

研究助成 業績報告集

2016 年度

公益財団法人 小柳財団

創立者あいさつ

人間の健康と美を促進する研究活動を支援し、
より良い社会環境を実現するために

生命科学の健全な発展に寄与し、技術革新と人間重視の両面からより良い社会環境の実現に貢献したいと願っています。

昨今、日本の経済・社会・文化の持続的な発展のために、研究開発の重要性が再認識されています。研究開発のために様々な形の公的施策や、公益法人等により支援措置が取られ、また民間企業においても共同研究などの様々な改善や工夫が行われています。

既成の概念にとらわれず広い視野と新たな発想を持って、農林水産分野、食品分野、生物学分野において、既に存在する課題はもとより未来を見据えた潜在的な課題に取り組む基礎研究活動を応援することを目的として、公益財団法人小柳財団を設立いたしました。



公益財団法人 小柳財団
設立代表者 小柳 昌之

財団概要

財団名	公益財団法人 小柳財団
理事長	大倉一郎
設立	設立 平成 24 年 11 月 1 日
所在地	〒 101-0041 東京都千代田区神田須田町 1-24
TEL	03-5296-6299
FAX	03-5296-6259

役員一覧

評議員	小柳昌之
評議員	知野秀雄
評議員	石川和則
理事長	大倉一郎
理事	蟻川芳子
理事	小柳典子
監事	宮崎一成

2016 年度 研究助成選考委員名簿

財団役職	氏 名	経歴
選考委員長	小澤 俊彦	放射線医学総合研究所 名誉研究員 昭和薬科大学 酸化ストレス研究室 特任教授
選考委員	蟻川 芳子	日本女子大学 名誉教授 (前日本女子大学学長・理事長)
選考委員	大倉 一郎	東京工業大学 名誉教授 (前東京工業大学副学長)
選考委員	上村 みどり	帝人ファーマ株式会社 生物医学総合研究所創薬化学研究所 上席研究員
選考委員	畠中 研一	東京大学 生産技術研究所 教授
選考委員	三原 久和	東京工業大学 生命理工学院 教授

● 研究助成業績報告集 ●

2016年度

[2016年4月1日～2017年3月31日]

公益財団法人 小柳財団

目 次

1	幹細胞のライブイメージングによる皮膚の新生・再生制御機構の解析 研究者 > 東京工業大学 大学院生命理工学研究科：川上 厚志	P.6-7
2	メラニン分解微生物の探索 研究者 > 日本女子大学 理学部：菅野 靖史	P.8
3	Cellular Uptake and Release of Surfactants Used in Cosmetics 研究者 > 東京大学 生産技術研究所：粕谷 マリアカルメリタ	P.9-10
4	GPCRの立体構造安定性を向上させるアミノ酸置換の 理論的予測法の確立 研究者 > 京都大学 エネルギー理工学研究所：木下 正弘	P.11-12
5	細胞内の活性種生成に関わる酸化還元タンパク質群の 電子移動測定法の開発 研究者 > 東京工業大学 大学院生命理工学研究科：朝倉 則行	P.13-14
6	未利用農業資源から高機能食品・化粧品素材の生産 研究者 > 独立行政法人国立高等専門学校機構 沼津工業高等専門学校：竹口 昌之	P.15-16
7	転写因子タンパク質導入によるダイレクトリプログラミングの誘導 研究者 > 東京工業大学 総合理工学研究科：三重 正和	P.17
8	UVA/UVB照射したメラノサイトのメラニン過剰合成のメカニズム解析 とミトコンドリア指向性抗酸化物質による防護効果 研究者 > 北海道大学 大学院獣医学研究科：稻波 修	P.18
9	若年女性における体組成上の筋減弱・体脂肪過多は 肌状態不良の原因となるか 研究者 > 公益財団法人ルイ・パストゥール医学研究センター：川合 ゆかり	P.19-20

-
- 10 セロトニン2A受容体の立体構造解析 P.21-22
研究者 > 千葉大学大学院 理学研究科：鈴木 七緒
-
- 11 アオサから得られる潤い成分の高機能化 P.23-24
研究者 > 近畿大学 産業理工学部：菅野 憲一
-
- 12 マイクロ血管デバイス開発による血管機能の解明と
健康および美肌へのアプローチ P.25
研究者 > 日本女子大学 理学部：佐藤 香枝
-
- 13 創傷治癒を目指したナノ粒子型人工成長因子の設計と機能評価 P.26
研究者 > 東京大学 大学院工学系研究科：山東 信介
-
- 14 シアル酸糖鎖のアンチエイジング効果の解析 P.27
研究者 > 地方独立行政法人 東京都健康長寿医療センター研究所：三浦 ゆり
-
- 15 栄養障害型表皮水泡症の原因遺伝子であるⅧ型コラーゲンの
分泌メカニズムの解析 P.28
研究者 > 東京大学 大学院薬学系研究科：齋藤 康太
-
- 16 核酸アプタマー内包固定化不織布の作成と分子センサーへの応用 P.29-30
研究者 > 名古屋工業大学 大学院工学研究科：水野 稔久
-
- 17 新規結核薬の開発を目指した標的蛋白質の構造生物学研究 P.31-32
研究者 > 大阪大学 蛋白質研究所：竹下 浩平
-
- 18 トマトのリコピン及びトウガラシのカプサンチンの高含有量保持のための
果実内の超微構造学的メカニズムの解明 P.33
研究者 > 日本女子大学 理学部：永田 典子
-
- 19 中枢神経系の老化と肥満に関わるマイクロRNAの同定と機能解析 P.34-35
研究者 > 大阪大学 蛋白質研究所：古川 貴久
-
- 20 天然の光合成タンパク質を用いた「ガラスの葉」の作製と機能解明 P.36-37
研究者 > 大阪市立大学 複合先端研究機構：野地 智康
-

研究テーマ

幹細胞のライブイメージングによる皮膚の新生・再生制御機構の解析

研究者 ▶ 東京工業大学 大学院生命理工学研究科：川上 厚志（かわかみ あつし）

研究成果

多細胞生物の表皮は、外部からの異物の侵入や体の水分の蒸散を防なって、内部の組織を保護している。表皮はヒトの場合、約4週間の周期で、幹細胞である基底細胞からの新生を繰りかえすが、老化や健康状態によって細胞新生の速度は低下する。表皮の幹細胞による細胞新生は、健康で機能的な皮膚を維持する基本的なメカニズムであるが、この過程がどのように調節されているのか実際はよくわかつていない。本研究では、ヒト疾患のモデルとして近年注目されているゼブラフィッシュを使って、表皮幹細胞のライブイメージングと追跡により、細胞新生や再生における、幹細胞の増殖や分化の調節機構を明らかにすることを目標とした。

私達は以前に、再生過程で誘導される遺伝子の探索を行い、再生上皮細胞で活性化される遺伝子の一つとして、フィプロネクチン(*fn*)1bを同定した。再生上皮細胞が再生後にどのような運命をたどるかを知るために、*fn1b*のトランスジェニックを作製して再生上皮でCreリコンピナーゼを発現させることに成功した。この系統をCre組み換えによってEGFPを発現するCreレポーター（当研究室で作製）と掛け合わせて、再生上皮細胞を子孫まで永続ラベルすることができるようになった。

再生中の再生上皮細胞をラベルしてみると、3種類の運命をたどることがわかつってきた。第一には、傷害後すぐに傷口を覆う最も表層の上皮細胞は、傷修復後3–4日で細胞死を起こして脱落してしまう。それより遅れて傷口に遊走してくる表皮細胞は、一定の細胞増殖を行い、長く再生した表皮に寄与した。しかしながら、その中の一部の細胞は、約2–3週で細胞のターンオーバーによって表皮から消えていった。一方、残る第3の細胞群は、半年以上たっても表皮内に子孫が残り、組織学的な解析の結果、これらは基底層幹細胞を含んでいることが示された。

再生上皮から生じ永続する表皮細胞群は必ず基底層幹細胞を含むことがわかつたが、基底幹細胞は表層分化細胞にも由来するのか、それとも基底細胞は基底細胞からしか生じないのかをさらに調べた。このために、再生上皮の表層分化細胞で発現するケラチン4遺伝子を用い、Cre系統を作製して表層細胞をラベルした。すると、表層の表皮細胞は再生後に基底層の幹細胞に寄与することはなく、再生過程では表皮細胞の脱分化は起こらないことがわかつた。

つまり、細胞運命のトレーシングから以下のようなことがわかつってきた。上皮細胞は、通常は基底層の幹細胞から生じ、次第に分化が進む表層の細胞を経て、最後は最上層から脱落するが、傷害を受けて再生に移ると、上皮細胞はその分化状態のままで、再生的な細胞増殖を行って細胞数を回復し、上皮の組織構造を再形成する。その後、再生になると、再び幹細胞から表皮細胞への細胞新生サイクルに戻ることがわかつた。ゼブラフィッシュモデルを用いた本研究によって、ほ乳類モデルでは観察困難であった皮膚細胞のクローナルな増殖や分化の様子を直接見ることができた。

また私達は、再生上皮細胞は、傷害に応答してFgf20aシグナルを活性化し、直下の間充織細胞へ作用して、細胞の増殖を誘導することも明らかにし、初めて再生における傷上皮の存在意義を解明した(Shibata et al., 2016; Shibata et al., 2017)。

さらに最近の研究では、上皮における炎症性サイトカイン、インターロイキン(IL)1bを介した炎症シグナルの再生における予想外の働きを解明した。従来考えられてきたように、免疫細胞であるマクロファージが炎症シグナルを発するのではなく、組織損傷の場合、表皮細胞自身がIL1b炎症シグナルを活性化し、このシグナルは組織再生を開始するスイッチとして必須であることがわかった。マクロファージは逆に、組織の炎症を抑制して、過度の炎症が細胞死を誘導しないように制御していた。つまりIL1炎症シグナルは、再生において「諸刃の剣」というべき意外な作用を果たすことがわかった。

これら一連の研究から、組織再生におけるインターフェースとしての表皮の重要な役割がわかつてき。今後は、表皮幹細胞の増殖と分化を制御するシグナルや因子の探索、哺乳類など再生できない組織における炎症応答を調べることや、マクロファージの産生する抗炎症因子の解明などによって、ヒトの組織再生能力を増進する方法や薬の開発に繋がることが期待される。

発表論文

Tomoya Hasegawa, Christopher J. Hall, Philip S. Crosier, Gembu Abe, Koichi Kawakami, Akira Kudo, Atsushi Kawakami (2017) Transient inflammatory response mediated by interleukin-1 β is required for proper regeneration in zebrafish fin fold. eLife 10.7554/eLife.22716.

Shibata, E., Ando, K. and Kawakami, A. (2017) Transplantation of mesenchymal cells including the blastema in regenerating zebrafish fin. Bio-protocol 7(2), e2109.

Shibata, E., Yokota, Y., Horita, N., Kudo, A., Abe, G., Kawakami, K. and Kawakami, A. (2016) Fgf signalling controls diverse aspects of fin regeneration. Development 143, 2920–2929.

Hasegawa, T., Nakajima, T., Ishida, T. Kudo, A. and *Kawakami, A. (2015) A diffusible signal derived from hematopoietic cells supports the survival and proliferation of regenerative cells during zebrafish fin fold regeneration. Developmental Biology 399, 80-90.

研究テーマ

メラニン分解微生物の探索

研究者 ▶ 日本女子大学 理学部：菅野 靖史（すがの やすし）

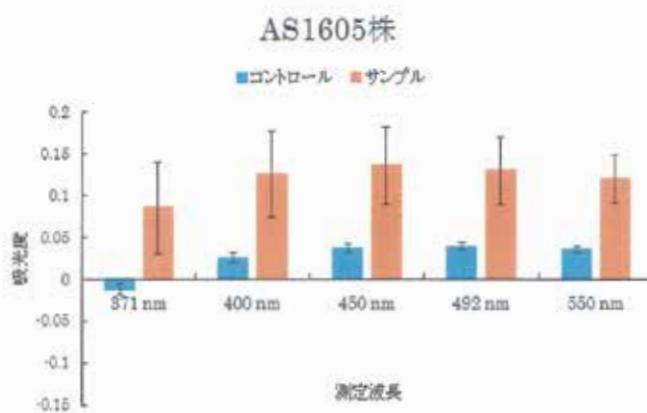
研究成果

①研究の目的：メラニンは多くの生物種で生成が見られる色素である。ヒトにおいては、皮膚に多く存在し有害な紫外線から人体を保護する役割を果たしていると考えられている。一方で、過度のメラニンの蓄積はシミの原因となることから美容面での対策が求められている。従来、メラニン生成を抑制することでシミを減らす化粧品が作られたが、本来生体に必要なメラニンの生成も阻害し、白斑症状などの副作用が生じたことから大きな社会問題にもなった。そこで、本研究では、メラニンの生成そのものを抑制するのではなく、生成した余分なメラニンのみを分解することを目指し、そのために、メラニン分解微生物を自然界から探索することを目的とした。

②実験方法：対称とした微生物の探索地点は、千葉県、神奈川県の海岸地帯とし、延べ78地点の土壤等を採集した。採集した土壤は滅菌3%NaClに懸濁し、これをさらに100倍希釀したもの100 μLをメラニンを含む寒天培地に塗布し、27-30度のインキュベータで1週間から3週間程度培養した。この中から、メラニン分解が期待される菌株を選び、メラニンを含む液体培地で振とう培養を行った。

③結果および考察：78地点の土壤から数百のコロニーが得られたが、このうち23コロニーについては、菌体の着色や培地の変色などが見られ、メラニン分解の可能性が示唆された。これら23コロニーを単離し、AS1601からAS1623までの番号を振り保存菌株とした。続いて、これらの菌株についてメラニンを含む試験管振とう培養を1週間行い、メラニン分解の様子を観察したところ、AS1601, 1602, 1605, 1609, 1611, 1621, 1622, 1623の8種について菌体にメラニンが吸着している様子が観察できた。明らかにメラニンが菌体に吸着している菌については、培養上清が無色透明に近い状態のものもあった。そこで、実際にメラニンがどの程度分解されたかを定量するために、メラニンに由来する吸収波長(371 nm, 400 nm, 450 nm, 492 nm, 550 nm)の増大が観察された(AS1605の例として下図参照)。菌体がメラニンを生産しない限り、メラニン量が最初の量よりも増えるはずはないので、この結果は、本来不溶性であるメラニンを菌体が吸着した後、菌体表面或いは菌体外で可溶化出来るまでに低分子化するよう分解したため、培養上清の吸光度が見かけ上、上昇したことを示唆している。

今後は、不溶性である巨大分子のメラニン本体が実際にどの程度分解されているか調べることが重要な課題となる。



研究テーマ

Cellular Uptake and Release of Surfactants Used in Cosmetics

研究者 ▶ 東京大学 生産技術研究所：粕谷マリアカルメリタ（かすやマリアカルメリタ）

研究成果 This research investigated the cytotoxicity, cellular uptake and release of 4 kinds of nonionic surfactants that are widely used for a variety of cosmetic applications: polyethylene glycol 10 monolaurate (Peg 10 laurate), polyethylene glycol 10 monooleate (Peg 10 oleate), polyethylene glycol 2 monooleate (Peg 2 oleate), and polyethylene glycol 10 monostearate (Peg 10 stearate).

A. Cytotoxicity of surfactants

Initially, the effect of each surfactant on mouse melanoma B16 cells (5×10^4 cells per well, 24-well plate) cultured in 1 ml TI/DF medium (DMEM-F12 containing 1% insulin-transferrin-selenium X solution) was determined from a concentration range of 50 to 2000 $\mu\text{g/ml}$.

After 48-h incubation (37 oC, 5% CO₂), results showed that normal attachment, spreading and growth of mouse melanoma B16 cells were observed for Peg 10 oleate, Peg 2 oleate, and Peg 10 stearate from a concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$ up to 500 $\mu\text{g/ml}$. Cell morphology was not affected and viability was high at 91–97%, indicating that these surfactants did not have harmful effects on B16 cells at this concentration range. On the other hand, Peg 10 laurate exhibited moderate cytotoxicity. At 500 $\mu\text{g/ml}$, cell viability was 72% and cells were rounded and detached from the solid substrate. Regardless of the surfactant used, cell viability was 50% or lower when 1500 $\mu\text{g/ml}$ and higher was administered.

Based on results, the number of oxyethylene group did not seem to contribute to cytotoxicity of the surfactants as evidenced by results obtained for Peg 10 oleate and Peg 2 oleate that have the same oleate moiety but have 10 and 2 oxyethylene units, respectively. Cell viability was 90% or higher at 500 $\mu\text{g/ml}$ for both regardless of the number of ethylene glycol units. Comparing Peg 10 oleate and Peg 10 stearate, results showed that the functional group also did not have any significant effect on viability at 500 $\mu\text{g/ml}$. However, the length of the fatty acid chain has an effect on cells. Among the surfactants used in this study, only Peg 10 laurate having the shortest fatty acid chain affected cell morphology, attachment and growth at 500 $\mu\text{g/ml}$.

Melanocytes such as mouse melanoma B16 cells secrete the black pigment melanin when under stress due to exposure to sunlight. The elevated production of melanin is also evidence of stress caused by exposure to certain chemicals. During incubation of B16 cells in the presence of 500 $\mu\text{g/ml}$ of each surfactant for 48 h, black coloration of medium was observed only in the presence of Peg 10 laurate suggesting that this surfactant induces stress to cells resulting to elevated production of melanin that was released by cells to the medium.

B. Cellular uptake and release of surfactants

To assess cellular uptake, the cells (2×10^6 cells seeded into 100-mm culture dishes) were incubated with 100 μg of each surfactant in 3 ml TI/DF. After incubation for 48 h, cells were collected and the surfactants were extracted from the cells with CHCl₃:MeOH (2:1, v/v), then with CHCl₃:2-propanol:water (7:11:2, v/v), in a sonicated bath. The amount of surfactant was quantified by LC ESI MS. The stationary phase used was Inertsil ODS Reversed Phase Column. The samples were dissolved in MeOH. The column temperature was

25oC, and the injection volume was 0.5 μ l. Gradient elution starting with 52% MeOH was carried out.

Peg 10 oleate, Peg 2 oleate and Peg 10 stearate were not detected from the LC ESI MS of cell extracts suggesting that only minute amounts of each surfactant may have been taken in by cells and beyond detection by the method used in this work. On the other hand, the presence of Peg 10 laurate in the cells was confirmed and quantified. The amount of Peg 10 laurate that was found in the cells was 8 μ g per dish indicating that 8% of the amount that was administered (100 μ g) was taken in by the cells.

Cytotoxicity may be linked to cellular uptake. Based on results, Peg 10 oleate Peg 2 oleate and Peg 10 stearate that exhibited high viability even at high concentration were hardly taken in by cells. On the other hand, Peg 10 laurate that exhibited moderate cytotoxicity was confirmed present in cells in quantifiable amounts. This result suggests that cellular uptake may trigger cell death when this surfactant is administered at high concentration. The life of the cell can be compromised if Peg 10 laurate enters the cells and the amount taken up exceeds the cell's degree of tolerance, or leads to cellular transformation eventually resulting to loss of viability.

The prerequisite for entry into cells is interaction of surfactant to the cell membrane. The results suggest that Peg 10 laurate has stronger interaction to the cell membrane than Peg 10 oleate, Peg 2 oleate and Peg 10 stearate. Our previous work on perfluorinated carboxylic acids showed that cellular uptake increases with increasing perfluoroalkyl chain length suggesting that hydrophobicity is a key factor in cellular uptake (M. Kasuya and K. Hatanaka, J of Fluorine Chem, 188, 2016, 1-4). However, the results of the study on surfactants showed otherwise. Cellular uptake of surfactant having shorter alkyl chain such as laurate was higher when compared with surfactants that have longer hydrophobic alkyl chain such as oleate and stearate. It is possible that in the case of surfactants, cellular uptake can be influenced by factors other than hydrophobicity of the alkyl moiety.

The release of Peg 10 laurate from the cells was also investigated to assess the extent of accumulation. B16 cells were cultured in 3 ml TI/DF with 100 μ g Peg 10 laurate per dish (first incubation) and after 48 h, the medium was discarded and cells were washed with fresh medium. The incubation of cells in 3 ml TI/DF medium only was continued for another 48 h (second incubation) to determine whether the Peg 10 laurate that were taken in can also be released by the cells to the culture medium. After the second incubation, the culture medium fraction was collected and analyzed by LC ESI MS.

The presence of Peg 10 laurate was detected from the culture medium and quantified (0.9 μ g per dish). This was the amount released by cells to the culture medium and accounted for 11% of the amount (8 μ g) that was taken in by cells during the first incubation. This result confirmed that Peg 10 laurate can enter the cells and could also be released by cells to the culture medium.

This research investigated the cytotoxicity, cellular uptake and release of 4 kinds of nonionic surfactants. The effect of the number of oxyethylene groups, the functional group and the length of the fatty acid chain on B16 cells was reported. Moreover, this work provided evidence that nonionic surfactant such as Peg 10 laurate could be taken-up and released by cells.

Amphiphilicity of the surfactant is essential for their role in cosmetics. The design and availability of surfactants that can be taken up by cells but with low cytotoxicity is necessary to eliminate any potential damage to human health and to advance the health benefits that could be derived from cosmetics.

研究テーマ

GPCR の立体構造安定性を向上させるアミノ酸置換の理論的予測法の確立

研究者 ▶ 京都大学 エネルギー理工学研究所：木下 正弘（きのした まさひろ）

研究成果

(1) GPCRの折り畳みに伴う自由エネルギー低下 ΔF （負）を計算し、 ΔF の絶対値が大きくなるアミノ酸置換を高速で予測できる方法を開発した。野生体と変異体の立体構造は、原子レベルで入力データとして与えられると仮定する。 ΔF はエネルギー成分 ΔU （負）とエントロピー成分 ΔS （正）から成る。 ΔU には分子内水素結合形成に伴うエネルギー低下のみを考慮する。 ΔS には溶媒構成粒子の並進移動に起因するエントロピー効果のみを考慮する。開発した方法の性能をGPCRの一種であるアデノシンA2a受容体(A2aR)に対して調べた。第1段階として、その野生体の立体構造として実験的に決定されたものを用いた。変異体の立体構造は MODELLERプログラムを用いて推定した。安定化すると予測した変異体7個、不安定化すると予測した変異体3個を代表として選び、実験結果と比較した。的中率は、実験で用いる安定化の基準によって異なるものの、実に8/10～10/10に達した。

○S. Yasuda, Y. Kajiwara, Y. Takamuku, N. Suzuki, T. Murata, and M. Kinoshita, “Identification of Thermostabilizing Mutations for Membrane Proteins: Rapid Method Based on Statistical Thermodynamics”, Journal of Physical Chemistry B, 120, 3833–3843 (2016).

○Y. Kajiwara, T. Ogino, S. Yasuda, Y. Takamuku, T. Murata, and M. Kinoshita, “Physical Origins of Remarkable Thermostabilization by an Octuple Mutation for the Adenosine A2a Receptor”, Chemical Physics Letters, 657, 119–123 (2016).

○2016年5月27日付の科学新聞:「膜タンパク質の理論的耐熱化法—アミノ酸置換を短時間で予測」。

(2) 実用性を持たせるためには野生体の立体構造は未知であると考えねばならない。そこで、以下の方法を考えた:標的蛋白質とアミノ酸配列の相同性が高く、かつ、立体構造が分かっている鉄型蛋白質を探し出し、ホモジーモデリングによって標的蛋白質の立体構造モデルを多数作成する;それらの中から我々の ΔF が最低になるモデルを選定する(ΔF が低いほど成績が良いという強い傾向が認められるからである);その後、安定化に繋がる置換を予測する。この方法を用いた場合、野生体の立体構造が使える場合に比べて的中率がやや低下するのみであることをA2aR(野生体の立体構造は未知であると仮定)に対して確認した。

○Y. Kajiwara, S. Yasuda, Y. Takamuku, T. Murata, and M. Kinoshita, “Identification of Thermostabilizing Mutations for a Membrane Protein Whose Three-Dimensional Structure is Unknown”, Journal of Computational Chemistry, 38, 211–223 (2017).

(3) 各GPCRに対し、「それを置換して得られる変異体の多くが大きく耐熱化する」という残基が存在することが分かった。それを鍵残基と呼び、1つのGPCR当たり複数個存在する。さらに、数多くのGPCRに保存され共通に鍵残基となる残基(ホットスポットと呼ぶ)の存在も見出した。ここで、Ballesteros-Weinstein (BW)数について説明する。BW数はx.yz の3つの数字で表される。xはその残基が第xヘリックスに存在することを表す。yzは第xヘリックスの中で最も良く保存されている残基を50とした時に、考へている残基が存在する位置を表す。例えばBW数が5.52とあった場合、第5ヘリックスの最も保存されている残基から2つC末端側の残基を表す。我々は、Class Aの不活性型A2aR、M2ムスカリン受容体、EP4プロスタノイド受容体に対し、BW数3.39の残基がホットスポットであると特定し、それをアルギニンに置換することにより、M2とEP4の顕著な耐熱化に成功し、M2と新たなリガンドの複合体及びEP4の結晶構造を世界で初めて決定できた。後者については、A2aRを鋳型蛋白質とし、ホモジーモデリングによって標的蛋白質の立体構造モデルを多数作成した後、それらの中から我々のdelta-Fが最低になるモデルを野生体の立体構造として選定した。さらに、他の6種類のClass Aの不活性型GPCRの耐熱化にも成功した(結晶化及び立体構造解析を検討中)。

○木下正弘・村田武士、「膜タンパク質の耐熱化に繋がるアミノ酸置換の理論的予測」、バイオサイエンスとインダストリー、75、33–36 (2017).

研究テーマ

細胞内の活性種生成に関わる酸化還元タンパク質群の電子移動測定法の開発

研究者 ▶ 東京工業大学 大学院生命理工学研究科：朝倉 則行（あさくら のりゆき）

研究成果

緒言

活性酸素をはじめとする細胞内活性種は、生体内のシグナル伝達物質であると同時に、健康の悪化や皮膚組織の老化の原因として知られている。活性酸素の大部分は、ミトコンドリアで進行しているタンパク質間の酸化還元反応の連鎖の副反応として生じる。本研究では、この連鎖反応の中で、細胞質と接する膜間スペースで進行する酸化還元反応であるシトクロムcからシトクロムcオキシダーゼへの電子移動に注目した。そこで、シトクロムcの分子内での「電子の流れ」を明らかにすることにより、細胞質中の酸素分子とシトクロムcとの電子移動について考察すること目的とした。

申請書の研究計画にしたがって、以下の研究を行い、

- ①走査型電気化学顕微鏡を応用し、タンパク質内の電子の流れの直接測定法を開発した。
- ②開発した測定法を利用し、シトクロムcとシトクロムcオキシダーゼの反応からシトクロムcの電子の流れを明らかにした。

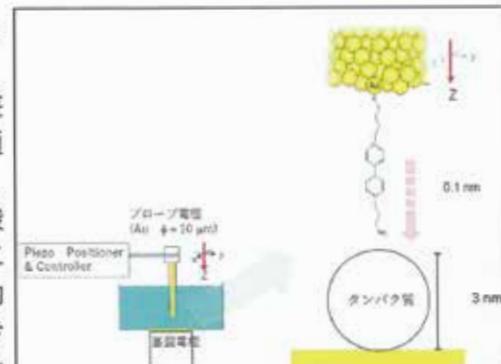
①タンパク質内の電子の流れを直接測定する新規手法の開発

「方法」

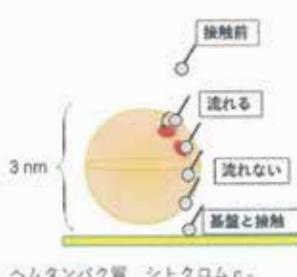
測定には、直径10 μm金電極をプローブ電極に利用し、基盤電極には直径1 mmの金電極を利用した。走査型電気化学顕微鏡では、右図に示すようにプローブ電極を動かすことにより、基盤電極に接近させることができるので、プローブ上の分子（酸化還元分子ビオローゲン）と基盤上のタンパク質を接触させることができ。さらに、ビオローゲンを0.1ナノメートルレベルで移動させることにより、タンパク質の複数箇所と接触させることができる。例えるならば、電流テスターでタンパク質表面を触診するような測定である。

「結果」

マルチレドックスタンパク質であるシトクロムc₃の表面の電子移動特性を調べることにより、タンパク質表面の測定が可能となったことを示す。マルチレドックスタンパク質は、複数の酸化還元中心を有しており、電子移動する部位と電子移動しない部位が明確であると考えられているので、測定モデルとして適している。基盤電極にシトクロムc₃の単分子層を構築した。構築できたことは、電気化学測定を利用して確かめた。このシトクロムc₃の単分子層にプローブ電極上のビオローゲンを接近させ、電流を測定した。



Position / nm	Current / nA	
	P -0.6 V	S +0.14 V
0	-0.59	
1	-0.61	
2	-11.58	
3	-11.58	
4	-0.70	
5	-0.69	
6	-11.58	



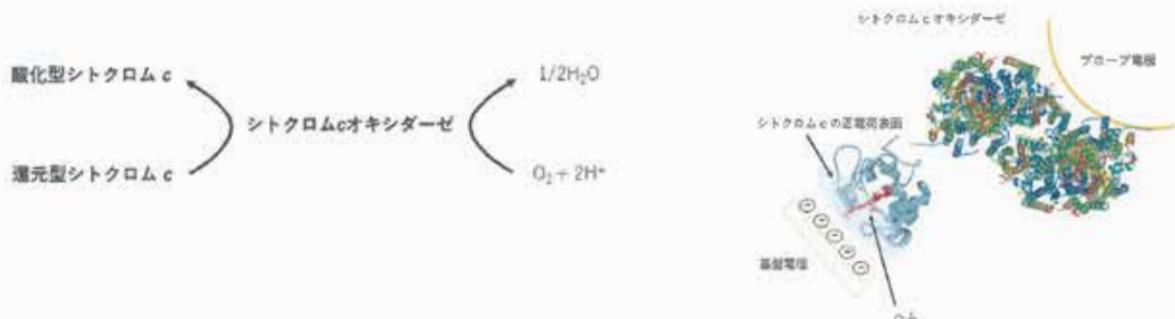
左図に示す表の左のカラムはプローブの位置（相対値）、右のカラムは電流値である。0 nmは、電流値が小さく、シトクロムc₃と接触する前である。6 nmでは、プローブ上のビオローゲンが基盤電極と接触したことが確かめられ、電流値が増加している。

シトクロムc₃の直径が約3 nmであることから類推すると、2 nm付近で接触していると考えられる。2 nm, 3 nmでは、電流が見られ、4 nm, 5 nmでは流れなかった。以上の結果から、本測定によって、シトクロムc₃表面の電子移動特性を測定できることが分かった。

②開発した測定法を利用し、シトクロムcとシトクロムcオキシダーゼの反応からシトクロムcの電子の流れを解明

「方法」

①で示した測定法を利用して、基盤電極に固定化したシトクロムcにプローブ上のシトクロムcオキシダーゼを接触させ電子の流れを測定した。シトクロムcオキシダーゼの反応は以下の通りである。



したがって、基盤電極上のシトクロムcを還元型に保つと、プローブ上のシトクロムcオキシダーゼと反応することがわかる。本研究では、シトクロムcの正電荷表面（リシンが豊富）を基盤電極に結合させ、脱酸素条件下においてプローブ電極の電流特定について調べた。

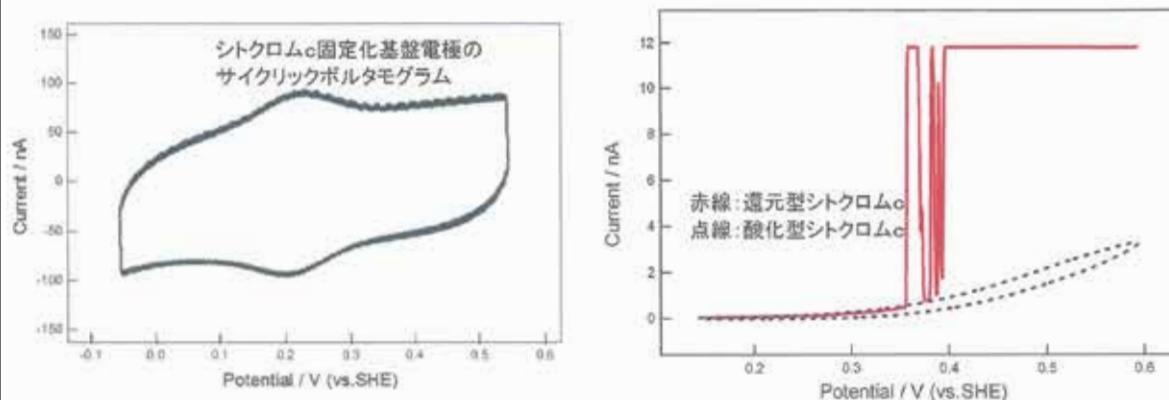
「結果」

本研究では、シトクロムcの正電荷表面を利用して基盤電極に結合させた場合の電流特定について調べた。基盤金電極表面を負電荷にするために、ウンデカン酸チオールを用いて被覆し、シトクロムcを静電的に固定化した。これにより、シトクロムcの正電荷表面が電極側となる配向にした。

下図に基盤電極のサイクリックボルタモグラムを示す。固定化分子に典型的な酸化還元シグナルを示していることから、シトクロムcが固定化されたことが分かった。

シトクロムcとシトクロムcオキシダーゼが接触した場合のプローブ電極の電流特性を調べた。下に示すように、基盤電極に電位を印加し、シトクロムcを還元型に保持した場合、プローブの電位が+0.35 Vより高い範囲において、電流値が大きく増加した。このことから、シトクロムcから、シトクロムcオキシダーゼに電子移動が進行したことがわかった。

本測定では、シトクロムcの正電荷表面が基盤電極側にある。シトクロムcオキシダーゼと電子移動反応したのは、正電荷表面の裏側である。したがって、シトクロムcの分子内の電子の流れは、正電荷表面からその反対側へ流れることが示唆された。



研究テーマ

未利用農業資源から高機能食品・化粧品素材の生産

研究者 ▶ 独立行政法人国立高等専門学校機構 沼津工業高等専門学校：竹口 昌之（たけぐち まさゆき）

研究成果

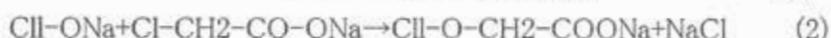
1.はじめに

北海道の小清水町農業協同組合は、馬鈴しょからでん粉を製造するでん粉工場を有している。この工場は毎年9月初旬から11月中旬まで24時間連続稼働し、北海道馬鈴しょでん粉生産量の約10%を製造している[1]。馬鈴しょからでん粉を製造する工程は輸送、洗浄、すりつぶし、抽出、乾燥の5工程に分けられる。でん粉製造の際、副産物として馬鈴しょの果肉絞りかすであるポテトパルプ(以下PP)と植物性タンパク質を多く含むデカンター廃水(PFJ)を生じる。PFJは酸処理後、タンパク質成分が固体物として回収される。回収されたタンパク質は乳牛の飼料として利用され、残渣液は液肥として畑に散布されている。

PPはすりつぶし工程の際に排出される廃棄物であり、毎年5千トン排出されている。PPは酪農飼料原料として用いられるが、利用方法が限られている。PPの組成は馬鈴しょ外皮などの纖維質を主成分とし、食物纖維77.6%、タンパク質5.8%、水分4.5%、灰分2.6%、脂質0.3%、その他(でん粉)9.2%である。纖維の主成分であるセルロースは食品添加物であるカルボキシメチルセルロース(CMC)やエネルギー源、工業原料として期待されるエタノールの主原料として期待できる。そこで本研究室ではPPの主成分が纖維質であることに着目し、未利用農業資源であるPPより高機能食品・化粧品素材として期待されるCMCの製造方法について検討を行なった。

2.方法

CMC合成はPPを原料に以下に示すWilliamsonエーテル合成法に従って行なった。



PPを80°Cの加熱乾燥により乾燥させた。乾燥したPPをハンマークラッシャー(三庄インダストリー(株), NH-34)を用いて粒径2 mm以下に粉碎した。この粉碎PP 20 gとアセトン300 mL、クロロ酢酸8 g、水酸化ナトリウム12.5 gおよびイオン交換水20 mLを1 L容丸底フラスコ中へ添加し、50°Cで3.5時間加温した。反応後、エバボレーションによりアセトンを除去し、残渣にイオン交換水1 Lを加えて1晩溶解させた。得られたエバボレーション残渣溶解液を目の開き90 μmのふるいでろ過し、不溶性残渣を取り除いた。得られた液を5 L容三角フラスコに移し、エキネンF-6(エタノール89%, メタノール11%)3 Lを添加した。エキネンの添加により析出した物質を目の開き90 μmのふるいでろ過分離し、ろ過残渣を105°Cで乾燥させた。この乾燥物をワンダーブレンダーで粉碎し、得られた粉碎物をポテトパルプカルボキシメチルセルロース(PP-CMC)とした。種々の添加量のクロロ酢酸(4, 8, 16, 32 g)、水酸化ナトリウム(6.25, 12.5, 25.0 g)を用いた場合においても同様に実験を行なった。得られたPP-CMCについて、フーリエ変換度計(以下FT-IR)による官能基分析と置換度測定を行なった。置換度測定法はASTM D1439-94に従った。

3.結果

PP 20 gに対し、クロロ酢酸(4~32 g)と水酸化ナトリウム(6.25~25.0 g)重量を変化させ、PPのカルボキシメチル(CM)化を行なった。得られたカルボキシメチル化物(PP-CMC)についてフーリエ変換赤外分光光度法(FT-IR分光法)による官能基分析、CM化度(置換度)の測定および粘度測定を行なった。

FT-IR分析はKBr錠剤法により行ない、波数4000~500 カイザーの範囲で吸光度測定を行なった。FT-IRの結果よりCM基に基づく1600, 1420 カイザーにピークが観測された。1600 カイザーのピークはカルボニル基のC=O二重結合の存在を示し、1420 カイサーのピークはカルボキシメチル基の-CH₂-の存在を示している。このことから、各試料中にカルボキシメチル基を有していることがわかった。また、カルボニル基が一般的なカルボン酸の検出位置である1700 カイサーから低波数側にシフトしているのは、合成物中のカルボニル基がナトリウム塩でありイオン的結合であること、2つの酸素原子が共役していることによると考えられる。一方で、PP以外の反応成分であるクロロ酢酸の重量が高い場合において、CM基に基づく1600, 1420 カイサーのピークは消失し、新たに1740, 1610 カイサーのピークが観測された。PPにはセルロースに加え、ペクチンが含有されている。1740 カイサーはペクチンの構成分子であるガラクツロン酸のメチルエステル化されたカルボキシ基のC=O伸縮振動、1610 カイサーはガラクツロン酸のイオン化したカルボキシ基のC=O伸縮振動を示していると考えられる。これより、特にクロロ酢酸重量の高い場合では、CMCが合成されないことがわかった。FT-IR分析よりPP中のセルロースがCM化していることがわかった。そこで、CM基の置換度を明らかにするために置換度測定を行なった。その結果、クロロ酢酸重量40 g, NaOH重量7.25 gの条件において置換度が最も高い0.72のCMCが合成できた。

4.総括

Williamsonエーテル合成法に従ってPPからのCMC合成を行ない、合成したCMCについてFT-IRによる官能基分析、置換度測定および粘度測定を行なった。なお、合成条件としてPP 20 gに対してクロロ酢酸重量を4, 8, 16, 32 g、水酸化ナトリウム重量を6.25, 12.5, 25.0 gの条件で合成反応を行なった。その結果、クロロ酢酸重量40 g, NaOH重量7.25 gの条件において置換度が最も高い0.72のCMCが合成できた。この合成物のFT-IRによる官能基分析の結果は、CM基に由来する1620, 1420 カイサーにピークが観測された。また、クロロ酢酸重量が16 g以上になるとCMCが合成されず、PPに含まれるペクチンがCM化された物質が合成されることがわかった。

以上より、未利用農業資源であるPPよりCMCを製造するための反応条件を決定することができた。

謝辞

本研究は2015年度小柳財団様の助成を受けたものです。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- [1] 北海道オホーツク総合振興局農務課のページ(平成23年度実績)。“2 馬鈴しょでん粉”。
<http://www.okhotsk.pref.hokkaido.lg.jp/ss/num/ohonou2012/4.p26-sebyoushi.pdf>,
(参照2015-12-14)

研究テーマ

転写因子タンパク質導入によるダイレクトリプログラミングの誘導

研究者 ▶ 東京工業大学 総合理工学研究科：三重 正和（みえ まさやす）

研究成果 本研究は、iPS細胞を経ること無く、細胞の運命をリプログラミングする“ダイレクトリプログラミング”を転写因子タンパク質導入により実現することを目的とした。当初の計画では、Sox2転写因子タンパク質導入による神経幹細胞へのダイレクトリプログラミングを予定していたが、Sox2での実験に先立ち、ニューロン分化を制御するAscl1転写因子タンパク質導入による神経細胞へのダイレクトリプログラミングを試みた。Ascl1は、Lmxalなど数種類の転写因子と共にマウス纖維芽細胞へと導入することでドーパミン作動性ニューロンへのダイレクトリプログラミングが可能であることに加え、単独でもダイレクトリプログラミングが可能であることが報告されている。

はじめにAscl1遺伝子をマウス胚性腫瘍細胞株p19に導入し、ニューロンへの分化誘導能を検討した。その結果、Ascl1遺伝子を導入した細胞では神経突起の伸張が確認された。このことから、Ascl1タンパク質の活性評価法として、p19細胞へのタンパク質の導入を行うこととした。次に、遺伝子導入に使用したAscl1遺伝子を大腸菌内でのタンパク質発現用ベクターにクローニングし、タンパク質の強制発現を行った。タンパク質精製のためにタンパク質のN末端あるいはC末端にヒスチジンタグ(His-tag)を融合し、Ascl1を発現させた。His-tagをNあるいはC末端に融合したAscl1タンパク質は、いずれの場合も大腸菌内で発現した。しかしながら、いずれも可溶画分ではなく不溶画分であった。そこで、不溶画分から得られたタンパク質の精製を行った。その結果、N末端にHis-tagを融合したAscl1は、透析の過程で凝集し、精製したタンパク質を得ることが出来なかった。一方、C末端にHis-tagを融合したAscl1は透析により尿素を除去した後も凝集することなく、精製に成功した。そこで、得られたタンパク質を蛍光修飾して、Ascl1タンパク質の膜透過能を検討した。通常、タンパク質を細胞内に導入することは困難である。しかしながら、幾つかのbHLH型の転写因子タンパク質は、細胞膜透過能を有することを我々は見出している。Ascl1もbHLH型の転写因子であることから同様に膜透過能を有するかを検討した。蛍光修飾したAscl1タンパク質をp19細胞に添加し、インキュベーションの後、共焦点レーザー顕微鏡を利用して蛍光の様子を観察した。その結果、細胞内に蛍光が観察されAscl1も膜透過能を有することが明らかになった。Ascl1の膜透過能が明らかとなったので、分化誘導能を検討した。P19細胞にAscl1タンパク質を添加し、数日間培養した後、ニューロンの分化マーカーの一つである β -tubulinの免疫染色を行った。しかしながら、 β -tubulin陽性の細胞を確認することは出来なかった。得られた精製タンパク質自身が活性を有していない可能性もあるが、添加するタンパク質の量や培養日数などの条件を今後検討する必要がある。

以上の結果をまとめると、大腸菌を用いたAscl1タンパク質の発現・精製に成功し、Ascl1タンパク質が細胞膜透過能を有することを明らかにした。ここで得られた知見は、多くのbHLH型の転写因子タンパク質が細胞膜透過能を保持することを示唆するものであり、転写因子タンパク質導入による細胞分化誘導法の開発に寄与するものと期待される。今後は、Ascl1タンパク質の活性を確認した後、纖維芽細胞へのAscl1タンパク質導入によるドーパミン作動性ニューロンへのダイレクトリプログラミングを試み、更には、Sox2タンパク質導入によるダイレクトリプログラミングを試みる。

研究テーマ

UVA/UVB 照射したメラノサイトのメラニン過剰合成のメカニズム 解析とミトコンドリア指向性抗酸化物質による防護効果

研究者 ▶ 北海道大学 大学院獣医学研究科：稻波 修（いななみ おさむ）

研究成果

本研究は皮膚由来細胞で紫外線によって起きるメラニン過剰合成蓄積の波長依存性を明らかにし、抗酸化物質処理で紫外線誘導メラニン過剰蓄積を防護できるか否かについて明らかにする目的として行った。

ヒト皮膚黒色腫由来MeWo細胞を用い、細胞培養には、10% fetal bovine serum、3.7 g/l 炭酸水素ナトリウムならびに1% non-essential amino acidを含むDMEM培地 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いた。照射は24時間後の細胞においてUVA、UVBならびUVC照射で大きな細胞死を誘導しない条件を予備実験で予め評価し、次の照射条件を選択した。すなわち、細胞を照射は60 mmプラスチックシャーレ上に播種して一晩培養した細胞の培地を取り除き、UVA (362.3 nm, 1.24 kJ/m²)およびUVB (313 nm, 37.9 J/m²)をUSHIO Optical ModuleX (ウシオ電機株式会社, 東京)にて照射した。UVC (254 nm, 0.464 J/m²)は日立殺菌ランプGL-15 (日立, 東京)を用いて照射した。照射により生じるメラニンの量は、SiegristとEberleの方法により測定した。すなわち、照射した細胞を培養して24時間後にトリプシン処理により回収、洗浄後、細胞数が3,000,000 cells/mlになるように1 N NaOHを加え、65° Cで1時間インキュベートし、遠心操作により回収した上清をDU 800 分光光度計 (Beckman Coulter, CA, USA)を用いて405 nmの吸光度を測定し、メラニンの相対量を評価した (Anal. Biochem., 159:191, 1986)。その結果UVB照射では非照射と比較して有意なメラニンがコントロールの1.3倍の蓄積が起きていることが観察された。UVAでも平均値で同程度の増加傾向があるものの有意な上昇ではなかった。しかしながら、UVCではメラニンの蓄積は起こらなかった。さらに、照射時ならび照射後に抗酸化物質として10mM N-acetylcysteine (NAC)、100 μM Troloxならびに1.5 μM Mito-TEMPOによって処理することにより、UVBによるメラニンの有意な上昇ならびに上昇傾向は完全に消失した。また、照射後24時間後の細胞内活性酸素種 (ROS)について2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFDA)の蛍光強度で評価したこと、UVBの紫外線照射後で細胞内ROSの上昇が明確に上昇した。さらにミトコンドリア膜電位についても tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM)で評価したこと、UVB照射で著しい膜電位の増加が観察された。

以上の結果から、UVB照射によりメラニンの蓄積が効率的に起こり、これにはミトコンドリア膜電位の上昇に伴ってROSの増加し、このROS増加がメラニンの蓄積に関与することが示された。UVBは太陽光に0.2%程度含まれることから本知見は重要であると考えられる。また、この増加するROSを消去する能力のある抗酸化物質の投与がメラニン蓄積を軽減できることから、皮膚のシミやそばかす等の生成に関与するメラニン蓄積を抗酸化剤により制御できる事が明らかとなった。とりわけミトコンドリア由来ROS消去能が高いことが知られているMito-TEMPOが効果的にUVBによるメラニン蓄積を効率よく低減できたことから、本研究によってミトコンドリアを標的とした抗酸化物質が「しみ」や「そばかす」などの美容上問題がある皮膚障害の低減出来る可能性を明らかとなり、ミトコンドリアを中心とするレドックスバランスを制御する化合物の開発が皮膚の美容に重要なことが示唆された。

研究テーマ

若年女性における体組成上の筋減弱・体脂肪過多は肌状態不良の原因となるか

研究者 ▶ 公益財団法人ルイ・パストゥール医学研究センター：川合 ゆかり（かわい ゆかり）

研究成果 近年、若年女性の極端なやせ志向の結果として、体格指標ではやせ傾向にあるにもかかわらず体脂肪率が高いという、いわゆる「かくれ肥満」が増加している。体組成上は「筋減弱・体脂肪過多」という特徴を有し、筋減弱が顕著である。このような体組成の者では、易疲労感や肌状態不調といった健康障害を訴えるものが多い。そこで本研究では、若年女性の筋減弱が肌状態の不良につながるかどうか、さらにその原因として酸化ストレスが関与するか否かを明らかにすることを目的とした。

【対象者及び測定項目】 対象者は東京都内女子大学に在学する20～22歳の学生61名とした。すべての対象者に対して、インフォームドコンセントを行い、書面による参加の同意を得てから測定を行った。

測定項目は、体組成として身長、体重、BMI、体脂肪率、骨格筋指数(四肢骨格筋量÷身長(m)²)をInBody730(インボディ・ジャパン社製)にて測定した。顔の肌状態を水分保持機能およびバリア機能について測定した。水分保持機能として角層水分量をCorneometer CM825、バリア機能の指標として経皮水分蒸散量(TEWL)をTewameter TM300(双方ともCourage and Khazaka社製)を用いて測定した。測定は2016年10月から2017年1月の4か月間に月経周期の卵胞期の月経開始から7日目～10日目に統一して実施した。各被験者は実験担当者の指示のもと、同一の洗顔料を用いて決められた手順にて洗顔を行い、一定条件下(室温20±1°C、湿度50±5%)の恒温湿度の部屋にて20分間座位安静を保ち、肌の順化を行った後、それぞれの測定を実施した。測定部位は目尻から垂直に下した線と小鼻下から水平に伸ばした線との交点を中心とする右頬とした。酸化ストレスマーカーとして尿中8-OHdGを抗体チップ法にて測定した。

【結果】 対象者の身体特性および肌特性を表1に示した。対象者の骨格筋指数と角質水分量あるいはTEWLとの間に相関関係は認められなかったので、骨格筋指数をアジア人高齢女性のサルコペニアのカットオフ値とされている5.7kg/m²で2群に分け、角質水分量、TEWL、さらに酸化ストレスの指標である尿中8-OHdGについても差が認められるかを検討した。結果を表2に示す。この結果から骨格筋指数の低い者は骨格筋指数の高い者より、肌の角質水分量が少なくTEWLは高い傾向が認められた。尿中8-OHdGも骨格筋指数の低い者は高い者と比較して高値を示した。さらにTEWLと尿中8-OHdGとの関係を検討したところ、有意な正相関関係を認めた(図1)。

【考察】 体組成上「筋減弱・体脂肪過多」という特徴を有する「かくれ肥満」の場合、肌状態に対して体脂肪過多であること、もしくは筋減弱であることのどちらかが大きく関わっているのかは不明である。筋減弱の状態は、特に高齢者における骨格筋量や筋力の低下した状態“サルコペニア”が良く知られている。本研究の対象者では約34%が、若年者でありながらサルコペニアのカットオフ値以下の筋肉量であった。そこで今回は「筋減弱」に着目して検討を行った。その結果、骨格筋指数が低い対象者は角質水分量が低く、TEWLが高いという結果を示した。つまり骨格筋量が少ない者ほど、肌の水分保持機能のみならず、バリア機能も低く、さらにバリア機能の指標であるTEWLと酸化ストレスマーカーである尿中8-OHdGとの間に正の相関関係が認められたことから、酸化ストレスが高いほど、肌のバリア機能が低いという可能性が示唆された。このことから、若年女性の筋減弱は肌状態不良をもたらし、

その原因の一つとして酸化ストレスが関連することが示された。しかし、肌状態には栄養素の摂取状況、代謝及び健康状態、心理的ストレスなど複雑に絡み合い影響を及ぼしているものと考えられる。今後、対象者人数を増やし多方面からの検討が必要と考えられる。

【謝辞】本研究は平成27年度公益財団法人小柳財団研究助成金交付により研究を遂行することができました。ここに深謝いたします。

表1 対象者の身体特性および肌特性

対象者数	61
年齢 (yrs)	21.5 ± 0.9
身長(cm)	158.3 ± 5.0
体重 (kg)	50.7 ± 5.8
BMI (kg/m ²)	20.2 ± 1.8
体脂肪率 (%)	25.9 ± 4.6
骨格筋指數 (kg/m ²)	5.90 ± 0.50
角質水分量 (AU)	55.1 ± 12.1
TEWL (g/m ² /h)	16.0 ± 6.4

mean ± SD 骨格筋指數 = 四肢骨格筋量(kg) / 身長(m)²

表2 骨格筋指數による2群比較

	骨格筋指數 < 5.7kg/m ²	骨格筋指數 ≥ 5.7kg/m ²	P
角質水分量 (AU)	51.5 ± 9.5	57.0 ± 12.0	0.08
TEWL (g/m ² /h)	17.7 ± 8.2	14.7 ± 4.7	0.07
尿中8-OHdG (ng/mg CRE)	9.3 ± 6.3	6.8 ± 2.6	0.06

mean ± SD

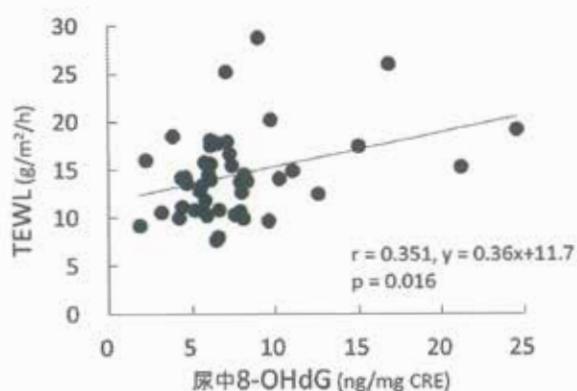


図1 尿中8-OHdGとTEWLとの関係

研究テーマ

セロトニン2A受容体の立体構造解析

研究者 ▶ 千葉大学大学院 理学研究科：鈴木 七緒（すずき ななお）

研究成果 Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は7回膜貫通型の膜タンパク質であり神経伝達物質、ホルモン、味、匂い、光など様々な刺激を受容し細胞内にシグナルを伝達する重要な役割を担っている。また、医薬品の多くは、GPCRをターゲットとしており、医学・創薬においても重要なターゲットである。セロトニン2A受容体(5-HT2AR)は、統合失調症や不眠症といった疾患に関わっており、5-HT2ARを不活性に抑えることができれば、これらの疾患の症状の緩和・寛解に繋がる。5-HT2ARをターゲットとした医薬品の開発が行われているが、5-HT2ARはアミン受容体ファミリーに属し、このファミリー内のリガンドは分子構造や性質が類似しているため、標的としていない他のアミン受容体への親和性も高くなってしまうということが起こり得る。不活性型5-HT2ARの構造が明らかになれば、その詳細な立体構造情報から5-HT2ARをより選択的かつ効果的に不活性型に固定できるような医薬品をデザインすることが可能となる。これまでの研究から、活性型の5-HT1BR[1]と5-HT2BR[2]の立体構造は解かれているが、不活性型のセロトニン受容体の構造は解かれていらない。本研究では、まだ解かれていらない不活性型5-HT2ARの結晶構造解析を行うことで、各受容体間のリガンド結合部位の差を明らかにし、より受容体選択性の高い化合物の創出に貢献することを目標とした。

これまでの研究では、5-HT2ARの野生型(WT)からN末端とC末端の配列を欠損させた欠損変異体(ICL3)と細胞内第3ループにapocytochrome b562の熟変異体RIL(BRIL)を導入したICL3_BRILを作製したところ、WTと比較し発現量が増加した。そこでICL3_BRILの大量発現・精製を試みたが、精製途中や結晶化時の濃縮で変性や凝集が生じてしまっていた。これらの変性や凝集は不安定な構造に起因していると考えられた。そこで、本研究では、さらなる安定化を目指し変異導入による安定化を試みた。安定化変異候補は、結晶化に成功している他のクラスAに属するGPCRの変異情報をもとに、相同性が高く同じ安定化効果が期待できる変異を9種類選出した。これらの変異は、PCRによって大腸菌並びに出芽酵母発現ベクター[3]に導入した。安定化変異体の選別は、発現量と可溶化効率を指標に行なった。9種の変異体は小スケールで発現し、菌体破碎後、超遠心分離によって得られた膜画分をcholesteryl hemisuccinateを含む界面活性剤n-dodecyl- β -D-maltopyranoside(DDM/CHS)で可溶化しその可溶化効率を算出した。その結果、発現量が増加しつつ可溶化効率が上昇した変異体1種類を得ることができた。そこで、この安定化変異体を用い、結晶化に向け大量培養・精製を行った。出芽酵母発現系を用い、リッチ培地を用いて大量培養を行なった。得られた菌体は、フレンチプレスで破碎し、超遠心分離により膜画分を得た。得られた膜画分はDDM/CHSで可溶化し、超遠心分離後のサンプル上清は、Hisタグを用いたアフィニティカラムクロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーで精製をおこなった。結晶化には多量のサンプルを必要とするが、精製段階での収率が低かったため、収率向上を目指し、アフィニティカラムクロマトグラフィー用の樹脂の種類を検討した。その結果、樹脂の種類を変更することで回収率を3倍以上増加させることができた。さらに、ゲルろ過クロマトグラフィーの結果から、変異導入により単量体のピークが増加していた。この単量体のピークを回収し、濃縮後に結晶化を行なった。結晶化には、脂質キューピックフェーズ法(LCP法)を用い、結晶化剤として3種類の結晶化キット(MemMeso, MemGold, MemGold2)を用いスクリーニングを行なった。LCP法では高濃度のタンパク質を必要とし、これまでのデータでは20-80 mg/mLの濃度で結晶化に成功しているという報告がある[4]。以前、ICL3_BRILで結晶化を行なった際は、濃縮途中で変性や凝集が生じて

しまい、高濃度まで濃縮することができなかった。しかし、変異体では変性や凝集することなく30 mg/mL以上の濃度まで濃縮が可能であった。現在までに微結晶が観察されており、放射光施設でX線回折実験を行なったが、タンパク質の回折点は得られていない。原因として、フレキシブルな構造の存在、不十分な精製精度、そして安定化が十二分であることが考えられる。今後は、フレキシブルなリンカーで繋がれている蛍光タンパク質の除去、精製ステップの追加、そしてさらなる熱安定化向上を目指し新たな変異体の選出と変異体の組み合わせを検討し結晶化を目指していく予定である。

【参考文献】

1. C. Wang et al., *Science*, 2013, 340, 610.
2. D. Wacker et al., *Science*, 2013, 340, 615.
3. M. Shiroishi et al., *Microb. Cell Fact.*, 2012, 11, 78.
4. J. Xiang et al., *Trends Pharmacol Sci.*, 2016, 37, 1055–1069.

研究テーマ

アオサから得られる潤い成分の高機能化

研究者 ▶ 近畿大学 産業理工学部：菅野 憲一（かんの けんいち）

研究成果

緑藻(アオサ)由来の粘性物質ウルバンや褐藻由来のアルギン酸塩は、海藻から豊富に得られる粘性物質です。これらの粘性物質を化粧品や食品分野へ応用することを目指して、粘度や強度の向上を目指して、アオサおよびアルギン酸について大別して3つの研究を行いました。

(1) アルギン酸とアクリル誘導体のブレンドによる機械的性質

アルギン酸塩やアクリル酸誘導体はハイドロゲルを形成する保湿性の高い材料です。アクリル誘導体とアルギン酸塩のIPN(相互侵入網目の形成)によって、ハイドロゲルの機械強度を向上することが可能であることが報告されております(J.-Y. Sun, et al., Nature, VOL 489, 133-136 (2012))。一方、本研究では、アクリル酸誘導体の架橋物に直鎖状アルギン酸塩を共存させるだけで強度を向上することを示しました。これは、鉄筋コンクリートで例えるなら、アクリル誘導体の架橋物がコンクリートであり、アルギン酸は鉄筋の役割をしていると考えられます。

具体的には、アルギン酸ナトリウムおよびビスアクリルアミド(架橋剤)存在下、4種類のアクリル酸誘導体(アクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、ヒドロキシエチルメタクリレート、アクリル酸ナトリウム+アクリルアミド)を過硫酸アンモニウム、TEMEDでラジカル重合することでハイドロゲルを得ました。これらのハイドロゲルを3号ダンベルに型抜きし、引っ張り強度試験を行いました。アルギン酸ナトリウム含有ゲル群と不含ゲル群を比較すると、含有ゲル群のほうが高い強度を示しました。このことから、繊維強化プラスチックでみられるように、剛直な高分子を添加することにより、ハイドロゲルの強度が簡易に向上可能であることが示されました。

Table 1. アルギン酸ナトリウムによるアクリル誘導体ゲルの引っ張り強度向上

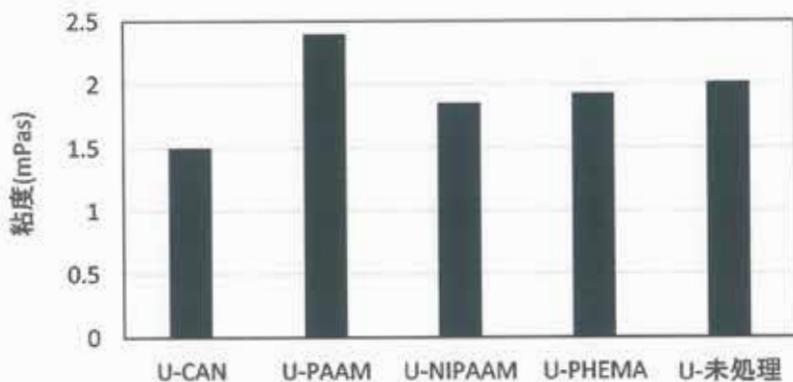
No.		荷重 (mN)	伸び (mm)	破断伸 度(%)	引張強 さ(kPa)
1	アクリルアミド+bis +アルギン酸ナトリウム	407.9	41.9	41.9	20.4
2	2-ヒドロキシメタクリレート+bis +アルギン酸ナトリウム	200.3	46.5	46.5	10
3	イソプロピルアクリルアミド+bis +アルギン酸ナトリウム	459.7	33	33	23
4	アクリル酸ナトリウム+アクリルアミド+bis +アルギン酸ナトリウム	240.2	46	46	12
5	アクリルアミド+bis	191	37.9	37.9	9.5
6	2-ヒドロキシメタクリレート+bis	105.9	43.6	43.6	5.3
7	イソプロピルアクリルアミド+bis	245.3	17.9	17.9	12.3
8	アクリル酸ナトリウム+アクリルアミド+bis	145.2	28.5	28.5	7.3

(2)アオサ多糖ウルバンのカチオン化

アオサ多糖ウルバンはアルギン酸塩と同様に海藻から豊富に得られる粘性物質です。ウルバンはカルボン酸基および硫酸基を有する多糖ですので、アミンなどのカチオン基を導入することによって、イオン架橋を形成してハイドロゲル化することが期待されました。種々の条件で、アオサ多糖ウルバンを(S)-(-)-(3-Chloro-2-hydroxypropyl)trimethylammonium chlorideによってカチオン化を行いました。カチオン化反応の条件を検討した結果、難溶性の粉末を与え、目的とする粘性物質およびハイドロゲルを得ることはできませんでした。生成物が種々の溶媒に対して不溶であったため、核磁気共鳴スペクトルによる構造解析は困難であり、赤外吸収スペクトルからも直接的にカチオン基の導入を確認することは困難でした。

(3)アオサ多糖ウルバンのアクリル誘導体によるグラフト化と粘性に対する影響

アオサ多糖ウルバンに、3種類のアクリル誘導体(アクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、ヒドロキシエチルメタクリレート)をグラフト化しました。グラフト重合は、硝酸酸性水溶液中でCAN(硝酸セリウムアンモニウム)によって行いました。得られた生成物の粘度を比較したところ、アクリルアミドをグラフトしたものが最も高い粘度を示しました。



U-CAN: CANにより処理したウルバン; U-PAAM: アクリルアミドをグラフトしたウルバン;
U-NIPAAM: N-イソプロピルアクリルアミドをグラフトしたウルバン; U-PHEMA: 2-ヒドロキシエチルメタクリレートをグラフトしたウルバン; U-未処理: ウルバン

Figure 1. 各種アクリルアミドグラフトウルバンの粘度

上述のとおり、海藻由来の潤い成分(多糖)をハイドロゲルへの添加剤として評価したり、粘性の向上を行いました。褐藻由来アルギン酸塩はその剛直な構造ゆえ、ハイドロゲルの強度向上に用い、緑藻由来ウルバンは粘度が低いため、グラフト化によって粘度を向上しました。

これらの研究成果は、学会年会などで発表予定(化学関連支部合同九州大会、日本糖質学会を予定)。また、追加実験後に学術雑誌への投稿を予定。

研究テーマ

マイクロ血管デバイス開発による血管機能の解明と健康 および美肌へのアプローチ

研究者 ▶ 日本女子大学 理学部：佐藤 香枝（さとう かえ）

研究成果

毛細血管は血液と臓器組織との間で物質交換を行う器官である。この物質交換の機能は、生命活動の維持に重要で、健康な体を保つために欠かせない。がん、生活習慣病、感染症など様々な病態では血管と臓器の間の物質交換の機能の破綻がみられ、また、むくみ、クマ、シミなども血管の機能不全が原因である。これらの疾病的治療法は確立されていない。その理由として、血管の機能を体外で再現し治療効果を検証するための方法が存在しないことが挙げられる。そこで、本研究では、ヒトから得た培養細胞とシリコーンゴムやハイドロゲル、ポンプを用いてマイクロ血管モデルを構築することを目的とした。

1. シリコーンゴムのデバイスを用いた血流と血管伸縮を模倣した血管モデルの構築

シリコーンゴムとカバーガラスを用いて長さ1 cm、幅1 mm、深さ500 μm の流路を持つデバイスを作製した。ここにヒト肺動脈平滑筋細胞を導入し、培地を流すためのポンプと接続し、送液を行なながら培養した。すると静置培養の条件と比較して、細胞増殖が促進されることがわかった（発表論文）。一方、流路を持つシリコーンゴムシート2枚で薄いシリコーンゴムシートを挟んだ構造のデバイスを作製した。この上の流路にはヒト肺動脈平滑筋細胞を導入し、薄いシリコーンゴムシートに細胞を接着させた。下の流路は制御流路として使用し、バルブを挟み吸引ポンプに接続し、常圧と陰圧を制御できるようにした。ここで下流路を陰圧にすると薄いシリコーンゴムシートが下流路へ引き込まれ、シートが伸展する。これを脈拍と同じ頻度で行うことで、動脈内での細胞の伸展を模倣した培養を実現した。ここで刺激を受けた細胞は、静置培養と比較して増殖傾向にあることが示された。血管の細胞においては静置培養と力学的刺激を加えた培養とでは細胞の機能発現が異なったことから、血管モデル作製に重要な要素であることがわかった。デバイスの開発により、培養皿で行う従来の実験法でわからなかつた血流や細胞の伸縮の影響が明らかになることが期待できる。今後、応用研究として高血圧などの病態モデルや皮膚の血流モデルを構築することを目指す。

2. ゼラチングルのデバイスを用いた血管モデルの構築

細胞外マトリックス(ECM)の主成分であるコラーゲンやゼラチンを素材としたデバイスは、物質透過性に優れたうえ、組織本来の機能をもたせた細胞培養を可能にすると考えられている。本研究では、細胞培養及び観察に適した、ガラスを下板としたゼラチン製のウェル及びマイクロ流体デバイスを開発した。底部も厚みのあるゼラチングルで構成されているデバイスと比較して、高倍率での細胞観察には適したデバイスの作製に成功した。シリコーンゴムのウェルとゼラチン製ウェルでヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)と正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)の共培養を行い、毛細血管網を構築したところ、ゼラチン製のウェルのほうが速やかにそして細い毛細血管ができることがわかった。また、ゼラチン製マイクロ流体デバイス内でHUVECを培養したところ、管空状に流路壁面に細胞を貼り付けることができた。今後、培地を流すためのポンプとデバイスを接続し、血流を再現する条件での培養を試みる予定である。本デバイスは皮膚の血流を評価したり、毛細血管の透過試験への応用や長期に渡る細胞機能の評価へ用いることが期待できる。

発表論文

"Fluidic culture and analysis of pulmonary artery smooth muscle cells for study of pulmonary" Sato K, Nakajima M, Tokuda S, Ogawa A, *Anal Sci.* 32(11): 1217-1221 (2016).

研究テーマ

創傷治癒を目指したナノ粒子型人工成長因子の設計と機能評価

研究者 ▶ 東京大学 大学院工学系研究科：山東 信介（さんどう しんすけ）

研究成果

創傷治癒や一部組織の再生は、創傷部位近傍の細胞群から様々な因子が放出されることで引き起こされる。種々の因子のうち、最も有用なもの1つは成長因子・増殖因子である。機能性タンパク質である成長因子は極めて有用な分子ツール、および薬剤になりうるが、その不安定性、コンタミネーションの問題、また高い作成コストが実応用に受けた大きな問題であった。

これら現状の克服に向け、化学的に合成可能な核酸分子を基本骨格とする人工成長因子の開発に取り組んでいる。これまでに、肝細胞増殖因子(Hepatocyte Growth Factor)の機能を代替できる人工核酸の開発に成功し、細胞の遊走や増殖などの現象を誘起できることを確認している。本助成研究では、これらの成果を発展させ「生体安定性に優れた人工成長因子の検討」および「多価人工成長因子の調整と機能評価」に関する研究を進めた。

1. 生体安定性に優れた人工成長因子の検討

核酸からなる人工成長因子は、生体中に多く存在するヌクレアーゼ等による生分解をうけ、直接的な生体応用は困難であると予想される。そのため、実応用に向けては、粒子化や核酸塩基の修飾が必須であると考えていた。しかし、精製ヌクレアーゼや血清中の安定性を調査したところ、意外なことに、この人工成長因子が血清中でも長時間安定に存在できることを見出した。種々の人工成長因子誘導体を作成し、生体中における安定性を詳細に検討した結果、この人工成長因子が形成する立体構造、特に3'末端の立体構造が生体安定性に寄与していることが明らかとなった。これは、過去に報告された核酸構造の生体安定性に関する知見と矛盾しない結果である。様々な修飾なしに生体応用が可能であることを見出した点、またその構造的要因を明らかにした点は、今後の生体応用に向けた重要な進展である。

2. 多価人工成長因子の調整と機能評価

核酸錠型上に複数の人工成長因子をナノレベルの制御で配置した「多価人工成長因子」の調整を行った。多価人工成長因子の形成はゲル電気泳動等により確認した。実際に、cMet受容体を発現する細胞に対してこれら多価人工成長因子を作用させ、その活性(リン酸化や運動性等)を評価した。その結果、多価人工成長因子がアゴニストとして機能することが確認された。

上記の結果は萌芽的な段階であるが、今後の研究発展につながる重要な知見を含むものである。

研究テーマ

シアル酸糖鎖のアンチエイジング効果の解析

研究者 ▶ 地方独立行政法人 東京都健康長寿医療センター研究所：三浦 ゆり（みうら ゆり）

研究成果

① 研究の背景と目標

申請者は今までに、ヒト長寿モデルである超百寿者の血漿タンパク質の糖鎖解析を行い、健康長寿に抗炎症性糖鎖であるシアル酸を含む糖鎖が関与することを明らかにした(Miura, Y. et al. PLoS One, 10, e0142645, 2015)。シアル酸は、美肌効果があることで知られているが、肌以外のアンチエイジング効果については明らかになっていない。そこで本研究では、シアル酸糖鎖を増加させたマウスを実験的に作成し、抗炎症作用を指標としてシアル酸のアンチエイジング効果について明らかにする。

② 研究方法

[実験動物] C57BL/6NCr(22か月齢・♂)を用い、N-アセチルノイロミン酸を2か月間飲水投与した。投与量は、15、200、1200 mg/kgとし、投与期間中、1週間毎に体重変化と飲水量の変化を測定した。また、2週間毎に眼窩静脈叢採血を行い、遠心して血漿を分取した。投与2か月後に心臓より全採血を行い、血漿を分取するとともに肝臓を摘出して-80°Cで保存した。

[血漿糖鎖解析] peptide-N-glycanase Fを用いて、血漿タンパク質からN-結合型糖鎖を遊離させた。次に、糖鎖結合シアル酸の結合様式を区別するため、化学誘導体化法であるsialic acid linkage specific alkylamidation (SALSA)法により、糖鎖を誘導体化した。最後に糖鎖の還元末端を2-aminobenzoic acid (AA) 化し、MALDI-TOF/MSで分析した。得られたMSスペクトルの各ピークについて、SALSA de Glycanを用いて糖鎖の推定構造を解析した。構造が推定できたピークを糖鎖ピークとし、糖鎖ピークのピークリストの作成とピーク面積の測定をTOF/TOF Series Explorerを用いて行った。さらに糖鎖ピーク面積の合計を求め、総ピーク面積に対するそれぞれの糖鎖の相対ピーク面積比を計算し、サンプル毎の糖鎖の比較定量に用いた。

[シアル酸の定量] 血漿中の遊離シアル酸と糖鎖に結合したシアル酸を、シアル酸アッセイキットを用いてそれぞれ定量した。塩酸処理を行って糖鎖からシアル酸を遊離させて測定したサンプル（総シアル酸）と塩酸処理を行わないで測定したサンプル（遊離シアル酸）について測定し、総シアル酸と遊離シアル酸の差から糖鎖に結合したシアル酸含量を求めた。

③ 結果と考察

22か月齢のC57BL/6NCrにシアル酸を2か月間飲水投与したところ、200 mg/kg以上の投与量で体重減少が認められ、投与開始から8週間後に1200 mg/kg投与の群で25 % 減少した。しかし、飲水量については投与量依存的な変化は認められなかった。

血漿の糖鎖解析を行い、シアル酸を3個以上含む糖鎖を8種類同定した。これら8種類の糖鎖について、シアル酸長期投与の効果を調べたところ、投与56日目よりも投与28日目において、投与量依存的にシアル酸含有糖鎖の割合が増加する傾向が認められた。また、糖鎖に結合したシアル酸の含量も、投与28日目において投与量依存的に増加する傾向が認められた。以上より、1か月程度のシアル酸飲水投与により、マウス血漿タンパク質のシアル酸含有糖鎖を実験的に増加させられることが明らかになった。今後この実験系を用いて、肝におけるシアル酸転移酵素の変動や、炎症性疾患に対する抵抗力などについて検討する。

研究テーマ

栄養障害型表皮水泡症の原因遺伝子である VII型コラーゲンの分泌メカニズムの解析

研究者 ▶ 東京大学 大学院薬学系研究科：齋藤 康太（さいとう こうた）

研究成果

コラーゲンは小胞体で合成されるが、そこで形成する複合体は堅くかつ巨大（長さ>300 nm）で、通常の輸送小胞（直径60~90 nm）に入りきらないことが知られている。したがってコラーゲンの分泌には特殊な機構の存在が考えられたが、その詳細は不明であった。

報告者は、VII型コラーゲンの小胞体からの分泌に特異的に関与する積み荷受容体としてTANGOを単離・同定し、さらにこれがcTAGE5, Sec12といった因子と複合体を形成することで機能することを発表してきた（Saito et al. Cell, 2009; MBC, 2011; JCB, 2014, CMLS, 2015）。

本助成金を受けた研究で、報告者は、新たにTANGO1の短鎖アイソフォームとしてTANGO1Sを同定し、これが長鎖のTANGO1(TANGO1L)と協調してコラーゲン輸送を担っていることを新たに見出した（Maeda et al. MBoC, 2016）。さらに報告者は、複合体の構成成分を二次元Blue-Native PAGE/SDS-PAGEにより解析し、TANGO1L, cTAGE5多量体, Sec12多量体からなる900 kDaの複合体と、TANGO1S, cTAGE5多量体, Sec12多量体からなる700 kDaの複合体が協調してコラーゲン輸送を担っていることを見出した（Maeda, et al. MBoC, 2016）。

さらに報告者は以前Sec12がcTAGE5によりER exit siteに集積していることがコラーゲン分泌に必要であることを明らかにしていた（Saito et al. JCB, 2014）。しかしながら、どのような機構によりSec12の集積がコラーゲン分泌に関与するのか、そのメカニズムは不明であった。本助成金を受けた研究で報告者は、cTGAE5とSec12の結合に必要なドメインを詳細に解析し、両者の結合を欠失させるcTGAE5点変異体を作成した。この変異体を用いた解析の結果、報告者は、Sec12のcTAGE5を介したER exit siteへの集積は、ER exit site周辺におけるSar1の効率的な活性化を介してコラーゲンの輸送に関与することを新たに明らかにした（Tanabe et al., MBoC, 2016）。

2016年 第13回柿内三郎記念奨励研究賞受賞

研究テーマ

核酸アプタマー内包固定化不織布の作成と分子センサーへの応用

研究者 ▶ 名古屋工業大学 大学院工学研究科：水野 稔久（みずの としひさ）

研究成果

(1) DNzymeを代表的な機能性核酸として用いた不織布のナノ纖維内部への機能性核酸固定化方法の検討

以前の蛋白質酵素を内包固定化した不織布作製の検討(Langmuir, 32, 221–229 (2016))から、ポリ(γ-グルタミン酸)(γ-PGA)と4-グリシルブロピルトリメトキシシラン(GPTMS)の反応により得られる、有機-無機ハイブリッド(γ-PGA/GPTMSハイブリッド)が、機能性核酸を内包固定化した不織布作製に於いても有効な前駆体となると考えられた。そこで酸化触媒活性を持つDNazymeの1つであるDNA/Hemin(～7 kDa)を代表的な機能性核酸として選択し、まずは(1)機能性核酸を外部に漏洩させることなく不織布を構成するナノ纖維内部に固定化可能か、次に(2)内包固定化されたDNA/Heminが十分な機能を発揮するか、さらに(3)内包固定化されたDNA/Heminが核酸加水分解酵素による機能失活から保護されるか検討を行った。DNA/Heminはγ-PGA/GPTMSハイブリッドに水溶液の状態で混合し、電界紡糸により不織布の作製は行った(図1)。走査型電子顕微鏡(SEM)測定より、

不織布を構成するナノ纖維の表面構造の確認を行ったが、蛋白質酵素を固定化した場合と同様に、γ-PGA/GPTMS纖維表面のナノ構造に影響はないことがわかった(図2)が、一方でDNA/Heminが、分子量が比較的小小さく、さらにホスホジエステル結合由来の負電荷を多量に含むために、そのままではγ-PGA/GPTMS不織布の纖維内部に安定に固定化することができなかった。しかし、ストレプトアビシン(～53 kDa)と複合化し全体の分子量を大きくした(～73 kDa)ものを代替として利用することで、完全に漏洩を抑えることに成功した。

そこで、次に纖維内部に固定化されたDNA/Heminの酸化触媒活性の検討を行った。DNA/Heminは、西洋わさびペルオキシダーゼと同様に、助触媒としてH₂O₂存在下4-アミノアンチビリン(4-AAP)とジメチルアニリン誘導体(TOOS)の間の酸化カップリング反応を触媒出来る。

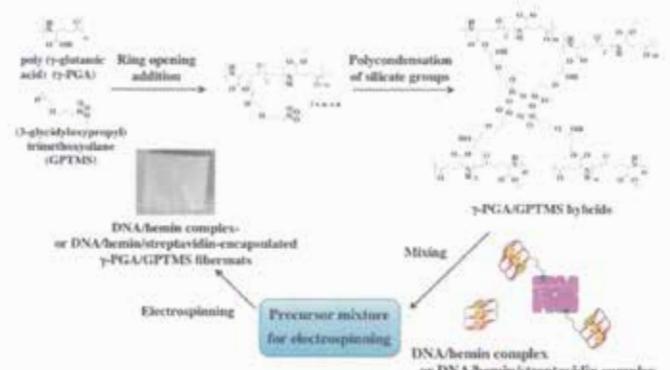


図1 γ-PGA/GPTMSハイブリッドを前駆体として用いたDNA/Heminあるいはこのストレプトアビシン複合体を内包固定化した不織布作製のスキーム

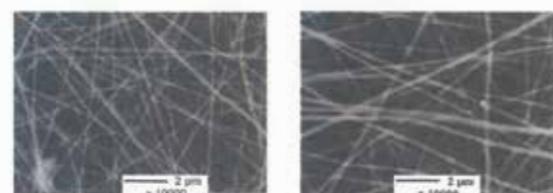


図2 DNA/Heminを内包固定化していないγ-PGA/GPTMS不織布(左)とDNA/Heminを内包固定化したγ-PGA/GPTMS不織布(右)の走査型電子顕微鏡(SEM)像の比較

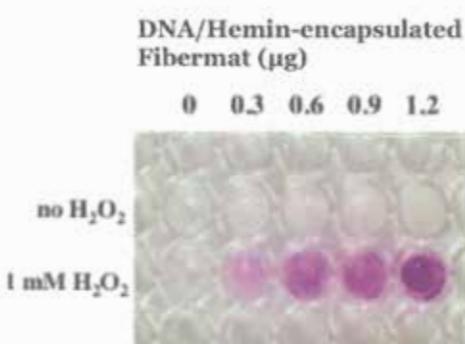


図3 4-AAPとTOOS間のカップリング反応に対するDNA/Hemin固定化γ-PGA/GPTMS不織布(左から0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 μg)の触媒活性の評価：過酸化水素非存在下(上段)、過酸化水素存在下(下段)

そこで4-AAPとTOOSの酸化縮合反応を、1mM H₂O₂が存在下、非存在下においてDNA/Heminを固定化した不織布の量を変化し比較を行った(図3)。その結果、DNA/Hemin固定化不織布の存在する場合においてのみ、顕著な4-AAPとTOOSの酸化縮合物の生成(紫色の発色)が見られた。さらにこの酸化触媒活性に関して、バッファー溶液中に溶解したDNA/Heminとの比較を行ったところ、ほぼ活性は変わらないことがわかった。この結果は、 γ -PGA/GPTMS不織布の纖維径を数百nm程度と極細化することで、纖維内部での分子の拡散速度低下を大きく抑制できていることを示唆した。さらに、この酸化触媒活性を評価する前に、核酸加水分解酵素の1つであるExo Iで処理して活性評価を行ったが、不織布に固定化したものでは、全く活性低下は見られなかった。バッファーに溶解しているDNA/Heminでは40%以上の顕著な活性低下が見られたことから、纖維内部に固定化することは核酸加水分解酵素からの保護機能を付与できることもわかった(Langmuir (2017)、受理済み)。

(2) アデノシンアプタマー内包固定化不織布のアデノシンセンサーへの応用

上記までのDNA/Heminを代表的な機能性核酸として用いた検討から、不織布が機能性核酸の新たな固定化担体として有効であることがわかった。そこで次に、アデノシンに対してセンサー分子として機能するDNAアプタマー用いた検討を行った。図4(A)に示す、蛍光色素(フルオレセイン)を5'-末端に持つ3'-側にアデノシンに対するアプタマー部位を持つ1本鎖DNA(FAM-DNA)と、3'-側に消光剤を持ちアデノシンアプタマーと部分的に相補配列を持つ1本鎖DNA(Q-DNA)を複合化した核酸複合体(FAM-DNA/Q-DNA)は、アデノシンに対する蛍光性アプタマーとして利用可能であることが知られている。アデノシン非存在下においてはFAM-DNAがQ-DNAと二本鎖を形成し、FAM-DNAの蛍光色素とQ-DNAの消光剤が近接することで蛍光発光が抑制される。しかし、アデノシン添加後はアプタマーパートの構造が壊れ、これにより蛍光発光が回復する。ここでは、このFAM-DNA/Q-DNAをナノ纖維内部に固定化するために、3'-側にビオチン修飾したFAM-DNA(FAM-DNA-BIO)とQ-DNAとの複合体(FAM-DNA-BIO/Q-DNA)をストレプトアビジンと複合化し、不織布のナノ纖維内部へ固定化した。センサー機能の評価を行うため、得られた不織布に対して、バッファー溶液のみ、グアノシン(10 mM)を含むバッファー溶液、アデノシン(10 mM)を含むバッファー溶液を、それぞれスポットした結果を図4(B)に示した。その結果、アデノシンを含むバッファー溶液を添加した場合のみにおいて、顕著な蛍光発光が確認された。この結果は、センサーとして働く機能性核酸に関しても不織布のナノ纖維に内包固定化した状態で機能を発揮させることができることを示唆した。本研究では、センサーとして利用可能な機能性核酸の検討がアデノシンアプタマーを用いた検討に限られてしまったが、同様の方法は様々な機能性核酸にも応用可能と期待される。

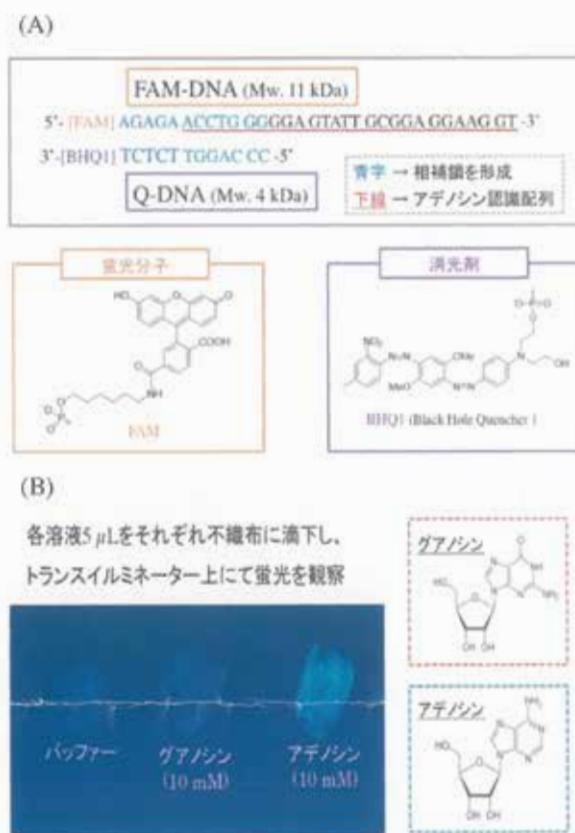


図4(A) アデノシンに対する蛍光センサーとして利用可能なDNAアプタマー複合体(FAM-DNA/Q-DNA)を構成する各1本鎖DNAの化学構造、(B)FAM-DNA/Q-DNAを固定化した不織布を用いたアデノシン選択的な蛍光検出

研究テーマ

新規結核薬の開発を目指した標的蛋白質の構造生物学研究

研究者 ▶ 大阪大学 蛋白質研究所：竹下 浩平(たけした こうへい)

研究成果

結核のうち感染しているが発病していない「潜在性結核菌感染症」の治療は重要であり、より簡便な薬物治療法の開発が望まれる。また、職業的な側面として、理容師法・美容師法では施術者が結核に感染していないことを届出る必要があり、結核は人々の健康を脅かすだけでなく、美容に従事する理容師や美容師にとっても身近で深刻な問題である。近年、Arai らは海綿から単離した抗結核作用のある Agelasine-D がウシ由来結核菌由來の BCG3185c に特異的に相互作用することを見出した (Arai, M., et al., ChemBioChem, 2014)。さらに、申請者はこの BCG3185c の構造解析に成功し、活性触媒中心に大きな結合ポケットが存在することを見いだした (unpublished data)。本研究課題では BCG3185c をターゲットとした基質となるリード化合物との複合体構造を網羅的に行い、新規結核薬の開発につながる研究を目指した研究を行った。既に基質なしの BCG3185c 蛋白質の構造決定に成功していたが、BCG3185c に結合する基質を探索する際に、ある程度高分解能で BCG3185c の結晶構造決定ができるほうが好ましい。そのため大腸菌をもちいて発現させた BCG3185c の高純度化さらに結晶化スクリーニングを再度行うことで最終的に分解能 2.3Å の精密構造を決定することに成功した。BCG3185c はジオキシゲナーゼに似た構造であったが、ネイティブな基質が不明なオーファン蛋白質であったため、ナフタレン等の化合物を結晶へ浸潤させ X 線回折を行うことで、どのような基質が結合するのかを探索した。しかし明確に基質特異性を決定することは困難であった。また、Arai らの報告にある Agelasine-D との複合体の結晶化ならびに X 線結晶構造解析を行ったが、その複合体構造を決定することも困難であった。

そこで計算科学的手法をもちい、Agelasine-D とのドッキングシミュレーションを行った。その結果、既に予想された基質結合ポケットに Agelasine-D が結合したモデルを見出した。Agelasine-D は疎水性の高い基質であることが予想されるが、結合部位周辺は疎水性アミノ酸環境にあり、その結合様式も分子間相互作用を考慮するとリーズナブルなものであると考えられる。今後は、基質が相互作用しているアミノ酸残基の同定、さらに結合力を向上させた Agelasine-D 改変体を探索することで、BCG3185c をターゲットにした新規抗結核薬の開発が期待でき、申請者は精力的に研究を継続していく所存である。



BCG3185cの結晶構造

本研究のスタート

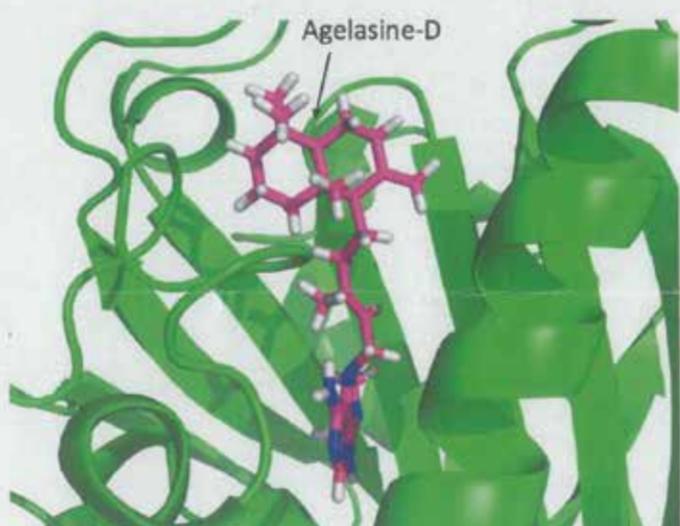
BCG3185cのX線結晶構造解析に成功済み。Araiらの報告で、抗結核作用のあるAgelasine-Dが作用する分子であることが判明。一方で、ネイティブな基質は分かっていないオーファン蛋白質である。

本助成により、

- ・Agelasine-D複合体構造解析
- ・既知のジオキシゲナーゼ基質との複合体結晶構造解析

↓

複合体が結合した構造解析に成功しない。原因としてAgelasine-Dが水溶性溶媒に溶けにくく結晶化に使用しづらいこと、他のジオキシゲナーゼの既知基質はBCG3185cのネイティブな基質となりえないことが考えられた。



Agelasine-DのDockingシミュレーション

結晶構造解析は困難であったため、計算科学的手法によりAgelasine-DのBCG3185cへのDockingシミュレーションを実施。

↓

基質ポケットと予測された領域にAgelasine-Dが結合した構造が予測された。

↓

今後はより結合力のつよい改変基質をデザインすることで、BCG3185cを標的とする新規抗結核薬の開発が可能であることを示唆。

*本研究成果は平成29年度日本蛋白質科学会年会で発表予定

研究テーマ

トマトのリコピン及びトウガラシのカプサンチンの高含有量保持のための果実内の超微構造学的メカニズムの解明

研究者 ▶ 日本女子大学 理学部：永田 典子（ながた のりこ）

研究成果 カロテノイドは抗酸化作用を有することから健康食品として注目されており、トマトのリコピン及びトウガラシのカプサンチンの2種のカロテノイドはとりわけ有用である。しかし、それらカロテノイドが果実内で実際にどのような構造に保持されているのか、構造学的な知見は極めて少ない。カロテノイドを高濃度かつ安定な状態で保持するしくみの解明をめざし、本研究ではトウガラシ及びトマト果実の色素体構造を網羅的に電子顕微鏡で観察し、カロテノイド成分データとの比較解析を行った。

これまでに30系統のトウガラシ果実の色素体構造を網羅的に電子顕微鏡で観察した。色素体内には約15種の様々な構造物がみられたため、どの系統がどの構造物を有するかを調査し、カロテノイド成分データとの比較を行った。その結果、カプサンチンの有無とフィブリル構造の有無に強い相関関係が認められたと同時に、カプサンチンを含まないオレンジ色果実にフィブリル構造が存在する系統が見つかった。また逆に、カプサンチンを含む赤色果実であるにも関わらずフィブリルが存在しない系統も見つかった。この後者の系統では、フィブリルの代わりにチューブ状構造物が多く蓄積されており、チューブ状構造の由来はチラコイド膜ではなく色素体内膜陥入による内膜に由来することも明らかになった。これは、従来考えられてきた「カプサンチンはフィブリル構造にのみ安定的に保持されうる」という仮説を覆す新しい知見である。

さらに、5系統のトマト果実の電子顕微鏡観察も行った。ある系統のトマト果実は成熟してもオレンジ色にしかならず、通常のトマトで合成されるリコピンを合成できずにプロリコピン（リコピンの前駆物質）を蓄積することがわかった。果実の成熟に伴い詳細に観察を行ったところ、野生型のプラストグロビュールは未熟時から成熟時まで一貫して電子密度の高い小さな球状のままであったが、この系統のプラストグロビュールは果実の成長に伴って次第に巨大化していた。このことから、プロリコピンはプラストグロビュールに蓄積することが示された。通常のトマトではプロリコピンからリコピンが合成される時期に、電子密度の高い波状構造が出現し、その後その構造は急速に増加した。この結果より、プロリコピンは一旦プラストグロビュールに存在するが、プロリコピンがリコピンに変換されると、リコピンは電子密度の高い波状構造に蓄積すると推測できた。このように、同じカロテノイドであってもリコピンとカプサンチンは色素体内で全く異なる構造体に保持されていることが明らかになった。

色素体形態の三次元解析は、これまで「連続切片TEM法」で行われてきた。これは、超薄切片を連続的に切り出し、透過型電子顕微鏡（TEM）にて連続撮影を行い、コンピュータ上で立体構築を行う方法である。しかしこの方法は、電子線による切片の伸縮や損傷などが起きやすく、また切片の回収に高度な技術が必要とされた。そこで私は、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いた「連続切片SEM法」を用いた。連続切片SEM法は、近年開発された新しい手法であり、観察の際にグリッドを使用せずカバーガラスなどの比較的大きい基板で切片を回収できる利点があり、一度に多くの切片を観察・撮影することが可能である。この手法を用いて、トウガラシ果実の色素体の三次元構築を試みた。その結果、厚さ80nmで84枚の連続切片にて、色素体の外膜やプラストグロビュールや電子密度の高い網状構造を視覚化し、精緻で正確な立体構築像を得ることができた。今回はトウガラシ色素体の構築しか行えなかったが、今後はトマト色素体でも同様の立体構築像を作成する予定である。これにより、カプサンチン及びリコピンを保持する色素体内構造物のより詳細な違いを明らかにし、カロテノイド保持のメカニズム解明に迫りたい。

研究テーマ

中枢神経系の老化と肥満に関わるマイクロ RNA の同定と機能解析

研究者 ▶ 大阪大学 蛋白質研究所：古川 貴久（ふるかわ たかひさ）

研究成果

<目的>

アルツハイマーやパーキンソン病患者の脳では加齢に伴う晩期発症性のゆっくりとした神経細胞の変性が進行している。申請者らは最近、膜-細胞骨格アダプターたんぱく質4.1G欠損マウスの網膜において、神経回路のリモデリングによるシナプス位置の変化と晩発性の神経変性が起こることを見出して報告した。さらに、これらの異常は正常老化マウスの網膜でも観察されることを見出している。様々な動物種でカロリー・コントロールによって寿命が伸びるという報告もあり、食生活が加齢現象に少なからぬ影響を与えることが知られている。本研究計画では加齢に伴う神経回路機能の低下および晩発性の神経変性の発症とその予防の分子機構を解明すべく、高脂肪食が引き起こす高脂血症による網膜と脳の老化進度を比較し、それに伴う遺伝子発現、mRNA および低分子非コードRNA(マイクロRNAのみならず最近、神経細胞での発現が知られているpiRNAなども含む)の発現変化を次世代シーケンス解析で明らかにし、正常老化による神経回路のリモデリングと晩発性神経変性に対する高脂血症の与える影響と低分子RNAを含む遺伝子発現の役割の解明を目指し、本研究を行った。

<方法>

老年期(1年齢)マウスに脂肪含有量60%の高脂肪食あるいは通常食を6か月間与えたマウス(生後1.5年齢)由来の脳と網膜のそれぞれから mRNA および低分子非コードRNA (ncRNA)を単離した。2か月齢の野生型マウスの mRNA および低分子 ncRNA もコントロールサンプルとして単離した。mRNA はマイクロアレイ(Agilent社)を、低分子 ncRNA については次世代シーケンスによる低分子 ncRNA の発現解析を行って、加齢や高脂肪食の脳と網膜で発現が高くなっているあるいは低くなっている mRNA ならびに低分子 ncRNA を抽出した。

<結果>

まず mRNA のマクロアレイデータの GO アノテーション解析を行った。遺伝子選択にあたり、これまでの qPCR の実績を念頭に置いて、必要条件「脳かつ2000以上の発現量かつ加齢で2倍以上の変化量かつ遺伝子名のアノテーションがつくプロープ」でマイクロアレイデータを探索すると、30数個の遺伝子に絞られモグロビンに関連する6遺伝子を同定した。これらの遺伝子は神経細胞のストレス応答に関与することが知られていたが、老化との関わりは知られておらず、新たな発見となった。さらに炎症系の遺伝子も4つ同定した。脳でのみ老化で上昇する遺伝子として、長鎖非コードRNAを1個同定した。この長鎖非コードRNAはヒト腫瘍との関連が知られており、特定のマイクロRNAのスponジとして抑制的に機能すること、ストレス反応、腫瘍形成に関与することが知られている。興味深いことに、ハンチントン病患者の死後脳やハンチントン病のモデルマウス脳においても発現が上昇していることが報告されている。老化に伴う脳細胞のストレス反応として発現が誘導される可能性が示唆される。

また、発現が低下変動する遺伝子として、ミエリン形成にかかわる遺伝子7個を同定した。サルを用いた研究で、大脳白質のミエリンは加齢に伴い脱落・変性することが知られている。このことから、本研究の脳と網膜の老化と高脂質食における解析において、マウス脳が老化を反映していることが確認された。次に、次世代シーケンスを行ったマイクロRNAを含む低分子 ncRNA の解析を行った。加齢や高脂肪食によって発現変動を示すマイクロRNAを同定した。加齢網膜のみで発現上昇する miR-29 クラスターを同定した。加齢網膜において発現減少する miR-99、

miR-181、miR-298クラスターを同定した。また、加齢脳のみで発現上昇するmiR-182/miR-96/miR-183クラスターとmiR-429/miR-200a/miR-200bのクラスターを同定した。脳と網膜で共通して加齢に伴い減少するマイクロRNAとしてmiR-217、miR-296、miR-1983を同定したが、これらの発現レベルは低かった。

<考察と今後の展開>

本研究において、我々は加齢に伴う神経回路機能の低下および晩発性の神経変性の発症とその予防の分子機構を解明すべく、老化や高脂肪食が引き起こす網膜と脳に伴うmRNAおよび低分子非コードRNAの発現解析を行った。結果は非常に興味深いものであり、特に今まで知られていなかった脳の老化とヘモグロビン関連遺伝子の上昇は新しい知見である。ヘモグロビン関連遺伝子は、マウス頭蓋内出血後の神経細胞やグリア細胞において上昇することが報告されおり(He et al., 2011)、神経細胞におけるヘモグロビン関連遺伝子の上昇は神経細胞の保護に機能している可能性が考えられる。したがって、脳の加齢に伴ってヘモグロビン関連遺伝子が低下することは、神経保護作用の加齢に伴う低下を反映している可能性があり、今後これらヘモグロビン関連遺伝子の神経細胞の老化における機能を追求することによって、現在大きな社会問題となっている痴呆症やアルツハイマー病の予防法や治療法の開発につながることが期待される。また、本研究によって、脳や網膜の老化に伴い変動するマイクロRNAクラスターを複数同定したことによって、これらのマイクロRNAの神経細胞老化における機能解明が脳老化のメカニズム解明につながることが期待される。さらに、本研究において同定した老化によって変動するmRNAやマイクロRNAが血中に出ていている可能性も考えられ、血中に出ていた場合は、脳老化の客観的なバイオマーカーとして用いることができる可能性がある。今後、これらの因子の老化における局在、発現、機能の解析を引き続き行っていく予定である。

研究テーマ

天然の光合成タンパク質を用いた「ガラスの葉」の作製と機能解明

研究者 ▶ 大阪市立大学 複合先端研究機構：野地 智康（のじ ともやす）

研究成果 現在我々は、いずれ枯渇する石油・石炭などの地下資源に頼った生活をしている。これらの燃料資源からエネルギーを作る際に生じる廃棄物や二酸化炭素による環境汚染などの問題を抱えている。この現状を続けていれば、いずれ将来のエネルギー供給源が絶たれて、豊かな文明社会を継続できないと予想される。この問題を解決するため、

人が安心して健康に美しく平和に暮らせる社会環境を実現し、継続するために、安定的に安全にエネルギーを供給できるシステムの構築が必須である。近年、燃焼しても有害物質や二酸化炭素を放出しない水素を燃料として走る燃料自動車が市販されるなど、水素エネルギー社会実現のための準備が整い始めている。もし、無尽蔵なエネルギー供給源である太陽光で水素を合成することができれば、有限な地下資源に頼らない新しい社会を構築できる(図1)。

太陽光で水素を合成する化学反応を高効率に達成するため、太陽光エネルギーを上手く利用して生きている植物の光合成を模倣した様々な太陽光水素発生技術が提案されている。その方法を一般的に簡単に説明すると、図1の様になる。まず、光増感剤が太陽光エネルギーを受け取り、電荷分離反応を起こし、電子伝達体を経由して触媒に電子が渡り、触媒が水素イオンを水素分子に変換する。電子がなくなった光増感剤に電子供与体が電子を供給する事で反応がサイクルする。しかし、一般的に、光増感剤から電子供与体、電子供与体から触媒、触媒から水素イオンへの電子移動反応は、大気下では酸素に阻害される。そのため、多くの研究では大気下での水素発生は達成できず、大気下での水素発生を達成するために、触媒に特殊な処理を施さなければならない。これまでに、我々は、光増感剤 Ru錯体、電子伝達体メチルビオローゲン、水素発生酵素ヒドロゲナーゼを、50 nmの孔を無数に持つガラス板(多孔質ガラス板)の細孔内部に導入することで、大気下での水素発生効率を飛躍的に向上できることを報告した。多孔質ガラス板を用いない溶液系ではほとんど水素が発生しないため、極めて画期的な手法であると考えられた。しかし、有毒物質でもあるメチルビオローゲンを用いた系では、コスト面でも安全面でも実用化が難しい。メチルビオローゲンから脱却した系での、大気下での太陽光水素発生反応を達成できれば、実用化に一步前進できる。

このような研究背景から、本研究では、メチルビオローゲンを用いない、大気下での太陽光水素発生が可能なガラスデバイスの構築に挑戦した。具体的には、光化学系Iと呼ばれる植物が持つ色素とタンパク質の複合体を光増感剤、白金ナノ粒子を水素発生触媒として用いた。これらを用いる利点を次ページの図3を使って説明する。



図1. 一つの理想的なエネルギー循環システム。

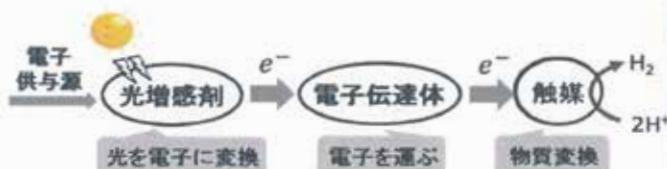


図2. 太陽光水素発生の簡単な原理図。大気下では、各

光化学系IIはクロロフィルと呼ばれる色素を持ち、この色素は Ru 錯体よりも高効率に太陽光を吸収できる特徴を持つ。さらには、光化学系Iの内部に構成されている穂因子間では、ほぼ100%で電子移動反応が達成できるため、Ru錯体よりも高い効率で吸収した光子を電子に変換する特徴を持つ。

光化学系IIに直径約3 nmの白金ナノ粒子が結合する手法が報告されているため、その手法を参考に、光化学系I-白金ナノ粒子複合体を作製した。光化学系IIには、それ自身に電子伝達体の様な機能を有する部位である鉄硫黄クラスターがあり、メチルビオローゲンなどの電子伝達体を導入しなくても、鉄硫黄クラスターを経由して電子が白金ナノ粒子に渡る。そのため、光化学系I-白金ナノ粒子複合体を細孔径50 nmを有する多孔質ガラス板に導入する事により、大気下での太陽光水素発生が可能な新しいガラスデバイスを作製した。

上記の様に作製したガラスデバイスに擬似太陽光を照射する事により、大気下での水素発生が可能となった。溶液系では、酸素に対する抵抗性が無いため、大気下での効率は非酸素存在下の0.8%にまで劇的に低下するが、多孔質ガラス板を用いることで16%の低下にどどめる事ができた。以上の研究成果を論文発表した(業績1)。また、この反応の律速段階が cyt c₆ からPSIへの拡散律速であることがわかった。以上のことから、cyt c₆ とPSIを架橋結合などの方法により、結合させることによって、さらなる変換効率改善が見込めることがわかり、新しい研究方針が得られた。

以上が研究提案に対する研究業績であるが、その業績を元にいくつか派生した関連研究の業績がある。一つ目は、多孔質ガラス板と酵素を利用した二酸化炭素の光還元である[業績2]。二酸化炭素を水素と同様に燃料源の一つとして期待されているギ酸に変換できるガラスデバイスを作製した。二つ目は、多孔質ガラス板と光化学系IIを利用して水の光酸化反応である[業績3]。水素合成や二酸化炭素の還元に必要な電子を、天然の光合成と同じように水から供給するための新しいガラスデバイスを開発した。いずれも、多孔質ガラス板を利用した人工光合成「ガラスの葉」を発展させるための研究成果である。

研究業績リスト 論文発表(査読あり)

- [1] Noji, T.; Suzuki, T.; Kondo, M.; Jin, T.; Kawakami, K.; Mizuno, T.; Oh-oka, H.; Ikeuchi, M; Nango, M.; Amao, Y.; Kamiya, N.; Dewa, T.; "Light-induced hydrogen production by Photosystem I -Pt nanoparticle conjugates immobilized in porous glass plate nanopores" *Res. Chem. Intermed.*, 42, 7731–7742, 2016.
- [2] Noji, T.; Jin, T.; Nango, M.; Kamiya, N., Amao, Y., T. "CO₂ Photoreduction by formate dehydrogenase and a Ru-complex in a Nanoporous Glass Reactor" *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 9, 3260-3265, 2017
- [3] Noji, T.; Kawakami, K.; Shen, J-R.; Dewa, T.; Nango, M.; Kamiya, N.; Itoh, S.; Jin, T. "Oxygen-Evolving Porous Glass Plates Containing the Photosynthetic Photosystem II Pigment-Protein Complex" *Langmuir*, 32, 7796–7805, 2016

研究助成をして頂いた小柳財団、および、本研究の関係者方々に深く御礼を申し上げる。

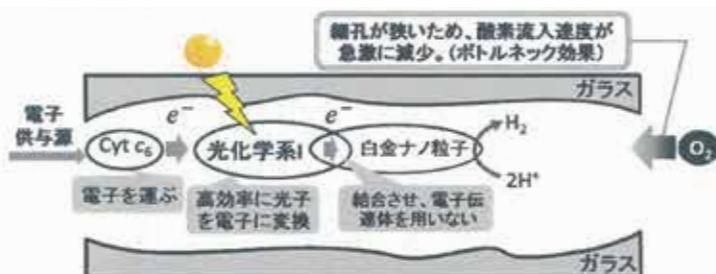


図3. 本研究戦略および研究成果。光化学系Iと白金ナノ粒子を結合させることで、メチルビオローゲンを使わず、且つ、多孔質ガラス板の中に導入することで、大気下での太陽光水素発生が可能になる。細孔の外にある酸素は、細孔の入り口が狭いため、急激に流入速度が減速される。cyt c₆は電子供与体から光化学系Iへの電子伝達体として機能するタンパク質。

公益財団法人 小柳財団
