

DOJIN NEWS

No.104
2002

ドージンニュース

Review

全身性アミロイドーシスの新たな診断法

安東由喜雄

Topics on Chemistry

遺伝子治療用ベクターとしてのナノ粒子

佐々本一美

連載

ケミストからみたポストゲノム 4

片山佳樹



目次

Review

- 全身性アミロイドーシスの新たな診断法
 熊本大学医学部臨床検査医学講座 安東由喜雄 1
- ケミストからみたポストゲノム4
 ~タンパク質相互作用の解析法(1)~
 九州大学大学院工学研究院 片山佳樹 8

Topics on Chemistry

- 遺伝子治療用ベクターとしてのナノ粒子
 同仁化学研究所 佐々本一美 13

Commercial

- 新製品案内
 アミロイド染色用蛍光色素 6
- 近日発売予定
 HTS用細胞内カルシウム測定用試薬キット 16
 Total RNA 抽出キット 17

Q&A

- DNA Damage Quantification Kit-AP site counting 14
 Biopyrrin EIA Kit 15

お知らせ

- 学会展示のご案内 5
 受託サービス・機能性材料ページオープン 7
 販売中止予定のご案内 14
 フォーラム開催案内 18

新製品案内

- アミロイド染色用蛍光色素 (1%BSB in DMSO) 6
 BSB solution



秋の熊本テクノリサーチパーク
 同仁化学研究所の周囲では、赤、黄、緑と木々の葉が美しい色合いを見せてくれる。

全身性アミロイドーシスの新たな診断法 (Novel diagnostic methods for amyloidosis)



安東由喜雄
(Yukio Ando)
熊本大学医学部臨床検査医学講座

[Summary]

Amyloidosis is a disorder of protein metabolism in which normally soluble autologous proteins are deposited in tissues as abnormal insoluble fibrils, which cause structural and functional disruptions. They are usually characterized by an intra- and extracellular deposition of amyloid in various tissues and are classified as localized or systemic amyloidoses. So far, 18 different amyloid precursor proteins have been discovered. It has been generally considered that amyloidosis is a rare disease. However, when we actively suspect amyloidosis in an unknown cause of a disease, more cases may be diagnosed. To make a diagnosis as an amyloidosis, histopathologic examination is one of the indispensable methods. Recently, (*trans, trans*)-1-bromo-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy) styrylbenzene (BSB) has been focused in the recent attention as a useful tool for histochemical examinations. In this review, we refer to the possibility as a inhibitory effect of BSB on amyloid formation.

キーワード :

アミロイドーシス、BSB、家族性アミロイドポリニューロパチー、Congo red、アルツハイマー病、トランスサイレチン、アミロイド線維

1) はじめに

アミロイドーシスとは、アミロイドとよばれる線維状の難溶性蛋白質が主として種々の臓器の主に細胞外に沈着することにより機能不全を来す疾患単位である。沈着様式により全身性と局所性の2つに大別され、前駆蛋白の違いにより更に細かく分類されている(表1)。最近、我々はラクトフェリンが原因となって角膜にアミロイドを形成した限局性アミロイドーシスを新たに発見し、前駆蛋白はそれをあわせると合計18種類となっている¹⁾。一般にアミロイドーシスは比較的稀な疾患と考えられがちであるが、診断不能な疾患を疑い、下記の手法で診断できるケースも少なくない。本症の診断には組織学的な検討が不可欠であるが、近年我々の研究グループと同仁化学により研究開発されている(*trans, trans*)-1-bromo-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy) styrylbenzene (BSB)は、各種アミロイドーシスの組織診断に有用であるばかりでなく、アミロイド沈着阻止剤としても有用である可能性がある。

アミロイドーシスの診断手順

アミロイドーシス診断の最大のポイントは、臨床医が患者の臨床所見や病歴などから、まずアミロイドーシスを疑うことである。古典的な内科学の教科書には、原因不明な疾患は、アミロイドーシスである可能性が記されている。本症を疑った場合、まず生検可能な部位から組織を採取し、Congo red 染色を行なう²⁾。Congo red 陽性所見が得られれば、原因蛋白を想定し、その抗体による免疫染色を行なう。しかしCongo red染色は偏光顕微鏡下で検討しても、しばしば陽性か否かを判断しかねることがあるため、以下に述べるBSBなどの新たなアミロイド検出試薬の開発が必要となる。

1. アミロイドーシスの臨床診断

アミロイドーシスの診断においては、何と言っても臨床症状が決め手となる。全身性アミロイドーシスでは10年以上の透析歴を持つ患者では必ず透析アミロイドーシス(DRA)を、慢性の炎症性

全身性アミロイドーシス

免疫グロブリン性アミロイドーシス		
1)AL アミロイドーシス	AL	L鎖(λ, κ)
2)AH アミロイドーシス	AH	Ig(IgG(γ1))
反応性AA アミロイドーシス	AA	SSA
家族性アミロイドーシス		
1)FAP	ATTR	トランスサイレチン
2)FAP	ATTR	トランスサイレチン
3)FAP	AApoAI	アポAI
4)FAP	AGel	ゲルソリン
5)家族性地中海熱(FMF)	AA	アポSAA
6)Muckle-Wells症候群	AA	アポSAA
7)家族性腎アミロイドーシス		リゾチーム
8)家族性腎アミロイドーシス		フィブリノーゲンA
透析アミロイドーシス	Aβ2m	β2-ミクログロブリン
老人性アミロイドーシス	ATTR	トランスサイレチン

限局性アミロイドーシス

脳アミロイドーシス		
1)アルツハイマー型痴呆	Aβ	β前駆蛋白
2)脳血管アミロイドーシス	Aβ	β前駆蛋白
3)遺伝性アミロイド性脳出血	Aβ	β前駆蛋白
4)遺伝性アミロイド性脳出血	ACys	シスタチンC
5)クロイツフェルト・ヤコブ病	AScr	スクレイピー前駆蛋白
内分泌アミロイドーシス		
1)甲状腺髄様癌	ACal	(プロ)カルシトニン
2)型糖尿病	インスリノーマ	AMP アミリン
3)限局性心房性アミロイド	AANP	ANP
皮膚アミロイドーシス	AD	ケラチン?
限局性結節性アミロイドーシス	AL	L鎖

表1 アミロイドーシスの分類
(厚生省特定疾患調査研究班新分類一部改変)

疾患を持つ患者に浮腫や蛋白尿、腎障害を伴った場合は二次性アミロイドーシスを疑う。特に慢性関節リウマチ症では、剖検により約半数の患者の諸臓器にアミロイド沈着が認められることから、本症の合併を強く疑う必要がある。また、発熱や全身倦怠感を強く訴える患者で、蛋白尿がみられる場合、骨髄腫の有無に関わらず常にALアミロイドーシスを鑑別診断に入れておく必要がある。ALアミロイドーシスは骨髄腫を伴うタイプと、伴わない原発性アミロイドーシスとに大別されるが、原発性アミロイドーシスは骨髄腫に伴うタイプの約4倍存在するため、骨髄腫を疑わせる所見がない場合でも上記の症状があれば本症を疑う必要がある。家族性アミロイドポリニューロパチ - (FAP)では、トランスサイレチン (TTR) の変異の種類に関わらず、常染色体優性遺伝の形式をとるため、家族歴が重要となる。しかし、孤発例も存在することから、下痢・便秘などの消化器症状、四肢末梢の感覚・運動障害、起立性低血圧、発汗障害などの自律神経障害などの症状が主症状である場合、本症を疑う。また高齢者において、正常のTTRがアミロイドの原因蛋白となり、主として心不全、心肥大などを起こす老人性アミロイドーシス患者が存在することもわかって来ているので、原因不明の高齢者の心疾患は本症を疑ってみる必要がある³⁾。

限局性アミロイドーシスにおいては組織に限局した腫瘤、結節が悪性の増殖パターンを示さず、H-E染色などで無構造なピンク色に染まる物質が検出された場合、本症を疑い、まずCongo red染色あるいは後に述べるBSB染色を行う。

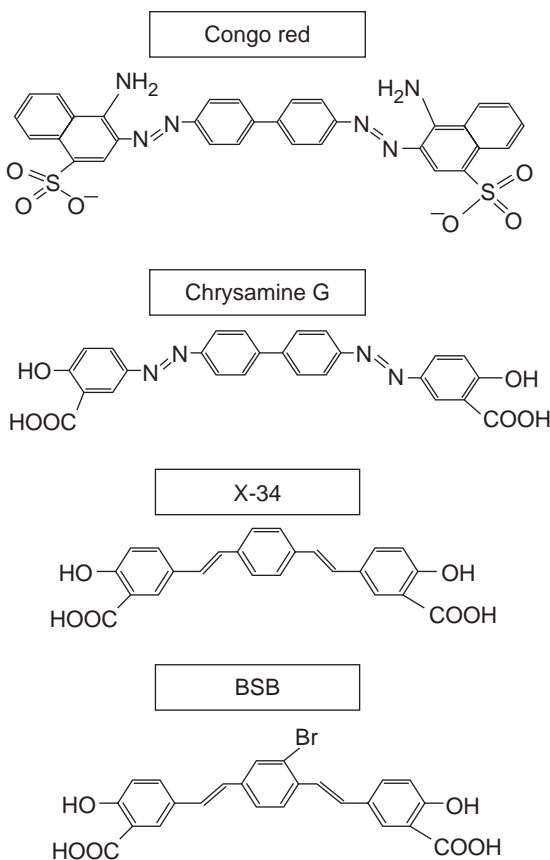


図1

2. アミロイドーシスの組織診断

アミロイドーシスの確定診断は、まず生検材料からアミロイドを病理組織学的に証明することにより始められる。一般的には、下記A～Cが行なわれるが、より確実な診断を必要とする場合にはDまで行なう。

- A. ヘマトキシリン・エオジン (H-E染色)
H-E染色では淡ピンク色の無構造な物質として認められる。
- B. アミロイド特殊染色
アミロイド沈着部位はCongo red染色で赤紫色に染まり、その配向性のため偏光顕微鏡下でアップル・グリーンの複屈折を示す。Congo red染色で赤紫色に染まっても複屈折性を呈さない場合は、通常アミロイド沈着とはみなさない。組織沈着アミロイド量が比較的少量であった場合、アミロイドの沈着の有無の判断がしばしば困難なことがある。最近、Congo red誘導体であるChrysamine-G、X-34、BSB ((trans, trans)-1-bromo-2, 5-bis- (3-hydroxycarbonyl -4-hydroxy) styrylbenzene) (図1) といった物質を用いた *in vivo* の系でのアミロイド検出法がアルツハイマー病における老人斑のアミロイドの検出などに利用され、注目されていたが、中でもBSBは後述するごとく、脳のみならず全身性アミロイドーシスの診断薬として有用であることが明らかとなっている。
- C. 免疫染色
アミロイドの存在が証明された後、そのアミロイド線維を構成する前駆蛋白に対する抗体を用いて免疫染色を行ない、アミロイドーシスの病型を決定する(各抗体の適正使用濃度についてはカタログや文献等を参照のこと)。
- D. 電子顕微鏡による線維状物質の確認
電子顕微鏡下では、多くのアミロイド線維は幅8～14 nm、長さ30～1000 nmの枝分かれのない周期的ヘリックス構造を有する細線維の集簇として認められる。
- E. その他の特殊な組織診断
ABOの血液型は毛髪を試料とし、ABOの抗体を用い組織学的に血液型を診断することが出来る。我々はこの事実に着目し、異型TTRに対する monoclonal 抗体を用いた免疫染色で、毛髪髄質の異型TTRを同定することにより、FAPを診断することが出来ることを証明した⁴⁾。本法は、FAP以外にも毛髪に存在する様々な異常蛋白を検出する画期的な診断法として有用である可能性がある。
- F. BSBによるアミロイドーシス診断の有用性
BSBは、Congo red誘導体で、lipophilicであることから、*in vivo* で投与した場合、血液脳関門を通過し、アルツハイマー病のモデルマウスに本誘導体を静注すると脳内のアミロイド組織に集積することが知られている。またその構造にベンジジン構造を持たないことから、将来的にヒトに投与した場合、発癌性などの問題性が少ない可能性が高い。そこで我々はBSBを用いて、全身性アミロイドーシスにおいて *in vitro* および *in vivo* での有用性を検討した。図2に示す如く、BSBは検討した全ての全身性アミロイドーシスの組織において、沈着アミロイドをCongo red染色よりもより鋭敏に検出することに成功した。*in vivo* での有用性を検討するため、結核死菌を用いて

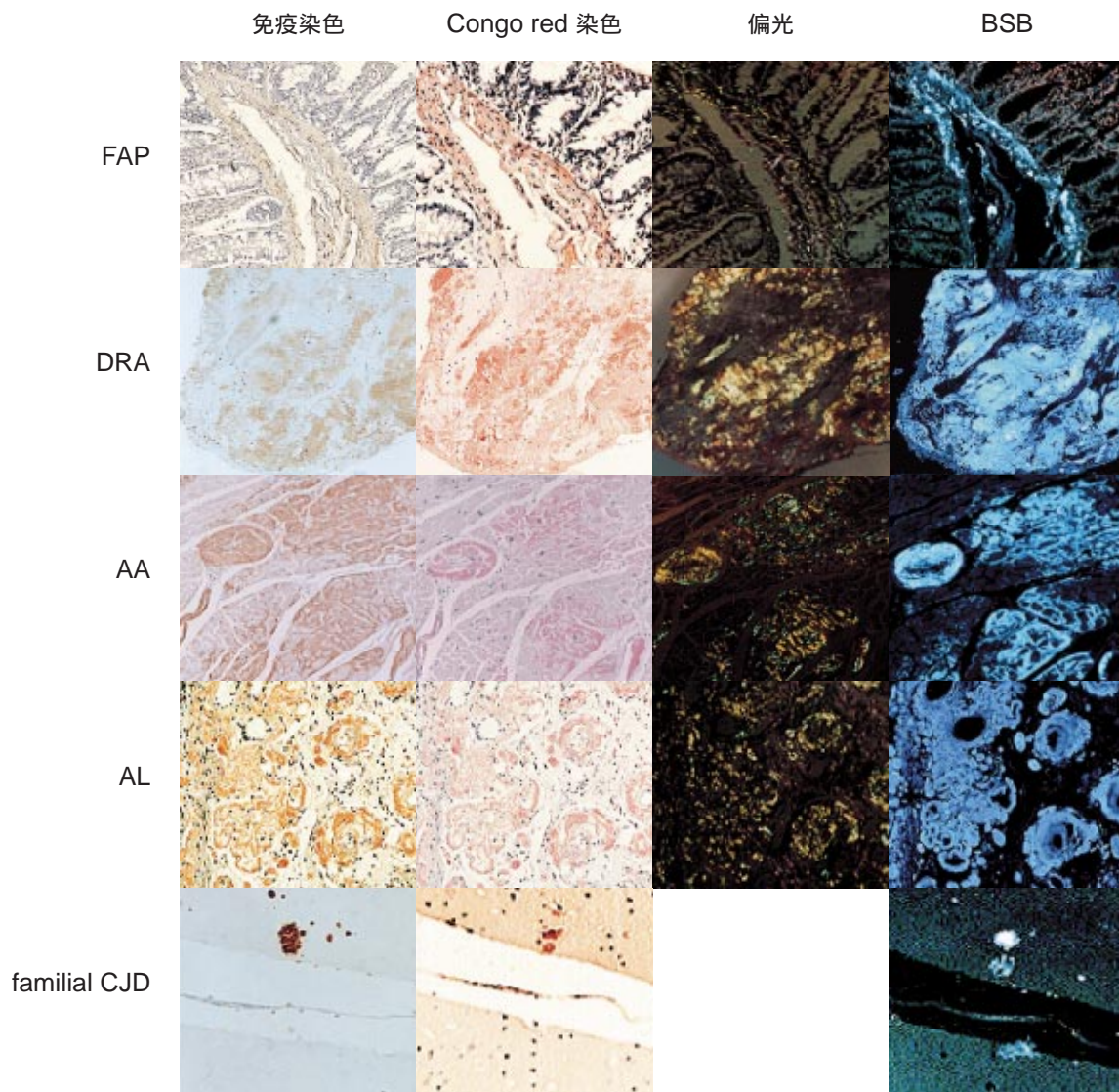


図2

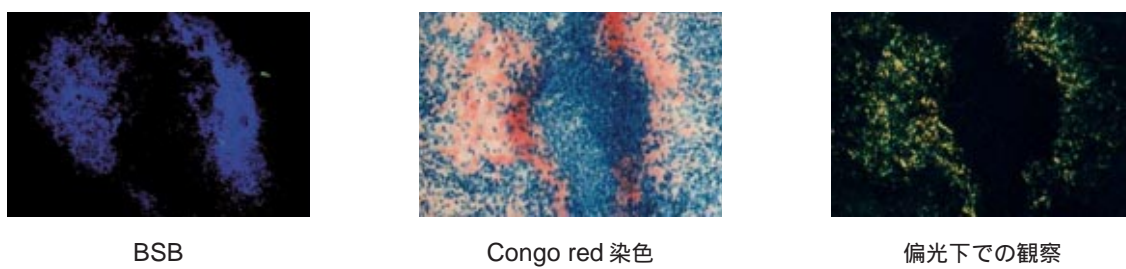


図3

二次性アミロイド - シスを誘起したマウスにBSBを静注したところ、沈着アミロイドにBSBが集積することも判明した(図3)。BSBの構造の中のBrは、化学修飾が可能なることから、これをRIラベルしたヨウ素などに置換すると、シンチグラフィとしてアミロイド沈着の検出に有用である可能性が考えられる。

3. アミロイド - シスの生化学的診断

多くのタイプのアミロイド - シスでは、血液、尿などの生化学的検査データにより診断が確定する可能性は低い。しかし、多くの場合、病態解析の重要な情報となり、いくつかのタイプのアミロイド - シスでは、これらの所見が治療効果の判定や病態を把握する有用なマーカーとなる。

A. 血液生化学検査

(a) ALアミロイド - シス

ALアミロイド - シスにおいては、単クローン性の免疫グロブリン産生による血清中のM蛋白の出現がみられる。以下に示す所見は、アミロイド - シスの確定診断になることはないが、病態把握や治療効果のマーカーとして有用である⁵⁾。

・血清蛋白レベル

A/G比の減少を伴う蛋白の異常高値がみられた場合、まず多発性骨髄腫が疑われる。しかし、発症初期には血清、尿ともに正常所見を呈することも多く、さらに原発性ALアミロイド - シスの場合、蛋白の高値を認めないこともあるため注意が必要である。その場合は免疫組織診断が重要な決め手となる。

・血清蛋白分画

ALアミロイド - シスを疑った場合、電気泳動法により血清の蛋白分画を調べる。 α_2 - γ 領域にシャープなピークが認められた場合、M蛋白血症を疑う。M蛋白の比率の減少は、病態把握や治療効果のマーカーとして有用である。血清でなく血漿を用いた場合や、高度の溶血血清では、偽M蛋白が現れることがあるので注意を要する。

・血清蛋白免疫学的検査

M蛋白血症が疑われた場合、特異抗血清(抗IgG, 抗IgA, 抗IgM, 抗 κ 鎖, 抗 λ 鎖抗体)を用いて、電気泳動免疫固定法あるいは免疫電気泳動法により、M蛋白の構成成分である免疫グロブリン鎖の種類を同定する。

(b) FAPの診断

FAPの場合、TTRレベルの上昇は認められないが、TTRのアミノ酸変異型を同定する必要がある。方法としては、PCR-SSCPを用いた塩基レベルでの検出法、あるいは質量分析装置を用いたアミノ酸レベルでの検出法があり、最終的にはシーケンスにより変異残基を同定する。

塩基変異の検出

・PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) 法

塩基変異に伴う分子内高次構造の変化による泳動の違いを、RIを用いて検出する方法である。TTRは4つのエクソンから構成されており、その各々を切り出し、RIを加えた反応液でPCRを行なう。熱変性後、非変性条件下で電気泳動を行ない、正常と異なる泳動パターンを示すエクソンをオートラジオグラフィにより検出し、変異があるエクソンを同定する。

・NIRCA (non-isotopic RNase cleavage assay)法

標的DNAが転写したRNAを野生型RNAにハイブリダイズさせた後、RNase処理を行うことで、変異が存在する場合、RNase切断によるRNAの小断片が検出される。本法は、RI実験施設を用いることなく変異エクソン及び変異のおおよその位置を検出できるため、実際の臨床の場ではSSCPより有用である。

・PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法

既知の遺伝子変異の同定に用いる。たとえばFAP ATTR Val30Metの診断の場合、Val (GTG)がMet (ATG)に変異している遺伝子が存在すれば、制限酵素NSI1で切断されるため、これにより診断が可能である。

アミノ酸変異の検出

近年、我々は質量分析装置を用い、簡便でかつ高感度のアミノ酸変異の検出法を開発した(図4)⁶⁾。アミノ酸変異は質量の変化として検出され、検出限界も鋭敏である。さらにこの方法は、大量のサンプルの測定が短時間で済み、未知のアミノ酸変異の予測も可能であることから、遺伝子変異によるアミノ酸変化を検出するスクリーニング法として優れている。また、正常、及び変異蛋白の翻訳後修飾も検出できるため、本検査法は、病態解析に重要な情報を提供するものとしてその有用性が期待されている。

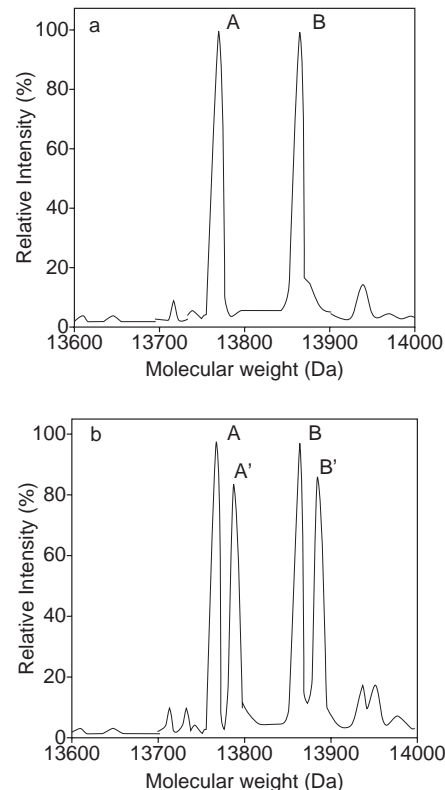


図4 質量分析装置を用いたTTRのアミノ酸変異の検出法(模式図) 健康人(a)の場合、未修飾のTTR(A)およびシステイン結合型TTR(B)の2つの大きなピークが検出される。一方、ヘテロ接合体のFAP ATTR Val30Met患者の場合、正常TTRに加え、Val(99Da) Met(131Da)変異により32Daずつ増加した異型TTR(A', B')が検出される。

B. 尿検査

AL アミロイドーシスにおいては、尿中のBence-Jones 蛋白の証明が重要である。

・尿蛋白の検出および定量

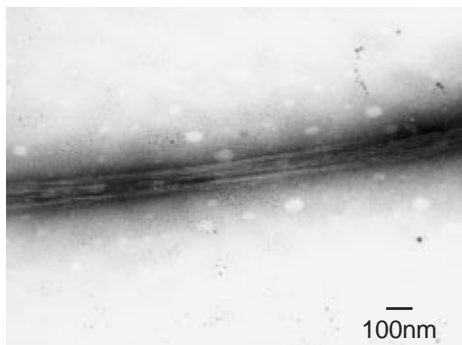
テープ法はアルブミンに特異的であり、通常BJPでは陰性となるため、注意が必要である。必ずスルホサリチル酸法または煮沸法を用いて検出する。また、血清の場合と同様に、治療効果や病勢を把握するために必要な検査である。

・Bence Jones 蛋白の検出および同定

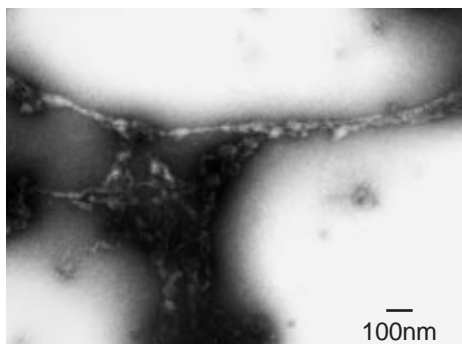
尿蛋白電気泳動法で、 β ~ γ 領域にシャープなピークが見られた場合、Bence Jones 蛋白を疑い、血清の場合と同様に、特異抗血清を用いた電気泳動固定法や免疫電気泳動法により、その構成成分を同定する。

C. 髄液検査

アルツハイマー病において、髄液中のタウ蛋白の上昇や、 $A\beta$ 蛋白レベルの低下をELISAなどを用いて証明することが出来るが、病態との関連は議論が分かれる。臨床診断としては、むしろMRIで他疾患を除外した上でのPETによる側頭・頭頂連合野での血流量低下といった、画像診断が用いられている。また、アポリポ蛋白E4 アイソフォームをもつ群で本症の発症率が有意に高いことや、本症患者の髄液中のTTR レベルが低下することも知られている。



TTRのみ



TTR + BSB

図5 TTRをpH4.0でインキュベーションすると上図の如くアミロイドを形成するが、BSB存在下ではアミロイドの形成が抑制され、断片化する。

4. BSBのアミロイド形成阻止能

上記のごとく、BSBがアミロイドに親和性を持つことから、本剤がアミロイド表面をマスクし、その形成に阻力的に働く可能性を検討した。TTRを酸性条件下でインキュベーションすると数日後にはアミロイド線維を形成するが、この系にBSBを添加すると有意にアミロイド形成が阻止されることが判明した(図5)。

5. おわりに

以上、アミロイドーシスの診断およびBSBの有用性について述べた。本症は、特異的とされる症状に乏しく、またその病型は多岐にわたるため、原因不明の疾患として取り扱われているケースが未だに少なくない。従って有用な診断ツールを用い、速やかに確定診断を行ない、早期に治療を開始することが望まれる。FAPでは早期に診断が確定し、肝移植を行えば症状の進行が停止することが証明されている。さらに研究が進めば、他のアミロイドーシスにおいても対症療法のみならず、根治療法の道が開けるものと期待される。そのためには、何事もまず本症を疑い、正確に診断することから始めなければならない。

参考文献

- 1) Ando Y, Nakamura M, Kai H *et al.*, A novel localized amyloidosis associated with lactoferrin in the cornea. *Lab. Invest.*, (2002).
- 2) 石原徳得: アミロイドーシス シンボジウム難病研究の進歩, (1997).
- 3) 安東由喜雄、原岡克樹: アミロイドーシスの診断プロトコル. *Medical Technology* **29**, 794 (2001).
- 4) 安東由喜雄、坂下直実、田中由也、安藤正幸、原発性アミロイドーシスの症状, *リウマチ科*, 第11巻 第2号, (1994).
- 5) Ando Y, Anan I, Suhr O, Holmgren G, *et al.*, Detection of a variant protein in the hair: A new diagnostic method in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) (Met30) *Br. Med. J.*, **316**, 1500, (1998).
- 6) Ando Y, Ohlsson PI, Suhr O, *et al.*, A new simple and rapid screening method for variant transthyretin (TTR) related amyloidosis., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **228**, 480, (1996).

著者紹介

氏名: 安東由喜雄 (Yukio Ando)

所属: 熊本大学医学部臨床検査医学講座

出身大学: 熊本大学医学部 (昭和58年卒)

学位: 医学博士

研究テーマ: アミロイド沈着機構の解析と治療

自律神経疾患の病態解析と治療

趣味: 映画鑑賞・エッセイを書くこと

連絡先: 〒860-8556 熊本市本荘1丁目1番1号

E-mail: yukio@kaiju.medic.kumamoto-u.ac.jp

秋から冬の学会展示ご案内

下記学会において、試薬新製品の展示を行います。
皆様のご来場をお待ちいたしております。

- ・日本生化学会第75回大会
10月15日(火)~17日(木) 国立京都国際会館
- ・第25回日本分子生物学会年会
12月11日(水)~14日(金) パシフィコ横浜

新製品

アミロイド染色用蛍光色素 (1% BSB in DMSO)

BSB solution

特長

1. アミロイドβペプチド(Aβ)に対して高い親和性($K_d = 0.4\mu\text{mol/l}$)¹⁾をもつ。
2. 従来色素に比べ検出感度が高く、抗体による染色と同等の感度を有する。
3. 簡単に染色が可能である。
4. 生細胞のアミロイド染色も可能である。
5. 脂溶性物質で、脳 - 血液関門(blood-brain barrier)を透過する。

アミロイドーシスはアミロイドが臓器や組織細胞の外に沈着してこれらの臓器や組織の働きを阻害する病気です。アミロイドーシスには、全身の様々な部分にアミロイド沈着が起こる「全身性アミロイドーシス」と一部の臓器のみに沈着が起こる「限局性アミロイドーシス」があります。全身性アミロイドーシスには熊本地方で患者の多い家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)と呼ばれる遺伝性のもがあり、肝臓でアミロイドを作り出し、それが全身の臓器などに沈着して障害を起こします。発症後10年で死に至る難病ですが、現在はドミノ肝移植などの治療により命を落とす危険性は少なくなっています²⁾。他にも高齢で非遺伝的に発症する老人性アミロイドーシスや、透析患者の治療で使用する透析膜では除けないタンパク質が変化したアミロイドが引き起こす透析アミロイドーシス、リウマチで発現するタンパク質が切れて出来るアミロイドによる二次性アミロイドーシスなどがあります。限局性アミロイドーシスには、アミロイドが脳に蓄積する老人斑(SP)があり、アルツハイマー病の特徴の1つです³⁾。また、現在問題となっている狂牛病(牛海綿状脳症, BSE)や新型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)も限局性アミロイドーシスの一種です。BSBはアルツハイマー病の研究において最初に用いられ、Skovronskyらはアミロイド前駆体タンパク質(APP)を発現するトランスジェニックマウスTg2576にBSBを静注し、18時間後の脳組織のSPに色素が集積していることを確認したと報告しています¹⁾。

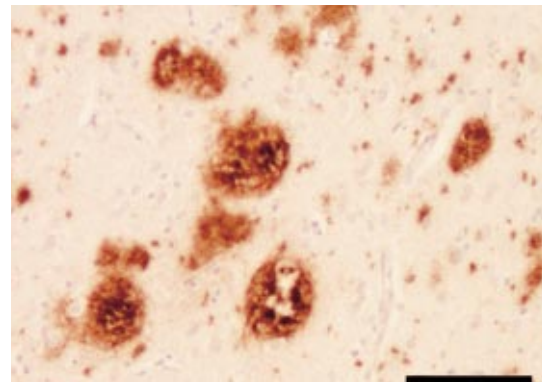
同様にアミロイドが沈着するその他のアミロイドーシスでもBSBを用いた研究が進められており、FAP、透析アミロイドーシスや二次性アミロイドーシスなどの組織染色を行なった結果、アミロイドが沈着した部分を感度よく染色していることが確認されました。また、BSEやvCJDを発症した組織でも同様の結果が得られています。

BSBは、従来色素に比べ、親和性・検出感度共に高い蛍光色素です。Skovronskyらの結果から *in vivo* の系での使用も可能であると考えられます。従来色素では組織染色など *in vitro* でしか検出できないものも多く、*in vivo* の系で沈着アミロイドを検出した報告はありません。今後は安定性や毒性などの研究は必要ですが、FAPやBSEを含めたアミロイドーシスの診断・治療などの研究へのさらなる応用が期待されます。

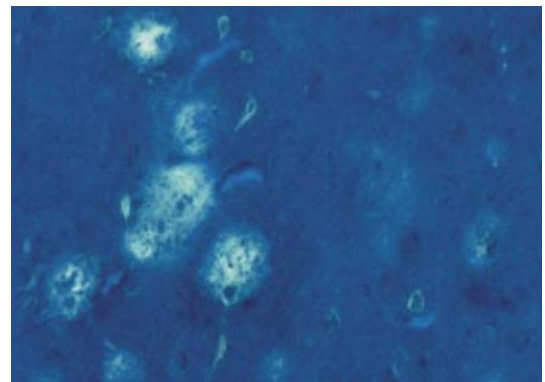
病理切片染色例

アルツハイマー病

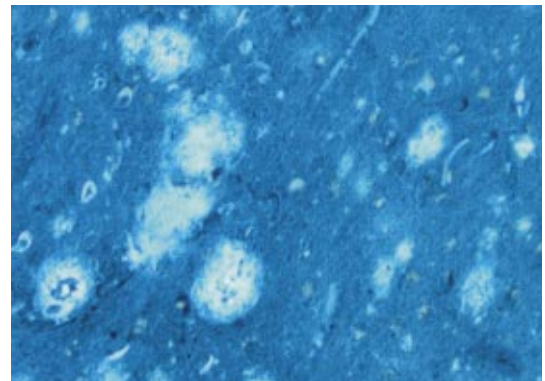
A



B



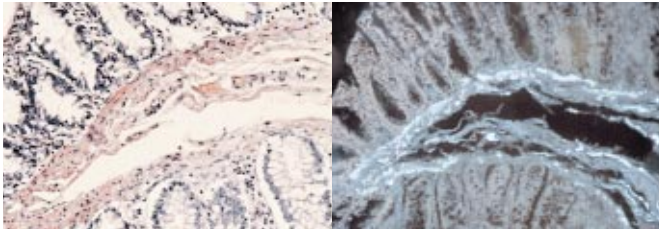
C



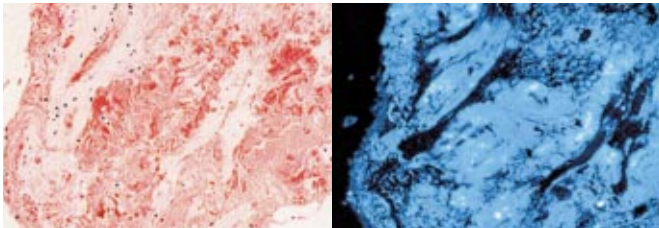
画像はアルツハイマー病患者の脳。(A)はAbに対する抗体による染色で、褐色に染まった部分がアミロイドである。(B)は thioflavin S により、(C)は BSB により蛍光染色したもので、白く光っている部分がアミロイドである。BSBによる染色の方が薄い老人斑や神経原線維変化の様子を明確に観察することができる。(BSB濃度: 0.01%)

(画像提供: 東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学 古和久朋生)

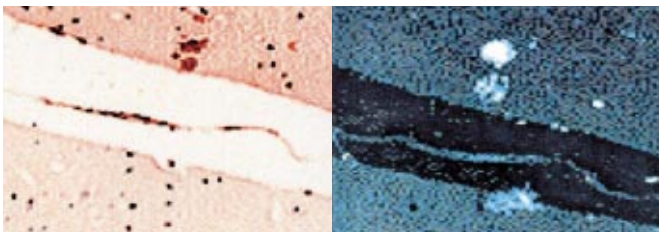
FAP



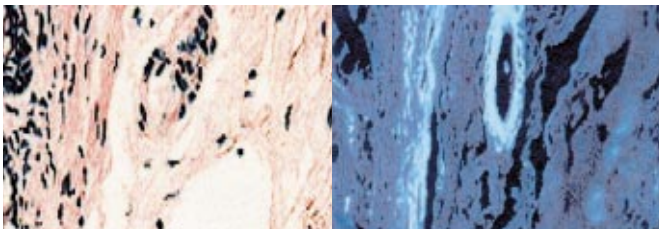
DRA (透析アミロイドーシス)



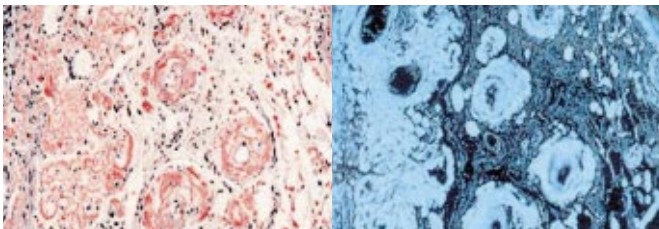
familial CJD



AL amyloidosis



AA amyloidosis



画像は各種アミロイドーシス患者の組織。左列はCongo Redにより染色したもので赤褐色に染まった部分がアミロイドである。右列はBSBで染色したもので、白く光っている部分がアミロイドである。

(画像提供：熊本大学医学部臨床検査医学 安東由喜雄先生)

使用法

サンプルの固定法

エタノール固定もしくはホルマリン固定

操作方法

* 本製品は1% BSBのDMSO溶液です。

本製品1本から、0.01%濃度の染色液が10 ml、0.0001%の染色液が1,000 ml調製できます。

1. BSB染色液の調製

製品に50% EtOHを加えて希釈し、0.01 ~ 0.0001%の濃度にする。

2. 染色

・切片をBSB染色液に30分間浸す。

・切片を飽和炭酸リチウム水溶液に浸した後、50% EtOHにて軽く洗う。

3. 観察：UV光(V励起)にて観察する。

取扱方法

保存：冷蔵保存

(購入後は必要に応じて小分けして保存してください。)

参考文献

- 1) D. M. Skovronsky, B. Zhang, M.-P. Kung, H. F. Kung, J. Q. Trojanowski, V. M.-Y. Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7609 (2000).
- 2) 安東 由喜雄, *臨床病理*, **48**, 425 (2000).
- 3) 佐々本 一美, *Dojin News*, **97**, 11 (2001).

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
BSB solution	100 µl	20,000	B525

お知らせ

このたびHome Pageに 受託サービス(有機化合物の合成、昇華、精製)と機能性材料(高純度機能性材料とSAM関連試薬)のページがオープンしました。皆様のご利用をお待ちしております。 <http://www.dojindo.co.jp/>



ケミストからみた ポストゲノム

4

～タンパク質相互作用の解析法(1)～

九州大学工学研究院応用化学部門

片山佳樹

1. はじめに

ゲノム配列が明らかになり、ORFが推定され、遺伝子配列が同定されると、多くの未知遺伝子が発見されてくる。さらに、それらの中から、DNAアレイを用いた遺伝子の発現差解析により疾患などに関連した遺伝子が同定されてくると、それらを用いた創薬などの産業利用が期待される。しかし、実際にはそれら遺伝子の機能が分からなければ、産業利用は困難である。遺伝子の機能とは、それから発現してくるタンパク質の機能であるが、これを調べることは容易ではない。細胞内でのタンパク質の種類は10万種ともいわれるが、これらのタンパク質が様々な相互作用しあい、極めて複雑なネットワークを形成しているからである。ゲノム研究の究極の目的も、このタンパク質間ネットワークの解明にあるといえる。残念ながらこれを解決する手法はまだ存在しない。しかし、これを解決していく一つの糸口は、2つのタンパク質間あるいはタンパク質とリガンド、DNA等の相互作用を網羅的に解析していくことである。

タンパク質間の相互作用を評価する手法としては、これまで免疫共沈降法¹⁾や光アフィニティーラベル²⁾、架橋剤を用いてタンパク質複合体を架橋後クロマトグラフィーで単離するなどの手法があったが、少量の試料では困難であった。近年、これらをハイスループットで網羅的に実行する手法が様々な報告されている。それらは、大きく分けて以下のようなものである。

- 1) 免疫共沈降法などの概念の改良法
- 2) プロテインアレイを用いる手法
- 3) *in vivo*で行える手法
- 4) 蛍光エネルギー移動を利用する手法
- 5) その他

これらの手法には、一長一短があるが、最近、3)に属する手法が注目され、多くの手法が開発されている。これらの手法は、Yeast Two Hybrid System(Y2H)に代表される手法であり、対象とする

2つのタンパク質間の相互作用が、あるタンパク質の機能の再構成(回復)を促すことを利用し、相互作用の有無を判定する。今回は、このカテゴリーに属する手法についてご紹介する。

2. Yeast Two Hybrid System(Y2H)

Y2Hは、FieldsとSongにより初めて報告された手法である^{3,4)}。真核細胞において、遺伝子の転写を制御する転写制御因子は、分子内に標的遺伝子配列に結合するDNA結合ドメイン(DBD)と転写を活性化するドメイン(AD)が機能的に独立に存在する。これを利用したのがY2Hであり、酵母の転写活性化因子であるGAL4のDBDとADをそれぞれ、調べたい2種類のタンパク質(PreyとBait)と結合したキメラタンパク質を発現する遺伝子を設計し、酵母で発現する。もし、発現した2種類のタンパク質が相互作用すれば、各々に結合したDBDとADが再び近傍に配置され、GAL4の転写活性化機能が回復する。酵母内に、 β -ガラクトシダーゼ等の遺伝子をGAL4プロモーター下流に組み込んだレポーター遺伝子を導入しておく、回復したGAL4活性により、レポーター遺伝子が発現し、その酵素活性を発色基質などで計測すると、タンパク質間の相互作用の有無が判定できる(Fig.1a)。

この手法は、感度が高く、タンパク質が精製あるいは同定できていなくても、遺伝子さえ手に入れば評価可能であり、ゲノム研究向きである。最近、これを用いたハイスループット手法により、6000種の酵母遺伝子ライブラリを用いて相互作用のマップを作成するなど⁵⁾、千種を超えるタンパク質間の相互作用を網羅的に解析する試みがなされている⁶⁾。ただし、Y2Hには欠点もある。例えば、相互作用は細胞核内で、しかも転写装置の近傍で起こらねばならず、細胞質や特に細胞膜のタンパク質には不向きである。タンパク質自身が転写活性を持つ場合も正確な評価ができない。また、哺乳類のタンパク質を酵母内でアッセイすると、正確なタンパク質の折り畳みができなかつたり、翻訳後修飾がなされなかつたり、他の会合に必要な因子が存在しないなどの理由で、実際には相互作用するにもかかわらず、酵母内では相互作用しない場合がある。調べたいタンパク質がホモダイマーを形成する場合も、ヘテロダイマーに競合して、相互作用が同定されない可能性がある(Fig.1b)⁷⁾。加えて、本手法は感度が高い反面、擬陽性が極めて出やすく、実際には相互作用の判定はかなり困難である。

3. Y2Hの欠点を解決する種々の手法

3-1: 酵母以外でのTwo Hybrid System

前述したように、酵母内で哺乳類タンパク質を発現した場合、実際の相互作用が再現できない場合がある。また、そのタンパク質が酵母にとって毒性を有する場合もある。したがって、哺乳類由来のタンパク質を調べる場合は、Two Hybrid Systemは、哺乳類細胞で行うことが理想的である。しかしながら、一般的には哺乳類細胞への遺伝子の導入効率は、酵母に比して低く、手間がかかる。遺伝子が導入された細胞を選別する場合、成長促進遺伝子や細胞表面抗原を用いると、より強い相互作用の組み合わせばかりが同定されてきたりする^{8,9)}。Shiodaらは、EBウイルス核抗原(EBNA)を発現したサルの腎臓上皮細胞株を用い、レポーター遺伝子として蛍光タンパク質であるGFPを染色体内に組み込むことで安定化し

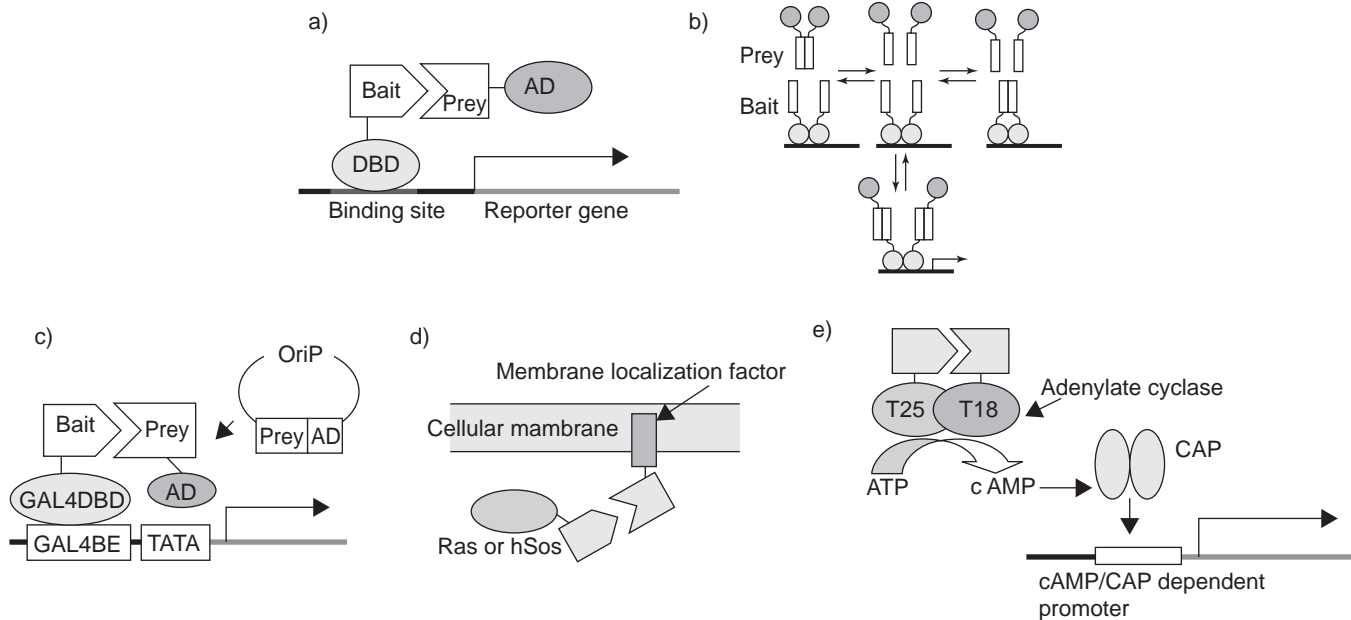


Fig.1 Schematic outlines of Two hybrid systems

- a) Yeast Two Hybrid System, b) effect of homodimer-forming in bait or prey in Y2H, c) two hybrid system in mammalian cell, d) protein recruitment system using Ras(RRS) or hSos(SRS), e) two hybrid system in bacterial cell

た系を用いている¹⁰⁾。この細胞では、EBNA存在下で遺伝子複製開始配列(OriP配列)を有するプラスミドは、比較的低コピーで染色体外に安定に保たれ、転写できる。これを利用し、このプラスミドにPrey-AD融合タンパクを組み込み、哺乳類での発現効率を保障している(Fig.1c)。彼らはこの系の有用性を、BaitとしてSmad4、Preyとしてメラノサイト特異的転写活性化因子(MSG1)を用いて検討している。Smad4とMSG1は、TGF- β 依存性に相互作用するが、酵母中では相互作用しないためY2Hでは陽性とならない。Smad4をGAL4DBDと融合した遺伝子と、MSG1をコードした遺伝子を共にトランスフェクトすると、TGF- β 依存性に、GFPの発現が認められている。

これとは別に、Ras-GEF(GTP交換因子)であるhSosが細胞膜にリクルートされて活性化することを利用したSRSシステムも報告されている(Fig.1d)¹¹⁻¹³⁾。すなわち、BaitタンパクをSosと結合しておき、パートナー(Prey)をv-Srcミリスチル化などの膜局在シグナルと結合しておくと、PreyとBaitが相互作用する場合にSosが膜にリクルートされて活性化する。このシステムを温度感受性Cdc25株(Cdcは、酵母のRas-GEF)に用いると、対象タンパクが相互作用する場合に限り、Cdc25が失活する温度で、哺乳類hSosが活性化して生存することでモニターできる。Ras-GEF欠失哺乳類細胞などを用いれば、このシステムは哺乳類細胞でも用いることができる。ただし、Sosは大きいタンパクであるため、結合する調べたいタンパクが小さい場合に制限がある。また、Baitの30%がSosと結合するとPreyが無くとも陽性を与えるなどの欠点がある。これを解決するため、より小さいタンパクである哺乳類Rasを用いるシステム(RRS)も報告されている^{14,15)}。この

場合、Rasの膜局在化に必要なファルネシル化部位を除いた物を用い、これにBaitを結合した遺伝子を、前述のSosの代わりに導入する。Ras活性化の膜局在要求性は、Sosよりずっと厳密であり、擬陽性の確率は大きく低減できる。

哺乳類細胞ではなく、バクテリア(原核細胞)でTwo Hybrid Systemを行うと、別の意味でメリットがある。バクテリアは、増殖速度が大きく、遺伝子導入効率も高い。また、多くの分子生物学的手法は、バクテリアで最適化されている。Karimovaらは、大腸菌のカルモデュリン依存性アデニル酸シクラーゼを1~224番目までのアミノ酸配列断片(T25)と225~399番目までのアミノ酸配列断片(T18)に分け、これにそれぞれPreyとBaitを融合し、それらが相互作用するとき、アデニル酸シクラーゼ活性が回復するようにした^{16,17)}。これによりサイクリックAMPが合成されると、CAP(サイクリックAMP結合タンパク)依存性プロモーター支配下のレポーター遺伝子(β ガラクトシダーゼ)が発現する(Fig.1e))。これをp-ニトロフェニルリン酸などの発色基質で検出する。これは、Y2Hの変法というよりは、むしろ次項で述べるタンパク再構成アッセイ(Protein complementation assay)であるが、Y2Hのバクテリア版として評価されている。レポーター遺伝子の下流に抗生物質耐性遺伝子を組み込んでおくと、簡単にセクションできる。また、タンパク間相互作用がY2Hの様に核内で起きる必要がないため、細胞内で起きる相互作用にも用いることができる。また、サイクリックAMPを仲介することで、シグナルが増幅されるメリットも考えられる。真核細胞のタンパクに可能と報告されているが、もちろん翻訳後修飾などの問題で、ある程度の制限はあると考えられる。

3-2: タンパク再構成アッセイ (Protein Complementation Assay, PCA)

これは、酵素などを2つの断片に分解し、各々を Prey と Bait に融合して、これらが相互作用した場合、元のタンパクが再構成され、活性が回復することを利用して相互作用を同定するものである。Y2H に比べ、ホスト特異的なプロセスや酵素が必要なく、利用できる細胞のタイプに制限が少ない。またタンパク間相互作用が、核内で起こる必要がない。さらに、タンパクの再構成を見るので、Prey と Bait に結合する断片の方向が重要で、これを利用すれば、調べたタンパク間相互作用の方向性も評価できるなどの利点がある。

3-2-1: Prey と Bait の相互作用で直接タンパクを再構成するタイプ (Fig.2a)

これは、最もシンプルな系で、Prey と Bait の相互作用により、各々と結合したタンパク断片が接近して元のタンパクを再構成するものである。タンパクとしては、ジヒドロ葉酸レセプター (DHFR)¹⁸⁾ や β ガラクトシダーゼ (β -Gal)¹⁹⁾ を用いる例がある。

DHFR を用いる例では、107 番目のアミノ酸で切断した2つの断片 F[1,2] と F[3] に分けて用いる。これに結合する Prey と Bait としては、2量化するロイジンジッパーや、p21Ras と Raf の Ras 結合ドメイン、FK506 結合タンパク (FKBP) と酵母ラパマイシン標的タンパク (TOR2) のラパマイシン依存性結合、Epoレセプタータンパクなどが報告されている²⁰⁾。検出としては、DHFR 欠損株での細胞の生存 (タンパクが相互作用して DHFR が再構成されないと細胞は死滅) やフルオレセイン標識メトトレキサート (fMTX) の DHFR への結合を利用した蛍光法が用いられる²⁰⁾。細胞の生存で見える場合、バクテリアでアッセイすれば、DHFR を欠損させなくても、これを阻害するトリメトロプリムで処理するとよい。哺乳類の DHFR は、この薬剤に対し 1200 分の 1 の親和力しかないため、影響を受けずにアッセイできる。また fMTX を用いる場合、THFR に結合しない場合、細胞から迅速に排除され、また、結合したものは蛍光量子収率が 4.5 倍向上するので、感度良く DHFR の再構成がモニターできる。この手法の利点は、蛍光強度から結合した MTX を定量できるので、タンパク間相互作用の K_d 値や、それに影響する薬剤の能力を定量的に評価できる点である。

β -Gal を用いる手法では、11~41 番目のアミノ酸を欠損させた α と最初の 788 アミノ酸部分である ω の2つの断片を用いる。この2つの断片自身の会合能力は低く、各々に結合した Prey と Bait の相互作用に依存している。FKBP12 とラパマイシン依存性に FKBP と結合する FRAP を用いた例がある¹⁹⁾。

これらの手法は、対象とするタンパクや用いる細胞に制限が少なく、相互作用を直接評価できるのが利点だが、擬陽性が多いとも言われている。

3-2-2: タンパクの再構成と共にレポータータンパクの切断を介させる方法

単純に、対象タンパクの相互作用が、それらに結合するレポータータンパクの再構成を促すのではなく、相互作用に伴いレポータータンパクが切断されてくるタイプもある。まず、Johnsson らは、ユビキチンを用いた系を報告している (Fig.2b)²¹⁾。ユビキチンは 76 アミノ酸からなる小さなタンパクで、プロテアソームを介

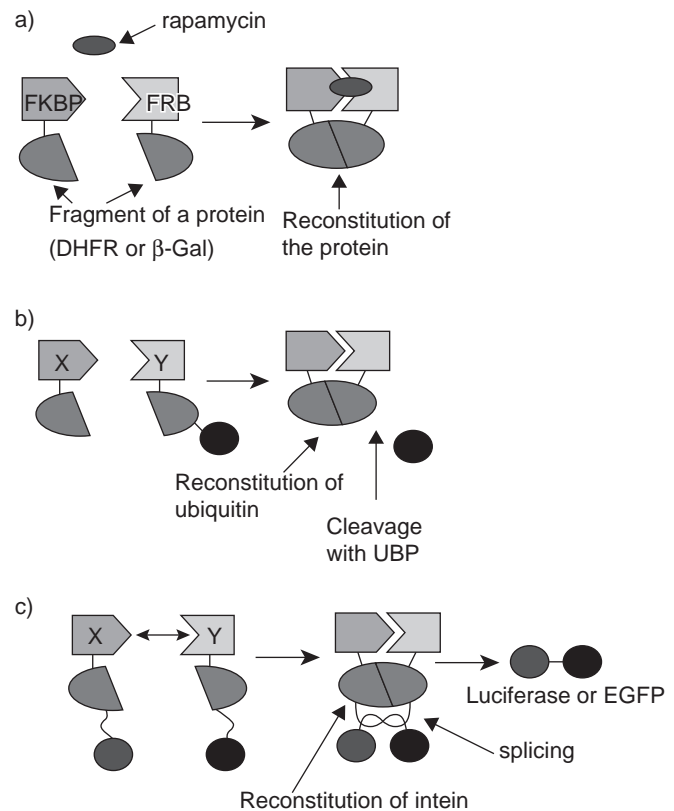


Fig.2 Schematic outline of protein-fragment complementation assay
a) Original protein-fragment complementation assay
b) Split ubiquitin assay
c) Split enzyme reconstitution based on protein splicing

する不要タンパクの分解に関係する。真核細胞では、ユビキチンがタンパクに結合すると、ユビキチン結合タンパク (UBP) により、迅速にユビキチン - タンパク結合部位で切断される活性がある。ただし、このためにはユビキチンが正確にフォールディングされている必要がある²²⁾。そこで、ユビキチンを N 末端 1~37 残基 (Nub) と C 末端 36~76 残基 (Cub) に分割し、Nub の C 末端と Cub の N 末端にそれぞれ対象とするタンパクをリンカー介して結合し、さらに Cub の C 末端には DHFR などのレポータータンパクを結合する。もし、対象タンパクが相互作用すると、互いに接近するユビキチンが正しい折り畳みを起こし、UBP により結合しているレポータータンパクが切断される。この切断を電気泳動などで確認する。この手法では、Cub に結合しておくレポータータンパクの種類をいくつか用意しておく、これにそれぞれ異なるタンパクを結合させることにより、どのタンパクがどのくらい切断されてくるかで、Nub に結合したタンパクとの相互作用の強さを比較することもできる。ただし、切断前後でレポータータンパクの機能が変化するわけではないので、切断は電気泳動などでアッセイせねばならず煩雑さが伴う。

これに対し、Umezawa らは、タンパクスプライシングを利用した手法を報告している^{23, 24)}。これは酵母の発生期の翻訳産物が

ら内部のタンパク(Intein)が正確に切り出され、その両側(外側の)2つのタンパク断片(Extein)がライゲーションされる現象を利用したものである。すなわち、このInteinを2つに分割し、それぞれにExteinを結合し、他方の末端にPreyとBaitを結合すると、それらが相互作用した場合、2つのIntein由来の断片が接近し、元の形にフォールディングされることにより、スプライシング活性が回復し、Exteinがライゲートされ切り出される。このExteinにレポータータンパクの断片を用いると、これによりレポータータンパクが再構成され、その回復した酵素活性などの機能によりタンパク間相互作用が評価できる(Fig.2(c))。彼らはまず、120kDaのVMA1翻訳産物のInteinである50kDaエンドヌクレアーゼ(VDE)を128番目のアミノ酸で2つの断片に分けたものに、蛍光タンパクであるEGFPを2つに分割した断片をExteinとして結合し、反対側に調べたいタンパクをそれぞれ結合した²³⁾。モデル系としてカルモデュリンとそれに結合するM13ペプチドを結合したところ、大腸菌内でのその相互作用に基づきEGFP由来の蛍光の増大が見られる。この手法は、酵素基質などが要らないなどの利点があるが、哺乳類細胞では感度が足りなかった。そこで、Inteinとして酵母のDnaEタンパクを用い、レポーターとしてルシフェラーゼを用いて同様のシステムを構成することで、この問題を解決している²⁴⁾。モデル系として、インスリンレセプター基質1(IRS-1)とそのターゲットであるPI-3キナーゼのSH2ドメインを用い、そのインスリン依存性の結合をCHO-HIR細胞内で評価し、その有用性を報告している。ただし、実際にインスリン刺激によりIRS-1がリン酸化されていると考えられる時間より、本アッセイでIRS-1とSH2ドメインの相互作用が確認できるには長い時間が必要で、また、他のインスリン非依存性リン酸化によるバックグラウンド増加などいくつかの改善されるべき問題もあるが、薬物やアゴニストのスクリーニングなどにも使える可能性があり、興味深い。

4. タンパク間相互作用以外への応用

これまでの手法は、いずれもPreyとBaitの相互作用が、別のタンパクの何らかの機能の変化を引き起こすものであるが、これを応用すると、タンパク間の相互作用以外のアッセイにも適用できる。

4-1: DNA - タンパク相互作用評価法 (One Hybrid System) (Fig.3a)

標的DNA配列に結合するタンパクを、ライブラリーから探索したり、逆にあるタンパクが結合するDNA配列を探したりする場合、対象タンパクに転写活性化ドメイン(AD)を結合し、レポーター遺伝子の upstream に調べたいDNA配列を結合しておくと、これが対象タンパクと結合した場合のみ、レポーター遺伝子の発現が起こり、容易にアッセイできる^{25, 26)}。Wangらは、このシステムを用い、嗅覚細胞特異的な遺伝子の発現スイッチに関係する転写活性化因子Olf-1を発見している²⁶⁾。また、Paboらは、バクテリアでDNA結合性ZnフィンガータンパクのターゲットDNA結合配列をこのシステムを利用してデザインしている²⁵⁾。

4-2: タンパク-小分子相互作用評価法 (Three Hybrid System) (Fig.3b)

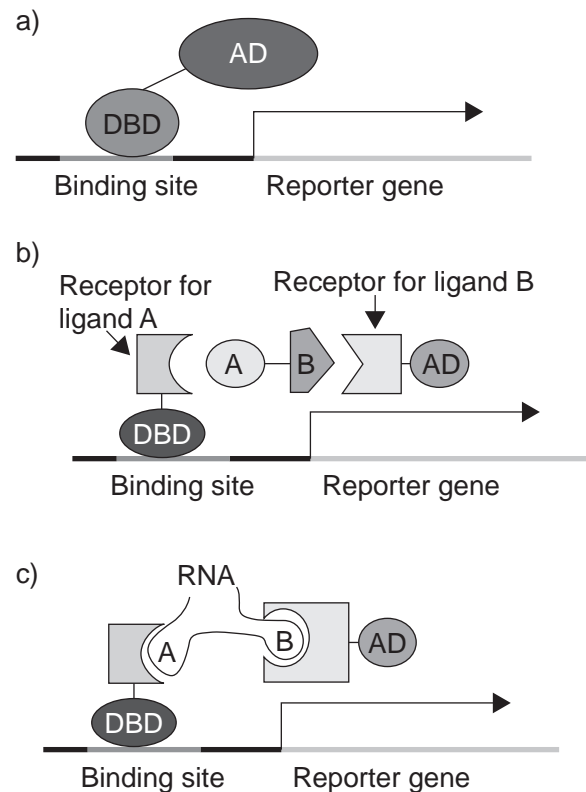


Fig.3 Schematic outlines of one- and three-hybrid assay
a) One hybrid assay for detecting DNA-protein interaction
b) Three hybrid assay for detecting protein-ligand interaction
c) Three hybrid assay for detecting protein-RNA interaction

前述のβ-GalやDHFR再構成を利用するPAC法では、ラバマイシン依存性のFKBPとFRAPの結合が用いられたし、タンパクスプライシングを用いる方法では、インスリン依存性のIRS-1とSH2ドメインの結合がアッセイされている。これらは見方を変えれば、ラバマイシンやインスリン類似物質やアゴニストの標的タンパク結合のアッセイにも用いることができる。この考え方をさらに発展させたのが、Three Hybrid Systemである²⁷⁻³²⁾。このシステムでは、レポーター遺伝子の upstream の配列に結合するDNA結合ドメイン(DBD)とリガンドAのレセプターを結合したHook、リガンドBのレセプターを転写活性化ドメイン(AD)と結合したFish、リガンドAとBを化学的に結合した人工リガンド(Bait)を用いる。HookとFishをコードする遺伝子を細胞に導入し、人工リガンドを細胞内に投与すると、リガンドとそれぞれのレセプターの結合により、DBDとADが近傍に固定され、レポーター遺伝子の発現が起こる。ここで、例えばリガンドAとHook内のレセプターは既知の強力に結合するものを用いると、人工リガンドのBに相当する部分をコンピケムなどで種々合成して、Fish内のレセプターBに結合するリガンド分子を探索できる。逆に、リガンドAにリンクしたリガンドBに結合するタンパクをライブラリーからスクリーニングすることも可能である。このシステムは、

初めにFK506ダイマーをリガンドとして報告された²⁷⁾が、LicitraとLiuは、Hook側のレセプターAにグルコシルコイドレセプターのリガンド結合ドメイン、Fish側のレセプターBにFK506結合タンパク(FKBP12)を用い、人工リガンドとしてデキサメタゾンとFK506を化学的に結合した分子を合成して、この系の有用性を示し、既知薬物の細胞内ターゲットの同定に使えると主張している²⁸⁾。実際、Jurkat T細胞ライブラリーでFK506に結合するタンパクの同定を行い、ヒトFKBP12の2種類のバリエーションを3週間で見出している。既存の手法では、1年以上かかるという。ただし、元からあるFKBPの競合により、会合能力の強いものしか見つからない問題もある。また、人工リガンドは、この例のように疎水性のものはよいが、親水性のリガンドでは酵母の細胞内に透過しないという問題もある。それでも、同様の系を用いてFK506合成アナログの性能評価やデキサメタゾンとメトトレキサートを結合したリガンドを用いたシステム、ラパマイシンとFK506結合リガンドを用いて、Fishに結合したラパマイシン会合タンパクに種々の変異を導入してのラパマイシンに高選択的な変異のスクリーニングの試みなどが報告されている²⁹⁾。

4-3 : RNA- タンパク相互作用の評価法(Three Hybrid System)(Fig.3c)

RNA- タンパク間相互作用の評価は、RNA- タンパク融合体が*in vivo*で合成できないので、Y2Hの直接の応用は難しいが、Three Hybrid Systemを利用することで解決できる³³⁾。すなわち、前述の系で人工リガンドの部分にRNA分子を用いる。その際、RNAの半分は、既知タンパクに結合する配列を用い、もう半分に調べたい配列を結合する。すると、その部分がFishのタンパクと結合した場合にだけ、レポーター遺伝子の発現が見られる。例えばこの系を利用して、線虫の3'-fem-3遺伝子の非翻訳領域に結合して精子/卵子のスイッチを仲介するタンパクの探索などが行われている³⁴⁾。

5. おわりに

以上、遺伝子を用いて細胞内(*in vivo*)でタンパク間やタンパク-リガンドなどの相互作用を評価できる手法について概説した。これらの手法は、いずれもタンパクが同定されなくても遺伝子さえ取得できれば評価に供することができ、迅速性、感度、ハイスループット化などの点で、既存の手法よりも優れている。しかし、系によって、擬陽性の出易さ、利用できる細胞のタイプ、利用できるタンパクのタイプなどに制限があるなど、それぞれ長所と短所がある。にもかかわらず、これらの使い分けをして、ハイスループットの網羅的解析系にもっていけば、今後、タンパク機能の解明、未知タンパクや未知リガンド、新薬や遺伝子配列の探索に大きな力を発揮するものと期待できる。次回は、これらの手法以外のタンパク相互作用の評価法についてご紹介する。

参考文献

- 1) J. W. Schneider, W. Gu, L. Zhu, V. Mahdavi, *Science*, **264**, 1467-1471 (1994).
- 2) E. M. Phizicky, S. Fields, *Microbiol. Rev.*, **59**, 94 (1995).
- 3) S. Fields, O. Song, *Nature*, **340**, 245 (1989).
- 4) C. Chien, P. L. Bartel, R. Sternglanz, S. Fields, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9578 (1991).
- 5) P. Uetz, L. Giot, G. Cagney, T. A. Mansfield, R. S. Judson, J. R. Knight, D. Lockson, V. Narayan, M. Srinivasan, P. Pochart, A. Qureshi-Emili, Y. Li, B. Godwin, D. Conover, T. Kalbfleisch, G. Vijayadmodar, M. Yang, M. Johnston, S. Fields, J. M. Rothberg, *Nature*, **403**, 623 (2000).
- 6) T. Ito, K. Tashiro, S. Muta, R. Ozawa, T. Chiba, M. Nishizawa, K. Yamamoto, S. Kuhara, Y. Sakaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1143 (2000).
- 7) J. C. Hu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12935(2000).
- 8) E. Fearon, T. Finkel, M. Gillson, S. Kennedy, J. Casella, G. Tomaselli, J. Morrow, C. Dang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7958 (1992).
- 9) H. Vasavada, S. Ganguly, F. Germino, Z. Wang, S. Weissman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10686 (1991).
- 10) T. Shioda, S. Andriole, T. Yahata, K. J. Isselbacher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5220 (2000).
- 11) A. Aronheim, E. Zandi, H. Hennemann, S. Elledge, M. Karin, *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 3094 (1997).
- 12) X. Yu, L. C. Wu, A. M. Bowcock, A. Aronheim, R. Baer, *J. Biol. Chem.*, **273**, 25388 (1998).
- 13) J. Andreev, J. P. Simon, D. D. Sabatini, J. Kam, G. Plowman, P. A. Randazzo, J. Schlessinger, *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 2338 (1999).
- 14) A. Aronheim, *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 1009 (2000).
- 15) Y. C. Broder, S. Katz, A. Aronheim, *Curr. Biol.*, **8**, 1121-1124 (1998).
- 16) G. Karimova, J. Pidoux, A. Ullmann, D. Landant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5752 (1998).
- 17) S. Dove, J. Joung, A. Hochschild, *Nature*, **386**, 627 (1997).
- 18) J. N. Pelletier, F-X. Campbell-Valois, S. W. Michnick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12141 (1998).
- 19) F. Rossi, C. A. Charlton, H. M. Blau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8405 (1997).
- 20) I. Remy, S. W. Michnick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5394 (1999).
- 21) N. Johnsson, A. Varshavsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10340 (1994).
- 22) N. Johnsson, A. Varshavsky, *EMBO J.*, **13**, 2686 (1994).
- 23) T. Ozawa, S. Nogami, M. Sato, Y. Ohya, Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **72**, 5151 (2000).
- 24) T. Ozawa, A. Kaihara, M. Sato, K. Tachihara, Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **73**, 2516 (2001).
- 25) J. K. Joung, E. I. Ramm, C. O. Pabo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7382 (2000).
- 26) M. M. Wang, R. R. Reed, *Nature*, **364**, 121(1993).
- 27) D. Spencer, T. Wandless, S. Schreiber, G. Crabtree, *Science*, **262**, 1019 (1993).
- 28) E. J. Licitra, J. O. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12817 (1996).
- 29) S. D. Liberles, S. T. Diver, D. J. Austin, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7825 (1997).
- 30) T. Clackson, W. Yang, L. W. Rozamus, M. Hatada, J. F. Amara, C. T. Rollins, L. F. Stevenson, S. R. Magar, S. A. Wood, N. L. Courage, X. Lu, F. Cerasoli, M. Gilman, D. A. Holt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10437 (1998).
- 31) H. Lin, M. W. Abida, R. Sauer, V. Cornish, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 4247 (2000).
- 32) J. Amara, T. Clackson, V. Rivera, T. Guo, T. Keenan, S. Natesan, R. Pollock, W. Yang, N. Courage, D. Holt, M. Gilman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10618 (1997).
- 33) D. SenGupta, B. Zhang, B. Kraemer, P. Pochart, S. Fields, M. Wickens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 8496 (1996).
- 34) B. Zhang, M. Gallegos, A. Puoti, E. Durkin, S. Fields, J. Kimble, M. P. Wickens, *Nature*, **390**, 477 (1997).

Topics on Chemistry

遺伝子治療用ベクターとしてのナノ粒子

(株) 同仁化学研究所 佐々本 一美

細胞に遺伝子を導入するにはベクターと呼ばれる運び屋を用いるのが一般的だが、これにはウイルスを用いる方法と、そうでない方法の2通りがある。前者はウイルスの扱いに慣れていないとできないし、病原性の問題も依然として課題である。それに比べ非ウイルス法は導入効率は劣るが、安全かつ操作が簡便であるという利点を持っている。近年、脂質系リポソームや合成ペプチドに代表される非ウイルス系遺伝子導入試薬が各社から市販されるようになり、種々の培養細胞への導入効率も飛躍的に向上している。遺伝子を核まで効率よく運ぶには、細胞表面への取りつき、細胞内でのエンドソームから細胞質への移行、ベクターからの離脱、細胞質から核への移行など、ちょっと考えただけでも多くの障害を乗り越えなければならない。さらに治療に用いる場合、体内の特定の細胞だけを狙ったターゲティングが重要になる。核にたどり着くには気が遠くなりそうな生物学的な距離だが、鍵を握るのはやはりベクターの選択である。

ここに紹介するのは、転移性癌の遺伝子治療にむけたベクターの開発である。癌は依然として人類に対して大きな脅威だが、転移さえしなければその脅威もさほどでもない。転移した癌に対する確立した治療法がない現在、遺伝子治療は多くの期待を集めている。そもそも癌の転移は、原発巣から離脱し、細胞外マトリックスと呼ばれる周辺組織に浸潤し、血管（血行性）もしくはリンパ管（リンパ行性）に進入、さらに遠隔組織に接着し、再び増殖するといった長い旅の結果である。癌細胞はその増殖を支えるために、VEGF、bFGFといった血管新生因子を産生し、盛んに血管新生を促している。これらの因子に刺激された血管の内皮細胞は血管外に移動し、新たに血管を形成する。したがってこの過程をブロックすると、癌への栄養や酸素供給が絶たれ、いわゆる兵糧攻めの状態となる。血管新生の際には、血管内皮細胞の表面に癌細胞からの刺激を受けるための特殊なタンパク質が高発現しているが、代表的なものがインテグリン・ファミリーの一つ $\alpha_v\beta_3$ である（図1）。

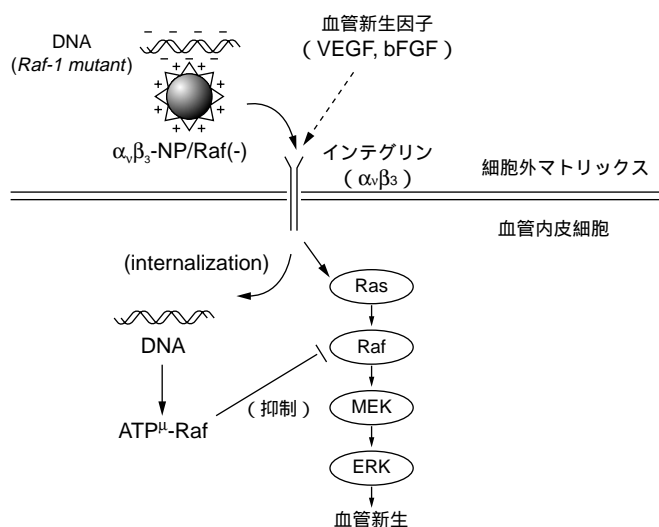


図1 $\alpha_v\beta_3$ -NP/Raf(-)の血管新生抑制機構

Hood ら¹⁾は、インテグリンのアンタゴニストを表面に有するカチオン性のナノ粒子をベクターとした（図2）。 $\alpha_v\beta_3$ を認識するアンタゴニスト部分はタウリンより7ステップで合成できる。このアンタゴニストを3個結合したジアセチレン含有脂質と、フォスファチジルコリン骨格を有するジアセチレン含有脂質、およびカチオン性脂質の3者を混合し、得られたベシクルを照射によって高分子化すると40 nm前後の粒径のカチオン性ナノ粒子（ $\alpha_v\beta_3$ -NP）が得られる。導入する遺伝子はシグナル伝達経路のRafに注目し、この変異体（ATP^μ-Raf）のcDNAを選択した。Rafの働きを抑えることで血管新生を抑制することができる。実際、この $\alpha_v\beta_3$ -NPとDNAの複合体（ $\alpha_v\beta_3$ -NP/Raf(-)）を坦癌マウスに静注したところ、大腸癌（CT-26）の肺および肝転移巣の顕著な退縮が見られた。

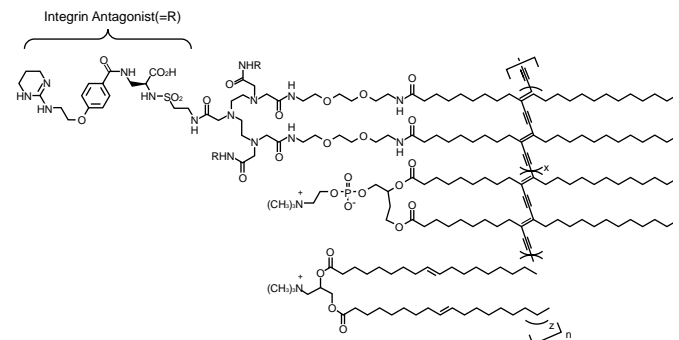


図2 $\alpha_v\beta_3$ -NPの構造

遺伝子治療において遺伝子を *in vivo* に導入する場合、特定の細胞だけに導入する細胞ターゲティングの技術が必須である。そのため、既存のDNAベクターを糖などで修飾し、レセプターを介して導入する試みも盛んに行われている。今回ベクターとして用いたナノ粒子は、粒子サイズが40 nm前後と比較的小さく、表面荷電も多いため（ゼータ電位 35 mV）DNAとの結合性も高いと思われる。多価のインテグリン・アンタゴニストにより効率的なターゲティングが達成され、さらに $\alpha_v\beta_3$ レセプターとの結合によってinternalizationが促進されている。このナノ粒子は抗原性も低く、転移性癌の治療法としての臨床応用が期待される。

参考文献

- 1) J. D. Hood, M. Bednarski, R. Frausto, S. Guccione, R. A. Reisfeld, R. Xiang and D. A. Cheresh, *Science*, **296**, 2404 (2002).

Q & A

DNA の塩基損傷部位検出キット

-Nucleostain-

DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting-

DNAは紫外線や化学物質、生体内の活性酸素などにより損傷を受ける。この損傷が正しく修復されないと突然変異を誘発し、癌や老化の原因ともなる。DNA損傷の修復機構の一つに塩基除去修復があり、この時AP siteと呼ばれる塩基除去部位が出現する。このAP siteの検出はDNAの損傷部位を測定し得る有効な方法である。

このキットはAP siteと特異的に結合するARPによるビオチン化を行ない、検体DNA中のAP siteを簡便に定量できる。

Q1 DNA Damage Quantification Kitに含まれるARP 溶液の濃度はどれくらいですか？

A1 ARP solution: ARP 5 mg/1.5 ml H₂O になっています。

Q2 DNA 固定用にアミノプレートとしてELISA用プレートアミノを用意したのですが、使用出来るでしょうか？

A2 基本的には大丈夫です。実際にアミノプレートを用いてAPサイトの検出を行っている例があります。ただし、BSA等によるブロッキングが必要になってくるかもしれません

A.Kanazawa *et al.*, *Cancer Letters*, **156**, 51 (2000).

K.Kubo *et al.*, *Biochemistry*, **31**, 3703 (1992).

Q3 Filtration tube の分画分子量はどのくらいですか？

A3 キットの中に入っているチューブの分画分子量は30Kです。

Q4 DNAの精製度が1.8以上を推奨されていますが、1.5程度でも測定は可能ですか？

A4 1.5では確認していませんので、保証は出来ません。1.6～1.7のDNAで測定した結果、大きなバラツキは見られてませんでした。推奨として1.8としています。

精製度が低いということは、タンパクの混入が考えられると思います。タンパクはブロッキング作用を持ち、DNAがプレートに吸着するのを妨げる可能性があります。

Q5 抽出したDNAをARP化せずに保存することは可能ですか？

A5 溶液状態での保存はAP siteが増えてくるので注意が必要です(冷蔵、冷凍の両方)。

エタノール沈殿を行い、ペレット状にして冷凍保存して下さい。

AP 部位は確かに切断が起こりやすい部位です。ただcaralyst freeの状態では保存されていれば、3'側に切断があってもARPの検出には支障ありません。むしろ抽出DNAが凍結状態以外の環境下で保存されていた場合、自然に起こる脱塩基によって形成されたAP部位の問題の方が重要になります。この場合、サンプルに同一条件下で保存されていた標準DNAが含まれる場合は補正が可能になります。ARP

修飾後のAP部位は安定ですので、抽出後の速やかなARP処理をおすすめします。

Q6 洗浄用PBSTの保存方法が室温になっていますが、安定性はどの程度でしょうか？

A6 室温で半年以上持ち、かなり安定です。長期保存すると白い濁りが出てくる場合がありますが、測定には影響はありません。冷蔵保存の場合は沈殿が出てくる可能性があります。

Q7 標準DNAの長さはどのくらいですか？

A7 キットに用いている標準DNAはウシ胸腺DNAを精製したもので、長さは大体20 kbp程度です。

文献に従いAP buffer(pH 5.0のクエン酸バッファー)中で一定時間熱処理を行って生じさせています。

H.Ide, *et al.*, Synthesis and Damage Specificity of Novel Probe for Detection of Abasic Sites in DNA, *Biochemistry*, **32**, 8276 (1993).

Q8 40 AP sites/100,000以上のstandard solutionを作成することが出来ますか？

A8 弊社では50 AP sites/100,000までのARP-DNAを調製したことはありますが、それ以上はありません。キットのスタンダードDNAは0～40 AP sites/100,000です。

理論的にはそれ以上のARP-DNAを調製することは可能ですが、検量線の直線性がどこまで保持されるか保証できません。高いレベルの塩基傷害を検出するには、サンプルDNAを同じ濃度の傷害のないDNA、つまり0 ARP-DNAでキットの測定レンジに希釈してアッセイを行い、その後実際にAP数を換算して求める方法がよいのではないかと思います。

品名	容量	価格(¥)	和光コード	メーカーコード
----	----	-------	-------	---------

-Nucleostain-

DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting-

5 samples	21,000			DK02
ARP	10 mg	18,000	340-07611	A305

販売中止予定のご案内

2002年12月20日をもって、下記商品の販売を勝手ながら中止させていただきます。

このたび本製品に原料として用いております非イオン性界面活性剤が、環境ホルモン物質に指定されました。それに伴い、購入メーカーより販売中止の連絡を受けたのが販売中止の理由です。

ご不明な点、詳細につきましては小社マーケティング部までお問い合わせください。

品名	容量	和光コード	メーカーコード
Scintisol 500	500 ml	344-03915	SC08
Scintisol EX-H	3.8 L	348-04013	SC09

Q & A

酸化ストレスマーカー - 尿中 Biopyrrins 測定キット

Biopyrrin EIA Kit

Biopyrrins の尿中排泄量は、生体内の酸化的状態を反映すると考えられ、ストレスマーカーとしても報告されています。このキットは抗ビリルビンモノクローナル抗体を使用し、inhibition ELISA により尿中 Biopyrrins を簡便に測定できます。

Q1 Biopyrrin EIA Kit は尿をサンプルとして測定しますが、尿の種類(早朝尿、2 番尿、蓄尿など)はどれを使用するのがよいのでしょうか？

A1 一般論としては「早朝第一尿」を用いるのが普通です。しかし、実際のところ早朝第一尿の採取は困難なため、随時尿を用いている例が多く見られます。蓄尿も出来れば良いのですが「サンプリング後すぐに遮光凍結」することが難しいので用いられません。

Q2 尿採取にあたって添加剤(抗酸化剤等)は必要でしょうか？

A2 抗酸化物の添加は行わず、「採取後、すぐに遮光凍結する」ようにして下さい。Biopyrrins は 1 種類の物質ではなく、ビリルビンの分解物の物質群です。そこに含まれる物質には安定なものと不安定なものがあると考えられています。特に高値の検体で不安定な場合が多く、経時的に値の低下のみられる場合があります。しかし、抗酸化物を添加するだけでは、その分解を止めることは難しいと考えます。

Q3 マウスやラットなどの血中の Biopyrrins の測定は可能でしょうか？また細胞培養上清中の Biopyrrins は出来ますか？

A3 本キットはヒトの尿中 Biopyrrins を測定する事を前提として開発されていますので、動物での応用が可能かどうかの検討はされておりません。血清サンプルにおいては、ビリルビンとも反応します。Biopyrrin EIA Kit の原形ともいえる方法では、数報の論文が出されていますが、キットを使用して培養上清の測定を検討した際に、定量性に不具合がみられることもありました。ヒト尿サンプル以外での測定を検討される際は、お問い合わせください。

Q4 本キットで測定した Biopyrrin 量を濃度表示で表すことは可能でしょうか？(例えば $\mu\text{mol/l}$ のような表記法)

A4 厳密な意味では、 $\mu\text{mol/l}$ のような濃度表記で表すことはできません。ただし、本キットの試薬の設定は、原法の $1 \mu\text{mol/l}$ のものが 1 u/l になるようにしてありますので、 u/l を $\mu\text{mol/l}$ と記載している論文もあります。しかし、ここでいう $1 \mu\text{mol/l}$ は、Biopyrrins がサンプル中にそのモル数含まれているということを必ずしも示しているのではなく、試薬に使われている抗体に対して、サンプル中の Biopyrrins が「 $1 \mu\text{mol/l}$ のビリルビンと同じ強さの抗

原抗体反応を示す」ということを示しています。

従って、抗体に対するビリルビンの反応性と Biopyrrin の反応性に差があれば、当然その分だけ実際の $1 \mu\text{mol/l}$ からはずれると考えられます。その差がどの程度のものであるかは今のところ分かっていません。また、Biopyrrins は、ビリルビン分解物の混合物であり、それぞれの物質について反応性の差はあると思われませんが、確認はされていません。

Q5 本キットで測定されるものから、ビリルビンのみを除外できますか？

A5 ビリルビンだけ除外する方法は、いまのところ確立されていません。サンプル中にビリルビンがあれば、反応し、正誤差を生じてしまいます。

Q6 第 2 反応停止液を加えなくても問題無いでしょうか？

A6 これを入れないと反応が進行しますので、データのばらつきが生じます。データのばらつきを押さえる意味でも各ウェルの反応時間を正確にあわせて入れて下さい。

参考文献

- 1) Yamaguchi T., *et al.*, Bilirubin oxidation provoked by endotoxin treatment is suppressed by feeding ascorbic acid in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid, *Eur. J. Biochem.*, **245**, 233 (1997).
- 2) 山口登喜夫、杉本昭子、酸化ストレスと生体防御機構—バイオピリンを含めて、臨床検査、**45**, 237 (2001).
- 3) Yamaguchi T., *et al.*, psychological stress increases bilirubin metabolites in human urine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 517 (2002).

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Biopyrrin EIA Kit	1set	100,000	B433
Anti-Bilirubin Antibody(24G7)	200 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$	50,000	A420
	1 mg/ml	200,000	A420

(メーカー：株式会社シノテスト)

近日発売予定

HTS用細胞内カルシウムイオン測定用試薬キット

Calcium Screening Kit II Calcium Custom Screening Kit

<特長>

- ・測定系に応じた最適条件が設定可能である。
- ・細胞洗浄の必要がなく、ウェルに直接試薬溶液を添加できる。
- ・96well, 384wellの両方のマイクロプレートに対応。
- ・シャープなシグナル応答が得られる。

<キット内容>

Calcium Screening Kit II (Fura 2, type A)

・ Fura 2-AM	1 mg × 1 本
・ DMSO	2 ml × 1 本
・ Hanks' HEPES Buffer	1 本
・ Quenching Buffer A	2 本
・ Probenecid	1 本
・ Pluronic F-127	1 本
・ Cremophor EL	1 本

- * Fluo 3タイプのキットには、Fura 2-AMの代わりにFluo 3-AM 1 mg × 1 本が含まれます。
- * type Bのキットには、Quenching Buffer Aの代わりにQuenching Buffer Bが含まれます。
- * 発売時まで、仕様が一部変更になる可能性がございます。

本キットは、細胞内カルシウムイオン測定試薬である Fluo 3-AM または Fura 2-AM と、その測定に必要なバッファー等を組み込んだ High-Throughput Screening (HTS) 用キットで、先に発売された Calcium Screening Kit の改良タイプです。細胞種や添加する薬剤などに応じて、Pluronic F-127 または Cremophor EL (Fluo 3-AM または Fura 2-AM の溶解補助剤)、Probenecid (陰イオントランスポーターの阻害剤) の各濃度を任意に設定することが可能となりました。

1 キットで 2,000 アッセイ (96 穴プレート 20 枚分) の測定が可能です。

<使用法> (96 穴マイクロプレート 10 枚を処理する場合)

1. マイクロプレートで細胞を培養する (培地 100 μ l/well)。
2. Fluo 3-AM または Fura 2-AM 1 mg を添付の DMSO 1ml で溶解する。
3. Quenching Buffer 1 本 (50 ml) に、10x Hanks' HEPES Buffer 5 ml また測定条件に応じて任意の量の Pluronic F-127 または Cremophor EL, Probenecid を添加して純水で全量を 100 ml とする。
4. これに Fluo 3-AM または Fura 2-AM の DMSO 溶液を半量 (500 μ l) 添加して、Loading Buffer とする。(DMSO 溶液 1 ml から 500 μ l × 2 を分取することが困難な場合、予め添加する DMSO を 50 μ l 程度過剰に加えて溶解して下さい)。
5. 培地に 100 μ l/well の Loading Buffer を添加し、37 °C で 1 時

間インキュベートする。

6. FDSS にて、薬剤刺激による蛍光強度変化を測定する。

[trial version のご案内]

測定条件に応じて最適な Quenching Buffer を選んでいただけるように、Calcium Screening Kit II (Fluo 3, trial version) と Calcium Screening Kit II (Fura 2, trial version) をご用意致しました。これらのキットには、2種類の Quenching Buffer が組み込まれております。Quenching Buffer には、細胞外に存在する Fluo 3 または Fura 2 の蛍光を消去するための試薬が入っております。細胞種や添加する薬剤などの測定条件によっては、「レスポンスが低い」「リガンドとの相互作用がある」などの問題が生じる可能性がありますので、各々の Quenching Buffer でアッセイを行ない、2種類のうちから、最適な結果が得られる Quenching Buffer をお選びください。各 Quenching Buffer 1 本で 100 アッセイ (96 穴プレート 1 枚分) が測定可能です。

[Calcium Custom Screening Kit のご案内]

Calcium Screening Kit II を用いて条件検討を行ない、最適なスクリーニング条件を見つけられた上で、Calcium Custom Screening Kit をご検討されてはいかがでしょうか？

既に設定した条件にて大量にスクリーニングを行なおうとする場合、各補助剤を別包装にした Calcium Screening Kit II は、キット購入毎に試薬を混合する必要があり操作が煩雑になります。

Calcium Custom Screening Kit は、弊社にてお客様が予め設定した条件に組み上げたキットです。例えば、Calcium Screening Kit II (Fluo 3, type B) にて条件検討し、Quenching Buffer B に Cremophor EL を 0.01 %、Probenecid を 10 mmol/l 添加した場合に最も良く Ca シグナルを捉えることができたとします。この条件を弊社にお伝えいただきましたら、弊社にて予め、上記の条件で Quenching Buffer B に必要量の溶解補助剤や Probenecid を添加してご提供させていただきます。スクリーニング条件が決まりましたら、こちらのキットをご用命ください。価格等、詳細につきましては弊社マーケティング部までお問い合わせください。

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Calcium Screening Kit II (Fura 2, trial version)	1 set	販売中止	CS10
Calcium Screening Kit II (Fura 2, typeA)	2,000 assays	販売中止	CS11
Calcium Screening Kit II (Fura 2, typeB)	2,000 assays	販売中止	CS12
Calcium Screening Kit II (Fluo 3, trial version)	1 set	販売中止	CS13
Calcium Screening Kit II (Fluo 3, typeA)	2,000 assays	販売中止	CS14
Calcium Screening Kit II (Fluo 3, typeB)	2,000 assays	販売中止	CS15

近日発売予定

Total RNA 抽出キット

Get pureRNA Kit

< 特長 >

- ・ フェノール、クロロホルム等有害な有機溶媒は使用しない。
- ・ 高純度、高収率で Total RNA が得られる。
- ・ 細胞、動物組織および血液から Total RNA が得られる。
- ・ 大量サンプルから抽出も可能。
- ・ RT-PCR、ノーザンブロット等にそのまま使用できる。

< キット内容 >

- ・ Lysis buffer
- ・ Precipitation solution I
- ・ Precipitation solution II
- ・ DNase
- ・ DNase dilution buffer

遺伝子解析の一つであるノーザンブロット解析、cDNA ライブラリーの構築などのアプリケーションには組織や細胞から抽出したRNAが必要となります。また研究手段として増幅技術の使用が広がるにつれ高品質のRNAをゲノムDNAの混入なく迅速に取り出す方法が必要とされています。

従来、Total RNA 抽出には酸性フェノール法が用いられてきましたが、精製した Total RNA の純度に影響を及ぼすことが知られています。フェノールの混入はRT-PCR、シーケンシング等の反応を阻害したり効率を低減させたりしてきました。

Get pureRNA Kitは、溶解液、タンパク除去液およびDNase 溶液により構成されています。フェノール、クロロホルム等の有害な有機溶媒を一切使用せず40分程度で高純度な Total RNA を抽出することができます。また、スピнкаラムやフィルターチューブを用いるキットに比べ、サンプル量の制限が無く大量のサンプルからでも一度に高純度な RNA を抽出可能です。

表. Total RNA回収量とその純度

	回収量(µg)	OD _{260/280}
HeLa (1 x 10 ⁷ cells)	90 - 150	2.0-2.2
Balb3T3 (1 x 10 ⁷ cells)	90 - 150	2.0-2.2
HL60 (1 x 10 ⁷ cells)	30 - 60	2.0-2.2
Mouse liver (20 mg)	60 - 75	2.0-2.2
Mouse brain (30 mg)	15 - 25	2.0-2.2
Mouse kidney (30 mg)	40 - 55	2.0-2.2
Mouse heart (30 mg)	7 - 15	2.0-2.2
Mouse liver (1.0 g)	3800-4400	2.0-2.2
Mouse brain (1.0 g)	700-1000	2.0-2.2

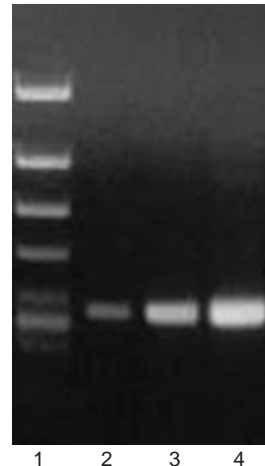
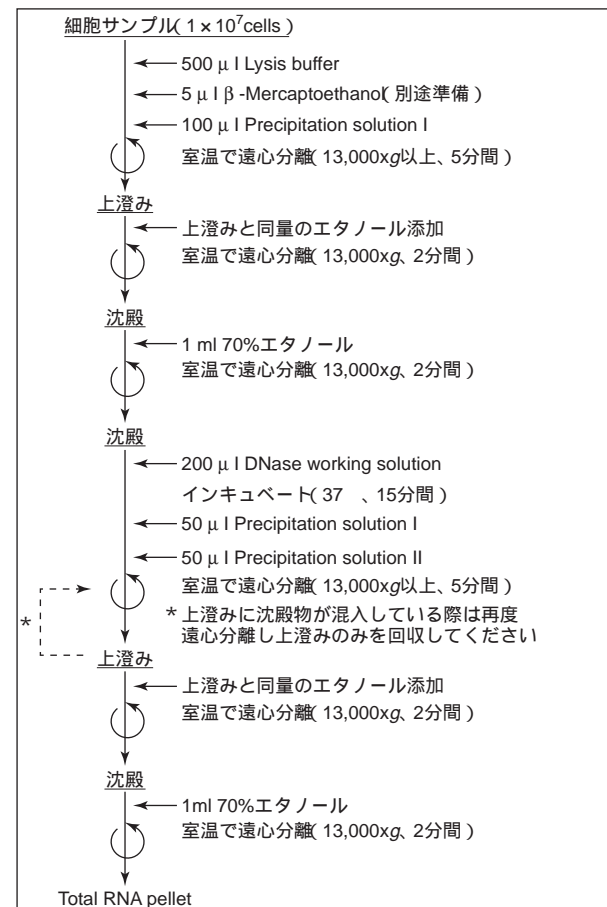


図. 抽出 Total RNA をテンプレートとした RT-PCR 産物の電気泳動写真
Lane1: Marker(φx174/Hinc II)
Lane2: positive control (353 bp)
Lane3: 回収 HeLa RNA (Run1)
Lane4: 回収 HeLa RNA (Run2)
Primer: Human β-actin

1.2% Agarose gel

< 操作方法 >

例) 細胞からの Total RNA 抽出



13th フォーラム・イン・ドージン

生命機能と病の中の蛋白質フォールディング

日 時 / 平成 14 年 11 月 29 日 (金) 10:15 ~ 18:20 (開場 10:00) 参加費 / 無料
 場 所 / 鶴屋ホール (テトリア熊本 7 階 熊本市手取本町 6 1) 定員 / 300 名
 代表世話人 / 前田 浩 (熊本大学医学部 微生物学講座)
 当番世話人 / 山本 哲郎 (熊本大学大学院医学研究科 分子病理学講座)
 主 催 : 株式会社 同仁化学研究所
 後 援 : 株式会社 ケミカル同仁

セッション 1 <座長: 三浦 洵 (熊本大学医学部 生化学第一講座)>

- 10:30-11:15 星野 大 (大阪大学蛋白質研究所 溶液学部門)
 「蛋白質のフォールディングにおける α β 構造転移」
 11:15-12:00 永田 和宏 (京都大学再生医学研究所 細胞機能調節学分野)
 「小胞体品質管理機構と分子シャペロン」
 12:00-12:45 田中 啓二 (東京都臨床医学総合研究所 分子腫瘍学研究部門)
 「蛋白質分解と品質管理」

セッション 2 <座長: 棚瀬 純男 (熊本大学医学部 生化学第二講座)>

- 13:45-14:30 森 正敬 (熊本大学医学部 分子遺伝学講座)
 「タンパク質のミトコンドリア輸送・フォールディング
 ・アポトーシスと分子シャペロン」
 14:30-15:15 小椋 光 (熊本大学発生医学研究センター 細胞複製分野)
 「AAA⁺ファミリー ATPase と分子シャペロン」
 15:15-16:00 吉田 賢右 (東京工業大学資源化学研究所 生物資源部門)
 「分子シャペロンとタンパク質の変性凝集」

セッション 3 <座長: 前田 浩 (熊本大学医学部 微生物学講座)>

- 16:15-17:00 西道 隆臣 (理化学研究所 脳科学総合研究センター)
 「アルツハイマー病とアミロイド β タンパク質代謝」
 17:00-17:35 安東 由喜雄 (熊本大学医学部 臨床検査医学講座)
 「家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) のアミロイド沈着機構の解析と治療」
 17:35-18:10 堂浦 克美 (九州大学大学院医学研究院 脳神経病研究施設病理部門)
 「タンパク質フォールディングとプリオン病」

問い合わせ・参加申し込み先:

フォーラム・イン・ドージン事務局 (担当: 蒲野・堀口)

〒861-2202 熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 株式会社 同仁化学研究所 内

Tel: 0120-489548, Fax: 0120-021557, E-mail: komine@dojindo.co.jp

講演終了後、ミキサーを同会場ですべて予定しております。(20:00 終了予定、無料)

参加ご希望の方は、所属・氏名・連絡先 (住所、TEL、FAX、E-mail)・ミキサー参加の有無を

ご記入の上、E-mail または FAX でお申し込みください。

駐車場は有料となりますので、出来るだけ公共の交通機関をご使用ください。

ホームページアドレス

URL : [http:// www. dojindo. co. jp/](http://www.dojindo.co.jp/)
 E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス 0120-021557
 フリーダイヤル 0120-489548