

# 原子間力顕微鏡で吸着分子は見えるか？

福井 賢一 (化学専攻)

fukui@chem.s.u.-tokyo.ac.jp

岩澤 康裕 (化学専攻)

iwasawa@chem.s.u.-tokyo.ac.jp

原子間力顕微鏡 (AFM) は走査トンネル顕微鏡 (STM) から派生した走査プローブ顕微鏡の一つで、カンチレバーと呼ばれる小さな‘てこ’の先につけた探針先端と試料表面との間に働く力を用いて表面構造を画像化する。STM と違って試料の導電性を必要としないことから、対象となる物質系は格段に広がる。AFM で通常用いられるコンタクトモードは両者間に斥力が働く領域で測定を行うが、良いコントラストの像を得るために必要な数 nN は探針先端の一原子と表面の一原子で耐えられる大きさではない。劈開した雲母などの表面について原子スケールの像が容易に得られるが、それは多数原子が関与した結果の表面周期像である。この事からも分かるように AFM で吸着分子を見るのは非常に困難で、分子を探針で掃いてしまっ下地の (周期) 構造だけが見えるというのがよくあるケースである。

それに対し近年、探針先端と試料表面間の引力を高感度で測定し構造を画像化するノンコンタクトモード (NC-AFM) を用いることで表面原子欠陥を含む原子像が得られるようになってきた。図 1 は典型的な金属酸化物の一つである二酸化チタン単結晶の (110) 清浄表面の NC-AFM 像で [001] 方向に伸びた酸素原子の列 (図 2) が明るい線として観測されている。([1])。列上のところどころに見られる黒い点は酸化物の表面反応において重要な役割を果たす酸素原子欠陥である。この像は NC-AFM により金属酸化物の原子像観測に成功した最初の例である。ノンコンタクトモードはその名の通り非接触でコンタクトモードに比べて数桁小さい力を用いて

画像化するため、吸着分子が見える可能性が高くなる。そこで図 1 の表面を室温で酢酸の蒸気に晒して酢酸イオンの単分子吸着層をつくり観察を行った。図 3 に示すように酢酸イオンの一つ一つが輝点として画像化されている。また、被覆率がさらに小さく分子が孤立している場合の観察にも成功した ([2])。図 2 のモデルに示すように酢酸イオンによる周期構造は下地に対して等価な 2 種類のドメインを取り得る。実際、図 3 の中には 3 つのドメインが観測された。これらの結果は、得られた像が実際の分子配列を観測したものである確かな証拠であり、AFM で吸着した小分子の観察が可能なことを世界に先駆けて示すことに成功した。更にドメイン A と B の間の領域はドメイン内部に比べて分子の像の乱れが大きく、境界でどちらのドメインにそろわなければならない分子を捉えていると考えられる。

非接触原子間力顕微鏡はその画像化の理論的裏付けやその測定法の改良も途上であるが、STM に匹敵する空間分解能を持っている分子とその動きを観ることが可能なことを実証することができた。これにより STM の対象となり得なかった絶縁性物質の原子分解能の表面化学が拓かれようとしている。

## 参考文献

- [1] Ken-ichi Fukui, Hiroshi Onishi, and Yasuhiro Iwasawa, Phys.Rev.Lett. 79(1997)4202.
- [2] Ken-ichi Fukui, Hiroshi Onishi, and Yasuhiro Iwasawa, Chem.Phys.Lett. 280(1997)296.

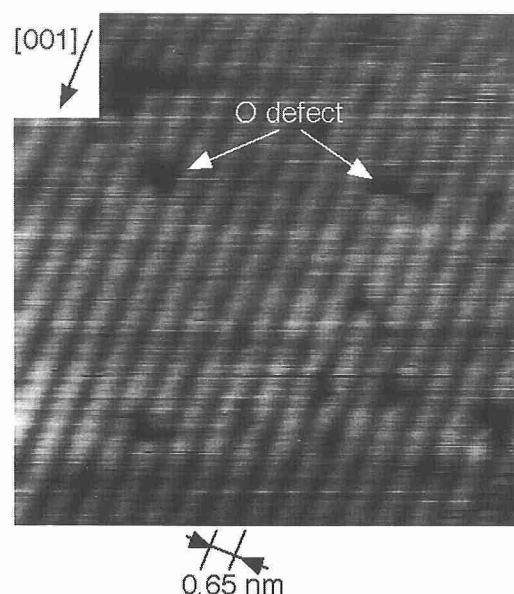


図 1 TiO<sub>2</sub> (110) 清浄表面の NC-AFM 像 : 10.6×10.6nm<sup>2</sup>。  
表面から突き出した酸素原子列が明るい線として観測される。

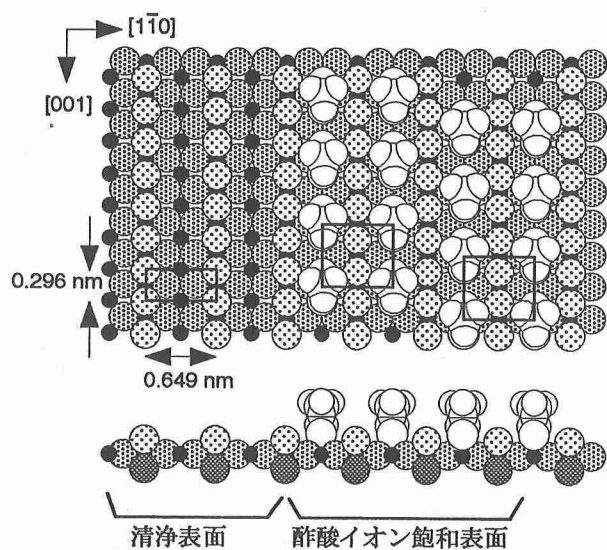


図2  $\text{TiO}_2$  (110) 清浄表面及びその上の酢酸イオン単分子層のモデル。小さな黒丸は  $\text{Ti}^{4+}$ 、ドット入りの丸は  $\text{O}^{2-}$ 。酢酸イオンによる周期構造については、下地に対して等価な2種類のドメインを図示した。

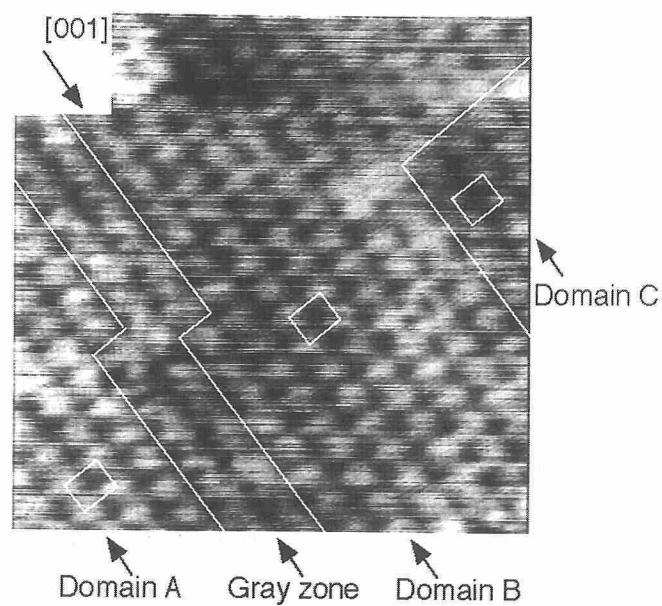


図3  $\text{TiO}_2$  (110) 表面上に飽和吸着し  $(2 \times 1)$  周期に配列した酢酸イオンの NC-AFM 像:  $8.4 \times 8.4 \text{ nm}^2$ 。真ん中の Domain B に対して  $[001]$  方向に半周期ずれた Domain A 及び Domain C が両側に観測された。Domain A と B の間には分子が不安定な領域が見られる。

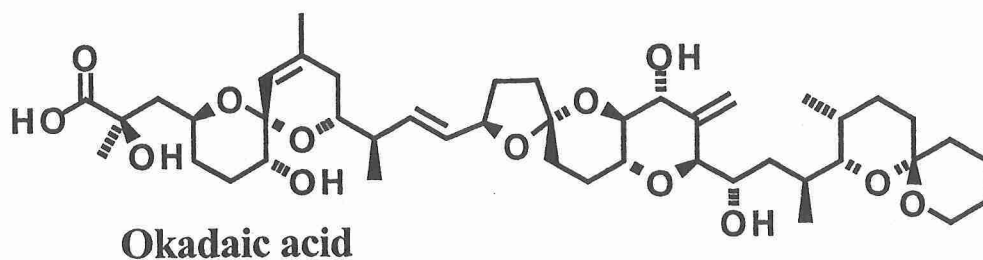
# タンデム質量分析による生合成研究のスケール・ダウン

橘 和 夫 (化学専攻)  
ktachi@chem.s.u-tokyo.ac.jp

生物の二次代謝産物の生合成経路解明は、近年こそ変異による酵素欠落体を用いるアプローチが盛んになりつつあるが、対象分子そのものを用いた化学的解明には、前駆体と推定される分子を同位体元素で標識したものが生体内で研究対象分子のどこに組み込まれるかを調べる方法が一般的である。古くは放射性同位体を用いられ、生産分子を細かく切断することで同位体の分子内での位置を決定した。現在ではこれに代わり、安定同位体の核磁気共鳴による直接観察、または近隣核化学シフトへの同位体効果により、分解反応なしで同位体の位置が特定可能となった。しかしこの方法での検出には数  $\mu\text{mole}$  の精製分子を要する難点がある。そこで今回検出感度が遥かに勝る分析法として、同位体標識位置の決定における質量分析の有効性を試みた。タンデム質量分析とは、真空中にて先ず静電的に加速した試料分子イオンを中性子1個分の精度で質量選別し、この後一旦昇圧してヘリウム原子などに衝突させて物理的に断片化、これを再度質量分析することで、各断片の質量分布（今回の場合は同位体数）を得るというものである。この意味で放射性同位体を用いる分析を一気に行う発想に近い。

今回研究対象として用いたオカダ酸は当初、海綿およ

び食用二枚貝から独立に単離された海産毒で、タンパク質脱リン酸化酵素の特異的阻害試薬として細胞生理学の研究分野で重用される天然物である。本化合物の炭素鎖形成に関して、類似の基本骨格を有する放線菌由来のポリエーテルやマクロリド抗生物質群に知られる酢酸の単純な縮合伸長で説明できないことは分かっているが、その他の詳細は未解明である。今回、この生産生物である渦鞭毛藻を $^{18}\text{O}$ 含有の分子状酸素、酢酸、または水の存在下でそれぞれ70 mL規模で培養し、同位体ラベルされたオカダ酸を数 $\mu\text{g}$ ずつ精製した。各試料のタンデム質量分析で得られた開裂ピークの同位体比を順次比較し、各酸素原子の前駆体からの取込み率を定量することで、本化合物中のすべての酸素原子の由来が帰属された。これより本化合物の生合成に関するいくつかの考察が可能となった (*J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 147-151)。本方法論は核磁気共鳴法に比べて数100倍の感度を有し、これにより培養の小規模化、同位体試薬量の低廉化、および試料単離の迅速化が可能となる有効な方法であることが実証された。なお、以上は(財)サントリー生物有機科学研究所との共同研究による成果である。



## 匂い識別と嗅覚受容体遺伝子

坂 野 仁 (生物化学専攻)  
sakano@hongo.ecc.u-tokyo.ac.jp

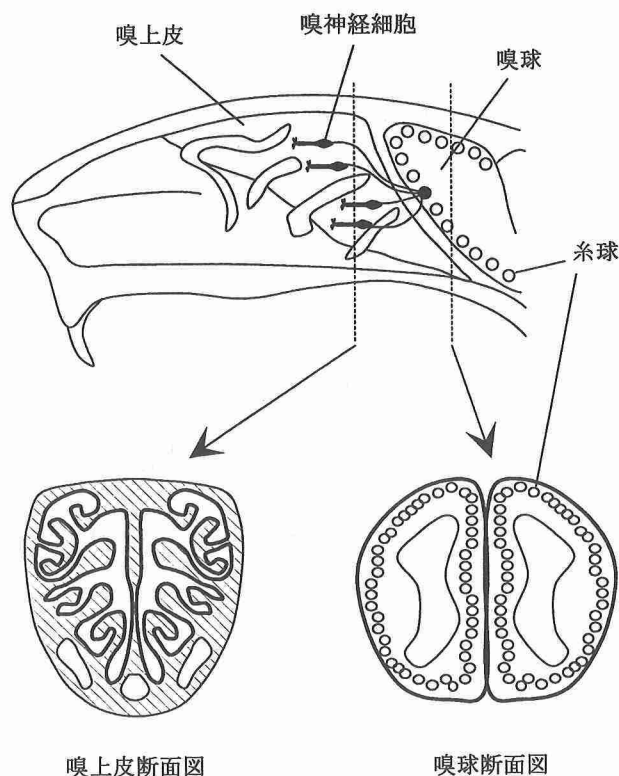
高等動物における嗅覚系の研究は、数年前 Axel のグループによって嗅覚受容体遺伝子が単離されて以来、その進展には目をみはるものがある。マウスの嗅神経細胞では、約1000種類存在する嗅覚受容体遺伝子の中から1つが選択的に発現し、2つある対立遺伝子座のうちの一方の allele からのみ転写が起こる。また、嗅球への投射に関しては、同じ種類の嗅覚受容体遺伝子を発現している嗅神経細胞はその軸索を嗅球上の特定の糸球に投射する。(図)

当研究室では、嗅覚受容体遺伝子の相互排他的発現調節、及び嗅神経細胞の軸索投射のメカニズムを解明するため、マウス嗅覚受容体遺伝子 MOR28 を含む 450kb の DNA 領域をマウスに導入してその解析を進めている。トランスジェンとして持ち込まれた外来性の MOR28 遺伝子は tau-lacZ で標識してあるので、これを発現する嗅神経細胞は軸索を含め X-gal により青色に染色、あるいは抗  $\beta$ -gal 抗体により検出することが出来る。このトランスジェニックマウスにおける外来性の遺伝子の発現を内在性のものと区別するため、当グループではさらに、内在性の MOR28 遺伝子をノックインの手法を用いて別のレポーター遺伝子 gap-GFP で標識し、その発現細胞を蛍光により緑色に検出できる様にした。

このノックインマウスを、先のトランスジェニックマウスとかけ合わせ、同一組織中で外来性と内在性、2種類の MOR28 遺伝子の発現を区別して解析したところ、それぞれが別の嗅神経細胞で互いに排他的に発現し、同一細胞で同時に発現されることはないことが明らかになった。また、外来性の MOR28 遺伝子を発現する嗅神経細胞の投射先は、内在性 MOR28 遺伝子を発現する細胞の投射先と同一ではなく、それらに隣接、あるいはごく近傍に位置する別の糸球であることが判明した。これらの結果は、外から導入された MOR28 遺伝子が内在性 MOR28 遺伝子と基本的には同じ構造を持つにも拘わらず、遺伝子発現や軸索投射に際してはそれぞれが区別された独立の嗅覚受容体遺伝子として振る舞うことを示唆している。即ち、トランスジェンとして新たな嗅覚受容体遺伝子を導入することで、新しい投射先が用意されたと考えられる訳である。これらの結果は、一嗅覚受容体遺伝子：一嗅神経回路という嗅覚系における新たなルールを示唆するものとして興味深い。

ここに紹介した研究では、においの識別及びフェロモン受容の分子機構の解明を目指しているが、応用面での将来性も極めて高い。下等動物から人間に至るまで、嗅覚の果たす役割は重要で、動物一般に見られる摂食行動や、生殖活動はもとより、免疫機能の高揚及び精神安定

効果など人の健康や社会的行動にも深くかかわっている。しかしながら、嗅覚を分子レベル、特に遺伝子レベルで理解し、人工的に操作する事によって、動物や昆虫の生殖行動をコントロールし、更には医薬品や化粧品の分野などに応用することは、これ迄のところほとんど試みられていない。嗅覚系は極めて敏感な感覚受容機能であり、フェロモンの研究でも明らかのように、遠く離れた場所から拡散する一分子をも識別する高い能力を備えている。また線虫などの走化性にもその原型が見られ、ハエなどにも最近嗅覚受容体遺伝子の同定が報告されている。これらの線虫や昆虫などを用いて、新たな嗅覚受容能力を賦与された遺伝子組み換え個体を作製すれば、微量物質の検出及びスクリーニングを迅速に行なう事が可能になる。またアロマセラピーに代表される様に、嗅覚の免疫系や神経系に与える効果は大きく、今後の応用が期待される。



マウス嗅覚器の構造

# 消化管における上皮・間充織相互作用の分子機構： 特に肝細胞増殖因子(HGF)について

深 町 博 史 (生物科学専攻)  
h-fukama@biol.s.u-tokyo.ac.jp

多細胞生物の発生において、組織間での相互作用は非常に重要な役割を果たしている。特に1924年に Spemann と Mangold によって発表された、イモリの初期胚における形成体 (Organizer) による神経誘導の研究は有名であり、最近の急速な研究の発展の結果、この誘導には Bone Morphogenetic Proteins や Chordin/Noggin 等の液性因子が関与していることが示されている。

後期発生においても、組織間の相互作用は器官形成や組織分化に重要な機能を果たしている。私が研究している消化管の場合、内胚葉由来の上皮と中胚葉由来の間充織から器官が形成されるが、これらの由来の異なる組織間での相互作用が消化管の組織分化に非常に重要である。例えば、最近我々が調べている *Fkh6* という転写因子 (これは消化管の間充織で発現され、上皮では発現されない) を欠失したトランスジェニック・マウスでは、消化管上皮細胞の増殖が昂進し、その分化が異常になる (図1)。これは *Fkh6* の欠失によって、間充織から分泌される上皮の増殖・分化を調節する因子の発現が異常となるためだと考えられるが、この因子は未だ同定されていない。今回は、上皮・間充織相互作用に関与する因子が同定され、その調節機構が明らかになった例について紹介する。

肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor; HGF) は、当初、肝細胞の増殖を引き起こす因子として同定されたが、その後、種々の上皮・間充織相互作用に関与することが明らかになった。消化管について我々が調べた結果、HGF タンパク質が消化管上皮細胞の増殖を部域特異的に (胃>腸>食道>の順に、上皮細胞の反応性が高い) 促進すること、HGF の発現は上皮では見られず間充織でのみ見られることが明らかになり、HGF は消化管間充織から分泌される上皮増殖調節因子の一つであると結論された<sup>(1)</sup>。更に、HGF が胃上皮の腺管形成時

期に強く発現されること、HGF 発現細胞と共に胃上皮を培養すると腺管形成が見られることから、HGF は上皮の増殖調節だけでなく、形態形成誘導にも関与していると考えられる<sup>(2)</sup>。

HGF は、一本鎖の不活性な前駆体として細胞から分泌された後、酵素によって分断され、二本鎖の活性型になる。最近この酵素として HGF Activator (HGFA) が同定された。そこで消化管について調べたところ、HGFA は間充織では発現されず上皮でのみ発現されること、また上皮の形態形成時期にその発現が高まることが明らかになった<sup>(3)</sup>。以上の結果は、消化管における HGF の作用は、間充織による HGF の発現と、上皮による HGFA の発現という二つのレベルで調節されていること、またその両方の発現が胃上皮の形態形成期に高まることによって、腺管形成が誘導されることを示唆している (図2)。

このように、HGF は消化管の上皮・間充織相互作用を仲介する重要な因子の一つであるが、残念ながら、上記の *Fkh6* のターゲットではないことが示された。最近トランスジェニック・マウスの作製が広く行われるようになり、*Fkh6* 欠失マウス以外にも、消化管の上皮・間充織相互作用に影響する例が報告されている。これらのマウスを調べることにより、上皮・間充織相互作用の詳細が明らかになると期待されている。

## 参考文献

- (1) Biochem. Biophys. Res. Commun. (1994) 205, 1445-1451.
- (2) Biochem. Biophys. Res. Commun. (1996) 222, 669-677.
- (3) Biochem. Biophys. Res. Commun. (1998) 253, 477-484.



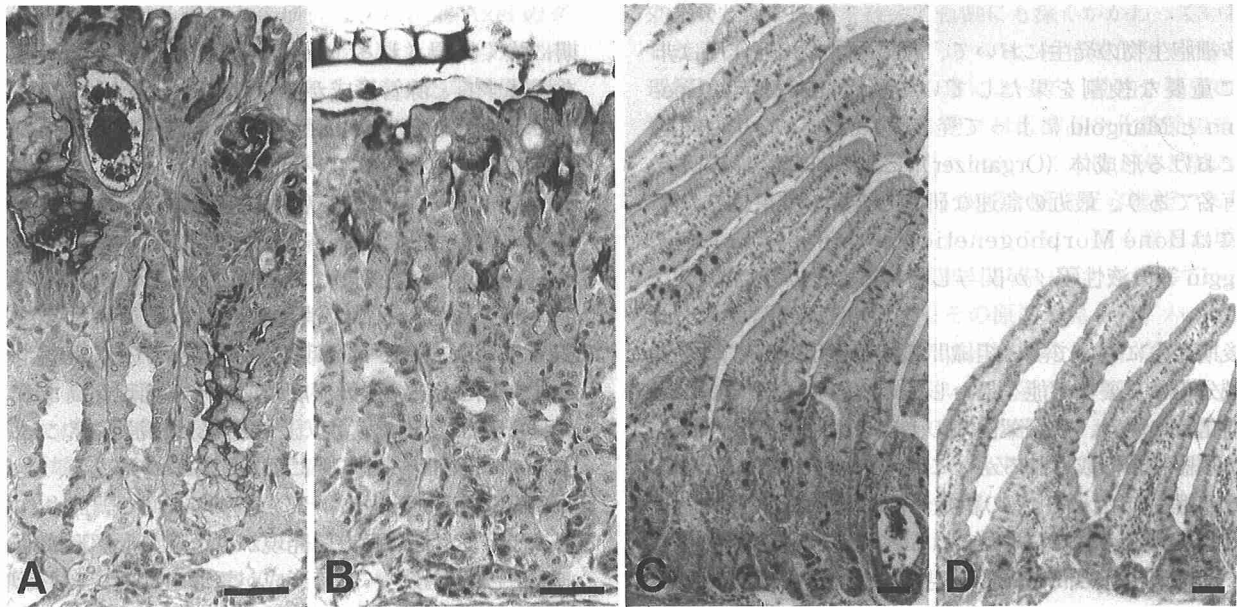


図1： *Fkh6* 欠失マウスにおける消化管の組織像。A, *Fkh6* 欠失マウスの胃。B, 正常マウスの胃。C, *Fkh6* 欠失マウスの十二指腸。D, 正常マウスの十二指腸。胃の上皮の構造は *Fkh6* 欠失によって著しく乱れる。*Fkh6* 欠失によって上皮細胞の増殖が高まるため、*Fkh6* 欠失マウスの十二指腸の絨毛は、正常の2倍近くに長くなる。Bar は  $50\mu\text{m}$ 。

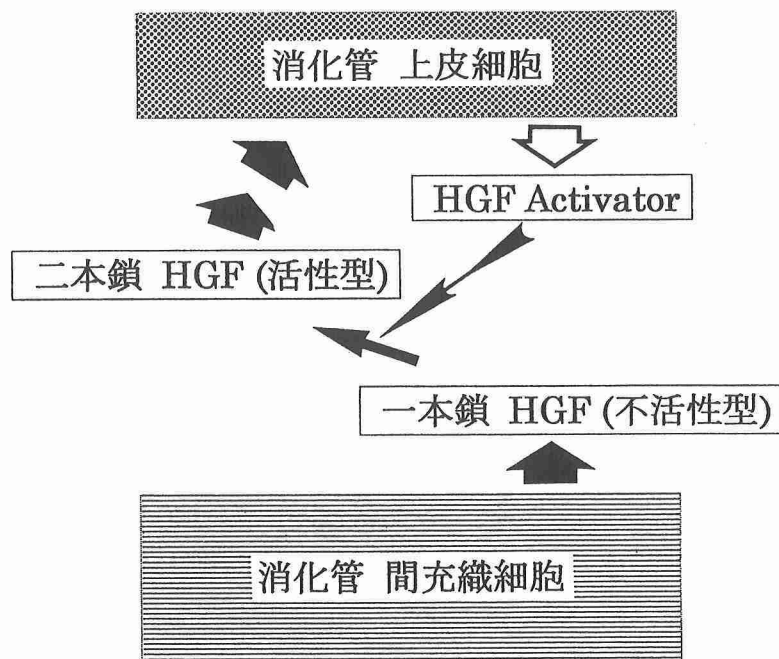


図2：消化管における HGF と HGFA の作用機構の模式図。

# mRNAの制御

上 園 幸 史 (生物科学専攻)

uesono@biol.s.u-tokyo.ac.jp

遺伝子の発現は転写、翻訳、蛋白質のレベルで制御されている。転写制御、また蛋白質の修飾、分解、局在といった制御機構に関する研究は膨大な研究がなされている。一方、合成された mRNA はすぐ蛋白質に翻訳されるだけで、制御があったとしても特殊なケースに限られると考えられがちである。ところが最近の研究は mRNA の制御に新たな視点を見い出している。

真核生物の mRNA の構造は図に示すように、5' 末端にキャップ、3' 末端にポリ A 鎖という特殊な構造が付加され、その間に 5' 非翻訳領域 (5'UTR)、翻訳領域、3' 非翻訳領域 (3'UTR) が存在している。我々が材料として用いている出芽酵母でも基本的に構造は同じである。この mRNA から見た遺伝子発現はこれらの構造により多彩な制御を受ける。

5'UTR はどういう役割をもっているか？例えば出芽酵母では、アミノ酸合成に必要な GCN4 という転写因子が翻訳制御を受けるが、5'UTR に存在する小さな読み取り枠が、本来の翻訳領域の阻となることで制御を受ける。また細胞周期の制御に関わるある種のサイクリンの翻訳も 5'UTR を介した制御を受けることが明らかになっている。これに限らず、翻訳制御は主に 5'UTR に作用する例が多い。ここは翻訳制御において最もオーソドックスな場所で遺伝子種に応じて多様性がある。3'UTR は mRNA の寿命に影響を与えることが知られていたが、多細胞生物の発生初期にみられる 3'UTR を

介した mRNA の局在現象が、最近、単細胞である出芽酵母でも発見された。その局在化はアクチン骨格系に依存している。この事実は真核生物の遺伝子発現が、空間的にも制御されている事を示している。この領域の構造も遺伝子種によって多様性がある。

ほとんど全ての mRNA に共通な構造は、5' 末端のキャップ構造と 3' 末端のポリ A 鎖構造である。キャップ構造は効率的なタンパク合成に必要であることは示されていたが、ポリ A 鎖のタンパク合成における役割はよくわかっていなかった。近年、出芽酵母でキャップ構造に結合する因子だけでなく、ポリ A 鎖に結合する因子も発見され、両者がタンパク質合成に不可欠である事実が見い出された。さらにその両者が相互作用している事実が明らかになったことで、mRNA は直鎖状だけでなく環状構造をとりタンパク質合成を行っていると考えられるようになってきた。環状構造をとる利点は、mRNA は主に末端から分解されるので、環状構造により末端がマスクされていると mRNA の安定性が増すと考えられる。また翻訳装置であるリボソームをリサイクルできるため、効率よくタンパク合成を行えるとも考えられている。さらにもうひとつ重要なことは先に述べた各種制御領域が物理的に近い位置に集まるということである。我々はこれらの事実をふまえた上で、真核生物のモデル系である出芽酵母を用いて、翻訳制御と細胞周期との新たな接点を見い出そうと試みている。

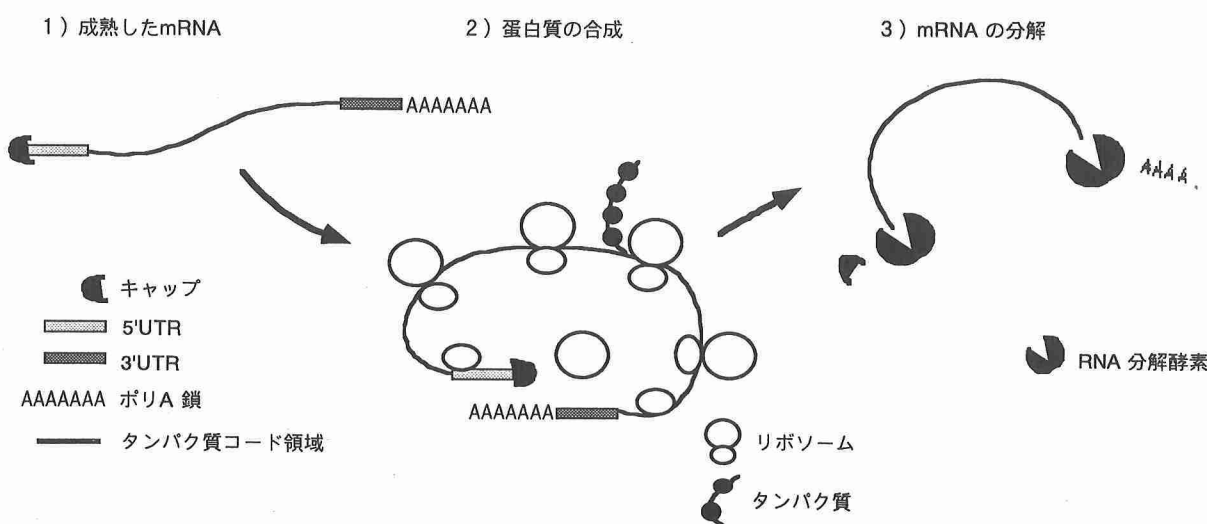


図 mRNA の制御

## ハインリッヒ・イベント期および新ドリラス期における北太平洋中層水の強化

多田 隆 治 (地質学専攻)

ryuji@tsunami.geol.s.u.-tokyo.ac.jp

最終氷期に数千年に一度の割合で繰り返した急激な気候変動の存在は、90年代初頭に発表されたグリーンランド氷床コアの解析結果を通じ、ダンスガード・サイクルの名で広く世界に知られるに至った。その後、この急激な気候変動の空間的広がり、同時性、伝播機構の究明が、全世界の古気候学者、古海洋学者を中心に精力的に進められている。

この気候変動の伝播、増幅機構として重要な役割を果たしていると考えられるのが海洋中、深層水循環である。特に、ダンスガード・サイクルにともなう北半球氷床崩壊イベント（ハインリッヒ・イベント）期および新ドリラス期（約13,000～11,500年前；氷期から後氷期への移行期における一時的寒冷期）に北大西洋表層水の塩分が激減し、北大西洋深層水の活動が弱まった証拠が示され、北大西洋深層水の循環が熱の南北輸送に与える影響の重要性が指摘されている。一方、太平洋については、石灰質化石の溶解の影響が強いために記録解析に適した堆積物コアの採取が難しく、氷期一過氷期、あるいはダンスガード・サイクルに対応した中、深層水循環の変動は未だに十分に解明されていない。

私と共同研究者の Kennett 博士（カリフォルニア州立大学サンタバーバラ校）は、それぞれ日本海およびサンタバーバラ海盆における堆積物コアの解析結果から、

ダンスガード・サイクルに連動した気候、海洋変動が北太平洋域に広く認められる事を見だし、更に Kennett 博士らは、ダンスガード・サイクルの寒冷期および新ドリラス期に北太平洋中層水の循環が強化されたとの仮説を提唱した。この仮説を検証するため、私は Kennett 博士、Pedersen 博士（ブリティッシュコロンビア大学）、石渡博士（都立大）らと共同で、国際深海掘削計画によりカリフォルニア沖水深950mの地点から採取された堆積物コアの高時間解像度の解析を行っている。現在までに、堆積物の軟X線撮影および粒度分析の結果から、新ドリラス期およびハインリッヒ・イベント 1（約16,000年前）、2（約25,000年前）期の堆積物が強い底層流下で堆積した証拠を見いだした。また、Re, Mo, U などその含有量が底層水の酸化還元度に左右される元素に基づいてこれらの時期に底層水が著しく酸化になった事を、底生有孔虫（海底に棲み石灰質な殻をつくる微生物）の殻の酸素同位体比に基づいてこれらの時期に底層水温が低下した事も見いだした。これらの事実は、新ドリラス期およびハインリッヒ・イベント期において、北太平洋中層水の循環が強化、拡大した事、更に、大西洋において南北熱輸送が停滞した時期に太平洋では逆に南北熱輸送が活発化した可能性を示している。

