

DOJIN NEWS

ドージンニュース

Review

蛋白 - 核酸・蛋白 - 蛋白相互作用接点同定の革新的方法

石浜 明

Topics on Chemistry

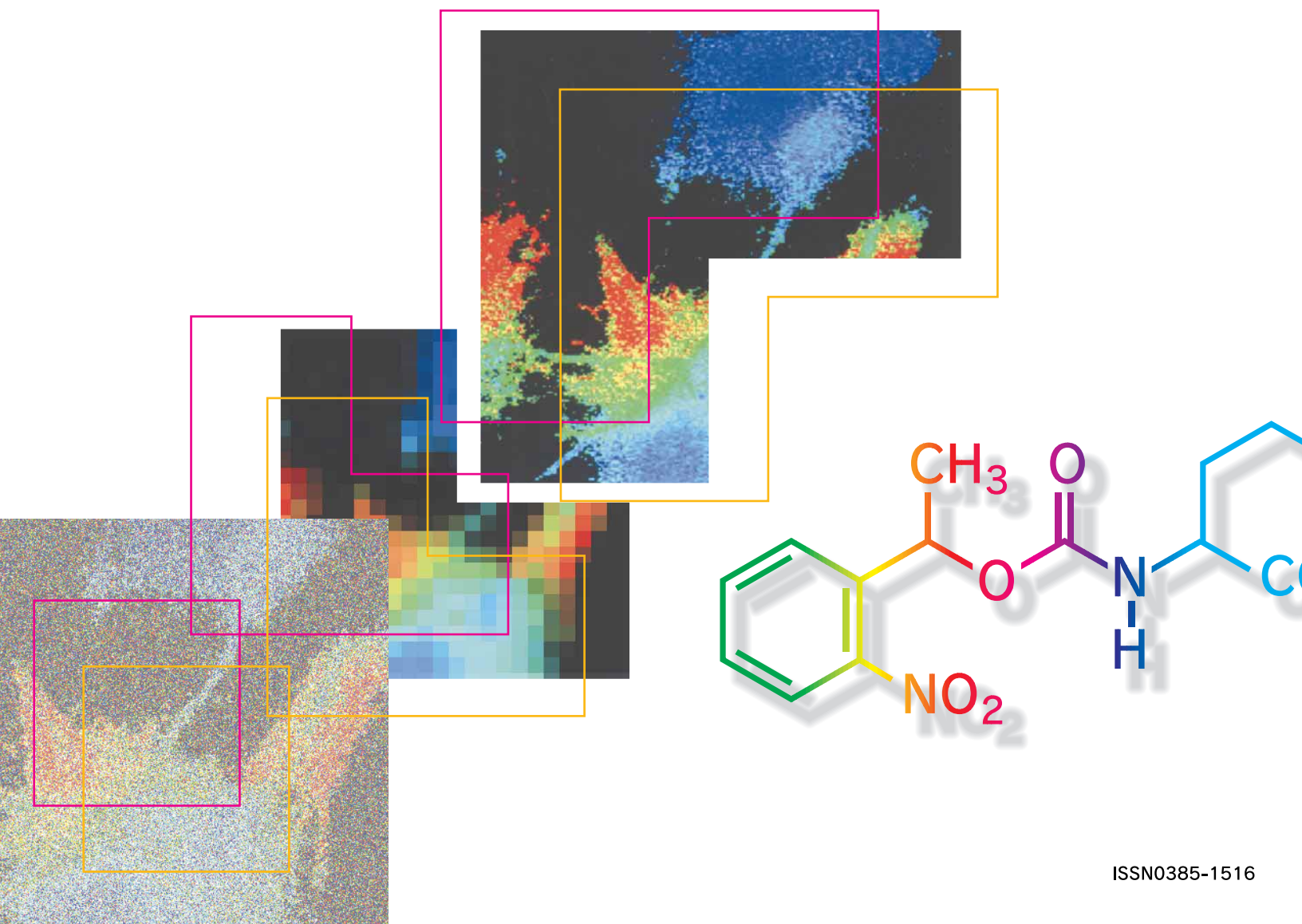
タンパク質を正しく折りたたむ試薬

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

- 蛋白 - 核酸・蛋白 - 蛋白相互作用接点同定の革新的方法
 国立遺伝学研究所 石浜 明..... 3
- 実用的蛍光誘導体化4
 福岡大学薬学部 山口 正俊、能田 均..... 6

Topics on Chemistry

- タンパク質を正しく折りたたむ試薬..... 8

Commercial

Q & A

- Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit
 -AP Site Counting- 11

新製品案内

- 生体高分子機能解析用試薬..... 5
- 株式会社クマモト抗体研究所製品..... 9
- Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit
 -AP Site Counting-.....10
- 細胞染色用試薬.....12
- Self-Assembled Monolayers(SAMs)研究用試薬..... 13
- 近日発売予定
- タンパク質定量キット.....13

お知らせ

- 総合カタログのご案内..... 14

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..... 5
- 株式会社クマモト抗体研究所製品..... 9
- 細胞染色用試薬.....12
- Self-Assembled Monolayers(SAMs)研究用試薬13



熊本城.....周囲が12kmにも及ぶ建物は青々とした楠に覆われ、桜咲きほこる春から新緑が萌え出す初夏にかけて、一層の美しさを誇ります。

蛋白 - 核酸・蛋白 - 蛋白相互作用接点同定の革新的方法 FeBABE (Fe · p-bromoacetamidobenzyl EDTA) の利用



石 浜 明
(Akira ISHIHAMA)
国立遺伝学研究所

Summary

Iron (S)-1-(p-bromoacetamidobenzyl) ethylenediaminetetraacetate (FeBABE) can be conjugated to protein Cys residues, and introduces the contact-dependent cleavage of nucleic acids and proteins in the presence of hydrogen peroxide and ascorbate. The sequence-non-specific cleavage activity of nucleic acids and proteins by FeBABE can be used for mapping the contact sites of protein-protein and protein-nucleic acids (DNA and RNA) By using 2-iminothiolane (2-IT) as a linker, FeBABE can also be conjugated to protein Lys residues. The protein-tethered chemical probe with nuclease and protease activities has been employed for mapping of molecular interactions within transcription apparatus and translation machinery.

キーワード : Chemical nuclease; Chemical protease; FeBABE; FeEDTA; protein-protein contact site; Protein-nucleic acid contact site.

1. はじめに

20世紀、特に後半期は、分子のレベルで生命現象の解析が進んだ画期的時代となった。ゲノムプロジェクトが進んだ、1980年代からは、個別分子反応から、分子集団が織りなす複合現象、高次生命現象が次の標的となってきた。21世紀は、分子集団の構造・機能を解析する研究が主流となる。研究発展のひとつの鍵は、分子集合体の構造決定に掛かっている。現代科学では、技術の進歩が、研究進展に直結し、技術革新が研究の主要な動因となる。本稿では、分子集合体の成分分子間接点同定に関して、我々も参加して最近開発した新規の方法を紹介したい。

2. 遺伝情報伝達機構の研究

20世紀、分子生物学の方法が生命科学で最も威力を発揮したのは、ゲノムの複製、遺伝子の発現における情報伝達機構の解明である。これらの過程はいずれも、多数の要素の集合体で行われる生体反応の典型である。複製装置、転写装置、翻訳装置は、いずれも多数の蛋白成分から構成され、ゲノムDNAや、その転写産物のRNAとの相互作用が、情報伝達の基盤となる。これまでに、

遺伝情報伝達に関わる巨大分子集合体の構成成分については、ほぼ全体像が解明された。研究の焦点は、構成成分の集合様式、成分間の接点の同定、成分間の相互作用による成分素機能の変化、集合体形成に伴う新機能の発現などに移行して来た。

転写装置は、RNA合成分子機械であるRNAポリメラーゼを基幹成分として、それに加えて発現を必要としている遺伝子を認識しRNA合成分子機械をそこに運搬する転写因子群からなっている(図1)。RNAポリメラーゼに作用する転写因子は、大腸菌などの細菌でも100 - 200種類、酵母では数百種類にもなり、ヒトを含めた動物細胞では1000種類を越えるまで想像されている。転写因子は、RNAポリメラーゼの表層のさまざまな領域に接触し、それに応じて転写装置は、ゲノムの多数の遺伝子のどれかに誘導されて転写を行う。例えば、大腸菌では、2段階の転写因子との相互作用で、RNAポリメラーゼの遺伝子選択能の変換が起きることが知られている(図2)^{1,2)}。その結果、大腸菌ゲノムの4,000遺伝子のどれが発現されるかが決定される。

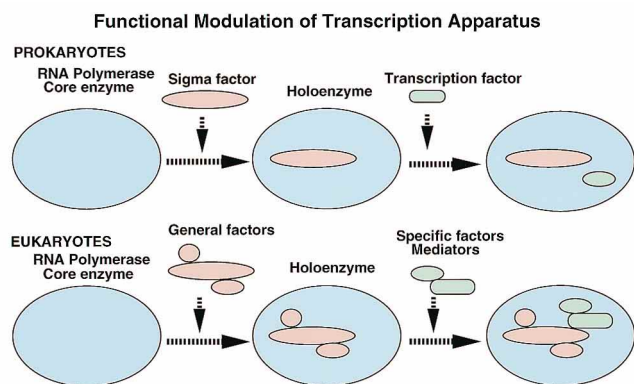


図1. 転写装置の機能分化
RNAポリメラーゼは、RNA合成の分子機械である。転写をする遺伝子の選択は、転写因子でなされる。転写因子との相互作用で、遺伝子選択性の異なる様々な転写装置へと分化する。

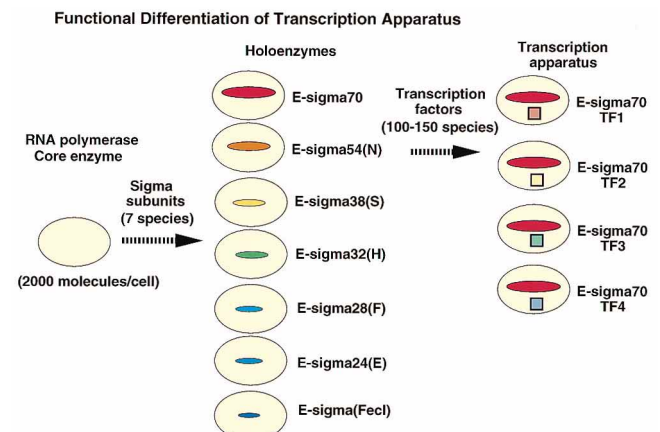


図2. 大腸菌転写装置の特異性分化
3種類のサブユニットからなる。構造の大腸菌RNAポリメラーゼ酵素は、7種類のシグマサブユニットのどれかを結合してホロ酵素となり、その上、転写因子との相互作用でさらに特異性の分化が起きる。

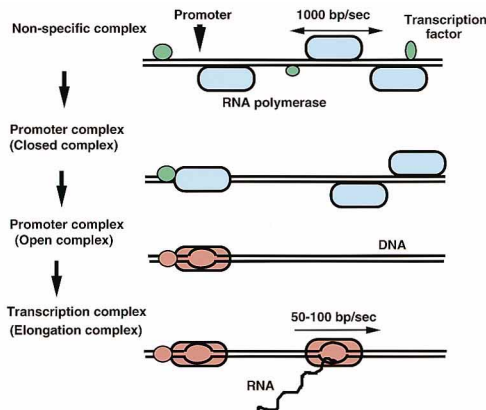


図3．転写機構
RNAポリメラーゼは、転写因子との相互作用で転写をする遺伝子を選択し転写を行う。転写因子は、転写開始点プロモーターの認識を援助し、さらには、RNA合成の開始を促進する。

3．DNA上の転写装置接点同定法

転写装置は、遺伝子プロモーターを識別結合し、そこから転写を開始する(図3)。RNAポリメラーゼはまず、ゲノムDNAに非特異的に結合した後、DNA上をスライドして移動し、やがてプロモーターに行き着くと、そこに定着する。時には、さらに転写因子がそこに会合し、プロモーターDNAを局所的に開裂し、一本鎖DNAがRNAに転写される。こうした転写装置のDNA上での結合部位を、簡便に同定する方法としては、デオキシリボヌクレアーゼによる分解消化から免れる部位を分析する、いわゆる「DNAフットプリント法」が広く利用されている。酵素の代わりに、DNA切断活性、DNA塩基修飾活性をもつ、化学試薬やラジカルを利用するDNAフットプリント法もいくつか開発され利用されている。

しかし、多数の蛋白因子がDNAに結合している場合には、それぞれの蛋白がDNAのどの部分に結合しているかを決めるのは簡単ではない。また、蛋白質のどの部分が直接DNAと接触しているかを解析することは、これまででは、不可能ではないにしても、大変困難な作業であった。ところが、FeEDTAを蛋白質の特定部位に結合する方法が開発されたので、これを利用して、蛋白複合体の各成分、さらには、それぞれの蛋白成分の各領域が接触するDNA部位が直接に同定できる可能性が生まれてきた。

4．FeBABEの開発

EDTAは、Fe³⁺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。蛋白質の特定部位にFeEDTAを結合し、その周辺の接触する蛋白質や核酸を同定し、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¹¹¹In³⁺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た³⁾。最近になって、Fe³⁺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、アミノ酸配列や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^{4),5)}、その有用性が認められたことで、その効率的合成法が開発された⁶⁾。

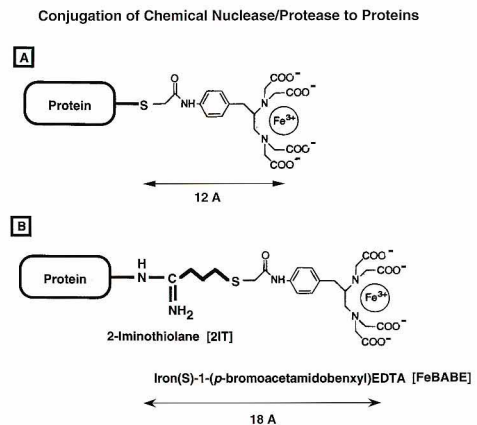


図4．蛋白質へのFeBABEの結合
FeBABEは、FeEDTAを蛋白質に結合する目的で開発され、主としてシステイン残基に結合する(A)。FeBABEと同時に、2ITを併用すると、2ITを介して、リジン残基にも結合し利用範囲が拡大する。

蛋白結合性のEDTA化合物は一般にMeares試薬と呼ばれる。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する(図4)。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、Fe³⁺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る(図5)。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分程度の短時間で良い。FeBABEの分子構造から推定して、蛋白質システイン残基から12Åの位置にFeイオンが配置されるので、切断がおきるのはその周辺に限られる。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る。Fe-BABEの利点としては、(i) ペプチドや蛋白へ温和な条件で結合できること、(ii) 温和な条件で開裂反応を行えること、(iii) 開裂反応が速く高収率であること、(iv) 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、などが挙げられる。

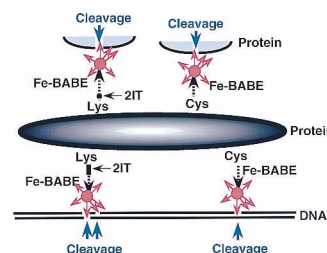


図5．FeBABEによる核酸・蛋白質の切断
過酸化水素とアスコルビン酸存在下で、FeBABEからラジカルが発生し、周辺の核酸や蛋白質の切断が起きる。切断点の分析で、接触点を推定できる。

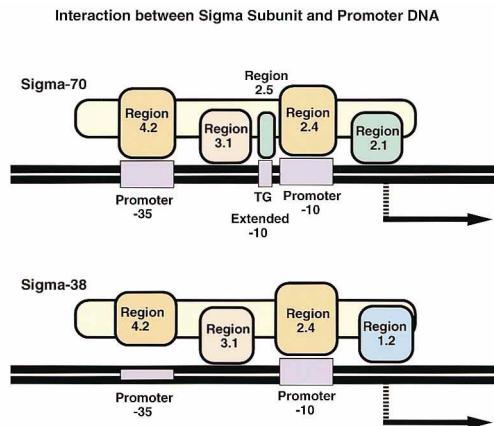


図6 . FeBABEを利用したシグマサブユニットプロモーター相互作用接点の同定

大腸菌RNAポリメラーゼシグマサブユニット各部位にFeBABEを導入し、プロモーターに結合させた。DNA切断点を分析から、接触部位が推定された。

5 . 蛋白質のDNA接点の同定へのFeBABEの利用

蛋白質に結合したFeBABEを利用して、核酸切断部位から、その蛋白質のDNAやRNA上の結合領域を同定できることが予想された。我々は、RNAポリメラーゼの遺伝子プロモーターの結合域の同定に成功し^{7)・11)}、Nollerらはリボゾーム蛋白質のrRNA結合点の同定に成功した^{12)・14)}。

大腸菌RNAポリメラーゼは、4種のサブユニットから構成されている(図6)²⁾。この内、シグマサブユニットは、転写プロモーター認識に関わる成分であるが、RNA合成には必要ないばかりか、転写開始と共に、酵素本体(コア酵素)から遊離し、転写をしていないコア酵素に結合し転写開始に再利用される。大腸菌では、7種類のシグマサブユニットが存在し、それぞれは、異なる遺伝子集団の転写を担当している。さて、転写開始に最も重要な役割をしているシグマサブユニットがそれぞれどのようなDNA塩基配列を識別し、その過程には、蛋白質のどの領域が関与しているかを決定することは、転写制御機構解明のひとつの鍵である。そこで我々は、各種シグマサブユニットの様々な領域に1ヶ所だけシステイン残基をもつ変異体を多数作製し、これらを発現して純化した蛋白質にFeBABEを結合した。これらのコレクションを用いて得られた、DNA切断点の解析から、それぞれの接点を同定した^{9)・11)}。その結果、シグマサブユニット蛋白質群に共通の4個所のドメインが、それぞれにDNAの異なる部位の認識結合に寄与していることが判明した(図6)。

一方、大腸菌RNAポリメラーゼ・アルファサブユニットのC端ドメインは、クラスI転写因子や、DNAエンハンサー(UPエレメント)との相互作用に関与し、転写調節に重要な役割を果たしていることが、主として遺伝解析から予想されていた。リボゾームRNA遺伝子のUPエレメントへの結合を実証する目的で、アルファサブユニットのC端ドメインにFeBABEを結合して解析したところ、見事にUPエレメントとの接触が同定された(図6)。その上、2分子のアルファサブユニットのうち、

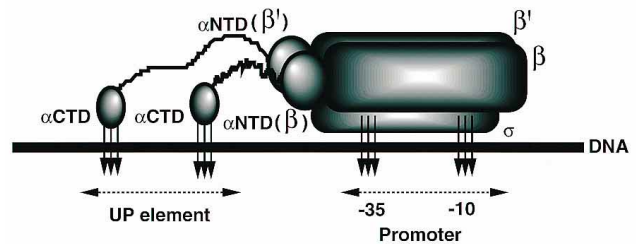


図7 . FeBABEを利用したアルファサブユニットエンハンサー相互作用接点の同定

大腸菌RNAポリメラーゼシグマサブユニット各位にFeBABEを導入し、プロモーターに結合させた。DNA切断点を分析から、エンハンサーとの直接接触が実証され、また接触部位が推定された。

ベータサブユニットに結合するアルファサブユニットがプロモーター寄りには、ベータプライム・サブユニットに結合するアルファがより遠くに結合することまで判明した。また、アルファサブユニットのC端ドメインは、プロモーター上流域のDNAに結合した転写因子一群とも相互作用をするが、転写因子の結合位置に応じて、アルファサブユニットが移動するので、確かに蛋白質間の相互作用が実証された⁸⁾。

6 . 蛋白 - 蛋白相互作用接点同定へのFeBABEの利用

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る(図7)。FeEDTAのこの反応性を利用して、システイン残基に結合したところ、その周辺の接触相手の蛋白質を切断する活性を示した。蛋白質の各部位にFeBABEを結合して系統的に解析すれば、蛋白質の三次元構造に関する情報までも得ることができる。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反応によるものと考えられている¹⁵⁾、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る¹⁶⁾。この方法を用いて、RNAポリメラーゼのサブユニット集合に最も重要な役割を果たす、アルファサブユニットのN端ドメインにFeBABEを結合し、それと接触する蛋白成分の同定を試みた¹⁷⁾。その結果、切断の多くは、同一分子内でおこったが、接触する相手のアルファサブユニットを切断する場合も観測された。

細菌には、一般に多数のシグマサブユニットがあり、RNAポリメラーゼはシグマサブユニットを交換することで、転写をする遺伝子の選択を変えている(図2)。大腸菌の7種類のシグマサブユニット間では、RNAポリメラーゼコア酵素への結合力が異なる。多数のシグマサブユニットは、コア酵素のどこに結合しているかを解析する目的で、各種シグマサブユニットについて、システインをひとつだけもつ変異体コレクションが構築され、それぞれにFeBABEを結合し、コア酵素に結合し、コアサブユニット上の切断点が決定的された。ベータサブユニット上に2箇所、ベータプライム・サブユニット上に1箇所の接点が決定的された¹⁸⁾。

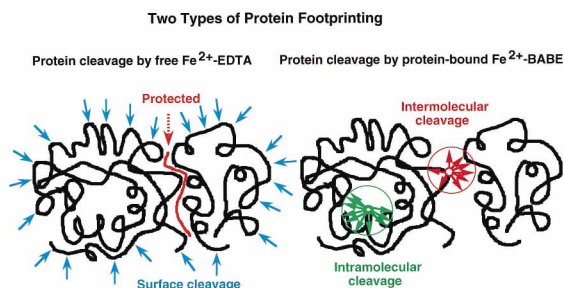


図8 . FeBABEを利用した蛋白質間相互作用接点の同定

FeEDTAは、従来、蛋白質の表面に露出している領域を推定するのに利用されてきた。FeBABEを蛋白質の各部に結合させ、接触蛋白の切断点を分析すると、分子内部の接触部位、分子間の接触部位が推定できる。

7 . 蛋白質リジン残基へのFeBABEを結合

当初提案されたFeBABEの使用法は、蛋白質のシステイン残基に直接結合させるものであった。しかし、この場合には、システイン1残基をもつ目的蛋白のさまざまな領域にもつ、多数の変異体の構築が必要である。そこでこの手間を掛けない使用法が提案された。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を結合する方法である¹⁹⁾(図4)。一般に蛋白質の表面には、多数のリジン残基が露出している。従って、平均一分子のFeBABEを結合するためには、FeBABEと蛋白質の混合比を調節する必要がある。この方法を用いて、多数の転写因子の大腸菌RNAポリメラーゼ上の接点の同定が進められている¹⁹⁾。この新規の応用法の開発に依って、FeBABEの利用範囲はさらに拡大した。

8 . おわりに

転写装置などのように、多成分が集合した生体の機能的構造体の蛋白成分間のネットワークや、装置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、FeBABEは大変有効であることが実証された。論文公表と共に、殺到した需要に応えるために、最近市販され始めた。今後広く利用されるであろう。

なお、FeBABEの開発と利用の詳細については文献²⁰⁾を参考にしたい。

参考文献

- 1) Ishihama, A.: Promoter selectivity control of RNA polymerase. *Nucleic Acids & Molecular Biology*, Vol. 11, *Mechanism of Transcription*, Eds. F. Eckstein and D. M. J. Lilley, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 53-70, 1997.
- 2) Ishihama, A.: Promoter selectivity of prokaryotic RNA polymerases. *Trends in Genet.* **4**, 282-286 (1988)
- 3) L. H. DeRiemer and C. F. Meares. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **18**, 1517 (1981)
- 4) T. M. Rana, and C. F. Meares, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 2457 (1990)

- 5) T. M. Rana, and C. F. Meares. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10578 (1991)
- 6) D. P. Greiner, R. Miyake, J. K. Moran, A. D. Jones, T. Negishi, A. Ishihama, and C. F. Meares. *Bioconjugate Chem.*, **8**, 44 (1997)
- 7) K. Murakami, M. Kimura, J. T. Owens, C. F. Meares, and A. Ishihama. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1709 (1997)
- 8) 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)
- 9) J. T. Owens, A. J. Chmura, K. Murakami, N. Fujita, A. Ishihama, and C. F. Meares. *Biochemistry*, **37**, 7670 (1998)
- 10) 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)
- 11) F. Colland, N. Fujita, D. Kotlarz, J. A. Bown, C. F. Meares, A. Ishihama, and A. Kolb. *EMBO J.* **18**, 4049 (1999)
- 12) G. M. Heilek, R. Marusak, C. F. Meares, and H. F. Noller. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1113 (1995)
- 13) G. M. Heilek, and H. F. Noller. *Science*, **272**, 1659 (1996)
- 14) K. R. Lieberman, and H. F. Noller, *J. Mol. Biol.* **284**, 1367 (1998)
- 15) J. B. Ghaim, D. P. Greiner, C. F. Meares, and R. B. Gennis. *Biochemistry*, **34**, 11311 (1995)
- 16) E. Platis, M. R. Ermacora, and R. O. Fox. *Biochemistry*, **32**, 12761 (1993)
- 17) R. Miyake, K. Murakami, J. T. Owens, D. P. Greiner, O. N. Ozoline, A. Ishihama, and C. F. Meares. *Biochemistry*, **37**, 1344 (1998)
- 18) 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)
- 19) S. L. Traviglia, S. A. Datwyler, D. Yan, A. Ishihama, and C. F. Meares. *Biochemistry*, **38**, 15744 (1999)
- 20) A. Ishihama, *Chem. Commun.*, **13**, 2000, in press.

著者紹介

氏名 石浜 明 (Akira ISHIHAMA)

国立遺伝学研究所

分子遺伝研究部門・教授

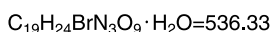
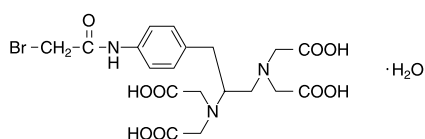
連絡先 〒411-0801 静岡県三島市谷田1111

Tel : 0559-81-6741, Fax : 0559-81-6746

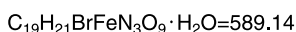
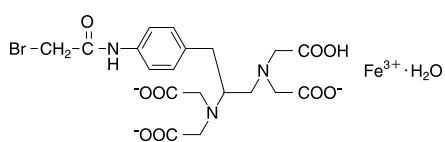
新製品

生体高分子機能解析用試薬

BABE



FeBABE



特徴

- 1) ペプチドや蛋白へ温和な条件で結合できる
- 2) 温和な条件で開裂反応を行える
- 3) 開裂反応が速く、高収率である
- 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

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部位に放射性 $^{111}\text{In}^{3+}$ を結合させ、抗腫瘍性抗生物質であるプレオマイシン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、薬理学的・臨床的な利用が計られてきました。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、その有用性が認められたことで効率的合成法が開発されました。

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分程度の短時間で進行し、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ため、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、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できます。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、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。

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たことによって、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ⅠとⅡの接点の同定、大腸菌RNAポリメラーゼのサブユニット間の接点の同定などがあります。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や、リボゾーム蛋白質のRNA結合点の同定などがあります。

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、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は凍結乾燥品と溶液タイプを用意いたしました。凍結乾燥品は水、緩衝液、DMSOなどで溶解して御使用ください。溶液タイプは蛋白への結合に必要な塩基を調製してありますのですぐに用いることができます。

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	BABE	10mg	29,000
Request	FeBABE	1mg	12,000
Request	FeBABE solution	50 μ l (20mmol/l)	13,500

実用的蛍光誘導体化

4

福岡大学薬学部

山口政俊・能田 均

4 カルボン酸類の蛍光誘導体化

生体、食品、環境中には、種々の脂肪酸、 α -ケト酸、シアル酸、アスコルビン酸などのカルボン酸類が微量で存在し、重要な生理的役割を担っている。これらカルボン酸は、そのままではHPLC分離や検出が困難であるため、分析には誘導体化が必要である。本稿では脂肪酸について、次回にその他のカルボン酸について述べる。

4.1. カルボン酸用ラベル化試薬とその特性 (図1 及び 2)

(1) 現在開発されている試薬のほとんどがプレラベル化用である。これらは、発蛍光体とカルボキシル基との反応活性基から構成されている(図1)。活性基として(A)プロモメチル(プロモアセチル)基、(B)ジアゾメチル基、(C)アミノ基、(D)ヒドラジノ基などがある。

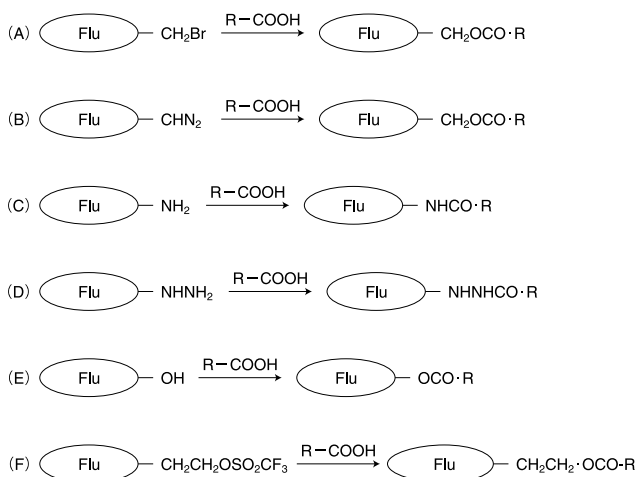


図1. Fluorescence labeling reagents for carboxylic acids.

(A)に属する試薬(図2、a~k)は、一般に、アセトンやアセトニトリル中、触媒(カリウムイオンと18-クラウン-6)の存在で、比較的高温で反応する。これらの試薬の中で最も高感度な試薬の一つとして、3-プロモメチル-6,7-ジメトキシ-1-メチルキノキサリン-2(1*H*)-オン(Br-DMEQ : a)(検出限界、数百amol~数fmol)がある。(B)として、9-アンスリルジアゾメタン(ADAM : l)があり、汎用されている。脂肪酸とは、酢酸エチル中、40、30分で反応する。反応性に優れ、反応促進剤を必要としないが、試薬が分解し易く、蛍光性の分解物や副産物が高感度分析を困難にする場合がある。類似試薬にmやnがある。mはADAMより安定であるが、反応性が劣る。(C)や(D)の試薬も多数(o~u)存在する。これらは、縮合剤の存在下、室温で比較的短時間にラベル化できる。特に、DMEQ-NHNH₂(r)は極めて高感度(検出限界、3-5 fmol)で、含水溶液中、水溶性カルボジイミド及びピリジンの存在で緩和な条件で反応(室温、15分間)する。ベンゾチアゾール骨格をもつ同様の試薬(BHBT : t)はDMEQ-NHNH₂よりさらに高感度である。類縁試薬である4(1-メチルフェナンスロ[9,10-*d*]イミダゾール-2-イルベンゾヒドラジド(DMBI : u)¹⁵⁾は、He-Cdレーザー励起蛍光検出用ラベル化剤として有効である。マイクロボアカラムとの併用により70~100amolの検出限界を与える。この他、NE-OTf(v)やAE-OTf(w)も比較的緩和な条件でラベル化が進行する。これらはテトラエチルアンモニウムカルボネートの存在下で反応し(室温、10分)、検出限界は数fmolである。

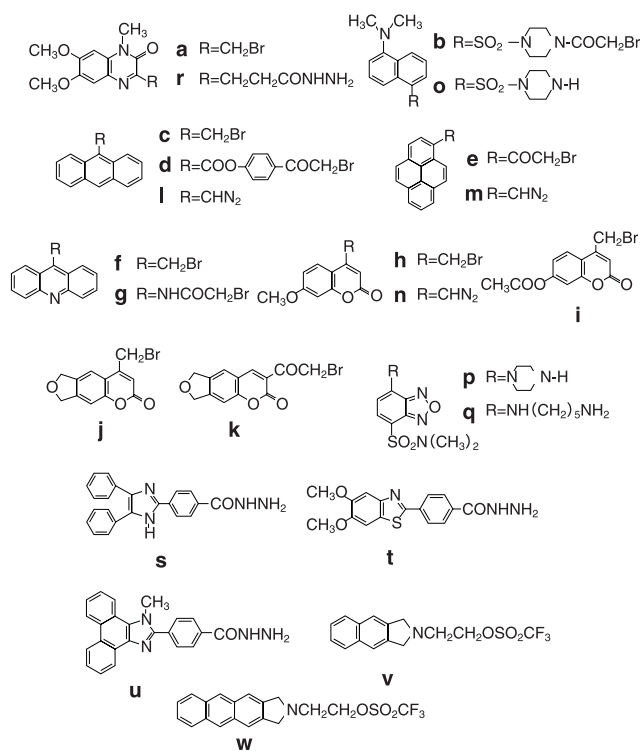


図2 カルボキシル基のラベル化試薬

(2) 光学活性カルボキシル基 (図3) 発蛍光団として汎用されているダンシル骨格を用いたカルボン酸類の光学分割試薬 DAPEA (a) が市販されている。DAPEAはアセトニトリル中、トリフェニルホスフィン及び2,2'-ジピリジルジスルフィドの存在でカルボン酸類と反応 (室温、3時間) する。DBD-APy (b) やNBD-APyも光学活性カルボン酸の分離・定量に有効である。

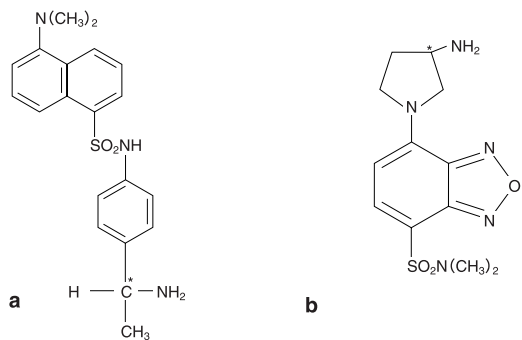


図3 光学活性カルボキシル基のラベル化試薬

4.2 . 6,7-ジメトキシ-1-メチル-2(1H)キノキサリノン-3-プロピオンカルボン酸ヒドラジド (DMEQ-H) の実用例

DMEQ-Hは、水溶性カルボジイミド (N-エチル-N-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド:WSC) の存在下、水溶液中においても緩和な条件で脂肪酸と反応する (図4)。従って、例えば血清脂肪酸の定量する際に、血清 (いわば、水溶液) に直接、試薬 (DMEQ-H) 溶液を加えることにより、蛍光誘導体化が進行する。また、誘導体化条件が緩和であるため、熱や酸化に対し不安定な脂肪酸の分析に有効である。また、水溶性の高いカルボン酸 (例えば、グルクロン酸抱合体) の計測に適している。一方、プロモメチル試薬では、血清脂肪酸を弱酸性で有機溶媒に抽出し、乾固後、試薬溶液を加えて蛍光誘導体化を行う必要があり、操作が煩雑である。

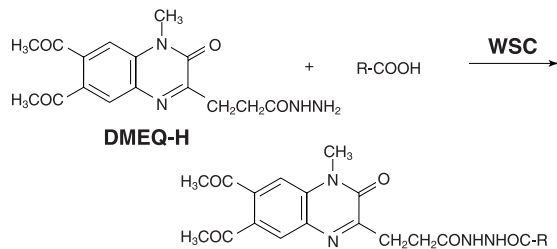


図4 DMEQ-Hによる脂肪酸の蛍光誘導体化

文献

- 1) T. Iwata, K. Inoue, M. Nakamura and M. Yamaguchi, *Biomed. Chromatogr.*, **6**, 120 (1992)
- 2) T. Iwata, T. Hirose, M. Nakamura and M. Yamaguchi, *J. Chromatogr. B*, **654**, 171 (1994)
- 3) T. Iwata, T. Hirose and M. Yamaguchi, *J. Chromatogr. B*, **695**, 171 (1994)

(1) 血清脂肪酸の定量 (図5)

DMEQ-Hの特性を利用し、血清遊離脂肪酸の直接誘導体化-HPLC蛍光検出法が開発された¹⁾。

Determination of free fatty acids in human serum

Serum	5 μL
4% Pyridine in 20 mM HCl	50 μL
Vortex-mix	
50 mM DMEQ-H in DMF	25 μL
2M WSC in water	15 μL
Warm (37°C, 10 min)	
Centrifuge (1000 g, 5 min)	
Supernatant	
Apply onto RP-HPLC	

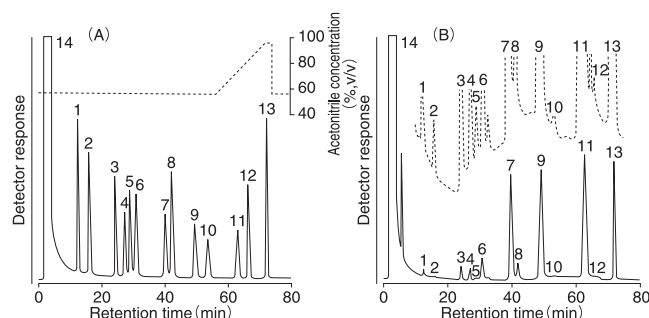


図5. Chromatograms obtained with: (A) a standard and (B) a normal human serum sample. Peaks: 1=C12:0; 2=C14:1; 3=C14:0; 4=C18:3; 5=C20:5; 6=C16:1; 7=C18:2; 8=C22:6 and C20:4; 9=C16:0; 10=C20:3; 11=C18:1; 12=C17:0; 13=C18:0; 14=DMEQ-PAH. Column: YMC-Pack C8(10 μm; 250 × 4.6 mm I.D.). Mobile phase: aqueous 55-95% acetonitrile (gradient elution). Flow-rate: 1.0 ml/min.

(2) 尿中ステロイドグルクロン酸抱合体の定量 (図6)

DMEQ-Hは、グルクロン酸抱合体のカルボキシル基と水溶液中において容易に反応する^{2,3)}。

Determination of urinary ethiocholanorone-3-and androsterone-3-glucuronides in urine

Urine	5 μL
4% Pyridine in ethanol	50 μL
50 mM DMEQ-H in DMF	50 μL
4.0 μM WSC in water	50 μL
Warm (37°C, 20 min)	
Reaction mixture	
Apply onto RP-HPLC	

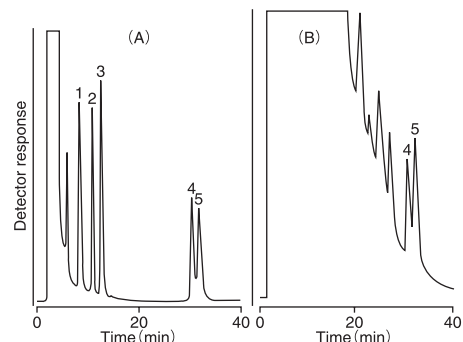


図6. Chromatograms obtained with: (A) a standard; and (B) normal human urine. Peaks: 1=estrone-3-glucuronide; 2=testosterone-3-glucuronide; 3=dehydroisoandrosterone-3-glucuronide; 4=ethiocholanorone-3-glucuronide; 5=androsterone-3-glucuronide. Column: L-column ODS(5nm; 250 × 4.6 mm I.D.). Mobile phase: methanol-acetonitrile-0.5% triethylamine in water(1:1:2, v/v). Flow-rate: 1.0 ml/min.

Topics on Chemistry

タンパク質を正しく折りたたむ試薬

(株) 同仁化学研究所 佐々本一美

最近、ゲノム解析が世間の耳目を集めているが、それによって明らかにされる遺伝子情報と実際のタンパク質の構造や機能との間には依然大きな隔りがある。タンパク質はDNA情報に基づいて翻訳された後、フォールディングや糖付加といった様々な修飾を受けて成熟していく。生命活動はこの成熟したタンパク質の働きによって支えられており、成熟過程（翻訳後修飾）の研究や、あるいはタンパク質間の相互作用の研究は、ポストゲノムの中心的課題になると思われる。これらの研究に利用される化合物は多いが、最近、従来のアプローチとは異なる新たな低分子化合物が報告されたので紹介したい。

バイオテクノロジーの分野では、組み換え遺伝子を発現させるのに大腸菌などの微生物が用いられる。しかしこれらの細胞では、遺伝情報が翻訳された後の修飾系が大きく異なるか欠けているため、ヒトDNAのような真核細胞の遺伝子を（例えば大腸菌で）発現させるときには、活性なタンパク質が生成しないばかりか、inclusion body と呼ばれる凝集体が沈殿したりする。これらは、本来の細胞では小胞体（ER）内で折りたたまれて固有のコンフォメーションをとるべきものが、大腸菌ではその機構を備えていないためである。タンパク質が折りたたまれるのはシステイン残基のチオール基（-SH）同士が酸化的に結合してジスルフィド結合（-S-S-）を生成するため、正しいジスルフィド結合はタンパク質の高次構造、すなわち活性に必須である。特に、システイン残基の数が多い場合は誤った対を形成する確率も高くなり、正しく折りたたまれないことが多い。これは酵母を発現系とする場合でも同様であり、バイオテクノロジーの分野では長年の課題であった。一方で生体は、誤って形成されたジスルフィド結合を解き、正しい対を再形成するリフォールディング反応を触媒する酵素も備えている。ER に存在する 57 kDa のタンパク質である PDI (protein disulfide isomerase) がそれで、最近、この酵素の低分子ミミック（BMC、図 1）が Raines¹⁾らによって報告された。

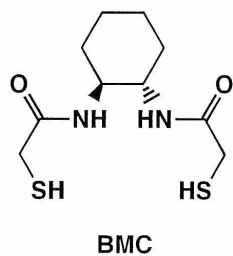


図 1

ER はタンパク質合成の中心に位置する細胞内器官で、新たに合成されたタンパク質はここで正しく折りたたまれた後、それぞれ機能を発揮する場所へ送られる。このため ER 内は、細胞質が還元的な環境であるのに対して、酸化的な環境になっており、ジスルフィド結合の生成が可能である（ジスルフィド結合の還元電位 $E^0 = -0.18 \text{ V}$ ²⁾）。BMC は PDI 同様、ER 内で誤

って折りたたまれたタンパク質のリフォールディングを触媒すると考えられる（図 2）。

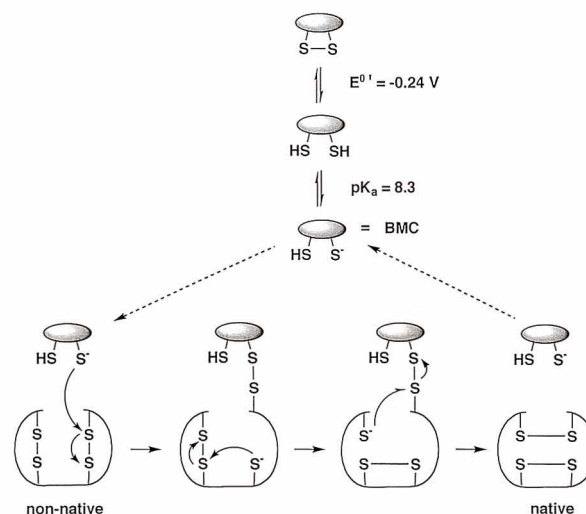


図 2 . BMCによるタンパク質のリフォールディング

この反応で重要なのは、BMC の還元電位と pK_a 値である。同じ低分子ジチオール化合物である DTT と比較して、BMC は大きな還元電位を有し、かつ、 $pK_a = 8.3$ （第一解離）と、DTT ($pK_a = 9.2$)³⁾よりも低いため、pH 7 の ER 内でも僅にチオレートアニオンが生成しており、より安定なコンフォメーションの native タンパク質へ異性化すると考えられる。因みに、ジスルフィド結合の還元電位と pK_a の値を他の化合物と比較したものを図 3 に示している（図では、上に行くほど ER 内での存在比率が RSSR > RSH となり、また、右に行くほど RSH > RS⁻となる）。これからも分かるように PDI は ER の環境に非常に近く、異性化効率が良いことが窺える^{4),5)}。同様に、低分子の BMC は酵素である PDI には及ばないが、DTT よりも ER の環境に近く、効率が良いことが分かる。BMC のアミド構造は pK_a を引き下げる効果があり、さらに、分子が環化されることによる立体的な歪みはジスルフィド結合生成には不利に働く筈である。もともとこの化合物は Fritzberg らによって 1985

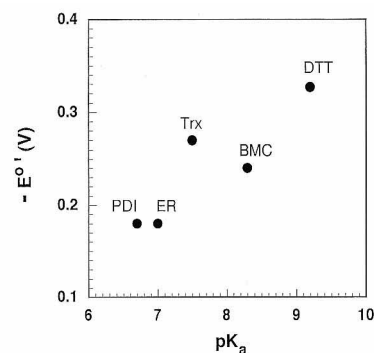


図 3 . チオール化合物の酸化還元電位と pK_a の関係
（チオレドキシンの値は、*Biochemistry*, 1997, 48, 14985より抜粋。他は本文参照。）

年に腎機能検査のためのテクネチウム (^{99m}Tc) キレーターとして報告されているが⁶⁾、今回 Raines らによって全く新たな用途が見つけられたことになる。

BMC の生物学的な評価系として、*in vitro* の系で RNase 活性を、また、*in vivo* の系で酵母細胞からの組み換え酵素 *S. pombe* acid phosphatase の分泌量を測定している。前者は、ランダムにジスルフィド結合を生成した RNase (8 個のシステイン残基をもつ) と、pH 7.6、30 の条件で BMC をインキュベートし、酵素活性をモニターしている。コントロールと比較して、リフォールディングによる 2 倍の酵素活性の上昇が見られた。また、後者の系では酵母 *S. cerevisiae* の培養液に BMC (0.1 mg/ml) を加えたところ、コントロールの 3 倍以上の酵素の分泌が見られ、これは PDI を 15 倍量過剰発現させた場合に匹敵する量である。この結果は、BMC が膜を透過した後、酵母細胞の ER 内で外来性のタンパク質である *S. pombe* acid phosphatase のリフォールディングを触媒していることを示しており、実用的には重要である。

このように BMC は、培養系へ添加することによって組み換えタンパク質の発現量を向上させることができ、かつ低分子であるため安定、安価であり、大量に使用することも可能で、容易に系から除去することもできる。さらには、タンパク質のフォールディング異常によって引き起こされるヒトの遺伝的な疾病⁷⁾の治療薬としての可能性も秘めている。

【参考文献】

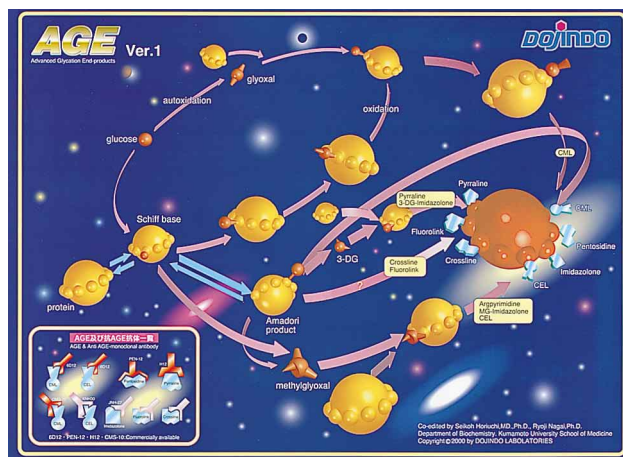
- 1) K. J. Woycechowsky, K. D. Wittrup and R. T. Raines, *Chemistry & Biology*, **1999**, 6, 871 - 879.
- 2) C. Hwang, A. J. Sinskey and H. F. Lodish, *Science*, **1992**, 257, 1496 - 1502.
- 3) W. J. Lees and G. M. Whiteside, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 642 - 647.
- 4) H. C. Hawkins and R. B. Freedman, *Biochem. J.*, **1991**, 275, 335 - 339.
- 5) J. Lundstrom and A. Holmgren, *Biochemistry*, **1993**, 32, 6649 - 6655.
- 6) S. Kasina, A. R. Fritzberg, D. L. Johnson and D. Eshima, *J. Med. Chem.*, **1986**, 29, 1933 - 1940.
- 7) R. J. Villafane and K. Baksi, *P. R. Health Sci. J.*, **1999**, 18, 105-115.

新製品

(株) ヲモト抗体研究所製品

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。



AGE化の反応スキーム

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 pyrraline 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

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

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'-Aminooxymethylcarbonylhydrazino-D-biotin) を用いてDNAをビオチン化し、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。

キット内容 (5検体測定用)

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

Kit以外の試薬

- TE Buffer : 滅菌水にTrisを10mmol / l、EDTAを1mmol / l 溶解し、pHを7.5に調製後オートクレーブ滅菌します。(添付のTE Bufferはfiltration用として用いますので、DNA精製用としては別途調製が必要です。)
- 酢酸ナトリウム溶液 : 3mol / l 酢酸ナトリウム水溶液を酢酸でpH5.2に調製します。
- RNase溶液 : 市販のRNaseを滅菌水で希釈し10 mg/ml に調製します。
- 75%エタノール

注意事項

1. キットは0 - 5 °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 °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り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後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 µlずつ抜き取り新しいプレートに移します。同量の1mol/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。
7. 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 A処理後市販のDNA精製キットを用いるか、フェノール/クロロホルムなどを用いて精製したDNAを使用することをお勧めします。

(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 ($O.D_{260nm} / O.D_{280nm}$) により検定することができます。 $O.D_{260nm} / O.D_{280nm}$ 1.8のDNAを使用することを推奨します。)

参考文献

- 1) Sancar, A. and Sancar, G. B., *Annu Rev. Biochem.*, **57**, 29-67 (1988)
- 2) Lindahl, T. and Nyberg, B., *Biochemistry*, **11**, 3610-3618 (1972)
- 3) Liuzzi, M. and Talpaert-Borle, M. J., *Biol. Chem.*, **260**, 5252-5258 (1985)
- 4) Weinfeld, M., Liuzzi, M. and Paterspm, M. C., *Biochemistry*, **29**, 1737-1743 (1990)
- 5) Chen, B. X., Kudo, 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 samples	21,000

Q & A

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

Q1 このキットで何が測定できますか？

A1 AP siteの定量ができます。AP siteとはapurinic/aprimidinic siteの略で、損傷したDNAに働く塩基除去修復の過程で現れるものです。AP siteを測定することによりDNA損傷をみることができます。

Q2 今まで販売していたキット (ARP Kit) とはどのように違うのですか？

A2 従来のARP KitはARPでラベル化するところまでを含んだキットで、そのためアビジンや検出用の色素を別途購入していただく必要がありました。この *-Nucleostain-* DNA Damage Quantification Kit *-AP Site Counting-*はHRP標識ストレプトアビジンや発色基質溶液などの検出系までを組み込んでおり、簡単にDNA中の塩基損傷部位を測定することができます。

Q3 キット以外に何を準備すれば測定できますか？

A3 必要な器具は、下記の通りです。

- ・10 μ lおよび200 μ l マイクロピペッター
- ・8連マイクロピペッター (50-200 μ l)
- ・低温恒温槽 (37)
- ・マイクロプレートリーダー
- ・0.5 ml、1.5 ml遠心チューブ
- ・遠心機

その他検体として、DNAを別途精製していただく必要があります。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。

Q4 5検体以上は測定できないのでしょうか？

A4 本キットには Filtration Tubeが5本入っております。これは試料をARP標識する際に用いるもので、一つの試料に1本用いることになります。5検体以上を測定される際には、本キットをもう一つ購入していただくか、別に Filtration Tubeを用意していただくことになります。

Q5 キットの保存は冷凍でも大丈夫でしょうか？

A5 中に含まれているHRP認識ストレプトアビジンが冷凍すると劣化してしまいます。これは常温でもすぐに劣化してしまいますので、キットの保存は必ず冷蔵 (0~5)で行ってください。

Q6 発色基質は何を用いているのでしょうか？

A6 本キットはTMBZ [3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine]の安定化溶液を用いております。このTMBZ溶液は青緑色をしており、最大吸収波長は655 nm付近にあります。655 nm付近の波長が最も感度良く測定できます。

Q7 DNA精製はどのような方法で行えばいいのでしょうか？

A7 DNA精製には色々な方法がありますが、統一した方法で精製していただくようお願い致します。一般的に行われているフェノール/クロロホルムによる精製は一本鎖DNAが生じる可能性がありますので、市販のDNA精製キットを用いて精製していただくことを推奨します。

Q8 現在サンプルを3検体分持っているのですが、今回3検体分使用して残り2検体分を1ヶ月後に測定することは可能でしょうか？

A8 残念ながら2回に分けて測定することはお勧めできません。基本的には使いきりと考えてください。しかし、5検体にて測定されたい場合には精製DNAは安定ではないため、まずは3検体分の精製DNAサンプルをARP標識して、0~5 にて保存してください。この状態であれば安定に保存できますので5検体集まってから測定して下さい。

Q9 発色の時間はどのくらいでしょうか？ また、途中で止めることはできますか？

A9 通常、発色溶液添加後1時間で測定しますが、2時間まで延長しても測定できます。反応を途中で止めたい場合は、下記の操作を行ってください。

1) 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。

2) 1mol/l硫酸50 μ lを添加後、450 nmの吸光度で測定します。(吸光度が2を超える場合には、必要に応じて希釈して測定してください)

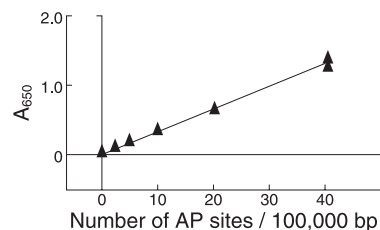
Q10 測定波長である650 nmのフィルターがないのですが、他の波長での測定は可能でしょうか？

A10 硫酸により反応を停止させることにより、450 nmの吸光度で測定できます。(詳細はA9参照)

Q11 どのくらいの感度で測定できるのでしょうか？

A11 検量線は、0, 2.5, 5, 10, 20, 40 AP sites/10⁵ bpで作成します。測定限界は、10⁵bpあたり1 AP siteとなります。

Typical Calibration Curve Prepared by
ARP-DNA Standard Solutions



Q12 一本鎖DNAの損傷 (AP site) は測定できるのでしょうか？

A12 標準DNAは二本鎖のものを用いております。一本鎖DNAにはそのまま使用できませんので、ご注意ください。

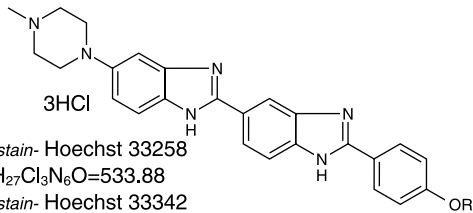
新製品

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に結合する試薬であり、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に結合する蛍光色素です。同じようにDNAに結合する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配列に特異的に結合するために染色体分析などにも用いることができます。

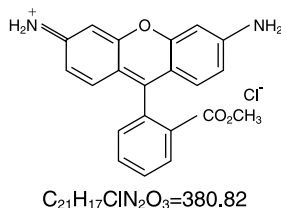
Hoechst dyeは変異原性があり、取り扱いには十分に注意を払わなくてはなりません。そこでHoechst dyeをより安全に取り扱っていただくために水溶液化(1 mg/ml)して、それぞれ-Cellstain-Hoechst 33258 solution、-Cellstain- Hoechst 33342 solutionとして発売いたします。溶液化することにより、秤量時などに起こり得る飛散による実験室内の汚染を防ぎ、使いやすくなりました。

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- Rh123



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

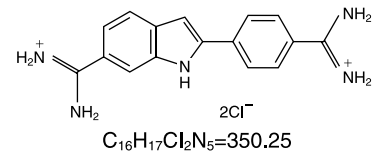
ます。Rh123は生細胞に容易に取り込まれ、ミトコンドリアに局在していることが1980年にJohnsonらにより報告されています。ミトコンドリアの産生するATP量とRh123の蛍光強度とは相関があり、細胞内のATP定量試薬としても用いられています。

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は正電荷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- Rh123	1mg	3,300
340-07971	-Cellstain- DAPI solution	1ml	3,800

新製品

Self-Assembled Monolayers (SAMs) 研究用試薬

近年、アルキルチオール類を金表面に吸着させ自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayers) を形成する方法は、欠陥の少ない単分子膜を容易に作製できるため、金修飾電極、表面プラズモン共鳴 (SPR; Surface Plasmon Resonance) や水晶発振子マイクロバランス (QCM; Quartz Crystal Microbalance) 等への利用が盛んに進められています。いずれの手法においても、基板の上に金を蒸着し、これにチオールあるいはジスルフィドを用いてプローブ分子を固定します。金修飾電極では電流変化、SPRでは反射角、QCMでは水晶発振子の振動数変化を検出することにより、目的とする基質との相互作用を調べることができます。これらの自己組織化膜の性質は、そのアルキル鎖の長さや末端の官能基の変更、主鎖の親水性などによって変えることができ、多彩な機能を持たせることができると期待されます。既にSPRを用いた分析機器やQCMを利用した匂いセンサーはありますが、さらに分子認識性能を向上させたセンサーが期待されています。

弊社では、これからの自己組織化単分子膜の研究及び機能開発に関して有用な試薬の開発を進めています。種々の化学修飾が可能なアミノ基、カルボキシル基及びヒドロキシル基を末端に持つアルカンチオール (C5 ~ C11) を発売しています。さらに電気化学活性部位であるフェロセニル基を末端にもつアルカンチオール (C6 ~ C11) も発売しています。

これらの試薬に関するパンフレットを新しく作成いたしました (次のページ参照)。どうぞご利用下さい。

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	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
Request	11-Hydroxy-1-undecanethiol		
Request	8-Hydroxy-1-octanethiol		
Request	6-Hydroxy-1-hexanethiol		
	(上記三品目)	10mg	11,000
		100mg	30,000
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

4月13日発売予定

タンパク質定量キット

-Proteostain- Protein Quantification Kit

試料中のタンパク濃度を定量する方法として、Lowry法、Bicinchoninate (BCA) 法、Biuret法、Bradford法など、数々の方法が開発されています。中でも、Lowry法およびBCA法については現在良く用いられているタンパク定量法として知られています。この2つのタンパク定量法は、タンパクにより還元された1価銅イオンと、それと特異的にキレートする試薬との錯体の吸光度を測定することによりタンパク濃度を測定するものです。よって高濃度の2価銅イオン溶液が必要なばかりでなく、測定溶液中に銅イオンを含むために測定後容易に廃棄することが出来ないなどの欠点があります。

ここに紹介する -Proteostain- Protein Quantification Kit は、高pH領域でのテトラゾリウム塩の還元反応に基づいている新しいタイプのタンパク定量キットです。テトラゾリウム塩は糖タンパクにより還元を受けホルマザンに変わります。例えば還元して生成したWST-8ホルマザンは中性領域では黄色ですが高pH領域では濃青色に変化します。このホルマザンのpH12.5以上での最大吸収波長は650nmです。-Proteostain- Protein Quantification Kitの測定レンジはBSA換算で50 µg/mlから5000 µg/mlです。

特長

- ・広い測定範囲
従来品に比べ幅広い範囲で測定出来ます。
(50 ~ 5,000 µg/ml BSA)
- ・環境にやさしい
重金属を使用していません。
(BCA法やLowry法は重金属使用)
- ・簡単
96穴マイクロプレートアッセイキットです。
- ・精製した膜タンパク質でも測定可能
界面活性剤は測定に影響しません。

-Proteostain- Protein Quantification Kit-CBB

タンパク定量法の一つであるBradford法は、Coomassie Brilliant Blue Gを使用した迅速で高感度な定量方法です。Coomassie Brilliant Blue Gは、いわゆるpH誤差法によりタンパクと相互作用し酸性領域で青色に着色します。最も変化の大きい波長は590nmですのでその付近の波長での測定が効果的です。発色反応は速く約1分で完結し、発色後30分程度は安定です。したがって短時間にタンパク濃度を定量することが可能です。

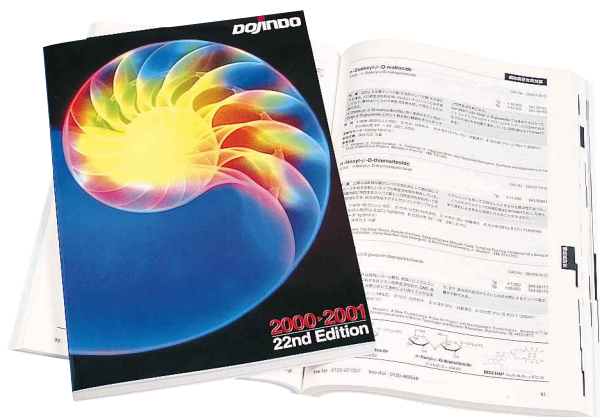
-Proteostain- Protein Quantification Kit-CBBはCoomassie Brilliant Blue G溶液とタンパク標準溶液としてBSA溶液を組合せたキットで、マイクロプレートを用いたタンパク定量に適合しています。測定範囲は一般的定量法の場合10 µg/mlから2000 µg/mlであり、マイクロ定量法では0.1 µg/mlから50 µg/mlです。

特長

- ・Coomassie Brilliant Blue Gを用いたキットです。
- ・高感度 (5 ~ 2,000 µg/ml BSA)
- ・短時間 (インキュベーションは30秒程度)
- ・環境にやさしい
重金属を使用していません。
- ・検体を選びません。
アスコルビン酸などの還元剤の影響をほとんど受けません。

カタログご案内

総合カタログ第22版(2000 - 2001)が完成しました



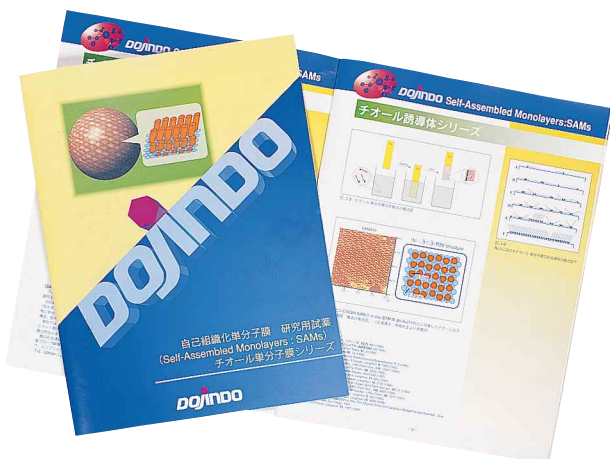
本カタログは、レイアウトを工夫し、内容を見やすくしました。

第一部では、製品の使用方法を詳しく説明したプロトコル集を前版より更に充実させましたので、これまで以上に参考資料としてご利用いただければと存じます。第二部では弊社の製品を用途別に分類し、性質・規格等を掲載いたしております。また、前版では巻末にあった参考文献を製品と同じページに掲載いたしました。第三部は各種索引を掲載いたしております。アルファベット別、用途・分析対象別、CAS番号別に検索することが出来ます。必要に応じ、ご使用下さい。

更に皆様にご活用いただけるカタログ作りを心がけております。

本カタログご希望の方は、弊社マーケティング部までご依頼ください。

SAMs (Self-Assembled Monolayers) パンフレット完成



金修飾電極、表面プラズモン共鳴や水晶発振子マイクロバランス等に金表面にアルキルチオール類を吸着させる自己組織化単分子膜の利用が盛んに行われております。

弊社では自己組織化単分子膜作成に必要なアルキルチオール類を数多く用意しておりますが、この度、試薬に関する説明をパンフレットとしてまとめました。

ご希望の方は弊社マーケティング部までご依頼ください。

ホームページアドレス

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

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