

ナノサイズカプセルとしての
シャペロニン GroEL/GroES 複合体の応用的研究

神奈川工科大学大学院 工学研究科

応用化学・バイオサイエンス専攻

博士後期課程

1293001

依田 ひろみ

目次

第1章 序論	1
1-1. シャペロニン	2
1-1-1. シャペロニンの役割	2
1-1-2. シャペロニン GroEL と GroES	2
1-1-3. GroEL 変異体ライブラリー	4
1-2. 生体分子とナノマテリアル	5
1-2-1. ナノテクノロジー	5
1-2-2. ナノ粒子	6
1-2-3. 生体分子-ナノマテリアル複合体	7
1-3. 本論文の目的と構成	7
第2章 GroEL/GroES 複合体のナノマテリアル内包	14
2-1. 研究概要	15
2-2. 実験方法	16
2-2-1. 実験材料	16
2-2-2. 実験手順	20
2-3. 実験結果	23
2-3-1. 白金鉄ナノ粒子の粒径分布	23
2-3-2. 金属ナノ粒子内包 GroEL/GroES 複合体の形成	23
2-3-3. 金属ナノ粒子内包 GroEL/GroES 複合体形成の効率の向上	26
2-3-4. 2種類の金属ナノ粒子の GroEL/GroES 複合体への内包	26
2-4. 考察	28
第3章 GroEL 複合体を介した金属ナノ粒子の固定と配置	43
3-1. 研究概要	44
3-2. 実験方法	45
3-2-1. 実験材料	45
3-2-2. 実験手順	45

3-3. 結果.....	47
3-3-1. 高濃度 ATP 存在下の GroEL	47
3-3-2. GroEL チューブの伸長と解離	48
3-3-3. GroEL チューブの形成を介した金属ナノ粒子の等間隔配置.....	48
3-4. 考察.....	49
第 4 章 核移行シグナル配列融合 GroES による GroEL/GroES 複合体の細胞送達 ..	57
4-1. 研究概要	58
4-2. 実験方法	59
4-2-1. 実験材料	59
4-2-2. 実験手順	60
4-3. 結果.....	65
4-3-1. GroES ^{N-AhR} の遺伝子発現とタンパク質発現	65
4-3-2. GroES ^{N-AhR} のタンパク質発現と GroEL/GroES 複合体の形成.....	65
4-3-3. GFP 含有 GroEL/GroES ^{N-AhR} 複合体の細胞送達	66
4-3-4. GroEL/GroES ^{N-AhR} 複合体投与細胞の小核試験	67
4-4. 考察.....	69
第 5 章 結論	81
付録	85
付録 1. 超解像顕微鏡を用いた GroEL ^{D52,398A} /GroES ^{N-AhR} 複合体の観察	86
付録 2. 小核・細胞検出システムの開発.....	88
引用文献.....	99
謝辞	113

略語・語句の説明

NP	Nanoprticle(s)
ATP	Adenosine triphosphate
ADP	Adenosine diphosphate
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
Amp	Ampicillin
PFA	Paraformaldehyde
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
TEM	Transmission Electron Microscope 透過電子顕微鏡. 高電圧で加速された電子線を試料に照射し、試料を透過した電子の干渉像を拡大する顕微鏡.
STEM-EDS	Scanning Transmission Electron Microscopy-energy-dispersive X-ray Spectroscopy 走査型透過電子顕微鏡-エネルギー分散型 X 線分光法. 電子線を絞って電子ビームとして試料に照射し、試料から放出される透過電子を検出して走査像を得るほか、電子線照射により発生する元素特異的な特性 X 線を検出する方法.
DLS	Dynamic Light Scattering 動的光散乱法. 溶液中の微粒子に光を当てるとブラウン運動が生じ、その振幅が粒子サイズによって異なることを利用した粒径測定方法.
MTT アッセイ	MTT [3-(4,5-Dimethylthial-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] が生細胞により還元されて紫色を呈することを利用し、比色定量により細胞の生存率を測定する方法.
GroEL ^{D52,398A}	アミノ酸配列の 52 番目, 398 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した GroEL 変異体
GroES ^{WT}	野生型 GroES
GroES ^{C-6His}	アミノ酸配列の C 末端に 6 個のヒスチジンを融合している GroES 変異体
GroES ^{N-AhR}	アミノ酸配列の N 末端にマウス芳香族炭化水素受容体核移行シグナル配列の一部を融合した GroES 変異体

第 1 章

序論

1-1. シャペロニン

1-1-1. シャペロニンの役割

タンパク質科学の原点ともいえる Anfinsen's dogma は、タンパク質のネイティブな立体構造はそのアミノ酸の配列情報によって一義的に決まり、生理条件下で自発的に折れたたむ（フォールディングする）と提唱するものである[1]。しかし後に、細胞内の一部のタンパク質は自発的にフォールディングせず、無秩序な凝集体（アモルファス凝集体）[2, 3]や、規則的な凝集体（アミロイド凝集体）[4]になることがわかった。細胞内には、このような凝集の形成を未然に防ぎ、または分解して処理する品質管理機構が存在する[5, 6]。それらは分子シャペロンと呼ばれ、細胞内の非ネイティブ状態のタンパク質を基質として捕捉し、コンフォメーションの形成を補助する役割を持つ。分子シャペロンは熱ストレスによって誘導されるタンパク質であったことから熱ショックタンパク質（Heat shock protein: HSP）とも呼ばれ、分子量の大きさによって複数の HSP ファミリーに分類されており、それぞれが原核細胞から真核細胞まで広範に分布している[5, 7-9]（Fig. 1）。

HSP60 ファミリーに属する分子シャペロンは、シャペロニンと呼ばれる。シャペロニンは、タンパク質構造の観点から、グループ I 型[10]、グループ II 型[11]に分類される（Fig. 2）。グループ I 型シャペロニンは、7 量体リングが重なった構造をしているタンパク質分子で、協働タンパク質として Hsp10 を必要とする。具体例は、バクテリアの細胞質に存在する GroEL[12, 13]、哺乳類細胞や酵母のミトコンドリアに存在する Hsp60[14, 15]、植物の葉緑体に存在する Cpn60[16]が挙げられる。グループ II 型シャペロニンは、協働タンパク質を必要とせず、8 量体リングが重なったダブルリング構造をしている。具体例は、真核生物の細胞質に存在する TCiR/CCT [17]、古細菌の細胞質に存在する Thermosome [18]が挙げられる。近年は、形状は II 型シャペロニンに類似しているが、機構と系統が I 型、II 型とは異なるものとして *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* のシャペロニンが報告されている[19, 20]。

1-1-2. シャペロニン GroEL と GroES

グループ I 型に分類される大腸菌シャペロニン GroEL は、57 kD のサブユニットの 7 量体リングが背中合わせに 2 つ重なった 14 量体構造を形成している[21]（Fig. 3A）。GroEL

の各サブユニットは、頂点ドメイン (Phe205-Lys372)、中間ドメイン (Pro137-Val190、Ala377-Ala405)、赤道ドメイン (Met1-Lys132、Gly410-M548) の3つに分かれており、ドメイン間は2つのヒンジ部分で繋がっている[21, 22]。協働タンパク質 (コシャペロン) の GroES は、10 kDa のサブユニットからなるドーム型の7量体リングを形成している[21] (Fig. 3B)。ATP 加水分解活性を有する GroEL が赤道ドメイン付近で ATP を結合すると、ダイナミックにリングを伸長させ (Fig. 3C)、GroEL リング開口部に存在する Helix H、Helix I を介して GroES を結合する (Fig. 3D)。GroES をひとつ結合した GroEL は弾丸型複合体を形成し、約 5 nm の空洞を内部に生じる (Fig. 3E)。GroES を2つ結合した GroEL はフットボール型複合体を形成し、約 5 nm の空洞を2つ生じる (Fig. 3F)。なお、GroEL アミノ酸配列の N 末端、C 末端はリング内腔に、GroES アミノ酸配列の N 末端、C 末端は外側に向いている (Fig. 4)。

生体内の GroEL と GroES は、基質タンパク質の折れ畳み (フォールディング) を介助する役割を持つ。フォールディング対象となる基質は細胞内タンパク質の 20-30% に及ぶといわれている[23]。GroEL/GroES 複合体による反応サイクルは次のとおりである (Fig. 5)。はじめに GroEL は、基質となる新生ポリペプチドや変性タンパク質を、リング開口部へ疎水的相互作用によって結合する。その後、GroEL は ATP を結合してリングをダイナミックに伸長させ、次いで GroES が、GroEL の基質結合部位のアミノ酸配列を奪うようにして結合して複合体を形成する。同時に、GroEL に結合していた基質は空洞内へ落とし込まれ、GroEL/GroES 複合体によるフォールディングが開始される。GroEL が結合したすべての ATP が ADP に加水分解されるまで、空洞内に内包された基質タンパク質のフォールディングは進行する。野生型 GroEL では、この ATP 加水分解時間が~8 秒とされている[24]。反応が先行する GroEL リング (*cis*-ring) ですべての ATP が加水分解された後、反対側のリング (*trans*-ring) への ATP 結合をトリガーにして、GroEL の *cis*-ring から GroES、ADP、基質タンパク質が放出される。*trans*-ring では、新たに補足された基質のフォールディングが開始され、こちらのリングが今度は *cis*-ring となって反応を先行する。なお、GroEL から放出されたもののフォールディングが未完の基質タンパク質は再度 GroEL に捕捉され、GroEL/GroES 複合体による複数回の介助を受けて、フォールディングを完了する。GroEL は、2つのリングを交互に活性化させるとして、弾丸型複合体を反

応中間体とするシングルストロークモデルが提唱されてきたが、近年はフットボール型複合体を反応中間体とするダブルストロークモデルも提唱された [25, 26]。弾丸型 GroEL/GroES 複合体は *trans-ring* に基質を結合するとフットボール型複合体を形成しやすくなり [27]、基質を閉じ込めたフットボール型複合体の形成時間は~1 秒に短縮される [28]と報告されていることから、GroEL はフォールディングすべき基質の量に応じてストロークモデルを使い分けると考えられているが、弾丸型複合体：フットボール型複合体の存在比はまだ明らかになっていない。

1-1-3. GroEL 変異体ライブラリー

細胞内では、野生型 GroEL が形成する弾丸型 GroEL/GroES 複合体は 8 秒で解離してしまうので、2 つめの GroES を結合してフットボール型 GroEL/GroES 複合体を形成している時間はさらに短い [29]。しかし、ダブルストロークモデルの解明に向けた研究では、フットボール型 GroEL/GroES 複合体の結晶構造解析が必要とされていた。そこで、世界的にもシャペロニンの研究を牽引していた吉田ら [30, 31] のグループでは、GroEL のアミノ酸配列において ATP 加水分解活性に関与する Asp52、Asp398 のいずれか 1 カ所以上を Ala 置換し、ATP 加水分解活性低下型 GroEL 変異体を作製した。Asp398 を Ala 置換した GroEL^{D398A} 変異体は、半減期が約 30 分のフットボール型 GroEL/GroES 複合体を形成でき [32]、Asp52 と Asp398 が両方とも Ala 置換された GroEL^{D52,398A} 変異体は、半減期が 6 日にまで延長されたフットボール型複合体を形成できることを報告している [26]。さらに、増田ら [33] は、Asp52 と Asp398 のアミノ酸置換の種々の組合せにより、GroEL/GroES 複合体の解離時間が異なる GroEL 変異体ライブラリーを構築した。

GroEL 変異体ライブラリーでは、GroEL/GroES 複合体の解離時間が数時間から数日以上に及ぶ GroEL 変異体がリストされている [33]。この報告は、GroEL の ATP 結合部位のアミノ酸の違いが ATP 加水分解活性へ影響を与えることを結論づける過程で、GroEL 変異体によっては、GroEL/GroES 複合体として一度基質を閉じ込めたら数時間~数日間放出しない状況を作り出すことが示されている。GroEL が基質として認識するタンパク質は、非ネイティブ状態のため疎水性アミノ酸をむき出しにしており、細胞質ゾルのような水溶液環境中では凝集しやすい。それを GroEL/GroES 複合体に閉じ込めることによって外部

環境から安全に保護するので、長時間複合体を維持できる GroEL/GroES 複合体は、いわばナノサイズのカプセルである。また、複数の異なる GroEL 変異体が同じタイミングで基質を内包して GroEL/GroES 複合体を形成した場合、それらは時差をもって内包物を放出することが想像できる。同じ水溶液中にこれらの GroEL/GroES 複合体を共存させることにより、順次内包物を放出する、すなわち徐放性のある水溶液を調製することが可能になると考えられる。GroEL 変異体は、ダブルリング構造という独特の形状とそのリングを開閉する機能から、ナノカプセルとして利用できる可能性がある。

1-2. 生体分子とナノマテリアル

1-2-1. ナノテクノロジー

原子、分子、超分子のスケールで物質を操作するナノテクノロジーは、機械工学、電気・電子工学、材料科学といった工学にとどまらず、物理学、化学、生物学、理学、医学にまで及ぶ分野横断的な技術であり [34]、走査型トンネル顕微鏡や原子間力顕微鏡のような材料計測器 [35] の性能向上と共に、急速に発展してきた。国際標準化機構 (ISO) で 2005 年に発足した専門員会 TC 229 は、ナノテクノロジーとその応用について定義をしている (ISO/TS 80004 シリーズ)。

ナノスケールの微細構造物を作製する技術には、バルク材料を削り落として加工する「トップダウン」型と、原子・分子を積み重ねて加工する「ボトムアップ」型の 2 種類がある [36]。トップダウン型技術はフォトリソグラフィーの発展によりナノメートルスケールのサイズにまで至っているが、デバイスの微細化が進むといずれ限界を迎えることが予測されていることから、ボトムアップ型技術の指向性が高まっている [37]。これらの手法で調製されたナノマテリアルは、三つの次元 (縦、横、高さ) のうちいずれかが 100 nm 以下であるものを指す。構造物の形態が球状であるものは 0 次元、針状であるものは 1 次元、膜状であるものは 2 次元、バルク状であるものは 3 次元と呼ばれる。ナノマテリアルは、同じ組成の粗大な材料よりも表面積が増大したことにより、機械的、光学的特性等の新たな物性を発現する。経済協力開発機構 (OECD) は 2006 年に工業ナノ材料作業部会を設置し、国際的な商業的利用状況を勘案して選定した代表的な工業ナノ材料の安全性を評価

しており、2011年現在13物質（フラーレン、単層カーボンナノチューブ、多層カーボンナノチューブ、銀ナノ粒子、鉄ナノ粒子、二酸化チタン、酸化アルミニウム、酸化セリウム、酸化亜鉛、二酸化ケイ素、 dendrimer、ナノクレイ、金ナノ粒子）を対象としている。この他、特有の光学特性を持つ量子ドットや、生体成分で構成されるリポソームも注目度が高い。ナノマテリアルが使用されている代表的な製品は、医薬品、化粧品、食品、食品容器包装、繊維、家庭用品・雑貨・スポーツ用品、家電・電気電子製品、塗料・インク等が挙げられ、用途は広範に及ぶ。

1-2-2. ナノ粒子

ナノマテリアルのうち、コロイド状微粒子はナノ粒子と呼ばれる。ナノ粒子は、国際純正応用化学連合（IUPAC）により、100 nm以下の微粒子と定義されている[38]。粒子サイズが、可視光域（400-800 nm）、分子の自由行程（大気圧中で70 nm）、磁性体の磁壁厚（数 nm～数十 nm）より小さくなると、バルク（塊）とは異なる物性を発現し始める。直径が10 nm以下になると、バルク原子にくらべて表面原子の占める割合が大きくなり、物性全体に影響を与える。金属ナノ粒子では、結合エネルギーにくらべて表面エネルギーが無視できなくなる。サイズに伴う物性の変化はサイズ効果と呼ばれ、①融点降下、②局在表面プラズモン共鳴の発現、③触媒作用（化学吸着・反応性）の向上、④分散エネルギー準位の発現、⑤分散と凝集の抑制の困難化、といった性質が現れるようになる[39]。

ナノ粒子は、寸法・形状を制御して調製される。単分散粒子の生成機構モデルでは、溶液中の溶質濃度が過飽和限界を超えると核が生成され、前駆体モノマーの消費が供給を上回り（過飽和限界を下回り）、以後に核生成が起これなければ粒形が揃うことを示しているが、ナノ粒子の調製では個々の核成長が速く、一般に核成長期が長くなり、単分散化が難しい[38]。そこで、吸着性の強い物質を反応系に加えておき、核生成から一定時間後に吸着が完了して成長反応が自動的に止める。多くの場合、核成長の停止と粒子の凝集抑制のために、界面活性剤、錯形成剤、吸着性高分子、吸着性溶媒が加えられる[40]。具体的には、ゼラチン、寒天、酢酸セルロース、硝酸セルロース、シクロデキストリン、PVA、PVP、チオール類などが挙げられる。ナノ粒子の代表的な種類と用途をTable 1に示した。金属

ナノ粒子は、熱的材料・低融点材料、力学材料、光学材料として多様な分野で利用が進んでいる。

1-2-3. 生体分子-ナノマテリアル複合体

ナノ粒子が製品の小型化や高機能化のために適切に使用されるには、ナノ粒子の凝集しやすい性質は障壁となることがあり、粒子の合成時には保護剤が欠かせない。一方で、金属を取り込む性質のある微生物あるいは生体分子を利用してナノマテリアルを合成し、取り扱う方法も検討されている。重金属汚染土壌で生息する微生物やマグネトソームを産生する磁性細菌[41]、生体分子では鉄貯蔵タンパク質であるフェリチン[42, 43]に、本来とは異なる金属を与えて金属ナノ粒子を合成させた報告がある。これらは、金属ナノ粒子を合成する器としてバイオテンプレートといわれることもあり、合成された粒子の表面は生体内化合物で修飾または水溶性タンパク質で被覆された状態になっている。フェリチンにおいては、単一金属や合金など種々の金属ナノ粒子を合成でき、MRI造影剤への応用や、陽荷電または陰荷電を帯びる化合物であらかじめ表面修飾した平板上へ吸着させた例が報告されている[44]。ただし、これらの金属ナノ粒子はタンパク質に被覆されたままの使用が前提になっており、GroEL/GroES複合体のような内包物の放出は起こりえない。

1-3. 本論文の目的と構成

大腸菌のシャペロニン GroEL と協働タンパク質 GroES は、基礎研究で得られた知見が豊富であり、GroEL の ATP 結合部位のアミノ酸置換によって ATP 加水分解活性を調節できることがわかっている。変異体のひとつである GroEL^{D52,398A} は、通常 8 秒で解離する GroEL/GroES 複合体の半減期が 6 日間まで延長されており、幅 14 nm、長さ~24nm の水溶性のナノカプセルとして利用できる可能性を秘めている。一方で、新たな物性を期待されるナノマテリアルは、表面積の増加により反応性が高くなった反面、凝集しやすい場合がある。そこで、ナノサイズの空洞を有する GroEL/GroES 複合体は、これらをカプセル化することを通して、ナノマテリアルの取扱いに有効活用できるのではないかと考えた。さらに、長期間 GroEL/GroES 複合体を維持する GroEL 変異体は、複合体解離までの時間

を考慮して、DDS キャリアとして利用することも検討できる。生体分子や微生物に金属を取り込ませる研究例は多いが、シャペロニンが 5 nm 前後のサイズの内包物を放出する機能まで備えていることは、他の生体分子には見られない点である。

本研究では、GroEL/GroES 複合体の発展的な利用の可能性を踏まえて、基質タンパク質の代わりにナノマテリアルとして金属ナノ粒子を内包した GroEL/GroES 複合体を形成し、複合体を介してナノマテリアルの局在を制御する方法を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では、本研究の背景と目的および意義を述べた。特に、ナノサイズの天然構造をもつシャペロニンについて詳しく記し、ナノマテリアルと融合するアプローチの礎とした。

第 2 章では、基質タンパク質の代わりに金属ナノ粒子 (NP) を取り込ませて GroEL/GroES 複合体を形成させ、TEM、STEM-EDS、DLS を用いて GroEL/GroES 複合体の粒子内包の可否を分析した。

第 3 章では、TEM グリッドまたはマイカを平面に見立て、GroEL/GroES 複合体または GroEL を介した NP の面上への配置方法を TEM または SPM により評価した。

第 4 章では、マウス芳香族炭化水素受容体 (AhR) の核移行シグナルを融合した GroES 変異体 (GroES^{N-AhR}) を作製し、GroEL と複合体を形成することによって細胞送達能力を獲得した GroEL/GroES 複合体を調製した。GFP 含有 Cy5 標識 GroEL/Cy3 標識 GroES 複合体を投与した CHL/IU 細胞を共焦点レーザー顕微鏡にて観察し、シグナルの重複と経時的な局在の変化から、内包物を維持した GroEL/GroES 複合体の細胞送達を評価した。

第 5 章では、総括として、本論文で得られた成果について要約した。

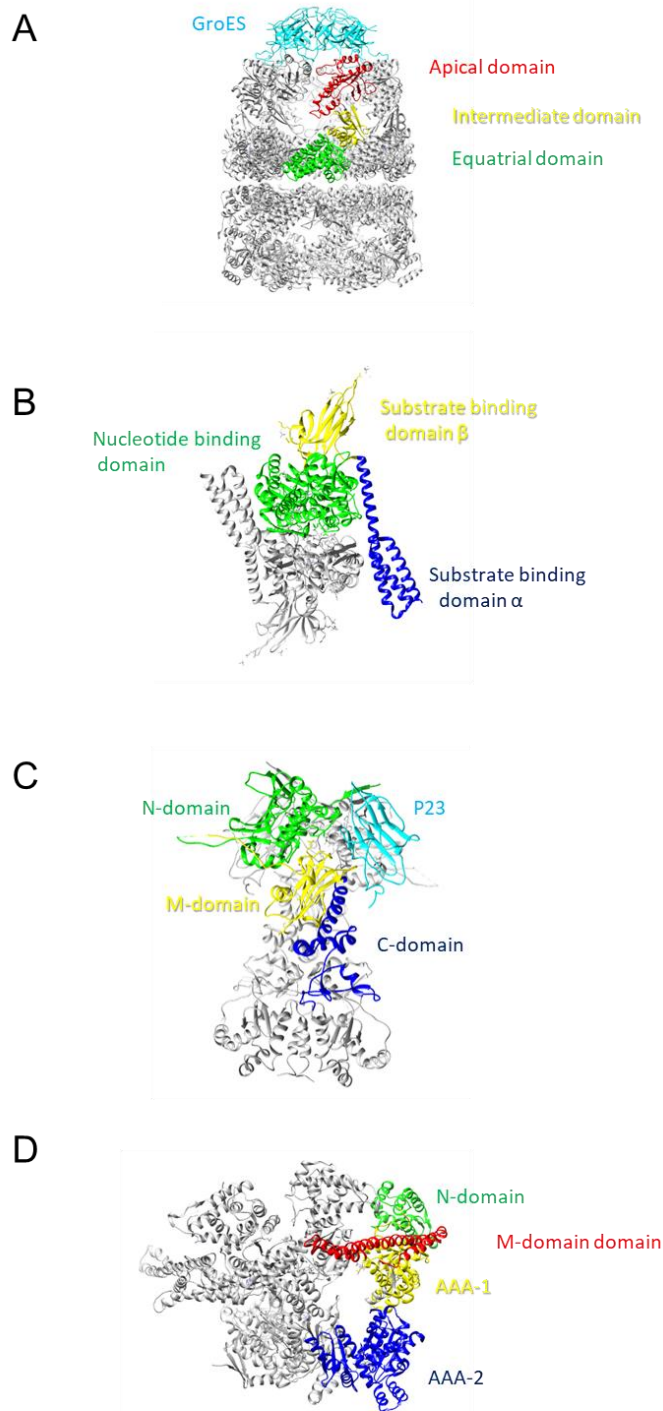


Fig. 1 Molecular architecture and domain organization of ATP-dependent molecular chaperones.

The monomer of the protein is colored in each domain, other subunits are colored gray, and bound co-chaperone is colored cyan. (A) Hsp60: GroEL tetradecamer of *Escherichia coli* bound with GroES heptamer (PDB: 1AON). (B) Hsp70: The *E. coli* DnaK dimer in the ATP-bound state (PDB: 4JNE). (C) Hsp90: The ATP-bound yeast HtpG dimer (PDB: 2CG9). (D) Hsp104: a yeast ClpB trimer (PDB: 1QVR). Cited from Ref [7].

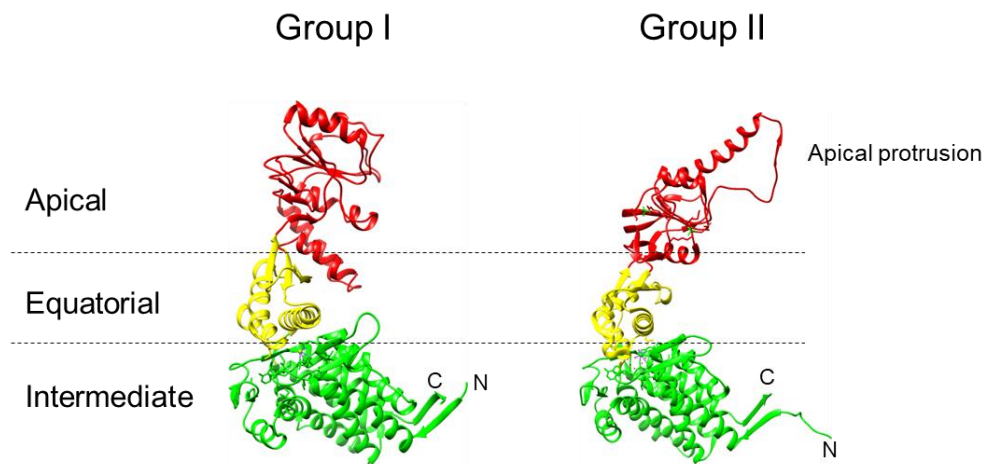


Fig. 2 Structural comparison of group I and group II chaperonins.

The *E. coli* GroEL and *Methanococcus maripaludis* Cpn crystal structures used were PDB ID: 1AON and PDB ID: 3RUW, respectively. C or N showed terminus of amino acids sequence. Cited from Ref [11].

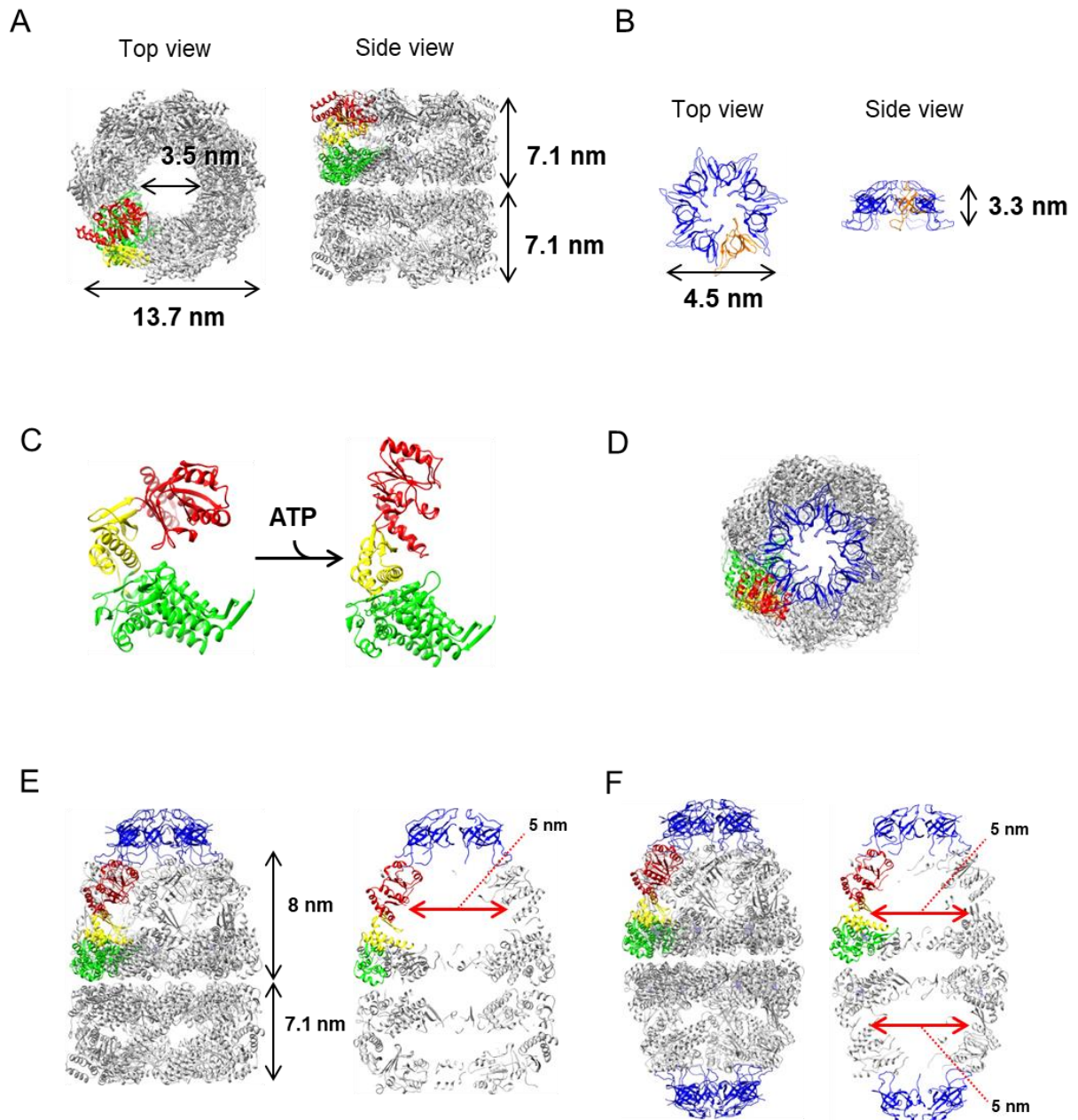


Fig. 3 Structure of GroEL/GroES complex

(A) GroEL, (B) GroES, (C) GroEL monomer extended by binding ATP, (D) the top of view of GroEL/GroES complex, the side view of (E) the bullet-shaped GroEL/GroES complex, and the side view of (F) the football-shaped GroEL/GroES complex. The three domains as defined by GroEL are color-coded on the GroEL sequence and structure: equatorial (green), intermediate (yellow), and apical (red). One subunit of GroES is shown in orange. The apo GroEL, the bullet-shaped GroEL/GroES complex, and the football-shaped GroEL/GroES complex crystal structures used were PDB ID: 1SS8, 1AON, and 3WVL, respectively. GroES crystal structures was also used PDB ID: 1AON.

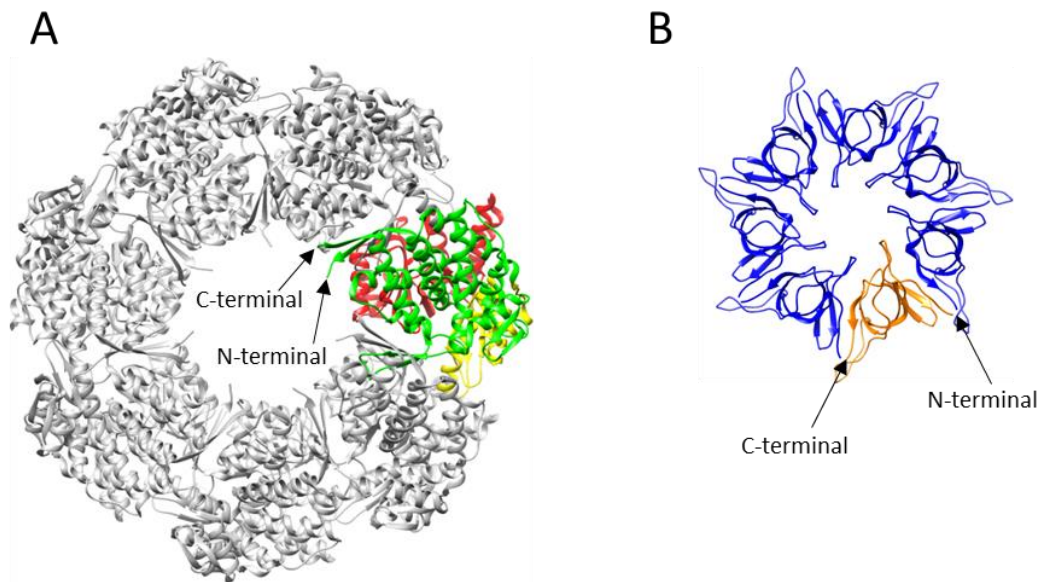


Fig. 4 Amino and carboxy terminus of the amino acid sequence
 (A) GroEL and (B) GroES.

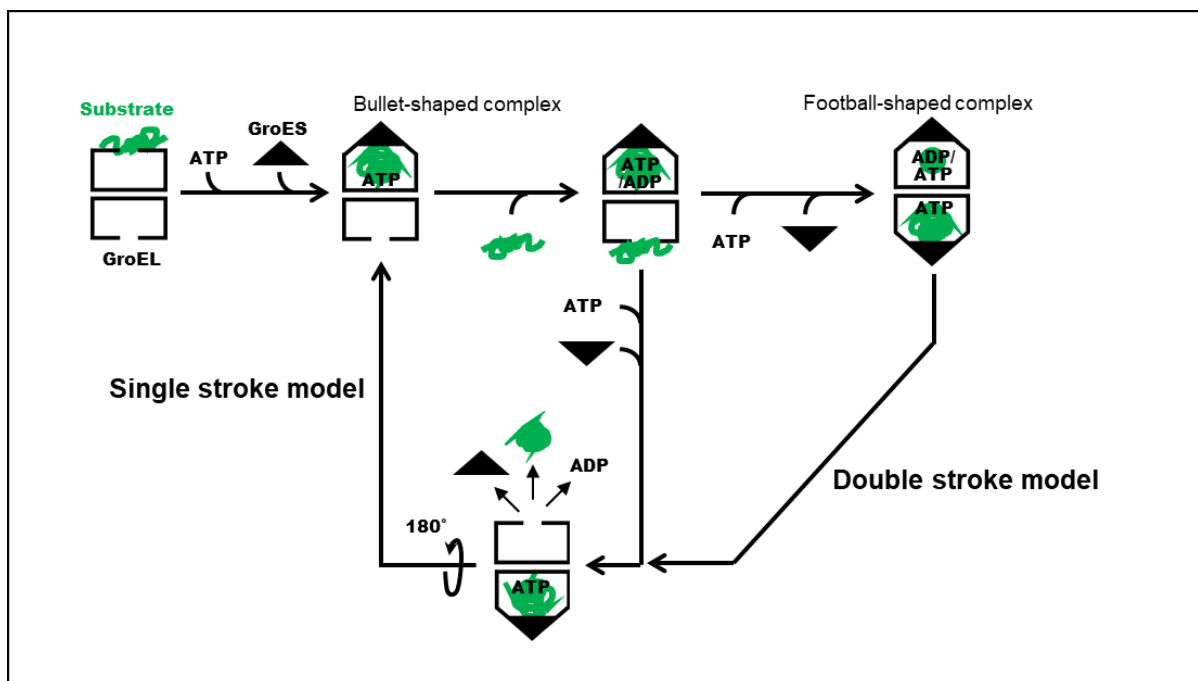


Fig. 5 The reaction cycle of GroEL

Table 1 Typical nanoparticles

Base type	Nanoparticles	Properties
Carbon	Fullerenes	Safe and inert, semiconductor, conductor and superconductor, transmits light based on intensity
	Graphene	Extreme strength, thermal, electrical conductivity, light absorption
	Carbon nano tubes	High electrical and thermal conductivity, tensile strength, flexible and elastic
	Carbon nanofiber	High thermal, electrical, frequency shielding, and mechanical properties
	Carbon black	High strength and electrical conductivity, surface area; resistant to UV degradation
Metal	Aluminium	High reactivity, sensitive to moisture, heat, and sunlight, large surface area
	Iron	Reactive and unstable, sensitive to air (oxygen) and water
	Silver	Absorbs and scatters light, stable, anti-bacterial, disinfectant
	Gold	Interactive with visible light, reactive
	Cobalt	Unstable, magnetic, toxic, absorbs microwaves, magnetic
	Cadmium	Semiconductor of electricity, insoluble
	Lead	High toxicity, reactive, highly stable
	Copper	Ductile, very high thermal and electrical conductivity, highly flammable solids
	Zinc	Antibacterial, anti-corrosive, antifungal, UV filtering
Metal oxide	Titanium oxide	High surface area, magnetic, inhibits bacterial growth
	Iron oxide	Reactive and unstable
	Magnetite	Magnetic, highly reactive
	Silicon dioxide	Stable, less toxic, able to be functionalize many molecules
	Zinc oxide	Antibacterial, anti-corrosive, antifungal and UV filtering
	Cerium oxide	Antioxidant, low reduction potential
	Aluminium oxide	Increased reactivity, sensitive to moisture, heat, and sunlight, Large surface area

Cited from Ref [36].

第 2 章

GroEL/GroES 複合体のナノマテリアル内包

2-1. 研究概要

GroEL は、数十年に及ぶ継続的な研究により生体分子としての反応機構が十分に解明されているだけでなく、精製時の安定性や易操作性の利点を有している。近年、次世代材料である金属ナノ粒子 (NP) [45] と、このような生体分子や微生物を組み合わせるバイオリアクターやバイオテンプレートに利用する試みが行われている [41, 43]。大腸菌と *Thermus thermophilus* の GroEL もまた、リングの端に金属ナノ粒子を捕捉し、水中で高い熱的・化学的安定性を付与できることが報告されている [46–48]。GroEL は分子マシンとして対象物を捕捉、内包 (GroES を蓋として結合)、放出 (GroES の解離) することができることから、ATP をゆっくり加水分解する GroEL^{D52,398A} を GroES と併用することで、反応ステップを制御しながらフットボール型複合体の 2 つの空洞にナノ粒子をカプセル化できると考えられた。本研究では、基質の代わりに内包する NP として、白金鉄ナノ粒子 (FePt NP)、金ナノ粒子 (Au NP)、量子ドット (QD) を用いて GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体を形成し、TEM 観察、STEM-EDS 解析、DLS 解析により、NP が GroEL/GroES 複合体に内包されるかどうかを分析した。

2-2. 実験方法

2-2-1. 実験材料

GroEL

野生型 GroEL (GroEL^{WT})、GroEL^{D52,398A} は、既報 [49] に従い、次のように発現、精製した。野生型あるいは変異体の GroEL を発現する *pET* ベクターを用いて形質転換した大腸菌 BL21 (DE3) を、Amp 50 µg/ml を含む LB 寒天培地に塗布し、37 °C のインキュベーターで一夜培養してコロニーを得た。滅菌した爪楊枝でコロニーを突き、Amp 50 µg/ml を含む LB 培地 5 mL を収めた試験管へ植菌し、37 °C のインキュベーターで一夜振盪培養した。Amp 50 µg/ml を含む LB 培地 2 L を収めた 5L 三角フラスコに菌液 200~800 µL を植菌し、37 °C の大型振盪培養器 (innova42, Eppendorf) で巡回培養した。培養液の濁度が OD₆₀₀ = 0.7~0.8 になったら終濃度 1 mM の IPTG を加え、2 時間誘導培養した。培養後、10,000 rpm、4 °C の大型遠心機 himac CR20G II (日立工機) を用い、15 分遠心して集菌した。菌体のペレットをゴムベラでかき集め、風袋測定済みの 50 mL のコンカルチューブに移し、7,000 rpm、4 °C の卓上遠心機 MX-300 (トミー精工) で 10 分遠心後、アスピレーターで上清を除去し、使用するまで -80 °C で保管した。なお、プレカルチャーの培養液は、80% グリセロールと等量混合し、グリセロールストックとして -80 °C に保管した。

凍結菌体を解凍し、1 mM EDTA、1 mM PMSF を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を用いて菌体凍結を懸濁し、ステンレスビーカーに移した。クーラーボックスでステンレスビーカーを氷冷したまま、スタンダード 1/2 タップ、フラットチップを具えた SONIFIRE 250 (Branson) を用い、Output 8、Duty cycle 50% の設定で 10 分間の超音波照射を 3 回以上繰り返した。40,000 rpm、4 °C の超遠心機 himac CS120GXL (日立工機) を用いて菌体破砕液を 30 分間遠心し、上清をトールビーカーに回収した。上清に攪拌子を入れ、泡立たないようにスターラーで攪拌しながら終濃度 20% 硫酸アンモニウム (硫安) となるように顆粒を少しずつ加え、さらに 30 分間室温で攪拌して飽和させた。硫安飽和後の上清を再び 40,000 rpm、4 °C で 30 分間遠心し、上清を新しいビーカーに回収した。

疎水クロマトグラフィーによる初期精製のため、ガラスエコノカラム (Bio-Rad) に TOYOPEARL Butyl-650M 樹脂 (東ソー) を収め、20% 硫酸、1 mM EDTA を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を 5 CV 通液して平衡化した。遠心上清を樹脂にアプライし、自然落下で濾液を回収した。カラム溶出口から濾液をマイクロピペットで 3 μ L 採取し、96 well に収めた 100 μ L の Bradford 試薬 (CBB プロテインアッセイ試薬、ナカライテスク) に混合して定性的にタンパク質の溶出を確認した。樹脂を枯らさないように緩衝液を加え、Bradford 試薬の発色が十分に低減したら、カラムにフローアダプターを取り付けて流速が一定になるように調整した。GroEL の基質剥離のため、20%硫酸、1 mM EDTA、10% MeOH を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) をカラムに流し、タンパク質溶出が低減するまで通液した。MeOH を除去するため、20% 硫酸、1 mM EDTA を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を再び流して洗浄した。洗浄後、3~5 CV の 20-0% 硫酸勾配を行い、ガラスチューブを具えたフラクションコレクターで画分が 8 mL/tube となるように回収した。勾配終了後はただちに 1 mM EDTA を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を樹脂に追加し、タンパク質溶出がなくなるまで画分回収を続けた。12% ポリアクリルアミドゲルを用いて 2 回の超遠心上清、沈殿、および勾配溶出画分を試料として SDS-PAGE を行った。なるべく夾雑物の少ない画分範囲を選択し、MWCO 100 kD の遠心式フィルタユニット Amicon Ultracel-15 (品番 UFC910024、Merck) 用いて、総量 8 mL にまで濃縮した。

ゲル濾過クロマトグラフィーのため、100 mM Na₂SO₄、20% MeOH を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で Sepharose CL-4B 樹脂 (GE Healthcare) をあらかじめ平衡化した。緩衝液を樹脂界面まで下げてから、濃縮試料を樹脂にアプライして染みこませ、再び緩衝液を満たしてフローアダプターを装着した。試料をアプライしてからカラム溶出液を 1L シリンダーで受け、Void volume 700~900 mL を回収後、15 mL コニカルチューブを具えたフラクションコレクターを用い、定性的にタンパク質溶出を確認しながら 14 mL/tube で画分を回収したのち、12% ポリアクリルアミドゲルを用いて溶出画分を SDS-PAGE 解析した。なるべく夾雑物の少ない画分範囲を選択し、新しい Amicon Ultracel-15 で遠心濃縮した。必要に応じ、100 mM Na₂SO₄、20% MeOH を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) を溶離液とする TSK-GEL G3000SW または G3000SW_{XL} (共に東ソー) を

具えた HPLC を用いて、試料の精製度を向上させた。濃縮試料は最後に 1 mM EDTA を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で十分置換し、終濃度 65% 硫酸になるよう硫酸アンモニウムを加えてタンパク質沈殿をさせた後、使用まで 4 °C で保管した。

使用時は、65% 硫酸沈殿した試料液を穏やかに転倒混和後、一定量をマイクロチューブへ採取し、14,500 rpm、4 °C の卓上遠心機で繰り返して沈殿させ、上清を除去した。ペレットに 100 mM KCl、5 mM MgCl₂ を含む 20 mM HEPES/KOH 緩衝液 (pH 7.5) (HKM 緩衝液) を最小量加えて溶解した。HKM 緩衝液であらかじめ平衡化した PD-10 カラム (GE Healthcare) にアプライし、カラム溶出液をマイクロチューブで一定量ずつ回収した。Bradford 法により、BSA を標準曲線として脱塩タンパク質の濃度を定量し、GroEL タンパク質濃度 0.8 mg/ml を 1 μM として換算した。

GroES

野生型 GroES (GroES^{WT}) は既報 [49] に従い、次のように発現、精製した。菌体発現から疎水クロマトグラフィーまでを GroEL 同様に実施後、フラクションコレクターで回収したカラム溶出液の画分を試料に、14% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。夾雑物になるべく少ない画分範囲を選択し、透析膜チューブ Spectra/Por Dialysis membrane (MWCO:6000-8000、Spectrum) へ収めた。5L の 1 mM EDTA 含有 25 mM クエン酸緩衝液 (pH 4.3) で 4 回透析し、試料液の溶媒を置換した。4 °C、14,000 rpm の大型遠心機 himac CR20G II (日立工機) で試料液を 10 分間遠心し、上清を回収した。陽イオン交換クロマトグラフィーのため、TOYOPEARL SP-650M 樹脂に、1 mM EDTA 含有 25 mM クエン酸緩衝液 (pH 4.3) を 5 CV 通液して平衡化した。ペリスタルティックポンプを用いて、フローアダプター無しに遠心上清を樹脂にアプライした。試料液を通液後、1 mM EDTA 含有 25 mM クエン酸緩衝液 (pH 4.3) を追加し、フローアダプターを装着して通液を続けた。CBB プロテインアッセイ試薬を用いて定性的にタンパク質溶出を確認し、溶出ピークを過ぎたら、3~5 CV の 0-1M NaCl 勾配溶出を行い、カラム溶出液をフラクションコレクターにて 8 mL/tube で回収した。14% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、夾雑物になるべく少ない画分範囲を選択した。MWCO が 30 kD (品番 UFC903024、Merck) または 10 kD (品番 UFC901024、Merck) の遠心式フィ

ルタユニット Amicon Ultracel-15 で遠心濃縮し、最後に 1 mM EDTA を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に置換した。濃縮試料が 65% 硫酸溶液になるよう硫酸アンモニウムを混合し、脱塩するまで 4 °C で保存した。

使用時は、GroEL 同様に硫酸沈殿試料のペレットを HKM 緩衝液で溶解し、Nap5 カラム (GE Healthcare) を用いて脱塩した。Bradford 法によるタンパク質定量を行い、GroES タンパク質濃度 0.073 mg/mL を 1 μ M として換算した。

金属ナノ粒子

安定化剤としてクエン酸が加えられている平均粒径 2.2 nm または平均粒径 4 nm の金ナノ粒子 (Au NP) は、Nanopartz Inc. から購入した。平均粒径 2 nm のトリメチルアンモニウム修飾プラチナナノ粒子 (Pt NP) は、田中貴金属工業から購入した。トルエン分散されている粒径 4.0-5.4 nm の蛍光波長 460 nm の量子ドット (Lumidot™ CdS - 460) は、Sigma-Aldrich から購入し、EtOH 洗浄を繰り返したのち超純水へ分散した。平均粒径 5 nm で蛍光波長 490 nm の量子ドット (Trilite™ Fluorescent Nanocrystals 490) または平均粒径 5 nm で蛍光波長 575 nm のカルボキシ基修飾量子ドット (Trilite™ Fluorescent Nanocrystals 575 nm - Carboxy) は、Cytodiagnosics から購入した。平均粒径 7.5 nm のオクタデシルアミンと両親媒性ポリマーで被覆された蛍光波長 600 nm の量子ドット (QSH-600) は、Ocean NanoTech から購入した。量子ドットは便宜的に、蛍光波長に応じて QD460、QD490、QD575、QD600 と呼称する。

試薬類

ATP と ADP は、Roche Diagnostics より購入した。必要に応じて、ATP を 2M グルコース、7.5 unit の ADP-hexokinase (Cat. No. 11426362001、Roche Diagnostics) と共に 30 分室温静置し、10 mM ADP に変換したものを使用した。その他の試薬類は、すべて特級を使用した。

2-2-2. 実験手順

FePt NP の合成

白金鉄ナノ粒子 (FePt NP) の合成は、Sun らの方法を参照した[50]。具体的には、FePt ナノ粒子は、酢酸アセトン鉄(III) (1 mmol/L) と酢酸アセトン白金(III) (1 mmol/L) を Ar 雰囲気下、300 °C のテトラエチレングリコール中で 1 時間還流した。その後、粒子表面のオレイン酸修飾では、温度を 200 °C まで下げ、オレイン酸 10 ml を加えて 30 分還流し、放冷した。粒子表面のピルビン酸修飾では、温度を 150 °C まで下げ、ピルビン酸 20 ml を加えて 2 時間還流し、放冷した。粒子表面を修飾しない場合は、そのまま放冷した。FePt NP 合成後のテトラエチレングリコール溶媒に、終濃度 50% の EtOH を混和し、19,000×g で遠心沈殿し、一連の実験に使用するまで EtOH に浸漬して 4 °C で遮光保管した。FePt NP を使用する前に、遠心を繰り返して EtOH で洗浄後、超純水を加えて超音波クリーナーバスを用いて懸濁した。合成した粒子の懸濁液を TEM 観察し、200 個以上の粒径を数えて平均粒径±標準偏差を算出した。

GroEL/GroES 複合体の金属ナノ粒子内包実験

GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体が金属ナノ粒子を内包するかどうか確認するため、1 μM の GroEL^{D52,398A}、2 μM の GroES、1 mM ATP、および 10 mg/mL の FePt NP を HKM 緩衝液に添加して試料を調製した (FePt NP/EL/ES/ATP)。コントロールとして、FePt NP のみ、GroEL^{D52,398A} のみ、空の GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体 (EL /ES/ATP)、FePt NP と GroEL と ATP の混合物 (FePt NP/EL/ATP) を調製した。

GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体が空洞に内包できる粒子サイズの範囲を調べるため、HKM 緩衝液に直径 2.2 nm の Au NP (0.05 mg/mL)、直径約 5 nm の QD460 (1 mg/mL)、および直径約 7.5 nm の QD600 (1 mg/mL) のいずれかを含め、1 μM の GroEL^{D52,398A} を混合後、2 μM の GroES、1 mM ATP を加えて試料を調製した。

GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体はどのような試料の混合順序で金属ナノ粒子を内包するのかわかるため、FePt NP 含有試料を次のように調製した。HKM 緩衝液中で予め FePt NP (10 mg/mL) と 0.1 μM GroEL^{D52,398A} を 1 分間混合し、次いで 0.2 μM GroES と 1 mM ATP を加えた (FePt NP/EL_ES/ATP)。比較試料として、FePt NP 単独 (FePt NP)、粒

子なしに GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体を形成した試料 (EL_ES/ATP)、FePt NP、GroEL^{D52,398A}、GroES をマイクロピペットで 1 分間混合後に ATP を加えた試料 (FePt NP/EL/ES_ATP)、FePt NP と GroES をロータリーシェーカーで 30 分以上混合後に GroEL^{D52,398A} と ATP を混合した試料 (FePt NP/ES_Rotaty_EL/ATP)、FePt NP と GroES をマイクロピペットで 1 分間混合後に GroEL^{D52,398A} と ATP を混合した試料 (FePt NP/ES_EL/ATP)、GroES と同タンパク質量の牛血清アルブミン (BSA) 予め FePt NP と混合後に GroEL^{D52,398A}、GroES、ATP を加えた試料 (FePt NP/BSA_EL/ES/ATP) を調製した。

FePt NP 含有 GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体試料の経時観察のため、上述の FePt NP/EL_ES/ATP 試料を調製後 4 °C に保管し、調製から 1 日目、4 日目、7 日目、10 日目に試料液をピペッティングして再懸濁し、一部を観察試料に供した。

GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体が反応機序に従って異なる種類の NP を内包するかどうか確認するため、次のように試料を調製した。1 μ M GroEL^{D52,398A} と Pt NP (0.01 mg/mL) または Au NP (0.01 mg/mL) をマイクロチューブで 1 分間混合した後、1 μ M GroES、1 mM NaF、2 mM BeCl₂、および 2 mM ADP を添加して、GroEL リングの片側に NP を内包した弾丸状複合体 (Pt NP/EL/ES/ADP、または Au NP/EL/ES/ADP) を形成させた。NP 内包弾丸型 GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体の試料液を FePt NP (10mg/mL) と混合後、0.5 μ M GroES と 1mM ATP を添加してフットボール型複合体 (Pt NP/EL/ES/ADP \cdot BeFx_FePt NP/ES/ATP、または Au NP/EL/ES/ADP \cdot BeFx_FePt NP/ES/ATP) を形成させた。

これらの試料液は、透過電子顕微鏡 (TEM) を用いた観察のため、次のように処理した。コロジオン支持膜付 Cu グリッド (EM Japan) は、イオンコーター IB-II (エイコーエンジニアリング) に収め、3 mA で 30 秒間グロー放電することにより、事前に親水化処理を行った。また、試料液は、グリッド上の GroEL/GroES 複合体の密度調整のため、1 mM ATP 含有 HKM 緩衝液で適宜希釈して用いた。はじめに、グリッドに試料滴を 3~6 μ L 滴下して 30 秒程静置後、グリッドに対して直角に当てた濾紙片で試料滴を吸い取った。次いで、ただちに 6 μ L の 超純水をのせて同様に濾紙片で吸い取った。最後に、ネガティブ染色のため、NaOH で pH 4.0 に調整した電子顕微鏡グレードの 0.5% りんタングステン

酸 (TAAB) を 6 μL のせて 30 秒程度静置後、同様に濾紙片で吸い取った。金属ナノ粒子のみを観察する場合は、適度に希釈した粒子懸濁液を親水化グリッドへ滴下し、1 分静置後、濾紙片で吸い取り、染色無しに乾燥した。調製したグリッドはデシケーターで一夜乾燥後、加速電圧 100 kV の透過電子顕微鏡 JEM 2000-EX または JEM 2100 (日本電子) で観察した。

GroEL/GroES 複合体被内包金属ナノ粒子の成分分析

試料を次のように調製した。FePt NP (10 mg/mL) あるいは直径 4 nm の Au NP (0.05 mg/mL) を含む HKM 緩衝液に 1 μM の GroEL^{D52,398A} を混合後、2 μM の GroES、1 mM ATP を加えた。試料は、グリッド上の GroEL/GroES 複合体の密度調整のため、1 mM ATP 含有 HKM 緩衝液で適宜希釈した。

走査型透過電子顕微鏡-エネルギー分散型 X 線分光法 (STEM-EDS) による解析のため、Carbon C20-C10 STEM Cu100P グリッド (#10-1023、応研商事株式会社) をイオンコーターで親水化処理を行った。TEM 観察同様にグリッドを調製し、ネガティブ染色剤には、試料が FePt NP を含有する場合はりんタングステン酸 (pH 4.0) を用い、Au NP を含有する場合は NaOH で pH 4.0 に調整したりんモリブデン酸 (TAAB) を用いた。グリッドは、観察までデシケーターに保管した。STEM-EDS 解析は、国立研究開発法人 物質・材料研究機構にて、EDS 検出器を具えた加速電圧 200kV の透過型電子顕微鏡 JEM-2100F を用いて行った。

金属ナノ粒子含有 GroEL/GroES 複合体の粒径測定

試料を次のように調製した。直径約 5 nm の QD460 (1 mg/mL) を含む HKM 緩衝液に、終濃度 0.1 μM 、0.5 μM 、1.0 μM の GroEL^{D52,398A} を加えて 1 分間混合後、GroEL の 2 倍モル濃度の GroES と 1 mM ATP を添加した。動的光散乱法による試料の粒径測定 (DLS) のため、赤色レーザー (632.8 nm) を搭載した Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical) を使用した。光路長 1 cm のポリスチレンキュベットに試料を充填し、25 °C で少なくとも 30 回の測定を 10 秒ごとに測定した。

金属ナノ粒子含有 GroEL/GroES 複合体の HPLC 分析

試料を次のように調製した。粒径 5 nm の蛍光波長 490 nm の QD490 (0.01 mg/ml) を含む HKM 緩衝液に 1 μ M GroEL^{D52,398A} を 1 分間混合後、1 μ M GroES、1 mM NaF、2 mM BeCl₂、および 2 mM ADP を添加して、弾丸状複合体を形成させた。NP 含有弾丸型 GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体の試料液を QD575 (0.01 mg/mL) と混合後、1 μ M GroES と 1mM ATP を添加してフットボール型複合体を形成させた。

ゲル濾過カラム G3000SW_{XL} (東ソー) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析のため、カラムを 100 mM KCl、5 mM MgCl₂、50 mM Na₂SO₄ を含む 20 mM HEPES/KOH (pH 7.0) の溶離液を用いて流速 0.5 mL/min であらかじめ平衡化した。調製した試料液を 19,000 $\times g$ で遠心し、上清 25 μ l をカラムにアプライし、紫外波長 280 nm、励起波長 370 nm/蛍光波長 490 nm または励起波長 370 nm/蛍光波長 575 nm の検出器を用いて 30 分間分析した。HPLC のクロマトグラムは ChromNAV、Ver. 1.08.02 (日本分光) で取得した。

2-3. 実験結果

2-3-1. 白金鉄ナノ粒子の粒径分布

合成した FePt NP を超純水に懸濁し、TEM 観察を行った。TEM 視野で FePt NP は黒点のように観察されたので、TEM 像から平均粒子径を測定した。TEM 視野上で非修飾 FePt NP は分散して見え、平均粒径は 4.88 ± 1.43 nm ($n = 213$) だった (Fig. 6A)。オレイン酸修飾 FePt NP (FePt NP-OA) は凝集しており (Fig. 6B)、平均粒径は 4.68 ± 1.63 nm ($n = 713$) だった。ピルビン酸修飾 FePt NP (FePt NP-PA) は最も分散しているように見え (Fig. 6C)、平均粒径は FePt NP-PA が 3.99 ± 1.00 nm ($n = 713$) だった。

2-3-2. 金属ナノ粒子内包 GroEL/GroES 複合体の形成

GroEL/GroES 複合体が FePt NP を内包するかどうか確認するため、合成した FePt NP のうち平均粒径が最も小さく水中への分散の良い FePt NP-PA を用いて試料調製し、TEM 観察を行った。FePt NP-PA は、単独では黒点として観察された (Fig. 7A)。GroEL^{D52,398A} 単独の TEM 像は、上面図として見えるリング状の構造と、側面図として見えるダブルリングの水平線を持つ長方形の構造の 2 つの形態を示した (Fig. 7B)。ATP と GroES の存

在下の GroEL^{D52,398A} は、以前に報告されているように、GroES が GroEL 分子の両端に結合しているフットボール型の形状をした複合体を示した (Fig. 7C)。GroES 非存在下では、GroEL^{D52,398A} は FePt NP-PA を空洞内に取り込むことができず、明るい中空構造を示した (Fig. 7D)。FePt NP-PA を含有した GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体 (FePt NP/EL/ES/ATP) では、GroEL^{D52,398A} の空洞に FePt NP が黒点として見え、GroEL^{D52,398A} 単独または空のフットボール型複合体と比較して暗い中央領域を示した (Fig. 7E)。

FePt NP-PA が GroEL/GroES 複合体に内包されたので、比較のため FePt NP-OA または非修飾 FePt NP を用い、FePt NP 含有 GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体を調製し、TEM 観察をした。FePt NP-OA または非修飾 FePt NP は、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体の内腔に捕捉された粒子が少なく、FePt NP-PA にくらべて内包される効率が悪いことがわかった (Fig. 7F, G)。よって、以後はピルビン酸修飾 FePt NP (FePt NP-PA) を FePt NP として用いた。

次に、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体が空洞に内包できる粒子サイズの範囲を調べるため、直径 2 nm の AuNP (Fig. 8A)、直径 5 nm の QD460 (Fig. 8B)、および直径約 7.5 nm の QD600 (Fig. 8C) を用いて複合体を形成した。Au NP は、GroEL^{D52,398A} のリングまたはフットボール型複合体に内包され、小さな黒点のように観察された (Fig. 8D)。QD460 も内包されたが、QD の粒子の輪郭とコントラストは Au NP と比較してぼやけて見えた (Fig. 8E)。QD600 は GroEL^{D52,398A} に高効率で捕捉されたが、GroEL^{D52,398A} がいずれも起立して見えたことから、粒子を内包した状態で GroEL/GroES 複合体を形成しているかどうかまでは判別できなかった (Fig. 8F)。GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体は、FePt NP だけでなく、貴金属ナノ粒子や量子ドットを補足したり内包したりできることがわかった。

TEM 以外の方法で金属ナノ粒子含有 GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体を解析するため、FePt NP または Au NP 存在下で形成した GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体試料の STEM-EDS を行った。STEM の暗視野像では、空の GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体は黒く見え、ネガティブ染色に含まれるタングステン (W) は白く見えた (Fig. 9A)。FePt NP は W よりも高い輝度を示して白い点のように観察され、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体によって内包された粒子は簡単に見つけることができた (Fig. 9B)。FePt NP 内包 GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体の EDS 点分析により、STEM で NP が観察されている位置 (Fig. 9C の 1、4、5) で Pt

M_{α} (2.048 keV)、 $Fe K_{\alpha}$ (6.398 keV)、および $Pt L_{\alpha}$ (9.441 keV) の成分ピークが検出された。 Fe と Pt のピークは、複合体の空のチャンバー内では観察されず (Fig. 9C の 2)、バックグラウンドの W のピーク (Fig. 9C の 3、6) とともに区別することができた。 $AuNP$ 含有 $GroEL^{D52,398A}/GroES$ 複合体試料においては、りんモリブデン酸でネガティブ染色した。 $FePt$ NP 同様、STEM 暗視野では輝度の高い Au NP を内包した $GroEL^{D52,398A}/GroES$ 複合体を明確に区別できた (Fig. 10A)。 Au NP 内包 $GroEL^{D52,398A}/GroES$ 複合体の EDS 分析では、 $GroEL^{D52,398A}/GroES$ 複合体チャンバー内の NP の位置から $Au M_{\alpha}$ (2.120 keV) と $Au L_{\alpha}$ (9.712 keV) の特徴的なピークが示され (Fig. 10B の 1、4、5)、バックグラウンド (Fig. 10B の 3、6、9) や、空の $GroEL^{D52,398A}/GroES$ 複合体チャンバー (Fig. 10B の 2、7、8) と区別できた。これらのことから、STEM-EDS は、TEM よりも $GroEL^{D52,398A}/GroES$ 複合体に金属ナノ粒子が含まれていることを明確にした。

次に、DLS を用いて、 $GroEL^{D52,398A}/GroES$ 複合体による粒子内包の可否を評価するため、量子ドットの $CdS460$ (1 mg/mL) を含む HKM 緩衝液中に $GroEL^{D52,398A}$ を 0.1、0.5、1.0 μM のいずれかの濃度で混合後、 $GroEL$ の 2 倍モル量の $GroES$ を加え、1 mM ATP を添加した試料のサイズを測定した。 $QD460$ 粒子単独では、緩衝液中で 2 つのピークを示し、それらの平均試料サイズは 904.8 ± 113.9 nm だった (Fig. 11A)。 $QD460$ 存在下で $GroEL^{D52,398A}/GroES$ 複合体を形成した試料では、 $GroEL^{D52,398A}$ および $GroES$ の濃度が増加するにつれ、小さな試料サイズを含むブロードピークが現れるようになった (Fig. 11C、D)。さらに、1.0 μM $GroEL^{D52,398A}$ および 2.0 μM $GroES$ の存在下の $QD460$ はシャープなピークとなり、 24.1 ± 0.50 nm の平均試料サイズを示し (Fig. 11E)、空の $GroEL^{D52,398A}/GroES$ 複合体の平均試料サイズ (Fig. 11B) とほぼ同じになった。なお、試料サイズの 10000 nm 付近のごく小さなピークは $GroEL^{D52,398A}/GroES$ 複合体が含まれるときにだけ出現したため、タンパク質試料液にもとから含まれる僅かな凝集物が反映されたか、タンパク質含有試料測定時のベースラインノイズ[51]が現れたものとみられる。

これらの結果は、試料に含まれる $QD460$ のほとんどが $GroEL^{D52,398A}/GroES$ 複合体に内包されたことによって、水溶液中の $QD460$ の凝集が消失していることを示している。

2-3-3. 金属ナノ粒子内包 GroEL/GroES 複合体形成の効率の向上

FePt NP 含有 GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体は、どのような試料の混合順序で粒子を効率よく内包するのか調べるため、複合体調製までの混合順序を変えた試料を調製し、TEM 観察を行った。

FePt NP 単独では、緩衝液中で凝集していた (Fig. 12A)。一方、空の GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体は、丸、または楕円状に白く見え、よく分散していた (Fig. 12B)。FePt NP 存在下で GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体を形成した試料においては、複合体内に黒点が見られる場合は FePt NP が内包されたと判断し、視野中の複合体総数のうち、粒子内包複合体が占める割合を粒子内包率として表した。粒子内包率は、FePt NP と GroEL^{D52,398A} を混合後、GroES、ATP を追加した試料 (FePt NP/EL_ES/ATP) が 84.4% (Fig. 12C)、FePt NP と GroEL^{D52,398A}、GroES を混合後、ATP を追加した試料 (FePt NP/EL/ES_ATP) が 83.2% (Fig. 12D)、Fig. 12D と混合順序は同じだが ATP 追加前にロータリーシェーカーで 30 分以上攪拌した試料 (FePt NP/EL/ES_(shaker)_ATP) が 95.4% (Fig. 12E)、FePt NP と GroES を混合後、GroEL^{D52,398A} と ATP を追加した試料 (FePt NP/ES_EL/ATP) が 59.3% (Fig. 12F)、FePt NP と BSA を混合後、GroEL^{D52,398A}、GroES、ATP を追加した試料 (FePt NP/BSA_EL/ES/ATP) が 17.7% (Fig. 12G) だった。

1 分間のピペッティングによる混合で 80%以上の GroEL^{D52,398A} に FePt NP を内包できることがわかったので (Fig. 12C)、同様に調製した試料を調製から 3 日ごとに経過観察したところ (Fig. 13A-D)、10 日目でも GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体は概ね 80%前後の粒子内包率を示した (Fig. 13E)。GroEL^{D52,398A} が一度内包した FePt NP は、GroEL^{D52,398A}/GroES 複体の半減期を超えても維持されることがわかった。また、この方法で調製した試料の溶媒を、遠心式フィルタユニットを用いて HKM 緩衝液から生理食塩水へ置換しても、試料中の複合体は維持されており、粒子内包率は 71.4% (n = 227) を示した (Fig. 13F)。

2-3-4. 2 種類の金属ナノ粒子の GroEL/GroES 複合体への内包

GroEL と GroES は、BeF_x が共存するとき、ADP 存在下で弾丸型複合体を形成し、ATP 存在下でフットボール型複合体を形成することが分かっている [52]。そこで、GroEL^{D52,398A}

が反応機序に従って 2 つの金属ナノ粒子を内包できるかどうか分析した (Fig. 14A)。TEM 観察においては、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体に内包する 1 粒子目に Pt NP (Fig. 14B) または Au NP (Fig. 14C) を使用し、2 粒子目に FePt NP を使用した (Fig. 14D)。1 粒子目を内腔に補足した GroEL^{D52,398A}/GroES/ADP·BeF_x 弾丸複合体 (NP/EL/ES/ADP·BeF_x) が TEM 観察され (Fig. 14E)、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体の Pt NP 内包率は 23.1% (n = 333) だった。Au NP を使用して弾丸型複合体を形成した場合の粒子内包率は、33.0% (n = 100) だった。Pt NP/EL/ES/ADP·BeF_x 弾丸型複合体または Au NP/EL/ES/ADP·BeF_x 弾丸型複合体は、2 粒子目の FePt NP と GroES の存在下で ATP を追加されたとき、Pt NP (薄灰色) と FePt NP (黒色) または Au NP (小さな黒点) /FePt NP (大きな黒点) で内腔が占められているフットボール型複合体を形成した (Fig. 14F, G)。異なる 2 粒子を内包したフットボール型複合体の個数は少なかったが、1 分子の GroEL/GroES 複合体の中に Pt NP/FePt NP または Au NP/FePt NP の組合せで入っている 2 粒子の距離は、平均 10.84 nm (n = 4) だった。これらの結果は、2 つの金属ナノ粒子が、GroEL^{D52,398A} の段階的な反応に従って連続的に GroEL/GroES 複合体に内包されたことを示した。

続いて、いずれも粒径 5 nm の QD490 と QD575 を用いて 2 粒子内包 GroEL/GroES 複合体を形成し、ゲル濾過カラムによる HPLC 分析を行った。GroEL/GroES 複合体は、ゲル濾過カラム G3000SW_{XL} を用いて 30 分間の HPLC 分析をしたとき、保持時間 12 分付近に溶出されることが分かっている [32]。そこで、1 粒子目に QD490 を、2 粒子目に QD575 を用いて 0.5 μM のフットボール型 GroEL^{D52,398} 複合体を調製し、コントロール試料と共に HPLC 分析に供した。励起波長 410 nm/蛍光波長 490 nm、および励起波長 410 nm/蛍光波長 575 nm のそれぞれのモニタリングにおいて、保持時間 12 分付近に蛍光ピークが示された (Fig. 15)。一方、QD490 存在下にて GroEL^{D52,398A} と GroES をモル比 1 : 1 で混合後、ADP を添加したのみの比較試料では、励起波長 410 nm/蛍光波長 490 nm のモニタリングでは保持時間 12 分付近に蛍光ピークが立ったが、励起波長 410 nm/蛍光波長 575 nm のモニタリングではピークを示さなかった。また、どちらの QD も含まず、ADP で弾丸型複合体を形成し、ATP でフットボール型複合体を形成したコントロール試料では、蛍光波長 490 nm、575 nm のいずれも蛍光ピークを示さなかった。

2-4. 考察

GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体の空洞への金属 NP の内包を明らかにするため、TEM 観察、STEM-EDS 解析、および DLS 分析を行った。Table 2 は、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体への内包実験に用いた NP の一覧を示したものである。

はじめにピルビン酸修飾 FePt NP を用いて、GroEL^{D52,398A} に粒子を内包できるか検討したところ、ATP 存在下であっても、GroES を伴わない GroEL^{D52,398A} は粒子を内包していなかった (Fig. 7D)。ATP 存在下で GroES が共存し、GroEL^{D52,398A} /GroES 複合体を形成することにより、GroEL^{D52,398A} は初めて FePt NP を内包した状態を維持できた (Fig. 7E)。野生型 GroEL の場合、GroES なしに CdS NP を捕捉し、ATP 存在下で NP を放出すると報告されていることから [46]、GroEL はリング開口部で NP を捕捉するが、NP の材質によってはその後に粒子同士が凝集して GroEL リング開口部から外れてしまうのではないかと考えられる。

直径 4~5 nm で合成された FePt NP は、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体の約 5 nm の内腔にちょうど収まるサイズであったが、表面修飾の違いが GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体への取り込み効率に影響を与えた。FePt NP は、表面修飾剤としてオレイン酸とオレイルアミンを添加すると、オレイン酸の-COOH 基が Fe に共有結合して COO-Fe を形成し、オレイルアミンの-NH₂ は電子供与体として Pt に配位結合すると報告されている [53]。本研究ではオレイルアミンは使用せず、カルボン酸のみの添加とし、炭素数 18 のオレイン酸、または炭素数 3 のピルビン酸を用いて FePt NP を表面修飾した。ピルビン酸修飾 FePt NP は粒子単独でも水によく分散し (Fig. 6C)、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体に内包されやすかった (Fig. 7E)。一方、オレイン酸修飾 FePt NP は水中で凝集し (Fig. 6B)、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体に内包されにくかった (Fig. 7F)。カルボン酸の炭素数の違いが FePt NP の性質を水溶性と疎水性とに分け、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体への内包にも影響を与えたとみられる。また、非修飾 FePt NP は、水中分散したが (Fig. 6A)、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体には内包されにくかった (Fig. 7G)。非修飾 FePt NP の合成後の粒子表面では、Fe が酸化されて Fe₂O₃ に、あるいは水溶液中で水酸基を結合して Fe(OH)₂ になっている可能性が考えられる。それによって GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体による粒子内包効率を下げたのだとすると、金属ナノ粒子は表面酸化防止のために修飾剤を

施されており、また、合成からなるべく時間の経過していない状態で用いることが望ましいと考えられる。

FePt NP 以外の素材として、市販の Pt (田中貴金属工業社)、Au (Nanopartz 社)、CdS (Sigma Aldrich 社) または CdSe/ZnS_x (Ocean NanoTech 社) を用いたところ、粒径 2.2~7.5 nm の NP を GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体に内包できることがわかった (Fig. 8-17)。GroEL/GroES 複合体の内腔は結晶構造解析により約 5 nm と示されているが[21]、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体の空洞には粒径 7.5 nm の QD600 も内包でき、内包物を閉じ込めて膨れている状態が TEM 観察された (Fig. 8F)。GroEL は内腔に収まりきらない 82 kD のアコニターゼの一部をフォールディング基質として取り込むことや[54]、シングルリング変異体 GroEL では 86 kD の基質を取り込んで GroES と複合体を形成することが報告されており[55]、GroEL の各 7 量体リングには、空洞のサイズに比べて一回り大きい粒子も内包できる弾力性があるといえる。ただし、市販粒子の表面修飾基もまた、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体への粒子内包に影響を与えるとみられる。Au NP の安定化剤であるクエン酸は、カルボキシ基を 3 つ持つ水溶性の有機酸であり、Au 表面に作用するだけでなく、粒子の水中分散に寄与している。HPLC 分析で使用した QD490、QD575 は表面がカルボキシ基修飾されており、カルボン酸修飾粒子に似て水溶液に分散しやすい状態だった。表面修飾剤に含まれるカルボキシル基が粒子の分散に寄与しているとき、粒子は、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体に取り込みやすい状態になっていると考えられる。一方、Pt NP を被覆していたトリメチルアミンや QD600 の表面修飾の一部に使われていたオレイルアミンには、アミノ基が含まれている。これらの粒子はアミノ基のポジティブチャージによって、タンパク質のネガティブチャージと静電的に相互作用し、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体に取り込まれやすくなったと考えられる。QD600 は粒径が約 7.5 nm あるにもかかわらず、効率よく GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体に内包されたことから、粒子表面の一部にアミンがあることは GroEL の粒子内包に有利のようである。トルエン分散されていた QD460 は、表面修飾基の情報が公開されていなかったが、ホスフィンオキシドのような疎水性化合物で表面修飾されていたと推測される[56]。DLS では、EtOH 洗浄を経て水分散した QD460 が GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体に内包されて水溶液中に分散したことから (Fig. 11)、余剰の表面修飾剤は洗浄操作で排除でき、そのうえで

GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体に内包できることがわかった。ただし、オレイン酸修飾 FePt NP が GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体には内包しにくかったことから、粒子の材質によっては、表面洗浄をしても GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体に向かない可能性がある。これらの実験結果は、さまざまな分子量を持つ多くの細胞内タンパク質のフォールディングに関与している GroEL の幅広い基質特異的認識 [20]が、FePt、Au、Pt、QD などのさまざまな金属 NP の内包を可能にしたことを表していると考えられる。フェリチンのように金属イオンを取り込ませて金属ナノ粒子をつくるわけではないので、GroEL/GroES 複合体は粒子の材質を問わず内包できるといえる。

GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体の粒子内包率の向上においては、GroES と混合する前に NP を GroEL^{D52,398A} と混合するという単純な処理で約 95%にまで上昇した。一方、NP をあらかじめ GroES や BSA のような他のタンパク質と混合してしまうと、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体の NP 内包化効率を低下したことから、GroEL^{D52,398A} への NP の十分な吸着が、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体への粒子内包確実にするものと示唆された。一度形成された NP 含有 GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体は、調製から 10 日後でも複合体を維持しており、遠心濾過による溶媒置換にも耐えることがわかった。

GroEL が NP を内腔に落とし込むスキームは、GroEL^{D52,398A} は反応機序に従っているといえる。実際、ADP とフッ化ベリリウム (ADP・BeFx) を使用した 1 粒子目の NP 存在下での弾丸型複合体の形成は、ATP を使用した反対側のリングで 2 粒子目の NP を内包するフットボール型複合体を形成できることを示した (Fig. 14)。NP の材質が異なっても、NP 同士は表面修飾剤の厚みを隔てて隣り合うことが Ag NP と Au NP によって示されており [57]、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体によって各空洞に閉じ込められた Pt NP と FePt NP、Au NP と FePt NP との組み合わせも、これらの結果から近傍配置することは可能であるといえる。同様の調製方法で形成した異なる蛍光波長の QD を内包した GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体は、HPLC ゲル濾過分析により、それぞれの蛍光ピークを GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体溶出時間に示し、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体には 2 つの QD を内包したままゲル内を通過してくる強度があることも示された (Fig. 15)。GroEL/GroES 複合体が 2 つの粒子を同時内包すると、粒子同士は約 10 nm 以内に配置されることが示唆され、金属ナノ粒子の近接配置を可能にすることがわかった。

第 2 章についてまとめると、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体は、基質タンパク質の代わりに NP を内包でき、凝集しやすい NP を水溶液中に分散させるナノサイズカプセルとして利用できることを示した。

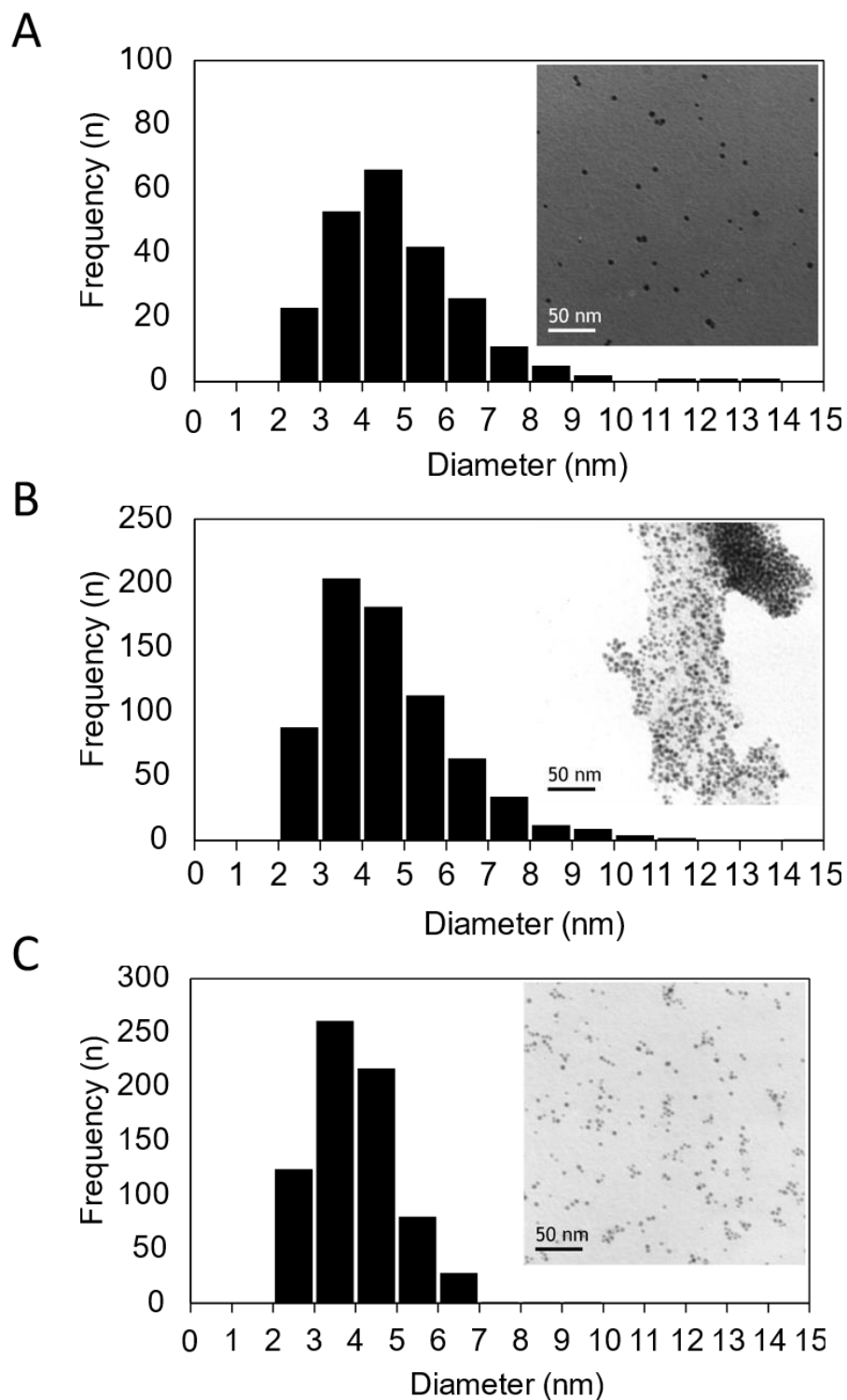


Fig. 6 Size distribution histogram and TEM image of FePt NP
 (A) unmodified FePt NP, (B) FePt-OA NP, and (C) FePt-PA NP. Average particle size of unmodified FePt NP, FePt-OA NP, and FePt-PA NP was 4.88 ± 1.43 nm, 4.68 ± 1.63 nm, and 3.99 ± 1.00 nm, respectively.

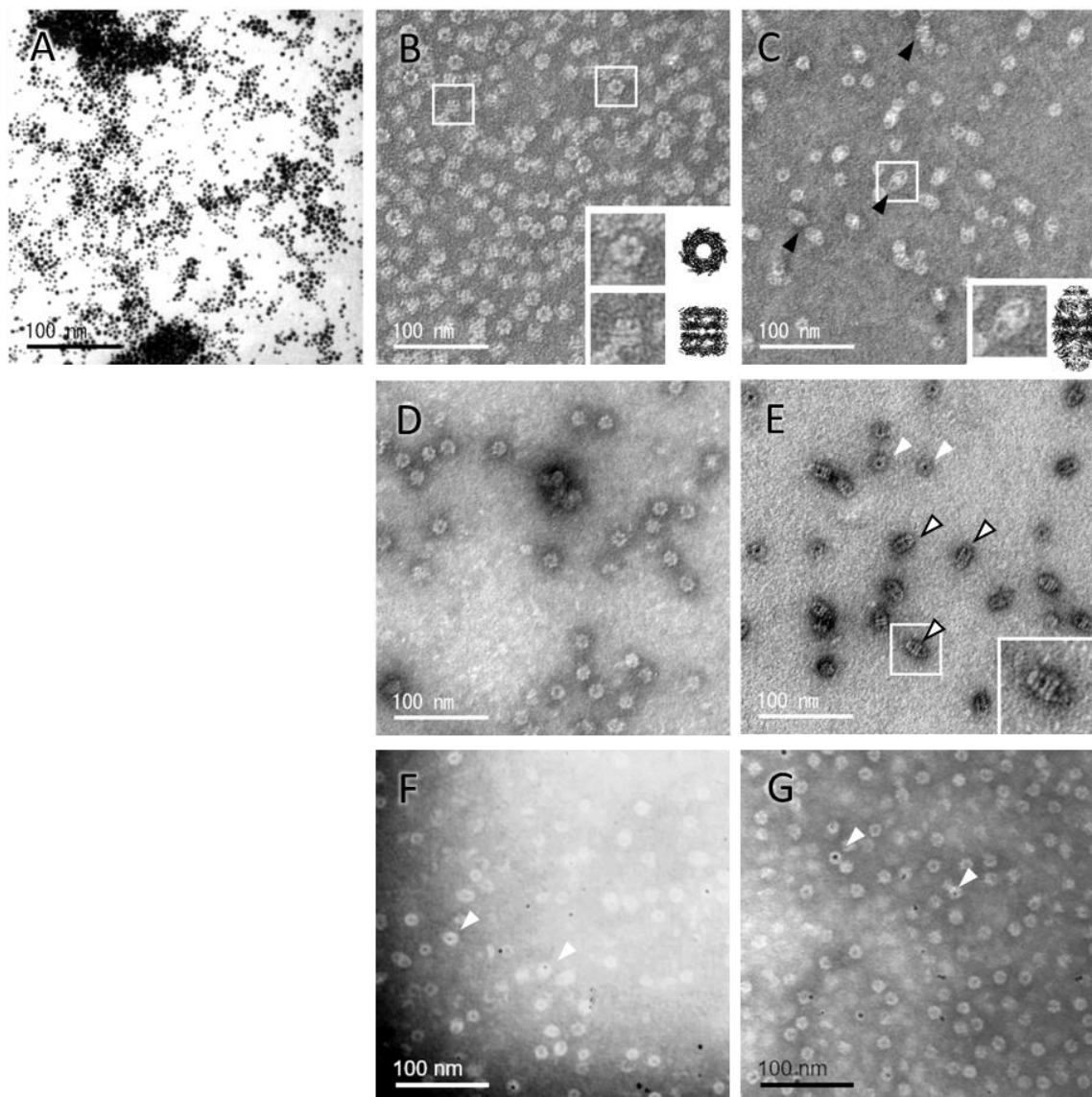


Fig. 7 TEM observation of GroEL/GroES complexes.

(A) Pyruvic acid-modified FePt NP (FePt NP-PA) image (B) GroEL^{D52,398A} (EL) image. The magnified figures extracted from white-lined squares were shown with top view and side view of GroEL crystal structure (PDB ID 1SS8). (C) Empty EL/ES/ATP complexes. Black arrowheads showed side view of football-shaped complexes. The magnified figures extracted from white-lined squares were shown with side view of football GroEL/GroES crystal structure (PDB ID 3WVL). (D, E) FePt NP-PA/EL/ATP (D) and FePt NP-PA/EL/ES/ATP (E), in which the NPs was mixed with EL and ATP in the presence (D) or absence (E) of ES. (F, G) FePt NP/EL/ES/ATP prepared using oleic acid-modified FePt NP (F) or unmodified FePt NP (G). White arrowhead showed top view of NP-encapsulating EL/ES complex. Black-open arrowheads showed side view of football-shaped NP-encapsulating EL/ES complexes.

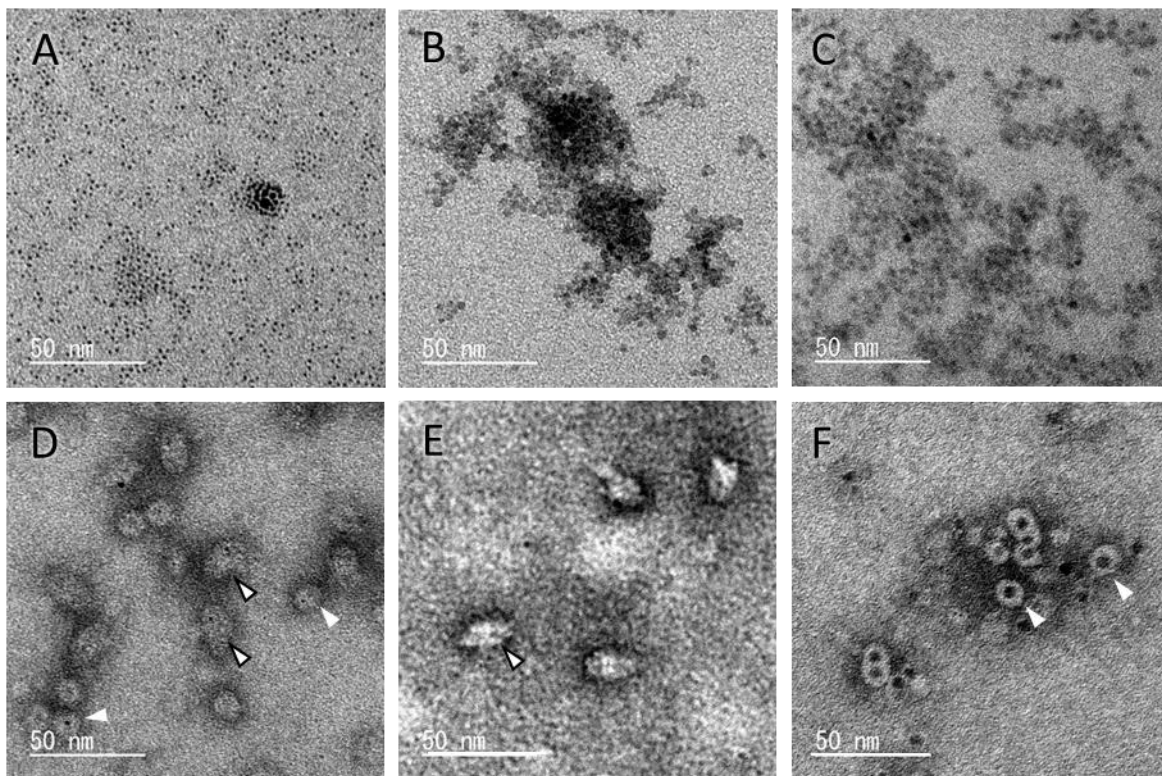


Fig. 8 TEM observation of EL/ES complexes including nanoparticles which variation of the size and materials.

(A) Au NPs, (B) QD460, (C) QD600, (D) Au NP/EL/ES/ATP, (E) QD460/EL/ES/ATP, and (F) QD600/EL/ES/ATP. White arrowhead showed top view of NP-encapsulating EL/ES complex. Black-open arrowheads showed side view of football-shaped NP-encapsulating EL/ES complexes.

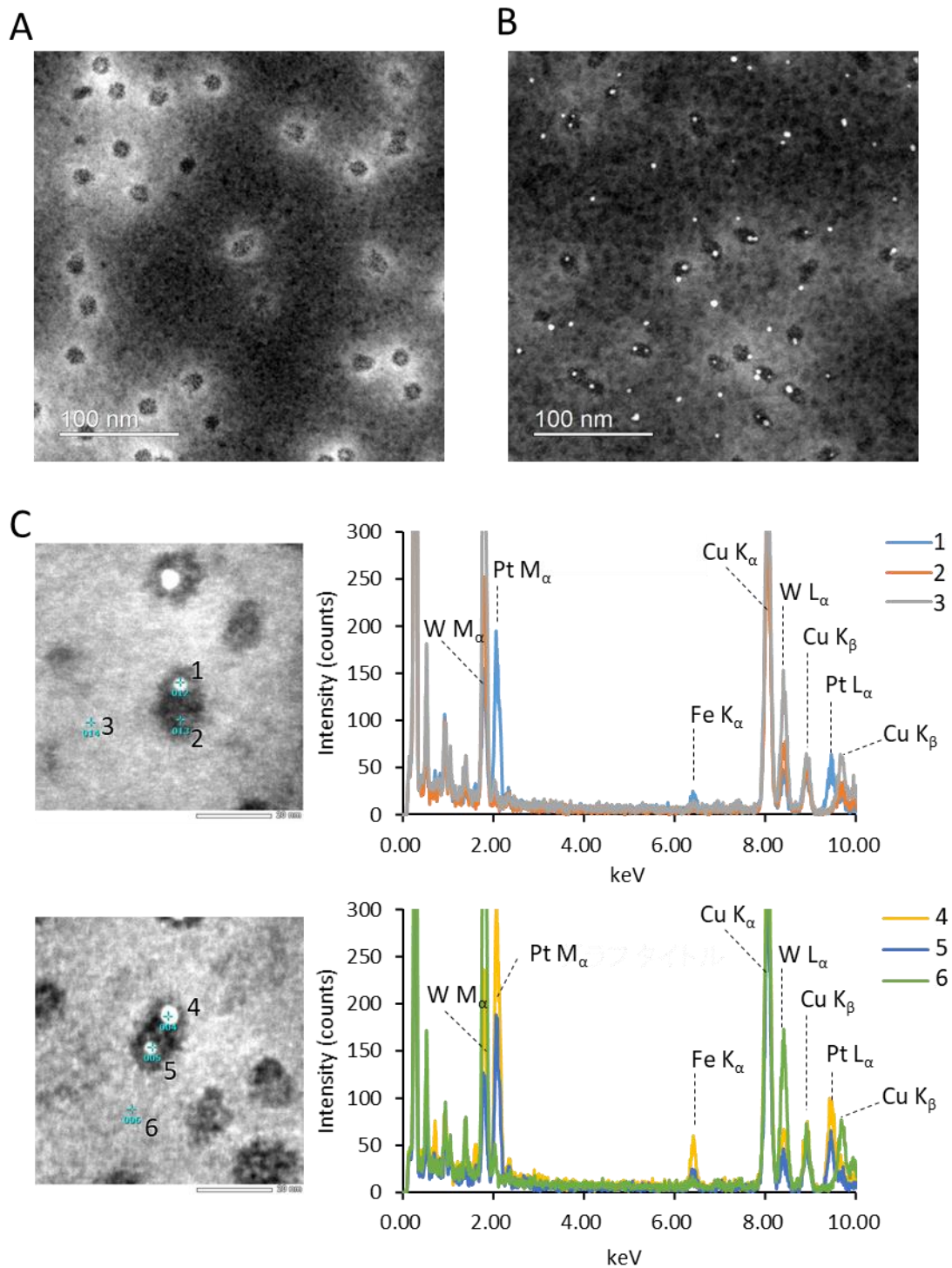


Fig. 9 STEM-EDS analysis of the FePt NP-encapsulating GroEL/GroES complexes. (A, B) STEM dark-field images of EL/ES/ATP (A) and FePt NP/EL/ES/ATP (B). The specimen was stained with phosphotungstic acid. (C) EDS spectrum at (1-6) points on the STEM views of FePt NP-encapsulating EL/ES complexes (left).

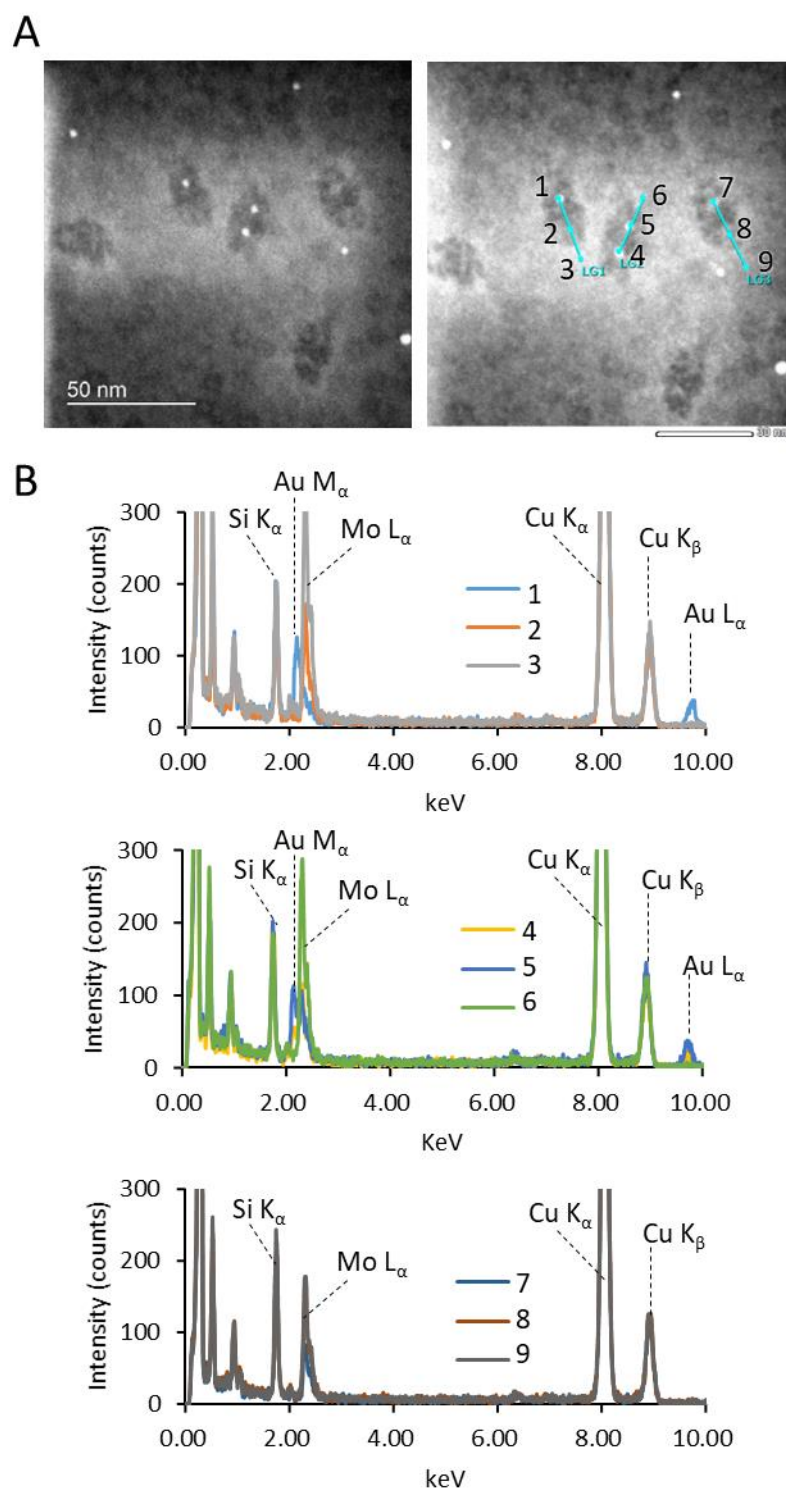


Fig. 10 STEM-EDS analysis of the Au NP-encapsulating EL/ES complexes.

(a) STEM dark-field images of Au NP/EL/ES/ATP (left) and EDS analysis points (right). The specimen was stained with phosphomolybdic acid. (b) EDS spectrum at (1-9) points of (a).

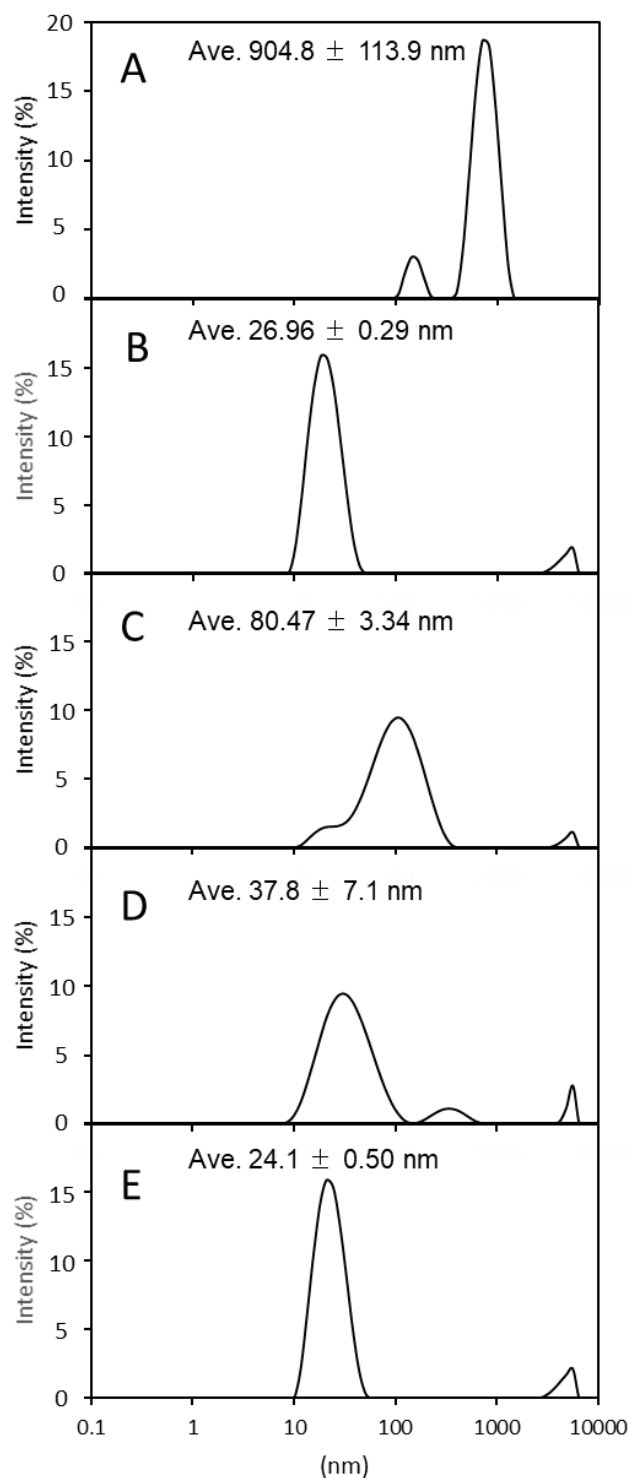


Fig. 11 Particle size distribution of QD460 encapsulated in GroEL/GroES complexes. DLS profiles of QD460 encapsulated in GroEL/GroES complexes. (A) 1 mg/mL QD460 NPs, (B) empty GroEL/GroES, (C) 1 mg/mL QD460 NPs mixed with 0.1 μ M GroEL, 0.2 μ M GroES, and 1mM ATP, (D) 1 mg/mL QD460 NPs mixed with 0.5 μ M GroEL, 1.0 μ M GroES, and 1mM ATP, and (E) 1 mg/mL QD460 NPs mixed with 1.0 μ M GroEL, 2.0 μ M GroES, and 1mM ATP.

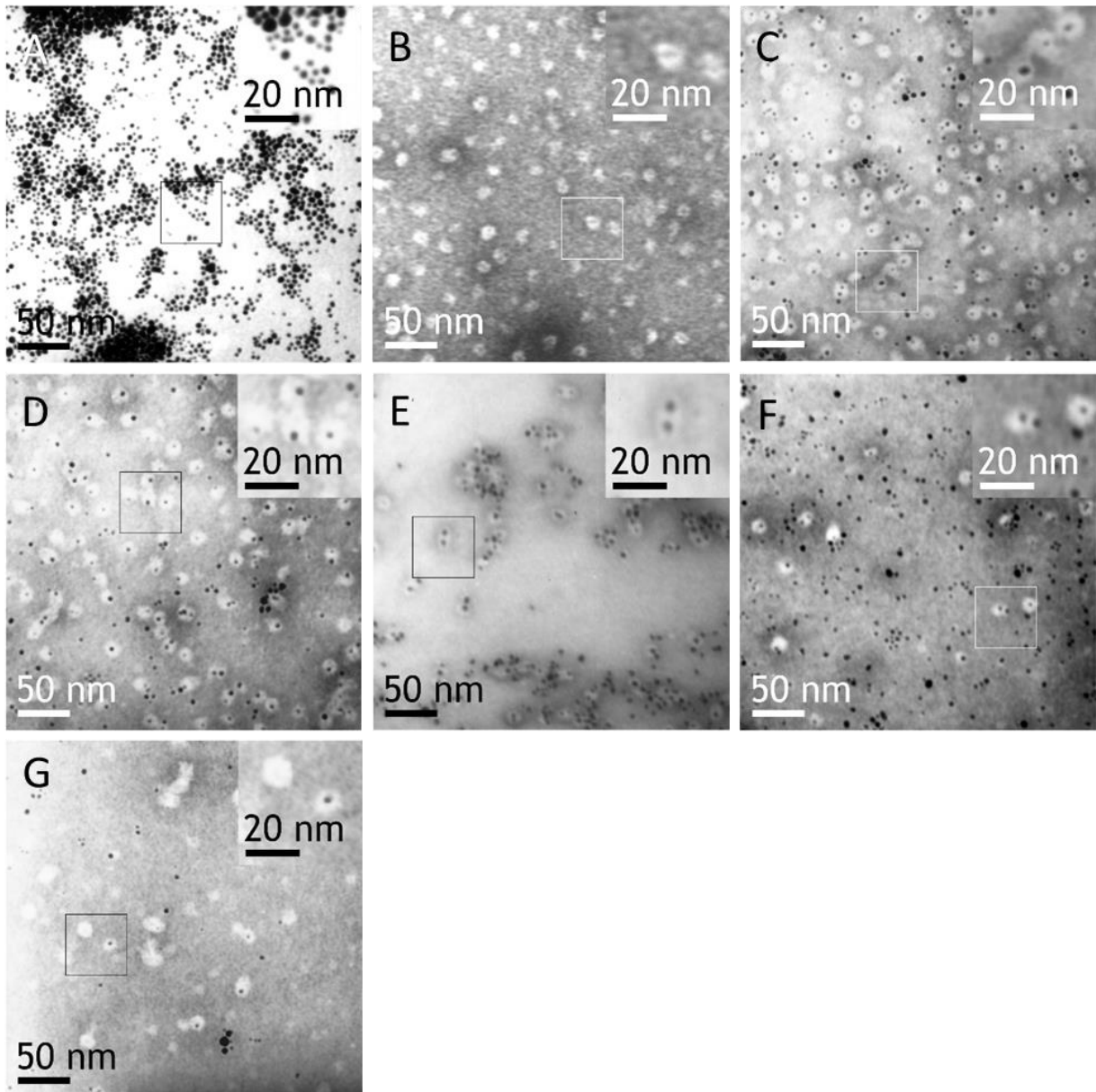


Fig. 12 TEM images of GroEL^{D523,398A}/GroES complexes encapsulating FePt NP under a particular set of conditions.

(A) FePt NP, (B) EL_ES/ATP, (C) FePt NP/EL_ES/ATP, (D) FePt NP/EL/ES_ATP, (E) FePt NP/EL/ES(shaker)_ATP, (F) FePt NP/ES_EL/ATP, and (G) FePt NP/BSA_EL/ES/ATP.

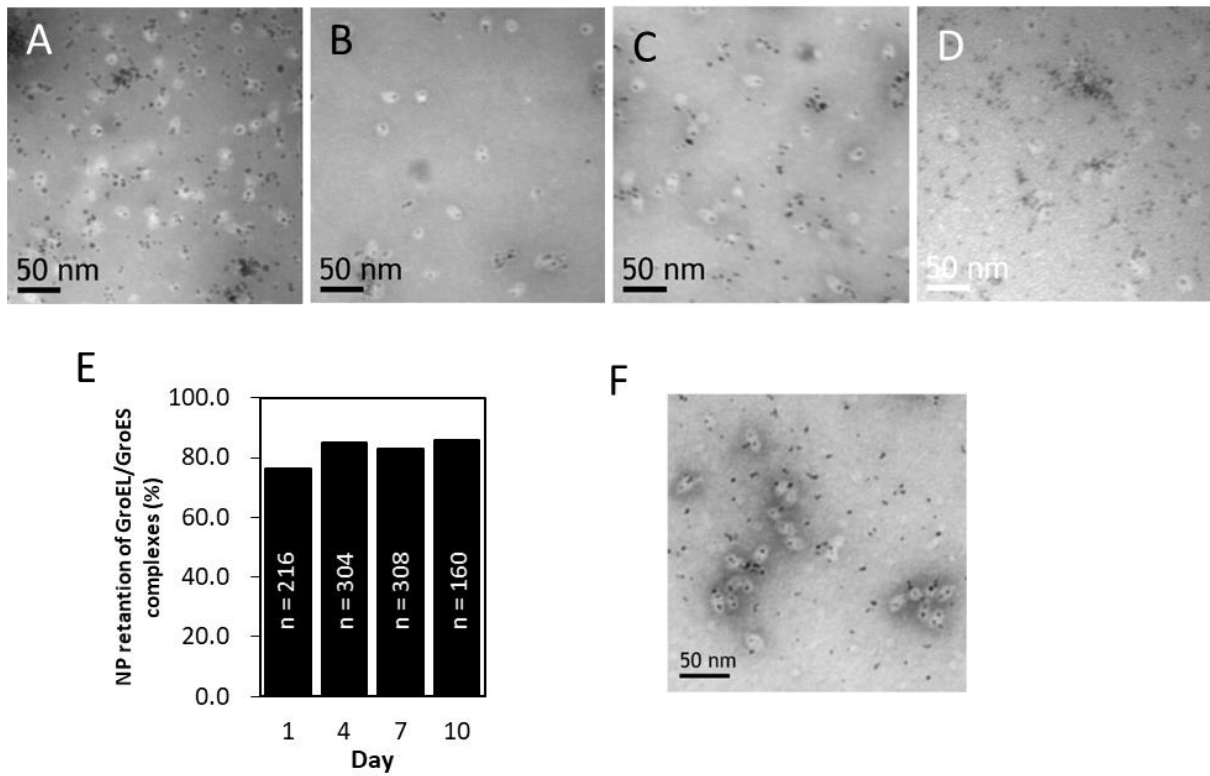


Fig. 13 TEM images of GroEL^{D52,398A}/GroES complexes encapsulating FePt-PA NP per 3 days. (A) day 1, (B) day 4, (C) day 7, and (D) day 10. (E) The retention percentages of GroEL^{D52,398A}/GroES complexes encapsulating FePt NP of (A)-(D).

A

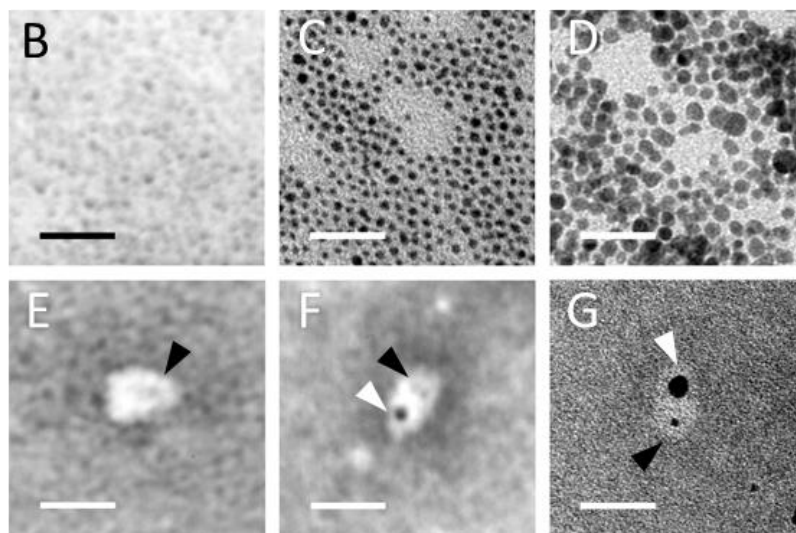
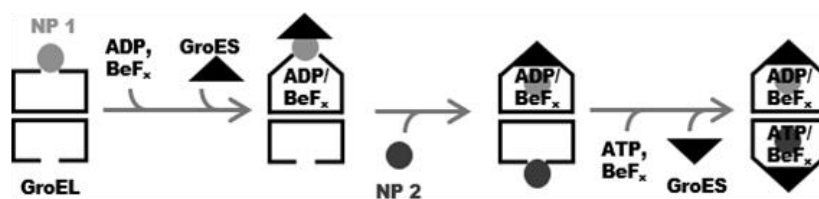


Fig. 14 GroEL/GroES complexes encapsulating two metal NP in each of two cavities.

(A) The reaction scheme of NP encapsulation in GroEL/GroES complex. (B, C, D, E, F, G) TEM images of Pt NP (B), Au NP (C), FePt NP (D), Pt NP/GroEL/GroES/ADP · BeFx, which is bullet-shaped GroEL/GroES/ADP · BeFx complexes encapsulating Pt NP (E), Pt NP/EL/ES/ADP · BeFx_FePt/ES/ATP, which is football-shaped GroEL/GroES complexes encapsulating Pt and FePt NP (F), and Au NP/EL/ES/ADP · BeFx _FePt/ES/ATP which is football-shaped GroEL/GroES complexes encapsulating Au and FePt NP (F). Black arrowheads showed the first encapsulated NP, and white arrowheads showed the second encapsulated NP in the GroEL/GroES complex. All scale bars are 20 nm.

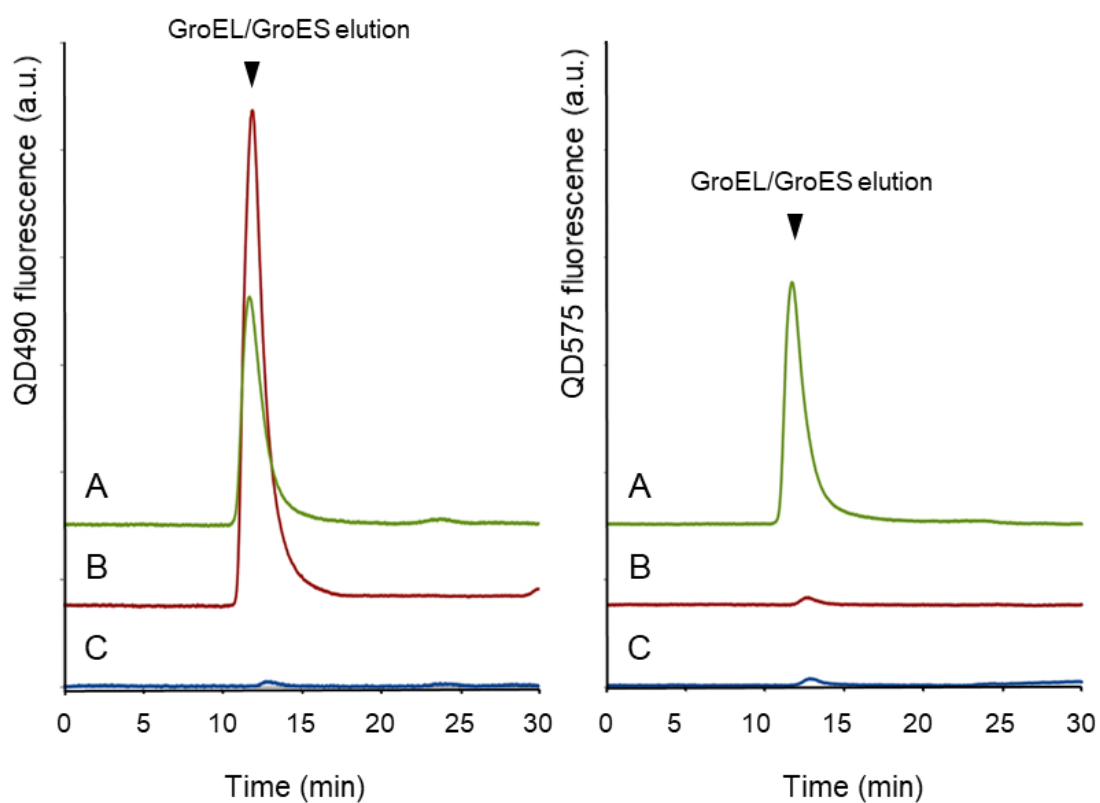


Fig. 15 HPLC analysis of GroEL^{D52,398A}/GroES complexes encapsulating QD490 and QD575.

Chromatogram of (left) Ex 370 nm/Em 490 nm, and (right) Ex 370 nm/Em 575 nm. (A) EL/QD490(ADP)/QD575(ATP)/ES, (B) EL/QD490(ADP)/ES, and (C) EL/(ADP)/(ATP)/ES.

Table 2 Nanoparticles used for inclusion in GroEL/GroES complexes

NP	Average diameter	Surface modifier
FePt	3.99 ± 1.00 nm (n = 713)	Pyruvic acid
	4.68 ± 1.63 nm (n = 713)	Oleic acids
	4.88 ± 1.43 nm (n = 231)	Unmodified
Pt	2 nm	Tetramethyl ammonium*
Au	2.2 nm or 4 nm	Citrate acid*
QD460	4.0-5.4 nm	(unknown)
QD490	5 nm	Carboxyl acid ligand*
QD575	5 nm	Carboxyl acid ligand*
QD600	7.5 nm	Oleylamine and Amphiphilic polymer*

*Commercially available particle surface modifiers were referenced from the product specifications.

第 3 章

GroEL 複合体を介した金属ナノ粒子の固定と配置

3-1. 研究概要

金属 NP を製品開発に利用する際、NP は焼結して固定されることが多い。貴金属 NP を触媒として利用するには、担体の表面に貴金属水溶液または粉末、あるいはポリマー被覆された NP を接触させた後、焼結、還元、接合、または蒸着して NP を担持する方法がとられる[38]。近年はレーザー焼結方法を用いて、液体金属を塗布したフレキシブル素材を用いたウェアラブルデバイスのシート作成[58]、インク状 NP を用いたマイクロスケールの 3 次元構成物の作成[59]など、局所的な NP の焼結による応用例が報告されている。これらの作成物に共通することは、平面上に金属 NP を密に敷き詰める、あるいは等間隔に配置するという技術である。

一方、生体分子もまた NP の内包を通して平面整列に利用され、企業のプレスリリースや特許として示されている。鉄貯蔵タンパク質フェリチンを用いた金属 NP の平面配置[60]や、各サブユニットのアミノ酸配列末端に直径 1 nm の Au NP を結合できる GroEL 変異体の特許[61]がそれらの例として挙げられる。

GroEL/GroES 複合体は、基礎研究においても、結晶化試薬を用いて複合体タンパク質を整列させた TEM 像[62]、GroEL リング開口部がマイカに吸着して密に敷き詰めている様子の AFM 走査像[63]が報告されている。これらの知見は、金属 NP 内包 GroEL 複合体を平面上に配置することにより、間接的に NP を整列できる可能性を示している。本研究では、GroEL の ATP 加水分解活性測定において偶然発見された、高濃度 ATP 存在下で GroEL 同士が連結するという現象を利用し、NP 内包 GroEL 複合体の形成を試行した。金属 NP 内包 GroEL 複合体の整列を制御できれば、GroEL 複合体を介して狭小の平面や湾曲面に NP を敷き詰めることが容易になる。このような技術は、電子機器の小型化、携帯可能なバイオセンサやウェアラブルデバイス[64]、マイクロ燃料電池[65]の開発に利用できると考えられる。

3-2. 実験方法

3-2-1. 実験材料

GroEL^{D398A}

GroEL の ATP 結合部位である D398 を A にアミノ酸置換したことにより反応サイクルが 1 時間に遅延された変異体 GroEL^{D398A} は、既報 [49] に従い、野生型 GroEL 同様にタンパク質精製した。

3-2-2. 実験手順

GroEL の ATP 加水分解活性の測定

ATP 再成系を用い、GroEL から放出された ADP を分光学的に測定した。HKM 緩衝液に 0.15 μ M GroEL、0.2 mM NADH、5 mM phosphoenolpyruvate、100 μ g/mL pyruvate kinase、100 μ g/mL lactate dehydrogenase、5 mM DTT を加え、反応溶液とした。攪拌している反応溶液中に終濃度 0.005~6 mM の ATP を添加して加水分解反応を開始し、NADH の減少に起因する 340 nm での吸光度の減少を、分光光度計を用いて連続的に測定した。反応開始から 150 秒後に、0.45 μ M GroES を添加した。

5 mM ATP 存在下の GroEL の DLS 分析

試料調製と DLS 測定を次のように行った。5 μ M の GroEL^{WT}、GroEL^{D398A}、GroEL^{D52,398A} のいずれかを含む HKM 緩衝液に終濃度 5 mM の ATP を加えて試料を調製し、ただちに High Concentration Zeta Potential Cell (ZEN1010, Malvern Panalytical) に充填した。測定セルを Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical) にセットし、25 °C で少なくとも 30 回の測定を 10 秒ごとに測定した。

GroEL チューブの TEM 観察

イオンコーター IB-II (エイコーエンジニアリング) を用い、3 mA で 30 秒間グロー放電することにより、コロジオン支持膜付 Cu グリッド (EM Japan) を親水化処理した。終濃度 5 μ M の GroEL^{WT}、GroEL^{D398A}、GroEL^{D52,398A} のいずれかを含む HKM 緩衝液に 5 mM ATP を加えて試料を調製し、ただちにグリッドに 6 μ L 滴下して 20 秒静置後、濾紙で

吸い取った。続いて超純水 6 μ L を滴下し、ただちに濾紙で吸い取った。最後に、0.5% リンタングステン酸 (pH 4.0) 6 μ L を滴下して 20 秒間静置後、濾紙で吸い取り、ネガティブ染色した。グリッドはデシケーターで一晩乾燥後、加速電圧 100 kV の透過電子顕微鏡 JEM2100 で観察した。

NP 含有 GroEL チューブの形成においては、次のように試料を調製した。FePt NP (1 mg/ml) 含有 20 mM HEPES/KOH (pH 7.4) 緩衝液へ 1 μ M GroEL^{D52,398A} を加えて 1 分間ピペッティングにより混合後、5 mM ATP を加えて GroEL チューブを形成した。調製した試料はりんタングステン酸でネガティブ染色後、TEM 観察に供した。

3-3. 結果

3-3-1. 高濃度 ATP 存在下の GroEL

ATP 再成系で測定された GroEL^{WT} の ATP 加水分解活性は、GroES 共存下のとき、ATP 終濃度 0.005~6 mM のすべての範囲でおおむね 0.03 U/mg の比活性を示した (Fig. 16)。一方、GroEL^{WT} 単独であるときは、0.5~2 mM ATP の濃度範囲で最も高い比活性 0.06 U/mg を示した。しかし、3 mM 以上の ATP 濃度では比活性が低下し、5 mM 以上の ATP 濃度では GroES 共存下の試料と同程度の値を示した。2 mM 以上の ATP 濃度で GroEL^{WT} の比活性が低下する原因を調べるため、5 mM ATP 含有 GroEL^{WT} 試料を TEM 観察したところ、GroEL^{WT} が縦に連結してチューブ状の構成物になっていることがわかった。そこで、ATP 加水分解活性の異なる GroEL に 5 mM ATP を添加した試料の DLS 測定を行った。その結果、ATP を含まない GroEL^{WT} の平均試料サイズが約 20 nm であったのに対し、5 mM ATP 存在下の GroEL^{WT} の平均試料サイズは約 33 nm であった (Fig. 17)。また、5 mM ATP 存在下の GroEL^{D398A} は約 49 nm、GroEL^{D52, 398A} は 52 nm の平均試料サイズを示した。これらの GroEL 試料の TEM 像は、GroEL がリング開口部同士で結合してチューブ状になっていることを示し、GroEL^{D52,398A}、GroEL^{D398A}、GroEL^{WT} の順に長いチューブを形成していた (Fig. 18)。DLS 分析と TEM 観察の結果は、ATP 加水分解活性が遅い GroEL ほど長い GroEL チューブを形成することを示した。

最も長く GroEL チューブを形成した GroEL^{D52,398A} の TEM 像から GroEL チューブの長さを計測したところ、平均 48.32 ± 28.06 nm の GroEL チューブを形成していた (Fig. 19)。計測された最長の GroEL^{D52,398A} チューブは 178 nm で、GroEL が 13~14 個連結した長さに相当した。また、GroEL^{D52,398A} チューブの 65% は 30~50 nm の長さで形成されていた。一方で、4 mM ATP の GroEL^{D52,398A} を試料とした DLS では、平均試料サイズは約 20 nm を示し、TEM 像では GroEL^{D52,398A} がばらばらに存在していることが示され、4 mM ATP 存在下では GroEL^{D52,398A} チューブを形成しないことがわかった (Fig. 20)。6 mM ATP 存在下では、GroEL^{D52,398A} の DLS 測定結果は約 90 nm の平均試料サイズを示したが、TEM 像では長く形成された GroEL^{D52,398A} チューブの他にばらけた GroEL^{D52,398A} も多数散見された (Fig. 20)。さらに、GroEL^{D52,398} は、5 mM ADP 存在下ではチューブ化

せず (Fig. 21A)、5 mM ATP 存在下でも GroES が共存する場合はチューブ化しなかった (Fig. 21B)。

3-3-2. GroEL チューブの伸長と解離

GroEL^{D52,398A} チューブが伸張されるかどうか確認するため、マイクロチューブ内で GroEL^{D52,398A} を含む HKM 緩衝液に 5 mM ATP を加えて試料調製し、マイクロチューブを氷上 30 分間静置、または 19,000×*g* で 15 min 遠心後、マイクロチューブ内の試料液の上部と下部を一部採取して TEM 観察した。その結果、30 分間静置したマイクロチューブでは試料液の上部と下部の違いに関わらず、GroEL^{D52,398A} チューブの長さに変化はなかった (Fig. 22)。遠心操作を行ったマイクロチューブでは、試料液の上部では短い GroEL^{D52,398A} チューブが見られ、試料液の下部では静置試料中の GroEL^{D52,398A} チューブよりも長いチューブが観察された。5 mM ATP 存在下で形成された GroEL^{D52,398A} チューブは、遠心操作によりチューブを伸張できることがわかった。

3-3-3. GroEL チューブの形成を介した金属ナノ粒子の等間隔配置

NP 含有 GroEL チューブを形成可能であるかどうか確認するため、FePt NP を含む HKM 緩衝液に GroEL^{D52,398A} を混合後、5 mM ATP を加えて試料調製し、TEM 装置観察した。GroEL^{D52,398A} は FePt NP を捕捉した状態でチューブ様構造を形成した (Fig. 23)。TEM 像から、GroEL に捕捉されている FePt NP 同士の距離 ($n = 7$) を計測したところ、平均して 15.62 nm の間隔で粒子が配置されていた。

3-4. 考察

GroEL は、ATP が結合すると構造を変化し、基質結合部位である疎水性アミノ酸残基を含む H helix と I helix が立ち上がる。GroEL が 5 mM 以上の ATP 存在下にあるときは、ATP が絶えず供給されて GroEL のオープン構造が維持され続けるため、GroEL のリング開口部同士が疎水性相互作用によって結合し、チューブ化したと考えられる (Fig. 17, 18)。このことは、GroES や ADP 存在下では GroEL チューブが形成されないことと一致する (Fig. 21)。GroEL は、ATP 加水分解活性が遅延された変異体ほど長いチューブを形成し、GroEL^{D52,398A} では約 52 nm のチューブを形成し、さらに遠心操作によってチューブを伸張できることが示された。

さらに、GroEL^{D52,398A} は、HKM 緩衝液中で FePt NP と混合後に 5 mM ATP を添加するだけで FePt NP 内包 GroEL^{D52,398A} チューブを形成でき、NP を約 15 nm 間隔で配置した (Fig. 23)。FePt NP 内包 GroEL のチューブ化による平均粒子間距離は、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体に 2 粒子を内包させたときの粒子間距離 (約 10 nm) よりもわずかに長く、GroES の存在の有無で NP の間隔を制御できることを示した。

本章における試料の調製方法を用いると、タンパク質を取り扱う要領で NP 内包 GroEL 複合体を形成でき、NP を互いに近傍に配置して固定することが可能である。FePt NP 内包 GroEL チューブを長く延伸すれば、磁性のある NP 含有ナノチューブ、言うなれば磁気ナノテープを調製できる。磁気ナノテープを平面に隙間なく並べれば、FePt NP は縦横に約 15 nm 間隔で面に配置されることになる。さらに、GroEL はタンパク質であるため遺伝子工学的に機能付加でき、金属 NP 特異的、あるいは設置したい素材表面に吸着しやすいアミノ酸配列を付加することも検討可能である。NP 内包 GroEL 複合体の形成や複合体による平面の敷き詰めは、NP 合成時に被覆材を施すだけでは実現できない粒子の等間隔配置に寄与できると考えられる。

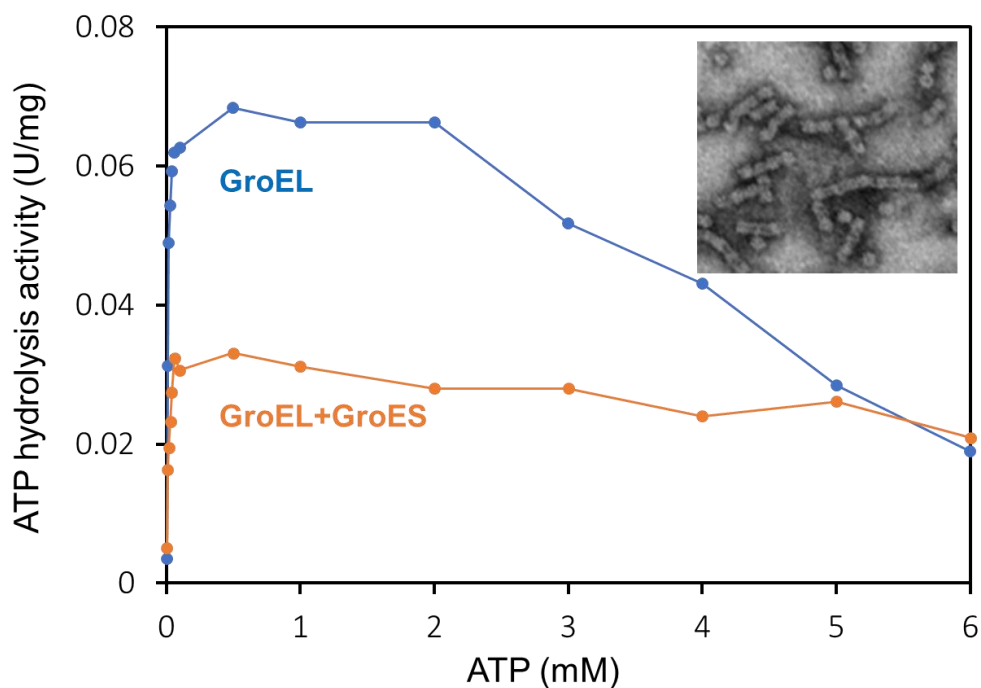


Fig. 16 ATP hydrolysis activity of GroEL^{WT}
 The inset showed TEM image of GroEL in the presence of 5 mM ATP.

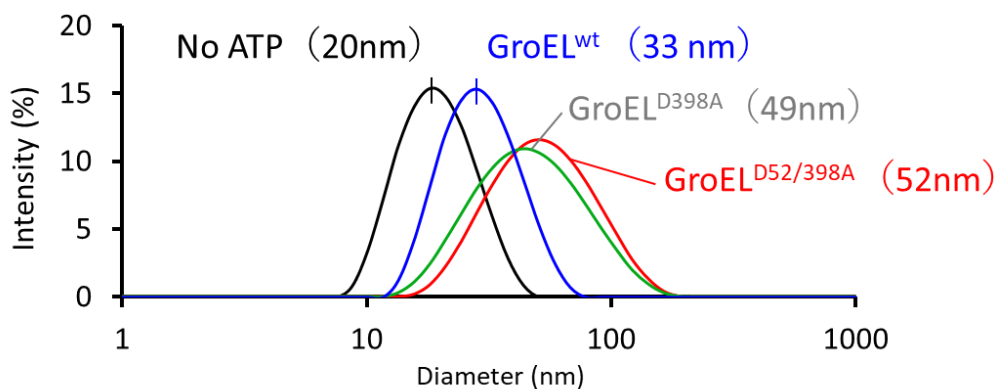


Fig. 17 The histogram of GroEL with different ATP hydrolysis activity in the presence of 5 mM ATP.
 The sample pf No ATP was measured with GroEL^{WT} in the absence of ATP. The average sample size was showed each peak top.

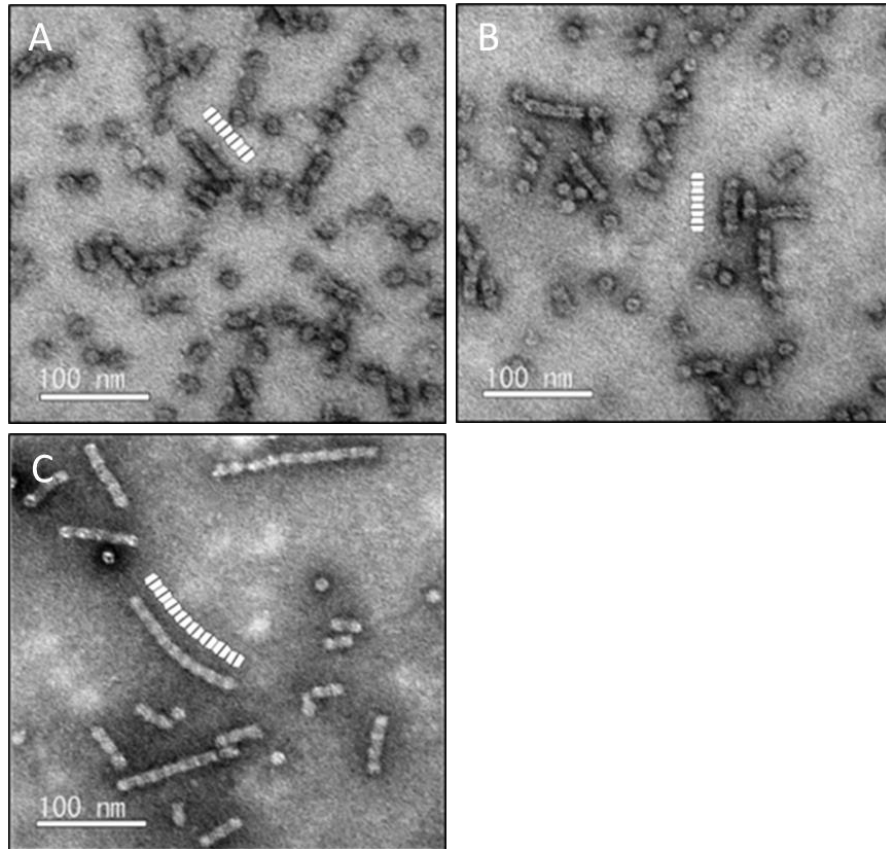


Fig. 18 TEM image of GroEL with different ATP hydrolysis activity in the presence of 5 mM ATP.

(A) GroEL^{WT}, (B) GroEL^{D398A}, and GroEL^{D52,398A}. The illustrated GroEL tube was attached next to the typical GroEL tube structure.

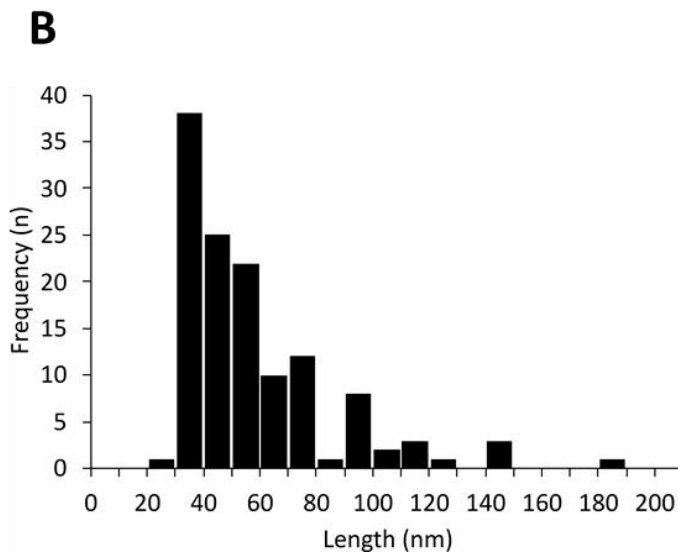
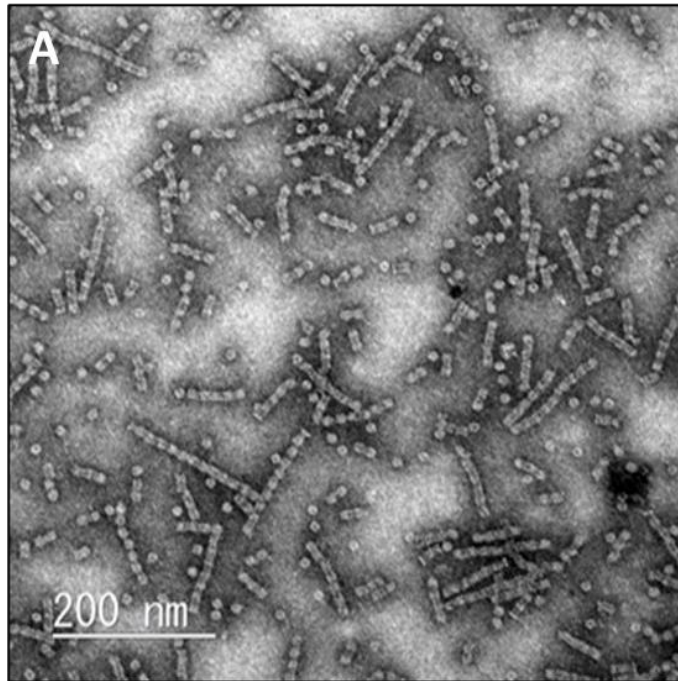


Fig. 19 GroEL tube length distribution measured from TEM image.
(A) TEM image of GroEL^{D52,398A} in the presence of 5 mM ATP, (B) GroEL tube length measured from (A).

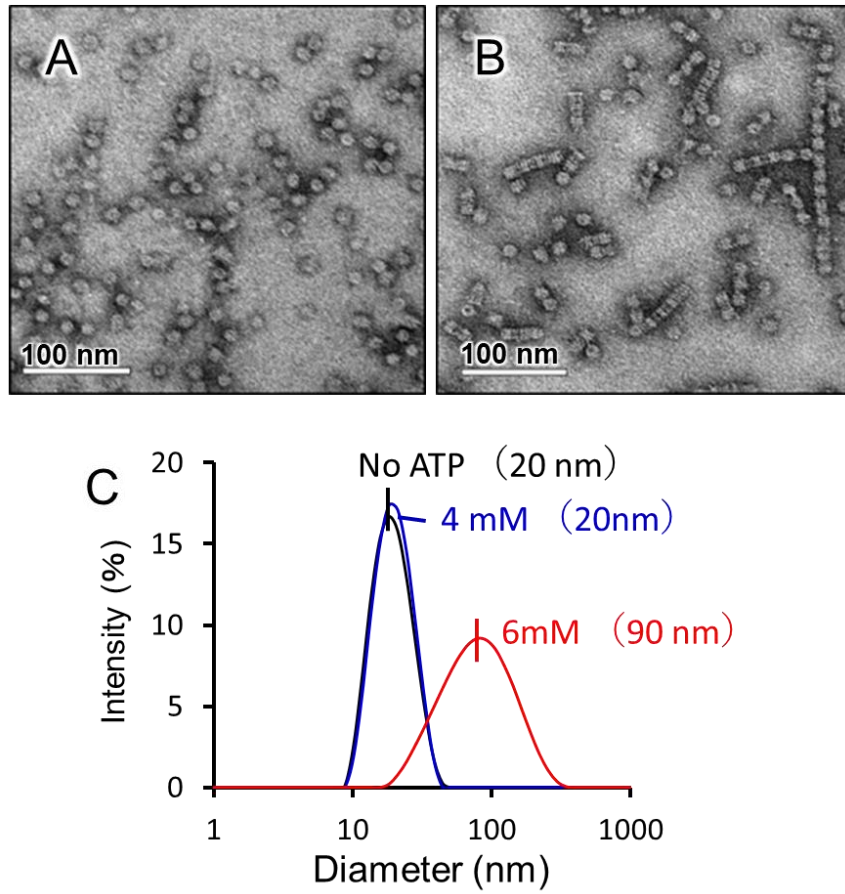


Fig. 20 ATP concentration-dependent GroEL^{D52,398A} tube formation. TEM images of GroEL^{D52,398A} in the presence of (A) 4 mM and (B) 6 mM ATP. (C) 5 μ M GroEL^{D52,398A} sample size in the presence of 4 mM or 6 mM ATP by DLS measurement.

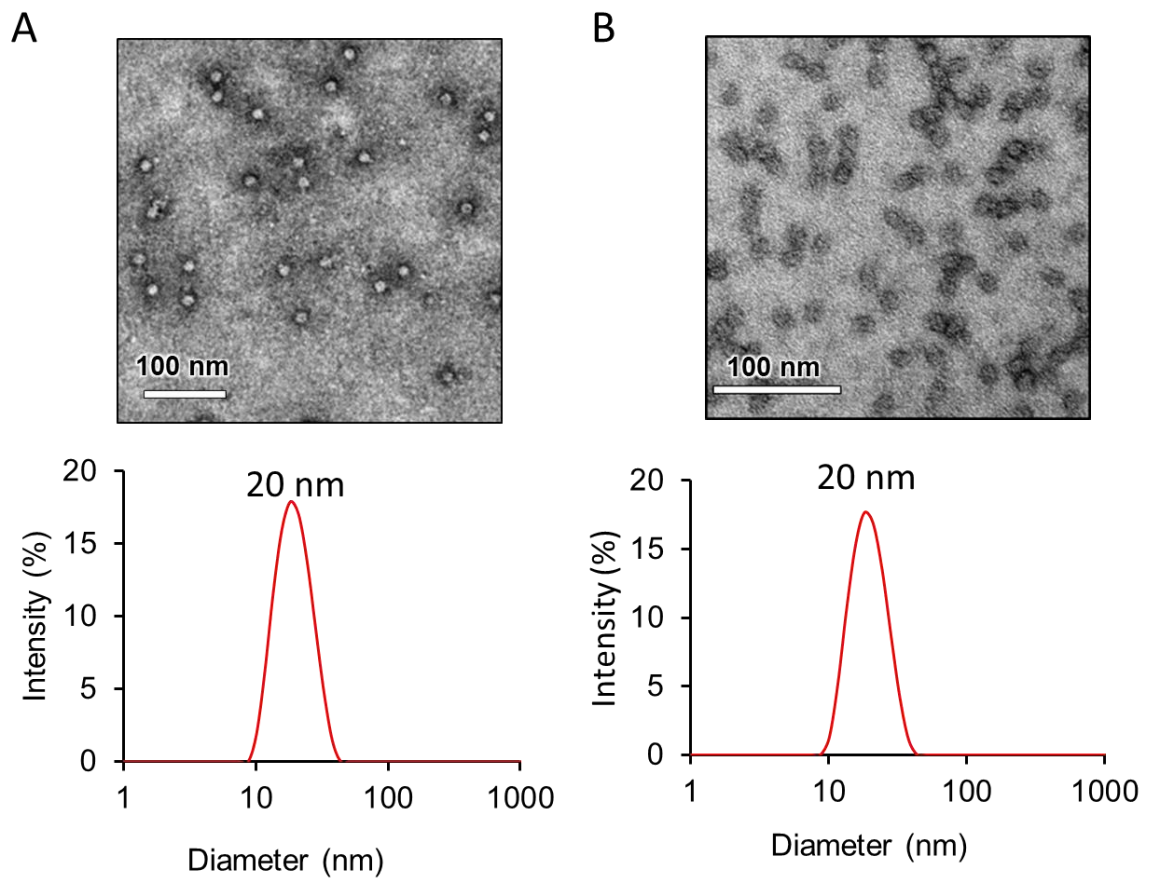


Fig. 21 TEM image and DLS measurement of GroEL^{D52,398A} in the presence of 5 mM ADP, or GroES with 5 mM ATP.

Five μM GroEL^{D52,398A} in the presence of (A) 5 mM ADP, and (B) 5 mM ATP and 10 μM GroES.

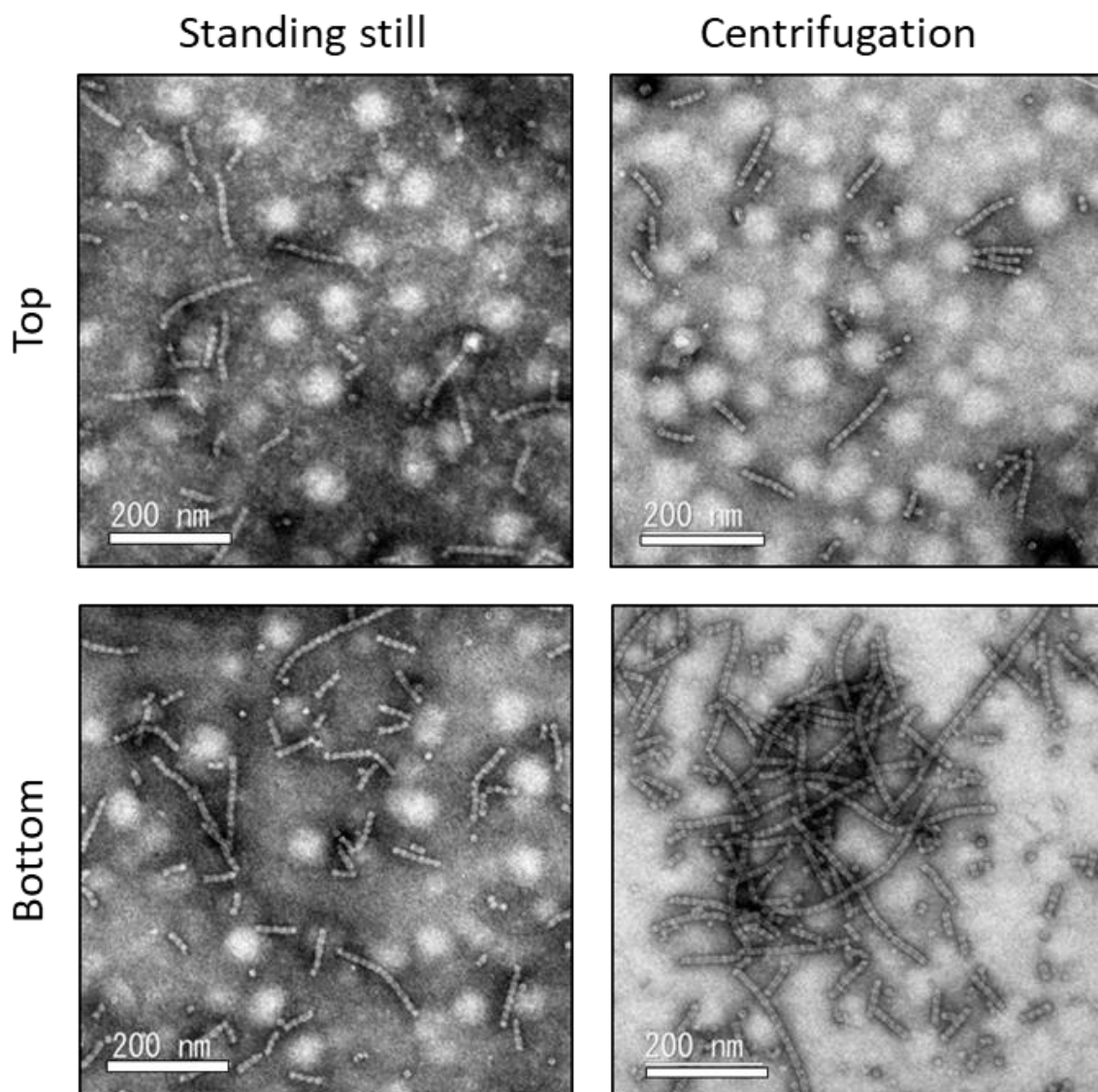


Fig. 22 TEM image of GroEL tube elongation in presence of 5 mM ATP.

Prepared sample in microtube was standing still on ice for 30 min or centrifuged with $19,000 \times g$ at 4°C for 15 min, and then the top or bottom of sample solution was observed using TEM.

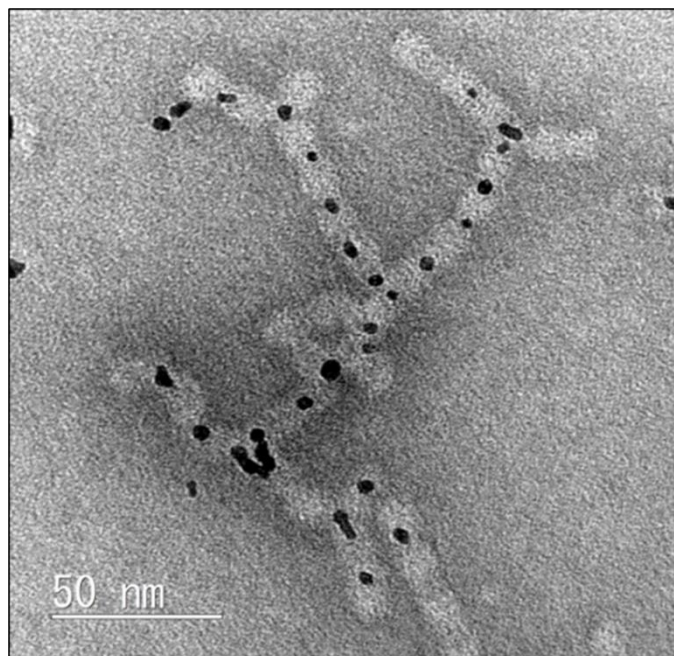


Fig. 23 TEM image of GroEL tube encapsulated FePt NP in presence of 5 mM ATP.

第 4 章

核移行シグナル配列融合 GroES による GroEL/GroES 複合体の細胞送達

4-1. 研究概要

次世代投薬方法として開発が進むドラッグデリバリーシステム (DDS) [66]は、細胞のエンドサイトーシスを介して薬剤が細胞内部へ移行するように考慮される[67]。DDS キャリアの材料には、リポソーム、両親媒性ポリマー、ミセル体、ハイドロゲル、デンドリマー[68]などの化成品だけでなく、エキソソーム [69, 70]、膜透過性ペプチド (CPP) [71–73]などの生体分子も利用が検討されている[67, 74]。

一方で GroEL は、ATP 加水分解活性に重要なアミノ酸配列の 52 番目と 398 番目のアスパラギン酸を、他のアミノ酸に置換すると、GroEL/GroES 複合体半減期が数十分、数時間、数日間に可変できる[33]。GroEL^{D52,398A}は、通常 8 秒間で解離してしまう GroEL/GroES 複合体の半減期が 6 日間まで延長されている GroEL 変異体であり、両側のリングが閉鎖されたカプセル状の構造は、水溶性 DDS キャリアとして魅力的な形状をしている。そこで、アミノ酸配列の末端を外側に向けている GroES の N 末端側に、マウス芳香族炭化水素受容体 (AhR) [75, 76]の核移行シグナル配列の一部を融合し、細胞核移行能を付与した変異体 GroES^{N-AhR}を作製した。この変異体 GroES と GroEL^{D52,398A}を用いて GroEL/GroES 複合体を形成し、培養細胞へ投与して複合体の局在変化を観察した。GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} 複合体の内包物には、GroEL が基質として取り込むことが報告されている GFP[31]のほか、フラーレンを採用した。フラーレンは二本鎖 DNA の大溝、小溝に結合しやすい[77]。また、フラーレンは、光照射によって活性酸素種 (ROS) を発生し、DNA を切断することが知られており[78, 79]、光線力学療法への適用が期待されている[80, 81]。HeLa 細胞の細胞死誘導[82]、マウス表皮肉腫の増殖抑制[83]が報告されているが、これまでにフラーレンを細胞核にまで送達したとの記載はない。フラーレンによる DNA 切断は、フラーレンが細胞内に送達されて初めて機能を発現する物質であることから、GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} 複合体の内包物として評価するのに適していると考えられた。

4-2. 実験方法

4-2-1. 実験材料

DNA オリゴマー

マウス芳香族炭化水素受容体 Aryl hydrocarbon receptor (AhR) のシグナル配列のうち 12-38 番目のアミノ酸配列 (以下、AhR12-38 とする) (Fig. 24、赤線部) を発現する遺伝子配列の 5'末端に制限酵素 Nco I サイトを、3'末端に Nde I サイトを持つ 96 塩基対のオリゴマー (Forward sequence: 5'-taccatgggccgcaaacgccgcaaaccggtgcagaaaaccgtgaaaccgattccggcgaaggcattaaaagcaaccgagcaaacgccatgaa-3'、Reverse sequence: 5'-ttcatatggcgtttgctcgggttgcttttaatgccttcgccggaatcggtttcacggttttctgcaccggtttgcggcggtttgcggcccatggt a-3') を設計し、オペロンバイオテクノロジー株式会社に合成を依頼した。また、AhR12-38 オリゴマーを増幅するため、25 塩基の PCR 増幅用プライマー (Forward primer: 5'-ttcatatggcgtttgctcgggttgc-3'、Reverse primer: 5'-taccatgggccgcaaacgccgcaa-3') をライフテクノロジーズ株式会社に合成依頼した。

培養細胞

培養細胞は、JCRB 細胞バンクから購入した。チャイニーズハムスター肺線維芽細胞株 (CHL/IU 細胞) は、10% FBS (Lot # M5442, Cat. # 2916154, MP Biomedicals)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン (和光純薬) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を用いて、37 °C、5% CO₂ のインキュベーターで培養した。

4-2-2. 実験手順

GroES^N-AhR 発現ベクターの調製

96 塩基対である AhR12-38 の Forward sequence と Reverse sequence の各オリゴマーを滅菌した PCR チューブ内で等量混合し、PCR 装置 GenAmp PCR System 9700 (Applied Bioscience) で 72 °C、5 分間アニーリングした。別途用意した PCR チューブ内で、アニーリングした AhR12-38 二本鎖オリゴマー、PCR 増幅用プライマー、DNA ポリメラーゼ AmpliTaq Gold (ThermoFisher)、dNTPs を混合し、PCR 装置で 95 °C、5 分間予備加熱後、95 °C で 30 秒間 → 55 °C で 30 秒間 → 72 °C で 30 秒間の工程を 25 周行い、最後に 72 °C で 7 分間アニーリングし、AhR12-38 二本鎖オリゴマーを増幅した。

PCR 増幅時に DNA ポリメラーゼによってマウス AhR12-38 二本鎖オリゴマーの 3'-末端に dA が付加されたことを利用し、ライゲーションキット (Takara Bio) を用いて、T ベクターである pT7 Blue ベクター (Takara Bio) にオリゴマーを挿入し、TA クローニングを行った。作製した *AhR12-38 / pT7Blue* ベクターでコンピテントセル *Escherichia coli* DH5α (Takara Bio) を形質転換し、LB/Amp/IPTG/X-gal プレートに塗布して 37 °C で培養し、ブルー・ホワイトセレクションを行った。なお、LB/Amp/IPTG/X-gal プレートは、50 µg/mL の Ampicilin を含む LB 寒天培地 (LB/Amp プレート、9 cm シャーレ) 1 枚あたり、X-Gal (20 mg/µL) を 40 µL、0.1M IPTG を 20 µL、滅菌水 140 µL を混合したものを塗布するか、LB/Amp プレート作成時に、培地の芯温がおよそ 60 °C 以下になってから混合して固化したものを使用した。プレートに生えた白色コロニーを滅菌爪楊枝でつつき、5 mL の LB/Amp 液体培地で一夜振盪培養後、滅菌マイクロチューブへ分注し、遠心により集菌した。QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いて、菌体からプラスミドベクターを抽出した。抽出したプラスミドベクターを、制限酵素 Nco I、Nde I (共に Takara Bio) で一夜処理後、サーモブロックで 70 °C、10 分間加熱処理して制限酵素を失活させた。4% アガロースゲルを用いて切断されたプラスミドベクターの電気泳動後、EtBr 染色し、UV トランスイルミネーターまたは LAS3000 (GE Healthcare) を用いて UV 透過し、目的断片 (96 bp) をゲルから切り出した。続いて、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて、目的断片を精製、回収した。

アミノ酸配列の N 末端に His-Tag を融合している GroES を発現するプラスミドベクター *GroES N-end His-Tag / pET 21(b)+* ベクターを一夜制限酵素処理し、ベクターに含まれる His-Tag 遺伝子配列の 5'末端を Nde I で、GroES の 1 つ目のアミノ酸の遺伝子配列に続いている 3'末端を Nco I で切断した。2% アガロースゲル電気泳動により遺伝子断片を分離し、UV トランスイルミネーター上でアガロースゲルから *GroES / pET* ベクターを切り出すことによって His-Tag を除し、さらに Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を用いて、開裂環の *GroES / pET* ベクターを精製、回収した。

5'末端を Nde I で、3'末端を Nco I で切断されているマウス AhR12-38 二本鎖オリゴマーを、Nde I サイトと Nco I サイトを両端に持った状態で開裂している *GroES / pET* ベクターに混合し、ライゲーションキットで処理した。調製した *pET* ベクターでコンピテントセル *E. coli* DH5 α を形質転換し、LB/Amp プレートに塗布し、37 °C で一夜培養した。プレートに生えたコロニーを滅菌爪楊枝でつつき、マスタープレートを作成すると共に、5 mL の LB/Amp 液体培地で一夜振盪培養した。集菌した菌体から、QIAprep Spin Miniprep Kit を用いてプラスミドベクターを抽出した。DNA 配列解析のため、T7 Universal Primer、T7P (24) Primer、T7F BglII I UpFs1 Primer、T7 Reverse Primer を用い、抽出プラスミドを各プライマー、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit および Sequencing Buffer (共に ABI) と共に 96 °C 1 分予備加熱後、96 °C で 10 秒→50°C で 5 秒→60 °C で 4 分の工程を 25 周行って増幅後、Performa Gel Filtration Cartridges (Edge Bio) で濾過した。遺伝子溶液を真空乾燥後、HiDi ホルムアミドで溶解し、Genetic Analyzer 3130 (ABI) で遺伝配列を解析した。

DNA 配列確認後、培養した *E. coli* DH5 α から抽出した AhR12-38 オリゴマー挿入 *GroES / pET21(b)+ vector* を用いてコンピテントセル *E. coli* BL21 (DE3) を形質転換し、野生型 GroES 同様に大量培養、タンパク質精製を行った。タンパク質発現確認のため、集菌後の超音波破碎液を試料として、12% ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行い、抗 GroES 抗体 (1 : 5000) を用いてウェスタンブロットを行ったのち、化学発光法により検出した。

GroEL/GroES^{N-AhR} 複合体試料の TEM 観察

TEM 観察のため、HKM 緩衝液中で 1 μ M GroEL^{D52,398A}、2 μ M GroES^{WT}(野生型 GroES) または 2 μ M GroES^{N-AhR} を混合し、最後に 1 mM ATP を加えて試料を調製した。1 mM ATP 含有 HKM 緩衝液で試料を適宜希釈し、親水化処理済みコロジオン支持膜付き Cu グリッドに 3~6 μ L を滴下して 1 分静置後、濾紙片で吸い取った。続けて超純水 6 μ L を滴下してただちに濾紙片で吸い取り、0.5% リンタングステン酸 (pH 4.0) を 6 μ L を滴下して 30 秒間静置後、濾紙片で吸い取った。グリッドはデシケーターで一晩乾燥させ、加速電圧 100 kV の JEM2100 で観察した。

GroEL/GroES^{N-AhR} 複合体投与細胞の経時観察

共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた経時観察のため、 4×10^3 個の CHL/IU 細胞を $\phi 35$ mm ノンコートガラスボトムディッシュ (松浪硝子)、または 10^3 個の CHL/IU 細胞を 12-well ノンコートガラスボトムプレート (MatTec) に播種し、30-50% コンフルエントになるまで培養した。

試料は次のように調製した。野生型 GroES (GroES^{WT}) または GroES^{N-AhR} を Cy3 (GE Healthcare) で、GroEL^{D52,398A} を Cy5 (GE Healthcare) で標識後、NAP 5 ゲル濾過カラム (GE Healthcare) で標識タンパク質を分取した。60 °C で 15 分間加熱変性させた 4 μ M GFP を基質として 2 μ M Cy5-GroEL^{D52,398A} に取り込ませ、4 μ M Cy3-GroES^{WT} または GroES^{N-AhR} を加え、さらに 1 mM ATP を添加した。1 時間室温静置後、ポアサイズ 0.22 μ m のメンブレンフィルタで濾過滅菌した。

Cy5-GroEL^{D52,398A}/Cy3-GroES 複合体が終濃度 50 nM となるように CHL/IU 細胞の培地に添加し、CO₂ インキュベーターで培養を開始した。インキュベーション後の生細胞の画像は、サンプル投与から 12 時間までは 4 時間ごとに、36 時間までは 12 時間ごとに、72 時間までは 24 時間ごとに、IX81 顕微鏡 を備えた FluoView1000 システム (OLYMPUS) を使用した。3D 画像再構築のため、細胞の z-stacks 画像は 0.1 μ m 厚で深度 10 μ m の距離で取得した。また、48 時間目には、投与タンパク質の細胞内局在を 100 個以上の CHL/IU 細胞を検鏡下で数えた。

GroEL/GroES^{N·AhR} 複合体投与細胞の相対生存率の測定

ノンコーティングのフラットボトムの 96-well プレート (Numc) に、 2×10^2 個の CHL/IU 細胞を播種し、細胞を 24 h 培養した。

細胞への投与試料は、HKM 緩衝液に $1 \mu\text{M}$ GroEL^{D52,398A}、 $2 \mu\text{M}$ GroES^{N·AhR}、 1 mM ATP を加えて混合し、1 時間室温静置後にポアサイズ $0.22 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルタで濾過滅菌して調製した。

細胞に終濃度 $0 \sim 500 \text{ nM}$ の GroEL^{D52,398A}/GroES^{N·AhR} 複合体を投与して 24 h 培養後、MTT セルカウントキット (ナカライテスク) と Tecan i-control, ver. 1.5.14.0 を搭載したマイクロプレートリーダー Infinite 200 PRO (Tecan) を用い、波長 570 nm のフィルタで吸光度を測定した。細胞のみのコントロールウェルより相対細胞生存率を算出し、平均値 \pm 標準偏差 (%) を求めた。

フラレン化合物含有 GroEL/GroES^{N·AhR} 複合体投与細胞の小核試験

2×10^4 個の CHL/IU 細胞を 60 mm のノンコートディッシュ (Nunc) に播種し、3 日間培養した。

細胞に投与する試料は次のように調製した。フラレン C₆₀ (483036、Sigma Aldrich/Merck)、C₆₀ Pyrroldine tris-acid (709085、Sigma Aldrich/Merck) (以後、C₆₀tris) を DMSO に懸濁して $100 \mu\text{M}$ となるよう調製し、超音波破碎した。C₆₀ または C₆₀tris を含有する DMSO が終濃度 10% となるように HKM 緩衝液に懸濁し、 $10 \mu\text{M}$ GroEL^{D52,398A} を加えてマイクロピペットで 1 分間混合後、 $20 \mu\text{M}$ GroES^{N·AhR} と 1 mM ATP を加えた。 $10,000 \text{ rpm}$ の卓上遠心機で 1 分遠心して上清を採取した。その他の比較試料も試料溶液中で同濃度となるように、同様に調製した。

C₆₀ または C₆₀tris 単独では終濃度 $10 \mu\text{M}$ となるように、GroEL^{D52,398A}/GroES^{N·AhR} 複合体を含む試料の場合は複合体終濃度が $1 \mu\text{M}$ となるように新しい培地に加え、ポアサイズ $0.45 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルタで培地ごと濾過滅菌後、細胞のディッシュの培地と交換した。試料投与後 2 日間インキュベーションしたのち、CL-1000 Ultraviolet Crosslinker (UVP) を用いて 0 、 45 、 90 、 135 mJ/cm^2 の UV を照射した。その後に培地交換し、CHL/IU 細胞を 24 時間培養した。

培養後の細胞を 1 mL の 0.25%トリプシンで剥がし、同量の DMEM で中和後、2 mL の PBS を収めた 15 mL チューブに細胞懸濁液を移し、1,000 rpm のスウィング式ローターの卓上遠心機で 5 分間遠心した。上清をアスピレーターで除去後、3 mL の 0.075M KCl で細胞を懸濁して室温で 9 分間静置してから、EtOH : AcOH = 3 : 1 の固定液を容積の 1/10 量加えてボルテックスした。5 分間遠心して上清を除去後、3 mL の固定液で細胞を懸濁し、室温で 10 分間静置し、5 分間遠心した。上清除去後、適当量の 1% AcOH/MeOH で細胞を懸濁し、試料液とした。

クリーンベンチにて、アルコール清拭したスライドガラスに 15 μ L の試料液を滴下し、風乾した。続けて 10 μ L の PBS を滴下し、液滴にアクリジンオレンジ染色液を滴下し、ただちにカバーガラスをかけた。Cy3 フィルタを備えた蛍光顕微鏡 AXIO Scope.A1 (ZEISS) でスライドガラスを観察し、ディッシュあたり 1,000 個の細胞における小核数を数えて小核発生率を求めた。各試料とも独立した試験を 6 回行った。統計 R ver. 3.1.2 を用いて、UV 強度別に一元配置分散分析を行い、続いてボンフェローニの多重比較検定を行った。

4-3. 結果

4-3-1. GroES^{N-AhR} の遺伝子発現とタンパク質発現

アニーリングにより二本鎖にした AhR12-38 オリゴマーを pT7 Blue ベクターに挿入し、*E. coli* DH5α を形質転換後、LB/Amp/IPTG/X-gal プレートを用いてブルー・ホワイトセレクションを行ったところ、複数の白色コロニーを得た。各コロニーから抽出したベクターを Nde I、Nco I で処理し、アガロース電気泳動したところ、Nde I、Nco I サイトを持つ 96 bp の目的断片のオリゴマーを得た (Fig. 25A)。GroES の N 末端に Nco I サイトを持ち、その上流に Nde I を持つよう設計された GroES 発現 pET ベクターに、アガロースゲルから切り出した 96 bp のオリゴマーをライゲーションして調製された AhR12-38 オリゴマー挿入 pET ベクターは、形質転換した *E. coli* DH5α の菌体内で AhR12-38 オリゴマーを増幅することを確認した (Fig. 25B)。この AhR12-38 オリゴマー挿入 pET ベクターの DNA 解析結果は、AhR12-38 融合 GroES の全長遺伝子配列が合成されていることを示した (Fig. 25C)。以後、このベクターを *GroES^{N-AhR}/pET* ベクターとする (Fig. 26)。

4-3-2. GroES^{N-AhR} のタンパク質発現と GroEL/GroES 複合体の形成

GroES^{N-AhR} 発現ベクターで形質転換した BL21(DE3) を誘導培養後、超音波破碎した菌体試料を電気泳動し、ウェスタンブロッティングを行った (Fig. 27A)。CBB 染色したポリアクリルアミドゲルの分子量マーカーから、GroES^{WT} の Rf 値は 9.42 kD と算出され、理論値 10 kD 付近の分子量を示した。GroES^{N-AhR} の Rf 値は 13.11 kD と算出され、GroES^{WT} モノマーよりも約 3 kD 大きいことが分かった。ウェスタンブロッティングでも、GroES^{N-AhR} は、GroES^{WT} よりもやや分子量が大きい位置にバンドを示した。野生型 GroES 同様に、GroES^{N-AhR} 発現菌体の大量培養を経て、GroES^{N-AhR} タンパク質を精製した。精製 GroES^{N-AhR} は、ATP 存在下で GroEL^{D52,398A} と混合すると、GroES^{WT} 同様にフットボール型複合体を形成することがわかった (Fig. 27B-D)。

4-3-3. GFP 含有 GroEL/GroES^{N-AhR} 複合体の細胞送達

培養細胞に投与した GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体の局在を観察するために、50nM の GroEL を含む GFP 含有 Cy5-GroEL^{D52,398A}/Cy3-GroES^{WT} 複合体 (GFP/EL/ES^{WT}) または GFP 含有 Cy5-GroEL^{D52,398A}/Cy3-GroES^{N-AhR} 複合体 (GFP/EL/ES^{N-AhR}) を CHL/IU 細胞に添加した。比較として、GFP/EL/ES 試料の含有濃度と同濃度の Cy5-GroEL^{D52,398A} (EL)、GFP、Cy3-GroES^{WT} (ES^{WT})、および Cy3-GroES^{N-AhR} (ES^{N-AhR}) の各単独サンプルを添加したディッシュを調製した。

細胞イメージング (Fig. 28) では、観察期間を通じてネガティブコントロールディッシュにシグナルは見られなかった。GFP/EL/ES^{WT} を添加したディッシュでは、添加後 4 時間で細胞核の近くに 3 つの蛍光の複合体融合シグナルが観察され、時間依存的に蓄積するようだったが、添加から 48 時間後でも細胞核に到達しなかった。GFP/EL/ES^{N-AhR} を添加したディッシュでは、添加後 4~12 時間で蛍光標識試料は細胞の表面または細胞質へ集合的に付着し、早期から細胞核付近にも存在した。また、GFP/EL/ES^{N-AhR} の集塊は、添加後 8 時間まで培地に浮遊またはディッシュ底面に蓄積していたが、それらのほとんどは 24 時間までに細胞表面に付着したようだった。GFP/EL/ES^{N-AhR} は、48 時間までのすべての観察時間を通じて細胞核の周囲または上に存在し、それらの局在は球形に分散するか、細胞内で点状になった。また、GFP/EL/ES^{N-AhR} は、GFP/EL/ES^{WT} と比較して、観察の各時点で細胞質に豊富に含まれていたように見えた。EL、GFP、または ES^{WT} を単独で添加したディッシュでは、これらのタンパク質は細胞質に到達したように見えたが、細胞核には侵入せず、GFP/EL/ES^{WT} と同様の挙動を示した。ES^{N-AhR} のみを添加したディッシュでは、ES^{N-AhR} の挙動は GFP/EL/ES^{N-AhR} に類似して、投与後から細胞質と細胞核に到達し、なおかつ細胞質によく分散しているように見えた。

GFP/EL/ES^{N-AhR} は添加後 48 時間までに細胞核に到達したように見えたため、GFP/EL/ES^{WT} または GFP/EL/ES^{N-AhR} を添加した細胞の三次元断面を取得した (Fig. 29)。二次元の重ね合わせ像では、GFP/EL/ES^{WT} が追加された細胞は蛍光タンパク質を積極的に取り込んでいるように見え、細胞分裂中の細胞内の 2 つの細胞核間にわずかな蛍光シグナルが存在した。三次元断面では、GFP/EL/ES^{WT} は細胞核に侵入しておらず、細胞核の膜に留まっていた。一方、GFP/EL/ES^{N-AhR} を添加した細胞には豊富な蛍光シグナルがあ

り、三次元断面では GFP/EL/ES^{N-AhR} が細胞核の中心に入っていることがわかった。Table 3 は、添加から 48 時間後の細胞内の蛍光標識タンパク質の局在を示している。細胞質への局在率では、最も低いサンプルは ES^{WT} 単独 (約 9%) で、次は GFP 単独、EL 単独、GFP EL/ES^{WT} (約 20~26%)、続いて ES^{N-AhR} 単独 (約 39%) だった。最も到達したサンプルは GFP/EL/ES^{N-AhR} (約 71%) だった。ES^{WT} 単独の細胞質到達率が低いことは、ES^{WT} が細胞に蓄積するよりも培地に分散する傾向を示している可能性がある。細胞核到達率では、ES^{N-AhR} 単独が約 24%、GFP/EL/ES^{N-AhR} が約 50% だった。他のサンプルの蛍光タンパク質は核内で観察されなかったため、表示していない。添加後 4 時間から 48 時間までの経時観察と、三次元断面の取得の結果、GroES^{N-AhR} は、GFP 含有 GroEL/GroES 複合体の細胞質および細胞核への到達に寄与していることがわかった。

GFP/EL/ES^{WT} または GFP/EL/ES^{N-AhR} を添加した細胞は、ネガティブコントロール同様にサンプル添加後 72 時間でも増殖し続けた (Fig. 30)。また、EL/ES^{N-AhR} を 0-500 nM の範囲で投与し 24 時間インキュベーションした CHL/IU 細胞の MTT アッセイでは、100 nM 付近まで細胞生存率に影響がないように見えた (Fig. 31)。GroEL/GroES 複合体の添加は細胞増殖に影響を与えなかったとみられる。

4-3-4. GroEL/GroES^{N-AhR} 複合体投与細胞の小核試験

GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} 複合体が C₆₀ 化合物を内包物して細胞核へ到達できるのか確認するため、FITC-C₆₀-COOH 含有 GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} 複合体を調製し、終濃度 50 nM 複合体となるように CHL/IU 細胞に投与後、1~4 h インキュベーションした。1 時間経過ごとにエンドポイントで細胞を 4% PFA で固定して細胞核を DAPI 染色し、超解像顕微鏡で観察した。試料添加後 2~3 h の間は、FITC-C₆₀-COOH に由来する蛍光が細胞核周辺の細胞質に存在したが、添加後 4 h では細胞核付近へ到達していることがわかった (Fig. S1)。

GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} 複合体が C₆₀ 化合物を細胞送達できることが示唆されたので、C₆₀ または C₆₀tris 単独、C₆₀ 含有 GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} 複合体 (C₆₀/EL/ES^{N-AhR}) または C₆₀tris 含有 GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} 複合体 (C₆₀tris/EL/ES^{N-AhR})、フラーレン化合物を含まない GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} 複合体 (EL/ES^{N-AhR}) を細胞へ添加する試料として

調製した。フラレン化合物は終濃度 10 μM に、GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} 複合体は終濃度 1 μM になるように CHL/IU 細胞に投与し、48 時間のインキュベーション後の UV 照射を経て小核試験を行った (Fig. 32)。

UV 照射強度 0 mJ/cm^2 では、試料間に有意差が無く、CHL/IU 細胞は自然発生的に 2 % 前後の小核発生率を示すことが分かった。UV 照射強度 45 mJ/cm^2 では、C₆₀tris/EL/ES^{N-AhR} が最も高い小核発生率を示し、C₆₀/EL/ES^{N-AhR}、空の EL/ES^{N-AhR}、C₆₀ 単独、コントロール (無添加) にくらべて有意に CHL/IU 細胞に小核を発生させた。また、C₆₀/EL/ES^{N-AhR} は、C₆₀ 単独にくらべ、有意に CHL/IU 細胞に小核を発生させた。UV 照射強度 90 mJ/cm^2 では、C₆₀tris/EL/ES^{N-AhR} が最も高い小核発生率を示し、C₆₀/EL/ES^{N-AhR}、コントロールにくらべて有意に CHL/IU 細胞に小核を発生させた。また、C₆₀/EL/ES^{N-AhR} は、コントロールにくらべて有意に小核を発生させた。UV 照射強度 135 mJ/cm^2 では、C₆₀tris/EL/ES^{N-AhR} が最も高い小核発生率を示し、C₆₀ 単独、C₆₀tris 単独、空の EL/ES^{N-AhR}、コントロールにくらべて有意に CHL/IU 細胞に小核を発生させた。

4-4. 考察

タンパク質発現した GroES^{N·AhR}は、GroES^{WT}よりも約 3 kDa 分子量が大きく、GroES^{WT} 同様に GroEL^{D52,398A} に結合してフットボール型複合体を形成することが示された (Fig. 27)。

細胞の顕微鏡観察 (Fig. 28) では、単独投与した GroES^{WT} の 48 時間時点の細胞到達率は比較試料の中で最も低く (約 9%)、細胞付着するよりも培地に分散し続ける傾向を示唆した。また、GroEL^{D52,398A} 単独投与の細胞質到達率 (約 24%) と GFP/ES/ES^{WT} の細胞質到達率 (約 26%) が近似であることから、GroEL^{D52,398A} は単独でも細胞質に侵入可能であることが示唆されている。GFP 単独投与でも約 20% の細胞質到達率を示したので、疎水性アミノ酸が豊富なタンパク質は、疎水的相互作用により細胞膜に付着して細胞質に侵入する可能性がある。DDS キャリアの作成を目的に、疎水性アミノ酸であるバリン、ロイシン、フェニルアラニンを含めて重合されたポリマーは、赤血球を溶血させ、膜破壊することが報告されていることから [84]、GFP は CHL/IU 細胞の細胞膜を一部壊して細胞質へ侵入したのかもしれない。また、GroEL も、細胞内では基質タンパク質を疎水的相互作用により補足することから、GroEL のリング開口部に配置されている疎水性アミノ酸が CHL/IU 細胞の細胞膜と相互作用した可能性がある。一方で、シグナル配列を融合した GroES^{N·AhR} は、単独または GFP 含有 GroEL/GroES^{N·AhR} 複合体のどちらの投与でも 4 時間以内にある程度細胞膜に付着し、48 時間までに細胞核に到達した。GFP 含有 GroEL/GroES^{N·AhR} 複合体は、細胞質到達率、細胞核到達率とも GroES^{N·AhR} 単独投与の 2 倍近くを示し、GroEL^{D52,398A} 単独投与の細胞質到達率の約 3 倍の値を示した。GroES^{N·AhR} と GroEL^{D52,398A} が複合体を形成することにより、CHL/IU 細胞の細胞膜を侵入しやすくなったようにみえる。

GroES^{WT} とは異なり、GroES^{N·AhR} の N 末端に負荷された 27 個のアミノ酸があり、その配列の中には、リジン、アルギニン、ヒスチジンを含む 11 個の塩基性アミノ酸と、プロリン、バリン、イソロイシン、アラニンを含む 8 個の疎水性アミノ酸がある。塩基性アミノ酸の荷電は細胞膜中のリン酸基と相互作用し、膜を変形させるというシミュレーション結果が報告されており [85]、GroES^{N·AhR} のシグナル配列は、疎水性アミノ酸に加え、塩基性アミノ酸もまた細胞膜を歪めて内部移行しやすくしていると考えられる。細胞のエンドサ

イトーシスの種類は、ファゴサイトーシス（食細胞）、マイクロピノサイトーシス (> 1 μm)、クラスリン非依存性エンドサイトーシス (~90 nm)、クラスリン依存性エンドサイトーシス (~120 nm)、カベオリン依存性エンドサイトーシス (~60 nm) と多様だが、核移行配列に類似する性質をもつ細胞膜透過性ペプチド (CPP) として知られる HIV-1 ウイルスの TAT ペプチドは、負電荷を帯びるプロテオグリカンとの接触を介したマイクロピノサイトーシス [86, 87]、または血清中の他のタンパク質と結合した状態でエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ [88]、エンドソームやリソソームに補足されるが、アルギニンの正荷電によるプロトンスポンジ効果によって膜破壊をし、細胞質に脱出する可能性が示唆されている [89]。また、代表的な CPP を融合した GFP を細胞投与した試験では、細胞の種類によって CPP 融合 GFP の内部移行量が異なることが示されており [90]、細胞表面のタンパク質分子や糖鎖修飾により影響を受けるものと考えられる。GroES^{N-AhR} も、TAT に似た振る舞いをしている可能性がある。また、GFP/EL/ES^{N-AhR} を投与した CHL/IU 細胞は 72 h 経過後も生存して細胞増殖しており、蛍光標識物はより小さな塊に分かれて細胞質の端に追いやられているように見えたことから、これら投与物はオートファジーやエンドソームによって排除されている可能性が考えられる [91]。

フラーレン化合物含有 GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} 複合体を用いた小核試験では、試料投与後 48 h のインキュベーション期間に C₆₀/EL/ES^{N-AhR} または C₆₀tris/EL/ES^{N-AhR} が細胞内へ移行したことにより、UV 照射サンプルにおいて、C₆₀ または C₆₀tris の単独投与よりも有意に小核を発生させたといえる (Fig. 26)。単独投与した C₆₀ または C₆₀tris は、培地で凝集したか [92]、血清アルブミンに吸収された可能性が高い [93, 94]。超解像顕微鏡観察により、CHL/IU 細胞へ添加した FITC-C₆₀-COOH/GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} は細胞核または近傍へ到達することが示され、C₆₀/EL/ES^{N-AhR} と C₆₀tris/EL/ES^{N-AhR} は細胞核付近で UV 照射を受け、活性酸素種を生じて DNA 切断に寄与したとみられる。また、C₆₀tris は細胞内に蓄積することが報告されていることから [95]、C₆₀tris/EL/ES^{N-AhR} 投与試料の小核発生率が最も高くなったと考えられる。C₆₀tris は水溶性のため、C₆₀tris が分散した溶液中で GroEL/GroES 複合体を形成するだけで、C₆₀tris 含有 GroEL/GroES 複合体を形成することができる。C₆₀ は疎水性のため水溶液中で凝集しやすいが、微小塊になっても、GroEL/GroES 複合体に内包できるサイズであれば、細胞内に導入できることがわかった。

GroEL は、ATP 加水分解時間が可変できるだけでなく[33]、GroEL リング開口部の Glu308 をシステインに置換した変異体では、GroES のモバイルループ領域にシステイン変異を入れた GroES^{98C} を用いて複合体を形成させると、S-S 結合によって永久に内腔を閉鎖することが可能になる[96]。また、GroEL のアミノ酸配列の C 末端にある 4 回反復 GCM 配列は削除しても機能に支障なく、GroEL の内腔を広げることができる[97]。GroEL を用いた DDS キャリアとしての報告は、野生型 GroEL の ATP 結合時のダイナミクスを利用して分離する GroEL チューブ[98]や、GroEL が露呈している疎水性アミノ酸に疎水的相互作用で薬剤を保持させる方法[99]が報告されており、GroEL の中空構造が利用されている。しかし、GroES を伴わないので、カプセル形状で使用されているわけではない。GroEL/GroES 複合体は、GroEL の ATP 加水分解終了時に、GroES の解離と共に内包物が放出される点で、DDS キャリアとして魅力的である。タンパク質であるため、遺伝子工学的に新たに機能付加ができ、水溶性ナノサイズカプセルとしてさらなる発展が期待できる。

10	20	30	40	50
MSSGANITYA	SRKRRKPVQK	TVKPIPAEGI	KSNPSKRHRD	RLNTELDRLA
60	70	80	90	100
SLLPFPQDVI	NKLDKLSVLR	LSVSYLRAKS	FFDVALKSTP	ADRNGGQDQC
110	120	130	140	150
RAQIRDWQDL	QEGEFLQAL	NGFVLVVTAD	ALVFYASSTI	QDYLGFPQSD
160	170	180	190	200
VIHQSVYELI	HTEDRAEFQR	QLHWALNPDS	AQGVDEAHGP	PQAAVYYTPD
210	220	230	240	250
QLPPENASFM	ERCFRCRLRC	LLDNSSGFLA	MNFQGRLLKYL	HGQNKKGKDG
260	270	280	290	300
ALLPPQLALF	AIATPLQPPS	ILEIRTKNFI	FRTKHKLDFT	PIGCDAKGQL
310	320	330	340	350
ILGYTEVELC	TRGSGYQFIH	AADMLHCAES	HIRMIKTGES	GMTVFRLFPAK
360	370	380	390	400
HSRWRWVQSN	ARLIYRNGRP	DYIIATQRPL	TDEEGREHLQ	KRSTSLPFMF
410	420	430	440	450
ATGEAVLYEI	SSPFSPIMDP	LPIRTKSNTS	RKDWAPQSTP	SKDSFHPSSL
460	470	480	490	500
MSALIQQDES	IYLCPPSSPA	PLDSHFLMGS	VSKCGSWQDS	FAAAGSEAAL
510	520	530	540	550
KHEQIGHAQD	VNLALSGGPS	ELFPDNKNND	LYNIMRNLGI	DFEDIRSMQN
560	570	580	590	600
EEFFRTDSTA	AGEVDFKDID	ITDEILTYVQ	DSLNNSTLMN	SACQQQPVTQ
610	620	630	640	650
HLSCMLQERL	QLEQQQLQ	PPPQALEPQQ	QLCQMVCPPQ	DLGPKHTQIN
660	670	680	690	700
GTFASWNPTP	PVSFNCPQQE	LKHYQLFSSL	QGTAQEFQYK	PEVDSVPYTQ
710	720	730	740	750
NFAPCNQPLL	PEHSKSVQLD	FPGRDFEPSL	HPTTSLNDFV	SCLQVPENQS
760	770	780	790	800
HGINSQSTMV	SPQAYYAGAM	SMYQCQPGPQ	RTPVDQTQYS	SEIPGSQAFL
810	820	830	840	
SKVQSRGIFN	ETYSSDLSSI	GHAAQTTGHL	HHLAEARPLP	DITPGGFL

Fig. 24 The amino acid sequence of mouse aromatic hydrocarbon receptor. Referred to GenBank AAK13443.1 for protein sequence. Red line showed AhR 12-38.

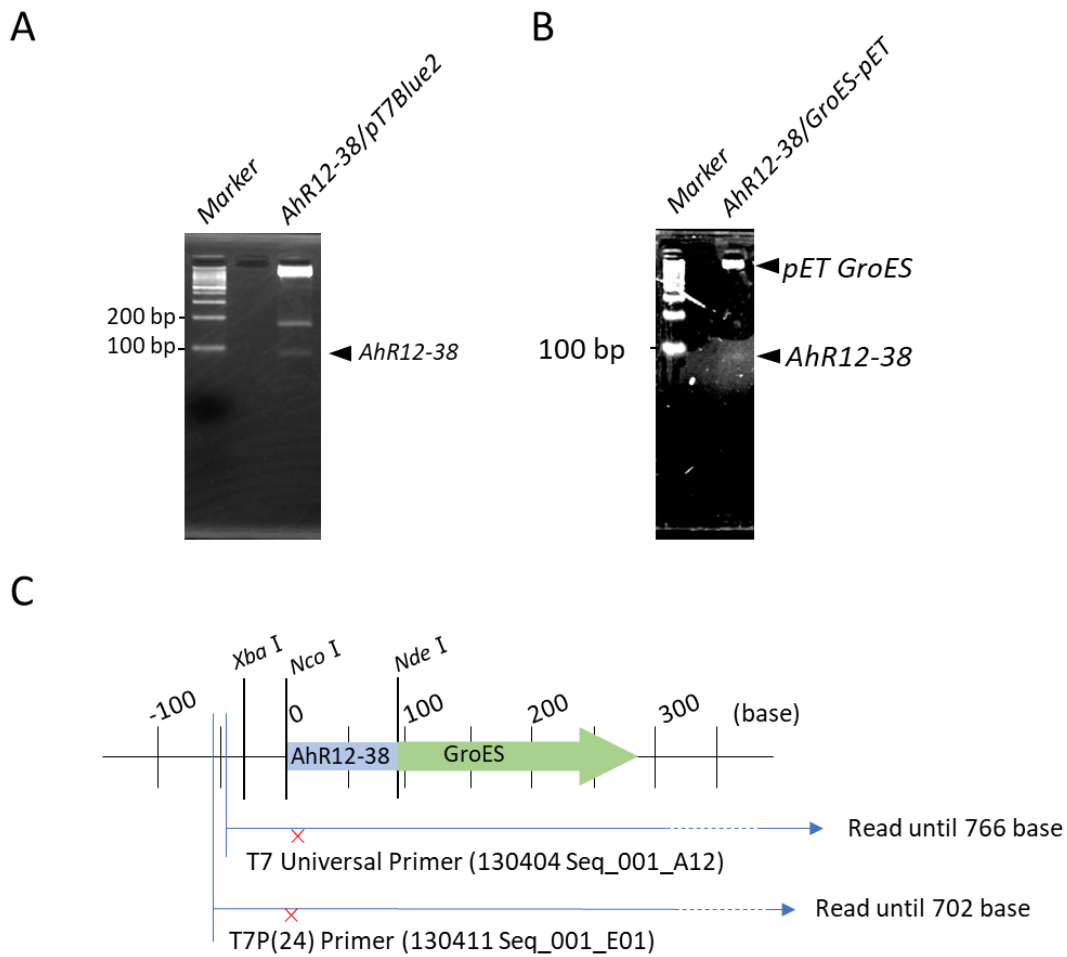
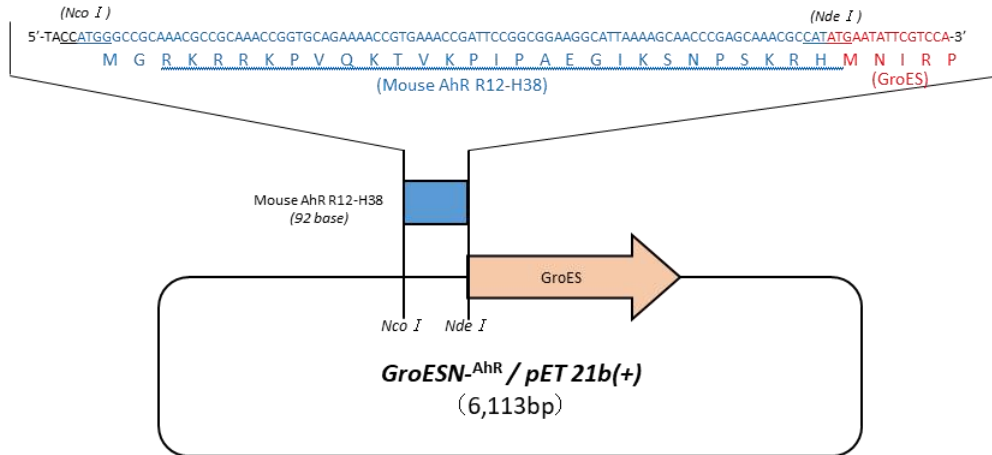


Fig. 25 Preparation of GroES^{N-AhR} expression vector

(A) 4% agarose gel electrophoresis of TA cloned colonies, (B) 4% agarose gel electrophoresis of AhR12-38 oligomer-inserted *GroES-pET* vector produced in the competent cell *E. coli* DH5 α , and (C) AhR12-38 oligomer range decoded by gene sequencing of the inserted *GroES-pET* vector.

A



B

```

Untitled2.txt
[GENETYX-WIN : Translation of Nucleotides into Amino Acids for Thesis]
Date : 2012.12.25
Filename : GroES N-end Mouse AhR12-38aa(T7u-r).seq
Sequence Size : 956
Sequence Position: 1 - 956

Translation Position: 69 - 449;
Genetic Code : Universal

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
GGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATAtaccatggccgcaaacgcccgaacccggtgcagaa AhR signal
M G R K R R K P V Q K

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
aacctgaaaccgattccggcgaagcattaaaagcaaccgagcaaacgcctatatgaaTATTCGTCCATTGCATGATCGCGTGATCGTCAAGCGTAAA GroES
T V K P I P A E G I K S N P S K R H M N I R P L H D R V I V K R K

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
GAAGTTGAACTAAATCTGCTGGCGGCATCGTTCTGACCGGCTCTGCAGCGGCTAAATCCACCCGCGGCGAAGTGTGGCTGTCCGCAATGGCCGTATCC
E V E T K S A G G I V L T G S A A A K S T R G E V L A V G N G R I L

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
TTGAAAATGGCGAAGTGAAGCCGCTGGATGTGAAAGTTGGCGACATCGTTATTTCAACGATGGCTACGGTGTGAAATCTGAGAAGATCGACAATGAAGA
E N G E V K P L D V K V G D I V I F N D G Y G V K S E K I D N E E

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
AGTGTGATCATGTCCGAAAGCGACATCTGGCAATTTGAGCGTAAATCCGCGCAGCAGACTGAACATACGAATTTAAGGAATAAAGATAATGGCAGC
V L I M S E S D I L A I V E A *

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
TAAAGACGTAATAATTCGGTAACGACGCTCGTGTGAAAATGCTGCGCGGCGTAAACGTAAGTACTGCGCAGATGCAGTGAAGTTACCCCTCGGTCCAAAAGCCGCT

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
AACGTAGTTCTGGATAAATCTTTCGGTGCACCGACCATCACCAAGATGGTGTTCCTGCTCGTGAATCGAAGTGAAGACAAGTTCGAAAATATGG

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
GTGCGCAGATGGTGAAGAAAGTTGCCTCTAAAGCAACGACGCTGCAGGCGACGGTACCACCACTGCAACCGTACTGGCTCAGGCTATCATCACTGAAGG

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
TCTGAAAGCTGTTGCTGCGGGCATGAACCGATGGACCTGAAACGTTGATCGACAAAGCGGTTACggggatcctctagatcgacaaGCTTGGCGCGC

910 920 930 940 950 960
ACTCGAGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCA
  
```

Fig. 26 Signal sequence and restriction enzyme site of GroESN-AhR expression vector.

(A) Schematic diagram of *GroESN^{-AhR}/pET* vector and (B) amino acid sequence corresponding to the full length of the gene. (B) was drawn with Genetix.

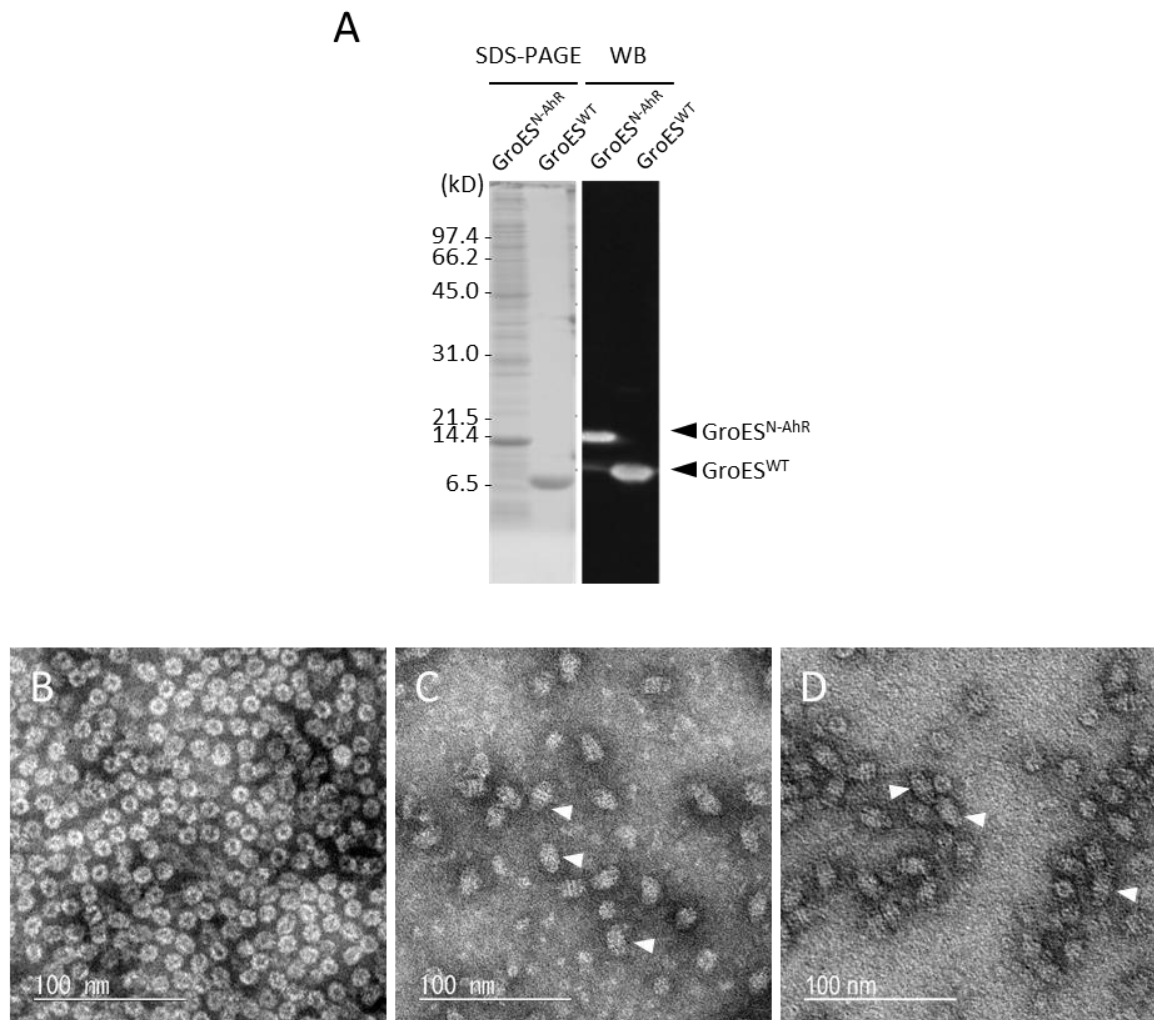


Fig. 27 Western blotting and TEM images of GroES^{N-AhR} sample.

(A) Western blotting (abbreviation WB) using anti-GroES antibody after the SDS-PAGE using 12% polyacrylamide gel. The gel was stained with CBB. GroES^{N-AhR} sample was used GroES^{N-AhR} expressing cell crude extract. (B, C, and D) TEM images of (B) GroEL^{D52,398A}, (B) GroEL^{D52,398A}/GroES^{WT} complexes, and (C) GroEL^{D52,398A} /GroES^{N-AhR}. White arrowheads showed the football-shaped GroEL/GroES complexes.

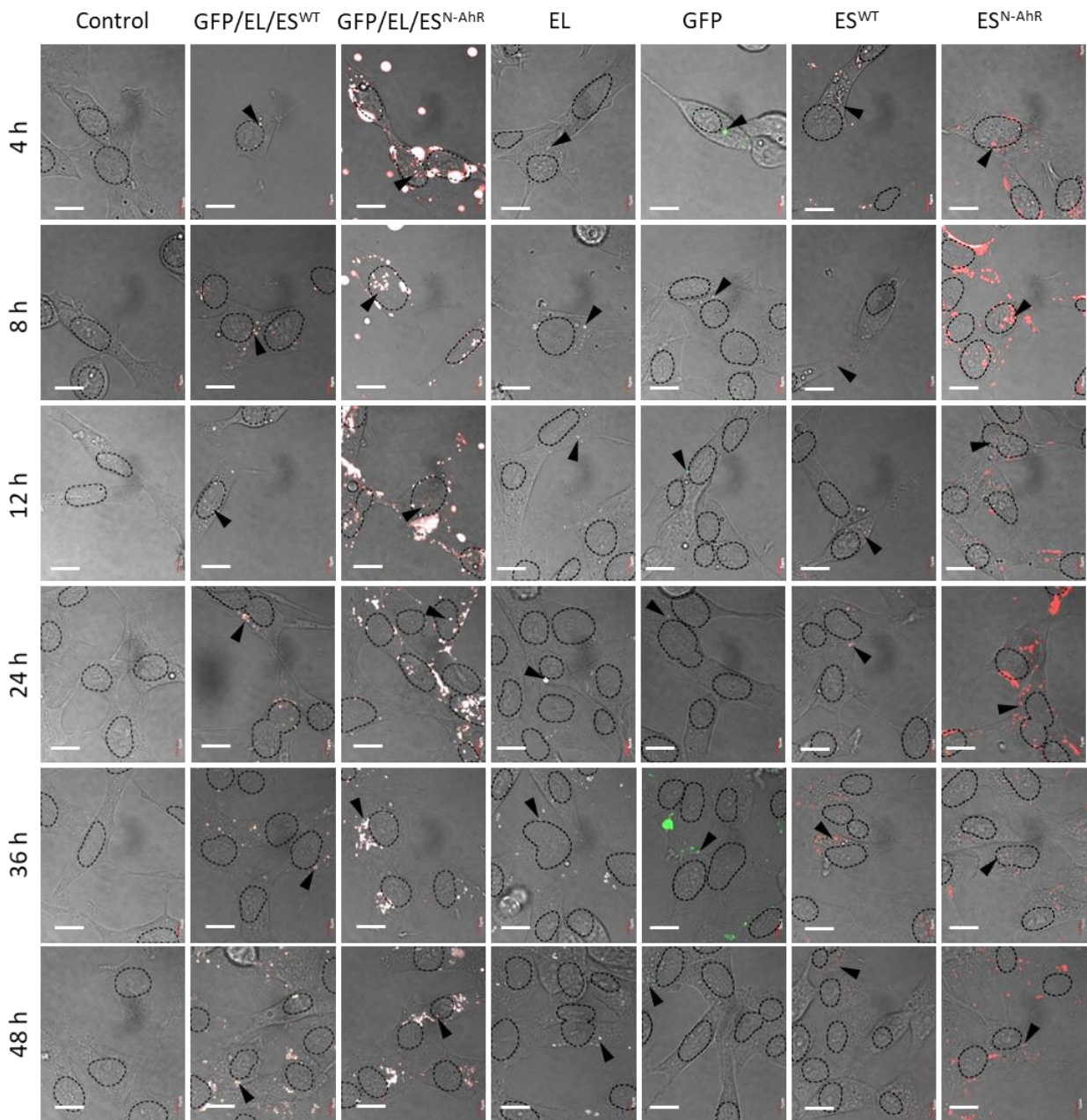


Fig. 28 Confocal images of the CHL/IU cells while 4-48 h after the addition of Cy5-GroEL^{D52,398A}/Cy3-GroES complexes including GFP.

Images were an overlay of GFP (green), Cy3-GroES (red), Cy5-GroEL^{D52,398A} (white), and DIC. Samples showed from the left side, control, Cy5-GroEL^{D52,398A}/Cy3-GroES^{WT} complexes including GFP (GFP/EL/ES^{WT}), Cy5-GroEL^{D52,398A}/Cy3-GroES^{N-AhR} complexes including GFP (GFP/EL/ES^{N-AhR}), Cy5-GroEL^{D52,398A} alone (EL), GFP alone (GFP), GroES^{WT} alone (ES^{WT}), and GroES^{N-AhR} alone (ES^{N-AhR}). The dashed line showed the membrane of the cell nucleus, and arrowheads showed the representative dye-labeled proteins around the nucleus. Scale bar showed 10 μ m.

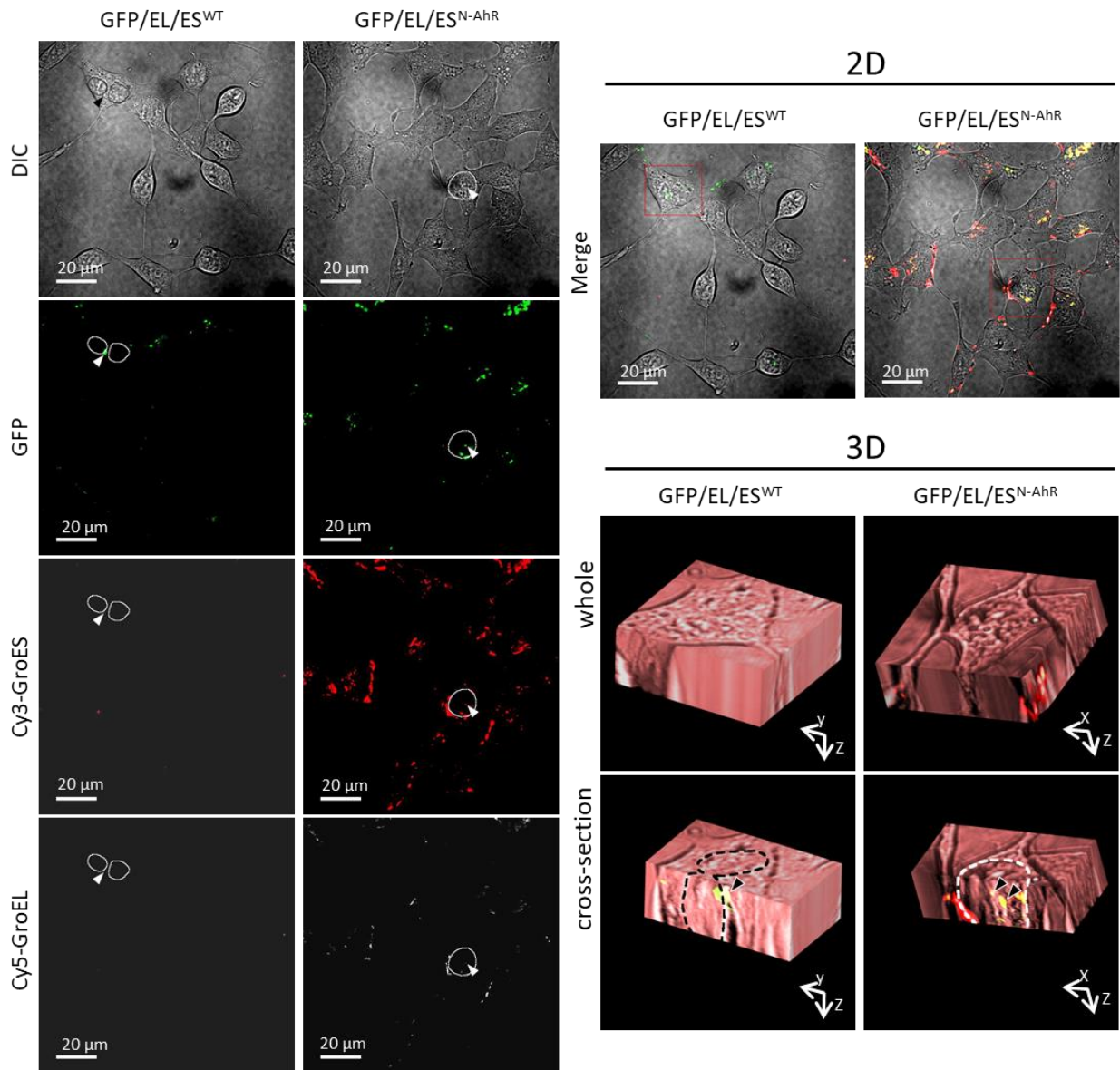


Fig. 29 Confocal images and 3D cross-sections of the CHL/IU cells at 48 h after the addition of GFP-including GroEL^{D52,398A}/GroES complexes.

Cells were added with Cy5-GroEL^{D52,398A}/Cy3-GroES^{WT} complexes including GFP (GFP/EL/ES^{WT}) or Cy5-GroEL^{D52,398A}/Cy3-GroES^{N-AhR} complexes including GFP (GFP/EL/ES^{N-AhR}). DIC, GFP, Cy3-GroES, and Cy5-GroEL^{D52,398A} images (left panels) were merged (right upper panels). The 3D image of the whole-cell was reconstructed from the red-lined area in the merged image, and cutting 3D cross-section at the XZ axis or the YZ axis. The dashed line showed the membrane of the cell nucleus, and arrowheads showed the dye-labeled proteins in the nucleus.

Table 3 The sample localization in the CHL/IU cells at the 48 h from the addition.

Added samples	Total Cell (n)	Cytosol (%)	Nucleus (%)
GFP	138	20.3	n. d.
EL ^{D52,398A}	145	24.1	n. d.
ES ^{WT}	122	8.9	n. d.
GFP/EL/ES ^{WT}	142	26.4	n. d.
ES ^{N-AhR}	139	38.1	24.4
GFP/EL/ES ^{N-AhR}	149	71.4	49.6

n. d. = not detected.

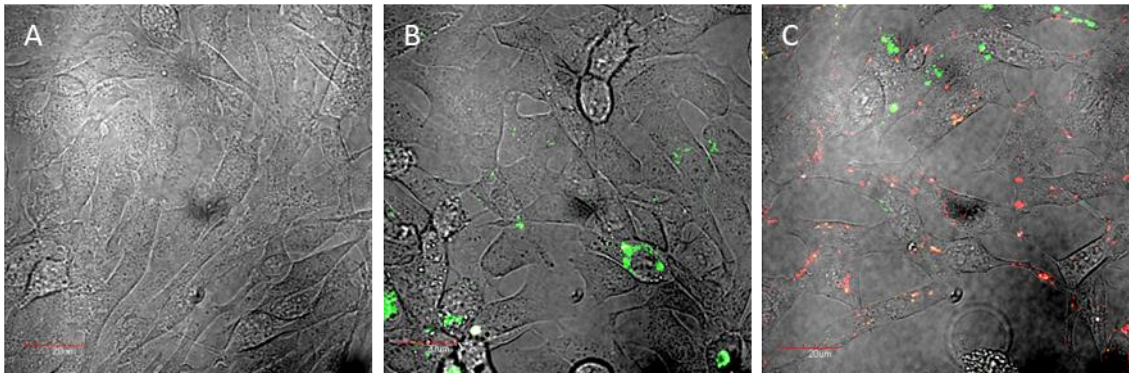


Fig. 30 Confocal images of the CHL/IU cells after 72 h after the addition of GroEL^{D52,398A}/GroES complexes including GFP. Images were an overlay of GFP (green), Cy3-GroES (red), Cy5-GroEL^{D52,398A} (white), and DIC. Scale bars showed 20 μ m.

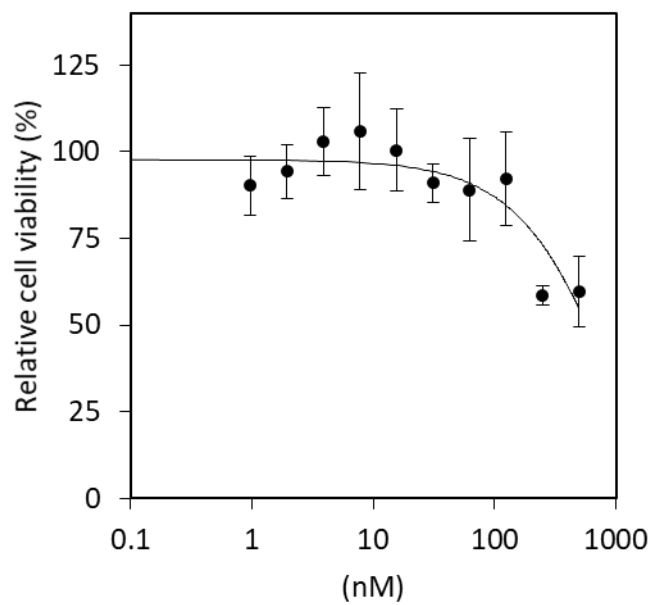


Fig. 31 CHL/IU cells relative viability treated with 0-500 nM GroEL^{D52,398A}/GroES^N-AhR complexes. Error bars indicate standard deviation.

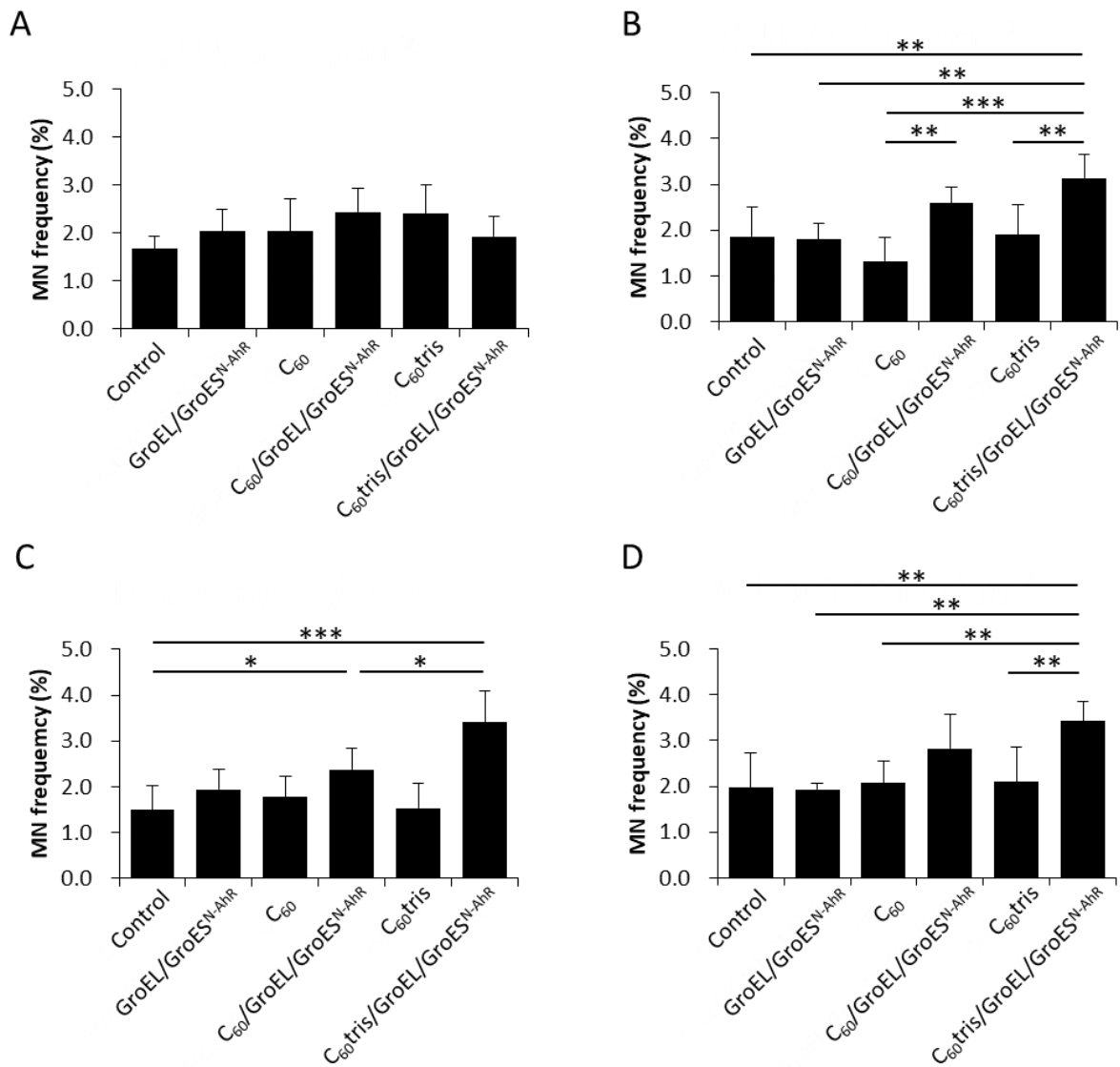


Fig. 32 Micronucleus frequency of the CHL/IU cells added with C₆₀ or C₆₀tris-including GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} complexes.

(A) UV 0 mJ/cm², (B) UV 45 mJ/cm², (C) UV 90 mJ/cm², and (D) UV 135 mJ/cm².

Samples' names showed control was additive-free, C₆₀ was C₆₀ alone, C₆₀tris was C₆₀tris alone, EL/ES was empty GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} complexes, C₆₀/EL/ES was GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} complexes including C₆₀, and C₆₀tris/EL/ES was GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} complexes including C₆₀tris, respectively. ****p* < 0.001, ***p* < 0.05, and **p* < 0.01.

第 5 章

結論

本論文を以下に総括する。

細胞内のシャペロニン GroEL/GroES 複合体は、細胞内タンパク質の 20-30%を基質として補足し、それらのフォールディングを介助する。ダブルリング構造の GroEL は ATP 依存的に、リング開口部にコシャペロン GroES を結合して複合体を形成することにより、カプセル状の形状をつくりだす。複合体内部に創出される約 5 nm の内腔には、GroEL のリング開口部に補足されていた基質タンパク質が落とし込まれる場であり、GroEL が結合した ATP がすべて加水分解されて GroEL/GroES 複合体が解離するまで、その空間は維持される。GroEL が ATP を結合するアミノ酸部位の D52、D398A をアラニン置換した GroEL 変異体は、ATP 加水分解活性を大幅に低下したことにより、GroEL/GroES 複合体の半減期を 6 日にまで延長されている。この GroEL 変異体によって形成される GroEL/GroES 複合体は、ナノサイズの水溶性カプセルとしての可能性を感じさせる。よって、本研究では、基質タンパク質の代わりにナノマテリアルを内包した GroEL/GroES 複合体の形成とその後の操作を介して、ナノマテリアルの分散、集積、局在の制御する方法の評価を行った。

第 2 章では、基質タンパク質の代わりに金属ナノ粒子 (NP) を取り込ませて GroEL/GroES 複合体を形成させ、試料を TEM、STEM-EDS、DLS により分析した。GroEL/GroES 複合体には、合金の FePt NP、貴金属の Au NP、Pt NP、量子ドットの CdS NP、CdSe/ZnSx NP が内包でき、直径は~7.5 nm まで閉じ込められることがわかった。FePt NP を用いた場合、GroEL^{D52,398A} と NP をあらかじめ混合しておくことにより、GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体の粒子内包率は約 95%まで高めることができ、さらに、試料調製後 10 日間維持できることがわかった。GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体の内腔への粒子内包の有無は STEM-EDS 解析でさらに明瞭に区別でき、さらに DLS では、水溶液中で凝集しやすい CdS NP を GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体が内包することにより粒子の凝集塊が解消されることが示された。GroEL は反応機序に従い、ADP 存在下で 1 つ目のナノ粒子を内包して弾丸型複合体を形成し、ATP 存在下で 2 つのナノ粒子を内包したフットボール型複合体を形成できることが TEM と HPLC により明らかにされた。これらの知見は、後続の第 3 章、第 4 章の研究の礎となった。

第 3 章では、高濃度 ATP 存在下で GroEL 同士がリング開口部同士で連結してチューブ状構造を形成する性質を見出し、DLS と TEM で評価した。GroEL は、5 mM ATP 存在下で、加水分解活性が遅延された変異体ほど長い GroEL チューブを形成し、さらに遠心操作を加えることでチューブの長さを伸長できることを示した。しかし、5 mM ADP 存在下、4 mM ATP 存在下であるときや、5 mM ATP 存在下であっても GroES が共存するときはチューブ化しないこともわかった。そこで、FePt NP を懸濁した緩衝液中に GroEL^{D52,398A} を混合後、5 mM ATP を添加することにより、FePt NP を内包した GroEL の連結によって約 15 nm 間隔で粒子を平面上に配置できることを明らかにした。

本研究で調製された NP 内包 GroEL^{D52,398A} 複合体は、化学修飾や架橋剤なしに調製でき、反応表面積を大きくするために金属 NP を敷設した平板の作成に役立つと考えられる。また、GroEL/GroES 複合体はタンパク質であるため、遺伝子工学的に、金属特異的ペプチドの融合など新しい機能を付加することが可能である。第 2 章の知見と合わせ、金属 NP 内包 GroEL^{D52,398A}/GroES 複合体または GroEL チューブの整列による二次元または三次元的な規則正しい集積は、導電性材料の効率的な配置を目的とした半導体や燃料電池の開発に貢献する可能性がある。

第 4 章では、マウス芳香族炭化水素受容体の核移行シグナルを GroES のアミノ酸配列の N 末端に融合した GroES 変異体 (GroES^{N-AhR}) を作製し、それを用いて形成した GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} 複合体を CHL/IU 細胞に投与し、共焦点レーザー顕微鏡を用いた経時観察により細胞送達を評価した。その結果、GFP 内包 Cy5 標識 GroEL^{D52,398A}/Cy3 標識 GroES^{N-AhR} 複合体が投与後から細胞に付着して細胞質へ移行し、投与後 48 h 時点では約 70%の細胞の細胞質に蛍光局在が、また、そのうちの約 50%の細胞の細胞核に蛍光局在が観察された。48 h 時点で細胞核に蛍光局在がみられる細胞の 3D 断面図を取得したところ、細胞核の中心部に GFP 内包 Cy5 標識 GroEL^{D52,398A}/Cy3 標識 GroES^{N-AhR} 複合体に由来する蛍光シグナルの重複が見られ、GFP を内包したまま GroEL 複合体が核内部に到達していたことを明らかにした。さらに、C₆₀ または C₆₀tris 含有 GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} 複合体を投与した CHL/IU 細胞は、他の試料を投与した細胞にくらべ、UV 照射後に有意に小核を発生させたことから、GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} 複合体によって細胞核近傍までフラレン化合物が送達されたことを間接的に示した。

以上、シャペロニン GroEL の構造と反応様式を利用し、コシャペロン GroES と複合体を形成することによって得られる水溶性ナノサイズカプセルは、金属ナノ粒子を内包することにより水溶液中に分散し、さらに、タンパク質を介して面上に間隔を持って固定することが可能であった。また、GroEL/GroES 複合体は、核移行シグナル融合 GroES を用いることによって、細胞外から細胞内の各近傍にまで内包物を送達できることが可能になった。本研究で得られたデータは、GroEL/GroES 複合体のナノサイズカプセルとしての潜在的能力に光を当てただけでなく、独特の形状をしている天然分子を有効利用するための知見となりうる。金属ナノ粒子を用いて作成される電子基板や DDS キャリアの発展に本研究の成果が寄与出来れば幸いである。

付録

付録 1. 超解像顕微鏡を用いた GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} 複合体の観察

S1-1. 緒言

一般的な光学顕微鏡は、光をレンズで集光しても、空間分解能を光の波長の半分以下に絞り込むことができず（回折限界）、集光位置ではスポット状の光強度分布が形成される。そのスポットサイズは光の波長とレンズの開口数（NA）で決まる。可視光を用いた場合は波長が 400~700 nm なので、観察はその半分の 200~350 nm 程度の構造までしかできない。細胞内のオルガネラは 200 nm 以下の構造を持つものが多数あり、従来はこれらのサイズを観察することが難しかった。そこで、蛍光分子と光の相互作用を利用した超解像蛍光顕微鏡が開発された。超解像顕微鏡は、光の波動性による空間分解能に制限を受ける広視野蛍光顕微鏡を利用した PLAM、STORM、SIM、SOFI と、レーザー共焦点顕微鏡を利用した STED がある。本研究では、構造化照明を用いた超解像顕微鏡法（structured illumination microscopy: SIM）を用いて試料投与細胞を観察した。SIM の光学系は全視野顕微鏡とほぼ同様だが、励起光に縞状の構造化照明を使用し、縞照明で励起した画像から超解像画像を再構築するものである。

S1-2. 実験方法

GroEL/GroES^{N-AhR} 複合体投与細胞の超解像顕微鏡観察のため、CHL/IU 細胞をノンコート 35 mm ガラスボトムディッシュに 10⁵ 個となるように播種し、一日培養した。

FITC-C₆₀-COOH（高村岳樹教授より供与）を DMSO に懸濁して 100 μM となるよう懸濁し、DMSO が終濃度 10% となるように HKM 緩衝液に懸濁し、1 μM GroEL^{D52,398A} を加えてマイクロピペットで 1 分間混合後、2 μM GroES^{N-AhR} と 1 mM ATP を加えた。10,000 rpm の卓上遠心機で 1 分遠心して上清を採取し、培地に含まれる GroEL^{D52,398A} が 50 nM となるように加え、ポアサイズ 0.45 μm のメンブレンフィルタで培地ごと濾過滅菌した。

CHL/IU 細胞のディッシュを試料含有培地で交換し、37 °C、5% CO₂ のインキュベーターで 2、3、4 時間インキュベーション後、ディッシュを PBS で数回洗浄し、4% パラホルムアルデヒド処理して細胞を固定化後、メタノール処理を経て DAPI 染色した。ディッシュを PBS で満たし、ディッシュのふちをテープ状にしたパラフィルムで巻き、観察まで 4 °C で遮光保存した。観察は、東京大学医科学研究所ニコンイメージングラボ（東京都港

区白金台)にて、超解像顕微鏡 N-SIM (Nikon) のデモンストレーションとして行っていただいた。

S1-3. 結果と考察

GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} 複合体が C₆₀ 化合物を内包物して細胞核へ到達できるのか確認するため、FITC-C₆₀-COOH 含有 GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} 複合体を調製し、CHL/IU 細胞に投与後 1~4 h インキュベーションした。1 時間経過ごとにエンドポイントで細胞を固定して細胞核を DAPI 染色し、超解像顕微鏡で観察した。試料添加後 2~3 h の間は、FITC-C₆₀-COOH に由来する蛍光が細胞核周辺の細胞質に存在したが、添加後 4 h では細胞核に付着または侵入しているように見え、培地添加後数時間で細胞核近傍へ到達していることがわかった (Fig. S1、白矢印)。

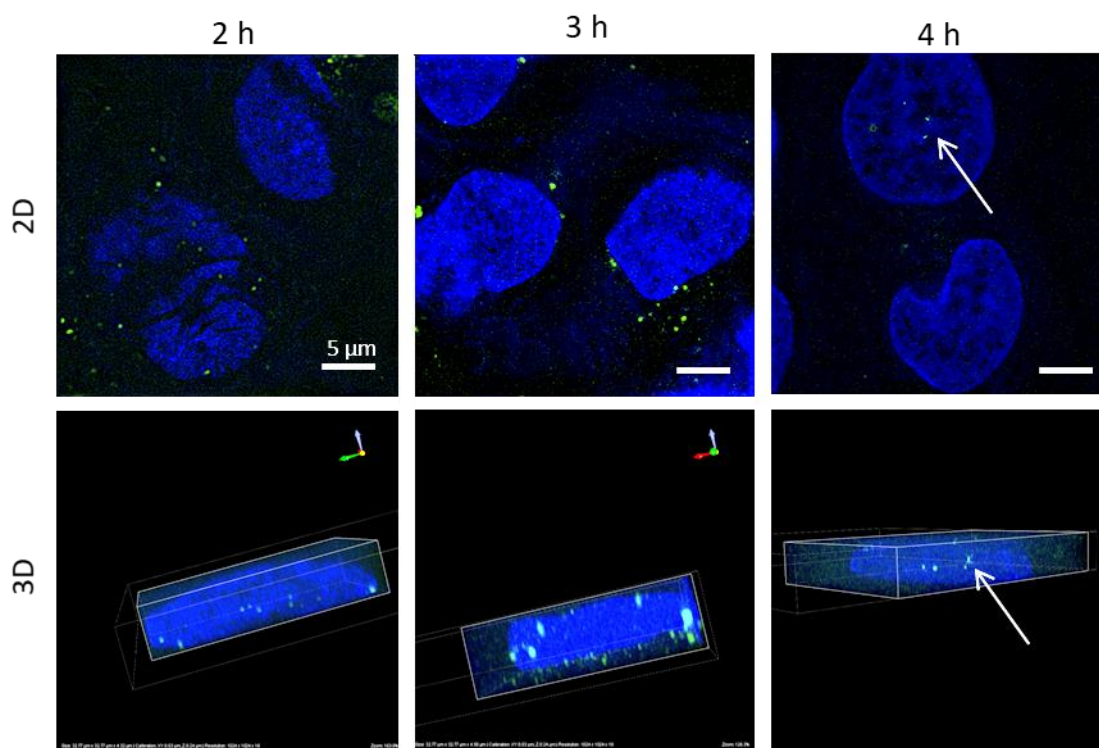


Fig. S1 Super-resolution fluorescence microscopy images of the fixed CHL cells administered GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} complexes which encapsulated FITC-C60-COOH.

The nuclei were stained with DAPI (Blue). FITC showed with green. White arrow showed FITC-C60-COOH entering the cell nucleus by GroEL^{D52,398A}/GroES^{N-AhR} complexes.

付録 2. 小核・細胞検出システムの開発

S2-1. 緒言

培養細胞を用いた *in vitro* 小核試験は、広く使用されている遺伝毒性試験であり、染色体異常誘発性および異数性化学物質によって誘発される染色体異常を検出するための最初の選択肢として認識されている [100–103]。また、動物個体を使用した *in vivo* 小核試験、細菌の変異原性試験とよく相関している [100, 104]。培養細胞を用いた *in vitro* 小核試験は、2 日程度の短い期間で簡単に実行でき、結果の解釈は比較的簡単であり（エンドポイントで細胞を計測するのみである）、試験方法は OECD が提供する規制ガイドラインに基づいて世界中で使用できるようになっている [102]。ただし、顕微鏡観察により目視で 1,000 個以上の細胞を数える必要があり、さらに細胞形態の評価のための熟練度も要することがネックとなる。そこで、迅速かつ客観的に小核細胞を判定するため、小核・細胞検出システム（武尾英也教授、安倍和弥博士との共同研究による）を開発した。本システムを用いて、小核誘発物質で処理した培養細胞を対象に、画像解析と手動計測によって得られたデータを比較し、精度を検証した。

S2-2. 実験方法

S2-2-1. 小核試験

被験物質であるマイトマイシン C (MMC)、メタンスルホン酸メチル (MMS)、過酸化水素水 (H_2O_2) は、ナカライテスクより購入した。クロム酸カリウム (K_2CrO_4) は、日本化薬より購入した。

24-well プレートに CHL/IU 細胞を 0.5×10^4 細胞で播種し、 37°C 、5% CO_2 のインキュベーターで 2 日間培養した。既報 [20] に基づき、MMC は 0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、メタンスルホン酸メチル (MMS) は 0, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、過酸化水素水は 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で小核試験に用いた。クロム酸カリウムを投与した小核試験の報告例がなかったため、二クロム酸カリウムの毒性試験を行った報告 [105] を参照し、0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM の用量で小核試験に用いた。同一試料・濃度で 4 ウェルずつ処理し、24 時間インキュベーション後、培地交換し、さらに 24 時間インキュベーション

ョンした。インキュベーション後、細胞を 0.25%トリプシン溶液で剥がし、4-2-8. と同様に小核試験を行った。

染色したスライドガラスサンプルを、蛍光モジュール (LED-FL-BG/MI) と光源 (URFLT50) を備えた倍率×20 の倒立顕微鏡 CKX41 (Olympus) で観察した。細胞を青色励起下で観察し、CellSence イメージアナライザーを用いて、デジタルカメラ DP80 で撮影した。CellSence ソフトウェア設定では、感度 ISO400、露光時間は 40ms にした。スライドごとに約 50 以上の画像を取得し、RGB-tiff 形式で保存した。

S2-2-2. 小核・細胞検出システム

小核・細胞検出システムは、画像解析プロセスにおいて円形の対象物を抽出するハフ変換[106]を採用したことにより、アクリジンオレンジで染色された細胞の顕微鏡写真から効率的に小核と細胞核を検出する。システムの概要と処理プロセスを Fig. S2 に示した。システムは初めに撮影画像 (24 bit カラーTiff) を読み込むと、RGB 値から Red 要素を切り捨て、Green 要素と Blue 要素からグレースケール化を行う。このとき、Blue 要素は、ヒストグラムを引き延ばして画像全体の明るさを調整するノーマライズを行うことにより、細胞核の視認性向上に寄与する。階調変換処理による細胞核の周辺領域を削除してエッジをシャープにしたのち、画像を二値化する。二値化画像でハフ変換を用いた円形状の検出を行い、また、細線化画像を取得し、これら 2 枚の画像の重ね合わせ像から小核の検出を行う。細胞数のカウントでは、重ね合わせ像から小核領域を除外後、再度ハフ変換を行って円形状を検出し、重複検出領域を除外した検出数を細胞数として計測する。

S2-2-3. 顕微鏡画像の手動計測

各顕微鏡画像の総細胞数と小核を有する細胞数を手動で計測した。手動計測は、画像解析を行った画像と同じものを用いて行った。手動計測で小核を検出する基準は、Fenech らの方法 [107]に従った。

S2-2-4. 統計解析

画像解析によるカウント数と手動計測によるカウント数を比較するため、投与試薬の濃度ごとに、スチューデントの t 検定を行った。

S-2-3. 結果と考察

S2-3-1. 化学物質による小核形成

溶媒コントロールの小核細胞の平均発生率は約 1.9~2.8% (n = 4) だった。公開された論文のネガティブコントロール値は 0.1~2.0%の範囲であったため [108, 109]、この研究のコントロールサンプルの小核発生率は許容範囲内であると言える。MMC、MMS、H₂O₂、K₂CrO₄ の 4 つの化学物質によって誘発された CHL/IU 細胞の平均小核発生率は、用量依存的に増加した (Fig. S3)。

S2-3-2. 画像解析による小核検出と手動計測との比較

小核・細胞検出システムの解析画面は、元画像と小核検出画像で構成されている (Fig. S4)。アプリケーションの操作は簡単で、テストする画像を含むフォルダを指定し、分析の開始ボタンのみを押すだけである。フォルダ内のすべての画像の分析が完了したら、表示ボタンをクリックして小核検出結果をディスプレイできるようになり、画面の右上に細胞数と小核数が表示されるようになる。解析過程で発生した分析画像は、アプリケーションフォルダに新しく格納され、再度見ることが可能である。

画像の処理事例では、はじめに原画像である RGB 画像をアプリに読み込んだ後 (Fig. S5A)、小核の検出を容易にするために、緑色と青色を強調したグレースケールに変化して赤色を排除した (Fig. S5B)。次に、細胞核の形態をハフ変換により円状に抽出し (Fig. S5C)、5 ピクセル以下の円状を小核として抽出した (Fig. S5D)。

MMC 0.04 µg/mL で処理した細胞の顕微鏡画像を解析したところ、円形マークは細胞核と小核の両方を示しており (Fig. S6A)、微小核の大きさが大きいため、システムでは主核と特定された。これは小核の検出限界を 5 ピクセルに設定したため、ハフ変換された 5 ピクセル以上の円形が正常核として検出されたことによる。一方で、小核を検出できない場合がみられた (Fig. S6B)。これは主核周辺に緑色の要素が残り、5 ピクセル以下の円形領域を小核として分離できなかったことによる。MMC 0.08 µg/mL で処理した細胞の画像では、いくつかの細胞の形態が著しく変化しており、G2/M 期に見られるような大型の核が 2 個の円形として検出され、細胞数を多くカウントされた (Fig. S6C)。しかし、この

ような場合でも、小核は十分に検出された (Fig. S6D)。MMC 濃度が高濃度になると細胞毒性が現れ、それらの細胞片が画像解析ソフトでの細胞計数の妨げとなった。

画像解析には誤った検出事例も含まれるが、複数濃度の MMC における平均小核発生率は、画像解析と手動計測の間で有意に相関性があった (Fig. S7)。撮影画像のセットから細胞数と小核数をワンタッチで計算するシンプルなシステムは、*in vitro* 小核試験と比較してかなり有利であった。

MMC、MMS は、OECD の小核試験ガイドラインで小核発生陽性試薬として掲げられており、使用報告は多く、本研究における小核試験も近似の結果を示した。また、 H_2O_2 も文献値に類似の傾向であった。 $KCrO_4$ は小核試験の報告例がなく、投与濃度やその他の毒性評価を行う必要があるかもしれない。少なくとも、MMC、MMS、 H_2O_2 投与細胞では、毒性による細胞や核の変形を伴わない濃度範囲では、画像解析と手動カウントの計測数はほぼ同じであった。ただし、我々のシステムには現在 2 つの弱点が存在する；(1) 染色ムラを生じている核が、複数の核として数えられてしまう；(2) 細胞のクラスターにおいて、正確な細胞数の計測に失敗する場合がある。視野に細胞クラスターが生じていた場合、現在段階では、このようなクラスターを手動で削除するか、スライドを再度準備するほかない。

検出精度にはいくつか改善すべき点があるが、顕微鏡画像さえ手元にあればいつでも解析でき、一試料 ($n = 4\sim 6$) を数えるのに目視では数時間がかかりであったところが、10 分足らずで終了することは労働力の大きな削減につながった。この小核・細胞検出システムは、CPU 容量とメモリをあまり消費しないため、高性能 CPU が必要ないことは注目に値するであろう。我々のシステムの処理速度は、intel core i3 や core i5 プロセッサを搭載した旧世代の PC で実行できる。CellProfiler[110]では一枚の画像処理に数分要するのに対し、我々のシステムでは、50 枚以上の顕微鏡画像を収めたフォルダをドロップしてスタートボタンを押すだけで、10 分以内に解析が終了した。また、画像の RGB プロファイルの変更も適用可能であるため、染色色素の交換が可能であり、検出対象の幅が広がる可能性を秘めている。

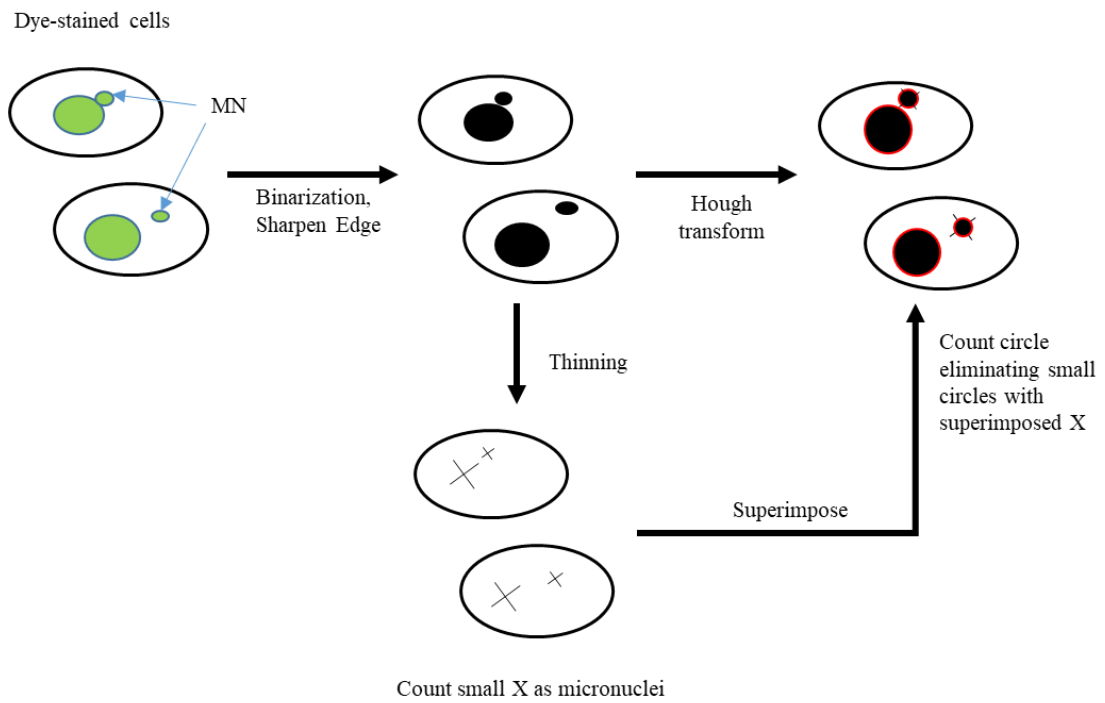


Fig. S2 Outline of the detection system of micronucleus from image photographs.

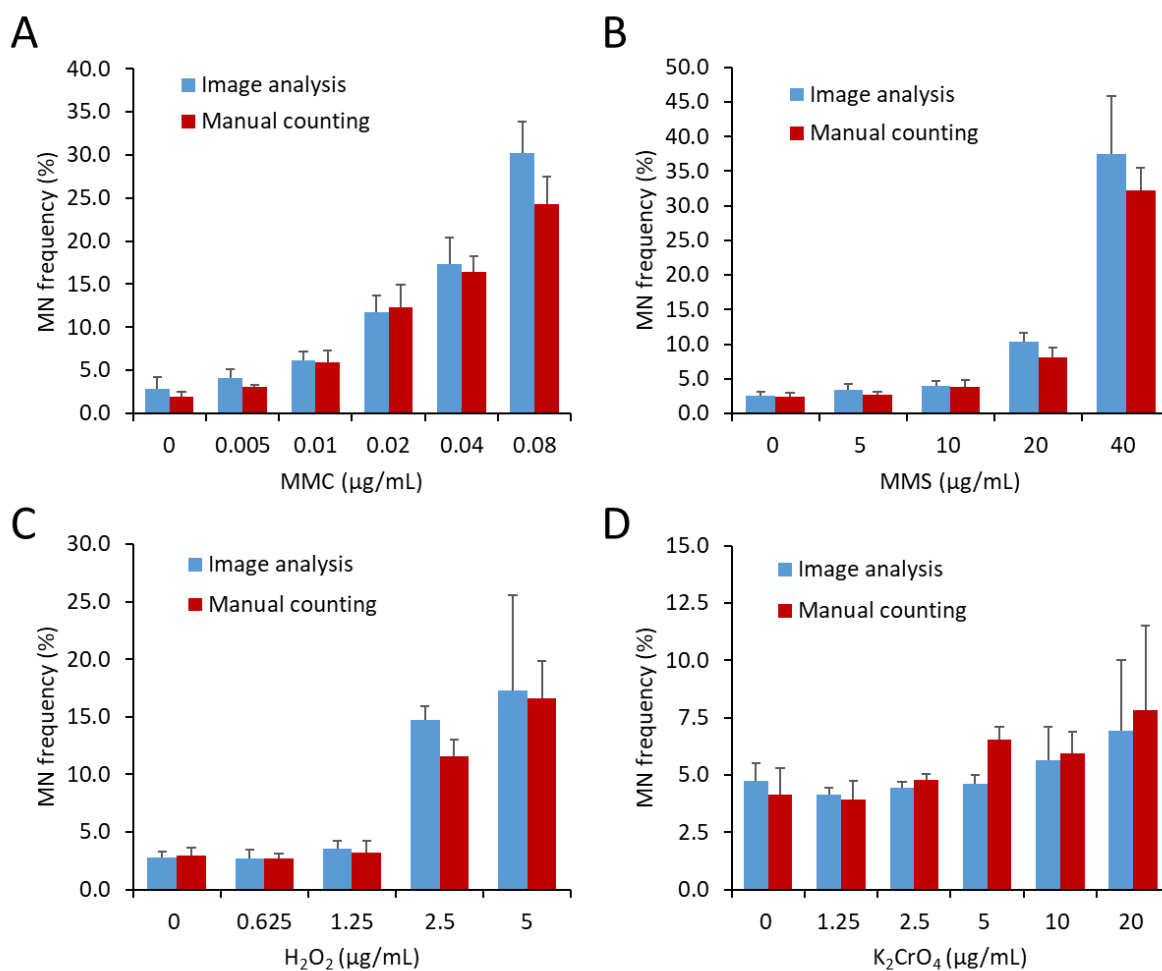


Fig. S3 Comparison of micronucleus frequencies by image analysis (blue) and manual counting (red).

Micronucleus frequencies of CHL/IU induced by (A) MMC, (B) MMS, (C) H_2O_2 , and (D) K_2CrO_4 . Micronucleus frequencies obtained by our developed system in red bars, whereas blue bars represent data obtained from manual counting.

Cell and micronucleus numbers

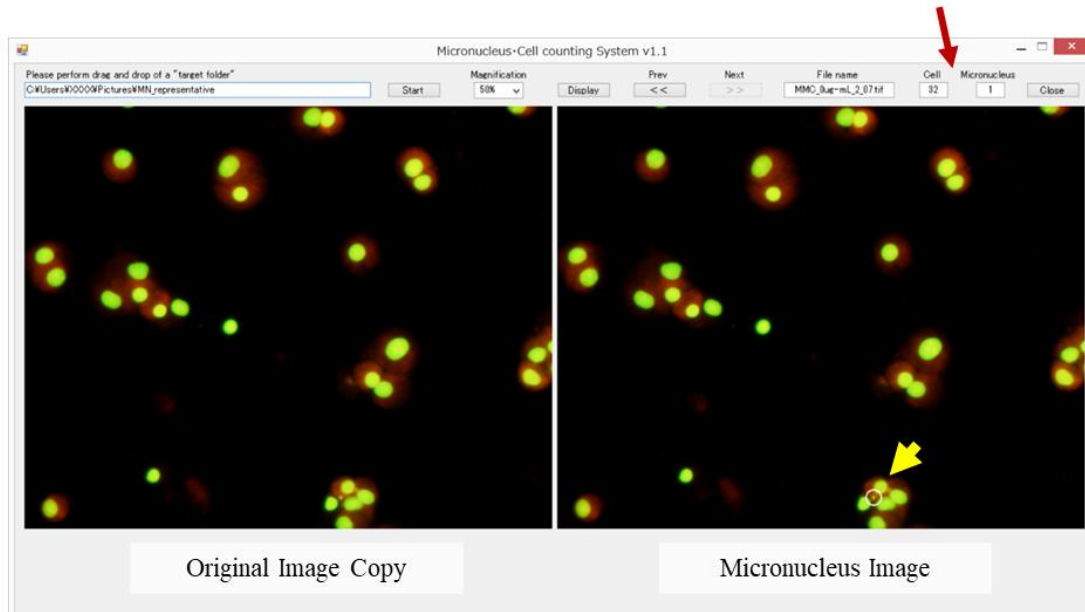


Fig. S4 Software interface on the computer screen.

Images of original photographs (left) and after analysis (right), micronucleus and cell numbers were shown in the upper right boxes.

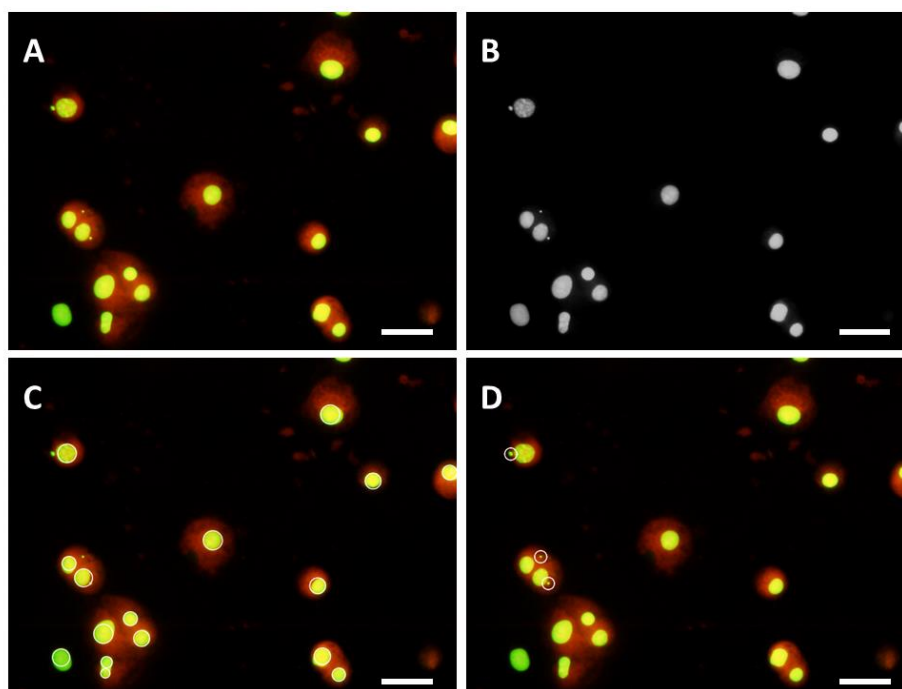


Fig. S5 Image processing of the micronucleus and nucleus detection from the microscopic photographs.

(A) Raw image, (B) normalized image reducing red color, (C) micronucleus detection indicated by small circles, and (D) total cell nucleus image with circles. Cell nuclei and micronucleus were observed in yellow-green and the cytosol was observed in red color. Scale bar = 50 μm .

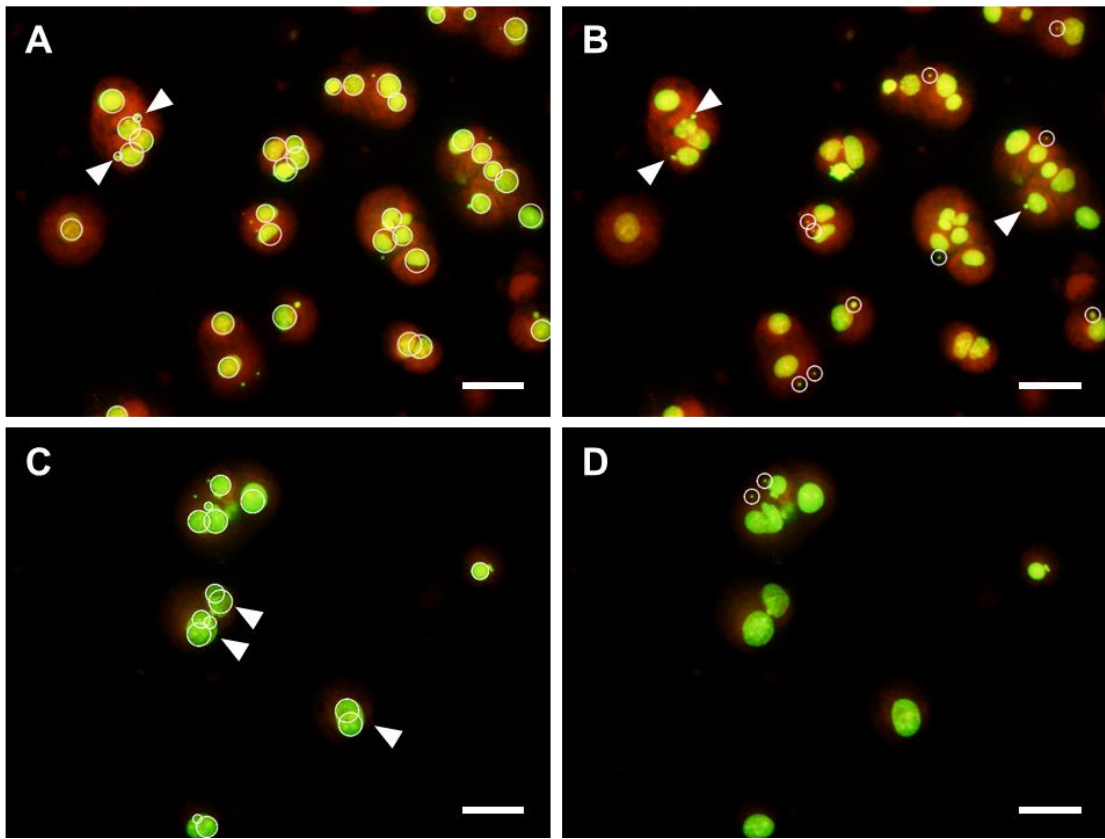


Fig. S6 Cases of false detection of micronuclei.

Cells treated with MMC at (A, B) 0.04 µg/mL and (C, D) 0.08 µg/mL showed a tendency in which the double of cells were counted in the cases of large-sized cell nuclei. White arrowheads show cell nuclei detected excessively or undetected micronuclei. Scale bar = 50 µm.

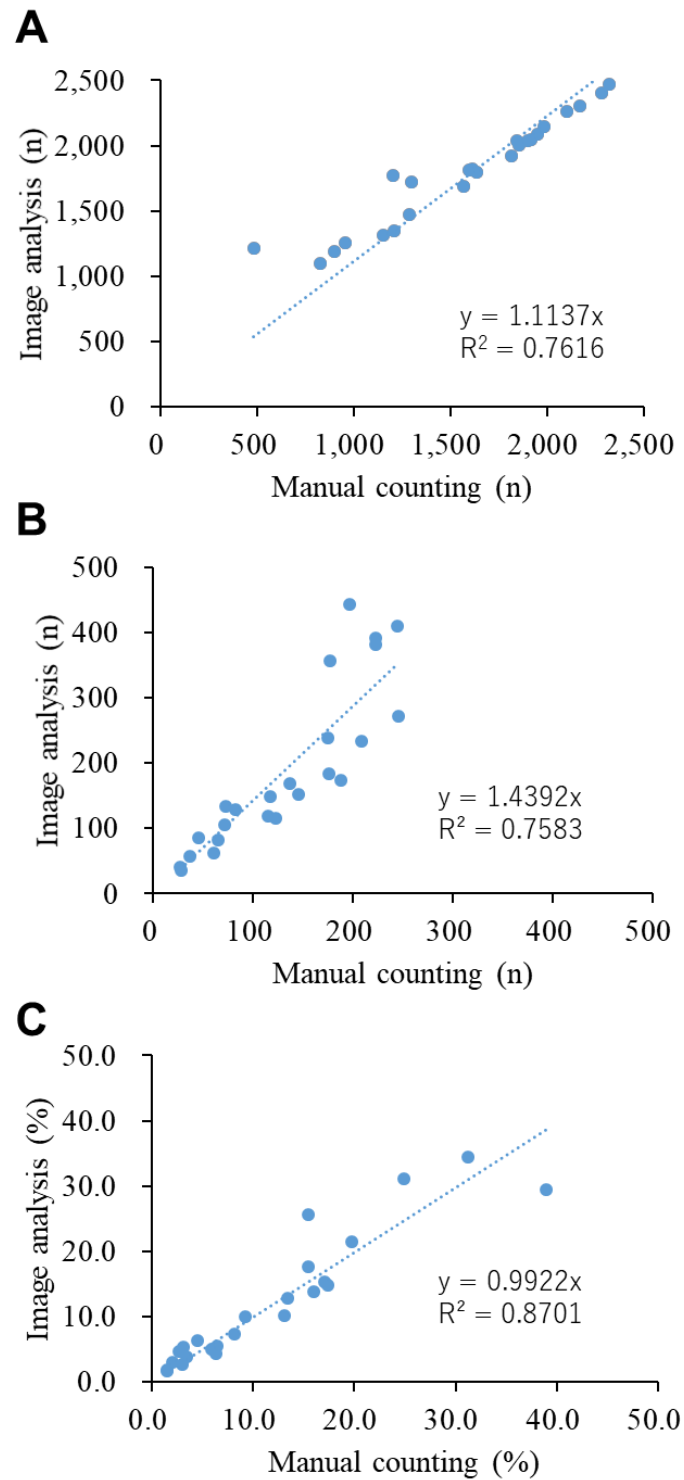


Fig. S7 Comparison between image micronucleus analysis and manual detection. The same images were counted by the two methods of our system and manual counting a) cell numbers, b) micronucleus numbers, c) micronucleus frequencies.

引用文献

1. Anfinsen CB (1973) Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science* 181:223–230
2. Singh SM, Panda AK (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99:303–310
3. García-Fruitós E (2010) Inclusion bodies: a new concept. *Microbial Cell Factories* 9:80
4. Bleem A, Daggett V (2017) Structural and functional diversity among amyloid proteins: Agents of disease, building blocks of biology, and implications for molecular engineering: Amyloid Proteins: Beyond Disease. *Biotechnology and Bioengineering* 114:7–20
5. Tyedmers J, Mogk A, Bukau B (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11:777–788
6. Kevei É, Pokrzywa W, Hoppe T (2017) Repair or destruction—an intimate liaison between ubiquitin ligases and molecular chaperones in proteostasis. *FEBS Letters* 591:2616–2635
7. Jeng W, Lee S, Sung N, Lee J, Tsai FTF (2015) Molecular chaperones: guardians of the proteome in normal and disease states. *F1000Research* 4:1448
8. Kumar CMS, Mande SC, Mahajan G (2015) Multiple chaperonins in bacteria—novel functions and non-canonical behaviors. *Cell Stress and Chaperones* 20:555–574
9. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE (2009) Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones* 14:105–111

10. Breiman A, Azem A (eds) (2018) Type I Chaperonins: Mechanism and Beyond. <https://doi.org/10.3389/978-2-88945-575-1>
11. Lopez T, Dalton K, Frydman J (2015) The Mechanism and Function of Group II Chaperonins. *Journal of Molecular Biology* 427:2919–2930
12. Azem A, Kessel M, Goloubinoff P (1994) Characterization of a functional GroEL14(GroES7)2 chaperonin hetero-oligomer. *Science* 265:653–656
13. Braig K, Otwinowski Z, Hegde R, Boisvert DC, Joachimiak A, Horwich AL, Sigler PB (1994) The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* 371:578–586
14. Nisemblat S, Yaniv O, Parnas A, Frolow F, Azem A (2015) Crystal structure of the human mitochondrial chaperonin symmetrical football complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:6044–6049
15. Rospert S, Looser R, Dubaquié Y, Matouschek A, Glick BS, Schatz G (1996) Hsp60-independent protein folding in the matrix of yeast mitochondria. *The EMBO Journal* 15:764–774
16. Dickson R, Weiss C, Howard RJ, Alldrick SP, Ellis RJ, Lorimer G, Azem A, Viitanen PV (2000) Reconstitution of Higher Plant Chloroplast Chaperonin 60 Tetradecamers Active in Protein Folding. *Journal of Biological Chemistry* 275:11829–11835
17. Cong Y, Baker ML, Jakana J, et al (2010) 4.0-Å resolution cryo-EM structure of the mammalian chaperonin TRiC/CCT reveals its unique subunit arrangement. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:4967–4972
18. Huo Y, Hu Z, Zhang K, et al (2010) Crystal Structure of Group II Chaperonin in the Open State. *Structure* 18:1270–1279

19. Techtmann SM, Robb FT (2010) Archaeal-like chaperonins in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:20269–20274
20. An YJ, Rowland SE, Na J-H, Spigolon D, Hong SK, Yoon YJ, Lee J-H, Robb FT, Cha S-S (2017) Structural and mechanistic characterization of an archaeal-like chaperonin from a thermophilic bacterium. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00980-z>
21. Xu Z, Horwich AL, Sigler PB (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL–GroES–(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature* 388:741–750
22. Chilukoti N, Kumar CMS, Mande SC (2016) GroEL2 of *Mycobacterium tuberculosis* Reveals the Importance of Structural Pliability in Chaperonin Function. *Journal of Bacteriology* 198:486–497
23. 後藤祐児, 谷澤克行, 桑島邦博 (2005) タンパク質科学—構造・物性・機能. 化学同人, 京都
24. Taguchi H (2005) Chaperonin GroEL Meets the Substrate Protein as a “Load” of the Rings. *The Journal of Biochemistry* 137:543–549
25. Koike-Takeshita A, Arakawa T, Taguchi H, Shimamura T (2014) Crystal Structure of a Symmetric Football-Shaped GroEL:GroES₂-ATP₁₄ Complex Determined at 3.8 Å Reveals Rearrangement between Two GroEL Rings. *Journal of Molecular Biology* 426:3634–3641
26. Koike-Takeshita A, Mitsuoka K, Taguchi H (2014) Asp-52 in Combination with Asp-398 Plays a Critical Role in ATP Hydrolysis of Chaperonin GroEL. *Journal of Biological Chemistry* 289:30005–30011

27. Sameshima T, Iizuka R, Ueno T, Funatsu T (2010) Denatured proteins facilitate the formation of the football-shaped GroEL-(GroES)₂ complex. *Biochemical Journal* 427:247–254
28. Yang D, Ye X, Lorimer GH (2013) Symmetric GroEL:GroES₂ complexes are the protein-folding functional form of the chaperonin nanomachine. *PNAS* 110:E4298–E4305
29. Sameshima T, Iizuka R, Ueno T, Wada J, Aoki M, Shimamoto N, Ohdomari I, Tanii T, Funatsu T (2010) Single-molecule Study on the Decay Process of the Football-shaped GroEL-GroES Complex Using Zero-mode Waveguides. *Journal of Biological Chemistry* 285:23159–23164
30. Taguchi H, Konishi S J, Ishii N, Yoshida M (1991) A Chaperonin from a Thermophilic Bacterium, *Thermus thermophilus*, That Controls Refoldings of Several Thermophilic Enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 266:22411–22418
31. Makino Y, Amada K, Taguchi H, Yoshida M (1997) Chaperonin-mediated Folding of Green Fluorescent Protein. *Journal of Biological Chemistry* 272:12468–12474
32. Koike-Takeshita A, Yoshida M, Taguchi H (2008) Revisiting the GroEL-GroES Reaction Cycle via the Symmetric Intermediate Implied by Novel Aspects of the GroEL(D398A) Mutant. *Journal of Biological Chemistry* 283:23774–23781
33. 増田恵, 依田ひろみ, 小池あゆみ (2019) 様々な反応サイクル時間をもつ GroEL 変異体のデザイン--材料分析室利用研究成果、その XXIX(3)--. *神奈川工科大学研究報告 B, 理工学編* 43:21–26
34. 大塚研一, 柳下皓男, 目崎令司 (2010) *ナノマテリアルの安全管理*. オーム社, 東京

35. 肥後矢吉, 谷川紘, 鈴木健一郎, 磯野吉正, 萩博次, 土屋智由, 石山千恵美 (2015) 小さなものをつくるためのナノ/サブミクロン評価法 - μm から nm 寸法のものをつくるための材料, 物性, 形状, 機能の評価法 -. コロナ社, 東京
36. Anu Mary Ealia S, Saravanakumar MP (2017) A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering 263:032019
37. 田中秀和, 李恵瑛, 川合知二 (2005) 表面ナノ加工とボトムアップナノテクノロジー～先端・新機能デバイスの創製～. 表面技術 56:373–378
38. 春田正毅 (2013) 化学の要点シリーズ7ーナノ粒子. 共立出版, 東京
39. 株式会社東レリサーチセンター (2013) ナノ粒子の最先端ー製法・用途展開・安全性・評価技術ー. 東レリサーチセンター調査研究部, 東京
40. Faure B, Salazar-Alvarez G, Ahniyaz A, Villaluenga I, Berriozabal G, Miguel YRD, Bergström L (2013) Dispersion and surface functionalization of oxide nanoparticles for transparent photocatalytic and UV-protecting coatings and sunscreens. Sci Technol Adv Mater 14:023001
41. Shen S, Zhou R, Li Y, Liu B, Pan G, Liu Q, Xiong Q, Wang X, Xia X, Tu J (2019) Bacterium, Fungus, and Virus Microorganisms for Energy Storage and Conversion. Small Methods 3:1900596
42. Watt GD, Kim J-W, Zhang B, Miller T, Harb JN, Davis RC, Choi SH (2012) A Protein-Based Ferritin Bio-Nanobattery. Journal of Nanotechnology 2012:1–9
43. Ban T, Uenuma M, Migita S, Okamoto N, Ishikawa Y, Uraoka Y, Yamashita I, Yamamoto S (2018) One-dimensional array of gold nanoparticles fabricated using biotemplate and its application to fine FET. Jpn J Appl Phys 57:06HC05

44. Uchida M, Kang S, Reichhardt C, Harlen K, Douglas T (2010) The ferritin superfamily: Supramolecular templates for materials synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1800:834–845
45. Taylor R, Coulombe S, Otanicar T, Phelan P, Gunawan A, Lv W, Rosengarten G, Prasher R, Tyagi H (2013) Small particles, big impacts: A review of the diverse applications of nanofluids. *Journal of Applied Physics* 113:011301
46. Ishii D, Kinbara K, Ishida Y, Ishii N, Okochi M, Yohda M, Aida T (2003) Chaperonin-mediated stabilization and ATP-triggered release of semiconductor nanoparticles. *Nature* 423:628–632
47. Dong C, Shao L, Guo J, Ren J (2008) Host–Guest Interaction of Chaperonin GroEL and Water-Soluble CdTe Quantum Dots and its Size-Selective Inclusion. *ChemPhysChem* 9:2245–2251
48. Sim S, Miyajima D, Niwa T, Taguchi H, Aida T (2015) Tailoring Micrometer-Long High-Integrity 1D Array of Superparamagnetic Nanoparticles in a Nanotubular Protein Jacket and Its Lateral Magnetic Assembling Behavior. *Journal of the American Chemical Society* 137:4658–4661
49. Motojima F, Makio T, Aoki K, Makino Y, Kuwajima K, Yoshida M (2000) Hydrophilic Residues at the Apical Domain of GroEL Contribute to GroES Binding but Attenuate Polypeptide Binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 267:842–849
50. Sun S (2000) Monodisperse FePt Nanoparticles and Ferromagnetic FePt Nanocrystal Superlattices. *Science* 287:1989–1992
51. Takahashi K, Sakurai K (2020) Dynamic light scattering. *Drug Delivery System* 35:332–335

52. Taguchi H, Tsukuda K, Motojima F, Koike-Takeshita A, Yoshida M (2004) BeF_x Stops the Chaperonin Cycle of GroEL-GroES and Generates a Complex with Double Folding Chambers. *Journal of Biological Chemistry* 279:45737–45743
53. Kumar Sahu N, Bahadur D (2013) Influence of excess Fe accumulation over the surface of FePt nanoparticles: Structural and magnetic properties. *Journal of Applied Physics* 113:134303
54. Chaudhuri TK, Farr GW, Fenton WA, Rospert S, Horwich AL (2001) GroEL/GroES-Mediated Folding of a Protein Too Large to Be Encapsulated. *Cell* 107:235–246
55. Chen D-H, Song J-L, Chuang DT, Chiu W, Ludtke SJ (2006) An Expanded Conformation of Single-Ring GroEL-GroES Complex Encapsulates an 86 kDa Substrate. *Structure* 14:1711–1722
56. Green M (2010) The nature of quantum dot capping ligands. *J Mater Chem* 20:5797–5809
57. ギュンター・シミット, 岩村秀 (2007) ナノ粒子科学 基本原理から応用まで. エヌ・ティー・エス, 東京
58. Liu S, Yuen MC, White EL, Boley JW, Deng B, Cheng GJ, Kramer-Bottiglio R (2018) Laser Sintering of Liquid Metal Nanoparticles for Scalable Manufacturing of Soft and Flexible Electronics. *ACS Appl Mater Interfaces* 10:28232–28241
59. Roy NK, Behera D, Dibua OG, Foong CS, Cullinan MA (2019) A novel microscale selective laser sintering (μ -SLS) process for the fabrication of microelectronic parts. *Microsystems & Nanoengineering* 5:1–14
60. 松下電器産業株式会社 バイオテクノロジーによるナノ構造半導体形成法を開発 | プレ ス リ リ ー ス | Panasonic Newsroom Japan.

<https://news.panasonic.com/jp/press/data/jn080321-1/jn080321-1.html>. Accessed 25 Feb 2021

61. 星野文彦, 今枝孝夫, 西田愛, 小池あゆみ 公開特許公報(A)_ナノ粒子-GroEL 蛋白質複合体及びその製造方法.
62. Harris JR, Plückthun A, Zahn R (1994) Transmission Electron Microscopy of GroEL, GroES, and the Symmetrical GroEL/ES Complex. *Journal of Structural Biology* 112:216–230
63. Yokokawa M, Wada C, Ando T, Sakai N, Yagi A, Yoshimura SH, Takeyasu K (2006) Fast-scanning atomic force microscopy reveals the ATP/ADP-dependent conformational changes of GroEL. *The EMBO Journal* 25:4567–4576
64. 菅沼克昭 (2017) ヘルスケア・ウェアラブルデバイスの開発. シーエムシー出版, 東京
65. 神谷信行, 梅田実 (2008) 小型燃料電池の最新技術. シーエムシー出版, 東京
66. Tibbitt MW, Dahlman JE, Langer R (2016) Emerging Frontiers in Drug Delivery. *Journal of the American Chemical Society* 138:704–717
67. Patel LN, Zaro JL, Shen W-C (2007) Cell Penetrating Peptides: Intracellular Pathways and Pharmaceutical Perspectives. *Pharmaceutical Research* 24:1977–1992
68. Dhand C, Prabhakaran MP, Beuerman RW, Lakshminarayanan R, Dwivedi N, Ramakrishna S (2014) Role of size of drug delivery carriers for pulmonary and intravenous administration with emphasis on cancer therapeutics and lung-targeted drug delivery. *RSC Adv* 4:32673–32689

69. Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, et al (2014) Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:14888–14893
70. Kanada M, Bachmann MH, Hardy JW, et al (2015) Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 201418401
71. Bechara C, Sagan S (2013) Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Letters* 587:1693–1702
72. Copolovici DM, Langel K, Eriste E, Langel Ü (2014) Cell-Penetrating Peptides: Design, Synthesis, and Applications. *ACS Nano* 8:1972–1994
73. Hällbrink M, Florén A, Elmquist A, Pooga M, Bartfai T, Langel Ü (2001) Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1515:101–109
74. Luo H, Lu L, Yang F, Wang L, Yang X, Luo Q, Zhang Z (2014) Nasopharyngeal Cancer-Specific Therapy Based on Fusion Peptide-Functionalized Lipid Nanoparticles. *ACS Nano* 8:4334–4347
75. Furue M, Takahara M, Nakahara T, Uchi H (2014) Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. *Archives of Dermatological Research* 306:769–779
76. Seok S-H, Lee W, Jiang L, Molugu K, Zheng A, Li Y, Park S, Bradfield CA, Xing Y (2017) Structural hierarchy controlling dimerization and target DNA recognition in the AHR transcriptional complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114:5431–5436
77. Alshehri MH, Cox BJ, Hill JM (2014) C60 fullerene binding to DNA. *The European Physical Journal B* 87:199

78. Ikeda A, Hatano T, Kawaguchi M, Shinkai S, Suenaga H (1999) Water-soluble [60]fullerene–cationic homooxalix[3]arene complex which is applicable to the photocleavage of DNA. *Chemical Communications* 1403–1404
79. Nakamura E, Tokuyama H, Yamago S, Shiraki T, Sugiura Y (1996) Biological Activity of Water-Soluble Fullerenes. Structural Dependence of DNA Cleavage, Cytotoxicity, and Enzyme Inhibitory Activities Including HIV-Protease Inhibition. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 69:2143–2151
80. Mroz P, Tegos GP, Gali H, Wharton T, Sarna T, Hamblin MR (2007) Photodynamic therapy with fullerenes. *Photochemical & Photobiological Sciences* 6:1139–1149
81. Garcia-Diaz M, Huang Y-Y, Hamblin MR (2016) Use of fluorescent probes for ROS to tease apart Type I and Type II photochemical pathways in photodynamic therapy. *Methods* 109:158–166
82. Ikeda A, Doi Y, Nishiguchi K, Kitamura K, Hashizume M, Kikuchi J, Yogo K, Ogawa T, Takeya T (2007) Induction of cell death by photodynamic therapy with water-soluble lipid-membrane-incorporated [60]fullerene. *Organic & Biomolecular Chemistry* 5:1158–1160
83. Yu C, Avci P, Canteenwala T, Chiang LY, Chen BJ, Hamblin MR (2016) Photodynamic Therapy with Hexa(sulfo- *n* -butyl)[60]Fullerene Against Sarcoma *In Vitro* and *In Vivo*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 16:171–181
84. Chen R, Khormae S, Eccleston ME, Slater NKH (2009) The role of hydrophobic amino acid grafts in the enhancement of membrane-disruptive activity of pH-responsive pseudo-peptides. *Biomaterials* 30:1954–1961

85. Li L, Vorobyov I, Allen TW (2013) The Different Interactions of Lysine and Arginine Side Chains with Lipid Membranes. *The Journal of Physical Chemistry B* 117:11906–11920
86. Nakase I, Tadokoro A, Kawabata N, Takeuchi T, Katoh H, Hiramoto K, Negishi M, Nomizu M, Sugiura Y, Futaki S (2007) Interaction of Arginine-Rich Peptides with Membrane-Associated Proteoglycans Is Crucial for Induction of Actin Organization and Macropinocytosis †. *Biochemistry* 46:492–501
87. Lambaerts K, Wilcox-Adelman SA, Zimmermann P (2009) The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans. *Current Opinion in Cell Biology* 21:662–669
88. Kosuge M, Takeuchi T, Nakase I, Jones AT, Futaki S (2008) Cellular Internalization and Distribution of Arginine-Rich Peptides as a Function of Extracellular Peptide Concentration, Serum, and Plasma Membrane Associated Proteoglycans. *Bioconjugate Chemistry* 19:656–664
89. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:7297–7301
90. Patel SG, Sayers EJ, He L, Narayan R, Williams TL, Mills EM, Allemann RK, Luk LYP, Jones AT, Tsai Y-H (2019) Cell-penetrating peptide sequence and modification dependent uptake and subcellular distribution of green fluorescent protein in different cell lines. *Scientific Reports* 9:6298
91. Buratta S, Tancini B, Sagini K, Delo F, Chiaradia E, Urbanelli L, Emiliani C (2020) Lysosomal Exocytosis, Exosome Release and Secretory Autophagy: The

Autophagic- and Endo-Lysosomal Systems Go Extracellular. *International Journal of Molecular Sciences* 21:2576

92. Bihari P, Vippola M, Schultes S, Praetner M, Khandoga AG, Reichel CA, Coester C, Tuomi T, Rehberg M, Krombach F (2008) Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Particle and Fibre Toxicology* 5:14
93. Deguchi S, Yamazaki T, Mukai S, Usami R, Horikoshi K (2007) Stabilization of C₆₀ Nanoparticles by Protein Adsorption and Its Implications for Toxicity Studies. *Chemical Research in Toxicology* 20:854–858
94. Francis GL (2010) Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. *Cytotechnology* 62:1–16
95. Hashimoto A, Yamanaka T, Takamura-Enya T (2017) Synthesis of novel fluorescently labeled water-soluble fullerenes and their application to its cellular uptake and distribution properties. *J Nanopart Res* 19:402
96. Koike-Takeshita A, Shimamura T, Yokoyama K, Yoshida M, Taguchi H (2006) Leu³⁰⁹ Plays a Critical Role in the Encapsulation of Substrate Protein into the Internal Cavity of GroEL. *Journal of Biological Chemistry* 281:962–967
97. Machida K, Kono-Okada A, Hongo K, Mizobata T, Kawata Y (2008) Hydrophilic Residues 526KNDAAD531 in the Flexible C-terminal Region of the Chaperonin GroEL Are Critical for Substrate Protein Folding within the Central Cavity. *J Biol Chem* 283:6886–6896
98. Biswas S, Kinbara K, Niwa T, Taguchi H, Ishii N, Watanabe S, Miyata K, Kataoka K, Aida T (2013) Biomolecular robotics for chemomechanically driven guest delivery fuelled by intracellular ATP. *Nature Chemistry* 5:613–620

99. Yuan Y, Du C, Sun C, et al (2018) Chaperonin-GroEL as a Smart Hydrophobic Drug Delivery and Tumor Targeting Molecular Machine for Tumor Therapy. *Nano Letters* 18:921–928
100. Corvi R, Madia F (2017) In vitro genotoxicity testing—Can the performance be enhanced? *Food and Chemical Toxicology* 106:600–608
101. Doherty AT (2012) The In Vitro Micronucleus Assay. In: Parry JM, Parry EM (eds) *Genetic Toxicology: Principles and Methods*. Springer, New York, NY, pp 121–141
102. OECD In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test.
103. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, et al (2003) Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 540:153–163
104. Kirkland D, Reeve L, Gatehouse D, Vanparys P (2011) A core in vitro genotoxicity battery comprising the Ames test plus the in vitro micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and in vivo genotoxins. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 721:27–73
105. Patlolla A, Barnes C, Hackett D, Tchounwou P (2009) Potassium Dichromate Induced Cytotoxicity, Genotoxicity and Oxidative Stress in Human Liver Carcinoma (HepG2) Cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 6:643–653
106. Hassanein AS, Mohammad S, Sameer M, Ragab ME (2015) A Survey on Hough Transform, Theory, Techniques and Applications. arXiv:1502.02160 [cs]
107. Fenech M (1997) The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 392:11–18

108. Matsushima T, Hayashi M, Matsuoka A, et al (1999) Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis* 14:569–580
109. Yamamoto M, Motegi A, Seki J, Miyamae Y (2005) The optimized conditions for the in vitro micronucleus (MN) test procedures using chamber slides. *Environmental Mutagen Research* 27:145–151
110. Ramadhani D, Purnami S (2013) Automated Detection of Binucleated Cell and Micronuclei using CellProfiler 2.0 Software. *HAYATI Journal of Biosciences* 20:151–156

謝辞

本研究を進めるにあたり終始ご指導とご鞭撻を賜りました神奈川工科大学大学院工学研究科応用科学・バイオサイエンス専攻 小池あゆみ教授に、心より感謝の意を申し上げます。栄養士畑から来た私にバイオ実験を手解きしてくださり、研究の楽しさと難しさだけでなく、立ち居振る舞いを通して人の在り方をも教えていただいたように感じています。

山形大学大学院理工学研究科 山本修教授には、白金鉄ナノ粒子のご提供および合成方法をご教授いただきました。研究室訪問をお願い申し上げます度にご快諾くださり、訪問時にはラボメンバーの皆さんのお気遣いもまた心に染みしました。深く感謝申し上げます。

神奈川工科大学工学部応用化学科 高村岳樹教授には、培養細胞を用いた実験をご指導いただきました。実験の相談や結果の議論について都度丁寧にご対応いただき、深く感謝申し上げます。

神奈川工科大学工学部電気電子情報工学科 武尾英哉教授、神奈川工科大学バイオメディカル研究センター 安部和弥博士には、小核・細胞検出システムを開発していただきました。検出システムの構築、検出精度の向上にご尽力いただき、感謝申し上げます。

副査を引き受けていただいた神奈川工科大学応用バイオ科学部応用バイオ科学科 飯田泰広教授、神奈川工科大学健康医療学科学部管理栄養学科 清瀬千佳子教授、澤井淳教授には、研究や論文に関して貴重なご教示を賜りました。この場を借りてお礼申し上げます。

東京工業大学技術部バイオ技術センター 山道桂子氏、国立研究科初法人物質材・料研究機構電子顕微鏡ステーション 鴻田一絵氏、伊坂紀子氏には、TEM 観察の手技を数回にわたりご指導いただきましたことを深く感謝いたします。

神奈川工科大学バイオメディカル研究センター 向井幸子さん、増田恵さん、小池研究室の皆様には、様々な場面で助けていただき、また、励ましていただきました。共に所属できたことを嬉しく思い、これからのご多幸をお祈りいたします。

最後に、長くに渡って私を支援してくれた家族に感謝を申し上げます。

おかげさまで本研究をまとめることができました。御礼申し上げます。

2021年3月

依田 ひろみ