



2007 No.
124
ISSN 0385-1516

CONTENTS

Review

リボソームによるタンパク質
合成の1分子力学測定

上村 想太郎

連載

エイズから見た感染症研究の最前線
その4 HIV1感染と宿主因子

熊本大学大学院医学薬学研究部 前田 洋助

Topics on Chemistry

一重項酸素の特異的検出

永田 貴裕

ドージンニュース

DOJIN NEWS

目次

Review

- リボソームによるタンパク質合成の1分子力学測定
 東京大学大学院薬学系研究科 上村 想太郎 1
- エイズから見た感染症研究の最前線
 その4 HIV1 感染と宿主因子
 熊本大学大学院医学薬学研究部 前田 洋助 6

Topics on Chemistry

- 一重項酸素の特異的検出
 株式会社同仁化学研究所 永田 貴裕 8

Commercial

- 新製品・関連製品
- 蛍光ラベル化キット 9
- Self Assembled Monolayers 研究用 11
- 開発予定品
- アンジオテンシン変換酵素(ACE)活性測定キット 12

お知らせ

- 販売中止品のお知らせ 5
- 学会展示のお知らせ 5
- 九州大学・同仁化学組織対応型連携 10
- パンフレットのお知らせ 13
- 18th フォーラム・イン・ドージン開催のご案内 14

新製品案内

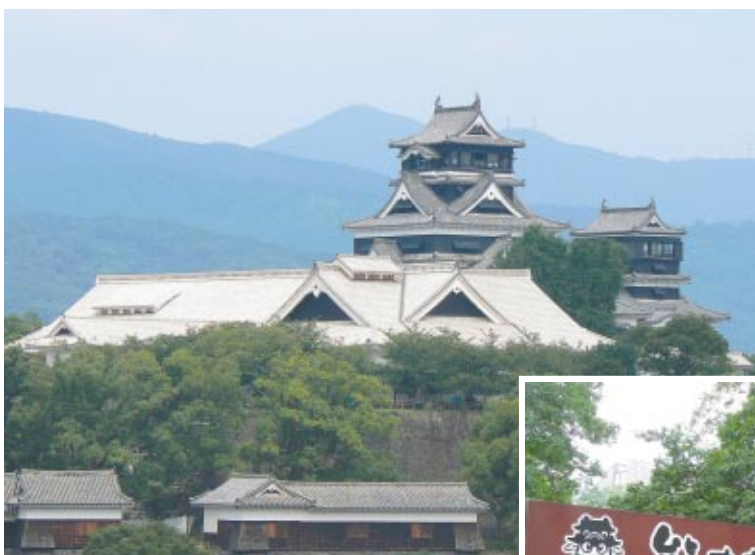
製品詳細は掲載ページをご覧ください。

蛍光ラベル化キット

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
HiLyte Fluor™ 750 Labeling Kit - NH ₂	3 samples	28,000	LK16

Self Assembled Monolayers 研究用

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Amino-EG ₆ -undecanethiol, hydrochloride	10mg	38,000	A483



昨年のNo.120号で紹介した熊本城築城400年事業として進めている本丸御殿の復元が完成に近づいています(12月完成予定)。天守閣の前に出来た真新しい白い屋根の本丸御殿を電車通りからも見ることができます。

リボソームによるタンパク質合成の1分子力学測定

Single molecule force measurement for protein synthesis on the ribosome



上村 想太郎
(Sotaro Uemura)
東京大学大学院薬学系研究科

[Summary]

The ribosome is a molecular machine that translates the genetic code contained on the messenger RNA (mRNA) into an amino acid sequence through repetitive cycles of transfer RNA (tRNA) selection, peptide bond formation and translocation. Here we demonstrate an optical tweezer assay to measure the rupture force between a single ribosome complex and mRNA. The rupture force was compared between ribosome complexes assembled on an mRNA with and without a strong Shine-Dalgarno (SD) sequence. The removal of the SD sequence significantly reduced the rupture force, indicating that the SD interactions contribute significantly to the stability of the ribosomal complex on the mRNA in a pre-peptidyl transfer state. In contrast, the post-peptidyl transfer state weakened the rupture force as compared to the complex in a pre-peptidyl transfer state and it was the same for both the SD-containing and SD-deficient mRNAs. The results suggest that formation of the first peptide bond destabilizes the SD interaction, resulting in the weakening of the force with which the ribosome grips an mRNA. This might be an important requirement to facilitate movement of the ribosome along mRNA during the first translocation step.

キーワード：1分子計測、リボソーム、光ピンセット法、破断力、Shine-Dalgarno 配列 (SD 配列)、アロステリック効果

1. はじめに

30Sと50Sサブユニットで構成される細菌リボソームはその3分の1がタンパク質であり、残りの3分の2はリボソームRNA (rRNA) で出来ている。リボソームはアミノ酸配列によってコードされたmRNA上のコドンに対応したアミノアシルtRNAを結合し続け、それによって毎秒10~20のアミノ酸を合成することができるが、その正確性はかなり高く、誤りは約3000アミノ酸に1回の確率である¹⁾。複雑な構造を持つリボソーム分子はどのようにしてこのような高い正確性を保ちながらmRNA上のコドンを読み取り、正確にタンパク質を合成できるのだろうか？この生命現象の重要な謎は長年にわたる生化学的手法などを用いた研究によってその巧妙な仕組みが徐々に明らかにされてきた。さらに構造解析による手法の発展によって近年高分解能で構造情報が明らかと

なり、より詳細な構造機能が議論されるようになった (Fig. 1)²⁾⁻⁵⁾。

リボソーム機能の大きな特徴の1つとして50Sサブユニットの大部分を占めている23SrRNAにはペプチジルトランスフェラーゼと呼ばれるペプチド結合を触媒するRNA酵素(リボザイム)としての機能を持っていることが挙げられる。一方、30Sサブユニットの16SrRNAはmRNAと相互作用し、mRNA上のコドンとtRNA上のアンチコドン結合を保護するような構造配置をする。それぞれの機能を阻害するような抗生物質は翻訳活性を著しく低下あるいは停止させることが知られている。mRNA上の遺伝情報を正確にタンパク質へと翻訳するためにはこれらの重要な2つの機能が独立に働くのではなく、互いに協同的に働かなければならず、そこには30S-50S間に機能する巧妙な共役メカニズムが存在するはずである。しかし、これらの現象を明らかにするためには先に述べた従来までの生化学的手法や構造解析によるアプローチでは限界がある。生化学的手法を用いた多分子系によるアプローチではデータが平均化されてしまうために個々の分子の特性を直接捉えることは難しい。また、構造学的手法では試料を結晶化させることがほとんどのため、相互作用が時間的にどのように変化するのかを捉えるのは非常に難しい。

そこで著者らはタンパク質翻訳系を担うリボソームの翻訳初期複合体に対して光ピンセット法を用いた1分子力測定を応用し、mRNAと30Sサブユニットとの間に働く相互作用の力を各翻訳過程に対して測定することでサブユニット間に働く共役現象を直接1分子レベルで明らかにした。その結果、初期結合配列であるSD (Shine-Dalgarno) 配列部位の結合が、50S内のペプチド結合によって弱められていることがわかった。この結果は30S-50Sのサブユニット間にアロステリック相互作用があることを示しており、このことがmRNA上を移動する分子モーターとしての機能として重要なメカニズムであると考えている⁶⁾。本文では1分子力測定を用いたこのような著者の結果を光ピンセット法の手法と共に示し、今後の応用展開について展望する。

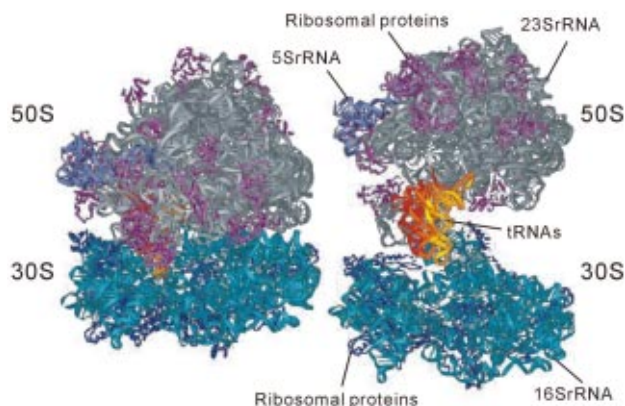


Figure 1 70S ribosome crystal structure.

The structure of the complete *Thermus thermophilus* 70S ribosome was crystallized in a complex including the 30S subunit (16S rRNA and small subunit proteins), 50S subunit (23S rRNA, 5S rRNA, and large subunit proteins), P- and E-site tRNA, and solved by x-ray crystallography to a resolution of 5.5 Å²⁾.

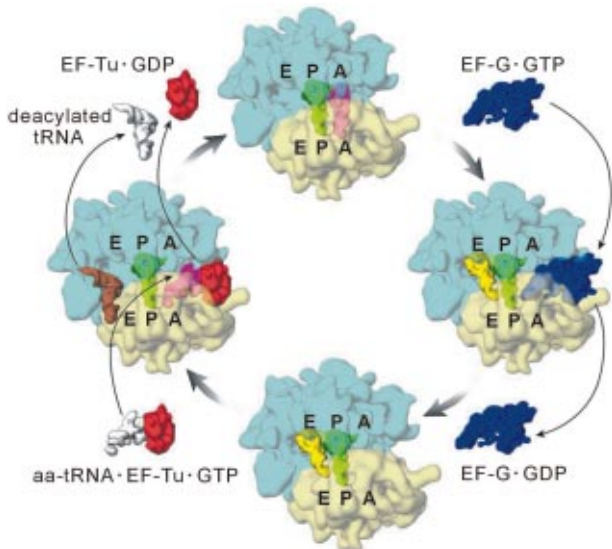


Figure 2 The elongation cycle, showing three-dimensional positions of tRNAs and elongation factors, as obtained by cryoelectron microscopy technique, overlaid on the 1.5-nm resolution map of the Escherichia coli 70S ribosome⁹⁾.

Top: tRNA positions in the pretranslational state. The aminoacyl-tRNA (pink) is present in the A site and peptidyl-tRNA (green), carrying a growing polypeptide chain, in the P site. Right: Posttranslational state. After peptide bond formation, A- (pink) and P- (green) site tRNAs have moved to P (green) and E (yellow) sites, respectively, in an EF-G-dependent translocation reaction. EF-G (purple) momentarily interacts with ribosome to facilitate the translocation reaction. Bottom: Posttranslational state with tRNAs occupying P and E sites. EF-G has been released, after GTP hydrolysis in GDP form, to vacate the overlapping binding site for the next ternary complex. Left: At this stage, a new aminoacyl-tRNA (grey, then pink) enters into the cycle in the form of a ternary complex with EF-Tu (red) and GTP, and binds to the ribosome.

2. リボソーム翻訳サイクル

リボソーム研究の初期、ペプチド結合を形成するためには最低2つのアミノアシル tRNA が必要であると考えられたため、リボソームにはアミノアシル tRNA (A 部位) とペプチジル tRNA (P 部位) の 2 つの tRNA が結合できるための結合部位は 2 つしか存在しないと考えられていたが、Exit 部位 (E 部位) の発見によって現在のスリーサイトモデルが確立されるようになった (Fig. 2)^{7,8)}。リボソームが連続的にペプチド結合を合成し続けるためには GTP 加水分解酵素である EF-Tu と伸長因子である EF-G が必要不可欠である。EF-Tu は GTP 加水分解作用によりアミノアシル tRNA を A 部位に運ぶ役割があり、EF-G は GTP 加水分解作用によって A 部位、P 部位にある 2 つの tRNA をそれぞれ P 部位と E 部位にトランスロケーションすることが知られている。その結果、リボソームは mRNA に対して 1 コドン分だけ 3' 方向へ移動することになる。このトランスロケーションによって A 部位に結合していた tRNA が P 部位へと移動するために A 部位に再び新しい tRNA が EF-Tu によって運ばれるようになる。

3. 光ピンセット法

近年、蛍光顕微鏡技術の進歩に伴い光ピンセット法が研究の進展に大きく寄与している。光ピンセット法とは Ashkin らが開発した手法⁹⁾で、大きな開口数 (N.A.) の対物レンズを用いてレーザー

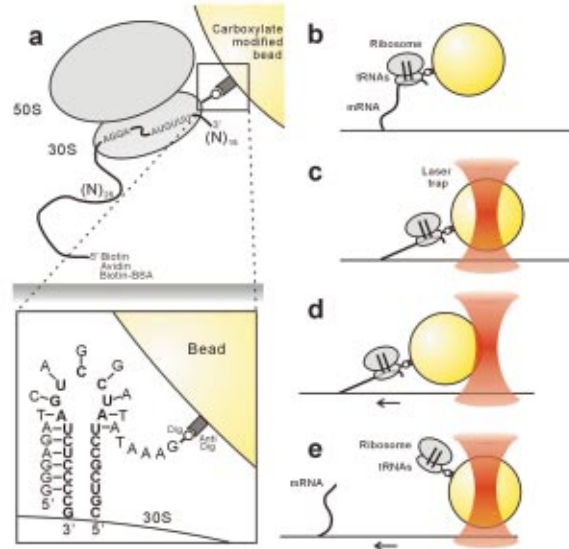


Figure 3 Experimental designs for rupture force measurements on the ribosome.

(a) The molecular attachments within the mRNA-ribosome-bead complex. Ribosomal particles were assembled on a short mRNA tethered to the surface via biotin-streptavidin linkage. A digoxigenin-modified oligonucleotide was designed to hybridize to an rRNA loop extension on the small ribosomal subunit. A bead coated with anti-digoxigenin antibody was conjugated to the oligonucleotide and used for optical trapping of the ribosomal complex. (b) The tethered ribosome-bead complex fluctuates around the point of surface attachment. (c) Optical tweezers are used to trap the bead. (d) As the stage with the attached ribosome-bead complex is moved in one direction, the force exerted on the complex increases and the bead becomes displaced. (e) Eventually the external force becomes sufficient to rupture the complex, and the bead returns to the trap center position.

光を集光することにより、直径が数十 nm から数 μm のビーズ粒子をその焦点付近に捕捉し、自由自在に操作する技術である。ビーズには捕捉中心からの変位に比例した復元力が働くことから、顕微画像解析法や四分割フォトダイオードを用いて微粒子の変位を nm 精度で計測すると、ビーズに加わる力を pN の精度で計測できる。具体的には、キネシンやミオシンなどに代表されるような ATP 加水分解によって生じる化学エネルギーを運動エネルギーに変換する分子モーター 1 分子をビーズに結合し、分子モーターの動きや発生力をビーズの動きを通して計測する。ビーズを捕捉することで、間接的だが分子モーターの変位を精度よく計測することができる。ビーズを使うもう一つの利点は、分子のブラウン運動 (熱運動) を抑えることにある。光ピンセット法で用いるレーザー光の波長は通常近赤外光である (YAG レーザーによる 1064nm など)。その理由として蛍光標識観察の邪魔になる可視領域を避けること、生体物質にダメージを与える紫外領域から遠いこと、また数 μm の赤外領域になると水分子による吸収があり温度上昇があるのでこれを避けることなどが挙げられる。

4. 光ピンセット法によるリボソーム 1 分子破断力測定

翻訳初期過程ではリボソームは mRNA 初期コドンの AUG と数塩基ほど離れた位置に存在する Shine-Dalgarno (SD) 配列と呼ばれるプリンに富んだ配列 (AGGA) を 30S 内の 16S rRNA の 3'

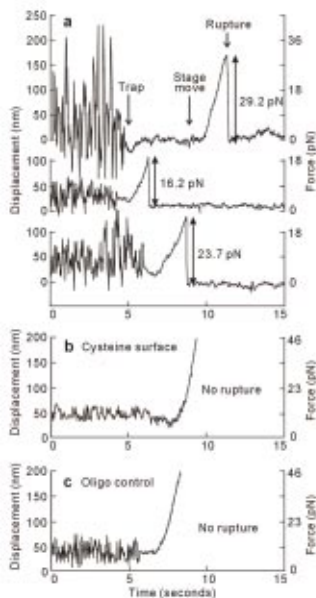


Figure 4 Examples showing the behavior of the bead.

(a) The position of tethered beads fluctuates around the tether center. Once the bead is trapped by the optical tweezers, its fluctuations become suppressed as indicated. As the bead starts to follow the stage movement, the force exerted on the complex increases. When the ribosome complex gets ruptured, the bead returns to the trapping center. (b) Control measurement for ribosomes covalently crosslinked to cysteine-reactive surface. No rupture events were observed within our measurement range. (c) Control measurement for a biotinylated RNA oligonucleotide designed to mimic the extension in the 16S rRNA. The RNA oligonucleotide was attached to streptavidin-derivatized surface and hybridized with the DNA oligonucleotide-bead conjugate. No rupture events were observed.

末端部分と相補的に結合させることが知られている^{10,11)}。しかし、翻訳が開始されるとリボソームはmRNA上を移動しなければならないため、いずれはこのSD配列における翻訳初期結合を解除しなければ移動することができないはずである。ではいつどのようにリボソームはこの結合を解除し、mRNA上の移動を可能にしているのだろうか？。そこには翻訳初期結合を解除するシグナルが存在し、タンパク質合成と関係があると予想することができる。

そこで我々は光ピンセット法を用いて1分子のリボソーム翻訳初期複合体における30SとmRNAに働く相互作用の力をペプチド結合前後で測定した。

まず、リボソームはSD配列を含んだT4gene32由来の57塩基からなるmRNAと複合体を形成させた。mRNAは5'末端がピオチン化されており、活性を保ったままガラス面上に複合体を固定させることができる。用いたリボソームの30S内16S rRNAのヘリックス44部位には23塩基の付加配列が遺伝子工学的に導入されており¹²⁾相補的な配列を持ち、3'末端にDigoxigenin抗体が付加されたオリゴDNAを用いることでリボソーム30Sをビーズ粒子と結合させた。ビーズ粒子は直径1 μ mのCarboxylateビーズを用いており、EDC (Ethyl Dimethylaminopropyl Carbodiimide)によってAnti-digoxigenin抗体と架橋され、相補オリゴを介して直接結合させた (Fig. 3a,b)。1分子のリボソーム

複合体が1つのビーズ粒子と結合しているかどうかはCy3蛍光色素でラベルしたtransfer RNA(tRNA)を結合した複合体を用いてその蛍光シグナルが1段階で退色する過程を観察することで確認することができた。

次にこの1分子力測定系を用いて破断力測定を試みた。まず、mRNAを介してガラス面上に固定されたビーズ複合体を光ピンセットで光捕捉し (Fig. 3c)、ピエゾステージを用いて一定の速度で動かし続けた (Fig. 3d)。するとビーズ複合体に負荷が徐々にかかり最終的に30SとmRNAの結合が破断し、ビーズが捕捉中心へとすばやく引き戻される (Fig. 3e)。負荷をかけ始めてから破断現象が起こるまでの時間はリボソームのmRNAからの解離時間に比べて十分速いものであるため、安定した複合体に対して測定を行っている。

Fig. 4aに破断力測定の例をいくつか示した。破断現象はmRNAからのリボソームの解離の結果起こるものと考えられる。これを証明するために、以下の予備実験を行った。はじめに、リボソームをmRNA非存在下でガラス表面に直接共有結合させ、破断力測定を試みた (Fig. 4b)。さらに30Sに遺伝子工学的に導入された付加配列と同配列をもつオリゴDNAをピオチン・アピジン結合を介してガラス面上に固定し、同様の方法でビーズ粒子と結合させ、破断力測定を試みた (Fig. 4c)。しかし、どちらの場合も結合力は強力だったので光ピンセットで破断できる範囲を超えていた。これらの結果は、rRNAに導入したオリゴDNAと相補的なオリゴとの結合が十分強いことを意味している。

もうひとつの予備実験として、破断測定後にオリゴ結合が破断していないかどうかを確認するために今回のみテトラメチルローダミン蛍光色素でラベルしたtRNAを複合体に結合させ、破断力測定後に蛍光シグナルの確認を行った。その結果、破断測定後蛍光シグナルが破断後のビーズ表面上に確認されたため、複合体がmRNAから破断していると考えられる。リボソームとビーズの結合がこの測定条件下において十分強いことが改めて明らかとなった。テトラメチルローダミン蛍光色素を用いた理由は光ピンセットで用いた1064 nmの赤外レーザーによる蛍光色素の退色の影響が比較的少ない色素であるからである。

5. 破断力分布によるペプチド結合前後の力変化と初期配列結合の影響

破断現象とはポテンシャル障壁を外力による仕事の分だけ下げた結合安定から障壁を越えると起こる。つまり、どれだけの仕事を外から加えると障壁を越えることができるのかを調べることができる。各翻訳過程では結合安定が異なると考えられるので、30SとmRNAの結合には各過程でどのような状態が存在するのかを調べることができる。注意すべき点は、この現象が確率的であるために繰り返し測定をして、統計的に議論しなければならないことである。まず、tRNA非存在下においてリボソームとmRNAの結合を調べた。リボソームはSD配列部分でmRNAと結合しているため、tRNA非存在下でも複合体は安定である。この条件で繰り返し測定を行った結果、破断力は10.6 pNをピークにもつ分布を示した (Fig. 5a)。さらに脱アミノアシル化tRNA^{Met}をP部位に結合した複合体は5pNほど強いピークを持つ破断力分布となった (Fig. 5b)。続けてアミノアシル化tRNAであるPhe-tRNA^{Phe}をA部位へと結合させるとさらに10 pNほど強い破断力 (26.5 pN)を示した (Fig. 5c)。

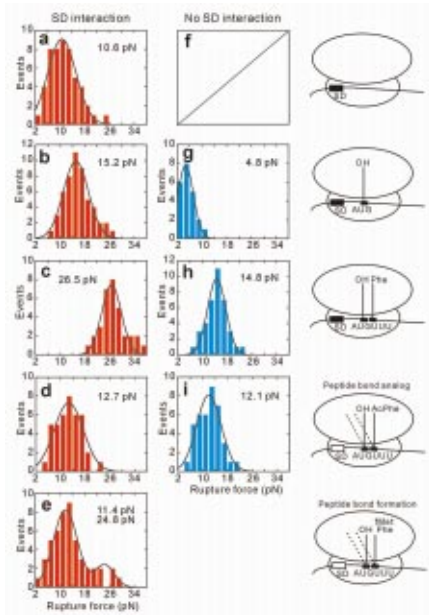


Figure 5 Rupture force distributions for ribosome complexes assembled on mRNAs containing (a-e) or lacking (f-i) the SD sequence. All complexes were assembled in 5 mM Mg²⁺. (a, f) Ribosome-mRNA complex without tRNAs. No tethered beads were observed in the absence of the SD sequence (f), indicating that the complex was too unstable for a force measurement under these conditions. (b, g) Ribosome-mRNA complex carrying deacylated tRNA^{Met} in the P site. (c, h) Ribosome-mRNA complex with tRNA^{Met} in the P site and Phe-tRNA^{Phe} in the A site. (d, i) Ribosome-mRNA complex with tRNA^{Met} in the P site and N-acetyl-Phe-tRNA^{Phe} in the A site. (e) Ribosome-mRNA complex after ribosome-catalyzed peptide bond formation. The complex was assembled with fMet-tRNA^{Met} in the P site and Phe-tRNA^{Phe} in the A site, and incubated for 20 min to allow for peptidyl transfer.

ここで tRNA がリボソームから解離した複合体に対して破断力測定を行っている可能性を否定するために、tRNA 存在下の全ての実験条件において tRNA^{fMet} は tRNA の 8 番目の U を Cy3-maleimide でラベルし、tRNA^{Phe} は 47 番目の U を Cy5-NHS でラベルした tRNA を用いた¹³。破断力測定直前に 532 nm レーザーによる励起によってその蛍光シグナルを確認することでその複合体から tRNA が解離していないことを確認した。A 部位及び P 部位にそれぞれ tRNA が結合している場合は Cy3 と Cy5 の間で FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) が観測されることを利用して、FRET シグナルを検出した複合体のみを破断力測定に用いた (Fig. 6)。

ここまでの結果から、P 部位と A 部位に同時に tRNA が結合するとリボソーム複合体はさらに mRNA との相互作用が強くなり、安定化することがわかった。次にペプチド tRNA のアナログである N-acetyl-Phe-tRNA^{Phe} を A 部位に結合した複合体に対して破断力測定を行うと、驚くべきことに 12.7 pN となり、Phe-tRNA^{Phe} を A 部位に結合した複合体の場合 (26.5 pN) と比べて著しく低い破断力を示した (Fig. 5d)。このことはペプチド結合を形成するとリボソームと mRNA の相互作用が弱くなることを示唆してい

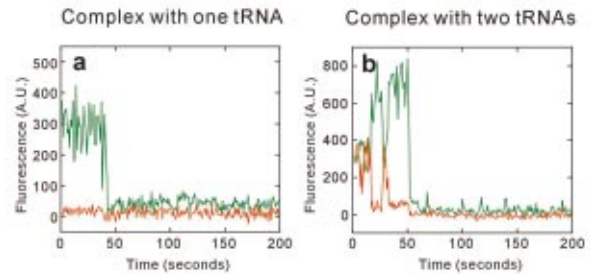


Figure 6 Verification of tRNA occupancy on ribosomal complexes using fluorescence. Ribosomal complexes were assembled on the surface and fluorescence was monitored upon 532 nm excitation just prior to force measurement. (a) Ribosomes with vacant A site, showing only fluorescence from Cy3-labeled tRNA^{Met} in the P site. Single step photobleaching of fluorescence indicates single tRNA occupancy. (b) Ribosomes showing FRET due to the presence of Cy3 labeled tRNA^{Met} in the P site and Cy5-labeled Phe-tRNA^{Phe} in the A site.

る。これをさらに確かめるために fMet-tRNA^{fMet} を P 部位、Phe-tRNA^{Phe} を A 部位に結合させ、リボソーム自身の触媒作用による fMet と Phe のペプチド結合形成を行い、同様に破断力を測定すると、11.4 pN のピークを持つ値が現れただけでなく 24.8 pN の大きな値も少数ではあるが計測された (Fig. 5e)。この少数の大きな値 (14.3%) は触媒活性の不活性が原因であると思われる。よってこの結果からペプチド結合形成がリボソームと mRNA の相互作用を不安定化していることが明らかとなった。

ここで、リボソームと mRNA の相互作用のどの部位が不安定化しているのかを突き止めるために SD 初期結合に着目した。複合体の安定化に SD 相互作用がどのように影響しているのかを調べるために、mRNA の SD 配列部分を AGGA から ACCA へと変化させ、SD 部分で相互作用しない mRNA¹⁴ を用いて破断力測定を同様に行った。tRNA 非存在下では SD 相互作用できないため、複合体は不安定となり、測定可能なビーズ複合体は観測されなかった (Fig. 5f)。一方、tRNA^{fMet} を P 部位へ結合した複合体は測定が可能となり、5 pN ほどの小さな破断力が測定された (Fig. 5g)。さらに Phe-tRNA^{Phe} を A 部位に結合させる条件で測定すると、Fig. 5c の場合と同様に 10 pN ほど強いピーク (14.8 pN) を持つ破断力分布となった (Fig. 5h)。そして N-acetyl-Phe-tRNA^{Phe} を A 部位に結合した複合体で測定すると、12.1 pN にピークを持つ破断力が測定された (Fig. 5i)。この値は Fig. 5h に比べるとやや小さい値であるが、SD 配列を含んだ mRNA を用いた場合 (Fig. 5d, 12.7 pN) とほとんど変わらない値を示した。すなわち、SD 配列を含んでいる mRNA を用いた場合と SD 配列を含んでいない mRNA を用いた場合で値が変化しないという結果はペプチド結合形成によって SD 相互作用が不安定化していることを示していることに他ならない。ペプチド結合の形成はリボソーム 50S 内 23S rRNA のペプチジルトランスフェラーゼによって行われており、SD 結合はリボソーム 30S 内 16S rRNA のアンチ SD 配列と mRNA 上の SD 配列との相互作用である。つまりこの結果は 50S 内のペプチド結合形成シグナルが何らかの構造変化を起こし、50S-30S の結合面を介して 30S の SD 相互作用を不安定にし、トランスロケーションによる mRNA 上の移動をより容易にしている

のではないかと考えられる。このようなアロステリック現象は翻訳初期段階においてリボソームがmRNA上を運動する上でとても重要な機能であると考えられる。

6. 今後の展望

以上のように翻訳初期複合体に対して1分子力学測定を応用した結果、新しい機能が明らかとなった。しかし、より詳しいリボソーム内部の構造変化を明らかにするためには負荷を加えた際の内部構造を同時に測定する技術が必要であろう。そのためには内部構造変化を捉えるためのFRET法を1分子力学測定と組み合わせることで同時測定系を構築することが求められる。さらには翻訳機能を可視化することも必要であろう。こうした技術の発展の先には翻訳機能を光ピンセットによる力で操作できるようになることが予想され、翻訳機能に関わる病気や抗生物質による翻訳阻害機構などが1分子レベルで理解されることが期待される。

参考文献

- 1) F. Bouadloun, D. Donner, and C. G. Kurland, *EMBO. J.*, **2**, 1351 (1983).
- 2) M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. Earnest, J. H. Cate, and H. F. Noller, *Science*, **292**, 883 (2001).
- 3) G. Z. Yusupova, M. M. Yusupov, J. H. Cate, and H. F. Noller, *Cell*, **106**, 233 (2001).
- 4) D. Moazed, and H. F. Noller, *Cell*, **57**, 585 (1989).
- 5) D. Moazed, and H. F. Noller, *J. Mol. Biol.*, **211**, 135 (1990).
- 6) S. Uemura, M. Dorywalska, T. H. Lee, H. D. Kim, J. D. Puglisi, and S. Chu, *Nature*, **446**, 454 (2007).
- 7) H. J. Rheinberger, H. Sternbach, and K. H. Nierhaus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 5310 (1981).
- 8) M. Valle, J. Sengupta, N. K. Swami, R. A. Grassucci, N. Burkhardt, K. H. Nierhaus, R. K. Agrawal, and J. Frank, *EMBO. J.*, **21**, 3557 (2002).
- 9) A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu, *Optics Letters*, **11**, 288 (1986).
- 10) J. Shine, and L. Dalgarno, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 1342 (1974).
- 11) R. A. Calogero, C. L. Pon, M. A. Canonaco, and C. O. Gualerzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 6427 (1988).
- 12) M. Dorywalska, S. C. Blanchard, R. L. Gonzalez, H. D. Kim, S. Chu, and J. D. Puglisi, *Nucl. Acids Res.*, **33**, 182 (2005).
- 13) B. S. Watson, T. L. Hazlett, J. F. Eccleston, C. Davis, D. M. Jameson, and A. E. Johnson, *Biochemistry*, **34**, 7904 (1995).
- 14) K. Fredrick, and H. F. Noller, *Mol. Cell.*, **9**, 1125 (2002).

[著者プロフィール]

氏名：上村想太郎 (Sotaro Uemura) 年齢：29
 所属：東京大学大学院薬学系研究科 助教
 所在地：〒133-0033 東京都文京区本郷7-3-1 東京大学薬学系総合研究棟6階
 TEL：03-5841-4761
 FAX：03-5802-3339
 E-mail：uemura@mol.f.u-tokyo.ac.jp
 出身大学：早稲田大学大学院理工学研究科
 学位：博士 (理学)
 研究テーマ：リボソームにおけるタンパク質翻訳のメカニズムの研究

学会展示のお知らせ

下記の学会にて展示を行います。
 ご来場をお待ちしております。

第37回日本免疫学会総会・学術集会
 附設展示会

日時：2007年11月20日(火)～22日(木)
 9:00～18:00(22日のみ17:00まで)

場所：グランドプリンスホテル新高輪：飛天・さくら

第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会
 合同大会
 附設展示会

日時：2007年12月11日(火)～14日(金)
 10:00～18:00

場所：パシフィコ横浜展示ホール

販売中止品のお知らせ

下記製品を販売中止とさせていただきます。
 これまでのご愛顧有り難うございました。

Drynap 500 g (コード：342-01135)
 SNAP 25 mg (コード：346-07071)
 SNAP 100 mg (コード：342-07073)

エイズから見た 感染症研究の最前線

その4 HIV 感染と宿主因子

熊本大学大学院医学薬学研究部感染防御分野 前田洋助

1. はじめに

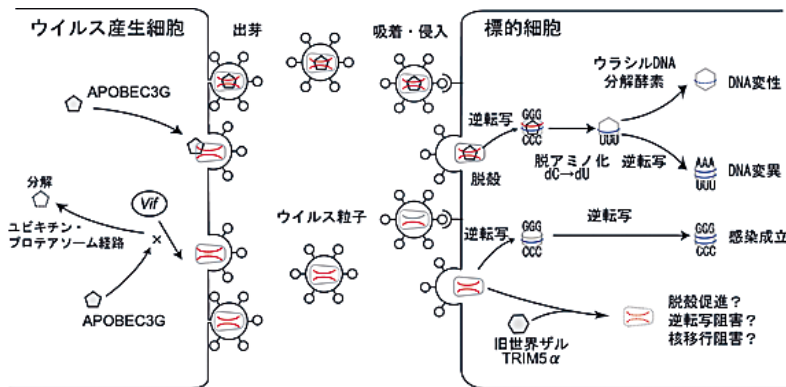
ウイルス粒子には遺伝情報としての核酸とそれを保護する脂質膜や少数の酵素などの蛋白質が存在しているだけで、それ自身のみで増殖することはできない。ウイルス複製のためには細胞内に侵入して、細胞に存在している種々の酵素などの宿主由来の成分を利用する必要があり、したがって細胞にそのような成分が備わっていない場合は子孫ウイルスを産生できない。一般に、ある特定のウイルスの種特異性や細胞指向性はこのようなウイルス複製に関連する種々のウイルス複製補助因子の有無により決定されている。HIVを含めたレトロウイルスも同様に種々の宿主因子の有無がその種特異性や細胞指向性を決定していることが明らかとなっているが、最近、レトロウイルスの増殖を制御している宿主因子として、その増殖を積極的に抑えるような因子が同定され、このようなレトロウイルス感染抵抗性因子がその種特異性を決定していることが明らかとなってきた。本稿ではこのような感染抵抗性因子としての宿主因子に焦点を絞って解説する。

2. TRIM5 α

HIVの起源はアフリカに生息しているアフリカミドリザルやアカゲザルなどの旧世界ザルに存在しているサル免疫不全ウイルス(SIV)であると考えられているが、SIVから進化したと考えられるHIVはサル由来細胞では増殖できないことが以前より報告されていた。このような種特異性は一般にそのウイルスの受容体分子の

違いによって説明されることがよく知られている。しかしサルのCD4分子もHIVの受容体であるヒトCD4分子と同様にHIVの受容体として機能することがわかり、さらにHIVのウイルス侵入の効率を上げてHIVの細胞内複製が阻害されていることが判明した。すなわちHIVの場合、サル細胞侵入後逆転写以前のレベルでその複製が阻害されていたのである。このようなウイルス複製の停止は一般的には前述のように何らかのウイルス複製に必須な細胞内に存在する宿主因子が欠如していることで説明されるが、大量のウイルス粒子で細胞を前処理しておくことで感染が成立するようになることから、ウイルス蛋白質により飽和される感染抵抗性因子の関与が示唆された。そこでSodroskiらは、アカゲザル由来cDNAライブラリーをヒト細胞に導入しHIV抵抗性を付与する遺伝子を同定した。同定した分子はRING finger, B-box, Coiled-coilと呼ばれる3つのドメインを有するTripartiteファミリーに属しており、さらにそのC末端にSPRY (B30.2)と呼ばれるドメイン構造を有する分子、TRIM5 α であった(図)。サルTRIM5 α はHIVの感染を阻害することができるが、ヒトTRIM5 α はHIVの感染を阻害することができず、種特異性を説明できる分子であることが示された。さらに種特異的感染抵抗性はそれぞれの種のSPRYドメインが決定していることが明らかとなった。

一方、以前よりカプシド蛋白質とサイクロフィリンAの結合を阻害する分子であるサイクロスポリンがHIV-1の感染を阻害することがわかっていた。これは標的細胞に存在する感染抵抗性因子から逃避するためにウイルスがそのカプシド蛋白質の立体構造をサイクロフィリンAとの結合により変化させているが、サイクロスポリンはその立体構造を感染抵抗性因子に反応できる形に戻すことによって感染を阻害していると考えられている。驚いたことに、一般的には新世界ザルはHIV-1に対して感染感受性であるが、新世界ザルの一種であるヨザルではHIV-1感染に抵抗性であることが示され、さらにサイクロスポリン添加により感染感受性が上昇してることがわかった。これはヨザルではTRIM5 α のSPRYドメインの中に、レトロトランスポゾンによってサイクロフィリン



(図) HIV-1の感染抵抗性因子 APOBEC3G・TRIM5 α

ウイルス産生細胞にVif蛋白質が存在しているとAPOBEC3Gはユビキチン・プロテアソーム経路によって分解されるが、Vif蛋白質が存在しないとウイルス粒子にAPOBEC3Gが取り込まれる。標的細胞内にウイルスが侵入・脱殻した後、ウイルスRNA(赤)から逆転写されたマイナス鎖ウイルスDNA(青)のシトシン残基がAPOBEC3Gのシチジンデアミナーゼの活性によりウラシル残基への変換を受ける。その結果プラス鎖ウイルスDNA(青)にグアニンからアデニンへの変異が導入され、アミノ酸の変異や停止コドンの出現によりウイルス蛋白質合成が阻害される。また、ウラシルに変換されたDNAはウラシルDNA分解酵素により破壊され、両者の作用によりウイルスの複製が阻害される。一方、旧世界ザルTRIM5 α はウイルス侵入後、ウイルスカプシド蛋白質と反応し、脱殻・逆転写・核移行を阻害していると考えられている。

ンA 遺伝子が持ち込まれた結果、Tripartite モチーフとサイクロフィリンAの融合蛋白質(TRIM-Cyp)が発現しており、HIV-1のカプシド蛋白質とこの融合蛋白質が直接結合することが抗ウイルス活性に重要であることがわかった。同様にアカゲザルTRIM5 α もSPRYドメインとHIV-1のカプシド蛋白質が相互作用することが抗ウイルス活性に重要であると想定されているが、直接的な結合は確認されておらず、その感染阻害機構の詳細については現時点ではよくわかっていない。またHIV-1カプシド蛋白質の一部をサイクロフィリン結合能のないSIVカプシド蛋白質に置換するとサル由来TRIM5 α によるHIV-1感染阻害を回避することができるようになることから、サイクロスポリンに関連する感染抵抗性因子としてヒトTRIM5 α が考えられたが、現時点では否定的な報告が多い。TRIM5 α 以外の感染抵抗性因子が関与しているのか、TRIM5 α と相互作用する分子が関与しているのかは現時点ではわからない。また最近、サルTRIM5 α はHIV-1の脱殻を異常に促進しているとの報告があり、脱殻という現在よくわかっていない複製過程を知るきっかけとなるかもしれない。また、ヒトのTRIM5 α はHIV-1に対してはほとんど感染阻害効果がないものの、マウスレトロウイルスの一部に対しては感染阻害効果があり、進化上何らかのレトロウイルスの侵入を防ぐために必要な因子であったのではないかと推測されている。

3. APOBEC3G

HIV-1には *vif* と呼ばれるアクセサリ遺伝子が存在しているが、この遺伝子の役割についてはよくわかっていなかった。*vif* 遺伝子欠損ウイルスでも増殖が可能な細胞と増殖できない細胞があり、増殖できない細胞ではウイルス侵入後逆転写のレベルで阻害がかかっていることが報告されていた。またこれらの感染非感受性細胞と感染感受細胞を細胞融合させてヘテロカリオンを作製してその形質をみても、感染非感受性細胞内に存在している何らかの宿主因子が *vif* 遺伝子欠損ウイルスに対して感染抵抗性を付与していることがわかった。そこでMalimらは感染非感受性細胞と感染感受性細胞の発現を比較して、感染非感受性細胞のみ発現している因子を同定したところ、この因子は核酸のシトシン残基を脱アミノ化してウラシル残基に変換するAPOBEC3Gというシチジンデアミナーゼという酵素だった。APOBEC3Gは *vif* 遺伝子欠損ウイルスではウイルス粒子内に取り込まれ、標的細胞でウイルスRNAから逆転写されたマイナス鎖DNAのシトシンを脱アミノ化してウラシルに変換することにより、結果的にプラス鎖DNAに多数のグアニンからアデニンへの変異を導入し、アミノ酸の変異や停止コドンの出現によりウイルス蛋白質合成を阻害する(図)。また同時にDNA鎖に取り込まれたウラシルDNAはウラシルDNA分解酵素により分解されると考えられている(図)。Vif蛋白質はウイルス産生細胞内でAPOBEC3Gと結合することによりユビキチン・プロテアソーム系でAPOBEC3G分解を促進し、結果としてAPOBEC3Gの粒子内取り込みを阻害し、ウイルスは細胞内で変異を起こすことなく増殖できるようになる(図)。しかしながらAPOBEC3Gの活性中心に変異を導入してシチジンデアミナーゼの活性を失活させても感染阻害がかかるとの報告や、標的細胞に存在しているAPOBEC3GがVif非依存的にウイルス複製

を阻害している報告もあり、その感染阻害メカニズムについてはまだ不明な点も多い。またAPOBEC3G以外にもAPOBEC3FやAPOBEC3Bなど他のヒトAPOBECファミリーや、ラット・マウスなどのAPOBECファミリーもHIV-1の感染を阻害することが次々と報告された。またマウスレトロウイルスなど他種のレトロウイルス感染もヒトAPOBEC3Gにより阻害できるなど、生物種とレトロウイルスの進化という観点へと拡がりを見せている。興味深いことはHIV-1のVif蛋白質はアフリカミドリザルAPOBEC3Gを中和することができない。逆にアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルス(SIVagm)のVif蛋白質はヒトのAPOBEC3Gを中和できず、その種特異性はAPOBEC3Gの128番目のアミノ酸により決定されていた。これはAPOBEC3Gがバリアーとなり他の生物種のレトロウイルス侵入を防いでいることを意味しているのかもしれない。またウイルス側も *vif* 遺伝子を獲得することにより生体の防御機構から逃れてウイルス複製を可能にしているとも考えられ、ウイルスと宿主のしのぎあいを垣間見ているのかもしれない。

4. おわりに

TRIM5 α やAPOBEC3Gは上述のように他種のレトロウイルスからの感染を防御する役割を有しており、現在ではレトロウイルスに対する宿主の自然免疫の一部として考えられるようになってきている。今後このようなレトロウイルスの感染を阻害する宿主因子が新たに分離されることが予想され、さらにはレトロウイルス以外のウイルスに対する感染抵抗性因子も分離されてくものと期待される。実際にAPOBEC3GはB型肝炎ウイルスの、TRIMファミリーの一部はヘルペスウイルスやインフルエンザウイルスなどの感染抵抗性に関与していることが報告されており、ウイルスに対する自然免疫の概念を大きく変える可能性がある。しかしながら外来性のウイルスに対してこれらの分子を宿主が本来の目的として備えているものなのか、単なる偶然なのかは議論が多い。最近APOBEC3Gがレトロトランスポゾンを抑制しているという報告があり、ウイルスに限らず細胞にとって不都合なイベントを抑制することが本来の目的なのかもしれない。またこのような感染抵抗性因子の作用機序を解析することにより新たな抗HIV-1戦略が生まれることを期待したい。



氏名：前田 洋助

所属：熊本大学大学院医学薬学研究所感染防御分野

住所：熊本市本荘 1-1-1

研究テーマ：レトロウイルスの宿主細胞への侵入機構の解明
HIVの抗HIV剤に対する耐性獲得機構の解明

Topics on Chemistry

一重項酸素の特異的検出

株式会社同仁化学研究所 永田 貴裕

活性酸素は、体内の細胞を破壊し、癌、心筋梗塞、脳血栓の原因物質として注目を集めている。呼吸により体内へ取り込まれた酸素の約3%が活性酸素になると言われており、この他にも外的要因として、ストレス、紫外線、アルコール、電磁波、排気ガスなどによっても体内で活性酸素が大量に発生することが明らかとなっている。また、これらの外的要因の殆どは、現代社会特有の環境によるものであり、現代人にとって活性酸素は、大きな病的要因の一つとして注目されている。

活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) には、スーパーオキシド、一重項酸素、ヒドロキシラジカル、過酸化水素があるが、これら特定の活性酸素種の特異的検出に関しては問題がある。なぜなら活性酸素の反応は多様であり、それぞれの活性酸素に独特の反応特性や基質特異性を持つと同時に共通の反応性を示すことも多く、個々の活性酸素を特異的に検出する試薬の設計は非常に難しい。そのため、反応種の特定には検出試薬を活性酸素阻害剤、例えばスーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase: SOD) やカタラーゼなどの酵素と共に使用した間接検出法が一般的に使用されている。

これら活性酸素は、生体内で微量に生成し、かつ寿命が短いため、直接的検出を行うには、高感度かつ高い反応性を有する検出試薬が求められる。活性酸素の中で紫外線により生じ、特に酸化力が強い一重項酸素($^1\text{O}_2$)は、皮膚傷害や老化の加速を引き起こすと言われている。今回はこの一重項酸素($^1\text{O}_2$)を特異的に検出できるプローブについて紹介する。

$^1\text{O}_2$ 蛍光プローブの代表例として挙げられるDCFH¹⁾は、ROS間の種特異性に乏しく、また励起光を照射するだけで蛍光が増大してしまうなど、多くの問題点を抱えている。Naganoらは、ene反応によるアントラセン類の電子密度変化を利用した $^1\text{O}_2$ 特異的な検出蛍光プローブDMAX(Fig.1)を開発した²⁾。DMAXの一重項酸素に対する反応速度は、 $2.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であり、寿命の短い $^1\text{O}_2$ を測定するのに適したプローブであるといえる。また、他のROSに対しても殆ど反応性を示さないことから、特異的 $^1\text{O}_2$ 検出試薬であるといえる。

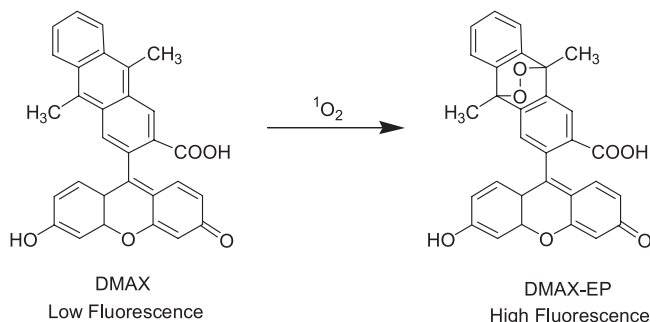


Fig.1 DMAXの構造

一方、Bo Songらにより開発されたATTA-Eu³⁺(Fig. 2)は、ユロピウム錯体を構造中にもつ $^1\text{O}_2$ 特異的なプローブである³⁾。検出感度は、2.8 nMと非常に高く、反応速度は、 $2.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となった。さらにBo Songらは、ATTA構造にメチル基をつけたMTTA-Eu³⁺(Fig. 3)を合成したところ、検出感度は、3.8 nMと劣るが反応速度は約18倍増加した⁴⁾。これは、寿命の短い一重項酸素を測定する上で非常に優れた結果となり、高感度な $^1\text{O}_2$ 検出が期待される。また、*in vitro*での実験においても、細胞内 $^1\text{O}_2$ 濃度依存的に蛍光強度が増加することが確認された。

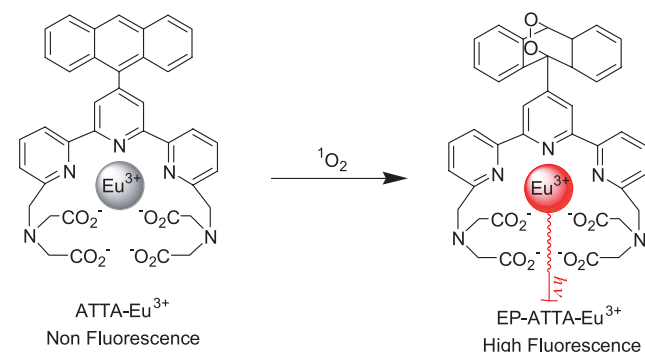


Fig. 2 ATTA-Eu³⁺の構造

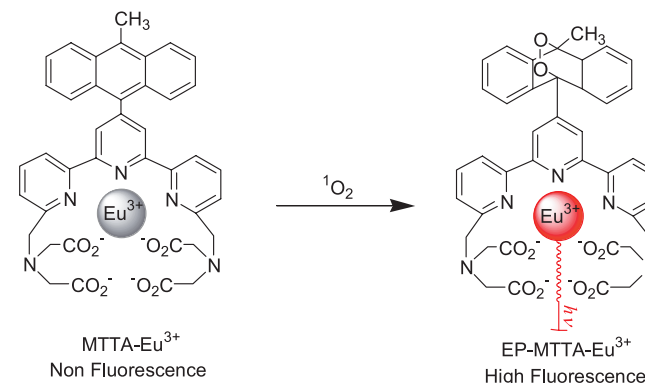


Fig. 3 MTTA-Eu³⁺の構造

これまで、寿命が短く測定が困難とされてきた活性酸素種であるが、有用な検出プローブの開発により、活性酸素により引き起こされる病気の診断、さらには酸化ストレスに対する薬剤開発への利用が期待される。

- 1) LeBel, C. P., Ishchiroopoulos, H. & Bondy, *Chem. Res. Toxicol.*, **1992**, 5, 227–231.
- 2) Naoki Umezawa, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 2530-2536.
- 3) Bo Song, Guilan Wang and Jingli Yuan, *Chem. Commun.*, **2005**, 3553 – 3555.
- 4) Bo Song, Guilan Wang, Mingqian Tan and Jingli Yuan, *J. Am. chem. Soc.*, **2006**, 128, 13442-13450.

新製品

開発元 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

蛍光ラベル化キット

HiLyte Fluor™ 750 Labeling Kit – NH₂

HiLyte Fluor™ 750 Labeling Kit – NH₂ は、抗体など分子量 50,000以上でアミノ基を有する少量のタンパク質を蛍光標識するためのキットです。本キットは、簡便な操作性、高い回収率、高い再現性などの特長を持っています。現在小社で販売しております 488 nm 励起の Fluorescein、より長波長の 550 nm、650 nm 付近で励起可能な HiLyte Fluor™ 色素と比較して、更に長波長の近赤外光で励起されるため、免疫染色などのアッセイにおいてバックグラウンドでの観察が可能となります(図1)。

標識タンパク質量は1サンプルあたり 50-200 µg です。わずか 2 時間で HiLyte Fluor™ 750 標識タンパク質を得ることができ、得られた標識体はそのまま免疫染色などの様々な用途に利用することができます。

HiLyte Fluor™ 色素は米 AnaSpec 社が開発した蛍光色素です。HiLyte Fluor™ 750 は Alexa Fluor® 750 や Cy7 と類似した蛍光特性を示します。蛍光強度は Alexa Fluor® 750 や Cy7 より強く、トランスイルミネーターにて UV 照射し続けた場合の蛍光強度の減少(退色)の程度は Alexa Fluor® 750 と同等です(図2、3)。

HiLyte Fluor™ は AnaSpec 社の商標です。
Alexa Fluor® はインビトロジェン株式会社の登録商標です。

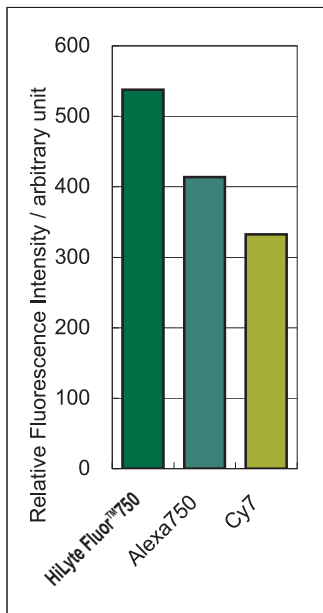


図2. 色素の蛍光強度比較

<キット内容>

- NH₂-Reactive HiLyte Fluor™ 750 3 本
- WS Buffer 4 ml × 1 本
- Reaction Buffer 500 µl × 1 本
- Filtration Tube 3 本

<特長>

- 約 2 時間で標識体が調製できる。
- 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。
- 付属の保存溶液で標識体の長期保存ができる。

<本キット以外に必要なもの>

- 10 µl, 200 µl マイクロピペッター
- インキュベーター(37)
- マイクロチューブ (標識体保存用)
- 遠心機 (マイクロチューブ用)
- DMSO

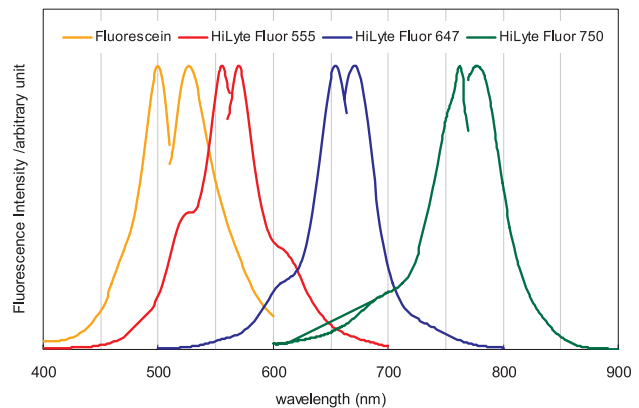


図1. HiLyte Fluor™ 750 標識抗体の励起・蛍光スペクトル

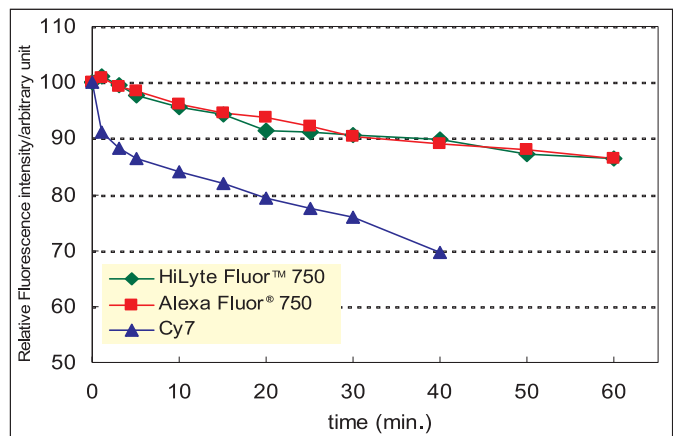


図3. 各色素をトランスイルミネーターにて UV 照射した場合の蛍光強度変化

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
HiLyte Fluor™ 750 Labeling Kit – NH ₂	3 samples	28,000	LK16

関連製品

今回ご紹介しております製品以外にもタンパク質標識キットシリーズとして、下記の製品を販売いたしております。用途にあわせてご使用ください。

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Fluorescein Labeling Kit - NH ₂	3 samples	21,000	LK01
Biotin Labeling Kit - NH ₂	3 samples	12,000	LK03
Peroxidase Labeling Kit - SH	3 samples	17,000	LK09
Biotin Labeling Kit - SH	3 samples	12,000	LK10
Peroxidase Labeling Kit - NH ₂	3 samples	17,000	LK11
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH ₂	3 samples	21,000	LK12
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - SH	3 samples	21,000	LK13
HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH ₂	3 samples	21,000	LK14
HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH ₂	3 samples	21,000	LK15
Allophycocyanin Labeling Kit - NH ₂	3 samples	43,000	LK21
B-Phycoerythrin Labeling Kit - NH ₂	3 samples	43,000	LK22
R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH ₂	3 samples	43,000	LK23
Allophycocyanin Labeling Kit - SH	3 samples	38,000	LK24
B-Phycoerythrin Labeling Kit - SH	3 samples	38,000	LK25
R-Phycoerythrin Labeling Kit - SH	3 samples	38,000	LK26

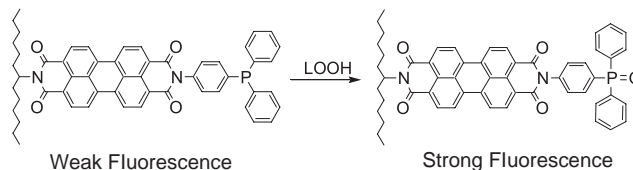
* 製品によっては、大容量(1mg 標識用)タイプもご用意いたしております。詳しくは、小社マーケティングまでお問い合わせください。(フリーダイヤル:0120-489548)
Dojindo Labeling Kits データ集もございます。
ご希望の方は、ご請求下さい。

九州大学 - 同仁化学組織対応型連携に関するお知らせ

九州大学と小社は、九州大学での優れた研究成果を迅速に実用化することを目的に組織対応型(包括的)連携契約を締結しております。下記の技術に関して現在実用化を検討しております。これらにご興味ございましたら小社までお問い合わせ下さい。

No.002 過酸化脂質計測用蛍光試薬

九州大学の宗らは、新規の過酸化脂質蛍光検出試薬として spy-HP (swallow-tailed perylene derivative for hydroperoxide) を開発した。spy-HP はトリフェニルホスフィンに蛍光基であるペリレン類を連結した構造であり、また脂質への親和性を向上するためアルキル鎖を有している。spy-HP に脂溶性過酸化物である *m*-chloroperoxybenzoic acid (MCPBA) を添加すると、ホスフィンオキシド体の形成に伴い蛍光が大きく増強することが確認された。本化合物の蛍光波長は十分に長く ($\lambda_{ex} = 524 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$ in methanol)。DPPP のような短波長励起が必要な従来の過酸化脂質計測用蛍光試薬で問題となる生体試料由来の自家蛍光の影響や生細胞へのダメージを大きく軽減できる。また本化合物の反応体(ホスフィンオキシド体)の蛍光量子収率は極めて高くなっている (~1 in methanol)。このように本試薬は、過酸化脂質計測用蛍光試薬として非常に優れた特徴を有している。



N. Soh, T. Ariyoshi, T. Fukaminato, K. Nakano, M. Irie, T. Imato, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16(11), 2943-6

No.007 Protein kinase C eta (η)の特異的基質ペプチド

セリン/スレオニンキナーゼである Protein kinase C (PKC) には12種類のサブファミリーが存在しており、各サブファミリーによる細胞内作用は異なる。Protein kinase C eta は最近グリオーマ(脳腫瘍)のターゲットシグナルとして注目されているが、リン酸化研究に利用可能な基質ペプチドは開発されていない。

九州大学では、10種類の Protein kinase C (alpha, beta, gamma, delta, theta, epsilon, iota, lambda および zeta) にはリン酸化されず、Protein kinase C eta にのみリン酸化される基質ペプチドの開発に成功した (Protein kinase C eta 10 ng/ μ l 濃度で 90% 以上リン酸化)。今後、診断および治療用基質ペプチドとして、また、各種研究用基質ペプチドとしての利用が期待される。

No.008 Rho-kinase に特異的リン酸化される基質ペプチド

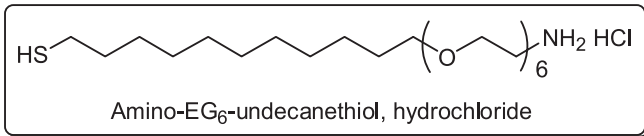
セリン/スレオニンキナーゼである PKA、PKC および Rho-kinase は RXS/T または RXXS/T という同じリン酸化基質モチーフを有するので、細胞内リン酸化研究のためには特異性を持つ基質ペプチドの開発は必要不可欠なことである。

九州大学では、血管疾病に深く関与している Rho-kinase に特異的にリン酸化される2種類の基質ペプチドを開発した。Rho-kinase に対する基質ペプチドの K_m (mM) と k_{cat} (min^{-1}) は A 基質の場合 0.29 と 6.48、B 基質の場合 0.38 と 20.9 であった。

新製品

Self Assembled Monolayer 研究用

Amino-EG₆-undecanethiol, hydrochloride



< 特長 >

- 非特異的吸着の少ないSAMを形成できる
- 蛋白質、DNAなど様々な物質をSAM上に固定化できる

固体表面に種々の分子を配向・集積させる方法の一つである自己組織化法は、簡便に高密度・高配向な自己組織化単分子膜(Self Assembled Monolayers: SAMs)を構築することができるため、研究・応用が活発に行われています。特に、末端にチオールを有する化合物は金表面と反応してAu-S結合し、安定なSAMsを形成することから汎用されています。

SAMsの性質は、そのアルキル鎖長や末端の官能基、主鎖の親水性などにより変化し、多彩な機能を固体表面に導入することが可能であり、表面プラズモン共鳴(SPR)や水晶振動子マイクロバランス(QCM)など、金属板を利用するセンサーに広く用いられております。

SPRやQCMを用いた測定においては、特異的吸着と非特異的吸着を区別することが困難であるため、非特異的吸着を抑制することが重要となります。

近年、蛋白質等の表面固定化にオリゴエチレングリコールを導入したSAMs試薬が頻繁に用いられています。オリゴエチレングリコールには蛋白質や細胞をはじめとする生体分子の吸着を抑制する効果があるため、Whitesidesをはじめ様々な研究者により、その効果が実証されております¹⁻³⁾。

上記のAmino-EG₆-undecanethiol, hydrochlorideはエチレングリコール部位と末端にアミノ基を有しており、カルボキシル基を持つタンパク質、ペプチド、リガンド等を導入する際に有用です。

末端アミノ基を有するSAMsの使用例としては、二価性試薬であるSSMCCを用いて末端をマレイミド基に変換し、チオールを導入したDNAを固定化することによりDNA arrayを構築でき、SPRを用いたタンパク-DNA間相互作用のイメージングなどが可能となります⁴⁾。

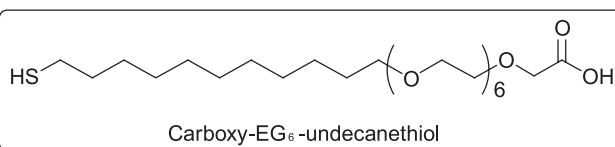
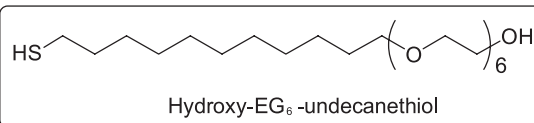
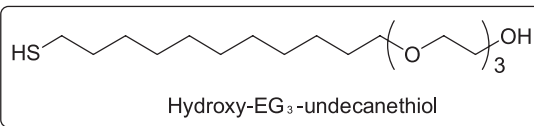
また、活性エステル化したBiotinを導入することで、Avidinとの親和性を利用した生体物質の固定化や、金ナノ粒子の表面修飾及びバイオセンシングへの応用が期待されます⁵⁾。

小社のSAM試薬は高純度であり、単分子膜形成を阻害する可能性が有る不純物をほとんど含んでいません。

参考文献

- 1) C. Pale-Grosdemange, E. S. Simon, K. L. Prime and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 777-790.
- 2) M. Kyo, K. Usui-Aoki, H. Koga, *Anal. Chem.*, **2005**, *77*, 7115-7121.
- 3) G. B. Sigal, M. Mrksich and G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 3464-3473.
- 4) Y. Li, H. J. Lee and R. M. Corn, *Nucl. Acids Res.* **2006**, *34*, 6416-6424.
- 5) 三浦 佳子, 米澤 徹, *Dojin News*, **2005**, *113*, 1-8.

関連製品



品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Hydroxy-EG ₃ -undecanethiol	10 mg	14,400	H354
	100 mg	36,000	H354
Hydroxy-EG ₆ -undecanethiol	10 mg	18,000	H355
	100 mg	38,800	H355
Carboxy-EG ₆ -undecanethiol	10 mg	24,000	C445
	100 mg	60,000	C445

上記以外にも、オリゴエチレングリコールを導入していないタイプとして

- Amine type
- Carboxyl type
- Carboxy disulfide type
- NHS ester type
- Ferrocenyl type
- N-Fmoc-Amino type
- Hydroxyl type
- NTA type

をご用意いたしております。

詳しくは、小社カタログ、HPにてご覧ください。

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Amino-EG ₆ -undecanethiol, hydrochloride	10 mg	38,000	A483

開発予定品

アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 活性測定キット

ACE Assay Kit (仮)

本キットはアンジオテンシン変換酵素 (ACE) の阻害活性を測定するためのキットです。アンジオテンシン変換酵素 (ACE) は、血圧調節メカニズムの一つであるレニン - アンジオテンシン系 (図1) において、アンジオテンシン から昇圧作用を有するアンジオテンシン I を生成します。また同時に降圧ペプチドであるブラジキニンを分解するなど、血圧上昇に大きく関係している酵素です。昨今、我が国では高血圧などの生活習慣病が社会問題となっており、ACE 阻害物質を含む機能食品 (特定保健用食品) が多く販売されるなど、生活習慣病の予防が大きな課題として注目を集めています。

従来の ACE 阻害活性測定法は、合成基質 Hippuryl-His-Leu (HHL) から切り出されてくる馬尿酸を酢酸エチルで溶媒抽出後、濃縮乾固し、再溶解して 228 nm の吸光度を測定するという煩雑な方法でした。本キットは、新規合成基質である 3-Hydroxybutyrylglycyl-glycyl-glycine (3HB-GGG) と種々の酵素を組み合わせることで、酢酸エチルのような有機溶媒を使用することなく、多くのサンプルを簡便に測定することが可能です。

3HB-GGG は、ACE により 3-Hydroxybutyrylglycine (3HB-G) と Glycyl-glycine (GG) に分解されます。更に Aminoacylase で処理することにより、3-Hydroxybutyric acid (3HB) が生成されます。3HB は D-3-Hydroxybutyrate dehydrogenase (3HBDH) により Acetoacetic acid (AA) に変換され、その際 NADH が生成されます。生成された NADH は電子メディエーターを介して水溶性の還元発色試薬である WST-1 を還元し、橙色の WST-1 ホルマザンを生成します。WST-1 ホルマザンの吸光度 (450 nm) を測定することにより、迅速・簡便に ACE 活性を測定することができます。

< 特長 >

- 96 穴マイクロプレートアッセイ対応。一度に多検体を測定できる (分光光度計での測定も可能)
- 有害な有機溶媒を使用しない。

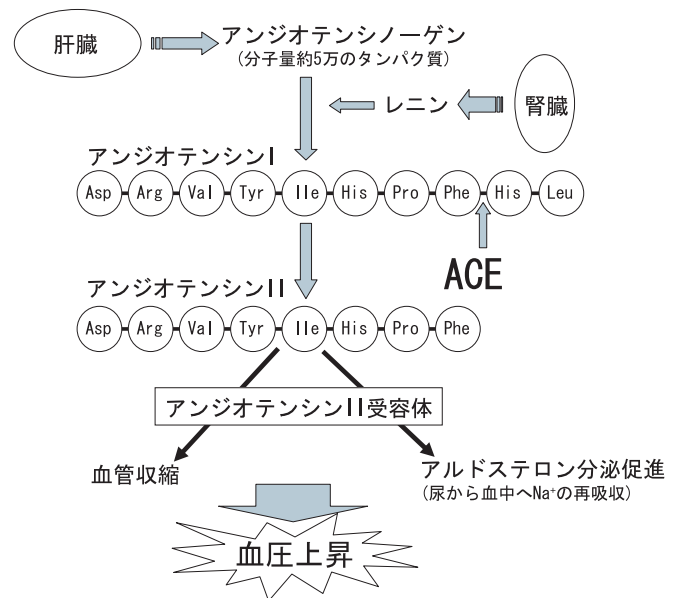
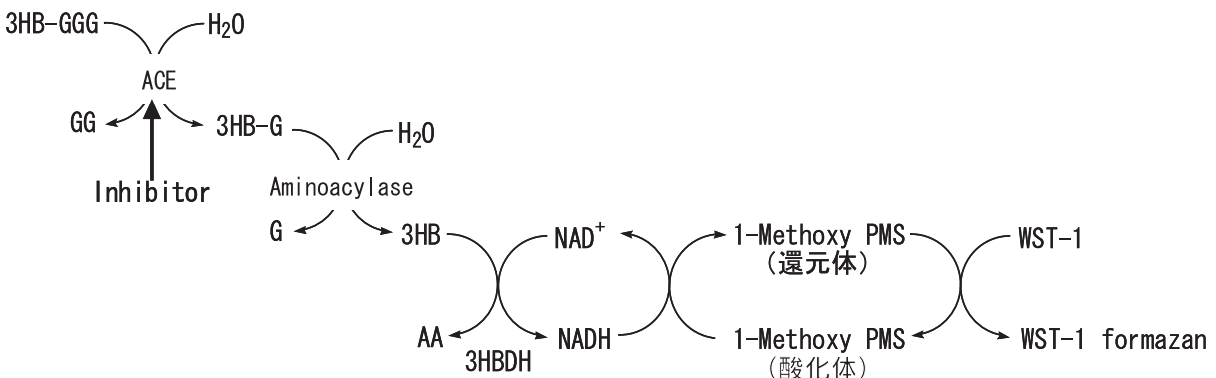


図1. 血圧調節メカニズム (レニン-アンジオテンシン系)

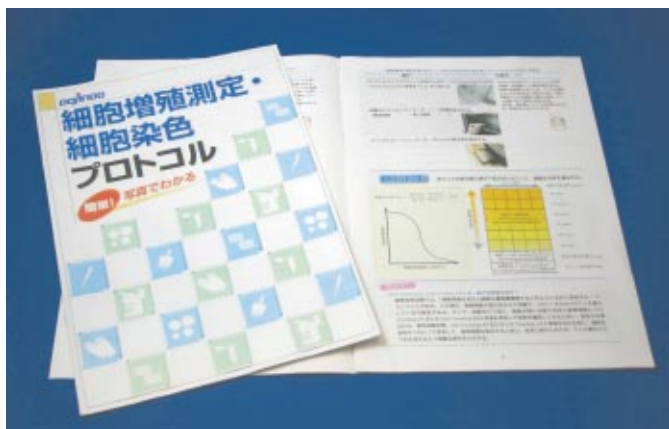
< 測定原理 >



お知らせ

パンフレットのお知らせ

「細胞増殖測定・細胞染色 プロトコル」ができました。



この度、弊社製品を用いた細胞増殖および毒性測定、細胞染色用のプロトコルを作成いたしました。

各製品の特徴や写真入り操作方法を盛り込み、初心者の方にも分かりやすく工夫しております。

また、皆様からのQ&Aやトラブルシューティングなどもまとめておりますので、是非ご覧下さい。

今後も、皆様のご研究により役立つ情報をご提供して参ります。ご意見・ご希望をお待ちしております。

カタログのご請求は、小社マーケティング部までご依頼ください。

URL: <http://www.dojindo.co.jp/catalog/index.html>

Tel:0120-489548

商品毎のパンフレットをご用意いたしております。

Labeling Kitにはどんなものがあるの？ SAMs 試薬ってどういう風に使い分けるの？

細胞が染まった写真を実際に見てみたいんだけど.....といったご要望に対応できるようにパンフレットをご用意いたしております。是非ご請求下さい。

- ・ Dojindo Labeling Kits データ集
- ・ -Cellstain-細胞染色用色素
- ・ 自己組織化単分子膜研究用試薬 (SAMs 試薬)
- ・ 膜タンパク質可溶化剤
- ・ Reagents for Cell Biology
- ・ 分子生物学関連試薬
- ・ タンパク質定量キット

ご請求は小社マーケティング部までご依頼下さい。

URL: <http://www.dojindo.co.jp/catalog/index.html>

Tel:0120-489548

商品に関するお問合せは、小社カスタマーサービス部にて承っております。お気軽にお問合せください。

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



開催のご案内

18th フォーラム・イン・ドージン

感染症をめぐる宿主の応答と微生物の戦略

日 時 / 2007年11月30日(金) 9:30-17:30 (開場 9:00) 参加費 / 無料
 場 所 / 鶴屋ホール(テトリア熊本[鶴屋東館]7F・熊本市手取本町6-1) 定員 / 200名
 代表世話人 / 山本 哲郎 (熊本大学大学院医学薬学研究部 分子病理学分野)
 当番世話人 / 中西 義信 (金沢大学大学院医学系研究科 生体防御応答学分野)
 住本 英樹 (九州大学生体防御医学研究所 増殖分化制御学分野)
 主 催 / 株式会社 同仁化学研究所 後 援 / 株式会社 ケミカル同仁

講演プログラム

9:30-9:35 主催者挨拶 / 野田 栄二 株式会社 同仁化学研究所
 9:35-9:45 世話人挨拶 / 山本 哲郎
 < Overview > 9:45-9:55 中西 義信 「宿主と微生物の攻防」
 Session 1 : 感染症の理解に向けた新しい取り組み <座長: 山本 哲郎 >
 9:55-10:35 鎮西 康雄 三重大学大学院医学系研究科 病態解明医学講座
 「マラリア原虫の宿主感染因子の同定」
 10:35-11:15 黒川 健児 東京大学大学院薬学系研究科 微生物薬品化学教室
 「細菌の形成に関わる遺伝子群の同定」
 11:15-11:55 嘉糠 洋陸 帯広畜産大学原虫病研究センター 原虫進化生物学研究分野
 「モデル生物から眺める感染抵抗性」
 11:55-13:15 <休憩: ランチョンセミナー(同仁化学製品紹介 12:05-12:35) >
 Session 2 : 自然免疫応答の仕組み - <座長: 住本 英樹 >
 13:15-13:55 Bok-Luel Lee National Research Laboratory of Defense Proteins,
 College of Pharmacy, Pusan National University
 「ペプチドグリカンと グルカンの認識」
 13:55-14:35 福井 宣規 九州大学生体防御医学研究所 免疫遺伝学分野
 「免疫系細胞高次機能を司る CDM ファミリー分子 DOCK2」
 14:35-15:15 佐々木 雄彦 秋田大学医学部 病理病態医学講座
 「細胞内リン脂質による好中球遊走の制御」
 15:15-15:30 <コーヒーブレイク >
 Session 3 : 自然免疫応答の仕組み - <座長: 中西 義信 >
 15:30-16:10 住本 英樹 九州大学生体防御医学研究所 増殖分化制御学分野
 「好中球におけるファゴソーム内での殺菌機構」
 16:10-16:50 白土 明子 金沢大学大学院医学系研究科 生体防御応答学分野
 「細菌による免疫機構の乗っ取り: TLR2 を介した黄色ブドウ球菌のマクロファージ内での生存」
 <総合討論 > 16:50-17:20 司会: 住本 英樹・中西 義信
 17:20-17:30 閉会の挨拶 / 当番世話人
 17:35-19:00 ミキサー・自由討論

問い合わせ・参加申し込み先:

熊本県上益城郡益城町田原 2025-5(株)同仁化学研究所内

フォーラム・イン・ドージン事務局(担当: 蒲野)

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

講演終了後、ミキサー(無料)を同会場にて予定いたしております。

参加ご希望の方は、所属・氏名・連絡先(住所, TEL, FAX, E-mail)をご記入の上、E-mail または FAX にてお申し込みください。

駐車場は有料となりますので(聴講による優待はございません)、できるだけ公共の交通機関をご利用ください。

ランチョンセミナー(無料)は当日の朝、受付時の先着順とさせていただきます。

ホームページアドレス

URL : <http://www.dojindo.co.jp/>

E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス 0120-021557

フリーダイヤル 0120-489548