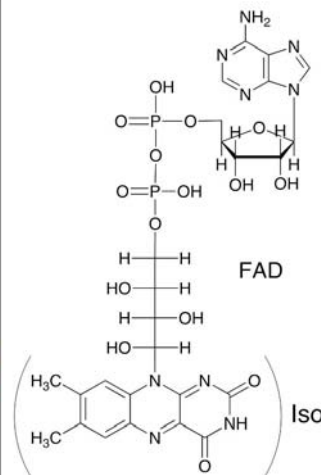
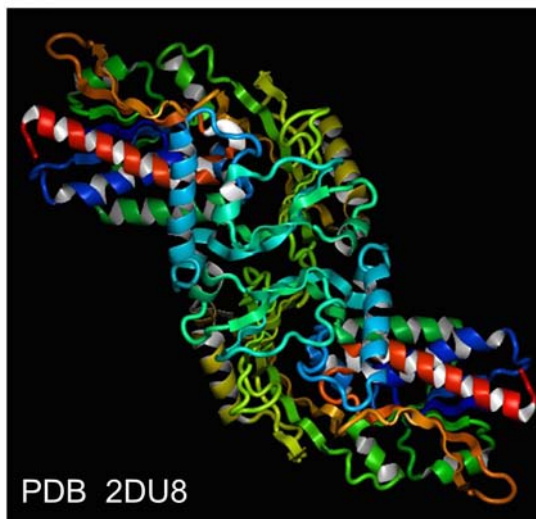


CONTENTS

- レーザー計測による
- D-アミノ酸化酵素の機能阻害効果の研究
- 第27回レーザーレーダー国際会議報告
(27th International Laser Radar Conference)
- 【光と蔭】親孝行の訓
- 主な学会等報告予定



【表紙図】(左)ヒト由来D-アミノ酸化酵素(DAAO)の結晶構造(2量体)、(右)補因子フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)の分子図

レーザー計測による D-アミノ酸化酵素の機能阻害効果の研究

レーザーバイオ化学研究チーム 谷口誠治 ハイク コスロービアン

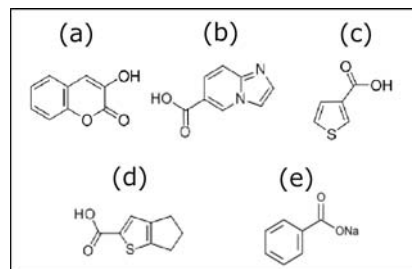
◆はじめに

近年注目を集めている酵素にD-アミノ酸を分解(代謝)する機能を持つD-アミノ酸化酵素(D-amino acid oxidase, DAAO)がある。DAAOはヒトを含む多くの生物中に存在するものの、人体はL-アミノ酸のみで構成されるため、その具体的な役割はよくわかっていなかった。これに対し近年福井グループ(徳島大)は統合失調症患者の脳内D-アミノ酸濃度がDAAOの異常活性により通常よりも低下していることをつきとめ、阻害剤の投与が脳内DAAOの反応活性を抑制し、疾患の治療に有効であると報告した¹⁾。この報告は、さまざまな脳疾患の治療薬開発の足がかりとなるという意味で重要な意義を持つ。我々はこれまで、蛋白質の光過程と機能阻害の関連性や、阻害効果評価法としての分光法の有用性等を明らかにすることを目的に、パルスレーザーを用いた時間分解蛍光計測法により、DAAO中で実際にD-アミノ酸を分解する補因子フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)の蛍光過程の観測を行ってき

た。前回はブタ腎臓由来のDAAO、および阻害剤を添加した条件での光過程をフェムト秒蛍光計測により検討した(Laser Cross No. 319, 2014, Oct.)が、本稿では実際にヒト由来のDAAO(human DAAO、表紙図左)を用い、ピコ秒蛍光計測による検討を行った結果について報告する。

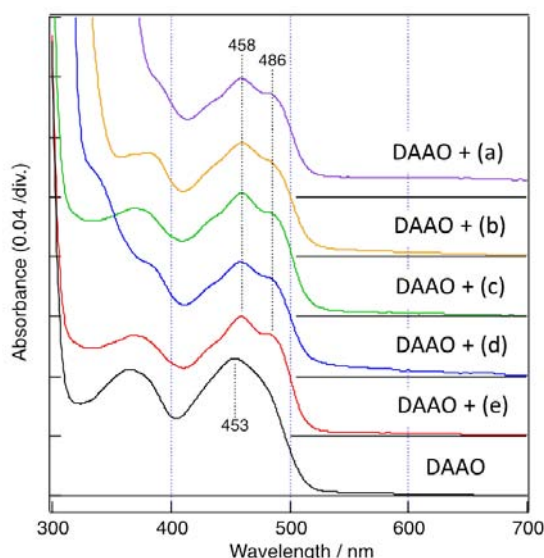
◆human DAAO

観測に用いたhuman DAAOは、遺伝子を大腸菌で発現させるクローニング法を用いて作成されたものであり、精製効率をあげるためヒスチジン(His)タグが付加されている。阻害剤には図1に示す(a)~(e)の5種を用いた。DAAOにおける機能阻害は、蛋白質内の補因子FAD(表紙図右)と阻害分子が結合し



【図1】阻害剤の分子図

次ページへつづく▶



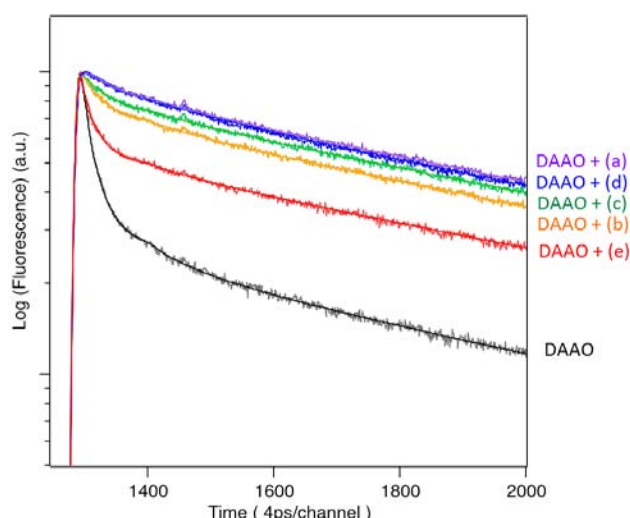
【図2】human DAAOおよび各阻害剤付加時の吸収スペクトル

で錯体化し、D-アミノ酸との反応をブロックすることにより起こると考えられるため、阻害分子は芳香環の大きさや対電子を持つ元素の種類をさまざまに変えてある。ピコ秒時間分解蛍光の観測にはチタンサファイアレーザーを光源に用いた単一光子計数(フォトンカウンティング)法を用いた。励起波長は400nm、時間分解能は約20psである。

◆human DAAOの機能阻害効果の検討

図2に、human DAAO水溶液、および各阻害剤を大過剰(〜2mM)加えた試料の各吸収スペクトルを示す。阻害剤の付加により458、486nmに新たな吸収ピークと500〜700nmにはブロードな吸収帯が生成する。これらはFADと阻害分子間で生成するCT錯体²⁾に由来するもので、DAAOとそれぞれの阻害分子が結合体を生成することがわかる。図3に、human DAAOおよび阻害剤 (a)〜(e)存在下での時間分解蛍光を示す(観測波長520nm)。DAAOのみでは蛍光は主に寿命約50psで減衰するが、その他数100ps、数nsの長寿命減衰もみられる。蛍光減衰の各寿命を求めるため、多成分指数関数による最小二乗法fittingを行った結果、47ps (0.74)、235ps (0.11)、1.17ns (0.04)、4.5ns (0.11) が得られた(() 内は前指数因子の比)。ブタ腎臓由来DAAOのピコ秒蛍光計測結果との比較から、47ps、235psの寿命成分はそれぞれDAAOの2量体、単量体の励起寿命に帰属される²⁾。長寿命の減衰成分(4.5ns)は、試料中に不純物として含まれる、蛋白質構造が解け水溶液中に露出したFADの励起寿命であると考えられる。阻害剤付加試料では2量体、単量体の寿命成分比はともに

低下し、阻害剤(a)、(d)ではこれらの寿命成分は殆ど観測されていない。これはDAAOが阻害分子と錯体を形成し相対的に2量体、単量体の濃度が低下するためである。この挙動は吸収スペクトルの変化とよく一致している。一方生成錯体の蛍光は観測されなかったが、これは錯体の励起寿命が蛍光計測の時間分解能(〜20ps)よりも短い(<1ps)ためである。fittingにより得られた2量体の各寿命成分の存在比(前指数因子)の低下率から阻害剤付加時の錯体生成率を見積もると、阻害剤(a)〜(e)でそれぞれ97、89、91、94、70%となり、阻害分子の種類により効果が異なっていることがわかる。この結果は、時間分解蛍光計測法によりDAAOの錯体生成率が高い精度で得られることを示しており、本手法が阻害薬開発にも有用であるといえる。一方、単量体の錯体生成率は阻害剤(a)〜(e)でそれぞれ77、73、79、75、72%となり2量体に比べ概して低く、また2量体の生成率との相関もあまりみられない。この主な要因のひとつには、2量体と単量体における蛋白構造の違いが挙げられる。2量体と単量体の励起寿命の変化は主にFADと周囲のチロシンまたはトリプトファン間の電子移動速度に依存するが、2量体の方が寿命は短くより高速の電子移動が起こることから、2量体ではFADとアミノ酸残基はより近接した配置を持つと考えられる。これは2量体によりタイトな蛋白構造を持ち、単量体の構造はよりルーズであるともいえる。タイトな構造を持つ2量体では阻害剤との錯体生成率は概して高く、また阻害分子の構造に対する反応性の変化もより顕著なものとなる(反応選択性が高い)。一方単量体の場合には、蛋白構造がルーズであるためアミノ酸残基と阻害分子との水素結合力が安定せず錯体生成率は低下し、反応選



【図3】human DAAOおよび各阻害剤付加時のピコ秒蛍光(観測波長520nm)

択性も低くなるものと推定できる。しかしながらこの結果を明確なものにするためには、水溶液中における2量体と単量体の蛋白構造の変化や錯体の立体構造、安定化エネルギー等についてより具体的に議論する必要がある。今後、分子動力学(MD)による構造計算や、分子軌道計算による反応速度の分析等を進める予定である。

参考文献

- 1) K. Fukui, H. K. Park et al., *Flavins and Flavoproteins*, **2005**, 853-860, 2005.
- 2) F. Tanaka, N. Tamai and I. Yamazaki, *Biochemistry*, **28**, 4259-4262, 1989.

【謝辞】本研究の実施にあたり、科学研究費補助金(基盤研究(C)、課題番号26410029)の支援を得た。実験に用いた酵素(human DAAO)は、北里大学薬学部生体分子解析学教室片根助教により作成されたものである。時間分解蛍光計測には大阪大学大学院基礎工学研究科物質創成専攻宮坂研究室所有のフォトンカウンティング装置を使用し、同研究室伊都准教授の協力を得た。ご協力頂いた方々に感謝致します。

REPORT

第27回レーザーレーダー国際会議報告 (27th International Laser Radar Conference)

レーザープロセス研究チーム 染川智弘

◆ILRCがニューヨーク市立大学シティカレッジで開催される

国際会議(ILRC)がニューヨーク市立大学シティカレッジのShepard Hallで7月5日から10日の6日間にわたり開催された。会場のニューヨーク市立大学シティ

カレッジはマンハッタン島の北側にあり、ハーレム地区の東に位置する。マンハッタン中心部からは地下鉄で15分程度であり、交通の便は非常に良かったが、学会初日の帰りの地下鉄が事故で動かなくなり、違う地下鉄のラインまで歩くことになり、慣れない土地でいっぱい汗

山中千代衛



親孝行の訓

「身体髪膚これを父母にうく。敢えて毀傷せざるは孝の始めなり。身を立てて名を揚げ、もって父母を顕はすは、孝の終りなり。」と孝経を唱っている。

体を大切として長生きするのが孝行の第一歩とされている。これは心掛ければ可能である。身を立て親を顕す程に出世することはなかなかもって難しいことである。

幼い頃から成人するまでずっと面倒を見てくれた親を大切にすることは人道の第一歩である。戦前の教育をうけた筆者でも時流にながされ、仕事にとりつかれ、中々親を大切にすることが出来なかった。母が寝たきりになって一年、それでも国際会議とか仕事で海外に赴き、十分看取れなかった。「孝行をしようと思へど親は亡し」はまこと事実を現している。

ところでわが国の戦後教育はあまりに伝統と歴史を無視したもので、大和民族の誇りと智知をすっかり無くしてしまった。地方振興が声高に叫ばれているが、今までやってきたことは地方の衰退を促す政策ばかりであった。昔の家督制度が新教育で崩壊し、地方に住み着く人がなくなり、旧家は無人、歴代の墓は守り手がなく、お寺も無住寺が増加している。

民主主義を唱えてかつての醇風美俗は影をひそめてしまった。平等と自由は誠に結構なことであるが、各人はそれぞれの責任持分を忘れてしまった。地方が衰退するのは目に見えて明らかである。大和の精神がなくなれば地方は全滅である。中国、韓国、米国とわが国を比べると最も親を大切にしないのが日本国である。どこで日本は自らの存立を保持する国柄を捨ててしまったのだろうか。

全く教育のせいである。教育程人柄をガラッと変えてしまうものはない。

親孝行はその第一歩である。

【名誉所長】

をかけた。

ILRCは2年に1度開催されるライダーの国際会議であり、前回は2012年にギリシャ・ポルトヘリにて開催された。第27回は2年後の2014年にアメリカのモントレールで開催予定であったが、アメリカの政治的な理由から、1年延期されてニューヨーク市立大学シティカレッジでの開催となった。

参加人数は283人であり、日本からは筆者の他、環境研、気象研、情報通信研究機構、千葉大、首都大、信州大、九州大から参加があった。口頭発表は92件であり、ポスター発表は210件であった。

◆海へのライダー応用も新規セッションに

講演はシングルセッションで行われ、セッションは測定対象ごとに区切られ、レーザー装置開発から観測手法までさまざまである。5日には初学者のためのレクチャーも行われた。発表内容としてはアメリカでの開催であったためか、NASAによる衛星搭載型のライダー開発の講演が多かった。

筆者は、海底開発における環境評価手法としてラマンライダーによる海中モニタリング手法への海水が与える影響についてポスター発表を行った。観測可能距離等の質問を国内外の研究者からいただいた。前回のギリシャの国際会議ではOther Lidar Applicationのセッションとして海、樹木のライダー観測の報告が少しあったが、今回の会議ではその名前を冠したMarine and Terrestrial LIDARのセッションが開催されており、今後のライダー開発の新しい応用先として認められたようだ。

◆UVレーザーを用いた遠隔検査

他に興味を引いた発表として、ロシアのBobrovnikov氏からレーザーを用いた空港等でのTNT等の爆発物の遠隔検知手法の報告があった。空港での荷物検査の際にレーザーを人に照射して爆発物を検査するイメージムービーが流されたが、今後、ロシアに入国の際はレーザーを打たれるかもしれないと思わせる発表であった。KrFエキシマレーザーを用いて、NO分子のレーザー

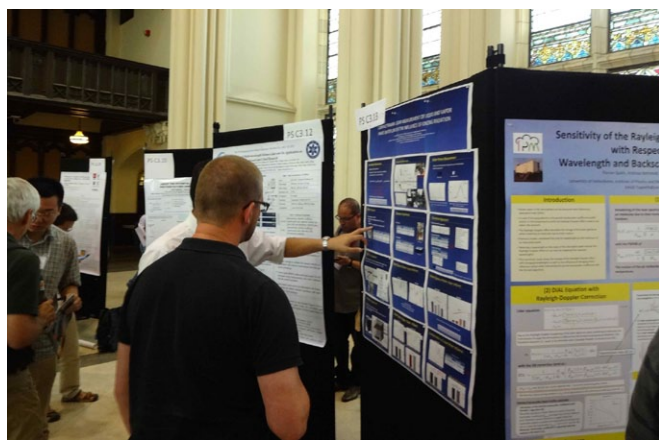
誘起蛍光により5 m先の爆発物のイメージを1 cmの位置分解能で測定していた。また、蛍光では爆発物の種類まで同定できないためか、ポスター発表では新たに同じUVレーザーを使用したラマンライダーによる識別も検討していた。

◆次回の開催予定

今回は、2年ごとのスケジュールに戻って、来年に開催するような話しも聞かれたが、2年後の2017年にルーマニア・ブタペストで開催されるのが濃厚である。



【写真1】口頭発表の様子



【写真2】ポスター発表の様子

主な学会等報告予定

- | | |
|------------------|--|
| 11月9日(月)～11日(水) | 2015 International Workshop on EUV and Soft X-Ray Sources (ダブリン)
砂原 淳 「Radiation hydrodynamic simulation of laser-produced tin plasmas」 |
| 11月15日(日)～20日(金) | 57th Annual Meeting of the APS Division of Plasma Physics (ジョージア州)
砂原 淳 「Hydrodynamic simulation of Irradiation of ultra-intense laser on the inner surface of shell」 |
| 11月18日(水) | 第4回「レーザー微細加工の最新ソリューション」セミナー (横浜情報文化センター)
藤田 雅之「レーザー微細加工の可能性と最近のトレンド」 |
| 12月1日(月)～2日(火) | The 23rd CERE International Symposium (千葉大学)
柴川 智弘「Development of differential absorption lidar using a coherent white light continuum」 |
| 12月9日(火)～10日(水) | 双方向型共同研究(レーザー分野)研究会形式シンポジウム
「レーザー核融合炉心プラズマと炉工の総合的理解」(核融合科学研究所)
古河 裕之「レーザー核融合炉チェンバー内のブルーム同士の衝突に関する評価」 |