

# トピックス

## ●——細菌の迅速かつ超高感度な化学発光検出

近年、生物発光及び化学発光研究の顕著な進歩が見られる。例えば、赤色発光 ( $\lambda_{\max}=675\text{ nm}$ ) ホタルルシフェリン誘導体及び高輝度ルシフェラーゼ変異体が開発され、脳の深部のイメージングに適用された<sup>1)</sup>。また、高い発光効率 (10%) を有するジオキセタン誘導体が合成され、細胞内の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性のイメージングが報告された<sup>2)</sup>。地道な発光化合物の開発が発光研究に革新をもたらしている。

従来、食品中のサルモネラ菌及びリステリア菌の検出結果に2~6日を要した。これらの細菌の迅速かつ高感度検出が望まれていた。そこで、Shabatらのグループは、サルモネラ菌が産生するエステラーゼ及びリステリア菌が産生するホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼCの化学発光基質 **1** 及び **2** を開発し、サルモネラ菌及びリステリア菌の検出に適用した (図1)<sup>3)</sup>。これらの化学発光基質は、酵素反応後、発光 ( $\lambda_{\max}=540\text{ nm}$ ) が生じる Turn-ON 型である。本化学発光法は、クマリン骨格を有する4-メチルウンベリフェロン誘導体 (発光:  $\lambda_{\max}=460\text{ nm}$ ) を用いる蛍光法と比較し、1/10の基質濃度 (10  $\mu\text{M}$ ) を用いて、約600倍の高感度化を達成した。更に、様々な菌量に適用でき、6時間の培養でサルモネラ菌を検出した。

今後、新たな化学発光特性を有する化合物が合成され、多くの新規化学発光分析法が開発されるであろう。

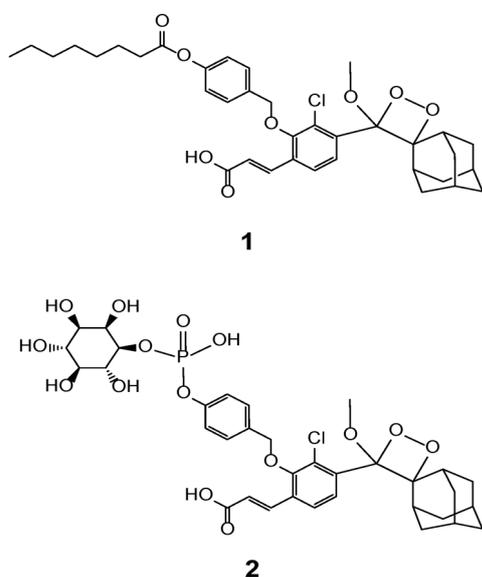


図1 サルモネラ菌及びリステリア菌検出用の化学発光基質

- 1) S. Iwano, M. Sugiyama, H. Hama, A. Watakabe, N. Hasegawa, T. Kuchimaru, K. Z. Tanaka, M. Takahashi, Y. Ishida, J. Hata, S. Shimozono, K. Namiki, T. Fukano, M. Kiyama, H. Okano, S. Kizaka-Kondoh, T. J. McHugh, T. Yamamori, H. Hioki, S. Maki, A. Miyawaki: *Science*, **359**, 935 (2018).
- 2) O. Green, T. Eilon, N. Hananya, S. Gutkin, C. R. Bauer, D. Shabat: *ACS Cent. Sci.*, **3**, 349 (2017).
- 3) M. Roth-Konforti, O. Green, M. Hupfeld, L. Fieseler, N. Heinrich, J. Ihssen, R. Vorberg, L. Wick, U. Spitz, D. Shabat: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **58**, 10361 (2019).

〔九州大学大学院薬学研究院 中園 学〕

## ●——細胞培養培地中のエクソソームの単離法

近年、細胞外小胞の一つであるエクソソームが注目を集めている。エクソソームはほとんどの細胞で分泌される直径50~150 nm程度の脂質二重膜からなる小胞で、細胞間を移動し様々な分子を輸送する。また、がん細胞由来のエクソソームは、がんの悪性化や転移に深くかかわっており、がんの早期発見を目指す研究も行われている。

エクソソームの分析法は、エクソソームのサイズの小ささから、分析ステップに入る前に、超遠心分離機や試薬を用いて単離・濃縮等の前処理が必要となる。超遠心分離は装置が大掛かりであるため医療現場には適さず、濃縮試薬は大変高価である。したがって、エクソソームのより簡単な単離法、あるいは、前処理をせずにエクソソームを分析する手法が求められている。

そこでChenらは、陰イオン交換 (AE) ベースの分離法を開発した<sup>1)</sup>。エクソソームは負に帯電しているため、正に帯電したAE磁気ビーズと結合することができる。このとき、正電荷または非荷電タンパク質、細胞片などの不純物はAE磁気ビーズに結合できず、洗浄バッファーで洗い流すことができる。次に最適化した溶出バッファーを使用して、AE磁気ビーズからエクソソームを溶出させる。この方法により、Chenらは30分以内にAE磁気ビーズにより血漿<sup>けっしょう</sup>および細胞培養培地からエクソソームを分離することに成功した。この手法は超遠心分離によって分離されたものよりも回収率が高く、不純物も少なかった。

一方、Boriachekらは金担持鉄酸化物ナノ粒子 (Au-NPFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NC) を使用し、細胞培養培地からエクソソームを分離、検出する方法を開発した<sup>2)</sup>。この方法では、Au-NPFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NCをCD63 (エクソソームの膜タンパク質) に対する抗体で機能化し、細胞培養培地に分散してバルクエクソソームを捕捉する。次に、磁気捕捉と精製を行うことで、エクソソームが結合したAu-NPFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NCを回収する。本研究ではその後、Au-NPFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NCのペルオキシターゼ活性を用いた比色分析も行っている。つまり、この方法により、高価で煩雑な予備分離ス

テップを必要としないエクソソームの分析が可能となっている。

エクソソームに関する研究は現在成長期にあり、活発に研究が進められている。しかし依然としてエクソソームの機能性や、生体中での役割には不明な点も多い。そのような基礎研究もさることながら、医学応用にむけた今後のさらなる発展を期待している。

- 1) J. Chen, Y. Xu, Y. Lu, W. Xing : *Anal. Chem*, **90**, 14207 (2018).
- 2) K. Boriachek, M. K. Masud, C. Palma, H. Phan, Y. Yamauchi, M. S. A. Hossain, N. Nguyen, C. Salomon, M. J. A. Shiddiky : *Anal. Chem*, **91**, 3827 (2019).

〔岡山大学大学院自然科学研究科 谷 夢希〕

## ● グラフェン酸化物を利用した抗 HIV 薬剤の探索

後天性免疫不全症候群 (AIDS) 発症過程で重要なヒト免疫不全ウイルス (HIV) mRNA の Rev responsive element (RRE) 領域と Rev タンパク質との相互作用を阻害する分子 (アンタゴニスト) は抗 HIV 剤になりうると期待されている。Proflavine (Pro) は、RRE のインターナルループ構造を強くかつ選択的に認識し、Rev タンパク質との競合的結合を示すため、抗 HIV 剤開発を指向した fluorescence indicator displacement (FID) 法において有用なプローブである。しかし、Pro は結合に伴う蛍光偏光 (fluorescence polarization : FP) の変化量 ( $\Delta FP$ ) が小さいため、候補化合物の RRE 結合反応を高感度に検出することはできない。

Zhang らは Pro の  $\Delta FP$  を増幅させることを目的としてグラフェン酸化物 (graphene oxide, GO) を活用する新たな FID 法を開発した (図 1)<sup>1)</sup>。GO がスタッキング相互作用および静電相互作用を介して RRE および Pro-RRE 複合体を選択的に捕捉することを用いる点に本手法の特徴がある。ここでは Pro-RRE 複合体に候補化合物および GO を添加し、Pro の  $\Delta FP$  を測定する。

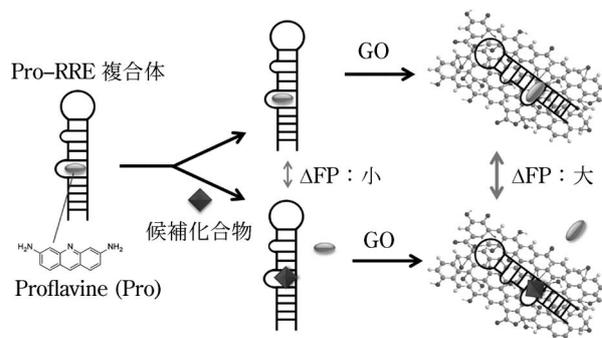


図 1 Proflavin と GO を併用する FID 法

候補化合物が RRE 結合能を持たない場合、複合体は GO に効果的に捕捉されることで、Pro の運動性が大幅に減少し、FP 値が増加する。一方、候補化合物が RRE 結合性を持ち Pro と競合的に結合する場合、Pro は複合体から遊離するため小さい FP 値を示す。

まず既知の RRE 結合性分子であるネオマイシン B を用いて、GO 添加に伴うシグナル増幅効果を検討した。その結果、濃度最適化された GO (8.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 存在下において、1.0  $\mu\text{M}$  ネオマイシン B 添加に伴う proflavine の  $\Delta FP$  は著しく大きいことが分かった。この  $\Delta FP$  は GO 非存在時におけるものと比較して 30 倍以上も大きいものであり、GO を用いることで候補分子の RRE 結合能を高感度に検出できることが示唆された。さらに、様々な小分子を用いた検討により、候補化合物の RRE 結合性の有無を明瞭に識別することができることが分かった。以上の結果より、GO を添加するという簡便な操作により既存プローブを用いた FID 法の検出感度を向上させることが可能であり、本手法は新規な抗 HIV 薬剤探索に有用な分析技術として期待できる。

- 1) L. Qi, Y-Y. Fan, H. Wei, D. Zhang, Z-Q. Zhang : *Sens. Actuators B.*, **257**, 666 (2018).

〔東北大学大学院理学研究科 リー エン ティン タビサ〕