# 液滴介在計測法によるバイオ分子相互作用自動解析システムの開発

Automated Analysis System for Biomolecular Interaction Based on Index Matching Fluid-Mediated Fluorometry

杉山 ]	聡*	仁科	潤*2	月 井	健*	田口	信一"
Satoshi Sugiy	ama	Jun Nish	ina	Ken Tsı	ıkii	Shinichi	Taguchi
	木村健	*	高橋	壹*	徐	傑*	
	Kenichi Ki	mura	Toru Takal	hashi		Jie Xu	

概要 ポストゲノムといわれる現在,タンパク質など生体分子の機能解析が重要なテーマとなって おり,生体分子の相互作用を高感度に計測及び分析できる汎用性の高いシステムが求められている。 本研究では新しい計測法である「液滴介在計測法」によって生体分子を自動解析するシステムを開発 した。この計測法の持つ約2倍の高感度計測と乾燥防止効果によって,微量サンプルのリアルタイム 計測を実現した。本システムによる合成ペプチドとタンパク質との相互作用,及び酵母を分子ツール としたアゴニスト計測の評価を行い,高い汎用性のハイスループットな生体分子相互作用解析手法と して有効であることを確認した。

# 1. はじめに

多種生物のゲノム解析が終了している現在,その膨大な情報 を創薬やオーダーメイド医療へと結実させるため,遺伝子産物 であると同時に人体の生命活動を直接に司り,大半の薬剤作用 のターゲットでもあるタンパク質の検出や機能解析が重要な研 究テーマとなっている。タンパク質のアミノ酸配列は遺伝子に 記述されているが,翻訳後にリン酸化,グリコシル化,アセチ ル化,メチル化など,様々な修飾によって多様化するため,遺 伝子情報のみによってその機能までを解明することは不可能で あるからである。

このために例えば,分子量が小さく合成が容易なペプチドの ライプラリを構築し,これをツールとすることで,疾患要因タ ンパク質の検出や分析,また医薬品開発における時間的及び金 額的ネックであるリード化合物のスクリーニングの効率向上を 目指した研究が盛んに行なわれている。

これに伴い, 生体分子の相互作用をハイスループットで高感 度に計測及び分析ができる汎用性の高いシステムが希求されて いる。本研究では, 新しい計測法である「液滴介在計測法」を 提案し, サンプルの取得から反応・計測までの全自動解析シス テム(図1)を開発した。

# 2. 液滴介在計測法の評価

## 2.1 液滴介在計測法の原理

光検出ヘッドによる蛍光計測では、コンタミネーション防止 のため計測ヘッドと計測対象との間にクリアランスを設ける必

\* 生産技術部 第一生産技術開発センター

\*2 研究開発本部 横浜研究所



図1 自動解析システム Automatic analysis system.

要があり,光検出ヘッドの先端と空気との間,及び計測対象と 空気との間に存在する屈折率界面での励起光及び蛍光のフレネ ル反射ロスなどが,蛍光取得効率の低下要因となっている。ま た,計測対象となる生体物質の多くは溶媒中に存在するか,若 しくはそれ自体に水分を含んでいるものであり,乾燥による特 性の喪失も問題となる。

液滴介在計測法は、図2に示すように光検出ヘッドと計測対 象との間を液体(以下,液滴)で満たし,感度低下やドライアッ プの要因となっている空気層の排除を特徴とするものである。 液滴として光検出ヘッドや計測対象に近い屈折率の材質を用い ることで,高感度な計測が可能となる。また計測サンプルとの 親和性の低い液滴を用いるため,検出ヘッドを液滴に接触させ てもコンタミネーションが起こらない。更に液滴が不揮発性で あれば,生体サンプルの蒸発防止効果も期待できる。



Fluid-mediated fluorometry.

#### 2.2 液滴による感度向上の数値検討

液滴介在計測法における感度向上の要因である,(1)フレネ ル反射ロスの低減,及び(2)開口数の増大について,簡易的な 数値検討を行なった。

#### 2.2.1 フレネル反射ロスの低減

屈折率が非連続的に変化する境界に光が入射すると,進行す るパワーの一部が反射する。反射率は屈折率,入射角及び入射 光の偏光状態に依存するが,垂直入射に限定すると偏光方向へ の依存性がなくなり,フレネル係数(パワー反射係数)は式(1) のようになる。

$$r^{2} = \left(\frac{n_{1} - n_{2}}{n_{1} + n_{2}}\right)^{2} \tag{1}$$

ここで、 $n_1$ ,及び $n_2$ は媒質1及び媒質2の屈折率である。rは 入射光に対する反射光の強度比であり、 $r^2$ はパワー比である。 例えば、 $n_1 = 1.515$ 、 $n_2 = 1.000$ の場合、 $r^2 = 0.0419$ となり、コー ティングのない光ファイバにレーザ光を結合させる場合、約 4%の反射損失が避けられない。

マイクロプレートを用いた蛍光計測においてもフレネル反射 ロスは顕著な障害である。励起と受光をガラス製の光ファイバ プローブで行う場合を考えると、励起光は光ファイバと空気と の界面での約4%の反射と、空気と試料との界面での約2%の 反射により、約6%の損失が発生する。これは励起光を受けて 放射されガラスファイバに入射する蛍光についても同様であ り、両者を合計すると感度全体の1割以上が界面反射で失われ ることになる。更に垂直入射以外の成分が含まれる場合、この 損失はより大きなものとなる。液滴介在計測法では中間層を屈 折率の高いオイルで満たすことにより、ヘテロな界面が実効的 に往復の光ファイバと試料との界面のみになるので、合計の反 射ロスを1%以内に抑えることができる。このことは感度に対 するメリットだけでなく、微少な蛍光を測定する際の迷光除去 という点でも有利である。

#### 2.2.2 開口数の増大

次に、液滴による開口数の増大効果について考察する。顕微

鏡において標本と対物レンズの間をオイルで満たす油浸対物レ ンズと同様に、液滴介在計測では、水やグリセリンと比較して 液体では最も高い屈折率を持つオイルを用いることで大きな開 口数を得ることができる。

図3にマイクロプレートを用いた蛍光測定の断面図を示す。 励起された試料から発した蛍光は界面で屈折し光ファイバで受 光される。蛍光は全方位に等方的に発光し,偏光は無視できる ものとする。簡単のため蛍光試料は大きさを有しない点光源で あり,光ファイバの鉛直下方向に位置していると仮定する。媒 質1は試料を含む液体であり,屈折率は水と等しく1.333とす る。媒質2は中間層であり,液滴介在法においては屈折率1.515 (シリコンオイルを想定)とし,従来計測法においては屈折率1 (エアギャップ)であるとする。媒質3は光ファイバコアであり, その屈折率をここでは1.515とおく。



図3 液滴介在計測における NA (開口数) 増大効果 Effect of enlargement of numerical aperture by fluid-mediation.

各媒体の境界面での屈折角 $\theta_1 \sim \theta_3$ はスネルの法則により結 び付けられるので、 $\theta_3$ 及び $R_2$ は次の式(2)及び式(3)のよう に $\theta_1$ を用いて表すことができる。

$$\theta_3(\theta_1) = \sin^{-1}\left(\frac{n_1}{n_3}\sin(\theta_1)\right) \tag{2}$$

$$R_2(\theta_1) = L_1 \tan \theta_1 + L_2 \tan \left( \sin^{-1} \left( \frac{n_1}{n_3} \sin(\theta_1) \right) \right)$$
(3)

ここで、 $n_1 \sim n_3$ は各媒質の屈折率、 $\theta_1$ は媒質1から媒質2 への光線の入射角度、 $\theta_2$ 及び $\theta_3$ はそれぞれ媒質2から媒質3 への光線の入射角度と屈折角度、 $R_1$ 及び $R_2$ は光線が媒質界面 を通過する際の光ファイバコア中心軸からの距離、 $L_1$ は媒質1 内の蛍光源の深さ、そして $L_2$ は媒質1と媒質2の境界面と光 ファイバ(媒質3)とのギャップである。

光線が光ファイバに結合する条件は、光線と光ファイバ端面 との交点がコアの内部にあり、かつ入射角が光ファイバの開口 数*NA* (numerical aperture)以下であることとする。すなわち、 次の式 (4) と式 (5) の両方を満足することである。

$$R_2(\theta_1) \le D_{\text{core}} / 2 \tag{4}$$

$$\sin \theta_3(\theta_1) \le \frac{n_2}{1.000} NA \tag{5}$$

ここで、D<sub>core</sub>は光ファイバコアの直径であり他の記号は上

記と同じである。なお、マイクロプレートのウェルの開口は充 分広く、光線がウェルの縁部で遮られることによる損失は起こ らないものとする。 蛍光感度は条件式(4)及び式(5)を同時に 満たすθ1の最大値を立体角に換算し、蛍光源深さL1に関して 積分した値 $I_1$ <sup>max</sup>に比例する。

図4は、光ファイバと媒質1-媒質2界面とのギャップL2を 変化させたときのI1<sup>max</sup>である。L2が広いほど受光できる立体 角が狭くなるので、グラフは全体的に右下がりの傾向を示す。 プローブとして高NA特殊光ファイバを用いた場合、従来のマ ルチモード光ファイバにくらべ受光可能角度が一桁程度大きい ことが分かる。

液滴による受光感度の増大率を見積もるために、媒質2がオ イルの場合と空気の場合のそれぞれについてI1maxを求め、比 をとった値をFOM (figure of merit:性能指数)として式(6)の ように定義する。

$$FOM = \frac{I_1 \max\_oil}{I_1 \max\_air}$$
(6)

図5はギャップL2に対し特殊ファイバプローブ時のFOMを プロットしたグラフである。L2の変化にあまり依存せず,約1.5 倍の感度メリットを得られることが分かった。



図4 受光感度のギャップ厚さ依存性 Dependence of measurement sensitivity on gap thickness.



性能指数(特殊ファイバ使用時) 図5 Sensitivity figures of merit (using specialty fiber).

以上、簡易的な考察ではあるが、フレネル反射ロスの低減と NA 増大によって、最大約2倍程度の感度向上効果が期待でき ることが分かる。

#### 2.3 液滴介在計測法の実現

2.3.1 サンプル及び液滴の条件

図6のように予め蛍光試薬と液滴を収納させたウェルに、励 起光を出射する光ファイバヘッドを上方より接近させ、これに 伴う蛍光と反射光の検出強度を取得した。蛍光試薬はTAMRA (N, N, N', N'-carboxytetramethylrhodamine) を稀釈して用い た。ウェルは ø 1.4 mm のほぼ円筒形状のものを用い、 蛍光試 薬8 µlの上に屈折率整合性のシリコンオイルを滴下してある。 光ファイバヘッドは蛍光色素の表面に、0.3 mmの位置まで接 近させ、この点での蛍光強度を計測値とした。



Fluorescent solution (8 µl)

図6 液滴介在計測の評価条件 Schematic of conditions for evaluation of fluidmediated fluorometry.

# 2.3.2 蛍光光学系

液滴介在計測に使用した蛍光光学系の概略を図7に示す。

高感度測定に対応するため,励起光として単色レーザ光源を 用い.ダイクロイックミラーとバンドパスフィルタを併用した 分光系とし、検出にはPMT (photomultiplier tube: 光電子増倍 管)を用いた。センシング用光ファイバは高感度計測用にNA の大きなものとし、必要とされる計測空間分解能に適した MFD (mode field diameter:モード・フィールド径) にて設計し. レンズ系はこれに合わせて最適化した。

多色の分光が可能な設計とするうえに,励起光源と光学素子 の交換によって、様々なアプリケーションに応じた蛍光色素の 測定が可能である。



Optical system used in fluid-mediated fluorometry.

また,状態認識によるデータ補正や状態エラーの検出などの ため,後方散乱光の計測に対応している。これによって光ファ イバヘッドの液滴面への接近や接触など,計測状態の認識が可 能となっている。

#### 2.3.3 蛍光と反射の2-ch信号による計測結果

1ウェルの計測結果の例を図8に示す。反射光の要因は主に ①光ファイバ端面,②計測サンプル液面,③プレート表面で励 起光が反射されることに起因するものであり,光ファイバ先端 がウェルに近づくにつれて緩やかに増大するが,液滴に触れる と上記①及び②の要因による反射が大幅に減少するため,検出 強度が低下している。

蛍光信号も光ファイバの接近とともに上昇するが,反射光と は異なり,液面に触れて空気層の介在がなくなると大幅に増加 した。



図8 2-ch信号による液滴介在計測 Fluid-mediated fluorometry monitored 2-channel signals.

#### 2.4 液滴介在計測法による感度向上効果

#### 2.4.1 計測感度の向上

液滴介在計測法による感度向上の効果を直接確認するため, まずは液滴を用いずに計測し,その状態で液滴を供給すること による比較計測を行なった。その結果,計測感度は約2倍に向 上し(図9),前節の数値解析結果と合致した。液滴の介在によっ て,屈折率界面でのフレネル反射ロスの低減と,受光NAの増 加によるものと考えられる。

図10は低濃度水準で行なった計測結果である。0.1 nM程度 の濃度であれば充分に計測可能であった。特に低濃度サンプル の微弱信号の検出には、蛍光の集光効率を向上させるだけでな く、バックグラウンドノイズを低減させることが必須となる。 バックグラウンドノイズの主要因の1つは励起光の界面反射で あるため、液滴介在計測によってこの反射光をそのばらつきご と低減できることが、微弱蛍光を検出するうえで大きなメリッ トとなる。

#### 2.4.2 サンプルのドライアップ防止効果

液滴介在計測法のもう1つの利点であるドライアップ防止効 果について計測評価を実施した(図11)。ウェルサイズは φ1.4 mm, 深さ4 mmの深穴形状としたが,それでも液滴な しの場合はドライアップによる検出蛍光強度の低下が著しい。 これでは分注後の時間経過や計測順序の影響が無視できず,定 量評価が困難である。これに対して不揮発性の液滴を用いた場 合,ドライアップが防止され,微量サンプルでも安定した計測 が可能となり,また測定対象の特性変化を長時間リアルタイム に計測可能であることが分かった。



図10 低濃度蛍光サンプルの計測

Detection of fluorescent signal using low-concentration samples.



図11 液滴介在計測によるドライアップ防止効果 Anti-drying effects by fluid-mediated fluorometry.

#### 3. 自動解析システムと生体分子計測への適用

### 3.1 自動解析システムの開発

自動解析システムのコンセプトに従い,複数サンプルの取得 から分注,混合,リアルタイムの反応計測及び次の計測のため の工程(光ファイバ先端部の洗浄と乾燥,ピペットチップ交換 など)の一連の動作を全自動で行なうことができる自動解析シ ステムを開発した(図12)。



図12 自動解析システム Automated analysis system.

#### 3.2 ペプチドー蛋白質の相互作用評価

3.2.1 背景

タンパク質を簡便かつ高効率に検出し、更に物理化学的・機 能的性質などの解析も可能なシステムは、非常に有用なものと なる。東京工業大学の三原教授グループでは、タンパク質の立 体構造認識特性に着目し、種々の二次又は三次構造を持つペプ チドを設計・合成し、タンパク質の検出と解析を行なうための プロテインチップ及びタンパクリン酸化検出のための新規アッ セイ法の構築を行なっている<sup>1)</sup>。

ペプチドはタンパク質に比べて分子量が小さく, αヘリック ス, βシートやループ構造など, 多様な二次的あるいは三次的 な分子立体構造の設計と合成が可能であり, 蛍光修飾ペプチド アレイによるプロテインフィンガプリント (PFP) 法によって, 多くのタンパク質のキャラクタライズが可能である。この方法 では特定タンパク質の検出以外にも, タンパク質の結合特性の 解析やタンパク質の機能を制御できるペプチドリガンドの探索 などのタンパク質の機能解析が期待できる。実際に三原教授グ ループでは, 図13のようなカルモジュリン (CaM) – カルシ ニューリン (Cn) 系をモデルとして, CaMと結合することによ り Cnの脱リン酸酵素活性を制御できるペプチドリガンドを探 索する系などを構築している<sup>2</sup>。

次節では,溶液状態で安定的に高感度計測が可能である液滴 介在計測法の利点を生かし,三原教授グループと共同で実施し たタンパク質機能解析への適用性評価について記述する。

#### 3.2.2 ペプチドー蛋白質の相互作用評価

#### 3.2.2 (1) CaM - L8K6の結合性計測

まずは液滴介在計測法によってタンパク質とペプチドとの結 合計測を行うことの妥当性評価のため、既に結合性が分かって いるCaMとL8K6ペプチド、及び結合性の低いL8K2E4ペプチ ドの結合評価を行った。

2 μMのペプチドと濃度水準を振ったCaM溶液とを4 μlづつ を混合・分注し,液滴介在計測法により蛍光強度を計測した。

ウェルはサンプル収容部の上に液適用の開口部を有する図14



図13 カルモジュリン (CaM) とカルシニューリン (Cn) による 免疫情報伝達系 Immune signaling system using calmodulin and calcineurin.

の形状とした。今回は1ウェルごとの測定としたため,1ウェ ル/1sで計測したが,光ファイバヘッドをスキャンさせるこ とで,50ウェル/sでの計測が可能である。

図15に計測結果を示す。CaMとの結合性の低いL8K2E4ペ プチドでは蛍光強度の増加はほとんど見られないが、L8K6ペ プチドではCaM濃度の上昇に伴う蛍光強度の増加が認められ る。CaM濃度が高い条件ではピペットチップへの吸着による 分注量ばらつきに起因した測定ばらつきが発生しているが、飽 和までの曲線はCaMとL8K6ペプチドとの結合定数 $K_a = 6.8 \times 10^6 M^{-1}$ でフィッティングでき、タンパク質とペプチドの結合 性を評価できることが確認された。



図14 ペプチド-タンパク質計測用ウェル形状 Schematic structure of the well for peptide-protein measurement.



3.2.2 (2) 複数のペプチドとタンパク質とのマトリクス評価

次に、ペプチドライプラリによるタンパク質解析への適用性 を評価するため、複数のペプチドとタンパク質によるマトリク ス評価を実施した。表1に示すように合成ペプチド4種類に対 してタンパク質4種及び緩衝液の合計5水準とし、結合による 蛍光強度の増加分を相対評価した。濃度はタンパク質3 µM, ペプチド1 µMとし、ウェルや容量の条件は前節同様の条件と した。

図16にその結果を示す。L8K6ペプチドについてはCaMと の結合が最も強く、α-アミラーゼ、プロテインキナーゼAと も結合するが、インスリンとは結合しておらず、結合性の大き さを蛍光強度で評価可能であることを示唆する結果となった。 またL8K2E4ペプチドに関しては、今回のタンパク質水準に限 定するとα-アミラーゼのみに結合すると言えることから、特 異的結合を検出可能である示唆された。このことから、多種類 の合成ペプチドを用いて、その中から特定タンパク質に対する リガンドをスクリーニングすること、また合成ペプチドによる プロテインチップによってタンパク質を検出することが可能で あることが確認された。

表1	ペプチド-タンパク質の計測マトリクス
	Measurement matrix elements for evaluation of
	peptide-protein interactions.

		Synthetic peptide (1 $\mu$ M)					
		TAMRA- L8K6	TAMRA- L8K2E4	TAMRA- L6A2K4E2	TAMRA- A8K2E2		
	Calmodulin (CaM)	0	0	0	0		
Protoin	Alpha amylase ( <i>a</i> -ami)	0	0	0	0		
(3 mol/l)	Protein kinaseA (PKA)	0	0	0	0		
	Insulin (Ins)	0	0	0	0		
	Buffer	0	0	0	0		



図16 ペプチド-タンパク質相互作用のマトリックス計測結果 Results of matrix measurement of peptide-protein interactions.

# 3.3 酵母を用いたリガンドスクリニングシステムの開発と評価3.3.1 背景

酵母のα型細胞の細胞膜上には、α型細胞が分泌する接合因 子であるα-factorが結合するSte2pというGタンパク質共役型 受容体 (GPCR) が存在する。本開発の共同研究先である神戸大 学の近藤教授グループでは、真核細胞において基本構造が保有 されて存在するGPCRを創薬の分子ターゲットとして、酵母α 型細胞のシグナル伝達を利用したリガンドスクリーニングシス テムを開発している。

遺伝子操作によって、酵母細胞膜にターゲット受容体を発現 させ、更に細胞表層にペプチドリガンドを提示させる。ペプチ ドリガンドについてはライブラリ遺伝子を導入することによっ て、各酵母で異なる多種のリガンドを提示させることができる。 その中で、同じ細胞上に発現している受容体にアゴニストとし て作用するペプチドが結合すると、細胞内へのシグナル伝達が 誘起される。この伝達経路の最終段で転写活性が誘導される FUS1プロモータの制御下において、蛍光タンパク質などのレ ポータ遺伝子を発現するよう酵母遺伝子を更に改変しておくこ とによって陽性アゴニストをスクリーニングすることができる (図17)。つまり陽性リガンドを発現した酵母は蛍光を発する ので、検出や単離が可能であり、大規模スクリーニングの非常 に有力な手法として注目されている。

近藤教授グループでは、このスクリーニングに最適な細胞シ ステムの開発を行なっており、特に受容体としてヒトレセプタ を用いることのできるシステムを構築することによって、ハイ スループットな創薬スクリーニングへの適用を目指している。

次節では,神戸大学と共同で実施した液滴介在計測法による アゴニスト検出用酵母の計測について記述する。



図17 HIS3を利用したスクリーニングシステム Screening system using HIS3.

#### 3.3.2 ペプチド表層提示細胞による蛍光検出評価

計測対象である酵母細胞は媒質の中で離散的に存在し、また 底部に沈下するため、図18に示すようにすり鉢形状のウェル に酵母けん濁液を0.5 µl分注し、そのうえから液滴(屈折率整 合性シリコンオイル)を約10 µl滴下したうえで、光ファイバ ヘッドを2次元的にスキャンさせる計測方法とし、得られた2 次元データの解析によって細胞部分の蛍光値を読み取った。 酵母宿主には、Saccharomyces cerevisiae BY4741 [MATa his3A1 leu2A0 met15A0 ura3A0]の変異体 [MATa his3A1 leu2A0 met15A0 ura3A0 bar1A::LEU2 far1A::kanMX4 sst2A::AUR1-C P<sub>fus1</sub>-FUS1-EGFP-HIS3](以下, IMGH-8と記載)を用いた。これは下 記の操作によって、スクリーニングに利用するシグナル伝達を 阻害するタンパク質や, 目的以外のシグナル伝達に関与するタ ンパク質を欠損させることによってスクリーニング感度を向上 させたものである。

- α-factorを分解するプロテアーゼ(Barlp)の遺伝子を破壊。
- α-factorの結合した受容体に共役しているヘテロ三量体G タンパク質の解離反応を抑制することでシグナル伝達を妨 げるタンパク質 (Sst2p)の遺伝子を破壊。
- シグナル伝達の最終段でFuslpの発現とともにリン酸化されて細胞周期を抑制するタンパク質(Farlp)の遺伝子を破壊。

レポーター高発現用プラスミドとしてFUS1プロモーター制 御下においてFusl-EGFPを発現するマルチコピー型プラスミ ドpMHRS-pFUS1を使用した。また、ペプチド表層提示用プ ラスミドとしてはGAL1プロモーター制御下においてα-factor を表層提示するpUESCα-FLO42を、コントロールプラスミド としてα-factorを生産しないpESC-URAを使用した。





それぞれのプラスミドを上述の宿主細胞に形質転換し、 IMGH-8/pESC-URA, IMGH-8/pUESC $\alpha$ -FLO42を得た。これら をそれぞれSD-Ura培地で種培養し、SG-Ura培地で15h本培養 を行った。その後OD<sub>600</sub> = 10となるよう細胞を調整し、更に それぞれを段階希釈して測定を行った。

図19にIMGH-8/pESC-URA及びIMGH-8/pUESCα-FLO42 の測定結果を示す。約103個以上の細胞数で明確な差異が認め られた。このことからリガンド結合における細胞表層提示が非 常に有用であること、及び本計測システムによってによる EGFPの蛍光が検出可能であることが確認された。



図19 ペプチド表層提示型 IMGH-8の蛍光検出評価 Evaluation of IMGH-8 with peptides presented on the surface by detection of fluorescence.

# 4. おわりに

タンパク質やペプチドをメインターゲットとして、微量な生 体分子の相互作用計測のための新しい蛍光計測法である「液滴 介在計測法」の開発を行なった。蛍光色素による基礎評価によっ て約2倍の高感度化と、ドライアップ防止を実現し、微量な蛍 光サンプルを溶液系のままリアルタイムで計測することが可能 となった。またこの計測を行なう汎用性の高い自動解析システ ムの開発を行ない、生体コンテンツによる評価によってその有 効性を確認した。

#### 5. 謝辞

本研究は、平成16年度及び平成17年度の関東経済産業局の 助成事業の一部として実施したものである。また、共同研究先 である東京工業大学大学院生命理工学研究科の三原久和教授と 神戸大学工学部応用化学科近藤昭彦教授より、多くのご指導と ご協力を頂いた。この場を借りて御礼申し上げる。

#### 参考文献

- (a) Takahashi, M., Nokihara, K., and Mihara, H.: Chem. Biol. 10 (2003), 53. (b) Usui, K. Takahashi, M. Nokihara, K. and Mihara, H.: Molecular Diversity 8 (2004), 209. (c) Usui, K., Ojima, T., Takahashi, M., Nokihara, K., and Mihara, H.: Biopolymers 76 (2004), 129. (d) Usui, K., Ojima, T. Tomizaki, K.-Y., and Mihara, H.: NanoBiotechnology 1 (2005), 191. (e) Tomizaki, K.-Y., Xu, Jie., and Mihara, H.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 15 (2005), 1731. (f) Tomizaki, K.-Y., and Mihara, H.: J. Mater. Chem. 15 (2005), 2732. (g) Watanabe, S, Usui, K, Tomizaki, K.-Y. Kajikawa, K., and Mihara, H.: Mol. BioSyst. 1 (2005), 363. (h) Sano, S. Tomizaki, K.-Y. Usui, K., and Mihara, H.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 16 (2006), 503.
- 2) Usui, K., Tomizaki, K.-Y., and Mihara, H.: manuscript in preparation.