

化学プローブのデザイン・合成による タンパク質機能の可視化ツール

水上 進, 菊地 和也

分子イメージングは生物が生きた状態における生体分子の機能解析を可能とすることから、近年大きな注目を集めている。筆者らは、化学原理に基づいた分子イメージングの基盤技術の開発に取り組んでいる。蛍光イメージング実験に汎用されているタンパク質のラベル化法は、これまでに数多く報告されているものの、依然として汎用性が高い手法は存在しない。そこで、細菌酵素β-ラクタマーゼに着目し、その変異体および合成蛍光プローブを用いて、タンパク質の特異的かつ発蛍光型の新規ラベル化法を開発した。また、動物個体内の酵素機能を可視化する取り組みとして、組織深部まで高解像度で可視化できるMRIを用いた酵素活性の検出を目的として、常磁性緩和促進(PRE)を利用したプローブ設計原理を確立した。この原理に基づいて開発したプローブを用いて、プロテアーゼ活性の¹⁹F MRI検出に成功した。

1. はじめに

生体分子は、金属イオン、脂質、タンパク質など様々な分子と相互作用しながら機能している。それゆえ、生体分子の相互ネットワークが実質的に破壊されている *in vitro* での機能は、その生体分子の真の生理機能を反映しているとは限らない。近年、生きた細胞や動物個体内における生体分子の挙動や機能を直接可視化する「分子イメージング」が大きな注目を集めている。小分子蛍光プローブや蛍光タンパク質 (FP) などを用いた蛍光イメージングは、医学・生物学の分野で最も広く用いられているイメージング法の一つであり、様々な生命現象の解明に大きく貢献してきた。蛍光タンパク質の発見から応用への功績を称えて、下村, Chalfie, Tsien の三氏に2008年度のノーベル化学賞が授与されたのは記憶に新しい。また、蛍光タンパク質の遺

伝子を改変し、生理機能を探索する機能性プローブの開発も数多く報告されている¹⁾。このような機能性蛍光タンパク質プローブは、遺伝子改変により発現の局在制御などが可能であり、大変有用である。その一方で、蛍光タンパク質の発現に関する時間制御は一般的に困難である。実際に、FPの応用研究が進んだ現在においても、小分子有機化合物プローブ (化学プローブ) である Fura-2 は Ca²⁺ イメージングにおいて汎用されており、発表論文の引用回数は17,000回を超え、作製者の Tsien 博士の論文の中でもノーベル賞受賞対象論文の引用回数を遙かに凌いでいる²⁾。また近年、分子イメージングの研究対象は、生細胞のみならず、より真の機能解明が可能な動物個体へも移行しつつあるが、蛍光タンパク質の励起および観測波長領域の光の組織透過性は低く、個体レベルでの解析に適しているとは言えない。

このように、蛍光タンパク質を用いた分子イメージング法にも課題は多く存在し、これらを解決する実験技術の開発が求められている。本総説では、筆者らの研究室で行っている次世代の分子イメージング法の開発研究について紹介したい。具体的には、①タンパク質の発蛍光ラベル化、②¹⁹F MRIを用いた酵素反応の検出の二つの研究について概説する。

大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻
(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1)

Design, synthesis and biological application of chemical probes for imaging protein functions

Shin Mizukami and Kazuya Kikuchi (Division of Advanced Science and Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

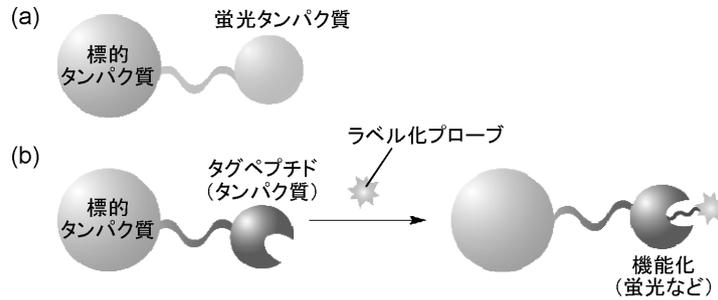


図1 生物学研究で用いられる標的タンパク質の可視化法
(a) 蛍光タンパク質との融合。(b) タグペプチド (タンパク質) との融合およびそれに続く機能性分子ラベル化。

表1 これまでに報告されている主なタンパク質ラベル化法

タグ	特徴	文献
テトラシステインタグ	FlAsH, ReAsH などの蛍光リガンドを用いた発蛍光ラベル化が可能。実用化。	Griffin et al. ⁴⁾
HaloTag	ハロアルカン構造の基質を用いる。実用化。	Los et al. ⁵⁾
SNAP-tag	O-アルキルグアニン構造の基質を用いる。実用化。	Keppler et al. ⁶⁾
CLIP-tag	SNAP-tag の類縁タグ。SNAP-tag とは異なる基質特異性を持つ。実用化。	Gautier et al. ⁷⁾
ビオチンアクセプターペプチド	ビオチンリガーゼを用いてビオチンをラベル化する手法。	Chen et al. ⁸⁾
Q-tag	トランスグルタミナーゼを用いて、ラベル化する手法。	Lin et al. ⁹⁾
His-tag	Ni ²⁺ -NTA などの金属錯体との配位を利用。	Guignet et al. ¹⁰⁾
D4-tag	Zn ²⁺ 錯体への配位を利用。	Ojida et al. ¹¹⁾

2. タンパク質の発蛍光ラベル化

標的タンパク質を可視化するには、蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現させる手法 (図 1a) が一般的となっている。しかしながら前節でも述べたように、蛍光タンパク質では適用困難な実験を行うために、標的タンパク質を低分子の蛍光色素などで特異的にラベル化する手法が近年注目を集めている³⁾。一般的には、タグと呼ばれるペプチドあるいはタンパク質を目的タンパク質に融合させ、そのタグに特異的に蛍光色素などを結合させる方法 (図 1b) が行われている。表 1 にこれまでに報告されているタンパク質のラベル化法のうち代表的なものを示す。このように、様々なラベル化法が報告されているにも関わらず、実用化されている手法は少ない。また、市販されている手法であっても、特異性に問題がある場合や、ラベル化前後におけるプローブの蛍光特性が変化しないために未反応のプローブを洗浄で完全に除く必要があるなど、改良の余地はまだ多い。そこで、筆者らは既存のタンパク質ラベル化法の弱点を克服する蛍光ラベル化法の開発に取り組んだ。

2-1. タグ分子の選択

汎用性を有するタンパク質ラベル化法を開発するには、適切なタグの選択が重要である。タグ分子を選択するポイントは、①内在性でないこと、②融合させた目的タンパク

質の機能を阻害しないこと、の二つである。

まず、内在性に関しては、用いる細胞内にタグ分子と同一あるいは同種のタンパク質が存在する場合、ラベル化プローブが内在性のタンパク質に結合する可能性がある。また、同種の内在性タンパク質が細胞内に発現していなくても、他にタグ分子に結合する内在性基質が存在する場合などは不適當である。

次に、目的タンパク質の機能に影響を与えるかどうかについては、タグ分子の大きさ、電荷、疎水性などが関係する。タグ分子の大きさは、一般的にはできるだけ小さい方が好ましいとされている。実際は 238 アミノ酸 (27kDa) からなる GFP が多くの実験で用いられており、目的タンパク質の機能への影響は個々のケースにより異なると考えられるが、実用化されているタグ分子は小さいものが多い。市販タグのうち、最小のテトラシステインタグ⁴⁾で 6 アミノ酸 (575Da)、最大の HaloTag⁵⁾でも 33kDa とタンパク質の中では小さな部類に入る。

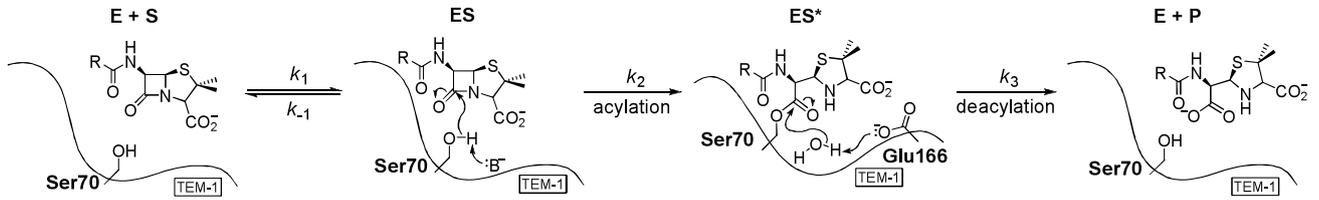
以上の条件を考慮して、タグタンパク質としてクラス A β -ラクタマーゼを選んだ。クラス A β -ラクタマーゼは分子量が 28K 程度の比較的小さな酵素である。 β -ラクタマーゼは細菌酵素であるため、哺乳類細胞には内在性の相同タンパク質は存在しない。また、 β -ラクタマーゼは抗生物質であるペニシリンやセファロスポリンを加水分解することから、それらの阻害剤の開発は細菌感染症の治療に極めて重要である。それゆえ、酵素反応メカニズムに関して

も古くから多くの研究がなされてきた。中でも、クラスA β -ラクタマーゼの一つであるTEM-1は、その触媒機構や基質特異性等に関して詳細な検討がなされている¹²⁾。

図2aにTEM-1によって触媒されるペニシリンの加水分解反応の機構を示す。酵素基質複合体の形成の後、活性化された70番目のSerの水酸基が β -ラクタムを求核攻撃し、酵素と基質がエステル結合で連結されたアシル中間体を形

成する(アシル化: acylation)。次いで、166番目のGluが近傍の水分子の脱プロトン化を促進し、その水分子がアシル中間体を加水分解する(脱アシル化: deacylation)¹³⁾。この脱アシル化過程に参与するGluをAsnに変異させた変異型酵素 E^{166N} TEMでは、酵素反応の脱アシル化速度定数 k_3 が極めて遅くなり、実質的に脱アシル化が起こらなくなる¹⁴⁾(図2b)。すなわち、基質が変異型酵素に共有結合した

(a) 野生型 (TEM-1)



(b) 変異型 (E^{166N} TEM)

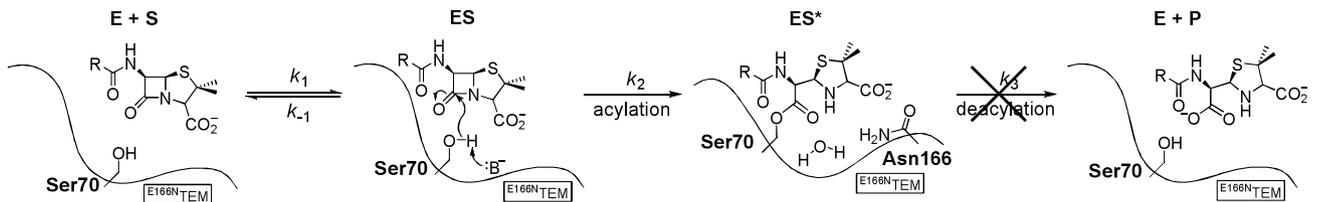


図2 タンパク質ラベリングのメカニズム

(a) 野生型 TEM-1 によるペニシリンの分解反応機構。(b) 変異型 TEM (E^{166N} TEM) の反応。

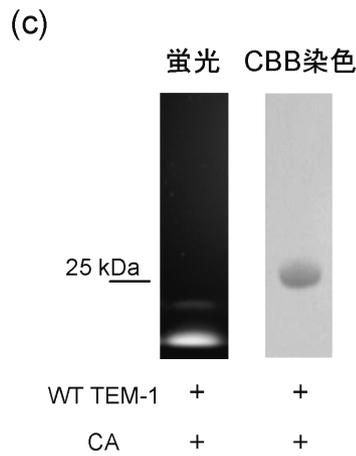
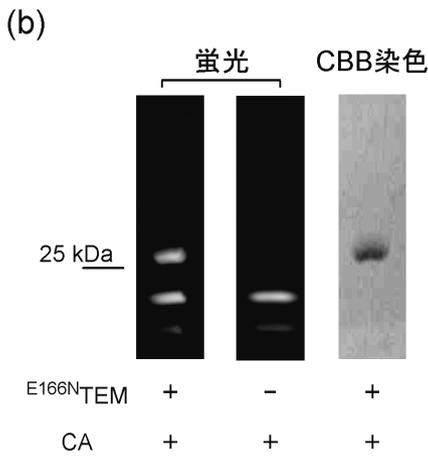
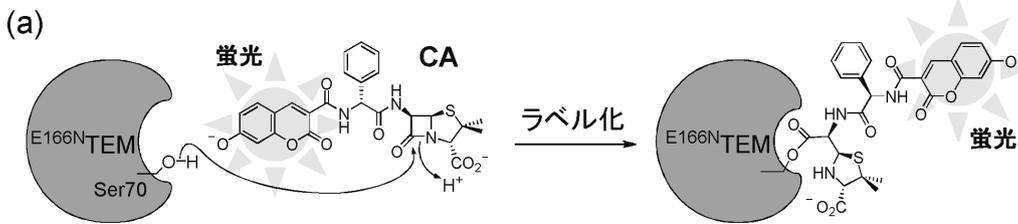


図3 β -ラクタマーゼの蛍光ラベル化

(a) 合成プローブCAの E^{166N} TEMへの蛍光ラベル化の概要。(b, c) SDS-PAGEを用いたCAの(b) E^{166N} TEMおよび(c) 野生型 (WT) TEM-1へのラベル化の確認。

反応中間体が安定に存在する．そこで、この E^{166N} TEM をラベル化タグとして利用することを考えた．

2-2. 蛍光ラベル化プローブ CA の開発

まず、標的タグを選択的に蛍光ラベル化するプローブ分子のデザインを行った．図 3a に示す化合物 CA は、抗生物質のアンプシリンに 7-ヒドロキシクマリン誘導体がアミド結合を介して繋がった構造をしている．この化合物は、紫外光励起によりクマリン由来の水色蛍光を発する．このプローブを E^{166N} TEM と反応させることにより、このタンパク質を蛍光色素でラベル化することができると予想した．そこで、精製した E^{166N} TEM を中性緩衝液中で CA とインキュベーションし、蛍光ラベル化が起こるかどうかを確認した．図 3b に示すように、CBB 染色で示される E^{166N} TEM と同位置 (28kDa) にクマリンの水色蛍光が観測された．CA を野生型の TEM-1 とインキュベーションした場合は、CA の加水分解物は観察されたものの、タンパク質への修飾は全く観察されなかった (図 3c)．すなわち、 E^{166N} TEM をタグとして、また蛍光化合物 CA をラベル化プローブとして用いることにより、新規の「タグ-蛍光ラベル化プローブペア」の開発に成功した．プローブ化合物の合成に

関しては、抗生物質アンプシリンに蛍光色素を修飾したシンプルなものであり、クマリン以外の様々な蛍光色素を有するプローブの開発が可能である．以上の結果を考慮すると、本ラベル化法は既存の HaloTag および SNAP-tag に匹敵する実用性・応用性を備えていると考えられる．

一方、CA を用いたラベル化法には未解決の課題も残る．CA はもともと蛍光性の化合物であるため、ラベル化の前後で蛍光特性は変化しない．一般的にラベル化プローブの量は、タグ分子よりも多く存在するため、プローブがタグにラベル化された後も未反応のプローブが多く残存することになる．そのような条件では、図 3b に示すように、未反応の CA 由来の蛍光バンドが強く観測される．そこで、実際の生細胞を用いた実験では、標的タグへの蛍光ラベル化後に、未反応のプローブを洗浄操作で完全に除去が必要がある．このとき、通常は非蛍光性であるが、タグにラベル化されると蛍光性となる「発蛍光性 (fluorogenic)」のラベル化プローブを用いることで、原理的には洗浄操作の必要は無くなる．そこで、次に変異型 β -ラクタマーゼタグに特異的にラベル化される発蛍光型プローブの開発に取り組んだ．

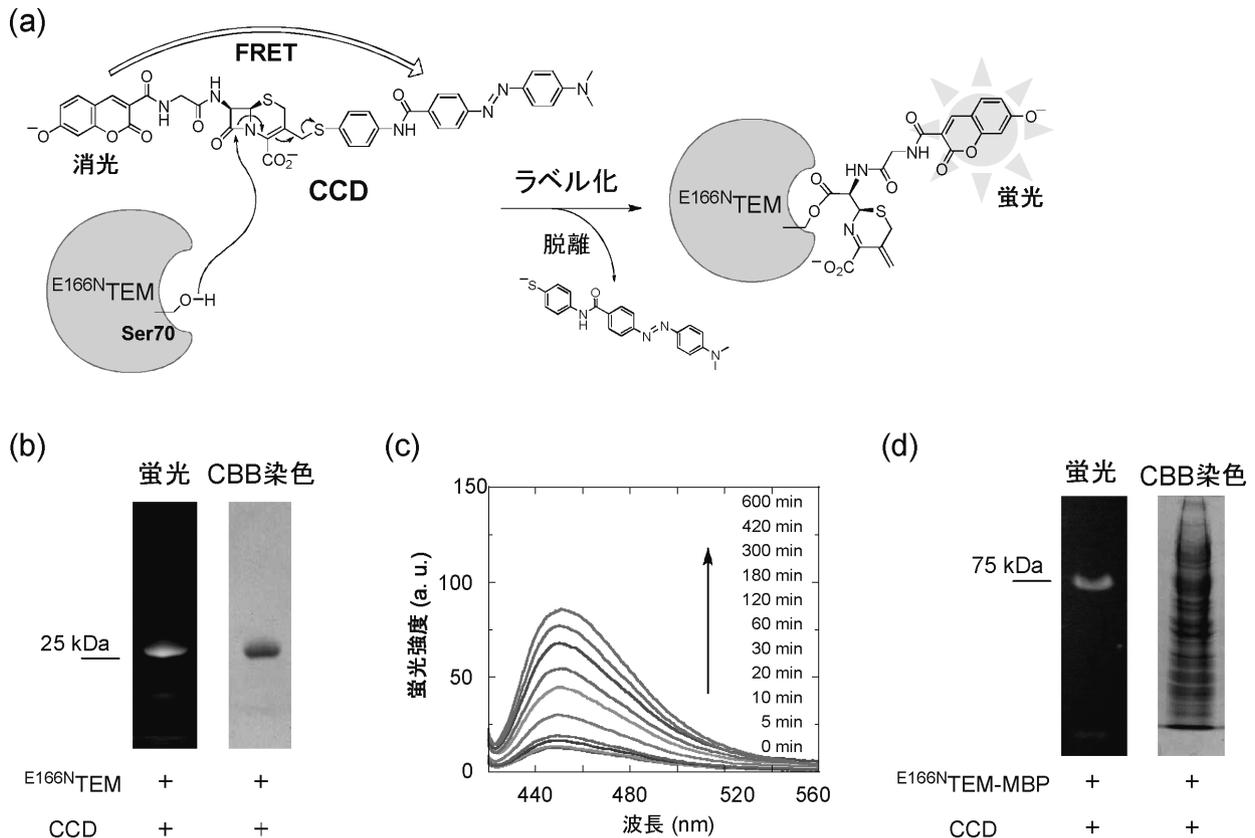


図 4 発蛍光型プローブを用いたタンパク質ラベル化

(a) 合成プローブ CCD の E^{166N} TEM への発蛍光ラベル化の概要．(b) SDS-PAGE を用いた CCD の E^{166N} TEM への発蛍光ラベル化の確認．(c) E^{166N} TEM とインキュベーションしたときの CCD の蛍光スペクトルの時間変化．(d) HEK293T 細胞抽出液存在下における、 E^{166N} TEM 融合 MBP の選択的 CCD ラベル化．

2-3. 発蛍光ラベル化プローブ CCD の開発

筆者らは図 4a に示すプローブ化合物 CCD をデザインし、合成を行った。CCD は β -ラクタム系抗生物質のセファロsporin を基本骨格とし、その両端に 7-ヒドロキシクマリンと *N,N*-ジメチルアミノアゾベンゼンカルボン酸 (Dabcyl) が結合している。Dabcyl は消光性色素として広く知られている化合物で、他の色素由来の蛍光を蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET: fluorescence resonance energy transfer) により消光させる。すなわち CCD においては、クマリンの蛍光は同一分子内の Dabcyl への FRET により、消光するようにデザインされている。ここで、図 4a に示すスキームにより、変異型 β -ラクタマーゼタグへのラベル化が起こると、Dabcyl が脱離して蛍光が回復すると期待した。

実際に CA の場合と同様に、合成した CCD を ^{166}N TEM とインキュベーションし、SDS-PAGE により解析を行った。遊離の CCD はほとんど蛍光を発しなかったのに対し、タグに結合した CCD は強い蛍光を発した (図 4b)。ラベル化反応の過程を蛍光光度計で経時測定したところ、はじめは消光していた蛍光が徐々に上昇していく蛍光スペクトル変化が得られた (図 4c)。すなわち、FRET の原理に基づいたプローブデザインにより、「発蛍光ラベル化法」の開発に成功した。

次に、本手法を用いて、標的タンパク質の特異的ラベル化について検討した。標的タンパク質としては、マルトース結合タンパク質 (maltose binding protein: MBP) を選択した。MBP の C 末端側に ^{166}N TEM を繋いだ融合タンパク質を作製し、CCD を用いてこのタンパク質への蛍光ラベル化を試みた。このとき、細胞内の他のタンパク質への非特異吸着の有無を調べるために、HEK293 細胞の抽出液を反応溶液に加えた。その結果、図 4d に示すように、MBP と ^{166}N TEM の融合タンパク質のみを選択的に発蛍光ラベル化できることが確認された。以上より、CCD を用いることで、タグと融合させた標的タンパク質の選択的な発蛍光ラベル化に成功した。

2-4. 生きた細胞膜表面のタンパク質ラベル化

CCD と ^{166}N TEM を用いたラベル化法は、優れた発蛍光特性と高い特異性を併せ持ち、既存のラベル化法と比較して優位な点を有していた。そこで次に、生きた細胞で発現している標的タンパク質のラベル化に本手法が適用可能か検討を行った。標的タンパク質としては、細胞膜上に発現する上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) を選択した。

膜タンパク質である EGFR の N 末端 (細胞外) 側に、タグタンパク質である ^{166}N TEM を融合させたタンパク質を HEK293T 細胞で発現させた。この細胞を培地中 37°C で 5

μM の CCD とインキュベーションした。1 時間後、培地を PBS に交換し、蛍光顕微鏡で観察を行ったところ、細胞膜表面に発現している ^{166}N TEM-EGFR が CCD によってラベル化され、クマリン由来の蛍光が観察された (図 5)。一方、EGFR のみを細胞膜上に発現させた場合は、ラベル化による蛍光は観察されなかった。すなわち、本ラベル化法を利用して、生細胞表面の標的タンパク質を高い特異性で蛍光ラベルすることが可能であった¹⁵⁾。

以上より、タンパク質工学に基づいたタグ分子設計と、有機合成化学に基づいたラベル化プローブ設計を組み合わせ、特異的な発蛍光ラベル化法の開発に成功した。よりチャレンジングな課題として、細胞内タンパク質の発蛍光ラベル化が挙げられる。これを達成するには、プローブが細胞膜を透過することが必要であり、プローブの膜透過性誘導体化を現在進めている。また、クマリンより長波長励起の色素のラベル化プローブ開発も行っている。このような誘導体を用いることで、研究の選択肢が大幅に広がり、既存のタグラベル化プローブのペアと同時に組み合わせることにより、複数の標的タンパク質の同時蛍光ラベル化も可能になるだろう。また、現在は機能性分子のラベル化といえば、そのほとんどが蛍光ラベル化である。その一方で、近年では蛍光イメージングに留まらず、様々なイメージング法の開発が行われている。筆者らは、MRI (magnetic resonance imaging: 磁気共鳴イメージング) を用いた生体シグナルの解析に着目しており、次節では MRI を用いて酵素活性を検出する試みについて述べる。

3. ^{19}F MRI を用いた酵素反応の検出

次に、個体内における酵素機能や遺伝子発現を可視化することを可能とする「MRI による生体シグナル可視化研究」について概説する。蛍光イメージングの短所の一つに、深部への透過性が悪いことが挙げられる。通常の蛍光イメージング実験で用いられる紫外～可視領域の光は、散乱の影響を受けやすく、組織深部までは到達しない。そこで、より組織透過性の高い近赤外蛍光を用いた個体イメージングが注目されている。一方、MRI は、感度や簡便性の面では蛍光イメージングに劣るものの、臨床で利用されているように、生体深部を高解像度で撮像することができる。それゆえ、生きた動物個体内における酵素などの生体分子の挙動を MRI で観察する試みが近年注目を集めている。

3-1. MRI による酵素活性の可視化

酵素活性の MRI 検出に関しては、Meade らによって先駆的な研究がなされている¹⁶⁾。彼らは、巧妙に設計された MRI プローブを用いて、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の胚における加水分解酵素の活性を、 ^1H MRI で可視

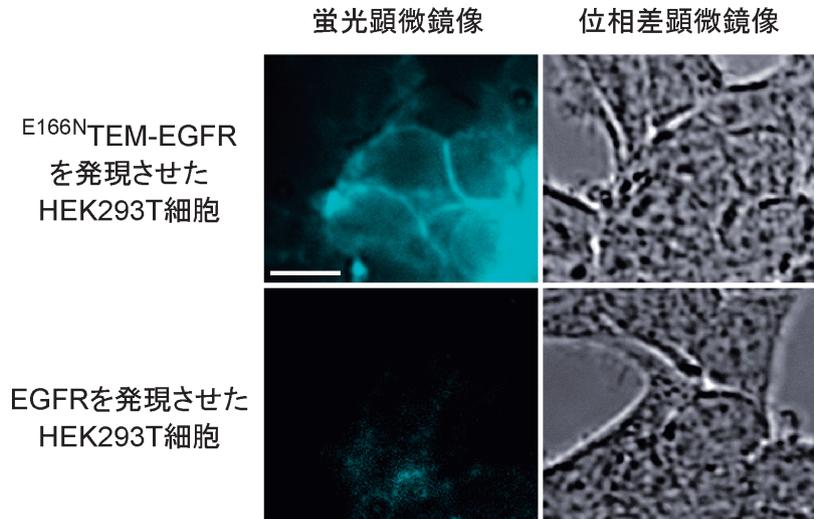


図5 標的タンパク質 ($E166N$ -TEM-EGFR, EGFR) を発現させた HEK293T 細胞の蛍光および位相差顕微鏡像。

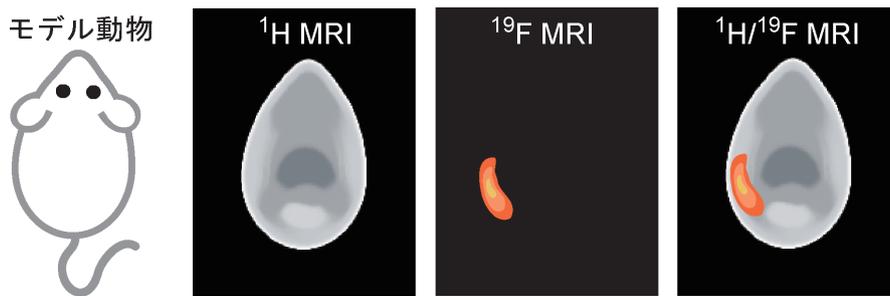


図6 ^{19}F MRI プローブ投与マウスの ^1H MRI, ^{19}F MRI, および両者の重ね合わせイメージ図。

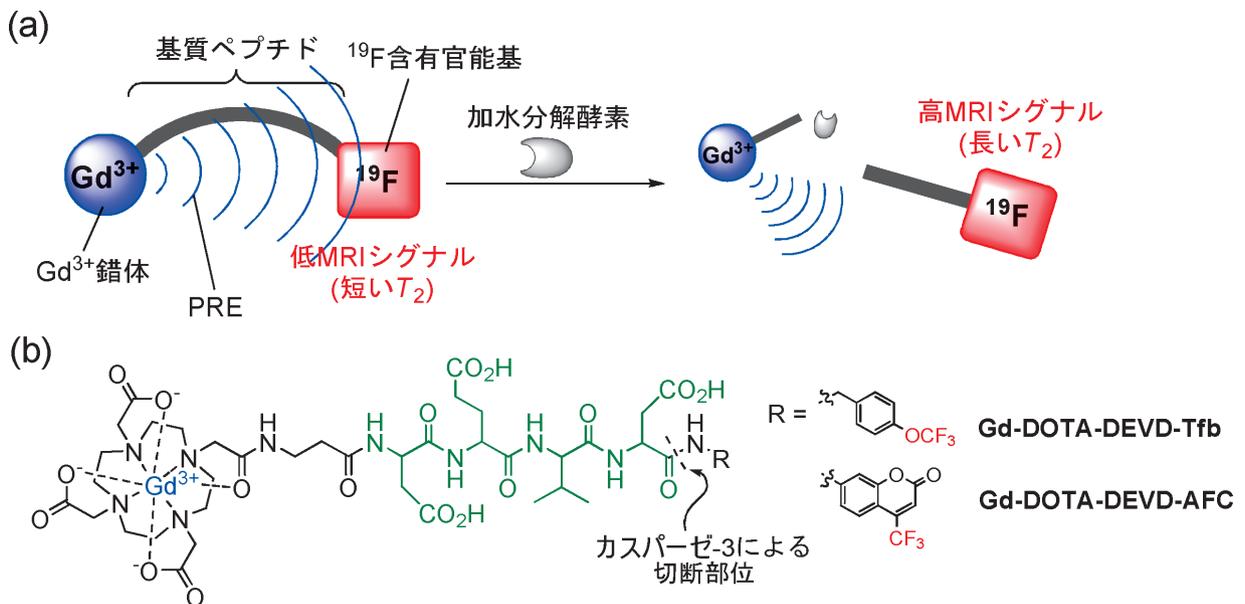


図7 緩和時間変化型 MRI プローブ

(a) 酵素活性を検出する ^{19}F MRI プローブの設計原理. (b) 合成したプローブ化合物の構造.

化している。このようなMRIによる酵素活性の可視化研究はまだ報告例は少ないものの、大きな注目を集めている。しかしながら、 ^1H MRIは体内の水や脂肪などの水素原子を検出する手法であり、常に内在性のバックグラウンドシグナルが観察される。そのため、酵素活性などを検出するプローブシグナルとバックグラウンドシグナルとを区別する必要があり、通常的手法ではその区別は困難である。

そこで、筆者らが注目したのが ^{19}F MRIである。 ^{19}F は天然存在比率が100%のフッ素の安定同位体であり、 ^1H に匹敵する高い磁気回転比を持つことから、比較的高感度なNMR測定が可能な核種である。また、生体内には歯や骨以外にはほとんど存在せず、内在性のバックグラウンドシグナルは全く観察されない。それゆえ、 ^{19}F を含むプローブ化合物を動物に投与し ^{19}F MRI測定を行うと、プローブシグナルのみが観察される(図6)。得られた ^{19}F MRI画像を、解剖学的情報を与える ^1H MRI断層画像と重ね合わせることで、動物個体内におけるプローブの局在を知ることができる¹⁷⁾。すなわち、標的酵素の活性を ^{19}F MRIシグナル変化として検出できれば、生きた動物個体内において、

いつ、どこで酵素活性が上昇するかを調べることができる。そこでまず、加水分解酵素活性を ^{19}F MRIシグナルへと変換する基本原理の開発に着手した。

3-2. 加水分解酵素活性の ^{19}F MRI検出の原理

MRIは、 $x \cdot y \cdot z$ 軸のそれぞれに磁場勾配をかけることでNMRシグナルを分離し、三次元画像を構築する撮像法である。ここで、あるボクセル(三次元画像の最小単位)のMRIシグナル強度は、ボクセル体積内に存在する観測核のNMRシグナル強度と等しい。NMRシグナル強度に影響を与えるパラメーターに緩和時間がある。緩和時間には、縦緩和時間 T_1 および横緩和時間 T_2 の2種類が存在し、このうち T_2 が短くなるとMRIシグナルは低下する。よって、プローブ化合物の T_2 をあらかじめ短縮させ、それを酵素反応によって延長させることにより、酵素活性をMRIシグナルの増大として検出できることになる。

そこで、プローブの T_2 を短縮させるために、常磁性緩和促進(paramagnetic relaxation enhancement: PRE)に着目した。PREは常磁性物質が持つ対電子スピンの影響

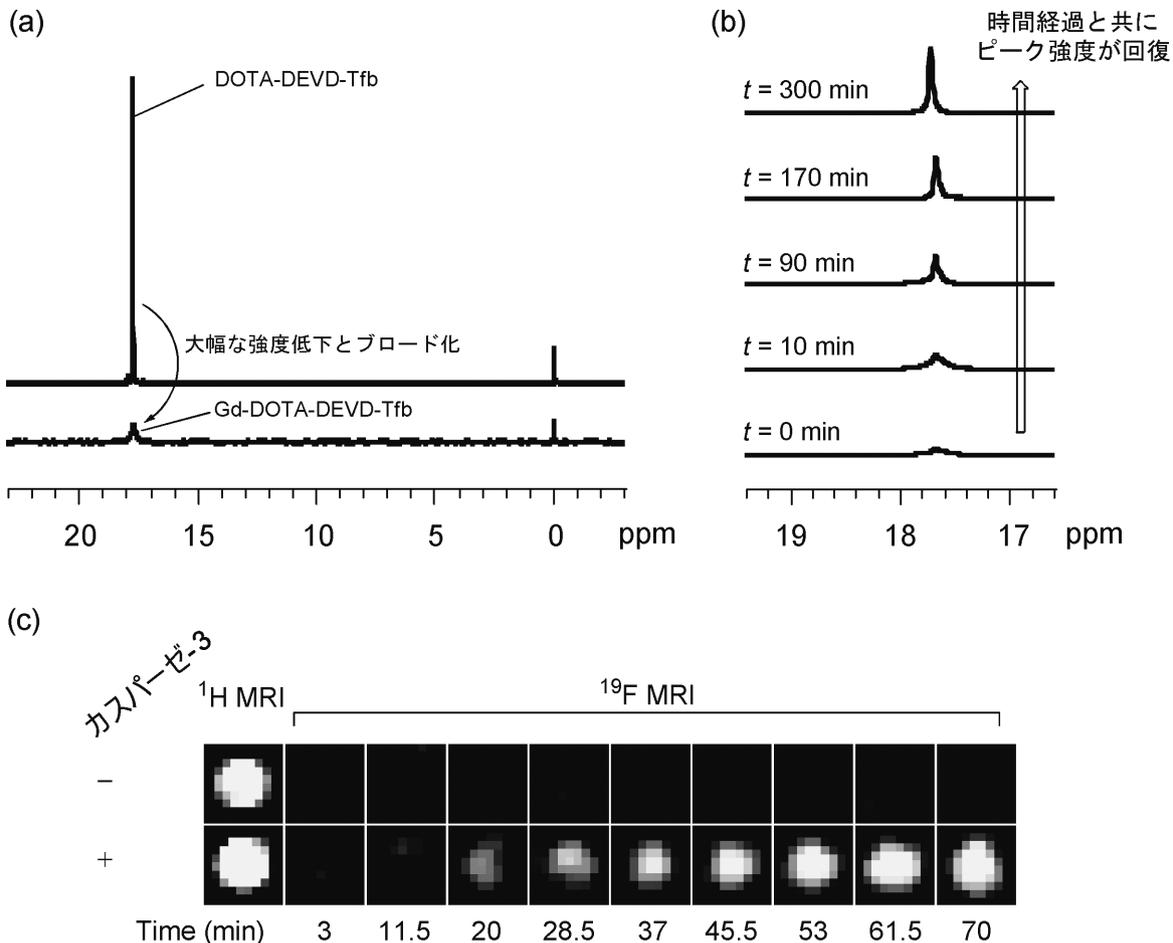


図8 酵素反応によるMRIシグナル変化

(a) DOTA-DEVD-TfbとGd-DOTA-DEVD-Tfbの ^{19}F NMRスペクトル。(b, c) カスパーゼ-3添加によるGd-DOTA-DEVD-Tfbの(b) ^{19}F NMR, および(c) ^{19}F MRIの経時変化。

で、近傍に存在する NMR 観測核の T_1 および T_2 が著しく短縮する現象である¹⁸⁾。常磁性物質の中でも Gd^{3+} イオンは 4f 軌道に七つの不対電子を有し、PRE 効果が特に大きい。それゆえ、 Gd^{3+} イオンの近傍にある NMR 観測核の T_2 は大幅に短縮すると予想される。そこで、図 7a に示すプローブの設計原理を考案した。常磁性金属イオンの Gd^{3+} と NMR 観測核種の ^{19}F を同一分子内に修飾したプローブの T_2 は PRE によって大きく短縮し、MRI シグナルは大きく低下すると予想される。 Gd^{3+} 錯体と ^{19}F 含有官能基の間のリンカーが、加水分解酵素によって切断されると、短縮していた T_2 が延長し、MRI シグナルが上昇すると考えられる。以上の原理により、加水分解酵素活性を ^{19}F MRI で検出できると考えた。

3-3. カスパーゼ-3 活性を検出する ^{19}F MRI プローブの開発

ターゲット酵素として、アポトーシスに関連するプロテアーゼカスパーゼ-3 を選択した。カスパーゼ-3 は高い基質特異性を有し、ペプチド DEVD の C 末端のペプチド結合を加水分解する。そこで、DEVD を含むペプチドの両端に Gd^{3+} 錯体と ^{19}F 含有官能基を修飾した化合物 Gd-DOTA-DEVD-Tfb をデザインし、液相法と固相法を組み合わせ合わせて合成した (図 7b)¹⁹⁾。

Gd-DOTA-DEVD-Tfb の ^{19}F NMR スペクトルは、 Gd^{3+} を配位していない DOTA-DEVD-Tfb と比較して大幅なブロード化が観測された (図 8a)。また、横緩和時間 T_2 を測定したところ、Gd-DOTA-DEVD-Tfb の T_2 は大幅な短縮のため正確な値の算出はできなかった。次に、Gd-DOTA-DEVD-Tfb を含む緩衝液にカスパーゼ-3 を添加したところ、 ^{19}F NMR ピークは、時間依存的にシャープに変化した (図 8b)。酵素反応が完了したサンプルでは、 T_2 は 32ms まで延長していた。

続いて、このプローブを用いて、カスパーゼ-3 活性の ^{19}F MRI 検出を試みた。Gd-DOTA-DEVD-Tfb の ^{19}F MRI 画像では、シグナルが完全に消失していたが、カスパーゼ-3 の添加後に経時的に増大する結果を得た (図 8c)。

以上により、PRE 効果を利用して加水分解酵素活性を検出する ^{19}F MRI プローブの設計原理を開発し、*in vitro* におけるカスパーゼ-3 活性検出へ応用した。この原理は特定の酵素だけでなく、様々な加水分解酵素への応用が可能である。実際、その他のプロテアーゼや糖加水分解酵素に対するプローブの開発も進めている。また、様々な実験に適用可能な多機能プローブとして、酵素活性を MRI シグナルと蛍光強度の双方で検出するプローブ Gd-DOTA-DEVD-AFC (図 7b) の開発にも成功している²⁰⁾。現在、それらのプローブを細胞、動物個体へ適用し、生きたサンプル中における酵素活性の MRI による可視化法の確立を進めている。

4. おわりに

本総説では、筆者らの研究室で開発してきた二つの分子イメージング基盤技術、「タンパク質ラベル化法」および「 ^{19}F MRI による酵素活性検出法」について紹介した。前半の、分子スイッチを組み込んだ「タンパク質ラベル化技術」は、既存の市販技術と比較しても優位な点を備えており、今後生物学で汎用される技術になることを期待している。後半の「 ^{19}F MRI プローブの開発」は、現状では測定機器がほとんど普及していないこともあり、実用化へはもう少し時間がかかるかもしれないが、これまでほぼ不可能であった酵素活性の *in vivo* MRI 検出の解決策が見えてきたと言える。

これら二つの技術はお互いに独立した研究テーマであるが、両者を融合させることで、さらに発展させた技術の開発に繋げることもできる。このような化学原理に基づいた分子プローブの研究は、ポストゲノム時代に求められる「生きた状態における生体分子の機能解明」のための強力なツールになるだろう。

謝辞 本総説で取り上げた研究の一部は、京都大学大学院工学研究科・白川昌宏教授、朽尾豪人准教授、横浜市立大学大学院国際総合科学研究科・杉原文徳氏との共同研究であり、ここに感謝の意を表します。本研究は、科学技術振興調整費「科学技術連携施策群の効果的・効率的な推進」プログラム (課題名：生体内分子を可視化するナノセンサ分子) の一環として行われました。

文 献

- 1) Chudakov, D.M., Lukyanov, S., & Lukyanov, K.A. (2005) *Trends Biotechnol.*, 23, 605-613.
- 2) Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R.Y. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 3440-3450.
- 3) Chen, I. & Ting, A.Y. (2005) *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16, 35-40.
- 4) Griffin, B.A., Adams, S.R., & Tsien, R.Y. (1998) *Science*, 281, 269-272.
- 5) Los, G.V., Encell, L.P., McDougall, M.G., Hartzell, D.D., Karassina, N., Zimprich, C., Wood, M.G., Learish, R., Ohane, R. F., Urh, M., Simpson, D., Mendez, J., Zimmerman, K., Otto, P., Vidugiris, G., Zhu, J., Darzins, A., Klauert, D.H., Bulleit, R.F., Wood, K.V. (2008) *ACS Chem. Biol.*, 3, 373-382.
- 6) Keppler, A., Gendreizig, S., Pick, H., Vogel, H., & Johnsson, K. (2003) *Nat. Biotechnol.*, 21, 86-89.
- 7) Gautier, A., Juillerat, A., Heinis, C., Correa, Jr, I.R., Kindermann, M., Beaufils, F., & Johnsson, K. (2008) *Chem. Biol.*, 15, 128-136.
- 8) Chen, I., Howarth, M., Lin, W., & Ting, A.Y. (2005) *Nat. Methods*, 2, 99-104.
- 9) Lin, C.W. & Ting, A.Y., (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 4542-4543.

- 10) Guignet, E.G., Hovius, R., & Vogel, H. (2004) *Nat. Biotechnol.*, **22**, 440–444.
 - 11) Ojida, A., Honda, K., Shinmi, D., Kiyonaka, S., Mori, Y., & Hamachi, I. (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 10452–10459.
 - 12) Matagne, A., Lammote-Blasseur, J., & Frere, J.M. (1998) *Biochem. J.*, **330**, 581–598.
 - 13) Guillaume, G., Vanhove, M., Lammote-Blasseur, J., Ledent, P., Jamin, M., Joris, B., & Frere, J.M. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 5438–5444.
 - 14) Adachi, H., Ohta, T., & Matsuzawa, H. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 3186–3191.
 - 15) Mizukami, S., Watanabe, S., Hori, Y., & Kikuchi, K. (2009) *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 5016–5017.
 - 16) Louie, A.Y., Hüber, M.M., Ahrens, E.T., Rothbacher, U., Moats, R., Jacobs, R.E., Fraser, S.E., & Meade, T.J. (2000) *Nat. Biotechnol.*, **18**, 321–325.
 - 17) Ahrens, E.T., Flores, R., Xu, H., & Morel, P. (2005) *Nat. Biotechnol.*, **23**, 983–987.
 - 18) Helm, L. (2006) *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **49**, 45–64.
 - 19) Mizukami, S., Takikawa, R., Sugihara, F., Hori, Y., Tochio, H., Wälchli, M., Shirakawa, M., & Kikuchi, K. (2008) *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 794–795.
 - 20) Mizukami, S., Takikawa, R., Sugihara, F., Shirakawa, M., & Kikuchi, K. (2009) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 3641–3643.
-