

DOJIN NEWS

ドージンニュース

Review

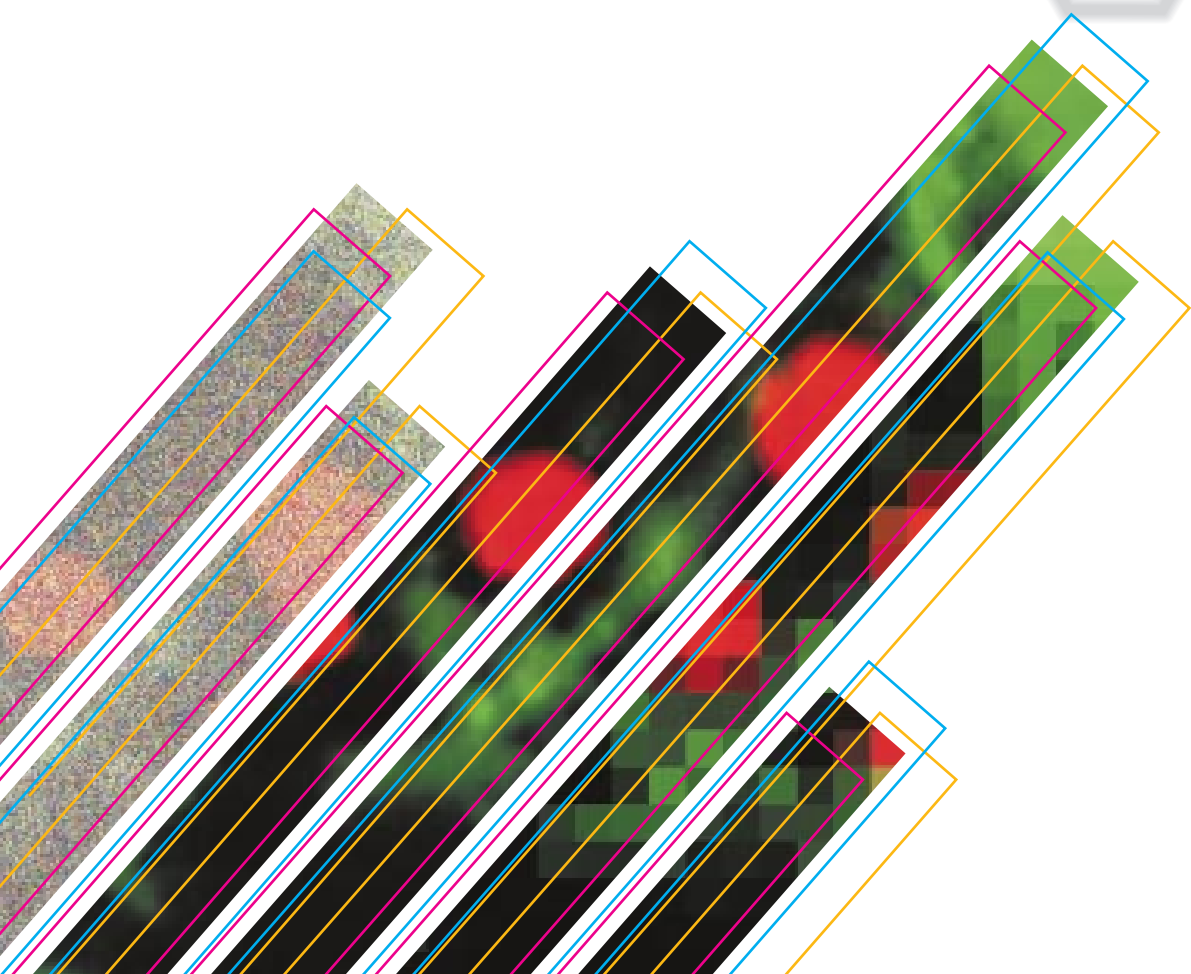
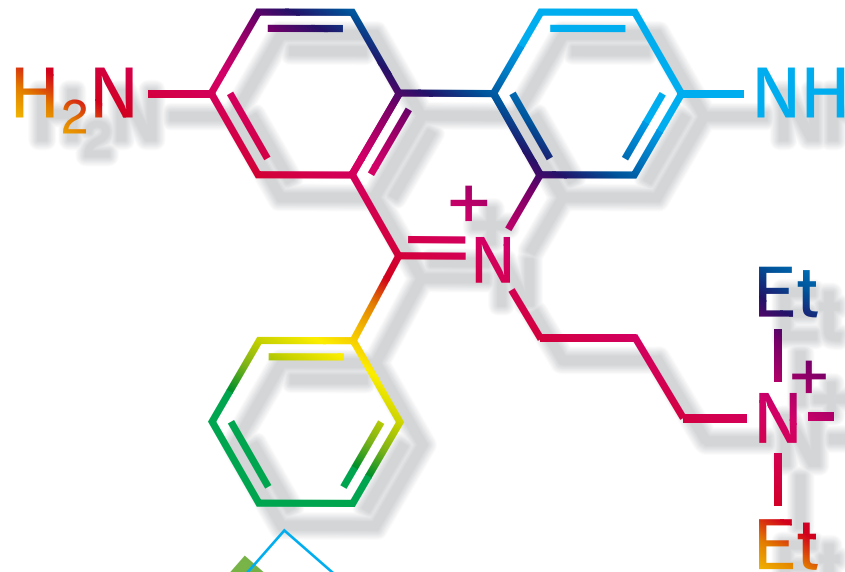
Aldehyde Reactive
Probe (ARP) による
DNA修復研究の
新たな展開
久保喜平

Topics on Chemistry

ポルフィリンの
テロメラーゼ阻害作用
佐々本一美

連載

実用的蛍光誘導体化
山口政俊・能田 均



目次

Review

Aldehyde Reactive Probe (ARP) によるDNA修復研究の新たな展開

大阪府立大学農学部 久保 喜平 3

実用的蛍光誘導体化 3

福岡大学 薬学部 山口 政俊、能田 均 8

Topics on Chemistry

ポルフィリンのテロメラーゼ阻害作用.....14

Commercial

生体高分子機能解析用試薬.....12

組織染色用試薬溶液.....13

アンモニウムイオノフォア.....14

生物発光用発光物質.....14

レーザー励起蛍光ラベル化剤.....15

Nitrosothiol Assay Kit.....16

分子生物学電気泳動用アガロース.....17

(株)カマモト抗体研究所新製品17

お知らせ

10thフォーラム・イン・ドージン.....20

新製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

生体高分子機能解析用試薬.....12

組織染色用試薬溶液.....13

アンモニウムイオノフォア.....14

生物発光用発光物質.....14

レーザー励起蛍光ラベル化剤.....15

Nitrosothiol Assay Kit.....16

分子生物学電気泳動用アガロース.....17

(株)カマモト抗体研究所新製品.....17



秋の菊池溪谷

Aldehyde Reactive Probe (ARP) によるDNA修復研究の新たな展開



久保 喜平

(Kihei KUBO)

大阪府立大学農学部獣医学科放射線学講座

An abasic site (apurinic/apyrimidinic site; AP site) is the most common DNA lesion which is spontaneously created by the release of deaminated bases under physiological condition. The damage is also produced as an intermediate in the course of the base excision repair of physically or chemically damaged bases. We have recently developed a novel method for detection and quantitation of abasic (AP) sites in DNA, in which the biotinylated reagent called aldehyde reactive probe (ARP) specifically reacts with aldehyde group of AP sites and biotin-tagged damages can be detected by an ELISA-like assay. A linear relationship between DNA concentration and the signal intensity was observed. Thus, about 0.1 fmole of AP sites (0.5 sites/ 10^5 nucleotides) in DNA derived from HeLa cells treated with sublethal dose (0.5 mM) of methylmethanesulfonate (MMS) could be detected. Using this system, a variety of base damages induced in the cellular DNA by various damaging agents can be estimated after converting damaged bases to AP sites by the specific glycosylase treatment. Possible applications and future development of new methods with the aid of ARP to detect the base damages are discussed.

キーワード：AP部位、ARP、塩基除去修復、グリコシラーゼ、DNA損傷

1. はじめに

DNA中のプリンおよびピリミジン塩基が欠失した脱塩基部位 (apurinic/apyrimidinic sites; AP部位) は突然変異や細胞死の原因となる¹⁻⁴。例えば、生理的な温度やpHのもとにおいても、生細胞DNA中のアデニンとシトシンのアミノ基は一定の速度で失われ、それぞれヒポキサンチンとウラシルが形成される。これらがそれぞれに特異的なDNA *N*-グリコシラーゼにより除去され、AP部位が形成される。シトシンの脱アミノ反応は、DNAの複製や転写が行われている単鎖部分では、二重鎖部分の100倍以上の速度で生成する²。

また、DNAの複製や遺伝的組み換えに伴って起こる塩基のミスマッチ修復の際にも、グリコシラーゼによるミスマッチ塩基の除去を介する経路の存在が知られている⁵⁻⁷。代謝の盛んな細胞では、活性酸素により形成されるAP部位の数も無視できない。LindahlとNyberg (1972) によると、大腸菌では、生理的条件下におけるAP部位の生成速度は毎秒 10^{-11} /ヌクレオチドに達する¹。これをともに、生理的条件下で増殖中の1個の哺乳動物細胞中のDNAには1日に1万個以上のAP部位が生じると推定されている^{1,8}。

一方、AP部位は放射線や、アルキル化剤処理により生じる損傷塩基の除去修復の中間体としても形成される⁹⁻¹¹。このような種々の塩基損傷も、DNAが単鎖状態にある方が形成され易いと考えられる。AP部位そのものは、活発な生命現象を営む細胞においては、特に毒性の強い損傷ではなく、いわば「ありふれたもの」であり、これを修復することは日常的な作業である。しかしながら、問題は「質」よりもむしろ「量」にあるといえる。何らかの理由で、その修復が妨げられたり、除去修復過程における生成と修復のバランスが崩れたりする場合、その圧倒的な数は細胞にとって重大な影響をもたらすことになる。

2. ARPによるDNAの脱塩基部位 (apurinic/apyrimidinic sites) の定量

これまで、AP部位の生物学的重要性が指摘されながら、その直接

的な定量法は Talpaert-Borle とLiuzzi (1983) による¹⁴C-メトキシアミン法の開発を待たねばならなかった¹²。メトキシアミンとAP部位の反応は定量的であり¹³、両者の結合は安定であった。しかしながら、¹⁴C-メトキシアミンの比活性が著しく低いためにAP部位の定量感が低い欠点があった。しかしながら、この研究以来、メトキシアミンが、AP部位のアルデヒド基とほぼ1:1に反応することが注目されるようになり、多くの人が、この反応をAP部位を安定化するために利用してきた。(R-NH-NH₂)型のヒドラジドの様な化合物は、DNA中のアルデヒドと結合する際に主鎖切断を引き起こすことが知られている¹³。筆者らは、切断の起こらない(R-O-NH₂)型の化合物 *o*(carboxymethyl)hydroxylamine に biotin hydrazide を carbodiimide (EDC) 存在下で結合させ、図1に示すようなプローブ化合物 (Aldehyde reactive probe, ARP) を開発した^{14,15}。

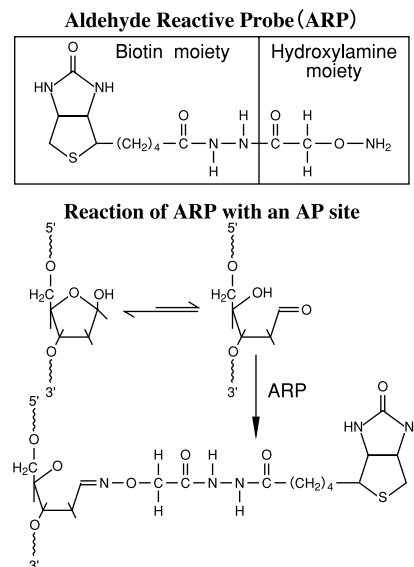


図1 AP部位に対するプローブ化合物ARPの構造(上)と反応(下)

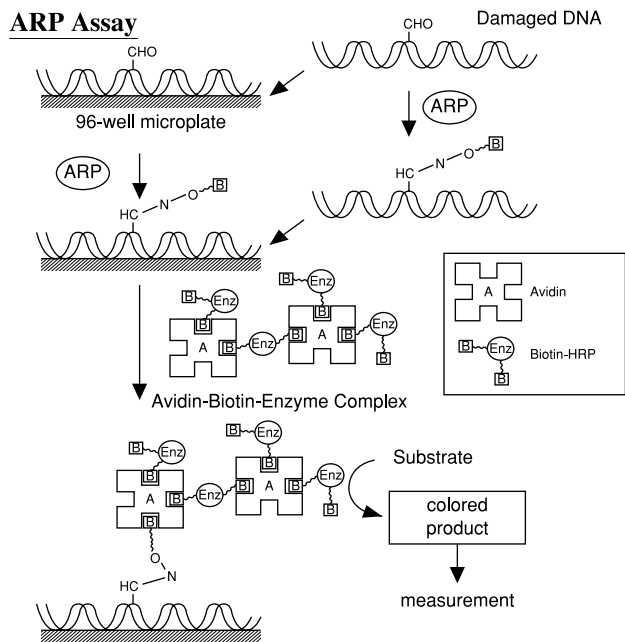


図2 ARP法によるAP部位の検出法の概略
被検DNAをあらかじめ液相でARPと反応させた後、マイクロプレートに固相化するか、または、固相化後にARPと反応させる。ウェルあたりのDNA量は、通常は、50～100ngであるが、AP部位数により調整する。

ARPは分子量331,399の白色の水溶性の粉末で、そのhydroxylamine moietyでAP部位を持ったDNAと定量的に結合する(図1)。定量法はマイクロプレートにAP部位を持つDNA(AP-DNA)を固相化し、ARPを反応させた後、ELISA法と同様にアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体を加えてから酵素基質溶液の吸光度の変化を測定する簡単で迅速なものである。この方法の概略を図2に示す。DNAの固相化法は、硫酸プロタミン(0.1～0.5%)をコートしたアッセイ用マイクロプレートを使用することを原則としているが、アミノプレートやニトロセルロース膜等による方法もあり、アッセイの多岐にわたる応用を可能にしている。このような固相化に伴う誤差は、比較的小さいが、われわれは酸性条件下(pH 5) 70℃で熱処理した子牛胸腺DNAをスタンダードとして用いている。ARP法の感度は、専ら固相化されたDNA量に依存する(図3)^{16,17)}。したがって、ヌクレオチドあたりのAP部位の数に応じて、DNA濃度を調整すれば、非常に広い損傷濃度範囲を取り扱うことができる。

アルキル化剤 methylmethanesulfonate (MMS) 処理により、細胞DNA中にはメチル化塩基とともに、多くのAP部位が形成される。このAP部位は、上述のごとくメチルプリンDNAグリコシラーゼによるもの他に、メチル化塩基自身のN-グリコシド結合が不安定になるために起こる化学的分解によるものを含む¹⁸⁾。MMSによるメチル化塩基のほとんどは、7-メチルグアニン(7-mG)と3-メチルアデニン(3-mA)であり、全体の約90%を占める7-mGは、3-mAに比して細胞毒性が低く、化学的にも安定である。このようにMMSは、その産物のスペクトルが明らかであることより、AP部位の生成と修復の研究のためには好適な薬剤である。

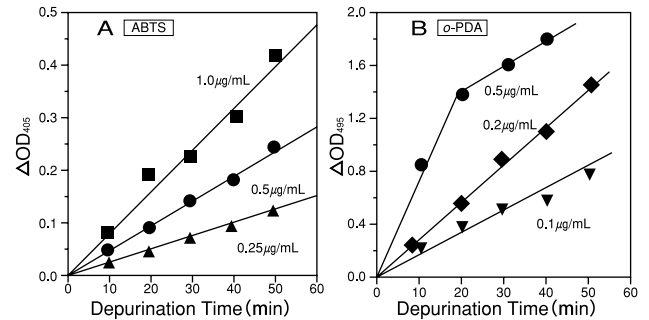


図3 DNA濃度とARPのシグナル(吸光度)との関係
酸性熱処理した子牛胸腺DNAを5mMのARPで修飾後、0.1(○) 0.2(△) 0.25(◇) 0.5(□)あるいは1.0(●) μg/mLに希釈して、プロタミンプレートに固相化し、ARP法を行った。HRPの基質には、ABTS(A)あるいはo-PDA(B)をそれぞれ使用した。

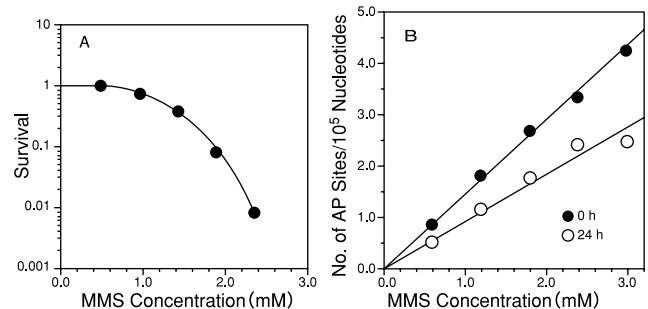


図4 低濃度のMMS処理細胞DNA中のAP部位の定量
一定数のMMS処理細胞を10日間培養後、コロニーを計測して求めた生存曲線(A)およびMMS処理直後(●)あるいは、24時間培養後(○)に細胞より抽出したDNA中のAP部位数(B)。塩基除去修復とAP部位。

図4は、HeLa細胞(RC-355株)をMMSで処理した時の細胞生存率とAP部位の形成を示したものである。AP部位の形成はMMSの濃度に比例しており、1mMの処理で 10^5 ヌクレオチド(NTD)あたりほぼ1個のAP部位が形成される(図中0h)したがって、生存率にほとんど影響のない濃度で、十分なシグナルが得られている。ヒトのゲノムサイズを 10^9 塩基対とすると1日に生理的条件下で細胞に生じるレベルのAP部位でもこの方法で検出可能である。一方、MMS処理後、薬剤を除いて24時間培養した細胞のDNA中のAP部位は修復により有意に減少していた(図中24h)

上述のMMS処理後に観察されたAP部位は、アルキル化損傷が化学的または酵素的に脱離した結果として観察されたものである。実際には、MMS損傷の修復を調べる場合は、DNA中に残っているメチル化損傷の数を調べる必要がある。図5は、MMS処理細胞より抽出したDNA中のAP部位数を測定後に、80℃で一晩加熱してメチル化塩基を脱離後に再びAP部位数を測定した結果である。MMS処理直後では、メチル化損傷の約10%が脱離していることが分かる。

ARPは、アルデヒド基に特異的であるので、AP部位を NaBH_4 で還元すると、反応しなくなる¹⁴⁾。ARP法はAP部位に特異性の高い定量法で多岐にわたる応用が可能であるが、電離放射線損傷を定量する場合にはアルデヒドを有する生成物が含まれるので注意を要する。幸いなことに、ARPは生成量の多いformylamidopyrimidineの窒

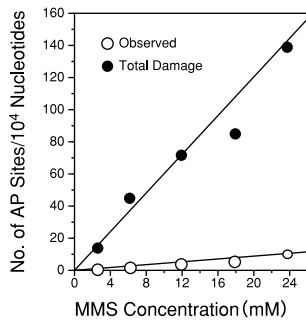


図5 MMS処理細胞DNA中に誘発されるメチル化塩基数
種々の濃度のMMSで処理したHeLa細胞のDNA中() および、これを80、16時間熱処理する事により、メチルプリンを脱離させたDNA中() に形成されたAP部位をARP法により定量した。

素と結合したアルデヒド基とは反応しない¹⁵⁾。一方、formyluracil等の炭素と結合したアルデヒド基は検出される¹⁵⁾。したがって、このような formyluracil はARP法ではシグナルを与えることになるが、その収量が少ないために、ARPの電離放射線照射DNAとの反応の大部分は、AP部位との結合に由来するものと思われる。

3. DNA修復研究における応用

上述の通り、細胞中の塩基損傷の塩基除去修復の中間産物として形成されるAP部位は、グリコシラーゼによる「きれいな」AP部位であり、図6に示すようないくつかの経路のいずれかにより修復されると考えられる。種々の損傷塩基は、それぞれ特有なグリコシラーゼ(図中、E1)により除去されて形成されたAP部位の修復の機構で、最も効率が良い場合には、(1) APエンドヌクレアーゼ(図中、E2a)が、AP部位の5'側を切断し、切断の3'側の5'-deoxyribose phosphate (5'-dRp)が、deoxyribosephosphodiesterase (dRpase)により除かれて産物Aを生じ、1 nucleotide gap が形成される、(2) ある型のグリコシラーゼ (FaPy- または thymine glycol-glycosylase など)に付随したAP lyase 活性や^{9,10)}、細胞内のポリアミン類により、3'側が切断され(β-elimination) その結果生じる3'-dRpが、加水分解されて(大腸菌 endo IVなどによる)¹⁹⁾、産物Bが形成される。または、(3) 図6に示したように、β-elimination と δ-elimination の組み合わせによって産物Cが形成されるのいずれかの反応が起こると考えられる²⁰⁾。いずれの場合においても、ARP法によってAP部位が検出されるのは、E1の反応からE3が働くまでの間である。

産物AおよびBが生じる場合、DNA中には3'-OHと5'-phosphate末端が残り、1ヌクレオチドの挿入により修復は完了する。産物Cが形成されるような場合では、DNA中には3'-phosphate と5'-phosphate末端が残るので、phosphatase により3'-OH / 5'-phosphate の形に変換されてから、正しいヌクレオチドが1個挿入される。なお、上述した以外の経路の詳細な検討やAPエンドヌクレアーゼおよび β-elimination catalysts の反応機構の解説は、DoeutchとCunningham (1990) が既に行っているので、参照されたい²¹⁾。

塩基除去修復の経路を考えると、細胞にとってAP部位は、扱い慣れた損傷であり、損傷塩基を、このより毒性の低い損傷に変換す

BASE EXCISION REPAIR

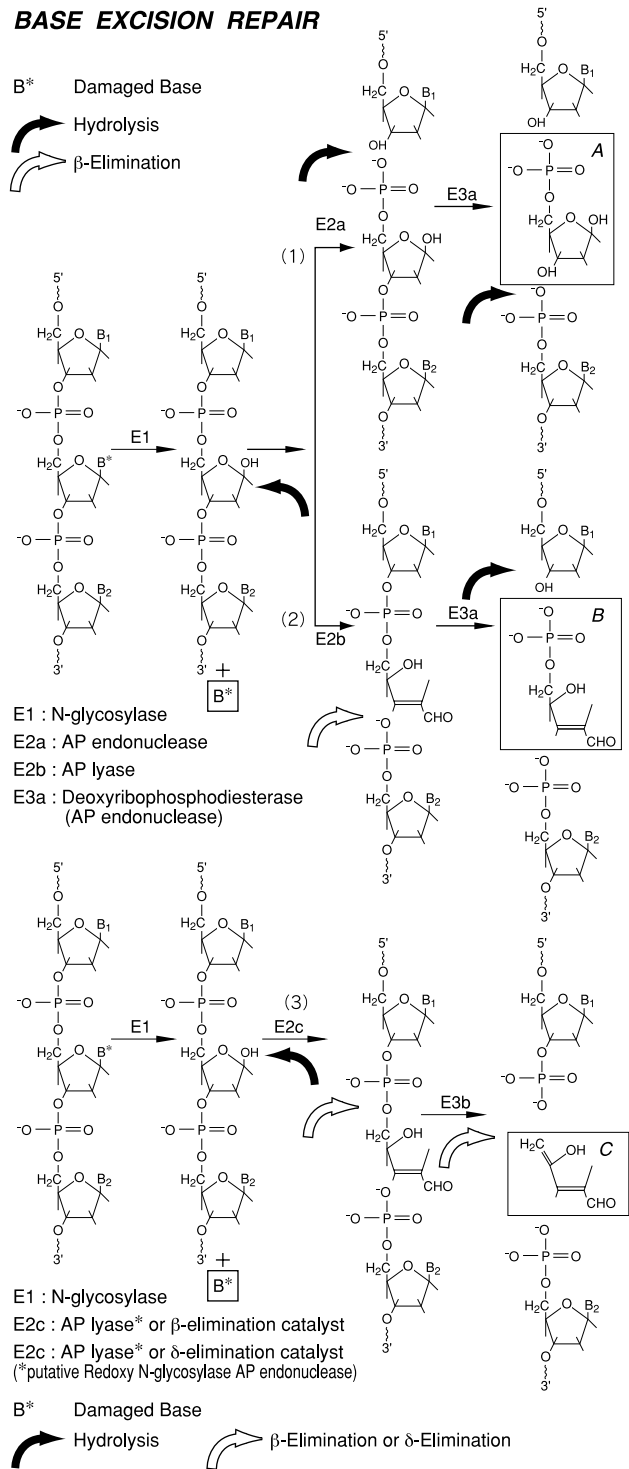


図6 塩基除去修復経路
DNA中の損傷塩基に特異的なDNA N-グリコシラーゼ (E1) の作用後、APエンドヌクレアーゼ (E2a) による加水分解を受けるか、AP lyaseなどによる β-elimination (E2b,c) により、それぞれAP部位の5'-または3'-側が切断される。その後は、主として、deoxyribosephosphodiesteraseなど (E3a) により、3'-または5'-deoxyribosephosphate (図中、AおよびB) が除去されるか、β-eliminationなど (E3b) によりdeoxyribose誘導体 (4-hydroxy-pent-2,4-dienal) (C) が遊離する。

るように見える。確かに細胞は、DNA中のA・U対にくらべて、G・U対のウラシルを選択的に除去したり²²⁾、MMS損傷の中でも毒性の強い3-mAを優先的に除くなど¹⁸⁾、損傷の重篤度に対する選択性を有するように思われる。最近、ElderらはMPGノックアウトマウス由来のTリンパ球をMMS処理した場合、A・TからT・AおよびG・CからT・Aのトランバージョンが増加すると報告している²³⁾。後者は3-メチルグアニンに由来すると考えられるが、3-mAが前者の原因であることはあり得ないことではあるが考えにくい。3-mAは強いDNA合成阻害能を有する細胞致死性損傷であることが知られているからである。したがって、DNA合成が開始された後に、化学的に3-mAが脱離して生じたAP部位が原因である可能性はきわめて高いと思われる。塩基除去修復は、動的な過程であり、AP部位の生成と消失が繰り返される。したがって、塩基除去修復の解明には、損傷塩基の除去のみならず、その結果生じるAP部位の除去の過程が明らかにならなければならない。

大腸菌では、3'-dRpおよび5'-dRpのいずれも除去するdRpase活性が知られてきたが²⁴⁾、後にRecJ産物が5'-dRpaseを有することが明らかにされた²⁵⁾。一方、哺乳動物においても、PriceとLindahl(1991)によりその活性が見いだされた²⁶⁾。近年、polのdRpase活性が発見されてから、この酵素がBER経路におけるdRp除去と修復合成を担っていると考えられるようになった²⁷⁾。事実、pol欠損株は、アルキル化剤に高感受性を示す²⁸⁾。しかしながら、pol非依存性PCNA依存性の修復経路やpolやによるバックアップ系の存在などが次々に報告され、AP部位という単純な損傷は、数多くの経路で修復されることが示唆される。このような多重修復機構の存在は、AP部位の生物学的意義の大きさを示すと言えよう。

4. 今後の展望

最後に、将来のARP法の新たな応用や改良法の開発について展望してみたい。1992年にARP法に関する初の報告を、また、1993年にその合成法を発表して以来、多くの研究者より分与の希望が寄せられた。近年、同仁化学研究所がARPの合成販売を開始し、世界中の多くの研究者が入手可能になった。ARP法は、原理的にはサンプルDNA量を増加させることにより、生理的条件下で形成される 10^5 - 10^6 NTDに1個程度のAP部位の検出も可能である。Nakamuraらは、アッセイプレートに比べての固相化DNA量の遙かに多いメンブレン法を用いて、このレベルの検出感度を報告している²⁹⁾。MikrigiorgosらはFITC-ARP(FARP)を用いた高感度定量法を報告している³⁰⁾。

ARP法を行う場合、化学的に不安定な損傷を対象とすることが多いため、通常のproteinase K法によるDNA抽出はあまり適しているとは考えられない。われわれもグアニジンチオシアネートを用いた迅速抽出法を早くから採用している。最近、各種DNA抽出キットも利用できるようになり、専門家でなくてもARP法に使用可能なサンプルDNAを容易に調製できるようになった。しかしながら、細胞学的手法を主とするラボでは、その設備や手法の点で、直ちにこの方法を利用することが困難な場合は多い。そこで、筆者らは個々の細胞中のAP部位の定量にARPを応用する方法を検討している。図7は

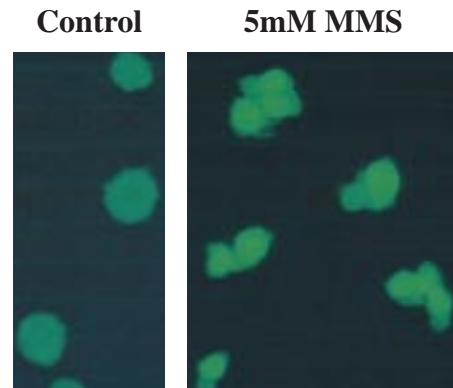


図7 MMS処理を行ったHeLa細胞核中のAP部位の検出。
エタノール固定したMMS処理細胞をARPで修飾し、FITC-avidin DCSで蛍光染色した。

MMS処理した細胞をARPで修飾後に avidin-FITC で蛍光染色したものである。対照は撮影時の露出時間を倍にしている。最近、同仁化学研究所により開発された蛍光ARP(FARP-1)を用いた場合は、さらに迅速で高感度の検出が可能であった。目下、このようなARP蛍光ARPの利用によりフローサイトメトリーや蛍光分光法によるAP部位の定量法の開発を行っている。これらの種々の方法の開発により、DNA損傷の超高感度アッセイはもちろん、多方面にわたる一層の応用拡大が期待される。

参考文献

- 1) Lindahl, T. and Nyberg, B. (1972) *Biochemistry* 11: 3610-3617.
- 2) Friedberg, E. C., Walkers, G. C. and Siede, W. (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington D. C.
- 3) Gentil, A., J. B. Cabral-Neto, R. Mariage-Samson, A. Margot, J. L. Imbach and Sarasin, A. (1992) *J. Mol. Biol.* 227: 981-984.
- 4) Loeb, L. A. and Preston, B. D. (1986) *Ann. Rev. Genet.* 20: 201-230.
- 5) Kunkel, T. A., R. M. Schaaper and Loeb, L. A. (1983) *Biochemistry* 22: 2378-2384.
- 6) Tsai-Wu, J. -J., H. -F. Liu and Lu, A. -L. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8779-8783.
- 7) Neddermann, P. and Jiricny, J. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 21218-21224.
- 8) Sancar, A. and Sancar, G. B. (1988) *Ann. Rev. Biochem.* 57: 29-67.
- 9) Kow, Y. W. and Wallace, S. S. (1987) *Biochemistry* 26: 8200-8206.
- 10) O'Connor, T. R. and Laval, J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5222-5226.
- 11) 別所忠昌、田野恵三 (1993) 放射線生物研究 28: 1-8.
- 12) Talpaert-Borle, M. and Liuzzi, M. (1983) *Biochem. Biophys. Acta* 740: 410-416.

- 13) Coombs, M. M. and Livingston, D. C. (1969) *Biochem. Biophys. Acta* 174: 161-173.
- 14) Kubo, K., H. Ide, S. S. Wallace and Kow, Y. W. (1992) *Biochemistry* 31: 3703-3708.
- 15) Ide, H., Akamatsu, K. Kimura, Y., Michiue, K. Makino, K., Asaeda, A., Takamori, Y. and Kubo, K. (1993) *Biochemistry* 32: 8276-8283.
- 16) Asaeda, A., Ide, H., Terato, H., Takamori, Y., and Kubo, K. (1998a) *Anaitical. Chimca. Acta.* 365. 35-41.
- 17) Asaeda, A., Ide, H., Tano, K., Takamori, Y., and Kubo, K. (1998b) *Nucleosides & Nucleotides* 17. 503-513.
- 18) Singer, B. and T. P. Brent (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 856-860.
- 19) Bailly, V. and Verly, W. G. (1989) *Biochem. J.* 259: 761-768.
- 20) Bailly, V. and Verly, W. G. (1988) *Biochem. J.* 253: 553-559.
- 21) Doetsch, P. W. and Cunningham R. P. (1990) *Mutat. Res.* 236: 173-201.
- 22) Verri, A., P. Mazzarello, S. Spadari and Focher, F. (1992) *Biochem. J.* 287: 1007-1010.
- 23) Elder, R. H., Jansen, J. G., Weeks, R. J., Willington, M. A., Deans, B., Watson, A. J., Mynett, K. J., Bailey, J. A., Cooper, D. P., Rafferty, J. A., Heeran, M. C., Wijnhoven, S. W. P., van Zeeland, A. A. and Margison, G. P. (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18, : 5828-5837.
- 24) Sandigursky, M., I. Lalezari and Franklin W. A. (1992) *Radiat. Res.* 131: 332-337.
- 25) Dianov, G., Sedgwick, B., Daly, G., Olsson, M., Lovett, S., and Lindahl T. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22: 993-998.
- 26) Price, A. and Lindahl, T. (1991) *Biochemistry* 30: 8631-8637.
- 27) Matsumoto, Y. and Kim, K. (1995) *Science*; 269: 699-702
- 28) Ochs, K., Sobol, R. W., Wilson, S. H., and Kaina, B. (1999) *Cancer Res.* 59: 1544-1551.
- 29) Nakamura, J., Walker, V. E., Upton, P. B., Chiang, S. Y., Kow, Y. W. and Swenberg, J. A. (1998) *Cancer Res.*, 58: 222-225.
- 30) Maulik, G., Botchway, S., Chakrabarti, S., Tetradis, S., Price, B. and Makrigiorgos, G. M. (1999) *Nucleic Acids Res.* 27: 1316-1322.

著者紹介

氏名 久保 喜平 (Kihei KUBO)
 役職名 大阪府立大学農学部獣医学科放射線学講座
 経歴 北海道大学獣医学部卒業 (獣医学博士)
 専門 放射線生物学
 連絡先 〒599-8531 堺市学園町1-1

ARP Kit - DNA損傷部位ピオチン化キット (AP Site)-

1プレート用

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/aprimidinic site) と呼ばれる塩基除去部位が出現します。よってAP siteを検出することはDNA損傷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、ピ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をピオチン化し96穴マイクロプレートに固相化して検体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数が規定された標準DNAが含まれておりますので、既存のピ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。

[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	5 mg
アミノプレート	1枚
保存方法：冷蔵保存, 安定性：6ヶ月間 (4 保存)	

[測定原理]

- 1) 検体DNAのAP site をARPで選択的に標識します。
 - 2) ARP標識検体DNAと標準DNAを96穴マイクロプレートに固相化します。
 - 3) ARPIはピ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てAP site数を定量します。
- *このキットはARPによってDNAのAP siteをピオチン化するキットです。よって、ピオチン化の過程までが行えます。

コード番号	品名	容量	価格(¥)
347-07861	ARP-Kit	1プレート用	29,000
340-07611	ARP	100mg	13,800

実用的蛍光誘導体化

3

福岡大学薬学部

山口政俊・能田 均

3. 特殊なアミン類の蛍光誘導体化

生体中には極めて多くの種類のアミノ基含有成分が存在している。従って、前号で述べた試薬類（第1及び第2アミノ基用試薬）を用いた場合、ほとんど全てのアミン類が誘導体化されてしまい、目的成分を計測するとき、誘導体化の前後におけるクリーンアップ処理が極めて複雑になる場合が多い。特に、カテコールアミンやセロトニンなどは生体中に極めて微量しか存在しておらず、またその前駆体や代謝物が多く共存している。従って、これらアミン類の測定には特に高感度かつ高選択的な蛍光試薬（あるいは反応）が必要である。次に示すアミン類を計測する場合、その成分に特有の試薬あるいは反応の使用が有利になる¹⁾。

3.1. ラベル化試薬とその特性

(1) カテコールアミン

カテコールアミンに選択的な蛍光誘導体化反応として、トリヒドロキシインドール (THI) 法及びエチレンジアミン (ED) 法が使用されてきた (Fig. 1A及びB)。THI法及びED法は、ポストカラム誘導体化法に用いられる。これらの方法の中で、THI法は選択性に優れているが、感度の面でやや問題がある。特に、ドパミンに対する感度が低い。

最近、1, 2-ジフェニルエチレンジアミン (メソ体, DPE) がカテコールアミンの測定に汎用されている (Fig. 1C)。DPEは、ヘキサシアノ鉄(Ⅱ)酸カリウムの存在下、緩やかな条件 (pH6.5-6.8, 37-50℃) でカテコールアミンと反応する。

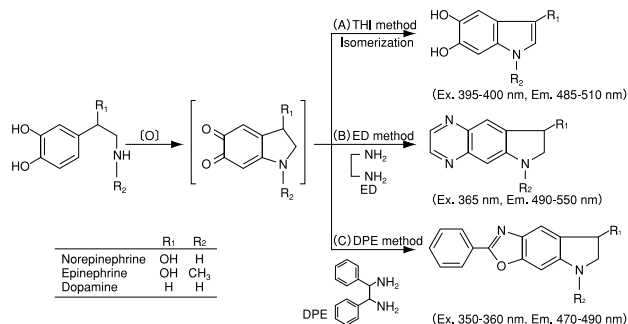


Fig.1. Fluorogenic reactions of catecholamines by: (A) THI, (B) ED and (C) DPE method.

DPE法は、すべてのカテコールアミン類に対して最も感度が高く、検出限界は約5fmolである。また、プレ及びポストカラム法の両方に適用できる。

DPE反応は、4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル化合物の測定にも利用されている。これら化合物を、電解酸化または過ヨウ素酸化して o -キノン体とし、DPE反応により蛍光誘導体化する。これをポストカラム蛍光誘導体化HPLCに利用してカテコールアミン及びその代謝物を一斉分析できる。

(2) セロトニン

セロトニンはそれ自身が比較的に強い自然蛍光（励起及び発光極大波長、それぞれ280nm及び350nm付近）を持っており、その代謝物も同様の蛍光を有しているため、セロトニン関連物質の同時定量も可能である。より感度の高い分析のためにOPAによるポストカラム蛍光誘導体化HPLCも報告されている。

近年の大きな社会問題である高齢化やストレス社会において、脳機能や精神疾患研究が重要になっている。これらの研究のために、神経伝達物質であるセロトニン関連物質の計測に対し、さらなる高感度化が要求されるようになった。次の蛍光反応が開発され、その使用が注目されている。

セロトニンを含む5-ヒドロキシインドール化合物は、ベンジルアミンとヘキサシアノ鉄(Ⅱ)酸カリウムの存在下、緩やかな条件で (pH9, 37℃、数分) 蛍光反応する (Fig. 2)。この反応は、プレ及びポストカラム法の両方に適用でき、検出限界はいずれの場合も数fmol/注入量である。

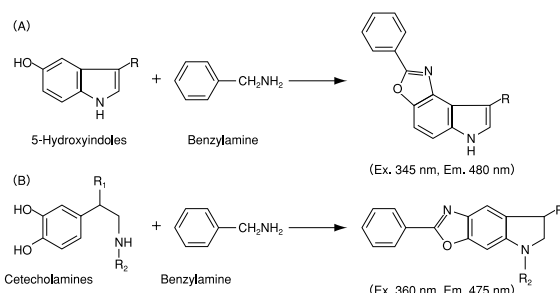


Fig.2. Fluorogenic reactions of: (A) 5-hydroxyindoles and (B) catecholamines with benzylamine.

(3) ヒスタミン

ヒスタミンはチオール化合物の非存在下、OPAと反応する (Fig. 3)。この誘導体化法はヒスタミンに選択性が高く、プレ及びポストカラム誘導体化HPLCに応用されている。

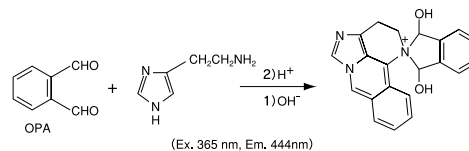


Fig.3. Fluorogenic reaction of histamine with OPA

(4) グアニジノ化合物

グアニジノ化合物及びアルギニンは、9, 10-フェナンスラキノン (PQ) 又はベンゾインと蛍光反応する (Fig. 4)。PQは、アルカリ性、続いて酸性条件下でグアニジノ化合物と反応し、蛍光性物質に導かれる。蛍光性物質が単一でないため、本試薬はポストカラム蛍光誘導体化のみに用いられる。一方、ベンゾインは同様の条件で反応が進行し、生じる蛍光物質が単一であるため、プレ及びポストカラム法の両方に用いることが可能である。ベンゾインを用いるプレカラム誘導体化HPLCにおけるグアニジノ化合物の検出限界は0.2pmol/注入量である。

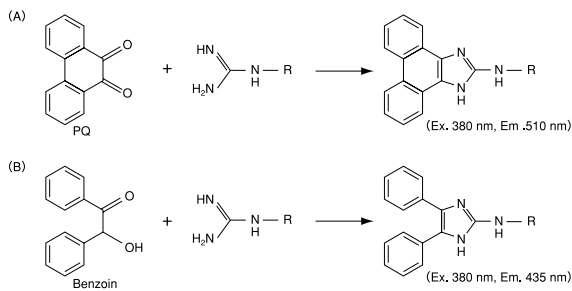


Fig.4. Fluorogenic reactions of guanidino compounds with (A) PQ and (B) benzoic.

(5) インドールアミン

トリプトファン及びインドールアミン類は酸化剤の存在下、ホルムアルデヒド、クロロアセトアルデヒド又はメトキシアセトアルデヒドとかなり過激な条件(酸性、100、50-60分)で蛍光反応する。この反応はプレカラムHPLCに適用できる。

フェニルグリオキサル(PGO) はトリプトファンと極めて選択的に反応(酸性、100、15分間)する(Fig. 5) この反応のプレカラムHPLCは、検出限界が0.2pmol/注入量である。

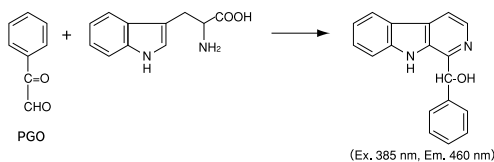


Fig.5. Fluorogenic reaction of tryptophan with PGO.

3.2. 1, 2-ジフェニルエチレンジアミンの実用例²⁾

カテコールアミン(エピネフリン、ノルエピネフリン、ドパミンなど)は、神経伝達物質やホルモンとして生体の恒常性を保っている物質で、その生体内濃度は各種の病態とも深く関与している。しかし、生体試料中の濃度は極めて低く、また類縁化合物も多く存在するので、その測定には極めて高い選択性と高感度性

Chart 1 Procedure for the determination of catecholamines in human plasma

Plasma	0.5mL
Isoproterenol (internal standard)	0.25pmol
Lithium phosphate buffer (0.2M, pH5.8)	0.5mL
Apply into Toyopak IC-SPS	
Wash with 5mL of H ₂ O (twice)	
Wash with 50% CH ₃ CN	
Elute with 300 μL of CH ₃ CN-0.6 M KCl[1:1, v/v; 0.6mM K ₃ Fe (CN) ₆]	
0.1M DPE	50 μL
Stand at 37°C for 40 min	
Apply onto HPLC (100 μL)	

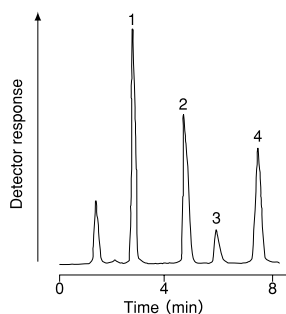


Fig.6. Chromatogram of the DPE derivatives of catecholamines in human plasma
Peaks (concentrations, pmol/mL): 1= norepinephrine (1.72), 2=epinephrine (0.56), 3=dopamine (0.21), 4=isoproterenol (IS, 0.50).

が要求される。DPEを用いる血漿カテコールアミン類のプレカラムHPLC測定法(Chart 1)を紹介する。これは、血漿から陽イオン交換カートリッジでアミン類を固相抽出し、抽出液のカテコールアミンだけを蛍光誘導体化することに基づいている。この方法により、従来法では測定が困難であったドパミンも精度良く測定できる(Fig. 6)

3.3. ベンジルアミンの実用例

(1) ポストカラムHPLC蛍光検出法による、生体試料中セロトニン関連物質の定量^{3, 4)}

(イ) 血漿

血漿中には、主にセロトニン(5HT)及びその主代謝物である5-ヒドロキシインドール-3-酢酸(5HIAA)が存在する。血漿中のこれらアミン量が異常を示す疾患として、カルチノイド腫瘍、ダンピング症候群、喘息及び偏頭痛などが報告されている。血漿中のセロトニン関連物質の定量は、これらの疾患の診断及び治療予後のモニタリングを行ううえで重要である。この計測に、ベンジルアミンを誘導体化試薬とするポストカラムHPLC蛍光検出法が開発されている。内標準物質に5-ヒドロキシ-3-アセトアミド(5HA)を使用する。

血漿サンプルの前処理 5HTは、主に血小板に存在している。従って、血漿分析に際しては、血小板の影響を除く必要があるため、本測定では無血小板血漿を用いる。

ヒト血漿(無血小板血漿)200 μLに0.5 μM 5HA (I. S.) 40 μL及び1.5M過塩素酸80 μLを加え混和し、除タンパク及び抽出を行う。混液を1300gで10分間遠心・分離後、上清をフィルター(0.45 μm、アセチルセルロース製)でろ過し、このろ液100 μLをHPLCに注入する。

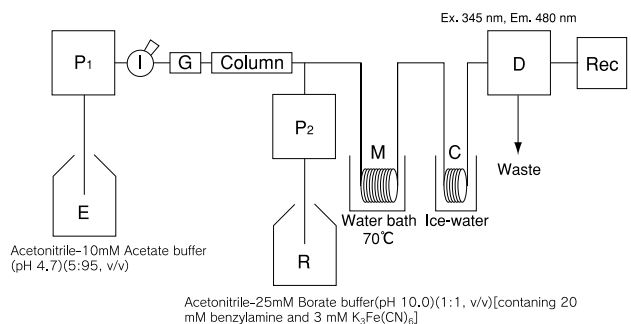


Fig.7. Schematic flow diagram of post-column HPLC with fluorescence detection
P₁ and P₂, HPLC pump; I, injection valve (100 μL); G, guard column (TSKgel ODS-80T_μ); column, TSKgel ODS-80T_μ(150 x 4.6 mm i.d.); M, reaction coil (PTFE, 7 m x 0.5 mm i.d.); C, cooling coil (PTFE, 0.5 m x 0.5 mm i.d.); D, fluorescence detector; E, mobile phase; R, fluorescent reagent solution. Flow rate: E, 1.0; R, 0.5 mL/min.

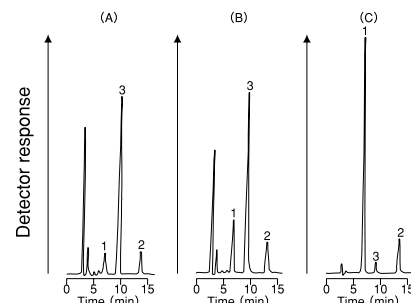


Fig.8. Chromatograms obtained with plasma from a normal volunteer (A), an asthmatic patient (B) and a carcinoid patient (C).

Peaks: 1, 5HT; 2, 5HIAA; 3, internal standard. Detector sensitivity : (A) and (B), x 16; (C), x 1.

ポストカラムHPLC蛍光検出システムをFig. 7に示す。本法の検出限度は10-50fmol/注入量である。

健康人、喘息患者及びカルチノイド患者血漿から得られるクロマトグラムをFig. 8の(A), (B)及び(C)にそれぞれ示す。血漿中の5HT及び5HIAAが、簡便な除タンパク法のみによる前処理操作で20分以内に分離検出される。本法は、カルチノイド腫瘍や喘息などの疾患の診断、治療後のモニタリングに有効である。

(ロ) 脳

5HTの重要な生理的役割として中枢における神経伝達物質としての働きがあり、精神機能、情動運動、知覚、自立機能に關するものとして注目されている。前述の方法を、ラット脳各部位の5HT及びその代謝物である5-ヒドロキシトリプトファン(5HOL) 5HIAAの同時定量に適用している。

ラット脳サンプルの調製 摘出ラット脳を大脳皮質、線状体、海馬、視床下部に分画し、それぞれ0.5M過塩素酸(含0.02w/v%アスコルビン酸)でホモジネート(1:5, w/v)し、このホモジネート液に1 μ M 5HA (l. S.) 50 μ Lを加え、混和後、遠心分離する。上清をフィルターでろ過し、その100 μ LをHPLCに注入する。

1例として大脳皮質より得られたクロマトグラムをFig. 9に示す。脳内の5HT、5HOL及び5HIAAを感度よく、同時定量できる。

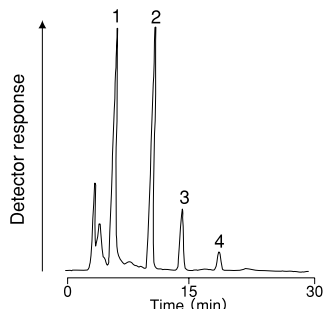


Fig.9. Chromatogram obtained with cortex from a rat brain. Peaks: 1, 5HT; 2, 5HA; 3, 5HIAA; 4, 5HOL.

(2) 微小透析 - プレカラムHPLC蛍光検出法による、ラット脳中セロトニンのインビボ計測⁵⁾

神経伝達物質の1つであるセロトニンの脳内インビボ計測は、感情障害などの脳神経科学研究、薬物の作用機序の解明や薬物療法の評価に重要である。ベンジルアミンをプレカラム試薬に用いる標記測定法が報告されている。これは、微小透析プローブの半透膜を通し、ラット脳内の小分子を抽出し、その中のセロトニンのみをベンジルアミンで選択的に蛍光誘導体化することに基づく。

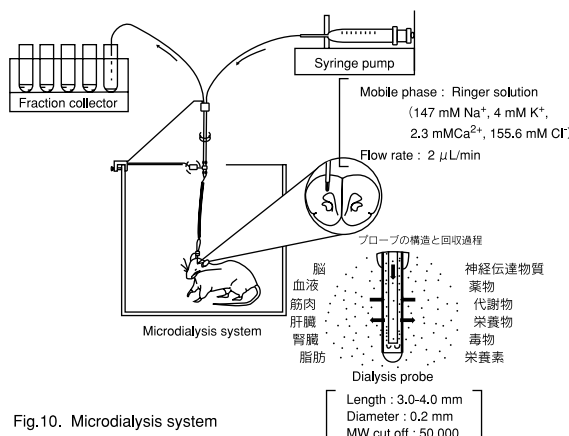


Fig.10. Microdialysis system

ラット脳から微小透析法 (Fig. 10) によって、5分間サンプリングした透析液 (10 μ L) に、ベンジルアミン溶液* 10 μ Lを加え、室温で2分間放置した後、その5 μ LをHPLCに注入する。

*ベンジルアミン溶液: 0.3M CAPS緩衝液 (pH12.0) -メタノール混液 (1:9, v/v) 0.2Mベンジルアミン溶液 [水-メタノール混液 (1:9, v/v) で調製] 100mMヘキサシアノ鉄()酸カリウム溶液 [水-メタノール混液 (1:1, v/v) で調製] 及びメタノールを5:9:3:3 (v/v) の割合で混合し調製。

HPLC conditions

Column: TSKgel ODS-80TM (100x1.0 mm ID, 5 μ m)
 Mobile phase A for frontal cortex and hippocampus:
 CH3CN-40 mM phosphate buffer (pH 7.5) (53:47, v/v)
 containing 1 mM EDTA-2Na
 Mobile phase B for striatum:
 CH3CN-40 mM phosphate buffer (pH 7.5) (40:60, v/v)
 containing 1 mM EDTA-2Na and 50 mM 1-octanesulfonic acid Na
 Flow-rate: 50 μ l/min
 Fluorescence detection: EX. 345nm; Em. 481 nm (2 μ l flow-cell)

脳微小透析中セロトニンは、前頭葉及び海馬で約5分、線状体で約10分以内に分離検出された (Fig. 11) 検出限界は、約75 amol/注入量と高感度である。これにより、従来の脳微小透析-HPLC-電気化学検出法では困難であった、短周期 (2-3分間) での脳内インビボ計測が可能になった。

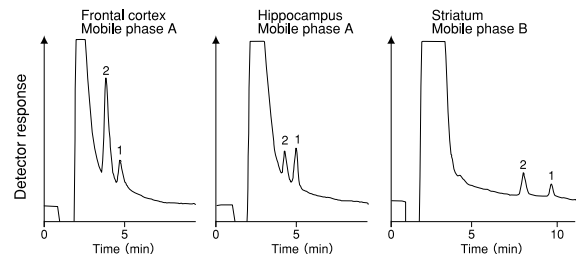


Fig.11. Chromatograms obtained with dialysate samples from intact rats. Peaks: 1 = serotonin; 2 = unknown.

最近、ベンジルアミンが、セロトニンとの誘導体化とは異なった条件で、エピネフリンとも反応する (Fig. 2) ことが見いだされ⁶⁻⁷⁾、これを用いる微小透析-蛍光HPLCによるラット脳内エピネフリンのインビボ計測も報告されている⁸⁾。

以上の実用例は、生体成分に対し固有の蛍光誘導体化試薬を用いることによって、比較的簡便な前処理により生体試料中の特定成分が計測可能になることを示した。このように、例えばカテコールアミンやセロトニンの測定に見られるように、誘導体化試薬の選択に際しては、先ず、目的成分とのみ反応する試薬を用いるべきであろう。

参考文献

- 1) 大倉洋甫, 能田 均, ドージンニュース, No. 64, p.3 (1993).
- 2) A. Mitsui, H. Nohta, Y. Ohkura, *J. Chromatogr.*, 344, 61 (1985).
- 3) J. Ishida, R. Iisuka, M. Yamaguchi, *Clin. Chem.*, 39 (11) 2355 (1993).
- 4) 石田淳一, 山口政俊, *Jasco Report*, 39 (1) 17 (1997).
- 5) J. Ishida, T. Yoshitake, K. Fujino, K. Kawano, J. Kehr, M. Yamaguchi, *Anal. Chim. Acta*, 365, 227 (1998).
- 6) H. Nohta, T. Yukizawa, M. Yoshimura, J. Ishida, M. Yamaguchi, *Anal. Chim. Acta*, 344, 233 (1997).
- 7) M. Yamaguchi, J. Ishida, M. Yoshimura, *Analyst*, 123, 307 (1998).
- 8) M. Yamaguchi, T. Yoshitake, K. Fujino, K. Kawano, J. Kehr, J. Ishida, *Anal. Biochem.*, 270, 296 (1999).

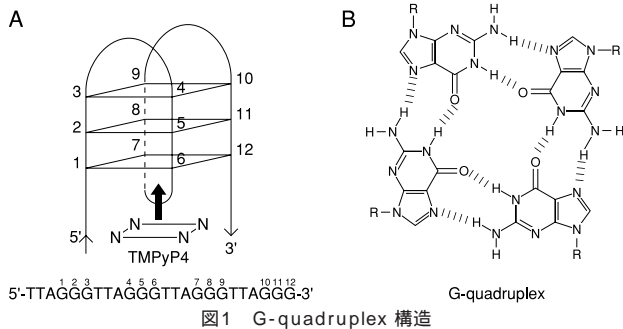
Topics on Chemistry

ポルフィリンのテロメラーゼ阻害作用

(株) 同仁化学研究所 佐々本一美

テロメア (telomere) は細胞の分裂回数を決めるいわゆる細胞寿命の本体として近年話題となっている。染色体の両末端に位置するテロメアはグアニンを多く含む単調な繰り返し構造を持っており、ヒトではTTAGGGを基本単位として、体細胞で6-10キロベース (kb)、精子で20kb繰り返されている。テロメアは分裂の度に5'末端が50-150塩基短縮してゆくため細胞分裂寿命の示標と考えられている。短くなったテロメアを複製・伸長する酵素テロメラーゼ (telomerase) は、生殖系、造血系を除く正常な体細胞では発現が抑制され、活性が見られないか非常に低い、ヒト悪性腫瘍細胞の90%以上で活性が見られ、これによって癌細胞が不死化していると考えられている。したがって、この酵素テロメラーゼの阻害剤は腫瘍細胞の無限増殖を抑制することが期待され、現在、活発な開発競争が行われている。テロメラーゼの3次元構造はまだ解明されておらず、阻害剤の開発は主にアンチセンス戦略¹⁾と、ここに紹介するG-quadruplex阻害²⁾の2つのアプローチがある。特に後者は最近大きな進展を見せ、注目されている。

テロメアDNAは前述の如く、(ヒトを含む脊椎動物の場合) TTAGGGの6塩基の繰り返しであり、殆どは2本鎖構造をとっているが、3'末端側には相補鎖との対をなさない1本鎖部分がはみ出していることが知られている³⁾。この部分はヒトでは150塩基以上と長く、テロメラーゼと直接結合しその活性を制御している部分である。ところが最近になって、この部分は1本鎖がかなりコンパクトに折り返された4本鎖構造 G-quadruplex、図1A)をとっていることが分かってきた⁴⁾。グアニン間の結合は良く知られた Watson-Crick 型の塩基対形成ではなく、7位窒素が水素結合に関与する Hoogsteen 塩基対である (図1B) 図ではquadruplex を正方形として表しているが、このときの1辺の長さは10~11である。この部分に特異的に結合できる化合物は、テロメラーゼ活性を阻害することで癌細胞の増殖を選択的に抑制することが期待される。



ポルフィリン化合物は光増感作用によりDNA鎖を切断するため、癌治療に応用されており (フォトダイナミクス療法) このためポルフィリン化合物とDNAとの相互作用は精力的に研究されてきた⁵⁾。特に、カチオン性のポルフィリン化合物である5,10,15,20-tetra-(N-methyl-4-pyridyl) porphine (TMPyP4、図2) はDNAと結合することが知られていたが⁶⁾、最近、Wheelhouse らによってヒトの HeLa 細胞のテロメラーゼ活性に対する阻害効果が確認された^{7,8)}。TMPyP4は平面構造をとり、隣接するピリジル基の窒素間距離は約9 Åと、サイズもほぼ G-quadruplex に近く、また、カチオン性窒素はDNAリン酸基と静電的な相互作用をしている。彼等はポルフィリンのもつ光増感作用によってDNAを切断することによりTMPyP4とG-quadruplex との結合部位を詳細に検討し、図1Aに示すような外側か

らのスタッキングモデルを提唱している。また、このときのテロメラーゼに対するIC₅₀値は6.5 ± 1.4 μMと強く阻害することが分かった。

最近、ポルフィリンを含む一部の化合物は単に G-quadruplex に結合、安定化するのではなく、むしろ G-quadruplex 生成を促進しているのではないかという可能性が示唆されている⁹⁾。丁度、蛋白が分子シャペロンによって折り畳まれ機能性の高次構造をとるように、G-quadruplex 阻害剤は3'末端の単鎖部分を折り畳み G-quadruplex を形成している可能性がある。これによって telomerase による伸長反応を免れることが阻害のメカニズムであり、G-quadruplex の生物学的な意味もそこにあると考えられる。いずれにせよ、G-quadruplex 阻害剤はこれまで考えられてきたような単なる結合阻害ではなく、よりダイナミックなプロセスに関与している可能性が高く、TMPyP4を始めとするプローブ分子によって解明されることが期待される。

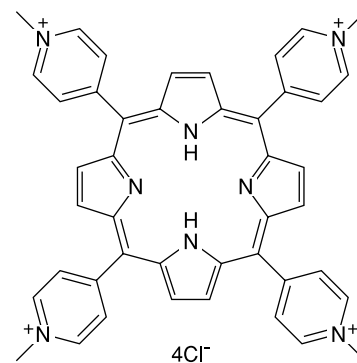


図2 TMPyP4

参考文献

- 1) J. Feng, W. D. Funk, S. S. Wang, S. L. Weinrich, A. A. Avillon, C. P. Chiu, R. R. Adams, E. Chang, R. C. Allsop and J. Yu, *Science*, 1995, 269, 1236-1241.
- 2) A. M. Zahler, J. R. Williamson, T. R. Cech and D. M. Prescott, *Nature*, 1991, 350, 718-720.
- 3) E. H. Blackburn and C. W. Greider, Eds. (1995) *Telomerase*, Cold Spring Harbor Press, New York.
- 4) W. I. Sundquist and A. Klug, *Nature*, 1989, 342, 825-829.
- 5) L. G. Marzilli, *New J. Chem.*, 1990, 14, 409-420.
- 6) Y. Li, C. R. Geyer and D. Sen, *Biochemistry*, 1996, 35, 6911-6922.
- 7) R. T. Wheelhouse, D. Sun, H. Han, F. X. Han and L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 3261-3262.
- 8) F. X. Han, R. T. Wheelhouse and L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 3561-3570.
- 9) *Chemical & Engineering News*, July 5, 1999, p36-37 and references cited therein.

【関連製品】

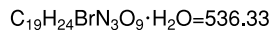
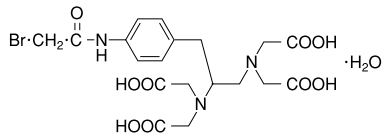
TMPyP

コード番号	品名	容量	価格(¥)
345-03883	TMPyP	100mg	3,350
341-03883	TMPyP	1g	20,400

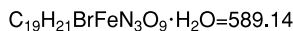
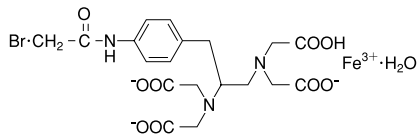
新製品

生体高分子機能解析用試薬～遺伝子発現における蛋白-蛋白、蛋白-核酸相互作用解析用試薬～

BABE



FeBABE



EDTAはFeイオンを結合すると、還元条件下でラジカルを発生し生体高分子を切断する性質をもっています。DNA結合蛋白質のDNA上の結合部位を、FeEDTAによる切断抵抗性領域として同定する「DNAフットプリンティング法」、蛋白質複合体中で表面に露出した部分を切断感受性領域として調べる「プロテインフットプリンティング法」は、最近の生命科学では広く利用されています。FeEDTAのこの反応性を利用し、蛋白質の特定部位にFeEDTAを結合し、その周辺の接触する核酸や蛋白質を同定し、また接触点を同定する目的で、BABE (p-bromoacetamidobenzyl EDTA) が生命科学に広く利用されるようになってきました。

BABEは、当初、金属を生体物質に結合させる架橋試薬として開発され、EDTA部分に放射性 $^{111}\text{In}^{3+}$ を結合させ、抗腫瘍性抗生物質であるブレオマイシンA2の末端に結合し、その集積でマウスの腫瘍部位を同定するなどの、薬理的・臨床的な利用が計られてきました¹⁾。最近になって、Feイオンを結合したBABE (FeBABE) が蛋白のペプチド結合と核酸ホスホジエステル結合の両方を選択的に、しかしアミノ酸配列・ヌクレオチド配列に関係なく、非特異的に切断する活性が注目され^{2,3)}、その有用性が認められたことで効率的な合成法が開発されました⁴⁾。

蛋白結合性のEDTA化合物は一般にMeares試薬と呼ばれます。BABEはbromoacetamido結合によって、蛋白質のシステイン残基のSH基と温和な条件下で反応します。蛋白質の天然のシステイン残基あるいは遺伝子工学的手法によって導入したシステイン残基に、Feイオンを結合したBABE (FeBABE) を結合し、アスコルビン酸と過酸化水素を加えると活性ラジカルが発生し、ラジカル飛程距離内の核酸や蛋白質の主鎖の切断が起きます。この切断反応は秒単位で進行するので、反応は10秒から10分程度の短時間でいきます。FeBABEの分子構造から推定して、蛋白質システイン残基から12の位置にFeイオンが配置されるので、開裂するのはその周辺に限られます。切断箇所をヌクレオチド配列やアミノ酸配列から解析することで、接触していた相手物質とその分子上の接触点を同定することが出来ます。従って、蛋白質非結合型の切断試薬では得られない、蛋白質の三次元構造に関する情報までも得ることが出来ます。核酸の切断に関してはヒドロキシルラジカルを介した酸化的な反応によるものと考えられていますが⁵⁾、ペプチド結合切断の機構としてはそれ以上に、鉄

に配位したペルオキシ中間体によるカルボニル炭素の求核攻撃説が提唱されています³⁾。

FeBABEの利点としては、1) ペプチドや蛋白へ温和な条件下で結合できること、2) 温和な条件下で開裂反応を行えること、3) 開裂反応が、速く高収率であること、4) 核酸や蛋白質の主鎖が選択的に切断されるが、ヌクレオチドやアミノ酸配列の影響されないこと、などが挙げられます。なお最近、蛋白質のリジン残基や末端アミノ基に、2-iminothiolane (2-IT) を介在させることで、FeBABEを結合する応用法が開発された⁶⁾ ことによって、FeBABEの利用範囲はさらに拡大してきました。

FeBABEの蛋白-蛋白相互作用の接点解析に利用した例としては、大腸菌チトクロームbdオキシダーゼのサブユニットと接点の同定⁷⁾、大腸菌RNAポリメラーゼの σ^{70} サブユニット間の接点の同定^{8,9)}などがあります。一方、核酸切断から蛋白質の結合領域を同定した研究としては、大腸菌RNAポリメラーゼの遺伝子プロモーター結合域の同定¹⁰⁻¹⁴⁾や、リボソーム蛋白質のrRNA結合点の同定¹⁵⁻¹⁷⁾などがあります。

このように高分解能の構造情報が得られない複雑な蛋白質集合体のサブユニット内、あるいはサブユニット間、さらにそれらと相互作用する核酸分子との空間的關係を解明するのに有効であり、今後広く利用されると期待されます。

参考文献

- 1) L. H. DeRimer and C. F. Meares, *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, 18, 1517 (1981)
- 2) T. M. Rana and C. F. Meares, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 2457 (1990)
- 3) T. M. Rana and C. F. Meares, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10578 (1991)
- 4) D. P. Greiner, R. Miyake, J. K. Moran, A. D. Jones, T. Negishi, A. Ishihama, and C. F. Meares, *Bioconjugate Chem.*, 8, 44 (1997)
- 5) E. Platis, M. R. Ermacora and R. O. Fox, *Biochemistry*, 32, 12761 (1993)
- 6) S. L. Traviglia, S. A. Datwyler, D. Yan, A. Ishihama and C. F. Meares, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
- 7) J. B. Ghaim, D. P. Greiner, C. F. Meares and R. B. Gennis, *Biochemistry*, 34, 11311 (1995)
- 8) R. Miyake, K. Murakami, J. T. Owens, D. P. Greiner, O. N. Ozoline, A. Ishihama and C. F. Meares, *Biochemistry*, 37, 1344 (1998)
- 9) J. T. Owens, R. Miyake, K. Murakami, A. J. Chmura, N. Fujita, A. Ishihama and C. F. Meares, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6021 (1998)
- 10) K. Murakami, M. Kimura, J. T. Owens, C. F. Meares, and A. Ishihama, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 1709 (1997)
- 11) K. Murakami, J. T. Owens, T. A. Belyaeva, C. F. Meares, S. J. W. Busby and A. Ishihama, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 11274 (1997)
- 12) J. T. Owens, A. J. Chmura, K. Murakami, N. Fujita, A. Ishihama and C. F. Meares, *Biochemistry*, 37, 7670 (1998)
- 13) J. A. Bown, J. T. Owens, C. F. Meares, N. Fujita, A. Ishihama, S. J. Busby and S. D. Minchin, *J. Biol. Chem.*, 274, 2263 (1999)
- 14) F. Colland, N. Fujita, D. Kotlarz, J. A. Bown, C. F. Meares, A. Ishihama and A. Kolb, *EMBO J.*, 18, 4049 (1999)
- 15) G. M. Heilek, R. Marusak, C. F. Meares and H. F. Noller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1113 (1995)
- 16) G. M. Heilek, and H. F. Noller, *Science*, 272, 1659 (1996)
- 17) K. R. Lieberman and H. F. Noller, *J. Mol. Biol.*, 284, 1367 (1998)

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	BABE	10mg	29,000
Request	FeBABE	1mg	12,000

新製品

組織染色用試薬溶液

TMBZ solution
AEC solution
DAB solution
BCIP / Nitro-TB solution

- 特長1 粉末計量の必要なしに調製できる
 特長2 保存安定性に優れている
 特長3 安全性が高い

組織染色やイムノプロット等では、様々な酵素基質が用いられています。しかし、これらの基質の中には体内への蓄積性や変異原性の危険を持つ試薬も含まれており、また、一般にこれらの試薬は溶液にした場合その溶液安定性が悪い場合用時調製を余儀なくされます。今回、弊社で溶状タイプ4種を開発しました。

TMBZ solution (1液系POD基質)

Western, Northern, Southern Blottingにおいて、PODラベル化されたプローブを検出することができ、反応によって安定な濃青色の沈殿物を生じます。

《包装》100 ml

《組成》TMBZ : 1.13 mmol/l, H₂O₂ : 1.91 mmol/l,
 DMSO : 1%未満, 80 mmol/l 酢酸緩衝液, pH = 4.9,
 安定化剤

《保存》室温

《操作法》

- 1) HRP標識のプローブを使って最終的な固定化を行った後、0.1%のTween 20を含んだリン酸緩衝液でよく洗浄する。
- 2) 最終的な洗浄が終わったら本溶液を加え緩やかに揺り動かしながら、5~30分インキュベートする。
- 3) 純水で洗浄し発色反応を停止する。
- 4) 乾燥メンブランは遮光して保存する。

AEC solution (2液系POD基質)

免疫組織染色、イムノプロット、またはドットプロットで使用可能です。3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC) はDAB程感度は高くないものの赤色の沈着を呈するため、2重染色などにおいて有用です。

《包装》AEC濃縮液 2.0 ml, AEC希釈用緩衝液 10 ml

《組成》AEC : 95 mmol/l, 安定化剤 (AEC濃縮液)

《保存》室温

《操作法》

- 1) 希釈用緩衝液を純水で10倍に希釈する。
- 2) AEC濃縮液を1)の希釈緩衝液で50倍に希釈する。
- 3) 組織切片等を固定化したカバーガラスに2)の発色液を加え、10~30分間室温(23~28)でインキュベートする。

- 4) 発色を確認した後、組織等を純水で洗浄し、反応を停止する。
- 5) 染色した組織等は遮光して保存する。

DAB solution (2液系POD基質)

最も頻繁に用いられているDABの溶液で、POD標識の抗体を用いた免疫組織染色、プロットに用いることができ、紫色または褐色に染色することができます。

《包装》DAB 濃縮液(25倍)4 ml, 希釈用緩衝液 100 ml

《組成》DAB : 69.2 mmol/l, 安定化剤 (DAB濃縮液)

《保存》冷蔵

《操作法》

- 1) 希釈用緩衝液 : DAB濃縮液を50 : 2に遮光下で混合する。
- 2) 組織切片等を固定化したカバーガラスに1)の発色液を加え、5~15分間室温(23~28)でインキュベートする。
- 3) 発色を確認した後、組織等を純水で洗浄し、反応を停止する。
- 4) 染色した組織等は遮光して保存する。

BCIP / Nitro-TB solution (1液系ALP基質)

5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate / Nitrotetrazolium blue (Nitro-TB) を発色試薬に用いたアルカリフォスファターゼ (ALP) 標識抗体検出用基質溶液です。ALPを標識酵素とした組織染色、プロットに用いる事ができ、酵素活性によって青紫の沈殿を生じます。

《包装》100 ml

《組成》BCIP : 0.69 mmol/l, Nitro-TB : 0.73 mmol/l / 2-Amino-2-methyl-1-propanol buffer (pH 9.8)

《保存》室温

《操作法》

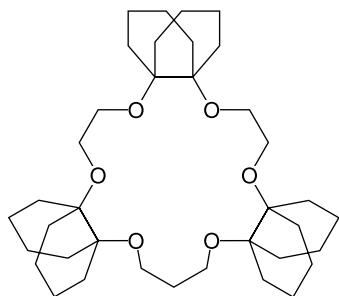
- 1) アルカリフォスファターゼ標識のプローブを使って最終的な固定化を行った後、0.1%のTween 20を含んだTris/HCl緩衝液でよく洗浄する。
- 2) 最終的な洗浄が終わったら本溶液を加え緩やかに揺り動かしながら、遮光下で5~15分インキュベートする。
- 3) 純水で洗浄し発色反応を停止する。
- 4) 乾燥メンブランは遮光して保存する。

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	TMBZ solution	100ml	13,000
Request	AEC solution	1set	18,000
Request	DAB solution	1set	17,000
Request	BCIP / Nitro-TB solution	100ml	11,500

新製品

アンモニウムイオノフォア

TD19C6



$C_{37}H_{62}O_6 = 602.89$

イオン選択性電極に適したアンモニウムイオノフォアは、現在のところ天然物の環状化合物であるノナクチンとその誘導体などしか知られていません。アンモニウムイオンは単独原子からなるイオンではありませんが、そのイオン半径はカリウムイオンに近く、従いましてアンモニウムイオンとカリウムイオンを区別することはなかなか困難です。ノナクチンでさえも、 NH_4^+/K^+ は約10であり、アンモニウムイオノフォアとして高選択性とは言えません。これまで幾つかの研究グループにより高選択性アンモニウムイオノフォアを目指した研究が行われていますが、十分な選択性を持つものは殆どありませんでした。

慶應大学の鈴木先生らのグループは、ジベンジルエーテル誘導体がノナクチンを上回るアンモニウムイオン選択性を持つことを見出しました。ベンジルエーテル誘導体を多種合成しその性能を調べた結果、 NH_4^+/K^+ 選択性が約100とノナクチンの10倍に当たるものまで合成されています。しかしながら、これらは電極膜で膜内保持能が低く電極膜の寿命の低さが問題となっています。

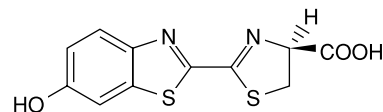
アンモニウムイオノフォアとして新たに開発されたTD19C6は、これまでのアンモニウムイオノフォア類と異なりクラウンエーテルを母核に持つ環状化合物です。BBPAを膜溶媒に用いた時のアンモニウムイオン選択性をノナクチンのそれと比較すると、カリウムイオンに対する選択性はほぼ同程度であるものの、ナトリウムイオンに対するアンモニウムイオン選択性はノナクチンのそれよりも1桁以上も向上していることがわかりました。クラウンエーテルに立体的に嵩高い基をうまく配置することで妨害イオンの影響を抑えた、新規のアンモニウムイオノフォアです。今後の応用が大いに期待されます。

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	TD19C6	10mg	13,000

12月発売予定

生物発光用発光物質

D-Luciferin



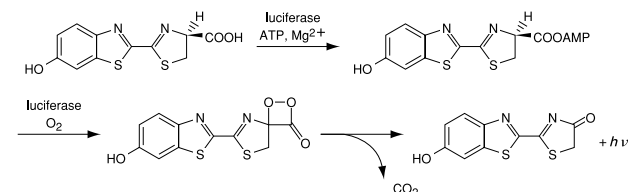
$C_{11}H_8N_2O_3S_2 = 280.32$

発光分析は、発光物質が酸化された高エネルギー状態から分解する際に、光を発生することを利用した分析方法です。

発光分析に用いられる発光の手段には、非酵素系の化学発光と、発光の際に触媒として酵素を必要とする生物発光があります。Luminol に代表される化学発光は、簡便な操作で行なうことができるという利点があります。一方、ホタルやトビイカなど自然界に見られる生物発光では、酵素が酸化の過程や酸化体の分解の過程に関与することにより、非常に高い量子収率で発光させることができます。

ホタルの発光物質であるD-Luciferinを用いた生物発光では、Luciferase、ATP 及びマグネシウム存在下で、発光量子収率が0.88と高く、化学発光物質として代表的な Luminol の20倍以上です。

D-Luciferin の発光機構は、Luciferase によりATPと反応した後、更に Luciferase を触媒として酸素分子により酸化されペルオキシドが生成します。このペルオキシドの脱炭酸分解の過程で、発光が起ります¹⁾。



D-Luciferin 発光系の持つ高い量子収率を利用して、細胞等から生産される微量のATPの測定²⁾のみならず、ATPを産生する微量の酵素の活性を測定する種々のアッセイに応用されています。以下にその例を示します。

- 1) Creatine kinase³⁾
 $ADP + \text{creatine phosphate} \xrightarrow{\text{creatine kinase}} ATP + \text{creatine}$
 $ATP + D\text{-Luciferin} + O_2 \xrightarrow{\text{luciferase} + Mg^{2+}} AMP + PPI + CO_2 + \text{oxyluciferin} + h\nu$
- 2) Pyruvate kinase
 $ADP + \text{phosphoenol pyruvate} \xrightarrow{\text{pyruvate kinase}} ATP + \text{pyruvate}$
 $ATP + D\text{-Luciferin} + O_2 \xrightarrow{\text{luciferase} + Mg^{2+}} AMP + PPI + CO_2 + \text{oxyluciferin} + h\nu$
- 3) Acetate kinase⁴⁾
 $ADP + \text{acetylphosphate} \xrightarrow{\text{acetate kinase}} ATP + \text{acetate}$
 $ATP + D\text{-Luciferin} + O_2 \xrightarrow{\text{luciferase} + Mg^{2+}} AMP + PPI + CO_2 + \text{oxyluciferin} + h\nu$

このように Luciferin を用いた生物発光は、様々な測定に用いられ今後の発展が期待されます。

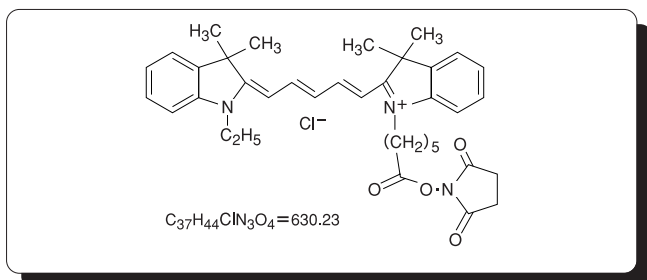
参考文献

- 1) 鈴木喜隆, 化学と生物, 18, 169 (1980)
- 2) J. J. Lemasters, C. R. Hackenbrock, *Methods Enzymol.*, 57, 36 (1978)
- 3) A. Lundin, *Methods Enzymol.*, 57, 56 (1978)
- 4) 辻章夫, 前田昌子, *Dojin News*, No. 65, p.11

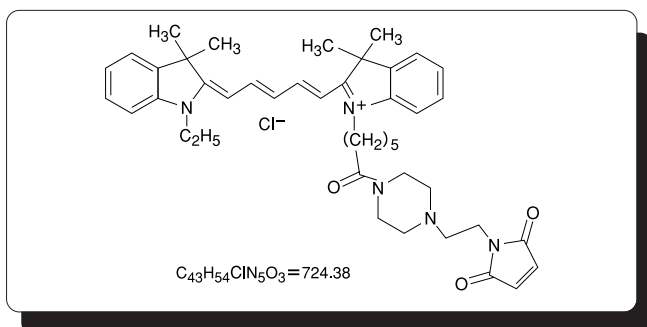
新製品

レーザー励起蛍光ラベル化剤 (IC5誘導体)

IC5-OSu



IC5-PE-maleimide



タンパクなどの蛍光ラベル化では、検出感度を高めるためにバックグラウンドの低い長波長側で測定できる蛍光ラベル化剤が必要とされています。一般に長い波長と強い蛍光を持つシアニン色素は、微量物質の検出に適しています。そこで、インドシアニン誘導体の蛍光ラベル化剤2種類を開発しました。これらは、下に示すような特長を備えています。

【特長1】長波長側での測定が可能

IC5誘導体は、炭素数5のポリメチン鎖を持っており、極大吸収波長640nm、蛍光波長660nmです。この蛍光ラベル化剤を用いることにより、より長波長側でバックグラウンドの低い領域での測定を可能としました。

【特長2】レーザー励起が可能

測定装置の進歩に伴いレーザーで励起できる蛍光ラベル化剤が求められています。IC5誘導体は、その励起波長が640nmであることから、HeNe 633nmのレーザーを用いての測定が可能となりました。共焦点レーザー顕微鏡による分析にも充分に対応できます。

【特長3】官能基選択的ラベル化が可能

今回開発したIC5誘導体は、IC5-OSu、IC5-PE-maleimideの2種類です。IC5-OSuは分子内に活性エステルであるサクシ

ニミド基を持ち、一級や二級アミンを選択的にラベル化します。また、IC5-PE-maleimideは分子内にマレイミド基を有し、SH基を選択的にラベル化します。つまり、ペプチドやタンパク、オリゴヌクレオチドなどの標識したい官能基に合わせて、ラベル化剤を使い分けることによって、ターゲット官能基のみを標識することができます。

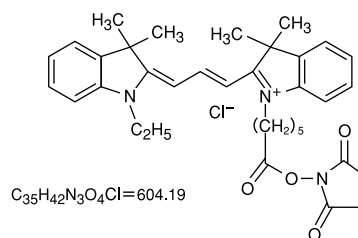
IC5誘導体は水溶性が低いために、実際にラベル化を行う際には、DMSOなどの有機溶媒に予め溶解しておき、その溶液をタンパク水溶液に添加する必要があります。

また、関連商品としてドージンニュース79号で紹介しております蛍光ラベル化剤 IC3誘導体があります。こちら、IC3-OSu、IC3-PE-maleimideの2種類があり、分子中に炭素数3のポリメチン鎖を持ち、極大吸収波長550nm、蛍光波長570nmです。IC3誘導体もIC5誘導体と同様の特長を備えています。IC5誘導体及びIC3誘導体を用いた分析技術の発展が期待されます。

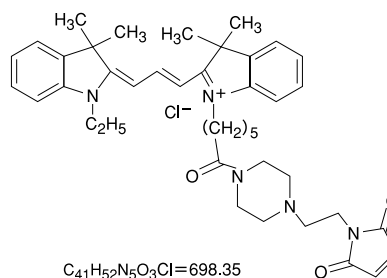
これらの商品に関しましては弊社HPの会員ページでもご案内いたしております。

関連商品

IC3-OSu



IC3-PE-maleimide



コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	IC5-OSu	200 μ g \times 5 1mg	24,800 21,000
Request	IC5-PE-maleimide	200 μ g \times 5 1mg	24,800 21,000
Request	IC3-OSu	200 μ g \times 5 1mg	24,800 21,000
Request	IC3-PE-maleimide	200 μ g \times 5 1mg	24,800 21,000

新製品

Nitrosothiol Assay Kit

【はじめに】

ニトロソチオール (R-SNO) は、寿命の長いNOの供給体であり、生体内では血管の弛緩等NO類似の生理活性を示すと言われていす。また、EDRF (内皮細胞由来血管弛緩因子)の本質はニトロソチオールだという考えもあります。

本キットは、ニトロソチオールのS-N結合を切断し、放出されたNOの代謝物であるNO₂⁻を、Griess法で検出することでニトロソチオールを定量するキットです。元々試料中に存在するバックグラウンドのNO₂⁻は、亜硝酸イオン消去剤により分解・消去されますので、ニトロソチオール由来のNO₂⁻のみを検出することができます。

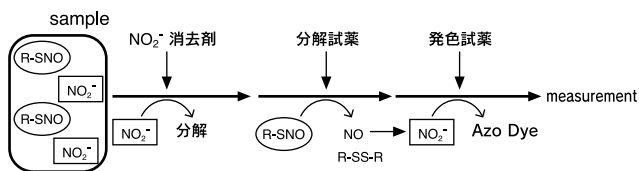
また、現在ニトロソチオールのS-N結合の切断には水銀が最も一般的に使われていますが^{1,2)}、本キットは水銀を一切使用せず、環境面にも配慮しています。

【本キットの特長】

1. Hgフリーで安全です。
2. バックグラウンドのNO₂⁻は完全に消去されるため、一回の測定でニトロソチオールのみを検出することができます。
3. 1 Kitで28サンプル (n=3として) 測定できます。
4. 1μmol/l以上の濃度のニトロソチオールを検出することができます。

【測定原理】

【操作方法】



1. S-Nitrosoglutathione (GSNO) を用いて検量線を作成する。
2. 測定試料中のNO₂⁻を亜硝酸イオン消去剤で消去する。
3. 測定試料中のニトロソチオールを分解試薬で分解させてNOを放出させる。
4. 放出されたNOが酸化されて生じるNO₂⁻を Griess 試薬で発色させる。
5. プレートリーダーで吸光度を測定し、1. で作成した検量線により試料中のニトロソチオールを定量する。

【キット内容】

- 1) 緩衝溶液
- 2) GSNO (凍結乾燥品)
- 3) 前処理剤
- 4) 亜硝酸イオン消去剤 (凍結乾燥品)
- 5) HCl 溶液

- 6) Tris 溶液
- 7) 反応試薬A (凍結乾燥品)
- 8) 反応試薬B
- 9) Griess 試薬A
- 10) Griess 試薬B

【注意事項】

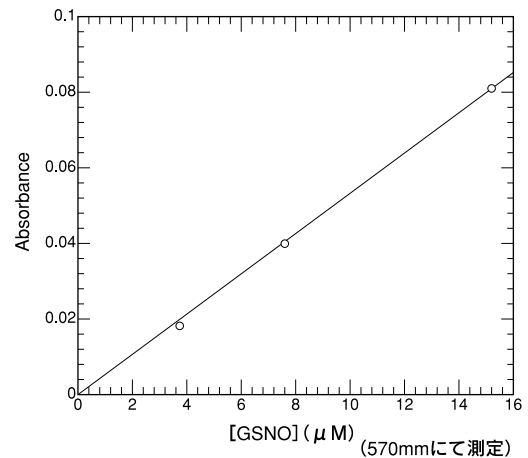


Fig. GSNOによる検量線の例

本キットは冷凍保存品です。

測定試料中のバックグラウンドのNO₂⁻に対して、亜硝酸イオン消去剤が過剰になっても測定には全く影響はありません。

測定試料は前処理として除蛋白が必要です。

【参考文献】

- 1) Robert K. Goldman, Angelo A. Vlessis, Donald D. Trunkey, Nitrosothiol Quantification in Human Plasma, *Anal. Biochem.*, 259, 98-103 (1998)
- 2) J. A. Cook, S. Y. Kim, D. Teague, M. Murali, C. Krishna, R. Pacelli, A. M. Miles, M. B. Grisham, D. A. Wink, Convenient Colorimetric and Fluorometric Assays for S-Nitrosothiols, *Anal. Biochem.*, 238, 150-158 (1996)

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	Nitrosothiol Assay Kit	1プレート用	32,000

新製品

分子生物学電気泳動用アガロース

Agarose 900

Agarose 1500

Agarose LM200

アガロースゲル電気泳動は、遺伝子操作などの解析には必要不可欠な方法で、ゲルの支持体であるアガロースは実験内容によって使い分けが必要です。そこで、弊社では実験目的に適したアガロースを使用するために、3種の分子生物学用アガロースをご用意しております。

Agarose 900

10kb以下のDNAの分析に最も汎用されているアガロースです。1%のアガロースで1～6kbのDNAを分析できると言われています。

Agarose 1500

現在、アガロースゲルが通常の方法で分析し得る範囲はアガロースのポアサイズから考えて20 kb までであると言われていますが、10数 kb の DNA についてもゲル強度の小さいアガロースゲルを用いると検出前にゲルが崩れてしまう危険性があります。Agarose 1500はゲル強度が1500 g/cm²であるために、低濃度のゲルでも崩れにくくなっています。

Agarose LM200

現在、電気泳動をかけた後、その分離したDNAを次の実験に使う場合、目的DNAを回収するということが必要になります。方法としては、低融点アガロースを用いる方法、DEAEペーパーなどのイオン交換体を用いて電気泳動的に回収する方法、透析膜の中で電気泳動的に回収する方法などがあり、その中でも低融点アガロースを用いる方法が最も操作性が良く、短時間で回収することができます。

Agarose LM200は融点が67 以下（通常のアガロースは80 以上）と低く、電気泳動分離後のDNA断片の抽出に適しています。

紹介した3種のアガロースはDNase, RNaseが検出されず、核酸（DNA, RNA）の分析及び分離回収に安心して使用できます。

参考文献

J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, "Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 2nd. Ed." (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press.

コード番号	品名	容量	価格(¥)
341-07842	Agarose 900	25g	4,000
343-07841		100g	11,000
344-07832	Agarose 1500	25g	4,000
346-07831		100g	11,000
340-07851	Agarose LM200	10g	8,000
346-07853		50g	29,000

関連商品

分子生物学用バッファー

遺伝子工学の発展に伴い、数十年前までは極めて特別なものであった核酸を用いた実験も比較的容易に出来るようになってきました。しかし、自然界には核酸を分解する酵素が多く含まれるために、通常の実験で用いるような緩衝液では、目的の核酸を分解させてしまう危険性が潜んでいます。弊社が提供する緩衝液は、濾過滅菌とオートクレーブ処理をすることにより、核酸を分解する酵素（DNase, RNase）の検出されない緩衝液です。またこれらの緩衝液はストック溶液であり、使用時に混合もしくは希釈します。希釈する精製水も必要に応じオートクレーブしたものを使用することをお勧めします。

MESA は RNA の検出やサイズ決定に、TAE、TBE、TPE は DNA の電気泳動に用いる緩衝液です。RNA の取り扱いには特に注意深く行い、希釈する精製水はオートクレーブしたものを使用します。また0.1%二炭酸ジエチルを添加してオートクレーブしたものはRNase を不活性化するといわれており、この精製水は RNA 実験に多く用いられているため、MESA の希釈にもこの精製水を用いることをお勧めします。

SSC、SSPE は Southern hybridization に使用する緩衝液です。Southern hybridization は1975年に Southern によって確立された方法で、アガロースゲルで泳動した DNA 断片をニトロセルロース膜などに吸着させます。プローブを用いて、プローブと同一もしくは類似の塩基配列をもつ部位を同定する方法で、現在、汎用されている方法の一つです。

TE、TNE は電気泳動のゲルや動物組織、細胞より DNA を抽出、精製するのに用いられます。この DNA の抽出、精製は、DNA ライブラリー作成や、より良い Southern hybridization を行うためには、高純度かつ長い DNA を必要とします。しかし、長鎖の DNA は物理的にも切断されるので取り扱いには慎重に行ってください。

コード番号	品名	容量	価格(¥)
344-07491	10 x MESA (0.4M MOPS, pH7.0, 0.1M Sodium acetate, 10mM EDTA)	1 L	11,800
347-07501	10 x TAE (0.4M Tris-acetate, pH8.3, 10mM EDTA)	1 L	9,800
344-07511	10 x TBE (0.89M Tris-borate, pH8.3, 20mM EDTA)	1 L	9,800
341-07521	10 x TPE (0.8M Tris-phosphate, pH8.0, 20mM EDTA)	1 L	9,800
344-07555	10 x TE (0.1M Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA)	500ml	7,900
341-07565	10 x TNE (0.1M Tris-HCl, pH8.0, 1.0M Sodium chloride, 10mM EDTA)	500ml	7,900
340-07535	20 x SSC (0.3M Sodium citrate, 3.0M Sodium chloride)	500ml	8,600
347-07545	20 x SSPE (0.2M phosphate buffer, pH7.4, 2.98M sodium chloride, 0.02M EDTA)	500ml	8,600
348-07575	1M Tris-HCl (pH8.0)	500ml	7,900
347-07481	0.5M EDTA (0.5M EDTA, pH8.0)	1 L	9,800

新製品

(株)クマモト抗体研究所新製品

Anti S19 Ribosomal Protein polyclonal antibody

S19タンパク質は、リボソーム由来のタンパク質として同定されました。近年、その架橋二量体の形成によって補体C5aとの類似構造が出現し、その二量体が単球特異的な走化活性をもつことが発見されました。

慢性リュウマチ等の組織像においては単球/マクロファージの浸潤がメインのイベントであり、これらの病態解明のため、本タンパクの解析は非常に注目されております。また、アポトーシス細胞がS19二量体を遊離して自己の単球/マクロファージによる貪食を促進することも示唆されており、形態形成や組織再構築等アポトーシスが関与する系でもS19タンパク質の解析は有用と考えられます。

各種免疫染色やELISAに使用でき、上記の解析に非常に有用です。

免疫原	組み換え体S19タンパク質(大腸菌発現)
種	ウサギポリクローナル抗体
内容量	100 µg/vial
形状	凍結乾燥品(1%BSA含有PBS溶液。防腐剤として0.1%proclin含有)
特異性	ヒト肝細胞株(HepG2)及びモルモット肝抽出液のウェスタンブロットにおいてS19タンパク質を明瞭なバンドで検出しています。

Anti Metallothionein monoclonal antibody
(Clone No. 1A12)

メタロチオネインは構成アミノ酸の約1/3をシステインが占めながらS-S結合を1つも持たないというユニークな特徴をもち、銅や亜鉛等の重金属と結合することから生体防御能を有するタンパクとして発見されました。カドミウム汚染等の研究分野でそれら重金属と結合することにより毒性発現の軽減を促すことが証明され、注目されています。

各種免疫染色やELISAに使用でき、上記の解析に非常に有用です。

免疫原	ウサギ由来精製メタロチオネイン
種	マウスモノクローナル抗体(IgG1)
内容量	100 µg / vial (100 µl / vial)
形状	凍結溶液(1mg / ml、1%BSA含有PBS溶液。防腐剤として0.1%proclin含有)
特異性	本抗体はマウス、ラット、ウサギおよびヒトメタロチオネインに反応します。

Anti AGE monoclonal antibody (Clone No. 6D12)
Anti AGE monoclonal antibody, Fab' Peroxidase conjugated (Clone No. 6D12)
Anti Pyrraline monoclonal antibody (Clone No. H12)

メイラード反応後期生成物とは、タンパク質のアミノ基と還元糖のアルデヒド基が反応し、 Schiff塩基・アマドリ転位生成物(前期生成物)を経由して、脱水、酸化、縮合などの反応を経て得られる後期生成物(Advanced Glycation End Products: AGE)であり、蛍光・褐色・分子架橋形成並びにAGE受容体から認識されるという生物学的特性を有しています。

近年の抗AGE抗体を用いた解析により、AGEが加齢を伴って水晶体レンズタンパクに蓄積すること、糖尿病性腎症および慢性腎不全の腎組織、粥状動脈硬化病変部、透析性アミロイドーシスの2-ミクログロブリン、アルツハイマー病、紫外線によって誘発される皮膚病変(日光性弾力繊維症)などの病態においてAGE化タンパク質が病巣に蓄積することが明らかになってきました。

本抗体は、今後、加齢を基盤とする慢性疾患の研究に益々有用と思われる。

Anti AGE monoclonal antibody (Clone No. 6D12)

形状 凍結溶液(0.1%proclin含有ブロックエース(安定化蛋白))
内容量 10 µg / vial (40 µl / vial)

Anti AGE monoclonal antibody, Fab' Peroxidase conjugated (Clone No. 6D12)

形状 凍結溶液(0.1%proclin含有ブロックエース(安定化蛋白))
内容量 20 µg / vial (200 µl / vial)

AGE構造体の一つであるピラリンは、糖尿病患者の組織や尿中で高値であり、当該疾患の臨床マーカーとして注目されており、また、アルツハイマー病患者の老人斑や神経原線維の変化部位にも高濃度に存在していることが確認され、脳疾患の分野でも重要視されており。

Anti Pyrraline monoclonal antibody (Clone No.H12)

免疫原 カプロイル-ピラリン構造体
種 マウスモノクローナル抗体
内容量 20 µg / vial (80 µl / vial)

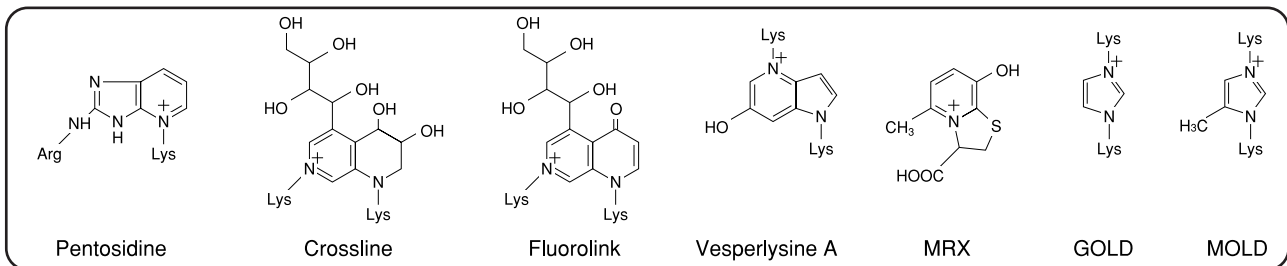
サブクラス IgG1

形状 凍結溶液(0.25mg/ml、50%ブロックエース含有PBS溶液。安定化剤として0.1%proclin含有)

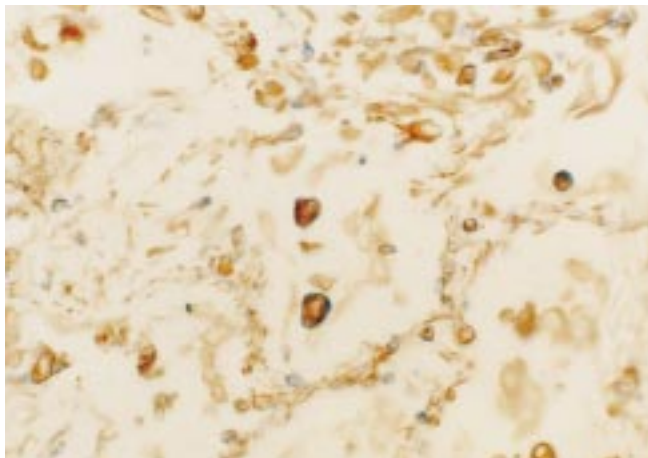
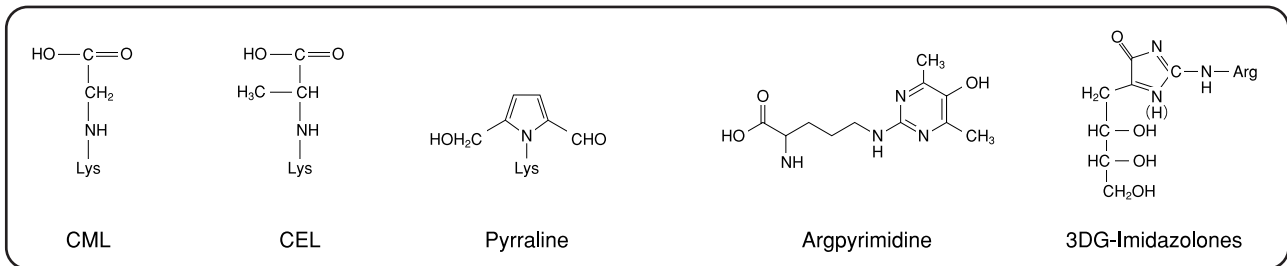
Anti Pyrraline monoclonal antibodyは明治乳業株式会社ヘルスサイエンス研究所との共同開発商品です。

現在まで提唱されているAGE構造体

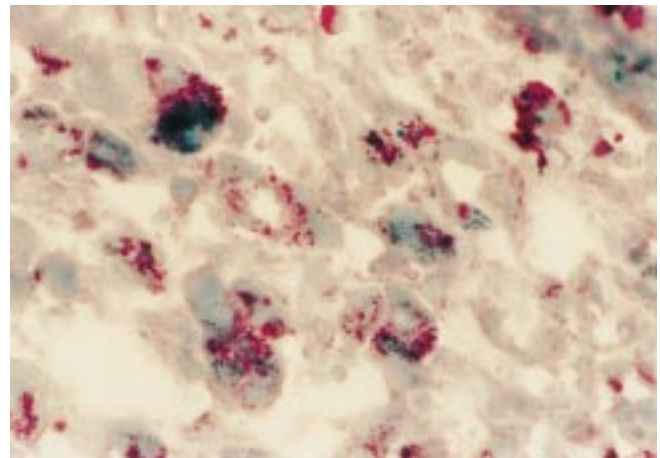
Fluorescent / Crosslinked



non-fluorescent / non-crosslinked



Upon double immunohistochemical staining with two different anti-AGE monoclonal antibodies 1F6 (brown) and 6D12 (blue), alveolar macrophages showed intense double immunoreactivity



Lipofuscin pigments markedly accumulated in the adrenal cortical parenchymal cells stained blue with Schmorl method. AGE-positive deposits were stained red.

(写真：熊本大学医学部Ling先生提供)

10月発売予定

KH011
Anti CML monoclonal antibody

コード番号	品名	容量	価格(¥)
KY 008	Anti S19 Ribosomal Protein polyclonal antibody	100 μg	45,000
KA 009	Anti Metallothionein monoclonal antibody (clone No. 1A12)	100 μg	45,000
KH 010	Anti Pyrraline monoclonal antibody (clone No. H12)	20 μg	55,000
KH 001	Anti AGE monoclonal antibody (clone No. 6D12)	10 μg	55,000
KH 002	Anti AGE monoclonal antibody Fab' Peroxidase conjugated	20 μg	70,000

10thフォーラム・イン・ドージン

生体と酸化還元

場 所 / 熊本市国際交流会館(熊本市花畑町)

日 時 / 平成11年11月8日(月) 9:45~17:30

参加費 / 無料 定 員 / 200名

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

9:45~ 9:50

9:50~10:00

セッション 1

10:00~10:45

10:45~11:30

11:30~12:15

12:15~13:45

セッション 2

13:45~14:30

14:30~15:15

15:15~15:35

15:35~16:20

16:20~17:05

17:05~17:30

18:00~19:30

主催者挨拶 / (株)同仁化学研究所 代表取締役社長 上野 景右

本シンポジウムのねらい / 熊本大学医学部 教授 前田 浩

酸化還元の生理化学

酸化還元酵素の分子酵素化学

熊本大学医学部 教授 志賀 潔

ヘムオキシゲナーゼによるヘムの分解機構

久留米大学医学部 教授 野口 正人

細胞機能のレドックス制御メカニズム

京都大学ウイルス研究所 教授 淀井 淳司

昼 食

酸化ストレスと生体応答

細胞における酸化ストレス応答

長崎大学薬学部 教授 渡邊 正己

酸化ストレスと生体防御機構(ビリルビンを例にして)

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 助教授 山口 登喜夫

休 憩

酸化ストレスと遺伝子変異

産業医科大学 産業生態科学研究所 教授 葛西 宏

酸化ストレスによるウイルス変異

熊本大学医学部 助教授 赤池 孝章

閉会の辞 / 熊本大学大学院医学研究科 教授 山本 哲郎

ミキサー・自由討論

〈申し込み先〉

株式会社同仁化学研究所 マーケティング部

e-mail: komine@dojindo.co.jp

URL: <http://www.dojindo.co.jp/forum/>

〒861-2202 熊本県上益城郡益城町田原2025-5

ホームページアドレス

URL : <http://www.dojindo.co.jp/>

E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス 0120-021557

フリーダイヤル 0120-489548