

参考文献

- 1) Niiro, H.; Azuma, H.; Tanago, S.; Matsumura, K.; Shikata, K.; Tachibana T.; Ogino, K., *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, *12*, 45.
- 2) Mosmann, T., *J. Immunol. Methods.*, **1983**, *65*, 55.
- 3) Azuma, H.; Ijichi, S.; Kataoka, M.; Masuda, A.; Izumi, T.; Yoshimoto, T.; Tachibana, T., *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 2860.
- 4) Choi, C.; Benveniste, E. N. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **2004**, *44*, 65.



スイス連邦工科大学ローザンヌ校(EPFL)留学中体験記

徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス部 堀研究室 助教
(日本学術振興会海外特別研究員併任)
中田 栄司

私は、九州大学大学院工学研究科(現京都大学大学院工学研究科)浜地格教授のもとで、博士号を取得した後、2006年12月より現在に至るまでの約6ヶ月間、スイス連邦工科大学ローザンヌ校(EPFL)のKai Johnsson教授のもとで博士研究員として研究させていただいております。この度、海外留学体験記を執筆する機会をいただきましたので、EPFLのあるローザンヌのことや、EPFL、Johnsson研究室のことなどを紹介したいと思います。

<スイス連邦・ローザンヌについて>

スイス連邦は、ヨーロッパの中心部に位置し、大きさにすれば、九州地方程ですが、ドイツ・フランス・イタリア・オーストリアなどの5カ国に囲まれており、ドイツ語(7割)・フランス語(2割)・イタリア語(1割)などの複数の公用語と多様な文化形態を有する国です。その中で、EPFLのあるローザンヌはフランス語圏に属し、正面にフレンチアルプスを望むレマン湖北岸にあります。ローザンヌ市街には、美術館や大聖堂・国際オリンピック委員会やミュージアムなどの文化施設が多数あり、スイス・フランス語圏の文化都市として知られています。また、オードリー・ヘップバーンやチャップリンなどの有名人が、晩年をローザンヌ近郊で過ごしたことからわかるように、のどかで情緒豊かな街です。街全体が丘陵地にあるため、坂が多いですが、メトロ・バス・鉄道などの交通網が細かく張り巡らされており、非常に便利です。また、移動手段として自転車を利用する人が多いことから、これらすべての交通機関に自転車を持ち込むことが出来るのも特徴です。そのため、突然の雨の場合には、メトロが自転車で込み合うといった光景もしばしば見受けられます。



ローザンヌ市街の風景。写真左中央が、ローザンヌで最も有名な大聖堂(Cathedral)

EPFL(Ecole Polytechnique Federale de Lausanne)は、このようなローザンヌ市街からメトロ(といってもほとんどは地上を走っていますが…)で10分程のレマン湖のほとりの郊外に位置しております。EPFLは、スイスに2つある連邦工科大学の一つ(もう一つは、ETH Zürich)で、スイス連邦が工学に非常に力を入れていることから、広大な敷地と立派な建物、最新鋭の研究設備を有しております。そのため、ヨーロッパ諸国はもちろん、世界中から様々な人々が集まってきており、日本を始めとするアジア圏からも比較的多くの研究者が留学されています。もちろん留学生のみならず、世界中の著名な研究者も数多く訪問されており、招待

セミナーも高頻度で開催されているため、様々な分野の研究に触れる機会も数多く用意されています。また、複数の公用語を有するスイスならではのと思いますが、フランス語はもちろん、ドイツ語、イタリア語、英語などの語学を習得する為の授業カリキュラムが充実しており、EPFL関係者であれば、無料で受講することが可能です。さらには、EPFL主催のパーティーやコンサートなどのイベントも時々開催されており、大きなイベントには、一般の方々も気軽に参加できるらしく、非常に盛大におこなわれているようです。このように研究活動のみならず、様々な面でのサポートが充実しており、非常に恵まれた環境下で研究をおこなうことが出来ています。



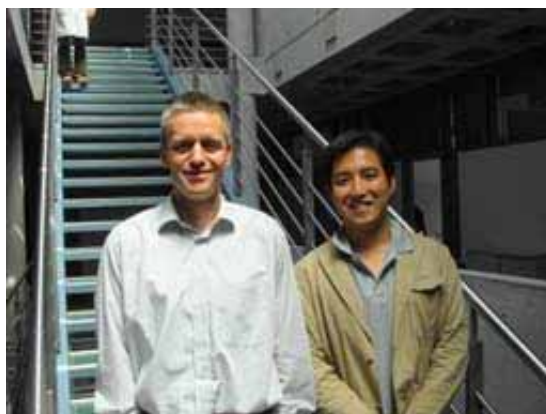
左)Johnsson研がある化学棟。船をイメージしたつくりで、タイタニックと呼ばれています。この1フロアの約1/4が一研究室の研究スペースで、非常に広々としています。右)化学棟から見た風景。天気の良い晴れた日には、レマン湖対岸にフレンチアルプスが一望できます。

< Johnsson研究室について >

次に、私が実際に研究活動を行っている Kai Johnsson 教授の研究室を紹介いたします。現在の Johnsson 研究室の構成は、ポスドク8人、大学院生が6人で、出身国は、現地のスイスの他に、ドイツ・フランス・イタリア・イギリス・ポーランドなどのヨーロッパ諸国と、インド、ブラジルと日本となっています。研究室内は主に遺伝子操作などを担当するバイオロジーグループと有機合成を担当する合成グループに二分されています。そして、それぞれのグループが協力しながら、プロジェクトを進行していくというのが基本スタイルとなっています。Johnsson 研究室の研究内容は、昨年(2006年)の夏に開催された本研究会の第2回国際シンポジウムで、Johnsson 教授が発表されたのでご存知の方も多いかと思いますが、大まかには「細胞可視化ツールの開発とそのアプリケーション」といえるかと思います。いまだ未知の部分が多い細胞機能の解明や発症メカニズムの不明な疾病の基礎研究では、特定のシグナル分子や蛋白質などの局在や活性変化を知ることが必要不可欠ですが、その有効な解析手法の一つとしては、それらを特異的に標識し可視化することで、光学顕微鏡視野下において、直接観察することが上げられます。特に特定蛋白質の標識には、特異性の高いタグとプローブペアが強力なツールとなる為、現在多くの研究者が様々なアプローチ方法により精力的に研究展開をおこなっています。¹⁾ Johnsson 教授は、そのアプローチ方法の一つである蛋白質タグ/基質プローブのペアを先駆的に開発したことで知られており、これまでに細胞内や細胞表層において特異的な標識が可能な2種類のペアを報告しています。²⁻³⁾ 手法の詳細については、参考文献を参照いただくことにして、ここでは詳細な説明は割愛させていただきますが、最近では、これら既存のペアの機能の向上や、互いに特異性を高めることで直交性を獲得したペアの開発など、ツールとしての改良を有機化学的なアプローチと生物工学的アプローチの両側面からおこなっています。また、これらのツールを使用したアプリケーションにも力を入れているため、個々人の研究テーマは非常に多岐に渡っています。ちなみにこれらのツールは、現在、Covaley という会社から販売されており、蛋白質タグのプラスミドや蛍光基質プローブなどを購入することが可能です。最近では、他グループがこれらのツールを利用した論文も報告されてきています。興味のある方のためにHPを示しておきます。⁴⁾

<おわりに>

さて、私がJohnsson研に加わって丁度6ヶ月が経ちました。振り返ってみると、この6ヶ月は言葉や生活習慣・文化の全く異なる環境になれるのがやっとなら、本当にあっという間に過ぎていきました。特に言葉に関しては、少しずつは改善されてきてはいる(と信じているのですが…)ものの、ラボ内の公用語である英語でのコミュニケーションも充分におこなえておらず、ずいぶん研究室のメンバーには迷惑をかけています。それでも、根気よく丁寧に対応・手助けしてくれるKai Johnsson教授を始めとするラボの面々に、本当に感謝しています。また私は、この4月より徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス部の堀研究室の助教として勤務させていただいておりますが、私のための希望で10月まで留学を継続させていただくことになっております。このようなわがまを快く了承して下さった堀教授と宇都准教授をはじめとする徳島大学ソシオテクノサイエンス部の関係の皆様には感謝いたします。最後になりますが、本稿を書く機会を与えて下さった諸先生方に御礼申し上げます。短期間の留学とはなりますが、ここJohnsson研で得られる経験をいかしつつ、面白い研究を展開していきたいと思っておりますので、皆様、今後ともご指導ご鞭撻のほど宜しくお願い致します。



Johnsson教授と筆者

- 1) 総説として a) N. Johnsson, and K. Johnsson, *ACS Chemical Biology*, **2**, 31-38 (2007) b) T. Gronemeyer, G. Godin, and K. Johnsson, *Current Opinion in Biotechnology*, **16**, 453-458 (2005). c) I. Chen and A. Y. Ting, *Current Opinion in Biotechnology*, **16**, 35-40 (2005). d) J. Zhang, R. E. Campbell, A. Ting, and R. Y. Tsien, *Nature Review Molecular Biology*, **3**, 906-918 (2002).
- 2) A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, and K. Johnsson, *Nature Biotechnology*, **21**, 86-89 (2003).
- 3) M. Kindermann, N. George, N. Johnsson, and K. Johnsson, *Journal of the American Chemical Society*, **125**, 7810-7811 (2003).
- 4) <http://www.covalys.com/>

なかた えいじ nakata@bio.tokushima-u.ac.jp





シンポジウム等会告

第27回日本糖質学会年会

主催: 日本糖質学会

共催: 日本生化学会、日本化学会、日本農芸化学会、日本薬学会、日本応用糖質科学会、日本生物工学会、日本膜学会、日本栄養・食糧学会、日本食品科学工学会、日本分子生物学会、日本植物生理学会、繊維学会、日本蛋白質科学会、日本生物物理学会

日時: 2007年8月1日(水) ~ 3日(金)

場所: 九州大学医学部百年記念講堂及び同窓会講堂

参加登録、発表申し込み: <http://www.gak.co.jp/jsr/27nenkai.html> 参照

発表申し込み〆切: 演題申込受付は終了いたしました。

事前参加登録申し込み〆切: 2007年7月2日

討論主題: 糖質、複合糖質に関する基礎及び応用研究

一般講演: 口頭発表、ポスター発表

特別講演: 根岸正彦 (NIEHS/NIH, USA) 「糖鎖合成・修飾酵素の構造と機能」

新海征治 (九大院工) 「工学から見た糖化学: バイオテクからナノテクまで」

シンポジウム: I. 糖鎖マシーナリーを俯瞰する

II. 糖質科学の社会還元

問合わせ先:

〒812-8581福岡市東区箱崎6-10-1

九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門

第27回日本糖質学会年会 世話人代表 伊東 信

TEL: 092-642-2898 FAX: 092-642-2907

E-mail: makotoi@agr.kyushu-u.ac.jp



FCCAセミナー/
FCCAグライコサイエンス若手フォーラム2007

本会は、糖関連の化学・工学・生化学・生物学等を研究対象とする若手研究者および学生の交流の会です。普段は交流のない様々な分野の研究者により、糖質を科学的かつ多角的に議論できればと思っております。以下の招待講演をお聞きした後、講師の先生方をお囲みした懇親会、参加者による口頭又はポスター発表(発表形式は事務局へ御一任下さい。学会とは異なりますので、他分野の方にも理解できるようにお願い致します。)等、内容は豊富です。また、企業にお勤めの方でしたら商品の説明でも構いません。経験のある研究者の聴衆としての参加も歓迎しております。糖質をキーワードに新たな研究を展開し、新しい人脈を培うきっかけになれば幸いです。是非、お気軽に御参加下さい。

日時: 2007年8月4日(土)～5日(日)

会場: 九州大学西新プラザ大会議室 (<http://www.kyushu-u.ac.jp/university/institution-use/nishijin/index.htm>)
福岡県福岡市早良区西新2-16-23 (Phone: 092-831-8104)

内容:

1. 招待講演

梶原康宏先生(横浜市大)「複合型ジシアリル糖鎖をもつ糖タンパク質の化学合成」

小川温子先生(お茶の水女子大院)「糖鎖が生まれたわけ」

2. 若手研究者(学生も含む)による一般講演及びポスター発表

3. 交流会

タイムテーブル: <1日目>

10:00～ 受付開始

午前 招待講演、口頭発表

午後 招待講演、口頭発表

夕方 ポスター発表&懇親会

<2日目>

午前 口頭発表(12:00 終了予定)

(発表件数により多少の変更あり)

定員: 50名

参加費: FCCA会員 無料、非会員 一般2,000円、学生1,000円

旅費申請: 本FCCAセミナーへの参加者は川口基金(<http://www.gak.co.jp/AN/kkfundJ.html>)からの旅費の補助申請が可能です。

申込締切: 平成19年7月6日(金)

※口頭あるいはポスターの希望、発表題目を明記の上、下記の代表幹事へE-mailでお申し込み下さい。

申込先: (財)野口研究所 水野真盛 (E-mail: mmizuno@noguchi.or.jp)

詳細は以下のホームページでもご覧になることができます。

http://www.geocities.jp/y_glycosci/

若手フォーラム

代表・松浦 和則(九大院工)

グライコサイエンス若手の会

代表幹事: 水野真盛 (野口研)

幹事: 天野麻穂 (北大)、伊田みちる(中部大)、小林厚志 (東北大院工)、仁平高則 (食総研)、松原輝彦 (慶応大院理工)、三浦佳子 (北陸先端大院)

第19回生体機能関連化学若手の会サマースクール

生体機能関連化学若手の会サマースクールは、生体機能関連化学分野を中心とした若手研究者を対象とし、自由な討論や意見交換を通して相互の親睦を図るため、毎夏に行われています。本年は、下記の先生方に講演をお願いしております。またポスター講演も企画しておりますので、ふるってご参加ください。

会期:平成19年8月6日(月)13時 -8月7日(火)12時

会場:八王子セミナーハウス(<http://www.seminarhouse.or.jp/>)

講演

岩崎 泰彦 准教授 (関西大学 化学生命工学部)

「生体に倣ったポリマーバイオマテリアルの設計」

岡本 晃充 独立主幹研究員 (理化学研究所 フロンティア研究システム)

「有機化学的視点からアプローチする遺伝子解析」

珠玖 仁 准教授 (東北大学 大学院環境科学研究科)

「単一細胞由来mRNA回収プローブと電気化学マイクロシステムの開発」

芝 清隆 部長 (癌研究会癌研究所 蛋白創製研究部)

「人工タンパク質とナノテクノロジー」

須磨岡 淳 講師 (東京大学 先端科学技術研究センター)

「人工制限酵素を用いた巨大DNAの選択的切断と遺伝子操作(仮題)」

藤井 輝夫 准教授 (東京大学 生産技術研究所)

「マイクロ流体デバイスその技術と応用展開」

参加申込締切:平成19年6月20日まで

参加申込方法:松野seitai19@bionano.rcast.u-tokyo.ac.jpまで氏名、所属、身分、連絡先(住所、電話、E-mail)、ポスター講演希望の有無をお知らせください。)

参加費:一般:13000円、学生:10000円 (参加費は平成19年6月30日までに郵便局備え付けの郵便振替払込用紙を使用し、以下の口座に振込んでください。)

口座番号:00150-9-428407 第19回生体機能関連化学部会若手の会サマースクール

代表世話人:三重 正和 (東工大・生命理工)

世話人:坂本 清志(東大・生産研)、堤 浩(東医歯大・生材研)、松野 寿生(東大・駒場オープンラボ)



お知らせコーナー

受賞のお知らせ

松浦 和則(九州大学大学院工学研究院 応用化学部門)
日本化学会 コロイド・界面化学部会 第6回科学奨励賞 平成19年1月29日
「生体分子組織化によるナノ構造体の構築と機能」

会員異動

廣田 俊 (順不同)
奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 教授
〒630-0192 生駒市高山町8916-5
TEL: 0743-72-6110 FAX: 0743-72-6119
E-mail: hirota@ms.naist.jp

小出 隆規
早稲田大学先進理工学部化学・生命化学科生物分子化学研究室 教授
〒169-8555 新宿区大久保3-4-1
TEL: 03-5286-2569
E-mail: koi@waseda.jp

和田 健彦
東北大学多元物質科学研究所 多元設計研究部門 教授
〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1
Tel: 022-217-5608
Fax: 022-217-5608
E-Mail : hiko@tagen.tohoku.ac.jp

田中 健太郎
名古屋大学 大学院理学研究科 物質理学専攻 (化学系) 分析化学研究室 教授
〒464-8602 愛知県名古屋市千種区不老町
TEL: 052-789 2940
E-mail: kentaro@chem.nagoya-u.ac.jp

編集後記

今回も著者のみなさんによる強力な援護体制のもと、なんとか無事に生命化学研究レターをお送りすることができ、心より感謝しております。毎年この時期アメリカ遺伝子治療学会に参加するために著者のみなさんに迷惑をかけていますが、読者のみなさんに興味深い内容をお届けできたかと思えます。次号(No. 25)は、円谷氏の担当により、2007年10月に発行を予定しております。編終担当は読者のみなさんからのニュースレターに対するご要望、ご指摘等の声をお待ちしています。レター改善のために、編集担当(長崎、原田、円谷)までご連絡を頂ければ幸いです。

長崎 健
大阪市立大学大学院工学研究科
(nagasaki@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp)
編集担当
原田 和雄(東京学芸大学)
円谷 健(大阪府立大学)