

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名：小林 厚子

2. 養成カリキュラム名：中枢神経細胞活動制御技術の開発

3. 養成カリキュラムの達成状況

申請段階で、習得したい技術として挙げていた項目について順調に研修が進みその成果も現れた。神経活性化蛋白質の作用機構解明については、当該フェローが独自の技術開発要素も取り入れて新たな画期的技術を生み出した。電顕技術および試料作製においては、目覚ましい進歩を遂げ、今後の神経活性化蛋白質の作用機構解明に大いに役立つことが予想される。

4. 成果

- (1) ニワトリ胚の終脳とラット胚海馬からの神経細胞の培養技術（培養皿直径 6 cm; 28 cm²）を習得した。
- (2) 受入機関である当研究室において、既にニワトリ胚終脳培養神経細胞から Mg-free 条件において、神経活性化蛋白質が分泌されていることが報告されている。この蛋白質を培養系から精製することを目的として、終脳神経細胞の大量培養系の確立、及びその活性上清の回収を試みた。ニワトリ胚の終脳解離神経細胞の細胞培養は容易ではないが、培養ディッシュの選択、培養皿コーティング、細胞の解離法に改良を加えることによって、培養面積を 28 cm² から 150 cm² に拡大し、総面積にして 3000 cm² の神経細胞を常時供給する培養法を確立した。さらに、神経活性化蛋白質を含んだ上清を調整するために、培養 7 日目に培地を Mg-free 記録外液に置換し、37 °C で 20 分間静置後、上清を回収した。電気生理学手法を用いた評価法により、目的とする神経活性化が確認された。また蛋白同様に障害となる血清蛋白アルブミン除去対策として Mg-free 記録外液に置換する前に、記録外液で培養細胞を 5 回洗浄する方法を試みても同様に目的とする神経活性化が確認された。回収した上清を約 100 倍に濃縮し、ブラッド法とプレートリーダーによる蛋白定量法の技術を習得した。
- (3) 上記神経活性化蛋白質単離精製を目的とし、2次元電気泳動法、液層クロマトグラフィー手法を習得した。(2)で回収した上清を約 200 倍濃縮したものを試料とした。2次元電気泳動においては、約 50 µg の蛋白質を等電点電気泳動にかけた。引き続き SDS ポリアクリルアミド電気泳動にかけ、そして銀染色を行った結果、各種蛋白質のスポットが確認できた。液層クロマトグラフィーにおいては、過去に目的とする蛋白質が中性条件で C Mセファロースに結合することが判明していたため、Resource Qカラムを用い、A K T A (Pharmacia Biotech)により蛋白の分離を試みた。
- (4) 当研究室でおこなわれる電気生理学手法を用いて評価されたラット胚海馬培養細胞の高分高分解能電子顕微鏡 (Hitachi H-9000; 最大加速電圧 300kV)、フィールドエミッション走査型電子顕微鏡 (Hitachi S-5000) で観察することを目的とし、それに必要な技術 (ネガティブ染色、試料固定、脱水、包埋、切片、ウラン-鉛の電子線 2重染色) を習得した。電気生理学評価法では、複雑な細胞培養系 (プラスチック製培養皿、ガラス製培養皿、カバーガラス等) を用いるため、どんな培養系にも対応できるような包埋および完全剥離法を確立した。
- (5) 当研究室で電気生理実験用に培養されたラット胚海馬培養神経細胞の固定、包埋、樹脂剥離作業をおこなった。切片作製においては、ウルトラミクロトーム LEICA-UCT (Leica) を用いた。光学顕微鏡レベルにおけるラット培養神経細胞の形状把握の為、培養皿表面から 15 µm まで 1 µm ごとに厚み 200nm の断片的連続切片を作製し、トルイジンブルーで染色した後、光学顕微鏡で観

察した。この観察により、当培養ラット神経細胞ニューロンは、細胞厚み約 15 μ 、培養皿から 2 μ ぐらいの高さで固定成長しており、1 μ までは接着細胞グリアで占められていることが明らかになった。

- (7) (5)で得た知見をもとに、電顕用の超薄切片 50nm を作成した。(6)で染色した後、高分解能電子顕微鏡 HitachiH-9000 で観察した。HitachiH-9000 は、生物用のポールピースを使用していないので、低倍においては画像コントラストに乏しい。そこで、画像コントラストを高める為に一般的に行われているアンダーディフォーカスの代わりに、対物絞り、制限視野絞り、ハーフフィルムサイズ、電子線照射範囲を組み合わせることによって、3000 倍、6000 倍、9000 倍、12000 倍においても高分解能かつ比較的高いコントラストの画像を得ることがわかった。また、H-9000 型は、最大加速電圧が 300kV なので、生体試料用に不適切な為、加速電圧を 100kV に下げた使用法を行なった。以上により、ラット胚海馬培養神経細胞のシナプス、シナプス後膜肥厚の観察像を得ることが出来るようになった。
- (8) 免疫電顕・電顕酵素抗体法 前包埋法を習得した。電顕で使用されるグルタルアルデヒドは、アルデヒド基が遊離して組織内に残りやすく、抗体中のアミノ基と特異的に結合して抗原性を失活させるため、免疫電顕では使用しないことが原則となっている。しかし、細胞構造保存に優れた固定液であるので、グルタルアルデヒド 0.1% 使用した。遊離するアルデヒド基と結合させるためのブロッキング剤として、グリシンを用いた。また、免疫電顕用の試料作成には、電気生理実験用に培養されたラット胚海馬培養神経細胞、第一次抗体にシナプトフィジンをを用いた。抗体の最適濃度を調べるため、1/200、1/400、1/600、1/1000 の抗体濃度を適用した。染色には、ビオチン標識 2 次抗体としてアビジン・ビオチン LSAB 法を用いた。電顕観察結果、抗体最適濃度は、1/200 ~ 1/400 であることがわかった。
- (9) 透過型電子顕微鏡トモグラフィー基礎知識を習得した。(7)で得た技術を用い、ラット胚海馬培養神経細胞包埋樹脂試料で厚さ 200nm 薄切片を作成した。10000 倍におけるシナプス後膜肥厚付近の透過型電子顕微鏡トモグラフィー画像（傾斜角度： -65 ° から + 65 °、傾斜刻み角度： 2 °）を得ることができた。
- (9) クライオ（ ~ - 110 ° ）凍結超薄切片作製操作を開始した。
- (11) (4) (6)で習得した技術を用いることによって、以下の研究の一部を分担、各テーマにおいて、更なる分析方法の検討、試料作成の改良に努めた。
- i) 高効率トランスフェクションキット（非ウイルス性ベクター）の開発
 - ii) CAD ドメインによるアミロイド原繊維の構造解析
 - iii) 蛋白質による生体無機結晶（炭酸カルシウム）化の制御における炭酸カルシウム-ポリマーの構造推定
 - iv) 古代火星生命論説の立証実験
 - v) 磁気走行性バクテリアの細胞骨格系支持構造の解明
 - vi) プラスチック材料と色素表面との界面部における微細構造の解明
 - vii) 電顕による蛋白複量体の構造解析

5 . 成果の対外的発表等

(1) 論文発表（論文掲載済、または査読済を対象。）

1) Benjamin P.Weiss, Soon Sam Kim, J. L.Kirshcivink, M. Sankaran, A. Kobayashi, A. Komeili, Magnetic Tests for Magnetosome Chains in Martian Meteorite ALH84001, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*(accepted)

2) Kazuyuki Takahashi, Hitoshi Yamamoto, Akira Onoda, Mototsugu Doi, Takashi Inaba, Masahiko Chiba, Atsuko Kobayashi, Takahisa Taguchi, Taka-aki Okamura, and Norikazu Ueyama. Highly oriented aragonite nanocrystal-biopolymer composites in an aragonite brick of the nacreous layer of *Pinctada fucata*. *Chemical Communication*. (accepted)

3) Takahashi, K., Doi, M., Kobayashi, A., Taguchi, T., Onoda, A., Okamura, T., Yamamoto, H., & Ueyama, N. (2004) Direct Observation of Polymer-Binding Site on Calcite Crystal By SE/SEM: Regulation of Binding Abilities by a Rotation of Amide Group in Poly(carboxylate) to CaCO₃ Crystals. *Chemistry Letters* 33, 192-193.

4) Takahashi, K., Yamamoto, H., Doi, M., Lee, K., Kobayashi, A., Taguchi, T., Onoda, A., Okamura, T., & Ueyama, N.: The Intra-side-chain NH--O hydrogen bonds to coordinated Carboxylate Oxygen Regulates binding Abilities of Poly (allylaminocarboxylate) Ligands to CaCO₃ crystals: Observation of influences of Polymers in CaCO₃ composites by ¹³C CP/MAS NMR and FE/SEM. *Journal of Crystal Growth*. (accepted)

5) Kobayashi, A. & Taguchi, T. (2003) Ultrastructure of the magnetite crystal chains in Magnetospirillum magnetotacticum (MS-1): Evidence from TEM tomography. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 67, A222-A222

6) Kobayashi, A., Taguchi, T. (2002) Biological control of magnetite crystal formation in the magnetotactic bacteria: hints concerning the possible evidence from ALH84001 for life on Mars. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 66, A408-A408

(2) 依頼口演

1) 2003年12月:平成15年度生理学研究所研究会:“Biological control of magnetite crystals formation in the magnetotactic bacteria: electron tomography for cytoskeletal structures of Magnetospirillum magnetotacticum (MS-1)、岡崎国立共同研究機構岡崎コンファレンスセンター

2) 2003年10月:FEI 2003 TEM 最新技術セミナー“TEM トモグラフィーによる磁性細菌マグネタイト微粒子鎖を支持する細胞骨格構造の研究:火星生命説への解明に向けて”

3) 2002年6月:NASA Astrobiology Institute Meteorite focus group, NASA Ames Research Center, California U.S.A “Investigation of thermal heated carbonate; Implication for ALH84001”

(3) 口頭発表(発表済を対象。予稿集のコピーを添付。)

i) 溝黒 登志子, 望月 博孝, 莫 暁亮, 小林 厚子, 谷垣 宣孝, 平賀 隆, 色素蒸気輸送法を用いたポリマー表面へのフォトクロミック色素の選択的ドーピング:光化学討論会、松江、11月、2003年

ii) 溝黒 登志子, 望月 博孝, 莫 暁亮, 堀内 伸, 小林 厚子, 田和 圭子, 谷垣 宣孝, 平賀 隆, 色素蒸気輸送法を用いた高分子の物性制御・デバイス化 VI:フォトクロミック機能の付加, 第52回高分子討論会, 山口, 9月25日, 2003年

iii) A. Kobayashi, E. Bertani, C. Nash & T. Taguchi, Ultrastructure of the Magnetite Crystal chains in Magnetospirillum magnetotacticum (MS-1): Evidence from TEM Tomography for Cytoskeletal supporting Structures, The 2003 Goldschmidt Conference, Kurashiki Japan, 2003 September.

iv) A. Kobayashi, T. Takahisa, Biological control of Magnetite Crystal Formation in the Magnetotactic Bacteria: Hints Concerning the Possible Evidence from ALH84001 for Life on

Mars, The 2002 Goldschmidt Conference, Davos Switzerland, 2002 August.

v) 高橋 和幸、山本 仁、小野田 晃、岡村 高明、小林 厚子、田口 隆久、上山 憲一
「側鎖にカルボキシル基を有する poly(methacrylamide)配位子を用いた炭酸カルシウム結晶複合体の合成」、日本化学会第 81 回春季年会、早稲田大学 (東京都新宿区) 2002 年 3 月

vi) 高橋和幸・山本仁・小野田晃・小林厚子・田口隆久・岡村高明・上山憲一,「Crystallization of CaCO₃ Calcite Composite with Poly(carboxylate) Ligands Having NH...O Hydrogen Bond Ring in The Side-chain」,Osaka University Macromolecular Symposium 2001 (2001 年 11 月・大阪大学・大阪府吹田市)

vii) 第 7 回極限場研究に関する国際シンポジウム Life Science & Material Science ジョイントセッションにおいて、単粒子の 3 次元再構築手法について討論を行った、2001 年 11 月 14 日~16 日

viii) Life Science & Material Science 分野での応用、産業技術総合研究所人間系特別研究体及び日本エフイー・アイ(株)主催による TEM 最新技術セミナーにおいて、EELS 元素マッピングによる細胞内の金属原子 (Fe, Mn, Mg) の局在分析の可能性について提案、討論を行った、2001 年 11 月 5 日

ix) 山本仁¹・小野田晃¹・稲葉隆²・千葉雅弘²・小林厚子³・田口隆久³・岡村高明¹・上山憲一¹“Pinctada fucata の真珠層超微細構造の観察と形成機構に関する考察”,¹大阪大学大学院理学研究科・²日立協和エンジニアリング・³産総研人間系特別研究体、高分子学会 第 50 回高分子討論会 (2001 年 9 月・早稲田大学・東京都新宿区)

x) 高橋 和幸、山本 仁、小野田 晃、岡村 高明、小林 厚子、田口 隆久、上山 憲一
「NH...O 水素結合性ポリ(カルボキシレート)配位子を用いた炭酸カルシウム結晶複合体の合成」、高分子学会第 50 回高分子討論会、早稲田大学 (東京都新宿区) 2001 年 9 月

xi) 高橋 和幸、小野田 晃、岡村 高明、小林 厚子、田口 隆久、山本 仁、上山 憲一
「隣接したアミド基を有するポリ(カルボキシレート)配位子を用いた炭酸カルシウム結晶複合体の形態観察」、高分子学会第 50 回高分子学会年次大会、大阪国際会議場 (大阪府大阪市) 2001 年 5 月

(4) Education and Public outreach : 米国政府放映サービス社 (PBS) 依頼により、製作番組 NOVA シリーズ “The Origin”において、磁気走行性バクテリア包埋切片の 3D トモグラフィー画像使用許可を与える