

# DOJIN NEWS

No.107  
2003

ドージンニュース

Review

分子シャペロンと蛋白質の変性・凝集・再溶解

吉田賢右

Topics on Chemistry

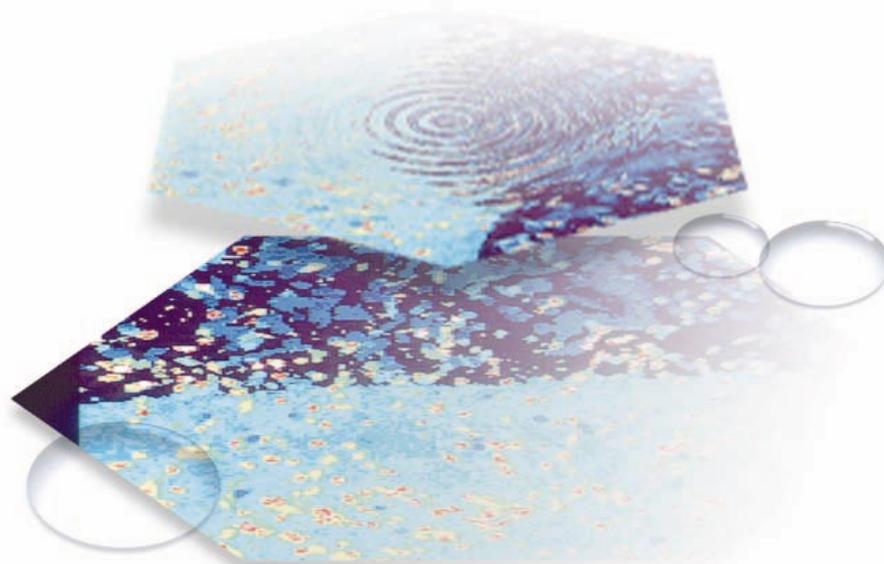
抗体のもつ触媒活性の意味とは？

大内雄也

連載

ケミストからみたポストゲノム7

片山佳樹



## 目次

### Review

- 分子シャペロンと蛋白質の変性・凝集・再溶解  
 東京工業大学資源化学研究所 吉田賢右 ..... 1  
 ケミストからみたポストゲノム7  
 九州大学大学院工学研究院 片山佳樹 ..... 6

### Topics on Chemistry

- 抗体のもつ触媒活性の意味とは？  
 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC. 大内雄也 ... 14

### Commercial

- 新製品案内  
 コリンエステラーゼ活性測定基質 ..... 5  
 遺伝子傷害検出抗体 ..... 10  
 HTS用細胞内カルシウム測定キット ..... 12  
 残留塩素測定キット ..... 15

### Q&A

- 残留塩素測定キット ..... 17

### お知らせ

- フォーラム開催案内 ..... 9  
 抗ニトログアノシン抗体発売記念キャンペーンのご案内 ..... 12  
 残留塩素測定キット-SBT法のお問合せ先のご案内 ..... 17  
 ホームページリニューアル案内 ..... 18

## 新製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

- p*-HBC ..... 5  
 Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody  
 (Clone#NO<sub>2</sub>G52) ..... 12  
 Anti-Nitroguanosine polyclonal antibody ..... 12  
 8-Nitroguanine(lyophilized) ..... 12  
 Calcium Kit - Fluo 3 ..... 13  
 残留塩素測定キット-SBT法 ..... 17  
 残留塩素測定試薬-SBT法 ..... 17  
 色素液 ..... 17  
 検水調整液 ..... 17



創業当時の同仁堂（熊本市上通町）



昭和33年の同仁薬化学研究所  
 （熊本市水前寺）



セキ止め薬「セラジン」  
 製造工場、  
 内国化学研究所  
 （熊本市八景水谷）



現在の同仁化学研究所  
 （熊本県上益城郡益城町）

同仁化学研究所は、大正初期に熊本で創設された薬局「同仁堂」から出発しました。創業者・上野景治は内国化学研究所でアスピリン合成や桜の皮を原料としたセキ止め薬の製造などを手がけていました。次男・景平が昭和21年に始めた同仁薬化学研究所が小社の前身です。

## 分子シャペロンと蛋白質の変性・凝集・再溶解 (Molecular chaperones and protein denaturation, aggregation, and disaggregation)



吉田 賢右  
(Masasuke Yoshida)  
東京工業大学 資源化学研究所

### [ Summary ]

Proteins are subjected to conformational transitions in cells. Among them, unfolded state is located at the central position where the paths are crossed to folding into native structure, transport to organelle, secretion to outside, formation of aggregates, and so on.

Aggregates are troublesome to the cell in general. There are three kinds of aggregates. Good aggregates can be rescued to the native protein by aid of molecular chaperones. Manageable aggregates cannot restore the native structure but can be digested by proteases.

Difficult aggregates have some ordered structures, are resistant to protease digestion and are accumulated in the cell which sometime cause cell death. I introduce here our recent experiments on how to molecular chaperones rescue good aggregates and how difficult aggregates grow.

### キーワード :

Protein aggregate, prion, amyloid, chaperone, Hsp,

### 1. 細胞の蛋白質の一生の新しい描像

過去約10年の研究によって、細胞の中の蛋白質の運命についてのわれわれのイメージは大きく変化しつつある。蛋白質は、ポリペプチドとして合成されれば、あとは間違いなく、自分自身で機能的な高次構造（ネイティブな構造）を形成し、所定のところに出向いて、細胞の要求にこたえる役割を果たし、確率的に壊れていく。こういういささか牧歌的な概念は過去のものとなった。高分子重合体としての蛋白質はリボソームでポリペプチドが出来上がった瞬間にすでに完成している。しかしこれは、役立つ蛋白質となるための単なる出発点であって、ゴールではない。ポリペプチドは細胞の中で、自力で、あるいは他の因子に助けられて、なんとか機能的構造を獲得して一人前の蛋白質になる。この構造形成の過程で脱落するポリペプチドも少なくない。その後、細胞内を移動して特定のコンパートメントに入り込む段になると、蛋白質はいったん高次構造がほどける必要がある。そして、あらかじめ予定された場所にたどりついて定着し、やっと求められる機能を発現することになる。しかし、その後もいろいろな機会に障害が生じ、高次構造は損傷を受ける。損傷蛋白質は、場合によっては修復されて快復し、手におえなければ分解されて消滅する。細胞には、こうした蛋白質の一生のすべての過程を、絶えず監視し、制御する巧妙で精緻なシステムが備わっていることが明らかになってきた。

### 2. 分子シャペロンと蛋白質の凝集

細胞内の蛋白質の運命に関するこのような認識の変化をもたらした契機として、まず、分子シャペロンの発見があげられる。分子シャペロンは、細胞内で新たに合成されたポリペプチドの折れたたみ（フォールディング）や集合（アセンブリー）細胞の中で生じた変性蛋白質の再生に働く。たとえば、リボソームで合成さ

れた直後の新生ポリペプチドはまだ高次構造を形成していないので、疎水性アミノ酸残基が分子表面に露出して凝集しやすい。このような疎水性部分に様々なシャペロンが一過的に結合して、正しい折れたたみに導くことが示されている。大腸菌の場合、全蛋白質の少なくとも1割は分子シャペロンの助けを借りて活性のあるきちんとした立体構造（ネイティブな構造）に至るといふ。この新しい「蛋白質の一生」の描像の中で、重要な意義を持つものとして見直されてきたのが、アンフォールドした蛋白質であり、蛋白質の凝集である。アンフォールドした蛋白質とは、ネイティブな構造が大きく、あるいは完全に壊れて、ヒモ状の構造になった蛋白質のことである。いわば、生まれてきたままの姿の蛋白質と言えようか。蛋白質はアンフォールドした形を経過しているいろいろな次のステップに進むのは上に述べたとおりで、いわば蛋白質の遷移の中央交差点にあたる。しかし、アンフォールドした蛋白質はそのままにしておけば凝集して沈殿する。この沈殿は、蛋白質を研究するものにとっては、こうなってしまったら蛋白質は意味がないもので、いままでまともな研究の対象にならなかった。しかし、近年これが細胞に重大な損傷を与え、ひいては多くの中枢神経系の変性による病気を引き起こしていることがわかってきて、にわかに真剣な研究が非常に熱心さをもって進められるようになった。そして、ここでも、分子シャペロンが関わっていることが見え始めた。この稿では、蛋白質の凝集とその脱凝集（再溶解）および分子シャペロンとの関わりについて述べる。

### 3. 良い凝集、処理できる凝集、どうにもならない凝集

細胞が高温などのストレスにさらされると、分子シャペロンは蛋白質の不可逆的な変性を防ぐべく活躍すると考えられるが、ストレスが強ければそれでも凝集が生じるのは避けがたい。しかし、細胞はそれでただちに死ぬわけではない。たとえば、酵母を高温

にさらすと、細胞の中に点々と蛋白質の凝集が出現するが、適温にもどせば凝集は消失し、酵母は再び活動を始める<sup>1)</sup>。この場合、凝集した蛋白質は、後述のように分子シャペロンによって再び活性のある構造を回復すると考えられる。これは、「良い」凝集である (Fig.1)。しかし、高温にさらす時間が長くなると、凝集はさらにすみ大きな塊となり、酵母は死んでしまう。ゆで卵状態である。今のところ誰もゆで卵を生卵にもどすことはできない。しかし、ゆで卵は胃袋に入れば消化される。つまり、プロテアーゼで分解される。再生は難しいがプロテアーゼによって分解される凝集は、なんとか「処理できる」凝集である。しかし、もっと悪い「どうにもならない」凝集も存在する。分子シャペロンによっても回復しないし、プロテアーゼによっても分解されない凝集である。

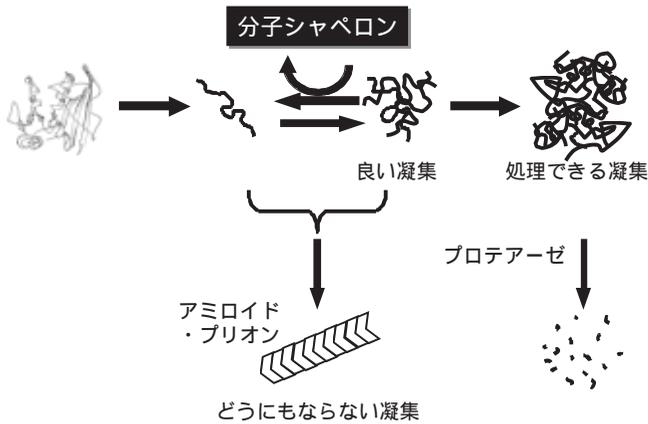


Fig.1 Three kinds of aggregates that can be generated in the cells. "Good aggregate" is the aggregate that can be resolubilized by aid of molecular chaperones. "Manageable aggregate" is digested by proteases. "Difficult aggregate" is not amorphous aggregate but has some ordered structure, likely  $\beta$  sheets. It is resistant to protease digestion and detergent solubilization.

#### 4. 「良い凝集」の脱凝集と再生

さて、凝集をときほぐして水に溶ける形にもどし、さらに再生するにはどうしたらいいだろうか。人工的には、凝集を高濃度の尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤(溶解剤)に溶かし、次に変性剤を透析などで徐々に除いていくと蛋白質の構造と機能が回復する(ただし、これもいつもうまくいくとは限らない)。細胞の中では分子シャペロンがこの作業にあたるのが、最近になってわかってきた。以下に私たちの研究を紹介する<sup>2-4)</sup>。

私たちは好熱菌 *Thermus thermophilus* の DnaK の研究をしていた。DnaKはストレス蛋白質であるHsp70ファミリーに属し、DnaJ および GrpE と協同して ATP を加水分解して、蛋白質の凝集阻止や、適当な条件のもとでの変性からの再生を助ける働きがある。この DnaK の遺伝子をクローニングして近くの領域を見ても、DnaJ や GrpE の遺伝子がすぐ近くにあるのは当然として、ClpBという分子シャペロンの遺伝子も同じオペロンに存在していた。同じ転写調節を受けているからには、その作用もお互いに協調しているのではないかと推定し、いろいろ調べてみると、

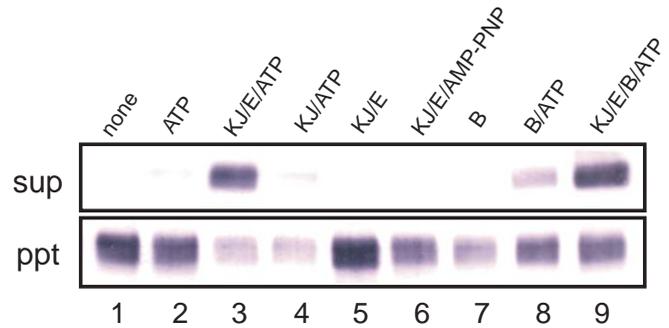


Fig.2-A Effect of the DnaK · J-GrpE set and ClpB on aggregation of lactate dehydrogenase (LDH). LDH, biotinylated for detection, was incubated in the presence of indicated components at 73 °C for 30 min. The solutions were centrifuged, and supernatant (sup) and precipitate (ppt) were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecylsulfate. Electrophoresed proteins were blotted to the membrane, and biotinylated LDH was detected by alkaline phosphatase-conjugated streptavidin. KJ, E, and B represent DnaK · J complex, GrpE and ClpB, respectively. All of the chaperones were isolated from *Thermus thermophilus*.

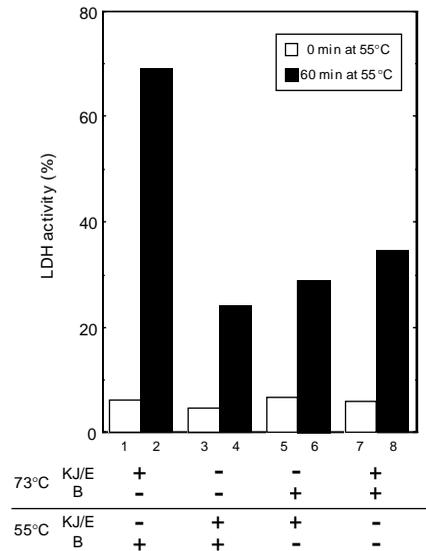


Fig.2-B Effect of order of additions of the DnaK · J-GrpE set and ClpB on the recovery of LDH activity. The order of addition of chaperones are indicated. For all experiments, ATP (3 mmol/l) was added from the beginning of the 73 °C incubation. The LDH activities at 0 min (blank bars) and 60 min (black bars) after temperature shift to 55 °C were measured.

たしかにこの4つの蛋白質 ( ClpB, DnaK, DnaJ, GrpE ) は、高温で変性し凝集した蛋白質の再可溶化 (脱凝集) と再生に協調して働いていることがわかった。乳酸脱水素酵素を 73 °C で 30 分熱すると変性し遠心すれば沈殿となる ( Fig.2 A, lanes 1 and 2 )。これを ( 遠心しないで ) 55 °C に温度を下げて同時に上記4蛋白質を加えると、活性が 20% ほどもどってくるのである ( Fig.2 B、

lanes 4) 73 の時に DnaK, DnaJ, GrpE と ATP を加えておくと、変性は避けがたいが凝集はある程度抑えられて (Fig.2 A, lanes 3) 55度に温度を下げた時に ClpB を加えると活性は80%ももどる (Fig.2 B, lanes 2)。ClpB には、このような凝集阻止作用はなく (Fig.2 A, lanes 7 and 8) DnaK などと共存させるとかえってその凝集阻止作用を打ち消してしまう (Fig.2 A, lanes 3 and 9) 同じころ米国の Lindquist たちも酵母の Hsp104 (ClpB のファミリー) と Hsp70 のセットで脱凝集が起こることを実証し<sup>5)</sup>、また少し遅れて、ドイツの Bukau たちも大腸菌で私たちと似た結果を報告した<sup>6)</sup>。こうして、分子シャペロン Hsp104/ClpB と Hsp70/DnaK の組み合わせによる凝集蛋白質の脱凝集が原核生物と真核生物の両方で確認された。

では、これらの分子シャペロンはどのように凝集から蛋白質をときほぐしフォールディングを可能とするのだろうか。残念ながらその機構についてはまだほとんどわかっていない。凝集体から蛋白質を1本ずつ引き出すのだろうか、それとも、変性剤のように凝集体の中にもぐりこみお互い同士を結合している力を弱めて可溶化するのだろうか。確証はないが凝集体にまず取りつくのはおそらく ClpB だと考えられるが、ClpB は6量体のリング構造の分子であって、AAA-ATP アーゼというファミリーに属する蛋白質である。この AAA-ATP アーゼファミリーのメンバーの中には、ATP のエネルギーでポリペプチド鎖や DNA 鎖をその中央の穴の中に糸通しのように引き込んで送る活性が想定されているものがある。そこから類推すれば、ClpB は凝集体に結合して、露出したポリペプチド鎖を見つけてそれを引きずり出す、という活動をしているのかもしれない。ClpB の ATP 加水分解の活性中心に変異を導入した変異体では、脱凝集活性はなくなる。ClpB の6量体リングは反応の間中ずっと安定なものではなくリングを開いたり、サブユニットが相互に回転したりする可能性も考えられる。ClpB と DnaK がどのように任務分担をしているのかもまだわからない。いまのところ、ClpB と DnaK 系のシャペロンの作用を分離することには誰も成功していないのである。ただ、この2つの分子シャペロンの活動で、凝集していた蛋白質は自分でフォールディングできる状態になったところで溶液中に放出されるようである。完全にフォールディングして活性を取り戻してから溶液中に放出されるのではないらしい。

## 5. どうにもならない凝集

これは単に蛋白質のポリペプチド鎖がからまりあった凝集ではない。構造を持った凝集である。ふつう、蛋白質は、さまざまに配置された  $\alpha$ ヘリックスと  $\beta$ シートという2種類の単位構造とこれをつなぐループからなる立体構造を持っている。 $\alpha$ ヘリックスは、アミノ酸配列上ひとつながりの領域が螺旋状に巻いて出来る構造であるが、 $\beta$ シートはアミノ酸配列上離れた2つの領域がほぼ平行に(あるいは逆平行に)並んで結合した構造である。したがって、 $\alpha$ ヘリックスは1つの蛋白質の内部で出現する構造であるが、 $\beta$ シートは2つの蛋白質の境界に形成されることもありうる。事実、蛋白質複合体のサブユニット間に分子間 $\beta$ シートが存在し、サブユニット同士の結合を安定化している例は少なくない。多数の蛋白質が次々と分子間 $\beta$ シートで結合すれば線維状の凝集体とな

る。これは、構造を持った凝集体であり、きわめて安定である。そもそも、何本ものポリペプチドが並んで1つの湾曲した壁のようになった(あるいは一周して樽のようになった) $\beta$ シートを持つ蛋白質は非常に安定であることが知られている。たとえば、細胞生物学などで便利な目印蛋白質として頻用される緑色蛍光蛋白質は、そのような蛋白質であり、熱にも変性剤にも安定で、生化学でよく使われる SDS ゲル電気泳動でもその緑の蛍光を失わない。したがって分子間 $\beta$ シートで結合した線維状の凝集体が非常に安定なのは想像に難くない。いったんこれが生体の中に生じると、プロテアーゼも歯が立たず、どうにもならないままに蓄積してゆく。アミロイド線維やプリオン線維と呼ばれるものはこうした構造の凝集体であろうと考えられる。

## 6. プリオン線維の形成機構

プリオン線維は、まず、線維のタネが生じて、次にこれが成長してゆき、そのうち分裂していくと考えられる。したがって、(A) タネとはどんなものでどのように形成されるのか、(B) どのように成長するのか、(C) どのようなことをきっかけにして分裂がおこるのか、ということが問題になる。

(A) については、タネは、これに付加成長してきてくる線維の部分と構造的に区別がつかないらしい。したがって、タネの中のプリオン蛋白質の一つ一つの構造は、線維の中のそれと同じ構造であり、タネというのは単にまだ小さくて可溶性のオリゴマーであろう、と考えられる。あるいは、タネは線維と違った構造のオリゴマーではあるが、これが線維に成長すると線維と同じ構造に変化する、という可能性もある。線維の生成は、時間とともに直線的に進むのではなく、しばらく何もできないように見える期間(lag phase)の後にどっと進行することがわかっている。凝集反応は一般的に  $n$  次反応であるから、上記のどちらの考え方も lag phase を説明できる。プリオンの毒性は、線維よりむしろこのタネにあるとする考えもあり、タネの構造や生成についての研究は重みを増しているが、まだ確かな知見は少ない。

(B) については、私たちの研究を後で紹介するとして、(C) について説明しておこう。毒性をもたない正常なプリオン蛋白質は、タネを形成できないが、既存のタネに付加して線維を成長させることはできると考えられる。たとえ異常プリオンのタネが細胞に侵入しても、そのタネだけが線維に成長するのであれば、線維の数はたかがしれていてそれだけでは細胞に問題を起こさないだろう。しかし、線維がちぎれて何本かに分裂してそれが(正常なプリオン蛋白質の付加で)また成長するとしたら、これは線維の自己増殖であり、プリオンの感染性を説明できる。しかし、肝心な分裂にかかわる因子は不明である。酵母の場合には、プリオン様蛋白質 Sup35 のプリオンの表現型は、前述の Hsp104 で制御されることが知られている。すなわち、Hsp104 の量が過少でも、過多でも、プリオンの表現型は現れない<sup>7)</sup>。前述のように、Hsp104 は凝集した蛋白質を脱凝集する力がある。これが過少な時は、線維の分裂がおきないので増殖できない。これが過多な時は、タネが脱凝集されてなくなってしまいうのでプリオン線維はできない。Hsp104 がちょうど良い濃度の時には、Hsp104 はタネの形成は妨害せず線維の分裂だけを触媒する。今のところ、そう解釈され

ている。

(B)の線維の成長については、私たちの研究を紹介する<sup>8)</sup>。酵母のプリオン様蛋白質 Sup35 の線維形成ドメインである Sup35NM の末端にヒスチジンタグとシステインを導入し、その SH 基に赤い蛍光、緑の蛍光、あるいはビオチンを付加した。Sup35NM を、塩酸グアニジン溶液から希釈して放置すると、モノマー(水可溶性の Sup35NM がモノマーである確証はないがモノマーと仮定しておく)の Sup35NM から数時間かけて徐々に線維ができて成長し始める。まず、赤い Sup35NM で線維を作った。

次に、緑の Sup35NM モノマーを加え放置して再び線維を成長させた後に、線維をガラス基盤に固定し、蛍光顕微鏡で観察した。すると、赤い線維の先に緑の線維が成長した2色からなる線維がはっきりと見えた。赤い線維の片側に緑の線維が成長したケース、両側に成長したケースの2通りがあったが、前者が圧倒的に多数(97%)であった(Fig.3)。他に、緑だけの線維が多数あった。これは、後から加えた緑の Sup35NM モノマーがタネを生じて線維になったものであり、長さが短い。赤と緑の順番を逆にして、最初に緑の線維を作り、次に赤い Sup35NM モノマーを加えた場合も、緑の線維の片側に赤い線維が成長する片方向成長が優勢であった。あらかじめ緑の線維をガラス基盤に固定し、そこに赤の線維が成長していくようすを時間を追って観察することも出来た。その場合も、片方向成長が70%を占めた。初めの線維をあらかじめ超音波処理して細かく分断して新しい成長末端を露出させてから次の成長をさせても、片方向成長優勢な結果は変わらなかった。これは、成長中の線維の末端がたまたま閉じられることがあり、その後次のモノマーを加えたから一見、片方向成長に見える、という可能性は少ないことを示す。

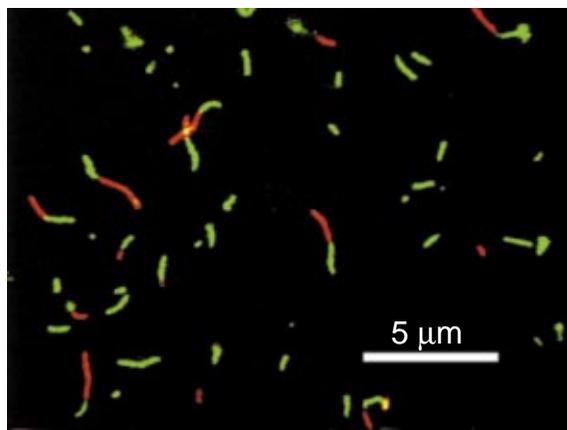


Fig.3 Fibers grown from green-Sup35NM in the presence of preformed red-Sup35NM fibers. Integrated fluorescent images of the Sup35NM fibers. TMR-labeled (red) Sup35NM (30 μmol/l) in 8 mol/l guanidine HCl was diluted 200-fold into Buffer A. After incubation for 10 h, 30 μmol/l of OG-labeled (green) Sup35NM in 6 mol/l guanidine HCl was diluted 200-fold into the reaction mixture and incubated for another 10 h. Red and green images were recorded separately, and the colored images were subsequently merged.

線維の片側だけが成長することは何を意味するか考えてみる。もし、水に溶けているモノマーの Sup35NM は、そのままでは線維に結合できないが、ある確率で構造変化を起こし、その結果、線維の先端に結合できるようになるとする。線維成長が持続するためには、モノマーは、線維に結合するための結合部位だけでなく、線維に結合した後に次にくるモノマーが結合できる受容部位を持たなければならない。したがって、モノマーの構造変化とは、この結合部位と受容部位の両方を生じるようなものである。そうすると、必然的に線維の成長は両方向となるはずである(Fig.4、モデルb)。今度は、モノマーは初めから結合部位を持っているが、受容部位は線維に結合した後に構造変化がおきて生じるとする。そうすると、線維成長は片方向成長とならざるを得ない(Fig.4、モデルa)。構造変化は、モノマーが線維に結合する前に起きるのか、それとも、モノマーが線維に結合してから起きるのか、2つのモデルはそこが違っている。構造変化の引き金は、前者では、水に溶けているモノマーに自発的に起きる確率的なものであり、後者では、線維の先端に結合したことによってモノマーにもたらされた構造の歪みである。私たちの実験結果は、線維先端には、新しく成長先端を形成する触媒活性のようなものがあることを示唆しているように見える。しかし、付け加えておかなければならないのは、両方向成長も皆無ではないことである。ごく少数だが、両方向に等しい速度で成長しているように見える線維もあった。私たちの報告の後、別の研究グループから原子間力顕微鏡で Sup35NM の成長方向を調べた論文が発表されたが、やはり、少数の線維は両方向に等しい速度で成長していた。また、片方向成長のものも、少しだけ反対方向に伸びているものも多かった。Sup35NM は、単一の成長方式ではなく、いろいろな成長のしか

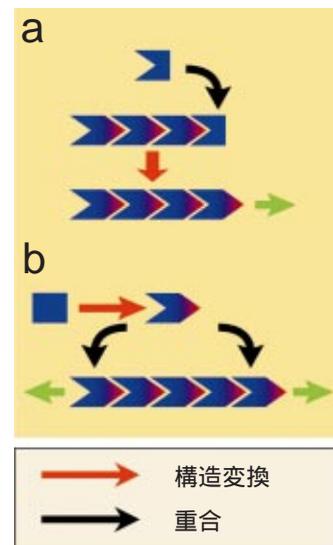


Fig.4 Two models of Sup35 prion-fiber growth. Model 1, a model for the unidirectional growth of prion fibers. Critical conversion occurs after the monomer associates to the fiber. Model 2, a model for the bidirectional growth. Critical conversion occurs in a monomer before association to a fiber.

たをするものの混合物である可能性がある。

## 7. 終わりに

細胞にとって、活性をもつ蛋白質ばかりが大事なのではない。ほどけた状態の蛋白質は、蛋白質の一生の転換点に現れてくる。これをうまく処理しないとやっかいなことになる。特に、凝集してしまうとまずい。それでも凝集が小さくて性質がよいならば、細胞は分子シャペロンを動員してこれを活性ある姿に再生できることがある。再生できなければ、分解すると考えられるが、時には、再生も分解もできない事態が発生する。この時、凝集は不定形というよりも構造を持った結晶のようにふるまって線維を形成する。この線維の形成にも分子シャペロンが関わっている気配が濃厚になってきている。

### 参考文献

- 1) Parsell, D. A., Kowal, A. S., Singer, M. A. & Lindquist, S., *Nature (London)*, **372**, 475(1994).
- 2) Motohashi, K., Watanabe, Y., Yohda, M., Yoshida, M. Heat-inactivated proteins are rescued by the DnaK.J-grpE set and ClpB chaperones., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7184 (1999).
- 3) Watanabe, Y., Motohashi, K., Taguchi, H., Yoshida, M. Heat-inactivated proteins managed by DnaKJ-GrpE-ClpB chaperones are released as a chaperonin-recognizable nonnative form, *J. Biol. Chem.*, **275**, 12388(2000).
- 4) Watanabe, Y.-h., Motohashi, K., Yoshida, M., Roles of the Two ATP Binding Sites of ClpB from *Thermus thermophilus*, *J. Biol. Chem.*, **277**, 5804(2002).
- 5) Glover, J. R., Kowal, A. S., Schirmer, E. C., Patino, M. M., Liu, J. J., Lindquist, S., *Cell*, **89**, 811(1997).
- 6) Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A. P., Tomoyasu, T., Bukau, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13732(1999).
- 7) Chernoff, Y., O. Lindquist, S. L., Ono, B., Inge-Vechtormov, S. G., Liebman, S. W., *Science* **268**, 880(1995).
- 8) Inoue Y, Kishimoto A, Hirao J, Yoshida M, Taguchi H. Strong growth polarity of yeast prion fiber revealed by single fiber imaging., *J. Biol. Chem.*, **276**, 35227(2001).

### 著者紹介

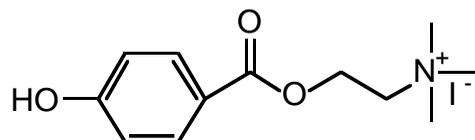
氏名：吉田 賢右 (Masasuke Yoshida)  
 所属：東京工業大学 資源化学研究所 生物資源部門 教授  
 〒226-8503  
 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259  
 TEL:045-924-5233  
 FAX:045-924-5277  
 E-mail:myoshida@res.titech.ac.jp  
 出身校：東京大学 理学系研究科 生物化学専攻課程 博士課程  
 学位：理学博士

## 新製品

### コリンエステラーゼ活性測定用基質

#### p-HBC

化学名 p-Hydroxybenzoylcholine iodide



C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>INO<sub>3</sub>=351.18

p-HBCはコリンエステラーゼ活性を測定するための基質です。p-HBCはコリンエステラーゼにより加水分解され、コリンとp-ヒドロキシ安息香酸を生成します(第一反応)。次いでp-ヒドロキシ安息香酸はNADPHの存在下、4-ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素によりプロトカテキユ酸に変換されます(第二反応)。このとき酸化されるNADPHの340 nmにおける吸光度の減少よりコリンエステラーゼ活性を測定します。第二反応の進行に伴って生ずるプロトカテキユ酸の蓄積は主反応の吸光度測定に正誤差を与えるので、プロトカテキユ酸酸素添加酵素を反応液に共存させて測定系から除去します。

p-HBCは、水に対する溶解性が良好な上、コリンエステラーゼの至適pHにおいても基質安定性がよいため、再現性よく測定できます。また、p-HBCを基質として使用したコリンエステラーゼ活性測定法は反応機序が明確で、検出系にNADPHを用いたUV法であるためモル吸光係数による計測が可能であり、ビリルビン、アスコルビン酸およびグルタチオンなどの還元物質の影響を受けることがありません。

### 参考文献

- 1) 内藤正宏, 他, 新合成基質 p-ヒドロキシベンゾイルコリンを使用した血清 pseudo-cholinesterase の測定法, 第二回臨床化学夏期セミナープログラム集, 79, (1982).
- 2) 日本臨床化学会, 甲信越, 中国支部酵素委員会, 酵素活性測定に関する日本臨床化学会勧告法 ヒト血清コリンエステラーゼ活性勧告法(案), 臨床化学, **25**(1), 15, (1996).

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
p-HBC	1 g	5,000	H324
p-HBC	5 g	20,000	H324

# ケミストからみた ポストゲノム

## 7

~プロテインアレイ(2)タンパク機能解析用プロテインアレイ~

九州大学工学研究院応用化学部門

片山佳樹

### 1.はじめに

前回、プロテインアレイの内、タンパクの発現パターン変化を解析するためのアレイについてご紹介した。今回は、タンパクの機能解析、すなわち、タンパク間相互作用やタンパク-核酸、タンパク-小分子などの相互作用、酵素活性などを直接評価するためのアレイについてご紹介する。Protein-function array (Kodadek)、Functional proteomics (MacBeath)等と呼ばれるものである。タンパク検出用アレイと異なり、この場合には非常に多種類のタンパクを同一基板上に固定化しなければならない。機能解析用プロテインアレイにおける最大の難関は、このタンパクの固定化である。一方、アレイに相互作用させる対象分子は、比較的簡単に検出用の標識を施せるので、検出過程は比較的容易であろう。

### 2.タンパク機能解析法とプロテインアレイ

ヒトをはじめ、幾つかの生物で全ORFやcDNA配列が解析されてきた現在、原理的には、全タンパクを取得する事が可能である。しかしながら、これらを受けて、すぐにゲノム情報の利用が可能になるわけではない。例えば、ヒトに先立ってゲノム配列解析が修了した酵母でも、いまだ49%の遺伝子の機能は未知のままである<sup>1)</sup>。また、タンパクの場合、構造と機能(活性)の間に明確な関連性が無い場合も多い<sup>2)</sup>。ゲノム情報を実際に利用する際には、個々のタンパクの機能解明が不可欠である。しかしながら、全く機能が未知であるタンパクの機能を解析する事は容易なことではない。タンパクの細胞内における機能推定に有用な手段として、当該タンパクに結合するタンパクやその他の分子の特定がある。

タンパク間相互作用の解析法としては、Yeast Two Hybrid Systemが感度のよい方法として知られる<sup>3)</sup>。本手法は、タンパク

間相互作用をレポーター遺伝子の発現シグナルで増幅できるため高感度で、また、ゲノムワイドに行う手法も検討されている。しかしながら、タンパクが転写因子との融合タンパクとしてしか扱えない事や、マルチコンプレックスには適用できない事、転写アクチベータや毒性のあるタンパクには適用できない事、細胞内であるので、条件設定や統一が困難などの欠点がある。免疫沈降法の利用は、マルチコンプレックスにも適用できる手法だが、対象タンパクが様々なタンパク複合体にあることが多く、解析が困難である<sup>4)</sup>。アフィニティークロマトグラフィーやGST pull-downアッセイなどの手法もあるが、ゲノムワイドに行うには不向きである。タンパク-核酸相互作用では、ゲル電気泳動法を用いたゲルシフトアッセイ<sup>5)</sup>やフットプリント法<sup>6)</sup>がある。これらの手法もハイスループット化が問題である。これに対し、多くのタンパクを同一基板上にディスプレイしたアレイは、対象分子との結合を直接観察でき、しかも、pH、イオン強度、タンパクの修飾状態、他の因子の有無などの種々の条件を制御できるため、非常に有望な手法となりうる。また、現在、ほとんどよい方法のない、ハイスループットな小分子の結合アッセイにも適用できるため、薬物スクリーニングなどその利用価値は広範である。

### 3.如何に多種類のタンパクを取得するか

機能解析用プロテインチップでは、基板上に非常に多種類のタンパクを固定化する必要がある。したがって、それらのタンパクをある程度の量、取得せねばならない。原理的には、発現ベクターにcDNAを組み込み、タグ付タンパクとして大腸菌などで発現後、アフィニティー精製すればよいが、ゲノムワイドに行うのは非常に大変であろう。それでも、Invitrogenでは、GALプロモーターとヒスチジンタグを組み込んだベクターを用い、酵母の2000種のタンパクを取得しているし<sup>7)</sup>、Martzenらは、酵母の85%のORFをGSTとの融合タンパクとして得ている<sup>8)</sup>。同様の手法で、Zhuらは6200種といわれる酵母のタンパクの5800種を既に取得し<sup>9)</sup>、予想されるプロテインキナーゼ122種の内、119種を取得している<sup>10)</sup>。今後は、アフィニティータグ配列を付加したプライマーとプロモータ付プライマーを用いてPCRによりcDNAを得た後、*in vitro*タンパク合成法などを用いる方が簡便かもしれない。

### 4.タンパクの固定化

機能解析用タンパクアレイでは、取得したタンパクを基板上に固定することが不可欠である。しかも、固定後、タンパクがその機能を維持している必要がある。しかしながら、タンパクはそれぞれ全く性質が異なり、基板表面との相互作用も異なるため、これは容易なことではない。さらに、理想的には、固定化したタンパク各々が同一の反応性を確保するため、タンパクの向きを揃えて固定化することが好ましい。100種類のタンパクがあれば、100種類の固定化法が必要だという研究者もいるくらいである。

固定化法として最も原始的なものは、ニトロセルローズ膜<sup>11)</sup>やPVDF膜<sup>12)</sup>にタンパクをドットプロットの要領でスポットする物理吸着法である(Fig.1(a))。転写因子などある種のタンパクでは、ある程度の活性を維持できるようなが一般性は乏しい。しかしながら、抗体のスクリーニングなどに用いる場合は、固定化し

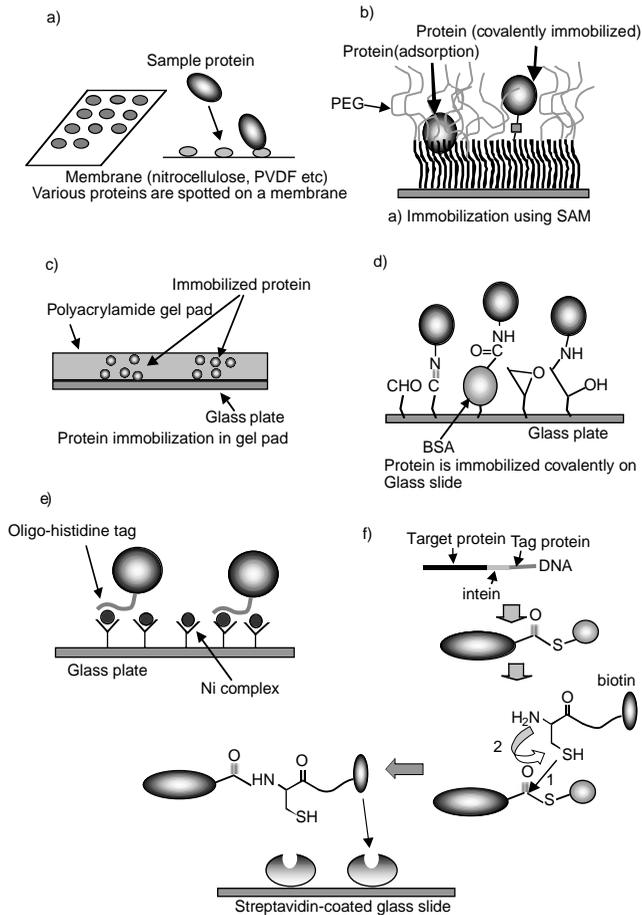


Fig.1 various methods for protein-immobilization for protein-function array

たタンパクが変性していても差し支えないので、この手法で十分である。ただし、一般にタンパクは金属やガラスなどの固体表面との接触で変性しやすいため、何らかの表面修飾が必要である。自己組織化膜(SAM)の利用は、基板表面を自由に修飾でき、利用価値が高い(Fig.1(b))。ただし、一般的なSAMはアルキル鎖などの会合により疎水場を形成するので、そのままではタンパクにとって変性しやすい場を与える。したがって、PEG等をSAMと組み合わせることでより親水性の場に転換してやる必要がある。タンパクの変性の問題を軽減する手法としては、スライドガラス上に厚さ10~100 μmのポリアクリルアミドのパッドを接合して、これにタンパクをスポットする手法がある(Fig.1(c))<sup>13,14)</sup>。この場合、タンパクは3次元空間に吸着するため、固定化量は2次元表面への手法に比べ、100倍以上が可能である。また、タンパクを多孔性ポリアクリルアミドゲル内にアミノ基を介して固定化する方法もある<sup>15)</sup>。

タンパクを表面に吸着させるだけでは、機械強度に問題があるため、一般にはタンパクを何らかの形で基板上につなぎとめる必要がある。そのような手法として最初に報告された方法は、Schreiberらのアルデヒド修飾スライドガラスの利用であろう

(Fig.1(d))<sup>16)</sup>。この場合、タンパクのリジン残基などのアミノ基を介して直接固定化することもできるが、Schreiberらは、まずBSAのようなタンパクを固定化しておき、タンパク表面層を形成させておいて、さらにBSAのグルタミン酸残基などを利用した活性エステルを形成させ、これにタンパクを反応させて固定化する手法を用いている。SAM等の末端に活性エステルを配して、タンパクを固定化することも可能である(Fig.1(b))。また、アミノ基を利用した固定化としては、ガラス表面をエポキシ基で修飾し、これにタンパクを固定化する手法もある<sup>10)</sup>表面のアミノ基を固定化反応に用いると、タンパクの活性が損なわれる事が多く、また、タンパクの向きをそろえることができないなどあまりよい方法とはいえない。

これに対し、タンパクを発現する際、何らかのタグを付加しておけば、そこを基板への固定化に用いることで、基板上でのタンパクの向きをそろえることが可能である。しかも、固定化反応はタンパク本体と別のところで起こるから、活性への影響も最小限に抑える事ができる。このような手法としては、オリゴヒスチジンタグを介して、ニッケル錯体で表面修飾した基板への固定化する方法がある(Fig.1(e))<sup>9)</sup>。この場合、タンパクの活性は比較的よく保たれる。Zhuらの酵母タンパクアレイでも5800種の酵母タンパクを固定化して、約80%が活性を保っている。我々も、この手法を用いてエストロゲン受容体や転写因子を金電極上に固定化しているが、活性はおおむね良好に保たれるようである<sup>17,18)</sup>。ただし、ニッケル錯体は荷電を有しているため、これに作用させるサンプル中の種々の物質や、対象タンパクが非特異吸着をすることがしばしば見られることが欠点である。これに対し、さらに強力な結合であるビオチン-アビジン相互作用を用いる手法も検討されている<sup>19)</sup>。アビジンは毒性を有するタンパクであるため、基板にビオチンを固定化して、固定化するタンパクにアビジンを融合して発現するのは好ましくない。そこで、基板をアビジンでコートしておき、ビオチンをタンパクに修飾する事になるが、ランダムに標識するとタンパクの変性や、固定化方向の統一性が取れなくなる。Yaoらは、インテインを利用してビオチンをタンパク発現時にカルボキシ末端のみに標識する手法を報告している(Fig.1(f))<sup>20)</sup>。インテインは、遺伝子から発現する際にその両端にある遺伝子からのタンパク同士を結合する性質を有しており、この性質を利用してインテイン遺伝子の両端に目的タンパクとマルトース結合タンパクの遺伝子をそれぞれ結合して発現させる。すると、目的タンパクとマルトース結合タンパクがシステイン残基を介してチオエステル結合で融合したタンパクが得られる。これをキチンカラムでアフィニティー精製してキチンに捕捉させておき、これに末端システイン型のビオチン誘導体を作用させると、チオエステル部分で自発的に組換えが起こり、結果的に目的タンパクのC末端にビオチンがペプチド結合により導入される。この手法を用いるとビオチンを介してタンパクを同方向に固定化できる。以前ご紹介したように、タンパクの末端への小分子の標識は、この他にもピューロマイシンを用いた手法でも可能である。これらの手法は非常に興味深い方法であるが、標識効率を如何に上げることがポイントである。同様の戦略として、ある温度以上でヘリックスを形成し、互いに凝集する性質のある感熱性のタンパクを融

合して発現させ、同じタンパクで修飾した基板上に、このタンパクの会合性を利用して固定化する方法もある<sup>21)</sup>。この場合、温度変化により固定化したタンパクを可逆的に脱着できるのが利点であるが、どの程度のタンパクに適用できるのかは不明である。エピトープタグを融合して発現させ、それに対する抗体で修飾した表面に固定化するなどの手法も考えられる。

## 5. 種々の機能解析用プロテインアレイ

機能解析用プロテインアレイとして最初の例は、ニトロセルロース膜状にタンパクをスポットしたユニバーサルアレイである。Ge<sup>11)</sup>は、転写因子など48種類のタンパクをメンブレンにスポットし、アッセイしたいタンパクをGSTとキナーゼ基質ペプチド(RRASV)を融合して発現し、心筋キナーゼと<sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATPによりペプチド部分のセリンをリン酸化することで<sup>32</sup>P標識し、メンブレン上にスポットしたタンパクとの結合性をオートラジオグラフィでアッセイしている。対象分子がDNAの場合は、クレンジフラグメントと<sup>32</sup>P-dCTPで3'末端を<sup>32</sup>P標識している。ただし、この手法ではディスプレイできるタンパクの数と変性しないて用いる事のできるタンパクの種類に限界がある。その後、より一般性があり、高密度にスポットが可能なアレイとしてゲルパッドをガラス基板に接合した種々のアレイが報告された<sup>13,14)</sup>。酵素などの固定化においては、比較的活性がよく保たれるという。

これに対し、よりDNAアレイに近い集積度を有するプロテインチップとして、市販のアレイヤーでタンパクをスポットし、蛍光スキャナーで解析できるアレイが報告されてきた<sup>9,16)</sup>。これらは、前述のアミノ基や、ヒスチジンタグを介した固定化法でガラス基板上に固定化される。この手法では、スポット辺りnL程度の溶液として数千~1万種のタンパクを固定化できるのが最大の利点である。酵母のタンパクでは、比較的活性が保たれるものが多いが、やはり20%ほどは不活性化するようである。検出は、蛍光標識したタンパクや小分子を用い、得られた蛍光強度から結合の程度を推測する。Zhuらは、こうして作成した酵母タンパクアレイに、カルモデュリンやリボソームを作用させ、33種の未知のカルモデュリン結合タンパク、150種のリン脂質結合タンパクを見出している<sup>9)</sup>。また、ポリジメチルシロキサンを素材として18 mm x 28 mmに直径1.4 mmのウェル(300  $\mu$ L)を10 x 14作成し、表面をエポキシ基で修飾し、これに種々の基質タンパクをアミノ基により固定化して、GST融合タンパクとして発現した酵母のプロテインキナーゼ119種類を作用させ、リン酸化を<sup>32</sup>Pを用いて評価した例では、これまで知られていなかったチロシンキナーゼの可能性

のあるキナーゼが7種類見つかった<sup>10)</sup>。

この様に、この種のアレイでは、対象とするタンパクが結合する相手を迅速かつ網羅的に直接評価できるため、タンパクの機能解析には極めて有効である。また、小分子との相互作用の評価例では、<sup>125</sup>Iで標識したトリヨードチロシンを用いた例がある<sup>11)</sup>。

## 6. プロテインアレイの定量性の評価(Fig.2)

プロテインアレイを開発する場合、表面化学に対する知見があまりにも乏しいことが開発を困難にしているが、それにも増して、一体どの程度のタンパクが固定され、それに作用させたタンパクがどの程度結合したのか、さらに検出に標識抗体などを用いる場合には、さらにどの程度の効率で(形成した複合体のどの程度が)検出されているのかといった事を評価するのが極めて困難であり、定量性の議論を妨げている。

Levit-Binnunらは、アルデヒド修飾基板上に固定した(BSA)に対し、ビオチン化抗BSA抗体を結合させるモデル系を用いてこの問題に対しアプローチしている<sup>22)</sup>。検出は、金コロイド標識ストレプトアビジンを用い、走査型電子顕微鏡で検出している。固定化したタンパクをP、作用させる標的分子をMとする。ここで、サンプル溶液中でPと出会えるMの分子数を $m_v$ とすると、Pに結合したM(すなわち、形成された複合体)の分子数 $m_s$ は、PがMより過剰の場合には、 $m_s = m_v \alpha$ で表される。 $m_v$ は、半径 $r$ のディスク(スポット)に関する拡散方程式から計算できる。 $m_v = 4lDrA[M]$ ( $D$ : 拡散係数、 $[M]$ : バルク溶液中のMの濃度、 $A$ : アポガド口数、 $l$ : 拡散流)。ここで、例えばMとして抗体を用いているが、 $D = 3.8 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ <sup>23)</sup>、 $r$ は200  $\mu\text{m}$ 、3時間作用させたとすると、 $m_v = 1.98 \times 10^{17}$ となる。 $\alpha$ は、基板表面で複合体が形成される効率であり、これが分かれば、サンプル溶液のタンパク濃度が分かり基板表面で形成される複合体数が分かる。 $\alpha$ は、用いる系に固有の値であり、反応基の表面被覆率やその上のPの固定化率、PとMの $K_d$ など多くの因子で形成される。一方、検出効率を $\beta$ とすると、検出される分子数 $m_d$ は、 $m_d = m_s \beta = m_v \alpha \beta$ となる。よって、全プロセスでの検出効率は、 $\alpha \beta$ で表される。すなわち、作用させるタンパクの濃度を変化させて、 $m_d$ と $m_s$ をプロットすれば、傾きから $\alpha \beta$ が求まる。もし、作用させるタンパクMを直接蛍光標識などした場合は、 $\beta$ は1となり、この実験で $\alpha$ が求まる。

## 7. おわりに

タンパク機能評価用のプロテインアレイは、直接タンパクと対象分子の結合を評価でき、しかも、標的分子としてタンパク以外にも核酸や小分子なども自由に用いる事ができるため、多くのタンパクが取得できれば、非常に有効な方法となる。しかしながら、多くのタンパクを変性させずに、しかも、互いに決められた量、決められた効率で固定化することは極めて困難である。今後、膨大な表面化学に関する基礎検討と、理論的検討、基板の加工法検討などの知見が蓄積されて初めて、理想的なプロテインアレイが開発できるものと考えられ、まだかなりの時間と開発費用を要するものであると考えられる。一方、タンパク検出用プロテインアレイのところでも指摘したように、タンパクは決して1:1の相互作

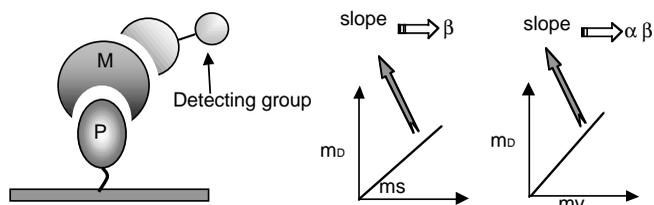


Fig.2 Method for quantitation of protein interaction

用をするものではなく、細胞内では既に、マルチコンプレックスを形成している場合が多い。このような場合、プロテインアレイを用いた結果が、はたして真の標的タンパクの機能的な姿を反映しているかどうかは依然として問題の残るところであることは承知しておく必要がある<sup>24)</sup>。

プロテインアレイは、潜在的な能力は疑う余地のないところであるが、開発上の多くの問題を抱えており、実用化にはまだ時間を要する。最近、薬物標的として利用しやすい膜タンパクに対してリガンド結合や機能評価を行うためのチップが種々検討され始めており、興味深い結果が出てきている。次回は、このような膜タンパクに対するプロテインチップ開発に関してご紹介する。プロテインチップは、DNAチップでは不可能な事にこそ用いるべきであり、最近、翻訳後修飾や小分子結合、活性変化等を対象にしたアレイの検討がなされている。そのような中で、ペプチドアレイは、タンパクに付きまとう変性の問題が無いため、よりシンプルに問題にアプローチできる。そこで、最近、ペプチドアレイも非常に活発に報告されている。これに関しても、追ってご紹介していく。

#### 参考文献

- 1) M. C. Costanzo, J. D. Hogan, M. E. Cusick, B. P. Davis, A. M. Fancher, P. E. Hodges, P. Kondou, C. Langieza, J. E. Lew-Smith, C. Linger, K. J. Roberg-Perez, M. Tillberg, J. E. Brooks, J. I. Garrels, *Nucleic Acid Res.*, **28**, 73 (2000).
- 2) A. E. Todd, C. A. Orengo, J. M. Thornton, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 548 (1999).
- 3) P. S. Bartel, S. Fields, *Methods Enzymol.*, **254**, 241 (1995).
- 4) A-C. Gavin, M. B. Marzioch, A. Bauer, J. C-M Cruciat, M. Remor, C. H. A. Merino, K. Klein, M. Hudak, D. Dickson, T. Rudi, V. Gnau, A. Bauch, S. Bastuck, B. Huhse, C. Leutwein, M-A. Heurtier, R. R. Copley, A. Edelmann, E. Querfurth, V. Rybin, G. Drewes, M. Raida, T. Bouwmeester, P. Bork, B. Seraphin, B. Kuster, G. Neubauer, G. Superti-Furga, *Nature*, **415**, 141 (2002).
- 5) S. Fields, R. Sternglanz, *Trends Genet.*, **10**, 286 (1994).
- 6) M. Harris, *Methods Mol. Biol.*, **88**, 87 (1998).
- 7) J. A. Heyman, J. Cornthwaite, L. Foncerrada, J. R. Gilmore, E. Gontang, K. J. Hartman, C. L. Hernandez, R. Hood, H. M. Hull, W-Y. Lee, R. Marcil, E. J. Marsh, K. M. Mudd, M. J. Patino, T. J. Purcell, J. J. Rowland, M. L. Sindici, J. P. Hoeffler, *Genome Res.*, **9**, 383 (1999).
- 8) M. R. Martzen, S. M. McCraith, S. L. Spinelli, F. M. Torres, S. Fields, E. J. Grayhack, E. M. Phizicky, *Science*, **286**, 1153 (1999).
- 9) H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein, M. Snyder, *Science*, **293**, 2101 (2001).
- 10) H. Zhu, J. F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor, K. G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M. A. Reed, M. Snyder, *Nat., Genetics*, **26**, 283 (2000).
- 11) H. Ge, *Nucleic Acid Res.*, **28**, e3 I-vii (2000).
- 12) L. J. Holt, K. Bussow, G. Walter, I. M. Tomlinson, *Nucleic Acid Res.*, **28**, e72 I-v (2000).
- 13) D. Guschin, G. Yerшов, A. Zaslavsky, A. Gemmell, V. Shick, D. Proudnikov, P. Arenkov, A. Mirzabekov, *Anal. Biochem.*, **250**, 203 (1997).
- 14) A. Lueking, M. Horn, H. Eickhoff, K. Bussow, H. Lehrach, G. walter, *Anal. Biochem.*, **270**, 103 (1999).
- 15) P. Mitchell, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 225 (2002).
- 16) G. MacBeath, S. L. Schreiber, *Science*, **289**, 1760 (2000).
- 17) M. Murata, M. Nakayama, H. Irie, K. Yakabe, K. Fukuma, Y. Katayama, M. Maeda, *Anal. Sci.*, **17**, 387 (2001).
- 18) M. Murata, M. Nakayama, H. Irie, K. Yakabe, K. Fukuma, Y. Katayama, M. Maeda, T. Suzutani, *Anal. Sci.*, **17**, i1273 (2001).
- 19) K-L. Tsao, B. DeBarbieri, H. Michel, D. S. Waugh, *Gene*, **169**, 59 (1996).
- 20) M-L. Lesaichere, R. Y. P. Lue, G. Y. J. Chen, Q. Zhu, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 8768 (2002).
- 21) N. Nath, A. Chilkoti, *Anal. Chem.*, **75**, 709 (2003).
- 22) N. Levit-Binnun, A. B. Lindner, O. Zik, Z. Eshhar, E. Moses, *Anal. Chem.*, **75**, 1436 (2003).
- 23) F. D. Carlson, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **4**, 243 (1975).
- 24) G. MacBeath, *Nat. Genetics*, **32**, 526 (2002).

#### 第14回フォーラム・イン・ドージン 開催のご案内

テーマ：

**糖鎖生物学:多様な糖鎖構造が作りだす生物機能と病態**

本年は、糖鎖をテーマとしたフォーラムを開催する予定としております。

下記先生方をお招きし、ご講演いただく予定です。

詳細は次号に掲載いたしますが、小社ホームページでも順次案内させていただきます。

谷口 直之 大阪大学大学院医学系研究科生化学  
 入村 達郎 東京大学大学院薬学系研究科  
 成松 久 産業技術総合研究所糖鎖工学センター  
 浅野 雅秀 金沢大学学際科学実験センター遺伝子改変動物分野  
 古川 鋼一 名古屋大学大学院医学系研究科生化学  
 宮城 妙子 宮城県立がんセンター研究所生化学  
 本家 孝一 高知医科大学遺伝子病態制御学教室  
 遠藤 玉夫 東京都老人総合研究所

日 時：平成 15 年 11 月 28 日(金) 9 : 30 開演  
 会 場：鶴屋ホール(テトリア熊本 7 階)  
 熊本市手取本町 6-1

参加費：無料

お問い合わせ：フォーラム・イン・ドージン事務局  
 (担当：蒲野、堀口)

お申し込み先：E-mail:komine@dojindo.co.jp  
 または d-hori@dojindo.co.jp  
 TEL:0120-489548 FAX:0120-021557  
 URL http://www.dojindo.co.jp/

## 新製品

### 遺伝子傷害検出抗体

#### Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody (Clone# NO<sub>2</sub>G52)

抗ニトログアノシンモノクローナル抗体 (Clone# NO<sub>2</sub>G52)

#### Anti-Nitroguanosine polyclonal antibody

抗ニトログアノシンポリクローナル抗体

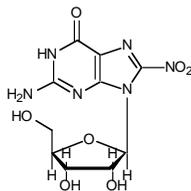
#### 8-Nitroguanine(lyophilized)

8-ニトログアニン (凍結乾燥品)

<特長>

- 遺伝子傷害のマーカー
- 高い特異性、免疫組織染色、ELISA で使用可能
- モノクローナル抗体サブタイプ: IgG<sub>1</sub>

8-ニトログアノシンは、生体内で血管の弛緩を制御し血圧調節をつかさどっている一酸化窒素(NO)と、活性酸素(スーパーオキシドアニオンラジカル)によって生じる過酸化亜硝酸(パーオキシナイトライト)によってRNAがニトロ化された核酸です。生体組織が炎症を起した際には、多量のNOが産生され、多くの過酸化亜硝酸が生じグアノシンをニトロ化することが知られています。化学修飾を受けた核酸塩基は、脱プリン部位を生成し細胞分裂によって遺伝子を複製する際に、翻訳の間違いを引き起こし、本来G-Cの対であった部分が、分裂と共にT-A対に置き換えられた遺伝子変異を引き起こすと言われており、癌組織中にはT A配列が多く存在することが知られております。これらのことから、8-ニトログアノシンは発癌や遺伝子変異に関与した遺伝子傷害の指標として注目されています。



8-ニトログアノシンの構造

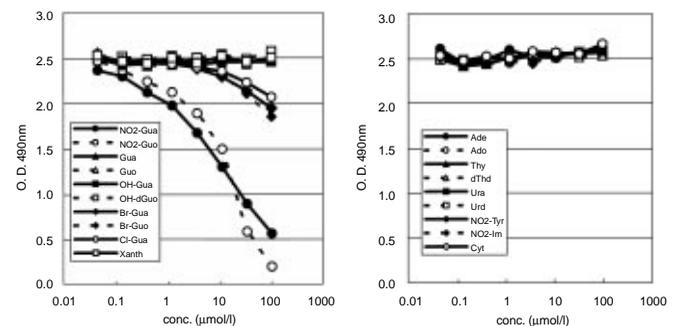
今回、熊本大学 赤池孝章先生らのグループと共同で抗ニトログアノシン抗体を開発致しました。赤池先生らはまず、ポリクローナル抗体を用いて、インフルエンザ感染マウスの肺上皮細胞の炎症を起した場所でニトログアノシンが多量に生成していることを発見しました。ニトログアノシンの局在は抗iNOS抗体で染色したiNOS発現部位と一致し、過剰に産生したNOによってニトログアノシンが生成していることが示唆されました<sup>1)</sup>。NOがウィルス遺伝子の変異をもたらすことは知られており<sup>2)</sup>、ニトログアノシンがNO由来の遺伝子変異に関与していることが考えられます。その後、力価の高いモノクローナル抗体で検討を進めていくと、ニ

トログアノシンは炎症部位以外にも正常な細胞でも微量ながら生体内に広く存在し、遺伝子傷害の指標としてだけでなく、生体内での酸化還元に関与し、生体機能を調節する因子として作用していることが示唆されました。抗ニトログアノシン抗体を用いれば、細胞内、特にヌクレオチドプールやRNA中にあるニトログアノシンの存在を免疫組織化学的染色によって検出することができ、ニトログアノシンの役割や遺伝子傷害や発癌機構の解明に役立つものと期待されています。

#### Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody (Clone# NO<sub>2</sub>G52)

モノクローナル抗体は、8-ニトログアノシンとその塩基である8-ニトログアニンに強く反応しますが、正常なヌクレオシドや核酸塩基には反応しません。また酸化ストレスのマーカーである8-ヒドロキシグアニン、8-ヒドロキシデオキシグアノシン、3-ニトロチロシンとも交差しない上、構造的に8-ニトログアニンと類似しているキサンチンや2-ニトロイミダゾールとも交差しないなど、抜群の特異性と高力価を有しています。

下図はプレートに固相化した8-ニトログアノシン結合BSA(NO<sub>2</sub>-Guo-BSA)と各種の物質に対する、本抗体の反応を競合法ELISAで検定したものです。8-ニトログアノシンと8-ニトログアニンに対してのみ、競合物質の濃度に依存した右下がりの曲線を与え、本抗体が反応していることを示しています。他のヌクレオシド等は反応しないため、競合物質の濃度に関係なく本抗体は固相化したNO<sub>2</sub>-Guo-BSAに反応し、ほぼ一定の値を示します。



モノクローナル抗体NO<sub>2</sub>G52の反応性

用途

- ELISA (1 µg/ml)、免疫組織染色 (10 µg/ml)

モノクローナル抗体NO<sub>2</sub>G52の反応性 (IC<sub>50</sub> (µmol/l))

- 強く反応する(10 µmol/l)  
8-NO<sub>2</sub>-guanosine, 8-NO<sub>2</sub>-guanine
- わずかに交差反応あり(>1 mmol/l)  
8-Br-guanosine, 8-Br-guanine, 8-Cl-guanine

## 新製品

### 遺伝子傷害検出抗体

- 交差反応なし  
guanosine, guanine, 8-OH-guanine, 8-OH-deoxyguanosine, xanthine, adenine, adenosine, thymine, deoxythymidine, uracil, uridine, 3-NO<sub>2</sub>-tyrosine, 2-NO<sub>2</sub>-imidazole, cytosine

#### 動物種

- マウス (BALB/c)

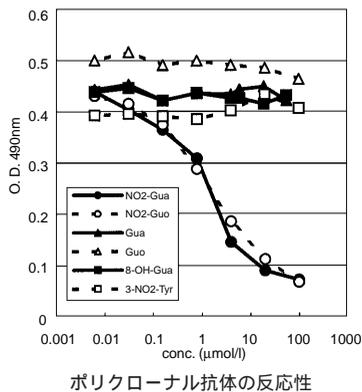
#### 形状および保存

- 凍結溶液 (1 mg/ml PBS 溶液、防腐剤として 0.1% ProClin を含む)
- 冷凍 (解凍後は冷蔵保存)

本抗体はわずかに 8-Br- グアノシン、8-Br-グアニン、8-Cl- グアニンと交差反応を示しますが、これはグアニンの 8 位近傍を正確に認識する力価が高いためと考えられます。8-ニトログアノシン、8-ニトログアニンとの反応性の差は100倍以上ありますので、問題なく使用できます。

### Anti-Nitroguanosine polyclonal antibody

ポリクローナル抗体も8-ニトログアノシンと8-ニトログアニンにのみ反応し、正常なグアノシン、グアニンには反応しません。また8-ヒドロキシグアニンや、3-ニトロチロシンとも交差しません。ウサギ由来であるためマウスなどげっ歯目の組織染色に適用できます。



#### 用途

- ELISA (5 μg/ml) 免疫組織染色 (10 μg/ml)

#### ポリクローナル抗体の反応性(IC<sub>50</sub>(μmol/l))

- 強く反応する(1 μmol/l)  
8-NO<sub>2</sub>-guanosine, 8- NO<sub>2</sub>-guanine

- 交差反応なし  
guanosine, guanine, 8-OH-guanine, 3- NO<sub>2</sub>-tyrosine

#### 動物種

- ウサギ (日本白色種)

#### 形状および保存

- 凍結溶液 (200 μg/ml PBS 溶液、防腐剤として 0.1% ProClin を含む)
- 冷凍 (解凍後は冷蔵保存)

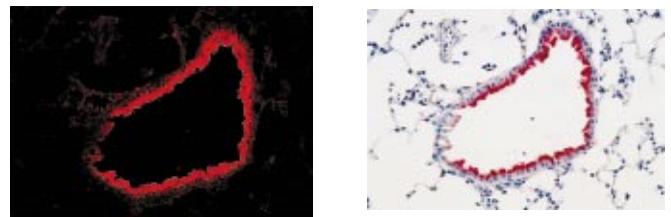


Fig.1 インフルエンザウィルス感染マウスの肺上皮組織切片を 8- ニトログアノシンポリクローナル抗体と蛍光(Vector Red)標識抗マウス抗体によって免疫組織染色した画像。

(熊本大学医学部微生物学教室 赤池孝章助教授ご提供)

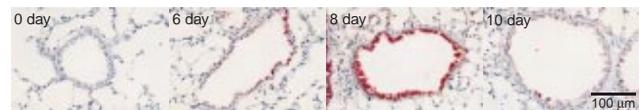


Fig.2 インフルエンザウィルス感染マウスの肺上皮組織における 8- ニトログアノシンポリクローナル抗体による免疫組織染色画像。

左から感染後 0, 6, 8, 10 日目。

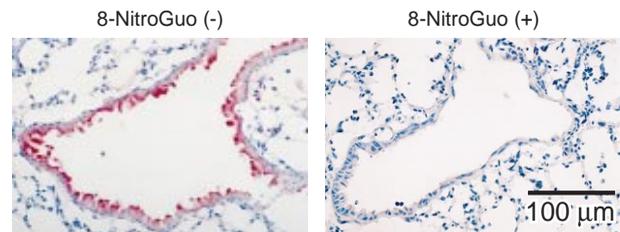


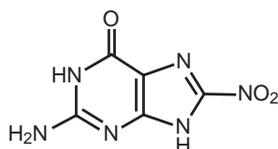
Fig.3 インフルエンザウィルス感染マウスの肺上皮組織。左は 8- ニトログアノシンポリクローナル抗体による免疫組織染色画像。右は染色時にニトログアノシンを添加した吸収試験画像。

## 新製品

### 遺伝子傷害検出抗体

#### 8-Nitroguanine(lyophilized)

8-Nitroguanine(lyophilized)は組織染色での吸収試験用です。PBS溶液を凍結乾燥したもので、0.4 mlの超純水を加えることにより1.2 mmol/lの濃度に調整できます。予め過剰の8-ニトログアニンで処理した抗体を添加した染色像が陰性であれば、抗体による陽性像は非特異的染色ではなく8-ニトログアノシンまたは8-ニトログアニンを検出していることを意味します。



8-Nitroguanine の構造

#### 参考文献

- 1) T. Akaike, S. Okamoto, T. Sawa, J. Yoshitake, F. Tamura, K. Ichimori, K. Miyazaki, K. Sasamoto, and H. Maeda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** (2), 685 (2003).
- 2) T. Akaike, S. Fujii, A. Kato, J. Yoshitake, Y. Miyamoto, T. Sawa, S. Okamoto, M. Suga, M. Asakawa, Y. Nagai, and H. Maeda, *FASEB J.*, **14**, 1447 (2000).

品名	容量	価格( ¥ )	メーカーコード
Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody (Clone# NO <sub>2</sub> G52)	50 µg ( 50 µl/vial)	65,000	AB02
Anti-Nitroguanosine polyclonal antibody	50 µg (250 µl/vial)	55,000	AB01
8-Nitroguanine (lyophilized)	100 µg	15,000	N455

#### 抗ニトログアノシン抗体発売記念キャンペーンのご案内

小社から抗体の新製品が6月24日に誕生しました。発売を記念しまして通常包装容量50 µgのところ、お気軽に試しやすい10 µg包装を期間限定で販売致します。この機会に是非お試し下さい。

キャンペーン期間：2003年6月24日(火)～8月12日(火)  
 キャンペーン商品：

品名	容量	価格( ¥ )	和光コード	メーカーコード
Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody(Clone#NO <sub>2</sub> G52)	10 µg	16,000	341-90671	AB02
Anti-Nitroguanosine polyclonal antibody	10 µg	14,000	348-90681	AB01

キャンペーン問合せ先：

和光純薬工業 学術部 TEL:06-6203-1788  
 同仁化学研究所 マーケティング部 TEL:096-286-1515

## 新製品

### HTS用細胞内カルシウム測定キット

#### Calcium Kit – Fluo 3

#### 特長

- Probenecidや界面活性剤を別添付にしており、任意の濃度に調製可能。
- ハイスループットスクリーニングに用いられる各種蛍光プレートリーダーで測定可能。
- 96穴マイクロプレート、384穴マイクロプレートの両方に対応。

Calcium Kit - Fluo 3は、細胞内Ca<sup>2+</sup>測定試薬であるFluo 3-AMと、その測定に必要なBuffer等を組み込んだ大量スクリーニングに最適なキットとなっております。細胞種や添加する薬剤などに応じて、Pluronic F-127またはCremophor EL( Fluo 3-AMの溶解補助剤)、Probenecid(陰イオントランスポーターの阻害剤)の各濃度を任意に設定することが可能です。1キットで2,000アッセイ(96穴プレート20枚分)の測定が可能です。

#### キット内容

- |                           |             |
|---------------------------|-------------|
| • Fluo 3-AM               | 1 mg × 1本   |
| • Dimethylsulfoxide       | 2 ml × 1本   |
| • Recording Medium (2 × ) | 100 ml × 2本 |
| • 250 mmol/l Probenecid   | 2.5 ml × 1本 |
| • 5% Pluronic F-127       | 5 ml × 1本   |
| • 5% Cremophor EL         | 5 ml × 1本   |

\* 必要に応じて細胞洗浄用のPBSをご用意下さい。Kitには組み込まれておりません。

#### 測定方法

#### 細胞の培養

- 附着細胞を使用する際は一般に、96穴プレートでは15,000 cells/well、384穴プレートでは5,000 cells/well程度の細胞を、一晚培養して使用することをお勧めします。
- 培養に用いる培地の量は、96穴プレートで100 µl/well、384穴プレートで25 µl/wellをお勧めします。

#### Loading Bufferの調製(マイクロプレート20枚分)

1. 添付のDimethylsulfoxideから1 mlを分取し、Fluo 3-AM 1本(1 mg)に加え、よく溶解する。
2. 200 mlスケールの容器を準備する。Recording Medium(2 × )100 mlに、測定条件に応じて、任意の量<sup>\*)</sup>の5% Pluronic F-127(または5% Cremophor EL)、250 mmol/l Probenecidを添加し、これに全量が200 mlとなるように純水を加え、よく混合する(本キットは予め、測定に最適なpH7.4付近となるよう構成してあります。)
3. Fluo 3-AMのDimethylsulfoxide溶液(1 ml)を添加して、超音波などでよく溶解し、Loading Bufferとする。

<sup>\*)</sup> 推奨濃度をProbenecid: 1.25 mmol/l、Pluronic F-127: 0.04%としておりますが、濃度の変更は可能です。Loading

新製品

HTS 用細胞内カルシウム測定キット

Buffer 200 ml を調製する場合、Probenecid、Pluronic F-127 (またはCremophor EL) のアッセイ時の最終濃度と、添加量の関係は以下ようになります。

250 mmol/l Probenecid の添加量と最終濃度

添加量 (ml)	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
最終濃度 (mmol/l)	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50

5% Pluronic F-127 (または5% Cremophor EL)の添加量と最終濃度

添加量 (ml)	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
最終濃度 (%)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05

Recording Medium (1 x) の調製 (マイクロプレート 20 枚分)

1. 別途、200 ml スケールの容器を準備する。Recording Medium (2 x) 100 ml に、測定条件に応じて、任意の量<sup>\*2)</sup> 250 mmol/l Probenecid を添加し、これに全量が 200 ml となるように純水を加え、よく混合する (本キットは予め、測定に最適な pH7.4 付近となるよう構成してあります)。
2. 37 °C インキュベーター中で加温しておく。

<sup>\*2)</sup> 推奨濃度を Probenecid: 1.25 mmol/l としておりますが、濃度の変更は可能です。Recording Medium (1 x) 200 ml を調製する場合、Probenecid のアッセイ時の最終濃度と、添加量の関係は以下ようになります。

250 mmol/l Probenecid の添加量と最終濃度

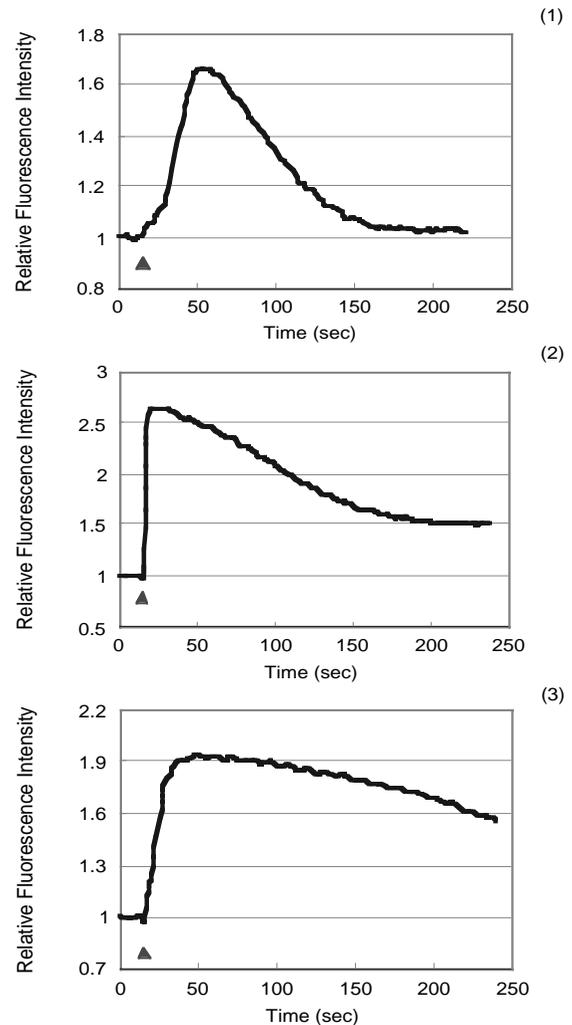
添加量 (ml)	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
最終濃度 (mmol/l)	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50

細胞への Fluo 3-AM のロード

1. 細胞を傷つけないように培地を取り除いた後、96穴プレートで 100 μl/well、384 穴プレートで 25 μl/well の Loading Buffer を、それぞれの well に加える (必要に応じて、Loading Buffer を添加する前に、37 °C に加温した PBS で細胞を洗浄して下さい)。
2. 37 °C で 1 時間、インキュベートする。
3. 細胞を傷つけないように Loading Buffer を取り除き、予め 37 °C に加温しておいた Recording Medium (1 x) を、96 穴プレートで 100 μl/well、384 穴プレートで 25 μl/well ずつ加える (必要に応じて、Recording Medium を添加する前に、37 °C に加温した PBS で細胞を洗浄して下さい)。
4. 薬剤添加による蛍光強度変化を、ハイスループットスクリーニング用の各種蛍光プレートリーダーで測定する。

注意事項

- 本キットは、冷凍にて保存してください。
- Fluo 3-AM Dimethylsulfoxide 溶液、Loading Buffer 及び Recording Medium は、用時調製してください。
- Fluo 3-AM を Dimethylsulfoxide に溶かした状態で長期保存しますと、Fluo 3-AM が分解する可能性がございます。Loading Buffer は、1 回の操作で使い切ることをお勧めします。
- ご購入後、1 年以内にご使用ください。



Calcium Kit-Fluo 3 測定結果

- (1)メラニン凝集ホルモン(MCH) 受容体を発現させた CHO 細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞, 15,000 cells/well)を 10 nmol/l MCH で刺激した。
- (2)orexin B 受容体を発現させた CHO 細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞, 15,000 cells/well)を 10 nmol/l orexin で刺激した。
- (3)SH-SY5Y 細胞(ヒト神経芽腫細胞 15,000 cells/well)を 0.1 μmol/l ionomycin で刺激した。

品名	容量	価格 ( ¥ )	メーカーコード
Calcium Kit - Fluo 3	2000 assays	65,000	CS21

# Topics on Chemistry

## 抗体のもつ触媒活性の意味とは？

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES,INC. 大内 雄也

抗体が触媒活性をもっているのをご存知だろうか？

1986年に抗体触媒が初めて報告されて以来、化学的手法では達成できない反応や既存の酵素では触媒しないような反応など、抗体がさまざまな化学反応を触媒することが示されてきた。今や抗体は単なるアダプタータンパクとしてではなく、触媒としての地位を築きつつある。にもかかわらず、実際に体の中で抗体が触媒として働いているかどうかは確認されていない。はたして抗体のもつ触媒能は単なる人工の産物なのであるか？

今回、ここに生体内に存在する抗体が過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) の生成を触媒し、この触媒プロセスが実際の免疫応答に関与することを示唆する興味深い報告についてご紹介したい。

最近 Wentworth Jr. らの報告によって、抗体が一重項酸素 ( $^1O_2^*$ ) からの過酸化水素の生成を触媒することが明らかとなった<sup>1)</sup>。この触媒活性は、抗体の種類や抗原特異性とは無関係にすべての抗体において観察されており、キセノンを用いたX線結晶構造解析は、一重項酸素が抗体によく保存された特定の疎水ポケットに結合することを示唆している。詳細なメカニズムは不明であるが、抗体は一重項酸素と水から中間生成物として  $H_2O_3$  を産生し、それから過酸化水素を発生させているようである<sup>2)</sup>。

これらの報告は、触媒活性が体内に存在する抗体にも備わっているということを証明するとともに、抗体のもつこの触媒活性が体内においてどのような役割を担っているのかという新たな疑問を投げかけることとなった。

貪食細胞は酸素から活性酸素を産生して、細菌などの外敵を酸化分解することが知られている。はじめに酸素は活性化された NADPH オキシダーゼによってスーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) に還元される。その後、過酸化水素を経由して殺菌性の高いヒドロキシラジカルや次亜塩素酸に変換されるのである。一重項酸素は次亜塩素酸から生成される活性酸素であるが、彼らは抗体がこの一重項酸素を過酸化水素に変換しているのではないかと考えている (図 1)<sup>3)</sup>。しかし、なぜ抗体がこの反応を触媒するのかという疑問の解決には至っていない。

最近の論文<sup>4)</sup>で、彼らはこの疑問に対する1つの答えを導き出している。抗体自身が殺菌を行っているというのである。確かに過酸化水素は活性酸素の1つとして殺菌に関与することが知られている。しかし、過酸化水素自体の活性はそれほど高くない。実際に殺菌効果を示すのは、過酸化水素から発生するヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) や次亜塩素酸 ( $HOCl$ ) などであり、事実、抗体から産生される過酸化水素だけでは殺菌に十分ではないことが示されている。つまり、抗体はこの触媒プロセスにおいて、過酸化水素とは異なる別の活性種を産生して殺菌を行っている可能性が考えられるのである。彼らはそれがオゾンのような化学種であると推察している。この化学種は抗体の触媒プロセスにおいてだけでなく、好中球の活性化や炎症の際にも発生することが確認されている。すなわち、抗体は過酸化水素からさらにオゾン様の活性種を産生することで実際の免疫系に寄与していることが示唆されたのである。

オゾンはそれ自体非常に強力な酸化剤であるが、寿命が短く、電子を受け取ると無害な酸素に変わる。このようなオゾンの性質は、ある特定の部位だけに殺菌作用を及ぼすという点で非常に都合がいいのかもしれない。また、オゾンは炎症における活性化因子として働いているという報告もある<sup>5,6)</sup>。抗体は我々が想像する以上に緻密に免疫系をコントロールしているのかもしれない。抗体のもつ触媒活性は未知の免疫経路の存在を示唆している。

### 参考文献

- 1) A. D. Wentworth, L. H. Jones, P. Wentworth Jr., K. D. Janda, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 10930 (2000).
- 2) P. Wentworth Jr. *et al.*, *Science*, **293**, 1806 (2001).
- 3) P. Wentworth Jr., *Science*, **296**, 2247 (2002).
- 4) P. Wentworth Jr. *et al.*, *Science*, **298**, 2195 (2002).
- 5) G. F. Joos *et al.*, *Allergy*, **55**, 321 (2000).
- 6) H.-Y. Cho *et al.*, *Am. J. Physiol.*, **280**, L537 (2002).

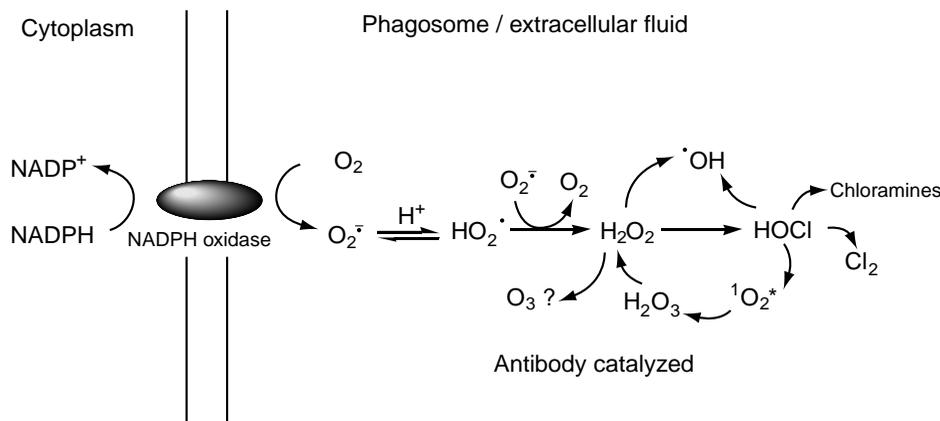


図 1. 貪食細胞による活性酸素の生成プロセス (文献 3 より改変)

## 新製品

### 残留塩素測定キット

#### 残留塩素測定キット-SBT法 残留塩素測定試薬-SBT法

##### 特長

- 検水中の遊離残留塩素と瞬時に反応し、青緑色に発色する。
- 発色試薬は安定な水溶液で、DPD法のように溶解・混和の操作が不要である。
- 感度はDPD法の約2倍を示す。
- 0～2.0 ppmまでの遊離残留塩素を測定できる。
- DPDに比べ極めて低い細胞毒性・変異原性を示す。

##### はじめに

古くから水道水およびプール水中の消毒には次亜塩素酸ソーダなどの塩素剤が用いられてきました。わが国では水道法により水道水中の遊離残留塩素濃度は0.1 mg/l(0.1 ppm)以上を維持することが定められており、各水道局などでは常に塩素濃度を監視しています。また、近年公衆浴場等の浴槽水からのレジオネラ菌類による集団感染が問題となっておりますが、塩素剤を用いた浴槽水の殺菌が有効であるために、厚生労働省から浴槽水中の遊離残留塩素濃度を維持・管理するよう指針が出されています。

残留塩素濃度の測定には、安価で操作性の良い吸光光度法が望まれます。N,N-Diethylphenylenediamine (DPD)が測定試薬として汎用されていますが、1) 検水への溶解・混和が煩雑である、2) 溶液状態で不安定などの問題がありました。昨年弊社で開発したSAT-3を用いた残留塩素測定では(Dojin News, No. 100, 10-11 (2001)参照) DPDより高感度検出を実現しましたが、溶液中での安定性が十分でなく、とりわけ日光下ではしだいに着色してしまうという問題がありました。

残留塩素測定キット-SBT法は、新規発色試薬(SBT)によりSAT-3法の問題を解決し試薬溶液の安定性の向上を実現しました。また、点眼瓶による試薬添加および色調比色計の採用などにより、より使いやすいキットとしました。お客様のご要望にお応えして新たに、高温の温水測定に対応した高温用色調比色板を追加致しました。

##### セット内容

検水調整液(白キャップ点眼瓶)	1本
色素液(青キャップ点眼瓶)	1本
色調比色計	1式
試験管	2本
スポイド	1本
高温用色調比色板	1枚

(キットの仕様は平成15年6月27日現在のものであり、予告なく変更される場合があります)

##### 測定手順

1. 試験管の下部のラインまで検水を入れる。
2. 検水調整液(白キャップ点眼瓶)を2滴加え軽くふり混ぜる。
3. 色素液(青キャップ点眼瓶)を1滴加え軽くふり混ぜる。
4. 発色後ただちに色調比色計にセットし、遊離残留塩素濃度を求める。

##### 次亜塩素酸の定量

本キットを用いて次亜塩素酸と反応させた時の発色および吸収スペクトルをFig.1およびFig.2に示します。水中の次亜塩素酸濃度に応じてSBTの青緑色の発色が強くなります。

また、各塩素濃度におけるSBTの675 nmでの吸光度を塩素濃度に対してプロットすると、相関係数  $R^2=0.999$  と良好な直線性を示します。その検量線はDPDのそれより約2倍の傾きを示し、より高感度な次亜塩素酸濃度の測定が可能です(Fig.3)。

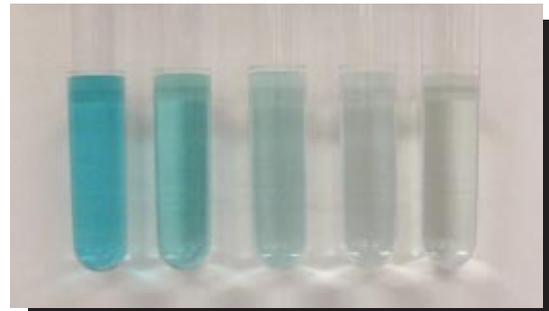


Fig.1 残留塩素 SBT キットによる発色  
左より[HClO]=2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 ppm

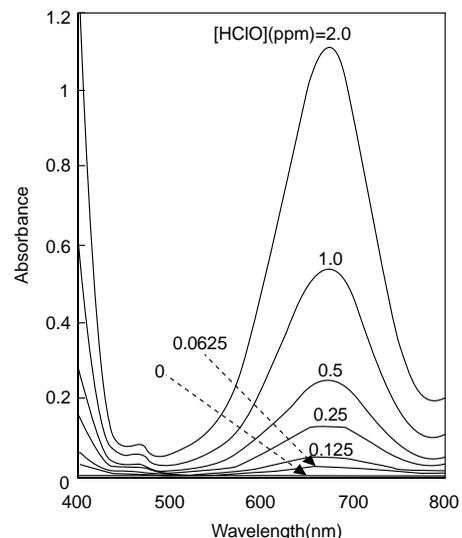


Fig.2 SBTの吸収スペクトル

残留塩素測定キット

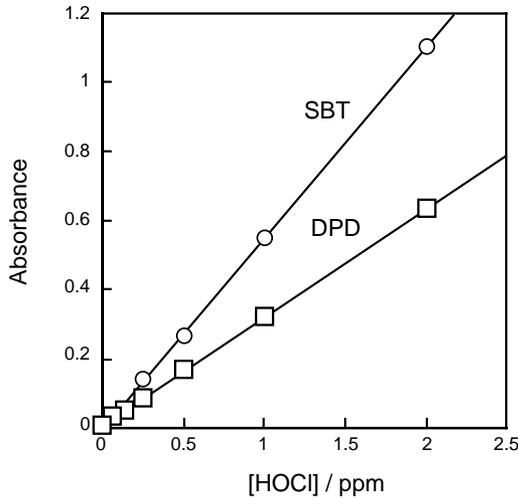


Fig.3 SBTおよびDPDの検量線

< 浴槽水中の残留塩素測定 >

近年、温泉や公衆浴場でレジオネラ菌に感染するケースが多発しています。宮崎県での集団感染では、感染者数は300名ちかくまで昇りそのうち7名が死亡するという衝撃的なケースとなりました。この他、全国各地でレジオネラ菌の感染事例が多数報告され世間を震撼させています。この背景には温泉施設の大型化・近代化に伴い、「循環式」の浴槽が普及してきたことが挙げられ、パイプやタンク、濾過器の清掃・消毒等の衛生管理を怠ったため浴槽中に菌が繁殖し、人体へ影響を及ぼす濃度にまで増殖したためとされています。厚生労働省はこのような事例を受け、レジオネラ症防止対策に関する指針等を各都道府県・政令市市長宛てに度々通達してきました。平成14年10月29日発行の指針では、「浴槽水の消毒に当たっては、塩素系薬剤を使用し、浴槽水中の遊離残留塩素濃度を頻繁に測定して、通常1L中0.2ないし0.4mg程度を保ち、かつ、遊離残留塩素濃度は最大1L中1.0mgを超えないよう努めるとともに、当該測定結果は検査の日から三年間保管すること」とされています。今後、各自治体での条例化が進み、塩素濃度の測定の義務化が予想されます。

残留塩素測定キット-SBT法は温泉水中の残留塩素測定が可能な試薬として開発いたしました。Fig.4には、熊本県内の数箇所から採取した源泉水に次亜塩素酸を添加したものを、SBT法およびDPD法で測定した結果を示しました。SBT法はDPD法と高い相関性があることが分かりました。また、残留塩素測定キット-SBT法は殺菌能力の少ない結合型塩素とは反応しません。このようにSBT法は多種多様な成分が含まれる温泉水においても正確に遊離残留塩素濃度を求めることができます。

< SBTの細胞毒性 >

過去、残留塩素測定試薬として汎用されていたオルトトリジン、その毒性が高いために2002年4月、上水試験の公定法から

削除され、現在はDPDが残留塩素測定試薬の主流となっています。しかしながら、DPDもその毒性が懸念されることから、DPDおよびSBTの細胞毒性試験をヒト子宮ガン細胞(HeLa細胞)を用いて行いました。

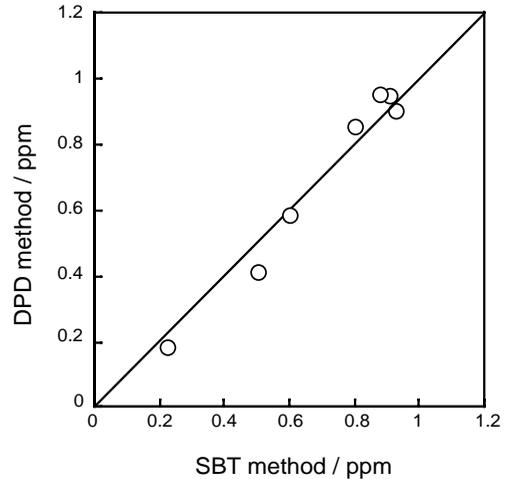


Fig.4 DPD法との相関

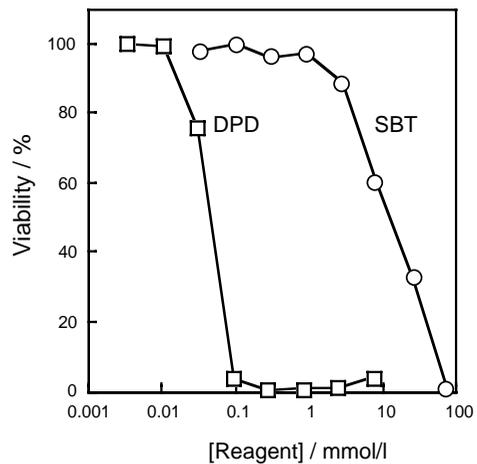


Fig.5 SBTおよびDPDの毒性試験

実験の結果、図から求めたLD<sub>50</sub>はSBT:13,500 μmol/l、DPD:50 μmol/lとなり、SBTはDPDに比べて非常に低い毒性を示しました(Fig.5)。また、Ames試験により復帰突然変異誘発能の有無を確認しました。S.typhimrium TA100、TA98株を用いてDPD、SBTを比較したところ、SBTの変異原性は陰性であるのに対し、DPDではTA98(S9Mix+)株において最高比活性3.31 × 10<sup>3</sup>rev./mgと強い変異原性を示しました。このように、SBT法はDPD法よりも人体への害が少なく、安心して残留塩素の測定にご使用いただけます。

## Q &amp; A

## 残留塩素測定キット

## 残留塩素測定キット-SBT法

Q1 このキットの測定範囲は？

A1 0～2 ppmで測定できます。

Q2 検水調整液や色素液の量を間違えた場合はどうなりますか？

A2 色素液は2,3倍多く使用しても残留塩素量に相当する量しか発色しませんので、過剰に使用しても差し支えありません。ただし、その分、測定回数が少なくなります。検水調整液を少なく使用した場合は発色に影響が出て、値が低く出る可能性があります。

Q3 検水調整液と色素液の入れる順番を間違えたのですが、測定値に影響はありますか？

A3 ミネラル成分が多い検水では、正しい残留塩素濃度を示さない可能性があります。必ず、検水調整液を先に入れてください。

Q4 色素液を加えた後はすぐに測定出来ますか？

A4 直ちに測定可能です。色素液を添加し、振り混ぜた後はすぐに色調比色計にセットして測定して下さい。

Q5 検水中の残留塩素濃度が高すぎる時はどうすればよいでしょうか？

A5 純水や沸騰させ冷ました水道水などで希釈して測定してください。求めた残留塩素濃度を希釈倍率で掛けたものが検水中の残留塩素濃度になります。

Q6 検水の温度が高温でも測定できますか？

A6 プラスチック容器の試験管が変形しない程度の温度であれば結構です。ただし、浴槽水などの温水の場合、若干色調が異なりますので、温水を測定される場合は高温用の色調比色板を使用して下さい。

Q7 測定に使用した液はどのように処理すればよいでしょうか？

A7 廃水処理設備のある排水溝に流すか、大量の水で希釈し、廃水としてください。

Q8 保管はどのようにすればよいでしょうか？

A8 高温多湿を避けて保管してください。車中やボイラー室に放置すると色調比色計等に容器変形などが起こる可能性があります。また、長期保存の際、薬品類は冷蔵での保管をお勧めいたします。開封後は、きちんと蓋を閉めて保管してください。

Q9 キットの中の薬品が無くなったのですが、どのように購入すればよいでしょうか？

A9 薬品だけを別途販売しております。ご使用量にあわせてご購入ください。

## 【残留塩素測定試薬-SBT法】

色素液・検水調整液がセットになっています。100回用と500回用があります。

## 【色素液】

色素液(100 ml)をポリ瓶に入れております。空になった点眼瓶(青)に詰め替えてご使用ください。下記の検水調整液とセットにすると2000回分になります。

## 【検水調整液】

検水調整液(200 ml)をポリ瓶に入れております。空になった点眼瓶(白)に詰め替えてご使用ください。上記の色素液とセットにすると2000回分になります。

Q10 有効期限はありますか？

A10 特に設定しておりません。お手元に到着後、高温多湿をさけて保管し、半年以内を目処にご使用ください。不適切な保管を行われた際は、半年以内でも品質の保証は出来ません。(Q8の保管に関する項を参考にして下さい)

Q11 検水調整液が労働安全衛生法対象品となっておりますが、どの程度危険なのでしょうか。

A11 皮膚についた場合、直ぐに水洗していただければ特に問題はありません。検水調整液には酢酸が6%含まれますが、酢酸6%という濃度は一般に市販されている食酢とほぼ同程度の濃度です。酢酸は労働安全衛生法で含まれていることを通知しなければならない対象物質ですので表示しています。

## 残留塩素測定キット-SBT法のお問合せ先のご案内

本製品は、株式会社同仁グローバルの開発製品です。このためお手数ですが、本製品に関してのご購入ご質問は、現在、小社製品をお買い求めの和光純薬工業様、販売店様ではなく、直接、同仁化学研究所マーケティング部、カスタマーサービス部へお問合せください。

TEL : 096-286-1515

フリーダイヤル : 0120-489548

E-mail : info@dojindo.co.jp

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
残留塩素測定キット-SBT法	set	7,000	ZK01-50
残留塩素測定試薬-SBT法	100回用	1,300	ZK01-60
残留塩素測定試薬-SBT法	500回用	5,000	ZK01-60
色素液	100 ml	9,000	ZK01-70
検水調整液	200 ml	5,000	ZK01-80

# Homepage Renewal Open!!

ホームページのデザインを一新しました。  
 Q&Aを新しく追加し、製品に関する情報をより詳しくご覧になれるようになりました。  
 製品やホームページについてのご意見やご質問がございましたら [info@dojindo.co.jp](mailto:info@dojindo.co.jp)  
 までお寄せください。



<p>ホームページアドレス                  URL : <a href="http://www.dojindo.co.jp/">http:// www.dojindo.co.jp/</a>                  E-mail : <a href="mailto:info@dojindo.co.jp">info@dojindo.co.jp</a></p>	<p>フリーファックス 0120-021557                  フリーダイヤル 0120-489548</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------