

社団法人 日本化学会
生体機能関連化学部会

NEWS LETTER

Division of Biofunctional Chemistry
The Chemical Society of Japan

Vol. 26, No.4 (2012. 3. 29)

目 次

◇ 巻 頭 言

「原点に立ち戻る勇気と大切さ…」 ……………和田 健彦 1

◇ 研 究 紹 介

カイニン酸型グルタミン酸受容体に作用する化合物
ダイシハーベイン構造類縁体の結合様式と選択性 ……………海野 昌喜 3

分子の輝き方から情報を読み出す
—1分子レベル蛍光観測による DNA 内電荷移動測定— ……………川井 清彦 8

酵素法を用いるアミノ酸計測法の開発
—医療や食品計測への応用を目指して— ……………釘宮 章光 12

巻頭言

「原点に立ち戻る勇気と大切さ…」

東北大学多元物質科学研究所

和田健彦 (hiko@tagen.tohoku.ac.jp)

この巻頭言の書かせて頂いているのは震災からちょうど一年を経過した2012.03.11です。今回私に巻頭言を書かせて頂くチャンスを与えて頂いたのは、今年の第5回バイオ関連化学合同シンポジウム2011の東日本大震災復興祈念特別セッションにおいて講演させて頂いたこともきっかけになったかと思います。今回このような講演と執筆の機会を与えて下さった鍋島先生をはじめ関連の先生方、そして非常に遅れた納稿を快く、かつ辛抱強く待って下さった今号の編集担当大槻先生に心より感謝致します。

まず、東北地区太平洋沿岸地震(東日本大震災)により亡くなられたり、未だ行方不明の1万8千人を超える方々に、哀悼の意を表すると共にご冥福ならびに一日も早い発見をお祈り致します。また、甚大な被害を被られ未だ復旧もままならない地域のみなさまに心よりお見舞い申し上げますと共に、一日も早い復旧と復興を祈念致します。

さて、フランスからの来研者が強く希望されたことも有り、1年を目前に控えた2月末、研究室から車で約15分の沿岸地区、閑上・名取地区から仙台空港、そして仙台港を訪れました。津波の来襲から1年近くが経過し、直後に多数見られた流された家屋、山のように積み重なる累々たる車、そして岸壁に乗り上げた巨大な貨物船や田畑や道路の上に不自然に横たわる数々の漁船…これらの多くは、撤去され、一見震災の爪痕は消えているかのように見受けられました。しかし、砂埃の舞う荒涼たる更地が広がり、いくつか残る錆の浮き出た赤茶けた鉄骨枠組みと僅かな石膏ボードのみ残す建物、その場所に工場や家屋が軒を連ねていたことを物語るコンクリートの土台…いまだ移転・再建計画さえ定まらず、復旧から取り越された現実をまざまざと見せつけられ、胸の痛む思いでした。さらに女川や、石巻、釜石をはじめ沿岸地域でも、いまだ復興はおろか、地域の復旧すらままならない状況です。

幸いにも仙台中心部での被害は、沿岸部の津波被害に比較すると軽く、現在復旧の鈍音も高く、復興も比較的効率よく進み、3.11以前にも増して街は元気を取り戻しております。そのため、ともすると被災地に近い我々ですら東日本大震災は記憶の中の存在、過去のものになりつつある感すらあります。しかし、沿岸部を中心とした甚大な被害を被った地域では、いまだ被害は現在進行形で有り、精神的にもさらに生活面の状況などは、むしろより厳しくなっており、震災直後の日本に広がった素晴らしい「絆」をこれからも大切に、日本全体、そして世界の力を合わせて、最適の復旧計画策定と予算措置、そして復興に取り組んでいかねばとの想いを強く致しました。

今回、地震・津波被害、そしてそれに伴う福島原発の問題を考えると、自然の猛威と現代科学の限界を感じざるを得ません。地震・津波対策に関しては、地殻歪みや移動度の測定などデータに基づく地震予測、加えて過去の被害記録などデータに基づき、科学的にその大まかな時期と規模、そしてその被害や影響が予想され、万全とは言えないものの、建物の地震対策、堤防や防潮堤建設など、かなりの程度被害を防止、抑制するための準備・対応が施されてきました。しかし、例えば津波に関しては、ギネスブックに掲載されるほど高くそして長い釜石の防波堤でさえ、津波の襲来を6分遅らせる効果があった程度と一部で報道されています。自然の猛威の前では、最新・最強の防波堤でさえその威力を封じ込めることなどままならず、その惨状はみなさまご存じの通りで、被害の拡大を防ぐには十分とは言えなかったのは明白な事実です。さらに福島原子力発電所の事故に関しても、科学者である私でさえ東日本大震災以前は、原発の安全管理は完璧で、現在報道されているようなシリアスな状況に陥ることなど夢にも予想しなかった…。多くの方々も、それが偽ざる実感ではないでしょうか。

私たちは、科学の力を信じ、その原理・論理・手法を活用し、自然を、そして自然現象をある程度コントロール出来ていると、感じ、信じてきたのではないかと思います。しかし、今となってみれば、この科学の力による自然現象の制御は妄想に近く、科学の力に対する過信の面もあったと謂わざるを得ないと思います。産業革命以降に勃興した現代科学は、自然と

対峙し、自然の力、活動を抑え込むことにより、快適で便利な社会の構築を目指してきたのではないかと感じます。そして、自然の猛威もある程度コントロールできている…と思い込んできたのではないかと…。

今回の地震・津波被害、そしてその原因が解明されていく過程で、過去の記録などを紐解かれ、また地層や自然に刻み込まれた過去の地震や津波被害が明らかにされつつあります。そのデータに基づくと、今回の被害と同程度の被害が過去にも報告され、記録されており、その結果に基づき1,000年に一度繰り返されている規模の地震・津波です…などと、報道されています。そのような記録があるのなら、なぜ東日本震災以前に読解・活用されることがなかったのでしょうか？それは、現代科学では、明治維新以降の文章・記録は、信頼できるものも多いと利用される事が多いのに対し、江戸時代以前の記録・文章は科学的記述に欠け信頼できない…と、その記述の重要性・必要性を認識せず、その記述を活用できない状況が続いてきた事にも一因があるのではと、個人的には感じています。つまり、現在の科学者は、現代科学で理解できるデータや記録を活用するのみで、それ以外の記録や記録の活用を拒んできた面も否定できないのではと…。

さらに、福島パワープラントの問題…多重安全機構を備え、完全な安全性を確立出来ていると信じ、信じ込まされてきた原子力発電所。この原発においても津波の襲撃により、全電源が喪失する状況などの引き起こされた未曾有の重大事故が現実に発生したことはみなさまご存じの通りです。素人の私が詳細を記述することは適切ではないので控えますが、先日ご一緒した原子炉の設計に携わっておられる先生のお話しでは、原発は現代科学の力・粋を集結し高度に制御されたシステムで、100%安全です！と強調し説明…地域の皆様方になんとか納得して受け入れて頂いた経緯がある。そのため、より安全度の高い改善・改良法が確立されても、完全に安全な発電施設への改良工事は、その必要性を説明することも、納得して貰うことも出来ず、結果的に安全度の高いプラントへの変更工事が実現できなかった一面もある…とのことでした。つまり、原発を支える科学技術は完璧で、核分裂反応でさえ精緻に完璧にコントロールできる…との、妄想に近い説明を行い、結果的に受け入れてきた事の責任も大きいのではと感じます。完全に安全な施設、完璧な装置などはなく、どのようにリスクを下げるか…が、重要である。そのリスク管理の考え方があれば、リスクを出来るだけ少なくするための改良工事を受け入れられたのではないかと、悔やまれるところです。

もちろん耐震補強工事や、免震・制震工法など、現代科学が災害被害の軽減に大きく貢献したことは疑いようのない事実で有り、科学者としての誇りでもあります。

しかし今回、現代科学は、その適用と力の限界を謙虚かつ冷静に判断し受け入れると共に、これまでの慢心・過信を謙虚に反省し、原点に立ち戻り、科学技術の力は完全ではなく、必ずリスクは伴うことを科学者自ら再認識し、自然・自然現象への畏敬の念も大切に、もう一度社会からの信頼、そして自信を取り戻すべきではないかと感じます。このような反省と社会への説明には、社会からの信頼を失う危険性もはらみ、それを受け入れる勇気も必要です。しかし、人類の快適で充実した生活には科学の、そして科学技術の発展が必要不可欠…この大災害をきっかけに、科学者のみならず人類は、もう一度原点に立ち戻り、謙虚な姿勢を取り戻すと共に、今回の経験を糧として、自然科学、そして科学技術は自然との本当の意味での共生をなし得る新しい方向性とステップに進まなければならないと思います。

日本には、みなさまご存じのように自然と対峙しコントロールするだけではなく、自然を敬い、自然と共に生きていく独自の習慣・視点が豊かであったと考えられています。また、生体機能関連化学は、日本がユニークで世界のトップレベルの研究水準を誇る科学分野の一つであると共に、自然に学び、自然と共に発展していくべき学問…。今回の経験を活かし、もう一度原点に立ち戻り、日本独自の視点を大切に、自然に学び、自然を活用した新たなステップに発展していければ…と感じております。そして、私自身微力ながら、原点に立ち戻り、知的的好奇心と不屈の精神、ポジティブな姿勢を大切に、真摯に日々努力を重ねることが、1万8千人の方々へのせめても弔いになるのでは…と感じ、頑張っていくことを心に誓っております。

今回の東日本大震災を糧に、科学者としての原点に立ち戻り、自然への畏敬の念と科学技術の過信と妄想への戒めとして、いつまでもその経験を大切にしていければ…と、願い、祈っております。

震災、そして原発被害を受けられた方々への熱い想いに駆られ、僭越な文章となりましたことをお詫びすると共に、被災地の一日も早い復旧・復興を祈念し、筆を置かせて頂きます。

研究紹介

カイニン酸型グルタミン酸受容体に作用する化合物 ダイシハーベイン構造類縁体の結合様式と選択性

茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター 海野昌喜

今回は、私が東北大学多元物質科学研究所の齋藤正男研究室の助教だった時、当時の大学院生と、東北大学大学院生命科学研究所の佐々木誠教授や北海道大学水産学部の酒井隆一教授（当時、北里大）らと始めた研究（1）を紹介させていただきたい。

1. 研究の背景

1.1. グルタミン酸受容体 (GluR)

イオンチャンネル型グルタミン酸受容体 (iGluR) は、シナプス前細胞から神経伝達物質として放出されるグルタミン酸を受容するGluRの一種で、ホモまたはヘテロ四量体で構成されるイオンチャンネルである。グルタミン酸の結合による構造変化で、チャンネルの開閉により陽イオンを細胞内へ導入し、活動電位を発生させる (図1)。

iGluRには、少なくとも18種類のアイソフォームが存在し、それらは種々のアゴニストに対する感受性の違いにより、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 型、(S)-アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸 (AMPA) 型、カイニン酸 (KA) 型の三種のサブタイプに分類されている。iGluRの生理機能は、速い興奮性の神経伝達、記憶や学習の細胞レベルにおける基盤と考えられているシナプス可塑性や、痛みの認知、虚血などの病的条件下における神経細胞死など、非常に重要で多岐にわたる事が解ってきている (2-4)。しかし、アイソフォームが多数存在する意義や個々のアイソフォーム (サブユニット) の生理的な役割については未知な部分が多い。特に、KA型iGluR (5) については、他のiGluRと比べて研究が立ち遅れていた。

アイソフォーム個々の詳細な機能の解明のために、受容体蛋白質側からとリガンド側からの双方のアプローチによる研究が行われている。iGluRを構成するサブユニットを選択的に活性化や不活性化をすることができれば、特定のアイソフォームの機能解明に大きく寄与することができる。

1.2. ダイシハーベイン (DH)、ネオダイシハーベインA (NDH)、およびその構造類縁体

DHおよびNDHは、酒井らによって、ミクロネシア産海綿*Lendenferdia chondrodes*より単離、構造決定された天然の興奮性アミノ酸であり、天然物としては稀なシス縮環したヘキサヒドロフロ[3,2-b]ピラン環構造をもつ (6, 7) (図2)。DHとNDHでは8位の官能基が異なる (DH; メチルアミノ基, NDH; ヒドロキシ基)。この二種の天然のアミノ酸は、KA型iGluRに属するGluK1とGluK2の二種のアイソフォームに特に強く結合し、活性化することが明らかになった (KA型iGluRにはGluK1~5まで5種類のアイソフォームが存在する。) (表1)。佐々木らは、DH, NDHを種化合物として、KA型iGluRをサブユニット選択的に制御する化合物の開発を目指してきた。その中で8位と9位の官能基を両方削った8, 9-dideoxy-NDHがGluK1に選択的に結合し、アンタゴニストとして働くことを見出し、それをMSVIII-19と名付けた (8, 9)。後の研究で非常に弱いアゴニストであるということが解ったが、8位と9位の官能基の重要性が示

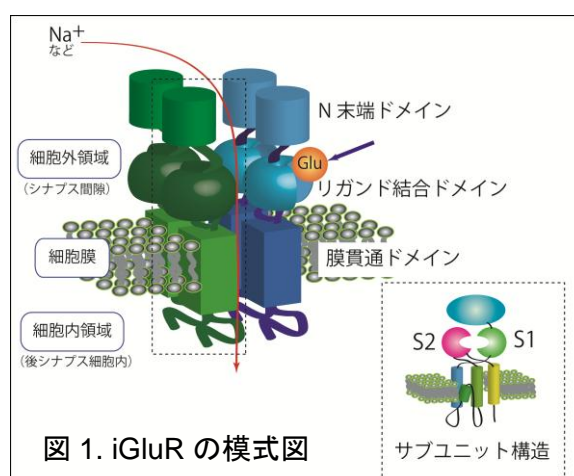


図 1. iGluR の模式図

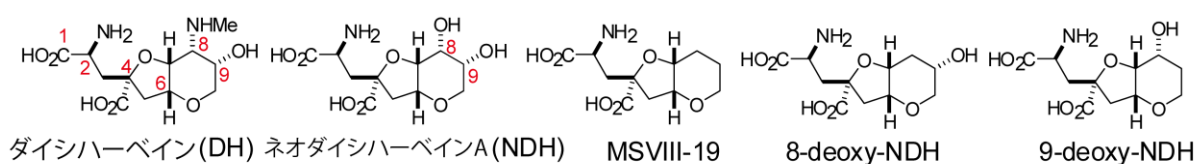


図 2. DH 構造類縁体 (一部) の化学構造式

唆され、8位OHを削った8-deoxy-NDHや9位OHを削った9-deoxy-NDHが合成され、それぞれの親和性と生物活性が測定された (10)。表1には、GluK1, GluK2に対する親和性にあたる値のみを記す。

表1. DH構造類縁体の K_i 値 (K_i 値は $[^3\text{H}]$ カイン酸の置き変えを基に実験的に求めた解離定数)

K_i (nM)	L-glutamate	DH	NDH	MSVIII-19	8-deoxy-NDH	9-deoxy-NDH
GluK1	290	0.5	7.7	128	1.5	169
GluK2	1080	1.3	33	> 100,000	48,000	> 100,000

DH, NDHは、GluK1, GluK2両方に強く結合する (K_i 値はnMのレベルである。言うまでもないが、値が小さいほど親和性は高い)。NDHの8位を削った8-deoxy-NDHは、NDHと比べてGluK1に対する親和性は落ちないが、GluK2に対しては、大きく親和性を低下させる (表1)。9位を削ると (8位OH基の有無に関わらず)、GluK1に対する親和性自体もやや落ちるが、GluK2には結合しなくなる (表1)。これらの化合物が図2に示すように非常に似た化学構造であり、また、GluK1とGluK2のリガンド結合ドメインのアミノ酸配列のidentityが80%以上あるという事実を考えると、その現象は非常に不思議である。これらDH構造類縁体は、どのようにGluK1とGluK2に対する結合選択性を生み出しているのか？

もう一つの興味は、KA型iGluRの活性化機構である。MSVIII-19がGluK1の実質アンタゴニストであることや、9-deoxy-NDHもアゴニスト活性が弱い事から、他の強力なアゴニストと比較することで、どのような違い (例えば結合後の蛋白側の構造変化) により、チャンネル活性化や不活性化が引き起こされるか？ということが解るかもしれない。これらは薬剤設計に欠かせない情報である。

1.3. この研究の目的

本研究では、これらDH構造類縁体と二種類のiGluRアイソフォーム (GluK1, GluK2) のリガンド結合部位との複合体の結晶構造解析を行い、化合物の構造とiGluRへの結合選択性や活性化との相関を明らかにする。得られる原子レベルの知見は、さらに効果の高いアイソフォーム選択的機能制御化合物の開発に有用な情報となる。また、親和性や生理活性の異なる化合物を用いれば、GluK1を中心としたKA型iGluRの機能や活性化機序を解明することが出来ると期待される。

2. 研究内容・方法

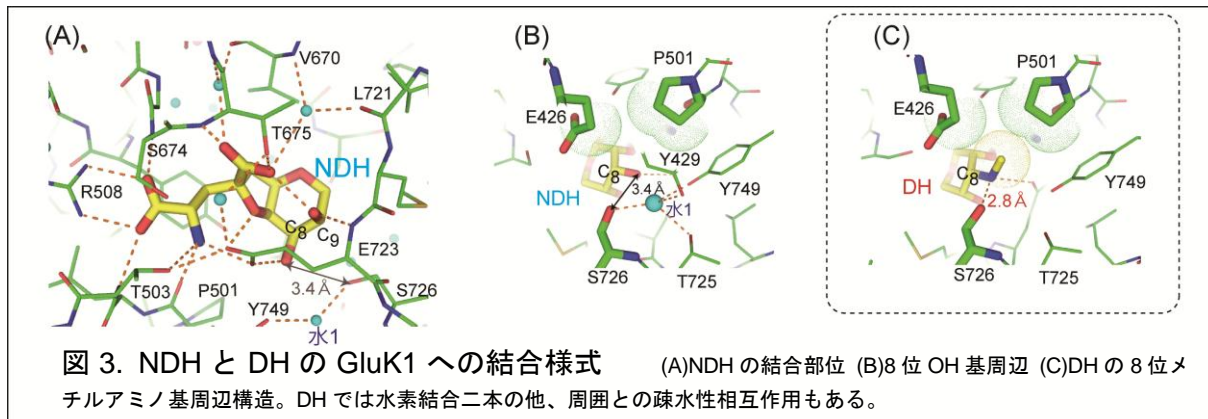
iGluR の構造は、大きく分けるとN末端ドメイン、リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン三つの要素から構成される (図1)。リガンドが結合する部位は、N末端ドメインと1番目の膜貫通ヘリックスの間のS1と2番目の膜貫通ヘリックスと3番目の膜貫通ヘリックスの間のS2という一次配列上は離れた2つの領域から構成されている (11, 12) (図1 点線枠内)。本研究では、ヒト脳由来GluK1, GluK2のリガンド結合ドメイン (hGluK1-S1S2, hGluK2-S1S2) を発現・精製し、構造研究の対象とした。

最初のhGluK1-S1S2の結晶は、試薬の定量ミスから高濃度の2-メルカプトエタノールを含んだ条件で得られた。その結晶は空間群C2に属し、非対称単位中に1分子のhGluK1-S1S2を含んでいた。形も良く綺麗な結晶だったが、再現良く得られなかったため、別の結晶化条件を検索し、還元剤が含まれていない結晶化条件を確立した。また、新しい条件で得られた結晶は軒並み高分解能の回折を示した (全て1.5Å分解能で構造解析した。)。細胞外に存在するリガンド結合ドメイン (図1) の構造解析には、高濃度の還元剤が入っている条件は適さないので、詳細な議論には、結果的に後者の結晶化条件で得られた構造が適していた。その結晶は空間群P1に属し、非対称単位中に2分子のhGluK1-S1S2を含んでい

た。DH構造類縁体はソーキングでは内在的に結合しているL-グルタミン酸と置き変わらなかったため、様々な条件を振った共結晶化で複合体構造を得た。

3. 原子レベル構造から解明されたこと

3.1. DH構造類縁体のGluK1への結合

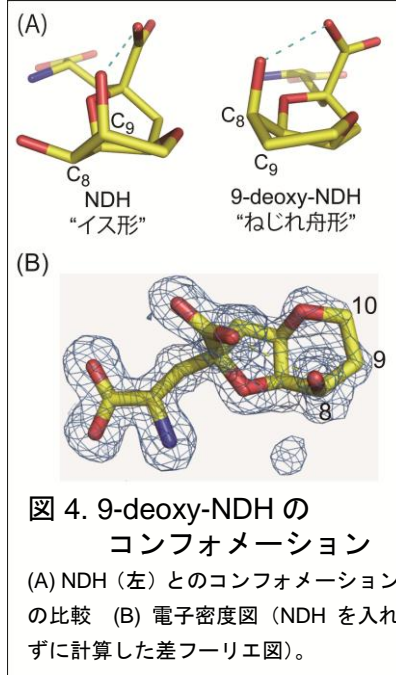


NDHのGluK1への結合様式を図示する(図3)。NDHは、DH同様、多くの水素結合や疎水性相互作用により結合を安定化されているが、8位のOH基が(Glu723を除く)GluK1のどのアミノ酸からも遠く、結合に寄与しないことを可視化できた(図3A, B)。事実、8位の置換基が無い8-deoxy-NDHは、NDHに比べて親和性が落ちない(表1)。DHとNDHの親和性の違い(表1)は、主に8位の置換基の性質と構造が異なることに由来する相互作用様式の違いによる(図3B, C)。結合様式の違いからNDHの8位付近にはDH結合時には見られない水分子(水1)が見られた(図3A, B)。DHの8位メチルアミノ基は周囲のアミノ酸と水素結合と疎水性相互作用をしているが、NDHが結合した時は、代わりに入り込んだ水1がSer726などと水素結合を形成している(図3)。

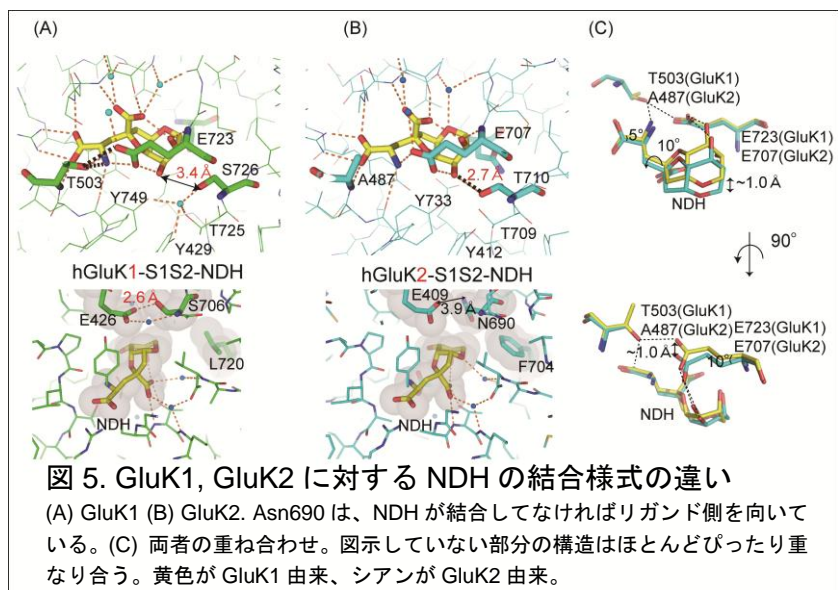
一連のDH構造類縁体とhGluK1-S1S2との複合体の高分解能構造解析での一番の発見は、化合物自体のコンフォメーションの違いが見られたことである。MSVIII-19結合型hGluK1-S1S2の構造からは、MSVIII-19がDH, NDHに比べて、平面的になっていることが分かった(1, 13)。これは、9位のOH基とグルタミン酸骨格由来のγカルボン酸との間にある分子内相互作用を失うためである。

それに遅れて構造解析した9-deoxy-NDH結合型からは、さらに面白いことが分かった。9位OH基を削っても、8位OH基が代わりにγカルボン酸と水素結合を形成していたのだ(図4)。そのため、他の化合物が単独でも安定なイス形(chair form)(図4A左)だったのに対し、9-deoxy-NDHだけは、ねじれ舟形(twisted boat form)(図4A右)であった(実際には少量イス形コンフォメーションも混じっているようである(図4B))。9位OH基を失うことは、Glu723の主鎖アミノ基との分子間の水素結合(図3A)を失うというだけでなく、化合物分子内の水素結合を失うことにより化合物自体のコンフォメーションが変化し、GluK1のリガンド結合ポケットの形状に適さなくなってしまう、ということが言える。とはいえ、9-deoxy-NDHもMSVIII-19も、GluK1に対してはまだ、比較的高い親和性を保持している(表1)。それなのになぜ、GluK2には結合しなくなるのか?それは、GluK2とNDHの結合を見ることで初めて理解することが出来た(次項)。

3.2. NDHのGluK2への結合(GluK1への結合様式との違い)から見る構造類縁体の結合選択性



hGluK2-S1S2の結晶の空間群は $P2_1$ であり、hGluK1-S1S2の $P1$ とは異なる。共に非対称単位には2分子のリガンド結合部位を含んでいるが、二分子の相対位置は両者では全く異なる。しかし、単量体として見た場合には、両者の全体構造は非常に似ている。また、NDHの結合様式も当然似ていた。両者のNDH結合に関与するアミノ酸の違いは、たった3残基である。このたった3残基の違いが、8-deoxy-NDH, 9-deoxy-NDH, MSVIII-19のGluK1, GluK2への結合に劇的な選択性を生み出していた。



GluK1でNDHのグルタミン酸骨格と水素結合している重要なアミノ酸の一つであるThr503に対応する残基が、GluK2ではAla487である(図5)。GluK1では、Thr503の側鎖はGlu723とも水素結合を形成しているが、GluK2のAla487はそれらの水素結合は形成し得ない(図5)。よって、GluK2とNDHのグルタミン酸骨格側の相互作用は、GluK1の場合と比べて弱い。また、GluK1のGlu723とそれに対応するGluK2のGlu707のコンフォメーションがやや異なる(図5 C)。そのため、そのグルタミン酸と水素結合を形成しているNDH自体のコンフォメーションもGluK1内とGluK2内では異なる(図5 C)。その微妙なコンフォメーションの違いが、8位のOH基とポケット内部のアミノ酸との水素結合に変化をもたらしている。GluK1内ではSer726と8位OH基との距離が3.4 Åあり(図5 A)、効果的な水素結合を形成するには遠すぎるのに対し、GluK2内では、それに対応するThr710と8位OH基との距離が2.7 Åと理想的な水素結合距離である(図5 B)ため、NDHは安定化されていると考えられる。つまりNDHは、GluK2の中で、GluK1内と比較して、自身のグルタミン酸骨格側での結合は弱いが、二環状構造側では8位OH基を介して安定化されている。これはGluK1の場合とは対照的である。

もう一つ重要な違いは、GluK1のSer706(図5 A下)とGluK2のAsn690(図5 B下)である。L-グルタミン酸やカイニン酸を結合したGluK2では、Asn690の側鎖はリガンド側を向いているが、NDHが結合した時のみ、外側を向くようにコンフォメーション変化している。そのように構造変化しないとNDHは納まらないのだ。GluK1のように、そこが側鎖の小さなセリンなら構造変化は必要ない。

これらの構造的特徴をまとめると、

- ①NDHの8位OH基はGluK1では結合安定化に寄与しないが、GluK2では重要な水素結合を形成する。
- ②NDHのグルタミン酸骨格側での結合安定化は、GluK2では、GluK1に比べ弱い。
- ③GluK2ではAsn690が立体障害になり、NDHが結合するのにマイナスに寄与している。

よって、NDHの8位OH基を削ってしまうと、結合を安定化する要素が減り、GluK2のAsn690の回転を起こさせる事が出来ず、GluK2には結合し難くなってしまふ(表1)。9位のOH基を削った場合は、8位OH基も動きGluK2蛋白質側との水素結合も失う上、化合物自体のコンフォメーション変化により、Asn690との衝突の影響が大きくなり、GluK2には結合できなくなってしまう(表1)のだと考えられる。

3.3. チャンネルの活性化はどのように制御されるのか

最近まで、iGluRはリガンド結合ドメインのみでも二量体になって、リガンド結合時の分子間の動きによりチャンネルの開口を誘起するという説があったが、今回の解析の過程で異なった結晶系の結晶が得られたこと(そのうちhGluK1-S1S2のC2の結晶は非対称単位に1分子しか含まない)、hGluK1-S1S2

とhGluK2-S1S2を二量体として見ると全く異なった構造になってしまうこと、ラットのものと構造比較でも二量体構造は全く異なる事などから、リガンド結合ドメインを二量体構造で考えて活性化機構を論じることは無意味だと思われる（もちろん、生体内では、リガンド結合ドメイン同士の相互作用はあり得る。）。

また、アゴニストを結合した時、リガンド結合ドメインが閉じ、その構造変化がチャンネルドメインに伝わり、チャンネルの開口を引き起こす、という考え方があった。アンタゴニストは、逆に、リガンド結合ドメインを開いた構造に保ち、チャンネルを閉じた状態にする、という機構である。しかし、最近の研究で、そのような単純な機構ではないことが示唆された(13)。本研究でも、リガンド結合部位の閉じ具合は、どのDH構造類縁体を結合した時もほぼ同じであり、その他、リガンドによって異なるような特徴的な動き（例えばツイストと呼ばれる動き）は見られなかった。

一連の構造解析から、チャンネル活性化については、次の3つの可能性が示唆される。

①そもそもリガンド結合ドメインのみの構造解析では、活性化機構については論じられない。

②リガンド結合ドメインの開閉やツイストという動きは、チャンネル活性化に関係ない。

③この構造は脱感作後の構造である。

これらの可能性のうち、どれが真実かを解明するためには、四量体全体構造や脱感作を起こさない変異体の高分解能構造解析など、更なる研究が必要である。

4. おわりに

この研究で得られた知見を基に、我々のグループでは、実際に、新たに GluK1 選択性の高い化合物の合成にも至っている。筆者はこのような薬剤設計には、親和性と相互作用様式との相関に定量化は必要ないと考えているが、化学に興味のある読者の中には、そのような定量性を要求する方もおられるかもしれない。今回の研究の更なる定量的解析に興味がある方がおられれば、是非共同研究をお願いしたいと思っている。unno19@mx.ibaraki.ac.jp までご連絡いただくと幸いです。

水素結合の有無は、水素が見えないこの分解能の X 線結晶構造解析では、実ははっきり言えない部分もある。水素原子を可視化するには、中性子結晶構造解析が非常に強力な手段となる。筆者は、現在、茨城大学フロンティア応用原子科学研究センターにおいて、蛋白質の中性子結晶構造解析を行おうと日々研究している。X 線結晶構造解析に比べると、測定できる格子定数に限界があることや非常に大きな結晶を要することなど、まだ弱点が多い。水素原子を可視化する中性子結晶解析の共同研究も募集しているので、大きな結晶が出来やすい蛋白質試料をお持ちの方はご連絡いただきたい。

謝辞

この研究は、上述した三名の先生と大学院生達の他に、東北大・医の堂浦教授、照屋助教（現・京都薬科大・准教授）など多くの方々の協力の元に行われました。ここに感謝申し上げます。

参考文献

- (1) Unno, M. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **413** (2011), 667-683
- (2) Asztely, F. *et al.*, *Mol. Neurobiol.* **12** (1996), 1-11
- (3) Schoepp, D. D. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299** (2001), 12-20
- (4) Maren, S. *et al.*, *Neurobiol. Learn. Mem.* **63** (1995), 1-18
- (5) Postila, P. A. *et al.*, *Neuropharmacology*, **58** (2009), 1-13
- (6) Sakai, R., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997), 4112-4116
- (7) Sakai, R., *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296** (2001), 650-658
- (8) Sanders, J. M., *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314** (2005), 1068-1078
- (9) Sanders, J. M., *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, **69** (2006), 1849-1860
- (10) 例えば Sakai, R., *et al.*, *Org. Lett.*, **3** (2001), 1479-1482 など
- (11) Fleck, M. W. *et al.*, *J. Neurosci.*, **23** (2003), 1219-1227.
- (12) Swanson, G. T., *et al.*, *Neuron*, **19** (1997), 913-926
- (13) Frydenvang, K., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **284** (2009), 14219-14229

研究紹介

分子の輝き方から情報を読み出す —1分子レベル蛍光観測によるDNA内電荷移動測定—

大阪大学産業科学研究所 川井 清彦

1. はじめに

夜空に瞬く星のように、1つ1つの蛍光分子に注目すると、分子がキラキラと輝いて見えることがある。これは、化学反応により蛍光分子が無発光状態となり、しばらくしてもとの発光可能な状態へと戻る過程が観測されるため、この現象は“blinking”とよばれる。筆者は、このblinkingの際の無発光状態 (=off time) の長さを測定し、蛍光分子周辺の情報にアプローチする手法の開発を目指して研究を行っている。blinkingは、分子を1分子レベルで観測することによって初めて追跡可能であり、言い換えると、blinkingの観測に基づき情報が読めれば、極微量、究極的には1分子からの情報読出しが可能となる。blinkingは様々な化学反応により引き起こされるが、本稿では光電子移動に伴う電荷分離に注目し、DNA内電荷移動速度の配列依存性を利用してDNA配列の読み出しを行った研究について述べる。

2. DNA内を電荷が移動する速度

まず、筆者らが行なってきたDNA内電荷移動の速度論的研究について、その背景を含め簡単に紹介する。DNAはその構造が明らかになった50年前当初からその導電性が注目されていた。90年代後半、DNAに位置特異的に光増感剤を結合し光照射すると、遠く離れた位置で酸化損傷が起こることがわかり、DNA中に生じた正電荷がDNA内を100 Å以上移動することが明らかになった^{1,2)}。しかしながら、DNA内電荷移動速度、DNA酸化損傷生成物の生成速度は全くわかっておらず、その詳細な機構および効率は不明であった。筆者らは、光増感剤および正電荷アクセプターを化学修飾したDNAを合成し、過渡吸収測定により個々の反応の速度定数（本稿では速度定数の逆数＝時定数で議論する）を決定することに基づき、DNA内光電荷分離、電荷移動、DNA損傷を説明することを目標に研究を行ってきた。研究をスタートしてすぐに、LewisらによりDNA内の正電荷移動速度に関する最初の論文が報告されたが³⁾、彼らが主に1 μs以下の時間領域の時定数を扱ったのに対し、筆者らは最終的な酸化損傷生成物の生成を時定数で説明することを目標の一つとしており、より幅広い時間領域（～1 ms）のDNA内電荷移動について検討を行なった。100 Åを超えるDNA内長距離電荷移動の実時間観測に成功し、Lewisらの報告と合わせることで、最終的にほぼすべての配列の電荷移動速度が決定された⁴⁾。

電荷は電子リッチな塩基のπ平面を介して移動するが、このπ平面の重なりで乱れを生じると電荷移動効率が低下すると予想された。そこで、長鎖DNAにおいて1塩基の違いにより生じるミスマッチを電荷移動測定より読み出し、一塩基多型 (SNPs) の検出に応用する試みが多くなされた^{5,6)}。著者らは、電荷移動測定をミスマッチ鎖にも拡張し、図1に示すようにDNA内電荷移動を各ステップの時定数の組み合わせで表すことができ、DNAの配列情報を時定数と言う情報に置き換えられることを示した⁷⁾。これは、一塩基多型を含むDNAの配列情報を時定数として読み出せることを意味する。しかしながら、一旦最も酸化電位の低いG上に正電荷が生じると、正電荷はG-C間を移動するため電荷移動はA-Tの存在により遅くなり、G-Cリッチな配列でしか電荷移動測定が出来ないという問題があった。

3. DNA内電荷移動の高速化

G-Cの割合にかかわらず電荷移動を高速化して、様々な配列の情報を読み出せないだろうか？GとのHOMOレベルのエネルギー差がAに比べ小さい、デアザアデニン (²A) やジアミノプリン (D) などA

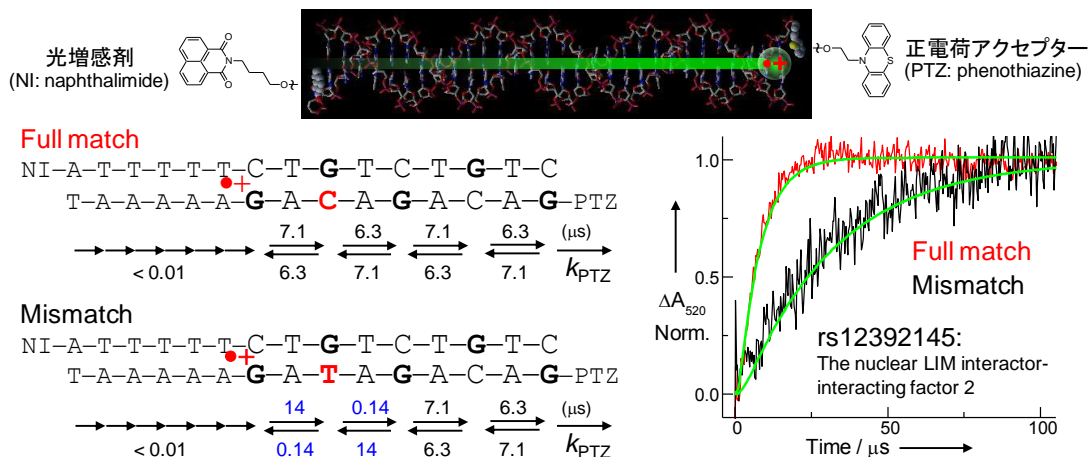


図 1. 光増感剤 NI の光励起により注入された正電荷が、もう片方の末端に達する過程を PTZ ラジカルカチオンの吸収の生成 (520 nm) よりモニターする (右: 黒線, 赤線)。配列の下に示した別途求めた時定数を用いて得られる理論線 (右: 緑線) は実験結果と良い一致を示し、DNA 内電荷移動過程がほぼ解明されていることがわかる。電荷移動速度を測定すれば配列情報を読めるが、多量のサンプルと大掛かりな装置を必要とした。

誘導体が、電荷のキャリアーとして機能しうることが中谷和彦先生、齋藤烈先生により報告されていた⁸⁾。そこで、Aを²AやDに置き換えDNA内電荷移動を測定したところ、DNA内電荷移動が配列によって3桁以上増加した。電荷移動が高速化したDNAにおいても、ミスマッチが電荷移動速度を減少することが示され、Aを²AやDに置き換えることにより、様々な配列における一塩基多型の検出が可能となった⁹⁾。しかしながら、過渡吸収測定は多量のサンプルを必要とし (>1 nmol) 実用化は困難であった。

4. 蛍光分子を用いた電荷分離の観測

極微量のDNAを用いて、電荷移動速度を測定できないか？筆者は、蛍光分子を光増感剤として用いると、電荷分離中は発光出来ず、電荷分離寿命がoff timeに対応することに着目した。電荷分離寿命は、DNA内電荷移動速度を反映するため、off timeを測定すれば周辺の配列情報を読み出せることになる。これは、潜水艦等で使われている、アクティブソナーをイメージしていただくとわかりやすい。ピン (音) の代わりに正電荷をDNA内に注入し、戻ってくるまでの時間 (off time) を測定することにより周辺の情報を読み出す手法である。では、1分子蛍光観測に用いられているような一般的な蛍光分子を用いても電荷分離・電荷再結合の測定が可能なのだろうか？蛍光分子として TAMRA、Alexa 532、ATTO 655 を用い、正電荷アクセプターとして PTZ を修飾した DNA を合成し、過渡吸収測定を行ったところ、これら蛍光分子を用いて DNA 内電荷分離、電荷再結合の観測が可能であることがわかった。これにより、DNA 中の G のみにその蛍光が選択的に電子移動消光される様々な蛍光分子を用いて DNA 内電荷分離・電荷再結合の観測が可能であることが示唆された。

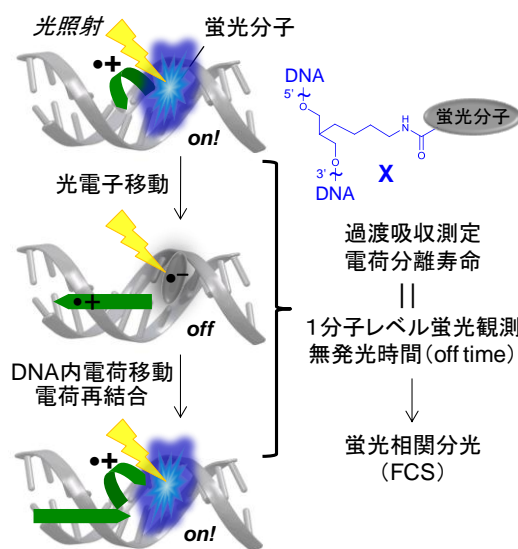


図 2. 蛍光分子は、電荷分離により還元されると、発光できないラジカルアニオン状態となる。配列に大きく影響を受ける DNA 内電荷移動を経て電荷再結合が進行すると、再び発光可能な状態に戻る。蛍光が消えている時間 (off time) の長さが電荷分離寿命に対応する。

5. 分子の輝き = blinking の観測 ~ 蛍光相関分光 (FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy) ~

比較的容易に再現性良く 1 μs の時間分解能で blinking を観測できる手法として、筆者はハイスループット測定が可能な市販装置も存在する FCS に着目した。FCS は主に、共焦点顕微鏡の焦点内を蛍光分子が通過する時間を求め、分子の拡散速度 (τ_D) を測定するのに用いられるが、同時に焦点を通過する際の蛍光の blinking の off time (τ_{FCS}) に関する情報も得ることができる。蛍光分子は、焦点を通過する際に何度も励起・発光サイクルを繰り返し、その際電荷分離が起こると蛍光分子は光を吸収しても発光しないラジカルアニオン状態となる (ATTO 655 はラジカルアニオン状態が励起光の 633 nm に吸収を持たないためそもそも光励起が起こらない¹⁰⁾)。電荷再結合によりもとに戻ると、再び励起・発光サイクルを繰り返すことになる。実際は、複数の蛍光分子が焦点内に入出入りするので、自己相関解析により、 τ_D 、 τ_{FCS} が求められる。FCS 測定は MF20 (オリンパス : 384 サンプル連続測定可) を用い¹¹⁾、DNA を 2 nM 45 μL (0.1 pmol)、 τ_D と τ_{FCS} をより明確に区別するため PEG20,000 を 5% を添加し、各サンプル 10 秒 \times 3 回、すなわち過渡吸収測定 の 10,000 分の 1 以下のサンプルを用いて、1 時間 100 サンプル以上のハイスループット条件で自動測定・自動解析を行なった。

ATTO 655 を蛍光分子として選び (理由は後述)、様々な配列における電荷分離を可能とするため、鎖内 (末端ではなく) アクセプターとしてデアザグアニン (Z) を用い、DNA 内電荷移動を高速化するため一部 A を D に置き換えた DNA を合成した。ATTO 655 と Z の間の配列を 1 塩基ずつ変化した、1、G \rightarrow A、D \rightarrow G の FCS 測定結果を図 3 に示した。すべての配列において τ_D は同様の値を示したが、 τ_{FCS} は配列に伴い大きく変化した。 τ_{FCS} は別途過渡吸収測定より求めた電荷分離寿命と良い一致を示し、FCS を用いて電荷分離寿命の測定、配列情報の読み出しができることが示された。 τ_{FCS} は 1、G \rightarrow A、D \rightarrow G となるに従い増加したが、これは ATTO 655 と Z 間の塩基の HOMO レベルが減少し、Z との HOMO ギャップが増加し電荷再結合速度が遅くなることにより説明された¹²⁾。次に、ATTO 655 と Z 周辺にミスマッチを配置し FCS 測定を行なった。フルマッチの鎖に比べ、ミスマッチの存在により τ_{FCS} が増加しており、FCS 測定によりミスマッチの検出、すなわち SNPs の読みわけが可能であることが示された¹³⁾。著者らはこれまで、DNA/RNA ハイブリット中においても、電荷移動の測定が可能であることを報告しており¹⁴⁾、現在 RNA の化学修飾や編集に関する情報を、PCR を経ずそのまま読み出す手法の開発を行なっている。

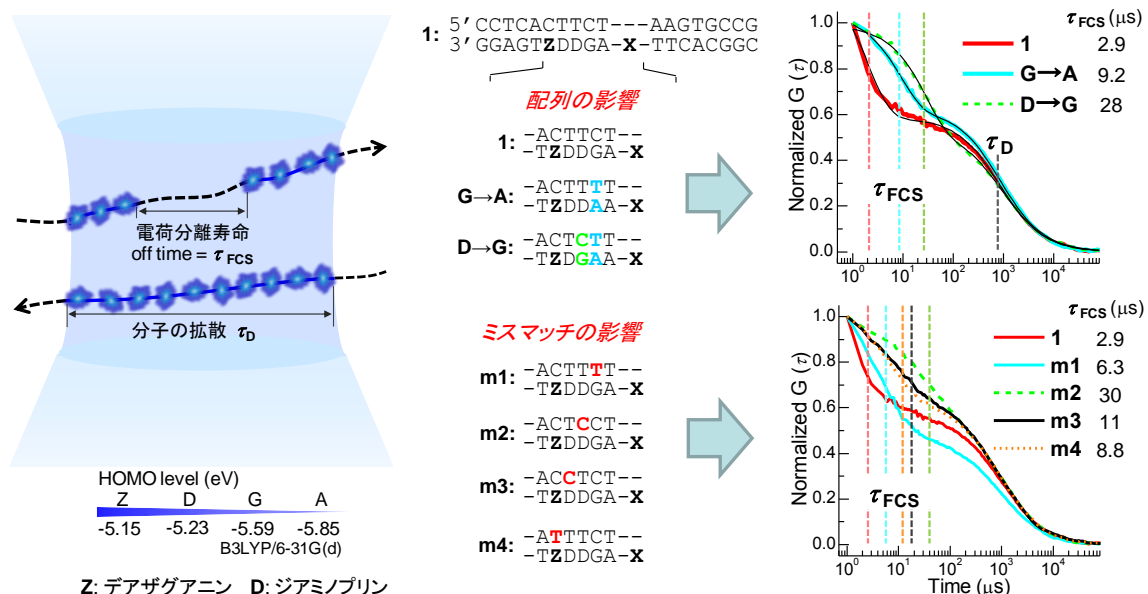


図 3. 左 : FCS 測定 の 概念。レーザー焦点内の蛍光分子が光励起され、分子が焦点を通過する時間 (τ_D) に加え、off time (τ_{FCS}) を測定できる。右 : τ_{FCS} から、DNA 配列、ミスマッチを読み出すことができる。

4. おわりに

1分子レベル蛍光観測により、**blinking**としてDNA内電荷分離を観測可能な蛍光分子は、次の諸条件を満たす必要がある。まず、三重項励起状態も**blinking**として観測されるため、**a) 項間交差収率が非常に低い**必要がある。蛍光分子は基本的に良く光ることが望まれ、DNA内で十分な発光量子収率を有するため、**b) 最も酸化電位の低いG以外に消光されない**ことが大事である。そして、空気飽和下での実験を可能とするため、**c) 還元電位が酸素より正でなければならない**。もし、還元された蛍光分子が電荷再結合よりも速く酸素と反応すると、電荷分離寿命が測定出来ないうえ、電荷再結合が進行せず反応が不逆になりDNA損傷が引き起こされる¹⁵⁾。脱気下で行うと、優れた三重項励起状態の消光剤である酸素が存在しないため、三重項励起状態が蓄積してしばしば測定が困難になる。b)、c) が両立するためには、酸素の還元電位 (-0.32 V vs NHE)、2番目に酸化されやすいAの酸化電位 (1.63 V vs NHE) を考慮すると、蛍光極大は635 nm (1.95 eV) よりも長波長であることが必須となる。こんな都合の良い蛍光分子は存在しないと思っていたが、Tinnefeld¹⁶⁾らの報告において、ATTO 655が上記のすべての条件を満たすことを知り、本研究へと至った。研究は一人で行なっているのではないと実感させられた瞬間だった。最後まで読んでくださった方の研究に、本稿が少しでもお役に立てれば幸いです。

謝辞

本稿で紹介した研究は、大阪大学産業科学研究所真嶋哲朗教授の研究室で行った研究成果です。真嶋哲朗先生および実験を遂行してくれた松谷恵利氏に深く感謝いたします。また、FCS測定に関し共同研究いただきました九州大学丸山厚教授、測定および解析でお世話になりました、九州大学山東信介教授、オリンパス加藤則子博士に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) E. Meggers; M. E. Michel-Beyerle; B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12950.
- 2) K. Nakatani; C. Dohno; I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10854.
- 3) F. D. Lewis; X. Y. Liu; J. Q. Liu; S. E. Miller; R. T. Hayes; M. R. Wasielewski, *Nature* **2000**, *406*, 51.
- 4) a) T. Takada; K. Kawai; M. Fujitsuka; T. Majima, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 14002. b) T. Takada; K. Kawai; M. Fujitsuka; T. Majima, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 3835. c) Y. Osakada; K. Kawai; M. Fujitsuka; T. Majima, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 18072. d) S. M. M. Conron; A. K. Thazhathveetil; M. R. Wasielewski; A. L. Burin; F. D. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14388.
- 5) E. M. Boon; D. M. Ceres; T. G. Drummond; M. G. Hill; J. K. Barton, *Nat. Biotech.* **2000**, *18*, 1096.
- 6) A. Okamoto; T. Kamei; I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 658.
- 7) Y. Osakada; K. Kawai; M. Fujitsuka; T. Majima, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 5562.
- 8) K. Nakatani; C. Dohno; I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5893.
- 9) a) K. Kawai; H. Kodera; Y. Osakada; T. Majima, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 156. b) K. Kawai; H. Kodera; T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 627. c) K. Kawai; H. Kodera; T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14216.
- 10) S. van de Linde; I. Krstic; T. Prisner; S. Dose; M. Heilemann; M. Sauer, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 499.
- 11) S. W. Choi; A. Kano; A. Maruyama, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 342.
- 12) K. Kawai; M. Hayashi; T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* DOI: 10.1021/ja2109213
- 13) K. Kawai; E. Matsutani; A. Maruyama; T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15568.
- 14) K. Kawai; Y. Osakada; A. Sugimoto; M. Fujitsuka; T. Majima, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 2386.
- 15) K. Kawai; Y. Osakada; M. Fujitsuka; T. Majima, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1049.
- 16) J. Vogelsang; T. Cordes; C. Forthmann; C. Steinhauer; P. Tinnefeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 8107.

研究紹介

酵素法を用いるアミノ酸計測法の開発 —医療や食品計測への応用を目指して—

広島市立大学社会連携センター 釘宮 章光

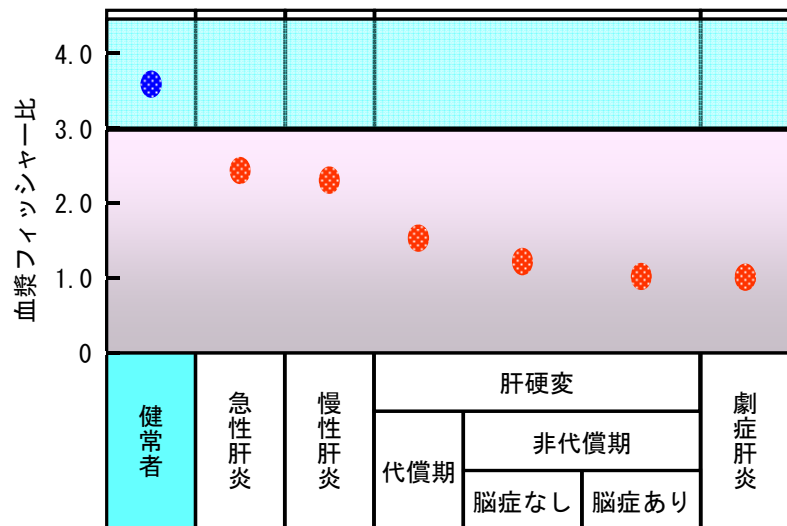
1. はじめに

我々人間の体を構成する成分の内、その 60～70%は水であるが、次に多いのはたんぱく質を構成する基本物質であるアミノ酸であり、その占める割合は約 20%である。残りの 10～20%は脂質や糖質、無機物質などからなっている。生体内では 20 種類のアミノ酸がある決まった組み合わせで結合することによって筋肉や内臓、皮膚などの組織を構築している。また体内には遊離アミノ酸と呼ばれる細胞や血液中などに蓄えられているアミノ酸も存在する。このように生体内においてアミノ酸は水分を除くと半数以上を占める構成成分であり主要組織の基となっていることから、アミノ酸は生体内において重要な役割を担っているということは広く認識されているが、最近、生体内のアミノ酸濃度に着目して病態の診断など臨床医療への応用を目指した研究が熱心になされている。

2. アミノグラムによる病態の診断・食品の分析

臨床医療や予防医療の分野において、血液中や尿中のアミノ酸濃度の分析を行うことは疾患の早期発見、疾病の計測に極めて有効であり、メタボリックシンドロームや肝臓病 [1]、糖尿病、がん [2]、アルツハイマーなどの病態で血中のアミノ酸濃度バランスが健常な状態とは異なってくる事が知られている。

図 1 は肝疾患の病態と血漿中のフィッシャー比との関係を引用したものである [3]。つまり 5 種類のアミノ酸について (バリン+ロイシン+イソロイシン) / (フェニルアラニン+チロシン) の式に各アミノ酸のモル濃度を代入して得られた数値が 3 以上なら健常、3 以下でその数値が低くなるにつれて、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変と病態が重篤になっていくことを示している。他の病態についても数種類のアミノ酸濃度をそれぞれの数式に代入することで病態の診断が可能であることが報告されている。



(岐阜大学第一内科)

アミノ酸セミナー (工業調査会) [3]より抜粋・一部改変

図 1 肝疾患の病態別血漿フィッシャー比

また、食品製造や食品管理プロセスの分野においてもアミノ酸の分析を行うことは、食品の鮮度測定や味付け、風味、味覚の計測などの品質管理に有効である。例えば日本酒について、アミノ酸の組成が呈味に影響しているという研究がなされている [4]。これによると、日本酒に含まれるアミノ酸は吟醸酒、純米酒、本醸造酒などの特徴を形成する重要な成分であり、吟醸酒は本醸造酒よりもグルタ

ミン酸やグルタミンなど旨味や甘味を表すアミノ酸を多く含有し、一方、ロイシン、バリン、チロシン、アルギニン、リジン、フェニルアラニンのような苦味を表すアミノ酸の含有量が少ないということを明らかにしている。このような結果から、日本酒中のアミノ酸分析を行うことは、日本酒の味や品質などの計測に有用であると考えられる。

また、野菜を貯蔵することによる、アミノ酸などの含有成分の変化と品質との関連についての研究や [5-6]、チーズを加熱調理した時のアミノ酸量と味や風味に及ぼす影響について評価した研究も行われている [7]。

このように従来から用いられているような癌や各種病態のマーカーを計測する方法や血糖値を計測する方法など様々な物質を異なる手法や装置を用いて測定する方法に比べて、各アミノ酸濃度を分析する方法を用いると、同一の手法や装置により網羅的に各病態の診断ができる可能性が出てきた。

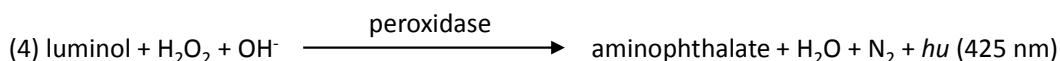
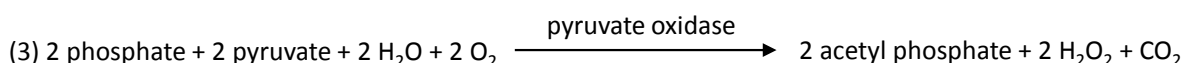
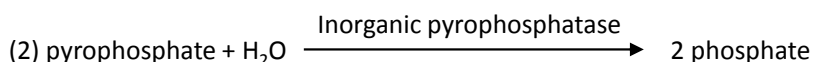
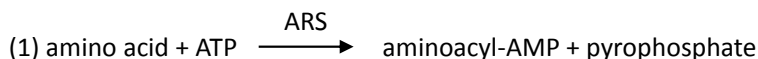
3. アミノアシル tRNA 合成酵素を用いるアミノ酸分析法の開発

現在、一般に用いられているアミノ酸濃度の計測法としては高速液体クロマトグラフィーによる方法であり、アミノ酸をニンヒドリン試薬で反応させるポストカラム法、あるいは蛍光色素などで標識することによるプレカラム法が広く用いられている。また最近ではLC-MSをベースとして短時間で高感度に計測できる装置も市販されている。しかし、より安価で迅速かつ簡便にアミノ酸分析を「その場」において特殊な技術を必要とせずに行うことができれば、臨床の現場や家庭などにおいて病気の診断や健康管理などに利用するなど、その用途は大幅に増大すると考えられる。

我々は、20種類のアミノ酸の分析を迅速かつ簡便、安価に同時計測可能な手法および装置を開発することを目的として研究を行っている [8]。そして酵素を分子認識材料に用いるバイオセンサー型の装置あるいは分析用マイクロチップにすることで装置の小型化や廉価化が期待できる。用いる酵素として、生体内に存在する酵素であるアミノアシルtRNA合成酵素 (ARS) の分子認識能に着目した [9-11]。ARSは20種類のアミノ酸に対してそれぞれ20種類存在し、生体内においてたんぱく質やペプチドの生合成に関わっているため、アミノ酸に対する正確な分子認識能が期待できると考えられる。

4. ルミノール化学発光法によるアミノ酸の計測

本稿ではアミノ酸の分析について、ARS の酵素反応とルミノールによる化学発光を組み合わせることで評価した方法について紹介する。ルミノール化学発光法は、糖尿病診断用のグルコースセンサーなどにおいて電極を用いる検出法よりも高感度に目的物質を検出する方法として広く研究に利用されている [12]。アミノ酸を認識させるための酵素である ARS と、目的とするアミノ酸との特異的な酵素反応によって生成するピロリン酸に (式 1)、さらに無機ピロホスファターゼ (式 2) とピルビン酸オキシダーゼ (式 3) を反応させて過酸化水素を生成させ、さらにルミノールによる化学発光をマイク



ロプレートリーダーを用いて計測して評価を行った。

実験方法は、ヒスチジン結合性 ARS 酵素であるヒスチジル tRNA 合成酵素 (HisRS) を用い、アミノ酸、ATP、塩化カリウム、塩化マグネシウムなどの試薬を HEPES-NaOH バッファー (pH 8.0) 中で混合して 80°C で反応させて冷却後、無機ピロフォスファターゼ、ピルベートオキシダーゼ、ピルビン酸ナトリウムの混合液を加えてマイクロプレートリーダー内でルミノール発光試薬を分注して 3 秒間計測することにより発光強度の計測を行った。

HisRS を用いてヒスチジンの定量性について評価したところ、ヒスチジン濃度が 1.0~40 μM の範囲でヒスチジン添加量と発光量に相関があることが示された。次に 25 μM の濃度の各アミノ酸を用い、HisRS を用いるアミノ酸分析法について選択性の評価を行った (図 2)。その結果、HisRS の基質のアミノ酸であるヒスチジンに対して強い発光強度を示し、それ以外の 19 種類のアミノ酸やアミノ酸を加えなかった場合の発光強度に比べて 4 倍以上の高い値となり、HisRS がヒスチジンに対して選択的に結合し、また計測可能であることが示された。また、ヒスチジン濃度が 1.0~40 μM という濃度範囲は血液中や尿中のヒスチジン濃度の低濃度領域を満たしており、本法が医療分野での応用に利用可能性が高いことを示している。

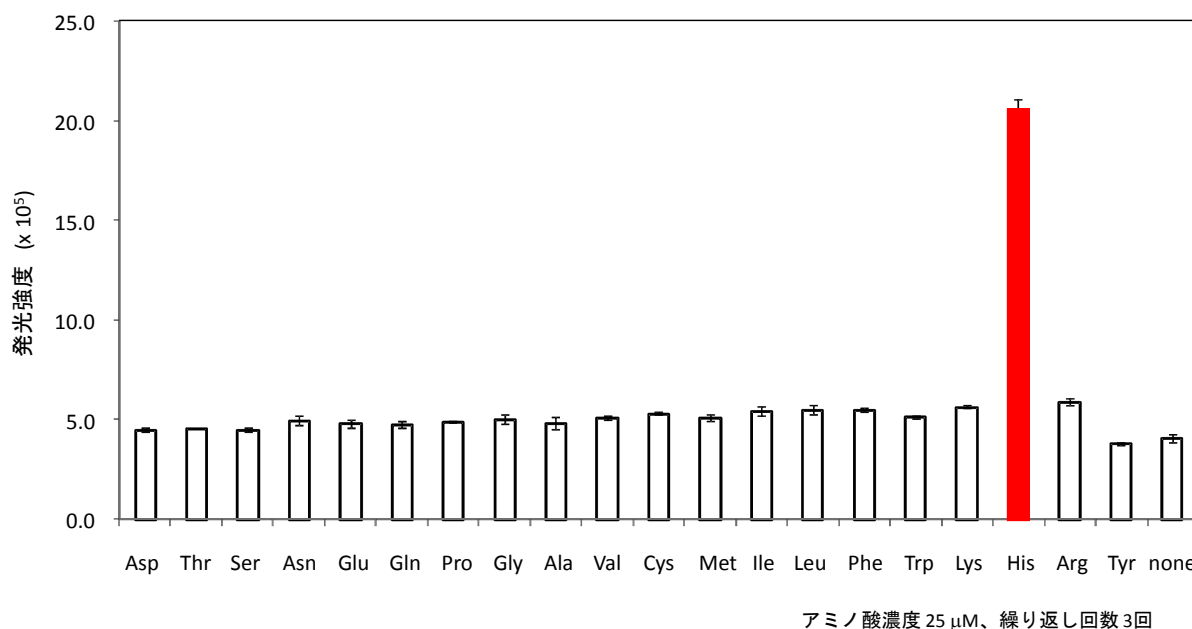


図 2 HisRSを用いる各アミノ酸に対する選択性の評価

今回紹介したルミノール化学発光法によりヒスチジンの他、セリン、リジン、プロリン、グリシン、アスパラギン、ロイシン、アラニン、バリンの計 9 種類のアミノ酸についても数 μM ~数十、あるいは 100 μM の濃度域で選択的に定量可能であることも示している。

5. おわりに

今回は紙面の都合で紹介しなかったが、より少ないサンプルで、短時間に手間をかけずに計測する手段として、マイクロチップを用いる分析法についても現在検討を行っている。シリンジポンプを用いて、サンプルのアミノ酸をインジェクトし、酵素反応と呈色反応をチップ内で行わせたと検出するという手法によりヒスチジン、セリン、リジン、グリシン、アスパラギン酸、メチオニン、システインの計 7 種類のアミノ酸

について選択的に計測可能なことも示している。マイクロチップを用いる方法では、サンプルのインジェクトのみで20分程度の所要時間でアミノ酸の計測が可能であった。

本研究は臨床医療や食品工場、家庭などにおいて簡便に利用可能なセンサー素子の構築を目指すものである。現在これら分野において外部に委託して行われているアミノ酸の計測を、医療現場や家庭など「その場」において容易に利用可能なものにするを最終的な目標としている。本研究で提案するアミノ酸センサーは、微量のサンプルを水系において高感度に検出することができると考えられるため、現在の主なアミノ酸検出法である高速液体クロマトグラフィーを用いる方法に比べて大量の溶媒を必要とせず、検出のステップ、検出時間、コストが大幅に短縮することが可能であり、従来法に取って代わるアミノ酸検出法になる可能性があると考えられ、また環境負荷も小さくなるというメリットもある。また、一つの装置あるいは分析キットで複数の病態の診断が可能となり、また病気の早期発見や病態異常への早期対処が出来るため、患者のみならず健常人の医療や食に対する安心・安全を実現し向上させることが可能になると考えられる。

謝辞

本稿で紹介した内容の一部は、広島市立大学特定研究費（一般研究）および（独）農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センターの「イノベーション創出基礎的研究推進事業・若手研究者育成枠」からの助成を受けて行ったものである。ここに深く感謝いたします。

参考文献

1. Y. Noguchi, Q-W Zhang, T. Sugimoto, Y. Furuhashi, R. Sakai, M. Mori, M. Takahashi and T. Kimura, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2006, **83**, 513S.
2. Y. Miyagi, M. Higashiyama, A. Gochi, M. Akaike, T. Ishikawa, T. Miura, N. Saruki, E. Bando, H. Kimura, F. Imamura, M. Moriyama, I. Ikeda, A. Chiba, F. Oshita, A. Imaizumi, H. Yamamoto, H. Miyano, K. Horimoto, O. Tochikubo, T. Mitsushima, M. Yamakado, N. Okamoto, *PLoS ONE*, 2011, **6**, 1.
3. 岸恭一 監修, 日本必須アミノ酸協会 編, *アミノ酸セミナー*, 工業調査会, 2003.
4. 岩野君夫・高橋和弘・伊藤俊彦・中沢信重, *日本醸造学会誌*, 99, 659, 2004.
5. 笠原光子・小西あや子・畑江敬子・島田淳子, *日本家政学会誌*, 51, 23, 2000.
6. 鈴木忠直・久保直哉・荻沼之孝・田村真八郎・山本博道, *食総研報*, 38, 46, 1981.
7. 山田正子・竹内枝穂・中澤勇二・津田淑江, *日本調理学科学会誌*, 36, 108, 2003.
8. A. Kugimiya, M. Morii and T. Ohtsuki, *Anal. Biochem.*, 2008, **378**, 90.
9. S. Sekine, O. Nureki, D. Y. Dubois, S. Bernier, R. Chenevert, J. Lapointe, D. G. Vassilyev and S. Yokoyama, *EMBO J.*, 2003, **22**, 676.
10. S. Sekine, M. Shichiri, S. Bernier, R. Chenevert, J. Lapointe and S. Yokoyama, *Structure*, 2006, **14**, 1791.
11. T. Ohtsuki, Y. Watanabe, C. Takemoto, G. Kawai, T. Ueda, K. Kita, S. Kojima, Y. Kaziro, J. Nyborg and K. Watanabe, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 21571.
12. S. Kasai, Y. Hirano, N. Motochi, H. Shiku, M. Nishizawa, T. Matsue, *Anal. Chim. Acta*, 2002, **458**, 263.

ニュースレター Vol. 26, No. 4 2012年 3月 29日発行

事務局：101-8307 東京都千代田区神田駿河台1-5, 日本化学会生体機能関連化学部会

Office of the Secretary : The Chemical Society of Japan, 1-5 Kanda-Surugadai, Chiyodaku, Tokyo 101-8307, Japan

URL: <http://seitai.chemistry.or.jp/>

mail to: seitai@chemistry.or.jp

編集委員：大槻高史, 青野重利, 民秋均