

論文の内容の要旨

論文題目 生体高分子の認識能を利用したベシクルの選択的集合化
および胚性幹細胞との複合体形成

(Vesicular Self-Aggregation and Complexation with Embryonic Stem Cell
on the Basis of Recognition of Biomolecules)

氏名 丸 直人

I. 研究の背景と目的

両親媒性分子は分子内に極性の高い親水部と極性の低い疎水部を併せ持ち、そのため、主に水中において疎水相互作用を駆動力として、様々な分子集合体を形成する。ベシクルはその一つであり、二本鎖型両親媒性分子が水中において形成する球状中空状構造体である(図 1)。その大きさは幅広く、数十ナノメートルから数十マイクロメートルのものまである。ベシクルの魅力は、二分子膜を境界として"外"と"内"が隔てられた構造にあり、この構造を利用した研究が数多くなされている。

本論文において目指すものは、ベシクルとベシクル及びベシクルと胚性幹細胞(ES 細胞)を結びつけ、集合化させることである。その目的は以下の通りである。

- (1) ベシクル集合化のミクロな理解のために、その集合化過程や形状を調べる。
- (2) ベシクルが接触した状態からさらに融合を導き、ベシクル輸送体への応用の基礎とする。
- (3) ベシクルの特性を利用した胚性幹細胞の新しい培養方法を確立する

ベシクルとベシクルもしくは ES 細胞を結びつける手段として、本論文では、生体高分子の認識能を利用することにした。これによって、生体適合性の高いベシクルの特性を失うことなく、新たな機能を付加することができる。

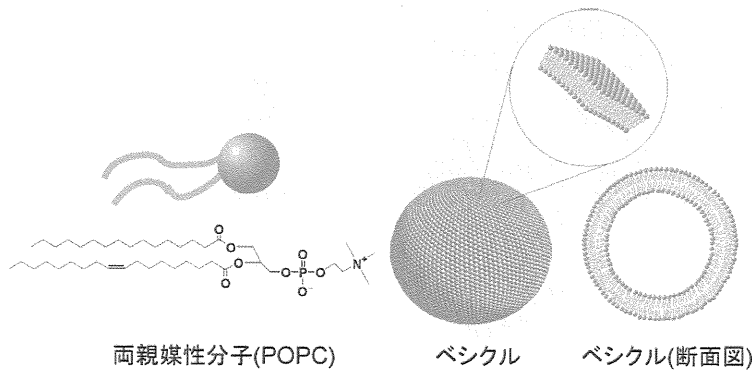


図 1 : ベシクルの構造

II. DNA 二重鎖の架橋によるベシクルの集合化

1. DNA 担持ベシクルの作製

ベシクルの接着・集合化は、ベシクル間の相互作用の足掛かりとして、また、形成される集合体の示すマクロスコピックな物性の発現プロセスとして、注目を集めている。本論文は、ベシクル表面に DNA を導入して「DNA 担持ベシクル」を作製し、DNA の二重鎖形成によってベシクルを接着、集合化させることを目指した。DNA 担持ベシクルを作製するために「DNA-コレステロール複合分子」(図 2)を設計・合成した。この分子は、二分子膜への親和性が高いコレステロール、スペーサーであるテトラエチレングリコール、DNA の三つの部位から成っている。

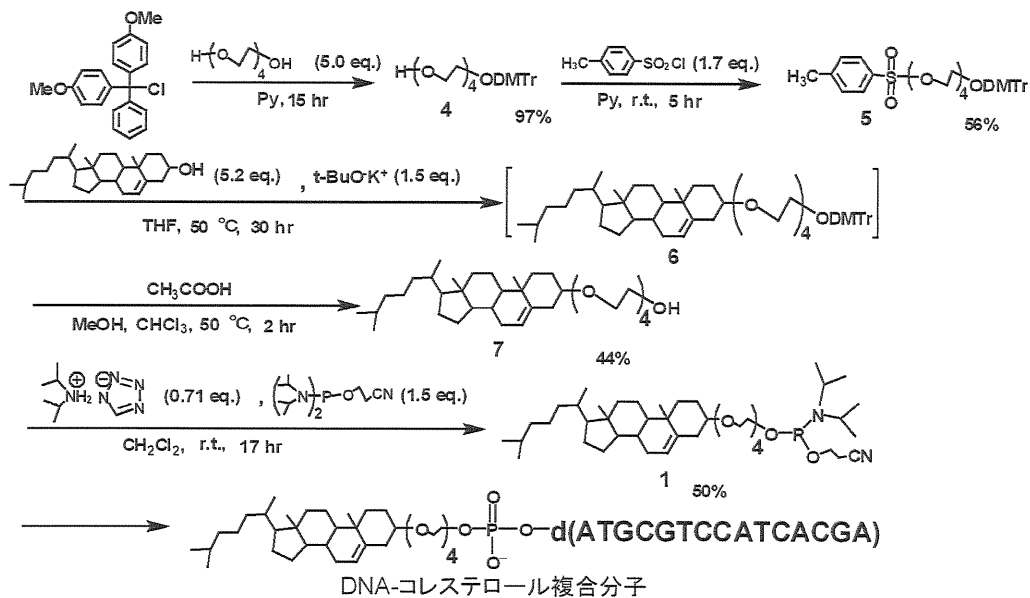


図 2 : DNA-コレステロール複合分子の合成

3. 相補的 DNA 担持ベシクルの集合化

合成された DNA-コレステロール複合分子とリン脂質である 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-3-phosphocholine (POPC) の溶液を混合し、脂質薄膜を形成させた後に、リン酸緩衝液を加えることにより「I 型 DNA 担持ベシクル」を作製した。これを用いて、以下のベシクル集合化に関する実験を行った。

はじめに、DNA 担持ベシクルを混合した試料溶液に対して、動的光散乱型粒度分布測定を行って、相補的 DNA 担持ベシクルの接着能、及びその結果できる接着体のおおよそのサイズを検証し、DNA 担持ベシクルがその塩基配列特異的に接着し合うことを確認した。続いて、凍結切断法を用いて DNA 担持ベシクル集合体を透過型電子顕微鏡で観察し、互いに相補的な DNA を担持したベシクルの集合化が直接的に観察された(図 3a)。さらに、位相差顕微鏡にて相補的 DNA 担持ベシクルの集合体を観察し、内部に多くのすき間を持つような巨大な網目状構造体が形成されていることを明らかにした(図 3b)。

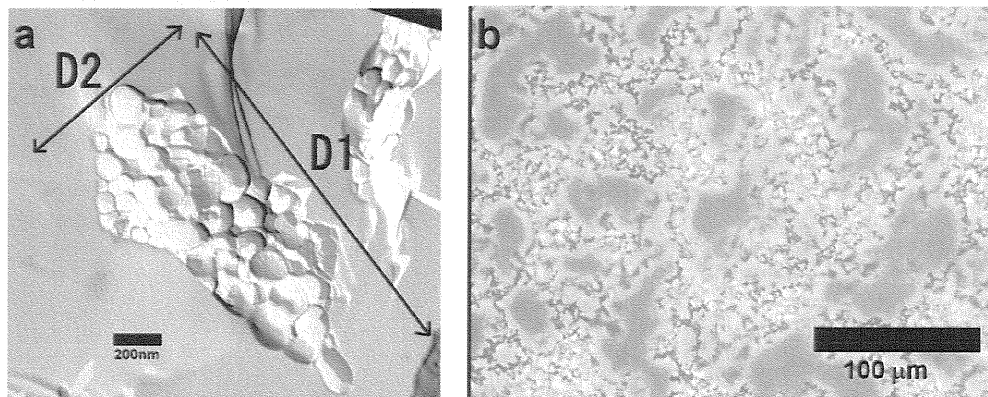


図 3 : (a) 凍結切断法による DNA 担持ベシクル集合体の透過型電子顕微鏡像。(b) DNA-担持ベシクル集合体の位相差顕微鏡像。

DNA 担持ベシクル集合体の形状に関するここまでの結果をまとめると以下ようになる。

- (1) DNA 担持ベシクルは、ミクロスコピックにはベシクルが密に詰まったクラスタ状集合体集合化する。
- (2) マクロスコピックにはすき間の多い三次元的網目状構造を持ち、1mm 以上にわたって切れ目のない構造を持つ。

さらに、T 字型に DNA とコレステロールを連結した「T 型 DNA 担持ベシクル」を作製し、「I 型 DNA 担持ベシクル」との比較により、ベシクル集合化の微視的描像を得た。

3. 網目状構造体形成過程の考察

DNA 担持ベシクルの集合体が巨大なクラスタ状にならずに、網目状構造体を形成する理由を「クラスタ凝集モデル」を参考にして考察した。まず、いくつかの DNA 担持ベシクルが、ブラウン運動を行いながら接着して非球状のクラスタを形成する。形成された非球状

クラスタは、さらにブラウン運動を行いながら接着して、より大きな集合体を形成する。クラスタの接合の際に内部の溝まで接近できないので、クラスタ間にすき間ができる。このようなクラスタのクラスタリング(clustering of clusters)を経て、枝分かれ構造が発達し、網目状構造が形成されていくと推論した。

以上の考察は、DNA 担持ベシクルの実験条件に合わせて行った簡潔な二次元シミュレーション及び DNA 担持ベシクルの集合化過程を共焦点レーザー顕微鏡によって追跡した実験結果と矛盾しないものである(図 4)。

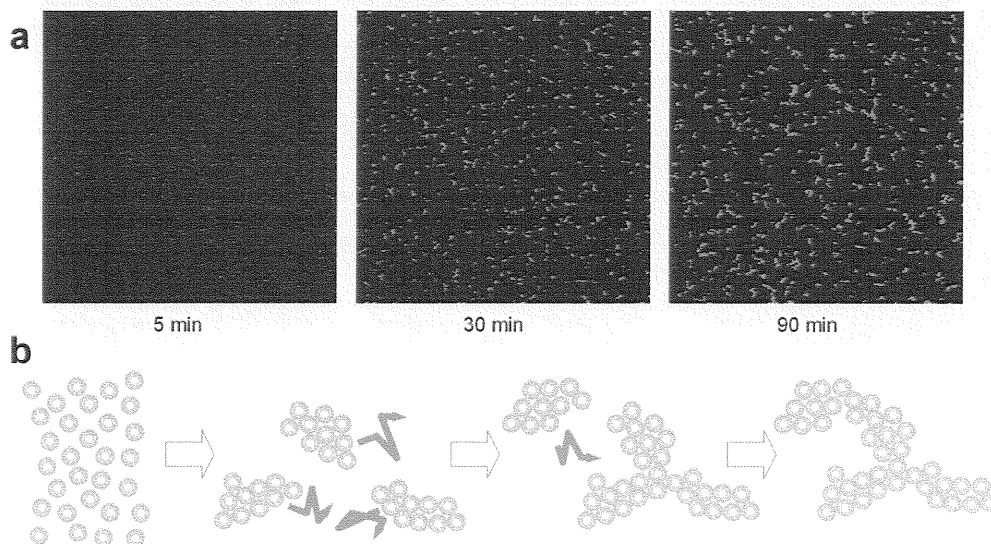


図 4 : (a) DNA 担持ベシクルの集合過程を追跡した共焦点顕微鏡観察像。(b) クラスタ凝集モデルに基づく DNA 担持ベシクル網目状構造体形成過程の考察。

II. 集合化した DNA 担持ベシクルの界面活性剤存在下における融合

ベシクルの融合とは、複数のベシクルの二分子膜が合わさっていくのに伴い内水相も混合され、一つのベシクルが形成される現象である。接着したベシクルの間に融合を誘起できれば、ベシクル間の物質のやり取りも可能となろう。そこで、集合化した DNA 担持ベシクル融合させることを目指し、界面活性剤である Triton X-100 を作用させ、二分子膜を不安定化させることを試みた。

DNA 担持ベシクルを集合化させ、様々な濃度で Triton X-100 を加えたところ、Triton X-100 の濃度が 0.6–1.2 mM の場合に、ジャイアントベシクルの形成が確認された。特に 1.2 mM の試料では、ほとんどの DNA 担持ベシクル集合体が、ジャイアントベシクルに変化していることが分かった(図 5)。

同様の実験を、集合化していない DNA 担持ベシクルを用いて行ったが、ジャイアントベシクルの形成は見られず、粒度分布測定から、DNA 担持ベシクルはミセル化していることが分かった。

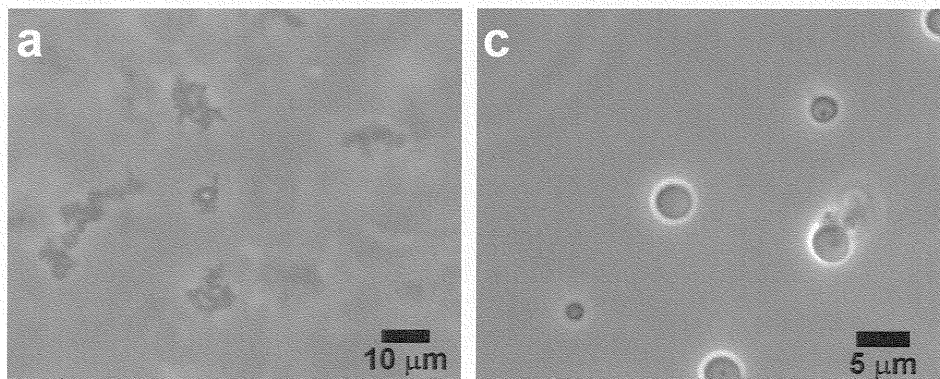


図 5: (a) Triton X-100 を添加しなかった DNA 担持ベシクル集合体。Triton X-100 (1.2 mM) の存在下, 変化した DNA 担持ベシクル集合体(b)。

さらに, DNA 担持ベシクルが Triton X-100 によってジャイアントベシクルに融合していく様子を詳しく調べるために, 溶液混合用観察チャンバーを用いて, 顕微鏡リアルタイム観察を行った。リアルタイム観察の結果から, 集合化した DNA 担持ベシクルからジャイアントベシクルへの融合は, 一度融合したベシクル同士がさらに段階的に融合していくという「ベシクルの連続的融合過程」により進行することが分かった(図 6)。

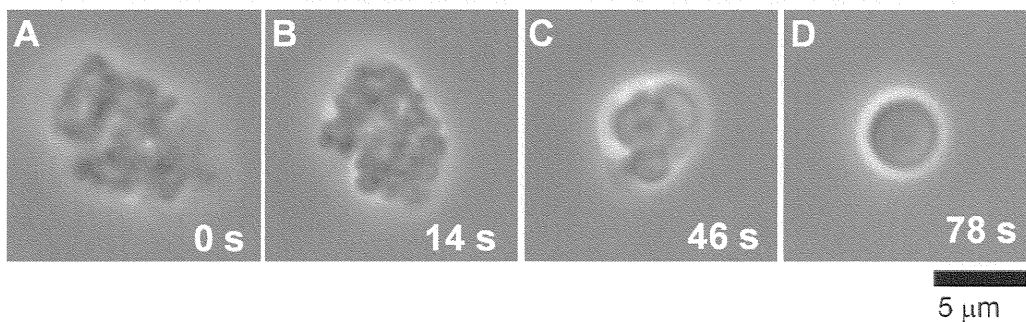


図 6 : 集合化した DNA 担持ベシクルの連続的融合の時間追跡。

以上の実験から, 集合化した DNA 担持ベシクルに生じる Triton X-100 の存在下での融合現象は「Triton X-100 存在下におけるベシクルのミセル化という変化の方向が, 集合化によって融合へと切り換わる」と表現することができる(図 7a)。

Triton X-100 はベシクルの脂質二分子膜を不安定化させ, 二分子膜に欠損を形成させる。この際, 同じように欠損がつけられたベシクル二分子膜が DNA 二重鎖で架橋されることで近くに存在していれば, 露出した疎水部鎖同士が接触し, さらに再構成が行われて, ベシクルの融合が導かれると考えられる(図 7b)。

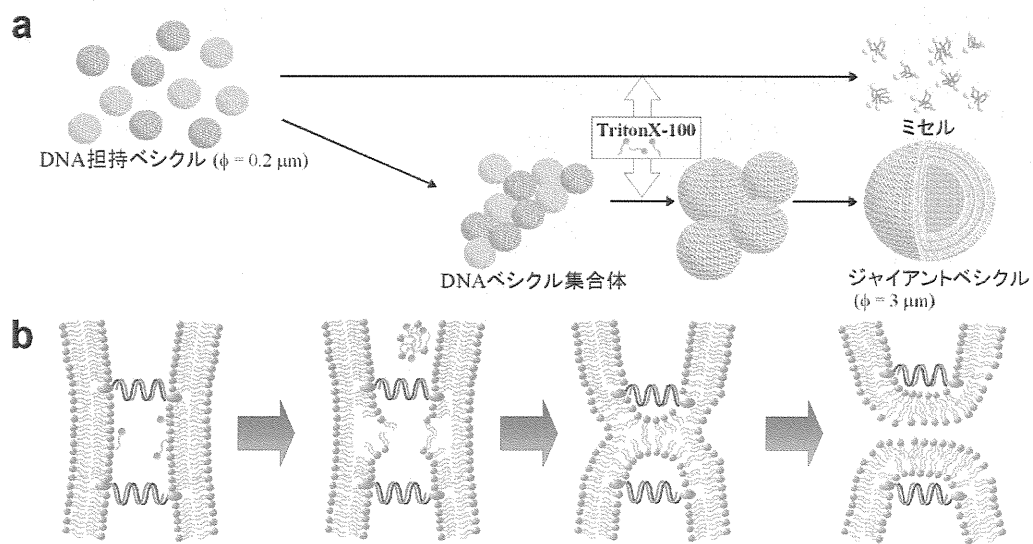


図7: (a) ベシクルはDNAに架橋されて集合化することで, Triton X-100の作用による変化がミセル化から融合に変わる。(b) DNAによって架橋されたベシクルが Triton X-100によって融合する機構の考察。

III. 細胞外基質タンパクの仲介によるベシクルと胚性幹細胞の複合体形成

1. 胚性幹細胞の新しい培養法の提唱

ES 細胞とは、様々な種類の細胞に分化する能力を持った細胞であり、再生医療の観点などから注目を集めている。ES 細胞の分化方向は ES 細胞が何を足場とし、いつ、どのような濃度の分化誘導因子にさらされているかといった「微小環境」によって決定される。そのため、いかに多様な微小環境を ES 細胞に提供できるかが、ES 細胞の分化に関する研究において非常に重要である。

そこで、本論文では従来の培養方法の問題点を補完する新しい培養方法を提唱した。図 8 のように、ES 細胞集合体の内部にベシクルが共存する「ベシクル-ES 細胞複合体」を作製し、ここから ES 細胞を分化させるという方法である。そこで、いくつかの実験から ES 細胞への親和性が明らかになったラミニンを、ベシクルに共有結合を通じて導入した「ラミニン担持ベシクル」を作製し、その ES 細胞との親和性を検証した。

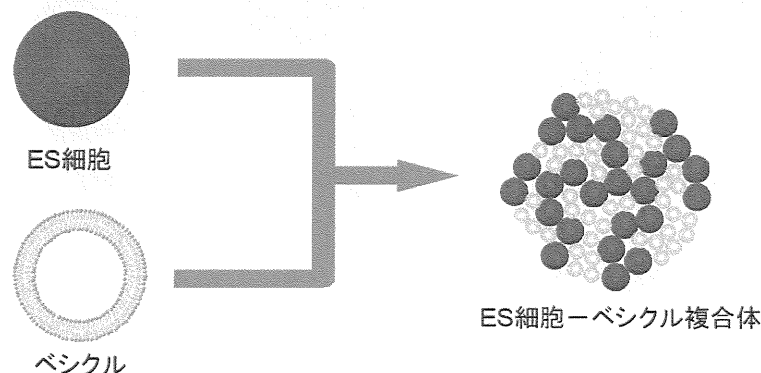


図 8 : ベシクルと ES 細胞の複合体形成

2. ラミニン担持ベシクルによるベシクル-ES 細胞複合体の形成

細胞外基質タンパクであり、分子量約 90 万と巨大な分子であるラミニンを、Derksen らによって報告された方法を用いて、チオール基とマレイミド基の結合を介してベシクルに担持させた。この際、Ellman 法によってラミニンに導入されたチオール基の量が約 80 であることを確認し、Bradford 法によって 150 nm の大きさを持つベシクルの場合には約 5 のラミニンが担持されていることを確認した。また、別途、緑色蛍光染色したラミニンを同様の方法でベシクルに担持させ、それを蛍光顕微鏡によって確認した(図 9)。

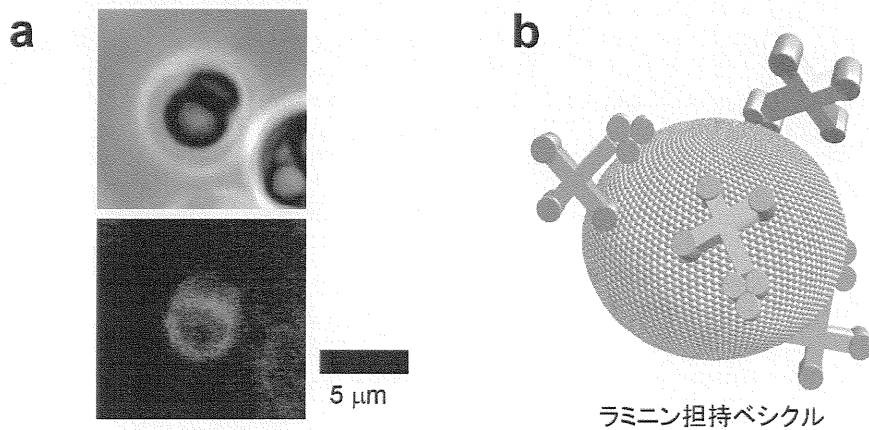


図9: ラミネン担持ベシクル。(a) 位相差顕微鏡像(上)と蛍光顕微鏡像(下)。Ex: 460-490 nm, Em: > 515 nm。(b)ベシクルの大きさが 100 nm の場合, 4つのラミネンが担持されている。

作製されたラミネン担持ベシクルと ES 細胞を培養液中で混合して, 培養を行った。同時に, ラミネン担持ベシクルに, 遊離ラミネン(緑色染色)を添加してから ES 細胞に加えた試料も作製した。培養開始から 3 日後, 「ラミネン担持ベシクルと ES 細胞を混合した試料」においては, ES 細胞集合体の内部にわずかではあるものの, ラミネン担持ベシクルの二分子膜に含ませた赤色蛍光が分布していることが認められた。さらに図 10 に示した, 「ラミネン担持ベシクルと遊離ラミネン(緑色染色)を同時に ES 細胞と混合して培養した試料」においては培養後, ES 細胞集合体内のより広い範囲に蛍光が分布していることが観察された。

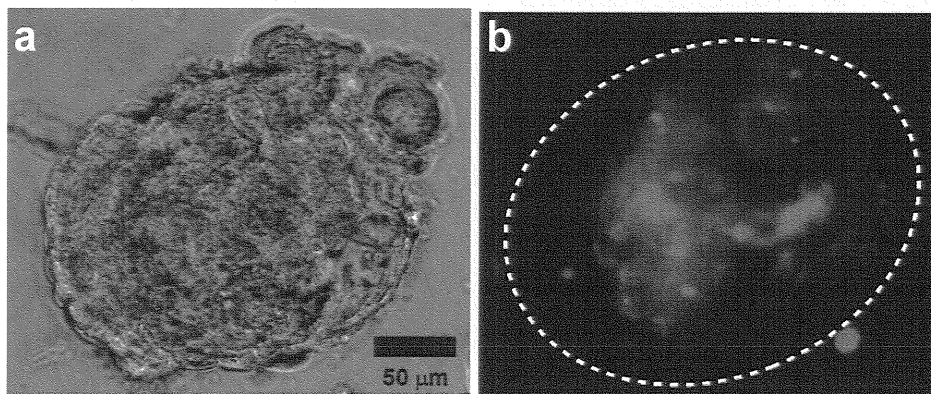


図 10 : ラミネン担持ベシクル及びラミネンと混合して培養を行った結果形成されたベシクル-ES 細胞複合体。(a) 位相差顕微鏡像。(b) 蛍光顕微鏡像によるベシクル分布の観察(Ex: 510-560 nm, Em: > 590 nm)。破線部内が ES 細胞集合体。

これらの観察結果から, ラミネンを担持したベシクルは ES 細胞との親和性を示し, その集合体に取り込まれること, さらに遊離ラミネン分子が介在すると, ベシクルが取り込まれる量が増大することが分かった。この結果から, ベシクル表面でのラミネン担持ベシクル

ルと ES 細胞の接着には、自由度があるラミニンの存在が重要であると結論付けた。以上の成果により、ベシクル-ES 細胞複合体の形成に向けた研究は大きく進展したといえる。

IV. 研究のまとめと今後の展望

本論文においてベシクルは、DNA やラミニンという生体高分子を共有結合で連結した複合分子が組み込まれることで、選択的認識能が付加され、異種のベシクルもしくは ES 細胞と複合体を形成できることが示された。本結果は、多数の両親媒性分子が自己集合化したベシクルが、さらに複合化して、その階層構造をさらに高次化したということが出来る。これらの複合体形成は、ベシクルの新しい応用にも繋がることとなろう。