



2006 NO
121

CONTENTS

Review

ヘパリンと血小板ならびにフォンビル
ブラント因子との相互作用解析から
シュガーチップの開発へ

隅田 泰生

New 連載

エイズから見た感染症研究の最前線

原田 信志

Topics on Chemistry

高性能FIAsh誘導体

岩永 竜弥

ドージンニュース

DOJIN NEWS

目次

Review

- ヘパリンと血小板ならびにフォンビルブランド因子との相互作用解析からシュガーチップの開発へ
 鹿児島大学大学院理工学研究科 隅田 泰生 1
 エイズから見た感染症研究の最前線
 熊本大学大学院医学薬学研究部 原田 信志 11

Topics on Chemistry

- 高性能 FIAsh 誘導体
 同仁化学研究所 岩永 竜弥 13

Commercaill

- 新製品
 遺伝子導入試薬 : HilyMax 17
 試作品
 ペルオキシダーゼ標識用キット (for 1mg) 20

コラム

- EDTA 類似化合物をキレート試薬とする滴定法 14

お知らせ

- 九州大学 - 同仁化学組織対応型連携 12
 販売中止のお知らせ 15
 IgG 精製キット包装内容変更 15
 総グルタチオン測定キット内容の一部変更 15
 Biopyrrin EIA Kit 標準液変更 16
 フォーラム・イン・ドージン開催報告 22

新製品案内

製品詳細は掲載ページをご覧ください

遺伝子導入試薬

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
HilyMax	1.0 ml	20,000	H357

ペルオキシダーゼ標識用キット (for 1mg)

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Peroxidase Labeling Kit-NH ₂ (for 1mg)	1 sample	30,000	LK51



17th フォーラム・イン・ドージン 講演者と座長の先生方

ヘパリンと血小板ならびにフォンビルブランド因子との相互作用解析から シュガーチップの開発へ



隅田 泰生
鹿児島大学大学院理工学研究科
ナノ構造先端材料工学専攻

[Summary]

Heparin, used clinically as an anticoagulant, is a highly sulfated natural polysaccharide and is composed of various distinct partial structures. Recently, heparin has drawn more attention, since it possesses regulatory functions for cell proliferation, through the direct binding interaction with growth factors. We have studied heparin-platelet and heparin-von Willbrand factor interactions using a synthetic approach with structurally defined heparin partial structures. Through this work, we found that the assembly of the structurally defined oligosaccharides was needed to mimic nature, and we also lacked sufficient mass of oligosaccharides to study their function at the molecular level. To resolve both issues, we have developed a novel, molecular level technology – the oligosaccharide-immobilized chip (named Sugar Chip). This permits real-time and high-throughput analysis of oligosaccharide-protein interactions without any labeling of the targeted protein, using these Sugar Chips and the surface plasmon resonance (SPR) apparatus.

キーワード：ヘパリン、構造特異性、オリゴ糖鎖、部分構造、結合相互作用、無標識、チップ、表面プラズモン共鳴、血小板、フォンビルブランド因子、糖鎖結合性蛋白質

1. ヘパリンと血小板ならびにフォンビルブランド因子との相互作用解析

1.1 ヘパリンについて

抗血液凝固剤として知られるヘパリンは、高濃度に硫酸化されている天然多糖であり、抗血液凝固活性以外にも近年では細胞増殖の調製因子としての活性が注目されている¹⁻⁵。ヘパリンの構造的特徴は、一言でいえば不均一、即ち非常に多くの部分構造の混合物であるということである。たとえば、図1にはヘパリンの部分構造の1つを示している。この中の右から3つ目からの五糖構造は、抗血液凝固活性を担う最小単位であるAntithrombin IIIとの結合ドメインとして同定されたもの^{6,7}である。五糖には3単位のグルコサミンと2単位のウロン酸があるが、全て構造が異なっている糖分子から構成されている。

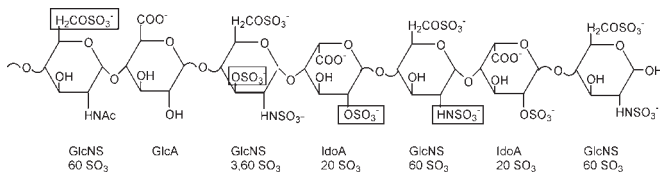


図1 ヘパリンの構造の不均一性

1.2 ヘパリンと血小板相互作用

1.2.1 構造推定

ヘパリンは抗血液凝固剤であり、第2次大戦頃から臨床の場において使用されているが、1970年頃からヘパリンによって血小板が凝集するという現象論が報告されていた⁸。筆者は、この現象を分子レベルで解析する研究を、1988年頃からDr. Sobel (現在、米国ワシントン大学医学部)とともに行った。前述したように、ヘパリンの構造は単純ではなく、また血小板のどの蛋白質がこの現

象に関係しているかという情報もなかった。そこで、まずヘパリンを既知の3つの方法で低分子化した後、分子量と電荷によって分画し、一連の低分子化ヘパリン(LMWH)を調製し、それらの活性を測定することによって、血小板に結合するヘパリンの部分構造を推定しようとした⁹。3つの方法は、図2に示すが、亜硝酸での分解、過ヨウ素酸でvic-diolの酸化と引き続くb脱離反応による分解、酵素(ヘパリナーゼI)による酵素消化である。

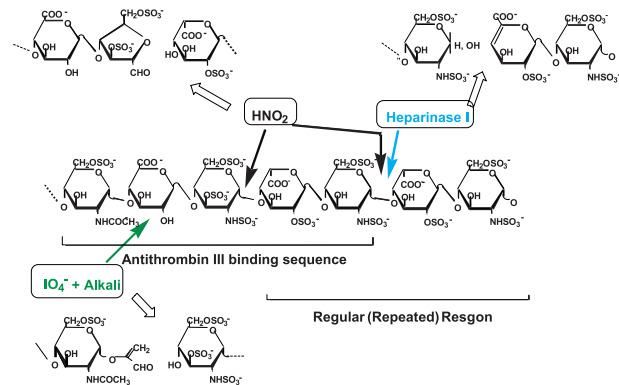


図2 ヘパリンの分解とドメイン構造の例

ラジオアイソトープ標識したヘパリンの血小板への結合を、調製したLMWHがどれくらい強く阻害するかを調べるBinding Competition Assayを行った。実験を迅速に行うためにラジオアイソトープとして¹²⁵ヨウ素を用いたが、そのために混合するだけでヘパリンの水酸基と共有結合できる新規修飾試薬も開発した¹⁰。それぞれの阻害活性を各々のLMWHの血小板への結合能として評価し、図3に示した。横軸はLMWHの平均分子量、縦軸は血小板への結合能である。いずれも分子量が大きいほど結合活性が高く

なっているが、色分けしている様に、ヘパリンの低分子化の方法によって傾向が異なることがわかった。即ち、ヘパリナーゼで低分子化したLMWH(HI-Hep)と亜硝酸分解のLMWH(NA-Hep)はほぼ同じ集合の中にあるが、過ヨウ素酸とアルカリで分解して調製したLMWH(PI-Hep)はそれらより上にプロットされた。即ちより強い活性を持つ集合を形成していることがわかった。一方、これらLMWHの抗血液凝固活性は抗第10因子活性(anti-Xa活性、antithrombin IIIとヘパリンの活性をもっとも直接的に見ることができる)を調べてみると、図中に数字(大きいほど活性が高い)を示したように、PI-Hepの活性はほとんどないことがわかった。

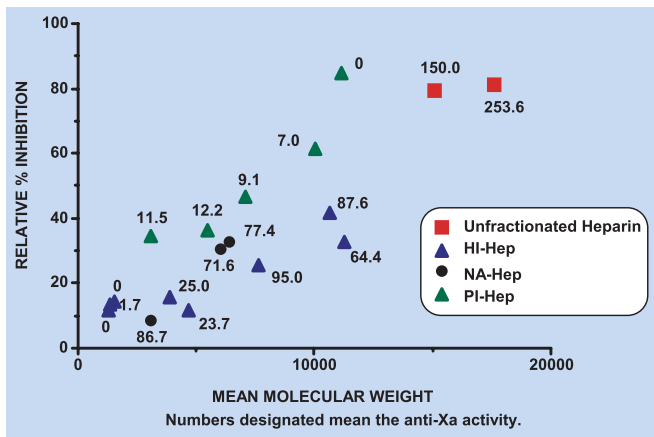


図3 低分子化ヘパリン(LMWH)の血小板結合活性

低分子化反応によって消失する構造を考える(図2参照)と、PI-HepではAntithrombin IIIに結合する五糖構造の中にvic-diol構造があり、これが過ヨウ素酸で酸化して環が開裂し、引き続きアルカリ処理でβ脱離がおこるので、五糖構造が消失する。それ故、PI-Hepはanti-Xa活性が激減すると考えられるが、結果はその通りになっていた。一方、血小板結合能はanti-Xa活性ほどはっきりしていないが、分子量11000程度のLMWHを比較してみると、PI-Hepは分画していないヘパリンと変わらない活性を持っているが、HI-Hepは半分以下の活性となっている。即ち、ヘパリナーゼ処理によって消失した構造が血小板結合に重要な役割を持っていると考え、図中のGlcNS6S-IdoA2Sと略した二糖構造を血小板結合最小構造と推定した。

1.2.2 合成化合物による推定構造の確定

推定した二糖構造がはたして本当に血小板結合性があるのか、これを確定させるためにこの二糖構造を合成することにした¹¹⁾。図4に合成ルートを示したが、硫酸化オリゴ糖の合成は初めてだったので、大学院生と試行錯誤しながら進め、1年以上がかったが、SynDSと命名した二糖を10数ミリグラム得た。

この合成硫酸化二糖(SynDS)の活性を、同様の結合阻害実験を行い調べた。陽性コントロールとしてはヘパリン、二糖の比較対照としてはヘパリンをヘパリナーゼで徹底的に消化して得られる二糖構造(図中DigDSと略)を用いた。DigDSはSynDSと同じ数の硫酸基、カルボキシル基を持つ二糖であるが、構造は全く

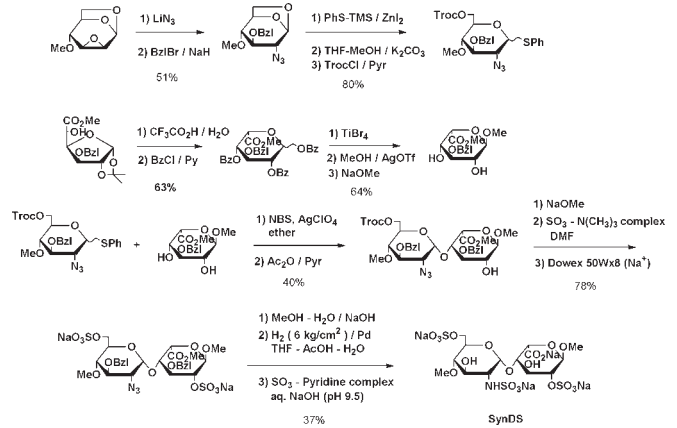


図4 GlcNS6S-IdoA2S構造を有するヘパリン部分二糖構造の合成

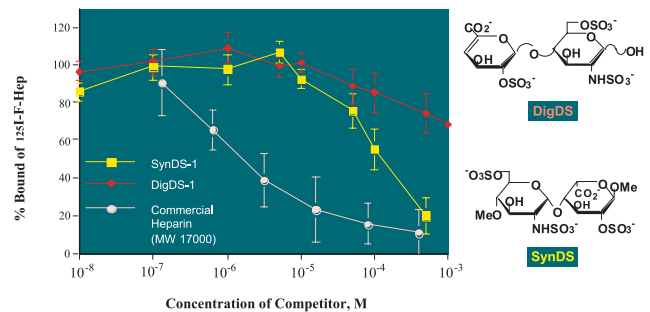


図5 合成ヘパリン部分二糖構造の血小板結合挙動

異なる。SynDSは、陽性コントロールのヘパリンと比べると活性は弱く、かなりの高濃度を必要とするが、DigDSと比べると明確に活性があることが示された。これから、ヘパリン中のヘパリナーゼ消化で消失する二糖構造GlcNS6S-IdoA2Sを血小板結合に関する最小構造と結論した。

1.2.3 集合化合物の合成と血小板結合活性

ところで図3のように、活性はLMWHの分子量に依存していた。このことは、最小二糖構造に基づくクラスター効果の影響であると考え、次に複数のGlcNS6S-IdoA2Sユニットを有する構造明確な合成化合物を得ることを目指した。

この際、硫酸化糖であることから、工夫が必要になった。即ち、一般的な方法では、まず保護基を有する糖鎖前駆体を調製し、それを集合化した後、脱保護、硫酸化を行う。しかし、実際やってみると二糖構造が3単位ある化合物までは、何とか合成することができた¹²⁾、4単位以上では硫酸基がすべて入らず、不均一な化合物ができてしまった。そこで、二糖では硫酸基をすべて導入できていることから発想を変えて、ユニットの硫酸化二糖構造を完成させたのち、マイルドな反応によって、ユニットごと集合させる方法を考えた(図6参照)。

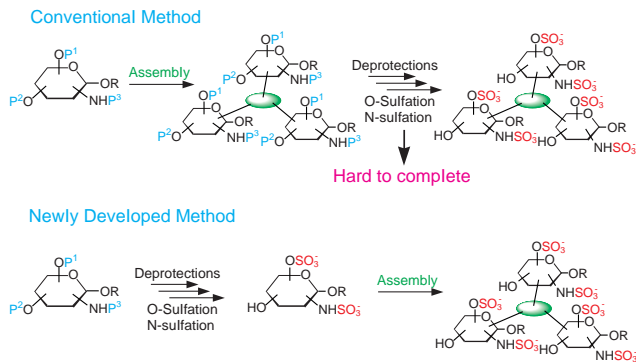


図6 集合化オリゴ糖鎖の調製法

いくつかの方法を検討した結果、還元アミノ化が硫酸基に影響を与えない最適の方法であることを見出した^{13,14)}。そのために、最小二糖構造の還元末端側にグルコースを導入した三糖体をまず合成した。また、還元アミノ化反応を詳細に検討したところ、反応液のpHを3~4に保つことが重要であることもわかり、このpH領域で反応が起こるアミノ基として芳香族アミンを有するリンカー化合物を設計した(図7参照)。芳香族アミノ基は疎水性があるため、疎水性相互作用に基づく非特異吸着があることが懸念されるが、グルコースを末端に持つ化合物の場合、反応後グルコース部位が親水性のリンカーとしても働くので、非特異吸着を最少にする効果も期待した。

この方法で、調製した化合物の一例を図8に示す。精製がやや困難であったことから、単離収率は60%程度にとどまっているが、硫酸基の脱離もなく、1ステップで硫酸化二糖を集合化した化合物を調製できた。この化合物の同定・確認には、ちょうど市場にでてきた陰イオンを高分解能、かつ高感度で測定できるESI-TOF/MSが役に立った。

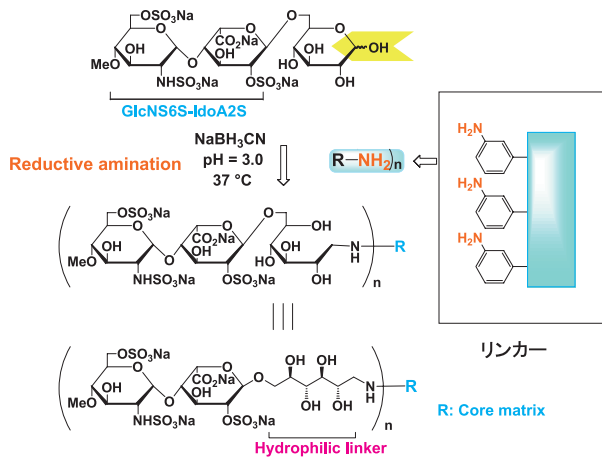


図7 還元アミノ化方法によるオリゴ糖鎖の集合化

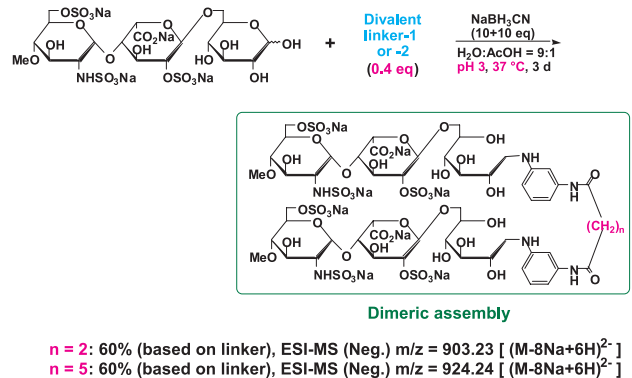


図8 図6のストラテジーに基づく集合化オリゴ硫酸化糖鎖の合成例

このようにして、図9に示すように、複数の硫酸化二糖構造を有する一連の構造明確な化合物群を得ることができた。

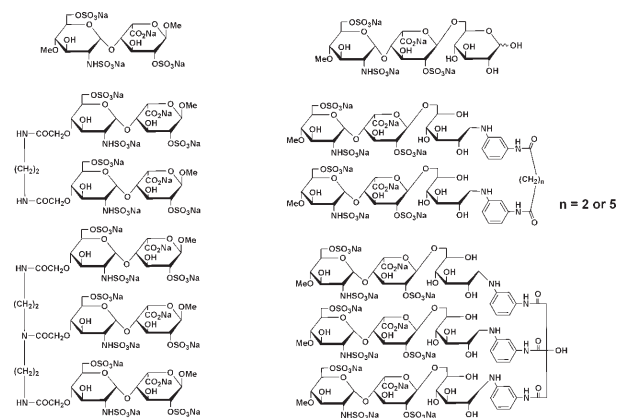


図9 構造明確な集合化オリゴ糖鎖群

そして、血小板への結合挙動を調べたところ、図10に示すように、二糖構造1つだけでは活性を示さない濃度範囲でも、2,3ユニットを増やしていくと活性は明確に存在することが示された。分子量17000程度のヘパリンに比べるとまだ活性は1/500程度にとどまっているが、二糖という非常に小さな単位でも、集合化すれば活性を測定することができることが明確になった。

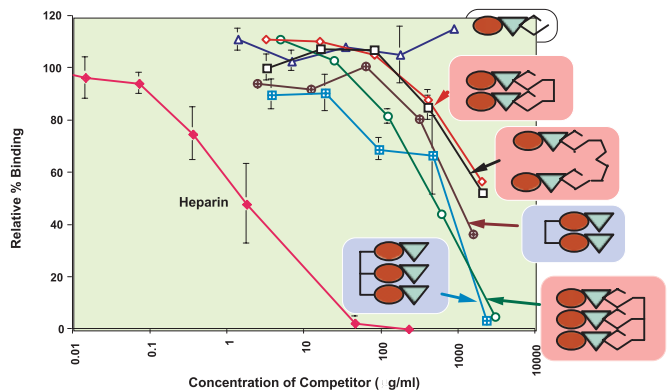


図10 集合化オリゴ糖鎖の血小板結合活性

1.3 ヘパリンとフォンビルブラント因子の結合相互作用の解析

フォンビルブラント因子(vWF)は血小板止血に関する重要な血液蛋白質であり、血管内皮の損傷部に吸着してそのコンフォメーションが変化すると血小板のGplbと結合するようになり、結果として血小板を損傷した血管部へ集積させる作用を持つ。しかし、作用のバランスが壊れると血栓症を引き起こすので、特に血管狭窄によって内皮損傷が起こる外科手術後の重篤なトラブルの原因となる。そのため、vWFと血小板Gplbとの結合を阻害する様々な薬剤が開発されているが、ヘパリンにその作用があることがSobelらによって見つけられていた¹⁵⁾。しかし、ヘパリンをそのまま使うと抗血液凝固作用が大きく、ブリーディング(出血傾向)が起こるので、ヘパリン中の作用部位を特定させ、新規薬剤のリーディング化合物を見つけることは重要であった。

ヘパリンの血小板結合を調べるのと同じ方法を採用した。即ち、ヘパリンをヘパリナーゼまたは過ヨウ素酸とアルカリで低分子化したLMWHを、ヘパリンビーズへのvWFの結合阻害実験と、vWF依存性の血小板凝集阻害実験に供した。図11に示すように、この場合もPI-HepはHI-Hepに比べて高い阻害活性を有していた。即ち、血小板結合と同様に、ヘパリナーゼ消化によって消失する二糖構造GlcNS6S-IdoA2Sが関与することが示唆された¹⁶⁾。

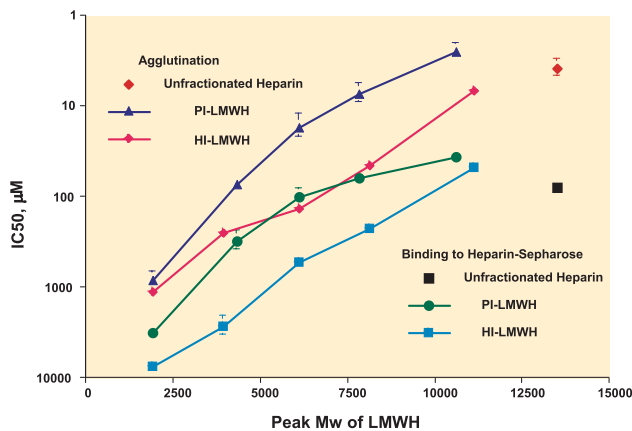


図11 LMWHのvWFに対する結合活性と血小板凝集反応に対する阻害活性

そこで、合成していた集合化合物を用いて、ヘパリンビーズへのvWFの結合阻害実験を行った。血小板とは異なり、この場合は2単位のGlcNS6S-IdoA2Sでは活性を持たず、3単位持つ化合物でようやく活性が認められた。さらに、血小板とは異なり、3単位でもお互いのユニット間の距離が近い化合物がより高い活性を有した。これらから、ヘパリンのvWF結合にはGlcNS6S-IdoA2Sユニットが3単位以上連結している部分が必要であることが示唆された(図12)。

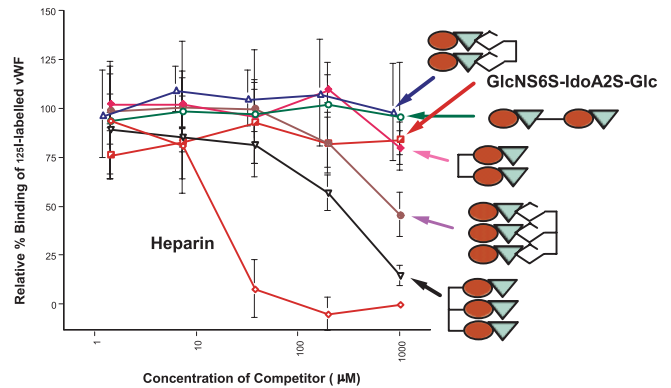


図12 GlcNS6S-IdoA2Sを含む集合化オリゴ糖鎖のvWFへの結合活性

2. シュガーチップの開発¹⁷⁾

一連のヘパリンの研究から、特定の硫酸化オリゴ糖鎖の活性を調べるためには、それを集合化することが重要であることがわかった。即ち、ヘパリンのような直線性の高分子でも、そのユニットを2次的に並べれば、活性を評価できる。また、生体内にはムチン糖鎖に代表されるように、オリゴ糖鎖は集合して存在する事が多いことも、集合化を考えなければならない大きな理由である。また、集合化合物の合成は可能となったが、依然として時間と労力がかかり、構造明確な化合物の量的な不足は常につきまとうこともわかった。これらを解決するために、糖鎖をチップに2次的に固定し、それを表面プラズモン共鳴(SPR)のセンサーチップに用いることができれば、構造明確なオリゴ糖鎖を複数回使用できるので、量的な問題の解決法の1つになる。また、対象の蛋白質をラジオアイソトープなどで標識することなく、かつリアルタイムで結合挙動を観測できる。さらに、結合相手が不明でも、SPRを用いれば、結合だけは観測できるので、結合を観測した後に質量分析を用いて、蛋白質を同定するというアイデアも生まれた(図13参照)。

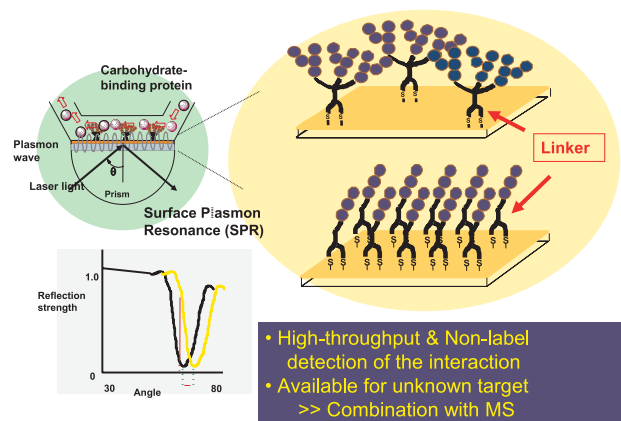


図13 シュガーチップの概念と表面プラズモン共鳴(SPR)

2.1 疎水性相互作用を利用した糖鎖の固定化

それでは、どのように糖鎖をチップに固定すれば簡単に糖鎖と蛋白質の結合を調べることができるか検討した。もっとも単純、かつ世の中にあつた技術としては、チップ上に疎水性の膜を調製しておき、それに疎水化した糖鎖を吸着させるという方法があつた。そこで、まずこの方法が適当なものであるか検討するために、図14のように疎水化した硫酸化二糖構造 (Hydro-mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc) を合成した。

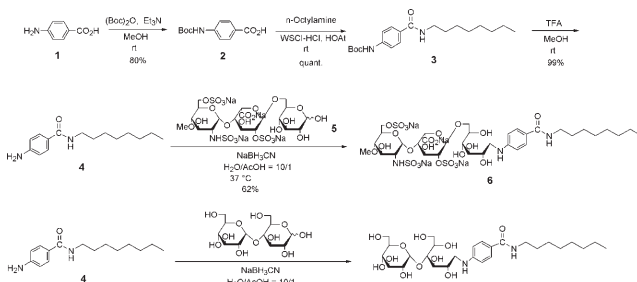


図14 疎水化硫酸化二糖 (Hydro-mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc) の合成

オクタンチオール基で表面に膜を作製した金チップ^{18,19)}に、図14のように合成したHydro-mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc (Compound 6) を濃度をあげながら添加していくと、SPRのシグナル強度の上昇が見られた。上昇が飽和に達するまで疎水化した二糖構造を添加した後、vWFのヘパリン結合ドメインの合成ペプチド (vWF - ペプチド) を流すとさらにSPRシグナルの上昇が見られた (図15a)。

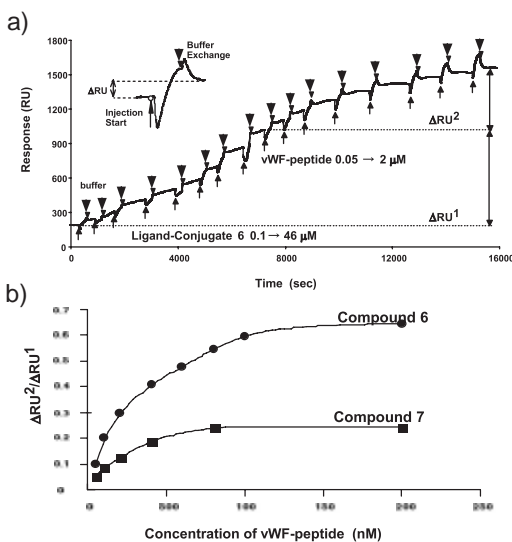


図15 (a) Hydro-mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glcの固定化とvWFペプチドの結合; (b) 固定した疎水化糖鎖とvWFペプチドの濃度の関係。Compound 6, 7は図14を参照。

濃度との関係をプロットすると、飽和曲線がかけたので、この方法で糖鎖チップは調製できたと一旦は考えた。しかし、ネガティブコントロールとして用いた疎水化マルトース (Compound 7) を固定化したチップに対しても、vWFペプチドを流したときにSPRシグナルの上昇が見られた (図15b)。vWFと α グルコースの結合があるとは思えず、SPRシグナルの上昇は、非特異的相互作用であることが予想された。

これを確かめるために、疎水化マルトースを固定化したチップにBSAを流したところ、非常に大きなSPRシグナルの上昇が見られた。この上昇は、疎水部分へのBSAの非特異的吸着と考えられ、この疎水性に基づく固定化は難しいと結論した。

次に、チップ上に固定したアビジンと糖鎖に導入したビオチンとの強い特異的結合を利用した固定化を検討した。これに関しては、別の成書²⁰⁾を参考していただきたいが、アビジンに起因する非特異的吸着を避けることはできず、常にネガティブコントロールを同時に測定し、SPRシグナルの差を常に測定する必要があることがわかった。

2.2 糖鎖固定化の最適

今までの検討から、疎水性の脂質や、アビジンといった物質を介して糖鎖を固定化すると、非特異吸着の問題を避けることができないことがわかった。そこで、糖鎖に金チップに直接結合できる官能基を導入して「糖鎖リガンド複合体」を調製し、それを用いて、糖鎖を固定化することとした。こうすれば、固定化する糖鎖の数 (相対濃度) は比較的簡単にコントロールできるという予想もあった。

糖鎖と金チップをつなぐリンカーとしては、糖鎖の集合物を合成する際に有効であった還元アミノ化反応を効率よく進めることができる芳香族アミンと、金とAu-S結合を作ることができ、かつ分子内環構造を有するチオクト酸を用いることにした。分子内環化SS結合があるため、一時的に還元環境に晒されてSS結合が解離しても、すぐに空気酸化を受けて元の構造に戻ることが予想され、糖鎖リガンド複合体を精製する際に手間取らないと考えたこともチオクト酸を採用した理由である。図16に示したように、末端にグルコースを導入したヘパリン部分二糖構造 (GlcNS6S-IdoA2S-Glc) をまず完成させた後、リンカーを反応さ

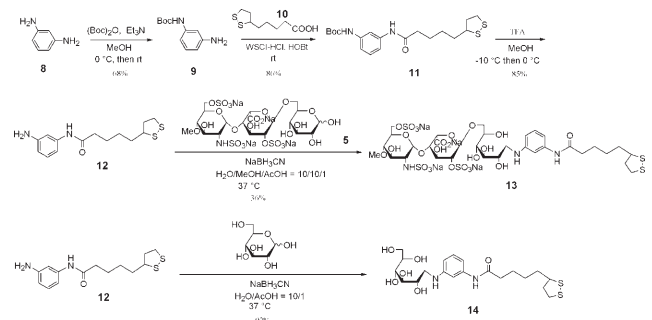


図16 Mono-valent型糖鎖リガンド複合体の合成

せ、60%以上の収率でリガンド複合体、Mono-GlcNS6S-I doA2S-Glcを得た。前述したように、末端のグルコースは親水性のリンカーとしても機能し、糖鎖を金チップから離して、蛋白質の結合を容易にすること、また疎水性に基づく非特異吸着を最小限にすることを期待した。

合成したリガンド複合体 Mono-GlcNS6S-I doA2S-Glc (Compound 13) を50%メタノール溶液で10 μMに調製し、その溶液にSPRの金チップを浸せし、室温で終夜反応させ、固定化チップを調製した。これに2 μMのvWFペプチドを流したところ、標準的なSPRセンサグラムが得られた(図17a)。一方、疎水性を利用した固定化法では非常に大きなSPRシグナルと、バッファで洗浄してもチップ上に吸着したままだったBSAを流した場合、かなりの高濃度の溶液を流した場合でも、非常に小さなSPRシグナルしか観測されず、またバッファの洗浄後速やかにベースラインに戻ったことから、このチップにはBSAはほとんど結合しないことが示された。即ち、糖鎖をこの方法で金チップに直接結合させることによって、非特異的吸着をほぼ無視できる系を構築することができた。vWFペプチドを結合させた後、800秒間バッファで洗浄しても残っているSPRシグナル量を平衡結合量(equilibrium binding)とし、vWFの濃度に対してプロットすると、図17bが得られた。この図からK_D値を210 nMと推定した。この値は、ラジオアイソトープラベルしたヘパリンを用いて得られた報告値(370 ± 200 nM)²¹⁾と大差なかった。比較対照として、グルコースにリンカーを導入したリガンド複合体(Mono-Glc, Compound 14)を用いて、同様の実験を行った。この際vWFペプチドの濃度を上げて、全くSPRシグナルの上昇は見られず、非特異的吸着を無視できる系であることが確認された(図17b)。

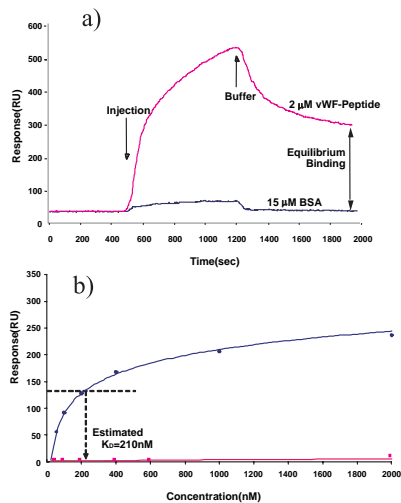


図17 (a) Mono-GlcNS6S-I doA2S-Glcを固定化したチップへのvWFペプチドおよびBSAの結合挙動。(b)vWFペプチドのMono-GlcNS6S-I doA2S0GlcおよびMono-Glcを固定化したチップへの結合。

このチップを用いて、vWFのヘパリン結合ドメインを含む部分リコンビナント蛋白質(vWF-A1)^{22,23)}の結合挙動を観測した。蛋白質濃度の上昇にともなってSPRシグナルの上昇が見られ、K_D値は1.2 μMと推定できた。

2.3 クラスター化の検討

このように、モノバレントのリガンド複合体を用いて、糖鎖と糖鎖結合性の蛋白質の結合挙動をリアルタイムで測定することができるようになった。この場合、リガンドの固定化は容易であり、チップ上にリガンドはほぼ均一に分散していると考えられるが、糖鎖クラスターの密度(オリゴ糖鎖のチップ表面の濃度)はリガンド複合体溶液の濃度や金チップの状態(凹凸)に依存する。それらに依存しない系を構築するために、複数ユニットのオリゴ糖鎖が常に2~5nmの距離内に集合した状態でチップ上に固定化されたMulti-valent型のリガンド複合体について次に検討した。

2.3.1 合成

Ashtonらの報告²⁴⁾を参考にして、Tri-およびTetra-valentリンカーとリガンド複合体の合成を図18,19のように行い、それぞれTri-GlcNS6S-I doA2S-Glc、Tetra-GlcNS6S-I doA2S-Glc-longを合成した。この過程で、集合化する糖鎖の大きさにもよるが、集合化する糖鎖の数が多くなるに従い、リンカー中のSS部位が金チップ表面に接触しにくくなるという立体反発的な要素が大きくなる事がわかった。そのため、分岐部分とチオクト酸部分の間のスペーサーを長くする必要があった。この際、疎水性を高めないためにオリゴエチレングリコールの利用が効果的であった。

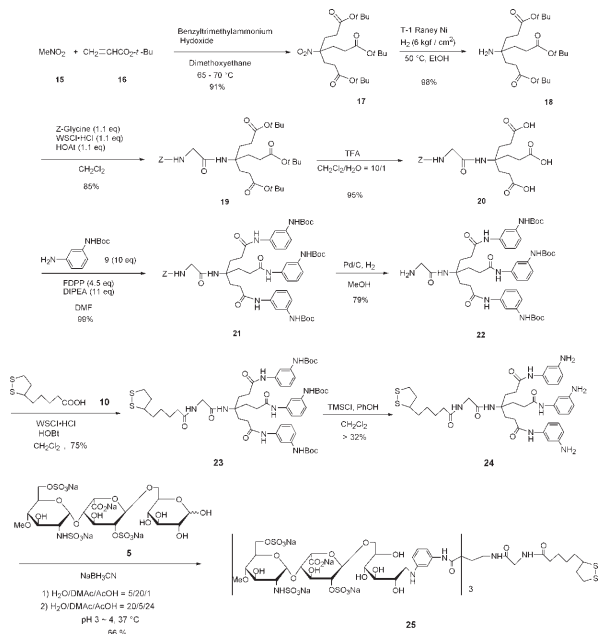


図18 Tri-GlcNS6S-I doA2S-Glcの合成

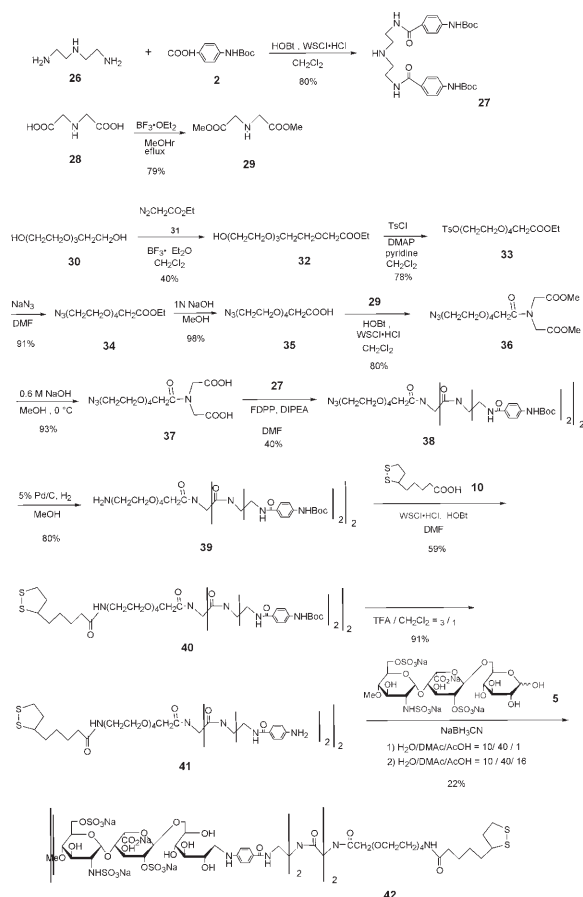


図 19 Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc-long の合成

2.3.2 クラスター化リガンド複合体を用いた結合活性の評価

Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc (Compound 25)および Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc-long (Compound 42) を固定化したチップへ1.5 μ MのBSAを流した時には、Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glcを固定化したチップと同様(図17)、SPRシグナルは僅かに上昇するが、バッファーで洗うと直ちにベースラインに戻り、BSAはこのチップにはほとんど結合しない、即ち非特異吸着は無視できることが分かった。

このように、直接結合型のリンカーを用いて糖鎖を金チップに固定化すると、非特異吸着は無視できることが明らかとなったので、次に固定化された糖鎖リガンドの密度の影響を検討した。即ち、硫酸化二糖構造をもつ Mono-, Tri-, および Tetra-valent リガンド複合体と、糖鎖構造をもたない Mono-Glc (Compound 8)を混合した溶液を先ず調製し、それに金チップを浸漬することによってチップ上の相対リガンド濃度が違うチップを調製した。

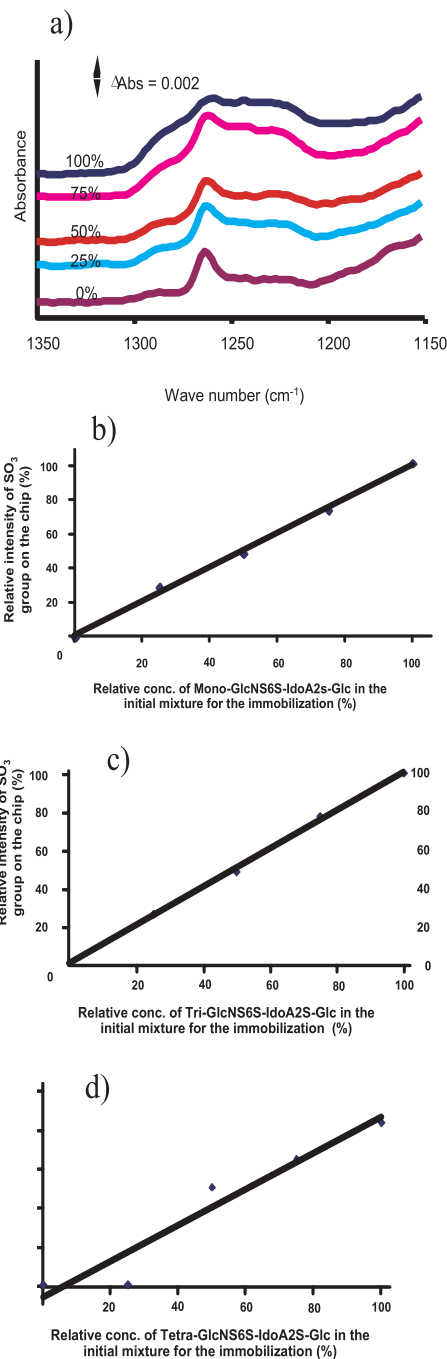


図 20 (a) Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc と Mono-Glc を混合して作成したチップの ATR-FT-IR スペクトル。(b) Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc と Mono-Glc の仕込み比とチップ上の硫酸基の相対強度との関係 ($R^2 = 0.9984$)。(c) Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc と Mono-Glc の仕込み比とチップ上の硫酸基の相対強度との関係 ($R^2 = 0.9993$)。(d) Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc-long と Mono-Glc の仕込み比とチップ上の硫酸基の相対強度との関係 ($R^2 = 0.9610$)。

相対濃度は、各々のチップをATR-FT-IRで測定し、1200 から 1303 cm^{-1} に現れる硫酸基の吸収を積分して定量した。図20aに Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glcと Mono-Glcをそれぞれ混合比を変えて作成したチップのATR-FT-IR スペクトルを、20b-20dには相対濃度と、仕込み比の関係を示した。いずれの場合も、仕込み比と相対濃度には直線関係が成り立っており、硫酸化二糖はチップ上で均一に分散して固定化されていることが示唆された。また、仕込み比を変えることでチップ上の硫酸化二糖構造の相対濃度を調整できることも明らかとなった。

2.3.3 ヘパリン結合性蛋白質の結合親和性

リコンビナントのヒトvWf-A1 domain (rhvWf-A1)^{22,23}をモデル蛋白質に用いて、3つのリガンド複合体について、チップ上の糖鎖の密度(100%と50%)と結合親和性の相関について検討し、表1に結果をまとめた。

表1 rhvWf-A1の結合挙動:チップに固定化された硫酸化二糖構造のクラスター効果

Ligand-conjugates	ratio	K_D (μM)	k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}\times 10^3$)	k_d ($\text{s}^{-1}\times 10^{-3}$)
Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc / Mono-Glc	100 / 0	2.60	8.38	21.9
	50 / 50	3.79	14.6	55.2
Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc / Mono-Glc	100 / 0	1.20	6.60	8.05
	50 / 50	1.50	4.52	6.83
Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc / Mono-Glc-long	100 / 0	0.99	6.50	6.44
	50 / 50	1.00	5.24	5.26

$K_D = k_d / k_a$ (Dissociation Constant)
 k_a : association rate
 k_d : dissociation rate

リガンド複合体中の硫酸化二糖構造の数が増えていくにつれて、小さな K_D (高い親和性)を有することが明確になっている。Mono-valentリガンド複合体と比べると、その親和性は3倍程度高い。この理由は、解離速度定数 k_d が小さいことから、クラスター化されたリガンドの場合は数nm以内に糖鎖が存在しているため、結合と解離の平衡にあるとき、解離した蛋白質がすぐ近くのリガンドに再び結合することが出来、その結果ネットの解離速度定数が小さくなっていると解釈できる。リガンド複合体の濃度を50%に低下させると、クラスター化リガンドの効果はさらに明確になった。即ち、Tri-valentやTetra-valentのリガンド複合体は K_D の値はほとんど変わらなかったが、Mono-valentリガンド複合体では K_D は1.5倍になっていた。

次に、部分構造ではなく全ヒトvWF蛋白質について検討した。この蛋白質は単量体でも分子質量が270 kDaもある巨大な蛋白質であるだけでなく、自己会合性が高く、一般に溶液中で存在しているときはその分子量は数百万におよび、また会合に伴いヘパリン結合ドメインも複数有している。3種類のリガンド複合体の濃度をそれぞれ100%と20%に変化させて調製したチップを用いてvWFの結合活性を調べ、表2に結果をまとめた。

表2 whole rhvWFの結合挙動:チップに固定化された硫酸化二糖構造のクラスター効果が見られない例

Ligand-conjugates	Ratio	Estimated K_D (nM)
Mono-GlcNS6S-IdoA2A-Glc / Mono-Glc	100 / 0	35
	20 / 80	41
Tri-GlcNS6S-IdoA2A-Glc / Mono-Glc	100 / 0	24
	20 / 80	27
Tetra-GlcNS6S-IdoA2A-Glc / Mono-Glc-long	100 / 0	35
	20 / 80	32

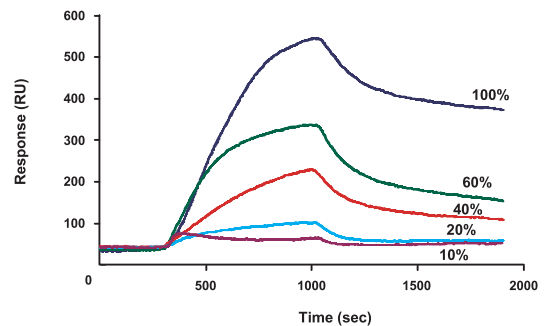


図21 Mono-GlcNS6S-IdoA2Sを固定化したチップ上のリガンドの相対密度のvWFペプチド(2 μM)の結合に与える影響。

先の表1の結果とは異なり、推定した K_D 値は全てほぼ同じであった。全vWF蛋白質の場合は会合してヘパリン結合ドメインが複数あるため、チップ上の硫酸化二糖の密度の影響がほとんどないのであろう。

なお、vWF-ペプチドとMono-valentリガンドの結合を調べると、相対密度が40%以上ないと結合が見られなかった(図21)。

これらから、チップ上の糖鎖の相対密度、またリガンドのMulti-valencyを変化させて結合相互作用を評価することによって、蛋白質の糖鎖結合ドメインがシングルかマルチかという判断をすることも出来ることが示された。

最後に、調製した硫酸化二糖構造を固定化したチップを用いて、結合阻害実験を行ってみた。すなわち、チップはTri-GlcNS6S-IdoA2S-Glcを固定化して調製し、200 nMのbFGF(塩基性繊維芽細胞増殖因子)と阻害剤としてヘパリンを濃度を変えて加え、そのときのSPRシグナルの変化を測定した。図22(a)にはSPRシグナルの変化を、図22(b)には阻害剤のヘパリン(平均分子量15000)の濃度と、結合したbFGFの濃度をプロットした。図22(b)から、ヘパリンの阻害濃度 IC_{50} は50-100 nMであると見積もることが出来た。なお、この値はbFGFのヘパリン硫酸プロテオグリカンへの K_D 値²⁵⁾と近いものであり、この方法の有用性が示唆された。

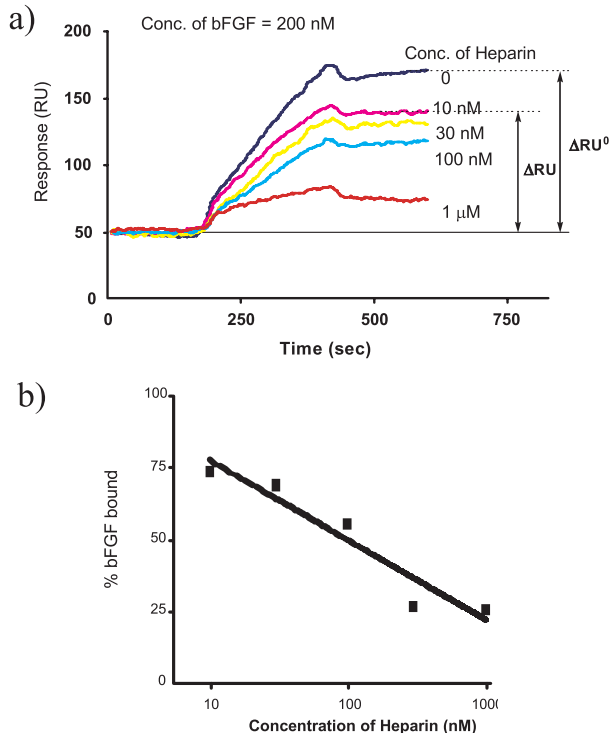


図22 硫酸化二糖構造を固定化したチップを用いたbFGFの結合に対するヘパリンの阻害実験 (a) SPR センサーグラム、(b) ヘパリン濃度とbFGFの結合に起因するSPRシグナルの増加度

3. 結語

ヘパリンと血小板、またvWFとの相互作用を、構造明確なオリゴ糖鎖を用いることによって、分子レベルでの解析を行うという目的で始めた研究が、糖鎖固定化チップ(他との差別化のために、シュガーチップと総称している)の開発に繋がった。現在では、リガンド複合体の数も70種類程度にのぼり、糖鎖と結合する蛋白質をSPR法で系統的に解析したデータベースも整備することが出来た。また、シュガーチップを調製する技術を金ナノ粒子に応用し、糖鎖固定化金ナノ粒子(SGNPと総称)の開発にも成功した²⁶⁾。SGNPは高価なSPR測定機器を用いることなく、糖鎖と蛋白質の相互作用を可視で判断できるものである。そして、研究成果の社会還元を目指し、本年9月に起業し、シュガーチップを用いた受託研究やSGNPの販売を行うことが出来るようになった²⁷⁾。なお、糖鎖チップや糖鎖アレイの技術は、世界中で開発されている²⁸⁻³³⁾。しかし、そのほとんどは、対象とする蛋白質をあらかじめ蛍光色素や酵素で標識するか、結合後に抗体を組み合わせて蛋白質が結合した糖鎖を同定するものであり、SPRと組み合わせることで網羅的な解析を可能とする技術はわれわれ以外にもほとんど報告がないことを追記する。

わが国の糖鎖研究は世界をリードする立場を保っている。我々の技術が、わが国の糖鎖研究の国際優位性を保つのに役立つこと、さらに現在開発研究を進めているシュガーチップ技術を用いた各

種疾患の検査・診断技術の開発を通じて、世界人類に貢献したいと考えている。

4. 謝辞

本研究は、筆者の前任地の大阪大学大学院理学研究科楠本研究室で開始し、鹿児島大学で確立させることが出来たものであり、日本学術振興会の重点領域研究(代表者:楠本正一大阪大学教授、現(財)サントリー生物有機科学研究所長)(独)科学技術振興機構の権利化試験事業およびプレベンチャー事業(代表者:筆者)のサポートを受けた。文中にも述べたが、現ワシントン大学医学部のSobel教授は、この研究を開始したときからの共同研究者である。また、化合物の合成やSPR実験では、大学院生であった市山君(現、大日本住友製薬)、越田君(現、北海道大学助手)、荒野君(現、東亜合成化学)をはじめとして、多くの方々のサポートを頂いた。ここに深く感謝します。また、本稿の執筆の機会を与えて下さった(株)同仁化学研究所の関係各位に深謝します。

参考文献

- 1) *Heparin*, (1989) (Eds.: Lane, D. A. and Lindahl, U.), CRC Press Inc., Boca Raton, FL, and references therein.
- 2) Esko, J. D. (1999) in *Essentials of Glycobiology*, (Eds.: Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, pp. 441-453, and references therein.
- 3) Gallagher, J. (2001) Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu. *J. Clin. Invest.* 108, 357.
- 4) Ostrovsky, O., Berman, B., Gallagher, J., Mulloy, B., Fernig, D. G., Delehedde, M., and Ron, D. (2001) Differential effects of heparin saccharides on the formation of specific fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor complexes. *J. Biol. Chem.* 277, 2444.
- 5) Faham, S., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Linhardt, R. J., Rees, D. C. (1996) Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. *Science* 271, 1116.
- 6) Choay, J., Lormeau, J.-C., Petitou, M., Sinay, P. and Fareed, J. (1981) Structural studies on a biologically active hexasaccharide obtained from heparin. *Ann. New York Acad. Sci.*, 370, 644.
- 7) Thunberg, L., Backstrom, G. and Lindahl, U. (1982) Further characterization of the antithrombin-binding sequence in heparin. *Carbohydr. Res.*, 100, 393.
- 8) Salzman, E. W., Rosenberg, R. D., Smith, M. H., Lindon, J. N. and Favreau, L. (1980) Effect of heparin and heparin fractions on platelet aggregation. *J. Clin. Invest.*, 65, 64.
- 9) Suda, Y., Marques, D., Kermode, J. C., Kusumoto, S. and Sobel, M. (1993) Structural characterization of heparin's binding domain for human platelets. *Thromb. Res.*, 69, 501.

- 10) Sobel, M., Ottenbrite, R. M. and Suda, Y. (1991) Fluorescent labeling of heparins and related polysaccharides: Old problems and new solutions, in: Polymeric Drugs and Drug Delivery systems (Eds.: Dunn, R. L. and Ottenbrite, R. M.), ACS Symposium Series 469, American Chemical Society, Washington D. C., pp. 60.
- 11) Suda, Y., Bird, K., Shiyama, T., Koshida, S., Marques, D., Fukase, K., Sobel, M. and Kusumoto, S. (1996) Synthesis and biological activity of a model disaccharide containing a key unit in heparin for binding to platelets, *Tetrahedron Lett.*, 37, 1053.
- 12) Koshida, S., Suda, Y., Fukui, Y., Ormsby, J., Sobel, M., and Kusumoto, S. (1999) Synthesis and biological activity of oligomer-model compounds containing units of a key platelet-binding disaccharide of heparin. *Tetrahedron Lett.* 40 (21), 5725.
- 13) Koshida, S., Suda, Y., Arano A., Sobel, M., and Kusumoto, S. (2001) An efficient method for the assembly of sulfated oligosaccharides using reductive amination. *Tetrahedron Lett.* 42 (7), 1293.
- 14) Koshida, S., Suda, Y., Sobel, M., and Kusumoto, S. (2001) Synthesis of oligomeric assemblies of a platelet-binding key disaccharide in heparin and their biological activities. *Tetrahedron Lett.* 42 (7), 1289.
- 15) Sobel, M., McNeill, P. M., Carlson, P.L., Kermode, J. C., Adelman, B., Conroy, R. and Marques, D. (1991) Heparin inhibition of von Willebrand factor-dependent platelet function in vitro and in vivo. *J Clin Invest.*, 87, 1787.
- 16) Poletti, L. F., Bird, K. E., Marques, D., Harris, R. B., Suda, Y., and Sobel, M. (1997) Structural aspects of heparin responsible for interactions with von Willebrand factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (5), 925.
- 17) Suda, Y., Arano, A., Fukui, Y., Koshida, S., Wakao, M., Nishimura, T., Kusumoto, S. and Sobel, M. (2006) Immobilization and clustering of structurally defined oligosaccharides for sugar chips: an improved method for surface plasmon resonance analysis of protein-carbohydrate interactions. *Bioconjug Chem.*, 17, 1125.
- 18) Peterlinz, K. A., and Georgiadis, R. (1996) In situ kinetics of self-assembly by surface plasmon resonance spectroscopy. *Langmuir* 12 (20), 4731.
- 19) Liedberg, B., Nylander, C., and Lundström, I. (1983) Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* 4, 299.
- 20) 隅田泰生 "糖鎖チップ" (2005) 糖鎖科学の新展開-機能解明・次世代型材料・医薬品開発に向けて(谷口直之、伊藤幸成 編) エヌティーエヌ、pp. 471.
- 21) Sobel, M., Soler, D. F., Kermode, J. C., and Harris, R. B. (1992) Localization and characterization of a heparin binding domain peptide of human von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 267, 8857.
- 22) Cruz, M. A., Handin, R. I., Wise, R. J. (1993) The Interaction of the von Willebrand Factor A1 Domain with Platelet Glycoprotein Ib – The role of glycosylation and disulfide bonding in a monomeric recombinant A1 domain protein. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 21238.
- 23) Rastegar-Lari, G., Villoutreix, B. O., Ribba, A.S., Legendre, P., Meyer, D., and Baruch, D. (2002) Two clusters of charged residues located in the electropositive face of the von Willebrand factor A1 domain are essential for heparin binding. *Biochemistry* 41, 6668.
- 24) Ashton, P. R., Boyd, S. E., Brown, C. L., Nepogodiev, S. A., Meijer, E. W., Peerlings, H. W. I., and Stoddart, J. E. (1997) Synthesis of glycodendrimers by modification of poly(propylene imine) dendrimers. *Chemistry-A Eur. J.* 3, 974.
- 25) Presta, M., Maier, J. A., Rusnati, M., and Ragnotti, G. (1989) Basic fibroblast growth factor is released from endothelial extracellular matrix in a biologically active form. *J. Cell. Physiol.* 140, 68.
- 26) Suda, Y., Kishimoto, Y., Nishimura, T., Yamashita, S., Hamamatsu, M., Saito, A., Sato, M., and Wakao, M. (2006) Sugar-immobilized gold nano-particles (SGNP): Novel bioprobe for the on-site analysis of the oligosaccharide protein interactions, *Polymer Preprints* 47(2), 156.
- 27) URL <http://www.sudxbiotech.jp/>
- 28) Houseman, B. T., and Mrksich, M. (2002) Carbohydrate arrays for the evaluation of protein binding and enzymatic modification. *Chem. Biol.* 9, 443.
- 29) Fazio, F., Bryan, M. C., Blixt, O., Paulson, J. C., and Wong, C. -H. (2002) Synthesis of sugar arrays in microtiter plate. *J. Am. Chem. Soc.* 124 (48), 14397.
- 30) Park, S., Lee, M. -R., Pyo, S. -J., and Shin, I. (2002) Carbohydrate chips for studying high-throughput carbohydrate-protein interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 126 (15), 4812.
- 31) Ratner, D. M., Adams, E. W., Su, J., O'Keefe, B. R., Mrksich, M., and Seeberger, P. H. (2004) Probing protein-carbohydrate interactions with microarrays of synthetic oligosaccharides. *ChemBioChem.* 5, 379.
- 32) de Paz, J. L., Noti, C., and Seeberger P. H. (2006) Microarrays of synthetic heparin oligosaccharides. *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 2766.
- 33) Feizi, T., and Chai, W. (2004) Oligosaccharide microarrays to decipher the glyco code. *Nature Reviews*, 5, 582.

筆者紹介

氏名：隅田 泰生

所属：鹿児島大学大学院工学研究科
ナノ構造先端材料工学専攻

連絡先：〒 890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元 1-21-40

出身大学：大阪大学大学院工学研究科

研究テーマ：糖鎖生物化学に関する研究

専門分野：糖鎖生化学、ナノテクノロジー

今回より新しい連載が始まります。
1つのテーマに対し様々な観点からの記事を掲載していく予定です。
ご期待下さい。

エイズから見た 感染症研究の最前線

その1 序：エイズ治療のストラテジー

熊本大学医学薬学研究部感染防御 原田信志

1. はじめに

エイズはHIV (human immunodeficiency virus)というレトロウイルスの感染症である。HIVに感染すると15から20年といわれる長い無症候期を経てエイズを発症し、悪性腫瘍、日和見感染、精神神経症状で代表される病気が認められる。現在、日本で公的に報告されているHIV感染者およびエイズ患者数は1万人程度である。しかし、献血におけるHIV陽性件数は10万人あたり約1.5件であり、もっと多くの人が感染している可能性が示唆されている。全世界的には4000万人から5000万人がすでに感染しているといわれ、一年に約500万人が新たにHIVに感染している。その意味ではHIV感染はすでにpandemicな状態であり、この感染の拡大を阻止すること、あるいはHIV感染者をいかに治療するかは公衆衛生上の火急の問題である。そのひとつはエイズ教育の普及であり、また新たな感染を防ぐことが可能なワクチンの開発である。HIV感染者やエイズ患者に対しては、体内でのHIV増殖を防ぎかつ体内からウイルスを排除する方策を考えることが要求される。研究上で可能なHIV感染防止およびエイズ治療の方策を考えてみたい。

2. ウイルスの一般的ライフサイクル

HIVの感染を止めるということでは、このウイルスが細胞に感染し如何に増殖するかを理解していなければならない。一般的にウイルスは多くの細菌とは異なりそれ単独での自己増殖能はない。つまり、ウイルスはどんなに栄養豊富な培地を用いても、それ自体で分裂を開始することが出来ない。ウイルスが増殖するためには、細胞という宿主の助けが必要である。細胞のさまざまな増殖

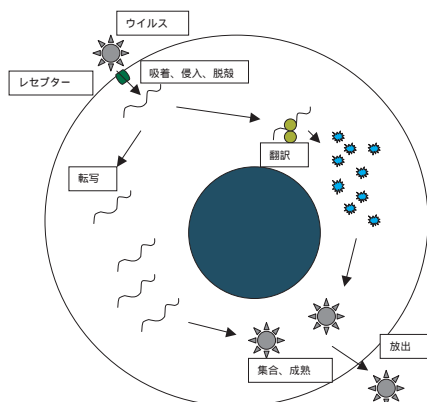


図1 ウイルスのライフサイクル

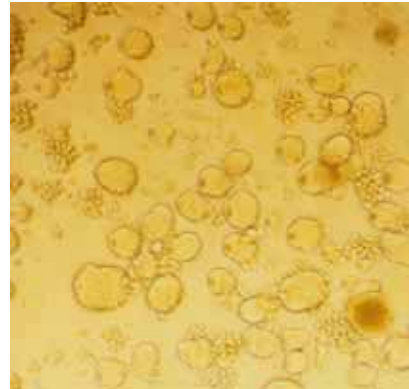


図2 HIVによる細胞融合

機構を利用することではじめて自己複製が可能となる。その意味で、ウイルスは細胞内寄生体である。従って、ここにウイルス感染を阻止する新旧のアイデアが潜んでいる。一般的なウイルスのライフサイクルとして、ウイルスは固有のレセプターに付着（吸着 adsorption）し、細胞内へ侵入 penetration する。脱殻 uncoating 後、ウイルス遺伝子（DNAかRNA）は転写 transcription と翻訳 translation が行われ、ウイルス遺伝子の増幅とウイルス蛋白が産生される。その後、増幅されたウイルス RNA あるいは DNA は、産生されたウイルス蛋白と集合 assembly し、成熟 maturation 過程を伴って細胞外へ放出 release される（図1）。

レトロウイルスであるHIVでは、ウイルス粒子内に逆転写酵素、インテグラーゼ、プロテアーゼという酵素があり、それぞれ固有のライフサイクルに使用される。HIV RNAは侵入後、逆転写酵素でDNAへ転写され、そのDNAは細胞の染色体DNAへインテグラーゼを使って組み込まれる（組込まれたウイルスDNAをプロウイルスDNAと呼ぶ）。プロウイルスDNAからmRNAとウイルスのvRNAが転写され、集合を経て細胞外へ出芽 budding により放出される。放出されたウイルスはプロテアーゼの作用で成熟し、感染性を有したHIVとなる。一方で感染細胞は正常な細胞とHIVエンベロープ糖タンパクとレセプターを介してお互いに融合する（図2）。HIV感染細胞および融合細胞は最終的に死滅する。HIV固有の酵素とその作用点は、HIVの抗ウイルス剤を開発する上での最適な標的である。

3. HIV感染の制御

レトロウイルスであるHIVの感染を阻止するには、そのライフサイクルのどこかで止めることである。それには以下の三つが理論的に考えられる。

(A) HIV固有な感染阻止

HIVのライフサイクルで、HIV特有なものは1)レセプター（CD4とケモカインレセプター）、2)逆転写酵素、3)インテグラーゼ、4)プロテアーゼである。それぞれの阻止剤は、非常に選択性の高い、強力な抗HIV効果を持つと考えられる。事実、HIV-1の逆転写酵素やプロテアーゼの阻害剤は現在広く臨床応用され、HIV-1の血中ウイルス量を下げ治療効果が認められるという意味で非常

に有効なエイズ治療薬である。近い将来、ケモカインレセプターやインテグラーゼ阻害剤も臨床的に使用される日が来るであろう。

(B) HIVの増殖を修飾する宿主因子

HIV固有なものの阻害剤の最大の難点は、HIVの変異による耐性ウイルスが出現しやすいことである。ウイルスの吸着、侵入、転写、翻訳、集合、放出の過程では、これら全てのステップで何らかの宿主細胞の因子が作用している可能性が高い。この宿主因子を探し出し、感染制御に用いようという試みがなされている。デフェンシン、インターフェロンは昔から良く知られたものであるが、最近HIVの感染系ではAPOBECやTRIM5 α などが報告されている。

(C) 免疫によるHIV制御

ウイルスおよびウイルス感染細胞は、生体内では免疫機構により排除される。この意味で、この免疫機構を活性化させることは感染阻止や感染防止に有効に働くと考えられる。これがいわゆるワクチンの基本的作用機序である。現在、ワクチン作用の主目的となっているのは、液性免疫としての抗体（ウイルスでは中和抗体）と細胞性免疫の細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導である。両者とも非常に特異性の高い排除機構であるが、高変異性のHIVに対し如何に有効な免疫を成立させるか大きな課題を抱えている。

4. おわりに

本シリーズでは、以上三つの観点からHIV感染制御の最前線であるトピックスを拾いながら論じてみたい。それによりエイズとは何か、HIVというウイルスの特徴、現在行われている治療戦略の方向性を感じとっていただきたい。

* 本連載は一つのテーマを元に毎号異なる著者が執筆をします。

著者紹介



氏名：原田信志

所属：熊本大学大学院医学薬学研究部 感染防御

住所：熊本市本荘 1-1-1

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)連携契約を締結しております。下記の技術に関して実用化を検討しております。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.010 PKC α 特異的阻害剤ペプチド

従来、ペプチドをはじめ、種々のPKC阻害剤が有るが、PKC α に特異的なものは存在しなかった。PKC α はガンなどにおいて他のPKCと全く異なる挙動を取り、発ガンに極めて重要なシグナルであることが分かってきている。したがって、PKC α 特異的な阻害剤は非常に有用な物質であると考えられる。

九州大学では、種々のPKCサブタイプに特異的な基質ペプチドを開発する中で、これまでに存在しなかったPKC α に特異的な阻害ペプチドを見いだした。この阻害剤ペプチドは、PKC α 、あるいはそれが深く関与するガンの研究に有用であると考えられる。

No.011 脂質膜局在型ヒドロキシルラジカル計測用蛍光試薬

ヒドロキシルラジカルは活性酸素種の中でも特に反応性が高く、様々な生体分子と速やかに反応して酸化的損傷を与える。ヒドロキシルラジカルが関与する反応は多様であるが、この中でも特に重要なものに連鎖的脂質過酸化反応の開始反応がある。しかしながら、現存するヒドロキシルラジカル計測用蛍光試薬はいずれも水溶液中（細胞質中を含む）でのヒドロキシルラジカル計測を意図して開発されており、上記脂質過酸化反応のような細胞膜におけるヒドロキシルラジカルの挙動を捉える目的に適してはいない。

九州大学では、優れた細胞膜局在性を示すヒドロキシルラジカル計測用蛍光試薬を開発した。脂質過酸化反応のような細胞膜におけるヒドロキシルラジカルの活性を適切にモニタリングするための有用な新規試薬としての使用が期待できる。

No.012 シグマ受容体を認識するMRI造影剤

シグマ受容体は、ドーパミン受容体のひとつで、主として中枢神経系に発現している。一方、最近になり乳ガンなどのある種のガン細胞では、シグマ受容体が高発現していることが明らかになってきている。

九州大学では、シグマ受容体特異的なMRI造影剤を開発した。本造影剤はシグマ受容体を発現するガン細胞だけを特異的に造影できる可能性があり、ガンの診断や研究、精神病や脳疾患の研究に応用できるものと期待される。

Topics on Chemistry

高性能 FIAsH 誘導体

現在、細胞を生きたままその機能を調べるという目的で、細胞内の特定の分子と特異的に結合する、さまざまな分子や技術が開発されている。

特に、タンパク質標識技術として近年広く用いられてきている GFP (Green Fluorescent Protein) のような、さまざまな可視蛍光タンパク質 (VFPs; Visible Fluorescent Proteins) は、遺伝子組み換え技術により蛍光化したタンパク質を発現させ、解析する手法の 1 つである。しかし、このような標識プローブとしての VFPs は分子量が大きく、細胞内での立体障害で挙動が変化してしまう可能性がある。

新しい蛍光標識技術の開発に関する研究の中で FIAsH を用いた手法は、VFPs に比べて分子量が小さいため、タンパク質の構造への影響が少なくなるという利点がある。

Tsien らの開発したタンパク質標識試薬である FIAsH-EDT₂ は、無蛍光性で膜浸透性を持ち、ターゲットとなる tetracysteine motif (Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys, Xaa は cystein 以外のアミノ酸) を正確に認識して、強い蛍光を発する安定な錯体を形成することが知られている¹⁾。また、VFPs に比べて小さく、立体化学的な妨害が減少するため、パルスチェースを使った実験手法や CALI を使った実験手法が報告されている²⁾。

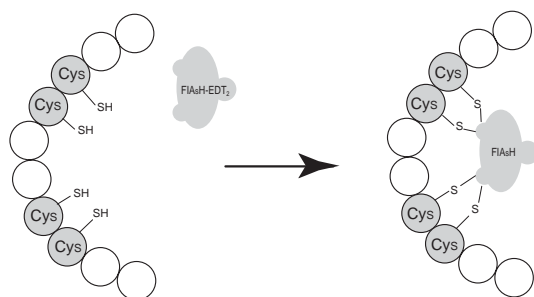


図1 FIAsH-EDT₂ による tetracysteine motif 認識機構

今回紹介するのは、Spagnuolo らによって開発されたフッ素基を導入した F2FIAsH と F4FIAsH である³⁾。

彼らは、モデルターゲットとしてペプチドシーケンス (FLNCCPGCCMEP, P12) との複合体、F2FIAsH-P12 および F4FIAsH-P12 を合成し、その性能を評価した。

F2FIAsH-P12 は FIAsH-P12 に比べ、4 倍の蛍光強度を示し、7nm 大きなストークスシフトを持つ。

また、水銀ランプによる照射 (490 ~ 560nm, 70mW/cm², 120min.) による光退色の評価では、F2FIAsH-P12 は FIAsH-P12 に比べて 50 倍の光安定性を有していた。

FIAsH-P12、F2FIAsH-P12、F4FIAsH-P12 をリン酸バッファーに溶解して、pH を 7.8 から 5.6 に変化させると、FIAsH-P12 の吸収は 50% 減少したのに対して、F2FIAsH-P12、F4FIAsH-P12 は 16% の減少しかなく、pH 依存性が低いことを示した。

F2FIAsH-P12 ($\lambda_{ex}=500\text{nm}$, $\lambda_{em}=522\text{nm}$) の蛍光スペクトルと F4FIAsH-P12 ($\lambda_{ex}=528\text{nm}$, $\lambda_{em}=544\text{nm}$) の吸収スペクトルは大

株式会社 同仁化学研究所 岩永 竜弥

きく重なる部分があるため、蛍光エネルギー共鳴転移 (FRET; Fluorescence Resonance Energy Transfer) を起こすのに有利な J 値を持つ。さらに F2FIAsH-P12 (ドナー) と F4FIAsH-P12 (アクセプター) の結合による Ro 値は、54Å であり、FRET が作用する範囲が大きいことを示した。これは様々に開発されている他の二砒素化合物群の FRET ドナーとアクセプターにも新しい可能性を示した。

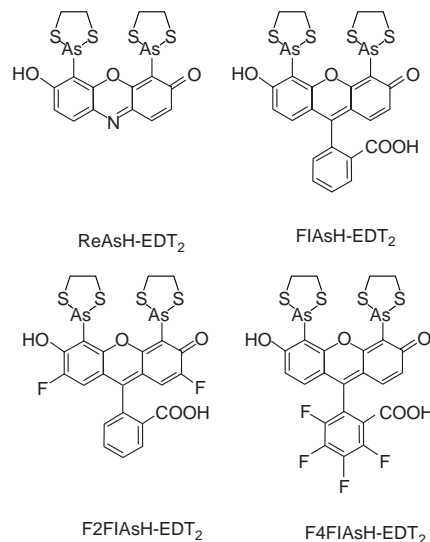


図2 FIAsH 誘導体

このように、Spagnuolo らは FIAsH にフッ素を導入することにより、より高感度で光安定性の高いタンパク質標識試薬を得ることに成功した。今後、この成果はタンパク質の構造変化や分子相互作用の動態研究に応用される、非常に魅力的な技術であると期待される。

参考文献

- 1) B. Albert Griffin, Stephen R. Adams, Roger Y. Tsien, *Science*, **1998**, 281, 269-272.
- 2) Oded Tour, Rene M Meijer, David A Zacharias, Stephen R Adams, Roger Y. Tsien, *Nat. Biotechnol.*, **2003**, 21, 1505-1508.
- 3) Carla C. Spagnuolo, Rudolf J. Vermeij, Elizabeth A. Jares-Erijman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 12040-12041.

EDTA 類似化合物をキレート試薬とする滴定法

金属イオンの分析方法として「キレート滴定」があります。小社の過去の資料の中から、有用と思われるものをご紹介いたします。

キレート滴定法で用いられるキレート試薬のほとんどがEDTA といって差し支えない。しかし、EDTA 以外のキレート試薬の中には、金属イオンに対する安定度定数の値に相当の差異があったり、あるいはTTHAのように安定な1:2キレートを作るものもある。それらのキレート試薬を用いればEDTAでは困難な選択的滴定も可能になる。

EDTA以外のキレート試薬で、主なものは表1の通りである。表に記した安定度定数は溶液のpHおよび補助錯化剤の影響を受けて大きく変動するので、実際にはその他の影響までを含めた、いわゆる「みかけの安定度定数」が重要な意味を持つ。詳しい理論は別途、専門書をご覧いただきたいが、適当なpHを選び、その安定度の差を利用すれば、EDTAを用いる場合とは異なった組み合わせの混合イオンの選択的分別滴定ができる。

表1. 各種キレート試薬の安定度定数

	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cd ²⁺	Zn ²⁺	Cu ²⁺	Ni ²⁺	Al ³⁺	Fe ³⁺	Ba ²⁺
EDTA	10.59	8.69	16.46	16.50	18.80	18.62	16.13	25.1	7.76
CyDTA	12.50	10.32	19.23	18.67	21.30	19.4	18.63	28.05	8.64
DTPA	10.74	9.3	19.31	18.75	21.53	20.32	18.4	28.6	8.63
EDTA-OH	8.14	7.0	13.0	14.5	17.35	17.0	12.43	19.8	5.54
GEDTA	11.0	5.21	16.7	14.5	17.8	13.6	13.9	20.5	8.41
TTHA	10.06	14.38	26.85	28.7	32.6	32.4	19.7	40.5	11.63
	(1:1)	(1:2)	(1:2)	(1:2)	(1:2)	(1:2)	(1:1)	(1:2)	(1:2)

応用

1) GEDTA を用いる Ca の選択滴定

表より明らかなようにGEDTAを滴定試薬に用いれば、CaとMgの安定度に $\log K=11.0-5.2=5.8$ と他の試薬では見られない差がある。そのため、Mg存在下のCaをpHを変えることなく選択的に定量可能である。Ca、Mgの混合試料溶液を一旦中和し、アンモニア緩衝液でpH10前後とする。指示薬としてはZincon^{2,3)} (0.1 mol/l Zn-GEDTA溶液 1~2滴を加える。終点の変色は青赤)、PAN⁴⁾ (Zn-EDTAを添加、Ca標準液で逆滴定、終点の変色は黄ピンク)を用いる。

なお、Ca、Mgの混合液にPO₄³⁻が共存するとpH6.9以上ではリン酸カルシウムとして沈殿し、滴定ができない。このような場合は、pH6以下で過剰のGEDTAを加えた後、ゆっくりpHを12~13に上げ、Calceinを指示薬として、Ca標準液で逆滴定する方法がある。

2) GEDTA を用いる Mg の選択滴定

EDTAを用いるCa、Mgの混合溶液中のMg定量法は、まずpH10でBTを指示薬とする滴定値(Ca+Mg)と、pH12~13でNNを指示薬とする滴定値(Caのみ)の差から算出する方法がとられている。このようにMgを直接滴定できないため、Ca、Mgの混合比が大きい場合には誤差が大きくなる。このような場合にGEDTAの安定度定数の差をたくみに利用すればCa、Mg混合物中のMg選択滴定が可能になる。

Ca、Mgの混合溶液にBa-GEDTAを加えると次のような反応が起こることが知られている。

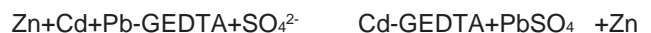


表より、 $\log K(\text{Ca-GEDTA}) = 11.0$ 、 $\log K(\text{Ba-GEDTA}) = 8.4$ であるから、Ca、Mgの混合溶液にBa-GEDTAを加えると、CaとBaの交換反応が起こり、同時にBaは添加されているSO₄²⁻と反応して難溶性のBaSO₄となって沈殿し、試料溶液中にはMgイオンのみが残存することとなる。このMgをBT指示薬を用いEDTAで滴定する。この方法によってCa:Mg = 1:1 ~ 100:1 程度の試料中のMgを少ない誤差で滴定できる。

3) GEDTA または DTPA を用いる Cd、Zn の選択滴定

Cd、Znに対するEDTAのキレート安定度定数は、ほとんど等しいので、EDTAをキレート試薬として用いる限り、Cd、Znは同時に滴定される。GEDTAおよびDTPAの場合も安定度定数の差はほとんどないが、適当なpH条件を選択すれば、みかけの安定度に3~4の差を生ずることが知られており、光度滴定、電流滴定法を用いればCdのみ定量できる⁷⁻¹⁰⁾。

Ca、Mgの場合と同様にSO₄²⁻を加えれば次式のような反応が起こる。



この反応を上手に利用すれば、Znのみ選択的に定量できる。また、Zn-GEDTAはNaOHアルカリ性溶液中ではGEDTAと亜鉛酸イオンに分解するのに対し、Cd-GEDTAは変化しないので、CdとZn混合試料中のCdを選択的に滴定できる¹²⁾。

4) CyDTA を用いる Cu、Ni 中の Cu の選択滴定¹³⁾

CyDTAは、ほとんどの金属に対してEDTAなどより安定度定数が多い。従ってCyDTAが存在するとKCNと反応しなくなる金属がある(安定度定数が知られていないので比較できないことが多く、同程度の安定度を持っている場合は先に加えたキレート剤と反応する)。CyDTAがあると、NiはKCNと反応しない。この性質を利用してCyDTAを過剰に加えてMg標準液で過剰分のCyDTA量を滴定する。次に30% H₂O₂ 約2 ml、KCN 約0.5 gを加えるとCuのみCu(CN)₄²⁻を生じ、Cuとキレートとしていた

CyDTAが解離するので、Mg標準液で滴定を続ければCuのみ定量できる。

5) CyDTAを用いるAl,Crの選択滴定^{14, 15)}

CyDTAはEDTAよりも反応速度が遅く、滴定に際しては加熱するか、ゆっくりと行う必要がある。特にAl,Cr,Ni,Zrとは反応速度が遅く、0ではCrとは数日以上反応しないといわれている。AlとCrの混合試料の場合、Alは常温でCyDTAとゆっくり反応するが、Crは反応しない。従って混合試料にAlに対して常温でCyDTAを過剰加え、一定時間静置後XO指示薬を用いてPb標準液で逆滴定する。滴定の終わった溶液にCrに対してCyDTAを過剰加え、加熱して錯形成させた後、逆滴定を続けるとCrが滴定できる。クロム酸が共存してもこの方法は実施できるが、逆滴定を行うにはZn標準液を用いる必要がある。

6) TTTHAを用いる選択滴定^{16 - 18)}

EDTA、CyDTA、GEDTAなどいずれも金属と1:1に結合するのが特長である。しかしながらTTTHAは金属の種類およびpHを選べば、1:1に結合する場合と1:2に結合する場合がある。例えば、Caは1:1に結合し、Mgは1:2に結合する。従って、Ca+Mg等量混合物をTTTHAで滴定すれば、MgはCaに対して半量しかTTTHAを必要としないため、EDTAで滴定した場合の1/2 mol/lの滴定値をえる。この差により、Mgの存在量を知ることができる。また、1:2結合する場合、安定度定数が極めて大きくなり、マスク剤の作用も著しく変化してくる。従ってこのような特殊なキレート試薬は適当に利用すれば、混合イオンの選択滴定に大いに役立つと思われる。

参考文献

- 1) 上野景平, "キレート滴定法", 南江堂.
- 2) F. S. Sadek, R. W. Schmid and C. N. Reilley, *Talanta*, **1959**, 2, 38.
- 3) E. Wanninen, *Talanta*, **1961**, 8, 355.
- 4) G. Nakagawa, M. Tanaka and H. Wada, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1963**, 36, 320.
- 5) J. H. Austin and C. A. Klett, *Chemist-Analyst*, **1966**, 55, 11.
- 6) R. A. Burg and H. F. Conaghan, *Chemist-Analyst*, **1960**, 49, 100.
- 7) H. Flaschka and J. Ganchoff, *Talanta*, **1962**, 9, 76.
- 8) H. Flaschka and J. Butcher, *Mikrochim. Ichnoanal. Acta*, **1964**, 401.
- 9) D. A. Aikens, G. Schmuckler, F. S. Sadek and C. N. Reilley, *Anal. Chem.*, **1961**, 33, 1664.
- 10) E. Wanninen, *Acta Academia Aboensis, Math. Et Phys.*, **1960**, 21, 1.
- 11) R. Fabregas, A. Prieto and C. Garcia, *Chemist-Analyst*, **1962**, 51, 77.
- 12) R. Pribil and V. Vesely, *Chemist-Analyst*, **1966**, 55, 4.
- 13) R. Pribil, *Collection*, **1955**, 20, 162.
- 14) R. Pribil and V. Vesely, *Talanta*, **1963**, 10, 1287.
- 15) K. E. Burke and C. M. Sovis, *Anal. Chem.*, **1964**, 36, 172.
- 16) R. Pribil and V. Vesely, *Talanta*, **1962**, 9, 939.
- 17) 伊藤敦子, 上野景平, 分析化学, **1968**, 17, 327.
- 18) L. Harju and A. Ringbom, *Anal. Chim. Acta*, **1970**, 49, 205.

お知らせ

IgG 精製キットの包装内容を変更しました
IgG Purification Kit - A
IgG Purification Kit - G

ご愛用いただいておりますIgG精製キット2種の、抗体回収用のチューブを増量しました。
これまでは必要に応じてご用意しておりましたが、「キットに入っているチューブと同じ形状のものを使用したい」というご意見をいただき、チューブの本数をキットの使用回数の上限である10回分(10本)といたしました。

Total Glutathione Quantification Kit 内容の一部変更
Total Glutathione Quantification Kit の中に含まれているCoenzymeは、溶解した後の安定性が悪いため使いきりとしておりましたが、改良を行い溶解方法を変えることで安定性を向上させることができました。
それに伴い、製品仕様・使用方法が若干異なっておりますのでご購入の際は製品説明書をよくご覧の上、ご使用ください。

今後もより使いやすい製品を目指して参りますので、ご意見ご要望をお寄せください。

IC Dye 販売中止のお知らせ

IC3-OSu, IC5-OSu, IC3-PE-maleimide, IC5-PE-maleimide
(各1mg, 200µg × 5包装) に関しまして、販売中止とさせていただきます。

Fluoral-P 販売中止のお知らせ

Fluoral-P (コート: 342-04491, 1g包装) に関しまして販売中止とさせていただきます。

Biopyrrin EIA Kit の変更予定のお知らせ

平素は(株)シノテスト製品、Biopyrrin EIA Kitをご愛顧頂き有難うございます。

このたび、**2007年1月1日**以降に受注致しますBiopyrrin EIA Kitの標準液を、ビリルビン溶液からバイオピリンを含む尿抽出物へと変更することとなりました。

この変更により希釈直線性が改善し、測定上限が3.2u/Lから6.4u/Lへと向上致しますが(図1)測定値が従来と若干変わる場合がありますのでご了承ください(図2)。

標準液の変更に伴いますプロトコルの変更に関しては、小社ホームページでご案内させていただきます。

今後とも一層のお引き立てを賜ります様お願い申し上げます。

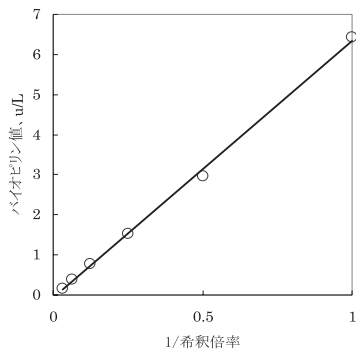


図1. 変更後の希釈直線性

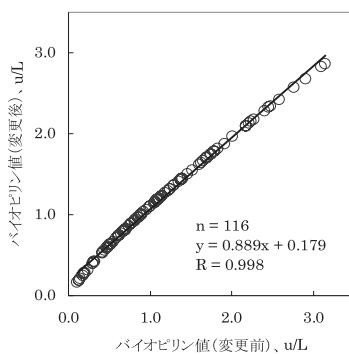


図2. 標準液変更前後の相関*

*検体の吸光度は、変更前後で共通のものを用いました。

《標準液変更に関するお問い合わせ先》
株式会社シノテスト 企画部 サービスチーム
神奈川県相模原市大野台2-29-14
TEL 0120-66-1141(フリーダイヤル)
FAX 042-753-1892

尿中 Biopyrrins 測定キット

Biopyrrin EIA Kit

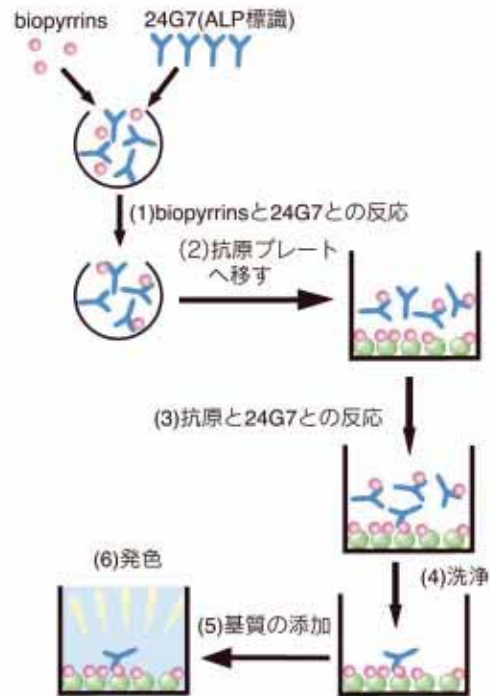
Biopyrrinsの尿中排泄量は、生体内の酸化状態を反映すると考えられ、ストレスマーカーとしても報告されている。そのため、今後の実験結果には多くの関心が持たれている。本キットは、Anti-Bilirubin Monoclonal Antibody (24G7)を用いた、inhibition ELISAによる尿中Biopyrrinsを簡便に測定できるキットである。

特長
1. 酸化ストレスマーカーと言われている尿中のBiopyrrinsを測定出来る。

2. 簡便に再現性良く測定出来る。

測定原理

アルカリフォスファターゼで標識した抗ビリルビンモノクローナル抗体(24G7)を用いた inhibition ELISAによる測定。



このキットは研究用です。臨床や他の目的で使用しないで下さい。
(製造元：株式会社シノテスト)

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Biopyrrin EIA Kit	1set	100,000	B433

遺伝子導入試薬

HilyMax (ハイリーマックス) は、新規に開発したカチオン性リポソームを利用した導入試薬です。(特許出願: PCT/JP2006/304514)

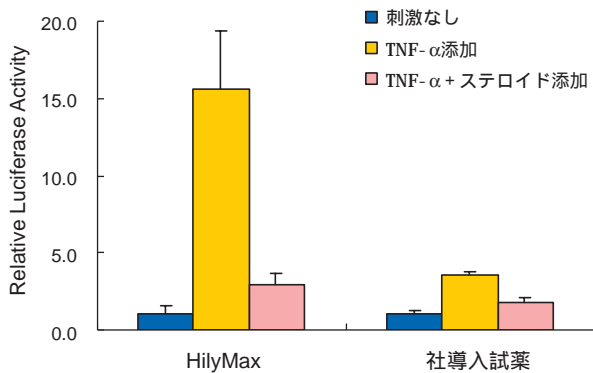
多岐にわたる動物細胞へ、プラスミドDNAを高効率に導入することができます。また siRNA 用導入試薬としても使用可能です。培地中の血清の影響を殆ど受けないため、遺伝子導入時の面倒な培地交換をする必要がありません。

HilyMax は、化学合成品のため、遺伝子導入時に影響を及ぼす可能性のある生物由来成分は含まれていません。

特長

- 多岐にわたる細胞へ DNA を高効率に導入
- 血清を含む培地での導入が可能
- 導入遺伝子の細胞内シグナル応答が良好
- コストパフォーマンスに優れた純国産導入試薬

シグナル伝達研究への利用



24-well プレートにて細胞密度 90% confluent の A549 細胞に対し、NF-kB 依存的に転写活性化される IL-8Luc を組み込んだプラスミド DNA を血清存在下でトランスフェクションした。

トランスフェクション 24 時間後に TNF-a (NF-kB の活性化物質) または TNF-a + dexamethasone (NF-kB の抑制物質) を添加した。添加剤投与 6 時間後に TNFa 及び dexamethasone による転写刺激応答を Luciferase 活性にて確認した。

結果、HilyMax にてトランスフェクションした細胞では、I 社導入試薬のものに比べ、薬物刺激による応答が著明であった。

(データ提供: 熊本大学大学院 医学薬学研究部)

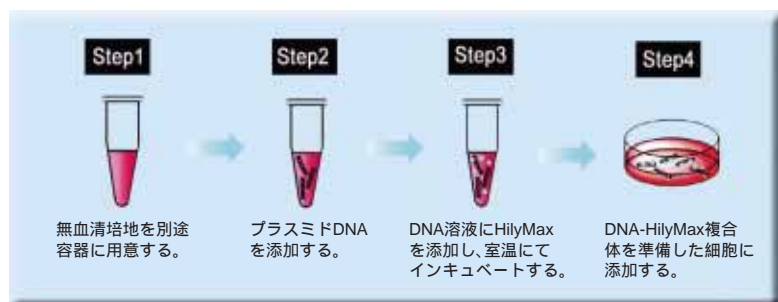
薬物活性学分野 磯濱洋一郎先生)

HilyMax と汎用されている市販品でのプラスミド DNA 導入率比較

細胞名	HilyMax	社導入試薬	細胞名	HilyMax	社導入試薬
CHO	90%	80%	MCF-7	70%	70%
HeLa	70%	70%	Neuro2a	70%	70%
HEK293	60%	60%	MG63	20%	17%
NIH3T3	70%	50%	HC	50%	65%
A549	50%	50%	COS7	40%	50%
L6	30%	20%	HepG2	10%	20%
3T3-L1	30%	30%	Vero	40%	55%
K562	30%	3%	MDCK	20%	25%
LNCap	70%	30%	Jurkat	3%	4%
PC3	70%	45%	UtSMC	10%	15%

導入手順

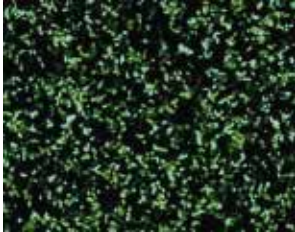
- ワンチューブによるシンプルプロトコール
- 遺伝子導入前の培地交換が不要



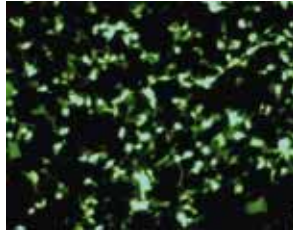
遺伝子導入試薬

HilyMax を用いた遺伝子導入による各細胞での GFP 発現

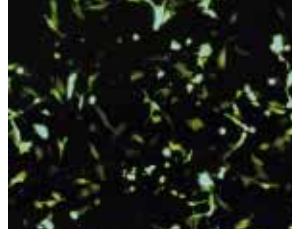
CHO 細胞



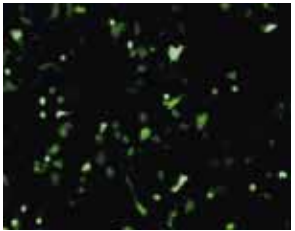
HEK293 細胞



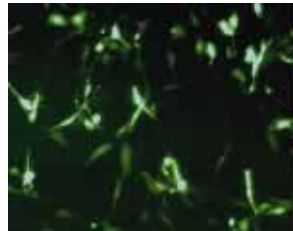
HeLa 細胞



A549 細胞

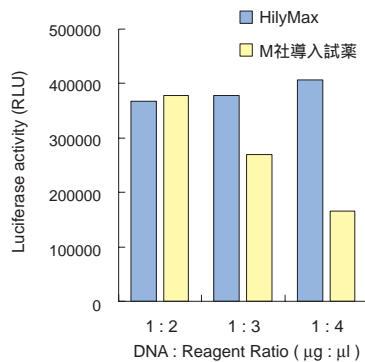


NIH3T3 細胞

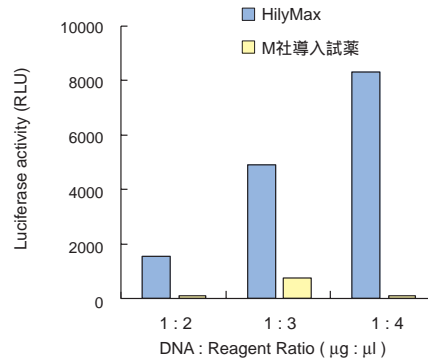


各培養細胞を遺伝子導入前日に24-wellプレートに播種。hsGFP遺伝子発現ベクターを80% confluentの各培養細胞へ血清存在下で遺伝子導入を行い、24時間後に蛍光顕微鏡で観察した。

初代培養細胞 (COV) への遺伝子導入



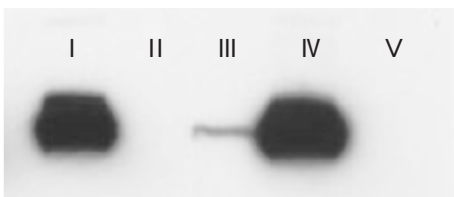
血球系細胞(DT40)への遺伝子導入



COV (ニワトリ卵巣由来) 細胞およびDT40 (ニワトリB細胞由来) 細胞にpGL3 vectorを血清存在下でトランスフェクションし、24時間後に導入活性を測定した。

(データ提供: 就実大学薬学部 生物薬学科 分子細胞薬学ユニット 工藤季之先生)

HEK293 細胞への遺伝子導入



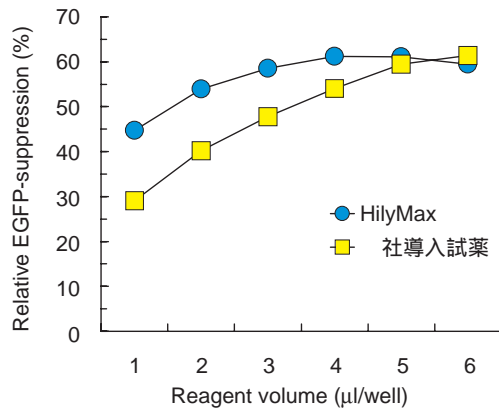
I : HilyMax
 II : R社導入試薬 1
 III : R社導入試薬 2
 IV : I社導入試薬
 V : Non-transfected

6-well プレートにて細胞密度70%confluentのHEK293細胞に対し、HilyMax及び市販導入試薬を用いてHerpes virus protein cDNA発現プラスミド(pcDNA3由来) 0.5 μgを血清存在下でトランスフェクションし、48時間後にウェスタンブロット法により目的タンパクの発現を確認した。

(データ提供: 鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 附属難治ウイルス病態制御研究センター 分子ウイルス感染研究分野 草野秀一先生)

遺伝子導入試薬

siRNA 導入による EGFP ノックダウン



24-well プレートにて EGFP を安定発現している CHO 細胞に対し、HilyMax を用いて GFP siRNA を血清存在下でトランスフェクションした。24時間後にフローサイトメトリーにて EGFP のノックダウン率を測定した。

(データ提供:福岡県工業技術センター 生物食品研究所 楠本賢一先生)

導入実績細胞種

動物細胞

細胞名	由来	細胞名	由来	細胞名	由来
COS-1	アフリカミドリザル 腎臓	HeLaS3	ヒト 子宮頸部	3T3-L1	マウス 胚
COS-7	アフリカミドリザル 腎臓	HepG2	ヒト 肝臓 胆嚢	Neuro2a	マウス 神経系
Vero	アフリカミドリザル 腎臓	HFL-1	ヒト 胎児 肺	NIH3T3	マウス 胎仔
MDCK	イヌ 腎臓	Human hepatic Stellate	ヒト 肝臓	L929	マウス 繊維芽
CHO	チャイニーズハムスター 卵巣	Jurkat	ヒト 白血病性 T細胞	C2C12	マウス 骨芽
DT40	ニワトリ 血球・リンパ系	K562	ヒト 血球・リンパ系	L6	ラット 筋組織
CEF	ニワトリ 胚	LNCap	ヒト 前立腺ガン	RBL2H3	ラット 血球・リンパ系
COV	ニワトリ 卵巣	MCF-7	ヒト 哺乳器	VSMC	ラット 血管平滑筋
A549	ヒト 肺上皮	Mesenchymal cell	ヒト 間葉系幹	昆虫細胞	
AGS	ヒト 胃上皮	MG63	ヒト 骨肉腫		
HC	ヒト 胎児 肝臓	MKN	ヒト 胃	細胞名	由来
HEK293	ヒト 胎児 腎臓	PC3	ヒト 前立腺ガン	BMN	カイコ 卵巣
HeLa	ヒト 子宮頸部	UtSMC	ヒト 子宮平滑筋	Sf9	ヤトウガ

Q&A

Q1 HilyMax は、どのような細胞種に使用できますか？

A1 NIH3T3、CHO、HEK293、HeLa、A549 細胞をはじめ、初代細胞、幹細胞など、広範囲な細胞種への高効率遺伝子導入が可能です。I社導入試薬と同等以上の導入率を示した細胞種を p17 に示しております。

Q2 何故、HilyMax は低価格で提供が可能なのですか？

A2 原料である陽イオン性脂質を自社合成することにより、大量スケールでの導入試薬製造を実現しました。また完全化学合成品のため、動物由来成分を含みません。

Q3 細胞種毎での導入プロトコルはありますか？

A3 遺伝子導入に広く用いられている細胞種(NIH3T3、CHO、HEK293、HeLa)における、最適導入条件を記載したプロトコルをご提供いたします。また、導入実績のある細胞種については、随時 HP 上で更新していく予定です。

Q4 市販の導入試薬と比べて、どの程度の導入効率、毒性を示しますか？

A4 導入条件を最適化することにより、汎用されている導入試薬(I社導入試薬)よりも高い導入率を示します。毒性についても、最適化を行うことで、殆ど毒性が確認されない条件での高効率遺伝子導入が可能です。

Q5 他の試薬にはない特徴はありますか？

A5 サイトカインに関する研究で遺伝子導入を行った際、これまで使用していた導入試薬では転写活性にバラツキが大きかったのですが、HilyMax で遺伝子導入した細胞は、転写活性が安定しているとの結果を数名の先生から頂いております。このことから HilyMax による遺伝子導入は、細胞内シグナル伝達に影響を与えにくいと考えられます。

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
HilyMax	1.0 ml	20,000	H357

試作品

開発元 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

ペルオキシダーゼ標識用キット (for 1mg)

本製品は、アミノ基あるいはスルフヒドリル基を有する分子にペルオキシダーゼを標識するためのキットです。従来の0.1 mgタンパク質標識用キットと同様に、Reactive Peroxidaseと標的分子を混合するだけで簡単にペルオキシダーゼ標識体を得ることができます。

2007年1月初旬発売予定
Peroxidase Labeling Kit -NH₂ (for 1mg)

Peroxidase Labeling Kit -NH₂は、アミノ基を有する分子にペルオキシダーゼを標識するためのキットです。NH₂-Reactive Peroxidaseは、その構造内に活性エステル基を有しているため、アミノ基を有する標的分子と混合するだけで、安定な共有結合を形成します。

IgGのような分子量の大きい分子をサンプルに使用する場合、ペルオキシダーゼ活性や標識反応を阻害するような低分子化合物(アジ化ナトリウム、トリスまたはグリシン)などは、付属のFiltration Tubeを用いた前処理によって除去されるため、透析やゲルろ過などの処理は不要です。また、低分子化合物を標識する場合、未反応の低分子化合物はFiltration Tubeを用いた精製操作により除去されるため、高純度のペルオキシダーゼ標識体を得ることができます。

< 特長 >

- 1 mgのタンパク質を標識可能である。
- 高分子化合物 (MW>50,000) および低分子化合物 (MW<5,000) を標識できる。
- NH₂-Reactive Peroxidaseと混合するだけでペルオキシダーゼ標識体を形成する。
- Filtration Tube を用いた分離操作により高い回収率で標識体を得られる。

< キット内容 >

• NH ₂ - Reactive Peroxidase	1 mg	X 1
• Washing Buffer	10 ml	X 1
• Reaction Buffer	1.2 ml	X 1
• Storage Buffer	10 ml	X 1
• Filtration Tube *1		X 1 tube
• 15ml Tube		X 1 tube

*1 Filtration Tubeを使用する際は、15 ml容量の遠沈管に対応する遠心機が必要です。7,000 xgの遠心を推奨しますが、7,000 xg以下の場合でも遠心時間を延長することで対応可能です。

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Peroxidase Labeling Kit -NH ₂ (for 1mg)	1 sample	30,000	LK51

Peroxidase Labeling Kit -SH (for 1mg)

Peroxidase Labeling Kit -SHは、SH基を有する分子にペルオキシダーゼを標識するためのキットです。SH-Reactive Peroxidaseは、その構造内にマレイミド基を有しているため、SH基を有する標的分子と混合するだけで、安定な共有結合を形成します。標的タンパク質がSH基を持っていない場合には、添付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)。IgGの場合、ヒンジ領域のSH基を利用することでペルオキシダーゼ標識体を得ることができます。

IgGのような分子量の大きい分子をサンプルに使用する場合、ペルオキシダーゼ活性を阻害するような低分子のアジ化ナトリウムなどは、付属のFiltration Tubeを用いた前処理によって除去されるため、透析やゲルろ過などの処理は不要です。また、低分子化合物を標識する場合、未反応の低分子化合物はFiltration Tubeを用いた精製操作により除去されるため、高純度のペルオキシダーゼ標識体を得ることができます。

< 特長 >

- 1 mgのタンパク質を標識可能である。
- 高分子化合物 (MW>50,000) および低分子化合物 (MW<5,000) を標識できる。
- SH-Reactive Peroxidase と混合するだけでペルオキシダーゼ標識体を形成する。
- 付属の還元剤を用いることで遊離SH基を持たないタンパク質への標識も可能である *2。
- Filtration Tube を用いた分離操作により高い回収率で標識体を得られる。

< キット内容 >

• SH- Reactive Peroxidase	1 mg	X 1
• Reducing Agent		X 1
• Solution A	10 ml	X 1
• Solution B	4 ml	X 1
• Reaction Buffer	0.6 ml	X 1
• Storage Buffer	10 ml	X 1
• Filtration Tube *1		X 1 tube
• 15ml Tube		X 1 tube

*2 還元剤(Reducing Agent)は、IgG への標識用として最適化されています。IgG以外のS-S結合を有するサンプルを使用する場合は、S-S結合の切断によって標識対象分子の活性が失われる場合があるため、検討が必要です。

お知らせ

第25版総合カタログ発行

第25版総合カタログ(2006/2007)をお送りします。



今回のカタログではプロトコルをカラー化し、操作写真などを追加することで、より見やすく分かりやすくなっております。新製品のプロトコルも追加いたしましたので、是非ご覧下さい。

あわせて、ホームページの商品カタログ・プロトコルも更新致しました。

今後も、皆様のご研究により役立つ情報をご提供して参りたいと考えております。

カタログのご請求は、小社マーケティング部までご依頼ください。

URL: <http://www.dojindo.co.jp/catalog/index.html>

Tel:0120-489548

商品毎のパンフレットをご用意いたしております。

Labeling Kitにはどんなものがあるの？ SAMs 試薬ってどういう風に使い分けるの？

細胞が染まった写真を実際に見てみたいんだけど..... といったご要望に対応できるようにパンフレットをご用意いたしております。是非ご請求下さい。

- ・ 遺伝子導入試薬 HilyMax
- ・ Dojindo Labeling Kits データ集
- ・ -Cellstain-細胞染色用色素
- ・ 自己組織化単分子膜研究用試薬 (SAMs 試薬)
- ・ 膜タンパク質可溶化剤
- ・ Reagents for Cell Biology
- ・ 分子生物学関連試薬
- ・ タンパク質定量キット

ご請求は小社マーケティング部までご依頼下さい。

URL: <http://www.dojindo.co.jp/catalog/index.html>

Tel: 0120-489548

商品に関するお問合せは、小社カスタマーサービス部にて承っております。お気軽にお問合せください。

E-mail: info@dojindo.co.jp

フリーダイヤル : 0120-489548

フリーファックス : 0120-021557



17th フォーラム・イン・ドージン開催報告

生命活動を支える RNA プログラム

昨年のフォーラム・イン・ドージンは、2本鎖RNAによって相補的な遺伝子の発現が抑制されるRNA干渉を主題に行ったが、奇しくも今年のノーベル医学生理学賞は、このRNA干渉を発見した2名の米国研究者に与えられることになった。昨年のフォーラムの際に、翌年のテーマについて参加者にアンケートしたところ、RNAに関する希望が多く寄せられた。

遺伝子をコードしないnon-coding RNAが実は多彩な生命機能を調節しており、その広汎な役割が少しずつ明らかになり、生物学そのもの変わるうとしている。そういった大きなうねりを少しでも感じられたらという思いから、RNA研究の第一線で活躍されている研究者を熊本に集め、「生命活動を支えるRNAプログラム」というタイトルで、11月17日、第17回フォーラム・イン・ドージンを開催した。



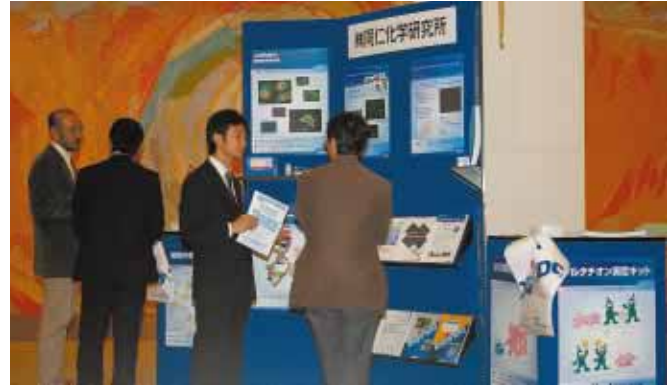
今回の世話人は塩見 春彦 先生（徳島大ゲノム機能研究センター）をお願いした。さらに、塩見先生を中心に以下の先生方にそれぞれ講演をお願いした。菅 裕明 先生（東大先端研）は、先生のところで開発されたフレキシザイム技術によるタンパク質の翻訳合成について話された。

続いて、井上 邦夫 先生（神戸大理）がゼブラフィッシュの発生過程におけるマイクロRNAの役割について講演された。

午後のセッションでは、鈴木 勉 先生（東大工）がRNA修飾について、宮川 さとみ 先生（大阪大医）がマウスの精子形成におけるエピジェネティック制御について、今泉 和則 先生（宮崎大医）がスプライシング異常について、最後に、谷 時雄 先生（熊本大理）がmRNAの輸送について講演された。

いずれも最先端の研究内容を分かりやすく工夫された魅力的なプレゼンテーションであったが、特に、菅先生の講演はケミストリーを踏まえたもので、強く印象に残った。

参加者は昨年同様約120名とかなり多く、地元熊本以外に、東京、大阪から参加された方もおられた。会場はいつもながら、参加者からの熱心な質問が相次ぎ、やはりこの分野への関心が高いことが感じられた。参加者からのアンケートの意見も、内容がタイムリーで優れている点、また、熊本で最先端の話が聞ける点などを評価したものが多かった。



また、今回初めての試みとしてランチョンセミナーを実施し、小社が最近開発した遺伝子導入試薬“HilyMax”の紹介を行った。共同開発者である福岡県工業技術センター（生物食品研究所）の楠本先生に、HilyMaxによるsiRNAの導入実績について発表していただいた。

同時に会場に設置した製品案内用のブースに立ち寄られる方も多く、今回のテーマとマッチした効果的な製品紹介を行うことができた。



また、代表世話人の山本先生（熊本大医）さらに、座長を引き受けていただいた中尾先生（熊本大発生研）および遠藤先生（熊本小児科）にもご尽力いただきました。詳しくは、どうぞ要旨集をご覧ください。要旨集をご希望の方は、小社（info@dojindo.co.jp）までご連絡ください。（佐々木）

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