

2012
No.144

ISSN 0385-1516



CONTENTS

●Review

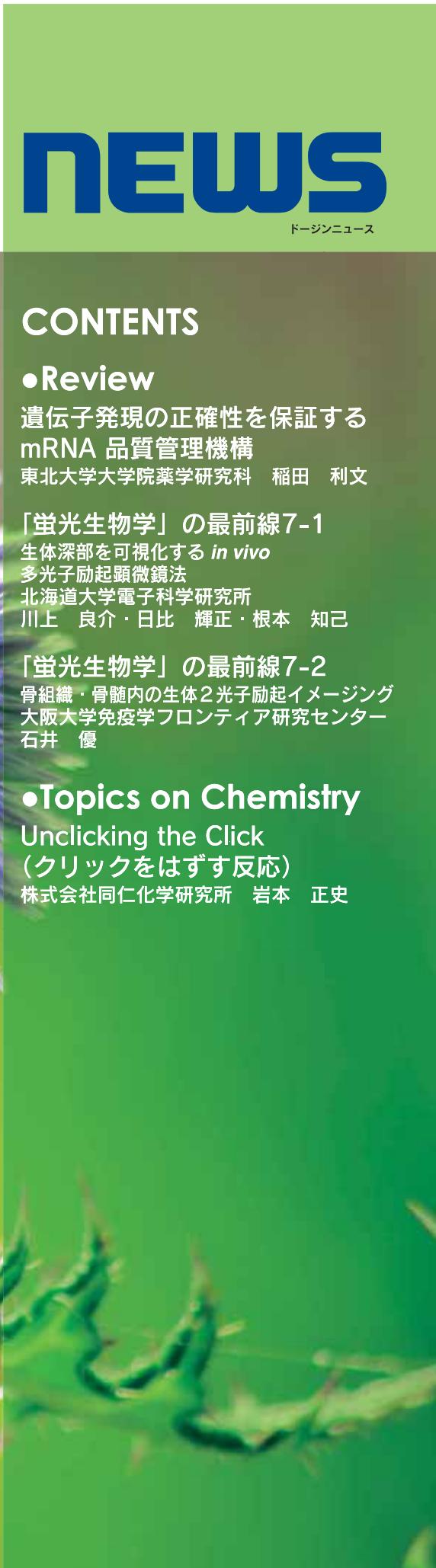
遺伝子発現の正確性を保証する
mRNA 品質管理機構
東北大大学院薬学研究科 稲田 利文

「蛍光生物学」の最前線7-1
生体深部を可視化する *in vivo*
多光子励起顕微鏡法
北海道大学電子科学研究所
川上 良介・日比 輝正・根本 知己

「蛍光生物学」の最前線7-2
骨組織・骨髄内の生体2光子励起イメージング
大阪大学免疫学フロンティア研究センター
石井 優

●Topics on Chemistry

Unclicking the Click
(クリックをはずす反応)
株式会社同仁化学研究所 岩本 正史





CONTENTS

Review

遺伝子発現の正確性を保証する mRNA 品質管理機構 • [1]

東北大大学院薬学研究科

稻田 利文

「蛍光生物学」の最前線 7-1

生体深部を可視化する *in vivo* 多光子励起顕微鏡法 • [6]

北海道大学電子科学研究所

川上 良介・日比 輝正・根本 知己

「蛍光生物学」の最前線 7-2

骨組織・骨髄内の生体2光子励起イメージング • [10]

大阪大学免疫学フロンティア研究センター

石井 優

Topics on Chemistry

Unclicking the Click (クリックをはずす反応) • [14]

株式会社同仁化学研究所 岩本 正史

Commercial

新製品

細胞内カルシウムイオン測定用キット • [15]

Calcium Kit II - iCellux

自己組織化单分子膜作製用試薬 • [16]

アルキルホスホン酸誘導体

お知らせ

パンフレットのお知らせ • [5]

Good's Buffer ポスターのお知らせ • [13]

フォーラム・イン・ドージン開催 • [18]

新製品案内

細胞内カルシウムイオン測定用キット

品名 容量

Calcium Kit II - iCellux 10 plates

希望納入価格(¥) メーカーコード

58,000 CS34

自己組織化单分子膜作製用試薬

-アルキルホスホン酸誘導体-

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
----	----	-----------	---------

10-CDPA	10 mg	11,000	C490
	100 mg	30,000	

FHPA	10 mg	9,800	F340
	100 mg	28,000	

FOPA	10 mg	9,800	F329
	100 mg	28,000	

FDPA	10 mg	13,000	F330
	100 mg	36,000	

M-EG ₃ -UPA	10 mg	13,800	M457
	100 mg	38,200	

11-NUPA	10 mg	11,000	N468
	100 mg	30,000	

11-HUPA	10 mg	11,000	H399
	100 mg	30,000	

ODPA	10 mg	11,000	O407
	100 mg	30,000	

11-PIUPA	10 mg	11,000	P463
	100 mg	30,000	

遺伝子発現の正確性を保証する mRNA 品質管理機構

mRNA quality control systems to ensure the accuracy in gene expression



稻田 利文

東北大学大学院薬学研究科

要旨

The quality of mRNA is recognized by ribosome to express genetic information precisely, and aberrant translation termination triggers specific mRNA decay systems. An aberrant mRNA lacking a termination codon (nonstop mRNA) is produced mainly by polyadenylation within an ORF but is rapidly degraded by a quality control system designated as non-stop decay (NSD). We have demonstrated that the synthesis of polylysine by translation of the poly(A) sequence leads to translation arrest, and the level of the product of nonstop mRNA is reduced 100-fold by rapid mRNA degradation, translation repression and protein destabilization by the proteasome. NSD releases a ribosome stalled at the 3' end of mRNA and stimulates the exosome to rapidly degrade the transcript. We found that Dom34:Hbs1 stimulates the decay of endogenous nonstop mRNAs from the 3' end by the exosome, and is required for the complete degradation of decay intermediates of nonstop mRNA.

No-go decay (NGD) detects a ribosome blocked in translational elongation, and the mRNA is then endonucleolytically cleaved in the vicinity of the stalled site. The resulting mRNAs, with free 3' or 5' termini (5'-NGD intermediate and 3'-NGD intermediate), are further degraded by the exosome or Xrn1 exoribonuclease respectively. We also found that Dom34:Hbs1 complex dissociates the subunits of a ribosome that is stalled at the 3' ends of a 5'-NGD intermediate and stimulates its degradation by Exosome. We propose that Dom34:Hbs1 stimulates degradation of nonstop mRNAs and 5'-NGD intermediates by dissociating ribosomes that are stalled at the 3' end of the mRNAs, which makes the released mRNA more vulnerable to nucleolytic attack, and that Dom34:Hbs1 plays crucial roles in both NSD and NGD.

キーワード mRNA品質管理、異常mRNA分解、翻訳、リボソーム、プロテアソーム、ナンセンス変異

1. はじめに

遺伝子産物の多様性を獲得することは、個体を形成する多種多様な細胞機能を獲得するために極めて重要な分子基盤である。限られた数の遺伝子からその数十倍もの遺伝子産物を生み出す最も重要な制御機構の1つは選択的スプライシングであり、1つの前駆体 mRNA から多くの成熟型 mRNA を产生する機構である。一方で、選択的スプライシングの過程においては、高頻度でエラーが起る結果、異常 mRNA が合成される。この様な異常 mRNA は、細胞の保持する品質管理機構によって認識され排除される。従って、通常の条件下で発現している mRNA は、様々な mRNA 品質管理機構による「認証」を受けたものであると考えることができる。mRNA 段階での多様性獲得機構は mRNA 品質管理機構を前提として成立しており、遺伝子発現制御の理解には mRNA 品質管理の分子機構の理解が不可欠である。

近年、真核生物における mRNA 品質管理機構の研究が進展し、新たな制御機構が発見されてきた¹⁾。現在までに、真核生物における mRNA 品質管理機構として、①本来の位置より上流に終止コ

ドンを持つ mRNA を特異的に認識するナンセンス変異依存分解系 (NMD)、②終止コドンを持たないノンストップ mRNA を特異的に認識するノンストップ依存分解系 (NSD)、③翻訳伸長反応が阻害される配列を持った mRNA を特異的に認識する翻訳伸長阻害依存分解系 (NGD) 等が知られている¹⁾。これらの品質管理機構に必須な因子の多くは細胞増殖に必須であり、遺伝子破壊マウス（ノックアウトマウス）は多くの因子について胎生致死となる。また、生殖細胞の分化や維持や神経活動に重要な mRNA 品質管理因子も知られており、標的 mRNA の同定を進めることによって、品質管理因子による発現制御の生理的意義がより明確になることが期待される。

筆者らは、mRNA の分解促進に加えて、翻訳抑制と異常タンパク質の分解が異常 mRNA 由来の異常タンパク質の発現抑制に重要であることを明らかにしてきた²⁻⁶⁾。この異常タンパク質の分解は異常 mRNA 由来の異常タンパク質の発現抑制機構として重要であるのみならず、翻訳に共役した新生ポリペプチド鎖の ubiquitination という点でも新しい分子機構である。本稿では、筆者ら

の研究成果を中心に、mRNA品質管理の分子機構解析の現状について紹介する。

2. 原核生物におけるノンストップ mRNA 品質管理機構 – tmRNAによるトランス翻訳 –

終止コドンの位置が異常であるmRNAとして、最も極端なケースは終止コドン自体を含まないノンストップmRNAである。この異常なノンストップmRNAの品質管理機構は、原核生物である大腸菌で最初に発見された⁷⁾。Sauer博士らは、ヒト Interleukin-6(IL6)タンパク質を大腸菌で過剰生産させ精製を行った。その結果、大部分は全長のサイズのタンパク質であったが、わずかに短いタンパク質も精製された。これらの短いタンパク質を解析したところ、カルボキシル末端が欠失し、かつIL6の遺伝子にコードされていない11アミノ酸残基が付加されていた。この11アミノ酸残基をコードする領域を探査した結果、ssrAとよばれるtRNAとしての活性をもつ遺伝子内に存在していた。2つの異なるmRNA由来のアミノ酸配列が1つのポリペプチド鎖中に存在することから、終止コドンを持たないmRNAからssrAへとリボソームが乗り移るトランス翻訳という現象が明らかとなった。その後の解析の結果、以下の様なトランス翻訳の分子機構が明らかになり、tRNAとmRNAの両方の機能を持つ分子としてssrA遺伝子産物はtmRNAと命名された。

- ① 終止コドンを持たないmRNAの末端で、リボソームが停滯する。
- ② mRNAが存在していない停滯したリボソームのAサイトに、アラニンをチャージしたtmRNAとSmpBの複合体が結合する。
- ③ ペプチド鎖転移反応がおこり、リボソームはtmRNA内のORFを翻訳する。
- ④ tmRNA内のORFの終止コドンで翻訳が終結する。
- ⑤ ノンストップmRNA由来の異常タンパク質のカルボキシル末端には、tmRNAにコードされたアラニン-アラニンの配列が存在する。その結果、この配列を認識するプロテアーゼにより異常タンパク質は迅速に分解される。

大腸菌でヒトIL6タンパク質を過剰生産させるためのIL6mRNAの一部が3'末端からエキソヌクレアーゼによって分解される結果、終止コドンを持たない異常ノンストップmRNAとなり、このノンストップmRNAを翻訳したリボソームがmRNAの3'末端で停滯したと考えられる。トランス翻訳の分子機構とtmRNAの機能については、他に優れた日本語の総説もあるので、参照されたい。筆者は、名古屋大学理学研究科在職中に饗場弘二教授の元でtmRNAの研究を行っていたが、1998年からUCバークレー校に留学し、Sachs博士の研究室で翻訳開始の分子機構の研究を行った。3年後の帰国時に、新たな研究テーマを開始する機会に恵まれた。2001年当時、NMD以外のmRNA品質管理機構は全く不明であったため、真核生物におけるノンストップmRNAの品質管理機構を研究テーマとした。

3. ノンストップ mRNA 品質管理とポリ(A)鎖の新しい機能の発見

ノンストップmRNAは、正常細胞でもORF途中でのポリ(A)鎖の付加により产生され、mRNA全体の数%を占める。一方、欠失または挿入変異により終止コドンより下流までORFが継続した

場合でも、3'非翻訳領域には全てのフレームで終止コドンが高頻度に存在する。従って、ノンストップのレポーター遺伝子へと改変可能な遺伝子は限定されており、出芽酵母の遺伝学で一般的に用いられる遺伝子中ではHIS3遺伝子がその条件を満たしていた。筆者は、2001年に真核生物におけるノンストップmRNAの品質管理機構の解析を開始し、HIS3遺伝子を用いてノンストップmRNAのレポーター遺伝子を作製した。mRNAとタンパク質の両方について発現定量を行い、mRNA段階での抑制は5分の1程度であり、タンパク質レベルでは発現は100分の1にまで抑制される結果を得た。この結果は、mRNAの分解のみでなく、タンパク質合成もしくは異常タンパク質の分解の段階で制御が、品質管理に重要なことを示唆していた。

筆者がノンストップmRNA品質管理の分子機構の研究を開始して1年後の2002年に、Parker博士らが出芽酵母と培養細胞においてノンストップmRNA 3'末端から迅速に分解されることを見だし、このmRNA品質管理機構をNon Stop Decay(NSD)と名付けた⁸⁾。Parker博士らも、筆者同様遺伝子(HIS3)を用いてノンストップのレポーター遺伝子を作製していたが、迅速なmRNA分解のみで異常タンパク質の発現が抑制されることを提唱した。ノンストップmRNAの迅速な分解には、mRNAの3'末端で停滯したリボソームがmRNAから解離することが必須である。Parker博士らは、3'末端で停滯したリボソームがSk1によってノンストップmRNAから解離し、3'→5'方向のエキソヌクレアーゼであるエキソソーム(RNA分解複合体)によって迅速に分解されるモデルを提唱した。しかしながら、Sk1の機能を証明する実験結果は現在まで報告されておらず、3'末端で停滯したリボソームが解離される分子機構は筆者らがノンストップmRNA分解におけるDom34:Hbs1複合体の機能を明らかにするまで不明であった(後述)。またParker博士らは、タンパク質段階での制御機構については全く解析していなかった。その後筆者らは、タンパク質段階での制御機構について詳細な解析を行い、ノンストップmRNAの品質管理機構におけるポリ(A)鎖の新たな機能を見いだした。ポリ(A)鎖は真核生物の普遍的な修飾であり、翻訳開始促進とmRNA安定化に極めて重要な機能を持っているが、正常なmRNAでは決して翻訳されない。一方、ノンストップmRNAでは終止コドンが存在しないため3'末端まで翻訳が進行しポリ(A)鎖が翻訳される。その結果、①合成中のポリリジンとリボソームとの相互作用による翻訳伸長阻害(翻訳アレスト)、②プロテアーゼによる異常タンパク質の迅速な分解が起こることを見いだした^{2,3)}。この結果は、ポリ(A)鎖の翻訳自体が、多段階での発現抑制機構を作動させ、品質管理機構において必須な役割を果たすことを初めて明確に示している。真核生物のmRNAの普遍的な修飾であるポリ(A)鎖が、翻訳開始とmRNA安定性制御に加えてmRNA品質管理機構にも重要な役割を果たすことが、筆者らの研究により初めて明らかとなった。

4. mRNA品質管理機構におけるDom34:Hbs1複合体の機能

様々な生物種において、特異的なアミノ酸配列を持つたタンパク質が合成された場合に、タンパク質合成反応(翻訳伸長反応)が阻害される。Parker博士らは、出芽酵母において、mRNAの高次構造(ステムループ)によって翻訳伸長反応が阻害された場合、mRNAが分子内で切断されることを2006年に報告し、NGD(No-Go-Decay)と名付けた⁹⁾。これは、本来停止することのないリボ

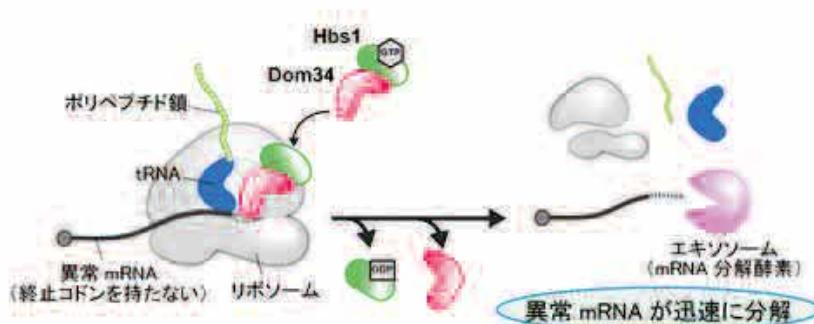


図1 Dom34:Hbs1複合体は、異常mRNAの3'末端で停滞したリポソームを解離させることで、ノンストップmRNAの分解を促進する。

ソームがmRNA上で立ち往生することを細胞が異常と認識する結果、mRNAが迅速に分解される品質管理機構と考えることができる。Parker博士らは、翻訳終結因子eRF1:eRF3複合体と相同性を示すDom34:Hbs1複合体がNGDに関与することを見いたした。その後、試験管内で再構成された翻訳反応系を用いて、Dom34:Hbs1複合体の活性がGreen博士らによって解析された。その結果、Dom34:Hbs1複合体が翻訳伸長複合体のAサイトに結合し、①リポソームサブユニット解離と、②リポソームからのペプチジルtRNAの解離を起こすことが示された¹⁰⁾。これらの結果から、mRNA上で立ち往生したリポソームにDom34:Hbs1複合体が結合し、リポソームの解離を引き起こし、その後に未知のmRNA分解酵素によって分子内切断が起こるモデルが考えられていた。

筆者らはノンストップmRNAの3'末端で停止したリポソームに対してDom34:Hbs1複合体が結合し、各サブユニットへと解離させる可能性を示唆する結果を得た。この活性を検証する為に、自己切断活性を持つハンマーヘッドリボザイムを用いて効率よくノンストップmRNAを細胞内で発現させる系を構築し、Dom34:Hbs1複合体がmRNAの3'末端で停止したリポソームを解離させるかを検討した。その結果、①ノンストップmRNA由来のタンパク質の合成にはDom34:Hbs1複合体が必要である^{11, 12)}、②Dom34:Hbs1複合体非存在下の細胞では、ノンストップmRNAの末端で停止したリポソームがペプチジルtRNAを含む状態で存在する¹²⁾、ことが明らかとなった。この結果から、Dom34:Hbs1複合体が、終止コドン非依存の翻訳終結反応に必須であることが*in vivo*で初めて証明された(図1)。同様の結果が、酵母とヒトの試験管内翻訳反応系を用いた生化学的解析においても証明されている^{13, 14)}。Dom34はtRNAと極めて類似した構造を保持し¹¹⁾、GTP結合因子Hbs1との複合体としてリポソームのAサイトに結合し、終止コドン非依存にリポソームをmRNAから解離させることが明らかとなった。

ノンストップmRNAの3'末端で停止したリポソームがmRNAから解離する反応は、エキソソームによるノンストップmRNAの分解に必須である。筆者らは、Dom34:Hbs1複合体がノンストップmRNAの安定性を検証し、Dom34:Hbs1複合体がノンストップmRNAの迅速な分解に必須であることを証明した。NGDにおいても、翻訳伸長阻害に依存したmRNAの分子内切断の結果生じる2つの分解中間体のうち、5'-NGD中間体はキャッ

プ構造を持ち、終止コドンを持たないノンストップmRNAである。筆者らは、5'側の分解中間体(5'-NGD中間体)がDom34:Hbs1複合体依存に分解されることを見いたした¹²⁾。Dom34:Hbs1複合体は、翻訳活性を失った異常リポソーマルRNAの迅速な分解機構(NRD)にも関与する品質管理因子である。これらの結果から、Dom34:Hbs1複合体が、「停滞したリポソーム」という共通した異常翻訳を認識し、3つの品質管理機構(NGD/NRD/NSD)を作動させる普遍的な品質管理因子であることが明らかになった。

5. ノンストップmRNA品質管理の分子機構

ノンストップmRNAではポリ(A)鎖が翻訳される結果、翻訳伸長阻害と異常タンパク質のプロテアソームによる分解が起こることを筆者らは明らかにした。また、Dom34:Hbs1複合体によって末端で停止したリポソームが解離されることで、エキソソームによるノンストップmRNAの分解が促進されることを見いたした。これらの結果を統合すると、以下の様なノンストップmRNA品質管理の新規分子機構が考えられる(図2)。

- ① 終止コドンが存在しないため、ポリ(A)鎖までリポソームが翻訳を継続する結果ポリリジンが合成され、翻訳伸長反応が阻害される^{2, 3)}。リポソームトンネルとポリリジンとの静電的相互作用の結果、リポソームの活性または構造が変化して翻訳伸長反応が阻害されると予想される。
- ② 最終的にmRNAの末端でリポソームが停止する。
- ③ mRNAの末端で停止したリポソームのAサイトにはmRNA(コドン)が存在しないため、eRF1:eRF3複合体やアミノアシルtRNAは結合しない。その結果として、Dom34:Hbs1複合体が結合し、リポソームをmRNAから解離させる¹²⁾。
- ④ mRNAの3'末端が解放され、エキソソームが3'末端から効率よくノンストップmRNAを分解する^{8, 12)}。ノンストップmRNAのポリ(A)鎖はリポソームによって翻訳されるため、ポリ(A)結合タンパク質(PABP)がポリ(A)鎖から解離している。その結果、5'末端からもXrn1によって効率よく分解される²⁾。
- ⑤ 異常タンパク質もユビキチン化されプロテアソームによつて分解される^{3, 15)}。

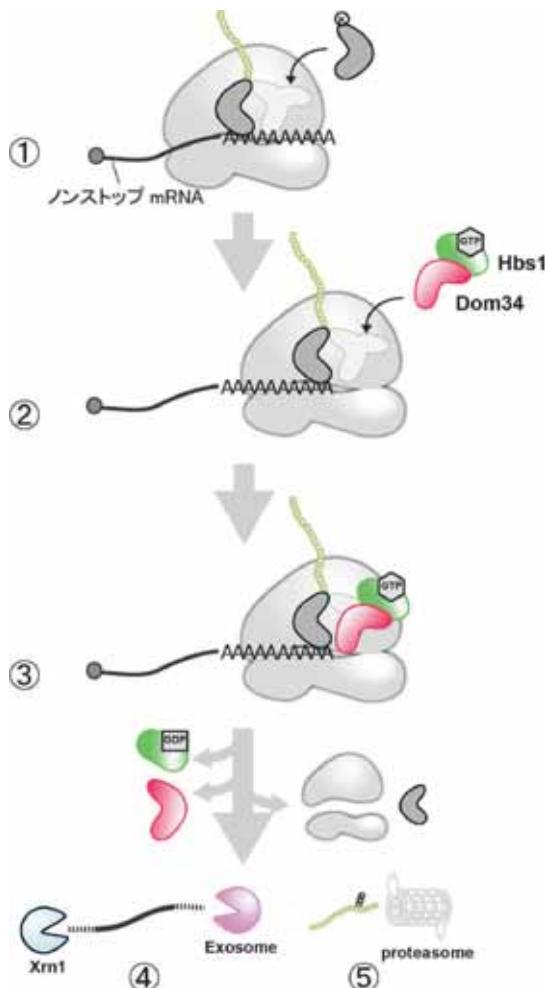


図2 新たなノンストップ mRNA 品質管理機構モデル

6. 異常mRNAに起因する遺伝性疾患と治療の現状

遺伝子疾患の原因変異は、近年のヒトゲノム研究により数多く同定されている。しかしながら、ほとんどの遺伝病について未だ治療法は確立されてない。異常mRNAに由来する異常タンパク質は、細胞の正常な機能を阻害する可能性があり、品質管理機構で発現が抑制されると考えられる。例えば、ヒトの遺伝病の主要な原因変異であるナンセンス変異は、異常な位置での翻訳終結を引き起こす。ナンセンス変異を持つ異常mRNAはNMDによって認識され、迅速に分解される。最近筆者らは、ナンセンス変異を持つ異常mRNAから合成される異常タンパク質のプロテアソームによる分解が、NMD因子によって促進される機構を発見した⁵⁾。この機構も、異常mRNAに由来する異常タンパク質の発現を抑制する品質管理機構の1つである。

囊胞性線維症の患者の10%、およびデュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者の13%は、ナンセンス変異が原因で発症する¹⁶⁾。デュシェンヌ型筋ジストロフィーは小児期のうちに発症する致死

的な遺伝性疾患であり、筋ジストロフィー症の中で最も頻度が高い。日本と欧米で約3万人の患者がいるとされ、男児の3500人につき1人の割合で発症する。デュシェンヌ型筋ジストロフィーの大部分は、X染色体に存在するジストロフィン遺伝子に変異を持つために筋肉のジストロフィンが正しく合成されず、筋細胞が異常となる。囊胞性線維症の原因遺伝子は、塩素イオンチャンネルをコードするCFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)である。CFTRの機能欠損によって、上皮細胞にある塩素イオンチャンネルの機能欠損やナトリウムイオンの再吸収の低下がおこり発症する。これらの疾患の治療法として、①遺伝子を操作することなく活性を持つ正常タンパク質を合成させるリードスルー剤と、②ナンセンス変異を持つエキソンを除く様なスプライシング反応を促進し、正常タンパク質より短いが活性を持ったタンパク質を合成させるエキソンスキップ法の開発が進められている。

ナンセンス変異を持つ異常mRNAから正常なタンパク質を合成させる最も単純でかつ根本的な方法は、ナンセンス変異での翻訳終結を阻害して翻訳を継続させ（終止コドンの読み飛ばし：リードスルー）、かつ正常な終止コドンでの翻訳終結は阻害しない低分子化合物を同定することである。ゲンタマイシン等のアミノグリコシド系薬剤がリードスルー活性を示すことは知られている。しかしながら、①有効濃度の維持が困難、②腎毒性や聴毒性などの副作用がある、等の理由から実際の治療にはほとんど使われていない。米国のPTC Pharmaceutical社（現PTC Therapeutics社）は、リードスルー活性を持つ低分子化合物Atalurenの同定に成功した¹⁶⁾。Atalurenは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー疾患モデルマウスを用いた予備実験で①特異性が高い、②副作用がほとんどない、③腹腔注射のみでなく経口投与でも十分効果が得られることが示された。昨年度までに、ナンセンス変異に起因する筋ジストロフィー（デュシェンヌ型筋ジストロフィー）と囊胞性線維症についてPhase 2試験が完了している。

デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の多くは一部のエキソンの欠失変異を保持している。エキソン50の欠失変異の場合、タンパク質合成の読み枠が変化し異常な位置で翻訳が終了するため、活性を持ったタンパク質は合成されない。しかしながら、ジストロフィン遺伝子は79のエキソンから構成される非常に大きな遺伝子であり、ジストロフィンタンパク質は繰り返しの構造を持っており、一部を欠失しても依存として機能を保持できる。従って、エキソン51を含むスプライシング反応を阻害して短い成熟型mRNAが合成されても、正常な終止コドンまで翻訳が行われた場合には、活性を持ったジストロフィンが合成される。この様に、アンチセンス・オリゴヌクレオチド等を用いて目的のエキソンを含むスプライシング反応を阻害して、活性を持ったタンパク質を合成させる方法は、エキソンスキップ法と呼ばれる。活性のあるジストロフィンの合成が可能となる患者を対象にした治療薬の臨床試験が行われており、その結果が期待される。

7. 今後の展望

異常mRNA由来の異常タンパク質の発現抑制に、mRNAの分解促進に加えて、翻訳抑制と異常タンパク質の分解が重要であることを明らかにしてきたが、その分子機構の一端が解明されつつある。特に、異常タンパク質の分解に関与するE3ユビキチンライゲースの特異性や、翻訳と共に役割したユビキチン化の反応については、今後数年で飛躍的に解明が進むと予想される。ペプチジルtRNAである翻訳アレスト産物のペプチド鎖解離反応を担う因子

やNGDを担うエンドヌクレアーゼの同定など、解決すべき問題は山積している。年々競争が激化しているが、今後も独自の視点で本質に迫る研究を目指して努力したい。

[参考文献]

- 1) O. Isken and L. E. Maquat, "Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function", *Genes Dev.*, **2007**, *21*, 1833-1856.
- 2) T. Inada and H. Aiba, "Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast", *EMBO J.*, **2005**, *24*, 1584-1595.
- 3) S. Ito-Harashima, K. Kuroha, T. Tatematsu and T. Inada, "Translation of the poly(A) tail plays crucial roles in nonstop mRNA surveillance via translation repression and protein destabilization by proteasome in yeast", *Genes Dev.*, **2007**, *21*, 519-524.
- 4) L. N. Dimitrova, K. Kuroha, T. Tatematsu and T. Inada, "Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome", *J. Biol. Chem.*, **2009**, *284*, 10343-10352.
- 5) K. Kuroha, T. Tatematsu and T. Inada, "Upf1p stimulates proteasome-mediated degradation of the product derived from the specific nonsense-containing mRNA", *EMBO Rep.*, **2009**, *10*, 1265-1271.
- 6) K. Kuroha, M. Akamatsu, L. Dimitrova, T. Ito, Y. Kato, K. Shirahige, T. Inada, "Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest", *EMBO Rep.*, **2010**, *11*, 956-961.
- 7) K. C. Keiler, P. R. Waller and R. T. Sauer, "Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA", *Science*, **1996**, *271*, 990-993.
- 8) A. van Hoof, P. A. Frischmeyer, H. C. Dietz and R. Parker, "Exosome mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon", *Science*, **2002**, *295*, 2262-2264.
- 9) M. K. Doma and R. Parker, "Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation", *Nature*, **2006**, *440*, 561-564.
- 10) C. J. Shoemaker, D. E. Eyler and R. Green, "Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay", *Science*, **2010**, *330*, 369-372.
- 11) K. Kobayashi, I. Kikuno, K. Kuroha, K. Saito, K. Ito, R. Ishitani, T. Inada and O. Nureki, "Structural basis for mRNA surveillance by archaeal Pelota and GTP-bound EF1α complex", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, *107*, 17575-17579.
- 12) T. Tsuboi, K. Kuroha, K. Kudo, S. Makino, E. Inoue, I. Kashima and T. Inada, "Dom34:Hbs1 Plays a General Role in Quality Control Systems by Dissociation of a Stalled Ribosome at the 3' End of Aberrant mRNA", *Mol. Cell*, **2012**, *46*, 518-529.
- 13) V. P. Pisareva, M. A. Shabkin, C. U. Hellen, T. V. Psetova and A. V. Pisarev, "Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes", *EMBO J.*, **2011**, *30*, 1804-1957.
- 14) C. J. Shoemaker and R. Green, "Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2011**, *108*, 1392-1398.
- 15) M. H. Bengtson and C. A. Joazeiro, "Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control", *Nature*, **2010**, *467*, 470-473.
- 16) E. M. Welch, et al., "PC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations", *Nature*, **2007**, *447*, 87-91.

[著者プロフィール]

氏名：稻田 利文

現職：東北大学大学院薬学研究科 教授

学位：平成4年3月 博士（理学）

生年月日：1964.11.6 生

出生地：鹿児島県奄美大島

略歴：1992年東京大学理学系大学院生物化学専攻博士課程終了。

同年名古屋大学理学部分子生物学科情報高分子学講座助手。
98年4月より01年3月まで、カリフォルニア大学バークレー校留学（日本学術振興会海外特別研究員）。2002年7月名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 助教授。
2005年10月～2009年3月まで戦略的創造研究推進事業（さきがけ）「代謝と機能制御」研究者兼任。2010年10月より現職。

研究テーマと抱負：mRNA品質管理の分子機構を解明し、遺伝子発現の全体像の理解と遺伝病治療薬の開発につなげたい。

ホームページ：<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~idenshi/idenshi-j.shtml>

パンフレットのお知らせ

ビオチンラベル化剤、二価性試薬、蛍光ラベル化剤等をまとめたパンフレットを作成いたしました。

架橋の際に役立つリンクバーの長さの情報も記載しています。



<目次>

1. ビオチンラベル化剤
2. 二価性試薬
3. タンパク質標識試薬
4. HPLC用誘導体化試薬
5. 関連試薬



お近くの販売店様もしくは小社マーケティング部までご請求ください。

e-mail: info@dojindo.co.jp

tel: 0120-489548

「蛍光生物学」の最前線

7-1

生体深部を可視化する *in vivo* 多光子励起顕微鏡法

川上 良介、日比 輝正、根本 知己
北海道大学電子科学研究所光細胞生理研究分野

1. はじめに

脳の中をのぞいても肉眼ではただの乳白色の塊でしか見ることはできない。神経科学の勃興期においては、脳を構成する神経細胞の形態を明らかにすることは最も重要な課題であった。ゴルジによる疎らな神経細胞の染色が個々の神経細胞の形態を顕在化させた。加えて、顕微鏡の発達によって脳を構成する細胞群の様相や神経細胞同士の関係が形態学的に示され、脳を構成する神経細胞に関する知見が蓄積してきた。しかし、ゴルジ法の世界はモノクロであり、ホルマリン固定された組織を対象とする方法のため、脳の持つ機能や変化を記述することは非常に困難であった。さらに数十年の後、様々な波長を発する蛍光物質や蛍光タンパクの研究が進んだが、それらを生物学的研究に資することで、神経科学に限らず、細胞の形態や機能メカニズムの解析が飛躍的に進んだ。その一番の理由は、蛍光物質や蛍光タンパク質により観察対象を生きたまま可視化できたためである。現在では、様々な生

物学的研究分野において蛍光物質は用いられ、生きた細胞の機能を可視化することで細胞の機能が続々と解明されてきている。しかし、我々の様に生きた個体においてこれらの蛍光物質をみるためにには大きな障壁が存在する。それは「生体は不透明である」ということである。即ち、蛍光物質を観察する為には光が必要であるが、我々の肉体は可視光を極めて透過しにくい。そんな中、様々な技術の展開と学際的な応用により、多光子励起過程という現象を利用して蛍光物質を励起することで、これまで観ることが出来なかつた生体深部の蛍光イメージングが可能になってきた^{1,2)}。

2. 多光子励起過程

様々な新しい光学顕微鏡法の中で、多光子励起レーザー顕微鏡は多光子励起過程を用いた方法論である。蛍光物質は通常、特定波長の励起光により第一電子励起状態へ遷移し、蛍光を発しながら基底状態に戻る。一方、複数個の光子の同時吸収により起こる多光子励起過程は、量子力学的には実現する確率が極めて低い過程である。

1光子励起の際と比較して、波長が約2倍、即ちエネルギーが1/2の光子が2個、同時に吸収された場合を2光子励起過程、同様にエネルギーが1/3の光子3個の場合を3光子励起過程といい、総称して多光子励起過程と呼ばれる（図1）。なお、多光子励起過程以外の非線形光学過程としては、第2次高調波発生（SHG）が生体組織観察にも用いられるようになってきている。

多光子励起過程は、1931年という量子力学の黎明期に、後にノーベル物理学賞を受賞するMaria Goepert-Mayerによって既に論理的に予言されていた³⁾。しかし、通常の我々が目にすることのない光で、この多光子励起過程が起こる確率は、宇宙開拓以来一度も起こることのないくらい、非常に稀である。実際に多光子励起過程が存在することが実験的に示されたのは1961年、30年もの長い月日が流れしており、それもこの確率の小ささゆえである。つまり、人類がレーザーという非常に強度が強く、性質の整った光を手に入れるまで待たなければならなかつたのである。そして、この多光子励起過程を用いた生体試料観察の適用までさらに30

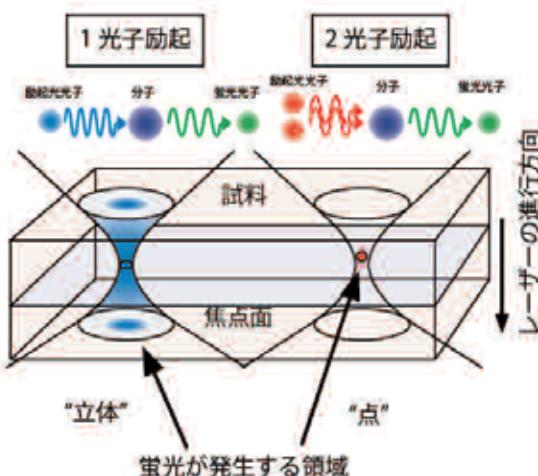


図1 通常の蛍光過程（1光子励起）と2光子励起過程における蛍光発生領域の違い

通常の1光子過程では光子1つを吸収し、蛍光光子1つを放出する。試料中のレーザーの通過する領域全てから蛍光の発生が観察される。2光子励起過程では、光子を2個同時に吸収し、蛍光光子を1つ放出する。同時吸収が起きるのは対物レンズの焦点付近においてのみ蛍光の発生が観察される。

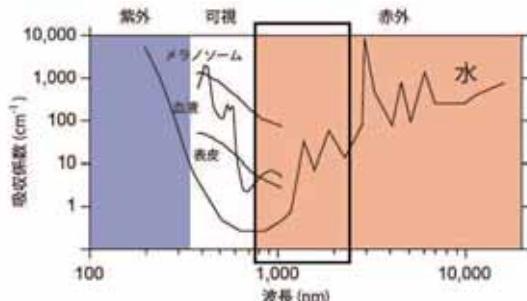


図 2 生体の分光的な窓

オレゴンメディカルレーザーセンターのホームページより改変
(<http://omlc.ogi.edu/>)
可視光では水による光の吸収は少ないが、それ以外の血液による吸収が大きい。
枠で表記した可視光より少し長い、近赤外領域では水の吸収の影響が少なく、
より深部まで光が到達できることを示唆している。

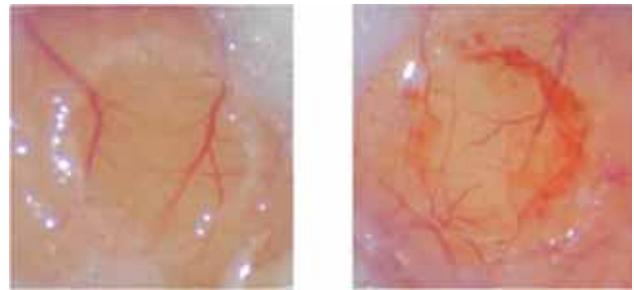


図 3 Open Skull 法による手術例

頭蓋骨を丸型カバーガラス (ϕ 2.7 mm) に置換する手術を施した。
左) 硬膜下の出血が少なく、より良い状態。右) 硬膜下出血が多く認められる。

年間の時間がかかっている。1990 年の Webb のグループの報告以降、全世界的に注目を浴びることとなった⁴⁾。

現在、多光子励起過程の光源としてチタンサファイアレーザーという近赤外フェムト秒レーザーが広く用いられている。100 フェムト秒という極めて短いパルス幅のレーザー光を対物レンズにより集光することで、その焦点付近のみに限局して多光子励起を誘起することができる。この特性により多光子励起レーザー走査型顕微鏡の最大の強みである「共焦点ピンホール無しの断層イメージング」という特徴を生み出している。この多光子励起過程という現象に固有の物理的、化学的特徴から、多光子励起レーザー顕微鏡には、「長波長光による深部到達性・低障害性」、「自己遮蔽効果の回避・褪色の補償」、「多彩かつ同時多重染色イメージング」、「紫外励起共焦点顕微鏡」、「局所的光化学反応の誘起」、という性質がもたらされている。詳細な解説は他の総説等を参照されたい^{2,5)}。

この多光子励起過程を利用した顕微鏡法による生体観察は生物学の中でも特に神経科学において頻繁に利用してきた。神経細胞はその構造として長いもので数 mm もの樹状突起を有し、さらにその樹状突起は直徑 1 μm 以下のスパンを有しており、それが複雑なネットワークを形成することで脳としての機能を発現していると考えられている。そして、その個々の神経細胞の機能は経時的に変化する電気化学的な応答により表現されている。低障害であり、深部到達性の高い多光子励起顕微鏡法は、例えば新鮮スライス標本において深部にある健康な細胞の挙動を明らかにできることで、神経細胞の機能と形態を同時に解析できたことが重要な発見へとつながっていったと考えている。しかし、脳の全ての機能を維持したままそのメカニズムに迫るには個々の細胞全てが保全された状態が必要である。新鮮スライスでは大部分の軸索は切断され、ある程度の回路は保全されているとはいえない。現在、多光子励起顕微鏡を用いて全ての機能が保持された個体脳を直接観察する「in vivo 多光子励起顕微鏡法」が発展してきている。

3. 生体脳を可視化する

A) 生体組織の分光的な窓

生体組織の組成の 70%以上が水である。水は透明であり、ほと

んどの光を透過するように思われるが、実際には 400 nm 以下の紫外光と 1200 nm 以上の赤外光に非常に強い吸収をもつ（図 2）。通常の 1 光子励起では励起光も蛍光も基本的に可視光であることから透過率という点で問題は無いように思われるだろう。しかし、より短波長の励起を用いる共焦点顕微鏡の場合には、励起光と蛍光の散乱の問題が顕在化する。生体試料は通常の分子や微粒に起因する散乱に加え、屈折率界面が多いことにより散乱係数がさらに高くなっていると推定される。例えば、固定脳組織の場合、表面からのほんの 100 μm 程度の深さの構造も明瞭に観察することができない。一方、多光子顕微鏡法では励起光は近赤外の領域にあるので、散乱の影響を受けにくい。さらに、多光子顕微鏡で多く用いられる NDD 型の検出器では、蛍光の散乱の問題も低減される。なぜなら、共焦点顕微鏡の共焦点ピンホールが排除するような散乱された蛍光成分も多光子顕微鏡では結像に利用できるためである。このように生体組織深部でのイメージングに適している。結果、長波長励起による組織透過性を確保しつつ、深部からの蛍光を断層像として取得できる最も有効な顕微鏡法として、脳研究に大きく貢献してきている⁶⁻⁹⁾。

B) in vivo 観察のための外科的手術

生きたマウス個体の脳を可視化するにあたって、そのイメージングに対し最も障害になるのが頭蓋骨である。マウスにおいては頭蓋骨の厚さは週齢を経るごとにその厚さを増していく、成獣の場合、おおよそ 100 μm の厚さになる。頭蓋骨は高散乱体であり、多光子顕微鏡に用いるレーザーが長波長であるとはいっても、骨越しにイメージングすることは非常に困難である。それゆえ、現在では生体脳をイメージングする為の手法としてこの頭蓋骨を外科的に処理することでその中の脳をイメージングする方法が実施されている。外科手術による頭骨処置法には大きく分けて 2 種類あり、一つは頭蓋骨をカバーガラスに置換、もしくはアガロースで封入する Open skull 法である。この手法は高散乱体である頭蓋骨を透明体に置換することで、励起光の到達度および蛍光取得量を向上させる。それゆえに脳深部における精細な画像を取得できる。しかしながら、頭蓋骨を置換する手術はある程度の熟練を必要とする。なぜならば、頭蓋骨を切除することは必然的に出血を回避できないためである。特に脳深部をイメージングする際に脳表面での出血は可視光のヘモグロビンによる吸収が強い為に蛍光

取得を大きく損ねる（図2）。それゆえ、この方法では出血を最低限に抑えたうえで、脳そのものへのダメージを低減することが重要である（図3）。また、多光子顕微鏡下で電気生理学的手法を組み合わせて機能形態学的な解析をする場合、硬膜を除去する必要がある。マウスにおいて硬膜は非常に薄く、脳実質に障害を与えることなく硬膜を除去することは非常に難易度が高い。また、脳実質が外界と直接触れあうために、炎症に対する処置や、浸液および対物レンズの温度コントロールが長時間のイメージングに重要な意味をもつ。これらの諸注意事項を解決した上であれば、生体マウス大脳皮質の全層にわたって多光子顕微鏡を用いて可視化することが可能である。

in vivo 多光子顕微鏡法は電気生理学的な解析を同時に実施することで、さらなる詳細な神経細胞の機能解析が可能である。電気生理学的解析には必ずと言ってよいほど電極を刺入する必要がある。その為に、Open Skull 法とは異なる Direct Access 法が採られる。この手法は頭蓋骨をカバーガラスに置換せず、アガロース等のゲルを脳表面に流し込むことで、電気生理用の電極が刺入できるようにしたものである。多くの場合、電極を差し込む為に硬膜を除去してしまうことから、対物レンズの浸液を加温した人工脳脊髄液で灌流する必要がある。また、カバーガラスに置換しつつ、観察部位には影響の少ないと考えられる部位の頭蓋骨に電極刺入用の穴を別に開けることで極力外界からの影響を抑える手法も提唱されている¹⁰⁾。

他方、限界まで頭蓋骨を削り骨表面を研磨し、その下にある脳組織を観察する手法が Thin skull 法である。この手法の最大の利点は脳実質が直接外界と接触しない為、炎症や外傷の回復によるガラスの壊れ等の問題が生じない。その為、長期にわたる観察が容易になることである。状態にも依存するが、数日から数か月にわたり1匹のマウスの変化を観察することで生体機能を解明する手法としては非常に大きな利点である⁶⁾。しかしながら、おおよそ 20 μm の厚さまで研磨したとしても Open skull 法の様に深部を観察することはできない。これは骨の散乱による集光への阻害が原因であると考えられている。

脂質やタンパク質によって形成される屈折率界面を非常に多く持つ脳の透過率は、頭蓋骨同様に週齢によって変化し、若齢では高く、高週齢になるとほど透過率は低くなる¹¹⁾。生体脳イメージングにおいて光の透過率は励起光の到達、蛍光取得のどちらにも大きな影響を及ぼす。さらに、Open Skull 法でも Thin Skull 法でも外科手術の難易度は頭蓋骨の厚さに依存する。これらの手術法やマウスの週齢について、実験目的に応じた最適な条件を選択することがより良い生体脳イメージングにとって不可欠である。

C) *in vivo* 多光子顕微鏡イメージング

観察用の窓を作る手術を頭蓋骨に施した後、多光子顕微鏡下にマウスを安定に保定しなければならない。正立型の顕微鏡では通常のプレパラートによる観察と異なり、マウスの個体を対物レンズ下に固定する必要性があることから、付属の顕微鏡 XY ステージを利用することは難しい。それは、対物レンズの動作距離はメーカーによっても異なるが、マウスの頭が入るほどの距離は確保されていないからである。そのため、ステージ位置を下げた仕様のものを作製するか、スキヤナヘッドの高さを特注で変更しなければならない。マウス頭部を固定する為には脳定位固定装置をステージに取り付け、対物下に保定する方法がよく用いられる。

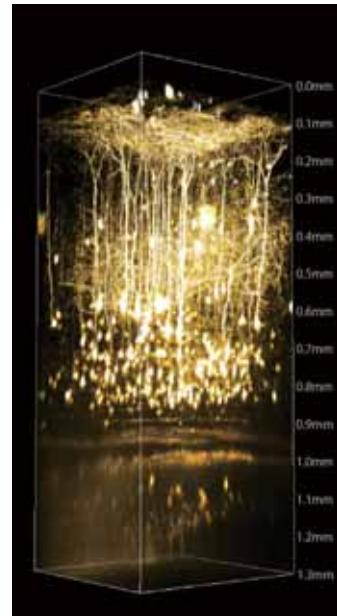


図4 麻酔下の H-Line マウス大脳の *in vivo* 観察

H-Line マウスは大脳皮質や海馬の一部の錐体細胞に EYFP を発現するトランジジェニックマウスである。Open Skull 法により励起光 950 nm のパルスレーザー (MaiTai HP) を用いて正立型 2 光子励起レーザー顕微鏡 (Nikon A1R MP+) において断層撮影を行った。これを PC 上で 3 次元再構築することで大脳皮質から海馬錐体細胞までの 3 次元的な走行を可視化することができた。

しかしながら、脳定位固定装置はイヤーバーやノーズバーによる締め付けが脳圧を上げているためか、心拍の影響が顕著にでることが経験的に知られている。そこで、頭蓋骨に金属製の固定具を歯科用セメントで取り付け、その固定具をステージに取り付けた専用の器具で挟み込み、マウスの頭を吊り下げる手法がよく用いられている。マウスの頭部を対物下に保定する際に最も注意すべき点は、手術で取り付けたカバーガラスが可能な限り水平になるようすることである。スライドグラスによる観察とは異なり、カバーガラスや手術部位が大きく傾いた状態では非点収差が発生しイメージングの質に大きな影響を与えるからである。*in vivo* イメージング中、問題として起こりやすいのは体温低下や高濃度麻酔による死亡が挙げられるが、体温保持の為のヒーターや呼吸管理、血中酸素濃度の測定をおこなうことで、より長時間の安定なイメージングが期待できる。

4. 最後に

最近、筆者らは高感度の NDD 検出器の導入や励起光の条件の最適化を行うことで、Open Skull 法を改良した。その結果、生きたマウスの脳において、これまで観察できなかった大脳皮質下にある海馬錐体細胞の観察に成功した（図4）。現状の *in vivo* 多光子顕微鏡にはまだ改善の余地が残っていることを強く示唆する。例えば、光学顕微鏡技術としては、生体組織内で生じる収差を補正

する「補償光学系」の提案がなされている¹²⁾。また、レーザー技術としては、レーザーチタンサファイアレーザーでは発振できない1000 nm以上の長波長を発する高出力のパルスレーザーが開発されており、生体組織の分光的な窓のうち、これまで使えていなかった1000から1300 nmの領域を生体観察に用いることができるようになってきている。さらに蛍光物質においても赤色から近赤外にピークを有し、これまで以上に明るい蛍光物質や蛍光タンパク質の開発がなされてきている。これらの技術的な発展により、深部脳のイメージングやより非侵襲的生体脳イメージングが可能になるであろう。

[参考文献]

- 1) F. Helmchen and W. Denk, *Nature Method*, **2005**, 2(12), 932-940.
- 2) T. Nemoto, *Molecules and Cells*, **2008**, 26(2), 113-120.
- 3) M. Goeppert - Mayer, *Annals of Physics (Leipzig)*, **1931**, 5, 273-294.
- 4) W. Denk, J. H. Strickler and W. W. Webb, *Science*, **1990**, 248(4951), 73-76.
- 5) 根本知己, 日比輝正, 川上良介, フアルマシア, **2011**, 47(8), 724-727.
- 6) H. Inada, M. Watanabe, T. Uchida, H. Ishibashi, H. Wake, T. Nemoto, Y. Yanagawa, A. Fukuda and J. Nabekura, *PLoS ONE*, **2011**, 6(12), e27048.
- 7) S. K. Kim, K. Eto and J. Nabekura, *Neural Plast.*, **2012**, 2012, 640259.
- 8) H. Wake, A. J. Moorhouse and J. Nabekura, *Neuron Glia Biol.*, **2012**, 1-7.
- 9) M. Matsuzaki, N. Honkura, G. C. Ellis-Davies and H. Kasai, *Nature*, **2004**, 429(6993), 761-766.
- 10) J. Noguchi, A. Nagaoka, S. Watanabe, G. C. Ellis-Davies, K. Kitamura, M. Kano, M. Matsuzaki and H. Kasai, *J. Physiol.*, **2011**, 589(Pt 10), 2447-2457.
- 11) M. Oheim, E. Beaurepaire, E. Chaigneau, J. Mertz and S. Charpak, *J. Neurosci. Method*, **2001**, 111(1), 29-37.
- 12) N. Ji, T. R. Sato and E. Betzig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2011**, 109(1), 22-27.



氏名：日比 輝正
北海道大学電子科学研究所 助教
連絡先：〒 001-0020

札幌市北区北 20 条西 10 丁目
TEL: 011-706-9362 FAX: 011-706-9363

E-mail: thibi@es.hokudai.ac.jp

略歴：名古屋市立大学薬学部製薬学科卒、同大大学院博士課程修了、博士（薬学）。生理学研究所博士研究員等を経、2010 年 4 月より現職。

専門：分子細胞生物学、生物物理学。



氏名：根本 知己
北海道大学電子科学研究所 教授
連絡先：〒 001-0020

札幌市北区北 20 条西 10 丁目

TEL: 011-706-9362 FAX: 011-706-9363

E-mail: tn@es.hokudai.ac.jp

略歴：東京大学理学部物理学科卒（和田昭允研究室）。東京工業大学大学院理工学研究科応用物理学専攻博士課程修了（梶屋美實研究室），博士（理学）。理化学生物研究所等を経、岡崎国立共同研究機構生理学研究所助手に着任。その後、科学技術振興機構さきがけ研究員、国立大学法人総合研究大学院大学を兼務の後、2006 年 1 月、同研究所独立助教授に昇任。2009 年 9 月より現職。現在に至る。

専門：細胞生理学、生物物理学。

[著者プロフィール]



氏名：川上 良介
北海道大学電子科学研究所 助教
連絡先：〒 001-0020

札幌市北区北 20 条西 10 丁目

TEL: 011-706-9362 FAX: 011-706-9363

E-mail: rkawascb@es.hokudai.ac.jp

略歴：九州大学理学部生物学科卒、同大大学院医学系研究科博士課程修了、博士（理学）。生理学研究所博士研究員等を経、2010 年 6 月より現職。

専門：神経生理学

「蛍光生物学」の最前線

7-2

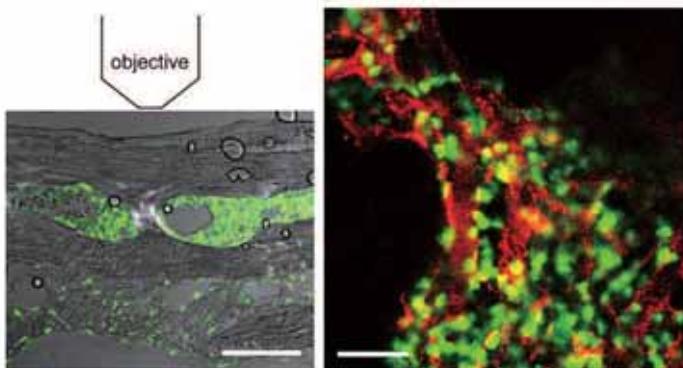
骨組織・骨髄内の生体2光子励起イメージング

石井 優

大阪大学免疫学フロンティア研究センター・細胞動態学

1. はじめに

硬い石灰質に囲まれた骨組織の内部は、従来から生きたままでの観察が極めて困難であると考えられていた。実際にこれまで骨や骨髄の研究では、固定して摘出した骨を、カルシウムキレート剤に1週間ほど漬け込んで脱灰して薄切したり、未脱灰の骨組織を硬質の剃刀で切片にしたりして観察していた。この従来法でも、骨内の細胞・組織の「形態」や「分子発現」(免疫染色による)を解析することはできたが、決定的な情報が欠落していた。それは細胞の「動き」である。細胞の「動き」を観察するためには、生きた細胞を、生きた組織の中で観察する必要がある。さらに、骨髄腔のように血管床を介した豊富な循環血流を保つたままで、そこで流入・流出する細胞の動きを捉えることが重要な組織では、「摘出して生かした骨組織」ではなく、「生きた個体の中の骨組織」を観察する必要がある。著者の研究室では最近、2光子励起顕微鏡を駆使してマウスを生かしたままで骨組織内を観察するイメージング法を立ち上げた。この方法を用いると、骨組織のリモデリングに関わる破骨細胞や骨芽細胞、骨髄内で分化・成熟を遂げる単球・顆粒球・リンパ球、その他の間葉系細胞や血液幹細胞などの生きた動きを、リアルタイムで観察することが可能となった。本稿では、これを用いて明らかにした破骨細胞動態に関する著者の最近の研究成果の紹介に加え、この方法論の実際や、その免疫学・生命科学研究における今後の応用と発展性について概説したい。



2. 生体(= intravital) 2光子励起イメージングの長所

免疫・血液系は、特に細胞の動態が重要なシステムである。好中球やマクロファージなどの抗原提示細胞や細胞性免疫を担うリンパ球が、感染局所や全身をくまなく遊走し、リンパ組織間内の微小環境で会合し、互いに信号を伝達することにより、免疫機能が維持されている。これら細胞遊走は時空間的に精緻にコントロールされており、各細胞が適切な場所に適切な時間に存在しなければ、機能を十分に発揮できない。これら免疫系における統率された細胞遊走システムは、神経系での固定した軸索システム("hard-wired")と比較して、"soft-wired"と形容される。このようなシステムの解析のため、2光子励起顕微鏡を用いて、実験動物を生かしたままで顕微鏡に乗せて、注目する組織を観察する "intravital two-photon microscopy (生体2光子励起イメージング)" の手法が、2002年頃より海外の複数の研究者によって開発された^{1,2)}。この方法論では、注目する組織のみならず、個体自体が生きており、全身の血流や代謝が保たれた状態で観察できるため、極めて情報量が多い。

著者は、特に骨組織・骨髄腔内の "intravital" imaging に取り組んだ^{3,4)}。この方法では、骨髄腔内を流れる豊富な血流が保たれているため、骨組織に定着している細胞の動きのみならず、血管から骨髄内へ細胞が流入したり、逆に血中へ還流していく様子を観察することができる。さらには、薬剤を尾静脈などから全身投与すると血流を通して速やかに観察部位に到達させることができる。このような長所から、著者は骨の tissue explant imaging では intravital imaging を行っているが、そもそも骨のように血流が豊富な組織は、取り出した状態で生かして観察することはかなり難しい。

3. 骨組織・骨髄内の生体イメージングの実際

骨基質に含まれるリン酸カルシウム結晶は、励起光を容易に散乱させるため、二光子励起に用いる近赤外線レーザーを用いても深部まで到達することは難しい。現在の近赤外線レーザーでは軟部組織であれば表面から 800 ~ 1000 μm まで到達が可能であるが、骨組織の場合は、150 ~ 200 μm が限界である。このため我々は、骨基質が薄くて骨表面から骨髄腔まで 80 ~ 120 μm で到達できる、マウスの頭頂骨をイメージングに用いた(図 1)。

また、骨組織・骨髄内細胞のイメージングに関しては、その蛍光標識の方法にも難点があった。2光子励起イメージングを含め

図 1 骨組織(骨髄内)の生体2光子励起イメージング
Lysozyme M promoter-EGFP transgenic mouse の頭頂骨の断面像(左)と、2光子励起顕微鏡による生体イメージング像(右)。生体イメージングでは、骨髄内の血管構造を、Texas Redをconjugateした高分子デキストランを静脈注射にて可視化している。実際の実験ではこれを一定時間間隔で撮影し、動画を作成する。スケールバー：100 μm(左), 30 μm(右)。

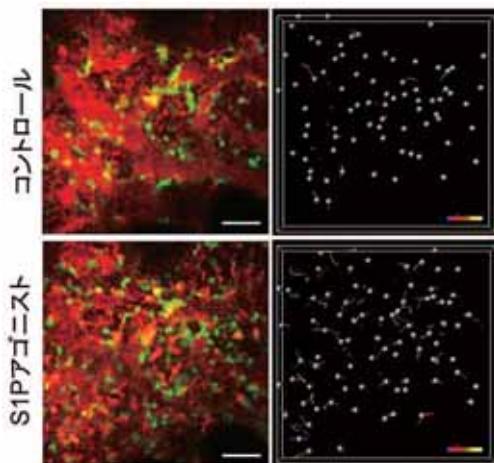


図2 骨組織内での破骨細胞およびその前駆細胞の生体2光子励起イメージング
破骨細胞を含む単球系細胞 ($CX_3CR1-EGFP^+$) を緑色で標識し可視化している（左）。また、各細胞を球体に置き換え、軌道を書いて速度を計算している（右）。定常状態では単球系細胞はほとんど静止しているのに対し（上部2パネル）、S1PアゴニストであるSEW2871を投与すると、急速に細胞の運動能が亢進し、血中へ還流していく様子が観察される（文献4より一部改変）。

て、あらゆる蛍光イメージングでは、見たい対象物を蛍光標識する必要があるが、リンパ球のイメージングなどのintravital imagingでは、あるマウスから細胞を取り出して *ex vivo* (生体外) で蛍光ラベル (細胞透過性の蛍光色素が各種存在する) して、これを別のマウスに adoptive transfer すると、リンパ節内に蛍光ラベルしたリンパ球が多数観察される。しかし、同様の手法は骨髄系の細胞に関しては、うまくいかないことが多い (理由としては、細胞に起因するもの (体外へ出すと脱分化しやすい、など) や、骨髄腔に関連したもの (骨髄腔は細胞が詰まっており、移入した細胞が入る余分なスペースがない、など))。このため、我々は可視化したい細胞に特異的に蛍光分子を発現させたトランジエニックマウスを用いて実験を行った。例えば、単球系細胞のイメージングには、CSF1R (M-CSF/CSF-1の受容体) や CX_3CR1 ($CX_3CL1/fractalkine$ の受容体) のプロモーター下に EGFP を発現するマウス、顆粒球系のイメージングには、Lysozyme M プロモーター下 EGFP 発現トランジエニックマウスなどを用いている。これらの問題点としては、蛍光分子の発現が、完全に細胞系統特異的とはなっていないこと (例えば Lysozyme M-EGFP transgenic であれば、EGFP の発現は顆粒球以外にも、一部マクロファージや NK 細胞などにも見られる) や、作製にコストと時間がかかることがある。一方で長所としては、*adoptive transfer* とは違って、元々その組織・臓器にいた状態 (*in situ*) での細胞を観察できるので、よりインタクトな細胞現象を観察できる点である。

4. 生体骨組織イメージングによる破骨細胞やその前駆細胞の動態解析

破骨細胞は単球系血液細胞から分化・成熟する多核巨細胞であり、古い骨を壊して吸収する特殊な能力を有する。破骨細胞は、骨を新生する骨芽細胞と協調して機能し、骨組織のホメオスタシスを維持しているが、加齢や炎症により破骨細胞の機能が亢進するとバランスが骨吸収側に傾き、骨粗鬆症の発症につながる。また関節リウマチでは、関節炎局所に活性化破骨細胞が多数誘導され、骨破壊に関与していることが知られている。

これまでの研究成果により、破骨細胞は骨髓ストロマ細胞や骨芽細胞などによって産生される M-CSF (macrophage colony stimulating factor) や RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) からの刺激によって分化・成熟にすること、RANKL 刺激は NF- κ B や NF-AT などの転写因子群を介して破骨細胞の分化を誘導すること、などの重要な知見が確立している。その一方で、長らく解決されていなかった重要な謎があった。それは「破骨細胞（及びその前駆細胞）はどうやって骨表面に到達するのか」である。

—「どのような分子機構が破骨細胞の遊走を調節しているのか」「一旦骨表面に達した破骨前駆細胞はすべて最終分化するのか（再び戻っていくことはあるのか）」など、破骨細胞およびその前駆細胞の生きた骨組織内での動態については、全く明らかにされてこなかつた。

著者らはこれらの謎に迫るべく、まず初めに種々のケモカインや脂質メディエーターについて、破骨細胞を動かし得るかどうか *in vitro* の実験系でスクリーニングを行った。その結果、血中に豊富に存在する脂質メディエーター・スフィンゴシン1リン酸 (S1P) などのいくつか興味深い分子が、破骨細胞前駆細胞の遊走能を *in vitro* で刺激し得ることが分かった。しかしながら、この次の段階として、「これらの候補分子が実際に *in vitro* で破骨細胞やその前駆細胞を動かすのかどうか」を解決する必要があった。このため、2光子励起顕微鏡を用いて生きた骨組織内部での破骨細胞およびその前駆細胞の動態を解析し、この観察系において S1P 刺激を加えて、その効果について検討した⁴⁻⁶⁾。

骨組織にある破骨細胞前駆細胞を含む単球系細胞 (CSF1R-EGFP+ 細胞、または $CX_3CR1-EGFP^+$ 細胞など) は、定常状態では骨組織および骨表面付近に留まり、ほとんど動きが認められなかつたが、S1P 受容体に対する強力なアゴニストである SEW2871 を経静脈的に投与すると急速に動きが大きくなり（約 30 分ほどで動きが最大になる）、多くの細胞が血管へと移行していく様子が観察された（図2; 参考文献4のsupplementary videos や、著者の研究室のオリジナルHP (<http://bioimaging.ifrec.osaka-u.ac.jp/>) を参照）。これにより、*in vitro* の骨組織内でも、破骨細胞前駆細胞は確かに S1P 受容体刺激に反応して遊走能が亢進す

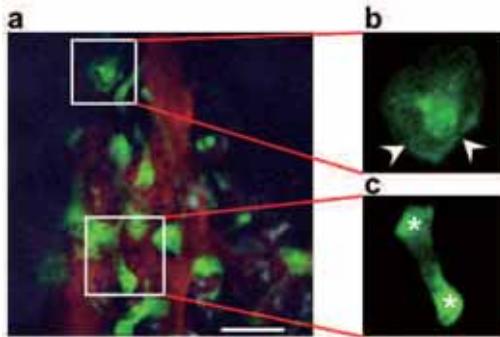


図 3 骨組織内の成熟破骨細胞の生体 2 光子励起イメージング

成熟破骨細胞を GFP で標識したマウス (a3-GFP マウス) の骨髄腔の生体二光子励起イメージング (a)。骨髄腔内の血管構造は、赤色蛍光 (Texas Red) を結合させた高分子デキストランを静脈注射して可視化している。実際の実験ではこれを一定時間間隔で撮影し、動画を作成する。骨表面で骨吸収を行っている成熟破骨細胞 (緑色) には、「動きの乏しい細胞 (b)」と、「アメーバー状によく動いている細胞 (c)」の少なくとも 2 種類が存在する。動きの乏しい細胞の方では、GFP (H⁺ ポンプ) が膜に沿って発現しているように見える (b、矢印)。つまり、今まさに酸を出して骨吸収をしていると考えられる。一方、アメーバー状によく動いている細胞の方では、GFP (H⁺ ポンプ) が細胞質に存在し、膜上には発現していないように見える (c、アステリスク)。つまり、現時点で酸を出しておらず骨吸収には関わっていないと考えられる。(スケールバー : 40 μm)

ることが実証された。

5. 生体イメージングによる成熟破骨細胞の動態解明

成熟破骨細胞を可視化するために、まず我々は、成熟破骨細胞に発現する H⁺ ポンプに注目した。成熟破骨細胞は骨基質に接着すると、骨吸収面がインテグリンによって強くシールされる。破骨細胞の骨吸収面には、骨を吸収するために H⁺ を放出するための H⁺ ポンプ (V-type H⁺ ATPase) が発現している。V-type H⁺ ATPase には様々なサブユニットがあり、破骨細胞では特に a3 subunit が特異的に発現している。我々は、V-type H⁺ ATPase a3 subunit の locus に a3 subunit と GFP の融合蛋白質 (a3-GFP) を knock-in したマウス (a3-GFP マウス) を用いてこの骨組織内を二光子励起顕微鏡で観察することにより、骨表面上での生きた成熟破骨細胞の動態の可視化に成功した (図 3a)。このマウスでは、GFP 標識された成熟破骨細胞の動態だけでなく、H⁺ ポンプの破骨細胞内局在を観察することが可能である。その結果、骨表面で骨吸収を行っている成熟破骨細胞には、「①動きの乏しい細胞」と、「②アメーバー状によく動いている細胞」の少なくとも 2 種類が存在することが明らかとなった。動きの乏しい細胞の方では、GFP (H⁺ ポンプ) が膜に沿って発現しているように見える (図 3b、矢印)。つまり、今まさに酸を出して骨吸収をしていると考えられる。一方、アメーバー状によく動いている細胞の方では、GFP (H⁺ ポンプ) が細胞質に存在し、膜上には発現していないように見える (図 3c、アステリスク)。つまり、現時点で酸を出しておらず骨吸収には関わっていないと考えられる。

6. 生体 2 光子骨イメージングの機能解析のための新規ツールの開発

(1) 破骨細胞の「形態変化」の画像解析ソフトの開発

成熟破骨細胞は、図 3 のように複雑な形をしており、多種多様な形態変化を見せる。これまでの画像解析ソフトでは、リンパ球や単球といった球体に近い血液系細胞の速度や移動距離は簡単に解析することができたが、成熟破骨細胞のように複雑な形態変化を示す細胞に関しては、形態の変化量を数値化して評価することはできなかつた。そこで、現在我々は、成熟破骨細胞の形態変化

を画像解析するソフトを開発し、「形態変化がなく骨吸収を行っている破骨細胞」と、「形態変化が大きく骨吸収に関わっていない破骨細胞」との区別を行っている。

(2) pH 応答性蛍光プローブの開発

成熟破骨細胞は、H⁺ ポンプを介して酸を出し、骨表面を酸性化することによって骨吸収を行っている。最近、この pH の低下に応答して蛍光が ON になる「pH 応答性蛍光プローブ」を開発し、生体内における成熟破骨細胞の「骨吸収」の可視化に成功した⁷⁾。現在我々は、この pH 応答性蛍光プローブを用いて、成熟破骨細胞が、実際に生体内で骨吸収を行っているところを観察し、「骨吸収をしていない破骨細胞」と、「今まさに骨吸収している破骨細胞」の区別を行っている。これまでの生体イメージング研究の多くは、生体内での細胞の動き (動く速さ) や細胞間相互作用 (細胞同士の接触時間) を観察するにすぎなかつたが、蛍光プローブという新たなツールを組み合わせることにより、生体内での細胞の「機能」をイメージングすることができるようになった。

7. おわりに：骨組織の生体 2 光子励起イメージングの今後の応用と課題

骨組織・骨髄腔には、多種多彩な種類の細胞現象が営まれている。破骨細胞や骨芽細胞・骨細胞による骨代謝制御の場であるばかりでなく、B リンパ球を始めとして種々の血液系細胞の発生・機能分化にとって極めて重要な部位である。また、メモリー B/T リンパ球などにより保持される長期免疫記憶の座所である。骨髄腔内の各種細胞の挙動・位置決めとその分化制御がなされる特殊な環境 (ニッヂ) の同定・解析は、現在、免疫学のみならず生命科学全般において極めて大きな研究課題と言える。一方では、癌の骨転移では、本来存在しないはずの細胞 (癌細胞) が骨組織に到達し、しかも極めて巧妙に彼らにとっての「特別な場所」を見出して生き延びており、骨髄腔には内在・外来性に関わらず、多種多様な細胞がそれぞれのニッヂを見つけて暮らしていることが分かる。こういった、骨髄腔内での各細胞の挙動・位置決めとその分化制御がなされる特殊な環境の同定・機能解析のためには、骨組織の生体 2 光子励起イメージングは極めて強力な研究ツール

となることが強く期待される。

その一方で、本方法論に関して今後のさらなる技術革新が望まれるものとして、以下の点が挙げられる。

①頭頂骨以外の骨組織のイメージング：現時点では、十分な解像度で可視化できる骨組織は、骨梁が薄くレーザー光を透過させやすい頭頂骨に限られている。基本的には、どこの部分の骨であっても、骨代謝や骨髓細胞の動態などには変化がないと考えられるが、それらを実証するためには、やはり長管骨など一般に広く研究に用いられている骨組織をライブイメージングにより解析する必要があり、今後の技術改良が望まれる。

②長時間のライブイメージング系の開発：ガス麻酔下でマウスを生かしたままでの骨組織を手術的に露出してイメージングに当たっている現法では、連続した観察時間は4～5時間程度が限界である。細胞の動きや細胞間の接触時間などをイメージングするのであれば、この観察時間で十分であるが、それより長い時間のかかる現象（e.g. 細胞の分化など）をイメージングするためには別の測定系を構築する必要がある（マウスの長期間にわたり麻酔管理するか、手術野を閉じて経日観察を可能にする、など）。このような技術革新も今後進められていくことが期待される。

[参考文献]

- 1) S. Stoll, J. Delon, T. M. Brotz, et al., "Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes", *Science*, **2002**, 296, 1873-1876.
- 2) M. J. Miller, S. H. Wei, I. Parker, et al., "Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node", *Science*, **2002**, 296, 1869-1873.
- 3) R. N. Germain, M. Bajénoff, F. Castellino, et al., "Making friends in out-of-the-way places: how cells of the immune system get together and how they conduct their business as revealed by intravital imaging", *Immunol. Rev.*, **2008**, 221, 163-181.
- 4) M. Ishii, J. G. Egen, F. Klauschen, et al., "Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis", *Nature*, **2009**, 458, 524-528.
- 5) F. Klauschen, M. Ishii, H. Qi, et al., "Quantifying cellular interaction dynamics in 3-D fluorescence microscopy data", *Nature Protoc.*, **2009**, 4, 1305-1311.
- 6) M. Ishii, J. Kikuta, Y. Shimazu, et al., "Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling *in vivo*", *J. Exp. Med.*, **2010**, 207, 2793-2798.
- 7) T. Kowada, J. Kikuta, A. Kubo, et al., "In vivo fluorescence imaging of bone-resorbing osteoclasts", *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 17772-17776.

[著者プロフィール]



氏名：石井 優 (Masaru ISHII)

大阪大学免疫学フロンティア研究センター・細胞動態学
教授

連絡先：〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-1
TEL: 06-6879-4267 FAX: 06-6879-8296
E-mail: mishii@ifrec.osaka-u.ac.jp

略歴：

1998	大阪大学医学部医学科卒業
2000-2005	大阪大学大学院医学系研究科 助手
2006-2008	米国国立衛生研究所 客員研究員
2009-2011	大阪大学免疫学フロンティア研究センター 准教授
2011-	現職
2011-	科学技術振興機構・戦略的創造研究推進事業(CREST) 研究代表者

現在のテーマ：

骨・免疫・がんをテーマとした、生体内での細胞動態を制御する基本原理の解明、この目的のための新しいイメージング技術の開発

Good's Buffer ポスターのお知らせ



生化学用緩衝剤 グッド緩衝剤のポスターを作成いたしました (A2 サイズ)。

pH 範囲や pKa、調製方法など記載しています。

お近くの販売店様もしくは小社マーケティング部までご請求ください。

e-mail: info@dojindo.co.jp

tel: 0120-489548

Topics on Chemistry

Unclicking the Click (クリックをはずす反応)

株式会社同仁化学研究所 岩本 正史

クリックケミストリー(click chemistry)とは、K. B. Sharplessらが2001年に提唱した概念で、その名の“click”は、シートベルトがカチッと音を立ててロックされるように、素早く確実な結合をつくる様子を例えた言葉である。その代表的なHuisgen反応は、それぞれアルキンとアジドをもつ分子を銅触媒下で付加環化反応によってトリアゾール環を形成する反応である。この反応は、高収率・高選択性・高速反応性をもち、さらに、溶媒やタンパク質などの夾雑物の影響も受けず精製の必要もない。以下に、よく知られている2つの応用例を紹介する。

一つ目は、アセチルコリンエ斯特ラーゼ(AChE)への 10^{-13} Mという解離定数をもつ強力な阻害薬の開発である¹⁾。Manetschらは、Huisgen反応の不可逆性を利用して、生体成分をターゲットとした阻害薬の探索方法を示した。AChEは、分子内に埋もれた基質結合部位(活性部位)と分子表面に別のリガンド結合部位(この部位は、基質結合部位につながるポケットの入口に位置している)があることが知られている。また、基質結合部位には tacrine が、リガンド結合部位には phenylphenanthridinium が特異的に結合する。Tacrine または phenylphenanthridinium にアルキンまたはアジドをアルキル鎖の長さを変えてそれぞれ導入した。これらの化合物を AChE と混ぜ、それぞれの分子が AChE の特異的部位に結合した状態でクリックケミストリーをおこさせた(*in situ* click chemistry)。この*in situ* click chemistry によって合成された分子の中から、強力な阻害剤を選び出すことができた。

二つ目は銅触媒を用いないクリックケミストリーによる細胞組織の蛍光標識である²⁾。Baskinらは、シクロオクチンのアジドに対する反応性を上げるために、電子吸引基としてフッ素をアルキンの隣に導入した 3,3-difluorocyclooctyne (DIFO) を合成した。*In vitro*において DIFO は銅触媒を用いた場合とほぼ同等の反応性を示した。また、常に再生されていることで知られる細胞表面のグリカン (Ac4ManNAz: peracetylated, N-azidoacetylmannosamine を用いて、アジド基を導入) を、蛍光色素を導入した DIFO で銅触媒なしに標識することに成功した。銅を用いないことで銅による典型的な細胞毒性の影響を受けずに、分単位の細胞活動を追跡可能であることがわかった。

このように、温かみ条件で高収率、高選択性に反応することから、蛍光試薬の標識や化合物の探索に広く利用されている。

最近になり、アルキンとアジドの反応で得られるトリアゾール環は、超音波による機械的な刺激により、元のアルキンとアジドに戻ることが報告された³⁾。このことは、機械的に不安定な保護基としての利用や、機械的な力へ応答する物質としての利用が期待されている。以下に、この論文について紹介する。

Brantley らはアルキンとアジドからできるトリアゾール環を中心部位に持つ分子質量 96 kDa のポリマー (TriP₉₆) を合成した (Fig.1)。そのポリマーを 0 °C 下で 2 時間、超音波処理すると、分子質量が半分の 48 kDa の分子種ができるることを GPC (Gel Permeation Chromatography, ゲル浸透クロマトグラフィー) で確認した。この超音波処理後のサンプルの IR スペクトルには、アルキンとアジドの特徴的なシグナルがみられた。そこで、さらにアルキンとアジドに開裂したことを確認するために、超音波処理後のサンプルを、アルキンに対しては 1-azidopyrene を用いて典型的な [3+2] の付加環化反応(click chemistry) により標識し、アジドに対しては 1,3-dimesitylaphthoquinimidazolylidene (NQMes) を反応させそれぞれ選択的に発色団で標識した。NQMes はアジドと反応することで強い発色を示すことが知られている。超音波処

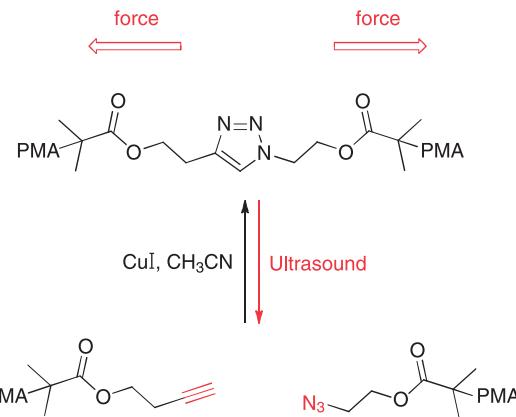


Fig. 1 超音波によるトリアゾール環の開裂
Poly(methyl acrylate) (PMA) に click chemistry によって埋め込まれた典型的な [3+2] 付加環化体のトリアゾール環は、超音波によってアルキンとアジドに切断された。また、切断されたアルキンとアジドは銅触媒下の click chemistry によって再び環化し、元のトリアゾール環が再生された。

理後のサンプルは処理前のサンプルに比べ、構造変化に伴うスペクトルの変化がみられ、確かにアルキンとアジドに切断されていることがわかった。

他にも超音波による機械的な力が共有結合に影響を与える現象がすでに数例報告されている^{4,5)}。シクロプロパンやシクロブタンなどをポリマーの中心にもつ化合物はポリマーの分子質量が 60-90 kDa 程度以上で超音波による機械的な影響を受ける。この分子量依存的な現象は、トリアゾール環でも確認された。さらに、TriP₉₆ をジフェニルエーテル中、258 °C で 19 時間加熱したがポリマーの開裂は見られなかった。以上のことから、トリアゾール環は熱による影響ではなく機械的な力により開裂したと考えられる。さらに Brantley らは、一度切断されたアルキンとアジドの再環化を試みた。TriP₉₆ を超音波処理しアルキンとアジドに切断されたことを確認した後、脱気したアセトニトリルに溶解させ、ヨウ化銅を加え 80 °C で 19 時間攪拌したところ、最大 86% の収率で再環化させることができた。

以上のように、トリアゾール環は超音波処理による機械的な力によって開裂し、しかも再環化できることがわかった。このような、可逆的 clicking - unclicking 反応は機械的ストレス応答のモニタリング、機械的な刺激で脱保護できる保護基などへの応用が期待される。

[参考文献]

- R. Manetsch, A. Krasinski, Z. Radic, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless and H. C. Kolb, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 12809.
- J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli and C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, 104, 16793.
- J. N. Brantley, K. M. Wiggins and C. W. Bielawski, *Science*, **2011**, 333, 1606.
- J. M. Lenhardt, M. T. Ong, R. Choe, C. R. Evenhuis, T. J. Martinez and S. L. Craig, *Science*, **2010**, 329 1057.
- M. J. Kryger, M. T. Ong, S. A. Odom, N. R. Sottos, S. R. White, T. J. Martinez and J. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 4558.

新製品

細胞内カルシウムイオン測定用キット

Calcium Kit II - iCellux

<特長>

- ・薬剤低濃度領域のシグナル応答が向上（小社 Calcium Kit II - Fluo 4 比較）。
- ・プローブを添加した後の細胞洗浄は不要。
- ・Fluo 3 や Fluo 4 と同様の蛍光特性を有するプローブを使用。
- ・96 穴、384 穴の両方のマイクロプレートに対応。

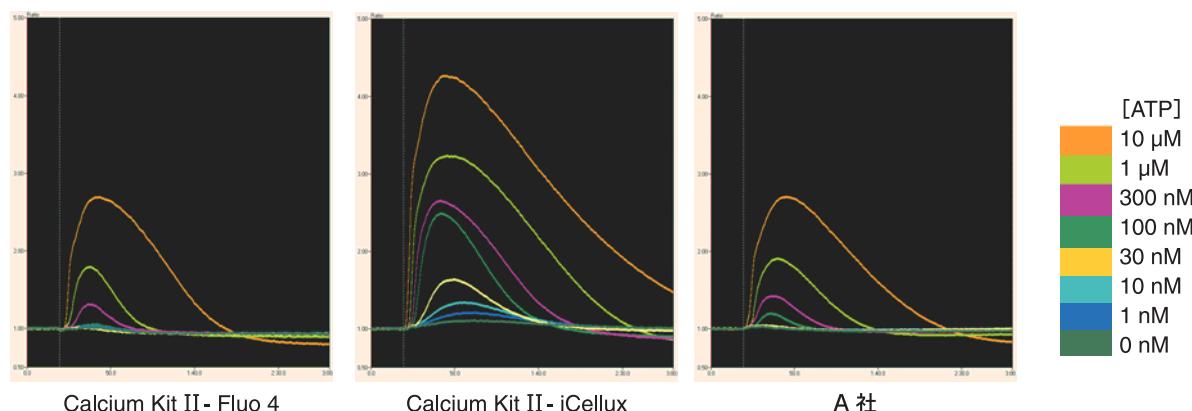
本製品は、細胞内カルシウムイオン測定蛍光試薬と測定に必要なバッファー等を組み込んだキットです。これまでのキットに比べ、低濃度域でのシグナル検出が可能となり、より高感度な Ca 濃度測定が可能となっております。

溶液中のバックグラウンド蛍光を消光するクエンチャラーを用いることで、カルシウムプローブを細胞へ負荷した後の洗浄操作を行うことなく、細胞内カルシウム濃度変化を測定できます。洗浄操作が不要となるため、HEK293 細胞などの剥離しやすい細胞を使用する場合や、特に HTS (High Throughput Screening) による薬剤スクリーニングを行う場合に適しています。また、細胞種や添加する薬剤などに応じて、製品に付属した Probenecid (陰イオントransporter 阻害剤) 溶液を添加することが可能です。

細胞種や添加する薬剤によっては、「レスポンスの高低」「リガンドとの相互作用」などが生じることがあります。測定系に影響の少ない方法での測定を行いたい場合は、Wash タイプで姉妹品の「Calcium Kit - Fluo 4」をご使用ください。本キットでは、96 穴プレート 10 枚分の測定が可能です。

<測定例>

Fig. 1 FDSS7000 EX を用いた、細胞内カルシウム測定結果



細胞 : CHO-K1 プレート : NUNC 384 wells plate (Non-coating)

刺激薬剤 : ATP final: 1 nM-10 μM

Probenecid : final 1.25 mM Calcium Probe インキュベート時間 : 1 hr

データ提供 : 浜松ホトニクス株式会社

<キット内容>

· Calcium Probe	× 10
· Dimethylsulfoxide	2 ml × 1
· Quenching Buffer	100 ml × 1
· 250 mmol/l Probenecid	1.3 ml × 1

操作方法

- 1) クリアボトルの蛍光測定用マイクロプレートに細胞を播種する。
- 2) 添付の Dimethylsulfoxide を用いて、Calcium Probe を溶解し、Quenching Buffer に加え、Loading Buffer を調製する。
- 3) 1) のプレートに培地と等量の Loading Buffer をそれぞれのウェルに加える。
- 4) 37°Cで 1 時間インキュベートする。
- 5) そのまま薬剤添加による蛍光強度変化を各種蛍光プレートリーダーで測定する。

注意事項

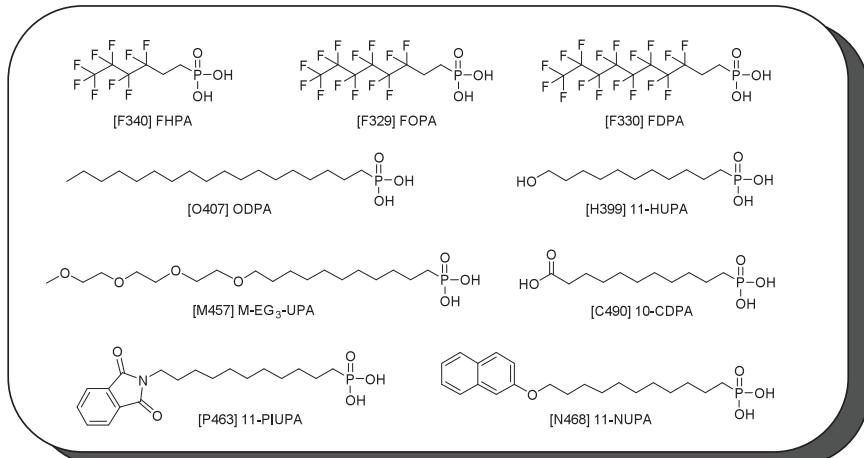
*測定には、クリアボトルの蛍光測定用マイクロプレートと下方励起／下方蛍光測定が可能なマイクロプレートリーダーが必要になります。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Calcium Kit II - iCellux	10 plates	58,000	CS34

新製品

自己組織化单分子膜作製用試薬

アルキルホスホン酸誘導体



ホスホン酸誘導体は、Al₂O₃¹⁾、TiO₂²⁾、ZrO₂³⁾、SiO₂⁴⁾、マイカ⁵⁾、ステンレス(SS316L)⁶⁾、ニチノール⁷⁾、ヒドロキシアパタイト⁸⁾、ZnO⁹⁾、ITO^{10,11)}等の種々金属酸化物の表面処理・改質剤として、近年、注目されています。小社ではこのような表面処理用のホスホン酸誘導体9種類を6月より発売しております。

<ホスホン酸誘導体の特長>

金属酸化物の表面処理には古くから有機シランの自己組織化单分子膜(SAMs)が用いられていますが、安定性が低く、試薬同士の重合が起こるなど必ずしも使い易いものではありません。ホスホン酸誘導体はそれ自身は非常に安定な化合物であるにもかかわらず、有機シラン同様に金属酸化物表面にSAMsを形成します。また、ホスホン酸誘導体は有機シランに比べ、密度が高く安定なSAMを形成します。

Schwartzらは、Ti酸化膜上に11-HUPAのSAMを形成して蛍光分子を修飾し、ホスホン酸SAMが有機シランよりも4倍高密度で、アルカリ溶液中で安定性が高いことを示しています¹²⁾。有機シランがTi酸化膜上に存在するOH基としか反応できないのに対し、ホスホン酸誘導体は基板にプロトンを供給することでOHを產生し、高密度に結合すると考えられています¹³⁾。

<有機デバイスへの応用例>

KlaukらやSekitaniらは、Al₂O₃上のアルキルホスホン酸(ODPA)SAMを有機トランジスタの絶縁膜として使用し、トリクロロシラン誘導体よりも密度が高く、有用であることを示しています¹⁴⁾。

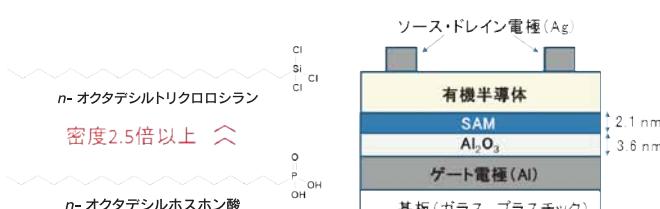


Fig. 1 SAMを絶縁膜に利用した有機トランジスタの模式図¹⁴⁾。

ます(Fig. 1)¹⁴⁾。また、Kraftらはフッ化アルキルホスホン酸(FDDPA:試作品)のSAMをゲート絶縁膜として利用して、低電圧有機薄膜トランジスタのしきい値電圧の制御に成功しています。FDDPAはフッ化アルキル鎖の強い電気吸引性のため、アルキルホスホン酸に比べ、しきい値電圧を約1V変化させると報告されています¹⁵⁾。

更にフッ化アルキル鎖を有するホスホン酸誘導体はITOの修飾により仕事関数を増加することから、注目を集めています。SharmaらはITO基板をFOPAで修飾することにより、酸素プラズマ処理と同様に、ITO基板の仕事関数が増大することを報告しています¹⁰⁾。酸素プラズマ処理によって増加した仕事関数はすぐに低下しますが、FOPA修飾により増加した仕事関数は安定性が高く、246時間後も低下しないことが示されています(Fig. 2)。また、FOPA修飾ITOを用いて作製した有機ELデバイスは発光量、駆動電圧ともにより安定で、長寿命化されています。

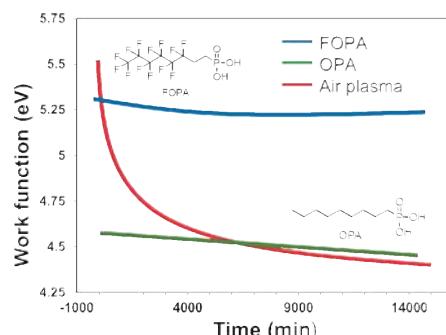


Fig. 2 FOPAにより増加したITOの仕事関数の安定性¹⁰⁾。

<その他の応用例>

有機デバイス以外にも最近様々な応用例が報告されています。例えば、PulsipherらはITO基板に水酸基末端のアルキルホスホン酸(11-HUPA)のSAMを形成し、酸化条件をコントロールすることで、アルデヒドとカルボン酸二種類の表面パターンを作製して

います¹¹⁾。Traina らはオリゴエチレングリコール部位を有するアルキルホスホン酸で Y_2O_3 微粒子を修飾し、水に均一に分散することに成功しています¹⁶⁾。

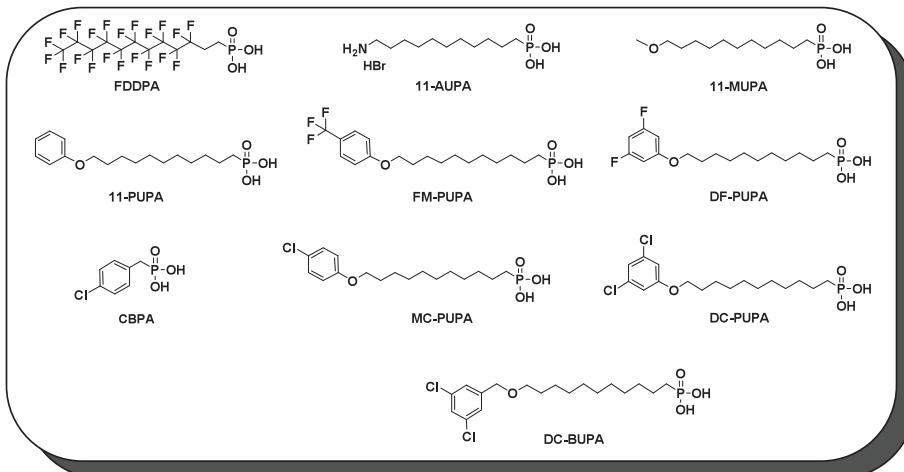
Zhang らは、ZnO 上にカルボン酸末端のアルキルホスホン酸(10-CDPA) SAM を形成し、縮合剤を用いて抗体を固定化し、バイオセンサーへの有用性を示しています⁹⁾。

高原らはゾルゲル法で作製したアルミナゲルを FDPA で修飾し、

超疎水性表面の作製に成功しています¹⁷⁾。

＜試作品のご案内＞

同仁化学研究所では、このような種々の金属酸化物表面の機能化に有用なホスホン酸誘導体の開発を進めております。試作品として下記のような誘導体もございますので、ご興味、ご要望などありましたら、お気軽に小社までお問合せ下さい。



[参考文献]

- (a) T. A. Lewington, M. R. Alexander, G. E. Thompson and E. McAlpine, *Surf. Eng.*, **2002**, 18(3), 228. (b) T. Hauffman, O. Blajiev, J. Snauwaert, C. van Haesendonck, A. Hubin and H. Terryn, *Langmuir*, **2008**, 24(23), 13450.
- (a) B. M. Silverman, K. A. Wieghaus and J. Schwartz, *Langmuir*, **2005**, 21(1), 225. (b) G. Zorn, I. Gotman, E. Y. Gutmanas, R. Adadi, G. Salitra and C. N. Sukenik, *Chem. Mater.*, **2005**, 17(16), 4218. (c) E. S. Gawalt, G. Lu, S. L. Bernasek and J. Schwartz, *Langmuir*, **1999**, 15(26), 8929.
- W. Gao and L. Reven, *Langmuir*, **1995**, 11(6), 1860.
- (a) E. L. Hanson, J. Schwartz, B. Nickel, N. Koch and M. F. Danisman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125(51), 16074. (b) M. Dubey, I. Gouzman, S. L. Bernasek and J. Schwartz, *Langmuir*, **2006**, 22(10), 4649. (c) I. Gouzman, M. Dubey, M. D. Carolus, J. Schwartz and S. L. Bernasek, *Surf. Sci.*, **2006**, 600(4), 773.
- J. T. Woodward, A. Ulman and D. K. Schwartz, *Langmuir*, **1996**, 12(15), 3626.
- A. Raman, M. Dubey, I. Gouzman and E. S. Gawalt, *Langmuir*, **2006**, 22, 6469.
- R. Quinones and E. S. Gawalt, *Langmuir*, **2008**, 24, 10858.
- S. C. D'Andrea and Al. Y. Fadeev, *Langmuir*, **2003**, 19, 7904.
- B. Zhang, T. Kong, W. Xu, R. Su, Y. Gao and G. Cheng, *Langmuir*, **2010**, 26(6), 4514.
- A. Sharma, B. Kippelen, P. J. Hotchkiss and S. R. Marder, *Appl. Phys. Lett.*, **2008**, 93, 163308.
- A. Pulsipher, N. P. Westcott, W. Luo and M. N. Yousaf, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131(22), 7626.
- B. M. Silverman, K. A. Wieghaus and J. Schwartz, *Langmuir*, **2005**, 21, 225.
- J. Schwartz, M. J. Avaltroni, M. P. Danahy, B. M. Silverman, E. L. Hanson, J. E. Schwarzbauer, K. S. Midwood and E. S. Gawalt, *Mat. Sci. Eng. C*, **2003**, 23, 395.
- (a) H. Klauk, U. Zschieschang, J. Pflaum and M. Halik, *Nature*, **2007**, 445, 745. (b) T. Sekitani, Y. Noguchi, U. Zschieschang, H. Klauk and T. Someya, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, 105, 4976.
- U. Kraft, U. Zschieschang, F. Ante, D. Kalblein, C. Kamella, K. Amsharov, M. Jansen, K. Kern, E. Weverb and H. Klauk, *J. Mater. Chem.*, **2010**, 20, 6416.
- C. A. Traina, A. Christopher and J. Schwartz, *Langmuir*, **2007**, 23(18), 9158.
- W. Ma, H. Wu, Y. Higaki, H. Otsuka and A. Takahara, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 6824.

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
10-CDPA	10 mg	11,000	C490
	100 mg	30,000	
FHPA	10 mg	9,800	F340
	100 mg	28,000	
FOPA	10 mg	9,800	F329
	100 mg	28,000	
FDPA	10 mg	13,000	F330
	100 mg	36,000	
M-EG ₃ -UPA	10 mg	13,800	M457
	100 mg	38,200	
11-NUPA	10 mg	11,000	N468
	100 mg	30,000	
11-HUPA	10 mg	11,000	H399
	100 mg	30,000	
ODPA	10 mg	11,000	O407
	100 mg	30,000	
11-PIUPA	10 mg	11,000	P463
	100 mg	30,000	

DOJINDO LABORATORIES
FORUM in DOJIN
KUMAMOTO, JAPAN

23rd Forum in DOJIN フォーラム・イン・ドージン

ホスホリパーゼA₂が織りなす多元的世界

日時：2012年11月16日（金）10:00～17:00（開場 9:30）

場所：熊本ホテルキャッスル（熊本市中央区城東町4-2）

代表世話人：山本 哲郎（熊本大学大学院生命科学研究所 分子病理学分野）

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

参加費：無料
定員：140名

講演プログラム

10:00～10:05	主催者挨拶／野田 栄二（株式会社 同仁化学研究所）
10:05～10:15	世話人挨拶／山本 哲郎（熊本大学大学院生命科学研究所 分子病理学分野）
Session 1: 〈座長：住本 英樹（九州大学大学院医学研究院 生化学分野）〉	
10:15～11:15	清水 孝雄（東京大学大学院医学系研究科 特任教授） 「リン脂質代謝 — ホスホリパーゼA ₂ とアシル転位酵素」
11:15～12:00	村上 誠（東京都医学総合研究所 生体分子先端研究分野） 「sPLA ₂ 分子群のバイオロジー」
12:00～13:30	ランチブレイク マスターズレクチャー 西野 憲和（九州工業大学名誉教授） 「有機機能分子の設計合成」
Session 2: 〈座長：山本 哲郎（熊本大学大学院生命科学研究所 分子病理学分野）〉	
13:30～14:15	久木山 清貴（山梨大学大学院医学工学総合研究部 内科学第二講座） 「心血管病におけるホスホリパーゼA ₂ の役割」
14:15～15:00	隅 寿恵（大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学） 「ホスホリパーゼA ₂ β（PLA ₂ G6） 遺伝子異常と神経変性」
15:00～15:15	コーヒーブレイク
Session 3: 〈座長：三浦 利（株式会社 同仁化学研究所）〉	
15:15～16:00	西浦 弘志（熊本大学大学院生命科学研究所 分子病理学分野） 「C5a受容体シグナルの多様性： リボソームタンパク質S19オリゴマー刺激に対する 単球走化反応におけるホスホリパーゼA ₂ の役割」
16:00～16:45	上田 直子（崇城大学薬学部生命薬学講座 生化学研究室） 「ハフ毒ホスホリパーゼA ₂ アイソザイムの構造・機能と分子進化」
16:45～17:00	閉会の挨拶／三浦 利
17:00～18:30	ミキサー

問い合わせ・参加申込先

〒861-2202 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

- ◆事前登録をいただいた方へ昼食（お弁当）をご用意いたしております。
- ◆講演終了後、ミキサー（無料）を同会場にて予定しております。
- ◆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にてお申し込み下さい。

ホームページアドレス

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

フリーファックス
フリーダイヤル

0120-021557
0120-489548

ドージンニュース No.144 平成24年9月27日発行
株式会社同仁化学研究所 DOJINDO LABORATORIES
熊本県上益城郡益城町田原2025-5 〒861-2202
発行責任者 吉田睦男 編集責任者 蒲野志保 年4回発行 許可なくコピーを禁ず