

2008 No.  
**127**

ISSN 0385-1516

## CONTENTS

### ●Review

水溶性テトラゾリウム塩を用いた  
酵母活性の測定  
塚谷 忠之

### 連載

エイズから見た感染症研究の最前線  
その7 HIVに対するヒトCTL免疫応答  
上野 貴将

### ●Topics on Chemistry

新しいタンパク質タグを用いた蛍光標識法  
池田 千寿

ドージンニュース

**DOJIN NEWS**

目次

Review

- 水溶性テトラゾリウム塩を用いた酵母活性の測定  
福岡県工業技術センター 生物食品研究所 塚谷 忠之 ..... 1
- エイズから見た感染症研究の最前線  
その7 HIV に対するヒトCTL 免疫応答  
熊本大学エイズ学研究センター 上野 貴将 ..... 8

Topics on Chemistry

- 新しいタンパク質タグを用いた蛍光標識法  
同仁化学研究所 池田 千寿 ..... 11

Commercial

- 新製品  
分子生物学用 Good's Buffer ..... 14
- 試作品  
少量抗体用蛍光標識キット ..... 12
- 製品案内  
WST-1 ..... 7  
Self Assembled Monolayer 研究用 ..... 13

お知らせ

- フォーラム・イン・ドージン開催 ..... 10

製品案内

分子生物学用 Good's Buffer

品名	容量	価格(¥)	コード	メーカーコード
ACES 分子生物学用	20 g	7,800	342-08271	GB73
ADA 分子生物学用	20 g	3,400	349-08281	GB74
BES 分子生物学用	20 g	2,800	346-08291	GB75
Bicine 分子生物学用	20 g	2,800	349-08301	GB76
Bis-Tris 分子生物学用	20 g	4,800	346-08311	GB77
CAPS 分子生物学用	20 g	4,000	343-08321	GB78
CHES 分子生物学用	20 g	3,800	340-08331	GB79
EPPS 分子生物学用	20 g	5,800	347-08341	GB80
HEPES 分子生物学用	20 g	2,200	340-08233	GB70
MES 分子生物学用	20 g	2,800	344-08351	GB81
MOPS 分子生物学用	20 g	2,600	347-08243	GB71
PIPES 分子生物学用	20 g	3,400	344-08253	GB72
TAPS 分子生物学用	20 g	3,000	341-08361	GB82
TES 分子生物学用	20 g	4,800	348-08371	GB83
Tricine 分子生物学用	20 g	2,600	345-08381	GB84



アメリカの Dojindo Molecular Technologies, Inc.  
2008年6月1日より、Maryland, Rockville に移転しました。  
URL, E-mail, Tel No. 等はこれまで通りです。

# 水溶性テトラゾリウム塩を用いた酵母活性の測定 Measurement of Yeast Vitality Using Water-Soluble Tetrazolium Salt



塚谷 忠之  
(Tadayuki Tsukatani)  
福岡県工業技術センター  
生物食品研究所 食品課

[Abstract]

Brewing yeast strains have traditionally been used in food processing. Therefore, the measurement of yeast vitality is important to maintain proper fermentation and to produce high-quality food products. In this study, a method for the colorimetric assay of yeast vitality was developed using 2,3,5,6-tetramethyl-1,4-benzoquinone (BQ) and water-soluble tetrazolium salts. The metabolic efficiency of 2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQ by yeast cells was used as an index of yeast vitality. We demonstrated the reaction mechanism for the reduction of tetrazolium salts by yeast cells using spectrophotometric, electrochemical, and ESR methods. It became clear that superoxide anion radicals generated in the metabolic process of 2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQ reduced mainly tetrazolium salts to formazan dyes. A good linear relationship between the absorbance obtained by the proposed method and viable cell density was obtained. During the cultivation of yeast cells, the absorbance showed an almost anti-parallel change with that of glucose in yeast growth and fermentation, suggesting that the absorbance change reflected the vitality of yeast cells. The proposed method can provide a measurement of the yeast vitality in area of process control, such as proliferation and fermentation.

キーワード: 酵母活性、水溶性テトラゾリウム塩、電子メディエータ、キノン

## 1. はじめに

伝統的発酵食品の製造において、酵母等の微生物の生理状態を把握することは発酵を最適に制御するために極めて重要である。現在、酵母活性の測定法としてメチレンブルー染色法<sup>1,2)</sup>、スライドカルチャー法<sup>2)</sup>、acidification power test<sup>2)</sup>、cumulative acidification power method<sup>3)</sup>、細胞内 pH 測定法<sup>4)</sup>などその代謝活性に注目した方法がいくつか提案されている。この中で最も汎用されているのがメチレンブルー染色法である。メチレンブルーは細胞内に取り込まれた後、細胞内の酸化還元酵素の作用を受けて無色のロイコメチレンブルーになる。したがって、生細胞は染色されず、死細胞のみが染色される。酸化還元反応は呼吸という生命活動と密接に関係しているため、酵母等の生菌と死菌を区別するのに利用されている。しかし、この手法では染色具合の曖昧さが生じやすく、測定者による誤差が大きい。

我々は簡便かつ迅速な酵母活性の測定を目的として、酵母によるキノン類の代謝と様々な検出系（発色法、電気化学法、化学発光法）を組み合わせた活性測定法を開発してきた。この中でも発色法は最も汎用性に優れた方法と考えられる。そこで、本稿ではキノン類に代表される電子メディエータ及び水溶性テトラゾリウム塩 WST を利用した酵母活性測定法の開発とその発色反応機構の検証に関する研究を中心に紹介する。キノン類は細胞内 NAD(P)H とキノンレダクターゼをはじめとする細胞膜の酸化還元酵素の働きによりヒドロキノンへ還元されると考えられており、ここでいう細胞活性とは細胞内 NAD(P)H と細胞膜酵素活性に依存するものであると考えられる (Fig.1)<sup>5)</sup>。NAD(P)H は主にミトコンドリアで生産されると考えられており、呼吸や代謝活動を続けている間は作られ続けることから、微生物によるキノン類の代

謝は生命活動と密接に関連していると考えてよい。したがって、このキノン類の代謝を検出できれば微生物の活性を把握することができる。

## 2. 水溶性テトラゾリウム塩 WST-1 を用いた酵母活性の測定

発色法は、酵母活性を測定する上で簡便性や汎用性の面から最も有効な手法と考えられる。そこで、我々は発色試薬として水溶性テトラゾリウム塩である WST-1 (同仁化学研究所製) を利用した酵母活性測定法の開発を行った。また、本法を酵母培養時にかける活性測定に適用した。

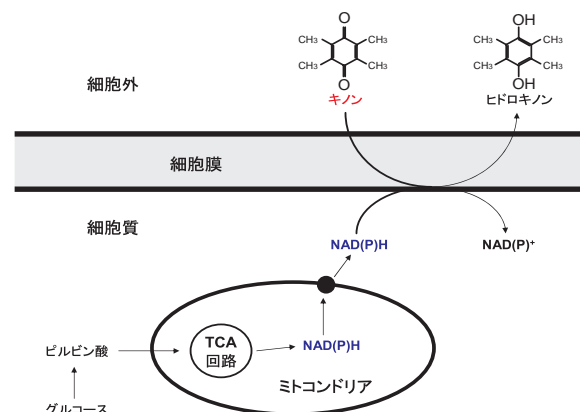


Fig. 1 Schematic representation of the proposed mechanism of cellular reduction of quinones.

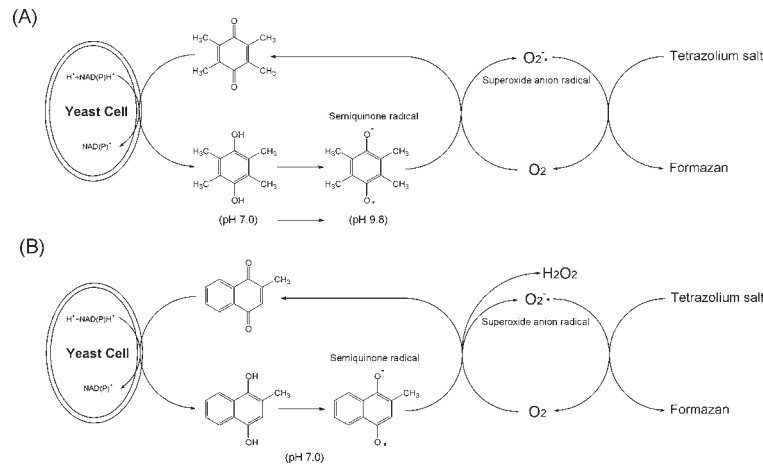
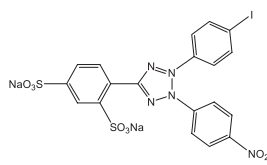


Fig. 2 Reaction mechanism for the reduction of tetrazolium salt in the presence of yeast cells and electron mediators  
 (A) 2,3,5,6-tetramethyl-1,4-benzoquinone,  
 (B) 2-methyl-1,4-naphthoquinone.

2.1. 酵母活性測定法

我々が開発した酵母活性測定法は、WST-1を含む50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁させた酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に対して電子メディエータとしてキノン類を添加し、一定時間インキュベーション後に得られるホルマザン色素を 440 nm における吸光度測定に供するといった簡単な操作で行うことができる<sup>6)</sup>。Fig. 2は電子メディエータに2,3,5,6-tetramethyl-1,4-benzo-quinone (BQ) あるいは2-methyl-1,4-naphthoquinone(NQ)を用いた際の発色反応機構を示したものであり、以下のように説明できる。ベンゾキノンあるいはナフトキノンは酵母により代謝されて、それぞれヒドロキノン体を生成する。ナフトヒドロキノンはpH中性付近でも速やかに酸化され、その過程で生じるスーパーオキシドアニオンラジカル(O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>)がテトラゾリウム塩を還元してホルマザン色素が生成する (Fig. 2(B))。



WST-1 (MW=651.35, λ<sub>max</sub>=440 nm)

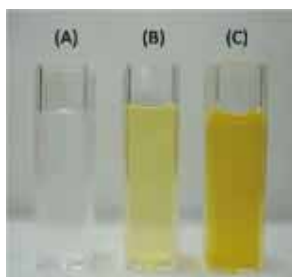


Fig. 3 Photographs of the formazan produced from WST-1.  
 Yeast cell density (cells/ml): (A) none, (B) 0.5 × 10<sup>6</sup>, (C) 2.0 × 10<sup>7</sup>.

一方、ベンゾキノンから生じるヒドロキノンは中性pH付近では比較的安定でありこのままでは発色はみられないが、アルカリ条件下では速やかに酸化されるため、代謝後にNaOH水溶液を添加することで発色が生じる (Fig. 2(A))。WST-1は一連の反応で生成したO<sub>2</sub>•<sup>-</sup>により還元を受けると440 nm付近に最大吸収波長を有する黄色のホルマザン色素を生成する (Fig. 3)。

Fig. 4は、最適な電子メディエータの選択を行うために酵母に様々な電子メディエータを代謝させ、pH7.0あるいは代謝後にNaOH水溶液を添加してpH9.8で発色させた結果である。pH7.0ではほとんどのベンゾキノン類で発色がみられなかったが、ナフ

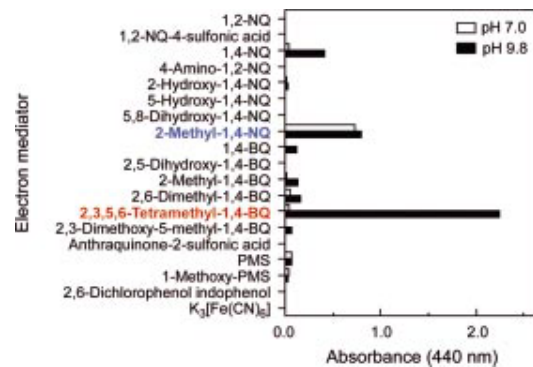


Fig. 4 Effect of electron mediator on the amount of formazans produced by yeast.

Neutral condition (pH7.0, blank bar); Alkaline condition (pH9.8, dark bar);

NQ, naphthoquinone; BQ, benzoquinone; PMS, phenazine methosulfate.

Yeast cells (2.0 × 10<sup>7</sup> cells/ml) were incubated in 50 mM phosphate buffer (pH7.0) containing 0.24 mM electron mediator and 0.24 mM WST-1 at 25°C for 10 min. Then, 0.02 ml of NaOH (0.8 M) was added to 1.0 ml of the mixture in order to adjust pH (pH 9.8). Formazan produced by yeast cells was measured at 440 nm with a spectrophotometer.



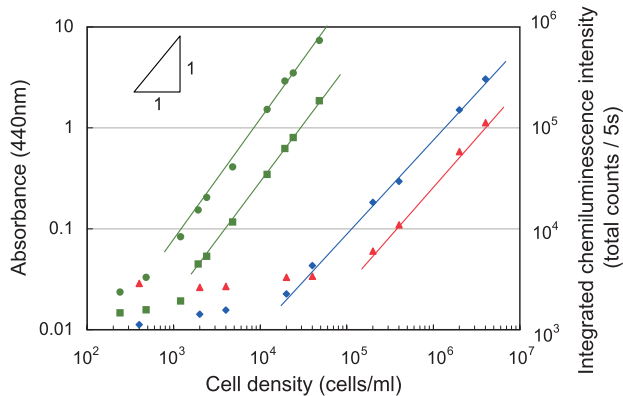


Fig. 5 Cell proliferation assays using different methods with yeast cell line.

○, 2-methyl-1,4-NQ in colorimetric method; □, 2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQ in colorimetric method; and ▲, 2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQ in chemiluminescent method.

Colorimetric method: the same procedure as shown in Fig. 4.

Chemiluminescent method: Yeast cells were incubated in 50 mM phosphate buffer (pH7.0) containing 0.01 mM 2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQ and 0.02 mM lucigenin at 25°C for 10 (○) or 30 min (□). Then, 0.025 ml of NaOH (0.64 M) was added to 1.0 ml of the mixture in order to adjust pH (pH 9.8). The chemiluminescence intensity after the injection of NaOH was automatically counted for 5 s with a luminometer.

トキノロン類、特に2-methyl-1,4-NQにおいて最も高い発色が得られた。一方、反応後にpH9.8に移行させた系では2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQにおいて最も高い発色度が得られた。そこで、電子メディエータとして2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQ及び2-methyl-1,4-NQを選択し、酵母数と発色度の相関関係を調べたところ、2-methyl-1,4-NQでは酵母数 $2.0 \times 10^5 \sim 4.0 \times 10^6$  cells/mlの範囲で測定が可能であったのに対して、2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQでは $2.0 \times 10^4 \sim 4.0 \times 10^6$  cells/mlの範囲で直線性が得られ、2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQのほうが感度良く測定できることがわかった(Fig. 5)。

## 2.2. 電子メディエータの検討

では何故、2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQのほうが2-methyl-1,4-NQよりも感度良く測定できるのか？この感度の差は生成したヒドロキノン体の特性の相違によるものと考え、pH7.0における2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQ及び2-methyl-1,4-NQのヒドロキノン体の挙動について電気化学的手法を用いて検討を加えた。酵母により生成したヒドロキノン体は電極により直接酸化させることでモニターすることができる。まず、2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQを酵母に代謝させた場合、好気あるいは嫌気いずれの条件下においても、ほぼ直線的な応答電流が得られた(Fig.6)。これは、溶存酸素が存在してもpH7.0では2,3,5,6-tetramethyl-1,4-hydroquinone(HQ)は比較的安定であることを示している。一方、2-methyl-1,4-NQを好気条件下で酵母に代謝させた場合、応答電流は直線性を示さず頭打ちしたが、嫌気条件下では直線的な応答が得られた。さらに、スーパーオキシドジスム

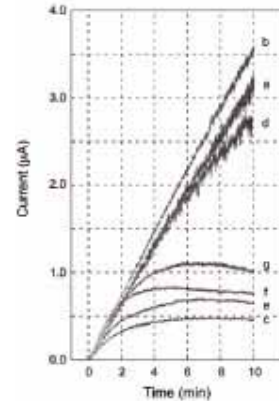


Fig. 6 Time course for the oxidation current in the presence of yeast cells and mediators under various conditions.

a, 2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQ under aerobic condition; b, 2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQ under anaerobic condition; c, 2-methyl-1,4-NQ under aerobic condition; d, 2-methyl-1,4-NQ under anaerobic condition; e, 2-methyl-1,4-NQ in the presence of SOD (141.5 units) under aerobic condition; f, 2-methyl-1,4-NQ in the presence of catalase (81.2 units) under aerobic condition; g, 2-methyl-1,4-NQ in the presence of SOD (141.5 units) plus catalase (81.2 units) under aerobic condition.

The oxidative current of the mixture in which yeast cells ( $1.0 \times 10^8$  cells/ml) were incubated with 0.24 mM electron mediator at 25°C for 10 min was measured.

ターゼ(SOD)やカタラーゼを共存させると応答の増加が認められた。この結果より、生成した2-methyl-1,4-naphtho-hydroquinoneは溶存酸素存在下で速やかに酸化されて減少するとともに、 $O_2^{\cdot -}$ や過酸化水素などの活性酸素種が生じ、これらが酵母に酸化ストレスを与えていることが推察される。さらに、ここにはデータを示していないが、低密度(約 $10^3$  cells/ml)の酵母に2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQあるいは2-methyl-1,4-NQを共存させ、24時間培養した際の増殖曲線を取得したところ、2-methyl-1,4-NQでは増殖が阻害されたのに対して、2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQでは無添加群と比べ若干の遅れはあるものの増殖がみられた。これらの結果から、2-methyl-1,4-NQを用いた場合、測定中に酵母が酸化ストレスを受け続けるため活性が低下し、測定感度の低下がもたらされたものと考えられる。これに対して、2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQは、pH7.0で酵母により代謝されている間は活性酸素種はわずかしが生成されず、酸化ストレスを受けないため、2-methyl-1,4-NQより有効な電子メディエータといえる。

## 2.3. 酵母培養時における活性変化の測定

そこで、2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQ及びWST-1を用いた測定法を実際の培養系における酵母活性のモニタリングへ適用し、発色度の変化が培養過程における酵母の活性変化を反映しているかどうか、つまり、対数増殖期、定常期を経て死滅期へ至る過程を反映しているかどうかを調べた(Fig. 7)。菌体密度(660 nm)は時間の経過とともに増大していき、約24時間で菌体はフルグロースに達し、それ以降変化はみられなかった。一方、発色度(440 nm)

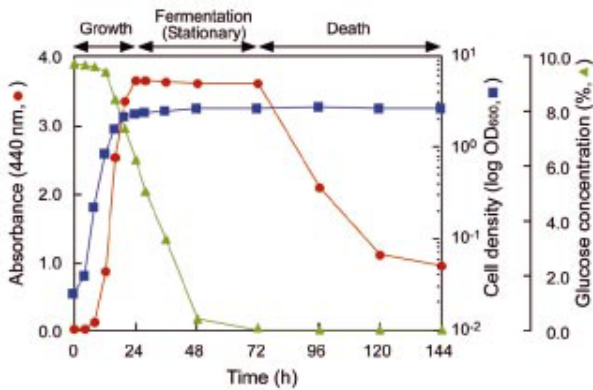


Fig. 7 Time course for the absorbance, cell density, and glucose concentration.

Yeast cells were grown at 30°C in a medium containing 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, and 10.0% glucose.

は24時間で最大に達し、72時間までほぼ一定値を示したが、それ以降は低下がみられた。これは、72時間で培地中のグルコースがほぼ消費されたため、細胞内NAD(P)H量が低下し、その結果、キノンの代謝活性が低下したものと考えられる。このように得られた発色度は見かけ上の菌体密度とは異なり、対数増殖、定常及び死滅期における生命活動を反映したものであると考えられる。本法は、酵母の細胞数あるいは同一発酵系における活性変化を迅速かつ簡便に測定できる手法であり、様々な発酵食品の製造工程の管理への応用が期待できる。

### 3. 発色反応機構の解明

2,3,5,6-Tetramethyl-1,4-BQ及びWST-1を用いた発色反応はFig. 2(A)のような機構で起こっていると考えられる。そこで、電気化学的手法や電子スピン共鳴法を用いて発色反応機構の検証を行った。また、酵母による代謝産物であるヒドロキノン体の酸化特性を検証することで、本法において2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQが最も効率的な電子メディエータであることを明らかにした。

#### 3.1. 発色反応機構におけるラジカルの関与

まず、Fig. 2(A)に示す2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQを電子メディエータとして用いた際の発色反応機構を立証するために、電子スピン共鳴法を用いて反応に関与していると考えられる $O_2^{\cdot -}$ 及びセミキノラジカルの検出を試みた (Fig. 8)<sup>6)</sup>。その結果、好気条件下において酵母により2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQを代謝させた際のDMPO付加体のESRスペクトルは、ヒポキサンチン/キサンチンオキシダーゼ系で生じる $O_2^{\cdot -}$ 由来のDMPO付加体のスペクトルと同様なものであった。さらに、酵母の2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQ代謝系にSODを添加して測定を行ったところスペクトルは消失した。この結果より、 $O_2^{\cdot -}$ が発色反応に関与していることが確認できた。一方、嫌気条件下で酵母により2,3,5,6-

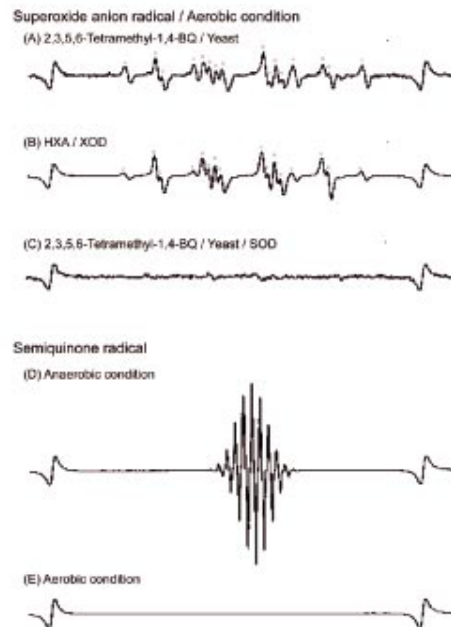


Fig. 8 ESR spectra of superoxide anion radical and semiquinone radical.

tetramethyl-1,4-BQを代謝させた後、アルカリ条件にするとセミキノラジカルのスペクトルが得られ、さらに、上記の系を好気条件へ移行させたところ、スペクトルは消失した。この結果より、セミキノラジカルも本反応に関与していることが確認でき、Fig. 2(A)の発色反応機構におけるラジカル種の関与を立証することができた。

#### 3.2. ヒドロキノン体の酸化特性

ところで、第2節の中で少し触れたが、ベンゾキノンから酵母により代謝されて生成したヒドロキノン体は中性pH付近では比較的安定に存在するため、電極を用いて電気化学的に測定することができる。したがって、この手法によっても酵母活性の測定が可能である。測定方法は、酵母を懸濁させた溶液に電極(作用電極: グラッシーカーボン電極、参照電極: 銀・塩化銀電極、対極: 白金電極)を挿入し、電子メディエータを添加して酸化電流をモニターするという単純な系で行うことができる<sup>7)</sup>。WST-1を用いた発色法も同様に酵母により代謝されて生成したヒドロキノンを検出しているため、電気化学法と発色法により得られた結果には相関性があるように思えるが、適用するベンゾキノンの種類により結果が著しく異なるという現象が見られた。Fig. 9は7種類の1,4-BQ誘導体を酵母に代謝させ、発色法及び電気化学法で測定した結果を比較したものである。この結果から検出されたヒドロキノン量がほぼ一致しているのは2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQのみで、他のベンゾキノンでは一致が見られないことがわかる。電気化学法では生成したヒドロキノン量を直接電極でモニターしているため、正確な値と考えられる。したがって、発色法において何らかの影響で生成したヒドロキノン量に比例した発色度が得られていないものと考えられる。何故、そのような現象が

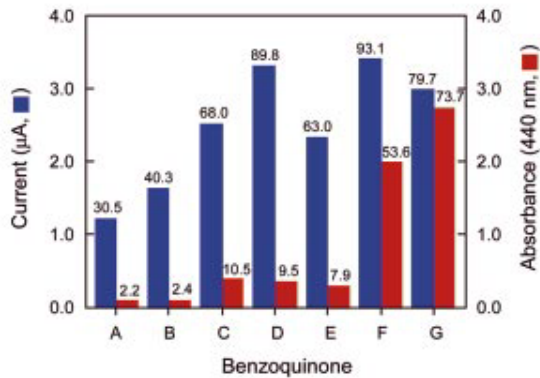


Fig. 9 Comparison of the amounts of hydroquinones measured by the colorimetric and electrochemical method.

Colorimetric method (red bar): the same procedure as shown in Fig.4.

Electrochemical method (blue bar): the same procedure as shown in Fig.6.

The figures on the bars represent the yields as hydroquinone (μM). A, 1,4-BQ; B, 2-methyl-1,4-BQ; C, 2,3-dimethyl-1,4-BQ; D, 2,5-dimethyl-1,4-BQ; E, 2,6-dimethyl-1,4-BQ; F, 2,3,5-trimethyl-1,4-BQ; G, 2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQ.

みられるのか？ 1つの仮定として、ヒドロキノンが酸化される過程で生成する  $O_2^{\cdot -}$  がテトラゾリウム塩を還元する経路とは別に、 $O_2^{\cdot -}$  がさらに1電子還元を受けて過酸化水素が生成する経路があるのではないかと考えた。

そこで、酵母による代謝産物である各ヒドロキノン体の酸化特性を調べるために、7種類の1,4-HQ誘導体をテトラゾリウム塩共存下でアルカリ条件において生じるホルマザン色素量及び過酸化水素量を測定した。Table 1は50 nmolの各ヒドロキノンから得られたホルマザン色素及び過酸化水素量である。2,3,5,6-Tetramethyl-1,4-HQではほぼ100%の効率でホルマザンが生成したのに対して、1,4-HQや2-methyl-1,4-HQではホルマザンの生成はほとんど起こらず、代わりに過酸化水素が生じることが明らかとなった。また、ジメチルやトリメチル体ではホルマザンと過酸化水素が一定の割合で生じた。さらに、ホルマザン量と過酸化水素量の合計が最初に加えたヒドロキノンのモル量とほぼ一致することから、1分子のヒドロキノンからは1分子のホルマザン色素あるいは過酸化水素が生成することがわかった。

以上の結果から、アルカリ条件下におけるヒドロキノンの酸化反応はFig.10のようなスキームで進行するものと考えた<sup>8-11)</sup>。ほぼ100%の効率でホルマザンが生成する2,3,5,6-tetramethyl-1,4-HQはアルカリ条件下で酸化されて、まず、反応式(1)のように $O_2^{\cdot -}$ とセミキノンラジカルが生成する。セミキノンラジカルは反応式(2)で酸化されてさらに $O_2^{\cdot -}$ を与え、この $O_2^{\cdot -}$ が反応式(5)でテトラゾリウム塩WST-1を還元する。したがって、反応式(1)、(2)及び(5)より、見かけ上、2,3,5,6-tetramethyl-1,4-HQは反応式(6)を経ることになり、1分子のヒドロキノンからは1分子のホルマザンが生成することになる。一方、発色がほとんど見られな

Table 1 Parameters in the reaction scheme for the autoxidation of hydroquinones

Hydroquinone (50 nmol)	Formazan <sup>a</sup>		$H_2O_2$ <sup>b</sup>		Total (%)
	(nmol)	(%)	(nmol)	(%)	
1,4-HQ	0.80	1.6	47.20	94.4	96.0
2-Methyl-1,4-HQ	2.45	4.9	48.65	97.3	102.2
2,3-Dimethyl-1,4-	18.20	36.4	32.85	65.7	102.1
2,5-Dimethyl-1,	18.25	36.5	33.55	67.1	103.6
2,6-Dimethyl-1,4-HQ	17.25	34.5	36.20	72.4	106.9
2,3,5-Trimethyl-1,4-HQ	38.85	77.7	7.60	15.2	92.9
2,3,5,6-Tetramethyl-1,4-HQ	49.75	99.5	0.20	0.4	99.9

(Final amount of HQs: 50 nmol)

<sup>a</sup> The produced formazan was measured at 440 nm with a spectrophotometer.

<sup>b</sup> Peroxidase (4.58 U), 0.34 mM 4-aminoantipyrine and 0.34 mM TOOS were added to the reaction mixture at the final concentration. After incubating the solution at 37 °C for 10 min, the produced condensate was measured at 555 nm with a spectrophotometer.

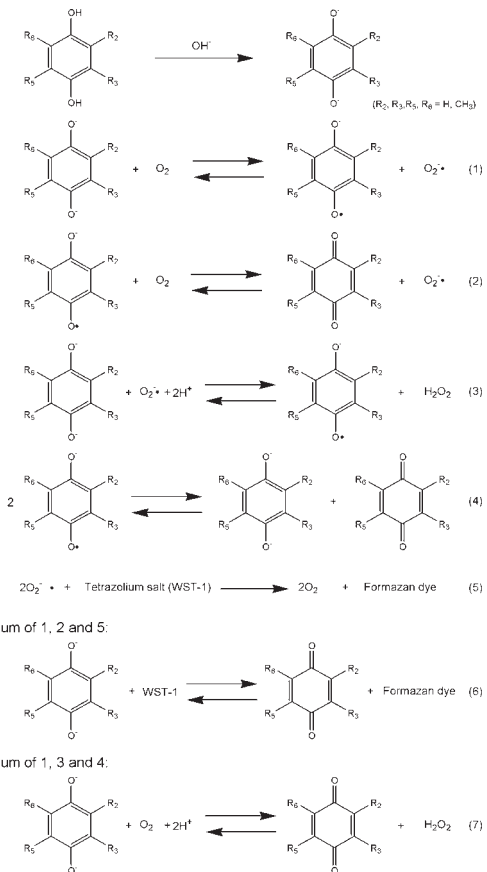


Fig. 10 Stepwise oxidation of hydroquinones under alkaline conditions.

い1,4-HQなどでも、まず反応式(1)によりセミキノンラジカル及び $O_2^{\cdot -}$ が生成すると考えられる。しかし、生成した $O_2^{\cdot -}$ は反応式(5)でWST-1を還元するよりも、反応式(3)のように1,4-HQ自身と反応して過酸化水素を生成し、一方、セミキノンラジカルは



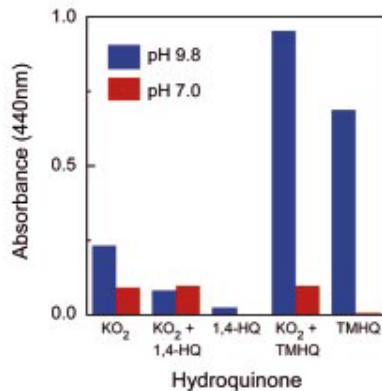


Fig. 11 Reactivity of hydroquinones with superoxide anion radicals. The solution of 0.06 mM KO<sub>2</sub> in DMSO and 0.02 mM derivatives of 1,4-HQ were added simultaneously in a final concentration to 50 mM carbonate buffer (pH 9.8, blue bar) or 50 mM phosphate buffer (pH 7.0, red bar) containing 0.24 mM WST-1 and 0.1 mM EDTA. 2,3,5,6-Tetramethyl-1,4-HQ was shown as TMHQ.

反応式(4)のように不均化反応を起こす。したがって、反応式(1)、(3)及び(4)より、見かけ上、1,4-HQなどは反応式(7)を経ることになり、1分子のヒドロキノンからは1分子の過酸化水素が生成することになる。つまり、1,4-HQと2,3,5,6-tetramethyl-1,4-HQのいずれのヒドロキノン体でもまず反応式(1)でセミキノンラジカルとO<sub>2</sub><sup>•-</sup>が生じ、次に反応式(5)のようにO<sub>2</sub><sup>•-</sup>が先にWST-1を還元して発色するか、反応式(3)のようにO<sub>2</sub><sup>•-</sup>がWST-1より先にヒドロキノン自身と反応して最終的に過酸化水素を与えるかの違いがあると考えられる。

そこで、本当にヒドロキノンの種類の違いでO<sub>2</sub><sup>•-</sup>が先にWST-1を還元して発色したり、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>がWST-1より先にヒドロキノン自身と反応して最終的に過酸化水素を与えるようなことが起こりうるのか調べるために、外来のO<sub>2</sub><sup>•-</sup>と1,4-HQあるいは2,3,5,6-tetramethyl-1,4-HQとの反応性の比較を行った(Fig.11)。外来のO<sub>2</sub><sup>•-</sup>は超酸化カリウムを用いて誘導した。その結果、pH9.8において超酸化カリウムのみの場合は一定の発色を与えたが、ここへ1,4-HQを共存させると発色は著しく阻害された。これは、超酸化カリウムから生じたO<sub>2</sub><sup>•-</sup>がWST-1を還元するよりも先に1,4-HQと反応したことを示すものである。一方、2,3,5,6-tetramethyl-1,4-HQはそれのみでも一定の発色を示すが、過酸化カリウムと共存させると、その分だけ発色度も増加した。このように、WST-1の還元反応はヒドロキノンの酸化特性の違いに大きく左右されることが明らかとなった。

以上の結果は、WST-1の還元反応を利用する本法において、2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQが最も効率的な電子メディエータであることを支持するものである。

#### 4. 検出の高感度化

以上述べてきたように、酵母によるキノンの代謝にはヒドロキノン体から生じる活性酸素種、特にO<sub>2</sub><sup>•-</sup>や過酸化水素が反応に関与していることが明らかとなった。特に2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQを用いた測定系ではO<sub>2</sub><sup>•-</sup>が反応に大きく関与していることから、WST-1の代わりにO<sub>2</sub><sup>•-</sup>を検出する発光プローブを使用すれば、発光法による高感度化が期待できる。本法では最終的にNaOH水溶液を添加してアルカリ条件下で検出を行うことから、アルカリ条件下で高感度な測定が可能なルシゲニンを発光プローブとして選定した。そこで、ルシゲニンと2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQとの組み合わせにおいて最適条件を設定し、酵母密度の測定を行った(Fig.5)。その結果、30分の反応で1.2 × 10<sup>3</sup> ~ 4.8 × 10<sup>4</sup> cells/mlの範囲で測定が可能になり、発色法と比べて約100倍の感度を実現することができた。この方法は微生物の高感度検出への応用が期待できる。

#### 4. おわりに

本稿では、水溶性テトラゾリウム塩WST及び電子メディエータを用いた酵母活性測定法の開発について、発色反応機構の解明も交えて紹介した。今回使用したテトラゾリウム塩WST-1は還元体であるホルマザンが高い水溶性を有しているのが特徴である。既存のテトラゾリウム塩、例えばMTTやNBTは還元を受けると不溶性のホルマザンが生成されるため、細胞内組織や細胞表面へ沈着してしまい、分光学的に測定するためには適当な溶剤で溶解させるステップを踏まなくてはならない。これに対して、WSTは溶解操作も不要であり、リアルタイム計測への適用も可能である。しかし、カチオニックな構造を有するMTTやNBTは細胞膜を透過して細胞内へ入っていくことができるのに対して、水溶性を高めるためにスルホン酸基を導入したWST-1はアニオン性が高められたため、細胞内へ入っていくことができないと考えられる。そこで、電子の受け渡しを仲介する電子メディエータを併用することで細胞活性に依存したWST-1の還元を実現した。したがって、電子メディエータの選択は細胞活性を測定する上で非常に重要なものといえる。今回は、モデル系として清酒酵母を対象に代謝活性の比較や発色反応機構の検証を行い、本法において2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQが電子メディエータとして最適であるという結論に至った。しかし、他の微生物への適用を想定した場合、さらなる電子メディエータの検討が必要である。

我々は、これまでに得られた知見に基づき、現在、酵母以外の微生物への適用を図っており、電子メディエータと水溶性テトラゾリウム塩WSTシリーズを組み合わせた微生物検出用キットの開発にも取り組んでいるところである。近い将来、このような手法が微生物検出へ利用されることを期待したい。

#### 謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なご支援、ご教授をいただきました九州大学大学院農学研究院の松本清教授、高知大学農学部の受田浩之教授に深く感謝いたします。



参考文献

- 1) M. Sami, M. Ikeda, and S. Yabuuchi, *J. Ferment. Bioeng.*, **1994**, *78*, 212.
- 2) European Brewing Convention., *J. Inst. Brew.*, **1997**, *83*, 109.
- 3) H. Patino, C. Edelen and J. Miller, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **1993**, *51*, 128.
- 4) T. Imai, I. Nakajima and T. Ohno, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **1994**, *52*, 5.
- 5) M. V. Berridge, P. M. Herst and A. S. Tan, *Biotechnology Annual Review*, **2005**, *11*, 127.
- 6) T. Tsukatani, T. Oba, H. Ukeda and K. Matsumoto, *Anal. Sci.*, **2003**, *19*, 659.
- 7) T. Tsukatani, S. Ide, T. Oba, H. Ukeda and K. Matsumoto, *Food Sci. Technol. Res.*, **2003**, *9*, 271.
- 8) T. Tsukatani, S. Ide, H. Ukeda and K. Matsumoto, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2004**, *68*, 1525.
- 9) T. Nakayama, M. Hashimoto and K. Hashimoto, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1997**, *618*, 2034.
- 10) R. Jarabak and J. Jarabak, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1995**, *318*, 418.
- 11) F. Guillen, M. J. Martinez, C. Munoz and A. Martinez, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1997**, *339*, 190.

著者プロフィール

氏名：塚谷 忠之 (Tadayuki Tsukatani)

年齢：37 歳

所属：福岡県工業技術センター 生物食品研究所 食品課

連絡先：〒 839-0861 福岡県久留米市合川町 1465-5

TEL (0942)30-6644 FAX (0942)30-7244

tukatani@fitc.pref.fukuoka.jp

出身学校：九州大学大学院農学研究科食糧化学工学専攻

学位：博士 (農学)

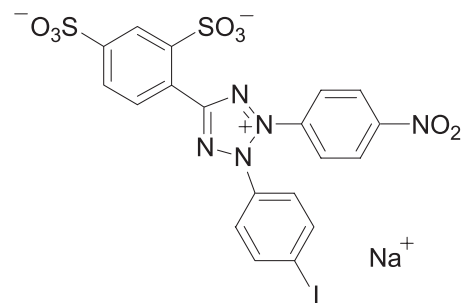
現在の研究テーマ：

- ・電子メディエータを用いた微生物検出法の開発
- ・固定化酵素リアクターを用いた食品成分のフローインジェクション分析

趣味：テニス、阪神タイガース応援

関連製品

WST-1



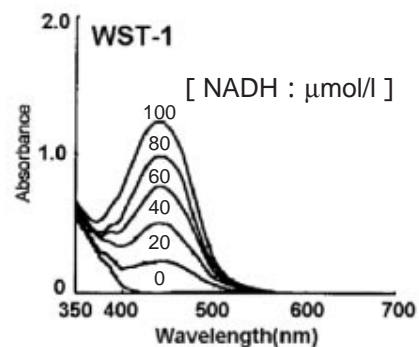
2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt  
 $C_{19}H_{11}IN_5NaO_8S_2=651.35$

脱水素酵素の検出試薬、細胞増殖測定用試薬として使用することができます。

これまで、生化学分野において還元型発色試薬のMTTが広く利用されてきていますが、MTTから生じるホルマザンは水に難溶性な結晶として細胞表面に析出するため、吸光度測定時にはそれを溶解させ均一溶液にする操作が必要になり、使用する際に問題とされてきました。しかし、WST-1は水溶性ホルマザンを生じるので反応時に沈殿を生じません。また、1-Methoxy PMSを電子キャリアーとして用いることで、脱水素酵素により還元され黄色ホルマザン ( $\lambda_{max}=438 \text{ nm}$ ,  $\epsilon=3.7 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ )を生じます。生じたホルマザンは0.1 mol/l以上の濃度で水に溶解します。

これまでも小社にて、細胞増殖測定キット[Cell Counting Kit]やSOD様活性測定キット[SOD Assay Kit-WST]に応用しております。

今後も様々な分野で使用されていくことが期待されます。



品名	容量	価格(¥)	コード	メーカーコード
WST-1	25 mg	9,000	342-06451	W201
	100 mg	19,200	348-06453	W201
	500 mg	64,600	346-06454	W201

# エイズからみた 感染症研究の最前線

その7

HIV に対するヒト CTL 免疫応答

熊本大学 エイズ学研究センターウイルス制御分野 上野 貴将

## 1、HIV に対する CTL のはたらき

HIV はヒトに感染すると激しく増殖するが、やがてウイルス量の上昇は抑えられる。HIV 感染に対して、ヒト免疫系はインターフェロンやナチュラルキラー細胞等による自然免疫系に続いて獲得免疫系を誘導する。急性感染期には中和抗体はほとんど認められないが、細胞傷害性 T 細胞(CTL)応答とともにウイルス量が減少するため、CTL 応答が HIV 封じ込めに重要であると考えられている(Fig.1)。しかしながら、ヒト免疫系では HIV を完全に排除することはできず、多くの感染者では慢性持続感染が成立して病態が進行する(Fig.1)。CTL がどのように HIV を抑制するか、HIV はどのように CTL を中心とする免疫応答から逃避するかを理解することは、重要な課題であるばかりでなく、今後のワクチン開発に必須であり、世界中で盛んに研究されている。

CTL は、HLA クラス II 分子に提示された HIV 由来ペプチドを認識して、HIV 感染細胞を攻撃する(Fig. 2)。HLA クラス II はヒトゲノムで最も多型の著しい遺伝子で、HLA クラス II 分子のペプチド結合部位に多くの多型変異が集中している。この部位の構造は CTL に提示する抗原ペプチドの種類を決めるため(たとえば HLA-B\*35 という HLA クラス II 分子は、2 番目がプロリンで C 末端がチロシンの 9 から 11 個のアミノ酸で構成されるペプチドを好む)、CTL 応答の抗原特異性は各個人がどの HLA クラス II アリルを持つかで規定されている(これを HLA 拘束性と呼ぶ)。HIV 感染に対する CTL の攻撃手段としては、ターゲット細胞を直接的に殺傷する、抗ウイルス性サイトカインを放出する、CTL 自身が成熟し増殖することである(Fig. 2)。これまでの研究から、すべての CTL が等しく抗ウイルス機能を有するのではなく、ある特定の CTL 集団が HIV 感染制御に有効であることが分かってきた<sup>1-4)</sup>。

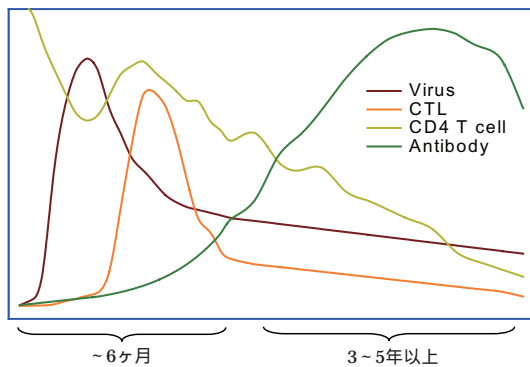


Fig.1 HIV 感染経過と CTL 応答

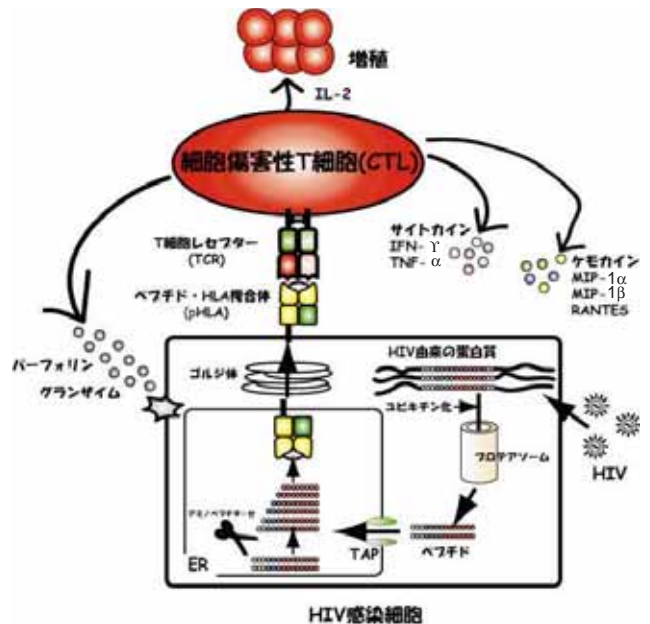


Fig. 2 HIV 抗原の提示と CTL 応答

細胞内で発現した HIV 由来蛋白質は、ユビキチン化された後、プロテアソームでペプチドに分解される。ペプチドは、トランスポーター(TAP)を介して粗面小胞体(ER)内に輸送され、アミノペプチダーゼにより 8 ~ 11mer の長さまでトリミングされる。その後、HLA クラス II 分子と結合してペプチド-HLA 複合体(pHLA)を形成し、ゴルジ体を経由して細胞表面に輸送される。細胞表面に提示された pHLA は、T 細胞レセプター(TCR)を介して、細胞傷害性 T 細胞(CTL)に認識される。CTL は、パーフォリン、グランザイムを放出し、HIV 感染細胞を殺傷する。MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES などのケモカインならびに IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  などのサイトカインを産生し、HIV の細胞内への侵入阻止ならびに HIV の増殖を抑制する。IL-2 を産生し増殖する。

## 2、HLA 遺伝子多型と HIV

HIV 感染症の病態には個体差がある。同じウイルスに感染したとしても、ヒトによって病態の良し悪しが大きく異なることが知られている。HIV に感染しても病態が長期に渡って進行しない感染者(Long-Term Non Progressor; LTNP)や、HIV 複製を低レベルに抑え込み続ける感染者(Elite Controller; EC)が、総 HIV 感染者の約 0.3 から 1% 程度認められている<sup>2)</sup>。こうしたケースでは、感染したウイルスに何らかの欠損があったという場合も稀に報告されているが、ほとんどは宿主のさまざまな遺伝学的要因(あるいはそれらの複雑な相互作用)に因ると考えられている。こうした検体を用いて、HIV 感染症に防御的に働くヒト遺伝子をハプロタイプレベルで包括的に明らかにしようとする試みがアメリカ、ヨーロッパ、アフリカで大規模に進められている<sup>2,5)</sup>。興味深いことに、CTL 応答を拘束する HLA クラス II 遺伝子の多型性が HIV 制御に大きく影響する。HLA クラス II は HLA-A, B, C という 3 つの多型性アリルで構成されるため、一人当たり最大 6

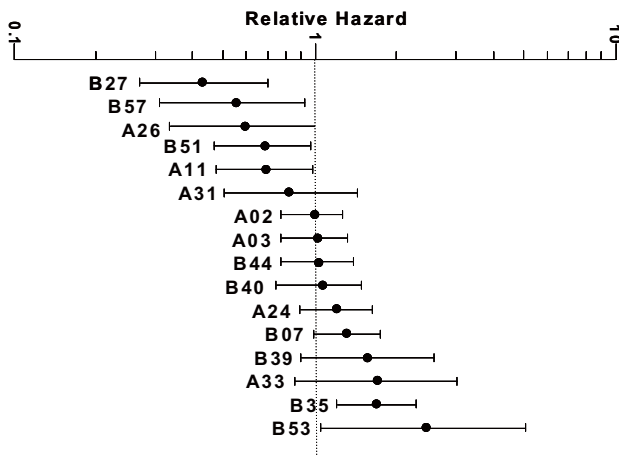


Fig.3 エイズ病態進行とHLAアリル  
 文献6のデータを基に図を改変した。HLA-A2アリルを持つ感染者を規準として、他のHLAクラスIアリルを持つ感染者の病態進行を相対的に比較した。Relative Hazardが高いほど病態が進行するリスクが大きいことを示す。これらのうち、HLA-B\*27, B\*57, B\*53は日本人では極めて頻度の低いアリルである。

種類のHLAクラスI分子がCTLに抗原を提示する。多数のHIV感染者のHLAクラスIアリルと病態を調べたところ、同一のアリルを両染色体上に持つ(homozygote)感染者では、異なるアリルを持つ(heterozygote)感染者に比べて、病態の進行が有意に早いことが報告された<sup>6)</sup>。各HLAクラスI分子が異なった抗原ペプチドをCTLに提示することを考えると、heterozygoteの方がCTLがより広くHIV抗原に应答できるため、HIV制御に有効になると考えられている。さらに、個々のアリルについて調べると、HLA-B\*57やHLA-B\*27アリルを持つ感染者では病態進行が遅いが、反対にHLA-B\*53アリルを持つ感染者では進行が早かった(Fig. 3)。このことは、HLA-B\*57やB\*27分子が拘束するCTLの中には、HIV封じ込めに優れた活性を示すものが多く含まれていることを示唆している。

ここで一点、注意しておきたい。HLA-B\*57やB\*27アリルと病態進行に統計学的に有意な相関が認められることは、こうしたアリルを持つヒトではHIVに感染しても病態が安定することを保証していない。HLA-B\*57アリルを持っていてもLTNPやECになる感染者はごくごく一部である。他の遺伝的あるいは環境要因が関与していると考えられる。一方、日本人にはどちらのアリルも極めて少ない。血友病HIV感染者のLTNPではHLA-B\*51アリル頻度が有意に高いとする報告もあるが、最近の感染者においてもこの傾向が認められるか不明である。日本人を対象としたより包括的な解析が待たれる。

### 3、CTL 淘汰圧と HIV 進化

これまで述べてきたようにCTLは非常に強く生体内でHIVを抑制する。それでは、CTLは強い淘汰圧としてHIVの進化に広く影響するのだろうか？ CTLが認識する抗原は、その人が持つHLAクラスIアリルに依存する。もしCTL逃避変異が多くのHIV感染

者で広範に起きるとすれば、同じHLAクラスI分子を持つ感染者に共通したHIV変異パターンが見出されるはずである。我々は50人以上の日本人HIV感染者から分離したウイルスを用いてHIV変異とHLA-B\*35アリルの有無を調べたところ、HLA-B\*35を持つ人ではHLA-B\*35拘束性CTL抗原の内部に変異が認められ、この変異によって実際にCTL応答から逃避することを報告した<sup>7)</sup>。さらにオーストラリア、カナダおよび南アフリカなどの大規模コホート(HIV感染者をそれぞれ400人以上集めている)で、感染者のHLAクラスIアリルとHIV変異の関係が集団遺伝学的アプローチで解析された。その結果、多くのHIV変異が感染者のHLAクラスIアリルと相関することが明らかになった<sup>8,9)</sup>。たとえば、nef遺伝子はHIVの中でも変異性の高い領域として知られているが、驚くことにNefの全アミノ酸の約半分に相当する84ヶ所がHIV感染者のHLAクラスI遺伝子型と相関する変異であった<sup>8)</sup>。こうしたことから、HLAクラスI拘束性のCTL免疫応答は、HIVに対して非常に強い淘汰圧として働いていることが示された。

HIVは変異性が高いウイルスであるが、ウイルス蛋白質の機能や構造、あるいはウイルス複製にとって必須な領域はよく保存されている。このような保存性の高い機能性領域に逃避変異を獲得することは容易ではないだろう。Nefは多数の宿主因子と相互作用して生体内でのHIVの複製を増強させる病原性因子であるが、その一方CTLが頻繁に標的とすることも知られている。我々は、Nefの最も重要な機能性領域で保存性の高いPxxPモチーフをターゲットとするCTL応答を解析した。その結果、HIVはCTL逃避変異体を選択するが、同時にその変異はNefのウイルス複製増強作用を減弱化させることを見出した<sup>10)</sup>。また、興味深いことにHIV感染制御と関連するHLA-B\*57やHLA-B\*27に拘束性のCTLでは、カプシドを構成する蛋白質(p24 Gag)に対して非常に強い応答を示す。CTL応答によって変異体が選択されるが、CTLから逃避しても変異ウイルスの複製が十分に回復しないことが報告された<sup>11,12)</sup>。CTLがターゲットした領域は、カプシドの複合体構造形成やサイクロフィリンAとの結合などウイルス複製に極めて重要であった<sup>12)</sup>。さらに、この変異ウイルスが他の宿主に伝染すると、次の宿主がHLA-B\*57を持たないときには変異は速やかに野生型に復帰することが分かった<sup>9,11)</sup>。これらの観察結果は、HIVに対するCTL応答の中には、HIV複製をきわめて重要な役割を担う領域を標的としており、そうしたCTLはHIVに対して非常に強い淘汰圧として働いていることを示している。

このようにHIVは確かに極めて高い変異性を利用してCTLから逃避するが、CTLが標的とする領域を適切に選択することができれば、ウイルス複製を機能的に制御することが可能となるかもしれない。HIVが自身の骨身を削ってでも逃げなければならないほど強いCTL応答を誘導し、その活性を長期にわたって維持できる合理的な免疫誘導法(ワクチン)の開発が待たれる。



## [参考文献]

1. A. J. McMichael and Rowland-Jones SL: Cellular immune responses to HIV. *Nature*, **2001**, 410, 980.
2. S.G. Deeks and B. D. Walker, Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity*, **2007**, 27, 406.
3. P. K. Kiepiela, *et al.*, CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load., *Nat. Med.*, **2007**, 13, 46.
4. T. Ueno, *et al.*, Functionally impaired HIV-specific CD8 T cells show high affinity TCR-ligand interactions, *J. Immunol.*, **2004**, 173, 5451.
5. J. Fellay, *et al.*, A whole genome association study of major determinants for host control of HIV-1, *Science*, **2007**, 317, 944.
6. S. J. O'Brien, *et al.*, HLA and AIDS: a cautionary tale, *Trends Mol. Med.*, **2001**, 7, 379.
7. T. Ueno, *et al.*, Altering effects of antigenic variations in HIV-1 on antiviral effectiveness of HIV-specific CTLs, *J. Immunol.*, **2007**, 178, 5513.
8. Z. Brumme, *et al.*, Evidence of differential HLA class I-mediated viral evolution in functional and accessory/regulatory genes of HIV-1, *PLoS Pathog.*, **2007**, 3, e94.
9. P. J. R. Goulder, D. I. Watkins, HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design, *Nat. Rev. Immunol.*, **2004**, 4, 630.
10. T. Ueno, *et al.*, CTL-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef, *J. Immunol.*, **2008**, 180, 1107.
11. A. J. Leslie, *et al.*, HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission, *Nat. Med.*, **2004**, 10, 282.
12. M. A. Brockman, *et al.*, Escape and compensation from early HLA-B57-mediated cytotoxic T-lymphocyte pressure on human immunodeficiency virus type 1 Gag alter capsid interactions with cyclophilin A, *J. Virol.*, **2007**, 81, 12608.

## 著者プロフィール



氏名：上野 貴将(うへの たかまさ)  
 所属：熊本大学 エイズ学研究センター ウイルス制御分野  
 住所：〒860-0811 熊本県熊本市本荘2-2-1  
 連絡先：TEL:096-373-6530 FAX:096-373-6532  
 e-mail: uenotaka@kumamoto-u.ac.jp

## 開催のご案内

## 19<sup>th</sup> フォーラム・イン・ドージン 細胞膜脂質のダイナミクス

日時：2008年11月28日(金)9:30-16:50(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/200名

代表世話人/山本 哲郎(熊本大学大学院医学薬学研究部 分子病理学分野)  
 当番世話人/赤池 孝章(熊本大学大学院医学薬学研究部 微生物学分野)  
 入江 徹美(熊本大学大学院医学薬学研究部 薬剤情報分析学分野)  
 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

主催者挨拶/野田 栄二 株式会社 同仁化学研究所  
 世話人挨拶/山本 哲郎

< Overview > 三浦 洸 株式会社 同仁化学研究所

Session 1: <座長：山本 哲郎>

楠見 明弘 京都大学 物質・細胞統合システム拠点(アイセムス)  
 「1分子で見る細胞膜がはたらく仕組み」

小林 俊秀 (独) 理化学研究所 小林脂質生物学研究室  
 「脂質を見ることで見えてきたもの」

花田 賢太郎 国立感染症研究所 細胞化学部  
 「セラミドの細胞内選別輸送」

Session 2: <座長：赤池 孝章>

佐藤 圭創 熊本大学大学院医学薬学研究部 薬物治療学分野  
 「脂質ラジカル研究におけるESR Spin trap extractionの有用性」

野口 範子 同志社大学生命医科学部 医生命システム学科  
 「脂質酸化生成物による遺伝子発現制御」

Session 3: <座長：入江 徹美>

東城 博雅 大阪大学大学院 医学系研究科 医化学講座  
 「病態リビドミクスの方法と応用」

有馬 英俊 熊本大学大学院医学薬学研究部 製剤設計学分野  
 「膜脂質マイクロドメイン解析におけるシクロデキストリンの有効利用とその治療への応用」

閉会の挨拶/三浦 洸  
 ミキサー・自由討論

尚、ランチョンセミナー(無料)ならびに講演終了後にミキサー(無料)を同会場にて予定しております。

ランチョンセミナーは当日の朝、受付時の先着とさせていただきます。

お問い合わせ・参加申し込み先：

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(かばの))  
 Tel:0120-489548, Fax:0120-021557 E-mail:info@dojindo.co.jp

参加ご希望の方は、ご所属・ご氏名・ご連絡先(住所,TEL,FAX,E-mail)をご記入の上、E-mailまたはFAXにてお申し込みください。

尚、駐車場は有料となりますので、公共の交通機関をご利用ください。(聴講によるご優待はございません)

# Topics on Chemistry

## 新しいタンパク質タグを用いた蛍光標識法

同仁化学研究所 池田 千寿

細胞内タンパク質の発現量や局在状態、他のタンパク質との相互作用やコンフォメーション変化は細胞機能を明らかにする為の重要な情報である。近年、そのような細胞内情報の解析には蛍光を用いる方法が主流となってきている。この理由の一つは有用な蛍光標識プローブの数や種類が急増しているためである。

細胞内タンパク質を標識する方法として最も良く用いられる手法の一つが、GFP (オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質) に代表される蛍光タンパク質を用いる方法である。GFP目的タンパク質に遺伝子レベルで融合してキメラタンパク質として細胞内で発現させ、発現タンパク質の分布の変化をGFPの蛍光で観測する。最近では、GFPに変異を導入して蛍光の色を変化させたYFP (黄色)、CFP (シアン) や蛍光量子収率を向上したEGFP、Venusなども用いられている。

また、SNAP-TagやHalo-Tag、FIAsHなど、目的タンパク質に蛍光性を持たないタンパク質やペプチドをタグとして融合発現させ、それらタグと特異的に結合する蛍光分子を用いて標識する方法も近年数多く報告され、利用されてきている。

こうした中、最近、WaggonerらはFluorogen activating proteins (FAPs) と呼ぶタンパク質タグを用いる方法を報告している<sup>1)</sup>。これは、チアゾールオレンジ(TO)やマラカイトグリーン(MG)などのFluorogen (単独では弱い蛍光しか持たないが、何らかの物質と結合するなどにより蛍光強度が増強する色素) がタンパク質タグと結合することにより、強い蛍光を発することを利用したものである。このようなFluorogenを細胞に加えることで、タンパク質タグを発現させた目的タンパク質を蛍光で可視化することができる。

FAPsを得るために、Waggonerらはヒト一本鎖抗体(scFVs)を利用した。ヒトscFVsは幅広い抗原認識能を持った比較的小さなタンパク質(30kDa以下)であり、タグとしても利用可能である。酵母表面に発現させた可変領域の異なる $10^9$ 個程度のscFVsライブラリを利用して、Fluorogenと結合し蛍光増強するscFVsを単離した。

TOはDNAにインターカレートすることにより蛍光増大することが知られている分子である。そこで、DNAとの結合によるパツ

クグラウンドを減少するため、及び水溶性向上のためにスルホン酸基が導入されたTO誘導体(TO1)が合成された。TO1やMGをPEG-Biotinと結合させ、ストレプトアビジンやanti-Biotin磁気ビーズを用いることでFluorogenと結合するscFVsライブラリを絞り込み、さらにFluorescence activated cell sorting (FACS)を用いて蛍光を発するscFVsを絞り込んだ。その後、抗原構造や水溶性を保持するためにTO1やMGをジエチレンジグリコールアミンと結合したTO1-2pとMG-2pを用いて選別を進め、TO1-2pに対して2つ、MG-2pに対して6つの蛍光を増幅するクローンがライブラリから単離された。

このようにして得たFAPsの内、最も小さいものは110のアミノ酸からなり、GFPの半分以下のサイズであった。FluorogenとFAPsの解離定数は数ナノ~数百ナノmol/lであった。FAPsの結合によるFluorogenの蛍光増幅は最大のもので18,000倍であり、これはFIAsH試薬の50,000倍には劣るものの、他の抗体/Fluorogen複合体の40~100倍と比べると非常に大きいものである。結合力や蛍光強度、励起スペクトル、蛍光スペクトルの形はFAPsを変える事により変化した。またMG-2pのアナログであるMG ester、Crystal violet、MGを用いた検討から、同じFAPsを用いてもFluorogenの構造を変えることで異なるスペクトルが得られた。これらの結果はFluorogen-FAPsの組み合わせにより、多彩な蛍光特性をもつ標識が可能であることを意味しており、FAPsを発現している細胞の多重染色の可能性を広げるものである。

このように、多重蛍光染色によって複雑な細胞の機能を直接モニターするために、本システムは非常に有効な方法の一つであると考えられる。Fluorogen-FAPsの設計には柔軟性があることから、今後更に進化した組み合わせが開発され、細胞機能解明のための重要なツールになっていくものと期待される。

### 参考文献

- 1) C.Szent-Gyorgyi, B. F. Schmidt, Y. Creeger, G. W. Fisher, K. L. Zakel, S. Adler, J. A. J. Fitzpatrick, C. A. Woolford, Q. Yan, K. V. Vasilev, P. B. Berget, M. P. Bruchez, J. W. Jarvik and A. Waggoner, *Nat. Biotechnol.*, **2008**, 26 (2), 235-240.

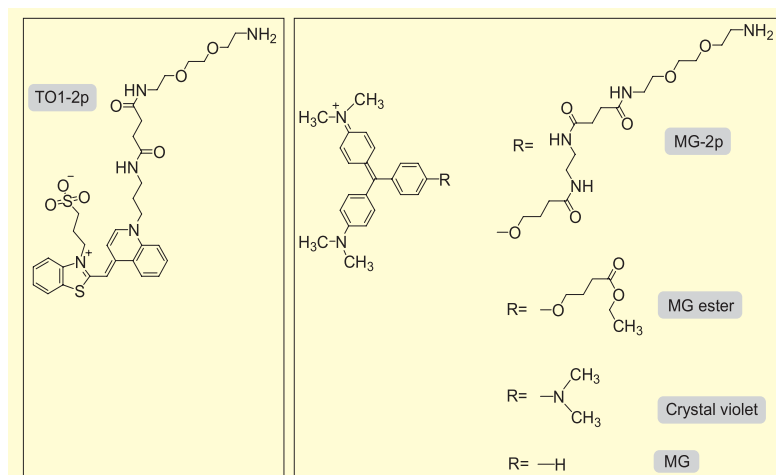


Fig.1 Fluorogenの構造

試作品

開発元 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

少量抗体用蛍光標識キット

Tailing System

Tailing System 標識キットは、ピオチン-ストレプトアビジン法に基づいた標識方法を採用することで、1 µgの抗体<sup>\*1</sup>を用いた場合でも蛍光標識することができます。

Tailing Reagentは、アミノ基と結合可能なスクシンイミジル基を有するピオチンで、抗体と混合するだけで簡単にピオチン標識抗体を得ることができます。ピオチン標識は1 ~ 20 µgの抗体量に対応しており、付属のFiltration Tubeを用いることで未反応のTailing Reagentを除去し、保存用バッファーでピオチン標識抗体を回収・保存します。Tailing Reagentによりピオチン標識された抗体は、実験に必要な量だけ( 1 µg)をTagging Reagentと混ぜるだけで、直ちに蛍光標識されます。Tagging Reagentで蛍光標識された抗体は、フローサイトメトリーや組織/細胞染色に利用することができ、また、異なる抗体<sup>\*1</sup>を各々の蛍光特性が違うTagging Reagentで標識することで多重染色をすることができます。

<sup>\*1</sup>Tailing Reagentによりピオチン標識された抗体

< 特長 >

- 少量の抗体から蛍光標識体を調製することができる ( 1 µg 以上 )
- 測定に応じて種々の蛍光物質を選択することができる。
- 異なる抗体を用いることで多重染色ができる。
- Tailing Reagent によるピオチン標識体は、Filtration Tube により高い回収率で得られる。

< キット内容 <sup>\*2</sup> >

- Tailing Reagent
- Universal Solution
- Filtration Tube
- Tagging Reagent Fluorescesin
- Tagging Reagent R-Phycoerythrin
- Tagging Reagent HiLyte Fluor™ 647
- RS Buffer

<sup>\*2</sup>仕様は変更になる場合があります。

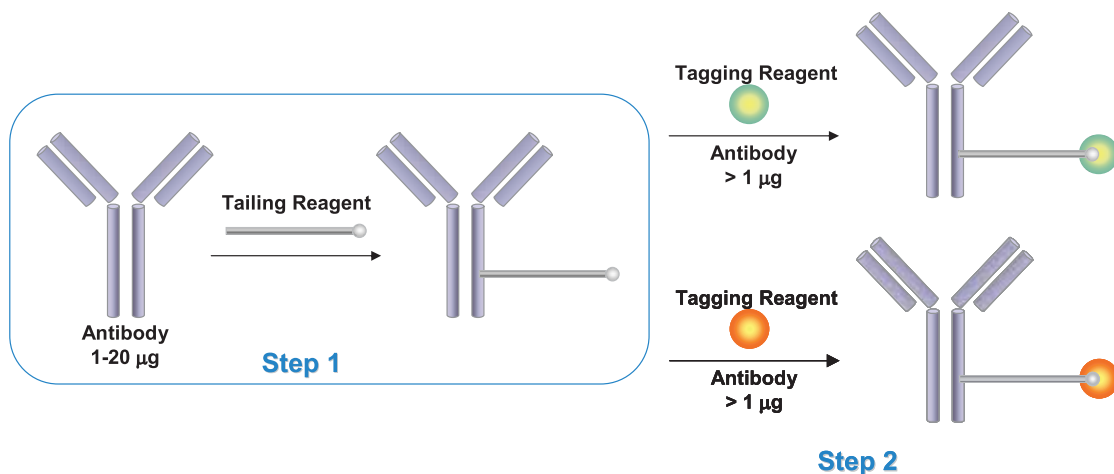
< 標識操作 >

Step 1

- Tailing Reagent と抗体を混合して、ピオチン標識抗体を調製する。
- Filtration Tube により未反応の Tailing Reagent を除去し、付属のバッファーでピオチン標識抗体を回収する。

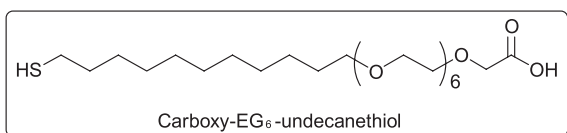
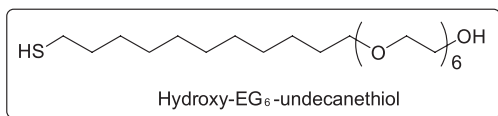
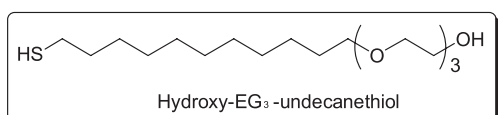
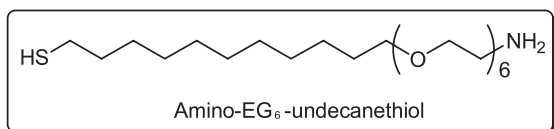
Step 2

- Step 1 で調製したピオチン標識抗体を実験に必要な量だけ Tagging Reagent と混合して、蛍光標識抗体を調製する。





Self Assembled Monolayer 研究用



< 特長 >

- 非特異的吸着の少ない SAM を形成できる
- 蛋白質、DNA など、様々な物質を SAM 上に固定化できる

固体表面に種々の分子を配向・集積させる方法の一つである自己組織化法は、簡便に高密度・高配向な自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayers: SAMs) を構築することができるため、研究・応用が活発に行われています。

SAMs の性質は、そのアルキル鎖長や末端の官能基、主鎖の親水性などにより変化し、多彩な機能を固体表面に導入することが可能であり、表面プラズモン共鳴 (SPR) や水晶振動子マイクロバランス (QCM) など、金属板を利用するセンサーに広く用いられていますが、非特異吸着を抑制することが重要となります。

近年、タンパク質等の表面固定化にオリゴエチレングリコールを導入した SAMs 試薬が頻繁に用いられています。オリゴエチレングリコールにはタンパク質や細胞の吸着を抑制する効果があるため、その効果は Whitesides らにより実証されています<sup>1)</sup>。

Hodenland らは、Amino-EG<sub>3</sub>-undecanethiol と Hydroxy-EG<sub>3</sub>-undecanethiol を混合した SAM を作製し、Calmodulin を固定化して Calcineurin との相互作用を SPR にて測定しています<sup>2)</sup>。また、Bamdad らは、Amino-EG<sub>3</sub>-undecanethiol を基に Duplex DNA を基板上に結合させ、ハイブリッド形成の様子を SPR にて観測しています<sup>3)</sup>。

< 参考文献 >

- 1) C. Pale-Grosdemange, E. S. Simon, K. L. Prime, and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 777-790.
- 2) C. D. Hodneland, Young-Sam Lee, D. Min, and M. Mrksich, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **2002**, *99*, 5048-5052.
- 3) C. Bamdad, *Biophysical Journal.*, **1998**, *75*, 1997-2003.

価格一覧表

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Amino-EG <sub>6</sub> -undecanethiol	10 mg	38,000	A483
	100 mg	Request	
Carboxy-EG <sub>6</sub> -undecanethiol	10 mg	24,000	C445
	100 mg	60,000	
Hydroxy-EG <sub>3</sub> -undecanethiol	10 mg	14,400	H354
	100 mg	36,000	
Hydroxy-EG <sub>6</sub> -undecanethiol	10 mg	18,000	H355
	100 mg	38,800	
11-Amino-1-undecanethiol, hydrochloride	各10 mg	13,600	A423
8-Amino-1-undecanethiol, hydrochloride	100 mg	40,600	A424
6-Amino-1-undecanethiol, hydrochloride			A425
10-Carboxy-1-decanethiol	各10 mg	11,800	C385
7-Carboxy-1-heptanethiol			C386
5-Carboxy-1-pentanethiol	100 mg	32,000	C387
10-Carboxydecyl disulfide	10 mg	11,800	C404
	100 mg	34,000	
7-Carboxyheptyl disulfide	各10 mg	11,800	C405
5-Carboxypentyl disulfide			C406
4,4'-Dithiodibutyric acid	500 mg	20,000	D524
Dithiobis(succinimidyl undecanoate)	各10 mg	13,600	D537
Dithiobis(succinimidyl octanoate)			D538
Dithiobis(succinimidyl hexanoate)	50 mg	41,000	D539
11-Hydroxy-1-undecanethiol	各10 mg	12,400	H337
8-Hydroxy-1-octanethiol			H338
6-Hydroxy-1-hexanethiol	100 mg	36,000	H339
11-Ferrocenyl-1-undecanethiol	10 mg	16,600	F246
	100 mg	49,400	
8-Ferrocenyl-1-octanethiol	各10 mg	15,600	F247
6-Ferrocenyl-1-hexanethiol			F269
N-Fmoc-Aminoundecanethiol	各10 mg	15,400	F287
N-Fmoc-Aminooctanethiol			F288
N-Fmoc-Aminoheptanethiol			F289
Dithiobis(C <sub>2</sub> -NTA)	10 mg	19,000	D550
	50 mg	76,000	

SAMs 試薬のパンフレットを改訂いたしました。

その他、カタログ・パンフレットをご要望の方は、小社マーケティング部までご連絡ください。

Tel: 0120-489548、 Fax: 0120-021557

E-mail: info@dojindo.co.jp



新製品

分子生物学用 Good's Buffer

分子生物学用 Good's Buffer を新たに 12 種類発売

- ACES 分子生物学用    ADA 分子生物学用
- BES 分子生物学用    Bicine 分子生物学用
- Bis-Tris 分子生物学用    CAPS 分子生物学用
- CHES 分子生物学用    EPPS 分子生物学用
- HEPES 分子生物学用    MES 分子生物学用
- MOPS 分子生物学用    PIPES 分子生物学用
- TAPS 分子生物学用    TES 分子生物学用
- Tricine 分子生物学用

<特長>

- 高純度 (99.7% もしくは 99.5% 以上)
- エンドトキシン試験済み (※一部製品を除く)
- DNase, RNase 不検出

※ HEPES, MOPS, PIPES 各分子生物学用は 20 g 包装を新たに追加致しました。

Good's Buffer は優れた緩衝剤として知られており、幅広い研究に使用されております。

特に生化学分野において使用される際には、純度のみならず、エンドトキシンや DNase, RNase free であるかどうかという点も試薬品質として重要な要素であり、これらが保証されている製品を望む声も多く聞かれます。これまでも、同様の目的の製品を発売いたしておりましたが、より多くの製品をというご要望にお応えし、今回新たに 12 種類の Good's Buffer の分子生物学用規格品をご用意致しました。使いやすい少容量包装にてご提供いたします。

品名	容量	価格(¥)	コード	メーカーコード
ACES 分子生物学用	20g	7,800	342-08271	GB73
ADA 分子生物学用	20g	3,400	349-08281	GB74
BES 分子生物学用	20g	2,800	346-08291	GB75
Bicine 分子生物学用	20g	2,800	349-08301	GB76
Bis-Tris 分子生物学用	20g	4,800	346-08311	GB77
CAPS 分子生物学用	20g	4,000	343-08321	GB78
CHES 分子生物学用	20g	3,800	340-08331	GB79
EPPS 分子生物学用	20g	5,800	347-08341	GB80
HEPES 分子生物学用	20g	2,200	340-08233	GB70
MES 分子生物学用	20g	2,800	344-08351	GB81
MOPS 分子生物学用	20g	2,600	347-08243	GB71
PIPES 分子生物学用	20g	3,400	344-08253	GB72
TAPS 分子生物学用	20g	3,000	341-08361	GB82
TES 分子生物学用	20g	4,800	348-08371	GB83
Tricine 分子生物学用	20g	2,600	345-08381	GB84



ホームページアドレス  
 URL : <http://www.dojindo.co.jp/>  
 E-mail : [info@dojindo.co.jp](mailto:info@dojindo.co.jp)

フリーファックス    0120-021557  
 フリーダイヤル    0120-489548