

共用研究施設

教授：馬目 佳信 分子細胞生物学・脳神経科学
 准教授：佐々木博之 微細形態学
 准教授：岩本 武夫 生化学

教育・研究概要

本施設は大学を活性化し、より一層医学研究を振興するために総合医学科学研究センターの中に設けられた組織である。この施設の利用には2つの方法がある。

1. 一般研究員制度

本制度は主に学内研究者を対象としており、研究者が年度毎に登録・申請することで大学一号館8階にある共焦点レーザー顕微鏡、光学顕微鏡、電子顕微鏡および各試料作製機器、HPLC、核酸増幅装置など、様々な装置を自由に利用できる。機器の整備や点検はスタッフにより行われるため、いつでも安心して装置・機器を利用可能である。またこの制度では単に装置・機器等が利用可能な場を提供するだけでなく、研究者に形態学的、生化学的な研究方法や具体的なアドバイスを必要に応じて行っている。

2. 受託業務制度

測定機器や観測機器の発展に伴いハード/ソフトいずれの技術も急速に高度化し、専門的な生物学的観察が可能となった。しかし解析技術もハイテク化されたため、様々な機器の使用には専門的な知識が要求されるようになってきている。受託業務制度では、時間と余裕のない研究者のために、施設のスタッフが業務として透過型電子顕微鏡や走査型電子顕微鏡の試料作製、観察、撮影記録、高速液体クロマト(HPLC)や質量分析装置による試料の解析などを行っている。この制度の利用により研究の推進・能率化を図ることができる。本学に所属する医師や教職員はこれらの制度を必要に応じて利用可能である。

また本施設では学内の研究支援だけでなく独自の研究も行っている。

I. 蛍光ナノ粒子を利用したバイオイメージング・微量計測

本学で開発されたモノクローナル抗体、JT95は分化型甲状腺がん、特に乳頭がんに発現する抗原を認識する。この抗体の甲状腺がん血清診断等への利用のため、蛍光ナノ粒子を抗体に結合する方法を開

発した。抗体に蛍光ナノ粒子を結合させる技術は近年進んでいるが標準的な手法ではIgMのクラスの標識効率はまだ不十分である。我々は結合様式を変えることによって徐々に利用可能な技術を目指している。本年度結合した抗体では甲状腺がんと反応させると蛍光顕微鏡で抗原の局在を可視化することができ、また従来、酵素抗体法で行っていた抗原定量も蛍光測定によって感度を向上させることができた。

II. 形態学的手法を中心とした細胞生物学

1. タイトジャンクションストランドのダイナミクス解析

異なるアミノ酸配列位置に緑色蛍光タンパク質GFPを組み込んだ二種類のタイトジャンクション構成分子クローニン-1の強制発現安定細胞株(L細胞およびMDCK細胞)を作成し、タイトジャンクションストランドの動的解析を行っている。

2. 重層扁平上皮組織におけるタイトジャンクションの機能解析のため、ヒト三次元培養皮膚を用いて、タイトジャンクションと細胞間バリアおよびタイトジャンクションと細胞極性形成の関連性について検討を行っている。

3. 新学術領域研究「次世代多階層生体機能シミュレーション基盤構築と実証研究」の分担研究として、生体シミュレーションのための組織・細胞・分子レベルの光学顕微鏡的および電子顕微鏡的データベース構築を行っている。

4. 学内電子顕微鏡受託の技術向上を目指して、酢酸ウラン代替染色法および新たな走査電子顕微鏡用試料乾燥法の開発を行っている

III. 疎水性で荷電したアミノ酸を含むペプチドより成るタンパク質ナノ材料の接着力と構造特性

タンパク質ポリマーはバイオベースの接着剤やコーティング材料として使用され、更に開発が進められている。マクロタンパク質に由来する大部分の接着力はレセプターまたは架橋に起因して働いている。タンパク質ポリマーの接着機構の解明は、結果として接着剤のより良い理解とナノやマクロオーダーでのタンパク質ポリマー新機能特性の発見に繋がる。この研究プロジェクトの目的は、タンパク質ポリマーの接着特性をナノスケールで研究することである。接着力の異なる7つのタンパク質ナノ材料サンプルを設計し、固相ペプチド合成法で合成した。すべてのタンパク質ナノ材料は、荷電アミノ酸シーケンスを側面に配置し共通の疎水性コアを挟んでい

る。その接着特性を最適化するため、色々な pH と硬化温度について調べた。その結果、本研究でデザインした中の KKK-FLVIGSII-KKK ペプチドは、木を用いた場合に最も高い接着力を示した。このペプチドは水溶液中で自己会合し、それらの相互作用により接着能力を示した。pH12 で電荷を失うアミノ酸配列構造を持つ疎水性ペプチドが最も高い剪断強度を示した。更にタンパク質ナノ材料について、円偏光二色性、レーザーフォーリエ変換赤外分光光度計、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析装置などを用いて構造解析を行った。

「点検・評価」

本年度の登録者は 47 人、受託件数は微細形態学 研究関連 206 件、生化学関連 433 件であった。新設されてからまだ 2 年目だが徐々に学内で使用する人数も増えており装置についても認知度が高まってきた。ホームページも充実させ、施設で使える装置全てを写真とともに公開するなど工夫を凝らしてきた。また研究の支援だけでなく、学部や大学院教育にも積極的に参加しており、特に学部 3 年生の研究室配属や大学院共通カリキュラムなどのような演習型、実習型の授業を中心に教育を行っている。

蛍光ナノ粒子は従来型のものに加えてより安全性の高いシリコン型ものを開発するなど将来に役立つ技術開発を行っている。

細胞間接着は、炎症反応抑制、がんの転移抑制あるいは皮膚生体防御機構においても一定の重要な役割を果たしている。タイトジャンクションを含めた細胞間接着の制御機構の理解は、炎症やがんの予防、診断、治療方法の開発や創薬、あるいは皮膚を対象とした機能的化粧品素材探索にもつながると考えている。これらの応用的な研究は、産学協同のプロジェクトとして幾つかの企業との共同で遂行しつつあり、今後も継続していきたいと考える。

デザインしたタンパク質ナノ材料のペプチドは pH12 で、ベータシートのような立体構造を取り、この接着力は、水素結合とファンデルワールス相互作用によるもので、イオン結合や共有結合は重要な要因ではなかった。従来の石油化学薬品製接着剤は乾燥下で接着能力が低下するが、ペプチド接着剤はむしろより強度を増した。このことは地上ではなく宇宙環境のような場で威力を発揮するものと考えられている。現在、熱シールド・タイルなどを宇宙船に貼り付ける際の接着剤として検討が進められている。デザインしたペプチド接着剤はアメリカ並びに国際特許を取得した。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Shirasu M, Fujioka K, Kakishima S, Nagai S, Tomizawa Y, Tsukaya H, Murata J, Manome Y, Touhara K. Chemical identity of a rotting animal-like odor emitted from the inflorescence of the titan arum (*Amorphophallus titanum*). *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74(12) : 2550-4.
- 2) Inaba N, Ishizawa S, Kimura M, Fujioka K, Watanabe M, Shibasaki T, Manome Y. Effect of inhibition of the ROCK isoform on RT2 malignant glioma cells. *Anticancer Res* 2010; 30(9) : 3509-14.
- 3) Hoshino A, Iimura T, Ueha S, Hanada S, Maruoka Y, Mayahara M, Suzuki K, Imai T, Ito M, Manome Y, Yasuhara M, Kirino T, Yamaguchi A, Matsushima K, Yamamoto K. Deficiency of chemokine receptor CCR1 causes defective bone remodeling due to impaired osteoclasts and osteoblasts. *J Biol Chem* 2010; 285(37) : 28826-37.
- 4) Raleigh DR¹, Marchiando AM¹, Zhang Y¹, Shen L¹, Sasaki H, Wang Y¹, Long M¹, Turner JR¹(¹ Chicago Univ.). Tight junction-associated MARVEL proteins *marveld3*, *tricellulin*, and *occludin* have distinct but overlapping functions. *Mol. Biol. Cell* 2010; 21(7) : 1200-13.
- 5) Muto S¹, Hata M¹, Taniguchi J¹, Tsuruoka S¹, Moriwaki K¹, Saitou M², Furuse K¹, Sasaki H, Fujimura A¹, Imai M¹, Kusano E¹, Tsukita S²(² Kyoto Univ.), Furuse M¹(¹Kobe Univ.). Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(17) : 8011-6.
- 6) Shiozuka M¹, Wagatsuma A¹, Kawamoto T¹, Sasaki H, Shimada K¹, Takahashi Y¹, Nonomura Y¹, Matsuda R¹(¹Univ. of Tokyo). Transdermal delivery of a readthrough-inducing drug: a new approach of gentamicin administration for the treatment of nonsense mutation-mediated disorders. *J Biochem* 2010; 147(4) : 463-70.
- 7) Wu S¹, Liu J¹, Reedy MC², Tregear RT (MRC), Winkler H¹, Franzini-Armstrong C³, Sasaki H, Lucaveche C¹, Goldman YE³(³Univ. Pennsylvania), Reedy MK²(²Duke Univ.), Taylor KA¹(¹Florida Univ.). Electron tomography of cryofixed, isometrically contracting insect flight muscle reveals novel actin-myosin interactions. *PLoS One* 2010; 5(9) : e12643.
- 8) Iwase T, Shinji H, Tajima A, Sato F, Tamura T,

- Iwamoto T, Yoneda M¹⁾(¹Univ. of Tokyo), Mizunoe Y. Isolation and identification of ATP-secreting bacteria from mice and humans. *J Clin Microbiol* 2010; 48(5): 1949-51.
- 9) Tomich J¹⁾, Iwamoto T, Shen X¹⁾, Susan San X¹⁾(¹Kansas State Univ.). PH dependent adhesive peptides. US Patent 2010; US 7745570 B2.
- 10) Herrera A¹⁾, Al-Rawi A¹⁾, Cook G (Univ. San Diego), Gao J¹⁾, Iwamoto T, Prakash O¹⁾, Tomich J¹⁾, Chen J¹⁾(¹Kansas State Univ.). Structural characterization of two pore-forming peptide: consequences of introducing a C-terminal tryptophan. *Proteins* 2010; 78(1): 2238-50.
- 11) Ayella A¹⁾, Lim S¹⁾, Jiang Y¹⁾, Iwamoto T, Lin D¹⁾, Tomich J¹⁾, Wang W¹⁾(¹Kansas State Univ.). Cytostatic inhibition of cancer cell growth by lignan secoisolariciresinol diglucoside. *Nutr Res* 2010; 30(11): 762-9.
- 12) 藤岡宏樹, 富澤康子, 山本健二, 馬目佳信. 冷凍食品の匂いの絶対値化と温度変化による影響. *日味と匂い* 2010; 17(3): 533-5.

Ⅲ. 学会発表

- 1) Somura H, Hori H, Fujioka K, Manome Y. Sequences of COX1 in slow lorises (*Nycticebus*) and identification of individual species. International Symposium on Biodiversity Sciences 2010 (ISBS2010). Nagoya, June.
- 2) Hori H, Somura H, Wirdateti, Watanabe M, Hayakawa T, Perwitasari-Farajalla D, Wijayanto H, Manome Y, Manangsang J. Determination of mitochondrial COX1 DNA sequences of native Slow lorises (*Genus Nycticebus*) in Indonesia. SEAZA (South East Asian Zoos Association) 18th Annual Conference. Bali, Nov.
- 3) 藤岡宏樹, 真鍋法義, 野村真弓, 渡辺美智子, 花田三四郎, 星野昭芳, 山本健二, 馬目佳信, 武山 浩. 甲状腺がん特異的抗体 JT95 と, 蛍光ナノ粒子 QD による新規検出法の開発. 第 53 回日本甲状腺学会学術集会. 長崎, 11 月.
- 4) Manome Y, Watanabe M, Takeyama H, Fujioka K. Localization of thyroid carcinoma-related antigen recognized by JT-95 monoclonal antibody. The 17th International Microscopy Congress (IMC17). Rio de Janeiro, Sept.
- 5) Fujioka K, Saito H, Yamada Y, Manome Y. High-resolution images of resin structure in agarwood. The 17th International Microscopy Congress (IMC17). Rio de Janeiro, Sept.
- 6) Somura H, Hori H, Manome Y. Sequence analysis of mitochondrial COX1 region in Slow lorises (*Genus Nycticebus*) for identifications of individual species. SEAZA (South East Asian Zoos Association) 18th Annual Conference. Bali, Nov.
- 7) 荒井久子, 関 啓子, 村田実千代, 斉藤英希, 佐々木博之. GFP 融合タンパク質の photoconversion 法による電顕観察の試み. 医学生物学電子顕微鏡技術学会第 26 回学術講演会および総会. 別府, 5 月.
- 8) 菊地恵美, 村田実千代, 荒井久子, 斉藤英希, 関啓子, 西田倫希¹⁾, 長谷川紀昭¹⁾, 佐々木博之 (¹大阪大). 透過型電子顕微鏡による whole mount 試料作製法の試み. 医学生物学電子顕微鏡技術学会第 26 回学術講演会および総会. 別府, 5 月.
- 9) Sasaki H, Maeda T¹⁾, Kuroda S¹⁾, Kurasawa M¹⁾, Oba A¹⁾, Yamamoto T¹⁾(¹Pola). Epidermal tight junction maintains calcium distribution in human reconstructed epidermis and regulates the epidermal differentiation. The 40th Annual European Society for Dermatological Research Meeting. Helsinki, Sept.
- 10) Seki K, Murata M, Sasaki H. Tight junction maintains calcium distribution which leads to the cellular differentiation in epidermis. The 50th American Society for Cell Biology Annual Meeting. Philadelphia, Dec.
- 11) Gudlur S¹⁾, Yao X¹⁾, Hiromasa Y¹⁾, Iwamoto T, Tomich J¹⁾(¹Kansas State Univ.). Peptide nanovesicles: Supramolecular assembly of branched, amphiphilic peptides. Biophysical Society 55th Annual Meeting. Baltimore, Mar.