

DOJIN NEWS

No.105
2003

ドージンニュース

Review

全反射現象を利用した液液界面での分子挙動の研究

河濱博文

Topics on Chemistry

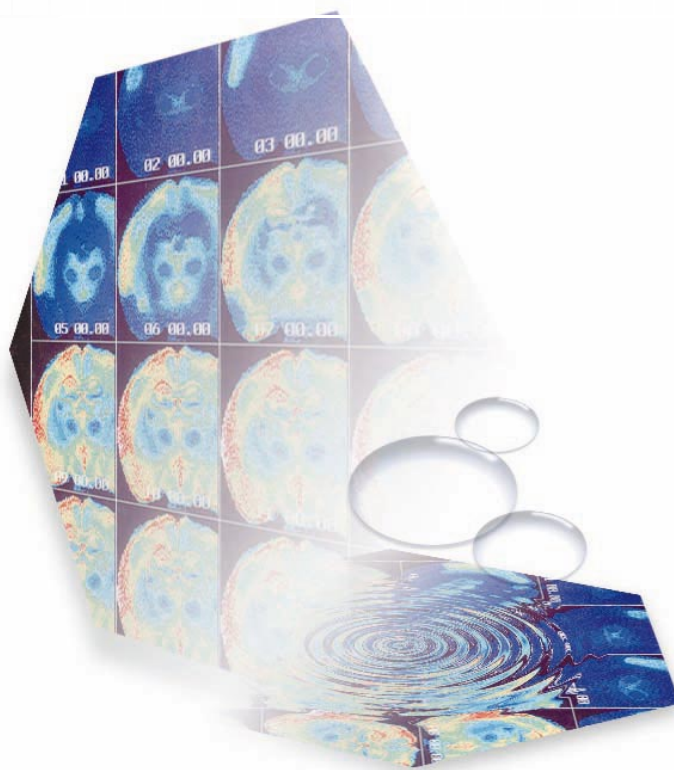
Apoenzyme Reactivation Immunoassay System (ARIS)

渡辺栄治

連載

ケミストからみたポストゲノム5

片山佳樹



目次

Review

| | |
|---|---|
| 全反射現象を利用した液液界面での分子挙動の研究 近畿大学九州工学部 河済博文 | 1 |
| ケミストからみたポストゲノム5 九州大学大学院工学研究院 片山佳樹 | 8 |

Topics on Chemistry

| | |
|---|----|
| Apoenzyme Reactivation Immunoassay System (ARIS) | 13 |
|---|----|

Commercial

新製品案内

| | |
|-------------------------------|----|
| Total RNA 抽出キット | 14 |
| アガロースゲルからの DNA 抽出キット | 15 |
| 血液、細胞・動物組織からの DNA 抽出キット | 16 |
| 水に溶ける PIPES | 17 |

Q&A

| | |
|--------------------|---|
| Biotin ラベル化剤 | 5 |
|--------------------|---|

お知らせ

| | |
|-------------------------|----|
| 春の学会展示ご案内 | 17 |
| フォーラム・イン・ドージン開催報告 | 18 |

新製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

| | |
|-----------------------------------|----|
| Get pureRNA Kit | 14 |
| Get pureDNA Kit-Agarose | 17 |
| Get pureDNA Kit-Blood | 17 |
| Get pureDNA Kit-Cell,Tissue | 17 |
| PIPES sesquisodium | 17 |



迎春準備の同仁化学研究所
仕事納めの日には、大掃除をすませた後つきたてのお餅を頂きます。

全反射現象を利用した液液界面での分子挙動の研究 (Studies of molecular behavior on liquid-liquid interfaces by total reflection spectroscopy)



河済 博文
(Hirofumi Kawazumi)
近畿大学九州工学部

[Summary]

Studies of molecular behavior on liquid-liquid interfaces by total reflection spectroscopy have been reviewed. Various sciences, especially the microsystems demand more direct information about the molecular and reaction dynamics in the interface and its characters. Topics reviewed are single molecule detection, total internal reflection fluorometry, second harmonic generation, multi-photon ionization and thermal lens spectroscopy in respect of the detection technique. Some schematic illustrations of the interface are presented and elucidate the molecular behavior in the reaction such as metal ion recognition and chelate formation.

キーワード :

単一分子検出、内部全反射蛍光法、高調波発生、多光子イオン化、サーマルレンズ、分子会合

1) はじめに

二種の混じり合わない溶媒からなる液液界面は、化学工業の合成、精製プロセスから、環境問題におけるシミュレーションパラメータのひとつとしてまで、幅広い領域で重要な役割を果たしている。また、最近大きな期待が寄せられているマイクロ化学システムでは、反応体積全体に対する界面の割合が非常に大きく、界面現象の理解が不可欠になっている。液液界面で起こる化学変化のメカニズムを明らかにするためには、素過程を分子レベルで研究する必要がある¹⁾。しかし、種々の光やビームによる測定技術が開発されている「硬い」固体表面に比べ、「軟らかい」液液界面の計測方法は限られており、表面張力や分配比といった古典的な実験からでは、直接的な分子レベルの情報が十分に得られていないのが現状である。

分子動力学による計算では、液液界面の厚さは1ナノメートル程度と薄く²⁾、そこでの分子挙動の解析にはナノ領域の新しい計測方法が開発されなければならない。近年、界面の状態を反映するように選ばれたプローブ分子や界面での接触が重要な化学反応に関係した分子を、全反射により発生したエバネッセント波で励起し、そこから発生する色々な信号を解析し、界面について分子レベルの情報を得ることが、いくつかのグループで行われている。Fig.1には、液液界面の全反射による励起と、本小論で取り上げた信号発生のようなすを模式的に示している。通常、興味ある界面は、水相と適当な有機溶媒相（油相）の組み合わせであり、比重の大きな水相を下にして、上に屈折率の大きな有機相がくる。ここでは、我々の研究も含め国内の研究グループの結果を、詳しいデータの解析ではなく、明らかになった液液界面のようすを模式図的に見ること、このアプローチの有用性を示すことにする。

2) 全反射現象とエバネッセント波

光が光学的に異なった二つの物体の界面に至ったときの反射、屈折のようすは、マクスウェルの電磁波方程式を用いて解析することができる。しかし、この波動方程式から光の伝搬のようすを直感的に理解するのは困難であり、我々はほとんどの場合、適当な領域で積分することで得られる光線の経路として取り扱っている。その中で最も基本的なものが、透明で光学的に等方な物質が接する界面でのスネルの屈折法則である。

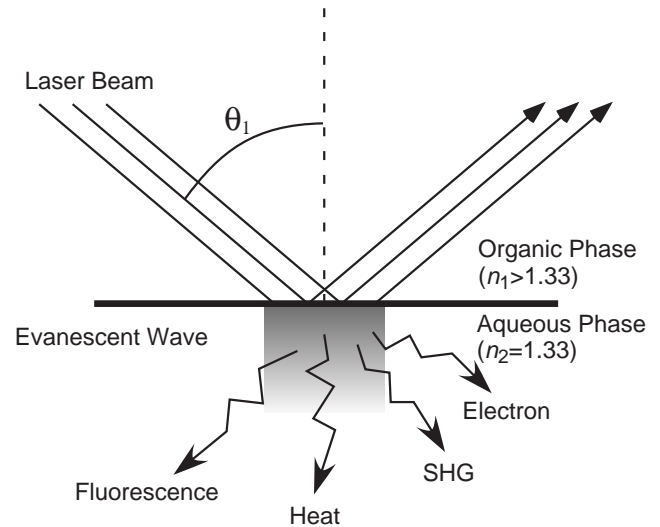


Fig.1 Diagram of total reflection spectroscopy on liquid-liquid interface.

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (1)$$

ここで、 n は屈折率、 θ は界面法線からの角度、添え字1、2はそれぞれ入射側、透過側を表す。また、物質が等方的であっても、光の電気ベクトルが入射面（光線と界面の法線とを含む面）内で振動する場合と入射面に垂直に振動する場合とでは、反射率や透過率が異なってくる。前者をp（平行）偏光、後者をs（垂直）偏光と呼ぶ。 $n_1 > n_2$ のとき、臨界角 θ_c

$$\sin \theta_c = n_2 / n_1$$

を超えて入射角を深くすると、式(1)を満たす θ_2 は存在せず、光がすべて反射する全反射現象が起こる。しかし、透過側では依然

$$\cos \theta_2 = - \left\{ \left(\frac{n_1}{n_2} \right)^2 \sin^2 \theta_1 - 1 \right\}^{1/2} \quad (2)$$

が虚数になるマックスウェル方程式を満たす解が得られる。この解は、電場の振幅が界面からの距離（深さ）に対して指数関数的に減少し、伝搬方向が界面に沿った方向である波（p波）を表している。この波は光強度が徐々に減衰することからエバネッセント波（evanescent wave）と呼ばれる。光強度が1/eに減少する深さ d は、波長 λ の光が入射したとして

$$d = \lambda / 2\pi \left\{ n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2 \right\}^{1/2} \quad (3)$$

となり、波長の数分の1程度となる。入射光に強力なレーザー光を用いれば、この微小な滲み出しによる励起でも検出に十分な応答が得られ、偏光特性や光学系のデザインなどでも有利なため、光源にはレーザーが多用されている。

このように波長以下の深さに滲み出す光は、通常の光が伝搬光と呼ばれるのに対して近接場光と呼ばれ、波長程度の領域に局在する特長を生かし、空間分解能の高い分光測定に積極的に利用されることになる。全反射現象は、近接場光を発生できる最も容易な方法であり、ATRプリズム、スラブ導波路、光ファイバによる吸光度測定には以前より利用されている。蛍光測定においては、励起領域が数百ナノメートルと限定され、背景光が抑えられるため、共焦点顕微鏡よりも高感度なエバネッセント蛍光顕微鏡が開発されており、タンパク質の1分子イメージングが可能となっている。また、エバネッセント波は界面に沿って伝搬するため、金属表面のプラズモンを励起することができ、表面プラズモン共鳴（SPR）測定にも利用されている。近接場光を発生させるもう一つの方法は、波長以下の微小開口を用いるもので、近年、走査型光プローブ顕微鏡（SNOM）として大きく発展している。こうした測定では主に固体表面近傍での濃度や量に注目しているが、物質の移動が起こり易い「軟らかい」液液界面では、エバネッセント波による励起を行い、そこからの応答を測定すれば、分子レベルでの界面の状態や化学反応の動的な情報を今までにない直接的に得ることができると思われる。

3) 蛍光による検出

エバネッセント波で励起された分子から得られる応答のうち、蛍光を測定する方法が最も一般的である。対象が蛍光性分子に限られるが、一方で非常に多くの蛍光性プローブ分子が開発されており、光電子増倍管などの高感度な検出器が利用できることから、最も感度の高い方法と言える。さらに分光測定や時間分解測定を行えば、より詳しい情報が得られる可能性がある。

Wataraiらは、高倍率高効率の光学系が使えるように、中に液液界面が作れる1 mm以下の非常に薄いセルを試作し、界面吸着能のあるシアニン色素（dioctadecyltetramethyl-indocarbocyanine）の1分子検出に成功している³⁾。セルの上部からプリズムを組み合わせて、ドデカン相へ全反射条件で連続発

振のNd:YAG laser（532 nm、50 mW）を入射し、セルの下側からアバランシェフォトダイオードで光子計数により蛍光を測定している。検出側のピンホールにより観測領域を界面上で1 μm 以下にし、そこでの平均分子数0.02個という状況で、1分子からの蛍光をサブミリ秒の間に離散的に測定できている。分子が蛍光を発する時間は、観測領域を横切る時間なので、その解析により界面に存在する分子の拡散係数を直接求めることができ、界面の粘性といった量を推定することができると期待される。

界面に存在するプローブ分子の蛍光寿命の測定も界面の状態についての情報を与えてくれる。Kitamuraらは、蛍光性プローブ分子としてsulforhodamine 101（SR101）を選び、サブピコ秒のパルスレーザー光で全反射励起し、ナノ秒オーダーの蛍光減衰をピコ秒の時間分解能で精密に測定し、その解析結果から界面の「厚み（thickness）」や「粗さ（roughness）」について検討している⁴⁾。励起と蛍光観測において偏光面を制限した測定をすると、プローブ分子サイズの1 nmに比べ、「薄い」界面では分子回転が二次的に制限され、「厚い」界面では三次元的に回転するため、蛍光減衰曲線が異なってくる。極性の非常に低い四塩化炭素と水の界面は「薄く」、極性の高い1,2-dichloroethaneとの界面は「厚い」という結果が得られている。また、より長距離の界面の構造をSR101からacid blue 1へのエネルギー移動を利用して求めている。この分子間ではエネルギー移動は約7 nmまで効率良く進むが、分子相互が二次的に分布しているときと、三次元的に分布しているときでは、やはり、SR101の蛍光減衰曲線が異なってくる。四塩化炭素 - 水界面は「平ら」であり、1,2-dichloroethane - 水界面は、7 nmのスケールでは「粗い」ため三次元的なエネルギー移動の寄与が入っているという結果が得られている。Fig.2にそのようすを模式図的に示す。

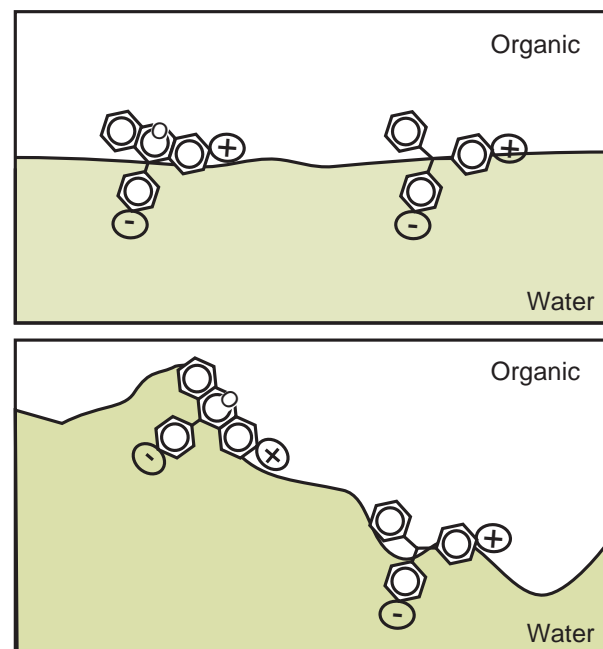


Fig.2 Schematic illustrations of sharp (upper) and rough (lower) interface. Two molecules stand for donor and acceptor of energy transfer.

4) 非線形現象による検出

パルス幅が短くピーク出力の高いレーザー光を用いれば、エバネッセント波による励起でも、第二高調波 (second harmonic generation, SHG) や多光子イオン化といった非線形現象による信号が検出できる。これらの応答では、非線形過程にあるパラメータをコントロールすることで、より質の高い情報を得ることができる。また、信号の光強度依存性が2次以上であるので、より空間分解能の高い測定が可能になる。

Teramaeらは、ヘプタン - 水界面に吸着したクラウンエーテル骨格を持つ分子によるアルカリ金属イオンの分子認識について、SHGにより研究している⁵⁾。SHGの発生は分子の配向を要求するため、SHG信号は二次元的な領域である界面に存在する分子からのみ観測され、エバネッセント波励起とは別に界面選択性を持っている。光応答部としてアゾ色素骨格を持つ15-クラウンエーテルをプローブ分子として用い、アルカリ金属イオン (Li^+ , Na^+ , K^+) を抽出すると、それまで水相にあったプローブ分子が、電荷が中和され有機相との界面に吸着する。そのため全反射条件で入射したレーザー光に対するSHG信号の発生が観測される (Fig.3)。

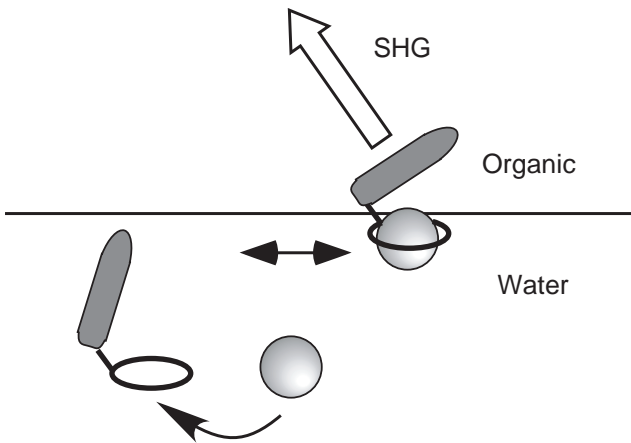


Fig.3 Schematic illustration of alkali metal ion recognition by crown ether.

励起レーザー光の波長を掃引して得られるSHGスペクトルも測定でき、対応する1光子吸収スペクトルに比べて長波長シフトしており、界面吸着種を直接測定していることを支持した。さらに、そのシフト量から界面の極性が、オクタンと水の間であることを示された。抽出効率の順番は、イオンの水和の程度に対応して $\text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ とバルク相での結果と同じであったが、バルク相では抽出できないLi - クラウンエーテル会合体でもSHG信号が観測でき、界面上まではこの会合体も分配できることが分かった。SHG信号は、その発生の仕組みから、直接、分子の配向を測定できる方法でもある。励起レーザー光の偏光面とSHG検出の偏光面の関係を固定することで、会合体のアゾ色素部位の配向を求めている。 K^+ や Na^+ との会合体は界面においてアゾ色素部分を比較的自由な状態にして存在しているが、水和の程度が大きく親水的

な Li^+ との会合体は、より水相に沈んだところで、アゾ色素部分を立ち上げた形で存在していることが明らかにされた。

可視から紫外レーザー光を吸光性分子に強く照射すると、2光子励起によりイオン化が起き、電子が放出される。通常の溶媒分子のイオン化にはエネルギーが足りず、プローブ分子のみからの電流信号が高感度に測定できる。電流の測定であるため、光検出で不可避な散乱光の妨害を受けず、比較的簡便な装置構成であることも特徴である。Inoueらは、この方法をプローブ分子やタンパク質の液液界面からの深さ方向の分布測定に適用している⁶⁾。式(3)において入射角 θ_i を変化させれば、エバネッセント波が滲み出す深さをコントロールできる。指数関数的な減衰の滲み出しであるため、信号強度は深さ方向で積分されたものとなるが、適当な仮定をすることで、濃度分布に変換できる。Fig.4に、牛血清アルブミン (BSA, 等電点 pH 4.7) を等電点前後の pH の緩衝液に加え、オクタン - 水界面からの光イオン化信号の窒素レーザー入射角度依存性を示す。光イオン化信号はたんぱく質中のフェニルアラニン残基などから得られている。同時に、式(3)により計算した滲み出し深さ d をプロットしてある。電流測定のために界面を横切って電圧を印加してあり、たんぱく質がプラスに帯電した場合 (pH 2.7) とマイナスに帯電した場合 (pH 7.5) とでは界面近傍のタンパク質の濃度分布が大きく違うことは明らかである。解析結果から、プラスに帯電したものはほとんど界面から 100 nm 以下に存在し、マイナスに帯電したものは 100 nm 以上の領域まで分布が大きく広がっていることが明らかになった。

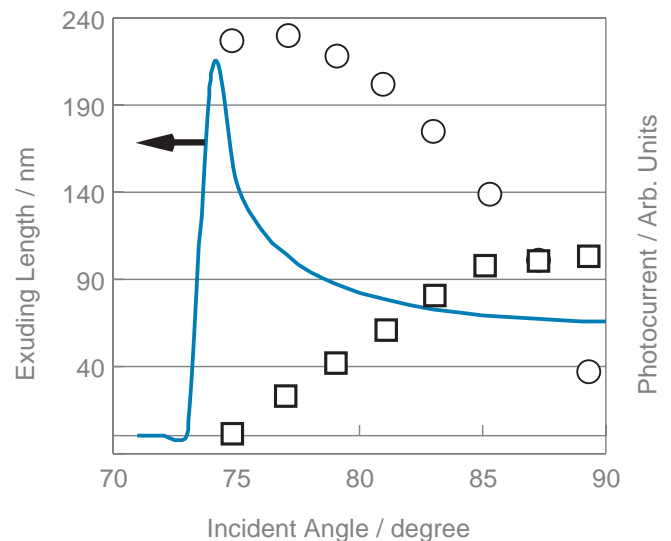


Fig.4 Dependences of incident angle on exuding length of the evanescent wave and photoionization currents from bovine serum albumin; () pH 2.7, () pH 7.5.

5) サーマルレンズによる検出

筆者らは、液液界面におけるイオン会合溶媒抽出反応を研究するために、サーマルレンズを検出する新しい計測法を提案し、キレート生成素過程を追跡した^{7,8)}。Fig. 5に実験装置の概略を示す。

ポンプレーザー光は全反射条件下で界面に導かれ、界面に生成した錯体分子を励起する。電子励起エネルギーの緩和により発生した熱は、媒体の屈折率変化を引き起こし、サーマルレンズ(TL)を誘起する。全反射位置に対してプローブレーザー光を照射すると、レンズ効果によりビームが広がり、ピンホール通過後、光強度の変化が検出される。この幾何学的配置により液液界面に存在する分子のみの濃度変化が測定可能となる。サーマルレンズのような光熱変換測定は、蛍光性分子を必要とせず、吸収法と同様に物質濃度に線形な応答を高感度で得ることができる。本方法でも、 10^{-10} mol/cm²、単分子膜被覆の約1/100の界面濃度が検出できている。この全反射励起界面サーマルレンズ法をバソフェナントロリン(diphenyl phenanthroline、DPP)によるFe²⁺とのキレート生成反応へ適用した。

セル内でFe²⁺を含んだ水相にDPPを含んだベンゼン相を重ね界面を形成すると、徐々にTL信号が増加した。これは界面での錯体生成速度を直接的に測定したことであり、金属イオンやキレート試薬の濃度依存性を解析し、Fig.6に示すような詳細な反応メカニズムを明らかにした。反応全体の律速段階はキレート試薬の界面への吸着、配向(図中の k_{abs})であり、界面での錯体生成速度(k_{f1})は、バルク中に比べ約300倍速いことが明らかになった。界面反応では界面近傍への濃縮効果により、見かけの反応速度が大きくなることはよく知られているが、この結果は濃縮効果を含まない本質的な反応速度であり、界面では配向や分子相互の接近方向など立体的な効果が大きく寄与することが定量的に示された。

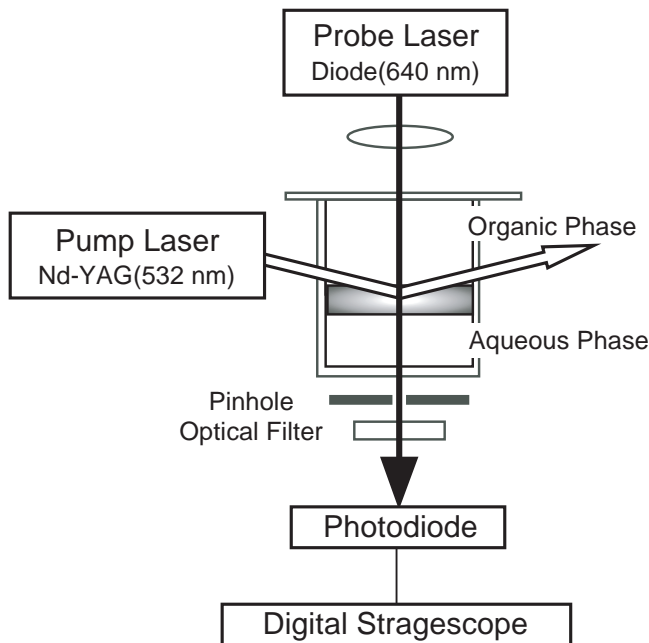


Fig.5 Diagram of the interfacial thermal lens detection system.

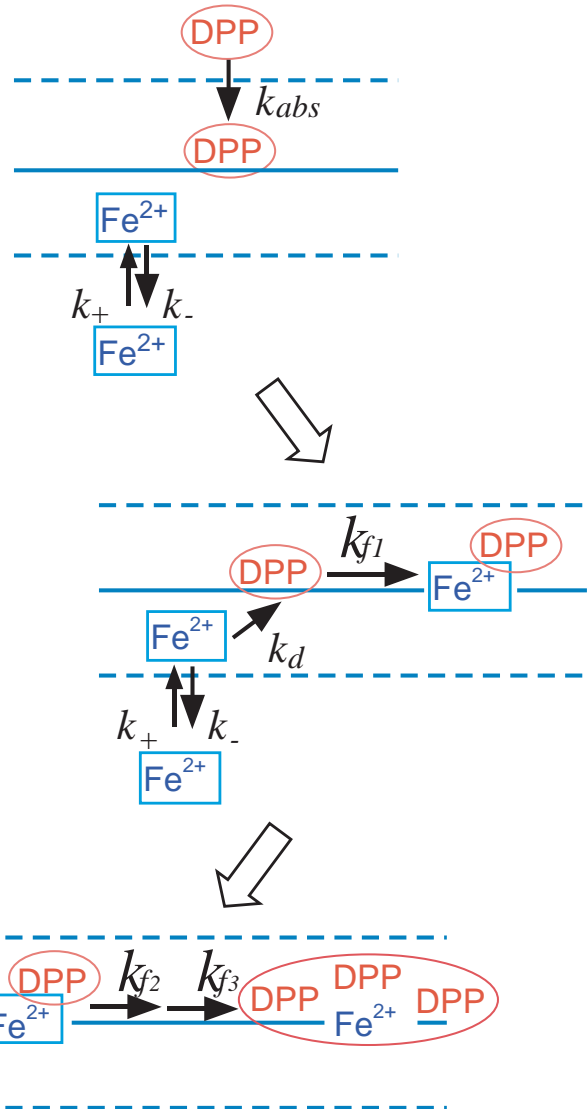


Fig.6 Schematic diagram of chelate formation reaction between Fe²⁺ and bathophenanthroline at the interface.

6) おわりに

レーザー光による全反射励起を利用して、液液界面の分子の挙動を計測し、界面の状態や化学反応メカニズムを探る研究につき紹介した。新しい手法の発展段階であり、ここで見たものは限られた界面や反応の組合せであるが、新しい機能的なプローブ分子の開発や有用な反応への適用など、今後も発展していくと期待される。界面の分子レベルの情報を得るための研究手法として全反射を用いる以外にも、界面張力波を準弾性レーザー散乱により測定する方法や、Sheath Flowを利用した時間分解測定可能な界面作成法など、新しい方法が提案されている。いずれの方法も万能ではなく、お互いの結果を補い合うことで、液液界面についての情報の量と質が増え、界面の役割や機能が明らかになっていくものと思われる。

Q & A

Biotin ラベル化剤

参考文献

- 1) 現在、この分野では文部科学省特定領域研究「液液界面ナノ領域の未開拓化学機能の開発」(平成13-15年度、領域代表者：大阪大・渡會 仁)が進められている。
- 2) I. Benjamin, *Science*, **261**, 1558 (1993).
- 3) F. Hashimoto, S. Tsukahara and H. Watarai, *Anal. Sci.*, **17**, i81 (2001).
- 4) S. Ishizaka and N. Kitamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **74**, 1983 (2001).
- 5) K. Nochi, A. Yamaguchi, T. Hayashita, T. Uchida and N. Teramae, *J. Phys. Chem. B*, **106**, 9906 (2002).
- 6) 石川雄一, 井上高教, 大分大学 VBL 年報, **1**, 43 (2001).
- 7) H. Kawazumi, T. Kaieda, T. Inoue and T. Ogawa, *Chem. Phys. Lett.*, **282**, 159 (1998).
- 8) 河済博文, ぶんせき, **8**, 649 (1999).
- 9) Y. Uchiyama, T. Kitamori, T. Sawada and I. Tsuyumoto, *Langmuir*, **16**, 6597 (2000).
- 10) T. Tokimoto, S. Tsukahara, H. Watarai, *Anal. Sci.*, **17**, i1245 (2001).

著者紹介

氏名：河済 博文 (Hirofumi Kawazumi)

年齢：47 歳

所属：近畿大学九州工学部生物環境化学科
〒820-8555
福岡県飯塚市柏の森 11-6
Tel: 0948-22-5655
Fax: 0948-23-0536

出身校：九州大学大学院総合理工学研究科

学位：博士(工学)

現在の研究テーマ：マイクロ空間における化学反応挙動の解析
サーマルレンズ法や光イオン化法による界面分子挙動の解析
キャピラリー電気泳動法による環境・生体関連物質の高機能分析法の開発
ケモメトリックスを利用した分析データの高利用

趣味：パソコン自作

ビオチンはアビジンに対して高い親和性($10^5 M^{-1}$)を持つことが知られており、ビオチン-アビジン複合体を用いたシステムはEIA(エンザイムイムノアッセイ)などの免疫学的測定や組織染色の分野で広く利用されています。抗体やタンパク質にビオチンラベル化後、酵素標識または蛍光標識されたアビジン、ストレプトアビジンなどを反応させ、酵素反応により生じた可視色素や標識された蛍光色素を検出するという方法が行われます。

弊社では、各官能基に対するビオチン化剤ならびにアミノ基標識用のビオチンラベル化キットを販売しております。ラベル化のタイプは以下のものを用意しております。

- アミノ基標識用：活性エステルタイプ(Succinimidyl Biotin)
ε-アミノ基などの遊離のアミノ基(-NH₂)と結合します。
- SH基標識用：マレイミドタイプ(Maleimide Biotin)
システインなどのチオール基(-SH)と結合します。
- 還元糖末端標識用：ヒドラジドタイプ(Hydrazide Biotin)
糖の還元末端のアルデヒド基(-CHO)と結合します。

キット

Q1 Biotinylation Kit には[BK01][BK02]の2種類がありますが、どのように違うのですか。

A1 一般用と BIACORE® 用があります。
BIACORE® 用は Biacore 社の SPR 装置に適する緩衝剤をセットとしております。また、Biacore 社用のチップの洗浄及び再生用の薬品が入っております。
上記の装置を使用しないラベル化であれば、一般用(メーカーコード：BK01)のものをご使用ください。

Q2 キット以外に必要なものがありますか。

A2 一般的な器具があれば、本キットだけでビオチンラベル化できます。器具としては、マイクロピペッター(10 μl, 200 μl, 500 μl)、メスシリンダー、フラスコなどをご用意ください。
タンパク質に幾つのビオチンが結合したかを確認される場合は、HABA 法に必要な avidin, HABA, DMSO を準備してください。HABA 法に関してはカタログのプロトコールをご覧ください。

Q3 Biotinylation Kit に入っている Biotin-(AC₅)₂ Sulfo-OSu は単品でも買えますか。

A3 単品でも販売しております。また、スパーサーの長さ(ビオチンと結合残基との距離)が違うものもございますので、目的に合わせてお選び下さい。

アミノ基標識用(Succinimidyl Biotin)

Q4 Biotin の -OSu タイプにも、AC₅ や (AC₅)₂ などスパーサーの長さが違うものがありますが、性能はどのように違うのですか。

Q & A

Biotin ラベル化剤

A4 アビジンのビオチン認識部位は深部にあるために、Biotin-OSuよりもBiotin-AC₅-OSuでラベル化した方が認識されやすいと言われています。一方、タンパク質をビオチンで標識する場合も、標識部位が深部にあるとビオチン化してもアビジンが認識されない可能性があります。その場合もスパーサーは長いものが有利と考えられます。使用するタンパク質により、使い分けて下さい。

Q5 アミノ基標識用にはOSuと Sulfo-OSuの2種類がありますが、どのように使い分けるのでしょうか。

A5 反応性に関してはほぼ同じですが、Sulfo-OSuタイプは、スルホン酸基がついているため水に対する溶解性が高く、高濃度での反応が出来ます。その反面吸湿しやすく、保存しているときに加水分解しやすくなります。

Q6 抗体がPBSに溶解してあるので、反応をPBSで行いたいのですが、問題ないでしょうか。

A6 ラベル化反応の条件としては弱アルカリ側 (pH7 ~ 9) が適しているため、その範囲内にpHを調整したPBSを使用して下さい。PBSの場合は、中性付近で使用する事が多く、アルカリ側での緩衝能が十分でないことも考えられます。他の緩衝液 (炭酸緩衝液やHEPESなど) に比べるとpH変動が幾分あるかもしれませんが、反応は出来ます。pHに注意してご使用下さい。
Tris bufferやGlycine bufferはアミノ基をもっていますので、活性エステルタイプの緩衝液としては使用できません。

Q7 ラベル化すると、抗体やタンパク質の性質が変わったり、機能に問題が生じることがありますか。

A7 ラベル化される部位やラベル化率により、そのようなことが起こる可能性は十分あります。

Q8 Succinimidyl typeは水溶液中で不安定ということですが、通常の反応条件でどのくらい分解するのでしょうか。

A8 文献によると、pH8.2、25℃、4時間で約60% -OSuが残っているという報告もあります。

Q9 ラベル化する時に注意することはありますか。

A9

- ラベル化時のpHは中性~弱アルカリ性にして下さい。pHがずれると反応が進行しないことがあります。
- 試料の濃度が薄くならないようにして下さい。試料濃度が薄いとラベル化の進行が遅くなる場合があります。また、液量が多いとビオチン化タンパク質の最終濃度が薄くなったり、ゲルろ過している間に溶出したりします。
- 溶けている試料の量を把握して下さい。ラベル化率を求める時に必要になります。

SH基標識用(Maleimide Biotin)

Q10 IgGをFab'にしてSH基との反応を行いたいのですが、Fab'はどのように作成すればよいのでしょうか。

A10 IgGからのFab'作成方法を弊社カタログのプロトコールに掲載しております。こちらを参考にしてください。

Q11 IgM型の抗体にビオチンを標識したいのですが出来ますか。

A11 基本的には、Fab'型にして、ヒンジ部のSH基を利用して、Maleimideタイプで標識できます。
しかし、IgMでの報告は確認しておりません。
文献等によると、IgMはOSu型でアミノ基に標識する方法や抗体糖鎖還元末端にBiotin-AC₅-hydrazideで標識方法もあります。

還元糖末端標識用 (Hydrazide Biotin)

Q12 糖鎖のアルデヒド基にビオチンヒドラジドをシッフ塩基としてつけて、ビオチンを使って分離精製後、シッフ塩基を加水分解して糖を回収することを考えています。

1. 酸、アルカリでシッフ塩基は加水分解するか。
2. 糖を分解させないように中性でシッフ塩基を加水分解できないか。
3. カラム精製中にシッフ塩基は加水分解するか。
4. 精製中シッフ塩基が切れないようするには還元した方が良いか。

A12

1. 加水分解します。
2. シッフ塩基は平衡反応なので、糖のアルデヒドよりも安定なシッフ塩基を作るアルデヒド基を持つものを加えると、加水分解して外れます。
3. 条件によっては精製中に加水分解します。糖をつけると水溶性となり、水系でのカラム精製になります。その際にカラムの担体が触媒となり、加水分解することもあります。
4. 還元してシッフ塩基をアミンの形にすれば、加水分解して切れることはなくなります。ただし、後でビオチンを切ることは出来なくなります。

共通

Q13 ビオチンラベル化したサンプルの保存はどのようにすればよいのでしょうか。

A13 防腐剤として0.1%のアジ化ナトリウムを添加して、冷蔵で保存して下さい。

Q14 HABA法でラベル化率を算出する際の注意事項はありますか。

A14 ビオチン化タンパク質の濃度が高い場合、値が頭打ちになります。タンパク質溶液添加後の吸光度が0.7以下になる場合は溶液を希釈して測定して下さい。また反応時のpHは、

Q & A

7.0 ~ 7.6 で行なって下さい。
pH8 以上になると HABA とアビジンが結合しません。

Q15 HABA法を使用してピオチン化率を算出しているのですが、なかなか正確な値が出ません。その他の実験からもタンパク質がピオチン化されていることは明らかなのですが、HABA-Assay以外の方法でラベル化率を算出する方法がありましたら教えてください。

A15 条件等が違うので一概には言えませんが、正確な値が得られないのは、吸光度測定時の濃度が最適でない可能性があります。文献 N. M. Green, *Methods in Enzymol.*, **18**,418 (1970).) によると、ピオチン濃度やタンパク濃度が高いと誤った結果を与えることがあるようです。(A14 参照)
HABA法以外のピオチン化量測定法としては、2,6-ANS(2-anilinonaphthalene-6-sulfonic acid)を用いる方法があります。HABA 法と同様の原理で蛍光測定する方法です。この方法は感度が良いのでタンパク質の濃度が薄い場合に有効な方法だと思われます。下記文献を参考にして下さい。
D. M. Mock, *Methods in Enzymol.*, **184**,234 (1990).

Q16 Biotin と反応させるのはアビジンとストレプトアビジンどちらがよいのでしょうか。

A16 どちらでも結構です。
アビジンは塩基性が高く、糖側鎖を含むのに対し、ストレプトアビジンは非常に低い等電点を示し炭化水素基を含まないため非特異的結合が非常に少ないという特徴があります。しかし、その分ストレプトアビジンの方が高額です。これらの点をふまえ、選択いただければと思います。

| 品名 | 容量 | 価格 (¥) | コード | メーカーコード |
|--|--------|----------|-----------|---------|
| Biotinylation Kit(Sulfo-OSu) | 1 set | 34,000 | - | BK01 |
| Biotinylation Kit(Sulfo-OSu,Designed for use with BIACORE® instrument systems) | 1 set | 38,000 | - | BK02 |
| Biotin-OSu | 10 mg | 4,000 | 346-06351 | B304 |
| | 100 mg | 13,500 | 342-06353 | B304 |
| Biotin-AC ₅ -OSu | 10 mg | 5,200 | 343-06361 | B305 |
| | 100 mg | 24,000 | 349-06363 | B305 |
| Biotin-(AC ₅) ₂ -OSu | 10 mg | 8,000 | 340-06371 | B306 |
| | 100 mg | 41,000 | 346-06373 | B306 |
| Biotin Sulfo-OSu | 10 mg | 5,200 | 345-06821 | B319 |
| | 100 mg | 20,500 | 341-06823 | B319 |
| Biotin-AC ₅ Sulfo-OSu | 10 mg | 7,000 | 348-06811 | B320 |
| | 100 mg | 29,000 | 344-06813 | B320 |
| Biotin-(AC ₅) ₂ Sulfo-OSu | 10 mg | 11,000 | 341-06801 | B321 |
| | 100 mg | 51,500 | 347-06803 | B321 |
| Biotin-PE-maleimide | 10 mg | 8,900 | 347-06381 | B300 |
| | 100 mg | 43,200 | 343-06383 | B300 |
| Biotin-PEAC ₅ -maleimide | 10 mg | 8,900 | 344-06391 | B299 |
| | 100 mg | 43,200 | 340-06393 | B299 |
| Biotin-hydrazide | 10 mg | 4,600 | 347-06401 | B303 |
| | 100 mg | 25,000 | 343-06403 | B303 |
| Biotin-AC ₅ -hydrazide | 10 mg | 6,200 | 344-06411 | B302 |
| | 100 mg | 28,500 | 340-06413 | B302 |
| Biotin-(AC ₅) ₂ -hydrazide | 10 mg | 6,800 | 341-06421 | B301 |
| | 100 mg | 36,800 | 347-06423 | B301 |

下記結果は、Biotinylation kitでの実測データで、条件により若干変動する可能性があります。また、HABA 法によりラベル化率を算出しました。

a) タンパク 1 mol に対して混合したピオチン試薬のモル数

b) タンパク 1 mol に結合したピオチンのモル数

BIACORE® は Biacore 社の登録商標です。

表 1 各種タンパクに対するラベル化率

| | タンパク溶液の濃度 | ピオチン試薬溶液添加量 | | 混合比 ^{a)} | ラベル化率 ^{b)} (mol/mol) |
|---------------------------|-------------------|------------------|-------------|-------------------|----------------------------------|
| | | 濃度 | 添加量 (µ l) | | |
| rProtein A (MW=42,000) | 5 mg / 500 µ l | 10 mg / 355 µ l | 5.7 | 2.0 | 1.8 |
| | | | 14.3 | 5.0 | 3.7 |
| | | | 28.6 | 10.1 | 7.3 |
| | 2.5 mg / 500 µ l | | 2.9 | 2.0 | 1.5 |
| | | | 7.1 | 5.0 | 4.3 |
| | | | 14.3 | 10.1 | 8.1 |
| | 1.25 mg / 500 µ l | | 1.4 | 2.0 | 1.8 |
| | | | 3.6 | 5.1 | 4.5 |
| | | | 7.1 | 10.0 | 7.5 |
| BSA (MW=68,000) | 2.5 mg / 500 µ l | 10 mg / 567 µ l | 2.9 | 2.0 | 1.6 |
| | | | 7.1 | 5.0 | 3.6 |
| | | | 14.3 | 10.1 | 6.4 |
| IgG (MW=150,000) | 2.5 mg / 500 µ l | 10 mg / 1218 µ l | 2.9 | 2.0 | 1.4 |
| | | | 7.1 | 5.0 | 3.7 |
| | | | 14.3 | 10.1 | 6.3 |

ケミストからみた ポストゲノム

5

～新しい標識法～

九州大学工学研究院応用化学部門

片山佳樹

1. はじめに

ゲノム研究により取得可能となった多くの遺伝子の多型解析やそれらから発現してくる蛋白質の機能解析は、ポストゲノム技術の中心となるものである。これらを考える場合、従来の技術との大きな違いの一つが、網羅的という言葉である。すなわち、今後のポストゲノム技術に用いられる解析技術では、いかに多検体を効率よく処理できるかがまず、重要なポイントである。その様な目的のためには、多種類の対象物にあらかじめ個々を認識するための目印をつけておく必要がある。分子に目印をつける手法は、従来、蛍光分子や放射性同位体などを標識する技術が数多く存在する。しかしながら、極めて多くの物質を同時に見分けるためには、扱う検体と同じ数の目印が必要である。これまでの分子標識法は、限られた対象物に目印をつけるためのものであり、その様に多種類の目印を一度に用意する事はできない。そこで、全く新しい標識材料が必要になってくるのである。また、タンパク機能解析とは、広義にとらえれば、細胞内のタンパクネットワークの解明に他ならない。したがって、タンパクの構造変化、活性変化、分布状況の変化など、機能変化を検出できる方法も必要である。最近、この様な目的を指向した種々の興味深い新しい標識法が報告されてきている。そこで、今回は視点を変えてその様な手法に関してまとめてみた。

2. 蛍光タンパク end-to-end fusion と insertional fusion (遺伝子レベルでタンパクを標識)

最近良く用いられる最も一般的な手法に、GFP(オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク)に代表される蛍光タンパク質を、対象とするタンパクに遺伝子レベルで融合してキメラタンパクとする手法がある¹⁾。ゲノム研究においては、未知の遺伝子がまず取得できる場合も多く、その段階でGFPなどと融合したタンパクを発現

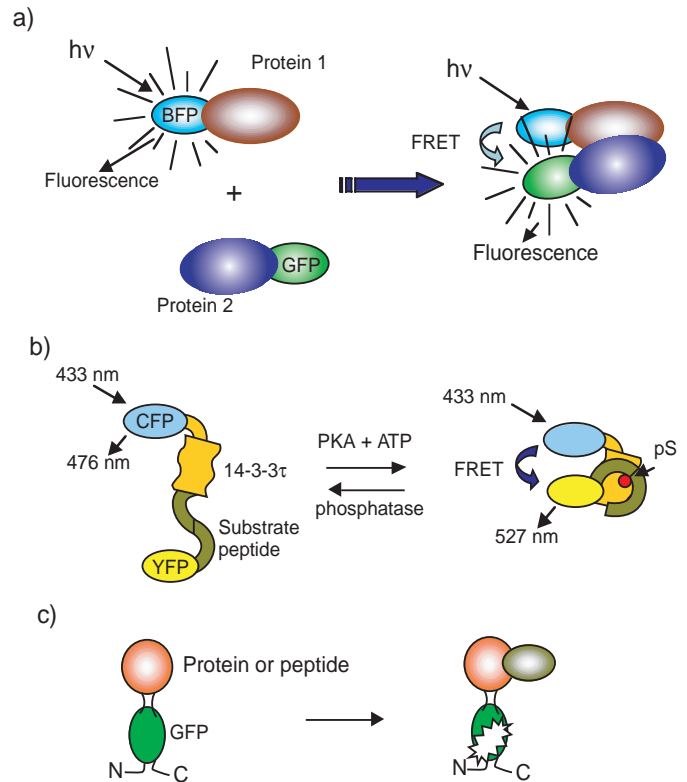


Fig.1 Fluorescent protein labeling (Gene fusion approaches)

- Protein-protein interaction is detected by FRET using two different GFP analogues
- Detection of kinase activity using GFP-fusion protein
- Application of domain insertion for functional switching

する遺伝子カセットに組み込んでやれば、*in vitro*でも細胞内でも標識タンパクを発現させることができる。その場合、タンパクへの影響を考え、通常は蛋白質のアミノ末端がカルボキシ末端に融合する(end-to-end fusion)²⁾。この手法は、特に設計した標識タンパクを細胞内で発現させる事ができる事から、細胞内における標的タンパクの状況に応じた分布の変化などを計測するのに用いられる。最近では、GFPに種々の変異を導入し、蛍光の色を変化させたYFP(黄色)、CFP(シアン)、珊瑚由来の赤色蛍光タンパクも利用できる³⁾。これらを用いると2種以上のタンパクの分布を同時に計測できる。例えば、2つのタンパクの細胞内での会合を、融合した蛍光タンパク間の蛍光エネルギー移動で調べることも可能である(図1(a))⁴⁾。その他にキナーゼ基質ペプチドとリン酸化ペプチドを認識する14-3-3ドメインを連結し、さらにその両端に配した異なるGFP誘導体間のエネルギー移動によりキナーゼ活性をモニターする分子なども報告されている(図1(b))⁵⁾。蛍光強度が小さいというGFPの欠点を補うためには、蛍光量子収率を向上したEGFPやVenusなどがある。

上記の手法では、蛍光タンパクの融合による対象タンパクへの影響ができるだけ少なくなるように考慮しているが、蛍光タンパ

クを対象タンパクの真中に挿入する事で、逆に積極的にタンパクの機能とのカップリングを利用する方法もある(図 1(c))⁶⁾。例えばGFPをショウジョウバエのシェーカー型カリウムチャンネルに挿入すると、膜電位依存的なチャンネルタンパクの構造変化によりGFP蛍光に変化が生じるため、膜電位をモニターできる⁷⁾。また、タンパク内にランダムにGFPを挿入してタンパク機能に重要な部分を探す事もできる⁸⁾。例えば、サイクリックAMP(cAMP)が結合するAキナーゼの調節サブユニットにGFPを導入して機能探索がなされ、その結果、サイクリックAMPの蛍光センサが得られたり、β-ラクタマーゼにGFPを挿入し、阻害タンパクの会合を蛍光で評価する方法などが報告されており⁹⁾、本手法は、未知タンパクの機能部位探索にも応用できると考えられる。このアプローチは、蛍光タンパクのほかにも種々の酵素をタンパク中央部に挿入した例もあり、酵素活性を指標に用いる事ができる^{10,11)}。膜タンパクの向きやランダムペプチドライブラリの機能探索などに利用されている¹²⁾。

3. タンパク末端標識法 (タンパク機能を損なわず決められた位置に標識)

タンパクの機能を解析するためには、標識により元のタンパクの機能が影響を受けない事が重要である。前述のGFP融合タンパク標識法はよい方法であるが、GFPが238アミノ酸と大きいため、タンパクに影響を与える危険性が高い。一方、蛍光有機分子は小さいが、標識部位を特定できない。もちろん、site-directed mutagenesis等の手法を用いてタンパクの特定部位に蛍光分子標識のための官能基を導入する事は可能であるが、煩雑でコストがかかり大量の検体には向いていない。この問題の解決法としてピューロマイシンを用いる手法が報告されている(図2(a))^{13,14)}。ピューロマイシンは、mRNAからタンパクが翻訳される際にリボソームのAサイトに結合してそれまで伸長してきたペプチド鎖に結合してタンパク合成を阻害する分子であるが、終止コドンを除いたmRNAを用いる無細胞タンパク合成系に低濃度で添加すると、タンパク合成終了後、mRNAに結合したままのリボソームを利用して合成されたポリペプチド鎖のカルボキシ末端に結合する¹⁵⁾。これを利用して、ピューロマイシンにフルオレセインやCy5等の蛍光色素を導入した分子(図2(b))を用いて、蛍光分子をタンパクのC末端のみに標識する事が可能である。この手法を用いれば、遺伝子さえ入手できれば、どんなタンパクであってもC末端のみに蛍光標識ができる。標識効率は、小麦胚芽抽出物を用いたタンパク合成系が最も高く、50 ~ 95%である。タンパクへの影響も考えられる限り小さいと期待できる。ただし、無細胞合成系では、得られる標識タンパクの濃度が低い(数100 μM)ことが欠点である。

この他に、特殊なペプチド配列(タグ)に選択的に結合できる蛍光色素を設計すれば、蛋白質の目的位置のみに標識する事が可能である(図2(c))。Flashはその様な標識剤に分類される蛍光色素である¹⁶⁾。この分子はそれ自体無蛍光であるが、砒素にチオールが配位するとフルオレセインと同様の蛍光を発する。もしタンパクの末端に、特定の間隔でシステインが4つ並んだタグを結合すると、Flashの2つの砒素に2つずつのチオールが配位して蛍光を発する。システインがこの様な間隔で4つ配置したアミノ酸

配列は、通常のタンパク中には存在しないから、Flashは導入されたタグにのみ結合する。遺伝子のレベルで末端にシステインタグを結合したタンパクを細胞中で発現させると、Flashによりそのタンパクが可視化できる。細胞内で用いる事は困難であるが、タンパクの精製に多用されるオリゴヒスチジンタグも蛍光標識に利用できる。この場合、タグは精製と検出に利用でき、*in vitro*でのタンパク間相互作用の評価などには効率がよい¹⁷⁾。ヒスチジンタグは、NTA-ニッケル錯体に結合するが、ニッケルイオンは、蛍光を若干消光する欠点がある。我々も単独に、ヒスチジンに結合できる色素を合成し、フィルター上で検出したところ、ngレベルの蛋白質が検出できた¹⁸⁾。

本項でご紹介した色素標識法は、タンパクアレイを標識タンパクで処理し、どのタンパクに結合するかなどの評価に有効であると考えられる。

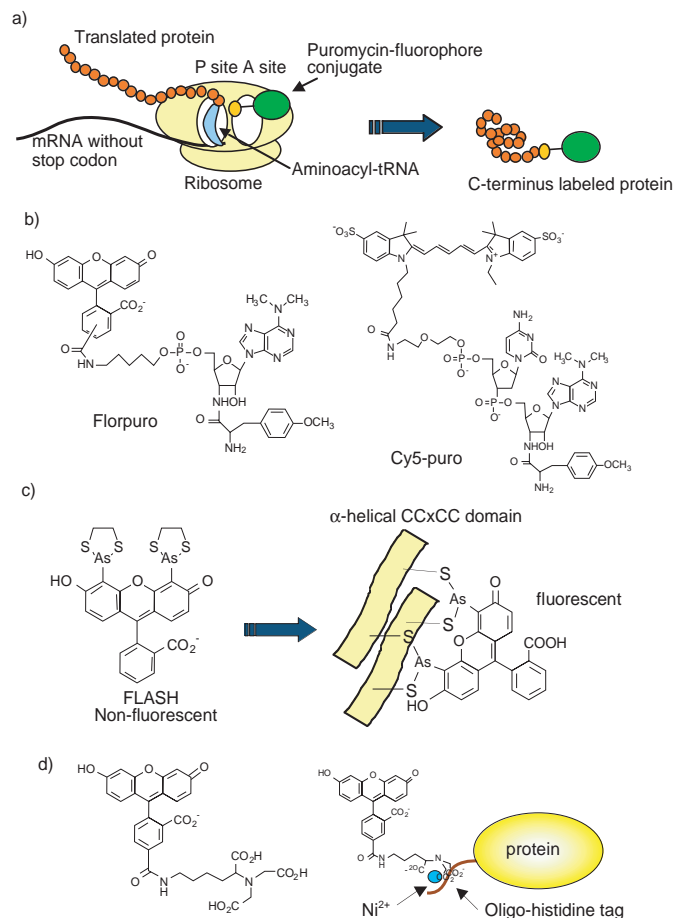


Fig.2 Specific labeling of fluorescent dye into proteins
a) Outline of fluorescent-labeling with puromycin-fluorophore conjugate
b) Chemical structures of puromycin-fluorophore conjugates
c) FLASH and proposed structure of its complex with a α -helical tetracysteine-containing tag
d) Fluorescein-NTA and proposed structure of its complex with a histidine-tag

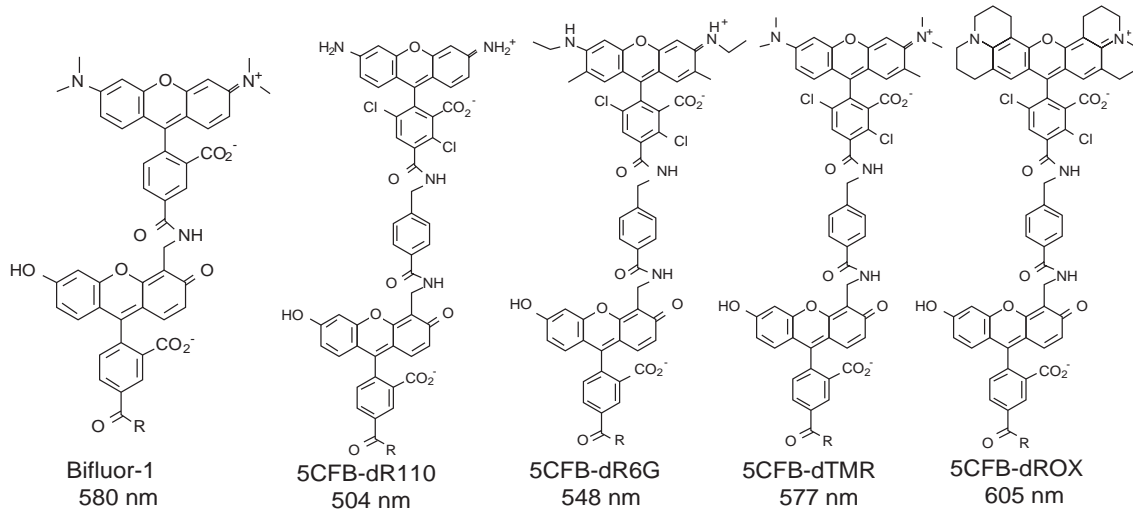


Fig.3 Chemical structures of Energy-transfer dyes

4. エネルギー移動型蛍光タグ (単一励起波長で多くの蛍光波長を得る)

蛍光色素分子を多検体同時計測に用いる場合、標識に多くの異なる波長の色素を用意しなければならない。しかし、異なる蛍光波長の有機分子の励起波長は、一般に異なっているから、これらを検出するためには、多くの励起波長を切り替えつつ用いなければならない、現実的でない。そこで、蛍光エネルギー移動を利用し、単一の励起分子で異なる蛍光色素を励起できるように励起用蛍光分子(フルオレセイン)と他のより長波長の蛍光色素を結合した一連の蛍光標識剤が報告されている。最も初期に開発されたBifluor-1は、フルオレセインにカルボキシローダミンがアミノメチル基を介して結合した色素で、フルオレセインを励起するとローダミンが蛍光する。しかし、その蛍光収率はローダミンに比べ低かった。そこで、フルオレセインと一連のローダミン誘導体をより長いリンカーで結んだ色素が報告されている(図3)¹⁹⁾。これをDNAシーケンシングのためのプライマーに標識してDideoxy法に適用したところ、良好な結果が得られている。また、蛍光色素間の距離をさらに調節できるようにオリゴヌクレオチド誘導体に励起用色素と蛍光用色素を導入した蛍光励起タグも報告されており、同様にPCRやシーケンシングの蛍光プライマー標識に応用されている^{20,21)}。これらの手法は、同一励起波長で複数の蛍光波長を取り扱える利点があるが、用意できる蛍光波長の種類には限界があることや、蛍光スペクトルの重なりなどの問題があり、スループットに難がある。

5. 蛍光ビーズを用いる方法

前項のようなアプローチでは、現実問題として用いることのできる蛍光色素の種類は限られ、それが同時にアッセイできる検体数を限定してしまう。これに対し、ポリスチレンビーズに異なる色の蛍光色素(例えばオレンジと赤)を異なる比率で混合し、両者の蛍光比をコードとすれば原理的に極めて多くの蛍光バーコード

を作る事ができる(図4)^{22,23)}。SNP検出のところで紹介したLuminexビーズである。また、ビーズ中にある蛍光色素は、酸素に触れないため消光も抑える事ができる。実際には、スペクトルの重なりが出るため多くて100種類のビーズを用意するのが限度である。64種類のビーズに異なる対象物を固定化し、これに会合する物質をフルオレセインで標識し、両者の蛍光を同時にフローサイトメーターで読み取っていくFlowMetrixというシステムが市販されている²⁴⁾。

この他にも、蛍光色素の代わりに希土類錯体を用いた方法もある。

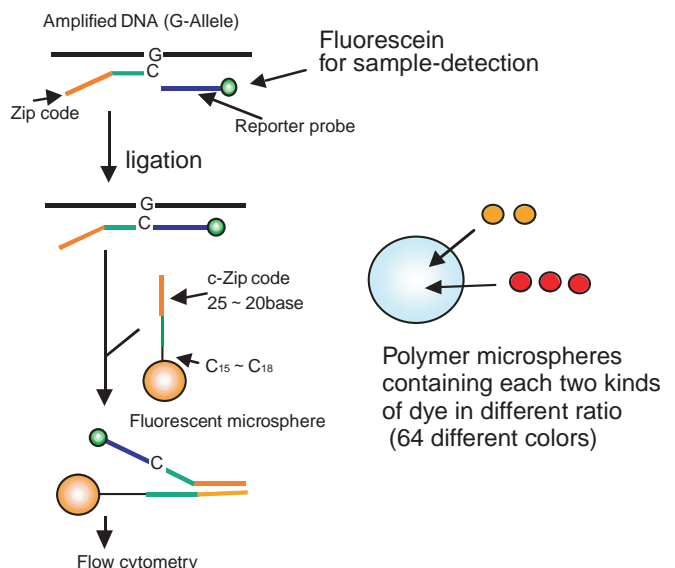


Fig.4 Barcode-making with microspheres containing fluorescent dyes

6. 量子ドットおよびそれを利用したビーズ (蛍光色素の欠点を克服)

量子ドット(QD)は、15 ~ 120 の半導体の結晶である。光を照射すると exciton 電子とホールが発生し、これに基づく発光が見られる^{25,26)}。発光波長は、結晶の大きさと種類に依存し、粒径が大きいほど長波長となる。ZnSe、CdS、CdSe、CdTe 等では発光は可視光域、InAs、InP、PbS では近赤外域となる²⁷⁻²⁹⁾。良く用いられる CdSe では、単に結晶径を変えるだけで青から赤まで任意の可視光の波長を作り出せる。バンドギャップの広い ZnS や CdS で表面をコートしてやると蛍光消光が抑えられる³⁰⁾。合成が比較的簡便で、同一の手法で多くの色を作り出せ、しかも、全て同じ近紫外(350 nm)で励起できる、発光スペクトルがシャープで幅が狭く(25 ~ 30 nm)スペクトル同士の重なりが避けられるので、多くの色を同時に使えるなど、既存の蛍光色素の欠点を克服できる。

合成に際しては、CdSe/ZnS の表面をトリオクチルホスフィン(TOP)やトリオクチルホスフィンオキシド(TOPO)でコートした形で得られる³¹⁾。こうして得られる QD は有機溶媒に可溶であるが、水中では凝集してしまう。しかしながら、表面を覆う TOP/TOPO は、極性基を持つチオール化合物などと交換可能であり、水中に分散できる QD を調製することができる。例えば、メルカプト酢酸でコートした QD を用い、表面のカルボキシル基に EDC 縮合で IgG を結合した例³²⁾ やメルカプトプロピオン酸でコートした QD にチオール末端を有する DNA を添加して配位子交換させ QD 表面に DNA を修飾した例がある³³⁾(図 5(a))。ジチオスレイトールで表面をコートしておき、水酸基をカルボニルイミダゾールで活性化してアミノ化 DNA を固定する事もできる(図 5(a))³⁴⁾。In situ ハイブリダイゼーションなどへも応用例がある。ただし、長い DNA では、40 CdS の発光を消光するとの報告もある³⁵⁾。タンパクを修飾すると、量子収率が下がったり、Dihydropyridic acid 等でコートした後、EDC カップリングなどで結合すると凝集が起こったりとうまくいかない場合が多い。この解決手段として、QD 表面を liponic acid でアニオンコートしておき、結合したいタンパクをカチオン性のロイシンジッパーと融合して遺伝子から発現し、静電的に QD 表面に結合させる手法が報告されている³⁶⁾。この場合は、QD の凝集やタンパクの変性などは見られないという(図 5(b))。QD は非常に小さいため、これに結合した生体分子は、均一系とほぼ同じ速度で反応する。

一方、この様に水溶性 QD 表面に直接対象分子を結合させるアプローチでは、用いる事のできる色の種類に限界がある。そこで、蛍光色素の代わりに QD を用いたバーコード作成が試みられている(図 5(c))³⁷⁾。考え方は Luminex ビーズと同じである。ただし発光スペクトル幅が狭いため多くの色を使う事ができる。例えば 3 色を使い、各々の蛍光レベル(ビーズに封入する QD の数の比)を 10 段階(0 ~ 9)で組み合わせると、強度 0 は使えないから $10^3 - 1 = 999$ 通りのコードを作成できる。同様に、6 色用いれば 100 万種近くのコードを用意できることになる。(一般に m 色をそれぞれ n 個のレベルで組み合わせれば、 $n^m - 1$ 通りのコードができる。)実際には、あまりにも各色の間での強度差が大きくなると、QD といえどもスペクトルが重なってしまうので、強度レベルを多く用

いるより、色の種類を増やした方がよい。現実的には、5 ~ 6 色で 6 つの強度レベルを組み合わせ、1 万から 4 万種のコードが使える。1 ~ 2 μm のビーズに封入すると QD 同士はお互いに離れて(分散状態で)ビーズ内に存在し、蛍光エネルギー移動などを起こす事はないため、良好なコードを作ることができる。

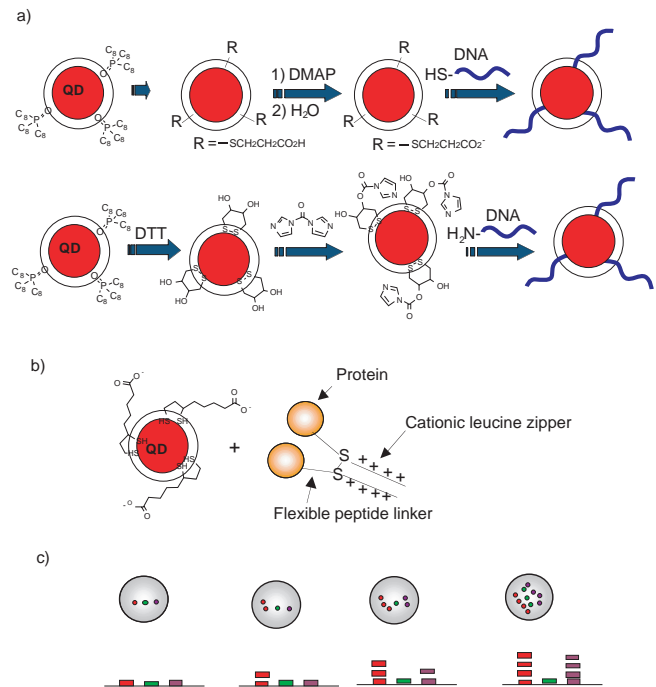


Fig.5 Application of quantum-dot for labeling of biomolecules or making of barcodes

- a) DNA-modification with quantum-dot
b) Protein-labeling with quantum-dot
c) Multiplexed optical code using quantum-dot-tagged microbeads

7. 多孔質シリカを用いた光干渉による発光 (光消光のないバーコード)

シリコン結晶をフッ化水素酸中で酸化すると数 μm の孔が規則正しく並んだ多孔質構造(マクロポーラスシリコン)が得られる。この構造が光を干渉するため、その構造特有の波長の光を発し、着色して見える。発光波長は、酸化条件を変化させ、多孔質構造を調節する事で種々のものが調製できる³⁸⁻⁴⁰⁾。

この多孔質シリコン膜を調製し、表面をオゾン酸化して親水性とし、これに生体分子を固定化した後、フィルムを砕いて小さな破片として水中に分散して用いる⁴¹⁾。これに、別の蛍光分子で標識した分子を加え、相互作用した組み合わせを標識色素の蛍光で見つけ出し、基板シリコンの発光波長で、その相手が何であるかを特定できる^{41,42)}。この光は、干渉により起こるものであるから光消光は全く起こらず安定である事、同一照射光で異なる色が出せる事、同様の調製法で比較的小さい多くの色が出せることなどの利点があり、今後の利用が期待できる。まだ、アルブミンを吸着させてこれに抗アルブミン抗体を結合し、フルオレセイン標識2次抗体との結合をアッセイした基本的データが報告されているのみであるが、発光スペクトル幅も狭く実用性を秘めている。

8. おわりに

これまでにない大量のサンプルを同時に網羅的かつハイスループットに扱うためには、極めて多くの目印(バーコード)を作らなくてはならない。当初有機色素の組み合わせでこれを成し遂げる試みがなされ、蛍光ビーズとして実用化もなされている。しかし、用意できる種類には限界がある。一方、半導体材料開発などの分野から生まれた量子ドットや多孔質シリコンは、これまでの蛍光法にない、種々の特質を兼ね備えており、ポストゲノム技術に利用するための新しい標識剤として期待できる。元々、多くのサンプルの目印としてのバーコードを作成する試みは、金属材料などを利用して進められた。例えば、金属の微小なロッドに金や銀をバーコード上にメッキしたり⁴³⁾、ラジオ波を発する材料⁴⁴⁾が開発されたりしてきた。金属ロッドは、作成に手間がかかる上、マイクロメーターサイズの大きさが必要で実用性に乏しかった。個々のご紹介したQDや多孔質シリコンは、これらの諸問題も克服する可能性を秘めている。

一方で、従来の蛍光有機色素はポストゲノム技術としては価値を失ったかというところではない。例えば、QDや多孔質シリカとの組み合わせで、計測対象がどこに結合したかを検出するのに必要である。また、従来の標識法とは異なる種々の機能を付与した蛍光色素もタンパクの機能解析には必須であろう。今後は、GFPのような蛋白質とあわせて、さらに特殊な機能を有する標識法や蛍光色素が開発され、効力を発揮すると考えられる。

大切な事は、ポストゲノム技術においては、蛍光標識といっても、従来の概念にとらわれない手法や化学以外の他分野の手法を組み合わせたり、これまで全く違う分野での材料であったものが利用されるなど、分野間の垣根を越えなくては有用な技術が開発できないという事実である。換言すれば、バイオに必要な革新的技術は、バイオとは無関係の分野の材料から産み出される。バイオテクノロジーという分野は、決して医学生物学とその他の分野の寄せ集めではなく、これらの要素を完全に融合して併せ持つ独自の学問(技術)分野である事を認識する必要がある。

参考文献

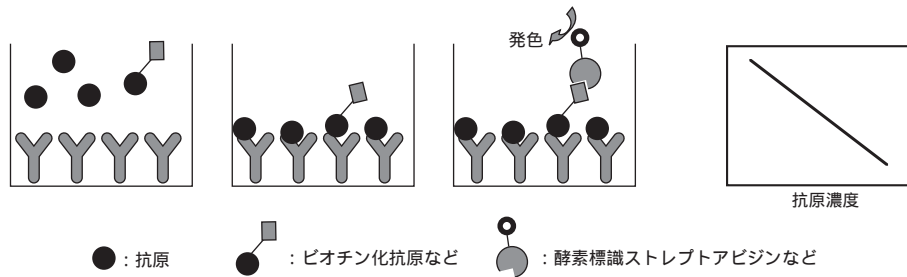
- 1) A. B. Cubitt, R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross, R. Y. Tsien, *Trends in Biochemical Sciences*, **20**, 448 (1995).
- 2) R. Y. Tsien, *Ann. Rev. Biochem.*, **67**, 509 (1998).
- 3) R. E. Campbell, O. Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7877 (2002).
- 4) N. P. Mahajan, K. Linder, G. Berry, G. W. Gordon, R. Heim, B. Herman, *Nature Biotechnol.*, **16**, 547 (1998).
- 5) J. Zhang, Y. Ma, S. S. Taylor, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14997 (2001).
- 6) N. Doi, H. Yanagawa, *FEBS Lett.*, **457**, 1 (1999).
- 7) M. S. Siegel, E. Y. Isacoff, *Neuron*, **19**, 735 (1997).
- 8) R. M. Biondi, P. J. Baehler, C. D. Reymond, M. Veron, *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4946 (1998).
- 9) N. Doi, H. Yanagawa, *FEBS Lett.*, **427**, 51 (1999).
- 10) N. Doi, H. Yanagawa, *Cell. Mol. Life. Sci.*, **54**, 394 (1998).
- 11) Z. Lu, K. S. Murray, V. V. Cleave, E. R. LaVallie, M. L. Stahl, J. M. McCoy, *BioTechnology*, **13**, 366 (1995).
- 12) M. Ehrmann, D. Boyd, J. Beckwith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7574 (1990).
- 13) N. Nemoto, E. Miyamoto-Sato, H. Yanagawa, *FEBS Lett.*, **462**, 43 (1999).
- 14) J. Yamaguchi, N. Nemoto, T. Sasaki, A. Tokumasu, Y. Mimori-Kiyosue, T. Yagi, T. Funatsu, *FEBS Lett.*, **502**, 79 (2001).
- 15) N. Nemoto, E. Miyamoto-Sato, Y. Husimi, H. Yanagawa, *FEBS Lett.*, **414**, 405 (1997).
- 16) B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science*, **281**, 269 (1998).
- 17) T. Stora, R. Hovius, Z. Dienes, M. Pachoud, H. Vogel, *Langmuir*, **13**, 5211 (1997).
- 18) Y. Katayama, H. Amano, Y. Ohuchi, M. Maeda, *Anal. Sci.*, **17**, i1469 (2001).
- 19) L. G. Lee, S. L. Sqrurgeon, C. R. Heiner, S. C. Benson, B. B. Rosenblum, S. M. Menchen, R. J. Graham, A. Constantinescu, K. G. Upaghya, J. M. Cassel, *Nucleic Acid Res.*, **25**, 2816 (1997).
- 20) L. Berti, J. Xie, I. L. Medintz, A. N. Glazer, R. A. Mathies, *Anal. Biochem.*, **292**, 188 (2001).
- 21) J. Ju, A. N. Glazer, R. A. Mathies, *Nucleic Acid Res.*, **24**, 1144 (1996).
- 22) F. J. Steemers, J. A. Ferguson, D. R. Walt, *Nature Biotechnol.*, **18**, 91 (2000).
- 23) J. A. Ferguson, F. J. Steemers, D. R. Walt, *Anal. Chem.*, **72**, 5618 (2000).
- 24) R. J. Fulton, R. L. McDade, P. L. Smith, L. J. Kienker, J. R. Keetman Jr., *Clin. Chem.*, **43**, 1749 (1997).
- 25) A. P. Alivisatos, *Science*, **271**, 933 (1996).
- 26) M. Nirmal, L. E. Brus, *Acc. Chem. Res.*, **32**, 407 (1999).
- 27) C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 8706 (1993).
- 28) M. L. Steigerwald, A. P. Gibson, T. D. Harris, R. Kortan, A. J. Muller, A. M. Thayer, T. M. Duncan, D. C. Douglass, L. E. Brus, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 3046 (1988).
- 29) M. A. Hines, P. Guyot-Sionnest, *J. Phys. Chem.*, **B102**, 3655 (1998).
- 30) B. O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. J. Jensen, M. G. Bawendi, *J. Phys. Chem.*, **101**, 9463 (1997).
- 31) R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin, *Science*, **277**, 1078 (1997).
- 32) G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: London, UK, Chapter 3 (1996).
- 33) G. P. Mitchell, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 8122 (1999).
- 34) S. Pathak, S-K. Choi, N. Amheim, M. E. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, (2001).
- 35) S. R. Bigham, J. L. Coffey, *J. Phys. Chem.*, **96**, 10581 (1992).
- 36) H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12142 (2000).
- 37) W. Han, X. Gao, J. Z. Su, S. Nie, *Nature Biotechnol.*, **19**, 631 (2001).
- 38) M. Cazzanelli, C. Vinegoni, L. Pavesi, *J. Appl. Phys.*, **85**, 1760 (1999).
- 39) P. A. Snow, E. K. Squire, P. S. J. Russell, L. T. Canham, *J. Appl. Phys.*, **86**, 1781 (1999).
- 40) V. Lehmann, r. Stengl, H. Reisinger, R. Detemple, W. Theiss, *Appl. Phys. Lett.*, **78**, 589 (2001).
- 41) F. Cunin, T. A. Schmedake, J. R. Link, Y. Y. Li, J. Koh, S. N. Bhatia, M. J. Sailor, *Nature Mater.*, **1**, 39 (2002).
- 42) V. Lehmann, *Nature Mater.*, **1**, 12 (2002).
- 43) S. R. Nicewarner-Pena, R. G. Freeman, B. D. Reiss, L. He, D. J. Pena, I. D. Walton, R. Cromer, C. D. Keating, M. J. Natan, *Science*, **294**, 137 (2001).
- 44) E. J. Moran, S. Sarsher, J. F. Cargill, M. M. Shahbaz, A. Lio, A. M. M. Mijallii, R. W. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 10787 (1995).

Topics on Chemistry

Apoenzyme Reactivation Immunoassay System (ARIS)

(株) 同仁化学研究所 渡辺 栄治

a) 通常の競合 EIA



b) ARIS

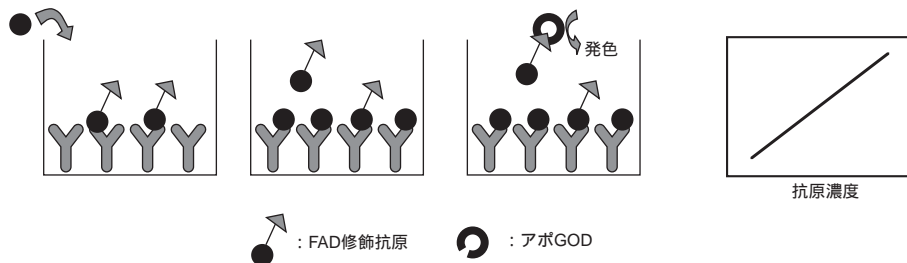


図1 通常の競合 EIA と ARIS の違い

ホルモンやペプチド等の低分子化合物の高感度検出法として、競合 EIA (Competitive Enzyme Immunoassay) は重要なツールの一つである。競合 EIA では通常、試料中の抗原をビオチン等で修飾した抗原と競合的に抗体と結合し、抗体に結合した競合物を発色反応により定量する。この手法では、抗原濃度の上昇とともに発色が減り、検量線は負の傾きとなる(図 1-a)。

これに対し、正の傾きの検量線が得られる競合 EIA 法として Apoenzyme Reactivation Immunoassay System (ARIS) がある(図 1-b)。glucose oxidase (GOD) は補酵素として flavin adenine dinucleotide (FAD) を含有している。FAD を取り除いた GOD (apo-GOD) は酵素活性を有しないが、FAD を加えることにより酵素活性を有するホロ酵素が再構成される。ARIS はこの原理を利用した手法である。

FAD 修飾した抗原と抗体を結合させ、そこへ抗原を添加すると、FAD 修飾抗原が溶液中に放出される。apo-GOD を添加し、溶液中の FAD 修飾抗原と再構成させる。抗体と結合した状態の FAD 修飾抗原は立体障害のため apo-GOD と再構成することはできない。再構成された holo-GOD をグルコース / POD / TMB 等で発色定量する。ARIS ではプレートの洗浄操作等が必要ないため、所要時間は 30 分ほどであり、数時間が必要な通常の EIA に比べ非常に短時間で分析を行うことができる。

Niessner らはトリニトロトルエン(TNT)と FAD のコンジュゲート(図 2)を合成し、ARIS を用いた TNT の検出を行っている(図 3)¹⁾。本手法による TNT の検出限界は 5 $\mu\text{g/l}$ であった。ARIS は抗原濃度の上昇に伴い発色する手法であることから、試験紙へ応用することも可能である。Niessner らは ARIS を用いた TNT 試験紙を作成し、水道水中の TNT の検出限界は 0.7 $\mu\text{g/l}$ であると報告している²⁾。このように、ARIS は多くの利点を有した競合 EIA であり、今後の展開が期待される。

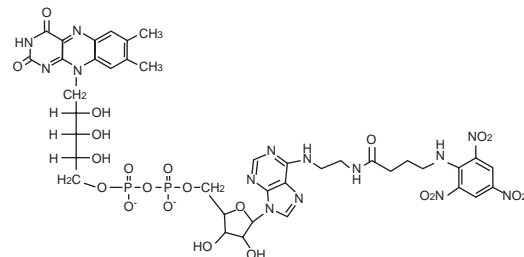


図2 FAD-TNT 複合体の構造

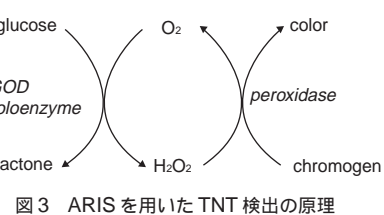
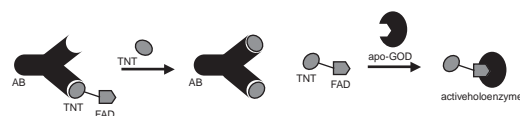


図3 ARIS を用いた TNT 検出の原理

参考文献

- 1) M. Dosch, M. G. Weller, A. F. Bückmann, R. Niessner: Homogeneous immunoassay for the detection of trinitrotoluene (TNT) based on reactivation of apoglucose oxidase using a novel FAD-TNT conjugate, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **361**, 174 (1998).
- 2) C. Heiss, M. G. Weller, R. Niessner: Dip-and-read test strips for the determination of trinitrotoluene (TNT) in drinking water, *Anal. Chim. Acta.*, **396**, 321 (1999).

新製品

Total RNA 抽出キット

Get pureRNA Kit

<特長>

- フェノール、クロロホルム等有害な有機溶媒を使用しない。
- 高純度な Total RNA を高回収率で抽出できる。
- 動物細胞、組織および血液からの抽出が可能。
- 大量サンプルからの抽出が可能。
- RT-PCR、ノーザンブロット等に使用できる。

<キット内容>

| | |
|-----------------------------|--------------|
| 50 samples | |
| ・ Lysis buffer | 13 ml x 2本 |
| ・ Precipitation solution I | 13 ml x 1本 |
| ・ Precipitation solution II | 8 ml x 1本 |
| ・ DNase | 0.55 ml x 1本 |
| ・ DNase dilution buffer | 12 ml x 1本 |

<保存方法>

本キットは冷蔵 (0 ~ 5) で保存して下さい。

Total RNA 抽出には酸性フェノール法 (AGPC法) が用いられてきましたが、有害な有機溶媒を使用すること、フェノール等のキャリーオーバーにより、下流のアプリケーションを阻害するなどの問題がありました。また、スピナラム法でのキットでは、RNAは水溶液として回収されるため、任意の濃度に調製できないという問題がありました。

Get pureRNA Kit は、溶解液、タンパク除去液および DNase 溶液により構成されており、フェノール、クロロホルム等の有害な有機溶媒を一切使用せず、1時間程度で高純度な Total RNA をペレットとして得ることができます。また、スピナラムやフィルターチューブを用いるキットに比べ、大量のサンプルからでも高純度な RNA の抽出が可能です。本キットは少量の組織や血液、あるいは培養細胞で容易に行えるため、複数のサンプルを処理する際もご使用いただけます。

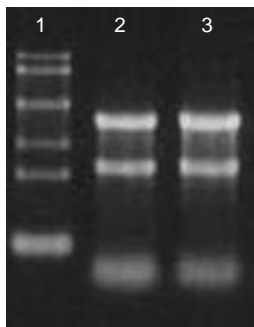


図 1 抽出 Total RNA の電気泳動

Lane 1: RNA Marker
Lane 2: HeLa Total RNA (Run 1)
Lane 3: HeLa Total RNA (Run 2)

1%ホルマリン変性アガロースゲル

| 品名 | 容量 | 価格(¥) | メーカーコード |
|-----------------|------------|---------|---------|
| Get pureRNA Kit | 50 samples | 18,000 | GK04 |

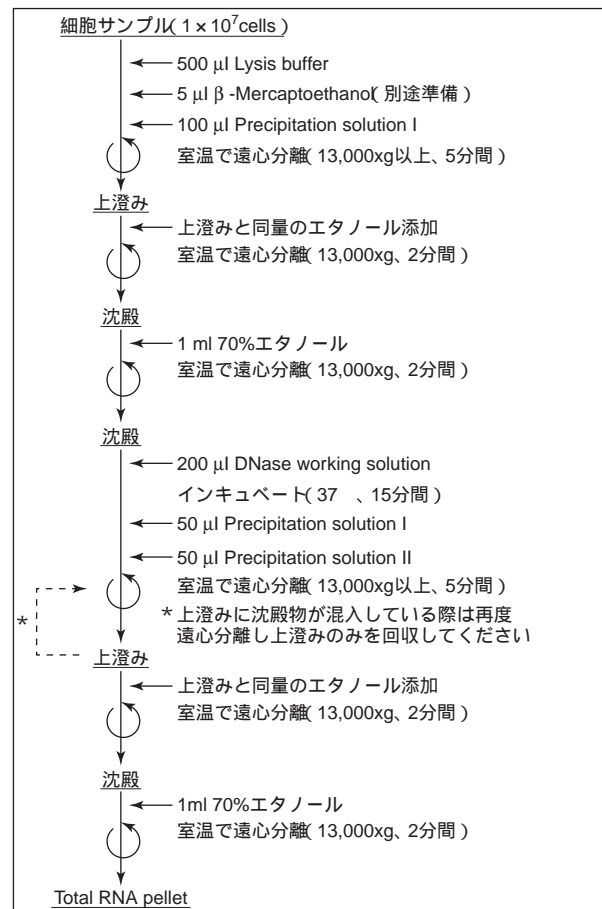
表 1 Total RNA 回収量とその純度

| Sample | Recovery (µg) | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ |
|----------------------------------|---------------|------------------------------------|
| HeLa (1 x 10 ⁷ cells) | 90 - 150 | 2.0-2.2 |
| HeLa (1 x 10 ⁸ cells) | 800 - 1400 | 2.0-2.2 |
| Mouse liver (20 mg) | 60 - 75 | 2.0-2.2 |
| Mouse liver (1.0 g) | 3800-4400 | 2.0-2.2 |
| Mouse brain (30 mg) | 15 - 25 | 2.0-2.2 |
| Mouse brain (1.0 g) | 700-1000 | 2.0-2.2 |
| Blood (5 ml) | 70 - 120 | 2.0-2.2 |

* 上記 A₂₆₀/A₂₈₀ 値は、回収した RNA を TE buffer(10 mmol/l Tris, 1 mmol/l EDTA, pH8.0)に溶解した際の値です。DEPC-treated water に溶解すると、A₂₆₀/A₂₈₀ 値が低く算出される場合があります。
* サンプルサイズにより1キットで可能な抽出回数は異なりますのでご注意ください。細胞 1 x 10⁶ ~ 1 x 10⁷ cells、組織 25 ~ 30 mg、血液 200 µl のとき 50 回抽出できます。

<操作方法>

例) 細胞からの Total RNA 抽出



新製品

アガロースゲルからのDNA抽出キット

Get pureDNA Kit-Agarose

特長

- 70%以上の回収率で高純度のDNAが得られる。
- 広範なサイズのDNA(0.05 ~ 50 kbp)の回収が可能。
- DNAをペレットで回収でき、目的濃度のDNA水溶液を容易に調製できる。
- 短時間で回収できる。
- TAEおよびTBE bufferで泳動したゲルの使用が可能。
- 低融点・高強度タイプのアガロースからも回収可能。
- 1 sampleあたり¥75と低コスト。

キット内容

- ・ Gel lysis buffer 65 ml x 1
- ・ Precipitation solution 65 ml x 1
- ・ Co-precipitation solution(20 mg/ml glycogen) 0.5 ml x 1

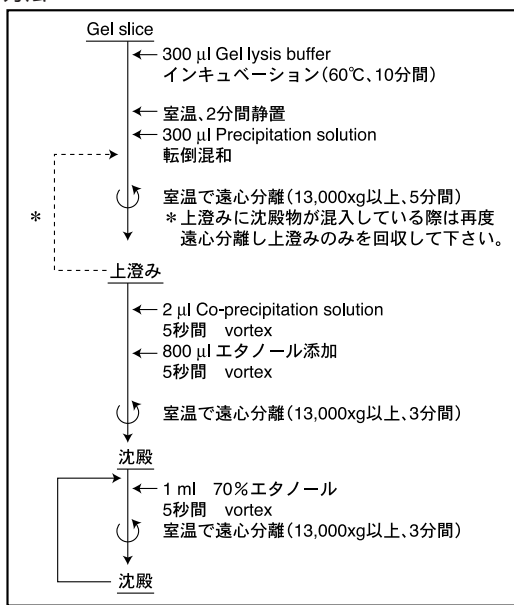
保存方法

本キットは冷蔵(0 ~ 5)で保存して下さい。

アガロース電気泳動後の目的DNAの回収には、透析膜を用いた電気泳動濃縮法、アガラーゼのようなゲル分解酵素を用いた方法、シリカ担体を用いた方法等が汎用されています。中でもシリカ担体を用いた方法はキットとして市販されていますが、1)処理するゲルの使用量に制限がある、2)高分子量のDNAでは回収率が低い、という問題を抱えていました。

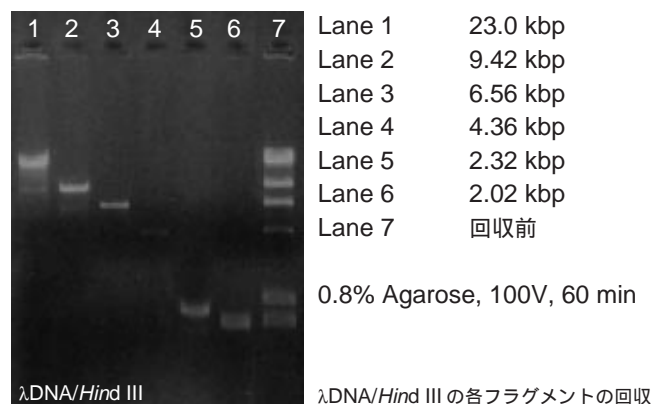
Get pureDNA Kit-Agaroseはゲル溶解剤、ゲル除去剤およびDNA共沈剤で構成され、目的DNAを簡便に高回収率で得ることができます。DNAはペレットで回収されますので、バッファーで目的濃度の水溶液に調製でき、PCR、ライゲーション等にそのままご使用頂けます。

操作方法



Q & A

- Q1 このキットで使用可能なアガロースゲルの濃度はどのくらいですか。
- A1 ゲル濃度3%以内でご使用下さい。それ以上の濃度ゲルから回収する際、Gel lysis bufferにゲルが溶解しにくい場合があるので加温時間を延長し完全に溶解して下さい。またTAE及びTBE bufferで泳動したゲルがご使用頂けます。
- Q2 このキットで処理可能なゲル量はどれくらいですか。
- A2 余分なゲルを含まないように切り出し、ゲル断片200 mg以内でご使用ください。それ以上のゲル重量を取り扱う場合、試薬量を比例倍に増やしてご使用ください。またその際1.5 ml チューブは使えませんのでご注意ください。
- Q3 回収したDNAフラグメントはどのようなアプリケーションに使用できますか。
- A3 ライゲーション、制限酵素消化反応、PCR増幅などにそのまま使用できます。
- Q4 Co-precipitation solution(20 mg/ml glycogen)を使用しても回収後のアプリケーションに影響しませんか。
- A4 A3のアプリケーションにも問題なくご使用頂けます。Co-precipitation solutionなしでもDNAは回収できますがペレットとして確認できないことがありますので上澄み除去の際にはDNAペレットを吸い取らないようご注意ください。
- Q5 シリカパウダーや遠心フィルターを用いた方法との違いは何ですか。
- A5 汎用されているシリカパウダーや遠心フィルターを用いた場合、(1)スピニングカラムを用いるため処理できるゲル量に制限がありました。(2)一旦DNAをシリカ担体に吸着させた後、指定のbufferにて溶出しますが、その際高分子量のDNA回収率が低いという問題がありました。一方、本キットでは(1)ゲル量に合わせてスケールアップが可能です。(2)DNAを担体に吸着させることなくエタノール沈殿で回収するので、回収量もDNAサイズにほとんど影響しません。さらには(3)DNAをペレットとして回収できるため目的濃度のDNA水溶液を調製できるという点が異なります。



新製品

血液、細胞・動物組織からの DNA 抽出キット

Get pureDNA Kit-Blood
Get pureDNA Kit-Cell, Tissue

特長

- 高純度な DNA を高い回収率で得られる。
- フェノール、クロロホルムなど有害な有機溶媒を使用しない。
- スピнкаラムを使わないため各種スケールに対応でき、大量のサンプルを一度に処理できる。
- 回収したゲノム DNA の A_{260}/A_{280} 値は 1.7 ~ 1.9 となり、様々なアプリケーションにそのまま使用可能。
- 1 sample あたり ¥143 と低コスト。
- キットには酵素類が含まれており別途準備する必要がない。

<キット内容>

| -Blood (200 samples) | | -Cell, Tissue (200 samples) | |
|---------------------------|--------|-----------------------------|--------|
| Lysis buffer | 44 ml | Lysis buffer | 110 ml |
| Precipitation solution I | 18 ml | Precipitation solution I | 22 ml |
| Precipitation solution II | 18 ml | Precipitation solution II | 22 ml |
| Proteinase K solution | 2.1 ml | Proteinase K solution | 2.1 ml |
| RNase solution | 0.5 ml | RNase solution | 0.5 ml |
| Co-precipitation solution | 0.5 ml | | |

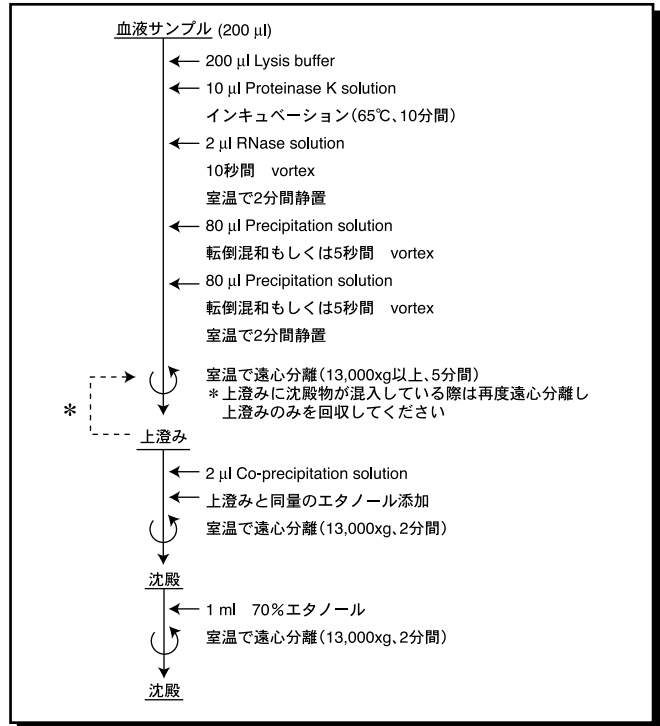
保存方法

本キットは冷蔵(0 ~ 5)で保存して下さい。

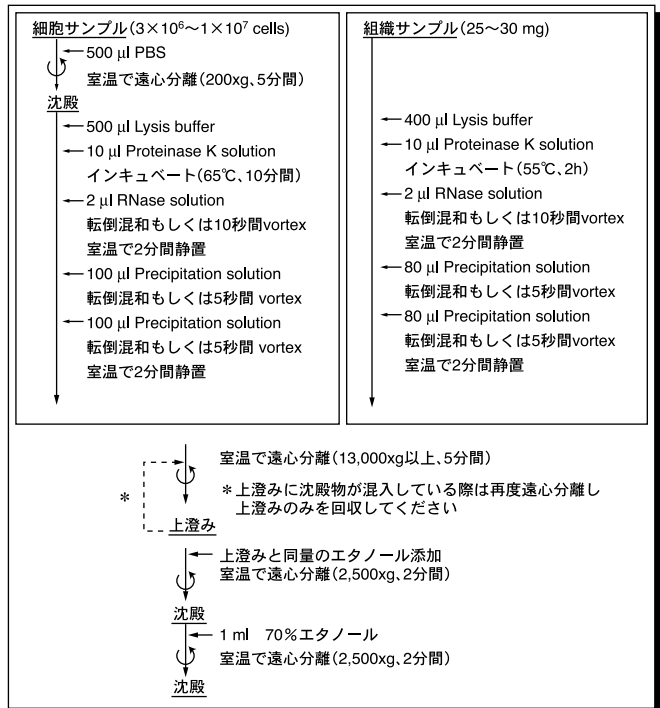
ゲノム解析法の一つであるサザンプロット法、ゲノムライブラリーの作製、および PCR には、高純度のゲノム DNA を簡便かつ短時間に抽出することが求められます。本キットは、サンプルを溶解する、溶解液から RNA およびタンパク質を除く、エタノール沈殿により DNA を回収する、という3ステップで、高純度のゲノム DNA を簡便に抽出できます。本キットは、フェノール/クロロホルムを必要としないので抽出した DNA は制限酵素反応、PCR 反応等にそのまま使用できます。

<操作方法>

Get pureDNA Kit-Blood



Get pureDNA Kit-Cell, Tissue

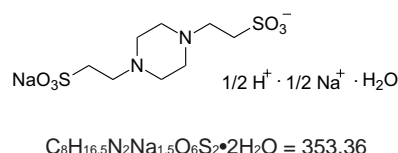


新製品

水に溶ける PIPES

PIPES sesquisodium

化学名 Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid), sesquisodium salt, monohydrate



特長

- PIPES の 1.5 ナトリウム塩
- PIPES はあまり水に溶けないが、本品はよく溶ける。(3.53 g/10 ml)
- 有機溶媒には溶けない。
- 溶かすだけで pH7 前後の緩衝液を作ることができる。
- pH6.1 ~ 7.5 で緩衝効果を発揮する。

| 品名 | 容量 | 価格(¥) | 和光コード | メーカーコード |
|--------------------|------|---------|-----------|---------|
| PIPES sesquisodium | 25 g | 3,000 | 340-08032 | GB25 |

< Q&A >

Q1 「Get pureDNA Kit-Cell, Tissue」で抽出できるサンプル量と回数はどのくらいですか。

A1 培養細胞 $3 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells、動物組織 25 ~ 30 mg (肝・腎・心臓等)、マウス尾 0.5 ~ 1.0 cm のとき 1 キットで 200 回抽出できます。また培養細胞 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ cells からの抽出は 400 回抽出できます。

Q2 ゲノム DNA の純度と回収量はどのくらいですか。

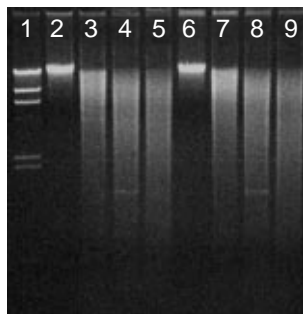
A2 どのサンプルも A_{260}/A_{280} は 1.7 ~ 1.9 になります。回収量はサンプルの種類によっても異なりますので下表をご参照ください。

Table 各試料から得られるゲノム DNA 量

| Sample | Recovery(µg) | A_{260}/A_{280} |
|-----------------------------------|--------------|-------------------|
| HeLa cell(1×10^7 cells) | 80 ~ 120 | 1.7 ~ 1.9 |
| HL60 cell(1×10^7 cells) | 40 ~ 60 | 1.7 ~ 1.9 |
| Mouse liver(25 ~ 30 mg) | 40 ~ 100 | 1.7 ~ 1.9 |
| Mouse brain(25 ~ 30 mg) | 20 ~ 40 | 1.7 ~ 1.9 |
| Mouse tail(0.5 ~ 1 cm) | 40 ~ 60 | 1.7 ~ 1.9 |
| Whole blood(200 µl) | 3 ~ 10 | 1.7 ~ 1.9 |

Q3 「Get pureDNA Kit-Cell, Tissue」を使って全血からの DNA 抽出はできますか。

A3 可能です。但し、使用前に一旦 PBS(-)にて血球層を洗浄してからご使用ください。



Lane 1 : λ DNA/*Hind* III
 Lane 2 ~ 5 : mouse heart DNA
 Lane 6 ~ 9: mouse kidney DNA
 Lane 2, 6: undigested
 Lane 3, 7: *Bam*H I-digested
 Lane 4, 8: *Eco*R I-digested
 Lane 5, 9: *Pst* I-digested

0.8% Agarose, 100V, 60 min

マウス組織からの抽出 DNA とその制限酵素消化反応

| 品名 | 容量 | 価格(¥) | メーカーコード |
|------------------------------|-------------|---------|---------|
| Get pureDNA Kit-Agarose | 200 samples | 15,000 | GK01 |
| Get pureDNA Kit-Blood | 200 samples | 28,500 | GK02 |
| Get pureDNA Kit-Cell, Tissue | 200 samples | 28,500 | GK03 |

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。皆様のご来場をお待ちいたしております。

第 76 回日本薬理学会年会
 第 80 回日本生理学会大会
 3月24日(月) ~ 26日(水) マリンメッセ福岡

第13回 フォーラム・イン・ドージン開催報告

生命機能と病の中の蛋白質フォールディング

生命の設計図である DNA から、設計図通りにタンパク質が作られる。その機能も予め DNA にプログラムされており、緻密な機構によって生命が維持されている。そういった DNA を中心とする生命観が最近大きく揺らいでいる。タンパク質は 100% 設計図通りに正しく作られる訳ではなく、我々が考える以上に間違いが多いようだ。例えば、平均して 30% もの不良品を産み出しているとも言われている。生まれたばかりのタンパク質は一本の紐でしかなく、正しく折り畳まれて初めて機能を発揮する。この折り畳み(フォールディング)をテーマとして、第13回のフォーラム・イン・ドージンが、さる11月29日、熊本市で開催された。極めて今日的なテーマであったためか、参加者が延べ約160人と、最近になく盛況でかつ充実したものとなった。

今回も熊本大学医学部の山本先生、前田先生、それに岩永先生(九大名誉教授)に企画の段階からお世話いただいたおかげで、国内の第一線で活躍されている先生方に講演していただくことができた。前半はフォールディングの機構、分子シャペロン、品質管理といった基礎的な内容で、後半にはフォールディングの異常によって引き起こされる疾病の話と、内容的には2部構成となった。

星野先生(阪大蛋白研)は、 β ラクトグロブリンや $\beta 2$ ミクログロブリンを例に、NMRによるアミドプロトンの重水素交換速度の測定がタンパク質のフォールディング過程の解析に有効であることを示した。永田先生(京大再生医科学研)は、分子シャペロン Hsp47 および EDEM の品質管理機構における役割について講演された。EDEM は彼らによって新たに発見された小胞体タンパク質で、糖タンパク質の小胞体関連分解(ERAD)を促進している。この品質管理については、田中先生(東京都臨床医学研)がシャペロン依存型の品質管理リガーゼである CHIP の役割について最新の知見を紹介された。

引き続き分子シャペロンに関して、森先生(熊大医)がタンパク質のミトコンドリア輸送とフォールディングおよびアポトーシス抑制におけるシャペロン系の役割について、また小椋先生(熊大発生研)が AAA⁺ファミリー ATPase について、最後に吉田先生(東工大資源化学研)がシャペロニン GroEL/ES の作用について、一分子の動きをリアルタイムに捕らえた動画を交えて講演された。

後半のセッションでは、正しく折り畳まれなかったタンパク質が凝集することで起こる疾病にフォーカスをあて、代表的なフォールディング病であるアルツハイマー病、家族性アミロイドーシス(FAP)およびプリオン病についての講演が行われた。西道先生(理研)は、加齢に伴って A β の分解系が低下し、結果的に A β の蓄積が起こることがアルツハイマー病の発症原因であるという立場から、A β の分解に関与するタンパク質ネプリライシンの役割について話された。安東先生(熊大医)は、FAP の病態解析、治療について講演された。FAP は熊本に大きなフォーカスがあるが、同じく患者数の多いスウェーデンとの興味ある比較データも紹介された。発症年齢や浸透率に大きな開きがあり、環境要因が重要なようである。最後に、堂浦先生(九大医)がプリオン病の治療薬開発の現状について話された。 β シート構造に親和性をもつ蛍光色素 BSB は、FAP およびプリオンのタンパク質凝集体の染色性に優れており、誘導体化することでこれら難治性疾患の診断用プローブの開発も可能と思われる。

どの演者の講演も非常に活発なディスカッションがあり、この分野に対する関心の高さが窺われた。ただ単にトレンドテーマを追いかけるだけに終わらず、しっかりとした分子的な基盤を軸にし、今後も地方からの発信を続けたいと思っている。(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

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