

DOJIN NEWS

ドージンニュース

Review

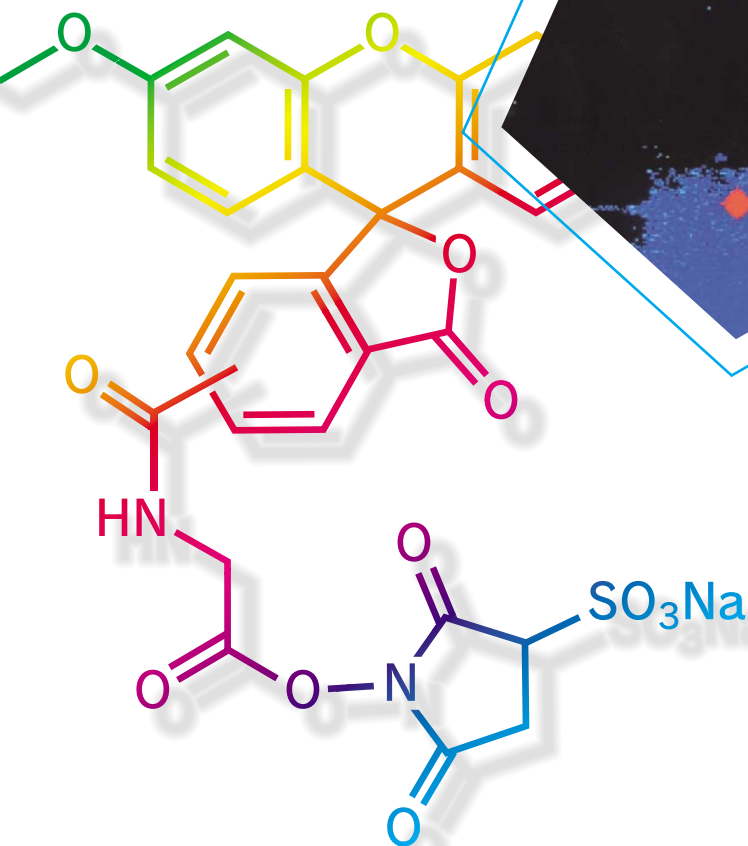
毒から薬へ:イモ貝毒コノトキシンの研究
佐藤一紀

Topics on Chemistry

SAT-3を用いた上水中残留塩素測定法
大瀬戸文夫
‘タンパク質の死’を誘導する
佐々本一美

連載

実用的蛍光誘導体化10
山口政俊・能田 均



目次

Review

毒から薬へ：イモ貝毒コノトキシンの研究 福岡女子大学人間環境学部 佐藤一紀	1
実用的蛍光誘導体化 10 福岡大学薬学部 山口 政俊、能田 均	6

Topics on Chemistry

SAT-3 を用いた上水中残留塩素測定法	10
‘タンパク質の死’を誘導する	12

Commercial

Q&A

NO 発生剤 (NOC、NOR)	13
--------------------	----

新製品

NOR 5	13
膜タンパク質結晶解析用界面活性剤	14
Aluminum Detection Kit	16

試作品案内

Self Assembled Monolayers (SAMs)研究用試薬	15
---------------------------------------	----

お知らせ

出版物のご案内	14
秋から冬の学会展示のご案内	14
カスタマーサービス部新設のご案内	14
第12回フォーラム・イン・ドージン開催のご案内	18

新製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

NOR 5	13
膜タンパク質結晶解析用界面活性剤	14
Aluminum Detection Kit	16



同仁化学研究所のある熊本テクノリサーチパークはご覧のような公園となっており、休日ともなると多くの方が訪れます。

毒から薬へ：イモ貝毒コノトキシンの研究 (From Venoms to Drugs: Studies on conotoxin from cone snail venom)



佐藤 一紀
(Kazuki Sato)
福岡女子大学人間環境学部

[Summary]

Conotoxins are peptide toxins isolated from the venom of marine cone snails. They are typically small disulfide-rich peptides containing 11-30 amino acid residues. Because conotoxins are highly specific for ion channels and neurotransmitter receptors, they are widely used as research tools in neuroscience and also considered as promising therapeutic agents. In this review article, structure-activity relationships of several conotoxins such as μ -, ω -, and λ -conotoxins are described. Active site of μ -conotoxin GVIA specific for muscle sodium channels was Arg13 and that of ω -conotoxin GVIA specific for neuronal N-type calcium channels was Tyr13. λ -Conotoxins are a group of conotoxins with novel disulfide pattern and this unique pattern is essential for their biological activity.

キーワード：

生物毒、イモ貝、コノトキシン、イオンチャネル、構造活性相関、SS 架橋、鎮痛薬

1. はじめに

本号はドージンニュースの記念すべき第100号である。実は筆者がこのニュースに総説を寄稿するのはこれが初めてではない。ちょうど4半世紀前1976年11月発行の第3号に「ペプチド合成試薬とその応用」と題して恩師である泉屋信夫先生（九州大学理学部）と共同執筆させていただいた。当時大学院生であった筆者は液相法によるペプチド合成に明け暮れていたように思う。Merrifieldらにより固相合成法が開発されてからすでに10年以上経っていたが、まだ世の中は液相法が主流であり、「何を合成するか」と同時に「どうやって合成するか」が大きな問題であった。あれから25年、自動合成機やHPLCの普及により、ペプチドは誰でも比較的容易に合成できるようになった。外注専門の業者も多く誕生した。こうした中で筆者が研究対象として選んだのがペプチド毒である。ペプチド毒の多くが分子内に複数のSS結合を有し、合成化学的に「玄人向け」と考えたことは事実であるが、同時に「脳の世紀」と言われる21世紀に神経系に作用するペプチド毒の研究が役に立つと考えたからである。

2. コノトキシンとは

"From Venoms to Drugs"と題する国際会議が1998年にオーストラリアで開かれた。2002年には第2回目が開催される予定である。Venomとは毒腺の発達した生物の毒液のことである。自然界には毒を用いて獲物を捕食する生物が多く棲息し、これらの生物毒は極微量で効果を表し、その作用部位も限定されていることから、上手く利用すれば新しい薬としての応用が期待される。

イモ貝は熱帯から亜熱帯の海に棲息し、毒矢を用いて魚や貝などを捕食する肉食性の巻き貝である。イモ貝の毒腺に含まれる活性成分の多くはペプチドであり、これらは一般にコノトキシンと呼ばれている^{1,2)}。コノトキシンはイオンチャネルに結合してその機能を特異的に阻害することから、神経科学の分野では研究に有用な薬物として広く利用されている。一方でモルヒネに替わる強力な鎮痛薬として実用間近なものもあり、新しい医薬品のリード化合物としても注目されている。本稿では筆者の研究成果を中心にコノトキシン研究の現状を紹介する。

3. コノトキシンの作用部位

コノトキシン研究をリードしてきたのはOlivera（ユタ大学）のグループである³⁾。彼らにより完全なアミノ酸配列が決められた最初のコノトキシンが α -コノトキシンGIである。筆者がかつて所属していた三菱化学生命科学研究所でも1980年代に沖縄産のイモ貝を用いてスクリーニングを開始し、 μ -コノトキシンのアミノ酸配列を決定した。薬理的な解析から神経筋接合部において、 α -コノトキシンはアセチルコリン受容体をブロックし、 μ -コノトキシンは筋肉の Na^+ チャネルを阻害することが明らかとなった。どちらも結果的に筋肉の収縮阻害をおこし、この時点でコノトキシンの致死毒性の本体について一応の回答が得られた（Fig. 1）。

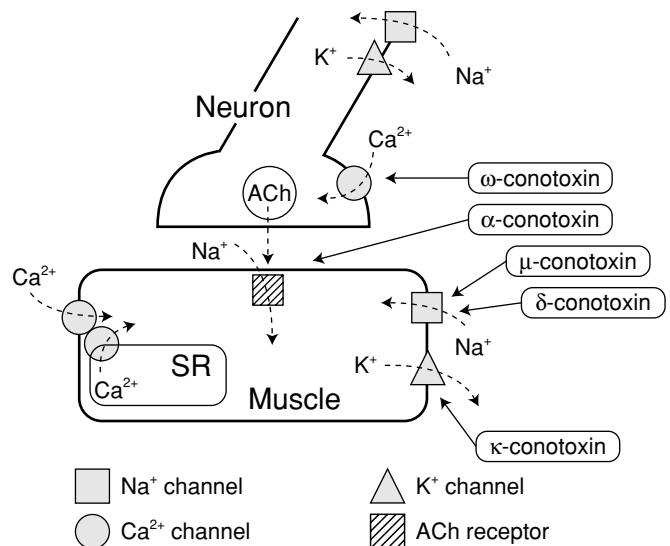


Fig.1 Targets of conotoxins at the neuromuscular junction.

その後 Olivera らは、イモ貝毒のフラクシオンを直接マウスの脳室内に注入することにより、摘出筋標本を使った従来のアッセイ法では見つからなかった多くのペプチドを単離した。震えを起こす "shaker peptide" は神経伝達物質の放出に関わる N 型 Ca²⁺ チャネルを阻害することが明らかとなり、ω-コノトキシンとして知られるこのペプチドは神経科学の研究試薬として広く使用されるのみならず、強力な鎮痛剤としてアメリカで認可される見込みである。最近では筋肉に興奮性硬直をもたらす物質として Na⁺ チャネルの不活性化阻害剤 δ-コノトキシン及び K⁺ チャネル阻害剤 κ-コノトキシンが単離されている。この他にも作用部位の特定されない多くの活性ペプチドが発見されており、イモ貝毒はさながら薬物の宝庫である。

4. イオンチャネル

イオンチャネルは透過するイオンの選択性により Na⁺ チャネル、Ca²⁺ チャネル等に分類され、イオン透過孔を開閉する機構により電位依存性チャネル、リガンド作動性チャネル等に分類される。チャネルポアを形成する α サブユニットを中心にクローニングにより次々と一次構造が明らかにされているが、立体構造を含めその分子としての実体はまだよく解明されていない。コノトキシン類は SS 結合により安定化された球状の立体構造をとっているため、それらの活性部位を明らかにすることにより、相手側のイオンチャネルの立体構造に関する詳しい情報が得られると期待される。

5. コノトキシンの分類

Fig. 2 に代表的なコノトキシンのアミノ酸配列をまとめた。最初のギリシャ文字は作用部位を表す。μ は筋肉の Na⁺ チャネル、ω は電位依存性 Ca²⁺ チャネル、α はアセチルコリン受容体に作用することを意味し、これらに最近 δ (Na⁺ チャネルの不活性化阻害) や κ (K⁺ チャネル阻害) が加わった。次のアルファベットはイモ貝の種類を表しているが、一文字の場合は魚食性のイモ貝、二文字の場合は貝食性あるいは虫食性のイモ貝を表す。例えば、G は *C. geographus* 由来、M は *C. magus* 由来、そして Tx は貝食性の *C. textile* 由来である。アルファベットの次のギリシャ数字は化学構造 (システインの配置) の分類を表し、最後のアルファベットは同一グループの中の固有種の符号である。



Fig.2 Amino acid sequences of conotoxins. Except for O (Hyp), the standard one-letter amino acid code is used.

6. μ-コノトキシン

筆者らが最初に構造活性相関の対象としたのが μ-コノトキシンである。その理由は μ-コノトキシンのアミノ酸配列が筆者の共同研究者により決定されたからである⁴⁾。22 残基の配列中 6 残基が Cys であり、Arg と Lys を多く含む強塩基性のペプチドである。

結合阻害実験により μ-コノトキシンは Na⁺ チャネル上でフグ毒テトロドトキシンと同じ部位に結合することが明らかにされているが、テトロドトキシンが神経と筋肉の両方のチャネルを阻害するのに対し、μ-コノトキシンは筋肉のチャネルに特異的である。このように μ-コノトキシンは筋肉と神経のチャネルを区別する初めての薬物として注目された⁵⁾。

筆者らは μ-GIIIA の活性部位を明らかにするため系統的なアミノ酸置換アナログの合成を行った。合成法の詳細については別に解説しているため、そちらを参照していただきたい⁶⁾。Fig. 3 は合成したアナログの摘出ラット横隔膜標本の電気刺激による収縮に対する阻害効果をまとめた結果である⁷⁾。この図から、塩基性残基の置換では活性が低下し、酸性残基の置換では活性が上昇する傾向があることが認められる。従って μ-GIIIA の活性には分子全体の塩基性が重要である。中でも最も大きな活性低下が見られたのが 13 位の Arg を置換した場合である。興味深いことに 13 位の Arg は Lys に置換しても活性が低下するのに対し、19 位の Arg は Lys 置換では活性に影響がなかった。このことは 13 位の場合には単なる塩基性ではなく、グアニジノ基の存在がチャネルとの結合に重要なことを示している。

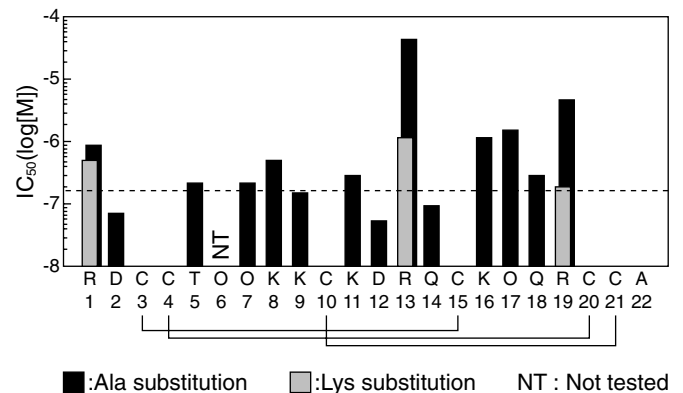


Fig.3 Inhibitory effects of μ-conotoxin GIIIA analogs on the twitch contraction of the rat diaphragm. The dashed line shows the IC₅₀ value of the native toxin.

コノトキシンのように分子内に複数の SS 結合をもつペプチドの場合は環化反応 (SS 結合形成反応) の成否が収率を大きく左右する。一連のアナログ合成の過程で、活性中心の Arg を置換した場合を含め大半のアナログでは高収率で目的物が得られたのに対し、Hyp を置換した場合には環化反応で主生成物が見られず、特に 6 位を置換したものは最終的に目的物が単離出来なかった。このことは Hyp の環状構造が局所的な立体構造を制限し、結果的に分子のフォールディングに影響していることを示唆している。

NMRにより解析された結果によれば μ -GIIIAは比較的平板な三角おにぎりのような立体構造をとっており、13位のArgはその一つの角に位置する (Fig. 4)。 μ -GIIIAの場合、立体構造中で活性に重要な残基 (Arg13、Lys16、Hyp17、Arg19) は分子の一方に集中し、他方に立体構造形成に重要な残基 (Hyp6、Hyp7) があることから、分子全体が活性ドメインと構造ドメインにきれいに分けられることが示唆された⁷⁾。また、13位のArgをAla置換したアナログと天然物の立体構造にほとんど相違が無いことから、活性低下は立体構造変化によるものでないことを確認した⁸⁾。

最近筆者らは上記の構造活性相関の結果に基づき活性部位の反対側にある5位のThrをCysに置換し任意の蛍光プローブを導入した誘導体を調製した⁹⁾。

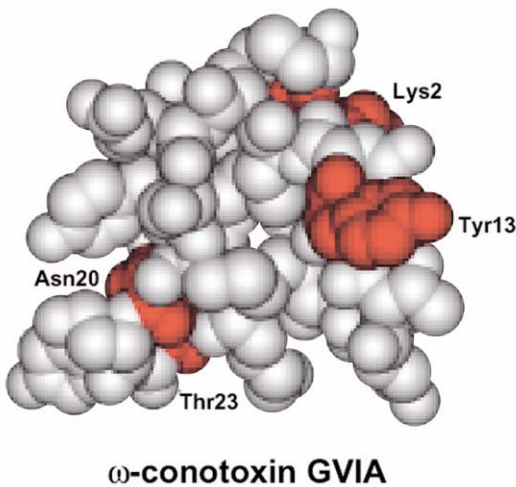
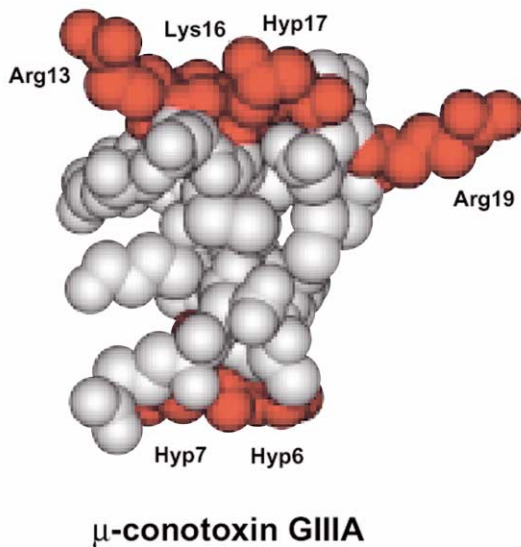


Fig.4 Structure-activity relationships of conotoxins. Dark color indicates the residues essential for the activity or folding.

7. ω -コノトキシン

電位依存性Ca²⁺チャンネルはその性質によっていくつかのサブタイプに分類され、チャンネル孔を形成する α_1 サブユニットの構造もその多くが遺伝子の解析から明らかにされている。その中でN型 (α_{1B}) 及びP/Q型 (α_{1A}) は神経系に分布し、神経伝達物質の放出に深くかかわっている。

Ca²⁺チャンネルを阻害する初めてのコノトキシンとして *C. geographus* から単離された ω -GVIAはN型のチャンネルを不可逆的に阻害する。そのアミノ酸配列は1984年Oliverらにより報告され¹⁰⁾、SS架橋様式は1986年榊原らにより決定された¹¹⁾。

筆者らは ω -GVIAの活性部位を解明するため系統的なアミノ酸置換をおこなった (Fig. 5)^{12, 13)}。その結果13位のTyrの置換が結合活性に最も大きな影響を与えた。また、この残基をPheに置換しても活性が大きく低下することから、水酸基が活性に必須であることが明らかになった。13位のTyrは多くの ω -コノトキシんに保存されており、サブタイプ特異性にかかわらず、Ca²⁺チャンネルに対する共通の阻害部位であることが示唆された。Tyr13に次いで重要なのは2位のLysであったが、この両残基は分子内で近接して存在し、その領域がCa²⁺チャンネルとの結合部位であることが示唆された。

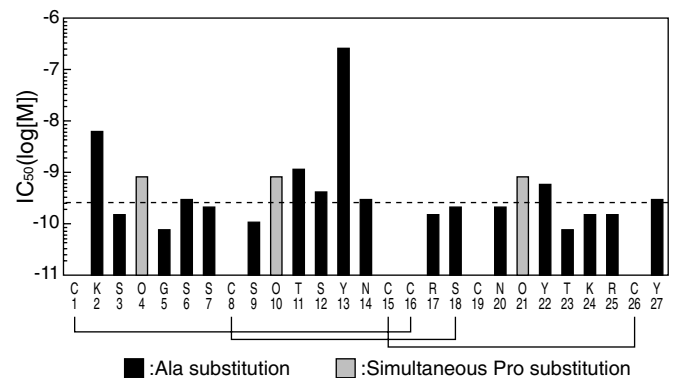


Fig.5 Inhibitory effects of ω -conotoxin GVIA analogs on the binding of ¹²⁵I- ω -conotoxin GVIA to chick brain synaptic plasma membranes.¹³⁾ The dashed line shows the IC₅₀ value of the native toxin.

また、一連のアナログ合成の過程でAsn20とThr23をAla置換するとSS結合形成が上手くいかないという現象を見つけた。ちょうどその時期、4つのグループから相次いでNMRによる立体構造解析の結果が発表されたが、その結果、 ω -GVIAは分子内に3本の β -ストランドよりなる逆平行 β -シート構造をもち、Asn20とThr23の側鎖が分子内水素結合によりこの β -シート構造を安定化していることが示された。したがって筆者らの結果は分子内水素結合がペプチドのフォールディングに重要であることを示す非常に興味深い事実である。

ω -GVIAの構造活性相関の結果もFig. 4のようにまとめられる。興味深いことに μ -GIIIAの場合と同様、分子全体を活性ドメインと構造ドメインに分けることができる。このことは、活性ドメイン上にある残基を変えることにより全体の構造には影響することなく、チャンネルに対する選択性を変えられる可能性を示唆する。

ω -GVIAはN型チャンネルに作用するがP/Q型チャンネルには作用しない。P/Q型チャンネルは*C. magus*から単離された ω -MVIICにより阻害されるが、 ω -MVIICはN型にも弱く結合するので、P/Q型のみを選択的に阻害するコノトキシンは知られていない。そこで筆者らは ω -MVIICを出発物質としてP/Q型選択的なアナログの開発を目指した。まず比較の対象として配列が類似しているがN型のみを阻害する ω -MVIIAの合成と立体構造解析をおこなった^{14, 15}。その結果 ω -MVIIAと ω -MVIICの立体構造はよく似ていたため、チャンネルサブタイプの識別は立体構造の違いによるものではなく、構成アミノ酸の違いによるものと考えられた。そこでまず ω -MVIIAと ω -MVIICのキメラアナログを合成した^{16, 17}。その結果、N型に対する結合は分子の前半部分で決まるのに対し、P/Q型では結合部位は分子全体に広がっていることが示唆された。さらに ω -MVIICに関して系統的なAla置換をおこなった結果、Lys2、Thr11、Tyr13の置換が両方のサブタイプに対する親和性を減少させたのに対し、P/Q型に対してはLys4やArg22の置換でも大きな親和性の低下が見られた¹⁸。このように ω -MVIICの場合は μ -GIIIAや ω -GVIAに見られたほど顕著な機能ドメインの分離は見られない。これは、 ω -MVIICの選択性のルーズさと関係しているのかもしれない。

ω -MVIICによるチャンネルの選択性が特定の残基によるものではないことが示唆されたので、筆者らは複数の残基を同時に置換して組み合わせの効果を調べることにした。そのために複数のアナログを同時に混合物として合成するコンビナトリアル法を開発した。通常のココンビナトリアル合成では装置から切り出した時点でライブラリーは完成しているが、筆者らの場合、合成機から得られるのは鎖状前駆体の混合物である。これを混合物のまま空気酸化した後精製するというのが筆者らの戦略である。結果は予想外に順調で、計6回の合成操作で50種近いアナログを単離することが出来、その中にはP/Q型チャンネルに高い選択性を示すものも見出された¹⁹。

L型(α_{1C})Ca²⁺チャンネルはジヒドロピリジン誘導体により阻害されるが、最近、*C. textile*から貝のジヒドロピリジン感受性のチャンネルを阻害する ω -TxVIIが単離された²⁰。 ω -TxVIIは既知の ω -コノトキシン類と異なり、酸性でかつ疎水性が非常に高いという特徴を持っており、そのため化学合成は困難であった。筆者らは多くの条件を検討して、高濃度の有機溶媒を含むトリス塩酸緩衝液がSS架橋反応に有効であることを見出し、大量合成に成功した²¹。さらにNMRにより ω -TxVIIが3本の β -ストランドよりなる逆並行 β -シート構造をとることを明らかにした²²。今後 ω -TxVIIの構造活性相関を解明することにより、詳細なCa²⁺チャンネル識別機構が明らかになると期待される。

8. λ -コノトキシン

1998年にオーストラリアで開かれた国際会議で知り合ったシン

ガポール大学のGopal博士からシンガポール産の種々の生物毒に関して共同研究の申し出があった。その中に、分子内にSSを2本もつコノトキシンが含まれていた。架橋様式を確認する目的で選択的2段階法により α -コノトキシン型のSS架橋(C1-C3, C2-C4)を形成させたところ天然物と全く一致しなかった。まさかと思いつながらC1-C4, C2-C3の組み合わせで合成したところ天然物と一致した。それがFig. 2に示す λ -コノトキシンである²³。貝食性のイモ貝から単離された毒であるが、マウスの脳室内投与で、あるものは興奮性作用を、あるものは弛緩性の作用を示す。まだ、具体的な作用部位(チャンネル)は特定されていないが今後の展開が楽しみなペプチドである。

9. 毒から薬へ

ω -コノトキシンMVIIAは商品名ziconotideとして米国でPhase IIIの試験を終えて認可に向けた最終段階にあると聞いている。これまでの試験ではモルヒネの100倍から1000倍強力な鎮痛効果が認められ、アメリカの大衆誌でも"From fish killer to pain killer"としてセンセーショナルに取り上げられたそうである。ただし、開発の当事者に聞いたところではポンプで脊髄中に直に送り込むという投与方法がネックになっているとのことであった。そのため ω -コノトキシンMVIIAの活性残基をテンプレートの上にのせたモデル化合物の合成を試みている企業もある。研究用試薬としての有用性は実証済みであるが、コノトキシンをリード化合物とする医薬の開発はこれからが本番であろう。

参考文献

- 1) W. R. Gray, B. M. Olivera, and L. J. Cruz, *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 665 (1988).
- 2) R. A. Myers, L. J. Cruz, J. E. Rivier, and B. M. Olivera, *Chem. Rev.*, **93**, 1923 (1993).
- 3) B. M. Olivera, and L. J. Cruz, *Toxicon*, **39**, 7 (2001).
- 4) S. Sato, H. Nakamura, Y. Ohizumi, J. Kobayashi, and Y. Hirata, *FEBS Lett.*, **155**, 277 (1983).
- 5) L. J. Cruz, W. R. Gray, B. M. Olivera, R. D. Zeikus, L. Kerr, D. Yoshikami, and E. Moczydlowski, *J. Biol. Chem.*, **260**, 9280 (1985).
- 6) 佐藤一紀 (1996) 廣川薬科学実験講座第3巻、創薬化学の基礎となる先導物質の合成法 (兼松編) pp. 97-108, 廣川書店, 東京
- 7) K. Sato, Y. Ishida, K. Wakamatsu, R. Kato, H. Honda, Y. Ohizumi, H. Nakamura, M. Ohya, J.-M. Lancelin, D. Kohda, and F. Inagaki, *J. Biol. Chem.*, **266**, 16989 (1991).
- 8) K. Wakamatsu, D. Kohda, H. Hatanaka, J.-M. Lancelin, Y. Ishida, M. Oya, H. Nakamura, F. Inagaki, and K. Sato, *Biochemistry*, **31**, 12577 (1992).
- 9) M. Nakamura, Y. Ishida, T. Kohno, K. Sato, and H. Nakamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 374 (2001).
- 10) B. M. Olivera, J. M. McIntosh, L. J. Cruz, F. A. Luque, and W. R. Gray, *Biochemistry*, **23**, 5087 (1984).
- 11) Y. Nishiuchi, K. Kumagaye, Y. Noda, T. X. Watanabe, and S. Sakakibara, *Biopolymers*, **25**, S61 (1986).
- 12) K. Sato, N.-G. Park, T. Kohno, T. Maeda, J.-I. Kim, R. Kato, and M. Takahashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**, 1292 (1993).
- 13) J.-I. Kim, M. Takahashi, A. Ogura, T. Kohno, Y. Kudo, and K. Sato, *J. Biol. Chem.*, **269**, 23876 (1994).
- 14) J.-I. Kim, M. Takahashi, A. Ohtake, A. Wakamiya, and K. Sato, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **206**, 449 (1995).
- 15) T. Kohno, J.-I. Kim, K. Kobayashi, Y. Kodaera, T. Maeda, and K. Sato, *Biochemistry*, **34**, 10256 (1995).
- 16) K. Sato, C. Raymond, N. Martin-Moutot, T. Sasaki, A. Omori, A. Ohtake, J.-I. Kim, T. Kohno, M. Takahashi, and M. Seagar, *FEBS Lett.*, **414**, 480 (1997).
- 17) K. Sato, C. Raymond, N. Martin-Moutot, T. Sasaki, A. Ohtake, K. Minami, C. V. Renterghem, M. Takahashi, and M. J. Seagar, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **269**, 254 (2000).
- 18) K. Sato, C. Raymond, N. Martin-Moutot, T. Sasaki, A. Ohtake, K. Minami, C. V. Renterghem, J.-I. Kim, M. Takahashi, and M. J. Seagar, *FEBS Lett.*, **469**, 147 (2000).
- 19) T. Sasaki, K. Kobayashi, T. Kohno, and K. Sato, *FEBS Lett.* **466**, 125 (2000).
- 20) M. Fainzilber, J. C. Lodder, R. Schors, K.-W. Li, Z.-H. Yu, A. L. Burlingame, W. P. M. Geraerts, and K. S. Kits, *Biochemistry*, **35**, 8748 (1996).
- 21) T. Sasaki, Z.-P. Feng, R. Scott, N. Grigoriev, N.-I., Syed, M. Fainzilber, and K. Sato, *Biochemistry*, **38**, 12876 (1999).
- 22) K. Kobayashi, T. Sasaki, K. Sato, and T. Kohno, *Biochemistry*, **39**, 14761 (2000).
- 23) R. A. Balaji, A. Ohtake, K. Sato, P. Gopalakrishnakone, R. M. Kini, S.-K. Tong, and B.-H. Bay, *J. Biol. Chem.*, **275**, 39516 (2000).

著者紹介

氏名：佐藤一紀 (Kazuki Sato)

年齢：51歳 (1950年8月30日生)

所属：福岡女子大学人間環境学部環境理学科 教授

連絡先：〒813-8529 福岡市東区香住ヶ丘 1-1-1

TEL/FAX : 092-673-0262

E-mail: sato@fwu.ac.jp

URL: <http://www.fwu.ac.jp>

出身大学：九州大学大学院理学研究科博士課程

学位：理学博士 (九州大学)

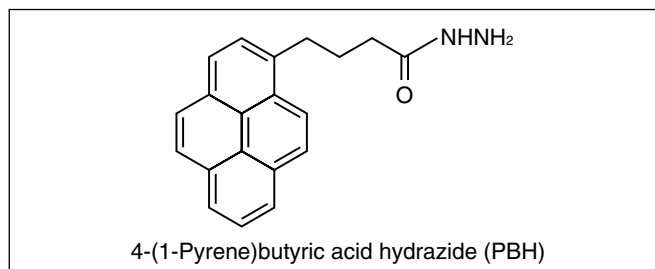
現在の研究テーマ：ペプチド生物毒の構造活性相関

趣味：ホームビデオ撮影 (大学の行事を大声で解説を入れながら撮影するのでひんしゅくを買っている)

実用的蛍光誘導体化

10

福岡大学薬学部
山口政俊・能田 均



ヒト尿中ジカルボン酸(Chart 1)は、特定酵素の欠損を起因とする種々の有機酸尿症等において増加するので、その測定は疾病の診断や病因究明に利用されている。有機酸尿症の多くは先天的な代謝異常が原因であったり、乳幼児期に発症したりすることが多いので、その簡便なマスキングや精査診断法の開発が望まれている。これまでのところ、GC/MSによる一斉分析が行われているが、前処理法の煩雑さ、長い分析時間や高い分析コストの面等に問題があり、マスキング法への適用はなされていない。そこで、尿中ジカルボン酸分析にエキシマー蛍光誘導体化法を適用し、有機酸尿症のマスキングのための蛍光スペクトル法(バッチ法)及び精査診断のためのHPLC法を開発した。それらの操作法をChart 1に示す。

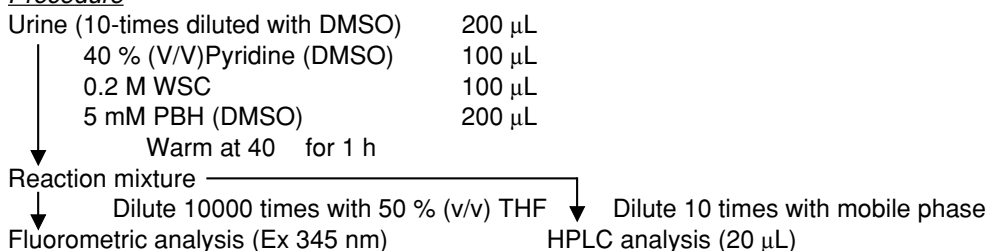
蛍光スペクトル分析(マスキング):尿中には種々のジカルボン酸類が存在する。それらをエキシマー蛍光誘導体化し、その蛍光強度を計測することにより、添加した試薬(PBH)やモノカルボン酸類の妨害をほとんど受けることなく、ジカルボン酸類を選択的に計測することができる。本法の定量では、ジカルボン酸量の総和をアジピン酸量として求める。

12.4. ジカルボン酸のエキシマー蛍光誘導体化^{1,2)}

前回、エキシマー蛍光誘導体化法及びそのポリアミン類計測への適用について説明した。ポリアミン類は分子内に2~4個のアミノ基を有しており、それらがいずれもピレン試薬で誘導体化されることでエキシマー蛍光現象が発現する。カルボキシル基用のピレン誘導体化試薬(PBH)を使用することにより、分子内に複数個のカルボン酸構造を有するポリカルボン酸も同様にエキシマー蛍光誘導体化が可能である。ここではジカルボン酸分析への適用について述べる。

Chart.1 Procedure for the fluorescence derivatization of urinary dicarboxylic acids

Procedure



HPLC conditions

Column: YMC-Pack ODS-AM (250 \times 4.6 mm I.D., particle size 5 μ m, YMC)

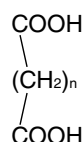
Mobile phase: Aqueous 67 % (v/v) CH₃CN

Flow rate: 1.0 mL/min

Fluorescence detection: Ex 345 nm, Em 475 nm

Structures

n	Dicarboxylic acid	Abbreviation
3	Glutaric acid	G.A.
4	Adipic acid	A.A.
6	Suberic acid	Sub.A.
8	Sebacic acid	Seb.A.



尿をジメチルスルホキシドで10倍希釈し、PBHで誘導体化する。反応液を50%テトラヒドロフランで10000倍希釈し、蛍光スペクトルを計測する。図1(A)及び(B)に、それぞれ健常人及び型グルタル酸尿症(有機酸尿症の一種)患者から得られたスペクトルを示す。総ジカルボン酸量は、それぞれ0.38及び10.7(μmol アジピン酸/mL尿)であった。このように、健常人尿中には数十~数百nmol/mL尿程度のジカルボン酸しか含まれていないが、患者尿中にはその数十~数千倍のジカルボン酸が含まれている。従って、スペクトル分析によりエキシマー蛍光強度を計測することで、有機酸尿症のマススクリーニングが可能である。

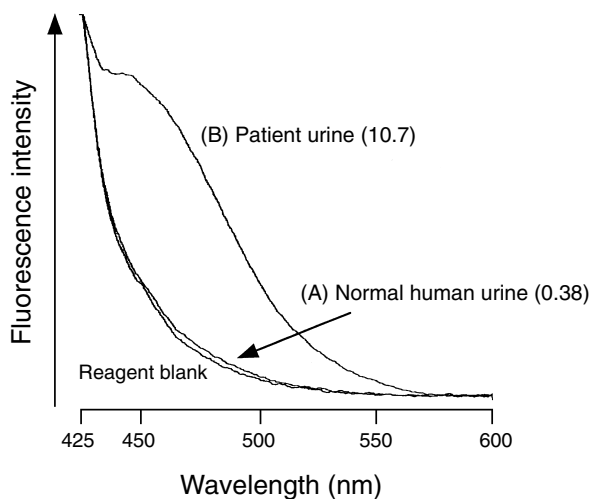


図1. Fluorescence emission spectra obtained with the urine samples of (A) normal human and (B) the patient of glutaric aciduria type. Concentrations in parentheses: μmol abipic acid /mL urine.

HPLC分析(精査診断法): マスクリーニングにより有機酸尿症患者を抽出した後、その精査診断を行う必要がある。そのためには、ジカルボン酸類を分別定量することが必須で、HPLC法を開発した。

蛍光スペクトル法で得られた反応液を67%アセトニトリル(HPLC移動相)で10倍希釈したものをHPLCに注入する(Chart 1)。このとき、健常人及び型グルタル酸尿症患者から得られたクロマトグラムを図2(A)及び(B)に示す。各ジカルボン酸(グルタル酸、アジピン酸、スベリン酸及びセバシン酸)が分離定量された。HPLC条件を変えることにより、その他のジカルボン酸の分離定量も可能で、これにより本症の精査診断が可能になるであろう。

これらの方法は、従来のGC/MSよりはるかに簡便であり、本症のマススクリーニング及び精査診断に有効である。

12.5. ビスフェノール化合物のエキシマー蛍光誘導体化³⁾

ポリフェノール化合物は、その分子内に複数個のフェノール性水酸基を有しているため、ピレン構造を有する水酸基用のラベル化試薬(PBC)との組み合わせによりそれらのエキシマー蛍光検出が可能である。ここではビスフェノール化合物(Chart 2)分析への適用について述べる。

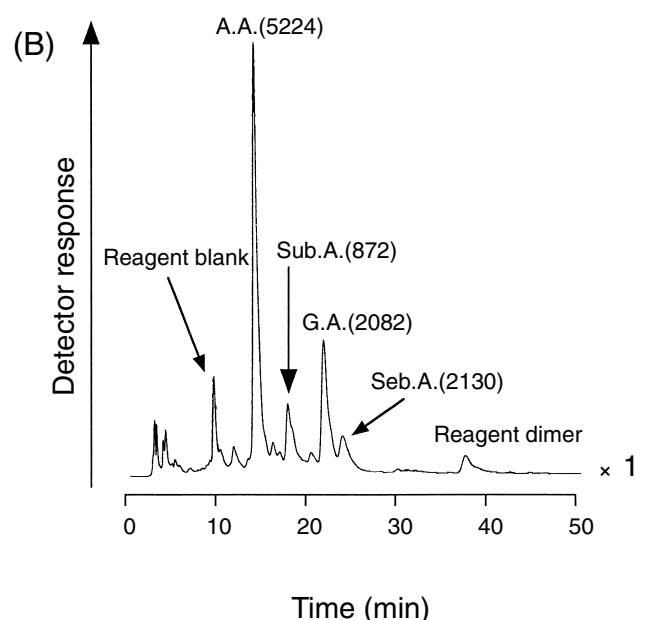
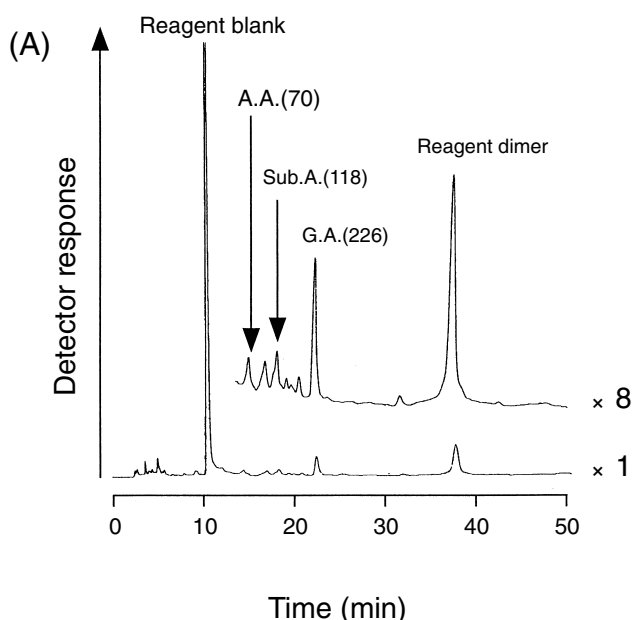
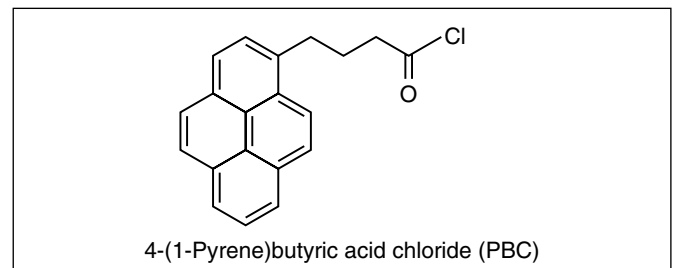


図2. Chromatograms obtained with the urine samples of (A) normal human and (B) the patient of glutaric aciduria type. Concentrations in parentheses: nmol/mL urine.

外因性内分泌攪乱物質（環境ホルモン）との疑いが指摘されているビスフェノールAは、ポリカーボネート樹脂やエポキシ樹脂などの原料として用いられている。そのため、これら樹脂からの溶出が大きな社会問題となっており、特に乳幼児に対する影響が懸念されている。そこでエキシマー蛍光誘導体化法によるポリカーボネート製ほ乳びん溶出液中のビスフェノールA分析法を開発した。

ほ乳びん溶出液の前処理法、誘導体化法及び分析条件をChart 2に、この操作法に従って分析したときのクロマトグラムを図3に示す。本法で、未使用未洗浄ほ乳びんから極微量のビスフェノールAの溶出が確認されたが、溶出される量は使用・洗浄と共に徐々に低い値となった（表1）。ポリカーボネート製ほ乳びんを乳幼児に対して使用する場合には、使用前に良く洗浄し、樹脂表面に付着しているビスフェノールAだけでも除去してやる必要があることを示唆している。

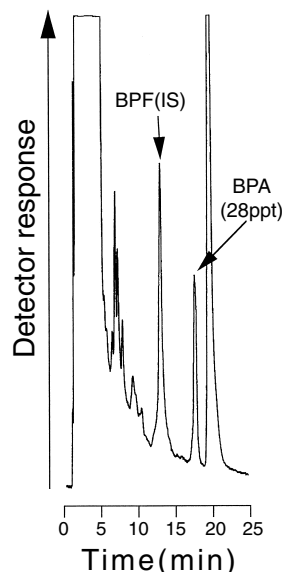


図3. Chromatogram obtained with the extract from polycarbonate baby-bottle.

Chart.2 Analysis of bisphenol A migrated from polycarbonate baby-bottle

Procedure

Extract from baby-bottle	100 mL
1.0 μM Bisphenol F (I.S.)	20 μL
1.0 M HCl	1.0 mL
Load onto Oasis HLB (60 mg, waters)	
Dry <i>in vacuo</i>	
Elute with CH ₃ CN (0.5 mL, 4 times)	
Evaporate to dryness under N ₂ stream	
Residue	
1.0 M K ₂ CO ₃	5 μL
2.5 mM PBC	200 μL
Heat at 100 for 30 min	
Reaction mixture	
Apply onto HPLC (20 μL)	

HPLC conditions

Column: TSKgel SuperOctyl (100 × 4.6 mm I.D., particle size 2 μm, Tosoh)
 Mobile phase: Aqueous 75 % (v/v) CH₃CN
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Fluorescence detection: Ex 345 nm, Em 475 nm

Structures

Compound	R	Abbreviation
2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane [Bisphenol A]	CH ₃	BPA
Bis(4-hydroxyphenyl)methane [Bisphenol F]	H	BPF

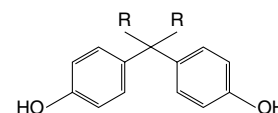


表1 ポリカーボネート製ほ乳びんからのビスフェノールAの溶出

ほ乳びん	ビスフェノールAの溶出量 (ppb)		
	未洗浄ほ乳びん	1度洗浄したほ乳びん	3度洗浄したほ乳びん
1	0.002	0.001	< 0.001
2	0.053	0.013	< 0.001
3	0.028	0.008	< 0.001
4	0.015	0.004	< 0.001

このように、エキシマー蛍光誘導体化は高選択性、高感度性を併せ持つ実用的な蛍光誘導体化の手段である。現在、同様の構造を有する医薬品や生体成分、あるいは他の化合物群（糖、チオール類など）への適用研究を進めている。

13. その他の方法

感度や選択性を向上させる試みとして、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)等の蛍光特性を利用する蛍光誘導体化法の研究も行っている⁴⁾。

また、誘導体化という項目をもっと広く解釈すれば、各種成分を対象にした電気化学や化学発光、MS検出用の誘導体化法も報告されている。蛍光誘導体化法との棲み分けがどのようになされるのか、これからの動向を見守りたい。

14. おわりに

10回にわたり、主として生体関連物質についての蛍光誘導体化法を概観した。蛍光誘導体化法は『単なる前処理法』の一環ではないという捉え方をされることも多いが、我々がそうであるように、多くの研究者は自らが挑戦してきた誘導体化の方法論が『単なる前処理法』ではないと自負しているに違いない。蛍光誘導体化法に馴染みのない方も『論より実』、それぞれの研究分野に本法を取り入れられることを期待したい。分析領域の今後の発展のために、我々も微力ながらお手伝いしていくつもりである。

約3年間、本稿にお付き合いいただいた方に心よりお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 山口政俊ら、第13回生体成分の分析化学シンポジウム講演要旨集 p103 (1999).
- 2) 荒木淳也ら、日本分析化学会第49年会講演要旨集 p115 (2000).
- 3) 吉田秀幸ら、日本薬学会第121年会講演要旨集 4 p121 (2001).
- 4) 吉武誠ら、日本薬学会第121年会講演要旨集 4 p121 (2001).

著者プロフィール

山口 政俊 (Masatoshi Yamaguchi)

所属：福岡大学薬学部薬品分析学教室 教授

連絡先：〒814-0180

福岡市城南区七隈 8-19-1

TEL 092-871-6631 ext.6618

FAX 092-863-0389

E-mail masayama@fukuoka-u.ac.jp

出身：九州大学大学院薬学研究科博士課程退学
薬学博士

研究テーマ：臨床・医薬品・薬学研究を志向する分析化学

趣味：スポーツ（見る・聞く・試す）

能田 均 (Hitoshi Nohta)

所属：福岡大学薬学部薬品分析学教室 助教授

所属：九州大学大学院薬学研究科博士課程退学

薬学博士

連絡先：〒814-0180

福岡市城南区七隈 8-19-1

TEL 092-871-6631 ext.6619

FAX 092-863-0389

E-mail nohta@fukuoka-u.ac.jp

研究テーマ：蛍光、化学発光を利用する分析法の開発

趣味：テレビショッピング、100円ショッピング

Topics on Chemistry

SAT-3 を用いた上水中残留塩素測定法

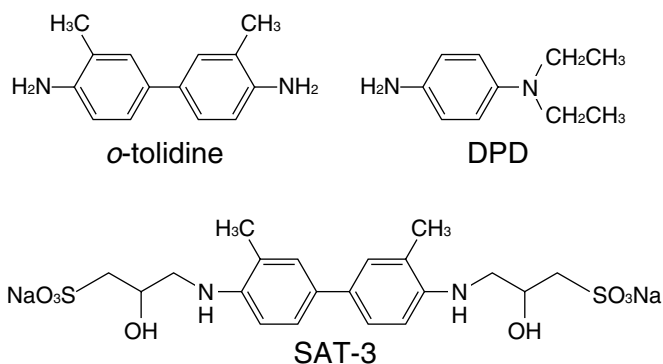
(株) 同仁化学研究所 大瀬戸 文夫

20世紀初頭、英国や米国などいくつかの国々で次亜塩素酸塩を使用した上水の消毒が行われていたが、その後多くの地域にその処理方法が普及し、いろいろな改良が進められ、現在では大規模な上水道では液化塩素を用いた処理が行われている。しかしながら、少量の水の消毒には次亜塩素酸塩が使用されている。

塩素は水の消毒に使用するような低濃度ではそのほとんどが完全に加水分解して次亜塩素酸(HClO)と塩酸を生成する。HClOは水中で解離して次亜塩素酸イオン(ClO⁻)となる。これらHClOやClO⁻などを遊離残留塩素という。水中にアミン類があると塩素はそれらと反応してクロロアミン類を生成する。クロロアミン類は結合残留塩素と呼ばれるが、遊離残留塩素より殺菌力は弱い。

水道法施行規則第16条第3号に「給水栓における水が遊離残留塩素を0.1 mg/l(結合残留塩素の場合は0.4 mg/l)以上保持するよう塩素消毒すること。ただし供給する水が病原生物に著しく汚染されるおそれがある場合、または病原生物に汚染されたことを疑わせるような生物もしくは物質を多量に含むおそれがある場合の給水栓における水の遊離残留塩素は0.2 mg/l(結合残留塩素の場合は1.5 mg/l)以上とする。」と規定されているが、そのため、常に水道中の塩素濃度を監視し、管理しておく必要がある。

水道中の残留塩素を測定する方法はいくつかあるが、操作の容易さ、簡便性また感度の面から吸光度法が最も頻繁に使用されている。吸光度法の一つ、*o*-tolidine(OT)法は安価でかつ操作が簡便な検査方法として広く使用されてきたが、OTは発癌性が疑われている物質であり、また労働安全衛生法などで特定化学物質として規制され取り扱いに制限があることから、2000年12月に「水道水質に関する基準の制定について」などの一部改正が勧告され、OT法が平成14年度に公定法から削除されることになっている。その方法に代わり、*N,N*-diethylphenylenediamine(DPD)法の使用が推奨されてきており、実際米国でもこの方法が残留塩素測定に採用されている。



DPD法も原理的にはOT法と同様試薬の残留塩素による酸化発色反応を基本としており、発色後、溶液は桃色を呈する。DPDには発癌性はないと言われているが、OTと同様脂溶性が高く、生体への蓄積性や毒性の面で安全であるとは言い難い。また、感度や試薬溶液の安定性に問題があると言われている。

我々はOTの誘導体で、水溶性を兼ね備えた化合物SAT-3を開発しているが¹⁾、その残留塩素測定への応用について検討を行い、

DPD法より測定に適した方法であることがわかったので報告する。

1. 方法

1) 試薬および溶液調製

SAT-3は同仁化学研究所製のものを使用した。CHAPSO(33 mmol/l)、EDTA(56 mmol/l)を含む1 mol/lの酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.2)にSAT-3を6.7 mmol/lの濃度で溶解した溶液(SAT-3溶液)を使用した。

2) 残留塩素濃度測定方法

SAT-3溶液(0.15 ml)を試料水(2.85 ml)に添加し、ただちに670 nm付近の吸光度を測定する。濃度既知の塩素溶液(実際には次亜塩素酸溶液)0.05 ~ 3.0 ppmを調製し、同様にして発色させそれぞれの濃度における吸光度を塩素濃度に対してプロットした検量線を作成し、その検量線から実際の塩素濃度を算出する。DPD法及びOT法については、上水試験法に基づき行った。

3) SAT-3の細胞毒性試験

例えばHeLa細胞などの培養細胞を、10%のFBSを含むminimum essential medium(MEM)に懸濁し、 1.2×10^4 cells/wellの割合で96穴マイクロプレートに播種し37℃で48時間前培養する。培養液を除き、様々な濃度のSAT-3、DPDあるいはOTを加えたMEM溶液を、それぞれのwellに添加し更に48時間培養する。その後、MEMで2回洗浄しCell Counting Kit-8(CCK-8、同仁化学研究所製)を各wellに10 μ lづつ添加し37℃で1時間培養後450 nmの吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定する。

2. 結果および考察

SAT-3の溶液には界面活性剤としてCHAPSOを、また金属のマスキング剤としてEDTAを添加している。DPD法の場合、Al、CuあるいはFeが測定に影響することが知られているが、SAT-3溶液の場合、EDTAを添加することにより、Al、Cu、Fe以外にもZn、Mn、MgあるいはCaなどが高濃度存在する場合でも測定にほとんど影響しないことを確認している。

Fig.1にSAT-3、DPD及びOTを1 ppmの塩素を含む水に添加した時の吸収スペクトルを示す。SAT-3の吸光度はDPDに対して約2倍、OTに対して約1.5倍大きく、また最大吸収波長も674 nmとOTのそれに対して約60 nmほど長く青色の色調変化も見やすいなどの利点がある。

DPDは試薬溶液の安定性が非常に悪く、測定に際し用時調製する必要がある。それに対してSAT-3やOTの溶液安定性は高く長時間放置しても発色はほとんど起こらない。一方、発色後の安定性はOTが最も悪く、発色後ただちに退色する。しかしながら、SAT-3は発色後も色素安定性が高く、数時間放置しても退色は見られなかった。

Fig.2に塩素濃度を0.05 ppmから3.0 ppmに変化させた時のSAT-3の吸収スペクトル変化を示す。各塩素濃度におけるSAT-3の674 nmにおける吸光度を塩素濃度に対してグラフにプロットすると相関係数が0.9998と良好な直線性を示すことがわかった。

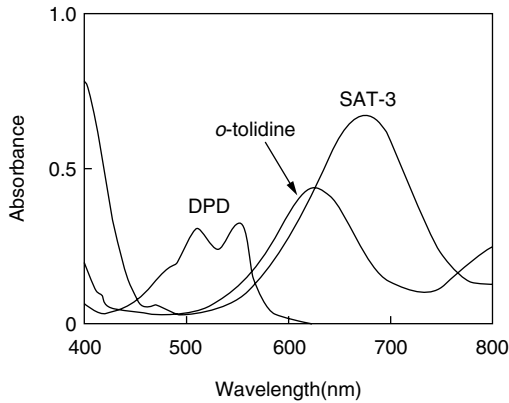


Fig.1 1ppmの塩素を含む溶液中のSAT-3、DPD及びOTの吸収スペクトル
SAT-3及びOTの試薬終濃度は0.33 mmol/l、DPDについては1.52 mmol/l

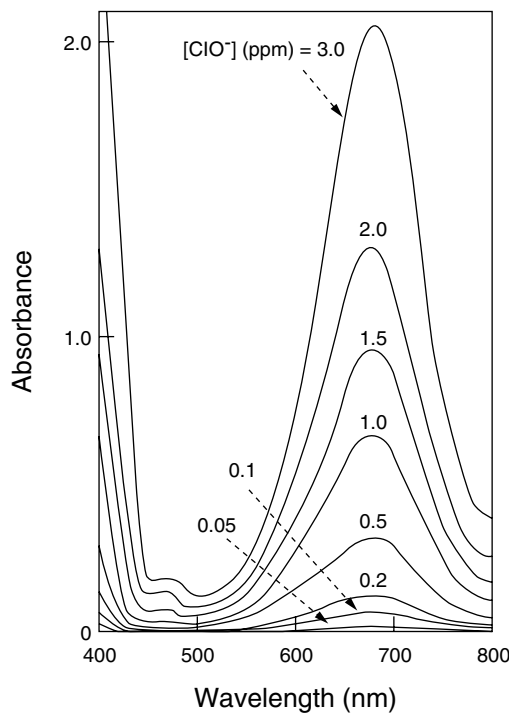


Fig.2 塩素濃度(0.05-3.0 ppm)中のSAT-3の吸収スペクトル

SAT-3及び公定法で推奨されているDPD法を使用して熊本県内の5箇所から採取した実試料中の残留塩素濃度を測定した。その結果をFig.3に示すが、SAT-3法とDPD法には高い相関性があることがわかる(相関係数R=0.989)。

次に、SAT-3の細胞毒性について調べた。HeLa細胞の培養液に各種試薬を添加したあとの生細胞数を細胞増殖アッセイキットCCK-8にて求めた。その結果をFig.4に示す。DPDは最も細胞毒性が高く、図から求めたLD₅₀は37 ppmであった。OTはDPDよりも若干細胞毒性が低くそのLD₅₀は92 ppmとDPDの約2倍であった。それに対して、SAT-3のLD₅₀はDPDやOTより2桁

大きく、4,800 ppmであり、10,000 ppmという高濃度域においても細胞の生存が可能であるなど、非常に毒性が低いことが分かった。

DPDやOT自体、脂溶性であるために、細胞膜を容易に透過するのに対して、SAT-3は水溶性が高く細胞膜を透過しにくいためにこのような効果があると思われる。

また、SAT-3を試験機関に送り、新AMES II試験を用いた変異原性の有無を調査してもらったが、その結果、SAT-3には変異原性がないことが確認された。

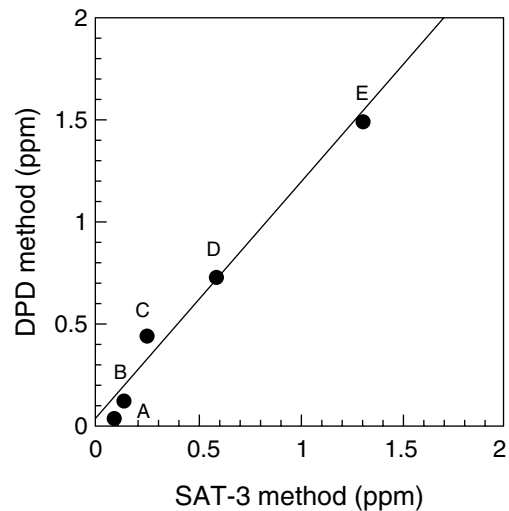


Fig.3 SAT-3及びDPDを用いた実試料の測定
熊本市内各所から採集した試料：飲料水(A)、地下水(B)、水道水(C)、井戸水(D)及びプール(E)

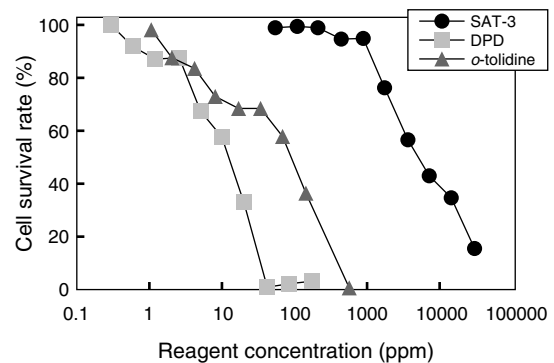


Fig.4 HeLa細胞を用いたSAT-3,DPD及びOTの細胞毒性試験

このように、SAT-3法はDPD法やOT法に比べ、i) 高感度、ii) 測定波長が長い、iii) 試薬溶液及び発色後の安定性が高い、iv) 細胞毒性が非常に低い、などの利点があり、残留塩素測定に適した方法であることが分かった。

参考文献

1) M. Mizoguchi, M. Ishiyama, M. Shiga, K. Sasamoto, *Anal. Commun.*, **35**, 179 (1998).

Topics on Chemistry

‘タンパク質の死’を誘導する

(株)同仁化学研究所 佐々本 一美

全ての生命に限りがあるように、生命活動を育む全てのタンパク質にも寿命がある。その役割に応じて、短いものは分のオーダーから数週間程度の寿命を持つものまで様々だが、役割を終えたタンパク質は新生タンパク質に常に置き換えられており、ターンオーバーという言葉で表現される。寿命を迎えたタンパク質がどのように識別されるのか、具体的に何が寿命(代謝的安定性)を決めるのか詳細は不明だが、寿命がきたタンパク質の処理のメカニズムについてはかなり分かっている。細胞内の清掃工場であるリソソームという酸性の細胞内小器官は、タンパク質を含む殆どの生体物質を分解するが、このシステム以外にも、ユビキチン(Ub)とプロテアソームからなる分解機構が知られている。糖などの分子は分解されるとエネルギーを発生するが、このUb/プロテアソーム分解系は逆にエネルギー依存性であり、分解にわざわざコストをかけている。しかしそれによって、リソソーム分解系が非選択的であるのと対照的に、この分解系は分単位でターンオーバーするようなタンパク質を選択的かつ迅速に分解できる。この選択的なタンパク質分解系を利用して、細胞内の特定のタンパク質を自在に分解できないだろうか。

Ub/プロテアソーム分解系は、まず分解されるタンパク質に複数のユビキチン(8.6 kDa)が結合するところから始まる。このUb標識が目印となり、プロテアソームによって捕捉され、その後の分解へと繋がっていく。したがって、分解シグナルであるUbを結合させることができればよいと思われるが、この過程は3種類の酵素(Ub活性化酵素 Ub結合酵素 Ubリガーゼ)の連続作業で行われる(最後のUbリガーゼが直接的Ub化を担っており、最も重要である)。このUbリガーゼには、細胞周期のG1/S期の進行をコントロールするSCF(Skp1/Cullin-1/F-box protein)と、M期進行において中心的な働きをするAPC(anaphase-promoting complex)の2種類の複合体が存在することが知られているが、以下、より単純な構成のSCFを利用したシステム¹⁾について紹介する(図1)。

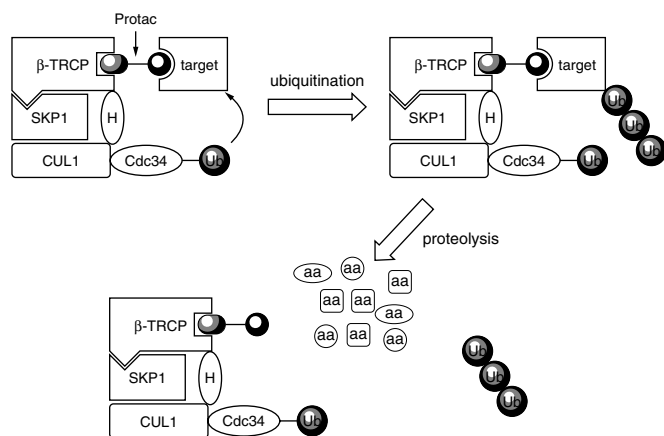


図1 PROTACを用いるタンパク質の死の誘導

SCFは4種類のサブユニットからなっているが、そのうちのF-box proteinが基質タンパク質と結合する。これにも多くの分子種が存在するが、図中のβ-TRCPというのは哺乳類のものである。

この部位に標的タンパク質を結合させるための仕掛けが必要となるが、細胞内シグナリングで中心的な役割をしている転写因子NF-κBの活性を抑制しているIκBαの分解がこの系で行われており、β-TRCPとの結合部分の構造も分かっている(10アミノ酸からなるモチーフがリン酸化され結合する)²⁾。

Sakamotoら¹⁾は、一方にこのリン酸化モチーフ(IPP)を有し、他端に標的タンパク質との結合部位を持ったProtacsというキメラ分子を合成した(図2)。標的タンパク質には、メチオニンアミノペプチダーゼ2(MetAP-2)を選んだ。MetAP-2は血管新生に深く関わっているタンパク質で、癌治療薬として期待される血管新生阻害剤(fumagillin, ovalicin)の標的タンパク質としても知られている。Protacsは、一方にこのovalicinの構造を持っており、エポキシド部分でMetAP-2と共有結合できる筈である。

実際、ProtacsはMetAP-2と容易に結合し、さらにそのコンジュゲートをXenopus egg extractに加えたところ、Ub/プロテアソーム分解系によるMetAP-2の分解が確認された。Protacsは膜透過性などまだ課題もあるが、一般にタンパク質の誕生(発現)を抑制するアプローチが多いなかで、対極にあるタンパク質の死を誘導するユニークな例である。

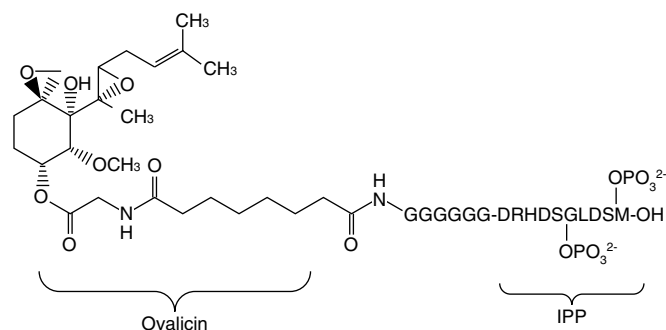


図2 PROTACの構造

参考文献

- 1) K. M. Sakamoto, K. B. Kim, A. Kumagai, F. Mercurio, C. M. Crews and R. J. Deshaies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** 8554 (2001).
- 2) A. Yaron, A. Hatzubai, M. Davis, I. Lavon, S. Amit, A. M. Manning, J. S. Andersen, M. Mann, F. Mercurio and Y. Ben-Neriah, *Nature*, **396**, 590 (1998).

Q & A

NO 発生剤 (NOC, NOR)

Q1 NOC、NORの違いは何ですか？

A1 NOCは水溶性で、水溶液が容易に作成できます。
NORは有機溶媒(DMSO)に良く溶け、また、メチルセルロースに懸濁することで経口投与が可能で、
NOCは高pHほどNO放出が遅くなり、NORは逆に低pHほど遅くなります。

Q2 NOR、NOCの水に対する溶解性を教えてください。

品名	DMSO	水	1 mol/l-NaOH
NOR 1	100 mg/100 μ l	4.0 mg/1 ml	-----
NOR 2	80 mg/100 μ l	3.5 mg/1 ml	-----
NOR 3	137 mg/100 μ l	3.7 mg/1 ml	-----
NOR 4	30 mg/100 μ l	1 mg以下/1 ml	-----
NOR 5	90 mg/100 μ l	1 mg以下/1 ml	
NOC 5	-----	28 mg/100 μ l	40 mg/100 μ l
NOC 7	-----	54 mg/100 μ l	70 mg/100 μ l
NOC 12	-----	26 mg/100 μ l	27 mg/100 μ l
NOC 18	-----	13 mg/100 μ l	20 mg/100 μ l

Q3 培養細胞での使用例を教えてください。

A3 NOCでは培養細胞での使用例(参考文献)があります。
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**,9813(1993).
Cancer Res.,**53**,546(1993).

NORでは培養細胞での使用例はありませんが、以下の文献が参考になると思います。

J. Cardiovasc. Pharmacol., **17**, 508(1994).
Eur. J. Pharmacol., **257**, 123(1994).
Free Rad. Res., **23**, 443(1995).

Q4 NOR類はNOを放出する際、pH、温度などの影響はありますか。

A4 温度は高いほどNO放出が速くなり、37℃では22℃のおよそ6～9倍です。
pHは、NOCは高pHほどNO放出が遅く、NORは低いほど遅くなります。

Q5 NOC、NORのNO放出量はどれくらいですか。

A5 NOC 1モルからは2モルのNOを放出します。
NOR 1モルからは1～1.5モルのNOを放出します。

Q6 NORの保存安定性を教えてください。

A6 DMSO溶液は冷凍(-20℃)1週間で96.0～98.0%以上を保っていますが、室温(25℃)では3日で70～80%に分解します。

粉末状態では室温(37℃)1週間で92.0～99.0%を保っています。

Q7 NOC、NORの*in vivo*での使用例を教えてください。

A7 NOC 18は10～200 mg/kg程度で使用直前に生理食塩水に溶解し投与されています。
J. Neurolog. Sci., **141**, 1(1996), *Neurosci. Lett.*, **187**, 103(1995).

NOR 3は0.5%メチルセルロースに懸濁して、0.1～100 mg/kg程度で経口投与した例があります。

ラット：経口投与(10 mg/kg)
Eur. J. Pharmacol., **257**, 123(1994).

ラット：静注(1.0～3.2 mg/kg)
Eur. J. Pharmacol., **275**, 125(1995).
Jpn. J. Pharmacol., **69**, 69(1995).

単離組織では下記の例があります。

イヌ：冠動脈(10pmol/l～10imol/l)
Br.J.Pharmacol.,**103**,1713(1991).

新製品

NOR 5

特長

半減期が長い(20時間、37℃、pH 7.4) 遅放型NOドナー
血圧降下作用がない
動物への経口投与が可能である

参考文献

- 1) M. Kato, S. Nishino, M. Ohno, S. Fukuyama, Y. Kita, Y. Hirasawa, I. Nakanishi, H. Takasugi, K. Sakane, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 33 (1996).
- 2) Y. Kita, Y. Hirasawa, S. Fukuyama, K. Ohkubo, Y. Kato, H. Takamatsu, M. Ohno, S. Nishino, M. Kato, J. Seki, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 421 (1996).
- 3) Y. Kita, Y. Hirasawa, Y. Kato, K. Ohkubo, M. Ohno, S. Nishino, M. Kato, S. Fukuyama, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **30**, 223 (1997).
- 4) Y. Hirasawa, Y. Kato, S. Fukuyama, M. Ohno, S. Nishino, M. Kato, Y. Kita, *Thrombosis & Haemostasis*, **79**, 620 (1998).

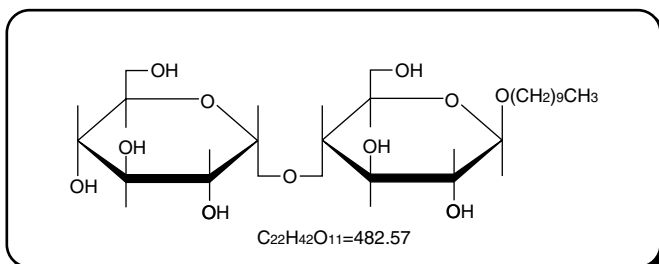
品名	容量	価格(¥)	コード	メーカーコード
NOR 5	10mg	8,500	348-08011	N448
	50mg	32,500	344-08013	N448

新製品

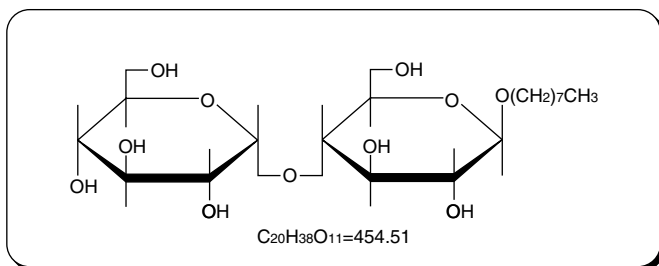
膜タンパク質結晶解析用界面活性剤

***n*-Decyl-β-D-maltoside**化学名：*n*-Decyl-β-D-maltopyranoside

CMC 値：1.8 mmol/l

***n*-Octyl-β-D-maltoside**化学名：*n*-Octyl-β-D-maltopyranoside

CMC 値：23.4 mmol/l



近年、タンパク質の立体構造に関する研究が盛んに行われています。これはタンパク質のもつ生物学的機能の重要さの究明が、タンパク質自身の立体構造の面からも掌握されなければならないと考えられているからです。膜タンパク質は、タンパク質全体の約30%を占めていますが採取・結晶化が難しいため、その構造はほとんどわかっていません。

タンパク質のX線結晶構造解析法には良質な結晶が必要です。膜タンパク質など非水溶性タンパク質の結晶化の方法のひとつに低分子量の化学構造のはっきりした界面活性剤を添加することがあります。ここに紹介する界面活性剤は、現在膜タンパク質の結晶化によく用いられているものです。^{1,2)}

参考文献

- 1) T. Tsukihara, *et al*, Structures of Metal Sites of Oxidized Bovine Heart Cytochrome c Oxidase at 2.8Å. *Science*, **269**, 25(1995).
- 2) S. Iwata, *et al*, Structure at 2.8Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Nature*, **376**, 24(1995).

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
<i>n</i> -Decyl-β-D-maltoside	1g	10,800	D382
	5g	42,000	D382
<i>n</i> -Octyl-β-D-maltoside	1g	35,500	O393

出版物のご案内



「ビデオ顕微鏡 その基礎と活用法」
Shinya Inoué/
Kenneth R. Spring 著
寺川 進・市江更治・渡辺 昭 訳
8月29日発売 / B5判 776頁 /
定価 19,000円(本体)
発行：共立出版

顕微鏡のルネッサンス！

300年の歴史をもつ光学顕微鏡は、ビデオとコンピュータの力を借りて新たな装置「ビデオ顕微鏡」に進化した。今日、プローブ、試薬の画期的進歩と相俟って、極微世界の新しいイメージが次々に生まれるようになった。本書ではテレビの基本から1分子観察の先端に至るすべての技術を詳細に紹介しています。21世紀のマイクロゲザーに贈る比類なきガイドブックの誕生です。

詳しい情報は次にあります。

<http://kyoritsu-pub.topica.ne.jp/shinkan/shinkan0108.html#p5>

秋から冬の学会展示ご案内

下記学会において、試薬新製品の展示を行ないます。皆様のご来場をお待ちいたしております。

- ・第60回 日本癌学会
9月26日(水)～28日(金)
パシフィコ横浜(横浜)
- ・第74回 日本生化学会
10月25日(木)～28日(日)
国立京都国際会館(京都)
- ・第50回 日本分析化学会
11月23日(金)～25日(日)
熊本大学工学部(熊本)
- ・第24回 日本分子生物学会
12月9日(日)～12日(水)
パシフィコ横浜(横浜)

カスタマーサービス部新設

技術的なお問い合わせに専任スタッフ2名で対応いたします。
フリーダイヤル 0120-489548

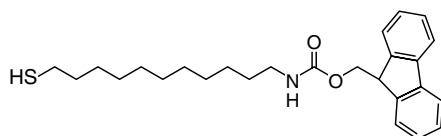
その他のお問い合わせは096-286-1515にて承ります。

試作品案内

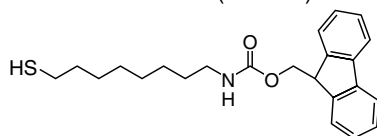
Self Assembled Monolayers (SAMs) 研究用試薬

N-Fmoc Amine Type

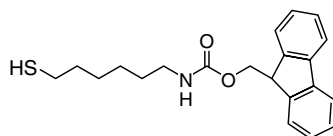
N-Fmoc-Amino undecanethiol (11-FAUT)

 $C_{26}H_{35}NO_2S=425.63$

N-Fmoc-Amino octanethiol (8-FAOT)

 $C_{23}H_{29}NO_2S=383.55$

N-Fmoc-Amino hexanethiol (6-FAHT)

 $C_{21}H_{25}NO_2S=355.49$

近年、アルキルチオール類を金表面に吸着させ、自己組織化単分子膜 (SAM : Self Assembled Monolayers) を形成する方法は、欠損のない単分子膜を容易に作製できるため、金修飾電極、表面プラズモン共鳴、水晶発振子マイクロバランス等に幅広く利用されています。

これらの自己組織単分子膜 (SAM) を構成する分子は、基本的に金基板への吸着を目的とする官能基、主鎖及び機能性官能基の3つの部分から構築されており、その単分子膜の性質は主鎖の長さや親水性、機能性官能基の種類により、多彩な機能を持ち得ます。

特に、機能性官能基としてアミノ基を持つアミノアルカンチオールは、種々のペプチドやタンパク質、その他分子認識サイトを導入する際に有用です。既に、11-Amino-1-undecanethiol 単分子膜を用いて、タンパク質-DNA 間相互作用のイメージングを行なった報告もなされています¹⁾。

今回紹介する SAM 研究試薬は、アミノ基を Fmoc 保護したアミノアルカンチオールです。基板上に SAM を形成させた後、脱保護を行なうことにより、アミノ基を露出させることができます。脱保護操作は容易であり、塩基溶液に基板を浸漬することで達成できます。

以下に SAM 修飾電極を作製し、サイクリックボルタモメトリー (CV) を行なった結果を示します。

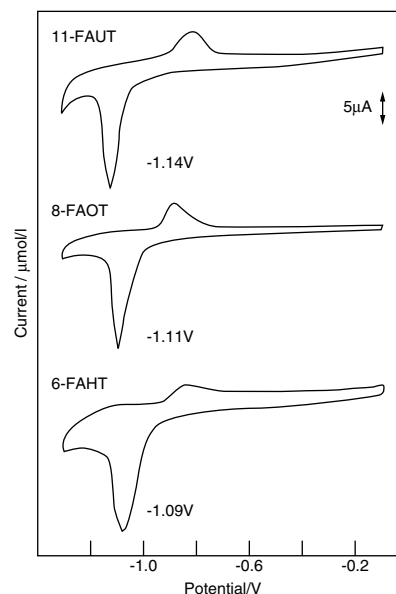


図 1. N-Fmoc アミノアルカンチオールのサイクリックボルタモグラム

11-FAUT、8-FAOT、6-FAHT の各エタノール溶液 (100 mmol / l) に、30 秒間水素炎アニールした金基板 (1000 Å) を 5 分間浸漬させて SAM 修飾電極を作製した。金表面からのチオール単分子膜の脱離挙動を、0.1 mol/l KOH 水溶液中で測定した。浸漬時間 5 分で、アルキル鎖長にかかわらず吸着量は、9 nmol/cm² であった。

測定条件

作用電極 : SAM 修飾電極、対極 : Pt Plate、参照電極 : Ag / AgCl、開始電圧 : -100 mV、最大掃引電圧 : -100 mV、最小掃引電圧 : -1300 mV、掃引速度 50 mV/sec、0.1 mol/l KOH 水溶液中、窒素雰囲気下で CV 測定。

金表面からのチオレートアニオンの脱離に由来する不可逆なカソード電流が各修飾電極で観測され、アルキル鎖長が長くなるにつれて、還元脱離の起る電位がより負電位側にシフトすることが確認されました (図 1)。また、脱保護後の各修飾電極においても同様の傾向が確認され、脱保護操作後も SAM を形成しており、吸着量の変化がないことが確認されました。また、ピペリジンのアセトニトリル溶液 (20%) に 30 分間浸漬することにより、脱保護できていることが電極表面の反射赤外吸収スペクトルから示唆されています (データ未掲載)。

光照射によるパターンニングを行なった後に化学修飾を行なった¹⁾、アミノ基と金との相互作用を回避したりするのに利用できる可能性があります。これまで以上に高度に制御された SAM を利用して、各種検出を行なうことが期待されます。

弊社ではお客様の使用用途に合わせて、他にも様々なタイプの SAM 関連試薬を取り揃えております。どうぞご利用下さい。

参考文献

- 1) J. M. Brockman, A. G. Frutos, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 8044 (1999).

新製品

Aluminum Detection Kit

特長

- ・サンプル調製は、試薬と混合するだけである(次ページの操作手順参照)。
- ・汎用型のHPLC装置を使用するため、オートサンプラーを用いて終夜運転が可能である。
- ・測定時間は5～7分である(約10検体/時間)。
- ・輸液製剤(LVP、SVP)も測定可能である。
- ・アルミニウムに対して高選択性であり、鉄、銅、亜鉛などの金属の他、グルコースなどの妨害を受けない。
- ・測定限界は、試薬ブランクを含む全操作の3SDとして1ppbまで測定可能である。

キット内容

- Al Detection Reagent R-1 :
 キレート試薬液(8-Quinolinol/HCl)..... 1本
 Al Detection Reagent R-2 :
 キレート形成液(緩衝液、pH 7.5)..... 1本
 Al Detection Reagent R-3 :
 HPLC 溶離液(界面活性剤含む、pH 7.0)..... 1本

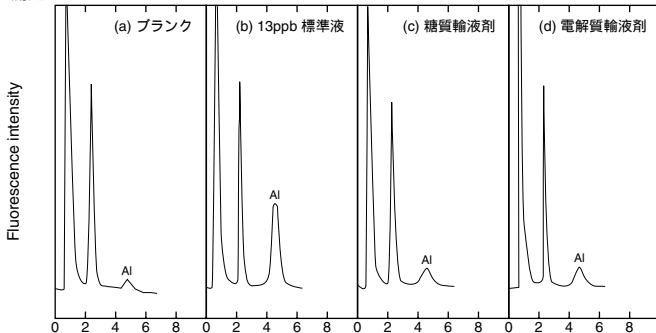
使用試薬、器具

Aluminum Detection Kit(キレート試薬 R-1、キレート形成液 R-2、溶離液 R-3)

Al分析専用カラム(4.6φ × 50 mm) HPLC(蛍光検出器) マイクロピペット(10～100 μl 1本、100～1000 μl 2本) ボルテックスミキサー、サンプルチューブ、ピペット用チップ

* 試薬とカラムはAlブランクを最小限に抑えてありますが、HPLC装置や使用器具類からAlの汚染がある場合がありますのでご注意ください。

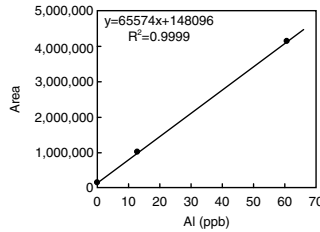
測定データ



Analytical conditions for aluminium determination
 Column : アルミニウム分析専用カラム (4.6 mm × 50 mm)
 Mobile phase : R-3
 Flow rate : 1 ml/min at 25
 Detector : 日本分光 FP-920(S)
 Ex = 370 nm, Em = 504 nm

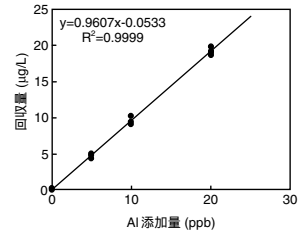
検量線

河川水標準物質使用 (JAC0031:13 ppb, JAC0032:61 ppb)



透析液原液の添加回収

透析液原液: NaCl 20 w/v%以上含有
 グルコース 5 w/v%以上含有



ICP-MS法との相関

No	サンプル名	容器 (*1)	ICP-MS法 (*3)		HPLC法 (*3)	
			Al濃度 (ppb) (*2)	Al濃度 (ppb)	10ppb Al 添加回収値	
1	加糖乳酸リンゲル液	P	1	0	2	11
2	脱水補給液	P	1	0	1	10
3	維持液	P	1	0	0	9
4	高張維持液	P	6	4	4	9
5	高カロリー輸液A	P	10	12	3	9
6	高カロリー輸液B	P	10	14	14	9
7	人工透析補液A	G	36	42	42	8
8	人工透析補液A	P	1	0	1	10
9	人工透析液	P	1	0	1	9
10	コントロール(超純水)	P	- - -	0	0	10

* 1. P: プラスチック製、G: ガラス製

* 2. : 未満

* 3. HPLC法で使用した標準液: 日本分析化学会 河川水標準物質(13 ppb, 61 ppb)
 ICP-MSで使用した標準液: 原子吸光用標準液(1000 ppm)を希釈して調整。

【使用上または取り扱い上の注意】

- 1) 実験器具および流路からのアルミニウムの汚染に十分注意して下さい。
- 2) 器具は0.1 mol/lの硝酸が塩酸で洗浄後、超純水にて洗浄した物をお使い下さい。
- 3) 測定の前後にはキャリブレーションを行って下さい。
- 4) 各試薬は使用后すぐにふたをして、空気中の浮遊粒子によるアルミニウムの汚染を防いでください。
- 5) キレート試薬液(R-1)は遮光して保存してください。
- 6) HPLC溶離液(R-3)は、長時間開放式で使用すると揮発性成分が蒸発してアルミニウム錯体の溶出時間が遅くなる場合があります。できるだけ蒸発を防ぐようにして下さい。
- 7) 冷蔵温度が低い場合に、まれにR-2中の緩衝成分が析出することがあります。室温にもどして完全に溶解してご使用ください。再溶解すれば試薬の性能に問題はあります。
- 8) キャリブレーターには原子吸光用、またはICP用の標準液をご使用下さい。

操作手順



1 純水をしみ込ませたキムワipeで、実験台やHPLC周辺を拭き掃除する。



2 キレート試薬 R-1を50 µl 分注する。R-1の分注に使用するチップは、最初にR-1で共洗いを行って下さい。



3 測定試料150 µlを加え、十分に攪拌する。サンプル採取チップは試料で共洗いをを行い、試料毎に交換して下さい。



4 キレート形成液R-2を400 µl加える。R-2は粘性が高いため、チップの共洗いは行わず、1検体毎に交換して下さい。



5 R-2は粘性が高いため、2層分離します。ボルテックスミキサーで十分に混和した後、室温(20~25℃)で10分間放置する。



6 この反応混液200 µlをHPLCに注入して、蛍光検出(Ex=370nm, Em=504nm)によってアルミニウム濃度を測定する。

参考文献

- 1) A. C. Alfrey, G. R. LeGendre, W. D. Kaehny, *New Engl. J. Med.*, **294**, 184(1976).
- 2) J. Walton, C. Tuniz, D. Fink, G. Jacobsen, D. Wilcox, *Neuro Toxicology*, **16**, 187(1995).
- 3) 中澤一, 腎と透析, **36**, 1111(1994).
- 4) D. P. Perl, D. C. Gajdusek, R. M. Garruto, R. T. Yanagihara, C. J. Gibbs, Jr., *Science*, **217**, 1053(1982).
- 5) M. Sato, H. Yoshimura, H. Obi, S. Hatakeyama, E. Kaneko, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi, *Chem. Lett.*, 203(1996).
- 6) M. Sato, H. Yoshimura, T. Shimamura, H. Obi, S. Hatakeyama, E. Kaneko, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi, *J. Chromatogr. A*, **789**, 361(1997).
- 7) M. Sato, H. Yoshimura, E. Kaneko, T. Yotsuyanagi, *Biomed. Res. Trace Elements*, **8**, 283(1997).
- 8) S. Nomoto, M. Totsuka, T. Nakabayashi, T. Katsuyama, O. Sugita, *Biomed. Res. Trace Elements*, **8**, 245(1997).
- 9) 佐藤誠, 芳村一, 金子恵美子, 四ツ柳隆夫, 日本化学会第74回春季年会 講演予稿集 I, 373(1998).

- 注) 1. 本キットは試験研究用です。
 2. 本キットの仕様はH13/9/1 現在のものであり、予告なく変更される場合があります。

製造元：株式会社シノテスト

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Aluminum Detection Kit	1Kit	Request	AL04
Al Detection Reagent R-3 (溶離液)	1L	Request	AL03
Al 分析専用カラム	1pkg	Request	AL05

12th フォーラム・イン・ドージン

生物毒から生命現象を垣間見る

日時/平成 13 年 11 月 30 日 (金) 9:10 ~ 16:45 参加費/無料
 場所/メルパルク熊本 (熊本市水道町 15-11) 定員/180 名
 オーガナイザー/森田隆司 (明治薬科大学) 中山 仁 (熊本大学薬学部)
 代表世話人/前田 浩 (熊本大学医学部)
 当番世話人/山本哲郎 (熊本大学大学院医学研究科)

セッション 1 細胞機能を垣間見る 座長: 正木春彦、山本哲郎
正木春彦 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
 「Overview」

梅田正郷 (東京都臨床医学総合研究所)
 「膜脂質作用性生物毒とその細胞生物学への応用」

遠藤彌重太 (愛媛大学工学部)
 「リポトキシン研究から無細胞タンパク質合成系の構築へ」

堀口安彦 (大阪大学微生物病研究所)
 「百日咳菌壊死毒による Rho ファミリー GTP 結合タンパク質の活性化」

セッション 2 イオンチャネルと神経系の機能を垣間見る 座長: 中山 仁
川合述史 (自治医科大学、沼南病院)
 「虫の神経毒とイオンチャネル」

佐藤一紀 (福岡女子大学人間環境学部)
 「イモ貝毒コノトキシンによるイオンチャネル阻害機構」

セッション 3 血液と血液循環機構を垣間見る 座長: 前田 浩
森田隆司 (明治薬科大学)
 「ヘビ毒蛋白質の進化」

鎮西康雄 (三重大学医学部)
 「吸血昆虫・ダニの唾液腺から活性分子を探る - オオサシガメ Prolixin-S を中心に - 」

後援: 株式会社ケミカル同仁

お申込先: 12th フォーラム・イン・ドージン事務局 (担当: 斉藤素子、満田健一)
 〒 861-2202 熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 株式会社同仁化学研究所 内
 TEL:0120-489-548 (フリーダイヤル) FAX:0120-021-557
 E-mail: motoko@dojindo.co.jp

講演終了後、ミキサーを同会場ですべて予定しております。(19:00 終了予定・無料)

参加ご希望の方は、所属・氏名・連絡先 (住所、TEL、FAX、E-mail)・ミキサー参加の有無をご記入の上、
 E-mail、FAX またはハガキでお申し込みください。

ホームページアドレス
 URL : [http:// www.dojindo.co.jp/](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