

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(B)	
研究期間：2007～2009	
課題番号：19350078	
研究課題名（和文）	シャペロンの糖鎖認識を原理とした新規細胞ストレスセンシング法の開発
研究課題名（英文）	New approach for the detection of cellular stresses based on chaperone-carbohydrate interactions
研究代表者	
新倉 謙一 (NIIKURA KENICHI)	
北海道大学・電子科学研究所・准教授	
研究者番号：40360896	

研究成果の概要（和文）：

申請者は糖鎖提示量子ドットをプローブとして細胞がストレスに暴露した際の応答を、感度よく検出することを目的に研究を進めた。3年間の研究で主に以下の2点を明らかにすることができた。

1. GlcNAc を提示した量子ドットは小胞体に蓄積する傾向があり、重金属などで細胞にストレスを付加することでその蓄積量が増えることがわかった。これは細胞ストレスを蛍光量で定量できることを示すものである。
2. α -Glucose を提示した量子ドットは、細胞の核内に蓄積することがわかった。ナノ粒子の核移行は医学的にニーズが高いため、多様な応用につながる発見である。

研究成果の概要（英文）：

For quantitative detection of stress responses to cells, we have developed sugar-displaying CdTe as a stress sensing probe in cells. During three years (H19-H21), we obtained following two results;

1. GlcNAc-QDs were accumulated in cells when stimulating the cells by adding heavy metals as chemical stresses.
2. The coating of QDs with α -Glucose can efficiently promote the nuclear import of QDs. This fact leads to various medical applications, such as drug delivery systems (DDSs) and bioimaging.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：糖鎖、量子ドット、核移行、細胞ストレス、シャペロン

1. 研究開始当初の背景

細胞ストレスは、神経変性疾患・アルツハイマー病・癌・糖尿病など様々な疾病に深く関与していることが近年明らかになってきた(例えば Zhang et al., *Cell*, 124, 587, 2006)。特に小胞体ストレスはこれら疾病の初期シグナルであるため、小胞体ストレスを早期にセンシングできれば癌などの早期発見につながる重要な技術になりうる。ストレスセンシングはまだ未開発な研究分野であり、細胞を破壊しない・その場観察・高速での検出・簡便で高汎用性などが今後強く求められる。申請者は、小胞体ストレス状況下で早期に発現される分子シャペロンに注目した。分子シャペロンは小胞体を中心に複数種細胞内に存在するが、興味深いことに2つのシャペロンが糖鎖を認識することが報告された。これらの報告を足がかりとして、新しい細胞のストレスの検出法(定量化方法)を作れないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、シャペロンの糖鎖認識を利用して簡便に細胞ストレスを検出する手法を確立することである。熱ショックタンパク70(シャペロン分子に属する)は *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を認識する(Lefebvre et al., *Biochem. J.*, 360, 179-188, 2001)。またタンパク質の品質管理を担うシャペロンであるカルネキシンは α 結合のグルコースを認識する。本研究はこのシャペロンによるこれら糖鎖認識を利用し、糖鎖プローブ分子(特に糖鎖提示量子ドット)によってシャペロンの細胞内増加を感知し、細胞ストレスの早期検出が可能な基盤技術を作り出す。

3. 研究の方法

合成した糖鎖プローブを用いて、細胞ストレスセンシングの可能性について調べていく。さらに細胞ストレス(熱・重金属への暴露)に応答した細胞内蛍光強度のビデオレート観察を行う。特に着目している点は、すでに見いだしている β -GlcNAc(熱ショックタンパク70との結合が示唆されている)及び α -Glucose(カルネキシンシャペロンとの結合)の2つの糖鎖プローブによる2重染色によるストレスセンシングである。糖鎖を提示した量子ドットはそれだけでは細胞膜を通過できないので、まずはジギトニンといわれる界面活性剤で一度細胞を処理することで透過性を上げた。この手法は、ジギトニンアッセイといわれ分子生物学の分野で汎用される手法である。これら2種糖鎖によって検知される2つのシャペロンが、ストレス下でそれぞれどのような応答をするのかを調べた。従来の小胞体ストレス検出として小胞体シャペロン Bip の発現量を RT-PCR で追跡する手法があ

る。この手法と申請者の手法を比較検討し、糖鎖蛍光プローブの有効性・優位性(特にどの程度のストレスを検出できるかという感度の比較)を調べた。

4. 研究成果

ストレスセンシングのツールとして量子ドットを選択した。これは、そのサイズがタンパク質とほぼ同程度の大きさで、糖鎖を複数提示できることからシャペロンなどによる認識が高いと予想した。メルカプトプロピオン酸(MPA)修飾量子ドット(CdTe)に対して、大過剰の合成したチオール修飾糖脂質を添加し、表面分子の交換反応により糖を提示した。糖鎖を提示した量子ドットはスピンカラムにより、過剰な脂質を取り除くことで精製した。細胞ストレスとして、重金属(コバルト、カドミウム、ヒ素など)への暴露を行った。重金属に暴露させたときの糖鎖(*N*-アセチルグルコサミン, GlcNAc)量子ドットの結合量を蛍光プレートリーダーによって定量化した。結果を図1に示した。カドミウムやヒ素といった毒性の高い金属に暴露させたときには量子ドットの結合量が、非暴露の時に比べて1.5倍程度になった。HSP70の発現量はRT-PCRによって定量化し、重金属によって確実に発現量が増えていることを確認した。これはHSP70との結合を示唆するものである。量子ドットが結合しているタンパク質が、真にHSP70であることを証明するために、細胞に添加した量子ドットを回収し、結合タンパク質を電気泳動法で解析したところ、複数のタンパク質が検出されたが、HSP70の結合も確認できた。詳細なメカニズムはまだ解明しきれていないが、GlcNAc量子ドットの蓄積量から細胞ストレスを定量できる可能性を得た。

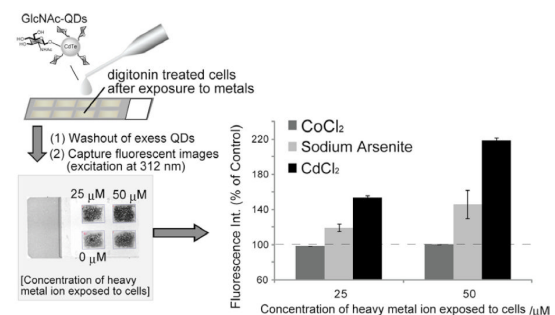


図1. GlcNAc提示量子ドットの重金属暴露した細胞内への蓄積。蓄積量は蛍光強度から積算した。

もう一つの糖鎖として α -Glucose を提示した量子ドットをいくつか作製し、細胞に添加した。予想外の結果であったが、 α -Glucose を提示した量子ドットは細胞核に集積すること

がわかった。ヘキサエチレングリコール (PEG)や β 結合のグルコースを提示した量子ドットは核移行しなかったが、 α 結合のグルコースを提示した量子ドットは核移行した (図.2 と図.3)。PEG 修飾した量子ドットは最もサイズが小さいが、核移行せず細胞質に留まった。これは糖鎖で修飾した量子ドットの核移行が、サイズに依存するような受動拡散によるものではないことを示している。核移行の効率は α -グルコース < マルトース << マルトトリオース (3糖) の順になった。マルトトリオースを提示した場合には特に強い蛍光が核内から検出された。マルトトリオースと類似した構造の3糖であるパノースでは、やや効率は落ちるが核移行は観察されたが、 β 結合のみからなる3糖のセロトリオースではほとんど核移行は観察されなかった。シャペロンの関与を調べるため、ATPの依存性や、マイクロインジェクションによる詳細解析を行ったが、タンパク質の関与というより、受動拡散による核移行が支持された。この研究は当初の目的とは異なるが、ナノ粒子の核移行を糖鎖によって促進できることを示した初めての例であり、2報の学術論文として報告した。また現在も共同研究によってそのメカニズムの検討を行っている。

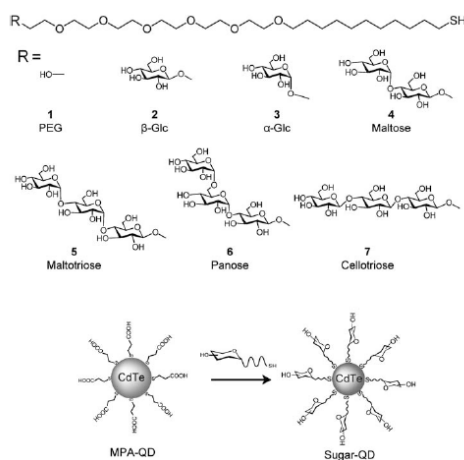


図 2. 化学合成した α Glucose 誘導体と、量子ドットへの提示スキーム

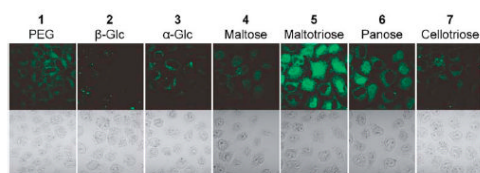


図 3. α Glucose 誘導体を提示した量子ドットの核移行の様子。特にマルトトリオース5が核によく移行されているのがわかる。

まとめ: 糖鎖を提示することで細胞内で凝集しやすい量子ドットを、分散させ、細胞との

相互作用を検出できることがわかった。当初の目的であるストレスセンシングは GlcNAc を提示することで達成できた。また α Glucose を提示することで核移行が促進されることを偶然見いだした。小胞体ストレスと疾病との関連は現在でも数多く報告されており、ストレスを数値化できるセンシングの重要性は増している。本研究の成果を今後、生物学的な議論深く組み合わせることで、より詳細な細胞ストレスの解明につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① K. Niikura, K. Nambara, T. Okajima, Y. Matsuo, K. Ijro, "Influence of Hydrophobic Structures on the Plasma Membrane Permeability of Lipid-like Molecules", *Langmuir*, in press, 2010, 査読有
- ② N. Ohtake, K. Niikura, T. Suzuki, K. Nagakawa, S. Mikuni, Y. Matsuo, M. Kinjo, H. Sawa and K. Ijro, "Low pH-Triggered Model Drug Molecule Release from Virus-Like Particles", *ChemBioChem*, 11, 959-962, 2010, 査読有
- ③ K. Niikura, K. Ijro, S. Sekiguchi, "Multivalent display of oligosaccharides on nanoparticles accelerates their nuclear import", *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 21, 335-344, 2009, 査読有
- ④ K. Niikura, K. Nagakawa, N. Ohtake, T. Suzuki, Y. Matsuo, H. Sawa, K. Ijro, "Gold nanoparticle arrangement on viral particles through carbohydrate recognition: A non-crosslinking approach to optical virus detection", *Bioconjugate Chem.*, 20, 1848-1852, 2009, 査読有
- ⑤ T. Masuda, H. Akita, K. Niikura, T. Nishio, M. Ukawa, K. Enoto, R. Danev, K. Nagayama, K. Ijro, H. Harashima, "Envelope-type lipid nanoparticles incorporating a short PEG-lipid conjugate for improved control of intracellular trafficking and transgene transcription", *Biomaterials*, 30, 4806-4814, 2009, 査読有
- ⑥ T. Nishio, K. Niikura, Y. Matsuo, K. Ijro, "Enhanced Accumulation of Carbohydrate-Displaying CdTe Quantum Dots in Cells Responding to Cellular Chemical Stresses", *Int. J. Nanosci.*, 8, 219-222, 2009, 査読有
- ⑦ R. Kamitani, K. Niikura, T. Okajima, Y. Matsuo and K. Ijro, "Design of

- cell-surface-retained polymers for artificial ligand display”, *ChemBioChem*, **10**, 230-233, 2009, 査読有
- ⑧ K. Niikura, S. Sekiguchi, T. Nishio, T. Masuda, H. Akita, Y. Matsuo, K. Kogure, H. Harashima, K. Ijiro, “Oligosaccharide-mediated Nuclear Transport of Nanoparticles”, *ChemBioChem*, **9**, 2623-2627, 2008, 査読有
- ⑨ A. Tanaka, Y. Matsuo, K. Niikura, and K. Ijiro, “Stabilization of Multiassembly by Addition of a Phosphate Group at the 5'-Sticky End”, *Chem. Lett.*, **37**(7), 758-759, 2008, 査読有
- ⑩ O. Haruta, Y. Matsuo, Y. Hashimoto, K. Niikura, K. Ijiro, “Sequence-Specific Control of Azobenzene Assemblies by Molecular Recognition of DNA”, *Langmuir*, **24**(6), 2618-2624, 2008, 査読有
- ⑪ N. Ohtake, K. Niikura, T. Suzuki, K. Nagakawa, H. Sawa, and K. Ijiro, “Enhanced Cellular Uptake of Virus-Like Particles through Immobilization on a Sialic Acid-Displaying Solid Surface”, *Bioconjugate Chem.*, **19**, 507-515, 2008, 査読有
- ⑫ T. Masuda, H. Akita, T. Nishio, K. Niikura, K. Kogure, K. Ijiro, H. Harashima, “Development of lipid particles targeted via sugar-lipid conjugates as novel nuclear gene delivery system”, *Biomaterials*, **29**, 709-723, 2008, 査読有
- ⑬ R. Kamitani, K. Niikura, T. Onodera, N. Iwasaki, H. Shimaoka, K. Ijiro, “Patterned Immobilization of Unprotected Carbohydrates on an Aminooxy Polymer-Grafted Solid Surface”, *Bull. Chem. Soc. Jp.*, **80**(9), 1808-1813, 2007, 査読有
- [学会発表] (計 17 件)
- ① 新倉謙一, 「ウイルスの金属被覆とウイルスセンシングへの応用」、田中貴金属工業記念講演、2010 年 4 月 27 日、田中貴金属工業(東京) (招待講演)
- ② 大竹範子、新倉謙一、鈴木忠樹、三國新太郎、松尾保孝、永川桂太、金城政孝、澤洋文、居城邦治、「pH に応答した分子放出のためのウイルスナノカプセルの機能化」、日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月 26-29 日、近畿大学本部キャンパス
- ③ Noriko Ohtake, Kenichi Niikura, Tadaki Suzuki, Shintaro Mikuni, Yasutaka Matsuo, Keita Nagakawa, Masataka Kinjo, Hirofumi Sawa and Kuniharu Ijiro, “Preparation of functionalized virus-like particles enabling pH-mediated release of target molecules”, International Symposium of Joint Research Network on Advanced Materials and Devices “彫” [Chou], 2010 年 3 月 25-26 日, Hotel-Nidom, Hokkaido, Japan
- ④ K. Nagakawa, K. Niikura, N. Ohtake, T. Suzuki, Y. Matsuo, H. Sawa, and K. Ijiro, “Gold nanoparticle array based on the surface structure of virus”, International Symposium on Engineering Neo-Biomimetics – Toward Paradigm Shift for Innovation –, 2009 年 10 月 1-2 日, AIST Tokyo Waterfront
- ⑤ 新倉謙一, 「分子内包ウイルスカプセルの作製とナノバイオロジーへの応用」、岐阜大学生命工学科公開セミナー、2009 年 9 月 28 日、岐阜大学(招待講演)
- ⑥ 関口翔太、新倉謙一、松尾保孝、吉村成弘、居城邦治、「オリゴ糖の高密度提示によって促進されるナノ微粒子の核内輸送」、第 58 回高分子討論会、2009 年 9 月 16-18 日、熊本大学工学部
- ⑦ 新倉謙一、南原克行、神谷亮介、岡嶋孝治、居城邦治、「細胞膜特異的な高分子を用いた細胞表層修飾法の開発」、第 19 回バイオ・高分子シンポジウム、2009 年 7 月 29-30 日、東京大学先端科学技術研究センター
- ⑧ 新倉謙一, 「ウイルスの糖鎖認識を利用したナノバイオテクノロジー」、生体分子機能工学専攻特別講義講演会、2009 年 7 月 16 日、東京工業大学(招待講演)
- ⑨ K. Niikura, “Sugar-Displaying Quantum Dots as a Bioimaging Tool”, Recent Advances in Fluorescence Spectroscopic Methods for Biological and Chemical Systems, 2009 年 2 月 27 日, 北海道大学(招待講演)
- ⑩ T. Nishio, K. Niikura, Y. Matsuo, H. Akita, H. Harashima and K. Ijiro, “Water soluble carbohydrate-displaying quantum dots for glycoprotein mimics in cells.”, AsiaNANO2008 (Asian Conference on Nanoscience and Nanotechnology), 2008 年 11 月 3-7 日, Biopolis, Singapore
- ⑪ 新倉謙一, 「糖鎖提示によるナノ微粒子・タンパクの核内移行促進」、大阪大学蛋白質研究所セミナー「細胞機能制御システムとしての核膜研究～基礎から臨床応用を目指して～」、2008 年 7 月 24-25 日、大阪大学(招待講演)
- ⑫ 西尾崇、新倉謙一、秋田英万、松尾保孝、原島秀吉、居城邦治、「糖鎖量子ドットプローブを用いた細胞ストレス可視化法の開発」、第 57 回高分子学会年次大会、2008 年 5 月 28-30 日、パシフィコ横浜
- ⑬ 関口翔太、西尾崇、新倉謙一、松尾保孝、居城邦治、「糖鎖修飾量子ドットを用いた

細胞内核内移行の解析」、日本化学会第88 春季年会、2008 年 3 月 26-30 日、立教大学

- ⑭ 西尾崇、新倉謙一、秋田英万、松尾保孝、原島秀吉、居城邦治、「糖鎖提示量子ドットによる細胞ストレスのイメージング技術の開発」、第 22 回生体機能関連化学シンポジウム、2007 年 9 月 28-29 日、東北大学多元物質科学研究所
- ⑮ 西尾崇、新倉謙一、松尾保孝、秋田英万、小暮健太郎、原島秀吉、居城邦治、「単一細胞のストレスをイメージングできる糖鎖プローブ分子の開発」、第 56 回高分子討論会、2007 年 9 月 19-21 日、名古屋工業大学
- ⑯ 新倉謙一、西尾崇、松尾保孝、秋田英万、小暮健太郎、原島秀吉、居城邦治、「細胞のストレスイメージングを可能とする糖鎖プローブの開発」、第 27 回日本糖質学会年会、2007 年 8 月 1-3 日、九州大学
- ⑰ 新倉謙一、西尾崇、秋田英万、原島秀吉、松尾保孝、居城邦治、「糖鎖半導体ナノ微粒子による細胞ストレス可視化技術の開発」、第 17 回バイオ・高分子シンポジウム、2007 年 7 月 30-31 日、上智大学

[図書] (計 3 件)

- ① 新倉謙一、シーエムシー出版、複合糖質の化学と最新応用技術、2009 年、228-234
- ② 松尾保孝、新倉謙一、居城邦治、シーエムシー出版、金属ナノ・マイクロ粒子の形状・構造制御技術、2009 年、188-198
- ③ 新倉謙一、居城邦治、シーエムシー出版、量子ドットの生命科学領域への応用、2007 年、195-203

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：表面分子の識別方法、および識別装置

発明者：岡嶋孝治、新倉謙一

権利者：国立大学法人北海道大学

種類：特許権

番号：特願 2007-226805

出願年月日：2007 年 8 月 31 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新倉 謙一 (NIIKURA KENICHI)

北海道大学・電子科学研究所・准教授

研究者番号：40360896

(2) 研究分担者

居城 邦治 (IJIRO KUNIHARU)

北海道大学・電子科学研究所・教授

研究者番号：90221762

(3) 連携研究者

小暮 健太郎 (KOGURE KENTARO)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70262540