

# STM 分子探針を用いて相補的核酸塩基をみる

## —電子トンネル効果による相補的核酸塩基の単分子レベルピンポイント検出—

梅澤 喜夫 (化学専攻 教授), 大城 敬人 (化学専攻修了; 同専攻客員)

従来の走査型トンネル顕微鏡 (STM) 探針の先端に核酸塩基分子を化学修飾、すなわち化学的に結合して作製した“核酸塩基探針”を用いて、試料中の相補的核酸塩基のみを単分子レベルでピンポイント的に可視化検出することに成功した。これは、探針を修飾する核酸塩基と、試料表面に並ぶ相補的核酸塩基との間で電子波動関数の重なりが生じ、分子間電子トンネル効果が発現することによる。

原子レベルの分解能をもつ STM は、原子の種類や官能基の識別能に乏しかったが、1998 年にわれわれのグループによって、化学種選択的な STM 像を得ることが可能な“分子探針”が初めて報告された。分子探針とは、通常金線を電解研磨して作製する STM 探針を、試料分子と電子波動関数の重なりが生ずる分子で化学修飾して作製した STM 探針のことである。この分子探針は、試料との間の電子波動関数の重なりに基づく STM 像のコントラストの変化が起こることから、特定官能基・化学種の違いを単一分子・官能基レベルで選択的に可視化検出することができる。

本研究では、こうした分子探針のもつ一分子可視化検出能を用い、4 種類の核酸塩基種を単一分子レベルでピンポイント可視化する方法を開発した。図 1 で示すように、核酸塩基探針と試料塩基が相補的塩基対である場合には、その電子波動関数の重なりを介して探針と試料間を流れるトンネル電流が増大する。この現象を利用すると、アデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G)、チミン (T) 探針を用いて、それぞれの相補的核酸塩基を単一分子レベルでピンポイント検出できる。

試料は、チオール (-SH) ユニットをもつ核酸塩基分子を金板上に自己組織化させた単分子膜 (SAM)、および、ペプチド核酸塩基鎖を金板上に物理吸着させたものを用いた。ペプチド核酸塩基鎖とは、DNA/RNA の糖およびリン酸部位をグリシンに変えた DNA/RNA と類似骨格をもつ核酸塩基鎖である。ペプチド 4 種類の核酸塩基を化学修飾した分子探針を作製し、この探針で試料となる核酸塩基を測定した結果、核酸塩基チオール SAM およびペプチド核酸塩基鎖の配列中に存在する相補的核酸塩基を可視化検出する

ことに成功した。たとえば図 2 で示すように、グアニン (G) とチミン (T) を含む 18 塩基からなるペプチド核酸塩基鎖をシトシン探針で測定した場合、探針がグアニン (G) の上を通るときに探針上のシトシン (C) と試料表面のグアニン (G) の間の電子波動関数の重なりが大きくなり、分子間電子トンネル効果で探針に流れる電流量が変化する。その変化を測定することで相補的核酸塩基であるグアニンのみがピンポイントで検出される。

この研究で用いた分子探針は、特定の官能基や化学種との間で、水素結合・配位結合・電荷移動相互作用に基づくトンネル電流の増加現象が起こることを利用して、さまざまな官能基の位置・配向性などを決定することができる。この分析手法は、“分子間トンネル顕微鏡”と呼ぶもので、膜・固体表面における化学種選択性のある一般的なイメージング法として今後大きく発展することが期待される。本研究は、次の論文に掲載された (T. Ohshiro, Y. Umezawa, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 103, 10-14, 2006)。

(2005 年 12 月 20 日プレスリリース)

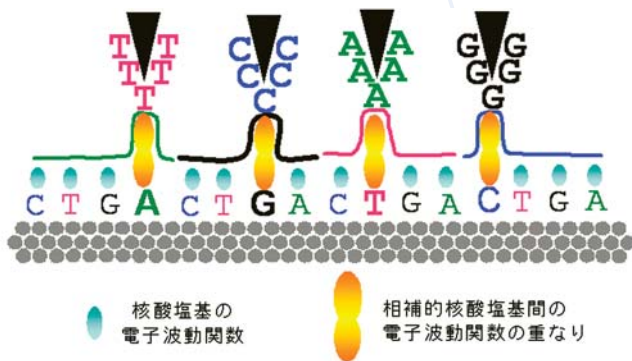


図 1: 4 種類の核酸塩基探針による相補的核酸塩基分子の選択的可視化の原理図

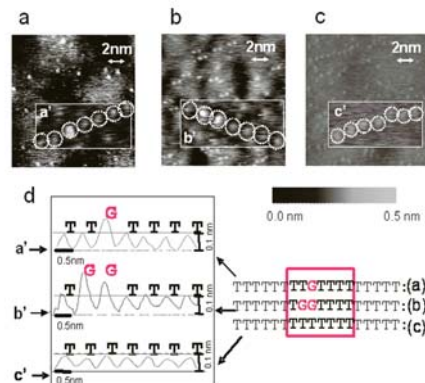


図 2: (a-c) 3 種類の 18 塩基ペプチド核酸 (PNA) をシトシン探針で測定した STM 像 (15 × 15 nm<sup>2</sup>)

# 脳の神経回路形成のしくみ解明に大きな一歩

## —神経が結合する相手を決める際の「目印」を発見—

＝ 能瀬 聡直（物理学専攻 助教授），新座（亀田）麻記子（生物化学専攻修了；物理学専攻客員）

私たちが秩序だった行動をとれるのは、神経のネットワークが、特定のパターンで脳や体内において配線されているからである。このような神経の配線は、発生過程において、神経細胞が決まった道筋に沿って突起を伸ばし、正しい相手と結合することにより形成されるが、そのしくみはよく分かっていなかった。とくに無数の細胞が密集している脳内において、神経細胞がどのようにして特定の相手を探し出すのかは大きな謎であった。しかし、われわれはカプリシャスという細胞接着分子<sup>注</sup>が、脳内の特定の領域に存在する「目印」として働き、神経細胞同士が、多数の細胞の中からお互いを見つけだし、結びつくのを手助けする役割を果たしていることを見いだした(図1右)。脳の大部分は、多数の神経細胞などが何層も積み重なった「層構造」からなっている。このことから、神経細胞は特定の層を見分けることにより、正しい神経

結合を形成すると考えられている(図1右)。本研究では、このような層に特異的な神経結合を研究するための簡単なモデルとして、ショウジョウバエの視覚系を用い、眼に存在する光受容細胞が、脳内の特定の層に配線される過程を調べた。この実験においては、特定の光受容細胞を発色させて他の細胞と区別できるようにし、その光受容細胞が脳内の多数の神経細胞のうち、どの層の神経細胞と接続するかを追跡することができるようにした。

われわれは細胞接着分子、カプリシャスが、8種ある光受容細胞のうち1種(R8と呼ばれる)のみとともに、その配線先である脳内の特定の層に局限して存在することを見いだした(図2：濃いピンク色で示した部分)。さらに、その機能を調べるために、遺伝学的にカプリシャスを失わせてみると、R8は本来の標的層とうまく結びつくことができな

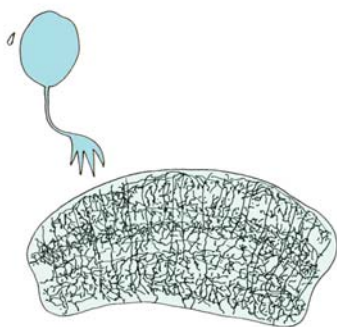
くなった(図1左)。逆に、本来カプリシャスをもたない光受容細胞R7に強制的にこの細胞接着分子を発現させると、その配線先が変わり、カプリシャスが存在しているR8の標的層に結合するようになった。以上の結果から、カプリシャスをもつ神経細胞は同じくカプリシャスをもつ神経細胞層と結合する、という層特異的な神経結合のしくみが明らかにされた。生体内でこのような脳の神経配線のしくみが確認されたのは初めてのことである。

本研究は、Neuron誌2006年1月19日号に掲載された。

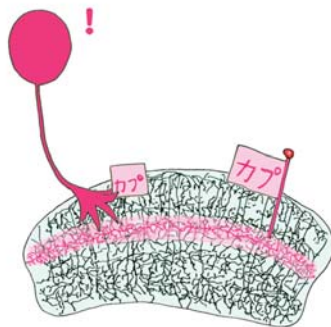
(2006年1月19日プレスリリース)

注) 細胞接着分子とは、細胞の表面に存在して細胞間の接着を介在する分子のこと。カプリシャスを発現する細胞同士はくっつくようになることから、分子間の結合を介して、特定の神経間の結合を促進する働きをしていると考えられる。

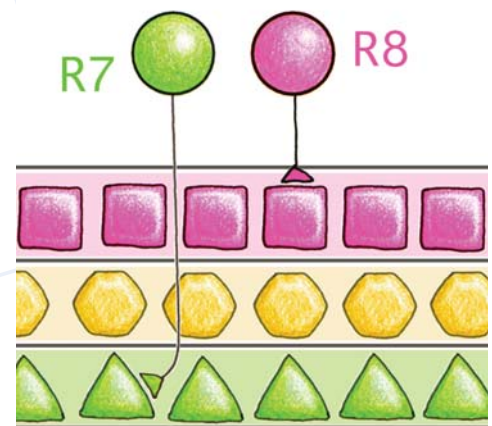
目印のない時



目印のある時



R7 R8



■ 図1：カプリシャスは脳内において特定の細胞を結ぶ「目印」として働く

■ 図2：ショウジョウバエ光受容細胞が脳内の特定の層に配線する様子

# 単頭型鞭毛ダイニンの機能, 構造, 分子系統

神谷 律 (生物科学専攻 教授), 八木 俊樹 (生物科学専攻 助手)

真核生物の鞭毛(繊毛と呼ばれるものと同じ)は高速の波動運動を行う細胞運動器官である。内部は9本の周辺微小管と呼ばれるタンパク質の管が2本の微小管を囲んだ構造をもち(図1), 周辺微小管上に並んでいるダイニン分子が局所的なすべり運動を行って波動を発生する。ダイニンには外腕ダイニンと内腕ダイニンがあり, 互いに協調して働いていると考えられるが, それぞれがどのような働きをしているのかは, まだよく分かっていない。しかし最近, とくに不明な点が多かった内腕ダイニンの構造と機能の一端が明らかになった。

ダイニンは複数のタンパク質からなる巨大な複合体で, 重鎖と呼ばれるもっとも大きなタンパク質(分子量40-50万)がATPを分解し, その際に得られるエネルギーを利用して微小管をすべらせる。この分野でもっとも研究が進んでいる単細胞緑藻のクラミドモナスでは, 外腕ダイニンは重鎖を3本もつ三頭型で, 内

腕ダイニンは重鎖を1本もつ単頭型と2本もつ双頭型に分けられる。外腕と双頭型内腕ダイニンの各重鎖の遺伝子配列はすでに決定されている。しかし, 鞭毛中に多種存在する単頭型ダイニン重鎖の配列は決定されていなかった。

われわれは, 各種ダイニンを欠失したクラミドモナス突然変異株を作製して, その運動性から各ダイニンの機能を探る研究を行っている。最近, あらたに分離したida9という変異株を解析したところ, 単頭型内腕ダイニン(少なくとも6種ある)のうちタイプcという分子種だけを失っていることが判明した。興味深いことに, その運動性は通常の溶液中では野生株とほとんど同じだが, 溶液の粘度を高くすると運動速度が激減した。すなわち, このダイニンは細胞が高負荷下で運動する場合に限ってとくに重要であると考えられる。遺伝子の検索によると, このようなタイプのダイニンはヒトの繊毛にも存在するらしい。

さらに, タイプc以外の単頭型ダイニンの重鎖についても部分アミノ酸配列を決定した結果, すべてについてゲノム配列との対応付けを行うことが可能になった。これらのダイニン間の系統関係を調べたところ, ダイニンは複数の頭部をもつグループ(細胞質ダイニンを含む)と単頭型グループに大きく分かれ, 単頭型グループはさらに2つのサブグループに分かれることが判明した(図2)。これらの結果は, 鞭毛ダイニンには機能の異なる数種のグループが存在するという, これまでの生理学研究の結果とよく合う。さらに, この解析によって, 鞭毛内に微量しか存在しない新種のダイニンが発見された。このように, 単頭型内腕ダイニンの変異株の運動性や重鎖構造が明らかになったことは, 鞭毛運動機構の研究にとって重要である。

なお, この研究の一部は Journal of Biological Chemistry 280, 41412-41420 に掲載されている。

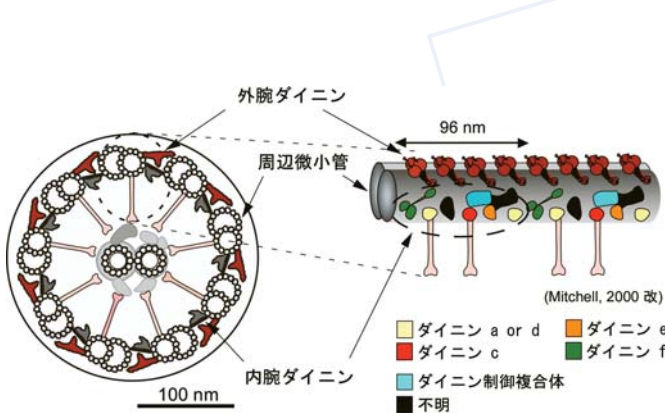


図1: 左図, 鞭毛の横断面像, 右図, 周辺微小管上のダイニンの配列。ダイニン外腕は三頭型複合体で, 9本の周辺微小管上に24 nm 間隔で並んでいる。ダイニン内腕はタイプfが双頭型, それ以外の6種は単頭型で, それぞれが96 nmに1個ずつ存在する。

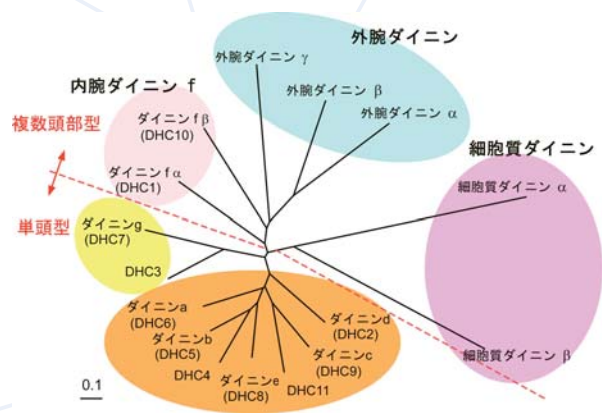


図2: クラミドモナスゲノムにある16種類のダイニン重鎖のアミノ酸配列(予測配列を含む)を用いて作成した系統樹。2つの遺伝子を結ぶ枝の長さが短いほど進化距離が短く, 互いに近縁であることを表す。細胞質性ダイニンは2種類(α型, β型)存在し, それぞれホモダイマー(同種の二量体)を形成することが知られている。

# 母性遺伝のしくみ

## —精子ミトコンドリア DNA の破壊—

西村 芳樹 (生物科学専攻修了\*), 成瀬 清 (生物科学専攻 講師)

多くの動植物において、母親のみから子孫に伝えられる一群の遺伝子がある。ミトコンドリアや葉緑体の遺伝子はその典型である。とりわけミトコンドリア遺伝子は、母性遺伝するという特徴から、人類の進化と起源 (ミトコンドリア・イヴ) を探索するための重要な手がかりとなり、さらに実用面では親子鑑定や犯罪捜査にまでさまざまに利用されてきた。

それでは、これらの遺伝子はどのようなしくみで母性遺伝するのだろうか。一般には、母親の卵は大きく多量のミトコンドリアを含むのに対し、精子は小さくわずかな量しかもたないため母性遺伝が引き起こされるという単純な説明が受け入れられている。しかし、これに対する大きな矛盾として、オスとメスがまったく同じ大きさの配偶子で生殖を行うにも

かかわらず母性遺伝が起きる生物 (緑藻や細胞性粘菌など) が知られていた。約半世紀に渡る精力的な研究の結果、これらの生物の母性遺伝は、片親のミトコンドリア DNA や葉緑体 DNA が積極的に破壊されることで引き起こされる事が分かってきた。今回の研究ではさらに、卵生生殖を行う脊椎動物 (めだか) においても、精子のミトコンドリア DNA が受精後に破壊されることが確認され、片親 DNA の破壊が、粘菌、藻類、植物から動物など真核生物の母性遺伝に共通する基盤である可能性が示唆された。

われわれはまず、これまで観察が難しかった精子のミトコンドリア DNA を、高感度な DNA 特異的色素サイバグリーンを用いて可視化することに成功した。この手法で精子を観察したところ、成熟過程で精子ミトコンドリア DNA は5分の1程度に減少し、受精後はまったく見えなくなった。さらに精子を1個ずつ赤外線レーザー顕微鏡「光ピンセット」で捕捉して試験管内に回収し、DNA を抽出した後、精子に由来するミトコンドリア DNA の状態を PCR によって分析したところ、受精後における精子ミトコンドリア DNA の完全な破壊を分子レベルで確認することができた。

精子ミトコンドリアは、動物では受精後、卵内で崩壊するが、興味深いことに精子ミトコンドリア DNA の破壊は精子ミトコンドリア自身の崩壊よりも早く観察された。これは雄ミトコンドリア

DNA を閉じ込めたまま速やかに破壊することで、雌雄のミトコンドリア DNA 間の組み替えが引き起こし得る問題を未然に防ぐためなのかもしれない。

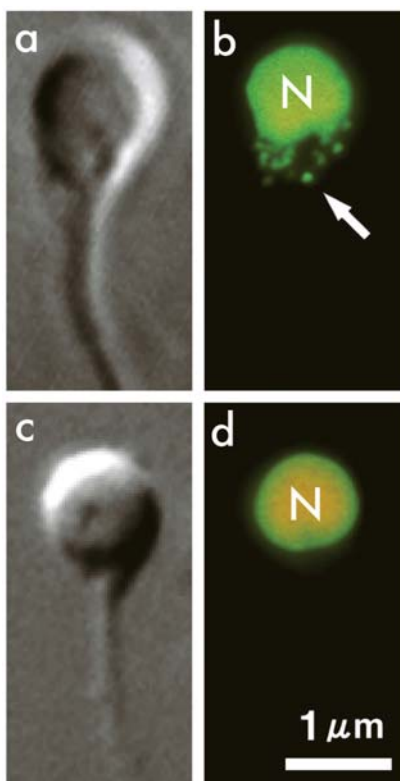
母性遺伝は、ヒトを含む動物から植物、藻類、粘菌に至るまで、多くの真核生物に普遍的に観察される現象である。今後さらにミトコンドリアや葉緑体の片親 DNA の破壊を担う酵素群、および破壊を制御する分子機構の解析を進め、さらにさまざまな生物間における共通点や相違点を一つ一つ明らかにしていくことで、母性遺伝機構の全体像が理解できるのではと考えている。

本研究は、生物科学植物学の黒岩常祥教授 (東京大学名誉教授、現立教大学教授) のご指導のもと、成瀬の協力を得て西村が行ったものである。異なる研究室間での協力が、研究の進展においていかに重要であるかを理解する良い機会となった。

この研究は 2006 年 1 月 31 日に発行の「PNAS (アメリカ合衆国科学アカデミー紀要)」誌に掲載された。またその後、Nature の Research Highlight, Nature Structural and Molecular Biology の Research Highlight, Science オンライン版の ScienceShots などにも紹介された。

(2006 年 1 月 24 日プレスリリース)

\* 現在、コーネル大学博士研究員



受精後における精子ミトコンドリア DNA の消失。

受精前 (a,b) と後 (c,d) の精子の位相差像 (a,c) とサイバグリーン染色像 (b,d)。受精前には細胞核 (N) の外に、ミトコンドリア DNA (矢印) が観察される。受精 1 時間後の精子ではまったく観察されなくなった。