

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510120

研究課題名（和文）ナノスケール高分子会合体-細胞膜界面における相互作用とシグナル変換

研究課題名（英文）Induced Signal Transduction by Interaction between Nano-sized polymer Aggregates and Plasma Membrane of Cells

研究代表者

西川 雄大（NISHIKAWA TAKEHIRO）

大阪大学大学院情報科学研究科・特別科学研究員

研究者番号：40281836

研究成果の概要（和文）：本研究課題「ナノスケール高分子会合体-細胞膜界面における相互作用とシグナル変換」では、「細胞膜における物質の取込み経路」と「ナノスケール高分子会合体（ナノ粒子）」との相互作用に伴う細胞応答について検討する。これまでに、種々のナノ粒子を血管内皮細胞に取り込ませ、このときの一酸化窒素合成酵素（eNOS）のリン酸化の割合、発現量の変化を検討した。その結果、“ナノ粒子=入力シグナル”⇒“細胞応答（出力）”が可能であることが実験的に示された。

研究成果の概要（英文）：In our research project supported by Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (22510120), we studied how the expression level and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) are influenced when nanoparticles of amphiphilic polymer are endocytosed into vascular endothelial cells. We experimentally demonstrated that cellular uptake of the synthetic nanoparticles of polysiloxane can be processed as signals and result in the enhanced cellular responses (nitric oxide release).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノバイオ、ナノ材料、生体機能利用

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は NO 産生のメカニズムに着目し、血管内皮細胞において生体分子でない高分子ナノ会合体（ナノ粒子）がカベオラを経路として取込まれる場合のシグナル処理について、ナノ粒子の構造とシグナル応答との間に何らかの相関がありうると考えた。まず、本研究構想の着想の経緯について述べる。

研究代表者らによる以前の研究において、ポリシロキサン骨格を有する両親媒性ポリマーを合成し、これが水中においてナノ粒子を形成することを見出した（*Polymer Journal*, 39, 1065-1070, (2007)）。加えて、血管内皮細胞による本ナノ粒子の取込みに伴い、NO 産生が亢進することを見出した（特開 2008-280280「血管内皮型一酸化窒素合成

酵素活性化剤、及び一酸化窒素欠乏に起因する疾病の予防または治療薬)。

研究代表者はこの知見を基に「高分子ナノ会合体 (ナノ粒子) が細胞に対する外部刺激として機能する」との考えに至った。そこで、一酸化窒素合成酵素 (eNOS) が集積する細胞膜ナノドメイン (カベオラ) に対してナノ粒子を作用させ、細胞膜との相互作用に関する速度論的な観点からの解析、NO 産生、細胞内シグナル伝達に関する生化学的な解析を進めることにより、「ナノ粒子と細胞膜との相互作用におけるシグナル変換」に関する知見を得るとの研究テーマを着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は「ナノ粒子による“シグナル特性”の発現」の解明であり、以下の点について系統的に研究を実施する。まず、①細胞膜への親和性 (リガンド-レセプター間の結合を利用) に基づき、取込み経路が異なる高分子ナノ会合体 (ナノ粒子) を作製する。経路として、カベオラ介在型パスとクラスリン介在型パスを想定している。次いで、②シグナル応答 (NO 産生、eNOS の活性化) と取込み経路との関係を検討する。このとき、③ナノ粒子の作用による細胞内シグナル応答の特徴について、生化学的な解析および速度論的解析を行う。上記の①~③の項目について検討を進め、ナノ粒子による細胞外シグナル特性の発現を解明するとともにナノ粒子の構造とシグナル特性発現との関係について知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞におけるナノ粒子の取込み経路の確認

両親媒性ポリシロキサンを用い、ナノ粒子の分散液を調製する。細胞内での動態を観察するために、これらのポリマーは蛍光ラベル化 (あるいは金ナノ粒子でラベル化: 電子顕微鏡観察に使用) したものを使用する。このナノ粒子分散液中において血管内皮細胞を所定の時間、培養し、ナノ粒子の取込みを行う。細胞における各ナノ粒子の取込み経路を調べるために、カベオラを構成するカベオリン-1 およびクラスリンとナノ粒子との細胞内局在を免疫染色法により確認する。まず、蛍光顕微鏡観察によりナノ粒子とカベオリン-1 およびクラスリンとの共局在の有無を確認した後、透過型電子顕微鏡による細胞の微細構造観察を行い、細胞膜、細胞質内におけるナノ粒子の局在より各ナノ粒子に対する取込み経路を特定する。

(2) ナノ粒子の取込みによる血管内皮細胞の機能に及ぼす影響

項目 (1) において取込み経路が異なることが示された二種類のナノ粒子を用い、これを細胞内に取込ませたときの血管内皮細胞における一酸化窒素 (NO) 産生に対する影響について、NO 産生量および NO 産生に関わるシグナル伝達系の活性化の観点から知見を得る。具体的には、ナノ粒子の取込み経路の違いが血管内皮細胞における NO 産生応答の相違として現れるのかについて検証する (①)。さらに、ナノ粒子の作用による細胞内シグナル応答の特徴についても知見を得る (②)。

- ① 血管内皮細胞に対し各種ナノ粒子を所定の時間、作用させ、そのときの NO 産生を評価する。NO 産生は細胞内 NO 指示薬 (蛍光プローブ) を用いた細胞イメージングにより評価する。
- ② 一酸化窒素合成酵素 (eNOS) は細胞内において二状態で存在し、外部からの刺激に応じて活性の on⇌off スwitchングを行う。そこで、①ナノ粒子の取込みプロセスと eNOS の活性化 (分子内リン酸化、細胞内局在の変化) との関係、②ナノ粒子の細胞への投与量に対する eNOS 活性化の応答挙動の特徴、③ナノ粒子の細胞外シグナルとしての特性および細胞におけるシグナル処理の特徴を明らかにする。特に、ナノ粒子の取込みに関する速度論解析および細胞膜におけるカベオラの発現量、ナノ粒子のエンドサイトーシスに伴うカベオラの細胞質内への移行量を評価し、これに対して速度論解析を行うことで、ナノ粒子と細胞膜との相互作用を定量的かつ速度論的に評価する。上述の結果を基に、ナノ粒子のシグナル機能に関してシグナルの強さ、シグナルの処理速度などの特性パラメーターを提示し、取込み経路との関係を考察する。eNOS の活性化は①eNOS 分子の細胞内局在の変化を免疫染色法によるイメージングで評価、②eNOS の活性化プロセスにおける eNOS 分子のリン酸化をウェスタンブロッティング (WB) により定量する。③カベオリン-1 およびその他リン酸化タンパク質の定量も WB により評価する。

4. 研究成果

- (1)、細胞によるナノ粒子の取込みに伴う

刺激（入力シグナル）の細胞内シグナル伝達によるシグナル応答と処理メカニズムについて検討を進め、以下の知見を得た。

①ナノ粒子の取込みによるナノ粒子は血管内皮細胞の細胞膜ナノ構造ドメインであるカベオラを経由して取込まれる。②ナノ粒子との相互作用の後、血管内皮細胞において一酸化窒素（NO）産生が亢進した。③NO産生を担っている一酸化窒素合成酵素（eNOS）の活性化がナノ粒子の取込みにリンクして生じる。即ち、ナノ粒子の取込みが生じている間は eNOS の活性化の指標であるリン酸化 eNOS の発現量が上昇する一方、ナノ粒子を除去するとリン酸化 eNOS の発現量が定常レベルに戻る。④ナノ粒子の取込みによる eNOS リン酸化の亢進は、血管内皮細胞に作用させたナノ粒子の濃度に依存する。しかし、その応答はナノ粒子の濃度に対してリニアではなかった。これらの結果より、血管内皮細胞におけるナノ粒子取込みが一酸化窒素合成酵素の活性化を誘起し、on-off 的にスイッチすることが明らかとなった。

（2）ナノ粒子の構造とナノ粒子の細胞外シグナル特性との相関について検討を進め、以下の知見を得た。これまで用いていた両親媒性ポリシロキサンに替え、ポリスチレンナノ粒子（粒子径が 20nm、50nm、100nm、200nm の四種類のナノ粒子）と血管内皮細胞との相互作用について検討した。ポリスチレンナノ粒子を血管内皮細胞に取り込ませ、このときの一酸化窒素合成酵素（eNOS）のリン酸化の割合、発現量の変化を検討した。その結果、カベオラの開口部サイズと同程度のサイズのナノ粒子が取り込まれた場合、eNOS のリン酸化が最も亢進することが分かった。ナノ粒子の取込みによる血管内皮細胞における一酸化窒素の産生誘導は、ポリシロキサンナノ粒子だけでなく、ポリスチレンナノ粒子を用いても生じた。このことは、カベオラサイズ（50nm～100nm）のナノ粒子をデリバリーさせれば、一酸化窒素が産生し得ることを示唆する。

（3）細胞側のシグナル制御についても検討を進めた。そのアプローチ法として、実際の細胞におけるシグナル制御の複雑さを排除したモデル系を用いた。モデル系としてリン脂質二分子膜小胞体（リポソーム）のリン脂質二分子膜に取込みのためのカベオラを再構成したものを想定した。その準備研究として、単層膜リポソーム内に簡単な遺伝子発現システムを組み込み、その発現をセルソーターにより確認した。

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 2 件）

- ① T. Nishikawa, T. Sunami, T. Matsuura, N. Ichihashi, T. Yomo, Construction of Gene Screening System Using Giant Unilamellar Liposomes and Fluorescence Activated Cell Sorter, Analytical Chemistry, 査読有、84、5017-5024、2012. DOI: 10.1021/ac300678w
- ② T. Nishikawa, T. Sunami, T. Matsuura, T. Yomo, Directed Evolution of Proteins through In Vitro Protein Synthesis in Liposomes, Journal of Nucleic Acid, 査読有、2012、1-11、2012. DOI: 10.1155/2012/923214

〔学会発表〕（計 1 2 件）

- ① 西川雄大、角南武志、松浦友亮、市橋伯一、四方哲也、リポソーム内水層を反応場とする遺伝子発現システム、第 59 回高分子学会年次大会、2010 年 5 月 26 日、パシフィコ横浜
- ② 西川雄大、角南武志、松浦友亮、市橋伯一、四方哲也、リポソームを用いたグルクロニダーゼ遺伝子の選択的な回収システム、第 59 回高分子討論会、2010 年 9 月 15 日、北海道大学
- ③ 西川雄大、角南武志、松浦友亮、市橋伯一、四方哲也、単層膜リポソームを反応場とする遺伝子選択系の構築、細胞を創る研究会 3.0、2010 年 11 月 12 日、東京大学生産技術研究所
- ④ T. Nishikawa, T. Sunami, T. Matsuura, N. Ichihashi, T. Yomo, Quantitative Screening System of β -Glucuronidase Genes Using Unilamellar Liposomes and Cell Sorter、241st American Chemical Society National Meeting & Exposition、2011 年 3 月 30 日、Anaheim, CA, USA
- ⑤ 西川雄大、角南武志、松浦友亮、市橋伯一、四方哲也、リポソームを用いた遺伝子スクリーニングシステムの構築、第 60 回高分子学会年次大会、2011 年 5 月 26 日、大阪国際会議場
- ⑥ 西川雄大、角南武志、松浦友亮、市橋伯一、四方哲也、単層膜リポソームとセルソーターを用いる遺伝子スクリーニングシステムの構築、第 21 回バイオ・高分子シンポジウム、2011 年 7 月 26 日、関西大学
- ⑦ 西川雄大、角南武志、松浦友亮、市橋伯一、四方哲也、単層膜リポソームを反応場とする遺伝子スクリーニングシステム

の定量的評価、第 60 回高分子討論会、
2011 年 9 月 29 日、岡山大学

- ⑧ T. Nishikawa, T. Sunami, T. Matsuura,
N. Ichihashi, T. Yomo, Quantitative
Gene Screening System Based on Giant
Unilamellar Liposomes and
Fluorescence Activated Cell Sorter、
International Symposium on
SYNTHESIZING LIFE AND BIOLOGICAL
SYSTEMS、2011 年 10 月 25 日、千里ライ
フサイエンスセンター
- ⑨ 西川雄大、角南武志、松浦友亮、市橋伯
一、四方哲也、リボソームを用いた遺伝
子スクリーニングシステムの構築、第 34
回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月
13 日、パシフィコ横浜
- ⑩ 西川雄大、角南武志、松浦友亮、四方哲
也、リボソームを反応場とする遺伝子ス
クリーニングによる活性型グルクロニダ
ーゼの探索、第 61 回高分子学会年次大会、
2012 年 5 月 30 日、パシフィコ横浜
- ⑪ 西川雄大、角南武志、松浦友亮、四方哲
也、反応場サイズを選択圧とする分子進
化に基づくタンパク質の会合体形成制御、
第 61 回高分子討論会、2012 年 9 月 20 日、
名古屋工業大学
- ⑫ 西川雄大、角南武志、松浦友亮、四方哲
也、反応場サイズを選択圧とする分子進
化学に基づく β -グルクロニダーゼの
会合特性の制御、第 35 回日本分子生物学
学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡国際会
議場

[図書] (計 1 件)

- ① T. Nishikawa (J. Kadokawa Ed.)、
Transworld Research Network、
Interfacial Researches in Fundamental
and Material Sciences of Oligo- and
Polysaccharides、(2010)、125-129.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：一枚膜リボソームを用いた酵素進化法
の開発

発明者：四方哲也、市橋伯一、角南武志、西
川雄大

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：特願 2011- 76727

出願年月日：2011 年 3 月 30 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 雄大 (NISHIKAWA TAKEHIRO)
大阪大学大学院情報科学研究科・特別科学
研究員

研究者番号：40281836

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：