

# DOJIN NEWS

No.109  
2004

ドージンニュース

Review

ファージディスプレイとヒト抗体エンジニアリング

杉村和久・濱崎隆之・吉永圭介

Topics on Chemistry

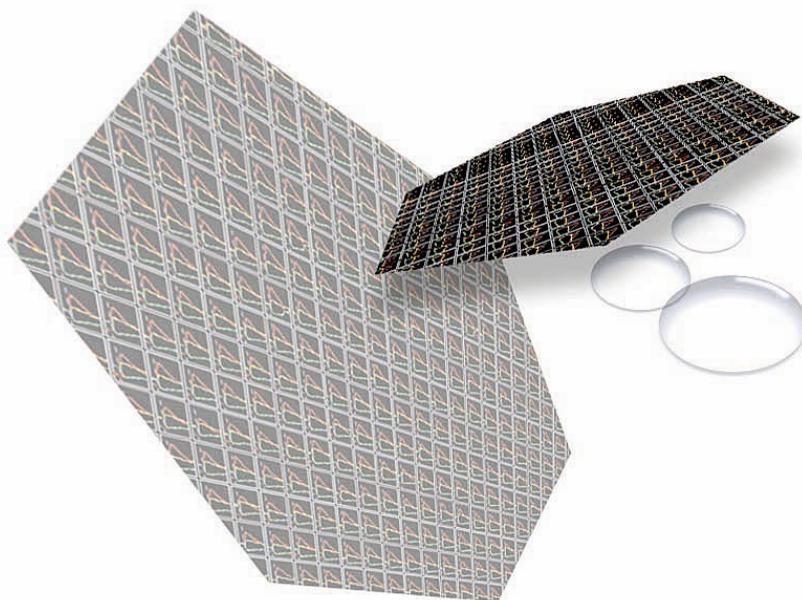
細胞内 1 分子イメージング技術

竹迫和浩

連載

ケミストからみたポストゲノム 9

片山佳樹



## 目次

### Review

ファージディスプレイとヒト抗体エンジニアリング 鹿児島大学工学部 杉村和久・濱崎隆之・吉永圭介 .....	1
ケミストからみたポストゲノム9 九州大学工学研究院 片山佳樹 .....	8

### Topics on Chemistry

細胞内1分子イメージング技術 同仁化学研究所 竹迫和浩 .....	13
--------------------------------------	----

### Commercial

試作品案内	
脱水素酵素の検出試薬 .....	15
アミロイド染色用蛍光色素 .....	16
ペルオキシダーゼ標識用キット .....	18
陽イオン性脂質遺伝子導入試薬 .....	21

### Q&A

細胞染色用色素 -Cellstain- .....	14
---------------------------	----

### お知らせ

ホームページ Q&A 活用法 .....	12
春の学会展示案内 .....	13
販売中止案内 .....	20
第14回フォーラム・イン・ドージン開催報告 .....	22



雪景色の同仁化学研究所  
南国熊本ではありますが、年に数えるほど珍しい雪景色となることがあります。

## ファージディスプレイとヒト抗体エンジニアリング Phage display technology and human antibody engineering



杉村和久  
(Kazuhisa Sugimura)  
鹿児島大学工学部

濱崎隆之  
(Takayuki Hamasaki)  
吉永圭介  
(Keisuke Yoshinaga)  
鹿児島大学理工学研究科

### [ Summary ]

Since J.Koller and C.Milstein reported the production of a murine monoclonal antibody by means of cell fusion technology, a tremendous number of studies has been carried out in a search for therapeutic antibodies. However, few attempts have been successful regarding human therapy. The reason is the immunogenicity of murine or rat monoclonal antibodies in human. However, there has been a recent breakthrough as a result of two cutting-edge technologies involving phage display library and human antibody engineering. In this article, we describe the outline of these technologies and introduce the remarkable progress for molecular-targeted therapy and proteome analysis.

### キーワード :

phage display (ファージディスプレイ) scFv (一本鎖抗体) biopanning(バイオパニング) human antibody(ヒト抗体) affinity maturation (抗体親和性増強) antibody engineering (抗体工学) antibody medicine (抗体医薬) proteomics (プロテオミクス)

## 1. はじめに

抗体は生命が40億年かけて進化させた最高の生体防御分子であるにもかかわらずヒトの治療薬としてほとんど利用されてこなかった。その理由は、マウス抗体は作れるがヒト抗体を造る技術がなかったことによる。

しかし最近、ヒト抗体遺伝子を有するマウスやヒト抗体を表面に提示するバクテリオファージライブラリーの利用ができるようになり、キメラ抗体でもヒト型化抗体でもなく、完全ヒト抗体を抗体医薬とする開発研究が急進するとともにプロテオミクスへの革新的な応用技術開発が試みられている。

私どもは1995年からバクテリオファージを用いたファージディスプレイの研究を開始し、その後ヒト抗体ライブラリーを用いた抗体医薬の開発研究を進めており、本稿では特にファージディスプレイライブラリーを中心に、ヒト抗体エンジニアリングについて紹介し、抗体医薬開発の現状まで言及したい。

## 2. ファージディスプレイ

ファージディスプレイは、1985年に G. Smith が繊維状ファージの表面にランダムペプチドの提示が可能であることを Science 誌に報告したのを発端に<sup>1)</sup>、現在では目的の機能を持ったポリペプチドを迅速に単離する方法として発展しており、有用な生理活性ペプチドや新たな機能をもったタンパク質の創製、完全ヒト抗体の作製など様々な分野で応用されている。

繊維状ファージ M13 は環状の一本鎖ゲノム DNA をもち、そのまわりに5つのコートタンパク(g3p, g6p, g7p, g8p, g9p)がアセンブリーした細長い筒状の構造をしており、大腸菌に感染して増殖するウィルスである。ファージディスプレイは、これらのファージコートタンパクと外来ポリペプチドを融合した形で発現させることでファージ表面にディスプレイさせる方法である。ファージに提示

されている外来ポリペプチドのアミノ酸配列はファージゲノムの塩基配列を読むことで推定できることから、アミノ酸配列と機能の関係容易に同定でき、さらに、ファージゲノムに組み込まれている外来ポリペプチド遺伝子へ変異を入れるだけで外来遺伝子の変異体をファージ表面に提示でき、より目的にそった分子を迅速に単離することが可能である。ファージへのディスプレイ法としては、ほぼ全てのコートタンパク質上に提示可能であるが、主に g3p, g8p への提示系が用いられている。ファージ1匹に5分子存在する g3p を提示系として用いた場合、分子量約50,000程度までのポリペプチドをファージ1匹あたり1 - 5分子提示することができる。この分子数の少なさは強いアフィニティを有するポリペプチドの単離を可能にする。一方、ファージ1匹に約3,000分子存在する g8p を提示系として用いた場合、5 - 8アミノ酸残基のポリペプチドを約3,000分子提示させることが可能であることから弱いアフィニティを有するポリペプチドでも単離することができる。さらに、最近になって Novagen Inc. により T7 ファージへのディスプレイシステムが開発された。T7 ファージは415分子のコートタンパク: g10p に覆われたキャプシド構造をしており、g10p の N 末または C 末に短いペプチドなら415分子、1200アミノ酸残基のポリペプチドなら5 - 15分子程度を提示させることができる。繊維状ファージとは異なり、C末端への提示が可能なのは外来遺伝子の導入によるファージコートタンパクの読み取りフレームへの影響や、コートタンパクより上流へのストップコドン導入がないので、cDNA library を作製するのに有利である。また、T7 ファージは繊維状ファージとは異なりタンパク変性剤(1% SDS, 4M urea, 2M guanidine-HCl)存在下においても感染能を維持できることから、バイオパニングの溶出にこれらの変性剤を用いることで繊維状ファージの場合より高い特異性とアフィニティをもつポリペプチドの単離が可能である。

### 3. ファージ抗体ライブラリの種類

1991年に、G. Winterらが抗体の結合部位であるVHとVLをリンカーでつないだscFv（一本鎖抗体）やFabの形でファージ表面への提示が可能であることを報告して以来<sup>2)</sup>、ファージディスプレイはヒト抗体作製技術として注目を集めている。これまでに様々な抗体ファージライブラリが作製・報告されているが、その抗体遺伝子ソースの違いで大きく3種類に分類される。

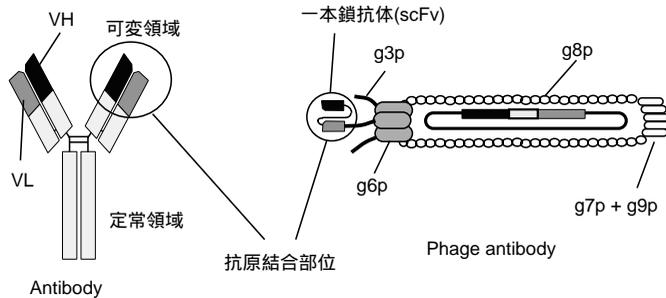


図1 抗体と抗体ファージの構造

抗体は抗原に結合する可変領域と生理活性に関与している定常領域から構成されている。抗体は可変領域の遺伝子再配列により抗原に対する多様性を獲得する。その抗体を組み換え抗体(scFv, Fabなど)の形で繊維状ファージ表面に提示することをファージディスプレイという。繊維状ファージはゲノムを5つのコートタンパク(g3p, g6p, g7p, g8p, g9p)で覆われた構造をしており、この図は抗体のVHとVLを直列につないだscFvをファージコートタンパクg3pに融合させてファージに提示させたモデルを示している。

### 3.1 免疫ライブラリ

免疫ライブラリは特定の抗原で免疫された動物、感染症患者やワクチン接種して血中抗体価を上昇させたヒト、癌患者、自己免疫疾患のリンパ球由来の抗体遺伝子をもとに構築された抗体ファージライブラリである。このライブラリのレパートリーは免疫システムによるアフィニティマチュレーションで最初から抗原特異的な抗体に絞られており、ライブラリサイズが小さくてもかなり高い確率で特異性、親和性の高い抗体の作製が可能である。ただし、このライブラリはそれぞれの抗原ごとにライブラリを構築する必要がある。

### 3.2 ナイープライブラリ

ナイープライブラリは健康人のリンパ球由来の抗体遺伝子をもとに構築された抗体ファージライブラリであり、抗体のレパートリーにバイアスがかかっていない。このライブラリはヒト自己抗原に対するヒト抗体の作製に有用である。ナイープライブラリは免疫ライブラリとは異なり抗原特異的なクローンが少ないため、抗体の多様性が確保されていることが重要であり、結果的に大規模なライブラリを作製する必要がある。ナイープライブラリから単離される抗体は免疫ライブラリから単離された抗体に比べてアフィニティの弱いクローンが大部分をしめると予想されたが、私どもも他の研究により十分なアフィニティ(nMのKd値)をもつ抗体の単離は可能であることが報告されている<sup>3,4)</sup>。また、たとえば抗体のアフィニティが弱くても *in vitro* でアフィニティマチュレーションすることでその目的は達成される。

### 3.3 合成ライブラリ

合成ライブラリはゲノムDNAにおけるV遺伝子や再構築され機能的なV遺伝子のCDR (complementary determining region) <sup>脚注1)</sup>を、適当な長さのランダムなアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドで置換したライブラリである。抗体遺伝子の配列の多様性はH鎖のCDR3領域において見られることから、この領域のみを置換するが多い。また、最初から機能的なscFvを産生するVHとVL遺伝子の組み合わせでライブラリを構築できるため得られる抗体の発現量や安定性が高く、ランダムなオリゴヌクレオチドを用いるためナイープライブラリよりも強い親和性及び多様性が得られる。ただし、このライブラリはヒト型抗体ライブラリなのか完全ヒト抗体ライブラリなのかは判然とせず<sup>5-7)</sup>、抗体医療に用いる際にCDR3の人工的な配列に対するHAHA(human anti-human antibody)が生じる可能性も示唆されている。

脚注1：CDR (complementary determining region, 相補性決定領域)

CDR領域とは抗体分子の可変領域で抗原と直接接触する領域でVH, VLに3つずつ(CDR1, CDR2, CDR3)存在し、中でもCDR3は結合に最も関与している。CDRは抗体の抗原認識部位であるため、抗体間でアミノ酸配列が大きく異なり超可変領域とも呼ばれている。

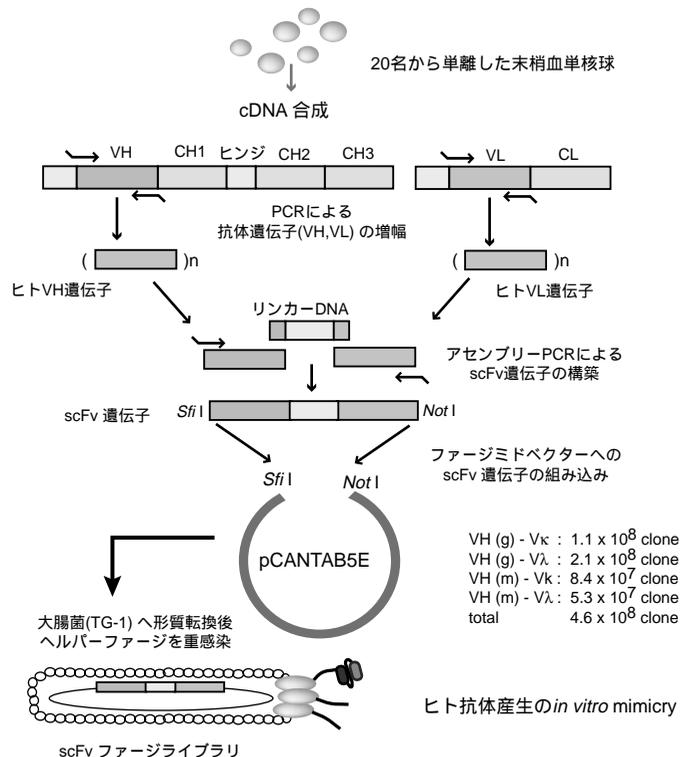


図2 ナイーブ抗体ファージライブラリの構築図

#### 4. ヒト抗体ライブラリの構築

私どもの研究に沿って詳細を述べる。基本的にファージディスプレイ抗体ライブラリにおける抗体の多様性は、多種類のVH遺伝子とVL遺伝子とをランダムに組み合わせることにより達成される。このVHとVLのランダムな組み合わせによって、本来は免疫系で選別されて現れないはずの組み合わせも生じるため、自己分子とも結合できる禁止クローンの単離も可能となっている。私どもの用いているライブラリはナイーブ（非免疫）ライブラリであり、複数のドナーより新鮮な末梢血リンパ球を確保し、mRNAを単離しcDNAを合成した。ヒト抗体のV領域のクローニング用プライマーについては複数の報告がされており<sup>2, 8-13</sup>、V領域のファミリーごとに特異的なプライマーを設定し、cDNAよりプライマーPCRでVH遺伝子とVL遺伝子をそれぞれ別個に増幅した。増幅したVH遺伝子とVL遺伝子とを、(GGGGS)<sub>3</sub>などのリンカーペプチド配列をコードしたリンカーDNAを利用してアセンブリPCRによりランダムに連結させ、scFv遺伝子を調製した。調製したscFv遺伝子を制限酵素サイト *Sfi*I および *Not*I を利用してファージミドベクター<sup>脚注2)</sup>であるpCANTAB5Eに組み込み、scFv遺伝子ライブラリを構築した。

##### 脚注2：ファージベクターとファージミドベクター

ファージディスプレイに用いられるベクターはファージベクターとファージミドベクターの2種に分類できる。ファージベクターはファージゲノムを改良してベクター化したもので、一つのベクター内にファージの全ゲノムを含み、単独でファージを形成することが可能である。一方、ファージミドベクターはファージへのパッケージングシグナルを含んだプラスミドベクターであり、後述するヘルパーファージの重感染によってのみファージを形成できる。ファージベクターとファージミドベクターにはそれぞれメリット・デメリットがあり、使用目的に応じてどちらを採用すべきか考えるべきである。それぞれのベクターの性質の詳細については成書を参照されたい。

当研究室では以下の3点の理由により抗体の提示にはファージベクター系ではなくファージミドベクターの系を採用している。1つめは、scFvを融合させるg3pはファージが大腸菌へ感染する際重要な分子であり、1ファージあたり5分子あるg3pすべてにscFvを融合させるファージベクターの場合、感染効率が低下し、さらに抗体分子によって感染効率にバイアスがかかるためである。2つ目は、g3pすべてにscFvを融合させた場合、抗体は多価となり、アビディティを考慮する必要がでてくるからである。3つ目に、ファージミドベクターの場合、可溶性scFvを大腸菌で発現させる場合に、余計なファージ構成タンパクが発現されないため、他の発現ベクターへのサブクローニングが不要であるという利点がある。

他のライブラリと同様、大きなライブラリを構築する際は、ここでの高いLigation効率および形質転換効率が要求される。このscFv遺伝子ライブラリを大腸菌TG-1(sup F)にエレクトロポレーション法により形質転換後、ヘルパーファージ<sup>脚注3)</sup>を重感染させ、scFvファージライブラリを調製する。ここで、scFv-g3p以外のファージコートタンパクはヘルパーファージより供給され、ファージゲノムとしてscFv geneを含んだpCANTAB5Eファージ

ジミドがパッケージされ、表現型(scFv)と遺伝型(scFv gene)がリンクした状態が達成される。

##### 脚注3：ヘルパーファージ

ファージディスプレイを行う場合、目的の抗体がファージ上に提示され、なおかつその抗体遺伝子をコードするファージミドベクターがファージ中にパッケージングされていなければならない。ファージミドベクターにはファージ構成タンパクとしてscFv-g3p融合タンパクのみがコードされているので、そのままではファージを形成することができない。そこで、その他のファージ構成タンパクを供給するためにファージを感染させる必要があり、そのとき用いるファージのことをヘルパーファージと呼ぶ。ヘルパーファージには数種類が報告されている。ヘルパーファージゲノムには複製起点またはパッケージングシグナルに変異があり、ファージミドベクターよりもファージ中にパッケージングされにくい。そのため、抗体を提示したファージ中には、その抗体遺伝子をコードするファージミドベクターが優先的にパッケージングされる。

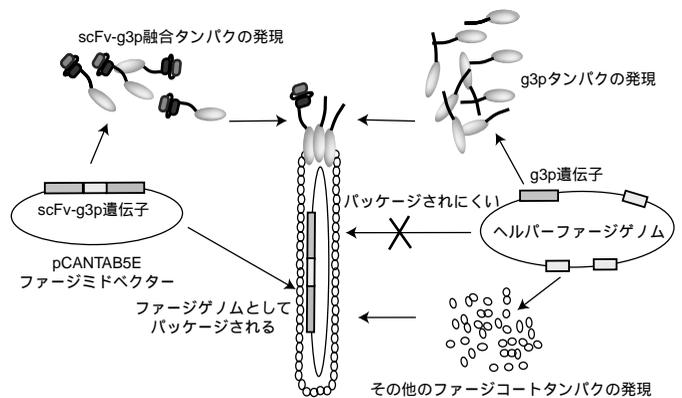


図3 ヘルパーファージを用いた抗体提示の仕組み

ここで用いているpCANTAB5Eの系ではscFv遺伝子とg3p遺伝子の境目にアンバーストップコドン(TAG)が導入されており、TG-1などのサブプレッサー変異株(sup F)で培養したときにのみアンバーストップコドンがチロシンとして読まれ、scFvとg3pが融合されファージ上に提示される。サブプレッサー変異株以外の大腸菌で培養した場合はscFvのみが発現され、大腸菌をかえることでファージへの提示と可溶性scFvタンパクの単独発現の両方が可能である。また、scFvにはC末端側にEtag(GAPVPYPDPLEPR)が融合されているため、抗E tag抗体を用いた検出やアフィニティー精製が可能である。このライブラリから標的とする抗原に対する特異的な抗体を取得するためには、後述するバイオパニングと呼ばれる操作によって、抗原に結合する特定のファージクローンを選別し、目的の抗体遺伝子の単離と決定を行う。

ファージディスプレイ抗体ライブラリの多様性が大きいと、高い親和性、特異性を有するクローンが得られる確率が大きくなるわけであるが、膨大な多様性を有するライブラリの構築にはきわめて多くの労力、コスト、時間が必要である。高い親和性を有するクローンが得られない場合、後述するアフィニティーマチュレーションを行う必要がある。

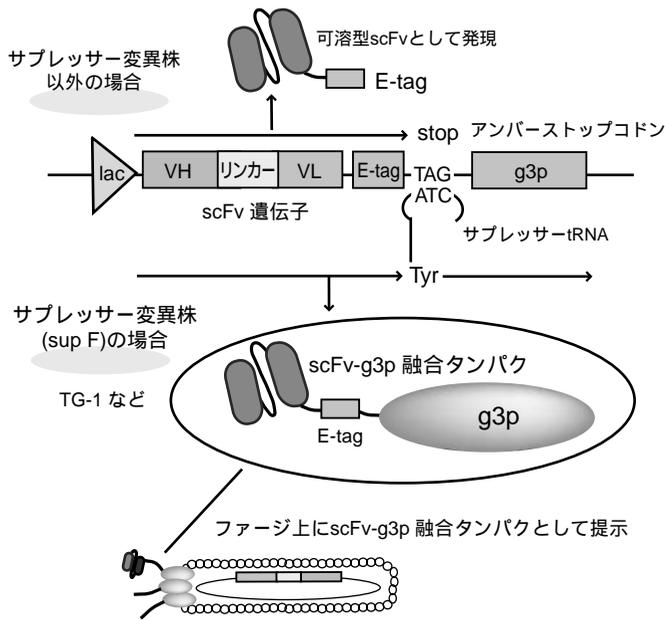


図4 scFv のファージ上への提示と可溶性 scFv 発現が一つのベクターで両立できる  
 ファージミドベクター pCANTAB5E では、アンバーストップコドンが scFv 遺伝子と g3p 遺伝子間に挿入されており、1種のベクターで大腸菌株を代えることで scFv のファージ上への提示 ( サプレッサー変異株 ) と可溶性 scFv 発現 ( 正常株 ) とを可能にしている。

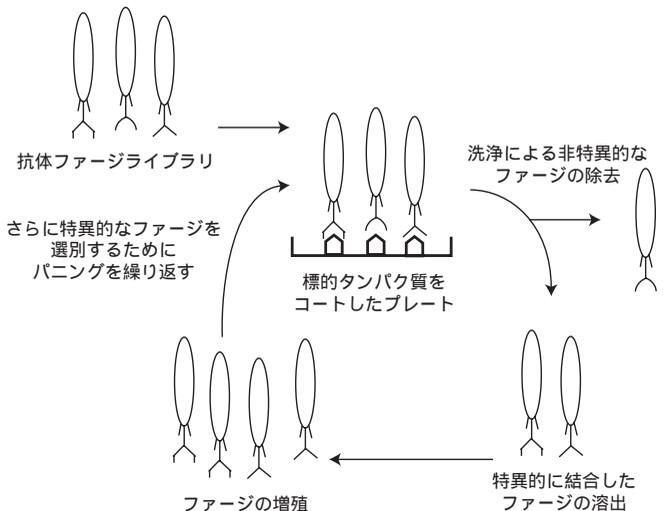


図5 抗体ファージライブラリのバイオパニング  
 標的タンパク質をコートしたプラスチックプレートに抗体ファージライブラリを反応させ、PBS/ 0.1% Tween20 で洗浄し非特異的なファージを取り除いた後、特異的なファージを 0.1M glycine-HCl(pH2.2) で溶出し大腸菌 TG1 に感染させ増幅する。この操作を数回行うことで標的タンパク質に特異的なファージを濃縮する。

## 5. バイオパニング

バイオパニングとは、抗体ファージライブラリから目的の標的タンパクに対するファージを選別する操作である。これまでに様々なパニング法が知られているが、その基本的な流れは固定化した標的タンパクに抗体ファージライブラリを反応させ、結合しなかったファージを洗浄により除去した後に、結合したファージを溶出し大腸菌に感染させて増殖させるという操作を数回行うことで標的タンパクに特異的なファージを濃縮することである。標的タンパク質の固定化法はイムノチューブなどのプラスチック表面に標的タンパクを直接吸着させる方法が最も簡便で一般的である。ただし、この方法は吸着の効率や固定化による構造変化により標的タンパクに特異的なファージが濃縮されない可能性がある。このような場合には、標的タンパクをビオチン化し、固定化されたストレプトアビジンを介して固定化することで標的タンパクの性質に関係なく、またその構造に影響を与えずに固定することができる。また、ストレプトアビジンがコートされたビーズに標的タンパクを固定化することで、より低濃度の標的タンパクでパニングを行え、このことはパニングの際に各ファージ間での競合反応を増加させ、高親和性の抗体ファージクローンの単離を可能にする。細胞表面上の分子に対するパニングを行う場合には細胞に抗体ファージライブラリを直接反応させる細胞パニングがある。これははじめに親細胞に結合する抗体ファージを吸収した後に、標的分子を強制発現させた細胞に反応させることで目的の細胞表面分子に特異的なファージを濃縮する方法である。このようにバイオパニングの標的タンパクの固定化法には様々な種類があり、標的タンパクにあった方法を選ぶことが重要である。また、抗体ファージライブラリ中で同じ解離定数 ( $K_D = K_{off}/K_{on}$ ) をもつ抗体ファージでも、ゆっくり会合するがゆっくり解離するもの ( $K_{on}, K_{off}$  がともに小さいもの)、すみやかに会合するがすみやかに解離するもの ( $K_{on}, K_{off}$  がともに大きいもの) とがある。前者は ELISA 法や western blotting 法のようにリガンドターゲット複合体を未反応のリガンドおよびターゲットから分離する操作 (B/F 分離: bound/free 分離) が必要な用途に適しており、セクション時に抗体ファージライブラリーと固相ターゲットの反応後、長時間洗浄して  $K_{off}$  が大きな抗体ファージを排除することで選択することができる。これは off-rate selection と呼ばれる。後者は B/F 分離が不要な用途に適し、ライブラリーと固相ターゲットの反応時間を短くして  $K_{on}$  が大きな抗体ファージを優先的に回収することで選択することができる。こちらは on-rate selection と呼ばれる。このようにセクションの手法は、単離した抗体の用途に応じて考える必要がある。

## 6. 抗体エンジニアリング

### 6.1 scFv(一本鎖抗体)から IgG へ

抗体ファージライブラリから得られた scFv を臨床で用いる場合には、そのフォーマットが活性に大きな影響を与える。scFv は完全抗体に比べ分子量が小さいことから組織への浸透効率がよいということが報告されているが<sup>14)</sup>、完全抗体は生体内での安定性・結合親和力の増加、エフェクター機能の付加などのメリットがあり、抗体を生体内で長期間作用させたり、膜上に標的分子を発現

している細胞を除去したい場合にはscFvを完全抗体へ変換したほうが有利である。また、完全抗体へ変換後は、リンカーの除去や発現系が大腸菌から動物細胞にかわることから結合活性がなくなる場合もあるが、変換後の結合特異性は75%という高い確率で保持されたという報告もされている<sup>15)</sup>。

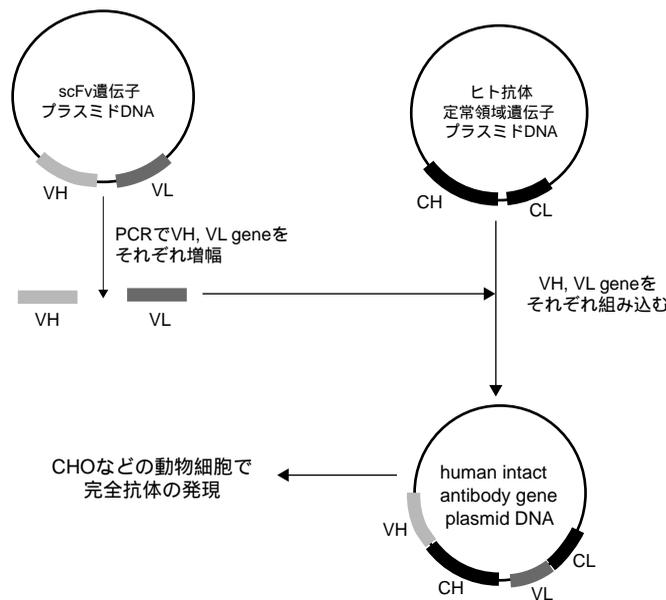


図6 scFv から完全抗体への変換  
抗体ファージライブラリから選別された標的タンパクに特異的な抗体から完全抗体へ変換する基本的な流れを示した。抗体のVH, VL遺伝子をPCRで増幅した後、あらかじめヒトの抗体遺伝子の定常領域の遺伝子が組み込まれた動物細胞発現用のベクターに組み込む。その後CHOなどの動物細胞にトランスフェクションし、完全ヒト抗体を発現させる。

scFvから完全抗体への変換の大まかな流れは図示してあるようにscFv遺伝子を含むプラスミドベクターからVHとVLの遺伝子をPCRにより増幅し、抗体の定常領域遺伝子があらかじめ組み込まれているプラスミドベクターに導入し、CHOなどの動物細胞で発現させる方法である。このように抗体ファージライブラリから単離されたscFvの完全ヒト抗体への変換法はほぼ確立してきており、完全ヒト抗体を医薬品として用いることは現実性をおびてきている。

## 6.2 アフィニティマチュレーション

### 6.2.1 アフィニティマチュレーションの目的

一般的に有用な抗体は高い親和性、特異性を有している。パンニングによって目的の分子に結合する抗体が単離できたとしても、その親和性が低いために実用に適さない場合がある。そのような場合、以下に述べるアフィニティマチュレーション (Affinity maturation :抗体親和性成熟)によって親和性を高めることが可能である。

### 6.2.2 生体内でのアフィニティマチュレーション

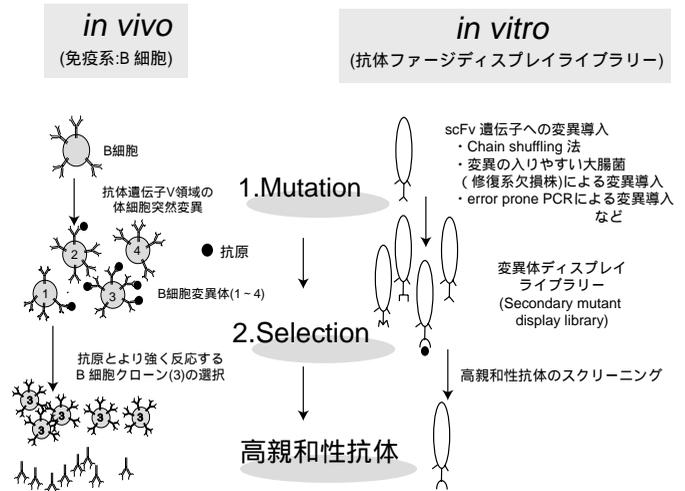


図7 生体内アフィニティマチュレーションと *in vitro* アフィニティマチュレーションの比較

免疫系では、抗原による刺激が繰り返されることでより強い抗体が産生されるようになるというアフィニティマチュレーションの存在が古くから知られている。アフィニティマチュレーションにより抗体の親和性を高めることで、免疫系はより効率的に病原体を排除できるようになる。このアフィニティマチュレーションは大きく分けて2つのステップからなる。1つ目のステップは抗体遺伝子への変異の導入である。B細胞では抗原刺激が繰り返されると、抗体遺伝子V領域に高頻度に突然変異が導入されることがわかっており体細胞突然変異(Somatic hypermutation)と呼ばれている。2つ目のステップは、体細胞突然変異によってできたB細胞変異体から親和性の強いクローンの選択で、より抗原と強く反応したB細胞クローンが選択される。

### 6.2.3 *in vitro* アフィニティマチュレーションの実態

*in vitro*アフィニティマチュレーションは、免疫系が採用している2つのステップを模倣して行われている。1つ目のステップである抗体遺伝子への変異導入の方法としては、chain shuffling 法、修復系を欠損し変異を起こしやすい大腸菌<sup>16)</sup>やエラーブローンPCRを用いたランダム変異導入法(random mutagenesis)、CDR walking などがある。2つ目のステップであるセレクションは、変異導入によってできた二次変異ライブラリ(secondary mutant library)からの高親和性抗体のスクリーニングである。例えば、1)セレクションに用いる抗原量を低濃度にして高アフィニティの抗体ファージを回収する方法、2)洗浄条件を厳しく設定し抗原からはずれにくい( $k_{off}$ が小さい)抗体ファージを回収する方法、3)拮抗反応を利用した方法などが考えられる。しかしながら、この上記の方法にはいくつかの問題点がある。それは最終的に高親和性抗体を得るまでに以下に示すようないくつかの複雑なステップがあり、時間と労力を要することである。1)リンパ球およびハイブリドーマ等から抗体遺伝子をファージミドベクターへ組み込みライブラリ化する必要がある。2)このライブラリから目的のクローンを選別する。3)さらに選別されたクロー

ンに遺伝子工学的改変を加え二次変異ライブラリを構築する。4) 二次変異ライブラリから高アフィニティー抗体を選択する。5) 得られた高親和性抗体分子を F<sub>ab</sub> または whole IgG 等へ変換し、大量に調製するための発現系構築が必要である。これにかわって、もし、抗体産生に用いられるハイブリドームで直接アフィニティマチュレーションができれば極めて有用で容易な手法となるであろう。

## 7. ファージライブラリとファージ抗体の特長

### 7.1 多様性は無限

これまで「抗体は動物を免疫して作製する」のは「あたりまえのこと」である。しかしこの手法では、糖鎖、脂肪、脂質、低分子を標的とする、理想的な特異抗体がなかなか採れないか、ほとんど不可能な場合が多い。おそらく高等動物の糖鎖の類似性ゆえ、免疫される動物自身がすでに、自己の分子としてトレランスにあるからと推察できる。一方ファージライブラリは、ヒト抗体の V 遺伝子をランダムに組み合わせ結合させ、それがそのまま *in vitro* での免疫系を再現するため、免疫学的な自己と非自己の選別過程を経ることがない。すなわち、正真正銘、この免疫システムはほぼ無限大の特異性を含有している。この scFv の多様性を利用して、コンフォメーションを識別する抗体の作製も試みられ、最近の Franck Perez (Inst. Curie) の報告では活性化型 GTP 結合 Rab と不活性化型 GDP 結合 Rab 分子のコンフォメーションを認識する scFv 抗体をもちて living cell 中の Rab 分子の一分子イメージングに成功している<sup>17)</sup>。抗体を作製するのに「動物を免疫するという操作」が必要な手法では、このファージライブラリの特性を乗り越えることができない。特に生体内の分子を標的とする抗体医薬開発にとって、この特性は強調されていると思われる。

### 7.2 超高速

私どもの研究を例に述べる。ハブ咬傷による被害は奄美大島をはじめとして年間約 200 名程度であり、その抗血清は馬で作製され、しかもその抗毒素活性は不完全で筋壊死を阻止できない。ハブ毒は多数の毒性酵素の混合物であり、馬抗血清の欠点を補うヒト抗体をファージライブラリで単離することを行った。この研究では、多数の抗原の混合物であるハブ毒を SDS-PAGE で分離し、そのゲルを 1 mm ずつスライスし、96 穴 ELISA プレートに少量の緩衝液とともに入れ一晩放置し、そのウエルにファージライブラリを添加しバイオパニングを行い、標的のバンドに特異的な抗体ファージを単離できることを明らかにした<sup>18)</sup>。これは、抗原の精製、免疫、細胞融合、ハイブリドームのクローニング、特異性のスクリーニングの全プロセスを省いて、数日間で達成できることを示している。

### 7.3 抗毒素

上述の研究のように毒物に対する抗体を作製する場合、通常は免疫される動物に致死的にならないように細心の注意を払いながら免疫操作をおこない、抗血清を作製する。しかし、ファージライブラリでは、標的抗原をプラスチックプレートに固定化し、単純にバイオパニングを行うことで抗体を作製することができる。

### 7.4 感染症と scFv

感染症にはモノクローナル抗体では十分な効果が期待できず、

ポリクローナル抗体を必要とするというのが、これまでの経験にもとづいた考え方である。昨年 San Diego で開催された抗体エンジニアリングの会議で、Bioterror 対策では scFv が重要であるという 2 つの研究結果が報告された。ともに米国政府主導の感が強いが、Kathrine Bowdish (Alexion Antibody Technologies) が炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) の感染を阻止する抗体作製、また James D Marks (UCSF) は Botulinum neurotoxin に対する抗毒素抗体の作製について、ファージライブラリを用いて scFv を単離し、Fab, あるいは IgG に抗体エンジニアリングを行い、2 つ以上のエピトープの異なる抗体をまぜることで、感染予防が成立することを明らかにした<sup>19,20)</sup>。ちなみに感染実験には Abgenix が開発したヒト抗体遺伝子を組み込んだマウスが用いられた。これらの研究成果は、ファージ抗体ライブラリと抗体エンジニアリングとヒト抗体遺伝子マウスの 3 つの要素が揃えば、ほぼ完全なヒトの感染免疫実験系で研究開発を進めることができることを示している。ファージライブラリを使えば、これまでの手法以上にエピトープの異なる多数の抗体を容易に確立することができ、今後の感染予防や阻止治療薬の開発に大きい影響を与えられる。このようにファージライブラリ法はこれまでの「免疫」についての常識を超えた革命的な特長を有している。

## 8. ディスプレイトテクノロジーの現状

最後に「抗体医薬」からは少し外れるが「医療」への貢献という観点から ディスプレイトテクノロジーの先端を簡単に紹介したい。ヒトに投与する抗体医薬の場合はできるかぎりナチュラルであることが必須であるが、診断等で標的分子に特異的な素子を開発するとその人工化に制限はない。この領域も激しく進展している。その性状には、熱安定性、低分子化、大量生産、低価格等の特性が求められる。抗体 V 領域の 3 次構造と類似の構造 (scaffold) 分子を利用し、そのループ形成部分をランダム化もしくは抗体 V 遺伝子の CDR3 を組み込むことにより人工抗体が作製されている。Protein A を抗体化して Affibody<sup>21)</sup>、GFP を抗体化した光る抗体 Fluorobody<sup>22)</sup>、fibronectin の domain 10 を抗体化した Minibody<sup>23)</sup>、ペプチドミミック分子と抗体の融合分子、Pepbody<sup>24)</sup> などはその例である。標的的特異的素子の開発は RNA ライブラリーでも目覚ましい進展がみられており、Aptamer (RNA の阻害剤) と Antidote (aptamer の相補配列 RNA で aptamer の除去剤<sup>25)</sup>)、RNA の光学異性体 (enantio-RNA) を利用した Spiegelmers<sup>26)</sup> などが報告されている。関連する境界領域の拡大はさまざまに、Angela Belcher (MIT) らが報告した「繊維状ファージ抗体の自己組織化を利用したカーボンナノチューブの作製」<sup>27)</sup> など、そのアイデアの斬新性と革新性、そしてその進展の速度は驚異的である。

## 9. おわりに

ヒトゲノム解析が終了し、疾病における標的分子の上限が予測可能な現在、国際的にはこの領域の重要性から欧米の挑戦はさまざま状況となっている。本稿では抗体医薬の詳細については概説しなかったが、抗 TNF $\alpha$  抗体や抗 IL-6 受容体抗体による慢性関節リウマチでの素晴らしい成果は注目されている。完全ヒト抗

体医薬開発はこの2～3年の間で急展開しており、前臨床試験を含めると既に100以上の抗体医薬の開発が進行している。

抗体医薬は、分子標的医療であるため、原因分子が明らかになっておれば、確実にその生命を救うことができる。癌のオーダーメイド医療への貢献が期待されるとともに数千万人が対象となる疾病に対する抗体医薬の貢献は計り知れない。さらに、利潤追求できないために民間企業では医薬品開発の対象にもされない数々の疾病もある。本文でも述べたが、昨年12月のSan Diegoで開かれた抗体エンジニアリングの会議では、米国政府が主導してバイオテロ対策のためのヒト抗体エンジニアリングのベンチャーを立ち上げ、バイオテロに対応している。抗体医薬は分子標的医療の典型でもあり、国際的な抗体医薬開発の勢いは標的分子がある限り続くと思われる。

#### 参考文献

- 1) G. P. Smith, *Science*, **228**, 1315 (1985).
- 2) J. D. Marks, H. R. Hoogenboon, T. P. Bonnert *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **222**, 581 (1991).
- 3) R. Gejima, K. Tanaka, T. Nakashima *et al.*, *Human Antibodies*, **11**, 121 (2002).
- 4) D. F. Gardoso, F. Nato, P. England, *et al.*, *Scand J. Immunol.*, **51**, 337 (2000).
- 5) BioInvent (Lund, Sweden), <http://www.bioinvent.com/>, ref) *Nat. Biotechnol.*, **18**, 852 (2000).
- 6) Crucell (Leiden, Netherlands), <http://www.crucell.com/>, ref) *J. Mol. Biol.*, **296**, 57 (2000).
- 7) C. Nizak, S. Monier, del E. Nery *et al.*, *Science*, **300**, 984 (2003).
- 8) M. Welschof, P. Terness, F. Kolbinger, M. Zewe, G. Opelz, *J. Immunol. Methods.*, **179**, 203 (1995).
- 9) M. Welschof, M. Little, H. Dorsam, *Methods Mol. Med.*, (1997).
- 10) R. Orlandi, D. H. Gussow, P. T. Jones, G. Winter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3833 (1989).
- 11) J. D. Marks, M. Tristem, A. Karpas, G. Winter, *Eur. J. Immunol.*, **21**, 985 (1991).
- 12) M. J. Campbell, A. D. Zelenetz, S. Levy, R. Levy, *Mol. Immunol.*, **29**, 193 (1992).
- 13) C. F. Barbas III, *et al.*, *IRL Press(Oxford)*, **1** (1996).
- 14) D. E. Milenic, T. Yokota, D. R. Fipula, *et al.*, *Cancer Res.*, **51**, 6363 (1991).
- 15) K. Barbara, R. Robert, R. Silke, *et al.*, *J. Immunol. Methods*, **254**, 67 (2001).
- 16) N. M. Low, P. Holliger, G. Winter, *J. Mol. Biol.*, **260**, 359 (1996).
- 17) C. Nizak, S. Monier, del E. Nery E., *et al.*, *Science*, **300**, 984 (2003).
- 18) 國料秀勇, 伊東祐二, 米澤弘夫, 杉村和久, ハブ毒中の筋壊死因子に対する中和抗体の作製, *ファルマシア*, **39** (2), S150 (2003).
- 19) K. Bowdish San Diego Meeting.  
<http://www.alxnsd.com/company/testimonials/04042003.html> : Testimony at House Committee on USA Government, April 4, 2003.
- 20) A. Nowakowski, C. Wang, D. B. Powers, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11346 (2002).
- 21) K. Nord, O. Nord, M. Uhlen, *et al.*, *Eur. J. Biochem*, **268**, 4269 (2001).
- 22) I. S. Kim, J. H. Shim, Y. T. Suh, *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1148 (2002).
- 23) V. Batori, A. Koide, S. Koide. *Protein Eng.*, **15**, 1015 (2002).
- 24) E. Lunde, V. Lauvrak, I. B. Rasmussen, *et al.*, *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, **500** (2002).
- 25) C. P. Rusconi, E. Scardino, J. Layzer, *et al.*, *Nature*, **419**, 90 (2002).
- 26) B. Wlotzka, S. Leva, B. Eschgfaller, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8898 (2002).
- 27) A. M. Belcher. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6946 (2003) *ibid*, phage-based electronic and magnetic materials, Cambridge Healthtech Institute 's Fourth Annual Molecular Display, Boston, May 11, (2003).

#### 一般参考書

- ・ O'Brien P., *et al.*, *Antibody Phage Display-Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Vol. 178 (Humana Press Inc, 2002).
- ・ R. Kontermann & S. Dübel, *Antibody Engineering*, Springer Lab Manuals (Springer, 2001).
- ・ C. Barbas, *et al.*, *Phage Display: Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).
- ・ 杉村和久, 伊東祐二, 本格化する抗体医療: 抗体エンジニアリングと抗体医療のすべて, *バイオベンチャー*, **2** (4), 28 (2002).
- ・ 伊東祐二, 田中孝一, 橋口周平, 杉村和久, ヒト抗体エンジニアリングと分子標的医療, *バイオインダストリー*, **34**, 2003年7月号
- ・ 杉村和久, 橋口周平, 伊東祐二, フェージディスプレイ法 *Molecular Medicine*, **40** (10), 1150 (2003).
- ・ *Molecular Medicine*, **40** (10), 1166 (2003).

#### 著者紹介

氏 名: 杉村 和久 (Kazuhisa Sugimura)

年 齢: 55 歳

所 属: 鹿児島大学工学部生体工学科 教授

連絡先: 〒 890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元 1-21-40

TEL: 099-285-8345 FAX: 099-258-4706

E-mail: kazu@be.kagoshima-u.ac.jp

出身校: 1978 年大阪大学医学部医学研究科博士課程修了後、Harvard Univ. Med. Sci. へ留学

研究テーマ: 遺伝子工学を用いた免疫病の治療および診断法の研究開発

氏 名: 濱崎 隆之 (Takayuki Hamasaki)

年 齢: 25 歳

所 属: 鹿児島大学理工学研究科物質生産工学専攻 博士後期課程

連絡先: TEL: 099-285-8347 FAX: 099-258-4706

E-mail: hamasaki@be2.be.kagoshima-u.ac.jp

研究テーマ: IL-18 シグナルを阻害するヒト抗体の作製

氏 名: 吉永 圭介 (Keisuke Yoshinaga)

年 齢: 25 歳

所 属: 鹿児島大学理工学研究科物質生産工学専攻 博士後期課程

連絡先: TEL: 099-285-8347 FAX: 099-258-4706

E-mail: keisuke@be2.be.kagoshima-u.ac.jp

研究テーマ: 抗体のアフィニティマチュレーションに関する研究

# ケミストからみた ポストゲノム 9

～ペプチドアレイ～

九州大学工学研究院応用化学部門

片山 佳樹

## 1. はじめに

前回までに様々なプロテインアレイに関してご紹介した。タンパク質は多彩な環境でそれぞれ特異性を持って働く機能性分子であり、かつ、多対多で相互作用する分子である。したがって、プロテインアレイの実現は非常に困難を伴い、また、実現できたとしても、正確な発現量、あるいは機能の解析はさらに難しい問題である。アレイのように多検体を一度に取り扱える技術としては、たとえばビーズ上に分子を合成してライブラリーを作成するコンビナトリアルケミストリーがある<sup>1)</sup>。この場合、one bead one compound法を用いれば、アレイに比べさらに多くの分子ライブラリーをスクリーニングできるが、得られた特定ビーズ上の分子が何であるかは分からないため、特定のビーズがセレクトできた後、ビーズ上の分子を同定しなければならない。これに対し、アレイでは、初めから各場所に固定された分子は何かまで分かっているので、多検体を用いるスクリーニング法としてはより、魅力的である。コンビナトリアルケミストリーを含め、このような固定化された多検体を用いるアプローチは、本来小分子のためのものである。したがって、タンパク機能などの解析においても、より安定に取り扱える小分子をアレイ化の方が現実的であろう。この考えに立つと、タンパクの断片であるペプチドを用いるアレイは、非常に興味深いものである。ただし、短いペプチドにそのままタンパクの機能を持たせることは不可能であるから、ペプチドアレイの用途は、プロテインアレイとはまた別のもとなる。今回は、ペプチドアレイの現状と用途について解説する。

## 2. ペプチドの固定化

ペプチドを基板上に固定化するには、(1) ペプチドを同一の形態で(特異的に)固定化する、(2) 各ペプチドの固定化環境は同一にする、(3) 目的の反応を阻害しない、(4) 周囲に非特異吸着を起こさない、などが必要である。各種のペプチド固定化法をFig.1に示した。ガラス表面に種々の反応性基を導入することになるが、その際、まずガラス表面をピラニア溶液などで洗浄しておき、アミノプロピルトリエトキシシランで処理して表面にアミノ基を導入し、これを基に各種の固定化のための修飾を施していくのが最も一般的である。初期の固定化法では、ガラス上などに活

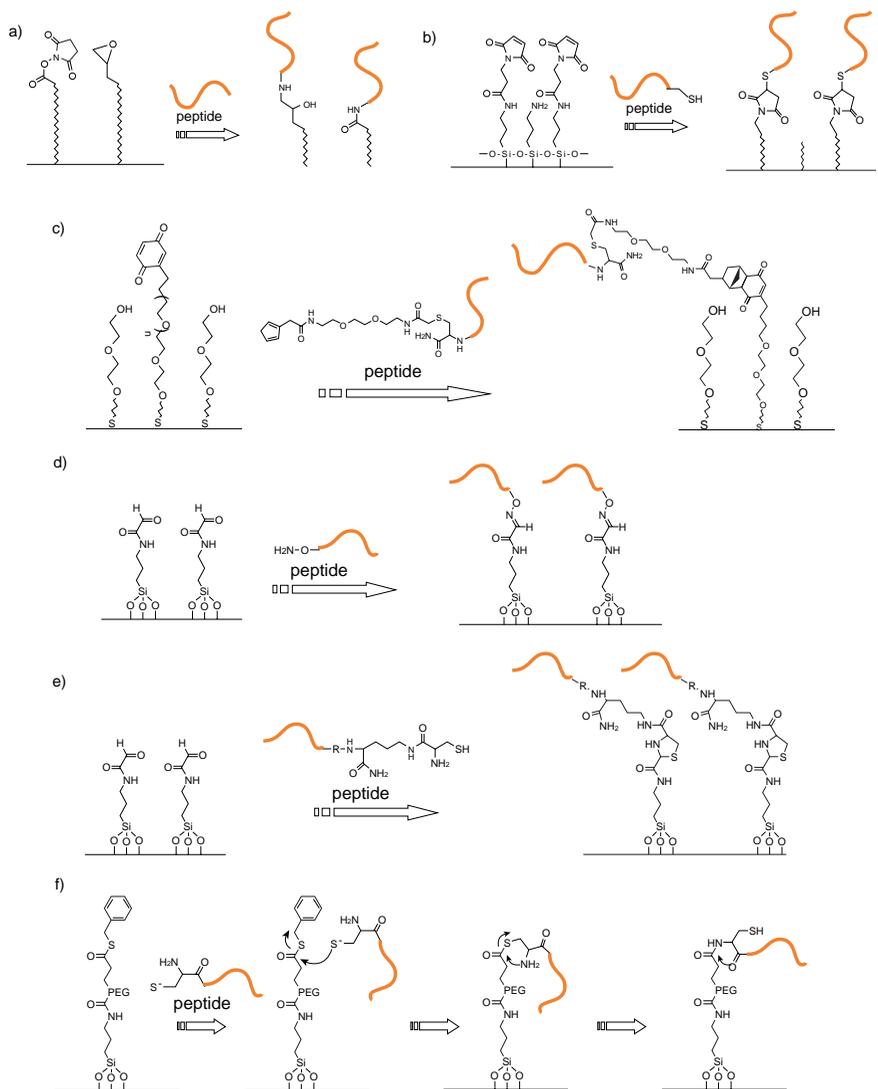


Fig.1 Various methods for peptide-immobilization

(a) activated ester or epoxide modified support, (b) maleimide-modified support, (c) cyclopentadienyl-modified peptide is immobilized with Diels-Alder reaction, (d) immobilization through Schiff-base using formyl-modified support and aminoxy-peptide, (e) peptide is immobilized through thiazoline-ring formation, (f) thioester-modified support and native chemical ligation

性エステルやエポキシドを修飾しておいて、アミノ基を介してペプチドを固定化するもの(Fig.1 (a))があるが、この場合、ペプチド配列にリシンなどの塩基性アミノ酸が存在すると、ペプチドの固定化位置が特定できなくなってしまう。MacBeathらは、マレイミドでガラス表面を修飾し、ペプチド末端にシステインを配して、マイケル付加反応によりペプチドを固定化する方法を報告している(Fig.1 (b))<sup>2)</sup>。この場合、ペプチド内に他のシステインがない限り位置選択的に固定化できる。その他には、シクロペンタジエンをペプチドに導入し、基板表面に修飾したキノンとの間でディールスアルダー反応を起こさせてペプチドを結合する方法がある(Fig.1 (c))<sup>3)</sup>。この場合、反応はシクロペンタジエン部位のみ起こるので位置選択的である。ただし、本来のペプチドには存在しないシクロペンタジエン環を用いるため、その影響が懸念される。その他に、ビオチン標識ペプチドをアビジン表面に固定する方法もある<sup>4)</sup>。一般的ではないが、ビオチン-アビジン相互作用は極めて強力であるので、スポットした瞬間に固定化でき、長いインキュベーション時間が必要ない。

アミノ基を用いる位置選択的固定化法としては、種々の方法で基板表面にホルミル基を導入し、オキシアミノ基を末端に結合したペプチドをシッフ塩基により結合する方法もある(Fig.1 (d))<sup>5)</sup>。基板表面をホルミル化するには、前述のアミノプロピルトリエトキシシランで表面をアミノ基修飾しておき、Fmoc-Ser(tBu)をペプチド結合で導入し、トリフルオロ酢酸などで脱t-ブチル化後、過ヨウ素酸酸化するか、アセタール型に保護したグリオキシル酸を導入して酸加水分解で脱保護する。ただし、シッフ塩基による結合は条件によっては不安定である。そこで同じくホルミル基を用い、ペプチドにリンカーを介してシステインをカルボキシル基で結合し、アミノ基とスルフヒドリル基を残しておいて、ホルミル基との間でチアゾリン環を形成して固定化する手法が開発されている(Fig.1 (e))<sup>6,7)</sup>。ただし、固定化する際に立体的にかさばったチアゾリン環による固定化は、ペプチドの配向を限定してしまうことも考えられる。そこで、基板側をベンジルチオエステルで修飾しておき、同様に末端システインを持つペプチドあるいはペプチド誘導体と反応する手法が考案されている(Fig.1 (f))<sup>4)</sup>。この場合、まず、システインのチオールがエステル交換で結合し、その後、システインのアミノ基側が再攻撃してペプチド結合する。これにより、ペプチド配列中に塩基性アミノ酸残基があっても、末端のシステインのアミノ基が選択的に基板に固定化されることになる。

以上のような基板上へのペプチドの固定とは別に、セルロース膜上にアレイ状に好みの配列のペプチドを合成していく手法もある<sup>7-9)</sup>。これは、SPOT合成と呼ばれ、DNAチップにおけるAffymetrix社のアプローチのようなものである。この手法は、上述のアプローチに比べると得られるライブラリーの集積度は小さいが、それでも1つのメンブレン上に数百から数千種類のペプチドを提示できる。ただし、その他の部分には化学修飾していないので、この部分の非特異吸着を抑えるために、ブロッキングがより重要である。

### 3. 非特異吸着を抑えるブロッキング

ペプチドを固定化しても、その他の部分に反応溶液中の成分が非特異吸着すると使用に耐えなくなるから、ペプチドを固定化した部分以外は、何らかの形でこれを抑制する方法が必要である。その場合、別にブロッキング剤を用いる方法とペプチドを固定化しない部分を別の分子で修飾する方法がある。前者の場合、ブロッキング剤としてBSAが最も一般的である。ELISAの様に検出時に酵素反応を用いて検出シグナルを増幅する場合は、この方法でほぼ目的を達することができる場合もある。しかし、蛍光標識による検出などでは、ブロッキング剤のみで非特異吸着を抑えて満足できる結果を得ることは困難である。この様な目的で用いられる代表的な分子はPEG誘導体である。例えば、ポリエチレングリコールをペプチド固定化部分以外に化学修飾したり、オリゴエチレングリコール部分を有する分子でSAM(自己集積膜)を形成したりする手法が報告されている。オキシエチレン鎖は、タンパクなどの生体成分の吸着を防ぐには最も優れた構造の一つである。ただし、長いPEGを用いると、その後ペプチドをスポットした場合に、スポットが広がってしまうことが報告されている<sup>5)</sup>。

## 4. ペプチドアレイの使用例

### 4-1. エピトープアレイ (Fig.2)

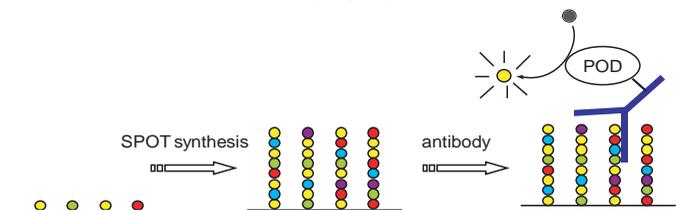


Fig.2 SPOT synthesis and epitope array for antibody-screening

ペプチドはタンパクの断片であり、ペプチドアレイは種々のタンパクの各部分を提示していると見ることができる。これを用いると、ある抗体が認識するエピトープを探索したり、特定のタンパクに結合する抗体をスクリーニングすると同時にそれが認識するエピトープ配列を明らかにしたりできる。この様な目的では、ペプチドアレイに結合するのは抗体であるから、酵素標識2次抗体を用いてELISA様の検出が利用できる。用いられるアレイは、SPOT合成によるものが普通である。エピトープ探索の例では、セルロースメンブレン表面をエビプロモヒドリンと両末端アミノ化テトラエチレングリコールでアミノ化して、その上に15merペプチドを5520種類合成した例がある<sup>10)</sup>。これを用い、HIVのp24に対する抗体など、いくつかの抗体のエピトープやミモトープを予想している。検出は、POD標識2次抗体を用い化学発光による。種々のタンパクの部分配列ペプチドをアレイ化して、特定のエピトープに結合する抗体を探索する例としては、ボルナウイルスのタンパクに対する抗体を探索したものがある<sup>11)</sup>。

#### 4 - 2 . プロテインキナーゼ基質アレイ (Fig.3)

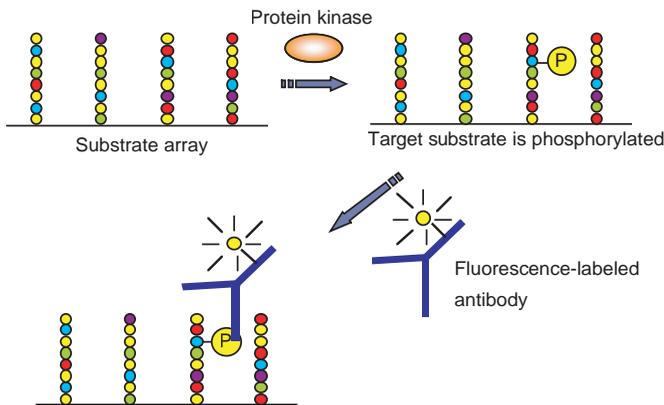


Fig.3 Peptide-array for the detection of protein kinase activity

ペプチドが機能を発揮する例としては、酵素基質ペプチドがある。一般に種々の細胞内シグナル酵素は、標的となる基質タンパクの特定部分の配列を認識して反応するから、その部分のペプチド配列を抜き出しても、ある程度の反応性と特異性を得ることができる。そこで、種々のペプチドをアレイ化すれば、特定の酵素の基質をスクリーニングできる。

その様な対象酵素としては、まず細胞内情報伝達で最も重要な役割を果たすプロテインキナーゼがある。実際に、たとえば非受容体型チロシンキナーゼであるSrc(p60)の基質ペプチドやプロテインキナーゼAの基質ペプチドをガラス基板に固定化しても、精製酵素を用いて確かにリン酸化が起こること、これを蛍光標識した抗リン酸化抗体で検出できることが示された<sup>5)</sup>。ただし、ペプチドを基板からある程度離し、さらに基質ペプチドが自由に運動できるように、基板とペプチドの間をつなぐリンカーが不可欠である。これがないと、リン酸化反応は起こらないという<sup>5)</sup>。また、Srcの基質ペプチドをアレイ化しておき、各ペプチドのスポットに、ATPとc-Srcおよび様々な濃度の種々の阻害剤候補分子を含む溶液をそれぞれ乗せていって、リン酸化反応を<sup>32</sup>P-ATPによる<sup>32</sup>Pの取り込みか、蛍光標識した抗リン酸化チロシン抗体で検出して、どの程度リン酸化が抑制されるかを評価することができる<sup>3)</sup>。この様にしてアレイを用いると、多くの候補分子を一連の濃度で一度に検定でき、4時間、37のインキュベートで直接阻害能であるKi値を求めることができる。ところが、アレイを用いて求めた値は、溶液中で求めたIC<sub>50</sub>値と比べ、50倍程度効果が優れている結果となる。これは、溶液中での実験では基質濃度が高いため、阻害剤との酵素への結合が競合することが原因である。したがって、直接Ki値を求めることはできないが、基板では、基質は表面に固定化されたものだけであり、溶液中にほとんど基質がないときの阻害剤の酵素への結合を見ることができる。例えば、基質と完全に非競合の阻害剤PP1では、溶液中で求めた値 (IC<sub>50</sub>値: 150nM、Ki値: 15nM) と、アレイで求めた値 (Ki値: 39nM) はほぼ一致する。この様に、基質アレイは、過剰の基質なしに阻害剤の効果が検定できる利点を有する。しかも、用いる酵素と阻害剤も溶液中の実験に比べ格段に少量でよい。

Yaoらは、前述のチアゾリン環を介するペプチドのシステイン末端での固定化により得られるチップの反応を検討している<sup>6)</sup>。これによると、プロテインキナーゼAとp60 (c-Src)の基質をCGG (システイン - グリシン - グリシン) 配列をリンカーとして表面に固定化し、BSAで残りの部分をブロックして、精製酵素でのリン酸化反応を蛍光標識(FITC)抗リン酸化抗体で検出するのに成功している。リン酸化基質と未リン酸化基質を各種混合比でスポットすることで、リン酸化の程度が定量できることも示している。

#### 4 - 3 . プロテアーゼ阻害剤アレイ

プロテアーゼは、プロテインキナーゼと並んで細胞内外での生理作用や多くの病態で重要な酵素活性である。ただし、前述のプロテアーゼでは、どの基質配列でも共通のリン酸基が付加するから、その後抗体などでの検出が可能であるが、プロテアーゼでは、特定の配列が切断されるから、これを共通の普遍的な手法で検出することは容易ではなく、特別なアプローチが必要である。そこで、切断ではなく、標的プロテアーゼの阻害剤をスクリーニングする目的のアレイが報告されている。この場合、標的プロテアーゼの阻害剤は、標的プロテアーゼに選択的に結合するから、これを検出する際の手がかりにするものである。

例えば、Hilpertらは、ブタすい臓のエラスターゼに対する阻害ペプチドの配列最適化を目的として、セルロースメンブレン上に

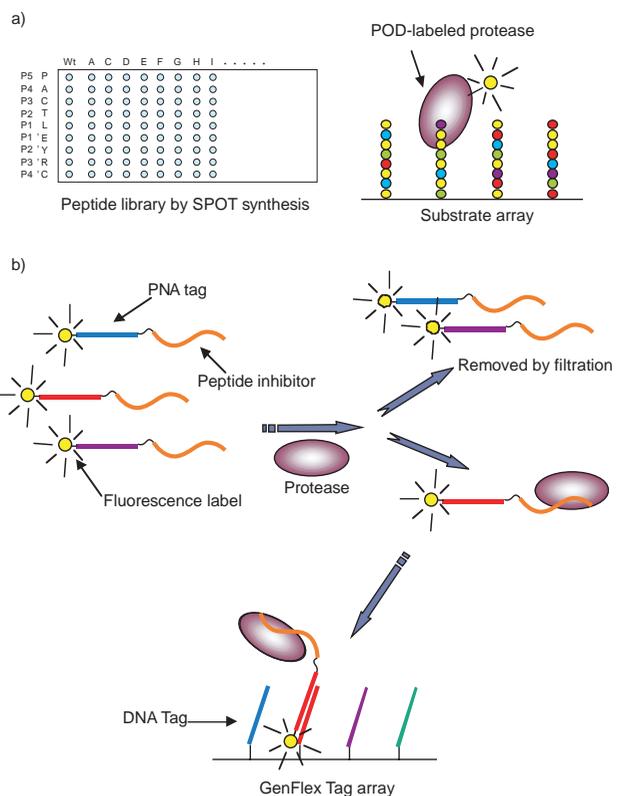


Fig.4 Peptide array for the screening of protease inhibitor

- Optimization of native protease inhibitor sequence using SPOT synthesis
- Screening of protease inhibitors using PNA-tag strategy and GenFlex array system

種々のペプチドをSPOT合成したものをを用いている(Fig.4(a))<sup>12)</sup>。阻害ペプチドとしては、仔牛キモトリプシン、ヒトリンパ球エラスターゼ、スブチリシンなど、多くのセリンプロテアーゼを阻害することが知られているオボムコイドインヒビターの第3ドメインを用いている。すなわち、阻害ペプチド、PACTLEYRC に対し、各々のアミノ酸を一箇所ずつすべてのアミノ酸に置換していったあらゆる組み合わせのペプチドをSPOT合成によりアレイ化し、これをPOD標識した標的エラスターゼで処理して、これが結合したスポットを化学発光により検出するという戦略である。これにより、阻害効果にどの位置のアミノ酸が重要であるかが一度に明らかになり、内在性のペプチド配列を元に、配列の最適化が可能となる。用いる基板がセルロースメンブレンであるから、標的プロテアーゼが結合した配列については、メンブレンのそのスポット部分をパンチアウトしてマイクロタイタープレートのウェルに切り出し、発色基質を入れて阻害効果を検定してKi値を測定することも可能である。

これに対し、Winssingerらは、PNA タグを利用している(Fig.4(b))<sup>13)</sup>。すなわち、阻害ペプチドにそれぞれ別の配列を有するPNAのタグを連結して、溶液中でプロテアーゼと反応して、プロテアーゼが結合しなかったものは、限外ろ過して除き、残ったものをAffymetrix社のGenFlex タグアレイに結合して同定する。GenFlex タグアレイは、SNP タイピングのところでご紹介したように、あらかじめ決められた種々の配列のオリゴヌクレオチドを並べたアレイで、各スポットに相補的な配列を有するDNAやPNAタグを有する分子がハイブリダイゼーションにより決められた場所に結合する。各ペプチドには、予め既知のPNAタグを連結しているから、ろ過されずに残った(すなわちプロテアーゼが結合した)ペプチドがアレイのどの部分に結合したかが検出できれば、どの配列のペプチドが標的プロテアーゼに結合したかが分かる仕組みである。PNAタグの末端に蛍光標識しておき、タグアレイ上のどこに蛍光が検出されるかを直接検出する。彼らはこれを用い、システインプロテアーゼの活性部位のシステインにマイケル付加により共有結合して阻害するペプチダクリル酸型阻害ペプチドが実際に検出できることを示している。アポトーシス実行シグナルであるカスパーゼファミリーとリソソーム内プロテアーゼであるカテプシンファミリーを阻害するペプチダクリル酸を設計し、細胞溶解液で処理したところ、カテプシン阻害剤の方は常に検出できるが、カスパーゼ阻害剤は、Jurkat細胞溶解液で、グランザイムを加えたときにだけ検出されている。グランザイムは、細胞障害性リンパ球が放出するセリンプロテアーゼで、標的細胞にアポトーシスを引き起こすため、カスパーゼが活性化され検出されたと考えられる。すなわち、活性プロテアーゼのみに結合することが分かる。

#### 4 - 4 . 加水分解酵素基質アレイ(Fig.5)

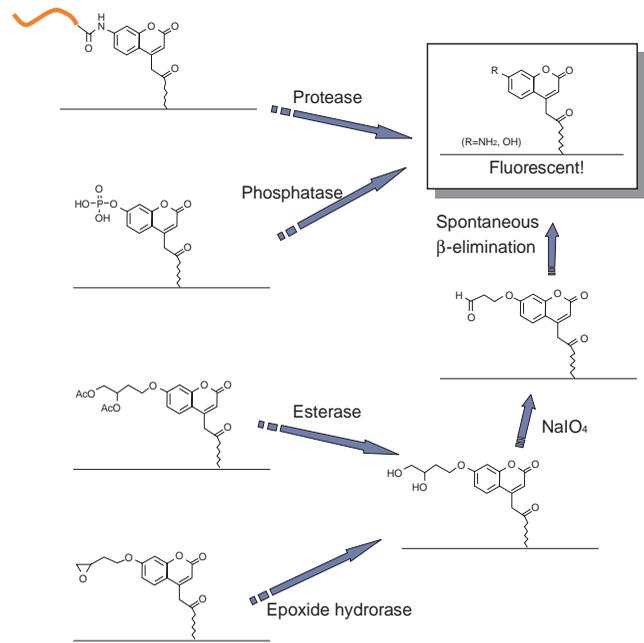


Fig.5 Strategies for detection of hydrolytic enzymes

前述のプロテアーゼアレイでは、基質をアレイ化した場合、切断されたものを検出する手段がないため、切断されず酵素が結合したままになる阻害剤のスクリーニング用アレイを目的としていたが、基質切断を検出するシステムに関して、最近報告がある。このシステムでは、基質が切断されると蛍光が増大するように分子を設計している。いずれも、基板上に蛍光分子としてアミノクマリンを固定化しておき、アミノ基に種々の基質を結合し、この結合が標的酵素に切断されることにより、アミノクマリンが生成して蛍光を発する仕組みである。このシステムを利用して、プロテアーゼ、ホスファターゼ、エステラーゼ、エポキシドヒドロラーゼの検出システムを開発している<sup>14)</sup>。溶液中で用いる加水分解酵素の蛍光基質としては同様の分子が知られているが、これを基板上に固定するというアイデアである。エステラーゼやエポキシドヒドロラーゼでは、酵素反応後、1,2 - ジヒドロキシブチル基が生成するように設計してあり、その後、これを過ヨウ素酸化してホルミルエチル基に変換して、自発的脱離してアミノクマリンが生成するというステップを用いる。アルカリホスファターゼ、トリプシン、アセチルコリンエステラーゼ、エポキシドヒドロラーゼを用いたモデル系で、基板上での検出が可能であることが示されている。彼らは、このアレイにより、内在性のリガンドや阻害剤のスクリーニングができると主張している。

## 5. おわりに

以上、ペプチドアレイに関してご紹介した。ここでは触れなかったが、この他にも、細胞接着をアッセイするものも報告されている<sup>5)</sup>。ペプチドは、基質や阻害剤、抗体エピトープのほかにも、サイトカインやホルモンなど、種々の生理活性ペプチドも知られており、これらに対する利用も可能であると考えられる。ペプチドは、安定に取り扱える生体分子としては、最も生体機能をミミックできるものであり、コンビナトリアルケミストリーのアプローチが適用できる分子であることから、アレイにすることによるメリットが最も大きい対象であるといえる。今後、ペプチドアレイを用いて、基質や阻害剤、リガンドの探索や抗体のスクリーニング、生理活性ペプチドの探索や配列最適化などの分野で大きな力を発揮することが期待される。我々も現在、細胞シグナル酵素の基質を用いるアレイの開発を手がけている。特に、酵素活性の変化は、遺伝子の発現を伴わない翻訳後修飾レベルで起こるものが多く、遺伝子発現差解析では、これらを直接調べることは不可能なだけに、今後、ペプチドアレイの重要性は大きいと考えられる。

次回は、本シリーズの最終回として、最近目覚ましい質量分析を用いたプロテオミクス的手法のご紹介する。

### 参考文献

- 1) J. Wu, Q. N. Ma, K. S. Lam, *Biochemistry*, **33**, 14825 (1994).
- 2) G. MacBeath, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 7967 (1999).
- 3) B. T. Houseman, J. H. Huh, S. J. Kron, M. Mirksich, *Nature Biochem.*, **20**, 270 (2002).
- 4) M-L. Lesaicherre, M. Uttamchandani, G. Y. J. Chen, S. Q. Yao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 2079-2083 (2002).
- 5) J. R. Falsey, M. Renil, S. Park, S. Li, K. S. Lam, *Bioconjugate Chem.*, **12**, 346 (2001).
- 6) M-L. Lesaicherre, M. Uttamchandani, G. Y. J. Chen, S. Q. Yao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 2085 (2002).
- 7) R. Frank, *Tetrahedron*, **48**, 9217 (1992).
- 8) H. Wenschuh, R. Volkmer-Engert, M. Schmidt, M. Schulz, J. Schneider-Mergener, U. Reineke, *Biopolymers*, **55**, 188 (2000).
- 9) W. R. G. Dostmann, M. S. Taylor, C. K. Nickl, J. E. Brayden, R. Frank, W. J. Tegge, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14772 (2000).
- 10) U. Reineke, C. Ivascu, M. Schlieff, C. Landgraf, S. Gericke, G. Zahn, H. Herzel, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, *J. Immunol. Methods*, **267**, 37 (2002).
- 11) C. Billich, C. Sauder, R. Frank, S. Herzog, K. Bechter, K. Takahashi, H. Peters, P. Staeheli, M. Schwemmler, *Biol. Psychiatry*, **51**, 979 (2002).
- 12) K. Hilpert, G. Hansen, H. Wessner, J. Schneider-Mergener, W. Hohne, *J. Biochem.*, **128**, 1051 (2000).
- 13) N. Winssinger, S. Ficarro, P. G. Schultz, J. L. Harris, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11139 (2002).
- 13) Zhu, M. Uttamchandani, D. Li, M. L. Lesaicherre, S. Q. Yao, *Org. Lett.*, **5**, 1257 (2003).

## お知らせ

### ホームページ Q & A 活用法

### Q & A のご紹介 (<http://www.dojindo.co.jp>)

ホームページのリニューアルに伴い、Q & A を新設いたしました。ご愛用いただいている多くの商品に対しこれまでお寄せいただいたご質問を、掲載しております。

今後も対象製品数、ご質問・回答の件数を増やしてまいります。

ご使用の製品でご不明な点は是非一度ご覧下さい。必ずお役に立てるものと考えます。

また、ご不明な点やご要望などございましたらご遠慮なく小社カスタマーサービス部へお寄せください。



### Q&A の活用法

1. ホームページの Q&A をクリックすると Q&A の画面が開きます。
2. 製品名、同仁品コード別、用途別で調べることができます。また、上部の検索欄に単語を入れて、関連用語でも検索できます。
  - ・製品名：カタログに掲載している小社の製品名です。
  - ・同仁品コード：カタログ等に載っている小社の製品のコードです。カタログ、ホームページの商品カタログ等に記載しております。
  - ・用途：小社が商品の使用目的に応じて分類したものです。
3. それぞれの項目より確認したい製品名をお探し下さい。Q&A は製品毎にまとめて載せてあります。
4. 表題より確認したい内容かをご判断下さい。表題をクリックすると詳細をご覧いただくことができます。
5. ご質問事項がない場合、お問い合わせをクリックしてフォームに入力して下さい。数日以内にご回答させていただきます。
6. お問い合わせの多い事項は、ご質問内容を参考に今後も Q & A に追加していきます。もちろんお客様の守秘事項はお守り致しますのでご安心してお問合せください。

# Topics on Chemistry

## 細胞内 1 分子イメージング技術

(株) 同仁化学研究所 竹迫 和浩

生体内で個々の分子がどのように動いているのか、見てみたいと思う科学者は多いはずである。

細胞内でのシグナル伝達機構は複雑であり、同一のシグナル伝達物質からシグナルを受ける物質が多種存在する。したがって、シグナル伝達物質の時間的・空間的局在によって、ひきおこされる現象が異なるのではないかと考えられている。各種タンパクが、核移行シグナル(nuclear localization signal)や核外輸送シグナル(nuclear export signal)を巧みに利用して、活性化・不活性化に伴ってその局在を変化させていることはよく知られている。最近では、それだけでなく、各種オルガネラ間の輸送から exocytosis に至るまでの各種輸送現象が、細胞生物学の研究対象としてクローズアップされてきている。また、タンパクに関する研究が盛んとなり、タンパクの相互作用に対する興味も、広い分野で研究の対象となっている。実際に細胞内で動いている分子を見ることができれば、輸送や局在・相互作用に関する知見が広がり、細胞内・生体内で起っている事象の解明に繋がるのではないだろうか。最近著された、細胞内分子イメージングに関する新たな報告について紹介する。

1 分子イメージングは、10 年ほど前から盛んに発展してきた技術である。全反射蛍光顕微鏡技術(total internal reflection fluorescence microscopy; TIRFM)を用いるのが主流であり、ATP 等のヌクレオチド類や、モータータンパクを初めとする各種タンパク 1 分子の挙動を見ることが出来るようになった<sup>1)</sup>。レーザートラップ技術と併せて結合力を議論したりするなど<sup>2)</sup>、空間・時間の解像度の向上だけに留まらず、手技自体も進歩を続けている。ただし、殆どが無細胞系での実験であり、生細胞内での 1 分子直接イメージングが報告されたのは、つい最近の出来事である<sup>3-5)</sup>。

佐甲らは、上皮増殖因子(EGF)を蛍光試薬で標識し、EGF 受容体(EGFR)との相互作用について考察を加えている<sup>3)</sup>。EGFR が二量体形成によって活性化され、細胞内ドメインの自己リン酸化を経てシグナルを伝達していることが分っていたが、その様子を直接イメージングしたのである。これにより、EGF 1 分子が結合することによって EGFR の二量体化が起り、次いで、更にもう 1 分子の EGF と結合する機構が明らかにされた。

多田限らは、細胞内での、mRNA 1 分子イメージングに成功した<sup>5)</sup>。ヒト グロビン遺伝子の部分配列からなる mRNA を蛍光標識し、*Xenopus* A6 細胞の核にマイクロインジェクションして、ビデオレートで観察している。静止していた輝点(つまり mRNA)が動き出すまでの時間や、動いている輝点の平均 2 乗変位等の測定から、mRNA の運動について考察を加えている。それによれば、mRNA はブラウン運動をしているが、核内の粘性だけでは説明付けられない拡散定数を示した。したがって、mRNA が、その結合タンパクと複合体を形成したり、非常に速い結合と解離を繰り返しながら拡散している可能性が示唆された。

TIRFM ではエバネッセント場に存在する蛍光分子のみ励起されるため、バックグラウンド蛍光が抑制される。逆に、界面からの距離 100 nm 程度のごく浅い領域の分子しか励起できないため、細胞のごく一部をイメージングすることしか出来ない。上に紹介した例のうち、前者は入射角を変えることにより、細胞質と培地との界面での反射を利用してイメージングを行っている。後者で

は扁平な細胞を選んで一分子観察しやすい系を作り上げている。

細胞内 1 分子イメージングは、細胞内の各種分子のダイナミクスを解明する、強い可能性を秘めている。現在では、TIRFM 蛍光顕微鏡システムは、国内メーカーから販売されている。どのような分子を見る事が出来るようになり、どのような知見が得られるか、今後の進展に興味は尽きない。

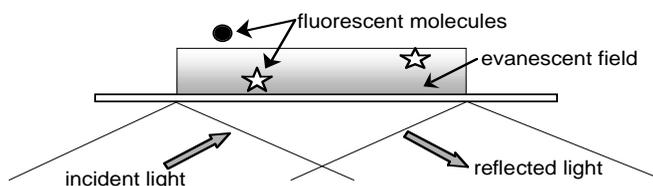


図. TIRFM の原理

励起光を、全反射する角度で入射させる。その際、ごく一部の光が、ガラスと試料(液体)の界面へと漏れ出す。このエバネッセント光は、界面からの距離に応じて指数関数的に強度を減衰させ、100nm 程度までしか到達しない。その範囲に存在する蛍光分子しか励起されないため、界面から遠い蛍光分子がノイズを与えず、低バックグラウンドでの観察が可能となる。

### 参考文献

- 1) T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, T. Yanagida, *Nature*, **374**, 555 (1995).
- 2) for example, C. Shingyoji, H. Higuchi, M. Yoshimura, E. Katayama, T. Yanagida, *Nature*, **393**, 711 (1999).
- 3) Y. Sako, S. Minoghchi, T. Yanagida, *Nat. Cell Biol.*, **2**, 168 (2000).
- 4) R. Iino, I. Koyama, A. Kusumi, *Biophys. J.*, **80**, 2667 (2001).
- 5) 多田限尚史, 船津高志, 谷時雄, 蛋白質 核酸 酵素, **48**, 421 (2003).

### 春の学会展示ご案内

次の学会において、試薬新製品の展示を行ないます。皆様のお越しをお待ちいたしております。

● 第 77 回日本薬理学会年会

3月8日(月) ~ 10日(水) 大阪国際会議場

## Q &amp; A

## 細胞染色用色素 - Cellstain -

各種色素を取り揃えた - Cellstain - シリーズは様々な色素を使い分けることにより、細胞や核の可視化や、細胞の形態やアポトーシスによるクロマチン凝縮、核の断片化などの観察が可能です。

その他、フローサイトメトリーやプレートリーダーによる細胞数の計測などにも利用されています。

Q1 それぞれの色素の蛍光特性を教えてください。

A1

	励起波長	蛍光波長
Calcein	490 nm	515 nm
BCECF	490 nm	526 nm
CFSE	496 nm	512 nm
FDA	488 nm	530 nm
CytoRed	535 nm	590 nm
MitoRed	560 nm	580 nm
Rh123	507 nm	529 nm
PI	488 nm	610-620 nm
EB	510 nm	595 nm
DAPI	360 nm	460 nm
Hoechst 33258	352 nm	461 nm
Hoechst 33342	350 nm	461 nm
AO	502 nm	526 nm(dsDNA)
	460 nm	650 nm(ssDNA,RNA)

Q2 生細胞染色色素の特徴は？

A2 細胞機能への影響が一番少ないといわれているのは

「Calcein-AM」です。(Q7 参照)

「FDA」は一番古くから知られている色素ですが、細胞からの漏出が早いといわれています。

「CFSE」は細胞内に導入後、細胞質内(細胞膜)のアミノ基と結合するため他の色素に比べ細胞外への漏出が少ないといわれています。

「BCECF-AM」は、元々細胞内のpHを測定する試薬として利用されていたものであり、生細胞を染色する色素としても利用されます。

「CytoRed」は、小社にて開発した化合物で、「Calcein-AM」よりも高い蛍光強度を示します。

Q3 核染色に使用される色素の違いは何ですか？

A3 蛍光波長以外に違いとしてあげられるものとしては以下の点があります。

「EB」塩基特異性はなく、全DNA、RNAに結合します。

「PI」「EB」と同様に塩基特異性はありますが、インターカレーションした時の蛍光強度が「EB」より高いため、より広く使用される色素です。

「DAPI」2重鎖の副溝(minor groove)と結合、アデニン-チミジクラスタに高い結合性を持っています。

「AO」2重鎖にインターカレーションしたとき、単鎖のリン酸に結合したときでは蛍光波長が異なることを利用して、2重鎖と単鎖を区別して検出できます。生細胞の細胞膜を透過します。

「Hoechst 33342」DNAのアデニン-チミジン部に特異的に結合します。生細胞の膜を透過し、生細胞のDNAを染色できる色素です。

Q4 「MitoRed」と「Rh123」はなぜミトコンドリア染色用なのですか？

A4 「MitoRed」,「Rh123」はともに「Rhodamine」と呼ばれる構造を骨格としています。この「Rhodamine」は細胞の中に入ると、ミトコンドリアに集積していく特性があるためミトコンドリア染色色素として使用されます。もちろん多量に細胞内に導入すると他の部分も染色されてしまいますので、濃度をご検討の上適量をご使用ください。

Q5 2種類の色素を同時に使用することはできますか？

A5 可能です。しかし波長が重なる色素を同時に使用することはできません。

使用例としては、「Calcein-AM」で生細胞の細胞質を染色、「PI」で死細胞の核を染色する「Double Staining Kit」があります。(小社カタログ、ホームページをご参照ください。)また、「Hoechst」で生細胞の核を染色、「PI」で死細胞の核を染色する方法もあります。

Q6 使用方法(濃度や時間)を教えてください。

A6 ホームページの「Q&A」に各試薬の使用例を、一部掲載していますのでご参照ください。

(<http://dominoweb.dojindo.co.jp/FAQkoukai.nsf/webhome/index>)

ただし、試料により最適濃度は異なります。濃度が高すぎると余分なもので染まる場合があります。

状況に応じ、最適な濃度や時間をご確認ください。

Q7 色素の細胞毒性について報告されている論文はありますか？

A7 「Calcein-AM」,「BCECF-AM」,「CFDA」,「CFSE」が細胞に与える障害活性を比較した論文がありますのでご参照ください。

L. S. D. Clerck, *et al.*, *J. Immunol. Methods*, **172**,115(1994).

Q8 細菌の染色をしたいのですが、どの色素を使えば可能でしょうか？

A8 細菌は「細胞壁」を持つため、その細胞壁を通過できない色素が多くあります。例えば「Calcein-AM」や「BCECF-AM」は細胞膜は通過できますが、細胞壁は通過できません。

細菌の染色目的に使用できる色素としては、例えば「AO(アクリジンオレンジ)」がマラリア原虫の染色として使われています。死菌ならば「PI」「EB」「DAPI」なども使用できます。

生菌染色は「FDA」の報告があります。

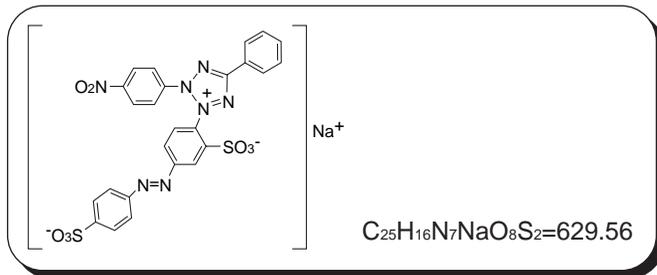
*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**,268(1992). 他

## 試作品

### 脱水素酵素の検出試薬

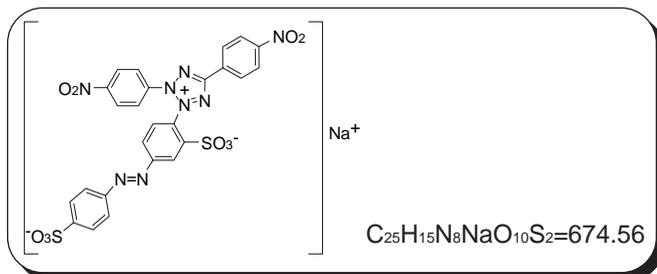
#### WST-9

化学名 2-(4-Nitrophenyl)-5-phenyl-3-[4-(4-sulfophenylazo)-2-sulfophenyl]-2H-tetrazolium, monosodium salt



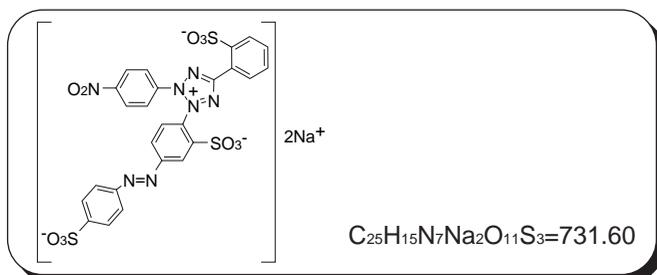
#### WST-10

化学名 2,5-Di(4-nitrophenyl)-3-[4-(4-sulfophenylazo)-2-sulfophenyl]-2H-tetrazolium, monosodium salt



#### WST-11

化学名 2-(4-Nitrophenyl)-5-(2-sulfophenyl)-3-[4-(4-sulfophenylazo)-2-sulfophenyl]-2H-tetrazolium, disodium salt



#### < 特長 >

- ・ 水溶性ホルマザンを生じる新規テトラゾリウム塩である。
- ・ WST-1 より長波長のホルマザンを生成する。
- ・ WST-4 および WST-5 より安定である。
- ・ 広範囲の波長での測定が可能である。

小社では、生体内補酵素 NAD(P)H を介した脱水素酵素活性測定用の水溶性基質として、水溶性テトラゾリウム塩 ( WST ) シリーズを取り揃えてまいりました。Fig. 1 のように、NAD<sup>+</sup> - NADH リサイクリング反応を利用することで、目的の酵素活性を高感度に検出することができます。WST はこれまで生化学検査試薬のみならず、細胞増殖・細胞毒性用 ( Cell Counting Kit、Cell Counting Kit-8 )、酸化ストレス検出用 ( SOD Assay Kit-WST )、タンパク定量用 ( Protein Quantification Kit-Wide Range ) 試薬としてご愛用頂いております。

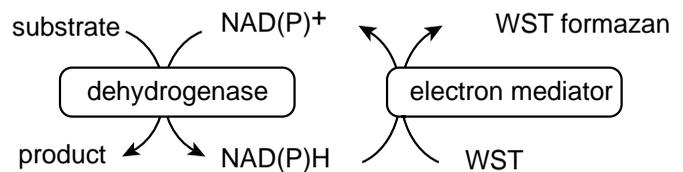


Fig. 1 WST の発色スキーム

今回、新しいタイプの水溶性テトラゾリウム塩、WST-9、WST-10、WST-11 を試作致しました。分子内にアゾ化合物を新たに導入したことで、ブロードなホルマザンの吸収スペクトルが得られました ( Fig. 2 )。そのため広範囲の波長での測定が可能です。WST は水溶液中で 25 ℃、1ヶ月以上安定であり、1-Methoxy PMS 存在下、NAD(P)H により容易に還元され、安定なホルマザンを生成します ( Table、Fig. 2 )。ホルマザンは高水溶性で ( 水に対する溶解度 : 0.5 mol/l ) 測定セルおよびチューブ等へ沈着しないため、自動分析器、プレートリーダー等、汎用機器を用いたアッセイにご使用いただけます。

Table pH8.0 での各水溶性ホルマザンのモル吸光係数 ( )

formazan	( $\epsilon_{max}$ )
WST-9	$1.6 \times 10^4$ (479 nm)
WST-10	$1.0 \times 10^4$ (530 nm)
WST-11	$3.8 \times 10^4$ (474 nm)

試作品

脱水素酵素の検出試薬

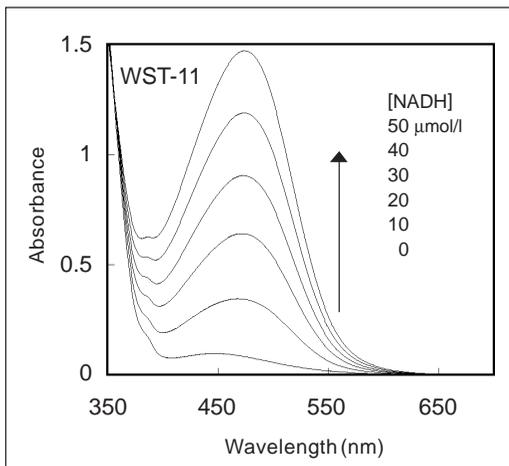
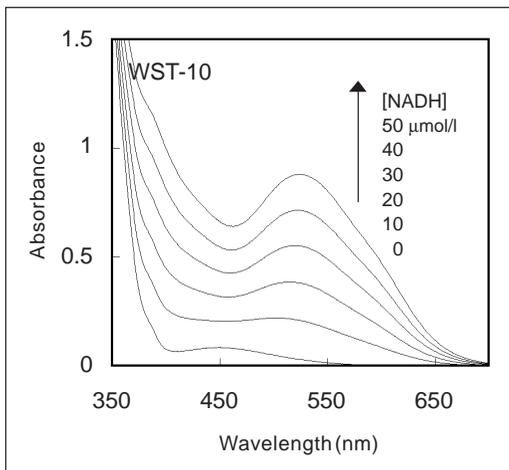
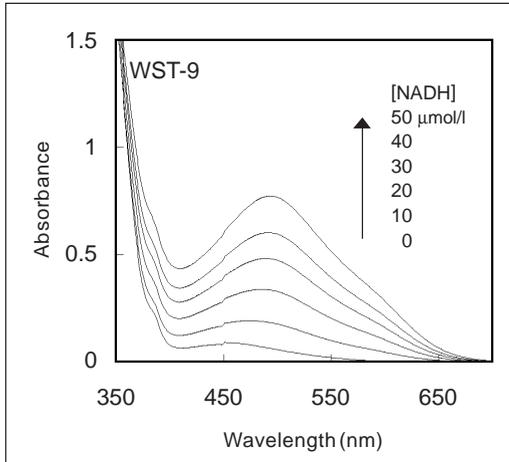


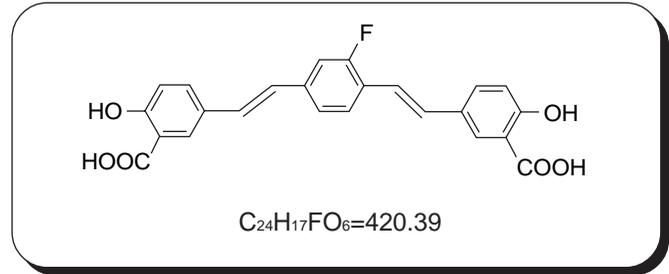
Fig. 2 各水溶性テトラゾリウムホルマザンの吸収スペクトル変化  
各WST(100 μmol/l)を1-Methoxy PMS(5 μmol/l)存在下、25℃、pH8.0  
溶液中でNADH(0, 10, 20, 30, 40, 50 μmol/l)と反応させた時の吸収ス  
ペクトル変化である。

試作品

アミロイド染色用蛍光色素(1% FSB in DMSO)

FSB solution

化学名 1-Fluoro-2,5-bis(3-carboxy-4-hydroxystyryl)benzene,  
1% DMSO solution



<特長>

- ・アミロイドに対して高い親和性をもつ。
- ・蛍光強度が従来のBSBの約2倍である。
- ・溶液タイプのため、染色が容易である。

アミロイドーシスはアミロイド(シート線維構造を持つタンパク質)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、常染色体優性遺伝で起きる「遺伝性アミロイドーシス」および慢性疾患や糖尿病などに合併してみられる「続発性アミロイドーシス」など多くのタイプがあります。また、この病気は全身の様々な部分にアミロイドが沈着する「全身性アミロイドーシス」と脳や皮膚など特定の部位にアミロイドが沈着する「限局性アミロイドーシス」にも分類され、これらはアミロイド前駆タンパクの違いによりさらに細分類されています。

すでに小社で販売しているBSBは、全身性アミロイドーシスの沈着アミロイドを鋭敏に染色することが知られています<sup>1)</sup>。in vivoの系においても全身性アミロイドーシスの1つである二次性アミロイドーシスを誘起したトランスジェニックマウスにBSBを静注すると、沈着アミロイド部分にBSBが集積していることが確認されています<sup>2)</sup>。他にも、限局性アミロイドーシスの1種であるアルツハイマー病の研究において、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時間後の脳組織の老人斑(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<sup>3)</sup>。また、BSBには染色だけでなく、遺伝性の全身性アミロイドーシスである家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)のアミロイド前駆体TTRのアミロイド形成を阻止する働きがあることもわかっています<sup>1)</sup>。

FSBはBSBの臭素をフッ素に変えて重電子効果による蛍光消光をなくすことで、アミロイドの高感度蛍光染色を可能にしました。アルツハイマー病患者の脳組織(Fig.1)およびFAP患者の心臓組織(Fig.2)の染色結果において、FSBはBSBより鋭敏にアミロイド沈着部分を検出しています。

FSBはBSBとほぼ同じ骨格であるため、蛍光強度以外はBSB

## 試作品

### アミロイド染色用蛍光色素(1% FSB in DMSO)

その特性をそのまま有していると考えられます。このことから *in vivo* で BSB より高感度検出が可能となり、今後の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。

#### 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% FSB 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 調整できます。

#### 1. FSB 染色液の調整

製品に 50% エタノールを加えて希釈し、0.01 ~ 0.0001% の濃度にする。

#### 2. 染色

切片を FSB 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% エタノールにて軽く洗う。

#### 3. 観察

UV 光(V 励起)にて観察する。

#### 取扱方法

購入後は必要に応じて小分けして冷蔵保存して下さい。

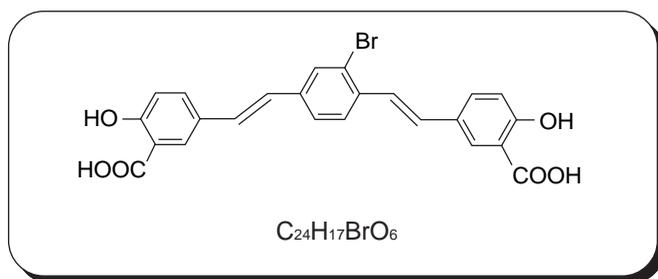
#### 参考文献

- 1) 安東 由喜雄, *Dojin News*, **104**, 1 (2002).
- 2) Y. Ando, Y. Tanoue, K. Haraoka, K. Ishikawa, S. Katsuragi, M. Nakamura, X. Sun, K. Nakagawa, K. Sasamoto, K. Takesako, T. Ishizaki, K. Doh-ura, *Lab. Invest.*, **83**, 1751 (2003).
- 3) D. M. Skovronsky, B. Zhawng, M.-P. Kung, H. F. Kung, J. Q. Trojanowski, V. M.-Y. Lee, *Proc. Natl. Acad. Soc.*, **97**, 7609 (2000).

## 関連商品

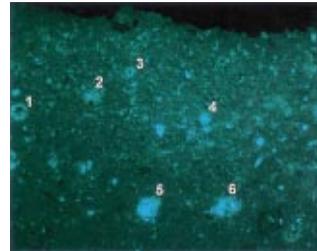
### BSB solution

化学名 1-Bromo-2,5-bis(3-carboxy-4-hydroxystyryl)benzene,  
1% DMSO solution



品名	容量	価格( ¥ )	メーカーコード
BSB solution	100 $\mu$ l	20,000	B525

#### FSB



#### BSB

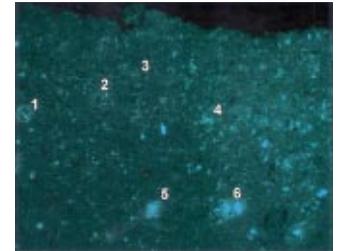
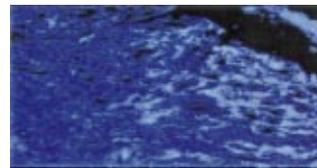


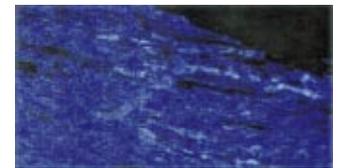
Fig.1 アルツハイマー病患者の脳の前頭皮質切片(エタノール固定)の染色像(光っている部分がアミロイド)。準隣接切片で図中の番号はそれぞれの老人斑に対応している。FSBの方がより細かい部分まで明確に観察できる。

(画像提供：理化学研究所脳科学総合研究センター神経蛋白制御チーム 樋口真人先生、西道隆臣先生)

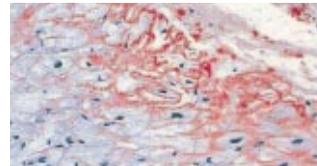
#### FSB



#### BSB



#### Congo red



#### Congo red(偏光顕微鏡下)



Fig.2 FAP 患者の心臓組織切片の染色像(Congo red は赤褐色、BSB と FSB は光っている部分がアミロイド)。準隣接切片。FSB はより細かい部分まで明確に観察でき、アミロイド沈着部分のコントラストがハッキリしている。

(画像提供：

熊本大学大学院医学薬学研究部消化器内科 原岡克樹先生  
同 生態情報分析医学講座 安東由喜雄先生)

\* MRI 造影剤及び染色剤としての特許出願中です。

## 試作品

## ペルオキシダーゼ標識用キット

Peroxidase Labeling Kit - NH<sub>2</sub>

## &lt;特長&gt;

- ・3時間以内にペルオキシダーゼ標識体が調製できる。
- ・高分子化合物 (M.W.>50,000)から低分子化合物 (M.W.<5,000)まで標識できる。
- ・Amine Reactive Peroxidaseと混ぜるだけで安定な共有結合を形成する。
- ・Filtration Tube を用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- ・付属の保存溶液でペルオキシダーゼ標識体の長期保存ができる。

ペルオキシダーゼは、エンザイムイムノアッセイ (EIA) や組織染色などに利用される最も一般的な酵素で、多くのペルオキシダーゼ標識体が市販されていますが、研究の多様性から研究者が自らペルオキシダーゼ標識体を調製するケースが増えてきています。ペルオキシダーゼを標識する方法は、グルタルアルデヒド法や過ヨウ素酸法など、いくつか知られていますが、標識効率の低さや標識に時間を要するといった問題があります。また、透析やゲルろ過カラムを用いたバッファー交換は煩雑で時間がかかります。

Peroxidase Labeling Kit - NH<sub>2</sub> は、アミノ基を有する分子にペルオキシダーゼを標識するためのキットです。Amine Reactive Peroxidase は、その構造内に活性エステル基を有しているため、アミノ基を有する標的分子と混合するだけで安定な共有結合を形成します。IgG のような分子量の大きい分子をサンプルに使用する場合、付属の Filtration Tube を用いて簡単にサンプルの前処理を行うことができます。ペルオキシダーゼ活性や標識反応を阻害するような低分子化合物 (アジ化ナトリウムやトリスなど) は、Filtration Tube を用いた前処理によって除去されるため、透析やゲルろ過などの処理を行う必要がありません。また、低分子化合物を本キットを用いて標識する場合、未反応の低分子化合物は付属の Filtration Tube を用いた精製操作により除去されるため、高純度の標識体を得ることができます。

本キットには標識に必要なすべての試薬と作製したペルオキシダーゼ標識体を保存するための溶液が含まれています。

## &lt;キット内容&gt; 3 サンプル標識用

Amine Reactive Peroxidase	100 µg x 3 本
Buffer A	4 ml x 1 本
Buffer B	4 ml x 1 本
Storage Buffer	4 ml x 1 本
Filtration Tube	3 本

(キット内容は平成16年1月15日現在のもので、予告なく変更される場合があります)

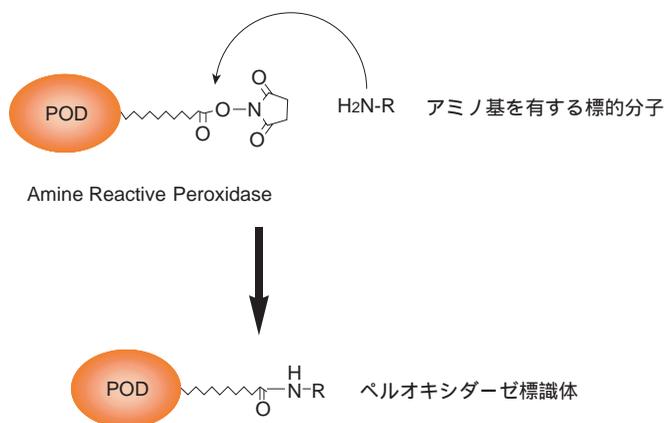


Fig. 1 Amine Reactive Peroxidase の標識反応

## &lt;操作方法&gt;

## IgG への標識

1. IgG 50 ~ 200 µg を含むサンプル溶液と Buffer A 100 µl を Filtration Tube に入れる。
2. ピペティングにより軽く混合した後、遠心する (8000 × g, 10 分間)。
3. Buffer A 100 µl を加え、さらに遠心する (8000 × g, 10 分間)。
4. Buffer B 10 µl を Amine Reactive Peroxidase に加え、ピペティングにより溶解する。
5. この溶液を IgG が濃縮されている Filtration Tube の膜上加える。
6. ピペティングにより膜全体をリンスした後、37 °C で 2 時間放置する。
7. Buffer A 100 µl を加え、遠心する (8000 × g, 10 分間)。
8. Storage Buffer 200 µl を加え、ピペティングし標識体を回収する。
9. 溶液を 500 µl のマイクロチューブに移し、0 ~ 5 °C で保存する。

## 低分子化合物への標識

1. 10 mmol/l の低分子化合物溶液 5 µl と 45 µl の Buffer B を混合する。
2. この溶液を Amine Reactive Peroxidase に加え、37 °C で 1 時間放置する。
3. Buffer B 100 µl を反応液に加え、溶液をすべて Filtration Tube に移す。
4. 遠心する (8000 × g, 10 分間)。
5. ろ液を捨てた後、Buffer B 200 µl を Filtration Tube に加え、遠心する (8000 × g, 10 分間)。
6. ステップ 5 を繰り返す。
7. Storage Buffer 200 µl を加え、ピペティングし標識体を回収する。
8. 溶液を 500 µl のマイクロチューブに移し、0 ~ 5 °C で保存する。

試作品

ペルオキシダーゼ標識用キット

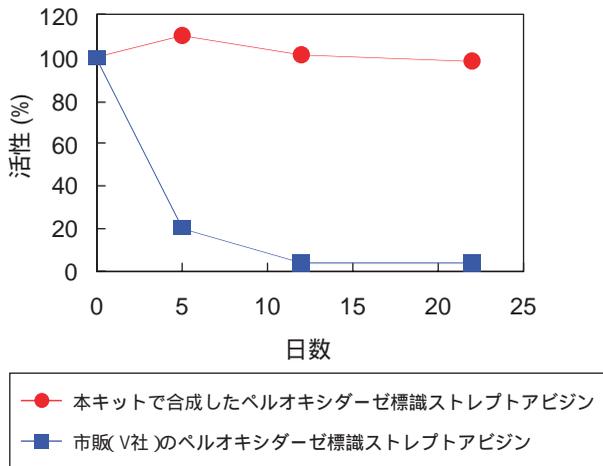


Fig. 2 本キットで合成したペルオキシダーゼ標識体の安定性  
条件: 10 µg/ml ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Storage Buffer) を 37 °C で保存

Peroxidase Labeling Kit - SH

< 特長 >

- ・ 3時間以内にペルオキシダーゼ標識体が調製できる。
  - ・ 高分子化合物 (M.W.>50,000) から低分子化合物 (M.W.<5,000) まで標識できる。
  - ・ Sulfhydryl Reactive Peroxidase と混ぜるだけで安定な共有結合を形成する。
  - ・ 付属の還元剤を用いることで遊離SH基を持たないタンパク質への標識も可能\*。
  - ・ Filtration Tube を用いた分離操作により高い回収率で標識体を得られる。
  - ・ 付属の保存溶液でペルオキシダーゼ標識体の長期保存ができる。
- \* S-S 結合の切断によってタンパク質の活性が失われる場合があります。

Peroxidase Labeling Kit - SHは、チオール基を有する分子にペルオキシダーゼを標識するためのキットです。Sulfhydryl Reactive Peroxidase は、その構造内にマレイミド基を有しているため、チオール基を有する標的分子と混合するだけで安定な共有結合を形成します。標的タンパク質がチオール基を持っていない場合には、付属の還元剤を用いて遊離SH基を調製することが可能です (ただし、S-S 結合の切断によってタンパク質の活性が失われる場合があります)。IgGヒンジ領域のチオール基を標識に利用すれば、抗体活性を損なわずにペルオキシダーゼを標識することができます。

IgGのような分子量の大きい分子をサンプルに使用する場合、付属のFiltration Tubeを用いることで簡単にサンプルの前処理を行うことができます。ペルオキシダーゼ活性を阻害するような低分子化合物 (アジ化ナトリウムなど) は、Filtration Tube を用いた前処理によって除去されるため、透析やゲルろ過などの処理を行う必要がありません。また、低分子化合物を本キットを用いて標識する場合、未反応の低分子化合物は付属のFiltration Tubeを用いた精製操作により除去されるため、高純度の標識体を得ることができます。

本キットには標識に必要なすべての試薬と作製したペルオキシダーゼ標識体を保存するための溶液が含まれています。

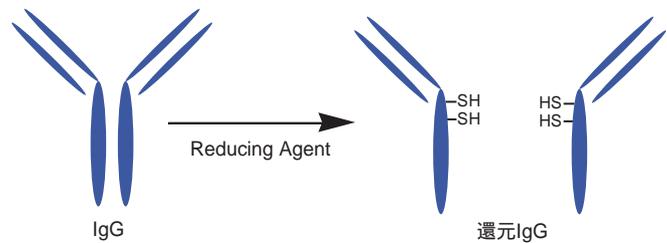


Fig. 3 Reducing Agent による IgG の還元反応

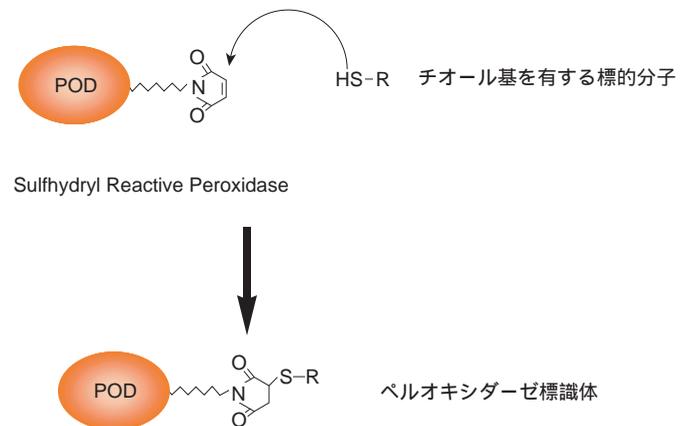


Fig. 4 Sulfhydryl Reactive Peroxidase の標識反応

## 試作品

## ペルオキシダーゼ標識用キット

<キット内容> 3 サンプル標識用

Sulfhydryl Reactive Peroxidase	100 µg x 3 本
Reducing Agent	400 µg x 3 本
Buffer A	4 ml x 1 本
Buffer B	4 ml x 1 本
Reaction Buffer	4 ml x 1 本
Storage Buffer	4 ml x 1 本
Filtration Tube	3 本

(キット内容は平成16年1月15日現在のもので、予告なく変更される場合があります)

<操作方法>

## IgG への標識

1. IgG 50 ~ 200 µg を含むサンプル溶液と Buffer A 100 µl を Filtration Tube に入れる。
2. ピペティングにより軽く混合した後、遠心する (8000 × g, 10 分間)。
3. Buffer A 150 µl を Reducing Agent に加え、ボルテックスして溶解する。
4. この溶液 100 µl を Filtration Tube に加える。
5. ピペティングにより膜上の IgG と混合した後、37 °C で 30 分間放置する。
6. Buffer B 100 µl を加え、遠心する (8000 × g, 10 分間)。
7. 上清を捨てた後、Buffer B 200 µl を加え、さらに遠心する (8000 × g, 10 分間)。
8. Reaction Buffer 50 µl を Sulfhydryl Reactive Peroxidase に加え、ピペティングにより溶解する。
9. この溶液を還元 IgG が濃縮されている Filtration Tube の膜上加える。
10. ピペティングにより膜上の還元 IgG と混合した後、37 °C で 1 時間放置する。
11. Buffer A 100 µl を加え、遠心する (8000 × g, 10 分間)。
12. Storage Buffer 200 µl を加え、ピペティングし標識体を回収する。
13. 溶液を 500 µl のマイクロチューブに移し、0 ~ 5 °C で保存する。

## 低分子化合物への標識

1. 10 mmol/l の低分子化合物溶液 5 µl と 45 µl の Reaction Buffer を混合する。
2. この溶液を Sulfhydryl Reactive Peroxidase に加え、37 °C で 1 時間放置する。
3. 100 µl の Reaction Buffer を反応液に加え、溶液をすべて Filtration Tube に移す。
4. 遠心する (8000 × g, 10 分間)。
5. 上清を捨てた後、Reaction Buffer 200 µl を加え、さらに遠心する (8000 × g, 10 分間)。
6. ステップ 5 を繰り返す。
7. Storage Buffer 200 µl を加え、ピペティングし標識体を回収する。
8. 溶液を 500 µl のマイクロチューブに移し、0 ~ 5 °C で保存する。

## お知らせ

## 販売中止のご案内

小社都合により下記製品の販売を中止いたしましたので、ご連絡申し上げます。(代替品をご利用下さい)

品名	容量	和光コード	メーカーコード
-Cellstain- BCECF-AM solution	1 ml	348-07391	B407 (代替: 344-05431)
5-Carboxypentyl disulfide	100 mg		C406 (代替: C406 10 mg)
7-Carboxypentyl disulfide	100 mg		C405 (代替: C405 10 mg)
AB-NTA	100 mg	348-07651	A296
在庫なくなり次第中止			(代替: 340-08071)
Alq3,sublimed	10 g		T203 (代替: T203 1 g)
Biotin-PEAC5-maleimide	100 mg	340-06393	B299
Biotin-PE-maleimide	100 mg	343-06383	B300
Biotinylation Kit (Sulfo-OSu, set)			BK02
Designed for use with BIACORE® instrument systems			
Bis-MSB	5 g	342-03293	B009
Bisthiourea-1	100 mg		B432 (代替: B432 25 mg)
Cell Counting Kit	100 回用	343-06464	CK01 (代替: 349-06461)
Cell Counting Kit-HS (for HTS)	10000 test		CK08
Cell Counting Kit-WR (for HTS)	10000 test		CK07
DPM	1 g	349-01101	D017
DTCS	1 g	348-04513	D021
FNDPE	5 g	342-05633	F008
HALPS	1 g		OC16
HBED	1 g		H214
HFPB	100 mg	345-06181	H209
Ionophore-K23E1	25 mg	347-06761	B315 (代替: 343-06763)
iso-Butyl alcohol,(Sp)	500 ml	345-00405	SP04
iso-Octane,(Lu)	250 ml	340-02111	LU14
Nitro-TB	5 g	342-02034	N011 (代替: 344-02033)
NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub> Assay Kit-C (Colorimetric) ~ Griess Reagent Kit ~	100 回用	341-07141	NK02 (代替: 344-07991)
NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub> Assay Kit-F (Fluorometric) ~ 2,3-Diaminonaphthalene Kit ~	100 回用	344-07131	NK01 (代替: 347-07981)
NPPE	1 g	344-06531	N053
Octadecyloxymethylpyridine	10 mg		O397
OMB-COCl	10 mg	344-06151	O004
Pr-PTA(NMR)	1 g	346-02331	P020
t-HDOPP-Ca	1 g	342-05334	H014
TSQ	25 mg	343-07341	T377

## 試作品

### 陽イオン性脂質遺伝子導入試薬

#### -DoFect- GT1

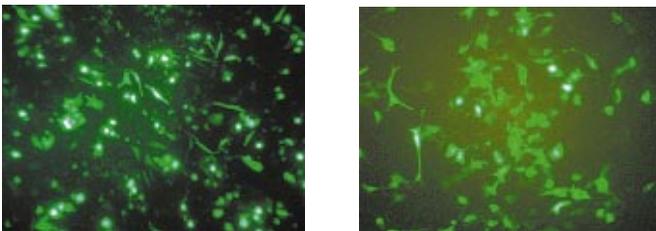
##### < 特長 >

- ・ DNA や siRNA を高効率に導入できる。
- ・ 神経細胞、初代培養細胞にも適応できる。
- ・ 非ウイルス性・非動物性なので安全である。
- ・ 操作性が非常に簡便で迅速である。
- ・ 血清を含む培地にも適応できる。

##### < はじめに >

本製品は、培養細胞に DNA や siRNA を導入するために最適化された陽イオン性脂質の遺伝子導入試薬です。全ての反応を 1 チューブで行うことができ、短時間(30 秒以内)で核酸との複合体を形成できるため、非常に迅速・簡便な操作で核酸を細胞に導入することができます。

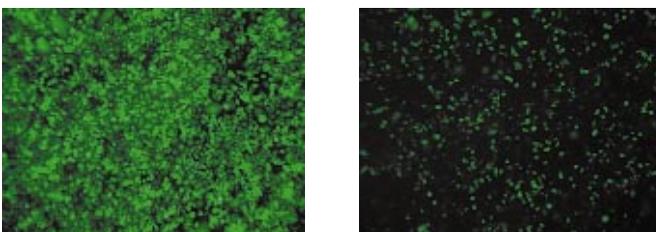
##### < GFP 遺伝子導入例 >



HeLa 細胞(ヒト子宮頸癌細胞) SFME(マウス胎児神経幹細胞)

Fig. 1 hsGFP 遺伝子発現ベクターをトランスフェクションし、1 日後に蛍光顕微鏡で観察しました。

##### < siRNA 導入例 >



CHO-EGFP 細胞  
(0 nmol/l siRNA)

CHO-EGFP 細胞  
(50 nmol/l siRNA)

Fig. 2 EGFP 遺伝子を安定に発現する CHO 細胞(ハムスター卵巣細胞)に、EGFP に対する siRNA をトランスフェクションし、1 日後に蛍光顕微鏡で観察しました。

##### < 導入実績のある細胞種 >

HeLa(ヒト子宮頸癌)、MRC5(ヒト胎児正常肺)、UtSMC(ヒト正常子宮平滑筋)、A549(ヒト肺癌)、HepG2(ヒト肝臓癌)、Caco2(ヒト大腸癌)、MG63(ヒト骨肉腫)、Jurkat(ヒト T 細胞性白血病)、Molt4(ヒト T 細胞性白血病)、K562(ヒト慢性骨髄性白血病)、U937(ヒト単球性白血病)、A172(ヒト神経膠芽腫)、PA1(ヒト卵巣性テラトカルシノーマ)、MCF7(ヒト乳癌)、PC12(ラット褐色細胞腫)、CHO(ハムスター卵巣)、COS7(サル腎臓)、Vero(サル腎臓)、NIH/3T3(マウス胎児繊維芽細胞)、SFME(マウス胎児正常神経幹細胞)、ES-D3(マウス胚性肝細胞)、STO(マウス胚細胞:ES 細胞用フィーダー細胞)

##### < 導入効率および他社製品との比較 >

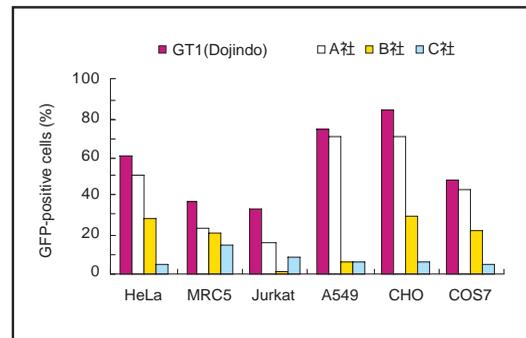


Fig. 3 GT1 と各遺伝子導入試薬を用いて、hsGFP 遺伝子ベクターを 4 時間トランスフェクションし、1 日後に GFP 陽性細胞をフローサイトメトリーで測定しました。

##### < 導入操作方法 >

- 24 well プレート(1 well の細胞密度 80-100%)を用いた場合
1. 1.5 ml サンプルチューブに 1 well に対して培地 25  $\mu$ l、DNA 1.5  $\mu$ g(1.0  $\mu$ g ~ 3.0  $\mu$ g で可)、GT1 5  $\mu$ l を順に加え、ゆっくりピペティングする。
    - ・ 様々な培地(MEM、DMEM、F-12、RPMI1640 等)に適応できます。また、抗生物質を除いた培地を用いる必要はありません。
    - ・ DNA(siRNA)と GT1 の複合体は短時間に形成されるため、インキュベート操作の必要はありません。
  2. 各 well の増殖用培地を除き、1 well に対して 300  $\mu$ l の無血清培地に交換する。
    - ・ 血清の有無(0-10%)に関わらず導入することが出来ます。
    - ・ 細胞を培地で洗う必要もありません。
  3. 各 well に 1. で作成した溶液を添加する。
  4. 3-6 時間培養する。
    - ・ 細胞への導入には約 3 時間以上の培養が必要です。

## 第14回フォーラム・イン・ドージン開催報告

# 糖鎖生物医学：多様な糖鎖構造がつくりだす生物機能と病態

今年で14回目となるフォーラム・イン・ドージンが11月28日、鶴屋ホール(熊本市)で開催されました。今回は、「糖鎖生物学：多様な糖鎖構造がつくりだす生物機能と病態」というテーマで、糖鎖研究の第一線で活躍されている国内の8人の研究者による講演が行なわれました。昨年はタンパク質のフォールディングをテーマに取りあげ、タンパク質の機能発現に果たすフォールディングの本質的な役割に焦点をあてたフォーラムを行いました。今年はそのタンパク質の機能に大きな影響をもつ糖鎖に注目しました。これまで、構造的な多様性、不均一性、機能解析の難しさなどから比較的敬遠されてきた糖鎖でしたが、最近急速に研究が進み、その重要性が認識されてきています。今回のフォーラムでも、これまで予想もされなかったような糖鎖の役割などが紹介され、今またこの分野が、非常に活気を帯びた研究領域となってきたことが実感されました。



谷口先生(阪大医)による基調講演「糖鎖の構造とあらたな生物機能」に続いて、入村先生(東大薬)の「ムチンとレクチンの生物学」と、成松先生(産総研)の「バイオインフォーマティクスを利用したヒト糖鎖遺伝子の網羅的解析」の2講演で午前のセッションが終了しました。糖鎖遺伝子の解析では日本人の貢献が大きく、会場との質疑応答も熱気に溢れたものでした。午後のセッションでは、糖鎖異常によって引き起こされる病態についての講演が中心となり、浅野先生(金沢大・学際科学実験センター)が、ガラクトース転位酵素 $\beta 4\text{GalT-I}$ とIgA腎症との関連、古川先生(名大医)が、ガングリオシド変異による神経系の異常、

宮城先生(宮城県立がんセンター)が、がん・糖尿病におけるシアリダーゼ異常について話されました。また最後のセッションでも、本家先生(高知大医)による硫酸化糖鎖の神経伝達や精子形成における役割が示され、さらに、遠藤先生(東京都老人総合研)によって、筋ジストロフィーが $\alpha$ -ジストログリカンの糖鎖不全により起こることが紹介されました。いずれも糖鎖が病態と深く関わっており、今後、糖鎖の研究によって病態の解明がさらに進み、病気を克服する日もそう遠くはないと実感させるものでした。



最後になりましたが、本フォーラムも14回を重ね、一定の評価を得るまでに成長してきました。これも、前田先生(熊大医)、山本先生(熊大医)、岩永先生(化血研)にこれまで支えていただいたからに他なりません。また、今回の企画では谷口先生にもご尽力いただき、充実した内容にすることができました。今後もさらに充実したものにしたいと、関係者一同願っています。(佐々本 一美)

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](mailto:info@dojindo.co.jp)

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