

2013
No.148

ISSN 0385-1516

**DOJIN**

NEWS

ドージンニュース

CONTENTS

●Review

硫化水素による膵B細胞保護
大分大学 木村俊秀・岡本光弘

連載

新しいナノ材料としてのカーボンナノチューブ
—最近の展開(バイオからエネルギーまで)③
九州大学 中嶋直敏・福丸貴弘・藤ヶ谷剛彦

●Topics on Chemistry

サルフェン硫黄検出用新規蛍光プローブ
とバイオイメージングへの応用
株式会社同仁化学研究所 立中佑希



CONTENTS

Review

硫化水素による膵B細胞保護 ●———— [1]

大分大学

木村 俊秀・岡本 光弘

連載

新しいナノ材料としてのカーボンナノチューブ
—最近の展開（バイオからエネルギーまで）③ ●—— [5]

九州大学

中嶋 直敏・福丸 貴弘・藤ヶ谷 剛彦

Topics on Chemistry

サルフェン硫黄検出用新規蛍光プローブと
バイオイメージングへの応用 ●—— [10]

株式会社同仁化学研究所 立中 佑希

Commercial

新製品

内胚葉分化モニタリングキット ●———— [15]

プロテオーム解析用試薬 ●———— [16]

開発中

硫化水素研究用試薬およびキット ●———— [12]

ミトコンドリア膜脂質過酸化検出蛍光試薬 ●———— [14]

試作品

ICG誘導体 ●———— [13]

N⁶-2AE-NAD ●———— [13]

関連製品

Liperfluo・Spy-LHP・DPPP ●———— [14]

One Shot type ●———— [17]

His-tag 試薬 ●———— [17]

お知らせ

学会展示のご案内 ●———— [9]

日経バイオテク ONLINE の紹介 ●———— [11]

パンフレットのご案内 ●———— [11]

第 24 回フォーラム・イン・ドージン開催 ●———— [18]

新製品案内

内胚葉分化モニタリングキット

品名	容量	希望納入価格(円)	コード
ES/iPS Differentiation Monitoring Kit - Human Endoderm	96 tests	95,000	ES01
ES/iPS Differentiation Monitoring Kit - Mouse Endoderm	96 tests	95,000	ES02

プロテオーム解析用試薬

品名	容量	希望納入価格(円)	メーカーコード
NTA-SAM Formation Reagent	2 μmol × 3	18,000	N475

硫化水素による膵B細胞保護

Hydrogen sulfide protects pancreatic beta-cells from cell death



木村 俊秀

大分大学医学部薬理学教室 准教授



岡本 光弘

大分大学大学院医学系研究科 博士課程

要旨

Hydrogen sulfide was historically recognized to be a toxic gas generated by natural resources. However, intracellular enzymatic production of hydrogen sulfide as a metabolite of L-cysteine has been recently demonstrated in mammals. More attention has been paid to hydrogen sulfide as a potential intracellular messenger, because it participates in modification of long-term potentiation in the neural cells and relaxation of the smooth muscle cells.

We previously reported that the hydrogen sulfide donor NaHS inhibited glucose-induced insulin release from mouse pancreatic islets. Underlying mechanisms for the inhibition seems to be multiple. They include metabolic inhibition, opening of the ATP-sensitive K⁺ channel and other non-ionic events. We also demonstrated that NaHS and L-cysteine, a substrate for the hydrogen sulfide-producing enzymes, protected mouse islet cells from apoptotic cell death induced by high glucose or fatty acids, although they failed to influence ER-stress-induced islet cell death by thapsigargin or tunicamycin. NaHS increased total glutathione levels and decreased the production of reactive oxygen species in the mouse beta-cell line MIN6. Finally, we found that the expression of the hydrogen sulfide-producing enzyme cystathionine gamma-lyase (CSE) was induced by stimulation with glucose or anti-diabetic sulfonylureas in mouse islets. This supports an idea that hydrogen sulfide may be produced in an inducible manner just like the other two gasotransmitters nitric oxide and carbon monoxide. These findings also tempt us to suggest that hydrogen sulfide produced by CSE may be an intrinsic brake equipped within the pancreatic beta cell to inhibit insulin release and reduce cellular stress evoked by glucose and other insulin secretagogues, possibly via its anti-oxidant actions.

1. はじめに

1980年代に一酸化窒素が、続いて一酸化炭素が細胞内あるいは細胞間の情報を伝達することが明らかになり、メッセンジャーの概念に気体分子が加わることになった。硫化水素がシグナルを伝達することは、わが国の木村英雄（現・国立精神・神経医療研究センター）によって初めて提唱された。それから15年あまりを経て、硫化水素が第3のガス性メッセンジャーであるという認識に異論を唱える人はいないであろう。それを裏付けるように、硫化水素の影響を扱った論文が最近5年で急増し、関連する細胞機能も神経伝達・筋収縮から分泌現象・細胞死へと急速な広がりをみせている。本総説では、これまでの著者らの研究成果を中心に、膵B細胞における硫化水素の産生機構とインスリン分泌や細胞死への影響を概説し、硫化水素が細胞内で果たす役割について議論する。

2. シグナル分子としての硫化水素

硫化水素は、古くより自然界で産生される有毒ガスとして認識されてきた。実際、地獄谷と呼ばれる地域や鉱山などでは毒ガスによる事故の記録が残っているが、このガスの主要な有毒成分は硫化水素である。硫化水素の産生源は、自然界だけではない。近代になってからは、化学工場やゴミ処理場など人為的な発生源から産生されることも知られている。硫化水素の毒性は極めて強く、呼吸鎖を構成する酵素を阻害することで死に至らしめることも少なくない。一方で、このガスは硫化水素泉の効能に挙げられるように、健康を促進する一面ももちあわせている。

硫化水素が生体内で産生されていることは、このガスによる中毒の研究に端を発している。1989年、脳内に高濃度の硫化水素が存在している可能性が示唆された¹⁾。1996年には、硫化水素が海馬神経細胞においてNMDA受容体のシグナルを増幅すること



図1 糖尿病状態における膵B細胞死を抑制

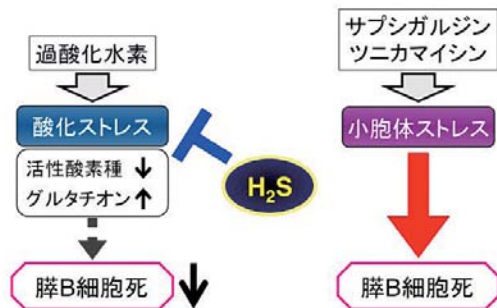


図2 硫化水素による酸化ストレスの抑制

で、長期増強を促進することが報告された²⁾。硫化水素が細胞内でシグナル分子として働いていることが認識されたわけである。次いで、硫化水素が平滑筋を弛緩させることが報告された³⁾。現在では、硫化水素が一酸化窒素や一酸化炭素に次ぐ第3のガス性メッセンジャーであることが広く受け入れられている⁴⁾。

生体内の硫化水素は、現在4種類の産生酵素によって制御されていると考えられている。CBS (cystathionine beta-synthase)は脳における主要な硫化水素産生酵素として同定され、前述の海馬長期増強に関わっている。現在では、脳以外に腎臓や肝臓に発現することがわかっている。CSE (cystathionine gamma-lyase)は平滑筋における硫化水素の産生源として同定され、弛緩作用を制御している。CSEは、脳を除く腎臓や肝臓などいくつかの組織に発現している。CAT (cysteine aminotransferase)と3-MST (3-mercaptopyruvate sulfurtransferase)は海馬や大脳皮質の錐体細胞などの神経細胞や血管平滑筋に発現し、2つの酵素が協調的に働くことで硫化水素を産生する。これらの酵素は、L-システインを基質としており、CBSとCSEは細胞質に、3-MSTは細胞質に加えてミトコンドリアのマトリックスに局在している。最近、D-システインから硫化水素を生合成する新規経路が腎臓で発見された⁵⁾。この経路では、DAO (D-amino acid oxidase)と3-MSTが協調的に働くことで、小脳や腎臓で硫化水素を産生する。特に、腎臓ではD-システインがL-システインに比べて80倍効率よく硫化水素を生成することがわかり、医療への応用が期待されている。また、硫化水素は各組織の産生酵素に加えて、腸内細菌により産生されることも知られている。硫化水素がガス性メッセンジャーであることから、周辺組織への影響を無視することはできない。上述の4種類の酵素は、発現が一部オーバーラップしている。そのため、各酵素の硫化水素産生能の違いや各組織における寄与については、さらなる解析が必要である。

3. インスリン分泌抑制効果

糖尿病はインスリンの欠乏および作用不全を示す全身性の代謝疾患である。我が国の糖尿病の大半を占める2型糖尿病では、膵B細胞からのインスリン分泌障害とインスリン標的細胞におけるインスリン抵抗性が様々な割合で入りまじっている。特に、日本人の糖尿病患者では前者の占める割合が大きいことが臨床的な研究から明らかにされている。インスリンは、血中のグルコース濃度すなわち血糖値の維持に重要なホルモンで、膵臓のランゲルハンス島(膵島)に存在する膵B細胞から分泌される。細胞内で合

成されたインスリンは、顆粒膜に包まれた後に細胞膜近傍へ輸送される。グルコース刺激は、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を介して顆粒膜と細胞膜の融合を促進し、インスリンを細胞外に放出する。

インスリン分泌を調節する栄養物質には、糖類やアミノ酸、脂質などが挙げられる。これらの物質で分泌抑制効果をもつものは極めて少なく、なかでも代謝されることによって分泌を抑制する物質は、ほとんど知られていない。筆者らは、非必須アミノ酸であるL-システインが複数の経路を介して、膵B細胞からのインスリン分泌を抑制することを見いだした⁶⁾。L-システインによる分泌抑制は、高グルコースに加えてスルホニル尿素薬やケトイソカプロン酸、高カリウム脱分極による分泌刺激条件でもみられた。さらに、L-システインによる分泌抑制効果は、細胞膜を透過性処理した細胞でも見られた。さらに、L-システインが細胞内のATP産生を抑制することを、ルシフェリン・ルシフェラーゼ法とRhodamine123を用いたミトコンドリア膜電位測定より明らかにした。また、グルコースによっておこるカルシウムイオンのオシレーションをL-システインが抑制することも報告している。

筆者らは、L-システインの効果を検討していく過程で、このアミノ酸から少なくとも部分的には硫化水素が産生され、インスリン分泌を抑制することを明らかにした⁶⁾。硫化水素ドナーであるNaHSは、L-システインでみられた抑制効果を再現した。さらに、膵B細胞に硫化水素産生酵素が発現していること、L-システイン処理により膵B細胞内で硫化水素が産生されることを見いだした。硫化水素は、代謝によるATP産生の抑制や細胞内カルシウムイオンの動態に依存せずにインスリン分泌を抑制する経路ももっているが⁶⁻⁸⁾、その詳細な機構に関しては今後の研究にゆだねられている。

4. 膵B細胞保護効果

硫化水素は、血管平滑筋の弛緩や神経伝達の調節に加えて、細胞死の惹起や抑制にも関わっている。惹起と抑制は、細胞や組織、種差に加えて、硫化水素の濃度や処置法、細胞障害の種類によって決まっていると考えられている。これは、硫化水素特異的な性質ではない。硫化水素より先行している一酸化窒素の研究では、濃度の違いにより相反する効果があらわれる「二面性の作用」が報告されている。

筆者らは、マウス膵島とマウス培養膵B細胞MIN6を用いて、高グルコースによって誘導される膵B細胞死に硫化水素が及ぼす影響を検討した⁹⁾。L-システインとNaHSは、高グルコースで誘導される膵B細胞死を抑制した(図1)。さらに、L-システインによる細胞死の抑制は、CSE阻害薬PPGの存在下ではみられなかった。また、この抑制には細胞内のグルタチオンの増加や活性酸素種産生の抑制が関与していることを示した。膵島機能への影響を検討した結果からは、細胞死の抑制は高グルコースによるインスリン分泌能の低下を改善し、膵B細胞を保護することがわかった。

硫化水素による膵B細胞保護は、グルコース刺激に特異的ではない(図1)。硫化水素は、パルミチン酸やサイトカイン、過酸化水素で誘導した細胞死にも同様の抑制効果を示した¹⁰⁾。一方、小胞体ストレスを誘発するサブシガルジンやツニカマイシンによる膵B細胞死には影響を及ぼさなかった(図2)。私たちの結果は、硫化水素が酸化ストレスから膵B細胞を保護するが小胞体ストレスには影響を及ぼさないことを示している。この保護作用は、前述の細胞内グルタチオンの増加を介した抗酸化作用に加えて、細

	構成性	誘導性
NO	cNOS	iNOS
CO	HO2	HO1
H ₂ S	CBS	CSE

図3 ガス性メッセンジャー産生酵素

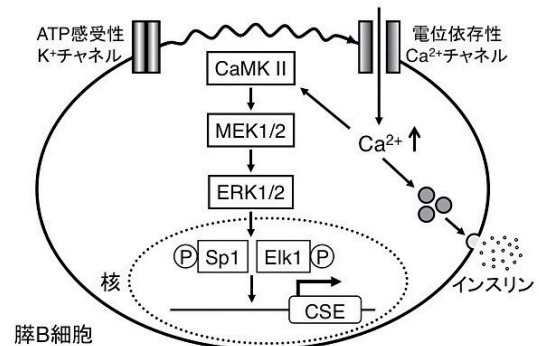


図5 膵B細胞におけるCSE発現誘導機構

胞保護的に働くプロテインキナーゼ Akt の活性化を介している。一方、Yang たちは、ラットインスリノーマ INS-1E を用いた実験より、高濃度の硫化水素が小胞体ストレスを介した細胞死を引き起こすことを報告している¹¹⁾。その差異は、膵B細胞における硫化水素の二面性を示していると考えられる。

5. 誘導性硫化水素産生酵素 CSE

組織や細胞種によって、機能している硫化水素産生酵素は異なっている。筆者らは、硫化水素のインスリン分泌抑制効果（硫化水素の短期的効果）を調べている過程で、膵B細胞には CBS と CSE が発現していることを明らかにした⁶⁾。その後、硫化水素の細胞保護効果（硫化水素の長期的効果）を解析する過程で、高グルコースで長期間培養した膵島で CSE の発現が上昇することを見いだした⁹⁾。発生過程で硫化水素産生酵素が誘導されることは既に知られていた^{12,13)}。また、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) が胃粘膜細胞の CSE の発現を抑制する報告もある¹⁴⁾。しかし、グルコースという生理的な物質が硫化水素産生酵素の発現を誘導することを示した報告は、筆者らの論文が初めてである (図3)。興味深いことに、膵B細胞で保護効果を示したのは、発現誘導された CSE からの硫化水素であった⁹⁾。長期間培養による CSE の発現上昇は、高グルコースに加えてスルホニル尿素薬でも

みられたが、ニトレンジピンやジアゾキシド、マンノヘプトコースではみられなかった¹⁵⁾。つまり、インスリン分泌を惹起する物質で長期間培養した膵B細胞において、CSE の発現が誘導されることが明らかになったわけである (図4)。

筆者らは、誘導性硫化水素産生酵素 CSE に着目し、その発現制御機構の解析を行った¹⁵⁾。インスリン分泌惹起物質による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は、CaM キナーゼ II を介した MAP キナーゼ経路を活性化した (図5)。その結果、転写因子の SP1 と Elk1 がリン酸化された。さらに、2つの転写因子をルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価した結果、SP1 は転写調節領域に直接結合して CSE の発現を促進するが、Elk1 は間接的な制御を行うことを明らかにした。グルコースによる SP1 のリン酸化は、MIN6 に加えて INS-1E でも確認されている¹⁶⁾。

インスリン分泌を惹起するグルコースで長期間暴露された膵B細胞は、CSE の誘導を介して細胞内の硫化水素産生を促進する。産生された硫化水素は、短期的にはインスリン分泌を抑制し、長期的には膵B細胞を保護する。筆者らは、硫化水素とは疲弊した膵B細胞の活動 (インスリン分泌) を下げることで、慢性的な高グルコースによる障害から自身を守るための保護因子 (intrinsic brake) であると考えている (図6)。

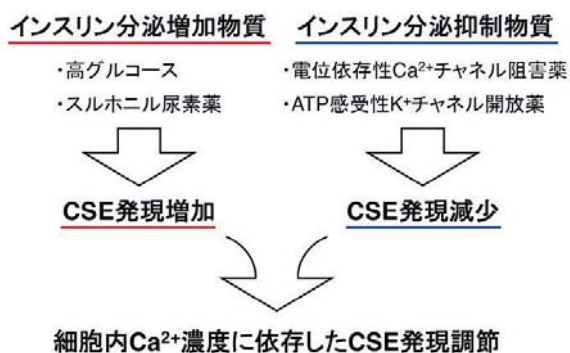


図4 膵B細胞におけるCSE発現調節

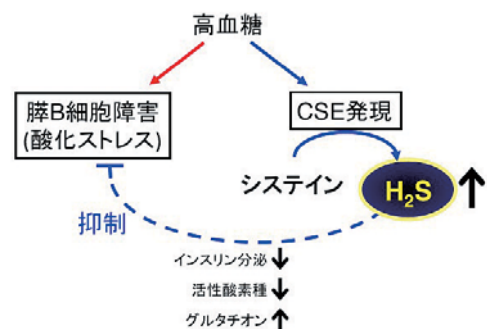


図6 糖尿病状態における硫化水素産生と膵B細胞保護

6. おわりに

本総説では、これまでの筆者らの研究を中心に、膵B細胞における硫化水素の機能について紹介した。硫化水素のインスリン分泌抑制効果は一見、糖尿病治療薬への応用からは外れているように見える。しかしながら、この抑制効果が膵B細胞を慢性的な高血糖による障害から守ることは興味深い。筆者らは現在、個体レベルの解析を行うためにCSEノックアウトマウスにおける耐糖能異常について研究を行っている。また、紙面の都合上、今回は紹介できなかったが、CSEから産生された硫化水素による細胞保護機構を分子レベルで解析するために、そのターゲット分子の網羅的な解析を行っている。これらの研究についても、近い将来に報告できることを期待している。

7. 謝辞

本研究は、大分大学医学部 故仁木一郎教授、精神・神経医療研究センター 木村英雄部長、琉球大学医学部 山本秀幸教授、藤田保健衛生大学医学部 湯沢由紀夫教授、大分大学医学部 石崎敏理教授、慶應義塾大学薬学部 石井功准教授、北里大学薬学部 内藤康仁講師、静岡県立大学薬学部 金子雪子助教との共同研究によるものです。また、本研究を推進するにあたり大分大学医学部薬理学教室の学生諸氏のご協力を得たことを感謝致します。本研究の一部は、文部科学省科学研究費(C)及び、大分放送文化振興財団の支援により行われました。

[参考文献]

- M. W. Waryncia, L. R. Goodwin, C. G. Benishin, R. J. Reiffenstein, D. M. Francom, J. D. Taylor and F. P. Dieken, "Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels", *Biochemical pharmacology*, **1989**, 38, 973-981.
- K. Abe and H. Kimura, "The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. The Journal of neuroscience", *the official journal of the Society for Neuroscience*, **1996**, 16, 1066-1071.
- R. Hosoki, N. Matsuki and H. Kimura, "The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide", *Biochemical and biophysical research communications*, **1997**, 237, 527-531.
- P. K. Moore, M. Bhatia and S. Mochhala, "Hydrogen sulfide, from the smell of the past to the mediator of the future?", *Trends in pharmacological sciences*, **2003**, 24, 609-611.
- N. Shibuya, S. Koike, M. Tanaka, M. Ishigami-Yuasa, Y. Kimura, Y. Ogasawara, K. Fukui, N. Nagahara and H. Kimura, "A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells", *Nature communications*, **2013**, 4, 1366.
- Y. Kaneko, Y. Kimura, H. Kimura and I. Niki, "L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic beta-cell, possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter", *Diabetes*, **2006**, 55, 1391-1397.
- M. Y. Ali, M. Whiteman, C. M. Low and P. K. Moore, "Hydrogen sulphide reduces insulin secretion from HIT-T15 cells by a KATP channel-dependent pathway", *The Journal of endocrinology*, **2007**, 195, 105-112.
- W. Yang, G. Yang, X. Jia, L. Wu and R. Wang, "Activation of KATP channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms", *The Journal of physiology*, **2005**, 569, 519-531.
- Y. Kaneko, T. Kimura, S. Taniguchi, M. Souma, Y. Kojima, Y. Kimura, H. Kimura and I. Niki, "Glucose-induced production of hydrogen sulfide may protect the pancreatic beta-cells from apoptotic cell death by high glucose", *FEBS letters*, **2009**, 583, 377-382.
- S. Taniguchi, L. Kang, T. Kimura and I. Niki, "Hydrogen sulphide protects mouse pancreatic beta-cells from cell death induced by oxidative stress, but not by endoplasmic reticulum stress", *British journal of pharmacology*, **2011**, 162, 1171-1178.
- G. Yang, W. Yang, L. Wu and R. Wang, "H₂S, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis of insulin-secreting beta cells", *The Journal of biological chemistry*, **2007**, 282, 16567-16576.
- N. Akahoshi, T. Izumi, Y. Ishizaki and I. Ishii, "Differential induction of cystathionine gamma-lyase in the livers and kidneys of mouse dams during gestation and lactation", *Biological & pharmaceutical bulletin*, **2006**, 29, 1799-1802.
- S. Kruck, V. R. Mittapalli, F. Prols and M. Scaal, "Cystathionine gamma-lyase expression during avian embryogenesis", *Journal of anatomy*, **2009**, 215, 170-175.
- S. Fiorucci, E. Antonelli, E. Distrutti, G. Rizzo, A. Mencarelli, S. Orlandi, R. Zanardo, B. Renga, M. Di Sante, A. Morelli, G. Cirino and J. L. Wallace, "Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs", *Gastroenterology*, **2005**, 129, 1210-1224.
- S. Taniguchi, T. Kimura, T. Umeki, Y. Kimura, H. Kimura, I. Ishii, N. Itoh, Y. Naito, H. Yamamoto and I. Niki, "Protein phosphorylation involved in the gene expression of the hydrogen sulphide producing enzyme cystathionine gamma-lyase in the pancreatic beta-cell", *Molecular and cellular endocrinology*, **2012**, 350, 31-38.
- L. Zhang, G. Yang, G. Tang, L. Wu and R. Wang, "Rat pancreatic level of cystathionine gamma-lyase is regulated by glucose level via specificity protein 1 (SP1) phosphorylation", *Diabetologia*, **2011**, 54, 2615-2625.

[著者プロフィール]

氏名：木村 俊秀

所属：大分大学医学部薬理学教室 准教授

連絡先：〒 879-5593 大分県由布市挾間町医大が丘 1-1

TEL：097-586-5722 FAX：097-586-5729

E-mail：t-kimura@oita-u.ac.jp

学位：博士（医学）

名古屋大学医学系研究科 神経情報薬理学講座（貝淵弘三教授）

略歴：2005年 名古屋大学医学系研究科博士課程修了

2005年 大分大学医学部 薬理学教室 助手

2007年 大分大学医学部 薬理学教室 助教

2010年より現職

研究テーマ：硫化水素による膵B細胞保護機構の解析、GDP型Gタンパク質シグナリングの解明、分泌マシナリーのリサイクリング機構の解析

興味のある方は、E-mailで問い合わせをしてください。大学院生を広く募集しています。

ホームページ：<http://www.med.oita-u.ac.jp/pharmacology/>

趣味：ドライブ、ランニング、テニス

氏名：岡本 光弘

所属：大分大学大学院医学系研究科 博士課程

略歴：2003年3月 大分大学医学部医学科卒業

2010年4月～大分大学大学院医学系研究科博士課程 在籍

趣味：スポーツ観戦、バドミントン、フットサル

連載

**新しいナノ材料としての
カーボンナノチューブ**
-最近の展開(バイオからエネルギーまで)
③

中嶋直敏、福丸貴弘、藤ヶ谷剛彦
九州大学

1. カーボンナノチューブ複合材料創製(機能材料創製)

第3回はカーボンナノチューブ(CNT)と他の材料(有機分子、高分子、金属ナノ粒子、バイオ分子)との複合による新しいCNT複合材料体のデザイン、創成について、*in vitro* および *in vivo* バイオアプリケーション研究を含め紹介する。

1-1. CNT と合成高分子との複合化

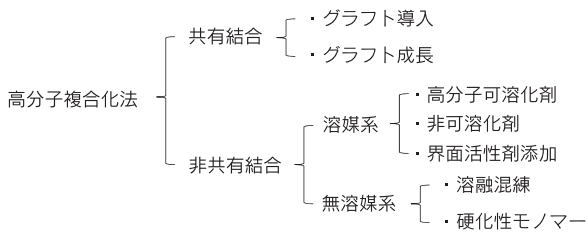


図1 CNTと高分子複合化法の分類

高分子とCNTとの複合化ではファイバー、フィルムや塗布膜など固体状態での応用展開が主に進められている。ここでCNTはフィラーとみなすことができるが、他の無機・金属フィラーと異なり、CNTでは、共有結合で複合化させる手法を用いることもできる(図1)。

共有結合による複合化法としては、あらかじめ合成した高分子をCNTにグラフトさせる「グラフト導入(grafting 'to')法」、及びCNTから高分子鎖を成長させる「グラフト成長(grafting 'from')法」などが試みられている。「グラフト導入(grafting 'to')法」としては、CNTへの直接付加であるラジカル付加¹⁾や環化付加²⁾の利用(図2)や、酸化処理CNTに導入されたOH基やCOOH基へのカップリング利用が挙げられる(図3)。カップリングは、ポリマー鎖末端官能基のみならず側鎖に官能基がある場合でも可能である。高分子/CNT界面の相互作用は、複合物そのものの物性に大きな影響があるため、複合化に用いるCNTの純度、マトリックス高分子との結合形成の化学的な評価が極めて重要である。

「グラフト成長(grafting 'from')法」は、CNT表面に重合開始点をCNT上に導入し、そこから重合を開始させる手法である(図4)。最も報告例が多いのはリビングラジカル重合の一種であるAtom Transfer Radical Polymerization(ATRP)法や、Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer(RAFT)法である。ATRP法ではスチレンの他、メタクリレート誘導体、N-イソプロピルアクリルアミド、およびそれらのブロック共重合体などの重合が報告されている³⁾。またRAFT法ではスチレン、アクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミドなどが用いられる。これらの修飾法は、これまで種々の基板表面で確立されていた反応重合開始剤導入法をそのままCNT表面に適用できるため利便性も高い。

開環重合では脂肪族ポリエステルや脂肪族ポリアミド、対象とするモノマーに適合可能な開始点をデザインして導入する。フリーラジカル重合ではAIBNによりラジカルが導入され、そこを反応開始点として重合が進行する。一方で、系中の成長末端ラジカルと付加反応も起こすことからgrafting 'to'も系中では同時に進行する。

CNT存在下でフリーラジカル重合を行った場合、CNT表面と

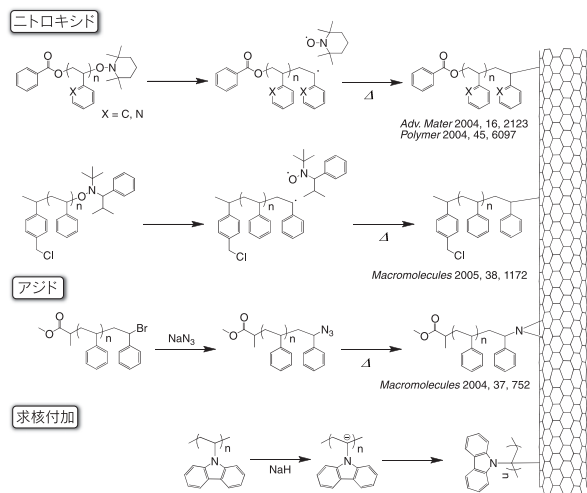


図2 付加反応によるCNT表面へのグラフト導入方法

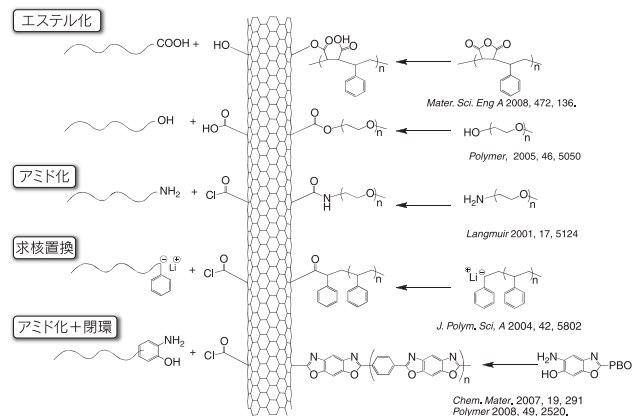


図3 カップリング反応によるCNTへのグラフト導入方法

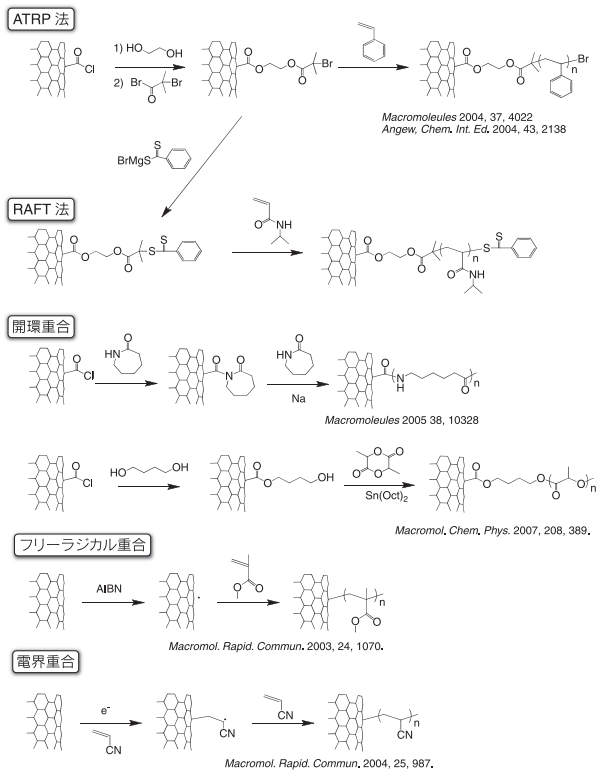


図4 CNTからのグラフト成長反応の例

共有結合を形成する可能性が非常に高い。また、CNTの高い電気伝導性を生かして、電界重合の反応場として利用することが可能である。ATRP法や、RAFT法の場合は開始点の導入効率により重合の数が決定されてしまう制限があるが、電界重合の場合、理論上は表面全体が反応点となりうることから均一な被覆化などに有利であると予想できる。アクリロニトリルの他、ポリアニリンの表面電界重合などが報告されている。その他の例については総説⁴⁻⁶⁾にまとめられているのでそちらを参考にしていきたい。

非共有結合による複合化で、我々の最近の研究を一例紹介する。ポリベンゾオキサゾールはモノマーユニット内にオキサゾール環を有する重縮合系高分子であり、ポリイミドやポリベンゾイミダゾール (PBI) と同様スーパーエンジニアリングプラスチックの一種である。中でもポリ(p-フェニレンベンゾビスオキサゾール) (PBO) (図5) はその剛直な構造から、市販されている高分子繊維の中で「最高」の強度・弾性率・耐熱性・難燃性を有し(表1)、消防服や防弾チョッキなどに利用されている⁷⁾。

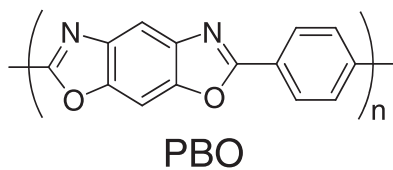


図5 PBOの化学構造

表1 高分子繊維の機械的・熱的性質の比較¹⁾

	PBO(HM)	p-アラミド(HM)	PBI ^{b)}	ポリエステル	HS-PE ^{c)}
引張強度(GPa)	5.8	2.8	0.4	1.1	3.5
引張弾性率(GPa)	270	109	5.6	15	110
耐熱性(°C) ^{a)}	650	550	550	260	150
限界酸素指数	68	29	41	17	16.5

^{a)}融点もしくは分解温度 ^{b)}ポリベンゾイミダゾール ^{c)}超高分子量ポリエチレン

PBOは優れた強度および耐熱性を有することから、カーボンナノチューブ (CNT) 高分子複合体の高分子マトリックスとして有望である。しかしながら、PBOとCNTは強酸にしか溶解しないため、その複合化や成形加工には、多くの難点がある。

いくつか例を挙げる。Kumarら⁸⁾は、単層CNT (SWNT) 存在下ポリリン酸 (PPA) 中での *in situ* (その場) 重合法および液晶紡糸法により PBO/SWNT ファイバーを得ている。SWNTを10 wt%添加することにより、引張強度が50%、引張弾性率が20%増加した複合体が得られている。Zhouら⁹⁾は、PBOの前駆体であるポリヒドロキシアミドオリゴマー (oHA) を多層CNT (MWNT) と反応させることで PPA への溶解性が向上した MWNT-oHA を作製し、MWNT-oHA 存在下 PPA 中での *in situ* 重合法および液晶紡糸法により MWNT/PBO ファイバーを得ている。MWNTを0.54 wt%添加することにより、引張強度が28%、引張弾性率が50%増加した複合体が得られる。

これらの PBO/CNT 複合体の弾性率の増加率は理論モデルから予想される値よりも低い値であり、CNTの低い分散性とその原因として考えられる。CNTと高分子間の弱い界面相互作用によるCNTの低い分散性はCNTによる効率的な補強効果を妨げる¹⁰⁾。強酸によるCNTの短尺化および補強効果の低下¹¹⁾が報告されており、産業面のみならず強酸を用いない複合体制法が望まれる。

我々は強酸を用いずに PBO/CNT 複合体を得る新たな手法を開発した(図2)¹²⁾。有機溶媒に可溶性 PBO 前駆体と CNT を有機溶媒中で複合化させ、加熱処理を行うことで PBO/CNT 複合体を得る。紫外可視赤外吸収分光およびフォトルミネッセンス分光により、CNTの分散状態を評価でき、PBO前駆体は有機溶媒中でCNTを孤立分散する(図6左)。PBO前駆体主鎖の芳香環とCNT表面とのπ-π相互作用によるものと考えられる。PBO/CNT複合体フィルムはPBO前駆体/CNT複合体フィルムを減圧下300度、350度、400度各1時間ずつ加熱処理することで得られる。Raman分光により、CNTの欠陥の度合いを評価したところ、複合化処理および加熱処理後もCNTには欠陥がそれほど導入されないことがわかった。CNTを1.7 wt%添加することにより、引張強度が130%、引張弾性率が179%増加した複合体が得られた。この補強効果はこれまで報告されている PBO/CNT 複合体の補強効果よりも大きなものであった。複合体フィルム断面の走査型電子顕微鏡観察により、PBO中でCNTが効率よく分散している様子が見られ、欠陥の少ないCNTが効率よく分散しているために、効率的な補強効果が得られたと考えられる。CNT添加後もPBOの優れた耐熱性は保持されており、このような高強度・高耐熱性高分子フィルムは金属代替材料として有望である。

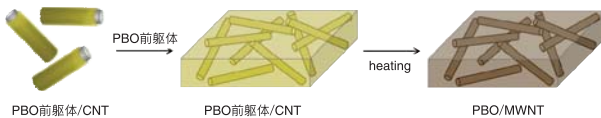


図6 溶解性 PBO 前駆体を用いた PBO/CNT 複合体の作製

1-2. CNT とナノ粒子との複合化

CNTはその大きな比表面積と高い電気伝導性、ファイバー状構造とそれらが作るメッシュ構造ゆえに反応に伴う電子の授受を行う場、すなわち電極材料として最適な構造を有している。従って、反応サイトとして何らかの触媒作用のあるナノ粒子と組み合わせたCNT/ナノ粒子複合体は、CNTの有効な利用法の1つだと言える。触媒作用のある物質としては金属ナノ粒子や半導体ナノ粒子等がある¹³⁾。これらナノ粒子とCNTとの間での高効率な電子の授受はデバイス効率向上へのポイントとなるため、両者を空間的に近接させる必要がある。従ってCNTとナノ粒子の単純な混合ではなく、ナノ粒子をCNTに直接担持する様々な手法が提案されている。

ベンゼン環からなるCNTはナノ粒子の足場となるサイトがなく、効率のよい直接担持が困難である。そこで酸処理などでCNT表面にカルボキシル基などの極性基を導入し、そこを足場としてナノ粒子を担持する方法が一般的である(ただし、ここではCNTは本来の特性を幾分なくしている可能性があることに注意)。一方で、CNT表面にダメージを与えない担持法として、CNT表面に吸着した分子(リンカー分子)を足場として担持する方法を用いる。リンカーとなる分子としては低分子系の界面活性剤¹⁴⁾や芳香族系化合物、あるいはDNAやポリアニリン等の高分子系が報告されている。芳香族系化合物の中でも、特にピレン誘導体はCNTとの強い相互作用を利用した粒子担持へのリンカー分子としての報告が多い。

これら2種類の足場形成方法それぞれに対し、主に2種類のナノ粒子担持法が報告されている。一方はあらかじめ調製したナノ粒子を担持する方法(*ex situ*法)と、もう一方はCNT存在下で粒子を直接CNT上に成長させる方法(*in situ*法)である。CdSe等の半導体ナノ粒子やTiO₂、ZnO等の金属酸化物ナノ粒子は*ex situ*法で、Au、Pt、Pd等の金属ナノ粒子は*in situ*法で担持されることが多い。

2. バイオアプリケーション (CNTとバイオ分子との複合化)

これまで、高分子ミセル、金属ナノ粒子や量子ドットなどのナ

ノ物質がバイオテクノロジーの分野に応用され、薬剤送達システムや生体プローブとして研究されてきた。最近ではCNTのバイオテクノロジー素材として利用が期待されている。特に単層CNT(SWNT)は、生体を構成する水や血液が吸収を持たない近赤外領域に強い吸収を持つ稀有な特徴ゆえ非常に魅力的である。この特長は分かりやすく言えば、もし近赤外の光で見ると体内のSWNTを体外から透かして見られるということを意味し、体内でも見たり使ったりしやすいということに他ならない。

これまでに多くの培養細胞を使った実験(*in vitro*)を経て、最近ではマウスを使った体内(*in vivo*)での実験が行われ始めている。これらの流れを本節で紹介する。

2-1. *in vitro* アプリケーション

可溶化剤自身に機能性がある場合、CNTの機能と組み合わせることにより高機能な複合体を作ることができる。例えば、ポリエチレングリコール(PEG)鎖が導入された分子で可溶化したCNTは、PEG鎖の高い生体適合性とCNTとの組み合わせにより、体内への薬剤送達材料やプローブ分子として利用できる。代表的な機能性可溶化剤としてはDNAを挙げることができる。DNAとCNTは、同程度の直径をもつ。第2回で紹介した様に、私たちは、DNAが単層カーボンナノチューブ(SWNT)を孤立溶解することを発見した¹⁵⁾。DNA/SWNT複合体は安定であり、核酸テリポリマーやDNA(RNA)センシングなど、長い研究の歴史を持つDNA(RNA)にCNTの特徴(形状、サイズ、分光特性、電気特性)を付与できる材料として展開を見せている。具体的な例を挙げる。DNAのB構造からZ構造へのコンフォメーション転位をSWNTの近赤外領域の蛍光シフトとして捉えた研究、DNAハイブリダイゼーションを同様な蛍光シフトとしてのナノモル(nM)レベル検出に成功した研究、SWNT/DNA複合体上のDNAハイブリダイゼーションを電気化学的検出手法を用いることでアットモル(aM)レベルの超高感度で検出した論文など多くの論文が報告されている。私たちは、DNA/SWNT複合体のアプリケーションの1つとして、DNA/SWNT複合体とPEGグラフト化ポリ-L-リジン(PLL-g-PEG)を複合化させることで、SWNTに分散安定性と生体親和性を付与した新規の三元複合体(PLL-g-PEG/DNA/SWNT複合体)を作製し、これがHeLa細胞へ高効率で取り込まれることを明らかにした¹⁶⁾。

Weismanらは、非イオン系界面活性剤であるPluronic F108で分散されたSWNTが細胞内に取り込まれ、その空間分布をSWNTの近赤外発光をプローブとしてマッピングできることを報告した¹⁷⁾。この報告は、SWNTが「色素プローブ」として有用であることを意味している。DaiらはSWNTをバイオアプリケーションに展開した先駆者の一人である¹⁸⁾。まず、がん細胞を使った実験でDNA/SWNT複合体をエンドサイトーシスにより細胞質内に取り

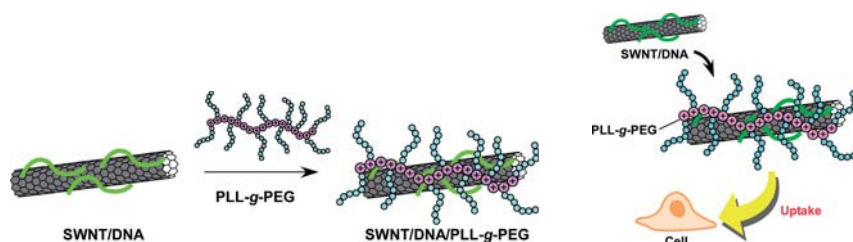


図7 PLL-g-PEG/DNA/SWNTハイブリッドと細胞への取り込みの模式

込ませることに成功し、さらに複合体を取り込んだ細胞への近赤外光レーザー（808 nm）照射により DNA が SWNT 上から放出され、核内まで到達することを発見した。さらに SWNT 吸着部位としてアルキル鎖を持ち、生体組織への非特異吸着を防ぐ PEG を連結したリン脂質誘導体（PEG 化リン脂質）を SWNT 可溶化剤とした複合体についての報告も行っている。さらに近赤外光照射による SWNT 発熱でがん細胞を死滅させることにも成功している¹⁸⁾。この研究は、SWNT によるがん治療への戦略について有益な示唆を与えてくれる重要な研究であった。

リン脂質誘導体可溶化剤で分散された SWNT では近赤外発光細胞イメージング¹⁹⁾の他、SWNT の強いラマンシグナルを利用したラマン細胞マッピング²⁰⁾も報告されている。SWNT は¹³Cを導入することによりラマンピークがシフトすることから、マルチカラーのラマンプローブとして染め分けることも可能である。SWNT は、遺伝子の導入や光刺激によるがん治療およびプローブ分子としてマルチな機能性を有していると言える。

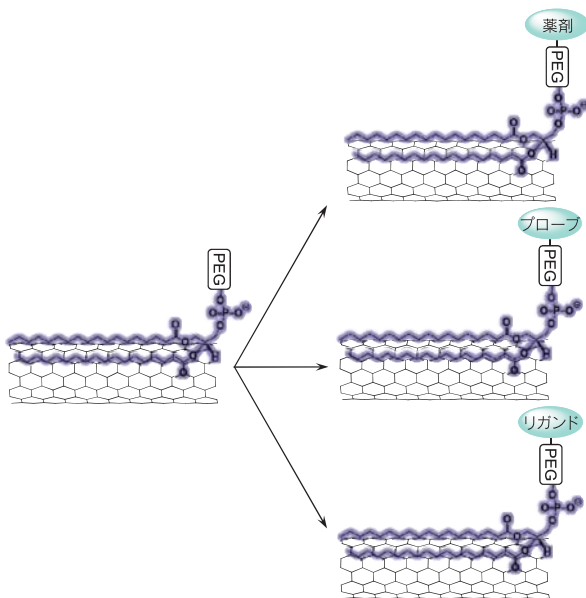


図8 H.Dai らの sPEG 化リン脂質を用いたバイオ用修飾の展開

一方で、共有結合による化学修飾 SWNT の *in vitro* 実験も 2004 年ごろから立ち上がった。Prato らは、いわゆる Prato 反応と言われるフラレーンへの反応で確立していた付加反応を SWNT 表面の官能基化へ適応し、化学修飾 SWNT をバイオアプリケーションへ展開した²¹⁾。彼らは図9で示した官能基化 SWNT を出発物質とし蛍光分子を導入した SWNT の細胞内への導入を顕微鏡観察により確認した。またプラスミド DNA をイオンコンプレックス形成により官能基化 SWNT と複合化し、これを効率よく細胞内に導入することにも成功している。このような化学修飾法では蛍光基や薬剤骨格などを有機合成化学に基づいて自在に修飾できるのが特徴である。ただし化学修飾法では SWNT はドーピングされることになり、SWNT ならではの強い近赤外領域での吸収や発光等の特長は失われ、SWNT 自身のイメージングや光熱変換を用いた温熱治療の効率は低下するといった短所もある。

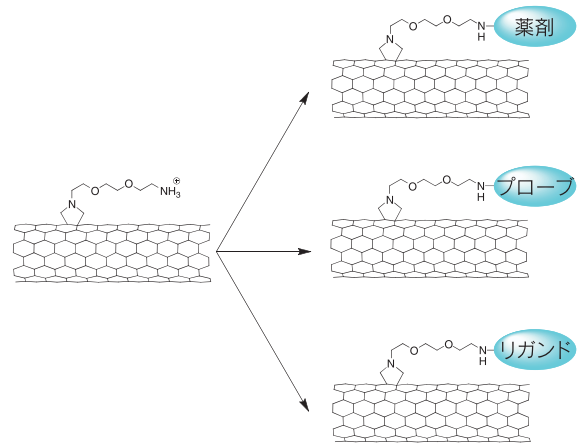


図9 Prato らの共有結合修飾 CNT のバイオ展開への分子デザイン

2-2. *in vivo* アプリケーション

培養細胞実験において得られた興味深い知見を踏まえて 2008 年頃から動物体内 (*in vivo*) への CNT の導入実験が報告され始めた。*in vivo* 研究において可溶化 SWNT は、i) イメージングのプローブ ii) 腫瘍の温熱治療のための発熱体 iii) 腫瘍部への分子送達キャリアという主に 3 つの用途に展開されている。

イメージングとしては、マウス体内からの SWNT の近赤外発光によるイメージング²²⁾、ラマン散乱によるイメージングの他²³⁾、SWNT をパルス光で励起した時に発生する音波をイメージングする光音響イメージングが報告されている²⁴⁾。また光熱変換作用を利用した腫瘍の温熱療法はマウス体内においても有効であることが多くの実験から確かめられている。以上 2 つの用途は、光照射で SWNT を励起することが必要であるが、体内への近赤外光の深度（～数 cm）を考えた時、人体内部にも適用可能であるとは言い難い。従って薬剤を腫瘍部に送達する薬物送達システム（ドラッグデリバリーシステム：DDS）としての使い方が最も实际的であろう。

CNT は疎水的な表面を持ち、疎水的分子を効率よく吸着することが知られており、DDS における課題の一つである疎水的薬剤の送達には非常に有利なキャリアである。例えば代表的な疎水性抗がん剤であるドキソルビシン (DOX) の場合 SWNT 1 g につき 4 g もの DOX 担持が可能である。実際に DOX を担持した可溶化 SWNT をマウスに投与したところ、DOX のみを投与した場合と比べ、優位な延命が見られた²⁵⁾。長さが 150 nm 程度の可溶化 SWNT は PEG 化で血中滞留性を高めた場合、受動的ターゲティングによる腫瘍集積性が見られるが、さらに積極的な腫瘍集積を目指して腫瘍ターゲティング機能を付与するアプローチも実証されている。Bhirde らは化学修飾により SWNT に抗がん剤であるシスプラチンとレセプター認識部位を結合し、マウスの尾静脈投与したところ、認識部位を連結した場合のみ腫瘍の成長抑制効果を確認した。*in vivo* においてもターゲティング機能が有効に作用することが明らかとなった²⁶⁾。今後はより実用化を意識した研究として SWNT の体外への排出機構の確認などが必要になってくるであろう。

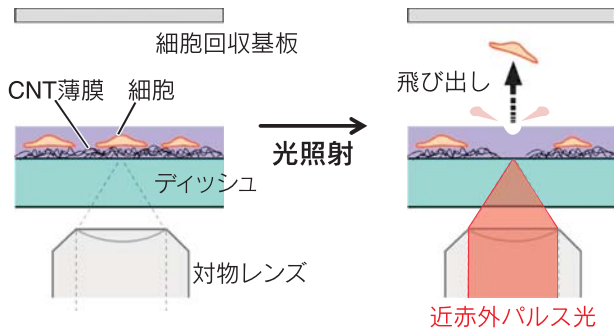


図 10 CNT 塗布デイツシュを用いた選択的単一細胞回収技術

2-3. 細胞培養基板としての CNT

一方、体外で用いる用途にも期待がかかる。最も報告が多いのは、CNT 薄膜上での細胞培養の研究であろう。CNT 薄膜は疎水的でファイバーメッシュ状の環境を細胞に与えるため、汎用のガラスデイツシュやプラスチックデイツシュとは異なる細胞増殖挙動を与えることがある。CNT 薄膜をコートしたデイツシュ (CNT デイツシュ) 上で培養した場合、良好な細胞接着および伸展が見られる例が多く、細胞が知られている。このことは、CNT に接着タンパクが吸着しやすく、細胞に接着環境を与えやすいことを示している。もともと比較的接着の良い HeLa 細胞などではこの効果は明瞭ではないが、接着が比較的に難しい細胞には有効であろう。また神経系細胞では特に興味深い挙動が知られており、例えば ES 細胞からの神経系細胞へ分化確率向上や²⁷⁾、神経系細胞の活性増加が報告されている²⁸⁾。これまで報告されているような高分子ナノファイバー細胞培養基板とは異なる CNT ならではの特性であり興味深い。筆者らは、CNT デイツシュ上で播種した細胞に近赤外パルスレーザー光照射を行い CNT に衝撃波を発生させ、その結果、照射したターゲット細胞が培地外に飛び出し、捕獲できることを明らかにした (図 10)。光照射は顕微鏡観察下で行えるために、狙った細胞 1 個を選択して回収できる。さらに回収した 1 個の細胞からの遺伝子情報の読み出しにも成功している²⁹⁾。このように細胞培養基板としての CNT の用途はバイオ・メディカル分野において大きな広がりを見せている。

[参考文献]

- 1) Y. Liu, Z. Yao and A. Adronov, *Macromolecules*, **2005**, *38*, 1172-1179.
- 2) S. Qin, D. Qin, W. T. Ford, D. E. Resasco and J. E. Herrera, *Macromolecules*, **2004**, *37*, 752-757.
- 3) S. Qin, D. Qin, W. T. Ford, D. E. Resasco and J. E. Herrera, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 170-176.
- 4) Z. Spitalsky, D. Tasis, K. Papagelis and C. Galiotis, *Prog. Polym. Sci.*, **2010**, *35*, 357-401.
- 5) N. G. Sahoo, S. Rana, J. W. Cho, L. Li and S. H. Chan, *Prog. Polym. Sci.*, **2010**, *35*, 837-867.
- 6) C. M. Homenick, G. Lawson and A. Adronov, *Polymer Reviews (Philadelphia, PA, United States)*, **2007**, *47*, 265-290.
- 7) http://www.toyobo-global.com/seihin/kc/pbo/Technical_Information_2005.pdf.
- 8) S. Kumar, T. D. Dang, F. E. Arnold, A. R. Bhattacharyya, B. G. Min, X. F. Zhang, R. A. Vaia, C. Park, W. W. Adams, R. H. Hauge, R. E. Smalley, S. Ramesh and P. A. Willis, *Macromolecules*, **2002**, *35* (24), 9039-9043.

- 9) C. J. Zhou, S. F. Wang, Y. Zhang, Q. X. Zhuang and Z. W. Han, *Polymer*, **2008**, *49* (10), 2520-2530.
- 10) J. N. Coleman, U. Khan and Y. K. Gun'ko, *Adv. Mater.*, **2006**, *18*, 689-706.
- 11) D. Bikiaris, A. Vassiliou, K. Chrissafis, K. M. Paraskevopoulos, A. Annakoudakis and A. Docoslis, *Polym. Degrad. Stab.*, **2008**, *93*, 952-967.
- 12) T. Fukumaru, T. Fujigaya and N. Nakashima, *Macromolecules*, **2013**, *46*, 4034-4040.
- 13) D. Eder, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 1348-1385.
- 14) L. Cao, F. Scheiba, C. Roth, F. Schweiger, C. Cremers and U. Stimming, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 5315-5319.
- 15) N. Nakashima, S. Okuzono, H. Murakami, T. Nakai and K. Yoshikawa, *Chem. Lett.*, **2003**, *32*, 456-457.
- 16) T. Fujigaya, Y. Yamamoto, A. Kano, A. Maruyama and N. Nakashima, *Nanoscale*, **2011**, *3*, 4352-4358.
- 17) P. Cherukuri, S. M. Bachilo, S. H. Litovsky and R. B. Weisman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 15638-15639.
- 18) N. W. S. Kam, M. O'Connell, J. A. Wisdom and H. Dai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2005**, *102*, 11600-11605.
- 19) K. Welsher, Z. Liu, D. Darancioglu and H. Dai, *Nano. Lett.*, **2008**, *8*, 586.
- 20) Z. Liu, X. Li, S. M. Tabakman, K. Jiang, S. Fan and H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 13540-13541.
- 21) D. Pantarotto, J.-P. Briand, M. Prato and A. Bianco, *Chem. Commun.*, **2004**, 16-17.
- 22) K. Welsher, Z. Liu, S. P. Sherlock, J. T. Robinson, Z. Chen, D. Darancioglu and H. Dai, *Nat. Nanotech.*, **2009**, *4*, 773-780.
- 23) C. Zavaleta, A. de la Zerda, Z. Liu, S. Keren, Z. Cheng, M. Schipper, X. Chen, H. Dai and S. S. Gambhir, *Nano Lett.*, **2008**, *8*, 2800-2805.
- 24) A. De La Zerda, C. Zavaleta, S. Keren, S. Vaithilingam, S. Bodapati, Z. Liu, J. Levi, B. R. Smith, T.-J. Ma, O. Oralkan, Z. Cheng, X. Chen, H. Dai, B. T. Khuri-Yakub and S. S. Gambhir, *Nat. Nanotech.*, **2008**, *3*, 557-562.
- 25) Z. Liu, A. C. Fan, K. Rakhra, S. Sherlock, A. Goodwin, X. Chen, Q. Yang, D. W. Felsher and H. Dai, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 7668-7672.
- 26) A. A. Bhirde, V. Patel, J. Gavard, G. Zhang, A. A. Sousa, A. Masedunskas, R. D. Leapman, R. Weigert, J. S. Gutkind and J. F. Rusling, *ACS Nano*, **2009**, *3*, 307-316.
- 27) T.-I. Chao, S. Xiang, C.-S. Chen, W.-C. Chin, A. J. Nelson, C. Wang and J. Lu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2009**, *384*, 426-430.
- 28) V. Lovat, D. Pantarotto, L. Lagostena, B. Cacciari, M. Grandolfo, M. Righi, G. Spalluto, M. Prato and L. Ballerini, *Nano Lett.*, **2005**, *5*, 1107-1110.
- 29) T. Sada, T. Fujigaya, Y. Niidome, K. Nakazawa and N. Nakashima, *ACS Nano*, **2011**, *5*, 4414-4421.

学会展示のご案内

第 36 回日本分子生物学会年会

期日：2013 年 12 月 3 日(火)～5 日(木)

会場：神戸国際展示場 (神戸ポートアイランド)

展示ブースでお待ちしております。

ぜひ、お立ち寄り下さい。

Topics on Chemistry

サルフェン硫黄検出用新規蛍光プローブとバイオイメージングへの応用

株式会社同仁化学研究所 立中 佑希

硫化水素 (H_2S) は火山性ガスに含まれる無色の気体で、一般的に有毒ガスとして知られる物質である。しかし、1980年代に硫化水素はラットやヒトで存在することが報告され、一酸化窒素 (NO) と一酸化炭素 (CO) に次ぐ第三番目のガス性生理活性物質として注目されている。内因性の H_2S は、受容体、イオンチャネル、転写因子、酵素などを標的とし、神経伝達調節、平滑筋弛緩、細胞保護、抗炎症、インスリン分泌調節など実に多彩な作用を示すことが確認されている。最近では、生体内で産生された H_2S の挙動、その貯蔵や放出のメカニズムも徐々に解明されつつあり、臨床応用への展開も期待されている¹⁾。

Reactive sulfur species (RSS) は、生体内に存在する反応性の高い硫黄含有分子の総称であり、硫化水素をはじめ、S- ニトロソチオール、スルフェン酸、パーサルファイド、ポリサルファイド、無機硫黄誘導体などがこれらに含まれる (Fig. 1)²⁾。

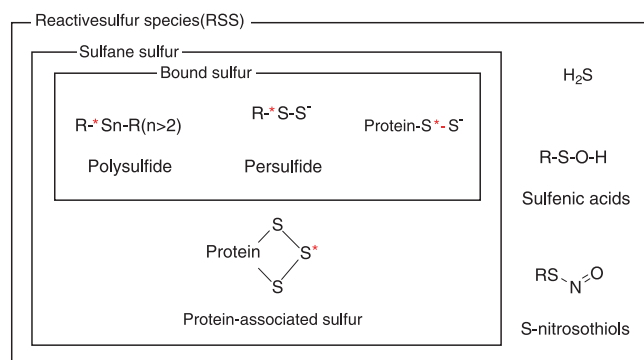


Fig. 1 Reactive sulfur species (RSS)
*Sulfane Sulfur Atom

サルフェン硫黄はパーサルファイドやポリサルファイドのように硫黄原子が連結した分子であり、重要な RSS の一つである。これらは、他の硫黄原子に可逆的に結びつく特有な反応性を持っており、最近、これらのサルフェン硫黄が生体内において多様な生理活性を示すことが明らかとなってきている (例えば、トランスファー RNA の転写後修飾を含む補酵素やビタミンの合成、酵素の活性化や阻害など)³⁾。興味深いことに、 H_2S とサルフェン硫黄は生体内において常に共存しており、最近の研究では、 H_2S 由来のサルフェン硫黄種が、実際のシグナル伝達分子であることを示唆するデータが得られている⁴⁾。このようなサルフェン硫黄研究の関心が高まっているにもかかわらず、生体試料中のサルフェン硫黄濃度の正確かつ信頼性の高い測定法が確立されていないため、それらの産出や作用メカニズムに関する多くの疑問は明確にされずに残ったままである。

現在用いられている唯一のサルフェン硫黄検出は、チオシアン酸との反応で生じるチオシアン酸イオンを鉄 (III) 錯体として測定する方法である。しかしながら、この手法は細胞や組織などの生体試料を破壊する必要があるため、生体中におけるサルフェン硫黄の動態を解析することはできない。そのため、生細胞内でリアルタイムにサルフェン硫黄を可視化できる、非破壊的な蛍光プローブの開発が求められている。

そこで本稿では、Ming Xian らによって報告されたサルフェン硫黄検出用蛍光プローブである SSP1 及び SSP2 を紹介したい (Fig. 2, 3)⁵⁾。

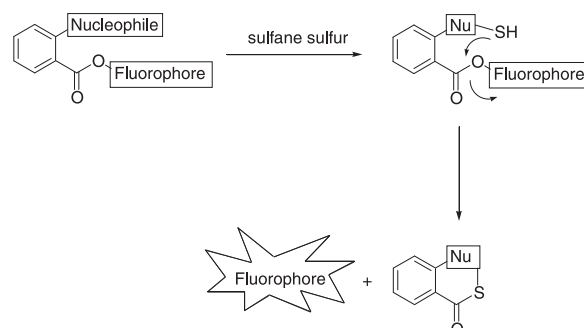


Fig. 2 蛍光プローブによるサルフェン硫黄検出メカニズム

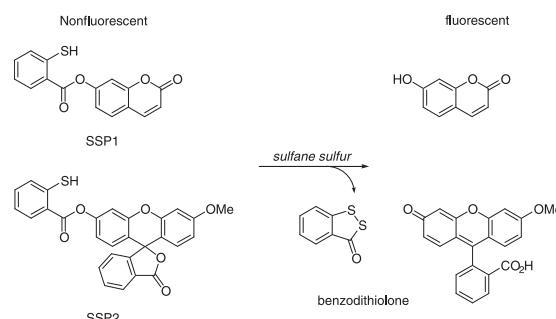


Fig. 3 蛍光プローブの構造と反応機構

このプローブは、求核性官能基を有するチオサリチル酸と蛍光色素 (SSP1: 7-ヒドロキシクマリン, SSP2: フルオレセイン) から構成され、蛍光色素のフェノール性水酸基がチオサリチル酸で保護された状態ではほとんど蛍光を発しない。しかし、これらプローブ内のチオサリチル酸がサルフェン硫黄と反応すると、速やかな分子内環化反応によって benzodithiolone を脱離し、蛍光体を生成する。SSP1, SSP2 は、それぞれ低い蛍光量子収率を示し (SSP1: $\phi = 0.06$, SSP2: $\phi = 0.05$)、可視領域に全く吸収特性を示さないが、サルフェン硫黄である Na_2S_2 を添加すると、蛍光強度は両プローブ共に劇的に増大し、5分以内に最大蛍光強度に達している (SSP1: 25倍, SSP2: 50倍)。これらプローブの検出限界は SSP1: 73 nM, SSP2: 32 nM となり、サルフェン硫黄の高感度検出が可能であることが示唆されている。また、プローブが効果的に機能する pH 領域は、中性から弱塩基性 (pH-7 ~ 8) 付近であり、生理的環境下での測定に適している。課題となる選択性に関しても、これらのプローブはシステイン、グルタチオン、ホモシステイン、酸化型グルタチオン、硫化水素、チオ硫酸塩、亜硫酸塩、硫酸塩など他の生物学的硫黄種にはほとんど蛍光変化を示さない上、これら硫黄種が共存する条件下においても Na_2S_2 の添加によって効率的な蛍光強度の増加を示している。以上の結果から、これらのプローブは種々の硫黄分子が複雑に存在する生体試料中においても選択的にサルフェン硫黄を検出できることが示唆される。

実際に、SSP2 を用いて H9c2 細胞および HeLa 細胞内のサルフェン硫黄のイメージングを試みた結果、SSP2 を添加した細胞内ではわずかな蛍光が観察されるに過ぎないが、外部からサルフェン硫黄である Na_2S_2 を添加することによって細胞内に強い蛍光が観察されることを確認している。これらの結果は、SSP2 が

生細胞中においてもサルフェン硫黄と効率的かつ選択的に反応し、サルフェン硫黄の動態を可視化できることを示唆するものである。今回紹介した蛍光プローブは、サルフェン硫黄の生細胞内可視化を示した最初の報告例である。サルフェン硫黄の存在量は正確には測定されておらず、厳密な生理的意義についても未知な部分が多いため、生細胞中のサルフェン硫黄の検出は非常に重要である。今後さらに感度や応答性、細胞滞留性などを改良することで生理学及び病理学的プロセスにおけるサルフェン硫黄種の役割を理解するための有用なバイオプローブとなることが期待される。

[参考文献]

- 1) R. Wang, *Physiol. Rev.*, **2012**, 92, 791.
- 2) M. C. H. Gruhke and A. J. Slusarenko, *Plant Physiol. Biochem.*, **2012**, 59, 98.
- 3) J. I. Toohey, *Anal. Biochem.*, **2011**, 413, 1.
- 4) Y. Kimura, Y. Mikami, K. Osumi, M. Tsugane, J. Oka and H. Kimura, *FASEB J.*, **2013**, 27, 2451.
- 5) W. Chen, C. Liu, B. Peng, Y. Zhao, A. Pacheco and M. Xian, *Chem. Sci.*, **2013**, 4, 2892.

お知らせ

日経バイオテク ONLINE は国内唯一のバイオポータルサイトとして、多くの国内バイオ研究者から閲覧されております。
<https://bio.nikkeibp.co.jp/>

すでに多くの方がご覧になられたことがあるかと思えます。様々な情報が日々発信されておりますが、同仁化学研究所も「学会・セミナー」「製品・サービス」のご案内を投稿しております。

新製品のご案内や各製品のトピックス、開発中の製品などを随時ご紹介しております。

より多くの研究者にご覧いただく機会を得たことで、国内研究者の研究ツールの一つとなれるものを提供できればと考えております。

今後も様々なツールから皆様に情報を発信してまいります。是非ご覧ください。

パンフレットのご案内

はじめてシリーズ 2
 「はじめての抗体標識プロトコル」

小社カスタマーリレーション部では小社に頂くお問合せを基にプロトコル「はじめてシリーズ」を作成しております。この度、第二弾として「はじめての抗体標識プロトコル」を作成いたしました。直接標識法の利点や実施例などを解りやすくまとめた、はじめて抗体を標識される方向けのプロトコルです。第一弾の「はじめての細胞内 Ca²⁺ 測定プロトコル」と共に是非一度ご覧下さい。

抗体を用いた検出法（イムノアッセイ）は特異性が高く、応用範囲が広いことから様々な研究で汎用されています。抗原に特異的な抗体（一次抗体）を抗原と結合した後、標識二次抗体（抗体を認識する抗体）で検出する方法（間接法）が一般的に利用されますが、必ずしも全ての研究で適用できるわけではありません。

一次抗体を直接、酵素やビオチン、蛍光色素等で標識することができれば、実験手順が簡略化されるのはもちろんのこと、多重染色の可能性の広がり、二次抗体の影響の排除など多くの利点があります。それにもかかわらず、一次抗体への直接標識法が浸透しない背景には、標識操作の煩雑さや得られる標識体の活性低下といった問題点があります。

小社では抗体への直接標識に適した Labeling Kit 類を販売しており、その利点や使用方法も記載しています。本プロトコルや Labeling Kit 類などの関連製品を是非ご研究にご活用下さい。

各資料のご請求は小社マーケティング部までご連絡下さい。
 フリーダイヤル：0120-489548
 e-mail: info@dojindo.co.jp

はじめての抗体標識プロトコル目次

- I. はじめに
- II. イムノアッセイの各手法の利点と欠点
- III. 何を標識するのか
- IV. 抗体のどこを標識するのか
- V. どのようにして標識するのか
- VI. どのようにして検出するのか
- VII. フィルトレーションチューブを利用した反応・精製
- VIII. 抗体へのビオチン標識方法
- IX. 抗体への酵素標識方法
- X. 抗体へ蛍光色素標識方法
- XI. 抗体への蛍光タンパク質標識方法
- XII. Fab' へのアルカリホスファターゼ標識方法
- XIII. 関連技術紹介
- XIV. 関連製品
- XV. 参考文献



開発中

硫化水素研究用試薬およびキット

近年、毒ガスとして知られている硫化水素 (H₂S) が、血管拡張や細胞保護、インスリン分泌や神経伝達調節など様々な生理活性を示すことが明らかにされ、一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) に続く第3のガス状シグナル分子として注目されています。

生体内に存在する硫化水素は、主にL-システインを基質としてシスタチオンβ-シターゼ (CBS) やシスタチオンγ-リアーゼ (CSE)、3-メルカプトピルビン酸サルファトランスフェラーゼ (3-MST) と呼ばれる酵素類によって産生され、生理活性を示すと共に、システイン側鎖のSH基に付加した結合型硫黄として生体内に貯蔵されると考えられています。硫化水素は、NOやCOと同様にガス状分子として認知されていますが、そのpKaは約7であり、生理的pHでは約80%が硫化水素イオン (HS⁻) の状態で存在します。また、硫化水素イオンは生体内で様々な結合形態や構造をとるため、その作用機序の詳細は未だ不明であり、硫化水素を中心とした硫黄の生体内機能の解明が待ち望まれています (概略に関しては、ドージンニュース 146号 Review「生理活性物質としての硫化水素」をご参照ください)。

小社では現在、このような研究背景の中、硫化水素研究に有用な試薬およびキットの開発を行っています。

還元物質応答性 硫化水素ドナー

硫化水素研究において、硫化水素の量や発生速度はその生理活性を決める重要な因子となります。しかし現在、一般的に硫化水素ドナーとして使用されている硫化ナトリウム (Na₂S) や硫化水素ナトリウム (NaHS) は、水溶液中に添加するだけで硫化水素を生成するため、硫化水素の発生量や発生時間を制御することは困難です。また近年の硫化水素研究の発展に伴い、治療薬を指向した有機化合物ベースの硫化水素ドナーも数多く開発されてきていますが、その多くは加水分解反応によるものであり、硫化水素の発生量や発生時間を制御しうるものではありません。Mingらが開発した硫化水素ドナーは生体内に存在する還元物質 (グルタチオンやシステインなど) に応答して硫化水素を発生する新規の硫化水素ドナーで、その構造の違いによって硫化水素の発生時間と発生量が異なります¹⁾。これらドナーの硫化水素発生機構は、生体内の硫化水素産生メカニズムに基づいており、パーサルファイドを経由して硫化水素を発生します (Fig. 1)。そのため、化合物自体の毒性が低く、硫化水素研究を行う上で大変興味深い化合物であると考えられます。現在、小社ではこれら硫化水素ドナーの製品化を進めています。

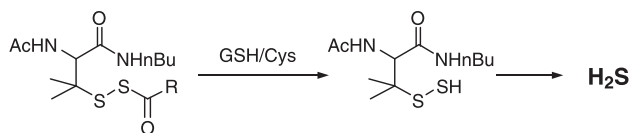


Fig. 1 還元物質応答性 硫化水素ドナー

硫化水素研究用 三硫化ナトリウム

硫化水素の細胞内機能を議論する上で、硫黄原子が連結したパーサルファイドやポリサルファイドのようなサルフェン硫黄は欠かせない存在となってきております。このようなサルフェン硫黄は、硫化水素の産生や貯蔵、放出だけでなく、スルフヒドリル化などのタンパク質内チオールをターゲットとしたシグナル伝達にも関与していることが示唆されており²⁾、硫化水素に関連する研究分野は大きな広がりを見せつつあります。木村らは、実際に脳内で硫化水素からポリサルファイドが生成することを発見し、このポリサルファイドが脳内の神経伝達を増強していることを明らかにしています³⁾。また驚くことに、その生理活性は硫化水素よりも300倍以上高く、脳内の硫化水素由来の生理活性物質はポリサルファイドである可能性が高いことを示しております。

三硫化ナトリウムは、硫黄原子が3つ連結した無機化合物であり、パーサルファイドのドナーとして利用されております (Fig. 2)。現在、小社ではこのような幅広い硫化水素関連の研究に対応するため、硫化水素研究用の三硫化ナトリウムの開発を行っております。

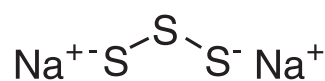


Fig. 2 三硫化ナトリウム

サルフェン硫黄検出用蛍光プローブ

硫黄原子が連なって結合したサルフェン硫黄は、硫化水素に関連するシグナル伝達系に深く関与しており、その機能解明が待ち望まれています。小社では、Mingらが開発したサルフェン硫黄検出用蛍光プローブ⁴⁾の製品化を進めています。詳しくは、本稿 Topics on Chemistry をご参照ください。

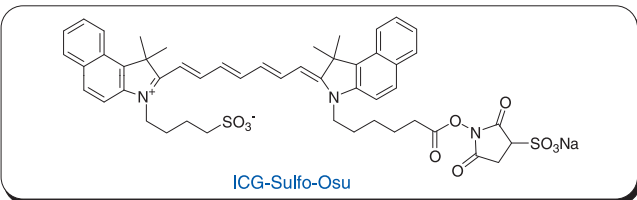
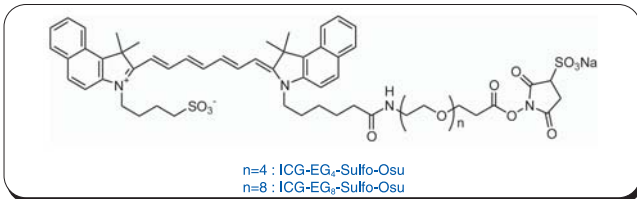
[参考文献]

- 1) Y. Zhao, S. Bhushan, C. Yang, H. Otsuka, J. D. Stein, A. Pacheco, B. Peng, N. O. Devarie-Baez, H. C. Aguilar, D. J. Lefer and M. Xian, *Chem. Biol.*, **2013**, *8*, 1283.
- 2) B. D. Paul and S. H. Snyder, *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.*, **2012**, *13*, 499.
- 3) Y. Kimura, Y. Mikami, K. Osumi, M. Tsugane, J. Oka and H. Kimura, *FASEB J.*, **2013**, *27*, 2451.
- 4) W. Chen, C. Liu, B. Peng, Y. Zhao, A. Pacheco and M. Xian, *Chem. Sci.*, **2013**, *4*, 2892.

試作品

ICG 誘導体

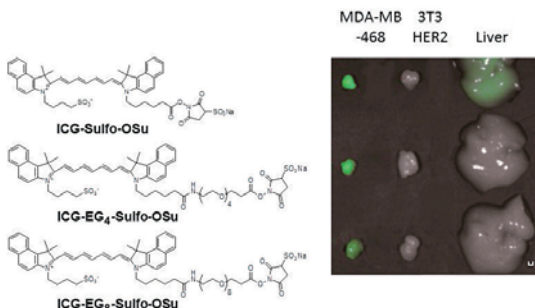
ICG-EG₄-Sulfo-OSu
ICG-EG₈-Sulfo-OSu
ICG-Sulfo-OSu



<特長>

- ・ アミノ基を選択的に標識できる活性エステル体である。
- ・ 近赤外蛍光を用いた低バックグラウンド検出が可能である。

ICG (Indocyanine Green) は肝機能、肝予備能検査のための色素負荷試験に用いられているシアニン色素で、励起波長は 774 nm 付近、蛍光波長は 805 nm 付近であり、近赤外領域に蛍光特性を有します。生体内で用いた場合でもヘモグロビンなどによる妨害を受けにくいという蛍光特性があります。本誘導体は、分子内に活性エステルを有しているため、アミノ基を有する分子と混合するだけで安定な共有結合を形成します。また、オリゴエチレングリコールを有するため、水溶性が高く非特異的吸着を低減することができます。今後、生体内における分子動態はさらに注目されていくものと考えられ、近赤外蛍光を利用した *in vivo* 蛍光イメージングへの更なる応用が期待されます。



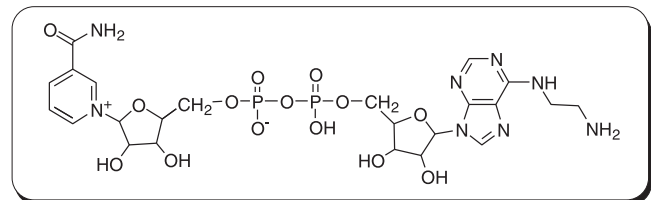
データ提供 : NIH, K. Sano, H. Kobayashi

[参考文献]

K. Sano, T. Nakajima, K. Miyazaki, Y. Ohuchi, T. Ikegami, P. L. Choyke and H. Kobayashi, "Short PEG-Linkers Improve the Performance of Targeted, Activatable Monoclonal Antibody-Indocyanine Green Optical Imaging Probes", *Bioconjugate Chem.*, **2013**, 24, 811.

試作品

N⁶-2AE-NAD



NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) は生体内で様々な脱水素酵素 (デヒドロゲナーゼ) の補酵素として重要な働きをしています。例えば、乳酸脱水素酵素 (LDH) による乳酸のピルビン酸への変換や、アルコール脱水素酵素 (ADH) によるエタノールのアセトアルデヒドへの変換において電子の授受に関わります (Fig. 1)。

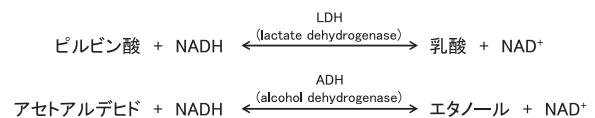
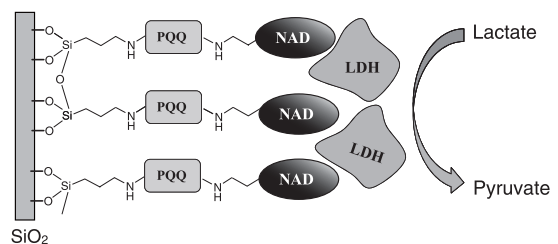


Fig. 1 生体内の様々なデヒドロゲナーゼと NAD の酸化還元反応

小社では現在、反応性基を導入した補酵素の開発を進めており、N⁶-2AE-NAD は NAD のアデニンの N⁶ 位にアミノエチル基を導入した誘導体です。末端のアミノ基を介して電極やタンパク質などに共有結合で固定化することが可能です。酵素による NAD⁺ の NADH への還元率を 100 としたときに、N⁶-2AE-NAD は、80 ほどの還元率を保持していることが報告されています^{1,2,3)}。

このような性質を生かして、N⁶-2AE-NAD はバイオセンサに活用されています。Kharitonov らは SiO₂ や金基板上へ NAD を共有結合で固定化し、Field-Effect Transistor (FET) ベースの乳酸検出酵素センサを作製しています (Fig. 2)⁴⁾。



N⁶-2AE-NAD にご興味がありましたら、小社までお問合せ下さい。

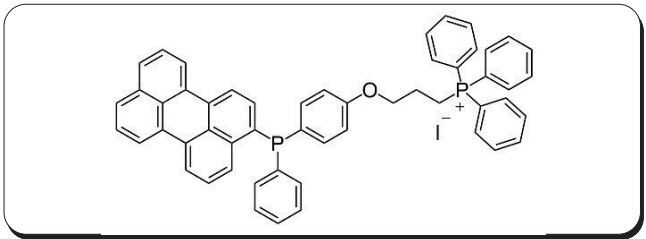
[参考文献]

- 1) H. L. Schmidt, G. Grenner, *Eur. J. Biochem.* **1976**, 67, 295.
- 2) M. Muramatsu, I. Urabe, Y. Yamada, H. Okada, *Eur. J. Biochem.* **1977**, 80, 111.
- 3) J. Hendle, A. F. Buckmann, W. Aehle, D. Schomburg, R. D. Schmid, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 213, 947.
- 4) A. B. Kharitonov, M. Zayats, L. Alfonta, E. Katz, I. Willner, *Sens. Actuators B*, **2001**, 76, 203.

開発中

ミトコンドリア膜脂質過酸化物検出蛍光試薬

MitoPeDPP (仮)



<特長>

- ・細胞内微小器官であるミトコンドリアに特異的に集積
- ・ミトコンドリア膜の脂質過酸化物を選択的に検出
- ・励起波長 488 nm、蛍光波長 535 nm で測定可能

小社では過酸化脂質検出試薬として DPPP、Spy-LHP、Liperfluo を販売しております。この度これら試薬に加え、ミトコンドリア膜中の脂質過酸化物を検出する試薬を開発しております。

本品は、生細胞中で脂溶性過酸化物のみと選択的に反応します。一般に汎用される 488 nm の励起波長で観測することが可能なため、蛍光顕微鏡を用いた生細胞でのミトコンドリア膜中の過酸化脂質イメージングが可能です。

MitoPeDPP は福岡大学・塩路准教授により開発された試薬です。

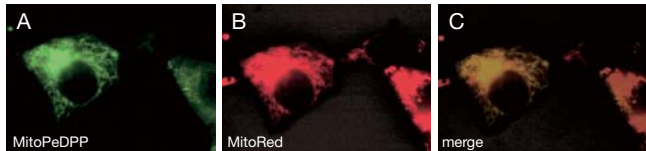
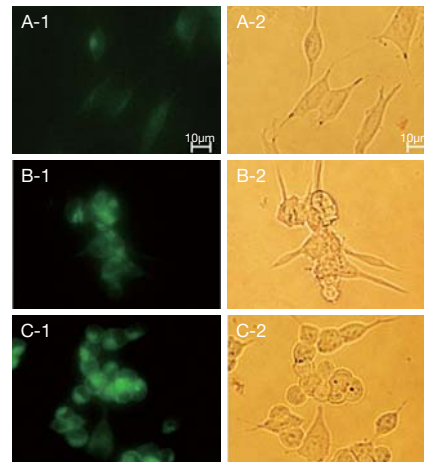
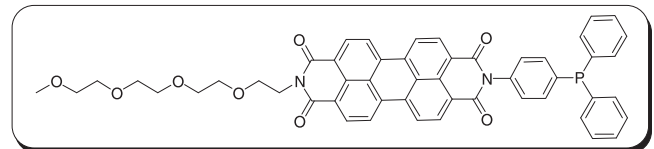


Fig. 1 HepG2 細胞での過酸化物添加による過酸化物捕捉イメージング
 (A) : MitoPeDPP を細胞にロード後、*t*-BHP*による外部刺激を加え 15 分後に観察
 (B) : ミトコンドリア染色試薬 MitoRed 染色
 (C) : (A) と (B) の重ね合わせ画像
 * *t*-BHP: *tert*-Butylhydrogenperoxide

関連製品

Liperfluo

細胞用過酸化脂質検出蛍光試薬
 励起波長 524 nm、蛍光波長 535 nm

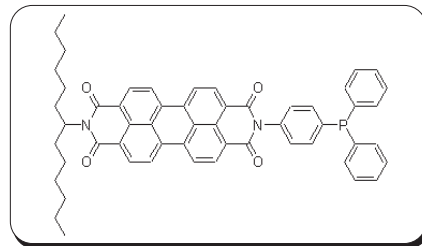


SH-SY5Y 細胞における各種薬剤刺激による過酸化脂質イメージング薬剤による酸化ストレス刺激により明確な蛍光増加が確認できる。
 (A) Control (B) AIPH (C) Cumene それぞれの蛍光及び明視野画像。
 *Cumene: Cumene hydroperoxide

(データ提供: 同志社大学生命医科学部 野口範子先生)

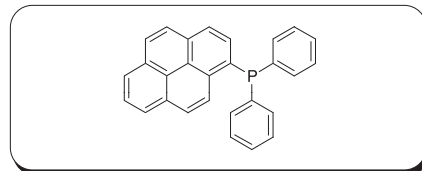
Spy-LHP

過酸化脂質検出蛍光試薬
 励起波長 524 nm、蛍光波長 535 nm



DPPP

過酸化脂質検出蛍光試薬
 励起波長 352 nm、蛍光波長 380 nm



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Liperfluo	50 µg×5	20,000	L248
Spy-LHP	1 mg	20,000	S343
DPPP	10 mg	12,400	D350

新製品 (9月20日発売)

内胚葉分化モニタリングキット

ES/iPS Differentiation Monitoring Kit - Human Endoderm ES/iPS Differentiation Monitoring Kit - Mouse Endoderm

<特長>

- ・内胚葉への分化を特異的に検出できる
- ・細胞を損なわずに継続培養しながら分化状態をモニターすることができる
- ・短時間で多検体の測定が可能である

胚性幹細胞または多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) は、三胚葉 (内胚葉・中胚葉・外胚葉) を経由しあらゆる細胞に分化できるため再生医療の実現に向けて注目されています。三胚葉のなかでも内胚葉由来の細胞は、膵臓や肝臓といった人にとって重要な機能をもつ臓器へと分化する分岐点に位置するため、効率的な分化誘導、分化度の確認は不可欠です。分化度の確認には、指標となる mRNA や細胞内タンパク質の発現量を一定期間ごとに測定し、それらの発現量の変化で判断するため一部の培養細胞を破壊する必要があります。

本キットを用いて培養上清中のマーカータンパク質を検出することで、ES/iPS 細胞から分化した内胚葉細胞の分化度を測定することができます。このマーカータンパク質は内胚葉マーカーである Sox17、Foxa2 二重陽性細胞率と相関します。本キットでは培養上清中のマーカータンパク質を ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 法により検出するため、細胞を損なわず継続培養しながら分化の状態をモニターすることが可能です。また、多検体の測定に用いることができるため、分化誘導剤などの薬剤スクリーニングにも有用と考えられます。

本製品は熊本大学発生医学研究所との共同研究成果です。

<キット内容 :- Human Endoderm * >

- ・ Coated 96-well Strip Plate x 1
- ・ Standard x 1
- ・ Reagent A x 1
- ・ Reagent B x 1
- ・ Washing Buffer x 1
- ・ Storage Buffer 0.5 ml x 1
- ・ Substrate Solution 10 ml x 1
- ・ Plate Seal x 3

*- Mouse Endoderm は一部内容が異なります。

[参考文献]

H. Iwashita, N. Shiraki, D. Sakano, T. Ikegami, M. Shiga, K. Kume and S. Kume, *PLoS ONE.*, **2013**, *8* (5): e64291.

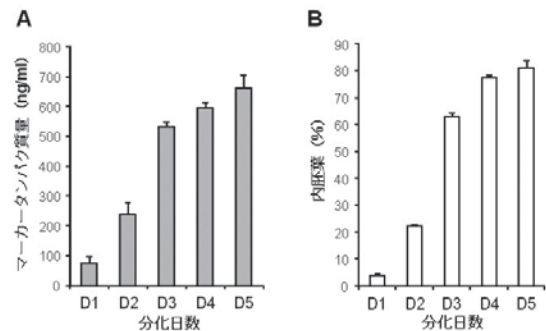


Fig. 1 ヒト iPS 細胞を用いた分化日数毎の培養上清中のマーカータンパク質量 (A) と内胚葉細胞の割合 (Sox17, Foxa2 二重陽性細胞) (B) の関係 (A) 分化日数毎の培養上清中のマーカータンパク質量 (ng/ml) (B) 分化日数毎の内胚葉細胞の割合 (%)

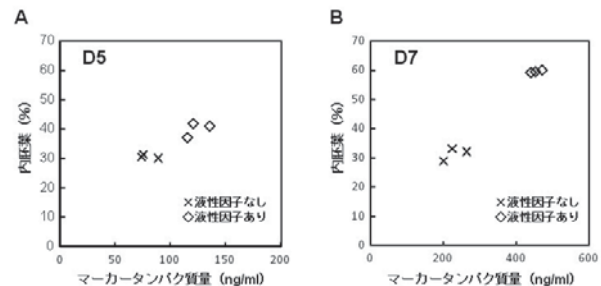


Fig. 2 マウス ES 細胞を用いた異なる培養条件下でのマーカータンパク質量と内胚葉細胞の割合 (Cxcr4, E-Cadherin 二重陽性細胞) の関係 (A) 分化 5 日目、(B) 分化 7 日目

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
ES/iPS Differentiation Monitoring Kit - Human Endoderm	96 tests	95,000	ES01
ES/iPS Differentiation Monitoring Kit - Mouse Endoderm	96 tests	95,000	ES02

新製品

プロテオーム解析用試薬

NTA-SAM Formation Reagent

< NTA-SAM 基板の特長 >

1. タンパク質を His-tag を介して固定化するため、固定化による変性の影響が少ない。
2. イミダゾールや EDTA など His-tag と Ni-NTA 間の相互作用を解消することで His-tag タンパク質を脱着することができる (Fig. 3)。
3. タンパク質の脱着が可能のため基板の再利用が可能である。

QCM (Quartz Crystal Microbalance : 水晶振動マイクロバラン) や SPR (Surface Plasmon Resonance : 表面プラズモン共鳴) 等のバイオセンサーに SAM (Self-Assembled Monolayer : 自己組織化単分子膜) を介してタンパク質を固定化する方法のひとつに Ni-NTA (Nitrilotriacetate : ニトリロ三酢酸) を介した His-tag タンパク質固定化法¹⁾ があります。この “His-tag” 技術により、複雑な高次構造を持つタンパク質を、その活性を損なわずに固体表面に化学的に結合させることが可能になっています。

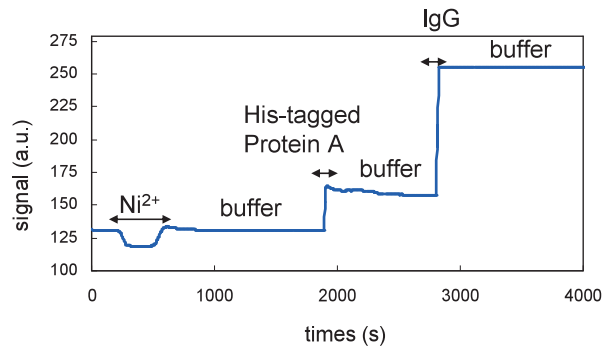
QCM や SPR 以外にも活用されており、SELDI (Surface Enhanced-LDI)-TOF-MS²⁾ は、質量分析法である LDI (Laser Desorption/Ionization)-TOF (Time of Flight)-MS (Mass Spectroscopy) と NTA-SAM を組み合わせ、表面のタンパク質の検出や相互作用の検討が可能です。また、NTA 部位を有する金ナノ粒子を利用して、His-tag タンパク質を粒子にコートし、目的タンパク質との相互作用を TEM (Transmission Electron Microscope) で高感度に観察する³⁾ など、NTA 表面を利用した様々なアプリケーションが報告されております。

小社では、表面カルボン酸とタンパク質などのアミノ基の結合反応を利用した方法 (Carboxylic acid-SAM Formation Reagent : メーカーコード C488) や Biotin-Avidin の特異的で強力な結合を利用した方法 (Biotin-SAM Formation Reagent : メーカーコード B564) でタンパク質を固定化できる製品をすでに販売しております。これらの製品は、タンパク質を効率的に固定化し、かつ非特異的吸着の少ない SAM を作製できるという特長があることから多くの方にご利用いただいております。更に、今回 His-tag タンパク質を効率的に固定化し、非特異的吸着の少ないセンサーを作製するための NTA-SAM Formation Reagent を開発いたしました。本製品には、表面に NTA 部位が存在する SAM 形成試薬が含まれており、エタノールに溶解して金基板を浸漬するだけで NTA-SAM を形成することができます。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
NTA-SAM Formation Reagent	2 μmol × 3	18,000	N475

[参考文献]

- 1) G. B. Sigal, C. Bamdad, A. Barberis, J. Strominger and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 490.
- 2) T. W. Hutchens and T. T. Yip, *Rapid Commun. Mass Sepctrom.*, **1993**, 7, 576.
- 3) T. Kitai, Y. Watanabe, Y. Y. Toyoshima, T. Kobayashi, T. Murayama, H. Sakaue, H. Suzuki and T. Takahagi, *Japanese Journal of Applied Physics*, **2011**, 50, 095002-1.



Ni²⁺: 40 mmol/l NiSO₄ aq
 Buffer: 10 mmol/l HEPES (pH 7.5)
 150 mmol/l NaCl, 0.05% Tween20
 His-tag Protein A: 0.1 mg/ml His-tagged Protein A in buffer
 IgG: 0.1 mg/ml IgG (Rabbit) in buffer
 EDTA: 10 mmol/l HEPES (pH 7.5)
 150 mmol/l NaCl, 200 mmol/l EDTA

Fig. 1 SPRを用いた Protein A と IgG の特異的結合の検出
 NTA-SAM 表面に Ni²⁺ をキレートさせ、His-tagged Protein A、続いて IgG を表面に固定した。

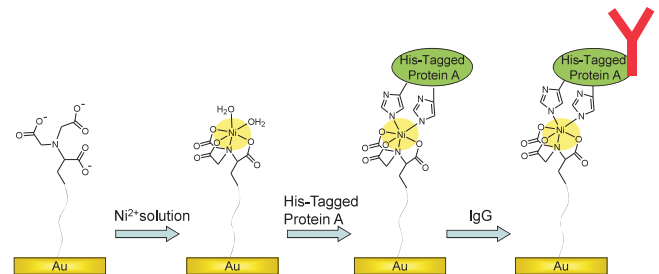


Fig. 2 Protein A と IgG の特異的結合の模式図

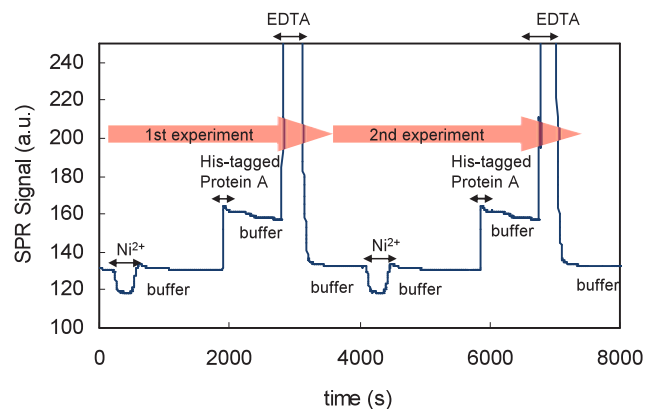


Fig. 3 NTA-SAM 基板のリサイクル性の評価
 NTA-SAM 表面に Ni²⁺ をキレートさせ、His-tagged Protein A を表面に固定した。続いて EDTA を作用し、Protein A を脱離させた。この操作を 2 回連続して行った。

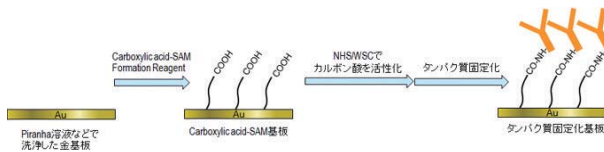
関連製品

One Shot type

Carboxylic acid-SAM Formation Reagent

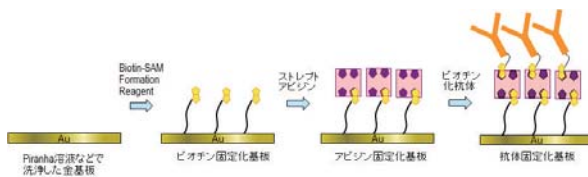
金電極、SPR および QCM などの金表面に、末端官能基としてカルボキシル基を有する SAMs (Self-Assembled Monolayers) を形成するための試薬です。

NHS/WSC を用いたアミンカップリング法によって簡単にタンパク質やペプチド、その他の分子認識サイトを導入することができます。



Biotin-SAM Formation Reagent

Streptavidin や NeutrAvidin などのアビジン類を効率的に固定化し、非特異吸着の少ないセンサーを作製するための、ビオチン SAM 作製用試薬です。本試薬を用いて作製したビオチン SAM では、従来品に比べ、Streptavidin 結合後の表面への非特異的なタンパク質吸着が少ない上、より多くのビオチン化タンパク質を固定化することができます。



Amine Coupling Kit

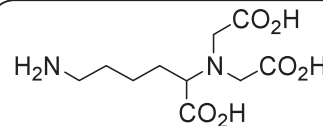
本キットには、アミンカップリングを行うための試薬およびバッファー類がすべて含まれており、カルボン酸の活性化、サンプル固定化、ブロッキングまでの操作すべてを行うことができます。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Carboxylic acid-SAM Formation Reagent	1 μmol × 3	16,000	C488
Biotin-SAM Formation Reagent	1 μmol × 3	16,000	B564
Amine Coupling Kit	2 ml × 4	24,000	A515

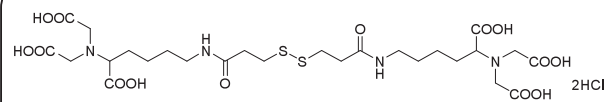
His-tag 試薬

His-tag 技術に使用できる NTA 誘導体を 4 種発売しております。様々な表面に NTA を形成し、His-tag を有するタンパク質やペプチドとの結合が可能です。

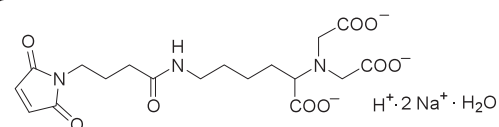
AB-NTA free acid



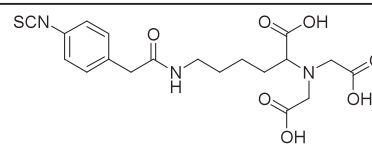
Dithiobis (C₂-NTA)



Maleimido-C₃-NTA



Isothiocyanobenzyl-NTA



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
AB-NTA free acid	100 mg	13,000	A459
Dithiobis (C ₂ -NTA)	10 mg	20,200	D550
	50 mg	80,600	D550
Maleimido-C ₃ -NTA	10 mg	17,000	M035
Isothiocyanobenzyl-NTA	10 mg	18,400	I 279



24th Forum in DOJIN フォーラム・イン・ドージン

生体硫化水素 $bioH_2S$ - 原始環境が用意したシグナル分子 -

DOJINDO

日時: **2013年11月15日(金)** 10:00~17:00(開場 9:30)

場所: **熊本ホテルキャッスル**(熊本市中央区城東町4-2)

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**

講演プログラム

- 10:00~10:05 主催者挨拶 野田 栄二 (株式会社 同仁化学研究所)
10:05~10:15 世話人挨拶 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)

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))

- 10:15~11:15 **木村 英雄** ((独) 国立精神・神経医療研究センター神経薬理研究部)
「硫化水素(H_2S)の生合成と機能」
11:15~12:00 **野中 孝昌** (岩手医科大学薬学部構造生物薬学講座)
「口腔細菌由来硫化水素産生酵素 β -C-S lyase の構造と反応機構」
12:00~13:30 ランチブレイク(ランチョンセミナー)

Session 2: (座長: 三浦 洵(株式会社 同仁化学研究所))

- 13:30~14:15 **永原 則之** (日本医科大学基礎医学放射性同位元素研究室)
「酵素から硫化水素は産生されるか: 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase の分子進化と生理的役割」
14:15~15:00 **中川 秀彦** (名古屋市立大学大学院薬学研究科薬化学分野)
「ケージド H_2S の開発研究」
15:00~15:15 コーヒーブレイク

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))

- 15:15~16:00 **木村 俊秀** (大分大学医学部医学科薬理学教室)
「誘導型硫化水素産生酵素CSEによる脾B細胞保護」
16:00~16:45 **梶村 真弓** (慶應義塾大学医学部医化学教室)
「一酸化炭素・硫化水素カスケードによる脳微小循環代謝制御」
16:45~17:00 閉会の挨拶 三浦 洵
17:00~18:30 ミキサー

参加費: 無料
定員: 140名

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: 蒲野・江口)
Tel: 0120-489548 Fax: 0120-021557 E-mail: info@dojindo.co.jp

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
フリーダイヤル

0120-021557
0120-489548