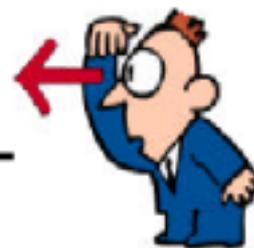




生命化学研究レター



No 7 (2001年10月)

糖鎖研究の輝かしい未来のために

佐藤 智典 (慶応義塾大学理工学部)

今年の8月19日～24日にオランダのハーグで国際複合糖鎖会議 (Glyco XVI) が開かれた。これは二年に一回開催されており、前回は東京、次回はインドが開催地である。今回の参加者は事前登録が約700名で、そのうち日本からは約200名であった。Glycoが世界中のどこで開かれても日本からの参加者は常に1位～2位である。日本での糖鎖の研究は澱粉から始まり、血液型抗原、合成や分析手法などの分野において世界の先導的な役割も果たしている。今回の会議では糖鎖生物学の発表が中心であったが、この領域は世界的に成熟期を迎えているように思える。新しい事実は次々に明らかになってきているが、目を見張るような研究に乏しい。なぜなら研究手法に目新しさがなく、世界中どこも似たようなことをやっているという印象を受けてしまう。その中で個人的に印象に残ったのは糖鎖チップを扱った一般講演であった。発表は企業であったため、近々商売にするようである。国内外で糖鎖の自動合成機と糖鎖チップの開発は大変活発で、将来の糖鎖研究を支える重要な技術である。これから糖鎖チップの開発は競争の時代に入るだろうが、この技術が糖鎖の研究を加速するための推進力になることは間違いない。生体に発現している糖鎖の機能解析の研究では、スクリーニングに用いるオリゴ糖鎖のライブラリーと、それを一気に解析する糖鎖チップの開発が、糖鎖の研究を成熟期から改革期に変えるための起爆剤になる。

もうひとつの重要な流れは糖鎖遺伝子→糖転移酵素→糖鎖の流れを明らかにすることである。ゲノムプロジェクトでは外国に水をあけられてしまったが、糖鎖の合成に関連する遺伝子の解析では日本で大半を見つけ出そうとするNEDOのプロジェクトが本年度より開始された。糖鎖の発現の異常は多くの病気に関連していることから糖鎖遺伝子の全容の解明は、病気の原因を明らかにし治療薬を開発するために欠かすことのできない研究である。ゲノム解析では細胞がもつ潜在的な糖鎖合成能力を知ることができるが、実際に細胞で発現している糖鎖は独立に検出する必要がある。従来の糖鎖構造の解析技術は、ゲノム情報により新たな意味をもってくることになる。

ゲノム→プロテオーム→グリコーム

この生命情報の流れはバイオインフォマティクスの発展に判って全体像が明らかに

なってくるであろう。プロテオーム全体は莫大な数の解析が要求されるが、グリコームを中心に考えればゲノムもプロテオームも限定されてくる。やり方によっては、結構早い時期に解明できる分野かもしれない。

糖の研究をはじめると誰かが悩まされるのは糖鎖配列の表記法の煩わしさである。グルコースはGlc、ガラクトースはGalと省略し、ラクトースはGal β 1 \rightarrow 4Glcと書く。二糖を書くにもこれだけの情報量が要求される。これが10コ以上つながったり分岐を有した糖鎖であればスライドを作る時に閉口してしまうほどである。遺伝子やたんぱく質は一文字表記を並べれば配列を表現できる。これからコンピュータでの情報処理が盛んになると、出来るだけ小さな容量でインプットする必要がある。糖鎖は短くても結合様式までデータを必要としており今後の情報社会にとり残されていく危険性もある。簡単な糖鎖の表記法を作ることも地味ではあるが、誰かがやらなくてはならない仕事であろう。

糖鎖の研究は決して派手ではないが、着実に進歩している。”*Nature*” ”*Science*” という雑誌への掲載が少ないので世界が糖鎖の研究を要求していないという批判もある。果たしてそうであろうか。多くの研究者が糖鎖の研究の魅力を感じ、その潜在的な機能にふれては、これからは糖鎖の時代であると信じている。糖鎖研究者はいつもそう思い続けているようである。しかし、単に言い続けているだけではいけない。多くの研究者が興味を示し、糖質研究者以外の人たちが糖鎖に興味を持ち、研究に参加してくれることが必要である。異なった視点や技術を有している研究者の方が一石を投じることで思いもかけない発見や発明が生まれ、重要なブレイクスルーをもたらしてくれることを期待している。と言うより、自分がそうありたいと思っている。

余談であるが、ヨーロッパでは牛肉を食べるなど言われていたが、オランダではシーフードより肉料理を食べることが多かった。海岸沿いのレストランに入ったらメニューが肉料理ばかり、バンケットでも牛肉料理ばかり・・・皆んな食べていたのでオランダでは狂牛病は恐れられていないのだろうか。この文章を書いていると日本でもついに狂牛病が見つかった。さて、狂牛病の発症における糖鎖の関与は？研究のねたはつきない。

当初この巻頭言の題目は「糖鎖研究の起爆剤」であった。文章を見直している間に米国での同時テロが起きてしまい、誤解を生みそうな言葉を使うべきではないと思い、夢のある題目に変えました。

(さとう としのり・sato@applc.keio.ac.jp)

09/18/01 受付

材料と生体成分との相互作用についての一考察

国立循環器病センター研究所 生体工学部 岸田晶夫

1. はじめに

医用材料研究において、新規な医用・人工臓器用材料を開発するためには、材料と生体との相互作用を詳細に理解し、新しい分子設計概念を確立する必要がある。その相互作用は大別すると、分子レベル（界面物性）、タンパク質レベル（吸着および変性）、細胞レベル（接着、増殖、機能発現）および生体レベル（動物実験）の4つに分類できる。これまではそれぞれについて多くの研究が報告され、知識が集積されてきた。しかしながら、生体となじみのよい、いわゆる生体適合性を有する材料の開発を行うためには、より詳細な検討が必要とされている。

生体との相互作用を検討する一手法として、材料表面上への細胞の接着・増殖について観察する方法がある。これは表面の物理化学的性質が細胞接着や増殖に及ぼす影響を、表面処理技術を用いて種々の表面性状の材料を調製し、細胞を播種して接着細胞数の計測や形態を観察して、材料の及ぼす影響を明らかにしようとするものである。これまでに、細胞の接着・増殖について大まかに材料表面の物理化学的特性で整理できることが明らかになっているが、一方で例外的な結果が得られる場合もあり、結果の解釈が困難なことも多い。生理学的な立場からは、細胞接着はフィブロネクチンなどの接着タンパク質を仲介して説明される。一方、それらの接着タンパク質に依存しない細胞接着も存在している。いわゆる無血清培養における細胞培養はすべてそうであるが、接着性タンパク質の存在しない環境でも細胞は多種多様な接着を行う。それらはいわゆる「非特異的相互作用」として説

明されていた。「非特異的相互作用」とは、物理化学的相互作用が代表的なもので、たとえば同じ表面自由エネルギーの材料であれば、同じタンパク質の吸着量、細胞接着を示すというものである。これはコロイド科学的な解釈であり、接着の初期（30分～2時間）では比較的適合する。しかし、必ずしも表面自由エネルギーで整理できるとは限らず、その場合には他の非特異的相互作用の影響（たとえば電荷など）を組み合わせ、現象の説明を行っている。

このような「非特異的相互作用」を理解するためには単純な表面を作成して細胞の反応を調べる必要がある。しかし、表面自由エネルギーを一定にして電荷量を変化させるなどの改質は非常に難しい。一方、材料ではなく細胞に着目すると、細胞が材料をどのように認識しているかを直接調べた例はほとんどない。細胞の反応を接着や増殖などのマクロな解析だけでなく、最新の細胞生物学の手法を用いてミクロな反応を検討できれば、生体側の材料認識のメカニズムを明らかにできる可能性がある。それを用いて、材料設計の指針を得られれば、新規材料設計も容易に行える。細胞が材料と接触すると、情報収集（レセプターの活性化）－状況認識（細胞内カスケードの活性化）－対応策策定（転写因子活性化）－対応準備（転写・タンパク質合成）－対応策実施（タンパク質機能発現・接着）の一連の反応が細胞内で起こる。細胞の接着や増殖というのは最終の対応策実施段階を観察しているわけであるが、その前段階についての情報についての研究はほとんどない。ここでは材料と生体との相互作用のうち、特に非特異的相互作用について、細胞内の

細胞の遺伝子レベルで理解することを目的として、材料と接触した細胞のメッセンジャーRNA (mRNA) の発現評価および転写因子の発現評価を行った。

2. 遺伝子発現評価について

材料に対する細胞の反応を遺伝子発現で評価するためにはいろいろな手法が考えられる。直接に発現遺伝子を知るにはノーザンブロット法が適している。しかし、ノーザンブロット法は大量の細胞を必要とするため、大表面積の細胞接着用材料が必要である。材料開発のための基礎検討のためには簡便に大量のサンプルを処理できることを第一に考える必要がある。そこで著者らは逆転写酵素を用いたポリメラーゼ連鎖反応法 (RT-PCR法) による遺伝子発現評価法を用いた。

PCR法はPolymerase Chain Reactionの略で、Mullisらによって1985年に発表された技法である。PCRの原理はDNAポリメラーゼ反応を利用したDNAの増幅反応の繰り返しであり、DNAの熱変性、プライマーとのアニーリング及び伸長反応を1サイクルとして、このDNAポリメラーゼ反応をn回繰り返すことで2n倍にDNAを増幅する。このため非常に高感度であ

り、極微量のサンプルからでも検出が可能である。mRNA発現をPCR法によって解析するには、mRNAを逆転写酵素で変換したcDNAを鋳型にすることによりPCRに用いることができ、reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)法と呼ばれる。

また、解析対象としては、熱ショックタンパク質 (Heat-Shock-Protein (HSP)) に注目した。HSPは、生物がそれぞれの育成温度より高温の環境にさらされると (熱ショック) 特異的に発現量が多くなる一群のタンパク質として発見された。しかしその後、熱ショックばかりでなく、遷移金属・酸化ストレス・生体内での虚血・炎症・分化誘導試薬などの様々なストレス因子によっても誘導されることがわかり、より一般的にストレスタンパク質と呼ばれている。HSPには多くの種類があり、その分子量に由来した命名がされている。HSP70はもっとも一般的なHSPであり、熱ショックをはじめとする様々なストレスに対応して発現する。HSP47は近年、細胞接着や組織修復に重要な役割を果たしているコラーゲンの特異的分子シャペロンであることが明らかにされた。これらのHSPはそれぞれの刺激に対して迅速に発現されることから、材料

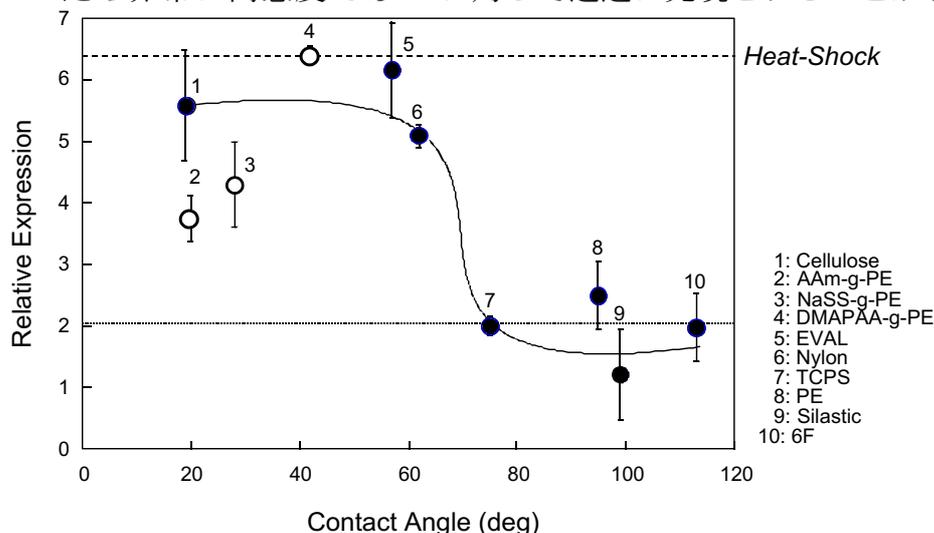


Fig.1 Evaluation of HSP 70B mRNA expression in HeLa S3 cells as a standard of β -actin by RT-PCR method. (mean \pm S.D., n=3)

● : Solid Surfaces ○ : Grafted Surfaces

と接触した細胞の応答を見積もるために有用と考えられた。

3. HSP mRNA 発現評価

HSP 発現評価では、HeLa 細胞を用い、種々の材料上の播種したHSP遺伝子の発現を解析した。図1に各高分子材料上で24時間培養後のHSP70Bの相対的な発現量を示す。HSP70Bは熱のようなストレスに対する細胞の応答の指標を表す最も一般的な熱ショックタンパク質である。HSP70Bの発現量は組織培養用ポリスチレン (TCPS、No.7) を境として発現量に大きな差異が生じており、TCPSより親水性の材料では発現が大きく誘導され、ポリエチレン (PE)・シリコーン膜(SilasticTM・フッ素系高分子 (6F) などのより疎水性の材料ではTCPSとほぼ同程度の発現量を示した。

これよりHSP70Bは親水・疎水の異なる材料に対して、それぞれ異なる発現挙動を示すことが分かる。TCPS上に接着した細胞に熱処理(45℃、20min)した場合の発現量と比較すると、親水性の材料に接着した

細胞は、熱処理時と同程度の刺激を受けていることがわかる。また、親水性の材料ではTCPSや疎水性の材料と比較して細胞の接着数は少ないにもかかわらず、細胞当たりに対してHSP70B発現の刺激を与えていると考えられる。さらに細胞接着数(性)とHSP70Bの発現結果を比較すると、NaSS-g-PE (p-styrenesulfonic acid sodium salt (NaSS)を表面グラフト重合したPE)とTCPS、ナイロンと疎水性材料 (PE, SilasticTM, 6F)は同じような細胞接着数を示しているにもかかわらず、HSP70B発現挙動には明らかな差異がみられ、両者の間に相関関係はみられなかった。

このように高分子材料に接着・接触した細胞のHSP発現評価では、疎水性の材料で発現が低く、親水性の材料で発現が高い結果が得られた。しかし、これら一連のHSP発現のシグナルがどのような経路で細胞内に伝達されているかは明らかでない。考えられる要因の一例として、親水性材料表面は動的な状態にあると想定した場合、血清タンパク質の吸脱着と細胞の膜タンパクの吸

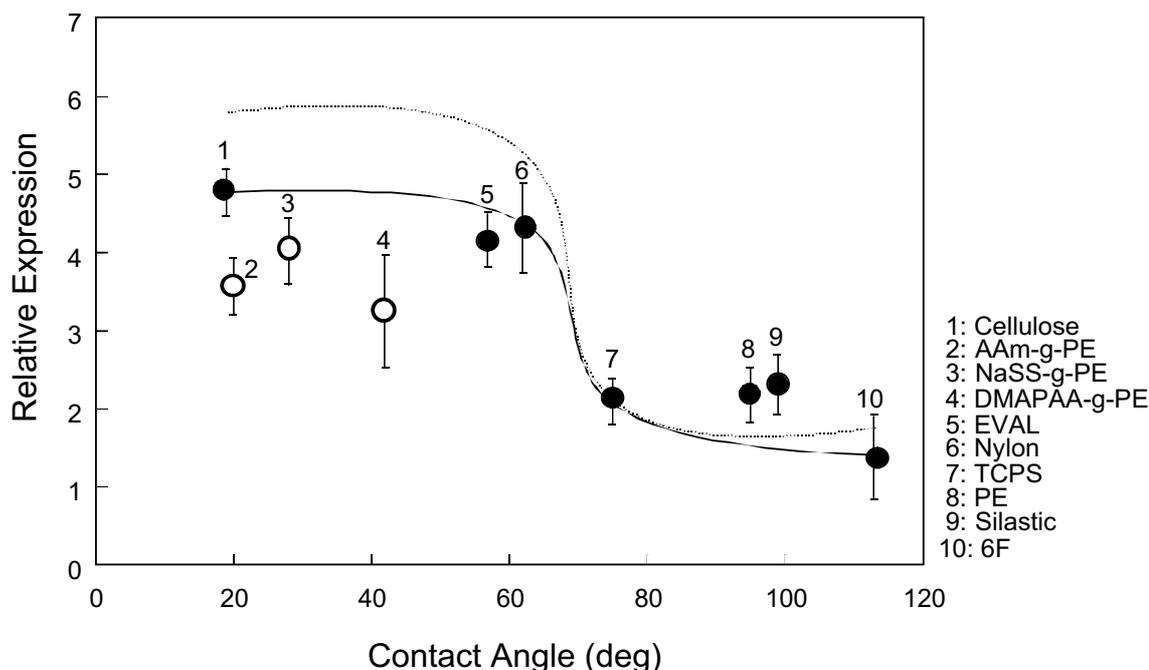


Fig.2 Evaluation of HSP 70B mRNA expression in non-adhered cells as a standard of β -actin by RT-PCR method. (mean \pm S.D., n=3)

● : Solid Surfaces ○ : Grafted Surfaces

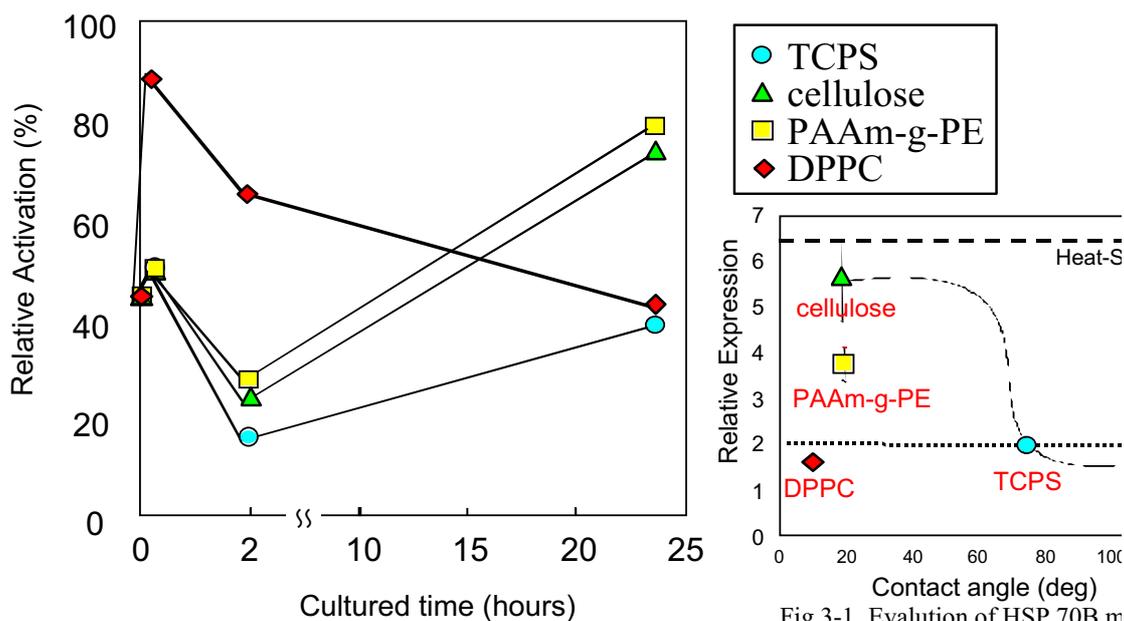
NF- κ B活性(Time course)

Fig.3 Gel shift assay of NF- κ B in HeLa cells adhered to various surfaces.

脱着などが動的な環境におかれ、材料表面と直接接したり離れたりを繰り返す、周りの環境が刻々と変化していることが刺激となっているとも考えられる。同様の考察が由井らによって報告されている。これより、材料上の吸着タンパク質同様に、材料表面の物理化学的性質も HSP 発現に直接的な役割を果たしていると考えられる。

また、同じ時間だけ材料と接触していても接着しない細胞が存在する。特に非電荷親水性材料では大多数の細胞が接着していない。これらの非接着細胞の HSP70B の mRNA 発現を調べた結果が図 2 である。一見して、接着細胞と同様の傾向を示していることが分かる。すなわち HSP70B 遺伝子の発現と細胞接着とは直接には関係がなく、細胞は材料に触れただけでも認識を行っていることになる。

図 1, 2 では材料の水濡れ性 (対水接触角) で材料を整理しているの、物理化学的性質が HSP70B 遺伝子発現のパラメータのように思われる。表面自由エネルギーで HSP70B 遺伝子の発現が制御されているならば、これはある種の特異的相互作用と考

えることもできる。事実は単純ではないだろうが、このような材料の性質が複数の非特異的相互作用を同時に発揮するのであれば、ここで観察された細胞の反応もそれぞれの材料に対して特異的なものとは考えられないだろうか。

3. 転写因子発現評価

上記のような仮説を確かめるために、mRNA 発現より早期の細胞反応を解析するために転写因子に注目した。代表的な転写因子である NF- κ B は、外界刺激を受けた際の一次反応のスイッチとして機能していると考えられており、細胞と材料の相互作用解析に有用であると考えられた。図 3 に NF- κ B 発現の時間変化を示す。脂質 (DPPC) 膜上では初期に発現が見られるが、その後減少し、正常レベルに戻る。一方、脂質膜と同じ親水性表面であるセルロースやアクリルアミドグラフト表面では経時的に発現量が増加していることが分かる。この結果から、同じ親水性表面をもつ材料でもそれを構成する分子種の違いにより、生体反応が異なることが示された。

高分子材料に接着・接触した細胞のHSP発現評価では、疎水性の材料で発現が低く、親水性の材料で発現が高い結果が得られた。一方、同じ親水性材料でも脂質膜と他の高分子では細胞の認識が異なることがNF- κ B発現評価から示された。これらのシグナルがどのような経路で細胞内に伝達されているかは明らかでない。考えられる要因の一例として、親水性材料表面は動的な状態にあると想定した場合、血清タンパク質の吸脱着と細胞の膜タンパクの吸脱着などが動的な環境におかれ、材料表面と直接に接することや、周囲の環境が刻々と変化していることが刺激となっているとも考えられる。今後、より詳細な検討が必要である。

おわりに

遺伝子発現評価、転写因子発現評価および水性二相系によって親水性高分子の検討を行った。前者からは親水性高分子が生体に種々の刺激を与えることが示唆された。このような刺激が最終的にどのような生体反応を発現するかは明らかではないが、刺激の有無・強弱を明らかにすることによって、細胞の1次刺激として材料との相互作用を利用できる可能性を探っている。これまでの結果からは脂質膜が興味ある刺激を

与えており、リポソームによるこれまでのDDSへの新しい機能の付与が考えられる。また、後者においては、親水性表面の生体適合性のみならず、蛋白製剤などのDDSにおける担体の設計に重要な知見が得られた。すなわち担体である高分子材料、薬剤、生体表面と体液との間の分配のバランスも生体への薬物の送達効率に影響を与えていると考えられる。また、感温性高分子が二相系の形成能を有していることから、これらのハイドロゲルや表面グラフトによる分配性の温度による制御およびそれを利用した新しいDDS系が考案できると期待される。

参考文献

1. A.Kishida, S.Kato, K.Ohmura, K.Sugimura, M.Akashi, *Biomaterials*, **17**, 1301 (1996)
2. S.Kato, T.Akagi, A.Kishida, K.Sugimura, M.Akashi, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, **8**, 809(1997).
3. S.Kato, T.Akagi, A.Kishida, K.Sugimura, M.Akashi, *Biomaterials*, **19**, 821 (1998)
4. A.Kishida, T.Serizawa, K.Sugimura, M.Akashi, et al., *Chem. Lett.*, 1267(1999).
5. S.Kato, T.Akagi, K.Sugimura, A.Kishida, M.Akashi, *Biomaterials*, **21**, 521(2000).

(きしだ あきお・kishida@ri.ncvc.go.jp)

09/25/01 受付



気になった論文

長崎 健 (ながさき たけし)

大阪市立大学院工学研究科生物応用化学専攻 助教授

nagasaki@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

今回は、我々が現在研究を行っている高分子や分子集合体に基づくポリカチオンを用いた非ウイルスベクター開発において注目すべき論文を紹介したいと思います。非ウイルスベクターを用いた遺伝子デリバリーに関してその最大の問題点である効率を向上するために、新しい試みとしての刺激応答型ベクターに期待が寄せられており、それらに関する以下の論文が最近相次いで報告されました。

1. Gene expression control by temperature with thermo-responsive polymeric gene carriers.

M. Kurisawa, M. Yokoyama, T. Okano,

J. Control. Release, **69**, 127-137(2000).

感温性高分子を用いて温度で DNA との親和性を、更にはトランスフェクションをも制御することに成功している。温度感温性であるイソプロピルアクリルアミドとジメチルアミノエチルメタクリル酸、ブチルメタクリル酸（組成モル比 81:8:11）から成るコポリマーは 21 °C に相転位温度を持つ。相転位温度以下でこのコポリマーは分子の膨潤が起こり相転位温度以上の場合と比較して DNA 親和性が低くなる。従って、DNA 複合体を細胞に導入後、20 時間 37 °C の通常培養を行った後に相転位温度以下の 20 °C での冷却を 3 時間行った場合は、取り込まれた複合体からの DNA リリースが促進され、冷却しない場合よりその後の培養におけるタンパク質発現の増大が見られる。細胞内に取り込まれた DNA 複合体からの DNA リリースに着目した点が特筆すべき点である。

2. Lipoic acid-derivatized amphiphiles for redox-controlled DNA delivery.

M. Balakirev, G. Schoehn,

J. Chroboczek, Chem. Biol., **7**, 813-819(2000).

この研究も細胞内に取り込まれた DNA 複合体からの DNA リリースに着目し、刺激応答型遺伝子デリバリー構築のためにチオールジスルフィドの酸化還元反応を利用した研究。リポ酸のカルボン酸エステルの形で脂質疎水部に導入されたりポ酸の 5 員環ジスルフィド構造は疎水性が高く、分子集合能力を保持する。一方、還元状態のジチオール体では疎水部の親水性が増大し分子集合能が低下する。この現象を利用し、親水部位に 4 級アンモニウム基を有するリポ酸誘導脂質から成る分子集合体ポリカチオンは分子集合能の低下と共に DNA 親和性が減少する。この DNA/ 分子集合体ポリカチオン複合体による遺伝子発現効率は細胞内の還元的環境を反映し、同じ親水部構造で酸化還元

不応答な脂質などと比較しはるかに高い効率を示す。また、細胞内還元剤（グルタチオン、NADPH）の能力を低下させるジアミドやジュロキノンなどで細胞を処理すると効率は低下する。これらのことから、酸化還元応答性脂質のDNA複合体が細胞内に導入後、還元雰囲気下でDNAリリースが促進され発現効率が向上したと考えられる。カチオン脂質を利用したトランスフェクション（リポフェクション）のメカニズムはDNA複合体が核内まで移行するのか？細胞質で解離するのか？など未だ不明な点が多い。しかし、細胞質内と核内を比較すると解離すべき核内においてより還元的であることを考慮するとチオールジスルフィドの酸化還元反応を利用する方法論は非常に有効な手段となるかもしれない。

3. Novel gene delivery systems: complexes of fusigenic polymer-modified liposomes and lipoplexes.

K. Kono, Y. Torikoshi, M. Mitsutomi, T. Itoh, N. Emi, H. Yanagie, T. Takagishi,

Gene Ther., **8**, 5-12(2001)

カチオンリポソームとDNAからなる複合体（リポプレックス）を用いたトランスフェクションにおいては細胞内に取り込まれた後の、輸送小胞体（リソソーム）からの脱出が大きなポイントであることが以前から指摘されてきた。膜融合物質の利用がその脱出を促進し、さらに、リソソームのpHの低さを利用して、pH応答型膜融合でDNAの脱出を促進させることも可能である。本論文もこの戦略に乗っ取り、コハク酸残基を持つ合成高分子でリポソームをコーティングすることで、リポプレックスにpH応答型膜融合性を導入している。細胞への取込はトランスフェリンレセプターを介在するエンドサイトーシスで細胞特異性や導入効率の向上を成し遂げている。特に、アニオン性リポプレックスは血中成分との非特異的相互作用の心配が無く、生体での遺伝子デリバリーに応用が期待される。

4. Non-viral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer.

M. Nishikawa, L. Huang, Human

Gene Ther., **12**, 861-8870(2001)

最後の紹介論文はこの十数年間の非ウイルスベクターの開発研究を網羅し、それらに残された問題点を指摘しつつ、非ウイルスベクターについてよくまとめられた総説である。遺伝子治療が臨床でスタートして10年以上が経過したものの、期待された程は結果が伴っていない。このような状況で、ウイルスベクターに対する危険性が現実の問題となり、今後ますます非ウイルスベクターに対する期待が高まることは間違いない。それと同時に非ウイルスベクターの開発において克服すべき問題点も明瞭となっており、今後非ウイルスベクターを用いた生体での効率的発現・更には遺伝子治療への応用につなげるためにはこれら問題点に対する深い理解が不可欠である。

10/02/01 受付

円谷 健 (つむらや たけし)
生物分子工学研究所 主任研究員
tsumu@beri.co.jp

In vivo activity in a catalytic antibody-prodrug system: Antibody catalyzed etoposide prodrug activation for selective chemotherapy

D. Shabat, H. N. Lode, U. Pertl, R. A. Reisfeld, C. Rader, R. A. Lerner, C. F. Barbas III

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **2001**, 98, 7528-7533.

プロドラッグを用いたガンの治療法の一つとして、ADEPT (antibody-directed enzyme prodrug therapy) という方法が提唱されている。これは、ガン細胞の表面抗原を特異的に認識する抗体とプロドラッグを活性化する酵素を共有結合させ、ガン細胞の周辺で局所的にドラッグの濃度を高めてガン細胞を破壊する方法である。ここで用いる酵素は活性化反応を特異的に行うことが必要であるため、ヒト以外に由来する酵素を用いなければならない。しかしながら、このような酵素を投与した場合、強い免疫応答が起こり、長期にわたる使用には耐えない。そこで、酵素の代わりに触媒抗体が利用できる。現在の所、ほとんどの触媒抗体がマウスを使って作製されるが、既に、ヒト化抗体へ変換する技術やトランスジェニックマウスを用いてヒト化抗体を作る技術、あるいはファージライブラリーを用いて *in vitro* にヒト化抗体を作る技術が確立されている。ヒト型の触媒抗体を使ってプロドラッグの活性化を行えば先に述べた様な問題は回避できる。また、抗体は抗原結合部位を2個持つ二量体の構造を有するため、触媒抗体とガン特異的抗体とを組み合わせたBispecific抗体を作製できれば、より安全なミサイル療法への応用が期待できる。

Lerner、Barbasらはレトロアルドール反応、レトロマイケル反応という生体内の酵素では触媒されることのない連続した2段階の反応を利用したプロドラッグ医薬品の活性化について報告している。これら二つの反応はいずれも、Reactive immunizationで得られた触媒抗体38C2によって加速される。実際に抗ガン剤であるetoposideにプロモエチーを結合させたプロドラッグを合成し触媒抗体38C2による活性化を検討した。38C2はガン細胞を用いた細胞増殖実験で増殖阻害活性を示したばかりでなく、ガン細胞を注射して作った腫瘍に対しても有効に働き、腫瘍の抑制が観測された。これは、触媒抗体が実用に耐えうる触媒活性を有することを初めて示したものである。今後の展開が期待される。

Antibody Catalysis of the Oxidation of Water

P. Wentworth Jr., L. H. Jones, A. D. Wentworth, X. Zhu, N. A. Larsen, I. A. Wilson, X. Xu, W. A. Goddard III, K. D. Janda, A. Eschenmoser, R. A. Lerner

Science **2001**, 293, 1086-1811.

この論文は最近同グループによって報告された抗体の光照射下における H_2O_2 の生成に関して、それがどのようにして起こっているのかを明らかにしたものである。Lernerらは彼らが作製した抗体の光照射下での反応を検討していたところ、特定の抗体のみならず幅広い抗体で H_2O_2 の生成が観測されることを見いだした。今回、彼らはこの反応が触媒

反応で抗体が500分子以上の $^1\text{O}_2$ (一重項酸素)から H_2O_2 への変換を触媒する事を見いだした。また、isotopeを用いた実験や様々な速度論の結果から、電子源としては金属やクロルアニオンではなく水が働いていると提唱している。 H_2O と $^1\text{O}_2$ との反応でまず H_2O_3 が中間体として生成し、これから H_2O_2 が生成すると考えられている。さらに、Xeを用いてX線結晶解析を行うことにより酸素原子の結合部位を推定している。Lernerらはこれらの実験を基に抗体の進化の過程で、有毒な $^1\text{O}_2$ から保護する役目を持った現在の抗体が選ばれてきた可能性を指摘している。もちろん、この反応の反応機構に関してはまだまだ不明な点も多い。しかし、抗体の機能として、これまで知られていた機能以外のものを持っている可能性を指摘したもので、興味深い。

In vitro abzyme evolution to optimize antibody recognition for catalysis

N. Takahashi, H. Kakinuma, L. Liu, Y. Nishi, I. Fujii

Nat. Biotechnol. **2001**, *19* 563-567.

この論文は私の研究室からの論文だが、宣伝の意味も込めて紹介させていただきたい。

Phage Library を使って、触媒抗体の高活性化を行った研究である。酵素は、遷移状態への結合を強くすると同時に、基質への結合は弱くすることによって高い反応活性を持つように進化してきている。そこで、この様な酵素の進化の原理を使って触媒抗体の活性を上げようとしたのが本研究である。まず、通常の遷移状態アナログを免疫する事によって作製された触媒抗体6D9のCDRの一部をランダム化したライブラリーから、新たにデザインされた2番目の遷移状態アナログを使ってselectionを行った。ここで用いた2番目の遷移状態アナログは免疫に使った遷移状態アナログの反応に重要な部分は保持したまま、基質認識に重要であると考えられる部分のみを変えたものである。このように二つの遷移状態アナログを用いて選択することによって、反応に重要な部分への認識、つまり遷移状態への結合は強まり、また、同時に基質への結合は弱くなることが期待される。実際にこのようにして得られた抗体は6D9にくらべて6倍から20倍の触媒活性を示した。また、興味深いことにこれらの抗体はすべて6D9の触媒残基であるHisに加えてTyrが新たな触媒残基として含まれていた。新たに導入されたTyrは抗体のgerm-lineではSerに相当しているため、somatic mutationの過程でSerからTyrへ変わるためには2個の隣り合った変異が起こらなければならないことから、通常の免疫ではまず起こりえない変異であることがわかった。つまり、このような高活性の抗体はin vitro evolutionで初めて可能となるものであり、この点でもin vitro evolutionの有用性が示されたものであると考えられる。また、遷移状態解析の結果、反応は全ての抗体が遷移状態の安定化を触媒要素として反応を加速していた。これまで、Phageライブラリーを用いて触媒抗体の触媒活性をあげる試みがされているが、ほとんど成功例はない。今回の報告は触媒抗体の活性を初めて10倍以上上げることに成功したものである。

10/05/01 受付

深瀬 浩一（ふかせ こういち）

大阪大学大学院理学研究科 助教授

koichi@chem.sci.osaka-u.ac.jp

innate immune response（自然免疫）に関わる話題から4点紹介する。免疫系は自然免疫と獲得免疫からなっており、自然免疫は生命発生の初期から進化してきた生体防御機構である。生体は自然免疫によりバクテリアを初めとする微生物の侵入を検知して、生体防御機構を活性化するシステムを有している。そのため細菌細胞壁ペプチドグリカン、グラム陰性菌の外膜を構成するリポ多糖、リポ蛋白質、バクテリアDNAなどバクテリアの主要構成成分の多くは免疫増強作用を示し、獲得免疫を含めた免疫系の調節作用を示す。リポ多糖が免疫担当細胞を活性化する機構はかなり明らかにされてきている。まず血中でリポ多糖は lipopolysaccharide binding protein (LBP) に結合し、単球 (monocyte) 上の GPI 蛋白質 CD14 に移される。さらに Toll-like receptor 4 (TLR4) と MD-2 複合体によって認識され、シグナルが伝えられる。核転写因子 NF- κ B が活性化され、核内に移行し、転写活性が促進される。これにより、TNF α 、種々のインターロイキン、血小板活性化因子 (PAF)、NO など様々なメディエーターの産生が促される。一方ペプチドグリカン、リポ蛋白質、やリポタイコ酸については TLR2 を経てシグナルが伝えられる。

1) Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide

Egil Lien, Terry K. Means, Holger Heine, Atsutoshi Yoshimura, Shoichi Kusumoto, Koichi Fukase, Matthew J. Fenton, Masato Oikawa, Nilofer Qureshi, Brian Monks, Robert W. Finberg, Robin R. Ingalls, and Douglas T. Golenbock

The Journal of Clinical Investigation, **105**, 497-504 (2000).

リポ多糖受容体に関する論争について、まず紹介する。1998年に Toll-like receptor-2 (TLR-2) がリポ多糖の受容体であると報告された。一方マウスについては *lps* gene にコードされている TLR-4 がリポ多糖受容体であると報告された。リポ多糖に非感受性の HeJ マウスでは TLR-4 の細胞内インターロイキン-1 (IL-1) 受容体様ドメインに一塩基対の変異があること、TLR-4 ノックアウトマウスでは LPS に対する感受性を失うことが示されていた。天然リポ多糖はバクテリア由来の他の免疫増強活性物質を含有している可能性があるため、合成リポド A を用いて検討が行われた結果、TLR-4 がリポ多糖受容体であることが以下のように確認された (リポ多糖は多糖部とリポド A と呼ばれる脂質部からなりリポド A はその活性中心である)。生合成前駆体型リポド A ならびに *Rhodobacter sphaeroides* リポド A は、ヒトに対してはアンタゴニストとして働くが、マウスやハムスター等の齧歯類においては免疫増強作用を示す。そこでヒト TLR-4 (hTLR-4)、ならびにヒト TLR-2 (hTLR-2) をハムスター単球に過剰発現させたところ、hTLR-4 発現細胞においては上記リポド A はリポ多糖に対するアンタゴニストとして働いたのに対して、hTLR-2 発現細胞においてはハムスター細胞と同様に上記のリポド A に応答した (ハムスター細胞、hTLR-2 発現細胞ともに、ハムスター TLR-4 が発現している)。このことから TLR-4 がリポ多糖の受容体であること、リポド A に対する種特異的な

応答はTLR-4に起因することが明確になった。

現在ではリポ多糖の中に混入していたリポ蛋白質によってToll-like receptor-2 (TLR-2)の応答が誘起されたものと考えられている。筆者も免疫増強活性を持つといわれていた構造を合成したところ、合成化合物が活性を示さなかった例を経験しており、構造が明確で純粋な化合物を用いない限り、常に他の成分が混入している可能性を考慮に入れる必要がある。ペプチドグリカンやリポタイコ酸の受容体がTLR-2であるとされているが、まだあやしい。

2) Involvement of Lipopolysaccharide Binding Protein, CD14, and Toll-Like Receptors in the Initiation of Innate Immune Responses by Treponema Glycolipids

Nicolas W. J. Schröder, Bastin Opitz, Nobert Lamping, Kathrin S. Michelsen, Ulrich Zähringer, Ulf B. Göbel, and Ralf R. Schumann

The Journal of Immunology, 165, 2683-2693 (2000).

スピロヘータは螺旋形の細菌の総称で、*Treponema* はその中の一つの属で梅毒 (*Treponema pallidum*)を初めとして多くの病原性の*Treponema* が知られている。*Treponema* の培養液がヒト単球からのTNF α 産生を促進すること、抗CD14抗体によってあるいは polymyxin B (リポ多糖の作用を抑制するペプチド性抗生物質)によってTNF α 産生が阻害されること、またTNF α 産生はLBP依存的事であることが示された。培養液の糖脂質画分に活性が存在し、興味深いことに *T. brennaborensis* の糖脂質画分はTLR4依存的にTNF α 産生を促進し、*T. maltophilum* の糖脂質画分はTLR2依存的にTNF α 産生を促進する。まだ糖脂質の構造は明確ではないがリポ多糖ではないことが示されている。

3) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA

Hiroaki Hemmi, Osamu Takeuchi, Taro Kawai, Tsuneyasu Kaisho, Shintaro Sato, Hideki Sanjo, Makoto Matsumoto, Katsuaki Hoshino, Hermann Wagner, Kiyoshi Takeda & Shizuo Akira
Nature, **408**, 740-744 (2000).

バクテリアDNAが哺乳類の免疫系を活性化することが知られていた。バクテリアDNAに特徴的なCpGジヌクレオチド構造によって免疫系が刺激されるがその機構は明らかではなかった。哺乳類のDNAはCpG構造の頻度が少なく、しかもその多くはメチル化されているので免疫系を活性化することはない。この論文でCpG DNAの受容体がToll-like receptor 9 (TLR9)であることが明らかにされた。TLR9を欠損した (TLR9 $^{-/-}$) マウスを育成したところ、CpG DNAに対する作用が失われていた。CpG DNAは脾細胞の増殖、マクロファージからのサイトカインの産生、樹状細胞の成熟を促進するが、TLR9 $^{-/-}$ マウスにおいてはCpG DNAは作用しなかった。通常のマウスではCpG DNAは致死作用を示すが、TLR9 $^{-/-}$ マウスではCpG DNAは致死作用を示さず、血中のサイトカインレベルも上昇しない。CpG DNAは樹状細胞によるヘルパーTh1細胞 (Th1)への分化を促進するが、TLR9 $^{-/-}$ マウスには効果を示さない。

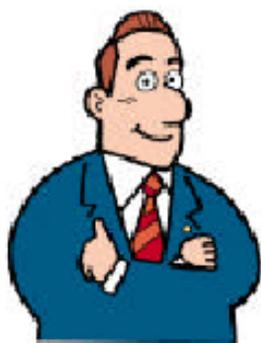
4) DNA from Protozoan Parasites Babesia bovis, Trypanosoma cruzi, and T.brucei Is Mitogenic for B Lymphocytes and Stimulates Macrophage Expression of Interleukin-12, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Nitric Oxide

Lisl K.M. Shoda, Kimberly A. Kegerreis, Carlos E. Suarez, Isabel Roditi, Ricardo S. Corral, Gustavo M. Bertot, Junzo Norimine, and Wendy C. Brown,*

Infection and Immunity, **69**, 2162-2171 (2001).

寄生性原虫のDNAによっても免疫系が活性化されることを報告した論文。トリパノゾーマ(Trypanosoma)は病原性の原虫で、T. gambiense や T. rhodesiense は睡眠病を引き起こす病原体である。バベシア (Babesia) も病原性の原虫で犬や牛に寄生する。Babesia bovis DNA は牛Bリンパ球のマイトジェン(分裂促進)活性を示すことが見出されていた。大腸菌 (E. coli), B. bovis, T. cruzi, と T. brucei のDNAはBリンパ球の増殖活性、マクロファージのIL-12、TNF α 、NO産生を促進した。これらの活性強度はゲノム中のCGジヌクレオチド構造の頻度とよい相関を示した。なおトリパノゾーマの脂質画分も免疫系を活性化することが報告されている。

10/17/01 受付



お知らせコーナー

第4回生命化学研究会シンポジウム・横浜（2001）

生命化学の新しい潮流

～ゲノム・プロテオーム・グリコームの研究のすすめ～

生命化学研究会シンポジウムは4回目を数え、これまでに生命化学の研究の方向性について白熱した議論がなされてきました。ゲノム解析が予想以上のスピードで進み、その成果を利用したポストゲノム解析のあり方が急速に問われるようになってきました。遺伝子や蛋白質の構造や情報を網羅する研究については世界的に活発になっていますが、蛋白質が作り出す分子の総括的な研究も必要になってきています。糖鎖はその代表的なものと言えるでしょう。本シンポジウムでは遺伝子情報から蛋白質さらには糖鎖に至る情報の流れを総括的に研究する事の必要性を議論いたします。

主催：日本化学会生命化学研究会

日時：平成13年12月13日（木） 9時50分～18時00分

場所：慶應義塾大学理工学部創想館マルチメディアルーム

〒223-8522 横浜市港北区日吉3-14-1、電話（代表）045-563-1141）

招待講演者

- 1) 国立遺伝学研究所 小原 雄治先生 「生命システムの解明に向けた統合的ゲノム研究」
- 2) 慶應義塾大学理工学部 柳川 弘志先生 「In vitro virus法とSTABLE法による遺伝子ネットワーク解析」
- 3) 創価大学生命科学研究所 西原 祥子先生 「ゲノムワイドな視点からの糖鎖生物学研究」
- 4) 帝京大学薬学部 平林 淳先生 「プロテオーム・グリコーム解析が抱える問題点：糖鎖構造の記載法」
- 5) 甲南大理工・HRC 杉本 直己先生 「ジーンエコロジーの新世紀」

ポスター発表

一般講演としてのポスター発表を受け付けます。ポスター発表の申込み締切：11月2日（金）発表希望者はA4の用紙1ページ（上下左右に2.5 cm余白）の上部に、題目・発表者（連名の場合は発表者に下線）・所属・同所在地を記してから、要旨本文を記載し、出来るだけ電子メール（Microsoft wordの添付書類）でお送り下さい。支障のある方はプリントアウトの上ご郵送下さい。講演要旨をもって発表の申込みといたします。

ミキサー（18時00分～19時30分）

講演会終了後、創想館7階フォーラムでミキサーを開催します。

参加費およびミキサー代：事前振り込みは11月16日まで

参加費：会員2,000円（当日3,000円）、非会員4,000円（当日5,000円）、学生1,000円（当日1,500円）

ミキサー代（講演終了後、希望者のみ）：4,000円、学生1,000円

振り込み口座

スルガ銀行 横浜日吉支店 普通 436856

第4回生命化学研究会シンポジウム 代表 佐藤 智典

（参加費ならびにミキサー代を期日までに下記振込み口座までご送金いただき、同時に振り込み内容（氏名、所属、会員・非会員・学生の別、ミキサー参加の有無、連絡先、振り込み日）を、電子メールもしくはFAXにて佐藤までお知らせ下さい。特に、研究室で一括して送金された場合は、振り込みをした人のお名前がわかるようにお知らせ下さい。）

問い合わせ先

慶應義塾大学理工学部応用化学科 佐藤 智典

〒223-8522 横浜市港北区日吉3丁目14-1

電話：045-566-1771 FAX：045-566-1447

電子メール：sato@aplc.keio.ac.jp

実行委員会

佐藤 智典（慶應義塾大学 理工学研究科）

塩谷 光彦（東京大学大学院 理学系研究科）

三原 久和（東京工業大学大学院 生命理工学研究科）

石田 斉（北里大学理学部）

第4回生命化学研究会

* テーラーメイド・バイオケミストリー *

Dr. Jeffery Kelly (Scripps Research Institute, USA)を含む約6名の講師による講演を
もとに、十分な時間をとり、盛り沢山の討論を行います。

主 催： 日本化学会生命化学研究会

日 時： 2001年12月14日（金）13:00～12月15日（土）14:00

場 所： ラフォーレ修善寺

〒410-2415 静岡県田方郡修善寺町大平字大城1529

TEL: 0558-72-3311 FAX: 0558-72-6115

参加費： 16,000円（宿泊費・懇親会費・12/15の朝昼食込）当日支払

参加申込： e-mailにて、氏名、所属、身分、会員の有無、連絡先を明記の上、下記世
話人あて、お申込みください。参加者に後日詳細お知らせします。また、生命化学研究
会HPにて公開します。

締 切： 2001年11月9日（金）

世話人： 三原久和 東京工業大学大学院生命理工学研究科

〒226-8501 横浜市緑区長津田町4259番地

Phone: 045-924-5756 FAX: 045-924-5833 e-mail: hmihara@bio.titech.ac.jp

生命化学研究会： <http://www-pclab.ph.tokushima-u.ac.jp/FBC/FBC-home.html>

第2回ペプチドフォーラム

ペプチド科学：化学と生物のクロスロード

主催 日本ペプチド学会

共催 日本化学会生命化学研究会

日時 平成13年11月2日（金）12:30-18:00

場所 東京工業大学大学すずかけ台キャンパス・生命理工学研究科大会議室
（横浜市緑区長津田町4259番地 B2棟）東急田園都市線すずかけ台駅から徒歩5分

参加費 無料、参加者はE-mailにてご登録ください。70名になり次第、締切。

ポストゲノムシーケンス時代に突入し、爆発的に情報が増え、目的や目標が明確になっていくことが期待されている反面、高いレベルに発展してきた技術や概念の上で、タンパク質を含めたポリペプチド科学のターゲティングがなおさら難しくなってきたようにも感じます。そこで今回のペプチド学会フォーラムでは、chemistry, physical & structural biology, molecular evolution および protein engineering のタンパク質&ペプチドに関係した広い観点から、各分野での目標や課題などを指摘していただき、化学と生物のクロスロードとしての今後のタンパク質・ペプチド科学を見つめてみたいと思います。

吉田賢右（東工大資源化学研）physical biology

廣明秀一（横浜市大総合理学）structural biology

浜地 格（九州大工）chemistry

芝 清隆（癌研細胞生物）molecular evolution

藤井郁雄（生物分子工研）protein engineering

申込先 〒226-8501 横浜市緑区長津田町4259番地 東京工業大学大学院生命理工学

研究科 三原久和

電話 045-924-5756 FAX 045-924-5833

E-mail: hmihara@bio.titech.ac.jp

文部科学省科研費特定領域研究(A)「分子シンクロ材料」 ミニシンポジウム

「細胞内トラフィックと薬物ターゲティングのシンクロナイゼーション」

主催：科研費特定領域研究(A)「分子シンクロ材料」

協賛：日本化学会、日本薬学会近畿支部

会期：平成13年12月5日（水）13時～12月6日（木）12時

会場：平安会館（京都市上京区烏丸通上長者町上ル）

[交通]京都市営地下鉄烏丸線「今出川」駅6番出口より徒歩7分

オーガナイザー：原島秀吉、河野健司、秋吉一成、二木史朗

プログラム

12月5日（水）13時～17時40分

1. 糖質高分子による肝細胞の分子認識（接着・取り込み）・シグナル伝達の制御
ー材料科学と生命科学の融合をめざしてー
（東工大院・生命理工、信州大院・医）赤池敏宏
2. 新しい細胞内デリバリーペプチドのデザイン（京大・化研）二木史朗
3. 塩基性抗菌ペプチドの細胞膜透過（京大院・生命）松崎勝巳
4. 小胞輸送による膜のトラフィックの分子機構（理研・生体膜）中野明彦
5. 細胞内ソーティング素子による細胞内動態制御システムの構築
（北大院・薬）原島秀吉
6. ペプチドディスプレイファージを使った遺伝子導入系の開発
（阪大・微研、産総研）中西真人
7. 細胞質から核への機能分子輸送機構（阪大院・医）米田悦啓

12月6日（木）9時～12時

1. 細胞との融合を利用した遺伝子デリバリーシステムの設計
（大阪府立大・工）河野健司
2. DNAバイオコンジュゲートによるペプチド核酸の細胞特異的核内デリバリー
（東工大院・生命理工）丸山厚
3. 人工分子シャペロンと免疫（京大院・工）秋吉一成
4. 核外輸送における mRNA の身分証明書（京大・ウイルス研）大野睦人

参加費：無料

連絡先：〒611-0011 宇治市五ヶ庄 京都大学化学研究所 二木史朗

TEL: 0774-38-3211 FAX: 0774-32-3038

E-mail: futaki@scl.kyoto-u.ac.jp

第16回 21世紀の薬学を探る京都シンポジウム

「Chemical Biology : 化学から生物への新たなアプローチ」

日時：平成13年12月8日(土) 13:00～17:20

場所：京都大学薬学部記念講堂

演題：1)「非対称な世界－ミクロからマクロまで」

黒田玲子(東京大学大学院総合文化研究科・教授)

2)「生体可視化プローブの開発と応用」

長野哲雄(東京大学大学院薬学系研究科・教授)

3)「蛍光性希土類錯体の設計とバイオ分析への応用」

松本和子(早稲田大学理工学部・教授)

4)「Chemical Genomicsの最前線－化学からゲノムサイエンスに挑戦する」

斎藤 烈(京都大学大学院工学研究科・教授)

5)「ゲノムと蛋白質の構築に隠された生物の進化」

郷 通子(名古屋大学大学院理学研究科・教授)

17:30～懇親会(芝蘭会館)

参加費：無料(シンポジウム・懇親会共)

主催：京都大学薬学部記念事業委員会

(連絡先) 〒611-0011 宇治市五ヶ庄

京都大学化学研究所 杉浦 幸雄

Tel : 0774-38-3210 Fax : 0774-32-3038

E-mail : sugiura@scl.kyoto-u.ac.jp

第 2 回大阪工業大学バイオベンチャーシンポジウム

日時：2001年11月5日(月) 10:00～17:20

場所：大阪工業大学60周年記念館 セミナー室(E)

(<http://www.oit.ac.jp/med/bio-mem/>)

午前の部 (10:00～12:00) Bio-MEMS 材料・加工・評価技術

10:00～10:40 「Bio-MEM用基盤材料創成技術の開発」

大阪工業大学バイオベンチャーセンター

仲町 英治 佐々 誠彦 平野 義明

槌谷 和義 小池 一步 大恵 克俊

10:40～11:20 「MEMS開発のための基盤技術の展開」

京都大学大学院工学研究科 教授 小寺 秀俊

11:20～12:00 「集束イオンビームによる超微細立体構造形成技術」

姫路工業大学 高度産業科学技術研究所 教授 松井 真二

(昼食)

午後の部 (12:55～17:20) バイオメディカルデバイス

12:55～13:00 挨拶 大阪工業大学 学長 西川 一

13:00～14:00 「化学IC構想とバイオメディカル応用」

名古屋大学大学院工学研究科 教授 生田 幸士

14:00～15:00 「極微量血液分析から日々の健康を診断するヘルスケアチップの創製」

東京大学大学院工学研究科 教授 堀池 靖浩

(休憩 20分)

15:20～16:20 「再生医療における組織工学の役割」

京都大学 再生医科学研究所 教授 岩田 博夫

16:20～17:20 「骨格筋系の再生医療における臨床前試験」

—生物物理学的刺激、骨形成蛋白、間葉系幹細胞の臨床応用をめざして—
ジョーンズホプキンス大学 准教授 井上 望

(懇親会 17:30～19:30 於：大阪工業大学60周年記念館)

参加申込先：大阪工業大学バイオベンチャーセンター 事務局まで

TEL:06-6954-4784, e-mail:bio-office@mmsun1.med.oit.ac.jp

会員異動情報

- ・松浦和則さん（4月から）

松浦 和則

九州大学大学院 工学研究院 応用化学部門 助教授

〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

Phone : 092-642-3598

Fax : 092-642-2011

E-mail : ma14tcm@mbx.nc.kyushu-u.ac.jp

- ・石田 齊さん（9月から）

北里大学理学部化学科 助教授

〒228-8555 神奈川県相模原市北里 1-15-1

TEL: 042-778-8159

FAX: 042-778-9953

E-mail: ishida@sci.kitasato-u.ac.jp

- ・浜地 格さん（10月から）

九州大学有機化学基礎研究センター

分子システム化学部門

生体機能分子化学分野 教授

Tel : 092-642-3584

Fax : 092-642-3611

E-mail: itarutcm@mbx.nc.kyushu-u.ac.jp