

2013年度 生物工学功績賞 受賞



バイオマテリアルの構造機能相関
及び相互作用に関する研究

高木 昌宏



Structure-function relationship and interactions of bio-materials

Masahiro Takagi (School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, 1-1 Asahidai, Nomi, Ishikawa 923-1292) *Seibutsu-kogaku* 92: 142-151, 2014.

はじめに：弱い化学結合と秩序

生体の秩序は、動的で刻々と変化し、分子、細胞、個体、それぞれの階層で「生きる」というダイナミクスを生み、そして育んでいる。「生きる」の本質を考えると、弱い結合や相互作用から生まれるダイナミックな動きに目を向ける事ではなかろうか？言葉を換えると、「生体の秩序」の根本にあるのは、弱い秩序構造である。

ここでは、固体結晶のように、完全に秩序立った構造ではなく、ある一定の秩序を持ちながら時々刻々とゆらぐ構造を“弱秩序”と定義する。ワトソン・遺伝子の分子生物学（第4版）には、その弱秩序に関連して、次のような記述がある¹⁾。「細胞内で起こる重要な化学現象は、必ずしも共有結合の形成や切断を伴わない。細胞の中にあるほとんどの分子の位置は、弱い、あるいは二次的な引力または斥力で決まっている。弱い結合は、多くの分子、特に巨大分子の形の決定に重要な役割を果たしている。弱い結合で重要なものは、水素結合、ファン・デル・ワールス結合、疎水結合、イオン結合である。」

タンパク質構造形成における弱い化学結合

1973年Cohenらは、初の遺伝子クローニング実験に成功した²⁾。その後、DNAを化学合成する技術も進歩し、1983年Ulmerは、タンパク質の分子構造とその機能との相関を背景として、一定の設計基準に基づいて分子の改変を行い、タンパク質機能を人工的に改変する技術を、

タンパク質工学と定義した³⁾。

当初よりタンパク質の熱安定性に興味があった我々は、中等度好熱菌 *Bacillus stearothermophilus*、そして独自に単離した超好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来のさまざまなタンパク質について、タンパク質工学的手法に基づいて構造機能相関に関する研究を行った⁴⁻¹⁸⁾。

さらに渡米中には、結晶性セルロース分解能力を示す *Clostridium cellulovorans* のセルロソームに関する研究を行い、分解機能を持つ巨大複合体に分子量約170,000のセルロース結合タンパク質 (CbpA) の存在を明らかにした。CbpA-CbpA間の相互作用、CbpAと分解酵素の特異的結合における疎水の相互作用の重要性を酵素免疫学的手法により解析した¹⁹⁻²¹⁾。

抗体産生を、きわめて洗練されたアミノ酸置換系と考えることもできるであろう。抗体を利用した触媒機能創成の例としては、抗体をホストタンパク質として用いた新規抗体触媒の開発、ならびに抗体工学的改変を行った。耐熱性が高く、L鎖のみで機能するユニークな抗体酵素をデザインし、また同抗体酵素の触媒メカニズムの解析、光水素発生反応の促進効果の解析も行った^{22,23)}。

その後、タンパク質の安定性を論じるには、正しい構造状態（ネイティブ状態）のみならず、変性状態を理解し、また工業的には、いかにして変性状態への構造転移を抑制するかを考え、タンパク質変性過程（凝集、線維形成）に関する研究、さらには、アミノ酸などの小分子添加による変性抑制に関しての研究を行った。塩基性アミノ酸であるアルギニンによる抑制効果についての研究

や、ポリアミンやアミノ酸エステル誘導体による凝集抑制効果について解析した²⁴⁻²⁷⁾。

研究成果の詳細については、個々の論文を参考にして頂きたいが、一連の研究で強く感じた事は、タンパク質が正しい立体構造を維持する、あるいはタンパク質が基質はもちろん、種々のバイオマテリアルと相互作用する、そして時に可逆的、時に不可逆的に構造変化を起こす際に必要な、「弱い化学結合」の重要性である。

大まかに述べれば、疎水的な相互作用、親水的そして静電的な相互作用と水分子の重要性である。

研究で扱った超好熱菌が、Archeaと称される原始生命体や真核生物の起源を考える上でも重要な微生物であったこと、酵素の分泌メカニズム研究の経験、さらにモノクローナル抗体を扱う事で、細胞信号伝達に興味を持ったことも合わさって、現在の研究における中心課題である膜秩序研究に至った。

膜秩序形成と信号伝達

生きている細胞は、膜で覆われた微小閉鎖空間であり、バルク空間と比較して[表面積] / [体積]の比が大きいため、高い反応性など顕著な膜表面の効果を持つ。つまり細胞は、巧みにデザインされたマイクロリアクターである。その利己的とも言える空間に、「生命ダイナミクス誕生」の秘密が隠されている。細胞膜の構造に関しては、1972年にSingerとNicolsonによって“流動モザイクモデル”が提唱されて以来、構成分子が膜面内を自由に拡散・移動し、均一に分布していると考えられてきた。しかし、近年になり、飽和脂質やコレステロールが豊富な秩序相からなる「相分離マイクロドメイン構造」の存在が示唆され、“ラフト”と呼ばれている(図1)。ラフトはスフィンゴ脂質とコレステロールが豊富に含まれる相分離した弱秩序としての「膜マイクロドメイン構造」である。

細胞膜にはイオンや分子を輸送するチャネルやシグナル分子と結合する受容体が存在しており、さまざまな様式の輸送やシグナル伝達過程に関与するといわれている。ラフトの構成成分であるスフィンゴ脂質は相対的に飽和脂肪酸鎖に富み、分子同士が密に会合している。一方、非ラフト領域を構成するリン脂質は、相対的にシス二重結合不飽和脂肪酸鎖に富み、比較的緩やかに会合している(図1)^{28,29)}。

つまりラフト形成の背景には、脂質間の疎水的相互作用が関係し、そこに膜受容体が含まれており、ラフトの動的挙動が信号伝達を調節するというモデルが考えられ、細胞生物学者を中心に活発な研究が展開されている³⁰⁾。

我々は、膜のダイナミックな構造変化を、2次元(2D)ダイナミクス(ラフトを中心とした相分離状態の変化)

と3次元(3D)ダイナミクス(エンドサイトーシス、エキソサイトーシス、オートファジーに代表される形態変化)に分類して研究を行っている(図2, 図3)。



図1. 脂質ラフトの模式図。不飽和脂質を豊富に含む流動性のある2分子膜内に、飽和脂質やコレステロールを豊富に含む固いドメイン(相分離構造:脂質ラフト)が存在している。

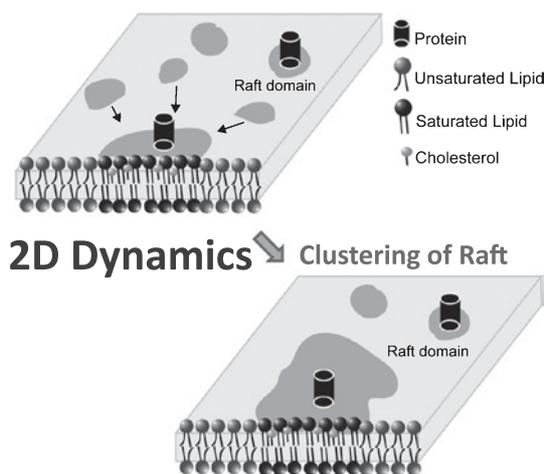


図2. 2次元(2D)ダイナミクスの模式図。ラフトの膜面上での2次元的な動き。小さなラフトに包含されている受容体が、信号伝達に伴い大きなラフトを形成している様子。

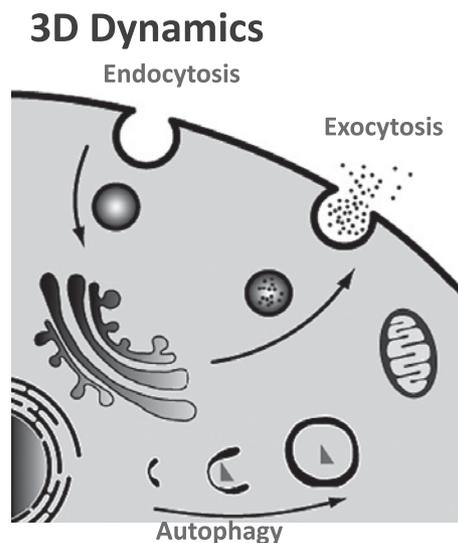


図3. 3次元(3D)ダイナミクスの模式図。膜の大きな変形に伴う3次元的な動き。代表的なものに、エンドサイトーシス、エキソサイトーシス、オートファジーがある。

ラフト構造は、リン脂質を用いた人工系（細胞サイズリポソーム）でも再現でき、生命ダイナミクスの根本である自己組織化的な秩序構造形成のモデル系として、ソフトマター物理学の分野でも注目されている³⁰⁾。

ここからは、生きた細胞と、人工膜系について、膜相分離構造としての「ラフト」とその2次元、3次元ダイナミクス、そしてそのダイナミクスの背景にある「弱い化学結合」について論じてみたい。

免疫系T細胞におけるラフト移動ダイナミクス

我々は、T細胞を用い、細胞膜（特にラフト）の動的挙動のメカニズムと、細胞内信号伝達との関係性を明らかにすることを目的として研究を行っている。T細胞活性化には、抗原提示細胞の代わりに情報分子としてレクチンタンパク質 concanavalin A (ConA) を用いた。そして、ConA添加後の細胞膜（ラフト）の動的挙動の観察を行った。さらに、細胞膜構成脂質の一種であるコレステロールを枯渇させた細胞でも、同様の観察を行った。

ラフトの可視化にはラフトに局在するガングリオシドGM1と結合する cholera toxin subunit B の Alexa Fluor 488 conjugate (CT-B-488) を用いた。可視化した細胞を、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。顕微鏡観察したところ、散在していたラフト領域が、情報分子 ConA の添加により、クラスタリングしている状態が観察できた (図4)。

ラフトと情報分子の同時観察の結果を詳しく観察すると、集積したラフトが細胞の内に入り込んでいる可能性が示唆された。そこで、集積したラフトの細胞における位置を調べるため、3次元観察を行った (図5)。共焦点像を 2 μm 間隔で撮影した画像を重ね合わせたものである。①～⑤のラインで細胞を切断したときの断面図を図5に示した。コントロールでも小さい集積が観察できたが、ConA刺激ではそれらが1か所に集まっていた。このことから、ConA添加などの刺激がない場合でも小さなラフトのクラスターは存在するが、ConA添加により

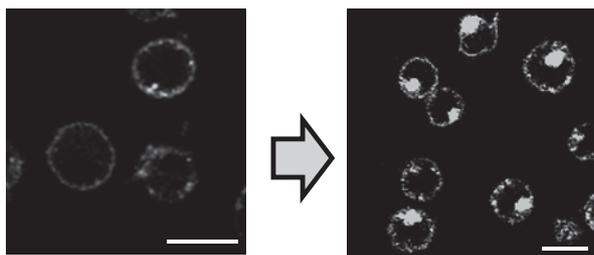


図4. JurkatT細胞のラフト可視化。ラフト領域を Cholera toxin subunit B の Alexa Fluor488 conjugate (CT-B-488) を用いて可視化した細胞を、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した蛍光像。左：ConA刺激前、右：ConA刺激後。

それらの小さなラフトが集積したことから、ConA添加がラフトの集積を誘導したと考えられた。

さらに立体的に解析すると、ラフト①の画像では確認されなかったクラスタリングしたラフトが、②で出現し、③ではサイズが大きくなっていった。そして、④では集積サイズが小さくなり、⑤では見られなくなったことから、集積したラフトが、細胞の内側に局在していることが分かった。

次にコレステロールの枯渇がラフトの挙動に与える影響を調べた。まず、細胞を methyl-β-cyclodextrin (MβCD) 処理 (2 mM MβCD/RPMI 1640 培地, 10 min) した。CT-B-488 を用いたラフトの可視化および、CT-B-488 と ConA-594 を用いた蛍光二重染色を行った後、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した (図6)。

MβCD処理細胞ではラフトの集積がほとんど起こっていなかった。このことから、コレステロールの枯渇によってラフトの集積が阻害されることがわかり、ラフト集積にはコレステロールの存在、さらには膜脂質の組成、つまりは流動性が重要であることが示唆された。

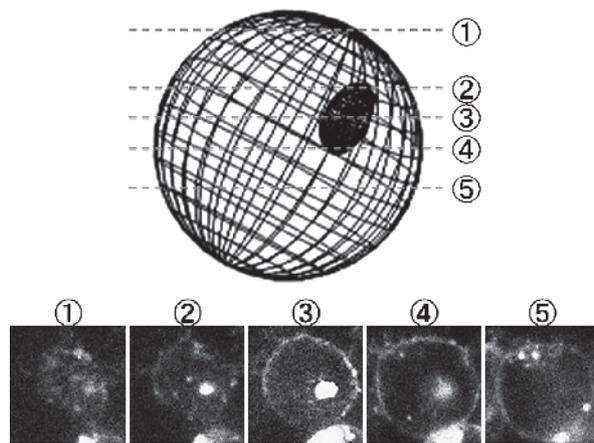


図5. ラフトの集積状態。①～⑤のラインで細胞を切断したときの断面画像と切断箇所 (模式図)。

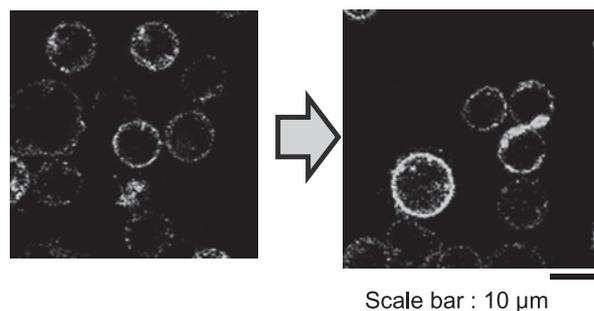


図6. コレステロール枯渇状態でのラフト観察。コレステロール枯渇状態では、ConA処理後 (右) も、ラフトの集積は認められない。

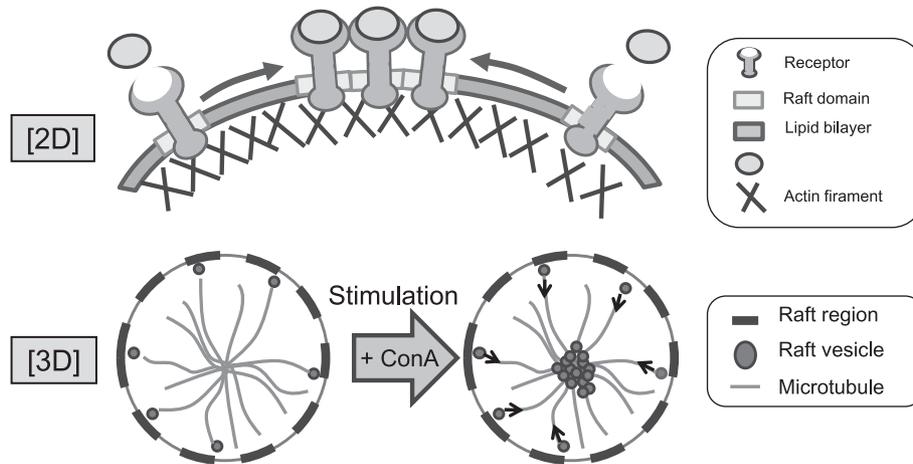


図7. ConAによるT細胞活性化モデル

これら一連のラフトの挙動に、細胞骨格がどのように関係しているかについても調べた。

細胞表層で重合していたF-アクチンは、ConA刺激により脱重合し、細胞内部に向け放射状に移動し集積した。セントロソームから放射状に伸びる微小管は、内部で集束した形状に再構築した。細胞内Ca²⁺濃度の上昇は、細胞内部での集積形成後であった。F-アクチンおよび微小管の脱重合は、いずれもクラスター形成を阻害した。コレステロール枯渇および過多の場合もクラスター形成は認められなかった。以上の結果から、T細胞活性化シグナルにおいて、脂質ラフトの「2次元的な動き」にF-アクチンが、「3次元的な動き」に微小管が関係し、ともにコレステロールに依存するプロセスであると考えられ、新たな信号伝達モデルを作成した(図7)。

細胞サイズリポソーム：人工膜での相分離構造

生体膜の主成分であるリン脂質は、親水基の頭部と疎水部の尾部を持つ両親媒性分子であり、水溶液中で自己集合しミセルや二分子膜構造(リポソーム)を自発的に形成する。リポソームは、生体膜に類似した組成・構造を備えており、生体モデル膜として研究に用いられてきた。細胞と同程度の直径10マイクロメートルスケールの巨大リポソームは、曲率が小さく安定な構造体であり、顕微鏡を用いて一集合体の挙動をリアルタイムに直接観察できる理想的な細胞モデル空間である。脂質ラフトは、脂質分子間の相互作用により引き起こされる2次元膜面上の相分離現象であると考えられている。相分離とは、結合エネルギーの異なる二種類以上の分子が存在するときに起こる現象であり、一般的に高温では混合のエントロピーが支配的となり一様状態が安定で、低温では結合エネルギーが支配的となり分離してドメインが形成され

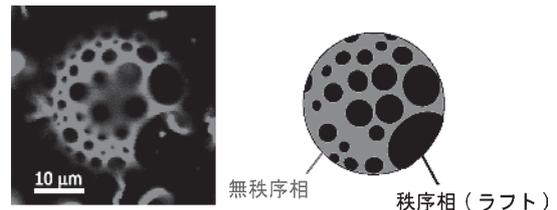


図8. 細胞サイズリポソーム上での相分離構造

る。すなわち、環境の熱力学的パラメーターに応じて、混合のエントロピーと結合エネルギーの競合によりドメイン構造の安定性が決定される。

生体膜を形成する脂質分子も同様の性質を示し、2種類以上の脂質分子で形成されたリポソーム膜上で相分離を観察する事が可能である。これまでに、飽和脂質と不飽和脂質とコレステロールから成る単純な3成分脂質混合リポソーム上にて、ラフト同様のドメイン構造が観察されている。図8は、ラフトドメイン構造をもつリポソーム表面の蛍光顕微鏡像である。蛍光分子を組み込むことで、膜面内のドメイン構造(相分離秩序相)を可視化することができる。ドメイン形態がきれいな円を描いているが、これは、円形状が境界エネルギーをもっとも小さくすることに起因している。

膜を構成する不飽和脂質は分子の自由度が高く流動性も高い無秩序相Liquid-disorder (Ld)相を形成する。飽和脂質は分子が密に充填され流動性が低い固体秩序相Solid-order (So)相を形成する。これに対し、コレステロールは、不飽和脂質よりも飽和脂質と親和性が高いため、飽和脂質に対して流動性を高め、液体秩序相Liquid-order (Lo)相を形成する。また、So相とLo相は、コレステロールの含量約20%を境に、液体と固体で性質を変化させる事などからも、コレステロール含量は、

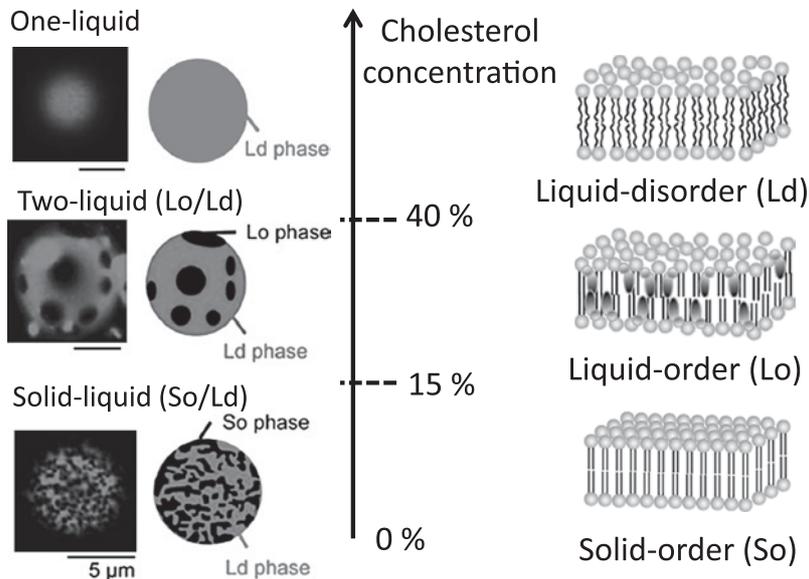


図9. コレステロール濃度と相分離構造. 飽和脂質 (DPPC) と不飽和脂質 (DOPC) とコレステロール (Chol) から成る単純な3成分脂質混合リポソーム上における相分離構造の観察. DOPC/DPPC=50/50において, Chol 15%以下では, So/Ld相分離構造が, Chol 15–40%では, Lo/Ld相分離構造が観察できる.

重要な因子である. 興味深いことに, モデル膜系においては, Ld, LoそしてSoの3種類の相 (Phase) が知られている (図9).

先にも述べたが, 生細胞の膜に関しては, ラフトと呼ばれるスフィンゴ脂質とコレステロールに富む非イオン性界面活性剤不溶性膜領域 (detergent-resistant membranes, DRM) の存在がラフトと定義されており, これはLo相とSo相の区別ができていない状況とも言える.

我々は, 細胞サイズの巨大リポソームを用いて, その挙動 (ダイナミクス) の物理化学的解析を通して, 細胞で起きている現象の本質を明らかにする研究を行っている³²⁻⁴³⁾.

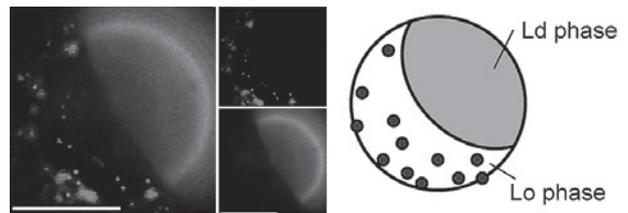
ナノ・マイクロ微粒子の膜局在

食品や化粧品, 医療などの分野において, ナノ・マイクロサイズの微粒子が注目を集めている. 微粒子は, 比表面積がきわめて大きく, 量子サイズ効果などによって特有の物性を示す. バルク材料と比較して物理的・化学的・電気的な性質が異なり, 研究・利用が進められている. しかし, 微粒子の生体系への影響については未知の部分が多い. そこで本研究では, 細胞膜を模倣した細胞サイズのリポソームを用いて, ポリスチレン粒子と膜との相互作用を解析した.

液体秩序相 (Lo相) と液体無秩序相 (Ld相) で構成されたりポソームでは, サイズによって変化が現れ, 200 nmを境界にして, 直径200 nm以下の微粒子はLo相に, 200 nm以上の微粒子はLd相へ局在した (図10).

DOPC:DPPC:Chol=35:35:30

100 nm particles in Lo/Ld membrane



500 nm particles in Lo/Ld membrane

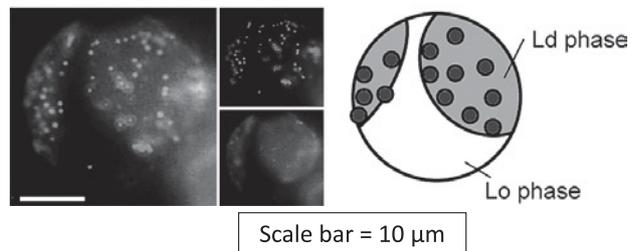


図10. ポリスチレンビーズの粒径に依存した膜相分離構造との相互作用. Lo/Ld相分離膜の場合, 100 nmのビーズは, Lo相に局在し (上), 500 nmのビーズは, Ld相に局在している (下).

一方, 固体秩序相 (So相) と液体無秩序相 (Ld相) で構成されたりポソームの場合は, サイズに関係なく, すべての粒子はSo相に局在した.

脂質膜と物質間の相互作用に関しては, 同じ物質であってもサイズによって膜の組成 (つまりはドメインの種類) に応じて, 相互作用メカニズムに違いがあると考えられた⁴⁴⁾.

アミロイドペプチドの膜局在・膜挙動

アルツハイマー病原因物質アミロイドβペプチド・(Aβ)とラフトを構成する糖脂質GM1ガングリオシド(GM1)との関連性が示唆され、Aβは、ラフトと相互作用する仮説が提唱されている。そこで、Aβの膜局在(Ld, Lo, So相)を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。Aβは、重合度に応じて、モノマー、オリゴマー、線維状態へと変化する。モノマーAβは、優先的にLd相に局在した。線維状態のAβは、膜面に均一に分布した後、So相に局在した。Aβは、その重合状態に応じて、膜局在を変化させ、特に線維状態では、So相との相互作用が強い事が明らかになった(図11)。

アミロイドとの相互作用により、膜構造のダイナミックな変化も観察できた。

生きた細胞において、So相の存在は、いまだ明らかにされていない。しかし、コレステロールの欠乏や過剰により、モデル膜と同様に生きている細胞でも、ドメインが多様に変化する可能性は十分に考えられ、さまざまな疾患との因果関係もあると予想できる⁴⁵⁻⁵⁰。

ラフト仮説は、魅力的である。しかし疎水性相互作用がもたらす2次元ダイナミクス(相分離構造変化)だけでなく、親水性領域(電荷や水素結合)の影響をエネルギー的に論じる必要性や、2次元と3次元ダイナミクスの共役関係など、解決すべき問題点も多い。

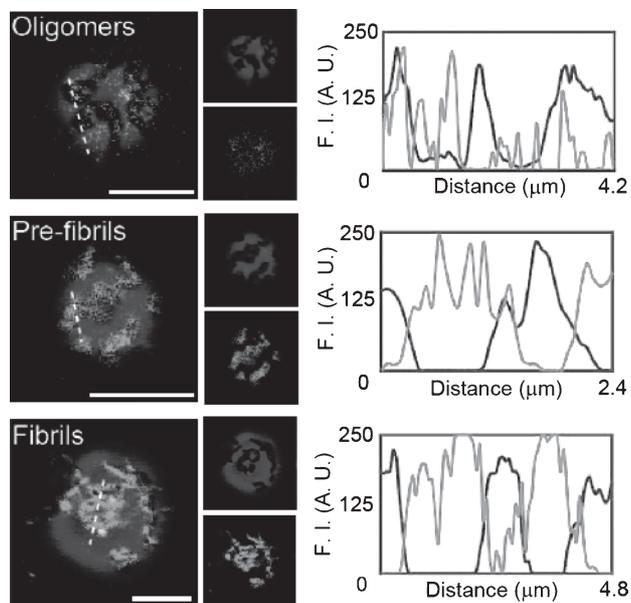


図11. アミロイドと膜相分離構造との相互作用. アミロイドの重合状態(モノマー(上), オリゴマー(中), 線維(下))に関係なく、So相に結合している。

親水性相互作用と相分離構造

膜相分離構造に関する知見は、脂質間の疎水的相互作用を基本に考察されてきた。膜構成成分であるコレステロール(Chol)は酸化されると酸化コレステロールである7-ketocholesterol(7keto), 7β-hydroxycholesterol(7β)を生じる。Cholに比べて酸化コレステロールを含む膜は、高い温度答性を示すことから、水酸基やケト基の膜ダイナミクスへの関与が示唆された⁵¹⁻⁵³。DOPC/DPPC/Cholの3成分系のCholすべてまたは半分を7ketoまたは7βに置換した際の相分離を蛍光顕微鏡観察と比較した。その結果、7keto, 7βを含む系ではともに低濃度域(<10%)では縞状とは異なる歪なドメインが観察できた(図12)。

また、ステロール濃度の上昇に伴いCholをすべて7ketoに置き換えた系ではCholとほぼ同じ濃度域(15~40%)で、Cholの半分を7ketoで置き換えた4成分系ではCholより低濃度域(10%~30%)で円形のドメインが観察された。7β含有膜では円形のドメインが観察できなかった。

つまりCholと7ketoの両方が存在する場合、円形ドメインの形成が促進された。この結果は、Chol, 7keto

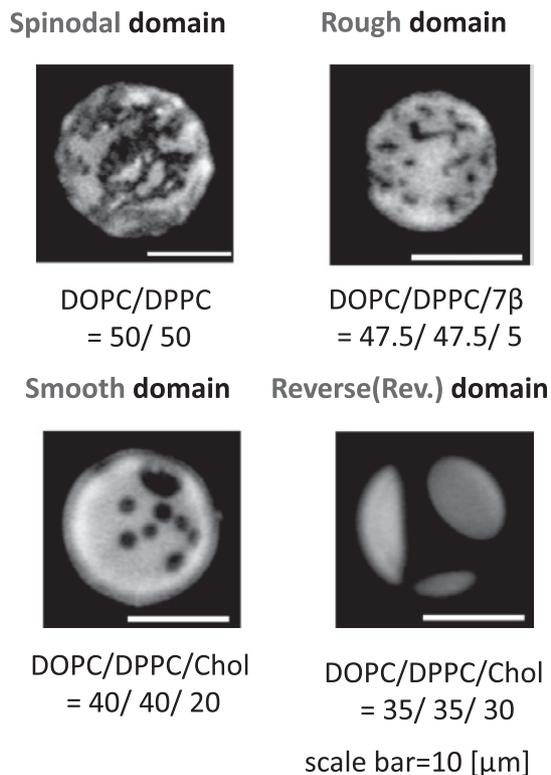


図12. 酸化コレステロール含有リポソームの多様な相分離構造. 縞状(Spinodal), 歪な形(Rough), 円形(Smooth), 反転状態(Reverse).

間の親水性相互作用が円形ドメイン（ラフト）形成の促進に關与することを示唆し、疎水性相互作用だけでなく、親水性相互作用を含めて相分離構造を論じなくてはならない事を示している。

静電相互作用と相分離構造

相分離構造形成に寄与するパラメータとして、静電相互作用にも着目した。生体膜は負電荷を有した脂質を含んでいるが、相分離研究は中性の脂質のみを用いており電荷は考慮されていない。中性不飽和脂質 (DOPC)、中性飽和脂質 (DPPC)、負電荷不飽和脂質 (DOPG(-))、負電荷飽和脂質 (DPPG(-))、コレステロール (Chol) を用いて荷電ベシクルを作製し、塩 (NaCl) 遮蔽と組み合わせて、膜表面の相分離ドメインや相転移温度を観察した。結果、DOPG(-)は相分離を抑制するのに対し、DPPG(-)は相分離や形態変化を促進する結果が得られ (図13)、静電的相互作用の影響は、ナトリウムイオンによって中和できた。コレステロールの局在も親水基頭部の負電荷の影響を強く受け、静電的な相互作用が膜相分離構造や形態変化に影響していると考えられた。

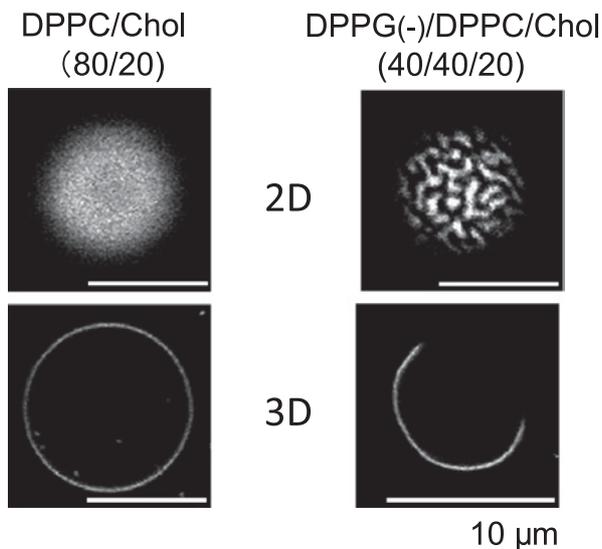


図13. DPPG含有膜の相分離構造と開孔構造。DPPG(-)含有膜 (右) では相分離構造形成 (2D) や形態変化 (開孔構造形成 (3D)) を促進している。

ラフト依存型エンドサイトーシス

脂質ラフトは、生体分子の集積化以外にも、輸送小胞の形成 (サイトーシス) の機能を備えていると考えられている。この膜小胞形成には特定のタンパク質 (クラスリン) の働きが重要であることが報告されているが、ここではタンパク質に依存しない脂質膜の物性に基づく小胞化メカニズムについて説明する。

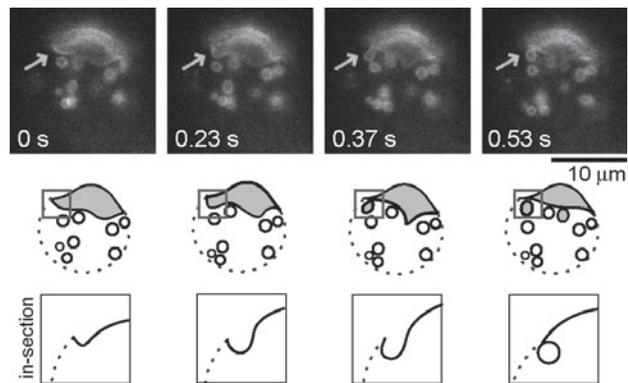


図14. 相分離状態の生体モデル膜における小胞出芽。DOPC (不飽和リン脂質) / DPPC (飽和リン脂質) / コレステロールの比率が、2 : 2 : 1となる状態に、1 mol%糖脂質 ganglioside (GM1) を加えた相分離状態にあるラフト含有リポソームに、界面活性剤 (Triton-X100) による処理をした際の、エンドサイトーシスに類似した内包の形成。人工膜に余剰膜面積を与えると、ドメインが自発的に出芽小胞を形成する。

脂質膜上でのドメイン構造の安定性は、2分子膜の弾性エネルギーとドメインの縁に発生する境界エネルギーにより決定される。モデル膜面上でのドメインは、時間経過とともに融合・成長するが、これは境界エネルギーを減少させるために起こっている。しかしこれ以外にも境界エネルギーを減少させる方法がある。それは、3次元の膜面の変形である。すなわち、ドメイン部が出芽変形することで境界の長さを減少させる現象である。よって、膜面内のドメインサイズを大きくする (2次元的变化) か、ドメインの膜形状を変形させる (3次元的变化) 事によって、脂質膜はより低いエネルギー状態に移ることができる。ただし、境界エネルギーを得るためにドメインが出芽すると、膜面が曲がり弾性エネルギーは損をする。ゆえに、どちらのエネルギー寄与が大きいかで出芽するかどうか決定される。これらエネルギーの特徴的な大きさは膜弾性係数と線張力係数で表され、その比 $\xi = \kappa / \sigma$ はおよそ 100 nm である。この特徴的なスケール ξ 以上のドメインは、膜面より出芽し小胞化する事でエネルギー的に安定化する⁵⁴⁾。

我々は、同スケールのドメインをもつ生体モデル膜を用いて、膜ドメインを有する人工膜に余剰膜面積を与えると、ドメインが自発的に出芽小胞を形成することを見出した (図14)。つまり外部刺激がドメイン出芽を引き起こすことを観察している。細胞の代表的な動的機能である小胞形成ダイナミクス (エンドサイトーシス機能) を、タンパク質の助けなく工学的に再現した。膜面の弾性エネルギーとドメイン境界エネルギーを考慮に入れた理論モデルを考案し、ダイナミクスの物理機構を説明し、細胞膜自体の力学的性質が、均一サイズの出芽小胞を生み出す特性を備えている事が明らかになった³²⁾ (図14)。

動物実験代替法の開発

界面活性剤は、膜透過を介して可溶化作用を発揮することにより、生体膜にダメージを与える⁵⁵⁾。また界面活性剤は、生化学分野における膜タンパク質の単離や、食品・化粧品の乳化剤などその用途は多岐にわたっている。界面活性剤などの「ドレイズ法」は、1944年に毒性学者ジョン・ドレイズ (John H. Draize) らにより考案された、拘束したウサギの眼に対し試験物質を適用して、その応答を調べる急性毒性試験法で、角膜、虹彩、結膜の変化に応じたスコアにより刺激性を定量化する方法である (OECD Test Guideline 405)。2006年度に使用されたウサギは24万羽で、試験後に殺処分されたことが知られている。

生体模倣膜として巨大リポソームを用い、膜のダイナミクスをリアルタイムで顕微鏡観察し、可溶化過程におけるリポソームの縮小、膜の反転、バーストといったさまざまな膜ダイナミクスを報告している例は存在する。しかしながら、リポソームと界面活性剤を用いた細胞毒性の評価や刺激メカニズムの解明は行われていない。

我々は、他に先駆けて界面活性剤の種類に応じて、巨大リポソームがどのように多様なダイナミクスを示すかについて解析し、大きく4パターンが存在することを報告した⁴¹⁾ (図15)。

リポソームの揺動、開孔、収縮現象を画像解析により

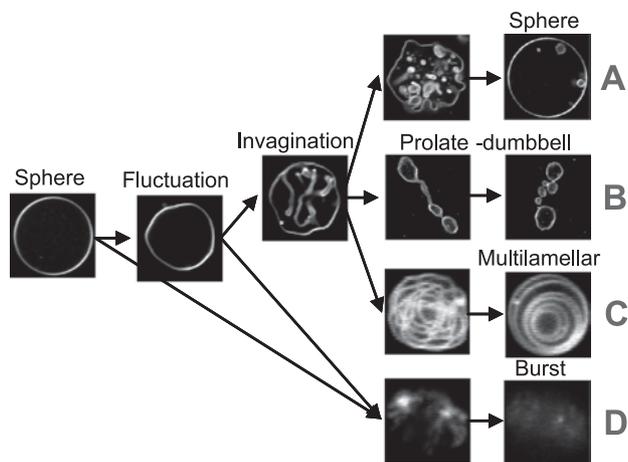


図15. 種々の界面活性剤による4種類の代表的な膜ダイナミクス (A-D)

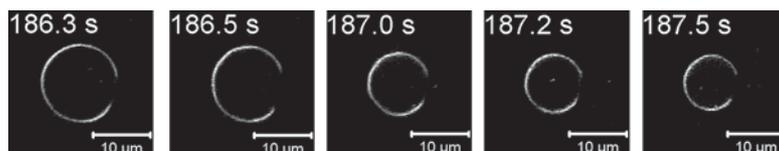


図16. 開孔膜の収縮過程

定量化し、それらを実際の生命現象 (皮膚刺激性) と関連づけ、動物実験に代わる新たな評価方法を開発できないか検討した。膜孔形成パターンを定量的に評価するため、リポソームの縮小スピード (Shrinkage speed) に注目し解析した (図16)。

ドレイズ試験法においてポジティブコントロール (刺激性)、ネガティブコントロール (無刺激性) とされている Triton X-100 と Tween 20 の Shrinkage speed に関して、それぞれの界面活性剤濃度を変えて比較したところ、界面活性剤種・濃度依存性が明らかとなり、ドレイズ試験代替法としての可能性が見いだされた。さらに、Shrinkage speed とドレイズスコアの相関性評価において、擬似的なドレイズスコアを算出することができた。これらの式によって導き出された擬似的ドレイズスコア (Estimated draize score) は実際のスコアと良い相関性を示したことから、ドレイズ代替法としての有用性が示された。さらに、ドレイズ法で算出されたスコアがきわめて低いにも関わらず、実際には強度の眼刺激性を示す界面活性剤として知られている [polyoxyethylene (caprylate/caprate) glycerides と polyoxyethylene-polyoxypropylene decyl ethers/POP(2)POE(7)] の擬似的ドレイズスコアが、実際の眼刺激性に匹敵する程高い値になる事が見いだされた (強刺激性ありと評価された) ことから、ドレイズ試験よりも信頼性の高い眼刺激性評価法としての可能性が示唆された。今後、さらに試験物質を増やし、ドレイズ試験代替法としての有用性を評価する必要があるが、細胞サイズリポソームの応用面での新たな可能性についても、研究を続けたい。

モデル系から細胞生理学への提案

ラフト仮説の想定する相分離は、ラフト1種類である。先にも述べたが、飽和脂質、不飽和脂質を1:1の割合で含むモデル膜では、コレステロール濃度に応じ、ラフトに相当する円状の相分離 (Lo/Ld) (15-40%) と、縞状の相分離 (So/Ld) (0-15%) の2種類が存在する。さらに、コレステロール酸化物を含むモデル膜では、歪な形をした相分離構造 (rough domain) の形成が、観察できる。

生細胞にもモデル膜同様、複数の相分離構造が存在する可能性がある。ラフトの定義が界面活性剤不溶性画分

(DRM) なら、固体秩序相 (So) と液体秩序相 (Lo) など、多様な相分離構造が存在したと仮定しても、分離する事は不可能である。今後、細胞モデル膜であるリポソーム研究と生細胞を用いた研究を対比させながら、相分離という弱秩序構造の多様性と生理学的な役割について調べたい。

現象論が先行する膜研究に、エネルギー状態解析、分子挙動解析など定量的な方法論を導入し、理論的な裏付けと「多彩なマイクロ空間の創出」「空間内外での反応場デザイン」を目指す。細胞生理学分野にも情報を提供し、工学を中心に、生物学、物理学の境界領域において、独創的研究を計画していきたい。

創造的研究と学会活動

「知識基盤社会」という言葉が語られている。これは、中央教育審議会答申「我が国の高等教育の将来像」で示された言葉で、21世紀は、いわゆる「知識基盤社会 (knowledge-based society)」の時代であると述べている。「知識基盤社会」とは、「新しい知識・情報・技術が政治・経済・文化をはじめ社会のあらゆる領域での活動の基盤として飛躍的に重要性を増す社会」であると定義している。また、答申では「知識基盤社会」の特徴として次のようなことをあげている。

- (1) 知識には国境がなく、グローバル化が一層進む。
- (2) 知識は日進月歩であり、競争と技術革新が絶え間なく生まれる。
- (3) 知識の進展は旧来のパラダイムの転換を伴うことが多く、幅広い知識と柔軟な思考力に基づく判断が一層重要になる。
- (4) 性別や年齢を問わず参画することが促進される。

この知識基盤社会において、産官学を問わず我々は、生物工学の研究・教育に関わる立場である。つまり、生物工学分野で、創造的研究を行うことが要求されている。創造的研究を成立させる大切な要素として、直感的思考、論理的把握に加えて多様な価値観が大切である。我々、研究者の為すべき役割は、多様な価値観を有する知的環境を準備することである。創造的研究が生まれる環境を実現するには、たとえば大学の研究室において院生一人ひとりが「知」の創造のプロセスに異なった価値観を持つ責任あるメンバーとして研究活動に参加させ、「協働」つまりは学問における創造活動とともに体験できる環境を作り上げることが求められる。創造的学問研究とは、異なる価値観や学問との出会いと人間関係における出会いとを総合した過程であり、その事を学生とともに体験するのが教員の役割である。

日本の若者が、そして現代人が忘れかけているのは、単純な、しかし重要な「地道な苦しみと楽しみの連続を、助け合って生きていく」精神である。これは実は、学問の世界に限らず、すべてに共通した人生の要諦である。

この大切な事を忘れることなく、創造的研究を通して社会に貢献するために、学会活動はきわめて重要な役割を担っている。

特に、「バイオテクノロジー」は、典型的な学際領域であり、さまざまな知識 (Scientific knowledge) と手法 (Biotechnological tools) が相互に対峙・融合して発達が遂げられている。この利点を生かし、バイオテクノロジーの目指す方向である「医療、環境、食糧」の3分野における問題解決に直結する既存の学問体系の枠を越えたところに存在している創造的研究の糸口を見つけ出す環境を提供するのが「学会」なのだと考える。

創造的研究とは、結局は学問と学問が出会う境界領域で生まれている。そして、それはとりもなおさず人との出会いに端を発するのである。

工学、農学、医学、薬学などの学問分野、さらには、産官学など、異なった種々の価値観を相互に、そして積極的に、刺激、対峙、融合させることにより新たな分野を創出することが、私の研究における大きな目標である。そしてこれは、まさしく学会活動の目標と一致している。

謝 辞

ここに述べた研究成果は、お世話になった多くの方々のご指導、御援助があってこそ得られたものである。大阪大学での今中忠行先生 (現・立命館大学)、カリフォルニア大学での Roy H. Doi 先生、北陸先端科学技術大学院大学での白木賢太郎先生 (現・筑波大学)、濱田勉先生はじめ、お世話になった多くの先生方、所属した学生諸君に、この場を借りてお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Watson, D. J., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steitz, J. A., and Weiner, A. M.: *Molecular Biology of the Gene (Fourth Edition)*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. ワトソン 遺伝子の分子生物学 第4版 (上) 松原謙一, 中村桂子, 三浦謹一郎 監訳 p. 160 (1987).
- 2) Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., and Helling, R. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3240–3244 (1973).
- 3) Ulmer, K. M.: *Science*, **219**, 666–671 (1983).
- 4) Imanaka, T., Shibasaki, M., and Takagi, M.: *Nature (London)*, **324**, 695–697 (1986).
- 5) Takagi, M. and Imanaka, T.: *FEBS Lett.*, **254**, 43–46 (1989).
- 6) Kubo, M., Mitsuda, Y., Takagi, M., and Imanaka, T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 7478–7481 (1992).

- 7) Takagi, M., Nishioka, M., Kakihara, H., Kitabayashi, M., Inoue, H., Kawakami, B., Oka, M., and Imanaka, T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4504–4510 (1997).
- 8) Siddiqui, M. A., Fujiwara, S., Takagi, M., and Imanaka, T.: *FEBS Lett.*, **434**, 372–376 (1998).
- 9) Siddiqui, M. A., Fujiwara, S., Takagi, M., and Imanaka, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **85**, 271–277 (1998).
- 10) Masui, A., Fujiwara, N., Yamamoto, K., Takagi, M., and Imanaka, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **85**, 30–36 (1998).
- 11) Hashimoto, H., Inoue, T., Nishioka, M., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., and Kai, Y.: *J. Mol. Biol.*, **292**, 707–716 (1999).
- 12) Shiraki, K., Nishikori, S., Fujiwara, S., Hashimoto, H., Kai, Y., Takagi, M., and Imanaka, T.: *Eur. J. Biochem.*, **268**, 4144–4150 (2001).
- 13) Hashimoto, H., Nishioka, M., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., Inoue, T., and Kai, Y.: *J. Mol. Biol.*, **306**, 469–477 (2001).
- 14) Nishikori, S., Shiraki, K., Fujiwara, S., Imanaka, T., and Takagi, M.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **136**, 503–508 (2004).
- 15) Izumikawa, N., Shiraki, K., Fujiwara, S., Imanaka, T., and Takagi, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 305–309 (2004).
- 16) Nishikori, S., Shiraki, K., Yokota, K., Izumikawa, N., Fujiwara, S., Hashimoto, H., Imanaka, T., and Takagi, M.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **135**, 525–532 (2004).
- 17) Shiraki, K., Nishikori, S., Fujiwara, S., Imanaka, T., and Takagi, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 75–77 (2004).
- 18) Nishikori, S., Shiraki, K., Fujiwara, S., Imanaka, T., and Takagi, M.: *Biophys. Chem.*, **116**, 97–104 (2005).
- 19) Shoseyov, O., Takagi, M., Goldstein, M. A., and Doi, R. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3483–3487 (1992).
- 20) Takagi, M., Hashida, S., Goldstein, M. A., and Doi, R. H.: *J. Bacteriol.*, **175**, 7119–7122 (1993).
- 21) Goldstein, M. A., Takagi, M., Hashida, S., Shoseyov, O., Doi, R. H., and Segel, I. H.: *J. Bacteriol.*, **175**, 5762–5768 (1993).
- 22) Takagi, M., Kohda, K., Hamuro, T., Harada, A., Yamaguchi, H., Kamachi, M., and Imanaka, T.: *FEBS Lett.*, **375**, 273–276 (1995).
- 23) Kohda, K., Kakehi, M., Ohtsuji, Y., Takagi, M., and Imanaka, T.: *FEBS Lett.*, **407**, 280–284 (1997).
- 24) Shiraki, K., Kudou, M., Fujiwara, S., Imanaka, T., and Takagi, M.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **132**, 591–595 (2002).
- 25) Kudou, M., Shiraki, K., Fujiwara, S., Imanaka, T., and Takagi, M.: *Eur. J. Biochem.*, **270**, 4547–4554 (2003).
- 26) Shiraki, K., Kudou, M., Nishikori, S., Kitagawa, H., Imanaka, T., and Takagi, M.: *Eur. J. Biochem.*, **271**, 3242–3247 (2004).
- 27) Okanojo, M., Shiraki, K., Kudou, M., Nishikori, S., and Takagi, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 556–561 (2005).
- 28) Simons, K. and Ikonen, E.: *Nature*, **387**, 569–572 (1997).
- 29) Vestergaard, M., Hamada, T., and Takagi, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **99**, 753–763 (2008).
- 30) Sonnino, S. and Prinetti, A.: *Curr. Med. Chem.*, **20**, 4–21 (2013).
- 31) Baumgart, T., Hess, S. T., and Webb, W. W.: *Nature*, **425**, 821–824 (2003).
- 32) Hamada, T., Miura, Y., Ishii, K., Araki, S., Yoshikawa, K., Vestergaard, M., and Takagi, M.: *J. Phys. Chem. B*, **111**, 10853–10857 (2007).
- 33) Hamada, T., Miura, Y., Komatsu, Y., Kishimoto, Y., Vestergaard, M., and Takagi, M.: *J. Phys. Chem. B*, **112**, 14678–14681 (2008).
- 34) Hamada, T., Hirabayashi, Y., Ohta, T., and Takagi, M.: *Phys. Rev. E*, **80**, 051921 (2009).
- 35) Ishii, K., Hamada, T., Hatakeyama, M., Sugimoto, R., Nagasaki, T., and Takagi, M.: *ChemBioChem*, **10**, 251–256 (2009).
- 36) Kakimoto, S., Hamada, T., Komatsu, Y., Takagi, M., Tanabe, T., Azuma, H., Shinkai, S., and Nagasaki, T.: *Biomaterials*, **30**, 402–408 (2009).
- 37) Hamada, T., Sugimoto, R., Vestergaard, M., Nagasaki, T., and Takagi, M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 10528–10532 (2010).
- 38) Muraoka, T., Shima, T., Hamada, T., Morita, M., Takagi, M., and Kinbara, K.: *Chem. Comm.*, **47**, 194–196 (2011).
- 39) Hamada, T., Sugimoto, R., Nagasaki, T., and Takagi, M.: *Soft Matter*, **7**, 220–224 (2011).
- 40) Hamada, T., Kishimoto, Y., Nagasaki, T., and Takagi, M.: *Soft Matter*, **7**, 9061–9068 (2011).
- 41) Hamada, T., Hagihara, H., Morita, M., Vestergaard, M. C., Tsujino, Y., and Takagi, M.: *J. Phys. Chem. Lett.*, **3**, 430–435 (2012).
- 42) Muraoka, T., Shima, T., Hamada, T., Morita, M., Takagi, M., Tabata, K. V., Noji, H., and Kinbara, K.: *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 19788–19794 (2012).
- 43) Dhingra, S., Morita, M., Yoda, T., Vestergaard, M. C., Hamada, T., and Takagi, M.: *Materials*, **6**, 2522–2533 (2013).
- 44) Hamada, T., Morita, M., Miyakawa, M., Sugimoto, R., Vestergaard, M. C., and Takagi, M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 13990–13996 (2012).
- 45) Morita, M., Vestergaard, M., Hamada, T., and Takagi, M.: *Biophys. Chem.*, **147**, 81–86 (2010).
- 46) Vestergaard, M., Hamada, T., Morita, M., and Takagi, M.: *Curr. Alzheimer Res.*, **7**, 262–270 (2010).
- 47) Hamada, T., Morita, M., Kishimoto, Y., Komatsu, Y., Vestergaard, M., and Takagi, M.: *J. Phys. Chem. Lett.*, **1**, 170–173 (2010).
- 48) Morita, M., Hamada, T., Tendo, Y., Hata, T., Vestergaard, M. C., and Takagi, M.: *Soft Matter*, **8**, 2816–2819 (2012).
- 49) Phan, H. T. T., Hata, T., Morita, M., Yoda, T., Hamada, T., Vestergaard, M. C., and Takagi, M.: *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1828**, 2487–2495 (2013).
- 50) Vestergaard, M. C., Morita, M., Hamada, T., and Takagi, M.: *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1828**, 1314–1321 (2013).
- 51) Yoda, T., Vestergaard, M. C., Ogawa, Y. A., Yoshida, Y., Hamada, T., and Takagi, M.: *Chem. Lett.*, **39**, 1273–1274 (2010).
- 52) Vestergaard, M. C., Yoda, T., Hamada, T., Ogawa, Y. A., Yoshida, Y., and Takagi, M.: *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1808**, 2245–2251 (2011).
- 53) Yoda, T., Vestergaard, M. C., Hamada, T., Minh, L. P. T., and Takagi, M.: *Lipids*, **47**, 813–820 (2012).
- 54) Lipowsky, R.: *J. Phys. II*, 1825–1840 (1992).
- 55) Deo, N. and Somasundaran, P.: *Langmuir*, **19**, 2007–2012 (2003).