

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21 世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	細胞特異的マーカーのスクリーニング法と細胞分取システムの開発	
研究者所属・氏名	研究代表者：産業理工学部 生物環境化学科 准教授 森田 資隆 共同研究者：産業理工学部 生物環境化学科 教授 河津 博文 産業理工学部 生物環境化学科 教授 藤井 政幸	

1. 研究目的・内容

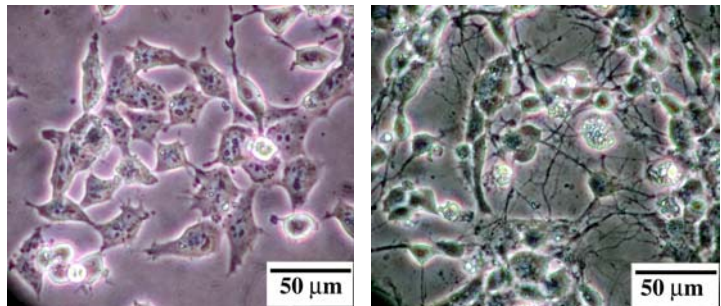
本研究では、コンビナトリアル・ペプチドライブラリーと呼ばれる、 10^7 ~ 10^9 種類のペプチドが提示された有用な薬剤候補を含む集団から、特徴的な細胞を特異的に認識して結合するペプチドの探索を行うことを目的とした。そして、単離したペプチドを担体に固定したカラムを作製することにより、特異的に結合する細胞を分離するシステムの開発や、細胞上に提示されている細胞特有のマーカー分子を探索・特定し、細胞間のシグナル解析を行うツールの開発を行うことを目的とした。

2. 研究経過及び成果

現在までに、自動ペプチド合成装置により、粒径 80 μm のポリスチレン製のペプチド合成用レジンに、側鎖保護基が結合したバリン (V)、イソロイシン (I)、メチオニン (M)、フェニルアラニン (F)、ロイシン (L) を用いて、5 残基を持つペプチドライブラリーを合成した。そして、このペプチドライブラリーを用いて、ラット副腎褐色細胞由来 PC12 細胞に対して、神経成長因子 (Nerve Growth Factor: NGF) 様作用を持つペプチドのスクリーニングを行った。NGF は、神経細胞の分化を促す作用、神経細胞の生存を維持する作用、脳の損傷時に修復する作用などがあるタンパク質である。その結果、NGF 作用のように、神経突起の伸張が生じさせるアミノ酸配列：M-M-V-I-F のペプチド A を得ることができた。

この NGF 様作用を持つと思われる、ペプチド A の神経突起の伸長に対する特性を調べた。まず、ペプチド A、もしくは NGF とコントロールペプチド (アミノ酸配列：V-V-V-V-V) をそれぞれ PC12 細胞に加え、37°C、5% 二酸化炭素雰囲気下で培養し、1 日ごとに神経突起の伸長の割合を調べた。この際、細胞自身から 2 倍以上神経突起が伸張した細胞を、神経突起の伸張が起こった細胞とした。その結果、ペプチド A と NGF は、時間に依存して神経突起の伸張が見られたが、コントロールペプチドでは、神経突起の伸張がほとんど見られなかった。培養から 4 日目には、ペプチド A を加えたときに約 15% の伸張が見られ、NGF を加えたときには約 70% の伸張が見られた。このように、ペプチド A は、PC12 細胞において、神経突起の伸張を起こす作用があることがわかった。

また、様々な細胞に分化する前の幹細胞を分取するシステムの構築を目指し、幹細胞を模した細胞として、神経細胞に分化するマウス胚性腫瘍由来 P19C6 細胞、および P19 細胞、心筋細胞に分化するマウス胚性腫瘍由来 P19.CL6 細胞を培養した (図 1 参照)。これらの多分化能と自己複製能を有する未分化な細胞から、特異的な細胞マーカーを探索した。方法としては、フェージディスプレイ法を用いて、分化した細胞には結合せず、未分化な細胞のみを特異的に認識して結合するペプチドの探索を試みた。



A) 未分化な状態 B) 神経細胞に分化した状態

図 1 P19 細胞の分化前後の様子 (明視野像)

3. 本研究と関連した今後の研究計画

今後は、ペプチド A による PC12 細胞への神経突起の伸張の割合や濃度依存性など、ペプチド A の神経突起の伸長に対する様々な特性を調べる。また、ペプチド A の PC12 細胞への神経突起伸長のメカニズムや細胞上の受容体の探索などを行う予定である。さらに、ファージディスプレイ法を用いて、 10^7 ~ 10^9 種類の提示されたコンビナトリアル・ペプチドライブラリーから、神経細胞や心筋細胞に分化する前の未分化な細胞を特異的に認識して結合するペプチドの探索を行う。そして、このペプチドを担体に固定したカラムを作製し、これを用いて未分化細胞を分離するシステムの開発を行い、ターゲット細胞上に提示されている幹細胞特有のマーカー分子（幹細胞マーカー）を探索・特定し、幹細胞のシグナル解析を行うツールの開発を行う予定である。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Journal of Bioscience and Bioengineering	論文(審査付き)	平成 23 年 8 月
第 48 回化学関連支部合同九州大会	ポスター発表(2件)	平成 23 年 7 月 9 日
日本農芸化学会 2011 年度大会	口頭発表	平成 23 年 3 月 25 日