

DOJIN NEWS

ドージンニュース

No.088/1998

Review

内分泌かくらん化学物質の生態影響を計る 有菌幸司

Topics on Chemistry

ペプチドプローブを用いた蛋白リン酸化酵素類の可視化 大瀬戸文夫

連載 ▶ 試料の前処理11

大倉洋甫



目次

Review

内分泌かくらん化学物質の生態影響を計る

長崎大学環境科学部 有園幸司.....	3
試料の前処理 ¹¹ 大倉洋甫.....	7

Topics on Chemistry

ペプチドプローブを用いた蛋白リン酸化酵素類の可視化

(株)同仁化学研究所 大瀬戸文夫.....	10
-----------------------	----

Commercial

新製品案内

PKA用蛍光ペプチドプローブ.....	12
水溶性カリックスアレーン.....	12
ビリルビン酸化代謝物(Biopyrrin)研究関連試薬.....	13

お知らせ

9thフォーラム・イン・ドージン	16
------------------------	----

新製品案内

1. **新製品** PKA用蛍光ペプチドプローブ

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	AR II	500 μ g	29,000
Request	DR II	500 μ g	29,000

2. **新製品** 水溶性カリックスアレーン

コード番号	品名	容量	価格(¥)
348-07813	Calix[6]arene <i>p</i> -sulfonic acid hexasodium salt	500mg	12,000
342-07811	Calix[6]arene <i>p</i> -sulfonic acid hexasodium salt	1g	19,000
345-07823	Calix[8]arene <i>p</i> -sulfonic acid octasodium salt	500mg	12,000
349-07821	Calix[8]arene <i>p</i> -sulfonic acid octasodium salt	1g	19,000

3. **新製品** ビリルビン酸化代謝物 (Biopyrrin) 研究関連試薬

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	Anti-Bilirubin Antibody (24G7) 200 μ g/200 μ l (PBS/vial)		50,000
Request	Anti-Bilirubin Antibody (24G7) 1mg/ml (PBS/vial)		200,000
Request	Biopyrrin EIA Kit	96well測定用	100,000

4. **近日発売** 環境ホルモン研究関連試薬

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	コイビテロジェニンモノクローナル抗体	100 μ g	40,000
Request	マダイビテロジェニンモノクローナル抗体	100 μ g	40,000
Request	メダカビテロジェニンモノクローナル抗体	100 μ g	40,000
Request	マミチヨグビテロジェニンモノクローナル抗体	100 μ g	40,000
Request	コイビテロジェニンELISAキット	1キット(96穴)	90,000



平成7年10月、257年ぶりに爆発。噴煙を上げる九重山系・硫黄山（遠くに阿蘇根子岳が見える。）
（弊社 河野雅昭 撮影）

内分泌かくらん化学物質の生態影響を計る ーバイオマーカーとしてのビテロジェニンー



有 園 幸 司

(Koji ARIZONO)

長崎大学 環境科学部 環境設計講座

Summary

Vitellogenin (VTG), the serum phospholipoglycoprotein precursor to egg yolk, is potentially an ideal biomarker for environmental estrogens. Effluent from sewage-treatment works entering rivers contains an estrogenic chemical, or mixture of chemicals, that stimulates VTG synthesis in male fish. The chemicals responsible for this feminizing effect have not yet been identified. However, many chemicals known to be estrogenic to fish. We tried to establish bioassays such as HPLC and enzyme-linked immunosorbent assay for detect estrogen exposure in fish. First of all, we developed the purification method of VTG from fishes (mum-michog red sea bream and carp) plasma with HPLC using anion exchange column. Secondly, monoclonal antibodies were generated against purified red sea bream and carp. VTG results of enzyme-linked immunosorbent assay and western blotting indicated that these monoclonal antibodies specifically recognize each purified VTG and plasma from red sea bream and carp, respectively. It is also enable to recognizing ecological effects by endocrine disrupting chemicals with HPLC VTG assay.

キーワード：ビテロジェニン、ELISA、モノクローナル抗体、内分泌かくらん化学物質、HPLC

1. はじめに

最近、内分泌かくらん化学物質（環境ホルモン）に関する話題がマスコミを賑わしている。内分泌かくらん化学物質とは水や大気など自然環境中に何らかのルートで放出され、野生生物や魚などの体内にとりこまれるとあたかもホルモン（特に女性ホルモン）が作用しているように影響をあたえる（メスのホルモン類似作用を持つ）化学物質、わかりやすい表現をすると、生物の生殖能力、健康に悪影響を及ぼす化学物質群のことである。現在、農薬や界面活性剤、プラスチック製品等多くの工業製品に含まれる約70種以上の化学物質に弱いながらもその性質が確認されている¹⁾。内分泌かくらん作用は、性の分化・成熟に対して長期間継続する影響を示し、その影響にははっきり見えるものとそうでないものとある。はっきり見えるようになるまで長期間かかることを熟知しなければならない。

化学物質によっておこる生物の異常を知ろうとすると、バイオマーカーと呼ばれる生体内反応であらわす試みが一般的になりつつある。環境中に存在する多くの化学物質に起因する内分泌かくらん作用を検定するためのスクリーニングに利用される水生生物として魚がよく用いられている^{1,2,3,4)}。一般にスクリーニングや試験に用いられているのはニジマス、金魚、コイ、ナマズ、メダカ、ゼブラフィッシュなどの魚種である。これらの魚種は世界中に広く分布することからフィールド調査にも利用でき、実験室内でモデル実験を行うことも可能である³⁾。ここで示した魚種は主に淡水魚であるが、特異的なケースを採用するためにも海産の魚種も必要と考えられ、日本ではマダイなどがその生殖生理学や養殖環境に関してよく調査されており利用可能と考えられる。さらに生殖や内分泌についてよく知られフィールド調査で利用可能な魚種としてヒラメ、ボラ、ハゼなどがあり、マミチヨグなども実験室内でのモデル実験系への応用が考えられる。レッドデータブックなどで、その存続が危ぶまれている野生生物種としてリストアップされている魚類も、フィールド調査において内分泌かくらん化学物質との関係を精査すべき生物種である。

この内分泌かくらん作用の影響（特に女性ホルモン様作用）を、魚類血中のビテロジェニン等魚類の血中タンパク成分への影響から精査しようとする試みがある⁴⁾。女性ホルモン様の作用物質に曝露された雄魚の血中に、成熟期の雌にしか存在しないタンパクビテロジェニンが検出されるようになる。即ち、雄魚の血中のビテロジェニンを調査することで、水環境中に女性ホルモン様物質が存在するかどうか明らかになる。本稿では一般的な魚を用いた実験室内での曝露実験及び内分泌かくらん化学物質に関するフィールド調査への魚種の応用例などについて概説し、我々が作成した特異抗体及びHPLCを用いた魚類血中のビテロジェニンを簡便に測定する方法^{5,6)}を紹介する。

2. ビテロジェニン

ビテロジェニンは、卵黄に含まれるリンタンパク質の前駆体でエストロジェンの刺激により鳥類、両生類など卵生動物や魚類の肝臓中で生合成され、血中に分泌される雌特異的タンパク質である⁴⁾。ビテロジェニンは、血中で分子量380~500KDaの2量体として存在し、リン酸の他に、糖、脂肪、カルシウムを含むタンパク質で、成熟中の卵に取り込まれ、卵内で成長する胚にとって栄養源となっている（図1）。これまで魚類の生殖生理機構を解明することを目的に、ビテロジェニン遺伝子の発現機構、卵成長及び生殖周期に伴うビテロジェニン量の変化などに関する研究が行われ、実用面でも早期雌雄判別法の指標タンパク、卵黄形成のモニタリングなどの分野で利用されてきていた。正常の雄にはほとんど検出されず、大量のエストロジェン処理によって雄血中にビテロジェニンが検出されることや、魚肝の培養細胞系でもエストロジェン処理で誘導される事実から、魚類の血中ビテロジェニンを調査することで水環境中に存在する内分泌かくらん化学物質の存在をスクリーニングしようと試みられている。尚、魚類特有の雄性ホルモンとして11-ケトテストステロンが精子形成期に高い値を示すことが知られている。

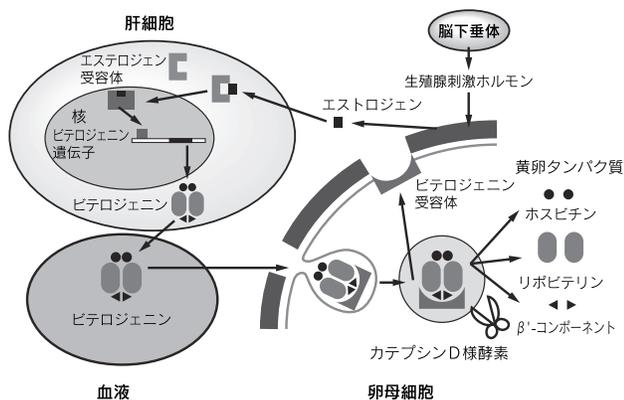


図1 サケ科魚類の卵黄形成モデル

卵濾胞細胞で合成されたエストロジェンが肝臓に作用しビテロジェニンを合成、その後卵に取り込まれ卵黄タンパクとして蓄積される⁴⁾。

3. 実験室内での内分泌かくらん作用のスクリーニング実験

小動物種で行われる急性毒性試験に使用される試験溶液濃度の1/2から1/10の用量が、一般的に用いられる魚を対象とする化学物質の毒性試験(亜急性毒性試験)に用いられている。しかし、内分泌かくらん作用を評価しようとした場合、その用量はあまりにも濃過ぎるため用いることはできない。試験に用いられる試験溶液の濃度は、成熟魚では対象組織の分化が既に終了しており、生理反応に対して未成熟魚に比べてそれほど感受性が高くない点、試験(曝露)期間が相対的に短いことを考慮すると若干高濃度に設定すべきであろう。また、絶食状態での実験は生殖腺の重さなどのパラメーターを変動させる事も考慮すべきである。成熟あるいは成熟に近い魚を用い、対照群と差が見られるように7~14日間の曝露実験が一般に用いられている。内分泌かくらん化学物質の影響を調査するために、7~14日間化学物質を曝露後、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンで処理し血清中の性ステロイドホルモン量を調査する方法など多くの短期間での魚への曝露実験(*in vivo* 試験)法や魚の生殖腺を*in vitro*で化学物質に曝露し、その組織から分泌されるホルモン量を調査する方法なども提案されている⁷⁾。成熟した魚と稚魚や十分成熟していない魚・卵(特に性の分化途中の)が内分泌かくらん効果に対して同様の感受性を持っているかどうか不明である。そのため、環境化学物質の毒性やリスクアセスメントの項目に内分泌かくらんに関する試験法を導入しようとする際、成熟した魚と性の分化・発生の十分進んでいない時期の魚・卵を併用して内分泌かくらん化学物質の効果を調査することが必要となる。この際、曝露期間(2~4週間)に注意を払わなければならないだろう。生殖能を評価しようとする場合、メダカやゼブラフィッシュのような比較的小さい魚を用い、性的に成熟した雌雄魚を1ペアか数匹をグループとして2~4週

間飼育する方法が用いられる。また試験物質は環境中に存在する(している可能性)用量を用いる。パラメーターとしては性行動、魚の表皮の色の变化、卵の孵化までの時間、産卵数、卵子及び精子の数、性ステロイドホルモン量及びビテロジェニン誘導能が考えられる。性分化・発生の時期の魚を用いた実験系では成熟後の生殖腺機能などを指標として、魚の性分化・発生が不十分な時期(胚の時期や孵化時)に曝露実験を行う。この時期の化学物質の曝露によって後日的に引き起こされる生殖腺形成の異常は不可逆的である。一方成熟した魚で化学物質の曝露によって引き起こされる生殖腺機能障害は多くの場合可逆的に正常化すると考えられている。性分化・発生の時期(胚の時期や孵化時)の曝露による成熟魚となってからの各パラメーターとしては生殖能、成熟してからの性比、性ステロイドホルモン及びビテロジェニン誘導能、卵の孵化までの時間、産卵数、卵巣及び精巣の組織像などが挙げられる。これらの実験には、研究室によって餌や水温などが異なるため、標準飼育条件を作成する必要があるだろう。また慢性及び後世代実験系の標準化も必要となつてこよう。

4. フィールド調査の具体例

欧米では多くの河川で主にニジマスなどの未熟及び成熟雄の魚を3週間以上ケージに入れて調査する試みが行われている。イギリスでは、1980年代に天然のエストロジェンやエチニールエストラジオール(経口避妊薬)が原因と考えられる雌雄同体の魚(ローチ)が見つかり、1986年から4年間に亘り、下水処理施設の下流に雄のニジマス20匹を入れたケージを置く調査を行った。1~3週間下水処理施設からの放流水にさらされた魚の血中のビテロジェニン量をラジオイムノアッセイで測定した結果、污水处理場からエストロジェン作用を持つ化学物質が放出されていることが示された⁸⁾。さらに、92年の夏と冬にロンドン北部のLea川の処理下水放流点から下流の異なる距離に雄のニジマスを入れたケージを設置した。3週間の曝露後、15km下流点までの魚は血中ビテロジェニン濃度の増大が認められ、92年11月のHarpenden下水処理場での再検査でも、排出口下流の2点で血中のビテロジェニン量の変化が認められている。また、93年夏に東南イングランドの15の原水貯水池のニジマスについても試験を行っている⁹⁾。多くの下水処理場が排水を川に放出するにつれ下流のある部分で内分泌かくらん作用が起こることが明らかになったため、94年夏にはイギリスの5河川(Great Stour川、Arun川、Chelmer川、Stour川、Aire川)への個々の排水放出について、排水流入口から下流に向かって雄ニジマスを入れたケージを設置し、ビテロジェニン合成能誘導が検討された。その結果、4つの河川では排出口または河川への流込み口の近くでニジマスの血中に非常に顕著で急速なビテロジェニン濃度上昇をみとめている。このうち、Great Stour川、Chelmer川では排出口のみビテロジェニン濃度上昇が見られ、両河川の下流域では見られなかった。またArun川では1.5km下流でも明らかなビテロジェニン合成が見られたという。一方、Aire川の状況は他の河川と全く異なっており、排水口近くで極端にビテロジェニン濃度が高いだけでなく下流5kmまでの全測定地点で血

中ピテロジェニン合成が見られている。この原因としてこの川には古い羊毛洗浄工場の排水が流込んでいると推察されている¹⁰⁾。事実、他の排水に比べてノニルフェノールエトキシレートの分解産物(ノニルフェノール)が多く検出され、血中ピテロジェニン濃度が高だけでなく、精巢の小さい魚の存在も報告された。米国ミネソタ州でも都市河川の5ヶ所で雄コイ血清中のピテロジェニンおよびテストステロン濃度を調べている。セントポール市の下水処理施設下流で捕獲したコイで、対照に比してピテロジェニンの上昇およびテストステロンの低減が報告され¹¹⁾、この河川においてもエストロゲン作用を有する化学物質が流入していることが示唆された。America Geological Survey は1994年の8月から12月にかけて全米25か所の河川の成熟コイ(雄雌各10 - 15匹、全647匹)を用いたエストラジオール - 17、11 - ケトテストステロン、ピテロジェニン および生殖臓器組織像と各場所における化学物質濃度について調査している¹²⁾。雌雄ともにステロイドホルモン量は調査地点で100倍近くの変動があり、単純に各地域を比較できないことや、エストラジオール - 17 と11 - ケトテストステロンの比(E2/11 - KT)がよい指標となる可能性が示唆された。

フロリダのパルプ工場の4マイル下流では、カダヤシの雌が雄化した例が報告され、漂白クラフト紙工場の近くでは、ホワイトサッカーのステロイドホルモン量が正常より低く雌雄ともに生殖腺の成熟が遅れていることも報告されている¹³⁾。日本でも多摩川(コイ)や関東近海(マコガレイ)の調査が行われているが⁴⁾、我々もマダイやコイピテロジェニンに対する特異抗体を用いて水環境中の内分泌かくらん作用を調査している¹⁴⁾。

5. 研究室レベルの調査の例

ノニルフェノール10ppbの入った水でニジマスを飼育すると、24時間目から肝臓中のピテロジェニンmRNAの誘導が認められ72時間で最高に達し、対照水へ返すとこの誘導が急激に減少することが報告されている¹⁵⁾。有機塩素化合物のクロルデンを飼料に混ぜニジマス幼魚に33週間慢性曝露させる実験においては、肝臓中のクロルデン濃度の増加とともに血中のピテロジェニンが増加した事実から、クロルデンはニジマス幼魚に対し、弱いエストロゲン作用を持つと結論されている¹⁶⁾。さらに、海産メダカマミチヨグの卵をエストロジェンの入った水で発生させると、正常な精巢をもつ個体はなく、全て卵巣あるいは未発達の生殖腺をもつ個体となったとの報告がある。この時、同時に骨形成(特に頭部)に異常があったこと、エストロジェンを雌に投与しても、卵にエストロゲンが入り、発生した魚の骨形成異常が認められたことが報告されている¹⁷⁾。メダカを孵化から3ヶ月間、下水場からの排水に含まれる量よりやや高い濃度である50あるいは100ppb中のノニルフェノールを含む水槽で飼育すると雄の50%及び86%で精巢と卵巣の両方もつ個体が出現したという¹⁸⁾。

6. 魚の細胞を使った *in vitro* 実験系

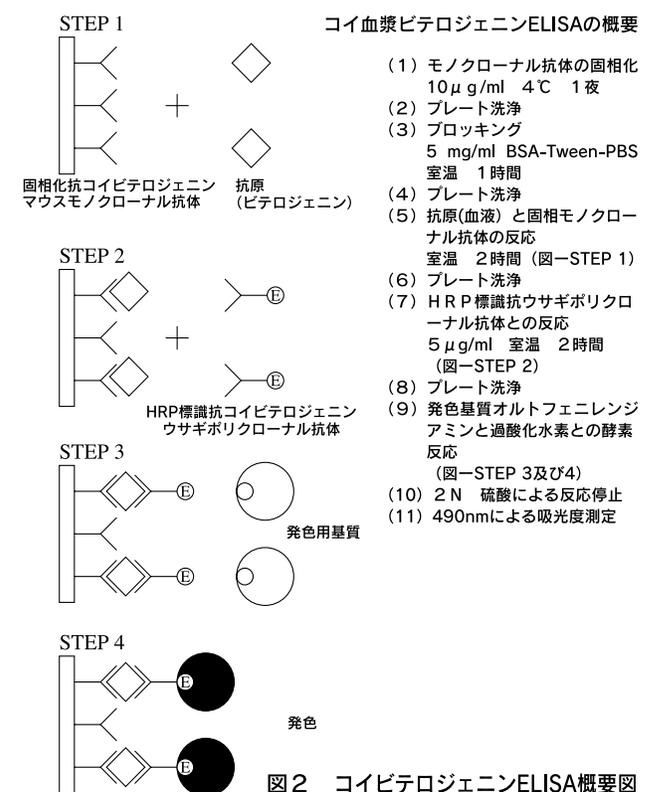
ニジマスの肝臓細胞を単層培養で8日間、あるいは集合塊として30日間、エストロゲン1μMで培養すると、ピテロジェニン

mRNA及びエストロジェンレセプターmRNA発現が増加し、ニジマス肝臓細胞の初代培養細胞のピテロジェニンmRNA及びエストロジェンレセプターmRNAは、クロルデンコン及びノニルフェノールで0.1~1.0μMでPCBs及びリンデンでは0.1μMで誘導されるという¹⁹⁾。これはエストラジオールと比較すると500~5000倍の量である。これらの誘導はエストロゲンによって阻害されたことから、これらの化学物質による効果はエストロジェンレセプターを介して作用したと考えられた。また、雄のニジマスの培養肝臓細胞に対して5~10μMのノニルフェノール、オクチルフェノール、op-DDT、アロクロール、ビスフェノールAは単独でピテロジェニン産生を誘導し、これら5種類を同時に1μMの濃度で添加すると単独の反応よりはるかに大きな反応を示した²⁰⁾。

7. 特異抗体を用いた血中ピテロジェニン測定法⁶⁾

内分泌かくらん化学物質の魚血中ピテロジェニンへの影響を調べるため、抗体を用いたバイオアッセイが有効と考えられる。各魚種に特異的な抗体を用いたピテロジェニンの測定系として免疫拡散法(検出感度20μg/ml程度)、ラジオイムノアッセイ(検出感度2.5~500ng/ml程度)及び酵素免疫測定法(検出感度1~5000ng/ml程度)が知られている。我々はコイリポピテリンを抗原として作成したコイピテロジェニンモノクローナル抗体を利用した酵素免疫測定法(ELISA)を考案した。その概念を図2に示した。尚、検出限界は10ng/ml程度である。

ピテロジェニンはプロテアーゼ感受性が強く分解されやすいことから、HPLCを用いた迅速分析⁵⁾も有用と考えられる。



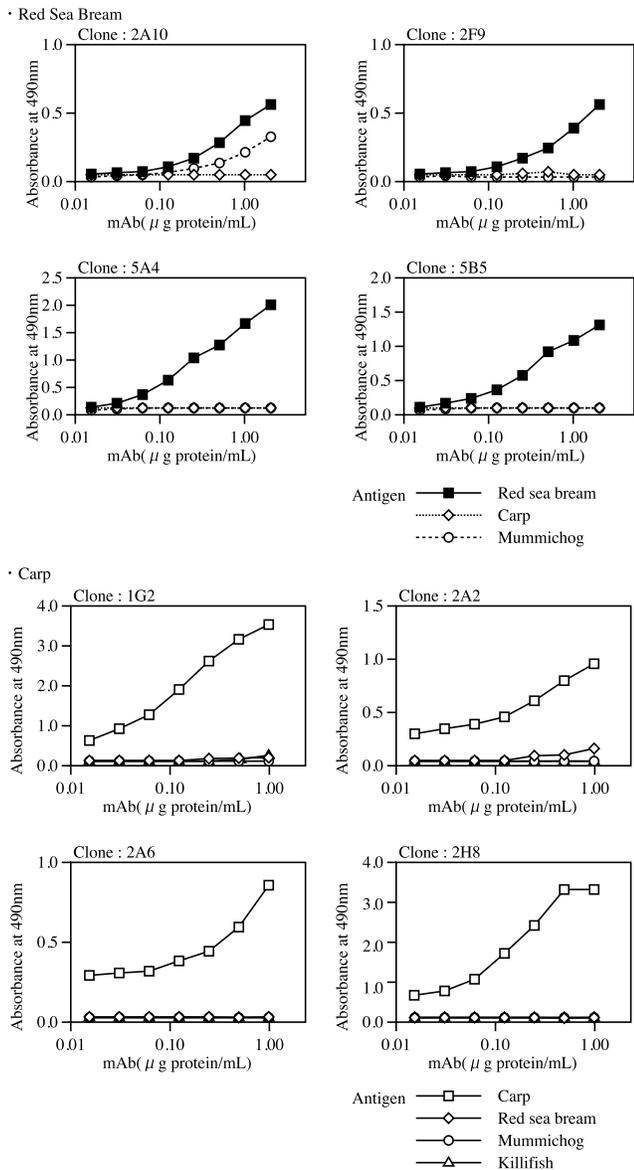


図3 マダイ及びコイピテロジェニン・マウスモノクローナル抗体の特性

終わりに

我々は、日常生活に於いて多くの化合物を食べ、飲み、呼吸し、皮膚からも吸収していることになる。内分泌かくらん化学物質（環境ホルモン）問題は、一部発ガン性との関与を指摘される化合物もあるが、一般に体内に摂取されてもヒトの生死にすぐ結びつく毒性の問題ではない。影響を及ぼす用量という観点では、毒性から考えての安全基準（環境基準）の100万分の1等の極微量での作用が心配されている。内分泌かくらん作用の全体像はまだほとんどわかっていないのが現状である。ホルモン作用は体内の正常なホルモンは必要なときに必要なだけ働き一次的なものであるが、胎児期に作用する内分泌かくらんは一過性のものでなく一

生を通じて遺伝子機能をプログラムしてしまう訳である。また、一部の内分泌かくらん様作用物質は、体内の脂肪に長く蓄積し何年も作用し続け、生殖能力、健康に悪影響を及ぼすことも心配される。そのため、胎児や幼い子供たちへの内分泌かくらん作用として、大人になってからの健康への影響、特に生殖異常が心配されている。数十年間に急増した化学物質に対する生体内の環境の適応には数百年以上必要と考えられ、ヒトを含めた生物種の健康を世代をこえて守るといふ、環境共生の考えのもとこの問題を考えるべきであろう。内分泌かくらん作用をもつ化合物は、正常状態での内分泌系で制御されている反応に十分な濃度で水環境中に存在している可能性がある。内分泌かくらん化学物質曝露による魚類への生体影響とエコロジカルな係わりはまだ多くの謎が残されており今後詳細な検討が望まれる。

参考文献

- 1) 環境庁リスク対策検討会 監修：環境ホルモン 環境新聞社 1997
- 2) 井口泰泉他：よくわかる環境ホルモン学 環境新聞社 1998
- 3) L. D. Arcand-hoy and W. Benson, *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 49-57 (1998)
- 4) 原 彰彦：科学 68: 591-596 (1998)
- 5) S. Yamanaka, *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62: 1196-1200 (1998)
- 6) 有園幸司：資源環境対策 34: 34-38 (1998)
- 7) L. Tattersfield, *et al.*, (eds) SETAC-Europe / OECD / EC Expert Workshop on Endocrine Modulators and Wildlife: Assessment and Testing (1997)
- 8) C. E. Purdom, *et al.*, *Chem. Ecol.*, 8: 275-285 (1994)
- 9) S. Jobling, *et al.*, *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 1993-2002 (1996)
- 10) J. E. Harries, *et al.*, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 534-542 (1997)
- 11) L. C. Folmar, *et al.*, *Environ. Health Perspect*, 104: 1096-1101 (1996)
- 12) S. L. Goodbred, *et al.*, *U. S. Geological Survey Open File Report* (1997)
- 13) K. R. Munkittrick, *et al.*, *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 1427-1439 (1992)
- 14) K. Arizono, *et al.*, Eighth Annual Meeting of SETAC-Europe, abstract No 638 (1998)
- 15) J. J. Lech, *et al.*, *Foundam. Appl. Toxicol.*, 30: 229-232 (1996)
- 16) R.M. Donohoe, *et al.*, *Aquatic Toxicol.*, 36: 31-52 (1996)
- 17) H. Urushitani *et al.*, *Zool. Sci.*, 13, Suppl 8: (1996)
- 18) M. A. Gray and C. D. Metcalfe, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1082-1086 (1997)
- 19) G. Flouriot, *et al.*, *J. Mol. Endocrinol.*, 15: 143-151 (1995)
- 20) J. P. Sumpter and S. Jobling, *Environ. Health Perspect*, 103, Suppl 7: 173-178 (1995)

プロフィール

氏名 有園幸司 (Koji ARIZONO) 43歳
 所属 長崎大学 環境科学部 環境設計講座
 〒852-8521 長崎市文教町1-14
 Tel: 095-843-1806 Fax: 095-843-6377
 出身大学 第一薬科大学 学位：薬学博士
 現在の研究テーマ 内分泌攪乱化学物質の生体影響評価法の開発

試料の前処理

11

(株)同仁化学研究所
大倉洋甫

このシリーズでは、生体試料中などの微量有機化合物の分析を主としてHPLCで行なう際の試料の前処理の方法について、ごく簡単に説明している。1～6項で基礎的な重要事項を総括し、7～8項で溶媒等による抽出方法を固相抽出法を含めて概説した。9～10項で分子サイズ別二分画法である透析と限外濾過の各方法の利用について概観した。11項で除たんぱくについて述べた。

12. 簡単な分離分析技術利用による荒分け

簡易・迅速で、かつ自動化できる前処理用分離技術として、固相抽出法(本シリーズ8項C; ドーজনニュース 84)が広く活用されている。しかし、このもとになったペーパークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー及びオープンカラムクロマトグラフィー、さらには簡易な電気泳動も前処理に利用すべき価値を有する方法である。

a. ペーパークロマトグラフィー及び薄層クロマトグラフィー

これら旧来からの展開クロマトグラフィーも分析目的物質の試料からの荒分けには依然として有用である。

ペーパークロマトグラフィーは、使用する濾紙に含まれる約20%の水を固定相として利用する順相分配クロマトグラフィーとして用いるのが一般的である。従って分離可能な物質に制約があり、分離能もあまりよくなく、分離に長時間を要する。また、分離スポットの検出に強酸と高温が使えない。一般にはデンストメーター*で検出する。便利な点は、目的物質あるいは目的物質群のスポット部分を切り取ることが容易であることであり、切り取った部分を溶媒などによる抽出に付す。(*クロマトスキャナー)

薄層クロマトグラフィーは現在もかなり広く実用されている。これはこの方法の簡易さと経済性のみならず、予試験的に使うのにかなりの分離能を持っているからである。また、分離モードもシリカゲルやアルミナを固定相とする吸着モードのほか、オクタデシルシリカを固定相とする逆相分配モードなどが利用できる。

薄層クロマトグラフィー用プレートの市販も利用に便宜を与えている。市販プレートは適当なサイズに切っても使用できる。分離した目的物質のスポット部分の薄層をかき取って (scrape off) 抽出する(微量試料のプレバティブTLC)。かき取り装置が市販されている。

高性能薄層クロマトグラフィー(HPTLC; メルク社提唱)用のプレートは数 μm 粒子径のシリカなどを用いて作成しており、分離能がよく実用に便利である。

b. オープンカラムクロマトグラフィー

小カラムを用いるオープンカラムクロマトグラフィーの試料の前処理への応用は、いまま重要である。

この方法で微量試料を取り扱う場合、内径数mm、長さ100～200mmのガラス管などをクロマト管として使い、分離には液体クロマトグラフィーにおけるすべての分離モード(吸着、分配、イオン交換、サイズ排除、生物学的親和性)を活用することができる。

分離用充てん剤は現在のHPLC用のものを用いると、粒子径が小さすぎて(数 μm ～sub μm)、移動相を流すのが困難である。通常数十mesh～数百meshのものを使用する。

HPLCや通常の液体クロマトグラフィーと異なり、多種類の溶媒や溶液を移動相に順次使うことが多い。これは測定妨害物質や不要物質を充てん剤に吸着分配された状態から引き放し、除去するためである。移動相は通常重力により自然流下させるが、空気圧、窒素ガス圧、炭酸ガス圧などをかけて流速を大きくすることも試みる。カラム内における物質分配平衡が乱れない程度の高速にすることが好ましい。

複雑な前処理操作の一部に、弱酸性陽イオン交換体のりん酸化セルロース(Cellex P)を使用した例をあげよう。ヒト血清中ポリアミンのプレカラム誘導体化HPLCである(M. Kai et al., *J. Chromatogr.*, 163, 151 (1979))。生体ポリアミン(図11-1)のうち、スペルミン(II)、スペルミジン(I)及びプトレシン(III)は前立腺、胸腺、腫瘍細胞など細胞増殖の盛んな組織に多く、血中へ移動し、尿中に排泄される。これらは腫瘍マーカーと

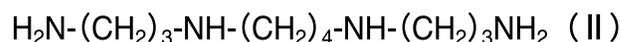
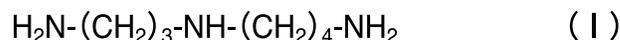


図11-1 生体ポリアミン
I, スペルミジン; II, スペルミン
III, プトレシン; IV, カダベリン

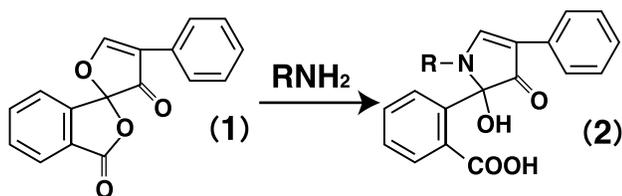


図11-2 フルオレッサミンと第一アミンとの反応
1,フルオレッサミン; 2, 蛍光誘導体

なり得るものである。

これらの正常ヒト血中濃度は III > I > II の順で、これらの遊離型アミンとしての濃度は10~200 pmol/mlである。カダベリン(IV)は正常ヒト血清中、遊離型では0~20 pmol/ml存在し、肝障害時に血中及び尿中濃度が増大する。これらのアミンは血中及び尿中でも抱合体が存在し、主なものはアセチル体である。その濃度は遊離型の2~4倍である。1,6-ヘキサンジアミンは生体(動植物全体)には存在しないと考えられており、内標準物質として利用する。

ポリアミンの蛍光誘導体化にフルオレッサミンを使用しているが、これは第一アミンとのみ蛍光反応する(図11-2)ので、各ポリアミンの両端の2個のアミノ基を誘導体化する。この反応はポリアミンへの選択性がないので、ヒト血清中に存在する相対的に非常に多量で、かつ多種類のアミン及びアミノ酸を可及的に除去する試料の前処理操作が要求される。

図11-3にヒト血清中遊離ポリアミン測定における前処理操作を示す。血清に内標準物質を添加し、除たんぱく操作及びクロロホルム・メタノールによる脂質の抽出除去を行う、得られる溶液をCellex P(Bio-Rad社)の小カラムを用いるクロマトグラフィーにかける。Cellex Pは小さなガラスクロマト管(長さ150mm、内径5mm)に高さ30mmのベッドを形成するように自然流下させてつめる(バイプレターで振動させながらつめた方がよい)。この陽イオン交換クロマトグラフィーにおいて、かなりの多量の妨害アミンを除去する。濃厚食塩液によりポリアミン画分を溶出させる。

この溶出液にpH9.0でNi²⁺を加え、これまでの操作で除去されないで残ったアミノ酸類を錯体化し、フルオレッサミンと反応しないようにマスキングする。ついでフルオレッサミンを用いる蛍光誘導体化を行う。

ポリアミンの蛍光誘導体はカルボキシル基を有しているので、コハク酸酸性で塩析しながら酢酸エチルで抽出する。酢酸エチル抽出液には多量のシクロヘキサンを加える。これは最後に行なうアルカリ性pHのほう酸塩バッファーを用いる逆抽出時に、水層との分離を改善し、ポリアミンの蛍光誘導体の抽出効率を高めるためである。この逆抽出も、これまでの操作で除去されなかった妨害物質を除去し、さらに濃縮を兼ねたものである。

アルカリ性抽出液を逆相分配HPLCにかけ、ポリアミンのフルオレッサミン誘導体を分離する。分離は酸性pHの酢酸塩バッファーとメタノールの混液を移動相とし、メタノールの濃度グラジェント法で行なう。正常ヒト血清のクロマトグラムを図11-4(A)に、試薬ブランクのそれを同図(B)に示す。

ブランクのクロマトグラムにスベルミジン、スベルミン及びブトレシンのピークが相対的に強く認められる。これは前処理に使う試薬、溶媒、器具などのポリアミン汚染によるものではなく、オープンカラム法で使用した陽イオン交換体が環境中のポリアミ

	ヒト血清	500μl
除たんぱく 内標添加	0.8nmol/ml 1,6-ヘキサンジアミン (内標)	500μl
	3M過塩素酸	100μl
	遠心、1200×g、10分	
	上澄	
過塩素酸の除去	1.5M水酸化カリウム (pH7に調節)	ca.200μl
	冷却、ca5℃、放置、ca20分	
	遠心、1000×g、5分	
	除たんぱく上澄液	
脂質の抽出除去	0.1Mりん酸ナトリウムバッファー (pH7.0)	1.0ml
	クロロホルム	500μl
	メタノール	300μl
	振盪、ボルテックス上、3分	
	遠心、1200×g、5分	
	水層	ca. 2ml
妨害アミンによる除去	Cellex Pカラムに注入、下記溶液順次注入	
	10mMりん酸ナトリウムバッファー(pH6.0)	2.0ml
	水	1.5ml
	50mM塩化ナトリウム	1.5ml
	3M塩化ナトリウム(ポリアミン溶出用)	2.0ml
	カラム溶出液	
妨害アミンのマスキングと誘導体化	0.4Mほう酸塩バッファー(pH9.0)	500μl
	20mM硫酸ニッケル	200μl
	1mMフルオレッサミン(アセトン溶液)	500μl
	蛍光反応液	
酢酸エチル抽出の誘導体化	0.3Mコハク酸 塩化ナトリウム	1.0ml ca. 1g
	酢酸エチル	400μl
	振盪、ボルテックス上、30分	
	酢酸エチル抽出液	
アルカリ抽出	シクロヘキサン	4.0ml
	0.4Mほう酸塩バッファー(pH10.0)	200μl
	振盪、ボルテックス上、30分	
	アルカリ性抽出液	
	HPLC・蛍光検出へ	100μl

図11-3 ヒト血清中遊離ポリアミンのHPLC定量における前処理

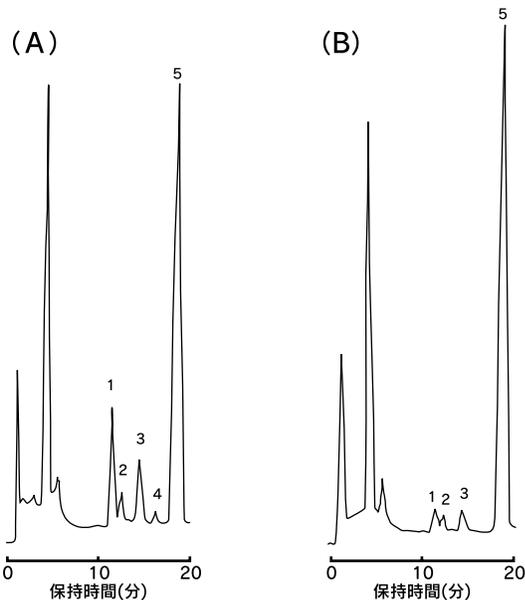


図11-4 正常ヒト血清中ポリアミン及び試薬ブランクのクロマトグラム
A, 正常ヒト血清; B, 試薬ブランク

カラム: LiChrosorb RP-18; 5 μ m, 150 \times 4mm i.d.
カラム温度: 30 $^{\circ}$ C
移動相: ベンゼンスルホン酸ナトリウム(35mM), 塩化アンモニウム(0.1M) 及び酢酸塩バッファー (0.7mM, pH4.0) を含むメタール溶液; 直線グラジエント, メタノール45% \rightarrow 50%, 25分間
流速: 1 ml/分
蛍光検出: 励起側390nm, 発光側490nm
ピーク: 1, スベルミジン; 2, スベルミン; 3, プトレシン; 4, カダベリン; 5, 1,6 - ヘキサンジアミン (内標準物質)

ンを吸着し、汚染され易いことに基づく。因みに、環境中には動物の尿や精液(精液の臭いは大部分がポリアミンに由来すると思われる)あるいは微生物を含む植物などに由来するポリアミンが相対的に多量に存在する。ここで使用したイオン交換体は前述の文献に記載された操作で丹念なポリアミン除去のための洗浄操作を施したものである。それにもかかわらず、これらのポリアミンのピークがまだ認められる。幸いに、このブランクのピーク高さあるいは面積の再現性は良好であるので、血清サンプルのピークからブランクを差し引くの使える。

c. 電気泳動

自由泳動法ではなく、不活性支持体を用いるゾーン電気泳動法を試料の前処理に使うことができる。支持体には濾紙、寒天(精製したらアガロース)ゲル、ポリアクリルアミドなどが使われる。分離ゾーンは一般的にはデンストメーターで検出し、必要な物質の分離ゾーンを切り取るか、またはかき取って、溶媒抽出に付す。濾紙電気泳動法は荷電あるいは低分子物質やペプチドなどの前処理に、アガロースやポリアクリルアミドはペプチド、たんぱく質、核酸などの前処理に活用できる。

お知らせ

1) PDF版ドージンニュースを追加致しました。

弊社ホームページ上に掲載しております電子版ドージンニュースにつきましてご案内致します。

今春、一部のニュース読者の皆様にご協力いただきましたアンケートの結果、HTML版を優先的に電子化するように進めてまいりました。理由は、掲載する形式としてはHTML版とPDF版とではHTML版の方がいいというご意見が多かったためです。しかし、PDF版の「必要な部分をプリントアウトできる」、「印刷物と同じように見えるので分かり易い」等のメリットを指摘される読者の方もいらっしゃいましたので、ご要望にこたえるべく準備を進め、前号よりHTML版・PDF版ともにホームページ上に掲載するように致しました。これにより、ご希望の形で電子版ニュースをご覧いただくことができると思います。この電子版ニュースは印刷版に比べ、1) 紙資源の保護、2) 検索が容易、3) 省スペース、4) ファイル管理が不要などの大きなメリットが得られております。

アドレスは、

<http://www.dojindo.co.jp/japanese/letterj/index.html>です。

ご覧いただいた上で、ご意見・ご要望等ございましたら、下記アドレスにお送りいただきますようお願い申し上げます。

2) ドージンニュースのE-mailのご案内

前号より電子メールで「ニュース目次」及び「掲載HOME PAGE address」をご案内するサービスを開始致しました。これは、ドージンニュース掲載の目次を、E-mailでいち早く、直接皆様にお知らせするサービスです。ご興味ある目次内容がございましたら、ホームページにて詳細をご確認いただけます。このサービスをご希望の方は、以下3つのいずれかをご指定ください。

- 1) E-mailで「目次」及び「掲載HOME PAGE address」のご案内をお送りする。紙版の郵送は不要。
- 2) E-mailで「目次」及び「掲載HOME PAGE address」のご案内をお送りする。紙版の郵送も必要。
- 3) 紙版の郵送のみ必要。E-mailのご案内は不要。

10月10日までにご回答いただきますようお願い申し上げます。

前回登録された方は、今回お答えいただく必要はございません。また、前回の登録内容からの変更を希望される方は、下記E-mailもしくは同封の送り状にてお問い合わせくださいますようお願い致します。

株式会社同仁化学研究所

マーケティング部ドージンニュース係

TEL: 0120-489548 FAX: 0120-021557

E-mail: info@dojindo.co.jp 担当者: 蒲野(かばの)志保

Topics on Chemistry

ペプチドプローブを用いた蛋白リン酸化酵素類の可視化

(株)同仁化学研究所 大瀬戸文夫

【はじめに】

細胞生物学・薬理学・免疫学をはじめとする生物学あるいは医学の分野においては、細胞内情報伝達に関する研究はますます盛んに行われている。更には、癌をはじめとする各種疾病のメカニズムを情報伝達と結び付けて研究しようとする動きも盛んである。細胞の受けた刺激は様々な細胞応答として現れるが、そこに至る間には、各種低分子化合物やタンパク質の関与があることが徐々に明らかにされつつある。最近では、それら情報伝達物質の細胞内での時間的、空間的局在を明らかにするための細胞内イメージングに関する研究も盛んである。

細胞機能を解析する方法には、放射性同位元素 (RI) を用いる手法、吸光・蛍光・化学発光など光化学的手法あるいは電気化学的方法などがある。中でも、蛍光分析は極めて高感度な分析手法であり、細胞内機能物質の蛍光検出はもとより、共焦点レーザー顕微鏡などの測定機器の利用によって、高い時間分解能・空間分解能をもとにした動的解析、可視化が可能である。多くの場合、細胞を破壊せず試薬を導入することが可能であり、より負荷の少ない「自然」に近い状態で細胞を観察することが可能である。

近年、蛍光試薬及び測定機器の発達により、細胞内での様々な情報伝達物質の動的解析が可能になってきている。特にセカンドメッセンジャー - として機能するカルシウムイオンに関して言えば、Fura 2 をはじめとする数多くの優れた蛍光性カルシウムプローブにより、細胞内の濃度変化を可視化し、動的に捉えることが可能となった。しかしながら、cAMPやIP₃などカルシウム以外のセカンドメッセンジャー類、タンパクキナーゼやフォスファターゼ類、その他情報伝達関連物質の殆どは、それぞれに特異的なプローブがなく、細胞内における動的解析が遅れているのが現状である。

最近になって、情報伝達物質、特にキナーゼ類の細胞内可視化の方法として、その特異的な基質に蛍光基を導入し、リン酸化/脱リン酸化の過程を蛍光変化で追う新しいタイプのプローブが開発され注目を集めている。その研究の中から、PKA (cAMP依存性タンパクキナーゼ) の細胞内での動的解析に関する研究を中心に、蛍光性ペプチドプローブの特性について概説する。

【PKAの可視化】

細胞にもたらされた情報は、一般的には細胞膜表面の受容体に捕捉され、セカンドメッセンジャーを介して細胞内部へ伝達されていく¹⁾。cAMP (環状AMP) は、カルシウムイオンと並び、セカンドメッセンジャーとして細胞内情報伝達系において重要な役割を演じており、PKAを活性化し、特異的な遺伝子発現などの様々な細胞応答を調節している。すなわち、Gタンパクに共役する細胞表面受容体にリガンドが結合すると、活性化Gタンパクを介してアデニル酸シクラーゼが活性化され、細胞内のcAMP濃度を上昇させる。cAMPはPKAの調節ドメイン (regulatory domain) に結合して活性化し触媒ドメイン (catalytic domain) の解離を促す。活性化した触媒ドメインは核内に移動しCREB (cAMP responsive element binding protein) をリン酸化し、最終的にCRE (cAMP responsive element) を活性化して最終的な遺伝子発現へと導く²⁾。

また、PKAはCa²⁺/カルモジュリン依存性タンパクキナーゼII (CaMKII) の同様、脳内の海馬における記憶の形成やその長期増強 (LTP: long term

potentiation) などに深く関与していることが次第に明らかになってきており³⁾、したがって、cAMPからPKAに至る情報伝達系の、細胞内における動的解析および可視化を実現する特異的なプローブの開発が望まれている。

McIlroyらは、PKC (リン脂質/カルシウム依存性タンパクキナーゼ) の特異的な基質であり、4つのPKC依存性のリン酸化部位を含むアミノ酸25個からなるペプチド (MARCKS: KKKKKRFSFKKSLKSGFSFKKNNK) を用い、そのN末端をCysに変え、蛍光基としてacrylodanを付加した蛍光性ペプチドプローブを合成した⁴⁾。このプローブはPKCの活性化によりリン酸化を受け、蛍光強度が減少するものである。PKAおよびCaMKIIなど他のキナーゼによる蛍光強度の減少が殆ど観測されないことから、これはPKCに特異的な変化であり、したがってこの基質はPKCのプローブとなることを示している。この結果は、キナーゼプローブの設計において重要な知見を与えている。すなわち、目的とするキナーゼの特異的な基質から、そのリン酸化部位を含む最小限のペプチド配列を選び出し、リン酸化/脱リン酸化過程において構造変化を反映する部位に蛍光団を導入することにより、その蛍光性プローブを作成することが可能であるということである。したがって、どの配列を選び、どの部位に、どのような方法でどの蛍光団を導入するかが、ペプチドプローブ合成の鍵となってくる。

PKAのホロ酵素には少なくとも2種類 (type I 及びtype II) あり、その中で、type IIはその調節ドメイン内に自己リン酸化部位 (autophosphorylation site) を持っていることが知られている⁵⁾。東京薬科大学の工藤先生らは牛の心筋からtype II型のPKA調節ドメインを抽出し、プロテアーゼ処理により切断したペプチド断片の中から、自己リン酸化部位を含む、81から99番目のアミノ酸19個からなるペプチド断片 (R II Domain) を基本とし、C末端にacrylodanを付加したPKAの特異的な蛍光性ペプチドプローブ、AR IIを開発した⁶⁾。AR IIIは、524nm (ex: 366 nm) に蛍光を示す。細胞膜透過性であるため、培養液に添加するだけで細胞内に負荷することが可能である。

AR II : DLDVPIGPRFDRRVSAAC-Acrylodan

DR II : DLDVPLPAKADRRVSAAC-DACM

試験管内で15 µg/mlのAR IIを10mMの酢酸マグネシウム、1 mMのEDTA及び0.5 mMのATPと共にpH7.5のHEPES/バッファーに溶解し、5 から10 µg/mlのPKA存在下、0.5 mMのcAMP添加によるPKAの活性化によりAR IIの蛍光強度が減少することを観測している。PKA溶液の代わりに、神経芽細胞腫の細胞溶解液を加え、cAMPを添加することにより同様に蛍光が減少することが観測された。液体クロマトグラフによる検討から、系内にリン酸化したAR IIが生成していることを確認している。更に、PKAの特異的な阻害剤、H-89を添加すると蛍光強度の減少が抑制されることから、この蛍光変化はAR IIのリン酸化に起因していると考えられる。また、AR IIIはCaMKIIの活性化条件下では全く蛍光変化を誘導しないことから、PKA特異的なプローブであると言える。

図 - 1 は、NG108-15 cell line にAR IIを負荷し、アデニル酸シクラーゼの活性化剤、forskolinで処理した時の蛍光強度変化を追ったイメージング画像である。まず、細胞質部分の蛍光変化に着目すると、forskolinを添加

後、10~30秒後から蛍光強度の減少が認められ、60~90秒後蛍光強度は最小となる。その後、蛍光強度は上昇し3~4分で強度変化は殆どなくなる。cAMP誘導体であるdibutyl cAMPを系内に添加しても同様の蛍光変化が見られた。またH-89を添加すると蛍光減少が阻害されることから、この蛍光変化はPKA活性化を反映していると言える。

一方、核内の蛍光変化に着目すると、forskolinによるアデニル酸シクラーゼの活性化後、細胞質部分の蛍光減少と同時に、核内の蛍光強度が上昇することが観測された。90~120秒で最大となり、その後徐々に減少した。活性化したPKAの触媒ドメインは、核内に移行し核蛋白をリン酸化するが、活性化時触媒ドメインに結合したAR IIが核内に同時に移行して行くために蛍光が増大すると考えられる。これも、H-89の添加により抑制されることからPKAの活性を反映していると言える。

細胞質部分における蛍光強度の増加は、リン酸化されたAR IIのフォスファターゼであるcalcineurinによる脱リン酸化によると考えられる。calcineurinの阻害剤、FK506を添加することにより、蛍光強度減少後の上昇が抑制されることから、それを示している。したがって、この一連の蛍光変化は、AR IIのリン酸化/脱リン酸化に起因していると言える。

DR IIIは、AR IIのペプチド配列をラット骨格筋由来のPKA調節ドメイン

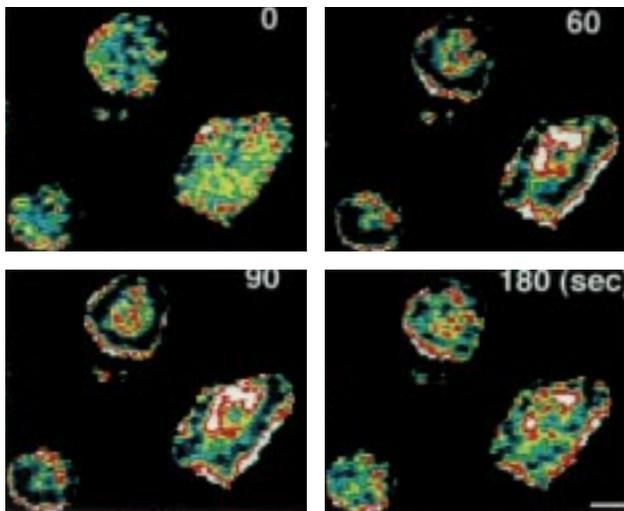


図 - 1 AR IIを負荷したNG108-15細胞培養液にforskolinを添加した時の蛍光変化のイメージング画像。forskolin添加後、細胞質部分の蛍光強度の減少から増加、核部分の増加から減少に至る蛍光強度変化像が得られている⁶⁾。

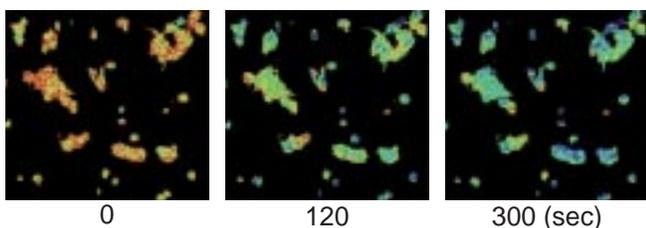


図 - 2 海馬神経細胞(初代培養)にDR IIを負荷し、L-glutamate刺激後の蛍光変化のイメージング画像。L-glutamate添加後の蛍光の時間変化を示している。calcineurin阻害剤FK506、1 μ M添加⁶⁾。

IIをもとに、Leu-86, Ala-88, Lys-89及びAla-90のアミノ酸に置換したペプチドに、クマリン系の蛍光団、DACMを導入したものである⁶⁾。475 nmに蛍光を示し(ex: 386 nm)高脂溶性であるために神経芽細胞種のみならず海馬の初代培養細胞内への色素の導入はAR IIよりも容易である。

図 - 2にDR IIを負荷した海馬の初代培養細胞に、FK-506存在下L-glutamateを作用してPKAを活性化した時の蛍光イメージング変化を示す。時間の経過とともに蛍光強度の減少が観測され、それはPKAの阻害剤、Rp-cAMPSの添加により完全に抑制されることが分かった。

Tsienらは、cAMPのプロープとして、PKAのホロ酵素、触媒ドメイン及び調節ドメインそれぞれにfluorescein及びrhodamineを導入したFICRHRを合成している⁷⁾。cAMPの結合によりPKAが活性化し、その結果触媒ドメインが解離するときの蛍光波長変化からcAMPの活性変化を追うことが可能である。レシオメトリーが取れるという利点があるものの、PKAホロ酵素に直接蛍光団を付加した複雑なプロープであるため極めて合成が難しく、したがって、試薬として売り出されてはいるものの、大変高価なものとして知られている。また、分子量が大きいため、細胞内への負荷にはマイクロインジェクションが必要なことから、非常に取り扱い辛い点が上げられる。一方、AR II及びDR IIIは、細胞膜透過性のオリゴペプチドであり、培養液に添加するだけで、容易に細胞内へ負荷することが可能である。また、合成が比較的容易であるため価格を低く抑えることが可能である。今後の情報伝達物質の動的解析に大いに貢献するプロープであると思われる。

【最後に】

Ca²⁺/カルモジュリン依存性キナーゼII (CaMKII)の基質でアミノ酸15個からなる合成ペプチド、Syntide 2を利用したCaMKII用蛍光性ペプチドプロープAS2などが開発されるなど⁸⁾、目的とするキナーゼに特異的な基質を用いたペプチドプロープの開発は今後益々増えてくるものと予想される。あらかじめリン酸化したものはフォスファターゼの基質に利用することも可能であり、同様の考えのもと、チロシンキナーゼ、MAPKなど多くのキナーゼ、フォスファターゼの蛍光基質の設計・合成が可能である。多くの特異的蛍光基質の出現と、したがってそれらを用いた細胞内での動的解析研究が、今後益々活発に行われることを期待している。

参考文献

- 1) B. Alberts, et al., *The Cell*, Garland publishing, New York, 1994.
- 2) M. Hagiwara, *生化学*, 67, 1390 (1995)
- 3) U. Frey, Y.-Y. Huang, E. R. Kandel, *Science*, 260, 1661 (1993)
- 4) B. K. McLroy, J. D. Walters, J. D. Johnson, *Anal. Biochem.*, 195, 148 (1991)
- 5) J. L. Meinkoth, Y. Ji, S. S. Taylor, J. R. Feramisco, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 9595 (1990)
- 6) H. Higashi, K. Sato, A. Ohtake, A. Omori, S. Yoshida, Y. Kudo, *FEBS Lett.*, 414, 55 (1997)
- 7) S. R. Adams, A. T. Harootunian, Y. J. Buechler, S. S. Taylor, R. Y. Tsien, *Nature*, 349, 694 (1991)
- 8) H. Higashi, K. Sato, A. Omori, M. Sekiguchi, A. Ohtake, Y. Kudo, *Neuroreport*, 7, 2695 (1996)

新製品

PKA用蛍光プローブ

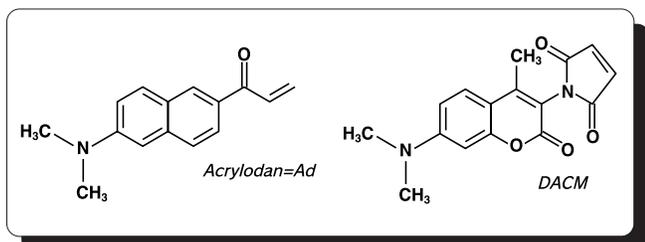
AR II : DLDVPIPGRFDRRVSAAC-Ad

DR II : DLDVPLPAKADRRVSAAC-DACM

-Single Letter Code for Amino Acids-

A=Alanine	I=Isoleucine	R=Arginine
C=Cysteine	K=Lysine	S=Serine
D=Aspartic acid	L=Leucine	T=Threonine
E=Glutamic acid	M=Methionine	V=Valine
F=Phenylalanine	N=Asparagine	W=Tryptophan
G=Glycine	P=Proline	Y=Tyrosine
H=Histidine	Q=Glutamine	

東京薬科大学の工藤先生らは、培養細胞内でのPKA活性化状態をイメージングする、全く新しいタイプの蛍光プローブを開発した。PKAの調節ドメイン内のオリゴペプチド部位のシステイン残基にacrylodanもしくはDACMを導入したものである。



Tsienらの開発したPKA関連のプローブはPKA調節ドメイン、触媒ドメインの各々に、波長の異なる蛍光基を導入しFRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) で検出するものが開発・商品化されている。しかし、これは分子量が大きく細胞への導入にはマイクロインジェクションが必要なこと、また極めて高価であることなどの欠点をもっている。

このAR II、DR IIは蛍光性低分子量ペプチドで細胞膜透過性なため、培養液に添加するだけで比較的簡単に細胞内に導入することができ、取り扱いも容易である。

・蛍光波長

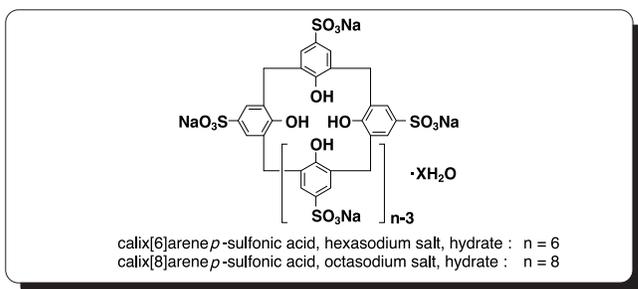
AR II : ex = 366 nm, em = 524 nm

DR II : ex = 386 nm, em = 475 nm

コード番号	品名	容量	価格(¥)
	AR II	500 μ g	29,000
	DR II	500 μ g	29,000

新製品

水溶性カリックスアレーン

Calix[6]arene *p*-sulfonic acid, hexasodium salt, hydrateCalix[8]arene *p*-sulfonic acid, octasodium salt, hydrate

カリックスアレーンはフェノールを環状に配置した大環状化合物であり、その特異な構造と、比較的容易に官能基を導入出来ることから、包接化合物を中心とした数々の機能性材料への応用が検討されている。

今回新たに発売した水溶性カリックスアレーンは、その芳香環部分にスルホン酸基を導入したもので、水に極めてよく溶け、したがって、環状の芳香環が作り出す疎水的環境を水溶液中に提供することが可能である。すなわち、脂溶性の化合物を空孔内に取り込み、水溶液中に溶解し、更に安定な錯体を形成することが可能である。また、カリックスアレーンのlower rim側に長鎖アルキル基を導入したものは、一分子でミセル様の性質を示すなど、極めてユニークな化合物である¹⁾。

諸角らは、水溶性カリックスアレーンと光学活性な四級アンモニウムあるいはアミノ酸誘導体の包接認識、読み出しに関する検討を行っている。その結果、カリックスアレーンの環構造が、包接する光学活性ゲスト分子に誘起されて不斉環境に固定されることが明らかにされた^{2,3)}。

ニトロ化カリックスアレーンは、カリックスアレーンの直接的ニトロ化では合成することが出来ず、スルホン化カリックスアレーンのニトロ基置換により達成される。更にニトロ基の還元によりアミノ体を得て、そこからカチオン性の水溶性カリックスアレーンに導くことが可能であるなど、スルホン化カリックスアレーンは機能性材料開発の原料としても利用できる。

参考文献

- 1) S. Shinkai, S. Mori, H. Koreishi, T. Tsubaki, O. Manabe, *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 2409 (1986)
- 2) T. Morozumi, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994, 1219.
- 3) T. Morozumi, S. Shinkai, *Chem. Lett.*, 1994, 1515.

コード番号	品名	容量	価格(¥)
348-07813	Calix[6]arene <i>p</i> -sulfonic acid hexasodium salt	500mg	12,000
342-07811	Calix[6]arene <i>p</i> -sulfonic acid hexasodium salt	1g	19,000
345-07823	Calix[8]arene <i>p</i> -sulfonic acid octasodium salt	500mg	12,000
349-07821	Calix[8]arene <i>p</i> -sulfonic acid octasodium salt	1g	19,000

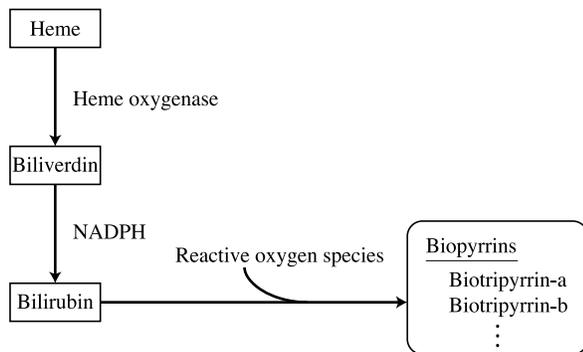
新製品紹介

ビリルビン酸化代謝物 (Biopyrrin) 研究関連試薬

ビリルビン酸化代謝物研究用
 抗ビリルビンモノクローナル抗体 (24G7)
 ビリルビン酸化代謝物 (Biopyrrin) 測定EIAキット

《ビリルビン (BR) とその酸化代謝物》

BRは、生体内においてヘモグロビンの正常代謝物であるビリベルジン (BV) がNADPHの還元作用を受け、代謝されたものです。何故、その様な代謝系を取ってまで、神経毒性の高いIBRを産生させる必要があるのか、黄疸の原因として排出されるべきBRの本来の役目は何であるのか、これまで明確な説明はなされていませんでした。清水、山口らは、抗BR単クローン抗体 (24G7) を開発し、現在までに7種類のBR類縁物 (Biopyrrins) の存在が明らかになっています。Biopyrrinsの尿中排泄量は、生体内の酸化状態を反映すると考えられ、ストレスマーカーとしても報告されており、今後の実験結果が注目されています。



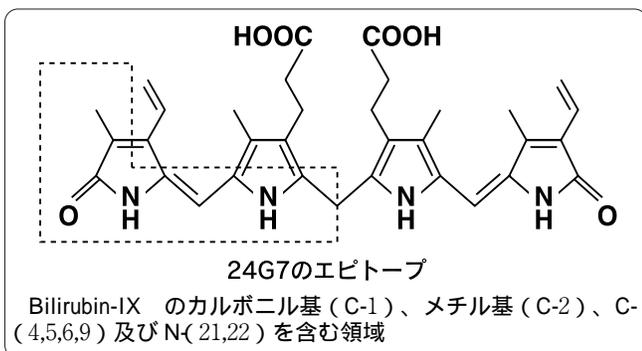
Anti-Bilirubin Antibody (24G7) [抗ビリルビンモノクローナル抗体]

[クローン名] : 24G7

抗原 (BSAのアミノ基にBilirubin-IX のプロピオニル基を共有結合させたもの) を免疫したBalb/c マウスの脾細胞と、マウスミエロマ細胞 (P3-X63-Ag8-U1) とのハイブリドーマ。

[エピトープ]

抗モノクローナル抗体は、下図に示すようにBRのジピロール部位をエピトープに持つ抗体です。



《特長》

1. Hemin、ビリベルジンとは交差反応性を示しません。
2. dipyrrolまたは tripyrrin誘導体に反応します。
(biopyrrinと交差反応性を示す。)

Biopyrrin EIA Kit (Biopyrrin測定ELISAキット)

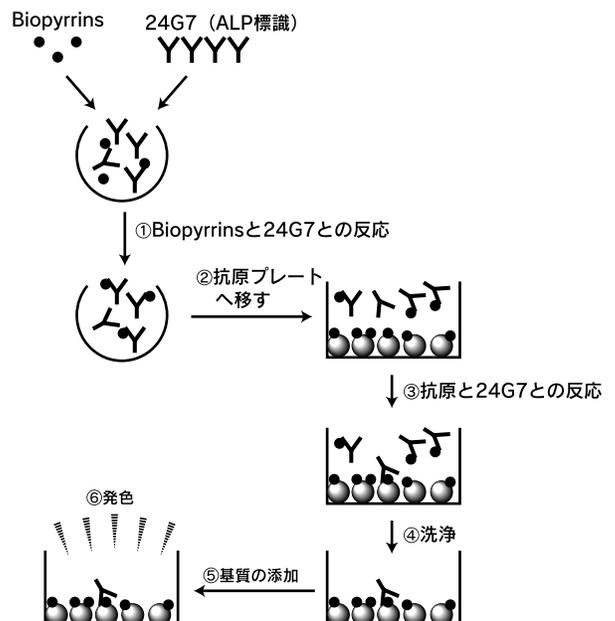
Anti-Bilirubin Monoclonal Antibody (24G7) を用いた、inhibition ELISAによる尿中Biopyrrinsを簡便に測定できるキットです。

《特長》

1. 酸化ストレスマーカーと言われている尿中のBiopyrrinsを測定できます。
2. 簡便に再現性良く測定できます。

《測定原理》

- アルカリフォスファターゼ (ALP) を標識した抗BRモノクローナル抗体 (24G7) と検体中のBiopyrrinとを反応させます ()
- 次に、抗原を感作させたイムノプレートに反応液を移し ()、過剰の抗BRモノクローナル抗体を抗原を介してプレートに結合させます ()
- このイムノプレートを洗浄して、プレートに結合していない抗体を除いた後 ()、抗体に標識してあるALPの基質 (p-Nitrophenylphosphate) を加えて発色させます ()
- 検体中のBiopyrrinsに相当する量の抗体が、イムノプレートに結合できずに少なくなるため、発色がその分弱くなります。この吸光度の減少を測定して、Biopyrrins値を求めます。



ビリルビン酸化代謝物 (Biopyrrin) 研究関連試薬

《構成試薬および保存方法》

標準BR (0.32単位)	(1 ml用)	1 瓶	2～8℃遮光保存
検体希釈液	100ml	1 本	2～8℃保存
ALP標識抗体 (100倍濃度)	0.12ml	1 本	2～8℃保存
ALP標識抗体希釈液	12ml	1 本	2～8℃保存
検体反应用ウェル	(96ウェル)	1 袋	室温保存
抗原結合ウェル	(96ウェル)	1 袋	2～8℃遮光保存
プレートシール		1 枚	室温保存
洗浄液 (10倍濃度)	100ml	1 本	室温保存
基質液A	9.6ml	1 本	2～8℃保存
基質液B	2.4ml	1 本	2～8℃保存

注) 付属品以外に必要なもの

ピペット (30～1000 μl, 3ml, 11ml)

試験管

蒸留水

メスシリンダー (500ml)

マイクロプレート・シェーカー

マイクロプレート・ウォッシャー

ペーパータオル

1 N NaOH

マイクロプレート・リーダー

《操作方法》

a. 試薬の調製

(1) 0.1～3.2単位/lおよび320単位/l標準液

標準BR (0.32単位) 1 瓶を検体希釈液 1 mlで溶解して、320 単位/l標準液を調製します。この320単位/l標準液30 μlを検体希釈液 3 mlに添加します (3.2単位/l標準液)。更に、下記のように希釈し、0.1～1.6単位/l標準液を調製します。

注) 320単位/l標準液は、-30℃保存で1ヶ月間使用できます。凍結融解の繰り返しは避けて下さい。

(2) 第2反応停止液

(1)で調製した320単位/l標準液 0.5mlを検体希釈液11mlに添加します。

注) 第2反応停止液は、-30℃保存で1ヶ月間使用できます。

(3) ALP標識抗体

ALP標識抗体 (100倍濃度) 1 瓶とALP標識抗体希釈液 1 瓶とを混和します。

注) ALP標識抗体は2～8℃保存で1ヶ月間使用できます (使用前に室温に戻して下さい)。

(4) 洗浄液

洗浄液 (10倍濃度) を蒸留水で10倍希釈します。

注) 洗浄液は室温保存で1ヶ月間使用できます。

(5) 基質液

基質液A 1瓶と基質液B 1瓶とを混和します。

注) 基質液は密栓、2～8℃保存で1ヶ月間使用できます (使用前に室温に戻して下さい)。

b. 測定方法

- 検体を検体希釈液で適当な濃度に希釈します (3倍希釈以上)。
- 検体希釈液、標準液、または希釈した検体 40 μlを検体反应用ウェルに加え (試薬ブランク用のウェルには添加しません)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	×	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×
B	▲	▲	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×
C	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	▲
D	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●
E	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

- 試薬ブランク用以外のウェルにALP標識抗体100 μlを加え、マイクロプレート・シェーカーで5秒間ミキシングした後、室温で遮光し、45分間放置します。

- 次の操作の直前に、抗原結合ウェルをマイクロプレート・シェーカーを用いて、洗浄液で5回洗浄します。フレームからウェルがはずれないようにペーパータオルを巻き、残った洗浄液をよく切ります。

- 洗浄した抗原結合ウェルに(3)の反応液 100 μlを移し、マイクロプレート・シェーカーで5秒間ミキシングした後、室温で遮光し、45分間放置します。

- 各ウェルの反応時間が同じになるように第2反応停止液 100 μlを添加します。

- マイクロプレート・ウォッシャーを用いて洗浄液で5回洗浄し、ペーパータオルを巻いて残った洗浄液をよく切ります。

- 基質液 100 μlを添加した後、マイクロプレート・シェーカーを用いて室温で60分間ミキシングします。

- マイクロプレート・リーダーで 405nmまたは 415nmの吸光度を測定します。

注) 最も高い吸光度が 1.0未満のときは、更に反応時間を延長して下さい (ミキシング速度や室温によっては発色が十分でないことがあります)。

- 吸光度が 1.0以上になったことを確認した後、各ウェルの発色反応時間が同じになるように 1 N NaOH を100 μl添加して反応を止めます。

- マイクロプレート・リーダーで 405nmまたは 415nmの吸光度を測定します。

c. 測定値の算出

- 試薬ブランク、検体希釈液、標準液、および検体の2重測定した吸光度の平均値を求めます。

- グラフの縦軸を吸光度、横軸 (対数) を Biopyrrins濃度とします。(1)で求めた標準液の吸光度をプロットし、これらの最

ビリルビン酸化代謝物 (Biopyrrin) 研究関連試薬

も近くを通る曲線を引いて検量線とします。

- (3) 検量線から(1)で求めた検体の吸光度に相当する測定値を読みとります。

注意事項

a. 検体についての注意事項

- (1) 当試薬は抗 BR単クローン抗体 (24G7) を用いているため、検体中にBRが存在すると正誤差を生じます。
- (2) Biopyrrins は光に対して不安定なので、検体は暗所で取り扱って下さい。
- (3) 検体は、遮光下-30℃以下で保存し、できるだけ早く測定して下さい。

b. 操作上の注意事項

- (1) 標準液および抗原結合プレートは光に対して不安定です。取り扱いには暗所で行って下さい。
- (2) 不安定な Biopyrrinsが検体中に存在する場合があります。これらは測定中にも徐々に分解していく可能性がありますので、操作を手早く行い、測定時間を出来るだけ短くして下さい。
- (3) 緩衝能の強い検体を測定するときは、希釈後の pHが検体希釈液とほぼ同じ(±0.2)になっていることを確認して下さい。pHが調整できていないときは、検体希釈液と同じ pHに調整してから測定して下さい。
- (4) 測定は、2重測定以上で行って下さい。
- (5) 袋間差が生じる場合がありますので、2キット以上購入した場合には、異なる袋の抗原結合ウェルを混ぜて使用しないで下さい。
- (6) 残った抗原結合ウェルは、乾燥剤と一緒に袋に戻してチャックを閉じ、保管して下さい。
- (7) 基質液以外の試薬には微量のアジ化ナトリウムを含有しています。アジ化ナトリウムは鉛や銅と接触するとアジ化金属を形成することがあります。本品および最終反応液を廃棄する際には安全のため大量の水で希釈し、流して下さい。

c. その他の注意事項

当試薬は研究用試薬です。測定結果を臨床に利用しないで下さい。

《単位について》

当試薬では、1単位が山口らの方法⁴⁾で測定したときの1 μmolに相当するように設定されています。ただし、標準液中のBRと検体中の Biopyrrins は同一物質ではなく、更にBiopyrrinsは単一の物質ではないので、抗体に対する反応性はそれぞれ異なると考えられます。従って、1単位が実際には1 μmolではない可能性があります。

《参考文献》

- 1) S. Shimizu, Y. Izumi, M. Yamazaki, K. Shimizu, T. Yamaguchi, H. Nakajima, Anti-bilirubin monoclonal antibody I. Preparation and properties of monoclonal antibodies to covalently coupled bilirubin-albumin, *Biochim. Biophys. Acta*, **967**, 255-260 (1988)
- 2) Y. Izumi, M. Yamazaki, S. Shimizu, K. Shimizu, T. Yamaguchi, H. Nakajima, Anti-bilirubin monoclonal antibody II. Enzyme-linked immunosorbent assay for bilirubin fractions by combination of two monoclonal antibodies, *Biochim. Biophys. Acta*, **967**, 261-266 (1988)
- 3) T. Yamaguchi, I. Shoji, A. Sugimoto, Y. Komoda, H. Nakajima, Chemical structure of a new family of bile pigments from human urine, *J. Biochem.*, **116**, 298-303 (1994)
- 4) T. Yamaguchi, T. Hashizume, M. Tanaka, M. Nakayama, A. Sugimoto, S. Ikeda, H. Nakajima, F. Horio, Bilirubin oxidation provoked by endotoxin treatment is suppressed by feeding ascorbic acid in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid, *Eur. J. Biochem.*, **245**, 233-240 (1997)
- 5) T. Yamaguchi, I. Shoji, A. Sugimoto, Y. Komoda, H. Nakajima, Epitope of 24G7 anti-bilirubin monoclonal antibody, *Biochim. Biophys. Acta*, **1289**, 110-114 (1996)

品名	容量	価格(¥)
Anti-Bilirubin Antibody (24G7)	200 μg/200 μl (PBS/vial)	50,000
Anti-Bilirubin Antibody (24G7)	1mg/ml (PBS/vial)	200,000
Biopyrrin EIA Kit	96well測定用	100,000

近日発売予定

ピテロジェニンモノクローナル抗体 (4種類)

コイ ピテロジェニン測定ELISAキット

卵黄蛋白質前駆物質であるピテロジェニンは、卵生高等脊椎動物の血中に出現するメス特異蛋白です。ピテロジェニンはエストロジェン(女性ホルモン)の作用のもとに通常、卵黄形成期のメス肝臓で合成され、血中を介して卵内に取り込まれ卵黄蛋白質を構成します。また、エストロジェン処理をすることによりオス血中にも誘導される蛋白であることから、近年、河川などの環境水中の内分泌かく乱物質のバイオマーカーとして注目されています。

本抗体、及びキットはこのピテロジェニンを測定する際に使用します。特にELISAキットは簡便で世界初の商品です。(詳細は本ニュース有菌先生のレビューをご覧ください)

環境庁も今年5月7日に報告したSPEED'98/JEAの中で唯一、実態調査指標としてこの「ピテロジェニン」を挙げています。

品名	容量	価格(¥)
コイ ピテロジェニンモノクローナル抗体	100 μg	40,000
マダイ ピテロジェニンモノクローナル抗体	100 μg	40,000
メダカ ピテロジェニンモノクローナル抗体	100 μg	40,000
マミチヨグ ピテロジェニンモノクローナル抗体	100 μg	40,000
コイ ピテロジェニンELISAキット	1キット(96穴)	90,000

9th フォーラム・イン・ドージン

「しのびよる化学汚染と生態系」

- 外因性内分泌攪乱物質（環境ホルモン）から地球温暖化まで -

フォーラム・イン・ドージンは株式会社同仁化学研究所が熊本大学医学部 前田浩教授にお世話いただき1990年から、毎年熊本で開催している化学技術セミナーであります。これまで、医学、臨床医学の分野を主題とし開催してきました。今回、熊本県が環境問題に積極的に取り組んでいる背景から、環境変化をテーマとし各方面の方々にご協力をお願いしました結果、世界的レベルで第一線の研究者のご講演をお願いすることが出来ました。

日時：平成10年12月4日（金） 9：30 - 17：30

場所：メイン会場（熊本）・・・定員500名

熊本テルサ（熊本市水前寺公園28-51）

TEL 096-387-7777

第二会場（東京都内）・・・定員50名

タケダビル

TV会議システム活用し、東京・熊本2ヶ所

で同時開催予定

入場料：無料

主催：株式会社同仁化学研究所

後援：熊本県環境保全協議会、財団法人バイオダイナ

ミクス研究振興会、バイオテクノロジー研究推

進会、くまもと科学・技術振興クラブ

協賛：株式会社クマモト抗体研究所、和光純薬工業株

式会社、株式会社同仁グローバル、株式会社ケ

ミカル同仁

セッションⅠ 基調講演

NHK 科学部 村松 秀 ディレクター

セッションⅡ グローバル環境汚染

<座長：熊本大学医学部 前田 浩教授>

ニューヨーク州立大学 吉成 正教授

愛媛大学 農学部 環境化学 田辺信介教授

九州大学 医療技術短期大学部衛生技術学科

長山淳哉助教授

セッションⅢ 外因性内分泌攪乱物質と生態系

<座長：長崎大学環境科学部 有蘭幸司助教授>

九州大学 農学部 水産学科 大嶋雄治助手

環境庁 国立環境研究所 地域環境研究グループ

堀口敏宏主任研究員

九州大学 医学部衛生学講座 大村 実助手

北海道大学 水産学部 海洋生物生産科学科 原 彰彦教授

東京農工大学 農学部 環境資源学科 高田秀重助教授

セッションⅣ 環境変化とヒトへの影響

<座長：北海道大学 水産学部 原 彰彦教授>

早稲田大学 人間科学部 山内兄人教授

聖マリアンナ医科大学 泌尿器科 岩本晃明教授

横浜市立大学 理学部 機能科学科 井口泰泉教授

セッションⅤ パネルディスカッション

<総合司会：NHK科学部 村松 秀氏>

申込先

株式会社同仁化学研究所 マーケティング部

9thフォーラム・イン・ドージン事務局（担当：蒲野、宮本）

Tel：096-286-1515 Fax：096-286-1525

フリーダイヤル：0120-489548

フリーファックス：0120-021557

E-mail：http://www.dojindo.co.jp/japanese/forum/9th/index.html

尚、お申し込み多数の場合は抽選とさせていただきます。
ミキサーは熊本会場のみ有料にて予定いたしております。

ホームページアドレス

URL：http://www.dojindo.co.jp/

E-mail：info@dojindo.co.jp

フリーファックス

0120-021557

フリーダイヤル

0120-489548