

DOJIN NEWS

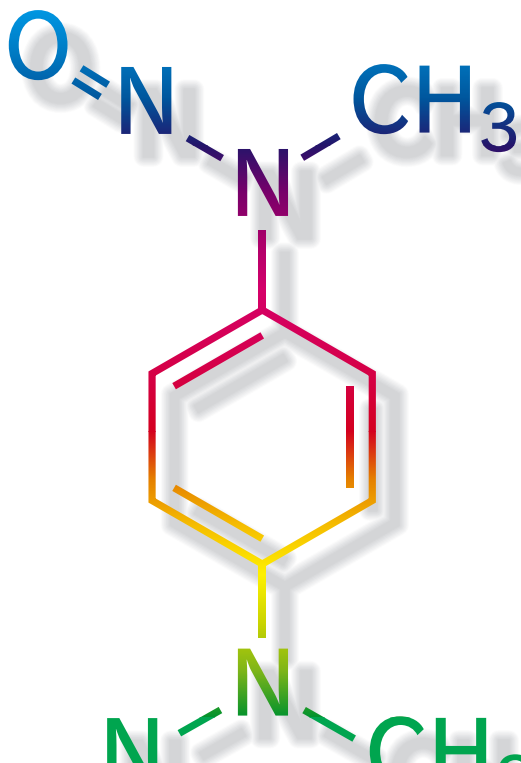
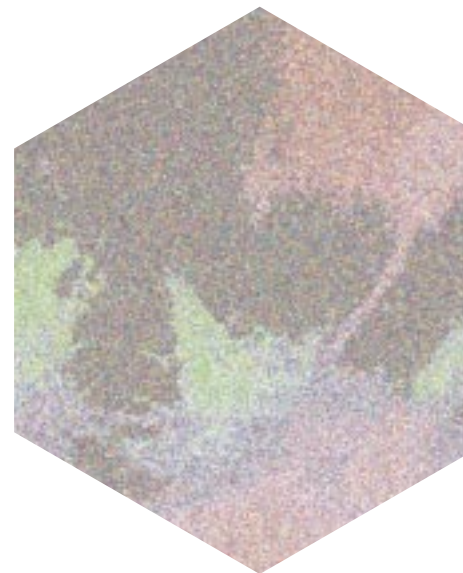
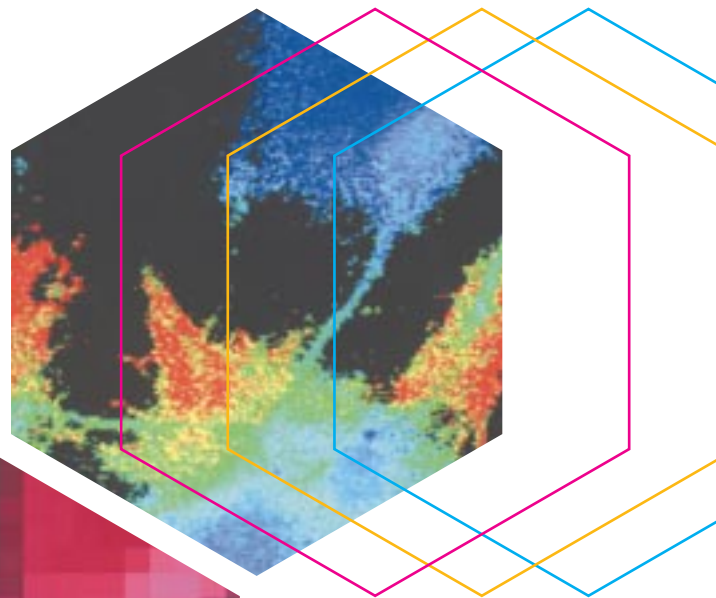
ドージンニュース

Review

酸化ストレスと
遺伝子変異
葛西 宏、紙谷浩之

Topics on Chemistry

ルシフェリン-
ルシフェラーゼ生物発
光系の癌治療への応用
佐々本一美



目次

Review

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

葛西 宏、紙谷 浩之..... 3

Topics on Chemistry

ルシフェリン-ルシフェラーゼ生物発光系の癌治療への応用

..... 8

Commercial

生体高分子機能解析用試薬..... 6

D-Luciferin 9

-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit

-AP Site Counting 10

細胞染色用試薬.....12

Self-Assembled Monolayer(SAM)研究用試薬 12

銀イオノフォア.....14

株式会社クマモト抗体研究所新製品.....14

NO₂/NO₃ Assay Kit-CⅡ(Colorimetric) FⅡ(Fluorometric)... 15

お知らせ

第10回フォーラムインドージン開催報告..... 20

今号の福岡大学山口先生の連載は弊社の都合により休ませていただきます。

新製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

BABE 6

FeBABE 6

D-Luciferin 9

Luminol 9

-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit

-AP Site Counting-.....10

-cellstain- Hoechst 33258 solution..... 12

-cellstain- Hoechst 33342 solution..... 12

-cellstain- Rh123 12

-cellstain- DAPI solution 12

11-Hydroxy-1-undecanethiol..... 13

8-Hydroxy-1-octanethiol..... 13

6-Hydroxy-1-hexanethiol.....13

Octadecyloxymethylpyridine 14

Anti Pentosidine monoclonal antibody(Clone No. PEN-12)... 14

Anti CML monoclonal antibody(Clone No. CMS-10)..... 14

NO₂/NO₃ Assay Kit-CⅡ(Colorimetric) 15NO₂/NO₃ Assay Kit-FⅡ(Fluorometric)..... 15

高橋稲荷神社.....熊本西部に位置し、日本5大稲荷の一つと称される。
2月初めの初午（はつうま）の日に初午大祭が行われ、10万人以上の参拝客で賑わう。

酸化ストレスと遺伝子変異 Oxidative Stress and Mutagenesis



葛西 宏
(Hiroshi KASAI)

産業医科大学
産業生態科学研究所



紙谷 浩之
(Hiroyuki KAMIYA)

産業医科大学
産業生態科学研究所

Summary

DNA lesions produced by reactive oxygen species appear to be one of the causes of mutations that either occur spontaneously or are induced by environmental mutagens. During the past decade, studies on mutagenesis by oxidative stress have been focused on oxidized guanine, 8-hydroxyguanine. Recently, we found that oxidized adenine, 2-hydroxyadenine, is formed by Fenton-type reactions and that this DNA damage is as mutagenic as 8-hydroxyguanine when present either in DNA or in the nucleotide pool. These results suggest that 2-hydroxyadenine plays an important role in mutagenesis by oxidative stress.

We review here the mutagenicity of 2-hydroxyadenine, which is observed *in vitro* and *in vivo* experiments carried out in our laboratory.

キーワード：活性酸素、ユーヒドロキシアデニン、DNA損傷、遺伝子変異

はじめに

近年、DNAの損傷における活性酸素の役割に大きな関心が寄せられている。生体内で生じた活性酸素は、DNAやその前駆体と反応し、修飾する。DNAの修飾（損傷）は、塩基対形成の誤り（遺伝情報の変化）をもたらし、遺伝子変異や発癌を誘発すると考えられる。活性酸素は、化学物質・放射線等の環境変異原のみならず正常な好氣的代謝の過程で産生されることから、酸化ストレスによって生ずるDNAの損傷は、化学発癌・放射線発癌において重要なだけでなく、自然突然変異の重要な因子であると思われる。ここでは、酸化ストレスによって生ずるDNA損傷の一つである、2-hydroxyadenine (2-OH-Ade) とDNA前駆体に生じた酸化的損傷、2-hydroxy-dATP (2-OH-dATP) の誘発する変異について述べる。

1. 試験管内反応における2-OH-Adeの生成

活性酸素によって塩基部、糖部が修飾を受けると、様々な種類のDNA損傷が生ずる。特に著名なのが8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine, 8-OH-Gua)で、活性酸素を産生する環境変異原によって生ずることが数多く報告されているDNA損傷であり^(1,2)、細胞内で主としてG-T変異を誘発することが明らかにされている⁽³⁻⁷⁾。

最近、私達は、DNA、dA、dATPを活性酸素産生系である Fe^{2+} -EDTA- O_2 で処理すると、塩基部が水酸化され、2-OH-Ade (図1)が生ずることを見出した⁽⁸⁾。また、腎発癌物質であるニトリロ三酢酸(NTA)と Fe^{2+} との錯体の系(Fe^{2+} -NTA- O_2)でも2-OH-Adeが生成することを見出ししている⁽⁹⁾。モノマー(dA)を Fe^{2+} -EDTA- O_2 や Fe^{2+} -NTA- O_2 処理した場合、細かい条件の違いにより若干の変動はあるが、2-OH-Adeの生成量は8-OH-Guaとほぼ同程度であった^(8,9)。細胞内でも同様に、モノマーにおいてはこの両者は同程度生成すると推定される。一方、DNAを Fe^{2+} -EDTA- O_2 処理した場合には、2-OH-Adeは8-OH-Guaの1/40程度しか生成しなかった⁽⁸⁾。従って、DNA中のアデニン残基が直接酸化されて2-OH-Adeが生成する割合

はあまり高くないと思われる。

2. DNA中に2-OH-Adeが生成するルート

上記のように、2-OH-Adeは、DNA中では生成量が低いと予想されるが、このことは変異誘発に2-OH-Adeは関与していないことを意味するのであろうか。

ヌクレオチドプールに生じる酸化的損傷ヌクレオチド、8-hydroxy-dGTP (8-OH-dGTP) を加水分解する酵素 (MutT蛋白質) は、mutTとして知られていた大腸菌のミューテーター遺伝子にコードされている⁽¹⁰⁾。このことは、DNA中のグアニン塩基の直接的な酸化によって生成する8-OH-Guaのみならず、損傷DNA前駆体の8-OH-dGTPもDNAに取り込まれることにより、変異を誘発することを示している。類推すると、2-OH-Adeの場合にもこの2つのルートによって2-OH-AdeがDNA中に生成すると考えられる。ただし、2-OH-Adeの場合、DNA中での生成から相対的に少ないことから、生成した2-OH-dATPのDNAポリメラーゼによる取り込みが重要な経路であると考えられる。実際、私達は2-OH-dATPがDNAポリメラーゼの基質となることを明らかにしている(後述)。

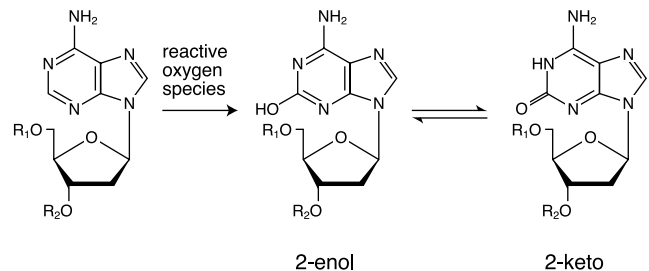


図1 2-OH-Adeの構造

3. DNA中の2-OH-Adeが誘発するヌクレオチドのミスインコーポレーション

私達は、2-OH-AdeがDNAポリメラーゼによる試験管内DNA合成

の系において、ヌクレオチドのミスインコーポレーションを誘発するかどうかを調べた。5'-及び3'-隣接塩基を色々と置換した、2-OH-Adeを含む12種類のオリゴヌクレオチドを合成し、鋳型DNAとして用いた。各鋳型DNAにプライマーをアニールさせ、1種類の基質 (dNTP; N=A,G,C,T) を加えた緩衝液中でDNAポリメラーゼ (ポリメラーゼ 及び、クレノー断片) によるプライマー伸長を行ったところ、配列によって若干の違いがあるものの、(1) ポリメラーゼ と ではdTMPとdCMPが、(2) クレノー断片ではdTMPとdGMPが取り込まれる傾向を観察した⁽¹¹⁾。興味深い点は、5'-TA*A-3' (A*=2-OH-Ade) 配列中の2-OH-Adeに対しては3種のポリメラーゼともdAMPを取り込んだことである^(11,12)。また、2種の鋳型DNAを用い、4種類のdNTP存在下でのポリメラーゼ反応で得られた、完全鎖長産物を解析したところ、TA*A配列の場合にはdAMPの取り込みが、そうでない配列 (この場合は5'-GA*C-3'配列) ではdCMPの取り込みが観察された。

以上の結果から、2-OH-Adeは試験管内の系においてヌクレオチドのミスインコーポレーションを誘発することが明らかになった。

4. DNA中の2-OH-Adeが細胞内で誘発する変異

私達は、上記の結果を踏まえて、2-OH-Adeの大腸菌及び培養細胞における誘発変異を解析した。標的配列はスクリーニングを考慮し、制限酵素部位、5'-GTCGA*C-3' (Sal I 部位) と5'-CTTA*AG-3' (Afl II 部位) に導入した、後者はdAMPの取り込みが観察されたTA*A部位中の2-OH-Ade、前者はその他の部位の2-OH-Adeを想定したものである。2-OH-Adeを含むオリゴヌクレオチドを二本鎖シャトルベクターpSVK3に導入し、大腸菌及びサル由来のCOS-7細胞にトランスフェクションした。その際に、複製の際のリーディング、ラギング鎖合成の違いを観察するために、二本鎖のそれぞれの鎖に2-OH-Adeを導入したプラスミドを構築した^(13,14)。

図2に大腸菌、COS-7細胞中での誘発変異率を示した。大腸菌、COS-7細胞ともにGA*C配列の2-OH-Adeの変異率はラギング鎖合成時では0.6~0.8%で、リーディング鎖合成時よりも高い。一方、TA*A配列中の2-OH-Adeの変異率はそれよりも低く、リーディング、ラギング鎖合成時ともに0.1%程度であった。TA*A配列は、上述したようにdAMPの取り込みが試験管内で観察された、やや特殊な配列であり、それを考慮すると2-OH-Adeの変異率は、約0.5%であると推定される。この変異率には、相補鎖 (2-OH-Adeを含まない鎖) の複製も反映されるため、実際の変異率は約1%であると推定される。この値は、二本鎖DNAを用いて得られている8-OH-Guaの変異率と同程度である^(4,7)。従って、DNA中に生じた2-OH-Adelは8-OH-Guaと同程度に変異を誘発すると言える。

GA*C配列中の2-OH-Adeは、大腸菌、COS-7細胞のいずれの場合にも、ラギング鎖合成時にアデニンの欠失変異を誘発した。同様にTA*A配列中の2-OH-Adeの誘発変異にもアデニンの欠失変異がラギング鎖合成時に観察されている。この欠失変異が生ずる機構は、2-OH-Adeに対してdCMP (GA*C) またはdAMP (TA*A) が取り込まれた後、misalignmentが生じた結果であると思われる^(13,14)。リーディング鎖合成の際には、欠失変異の割合が減少した。これは、

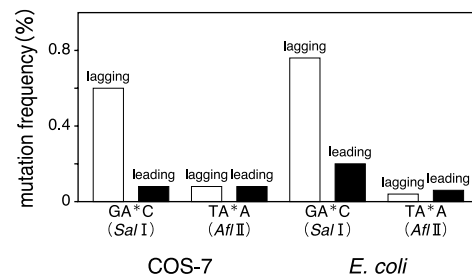


図2 2-OH-Adeの誘発変異率

前述のモデルから考えると、2-OH-Ade-Cまたは2-OH-Ade-Aからの伸長がリーディング鎖合成時の方が高いことを示唆する。従って、GA*C配列の2-OH-Adeに対してはdCMPが取り込まれてA G変異またはAの欠失変異が誘発され、TA*A配列中の2-OH-Adeに対してはdAMPが取り込まれてA T変異とAの欠失変異が誘発されたと考えられる。この結果は、試験管内での結果と概ね一致する。興味深いことは、TA*A配列中の2-OH-Adeが大腸菌、COS-7細胞のいずれの場合にも、A G変異をも誘発したことである。これは、細胞内でDNAポリメラーゼ III (大腸菌) やポリメラーゼ または (COS-7細胞) がTA*A配列中の2-OH-Adeに対してもdCMPを取り込んだことを示している。また、大腸菌では、低頻度ながらA C変異が観察されている。このことは、ポリメラーゼ III が2-OH-Adeに対してdGMPを取り込んだことを示す。

以上のデータをまとめると、2-OH-Adeは8-OH-Guaと同程度に変異原性を有し、そのスペクトルは、主としてA G変異、5'-隣接塩基がGの場合には、A Gの他にAの欠失、TA*A配列の場合には、A T、A G変異と欠失変異であると結論づけられる。

5. 2-OH-dATPのDNAポリメラーゼによる取り込み

次に、ヌクレオチドプール中に生ずると思われる2-OH-dATPのDNAポリメラーゼによる取り込みを検討した。合成オリゴヌクレオチドを用いた鋳型-プライマーを用い、2-OH-dATPを基質として与えてDNAポリメラーゼ反応を行ったところ、プライマー鎖の伸長が観察された。哺乳動物細胞の複製酵素であるDNAポリメラーゼ の場合には、鋳型中のTまたはC残基に対して、取り込みが観察された⁽⁸⁾。一方、大腸菌の複製酵素、DNAポリメラーゼ III の場合には、鋳型DNA中のTとG残基に対して2-OH-dATPが取り込まれた

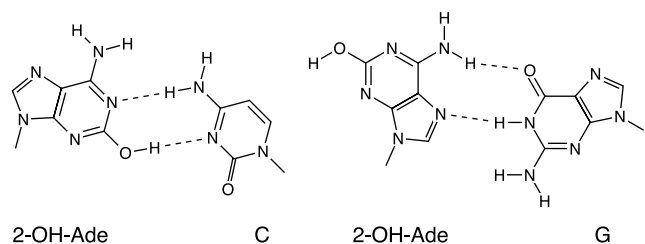


図3 推定される2-OH-Ade·C対と2-OH-Ade·G構造の一例

(紙谷ら、未発表データ) すなわち、哺乳動物のDNAポリメラーゼにより2-OH-Ade・C対が、大腸菌DNAポリメラーゼⅢにより2-OH-Ade・G対が形成される(図3)、このポリメラーゼ依存的に形成される塩基対の違いの機構についての詳細は現在不明である。このように、2-OH-dATPは、哺乳動物・大腸菌のいずれの複製酵素によっても誤った対合を行うことが明らかになった。

6. 2-OH-dATPが細胞内で誘発する変異

私達は、損傷を受けたDNA前駆体(デオキシヌクレオシド三リン酸)が細胞内で誘発する変異のアッセイ系を新たに開発し、2-OH-dATPが細胞内で誘発する変異を調べた。この方法は、大腸菌懸濁液に損傷ヌクレオチドを添加して取り込ませ、染色体DNA上の*lac I*遺伝子中に生じた変異を解析するものである⁽¹⁵⁾。

最初に、様々な濃度のヌクレオチドを添加し、*lac I*または*lac O*遺伝子座における変異体率を求めた。未修飾のdATPやdGTPの添加では、量依存的に変異体率の上昇が観察された。このことは、外から添加した損傷ヌクレオチドが大腸菌体内に取り込まれて変異を誘発したことを示唆する。事実、放射性同位元素で標識したヌクレオチドを添加した場合には、菌体内への放射性同位元素の移行が観察されている。

次に、変異体の*lac I*遺伝子の配列を解析した。図4に変異の大きな内訳と変異率の相対値を示した。その結果、塩基置換変異の頻度は、2-OH-dATPの添加により約9倍上昇したことが明らかになった。8-OH-dGTPの場合にはその上昇率は約12倍であった。この結果を標識ヌクレオチドを用いて調べた菌体内への取り込み効率に照らし合わせると、2-OH-dATPの方が8-OH-dGTPより約3倍変異原性が高いことが明らかになった。このことは、ヌクレオチドプール中に生じた2-OH-dATPが活性酸素が関与する変異に極めて重要な役割を担っていることを示唆するものである。

2-OH-dATPによって誘発された塩基置換変異の84%はG・C T・Aトランスバージョンであった⁽¹⁵⁾。一方、8-OH-dGTPによって誘発された塩基置換変異は、ほとんどがA・T C・Gトランスバージョンであった。8-OH-dGTPの誘発変異は、分解酵素活性を欠くmutT株大腸菌で見い出される変異や試験管内でのDNAポリメラーゼ反応の結果から予測されていた変異と同一のものであった。このことは、新たに開発した実験系が有効なものであることを示している。2-OH-dATPが誘発したG・C T・Aトランスバージョンの生成機構としては、最初の複製の際に鋳型DNA中のG残基に対して2-OH-dATPが挿入され、次の複製の際に2-OH-Ade残基に対してdTTPが取り込まれることが推定される。事実、最近の私達の実験で、大腸菌の複製酵素、DNAポリメラーゼⅢが鋳型DNA中のG残基に対して2-OH-dATPを取り込むことを見出している(紙谷・葛西、未発表データ; 紙谷ら、未発表データ)。

2-OH-dATPは8-OH-dGTPよりも変異原性が高く、また、G・C T・Aトランスバージョンを誘発することは大いに注目されるべきことである。以前には、活性酸素によりG・C T・A変異の頻度が上昇すると、それはDNA中に生じた8-OH-Guaの誘発変異だと(確かな根拠もなく)思われてきた。しかし、著者らの結果は、G・C T・A

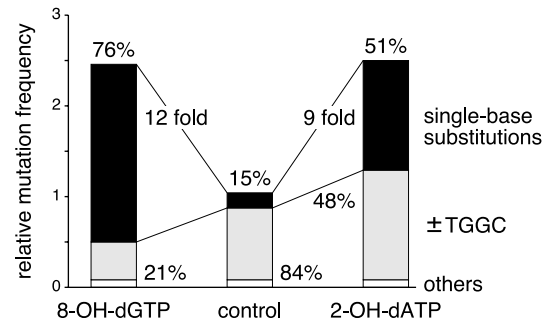


図4 酸化ヌクレオチドによる誘発変異

トランスバージョンの誘発には、少なくとも2-OH-dATPの生成が関与する可能性を示唆している。

また、5.で述べたように、*in vitro*においてDNAポリメラーゼが2-OH-dATPを鋳型DNAのCに対して取り込んだことを考慮すると、哺乳動物細胞中ではG・C T・Aトランスバージョンが誘発されると推定される。

おわりに

以上、DNA中の2-OH-Ade、ヌクレオチドプールに生ずる2-OH-dATPが8-OH-Gua、8-OH-dGTPに匹敵する変異原性を有する、重要な酸化的損傷であることが明らかになった。また、8-OH-dGTP分解酵素として知られていたヒトMTH I蛋白質が、2-OH-dATPを8-OH-dGTPよりも効率よく分解することも、この損傷の重要性を強く示唆する⁽¹⁶⁾。

参考文献

- 1) Kasai, H. (1997) Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation Res.*, **387**, 147-163.
- 2) 紙谷浩之、葛西宏 (1995) 活性酸素による8-ヒドロキシグアニンの生成と生体との関わり. *衛生化学*, **41**, 307-319.
- 3) Wood, M. L., Dizdaroglu, M., Gajewski, E. and Essigmann, J. M. (1990) Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydroxy-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry*, **29**, 7024-7032.
- 4) Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S. and Loeb, L. A. (1992) 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G T and A C substitutions. *J. Biol. Chem.*, **267**, 166-172.
- 5) Kamiya, H., Miura, K., Ishikawa, H., Inoue, H., Nishimura, S. and Ohtsuka, E. (1992) c-Ha-ras containing 8-hydroxyguanine at codon 12 induces point mutations at the modified and adjacent positions. *Cancer Res.*, **52**, 3483-3485.
- 6) Kamiya, H., Murata-Kamiya, N., Koizume, S., Inoue, H., Nishimura, S. and Ohtsuka, E. (1995) 8-Hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in hot spots of the c-Ha-ras gene. Effects of sequence contexts on mutation spectra. *Carcinogenesis*, **16**, 883-889.
- 7) J. Wagner, Kamiya, H. and Fuchs, R. P. P. (1997) Leading versus

lagging strand mutagenesis induced by 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in *E. coli*. *J. Mol. Biol.*, **265**, 302-309.

- 8) Kamiya, H. and Kasai, H. (1995) Formation of 2-hydroxydeoxyadenosine triphosphate, an oxidatively damaged nucleotide, and its incorporation by DNA polymerases. *J. Biol. Chem.*, **270**, 19446-19450.
- 9) Murata-Kamiya, N., Kamiya, H., Muraoka, M., Kaji, H. and Kasai, H. (1997) Comparison of oxidation products from DNA components by γ -irradiation and Fenton-type reactions. *J. Radiat. Res.*, **38**, 121-131.
- 10) Maki, H. and Sekiguchi, M. (1992) MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature*, **355**, 273-275.
- 11) Kamiya, H. and Kasai, H. (1996) Effects of sequence contexts on misincorporation of nucleotides opposite 2-hydroxyadenine. *FEBS Lett.*, **391**, 113-116.
- 12) Kamiya, H., Ueda, T., Matsukage, A. and Kasai, H. (1995) Misincorporation of dAMP opposite 2-hydroxyadenine, an oxidative form of adenine. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 761-766.
- 13) Kamiya, H. and Kasai, H. (1997) Substitution and deletion mutations induced by 2-hydroxyadenine in *Escherichia coli*: Effects of sequence contexts in leading and lagging strands. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 304-310.
- 14) Kamiya, H. and Kasai, H. (1997) Mutations induced by 2-hydroxyadenine on a shuttle vector during leading and lagging strand syntheses in mammalian cells. *Biochemistry*, **36**, 11125-11130.
- 15) Inoue, M., Kamiya, H., Fujikawa, K., Ootsuyama, Y., Murata-Kamiya, N., Osaki, T., Yasumoto, K. and Kasai, H. (1998) Induction of chromosomal gene mutations in *Escherichia coli* by direct incorporation of oxidatively damaged nucleotides. *J. Biol. Chem.*, **273**, 11069-11074.
- 16) Fujikawa, K., Kamiya, H., Yakushiji, H., Fujii, Y., Nakabeppu, Y. and Kasai, H. (1999) The oxidized forms of dATP are substrates for the human MutT homologue, the hMTH1 protein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 18201-18205.

著者紹介

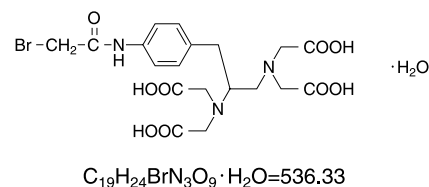
氏名 葛西 宏 (Hiroshi KASAI)
 産業医科大学産業生態科学研究所
 出身大学 学習院大学大学院自然科学研究科
 学位 理学博士
 専門 化学発癌、DNA損傷
 連絡先 〒807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1
 Tel : 093-691-7468, Fax : 093-601-2199

氏名 紙谷 浩之 (Hiroyuki KAMIYA)
 産業医科大学産業生態科学研究所
 出身大学 北海道大学大学院薬学研究所
 学位 薬学博士
 専門 核酸化学、分子生物学
 趣味 野球 (最近はニュースでの鑑賞のみ)
 連絡先 〒807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1

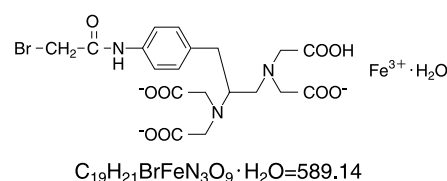
新製品

生体高分子機能解析用試薬

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) が生命科学研究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 $^{111}In^{3+}$ 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で結合できること、2) 温和な条件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に影響されないこと、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を結合する応用が開発され⁶⁾、これによって、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ⅠとⅡの接点の同定⁷⁾、大腸菌RNAポリメラーゼの⁸⁾、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、リボゾー

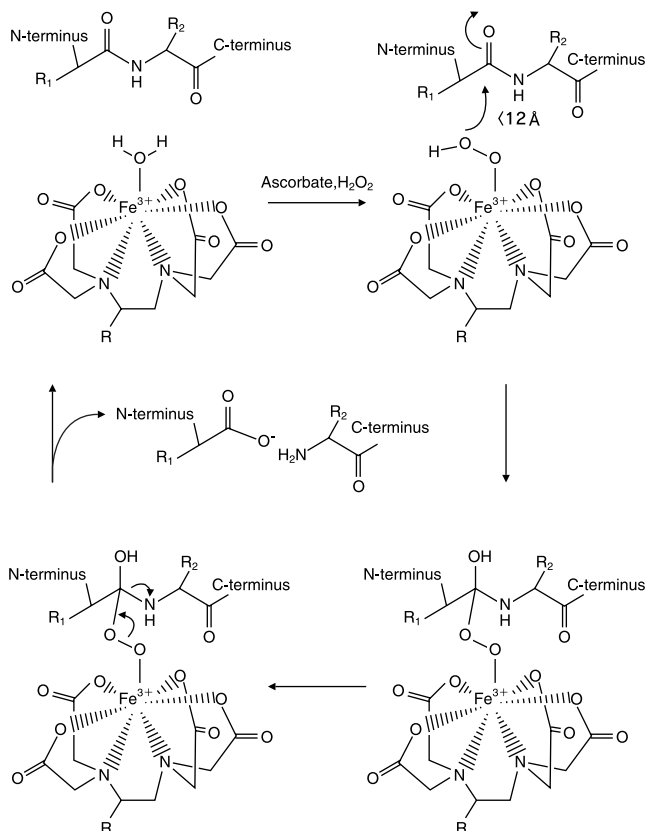


図 FeBABEによるペプチド結合の切断機構(ペルオキシ中間体経由)³⁾

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。今回、FeBABEは粉末凍結乾燥品を用意いたしました。水、緩衝液、DMSOなどを加えて溶解して御使用ください。

参考文献

- 1) L. H. DeReimer 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

Topics on Chemistry

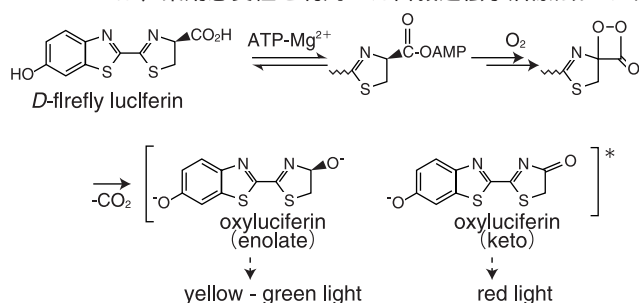
ルシフェリン - ルシフェラーゼ生物発光系の癌治療への応用

(株)同仁化学研究所 佐々本一美

ホタルの発光に代表される生物発光は昔から多くの化学者に魅了してきた。特に、現在知られている生物発光の中では最も発光効率が高い(量子収率=0.88)ホタル・ルシフェリン - ルシフェラーゼ発光系は、これまで分析化学への応用が盛んに行われてきた。ATPの検出¹⁾や、あるいはそれを示標とする細胞のバイアピリティーの測定²⁾などが代表的な例であるが、近年、レポーター蛋白としてルシフェラーゼ活性を検出するreporter gene assayが応用の主流となっており、現在ではGFPとならんで代表的な発光アッセイ系と言える。その理由として、この発光系が高感度であること、また殆どの細胞は本来ルシフェラーゼ活性を持たないことがあげられる。さらに最近、化学合成法の改良³⁾による安価な供給が可能になったことも一因として考えられる (cf. p.9)。

ホタル・ルシフェリン - ルシフェラーゼ発光系の反応は、ATPおよびMg²⁺の存在下、基質のD-ルシフェリンがルシフェラーゼによって発光体であるオキシルシフェリンに変換される反応である (Scheme)。実際のホタルでは、その種類によって緑から赤への発光が見られるが、これは酵素の違いによってエノール型ジアニオン (黄色~緑) もしくはケト型モノアニオン (赤) が発光体となるためである。発光はルシフェラーゼ濃度で8桁にわたって直線性があり、sub-attomoleレベルの検出感度が報告されている⁴⁾。ホタル・ルシフェリン - ルシフェラーゼ発光系のreporter gene assayへの応用は広汎に及ぶが、ここではごく最近の応用例、特に癌研究への応用について紹介したい。

Gnantらは、薬剤感受性を利用した自殺遺伝子治療法にお



Scheme Bioluminescent Reaction of Firefly Luciferin

る遺伝子導入効率の解析にルシフェリン - ルシフェラーゼ発光系を用いている^{5,6)}。(チミジンキナーゼ遺伝子を欠失させ)ルシフェラーゼ遺伝子を導入した組換えワクシニアウイルスベクターを作成し、マウス大腸癌の肝転移モデルに対して投与法や腫瘍集積性の検討を行ない、cytosine deaminase遺伝子と5-fluorocytosineとの組み合わせによる自殺遺伝子治療法が転移性肝癌に有効であることを示した。この他、前立腺癌⁷⁾、メラノーマ⁸⁾、カボシ肉種⁹⁾、乳癌¹⁰⁾などの遺伝子治療研究への応用も報告されている。

スタンフォード大学のContagらは、ルシフェラーゼ遺伝子をトランスフェクションしたHeLa細胞 (HeLa-*luc*) を液性免疫と細胞性免疫がともに欠損したいわゆるSCIDマウスに接種し、腫瘍細胞の体内での増殖を発光でモニターする手法を報告

している¹¹⁾。この方法は、生きたマウスで腫瘍細胞の増殖を時間を追って観察でき、非侵襲的、高感度、定量性に優れた方法である。彼等はまず、25 - 250,000個のHeLa-*luc*細胞を(予め放射線を照射した)SCIDマウスの腹腔内に接種し、全身から発生する光子をイメージング用カメラで捕え可視化した(基質のルシフェリンはイメージングの直前に腹腔投与)。腹腔部分に広がった腫瘍細胞からの発光量は接種した細胞数に比例し、検出感度は2,500cells(接種数)であった。次に、抗癌剤の効果を調べるために予め10,000個のHeLa-*luc*細胞を接種したSCIDマウスにcyclophosphamide、5'-fluorouracil、cisplatinをある間隔で投与し、4週間モニターした。その結果、cyclophosphamideでは殆ど腫瘍増殖の抑制効果は見られなかったが、5'-fluorouracilでは、初期には抑制するが、2 - 3週目から増殖に転じる様子が捕えられた。また、cisplatinは顕著な抑制効果を示した。

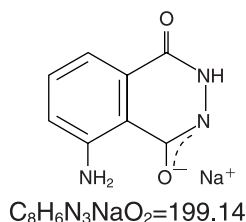
この方法により、腫瘍の増殖、再増悪、転移、薬物への応答などの動的な情報を直接発光画像として捕らえることができ、癌治療への新たな試みとして注目される。

参考文献

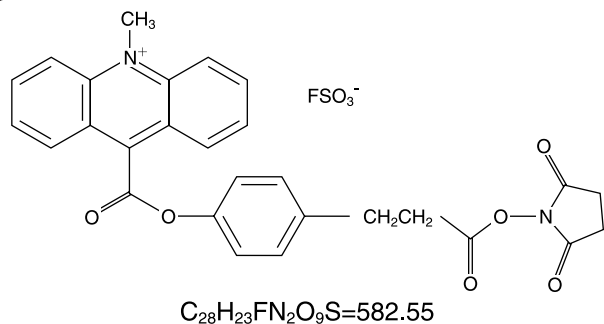
- 1) P. E. Stanley, *Methods Enzymol.*, vol.133, p14, Academic Press, 1986.
- 2) S. P. M. Crouch, R. Kozlowski, K. J. Slater and J. Fletcher, *J. Immunol. Methods*, **160**, 81 (1993)
- 3) Y. Toya, M. Takagi, H. Nakata, N. Suzuki, M. Isobe and T. Goto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **65**, 392 (1992)
- 4) I. Bronstein, J. Fortin, P. E. Stanley, G. S. Stewart and G. S. Kricka, *Anal. Biochem.*, **219**, 169 (1994)
- 5) M. F. Gnant, L. A. Noll, K. R. Irvine, M. Puhmann, R. E. Terrill, H. R. Alexander Jr and D. L. Bartlett, *Ann. Surg.*, **230**, 352 (1999)
- 6) M. F. Gnant, M. Puhmann, D. L. Bartlett and H. R. Alexander Jr, *J. Natl. Cancer Inst.*, **91**, 1744 (1999)
- 7) D. C. Yu, G. T. Sakamoto and D. R. Henderson, *Cancer Res.*, **59**, 1498 (1999)
- 8) B. J. Park, C. K. Brown, Y. Hu, H. R. Alexander, J. Horti, S. Rajee and W. D. Figg, *Human Gene Ther.*, **10**, 889 (1999)
- 9) J. A. Campaign, A. A. Matassa, P. L. Felgner, K. M. Barnhart, D. T. Curiel and G. S. Harrison, *Cancer Gene Ther.*, **5**, 131 (1998)
- 10) X. S. Li, A. K. Rishi, Z. M. Shao, M. I. Dawson, L. Jong, B. Shroot, U. Reichert, J. Ordonez and J. A. Fontana, *Cancer Res.*, **56**, 5055 (1996)
- 11) T. J. Sweeney, V. Mailander, A. A. Tucker, A. B. Olomu, W. Zhang, Y. Cao, R. S. Negrin and C. H. Contag, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **96**, 12044 (1999)

関連商品

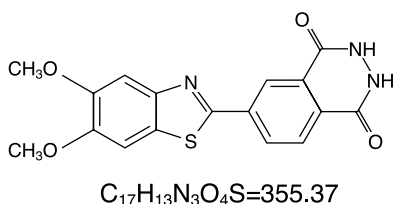
Luminol



Acridinium- I



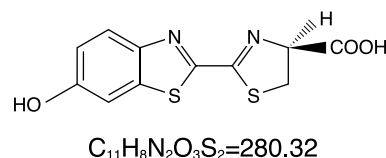
DBPH



コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	Luminol	Request	Request
347-06521	Acridinium- I	10mg	20,800
Request	DBPH	Request	Request
Request	D-Luciferin	25mg	14,000

新製品

D-Luciferin



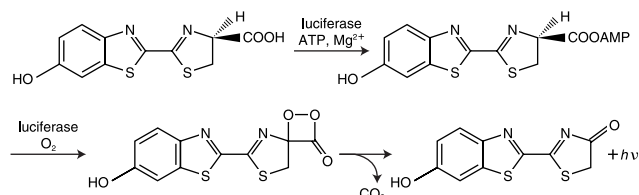
特長 高い量子集率をもつ生物発光試薬です。

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される際に、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、発光が起こります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⁾
 $ADP + \text{creatine phosphate} \xrightarrow{\text{creatine kinase}} ATP + \text{creatine}$
 $ATP + \text{D-Luciferin} + O_2 \xrightarrow{\text{luciferase} + Mg^{2+}} AMP + PPI + CO_2 + \text{oxyluciferin} + h\nu$
- 2) Pyruvate kinase
 $ADP + \text{phosphoenol pyruvate} \xrightarrow{\text{pyruvate kinase}} ATP + \text{pyruvate}$
 $ATP + \text{D-Luciferin} + O_2 \xrightarrow{\text{luciferase} + Mg^{2+}} AMP + PPI + CO_2 + \text{oxyluciferin} + h\nu$
- 3) Acetate kinase⁴⁾
 $ADP + \text{acetylphosphate} \xrightarrow{\text{acetate kinase}} ATP + \text{pyruvate}$
 $ATP + \text{D-Luciferin} + O_2 \xrightarrow{\text{luciferase} + Mg^{2+}} AMP + PPI + CO_2 + \text{oxyluciferin} + h\nu$

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、科学と生物、**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

-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit-AP Site Counting-

【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ることもあります。

DNA損傷部位には修復機構が働きますが、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。つまりAP siteを検出することによりDNA損傷を測定することができます。

-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kitは、AP siteと特異的に結合するARP(N'-Aminoxyethylcarbonylhydrazino-D-biotin) 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試料DNA中のAP siteを簡便に定量できるキットです。

I . キット内容 (5 sample用)

・ 標準ARP-DNA (0, 2.5, 5.0, 10, 20, 40 AP site/100,000 nucleotides, 0.5 μg x ml)	各250 μl x 1
・ ARP溶液	100 μl x 1
・ DNA Binding Solution	10ml x 1
・ 洗浄用PBST粉末	1 pack
・ HRP-Streptavidin	10 μl x 1
・ TE Buffer	10ml x 1
・ 発色溶液	10ml x 1
・ Filtration Tube	5 tubes
・ マイクロプレート	96 well x 1

II . DNAの精製

このキットによるDNAのAP site数検出は混在するRNAおよびタンパクにより測定誤差を生じる可能性がありますので、RNase 処理後、フェノール/クロロホルムもしくは他のDNA精製キット等を用いて精製したDNAを使用することをお勧めします。

また最近では、数多くのDNA精製キットが市販されるようになり簡便にDNAを単離精製することが可能です。中でもグアニジン / 界面活性剤による精製法は簡便でかつ高純度のDNAを得ることができます。

DNAの純度は吸光度比 (A_{260nm}/A_{280nm}) により検定することができます。 A_{260nm}/A_{280nm} 1.8のDNAを使用することを推奨します。

III . 操作方法

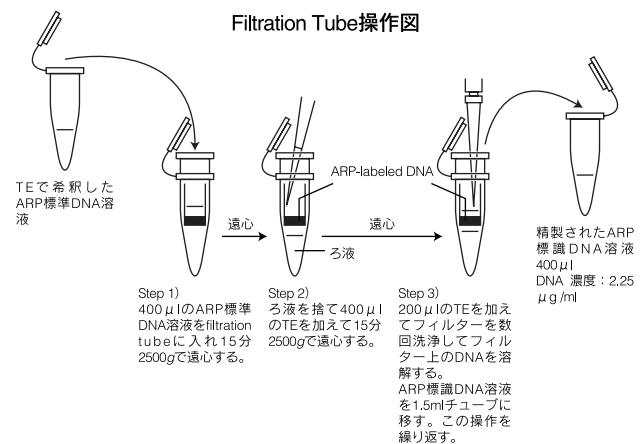
1 . 試料DNAのARP標識

操作

- 1) 精製した試料DNAをTE bufferに溶解させ、溶液の吸光度 (260nm) を測定する。吸光度から濃度を算出して (DNA濃度は50 μg/mlの時の吸光度を1.0として算出) 100 μg/mlの濃度になるようにTE bufferで希釈調製する。
- 2) 試料DNA溶液10 μlにARP溶液10 μlを0.5mlチューブ中で混

合する。

- 3) 37 °C で1時間反応させる。
- 4) 380 μlのTE-bufferを添加後、溶液をFiltration Tubeに入れる (Filtration Tube操作図を参照) 。*
- 5) 遠心分離 (2,500 g、15分間) 後、ろ液を捨てる。 **
- 6) 400 μlのTE-bufferをFiltration Tubeに加え、フィルター上に付着したDNAをピペッティングにより溶解させる。
- 7) 遠心分離 (2,500 g、15分間) 後、ろ液を捨てる。 **
- 8) 400 μlのTE-bufferをFiltration Tubeに加え、フィルター上に付着したDNAをピペッティングにより溶解させる。
- 9) DNA溶液を1.5mlチューブに移し、0 - 5 °C で保存する。



- * Filtration Tubeの代わりにエタノール沈殿による精製も可能です。
- ** 溶液がメンブラン上に残っている場合は、更に2,500 g、5分間遠心分離します。
- ***Filtration Tubeを使用した場合、DNAの回収率は90%です。従って、溶液中のARP標識DNA濃度は2.25 μg/mlとなります。

2 . AP site数の検出

2-1 試薬

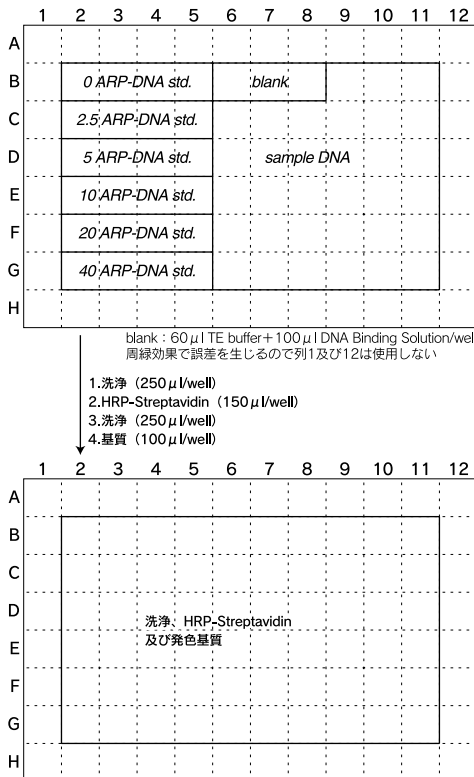
- ・ 洗浄用PBST : 洗浄用PBST粉末をイオン交換水1Lに溶解します。
- ・ HRP-Streptavidin : HRP-Streptavidinを洗浄用PBSTで5000倍希釈します。

2-2 操作

- 1) APR標識DNA 90 μlにTE buffer 310 μlを加える。
- 2) 各標準ARP-DNAを1 well当たり60 μlずつ3 wellに添加する (プレート配置図参照)。
- 3) ARP標準DNAを1 well当たり60 μlずつ3 wellに添加する。
- 4) DNA Binding Solution 100 μlをDNAの入ったwellに添加し数回ピペッティングにより攪拌後、室温に一夜放置する。*
- 5) wellの中の溶液を吸引等により除去し、洗浄用PBSTでwellを5回洗浄する。 **

- 6) 希釈HRP-Streptavidin 150 μ lを各wellに添加し、37 $^{\circ}$ C、1時間インキュベートする。
- 7) well中の溶液を吸引等により除去し、洗浄用PBSTでwellを5回洗浄する。 **
- 8) 発色溶液100 μ lを各wellに添加し、37 $^{\circ}$ C、1時間インキュベートする。
- 9) マイクロプレートリーダーにより吸光度を測定する。630 - 670nmの波長フィルターが使用可能である。
- 10) DNA中のAP site数を検量線から算出する。

標準AP-DNA (60 μ l/well) あるいはsample DNA (60 μ l/well) + DNA Binding Solution (100 μ l/well)



- * あらかじめエッペンチューブ中で標準ARP-DNAおよびARP標識DNAとDNA Binding Solutionを3 : 5の体積比で混合調製し、その溶液をwellに各々160 μ l添加することも可能です。
- ** 洗浄後は敷いたペーパータオル上などでプレートを叩いてwell中の洗浄用PBSTを完全に除いて下さい。

IV. 注意事項

1. キットは0 - 5 $^{\circ}$ Cで保存し、凍結させないで下さい。
2. AP-DNAは一般に不安定ですので、測定対象DNAを単離精製後は直ちにARP反応を行ってください。ARP化DNAのTE buffer溶液は0 - 5 $^{\circ}$ Cで1年安定です。

3. Filtration Tubeでの遠心分離後は直ちにTE bufferを添加しDNAを溶解させてください。長時間DNAをメンブラン上で放置しておきますと、DNAのメンブランへの吸着が起これ回収率にバラツキを生じる可能性があります。
4. 線滅菌のチューブはDNAの吸着を生じる可能性がありますので、チューブを使用の際は非滅菌チューブを必要に応じてオートクレーブ滅菌して使用することを推奨します。
5. 630 - 670nmのフィルターをお持ちでない場合は、発色反応後、各wellより50 μ l抜き取り新しいプレートに移します。同量の1 mol/l硫酸を添加後、450nmの吸光度で測定することができます。
6. well洗浄後、残存する洗浄液により測定誤差を生じることがありますので完全に除いてください。

1) 参考文献

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

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit -AP site counting-	5 sample	21,000

ご案内

本キット発売により、従来販売しておりましたARP Kitは販売中止させていただきます。
ご了承下さいますようお願い申し上げます。

コード番号	品名	容量
347-07861	ARP Kit	1プレート

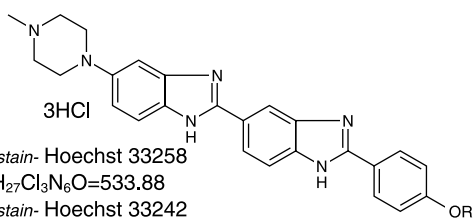
新製品

細胞染色用試薬

核染色蛍光色素

-Cellstain- Hoechst 33258 solution

-Cellstain- Hoechst 33342 solution



特長

DNAにintercalateする試薬であり、生細胞の核も染色できる。

-Cellstain- Hoechst 33258およびHoechst 33342 (以下Hoechst dyeと略す)はDNAにintercalateする蛍光色素です。同じようにDNAにintercalateするPropidium Iodide (PI) Ethidium Bromide (EB) やDAPIは細胞膜透過性がないために、死細胞や固定した細胞しか染色する事ができません。これらのHoechst dyeは容易に細胞内に透過するため、生細胞でも核染色することが可能です。また、DNAの副溝のAT配列に特異的にintercalateするために染色体分析などにも用いることができます。

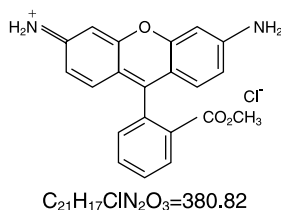
Hoechst dyeは変異原性があり、取り扱いには十分に注意を払わなくてはなりません。そこでHoechst dyeをより安全に取り扱っていただくために水溶液化(1 mg/ml)して、それぞれ-Cellstain- Hoechst 33258 solution、-Cellstain- Hoechst 33342 solutionとして発売いたします。溶液化することにより、秤量時などに起こり得る飛散による実験室内の汚染を防ぎ、使いやすくなりました。

参考文献

- 1) Lydon M. J., Keeler K. D., Thomas D. B., *J. Cell Physiol.* **102**, 175-181 (1980)
- 2) Sriram M., van der Marel G. A., Roelen H. L., van Boom J. H., Wang A. H., *Biochemistry*, **31**, 11823-11834 (1992)

ミトコンドリア染色蛍光色素

-Cellstain- Rh 123



特長

ミトコンドリアを染色し、ATP解析に利用できる。

ミトコンドリアは呼吸および代謝によって細胞にATPを供給する細胞内器官です。最近、呼吸のときの副産物として産生される酸素

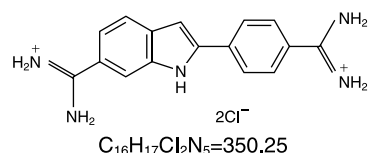
ラジカルが発癌および老化に関与していると言われ、注目されています。Rh 123は生細胞に容易に取り込まれ、ミトコンドリアに局在していることが1980年にJohnsonらにより報告されています。ミトコンドリアの産生するATP量とRh 123の蛍光強度とは相関があり、細胞内のATP定量試薬としても用いられています。

参考文献

- 1) Johnson L. V., Walsh M. L., Chen L. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**, 990-994 (1980)
- 2) Downes C. S., Ord M. J., Mullinger A. M., Collins A. R., Johnson R. T., *Carcinogenesis* **6**, 1343-1352, (1985)

死細胞染色蛍光色素

-Cellstain- DAPI solution



特長

DNAにintercalateし青色の蛍光を示す。

DAPIは正電価を持つ蛍光性色素で、DNAのintercalatorとして知られています。一般的に生細胞の細胞膜を透過しませんが、死細胞になると細胞膜が変化するため透過するようになり、この性質を利用して死細胞染色用の蛍光色素として使用されています。細胞膜を透過したDAPIは、DNAにintercalateすることにより青白色の蛍光を出します。

Hoechst dye (Hoechst 33258およびHoechst 33342)と同じようにintercalatorであるDAPIには変異原性があり、取り扱いには十分な注意が必要となります。しかし、DAPIは純水中で安定性が悪く、長期保存することができませんでした。また、PBSなどの溶液にはDAPIが溶解しにくいという欠点がありました。今回の-Cellstain-DAPI solutionは、均一な溶液であり、長期保存が可能です。このようにDAPIを溶液化(1mg/ml)することにより、秤量時などに起こり得る飛散による実験室内の汚染を防ぎ、使いやすくなりました。

参考文献

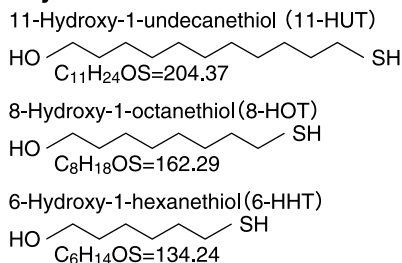
- 1) W. Schnedl, A. -V. Mikelsaar, M. Breitenbach, O. Dann, *Hum. Genet.*, **36**, 167-172 (1977)
- 2) I. Vollenweider, P. Groscurth, *J. Immunol. Methods*, **149**, 133 (1992)
- 3) M. A. Hotz, J. Gong, F. Traganos, Z. Darzynkiwicz, *Cytometry*, **15**, 234-244 (1994)
- 4) N. Poulin, A. Harrison, B. Palcic, *Cytometry*, **16**, 227-235 (1994)
- 5) C. Souchier, M. French, M. Benchaib, R. Catallo, P. A. Bryon, *Cytometry*, **20**, 203-209 (1995)

コード番号	品名	容量	価格(¥)
343-07961	-Cellstain- Hoechst 33258 solution	1ml	2,900
346-07951	-Cellstain- Hoechst 33342 solution	1ml	2,900
349-07941	-Cellstain- Rh 123	1mg	3,300
340-07971	-Cellstain- DAPI solution	1ml	3,800

新製品

Self-Assembled Monolayers (SAMs) 研究用試薬

Hydroxythiols



特長 非特異的吸着の抑制に使用できます

チオール化合物は、金 - イオウ結合によって分子が金表面に固定され、アルキル鎖間同士の相互作用によって、高い配向性を持つ自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayer, SAM) を形成します。

チオール化合物の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、種々のセンサーへの利用が考えられています。センサーを用いて、物質を高感度に検出するためには、SAM形式に用いる物資として、被検出物質と特異的に作用する物質を選択することが重要ですが、被検出物質の非特異的吸着を押さえることも課題となります。特に、生体関連物質を検出するためには、非特異的吸着が問題となります。これを解決するために、ヒドロキシアルカンチオール類を用いた混合SAMが有用であることが報告されています。

末端をチオール化した一本鎖DNAを金基板上に固定化し、表面のプラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance, SPR) を用いるDNAセンサーを作製する場合、チオール化DNAのスペーサー長と同一のアルキル鎖長を持つ6-HHTを加えた混合SAMは、チオール化DNAの単一SAMに比べ、非特異的吸着が起らず、高感度で目的のDNAが検出できることが報告されています¹⁾。

ピオチンを末端官能基に結合させたSAMを作製し、ストレプトアビジンの結合・脱離をSPRにより調べています。ピオチン化チオール化合物のスペーサー長とほぼ同一のアルキル鎖を持つ11-HUTを加えた混合SAMでは、ピオチン化チオール化合物の単一SAMに比べ、配向したSAMが形成され、ストレプトアビジンの非特異的吸着が起らないことが観察されています²⁾。

金修飾シリカゲル上に、種々のチオール類のSAMを形成させ、ペプチド分解酵素であるズブチリシンBPN'の吸着挙動を調べたところ、11-HUTのSAMは、未修飾の金シリカゲルに比べ、14分の1の吸着量であり、11-HUTが金表面へのタンパク質の非特異吸着を抑制する作用を持つことが報告されています³⁾。

今回、アルキル鎖が11, 8及び6のヒドロキシアルカンチオ

ールを発売することとなりました。

また、弊社では、固体基板への吸着部位としてチオールを有し、末端官能基としてアミノ基を有するアミノアルカンチオール塩酸塩 (アルキル鎖11, 8, 6) と、カルボキシル基を有するカルボキシアルカンチオール (アルキル鎖10, 7, 5) を既に発売しております。

参考文献

- 1) T. H. Herne, M. J. Tarlov, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 8916 (1997)
- 2) V. H. Perez-Luna, M. J. O'Brien, K. A. Opperman, P. D. Hampton, G. P. Lopez, L. A. Klumb, P. S. Stayton, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6469 (1999)
- 3) T. B. Dubrovsky, Z. Hou, P. Stroeve, N. L. Abbott, *Anal. Chem.*, **71**, 327 (1999)

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	11-Hydroxy-1 undecanethiol	10mg	11,000
		100mg	30,000
Request	8-Hydroxy-1-octanethiol	10mg	11,000
		100mg	30,000
Request	6-Hydroxy-1-hexanethiol	10mg	11,000
		100mg	30,000

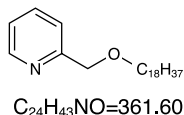
関連商品

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	11-Amino-1-undecanethiol, hydrochloride		
Request	8-Amino-1-octanethiol, hydrochloride		
Request	6-Amino-1-hexanethiol, hydrochloride		
	(上記三品目)	10mg	12,800
		100mg	38,500
Request	11-Ferrocenyl-1-undecanethiol		
Request	8-Ferrocenyl-1-octanethiol		
Request	6-Ferrocenyl-1-hexanethiol		
	(上記三品目)	10mg	11,500
		100mg	34,000
Request	10-Carboxy-1-decanethiol		
Request	7-Carboxy-1-heptanethiol		
Request	5-Carboxy-1-pentanethiol		
	(上記三品目)	10mg	11,000
		100mg	30,000

新製品

銀イオノフォア

Octadecyloxymethylpyridine



特長

銀イオンに対し極めて高い選択性を示します。

優れた特性をもつ遷移金属イオノフォア分子の開発が多くの研究機関で進められています。慶応義塾大学の鈴木先生のグループではピリジンおよびキノリン環を有する非環状化合物の中で銀イオンに対して極めて高い選択性を有する、Octadecyloxymethylpyridine (Ag ionophore) を開発しました。

この化合物3wt%に対し、K-TCPB 20mol%、膜溶媒としてBis (1-butylpentyl) adipate (BBPA) 67.9%、及びPVC29.1%で電極膜を作成し、セル構成として、Ag ; AgCl, KCl (satd) 0.3mol/l NH₄NO₃ sample solution membrane 10⁻³mol/l AgNO₃, AgCl ; Agでそのイオン選択性を検討した結果を図に示します。このイオノフォアは、優れた銀イオン選択性を示し、アルカリ及びアルカリ土類金属イオンに対しては殆ど応答しません。10⁻⁵ ~ 10⁻⁹mol/lの範囲で銀イオンに対して良好なネルンスト応答を示します。この研究の結果から酸素原子とピリジン環の窒素原子の両方が銀イオンの配位サイトとして有効であることがわかりました。

この銀イオン選択性電極は、これまでに報告されたものの中で最も優れたものであり、今後の応用に期待が持たれます。

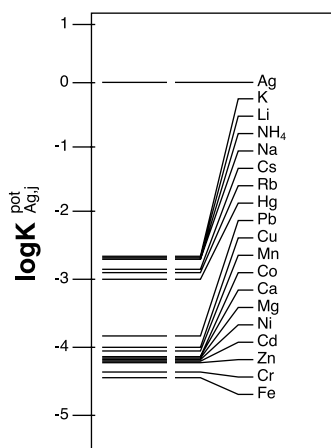


Figure. Octadecyloxymethylpyridine (Ag ionophore) のイオン選択性

参考文献

上満、熊倉、Dwi、久本、鈴木、日本化学会第69回春季年会講演予稿集 I、2C216.

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	Octadecyloxymethylpyridine	10mg	19,000

新製品

(株)ユマト抗体研究所新製品

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。

Anti Pentosidine monoclonal antibody (Clone No. PEN-12)

AGE構造体の一つであるpentosidineは、ヒトの脳硬膜コラーゲン中の蛍光物質から単離された構造体で、リジンとアルギニン残基が五炭糖を介して、イミダゾピリジニウム環を有する架橋を形成した化合物であります。生体内のpentosidine量に関しては、血漿や皮膚のコラーゲン中での糖尿病での上昇や、腎不全症例での高値が報告されております。

本抗体はpentosidineを特異的に認識するマウスモノクローナル抗体で、組織染色等により、生体内のpentosidineに関する解析に有用です。

内容量：50 µg (200 µl)

形状：凍結溶液 (0.1%proclin含有ブロックエース (安定化蛋白))

取り扱い条件：-20 以下冷凍 (安定性：6ヶ月)

Anti CML monoclonal antibody (Clone No. CMS-10)

CMLは1986年Baynesらによってグルコース由来アマドリ化合物の酸化的分解物として同定されたAGEの主要構造体の一つで、生体内での存在に関して最も研究されている化合物であります。

本抗体はCMLを特異的に認識するマウスモノクローナル抗体で、組織染色やELISA等により、生体内CMLの解析に有用です。

内容量：50 µg (200 µl)

形状：凍結溶液 (0.1%proclin含有ブロックエース (安定化蛋白))

取り扱い条件：-20 以下冷凍 (安定性：6ヶ月)

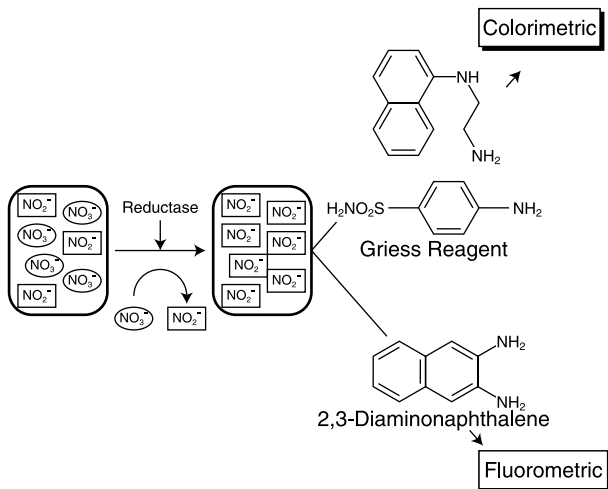
コード番号	品名	容量	価格(¥)
KH012	Anti Pentosidine monoclonal antibody (clone No.PEN-12)	50 µg	55,000
KH011	Anti CML monoclonal antibody (clone No.CMS-10)	50 µg	55,000
KH010	Anti pyrrolidine monoclonal antibody (clone No.H12)	20 µg	55,000
KH001	Anti AGE monoclonal antibody (clone No.6D12)	10 µg	55,000
KH002	Anti AGE monoclonal antibody Fab' Peroxidase conjugated	20 µg	70,000
KY008	Anti S19 Ribosomal Protein polyclonal antibody	100 µg	45,000
KA009	Anti Metallothionein monoclonal antibody (clone No.1A12)	100 µg	45,000

新製品

NO₂/NO₃ Assay Kit-C II (Colorimetric), -F II (Fluorometric)

今回発売するNO₂/NO₃ Assay Kit-C II,-F IIは、現在弊社より販売しているNO₂/NO₃ Assay Kit-C, Fの改良タイプです。酵素・補酵素に工夫を凝らし、血清や培地をそのまま測定試料として用いても酵素反応に対する阻害はほとんど見られなくなりました。試料の希釈といった作業は必要なくなり前処理も簡素化され、また希釈することで測定範囲を外れたりする、といったことも無くなりました。

近年、一酸化窒素(NO)が情報伝達物質として多くの生理的現象に関与していることが明らかとなり、NOに関する研究が盛んに行われています。現在、血清中や尿中の・NOの量を測定する方法としては、・NOの代謝物であるNO₂⁻やNO₃⁻を検出する方法が一般的になっています。この方法は、NO₂⁻の定量法として良く知られているGriess法やDiaminonaphthalene法を用いて、還元酵素等によりNO₃⁻をNO₂⁻に還元してNO₂⁻の総量を定量するという方法(下図)で、NO₃⁻とNO₂⁻のアッセイキットとして数社から市販されています。



しかし、現在市販されているアッセイキットの場合、血清や血漿、あるいは培地を測定試料として用いる際、試料を半分、もしくは1/3程度に希釈しなければ血中や培地中の成分により酵素反応に阻害が見られ、そのまま測定試料に用いることができませんでした。

NO₂/NO₃ Assay Kit-C IIは10~100 μmol/l、F IIは1~10 μmol/lの濃度範囲の測定に適しています。

【キット内容】

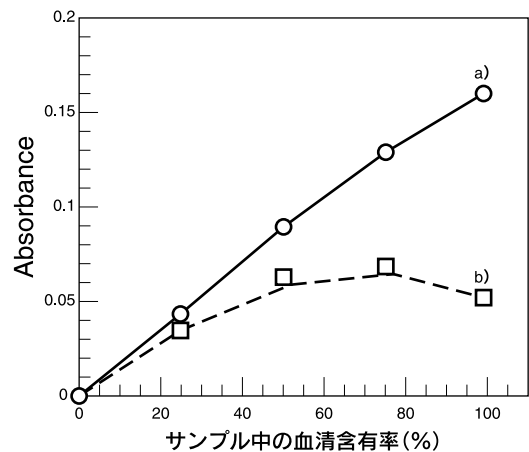
NO₂/NO₃ Assay Kit-C II

- 1) NaNO₂標準溶液
- 2) NaNO₃標準溶液
- 3) 緩衝溶液
- 4) 還元酵素

- 5) 補酵素
- 6) 試薬A
- 7) 試薬B

NO₂/NO₃ Assay Kit-F II

- 1) NaNO₂標準溶液
- 2) NaNO₃標準溶液
- 3) 緩衝溶液
- 4) 還元酵素
- 5) 補酵素
- 6) 試薬溶液
- 7) NaOH溶液



- a) 弊社 NO₂/NO₃ Assay Kit-C II
 b) C社 キット (LDH法)

図・ラット血清を用いた希釈直線性試験

弊社kit-C IIと他社のアッセイキットを用いてラット血清中のNitriteとNitrateを検出し比較した。

コード番号	品名	容量	価格(¥)
344-07991	NO ₂ /NO ₃ Assay Kit-C II (Colorimetric)	100回用	24,800
347-07981	NO ₂ /NO ₃ Assay Kit-F II (Fluorometric)	100回用	23,000

第10回フォーラム・イン・ドージン開催報告

「生体と酸化還元」

日時：1999年11月8日 9:30 - 17:30

場所：熊本市国際交流会館

1990年にスタートしたフォーラム・イン・ドージンも早いもので今回で第10回目を迎えました。この10年を振り返り、少しはその趣旨である社会への貢献、熊本から全国への情報発信が達成されたかと自負していますが、これもひとえに、第1回よりこれまで指導されてこられた熊本大学医学部の前田浩教授、山本哲郎教授のお力添えによるものであります。今回も両先生にお世話いただき、「生体と酸化還元」というテーマで、11月8日、秋も深まりつつある熊本市の国際交流会館で開催することができました。参加者は90名足らずと幾分小規模ではありましたが、その分、講演・討論にも充分時間をとることができ、内容的にはかなり充実したものではなかったかと思っております。

さて今回のテーマである酸化還元は、生命現象を司る最も基本的な機構として位置付けることができ、その機能を担う化学種の役割や疾病との関連など、解明すべき点は非常に多いと考えられます。フォーラムでは、酸化還元がどのように生命現象と関わっているか、そこにはどのような役者が存在しているのか、また種々の疾病を酸化還元という視点で理解するとどうなるのか、などについてそれぞれの分野で活躍されている先生方に講演していただきました。

主催者を代表して弊社・上野社長の挨拶、前田教授からの本フォーラムの意図するところの説明の後、午前のセッションに入り、三浦洸先生（熊本大・医）の司会で、志賀潔先生（熊本大・医）による「酸化還元酵素の分子酵素化学」の講演が行われました。講演では、生体内酸化還元を中心に位置するフラビン酵素の反応における酵素とリガンドから成るスタッキング構造の重要性について述べられました。酸化還元と言ういわゆる電子の授受を、それに関わる分子の軌道から説明され、基調講演としてふさわしいものでした。

2席目は、野口正人先生（久留米大・医）による「ヘムオキシゲナーゼによるヘム分解機構」についての講演でした。最近話題となっているヘムオキシゲナーゼが関与するヘム代謝の前半のビリベルジンに至るまでの分子機構について解明されています。

3席目の講演は、増谷弘先生（京都大・ウイルス研）の「細胞機能のレドックス制御メカニズム」で、酸化還元による制御機構で重要な役割を果たしているチオレドキシンの細胞内情報

伝達や細胞死との関連性について最新の実験結果をもとに紹介されました。

午後のセッションは前田教授の司会で、酸化ストレスが生体に及ぼす影響やそれに対する生体のレスポンスに焦点をあてた4題の講演が行われました。渡邊正己先生（長崎大・薬）は、「放射線による癌と突然変異の原因となる長寿命ラジカル」と題し、放射線による遺伝子損傷はこれまで考えられてきた短寿命で反応性の高いOH/Hラジカルによるものだけではなく、別のラジカル種によるプロセスの可能性もあることを実験事実をもとに紹介されました。むしろこの長寿命ラジカルが、遺伝子の突然変異 発癌にいたる主な原因であるといった従来の常識とは異なった斬新なアイデアを提唱されました。

午後2席目の山口登喜夫先生（東京医科歯科大・難治研）による「酸化ストレスと生体防御機構」では、抗酸化物質としてのビリルビンの生体内での役割や、酸化ストレスマーカーとしてのビリルビン代謝物（biopyrrin）の測定の意義について述べられました。酸化ストレスの度合を事前にチェックすることで、それによって引き起こされる疾病の予防に役立つことが期待されます。

次に、葛西宏先生（産業医科大・産業生態科学研）による「酸化ストレスと遺伝子変異」の講演では、活性酸素によるDNA酸化損傷の主生成物である8-ヒドロキシグアニンと、さらには、アデニンが酸化された生成物（2-OH-dATP）とが誘発する遺伝子変異についての興味ある報告がなされました。

最後に、赤池孝章先生（熊本大・医）が「酸化ストレスによるウイルス変異」と題し、ウイルス感染状態において産生されるパーオキシナイトライトがウイルス遺伝子の変異とどう関わっているかについての最新の知見を報告されました。

最後にフォーラムの締めくくりとして、山本教授によって本フォーラムのテーマである酸化還元の生体内での意義、全体像、その中で各講演の位置付けなどが総括され、本フォーラム関係者への謝辞さらに今後への期待を述べられて閉会しました。

このように記念すべき第10回のフォーラムも盛会のうちに幕を閉じました。ご講演いただきました演者の先生方に深く感謝いたします。なお、本フォーラムの要旨集の残部が若干ございますので、ご希望のかたは弊社マーケティング部までご連絡下さい。

ホームページアドレス

URL : <http://www.dojindo.co.jp/>
E-mail : info@dojindo.co.jp

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