

CONTENTS

●Review

GABA 合成酵素グルタミン酸
デカルボキシラーゼにみる隠れた
機能：味覚での役割と応用
奈良女子大学生生活環境学部 植野 洋志

漢方診療・再発見 7 中医・韓医と日本漢方
熊本赤十字病院総合内科
熊本大学大学院医学教育部 加島 雅之

●Topics on Chemistry

SAMをゲート絶縁膜に
用いた有機トランジスタの開発
株式会社同仁化学研究所 栢多 利博

三脚型Cu(II)BODIPY錯体を用いた溶液中での
ニトロキシルの直接的および特異的検出
株式会社同仁化学研究所 岩下 秀文

2010 No.136

ISSN 0385-1516

DOJIN NEWS

ドージンニュース

目次

Review

GABA 合成酵素グルタミン酸デカルボキシラーゼにみる隠れた機能：味覚での役割と応用
 奈良女子大学生活環境学部 植野 洋志 …………… 1

漢方診療・再発見

7 中医・韓医と日本漢方
 熊本赤十字病院総合内科
 熊本大学大学院医学教育部 加島 雅之…………… 8

Topics on Chemistry

SAM をゲート絶縁膜に用いた有機トランジスタの開発
 株式会社同仁化学研究所 栢多 利博…………… 10
 三脚型 Cu(II)BODIPY 錯体を用いた溶液中でのニトロキシルの直接および特異的検出
 株式会社同仁化学研究所 岩下 秀文…………… 12

Commercial

新製品

グルタチオン分別定量キット
 GSSG/GSH Quantification Kit …………… 14

試作販売品

アセチルコリンエステラーゼ特異的基質 MATP+ …… 16

開発中

表面処理用ホスホン酸誘導体…………… 11

開発中

自己組織化単分子膜作製用試薬 …………… 13

お知らせ

学会展示のご案内…………… 15
 第 21 回フォーラム・イン・ドージン開催 …………… 18

新製品案内

グルタチオン分別定量キット

| 品名 | 容量 | 希望納入価格(¥) | メーカーコード |
|-----------------------------|-----------|-----------|---------|
| GSSG/GSH Quantification Kit | 200 tests | 50,000 | G257 |

試作品販売

アセチルコリンエステラーゼ特異的基質

| 品名 | 容量 | 希望納入価格(¥) | メーカーコード |
|-------|-------|-----------|---------|
| MATP+ | 10 mg | 20,000 | M450 |



おこしき
 御興来海岸 (熊本県宇土市)
 「日本の渚・百選」に選ばれている。この独特な干潟の光景は、有明海を囲む 4 県 (長崎、佐賀、福岡、熊本) の中でも、ここでしか見ることができない。干潮時には海岸線約 10km、沖合約 2km にわたり見事な砂模様浮かび上がる。

Photo : 永島俊介氏

GABA合成酵素グルタミン酸デカルボキシラーゼにみる隠れた機能：味覚での役割と応用



植野 洋志

奈良女子大学 生活環境学部
食物栄養学科

Synopsis:

Glutamate decarboxylase (GAD) has been known as an enzyme that catalyzes a decarboxylation reaction to produce γ -aminobutyrate (GABA) from L-glutamate. GABA is an inhibitory neurotransmitter for mammals; hence, the major role of GAD has been thought to function in the brain including neuronal tissues. Recent findings of GAD in non-neuronal system including skin, stomach and intestine raise a question about the hidden role of this enzyme. Sodium glutamate is an internationally recognized umami compound and a substrate for GAD. We have found GAD67 in the taste buds, specifically in the type III cells that express receptors for acid and salt. In this article, the possible role of GAD in the taste signal transduction is described.

キーワード：GABA、神経伝達物質、味覚改変、塩味増強

1. はじめに

グルタミン酸の代謝酵素の一つにグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) がある。GADは高等動物の中枢神経系に多く発現し、抑制性神経伝達物質である γ -アミノ酪酸 (GABA) を合成する酵素として発見された¹⁻³⁾ (図1)。当時、活発に研究がなされて、生体での局在性などの研究もなされ、その結果、脳、脾臓、精巣に発現することが報告されている。このような初期の研究成果をもたらした功罪であろうか、それ以降GADの研究は中枢を主体とするものであった。高等動物以外でもGADの存在が知られている。大腸菌、トマトやホウレンソウなどからGADが精製された⁴⁾。しかし、神経組織を持たない大腸菌などでのGADの役割は長いこと不明であったが、酵素学的な性質の解明は大腸菌酵素の研究に負うところが多かったのである。この分野で大きな曲がり角となったのは1990年初頭である。その年には、高等動物のGAD遺伝子が同定され、二つの独立した遺伝子の存在が明らかになったこと⁵⁾、そして、その内の一つ (GAD65) がI型糖尿病患者に発現する自己免疫抗体の標的抗原であることが判明した⁶⁾。遺伝子解析の結果は、それまで積み上げてきたGADの酵素学的知見をほぼリセットするものである。それ以降は、同じGADの研究でも、アイソフォームの違いを明確にしないと意味をなさないものであることが明らかになった。そのような背景のもと、筆者はGADの研究を本格的に再開した訳である。その

際、ただ漠然と研究を始めるのではなく、GADの存在意義、つまり基質がグルタミン酸であることより生体内でのグルタミン酸の分布を意識してGADの生理作用を検討したいと考えた。その意味では、グルタミン酸濃度が高い部位はどこか?ということ考えた結果、口腔内ではないかということに至った。その結果、大変面白い現象に出会えたので、本稿でその研究成果をまとめさせていただく。まだ研究途中ではあるが、味覚という興味深い分野との接点が見えた。については、最初に、GADの高等動物から微生物にいたる概要を紹介し、次に、味覚の紹介と、GADとの関係について解説したい。

2. GADの高等動物から微生物

グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) は、ビタミンB₆関与の脱炭酸酵素である。アミノ酸配列は遺伝子解析より予想された配列が知られており、ヒスチジンデカルボキシラーゼ (HDC) と芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ (古くはDOPAデカルボキシラーゼ) (ADC) と同じ部類に分類される。ゲノム解析の結果、ほぼすべての生物体にGADと類似のアミノ酸配列をもつタンパク質の存在が予想されている。アミノ酸配列は遺伝子解析より簡便に予想できる。しかし、タンパク質レベルから配列決定した結果、遺伝子解析からの予想とは異なる残基 (多くは

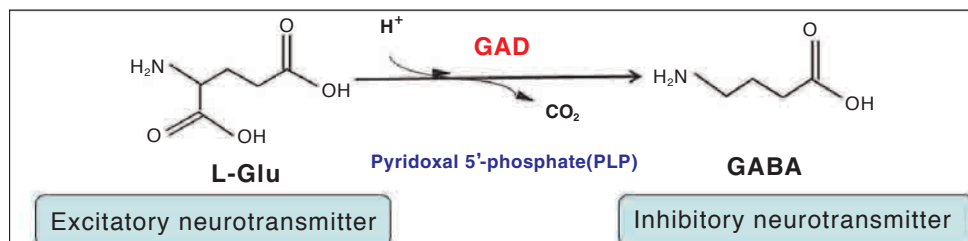


図1 グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) の触媒反応

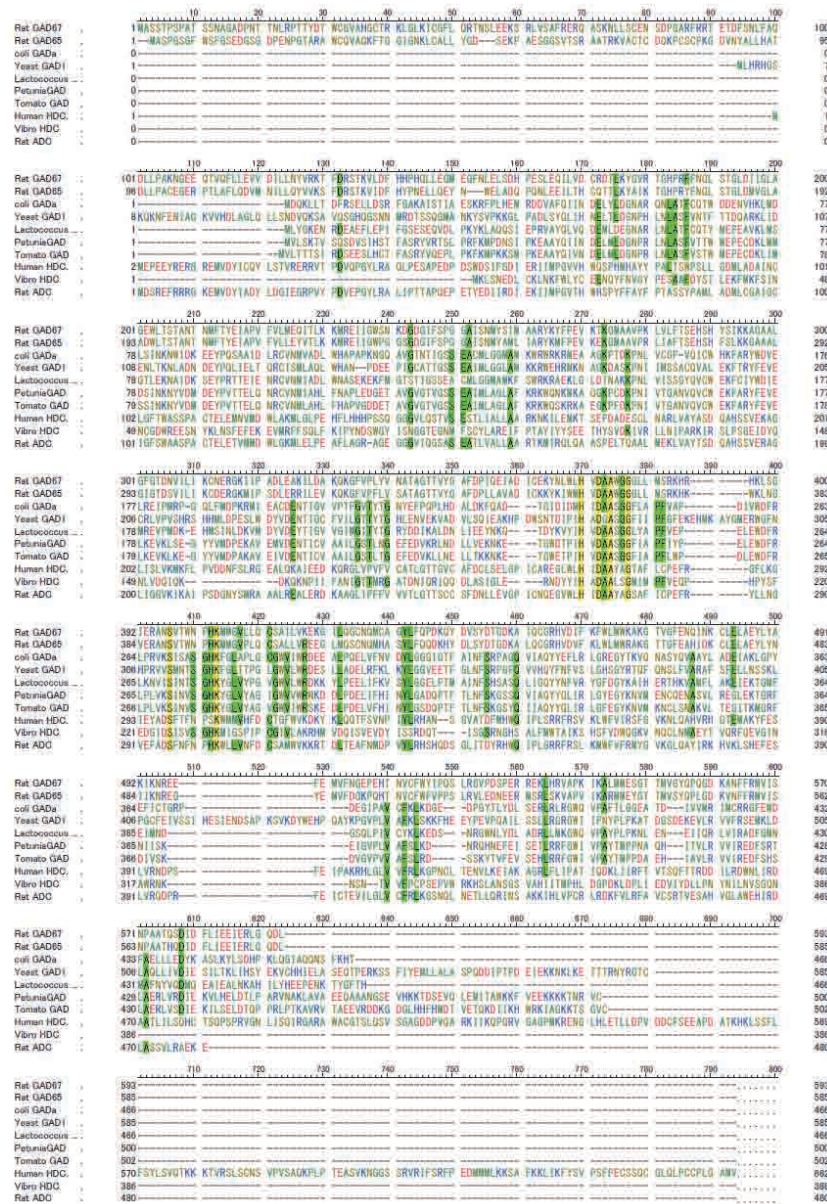


図2 グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)の生物間、および、ヒスチジンデカルボキシラーゼ(HDC)と芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ(ADC)とのアミノ酸相同性の比較

翻訳後修飾)の存在や、成熟化機構などによるN末端やC末端領域の切断機構などは分からないままなので、タンパク質レベルでのアミノ酸解析は必ず考慮すべきである。GADにおいては、まだタンパク質レベルでのアミノ酸配列解析は行われていない(一部、活性中心のアミノ酸配列は報告されている)。

高等動物のGADは1950年代にその存在が分かり、神経伝達物質であるGABAの合成を担うことより重要度が認識され、多くの酵素的性質を明らかにする研究がおこなわれてきた。精製も活発に行われてきたが、分子量やサブユニット構造に関しては統一した見解が得られずにいた⁷⁾。1990年になって、GAD遺伝子のクローニングがなされ、異なる染色体上に独立した遺伝

子としてGADが2つ存在することが判明し、それぞれをアイソフォームと呼ぶことになった。合成されるタンパク質の分子量が65 kDaと67 kDaであることよりそれぞれのアイソフォームはGAD65とGAD67と命名される。

GAD遺伝子は16個のエクソンで構成され、エクソン・イントロンの境界は動物種をまたがったGAD間でも、同一の動物種のアイソフォーム間でも類似している(図2)。タンパク質レベルでの相同性は、アイソフォーム間では60%程度であるが、種を超えた同一のアイソフォーム間では80%以上と高い。脱炭酸酵素としての機能には、補酵素であるピリドキサル5'リン酸(PLP)と結合して Schiff塩基をつくるLys残基、α位のカルボ

ン酸を認識するアミノ酸残基 (Argとされる)、そして、側鎖のカルボン酸を認識するアミノ酸残基 (Argであろう) が必要とされる。N末端100残基を欠失したX線結晶構造が近年報告され⁹⁾、アミノ酸基質認識に与関するこれらの残基はN末が欠損した残りの部位 (C末端領域) に存在することが判明した。これにより、GADの場合、N末100残基がなくても活性がフルに表現できることが判り、なぜN末端領域100残基が必要なのかというN末端領域の意義が反対に問われることになった⁹⁾。興味深いことに、GAD,HDCとADCのアミノ酸配列の相同性を比較すると、ADCが一番短くてちょうどGADがN末100残基を失った部分に相当する。また、GADはN末に約100残基長く、HDCは反対にC末が約150残基長い。近年、HDCは成熟化機構により、C末約150残基が切断除去されることで活性型に変化することが判明し、上述のGADのN末欠損型が活性をフルに保持していることと辻褃があう。これらをまとめると、ADCが一番古い形の脱炭酸酵素であり、その後、GADとHDCに進化したことが想像できる。

GADアイソフォームの役割解明は現在活発に進められている。触媒作用部位であるN末端100残基を除いた領域は、部位特異的な発現様式やアイソフォームの違いを説明するには酷似しているため、N末端領域に秘密が隠されているというのが一般的な考えである。GAD65のN末にはCys残基が3箇所存在し、ガン分野で知られているRasタンパク質内のCys残基と同様にpalmitoyl化されていることが報告されている⁹⁻¹¹⁾。GAD65は膜親和性が高く、GAD67はほとんど膜との親和性がないことが知られているので、palmitoyl化は膜親和性に関与すると想像されたが、部位特異的突然変異法でCys残基を他のアミノ酸に置換しても膜親和性に変化がなかったという報告がなされており、まだ完全には理解されていない。GADはビタミンB₆酵素では珍しくリン酸化される^{11,12)}。リン酸化により活性化、脱リン酸化により不活性化が起きるが、GAD65とGAD67ではリン酸化による活性制御機構が逆転しているという報告がある。小幡らはノックアウトマウスを作製し、GADアイソフォーム間の違いを示した。GAD65ノックアウトマウスでは、生後発作を頻繁に起こし、短命で終えるが、GAD67ノックアウトマウスでは、上あご形成不全という発生異常で生後すぐに呼吸不全で死ぬことが分かった^{13,14)}。これにより、GAD65は神経終末での小胞体関与が、GAD67は細胞質での代謝に何らかの役割を担っていると判断され、アイソフォーム間の役割分担がなされていることが分かる。ちなみに、LDHなどの「アイソザイム」は臓器ごとに発現するサブユニットの比率がM₄、M₃H、M₂H₂、MH₃、H₄という具合に異なるのとは違い、GADアイソフォームでは、同一の細胞にて同時に2種類のGADが発現し、それぞれ異なる役割を担っているという特徴がある (図3)。それでは、どちらのアイソフォームもグルタミン酸を基質としGABAを生成する化学反応を触媒する訳であるが、細胞内では、基質であるグルタミン酸分子はどのような取り分けがなされるのであろうか？また、グルタミン酸分子の供給経路に関しても大きな関心が寄せられているが、まだ理解されているとは言えない。

GADが発生や発作に与関する以外に、糖尿病などの疾患にも関与することが報告されている。I型糖尿病患者では発症の10~20年前より血液中に63~65 kDaタンパク質を標的とする自己免疫抗体が見つかっており、その標的タンパク質がGAD65であるという報告がなされている⁹⁾。I型糖尿病はウイルス感染の可能性があり、候補となるウイルスのコートプロテインの配列の

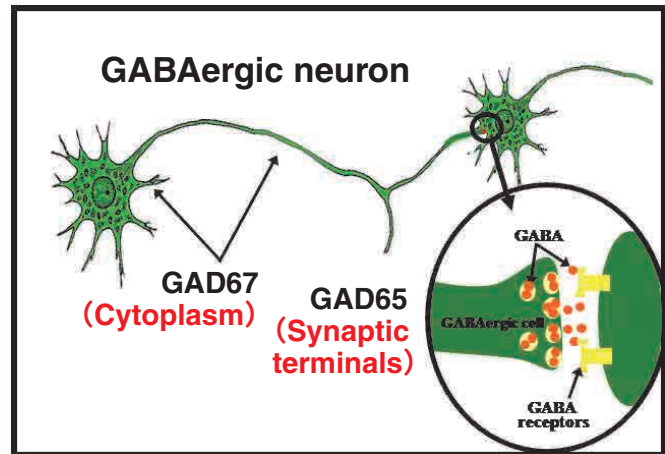


図3 GADアイソフォームの神経細胞内での局在性の想像図

表1 生物種におけるGADアイソフォームの数

| Species | Isoforms |
|---------------------|----------|
| Human | 2 |
| Mouse | 2 |
| Rat | 2 |
| Pig | 2 |
| Cow | 2 |
| <i>S.cerevisiae</i> | 1 |
| <i>A.oryzae</i> | 8 |
| Rice | 5 |
| <i>E.coli</i> | 2 |
| <i>C.cinereus</i> | 2 |

一部がGAD65と相同性があることで抗原性をもったのではないかと考えられている。膵臓のβ細胞で発現するGAD65が主たる標的となり、その結果、β細胞が壊れ、インスリンの合成系が破壊されることで糖尿病の発症につながるとされる。GAD65タンパク質の早期検出はI型糖尿病患者の早期発見につながるとして、簡便なそして高感度の検査試薬の開発が進んでいる。

GADは高等動物以外でも多くの生物が備えていることがゲノム解析の結果理解されてきた。GADが存在することは、すなわちGABAの存在も意味し、そこで生じる大きな疑問は、神経伝達物質であるGABAは、神経組織を持たない非神経系組織や細胞でどのような役割をしているのか？である。植物体は6量体タンパク質であるGADを発現するが、一部ではC末端領域が長く、その部分にカルモジュリン結合部位を持つことが報告されている。植物体でのGABAの役割はまだ検討すべき課題であるが、GABA合成機構がCa⁺⁺イオンにより制御されていることは興味深い。微生物界ではGADはほぼすべてにおいて存在が確認されている。特に興味深いことは、複数の遺伝子が備わって

いることと、産生されるタンパク質のサブユニット構成である。表1に示すように、大腸菌 (*E. coli*) ではGAD_AとGAD_Bの2種が、麹菌ではGAD1~8の8種が、キノコ (*C. cinereus*) では2種という具合に複数個のGAD遺伝子の存在がゲノム解析の結果明らかになっている。また、サブユニット構成に関しては、大腸菌やパン酵母 (*S. cerevisiae*) は6量体、乳酸菌は2量体という報告があるが、他の微生物由来のGADについての報告は少ない。多量体サブユニット構造をもつGADの酵素学的・生理学的研究はほとんどなされておらず、今後の課題とも言える。

古くより大腸菌由来のGADの研究は活発になされていたが、神経組織を持たない微生物におけるGADの役割は理解されてこなかった。しかし、近年、GADおよびGABAが酵母においては抗酸化機構に、大腸菌や乳酸菌では酸耐性機構に関与するとの報告がなされ、新たなGADの役割が明らかになってきている¹⁵⁻¹⁸⁾。

3. グルタミン酸デカルボキシラーゼの味蕾での発現

GADの非神経系組織での局在化に注目されている。近年、食の分野ではGABAが特保に認定され、GABA入りのチョコレート、ヨーグルト、味噌汁、飲料水を始めさまざまな製品が開発されて販売されている。GABAの生理効果は、血圧上昇抑制、利尿作用や成長ホルモンの誘発による細胞の活性化といった生活習慣病予防やリラクゼーション効果をうたっている。ところが、生体内での作用機序がまだ完全に理解されておらず、基本的なGADの局在性の検討が必要になっている。

従来、高等動物ではGABAの働きは神経伝達作用に注目され、脳の他では高い発現レベルを観察される膵臓や精巣が主たる研究対象であった。ところが非神経系での働きに注目していくことで、他の臓器での局在性を知る必要があるが、ほとんど理解されていない状態であった。そこで当研究室では、組織免疫化学染色法を用いて舌下腺、皮膚、胃、腸でのGADの局在性を京都府立医科大学河田光博教授、一丸ファルコス (株) 長谷川順一・伊藤賢一博士らとともに検討し、これら臓器にGADの発現を報告してきた¹⁹⁻²²⁾。また、分子生物学手法であるRT-PCRによりmRNAの存在も明らかにした。これまで酵素の組織における局在性の研究は数多くなされてきたが、酵素学的な見地での検討は少ないと考えられる。それは、酵素反応を行うに必要な基質濃度、つまりK_m値を考慮した基質レベルでの酵素の分布を考えるということである。実は、細胞内での基質の濃度分布を正確に測定することは大変困難である。これにより、通常は、基質濃度を考えずに酵素タンパク質の存在の有無を検討することになる。GADの場合、基質であるグルタミン酸が基質レベルで存在する部位といえば、口腔内であろう。グルタミン酸 (グルタミン酸ソーダと同義に使う) は、100年前に池田菊苗博士が昆布から抽出したうま味物質である。グルタミン酸ソーダの結晶である「味の素」をふりかけた食材を口にしたりすると、口腔内には基質レベルのグルタミン酸が存在することになる。人体では、大量のグルタミン酸を単にうま味物質としてうま味受容体と結合し、その信号を脳に送ってうま味を認識するだけに用いて、残りのグルタミン酸は機械的に胃や腸に送りこんでいるだけであろうか？グルタミン酸は何か他にも目的があって使われるということを考えて場合、代謝酵素の存在の有無を検討することは一つの要点ではないかと考えた。

我々は舌にはGAD抗体により染色される部位が存在し、それが味蕾であることを見出し、RT-PCRにてGADの発現の可能性を検討してきた。その折、生理学研究所の小幡邦彦教授と柳川右千夫助教授が作製されたGAD67/GFPノックインマウスに出会うことになった^{23,24)}。大阪医科大学渡辺正仁助教授との共同研究にて、味蕾でのGAD67の発現を検討してきたので、ここで紹介する。それにあたり、まずは、基本的な味蕾の仕組みについて触れておこう。

ヒトの場合、舌には有郭乳頭、葉状乳頭、耳状乳頭、糸状乳頭という4種類の乳頭があり、そのなかで糸状乳頭だけが味を感じる味蕾を持たないとされる。一般に一つの乳頭の中には数百といわれる細長い味蕾が集まっており、その様子は玉ねぎのようである。細長い味蕾細胞の形は特徴的で、乳頭から取り出すと球状の通常形に戻ることで、形態の形成機構に関連した研究は現在活発になされている状態である。また、細胞の寿命も10日と短いといわれており、早いターンオーバーと味の感知能力・記憶との関係などもまだまだ解明すべき課題は多いとされる。乳頭の位置関係は顕微鏡観察によりマッピングがなされているが、乳頭自身はすべての味質 (五味) を感知できるとされている。味を実際に感知する部分は、味物質との結合部位をもつ受容体が担っている。現在、ゲノム解析が完了したことにより、味物質と結合する受容体が遺伝子レベルで分かっており、代表的な受容体は培養細胞に発現させて味物質との応答機構を検討できるようになっている。

ヒトの五味は、「甘味」「苦味」「うま味」「酸味」「塩味」とされる。甘味・苦み・うま味受容体はGタンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、典型的な膜貫通型のヘテロ二量体タンパク質である。酸味と塩味はリガンド結合型イオンチャンネルで、複合体タンパク質で構成されている。GPCRの場合は、多種にわたるリガンド (味物質) が細胞外に表現されている部分に結合し、その結合が味の情報として細胞内に伝達され、細胞内のリン酸化カスケードを活性化することで次々と情報伝達される。リガンドの結合は、細胞内のCa⁺⁺濃度を変化させ、また電気信号の電位差を生じさせることも研究されている。味蕾にはGPCRを発現させているII型細胞、イオンチャンネルを発現させているIII型細胞の他に、細胞同士を保持させるI型細胞と幹細胞と考えられるIV型細胞に大別され、一つの乳頭にはI~IV型細胞が均等に分布しているのではないかと考えられている。興味深いことに、電子顕微鏡による観察では、脳とつながっている味神経の一端は味蕾に到達しているが、III型としか物理的な接触はなく、II型とは直接の接点を持たないことである。現在、II型が受け取った味の信号はどのようにして味神経に伝達されるか？という問題に注目されている。II型からはATPのような伝達物質が放出され、それが味神経に伝達されることが一部で考えられている。一方、II型の情報がIII型細胞を経由する考えも支持されている。後者の場合、昔から調理の分野で知られている少量の塩の存在がうま味や甘味を引き出す「対比効果」を説明できるからであろう。どちらにしても、味の情報伝達機構の研究は今後ますます重要となるであろう^{25, 26)}。

GAD67/GFPノックインマウスの舌にUVライトを照射すると、中央に強い緑色に光る部分が観察できた (図4)。この部分は、マウスに一か所存在する有郭乳頭であり、縦にスライスした切片を蛍光顕微鏡観察すると、細長く緑色に発色する細胞が観察され、味蕾であると判断できた。抗GABA抗体と抗GAD67抗体で染色される細胞と蛍光発色する細胞との重ね合

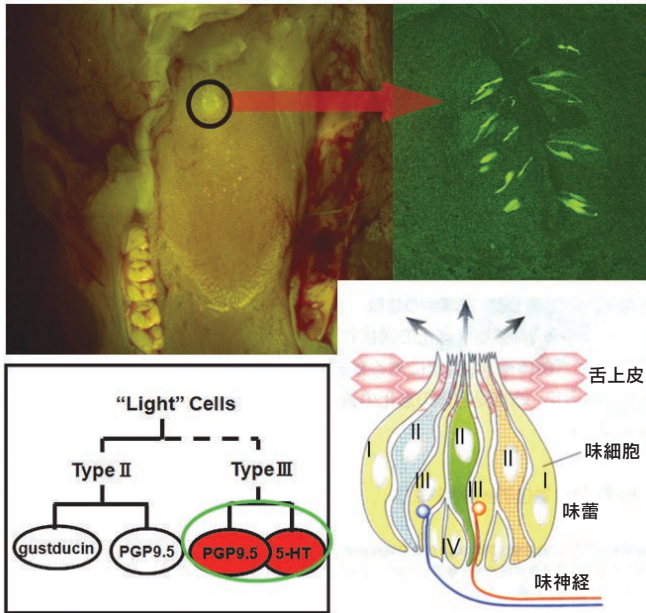


図4 GAD67/GFPノックインマウスの舌の解析図と局在する味蕾細胞の説明図

わせにより、蛍光を発する細胞はGAD67を発現し、GABAを産生することより、細胞内ではGADは活性型で発現していること、生産されたGABAは何らかの生理作用をもつことが想像できた。蛍光を発する細胞を指標として、さらに詳細な検討が可能となったが、まずは、味蕾細胞の種類を決定する作業に入った。II型、III型に特異的なマーカータンパク質が存在することより、これらのマーカータンパク質を組織免疫化学染色すると、III型に特異的なマーカーと蛍光の分布が一致することが判明し、GAD67発現細胞はIII型味蕾細胞であることが明らかになった^{27,28)}。

GABAの情報伝達機構の解析より、GABAにはGABA_A、GABA_B、そしてGABA_Cの3種類の受容体が知られている。その中で、GABA_AとGABA_Cはクロライドイオンチャンネル型受容体であり、GABA_BはGPCR型であることが知られている。クロライドイオンチャンネル型受容体は5つのヘテロサブユニット構造をとるが、各サブユニットには $\alpha 1\sim 6$, $\beta 1\sim 4$, $\gamma 1\sim 4$, σ , ϵ , $\rho 1\sim 4$ が準備されており、少なくとも α と β は1個ずつ備わっていると考えられている。味蕾の蛍光発色部分を切り出し、mRNA抽出後cDNA化し、RT-PCRによりサブユニットの存在を探索すると、GABA受容体に相当するサブユニット群の存在を明らかにすることができた(未発表)。これらの結果より、味蕾にてGABAが合成され、GABAをリガンドとしたクロライドイオンチャンネルもしくはGABA受容体の活動が想定できることになる。

4. 官能試験によるGABAの効果を見る

我々は、GABAが味蕾で発現することで、はたして味覚への関与はあるのか?という疑問に答えるために、官能試験による検討を行った。一般に味覚のような個人差もある感覚機能を定

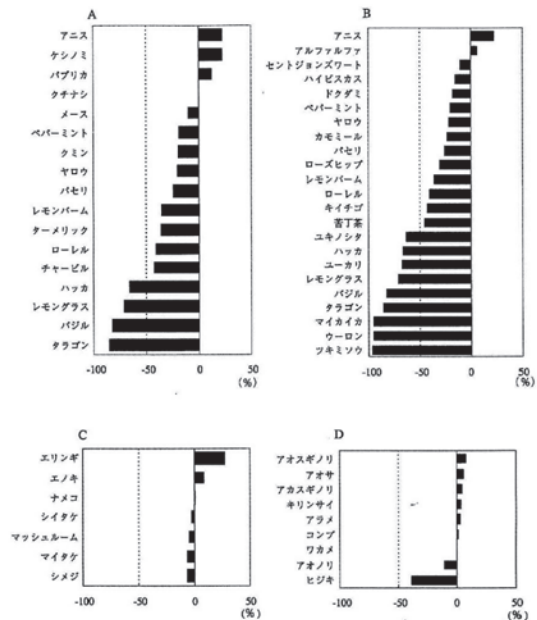


図5 天然物(香辛料, 茶, キノコ, 藻類)の抽出物が与えるGAD活性への効果 A: 香辛料, B: 茶, C: キノコ, D: 藻
プラスの数値は活性化の度合い, マイナスの数値は阻害の度合いを示す。

量的に評価することは困難である。ましてや、動物実験では得ることができない。まずは、GABAそのものが味質を呈するの否かを検討したところ、無味無臭と思われたが、多くが酸味に近い味を感じ、苦み、塩味、甘味の順で味質を表現している。また、基本五味に与える影響では、GABAの添加で塩味とうま味が強調される傾向にあることが判明した^{29,30)}。GABAがIII型味蕾に備わっている酸味と塩味の受容体を介して感じる感覚を提供していることは興味深く、GABAの味覚への関与が強く示唆できると考える。

これまで塩味はNaClのうち、Na⁺が主たる役割を担っていると考えられたが、NaClとNaIでは味質が異なるという報告などがあり、クロライドイオンの効果は否定できない。そこで、味蕾細胞内でのGABAの働きをさらに明らかにする一端として、GABA合成システムに揺らぎを与えることを計画した。つまり、GABA合成酵素であるGADの活性に変化を与える物質の味覚への効果を検討することにある。その第一歩として、組換え体GADタンパク質の酵素活性への香辛料抽出物の効果を検討した(図5)。

GADを大腸菌もしくはパン酵母に組込み、誘導発現させた組換え体タンパク質を用い、香辛料や生薬の抽出物がどのようにGAD活性に影響するかを検討した。その結果、これら天然物抽出物はGAD活性を大きく阻害したり、活性化することが判明した。この結果は少なからずの驚きである。我々が口にする食材の成分には、GABA合成に関わる酵素の活性に多様な影響を与えるというものがある^{31,32)}。GADの局在性が味蕾、胃、腸など食成分と直接接する部位であることを考慮すると、GABA量の変動が細胞レベルで何らかの効果(腸の運動、ホルモンや胃酸分泌など)を示す可能性を示唆する。もちろん、今後、実験的に証明してする必要はあるが、まだまだ研究が進んでいない領

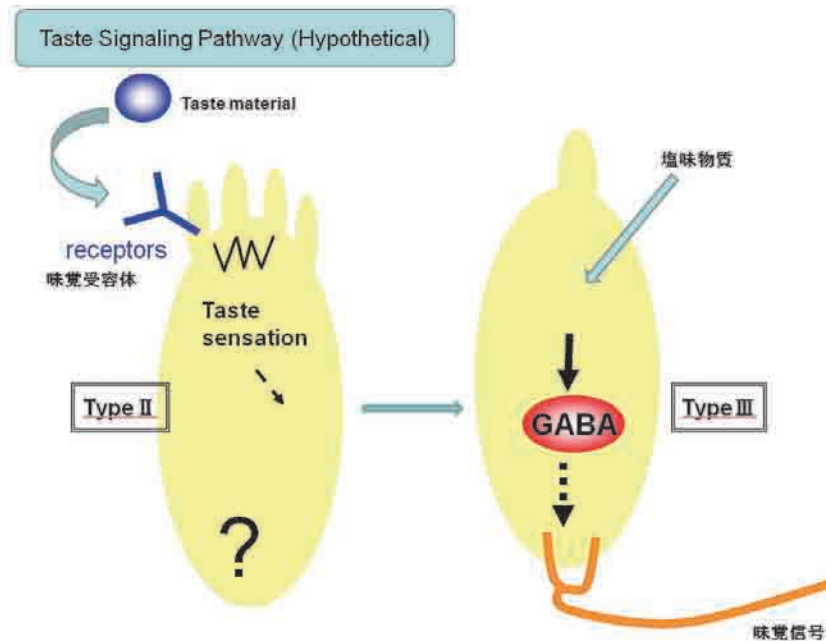


図6 味の対比効果の想像図

域のように思える。

図6には、II型とIII型味蕾細胞を中心とした味の情報伝達経路を想定している。II型細胞にはうま味や甘味受容がなされ、III型には塩味の受容がなされる。うま味や甘味を強調させるには、少量の塩を入れるという「味の対比効果」はこのような関係から説明できるのであろうか？また、味蕾細胞内でのリン酸化カスケードを介する情報伝達経路の存在は示唆されているが、まだタンパク質・タンパク質間相互作用のレベルではほとんど手つかずの状態である。そこで、GAD67がIII型細胞内で機能していることを加味すると、GADの酵素活性を上昇させたり下げたりできる因子の存在は味覚の信号伝達経路に大きな影響を与え、味質を変化させる可能性があると考えられる。このような因子を食品成分から求めることは可能であろうか？もし、食品成分が味蕾細胞内まで侵入できるならば、図7のようなスキームが描かれる。現在、GAD活性を試験管レベルで活性化する食品成分を抽出し、官能試験で味覚への効果を検討しており、その結果次第ではこの仮説を証明できるかもしれないと期待している。

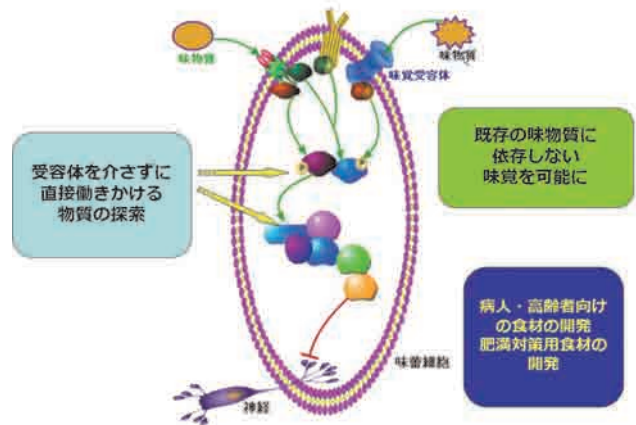


図7 塩味増強効果への取り組み

作用を観察するに至っている（未発表）。GABAを産生する酵素としてだけでなく、いろんな角度からのGADの働きに注目してしばらく活動したい。

5. おわりに

GADの酵素としての反応機構に興味をもって大腸菌由来のGADの自殺基質の研究から研究生活に入ったが、その後、遺伝子工学の技術を用いることで高等動物由来のGADの酵素学的研究が可能になり、さらに、抗体やRT-PCRの技術が使えるようになったことでいろんな臓器や細胞でのGADの局在化の検討をおこなえるようになった。その結果、今回は紹介できなかった血球におけるスプライシング異常の現象を見出すなど、GADには多くの謎めいた現象が付きまとっているようである。今回紹介した味覚との関係は、現在、細胞内でのタンパク質間相互作用としていくつかの非常識？と思えるGAD・タンパク質間相互

謝辞

本研究を進めるにあたり共同研究していただいた大阪医科大学渡辺正仁博士、生理学研究所小幡邦彦博士、柳川右千夫博士、京都府立医科大学河田光博博士、一丸ファルコス(株)長谷川順一博士、伊藤賢一博士に感謝申し上げたい。

また、研究の初期より浦上食品・食文化振興財団、中塾研究奨励会、奈良女子大学プロジェクト経費、うま味研究会、(株)永谷園より助成金の援助を頂戴した。

末筆ながら、本研究を推進してくれた研究室の学生諸君に、特に、中村 友美、久木 久美子、和田 和子、伊藤 美奈、赤松 香奈子、岩堀 みね子、浅井 麻衣子の皆さんに感謝申し上げます。

[参考文献]

- 1) J. Awapara, A. J. Landua, R. Fuerst, B. Seale, Free γ -aminobutyric acid in brain, *J. Biol. Chem.*, **1950**, *187*, 35-39.
- 2) E. Roberts, S. Frankel, γ -Aminobutyric acid in brain: Its formation from glutamic acid, *J. Biol. Chem.*, **1950**, *187*, 56-63.
- 3) E. Roberts, S. Frankel, Glutamic acid decarboxylase in brain, *J. Biol. Chem.*, **1951**, *188*, 789-95.
- 4) T. Matsumoto, I. Yamaura, M. Funatsu, Physical properties of glutamate decarboxylase from squash, *Agric. Bio. Chem.*, **1990**, *54*, 3001-03.
- 5) M. G. Erlander, N. J. K. Tillakaratne, S. Feldblum, N. Patel, A. J. Tobin, Two genes encode distinct glutamate decarboxylases, *Neuron*, **1991**, *7*, 91-100.
- 6) S. Baekkeskov, H-J. Aanstoot, S. Christgau, A. Reetz, M. Solimena, M. Cascalho, *et al.*, Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase, *Nature*, **1990**, *347*, 151-56.
- 7) H. Ueno, Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase, *J. Mol. Catalysis B.: Enzymatic*, **2000**, *10*, 67-79.
- 8) G. Fenalti, R. H. Law, A. M. Buckle, C. Langendorf, K. Tuck, C. J. Rosado, *et al.*, GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2007**, *14* (4), 280-6.
- 9) S. Christgau, H-J. Aanstoot, H. Schierbeck, K. Begley, S. Tullin, K. Hejnaes, *et al.*, Membrane anchoring of the autoantigen GAD65 to microvesicles in pancreatic β -cells by palmitoylation in the NH2-terminal domain, *J. Cell. Biol.*, **1992**, *118*, 309-20.
- 10) Y. Shi, B. Veit, S. Baekkeskov, Amino acid residues 24-31 but not palmitoylation of cysteines 30 and 45 are required for membrane anchoring of glutamic acid decarboxylase, GAD65, *J. Cell. Biol.*, **1994**, *124* (6), 927-34.
- 11) J. Wei, J.Y. Wu, Post-translational Regulation of L-Glutamic Acid Decarboxylase in the Brain, *Neurochemical research*, **2008**.
- 12) M. Namchuk, L. Lindsay, C. W. Turck, J. Kanaani, S. Baekkeskov, Phosphorylation of serine residues 3, 6, 10, and 13 distinguishes membrane anchored from soluble glutamic acid decarboxylase 65 and is restricted to glutamic acid decarboxylase 65 α , *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272* (3), 1548-57.
- 13) H. Asada, Y. Kawamura, K. Maruyama, H. Kume, R-G. Ding, N. Kanbara, *et al.*, Cleft palate and decreased brain γ -aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 6496-99.
- 14) H. Asada, Y. Kawamura, K. Maruyama, H. Kume, R-G. Ding, F. Y. Ji, *et al.*, Mice lacking the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but are susceptible to seizures, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1996**, *229*, 891-95.
- 15) A. Tramonti, M. De Canio, Delany I, Scarlato V, D. De Biase, Mechanisms of transcription activation exerted by GadX and GadW at the gadA and gadBC gene promoters of the glutamate-based acid resistance system in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **2006**, *188*(23), 8118-27.
- 16) N. Stewart, J. Feng, X. Liu, D. Chaudhuri, J. W. Foster, M. Drolet, *et al.*, Loss of topoisomerase I function affects the RpoS-dependent and GAD systems of acid resistance in *Escherichia coli*, *Microbiology*, **2005**, *151* (Pt 8), 2783-91.
- 17) G. Capitani, D. De Biase, C. Aurizi, H. Gut, F. Bossa, M. G. Grutter, Crystal structure and functional analysis of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase, *EMBO J.*, **2003**, *22* (16), 4027-37.
- 18) S. T. Coleman, T. K. Fang, S. A. Rovinsky, F. J. Turano, W. S. Moye-Rowley, Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276* (1), 244-50.
- 19) K. Ito, K. Tanaka, Y. Nishibe, J. Hasegawa, H. Ueno, GABA-synthesizing enzyme, GAD67, from dermal fibroblasts: evidence for a new skin function, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2007**, *1770* (2), 291-6.
- 20) K. Akamatsu, Y. Nakamura, H. Hayasaki, K. Kanabara, K. Maemura, Y. Yanagawa, *et al.*, Cells expressing GABA synthetic enzyme, glutamate decarboxylase, in stomach and intestine: RT-PCR and immunohistochemistry studies, *J. Biol. Macromol.*, **2007**, *7*, 55-62.
- 21) M. Iwahori, K. Akamatsu, S. Kurohara, K. Yokoigawa, H. Ueno, H. Ogawa, *et al.*, Immunohistochemical study of the localization of glutamate decarboxylase in rodent's submandibular gland, *J. Biol. Macromol.*, **2002**, *2*, 76-77.
- 22) K. Ito, Y. Katsuyama, N. Banno, J. Hasegawa, H. Ueno, Localization and characterization of glutamate decarboxylase in the skin, *XXI IFSCC International Congressed*, **2002**, 102.
- 23) K. Obata, GABAergic neurons revealed in the gene knock-out and knock-in mice, *Tanpakushitsu kakusan koso* **2004**, *49* (3 Suppl), 295-300.
- 24) N. Tamamaki, Y. Yanagawa, R. Tomioka, J. Miyazaki, K. Obata, T. Kaneko, Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse, *J. Comp. Neurol.*, **2003**, *467* (1), 60-79.
- 25) K. Abe, Studies on taste: molecular biology and food science, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2008**, *72* (7), 1647-56.
- 26) Y. Ninomiya, 食の調節情報としての味覚とおいしさのシグナリング. 化学と生物, **2007**, *45* (6), 419-25.
- 27) Y. Nakamura, Y. Yanagawa, K. Obata, M. Watanabe, H. Ueno, GABA is produced in taste bud, *Chem. Senses*, **2007**, *32*, J19.
- 28) Y. Nakamura, Y. Yanagawa, K. Obata, M. Watanabe, H. Ueno, GABA is produced in taste bud, *40th Annual Meeting of the Japanese Association for the Study of Taste and Smell (JASTS XL)ed, Fukuoka, Japan: Chem. Senses*, **2007**, J1-J25 (No. 69).
- 29) K. Wada, Y. Nitta, H. Ueno, Effect of GABA on taste sensory as judged by taste test, *家政学研究(奈良)*, **2006**, *53* (1), 1-6.
- 30) K. Hisaki, K. Wada, K. Shinohara, Y. Nakamura, H. Ueno, Contribution of GABA to taste sensation evaluated by taste test and effect of compounds in spices on the activity of GABA synthetic enzyme, *Japanese Taste and Smell J.*, **2007**, *14* (3): 435-38.
- 31) H. Ueno, K. Akamatsu, K. Yoshioka, S. Kurohara, M. Iwahori, K. Tone, *et al.*, Study of regulatory properties of spice and herb extracts on glutamate decarboxylase and site-specific expression of glutamate decarboxylase in digestive system, *Proceedings of 3rd China-Japan International Conference on Vitamins*, **2004**, 146-56.
- 32) S. Kurohara, M. Asai, M. Hayashi, K. Yokoigawa, H. Ueno, Microanalysis of GABA: An application for evaluating GABA production in yeast strains and the effect of spice extracts on glutamate decarboxylase activity, *J. Biol. Macromol.*, **2001**, *1*, 45-48.

著者プロフィール

氏名：植野 洋志 (UENO, Hiroshi)
 所属：奈良女子大学生生活環境学部食物栄養学科
 住所：〒630-8506 奈良市北魚屋西町
 TEL：0742-20-3493
 E-mail：hueno@cc.nara-wu.ac.jp

出身学校：京都大学工学部・米国ブランダイス大学大学院・米国アイオワ州立大学大学院, Ph.D.

現在の研究テーマ：塩味増強効果とGABA合成酵素 (GAD) の活性制御機構との関連の研究；GADアイソフォームの機能性の研究；GADの生物種による遺伝子多様性の研究；ヒスタミン合成酵素 (HDC) の活性化と活性制御機構の研究；消化酵素の活性発現様式と応用研究

漢方診療・再発見 7 中医・韓医と日本漢方

加島 雅之
熊本赤十字病院 総合内科
熊本大学大学院医学教育部
病態解析講座 医療情報医学分野

漢方医学（ここでは中国系の伝統医学の総称として用いる）は中国漢代に淵源を發し、約2000年という悠久の時とユーラシア大陸の東方という広大な地域に広がり様々な形の医学を形成しながら伝承されてきた。その中で今回は現存する漢方医学の中で特徴と一定の広がりを持つ日本漢方・中医学・韓医学を紹介したい。

1. 日本漢方

日本に漢方医学が流入した始まりは即ち、日本がユーラシア大陸と交流が始まった時と期を一にしている。その中で現在にまでつながる医学の形として姿を現すのは、安土桃山代に同時期の中国の明代後期の医学を輸入し体系化・マニュアル化（この診療システムを「察証弁治（さっしょうべんち）」という）を行った曲直瀬 道三（まなせ どうさん）の曲直瀬流である（後述の「古方派」と対比して「後世派」と呼ばれる）¹⁾。この流派は江戸時代中期まで日本の漢方医学の主流をなしたが、徐々にマニュアル化された方法論の固定的運用と安易で無難な治療法に墮してしまった。江戸時代中期に吉益東洞（よします どうどう）らによる医学革命が行われ、後の日本の漢方医学の方向を決定づけられた。この流派は古方派と呼ばれる。古方派は漢方医学理論の全てを否定し（吉益東洞に至っては医学に理論があることそのものを否定しようとしている）^{2,3)}、中国の後漢の末に誕生したとされる傷寒論（しょうかんろん）・金匱要略（きんぎょうりやく）の処方を中心に、症状・症候の組み合わせに対して一対一対応のように使用する（この方法論を「方証相對（ほうしょうそうたい）」という）。古方派の誕生の背景には治療対象となった人々が大衆にまでに広がったこと、梅毒やコレラなどの難治性感染症の流行、墮落した後世派へのアンチテーゼ、当時流行した朱子学の理論性を否定した復古儒学の強い影響がある⁴⁾。この後の日本の医家は立場の差はあるが、個々に古方の方法論と伝統的漢方概念・理論を自らの経験・見識で折衷する形で医学を形成していく。明治期に入り政府により漢方に対する弾圧が行われ、江戸時代よりの系譜はほぼ断絶してしまう。少数の医

師らの手により明治末から昭和初期にかけて漢方の復活が図られた。その主だった流派には古方派の流れをくむ2流派（後の大塚敬節のグループと千葉古方と呼ばれるグループ）と後世派の流れをくむ1流派（一貫堂医学といわれるグループ）、古方派・後世派の中間的立場をとる1流派がある。昭和の初期にこうした諸流派が共同して金字塔というべき教科書が編まれた。「漢方診療の実際」である（1969年以降は「漢方診療医典」に改名）。この本はその序文にあるように西洋医学しか学んだことがない医師が全く予備知識なしに漢方の実践を図ることができることを目指して作成された。版を重ねる過程で、臨床上の必要性および漢方医学としての体面の問題から、ある程度の漢方概念を導入せざる得なくなった。しかし、先に述べるように伝統中国医学の体系を引き継ぐ後世派と一方でその根幹からの否定を目指した古方派の矛盾を解決せず、なおかつ、全く漢方の素養のない者に概念を説明するためには、伝統的な漢方用語を新たに定義し直し体系化することとなった。そこでは本来、病態を説明するための諸概念が、ある種の病状を分類する概念として理解される形となっている。現在の日本漢方の陰陽・虚実・寒熱・瘀血・水毒などの用語の概念および、西洋医学の診断名を縦糸に用い、日本漢方を特徴づける一つである、臨床的ポイントを表す口訣（くけつ）・日本で独自に発展した診察法である腹診・簡単な脈診を用いて、漢方概念で表わされる分類項目に当てはめ、これを横糸として処方を決するというシステムはこの本によって完成した^{5,6)}。

2. 中医学

現代の中医学と呼ばれるものは共産革命後に中国政府の命令によって、その当時の伝統中国医学を集大成することで形成された。その手本とされたのは、清代末に西洋医学の流入に対抗すべく伝統医学の学校における近代教育の試みが浙江省の私学校でなされたものであった⁷⁾。その教育は西洋医学の教育・診断の方法論に倣い、基礎理論・生理・解剖・病理・症候学と続く内容となっている。診断システムもまずどの臓腑系統のシステムの異常かを確認した上でその病態生理を把握するものとなっており、現代の中医学の教育・臨床システムもその体系を受け継いでいる⁸⁾。中医学の診断から治療にわたる診療システムを「弁証論治（べんしょうろんち）」という。この意味は病態である「証」を診断しそれに基づき治療法を議論するということである。同じ診断名の病態であっても合併状況、進行の状況に基づき様々な選択を考え治療戦略をたてる。前述の日本漢方の「方証相對」の、ある種の処方が有効である症状の組み合わせという言わば“症候群”としての意味合いの「証」に対して、一対一対応の処方を選択するというシステムとは好対照である。処方の理解も日本漢方では処方単位での理解となるのに対して、中医学では処方構成している一つ一つの生薬の薬能が目的としている病態にどう有効であるかという視点が重視される。こうした病態分析の基本となる漢方概念や薬能概念は主に明代後期に確立している⁹⁾。また、清代に確立した「温病学（うんびょうがく）」といわれる感染症学、清代末から中華民国時代に西洋医学の影響を受けて発展した伝統医学の一派（「医学中西匯通派」と呼ばれる）の影響、中西結合といわれる西洋医学の知見を積極的に漢方医学に結びつける試み、および学校教育を行う為の臨床体系の構築（こうした臨床形態を「学院派」とよぶことがある）が現代中医学を特徴づける。

3. 韓医学

朝鮮半島における漢方医学の流入の起源も日本と同様、中国との交流の始まりまで遡る。こうした中で、現代につながる韓医学は約400年前の「東医宝鑑」(とういほうがん)によって成立した。この医学は同時代の中国明代後期の医学を集大成した内容であり、同時期の日本の曲直瀬道三が著した「啓迪集」(けいてきしゅう)と非常に類似した体系となっている。ただ二つの体系を比較すると、東医宝鑑は生理的な視点を重視し、予防医学・健康増進(伝統的には「養生」と表現される)に重点が置かれる^{10, 11)}。現代の韓医学においても、疾病の治療の中心は鍼灸療法であり、薬物療法は養生に重点が置かれている。実際の診療の方法論では、症状・症候の伝統的分類の項目を東医宝鑑やそのダイジェスト版である「方薬合編」(ほうやくごうへん)、その他の信奉するテキストで検索し、そこに書かれている処方を中心に、状況に合わせて薬物論に基づき若干の調整(この過程を「加減」という)をして用いるという伝統的な漢方医学のある種の方法論が残存している。また、約100年前の李氏朝鮮末に生まれた「四象医学」も韓医学の特徴的な内容の一つである。この医学では人体の気の昇降・集散の傾向と消化吸收機能の壮健さにより人を先天的な4つの体質に分類し、その体質診断に基づき、先天的生体の偏りを矯正する処方を服用することで治療・養生を目指す体系である¹²⁾。

4. おわりに

上記のように漢方医学はその地域や環境、歴史的経緯を踏まえてそれぞれに特徴的な医学が育まれてきた。こうした一見大きく異なり矛盾しあうように見えるそれぞれの医学体系もその本質的な内容を理解することで、漢方医学に共通する人体をとらえる視点が理解できると筆者は考えている。そうした内容を踏まえて研究が行われることでより豊富な恩恵を漢方医学から得られるであろう。

[参考文献]

- 1) 小曾戸洋: あじあブックス011 漢方の歴史 大修館書店, 142, 1999.
- 2) 大塚敬節ら 編集: 近世漢方医学集成12 吉益東洞 名著出版, 「医断」23-27, 「類聚方」65, 1981.
- 3) 呉秀三ら 選集: 東洞全集「医事或問」 思文閣出版, 6-9, 1981.
- 4) 安井廣迪: 日本漢方各家学説 日本TCM研究所, 269-270, 2002.
- 5) 大塚敬節ら 編著: 漢方診療医典 第5版. 南山堂, 1990.
- 6) 安井廣迪: 日本漢方各家学説 日本TCM研究所, 56-70, 2002.
- 7) 沈仲理ら 編著: 丁甘仁臨床医集 上海中医薬大学出版社, 1, 2000.
- 8) 南京中医学院編著: 中国漢方医学概論 中国漢方医学書刊行会, 1965.
- 9) 張伯訥: 中医学はいかにして形成されたか 中医臨床5: 8-9, 1981.
- 10) 許浚: 原本 東医宝鑑 新增版 南山堂, 2004

- 11) 大塚敬節ら 編集: 近世漢方医学集成2・3 曲直瀬道三 啓迪集(1)・(2) 名著出版, 1979.
- 12) 李濟馬 著・呉炳豪 編訳: 東医寿世保元 三冬社



筆者紹介

氏名: 加島 雅之 (かしま まさゆき)
所属: 熊本赤十字病院 総合内科
熊本大学大学院医学教育部
病態解析講座 医療情報医学分野

略歴:

- 2002年 国立宮崎医科大学医学部
(現: 国立宮崎大学医学部医学科) 卒業
- 2002年 熊本大学医学部総合診療部入局
- 2002年 熊本大学医学部第2内科(血液・膠原病内科) 勤務
熊本赤十字病院勤務
- 2003年 国立熊本病院 (現: 国立熊本医療センター) 勤務
- 2004年 沖縄県立中部病院 総合内科国内留学
- 2004年 熊本赤十字病院 救急部勤務
- 2005年 熊本赤十字病院 内科勤務～
- 2006年 亀田総合病院感染症科短期留学
- 2007年 熊本大学大学院 社会人大学院入学 (医療情報医学)

日本東洋医学会熊本県部会 幹事 2007年度～
熊本県東方医学研修会 理事 2008年度～
日本中医交流協会 理事 2008年度～
国際東洋医学会日本支部 評議員 2010年度～

研究テーマ: 救急疾患・難治性疾患における漢方医学の包括的応用
漢方医学の普遍的法則性の発見と実践応用できるシステムの開発

Topics on Chemistry

SAM をゲート絶縁膜に用いた有機トランジスタの開発

株式会社同仁化学研究所 栢多 利博

最近、急速に発展してきた有機エレクトロニクスの分野において、有機 EL (organic electro-luminescence)、太陽電池などと並んで注目すべきもののひとつに、有機トランジスタがある。トランジスタとは、“transfer + resistor(電気を伝える抵抗素子)”という言葉からつけられた名前、半導体によって作られた固体増幅素子のことである。トランジスタには、小さな入力信号を忠実に拡大する「増幅器」としての役割と外部からの電圧により電流を流す・流さないといった「スイッチ」の役割がある。トランジスタは、現在のエレクトロニクス製品の殆どすべてに組み込まれており、電子回路の基礎を成す最も主要なパーツのひとつである。

トランジスタといえば、通常シリコンやアモルファスシリコンといった無機材料を用いたものが主流である。しかし、その無機物トランジスタの製造は、シリコン系の基板上に、熱酸化法、化学気相成長法 (CVD)、物理気相法 (PVD) などの方法で成膜する「成膜工程」、フォトリソ塗布、露光、現像といった操作でパターンニングを行う「リソグラフィ工程」、化学反応を利用して薄膜を形状加工する「エッチング工程」、これらの工程により作られた薄膜の表面に、ホウ素 (B)、リン (P)、ヒ素 (As) などの不純物を添加する「ドーピング工程」などの複雑で多数の工程が必要である。そのため、大規模なクリーンルームや真空装置などの製造設備を必要とし、また、その製造工程に最大 300℃ の高温工程を含むため、使用できる基板に制限があるといった課題がある。それに対して、有機トランジスタは、有機物の長所を活かし、溶媒に溶かすことにより、インクジェットなどの印刷技術を用い、無機物トランジスタより低温の工程でガラスやプラスチックなどの様々な基板上に容易に電子回路を製造することができる。そのため、軽量、薄型、大面積、屈曲可能などといった特徴を持ち、電子ペーパーや有機 EL ディスプレイの制御回路、または、RFID (radio-frequency identification) タグなどの次世代エレクトロニクスデバイスとしての活躍が期待される。しかしながら、有機トランジスタの性能 (電子移動度) は、無機物トランジスタにはるかに及ばず、電子移動度をあげるための有機半導

体材料の開発はもとより、高移動度を達成するためのチャンネル長を短くする試みやリーク電流を抑えながら薄膜化への試みなど実用化への課題は多い。このような背景の中、本稿では、ゲート絶縁膜の薄膜化のために自己組織化単分子膜 (self-assembled monolayer; SAM) を使い、チャンネル長を短くするためにインクジェット技術を用いた有機トランジスタ開発への取り組みを紹介する。

Hagen Klauk らは、ゲート絶縁膜に酸化アルミニウム (Al_2O_3) 薄膜と *n*-オクタデシルホスホン酸の SAM を用い、非常に薄い絶縁膜で高いキャパシタンスと低いリーク電流を実現し、消費電力の非常に低い有機電子回路を作製した¹⁾。

これまで、シリコンを用いた無機物トランジスタのゲート絶縁膜にはシリコンの酸化膜である酸化ケイ素 (SiO_2) が用いられてきた (Fig.1 a)。 SiO_2 は、化学的に安定で絶縁性も良好、何よりシリコン上に作製しやすいという利点がある。しかし、微細化が進むにつれて、絶縁膜の厚さが極端に小さくなっていくと、量子効果により絶縁膜を電子が通り抜けるトンネル現象が起こり、リーク電流が増えるため、消費電力が増えるといった問題がでてきた。有機トランジスタにおいても無機物の絶縁膜を用いるのと同じような問題が起こる。そこで、SAM を用いた絶縁膜の開発が行われた。

ガラスや曲げやすいプラスチックなどの基板上にシャドウマスクによりゲート電極としてアルミニウム薄膜の電極パターンを形成し、その表面の一部を短時間の酸素プラズマ処理により酸化して厚さ 3.6 nm の酸化アルミニウム絶縁薄膜を形成する。次に、室温で 2-プロパノール溶媒中で *n*-オクタデシルホスホン酸の SAM を酸化アルミニウム絶縁薄膜上に厚さ 2.1 nm で形成し、厚さ 6 nm の酸化アルミニウムと SAM の絶縁薄膜が作製される。

今までシラン基を持つ SAM がシリコンやインジウムスズ酸化物 (ITO) 上で絶縁膜として用いられていた。しかし、低駆動電圧を実現するため導電性の高いアルミニウムがゲート電極に用いられた。アルミニウム上で *n*-オクタデシルホスホン酸 SAM の密度は、*n*-オクタデシルトリクロロシラン SAM の密度の 2.5 倍以上であった。また、リーク電流もホスホン酸の SAM の方がア

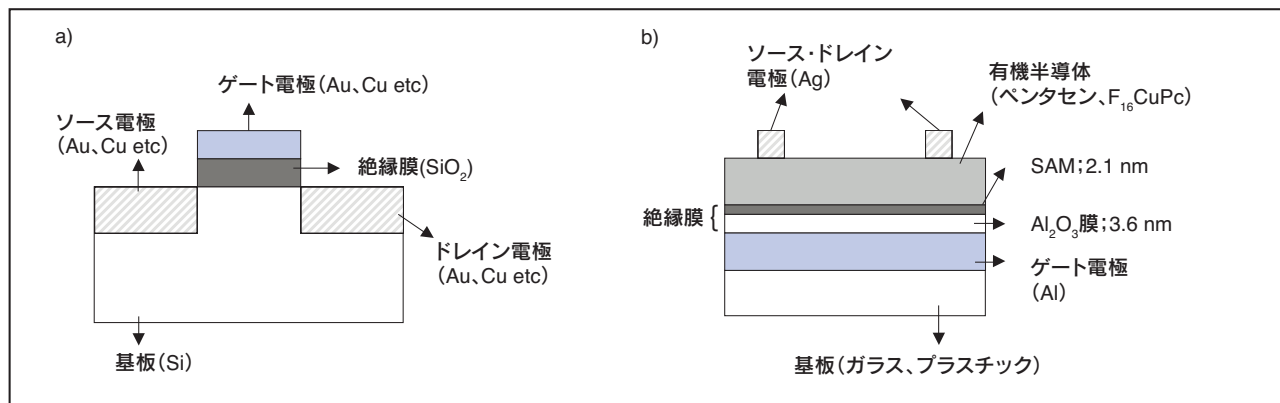
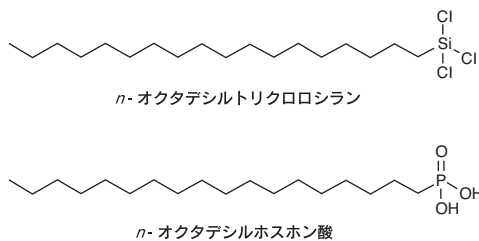


Fig.1 a) 従来型トランジスタの構造模式図

b) 有機薄膜トランジスタの構造模式図

ルキルシランより一桁低く、2 V の電圧で $(5 \pm 1) \times 10^{-8} \text{ A/cm}^2$ であり、ゲートキャパシタンスは $0.7 \pm 0.05 \text{ } \mu\text{F/cm}^2$ であった。これらの結果より、アルミニウム上で自己組織化するためホスホニル基を持つ SAM が選ばれ、*n*-オクタデシルホスホン酸 SAM の優れた絶縁性が証明された。

この SAM 絶縁膜を用い、p-チャンネルと n-チャンネルの有機トランジスタを組み合わせた相補的な回路は、スイッチングの間以外は伝導していない状態で、静止消費電力が常に 100 pA 以下と小さく、静止消費電力の散逸が非常に少ない超低消費電力有機電子回路を実現した。



東京大学の染谷隆夫らのグループは、この有機トランジスタにサブフェムトリットル・インクジェット技術を組み合わせることにより、銀電極の線幅 1 μm 、チャンネル長 2 μm 、絶縁膜厚 6 nm のトップコンタクト型の有機トランジスタを作製した (Fig. 1 b) ²⁾。すなわち、酸化アルミニウム薄膜と *n*-オクタデシルホスホン酸の SAM をゲート絶縁膜に使い、P 型有機半導体としてペンタセン、N 型有機半導体としてヘキサデカフルオロ銅フタロシアニン (F_{16}CuPc) を蒸着法により絶縁膜上に成膜し、銀ナノ粒子のインクをインクジェットで吐出し、有機半導体上に 1 ~ 2 μm の銀電極をパターンニングし、130°C の熱処理を行いトップコンタクト型の有機トランジスタが作製された。これによって、3 V という低駆動電圧で移動度 0.3 cm^2/Vs を実現することができた。

本研究に用いられたインクジェットは、フェムトリットルを再現性よく吐出することができる。インクジェットノズルから吐出された銀ナノ粒子の水滴は $0.7 \pm 0.2 \text{ fL}$ の量であり、空中で直径 0.1 μm 以下である。小さな液滴量により有機半導体上に 1 ~ 2 μm の銀電極をパターンニングできる。液滴量をサブフェムトリットルにすることで、飛翔中にほとんどの有機溶剤は揮発してしまうため、インク着弾後の溶剤による有機半導体膜のダメージを最小にすることができる。また、サブフェムトリットル・インクジェットでは、130°C という低い焼成温度で 25 $\mu\text{m} \cdot \text{cm}$ のライン抵抗を保持することができる。有機半導体は、150°C 以上の温度では不可逆的なダメージを受けるため、この低い焼成温度は、トップコンタクトデバイスの製造にとって重要である。

このようにして、フォトリソグラフィ・プレパターンニングや表面前処理を必要としないインクジェット技術により有機トランジスタの微細化、低電圧化、低消費電力化が実現された。

有機トランジスタの分野は、まだ基礎研究段階であり、実用化には乗り越えなければならない課題が数多く残されている。今回の SAM を絶縁膜に用いる試みにもあるように、有機デバイスの性能は、界面現象に依存することが多い。そのため、いかに良好な界面を実現するかが、素子性能の改善には不可避の問題であり、SAM は有機デバイスの性能向上にまだまだ貢献できる可能性を秘めている。

これからのトランジスタを含む半導体の研究は、電子工学だけに目を向けては先には進めない。電子工学に、化学や物理、またはバイオテクノロジーといった様々な分野の研究が融合し、進化して新しいテクノロジーが生み出されることを期待したい。

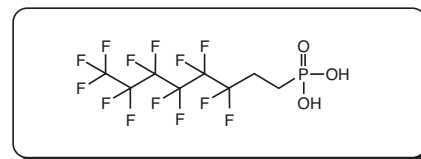
[参考文献]

- 1) H. Klauk, U. Zschieschang, J. Pflaum, M. Halik, *Nature*, **2007**, *445*, 745
- 2) T. Someya, T. Sekitani, Y. Noguchi, U. Zschieschang, H. Klauk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, *105*, 4976

開発中

表面処理用ホスホン酸誘導体

FOPA (1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-Perfluorooctyl phosphonic acid)



ホスホン酸誘導体は酸化アルミニウムや ITO 等の金属酸化物の表面処理・改質剤として、近年、注目されています。

上述のように、Klauk らや Someya らは、アルキルホスホン酸を有機トランジスタの絶縁膜として使用しています。また、Traina らはオリゴエチレングリコール部位を有するアルキルホスホン酸で酸化イットリウム微粒子を修飾し、水溶化することに成功しています ¹⁾。

最近、Sharma らは ITO 基板をパーフルオロアルキル基を有するホスホン酸 (FOPA) で修飾することにより、酸素プラズマ処理と同様に、ITO 基板の仕事関数が増大することを報告しています。

酸素プラズマ処理によって増加した仕事関数は直ぐに低下しますが、FOPA 修飾により増加した仕事関数は安定性が高く、246 時間後も低下しないことが示されています ²⁾。

FOPA は上記のような ITO 修飾以外にも、種々の金属酸化物表面の撥水処理への応用が期待されます。

[参考文献]

- 1) C. A. Traina, A. Christopher, J. Schwartz, *Langmuir*, **2007**, *23*(18), 9158
- 2) A. Sharma, B. Kippelen, P. J. Hotchkiss and S. R. Marder, *Appl. Phys. Lett.*, **2008**, *93*, 163308.

Topics on Chemistry

三脚型 Cu(II)BODIPY[®] 錯体を用いた溶液中でのニトロキシルの直接的および特異的検出

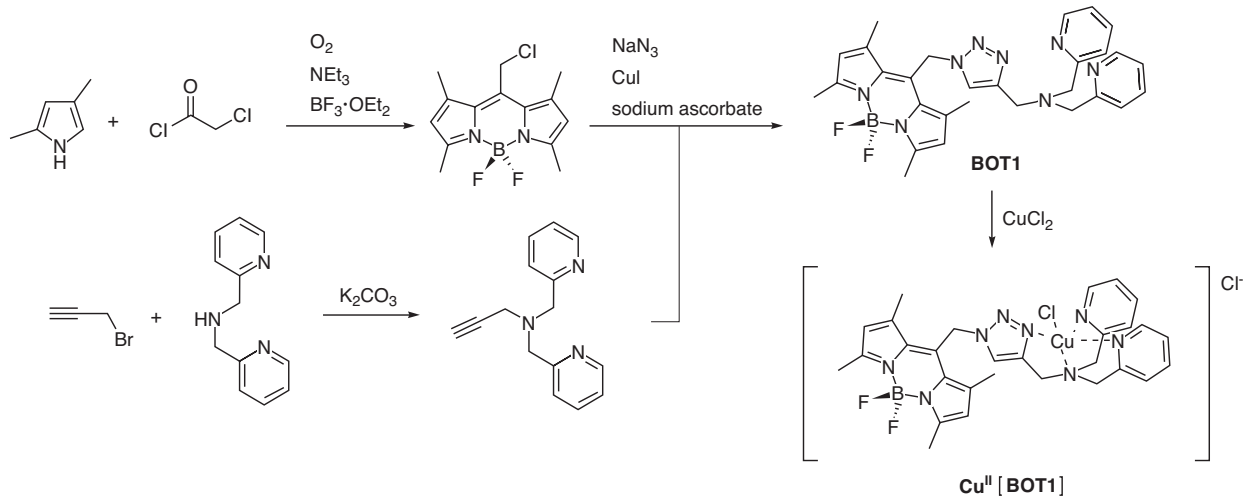
株式会社同仁化学研究所 岩下 秀文

活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) は、DNA 損傷を誘発する代表的な化学種であることが多くの研究者により明らかにされてきている。一方で、二酸化窒素 (nitrogen dioxide; NO₂)、三酸化二窒素 (dinitrogen trioxide; N₂O₃)、過酸化窒素 (peroxynitrite; ONOO⁻) などの活性窒素種 (reactive nitrogen species; RNS) による DNA 損傷も注目されてきているが、その詳細ははまだ研究段階である。活性窒素種の中で、もっとも広く研究されているのが一酸化窒素 (nitric oxide; NO) で、神経化学において重要な役割をもった内在性因子であることが明らかにされ、さらに様々な重要な研究結果が報告されてきた。しかしながら、一電子還元体であるニトロキシル (nitroxyl; HNO, NO⁻) は、DNA の損傷、細胞内グルタチオンの減少を引き起こすなど、注目されてきているものの、それほど研究が進んでいるとは言えないのが現状である¹⁾。本稿では、HNO, NO⁻ を特異的に検出する Cu(II) 錯体蛍光プローブを紹介したい²⁾。

蛍光法を用いた HNO, NO⁻ の検出に要求される重要な性質は

①それ以外の RNS との選択性がない、または低いこと、②生体試料との適合性、③水溶性、④膜透過性である。さらに、高エネルギー照射による細胞の損傷や、細胞の自家蛍光を最小限にするために、長波長領域の蛍光色素が望ましい。

以下に、Rosenthal らの報告²⁾ に基づいてニトロキシルに特異的な蛍光プローブについて解説する。BODIPY[®]-Triazole 1 (BOT1) は、細胞イメージングに適した光学的性質をもつ BODIPY[®] を蛍光検出部位にもち、トリアゾールを介して三脚型ジピコリルアミンを有する構造である。BOT1 は三級窒素を中心に 2 つの 2-ピリジルメチルによって金属を配位することができる。さらに、この構造は蛍光発色団とキレート部位が比較的近い距離に位置するため、光誘起電子移動 (photo-induced electron transfer; PET) 効果により蛍光が消光される性質を有する。BOT1 は、Scheme 1 に示すクリック反応 (click reaction) を利用した経路によって合成されている。



Scheme 1 BODIPY[®]-Triazole 1 (BOT1) の合成

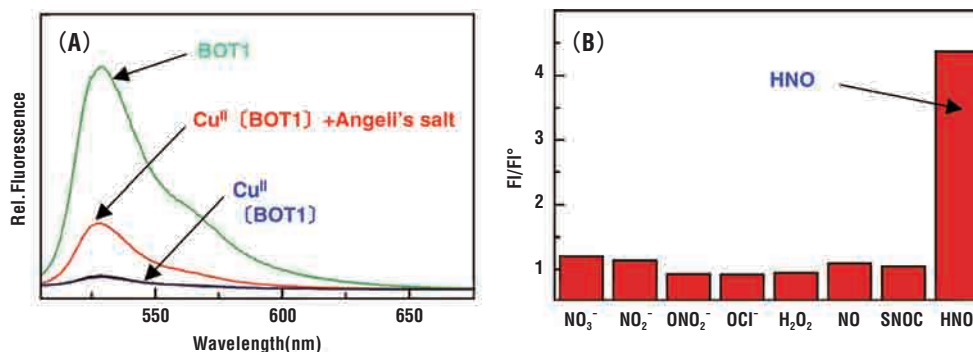


Fig. 1 (A) BOT 1 (上)、Cu^{II}[BOT1](下)、Cu^{II}[BOT1]に Angeli's salt を添加した際 (中) の蛍光スペクトル。(B) Cu^{II}[BOT1]の様々な RNS と ROS との蛍光応答性

開発中

自己組織化単分子膜作製用試薬

Fig.1 に示すように、BOT1 は 518 nm に吸収極大 ($\epsilon = 30\,900 \pm 960 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)、526 nm に最大蛍光波長 (緑) を示し、量子収率は 0.12 である。BOT1 に Cu^{2+} イオンをキレートさせた Cu^{II} [BOT1] は、BODIPY[®] の一重項励起状態から結合 Cu^{2+} イオンへの PET 効果により蛍光強度の減少が観測されている (Fig. 1 (A), 青)。

Cu^{II} [BOT1] に、1000 当量のシステインを添加すると、その蛍光強度は Cu^{2+} イオンを配位していない BOT1 の蛍光強度に回復した。また、緩衝溶液中で Cu^{II} [BOT1] に HNO 発生剤である Angeli's salt を添加すると、約 4.3 倍の蛍光強度の増大が確認された。一般に、Angeli's salt は HNO を発生させるのと同時に NO_2^- を副次的に生成させることが知られている。Rosenthal らは、この現象が NO_2^- による蛍光の増大でないことを、 NaNO_2 を用いた実験により実証し、 Cu^{II} [BOT1] が HNO のみと反応することを明らかにした。この反応は、HNO と Cu^{II} 型スーパーオキシド・ジスムターゼ (SODCu^{II}) が反応して、SODCu^I に還元される反応に似ていると考えられる。さらに、 Cu^{II} [BOT1] の蛍光応答性は、 NO 、 NO_3^- 、 ONOO^- 、 H_2O_2 、 OCl^- などの活性窒素種、活性酸素種との反応から、HNO に対して高い特異性を示すことが分かった (Fig. 1 (B))。

Rosenthal らは細胞中での Cu^{II} [BOT1] の性能も評価している。HeLa 細胞に $1 \mu\text{mol/l}$ Cu^{II} [BOT1] を添加し、一時間インキュベートした。これに、 $200 \mu\text{mol/l}$ Angeli's salt を添加すると 10 分毎に細胞内で赤色蛍光の増大が観測された。一方、Angeli's salt を添加しない場合、または NO 供与体である diethylamine NONOate を添加した場合には、細胞内での蛍光強度は増大しなかった。

以上のように、可視励起・発光プロファイルを有する Cu^{II} [BOT1] は、上記の HNO 検出に要求される①～④の性質を満たし、生体試料中での HNO を検出する初めてのすぐれた蛍光プローブであることが判明した。その際立った特徴は、あらゆる活性窒素の中で HNO 特異的に反応性を示すことである。この蛍光プローブの研究を原点に、HNO の生理学、病理学分野でのさらなる研究の発展に注目したい。

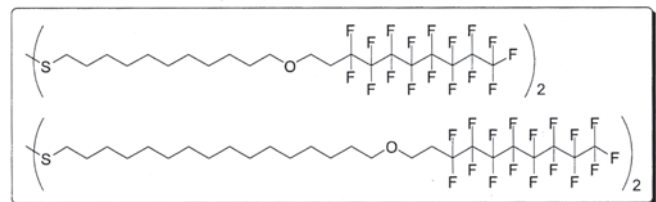
※BODIPYはLife Technologies社の登録商標です。

[参考文献]

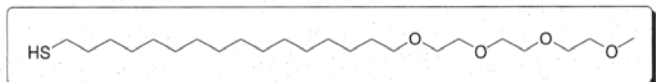
- 1) D. A. Wink, M. Feelisch, J. Fukuto, D. Chistodoulou, D. Jourdain, M. B. Grisham, Y. Vodovotz, J. A. Cook, M. Krishna, W. G. DeGraff, *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *351*, 66–74.
- 2) J. Rosenthal, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 5536–5537.

アルカンチオールやジスルフィド類が金属基板上で形成する自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayers: SAMs) は光スイッチング・光電池などの薄膜光学材料、超微細フォトレジストなどのパターン化材料、つや出し・濡れ性などの表面改質といった機能性材料分野から、マイクロアレイ、化学修飾電極、QCM や SPR 等を用いたバイオセンサーなどの分野で広く応用されています。

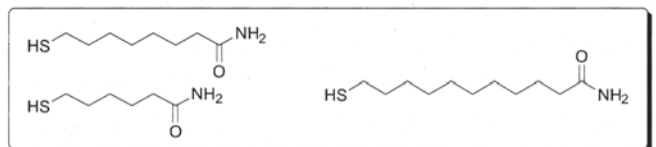
小社では様々な特性を有するチオールやジスルフィド類を販売しており、現在は下図のようなアルキルチオール類を試作しております。ご興味のある方は小社まで御問い合わせ下さい。



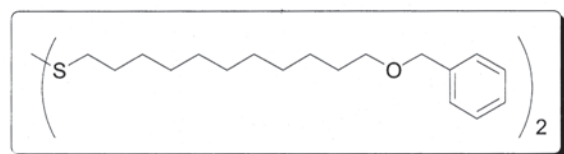
高い撥水性を持ち、化学的に安定な表面を形成することが期待されます。



非特異吸着抑制能を持つことから、SPR や QCM 等のバイオセンサーで用いることができます。



吸着抑制、熱安定性などの効果が期待されます。



芳香族性表面を形成することができます。

新製品

グルタチオン分別定量キット

GSSG/GSH Quantification Kit

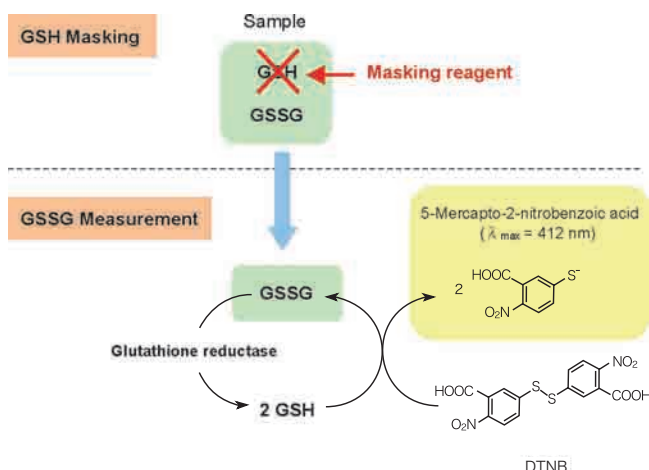
<特長>

- ・グルタチオン（酸化型、還元型）の分別定量が可能
- ・短時間で多検体の測定が可能

グルタチオン（ γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine）は生体内に存在するトリペプチドで、glutathione peroxidase、glutathione S-transferase および thiol transferase 等の酵素基質として抗酸化や薬物代謝などに関与しています。グルタチオンは通常、生体内で還元型（GSH）として存在しています。しかし、酸化ストレスなどの刺激によって還元型（GSH）から酸化型（GSSG）に変換されるため、GSH と GSSG の比率が酸化ストレスの指標として注目されています。小社では総グルタチオン量を定量するためのキット Total Glutathione Quantification Kit（品コード：T419）を販売しておりますが、GSSG および GSH をそれぞれ定量したいという要望が数多く寄せられました。そこで、このたび小社では GSH と GSSG を分別定量できるキットを開発しました。本キットには、GSH を隠蔽するためのマスキング剤が含まれています。このマスキング剤をサンプルに添加することによって、サンプル内の GSH のみを隠蔽することができます。その後、酵素リサイクリング法を用いた DTNB（5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)）発色（ $\lambda_{max} = 412 \text{ nm}$ ）を測定することによって GSSG のみを定量することができ、別途測定した総グルタチオン量から GSSG 量を差し引くことで GSH 量を求めることが可能です。なお、総グルタチオンの測定範囲は $0.5 \sim 50 \mu\text{mol/l}$ 、GSSG の測定範囲は $0.5 \sim 25 \mu\text{mol/l}$ となっております。

次頁に本キットを用いて赤血球中及び HL-60 細胞の前処理例を示します。本キットを用いることによって、これまで困難であった GSSG と GSH をそれぞれ簡便に定量することが可能です。本キットはグルタチオンを指標とした生体内の酸化ストレス状態の解析に有用です。

<測定原理>



<キットの使用法（エンドポイント法）>

試料調製：GSSG と GSH の測り分けを行う場合、測定試料はあらかじめ同一のものを 2 つ（ $200 \mu\text{l} \times 2$ ）準備する。

GSSG 測定用：測定試料 $200 \mu\text{l}$ をマイクロチューブに入れ Masking solution を $4 \mu\text{l}$ 加え、ボルテックスミキサーを用いて混合する（Sample A）。

総グルタチオン測定用：測定試料 $200 \mu\text{l}$ を準備する（Sample B）。
※注意：測定試料中のグルタチオン濃度がわからない場合、測定試料を希釈したものを数種類調製してから測定してください。

測定

- 1) GSSG, GSH standard solution 及び Sample A あるいは Sample B を $40 \mu\text{l}$ ずつ、各 well に入れる。
- 2) Buffer solution $120 \mu\text{l}$ を各 well に加える。
- 3) 37°C で 1 時間インキュベートする。
- 4) Substrate working solution $20 \mu\text{l}$ を各 well に加える。
- 5) Coenzyme working solution $20 \mu\text{l}$ と Enzyme working solution $20 \mu\text{l}$ を各 well に加える。
- 6) 37°C で 10 分間インキュベートする。
- 7) 405 nm もしくは 415 nm のフィルターを使い、マイクロプレートリーダーで各 well の吸光度を測定する。
- 8) 測定試料 (Sample A) 中の GSSG 濃度を GSSG 検量線 (Fig. 1) より求める。
- 9) 測定試料 (Sample B) 中の総グルタチオン (GSH+GSSG) 濃度を GSH 検量線 (Fig. 2) より求める。
- 10) 求めた総グルタチオン (GSH+GSSG) 濃度と GSSG 濃度より、下式を用いて GSH 濃度を算出する。

$$\text{GSH 濃度} = \text{総グルタチオン濃度} - [\text{GSSG 濃度} \times 2]$$

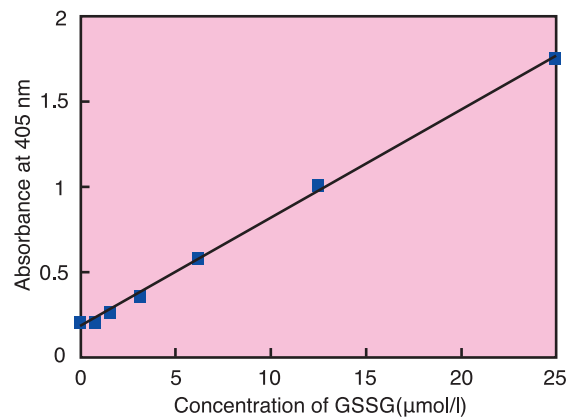


Fig. 1 GSSG 検量線

開発元 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

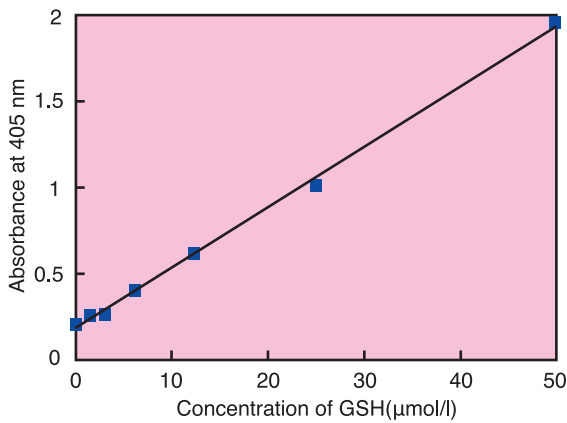


Fig. 2 GSH 検量線

<赤血球のサンプル前処理例>

- 1) 抗血液凝固剤（ヘパリン）を加えた血液を、1,000 x g で 10 分間 4℃にて遠心する。
- 2) 上清を捨て、4 倍量の 5% 5-スルホサリチル酸（SSA）で溶血する。
- 3) 8,000 x g で 10 分間 4℃にて遠心する。
- 4) 上清を新しいチューブに移し、純水にて SSA 濃度が 0.5 ~ 1% になるように希釈したものを測定試料とする。

<細胞（HL60 細胞：5 × 10⁶ cells）のサンプル前処理例>

- 1) 細胞を 200 x g で 10 分間 4℃にて遠心する。
- 2) 上清を捨て、300 μl の PBS buffer で洗浄後、200 x g で 10 分間 4℃にて遠心する。
- 3) 上清を捨てた後、10 mmol/l の HCl を 80 μl 加え、凍結と溶解を 2 回繰り返して細胞膜を破壊する。
- 4) 5% SSA を 20 μl 加え、8,000 x g で 10 分間遠心した。
- 5) 上清を新しいチューブに移し、純水にて SSA 濃度が 0.5 ~ 1% になるように希釈したものを測定試料とする。

※測定試料中の SSA 濃度が 1% を超えると測定に影響がでますので、0.5% ~ 1% になるよう純水で希釈して下さい。

※操作に必要な試薬類（5-スルホサリチル酸（SSA）、エタノールは除く）は、キットに含まれています。

<キット内容>

- ・ Enzyme solution 50 μl × 1 本
- ・ Coenzyme 2 本
- ・ Buffer solution 60 ml × 1 本
- ・ Substrate (DTNB) 4 本
- ・ Standard GSH 1 本
- ・ Standard GSSG 1 本
- ・ Masking reagent 20 μl × 1 本



| 品名 | 容量 | 希望納入価格(¥) | メーカーコード |
|-----------------------------|-----------|-----------|---------|
| GSSG/GSH Quantification Kit | 200 tests | 50,000 | G257 |

学会展示のご案内

第 62 回 日本生物工学会大会

期 日：2010 年 10 月 27 日（水）～ 29 日（金）

場 所：フェニックスシーガイア・リゾート
ワールドコンベンションセンター・サミット
（宮崎市山崎町浜山）

※ランチョンセミナーも同時開催

第 33 回 日本分子生物学会年会・第 83 回 日本生化学会大会
合同大会

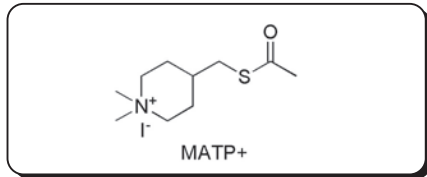
期 日：2010 年 12 月 7 日（火）～ 10 日（金）

場 所：神戸国際展示場（神戸市中央区港島中町 6-11-1）

試作販売品

アセチルコリンエステラーゼ特異的基質

MATP+



<特長>

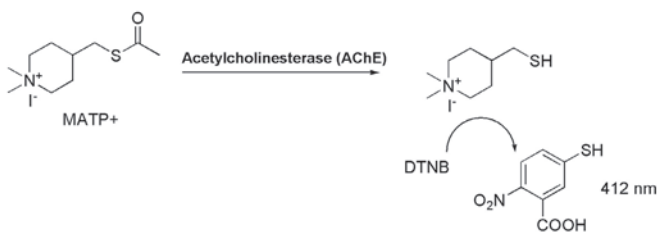
- ・アセチルコリンエステラーゼに対する高い選択性
- ・ブチリルコリンエステラーゼ阻害剤添加は不要
- ・DTNBを用いた Ellman 法によりアセチルコリンエステラーゼ活性を簡便に測定可能

アセチルコリンエステラーゼ (AChE) は、神経伝達物質であるアセチルコリンを分解して神経伝達系をコントロールする重要な酵素の一つであり、脳や血中等に存在することが知られています。この酵素は有機リン系およびカルバメート系の農薬や殺虫剤などによって活性が低下することから、これらの薬物の暴露指標として用いられています。また、アルツハイマー病では神経障害によってアセチルコリン量が減少するため、AChE 阻害剤がアルツハイマー病治療薬として注目されています¹⁾。

現在、AChE 活性測定には、基質であるアセチルチオコリンと検出試薬である DTNB を用いた Ellman 法が一般的に用いられています^{2,3)}。しかしながら、アセチルチオコリンは、AChE 選択性が低く、生体内に存在する非特異的コリンエステラーゼ (ブチリルコリンエステラーゼ; BChE) に対しても反応します。そのため、AChE 活性を測定するには BChE 阻害剤を添加する必要があり、操作が煩雑でした⁴⁻⁶⁾。

MATP+ は、独立行政法人 放射線医学総合研究所 (NIRS) によって開発された新規のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 基質です⁷⁾。

<測定原理>



この基質は、一般的に用いられているアセチルチオコリンに比べ、非常に高い AChE 選択性を有しています (Fig. 1, 2)。そのため、BChE 阻害剤を添加することなく AChE 活性を選択的かつ簡便に測定することができます。

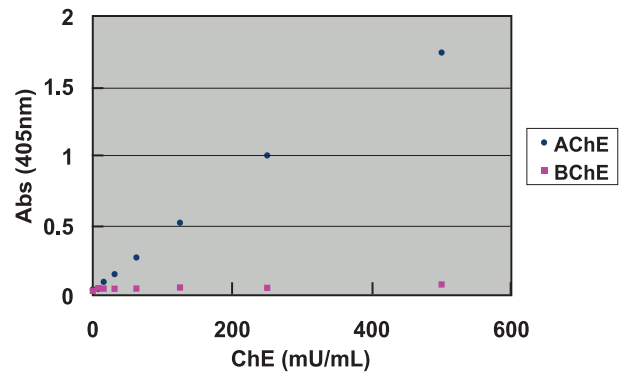


Fig. 1 MATP+ の AChE 選択性 (DTNB 発色)

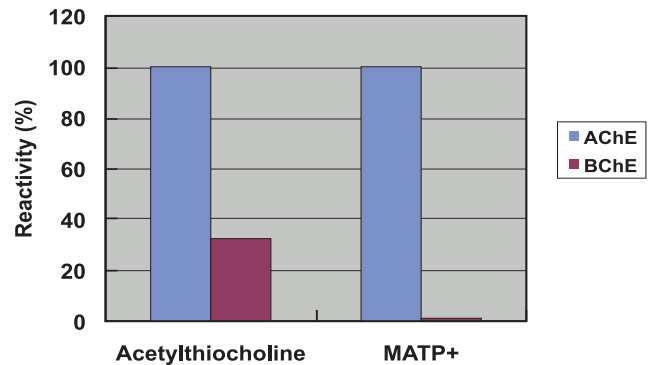


Fig. 2 AChE 選択性の比較

注) AChE に対する反応性を 100% とした場合の値を示す。

次項に全血および血漿をサンプルとして用いた場合の AChE 活性を測定した例を示します。一般的な基質であるアセチルチオコリンを用いた場合には、全血中だけではなく、AChE をほとんど含まない血漿中でも大きな発色が見られます。一方、MATP+ を用いた場合には、全血中では発色しますが、血漿中ではほとんど発色しません (Fig. 3)。血漿中には BChE が多く含まれていることが知られており、今回の結果は MATP+ が血漿中の BChE とは反応せず、AChE と選択的に反応していることを示しています。また、全血中の AChE 活性をリアルタイム測定するため、F. Worek らの手法⁸⁾ を参照し、436 nm 吸光度の発色速度をモニターしました。その結果、直線的な 436 nm 吸光度の増加が見られ、ヘモグロビンの影響を受けることなく全血中の AChE 活性をリアルタイムに測定できることが確認できました (Fig. 4)。

本試薬は、高い AChE 選択性を示すことから、これまで煩雑であった BChE 阻害剤の添加や赤血球の単離を行うことなく、簡便に血液中の AChE 活性を測定できます。また、神経組織の AChE 活性測定や Karnovsky/Roots 法を用いた AChE 染色にも有用です。

[測定例 1] 血液中のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性測定

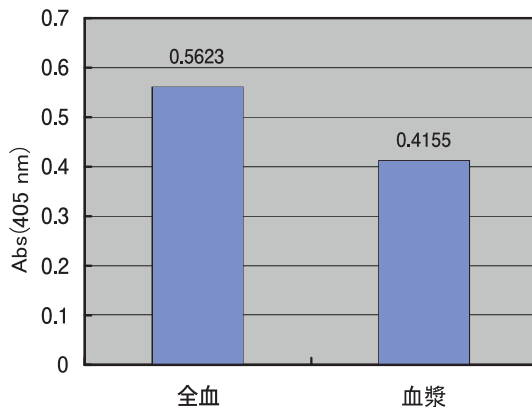
サンプルの前処理

- 1) ヘパリン処理した血液を全血サンプルとした。
- 2) ヘパリン処理した血液 40 μ l を 1000 \times g で 10 分間 4℃にて遠心し、上清を血漿サンプルとした。

測定

- 1) pH 7.4 100 mmol/l リン酸バッファー 500 μ l に血液サンプル (全血、血漿) 5 μ l を添加し、100 倍希釈液とした。
- 2) 操作1)で調製したサンプル溶液200 μ lにAChE基質(Acetylthiocholine; 200 μ mol/l, MATP+; 1 mmol/l) 100 μ lおよび2 mmol/l DTNB 100 μ lを添加した。
- 3) 37℃で 10 分間静置した後、1000 \times g で 10 分間遠心した。
- 4) 上清 200 μ l を 96 穴マイクロプレートのウェルに移し、マイクロプレートリーダー (405 nm フィルター) で測定した。

● Acetylthiocholine 使用



● MATP+ 使用

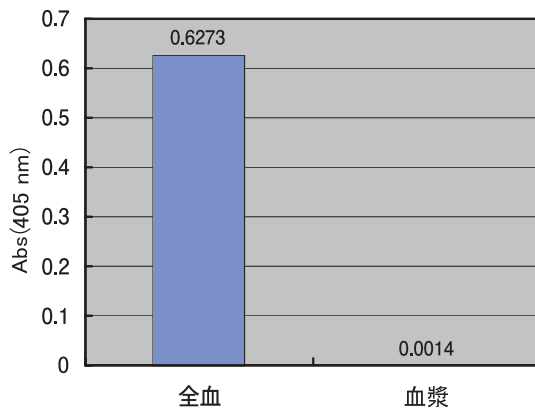


Fig. 3 全血および血漿サンプルを用いた AChE 活性測定

[測定例 2] 全血中のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性測定 (Kinetics)

- 1) ヘパリン処理した血液を pH 7.4 100mmol/l リン酸バッファーで 100 倍希釈し、血液サンプルとした。
- 2) 操作 1) で調製した血液サンプル 1 ml、pH 7.4 100 mmol/l リン酸バッファー 1.8 ml、10 mmol/l DTNB 0.1 ml および 10 mmol/l MATP+ 0.1 ml をキュベットに添加した。
- 3) 37℃で 436 nm 吸光度変化を測定した。

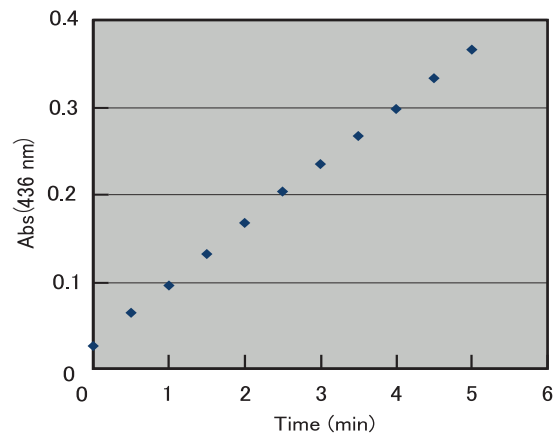


Fig. 4 MATP+ を用いた全血中の AChE 活性測定

[参考文献]

- 1) 杉本八郎 日薬理誌, **2004**, 124, 163-170.
- 2) Vanessa Battissi *et al.*, *Clin. Chim. Acta.*, **2009**, 402, 114-118.
- 3) M. Salud Garcia-Ayllon *et al.*, *Hepatology*, **2006**, 43, 445-453.
- 4) Stephen Brimijoin and Pamela Hammond, *J. Neurochemistry*, **1988**, 51, 1227-1231.
- 5) Franz Worek *et al.*, *Clin. Chim. Acta.*, **1999**, 288, 73-90.
- 6) Ramachandra S. Naik *et al.*, *Chem. Biol. Interact.*, **2008**, 175, 298-302.
- 7) T. Kikuchi, T. Okamura, K. Fukushi, and T. Irie, *Biol.Pharm.Bull.*, **2010**, 33, 702-706.
- 8) F. Worek *et al.*, *Clin. Chim. Acta.*, **1999**, 288, 73-90.

| 品名 | 容量 | 希望納入価格(¥) | メーカーコード |
|-------|-------|-----------|---------|
| MATP+ | 10 mg | 20,000 | M450 |



21st Forum in DOJIN フォーラム・イン・ドージン

エピジェネティクスによる 細胞のメタモルフォーゼ

場 所: 熊本ホテルキャッスル 2F(熊本市城東町4-2)

日 時: 2010年11月26日(金)9:30~16:50(開場 9:00)

代表世話人: 山本 哲郎(熊本大学大学院生命科学研究部 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

参加費: 無 料

定 員: 200名

●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

Session 1: <座長: 山本 哲郎(熊本大学大学院生命科学研究部 分子病理学分野)>

9:45~10:45

田嶋 正二(大阪大学蛋白質研究所 エピジェネティクス研究室)

「ゲノムメチル化模様形成と維持」

10:45~11:30

中尾 光善(熊本大学発生医学研究所 細胞医学分野)

「エピジェネティクス機構による細胞制御と病態」

11:30~12:15

胡桃坂 仁志(早稲田大学理工学術院先進理工学部 電気・情報生命工学科)

「ヌクレオソームの立体構造からみたエピジェネティクスの分子機構」

12:15~13:25

<ランチブレイク: ランチオンセミナー(12:45~13:05)>

Session 2: <座長: 西中村 隆一(熊本大学発生医学研究所 腎臓発生分野)>

13:25~14:10

石野 史敏(東京医科歯科大学難治疾患研究所 エピジェネティクス分野)

「ゲノムインプリンティング: 哺乳類におけるその生物学的意義」

14:10~14:55

中山 潤一(理化学研究所発生・再生科学総合研究センタークロマチン動態研究チーム)

「ヒストンのメチル化修飾とエピジェネティクス制御」

14:55~15:10

<コーヒブレイク>

Session 3: <座長: 富澤 一仁(熊本大学大学院生命科学研究部 分子生理学分野)>

15:10~15:55

近藤 豊(愛知県がんセンター研究所 分子腫瘍学部)

「がん細胞の制御に係わるエピジェネティクス機構」

15:55~16:40

沖 昌也(福井大学大学院工学研究科 生物応用化学専攻)

「出芽酵母染色体上における境界形成機構と

エピジェネティックな遺伝子発現調節機構との関わり」

16:40~16:50

閉会の挨拶/三浦 洵(株式会社 同仁化学研究所)

17:00~19:00

ミキサー

【問い合わせ・参加申込先】

〒861-2202 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: 尾方

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

◆ランチオンセミナーでは、事前登録をいただいた方へ昼食(お弁当)をご用意いたしております。

◆講演終了後、ミキサー(無料)を同会場にて予定いたしております。

◆参加ご希望の方は、所属・氏名・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。

◆駐車場は有料となりますので(聴講による優待はございません)、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