

お詫びと訂正

いつもドージンニュースをご愛読いただきありがとうございます。
116号で欠文がありましたので、ここにお詫びと訂正を申し上げます。

1. *DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.*のロゴが抜けておりました。

※下記商品は *DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.*の開発品であり、同仁化学研究所が委託されて製造、販売しているものです。

P17 試作品 蛍光ラベル化キット

P18~P19 新製品 蛍光タンパク標識キット

2. 容量・本体価格・メーカーコードが抜けておりました。

P16 新製品 生菌選択的蛍光染色試薬 CTC

容量：100mg 本体価格：¥14,000.- メーカーコード：C440

株式会社同仁化学研究所

ドージンニュース

DOJIN NEWS

CONTENTS

Review

希土類蛍光錯体の生体成分分析への応用
松本和子

連載

ライブセルイメージング技術講座 5
櫻井孝司

Topics on Chemistry

タンパク質の蛍光標識技術
宗 伸明

2005

ISSN 0385-1516

No.116



目次

Review

希土類蛍光錯体の生体成分分析への応用 早稲田大学理工学部化学科 松本和子	1
ライブセルイメージング技術講座 5 浜松医科大学光量子医学研究センター 櫻井孝司	8

Topics on Chemistry

タンパク質の蛍光標識技術 九州大学大学院 宗伸明	14
-----------------------------------	----

Commercial

試作品案内	
近赤外蛍光標識試薬	15
蛍光ラベル化キット	17
新製品案内	
生菌選択的蛍光染色試薬	16
蛍光タンパク標識キット	18

Q & A

細胞内カルシウムイオン測定用試薬	20
------------------------	----

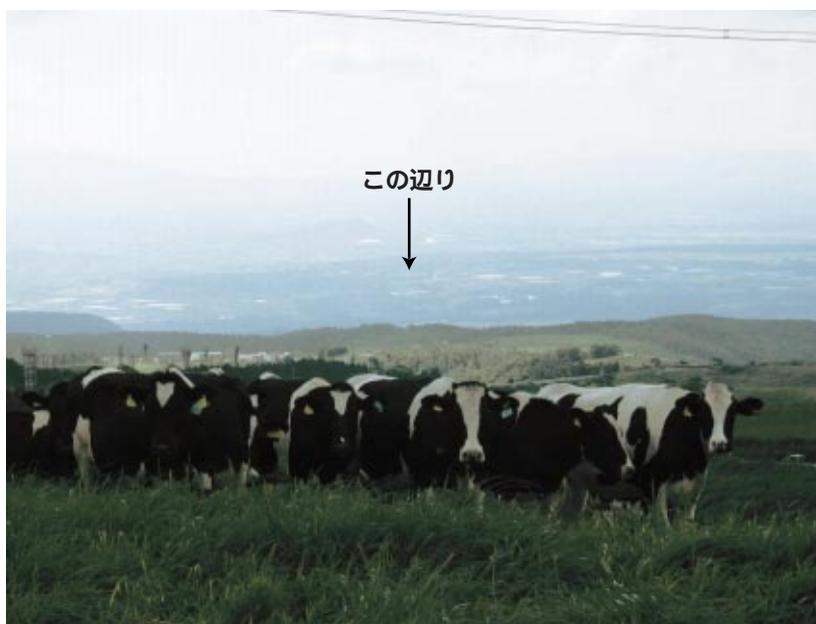
お知らせ

九州大学・同仁化学組織対応型連携	15
冬の学会展示のご案内	17
クロマトレーサー AI 関連試薬販売移管	21
フォーラム・イン・ドージン	22

製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

Allophycocyanin Labeling Kit - NH ₂	19
B-Phycoerythrin Labeling Kit - NH ₂	19
R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH ₂	19
Allophycocyanin Labeling Kit - SH	19
B-Phycoerythrin Labeling Kit - SH	19
R-Phycoerythrin Labeling Kit - SH	19
Fluo 4-AM	21
Fluo 4-AM special packaging	21
Fluo 3	21
Fluo 3-AM	21
Fluo 3-AM special packaging	21
Fura 2	21
Fura 2-AM	21
Fura 2-AM special packaging	21
Fura 2-AM solution	21
Indo 1	21
Indo 1-AM solution	21
Quin 2	21
Rhod 2	21
Rhod 2-AM	21
Calcium Kit - Fluo 3	21



「同仁化学はここです」
車で約 30 分走った場所のとある牧場で撮った写真です。
小社はすぐ側に自然があるいい所です。

「希土類蛍光錯体の生体成分分析への応用」

Application of fluorescent lanthanide chelate for bioassay



松本 和子

(Kazuko Matsumoto)

早稲田大学 理工学部 化学科

[Summary]

Fluorescent lanthanide chelate complexes are known to emit strong fluorescence with very distinct physical properties that are different from those of organic fluorescent compounds: the fluorescence of lanthanide chelates is long-lived with the decay-time of several hundreds microseconds to 2 ms. The fluorescent lanthanide chelates have been successfully developed as fluorescent labels for highly sensitive time-resolved fluoroimmunoassay, DNA hybridization and other bioassays. In this article, applications of the fluorescence lanthanide chelates for bioassay are introduced.

キーワード：希土類蛍光錯体、ラベル剤、時間分解蛍光測定法、
蛍光分析、生体成分分析イムノアッセイ

1. はじめに

1942年、Weissmanによって、Eu(III)- β -ジケトナト錯体が紫外光を吸収し、可視光を発することが発見¹⁾されて以来、希土類蛍光錯体は、様々な分野で研究、開発がなされてきた。本稿では、希土類蛍光錯体の計測への応用について解説する。

2. 希土類元素の特徴とその蛍光性錯体について

希土類元素はランタン(La)からルテチウム(Lu)までの4f電子が詰まっていく過程の15元素をいい、その電子構造は、 $4f^{0-15}5d^{0-10}s^{1-2}$ で表される。これらの元素の価電子は4f電子であるが、この軌道はそれより主量子数の大きい5s、5p、5d、6s軌道より内側にあり、他の元素のように価電子が物理的な最外殻電子でないという特徴を持つ。4f電子が他の外側の電子により環境から遮蔽されているため、周囲の環境の影響を受けにくく、希土類元素相互の性質はよく似ている。このような電子構造と多数の不対電子を持つという特徴によって、カラーテレビの蛍光体、永久磁石、レーザー発光体などに広く応用されている。また、医療の分野では、Gd(III)のキレート錯体がMRI(magnetic resonance imaging)の造影剤として用いられている。蛍光性の希土類錯体の用途は、蛍光標識剤として用い、種々の物質の測定に用いることである。希土類蛍光性錯体を蛍光特性から分類すると、3つのグループに大別される。強蛍光性グループ(Sm^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Dy^{3+} の錯体)は、中心金属のイオンの励起エネルギー準位は、配位子の励起三重項(T_1)準位より少し低い位置にあり、 T_1 からのエネルギー移動を受けることができる。また、これらのイオンでは、励起準位と基底準位のエネルギー差が大きいため、非放射遷移が起こりにくく、蛍光の量子収量が高い。弱蛍光性グループ(Ce^{3+} 、 Pr^{3+} 、 Nd^{3+} 、 Pm^{3+} 、 Er^{3+} 、 Tm^{3+} 、 Yb^{3+} の錯体)では、中心金属イオンは励起準位と基底準位の差がかなり小さいため、非放射遷移の割合が大きく、蛍光の量子収率は低い。 Nd^{3+} 、 Er^{3+} 、 Yb^{3+} に関しては、近赤外領域に発光を持つ錯体が報告されている。

通常、 Sm^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} および Dy^{3+} の水溶液は、普通の蛍光光度計では検出できないほどの弱い蛍光しか発しない。これらの

イオンは、適当な配位子と錯体を形成すると、近紫外領域の光を吸収して、励起され、非常に強い蛍光を発するようになる。これは、錯体が配位子から中心金属イオンへのエネルギー移動に基づいた蛍光発光を示すためである。 La^{3+} 、 Gd^{3+} 、 Lu^{3+} の錯体は蛍光を発しない(非蛍光グループ)。

励起と発光は、次のような過程で起こる。まず配位子が紫外光により励起され励起状態(S_1)となる。次に項間交差により三重項状態の T_1 にエネルギーが移動し、そこからユウロピウムイオンの励起状態(5D)にエネルギー移動が起こる。そして金属の励起状態から基底状態(7F)に戻る時に蛍光を発する。このとき、希土類イオンに配位している β -ジケトン等の配位子が、溶媒分子等へのエネルギーの移動による失活過程を抑制し、強い蛍光発光が得られる。したがって、強い蛍光を持つ錯体を得るための配位子としては、その吸光度が高く、励起三重項状態のエネルギーレベルが希土類イオンの最低励起エネルギーレベル 5D 準位より高く、エネルギー移動が効率よく起こることが必要となる。さらに、配位子の励起一重項状態から三重項状態への項間交差の効率も錯体の蛍光強度に大きな影響を与える。例えば、Table 1に示した β -ジケトン型配位子では、配位子の吸収極大波長の変化に関わらず、ユウロピウムの蛍光は常に約615 nmに観測される。しかし、吸収極大波長がある一定の値を超えると、その錯体は全く蛍光を発しなくなる。吸収極大波長は、励起一重項のエネルギーレベルに係り、励起三重項のエネルギーレベルを直接的に表す値ではないが、一定の相関性が存在するため、この傾向は励起三重項状態のエネルギーレベルが希土類イオンの最低励起エネルギーレベル 5D 準位へ遷移するのに十分高くなり、エネルギー移動が起こらなくなったためと説明される。

希土類蛍光錯体の特徴を理解するために、従来の蛍光検出法で使用される有機蛍光色素と比較してみる。Table 2によく使用される蛍光物質の蛍光特性を、Fig. 1に構造を示した。普通の有機蛍光色素化合物、例えば、フルオレセインやローダミンBと比べユウロピウム錯体の蛍光は以下の4つの特徴を持つ。

Table 1 Structures of β -diketone ligands and their fluorescent properties.

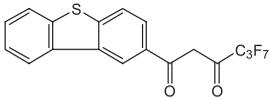
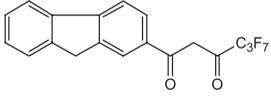
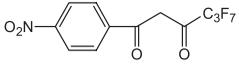
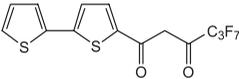
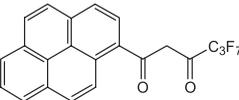
β -diketone ligand	Absorption (λ_{max})	Fluorescence
	360 nm	Strong
	363 nm	Strong
	382 nm	(-)
	396 nm	(-)
	415 nm	(-)

Table 2 Fluorescent properties of fluorescent compound.

Compound	Life time (ns)	$\lambda_{ex,max}$ (nm)	$\lambda_{em,max}$ (nm)	Stokes shift (nm)
FITC	4.5	492	518	26
RBITC	3	550	585	35
[Eu(β -NTA) ₃]	7 x 10 ⁵	340	613	273

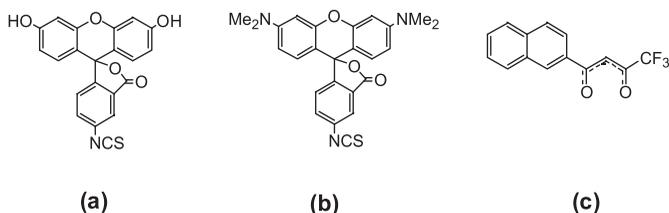


Fig. 1 Examples of fluorescent labels.

(a) fluorescein isothiocyanate, (b) Rhodamine B isothiocyanate, (c) β -naphthoyltrifluoroacetone.

1. 発光波長が配位子の構造にほとんど影響を受けない。

先に述べたように、希土類錯体は配位子の吸収により励起され、錯体内でのエネルギー移動により中心金属にエネルギーが移動し希土類イオンの励起状態から基底状態に戻る時に蛍光を発する。ユウロピウム錯体の場合、4f-4f遷移に基づく蛍光を発する(ほとんどの場合⁵D₀-⁷F₂放射(約615 nm)が一番強い)。すなわち励起と発光が錯体の異なる部分によって行われているため、希土類蛍光錯体は、配位子の分光学的性質に依存した励起スペクトルと、配位子には依存せず、中心金属イオンにのみ依存した発光スペクトルを示す。例えばユウロピウム錯体であれば、強度比に変化はあるものの常にユウロピウムイオンに特徴的な蛍光スペクトルを示す。

2. 蛍光寿命が長い。

ユウロピウム錯体は配位子の励起三重項T₁からのエネルギーが移動した後、蛍光を発する。このような過程は有機蛍光色素の発光に比べ、遅い過程を含んでおり、希土類蛍光錯体は長い蛍光寿命を持つ。希土類イオンの4f軌道が5sや6p軌道により大きく遮蔽されており、本質的に禁制遷移であることも寿命が長い理由であろう。有機蛍光色素の蛍光寿命は通常ナノ秒レベルであるが、希土類蛍光錯体、特にユウロピウムとテルビウム錯体の蛍光寿命は数百マイクロ秒以上である。Table 2に示すようにユウロピウム蛍光錯体は普通の有機蛍光色素と比べて、10⁵倍もの長い蛍光寿命を持つ。この特徴を利用して時間分解蛍光測定法が開発されているが詳細については次項に述べる。

3. 大きなストークスシフト (Stokes shift) を有する。

有機蛍光色素の励起スペクトルと発光スペクトルは一部重なっており、通常鏡面对称のような関係にある。また、励起極大波長と発光極大波長の差(ストークスシフト)は、数十nmで、励起、発光スペクトル間には大きな重なりがあるのが一般的である。一方、希土類蛍光錯体では、配位子が励起光により励起され、エネルギー移動のち希土類金属イオンの励起状態から基底状態への遷移に伴って発光するため、ストークスシフトが非常に大きく250 nm以上であるのが普通である。このため、有機蛍光色素に見られるような濃度消光(自己消光)をほとんど受けず、さらに蛍光測定をする際に励起光に由来する散乱光の影響を受けにくいという利点がある (Fig. 2)。

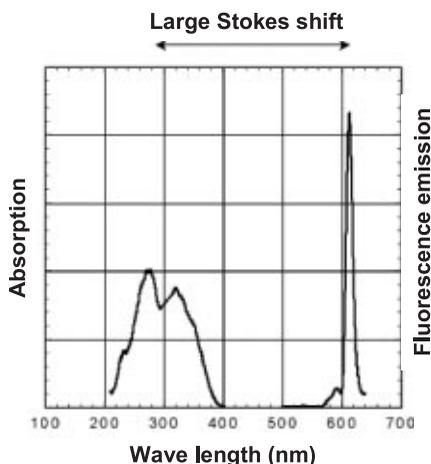


Fig. 2 Absorption and fluorescence emission spectra of the fluorescent europium chelate.

4. 発光ピークがシャープである。

蛍光発光エネルギーが非常に狭い波長領域に集中し、発光ピークの半値幅が約10-20 nmである。例えば、約615 nmにおけるユウロピウム(III)の蛍光スペクトルは非常にシャープであり、蛍光放射のエネルギーがほとんど615 ± 10 nmの波長範囲に集中している。このようなシャープなピークを持つことは、蛍光量子収率が低くても、特定波長での発光強度はブロードな発光スペクトルを持つ有機蛍光色素に比べて大きくなり、より検出しやすいという利点になる (Fig. 2)。

3. 希土類蛍光錯体を生化学的分析に応用する利点

3-1 時間分解蛍光測定法

生体成分の分析においては従来、放射性同位体や酵素、蛍光化合物、化学発光化合物など様々なプローブ(標識剤を含む)が用いられていた。特に、蛍光プローブはその取り扱いの容易さと高感度の検出能のために、遺伝子の塩基配列解析やDNAマイクロアレイでの発現解析などに使われ、大きな役割を果たしている。蛍光プローブを用いる方法は放射能の問題が無く、取り扱いが容易であること、種類が豊富で応用できる範囲が広いこと、検出が簡単で感度が高いこと等の利点がある。従来、蛍光プローブとしてはフルオレセインやローダミンなどの有機蛍光色素が使われてきた。しかし、有機蛍光ラベル剤を用いるバイオアッセイでは、サンプル中に存在する他の共存物質の蛍光と励起光の散乱などに由来するバックグラウンド蛍光の影響がラベル剤からの蛍光シグナルの検出を大きく阻害し、高感度の測定を困難にするという欠点があった。

有機化合物の蛍光とは異なり、希土類蛍光錯体の蛍光は前項で述べたように、(1) 蛍光寿命が長い、(2) ストークスシフトが大きい、(3) 発光ピークがシャープであるなどの特徴もっている。希土類蛍光錯体を用いた蛍光測定では、通常の蛍光測定法とは異なり、時間分解蛍光測定法が用いられる。時間分解蛍光測定法とは、物質の蛍光寿命の差を利用し、長寿命蛍光を発する目的化

物を選択的に検出する方法である。Fig. 3に希土類蛍光錯体を用いた時間分解蛍光測定法の原理を示す。励起光をパルスで照射すると、目的化合物のみならず、共存する不純物や容器材質も励起され発光する。この時点では、励起光の散乱光なども検出される。しかし、共存する不純物や容器材質からの蛍光は蛍光寿命が短いため、非常に速やかに減衰する。一方希土類蛍光錯体は数百マイクロ秒以上の蛍光寿命を持つので、不純物などからのバックグラウンド蛍光が十分に減衰した後に蛍光を測定することにより目的化合物からの蛍光を感度よく検出できる。つまり、希土類蛍光錯体を用いる時間分解蛍光測定法は希土類錯体の蛍光特性を生かして、蛍光ラベル剤とバックグラウンド蛍光の蛍光寿命の差を巧みに利用し、サンプル中の不純物や測定器具などからのバックグラウンド蛍光を効果的になくすとともに、プローブから発した長寿命蛍光のみを選択的に検出することができ、従来法にない高感度や高精度の測定が達成されている。

このような、希土類蛍光錯体の蛍光特性に基づいて、1980年代以来、希土類蛍光錯体をプローブとし、時間分解蛍光測定を用いた時間分解蛍光イムノアッセイ、DNAハイブリダイゼーションアッセイ、細胞活性アッセイ、蛍光パイオイメージング、HPLCなどの生体関連物質の測定法が次々に開発され、その応用範囲はますます広がっている。本稿ではイムノアッセイを例にとり、希土類蛍光錯体の分析への応用について述べる。

3-2 希土類錯体プローブを用いた生体成分の測定

バイオアッセイにおいて、放射性アイソトープや酵素、蛍光化合物、化学発光化合物など様々なプローブ(ラベル剤を含む)が汎用されている。特に、蛍光プローブは、その検出の便利さと高感度のために、ヒトゲノムプロジェクトやバイオチップなどに使われ、大きな役割を果たしている。蛍光プローブを用いる方法は、放射能の問題がなく、取り扱いが容易であること、種類が豊富で、応用できる範囲が広いこと、検出が簡単で、感度が高いこと、などの利点がある。従来、蛍光プローブとしてはフルオレセインやローダミンなどの有機蛍光化合物がよく使われている。しかし、有機蛍光ラベル剤を用いるバイオアッセイでは、サンプル中に存在する他の共存物質の蛍光と励起光の散乱光などに由来するバックグラウンドノイズの影響が蛍光検出を大きく妨害し、高感度の測定が困難であるという欠点がある。このような有機蛍光標識剤の問題点を解決する手段という観点を含め、希土類蛍光錯体の生体成分分析への応用について述べる。なお、参考文献掲載数の制限上、個々の事例について出典を掲載しなかったものもある。これらについては、総説を参照されたい²⁻¹⁰⁾。

3-3 Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay (DELFI法)

この方法は、 N^1 -(*p*-イソチオシアトベンジル)-エチレンジアミン四酢酸の Eu^{3+} 錯体(SCN-Ph-EDTA- Eu^{3+})あるいは N^1 -(*p*-イソチオシアトベンジル)-ジエチレントリアミン- N^1, N^2, N^3, N^3 -四酢酸の Eu^{3+} 錯体(SCN-Ph-DTTA- Eu^{3+})をラベル剤として用い、Fig. 4に示す原理で分析を行なうものである。この方法では、まずユウロピウム錯体標識タンパク質(抗体あるいは抗原)を調製する。この標識タンパク質を用いて免疫反応を行った後、未反応の試薬と免疫複合体を分離する(B/F分離)得られ

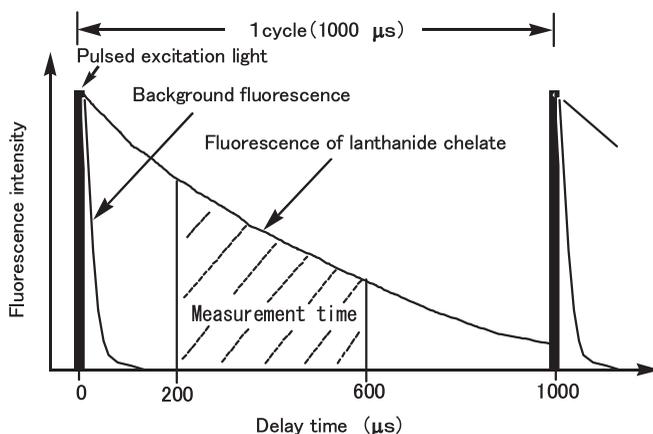


Fig. 3 Measurement principle of time-resolved fluorometry.

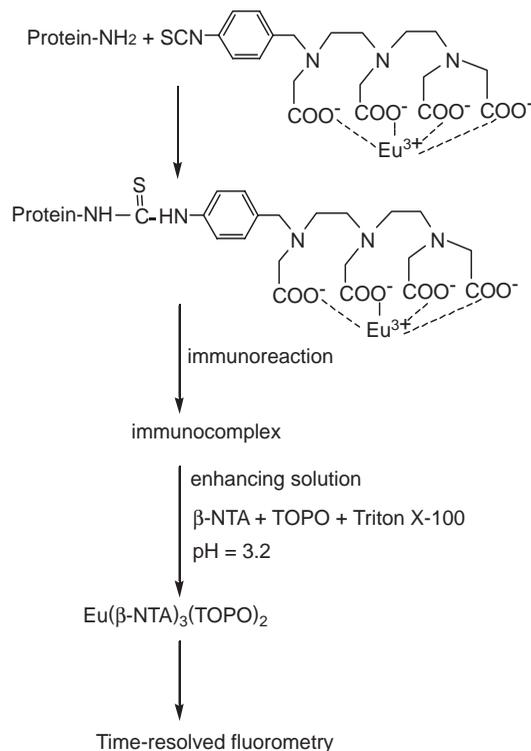


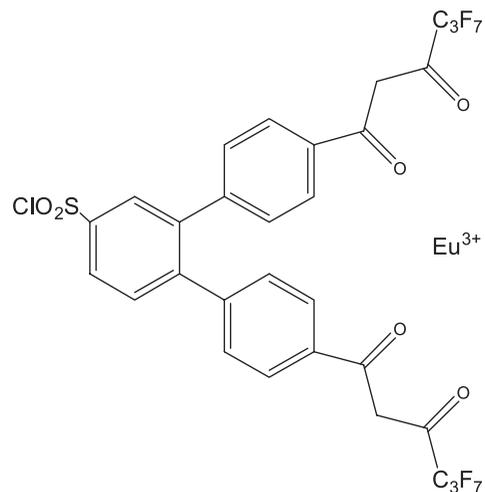
Fig. 4 Assay principle of DELFIA system.

た免疫複合体にβ-ジケトン(殆どの場合、2-ナフトイルトリフルオロアセトンβ-NTA)を使う。トリオクチルホスフィンオキシド(TOPO)と界面活性剤トリトンX-100を含む弱酸性の蛍光増強溶液(ミセル溶液、pH = 3.2)を加え、免疫複合体にあるユロピウムラベル剤からEu³⁺イオンを溶液中の配位子と結合させ、強い蛍光性をもつ錯体Eu(β-NTA)₃(TOPO)₂のミセル溶液に変換し、その溶液を時間分解蛍光測定する。

本法では、ラベル剤SCN-Ph-EDTA-Eu³⁺ 或いはSCN-Ph-DTTA-Eu³⁺自体は非蛍光性錯体であり、ラベル剤のユロピウムを蛍光性で高感度検出可能な蛍光錯体Eu(β-NTA)₃(TOPO)₂(10⁻¹⁴ Mレベルの検出限界)となし、その蛍光を計測するものである。しかし、蛍光測定に、β-NTA-TOPO-トリトンX-100を含むいわゆる蛍光増強溶液を加える必要がある。この蛍光増強溶液には大過剰の配位子(β-NTAとTOPO)があるため、系外からEu³⁺が入ると強いバックグラウンド蛍光を発生することが考えられる。従って、この方法はユロピウムの汚染を非常に受けやすい欠点がある。

3 - 4 時間分解蛍光イムノアッセイ法

本法は、まず希土類錯体標識タンパク質(抗体あるいは抗原)を調製する。この標識タンパク質を用いて免疫反応を行い、未反応の試薬と免疫複合体を分離した後、そのまま固相での時間分解蛍光測定を行うというものである。その1つは、FIAGEN時間分解蛍光イムノアッセイ法として知られているもので、蛍光性ユロピウム錯体4,7-ビス(クロロスルホフェニル)-1,10-フェナントロリン-2,9-ジカルボン酸のEu³⁺錯体(BCPDA-Eu³⁺)を標識剤とし

Fig. 5 Structure of BHHCT-Eu³⁺

て用いる方法である。DELFLIA法と比べると、FIAGEN時間分解蛍光イムノアッセイ法の利点は、蛍光増強溶液を使用する必要がなく、緩衝溶液や測定環境によるユロピウム汚染の問題がないことである。なお、この方法に用いる標識剤BCPDA-Eu³⁺の蛍光は弱いため(10⁻¹¹ Mの検出限界)感度が低いことが欠点である。

次に、本研究室で開発した配位子、クロロスルホニル化4座β-ジケトン化合物4,4'-ビス(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-ヘプタフルオロ-4'',6''-ヘキサジオン-6''-イル)クロロスルホ-*o*-テルフェニル(BHHCT、Fig. 5)での例を紹介する。この化合物は、クロロスルホニル基を通じて、アミノ基をもつタンパク質と反応し、スルホンアミド結合(-SO₂-NH-)を生成することによりタンパク質を標識する。標識したタンパク質溶液に適量のEuCl₃を加えると、速やかにBHHCT-Eu³⁺蛍光標識タンパク質になる。近年、BHHCT-Eu³⁺をラベル剤とした高感度時間分解蛍光イムノアッセイ法が次々と開発され、様々な物質の測定に応用されている。これらの測定においては、主にBHHCT-Eu³⁺標識ストレプトアビジン(SA)やSA-BSA(ウシ血清アルブミン)結合体、抗体、ハプテン-BSA結合体などが用いられている。BHHCT-Eu³⁺は非常に強い蛍光と長い蛍光寿命をもつため、このラベル剤を用いた時間分解蛍光イムノアッセイでは、蛍光増強溶液を使用する必要がなく、反応が終わった後、そのまま固相時間分解蛍光測定を行うことができる。

非競合(サンドイッチ)時間分解蛍光イムノアッセイにおけるラベル剤BHHCT-Eu³⁺の応用例としては、ヒト血清中のAFP、IgE、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、ストロマ細胞由来因子-1(SDF-1)、サイトカイン類タンパク質(インタロイキン-1α、tumor necrosis factor αとインタフェロンγ)などが測定され、競合時間分解蛍光イムノアッセイにおけるラベル剤BHHCT-Eu³⁺の応用例としては、ヒト尿と毛髪中の覚醒剤メタンフェタミン、ヒト血清中のp21タンパク、環境水中の農薬ペンシルフロニル-メチルとエストラジオール及びエストリオールなどの測定例がある^{5, 10)}。

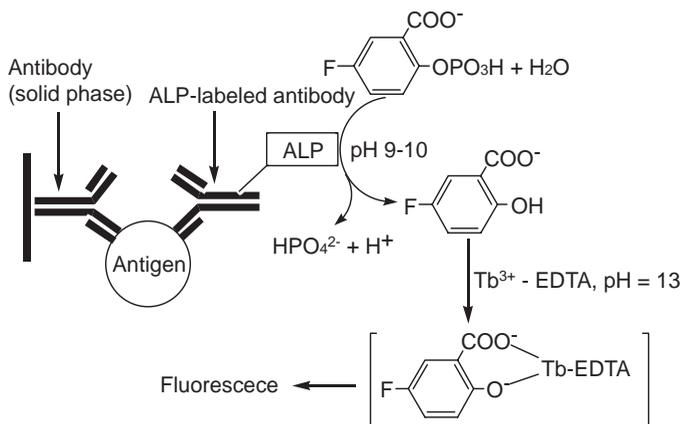


Fig. 6 Detection principle of enzyme-linked time-resolved immunoassay.

3 - 5 酵素増幅時間分解蛍光イムノアッセイ法

錯体EDTA-Tb³⁺は非蛍光性錯体であるが、サリチル酸誘導体とさらに三元錯体を生成すると、Tb³⁺の特徴的な長寿命蛍光を発生することができる。この反応を利用して、酵素アルカリホスファターゼ(ALP)をラベル剤とし、5-フルオロサリチル酸のリン酸エステルを基質とした酵素増幅時間分解蛍光イムノアッセイ法が開発されている¹¹⁾。Fig. 6に示すように、ALPで標識した抗体を用いて免疫反応を行った後、5-フルオロサリチル酸リン酸エステルの水溶液(pH = 9-10)を加える。ALPの触媒作用によって基質が加水分解し、5-フルオロサリチル酸リン酸になった後、EDTA-Tb³⁺の水溶液(pH = 13)を加え、5-フルオロサリチレート-Tb³⁺-EDTA三元蛍光錯体を生成させ、時間分解蛍光測定に用いる。5-フルオロサリチル酸リン酸エステルの代わりに、ジフルニサル(diflunisal)のリン酸エステルも酵素基質として使うこともできる。この場合、時間分解蛍光測定に用いる錯体はEDTA-Tb³⁺とジフルニサルの三元蛍光錯体である。この方法を用いた生体成分の測定例としてヒト血清中のα-フェトプロテイン(α-fetoprotein、AFPと略す)や前立腺特異抗原(prostate specific antigen、PSA)¹²⁾などが報告されている。

3 - 6 ホモジニアス時間分解蛍光イムノアッセイ法

ホモジニアスイムノアッセイは、固相材料が不要で、結合型と遊離型の分離(B/F分離)や洗浄などのステップがなく、速やかな測定が期待できることが利点である。希土類錯体蛍光ラベル剤の長寿命蛍光特性と蛍光化合物間の蛍光共鳴エネルギー移動を利用したホモジニアス時間分解蛍光イムノアッセイ法がすでに開発されている。その代表例は、time resolved amplified cryptate emission (TRACE)というホモジニアス時間分解蛍光イムノアッセイ法である。TRACE法では、まず2種の蛍光ラベル剤トリスビピリジンクリプテート-Eu³⁺(蛍光エネルギー移動のドナー色素、TBP-Eu³⁺と略す)とアロフィコシアニン(蛍光エネルギー移動のアクセプター色素、cross-linked allophycocyanin、分子量104 kDの色素タンパク、蛍光発光極大波長665 nm、蛍光量子収率約0.7、XL665と略す)でひとつの抗原と同時に反応できる2種の抗体をそれぞれ標識する。2種の標識抗体が抗原と結合し、ドナー色素とアクセプター色素が接近することで、ドナー色素の励起波長で照射すると、そのドナー色素の蛍光発光エネルギーがアクセプター色素に移り、蛍光エネルギー移動に由来するアクセプター色素に特徴的な蛍光シグナルを発生する。ドナー色素の蛍光発光寿命が非常に長い(約1 ms)、蛍光エネルギー移動によるアクセプター色素の蛍光発光も長寿命となる。従って、アクセプター色素の長寿命化した蛍光を時間分解蛍光測定法で測定することができるようになる。溶液中にある未反応のXL665標識抗体は、紫外光励起では発光しないのでその発光は除かれる。希土類錯体(長い蛍光寿命をもつ)の蛍光発光ピークは非常にシャープであるため、XL665の測定波長における希土類錯体の発光の重なりはわずかで、測定への干渉が小さい。実際に、この方法を用いて生体サンプルを測定する時に、シグナルとして用いるのは、665 nmにおけるXL665の蛍光強度と620 nmにおけるTBP-Eu³⁺の蛍光強度の比である。これは生体サンプルとサンプル間の光吸収や消光などの不均一性による影響を補正するためである。Fig. 7にTBP-Eu³⁺の構造とTRACE法の原理を示した。この方法の応用例としては、ヒト血清中のAFPとPSAの測定やヒト免疫不全ウイルスプロテアーゼアッセイ、チロシンプロテインキナーゼアッセイ、p53/HDM2プロテイン-プロテインバインディングアッセイ¹³⁾などが報告されている。

XL665のほか、小分子の有機蛍光色素ローダミン、Cy3、Cy5などを蛍光エネルギー移動のアクセプター色素として使うホモジニアス時間分解蛍光イムノアッセイ法も報告されている。吸収波長と蛍光発光波長を蛍光エネルギー移動のドナー色素の希土類錯体と合わせるために、Cy3とローダミンを使う場合はテルビウム錯体をドナー色素として、Cy5を使う場合はユウロピウム錯体をドナー色素として用いる。これらの方法はすでにヒト絨毛性腺刺激ホルモンの遊離βサブユニット(free β-subunit of human chorionic gonadotrophin)の測定やベンスルフロノメチル(bensulfuron-methyl)の測定、ヒトインタロイキン-2(interleukin-2)とインタロイキン-2レセプター相互作用測定などに応用されている。

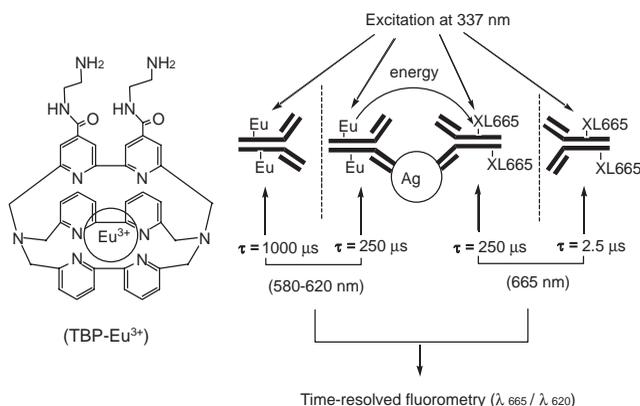


Fig. 7 Structure of TBP-Eu³⁺ and principle of "TRACE"-homogeneous time-resolved fluoroimmunoassay.

4. 多色測定

三価ユウロピウム、サマリウム、テルビウムとジスプロシウムといった希土類蛍光錯体は蛍光波長が異なり、しかもいずれもシャープな蛍光ピークであるため、これらの錯体を標識剤として組み合わせることで、測定の多色化、つまり、同時に複数成分の分析が可能となる。

Eu-Sm二重標識時間分解蛍光イムノアッセイは、通常サマリウムの測定感度がユウロピウムほど高くないため、その応用はほとんどサンプル中の低濃度成分(ユウロピウム標識を使う)と高濃度成分(サマリウム標識を使う)の二種類の物質の同時測定に用いられている。その例としては、ヒト血清中のルトロピン(lutropin)と卵胞刺激ホルモン(follitropin)の同時測定¹⁴⁾、ミオグロビンと炭酸デヒドラターゼの同時測定、AFPとヒト絨毛性性腺刺激ホルモンの遊離β-サブユニットの同時測定、妊娠性血漿タンパク質Aとヒト絨毛性性腺刺激ホルモンの遊離β-サブユニットの同時測定及び妊婦血清中のAFP、絨毛性性腺刺激ホルモンとエストリオールの同時測定などが報告されている。Eu-Tb二重標識時間分解蛍光イムノアッセイの例としては、ヒト血清中の遊離PSAと全PSAの同時測定¹⁵⁾が報告されている。

本研究室で開発されたBHHCT-Eu³⁺とBHHCT-Sm³⁺を組み合わせると、Eu-Sm二重標識時間分解蛍光イムノアッセイによる単一サンプル中の二成分同時測定も可能である。その応用例としてはヒト血清中のAFPとCEA(carcinoembryonic antigen)の同時測定や二種の薬物の同時測定がある。

また、BHHCT-Sm³⁺の代わりに、強い蛍光と長い蛍光寿命をもつテルビウム蛍光ラベル剤BPTA-Tb³⁺とBHHCT-Eu³⁺をラベル剤として組み合わせると、Eu-Tb二重標識時間分解蛍光イムノアッセイによるヒト血清中のAFPとCEAの高感度同時測定法も開発されている。Fig. 8に示すように、この測定法では、まず抗AFP抗体と抗CEA抗体の混合液で96-ウェルプレートにコートし、ヒト血清と反応した後、BHHCT-Eu³⁺標識抗AFP抗体とビオチン標識抗CEA抗体の混合液を加え反応させる。反応が終わった後、プレートを洗浄し、そのまま615 nmにおけるBHHCT-Eu³⁺の蛍光強度を測定し、AFPの濃度を計算する。続いてBPTA-Tb³⁺標識SAを加え、ビオチン化抗CEA抗体と反応した後、プレートを洗浄し、そのまま545 nmにおけるBPTA-Tb³⁺の蛍光強度を測

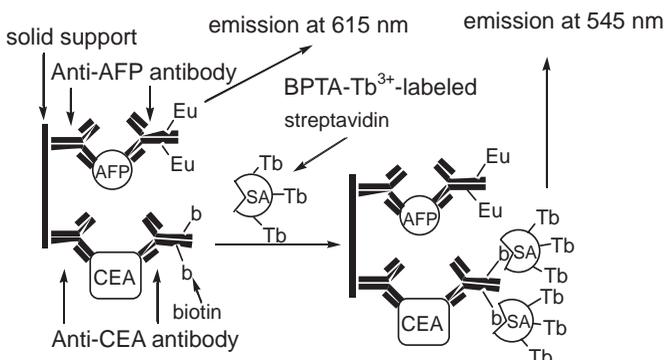


Fig. 8 Dual-label time-resolved fluoroimmunoassay of AFP and CEA with fluorescent lanthanide labels, BHHCT-Eu³⁺ and BPTA-Tb³⁺.

定し、CEAの濃度を計算する。このように蛍光増強溶液を使用することなく、高感度のAFP-CEA同時測定(検出限界: AFP, 44 pg/ml; CEA, 76 pg/ml)が可能になったのは、強い蛍光をもつEu-Tbラベル剤を用いたためである。

Eu-Sm二重標識時間分解蛍光イムノアッセイにおいて、SCN-Ph-DTTA-Eu³⁺とSCN-Ph-DTTA-Sm³⁺をラベル剤として用いることができ、この場合、β-NTA、TOPOとトリトンX-100を含むDELFLIA蛍光増強溶液をそのまま使うことができる。この蛍光増強溶液は、Tb³⁺とDy³⁺に非蛍光性であるため、Eu-Sm-Tb-Dy四重標識時間分解蛍光イムノアッセイによるヒト血清中のTSH、17α-ヒドロキシプロゲステロン(17α-hydroxyprogesterone)、免疫反応性トリプシン(immunoreactive trypsin)およびクレアチンキナーゼMMアイソザイム(creatine kinase MM isoenzyme)の4成分同時測定において、ピバロイルトリフルオロアセトン、Y³⁺、トリトンX-100と1,10-フェナントロリンを含む蛍光増強溶液が用いられた¹⁶⁾。この蛍光増強溶液の中で、Eu³⁺、Sm³⁺、Tb³⁺とDy³⁺イオンは、それぞれ820、88、323、27 μsの蛍光寿命をもつ錯体を生成し、各イオンの検出限界は、それぞれ0.035 (Eu³⁺)、7.9 (Sm³⁺)、0.34 (Tb³⁺)、46 (Dy³⁺) pMである。

5. 高感度化の工夫

これまでの項では、高感度分析における標識剤として希土類蛍光錯体を質的な観点(特性)から解説した。本項では、量的な観点からの高感度化へのアプローチを紹介する。そのアプローチとは、直接希土類蛍光錯体を抗体等に標識するのではなく、高分子ポリマーと共有結合したり、あるいは高分子に埋包した後、その高分子を抗体などに結合させ分析に用いるというものである。これまで次の3つの方法が報告されている。

(1)BCPDA-Eu³⁺標識ポリビニルアミン-ビオチン-ストレプトアビジン複合体を用いた方法¹⁷⁻²⁰⁾: この方法では、まずビオチン標識ポリビニルアミン(biotin)_x-PVAを作り、更にBCPDAを用いて(biotin)_x-PVAを標識する。得られた(biotin)_x-PVA-(BCPDA)_y (x = 5-10; y = 50-100)は一定量のストレプトアビジン(SA)とEu³⁺の溶液を混合すれば、時間分解蛍光イムノアッセイに直接使える高分子複合体(SA)_z-(biotin)_x-PVA-(BCPDA-Eu³⁺)_yが得られる。この複合体を分析に用いるというものである。

(2)ユウロピウム蛍光錯体標識poly(Glu:Lys)-ストレプトアビジン複合体およびユウロピウム蛍光錯体標識poly(Glu:Lys)-BSA-ストレプトアビジン複合体を用いた方法²¹⁾: この方法では、まず4-[2-(4-イソチオシアナトフェニル)エチニル]-2,6-ピス[[N,N-ピス(カルボキシメチル)アミノ]メチル]ピリジン{4-[2-(4-イソチオシアナトフェニル)エチニル]-2,6-bis[[N,N-bis(carboxymethyl)amino]methyl]pyridine}とEu³⁺との錯体を用いてpoly(Glu:Lys)を標識する。得られた標識poly(Glu:Lys)を更にストレプトアビジンと結合すると、ユウロピウム錯体標識poly(Glu:Lys)-ストレプトアビジン複合体が得られる。標識poly(Glu:Lys)をBSAと結合した後、ストレプトアビジンと結合すると、ユウロピウム錯体標識poly(Glu:Lys)-BSA-ストレプトアビジン複合体が得られる。二種類の蛍光高分子複合体がヒトPSAの高感度時間分解蛍光イムノアッセイに応用され、それぞれ4 pg/ml

と6 pg/mlの検出限界を示した。

(3) ユウロピウム蛍光錯体を含むポリスチレンラテックスナノ微粒子を用いた方法²²⁻²⁶⁾: この方法では、まず30000分子以上のβ-ジケトナト-Eu³⁺ 蛍光錯体を含む直径107 nmのポリスチレンナノ微粒子を蛍光プローブとして用いてストレプトアビジンや抗体を標識する。標識したストレプトアビジンと抗体がそのまま時間分解蛍光イムノアッセイに用いられる。この方法を用いたヒトPSAの時間分解蛍光イムノアッセイは0.21 pg/mlの検出限界を示した。

6. おわりに

以上、希土類蛍光錯体の標識剤への利用について紹介した。生化学的分析においては、現在、有機系蛍光色素や酵素（アルカリ性ホスファターゼやペルオキシダーゼなど）が標識として多用されている。本稿で紹介した希土類蛍光錯体を含め、標識剤にはそれぞれ利点と欠点があり、目的とする分析に応じてその利点が最大限に生かされるように標識剤を選択することが賢明なことと思われる。希土類蛍光錯体による標識は、まだ広く使用されているわけではないが、蛍光寿命が長く時間分解測定が採用できるので、かなり crude な試料でも分析が可能であることが最大のメリットといえる。昨今、研究例が増えつつあるプロテオミクスなどの分野、すなわち、分析対象が、DNAのPCRのごとく *in vitro* では増幅できるような試料でない分野において、その威力を発揮するものと期待される。そのような意味において、希土類蛍光錯体が認知されることを願いつつ、本稿を終えることとする。

参考文献

- 1) S. Weissman, *J. Chem. Phys.*, **1942**, *10*, 214.
- 2) E. Soini and I. Hemmilä, *Clin. Chem.*, **1979**, *25*, 353-361.
- 3) I. Hemmilä, *Appl. Fluoresc. Technol.*, **1988**, *1*, 1-8.
- 4) I. Hemmilä, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **1988**, *48*, 389-400.
- 5) 袁景利, 松本和子, *ぶんせき*, **1998**, 873-880.
- 6) J. Yuan and K. Matsumoto, *Bunseki Kagaku*, **1999**, *48*, 1077-1083.
- 7) I. Hemmilä and V.-M. Mikkala, *Crit. Rev. Cl. Lab. Sci.*, **2001**, *38*, 441-519.
- 8) K. Matsumoto and J. Yuan, *in Metal Ions in Biological Systems, Vol. 40*, ed. A. Sigel and H. Sigel, Marcel Dekker, Inc., **2003**, pp. 191-232.
- 9) J. Yuan, G. Wang and K. Matsumoto, *Trends Inorg. Chem.*, **2001**, *7*, 109-117.
- 10) 袁景利, 松本和子, *蛋白質核酸酵素*, **2003**, *48*, 1550-1558.
- 11) R. A. Evangelista, A. Pollak and E. F. G. Templeton, *Anal. Biochem.*, **1991**, *197*, 213-224.
- 12) H. Yu, E. P. Diamandis, A. F. Prestigiacomo and T. A. Stamey, *Clin. Chem.* **1995**, *41*, 430-434.
- 13) S. A. Kane, C. A. Fleener, Y. S. Zhang, L. J. Davis, A. L. Musselman and P. S. Huang, *Anal. Biochem.*, **2000**, *278*, 29-38.
- 14) I. Hemmilä S. Holttinen, K. Pettersson and T. Lövgren, *Clin. Chem.*, **1987**, *32*, 2281-2283.
- 15) S. Eriksson, M. Vehniäinen, T. Jansen, V. Meretoja, P. Saviranta, K. Pettersson and T. Lövgren, *Clin. Chem.*, **2000**, *46*, 658-663.

- 16) Y.-Y. Xu, K. Pettersson, K. Blomberg, I. Hemmilä, H. Mikola and T. Lövgren, *Clin. Chem.*, **1992**, *38*, 2038-2043.
- 17) A. Scorilas and E. P. Diamandis, *Clin. Biochem.*, **2000**, *33*, 345-350.
- 18) A. Scorilas, A. Bjartell, H. Lilja, C. Moller and E. P. Diamandis, *Clin. Chem.*, **2000**, *46*, 1450-1455.
- 19) L.-Y. Luo and E. P. Diamandis, *Luminesc.*, **2001**, *15*, 409-413.
- 20) A. Scorilas, A. Magklara, B. R. Hoffman, R. M. Bromberg, A. Bjartell and E. P. Diamandis, *Anal. Sci.*, **2001**, *17 Suppl.*, i547-i550.
- 21) Q.-P. Qin, T. Lövgren and K. Pettersson, *Anal. Chem.*, **2001**, *73*, 1521-1529.
- 22) H. Härmä T. Soukka, S. Lönnberg, J. Paukkunen, P. Tarkkinen and T. Lövgren, *Luminesc.*, **2000**, *15*, 351-355.
- 23) H. Härmä T. Soukka and T. Lövgren, *Clin. Chem.*, **2001**, *47*, 561-568.
- 24) T. Soukka, H. Härmä J. Paukkunen and T. Lövgren, *Anal. Chem.*, **2001**, *73*, 2254-2260.
- 25) T. Soukka, J. Paukkunen, H. Härmä S. Lönnberg, H. Lindroos and T. Lövgren, *Clin. Chem.*, **2001**, *47*, 1269-1278.
- 26) T. Soukka, K. Anttonen, H. Härmä A.-M. Pelkkikangas, P. Huhtinen and T. Lövgren, *Clin. Chim. Acta*, **2003**, *328*, 45-58.

著者紹介

氏名: 松本 和子 (Kazuko Matsumoto)

所属: 早稲田大学理工学部化学科

連絡先: 〒169-8555 東京都新宿区大久保 3-4-1

TEL: 03-5286-3108 FAX: 03-5273-3489

出身大学: 東京大学大学院理学系研究科化学専攻博士課程修了

学位: 理学博士

研究テーマ: 希土類蛍光錯体を用いるバイオ分析手法の開発

趣味: テニス

ライブセルイメージング技術講座

5

～ ライブステイニング ～

浜松医科大学光量子医学研究センター

櫻井 孝司

(浜松医科大学・21世紀COEプログラム
「メディカルホトニクス」の活動として掲載)

1. はじめに

銃の先端部における突起部は、火縄銃が用いられていた時代に「目当て」と呼ばれていた。まさに照準(sight)の黎明期仕様であり、簡単で正確な照準法は現代まで模索され続けている。ライブセルイメージングにおいても同様であり、細胞における照準位置をどう決めるかが技術的に重要なポイントとなる。現在考える最良の解の1つは見たい対象を光学的にマーキングすることである。照準さえ定まれば、あとはピントを合わせて測定開始である。蛍光マーキング法の適用は測定のダイナミックレンジを拡げ、手法を容易にする。今回はライブセルにおける機能や動態を可視化するための蛍光マーキング法(live cell fluorescent marking, or live staining)を中心に、蛍光分子の選択からライブ画像取得までの基礎手順を紹介する。

2. 蛍光とは

2.1 蛍光発光と量子収率

蛍光とは蛍光分子に励起光を当てた後、励起された分子が元の状態に戻るときに放たれる光である。蛍光強度は次のようなパラメータに左右される。

励起光の波長とパワー

分子の吸収スペクトル

量子収率

励起光の波長は吸収スペクトルにおけるピーク値付近が通常は用いられる。量子収率(quantum yield)¹⁾は蛍光分子に吸収されたフォトン数と蛍光として発せられたフォトン数の比率である。量子収率は熱発生や消光(quenching)^{1,2)}により低下する。熱発

生は蛍光色素の化学構造でほとんど決まっている。これに対して消光は測定者の工夫で改善可能である。

2.2 消光

消光は分子内過程による内部的要因と溶媒など外部的要因の両方によるが、おもに後者となる。光と分子の反応過程において、熱、赤外線、消光剤などに影響を受ける。消光剤には溶媒、酸素、色素、重金属などがある。消光効果は、励起・蛍光エネルギーの消失、無蛍光物質への化学変化、熱エネルギーへの変換などと物理化学的に説明される。蛍光強度が最初から暗くなってしまう場合は、消光が原因になっていることがあるので、外部環境の条件について検討してほしい。

3. 蛍光イメージング法で何が解る?

検出や定量を行いたい物質がある場合、専用のトレーサーまたはプローブが選択され、発光法・ラジオアイソトープ法・蛍光法などにより検出される。蛍光法においては細胞にマーキングを行ったあと、蛍光強度の測定をすることになる。系全体の光強度を単に測る方法と比べて、直接見ることの利点をあげる。

3.1 判ること

分布 (Fig.1a)

強度分布から対象の局在がわかる。時間経過を追うことで、分子移動や細胞内信号を見ることができ (Fig.2a)。測定対象の大きさが光学的な理論値以下(約0.2 μm)であったとしても、その存在を一分子レベルで検出可能である³⁾。蛍光標識したあと、任意領域に光を集中させることで退色を促進させた後での回復を見る方法をFRAP (fluorescence recovery after photobleaching)⁴⁾とよぶ。FRAPにより細胞質における物質の流動や、細胞の区画といわれるフェンスの構築状態がわかる。分子の相関 (Fig.1b)

蛍光エネルギー移動(FRET, fluorescence resonance energy transfer)⁵⁾から分子間の距離や相関がわかる。分子の組み合わせにはfluoresceinとrhodamine⁶⁾、CFPとYFP (Fig.2b)⁷⁾がある。それぞれの蛍光分子を見たい対象に標識することで、リガンドと受容体⁸⁾、イオンと結合タンパク質⁹⁾、抗原と抗体¹⁰⁾などの距離から分子内の結合状態や分子間の親和性を定量化できる。

3.2 解析できること

濃度や機能の定量化 (Fig.1c)

蛍光のスペクトルや明るさの変化から分子や機能を定量できる。受容体、細胞内イオン、膜へのマーキングより、電位などの測定ができ細胞の活性化状態がわかる^{11,11,2)}。ミトコンドリアや小胞分泌追跡からオルガネラの機能も測れる (Fig.2c)^{12,13)}。薬理的な効果や細胞分裂時におけるタンパク質量の変化が定量できる。

多重追跡 (Fig.1d)

蛍光スペクトルの違いから複数の対象を同時に追跡できる。分子ごとのスペクトル、細胞内における分布や動態がわかる (Fig.2d)¹⁴⁾。多重追跡は蛍光分子の改良やスペクトル分光技術の進化により容易化した。回折格子 (grating) と多チャネル検出器を組み合わせ、蛍光スペクトルをリアルに再現したイメージング手法が登場している¹⁵⁾。スペクトルピークに数 nm の波長差があれば何種類でも区別して、独立追跡できる。

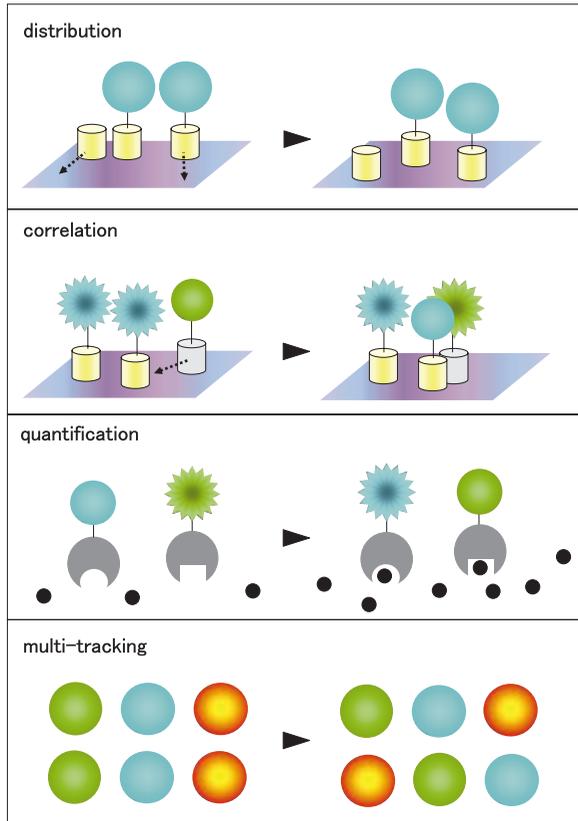


Fig.1 Characteristics of live cell fluorescence imaging. Representative 4 measurements (distribution, correlation, quantification, multiple-tracking) by realtime microscopy were illustrated.

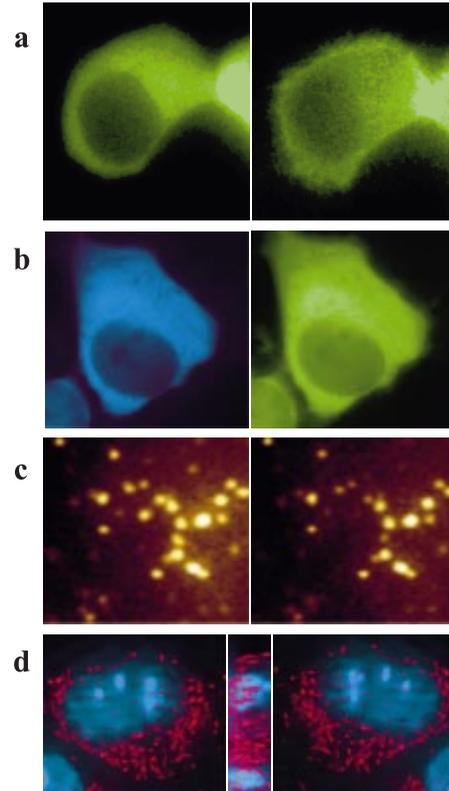


Fig. 2 Spatio-temporal analysis for live cell functions and movements. a, translocation of PKC-GFP. b, Ca ions by FRET between CFP and YFP (Yellow Cameleon 2.1). c, exocytosis of acridine orange containing granules. d, multi-angle views of mitochondria (DsRed as red) and nucleus (CFP as blue). In a-c, left images were before stimulation (resting states), and right were after stimulation. All figures were recorded at 12th Medical Photonics Course, Hamamatsu, 2003.

TABLE1 Fluorescent dyes and proteins for live cell staining

λ nm	band	Fluorescent proteins	Fluorophores	Ions	Organelle			Lasers	Lamps	
					nucleus	membrane	others		gas	solid
340	U	EBFP	AMCA	Fura2*	Hoechst33342	ANS	N2 337	355	Hg	i 365
350			Marina blue	Indo1**	Hoechst 33258					
360			Hydroxy coumarin	MQAE	DAPI					
370										
380										
390	V		PyMPO	BTC*			405	Hg	h 405	
400										
410	BV	ECFP	Lucifer Yellow	FuraRed*		Quinacrine	HeCd 442	430	Hg	g 436
420				BCECF*						
430										
440										
450										
460	B	EGFP	NBD		AO		Ar 488	473	H2	F 486
470			Alexa 488		FM 1-43					
480			Oregon Green 488	Fluo4	DiOC ₆ (3)					
490			Fluorescein	Fluo3	YOYO 1	Calcein				
500			Koala		DiBAC ₄ (3)	Rhodamine 123				
510	G	EYFP	Eosin	carboxy SNARF-1	EB β	JF1-ex	Ar 514	532	Hg	e 546
520			Alexa532		PI β	JF1-ex				
530			Tetramethylrhodamine			JF1-ex				
540			Cy3-IC3			JF1-ex				
550			Texas Red#			CY5(Red)				
560										
570	Y	mRFP	Rhodamine red-X				Kr 568	561	He	d 567
580										
590										
600	R						He-Ne 633	H2	C 656	
610										
620										
630			Alexa633							
640			Cy5-IC5							
650										

Left: fluorescent dyes and proteins for live cell staining.
 Right: light sources (lasers and lamps) for live cell imaging.
 AMCA:7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid.
 ANS:8-Anilino-naphthalene sulfonic acid.
 AO:acridine orange.
 DAPI:4, 6-diamidino-2-phenylindole HCl.
 FITC:Fluorescein isothiocyanate.
 TRITC:Tetramethylrhodamine isothiocyanate
 #:Sulforhodamine 101 acid chloride.
 *:2_{ex}, 1_{em}.
 **:1_{ex}, 2_{em}.
 #:for dead cell

4. 蛍光分子を選択する

Table 1 にライブステイニング用として代表的な蛍光色素を掲載した。何をみたいかが決まれば、あとは特異性、波長特性などを留意して選択すればよい。

4.1 標識の特異性

蛍光タンパク：細胞に任意の遺伝子を導入することで、蛍光分子と標的タンパク質が結合した状態で発現する^{16, 17)}。生きた細胞が自身で産生する蛍光分子であるので自然な状態に近く、特異性も高い標識法である。蛍光スペクトルにおけるピーク帯域の色で名称が分類されており、主にCFP、GFP、YFP、RFP (DsRED) が汎用されている³⁾。

蛍光標識剤：蛍光分子を修飾することで、細胞に発現している官能基と結合する。たとえばisothiocyanateやsuccinimidyl esterはアミノ基と、bromoacetamide、maleimideはチオール基と結合する。蛍光団はcoumarin, fluorescein, rhodamine類が多く、これを改良した専用の蛍光ラベリング化剤があり、Alexa, Cy などがある²⁾。半導体ナノ粒子 (Q dot)⁴⁾も抗体用のラベル化剤などとして活用されている。これらラベリング化剤は明るくて退色が少ないのが特徴とされる。通常は蛍光をほとんど発さないが、光を照射した場所だけで特定波長の蛍光を発するようになる試薬もあり、caged fluorophores²⁾ やフォトクロミック分子¹⁸⁾がある。

マーカー：溶液として投与することで、細胞内に移動して酵素類と結合したり、ポンプで運搬されて特定の部位に濃縮されたりする¹⁹⁾。小胞体やミトコンドリアのマーカー酵素や核酸構造と結合するものがある。アクリジンオレンジのような陽イオン性蛍光物質は細胞膜を通過でき、プロトンポンプにより分泌顆粒内に蓄積する (Fig.2c)。

4.2 波長

汎用されている蛍光プローブにおいて、大多数の波長範囲は可視光の領域であり、励起光(excitation, ex)は340 ~ 600 nm、蛍光(emission, em)は400 ~ 650 nmになる。可視域が汎用される理由を5つあげる。

肉眼で直接確認できるため標識の確認が容易。

対物レンズの色補正はC線 (656 nm)、F線 (486 nm)、g線 (436 nm) といった輝線を基準としており、この付近の波長におけるピントが最もよく合う。

励起光源としてのラインナップが豊富。ランプだけでなくレーザーの種類も増えている。ガスレーザーは波長488 ~ 630 nmの帯域、固体ブルーレーザーは400 ~ 500 nmをカバーしている。

励起光の生体に対する細胞傷害性が低い。紫外領域光は細胞内の核酸やタンパク質に吸収されやすく影響を及ぼす。

自家蛍光による背景光レベルが低い。

4.3 励起波長・蛍光波長

励起様式と蛍光検出は次のとおり、3種がある²⁰⁾。

1 波長励起 1 波長蛍光検出

2 波長励起 1 波長蛍光検出

1 波長励起 2 波長蛍光検出

は最も手軽な測定であり、蛍光強度の分布測定に適する。強度

の変化などを測る場合は同じ標本中における相対比較となる。や の2波長励起や検出では強度比 (ratiometry) を計算することになる²¹⁾。Caイオン感受性蛍光色素 fura-2 は2波長励起1波長蛍光 (ex:340/380, em:510) であり、その蛍光強度は340 nm励起でCa濃度に依存して上昇し、380 nm励起で減衰する。両者の蛍光強度比 (F340/F380) を算出することでS/N比があがる。レシオ法は励起光強度や蛍光分子濃度などの測定条件による影響や誤差を小さくできるという特徴があり、退色 (photobleaching) による測定誤差も軽減される。

4.4 明るさ

ダイナミックレンジ

同じ励起光量でも蛍光分子種によって明るさや変化幅 (dynamic range) が異なる。イメージングにとって理想的な蛍光分子とは、コントロールでも十分に明るく、ダイナミックレンジも大きいものであろう。微量物質の測定感度を上げたい場合は、静止時では暗く、対象量の増大に依存して明るくなるタイプがよい。ただし静止時の蛍光強度は暗くなるため、低ノイズな検出システムが必要になる。静止時においても十分に明るい色素は細胞像をとるのは容易であるが、応答時における強度変化率は相対的に低くなるため、感度とビット数の高い検出器を選択するとよい。

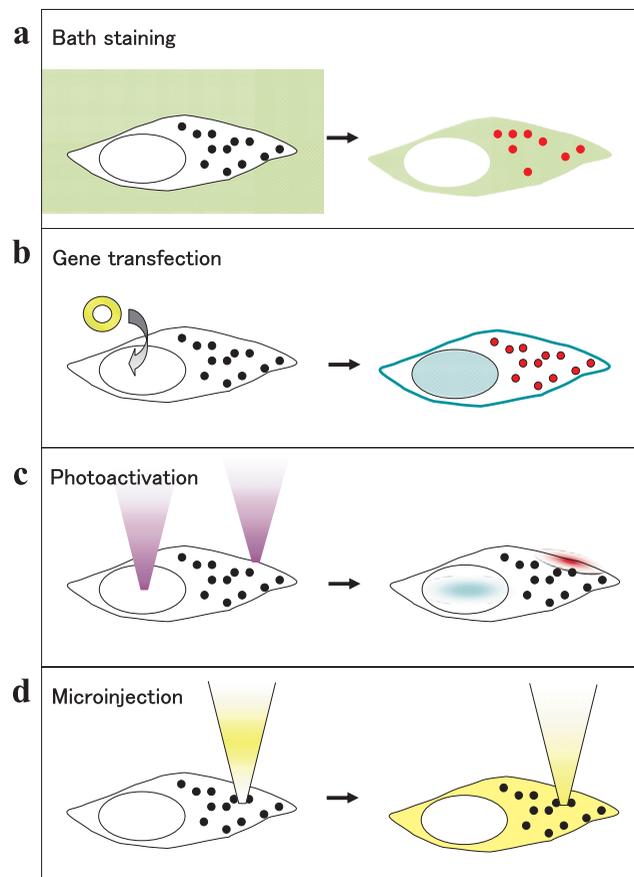


Fig. 3 Live cell fluorescent marking by 4 ways (a-d). Left images were before loading of fluorophores, and right were after the staining.

溶媒や pH の効果

細胞内において均一に色素を負荷しても一様な明るさとはならない。細胞膜中の存在位置で明るさが変わる。これは蛍光分子の分布量の差もあるが、存在位置における環境による量子収率(2-2項)も関係している。因子としては pH が相当に影響を及ぼすケースが多いので、pH7 付近では蛍光強度が安定であるかどうか確認したほうがよい。

4.5 細胞膜透過性

ライブステイニングでは蛍光分子と細胞膜の親和性や透過性の検討が必須である。細胞質、核やオルガネラを標識する場合には細胞膜を通過させなければならず、通常は疎水性、陽イオン性色素が有効である。細胞膜を通過できないような水溶性色素においてはカルボン酸基をアセトキシメチルエステル化 (acetoxymethyl ester, AM) することで細胞膜の透過性をあげることができる²²⁾。Calcein-AMは細胞外では蛍光強度は低いが、細胞膜を通過して、エステラーゼにより AM が解離して水溶性となると蛍光強度があがる²³⁾。この原理により細胞膜の状態がわかるので、生細胞の判定に用いることができる。

5. 蛍光ラベルする

蛍光分子の生細胞への標識法について 4 つの手法をあげる。

バース染色 (Fig.3a)

細胞外液に蛍光色素を負荷して目的の部位へ移行・結合させる。固定後の標本に対する染色と異なり、細胞活性へ影響を与えないよう染色条件を厳密とする必要がある。通常は室温 ~ 37度の温度で、数分 ~ 1 時間以内で染色を行うようにする。

トランスフェクション (Fig.3b)

目的とする分子を蛍光タンパクで標識として発現させるために遺伝子 DNA を細胞に導入する。トランスフェクションにはウイルスベクター法、リポソーム法、電気穿孔法、マイクロインジェクション法などがある²⁴⁾。細胞の蛍光強度分布から、遺伝子の導入と発現が成功したかどうかを判定できる。失敗すると異常な分布を示したり、時には死となる。生き残った細胞の中で蛍光分布を比較して、適当と思われるものを選択して測定へ供することになる。

光刺激・活性化 (Fig.3c)

任意の細胞または領域だけを標識したい場合に用いる。caged 蛍光色素、フォトクロミック化合物、光感受性タンパク質などが用いられ、光を照射した部位だけがマーキングされる (photoconversion, photoactivation)²⁵⁾。光源は紫外領域光を用いることが多いので照射による毒性が少なくなるようにする。

マイクロインジェクション (Fig.3d)

蛍光分子を細胞内へ移行できない場合に適用される。先端部が鋭利なガラスピペットを細胞へ刺し、細胞に影響がないよう注意しながら加圧して色素を注入して色素を導入する。電気生理測定用のパッチピペット²⁶⁾やオートインジェクタが使用される。細胞一個程度の標識となり、短期間における測定がむく。

~ における共通の注意がある: 1) 至適濃度や温度など条件を比較検討する、2) 刺激や物理的ストレスを最小限とするようにす

る、3) 標識が完了したらできるだけ早く測定に供する。

6. リアルタイム蛍光イメージングする

マークした対象をリアルタイムイメージングするための実際の操作手順は以下の 4 ステップになる。

STEP1: 励起 (Fig.4a)

ライブステイニングした細胞に励起光を照射して蛍光を確認する。光照射の方式は見たい領域・範囲・サイズなど測定の目的に応じて変わるが、測定前の光照射ではできるだけ弱い光をあて、検出器の感度を上げるとよい。

STEP2: 細胞の選択 (Fig.4b)

蛍光色素の種類に応じて基準は異なってくるが、初期状態における蛍光強度分布や細胞自体の動きなどから選ぶことになる。蛍光強度を選択基準とする場合は、明るいもの、中間程度のもの、暗いものと分類し、測定結果から測定目的に合う蛍光強度の範囲を決める。蛍光分子量が過飽和になる状態を蛍光色素負荷では overload、蛍光タンパク発現では over expression とよぶ。こうなると細胞応答に依存した蛍光変化率が落ちる。Ca イオンイメージングでは overload 時の場合や細胞の調子低下によって、蛍光強度が上昇するので、生理機能に影響がないまま適度な強度を呈しているものを見極める必要がある。

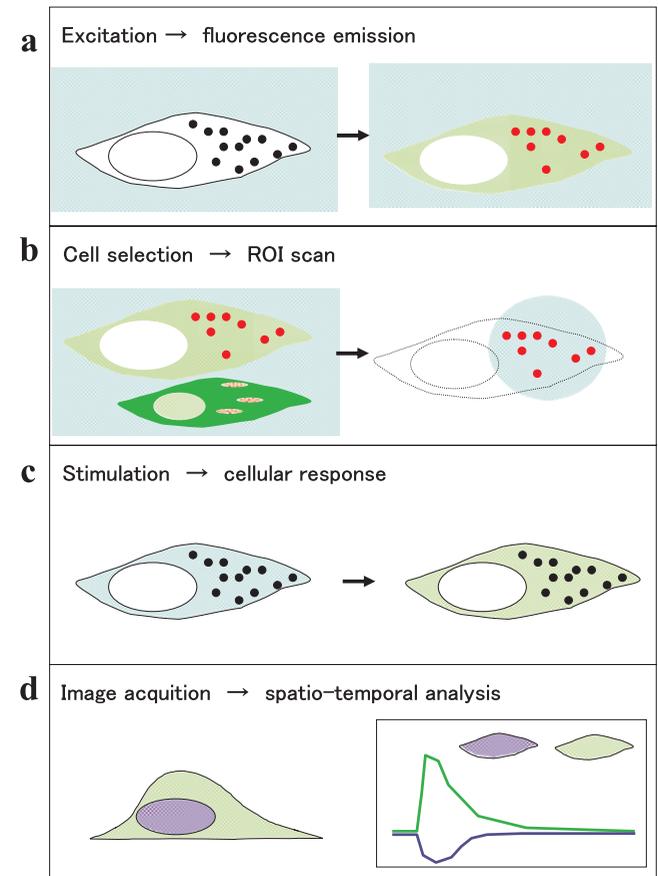


Fig. 4 4 steps for live cell fluorescence imaging as illustrated in a-d.

STEP3 : 刺激・応答 (Fig.4c)

投薬または刺激によって細胞応答を誘導する。投薬は溶液の交換、または急速注入・添加で行われる。溶液交換が測定に影響を与える場合は、電気刺激、光刺激などで代替することがある。反応したかどうか判定できない場合は、最大刺激による応答性の有無をチェックする。応答が全く無い場合は蛍光標識が適当であったかどうかを再確認する。

STEP4 : 画像取得と解析 (Fig.4d)

蛍光の明るさや波長に応じて検出器を選ぶ。蛍光が十分に明るければ CCD カメラでも良く、小型で使い勝手のよいデジタル CCD カメラを選択すればよい。やや暗い蛍光なら、高感度 CCD カメラやイメージ増倍付 CCD カメラがよい。非常に暗いもの・高速検出する場合は、電子増倍式冷却 CCD カメラまたはフォトマル (photomultiplier tube, PMT) となる。検出した蛍光イメージはデジタルデータとして記録すれば、蛍光強度(輝度)は8~16ビットの階調となり、単純な数値解析となる。特定の関心領域における輝度の平均や偏差などを求め、時間方向や Z 軸方向の数値変化を求める。時間方向の解析によりタイムコース、Z 軸の解析により 3 次元構築となる。

7. 分子やオルガネラのイメージング例

見たい標本へのマーキングや解析結果を 4 例紹介する。通常は空間 (XYZ)、時間 (T)、波長 (λ) の各軸に対する蛍光の強度や分布といった 5 次元での解析となる。

7.1 分子の分布や動態を見る (PKC α -GFP の場合)

PKCは細胞における生理機能制御系において重要なシグナル蛋白質である。これまでに多くのサブクラスが同定されている。PKC α は静止時において細胞質に存在しており、細胞への刺激によって細胞膜へ移動することが知られており、GFPなど蛍光タンパク標識によりダイナミックな変化を視覚的にとらえることができる^{27, 28)}。静止時は細胞質が一様に明るく、刺激によって細胞膜領域の強度が上がる(Fig. 2a)。蛍光分子の移動をとらえるためには共焦点法が優れ、膜領域限定で測るには全反射法がよい。fura-2法と組み合わせて、励起波長を切替えることでカルシウム信号との同時追跡もできる²⁹⁾。

7.2 FRETを見る Yellow Cameleon の場合

Caイオンは代表的なセカンドメッセンジャーであり、これまでに多くのイメージング法が開発されてきた。Caイオン結合蛋白を蛍光化した CFP と YFP の間でおこる蛍光エネルギー移動 (FRET) により Ca イオン濃度を測定できる(Fig. 2b)。通常は V 帯 (405 ~ 440 nm) の励起光を用い、Ca 濃度に依存して FRET がおこり CFP 強度は低下、YFP 強度は増加する。FRET を正確に定量するためには CFP と YFP の蛍光スペクトルにおけるクロストークをキャンセルするように演算するとよい。スペクトル分光型の共焦点顕微鏡を用いることで、CFP と YFP 信号の Unmixing ができ FRET を高 S/N 比で検出できる^{7, 15)}。

7.3 オルガネラを見る アクリジンオレンジ放出の場合

オルガネラにはミトコンドリア、小胞体、ゴルジ装置などがあり、特異的な官能基またはマーカーへの蛍光標識で可視化できる。分泌小胞にはホルモンや神経伝達物質が蓄えられており、刺激に

応じて外部に放出 (exocytosis) される。小胞内容物への標識化、または共存化で分泌小胞の動きや開口放出が見える。個々の小胞は単一のスポットとして見え、exocytosis によって蛍光分子も放出されて急激に消えてなくなる(Fig. 2c)。全反射法によりインスリンが放出される瞬間などを確認することができる¹²⁾。

7.4 多色でオルガネラを 3 次元的に見る Mit-DsRED の場合

複数のオルガネラをスペクトル特性の異なる蛍光分子で標識することで、単一細胞における数種類の標的を同時に追うことができる。ミトコンドリアでは cytochrome c oxidase が、核では核移行シグナルがマーカーとなり、それぞれ異なる蛍光分子 (たとえば DsRed や CFP) で標識する。Z 軸方向にピントをシフトしながら XY 平面画像を取得してから再構成することで 3 次元 (X・Y・Z) 解析ができ、標本をピント面に対して垂直方向から眺めたような画像が得られる(Fig. 2d)。共焦点法によりシャープな光学断面画像を取得でき、オルガネラ同士の位置関係がクリアとなる。3次元空間で複数の蛍光分子を追えば 4 次元 (X・Y・Z・ λ) 解析となり、時間方向を加えれば 5 次元 (X・Y・Z・ λ ・T) 解析となる。

8. ライブステイニングの課題

蛍光標識や解析において主に 3 つの問題がある。

染色の不均一性

選択した色素と細胞の間における相性、または標識過程における実験条件が影響する。前者はこれまで触れた量子収率の差が大きいとされる。後者においてはオーバーロードと、予想外の場所への移行化 (コンパートメント化) がある。これらは意図しない領域まで標識しまうことになるので、背景光やノイズ成分となって S/N 比が低下する。原因としては色素の溶解が不十分、ロード時における温度条件が適当でないことがあげられる。またロードに成功しても、色素が安定して存在し続けるわけではない。代謝や排出などによって徐々に不活化・分散して消失する。蛍光標識に成功したら、できるだけ早期に測定を開始したほうがよい。

自家蛍光

生体において自然に存在する有機物も蛍光を発する^{30, 31)}。代表的なものとしては、リボフラビンやビタミン B₆ などのビタミン類、セロトニンやカテコールアミンなど神経伝達物質、トリプトファンやチロシンなどアミノ酸類、NADH や FAD など補酵素類がある。その他にポルフィリン、コラーゲン、フィブロネクチンなども蛍光を発する。これら自家蛍光物質のほとんどは U 帯 ~ B 帯に吸収をもつため、500 nm 以下の蛍光を検出するときは、無標識時に細胞が光っていないかどうかチェックするとよい。

退色や光毒性

分子に光を照射している限り、蛍光を発し続けるわけではなく、徐々に退色していく。蛍光強度の低下だけなら検出器の感度を変えるなどの対策で済むが、もう一方で一重項酸素 (singlet oxygen) の産生が問題になる。一重項酸素はローズベンガル系やポルフィリン系色素と光との反応でよく発生して光毒性 (phototoxicity) を呈することが知られており、癌の光治療

(photo dynamic therapy, PDT)にも応用されている^{32, 33)}。すなわち退色と一重項酸素産生、そして一重項酸素と光毒性の双方に相関がある。光を当てすぎはメリットが少ないので、余計な光はできるだけ細胞に当てずに効率よく録ることに留意する。

9. おわりに

今回はライブセル蛍光ステイニングについて特色や手法を解説した。できることなら無染色・無標識のまま見たいが、蛍光マーキングの利点が勝っている。したがって、より明るく・低毒性で、長時間にわたって安定測定できるような照準造りをめざしてほしい。照準として選択する蛍光分子の種類は研究目的やイメージング機器に応じて選ぶことになる。蛍光分子の物理化学性質を目安に選択し、細胞における強度分布や応答から実験に最適となるよう染色条件を整えていただきたい。次回は本項でも少し触れたCa感受性蛍光色素を用いた細胞内Ca濃度イメージング法について紹介する。

参考文献

- 1) JR. Lakowicz, *Anal. Biochem.*, **2001**, 298, 1.
- 2) 片山佳樹 ドージンニュース, **2003**, 105, 8.
- 3) CK. Johnson, KD. Osborn, MW. Allen, BD. Slaughter, *Physiology (Bethesda)*, **2005**, 20, 10.
- 4) D. Sinnecker, P. Voigt, N. Hellwig, M. Schaefer, *Biochemistry*, **2005**, 18, 7085.
- 5) RN. Day, F. Schaufele, *Mol. Endocrinol.*, **2005**, 7, 1675.
- 6) JP. Goddard, JL. Reymond, *Trends Biotechnol.*, **2004**, 7, 363.
- 7) T. Nagai, S. Yamada, T. Tominaga, M. Ichikawa, A. Miyawaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, 29, 10554.
- 8) S. De, IG. Macara, DA. Lannigan, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2005**.
- 9) S. Okumoto, LL. Looger, KD. Micheva, RJ. Reimer, SJ. Smith, WB. Frommer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, 24, 8740.
- 10) B. Renberg, PK. Nygren, M. Eklund, AE. Karlstrom, *Anal. Biochem.*, **2004**, 1, 72.
- 11) RP. Haugland, *The Handbook 10th ed. invitrogen Molecular Probes*, **2005**.
- 12) M. Ohara-Imaizumi, C. Nishiwaki, T. Kikuta, S. Nagai, Y. Nakamichi, S. Nagamatsu, *Biochem. J.*, **2004**, 381, 13.
- 13) AC. Millard, M. Terasaki, LM. Loew, *Biophys. J.*, **2005**, 88, L46.
- 14) G. Rabut, J. Ellenberg, *J. Microsc.*, **2004**, 216, 131.
- 15) T. Zimmermann, J. Rietdorf, R. Pepperkok, *FEBS Lett.*, **2003**, 546, 87.
- 16) M. Stadtfeld, F. Varas, T. Graf, *Methods Mol. Med.*, **2005**, 105, 395.
- 17) O. Griesbeck, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **2004**, 14, 636.
- 18) MW. Berns, T. Krasieva, CH. Sun, A. Dvornikov, PM. Rentzepis, *J. Photochem. Photobiol.*, **2004**, 75, 51.
- 19) N. Yamamoto, P. Jiang, M. Yang, M. Xu, K. Yamauchi, H. Tsuchiya, K. Tomita, GM. Wahl, AR. Moossa, RM. Hoffman, *Cancer Res.*, **2004**, 64, 4251.
- 20) K. Dunn, FR. Maxfield, *Methods Cell Biol.*, **2003**, 72, 389.
- 21) RB. Silver, *Methods Cell Biol.*, **2003**, 72, 369.
- 22) H. Hayashi, Miyata, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **1994**, 31, 1.
- 23) J. Uggeri, R. Gatti, S. Belletti, R. Scandroglio, R. Corradini, BM. Rotoli, G. Orlandini, *Histochem. Cell Biol.*, **2004**, 122, 499.
- 24) PC. Hendrie, DW. Russell, *Mol. Ther.*, **2005**, 12, 9.
- 25) 片山佳樹, カルシウムイオンとシグナル伝達(蛋白質 核酸 酵素 増刊号), **1998**, 43, 1917.
- 26) MK. Park, AV. Tepikin, OH. Petersen, *Pflugers Arch.*, **2002**, 444, 305.
- 27) N. Sakai, H. Tsubokawa, M. Matsuzaki, T. Kajimoto, E. Takahashi, Y. Ren, S. Ohmori, Y. Shirai, H. Matsubayashi, J. Chen, RS. Duman, H. Kasai, N. Saito, *Genes Cells*, **2004**, 9, 945.
- 28) CD. Stubbs, SW. Botchway, SJ. Slater, AW. Parker, *BMC Cell Biol.*, **2005**, 6, 22.
- 29) H. Mogami, H. Zhang, Y. Suzuki, T. Urano, N. Saito, I. Kojima, OH. Petersen, *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 9896.
- 30) G. Bottiroli, AC. Croce, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, 3, 189.
- 31) GS. Harms, L. Cognet, PH. Lommerse, GA. Blab, T. Schmidt, *Biophys. J.*, **2001**, 80, 2396.
- 32) K. Berg, PK. Selbo, A. Weyergang, A. Dietze, L. Prasmickaite, A. Bonsted, BO. Engesaeter, E. Angell-Petersen, T. Warloe, N. Frandsen, A. Hogset, *J. Microsc.*, **2005**, 218, 133.
- 33) 吉田孝人、河野栄治、櫻井孝司、平野達、山本清二、寺川進、日本レーザー治療学会誌, **2004**, 2, 67.

* 1) <http://www.dojindo.co.jp/>

* 2) <http://www.invitrogen.com/>

* 3) <http://www.scbio.co.jp/products/quantumdot>

* 4) <http://clontech.takara-bio.co.jp/>

* 5) Cell Imaging Press, June (2005) 頼ニコンインステック

Topics on Chemistry

タンパク質の蛍光標識技術

九州大学大学院 宗 伸明

タンパク質の蛍光標識技術は、タンパク質の検出や定量のみならず、細胞内タンパク質の挙動解析やタンパク質間相互作用の研究において極めて重要である。タンパク質を蛍光標識する従来法として最も基本的な手法は、エステル化等により活性化した蛍光基をタンパク質のアミノ酸残基と化学反応させて標識する手法であるが、この手法では蛍光基の修飾位置や標識数を制御することができず、且つ標識に伴うタンパク質構造の劣化が懸念される。一方、1990年代初頭にオワンクラゲからのGFP遺伝子がクローニングされて以来、GFPをはじめとした種々の蛍光タンパク質を利用する手法も広く用いられるようになってきている。しかし、蛍光タンパク質は標識体としては大きすぎるため(GFPで27kDa)、蛍光標識されたタンパク質が本来の挙動を示さない恐れがあるという問題がある。

このような中、蛍光色素分子を用いる化学的手法と遺伝子工学的手法を組み合わせた新しい蛍光標識技術の開発に関する研究が近年盛んに行われている¹⁾。その例として、suppressor tRNAを用いる手法、プロテインスプライシングを用いる手法、*O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferaseを用いる手法、ピオチンリガーゼを用いる手法、FIAsHを用いる手法、蛍光基修飾NTA-Ni²⁺錯体を用いる手法等が報告されている。これらの手法は蛍光標識に伴うタンパク質構造への影響を大きく軽減できるという点で何れも魅力的であるが、中でもFIAsHあるいは蛍光基修飾NTA-Ni²⁺錯体を用いる手法は、タンパク質計測用蛍光プローブとも言うべき機能性蛍光分子とこれに対応したペプチドタグとのアフィニティー反応を利用するという方法論の特長から、タンパク質の任意の位置に蛍光修飾を行うことが可能である、標識操作が簡便である、可逆的な標識が可能である、といった利点を有しており、非常に興味深い。しかしながら、FIAsHを用いる手法では、ペプチドタグであるtetracycystein motifの認識に伴い、蛍光強度は単純に増大する。一方、蛍光基修飾NTA-Ni²⁺錯体としてはフルオレセイン系、シアニン系、ローダミン系の蛍光基を修飾したものが報告されているが、ペプチドタグであるHis-tagの認識に伴う顕著な蛍光強度変化は観測されないため、使用時には結合しなかった遊離の蛍光錯体を洗浄・分離するステップが必要不可欠となる。蛍光偏光測定や蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用した測定法を用いることも可能であるが、その応用範囲は大きく限定されてしまう。

最近、我々は新規タンパク質計測用蛍光プローブ(dansyl-NTA-Ni²⁺ complex)とこれに対応する新規ペプチドタグ(His-Trp-tag)を用いた新しい蛍光標識法を開発した(Fig.1)²⁾。dansyl-NTA-Ni²⁺ complexは場感受性蛍光基であるダンシル基を修飾したNTA-Ni²⁺錯体であり(Fig.2)、His-Trp-tagは疎水性部位を有するトリプトファン(Trp)を単数から複数個通常のHis-tagに連結したペプチドタグである(Fig.3)。このdansyl-NTA-Ni²⁺ complexをHis-Trp-tagと作用させた場合、蛍光強度の増大に加えて蛍光波長のブルーシフトが観測される。これは、dansyl-NTA-Ni²⁺ complexのNTA-Ni²⁺ complex部位がHis-Trp-tagのHis-tag部位に通常のアフィニティー反応に基づき配位した後、更にダンシル基が配位により接近したタグ中のTrp部位と疎水性相互作用に基づき会合することによる。本手法において、標識に伴

う蛍光変化は、His-Trp-tag中のTrpの数が増大するに従って顕著となった。また、本手法は非常に可逆性に優れており、EDTAの添加による標識の解消とNi²⁺の添加による再標識を効率的に行うことが可能であった。本蛍光標識手法では標識に伴い蛍光強度だけでなく蛍光波長がシフトするため、従来法と異なり蛍光強度比に基づくタンパク質検出を行うことが可能となる。今回は蛍光基としてダンシル基を、His-tag部位に連結するアミノ酸としてTrpを用いたが、これらは適切な他の異なる場感受性蛍光基とアミノ酸に置き換えることも可能であり、この詳細については現在検討中である。本手法はタンパク質の*in vivo*蛍光標識法としての利用に加え、B/F分離を必要としない*in vitro*あるいはon chipにおける新しいone potタンパク質蛍光検出法としても有効性を発揮することが期待できる。

参考文献

- 1) 総説として; I. Chen, A. Y. Ting, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2005**, 16, 35.
- 2) 瀬戸大輔, 宗 伸明, 中野幸二, 今任稔彦, 第42回化学関連支部合同九州大会講演予稿集, **2005**, 42.

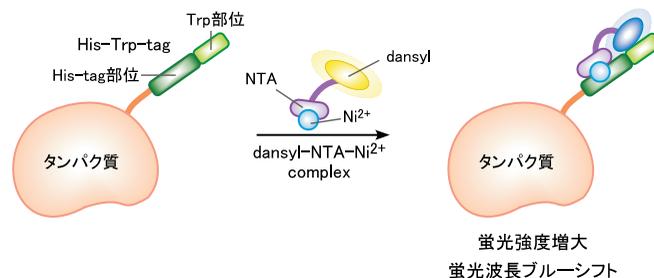


Fig. 1 Schematic illustration of protein labeling.

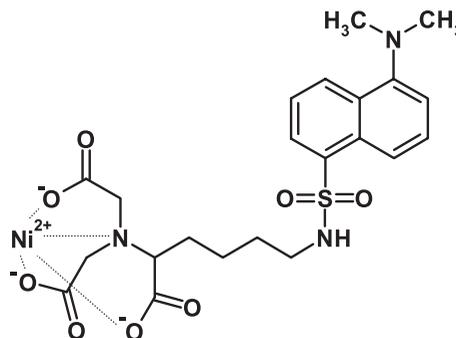


Fig. 2 Chemical structure of dansyl-NTA-Ni²⁺ complex.

His6Trp3: His-His-His-His-His-His-Trp-Trp-Trp

His6Trp2: His-His-His-His-His-His-Trp-Trp

His6Trp1: His-His-His-His-His-His-Trp

Fig. 3 Sequence of His-Trp-tags.

著者紹介

氏名：宗 伸明 (Nobuaki Soh)
 年齢：29歳
 所属：九州大学大学院工学研究院応用化学部門 助手
 連絡先：【伊都地区(新キャンパス)】
 〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744
 Tel：092-802-2891
 E-mail：soh@cstf.kyushu-u.ac.jp
 【箱崎地区】
 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1
 Tel：092-642-4134 Fax：092-642-4134
 (E-mailは共通)

学位：博士(工学)

研究テーマ：

- 1) タンパク質・活性酸素種を主な計測ターゲットとした分子プローブの開発
- 2) 新規バイオ材料の開発と分析化学的応用

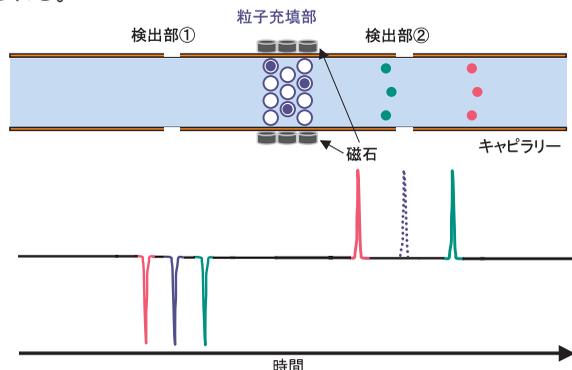
九州大学 - 同仁化学組織対応型連携に関するお知らせ

九州大学と小社は、九州大学での優れた研究成果を迅速に実用化することを目的に組織対応型(包括的)連携契約を締結致しました。本紙面上で随時それらの成果をご紹介する予定です。今回、Topics on Chemistryにてご紹介致しました「タンパク質蛍光標識技術」をはじめ、下記の技術に関しても実用化を検討しています。これらにご興味ございましたら小社までお問い合わせ下さい。

No.004 分子トラップキャピラリー電気泳動法

分子トラップキャピラリー電気泳動法は、複雑な組成を持つ試料中に含まれるタンパク質を迅速に分離し、その分離過程において目的タンパク質を簡便に同定するための新しい分析法である。キャピラリー内に抗体を固定化した微粒子を充填し、微粒子の両端に検出部を設ける。分離されたタンパク質は微粒子との反応前後で検出される。一点目で検出されたタンパク質は、微粒子に固定化された抗体と反応し、抗体と反応したタンパク質のピークのみが二点目の検出部の際に消失する。

この方法はタンパク質の分析法として広く利用されているウエスタンプロティング法と同等の性能を有し、かつ短時間で分析できるものである。分析に1~2日を要するウエスタンプロティング法と比較して、1時間以内で分析が完了する。また、レーザー励起蛍光検出法などの高感度検出法と組み合わせることで、固定化酵素を用いる発光法に匹敵する検出感度を実現できるものと考えられる。

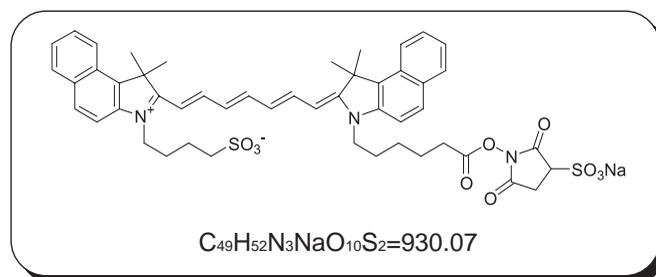


試作品

近赤外蛍光標識試薬

ICG-Sulfo-OSu

化学名 2-[7-[1,3-Dihydro-1,1-dimethyl-3-(4-sulfobutyl)-2H-benzo[e]indol-2-ylidene]-1,3,5-heptatrienyl]-1,1-dimethyl-3-[5-(3-sulfosuccinimidyl)oxycarbonylpentyl]-1H-benzo[e]indolium, inner salt, sodium salt



<特長>

緩衝液中に混合するだけでアミン選択的に標識できる活性エステルである。

近赤外蛍光を用いた低バックグラウンド検出が可能である。

($\lambda_{ex} = 768 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 807 \text{ nm}$)

ICG-Sulfo-OSuはindocyanine green (以下、ICG)の母核を参考にして分子設計された、蛍光標識試薬です¹⁾。ICGは、血液量測定や心機能検査・肝機能検査の他、蛍光眼底造影等に用いられている近赤外蛍光色素です。ICG-Sulfo-OSuも、分子内にICGと同じ蛍光団を有し、近赤外光で励起され、近赤外蛍光を発します。同様の極大励起波長・極大発光波長を持つ自家蛍光物質が少ないことから、生体試料の、低バックグラウンド観察が可能でです。

伊東らによって、消化器系癌の診断を目的とした研究について、一連の報告がなされています。専用の内視鏡用イメージングシステムにより、ICG-Sulfo-OSuの蛍光特性と適合した波長弁別が可能となっています²⁾。最近、癌マーカーである抗CEA(carcinoembryonic antigen)抗体を標識して組織染色を行った結果、近赤外蛍光像がDAB染色像と一致し、同一病巣を染色できることが示されました³⁻⁴⁾。

紫外光や可視光に比べ、近赤外光は透過力が高いとされ、試料深部の観察に向くとされます。そのため、生体イメージングによる診断の可能性も秘めています。今後の、近赤外イメージングシステム及び診断技術の進歩が望まれます。

本品のDMSO中での極大吸収波長は795 nmで、モル吸光係数は $1.28 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ です。標識生成物は、PBS中、極大励起波長768 nmで、極大発光波長807 nmを示します¹⁾。

参考文献

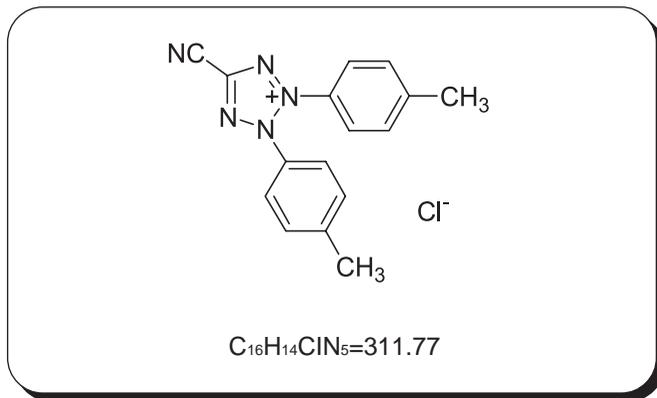
- 1) S. Ito et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, 5, 2689.
- 2) S. Ito et al., *Dig. Endosc.*, **1997**, 9, 278.
- 3) S. Ito et al., *Dig. Endosc.*, **2000**, 12, 33.
- 4) S. Ito et al., *Endoscopy*, **2001**, 33, 849.

新製品

生菌選択的蛍光染色試薬

CTC

化学名 5-Cyano-2, 3-ditolyl-2H-tetrazolium chloride



< 特長 >

- 呼吸活性を有する細菌を選択的に染色可能。
- 寒天平板培地法に比べ短時間で結果が得られる。
- 蛍光顕微鏡・フローサイトメトリーで使用可能。

細菌の検出には、培地で細菌を培養し、生成したコロニー数を計数する寒天平板培地法が主に用いられています。しかし最近になって、生きてはいるが培養できない状態（VNC状態：viable but non-culturable）の存在が明らかとなり、寒天平板培地法ではごく一部の細菌しか検出されないことがわかっています。そのため、新しい原理に基づくVNC細菌検出法の研究がなされており、その1つとしてCTC（5-Cyano-2,3-ditolyl-2H-tetrazolium chloride）が用いられています。CTCはモノテトラゾリウム還元色素であり、呼吸活性に伴う電子伝達系の作用で還元され蛍光性のCTC formazan (CTF) になり細菌細胞内に蛍光性沈澱として蓄積します。そのため、CTCで染色された細菌をフローサイトメトリーで検出したり、細菌をブラックメンブランフィルターで捕集した後蛍光顕微鏡観察することで、呼吸活性を有する細菌数を求めることができます。CTCで細菌の染色を行った後にDAPIで二重染色を行うと、全菌数と呼吸活性を有する細菌数を同時に求めることができます。CTC染色に要する時間はおよそ30分から4時間と短時間であるため、寒天平板培地法に比べて迅速に細菌を検出することができます。

細菌をはじめとする微生物による食中毒や感染症が社会問題となることは珍しくありません。CTCによる蛍光染色法は医薬品・食品・飲料やそれらの生産工程の衛生管理の手法としても、期待されます。

小社のCTCは高純度であり、呼吸活性を有する細菌数を、より正確に求めることができます。CTCを溶液状態で保存しておくと、染色能が低下することがありますので、用時調製でお使い下さい。

< CTC 染色法 > ¹⁾

1. 細菌懸濁液にCTC水溶液を終濃度が0.5 ~ 5 mmol/lになるように加え、30分 ~ 4時間インキュベートする。
2. 染色した細菌を0.2 μm ブラックメンブランフィルターで捕集し、フィルターを風乾する。
3. 蛍光顕微鏡（B励起）で細菌を計数し、呼吸活性を有する細菌数を求める。

* 試料の形態によっては、前処理が必要となる場合があります²⁾。

* 最適CTC濃度・インキュベート時間は試料の形態や細菌の種により異なります。

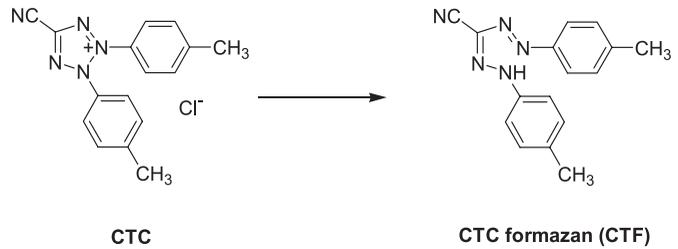


Fig. 1 CTCの還元反応

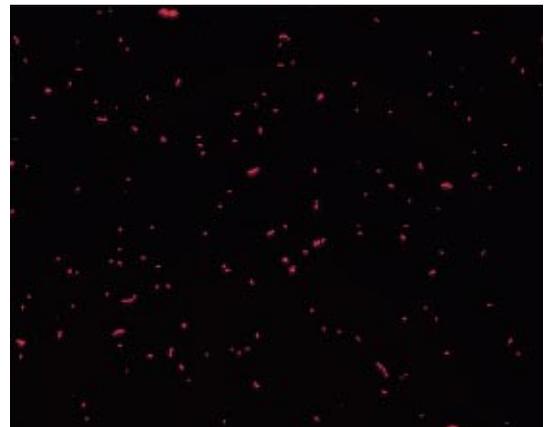


Fig. 2 CTCによる大腸菌染色画像

大腸菌 *E. coli* DH5α の細胞懸濁液 100 μl に、CTC 水溶液 100 μl を加え、37℃ で 4 時間インキュベートした。そのうちの 50 μl をガラスプレート上、倒立型蛍光顕微鏡で観察した（バンドパス励起フィルター：485 nm、ローカット吸収フィルター：510 nm）。

（福岡県工業技術センター生物食品研究所

赤尾哲之先生、末永光先生、楠本賢一先生より御提供）

参考文献

- 1) G. G. Rodriguez *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1992**, *58*, 1801.
- 2) e. g., N. Yamaguchi *et al.*, *Cytometry*, **2003**, *54A*, 27.

試作品

蛍光ラベル化キット

HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH₂ HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH₂

本製品は、抗体など分子量50,000以上で反応性のアミノ基を有する少量のタンパク質を蛍光標識するためのキットです。本キットは、簡便な操作性、高い回収率、高い再現性などの特長を持っています。これまでのFluorescein Labeling Kit - NH₂に加えて、550 nm 付近、650 nm 付近のより長波長で励起できるHiLyte Fluor™ 色素をラインナップに追加いたしました。Fluorescein Labeling Kit - NH₂を含めた波長特性は、右の表またはスペクトルをご参照ください。1キットで50-200 µgの3種類のタンパク質を、わずか2時間で蛍光標識することができ、得られた標識体はそのまま免疫染色などの様々な用途に利用することができます。

HiLyte Fluor™ 色素はアメリカ AnaSpec 社が開発した蛍光色素です。HiLyte Fluor™ 555 はCy3と、HiLyte Fluor™ 647 はCy5とそれぞれ類似した波長特性を持っています。

< 特長 >

- 約2時間で標識体が調製できる。
- Filtration Tubeを用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 付属の保存溶液で標識体の保存ができる。

< キット内容 >

- NH₂-Reactive HiLyte Fluor™ dye 3本
 - WS Buffer 4 ml × 1本
 - Reaction Buffer 500 µl × 1本
 - Filtration Tube 3本
- HiLyte Fluor™ 555 または 647

< 本キット以外に必要なもの >

- 10 µl, 200 µl マイクロピペッター
- インキュベーター(37 °C)
- マイクロチューブ (標識体保存用)
- 遠心機 (マイクロチューブ用)
- DMSO

< 標識体の波長比較 >

品名	標識体の励起・蛍光波長
Fluorescein Labeling Kit - NH ₂	λ _{ex/em} =490 / 525 nm
HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH ₂	λ _{ex/em} =555 / 570 nm
HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH ₂	λ _{ex/em} =655 / 670 nm

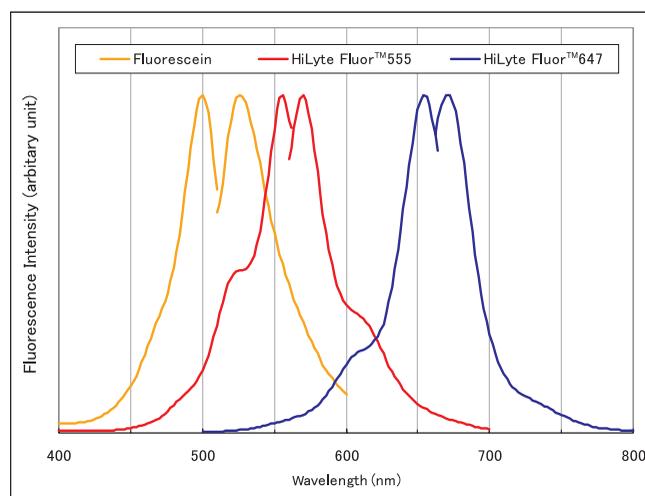


Fig. Fluorescein 及び HiLyte Fluor™ 色素の励起・蛍光スペクトル

< ご使用上の注意 >

試料溶液中に標識対象以外の分子量10,000以上の物質が含まれる場合は、標識反応が阻害される恐れがあります。特に市販の抗体は安定化剤としてゼラチンやアルブミンなどの高分子が添加されている場合があります。このような安定化タンパクが添加された抗体や、抗血清、マウス腹水のような未精製抗体をご使用の場合は、あらかじめアフィニティーカラムなどにより精製してご使用ください。精製方法に関してご不明な点がございましたら、小社までご相談ください。

冬の学会展示のご案内

下記会場にて、小社試薬製品の紹介を行います。皆様のご来場をお待ちしております。

第78回日本生化学会大会

期日：平成17年10月20日(木)～10月22日(土)

会場：神戸国際展示場

第28回日本分子生物学会年会 附設 試薬展示会

期日：平成17年12月7日(水)～9日(金)

会場：ヤフードーム(旧福岡ドーム)

新製品

蛍光タンパク標識キット

蛍光タンパク標識キットはモノクローナル抗体などの少量のタンパク質に Allophycocyanin(APC)、B-Phycoerythrin(B-PE)または R-Phycoerythrin(R-PE)の蛍光タンパク (Phycobiliprotein) を標識するためのキットで、それぞれNH₂タイプ、SHタイプの2種類があります。NH₂タイプはアミノ基を有する標的分子と、SHタイプはスルフヒドリル基を有する標的分子

と標識体を形成します。標的分子がスルフヒドリル基をもっていない場合には付属の還元剤を用いて遊離SH基を調製することが可能です(ただしS-S結合の切断によってタンパク質の活性が失われる場合があります)。得られた標識体はそのまま免疫組織染色、FACSなどの様々な用途に利用することができます。

Allophycocyanin Labeling Kit - NH₂
B-Phycoerythrin Labeling Kit - NH₂
R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH₂

Allophycocyanin Labeling Kit - SH
B-Phycoerythrin Labeling Kit - SH
R-Phycoerythrin Labeling Kit - SH

< 特長 >

- 約 2.5 時間で標識体が調製できる。
- Filtration Tube を用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 50 ~ 200 μg のタンパクの標識が可能。

< 特長 >

- 約 2.5 時間で標識体が調製できる。
- Filtration Tube を用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 50 ~ 200 μg のタンパクの標識が可能。

< キット内容 >

- NH₂- Reactive Phycobiliprotein 3 本
- WS Buffer 4 ml × 1 本
- Reaction Buffer 200 μl × 1 本
- Filtration Tube 3 本

< キット内容 >

- SH- Reactive Phycobiliprotein 3 本
- Reducing Agent 3 本
- RA Solution 1 ml × 1 本
- WS Buffer 4 ml × 1 本
- Reaction Buffer 200 μl × 1 本
- Filtration Tube 3 本

Phycobiliprotein : Allophycocyanin または B-Phycoerythrin または R-Phycoerythrin

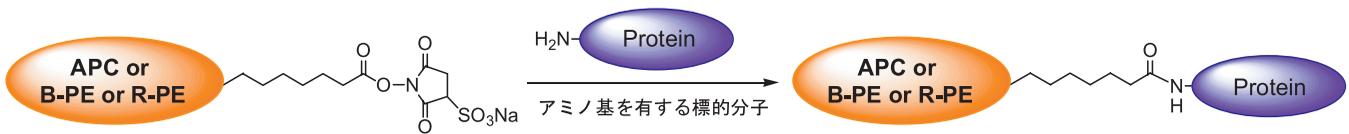


Fig. 1 蛍光タンパク標識キット NH₂ タイプの標識反応

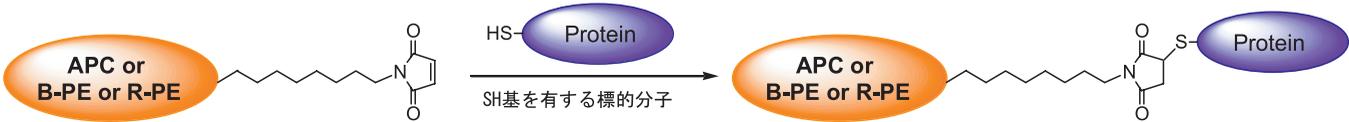


Fig. 2 蛍光タンパク標識キット SH タイプの標識反応

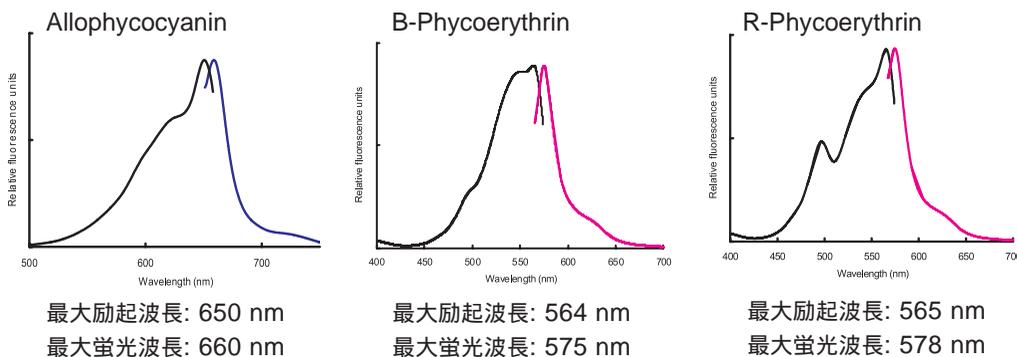


Fig. 3 各蛍光タンパクの励起、蛍光スペクトル (スペクトルは -NH₂ タイプ、-SH タイプ共通です)

< 蛍光タンパク標識 IgG の調製法 >

例) R-PE Labeling Kit -NH₂ の場合

*SH タイプの場合は、標識反応前に還元操作を行います。



a) IgG 溶液と WS Buffer を Filtration Tube に加えて、遠心する。

b) NH₂-Reactive PE を Reaction Buffer に溶解して、Filtration Tube 上の IgG と混合する。

c) 37 °C で 2 時間、標識反応を行う。

d) WS Buffer を用いて、標識体を回収する。

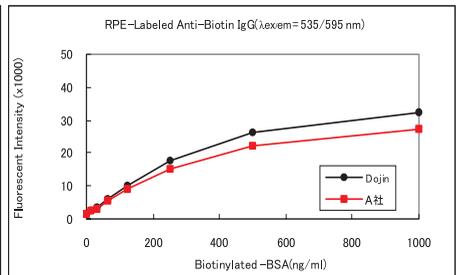
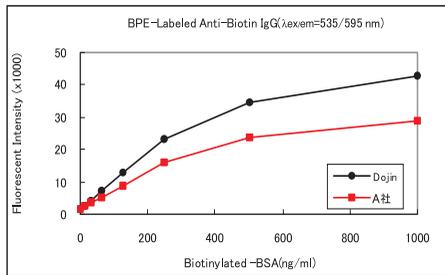
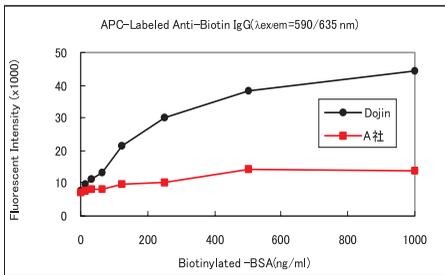


Fig. 4 APCまたはB-PEまたはR-PE Labeling Kit-SH 及び他社品 Kit を用いて蛍光タンパクを標識した Anti-Biotin IgG による FIA (Fluorescence Immuno Assay)

< 注意事項 >

- 標識対象物には、分子量50,000以上のサンプルをご使用ください。
- 標識対象物以外の分子量10,000以上の物質が含まれる場合は、あらかじめ精製操作が必要な場合があります。
- 本キット以外に必要なもの
10 μl, 200 μl マイクロピペッター
インキュベーター(37 °C)
マイクロチューブ (標識体保存用)
遠心機 (マイクロチューブ用)

品名	容量	本体価格 (¥)	メーカーコード
Allophycocyanin Labeling Kit-NH ₂	3 samples	43,000	LK21
B-Phycoerythrin Labeling Kit-NH ₂	3 samples	43,000	LK22
R-Phycoerythrin Labeling Kit-NH ₂	3 samples	43,000	LK23
Allophycocyanin Labeling Kit-SH	3 samples	38,000	LK24
B-Phycoerythrin Labeling Kit-SH	3 samples	38,000	LK25
R-Phycoerythrin Labeling Kit-SH	3 samples	38,000	LK26

Q & A

細胞内カルシウムイオン測定用試薬

1980年代の初めにFura 2-AMを代表とする細胞膜透過性蛍光カルシウム指示薬が登場して以来、生命の現象を知る上で、細胞内遊離カルシウムイオン測定は無くてはならない手法の一つとなっています。これまでに明らかになった細胞内でのカルシウムイオン動態は、これらカルシウム蛍光プローブによるところが大きいです。今後も様々な生体機能解析に利用されていくものと考えられます。

Q1 カルシウム蛍光プローブには幾つ種類がありますが、どのように使い分けるのですか？

A1 測定機器や測定波長などで選ばれることが多いようです。製品名の後ろに[-AM]が付いているものは細胞膜透過型になります。

それぞれの試薬の特性は

【Fluo 4】

- ・1波長励起1波長蛍光
励起： $\lambda_{ex}=495\text{ nm}$ 、蛍光： $\lambda_{em}=518\text{ nm}$
- ・解離定数：360 nmol/l
- ・励起波長が長波長側にあるので細胞に与える傷害が少ない（NADH,NADPH等の自家蛍光の影響が少ない）
- ・Arレーザー（488 nm）で励起出来る。
- ・Fluo 3よりも励起波長がArレーザーに近いためにFluo 3の2倍の蛍光強度が得られる。

【Fluo 3】

- ・1波長励起1波長蛍光
励起： $\lambda_{ex}=508\text{ nm}$ 、蛍光： $\lambda_{em}=527\text{ nm}$
- ・解離定数：400 nmol/l
- ・励起波長が長波長側にあるので細胞に与える傷害が少ない（NADH,NADPH等の自家蛍光の影響が少ない）
- ・Arレーザーで励起出来る。

【Fura 2】

- ・2波長励起1波長蛍光
励起($\lambda_{ex,ca}=340\text{ nm}$, $\lambda_{ex,free}=380\text{ nm}$)、蛍光： $\lambda_{em}=510\text{ nm}$
- ・解離定数：224 nmol/l
- ・Ca有無により励起波長がシフトするため ratiometry が可能。
- ・ratiometryにより、プローブ濃度などの影響を避けられる。

【Indo 1】

- ・1波長励起2波長蛍光
励起： $\lambda_{ex}=330\text{ nm}$ 、蛍光($\lambda_{em}=\text{Ca}:410\text{ nm}$, $\text{Ca free}:485\text{ nm}$)
- ・解離定数：250 nmol/l
- ・励起波長の切替えの必要がないので、非常に早い速度のCa濃度変化や心筋細胞のような動きの試料も測定できる（但し、検出器は2台必要）。

【Rhod 2】

- ・1波長励起1波長蛍光
励起： $\lambda_{ex}=553\text{ nm}$ 、蛍光： $\lambda_{em}=576\text{ nm}$
- ・解離定数：1.0 $\mu\text{mol/l}$
- ・励起波長が長波長側にあるので細胞に与える傷害が少ない（NADH,NADPH等の自家蛍光の影響が出ない）。
- ・He-Neレーザー（543nm）で励起出来る。

【Quin 2】

- ・1波長励起1波長蛍光
励起： $\lambda_{ex}=339\text{ nm}$ 、蛍光： $\lambda_{em}=492\text{ nm}$
- ・解離定数：110 nmol/l
- ・一番最初に開発されたプローブ。

Q2 Ca プローブが細胞に取り込まれているか確認をしたいのですが、どのような方法がありますか？

A2 細胞外液をCa過剰の状態にしておき、イオノマイシンを添加して下さい。Caの流入による蛍光の増加がみられます。その後、過剰のEGTAを添加することで蛍光の消光を確認することが出来ます。

Q3 カタログのプロトコル中に、Hank's-HEPES buffer を使うように書かれています。Hank's solution または HEPES buffer のどちらかではいけないのでしょうか？

A3 必ずしも「Hank's-HEPES buffer」である必要はありません。

実験の目的に応じた buffer をご使用ください。

Hank's solution は細胞の酵素活性を維持したいときに使用される塩類溶液です。HEPES buffer は緩衝域が6.8 ~ 8.2 と生化学的に適しており、細胞毒性もほとんどない緩衝剤です。

両者の長を兼ねたHank's-HEPES buffer は『生理的塩濃度をもつ緩衝剤』としてカルシウム研究に広く使用されております。

多くの論文で使用され実績があるためプロトコルに引用しています。

Q4 レコーディングメディウム中にCaがある場合、この溶液中のCaは細胞への導入や測定に影響しませんか？

A4 Fura 2-AM, Fluo 3-AM といったAM体はCaと反応しませんので、導入時に特に影響はありません。測定の際もプローブを細胞にロード後に、細胞外液を洗浄・交換すればバックグラウンドの上昇は抑えられます。

Q5 Fluo 3-AM などのCa プローブが細胞内に入りにくい場合、どうすればよいでしょうか？

A5 Pluronic F-127、Cremophor EL といった界面活性剤を使用することにより、改善されることがあります。

- Q6 Calcium Kit - Fluo 3に入っているProbenecidはどのような働きをするのでしょうか？
- A6 Probenecidは陰イオントランスポーター阻害剤といわれるもので、細胞内に取り込まれたFluo 3が細胞外に漏れ出すのを防ぐ役割をします。色素の漏れが早い細胞でご使用いただくと効果的です。必ずしも必要な薬剤ではありませんので、余分なものを添加したくない場合、また、陰イオントランスポーターを研究対象とする場合等には使用しないで下さい。
- Q7 Fluo 3でCa濃度を測定することは出来ますか？
- A7 理論的には濃度測定は可能です。
しかし、現実的には細胞からのプローブの漏れや試料の厚みなどによる強度差があり、絶対的な濃度の測定は難しい状況です。
濃度を算出したい場合には、Fura 2やIndo 1といったratiometryが可能なプローブをご使用いただく方が良いと考えます。
- Q8 フローサイトメトリーで測定したいと思いますが、どの試薬が使用できますか？
- A8 Fluo 3-AM, Fluo 4-AM(Ar-レーザー励起, 488 nm)やIndo 1(UV レーザー, 365 nm)といったものが使用できます。
- Q9 Fluo 4-AM、Fura 2-AMといった細胞膜透過型の試薬をbufferに溶かすことは出来ますか？出来ない場合、どのように溶解すればよいのでしょうか？
- A9 AM体の試薬は、bufferに直接溶解できません。
DMSOに一旦溶解後、そのDMSO溶液をbufferに添加してください。
また、AM体はbufferなどの水溶液中では加水分解をしますので、bufferに溶解後は直ちにご使用ください。
- Q10 Fluo 3-AMとFluo 4-AMは性質が似ているようですがどのような違いがあるのでしょうか？
- A10 基本的な性質(K_d値など)は非常に似ているのですが、Fluo 4は極大励起波長がFluo 3よりも短波長側にシフトしていることにより、Arレーザー(488nm)で励起した際に、Fluo 3の約2倍の蛍光強度を示します。
同じ濃度で使用した場合、Fluo 4の方が強い蛍光強度や明るい蛍光画像を得ることが出来ます。

*カタログ、ホームページにもプロトコルがございますので、こちらもご覧下さい。
(<http://www.dojindo.co.jp/catalog/protocol/p15.pdf>)

品名	容量	本体価格(¥)	コード	メーカーコード
Fluo 4-AM	1 mg	39,000	-	F311
Fluo 4-AM special packaging	50 µg × 8	29,000	-	F312
Fluo 3	1 mg	25,000	345-05721	F019
Fluo 3-AM	1 mg	33,400	-	F023
Fluo 3-AM special packaging	50 µg × 8	23,800	349-06961	F026
Fura 2	1 mg	24,200	347-05421	F014
Fura 2-AM	1 mg	28,800	-	F015
Fura 2-AM special packaging	50 µg × 8	18,200	348-05831	F025
Fura 2-AM solution	1 ml	38,800	343-05401	F016
Indo 1	1 mg	21,000	348-05571	I004
Indo 1-AM solution	1 ml	34,000	348-05571	I006
Quin 2	100 mg	15,000	344-04711	Q001
Rhod 2	1 mg	28,000	344-05811	R001
Rhod 2-AM	1 mg	45,000	341-05821	R002
Calcium Kit-Fluo 3	2000 assay	65,000	-	CS21

お知らせ

クロマトレーサー AI 関連試薬 販売移管

平成 17 年 9 月 1 日より、クロマトレーサー AI 測定試薬関連一式の販売を製造元である株式会社シノテスト様より行うことになりました。

これに伴い、同仁化学研究所からの販売を中止させていただきます。

今後、商品の購入や技術情報等に関するお問い合わせは下記、株式会社シノテストご担当者様へお願いいたします。
今後とも本商品の引き続きのご愛顧の程、何卒よろしくお願ひ申し上げます。

- お問合せ先 -

株式会社シノテスト 企画部 担当：橋本、堀内
〒 229-0011 神奈川県相模原市大野台 2-29-14
Tel :042-753-1593
Fax :042-753-1892
E-mail: info@chromatracer.com

開催のご案内

16th フォーラム・イン・ドージン

RNA 干渉 - その可能性 -

日 時 / 2005年12月2日(金) 9:30-17:40 (開場 9:00) 参加費 / 無料
 場 所 / 鶴屋ホール(テトリア熊本[鶴屋東館]7F・熊本市手取本町6-1) 定員 / 300名
 代表世話人 / 山本 哲郎(熊本大学大学院医学薬学研究所 分子病理学分野)
 主 催 / 株式会社 同仁化学研究所
 後 援 / 株式会社 ケミカル同仁

講演プログラム

9:30- 9:35	主催者挨拶 / 野田 栄二 (株式会社 同仁化学研究所)
9:35- 9:45	世話人挨拶 / 山本 哲郎
セッション1	<座長: 山本 哲郎>
9:45-10:45	多比良 和誠 東京大学大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 「バイオ・医学の世界を変える小さなRNAの発見と応用」
10:45-11:30	宮岸 真 東京大学大学院医学系研究科 21世紀COEプログラム 「siRNA発現ライブラリーを用いた機能遺伝子の探索」
11:30-12:15	桑原 知子 産業技術総合研究所 ジーンファンクション研究センター 「Non-coding RNAによる成体脳内の神経新生」
12:15-13:30	昼食
セッション2	<座長: 川畑 俊一郎 九州大学大学院理学研究院 生物科学部門>
13:30-14:15	野村 一也 九州大学大学院理学研究院 生物科学部門情報生物学講座 「線虫のRNAiで糖鎖の機能を探る」
14:15-15:00	西原 祥子 創価大学工学部 生命情報工学科 「RNAiによる網羅的糖鎖機能解析-ショウジョウバエからヒト糖鎖機能へ-」
15:00-15:15	コーヒープレーク
セッション3	<座長: 赤池 孝章 熊本大学大学院医学薬学研究所 微生物学分野>
15:15-16:00	小原 道法 東京都臨床医学総合研究所 感染症プロジェクト 「siRNAによるC型肝炎ウイルスの <i>in vivo</i> ターゲティング」
16:00-16:45	落谷 孝広 国立がんセンター研究所 がん転移研究室 「アテロコラーゲンによる生体へのsiRNAデリバリーとがん転移抑制への応用」
16:45-17:30	横田 隆徳 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究部 脳神経病態学分野 「siRNAの神経疾患への応用」
17:30-17:40	閉会の挨拶 / 山本 哲郎
17:45-19:00	ミキサー・自由討論

問い合わせ・申し込み先:

熊本県上益城郡益城町田原2025-5(株)同仁化学研究所内

フォーラム・イン・ドージン事務局(担当: 蒲野・堀口)

Tel:0120-489548, Fax:0120-021557 E-mail:komine@dojindo.co.jp

講演終了後、ミキサー(無料)を同会場にて予定しております。(17:45-19:00)

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またはFAXにてお申し込みください。

駐車場は有料となりますので、できるだけ公共の交通機関をご利用ください。

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