

生物機能開発研究所

平成 23 年度プロジェクト成果報告

課題 : 磁性ナノ粒子プローブ/オンライン質量分析法による生体反応メカニズムの
迅速解明ツールの開発

担当 : 石田康行・鈴木 茂・山本 敦・堤内 要

成果 1: 高性能化磁性ナノ粒子プローブの合成

まず、堤内グループは、*N*-ビニル-2-ピロリドンとメタクリル酸メチルをラジカル共重合させ、重合後にエステル部位をアルカリ加水分解して *N*-ビニル-2-ピロリドン/メタクリル酸メチル/メタクリル酸三元共重合体を合成し、その存在下、鉄ペンタカルボニル($\text{Fe}(\text{CO})_5$)の高温熱分解により *N*-ビニル-2-ピロリドン/メタクリル酸メチル/メタクリル酸三元共重合体被覆マグネタイトナノ粒子(P(VP-MMA-MA)-MNPs)を調製した。この合成方法により、①生体内における高い分散性、②生体適合性、③静脈注射可能な粒子径、④リガンド分子を担持可能な表面などの特性を満たした磁性ナノ粒子プローブの合成に成功した。さらに、このナノ粒子に抗体等のリガンドを結合させることで、標的指向性を持ちうるプローブを調製することも可能になった。

次に、山本グループは磁性ナノ粒子の新たな展開の一つとして、これらを取り込んだ磁性を帯びたポリマベースゲルを合成し、そこに農薬に対して選択性を発現可能な官能基を導入することで前処理技術の革新の実現を試みた。これにより、抽出剤とその他マトリクスとの分離工程が磁石で可能になれば、操作の簡便化のみならずオンサイトでの前処理作業も可能となる。今年度は、マグネタイト混合ゲルの調製処方案を作成するための基礎検討を行った。すなわち、マグネタイト分散溶媒の検討と、これに適したモノマーと希釈剤の選定である。さらに、こうして合成したプローブ表面に、生体試料に対して高い親和性を示すポリマー樹脂を導入する基礎実験を実施した。

成果 2: 各種計測法の高性能化

まず、石田グループは、すでに市販の磁気ビーズを利用して、磁性粒子表面に吸着させた生体試料を高感度に化学反応場ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) 測定するためのインターフェイス開発に成功した。ここでは試料に細菌を使用して、抗体-抗原反応を介して、ある特定の細菌種のみを選択的に磁性粒子プローブ捕集し、引き続き、そのプローブ表面上の細菌の構成成分をオンラインで化学反応場 GC/MS 測定することが可能になった。さらに、この応用研究として、血液試料中の特定の細菌種のみを選択検出することにも成功した。

次に、鈴木グループは、不安定化学種に対しても詳細な分子構造解析を可能にする、新規ソフトイオン化に注目して調査研究を進めた。特に、59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (2011, Denver)などで、以下のソフトイオン化技術を調査し、評価した。

(1) 大気圧マイクロコロナ放電による水和クラスターイオン生成方法

マイクロセラミックヒータ上で試料を加熱し、コロナ放電で出来た水クラスターイオンを付加させて、アミノ酸等を分析できる。我々の目指す高分子極性物質のイオン化には、水クラスター付加イオンを脱離させる方法の開発が必要。

(2) 大気圧固体試料分析プローブ(ASAP)

固体試料に、加熱した窒素脱溶媒ガス中のコロナ放電で生成する励起化学種でプロトン化を行う。低

極性、半揮発性が中心である。原理的には SGDI (特許取得済み) と類似のイオン化法である。極性、高沸点物質のイオン化には改良が必要。

(3) 低温プラズマイオン化法(LTP)

He ガスを交流放電し生成するプラズマにより、イオン化し難い低極性有機物をイオン化する。イオン化エネルギーの高い物質に適用されるため、この原理は不要であるが、放電プローブの構造など参考になる。

(4) Dielectric-Barrier Discharge Micro-plasma Ionization

He 中の交流放電は LTP と同じであるが、LC 溶媒を接触させてイオン化する。SGDI とも共通する。アミノ酸への応用もうたっているが、イオン化エネルギーが高いため、困難と判断する。

このほか、Desorption Electro Spray Ionization (DESI), Desorption Atmospheric Chemical Ionization (DAPCI), Direct Analysis in Real Time (DART) など、従来技術の利用可能性も評価した。

H24 年度の研究計画：

開発した磁性ナノ粒子プローブを実際の *in vivo* あるいはそれを模した反応系に作用させて、対応するアクセプター成分をその表面に特異的に分離及び吸着させる。こうしてアクセプターを吸着させたプローブを化学反応場 GC/MS やソフトイオン化 MS などの最先端質量分析法によりマルチ計測することにより、アクセプター化学種の同定及び分子構造解析を迅速に行う。具体的には、以下の様な反応系への応用を計画している。

- 1) アクリルアミド固定化磁性ナノ粒子プローブの活用によるアクリルアミドによるグルタチオン S-トランスフェラーゼの発現をもたらす未知トリガータンパク質の分離・同定
- 2) 各種糖質固定化磁性ナノ粒子プローブによる動物レクチンの分離および作用部位の特定

課題：融合調節タンパク質 FRP による細胞融合制御機構の解析

担当：大西素子・禹 済泰・中川 大・伊藤守弘

課題 1：細胞融合阻害物質の破骨細胞分化に対する作用

担当：大西素子

細胞融合は哺乳類の普遍的な生命現象の 1 つであり、破骨細胞も造血幹細胞由来の前駆細胞が融合することによって形成される。HIV エンベロープタンパク質 gp160 を発現するヒト単球由来 U937 細胞株 (U2ME-7 細胞) は、膜タンパク質である CD98 に対する抗体で刺激することによって、細胞融合起こすことが知られている。本研究では、細胞融合の制御を目指し、食品および生薬由来の化合物の中から、U2ME-7 細胞を用いて細胞融合を特異的に阻害する化合物を探索し、それらの破骨細胞分化に対する作用を検討した。

U2ME-7 細胞は、 $10\ \mu\text{M}$ の CdCl_2 および化合物溶液を含む MEM 培地で 1 時間培養後、抗ヒト CD98 重鎖モノクローナル抗体を加えて、さらに 24 時間培養した。細胞融合に対する化合物の影響を、融合細胞が存在する凝集数を計測することにより評価した結果、新たに 11 種類の化合物が U2ME-7 の細胞融合を阻害することを見出した。これらのうち 6 種類の化合物は融合の前段階である細胞どうしの凝集も阻害した。そこでマウスマクロファージ/単球由来の RAW264 細胞の破骨細胞様多核細胞へ

4-プロジェクト成果報告

の分化に対する、この6種類を含む8種類の化合物の影響を検討した。その結果、いずれの化合物も破骨細胞分化に対して阻害効果を示すことがわかった。また中川らの協力を得て、マウス骨髄細胞の培養系により、破骨細胞の細胞融合過程に対してこれらの化合物の影響を検討した結果、RAW264細胞と同様の結果が得られた。

以上の研究成果は日本農芸化学会 2012 年度大会にて発表した。

課題 2 : CD98 欠損による細胞融合への影響

担当 : 伊藤守弘

膜蛋白である CD98 は活性化した細胞に高い発現を示し、細胞増殖、癌化、細胞融合、運動性や生存性に深く関与している。CD98hc(Slc3a2)ノックアウトマウスを作製したところ、早期の胎生致死であり、生体内での機能解析が不可能であった。そのため組織特異的 CD98hc コンディショナルノックアウトマウス(cKO)を作製し、様々な臓器や細胞において CD98hc を欠損させ、その機能を詳細に検討する。今回はマウスマクロファージ巨細胞と破骨細胞の発生過程の細胞融合において検討した。

マクロファージ特異的 CD98hc cKO マウスの作製には、LysM-cre マウス(Lyz2tm1(cre)Ifo)と交配し、LysM-cre/CD98hclox/-を実験に用いた。破骨細胞特異的 CD98hc cKO マウスの作製には、cathepsin-K-cre マウス(Ctsktm1(cre)Ska)と交配し、Ctsk-cre/CD98hclox/-を実験に用いた。腹腔マクロファージは腹腔浸出細胞を採取し、その細胞を CD19, CD90.2, Ly-6G のマグネットビーズでネガティブセクションし、さらに CD11b でポジティブセクションし分離した。その後、腹腔マクロファージは IL-4 を加え 4 日間培養し、多核巨細胞を誘導した。破骨細胞の作製には骨髄細胞を採取し、M-CSF, RANKL と TGF- β と培養し誘導した。

予備検討において、腹腔マクロファージの IL-4 による細胞融合能では CD98 欠損マクロファージで融合能が抑制され、多核巨細胞の出現が減少していた。現在、詳細な検討を行っている。

課題 3 : 破骨細胞における FRP1 および関連因子の発現解析

担当 : 中川 大

細胞は、周辺環境や外部情報に応答するために多くの膜タンパク質を利用する。膜タンパク質と細胞融合との関連は、その大部分が未知の状態であるので、本研究では、ウイルス感染細胞における膜融合を制御する膜タンパク質 FRP1 の重鎖 (Slc3a2)を特異的に認識する抗体がヒト末梢血単球を破骨細胞へと分化させる現象に注目し、破骨細胞における FRP1 の重鎖 (Slc3a2)の発現と FRP1 の軽鎖 (Slc7a5, Slc7a6, Slc7a7, Slc7a8, Slc7a10, Slc7a11)の発現を解析した。

マウス骨髄細胞とマウス由来 RAW264.7 細胞からそれぞれ破骨細胞を調製し、これらの細胞が発現している全 mRNA を回収して cDNA を調製した。この cDNA を鋳型にして PCR を行った結果、いずれの破骨細胞においても FRP1 の重鎖と軽鎖の mRNA が発現していることが示された。一方、FRP1 の重鎖の発現量は、破骨細胞の発生の過程で変化しなかったが、FRP1 軽鎖 (Slc7a5, Slc7a7, Slc7a8, Slc7a10, Slc7a11)の発現量は、マウス骨髄細胞から破骨細胞が発生する過程において減少した。PCR と並行して、マウス骨髄細胞とマウス由来 RAW264.7 細胞から調製した破骨細胞の細胞溶解液を調製し、FRP1 タンパク質の発現を解析した。解析は、western blotting を実施して行ったが、ヒト末梢血単球を破骨細胞へと分化させる抗体によって特異的に認識されるタンパク質は、認められなかった。今後は、native PAGE の実施やマウス FRP1 cDNA を使用によって、この抗体の特異性を評価する。

課題 4：破骨細胞の分化を阻害する月桃由来 cardamonin

担当：禹 済泰

月桃は熱帯・亜熱帯地域に自生しているショウガ科ハナミョウガ属の多年生常緑草本であり、薬理作用として抗菌作用・抗酸化作用・抗炎症作用などが報告されている。本研究では、月桃の葉由来の cardamonin が破骨細胞の分化阻害することを見出した。破骨細胞の分化は、RANKL 刺激による破骨細胞への分化能を有する RAW264.7 細胞を培養し、破骨細胞分化マーカーである酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP)酵素活性と染色により評価し、Western blot 法による作用メカニズム解析を行った。沖縄産の月桃葉のメタノール抽出物から cardamonin を単離した。Cardamonin は、RAW264.7 細胞培養において RANKL 刺激による破骨細胞の分化を抑制した。Cardamonin は RANKL 刺激による p38MAPK, ERK 及び I κ B のリン酸化を抑制した。さらに MAPK シグナル分子の下流にある c-Fos と NFATc1 の発現を抑制した。これらの結果より cardamonin は、RANKL 刺激破骨細胞分化初期シグナル分子の活性化の阻害を介し c-Fos や NFATc1 の発現の抑制によって破骨細胞の分化が阻害されることが示唆された。

課題：メタゲノム解析法による植物の生育に適した土壌複合微生物層の解析

担当：倉根隆一郎・金政 真

課題 1：土壌からの土壌細菌および土壌糸状菌検出・解析手法の開発

担当：倉根隆一郎

農業における生産の基礎をなすものは、「土づくり」にある。この土づくりに向けて土壌改良資材として、微生物等を含有していることを特徴として様々な土壌改良微生物資材が販売されている。しかしながら、このような微生物資材に具体的にどのような微生物種が実際にどの程度含有され、農業生産にどのように寄与しているのかについての具体的かつ科学的知見は極めて乏しいのが現状である。そこで、実際に市販され一定の効果があると宣伝されている R 社製の粉末状複合微生物資材を用いて、メタゲノム法の適用化を試みた。

具体的には、菌叢解析を PCR-DGGE 法を適用することにした。PCR-DGGE 法の適用化をするにあたり、最終目的は土壌微生物相の解析であることを考慮し、土壌細菌の 16S rDNA 遺伝子を効率良く解析するために V6-8 可変領域に対する幾つかの細菌用プライマー (Forward primer および Reverse primer), 土壌糸状菌の 18S rDNA に対する幾つかの糸状菌プライマー (Forward primer および Reverse primer) を GC clamp をつけて設計し、土壌から土壌細菌と土壌糸状菌の検出を行いその効率化を検討した。その結果、土壌からの細菌検出用および糸状菌検出に適したそれぞれのプライマーを作り上げられた。これらのプライマーを上記の微生物資材に適用してみたところ、細菌用プライマーでは PCR-DGGE 法にて 10 数本の異なるバンドが検出できた。

課題 2：土壌改良資材に含まれる微生物の同定

担当：金政 真

様々な観点から農業の効率化が研究されてきたが、中でも良質な土壌作りは重要課題である。良質の堆肥づくりを行うには、有機物の発酵促進のために微生物を含む土壌改良資材が利用される。これ

6ープロジェクト成果報告

ら土壌改良資材は植物生育促進効果が認められたものであっても、古くからの経験に基づいて開発が行われており、多種類の土壌微生物により効果が得られていることが部分的に分かっているだけである。そこで、本研究は微生物相の最適化を謳った土壌改良資材に含まれる微生物を分離・同定することを目的とした。

試料は、植物の生育促進効果の認められている市販の粉末状複合微生物資材（R 社製）を用いた。NB 培地を基礎とし、pH 4～10、塩濃度を最大 3 mol/L まで振った様々な培地にて微生物を増殖させ、約 300 株を分離した。16S rDNA を標的にしたプライマーを用いて PCR を行い、157 種において増幅を確認した。43 種について塩基配列解析を行い、18 種を同定した。複数の微生物については 16S rDNA 配列を新規に見出した。同定した菌には、ダイオキシン類の分解、抗生物質などの生理活性物質生産、窒素固定などの報告がある菌の近縁種が見られた。今後、微生物相における各菌の役割を明らかにするため、特徴づけを進める計画である。