

# DOJIN NEWS

ドージンニュース

No.090/1999

Reviews

ニトロチロシンの生体内検出 澤 智裕

Oxidative Stress,  
DNA Damage and Human Diseases Yoke W. Kow

連載 ▶ 実用的蛍光誘導体化

山口政俊  
能田 均



## 目次

### Reviews

- ニトロチロシンの生体内検出  
 熊本大学医学部 澤 智裕、赤池孝章、前田 浩..... 3  
 Oxidative Stress, DNA Damage and Human Diseases  
 Emory University School of Medicine Yoke W. Kow, Ph.D..... 7  
 実用的蛍光誘導体化 1  
 福岡大学 薬学部 山口政俊、能田 均.....12

### Commercial

- Q&A PKA用ペプチドプローブ.....14  
 新製品案内  
 DNA損傷部位ビオチン化キット.....10  
 新規水溶性POD基質溶液.....15  
 細胞染色用色素溶液.....15  
 Self-Assembled Monolayer 研究用試薬.....16  
 機能性キレート試薬.....17  
 塩化物イオンイオノフォア.....18  
 水溶性セレンテラジン.....19

### お知らせ

- ピテロジェニン実技セミナー開催報告.....19  
 ホームページリニューアルのご案内.....20

## 新製品案内

- 新製品** DNA損傷部位ビオチン化キット  

コード番号	品名	容量	価格(¥)
347-07861	ARP Kit	100回用	29,000
- 新製品** 新規水溶性POD基質溶液  

Request	SAT Blue	50ml	Request
---------	----------	------	---------
- 新製品** 細胞染色用試薬  

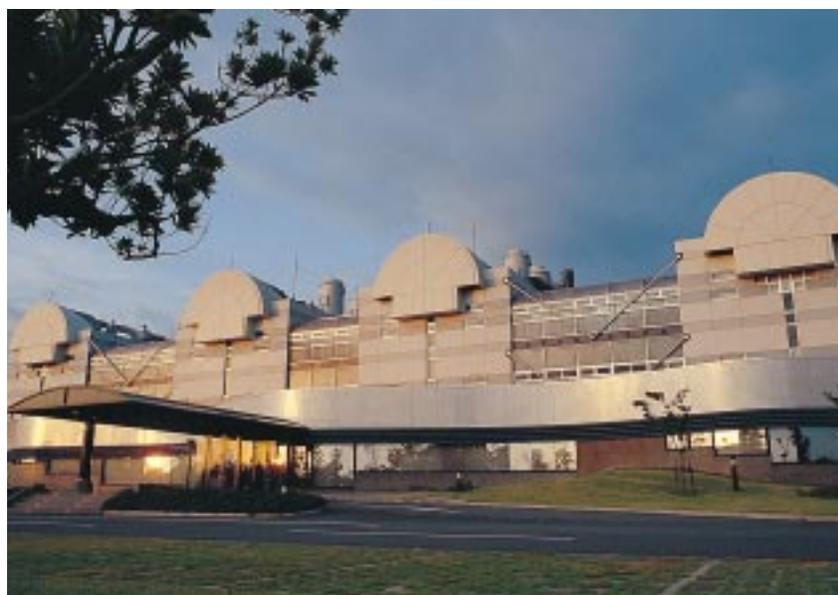
348-07891	-Cellstain- EB solution	1ml	3,800
341-07881	-Cellstain- PI solution	1ml	3,800
348-07911	-Cellstain- AO solution	1ml	3,800
341-07901	-Cellstain- Calcein-AM solution	1ml	13,000
- 新製品** Self-Assembled Monolayer 研究用試薬  

Request	11-Amino-1-undecanethiol hydrochloride	10mg	12,800
		100mg	38,500
Request	10-Carboxy-1-decanethiol	10mg	11,000
		100mg	30,000
Request	7-Carboxy-1-heptanethiol	10mg	11,000
		100mg	30,000
Request	5-Carboxy-1-pentanethiol	10mg	11,000
		100mg	30,000
- 新製品** 塩化物イオンイオノフォア  

Request	Bisthiourea-1	25mg	19,000
		100mg	59,800
- 新製品** 機能性キレート試薬  

Request	Maleimido-C <sub>3</sub> -NTA	10mg	11,000
		50mg	29,000
- 新製品** 水溶性セレンテラジン  

Request	Coelenterazine-WS	1mg	Request
---------	-------------------	-----	---------



同仁化学研究所社屋：熊本空港の近く、緑に恵まれたテクノロジーサーチパーク内にある。春にはテクノロジーサーチパーク内の公園の桜が満開になる。

## ニトロチロシンの生体内検出

### Measurement of 3-nitrotyrosine in biological systems



澤 智裕

(Tomohiro SAWA)

熊本大学医学部微生物学教室

赤池孝章(熊本大学医学部微生物学教室助教授)

前田 浩(熊本大学医学部微生物学教室教授)

#### Summary

Much attention has been given to a diverse function of nitric oxide (NO). Two different NO-dependent signal transductions are now known to occur in biological systems. One is cyclic GMP (cGMP)-mediated pathway via activation of soluble guanylate cyclase, the other is through cGMP-independent mechanism. Nitrosylation and nitration appear to be critically involved in various cGMP-independent biological phenomena caused by NO. It is now well conceivable that various oxidized forms of NO such as peroxynitrite and NOx, rather than NO per se, produce nitrosothiols and 3-nitrotyrosine. The biological significance of the tyrosine nitration is a major interest in this regard, because ample evidence indicates formation of 3-nitrotyrosine in vivo under various pathological conditions. A number of detection methods for nitrotyrosine are reported, however, only a few of them can be performed conveniently and reproducibly. Specific and sensitive measurement of 3-nitrotyrosine will be helpful to obtain a better understanding of physiological and pathological effects of nitration reaction in biological systems. The mechanism of biological nitration and its identification and quantification are reviewed in this article.

キーワード：ニトロチロシン、多電極型電気検出器、高速液体クロマトグラフィー、免疫組織化学、一酸化窒素、スーパーオキシド、パーオキシナイトライト

#### 1. はじめに

近年、生体内における一酸化窒素 (nitric oxide, NO) の多彩な生理活性が注目されている<sup>1,2)</sup>。NOは、比較的安定な無機ラジカルであるが、酸素ラジカルなどとは異なったユニークな化学的反応性を示す。生体内で生成したNOは、種々の酸化反応を介して最終的に比較的安定なNO<sub>2</sub><sup>-</sup>やNO<sub>3</sub><sup>-</sup>イオンとなるが、その過程でNOは、共存する分子状酸素(O<sub>2</sub>)や酸素ラジカル(活性酸素)さらには重金属(Fe, Cu)と反応することにより、より反応性に富む窒素酸化物が生じ、NOそのものには認められない多彩な活性が発現される。

NOによるシグナル伝達には可溶性グアニレートサイクラーゼの活性化によるcGMPを介する経路と、cGMPに依存しないものがある。前者は、血管内皮依存性弛緩反応に代表される情報伝達メカニズムであるが<sup>1)</sup>、後者の場合、NOそのものというより、NO由来の反応性窒素酸化物であるパーオキシナイトライト(ONOO<sup>-</sup>)やN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>(NO<sub>2</sub>)などによるニトロ化やニトロソ化反応を介する経路により、生体内の幅広い生命現象に関わっていることが明らかにされつつある<sup>3-5)</sup>。

特に最近では、パーオキシナイトライトなどによるチロシンのニトロ化反応が生体内のリン酸化反応を制御したり、アポトーシスを誘導することにより、細胞内あるいは細胞間のシグナル伝達や細胞死に深く関わる事が示唆されている。従って、生体内で生成した3-ニトロチロシン(以下ニトロチロシン)検出法の確立は、パーオキシナイトライトなどの反応性窒素酸化物の生体内における生成の指標(バイオマーカー)としてだけでなく、それら反応性窒素酸化物の生物活性を解析する上で重要な課題である。本稿においては、生体内ニトロチロシン生成のメカニズムについて概説した後、現在主に用いられているニトロチロシン検出法について紹介する。

#### 2. ニトロチロシン生成メカニズム

Table 1に、現在までニトロチロシン生成に関与することが示唆されている反応メカニズムをまとめた。パーオキシナイトライトはNOとO<sub>2</sub><sup>-</sup>の反応産物である(2次反応速度定数6.7 × 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>sec<sup>-1</sup>)。我々は、マウスインフルエンザウイルス肺炎モデルにおいて、ウイルス性炎症に伴ってNOとO<sub>2</sub><sup>-</sup>産生の共誘導がもたらされ、その結果、パーオキシナイトライトが過剰に産生されること、さらに、このパーオキシナイトライトがウイルス感染病態の病原性発現に深く関わっていることを報告してきた<sup>6,7)</sup>。

パーオキシナイトライト(ONOO<sup>-</sup>)のpKaは6.8であるので、やや酸性側の生理的pH域ではパーオキシナイトライトはプロトン化され、ONOOH(peroxynitrous acid)の生成を経て、最終的には硝酸(イオン)になる。パーオキシナイトライト生成以後の反応の過程で、特にONOOHがHNO<sub>3</sub>(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)へと変換する間に、反応性の高い中間体が生じ、これがチオール化合物などの酸化を

Table 1. 生体内ニトロチロシン生成メカニズム

- \*1. パーオキシナイトライトによるニトロ化  
CO<sub>2</sub>, ミエロパーオキシダーゼ(MPO), 重金属(Cu, Fe)などにより促進
- \*2. アルキル/アシルナイトライト生成を介する系  
ONOO<sup>-</sup>/NO/NO<sub>2</sub>による脂質のニトロ化産物: LO(O)NO<sub>2</sub>, LONO<sub>2</sub>などによるニトロ化反応
- \*3. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>(NO)/MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>反応系  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup>のMPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系による酸化、もしくはNO<sub>2</sub><sup>-</sup>とHOClからのNO<sub>2</sub>Clの生成を介するニトロ化反応(MPO以外のperoxidaseもしくは他のhemeproteinも関与する)
4. チロシンラジカルとNOのラジカルカップリング
5. NO<sub>2</sub>/HNO<sub>2</sub>によるニトロ化

\*1-3が生体内の主要なニトロ化反応系である。

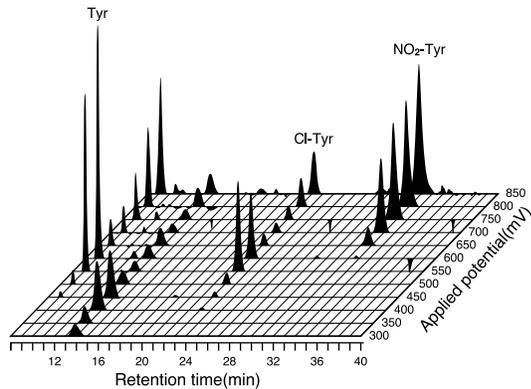


Fig. 1. HPLC-EC array chromatogram of tyrosine (5 pmol), 3-chlorotyrosine (5 pmol), and 3-nitrotyrosine (5 pmol) illustrated in two-dimensions.

もたらずものと考えられている<sup>8,9)</sup>。パーオキシナイトライト (ONOO<sup>-</sup>/ONOOH) の反応性は、 $\cdot$ OH などの酸化反応に比べ劣っているが、パーオキシナイトライトは $\cdot$ OH とは質的に全く異なった興味ある反応性を示す。すなわち、パーオキシナイトライトはアミノ酸、特に蛋白質中のチロシン残基のニトロ化をもたらし<sup>3,8,9)</sup>、核酸塩基、特にグアニンのニトロ化や水酸化を来す<sup>10)</sup>。さらに最近、パーオキシナイトライトのニトロ化反応が生体内に豊富に存在する (1.2 mM) 二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) により促進されることが明らかにされた<sup>11)</sup>。すなわち、パーオキシナイトライトが CO<sub>2</sub> と直接反応し、生じた ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup> が強いニトロ化活性を發揮すると考えられている。また、ONOO<sup>-</sup> は、中性域において $\cdot$ OH より、はるかに安定でその寿命は数秒であり、より安定な生物活性を發揮し、多彩な生理活性を有することがわかっている<sup>8,12)</sup>。

一方、最近 Eiserich らは、パーオキシナイトライトに依存しない生体内ニトロチロシン生成メカニズムを提唱している<sup>13)</sup>。それは、ミエロパーオキシダーゼ (myeloperoxidase, MPO) と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (+ Cl<sup>-</sup> イオン) による NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の過酸化反応により NO<sub>2</sub>Cl (未同定) が生じ、これが強いニトロ化反応をもたらすというものである。この反応は、好中球由来の MPO に依存した反応であるため、炎症局所における好中球浸潤の有無が、MPO 依存性のニトロチロシン生成の前提条件となる。実際、ニトロチロシン抗体を用いた各種組織の免疫染色像を検討した場合、ニトロチロシンの局在は、好中球・マクロファージを中心に認められることが多い。また MPO 以外にも NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の過酸化反応によるニトロ化を触媒する内因性パーオキシダーゼも存在することが示唆されており<sup>3)</sup>、今後、このシステムが生体内ニトロ化反応にどの程度寄与するかさらに検討が必要であろう<sup>13)</sup>。

### 3. ニトロチロシン検出法

これまで試験管内でのチロシンニトロ化の解析には、主に UV 検出器を接続した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が用いられてきた<sup>14)</sup>。しかしながら、生体内でのニトロチロシン生成量は、チロシン 100 残基に対して 0.01<sup>15)</sup> ~ 0.8<sup>16)</sup> 程度と報告されており、検出感度と特異性の点から通常の HPLC-UV 法においてはいくつかの問題点が指摘されている。例えば、パーキンソン病やア

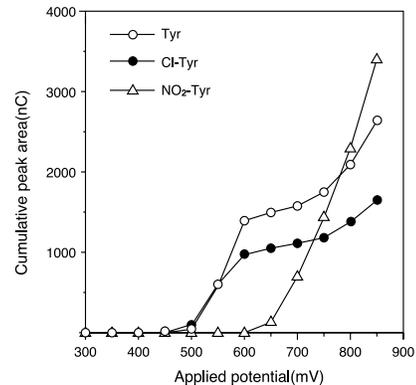


Fig. 2. Hydrodynamic voltammograms generated for tyrosine, 3-chlorotyrosine, and 3-nitrotyrosine.

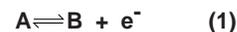
ルツハイマー病などの中枢神経系の病理組織中には、単波長の UV 検出器を接続した HPLC では区別できないアーチファクトの存在が示唆されており、HPLC-UV のみから求めた 3-ニトロチロシンの値については疑問視されている<sup>17)</sup>。そのため、現在では以下に述べる分析手法が生体内でのニトロチロシン生成の検出に応用されている。

#### 3.1 免疫化学的検出法

現在、米国 Upstate Biotechnology 社などから抗ニトロチロシン抗体が市販されており、これを用いた免疫化学的検出が盛んに行われている<sup>3)</sup>。我々も、インフルエンザ感染マウス肺<sup>6)</sup> やサルモネラ菌感染マウス肝<sup>18)</sup> におけるニトロチロシン生成を免疫組織化学的に検出している。本法はニトロチロシン生成とともにその局在も同定できるという利点もあるが、定量性に乏しい。そのため、生体内ニトロチロシンの定量においては、以下に述べるような、感度および特異性に優れた検出法を応用しなくてはならない。

#### 3.2 HPLC-電気化学検出器

HPLC-電気化学検出法 (HPLC-EC 法) は、HPLC により分離した化合物 (A もしくは B) を電極セルへと導入し、その電極表面上で起こる酸化還元反応 (式 1) により、検出・定量する方法である。



HPLC-EC 法は、蛍光検出器に匹敵する検出感度を持ち、また幅広い濃度範囲で直線性を有するなどの特徴から、核酸塩基の酸化物 (8-オキソグアニンなど) をはじめとする様々な生体内物質の検出・定量に用いられている。ニトロチロシンに関して、いくつかの動物モデルを用いて、その生成を HPLC-EC 法により解析した報告がある。例えば、Shigenaga らは、サンプル中のニトロチロシンを sodium dithionite により還元し、アミノチロシンとして、EC 法により検出する方法を報告している<sup>15)</sup>。しかしながら、生体試料中でのニトロチロシンの還元効率やアミノチロシンとしての収率などにいくつかの問題が残されている。また、単一電極による HPLC-EC 法では、試料に夾雑する物質との区別が困難な場合が多く、より特異的な検出法が望まれている。

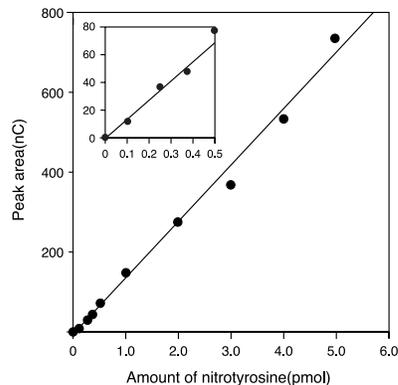


Fig. 3. HPLC-EC response to serial dilution of 3-nitrotyrosine obtained with applied potential of 750 mV.

### 3.3 HPLC-多電極EC法

最近、Hensleyら<sup>16)</sup>、およびCrow<sup>19)</sup>により、HPLC-多電極EC法が、ニトロチロシン生成をより特異的に、しかも高感度に検出できる優れた方法であることが報告された。HPLC-多電極ECでは、通常8～12個の電極セルが直列に接続され、HPLCで分離された試料はそれら多電極へ次々と導入される。その結果、一つの溶出時間に対して一度の測定で多数の電圧-電流関係を求めることが可能となる。例としてチロシン、クロロチロシン、ニトロチロシンをHPLC-多電極EC (CoulArray, ESA社)で検出した結果をFig. 1に示す。図では300 mVより50 mVずつ電圧を上げているが、それぞれの化合物が異なる電圧において酸化反応をしていることが分かる。このときのピーク面積の累積値を印加電圧に対してプロットしたものがFig. 2である。このようなプロファイルはそれぞれの化合物に固有であることから、HPLCによる溶出時間とあわせてピークを同定する上で、大変有用な知見を与える。

多電極ECにおいても単電極EC同様、高感度な検出が可能である。多電極ECでは、さらに電極が直列に接続されているために、一つ前の電極がガードセルとしての役目も果たす。そのため、単電極に比べ、よりノイズが抑えられる結果として、より高い感度が実現される。Fig. 3には750 mVにおけるニトロチロシン量とピーク面積との関係を示している。今回、検討した結果では0.1 pmol (50  $\mu$ l injection)まで検出可能であった。

タンパク質内に結合しているニトロチロシンを検出するためには、何らかの方法でタンパク質をアミノ酸まで分解することが必要である。Fig. 4には、コントロール(無処理)のウシ血清アルブミン(BSA)あるいはパーオキシナイトライトで処理したBSAを、Waters社製のタンパク質加水分解装置(Pico-Tag)を用いて、6N HCl、110℃、12時間、酸加水分解した試料をHPLC-多電極ECにて分離した結果を示している。アミノ酸混合物においてもニトロチロシンがきれいに検出され、またこの条件においては、チロシン(約9分に溶出)も同時に分離・定量が可能であるため、タンパク質中のチロシンニトロ化率を、全チロシン残基中のニトロチロシン残基量として求めることができる。この他に、蛋白質分解酵素を用いる方法も報告されている<sup>16,19)</sup>。

上述したように、我々はインフルエンザ感染マウス肺において

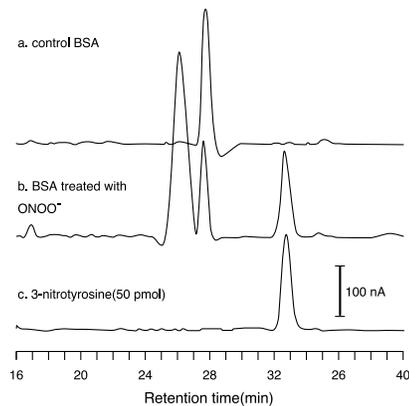


Fig. 4. HPLC-EC analysis of (a) acid hydrolysate of control BSA, (b) acid hydrolysate of BSA treated with  $\text{ONOO}^-$  (2 mM), and (c) authentic 3-nitrotyrosine (50 pmol) detected with applied potential of 720 mV.

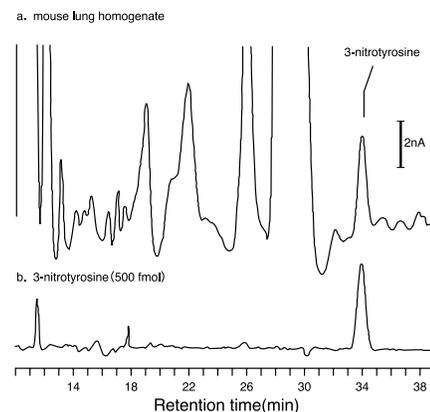


Fig. 5. Nitrotyrosine formation in mouse lung infected with influenza virus infection. (a) acid hydrolysate of lung homogenate (7 days postinfection) analyzed by HPLC-EC at 700 mV, (b) authentic 3-nitrotyrosine (500 fmol).

ニトロチロシンが生成していることを免疫組織化学的に明らかにしてきた。そこで今回、本システムを用いて感染マウス肺内に生成したニトロチロシンの定量を試みた。Fig. 5aには、インフルエンザ感染7日後のマウス肺ホモジネートを上記の酸加水分解した試料のHPLCプロファイル、標品のニトロチロシンのそれ(Fig. 5b)とともに示す。このときの肺内のニトロチロシン量は、0.03/100チロシン残基と見積もられた。このように本システムにより、生体内のニトロチロシン生成が感度良く定量できることが示された。

### 3.4 ガスクロマトグラフィー法

Ohshimaら<sup>20)</sup>、およびPetruzzelliら<sup>21)</sup>によりガスクロマトグラフィー法(GC法)でのニトロチロシン検出法が報告されている。Petruzzelliらによるとthermal energy analysis (TEA)を組み合わせたGC-TEA法では、ニトロチロシンの検出限界が37 pmol/mg proteinとなり、Ohshimaらの方法に比べて25倍の感度向上がみられるという。しかしながら、我々は上述した多電極型ECを接続したHPLC法により、さらに10倍以上感度良くニトロチロシンを検出できることを確認している。

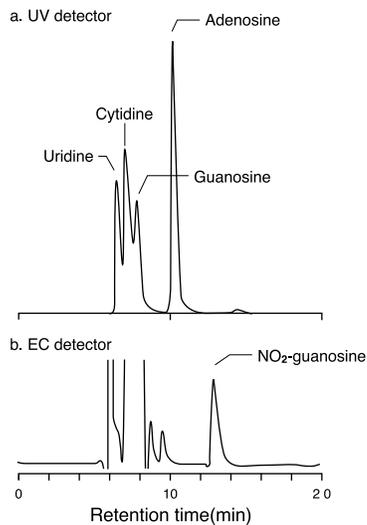


Fig. 6. HPLC separation of 8-nitroguanosine from nucleoside mixture detected by (a) UV detector and (b) EC detector (750 mV).

#### 4. HPLC-多電極ECによるニトログアノシンの検出

パーオキシナイトライトはチロシン以外にも様々な生体分子に対して酸化やニトロ化をもたらす。Yermilovらは、パーオキシナイトライトが核酸塩基グアノシンの8位を効率よくニトロ化することを報告している<sup>10)</sup>。生成した8-ニトログアノシンの生物学的な意義は未だ不明であるが、YermilovらはDNA鎖上に生じた8-ニトログアノシンが自発的に脱塩基反応を起こし、アペーシック部位を形成することを示している<sup>10)</sup>。DNA複製においてアペーシック部位の向かい側にはアデニンが取り込まれやすくなることが知られており<sup>22)</sup>、Yermilovらは8-ニトログアノシンがアペーシック部位形成を介してG→T変異を誘発する可能性があると示唆している<sup>10)</sup>。一方、Szaboらは、パーオキシナイトライトによるDNA鎖切断がアポトーシスを起こす引き金となる可能性を示唆している<sup>23)</sup>。これらのことから、8-ニトログアノシンは核酸とパーオキシナイトライトとの反応を知るためのバイオマーカーとしても注目されている。

これまでニトログアノシンは、HPLC-UV法<sup>24)</sup>や、ニトロ基を一旦アミノ基へ還元した後HPLC-EC法<sup>10)</sup>により検出されていた。今回、我々は上述したHPLC-多電極EC法によるニトログアノシンの検出を試みた。その結果、Fig. 6に示すように、他の正常ヌクレオシド(アデノシン、グアノシン、ウリジン、シチジン)の混合試料中から8-ニトログアノシンを良好に分離でき、しかも還元などの処理を行うことなく8-ニトログアノシンそのものを検出することができた。

#### 5. まとめ

以上述べてきたように、HPLC-多電極ECは、生体内ニトロチロシン生成を高感度に、しかも特異的に検出・定量できる優れた方法であることが示された。今後、免疫組織化学法と組み合わせた解析を行うことでより詳細な生体内ニトロ化反応の解析が可能になるものと期待される。

#### 参考文献

- 1) Furchgott, R. F. *Acta Physiol. Scand.*, **139**, 257-70 (1990)
- 2) Moncada, S. & Higgs, A. N. *Eng. J. Med.*, **329**, 2002-12 (1993)
- 3) Ischiropoulos, H. *Arch. Biochem. Biophys.*, **356**, 1-11 (1998)
- 4) Stamler, J. S., Toone, E. J., Lipton, S. A. & Sucher, N. J. *Neuron*, **18**, 691-6 (1997)
- 5) Akaike, T., *et al. J. Biochem.*, **122**, 459-66 (1997)
- 6) Akaike, T., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 2448-53 (1996)
- 7) Akaike, T., Suga, M. & Maeda, H. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **217**, 64-73 (1998)
- 8) Rubbo, H., Darley-Usmar, V. & Freeman, B. A. *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 809-20 (1996)
- 9) Beckman, J. S. & Koppenol, W. H. *Am. J. Physiol.*, **271**, C1424-37 (1996)
- 10) Yermilov, V., Rubio, J. & Ohshima, H. *FEBS Lett.*, **376**, 207-10 (1995)
- 11) Uppu, R. M., Squadrito, G. L. & Pryor, W. A. *Arch. Biochem. Biophys.*, **327**, 335-43 (1996)
- 12) Pryor, W. A. & Squadrito, G. L. *Am. J. Physiol.*, **268**, L699-722 (1995)
- 13) Eiserich, J. P., *et al. Nature*, **391**, 393-7 (1998)
- 14) Lyman, S. V., Jiang, Q. & Hurst, J. K. *Biochemistry*, **35**, 7855-61 (1996)
- 15) Shigenaga, M. K., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 3211-6 (1997)
- 16) Hensley, K., *et al. Anal. Biochem.*, **251**, 187-95 (1997)
- 17) Kaur, H., Lyras, L., Jenner, P. & Halliwell, B. *J. Neurochem.*, **70**, 2220-3 (1998)
- 18) Umezawa, K., *et al. Infect. Immun.*, **65**, 2932-40 (1997)
- 19) Crow, J. P. *Methods Enzymol.*, **301**, 151-60 (1999)
- 20) Ohshima, H., Friesen, M., Brouet, I. & Bartsch, H. *Food Chem. Toxicol.*, **28**, 647-52 (1990)
- 21) Petruzzelli, S., *et al. Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, **156**, 1902-7 (1997)
- 22) Kunkel, T. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 1494-8 (1994)
- 23) Szabo, C. & Ohshima, H. *Nitric Oxide*, **1**, 373-385 (1997)
- 24) Spencer, J. P., *et al. Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 1152-8 (1996)

#### プロフィール

氏名 澤 智裕 (Tomohiro SAWA) 31歳  
所属 熊本大学医学部微生物学教室・助手

〒860-0811 熊本市本荘2-2-1  
TEL: 096-373-5101 FAX: 096-362-8362  
E-mail: sawat@gpo.kumamoto-u.ac.jp

出身大学 鹿児島大学工学部応用化学科  
京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻

学位 工学博士

現在の研究テーマ  
フリーラジカル・パーオキシナイトライトの生化学、  
抗腫瘍剤のDDS

## Oxidative Stress, DNA Damage and Human Diseases



Yoke W. Kow, Ph.D.

Division of Cancer Biology, Department of Radiation Oncology, Emory University School of Medicine, 145 Edgewood Avenue, Atlanta, GA 30335

Reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radical are products of oxygen metabolism in all aerobic organisms. ROS are generated as a result of energy production from mitochondria (from the electron transport chain), as part of an antimicrobial<sup>1)</sup> or antiviral<sup>2)</sup> response, as well as detoxification reactions carried out by the cytochrome P-450 system<sup>3,4)</sup>. Environmental agents such as ultraviolet light, ionizing radiation, redox chemicals and cigarette smoke also readily generate ROS. The antioxidant defense system in most cells is composed of two components, the antioxidant enzymes component which includes enzymes such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, and the low molecular weight antioxidants component that includes vitamins A and E, ascorbate, glutathione and thioredoxin. These substances are the body's natural defense against endogenous generated ROS and other free radicals, as well as ROS generated by external environmental factors. Oxidative stress occurs when the production of ROS exceeds the body's natural antioxidant defense mechanisms, causing damage to biomolecules such as lipids, proteins and DNA.

### Spectrum of DNA damage resulting from oxidative stress

Oxidative damage to DNA is a result of interaction of DNA with ROS, in particular the hydroxyl radical. Superoxide and hydrogen peroxide are normally not reactive towards DNA. However, in the presence of ferrous or cuprous ion (the Fenton reaction), both superoxide and hydrogen peroxide are converted to the highly reactive hydroxyl radical. Hydroxyl radical produces a multiplicity of modifications in DNA. Oxidative attack by OH radical on the deoxyribose moiety will lead to the release of free bases from DNA, generating strand breaks with various sugar modifications and simple abasic (AP) sites. In fact, one of the major types of damages generated by ROS is AP site, a site where a DNA base is lost.

AP sites are also formed at an appreciable rate from spontaneous

depurination. It is estimated that at least 10,000 depurination events occur per cell per day under physiological conditions. A similar amount of AP site is thought to be generated by normal aerobic respiration. In addition to AP site, a wide spectrum of oxidative base modification occurs with ROS (Figure 1). The C4-C5 double bond of pyrimidine is particularly sensitive to attack by OH radical, generating a spectrum of oxidative pyrimidine damage including thymine glycol, uracil glycol, urea residue, 5-OHdU, 5-OHdC, hydantoin and others. Similarly, interaction of OH radical with purines will generate 8-OHdG, 8-OHdA, formamidopyrimidines and other less characterized purine oxidative products. It has been estimated that endogenous ROS can result in about 200,000 base lesions per cell per day. The biological consequences of many of the oxidative products are known. For example, unrepaired thymine glycol is a block to DNA replication and is thus potentially lethal to cells. On the contrary, 8-oxoG, an abundant oxidative damage to dG, is readily bypassed by the DNA polymerase and is highly mutagenic. Unrepaired 8-oxoG will mispair with dA, leading to an increase in G to T transition mutations.

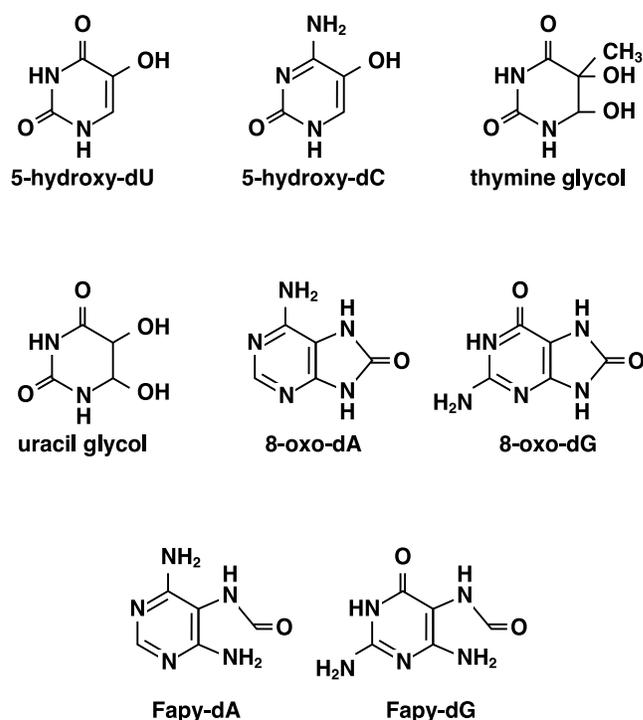


Fig. 1. Chemical structure of some of the stable oxidative DNA base lesion.

### Enzymatic repair of oxidative DNA damage

In order to maintain the fidelity of genetic material, all organisms have evolved many different repair pathways to remove various types of DNA damage, resulting from either endogenous or external DNA reactive agents. Oxidative damage is repaired by an ubiquitous base excision repair pathway<sup>5,6)</sup>. Base damage is recognized by DNA N-glycosylase. There are two major N-glycosylases for oxidative base damage (a deamination

product such as uracil is recognized by uracil N-glycosylase). Endonuclease III from *E. coli* is the prototype repair enzyme that recognizes many types of oxidative pyrimidine damages<sup>7,8)</sup>. Homologues of endonuclease III are found in all cells examined, and its gene has been cloned from bacteria, yeast, mouse, and human cells. The substrate specificity of various endonuclease III homologues appear to be similar<sup>9,10)</sup>. The enzyme has an associated  $\beta$ -lyase activity. After the release of the damaged base by endonuclease III, the enzyme cleaves to the phosphodiester bond 3' to the AP site, leaving behind a 3' modified sugar moiety, 4-hydroxypentenal<sup>11)</sup>. On the other hand, oxidative purine damage is recognized by formamidopyrimidine N-glycosylase (fpg)<sup>12,13)</sup>. Functional homologues of the bacterial fpg protein are present in yeast and human cells. The eukaryotic enzyme that recognizes 8-oxoG is called 8-oxoG glycosylase (OGG1 gene product) and shares no amino acid sequence homology with the bacterial fpg protein<sup>14)</sup>. The substrate specificity of bacterial fpg and eukaryotic OGG1 protein is similar, recognizing 8-oxoG and formamidopyrimidines. However, the bacterial fpg protein has an associated  $\beta$ -lyase activity, leaving behind a 3' phosphate terminus<sup>15,16)</sup>. The eukaryotic OGG1 protein is a  $\beta$ -lyase, leaving behind a 3' 4-hydroxypentenal residue. The 3' residue (either the 4-hydroxypentenal or phosphoryl group) left behind by these N-glycosylases are further processed by AP endonucleases, generating the 3' OH that is required for repair synthesis catalyzed by DNA polymerase. There are two major types of AP endonuclease, endonuclease III and the exonuclease IV. In *E. coli*, both AP endonucleases are present, with exonuclease III being the major AP endonuclease. In human cells, the major AP endonuclease is exonuclease III and in yeast, the major activity is endonuclease IV. After the 3' end of the DNA is processed by AP endonucleases, the repair process is completed following repair synthesis and ligation by DNA polymerase and ligase, respectively.

### Oxidative stress and human diseases

Oxidative stress has been thought to contribute to the general decline in cellular functions that are associated with many human diseases including Alzheimer's disease<sup>17,18)</sup>, amyotrophic lateral sclerosis (ALS)<sup>19,20)</sup>, Parkinson's disease<sup>21,22)</sup>, atherosclerosis<sup>23,24)</sup>, ischemia/reperfusion neuronal injuries, degenerative disease of the human temporomandibular-joint<sup>25)</sup>, cataract formation<sup>26,27)</sup>, macular degeneration<sup>20,28)</sup>, degenerative retinal damage<sup>29)</sup>, rheumatoid arthritis<sup>30)</sup>, multiple sclerosis<sup>31)</sup>, muscular dystrophy<sup>32,33)</sup>, human cancers<sup>34,35)</sup> as well as the aging<sup>36,37)</sup> process itself. Increased cellular level of ROS due to oxidative stress can result in an increased steady state level of oxidative DNA damage. There is increasing evidence that an increased level of oxidative damage such as AP site is detected in cells obtained from ALS and Alzheimer patients or after ischemia/reperfusion. Due to the fact that many human diseases might be resulting from chronic oxidative stress and the magnitude of oxygen damage to DNA that is associated with oxidative stress, it is important to have a simple and accurate procedure for estimating the level of oxidative DNA damage in oxidative stressed

cells.

### Detection and quantification of oxidative DNA damage by the ARP assay

ARP reagent (*N*'-aminooxymethylcarbonylhydrazino-D-biotin, Fig. 2) is a biotinylated hydroxylamine derivative. The chemical reacts specifically with an aldehyde group, thus allowing the detection of DNA modifications that resulted in the formation of an aldehyde group. AP site in DNA exists in equilibrium between the ring closed and the ring opened form (Fig. 3). Approximately 5% of the AP site is in the ring opened form, which has an active aldehyde group. ARP, a biotinylated alkoxyamine (Fig. 2) reacts

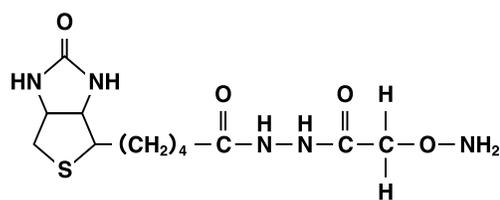


Fig. 2. Chemical structure of ARP reagent

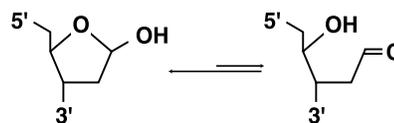


Fig. 3. Chemical structure of an AP site

specifically with the aldehyde group in the ring opened AP site. After treating DNA containing AP sites with ARP reagent, AP sites are thus tagged with a biotin residue. By using an excess amount of ARP reagent, essentially all AP sites can be converted to biotin-tagged AP sites. The amount of biotinylated AP sites can then be easily quantified with an ELISA-like assay, using avidin-biotin complex conjugated with either horseradish peroxidase or alkaline phosphatase as an indicator enzyme (Fig. 4). This procedure has been successfully used by

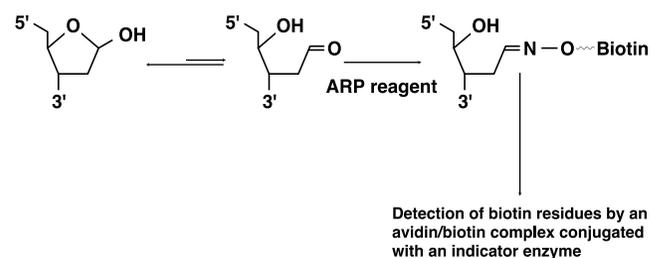


Fig. 4. Principle of ARP assay

several laboratories for accurate measurement of AP sites in DNA<sup>38, 39, 40, 41</sup>. A modification of the ELISA-like ARP assay was made by (38), allowing even more sensitivity in the detection of AP site. Instead of binding DNA to a microtiter plate, DNA was bound to a nitrocellulose membrane using a dot blot apparatus. A microtiter plate-based AP site assay kit is currently available from Dojindo Laboratories.

Many kinds of base damages are recognized by damage specific DNA glycosylases. The substrate spectrum of DNA glycosylases varies depending on the enzymes; some have very narrow substrate specificity, such as uracil DNA N-glycosylase and T4 endonuclease V, while some can recognize a variety of base modifications such as endonuclease III, 8-oxoguanine N-glycosylase and alkA protein. These glycosylases remove modified bases, leaving behind either intact AP sites or modified sugar moieties (4-hydroxy-pentenal) still attached to the 3' termini of nicked DNA. Both products of N-glycosylases still retain the active aldehyde that can easily be quantified by the use of ARP assay. Therefore, treating damaged DNA with a specific repair enzyme will permit the determination of a class of base damages that is normally recognized by the repair enzyme. The advantage of the enzyme-coupled ARP assay is that it allows the investigator to assess the contribution of a whole spectrum of base damage that is normally recognized by the repair enzymes. Furthermore, if one would like to assess the amount of oxidative DNA damage due to increased oxidative stress, treatment of the damaged DNA with both endonuclease III and yeast OGG1 will provide a relatively good assessment of the total amount of oxidative base damage that has occurred on the DNA. Endonuclease III has been shown to recognize many different types of pyrimidine oxidative damages. Therefore DNA samples treated with excess endonuclease III will leave behind a 3' modified sugar moiety (4-hydroxypentenal) that can be tagged with the ARP reagent. The amount of ARP tag can then be determined and be used as a measurement for endonuclease III sensitive site or an oxidative pyrimidine lesion. In fact, the enzyme coupled-ARP assay has been used for the quantification of thymine glycols and alkylation damage in DNA<sup>39, 41</sup>. Similarly, oxidative purine damage can be detected using either the yeast 8-oxoguanine glycosylase (yOGG1) or the human 8-oxoguanine glycosylase (hOGG1). In the latter case, the bacterial fpg protein cannot be used since the enzyme generates a phosphoryl group. OGG1 has been shown to recognize mostly 8-oxoG and formamidopyrimidines (OGG does not recognize 8-oxoA), but the amount of damage determined by the use of OGG might underestimate the total oxidative purine damage. However, it should provide a good assessment of the level of biologically important purine damage present in the cells. A kit for estimating the amount of oxidative pyrimidine and purine damage is currently under development by Dojindo Laboratories, and should be available soon.

## References

1. Weiss, S. J., and LoBuglio, A. F., *Laboratory Investigation*, **47**, 5-18(1982).
2. Griot, C., Burge, T., Vandeveld, M., and Peterhans, E., *Acta Neuropathol.*, **78**, 396-403(1989).
3. Scholz, W., Schutze, K., Kunz, W., and Schwarz, M., *Cancer Res.*, **50**, 7015-22(1990).
4. Cederbaum, A. I., *Free Radical Biology & Medicine*, **7**, 559-67(1989).
5. Kow, Y. W., Faundez, G., Melamede, R. J., and Wallace, S. S., *Radiation Res.*, **126**, 357-66(1991).
6. Kow, Y. W., *Annals of the New York Academy of Sciences*, **726**, 178-80(1994).
7. Kow, Y. W., and Wallace, S. S., *Biochemistry*, **26**, 8200-6(1987).
8. Purmal, A. A., Rabow, L. E., Lampman, G. W., Cunningham, R. P., and Kow, Y. W., *Mutation Res.*, **364**, 193-207(1996).
9. Aspinwall, R., Rothwell, D. G., Roldan-Arjona, T., Anselmino, C., Ward, C. J., Cheadle, J. P., Sampson, J. R., Lindahl, T., Harris, P. C., and Hickson, I. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 109-14 (1997).
10. Ikeda, S., Biswas, T., Roy, R., Izumi, T., Boldogh, I., Kurosky, A., Sarker, A. H., Seki, S., and Mitra, S., *J. Biol. Chem.*, **273**, 21585-93 (1998).
11. Mazumder, A., Gerlt, J. A., Absalon, M. J., Stubbe, J., Cunningham, R. P., Withka, J., and Bolton, P. H., *Biochemistry*, **30**, 1119-26 (1991).
12. Chetsanga, C. J., Lozon, M., Makaroff, C., and Savage, L., *Biochemistry*, **20**, 5201-7 (1981).
13. Tchou, J., Bodepudi, V., Shibutani, S., Antoshechkin, I., Miller, J., Grollman, A. P., and Johnson, F., *J. Biol. Chem.*, **269**, 15318-24 (1994).
14. Radicella, J. P., Dherin, C., Desmaze, C., Fox, M. S., and Boiteux, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8010-5 (1997).
15. Tchou, J., and Grollman, A. P., *J. Biol. Chem.*, **270**, 11671-7 (1995).
16. Rabow, L. E., and Kow, Y. W., *Biochemistry*, **36**, 5084-96 (1997).
17. Multhaup, G., Ruppert, T., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Masters, C. L., and Beyreuther, K., *Biochem. Pharm.*, **54**, 533-9 (1997).
18. Bozner, P., Grishko, V., LeDoux, S. P., Wilson, G. L., Chyan, Y. C., and Pappolla, M. A., *J. Neuropathol. Experimental Neurol.*, **56**, 1356-62 (1997).
19. Jackson, C. E., and Bryan, W. W., *Seminars in Neurology*, **18**, 27-39 (1998).
20. Christen, W. G., Glynn, R. J., and Hennekens, C. H., *Ann. Epidemiol.*, **6**, 60-6 (1996).
21. Radunovic, A., Porto, W. G., Zeman, S., and Leigh, P. N., *Neurosci. Lett.*, **239**, 105-8 (1997).
22. Mukherjee, S. K., and Adams, J. D., Jr., *Molecular & Chemical Neuropathol.*, **32**, 59-74 (1997).
23. Alexander, R. W., *Transactions of the American Clinical & Climatological Association*, **109**, 129-45 (1998); discussion, 109, 145-

- 6 (1998).
24. Fiorillo, C., Oliviero, C., Rizzuti, G., Nediani, C., Pacini, A., and Nassi, P., *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine*, **36**, 149-53 (1998).
25. Milam, S. B., Zardeneta, G., and Schmitz, J. P., *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, **56**, 214-23 (1998).
26. Tissie, G., Guillermet, V., Latour, E., Coquelet, C., and Bonne, C., *Ophthalmic Res.*, **20**, 27-30 (1988).
27. Varma, S. D., Devamanoharan, P. S., and Morris, S. M., *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, **35**, 111-29 (1995).
28. Nicolas, M. G., Fujiki, K., Murayama, K., Suzuki, M. T., Shindo, N., Hotta, Y., Iwata, F., Fujimura, T., Yoshikawa, Y., Cho, F., and Kanai, A., *Experimental Eye Research*, **62**, 399-408 (1996).
29. Andersson, M., Sjostrand, J., Petersen, A., and Karlsson, J. O., *Ophthalmic Research*, **30**, 157-67 (1998).
30. Miyata, T., Ishiguro, N., Yasuda, Y., Ito, T., Nangaku, M., Iwata, H., and Kurokawa, K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **244**, 45-9 (1998).
31. Calabrese, V., Raffaele, R., Cosentino, E., and Rizza, V., *International Journal of Clinical Pharmacology Research*, **14**, 119-23 (1994).
32. Rando, T. A., Disatnik, M. H., Yu, Y., and Franco, A., *Neuromuscular Disorders*, **8**, 14-21 (1998).
33. Murphy, M. E., and Kehr, J. P., *Biochem. J.*, **260**, 359-64 (1989).
34. DeWeese, T. L., Shipman, J. M., Larrier, N. A., Buckley, N. M., Kidd, L. R., Groopman, J. D., Cutler, R. G., te Riele, H., and Nelson, W. G., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 11915-20 (1998).
35. Meyer, T. E., Liang, H. Q., Buckley, A. R., Buckley, D. J., Gout, P. W., Green, E. H., and Bode, A. M., *International Journal of Cancer*, **77**, 55-63 (1998).
36. Stadtman, E. R., and Berlett, B. S., *Drug Metabolism Reviews*, **30**, 225-43 (1998).
37. Beckman, K. B., and Ames, B. N., *Physiol. Reviews*, **78**, 547-81 (1998).
38. Nakamura, J., Walker, V. E., Upton, P. B., Chiang, S. Y., Kow, Y. W., and Swenberg, J. A., *Cancer Research*, **58**, 222-5 (1998).
39. Kubo, K., Ide, H., Wallace, S. S., and Kow, Y. W., *Biochemistry*, **31**, 3703-8 (1992).
40. Ide, H., Akamatsu, K., Kimura, Y., Michiue, K., Makino, K., Asaeda, A., Takamori, Y., and Kubo, K., *Biochemistry*, **32**, 8276-83 (1993).
41. Asaeda, A., Ide, H., Tano, K., Takamori, Y., and Kubo, K., *Nucleosides & Nucleotides*, **17**, 503-13 (1998).

### お知らせ

ドージンニュースNo.89 (p16) にてご案内いたしました Aluminum detection kit は試験・研究用であり医薬品としては使用できません。

## 新製品

# DNA損傷部位ビオチン化キット

## ARP Kit

- DNA損傷部位ビオチン化キット (AP site) -

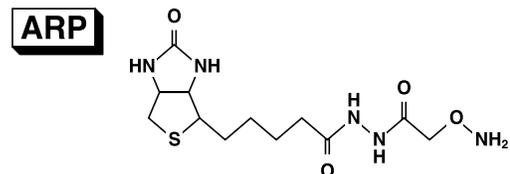
### 【はじめに】

生物の遺伝情報を保持しているDNAは、複製時のDNA polymeraseのエラーに加えて、環境中の放射線や紫外線、またはアルキル化剤等の化学物質、生体内における活性酸素等の代謝産物等により損傷を受けます。これらのエラーや損傷が正しく修復されなければ、突然変異を誘発し、これが癌や老化の原因となります。

DNA損傷部位には修復機構が働き、その一つとして塩基除去修復があります。この時 AP site (apurinic / apyrimidinic site) と呼ばれる塩基除去部位が出現します。つまりAP site の検出はDNA損傷部位を測定し得る有効な方法となります。

ARP (*N*-Aminooxymethylcarbonylhydrazino-D-biotin) はこのAP siteと特異的に結合し、ビオチン化できる試薬として知られています。ARP Kit は、ARPを用いてDNAをビオチン化し96穴マイクロプレートに固定化して検体DNA中のAP site を簡便に定量できるキットです。

このキットには、AP site 数が既定された標準DNAが含まれており、既存のビオチン検出法を用いることによってAP site の定量ができます。



### 【測定原理】

- 1) 精製した検体DNAのAP site をARPで標識します。
- 2) 標準DNAと共にARP標識した検体DNAを96穴マイクロプレートに固相化します。
- 3) ARPはビオチン構造を持つため、酵素標識したアビジンで認識されます。
- 4) アビジンの標識酵素活性を利用し、酵素発色基質試薬で発色させます。吸光度を測定し、標準DNAより作成した検量線より検体DNAのAP site 数を定量します。

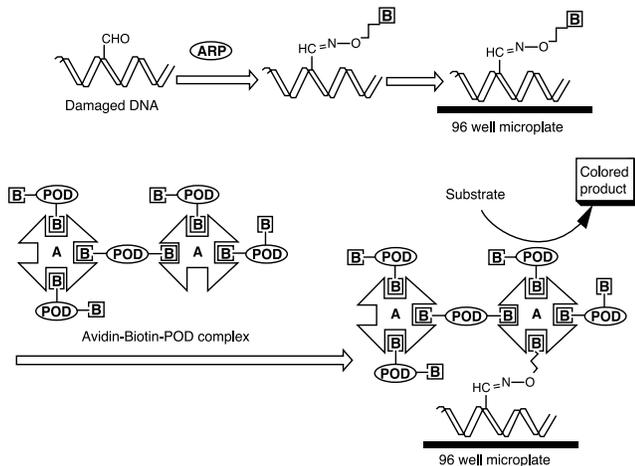
### 【キット内容】

標準ARP-DNA	3 ml
(5 AP-sites/10,000 nucleotides 0.2 μg/ml)	
希釈用ARP-DNA	3 ml
(0 AP-sites/10,000 nucleotides 0.2 μg/ml)	
BSA (ブロッキング用)	0.8 g
PBS (BSA希釈用)	40 ml
ARP	3 mg
アミノプレート	1 枚

## DNA損傷部位ビオチン化キット

### 【キット以外に必要な器具、試薬】

- 1) マイクロピペッター
- 2) マイクロプレートウォッシャー
- 3) 恒温槽
- 4) マイクロプレートリーダー
- 5) TE buffer (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH7.5)
- 6) PBST (0.1% Tween 20 in PBS)
- 7) ビオチン検出用試薬 (ABC Avidine-Biotin-POD complex 試薬など)
- 8) 発色基質試薬 (OPD, SAT Blueなど)



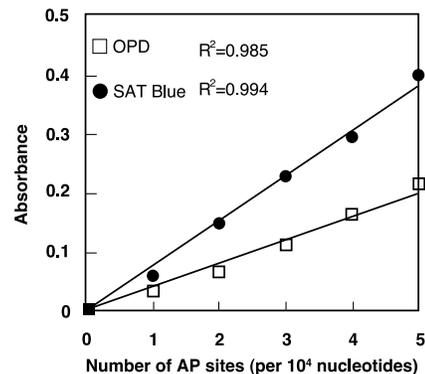
### 【測定操作】

- 検体DNAの標識  
 精製した検体DNAをARPと反応させDNA中のAP-sitesを標識します。
- ↓
- 検量線作成用標準溶液の調製  
 標準ARP-DNAと希釈用ARP-DNAを混合し検量線作成用の標準溶液を調製します。
- ↓
- DNA溶液のプレートへの固相化 (37℃、1時間)  
 で調製したDNA溶液をアミノプレートに固相化します。
- ↓
- プレート洗浄  
 PBSTでプレートを洗浄します。
- ↓
- BSA溶液でブロッキング (37℃、2時間)  
 ビオチン検出用酵素試薬の非特異的吸着を防ぐため、BSA溶液をプレートに添加しプレート表面をブロッキングします。
- ↓
- プレート洗浄  
 ↓

### ビオチン検出用試薬添加

- ↓
- プレート洗浄
- ↓
- 発色基質溶液添加、発色
- ↓
- 発色停止、吸光度測定
- 発色停止後、マイクロプレートリーダーで吸光度測定
- ↓
- 検量線作成  
 標準DNAの吸光度測定結果より作成した検量線から検体DNA中のAP-site数を求めます。

### 検量線作成例



### 【注意事項】

このキットはARPによってDNA中のAP siteをビオチン化するキットです。よって、本キットで【測定操作】)までが行なえます。

ビオチン検出用酵素試薬としてABC試薬のほか、POD conjugated Avidin, ALP conjugated Avidin 等を使用することができます。試薬の濃度、発色試薬などの条件により、検出感度が異なります。

測定感度はプレート間差、測定温度や発色の条件によっても異なってきます。そのため検体DNAと標準DNAの比較は同一プレート上で同時に行なって下さい。

### 参考文献

- 1) A. Sancar, G. B. Sancar, *Annu. Rev. Biochem.*, 57, 29-67 (1988)
- 2) T. Lindahl, B. Nyberg, *Biochemistry*, 11, 3610-3618 (1972)
- 3) M. Liuzzi, M. Talpaert-Borle, *J. Biol. Chem.*, 260, 5252-5258 (1985)
- 4) M. Weinfeld, M. Lizzi, M. C. Paterson, *Biochemistry*, 29, 1737-1743 (1990)
- 5) B. X. Chen, K. Kubo, H. Ide, B. F. Erlanger, S. S. Wallace, Y. W. Kow, *Mutat. Res.*, 273, 253-261 (1992)

コード番号	品名	容量	価格(¥)
347-07861	ARP Kit	100回用	29,000

# 実用的蛍光誘導体化

## 1

福岡大学薬学部

山口政俊



能田 均



### プロフィール

山口政俊  
(Masatoshi YAMAGUCHI) 51歳  
所属：福岡大学薬学部  
教授  
〒814-0180  
福岡市城南区七隈8-19-1  
Tel 092-871-6631 EXT.6618  
Fax 092-863-0389  
E-mail pp034545@psat.fukuoka-u.ac.jp  
出身学校：九州大学大学院薬学  
研究科博士課程退学薬学博士  
現在のテーマ：臨床、医薬品、  
薬理学研究を志向する分析化学  
趣味：スポーツ（見る、聞く、  
試す）

能田 均  
(Hitoshi NOHTA) 42歳  
所属：福岡大学薬学部  
助教授  
〒814-0180  
福岡市城南区七隈8-19-1  
Tel 092-871-6631 EXT.6619  
Fax 092-863-0389  
E-mail pp039454@psat.fukuoka-u.ac.jp  
出身学校：九州大学大学院薬学  
研究科博士課程退学薬学博士  
現在のテーマ：蛍光、化学発  
光を利用する分析法の  
開発  
趣味：テレビ（見る、聞く、  
演じる？）

### 1. はじめに

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は、近年、最も汎用されている分離分析法の一つで、このための装置の普及により多くの分野（例えば、医療、食品、環境など）で、これが日常的に使用されるようになった。通常、HPLCの検出は測定対象物質（目的成分）自身の物理的・化学的性質を検知することに基づいており、吸光度、示差屈折率、電気化学、質量分析、蛍光、化学発光の各検出器などが用いられている。これらの検出法は、測定する試料の種類（状態）、目的成分の化学的性質や濃度などにより適宜選択する。しかし、これら検出法に対し、目的成分が必ずしも強い応答を示すとは限らず、ある場合は全く応答を示さないこともある。この場合、これらの物質の測定は困難となる。

誘導体化は、検出器に対し目的物質が十分な応答を示さないときに、化学反応などにより検出器に強い応答を示す物質へ変換することをいう。また、それに使用する試薬を誘導体化（ラベル化）試薬と呼ぶ。このように、誘導体化は目的成分の高感度かつ高選択的分析を可能にするため、特に、複雑なマトリックスから構成される試料中の微量の目的成分を分析する際に、極めて有効な手段である。近年、この誘導体化法及び試薬の開発が進み、一部では日常的に用いられつつある。

誘導体化には、プレカラム誘導体化とポストカラム誘導体化があり、前者はカラム分離を行う前に誘導体化を、後者はカラム分離後にオンラインで試薬を加えて誘導体化を行う操作である。ポストカラム誘導体化は自動分析計に適用され、日常分析に使用される。

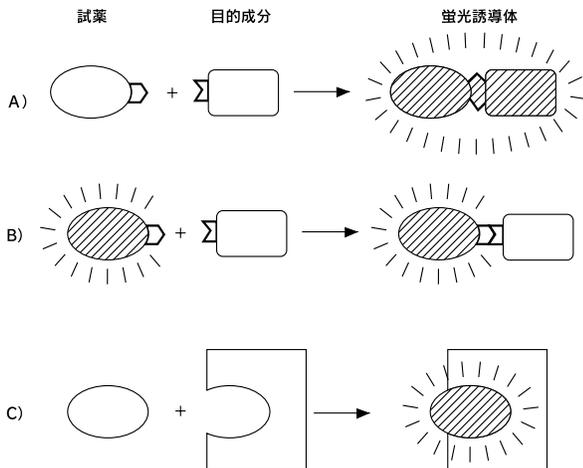
HPLCでは、吸光、蛍光、化学発光、電気化学の各検出法などにおいて誘導体化が用いられている。この中で、蛍光誘導体化が、その高感度性、高選択性などの理由から汎用されている。また、誘導体化に必要な試薬類も数多く開発・販売されており、蛍光法が誘導体化の主流となっている。

蛍光検出法は、特定波長の光（励起光）を照射し、それを吸収した目的成分より発する蛍光を検出する。光を吸収する物質のうち、その光エネルギーを蛍光として発する物質（蛍光物質）はごく一部である。従って、蛍光検出法は他の検出法に比べて選択性が高く、高感度である。また、複数の成分を分析するとき、それぞれの保持時間に応じて、最適な励起及び発光波長に設定できる機能を有する装置も一般化している。近年、蛍光検出器の感度をさらに上げるために、レーザー光を光源に用いるレーザー励起（誘起）検出器が市販されている。レーザー光は波長が限定されるので、目的成分の励起波長と適合すれば高い感度が期待される。

一般に、蛍光誘導体化は次の3タイプがある。

Aタイプの試薬は、試薬自身に蛍光性がなく、目的成分と反応することによって強蛍光性物質となるものである。これは、プレ及びポストカラム誘導体化のいずれにも使用される。

Bタイプの試薬は、強蛍光性物質と、目的成分の特定官能基に反応する活性基とによって構成されるもので、いわば目的成分に



強蛍光性物質というランプをぶら下げる様な種のものである。これは、プレカラム誘導体化に使用される。

C タイプの試薬は、試薬の環境が変化（例えば、親水の場合から疎水の場合への変化）することにより、蛍光強度や波長が大きく変化するものである。

その他、種々の蛍光特性〔時間分解、偏光（解消）、エキシマ一など〕を利用する誘導体化（試薬）もある。

次号からは、市販されている試薬を中心に、目的成分の官能基別に誘導体化試薬を紹介し、実際にそれらがどのように使用されているかを、著者らの経験を基に述べていく。著者らは、生体試料中の微量成分の分析に蛍光誘導体化を利用しているため、内容がこれらに片寄ることをお許しいただきたい。

生体試料中の微量の生体関連物質を実際に測定するとき、ほとんどの場合、誘導体化のみで効果的に目的成分を計測することは困難である。分析の過程で、前処理や濃縮などの操作が必要である。これについては、ドージンニュースの前号までに記されているが、実際の計測例を示す上で前処理法についても解説する。

ところで、近年、蛍光誘導体化は実用的な分析法として広く使用されつつある。しかし、一部では、誘導体化操作が面倒であることなどの理由から、未だに敬遠されがちであることも事実である。また、実際に試してみたが、期待したほど良い結果が得られなかったということもよく耳にする。分析関係の雑誌である *Analytical Chemistry* に2年に一度ずつ掲載される *Fundamental Reviews : Liquid Chromatography* で、誘導体化は、“necessary evil（必要悪）”と称され続けている所以でもあろう。しかし、これは蛍光分析に関わる基本的な知識の欠如から生じている場合も多い。特に、高感度性が要求される蛍光測定において、次のことが十分に留意されるべきである。

#### (1) 器具の洗浄

蛍光分析は感度が極めて鋭敏であるため、極く微量の不純物の混入によって大きな影響を受け、測定が困難になることがある。従って、前処理や誘導体化に用いる器具は十分に洗浄する必要がある。

ある。器具として、ガラス製を使用する 경우가多く、著者らは次の手順で洗浄している。

ガラス器具を使用後、直ちに軽く水で洗浄 無蛍光性の洗剤を入れたバケツに浸ける 器具を取りだし、ブラシで洗浄（ガラス器具を傷つけないよう注意！）水洗後、硝酸（市販の濃硝酸を、等容量の水で希釈）に、一夜浸ける 器具を取りだし、ブラシで水洗 イオン交換水で洗浄（できれば、メタノールで洗浄）蒸留水で洗浄 乾燥（風乾は避ける）

#### (2) 器具の保管

洗浄した器具を放置しておくことは、当然避けるべきである。器具類は、アルミ箔などで栓をするか、外気との接触を避けるための収納庫に保管する。

#### (3) 試薬、溶媒、溶液、測定試料の調製・保管

HPLC 用の溶媒はもちろんであるが、前処理、各種溶液調製、誘導体化反応等に使用する溶媒にも、その汚染に注意する。特に低濃度の標準溶液の調製時には、細心の注意を払う必要がある。保管方法にも前述と同様、留意したい。また、測定する試料への汚染も起こりうる。例えば、著者らは呼気などからの脂肪酸が、溶媒や血液試料に混入し、測定に支障をきたした経験がある。

#### (4) 器具の材質

前処理や誘導体化に用いられる器具の材質に注意を要することもある。前処理や誘導体化の際に、有機溶媒を使用する機会が多い。使用する溶媒に耐久性のある材質の器具が必須となる。ガラス器具を用いるのが一般的である。

器具の壁に、溶液中の溶質が吸着することもある。器具は傷のないものを使用する。生体試料中の微量生理活性アミン類の分析の場合のように、アミン類のガラス器具への吸着が問題になることもしばしばある。これを防止するためにガラス器具をシリコーン処理することもある。しかし、この場合、溶液の液性に注意する必要があるため、ポリプロピレン、ポリエチレン等の合成樹脂製の器具を使用する場合もある。

(5) 分析を行う場所は、汚染を防ぐため、できるだけ汚染源と遮断された部屋あるいはクリーンベンチなどで行うことを勧める。著者らの研究室では、薬品を調製する部屋と生体試料を取り扱う部屋は別室である。また、極く微量生体成分の分析では、実験者と直接接触のない条件下が望ましい。

このほか、取り扱う試料の種類、目的成分の濃度や化学的性質などに対応して、その都度種々の面で注意を払うべきであろう。

こう書いてくると、極めて面倒な操作であるように思われるであろうが、日常的にこれらの操作を行っている、それほど苦労はしない。

## Q&A PKA用ペプチドプローブ

### AR II, DR II

AR II, DR IIは東京薬科大学の工藤先生らにより開発された、新しい培養細胞内でのPKA活性化イメージング試薬です。

#### 【特長】

- ・培養液に添加するだけで比較的簡単に細胞内に導入できます。
- ・従来の試薬に比べ安価です。
- ・AR II : DLDVPIPIGRFDRRVSVAAC-Ad
- ・DR II : DLDVPLPAKADRRVSVAAC-DACM

Q) どのような原理で測定できるのでしょうか？

A) これらの試薬は、cAMP依存性蛋白リン酸化酵素(PKA)の調節ドメイン (regulatory domain) の一部を切り出しそのリン酸化部位の近くに蛍光基を付したものでPKAの特異的な基質となります。酵素の活性化に伴いこれらの試薬がリン酸化されると、ペプチド構造が変動し蛍光物質の蛍光強度が変動します。その変化を捉え解析することで、PKAの活性化を可視化することが出来ます。

Q) AR IIとDR IIはどこが違うのでしょうか？

A) AR II及びDR IIどちらもペプチドC端のシステインのSH基に、それぞれ蛍光物質のアクリロタン及びDACMをMichael付加して導入したもので、その蛍光基の違いにより蛍光波長が異なります。AR IIは  $\text{ex} = 366\text{nm}$ ,  $\text{em} = 525\text{nm}$ であるのに対しDR IIは  $\text{ex} = 386\text{nm}$ ,  $\text{em} = 475\text{nm}$ です。

また、細胞膜の透過性が若干異なるようです。文献によりますと、AR IIはNG108-15には容易に取り込まれますが、海馬神経細胞の初代培養細胞には取り込まれにくいようです。DR IIはAR IIのペプチドのアミノ酸配列を一部変更して若干膜透過性を上げたもので、これを使用すると海馬神経細胞の初代培養細胞も容易に染色できるようです。

Q) 測定装置はどのようなものが必要でしょうか？

A) これらの蛍光変化は数%から十数%程度と余り大きくなく、細胞内でのPKAの活性化を可視化するには、培養細胞の蛍光顕微鏡画像を感度良く取り込んで画像処理する必要があります。浜松ホトニクス社のArgus 50 やArgus 100を用いた報告があります。その他、Argus/Hiscaを用いて可視化した例もあります。

Q) 何が測定できますか。

A) 細胞内でのPKAの活性化状態を可視化することができます。PKA活性化前後の相対的な蛍光強度変化を追っておりますので、活性化したPKAやcAMPなどの細胞内濃度などが測定できるわけではありません。

Q) 細胞への負荷はどのようにすればいいのでしょうか？

A) 使用前にPBSなどのバッファーなどに溶解しそのまま培養液に添加すると細胞内にロードできます。濃度は文献では、数十  $\mu\text{g/ml}$  から100  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で使用されております。添加後30分から1時間程度インキュベートして頂いて細胞内にロードされ

ます。

Q) AR IIとDR IIはどの位の期間安定なのでしょう？

A) 本品は凍結乾燥品であり、冷凍庫で保存すれば1年以上安定です。短期間であれば冷蔵でも構いませんが、長期間保存されるのであれば冷凍にて保存してください。

Q) 高濃度のストック溶液として保存したいのですがどのような溶媒が使用できるでしょうか。また、水溶液にした後の安定性、保存方法について教えてください。

A) 純水に使用時の数十倍程度の濃度 (数十~数百  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ ) で溶解してお使いください。通常のペプチド同様、溶液での長期保存は出来ません。溶液を調製した後は、小分け後冷凍 (-20以下) で保存して下さい。なお、凍結融解は繰り返さないようにしてください。

Q) 細胞に負荷後、細胞外を DR II free の溶液にした場合 DR II の流失はどの程度でしょうか？

数十分の計測に充分耐える位には保持されるのでしょうか。

A) 細胞内への保持時間・漏出割合を調べたこと、またそれに関する論文などはございませんが、細胞内にロードして一晩置いたものでも細胞内に留まっているものもあります。全ての細胞で同様であるとは言えませんが、細胞内での保持は良いのではないかと思います。

Q) PKAそのものに蛍光基を導入したタイプのもの (FICRHR) が市販されていますが、それに対する利点は何ですか？

A) FICRHRはPKAの調節ドメイン、触媒ドメインそれぞれに蛍光基であるローダミン及びフルオレセインを導入したもので、PKAの活性化に伴いその2つのドメインが解離して蛍光波長が変化するものです。したがって、レシオメトリー測定が可能であるという利点がある反面、巨大分子であるために細胞内への負荷にはマイクロインジェクションなどの操作が必要です。また、非常に高価であるという欠点もあります。それに比較して、AR II 及びDR IIは膜透過性の蛍光プローブですので、培養液に添加するだけで細胞への負荷が出来ます。また、FICRHRに比較しても非常に安価です。

Q) 参考となる文献を紹介してください。

A) 下記の論文を参考にされるとよいと思います。

- 1) H. Higashi, K. Sato, A. Omori, M. Sekiguchi, A. Ohtake, Y. Kudo, *FEBS Lett.*, 414, 55 (1997)
- 2) H. Higashi, K. Sato, A. Omori, M. Sekiguchi, A. Ohtake, Y. Kudo, *Neuroreport*, 7, 2695 (1996)
- 3) 工藤佳久、東秀好、細胞工学、16, 64 (1997)

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	AR II	500 $\mu\text{g}$	29,000
Request	DR II	500 $\mu\text{g}$	29,000

## 新製品

## 新規水溶性POD基質溶液

試薬の調製を必要としないELISA用新規発色基質溶液

## SAT Blue

*N,N'*-Bis(2-hydroxy-3-sulfopropyl)tolidine, disodium salt  
(SAT-3) 液状化POD基質

- 特長1 変異原性の無い新規水溶性発色基質SAT-3を使用しています。  
 特長2 発色基質、過酸化水素が予め混合されていますので、面倒な調製や混合の必要が無くそのまま用いることができます。  
 特長3 保存による感度低下が無いので、保存期間に関係無く安定したデータが得られます。  
 特長4 水溶性基質を使っているため沈殿を生じる恐れがありません。

ペルオキシダーゼ (POD) を標識酵素としたELISAに本試薬を用いると、PODによって次第に青色色素 (max = 670 nm) を生じ、硫酸等で酵素反応を停止させると、吸光度の増大を伴って黄色色素 (max = 470 nm) に変化します。この色素体は従来から用いられている *o*-phenylenediamine (OPD) 等と同様に450 nmまたは490 nmのフィルターで吸光度の測定ができます。また自動分析機器やキットにも応用が可能です。

【容 量】 50 ml (遮光高密度ポリエチレン容器)

【保存条件】 冷蔵または冷凍保存

(水溶性の基質を用いており冷凍による沈殿等が起こらないため、長期にわたる冷凍保存も可能となりました。)

長期保存を除いては冷蔵で保存することをお勧めします。

【使用法】 POD標識抗体を固相化したマイクロプレート1ウェルに対し、本試薬を100  $\mu$ l加えます。(使用前に発色温度でプレインキュベートすることによって、安定したデータを得ることができます。)

- ・反応時間：10分 - 120分
- ・測定波長：450 - 490 nm (反応停止時：max = 474 nm)  
650 - 680 nm (発色反応中：max = 674 nm)
- ・反応停止液：希H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (最終濃度：2 - 3 mol/l)

その他、酸性タイプ停止液の使用が可能です。

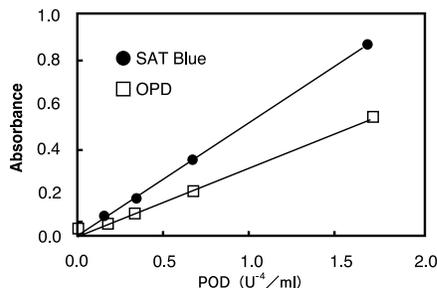


Fig. SAT BlueとOPDの感度比較

## 参考文献

M. Mizoguchi, M. Ishiyama, M. Shiga and K. Sasamoto, *Anal. Commun.* 35, 179 (1998)

コード番号	品 名	容量	価格(¥)
Request	SAT Blue	50ml	Request

## 新製品

## 細胞染色用色素溶液

-Cellstain- EB solution

1 mg/ml H<sub>2</sub>O, 1 ml

-Cellstain- PI solution

1 mg/ml H<sub>2</sub>O, 1 ml

-Cellstain- AO solution

1 mg/ml H<sub>2</sub>O, 1 ml

-Cellstain- Calcein-AM solution

1 mg/ml DMSO, 1 ml

## 【特長】

実験室内の秤量時などの飛散による汚染を防ぎ、使いやすくするために、これらの試薬を溶液化しました。生細胞染色用試薬としてよく使われているCalcein-AMも溶液化することにより、さらに使いやすくなりました。

-Cellstain- PI (propidium iodide) はDNAにインタカレートする蛍光試薬ですが、生細胞の膜を通過することができないために、死細胞や固定細胞の核の染色に用いられています。二本鎖構造のRNAにも結合するのでRNaseでRNAを除去することが望まれます。赤色の蛍光を発するので、FITC標識した抗体やCalcein-AMとで二重染色をすることが可能です。

-Cellstain- EB (Ethidium bromide) も-Cellstain- PIと同様、DNAにインタカレートする蛍光試薬であり、死細胞染色剤としても使用されます。

-Cellstain- AO (Acridine orange) は二本鎖DNAと一本鎖DNAおよびRNAとで蛍光波長が異なり、二本鎖DNAは緑色の蛍光に、一本鎖DNAおよびRNAは赤色の蛍光を発します。よってDNAとRNAを染め分けることができます。

-Cellstain- Calcein-AMは細胞内のエステラーゼによってAM (アセトキシメチル) 基が切断されます。その結果、無色のCalcein-AMが緑色の蛍光をもつCalceinに変わります。また、Calcein-AMは膜透過性を示しますが、Calceinは膜不透過性化合物ですので、発色後の色素漏出も少ない。エステラーゼ活性が生細胞由来であることより、生細胞染色色素として使用されます。

PI, EB, AOは変異原性がありますので、取り扱いには十分にご注意下さい。

コード番号	品 名	容量	価格(¥)
348-07891	-Cellstain- EB solution	1ml	3,800
341-07881	-Cellstain- PI solution	1ml	3,800
348-07911	-Cellstain- AO solution	1ml	3,800
341-07901	-Cellstain- Calcein-AM solution	1ml	13,000

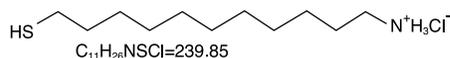
## 新製品

## Self-Assembled Monolayer(SAM)研究用試薬 - チオール誘導体シリーズ -

## 新製品

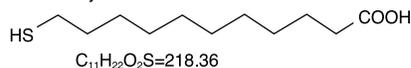
## Amine type

11-Amino-1-undecanethiol hydrochloride (11-AUT HCl)

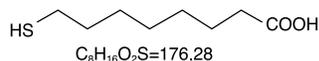


## Carboxylic acid type

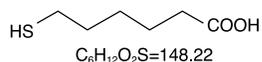
10-Carboxy-1-decanethiol (10-CDT)



7-Carboxy-1-heptanethiol (7-CHT)



5-Carboxy-1-pentanethiol (5-CPT)



固体表面上に種々の分子を集積させる手法の一つである自己組織化法は、欠陥の少ない単分子膜を容易に構築できること、配向制御された組織的膜による新規機能付与、また固体表面の分析手法および分析機器の進歩などから近年、活発に研究されています。なかでもアルキルチオール類を金表面に吸着させた自己組織化単分子膜 (SAM; Self-Assembled Monolayer) は、金修飾電極、表面プラズモン共鳴 (SPR; Surface Plasmon Resonance) 水晶共振子マイクロバランス (QCM; Quartz Crystal Microbalance) 等に利用され注目されています。いずれも基板となる金表面にチオール化合物あるいはジスルフィド化合物を用いてプローブ分子を固定し、それぞれ電流、反射角、振動数変化を検出しています。

これらの自己組織化単分子膜を構成する分子は基本的に固体基板への吸着を目的とする官能基、主鎖および機能性官能基の3つの部位から構成されており、その単分子膜の性質は主鎖の長さやその親水性、末端官能基の選択により多彩な機能を持たせることができると期待されます。

今回紹介するSAM研究用試薬は固体基板への吸着部位としてチオールまたはジスルフィド、末端官能基としてそれぞれアミノ基とカルボキシル基を有しており、タンパクやペプチド、その他の分子認識サイトを導入する際に有用です。

これらのチオール誘導体は金と特異的に吸着しアルキル鎖間の van der Waals 力により高密度・高配向な自己組織化単分子膜を形成します。単分子膜の作製には特殊な装置を必要とせず、チオール誘導体の溶液に基板を浸漬するだけで容易に構築でき、浸漬条件

(溶媒、濃度、温度、時間)によって構造、配向の制御も可能です。

以下に開発中の8-Amino-1-octanethiol hydrochlorideを用いて自己組織化法にて修飾電極を作製し、電気化学的に評価した結果を示します。

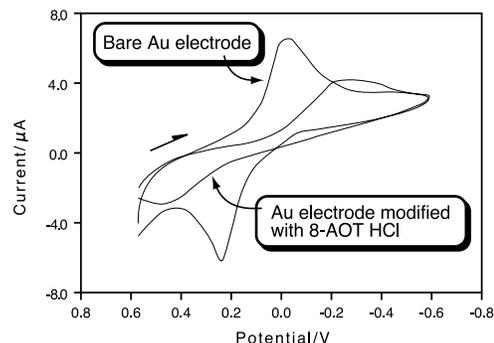
## 【評価1】

8-Amino-1-octanethiol hydrochloride のアセトニトリル溶液 (5mM) に金電極 (6.0 X 1.6 mm) を30分間浸漬し修飾電極を作製。酸化還元マーカである  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  に対する修飾電極の酸化還元ブロッキング挙動をサイクリックボルタンメトリー (CV) 法にて評価。

## 測定条件

作用電極：上記修飾電極、対極：Pt plate (1.5 X 1.5 mm) 参照電極：SCE、開始電圧：600mV、最大掃引電圧：600mV、最小掃引電圧：-600mV、掃引速度：100mV/sec

2mM  $K_4[Fe(CN)_6]$  /  $\alpha$ -Tetraethylammonium hydroxide (pH 11.0) 溶液中、アルゴン雰囲気下でCV測定。



修飾電極において単分子膜形成による  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  の酸化還元挙動のブロッキングが観測された。

## 【評価2】

8-Amino-1-octanethiol hydrochloride のエタノール溶液 (0.2mM) に金電極 (5.0mm) を20分間浸漬し修飾電極を作製した。強アルカリ条件下におけるチオール単分子膜の金表面からの脱離挙動をCV法にて評価。

## 測定条件

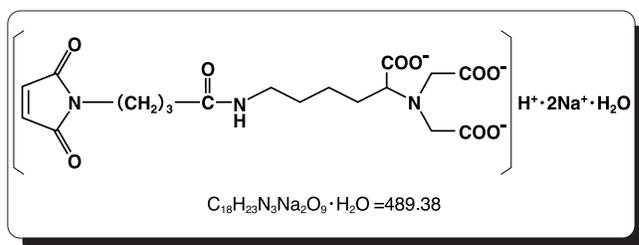
作用電極：上記修飾電極、対極：Pt plate (5.0 X 5.0 mm) 参照電極：Ag/AgCl、開始電圧：-200mV、最大掃引電圧：-200mV、最小掃引電圧：-1250mV、掃引速度：50mV/sec

0.1M KOH水溶液中、窒素雰囲気下でCV測定。

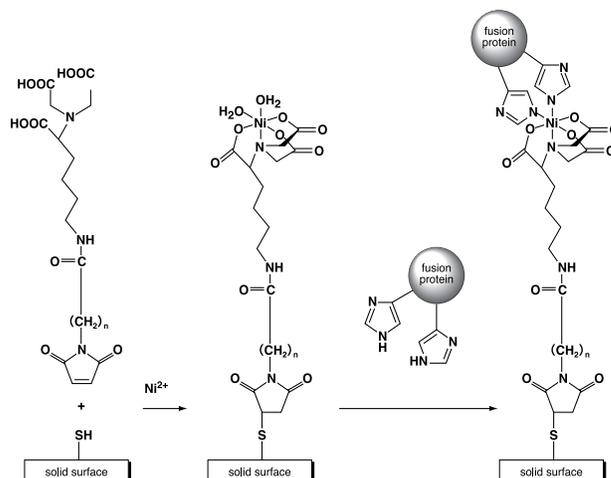
\* 熊本大学工学部物質生命化学科 谷口研究室の御指導のもとに測定しました。

## 新製品

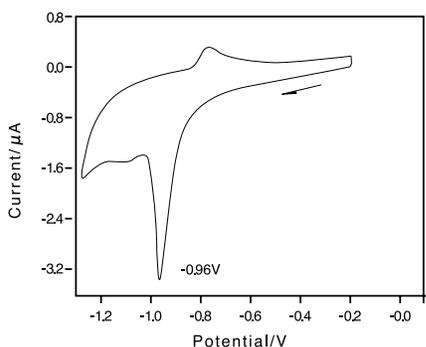
## 機能的キレート試薬

Maleimido-C<sub>3</sub>-NTA

最近、人工蛋白質の精製や蛋白質を固体表面に並べる“His-tag”という技術が注目されています。官能化された（通常、サクシニミド、チオール、エポキシなどの反応性基をもった）固体表面と反応させ、さらに、Ni(II)を加えて錯形成させます。ここで、Ni(II)の配位座は完全には満たされず、空いた部分には水が配位します。この状態で6個のヒスチジンを末端に発現させた融合蛋白質を加えるとヒスチジン部分がNi(II)に配位するため、固体表面で特異的かつ一定方向に結合されることとなります（この結合は強固ですが、フリーのヒスチジンやイミダゾール、EDTA等のキレート剤によって可逆的に解離します）。先に弊社では末端アミノ基を持ったAB-NTAを発売しました。さらに、今回はマレイミド基を官能基としましたMaleimido-C<sub>3</sub>-NTAを製品化しました。マレイミド基はチオール基と選択的に反応するため、チオール基で官能化された固体表面に結合可能です。



コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	Maleimido-C <sub>3</sub> -NTA	10mg	11,000
		50mg	29,000



金表面からのチオレートアニオンの脱離に由来する不可逆なカソード電流が-0.96Vに観測された。

チオール誘導体は空気酸化を受けジスルフィド体を生成するため、不活性ガス雰囲気下で冷凍で保存する必要があります。ここに紹介した新製品は上記条件で保存することにより6ヶ月以上安定です。

## 参考文献

- 1) 山口 淑久, *Dojin News* No.86, p14 (1998)
- 2) 近藤敏啓, 魚崎浩平, *ぶんせき*, 6, 457 (1997)
- 3) K. Kajikawa *et al.*, *Molecular Electronics and Bioelectronics*, 7(1), 2 (1996)

## Amine type

- 4) Yasuo Yoshimi *et al.*, *Mater. Sci. Eng. C*, 5, 131 (1997)
- 5) Masami Tanahashi *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 34, 305 (1997)
- 6) Joe Tien *et al.*, *Langmuir*, 13, 5349 (1997)
- 7) Fumihiko Mukae *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 69, 2461 (1996)
- 8) Shai Rubin *et al.*, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, 413, 377 (1996)
- 9) Ko Takehara *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 68, 1289 (1995)
- 10) Ko Takehara *et al.*, *Electrochim. Acta*, 39, 817 (1994)

## Carboxylic acid type

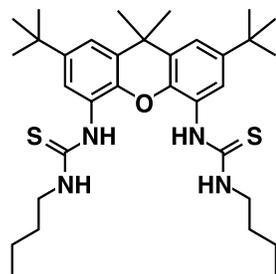
- 11) Lukas Scheibler *et al.*, *Tetrahedron*, 54, 3725 (1998)
- 12) Daniela D. Schlereth *et al.*, *J. Electroanal. Chem.*, 444, 231 (1998)
- 13) Lukas Scheibler *et al.*, *Polym. Bull.*, 40, 151 (1998)
- 14) Stephan Heyse *et al.*, *Biochemistry*, 37, 507 (1998)
- 15) Myoung-ho Pyo *et al.*, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 19, 122 (1998)
- 16) Luis A. Godinez *et al.*, *Langmuir*, 14, 137 (1998)
- 17) Jennifer L. Trevor *et al.*, *Langmuir*, 14, 1664 (1998)
- 18) Helen Schmitt *et al.*, *Adv. Mater.*, 10, 475 (1998)
- 19) Asma El Kasmi *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 225 (1998)

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	11-Amino-1-undecanethiol hydrochloride	10mg	12,800
		100mg	38,500
Request	10-Carboxy-1-decanethiol	10mg	11,000
		100mg	30,000
Request	7-Carboxy-1-heptanethiol	10mg	11,000
		100mg	30,000
Request	5-Carboxy-1-pentanethiol	10mg	11,000
		100mg	30,000

## 新製品

## 塩化物イオンイオノフォア

## Bisthiourea-1



生体試料中あるいは環境中の塩化物イオンの測定法として、各種方法が考案されていますが、なかでも簡便な方法としてイオン選択性電極を用いる方法が広く用いられています。塩化物イオンの測定に使用される陰イオン選択性電極としては、銀塩化銀に基づく固体膜電極や、PVCなどの高分子支持膜中に、第4級アンモニウム塩を感応物質（リガンド）として添加した高分子支持膜型電極が報告されています。その他、有機スズ化合物、有機水銀化合物、金属ポルフィリン化合物に基づくニュートラルキャリア型陰イオン選択性電極なども報告されています。しかしながら、この種の塩化物イオン選択性電極の選択性はいわゆるHofmeister序列によって支配され、脂溶性の高い陰イオンによって塩化物イオンの測定値が妨害を受けやすいという問題があります。その他にも、選択性が十分でなかったり、長期安定性が不十分であるなどの問題点もあります。

Table. Bisthiourea-1を使用した塩化物イオン選択性電極の選択係数 ( $\log K_{Cl,j}^{Pot}$ ) のイオン交換体イオン選択性電極との比較。

anion	$\log K_{Cl,j}^{Pot}$ (MPM)		$\log K_{Cl,j}^{Pot}$ (SSM)	
	ionophore <sup>a</sup>	ionophore <sup>b</sup>	TDDMACl	required <sup>c</sup>
Cl <sup>-</sup>	0	0	0	0
salicylate	+0.7	+1.8	+3.2	
SCN <sup>-</sup>	+1.0	+1.6	+3.8	≤+1.7
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	+0.2	+0.7	+2.1	
I <sup>-</sup>	-0.2	+0.5	+3.4	
Br <sup>-</sup>	+0.2	+0.4	+1.4	≤+0.7
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	-2.0	<i>d</i>		
HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	-2.0	<i>d</i>		
AcO <sup>-</sup>	-2.3	<i>d</i>		
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-2.6	<i>d</i>		
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> /HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	<-3.5	<i>d</i>		

MPM: matched potential method; SSM: separate solution method.

<sup>a</sup> For the chloride concentration range from  $10^{-5.00}$  to  $10^{-4.70}$  M. <sup>b</sup> For the chloride concentration range from  $10^{-2.34}$  to  $10^{-2.04}$  M. <sup>c</sup> Required selectivity coefficients for measuring chloride in normal blood samples. <sup>d</sup> Selectivity coefficients for these anions are too small to be accurately determined at  $10^{-2.34}$  M Cl<sup>-</sup>.

東京大学の梅澤先生らは、塩化物イオンの新しいニュートラルキャリアー型イオノフォアとして、ビスチオウレア部位を基本骨格に持つBisthiourea-1を開発しました。塩化物イオンは水素結合の良い受容体として知られています。一方、このリガンドの2つのチオウレア骨格にある合計4つのNH基は水素結合供与体として働くことから、水素結合を形成して塩化物イオンと錯体を形成することが可能です。Bisthiourea-1は、塩化物イオンと1:1で錯体を形成し、その錯安定定数は $840 \text{ (M}^{-1}\text{)}$  (DMSO-*d*<sub>6</sub>中)であることが確認されています。

ポリ塩化ビニル (PVC) を高分子膜母材とし、膜溶媒にNPOEを用い、1wt% のイオノフォアとそれに対して50モル% のBisthiourea-1を添加して作成した塩化物イオン選択性電極を、イオン交換体 (TDDMACl) を使用した従来型の塩化物イオン選択性電極と比較した結果をTableに示します。

塩化物イオン濃度が $10^{-5}$ から $10^{-2}$ Mで直線的にネルンスト応答し、測定限界は $(6.5 \pm 3.0) \times 10^{-6}$ Mであることが確かめられています。その他イオンに対する塩化物イオンの選択性は、SCN<sup>-</sup>、salicylate、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、I<sup>-</sup>及びBr<sup>-</sup>に対して、 $\log K_{Cl,j}^{Pot}$ 値はそれぞれ、+1.6、+1.8、+0.7、+0.5及び+0.4であり、従来型のものより選択性が向上していることが確認されました。

この電極を用いて、馬血清中の塩化物イオンの定量を行い、電位滴定法で求められた値とほぼ同じ値が得られています。従来型のものより測定誤差が少なく、濃度測定の正確さにおいても信頼性の高いものといえます。

## 参考文献

- 1) K. P. Xiao, P. Buhlmann, S. Nishizawa, S. Amemiya, Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, 69(6), 1038 (1997)
- 2) P. Buhlmann, S. Nishizawa, K. P. Xiao, Y. Umezawa, *Tetrahedron*, 53(5), 1647 (1997)

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	Bisthiourea-1	25mg	19,000
		100mg	59,800

## 4月発売予定

- ・抗S19タンパク質ポリクローナル抗体  
リボソーム由来のS19タンパク質は、近年、二量体の形成によって単球特異的な走化活性をもつことが発見されました。本抗体は、慢性リウマチ等の慢性炎症疾患の病態解明への応用が期待されます。
- ・抗メタロチオネインモノクローナル抗体  
メタロチオネインは、銅、亜鉛等の重金属と結合するタンパク質です。メタロチオネイン-1は、重金属により誘導されるので、カドミウム汚染等の研究分野での応用が期待されます。  
製造元 株式会社 クマモト抗体研究所

新製品

# 水溶性セレンテラジン

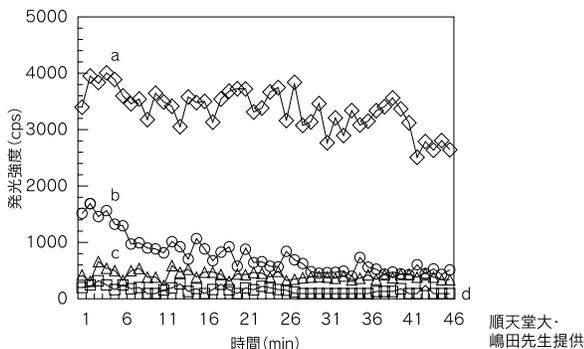
## Coelenterazine-WS

セレンテラジンを発光部分としてもつ発光たんぱく質エクオリンは、カルシウムイオンと特異的に結合して発光するため、細胞内カルシウムイオンの発光分析法として広く用いられています。

しかしながら、セレンテラジンは中性 pH における水溶性が低く、また細胞表面へ吸着するなど、細胞系での使用にとって大きな障害になっていました。

今回紹介するCoelenterazine-WSは中性 pH での水溶性が飛躍的に向上しており、種々のバッファーにも容易に溶解します。さらに細胞への導入が容易になることで、エクオリンの発光性能が増します<sup>1)</sup>。

セレンテラジン溶液：Coelenterazine-WS 10 mg を10 mM リン酸バッファー (pH 7.0) 0.1 ml に溶解したものを。



- 図中 a - d は以下の通り。  
 a) Triton X-100 を加え酵母細胞を破壊後、Coelenterazine-WS を加え、測定したもの。  
 b) Triton X-100 を加え酵母細胞を破壊後、セレンテラジン (メタノール溶液) を加え測定したもの。  
 c) Coelenterazine-WS を用いたもの。  
 d) セレンテラジン (メタノール溶液) を用いたもの。

参考文献

1) K. Teranishi and O. Shimomura, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1219 (1997).

訂正のご案内

ドージンニュースNo.89において、上記図説に誤りがございました。おわびと共に訂正いたします。

- 誤)  
 a) セレンテラジン (メタノール溶液) を用いたもの。  
 b) Coelenterazine-WS を用いたもの。  
 c) Triton X-100 を加え酵母細胞を破壊後、セレンテラジン (メタノール溶液) を加え測定したもの。  
 d) Triton X-100 を加え酵母細胞を破壊後、Coelenterazine-WS を加え、測定したもの。  
 正)  
 a) Triton X-100 を加え酵母細胞を破壊後、Coelenterazine-WS を加え、測定したもの。  
 b) Triton X-100 を加え酵母細胞を破壊後、セレンテラジン (メタノール溶液) を加え測定したもの。  
 c) Coelenterazine-WS を用いたもの。  
 d) セレンテラジン (メタノール溶液) を用いたもの。

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	Coelenterazine-WS	1mg	Request

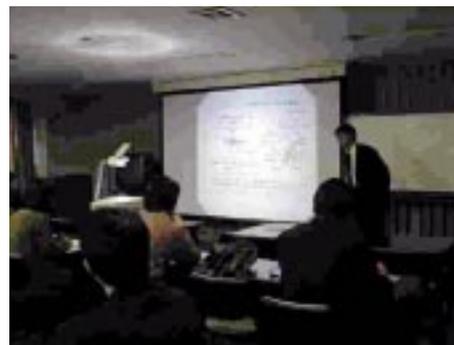
ピテロジェニン実技セミナー開催報告

環境ホルモン学会魚分科会開催のピテロジェニン実技セミナーに協賛

去る1月26日、2月8日に環境ホルモン学会魚分科会開催の実技セミナーが東京、大阪の和光純薬工業株式会社会議室で開催され、クマモト抗体研究所、和光純薬工業株式会社、小社の3社が協賛しました。

東西合わせて26名(25企業・機関)の方がご参加され、東京会場では北海道大学原先生、帝京大学中村先生、長崎大学有園先生、大阪会場では長崎大学征矢野先生、新潟大学東藤先生がご講演されました。

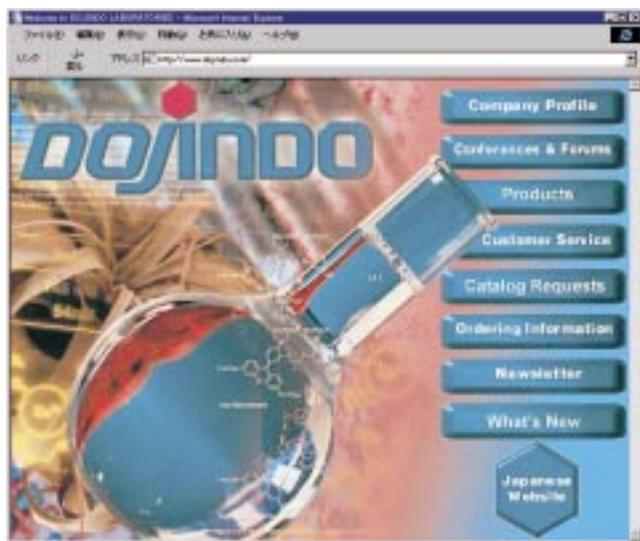
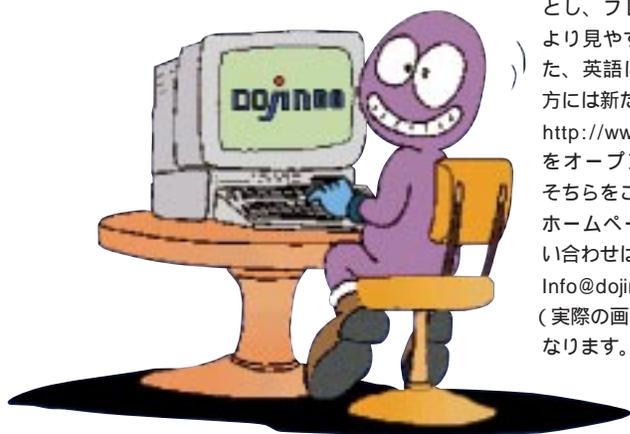
ピテロジェニンの学術的説明、測定意義、ビデオによる魚からの採血方法など詳細なご説明を頂き、参加された方からは大変ご好評いただきました。



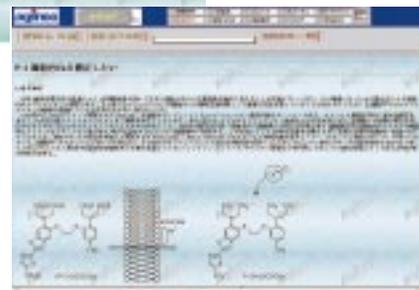
4月2日

# Homepage Renewal Open!

4月2日にホームページを一新します。  
<http://www.dojindo.co.jp/> は日本語のみとし、フレーム化を施してより見やすくしました。また、英語にて見たいという方には新たに  
<http://www.dojindo.com/> をオープンしましたので、そちらをご覧ください。ホームページに関するお問い合わせは、  
[Info@dojindo.co.jp](mailto:Info@dojindo.co.jp) まで。  
 (実際の画面は表示と一部異なります。)



「新製品」画面



「カタログ(プロトコル)」画面

ホームページアドレス

URL : <http://www.dojindo.co.jp/>  
 E-mail : [info@dojindo.co.jp](mailto:info@dojindo.co.jp)

フリーファックス  
 フリーダイヤル

0120-021557  
 0120-489548