

DOJIN NEWS

No.110
2004

ドージンニュース

Review

遺伝子治療を目指した遺伝子デリバリー技術

奥田竜也・新留琢郎

Topics on Chemistry

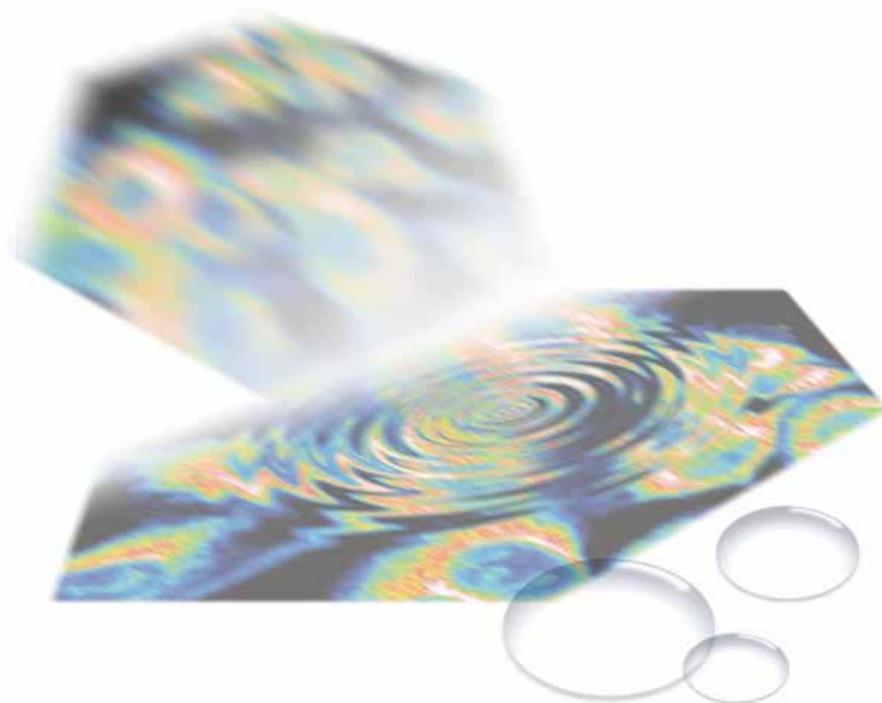
低分子蛍光性プローブによるアポトーシスの検出

佐々本一美

連載

ケミストからみたポストゲノム10

片山佳樹



目次

Review

- 遺伝子治療を目指した遺伝子デリバリー技術
 長崎大学大学院生産科学研究科 奥田竜也・新留琢郎 1
 ケミストからみたポストゲノム 10
 九州大学工学研究院 片山佳樹 10

Topics on Chemistry

- 低分子蛍光性プローブによるアポトーシスの検出
 同仁化学研究所 佐々本一美 19

Commercial

- 新製品案内
 アミロイド染色用蛍光色素 17
 ペルオキシダーゼ標識用キット 22
 陽イオン性脂質遺伝子導入試薬 26

試作品

- 膜タンパク質可溶化剤 20
 アルカリホスファターゼ標識用キット 25

Q&A

- 膜タンパク質可溶化剤 20

お知らせ

- 24版カタログ発行 9

新製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

- FSB solution 18
 Peroxidase Labeling Kit-NH₂ 23
 Peroxidase Labeling Kit-SH 25
 -DoFect-GT1 26



春爛漫の同仁化学研究所

美しい花の彩りで華やかな時期、周囲のテクノロジーパークはお花見にも絶好の場所として観光バスや自家用車で大賑わいとなります。

遺伝子治療を目指した遺伝子デリバリー技術 Gene delivery techniques for gene therapy



奥田 竜也
(Tatsuya Okuda)
長崎大学大学院生産科学研究科



新留 琢郎
(Takuro Niidome)
長崎大学大学院生産科学研究科

[Summary]

Gene therapy was originally designed as a technique for correcting inherited disorders on human genes responsible for disease development. At present, gene therapy is aggressively developed with hope that will be remedy for not only inherited disease but also obstinate diseases such as cancer, HIV infectious disease, and so on. Currently ongoing gene delivery techniques can be classified into two categories; one is non-viral methods, in which chemically synthesized cationic compounds are used as a gene carrier, the other is viral methods, in which replication-defective viruses with part or all of the viral coding sequence replaced by therapeutic genes, are used as a vector. Here, we focused on non-viral gene delivery techniques, and we introduce several physical techniques for naked DNA transfer, several kinds of gene carriers, and common efforts to realize gene therapy. In the second half, we also introduce a part of our study on *in vitro* and *in vivo* gene delivery mediated by dendritic poly(L-lysine) with high efficiency and low toxicity into cells.

キーワード：遺伝子治療、非ウイルス法、遺伝子キャリアー、
デンドリティックポリリジン

1. はじめに

遺伝子治療は先天性の遺伝子疾患ばかりでなく、がんやエイズなどの難治疾患の新しい治療法として期待されている。遺伝子治療を目的としたDNAの細胞内へのデリバリー技術は、ウイルスに治療用遺伝子を組み込んで標的細胞に感染させるウイルス法と、人工化合物を遺伝子キャリアーとして用いる非ウイルス法に分類できる。非ウイルス法ではキャリアー分子の物性コントロールによる毒性や抗原性を抑えたキャリアーデザインが可能である。しかし、導入した遺伝子の発現効率は低く、その遺伝子の発現は一過性であるという問題点がある。一方、ウイルス法はウイルスの持つ感染機構を利用しているため遺伝子の発現効率は高く、導入遺伝子の安定発現が期待できるが、ベクターとして用いたウイルスに起因すると思われる免疫性ショック死(1999年、米国)や白血病発症(2002年、フランス)の事例は記憶に新しく、改めて安全性の高い遺伝子デリバリー技術の開発が望まれている。

本稿では安全かつ機能的な遺伝子デリバリーを可能にするとして期待されている非ウイルス法に焦点を絞り、これまでにどのような遺伝子デリバリー法が開発されてきているのか、また、遺伝子キャリアーの開発はどのような方向へ向かっているのかについて、最近のトレンドを前半で紹介し、そして、後半では我々のデンドリマーを使った遺伝子デリバリー法に関する研究の一端を紹介させていただきます。

2. プラスミドDNAを単独で投与する方法

プラスミドDNAをそのままを投与する方法は最もシンプルであり、臨床応用を考慮した場合においても安全面を考慮する対象がプラスミドDNAのみとなるため、その敷居は低い。しかし、静脈からの全身投与を考えた場合、DNAは血中において速やかに分解される。さらに、DNAの細胞内への移行には細胞膜が大きなバ

アーとなっているため、何かしらの工夫によって細胞内へ移行させる必要があり、これまでに様々な方法が試みられている (Fig. 1)。

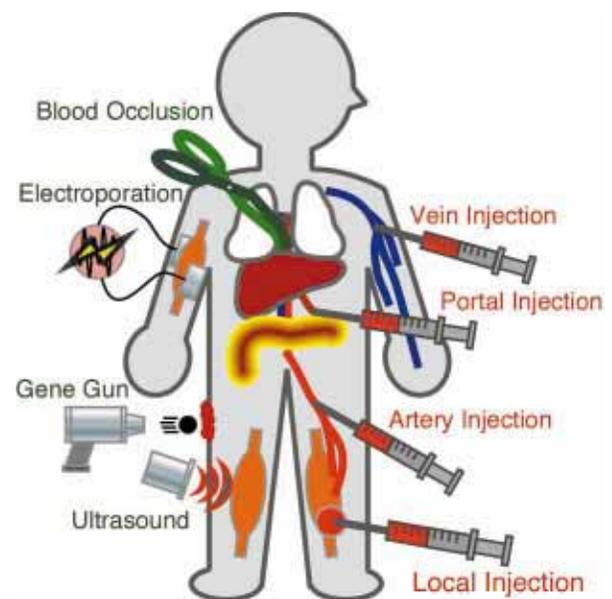


Fig. 1 Overview of non-viral gene delivery technologies. Different injection routes of naked DNA, enhancement strategies, and their combinations are outlined.

エレクトロポレーションは細胞に電気パルスをあてることで細胞膜に一過性の孔を開け、細胞膜の透過性を上昇させることによりDNAの取込を促進させる方法で、投与遺伝子の長期発現が可能であること、理論的にはあらゆる組織に適用可能であるという長所がある。これまでに *in vivo* へのアプリケーションを目的として、標的組織に応じたDNAの投与量、電解質溶液のイオン強度、電流量などの様々なファクターが最適化され、電極の形状なども改良が重ねられてきている¹⁾。中でも、処置のしやすさから皮膚や筋肉が最も適したターゲットといえる。DNAワクチン等の免疫療法を目的としたDNAの投与方法としてエレクトロポレーションが多く利用されており、皮膚や筋肉にエレクトロポレーションでDNAを投与し、B型肝炎ウイルスの表面抗原、あるいは、IL-12やIFN- α 等のサイトカインを発現させて治療効果や遠隔部位に存在する腫瘍に対する抗腫瘍効果を得た報告が増えている¹⁻⁵⁾。

超音波によってもDNAの細胞内への導入が可能であることが報告されている⁶⁻⁷⁾。この方法では、超音波照射により細胞周辺でキャビテーションが起こり、小さな気泡の生成と崩壊が繰り返され、気泡の崩壊時に発生する液体マイクロジェット流によって細胞膜に一過性の孔が開くことで細胞膜の透過性が上昇し、さらに細胞膜付近に存在するDNAや薬物がマイクロジェット流によって細胞内へ押し込まれるというメカニズムが提唱されている。この方法はエレクトロポレーションのように電極を標的部位に挿入する必要がないため、体内の臓器などを標的とする場合においても非侵襲的であり、さらにマイクロパブル（造影剤）を併用することによって低いエネルギーの超音波で効率よくDNAを導入可能であることが見いだされ、今後の発展が期待できる。

遺伝子銃は金粒子を核酸でコートし、それを高圧ヘリウムガスで直接細胞に打ち込む方法で、まさに遺伝子を弾丸として用いた銃である⁸⁻¹⁰⁾。この方法は導入するDNAのサイズに制限がないこと、一度に多くの細胞に確実にDNAを導入できること、複数の種類のDNAを同時に導入できることなど多くの利点があるが、生体への応用を考えた場合標的とする組織の表層部にしか導入できないという欠点もある。

ハイドロダイナミクスインジェクション法は、ほぼ全血量と同量のDNA溶液をマウスの尾静脈より数秒のうちに投与方法である。この方法では、最も柔軟性に富む臓器である肝臓に投与したDNA溶液がいったん集積し、投与の際の圧力によりDNAが肝組織へと押し込まれているものと考えられており、少量のDNAで導入遺伝子の高い発現が特に肝臓で認められる¹¹⁻¹⁴⁾。ヒトの場合で換算すると、数秒間に数リットルもの量を投与されることになり実用的ではないが、部位を限定することで適用は可能であろう。一方で、ある特定遺伝子のマウス肝臓での機能を評価するには便利な手法である。

その他、DNAを投与した後、標的部位周辺の血流を一時的に止めることにより遺伝子発現レベルを上昇させる方法や¹⁵⁾、マウス尾静脈よりDNAを投与後、腹部をマッサージし、機械的ストレスを与えることにより肝臓での遺伝子発現が促進されることも報告されている¹⁶⁾。また、肝臓表面へ直接DNA溶液を滴下するだけでも組織内へ浸透し、その部分に遺伝子発現が起こることも見いだされている¹⁷⁾。これらDNA単独投与で行う手法は、目的によって

は重要な遺伝子デリバリー技術となりうる。しかし、ターゲティング可能な部位や組織に制約が多く、応用範囲が限られてしまう。さらに、DNAの細胞内への移行メカニズムが解明されていないものもあり、今後の詳細な解析が待たれる。

3. 遺伝子キャリアー分子を使った方法

これまでに脂質やポリマーをベースにした多くの化合物が遺伝子キャリアーとして開発されてきた。一般に遺伝子キャリアーは塩基性の化合物であり、マイナスに帯電したDNAと静電的相互作用によって安定な複合体を形成することでDNAの細胞や組織内外での安定性を向上させるばかりでなく、細胞への取込みも促進する。

塩基性脂質を介した遺伝子デリバリーは1987年にFelgnerらによって最初に報告され¹⁸⁾、それ以降、脂質の塩基性ヘッド部分を様々に変化させた脂質が多く開発されてきた。さらに、DOPEやコレステロールなどのヘルパー脂質の添加や塩基性脂質との混合割合などが検討され、脂質の種類や利用する条件などの最適化がなされ、主要な遺伝子デリバリー技術になっている。

塩基性ポリマーをベースとした代表的な遺伝子キャリアーとしては、1995年Behrらにより報告された直鎖状のポリエチレンイミンがある¹⁹⁾。直鎖状ポリエチレンイミンは分子量およそ22~25 kDaほどの大きさのものが遺伝子キャリアーとして最も適していると言われている。また、DNA/遺伝子キャリアー複合体がエンドサイト-シス経路で細胞内へ取り込まれた後、エンドソームから細胞質へエスケープするメカニズムとして現在ではよく知られている“プロトンスポンジ効果”という考え方はこの化合物から生まれたものである。多くの分岐を持つ樹状高分子、ポリアミドアミン(PAMAM) dendrimerもまたポリマーベースの遺伝子キャリアーを代表する化合物の一つである。PAMAM dendrimerが様々な培養細胞に対する遺伝子キャリアーとして利用可能であることは、1993年にSzokaらによって報告された²⁰⁾。しかし、その後、厳密に合成されたPAMAM dendrimerは完全な球状の構造をしており、その遺伝子発現効率は低いことがわかった。そこで、部分的に加水分解して柔軟性を与え、多分散なものにすることで遺伝子導入能が向上することが報告されている²¹⁾。

合成ペプチドを利用した遺伝子デリバリー技術も報告されている。遺伝子キャリアーとして利用される合成ペプチドは両親媒性の構造を持ち、分子内にDNAとの結合のためにリジンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸残基を含んでいる²²⁾。そして、そのロイシンから構成されている疎水性領域がリン脂質膜との親和性を高め、エンドサイト-シスで取り込まれた後のエンドソームから細胞質への移行にも関わっている²³⁾。また、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン由来のKALAペプチドも、DNAとの結合能を持ち、エンドソーム膜の不安定化を引き起こすことが報告されている²⁴⁾。

一方で、遺伝子治療においても副作用を抑え、より効率的に治療効果を引き出すためには薬剤の服用や投与と同様、個体内における標的となる部位、組織に特異的にデリバリーする遺伝子のドラッグデリバリーシステム(DDS)が必要となってくる。このDDSの確立はプラスミドDNAを単独で使用した場合には難しく、

そこで、遺伝子キャリアー分子にこの機能を盛り込み、それを達成することが試みられている。DDSを目指した遺伝子キャリアーの機能化例として、細胞表面に特異的に存在するレセプターを標的とし、このレセプターに対する種々のリガンド分子を遺伝子キャリアーに修飾することが一般的に行われている。肝細胞表面に特異的に存在するアシアログリコプロテインレセプターに対するリガンドであるガラクトース残基やアシアロオルスコムコイドなどを遺伝子キャリアーに導入する方法が古くから行われている²⁵⁻²⁷。最近では腫瘍組織内において血管新生が活発に起こっていることに注目し、血管新生が盛んに起こっている部位の内皮細胞表面にとりわけ多く発現しているVEGF (vascular endothelial growth factor) レセプターに対するVEGFを遺伝子キャリアーに修飾することも行われている²⁸。

標的とする部位や組織に到達後も多くのバリアーが待ちかまえている。そこで、より効率的に導入遺伝子の発現を達成させるために、細胞内でのトラフィックコントロールの試みも盛んになされている。一般に、DNA/遺伝子キャリアー複合体はエンドサイトーシス経路で細胞に取り込まれ、多くはリソソームで分解を受けてしまうことより、いかにしてエンドソームから細胞質へのエスケープを促進するかが第一のポイントとなる。そのために先に述べたような膜融合能を持つペプチドやリソソーム内のpH条件に相当する弱酸性領域において膜破壊能を持つようなペプチドなどがよく用いられている²⁹。また、“プロトンスポンジ効果”によるエンドソームからのエスケープをねらい、多くのヒスチジン残基を導入することにより弱酸性条件下でバッファー能を持つようにデザインしたブロックコポリマーなどもある³⁰。第二のポイントとして、エンドソームから細胞質へと移行したDNA/遺伝子キャリアー複合体からのDNAのリリースが挙げられる。この点に関して、キャリアー分子内にジスルフィド結合を導入し、細胞内の還元的雰囲気を利用してリリースを促進させる、あるいは、外部から与える温度変化によりリリースをコントロールする目的で温度感受性ポリマーを利用することが行われている³¹⁻³⁴。さらに、第三のポイントが遺伝子の機能発現の場である核への移行ステップである。核移行の制御には核への指向性を持たせるため核局在化シグナルによる修飾などが行われている³⁵⁻³⁶。その他、非ウイルス法の欠点でもある一過性の発現を克服するため、生分解性ポリマーにDNAを内包させてDNAを徐放させることにより長期発現を実現させる試みも行われている³⁷。

ここで紹介してきたように、遺伝子キャリアーに関する研究は、実際の遺伝子治療を強く意識し、これまでの個々のテクニックを集約し、体内での細胞選択的デリバリー、それに加えて、細胞内でのトラフィックコントロールをも実現するシステムを確立することが現在のトレンドとなってきている。

4. デンドリティックポリリジンを用いた遺伝子デリバリー

様々な遺伝子キャリアーが開発されている中、我々は樹状高分子であるデンドリマーに注目している。ヘキサメチレンジアミンをコアとしてアミノ酸のリジン残基を枝分かれ単位として持つデンドリティックポリリジンを設計し、第1世代～第6世代 (KG1

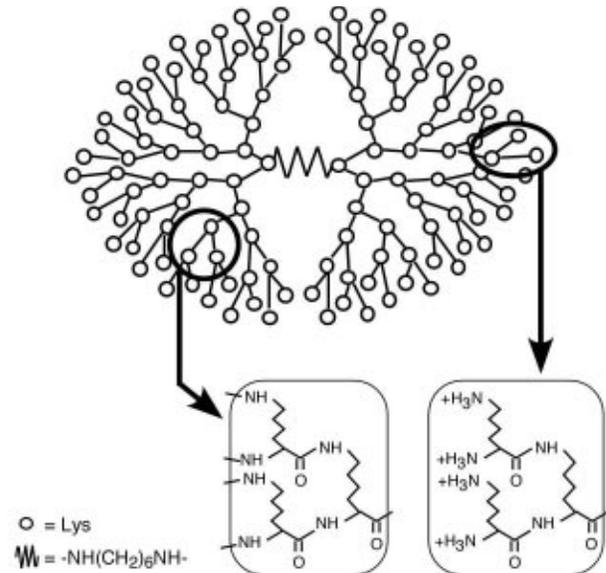


Fig. 2 Structure of the 6th generation of dendritic poly(L-lysine) (KG6).

～KG6) を合成した (Fig. 2)³⁸。デンドリティックポリリジンは 1) ペプチド合成をベースとしたHBTU-HOBt法により逐次世代を伸長していくため単一分子として得られる、2) 分岐単位を他のアミノ酸等に置き換えることによって様々な物性の誘導体が容易に合成できる、3) 分子表面にはアミノ基を多数持つため機能的な遺伝子キャリアーとするための各種リガンドによる表面修飾が容易に行える、等の特徴を持つ。また、生体分子であるアミノ酸から構成されているため低毒性であることが期待される。

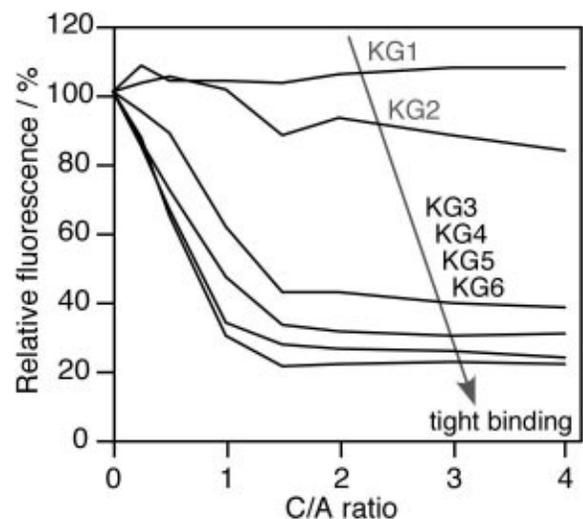


Fig. 3 Fluorescence titration assay. Plasmid DNA was mixed with the gene carriers in HBS at various cation/anion (C/A) ratios. After incubating for 20 min at room temperature, ethidium bromide was added to the mixtures. Fluorescence was measured on a spectrofluorometer by excitation at 530 nm while monitoring emission at 590 nm.

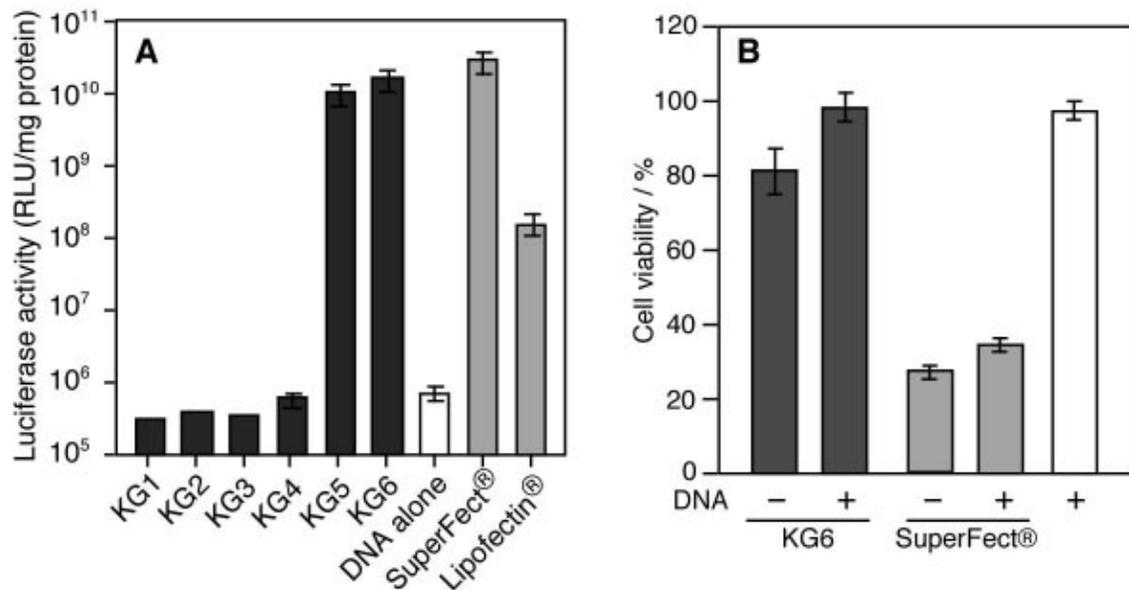


Fig. 4 Transfection efficiencies of dendritic poly(L-lysine)s into CHO cells (A) and cytotoxic activity of KG6 (B). (A) The cells were incubated with DNA-complex containing 2.5 μ g of plasmid DNA and dendritic poly(L-lysine) at a C/A ratio of 4.0 for 3 h at 37 °C. Harvesting of the cells and luciferase assays were performed 48 h after transfection. (B) Cytotoxic activities of KG6 and SuperFect® alone and their complexes with plasmid DNA at a C/A ratio of 4.0. Cell viabilities were evaluated by MTT assay. Open bar indicates cell viability in the presence of the plasmid DNA alone.

4.1. DNA 結合能

エチジウムブロミドはDNAの塩基対の間にインターカレーションし、蛍光を発するため、DNAとデンドリティックポリリジンが結合することでエチジウムブロミドのインターカレーションが阻害されると蛍光強度は低下する。測定の結果、第3世代以上のデンドリマーでその蛍光強度の著しい低下が見られたことから、これらはDNAと結合して安定な複合体を形成しており、その結合力は世代が増すほど強くなることが確認された (Fig. 3)。

4.2. 培養細胞への遺伝子デリバリー

デンドリティックポリリジンを遺伝子キャリアーとして用い、培養細胞へのトランスフェクションが可能であるかをレポーター遺伝子としてホタルルシフェラーゼをコードしたプラスミドを用いて評価した。Fig. 4A に示すように、第5世代のデンドリマー (KG5) と第6世代のデンドリマー (KG6) で高いルシフェラーゼの酵素活性が見られた。さらに、そのトランスフェクション能は細胞種に依存せず、コントロールとして用いた市販の遺伝子キャリアーである Lipofectin® や SuperFect® と同等のレベルであった。また、最も高いトランスフェクション効率を示した KG6 では PAMAM デンドリマーをベースとしている SuperFect® と比べて細胞毒性が低いことが明らかになった (Fig. 4B)。

静脈投与のように血流中へ投与する場合は、血清成分の影響を無視することはできない。あるいは、培養細胞を対象にしている場合でも、血清を抜くことができない場合もある。しかし、多くの遺伝子キャリアーは培養細胞へのトランスフェクションにおいて血清を培地中に共存させると著しい遺伝子導入能の低下をもたらすことが知られている。血清成分との相互作用は遺伝子キャリアーがDNAとの間でカチオン性の複合体を形成するためであると

言われており、いかにして複合体の表面電位を抑えるかが重要である。我々が用いている KG6 は50% 血清共存下でも著しいトランスフェクション効率の低下は見られなかった (Fig. 5A)。これは複合体表面電位がほぼ中性であることに起因し、血清成分との相互作用が抑えられているものと考えられる。また、この結果は、*in vivo* への適用可能性を期待させるのものである (Fig. 5B)。

4.3. 複合体の成長と遺伝子導入能の相関

DNA/遺伝子キャリアー複合体の大きさや形状は、細胞への取り込みの過程において重要なファクターである。複合体の大きさや形状に関する情報を得るために、蛍光顕微鏡および原子間力顕微鏡 (AFM) による複合体の観察を行った (Fig. 6)。DNA と KG6 を混合して15分後の複合体を観察すると、1~2マイクロメートル程の大きさの像が得られた (Fig. 6A,B)。この像をAFMでさらに拡大してみると、100ナノメートル程の多数の小さなユニットから形成されていることがわかった (Fig. 6C)。また、サンプルをのせているマイカ基板上を詳しく観察してみると、数百ナノメートル程の大きさの無数の像が観察された (Fig. 6D)。次にDNA と KG6 を混合して2時間後の複合体を同様に観察したところ、100ナノメートル程の小さなユニットから構成される数マイクロメートル程の像のみが観察された (Fig. 6E,F)。さらに、動的光散乱法により、DNA/KG6 複合体の粒径の経時変化を測定した (Fig. 7)。その結果、DNA/KG6 複合体の粒径は時間依存的に大きくなることが明らかになった。これらの結果より、DNA と KG6 が、まず数百ナノメートル程の大きさの複合体を形成した後、それぞれが時間依存的に徐々に凝集して数マイクロメートル程の大きさに成長していくというメカニズムが考えられる。

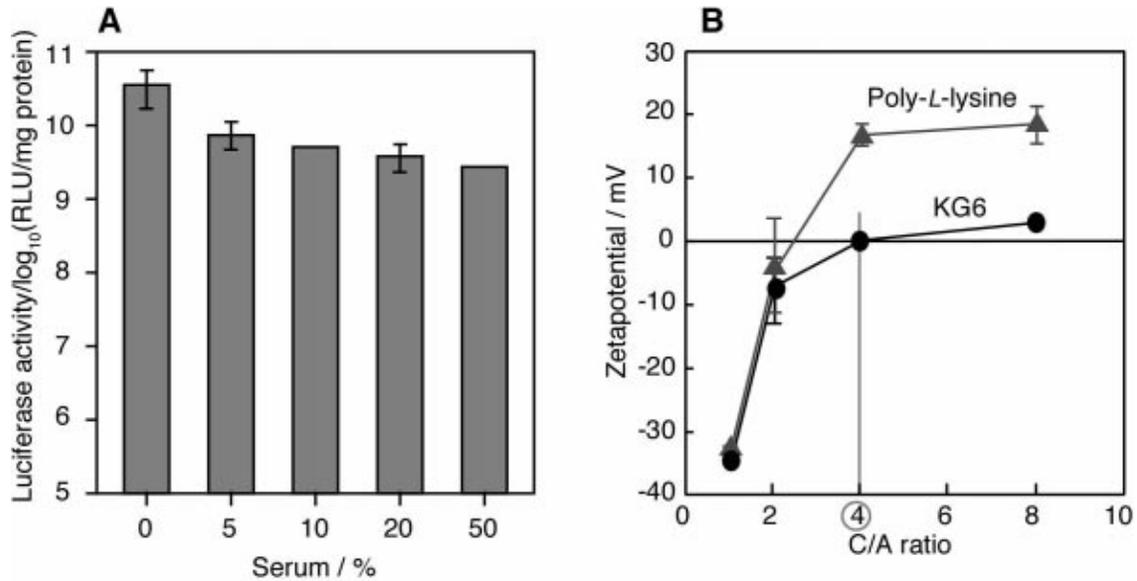


Fig. 5 Serum tolerant feature of DNA/KG6 complexes. (A) Effect of serum on transfection efficiency of KG6 into CHO cells. (B) Zeta potentials of DNA complex of KG6 and poly-L-lysine. Circle and triangle indicates zeta potential of DNA complex of KG6 and poly-L-lysine, respectively.

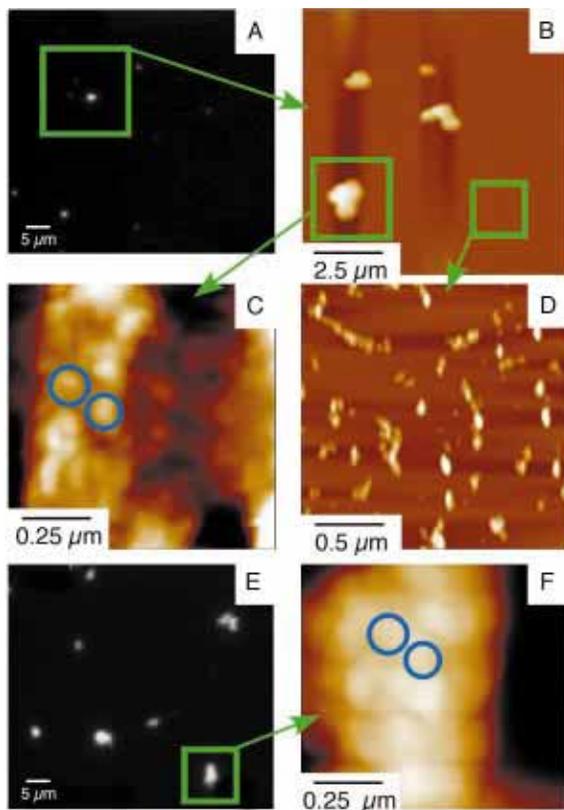


Fig. 6 Fluorescence and AFM images of DNA-complexes of KG6 at C/A ratio of 4.0. Panels A and E are fluorescence images of the complexes after 15 min and 2 h incubation, respectively. Panel B is the AFM image of the area indicated by a green square in Panel A. Panel C is a magnified image of the surface of the large complex (> 1 μm) indicated by a green square in Panel B. Panel D is a magnified image of the small complexes (< 1 μm) on the mica surface indicated by a green square in Panel B. Panel F is the magnified AFM image of the surface of the large complex indicated by a green square in Panel E.

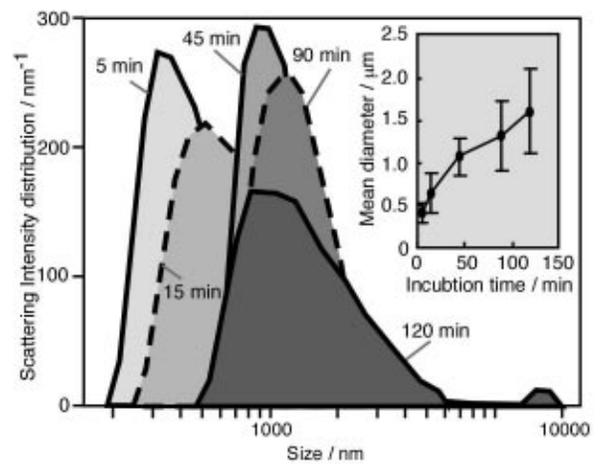


Fig. 7 Dynamic light scattering analysis of DNA-complexes of KG6. KG6 was incubated with the plasmid DNA in DMEM for 5 min to 2 h at room temperature, and then dynamic light scattering was measured at 25°C. The inset shows the time-dependent change in the mean diameter of the complexes.

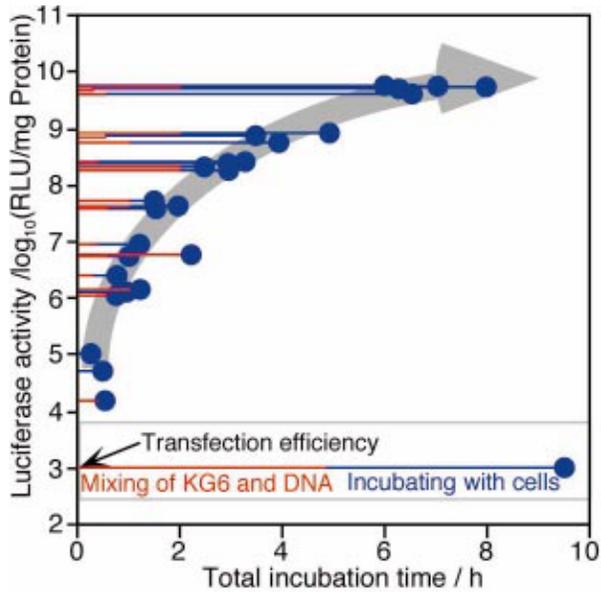


Fig. 8 Time-dependent transfection efficiency of KG6. KG6 was pre-incubated with the plasmid DNA in DMEM for 0 to 2 h at room temperature, and then the mixture was added to cultured cells (CHO cells). After incubation for 15 min to 2 h at 37°C, the mixture was replaced with fresh DMEM containing 10% FBS, and the cells were further incubated for 24 h. The cells were harvested and the transfection efficiency was estimated by measuring the luciferase activity. The relationship between the total incubation time and the transfection efficiency is shown. Red and blue lines indicate the pre-incubation and incubation times with cells, respectively. The height of the closed circle indicates the transfection efficiency of each incubation condition.

一方で、複合体形成のための時間および複合体が培養細胞と接している時間を様々に変化させて、トランスフェクション効率を評価した (Fig. 8)。そして、その効率と DNA/KG6 複合体の成長との相関を調べた結果、複合体の成長とともに導入遺伝子の発現は高くなり、培養細胞への遺伝子デリバリーにおいては大きな複合体ほど細胞に取り込まれやすいことが示された³⁹⁾。

4.4. DNA/KG6 複合体の細胞内での解離

一般に遺伝子キャリアーを用いた遺伝子デリバリーでは、DNA/遺伝子キャリアー複合体はエンドサイトーシス経路で細胞内に取り込まれていることが知られており、KG6を用いた遺伝子デリバリーも例外ではない。また、先にも述べたようにDNA/遺伝子キャリアー複合体の形成は細胞へ取り込まれる際に必須のステップであることも知られている。細胞内へ移行した後も複合体を形成したままでは導入遺伝子の発現は起こらないと考えられ、細胞内のどこかで解離しなければならない。しかし、これまでにこの細胞内での複合体の解離についての具体的な情報は得られていなかった。そこで我々はマウス肝臓から調製した細胞質画分を複合体溶液に添加し、擬似的に細胞質内の環境を再現することによって複合体の解離が自発的に細胞質内で起こっている可能性を探った。その結果、DNA/KG6複合体およびDNA/jetPEITM (市販のポリカチオン性遺伝子キャリアー) 複合体に細胞質画分を添加したときのみ複合体からのDNAのリリースが確認され、細胞質中には複合体の解離を促進する何らかのファクターが存在していることが明らかになった (Fig. 9, lanes 6, 10)。また、DNAと複合体を形成させる遺伝子キャリアーとして LipofectamineTM (市販のカチオン性リポソームベースの遺伝子キャリアー) を用いた場合、全ての条件下で複合体からのDNAのリリースは確認されなかったことより、ポリマー系キャリアーとリポソーム (脂質) 系キャリアー

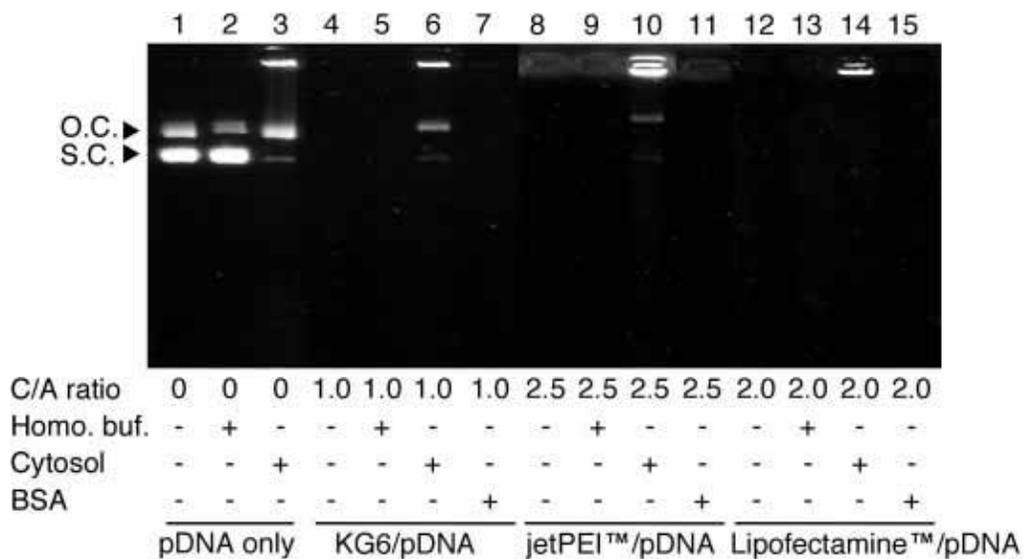


Fig. 9 DNA release from gene carrier/DNA complexes mediated by addition of mouse liver cytosolic fraction. The DNA complexes of gene carriers were made at individual C/A ratios, and then mixed with the cytosolic fraction (Cytosol), homogenization buffer (Homo. buf.), or BSA, and incubated for 3 h at 37°C. The released DNA was electrophoresed in agarose gels (1% w/v) and stained with ethidium bromide. O.C. and S.C. on the left of the gel indicate the position of the open-coiled and supercoiled forms of DNA.

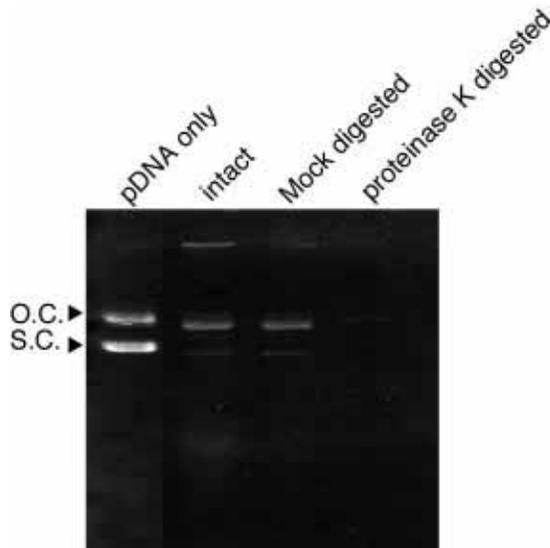


Fig.10 Effect of proteinase K treatment on DNA releasing ability of the cytosolic fraction. The pDNA complex of KG6 was formed at a C/A of 1.0, and then the complex was mixed with the proteinase K digested cytosolic fraction, intact cytosolic fraction, or mock digested cytosolic fraction, for 3 h at 37 °C. The released DNA was electrophoresed in agarose gels (1% w/v) and stained with ethidium bromide.

との間でDNA/遺伝子キャリアー複合体からのDNAリリースのメカニズムは異なっていることが示された。さらに、この細胞質画分をプロテイナーゼK処理すると、その解離は認められなくなったことから、細胞質中に存在するタンパク成分がその解離に関与していることがわかった (Fig. 10)。

4.5. *In vivo* への応用

前述したように、DNA/KG6複合体は多くの遺伝子キャリアーと異なり、複合体の表面電位は電気的にほぼ中性であり、*in vivo*での利用が期待される。そこでまず、DNA/KG6複合体をマウス尾静脈より投与し、その後のDNAの体内分布をサザンハイブリダイゼーション法で評価した (Fig. 11)。プラスミドDNA単独を投与した場合では速やかに分解を受けており、比較対象として用いたDOTAP/CholやjetPEI™の場合は、それぞれ主に肺と肝臓に集積していた。これに対し、KG6を用いた場合は肝臓や肺にもDNAは局在しているものの、血中に検出されるDNAの量が他のサンプルに比べて著しく多く、血中での滞留性が向上していることが明らかになった。

腫瘍組織では組織の成長のため血管新生が盛んに起こっているが、発達の遅い内皮細胞の成長が追いつかず、正常の血管組織に比べると未成熟で隙間の多い構造をしている。そのため、血中成分の漏出が起こりやすい状況にある。このように、血管新生が活発に起こっている部分で未成熟の内皮細胞を通して漏出し、物質が蓄積することをEPR (enhanced permeability retention) 効果と呼んでいる。我々のKG6はDNAの血中滞留性を著しく向上させることから、そのEPR効果が期待される。そこで、我々はddYマウスの皮下にマウスメラノーマ由来のB-16細胞を移植した腫瘍

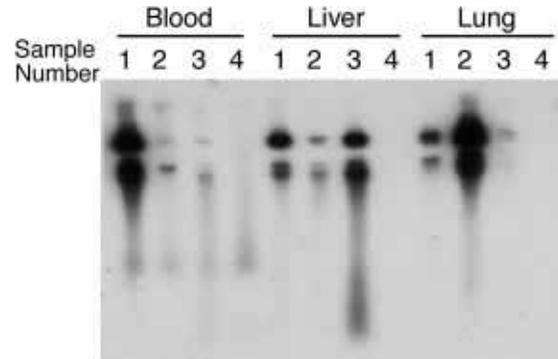


Fig.11 Biodistribution of DNA after intravenous injection with or without gene carriers into mice. The amounts of the DNA in several organs and blood were analyzed by southern blotting analysis after 30 min. Sample numbers 1 - 4 indicates DNA with KG6, DOTAP/Cholesterol, jetPEI™, or DNA alone, respectively.

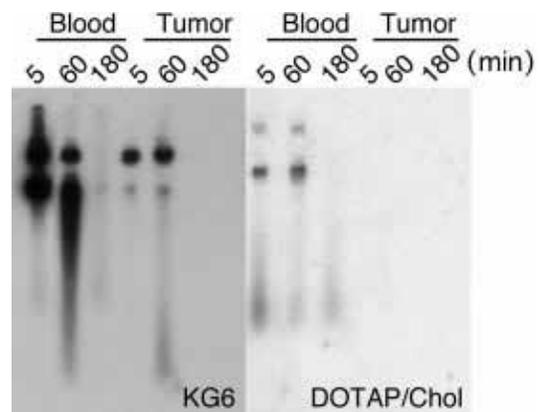


Fig.12 Biodistribution of DNA after intravenous injection with KG6 or DOTAP/Cholesterol in tumor bearing mice. The amounts of the DNA in several organs, blood, and tumor were analyzed by southern blotting analysis after 30 min, 1 h, and 3 h.

モデルマウスを作製し、このモデルマウスに対して尾静脈よりDNA/KG6複合体を投与し、そのDNAの体内動態を評価した (Fig. 12)。その結果、DOTAP/Cholを用いた場合は腫瘍組織へのDNAの蓄積は全く見られなかったのに対し、KG6を用いた場合は投与DNAの腫瘍組織への蓄積が見られた。今後、KG6を各種糖鎖などの機能性のリガンドで修飾することにより、さらなる組織選択的なターゲティングの可能性が期待される。

5. おわりに

現在の世界的な研究のトレンドは、副作用を抑え安全性を高めるためにいかにして遺伝子のDDSを達成するか、また、標的部位・組織にデリバリーした後、いかにして効率よく発現を達成させるかという方向へと向かっている。つまり、DNAと結合し、細胞内へ取り込まれるというだけでなく、さらに高度な機能を加えたバ

イファンクショナル、あるいは、マルチファンクショナルな遺伝子キャリアーの開発が始まっている。

しかし、近年の遺伝子治療を目指した遺伝子デリバリー技術に関する論文数の増加にもかかわらず、臨床に耐えうるようなキャリアー分子は依然として生まれてきておらず、現実には越えるべきハードルは未だ高く、かつ、その数も多い。今後、ウイルス法、非ウイルス法を問わず、遺伝子治療を一般的な治療法として現実のものとするためには、ブレイクスルーとなる何かが必要で、その何かを一刻も早く見つけ出し、未だ治療法の確立していない難治性疾患など多くの疾患を克服していきたい。

参考文献

- 1) J. J. Drabick, J. Glasspool-Malone, A. King, R. W. Malone, *Mol. Ther.*, **3**, 249 (2001).
- 2) H. Maruyama, K. Ataka, N. Higuchi, F. Sakamoto, F. Gejyo, J. Miyazaki, *Gene Ther.*, **8**, 1808 (2001).
- 3) N. Dujardin, Van Der Smissen P, V. Preat, *Pharm. Res.*, **18**, 61 (2001).
- 4) E. Hanna, X. Zhang, J. Woodlis, R. Breau, J. Suen, S. Li, *Cancer Gene Ther.*, **8**, 151 (2001).
- 5) S. Li, X. Zhang, X. Xia, L. Zhou, R. Breau, J. Suen, E. Hanna, *Gene Ther.*, **8**, 400 (2001).
- 6) C. M. Newman, A. Lawrie, A. F. Brisken, D. C. Cumberland, *Echocardiography*, **18**, 339 (2001).
- 7) P. G. Amabile, J. M. Waugh, T. N. Lewis, C. J. Elkins, W. Janas, M. D. Dake, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **37**, 1975 (2001).
- 8) M. T. Lin, L. Pulkkinen, J. Uitto, K. Yoon, *Int. J. Dermatol.*, **39**, 161 (2000).
- 9) S. Kuriyama, A. Mitoro, H. Tsujinoue, T. Nakatani, H. Yoshiji, T. Tsujimoto, M. Yamazaki, H. Fukui, *Gene Ther.*, **7**, 1132 (2000).
- 10) S. Yoshida, S. I. Kashiwamura, Y. Hosoya, E. Luo, H. Matsuoka, A. Ishii, A. Fujimura, E. Kobayashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **271**, 107 (2000).
- 11) G. Zhang, V. Budker, J. A. Wolff, *Hum. Gene Ther.*, **10**, 1735 (1999).
- 12) F. Liu, Y. Song, D. Liu, *Gene Ther.*, **6**, 1258 (1999).
- 13) V. Budker, T. Budker, G. Zhang, V. Subbotin, A. Loomis, J. A. Wolff, *J. Gene Med.*, **2**, 76 (2000).
- 14) D. C. Siess, C. T. Vedder, L. S. Merckens, T. Tanaka, A. C. Freed, S. L. McCoy, M. C. Heinrich, M. E. Deffebach, R. M. Bennett, S. H. Hefeneider, *J. Biol. Chem.*, **275**, 33655 (2000).
- 15) F. Liu, L. Huang, *J. Gene Med.*, **3**, 569 (2001).
- 16) F. Liu, L. Huang, *Hepatology*, **35**, 1314 (2002).
- 17) S. Kawakami, R. Hirayama, K. Shoji, R. Kawanami, K. Nishida, M. Nakashima, H. Sasaki, T. Sakaeda, J. Nakamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294**, 46 (2002).
- 18) P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7413 (1987).
- 19) O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J. P. Berh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7297 (1995).
- 20) J. Haensler, F. C. Szoka, *Bioconjugate Chem.*, **4**, 372 (1993).
- 21) M. X. Tang, C. T. Redemann, F. C. Szoka Jr., *Bioconjugate Chem.*, **7**, 703 (1996).
- 22) T. Niidome, K. Takaji, M. Urakawa, N. Ohmori, A. Wada, T. Hirayama, H. Aoyagi, *Bioconjugate Chem.*, **10**, 773 (1999).
- 23) N. Ohmori, T. Niidome, T. Kiyota, S. Lee, G. Sugihara, A. Wada, T. Hirayama, H. Aoyagi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **245**, 259 (1998).
- 24) T. B. Wyman, F. Nicol, O. Zelphati, P. V. Scaria, C. Plank, F. C. Szoka Jr., *Design, Biochemistry*, **36**, 3008 (1997).
- 25) J. Wu, P. Liu, J. L. Zhu, S. Maddukuri, M. A. Zern, *Hepatology*, **27**, 772 (1998).
- 26) S. Kawakami, F. Yamashita, M. Nishikawa, Y. Takakura, M. Hashida, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **252**, 78 (1998).
- 27) T. Niidome, M. Urakawa, H. Sato, Y. Takahara, T. Anai, T. Hatakeyama, A. Wada, T. Hirayama, H. Aoyagi, *Biomaterials*, **17**, 1811 (2000).
- 28) E. K. Gaidamakova, M. V. Backer, J. M. Backer, *J. Control Release*, **74**, 341 (2001).
- 29) N. Ohmori, T. Niidome, A. Wada, T. Hirayama, T. Hatakeyama, H. Aoyagi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**, 726 (1997).
- 30) P. Midoux, M. Monsigny, *Bioconjugate Chem.*, **10**, 406 (1999).
- 31) D. L. McKenzie, K. Y. Kwok, K. G. Rice, *J. Biol. Chem.*, **275**, 9970 (2000).
- 32) C. Pichon, E. LeCam, B. Guerin, D. Coulaud, E. Delain, P. Midoux, *Bioconjugate Chem.*, **13**, 76 (2002).
- 33) M. L. Read, K. H. Bremner, D. Oupicky, N. K. Green, P. F. Searle, L. W. Seymour, *J. Gene Med.*, **5**, 232 (2003).
- 34) M. Kurisawa, M. Yokoyama, T. Okano, *J. Control Release*, **69**, 127 (2000).
- 35) R. Tachibana, H. Harashima, Y. Shinohara, H. Kiwada, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **52**, 219 (2001).
- 36) R. Cartier, R. Reszka, *Gene Ther.*, **9**, 157 (2002).
- 37) Y. B. Lim, S. O. Han, H. U. Kong, Y. Lee, J. S. Park, B. Jeong, S. W. Kim, *Pharm. Res.*, **17**, 811 (2000).
- 38) M. Ohsaki, T. Okuda, A. Wada, T. Hirayama, T. Niidome, H. Aoyagi, *Bioconjugate Chem.*, **13**, 510 (2002).
- 39) T. Okuda, S. Kidoaki, M. Ohsaki, Y. Koyama, K. Yoshikawa, T. Niidome, H. Aoyagi, *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 1270 (2003).

著者紹介

氏 名：奥田 竜也 (Tatsuya Okuda)
 年 齢：27 歳
 所 属：長崎大学大学院生産科学研究科海洋生産科学専攻
 博士後期課程 3 年
 連 絡 先：〒 852-8521 長崎市文教町 1-14
 TEL & FAX: 095-819-2687
 E-mail: ta-okuda@nifty.com
 出身大学：長崎大学大学院工学研究科応用化学専攻
 学 位：修士 (工学)
 現在の研究テーマ：In vivoへ応用可能な遺伝子キャリアーの開発

氏 名：新留 琢郎 (Takuro Niidome)
 年 齢：37 歳
 所 属：長崎大学大学院生産科学研究科物質工学専攻 助手
 連 絡 先：〒 852-8521 長崎市文教町 1-14
 TEL & FAX: 095-819-2687
 E-mail: takuro@niidome.net

出身大学：九州大学大学院理学研究科
 学 位：博士 (理学)
 現在の研究テーマ：機能性遺伝子デリバリー技術の開発
 主な著書：
 化学のフロンティア、生命化学のニューセントラルドグマ、杉本直己著、化学同人、第 17 章遺伝子キャリアー、新留琢郎、p182-192, 2002
 T. Niidome and H. Aoyagi, Cationic α -Helical Peptides for Gene Delivery into Cells, *Non-viral gene therapy, a volume of Methods in Molecular Medicine*, Humana Press, Inc. p11-21 (2001).

お知らせ

24 版カタログ発行

総合カタログ第 24 版 (2004 2005) が完成しました

新製品のプロトコルも追加いたしましたので、是非ご覧ください。
 [カタログ価格表示] 本体価格のみで税込価格表示ではありません。

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。
<http://www.dojindo.co.jp/catalog/request.html>



ホームページの商品カタログ・プロトコルも新しくなりました。
 [ホームページカタログ価格表示] 税込価格と本体価格を併記して表示しています。

商品カタログ
<http://dominoweb.dojindo.co.jp/goodsr5.nsf/webhome/index>
 プロトコル
<http://www.dojindo.co.jp/catalog/protocol.html>

商品に関するお問い合わせは、小社カスタマーサービス部、マーケティング部にて承っております。お気軽にお問い合わせください。

E-mail : info@dojindo.co.jp
 フリーダイヤル : 0120-489548
 フリーファックス : 0120-021557

ケミストからみた ポストゲノム 10

～ プロテオミクスにおける質量分析 ～

九州大学工学研究院応用化学部門

片山佳樹

1. はじめに

これまでも繰り返し述べてきたように、ポストゲノム研究においては、タンパク機能を研究するプロテオミクスが中心課題である。タンパクについての研究では、まずタンパクの同定、発現量変化、翻訳後修飾とその量的変化、タンパク間相互作用などを明らかにしなくてはならない。しかし、遺伝子と異なりタンパクは増幅することが困難であるから、その分析は、感度、分解能、確度が要求される。質量分析は、得られる分析値がデジタルであり、しかも高感度な分析であるから、この種の研究には非常に有効である。もちろん、非常に複雑な混合物であるプロテオームのような研究に質量分析法を適用するには、種々の制約が存在した。しかし今では、これらを克服するための種々の手法が開発され、質量分析はプロテオミクスには不可欠な手段となっている。今回は、同位体タグに代表されるような、プロテオミクスにおける新しい質量分析法についてご紹介する。

2. 質量分析について

質量分析においては、対象はまず何らかの手法でイオン化され、そのイオンの質量/荷電比(m/z)とその質量のイオン量を計測する。したがって質量分析は、イオン化とイオン計測法により種々の組み合わせが存在し、それぞれ特色がある。イオン化法では特に Electrospray ionization (ESI) と Matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) が有用である。ESI は、タンパクの溶液を微細なノズルから噴射しイオン化する方法で、MALDI では、マトリックスとよばれる物質と混合して測定基板上に結晶化させ、照射したレーザー光をマトリックスが吸収することでタンパクを一緒に気化させイオン化する。前者では、溶液をそのまま用いることができ、液体クロマトグラフィーのような精製法を直接組み合わせる際に有用である。一方、MALDI 法は、測定試料の断片化(フラグメント化)や多価イオン化が起こりにくく、解析が容易である。イオン化された試料を解析するアナライザーとしては、イオントラップ法、飛行時間法(TOF)、四重極法、フーリエ変換法などがある。イオントラップは、感度が高く安価である反面、捕捉されるイオン数が限られるため、正確さが他の方法に比べ劣る。フーリエ変換型では、高真空下、高磁場でイオンを捕捉し、感度、確度、分解能に優れ、ダイナ

ミックレンジも広いなどの利点を有するが、高価で操作が複雑である。TOF や四重極法は、感度、確度、分解能、操作性などの観点から最も利用例が多い。TOF は、MALDI 法と組み合わせる用いられることが多く、確度、感度、分解能に最も優れているため、精製したタンパクの同定には極めて有用である。一方、液体クロマトのような精製法と組み合わせる場合には、いちいちフラクションを基板上に結晶化させる必要があり、自動化が難しく、ESI の方が優れているともいえる。四重極法は、ESI と組み合わせることが多いが MALDI との組み合わせでも用いられる。特にタンパクの同定では、後述するようにプロテアーゼで限定消化する代わりに、質量分析計内でタンパクを断片化し、各フラグメントをさらに質量分析で解析していくために、アナライザーを2つ連結し、その間に、高エネルギーのアルゴンなどの気体を衝突させてタンパクを断片化させるための衝突誘起解離装置(CID)を設けたタンデム型質量分析装置が用いられる。

3. 質量分析によるタンパクの同定

3.1 ペプチドマスフィンガープリント¹⁻⁵⁾

ある状態における細胞が有する全タンパク質の発現パターン(プロテオーム)は、2次元電気泳動で各タンパクを分離することで評価できるが、各スポットのタンパクを同定するのに通常、質量分析(特に MALDI-TOF)が用いられる。もちろん、2次元電気泳動で分離されたタンパクをそのまま質量分析しても得られる情報は少なく、同定には至らない。そこで、タンパクを特定のプロテアーゼで限定消化すると、得られるペプチド断片の質量のセットは各タンパクに固有(フィンガープリント)であり、そのデータベースを作成すれば、同定に用いることができる。この場合、AspN と LysC など異なるプロテアーゼで切断したプロファイルを複数用いると精度は向上する⁶⁾。

しかしながら、2次元電気泳動で分離されたスポットは、必ずしも単一のタンパクである訳ではなく、むしろ複数のタンパクの混合物である場合のほうが多い。その様な場合の解決法としては、酸素の安定同位体を用いる方法がある。例えば2つの異なる状態の細胞のプロテオームをそれぞれ2次元電気泳動分離し、それぞれから得られる標的スポットをプロテアーゼで限定分解する際に、片方は通常の水中、もう一方は、¹⁸Oを含む水(H₂¹⁸O)中で分解すると、各断片のC末は、¹⁶Oあるいは¹⁸Oが取り込まれ同位体標識される(Fig.1)⁷⁾。この2つのサンプルを混合すると、各ペプチド断片は、質量が2つずつ離れた2重線で得られる。スポット中に複数のタンパクが含まれていても、タンパクによって2つの細胞の状態間での発現量変化は異なるので、各ペプチド断片の存在比が同じものが同一のタンパク由来の断片となり、識別可能となる。酸素同位体標識は、後述の配列分析に用いるペプチドシーケンスタグとしても利用できる。

タンパクを酵素で限定消化する方法は、最も一般的な方法であるが、酵素類はタンパクが pmol レベルまでは迅速に消化できるが、fmol 以下になると非常に分解速度が小さくなってしまいうため、得られる試料が極めて少量の場合は、酵素限定消化は困難になる。この様な場合には、直接質量分析計の中でCIDなどの手法により分解させる方法も提唱されている⁸⁾。

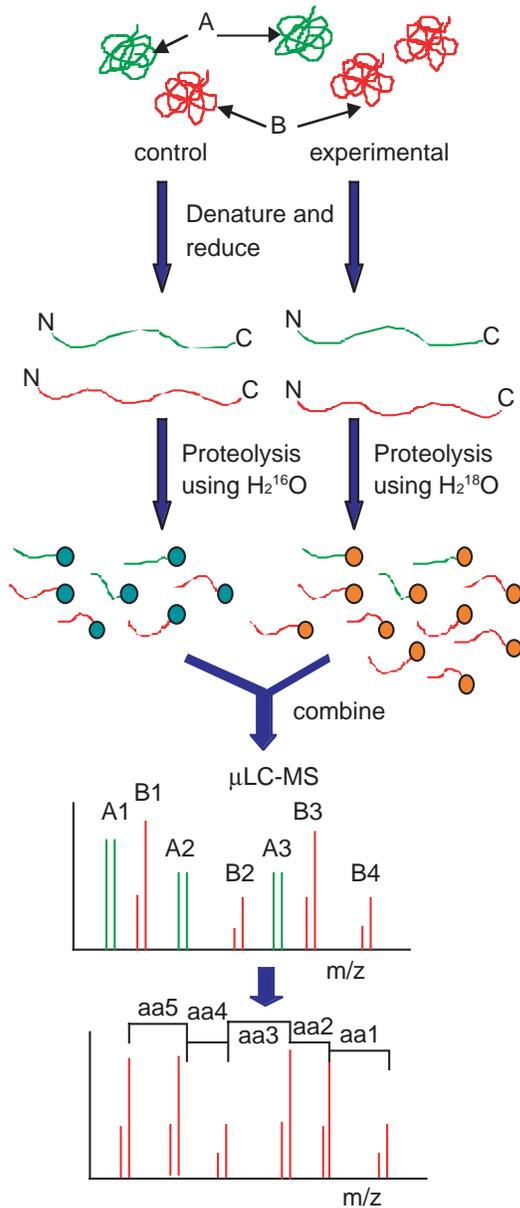


Fig. 1 Enzymatic labeling of stable isotope coding of proteomics
 Proteins from two distinct proteome are digested with protease in normal water or isotopically labeled water. Isotope code is labeled in every C-terminus of the digested peptides. Then, two samples are combined and analyzed by LC-MS/MS. Expression level of proteins between two states can be estimated. Amino acid sequence of selected peptide fragment can be identified, too.

3.2 配列分析 (ペプチドシーケンスタグ)⁹⁾

タンパクの同定においては、酵素消化などで得られるペプチドフィンガープリントだけでは情報が少ない。そこで、タンデムマスをを用い、初めのアナライザーで解析後、特定のペプチドイオンを選び、CIDでさらに分解後、そのペプチドの配列を解析することでさらに情報量を増やすことができる。すなわち、断片化は各アミノ酸でランダムに起こるから、最も質量の近い断片間の質

2D-electrophrogram of proteome in two distinct states

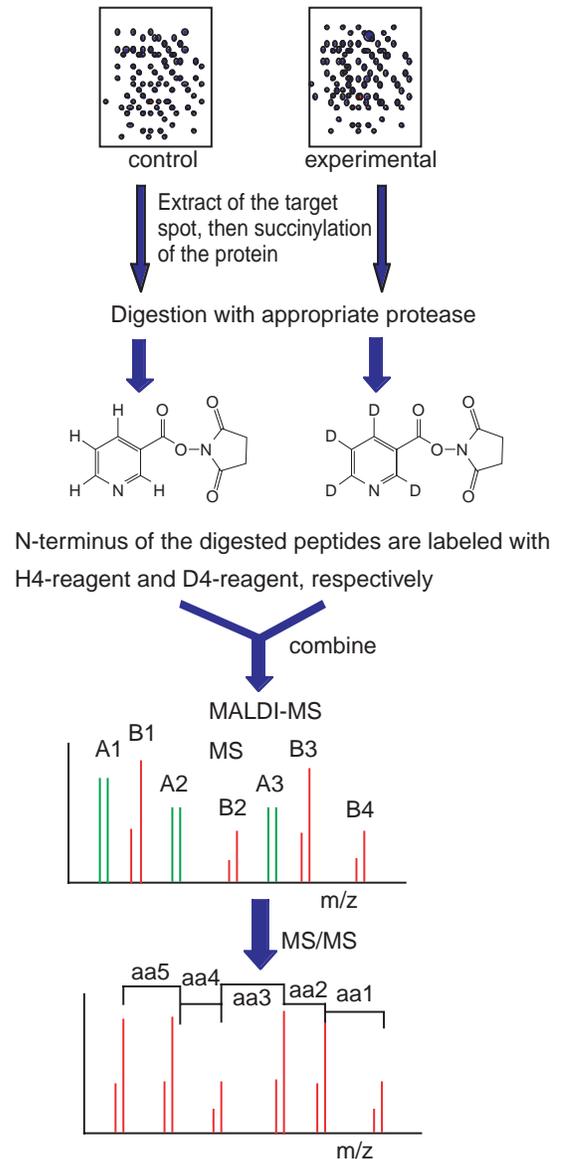


Fig. 2 N-terminus chemical labeling of stable isotope coding of proteomics
 Proteins from two distinct proteome are digested with protease, then the digested peptides in each sample are labeled with H4-reagent or D4-reagent, respectively. Then, two samples are combined and analyzed by MALDI-MS/MS. Expression level of proteins between two states can be estimated. Amino acid sequence of selected peptide fragment can be identified, too.

量差が、各アミノ酸に由来するため、配列が分かる。しかし、CIDで分解されたフラグメントは、ペプチドのN末由来のb系列フラグメントとC末由来のy系列フラグメントが混在しているため、両者を区別しなければ配列解析は極めて困難である。このような場合に、b系列とy系列を識別するためのタグがシーケンスタグである。前述の¹⁸Oを用いる標識もそのひとつである (Fig.1)。すな

わち、CID スペクトルは、 ^{18}O 標識を用いることで、y 系列フラグメントのみが 2 重線で得られるため、容易に配列解析が可能となる。一方、b 系列、すなわち N 末側の配列解析をするための N 末の同位体標識としては、化学修飾を利用する方法が報告されている。この場合、リシン残基への修飾を抑制するため、まずタンパクを無水コハク酸で処理し、リシン残基側鎖のアミノ基を潰し、限定消化後、一方の細胞由来のタンパク試料はニコチン酸活性エステルで N 末を標識し、別の細胞由来のタンパク試料は、芳香族水素を重水素化したニコチン酸活性エステル(D₄NicNHS)で標識して、両試料を混合する。これをタンデムマスで分析すると、CID スペクトルは、b 系列のみが質量が 4 異なる 2 重線となる (Fig.2)。

4. 定量プロテオーム (安定同位体タグ標識)

細胞は周囲の環境や情報の変化に対応して機能変化することで生命を維持している。また、疾患細胞は、それ自体正常細胞と機能が変化している。このような細胞の 2 つの異なる状態における細胞の機能変化に伴う各タンパクの発現量や翻訳後修飾量がどの程度変化しているのかを調べることは、機能プロテオミクスの中心課題である。これを質量分析で調べる場合、質量分析の定量性の乏しさや、計測毎のシグナル強度のばらつきが無視できないため、2 つの状態の試料を別個に計測して比較することは不可能である。そこで、両者を混合して直接比較することが必要となるが、相当する各タンパク (フラグメントペプチド) を見分けるため、質量に差をつける必要が生じる。この目的のため、開発されたのが安定同位体標識法である。

4. 1 *in vivo* 同位体標識 (Fig.3)

細胞を培養する際に一方の培地に ^2H 、 ^{15}N 、 ^{13}C などを含むものを用い、他方は通常の同位体を用いると、細胞中のタンパクは、それぞれの同位体で標識されるので、両者を混合しても、同一タンパクが質量分析で識別可能となり、質量スペクトルのピーク高さの比から存在比が評価できる¹⁰⁻¹²。このような手法では、培地中の窒素の同位体標識は、最も一般的である。一方、Ong らは、重水素化ロイシン (d_3Leu) を標識に用い細胞中のタンパク発現量変化を評価する手法を SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell Culture) と名づけている¹³。同様の手法は数多く報告されている。すなわち、重水素化したメチオニン (d_3Met)¹⁴、チロシン (d_2Tyr)¹² を用いたり、セリン (d_3Ser)¹⁵ を用いてヒストンのリン酸化量変化を同定したり、あるいは、 ^{13}C で標識されたアルギニン ($^{13}\text{C}_6\text{Arg}$) やリシン ($^{13}\text{C}_6\text{Lys}$) を用いて酵母のプロテオーム解析をした例がある¹⁶。*In vivo* 標識は簡単であり、後述する翻訳後修飾の解析にも有効であるが、高価であり、動物への適用ができないといった制限がある。

4. 2 Isotope-coded Affinity Tag (ICAT) 法

In vivo 同位体標識の制限を克服するためには、タンパクを化学的に安定同位体で標識する必要がある。このような戦略として最初に開発されたものが Aebesold らの ICAT 法である (Fig.4(a))¹⁷。ICAT 法では、チオール標識用ピオチン型標識剤のリンカー部分の水素 8 個を水素あるいは重水素としたものを使用する。すなわち、2 つの細胞や組織からの試料から別個にタンパクを抽出後、それぞれ H 型あるいは D 型のピオチン標識剤で標識後、両試料を混合し

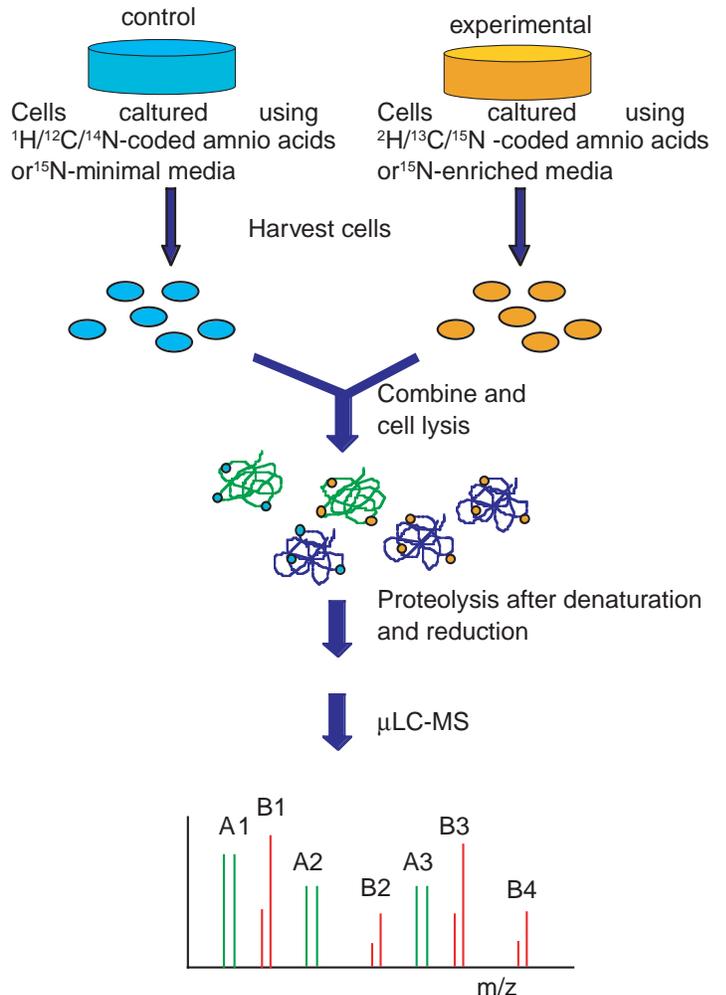


Fig. 3 *in vivo* stable isotope labeling of proteome sample
Cells are grown in normal media or isotopically labeled media. Mass tags are incorporated into every protein. An equivalent number of cells for each sample are combined and processed for MS.

てトリプシンなどで限定消化する。その後、アビジンカラムでピオチン標識されたペプチド (すなわちシステインを含むペプチド断片) のみを取得して質量分析する。通常のタンパク混合物では、膨大なペプチド断片が生じ、各タンパクを精製してからでないと、存在比の比較ができる状態ではないが、ICAT法ではシステインを含むペプチドに限定されるため、混合物内における種々のタンパクの存在比を比較可能となる。各タンパクの同定は、CID 分解により行う。ICAT法は、動物や真核生物のプロテオーム分析を可能とするだけでなく、2次元電気泳動などによるタンパクの精製を必要としないという利点も有する。ヒトミエロイド表面タンパクの分化による変化¹⁸や神経細胞のタンパク発現量の薬物 (カンプトテンシン) 投与による影響¹⁹、酵母のメタボローム解析²⁰など多くの適用例が報告されている。

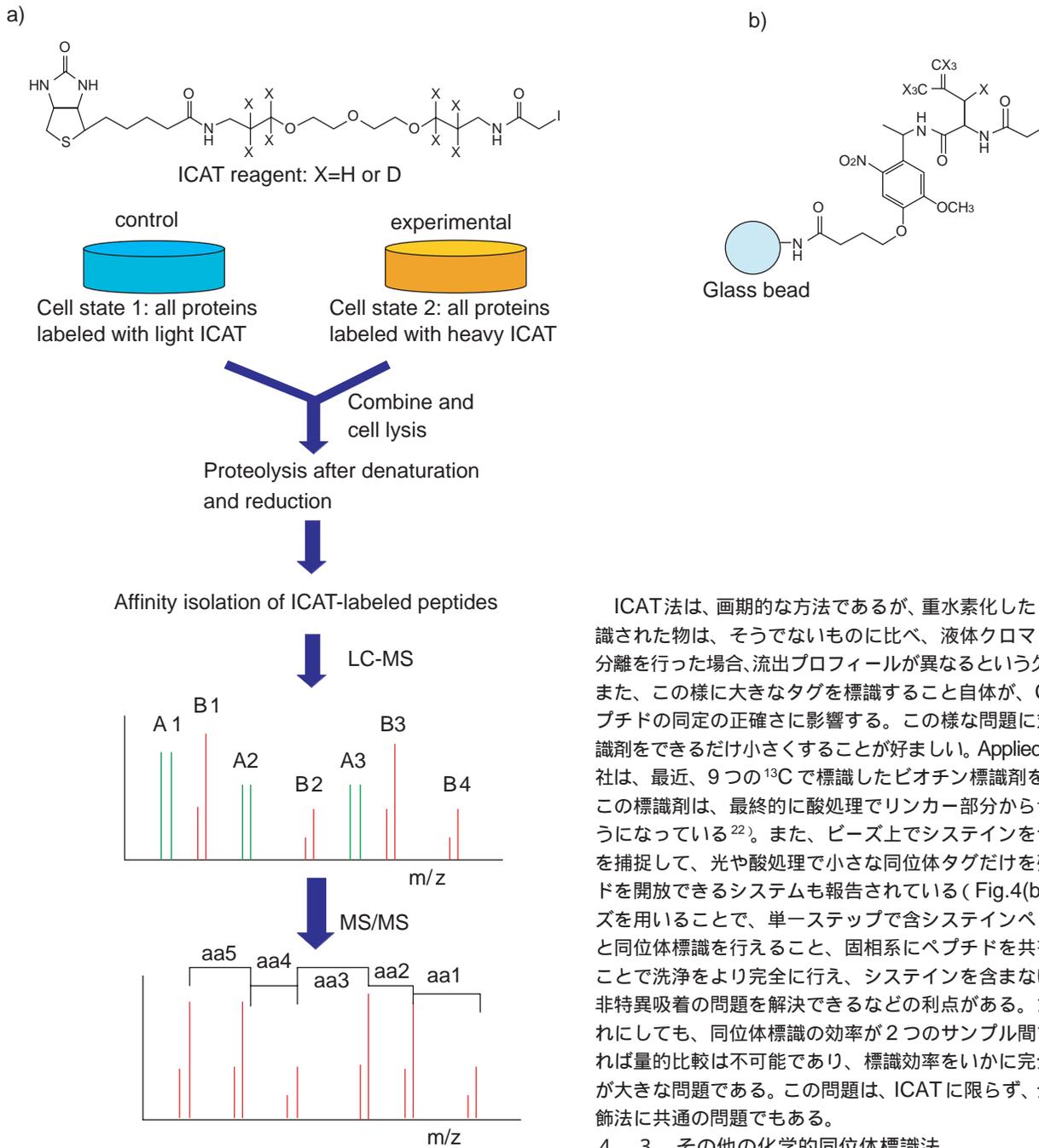


Fig. 4 ICAT-strategy
 (a) Structure of ICAT-reagent, and strategy for quantifying differential protein expression. Two proteomes representing two different cell states have been treated with isotopically light and heavy ICAT-reagents, respectively. ICAT-reagent are introduced into cystein-contained peptide fragment. These cystein-peptide can be isolated by avidine-column.
 (b) Example of solid phase ICAT-reagent

ICAT法は、画期的な方法であるが、重水素化したビオチンが標識された物は、そうでないものに比べ、液体クロマトなどによる分離を行った場合、流出プロフィールが異なるという欠点がある²¹⁾。また、この様に大きなタグを標識すること自体が、CIDによるペプチドの同定の正確さに影響する。このような問題に対しては、標識剤をできるだけ小さくすることが好ましい。Applied BioSystems社は、最近、9つの¹³Cで標識したビオチン標識剤を開発したが、この標識剤は、最終的に酸処理でリンカー部分から切断できるようになっている²²⁾。また、ピーズ上でシステインを含むペプチドを捕捉して、光や酸処理で小さな同位体タグだけを残してペプチドを開放できるシステムも報告されている (Fig.4(b))^{23,24)}。ピーズを用いることで、単一ステップで含システインペプチドの精製と同位体標識を行えること、固相系にペプチドを共有結合することで洗浄をより完全に行え、システインを含まないペプチドの非特異吸着の問題を解決できるなどの利点がある。ただし、いずれにしても、同位体標識の効率が2つのサンプル間で同一でなければ量的比較は不可能であり、標識効率をいかに完全にできるかが大きな問題である。この問題は、ICATに限らず、全ての化学修飾法に共通の問題でもある。

4.3 その他の化学的同位体標識法

ICAT法は、システインを含むペプチドにしか適用できない。そこで、H型とD型の酢酸の活性エステルを用いペプチドの1級アミンをアセチル化したり²⁵⁾、H型とD型のメタノールでペプチドのカルボキシル基をエステル化したりする方法²⁶⁾が報告されている。後者では、アニオン性のカルボキシル基がエステル化されることで、質量分析でイオン化されるペプチドが増加して計測を容易にする効果もある。また、H型とD型の無水コハク酸を用いる方法も報告されており、これらの手法は、Global Internal Standard Technology (GIST)と呼ばれる²⁷⁾。

5. タンパク間相互作用解析

例えば、あるタンパクをコードする遺伝子を発現ベクターに組み込み、さらにその末端に非常に短いエピトープタグを融合して細胞に導入し、発現後、細胞を溶解して、エピトープタグに特異的な抗体で免疫沈降して、当該タンパクを単離すると、それに結合したタンパクも同時に沈降してきており、これを質量分析することによって、そのタンパクに相互作用するタンパクを解析することができる (Fig.5(a))²⁸⁾。この方法では、細胞内での相互作用を直接評価できるため、種々の状態での細胞内での相互作用の変化を捉えることも可能である。また、これに先の同位体標識法を適用して、種々の状態間での相互作用の変化を量的に比較することもできる。例えば、細胞をそれぞれ¹³Cで標識したアルギニンと通常のアルギニンをそれぞれ含む培地で培養し、片方をEGFで刺激して両試料を混合後、活性化したEGF受容体が自己リン酸化し

ていることを利用して、このリン酸化部分に結合するGrb2のSH2ドメインをGSTに融合したものでアフィニティー分離し、結合するタンパクを同時に得る方法が報告されている¹⁰⁾。この場合、得られる両試料で存在比が異なるタンパクは刺激により受容体に対する結合性が変化したものであることがわかる。

これら以外の手法としては、タンパク複合体を同位体標識 (重水素化) した架橋剤で架橋してしまい、その後、限定消化して架橋されたペプチドを解析することで、相互作用するタンパクの同定と同時に、相互作用するサイトを決定してしまう方法 (Fig.5(b))²⁹⁾ や、エピトープタグを連結したユビキチンにシステイン反応サイトを結合し、システインプロテアーゼである脱ユビキチン化酵素の活性サイトにアフィニティー結合させてから、エピトープに対する抗体で免疫沈降させて、未知の脱ユビキチン化酵素を探索する試み (Fig.5(c))³⁰⁾ などが報告されている。

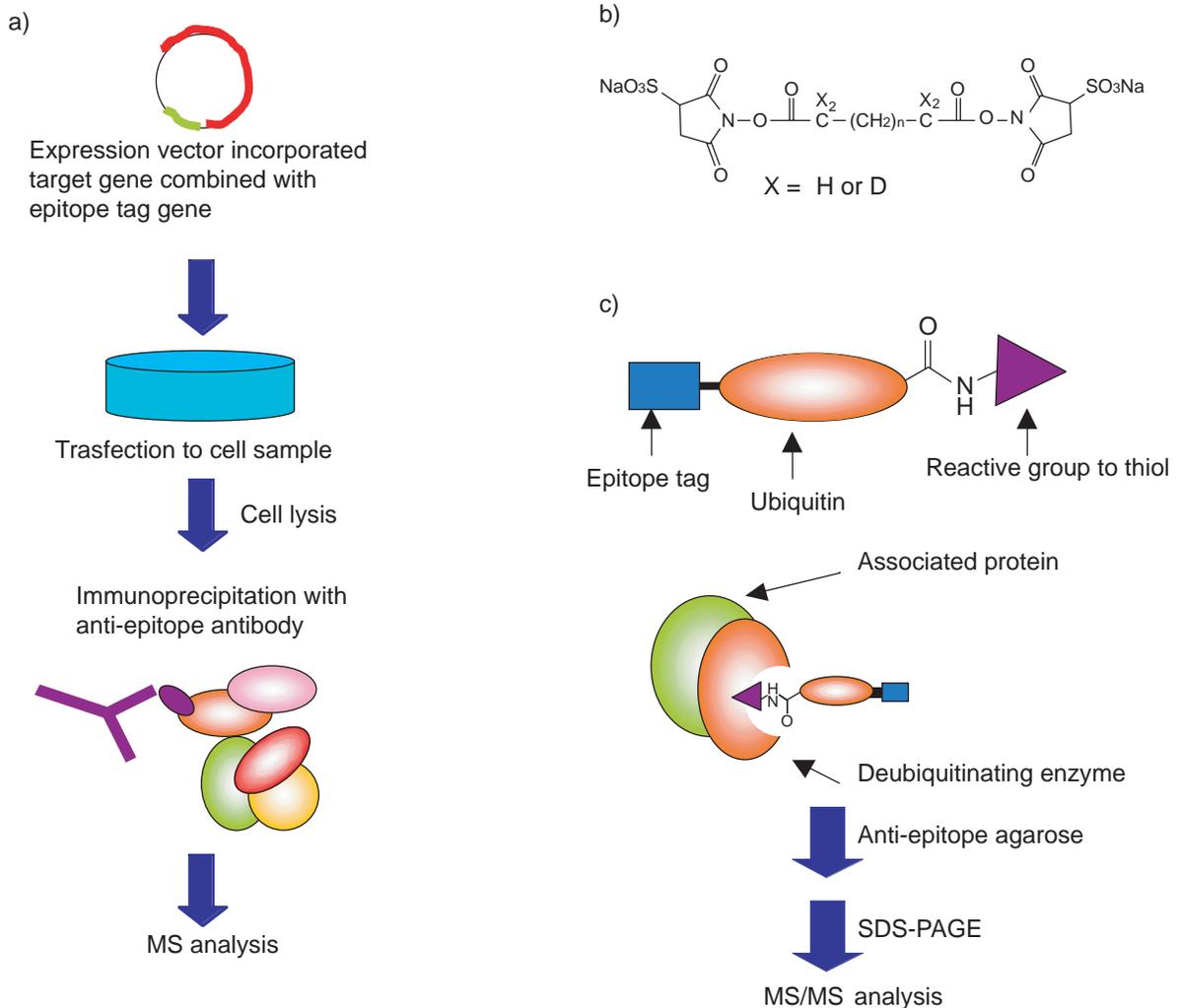


Fig.5 Strategies for evaluation of protein interaction

- General strategy for investigating intracellular protein interaction using MS analysis.
- Structure of stable isotope-coded cross-linker.
- Structure of ubiquitin derivative that can covalently bind to deubiquitination enzyme through the cysteine in the catalytic center, and the strategy to explore unknown deubiquitination enzyme.

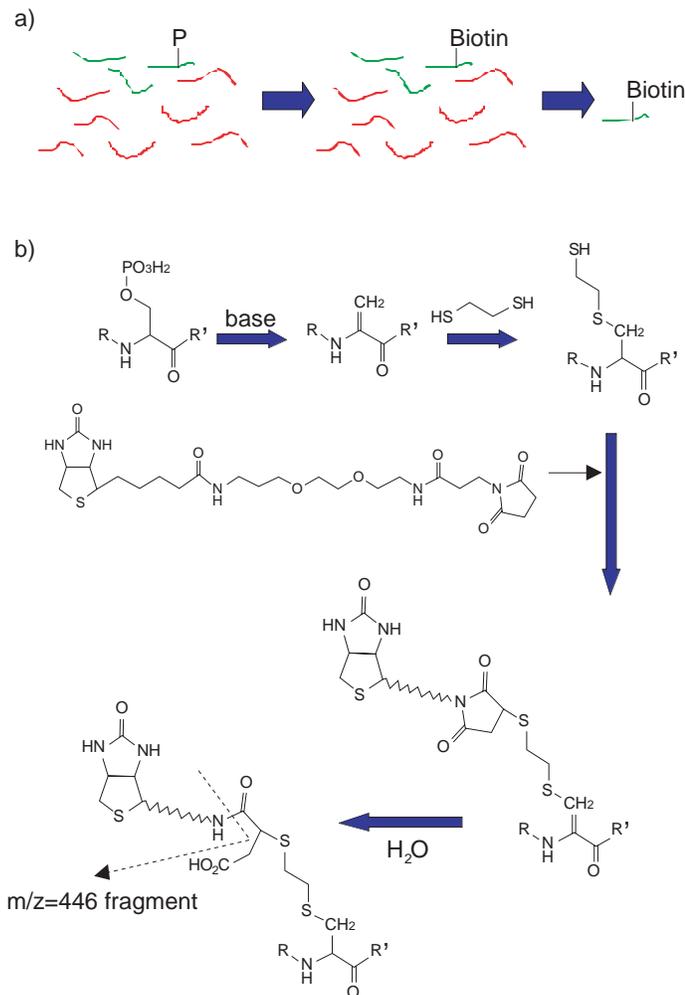


Fig.6 a) Scheme of isolating phosphorylated peptides.
b) Reaction scheme of the chemical conversion of phosphoserine residue to a biotinylated moiety.

6．翻訳後修飾の評価

タンパクは、遺伝子から発現後、種々の細胞機能に応じて糖化、リン酸化、アセチル化、脂質化などの修飾を受ける。これを翻訳後修飾といい、タンパクの機能に極めて重要な情報であるが、mRNA量を評価する遺伝子チップからは決して解析することができず、プロテオミクスの重要な分析対象である。翻訳後修飾の量的変化を知るには、前述の安定同位体標識の手法が適用できる。すなわち、例えば、*in vivo*標識で2つの細胞試料を標識して混合すると、2つの異なる試料中における同一タンパクのペプチド断片の存在比は全て同じはずであるが、それが異なるペプチド断片は、翻訳後修飾されたものであると分かる。また、その存在量変化より、修飾量の変化も評価できる。

また、Odaらは、リン酸化されたセリン部位を、塩基存在下でオレフィンとし、エタンジチオールを付加してチオールを導入し、これにチオール反応性のビオチン標識剤を結合してリン酸化セリンを含むペプチドを選択的に濃縮、精製する手法を開発した (Fig.6)³¹⁾。これにより、リン酸化サイトの配列まで同定できる。また、ビオチン標識剤として、前述のICAT試薬を用いて、2つの状態の細胞試料間に同位体標識すると、2つの状態間でのリン酸化の程度の変化を評価することができる。リン酸化ペプチドは、金属錯体カラムでも濃縮できるが、この方法では、種々の刺激に伴うタンパクのリン酸化の変化を直接評価できる。

7．細胞内シグナル解析

個別のタンパクにおけるリン酸化の程度変化を知る代わりに、タンパクをリン酸化する個々のプロテインキナーゼの活性変化を知ると、細胞機能を直接制御している細胞内シグナル活性の変化を知ることができる。我々は最近、種々のプロテインキナーゼに特異的な基質ペプチドを用いることで、2つの状態間にある細胞の特定のプロテインキナーゼ活性変化を直接比較できる手法を開発している (Fig.7(a))³²⁾。即ち、基質ペプチドのN末にリシンを導入し、アミノ末端と側鎖のアミノ基をアセチル化したものと、重水素化アセチル基にしたものを用い、2つの異なる細胞試料を溶解後、各々のライセートの一方に、通常のアセチル化プローブ、もう一方に重水素化アセチル化プローブを添加して所定時間反応後、両溶液を混合して質量分析すると、未反応のプローブと、リン酸化されたプローブがそれぞれ2重線で得られ、そのピーク高さ(正確には面積)から双方の状態間での標的プロテインキナーゼの活性が直接比較できる (Fig.7(b))。例えば、プロテインキナーゼAの場合、これを活性化するフォスコリン(アデニル酸シクラーゼ活性化剤)処理した場合、確かに本法で活性上昇が見られ、逆に阻害剤であるPKI処理では、活性の低下が認められた (Fig.7(c))。また、CREB由来の遺伝子発現は、種々の薬物処理後の本法での活性測定結果と完全に一致したことから、確かにこの方法により、細胞内の標的プロテインキナーゼ活性変化を評価できることがわかった。

これまでに、プロテインキナーゼCやSrcなどの他のキナーゼに関しても、測定に成功しており、複数のプローブを同時にライセートに添加することにより、複数のプロテインキナーゼ活性変化を同時にプロファイリングできる可能性がある。これまで、細胞内シグナルは単一の活性に関して、その細胞内での詳細な分布と時間変化をモニタリングするプローブの開発に主眼がおかれており、それはもちろん非常に重要なことである。一方、本法は、一度細胞を破碎するため、刺激後、特定時間後の活性の状態しか評価できず、その意味では詳細さに欠ける。しかしながら、例えば、薬物スクリーニングのような、多検体を迅速に評価する場合、このような手法は、非常に簡便迅速に行え、複数の酵素活性変化を一度に計測して、パターンとしてデータ化できるため、今後の新薬探索や副作用解析、遺伝子機能解析などに、有用な手段を提供するのではないかと期待している。

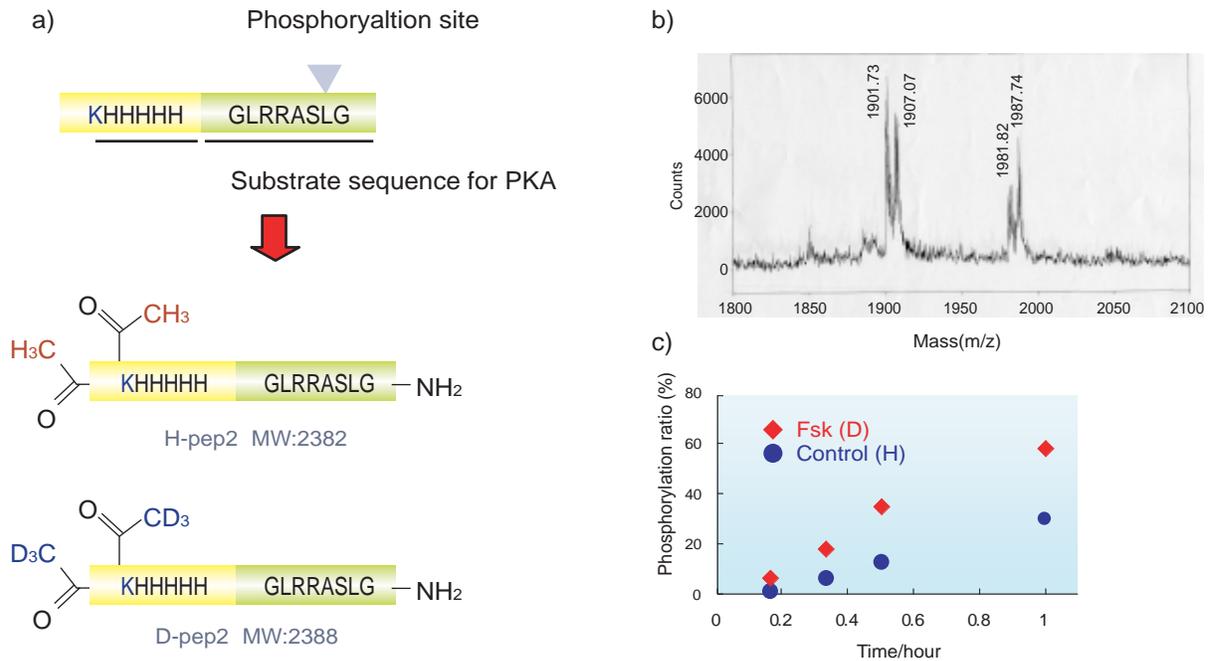


Fig.7 a) Structure of Mass-tagged probe for Protein kinase A. b) Mass spectrum of cell lysate containing mass-tagged probes. In this case, H-type probe and D-type-probe were added to two lysates from different cell sample, respectively. After 2h, two lysate were combined, and analyzed with MALDI-TOF MS. c) Development of mass signal for phosphorylated probe in cell lysate in the presence of or absent from forskolin.

8. おわりに

今回は、プロテオミクスにおける質量分析法に関する技術についてご紹介した。質量分析は、測定値がデジタルであり、高感度で迅速に計測が可能であり、タンパクの同定や機能評価には、今後、ますますその重要性が増すものと考えられる。このような細胞試料中のタンパクを扱う場合、特に、発現量や活性変化を比較、定量する場合、最も重要なことは試料の調製法にある。すなわち、もし、2つの状態の細胞間での試料調製や、標識効率に差があれば、どんなに優れた計測を行おうと、得られる値に全く意味がなくなってしまう。今後は、計測法の開発とともに、試料調製法の開発と情報の共有が必要となるであろう。

以上、これまで、化学の立場から俯瞰した、ポストゲノム技術についてご紹介してきたが、このシリーズも今回で終わりとなった。ポストゲノム技術は日進月歩であり、ここではご紹介できなかった多くの技術がまだまだ存在する。例えば、*in vitro* ウイルスやリボソームディスプレイなどに代表される遺伝子とタンパクをカップルで扱う手法や、遺伝子の導入法など、新技術を挙げれば枚挙に暇がない。また、これまでにご紹介してきたカテゴリーでも、その後、さらに新しい技術が次々に報告されている。ゲノム研究は、これまで異分野とされてきた多くの分野間の融合を真に必要としている。自分の技術は、全く関係がないと感じている技術が実は、非常に重要な技術に発展する可能性が大いにある。その様な中で、最も必要とされるのは、実際のポストゲノム研究の

現状と潜在ニーズを理解しながら、多くの工学的、化学的技術をも理解する目を育てることであろう。また、ゲノム研究は、体力にものを言わせて絨毯爆撃をするような、特にアメリカの産業国家戦略に基づく方法論に関係している。企業規模や体力的に比肩できない我国においては、ゲノム研究の見方を理解し、利用しつつも、さらに効率の良い、独自の技術と方法論を構築していくときに来ているのではないかと思考する。本シリーズが、ポストゲノム技術を考えるにあたって、些少なりともご参考になれば幸いである。

著者紹介

氏名：片山 佳樹 (Yoshiki Katayama)
 所属：九州大学工学研究院応用化学部門 教授
 連絡先：〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1
 TEL: 092-642-3608 FAX: 092-642-3611
 E-mail: ykatatcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp
 出身校：九州大学大学院工学研究科合成化学専攻
 学位：博士(工学)
 趣味：ドライブ、イラスト

参考文献

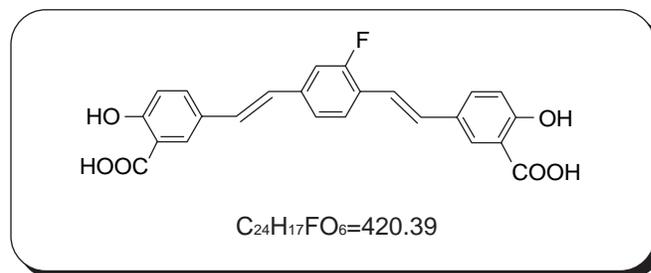
- 1) D. J. C. Pappin, P. Hojrup, A. J. Bleasby, *Curr. Biol.*, **3**, 327 (1993).
- 2) M. Mann, P. Hojrup, P. Roepstorff, *Biol. Mass Spectrom.*, **22**, 338 (1993).
- 3) W. J. Henzel, T. M. Billeci, J. T. Stults, S. C. Wong, C. Grimley, C. Watanabe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5011 (1993).
- 4) P. James, M. Quadroni, E. Carafoli, G. Gonnet, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **195**, 58 (1993).
- 5) J. R. Yates III, S. Speicher, P. R. Griffin, T. Hunkapiller, *Anal. Biochem.*, **214**, 397 (1993).
- 6) P. James, M. Quadroni, E. Carafoli, G. Gonnet, *Protein Sci.*, **3**, 1347 (1994).
- 7) T. Kosaka, T. Takazawa, T. Nakamura, *Anal. Chem.*, **72**, 1179 (2000).
- 8) M. W. Senko, J. P. Speir, F. W. MacLafferty, *Anal. Chem.*, **66**, 2801 (1994).
- 9) M. Mann, M. S. Wilm, *Anal. Chem.*, **66**, 4390 (1994).
- 10) B. Blagoev, I. Kratchmarova, S-E. Ong, M. Nielsen, L. J. Foster, M. Mann, *Nature Biotechnol.*, **21**, 315 (2003).
- 11) T. P. Conrad, K. Alving, T. D. Veenstra, M. E. Belov, G. A. Anderson, D. J. Anderson, M. S. Lipton, L. Pasa-Tolic, H. R. Udseth, W. B. Chrisler, B. D. Thrall, R. D. Smith, *Anal. Chem.*, **73**, 2132 (2001).
- 12) T. C. Hunter, L. Yang, H. Zhu, V. Majidi, E. M. Bradbury, X. Chen, *Anal. Chem.*, **73**, 4891 (2001).
- 13) S. E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics*, **1**, 376 (2002).
- 14) X. Chen, L. M. Smith, E. M. Bradbury, *Anal. Chem.*, **72**, 1134 (2000).
- 15) H. Zhu, T. C. Hunter, S. Pan, P. M. Yau, E. M. Brudbury, X. Chen, *Anal. Chem.*, **74**, 1687 (2002).
- 16) S. Martinovic, T. D. Veenstra, G. A. Anderson, L. Pasta-Tolic, R. D. Smith, *J. Mass Spectrom.*, **37**, 99 (2002).
- 17) S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold, *Nature Biotechnol.*, **17**, 994 (1999).
- 18) D. K. Han, E. J. Zhou, R. Aebersold, *Nature Biotechnol.*, **19**, 946 (2001).
- 19) L. R. Yu, M. D. Johnson, T. P. Conrads, R. D. Smith, R. S. Morrison, T. D. Veenstra, *Electrophoresis*, **23**, 1591 (2002).
- 20) H. Lee, T. J. Griffin, S. P. Gygi, B. Rist, R. Aebersold, *Anal. Chem.*, **74**, 4353 (2002).
- 21) R. Zhang, C. S. Sioma, R. A. Thompson, L. Xiong, F. E. Regnier, *Anal. Chem.*, **74**, 3662 (2002).
- 22) <http://www.applied biosystems.com>
- 23) H. Zhou, J. A. Ranish, J. D. Watts, R. Aebersold, *Nature Biotechnol.*, **20**, 512 (2002).
- 24) Y. Qui, E. A. Sousa, R. M. Hewick, J. H. Wang, *Anal. Chem.*, **74**, 4969 (2002).
- 25) M. Munchbach, M. Quadroni, G. Miotto, P. James, *Anal. Chem.*, **72**, 4047 (2000).
- 26) D. R. Goodlett, A. Keller, J. D. Watts, R. Newitt, E. C. Yi, S. Purvine, J. K. Eng, P. von Haller, R. Aebersold, E. Kolker, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 1214 (2001).
- 27) S. Wang, X. Zhang, F. E. Regnier, *J. Chromatogr.*, **A 949**, 153 (2002).
- 28) D. Figeys, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **4**, 210 (2002).
- 29) D. R. Muller, P. Schindler, H. Towbin, U. Wirth, H. Voshol, S. Hoving, M. O. Steinmetz, *Anal. Chem.*, **73**, 1927 (2001).
- 30) A. Borodovsky, H. Ovaa, N. Kolli, T. Gan-Erdene, K. D. Wilkinson, H. L. Ploegh, B. M. Kessler, *Chemistry & Biology*, **9**, 1149 (2002).
- 31) Y. Oda, T. Nagasu, B. T. Chait, *Nature Biotechnol.*, **19**, 379 (2001).
- 32) T. Sonoda, S. Shigaki, T. Nagashima, O. Okitsu, Y. Kita, M. Murata, Y. Katayama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 847 (2004).

新製品 4月1日発売

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。
- ・従来の色素に比べ検出感度が高い(蛍光強度が従来のBSBの約2倍)
- ・溶液タイプのため、染色が容易である。

現在、厚生労働省が特定疾患に認定している難病の「アミロイドーシス」とは、シート構造で線維状に凝集したアミロイドと呼ばれる異常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。日本人に多い疾患として免疫細胞性アミロイドーシス(ALアミロイドーシス)、反応性AAアミロイドーシス、家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)、透析アミロイドーシス(DRA)があげられ、国内に約数百人の患者がいると推定されています。これらのアミロイドーシスは上記の疾患のような全身の様々な臓器にアミロイドが沈着する「全身性アミロイドーシス」と、アルツハイマー病のように脳など特定の臓器のみにアミロイドが沈着する「限局性アミロイドーシス」と大きく2つに分類されます。アルツハイマー病は日本でも約100万人の患者がいるといわれており、年齢を重ねると誰もが発症する可能性のある疾患であり、原因究明及び診断・治療など、世界各国で様々な研究が成されています。

小社で販売しているBSBは、アルツハイマー病の原因アミロイドであるアミロイド ペプチド(A)へ高い親和性をもち、Aの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に静注することで、18時間後の脳組織の老人斑(SP)に色素が集積することをSkovronskyらにより確認されています¹⁾。Aに限らず、安東らは、様々な全身性アミロイドーシスの沈着アミロイド(AA, AL, ATTR, Ascr, A 2M など)に対しても従来の色素より鋭敏に染色することを報告し^{2,3)}、さらにin vivoの系においても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静注すると、沈着アミロイド部分にBSBが集積することを確認しています^{2,3)}。また、BSBは染色だけでなく、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³⁾。

新製品 4月1日発売

アミロイド染色用蛍光色素(1% FSB in DMSO)

FSBは従来の色素に比べ、高感度蛍光染色が可能な化合物です。Congo redなどに比べて高感度であったBSBの約2倍の蛍光強度をもっています。これはBSBの臭素をフッ素に変え、重原子効果による蛍光消光をなくしたことから実現しました。アルツハイマー病患者の脳組織(Fig.1)およびALアミロイドーシス患者の心臓組織(Fig.2)の染色結果から、FSBはCongo redやBSBなどの従来の色素より鋭敏にアミロイド沈着部分を検出していることが確認できます。

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調製できます。

1.FSB染色液の調製

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、冷蔵保存して下さい。

参考文献

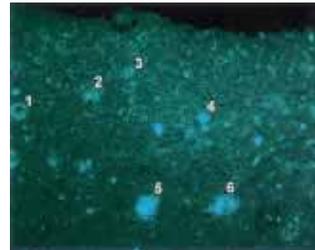
- 1) D. M. Skovronsky, B. Zhawng, M.-P. Kung, H. F. Kung, J. Q. Trojanowski, V. M.-Y. Lee, *Proc. Natl. Acad. Soc.*, **97**, 7609 (2000).
- 2) 安東 由喜雄, *Dojin News*, **104**, 1 (2002).
- 3) Y. Ando, Y. Tanoue, K. Haraoka, K. Ishikawa, S. Katsuragi, M. Nakamura, X. Sun, K. Nakagawa, K. Sasamoto, K. Takesako,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

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
FSB solution	100 µl	25,000	F308

関連商品

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

FSB



BSB

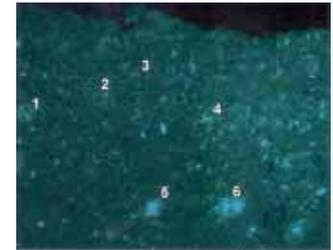


Fig.1 アルツハイマー病患者の脳の前頭皮質切片(エタノール固定)の染色像(光っている部分がアミロイド)。準隣接切片で図中の番号はそれぞれの老人斑に対応している。FSBの方がより細かい部分まで明確に観察できる。

(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)

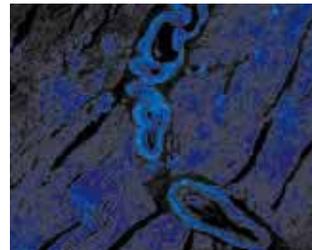
Congo red



Congo red(偏光顕微鏡下)



FSB



BSB



Fig.2 ALアミロイドーシス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)

Topics on Chemistry

低分子蛍光性プローブによるアポトーシスの検出

(株) 同仁化学研究所 佐々本一美

細胞が自ら死を選びアポトーシスとなったときには、死に至る過程で様々な形態変化が細胞に現れる。特に初期の段階で現れる変化に、細胞表層のホスファチジルセリン (PS) がある。正常細胞の細胞膜リン脂質の分布は非対称に保たれ、PSは内側の細胞質側に局限されているが、アポトーシスの状態ではこの非対称性が失われ、PSが外側層に移動し細胞表層に露出することが知られている。したがって、この細胞表層のPSは、アポトーシスを識別するための恰好の目印となる。同時に、アポトーシス細胞が食細胞によって貪食され、生体組織から排除される際の目印ともなっている¹⁾。

リン脂質結合性タンパク質であるアネキシンVは、Ca²⁺存在下でPSと強く結合するため、アポトーシスの識別に広く用いられている。しかし、PSとの結合にCa²⁺を要求する点がこの方法の欠点でもある。PSの細胞表層への移動を触媒しているスクランブラーゼという酵素が、アネキシンV同様、Ca²⁺依存性のため、検出に用いるCa²⁺によって酵素が活性化され、擬陽性を与えやすい。さらに最近では、細胞膜の過酸化代謝物との結合も報告されている²⁾。したがって、PSとの結合が迅速かつCa²⁺非依存的な低分子化合物で代替できれば理想的だが、これを達成するにはPSの構造に含まれるリン酸部分の分子認識が鍵となってくる。

リン酸の分子認識はCzarnikらの研究がよく知られているが、彼らが開発したプローブ1はリン酸に対する親和性が十分ではなく、生物学的応用には耐えられなかった³⁾。濱地らはこれを改良するため、フォスファターゼがリン酸部分の認識に金属配位を利用していることに着目し、Znの二核錯体を認識素とする蛍光性プローブ2を報告している⁴⁾。プローブ2は、Znがリン酸部位に立体的に配位することで、アントラセンの蛍光 ($\lambda_{ex} = 380 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 435 \text{ nm}$) が増強するように設計されており、中性バッファー溶液中で、種々のリン酸化ペプチドと結合し、 $10^{-6} \sim 10^{-5} \text{ mol/l}$ の濃度範囲で蛍光応答が得られる (結合定数 10^{-7} M^{-1})。

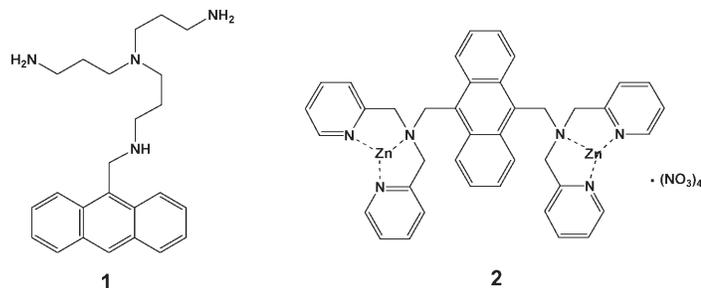


Fig.1 蛍光性プローブの構造

最近、プローブ2のリン酸との高い結合性を利用し、アポトーシス検出に応用した例がSmithらによって報告された⁵⁾。陽イオン性のプローブ2は、zwitter型のホスファチジルコリンのような細胞膜リン脂質と異なり、全体としてアニオン電荷を持つPSに対してより高い親和性を持っている。

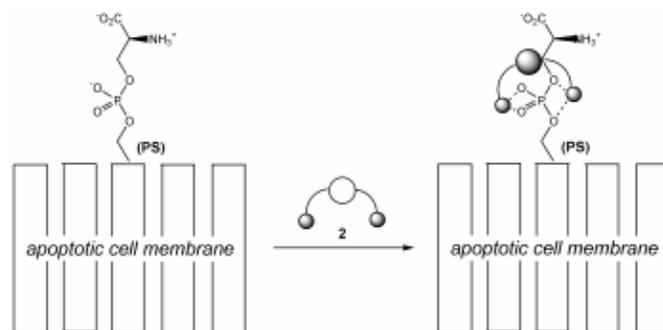


Fig.2 蛍光性プローブ2によるアポトーシスの検出

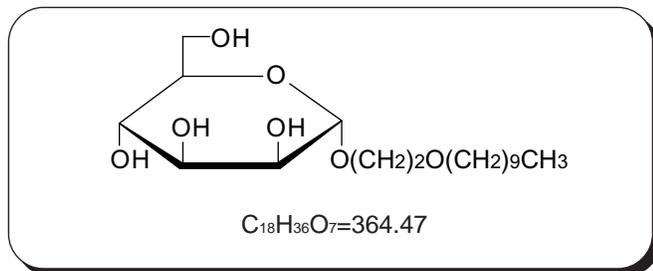
実際のJurkat細胞を用いた実験でアネキシンVと比較すると、Ca²⁺に影響されず、より迅速にアポトーシスを検出でき、高価なアネキシンVを代替できる可能性が出てきた。ただし、励起波長が380 nmと短いのが難点であり、今後、Arレーザー励起が可能な蛍光団をもつような化合物の開発が待たれる。

参考文献

- 1) 中西、白土、生化学、**75**, 1429 (2003).
- 2) K. Balasubramanian, E. M. Bevers, G. M. Willems and A. J. Schroit, *Biochemistry*, **40**, 8672 (2001).
- 3) M. E. Huston, E. U. Akkaya and A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8735 (1989).
- 4) A. Ojida, Y. Mito-oka, M. Inoue and I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6256 (2002).
- 5) A. V. Koulov, K. A. Stucker, C. Lakshmi and B. D. Smith, *Cell Death and Differentiation*, **2003**, pp.1-3.

試作品 4月上旬発売予定

膜タンパク質可溶化剤

3-Oxatriidecyl- α -D-mannoside化学名 3-Oxatriidecyl- α -D-mannopyranoside

3-Oxatriidecyl- α -D-mannoside は、親水部としてマンノースを、疎水部としてエーテル結合を含むアルキル鎖を有する非イオン性界面活性剤で、cmc は 0.63 mmol/l です。

膜タンパク結晶化剤として知られている、*n*-Decyl- β -D-maltoside、*n*-Dodecyl- β -D-maltoside などと同様に膜タンパクの結晶化に有用な界面活性剤です。姫路工業大学の吉川らは、3-Oxatriidecyl- α -D-mannoside を用いて牛心筋チトクロムc酸化酵素の単量体結晶を作成し、2.0 の分解能を持つ X 線回折像を得ています。今後、種々の膜タンパク質の結晶化、機能解析への応用が期待されます。

Q & A

膜タンパク質可溶化剤

界面活性剤とは、その物質を加えることにより液体の界面の張力を著しく低下させる物質のことです。この性質を生化学実験に使用する場合と洗浄のために洗剤として使用場合があります。

ここでは、生化学実験においてタンパク質可溶化剤として使用の際に疑問としてあげられる内容について記載しております。

- Q1 タンパク質可溶化剤としての界面活性剤の分類を教えてください。
- A1 界面活性剤は親水基と疎水基を合わせもつ分子です。親水基と疎水基の種類によって分類されます。親水基はイオン性、両イオン性、非イオン性の三種類に大きく分けられます。非イオン性はポリアルコール系とポリエーテル系があります。

Q & A

膜タンパク質可溶化剤

一方、疎水基部分は長鎖アルキル基とステロイド骨格基を持ったものに分けられます。これらの組み合わせによって界面活性剤が多種類出来ることとなります。

これらの組み合わせの中で、イオン性と長鎖アルキル基を組み合わせたものが一般に言われる界面活性剤で、洗剤と言われるものはこの範疇に入ります。ただ、この組み合わせの界面活性剤はタンパク質を失活させる傾向があり、活性を保持したままのタンパク質可溶化剤には向きません。代表的なものとしては SDS があります。

一般的なタンパク質可溶化剤には親水基に非イオン性、疎水基に長鎖アルキル基を組み合わせたものが種類としては多く存在します。

- Q2 種類が多く、どれを使えばよいのか判りません。選択基準を教えてください。
- A2 目的とするタンパク質が可溶化でき、余分なタンパク質を可溶化しないというのが第一の条件になります。さらに、目的タンパク質を失活させないこと、タンパク質を取り出した後の分離が容易なことが重要な要素となります。その他には毒性がないこと、安定であること、安価であることなどが要求されます。
- オールマイティにタンパク質可溶化剤として使用できる界面活性剤はありません。可溶化しようとするタンパク質と界面活性剤の相性も考慮して選択していただくこととなります。
- どれがよいか検討する際に小社では、5種類の界面活性剤を小容量にしてセットとした Detergent Screening Set を 2種類用意しております。一般的に使用される first choice のセットと、タンパク質の結晶化を目的とした for crystallization のセットをお試し下さい。

- Q3 cmc(臨界ミセル濃度)はタンパク質可溶化にどのように関係するのですか。
- A3 界面活性剤は cmc 以上の濃度でないとミセルを形成しません。

その濃度以上でないとタンパク質の可溶化も出来ません。タンパク質を可溶化する場合、最終濃度が cmc 以上となるように調製する必要があります。

一方、タンパク質を可溶化した溶液からこの界面活性剤を除去するときにも cmc は重要となります。透析を例として説明します。ミセルは界面活性剤の集合体ですが、ミセルを形成することで一つの大きな分子として振る舞います。ミセルを形成している場合、ミセルは透析膜を通過出来ません。よって、cmc が比較的大きい分子ほど、モノマーの状態の比率が高くなる傾向がありますので、透析により簡単に除去できます。cmc 以下に希釈すれば透析はさらに容易になるので、cmc が高いほど低い希釈率で透析ができます。

- Q4 cmc (臨界ミセル濃度) を比較してみたい。
A4 小社製品の cmc の一覧表を下記に示します。

製品名	cmc(mmol/l)
BIGCHAP	2.9
deoxy-BIGCHAP	1.4
CHAPS	8
CHAPSO	8
MEGA-8	55 ~ 67
MEGA-9	25.0
MEGA-10	7.0
<i>n</i> -Octyl- β -D-glucoside	25
<i>n</i> -Octyl- β -D-maltoside	23.4
<i>n</i> -Decyl- β -D-maltoside	1.8
<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltoside	0.2
<i>n</i> -Heptyl- β -D-thiogluco- side	30.0
<i>n</i> -Octyl- β -D-thiogluco- side	9.0
<i>n</i> -Nonyl- β -D-thiomalto- side	2.4
Sucrose monocapr- ate	2.5
Sucrose monolaur- ate	0.4
Sucrose monochol- ate	4.7
Sodium chol- ate (purified)	14.0
Sodium deoxychol- ate	5
<i>n</i> -Oxatridecyl- α -D-manno- side	0.63

ここに示す cmc は文献からの引用です。測定方法、温度条件等により数値は変わりますことをご承知下さい。

- Q5 *n*-Octyl- β -D-glucoside と *n*-Octyl- β -D-thiogluco-
side では性質上どのような違いがありますか。
A5 *n*-Octyl- β -D-glucoside はタンパク質可溶化剤としては良い
ものですが、開発された当初は製法上、それまでの界面活性
剤に比べ非常に高価なものでした。そこで、安価に製造でき
るものとして開発されたのが、*n*-Octyl- β -D-thiogluco-
side です。現在は *n*-Octyl- β -D-glucoside も製法が改善され、以
前より価格も安くなっております。
性質の違いとして、*n*-Octyl- β -D-glucoside はアセタール
構造であるため、加水分解されることがあります。それに対
して *n*-Octyl- β -D-thiogluco-
side の場合、アセタールの酸素
が硫黄原子に置き換わっているため加水分解され難いとい
った性質があります。
濃度が微妙に変化することにより、実験結果に影響を与
ることがあり、また分解物が悪影響を与えることも十分考
えられます。
n-Octyl- β -D-glucoside は水溶液の状態では安定性は高く
ありません。用事調整にて使用いただくのが望ましいです
よ。(その他 A6 もご覧下さい)。

- Q6 *n*-Octyl- β -D-glucoside は -グルコシダーゼで加水分解さ
れますか。
A6 加水分解されます。グルコシダーゼが入っているような試料
を取り扱う場合には、注意が必要です。*n*-Octyl- β -D-
thiogluco-
side に関しては -グルコシダーゼでは分解され
ません。
Q7 *n*-Octyl- β -D-thiogluco-
side の cmc は *n*-Octyl- β -D-gluco-
side の代替として使用できますか。
A7 両者は類似した性能を有しており、可溶性に多少の違いはあ
りませんが、代替品として使用可能です。
ただし、*n*-Octyl- β -D-thiogluco-
side の cmc は 9 mmol/l と
n-Octyl- β -D-glucoside (cmc 25 mmol/l) に比べ小さいの
で、cmc や膜タンパク質の可溶化に用いられる有効濃度を
考えると *n*-Heptyl- β -D-thiogluco-
side (cmc 30 mmol/l) の
方が使いやすいかもしれません。

参考文献

土屋友房、島本整、斉藤節生、蛋白質、核酸、酵素、**30 (9)**, 52 (1985)。

- Q8 長鎖アルキル基とステロイド骨格基ではどのような違いがあ
りますか。
A8 ステロイド骨格を持つ界面活性剤はコール酸系統が一般的で
す。この界面活性剤は数分子で会合してミセルを形成するた
め、ミセルサイズも小さく、透析により除去され易いという
特徴があります。
長鎖アルキル基との組み合わせでは、親水基として糖を結
合したものがタンパク質可溶化剤として用いられるものが多
くあります。
Q9 糖鎖を親水基にした可溶化剤の特長を教えてください。
A9 以下のような特長があります。
・可溶化したタンパク質をイオン交換クロマトグラフィーで精
製できる。
・マイルドな溶解作用を持つので変性しやすいタンパク質に適
している。
・多糖類を結合している膜タンパク質の可溶化や精製に良く用
いられる。
Q10 *n*-Octyl- β -D-glucoside で可溶化したタンパク質をそのまま
生体へ投与可能ですか。
A10 小社製品は試験・研究用です。生体成分(細胞や大腸菌など)
のタンパク質の可溶化には使用されておりますが、それを生
体に直接投与したデータは持ちあわせておりません。従いま
して、投与の可否についてはわかりません。

新製品 3月26日発売

ペルオキシダーゼ標識用キット

Peroxidase Labeling Kit

酵素を用いた免疫染色法やエンザイム免疫アッセイ(EIA)法は、高感度分析法として臨床診断や研究に欠かせない手法となっています。さらに、多種多様な抗体が入手可能な現在、酵素免疫法の有用性はさらに増していると言えます。それにもかかわらず、実際のアッセイは、未だに市販の酵素標識抗体に依存しています。これは、酵素標識抗体の作製に時間を要すること、mgオーダーの抗体を使用しなければならないこと、確立された標識法がないためだと考えられます。

Peroxidase Labeling Kitsは、アミノ基あるいはスルフヒドリ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、標的分子と混合するだけで簡単にペルオキシダーゼ標識体を得ることができます。標識に必要な抗体の量は50~200 µgで、少量の標識体を調製するのに最適です。また、Filtration Tubeを用いた分離操作によって標識体を回収するため、いくつかの標識体を同時に得ることができます。抗体のような大きなタンパク質だけでなく、低分子化合物への標識もでき、幅広いアッセイ系に適用できます。

Peroxidase Labeling Kit- NH₂

< 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。
- ・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。

< キット内容 > 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

Peroxidase Labeling Kit - NH₂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 (Fig. 2)。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 (Fig. 4)。

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。

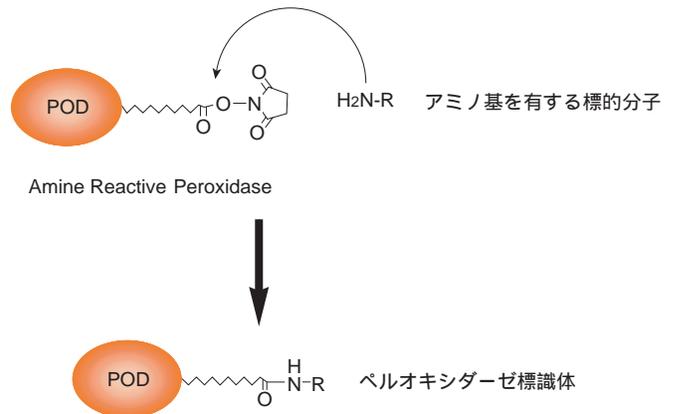


Fig. 1 Amine Reactive Peroxidaseの標識反応

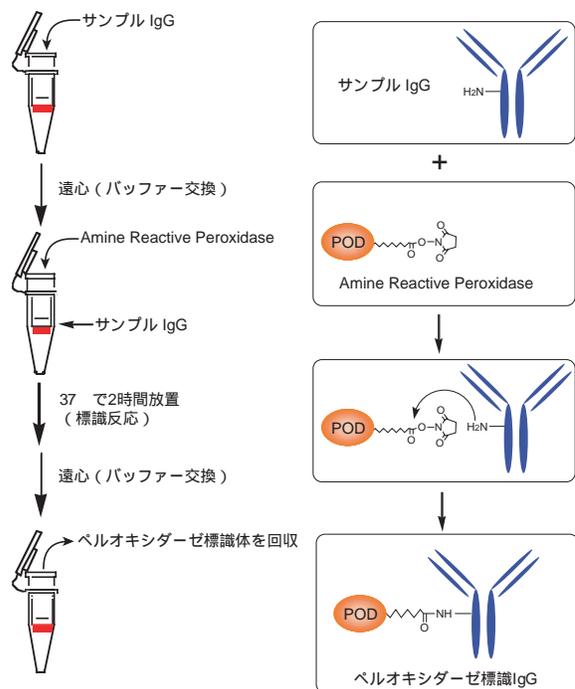
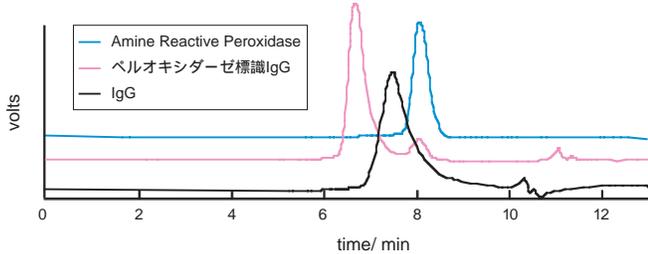


Fig. 2 ペルオキシダーゼ標識 IgGの調製法



カラム : TSKgel G3000PW_{XL}
 溶離液 : pH 7.0, 10 mmol/l リン酸バッファー
 流速 : 0.8 ml/min
 温度 : 28
 検出 : UV (280 nm)

Fig. 3 HPLC チャート

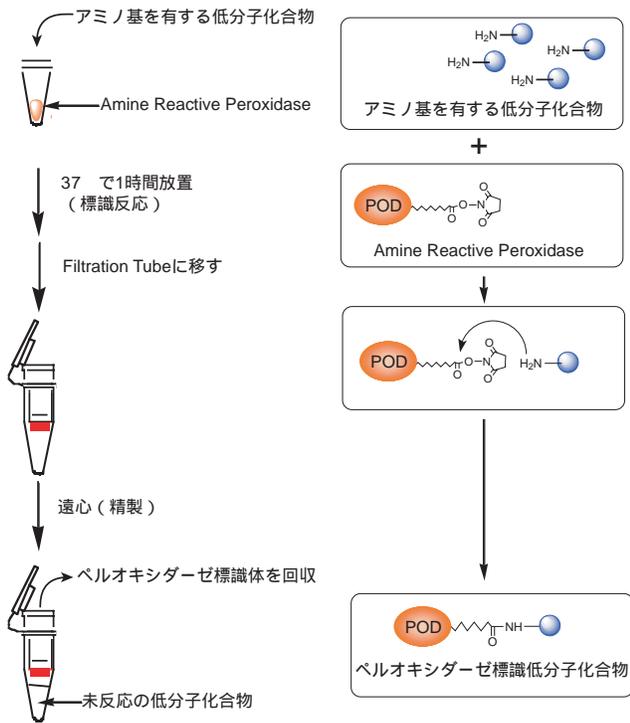


Fig. 4 ペルオキシダーゼ標識低分子化合物の調製法

品名	容量	本体価格 (¥)	メーカーコード
Peroxidase Labeling Kit-NH ₂	3 samples	Request	LK11

< 実験例 >

1. ペルオキシダーゼ標識 anti-CAT (Chloramphenicol Acetyltransferase) 抗体を用いた EIA

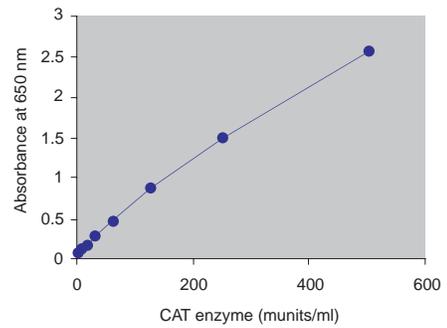
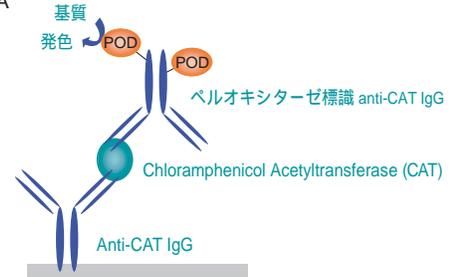


Fig. 5

2. ペルオキシダーゼ標識 Growth Hormone Releasing Factor (ペプチド)を用いた競合 EIA

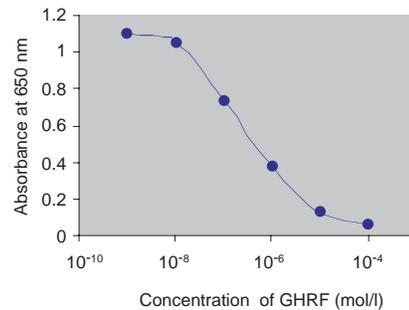
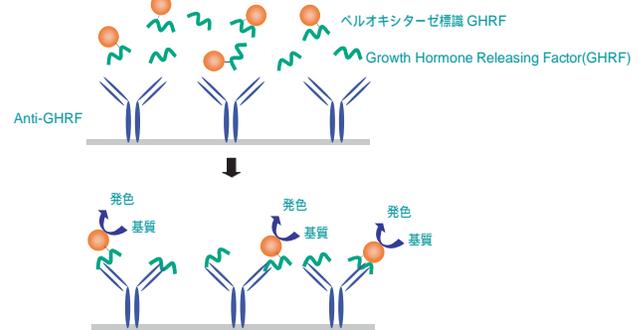


Fig. 6

新製品 3月26日発売

ペルオキシダーゼ標識用キット

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。

* 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。

<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

Peroxidase Labeling Kit - SH は、スルフヒドリル基 (-SH 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、スルフヒドリ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。標的タンパク質がスルフヒドリ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 ヒンジ領域のスルフヒドリ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 (Fig. 8)。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 (Fig. 10)。

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。

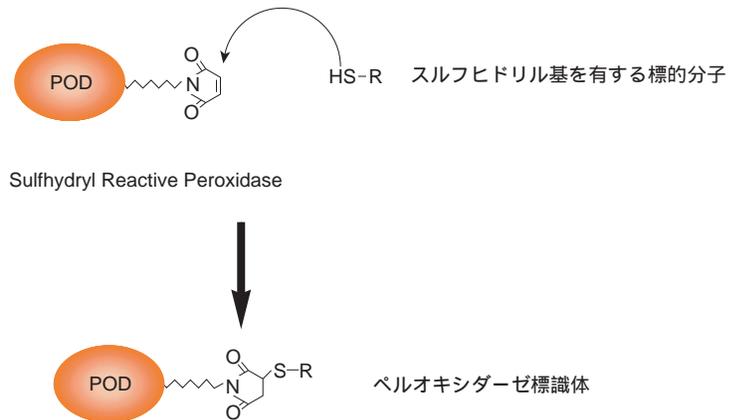


Fig. 7 Sulfhydryl Reactive Peroxidase の標識反応

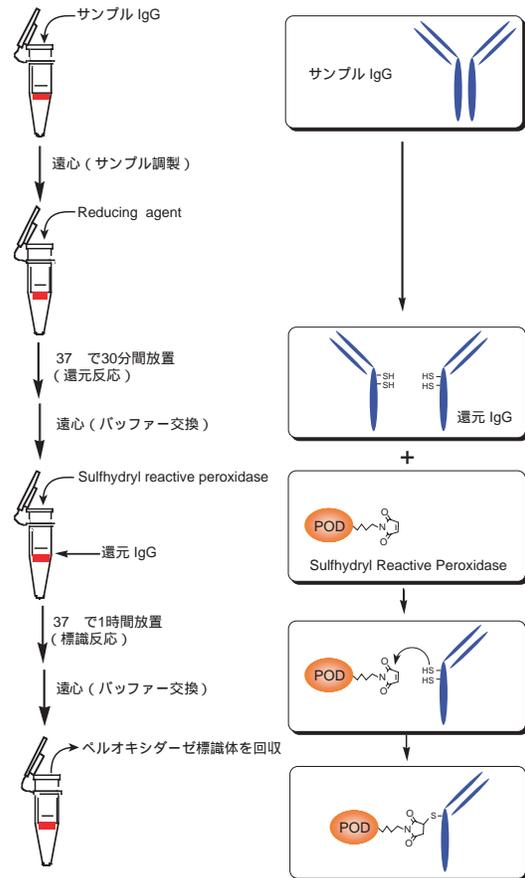


Fig. 8 ペルオキシダーゼ標識還元 IgG の調製法

試作品

アルカリホスファターゼ標識用キット

アルカリホスファターゼは、ペルオキシダーゼと並び、酵素免疫法に利用される最も一般的な酵素として知られています。化学発光を利用した検出法は、感度に優れており、プロットングや組織染色に利用されています。

Alkaline Phosphatase Labeling Kitsは、アミノ基あるいはスルフヒドリル基を有する分子にアルカリホスファターゼを標識するためのキットで、標的分子と混合するだけで簡単にアルカリホスファターゼ標識体を得ることができます。

Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH₂

< 特長 >

- ・3時間以内にアルカリホスファタ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 Alkaline Phosphatase 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。
- ・付属の保存溶液でアルカリホスファターゼ標識体の長期保存ができる。

< キット内容 >

- ・Amine Reactive Alkaline Phosphatase
- ・Buffer A ・ Buffer B ・ Storage Buffer ・ Filtration Tube

Alkaline Phosphatase Labeling Kit - SH

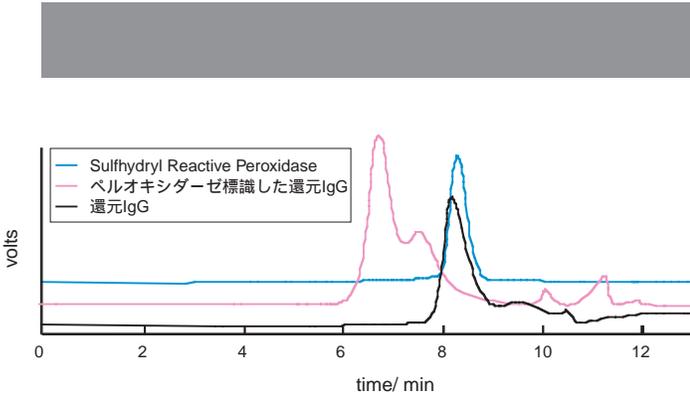
< 特長 >

- ・3時間以内にアルカリホスファタ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 Alkaline Phosphatase 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が得られる。
- ・付属の保存溶液でアルカリホスファタ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。

< キット内容 >

- ・Sulfhydryl Reactive Alkaline Phosphatase
- ・Reducing Agent ・ Buffer A ・ Buffer B
- ・Reaction Buffer ・ Storage Buffer ・ Filtration Tube



カラム : TSKgel G3000PW_{XL}
 溶離液 : pH 7.0, 10 mmol/l リン酸バッファー
 流速 : 0.8 ml/min
 温度 : 28
 検出 : UV (280 nm)

Fig. 9 HPLC チャート

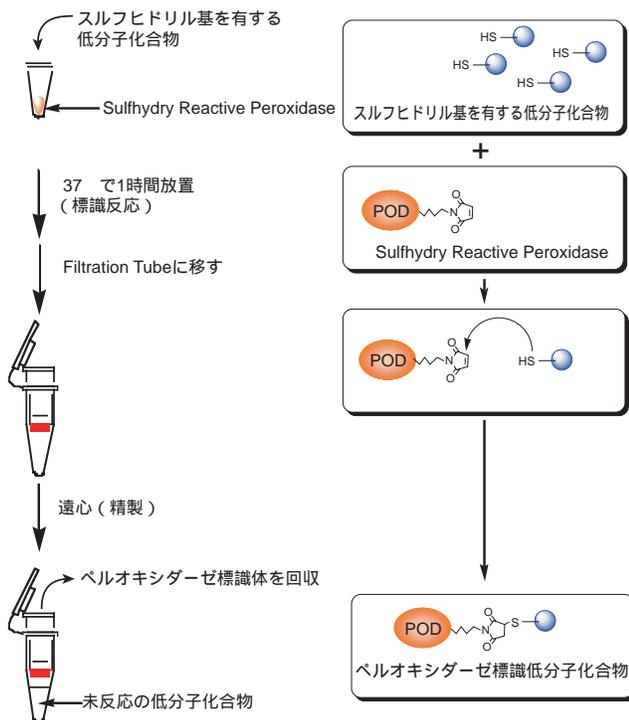


Fig. 10 ペルオキシダーゼ標識低分子化合物の調製法

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
Peroxidase Labeling Kit-SH	3 samples	Request	LK09

新製品 3月31日発売

陽イオン性脂質遺伝子導入試薬

-DoFect-GT1

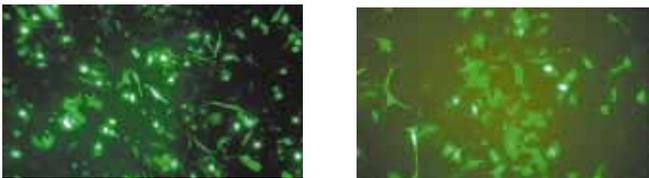
<特長>

- ・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>

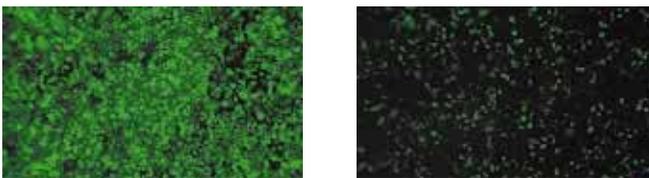
本製品は、培養細胞にDNA や siRNA を導入するために最適化された陽イオン性脂質の遺伝子導入試薬です。全ての反応を1チューブで行うことができ、短時間(30秒以内)で核酸との複合体を形成できるため、非常に迅速・簡便な操作で核酸を細胞に導入することができます。

< 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 >

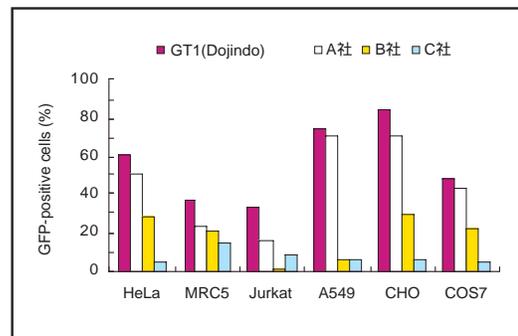


Fig. 3 GT1と各遺伝子導入試薬を用いて、hsGFP 遺伝子ベクターを4時間トランスフェクションし、1日後にGFP陽性細胞をフローサイトメトリーで測定しました。

< 導入操作法 >

- 24 well プレート(1 well の細胞密度 80-100%)を用いた場合
- 1.5 ml サンプルチューブに1 well に対して培地 25 μ l、DNA 1.0 μ g(0.5 μ g ~ 2.0 μ g で可)、GT1 を 5 μ l 順に加え、ゆっくりピペティングする。
 - 各 well の増殖用培地を除き、1 well に対して 300 μ l の無血清培地に交換する(血清を含む培地にも適応できます)。
 - 各 well に 1. で作成した溶液を添加する。
 - 3-6 時間培養する。

注意事項 -DoFect- GT1 は懸濁液です。
よく振り混ぜて、必ず懸濁状態でご使用ください。

品名	本体価格(¥)	メーカーコード
-DoFect- GT1	Request	DF01

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