

# DOJIN NEWS

No.101  
2002

ドージンニュース

Review

新たな蛍光ゲノム比較解析法とその応用

山下秀次

Topics on Chemistry

蛋白質を増幅する

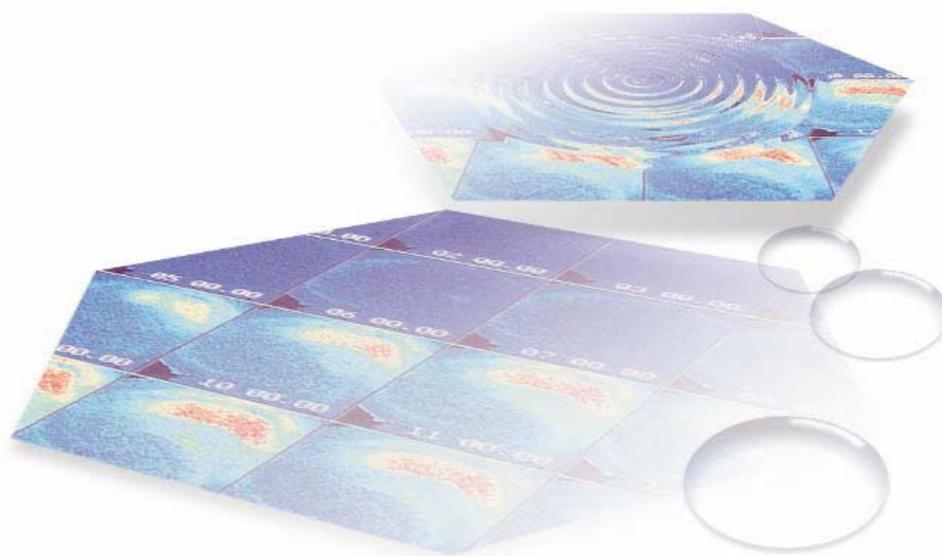
ープリオン病の早期診断に向けて

佐々本一美

連載

ケミストからみたポストゲノム1

片山佳樹



## 目次

### Review

新たな蛍光ゲノム比較解析法とその応用 九州東海大学農学部 山下秀次	1
ケミストからみたポストゲノム1 九州大学工学研究院 片山佳樹	6

### Topics on Chemistry

蛋白質を増幅するープリオン病の早期診断に向けて	5
-------------------------	---

### Commercial

#### Q&A

Self Assembled Monolayers(SAMs)研究用試薬	12
--------------------------------------	----

### 新製品

専用規格品	4
Get pureDNA Kit-Agarose	10

### お知らせ

春の学会展示ご案内	4
カスタマーサービス部新設のお知らせ	4
-Nucleostain-DNA Damage Quantification Kit-AP site Counting 仕様変更のお知らせ	8
販売中止品のご案内	16
ラベル材質変更のお知らせ	17
フォーラム・イン・ドージン開催報告	18

## 新製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

Ca( )-EDTA (薬添規)	4
CyDTA (オートアナライザー用)	4
Get pureDNA Kit-Agarose	10



12th フォーラム・イン・ドージン  
オーガナイザー・演者の先生方と弊社スタッフ

## 新たな蛍光ゲノム比較解析法とその応用

(Fluorescence representational genomic profiling method and its various applications)



山下 秀次  
(Hideji Yamashita)  
九州東海大学農学部

### [ Summary ]

The fluorescence representational genomic profiling (FRGP) method is capable of making a genome-wide survey of many loci. This method employs PCR-mediated size selection and FITC-labeling of restriction fragments containing landmark sites. Using this method with methylation-sensitive restriction enzyme *Eag I* as a landmark enzyme, we scanned quail genomic DNAs from several tissues to detect the transcriptionally active regions. This approach is based on the assumption that CpG methylation, particularly of CpG islands, might be associated with gene transcriptional regulation. Sixty out of 520 FRGP spots were identified as tissue-specific changes of the DNA methylation state. One of the spots, which show a testis-specific appearance, was cloned and sequenced to identify the gene. The spot clone contained the segment of the quail orthologue of *FOXF1* gene, one of members of the *forkhead* gene family of transcription factors. The *FOXF1* gene encodes the winged helix class of DNA-binding protein and is expressed in lung and placenta. The RT-PCR analysis of quail mRNAs from various tissues revealed that the quail orthologue is also lung-specific expressed. Thus, FRGP using methylation-sensitive restriction enzyme can offer a mean for detecting systematically the gene in which the state of DNA methylation.

### キーワード :

DNAメチル化、CpGアイランド、遺伝子発現、メチル化感受性制限酵素、PCR法、蛍光標識、二次元電気泳動法

## 1. DNAメチル化と遺伝子発現

シトシンのピリミジン環5位にメチル基が付加した5-メチルシトシン(5mC)は、脊椎動物のゲノム中に見出される唯一の生理的修飾塩基であり、その出現はCpG配列に限られている。5mCは化学的に不安定であり、脱アミノ反応を起こしてチミンに変換されやすく、CpG配列はTpG配列へと定常的に変換されていると考えられている。脊椎動物のゲノム全体では、GC含量は約40%と低く、CpG配列も塩基組成から確率論的に期待される20~25%程度しか存在しない。しかし、ゲノム中には非メチル化CpG配列の密度が高く、GC含量も60~70%と非常に高い領域が散在している。このような領域はCpGアイランドと呼ばれており、すべてのハウスキーピング遺伝子や約40%の組織特異的遺伝子の転写調節領域あるいはその近傍に存在することが示唆されている<sup>1-3)</sup>。また、*Eag I* (C GGCCG)や*BssH II* (G CGCGC)などのCpG配列を含むGC塩基のみからなる配列を切断する制限酵素は5mCを含む認識配列を切断できないという特性(メチル化感受性)を有しており、その認識配列はCpGアイランド中に高頻度で存在している<sup>4)</sup>。

ゲノムDNAのメチル化は、遺伝子の発現抑制に関与していることが古くから知られていたが、最近になって遺伝子機能抑制の二つの分子機構に関与していることが明らかになってきた。一つは5mCを認識して結合するメチル化CpG結合タンパク質(MeCP2)が、遺伝子の転写調節領域に結合して転写因子の結合を抑制する機構である<sup>5)</sup>。他の一つはヒストン脱アセチル化酵素と複合体を形成したMeCP2が5mCを認識し、ヒストン脱アセチル化酵素の作用によってメチル化部位近傍のクロマチン構造が凝縮して転写が抑制される機構である<sup>6, 7)</sup>。これらは互いに独立した現象ではなく、密

接に関連しながら、ゲノム中の各座位の遺伝子発現を制御していることから、ゲノムDNAのメチル化が遺伝子発現調節機構の最上位に位置するものと考えられている<sup>8)</sup>。これらのことから、CGメチル化感受性制限酵素による切断片は全ゲノム領域から活発に転写されている遺伝子を探索する際の目印となるものと考えられる。

## 2. 新たな genomic differential cloning 法

1990年代初めにゲノム全体を高速に検索する genomic differential cloning法として、Restriction Landmark Genomic Scanning(RLGS)法<sup>9)</sup>およびRepresentational Difference Analysis(RDA)法<sup>10)</sup>が相次いで開発された。RLGS法はゲノム上の位置指標となるランドマーク制限酵素切断部位(restriction landmark)を放射性標識し、二次元電気泳動によって検出される数千にも及ぶスポットの差異を検索する方法である。他方、RDA法は制限酵素消化とPCRによってゲノムの複雑度を1/100~1/10にした amplicon と呼ばれるPCR産物(representation)を作製し、amplicon間での競合的ハイブリダイゼーションによりゲノム差異を検索する方法である。RLGS法ならびにRDA法は強力な genomic differential cloning法であり、様々な遺伝子探索に多用されている<sup>11-14)</sup>。しかしながら、両方法ともにゲノム変異の検出工程あるいはクローニング工程において一長一短がある。

筆者は、RLGS法およびRDA法からそれぞれrestriction landmarkおよびrepresentationという概念を導入し、新たな genomic differential cloning法として Fluorescence Representational Genomic Profiling(FRGP)法を考案・開発した。FRGP法とは、制限酵素断片をPCRによってサイズ選択的に増幅するととも

に、ランドマーク制限酵素切断部位のみを蛍光標識した後、二次元電気泳動によって展開したスポットパターン（ゲノムプロファイル）からゲノム差異を検出する方法である。本法の考案に際しては、多量のDNAサンプルを必要としないこと、放射性標識を用いずに一度に短時間で多数のゲノム座位を視覚化できること、煩雑な操作によらずに変異DNA断片が確実にクローニングできることなどに留意した。

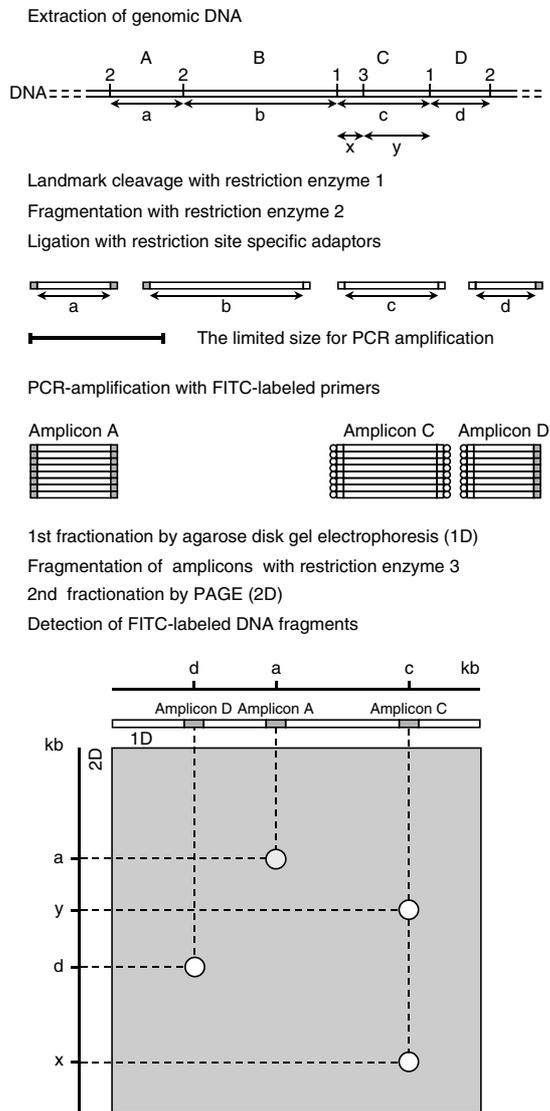


Fig.1 The procedure of FRGP. 1-3, restriction sites for restriction enzyme 1 (landmark enzyme), 2 and 3, respectively; A-D, restriction fragments digested with enzyme 1 and 2; a-d, the length of fragments A-D; x and y, the length of fragment C digested with enzyme 3; and □, adaptors for restriction sites of enzyme 1 and 2, respectively; , FITC.

### 3. FRGP 法の実際

Fig.1 に示すように、FRGP 法は ゲノム DNA 抽出、 ランドマーク制限酵素 (制限酵素 1) 消化、 制限酵素 2 による再断片化、 制限酵素切断部位への特異的アダプターの連結、 FITC 標識プライマーによる PCR、 一次元アガロースディスクゲル電気泳動、 制限酵素 3 によるゲル中消化、 二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動、 蛍光イメージアナライザーによるスポット検出という 9 つの工程からなる。

この FRGP 法の中で最も注目されるのが、5 番目の PCR の工程である。この工程は、制限酵素断片長の違いを PCR 産物の存在の有無に転換する representation という概念、ならびに特定の制限酵素切断部位のみを視覚化してゲノム上の位置指標とする restriction landmark という概念の両側面を兼ね備えている。実際の操作では、ランドマーク制限酵素切断部位に特異的なプライマーの 5' 末端のみを FITC 標識し、約 2kb 以下の DNA 断片のみが指数関数的に増幅するような条件下で PCR を行っている。Fig.1 によると、DNA 断片 C と D はランドマーク制限酵素切断部位が FITC 標識された PCR 産物 (Amplicon C と D) を生じ、DNA 断片 A は FITC 標識されていない PCR 産物 (Amplicon A) を生じる。しかし、DNA 断片 B は PCR 増幅限界鎖長よりも長いために増幅されない。次に、二次元電気泳動によって PCR 産物を分離・展開すると、Amplicon D、ならびに Amplicon C に由来する制限酵素 3 による切断片 (x と y の長さの断片) は蛍光検出によって視覚化されるが、Amplicon A は検出されない。したがって、サイズ選択的に増幅された制限酵素断片のうちランドマーク制限酵素切断部位を有するもののみによってゲノムプロファイルが構成されることになる。また、検出されるスポットは PCR 産物であるために容易にクローニングすることができる。

### 4. FRGP 法による組織特異的遺伝子の単離・同定

脊椎動物の体は、形態的・機能的な違いが著しい約 200 種類の細胞から構成されているが、元をたどれば 1 個の受精卵にたどり着く。受精卵は分化全能性をもっているが、発生の進行に伴って細胞系列の限定された遺伝子群だけが発現し、その他の遺伝子群の発現は抑制され、細胞の種類に特徴的な性質が備わるとされている。つまり、ゲノムの塩基配列の変化を伴わずに遺伝子機能が選択的に活性化あるいは不活性化される分子機構が存在する。この機構は後成的遺伝子発現修飾 (epigenetics) と呼ばれており、その中心的な役割をゲノム DNA のメチル化が担っているものと考えられている。

筆者は、ウズラ雄 1 羽の脳、心臓、腎臓、精巣より抽出したゲノム DNA を材料として、ランドマーク制限酵素に CG メチル化感受性制限酵素 *Eag* I、二次元展開制限酵素に *Hinf* I を用いた FRGP 法により組織特異的遺伝子の単離・同定を試みた。4 組織のうち精巣のゲノムプロファイルを Fig.2 に示している。4 組織のゲノムプロファイルにはそれぞれ約 520 個のスポットが検出され、これらのうち 60 個に組織特異的なスポットの有無あるいは蛍光強度の差異が認められた。同一個体の各組織から抽出したゲノム DNA を用いていることから、スポット変異が塩基置換によって生じた切断片長多型であるとは考えられず、*Eag* I 認識配列中のメチル化状態の差異に起因するものと考えられた。

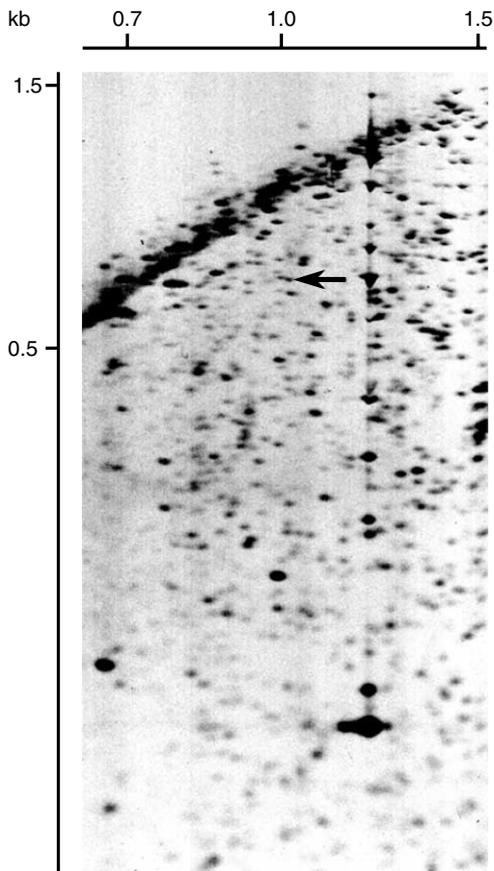


Fig. 2 FRGP profile of quail testis DNA. *Eag* I and *Hirt* I were used as a landmark enzyme and restriction enzyme 3, respectively (Fig.1). The arrow indicates the testis-specific spot (QTEH56).

変異スポットのうち精巣ゲノムにのみ検出されたスポット QTEH56 ( Fig.2の矢印、 Fig.3)をプローブとして脳、肺、心臓、肝臓、膵臓、腎臓、浅胸筋、精巣についてサザンブロット解析を行ったところ、肺と精巣にはゲノム差異の起因となった *Eag* I 認識配列が非メチル化状態にある細胞が特異的に存在することが明らかとなった。また、QTEH56の塩基配列解析の結果、ヒトの肺や胎盤で特異的に発現している転写因子フォークヘッドファミリーの1つである Forkhead Box F1 ( FOXF1 )と非常に高い相同性を示し、QTEH56は *FOXF1* 遺伝子のウズラオソログの一部であることが明らかとなった。さらに、サザンブロット解析に用いた8組織について RT-PCR 解析を行ったところ、 Fig.4 に示すように肺においてのみ強いシグナルが認められた。これらの結果より、 *FOXF1* 遺伝子はウズラにおいても CpG 配列のメチル化によって転写調節がなされ、肺で特異的に発現していることが明らかとなった。

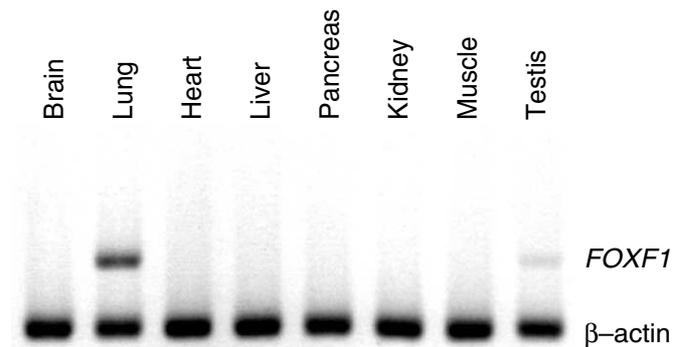


Fig.4 Expression of *FOXF1* gene measured by quantitative RT-PCR in eight different tissues. The upper and lower bands indicate *FOXF1* gene and  $\beta$ -actin gene as an internal control, respectively.

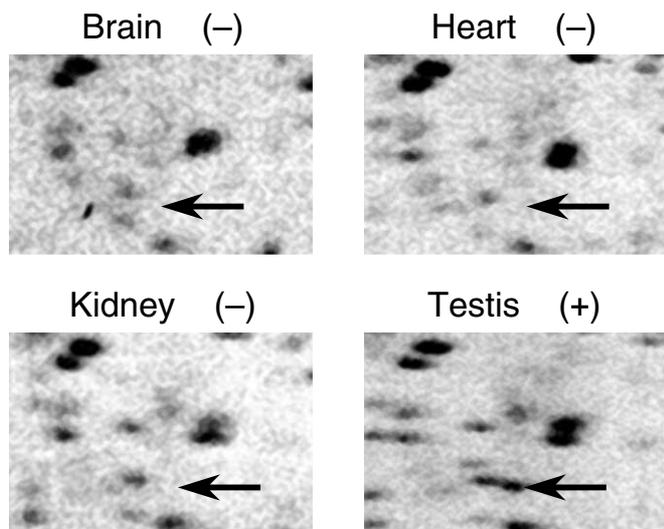


Fig.3 Parts of FRGP profiles surrounding Spot QTEH56 in four different tissues. The arrows indicate Spot QTEH56. (-) and (+) represent disappearance and appearance of Spot QTEH56, respectively.

### 5. FRGP 法の利点

以上のようにFRGP法は一度に多数のゲノム差異を視覚的に捉え、そのゲノム差異から容易に遺伝子にたどり着くことが可能である。本法の利点として次のような点が挙げられる。1枚のゲル上に500個以上のスポットとしてrestriction landmarkを検出することができる。異なる制限酵素の組み合わせを用いることで解析するゲノム領域を拡大できる。スポットの蛍光強度がrestriction landmarkのコピー数を反映しており、diploidとhaploidの識別も可能である。認識配列にGC塩基が豊富な制限酵素を用いると、遺伝子転写単位の近傍に存在するとされているCpGアイランドを特異的にスクリーニングできる。CGメチル化感受性制限酵素を用いると、ゲノムDNAのメチル化状態をスクリーニングできる。

従って、本法は oligogene や polygene の量的・閾値的な効果によって左右される量的形質や成人病 ( 通常疾患 ) などの多因子遺伝形質のゲノム解析に有効であると考えられる。現在、1枚のゲル上で多検体のゲノムプロファイルを作成できる多重蛍光標識FRGP法についての検討も行っている。

参考文献

- 1) F. Larsen, G. Gundersen, R. Lopez and H. Prydz, *Genomics*, **13**, 1095 (1992).
- 2) F. Antequara and A. Bird, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11995 (1993).
- 3) P. A. Jones, *Trends Genet.*, **15**, 34 (1999).
- 4) W. A. Bickmore and A. P. Bird, *Methods Enzymol.*, **216**, 224 (1992).
- 5) X. Nan, F. J. Campoy and A. Bird, *Cell*, **88**, 471 (1997).
- 6) P. L. Jones, G. J. Veenstra, P. A. Wade, D. Vermaak, S. U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis and A. P. Wolffe, *Nat. Genet.*, **19**, 187 (1998).
- 7) J. Ahringer, *Trends Genet.*, **16**, 351 (2000).
- 8) H-H. Ng and A. Bird, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **9**, 158 (1999).
- 9) I. Hatada, Y. Hayashizaki, S. Hirotsune, H. Komatsubara and T. Mukai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9523 (1991).
- 10) N. Lisitsyn, N. Lisitsyn and M. Wigler, *Science*, **259**, 946 (1993).
- 11) J. Kuromitsu, H. Yamashita, H. Kataoka, T. Takahara, M. Muramatsu, T. Sekine, N. Okamoto, Y. Furuichi and Y. Hayashizaki, *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 707 (1997).
- 12) S. Komatsu, Y. Okazaki, M. Tateno, J. Kawai, H. Konno, M. Kusakabe, A. Yoshiki, M. Muramatsu, W. A. Held and Y. Hayashizaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **267**, 109 (2000).
- 13) T. Ushijima, K. Morimura, Y. Hosoya, H. Okonogi, M. Tatematsu, T. Sugimura and M. Nagao, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2284 (1997).
- 14) K. Muller, H. Heller and W. Doerfler, *J. Biol. Chem.*, **14**, 14271 (2001).

著者紹介

氏名：山下 秀次 (Hideji Yamashita)  
 所属：九州東海大学農学部 バイオサイエンス学科 講師  
 出身大学：鹿児島大学大学院連合農学研究科  
 学位：博士 (農学)  
 現在の研究テーマ：  
 1) ウズラの組織特異的遺伝子の単離・同定  
 2) ニワトリの抗病性に関する遺伝子の探索  
 3) 精神神経疾患成因に関する DNA メチル化機構の解明  
 連絡先：〒 869-1404 熊本県阿蘇郡長陽村河陽  
 Tel : 09676-7-3932 Fax : 09676-7-3960  
 e-mail : hideyama@as-1.ktokai-u.ac.jp

新製品

専用規格品

- Ca(II)-EDTA (薬添規)  
 医薬品添加物規格 (薬添規) に相当した品質です。  
 規格 1) 純度 : 97.0 ~ 102.0%  
 2) 水溶状 : 試験適合  
 3) pH(20%) : 6.5 ~ 8.0  
 4) 水分 : 13.0%以下  
 5) 強熱残分 (硫酸塩) : 71.0 ~ 76.0%  
 6) シアン化物 : 0.0001%以下  
 7) 重金属 (pb として) : 0.002%以下  
 8) ヒ素 : 0.0002%以下  
 9) エデト酸ナトリウム : 限度内
- CyDTA (オートアナライザー用)  
 プランルー社のオートアナライザーでのアンモニア分析専用規格品です。  
 規格 1) 純度 : 99.0%以上  
 2) 重金属(Pb として) : 0.001%以下  
 3) オートアナライザー用試験 : 試験適合

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Ca ( )-EDTA (薬添規)	500g	Request	C421
CyDTA (オートアナライザー用)	100g	24,000	C420

春の学会展示ご案内

薬理学会において、試薬新製品の展示を行ないます。皆様のご来場をお待ちいたしております。

- 第75回日本薬理学会  
 3月13日(水) ~ 15日(金)  
 熊本県立劇場

カスタマーサービス部新設のお知らせ

昨年8月より弊社製品の技術的なお問い合わせに対応するため、カスタマーサービス部を新設しました。フリーダイヤル 0120-489548 で専任スタッフ2名が承っております。

その他のお問い合わせは、096-286-1515 マーケティング部で承ります。

# Topics on Chemistry

## 蛋白質を増幅する — プリオン病の早期診断に向けて

(株) 同仁化学研究所 佐々本 一美

狂牛病 (BSE) のパニックが日本を襲っているが、本場イギリスでも BSE からの感染と考えられる変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) の患者数は既に 110 名を越え、依然として増加している。これまで、牛の病気で人への感染はないと考えられていた BSE だが、1996 年 3 月、イギリス健康保険省が公式に感染を認めただけでなく今日のパニックの発端となっている。良く知られているように、原因となるプリオン蛋白質は正常脳組織にも発現しており (正常プリオン PrP<sup>C</sup>)、これが何らかの作用で  $\beta$ -シート構造に富んだアイソフォームに移行し (異常プリオン PrP<sup>Sc</sup>)、脳内に凝集することで神経疾患を引き起こすと考えられている。

最大の謎は、PrP<sup>C</sup> から PrP<sup>Sc</sup> への 2 次構造の変換がどのように起こるかであるが、アミロイドーシス同様、詳細な機構は分かっていない。 $\beta$ -シート蛋白質が自己触媒的に凝集していくのは他のアミロイド蛋白質と同じだが、大きな違いはプリオン蛋白質が感染することである。生命体とは言えない単なる物質が感染・伝播していく不思議さは、多くの科学者の関心を引いている。

現在 PrP<sup>Sc</sup> の検出は、脳組織をホモジネートし、プロテアーゼで処理し得られる N 末端側が除去された 142 アミノ酸からなるコア部分 (PrP27-30、図 1) を、抗体を用いて検出する方法で行われている (BSE の場合、ELISA による一次スクリーニング、更に Western blot 及び組織免疫染色による確定診断が行われている)。

vCJD の場合は若年で発症しており、しかも、発症してからの進行が早い。PrP<sup>Sc</sup> は、例外的に羊のリンパ組織で検出されるが、それ以外、BSE や vCJD では潜伏期の生前診断は不可能である。

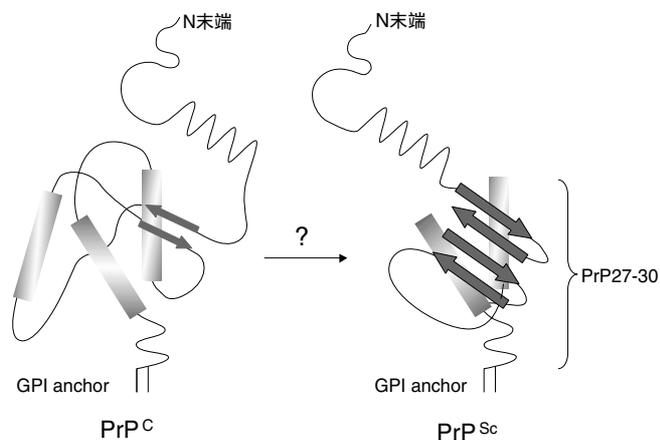


図 1 プリオン蛋白質の 2 次構造 (209 アミノ酸)

無論、血液などを用いる生前診断を可能にする抗体の開発は世界中で競って行われているが、そのためには、血中などの微量 PrP<sup>Sc</sup> を検出できる感度が必要である。勿論それは、単に現在の抗体検出の感度では検出できないだけで、極微量は存在しているという前提である。そうであれば、PCR のように人工的に PrP<sup>Sc</sup> を増幅できれば解決する。僅かの PrP<sup>Sc</sup> が核となって、体内で次々に PrP<sup>C</sup> を PrP<sup>Sc</sup> に変えていく感染のプロセスと基本的に同じである。

Saborio ら<sup>1)</sup>は protein-misfolding cyclic amplification (PMCA) と呼ばれる増幅システムを考案した (図 2)。スクレイピー感染ハムスターの脳ホモジネートを PrP<sup>Sc</sup> が検出できなくなるまで希釈し、それを正常のハムスターの脳ホモジネートと 37 °C でインキュベートすると PrP<sup>Sc</sup> が検出されてくる (proteinase K で処理し、PrP27-30 を検出)。界面活性剤の存在下で超音波処理を行うと凝集体を分散させることができるので、更に同様のサイクルで増幅することが可能である。原理は簡単だが、重要なポイントは PrP<sup>C</sup> の供給源として脳ホモジネートを用いていることである。精製した PrP<sup>C</sup> を PrP<sup>Sc</sup> と接触させることで、PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup> の変換が起こることは知られていたが<sup>2)</sup>、その系では効率は非常に悪く増幅することはできない。つまり、凝集反応を促進する何らかの因子 (例えば Protein X<sup>3)</sup>) の存在が必須で、ホモジネートを用いる必要がある。PrP<sup>C</sup> から PrP<sup>Sc</sup> へのリフォールディングを触媒するシャペロン分子の存在が疑われているが、それは PrP<sup>Sc</sup> 自身かも知れない。

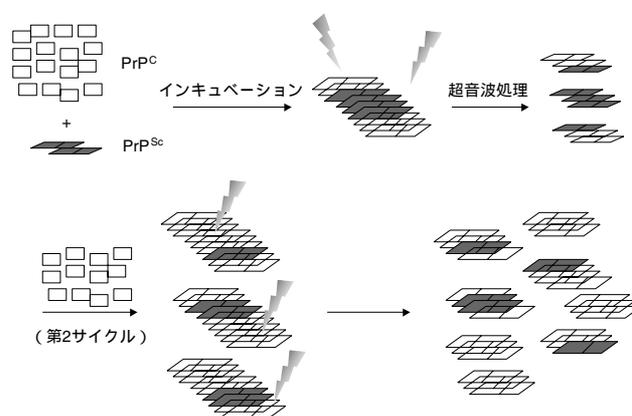


図 2 PMCA サイクル

報告された検出感度は、10,000 倍以上の希釈で、10 回の PMCA サイクルを行い、6~12 pg (0.2~0.4 amol) の PrP<sup>Sc</sup> の検出が可能である。PrP<sup>Sc</sup> というテンプレート無しでは、*in vitro* で PrP<sup>Sc</sup> を作り出すことができないなど、プリオン病の謎はまだ多いが、少なくとも *in vivo* で現象を利用した今回の技術は、プリオン病の早期診断に貢献することは確かである。

### 参考文献

- 1) G. P. Saborio, B. Permanne and C. Soto, *Nature*, **411**, 810 (2001).
- 2) D. A. Kocisko, J. H. Come, S. A. Priola, B. Chesebro, G. J. Raymond, P. T. Lansbury and B. Caughey, *Nature*, **370**, 471 (1994).
- 3) S. B. Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 13363 (1998).

## 新連載

# ケミストからみた ポストゲノム

## 1

### ~ Overview ~

九州大学工学研究院応用化学部門

片山佳樹



## プロフィール

片山佳樹 (Yoshiki Katayama) 41歳

所属：九州大学工学研究院応用化学部門・応化分子教室

連絡先：〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

TEL：092-642-3608 FAX：092-642-3611

e-mail:ykatatcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp

出身学校：九州大学工学研究院合成化学専攻 学位：工学博士

現在の研究テーマ：

細胞情報と化学情報を相互変換する分子の創製と機能

(科技団さきがけ)

各種細胞シグナル伝達計測系の開発

ポストゲノムを指向したタンパク間相互作用や

細胞表現系ハイスループットアッセイ系の開発

主な著書：

NO放出薬の臨床応用の可能性、循環器科、44(4)、344(1998)

ケージド化合物、蛋白質、核酸、酵素、43(12)、397(1998)

趣味：ドライブ、イラスト

## 1. はじめに

ヒトゲノム計画により、ヒトの全ゲノムの塩基配列が明らかになろうとしている。その直接の成果は、これから本格化する網羅的、体系的な遺伝子の発現解析と多型解析、機能解析にあるといえる。ゲノム研究とポストゲノムの流れに関する総説は、すでに非常に多く存在することもあり、本連載では、工学あるいはケミストの立場から見たポストゲノムとして、今回、全体像を概説した後、次回より今後有用となるであろう技術についてご紹介していきたいと考えている。分析技術はこれまで、大規模な装置を用いて感度や性能を競うところがあったが、これからのゲノム研究では、迅速、安価が極めて重要なキーワードになろう。

## 2. ゲノム研究の流れとポストゲノム

ゲノムとは、染色体上に存在する全遺伝子の総体である。ゲノム研究は、これまでの研究手法と異なり、一つ一つの遺伝子やタンパクに着目するのではなく、全体を網羅的に解釈するところに違いがある。例えば、ある遺伝子の機能が特定の疾患に関連付けられたとして、現実にはその遺伝子の機能のみが変化してその疾患が起こるわけではない。特に、多くの疾患、特にCommon diseasesと呼ばれる疾患は、多くの遺伝子が関わる多遺伝子疾患であり、これらの理解には、遺伝子機能全体の動きの理解が必須となる。

### 2.1. ゲノム研究の流れ

ゲノム研究の内容としては、全塩基配列の解読による物理地図の作成後、遺伝子配列の決定、遺伝子のゲノム上での位置決定(マッピング)、遺伝子多型の解析、刺激や疾患などに伴う発現変化、遺伝子機能の解析(タンパクの同定と発現解析、機能解析)などが挙げられる。ゲノムの物理地図作成後、このデータを用いてその後の研究が可能となり、これらがポストゲノムと呼ばれる研究である。

ゲノムの塩基配列が分かったことと、全遺伝子配列が分かることとは同じではない。真核生物の遺伝子は多くの場合、介在配列により分断されており、また、遺伝子の開始部分を予測することも困難である。EST(発現配列タグ:cDNAの一部に相当する短いDNA断片)を収集することで、ゲノム上の発現可能な部分を調べることができるが、遺伝子配列そのものを解析するには、タンパクをコードするメッセンジャーRNAから逆転写して得られるcDNAの配列を解析するのが最も効率が良い。しかしながら、全長のcDNAを得ることはそれ程容易なことではない。現在では、オリゴキャップ法<sup>1)</sup>やキャップトラッパー法<sup>2)</sup>などの技術が利用される。また、遺伝子のマッピングのためには、ポジショナルクローニングなどの技術がある。ゲノム塩基配列決定からこの部分までは、いわばゲノム研究の土台にあたる部分であり、コストがかかろうと既存の技術でかなりのところまでこなしてしまえる。しかしながら、その先にある種々の研究カテゴリーは、産業に直結するため、現状の技術ではクリアできない効率的技術が必要とされ、事実、現在極めて多くの技術開発が進行している。本連載では主としてこの部分の技術について述べる。

## 2.2 . 遺伝子多型解析

異なる個体間で遺伝子上の同一箇所の塩基配列が異なる場合、その頻度がその種全体の1%以上である時に、これを多型、1%以下のものを突然変異という。多型には、塩基配列が挿入されたもの(挿入多型)、欠失したもの(欠失多型)、繰り返し配列の長さの異なるもの(ミニサテライトやマイクロサテライト)、一塩基が変化したもの(一塩基多型)などがある。多型は、それが遺伝子上に存在し、機能に関係する場合は、疾患に直結する場合がある。

また、遺伝子の近傍にある場合も含めて、特定の遺伝子のゲノム上での位置決定に有用なマーカーとなる。多型のこのような利用法は、特に疾患関連遺伝子などの特定に効果的である。ある疾患関連遺伝子が遺伝した固体は、その近傍にある多型部分も同時に引き継いだ可能性が高いため、ある疾患を有する群に特異的な変異を見つければ、その近傍に疾患遺伝子が見つかる可能性が高い。多型をゲノム上のマーカーとする場合、マーカーの数は多いほど、位置決定が容易かつ正確になるのは言うまでも無い。その意味で、最も高頻度に表れる一塩基多型(SNP)が最も注目されている。SNPは1000塩基につきくらい存在し、ゲノム中に300万~1000万個あるといわれている。

## 3 . SNP 解析

SNPの解析といっても、ゲノム上のどこにSNPが存在するかを調べるSNPマッピングと、明らかになったSNPをそれぞれの個体で分析し、どの塩基に置換しているかを明らかにするSNPタイピングがある。前者では、少数のサンプルにおいて多数のSNPを検出し、その位置を決めることが必要であり、後者では、多数のサンプルで特定(少数)のSNPを解析できることが必要となる。従って、どちらの手法かで解析技術に要求される条件が異なる。SNPマッピングは、すでにかかなりの成果がでており、SNPコンソーシアムなどによりデータベース化が進められている。しかし、SNP解析で産業上より重要なのは、疾患関連遺伝子の探索

などに直結するSNPタイピングである。最近、Table 1のようなSNPタイピングを指向した種々の技術が開発されている。それらは大別すると、蛍光を用いる方法とマスペクトルを用いる方法に大別できる。各々については、次回より詳しく解説するが、これらの中でも、Invader assay<sup>3)</sup>やLuminex法<sup>4)</sup>は、実用化が始まっている。また、マスペクトルで用いられるプライマー伸長法を蛍光と組み合わせたDOL assay<sup>5)</sup>やmolecular beaconを用いるSniper assay<sup>6)</sup>も期待される手法である。タグDNAをアレイにすることで一般性を持たせたTagアレイ<sup>7)</sup>も有力な手法である。一方、マスをを用いる手法は、主としてプライマー伸長法を基本とするものが多い。この手法は、SNPの一塩基5'端側までに相補的なプライマーをハイブリダイズさせておいて、そこからサンプルを鋳型として伸長反応を行い、SNPの種類により伸長生成物の分子量が変わるようにする手法である。一般にddNTPとdNTPを組み合わせて用いる。その組み合わせ方によりPinpoint assay<sup>8)</sup>やPROBE法<sup>9)</sup>などがある。また、更に高感度化を狙って、dNTPに化学修飾したり、逆に残ったddNTPを測定するなどの方法もある。その他にオリゴプローブを用いる手法がある。

こちらは、SNP部位を含む領域に相補的なプローブを用いて2本鎖形成させ、2本鎖を形成したプローブの分子量を計測するものが代表的である<sup>10)</sup>。プローブとしてPNAを用いたり、SNP領域を翻訳してペプチドで計測する手法もある。

Table 2 RNA(DNA)-Protein display

Phage display
Ribosome display
RNA-protein fusion using puromycin
STABLE assay

Table 1 New technique for SNP typing

Technique using fluorometry as detection	Technique using Mass spectrometry
<u>Without PCR</u>	<u>Based on primer extension</u>
Invader assay	Pinpoint assay (four kind of ddNTP)
Sniper assay	Primer extension with three kind of ddNTPs and a dNTP
<u>With PCR</u>	PROBE assay (in solution, on chip)
DOL assay	Survivor assay
Luminex assay	Primer extension with labeled ddNTP
Oligo-Tag array	Primer extension with <sup>15</sup> N/ <sup>13</sup> C-labeled NTP
LCX <sup>®</sup> assay	GOOD assay
Kinetic PCR + PicoGreen	<u>Using oligo-probe</u>
TaqMan PCR	Using PNA probe
Pinpoint assay	Using biotinylated primer(for short tandem repeat)
	Using chaperon probe
	Invader assay
	Using translation to the peptide

#### 4. RNA(DNA)-タンパクをセットで取り扱う

遺伝子の機能解析としてタンパクを調べる場合、それをコードする遺伝子とセットで取り扱うと有用である。例えば、ファージディスプレイは、その代表で、ある機能を有するタンパクをスクリーニングすれば、同時にその遺伝子が得られる。これを *in vitro* で行う方法として、Table 2 に示すような手法が報告されている<sup>11-13)</sup>。

#### 5. プロテオーム解析

遺伝子の総体がゲノムであるのに対し、タンパクの発現プロフィール全体をプロテオームという。ゲノムプロジェクトの究極の目的である、遺伝子の機能の解析とそのネットワークの解明は、このプロテオーム無くしては解析できない。プロテオーム解析に関連する技術 (Table 3) は大別すると、タンパク間相互作用を見る方法と、タンパクを同定する手法、それを発展させてタンパク発現の変化を見る方法 (RNA での differential display に相当) である。

タンパク間相互作用を見る手法としては、Yeast Two Hybrid<sup>14)</sup> が有名であるが、その欠点の克服や種々の応用を目指してタンパク再構成を利用する手法<sup>15)</sup> やイースト以外で行う手法、ハイス

ルーット化等多くの方法が生まれている。また、タンパクだけではなく、小分子とタンパクの相互作用を見る手法も開発されている。これらの手法とは別に、タンパク機能解析に蛍光を用いる方法があるが、通常の蛍光標識では機能を損なうなど、種々の弊害がある。最近、これを克服するための種々のユニークな蛍光標識法がある (Table 4)。また、蛍光タグとして同一励起波長で多くの色を出せる蛍光タグも開発されている。

マススペクトルは、遺伝子だけでなく、プロテオーム解析技術としても注目される。タンパク同定やシーケンシング、発現変化の解析では、ペプチド配列解析や同定の効率を上げる種々のテクニック<sup>16)</sup> や発現比較を定量的に行う ICAT 法<sup>17)</sup> などが開発されている。また、プロテオーム全般に関連することであるが、種々のプロテインチップ開発が始まっている。

#### 6. おわりに

上述した技術以外にも、ユニークなタンパク複合体精製法や、電気化学的に SNP を解析したりタンパク相互作用を検出したりする手法もある。また、これまでと全く違ったイオンチャネルを利用して遺伝子のシーケンシングを行うナノポアシーケンシングのよ

Table 3 Various techniques for proteome analysis

For protein identification and differential display	For the investigation of protein-protein (ligand) interaction
Peptide sequence using charged tag (SMA or SPA reagent)	<u>Based on two-hybrid system</u>
Isotope label	Yeast two hybrid system (Y2H)
ICAT assay	Large scale Y2H
ICAT assay with <sup>15</sup> N-enrich medium	Y2H in mammalian cell
2-dimensional PAGE	Three hybrid system
Capillary LC	One hybrid system
Identification of phosphorylation site	<u>Based on protein complementation assay</u>
Protein array	Using Dihydroforate reductase(DHFR)
	Split Ubiquitin
	Using protein splicing
	Using β-galactosidase
	Using rasGEF+V-src myristoylation signal
	Using adenylyl cyclase
	<u>Other</u>
	Using isotope-labeled crosslinker
	Protein array

Table 4 Fluorescence labeling for proteome research

GFP fusion
Protein insertion into GFP
Fluorescence labeling using puromycin
Fluorescence correlation spectroscopy
Energy transfer cassette
Quantum dot
FLASH

うな技術も生まれつつある。産業に直結する技術として、今後開発の意義が大きいものは何であろうか。SNPのマッピングは、これから技術開発しても間に合わない可能性がある。ゲノム研究の基盤として力を発揮したDNAチップのような技術は、今後は、改良研究が主となろう。SNPタイピングに関しては、迅速性と経済性を競う技術がまだ開発される余地は残っている。しかし何と云っても、今後、必要となるのはプロテオームの関連した諸技術であろう。また、ゲノムから得られた情報をできるだけ効率よく、薬剤などの商品開発に結びつける質的に新しい技術革新が待たれる。例えば、ゲノム研究が進めば、個人レベルで薬物の最適化等が図れるテーラーメイド医療が実現するなどというのはよく耳にすることであるが、現実には、少なくとも現在の技術でそれは極めて困難であろう。個人向けの薬物が調合されるということは、開発する薬ひとつひとつの市場が小さくなることを意味する。現在の技術で、製薬会社がこの開発費 市場規模の問題をクリアできるとは考えられず、今のままでは利用できるのは、せいぜい、薬物代謝遺伝子の利用による副作用の回避程度であろう。本連載が、ゲノム研究に横たわる問題を考えるための一助となれば幸せである。

参考文献

紙面の都合もあり、ここでは代表的な幾つかを挙げる。次回以降の各項目で詳しく列挙する。

- 1) Y. Suzuki, K. Yoshimoto-Nakagawa, K. Maruyama, A. Suyama, S. Sugano, *Gene*, **200**, 149 (1997).
- 2) P. Carninci, C. Kvam, A. Kitamura, T. Ohsumi, Y. Okazaki, M. Itoh, M. Kamiya, K. Shibata, N. Sakaki, M. Izawa, M. Muramatsu, Y. Hayashizaki, C. Schneider, *Genomics* **37**, 327 (1996).
- 3) V. Lyamichev, A.L. Mast, J.G. Hall, J.R. Prudent, M.W. Kaiser, T. Takova, R.W. Kwiatkowski, T.J. Sander, M. de Arruda, D.A. Acro, B.P. Neri, M.A.D. Brow, *Nature Biotechnol.*, **17**, 292 (1999).
- 4) J. Chen, M.A. Iannone, M-S. Li, J.D. Taylor, P. Rivers, A.J. Nelsen, K.M. Slentz-Kesler, A. Roses, M.P. Weiner, *Genome Res*, **10**, 549 (2000).
- 5) X. Chen, B. Zehnbauser, A. Gnirke, P-Y. Kwok, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10756 (1997).
- 6) A.S. Piatek, S. Tyagi, A.C. Pol, A. Telenti, L.P. Miller, F.R. Kramer, D. Alland, *Nature Biotechnol.*, **16**, 359 (1998).
- 7) J-B. Fan, X. Chen, M.K. Halushka, A. Berno, X. Huang, T. Ryder, R.J. Lipshutz, D.J. Lockhart, A. Chakravarti, *Genome Res*, **10**, 853 (2000).
- 8) P. Ross, L. Hall, I. Smirnov, L. Hall, *Nature Biotechnol.*, **16**, 1347 (1998).
- 9) A. Braun, D.P. Little, H. Koster, *Clin. Chem.* **43**, 1151 (1997)
- 10) T.J. Griffin, W. Tannig, L.M. Smith, *Nature Biotechnol.*, **15**, 1368 (1997).
- 11) J. Hanes, A. Pluckthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4937 (1997).
- 12) R.W. Roberts, J.W. Szotak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12297 (1997).
- 13) N. Doi, H. Yanagawa, *FEBS Lett.*, **457**, 227 (1999).
- 14) C-T. Chien, P.L. Bartel, R. Sternglanz, S. Fields, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9578 (1991).
- 15) J.N. Pelletier, F-X. Campbell-Valois, S.W. Michenick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12141 (1998).
- 16) F. Karimi-Busheri, G. Daly, P. Robin, B. Canas, D.J.C. Pappin, J. Sgouros, G.G. Miller, H. Fakhrai, E.M. Davis, M.M. Le Beau, M. Weinfeld, *J. Biol. Chem.*, **274**, 24187 (1999).
- 17) S.P. Gygi, B. Rist, S.A. Gerber, F. Turecek, M.H. Gelb, R. Aebersold, *Nature Biotechnol.*, **17**, 994 (1999).

仕様変更のお知らせ

-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit-AP site Counting

-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit-AP site Counting は、酸化ストレスなどの障害により生じる DNA 損傷部位 ( AP site ) 数を測定するキットとしてこれまで大好評戴いております。しかしながら、そのキットを構成する HRP-streptavidin は現行のキットでは容量が少なく、その希釈溶液を調製する場合、溶液を採取しにくい場合があります皆様には大変ご迷惑をお掛けしておりました。また、保存安定性の問題もあり、この溶液は常に冷蔵保存しておく必要がありました。

今回、様々な検討を重ねた結果、この HRP-streptavidin を安定化剤を添加した状態で1/100に希釈することで安定性が向上すると共に、溶液が少なく取りづらという問題を解決することが出来ました。これまでのキットとの変更点は以下の通りです。

現行

HRP-streptavidin

- ・容量 10 µl
- ・溶液調製法

HRP-streptavidin 8 µl を TE buffer で 40 ml に希釈する。

改定

HRP-streptavidin

- ・容量 500 µl
- ・溶液調製法

HRP-streptavidin 400 µl を TE buffer 19.6 ml に希釈する。

今回の改定は HRP-streptavidin の容量と希釈方法のみとなります。その他の操作方法等は全く現行の方法と変わりません。

得られる実験結果は現行のキットと全く違いはございません。

輸送および保存条件について

現行のキットでは輸送条件は冷蔵でなければならず、輸送状態の不安定な海外については性能を保証できないため、お出しすることができませんでした。今回安定性が大幅に向上した新しいキットにおきましては、海外への輸送に際しても安心して性能を保証できることから、今後は海外のお客様へも本製品を提供できるようになりました。しかしながら国内のお客様に対しましては、輸送条件および保存条件は、これまで通り冷蔵輸送・冷蔵保存とさせていただきます。お手元にて保存する場合は確実に冷蔵保存していただきますようお願い申し上げます。

今回のキット内容の変更に伴い、取扱説明書を一部変更させていただきました。使用前に取扱説明書をお読みになり使用方法をご確認の上ご使用下さい。また、クイックリファレンスを添付致しております。実験時にお隣に置いてご利用下さい。

品名	容量	価格( ¥ )	メーカーコード
-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit-AP site Counting	5 samples	21,000	DK02

## 新製品

## Get pureDNA Kit-Agarose

## Get pureDNA Kit-Agarose

## 特長

- 70%以上の回収率で高純度のDNAが得られる
- 広範なサイズのDNA (0.05 – 50 kbp)の抽出が可能
- DNAをペレットで回収でき、目的濃度のDNA水溶液を容易に調製できる
- 短時間で回収できる
- TAEおよびTBE bufferで泳動したゲルの使用が可能
- 低融点・高強度タイプのアガロースからの回収が可能
- 1sampleあたり75円と低コスト

アガロース電気泳動後の目的DNAの回収には、透析膜を用いた電気泳動濃縮法、アガラーゼのようなゲル分解酵素を用いた方法、シリカ担体を用いた方法等が汎用されています。中でもシリカ担体を用いた方法はキットとして市販されていますが、1)処理するゲルの使用量に制限がある、2)高分子量のDNAでは回収量が低い、という問題がありました。

Get pureDNA Kit-Agaroseはゲル溶解剤、ゲル除去剤およびDNA共沈剤で構成され、目的DNAを簡単に高回収率で回収します。DNAはペレットで回収されますので、バッファーで目的濃度の水溶液に調製でき、PCR、ライゲーション等にそのままご使用頂けます。

## キット内容

- Gel lysis buffer 65 ml x 1本
- Precipitation solution 65 ml x 1本
- Co-precipitation solution (20 mg/ml glycogen) 0.5 ml x 1本

## キット以外に必要な試薬・機器類

- 100%エタノール、70%エタノール
- 1.5 ml遠心チューブ
- マイクロピペット及びチップ
- 遠心分離器
- ボルテックスミキサー
- 60 恒温槽

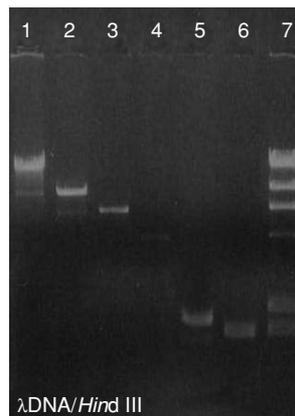
## 保存方法

本キットは冷蔵保存(0 ~ 5 )して下さい。

本キットを用いてpUC19/*Msp*I及びλDNA/*Hind* IIIの各フラグメントを回収し、再び電気泳動した結果をFig.1,2に示します。いずれのDNAフラグメントも、70%以上の回収率で得られます。また、DNAをペレットとして得ることができるため、バッファーで目的の濃度のDNA溶液を調製することが可能です。

本キットでは、Co-precipitation solution (glycogen)を使用することで目的のDNAを目視出来るため、エタノール沈殿後の上澄み除去の際に失うことがありません。Co-precipitation solution

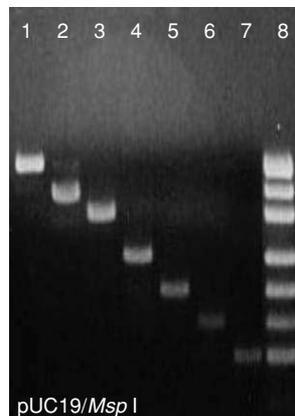
## Get pureDNA Kit-Agarose を使った DNA 回収例

Fig.1 λDNA/*Hind* IIIの

各フラグメントの回収

- Lane 1 23kbp
- Lane 2 9.42kbp
- Lane 3 6.56kbp
- Lane 4 4.36kbp
- Lane 5 2.32kbp
- Lane 6 2.02kbp
- Lane 7 回収前

0.8%Agarose, 100V, 60min

Fig.2 pUC19/*Msp*Iの

各フラグメントの回収

- Lane 1 501bp
- Lane 2 404bp
- Lane 3 331bp
- Lane 4 242bp
- Lane 5 190bp
- Lane 6 147bp
- Lane 7 111bp
- Lane 8 回収前

3%Agarose, 100V, 60min

なしでもDNAは回収できますが、ペレットとして確認できないことがありますのでご注意ください。尚、Co-precipitation solution (glycogen)はPCR、ライゲーション等阻害致しませんので、そのままご使用頂けます。

## 操作方法

ゲルスライスは200 mg以下でご使用下さい<sup>1)</sup>。

- Step 1 EB等で染色したアガロースゲルから目的のバンドを切り出す<sup>2)</sup>。
- Step 2 切り出したゲルを1.5 ml遠心チューブに入れ、ピペットチップなどで細かく砕く。
- Step 3 Gel lysis buffer 300 μlを加え、60 °Cで10分間インキュベーションする。2 ~ 3分毎にvortexする。<sup>3)</sup>
- Step 4 ゲルが完全に溶解したことを確認後、室温に2分静置する。Precipitation solution 300 μlを加え、転倒混和する<sup>4)</sup>。
- Step 5 13,000 × g以上で5分間遠心分離する。
- Step 6 上澄みをピペットで新しい1.5 ml遠心チューブに移す<sup>5)</sup>。
- Step 7 Co-precipitation solution 2 μlを加え、5秒間vortexする。更にエタノール800 μlを加え5秒間vortexする。
- Step 8 13,000 × g以上で3分間遠心分離し、上澄みをピペットで除去

## Get pureDNA Kit-Agarose

- する°。
- Step 9 DNAペレットに70%エタノールを1 ml加え、5秒間 vortex する。13,000 × g以上で3分間遠心分離し、上澄みをピペットで除去する。同じ操作をもう一度繰り返す。
- Step 10 DNAペレットはそのまま保存するか、TE buffer (10 mmol/l Tris、1 mmol/l EDTA)等に溶解する。

- 下で行って下さい。
- 4) 取り出した DNA の純度が低い。
- Step 6で白色沈澱物をピペットで吸いこまないようご注意ください。上澄みに不溶物が混入している際は再度遠心分離し上澄みのみを回収して下さい。
  - Step 8及び9において上澄み除去の最終段階では、最小容量用のマイクロピペットを使用し、上澄みを完全に除いてください。

### 注意事項

- \*1 ゲル重量が200 mg以上の場合、ゲル重量の1.5倍容量のGel lysis buffer及びPrecipitation solution、4倍容量のエタノール及び70%エタノールをご使用下さい。Co-precipitation solutionは2 µlご使用下さい。またその際1.5 mlチューブはご使用になれませんのでご注意ください。
- \*2 TAE及びTBE bufferで泳動したゲルがご使用できます。ゲル濃度3%以内でご使用下さい。
- \*3 ゲルが完全に溶解していない場合は加温時間を延長し完全にゲルを溶解させてください。
- \*4 Precipitation solutionを添加すると沈殿が析出します。
- \*5 上澄みに沈殿物が混入している際は、再度遠心分離し上澄みのみを回収して下さい。
- \*6 上澄みを完全に除去してください。微量の上澄みの残存により、PCR反応を阻害することがあります。完全に上澄みを除去するために、除去の最終段階では、最小容量用マイクロピペット(<20 µl)のご使用をお勧めします。

Gel lysis buffer および Precipitation solution は、一旦開封するとボトルの口に白く析出する場合がありますが使用には差し支えありません。

### トラブルシューティング

- 1) DNAが回収できない、または回収率が低い。
  - ゲルスライスを完全に溶解してください(トラブルシューティング2)を参照)
  - 遠心操作後、使用するチューブによってはDNAペレットがチューブ壁面にしっかりと付着していない場合があります。上澄み除去の際に、DNAペレットを吸い込まないようにご注意ください。
- 2) ゲルが溶解しにくい。
  - 1.5mlチューブ内でゲルスライスをあらかじめ細かく刻んでください。
  - 加温溶解の際、サンプル溶液を2分毎にピペティングまたは vortex してください。
  - 加温時間を延長し完全にゲルを溶解させてください。
- 3) Step 6の遠心分離後の沈殿物が固くバックされていない。
  - ゲルスライスを十分に溶かしてPrecipitation solutionを加えてください。
  - Precipitation solutionを加えた後、均一になるようタッピングまたは vortex を行ってください。
  - 13,000 × g以上の遠心が困難な場合は、遠心時間を長くし沈殿物が完全にバックされるまで遠心して下さい。尚、遠心操作は室温以

### 試作品の評価にご協力頂いた先生方の感想

- 「電気泳動(TAE)後のプラスミド(3kb)バンドから、プロトコルに従い抽出でき、形質転換に使用できました。サンプル数が少ない場合は勿論、多い場合でもステップ数が少ないので極めて便利だと感じました。」 (香川大学)
- 「回収率に関しては70%以上あり、ガラスパウダーや遠心フィルターを用いた場合より優れていると思います。また作業時間も非常に短時間で済み、効率よく実験が進められることを実感いたしました。今回このキットを用いて抽出したDNAはサザンハイブリ用のプローブに使用しましたが、全く問題なく使用できました。」 (姫路大学)
- 「アガロースゲルから回収したvectorとcDNAの制限酵素断片を使用して問題無くライゲーションできました。何度も洗浄しなくてよいマトリックスなどの混入が無い点 最終産物を小さな体積で得られる点は非常に良いと感じました。」 (大阪大学)
- 「染色体DNAを制限酵素EcoR1処理後、約20 kb付近の断片を精製してみました。かなり収量はいいようです。」 (崇城大学)
- 「操作が簡単・短時間でしかも高回収できました。遠心操作において沈殿が明確であり操作性が高いと感じました。常法(シリカマトリックスを使った手法)に比べると約半分の時間で終了するため、学生には好評でした。ただStep 6で上清を全て回収すると1.5 mlのチューブでは溢れてしまいます。上清のうち0.6 mlだけ用いると100-150 µlのロスが出ますが、十分な量のDNAが回収されていました。」 (九州東海大学)
- 「思ったよりも時間が掛かってしまいました。御社のキットは100-200 mg以下というゲル量で行うため、普段使っているゲル量(300-400 mg)よりも少ないという点で不便を感じました。(中略)シリカビーズを使う他社キットではビーズにDNAが吸着しているため、DNAを目視出来ません。でもこのキットはエタ沈法なのでその後の工程は、確実にDNAが回収できているのが目で見えるので安心して使えました。」 (早稲田大学)

平成 13年 10月 モニター調べ

本品開発に際し、試作品評価にご協力頂きましたことを厚くお礼申し上げます。

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Get pureDNA Kit-Agarose	200 samples	15,000	GK01

## Q & A

### 自己組織化単分子膜(Self-Assembled Monolayers : SAMs)

Q1 SAMs とは、どのようなものですか。

A1 固体表面に種々の分子が自発的に高密度・高配向な分子膜を形成することを自己組織化(Self-assembly : SA)といい、形成された分子膜を自己組織化単分子膜(Self-Assembled Monolayers : SAMs)と言います。

Q2 SAMs を構成する分子には、どのようなものが在るのですか。

A2 主に固体表面と結合性部位、アルキル鎖、機能性部位の3つから構成されており、本稿で述べるチオール誘導体の他に、有機シリコン誘導体、脂肪酸誘導体などが知られています。

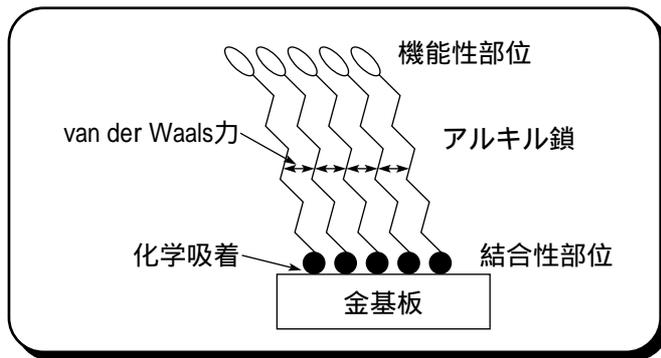


図1. 金表面に形成した SAMs の模式図

Q3 アルカンチオール化合物 SAMs の特徴はどのようなものですか。作製は簡単ですか。

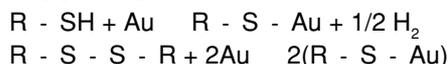
A3 SAMs の中でも、アルカンチオール化合物は金と反応して Au-S 結合すると共に、アルキル鎖同士の van der Waals 力によって高い配向性を持つ単分子を形成すると報告されています。SAMs の作製には、特殊な装置を必要とせず、チオール溶液中に基板を浸漬するだけで容易に単分子膜を構築できます。

Q4 チオール誘導体として、どのようなものが使用可能ですか。

A4 結合性部位はチオール(-SH)の他に、ジスルフィド(-SS-)やスルフィド(-S-)が使用されています。基板結合部位とは反対側のアルキル鎖末端に種々の機能性部位を導入することで、種々の機能を固体表面に導入することが可能です。

Q5 チオール誘導体は、基板にどのように結合しているのですか。

A5 チオール誘導体の金への化学的吸着は、以下の反応が自発的に起こる結果であると考えられています。但し、実際に水素分子は確認されていません。



Q6 SAMs の用途にはどのようなものがありますか。

A6 アルキルチオール類を金表面に吸着させた SAMs は、金修飾電極や表面プラズモン共鳴 (SPR)、水晶共振子マイクロバランス (QCM) 等に利用されています。いずれも、基板となる金表面にチオールやジスルフィドを用いてプローブ分子を固定化し、ターゲット分子との相互作用をそれぞれ電流、共鳴吸収の角度変化、振動子変化として検出しています。

Q7 どのようなタイプの試薬があり、どのような特徴を持つのですか。

A7 弊社では、以下の7種類のチオール誘導体を取り扱っています。以下に特徴と製品群(メーカーコード表示)を記します。

(1) 様々なペプチドやタンパク質、その他の分子認識サイトを導入する際に有用なチオール誘導体

- 末端アミノ基型チオール : A423, A424, A425
- 末端 Fmoc 基型チオール : F287, F288, F289 (アミノ基を Fmoc 保護した化合物であり、脱保護によりアミノ基を露出させることが可能)
- 末端カルボキシル基型チオール : C385, C386, C387
- 末端カルボキシル基型ジスルフィド : C404, C405, C406, D524 (チオールに比べ臭気が少なく、取扱いが容易)
- 末端 NHS エステル型 : D537, D538, D539 (既に活性エステル化してあるため、分子を共有結合する際、活性化の操作が必要ありません。)

(2) 酸化還元反応を示し、分子修飾電極センサーへの応用等に利用されているチオール誘導体

- 末端フェロセニル基型チオール : F246, F247, F269

(3) 生体関連物質を検出する際に問題となる非特異吸着を抑制するために有用な、混合 SAMs 形成に利用されているチオール誘導体

- 末端ヒドロキシル基型チオール : H337, H338, H339

Q8 膜の形成過程や配向構造はどのようにして調べれば良いですか。

A8 水晶振動子マイクロバランス (QCM)、走査型プローブ顕微鏡 (STM / AFM)、FT-IR スペクトル、X線電子分光 (XPS)、エリプソメトリーなどによって詳細に検討されています。

Q9 サイクリックボルタンメトリー (CV) では、どのようなことがわかるのですか。

A9 SAMs の CV から得られたサイクリックボルタモグラムとしては、チオール類の還元脱離に伴うピーク電位から、吸着量を見積もることができ、化学種が金表面にどの程度吸着しているかを知ることができます。また、ピーク電流値の変化で、SAMs 形成によるレドックス分子のブロッキング能を見ることも可能です。CV の他、表面プラズモン共鳴 (SPR) や QCM でも、吸着量を見積もることができます。

Q10 SAMs を形成する基板は、どのような物が使用可能ですか。

A10 金以外に銀、白金や銅などの貴金属、種々の半導体や金属酸化物などを用いた報告があります。チオール誘導体のSAMs作製基板としては、ガラス基板などに金を真空蒸着して作製した金基板、金板や金線など測定系に合わせて任意の形状のものが使用可能です。ガラス基板に金蒸着した市販品もあります。

Q11 SAMsの電気化学的な測定などで再現性良く結果を得るために注意すべき点は何ですか。

A11 金表面の性質(結晶面など)とSAMs修飾後の処理に気を付けて下さい。

金表面は単結晶など、結晶表面の状態が解っている方が良いですが、いつも同じ処理を行い、且つ表面の平滑性が一定であれば、再現性は得られると思われれます。また、SAMs修飾後、金表面に吸着していないと推察される過剰のチオール誘導体を除去することが重要です(A.16(4)参照)。

Q12 金表面は金(111)面でなければならないのでしょうか。

A12 A11. とも関連しますが、SAMs を作製する基板の表面状態により、吸着量や検出される特性の実験結果に差を生じる為、SAMs や機能性物質の性質や性能を反映せず、金基板の表面状態の影響が評価結果に反映されることとなります。そのため、チオール類の吸着挙動を調べる用途などでは、規則正しく原子配列した表面をもつ金(111)などの単結晶基板上での、限定した表面で研究が行われているようです。用途や目的によって、要求される金基板表面の状態が異なります。

Q13 基板の洗浄方法を教えてください。

A13 付着している有機物等を取り除き、金表面を清浄化するため、Piranha 溶液(硫酸:30%過酸化水素水=3:1)に10~15分間浸漬後、純水で洗浄します。Piranha 溶液は、強力な酸化力を有し、多くの有機化合物と反応するので、取扱い及び廃棄には注意して下さい。但し、この方法は金基板表面のみの洗浄方法であり、例えば金電極の回りを樹脂でコートした物には樹脂を劣化させる可能性があるため、不適当です。

また、金基板の研磨による洗浄、および鏡面処理方法として、エメリーペーパーの1000、1500、2000で順番に磨き、最後に粒径サイズ1 $\mu$ mのアルミナ粉末を懸濁させた水(アルミナ研磨剤として市販されている)をフェルト布に少量含ませて研磨する方法があります。または、粒径サイズ1 $\mu$ mのダイヤモンドペーストで研磨します。ガラス基板などに金を真空蒸着して作製した基板では、水素炎アニールにより有機物等を除去後、水洗して使用する

方法やUVランプによるオゾン照射法なども行われています。

Q14 SAMs を形成するための基板の浸漬条件(溶媒、溶液安定性、濃度、浸漬時間)を教えてください。

A14 溶媒や濃度、および浸漬時間に制限はありませんが、膜の密度や配向に影響を与える可能性があります。目的に応じて調整、検討を行ってください。下記に報告されている浸漬条件の一例を記します。

(1) 溶媒:チオール類が溶解し、それらと化学反応しないものが使用可能です。エタノールを使用した報告例が比較的多く見受けられます。必要に応じて蒸留したものや、溶液中の溶存酸素を除去するために不活性ガス(窒素ガスまたはアルゴンガス)バブルを行なったものを使用します。また、末端NHSエステル型などは、アルコール類やアミン類、及びチオール類と反応する恐れがあり、溶媒中の水で分解する恐れもありますので、脱水した溶媒を使用するなど、試薬によっては使用時に注意が必要な場合があります。

(2) 溶液安定性:溶媒中の溶存酸素によるチオールからジスルフィドへの酸化や、水分による分解が考えられる為、溶液の用時調製をお勧めします。チオール溶液保存中に生成する副生成物は主にジスルフィドです。

(3) 濃度:数 $\mu$ ~数10 $\mu$ mol/lで一般的に行われているようです。

(4) 浸漬時間:数10分~数時間。濃度にもよりますが、チオール類の吸着は、比較的短時間でもかなり飽和吸着に近い形で吸着しますが、その後ゆっくりと時間をかけて配向性が高くなると言われています。

Q15 溶解性を教えてください。

A15 表1. に各溶媒への溶解性データを記します。

Q16 SAMs の作製手順を教えてください。

A16 以下に簡略な操作方法の流れを記します。

(1) SAMs 作製基板を用意します(A.10参照)。

(2) 基板を洗浄します(A.13参照)。

(3)チオール類の数 $\mu$ ~数10 $\mu$ mol/lエタノール溶液に所定の時間浸漬します(A.14参照)。

(4)エタノール、純水の順に金表面を洗浄し、過剰に吸着しているチオール類を除去します。末端NHSエステル基型など、水で分解する可能性のあるものは、水洗しません。適切な溶媒で洗浄し、乾燥させるだけに留めます。

(5)必要であれば、金表面を窒素(アルゴン)雰囲気下で乾燥させます。

Q17 SAMs 表面にタンパクを結合させたい。

A17 末端カルボキシル基を有するチオール類を用いた一例を以下に記します。生体物質の固定化に関しては、他の方法も報告されています。

- (1) 末端カルボキシル基のSAMsを作製します(A.17の操作参照)。
- (2) 100 mg / ml NHS水溶液 100 μlをSAMs表面に滴下(または、その水溶液中にSAMs基板を浸漬)した後、100 mg / ml WSC水溶液 100 μlを加え、SAMs表面で数時間反応させます。
- (3) 抗体を溶解する溶媒などでSAMs表面を洗浄後、抗体溶液をSAMs表面に滴下(または、その水溶液中にSAMs基板を浸漬)します。

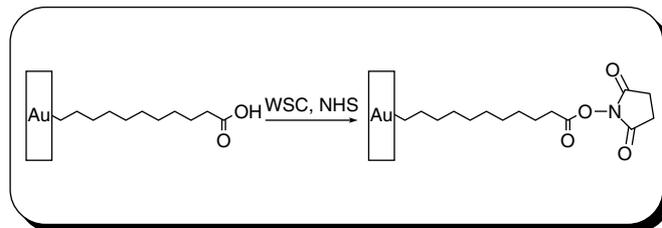


図2 . SAMs 表面の活性化の模式図

参考事項

NHSエステルアルカンジスルフィドを使用する場合は、既に活性エステル化してあるため、末端部分を活性化(上記の操作(1)(2))せずに、タンパクを固定化することができます。

品名	略名	容量	価格( ¥ )	メーカーコード
11-Amino-1-undecanethiol,hydrochloride	11-AUT,HCl	10 mg	13,100	A423
		100 mg	39,400	A423
8-Amino-1-octanethiol, hydrochloride	8-AOT,HCl	10 mg	13,100	A424
		100 mg	39,400	A424
6-Amino-1-hexanethiol, hydrochloride	6-AHT,HCl	10 mg	13,100	A425
		100 mg	39,400	A425
N-Fmoc-Aminoundecanethiol	11-FAUT	10 mg	14,800	F287
		50 mg	45,000	F287
N-Fmoc-Aminooctanethiol	8-FAOT	10 mg	14,800	F288
		50 mg	45,000	F288
N-Fmoc-Aminohexanethiol	6-FAHT	10 mg	14,800	F289
		50 mg	45,000	F289
10-Carboxy-1-decanethiol	10-CDT	10 mg	11,300	C385
		100 mg	31,000	C385
7-Carboxy-1-heptanethiol	7-CHT	10 mg	11,300	C386
		100 mg	31,000	C386
5-Carboxy-1-pentanethiol	5-CPT	10 mg	11,300	C387
		100 mg	31,000	C387
10-Carboxydecyl disulfide	10-CDD	10 mg	11,300	C404
		100 mg	33,000	C404
7-Carboxyheptyl disulfide	7-CHD	10 mg	11,300	C405
		100 mg	33,000	C405

品名	略名	容量	価格( ¥ )	メーカーコード
5-Carboxypentyl disulfide	5-CPD	10 mg	11,300	C406
		100 mg	33,000	C406
4,4'-Dithiodibutyric acid	DDA	500 mg	14,000	D524
Dithiobis (succinimidyl undecanoate)	DSU	10 mg	13,200	D537
		50 mg	39,800	D537
Dithiobis (succinimidyl octanoate)	DSO	10 mg	13,200	D538
		50 mg	39,800	D538
Dithiobis (succinimidyl hexanoate)	DSH	10 mg	13,200	D539
		50 mg	39,800	D539
11-Ferrocenyl-1-undecanethiol	11-FUT	10 mg	11,800	F246
		100 mg	36,000	F246
8-Ferrocenyl-1-octanethiol	8-FOT	10 mg	11,800	F247
		100 mg	36,000	F247
6-Ferrocenyl-1-hexanethiol	6-FHT	10 mg	11,800	F269
		100 mg	36,000	F269
11-Hydroxy-1-undecanethiol	11-HUT	10 mg	11,500	H337
		100 mg	34,000	H337
8-Hydroxy-1-octanethiol	8-HOT	10 mg	11,500	H338
		100 mg	34,000	H338
6-Hydroxy-1-hexanethiol	6-HHT	10 mg	11,500	H339
		100 mg	34,000	H339

表 1 SAMs 関連試薬類溶解性データ 溶解： 不溶：x 微量沈澱有り： 未測定：- 単位 mol/l

メーカーコード	Methyl alcohol				Chloroform			Ethyl alcohol				Dichloromethane			Tetrahydrofuran			
	10 m	1 m	100 μ	10 μ	10 m	1 m	100 μ	10 m	1 m	100 μ	10 μ	10 m	1 m	100 μ	10 m	1 m	100 μ	10 μ
A423												x	x		x	x	x	
A424																		
A425					x								x			x		
F287	x									x								
F288	x									x								
F289																		
C385																		
C386																		
C387																		
C404					x								x			x		
C405																		
C406																		
D524													x					
D537	-	-	-	-					-	-	-	-						
D538	-	-	-	-					-	-	-	-						
D539	-	-	-	-					-	-	-	-						
F246	x																	
F247																		
F269	x																	
H337																		
H338																		
H339																		

メーカーコード	Acetonitrile				Ethyl acetate				Hexane				DMSO		DMF		Water			
	10 m	1 m	100 μ	10 μ	10 m	1 m	100 μ	10 μ	10 m	1 m	100 μ	10 μ	10 m	1 m	10 m	1 m	10 m	1 m	100 μ	10 μ
A423	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					x			
A424	x				x	x			x	x	x	x								
A425	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					x			
F287	x								x	x	x	x					x	x	x	x
F288	x								x	x	x	x					x	x	x	x
F289									x	x	x	x					x	x	x	x
C385																	x	x	x	x
C386																	x			
C387																				
C404	x				x				x	x	x	x					x	x	x	x
C405									x	x	x	x					x	x	x	x
C406									x	x	x	x					x	x	x	x
D524	x								x	x	x	x					x	x	x	x
D537									x	x	x	x					-	-	-	-
D538									x	x	x	x					-	-	-	-
D539									x	x	x	x					-	-	-	-
F246																	x	x	x	x
F247																	x	x	x	x
F269									x								x	x	x	x
H337	x	x							x								x	x	x	x
H338																	x			
H339																				

**販売中止のご案内**

弊社都合により下記製品の販売を中止いたしますのでご連絡申し上げます。

ただし在庫あるものに限り対応できますので、弊社または販売店までお問い合わせください。

品名	容量	和光コード	メーカーコード
10x TAE	1 L	347-07501	MB03
10x TNE	500 ml	341-07565	MB09
10x TPE	1 L	341-07521	MB05
1H-1,2,4-Triazole	100 g	345-06561	NX05
1H-1,2,4-Triazole	25 g	343-06562	NX05
2-Aminoperimidine HBr	1 g	344-03971	A008
2-Aminoperimidine HCl	1 g	347-03961	A009
2-Furildioxime	5 g	344-01293	F006
2-Iminopiperidine	100 mg	346-07331	I012
3-Br-7-Nitroindazole	25 mg	342-07291	B350
4TF	100 mg	340-04811	T017
5-F-BAPTA	50 mg	344-05791	B038
5-F-BAPTA-AM	50 mg	347-05801	B039
5-Nitro-2-PDS	1 g	340-03451	N023
6TF	100 mg	347-04821	T018
7-Nitroindazole	50 mg	343-07221	N408
8-Acetoxyquinoline	5 g	347-00063	A002
AA	25 g	344-00012	A001
AB-NTA	1 g	344-07653	A296
Acetone,(Sp)	500ml x 6	340-00031	SP01
Acetonitrile,(Sp)	500ml x 6	323-00043	SP02
Acridinium-I	10 mg	347-06521	A060
ACVJ	25 mg	342-07051	A313
Ag(I)-CHBA,(AS)	1 g	344-03231	A017
Ag(I)-CHBA,(AS)	5 g	340-03233	A017
AO-10-Dodecyl bromide	100 mg	346-04911	A011
Azido-FDA	100 mg	349-04901	A014
Azidoluminol	10 mg	340-06871	A307
Ba(II)-CHBA,(AS)	1 g	341-03241	A018
BBD	1 g	340-03711	B022
BDC-OH	1 g	340-03691	B024
Benzene,(CV)	1 L	343-03941	CV01
Benzene,(Lu)	250 ml	349-00241	LU02
Benzene,(Sp)	500 ml	347-00225	SP03
Benzene,(Sp)	500ml x 6	345-00221	SP03
BNBAC3 Sulfo-OSu	5 mg	340-06251	B293
BNBAC3-OSu	5 mg	346-06231	B292
BNBAC5-OSu	5 mg	343-06241	B294
BNBA-OSu	5 mg	349-06221	B233
BPR	1 g	349-00361	B013
BPR	5 g	345-00363	B013
BT Standard	1 g	349-00383	B016
Butyl-PBD	250 g	340-00411	B017
Butyl-PBD	25 g	348-00412	B017
Butyl-PBD	5 g	346-00413	B017
Caged aspartic acid	5 mg	349-06081	CC18
Caged ATP dimethoxy	5 mg	342-05971	CC05
Caged cAMP	5 mg	340-05891	CC03
Caged cGMP	5 mg	347-05921	CC04
Caged fluorescein	5 mg	348-06311	C299
Caged fluorescein DPPE	5 mg	349-06341	C260
Caged fluorescein Sulfo-OSu	5 mg	342-06331	C261
Caged GABA	5 mg	346-06091	CC15
Caged glutamic acid	5 mg	349-06101	CC17
Caged glycine	5 mg	346-06111	CC16
Caged GTP	5 mg	343-05901	CC02
Caged GTP dimethoxy	5 mg	348-05951	CC06
Caged proton	5 mg	343-06121	CC13
Caged proton dimethoxy	5 mg	340-06131	CC14
Calcichrome	1 g	344-00453	CC03
CAPSO	100 g	345-05461	GB21
CAPSO	25 g	343-05462	GB21

品名	容量	和光コード	メーカーコード
Carboxyarsenazo	1 g	349-00523	C006
CCVJ	25 mg	349-07061	C340
Cd(II)-CHBA,(AS)	1 g	340-00531	A019
CDCQ	25 mg	345-07041	D406
Ce(III)-AA	5 g	344-00551	A034
Chloranilic acid	10 g	341-00561	C009
Chloroform,(Sp)	500ml x 6	342-00574	SP06
Chol-AECM-mannan	100 mg	342-05591	C036
Chol-AECM-pullulan	100 mg	345-05581	C037
Chromazurol B	1 g	340-04051	C011
Chromazurol S	5 g	340-00651	C012
Chromazurol S	25 g	348-00652	C012
Co(II)-CHBA,(AS)	1 g	342-03151	A020
Co(III)-AA	25 g	344-00752	A036
Colloid Titration Reagent A	1 Set	349-07701	C024
Colloid Titration Reagent B	1 Set	346-07711	C025
Colloid Titration Reagent C	1 Set	343-07721	C026
Colloid Titration Reagent D	1 Set	340-07731	C027
Colloid Titration Starter Kit	1 Kit	346-07691	C029
Cr(III)-AA,(AS)	1 g	347-00781	A021
Cu(II)-AA,(AS)	1 g	347-00801	A022
Cu(II)-CHBA,(AS)	1 g	344-00811	A023
Cyclohexane,(Sp)	500ml x 6	342-00851	SP07
CyDTA(for amino acids analysis)	5 g	340-00891	C019
CyDTA(for amino acids analysis)	10 g	346-00893	C019
DABITC	100 mg	345-05101	D004
DABITC	1 g	341-05103	D004
DAHP	1 g	345-07301	D462
DAMP · HCl	5 mg	348-06431	D351
DCQ	25 mg	348-07031	D407
DDD	5 g	344-00914	D002
DDPC	10 mg	345-05601	D044
Detergent Starter Kit	Set	343-05381	DS01
Detergent Starter Kit II	Set	341-06541	DS02
DHEG	25 g	345-00922	D007
Dibenzyl-bis(12-crown-4)	100 mg	341-06301	D349
Dichloro-CFSE	25 mg	341-06781	D353
Didodecyl-bis(12-crown-4)	100 mg	348-06291	D210
DIDS	100 mg	340-05271	D032
DIDS	500 mg	346-05273	D032
Dimercaptosuccinic acid	1 g	345-00961	D010
Dimethoxyethane,(Sc)	250 ml	346-00991	SC05
Dimethyl-CFSE	25 mg	344-06771	D352
Dimethyl-POPOP	25 g	341-01002	D011
Dimethyl-POPOP	5 g	349-01003	D011
Dimethylsulfonazo-III	1 g	346-01013	D012
Dimethylsulfoxide,(Sp)	500ml x 6	341-01024	SP10
Dioxane,(Sc)	250 ml	345-01061	D012
DIPSO	25 g	347-04142	GB08
DNBC	1 g	343-03821	D005
DPTA-OH	25 g	341-01122	D019
DPTBA	1 g	344-05213	D036
DTAN	100 mg	349-04803	D003
DTBPA	100 mg	348-05691	D046
Eu-DPM	1 g	345-01201	E019
Eu-FOD	1 g	342-01211	E020
Eu-PTA	1 g	349-01221	E021
FTA	5 g	347-01261	F003
GHA	1 g	341-01323	G003
Good's Buffer Starter Kit-I	Set	342-05471	GB51
Good's Buffer Starter Kit-II	Set	349-05481	GB52
Good's Buffer Starter Kit-III	Set	346-05491	GB53
GTB	1 g	348-01333	G004
HABT	25 g	341-01362	H002
HDTA	5 g	343-05641	H016
Hexanes,(Sp)	500ml x 6	347-01401	SP14
Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub> (synthetic)	100 µg	349-05861	I008
iso-Octane,(Pr)	250 ml	343-02101	PR05
iso-Octane,(Sp)	500ml x 6	340-02091	SP18
iso-Propyl alcohol,(Lu)	250 ml	349-02321	LU16
iso-Propyl alcohol,(Sp)	500ml x 6	342-02311	SP19

品名	容量	和光コード	メーカーコード
L-NIL	25 mg	347-07241	I233
L-NNA	1 g	346-07211	N410
Lumogallion	1 g	345-01603	L003
Maleimido-C3-benzyl-EDTA	10 mg	345-06061	M031
MBD	500 mg	343-03723	M017
MBOTAD precursor	10 mg	346-06971	M319
MBPM	10 mg	341-06281	M274
Meldola's Blue	1 g	343-03681	M001
MESS	10 mg	348-06551	M023
Methyl alcohol,(Pr)	250 ml	347-01641	PR04
Methyl alcohol,(Sp)	500ml x 6	340-01631	SP15
Methylcyclohexane,(Sp)	500ml x 6	341-01703	SP16
Methyl-EDTA	25 g	340-01712	M006
Methylene chloride,(sp)	500ml x 6	349-01721	SP17
Mg(II)-CHBA,(AS)	1 g	346-03171	A025
MMTr-Cl	25 g	341-06622	NX02
Mn(II)-CHBA,(AS)	1 g	340-04671	A026
MTB	1 g	344-01813	M008
MTB	5 g	342-01814	M008
MXB	1 g	342-01853	M013
N,N-Dimethylformamide,(Sp)	500ml x 6	342-00971	SP09
Na(I)-CHBA,(AS)	1 g	343-03201	A027
Naphthalene	100 g	344-01891	N044
NBD1	1 g	347-03841	N021
NBHA	500 mg	346-03833	N022
Neo-TB	1 g	348-01953	N006
Neo-Thorin	1 g	349-01961	N007
Neo-Thorin	5 g	345-01963	N007
n-Heptane,(Lu)	250 ml	344-01391	LU10
n-Heptane,(Sp)	500ml x 6	341-01384	SP13
Ni(II)-EDTA	25 g	345-02002	E015
NIPF	10 mg	342-06711	N372
Nitr 5	5 mg	349-05741	N051
Nitr 5-AM	1 mg	348-06791	N376
Nitr 7	5 mg	346-05751	N052
Nitroso-ESAP	100 mg	348-04091	N009
NOR 2	10 mg	348-06931	N389
NOR 2	50 mg	344-06933	N389
NOS Inhibitor Set I (arginine analogs)	1 Set	343-07581	NI01
NOS Inhibitor Set II (for iNOS)	1 Set	340-07591	NI02
NPDE	1 g	346-06731	N267
o,o'-Dihydroxyazobenzene	1 g	348-00951	D009
ODQ	10 mg	345-07781	O277
Pb(II)-CHBA,(AS)	1 g	348-02151	A029
PBPPB	1 g	341-03981	P015
PBPPB	5 g	347-03983	P015
PC3P	25 mg	346-05871	P030
Phenyl phosphorodichloridate	500 g	349-07005	NX16
Phenylarsonic acid	25 g	344-02212	P008
Phisyl-Cl	10 mg	340-07091	P308
PPC	1 g	347-02263	P010
PPKO	1 g	348-02271	P011
PPKO	10 g	342-02274	P011
Pr-DPM	1 g	342-02291	P018
Pr-FOD	1 g	345-02301	P019
PTA	5 g	343-02341	P013
p-Terphenyl	100 g	341-02641	T016
PV	1 g	340-02351	P014
PV	5 g	346-02353	P014
Pyridine	100 ml	341-06661	NX29
Pyridine	500 ml	343-06665	NX29
Quene 1	1 mg	345-05841	Q004
Quene 1-AM solution	1 ml	342-05851	Q006
Quin 2-AM	50 mg	342-04893	Q002
S-Aminoethyl-ITU	1 g	348-07271	A383
SAPH	1 g	341-02381	S002
SAPH	10 g	345-02384	S002
SBD-Cl	1 g	342-04991	S012
Scintisol AL-1	3 L	341-02401	SC01
SCR	1 g	345-02443	S004
S-Ethyl-ITU	1 g	341-07261	E259

品名	容量	和光コード	メーカーコード
S-Isopropyl-ITU	25 mg	344-07371	I011
S-Methyl-ITU	1 g	344-07251	M358
S-Nitroso-L-cysteine 溶液	5X1 ml	340-07351	N414
SNPA	1 g	346-03811	S014
SPADNS	5 g	347-02481	S005
SPADNS	25 g	345-02482	S005
SPQ	50 mg	344-05671	S017
Stilbazo	1 g	340-02493	S006
Stilbazo	5 g	348-02494	S006
Stilbenebluoblu-S	1 g	343-02503	S007
STTA	1 g	342-03031	S008
STTA	5 g	348-03033	S008
Sulfarsazene	100 mg	341-03861	S009
Sulfchlorophenol-S	1 g	340-02513	S010
Sulfonazo-III	1 g	347-02523	S011
TAA	5 g	348-02531	T005
TAC	1 g	341-02543	T006
TAM	1 g	348-02553	T007
TAMSMB	100 mg	347-04201	T009
TAMSMB	1 g	343-04203	T009
TAN	1 g	345-02563	T010
TAR	1 g	349-02583	T011
TAR	5 g	347-02584	T011
TDBA	10 mg	343-07101	T323
TDBA-OSu	10 mg	340-07111	T324
TEMPO-T	25 mg	343-05881	T038
TFPI	5 mg	345-07801	T401
Thiooxine	1 g	342-02713	T019
Thorin	1 g	343-02721	T020
Thorin	5 g	349-02723	T020
tma-DPH	50 mg	341-05201	T034
TMA-PTIO	10 mg	342-07311	A375
TMA-PTIO	100 mg	348-07313	A375
TMG	25 ml	348-06632	NX33
TMG	500 ml	342-06635	NX33
TPAC	1 g	348-02793	T025
TPAC	5 g	346-02794	T025
TPC	1 g	341-02803	T026
TPC	5 g	349-02804	T026
TPP	1 g	342-03891	T002
TPPC	1 g	348-02813	T027
TPPC	5 g	346-02814	T027
TTD-14-crown-4	5 mg	340-06751	T302
Umbelliferone	5 g	347-02883	U001
Variamine Blue B, hydrochloride	5 g	347-02903	V001
VO(II)-AA,(AS)	1 g	347-04681	A031
XB-II	1 g	348-02933	X002
Zn(II)-CHBA,(AS)	1 g	341-03001	A032
同仁式ヒ素定量器	1 Set	344-03851	D024
複合滴定液( A )	500 ml	346-01275	F004
複合滴定液( B )	500 ml	343-01285	F005

ラベル材質変更のお知らせ

昨年 10 月よりアルミ製のラベルを廃棄処理が容易な紙製のラベルへと段階的に変更いたしております。引き続き、ご愛顧くださいますようお願い申し上げます。



旧

新

# 第12回フォーラム・イン・ドージン開催報告

## 「生物毒から生命現象を垣間見る」

昨年11月30日、メルパルク熊本に於いて、第12回フォーラム・イン・ドージンが開催されました。当日は前日までの雨も上がり、白川河畔の木々の紅葉を眺めながらの一日となりました。

今回は、「生物毒から生命現象を垣間見る」と題して、国内のこの分野のトップランナーの先生方8名に講演していただきました。

遠くは関東から参加された先生方も多く、参加者延べ70名以上と、盛況のうちに終えることができ、あらためて、ご尽力いただいた先生方に感謝する次第です。実は昨年、自然免疫をテーマに開催した際に、「防御」としての免疫の次は「攻撃」としての生物毒をテーマにしてはどうかという話が上がり、折しもタイミング良く、「蛋白質・核酸・酵素」の3月号増刊「生物間の攻撃と防御の蛋白質」が刊行されたので、非常に順調に今回のフォーラムを準備することができました。昨年同様、山本先生（熊本大）岩永先生には企画段階からご尽力いただきました。今年から更に、前田先生に加え、中山先生（熊本大）にもアドバイスをお願いしました。



正木先生（東京大）は、生物界を全体として見た場合、「攻撃」と「防御」との区別は曖昧で、これらは生物間相互作用というより広い概念で理解すべきだという内容の講演をされ、本フォーラムの基調を成すものでした。細胞膜結合性毒素については、梅田先生（東京都臨床研）がリン脂質フォスファチジルエタノールアミン（PE）結合性ペプチドを用いて、PEが細胞骨格の制御に如何に関わっているかについて、また蛋白合成阻害毒については、遠藤先生（愛媛大）がリボソームRNAのN-glycosidaseの作用から無細胞蛋白合成系構築に至るまでの話をされました。両講演とも、蛋白質のフォールディングとの関連に多くの質問が集中し

ていました。また、細胞内情報伝達に作用する毒としては、堀口先生（大阪大）が百日咳菌壊死毒についての紹介をされました。さらに、もう一方の代表的な生物毒としてイオンチャネル・ブロッカーがありますが、これに関しては、川合先生（自治医大名誉教



授）と佐藤先生（福岡女子大）とが、それぞれ、クモ毒、貝毒を例に紹介されました。特に、佐藤先生はペプチドの固相合成技術を駆使した内容で、フォールディングの問題もジスルフィド結合を如何に架けるかという技術的なノウハウに集約できると感じました。ディスカッションでもこの点に踏み込んだ内容が多かったように思います。

最後のセッションでは、森田先生（明治薬科大）が血液凝固系に作用するヘビ毒について、また、鎮西先生（三重大）が吸血昆虫の唾液腺成分についての講演をされました。いずれも活発なディスカッションで、予定の時間を大きく上回り、関係者を心配させたようです。

今回のフォーラムでは代表的な生物毒について、それぞれ第一線の研究者に講演を行っていただきましたが、それらを通してどこまで生命現象を垣間見ることができたかは分かりません。しかし、生物毒が生命現象の根幹に深く結びついており、その働きを理解することは、生命の営みを理解する重要な視点に他ならないと確信することができたと思います。講演要旨集は若干の残部がございます。ご希望の方は小社までお問い合わせ下さい。（佐々本 一美）

ホームページアドレス

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

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