

生物機能開発研究所

平成 24 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

堤内グループは、本研究ではアクセプター探索型の磁性ナノ粒子の開発を目標とした研究を行っている。昨年度までに鉄ペンタカルボニルの高温熱分解法を利用して、粒径がナノオーダーレベルの酸化鉄微粒子を作成してきた（山城舞ら, *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の調製と特性解析, *高分子論文集*, **69** (7), 392 (2012))。本年度はこの微粒子表面上に、抗体やその他のリガンド分子、あるいは様々な生体試料に親和性を示すポリマー樹脂などを、化学結合を介して導入する合成技術を開発することを目標とした。

まず、*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 (P(VP-MMA-MA)) 存在下鉄ペンタカルボニルを高温熱分解することで調製したマグネタイトナノ粒子 (P(VP-MMA-MA)-MNP) について述べる。この粒子は表面にカルボキシル基を有するため昨年度はこの官能基を利用して抗体を粒子表面に導入することができた。本年度はエチレンジアミンとアミド形成反応をさせることにより、アミノ基を導入し、ここにマルトースやラクトースを還元アミノ化反応させることにより、表面にグルコースやガラクトースを有する微粒子とすることができた。これらの糖質はコンカナバリン A などのレクチン分子と特異的に相互作用することから、リン酸緩衝液中で吸着実験を行ったところ、コンカナバリン A と特異的な相互作用を示す α -D-グルコース残基を有する微粒子において、吸着量が増大する挙動を確認することができた。

さらに、当研究室でもう一つ合成している磁性ナノ粒子として、4-メチルカテコール存在下で鉄ペンタカルボニルを高温熱分解して得られるマグネタイトナノ粒子 ((4-MC)_n-MNP) がある。こちらの磁性ナノ粒子では、4-メチルカテコール残基のメチル基を臭素化して、それを足がかりに様々な官能基を導入することができた。そして、アジド基に変換した(4-MC)_n-MNP には還元末端にアルキンを導入した多糖分子を、また、キサントゲン酸エステルを導入した(4-MC)_n-MNP からはビニル化合物の重合反応を行うことに成功することができた。また、多糖である(1→3)- β -D-グルコピラナンを導入した磁性ナノ粒子に関してはレセプターを有するマクロファージ細胞への取り込みを確認することができた。

以上の結果から、多様なアクセプター探索型の磁性ナノ粒子の開発をすることができたと判断している。

次に、山本グループは磁性マグネタイト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ーベースゲルを合成し、これを固相抽出剤として利用することで生体試料のように高マトリクス成分の前処理操作の簡便化を図ることを目的として検討を行った。今年度は、実際にポリマー製磁気ビーズを作成し、物性評価を行った。ポリマーは、架橋剤や細孔調節剤等を一切考慮せず、純粋にジビニルベンゼンのみで重合した。1% w/v のマグネタイトは 55%ジビニルベンゼン溶液中に綺麗に分散し

た。しかし、0.1% w/v 量の重合開始剤、アゾビスイソブチロニトリルでは重合開始に至らなかった。0.5%まで追加することでようやく重合が始まった。マグネタイトによるラジカル捕捉効果であろうか？作製したポリマーは、乳鉢で粉碎し、更に 22-60 mesh に分球した。この内、磁性を有する樹脂のみを回収し、メタノールで十分に洗浄して固相抽出用のポリマー製磁気ビーズとした。収率は 15%強であった。

今回のビーズは、疎水性モノマーを使用したために水に対するヌレがなく、固相抽出剤には不向きであるが、芳香環へのアミノ基の導入を経て、各種抗体や蛋白質、レクチン等を結合することで、細胞の分離や蛋白や核酸などの分離・精製をきわめて簡便な操作で、確実かつ速やかに行うことができるようになる。一方、親水性のメタクリレートに活性なグリシジル基が導入されたモノマーを使えば、水系での分離・精製の効率性に優れた磁気ビーズが作成できる。これらは、今後の成体反応メカニズムの迅速解明のための有用なツールになるものと期待される。

成果 2： 磁性ナノ粒子プローブと連結する各種化学計測法の開発と応用

鈴木グループは、生体反応メカニズムの迅速解明ツールの開発の分担研究として、「不安定化学種のソフトなイオン化法の改良」を進める予定であったが、研究に使う装置が故障し修理費が高額なため、共通テーマである「生体反応メカニズムの迅速解明ツールの開発」として、「LC/Q-ToFMS/MS によるノンターゲット分析法」の研究を進め、「フラグメンテーションデータベースを用いるノンターゲット分析法」を開発した。これは、生体反応メカニズムの迅速解明ツールの基礎となる技術である。

1. 「LC/Q-ToFMS/MS によるノンターゲット分析法」とは

未知の化学種、分子構造を解明するための分析方法である LC/MS ノンターゲット分析法は、開発途上の技術である。これまでの LC/Q-ToFMS/MS によるノンターゲット分析法としては、MetFrag, MassBank など精密質量スペクトルを直接用いる方法があるが、これらは「質量のパターンをデータベースなどと比較する」方法で、構造解析のアルゴリズムを持たない。その結果、データベースにないスペクトルは解明できない、スペクトルパターンが似ている無縁の物質を検索するなど、ノンターゲット分析には大きな難点を持っている。

2. 研究開発した「LC/Q-ToFMS/MS によるノンターゲット分析法」

上記の難点を解決するため、112 種の化学物質の分子関連イオン、プロダクトイオン、中性ロスの元素組成から MS/MS のフラグメンテーションを解析し、得られた 232 の前駆イオン、400 のプロダクトイオンおよび 172 の中性のロスの構造と組成を、暫定版フラグメンテーションデータベースにし、それを用いるノンターゲット分析法を開発した。この方法により暫定データベースにはない化学種 (Bendiocarb) のスペクトルを検索したところ、Bendiocarb を含む 2 種類の農薬のみが同定された。他方、これまで最も広く使われている MetFrag では 1754 物質が検索され、Bendiocarb はその 27 番目であった。

この方法について、論文投稿を行い受理された（「分析化学」総合論文、2013 年 1 月受理）

次に、石田グループは、これまでに有機アルカリ共存下での反応熱分解 GC により、細菌中のリン脂質を構成する脂肪酸成分の分子構造や化学組成を、コロニー試料をそのまま用いて迅速に精密解析することを可能にしてきた。しかし、この方法は純粋培養した単一の細菌種を試料対象としているため、複

4-プロジェクト成果報告

雑な試料マトリックスが存在したり、多種の細菌が混在したりする試料系の分析への応用は困難であった。そこで今回は、抗体磁性ビーズを用いた細菌捕集技術を反応熱分解 GC と組み合わせることにより、複雑なマトリックス成分から特定の細菌種のみを捕集し、それに含まれる脂肪酸成分を迅速に解析する方法の開発を試みた。細菌試料にはサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium* LT2) を用いた。そのコロニー試料の 10 mg を試料管に入れ、そこへ脱イオン水 100 μ l, リン酸緩衝溶液 900 μ l および抗体磁性ビーズ (Invitrogen 社製) 150 μ l を加えた後、20 分間 37 $^{\circ}$ C 下で振とうし、細菌試料の選択捕集を行った。このビーズを磁石で集め、数回洗浄した後、脱イオン水 25 μ l を加えて調製した懸濁液の 2 μ l を、反応試薬である水酸化テトラメチルアンモニウム共存下での反応熱分解 GC/MS 測定に供した。その結果、得られたクロマトグラム上には、ミリスチン酸 (C14:0) およびステアリン酸 (C16:0) などの一連の脂肪酸成分が対応するメチルエステルとしてはっきりと観測された。それらの脂肪酸成分の化学組成は、サルモネラ菌そのものを反応熱分解 GC/MS 測定した際とよく一致したことから、本法により特定の細菌を選択捕集し、それに含まれる脂肪酸成分を迅速に解析することが可能になった。さらに、応用例として、豚の血液中に人為的に加えたサルモネラ菌を、本法により選択捕集し、当該菌中のリン脂質を構成する脂肪酸成分の分子構造や化学組成を分析することもできた。

課題 : LUC ライブモニタリング活用による新研究領域の開拓

担当 : 中村研三・坂野弘美・長谷川浩一・吉村和也・河合都妙

A.平成 24 年度の進捗状況と平成 25 年度の計画

課題 1 : 改良型 LUC レポーターとその有用作物への導入

担当 : 河合都妙

コード領域の DNA 配列が植物のコドンに至適化された改変 LUC (*OpLUC*) 遺伝子をシロイヌナズナに導入し、従来型ホタル *LUC* 遺伝子と比べて発現効率が高くなるか、その原因はどこにあるかを明らかにし、他の有用植物へも導入してレポーターとしての有効性を検証する。

【平成 24 年度の進捗状況】

35Sp:LUC と *35Sp:OpLUC* のコンストラクトを作成し、アグロバクテリウムを使ってシロイヌナズナを形質転換し、LUC 発現の確認を行った。

【平成 25 年度計画】

多数の *35Sp:LUC* と *35Sp:OpLUC* の形質転換植物の LUC の発現レベルを比較する。代表的な形質転換ラインについて、*OpLUC* 形質転換植物の活性レベルの高さと mRNA レベルとの相関や、*LUC* と *OpLUC* の mRNA 安定性を比較する。*35Sp:LUC* と *35Sp:OpLUC* のカメラナ形質転換体を作製し、同様の解析を行う。

課題 2 : ライブモニタリングシステムとアクティベーションタギングを組み合わせた転写制御因子同定システムの開発

担当：坂野弘美

シロイヌナズナ組織培養におけるシュート分化制御に重要な役割を果たす転写制御因子 *ESR1* の発現を制御する因子を、*ESR1* プロモーター::*LUC* (ルシフェラーゼ) 融合遺伝子を持つ植物体のアクティベーションタギング法で探索同定する。

【平成 24 年度の進捗状況】

ESR1 プロモーター::*LUC* 融合遺伝子を持つ植物体を作製し、これらの植物体を組織培養して通常の *ESR1* と同様の発現パターンを示す系統を選抜した。

【平成 25 年度計画】

この形質転換体の根切片にアクティベーションタギングベクターを導入し、ゲノム中の遺伝子をランダムに強制発現させることにより、通常では *ESR1* の発現が誘導されない培養条件でも *LUC* 活性の上昇がみられる組織をスクリーニングする。

課題 3：宿主マツ体内における植物寄生性線虫のライブモニタリング

担当：長谷川浩一

マツ枯れ病は、マツノザイセンチュウ *Bursaphelenchus xylophilus* が主な病原体であり、ベクターであるカミキリおよびそれらに付随する細菌が絡む複雑で巧妙な森林病害である。

【平成 24 年度の進捗状況】

実験室培養系統および野外採取線虫より分離した細菌のメタゲノム解析から、重要な機能を有する 3 種の細菌を選抜した。これら細菌を標識し、線虫との接着性、線虫への酸化ストレス耐性付与、線虫病原力の強化をライブモニタリングし、ごく僅かの細菌が体表面に付着することで、線虫は酸化ストレス耐性が劇的に向上し、病原力も増すことが分かった。

【平成 25 年度計画】

3 種の細菌ゲノム情報をもとに、マツ枯れ病進展におけるこれら細菌の機能を逆遺伝学的に解析する。既に作成済みの線虫をライブモニタリングするためのコンストラクトの線虫組み換えた作製に取りかかる。ライブ標識した線虫および細菌を同時に宿主マツへ感染させ、宿主マツ樹体内での遺伝子発現および個体群動態の変化と病徴進展を克明に観察してゆく。

課題 4：LUC ライブモニタリングシステムを用いた *Nudix hydrolase* による環境ストレス応答制御機構の解析

担当：吉村和也

【平成 24 年度の進捗状況】

シロイヌナズナの *Nudix hydrolase*, *AtNUDX6*, 7 および 19 の各遺伝子上流 2 kbp プロモーター領域と *LUC* 遺伝子との連結コンストラクトの作製、および *AtNUDX7* および 19 プロモーター::*LUC* 形質転換植物の T2 種子回収および *LUC* 活性の確認を終了した。

【平成 25 年度の計画】

得られた形質転換植物の *LUC* ライブモニタリングにより、種々のストレスやシグナル因子（サリチル酸やアブシジン酸など）処理に対する各プロモーターの発現誘導性を個体レベルで解析する。シグナ

6ープロジェクト成果報告

ルの組織間伝達の可能性を考慮し、局所的なストレス付与が他所での発現に及ぼす影響も検討する。特徴的なストレス誘導性発現を示した *AtNUDX* のプロモーターに変異や欠失を導入した *LUC* 発現コンストラクトを作製し、植物細胞での一過的発現によるデュアル *LUC* アッセイにより、それらの発現制御に関わるシスエレメントを同定する。

課題 5：種子発芽時の油脂貯蔵遺伝子サイレンシング機構への薬理学的アプローチ

担当：中村研三

シロイヌナズナの種子油脂貯蔵に関わるオレオシン遺伝子(*Ole*)の発現は種子特異的で、発芽後にその発現は抑制され、不活性ヒストン修飾を受けたヘテロクロマチン領域に組み込まれる。*OleS3:LUC* 導入植物の種子を使い、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A (TSA) など生化学的阻害剤や植物ホルモンが発芽後の *OleS3:LUC* の抑制に及ぼす影響をライブモニタリングで解析する。

【平成 24 年度の進捗状況】

OleS3:LUC 導入植物種子の発芽時に種々の濃度の TSA を与え、発芽実生での *LUC* 発光ライブモニタリングを進め、*hsi* 突然変異株に *OleS3:LUC* を導入して発現モニターを行った。

【平成 25 年度計画】

OleS3:LUC を導入した Col-0 野生株と *hsi* 突然変異株のライブモニタリングにより、TSA やそれ以外にも GA や ABA といった植物ホルモンや糖が種子発芽後の *OleS3* 遺伝子の発現抑制に与える影響を明らかにする。

B. 科研費採択状況

坂野弘美（代表者）・中村研三（共同研究者）

科研費「基盤 C」「シロイヌナズナの組織培養における側根原基から茎頂メリステムへの転換機構」

平成 25～27 年度 採択

課題：破骨細胞や骨芽細胞の発生・機能を制御する膜輸送体の探索と骨代謝との相互連関解析

担当：中川 大・伊藤守弘・禹済泰・大西素子

本研究プロジェクトでは、骨を溶解・脆弱化する細胞（破骨細胞）を研究対象に持つ学内研究者 3 名(伊藤守弘, 禹済泰, 大西素子)を含めた計 4 名で研究チームを結成し、次の 3 つの課題の解決に取り組んだ。

課題 1：破骨細胞や骨芽細胞の発生・機能を制御する ABC 輸送体の同定と骨代謝との連関の解析

破骨細胞に発現し、骨代謝を制御する可能性が見出された 9 種の ABC 輸送体のうち、*Abca5* 遺伝子と *Abcb4* 遺伝子をそれぞれ欠損させたマウスにおける骨組織の力学的強度を測定した。この結果、*Abca5* 遺伝子が排除されることによって骨の強度が上昇し、*Abcb4* 遺伝子が排除されることによって骨の強度が低下する可能性が見出された。

課題 2：破骨細胞や骨芽細胞の発生・機能を制御する SLC 輸送体の同定と骨代謝との関連の解析

破骨細胞の細胞融合に関与する可能性が見出された SLC 輸送体 **SLC3A2** を介して細胞融合が起こる際、いくつかのタンパク質の翻訳後修飾状態（リン酸化状態あるいは糖鎖修飾状態）が変化することを見出した。

課題 3：膜輸送体基質・阻害剤を用いた膜輸送体と骨代謝との関連の解析：破骨細胞の形態の異常を引き起こす H⁺輸送体阻害剤 destruxin E で処理した破骨細胞において、H⁺輸送体を構成するタンパク質の翻訳後修飾状態（リン酸化状態あるいは糖鎖修飾状態）が変化している可能性が見出された。

課題：花卉特異的高発現プロモーターの開発とその利用による大輪花卉作出の試み

担当：山田邦夫・坂野弘美

本課題の目標は、花卉成長を制御することで大輪花卉の花弁を作出し、鑑賞用花卉の高品質化を図るものである。本研究では、花卉成長に関わる遺伝子発現量を花卉特異的に制御するために花卉特異的高発現プロモーターを開発し、そのプロモーターを利用した形質転換花卉を作出することで花卉の大きさを制御することを試みる計画である。本年度はまず、花卉成長に関連する **XTH**（キシログルカン転移/加水分解酵素）遺伝子（*RhXTH*）およびエクспанシン遺伝子（*RhEXPA*）について、その発現パターンを詳細に調べた。これらの遺伝子はどちらもコピー数の多い遺伝子ファミリーであったが、*RhXTH*、*RhEXPA* の 5'非翻訳領域はそれぞれ特有の配列を持っており、それらを用いてリアルタイム PCR を行った。その結果、特に開花時期の花弁で強く発現している遺伝子を特定することが出来た。次に、トルコギキョウ葉からゲノム DNA を抽出し、ラムダファージベクターを用いてゲノムライブラリーを作製した。現在、花卉で特異的に発現する遺伝子の非翻訳領域をプローブに用いて、その遺伝子のプロモーター領域の単離を行っている。さらに今後は、その花卉特異のプロモーター中のエンハンサー領域を複数コピー重複させ、CaMV35S プロモーターの最小領域を連結させることで高発現化を試みる予定である。一方、今後の遺伝子導入実験で必要となる組換え体作出手法について、アグロバクテリウム法による遺伝子導入を検討した結果、形質転換法を確立し、実際に、GFP 遺伝子を導入したトルコギキョウを作製した。また、矮性トルコギキョウを用いて培養条件を工夫することにより短期間で開花させ、解析に用いることが可能であることを明らかにした。次年度は、高発現化した花卉特異のプロモーターを用いて花卉成長に関わる遺伝子をトルコギキョウに導入し、花卉大輪化の可能性を探る計画である。