

2012
No.141

ISSN 0385-1516

**DOJIN**

NEWS

ドージンニュース

CONTENTS

●Review

染色体の機能発現機構の解明を目指して
早稲田大学 理工学術院 胡桃坂 仁志

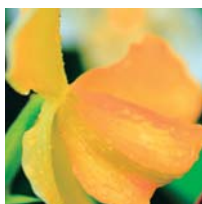
「蛍光生物学」の最前線4

セラミックスナノ粒子を用いた
近赤外励起蛍光バイオイメージング
東京理科大学 曾我 公平

●Topics on Chemistry

Glutathione S-transferase (GST) 活性を
イメージングするための新規蛍光プローブ
株式会社同仁化学研究所 大内 雄也

ARP (Aldehyde Reactive Probe) を
用いたカルボニルタンパク質の解析
株式会社同仁化学研究所 崎山 順次



CONTENTS

Review

染色体の機能発現機構の解明を目指して ●————— [1]

早稲田大学 理工学術院 胡桃坂 仁志

「蛍光生物学」の最前線 4

セラミックスナノ粒子を用いた ●————— [6]

近赤外励起蛍光バイオイメージング

東京理科大学 曾我 公平

Topics on Chemistry

Glutathione S-transferase (GST) 活性を ●————— [12]

イメージングするための新規蛍光プローブ

株式会社同仁化学研究所 大内 雄也

ARP (Aldehyde Reactive Probe) を用いた ●————— [13]

カルボニルタンパク質の解析

株式会社同仁化学研究所 崎山 順次

Commercial

新製品

細胞用過酸化脂質検出蛍光試薬

Liperfluo ●————— [15]

試作品

アセチルコリンエステラーゼ活性測定用キット

AChE-Specific Assay Kit ●————— [14]

自己組織化単分子膜作製用試薬

アルカンチオール類 ●————— [16]

関連製品

酸化ストレス関連試薬

ARP (Aldehyde Reactive Probe) ●———— [14]

-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting- ●———— [14]

製品紹介

自己組織化単分子膜作製用試薬

Carboxylic acid-SAM Formation Reagent ●————— [16]

お知らせ

第 28 版総合カタログ (2012/2013) 近日発行! ●————— [17]

販売中止予定のお知らせ ●————— [17]

フォーラム・イン・ドージン開催報告 ●————— [18]

新製品案内

細胞用過酸化脂質検出蛍光試薬

品名	容量
Liperfluo	50 µg × 5
希望納入価格(¥)	メーカーコード
20,000	L248

染色体の機能発現機構の解明を目指して

Structural and functional studies of human nucleosomes



胡桃坂 仁志

早稲田大学 理工学術院
教授

要約

In eukaryotic nucleus, genomic DNA is organized in highly compacted structure as chromatin. The fundamental repeating unit of chromatin is the nucleosome, which contains core histones, H2A, H2B, H3, and H4, and about 150 base pairs of DNA. In the nucleosome, two of each core histones form the

histone octamer, and the DNA is wrapped 1.65 turns around the octamer. In the past few decades, a variety of histone posttranslational modifications have been identified, and nonallelic isoforms of histones H2A, H2B, and H3 have been found as histone variants. The histone modifications and variants possess specific functions in the formation of specific chromatin domains of chromosomes. Therefore, the local structural versatility and dynamics of chromatin may be induced by the specific incorporation and exchange of histone modifications and histone variants, and may function in the regulation of DNA transcription, replication, recombination, and repair. In this review, I discuss the structural and biochemical properties of human nucleosomes, containing various histone variants and histone mutants that may mimic modified histones.

キーワード：

染色体、クロマチン、ヌクレオソーム、エピジェネティクス

1. はじめに

近年、染色体を構成する高次のクロマチン構造が、エピジェネティクスの本体として真核生物での遺伝子発現調節に中心的な役割を果たすことが明らかになってきた。クロマチンの基盤構造はヌクレオソームであるが、1990年代から現在までの期間は、クロマチン構造変換因子の発見、ヒストンアセチル化酵素の発見をはじめとしたアセチル化/脱アセチル化、メチル化/脱メチル化、リン酸化、ユビキチン化などのヒストン修飾メカニズムの解明、ヒストンバリエントの同定など、エピジェネティクスの根幹をなす多くの重要な発見がなされた、まさに染色体研究の爆発期でもあった。これらは、染色体の高次構造が、単にゲノムDNAを収納するための静的な構造体ではなく、ダイナミックに変動する機能的な構造体であることを示した。そしてこれらによる染色体のダイナミクスが、真核生物での遺伝子情報の発現、複製、組換え、修復などにおいて中心的な役割をはたしていることが明らかになりつつある。本総説では、これまでの筆者らの研究成果を中心に、ヌクレオソームの立体構造とその構造的性質について概説し、クロマチン構造のダイナミクスと機能発現機構について議論する。

2. ヒストンの調製

ヌクレオソームは、4種類のヒストン (H2A, H2B, H3, H4) が2分子ずつからなるヒストン8量体 (ヒストンオクタマー) に、約150塩基対のDNAが左巻きに巻き付いた円盤状の構造体である。これら4種類のヒストンは、ヒストンフォールドドメインと呼ばれる共通の構造を持つ中央領域と、フレキシブルなN末およびC末のテール領域からなる。ヒストンオクタマーを形成する際に、H2AはH2Bと、そしてH3はH4と二量体 (ダイマー) を形成する。それぞれ、2分子のH3/H4ダイマーはH3-H3間にて結合して、H3/H4テトラマーを形成する。

ヒストンは、細胞核に最も多く存在するタンパク質である。それゆえ、比較的簡単にかつ大量に細胞や組織から調製することができた。しかも精製されたヒストンは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析する限り均一に見えた。そこが落とし穴であった。今思うと当たり前なのだが、ヒストンは生体内でさまざまな修飾を受けており、そのため細胞や組織から調製した場合、極めて不均一な状態で精製されている。また、数アミノ酸しか違いがないヒストンバリエントなども分離が不可能なため、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では純粋に見えるヒストンも、実は、とても不均一な状態であったのである。実際に、筆者らの解析によって、ヒト由来のHeLa細胞から精製したヒストンH3は、H3.1、H3.2、H3.3という3種類のバリエントが7:2:1の割合で混在したものであることが明らかになった¹⁾。このヒストンの不均一性が、ヌクレオソームの立体構造解析を遅らせる大きな原因であった。

3. ヌクレオソームの立体構造解析

Lugerらは、アフリカツメガエルのヒストンを、リコンビナントとして大腸菌から精製する系を確立した。バクテリアにはヒストンを修飾する酵素やヒストンの類縁タンパク質が存在しないため、リコンビナントとして調製されたヒストンはまったく修飾されていない均一な状態で精製することができた。そしてX線結晶構造解析によって、ヌクレオソームの詳細な立体構造が原子分解能で解明された²⁾。その後、出芽酵母およびヒトのヌクレオソーム構造の解析もなされ、それらの比較解析から、出芽酵母のヌクレオソームは、アフリカツメガエルのヌクレオソームと比べてヌクレオソーム内でのヒストン間の結合が少なく、壊れやすい性質を有することが指摘された³⁾。また、ヒトのヌクレオソームは、DNA結合様式がアフリカツメガエルのものとは若干異なっている

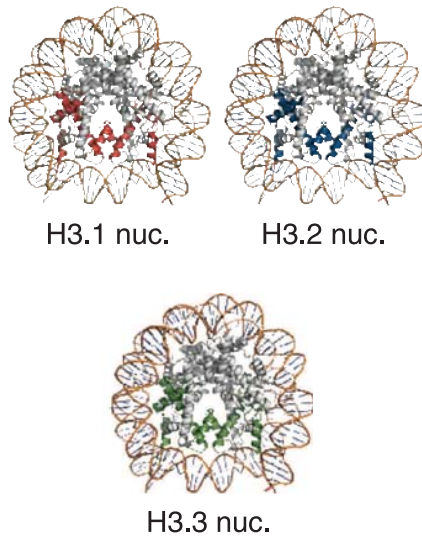


図1 ヒストンH3バリエント、H3.1、H3.2、H3.3を含むヌクレオソームの立体構造。H3.1を赤で、H3.2を青で、H3.3を緑で示した。

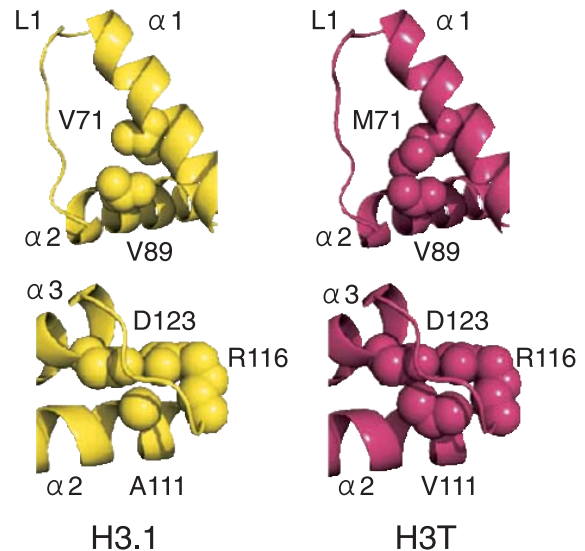


図2 ヒストンH3Tに特異的な局所構造。アミノ酸置換領域（メチオニン71およびバリン111）付近の立体構造を示した。H3.1の構造を黄色で、H3Tの構造を赤で示した。H3.1のバリン71、バリン89、アラニン111、アルギニン116、およびアスパラギン酸123、そしてH3Tのメチオニン71、バリン89、バリン111、アルギニン116、およびアスパラギン酸123の側鎖を空間重点表示にて示した。

ることも示された⁴⁾。

筆者らは、ヒトのヒストンをヒスチジンタグとの融合タンパク質として大腸菌にて作製し、粗精製の後にヒスチジンタグを切断除去した後に、高純度に精製するという独自のヒストン精製系を構築した⁵⁾。この系により、より簡便かつ大量に高純度のヒストンを調製することが可能になった。そこで筆者らは、ヒトのヒストンH3に着目し、HeLa細胞にて存在するH3.1、H3.2、H3.3をリコンビナントとして調製し、これらを含むヌクレオソームのX線結晶構造解析を行った(図1)¹⁾。その結果、これらのH3バリエントを含むヌクレオソームは、その立体構造上の顕著な違いはないことが分かった。これらのH3バリエントは、ヌクレオソームの安定性に影響を与えることが報告されており⁶⁾、ヌクレオソーム構造の内部でのヒストン間の結合様式の違いなど、更なる詳細な解析が必要である。

4. H3T ヌクレオソーム

ヒトのヒストンH3バリエントには、精巣特異的に見られるH3Tが存在する。H3Tは、ヒトの主要なH3であるH3.1と比較して4アミノ酸の違いを持つ。それらは、24番目のバリン(H3.1ではアラニン)、71番目のメチオニン(H3.1ではバリン)、98番目のセリン(H3.1ではアラニン)、111番目のバリン(H3.1ではアラニン)である。マウスにもホモログとしてH3Tが報告されているが、ヒトとマウスの間でこれらのアミノ酸配列が異なっており、このことからH3Tが進化的に新しいヒストンであることが分かる。精子ではクロマチンからヒストンが排除されて、プロタミンに置き換わっていることが分かっている。しかし近年、精子中でも、約4%のヌクレオソームが維持されているという報告がなされ⁷⁾、精子形成過程でのクロマチン構造の変換が重要視されている。

筆者らは、ヒトのH3Tをリコンビナントとして精製し、そのヌクレオソーム形成能を生化学的に解析した⁸⁾。生体内でのヌクレオソーム形成は、ヒストンシャペロンと呼ばれる一群のタンパク質の活性によってなされている。そこで、ヒトでの主要なヒストンシャペロンであるNap1と、精巣での高発現が認められるNap2を用いて、H3Tのヌクレオソーム形成能を評価した。その結果、驚くべきことに、H3TはNap1によってヌクレオソームに取り込まれることが出来ないことが分かった。一方、Nap2はH3Tを含むヌクレオソームの形成を触媒することができた。これらの結果は、Nap2が精巣で高発現しているという事実と良い一致を示すと同時に、ヒストンシャペロンがヒストンバリエントに対して特異性を有するという事を明らかにした。

次に、H3Tを含むヌクレオソームの立体構造を解明するために、H3TヌクレオソームのX線結晶構造解析を行った⁹⁾。その結果、ヌクレオソームの全体構造は通常のH3.1ヌクレオソームとほぼ同じであるが、H3.1の構造と比較して、H3Tはヌクレオソーム中で構造的に歪んでいる部分を2カ所持つことが分かった(図2)。H3Tヌクレオソームは、H3.1ヌクレオソームと比較すると、著しく構造安定性が低く、DNA非存在下では、ヒストンオクタマーの形成も見られなかった⁹⁾。H3Tヌクレオソームの構造上歪んだ部位が、H3T特有のアミノ酸であるメチオニン71番およびバリン111番と立体構造上近接していたことから、H3Tの構造的特徴と安定性との関連が疑われた。そこで、H3T特有の4カ所のアミノ酸置換を、それぞれH3.1タイプに置き換えた変異体を作製して、それらの変異体H3Tヌクレオソームの構造安定性を調べた。その結果、H3Tのバリン111番をH3.1タイプであるアラニンに置換した変異体では、ヌクレオソームの安定性が損なわれないことが明らかになった。逆に、H3.1のアラニン111番をバリンに置換すると、ヌクレオソームの安定性が低下した。これらの結果から、

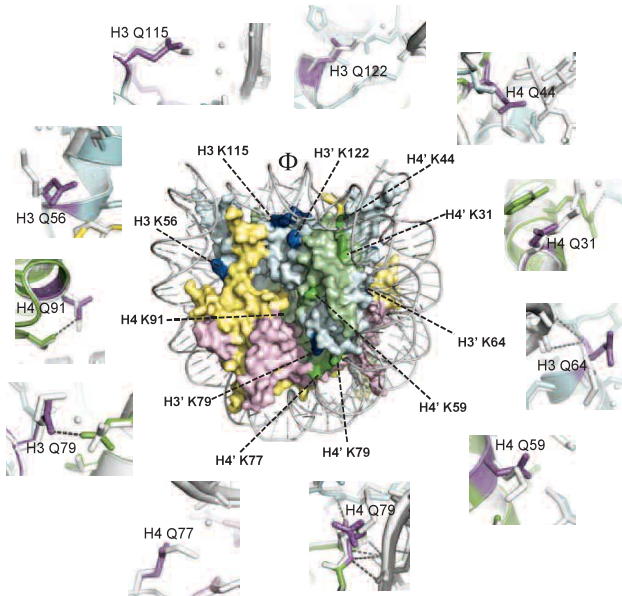


図3 ヒストンH3とH4のリジン-グルタミン変異体の立体構造。変異導入部位と変異部位付近の局所構造を示した。

H3Tヌクレオソームの構造的特徴および安定性は、H3Tの111番目のバリン残基に依存していることが明らかになった。H3の111番目にバリンを保持しているH3バリエーションは、生物種間での保存性も極めて低く、そのヌクレオソーム構造への劇的な影響を考えると興味深い。

5. ヒストン変異体の立体構造解析

出芽酵母の遺伝学的解析から、H3の116番目および118番目に点変異が導入されると、転写活性化時にヌクレオソームをリモデリングするSWI/SNF複合体を要求しなくなる(SWI/SNF-independent; Sin)ことが報告されている¹⁰⁾。興味あることに、これらのH3上での変異の位置は、H3Tで重要な111番目と非常に近い。実際に筆者の生化学的解析から、Sin変異を持つヒストンH3がヌクレオソームを不安定化することが明らかになっている¹¹⁾。さらに、Sin変異を持つヌクレオソームの構造解析がなされ、ヌクレオソーム不安定化の構造基盤が明らかになった¹²⁾。

ヒストンの変異体としては、アセチル化のターゲットとなるリジンをグルタミンに変換した変異体(K-Q変異体)の解析例が多く報告されている。ヒストンのK-Q変異体は、アセチル化状態をミミックした変異として頻繁に用いられている。ヒストンのアセチル化は、主にヒストンテール領域に見られ、ヒストン結合タンパク質のテール領域への相互作用や、テール領域のヌクレオソーム中のDNAとの結合に影響を与えられていると考えられている。実際に、高度にアセチル化されたヒストンを含むクロマチンでは、*in vitro*での転写が顕著に上昇することが示されている¹³⁾。しかし近年、H3とH4に関して、テール領域のみならず、ヒストンフォールドドメインにおいても、H3の56番目、64番目、115番目、122番目のリジン、H4の31番目、77番目、79番目、91番目のリジン

がアセチル化されることが明らかになった。特に、H3の56番目のアセチル化に関する知見が多く集まり、現在、転写、複製、修復、クロマチンアセンブリーなどの過程で機能していることが報告されている。

筆者らは、H3とH4のヒストンフォールドドメインに存在するすべてのリジンを、それぞれグルタミンに変換した11種類の変異ヌクレオソームの再構成を行った。そして、それら11種類すべての変異ヌクレオソームの立体構造を決定することに成功した(図3)¹⁴⁾。これらの多くは、アミノ酸置換を導入した部位周辺の、局所的な構造変化が観察されたが、ヌクレオソーム構造の大きな構造変化は見られなかった。このことは逆に、ヒストンフォールドドメインのアセチル化が、ヌクレオソーム構造の大規模な変換を伴わずに、おそらくヌクレオソームのダイナミクスなどを介して機能していることを示唆している。

しかし、興味あることに、H4の44番目のリジンをグルタミンに変換したヌクレオソームでは、H2AのC末端領域(111番目から118番目の領域)が、立体構造上で完全にディスオーダーしていることが明らかになった(図4)。

この大規模な構造変換は、H4の44番目とH2AのC末端領域が立体障害を引き起こすことに起因すると考えられた。このH2AのC末端領域は、H3のリジン36番目をメチル化する酵素Set2(ほ乳類ではNSD2)のドッキング領域である。H4 K44Q変異は、出芽酵母のH3のリジン36のメチル化を阻害するという*in vitro*の結果が報告されているが¹⁵⁾、筆者らの構造解析の結果は良好一致を示した。これまで多くのヌクレオソーム構造の解析がなされてきたが、1つのアミノ酸置換がこれほど大きなヌクレオソーム構造の変換を誘起した例は、今回のH4の44番目のK-Q変異が初めてである。H4の44番目のリジンのアセチル化はまだ報告されていないが、今後の解析が楽しみである。

6. セントロメアのクロマチン構造

染色体のセントロメア領域は、ヒトでは細胞周期の分裂期(M期)で凝縮した際にくびれた部位として観察される。M期では、

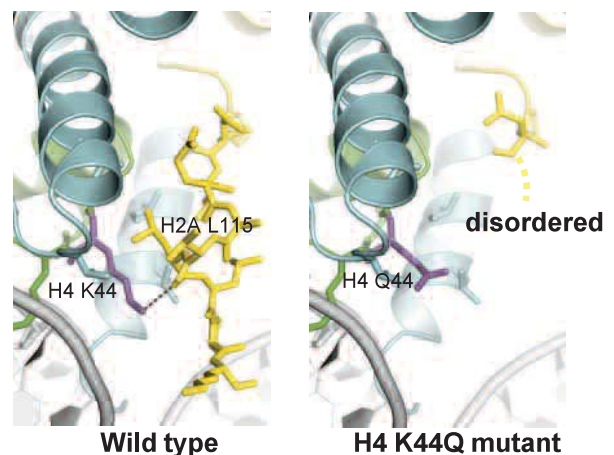


図4 ヒストンH4 K44Q変異体を含むヌクレオソームの局所構造。H4 K44Q変異体ヌクレオソームでは、H2AのC末端領域がディスオーダーしている。

セントロメア領域に動原体構造が形成され、染色体分配の際には微小管が動原体に結合することにより、姉妹染色分体が細胞の両極へ引っ張られて娘細胞に均等分配される。このような重要性から、セントロメア領域は他のアーム領域とは区別された、特殊なクロマチン構造を形成していると考えられてきた。そして実際に、セントロメア特異的なヒストン H3 のバリエーションとして、CENP-A が同定され、その重要性が明らかになった。CENP-A がセントロメア・クロマチンの基盤となる CENP-A ナクレオソームを形成し、その上に CENP-B や CENP-C などの DNA 結合タンパク質がアセンブリーすることによって、セントロメア・クロマチンが形成されると考えられている。

筆者らは、セントロメア領域に DNA 配列特異的に結合する CENP-B に着目した。そしてヒト CENP-B の DNA 結合ドメインと DNA との複合体の結晶構造解析に成功した¹⁶⁾。さらに、CENP-B 二量体形成ドメインの立体構造も解明した¹⁷⁾。CENP-B は、CENP-B box と呼ばれる 17 塩基対の認識配列に結合するのだが、CENP-B が結合した CENP-B box DNA は局所的にキンクしており、このキンク領域に存在する CpG にメチル化が起こると CENP-B の DNA 結合が著しく損なわれることが明らかになった¹⁸⁾。このような DNA キンクは、ナクレオソーム構造の形成を阻害すると考えられ、CENP-B の CENP-A ナクレオソームに対する相互作用様式が疑問であった。

そこで筆者らは、ヒト CENP-A をリコンビナントとして精製する系を確立し、CENP-B の CENP-A ナクレオソーム DNA への結合解析を *in vitro* 再構成系を用いて行った。まず、ヒトのゲノム DNA から、セントロメア由来のリピード配列をクローニングした⁹⁾。この配列には、CENP-B box の DNA 配列が含まれていたため、この DNA を基質として CENP-A を含むナクレオソームの再構成を行った。そして、CENP-B box が CENP-A ナクレオソーム内に取り込まれた場合でも、CENP-B box 配列が適切な向きに配向している限り、CENP-B が CENP-A ナクレオソーム中の DNA に結合できることを明らかにした¹⁹⁾。しかも、CENP-B の存在下では、CENP-A ナクレオソームの形成位置 (ポジショニング) は 1 カ所に固定されることを見つけた¹⁹⁾。この CENP-A ナクレオソームのポジショニングにヒントを得て、結晶中で対称性を維持しやすい回文配列の 147 塩基対 DNA をデザインした。そして最終的に、147 塩基対の中心にミスマッチを導入することで、質の良い CENP-A ナクレオソームの結晶を得ることに成功した。このミス

マッチがない DNA では、解析可能な結晶は得られていない。

そして、セントロメア特異的な CENP-A ナクレオソームの立体構造を解明することに成功した²⁰⁾。我々の解析がなされるまでは、ヒストンが 1 分子ずつのヘミソーム (DNA は右巻きに巻き付く) か、通常のナクレオソームと同じくヒストンが 2 分子ずつ含まれるオクタソーム (DNA は左巻きに巻き付く) か、が激論されていた²¹⁾。我々の解析で、ヒトでは CENP-A ナクレオソームはオクタソームであることが証明された (図 5)。CENP-A ナクレオソームでは、147 塩基対の DNA を用いたにもかかわらず、121 塩基対の DNA のみがヒストン 8 量体に巻き付いており、両端の 13 塩基対の DNA は完全にフレキシブルな状態であった。このフレキシブルな DNA 領域は、CENP-A の N 末端領域の構造に起因していた。しかも、このフレキシブルな領域には CENP-B box 配列も含まれていた。CENP-A ナクレオソームは、このフレキシブルな構造を形成することでナクレオソームの両端 DNA 配列へのアクセスを向上させ、CENP-B や CENP-C などのセントロメア形成に重要な DNA 結合タンパク質をアセンブリーしているのかもしれない。

また、CENP-A ナクレオソームの構造的特徴として、通常の H3.1 ナクレオソームと比較してループ 1 が表面から突き出した形状であることが分かった (図 6)²⁰⁾。CENP-A のループ 1 は、H3.1 のそれより 2 アミノ酸が長い。興味深いことに、CENP-A ループ 1 の先端部分の 2 アミノ酸を欠失させた CENP-A 変異体は、細胞核内で野生型と同様にセントロメアへ局在することはできるが、安定にセントロメアに局在し続けることができないことが分かった。この結果は、CENP-A ループ 1 が、セントロメア結合タンパク質のターゲット部位として機能しており、それらのトランス因子の動きが CENP-A ナクレオソームのセントロメアでの安定化に重要であることを示唆した。CENP-A のループ 1 と直接結合する因子はまだ同定されていないが、今後の発展が楽しみである。

7. おわりに

本総説では、これまでの筆者らの研究を中心に、染色体の構造と機能解析についてのナクレオソームレベルでの研究を紹介した。このような研究は、遺伝情報の収納、発現、複製、修復、継承といった、生命現象の根幹を理解するための基礎となると考えられる。そして、これらの遺伝情報制御機構のさらなる理解のために

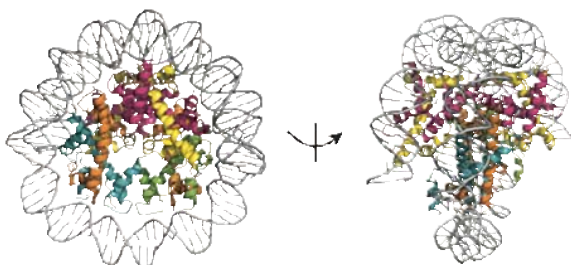


図 5 ヒト CENP-A を含むナクレオソームの立体構造。2分子の CENP-A は、青と緑で示した。

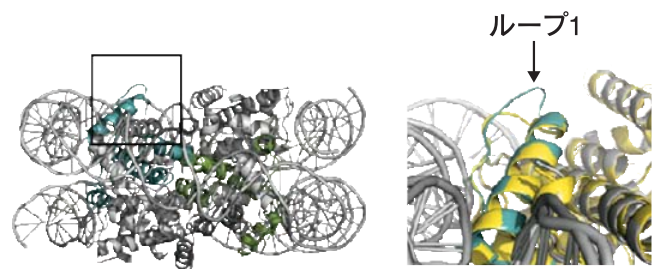


図 6 CENP-A のループ 1 領域の局所構造。CENP-A ナクレオソームの側面図 (左)。四角の領域の拡大図を右図に示した。CENP-A の構造 (青) と H3 の構造 (黄) を重ね合わせて表示した。

は、高次クロマチン構造の再構成系の確立と、クロマチンを基質とした転写、複製、修復、組換えなどの解析系の確立が急務である。筆者らは、現在、ヒストンバリエーションを個別に含むヌクレオソームを用いて高次クロマチンを再構成する系を確立しつつある。また紙面の都合上、今回は紹介できなかったが、ヒトの相同組換え因子群の研究も行っており、クロマチンを基質とした DNA 組換え反応の解析も順調に進んでいる。これらの研究についても近い将来に報告できることを期待している。

謝辞

今回紹介した筆者らの研究は、1995年に筆者が米国 National Institutes of Health の Alan Wolffe 博士の研究室に在籍していたときに開始し、その後、理化学研究所、早稲田大学と研究場所を移動しながらも継続的に行ってきたものである。それらの研究成果は、多くの共同研究者のご協力と、叱咤激励があつてこそのものであった。これらの方々に心より感謝を申し上げたい。また、作図に協力いただいた、立和名博昭博士（早稲田大学）と岩崎わか博士（理化学研究所）に深く御礼を申し上げる。筆者をクロマチン研究へと導いてくれた恩師、Alan Wolffe 博士は、2001年5月に事故により突然この世を去った。それは、大きな喪失感と悲しみを与えたが、Alan と始めた CENP-A の研究が結実し、2011年に論文を Nature 誌に発表できたことと、Alan Wolffe メモリアル EMBO Conference Series “Chromatin and Epigenetics” (2011年6月)にて講演できたことで、少しでも恩返しできたと思いたい。

[参考文献]

- H. Tachiwana, A. Osakabe, T. Shiga, Y. Miya, H. Kimura, W. Kagawa, H. Kurumizaka, “Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants”, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2011**, 67 (Pt 6), 578-583.
- K. Luger, A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, T. J. Richmond, “Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution”, *Nature*, **1997**, 389, 251-260.
- C. L. White, R. K. Suto, K. Luger, “Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions”, *EMBO J.*, **2001**, 20, 5207-5218.
- Y. Tsunaka, N. Kajimura, S.I. Tate, K. Morikawa, “Alteration of the nucleosomal DNA path in the crystal structure of a human nucleosome core particle”, *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, 3424-3434.
- Y. Tanaka, M. Tawaramoto-Sasanuma, S. Kawaguchi, T. Ohta, K. Yoda, H. Kurumizaka, S. Yokoyama, “Expression and purification of recombinant human histones”, *Methods (San Diego)*, **2004**, 33, 3-11.
- C. Jin, G. Felsenfeld, “Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z”, *Genes Dev.*, **2007**, 21, 1519-1529.
- S. S. Hammoud, D. A. Nix, H. Zhang, J. Purwar, D. T. Carrell, B. R. Cairns, “Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development”, *Nature*, **2009**, 460, 473-478.
- H. Tachiwana, A. Osakabe, H. Kimura, H. Kurumizaka, “Nucleosome formation with the testis-specific histone H3 variant, “H3t, by human nucleosome assembly proteins *in vitro*”, *Nucleic Acids Res.*, **2008**, 36, 2208-2218.
- H. Tachiwana, W. Kagawa, A. Osakabe, K. Kawaguchi, T. Shiga, Y. Hayashi-Takanaka, H. Kimura, H. Kurumizaka, “Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, 107, 10454-10459.
- W. Kruger, C. L. Peterson, A. Sil, C. Coburn, G. Arents, E. N. Moudrianakis, I. Herskowitz, “Amino acid substitutions in the structured domains of histones H3 and H4 partially relieve the requirement of the yeast SWI/SNF complex for transcription”, *Genes Dev.*, **1995**, 9, 2770-2779.
- H. Kurumizaka, A. P. Wolffe, “Sin mutations of histone H3: influence on nucleosome core structure and function”, *Mol. Cell. Biol.*, **1997**, 17 (12), 6953-6969.
- U. M. Muthurajan, Y. Bao, L. J. Forsberg, R. S. Edayathumangalam, P. N. Dyer, C. L. White, K. Luger, “Crystal structures of histone Sin mutant nucleosomes reveal altered protein-DNA interactions”, *EMBO J.*, **2004**, 23, 260-271.
- K. Ura, H. Kurumizaka, S. Dimitrov, G. Almouzni, A. P. Wolffe, “Histone acetylation: influence on transcription, nucleosome mobility and positioning, and linker histone-dependent transcriptional repression”, *EMBO J.*, **1997**, 16, 2096-2107.
- W. Iwasaki, H. Tachiwana, K. Kawaguchi, T. Shibata, W. Kagawa, H. Kurumizaka, “Comprehensive structural analysis of mutant nucleosomes containing lysine to glutamine (KQ) substitutions in the H3 and H4 histone-fold domains”, *Biochemistry*, **2011**, in press.
- H.-N. Du, I. M. Fingerman, S. D. Briggs, “Histone H3 K36 methylation is mediated by a trans-histone methylation pathway involving an interaction between Set2 and histone H4”, *Genes Dev.*, **2008**, 22, 2786-2798.
- Y. Tanaka, O. Nureki, H. Kurumizaka, S. Fukai, S. Kawaguchi, M. Ikuta, J. Iwahara, J., T. Okazaki, S. Yokoyama, “Crystal structure of the CENP-B protein-DNA complex: the DNA-binding domains of CENP-B induce kinks in the CENP-B box DNA”, *EMBO J.*, **2001**, 20, 6612-6618.
- M. S. Tawaramoto, S.Y. Park, Y. Tanaka, O. Nureki, H. Kurumizaka, S. Yokoyama, “Crystal structure of the human centromere protein B (CENP-B) dimerization domain at 1.65-Å resolution”, *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 51454-51461.
- Y. Tanaka, H. Kurumizaka, S. Yokoyama, “CpG methylation of the CENP-B box reduces human CENP-B binding”, *FEBS J.*, **2005**, 272, 282-289.
- Y. Tanaka, H. Tachiwana, K. Yoda, H. Masumoto, T. Okazaki, H. Kurumizaka, S. Yokoyama, “Human centromere protein B induces translational positioning of nucleosomes on alpha-satellite sequences”, *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 41609-41618.
- H. Tachiwana, W. Kagawa, T. Shiga, A. Osakabe, Y. Miya, K. Saito, Y. Hayashi-Takanaka, T. Oda, M. Sato, S.Y. Park, H. Kimura, H. Kurumizaka, “Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A”, *Nature*, **2011**, 476, 232-235.
- B. E. Black, D. W. Cleveland, “Epigenetic centromere propagation and the nature of CENP-A nucleosomes”, *Cell*, **2011**, 144, 471-479.

[略歴]

- 1989年 東京薬科大学 薬学部 卒業
 1991年 東京薬科大学大学院 薬学研究科 博士前期課程 修了、薬学修士
 1995年 埼玉大学大学院 理工学研究科 博士後期課程 修了、博士(学術)
 1995年 Laboratory of Molecular Embryology (Dr. Alan P. Wolffe), National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Visiting Fellow
 1997年 理化学研究所、細胞情報伝達研究室、研究員
 2003年 早稲田大学 理工学部、助教授/准教授
 2008年 早稲田大学 理工学術院、先進理工学部・研究科、教授(現職)

「蛍光生物学」の最前線

4

セラミックスナノ粒子を用いた 近赤外励起蛍光バイオイメージング

曾我 公平
東京理科大学
基礎工学部 材料工学科

1. はじめに

蛍光バイオイメージングは観察対象物質に蛍光性を付与することにより高感度、多色で動的にイメージングが可能な手法として、バイオメディカル分野における研究や診断において不可欠なツールとなりつつある。多くの場合観察には可視光の蛍光が用いられている。通常の蛍光では励起光が蛍光に対して短波長である必要があり、可視光の蛍光を得るためには紫外光や短波長可視光が用いられる。これらの波長の短い励起光は同時に量子エネルギーが高く、分子の光分解により有機系蛍光体の退色や観察対象である生体へのダメージ、観察対象以外の自家蛍光を招く。さらには波長が短いために起きる強い散乱のために観察深度は浅くならざるを得ない。光散乱は光損失によって励起光や蛍光の強度が損なわれるばかりでなく、光がランダムな方向に散ることから像のボケをもたらす。図1に示したのは人間の皮膚による光損失である¹⁾。可視光近傍の光の損失は主に短波長ほど強い光散乱と、2000 nm以上の波長域にピークを持つ分子振動による赤外吸収の裾によってもたらされ、1000 ~ 1700 nmの近赤外波長域で谷を形成する。この光透過性の高い波長域は古くから「生体の窓」として知られている²⁾。この図から特に可視光領域では光散乱による損失が強いことが読み取れ、蛍光バイオイメージングにおける蛍光波長の長波長化は一つのトレンドになっている。しかし、近年実用化し

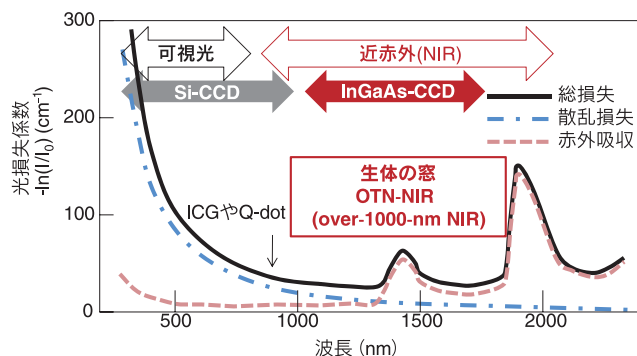


図1 人間の皮膚の光損失スペクトル¹⁾

たインドシアニンググリーン(ICG)³⁾や量子ドット^{4,5)}でもその蛍光波長は900 nmにとどまっておき、「生体の窓」が十分に活用されていないとは言えない。その主たる理由は現在用いられているCCDカメラの大部分がSiのCCDであり、その観察波長が1000 nm以下に限られているためである。一方近年、1000 ~ 1700 nmで観察が可能なInGaAs CCDカメラが入手可能になり、その性能も急速に進歩しつつある。筆者らはこのカメラを用いてイメージングシステムを開発し、希土類含有セラミックスナノ蛍光体(RED-CNP: rare-earth doped ceramic nanophosphor)を蛍光体としたアップコンバージョン(UC)蛍光バイオイメージング及びOTN-NIR (over-1000-nm near infrared) 蛍光バイオイメージングに取り組んできた^{6,7)}。本稿では蛍光体としてのRED-CNPの作製方法と表面機能化にフォーカスし、その研究成果を紹介する。

2. 希土類含有セラミックスナノ粒子と近赤外励起蛍光

3価の希土類イオンは $[Xe]4f^{N-1}5s^25p^6$ の電子配置をとることから、4f電子準位間で遷移が起こる一種の遷移金属である。一般に知られるd電子準位に空軌道のある遷移金属イオンとの違いは、第一に空軌道のある4f電子準位に対して空間的にはさらに外側にある5s5p電子準位が充満しており、これらの電子が4f電子に対して遮蔽効果を持ち、イオン周囲に存在するイオンや分子による外場や振動の影響が弱められることである。結果として3価希土類イオンの電子準位は溶媒効果や結晶場によるシフトが小さく、図2に示すように指紋判別的に観察されるスペクトルの電子遷移を特定することができる。また観察されるスペクトルは原子スペクトルにも似て線幅が極めて狭い。さらにはイオンや分子の振動から遮蔽されているために熱緩和を起こしにくい。第二に4f電子準位間の遷移は本来パリティ禁制であり、外場の影響によりわずかに許容になるforced electric dipole遷移と、許容の電気双極子遷移よりもはるかに振動子強度が小さい磁気双極子遷移、電気四重極子遷移が主な遷移機構であるため、発光を伴う緩和が極めてゆっくり起こる。以上の特徴に起因して、希土類イオンの発光に際し、狭い準位幅、長い励起状態寿命(蛍光寿命)、高い発光効率を特徴とする⁸⁾。また、可視光付近で発光を示す準位間隔が1 ~ 2 eV程度であり、室温の $k_B T$ が約0.025 eV程度であることを考えると1 eV以下(1240 nm以上相当)の近赤外発光準位では格子振動や分子振動の相互作用が強くなり、通常の蛍光体では効率の良い発光を望むことが難しいが、希土類イオンはこの相互作用が弱められ、比較的高い効率で近赤外光を発光できる。

希土類イオンをドープしたセラミックスのこれらの特徴を生かした蛍光体はすでに実用的に用いられており、固体レーザーロッドの代表格であるNd:YAGでは800 nm励起で1064 nm蛍光が効率よく得られ⁹⁾、光増幅に用いられるErドープ石英ファイバーでは980 nm励起で1550 nmの近赤外蛍光が用いられている¹⁰⁾。狭い準位幅と $\mu\text{sec} \sim \text{msec}$ に及ぶ長い準位寿命を用いた、希土類ドープセラミックスに特有な現象がUCである。図3に上述の近赤外蛍光とUC発光を図解する。UCは近赤外励起光により、さらに光子エネルギーの高い可視光を発光しうる現象として知られており、仮想的な準位を必要とする二光子吸収とは本質的に異なる実準位間の多段階励起現象である。熱緩和が起こりにくいホストにドープされた希土類イオンでは、近赤外光を励起光として二段階または三段階の励起過程を経てRGB三原色の可視発光が可能である(図4)¹¹⁾。

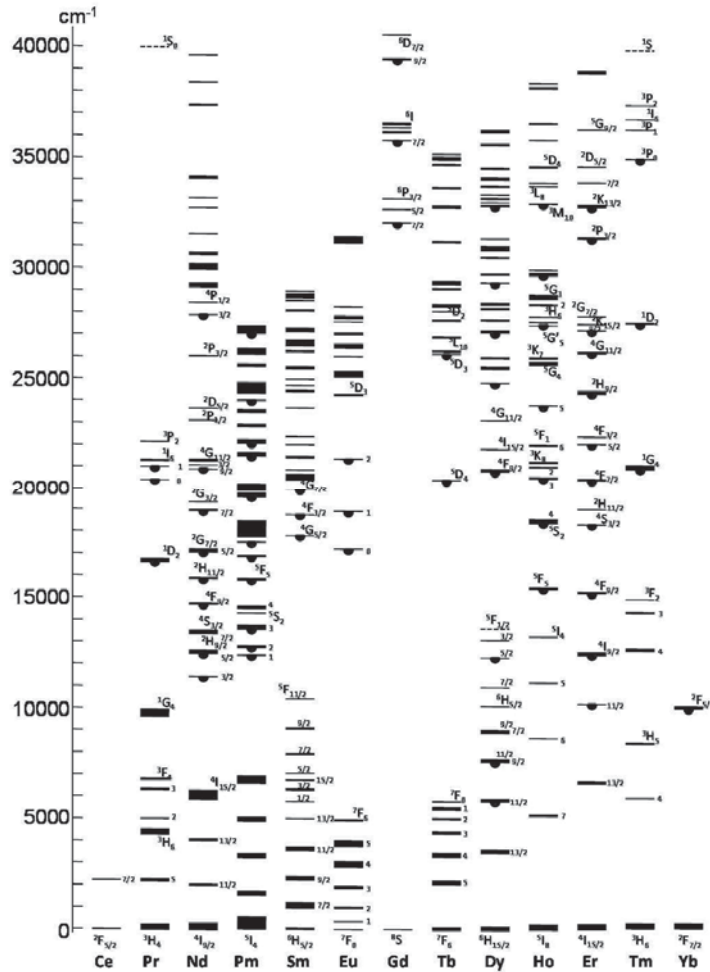


図2 3価希土類イオン中の4f電子のエネルギー準位図。元の図はLaCl₃中の3価希土類イオンについて作成されたものだが、ほとんどのホスト材料に適用することができる⁸⁾。

以上のように希土類ドーパセラミックスは近赤外励起による効率の良い可視・近赤外発光が可能であり、これをナノ粒子化し蛍光バイオイメージングプローブとして用いれば、励起光として短波長光を用いることに起因する蛍光体の退色、生体へのダメージ、自家蛍光、光散乱による損失という現在の蛍光バイオイメージングが抱えるすべての問題を一気に解決することができる。UC 蛍光のバイオイメージングは、励起光源をコンパクトかつ安価な半導体レーザーに変更するだけで可能になることから1990年代後半からすでに報文が発表され始めた¹²⁾。筆者らはイメージングシステムにOTN-NIRである1000-1700 nmでイメージングが可能なInGaAs CCDカメラを組み込めば、多段階励起を必要とするUCよりもはるかに高い効率で励起が可能であり、蛍光も近赤外光であるために生体における蛍光のロスが少ないOTN-NIR 蛍光バイオイメージングに独自に取り組んできた¹³⁾。蛍光プローブ設計の観点からはUC、OTN-NIRに共通のスキームを用いることができる。

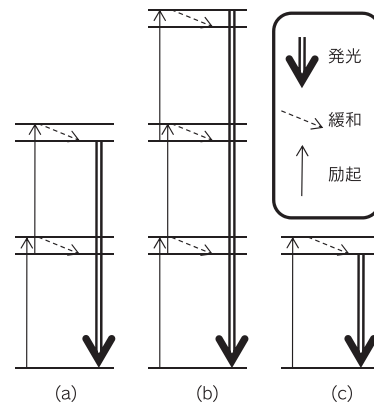


図3 希土類イオンの発光過程。二段階励起アップコンバージョン(a)、三段階励起アップコンバージョン(b)と近赤外蛍光(c)。

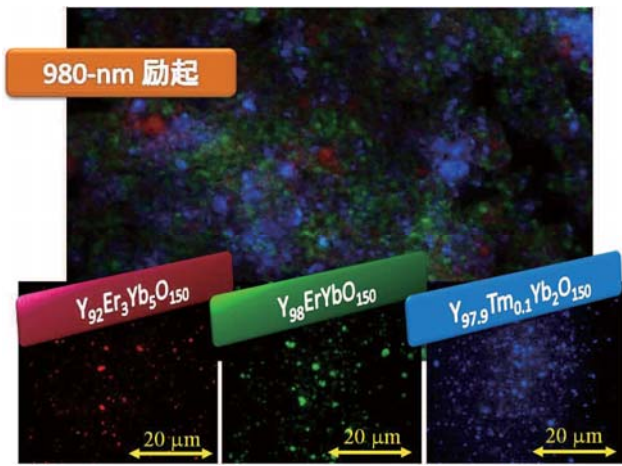


図4 希土類ドーパ酸イットリウム (Y₂O₃) ナノ粒子のRGB 発光像。励起波長は 980 nm。ドーパする希土類の種類と濃度を変化させることにより三原色が得られる。図中の組成はカチオン全体を 100 とした時の組成。

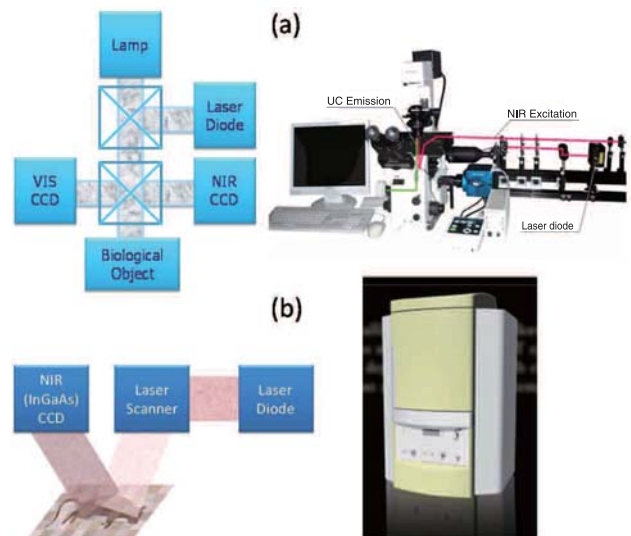


図5 OTN-NIR バイオイメージングのための (a) 生物蛍光顕微鏡システムと (b) 小動物を生きのままイメージングできる *in vivo* 蛍光バイオイメージング (IFBI) システム

3. イメージングシステム

UC 蛍光や OTN-NIR 蛍光でのバイオイメージングを行うために開発した二つのイメージングシステムを図 5 に示す。市販されている蛍光イメージングシステムの主なものは生物蛍光顕微鏡と小動物を生きのままイメージングできる *in vivo* 蛍光バイオイメージング (IFBI) システムである。これらで UC/OTN-NIR 蛍光を観察可能にするためには、励起光源として近赤外レーザーダイオードを搭載する必要がある。また、OTN-NIR 蛍光を観察するためには InGaAs CCD カメラを搭載しなければならない。両システムとも UC 蛍光による可視光を観察するための Si CCD と OTN-NIR 蛍光を観察するための InGaAs CCD カメラの双方を搭載している。図 6 に示すのは線虫の餌に RED-CNP を混ぜ込んでその消化管を観察した世界初の OTN-NIR バイオイメージング画像である¹⁴⁾。光ダメージのない近赤外光を励起光とし、セラミックスを蛍光体とした OTN-NIR 蛍光イメージングでは、半永久的に退色せず、生きのままの線虫の動画撮影が可能である。図 7 はネズミの餌に

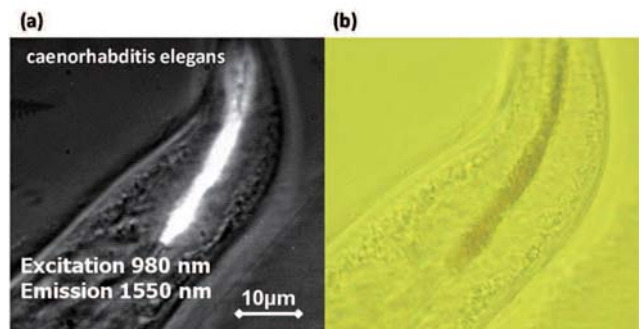


図6 線虫の消化管に取り込ませた粒子の 980 nm 励起 1550 nm 発光による OTN-NIR 蛍光バイオイメージング¹⁴⁾。(a) は蛍光像、(b) は明視野像。

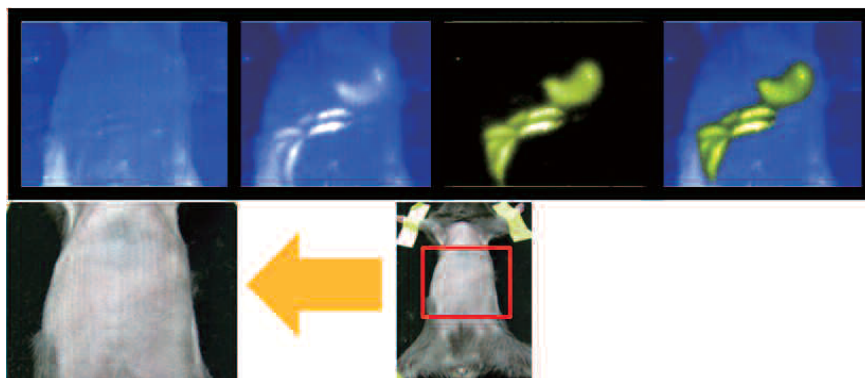


図7 世界初の 1550 nm 蛍光による OTN-NIR-IFBI。マウスに餌と RED-CNP を混合して食させ、撮影したもの。消化管が深部まで鮮明に観察できる¹⁵⁾。

RED-CNPを混ぜ込んでその消化管を観察したOTN-NIR IFBI画像である¹⁵⁾。光散乱の低減により開腹することなく鮮明な消化管の蛍光像が得られている。これまでの研究開発で従来は数mmが限界であった蛍光 *in vivo* イメージングで、筋肉組織を隔てて3 cmの蛍光が判別可能であることが明らかになっており、OTN-NIR 蛍光バイオイメージング、特にIFBIは生体深部の観察が可能な次世代の新たなイメージングとして注目を集めている。なお、筆者ら(東京理科大学)との共同開発によるOTN-NIR *in vivo* IFBIシステムは島津製作所よりNIS-OPTという名称で市販されている。

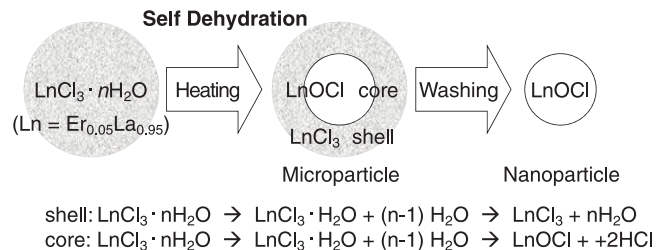


図9 自己加水分解によるLaOCl ナノ粒子の作製法¹⁴⁾

4. セラミックスナノ粒子の合成

RED-CNPの設計は所望の励起波長と蛍光波長を図2と見比べて始まるが、特にフォノンエネルギーに注目したホストの選定と¹⁶⁾、エネルギー移動などの諸現象に注目した濃度の設定¹⁷⁻¹⁹⁾が必要である。著者らは主にEr、Tm、HoをYbと共ドープしたY₂O₃、YPO₄、LaOCl、NaYF₄を中心に研究を進めている。バイオイメージング用のプローブとしてRED-CNPのサイズは10~300 nm程度であることが望ましい。10 nmを切ると、希土類イオンがホストの外の分子やイオンの外場の影響を受けて発光しにくくなる。発光の上ではいくら大きくても構わないが、生体応用を考えると水溶液中での単分散安定性が前提であり、あまり粒子サイズが大きいと沈降してしまうことから、我々は上限を300 nm程度に設定している。粒径分布は重要であり、第一義的に粒子の発光強度は粒子中の希土類イオンの数に比例する体積に比例し、粒径の三乗に依存して変化する。このため均一粒径で10~300 nmの範囲で粒径をコントロールすることが課題となる。

図8に粒径をコントロールしたイットリアのSEM像を示す。多くの場合粒径の制御されたRED-CNPは、溶液中で前駆体を析出させ、焼成することによって得られる。たとえば、希土類イオンが溶解した酸性水溶液に沈殿剤としてアンモニア水溶液などを加えると、水酸化物が析出する。しかしこの場合は沈殿剤を注いだ部分の沈殿剤濃度が高く、周囲に向けて沈殿剤濃度が分布するために、どうしても大きな粒径分布が生じてしまう。この問題を解決するために古くから知られる方法が均一沈殿法である。沈殿剤として室温で尿素を混合すると、室温では反応は起こらない。そこから均熱に注意しながら水溶液を徐々に加熱すると80℃付近で尿素が分解し、アンモニアと炭酸を生じる。たとえばY³⁺水

溶液中に尿素を添加して加熱するとY³⁺ + OH⁻ + CO₃²⁻ → YO₃ (CO₃)の反応が起こる。この時点で尿素の濃度は均一になっているので沈殿剤であるアンモニアと炭酸の濃度も均一であり、結果として均一粒径の前駆体YO₃ (CO₃)を得ることができ、焼成後図8のような均一粒径のY₂O₃粒子が得られる²⁰⁾。

この方法により約50~300 nmの均一粒径のY₂O₃粒子を作製することができるが、さらに小粒径の前駆体を得るためには80℃の水溶液では活性が高すぎる。そこで筆者らは熱により尿素の分解のための活性化エネルギーを得るのではなく、酵素を用いて室温での尿素の分解を試みた。この方法を用いると20~30 nmの極めて小粒径のY₂O₃ナノ粒子を得ることができる²¹⁾。

一般にナノサイズのセラミックス前駆体は大きな比表面積に伴う表面エネルギーのために、焼成時に容易に焼結してしまう。筆者らはこれを防ぐために焼成時ナノ粒子間にK₃PO₄を添加し、粒子同士を隔離して焼成し、水溶性のK₃PO₄を洗浄することにより数十nmのサイズのY₂O₃粒子を焼結することなく得られることを明らかにした²²⁾。

一方、良好なUC蛍光やOTN-NIR蛍光を示すLaOClでは極めてユニークなナノ粒子合成法を提案している²³⁾。LaCl₃は常温で7水和物が安定であるが、加熱により脱水し1水和物となる。この時、さらに粒子を加熱すると粒子表面は無水化するが、粒子の中心部には1水和物が残留し、やがてLaCl₃·H₂O → LaOCl + 2HClという自己加水分解反応によりLaOClを生じ、図9に示すような中心部がLaOCl、外部が無水LaCl₃というコアシェル構造を持った粒子を作製することができる。これを水中に投入すると極めて水溶性の高いLaCl₃のみが溶解し、LaOClナノ粒子が得られる。K₃PO₄を用いた方法と同様、この方法でも焼成時に目的とするLaOCl粒子は無水LaCl₃によって相互に隔離されている。

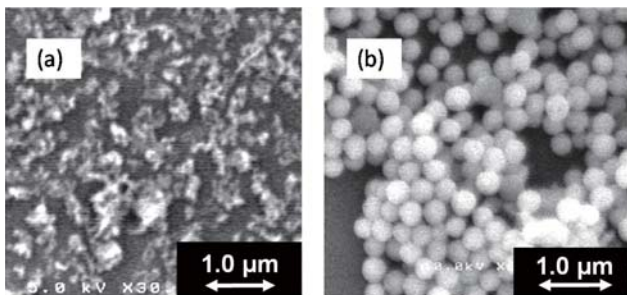


図8 アルカリ沈殿法により作製したY₂O₃粒子(a)と均一沈殿法により作製したY₂O₃粒子(b)。アルカリ沈殿法では沈殿剤の濃度分布により粒径が大きく分布するが、均一沈殿法では均一粒径の粒子が得られる。

5. セラミックスナノ粒子の機能化

得られたRED-CNPは表面電位を持つために純水中では分散するが、イオン性の水溶液では表面電位がイオンによりキャンセルされ、凝集沈降する。バイオイメージングでは生理環境に相当するイオン強度の水溶液中での分散が必須であり、このために親水性高分子を粒子表面に導入し、立体反発による分散安定性を付与しなければならない。また、粒子そのものは非特異的に観察対象以外の細胞や組織と相互作用するため、標的の物質を染め分けるためには非特異的な相互作用を抑制しなければならない。さらには特定の細胞や物質に蛍光性を付与するための特異的な相互作用の導入が必要である。この三条件、すなわち分散安定性、非特異

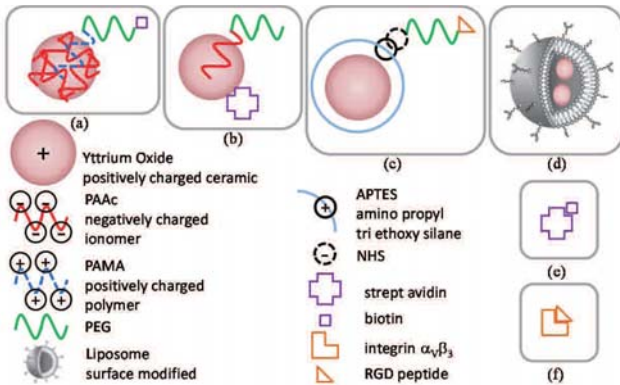


図 10 Y₂O₃ ナノ粒子の様々な表面修飾スキーム。詳細は本文参照。

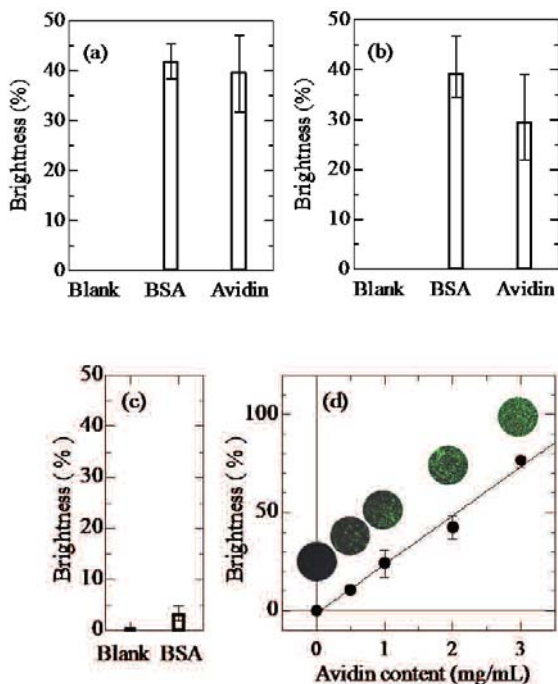


図 11 Y₂O₃ ナノ粒子上への PAAc/biotinyl PEG-b-PAMA 二層修飾による表面機能化。(a) は未修飾粒子、(b) は PAAc のみを修飾したもの、(c) PAAc/biotinyl PEG-b-PAMA 二層修飾を施した粒子のスライドガラス (blank)、BSA プレート (BSA: 非特異的な相互作用) とアビジンプレート (a ~ d) への蛍光プレートアッセイの結果。蛍光検出には 980 nm 励起、550 nm 発光のアップコンバージョン蛍光を用いている²⁴⁾。

的な相互作用の抑制、特異的な相互作用の付与を目的として、筆者らは毒性がなく生体親和性が高いことで知られるポリエチレングリコール (PEG) とリガンド分子を粒子表面に導入する種々の方法を検討している。

図 10 に様々な修飾スキームをまとめた⁶⁾。先に紹介した Y₂O₃ ナノ粒子の表面は中性条件で正に帯電している。スキーム (a) で

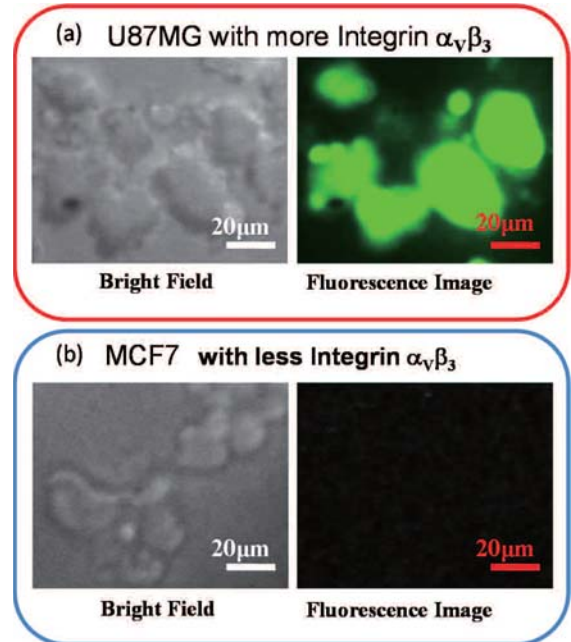


図 12 シランカップリング剤 APTES を用いてアミンを導入し、NHS-PEG-MA を Y₂O₃ ナノ粒子上に結合させることにより作製した最表面に RGD ペプチドを持つプローブで integrin $\alpha_v\beta_3$ を多く発現している U87MG 細胞を特異的に染色した場合の UC 蛍光イメージ²⁷⁾。

は酸性条件下で正に帯電する poly[2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl methacrylate] (PAMA) のブロックをもち、もう片末端にアビジンと特異的に相互作用する biotinyl 基をもつブロック共重合体である biotinyl PEG-b-PAMA を粒子表面に修飾するため、Y₂O₃ ナノ粒子表面を負に帯電するアイオノマーであるポリアクリル酸 (PAAc) で一次的に修飾し、さらに biotinyl PEG-b-PAMA を導入した例である²⁴⁾。PEG と先端に導入したビオチンの効果で上記の三条件を満たし、図 11 に示すようにアビジンプレートとのみ特異的に相互作用することが蛍光プレートアッセイにより示された。

スキーム (b) では水溶液中で負に帯電するアイオノマーである PAAc と PEG のブロック共重合体である PEG-b-PAAc を用いることにより、正に帯電した Y₂O₃ ナノ粒子の表面と負に帯電する PAAc を静電的に相互作用させることにより PEG を導入し、同時にアビジンを粒子表面に導入している。Y₂O₃ ナノ粒子の表面と PAAc の相互作用は静電的なイオン間の相互作用にとどまらず、カルボキシル基と Y³⁺ 間のキレートリングが多点で起こるために強固に粒子表面に PEG を導入することができる。この方法でも分散安定性、非特異的な相互作用の抑制、ビオチン化プレートとの特異的な相互作用が確認されている²⁵⁾。上村らは近年同様に有用なリン酸基を有するポリマーブロックとのブロック共重合体として PEG-b-poly(4-vinylbenzylphosphonate) (PEG-b-PVBP) を開発し、OTN-NIR IFBI を行っている²⁶⁾。

スキーム (c) では、Y₂O₃ ナノ粒子表面の Y-OH とアミノプロピル基を有するシランカップリング剤である 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTES) との脱水縮合により、粒子表面にアミノ基を

導入し、さらに片末端にアミド結合のための *N*-hydroxy-succinimide (NHS) を持ち、もう一方に RGD ペプチドを導入するためのマレイミド (MA) を持つ PEG、NHS-PEG-MA を反応させることで、RGD ペプチドを末端に有する PEG を Y_2O_3 ナノ粒子表面に導入した例である。こうして作られたプローブは図 12 に示すように integrin $\alpha v \beta_3$ を多く発現している U87MG 細胞に特異的に蛍光性を付与できることが示された²⁷⁾。

スキーム (d) ではリポソーム中に Y_2O_3 ナノ粒子を導入している。リン脂質二重膜からなり、動物細胞の表面と同じ構造を持つリポソームは、種々の分子が結合したリン脂質を表面に導入可能であり、表面電位の調節やリガンド導入が容易に行える上、細胞との膜融合によりリポフェクションによる粒子の細胞内への送込が可能である²⁸⁾ ことから、薬剤やイメージング用蛍光体のデリバリーに有用な材料である。筆者らは RED-CNP を導入したリポソームを作製し、マウスに投与することによりその挙動を OTN-NIR IFBI を用いて解析している²⁹⁾。

6. おわりに

近赤外光を励起光とし、RED-CNP を蛍光体とした UC 蛍光バイオイメージングと、特に次世代の IFBI 技術として期待を集める OTN-NIR 蛍光バイオイメージングについて総説した。特に OTN-NIR IFBI はこれまでにない深部のイメージングが可能な新たな手法として今後の発展が望まれる技術である。これらの技術については著者への問い合わせを歓迎する。

謝辞

ここに紹介した研究は筑波大学の長崎幸夫教授とグループメンバー、理化学研究所の座古保氏をはじめとする前田バイオ工学研究室のメンバー、東京理科大学の岸本英博准教授とグループメンバー、田代文夫教授とグループメンバーをはじめ、多くの方との共同研究により得られた研究成果であり、これらの方々から謝意を表する。

[参考文献]

- 1) R. R. Anderson *et al.*, *J. Investive Dermatology*, **1981**, 77, 13-19.
- 2) 飯沼武ら編, “医用物理学”, 医歯薬出版, 東京, **1998**, 162.
- 3) B. E. Schaafsma *et al.*, *J. Surgical Oncology*, **2011**, 104, 323-332.
- 4) 山本重夫監修, “量子ドットの生命科学領域への応用,” シーエムシー出版, 東京, **2007**.
- 5) Q. Ma *et al.*, *Analyst*, **2010**, 135, 1867-1877.
- 6) 曾我公平, バイオマテリアル-生体材料-, **2011**, 29, 95-103.
- 7) K. Soga, “Nanostructured Materials for Biomedical Applications,” **2009**, Transworld Research Network, 223-241.
- 8) 櫛田孝司, “光物性物理学”, 朝倉書店, 東京, **1991**.
- 9) R. C. Powell, “Physics of Solid State Laser Materials,” Springer, New York, **1998**.
- 10) S. Sudo *et al.*, “Optical Fiber Amplifiers: Materials, Devices, and Applications, Artech House Publishers,” Norwood, MA, USA, **1997**.
- 11) 曾我公平他, 応用物理, **2008**, 77, 1458-1461.
- 12) H. J. M. A. Zijlmans *et al.*, *Analytical Biochemistry*, **1999**, 267, 30-36.
- 13) 曾我公平, 金属, **2008**, 7, 6-11.
- 14) 曾我公平, 分析化学, **2009**, 58, 461-471.
- 15) K. Soga *et al.*, *Proc. SPIE*, **2010**, 7598, 759807-1-9.
- 16) K. Soga *et al.*, *J. Appl. Phys.*, **2003**, 93, 2946-2951.

- 17) M. Tsuda *et al.*, *J. Appl. Phys.*, **1999**, 85, 29-37.
- 18) M. Tsuda *et al.*, *J. Appl. Phys.*, **1999**, 86, 6143-6149.
- 19) M. Tsuda *et al.*, *J. Appl. Phys.*, **2000**, 88, 1900-1906.
- 20) K. Soga *et al.*, *J. Phys. Conf. Ser.*, **2008**, 106, 012023-1-5.
- 21) N. Venkatachalam *et al.*, *J. Am. Ceram. Soc.*, **2009**, 92, 1006-1010.
- 22) K. Soga *et al.*, *J. Phys. Conf. Ser.*, **2009**, 191, 012003-1-7.
- 23) T. Konishi *et al.*, *J. Mater. Sci. Mater. Electron.*, **2007**, 18, S183-186.
- 24) Y. Saito *et al.*, *Trans. Mater. Soc. Jpn.*, **2008**, 33, 803-806.
- 25) M. Kamimura *et al.*, *Langmuir*, **2008**, 24, 8864-8870.
- 26) M. Kamimura *et al.*, *Nanoscale*, **2011**, 3, 3705-3713.
- 27) T. Zako *et al.*, *J. Mater. Sci.*, **2008**, 45, 5325-5330.
- 28) H. Akiyama *et al.*, *J. Phys. Conf. Ser.*, **2010**, 232, 012001-1-4.
- 29) K. Soga *et al.*, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2010**, 2010, 2673-2677.

筆者プロフィール



氏名: 曾我 公平 Kohei SOGA

年齢: 44 歳

所属: 東京理科大学 基礎工学部 材料工学科
〒278-8510 野田市山崎2641

Tel: 04-7122-9689

Fax: 04-7124-1526

e-mail: mail@ksoga.com

略歴:

1990年 東京大学工学部金属工学科卒業

1995年 東京大学大学院工学系研究科材料学専攻博士課程修了、博士(工学)学位取得

1995年 東京大学大学院工学系研究科材料学専攻 助手

1999年 東京大学大学院新領域創成科学研究科物質系専攻 助手

2004年 東京理科大学基礎工学部材料工学科 講師

2007年 同 准教授

1994 ~ 1995年 日本学術振興会 特別研究員

1999 ~ 2000年 米国ニュージャージー州立ラトガース大学 博士研究員

2009年 ~ 2010年 台湾國立清華大學 客員教授

2010年 台湾國立陽明大學 客員教授

現在の研究テーマ

希土類含有セラミックスナノ粒子を用いた近赤外バイオイメージングの材料設計からイメージングデバイス構築まで幅広く手掛けています。

Topics on Chemistry

Glutathione S-transferase (GST) 活性をイメージングするための新規蛍光プローブ

株式会社同仁化学研究所 大内 雄也

Glutathione S-transferase (GST) は、毒物や薬物、生理活性物質などに、抗酸化物質の一つであるグルタチオンを付加する反応を触媒する酵素である。この反応はグルタチオン抱合と呼ばれ、解毒、代謝、酸化ストレス応答やシグナル伝達などに深く関与していることから重要な癌マーカーとして、また癌治療のターゲットタンパク質として注目されている。さらに GST はその酵素活性だけでなく、細胞内局在によって細胞機能をコントロールしていることが最近報告され、細胞内イメージングの必要性が示唆されている。

GST 活性の一般的な検出法として 2,4-Dinitrochlorobenzene (CDNB) を用いた方法が知られている。CDNB は、GST の良好な基質となりグルタチオンと効率よく反応する。この反応によって生成するグルタチオン抱合体は 340 nm の吸収をもつため、この吸光度変化を観察することによって酵素活性を測定することができる。しかしながら本手法は、比色法のため感度が低い、細胞内イメージングには適用できない、CDNB とグルタチオンが酵素非依存的に反応する、などの問題がある。一方で蛍光基質を用いた手法も報告されている。Monochlorobimane (mBCI) は、それ自体無蛍光であるが、グルタチオンと反応すると蛍光を発する。蛍光法を用いているため CDNB よりも高感度であり、GST 活性の細胞内イメージングに用いた例も報告されている¹⁾。しかし、CDNB と同様に酵素非依存的な反応が進行する、短波長励起のため細胞へのダメージが大きい、などの問題があり満足のいく方法とは言えない。

そこで本トピックでは、GST 活性の細胞内イメージングに適用できる新規の蛍光プローブについて紹介したい。

Fujikawa らは、PeT (photoinduced electron transfer) 機構に基づいた GST 活性特異的な蛍光プローブの開発に成功している²⁾。まず彼らは、CDNB や mBCI の抱える“酵素非依存的な反応”という問題を解決するため、種々の基質化合物の評価を行い、3,4-

Dinitrobenzanilide (NNBA) が GST 酵素依存的にグルタチオンと反応する特異的な基質となることを見出している。そして、この構造を蛍光色素 (フルオレセイン) に組み込むことにより GST 特異的な蛍光プローブ DNAF を開発している。この蛍光プローブは、その構造内の 3,4-Dinitrobenzamide 基が GST の基質として働くと共に PeT アクセプターとなる。そのため、蛍光プローブ自身は無蛍光であるが、GST によってグルタチオンが Dinitrobenzamide 基の 4 位の部位に付加されると PeT が解消され、30 倍以上の強い蛍光を発する。さらに蛍光色素の部分に疎水性の高い蛍光色素 (TokyoGreen) に変えた DNAT-Me によって細胞内の GST 活性イメージングに成功している。胆管癌細胞 (HuCC1) は GST 活性が高く、種々の抗癌剤に対する耐性を有していることが知られている。特に核内に存在する GSTP (GST の Pi isoform) は、非常に活性が高く薬物耐性の大きな要因と考えられている。DNAT-Me を用いたイメージングでは、核内に強い蛍光が観察されており、核内に存在する高活性の GSTP の存在を明らかにしている。

一方、Zhang らは GSH/GST 反応によるスルホアミド結合の開裂反応に着目し、新規の蛍光プローブの開発を試みている³⁾。強い蛍光を発する蛍光色素 Coumarin、Rhodamine、Cresyl Violet のアミノ基に、強い電子吸引基である 2,4-Dinitrobenzenesulfonyl (DNs) 基を導入したこれらの蛍光プローブ (DNs-Coum, DNs-AcRh, DNs-CV) は、それ自体は無蛍光である。しかしながら、GST によって GSH が反応するとスルホアミド結合の開裂が生じ、DNs 基が蛍光色素から脱離する。その結果、元の蛍光色素である Coumarin、Rhodamine、Cresyl Violet が生成し、強い蛍光を発するのである。驚くべきはその蛍光強度比であり、GSH/GST 反応によって Coumarin では 71 倍、Rhodamine では 110 倍、Cresyl Violet では 580 倍もの蛍光増加が確認されている。これらの蛍光プローブは GST の良好な基質となると共に酵素非依存的な反応がほとんど生じないため、有効な GST 特異的な蛍光プローブと言える。特に Cresyl Violet を蛍光色素とする DN-CV は、反応性および特異性、さらに細胞透過性の面で優れており、細胞内イメージングに適している。実際に DN-CV を GST 発現細胞に適用したところ、GST 活性由来の強い蛍光が観察され、この蛍光プローブが GST 活性のイメージングに応用できることを示している。

以上のように、これらの蛍光プローブはこれまで達成しえなかった GST 活性の特異的な検出や細胞内イメージングを可能にしている。GST の細胞内機能は酵素活性のみならず、その細胞内局在が重要となっており、このような蛍光プローブを用いた GST 活性の細胞内イメージングは新しい研究ステージを切り開くものと期待される。

以上のように、これらの蛍光プローブはこれまで達成しえなかった GST 活性の特異的な検出や細胞内イメージングを可能にしている。GST の細胞内機能は酵素活性のみならず、その細胞内局在が重要となっており、このような蛍光プローブを用いた GST 活性の細胞内イメージングは新しい研究ステージを切り開くものと期待される。

[参考文献]

- 1) K. Briviba, G. Fraser, H. Sies and B. Ketterer, *Biochem. J.*, **1993**, 294, 631.
- 2) Y. Fujikawa, Y. Urano, T. Komatsu, K. Hanaoka, H. Kojima, T. Terai, H. Inoue and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 14533.
- 3) J. Zhang, A. Shibata, M. Ito, S. Shuto, Y. Ito, B. Mannervik, H. Abe and R. Morgenstern, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 14109.

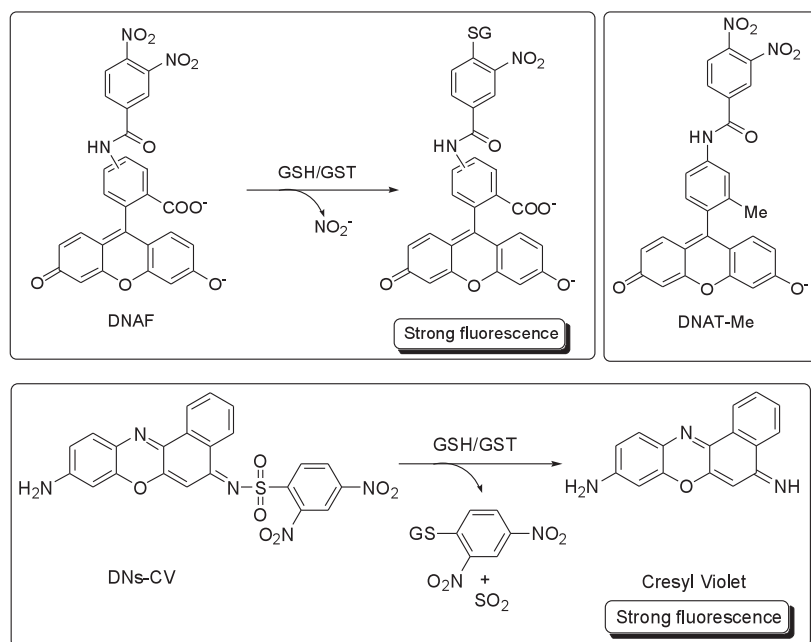


Fig. 1 GST 活性特異的な蛍光プローブ

Topics on Chemistry

ARP (Aldehyde Reactive Probe) を用いたカルボニルタンパク質の解析

株式会社同仁化学研究所 崎山 順次

活性酸素などの酸化ストレス分子種は、生物が生命活動を営むことによって必然的に発生するものであり、避けることのできないものである。そのような酸化ストレスに対し、生体は酸化ストレス分子種を消去するための抗酸化システムを機能させ、生体の酸化還元状態のバランスを取っている。しかしながら、何らかの要因で酸化ストレスのバランスが崩れると、生体組織すなわちタンパク質や脂質、DNA の酸化的損傷を引き起こす。このような酸化的損傷は、さまざまな疾病や老化などに関与していると考えられており、疾病の診断や治療、老化などの酸化ストレスマーカーとして注目されている。

タンパク質のカルボニル化は、主要なタンパク質損傷の一つである。カルボニルタンパク質は、アミノ酸側鎖の酸化的分解や脂質の過酸化反応によって生じるアルデヒド化合物の付加によって生成されることが確認されている。カルボニルタンパク質の一般的な解析法の一つとして 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) 法が挙げられる。本手法は、カルボニルタンパク質のアルデヒド基を DNPH でラベル化し、その吸収からアルデヒド基を定量、あるいは抗 DNPH 抗体を用いてアルデヒド基を検出する方法であり、一般的に広く用いられている (Fig. 1)。

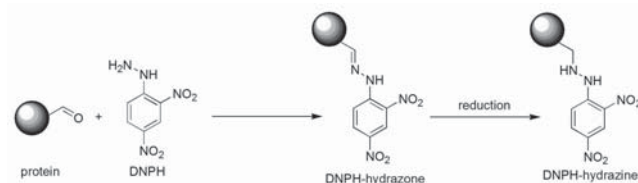


Fig. 1 DNPH 法によるカルボニルタンパク質のラベル化

しかしながら本手法は、酸性条件下での反応が必要であること、形成されたヒドラゾン結合が不安定であること、またそのために、より安定したヒドラジン誘導体への還元ステップが必要であることなどの問題点がある。そこで今回のトピックでは、DNPH 法に代わる新規のカルボニルタンパク質の解析法について紹介したい。

ARP (Aldehyde Reactive Probe) は、ヒドロキシルアミンを有するピオチン化合物であり、アルデヒド基と中性条件下で効率的に反応し、非常に安定な結合を形成する。本試薬は損傷 DNA の修復過程において生じる脱プリン/脱ピリミジン部位 (AP site) を検出する試薬として知られているが、近年 ARP をカルボニルタンパク質の解析に利用した例が報告されている (Fig. 2)。

Maierらは、ARPを用いてカルボニルタンパク質をラベル化し、ペルオキシダーゼ標識アビジンを用いたウェスタンブロット検出、さらにMS解析によるカルボニルタンパク質の同定を行っている^{2),3)}。ARPを用いた解析の結果、ラットのミトコンドリアタンパク質において、種々のカルボニルタンパク質が確認されている。また、若年ラットと老年ラットのカルボニル化の程度を比較した結果、いくつかのタンパク質において月齢に依存したカルボニル化の増加が観察され、カルボニル化が老化に関与していることを示している。

SladeらはMCF7乳がん細胞にて脂質過酸化由来のアルデヒドであるDODE (9,12-dioxo-10 (E)-dodecanoic acid) のタンパク質修飾について報告している (Fig. 3)。DODEは、リノール酸の過酸化化合物から生成する不飽和アルデヒド化合物であり、HNE (4-hydroxy-2(E)-nonenal) やONE (4-oxo-2(E)-nonenal) と同様にタンパク質に付加することが知られている。彼らはARPを用いてカルボニルタンパク質を網羅的に解析し、MCF7乳がん細胞中

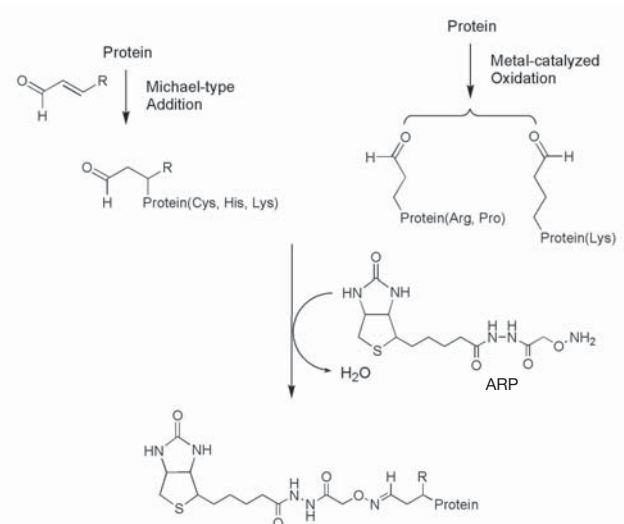


Fig. 2 ARP によるカルボニルタンパク質のラベル化

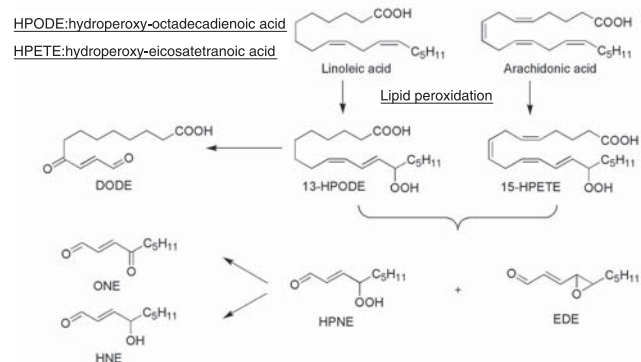


Fig. 3 脂質過酸化由来のアルデヒド化合物

において DODE が付加したタンパク質が多く生成していることを明らかにしている。本研究結果は、DODE 修飾タンパク質が重要な酸化ストレスマーカーとなりうることを示す最初の報告例である。

以上のように、ARP を用いたカルボニルタンパク質の解析法によって新しい研究結果が報告され、その有用性が示されている。ARP を用いたこの手法は一般的な DNPH 法と比べ、①ラベル化のステップが簡便である、②形成された結合が安定である、③ピオチン-アビジン相互作用を用いることで精製、濃縮および検出が容易である、などの利点を有しており、カルボニルタンパク質解析の新しい研究ステージを提供するものと期待される。

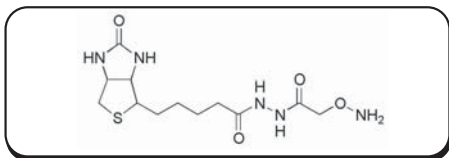
[参考文献]

- 1) P. G. Slade, M. V. Williams, V. Brahmabatt, A. Dash, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum, *Chem. Res. Toxicol.*, **2010**, 23 (3), 557.
- 2) W-G Chung, C. L. Miranda, C. S. Maier, *Electrophoresis*, **2008**, 29, 1317.
- 3) J. Chavez, J. Wu, B. Han, W-G Chung, and C. S. Maier, *Anal. Chem.*, **2006**, 78, 6847.

関連製品

酸化ストレス関連試薬

ARP (Aldehyde Reactive Probe)



DNAはアルキル化剤や発癌剤、放射線などにより物理的、化学的損傷を受けます。損傷したDNAは細胞内の損傷修復機構により正常な状態に修復されます。その修復過程において脱プリン/脱ピリミジン部位 (AP site) が生じます。正常な修復系ではこのAP siteはAP-エンドヌクレアーゼにより選択除去され、DNAポリメラーゼによりDNAの修復が行われますが、何らかの原因でAP siteが修復されなかった場合、突然変異や発癌、細胞死の原因となります。AP siteを定量することは、DNA損傷の1つの目安となり、また定量法の開発はDNA修復機構の研究に大きく寄与するものです。

ARP (Aldehyde Reactive Probe) は久保らにより、比較的簡単にAP siteを定量できる試薬として開発されました¹⁾。ARPはAP siteのアルデヒド基と特異的に結合する化学プローブで、AP siteに生じたアルデヒド基と反応するアミノキシル部位とアビジンと特異的に結合するビオチン部位からできています (Fig. 1)。ARPは、ビオチンヒドラジドよりもアルデヒド基に対する反応性が高く、ビオチン/アビジン-酵素/発色基質の系で定量した場合10,000ヌクレオチド当たり1個程度の割合で含まれるAP siteを定量することができます。-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting- (Code. DK02)は、ARPを用いてAP siteの数を測定するためのキットで、本キットによりサンプルから単離されたDNA中のAP siteを1 AP site/10⁵塩基対の感度で測定できます。

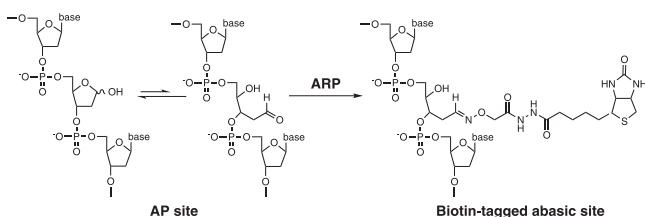


Fig. 1 AP siteとARPとの反応

[参考文献]

- 1) K. Kubo, H. Ide, S. S. Wallace and Y. W. Kow, *Biochemistry*, **1992**, *31*, 3703.
- 2) H. Ide, K. Akamatsu, Y. Kimura, K. Michiue, K. Makino, A. Asaeda, Y. Takamori and K. Kubo, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 8276.

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
ARP (Aldehyde Reactive Probe)	10 mg	20,400	A305

-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting-			
	5 samples	24,000	DK02
	20 samples	72,000	DK02

試作品

アセチルコリンエステラーゼ活性測定用キット

AChE-Specific Assay Kit

<特長>

- ・新規の基質である MATP+ を使用
- ・高選択的にアセチルコリンエステラーゼ活性を測定できる
- ・DTNBを用いた簡便な比色法
- ・アセチルコリンエステラーゼ阻害活性も測定できる

アセチルコリンエステラーゼ (AChE) は、神経伝達物質であるアセチルコリンを分解して神経伝達系をコントロールする重要な酵素の一つであり、脳や血中等に存在することが知られています。この酵素は有機リン系およびカルバメート系の農薬や殺虫剤などによって活性が低下することから、これらの薬物の曝露指標として用いられています。また、アルツハイマー病では神経障害によってアセチルコリン量が減少するため、AChE阻害剤がアルツハイマー病治療薬として用いられています¹⁾。

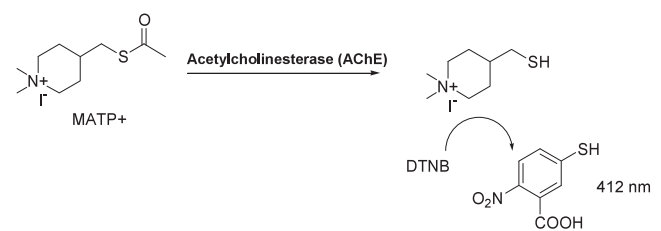


Fig. 1 アセチルコリンエステラーゼ活性測定法の原理

本キットは、AChE活性を測定するためのキットです。キットには、新規基質である MATP+ が含まれており、一般的な基質であるアセチルチオコリンに比べ、高選択的に AChE 活性を測定することができます²⁾ (Fig. 1)。

検出には DTNB を用いた比色法を利用しています。キット付属の Standard AChE を用いることで、簡便に AChE 活性を求めることができます。また、これまで煩雑であったブチリルコリンエステラーゼ (BChE) 阻害剤の添加や赤血球の単離を行うことなく、AChE 阻害活性を測定することも可能であり、農薬の検出や AChE 阻害物質のスクリーニングにも有用です。

* MATP+ は、独立行政法人 放射線医学総合研究所によって開発された新規のアセチルコリンエステラーゼ基質です。

[参考文献]

- 1) T. Kikuchi, T. Okamura, K. Fukushima, and T. Irie, *Biol. Pharm. Bull.*, **2010**, *33*, 702.
- 2) 杉本八郎, 日薬理誌, **2004**, *124*, 163.

<キット内容>

- ・ MATP+ × 2 本
- ・ Assay buffer 100 ml × 1 本
- ・ DTNB × 2 本
- ・ Standard AChE × 1 本

新製品

細胞用過酸化脂質検出蛍光試薬

Liperfluo

<特長>

- 1) 細胞の過酸化脂質のイメージングや検出ができる
- 2) 長波長励起のため、細胞への光ダメージや自家蛍光の影響を軽減できる
- 3) 過酸化脂質特異性が高い

Liperfluo は、Spy-LHP¹⁾ の類似化合物で、過酸化脂質検出用の試薬であり、過酸化脂質で特異的に酸化されエタノール等の有機溶媒中で強い蛍光を発します (Fig. 1, 2)。Liperfluo 酸化体の励起波長および蛍光波長はそれぞれ 524 nm、535 nm で、測定試料への光によるダメージや試料由来の自家蛍光の影響を軽減できます。本試薬は、ジイソキノリン環の片方にテトラエチレンジオキシメチル基が導入されたもので、Spy-LHP よりも水系バッファー中での分散性が向上しています。Liperfluo 酸化体は水中ではほとんど蛍光を発しませんが、細胞膜等の脂溶性の高い部位では蛍光性となることから、容易に蛍光顕微鏡による生細胞の過酸化脂質のイメージングやフローサイトメトリーによる細胞の過酸化脂質量の分析に使用することができます。

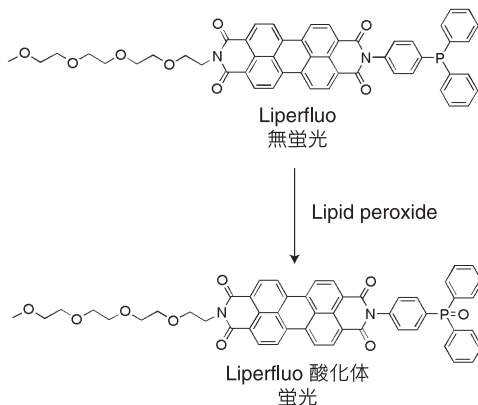


Fig. 1 Liperfluo の酸化反応

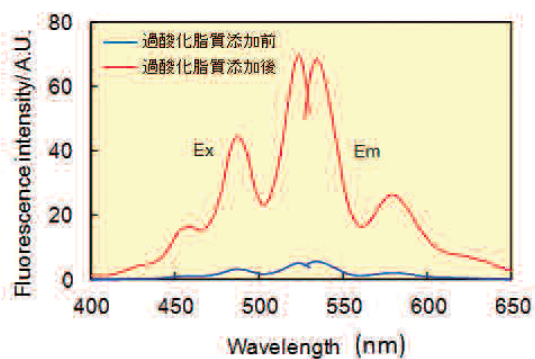


Fig. 2 過酸化脂質による Liperfluo の励起および蛍光スペクトル変化 (エタノール溶媒中)

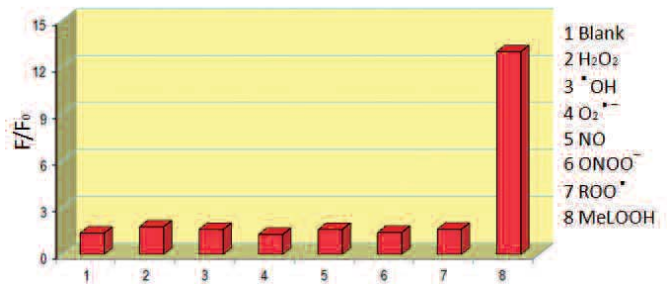


Fig. 3 Liperfluo の活性酸素種に対する反応選択性

使用例

細胞の過酸化脂質検出

- 1) Liperfluo 50 µg を含むチューブに DMSO 60 µl を添加し、ピペッティング等を使用して溶解する (濃度：1 mmol/l)。
 - ※ピペッティングだけでは溶解しにくいのでボルテックス、超音波、または加温にて溶解してください。
 - ※ Liperfluo (DMSO) 溶液調製後は、アルミホイル等で遮光し、その日のうちにご使用ください。
- 2) 操作 1 で調製した Liperfluo 溶液を細胞に添加する。
 - 例：細胞懸濁液 (細胞数 1.0 × 10⁵ cells/ml) 1 ml に対して適量の Liperfluo (DMSO) 溶液を添加する。

添加量	Liperfluo 濃度
10 µl	10 µmol/l
5 µl	5 µmol/l
1 µl	1 µmol/l

※培地中ではバックグラウンド蛍光が高くなる傾向にありますので、Liperfluo を添加する前に PBS 等に置換することをお勧めします。
 ※細胞懸濁液中の DMSO 濃度が 1% 以下になるように Liperfluo 溶液を添加してください。

- 3) 37°C で 30 分間インキュベートする。
- 4) 蛍光顕微鏡あるいはフローサイトメトリー等で観察、分析する。
 - ※ Liperfluo 酸化体は水中ではほとんど蛍光を発しませんが、バックグラウンド蛍光が高い場合は、必要に応じて PBS 等で洗浄を行ってください。

[参考文献]

- 1) N. Soh, T. Ariyoshi, T. Fukaminato, H. Nakajima, K. Nakano and T. Imato, "Swallow-tailed Perylene Derivative: a new Tool for Fluorescent Imaging of Lipid Hydroperoxides", *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 3762.

品名	容量	希望納入価格 (¥)	メーカーコード
Liperfluo	50 µg × 5	20,000	L248

製品紹介

自己組織化単分子膜作製用試薬

Carboxylic acid-SAM Formation Reagent

<特長>

- ・簡単に Carboxylic acid-SAMs を形成することができる
- ・非特異的吸着を抑制することができる

センサーとしてタンパク質を基板に固定化するにあたってよく用いられている SAM 試薬のひとつにカルボン酸末端を持つアルカンチオールがあります。カルボン酸末端を有するためアミンカップリング法等によりタンパク質を固定化することが可能です。しかし、同時に負電荷を持つためタンパク質の非特異的吸着が起こるなどの問題が生じます。そこで、小社ではより非特異的吸着を抑えることのできるカルボン酸 SAM 試薬を開発いたしました。本試薬は、一般的なカルボン酸 SAM に比べ、Bovine serum albumin (BSA) や Fetal bovine serum (FBS) 等のタンパク質の非特異的吸着を抑制いたします。

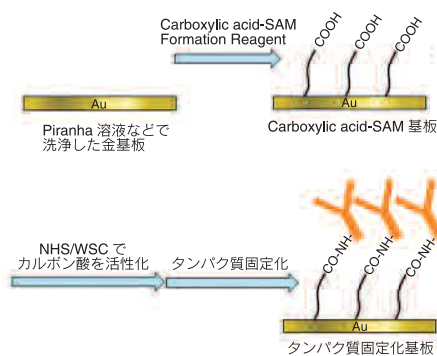


Fig. 1 アミンカップリング法を用いたカルボン酸 SAM 表面へのタンパク質固定化

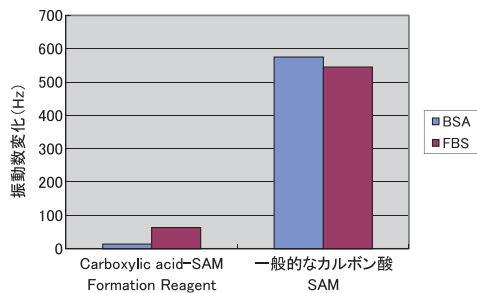


Fig. 2 QCM における本試薬を用いた SAM と一般的なカルボン酸 SAM へのタンパク質の非特異的吸着量の比較

カルボン酸末端にタンパク質を固定化したい場合は、小社の Amine Coupling Kit をご使用下さい。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Carboxylic acid-SAM Formation Reagent	1 μmol × 3	16,000	C488

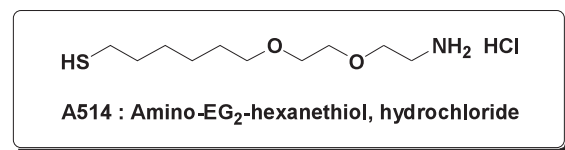
試作品

自己組織化単分子膜作製用試薬

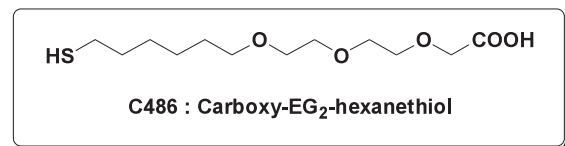
アルカンチオール類

アルカンチオールやジスルフィド類が金属基板上で形成する自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayers: SAMs) は、光スイッチング・光電池などの薄膜光学材料、超微細フォトリソトなどのパターン化材料、つや出し・濡れ性などの表面改質といった機能性材料分野から、マイクロアレイ、化学修飾電極、QCM や SPR 等を用いたバイオセンサーなどの分野で広く応用されています。

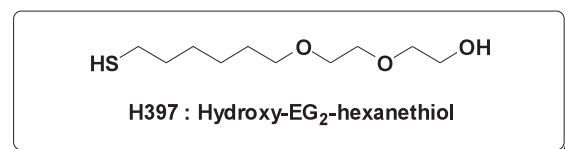
小社では様々な特性を有するチオールやジスルフィド類を販売しており、このたび、下記のようなオリゴエチレングリコール含有鎖アルカンチオールをラインナップに追加いたしました。オリゴエチレングリコールを導入することで非特異的な吸着が抑制され、また、鎖長を短くすることで電流の減衰を最小限に抑えられることから、特に化学修飾電極への応用が期待されます。



グルタルアルデヒドで活性化してタンパク等を固定化できます。また、二価性試薬を用いてマレイミド化し、チオール基を有する DNA やペプチドなどを固定化の際にも有用です。

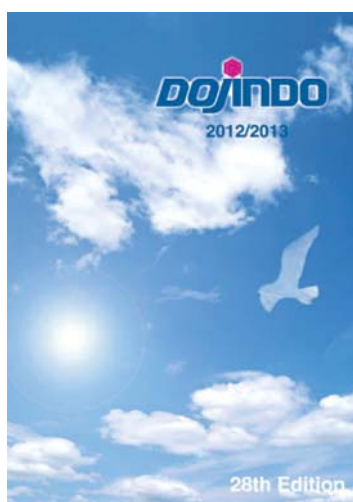


WSC などの縮合剤で活性化することにより、アミノ基を有するタンパク等を固定化できます。



カルボキシル基やアミノ基を有するアルカンチオールと混合して用いることにより、非特異的な吸着の抑制効果が期待できます。

第 28 版総合カタログ（2012/2013） 近日発行！



2012年2月1日に第28版総合カタログを発行いたします。
 今回のカタログより、各製品毎のページに危険・有害性シンボルマーク（GHS表示）を追加しております。
 また、INDEXも前版より更に見やすくなりました。

カタログ発行と併せて、ホームページの商品カタログ、プロトコルの内容も更新されます。
 これからも、引き続き皆様のご研究に役立つ情報をご提供して参ります。

カタログのご請求は小社マーケティング部までご依頼ください。
 その他パンフレット類のご請求も承っております。

Free dial : 0120-489548 free fax : 0120-021557
<http://www.dojindo.co.jp/technical/catalog.html>

販売中止予定のお知らせ

平素は、同仁化学研究所製品をご使用いただき誠にありがとうございます。
 2012年2月1日より、下記製品の販売を中止いたします。
 在庫につきましては、小社マーケティング部までお問い合わせください。

販売中止品

同仁コード	コード番号	品名
P384	—	PQQ
S309	—	SAT Blue

包装容量削減品

品コード	コード番号	品名	削減容量	代替容量	
				→	
N015	349-04521	NPOE	100 g	→	25 g
LU08	346-03615	Dimethylsulfoxide,(Lu)	500 ml	→	250 ml
Q001	344-04711	Quin 2	100 mg	→	50 mg
NX26	345-06603	HOBt anhydrous	100 g	→	5 g, 25 g



22nd Forum in DOJIN フォーラム・イン・ドージン RNAの識別と管理 —自己、異常な自己、そして非自己—

報告

本年度の第22回フォーラム・イン・ドージンでは、2005年の第16回の「RNA干渉—その可能性」、第17回の「生命活動を支えるRNAプログラム」に次いで、三度目のRNAに関するテーマが取り上げられた。この背景には、RNAにはまだまだ未知の領域があつて、次々と新たな世界が広がっている、という世話人の一致した認識があつた。同じヌクレオチドでありながら、糖（リボース）部分の2'-位が水素（DNA）であるか、ヒドロキシル基（RNA）であるか、というだけの違いによって、DNAとRNAはそれぞれ異なる化学的特性をもち、互いに異なる役割へと進化した。この微細な構造的相違から、より安定なDNAが主として遺伝情報の格納に使われるのに対して、より不安定な（反応性に富む）RNAは、様々な機能をもつばかりでなく、外来性の非自己RNAや、自己（正常）RNAが変貌した異常な自己RNAが個体の生命活動を脅かしかねない。ここに、RNAの識別と品質管理が個体にとって極めて重要な課題である理由がある。このような観点から、世話人の中で議論を重ねて「RNAの識別と管理—自己、異常な自己、そして非自己—」というテーマを設定した。今回も国内のみならず、国際的に第一線でご活躍の著名な先生方をご招待することができた。本フォーラムのために、ご講演を快く引き受けて下さった先生方には、改めてお礼を申し上げたい。

講演のトップバッターの稲田利文先生（東北大学薬学研究所）は、講演の冒頭に、この分野のオーバービューを兼ねて、詳しい解説を行って下さった。専門外の人達への細やかな配慮であった。続いて、稲田先生は異常RNAの分類と、それらに対して、様々な段階/レベル（mRNA、翻訳過程、新生タンパク質）における品質管理機構を、特異的な因子の関与とともに解説された。次いで、大野陸人先生（京都大学ウイルス研究所）は、RNAの核外輸送因子がRNAの長さを認識していること、その長さの意味、核外輸送因子とは別の因子の関与などに基づいて精緻な核外輸送機構を紹介された。また、リボソームRNAの品質管理には、完成リボソームレベルにおける、ユビキチン-プロテアソーム系が関与することについても言及された。吉久徹先生（名古屋大学物質科学国際センター）のご講演では、RNAの通常のスプライシングが核内で行われるのに対して、出芽酵母では、核外（細胞質）でスプライシングが進行し、関与する酵素系の局在からミトコンドリアが積極的な役割を果たすことを明らかにされ、さらに、スプライシングを受けた成熟RNAが核内と細胞質を行き来しながら品質管理を受ける機構についても言及された。谷時雄先生（熊本大学自然科学研究科）は、真核細胞の核内にあつて、遺伝子発現制御に重要な役割を担う構造体の一つである核スペckル形成を阻害する4種の化合物を、放線菌培養上清からスクリーニングによって同定された。これらの化合物による核スペckル形成阻害の詳しい解析から、前駆体mRNAの選択的スプライシングの制御に対する核スペckルの役割、制御機構について論じられた。最後のセッションでは、ウイルス由来の非自己RNAの認識・対処機構について三人の先生方のご講演があつた。最初の演者の米山光俊先生（千葉大学真菌医学研究センター）は、高等脊椎動物（ヒトを含む）の自然免疫系の中で、侵入ウイルスに特徴的な二本鎖RNAを認識するヘリカーゼ分子種による、非自己RNA認識機構や、細胞内局在変化から、自然免疫系の分子機構や獲得免疫との連携について述べられた。小糸厚先生（熊本大学生命科学研究



部）は、ほ乳類RNAエディティングに関わるシチジン脱アミノ化酵素APOBECファミリーによる、HIVなどの外来性レトロウイルスの制御機構、進化の過程で組み込まれた内在性レトロウイルス・レトロエレメントの制御機構について解説され、これらの制御機構の考察からAPOBECファミリーが自然免疫の担い手であることにも触れられた。最後の演者の高田賢蔵先生（北海道大学遺伝子制御研究所）は、EBウイルス関連のがん細胞に共通して発現されているEBER（タンパク質に翻訳されない二本鎖RNA様構造をとる小RNA）の発癌に対する役割が、ウイルスRNAを認識するRIG-I分子を介した自然免疫系を巧みに利用したものであることを明らかにされた。

このように、本フォーラムでは、非自己RNA、異常な自己RNAを認識する仕組みは、極めて多様性に富むことが明らかにされた。一方でRNAに対する校正・修復・排除を担う機構が進化し、他方ではウイルスが巧みにそれを利用しながらすりぬける仕掛けを身につけてきたのであろう。この多様性は、RNAの種類・構造の多様性に起因するばかりではなく、RNAの反応性の多様性によるものでもあろう。DNA-RNA-タンパク質というセントラルドグマの中で、DNAとタンパク質の品質管理の機構は、比較的早く検証されてきたのに対し、RNAの品質管理の検証が遅れたのは、その多様性故であろうか。RNAワールドは元来、DNA-RNA-タンパク質の生命系が確立される前にあつたとされる、RNAだけで成り立つ生命系を意味する造語であるが、本フォーラムで明らかにされたように、RNAワールドは、別の意味でこれからさらに発展する領域である、との確信を強くした。その発展には、現在タンパク質研究で進んでいるレベルのRNAの立体構造解析が必要だと思われるが、ご講演を引き受けて下さった演者の先生方がその中心的な役割を果たされることであろう。フォーラムの企画に携わった一人として、頼もしく感じた次第である。

それぞれの講演の後には、フロアから演者の先生方と活発な討論が行われ、しばしば討論を打ち切らざるを得ないほどであった。今回、初の試みとして、講演後のミキサーの時間にポスターセッションを設けてみた。熊本大学の若手の研究者や大学院学生のみなさんから6題に及ぶRNA関連のポスター発表をしていただいた。これを通して、これまでより多くの若い人達が演者の先生方と個別に交換することができたようである。世話人として、喜ばしいことであった。最後になったが、同仁化学研究所の開発部の部員を始め関係者の裏方としての尽力によって、フォーラムの円滑な運営・進行ができた。感謝申し上げたい。世話人は、直ちに来年の第23回フォーラム・イン・ドージンの企画に取りかかる。それに関して、ご希望、参考意見などお寄せいただければ幸いである。それらを参考に、例年のように魅力あるプログラムを企画したい。

（文責 同仁化学研究所 三浦 洵）

ホームページアドレス

URL : <http://www.dojindo.co.jp/>
E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス
フリーダイヤル

0120-021557
0120-489548

DOJIN News No.141

ドージンニュース No.141 平成24年1月18日発行
株式会社同仁化学研究所 DOJINDO LABORATORIES
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒861-2202
発行責任者 吉田陸男 編集責任者 尾方亮子 年4回発行 許可なくコピーを禁ず