

機能のゆらぎ

中西 守

Functional Fluctuation

Mamoru NAKANISHI

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori,
Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan*

(Received March 8, 2006)

The discovery of the double-helical structure of DNA, the elucidation of the genetic code, and the determination of the three-dimensional structure of several proteins are some of the outstanding achievements of biochemistry and life sciences in the latter half of the last century. Proteins play key roles in almost all the biological processes and the biological function of a protein depends on its conformation which is defined as the three-dimensional arrangement of the atoms of a molecule. The three-dimensional structure, however, is not rigid but fluctuated. Structural fluctuation plays an important role in bio-macromolecules. How about “functional fluctuation” in biological systems? The present review proposes that functional fluctuation is also very important for understanding the mechanism of supramolecules, biological processes in living cells, and the interaction between biological systems. This new theme is pretty well supported by our recent experiments for neuro-immune crosstalk, gene transfection with cationic liposomes, and cell signaling in embryonic stem cells.

Key words—neuro-immune crosstalk; mast cell; calcium signal; cationic liposome; embryonic stem cell; confocal laser scanning microscope

1. はじめに

最終講義について考えたとき、「機能のゆらぎ (Functional fluctuation)」という題目がごく自然に思い浮かんだ。「機能のゆらぎ」という言葉が適切なものかどうかの自信はないが、「構造のゆらぎから機能のゆらぎへ」とでもいう副題をつければ私の最終講義の題目としてそれほど不都合でない気がする。

生命科学の研究に携わる者にとっては、「構造と機能」は表裏一体であるという思いが強い。1953年に Watson と Crick が遺伝子の本体である DNA 二重らせん構造を明らかにして以来、既に半世紀が過ぎている。¹⁾しかし、今世紀はその成果がさらに大きく花開き、生命科学・バイオサイエンスの時代

になると考えられる。生命科学が基礎科学の1分野の学問に留まらず、医療、医学、薬学とより密接に結びつくとともに、産業はもちろんのこと、社会制度、倫理、人権などの諸問題においていっそう重要な役割を果たすようになるであろう。それはさておき、生物物理学、生化学、分子生物学の研究者にとっては生体分子や生体超分子 (高分子) の「構造と機能」の理解は生命科学の基盤として欠くことができないという考えは変わらないといってよいであろう。

「機能のゆらぎ」の「ゆらぎ」は“fluctuation”の訳である。これについては、坪井正道先生と共著で「化学の領域」に書いた解説文「生体高分子の構造のゆらぎ」(南江堂:1974年)の中で、²⁾坪井先生は J. C. Slater の “Introduction to Chemical Physics” という統計力学の入門書中の “Fluctuation” の章の一部を引用され、“ある気体の密度は大きい体積について平均値を求めれば何回測定しても同一の値が得られるが、ある一点の密度は測定のために違う” という記述があると紹介されておられる。これと全

名古屋市立大学大学院薬学研究科(〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1)

現住所: 愛知学院大学薬学部薬品分析学教室(〒464-8650 名古屋市千種区楠元町 1-100)

e-mail: mamoru@dpc.agu.ac.jp

本総説は、平成 17 年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

く同様ではないが、生体高分子の構造について「構造のゆらぎ」と呼んでよいような動きがあり、それを実験的に明らかにしたのだという形でその解説は始まっている。²⁾内容は私が東京大学の坪井正道教授の研究室の大学院生時代に行った研究を中心に記述したものである。大学院生時代の「構造のゆらぎ」の研究は、当時、名古屋大学理学部から東京大学理学部物理学教室の助教授に転出されて来られた池上明先生のご指導も受けて行ったものであった。³⁻⁶⁾

2. 構造のゆらぎ

蛋白質の分子構造（いわゆる高次構造）についてはX線結晶解析により、私が大学院生であった頃（1969—1974年）までには既にかんがりのことが分かっていた。Kendrewがミオグロビン⁷⁾を、Perutzがヘモグロビン⁸⁾を、また、Phillipsらは酵素リゾチーム⁹⁾の構造を明らかにしていた。また、アミノ酸転移酵素¹⁰⁾の構造もRichらによりまもなく明らかになった。そのように静的な立場からの蛋白質の構造がはっきりしてきた当時、高次構造についての関心はX線結晶解析に立脚しつつも、変化のない硬い姿から動きのある姿をとらえることに移行しつつあり、いわゆるnative状態における構造のゆらぎ（あるいは揺動）をとらえることが1つの目標であった。それは、蛋白質（生体高分子）の構造はnativeな状態においても、側鎖はもちろん、主鎖自身もかなり激しく揺動しつつその機能を発揮していると推察されたからである。温度を上昇させ蛋白質が変性するような条件にすると、蛋白質のnativeな構造は大きく壊され、その変化は比較的容易に分光学的手法などで追跡できるが、蛋白質が機能を発現している状況、いわゆる、native状態における構造の動きについてはあまり多くの知識は得られていなかった。

そのような生体高分子の構造のゆらぎをとらえるのに有効だと考えられるのに水素の同位元素交換法がある。¹¹⁾生体高分子中の窒素、酸素、硫黄などの原子について水素は水溶液中で比較的容易に水の水素と交換する。また、その水素の交換速度は蛋白質の高次構造の形成によって大きな影響を受けているが、高次構造に「ゆらぎ」があれば、そのような変化を受けた蛋白質分子はnative状態の分子に比べ速い速度で水の水素と交換すると推察された。重水中では生体高分子の特性は通常の水（軽水）の中と

ほとんど変わらないので、重水中での蛋白質の水素交換反応速度の測定は2つの状態（構造の「ゆらぎ」の前後）の反応速度の違いが大きければ、高次構造に変化を受けた分子の数は少なくとも時間さえかければ積算されて検出されてくるという利点がある。そこで、重水中での重水素（D）と生体高分子の交換可能な水素（H）との同位元素交換反応速度の測定から蛋白質や核酸の「構造のゆらぎ」についての情報を得ることができる。⁴⁻⁶⁾

3. 蛋白質の構造のゆらぎ

坪井先生、池上先生と私は1970年代の初頭に、蛋白質の構造のゆらぎに関連した一連の原論文を公表した。³⁻⁶⁾それらは、関連分野の研究者からかなり注目された。水素交換反応の測定法自身は1950年代半ばにLinderström-Langらにより提唱されたものである。¹¹⁾Linderström-Langらは動的構造を測定できると考えていたようであるが、¹²⁾当時はむしろ蛋白質の二次構造（ α -ラセン構造）の測定法として検討を行っていた。1950年代半ばはWatson-Crickにより遺伝子の本体である二重ラセン構造が提唱された時期であるが、¹⁾X線結晶解析による蛋白質の三次（高次）構造はいまだ明らかにはされていなかった。DNAの二重ラセン構造のモデル提案ではWatsonとCrickが成果を収めたが、構造化学者のPaulingはポリペプチドの α -ラセン構造の研究で、既に素晴らしい成果を得ていた。¹³⁾当時、分子構造の測定法としては赤外分光法が有力な手段であり、蛋白質中の α -ラセン構造の存在も実験から確かめられたばかりのところであった。¹⁴⁾それゆえ、水素交換反応がポリペプチドの動的構造を解析するという考えは、Linderström-Langの時代から約15年後に、池上先生が名古屋大学理学部で再発見されたものである。¹⁵⁾坪井先生は構造化学と振動分光学（赤外分光・ラマン分光）のご専門であり、1961年に東京大学薬学部にて「生体分子の立体構造



中西 守

愛知学院大学薬学部教授。1940年三重県生まれ。東京大学薬学部卒業、東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了（薬学博士）。東京大学薬学部助手、同助教授、スタンフォード大学客員教授、名古屋市立大学大学院薬学研究科教授、薬学研究科長（薬学部長兼務）を経て、2006年4月より現職。趣味、テニス。

研究」を導入するという使命を帯びて教授に就任された。わが国の薬学部での生体分子の立体構造の研究がスタートした。また、池上先生が一時、坪井先生の研究室の特別研究員をなさっておられた経緯などもあり、私は大学院に入学したときには赤外分光法を使って、蛋白質の構造のゆらぎの研究を行う準備は整っていた。

池上先生の研究室の金久さん（京大教授）にも計算機によるシミュレーションの部分を手伝っていただいて、ポリペプチドの α -ヘリックス構造のゆらぎを追究したのが、構造のゆらぎに関しては最初の論文である。³⁾ その後は、私自身はX線結晶解析で最初に立体構造が明らかになった酵素(リゾチーム)の動的構造を赤外分光法で追究し、蛋白質の構造のゆらぎについて実験を進めていった。その後の一連の研究の詳細は省くが、研究成果の1つは、常温での蛋白質の構造変化(ポリペプチド鎖)には熱変性のときのような分子構造全体に及ぶ変化ではなく、局所的な構造変化(local fluctuation)が存在することを水素交換反応の測定により明らかにしたことであろう。大学院生諸君らの研究等を通して、¹⁶⁻¹⁹⁾蛋白質の「構造のゆらぎ」の研究は大いに進展して行ったが、ただ、私自身はX線構造解析やNMR法では当分は追究できないであろうと考えられる、より高次レベルの生体の「構造と機能」の研究をしたいと考えていた。

4. 速い水素交換反応と核酸の構造のゆらぎ

核酸は水素交換反応速度の対象になる残基の交換速度が蛋白質のペプチド水素よりも速い。von HippelらはEnglander教授らが考案したセファデックス・ゲルろ過法を活用し、トリチウムで標識したDNAからトリチウムが水の酸素と交換する速度を低温(おおよそ0°C)で測定した。これは、よく工夫された方法であり、DNA二重らせん中の核酸の水素交換反応速度が初めて明らかになった。^{20,21)}

ところで、その頃、私は蛋白質や核酸の紫外吸収スペクトルの強度は水素が重水素と置換すると1%程度吸光度が減少することを見つけていた(吸収スペクトルの短波長移動)。²²⁾ これは水溶液を重水溶液に置換したことによる溶媒効果ではなく、水素と重水素の交換に基づくものである。紫外スペクトルは分子の励起状態への遷移に基づいており、赤外スペクトルのような分子振動とは異なっている。それ

ゆえ、水素が重水素に置換してもスペクトルは変化しないと考えられてきた。この吸光度の変化は励起状態での同位体効果と解釈すべきものであった。紫外・可視吸光度の1%の差異を通常は再現性よく計測することはそれほど容易ではない。しかし、高速反応の測定法の1つであるストップフロー法の場合、一定の波長での吸光度の変化を短時間で測定しているのだから、比較的容易にその変化(吸光度の減少)を追跡できた。当時、ユニオン技研社(現:大塚電子株)が開発したストップフロー装置は1万分の1の吸光度の変化を計測できた。^{23,24)} ユニオン技研社のストップフロー装置は後に購入したが、最初は、枚方市まで出かけて機器を使用させていただいた。その装置を使って、核酸の速い水素交換反応を容易に測定できることを示した。²⁵⁾ 核酸だけでなく蛋白質のアミノ酸側鎖(トリプトファンやチロシン)の水素交換反応も計測でき、それらの研究成果はアメリカ化学会誌等にいくつかの論文として公表した。²³⁻²⁶⁾

核酸に話を戻すと、紫外ストップフロー法により常温での二重らせんDNA塩基対のアミノ基やイミノ基の水素交換反応が明らかになり、DNA二重らせんの構造のゆらぎの度合いを知ることができた。また、ストップフロー水素交換反応法により、DNA helix-destabilizing蛋白質のDNA構造に及ぼす影響やヌクレオソーム中の塩基対構造の特質を解明した。^{27,28)} 一方、DNAの二重らせんと三重らせんの動的構造(Hoogsteen型の塩基対を形成)の研究をストップフロー法とセファデックス法を活用して行った。²⁹⁾ また、蛋白質分子のサブユニットの解離会合の研究を光散乱ストップフロー法を活用して追究できることを示した。³⁰⁾

5. 細胞内シグナルとその多様性

高次レベルの生体の構造と機能の研究をしたいと考えていた私にとっては、幸運にも、1981年秋から1982年夏まで客員教授としてスタンフォード大学化学科のMcConnell教授の研究室に滞在する機会を得た。McConnell教授のところでは顕微鏡のカバーガラス表面上の脂質単分子平面膜に主要組織適合性抗原(MHC抗原)を再構成し、T細胞との相互作用の研究を行った。³¹⁾ 1年弱の滞在であったが、McConnell教授の研究室のメンバーや研究の共同研究者のAdrian Brian博士の温かい支援は今

も忘れられない。帰国後は、生体分子や生体超分子の動的構造の研究を進めつつ、³²⁻³⁴⁾ 免疫反応の研究を少しずつ開始した。³⁵⁻³⁸⁾

1989年春、名古屋市立大学薬学部薬品分析化学教室教授として招いていただいた。既に、3名の修士1年の大学院生が研究室に配属していた。2人の大学院生は免疫細胞内のカルシウムイオン濃度の測定による機能解析を、1人は抗体の抗原認識の研究をスタートさせてくれた。カルシウムイオンは細胞内のセカンドメッセンジャーの1つであり、R. Tsien博士のカルシウムイオンの蛍光性試薬の利用により、多くの研究者が細胞の活性化の研究に利用するようになっていた。³⁹⁾ われわれも初めは蛍光分光器を活用し、細胞内のカルシウムイオン濃度の測定を行ったが、蛍光顕微鏡を使った単一細胞のカルシウムイオンの測定は遙かに魅力に富んだものであった。個々の細胞(マスト細胞)でのカルシウムイオン濃度の計測は、クローン化された細胞においても異なった応答をすることが明らかになった。⁴⁰⁾ 朝日新聞社記者の田辺 功さんが「クローン細胞にも個性があります」という見出しをつけて記事として新聞に載せていただいた。さすがに、記者である田辺さんは上手なタイトルをつけられると感心した。⁴¹⁾

その後は、共焦点レーザー顕微鏡の利用が可能になり、単一細胞のカルシウムイメージングは刺激応答に伴うカルシウムイオンの細胞内上昇の有無だけでなく、細胞内局所部位でのカルシウムイオン濃度の分布を解析できる有用な測定法になった。それと同時に、リンパ球やマスト細胞の抗原刺激に伴い、カルシウムイオン濃度が細胞質内だけでなく、核内でも上昇することをリンパ球とマスト細胞で発見した。⁴²⁻⁴⁵⁾ 免疫細胞は比較的サイズの小さい細胞であるが、核は細胞のかなりの部分を占めている。カルシウムイオンが細胞質内のセカンドメッセンジャーということは生化学の参考書に記載されているが、核内のカルシウムイオンについての記述は1990年代の初頭には私の知る限りは全く記述されていなかった。Bリンパ球での発見をヨーロッパの生化学の速報誌に投稿したら、その論文はすんなりと受理された。⁴²⁾ また、イノシトール三リン酸の発見者であるBerridge博士によりNature誌上で紹介された。⁴²⁾ その頃には、古野忠秀博士(愛知学院大

学薬学部助教授)がマスト細胞とリンパ球でカルシウムのイメージングと核のイメージングの二重染色を行い、それら画像の対比から、免疫細胞(マスト細胞, B細胞, T細胞)は抗原刺激により、細胞質内のカルシウムイオン濃度の上昇とともに核内でもカルシウムイオン濃度が上昇することを明らかにしていた。⁴³⁻⁴⁵⁾ また、核内で上昇するカルシウムイオンは細胞質から流入していることも解明した。⁴⁶⁾ 核内のカルシウムイオンは転写制御等に関与していると考えられるが、その詳細はいまだ不明である。1990年代後半になると核内カルシウムイオンに関するカンファレンスがいくつも開催され、招聘状をいただいたが、シグナル蛋白質の可視化解析⁴⁷⁾や免疫系と神経系のクロストークのような、より高次の機能解析に関心を移しつつあったので、核内のカルシウムシグナルの解析はその後は深くは進めなかった。高次細胞機能の解析と関連して、今後新たな形での追究がなされるものと考えられる。

共焦点レーザー顕微鏡はカルシウムイオンの計測を容易にするとともに、蛍光蛋白質(Green Fluorescence Protein 誘導体)の利用と相まって、シグナル蛋白質の細胞内動態の解析に多くの情報を提供してくれた。その1例はMAPキナーゼカスケードの蛋白質の細胞内動態の研究である。アレルギー反応の研究にしばしば用いられているラット好塩基球白血球細胞(RBL-2H3)を用いて、抗原刺激後のMAPキナーゼ(ERK)及びMAPキナーゼ・キナーゼ(MEK)の核シャトルの動的分子機構を明確にした。⁴⁸⁾

6. 免疫系・神経系のクロストーク

免疫系と神経系は生体内の独立したシステムであるかのように考えられてきた。しかし、免疫学や神経科学の急速な進歩は、免疫系と神経系との間に密接な相互作用(クロストーク)が存在し、両者の相互作用により生体の恒常性が維持されていることを示唆するようになってきた。これは、免疫系がいわば生体の環境変化に対するアンテナの役割を果たし、生体内の環境情報を末梢から神経中枢に伝達し、その一方、環境変化に対応するための指令や制御が、神経中枢から抹消を介して免疫系へ作用していることを示している(Fig. 1)。⁴⁹⁾ しかし、このような神経系と免疫系の相互作用については、適切な研究手段がなく、これまで十分な解析はなされてこ

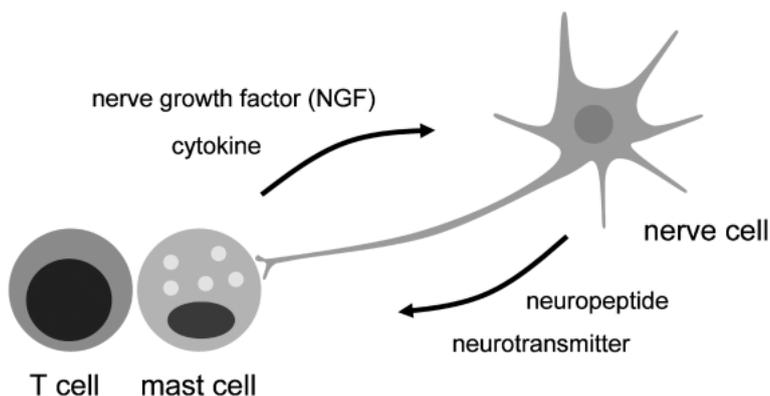


Fig. 1. Schematic Representation of Neuro-immune Crosstalk

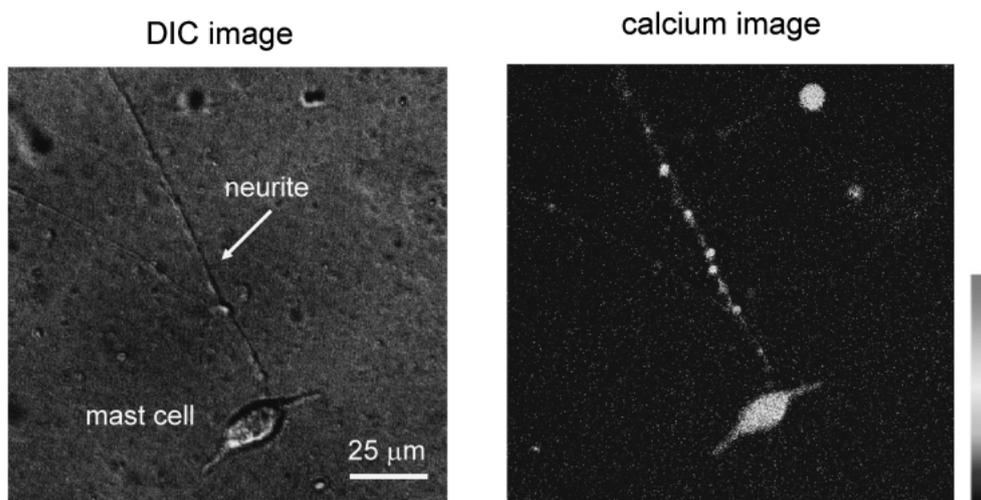


Fig. 2. Representative Images Showing the Interaction between the Neurite-mast Cell Coculture
Left: a DIC image, Right: a fluorescence image.

なかった。

1990年代半ばに、カナダ McMaster 大学の Bienenstock 教授のグループは、マウス神経節初代培養細胞とマスト (RBL) 細胞の共存培養に成功し、その結果を論文として公表していた。^{50,51)} 私はこの研究に大変興味を持ち、われわれが既に樹立しているカルシウムイメージングの方法を利用すれば、神経細胞から免疫細胞(マスト細胞やリンパ球)へ、また、免疫細胞から神経細胞への相互作用を解析できると考えた。Bienenstock 教授へ共同研究をしたい旨の手紙をお送りしたら、快い賛同の返事をすぐいただいた。同時に、文部科学省(文部省)へ海外国際共同研究費補助金の申請書を提出したら、幸いにも申請書が採択され、計4年間の研究費補助金を受けられることになった。McMaster 大学の

Bienenstock 教授の研究室に赴き共存培養技術を習得し、神経節初代培養細胞と免疫細胞(マスト細胞、リンパ球)との *in vitro* 共存培養システムを名古屋市立大学で確立し、共焦点レーザー顕微鏡による解析を可能にした。⁵²⁾

神経細胞と免疫細胞の共存培養のシステムは、まず、新生児マウス上頸神経節 (superior cervical ganglia, SCG) を取り出し、トリプシンで処理して神経節を分散させた。NGF (神経成長因子) 存在下で2日間培養すると、神経突起が伸長する。神経初代培養細胞とマスト細胞 (免疫細胞) の共存培養はマスト細胞を添加後、NGF 存在下でさらに3日間培養する。神経突起が伸長し、その結果、マスト細胞 (免疫細胞) との接着が観測される。

Figure 2 はマスト細胞 (RBL) と神経細胞 (SCG)

との相互作用をレーザー顕微鏡で観察したものである。⁵²⁾ 左は微分干渉画像であり、神経細胞の突起は伸長しマスト細胞と接着している。右はカルシウムイオンの蛍光画像である。カルシウムイオンの蛍光試薬 fluo-3 をあらかじめ標識してある。神経細胞を特異的に活性化する薬物であるブラジキニンやサソリ毒 (scorpion venom) を添加すると、神経細胞が活性化され、神経細胞内のカルシウムイオン濃度は上昇する。ついで、神経細胞の活性化に続いて、神経細胞と接着しているマスト細胞のカルシウムイオン濃度が上昇する。その様子を示した画像が Fig. 2 (右) である。

蛍光強度の時間変化を計測したものが Fig. 3 である。黒い矢印のところではブラジキニンを加えている。神経突起の活性化に続いて、マスト細胞のカルシウムイオン濃度が上昇していることが分かる。神経突起と接着していないマスト細胞ではこのようなカルシウムイオン濃度の上昇は観測されない。

神経細胞からマスト細胞への活性化シグナルは、神経突起から放出されるサブスタンス P (11 個のアミノ酸からなるペプチド) が関与していた。抗サブスタンス P 抗体を添加するとマスト細胞の応答は濃度依存的に抑制された。また、サブスタンス P 受容体 (NK1 受容体) のアンタゴニストの添加によってもマスト細胞の活性化が抑制された。⁵²⁾

一方、マスト細胞を活性化したときの神経細胞へのクロストークを観測するため、マスト細胞膜上の IgE 受容体を抗 IgE 受容体抗体で架橋し活性化を行

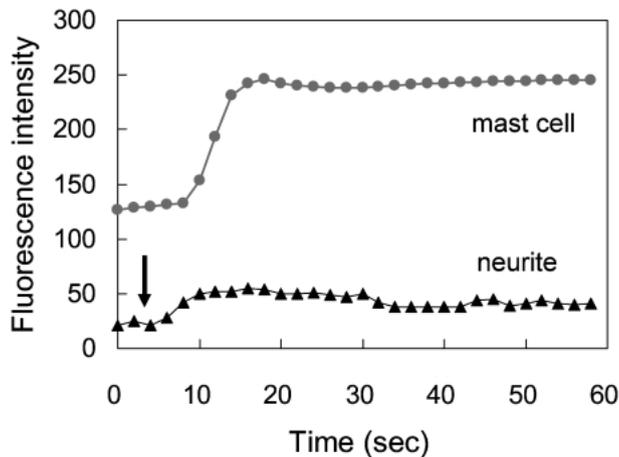


Fig. 3. The Sequential Increase in Fluorescence Evoked by Bradykinin in Neurite-RBL Coculture

った。マスト細胞のカルシウムイオン濃度の上昇に少し遅れて、細い神経細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇した。Figure 4 は fluo-3 を標識したマスト細胞と神経細胞の蛍光画像です。また、Fig. 5 は蛍光強度の時間変化を示したものです。マスト細胞の

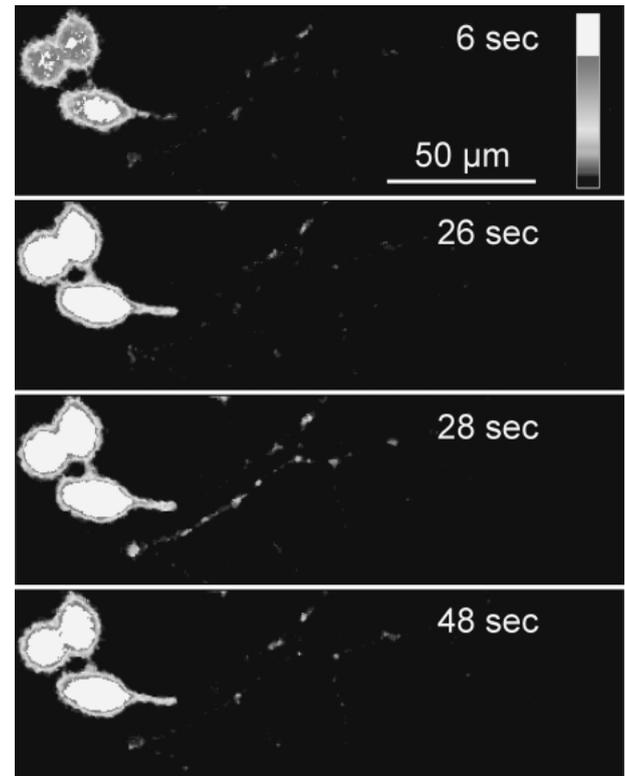


Fig. 4. Fluorescence Images of RBL-to-Neurite Communication

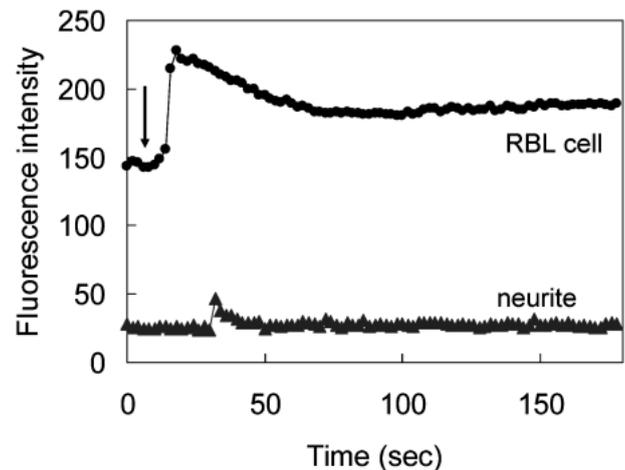


Fig. 5. Representative Tracing Showing that in Response to Anti-IgE Receptor Antibodies Added to RBL-neurite Coculture

カルシウムイオン濃度の上昇に少し遅れて、神経突起でもカルシウムイオン濃度が上昇していることが分かります。このような変化は、マスト細胞と接着していない神経細胞では起こりません。また、マスト細胞から神経細胞への活性化には ATP がメディエーターになっていることが分かった。それは、ATP の加水分解酵素アピラーゼを用いた実験や、ATP 受容体の阻害剤を用いた実験から明らかになった。また、マスト細胞を活性化したときのシグナルは、両者の細胞の接着部位から 160—200 μm 離れた神経突起にまで及んでいた。⁵³⁾

さて、神経突起とマスト細胞の相互作用の際には、細胞間でシナプス様構造が形成される。Figure 6 はその様子を電子顕微鏡で観察したものです。左は培養マスト細胞 (RBL) と神経突起の接着を示した電顕像です。中央はその拡大図です。神経突起とマスト細胞の培養株 (RBL) は明瞭なシナプス様構造を形成します。一方、マウス骨髄由来の初代培養マスト細胞 (BMMC) の場合には、マスト細胞が球形でかさばった形をしており明瞭なシナプス様構造を形成していないように見えますが (Fig. 6 右)、この場合も、神経細胞の活性化によってマスト細胞が活性化されます。初代培養マスト細胞 (BMMC) の場合も活性化にはサブスタンス P が関与しております。⁵⁴⁾

ここで参考までに、神経突起とマスト細胞株 (RBL) の相互作用を原子間力顕微鏡で観測した画像 (Fig. 7) を示します。神経突起の先端の成長円錐 (growth cone) がマスト細胞の偽足と相互作用しております。神経細胞の活性化により、マスト細胞が脱顆粒反応を行い、神経突起の繊維に添った形

で、脱顆粒した跡が観測されます。免疫細胞と神経細胞のクロストークが局所部位から起こっていることが分かります。⁵⁵⁾ 同様な結果は顆粒の膜蛋白質である CD63 と蛍光蛋白質とのキメラ蛋白質を用いた、共焦点レーザー顕微鏡による顆粒の細胞内動態の追究からも明らかになっております。^{56,57)}

次に、免疫細胞と神経細胞のシナプス様構造の形成に関与する接着分子について述べます。細胞間相互作用には接着分子としては N-カドヘリンと SynCAM が関与しております。^{58,59)}

接着分子 SynCAM は細胞外に 3 つの免疫グロブリンドメインを持つ糖タンパク質です (Fig. 8)。⁶⁰⁾ SgIGSF と呼ばれている接着分子と同一の蛋白質です。SynCAM は神経シナプスの形成において、homophilic な相互作用 (同一分子種間の相互作用) で細胞間相互作用の形成に関与しております。大阪大学名誉教授北村幸彦先生並びに、神戸大学医学部助教授伊藤彰彦先生との共同研究で、SynCAM の遺伝子を導入したトランスジェニックマウスや各種の変異マウスを用いて、神経細胞とマスト細胞の相互作用を追究しました。その結果、SynCAM を発現したマスト細胞では明瞭に接着率が增大することが分かりました。^{59,61)}

レーザー顕微鏡で神経細胞とマスト細胞 (BMMC) の相互作用の様子を追究しました。実験では、抗 SynCAM 抗体とマスト細胞に特異的に結合する抗 KIT 抗体を用いて免疫染色を行いました。詳細は省略しますが、SynCAM 分子がマスト細胞と神経突起の相互作用に関与していることを明らかにできました。⁵⁹⁾

これらの結果を総合すると、マスト細胞と神経突

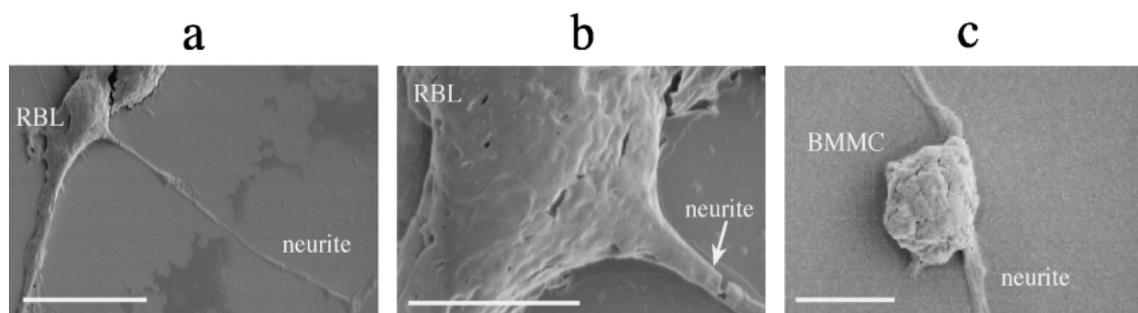


Fig. 6. Electron Microscopic Images of the Synapse-like Structures between Mast Cells (RBL or BMMC) and Neurite
(a): A typical example of neurite-mast cell (RBL) contacts. A white bar is 20 μm . (b): An enlarged images of Fig. 1 (a). A white bar is 5 μm . (c): A typical example of neurite-BMMC contacts. A white bar is 10 μm .

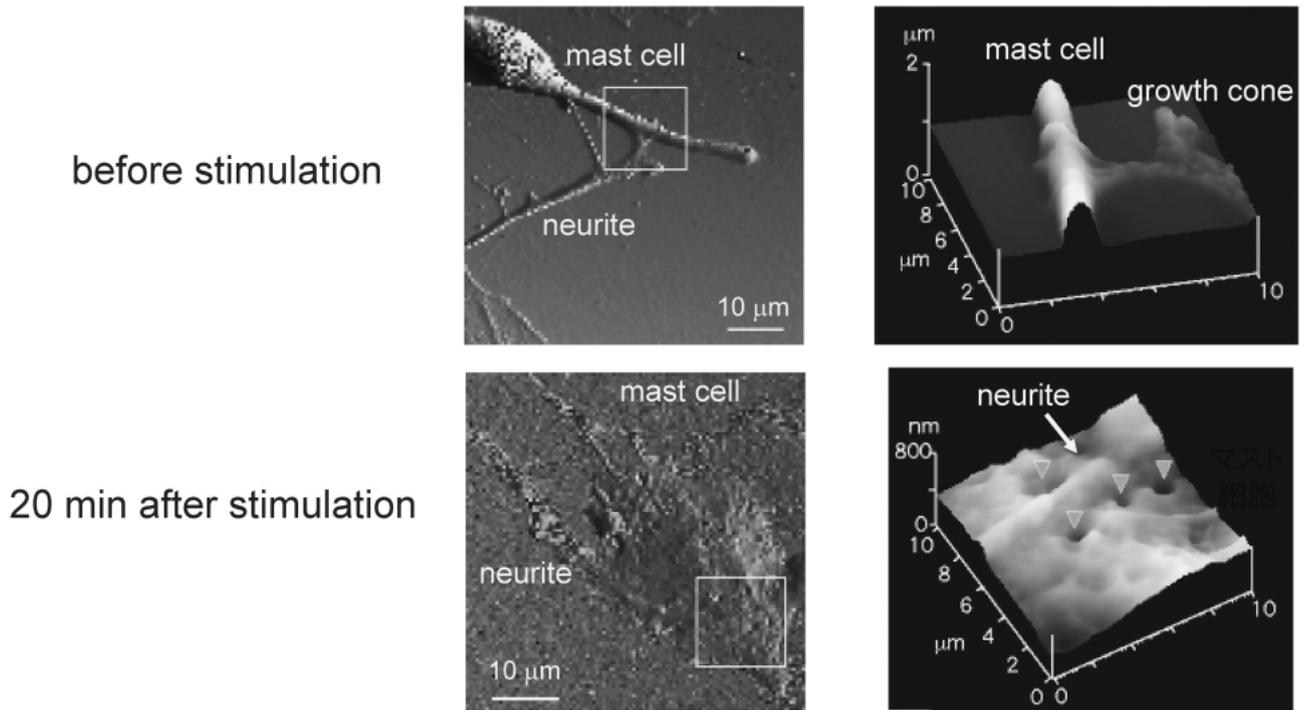
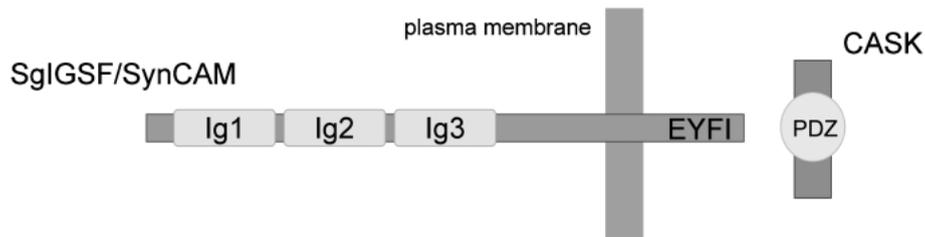


Fig. 7. AFM Images of Neurite-RBL Interaction
Upper: Before stimulation, Lower: After stimulation.



SynCAM (synaptic cell adhesion molecule)
Science, **297**, 1525. (2002)

Fig. 8. Molecular Model of SynCAM (Synaptic Cell Adhesion Molecule)

起のクロストークの分子機構として Fig. 9 のような模式図を考えることができます。マスト細胞と神経細胞は接着分子 *N*-cadherin と SynCAM が互いに homophilic な分子間相互作用で結合し、神経細胞が活性化されたときにはシナプス小胞からサブスタンス P が放出され、マスト細胞膜上の NK1 受容体を介してマスト細胞を活性化する。また逆に、マスト細胞が活性化されると ATP を放出し、神経細胞にシグナルを伝え、そのシグナルは神経末梢から神経中枢への情報伝達の一役を担っていると推察

されました。^{61,62)}

免疫細胞と神経細胞の *in vitro* 共存培養の研究から得られた今回の研究成果は、下記のような研究の進展にも大きく寄与するのではないかと考えられます。それは、一般には血液—脳関門 (blood—brain barrier) 説からは免疫系の細胞は脳内には侵入しないとされていましたが、マスト細胞やリンパ球は脳内でも存在することが既に明らかになっています。脳内ではミクログリアが生体防御を担っており、ミクログリアや脳内に侵入した免疫細胞 (マスト細胞

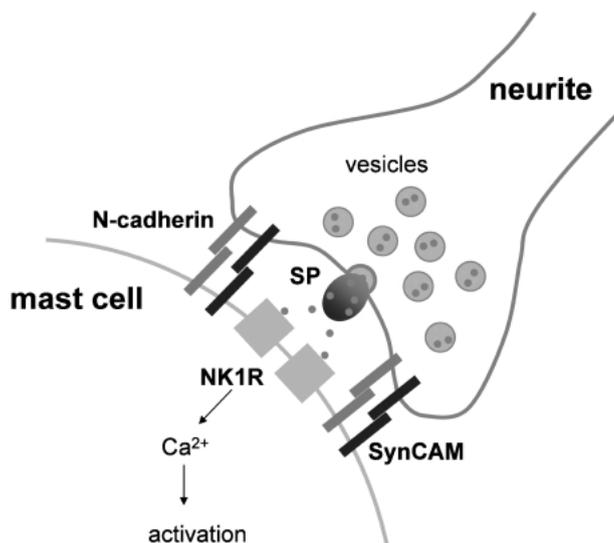


Fig. 9. Schematic Representation of the Interaction between Neurites and Mast Cells

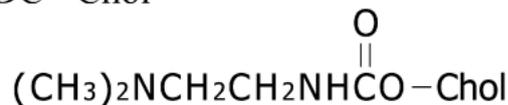
胞, リンパ球) と神経細胞の相互作用は, 各種の神経疾患 (アルツハイマー, 神経変性疾患) とも密接に係わっております. それゆえ, サイトカインや内分泌系物質 (ホルモン) を介した両者のクロストークの解析にここで紹介した方法は大変有効だと考えられます.⁶³⁾

7. 遺伝子導入

米国 NIH でアデノシンデアミナーゼ欠損症 (ADA 欠損症) の患者に対して試みられた遺伝子治療の研究は, 新しい医療の幕開けを告げるものであった. それ以来, 遺伝子治療は遺伝病の根元的治療法になるだけでなく, 癌やエイズの治療にも有効であると期待されており, 今後の重要な医療技術の1つになると考えられます. しかし, 遺伝子治療を受ける患者数の増加とともに, 病原性ウイルスをベクター (vector: 遺伝子の運び屋) として用いた場合の不慮事故の報告数が増加しております.

さて, われわれは正電荷コレステロール誘導体を素材とした非ウイルスベクターについて研究を行ってきました.⁶⁴⁾ この非ウイルスベクターは正電荷コレステロールを用いたものです (Fig. 10).^{65,66)} この誘導体は安全性が高い上に遺伝子導入効率も既存の非ウイルスベクターを上まわり, 今後, その利用が大いに期待できます.⁶⁷⁻⁷²⁾ また, 正電荷リポソームにバイオ・サーファクタント (微生物が産生する機能性脂質) を加えると, 遺伝子導入効率がさ

(I) DC - Chol



(IV)



(VII)



Fig. 10. Structures of Cationic Cholesterol Derivatives

らに大きく増大することを見出した (Fig. 11).^{73,74)}

さて, この遺伝子治療や遺伝子導入の非ウイルスベクターとしてのリポソームの特徴は, リポソーム内に薬物を封入してドラッグデリバリーに用いる際のリポソームとは若干その特質を異にしています. 遺伝子導入ベクターとしてのリポソームは, 膜脂質の成分として正電荷の脂質又はコレステロールを含み, リポソーム表面が正電荷を帯びているということです. これは, 正電荷リポソームが負電荷の DNA と複合体を形成し, 一般には負に帯電した細胞表面膜を介した遺伝子の細胞内への導入を容易にするものと考えられます. 実際には, 正電荷脂質 (又, 正電荷コレステロール) と中性リン脂質 DOPE とを混合して正電荷リポソームを作り, 細胞内に DNA を導入します.

Figure 12 は遺伝子の細胞内導入過程を模式的に示したものです.^{64,75-78)} その要点をまとめますと, 1) 負電荷 DNA を正電荷リポソームでカプセル化する, 2) エンドサイトーシスにより細胞内へ導入する, 3) エンドソーム膜とリポソーム膜の融合の際に遺伝子を放出する, 4) 微小管はリポソームの輸送に関与, MTOC (microtubule organization center) に運ぶ, 5) プロタミンは, DNA の核移行を促進させ, 遺伝子導入効率を上げる, 6) (チロシンキナーゼ型) 受容体の活性化により, 遺伝子導入効率は上昇することなどである.

画像解析法による具体的研究成果の一部を Figs.

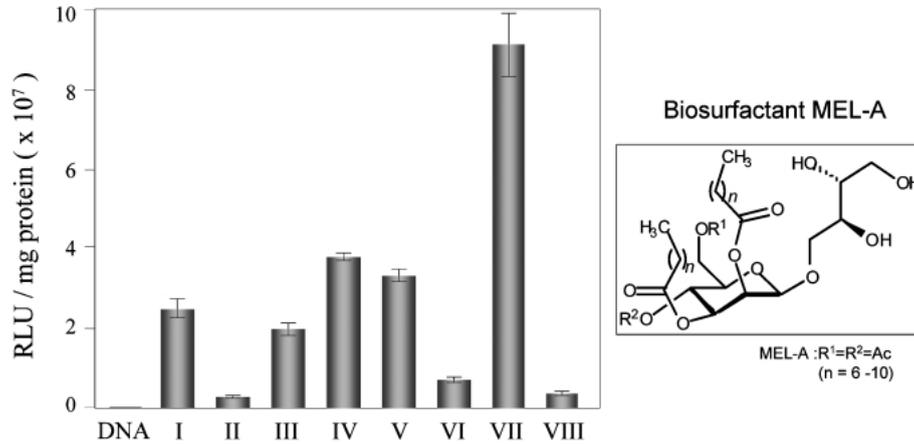


Fig. 11. Transfection Efficiency of Cationic Liposomes Prepared with Various Cholesterol Derivatives and the Structure of MEL-A

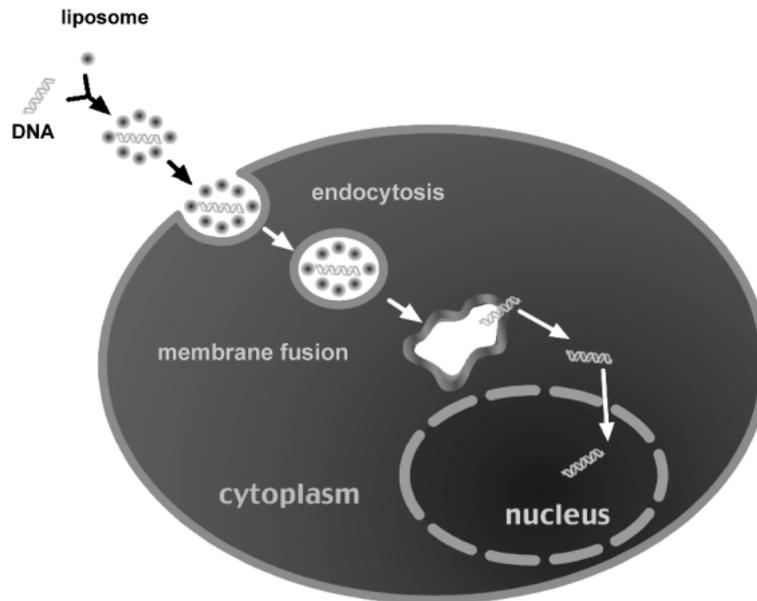


Fig. 12. Molecular Mechanism of Gene Transfection

13 と 14 に示します。リポソームでカプセル化された DNA はエンドサイトーシスで細胞内に導入され、エンドソームでの膜融合 (Fig. 13) の際に DNA はベクターから解離し核に移行する。細胞骨格蛋白質の働きも導入効率に影響を与えているということです (Fig. 14)。

8. 機能のゆらぎ (Functional Fluctuation)

免疫系と神経系のクロストークの研究を展開することができたのは、一つには共同研究を支援していただいた文部科学省 (文部省) の科学研究費・国際共同研究の制度であり、また、研究面においては、McMaster 大学の Bienenstock 教授の惜しみない協力のお陰である。

ところで、免疫・神経クロストークの実験を行っていた大学院生が博士論文の公開研究発表を学内で行ったとき、ある先生から、「クロストーク」という言葉は「電話の混線」や「電信の混信」の場合に使う単語だとのコメントをいただいた。大変貴重なコメントであった。私はその際、「免疫系」と「神経系」のようにこれまで独立していると考えられていたシステム間の相互作用は「本来からなるシグナル間の相互作用」であるのか「混線 (混信) したシグナル」であるのかは、見方によってはどちらも正しいのではないかと思った。そこでその後も、「免疫系と神経系のクロストーク」という言葉をそのまま使っている。それと同時に、私が大学院生時代に

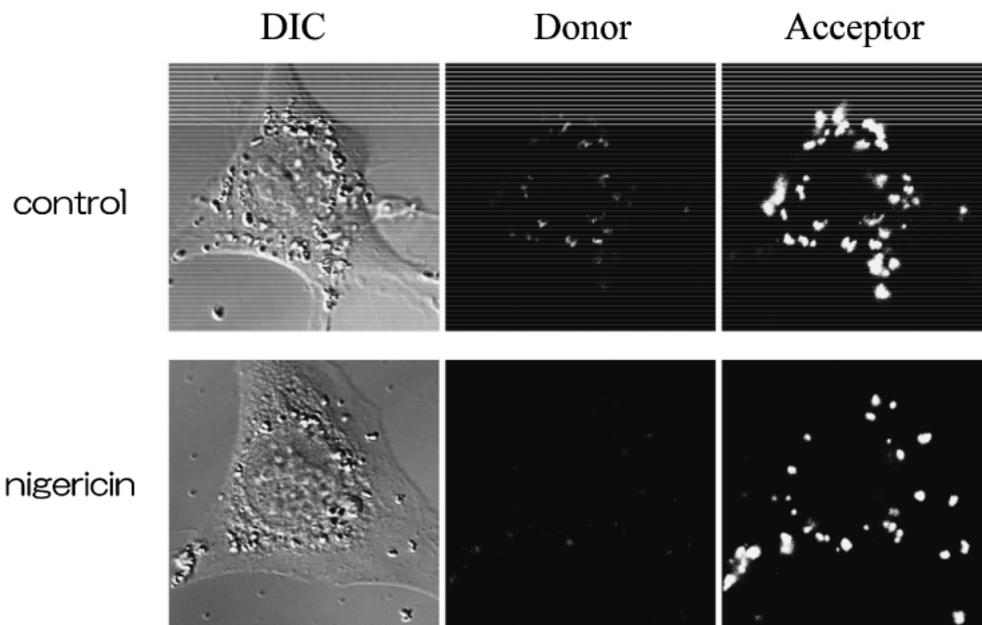
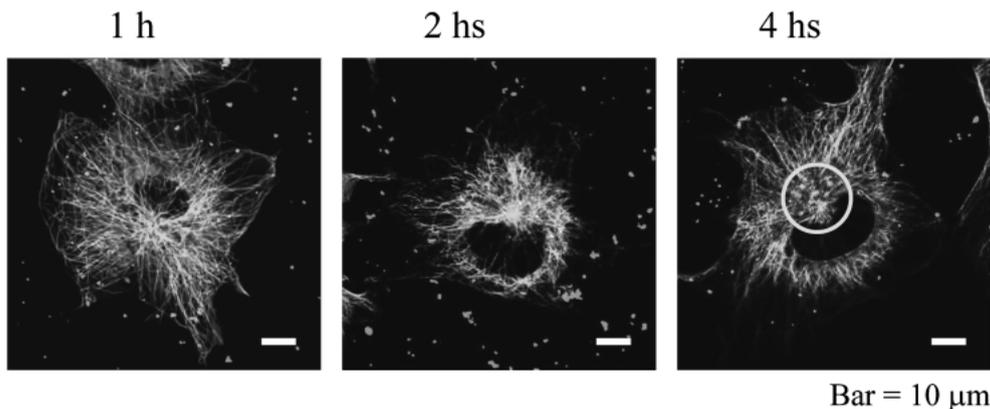


Fig. 13. Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Showing Membrane Fusion of Endosomes



Fibrous structures : microtubules
 Scattered small particles : liposomes

Fig. 14. Distribution of Microtubules and Cationic Liposomes in Target Cells

蛋白質の「構造のゆらぎ」の研究を行ったこととも関連させ、「免疫系と神経系のクロストーク」はいわば「機能のゆらぎ (Functional fluctuation)」の1つではないかと強く思った。

ところで、私は名古屋市立大学での研究生活の半ばから、正電荷コレステロールを使った細胞内遺伝子導入の研究を行った。研究の発端は、旧友である Leaf Huang 教授 (ピッツバーグ大学) のところへ訪問したことが大きく影響している。私がピッツバーグ大学を訪問したとき、Huang 教授は従来か

らのリポソームの研究ではなく、正電荷リポソームの研究に移っていた。その研究は大変興味があり、彼はリポソームを用いた遺伝子治療の先端的な研究を進めていた。共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞機能の可視化解析を進めていた私には、正電荷リポソームによる遺伝子導入の分子機構の解明にはわれわれの技術が活用できると考え、そのことを Huang 教授に話をした。非ウイルスベクターを用いた遺伝子導入の研究は、安全で導入効率の良い外来遺伝子の導入法を開発し、遺伝子治療に役立てようと

するものである。「病気」は「人」にとって「機能のゆらぎ」の最たるものと考えることができる。薬学に籍をおく者の1人として、そのような「機能のゆらぎ」の抑制に少しでも貢献できれば幸せである。

さて、私は名古屋市立大学での研究の最後において、Embryonic Stem cell (ES 細胞) の研究を手掛けた。現在、胚性幹細胞の研究は飛躍的に進展しており、胚性幹細胞は再生医療に利用できると期待されている。それと同時に、社会的にも色々な問題が生じている。再現性があり、倫理的にも問題ない基礎研究を行うことが重要である。胚性幹細胞を選択的に目的の組織や臓器に分化させることができるようになれば、これからの医療の進展に大きく寄与できると期待される。現時点では、胚性幹細胞を特定の組織へ選択的に分化させる技術は確立されていないが、胚性幹細胞の運命を決定付ける細胞内シグナル伝達機構の追究は、そのような目的に結びつくと考えられる。

そこで最後に、ES 細胞の分化とシグナル分子に関して、われわれが得ている研究結果の一部を紹介する。Figure 15 は ES 細胞における初期分化とシグナル分子の様子を示した模式図である。一般に、LIF 受容体を介したシグナルは STAT3 と ERK 経路を活性化するが、ES 細胞では、LIF 存在下で STAT3 は活性化されるが、ERK の活性化は起こらない。大学院生の宮津沙公子さんは、ES 細胞における LIF 除去後の各種シグナル分子の動態を解析した。詳細は省くが、SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling) の発現減少が、SOCS3 による SHP-2 に対する抑制効果を低下させ、その結果、ERK (MAPK 経路) の活性化を引き起こすことが明らか

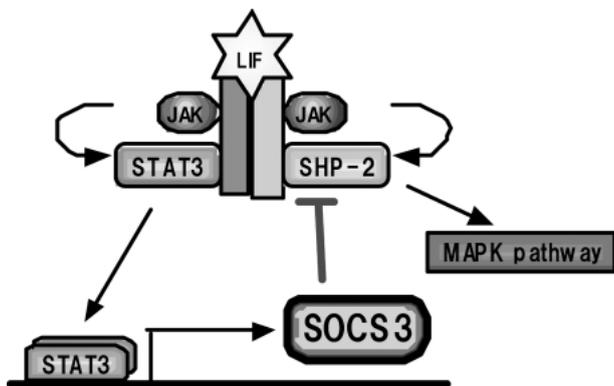


Fig. 15. Signaling Molecules in Embryonic Stem Cells

になってきた。⁷⁹⁾ 生物学における「分化」といってしまえば一言で済むことなのかもしれないが、ES 細胞の分化はまさに「機能のゆらぎ」と強く結びつくものである。

最後に、最終講義を迎えるに当たって、恩師である坪井正道先生 (東京大学名誉教授・東京大学薬学部薬品物理化学教室元教授) から、故久保亮五教授 (東京大学理学部物理学科教授・統計力学) の言葉、“ゆらぎ (fluctuation)” には厳密な統計力学上の定義はない; 「普通のことば」だと思って使う度に新しく定義しなさい……” を教えていただきました。

また、恩師である池上 明先生 (慶應義塾大学元教授、日本生物物理学会元会長) から、“2月10日 (最終講義日) の「機能のゆらぎ」大変興味をもちています。現在、ゆらぎによる生命の起源論を書いています” と新年に年賀状をいただきました。

上記の2つのことをご紹介いたし、本総説のまとめとさせていただきます。

謝辞 本総説は、東京大学大学院薬学系研究科と名古屋市立大学大学院薬学研究科における三十数年に渡る教育・研究成果を背景に、名古屋市立大学大学院薬学研究科で行った最終講義の内容を土台にして記述したものであります。この間、実に多くの諸先輩や友人の暖かい励ましと指導で今日に至りました。なかでも、恩師である坪井正道先生、池上明先生から受けた学生時代からのご指導の重みを改めて深く感じました。また、東京大学名誉教授廣部雅昭先生 (静岡県立大学元学長)、名古屋市立大学名誉教授渡邊 淳先生 (愛知学院大学薬学部長)、東京大学名誉教授今井一洋先生 (武蔵野大学教授) には長年に渡って格別のご指導とご配慮をいただき心から御礼申し上げます。

さらに、海外の研究者である、Harden McConnell 教授 (Stanford)、Bienenstock 教授 (McMaster)、McKay 教授 (McMaster)、Leaf Huang 教授 (Pittsburgh)、Janet Oliver 教授 (New Mexico)、Adrian Brian 博士 (Stanford)、S. Cheng 博士 (NIH)、また、友人である猪飼 篤先生、木下一彦先生、石渡信一先生、新井賢一先生、赤池敏弘先生、川戸 佳先生、桐野 豊先生、佐藤能雅先生、嶋田一夫先生、長野哲雄先生、杉山雄一先生、関水和久先生、大和田智彦先生、山田武範先生、手島玲子先生、稲

垣冬彦先生, 加茂直樹先生, 奥 直人先生, 美宅成樹先生, 神山 勉先生, 曾我部正博先生, 遠藤斗志也先生, 木村和子先生, 赤坂一之先生, 楠見明弘先生, 半田哲郎先生, 佐治英郎先生, 井上國世先生, 阿久津秀雄先生, 柳田敏雄先生, 加藤晃一先生, 平嶋尚英先生, 古野忠秀先生らには十数年以上に渡って常に変わらぬご支援とご教示をいただきましたことを厚く御礼申し上げます。最後に私事になり恐縮ですが, 専門の異なった研究に対し深い理解と尊敬を払い, 強く私を支えてくれた妻(恵子)に心から感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Watson J. D., Crick F. H. C., *Nature*, **171**, 737-738 (1953).
- 2) Tsuboi M., Nakanishi M., *Kagaku No Ryoiki*, **28**, 10-20 (1974).
- 3) Nakanishi M., Tsuboi M., Ikegami A., Kanehisa M., *J. Mol. Biol.*, **64**, 363-378 (1972).
- 4) Nakanishi M., Tsuboi M., Ikegami A., *J. Mol. Biol.*, **70**, 351-361 (1972).
- 5) Nakanishi M., Tsuboi M., Ikegami A., *J. Mol. Biol.*, **75**, 673-682 (1973).
- 6) Nakanishi M., Tsuboi M., *J. Mol. Biol.*, **83**, 379-391 (1974).
- 7) Kendrew J. C., Dickerson R. E., Strandberg B. E., Hart R. E., Davies D. R., Phillips D. C., Shore V. C., *Nature*, **185**, 422-427 (1960).
- 8) Perutz M. F., Rosmann M. G., Cullis A. F., Muirhead H., Will G., North A. C. T., *Nature*, **185**, 416-422 (1960).
- 9) Phillips D. C., *Sci. Am.*, **215**, 78-90 (1966).
- 10) Suddth F. L., Quigley G. J., McPherson A., Sneden D., Kim J. J., Kim S. H., Rich A., *Nature*, **248**, 20-24 (1974).
- 11) Linderstrøm-Lang K., *Chem. Soc. Spec. Publ.*, **2**, 1-20 (1955).
- 12) Hdidt A., Linderstrøm-Lang K., *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 574-575 (1954).
- 13) Pauling L., Corey R. B., Branson H. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **37**, 205-211 (1951).
- 14) Blout E. R., de Loze C., Asadourian A., *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**, 1895-1900 (1961).
- 15) Ikegami A., Kono N., *J. Mol. Biol.*, **29**, 251-274 (1967).
- 16) Takesada H., Nakanishi M., Tsuboi M., *J. Mol. Biol.*, **77**, 605-614 (1973).
- 17) Ohta S., Nakanishi M., Tsuboi M., Arai K., Kajiro Y., *Eur. J. Biochem.*, **78**, 599-608 (1977).
- 18) Ohta S., Nakanishi M., Tsuboi M., Yoshida M., Kagawa Y., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 929-935 (1978).
- 19) Takahashi T., Nakanishi M., Tsuboi M., *Anal. Biochem.*, **670**, 298-299 (1981).
- 20) Printz M. P., von Hippel P. H., *J. Mol. Biol.*, **63**, 171-177 (1972).
- 21) Englander S. W., Downer N., Teitelbaum H., *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 903-924 (1972).
- 22) Nakanishi M., Tsuboi M., Saijo Y., Nagamura T., *FEBS Lett.*, **81**, 61-64 (1977).
- 23) Nakanishi M., Nakamura H., Hirakawa A. Y., Tsuboi M., Nagamura T., Saijo Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 272-276 (1978).
- 24) Nakanishi M., Tsuboi M., *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 1273-1275 (1978).
- 25) Nakanishi M., Tsuboi M., *J. Mol. Biol.*, **124**, 61-71 (1978).
- 26) Nakanishi M., Kobayashi M., Tsuboi M., Takasaki C., Tamiya N., *Biochemistry*, **19**, 3204-3208 (1980).
- 27) Kohwi-Shigematsu T., Enomoto T., Yamada M., Nakanishi M., Tsuboi M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 4689-4693 (1978).
- 28) Mitane Y., Nakanishi M., Tsuboi M., Kohwi-Shigematsu T., Enomoto T., Yamada M., *FEBS Lett.*, **121**, 130-132 (1980).
- 29) Hayashi Y., Nakanishi M., Tsuboi M., Fukui T., Ikehara M., Tazawa I., Inoue Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **698**, 93-99 (1982).
- 30) Ohga Y., Nakanishi M., Tsuboi M., *Biochim. Biophys. Acta*, **656**, 120-122 (1981).
- 31) Nakanishi M., Brian M., McConnell H., *Mol. Immunol.*, **20**, 1227-1231 (1983).
- 32) Osada H., Nakanishi M., Tsuboi M., Kinisita Jr. K., Ikegami A., *Biochim. Biophys. Acta*, **773**, 321-324 (1984).
- 33) Okada A., Nakanishi M., Tsurui H., Wada A., Terashima M., Osawa T. *Mol. Immunol.*, **22**, 715-718 (1985).
- 34) Endo T., Nakanishi M., Furukawa S., Joubert F. J., Tamiya N., Hayashi K., *Biochemistry*, **25**, 395-404 (1986).
- 35) Kimura K., Nakanishi M., *FEBS Lett.*, **187**, 245-248 (1985).
- 36) Nakanishi M., Matsumoto K., Takahashi S.,

- FEBS Lett.*, **192**, 66–70 (1985).
- 37) Utsunomiya N., Tsuboi M., Nakanishi M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 1877–1880 (1986).
- 38) Kimura K., Nakanishi M., Ueda M., Ueno J., Nariuchi H., Furukawa S., Yasuda T., *Immunology*, **59**, 235–238 (1986).
- 39) Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R. Y., *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440–3450 (1985).
- 40) Kato K., Nakanishi M., Arata Y., Teshima R., Terao T., Miyamoto H., *J. Biochem.*, **102**, 1–4 (1987).
- 41) Asahi Shinbun, 26 March, 1991.
- 42) Yamada H., Mizuguchi J., Nakanishi M., *FEBS Lett.*, **284**, 249–251 (1991).
- 43) Nakato K., Furuno T., Inagoki K., Teshima R., Terao T., Nakanishi M., *Eur. J. Biochem.*, **209**, 745–749 (1992).
- 44) Furuno T., Hamano T., Nakanishi M., *Biophys. J.*, **64**, 665–669 (1993).
- 45) Furuno T., Hamano T., Nakanishi M., *Bioimages*, **1**, 9–12 (1993).
- 46) Okamoto Y., Furuno T., Hamano T., Nakanishi M., *Biochem. J.*, **305**, 1011–1015 (1995).
- 47) Tenjinbaru K., Furuno T., Hirashima N., Nakanishi M., *FEBS Lett.*, **444**, 1–4 (1999).
- 48) Furuno T., Hirashima N., Onizawa S., Sagiya N., Nakanishi M., *J. Immunol.*, **166**, 4416–4421 (2001).
- 49) McKay D. M., Bienenstock J., *Immunology Today*, **15**, 533–538 (1994).
- 50) Blennerhassett M. G., Bienenstock J., *Neurosci. Lett.*, **120**, 50–54 (1991).
- 51) Blennerhassett M. G., Tomioka M., Bienenstock J., *Cell Tissue Res.*, **265**, 121–128 (1991).
- 52) Suzuki R., Furuno T., McKay D. M., Wolvers D., Teshima R., Nakanishi M., Bienenstock J., *J. Immunol.*, **163**, 2410–2415 (1999).
- 53) Suzuki R., Furuno T., Teshima R., Nakanishi M., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 291–294 (2001).
- 54) Suzuki A., Suzuki R., Furuno T., Teshima R., Nakanishi M., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1963–1965 (2005).
- 55) Ohshiro H., Suzuki R., Furuno T., Nakanishi M., *Immunol. Lett.*, **74**, 211–214 (2000).
- 56) Amano T., Furuno T., Hirashima N., Ohyama N., Nakanishi M., *J. Biochem.*, **166**, 129, 739–744 (2001).
- 57) Mori N., Suzuki R., Furuno T., McKay D. M., Wada M., Teshima R., Bienenstock J., Nakanishi M., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **283**, C1738–1744 (2002).
- 58) Suzuki A., Suzuki R., Furuno T., Teshima R., Nakanishi M., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1891–1894 (2001).
- 59) Furuno T., Ito A., Koma Y., Watabe K., Yokozaki H., Bienenstock J., Nakanishi M., Kitamura Y., *J. Immunol.*, **174**, 6934–6942 (2005).
- 60) Biederer T., Sara Y., Mozhayeva M., Atasoy D., Liu X., Kavalali E. T., Sudhof T. C., *Science*, **297**, 1525–1531 (2002).
- 61) Furuno T., Nakanishi M., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1551–1559 (2005).
- 62) Furuno T., Ma D., Kleij P. M., Nakanishi M., Bienenstock J., *Neurosci. Lett.*, **372**, 185–189 (2004).
- 63) Dace A., Zhao L., Park K. S., Furuno T., Takamura N., Nakanishi M., West B. L., Hanover J. A., Cheng S. Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 8985–8990 (2000).
- 64) Nakanishi M., *Curr. Med. Chem.*, **10**, 1289–1296 (2003).
- 65) Takeuchi K., Ishihara M., Kawaura C., Noji M., Furuno T., *FEBS Lett.*, **397**, 207–209 (1996).
- 66) Okayama R., Noji M., Nakanishi M., *FEBS Lett.*, **408**, 232–234 (1997).
- 67) Kawaura C., Noguchi A., Furuno T., Nakanishi M., *FEBS Lett.*, **421**, 69–72 (1998).
- 68) Noguchi A., Furuno T., Kawaura C., Nakanishi M., *FEBS Lett.*, **433**, 169–173 (1998).
- 69) Fujiwara T., Hasegawa S., Hirashima N., Nakanishi M., Ohwada T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1468**, 396–402 (2000).
- 70) Fujiwara T., Hirashima N., Hasegawa S., Nakanishi M., Ohwada T., *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 1013–1024 (2001).
- 71) Nakanishi M., Noguchi A., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **52**, 197–207 (2001).
- 72) Hasegawa S., Hirashima N., Nakanishi M., *Gene Ther.*, **8**, 1669–1673 (2001).
- 73) Inoh Y., Kitamoto D., Hirashima N., Nakanishi M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**, 57–61 (2001).

-
- 74) Hasegawa S., Hirashima N., Nakanishi M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 1299–1302 (2002).
- 75) Noguchi A., Hirashima N., Furuno T., Nakanishi M., *Neurosci. Lett.*, **325**, 29–32 (2002).
- 76) Noguchi A., Hirashima N., Nakanishi M., *Pharm. Res.*, **19**, 933–938 (2002).
- 77) Noguchi S., Hirashima N., Nakanishi M., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1306–1310 (2003).
- 78) Noguchi S., Hirashima N., Furuno T., Nakanishi M., *J Control Release*, **7**, 88, 313–320 (2003).
- 79) Miyazu S., Furuno T., Nakanishi M. (to be published) (2006).