

DOJIN NEWS

No.102
2002

ドージンニュース

■ Review

ヒト培養細胞を用いた食品成分の機能性評価

立花宏文

■ Topics on Chemistry

細胞内情報伝達におけるリスク管理

～PKA活性の可視化プローブ～

佐々本一美

■ 連載

ケミストからみたポストゲノム2

片山佳樹



目次

Review

- ヒト培養細胞を用いた食品成分の機能性評価
九州大学大学院農学研究院 立花宏文 1
- ケミストからみたポストゲノム2
~ SNP タイピングその1 (蛍光法による検出)
九州大学大学院工学研究院 片山佳樹 6

Topics on Chemistry

- 細胞内情報伝達におけるリスク管理 ~ PKA 活性の可視化プローブ~
同仁化学研究所 佐々本一美 11

Commercial

Q&A

- SOD Assay Kit-WST 5

新製品案内

- Detergent Screening Set 12

- Get *pure*DNA Kit 13

試作品案内

- Self Assembled Monolayers(SAMs)研究用試薬 12
- Calcium Screening Kit 16
- アミロイド染色試薬 BSB 17

お知らせ

- カスタマーサービス部からのお知らせ 4
- カタログご案内 18

新製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

- Detergent Screening Set 12
- Get *pure*DNA Kit 13



DOJINDO Laboratories Europe Office 開設

昨年9月オランダ アムステルダムに弊社ヨーロッパオフィスを開設いたしました。
日米欧に拠点をおき、これまで以上に満足いただける製品・情報・サービスを提供してまいります。

ヒト培養細胞を用いた食品成分の機能性評価 (Analysis for the biological functions of food factors using human cell lines)



立花 宏文
(Hirofumi Tachibana)
九州大学大学院農学研究院

[Summary]

Many functional food-derived factors that can modulate physiological systems of our body (i.e., endocrine, nerve, and immunological systems) have been clarified, and these factors have been applied to create "functional foods". With respect to immunological modulation, close attention is paid to how to suppress allergy, and the screening of the anti- or pro-allergic factors in foodstuffs has been performed. Tea (*Camellia sinensis*), one of today's most popular beverages, contains various substances. A number of studies have shown that tea has a wide range of biological effects. Therefore we focused on tea leaves as a promising source for effective anti-allergic agents. To search for molecules that are able to suppress IgE synthesis, degranulation and high affinity IgE receptor expression, we examined various substances purified from tea for their effects on these aspects. Here we describe the identification of anti-allergic molecules found in tea leaves by using human cultured cell lines.

キーワード :

細胞培養、脱顆粒、IgE、高親和性IgE受容体、好塩基球、B細胞、茶成分

1)はじめに

食品中には体調節機能等を有する成分が存在することが明らかにされ、そうした機能性成分を活用した健康志向型の食品（機能性食品）が注目されている。著者らは現在、そうした機能性食品の創製に役立つ食品成分の検索を目的として、ヒト培養細胞株を利用した食品成分の機能性評価系の構築およびそれを利用した機能性成分の検索を行っている。ここでは、食品成分の機能性評価の実例として、筆者らが最近取り組んでいる茶葉成分の抗アレルギー性評価について紹介する。

2)アレルギーとは

われわれの体は免疫反応により体外から侵入する異物の攻撃から守られているが、時として免疫反応はわれわれの体に対して障害的に作用する。このような免疫機能に基づく障害反応はアレルギーと呼ばれるが、近年のアレルギー患者数の増加および症状の重篤化は重要な問題となっている。生体内で起こる免疫反応には、抗体が関与する液性免疫と抗体が関与しない細胞性免疫があり、I型からIII型アレルギー反応は前者に、IV型アレルギー反応は後者に属する。花粉アレルギーなどの環境アレルギーはI型アレルギーにより発症するが、食物アレルギーではI型アレルギーに加え、II型およびIV型アレルギーの関与が疑われている。経口的に摂取されたアレルゲンタンパク質は消化管内で分解され、アミノ酸もしくはペプチドの形で腸管より吸収される。ここでアレルゲンが完全に分解されればアレルギーの発症には至らない。しかし、消化機能が未発達な乳幼児期などにおいては、未分解のアレルゲン物質が腸管より吸収され、アレルギー応答を引き起こす。アレルゲンが生体内に侵入すると、アレルゲン特異的抗体の産生が誘導されるが、I型アレルギーの発症には特にIgE型の抗体が重要な役割を果たす。B細胞により産生されたIgEは肥満細胞および好塩基球の細胞膜上に存在する高親和性IgE受容体に結合する。そこに、アレルゲン物質が再び侵入して肥満細胞上のIgEを架橋すると、ヒスタミンやロイコトリエン等のメディエーターが放出され、ア

レルギーの発症に至る。このように、I型アレルギーの発症には多くの反応が関与しており、それぞれの段階でアレルギー応答を抑制することが可能である。

緑茶はその幅広い生理作用が注目され、抗アレルギー的に作用するか興味もたれるが、この点に関する研究はあまり進んでいなかった。そこで、主要な反応（1.IgE型抗体の産生、2.IgE受容体の発現、3.炎症物質の放出）を評価対象とし、それらに影響を与える緑茶成分をヒト培養細胞を用いて検索した。

3) ヒトB細胞株を用いたIgEの産生を抑制する茶葉成分の検索とその作用機構の解析

I型アレルギーでは特にIgE型の抗体が重要な役割を果たす。従って、IgEの産生を抑制する作用をもつ因子は抗アレルギー作用が期待できる。そこで、茶葉中におけるIgE産生抑制成分の検索を行った。抗体は重鎖の違いからIgM、IgD、IgG、IgE、IgAの5種類が存在する。IgEは、抗体産生細胞であるB細胞がゲノムDNA上で抗体重鎖遺伝子の組み換え（クラススイッチ）を起こすことにより産生される。IgEへのクラススイッチはサイトカインの一種であるインターロイキン4(IL-4)の刺激により、IgE重鎖胚型転写(Cε germline transcripts ; εGT)の発現が誘導されることで開始される。従って、εGT発現を阻害することはIgE産生の抑制につながる。そこで、このεGT発現の抑制活性を指標として茶成分を検討した。

ヒト成熟B細胞株DND39はIL-4の刺激によりεGTを発現することが知られている¹⁾。そこで、DND39細胞をIL-4および種々の溶媒を用いて抽出した茶葉成分の存在下でそれぞれ培養し、εGT発現を検討した。その結果、カテキン画分にεGT発現抑制活性が存在することが明らかとなった。そこでこのカテキン画分をさらに分画し、各画分のεGT発現に及ぼす影響を検討した結果、1つの画分に強い抑制活性が認められた。構造解析の結果、この画分中の成分はStrictininであることが判明した(Fig. 1)。Strictininは健康人由来の末梢血単核細胞においてもIL-4誘導性のεGT発現を抑制した²⁾。ま

た、アトピー患者由来末梢血単核細胞はIL-4を新たに外から与えない状況下においてもεGTが発現していたが、こうした発現に対しても顕著に抑制した(Fig. 2)。

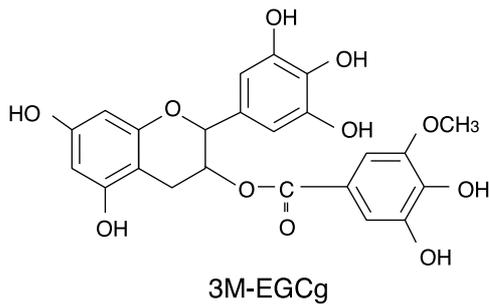
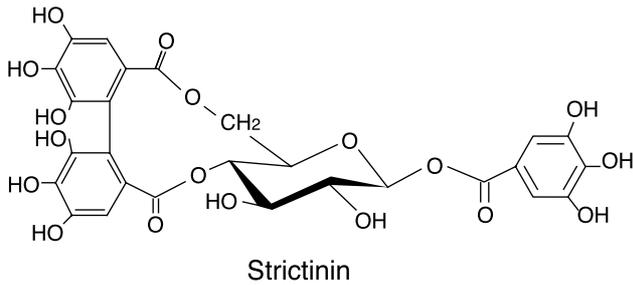


Fig.1 Structures of anti-allergic factors in green tea.

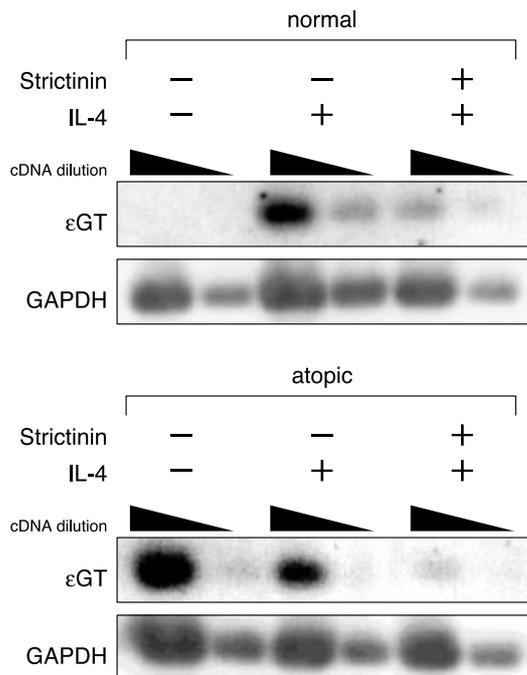


Fig.2 Strictinin inhibits IL-4-induced εGT expression in human peripheral blood mononuclear cells.

The peripheral blood mononuclear cells from either healthy or atopic donors were treated with IL-4 with or without Strictinin (25 μM) for 48 h, and then assessed for levels of εGT.

こうした *in vitro* における細胞実験の結果から、StrictininはIgEの産生を阻害する可能性が示唆されたため、次に *in vitro* に対する検討を行った。アレルゲンに対するIgE抗体は、アレルゲンを用いてマウスに免疫することで強制的に作らせることができる。そこで食物アレルギーの主要なアレルゲンである卵白アルブミンで感作すると同時にStrictininを経口投与し、4週間後における血清中の卵白アルブミンに対するIgM, IgG, IgE量を測定した。その結果、卵白アルブミン特異的IgMおよびIgG量に対してはStrictinin投与の影響はほとんどなかったが、Strictininを飲ませたマウスにおけるIgE量は、飲ませなかったマウスに比べ抑制されていた(Fig. 3)。つまり、Strictininはアレルゲン特異的なIgEの産生を特異的に抑制することが示唆された。

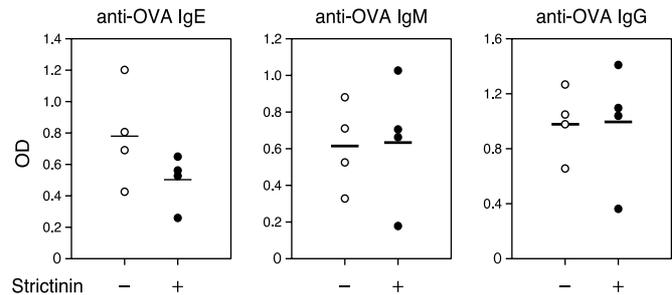


Fig.3 Oral administration of Strictinin decreases specific IgE antibody response in ovalbumin-immunized mice.

C57BL/6J mice injected intraperitoneally with ovalbumin were administrated water containing (+) or not containing (-) Strictinin every 2 days for 8 days. Two months after immunization, the amount of ovalbumin-specific IgE, IgM, and IgG in the sera was measured. Results are expressed in OD values.

Strictininは抗原特異的IgEの産生を特異的に抑制するが、その作用はIL-4誘導性のεGT発現阻害であることが推定されたことから、StrictininによるεGT発現の阻害機構について検討した。IL-4はB細胞膜表面上に発現するIL-4受容体に結合し、JAK-STAT経路を活性化する³⁾。この経路により、STAT6はリン酸化されホモ二量体を形成し、εGT発現が誘導される。そこでまず、STAT6のチロシンリン酸化に対する影響を検討した。DND39をIL-4で刺激後、STAT6を抗STAT6抗体で免疫沈降により回収し、抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタンブロットを行った。チロシンリン酸化STAT6はIL-4刺激により誘導されるが、Strictininは濃度依存的にこのリン酸化を阻害した(Fig. 4)。以上の結果より、StrictininはSTAT6のチロシンリン酸化を阻害することによりIL-4誘導性のεGT発現を抑制し、IgEの産生を抑える可能性が示された。

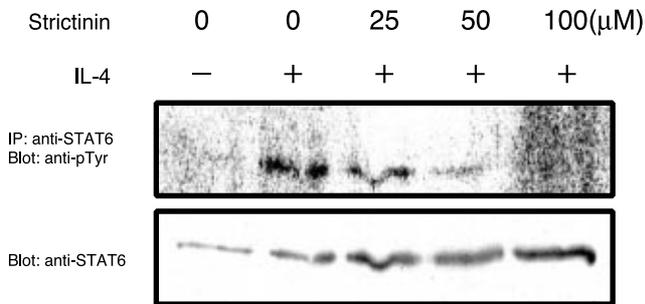


Fig.4 Strictinin inhibits tyrosine phosphorylation of STAT6.

DND39 cells were treated with strictinin (0, 25, 50, and 100 μM) in the presence of IL-4 for 30 min as indicated. STAT6 was immunoprecipitated, separated on a 8% SDS-PAGE, and immunoblotted with the anti-phosphotyrosine antibody. Shown in the lower panel are protein levels from the same filter blotted again with the anti-STAT6 antibody.

4)抗アレルギー性評価のためのヒト好塩基球細胞株の樹立

炎症発症に關与する細胞株を用いた活性検定系は、抗アレルギー活性を効率的に評価するための強力なツールになる。そこで筆者らは、炎症物質ヒスタミン産生細胞であるヒト好塩基球細胞株の樹立を試みた。ヒト白血病細胞株KU812を種々のサイトカインで刺激後、好塩基球への分化指標である1)高親和性IgE受容体F_{cε}RIの発現、2)顆粒球の形成、3)ヒスタミンの産生、に基づき好塩基球への分化誘導条件について検討した。その結果、IL-4やヒドロコルチゾンの添加培養によりF_{cε}RIの発現増大、ヒスタミンの産生増大および顆粒形成の促進が誘導されることが明らかとなった^{4,5)}。また、IL-4やヒドロコルチゾン処理により分化したKU812は、カルシウムイオノフォアA23187やIgE/抗IgE抗体の刺激に反応してヒスタミンを放出する。そこでIL-4で分化誘導した好塩基球細胞株を用いて脱顆粒および高親和性IgE受容体発現に対する茶成分の評価を行った。

5)ヒト好塩基球細胞株を用いた脱顆粒阻害活性の評価

アレルギーでは、ヒスタミンやロイコトリエン等の炎症物質が放出され、炎症発症が惹起される。IgEの産生抑制活性と同様、炎症物質放出シグナルの伝達阻害を含む炎症物質の産生・放出阻害活性は重要な抗アレルギー活性の指標である。

最近、国内で最も生産されている栽培種である“やぶきた”ではなく、紅茶系品種“べにほまれ”や台湾系統の茶に、強い抗アレルギー作用があることがマウス肥満細胞株やマウスを用いたアレルギー反応試験により明らかにされた⁶⁾。そこで、上記の新たに樹立したヒト好塩基球細胞株KU812を用い、この細胞からのヒスタミン放出抑制活性を指標に、“べにほまれ”より放出抑制成分の探索を行った。べにほまれ抽出物を分画して得られた画分を検討したところ、一つの画分に強い放出抑制活性が認められた。この

画分に含まれる成分の構造はNMR解析により、epigallo catechin 3-O-(3-O-methyl) gallate(3M-EGCg)であることが明らかとなった⁷⁾。この物質は緑茶に最も多く含まれるカテキンであるEGCgのガロイル基がメチルエーテル化されたもので (Fig. 1)、“やぶきた”には全く含まれない成分である。また、3M-EGCgの抑制活性はEGCgを若干上回る傾向にあった。この3M-EGCgに関してはI型アレルギーに対する抑制効果が、マウスの経口投与と実験から確認されている⁸⁾。

6)ヒト好塩基球細胞株を用いた高親和性IgE受容体発現抑制活性の評価

食物アレルギーにおける即時型アレルギー反応では、アレルギーン-IgEによる好塩基球や肥満細胞表面上に存在する高親和性IgE受容体(F_{cε}RI)の架橋が一連のアレルギー反応を誘導する引き金となる。そのため、これらの細胞表面上のF_{cε}RI発現を抑制することは、IgEを介したアレルギー反応の抑制につながる。そこで、上記のように樹立したF_{cε}RIを高発現している好塩基球様細胞株KU812のF_{cε}RI発現抑制活性を指標として、茶の主成分カテキン成分の抗アレルギー活性を検討した。その結果、EGCgのみにF_{cε}RIの発現抑制活性が認められた⁹⁾。また、F_{cε}RIはα鎖、β鎖、γ鎖から構成されるが、このうちα鎖およびγ鎖のmRNA発現量がEGCgにより低下することが認められた(Fig. 5)。これらの結果は、EGCgによるKU812細胞表面上のF_{cε}RIの発現抑制が、α鎖およびγ鎖のmRNA発現量低下によるものであることを示唆している。

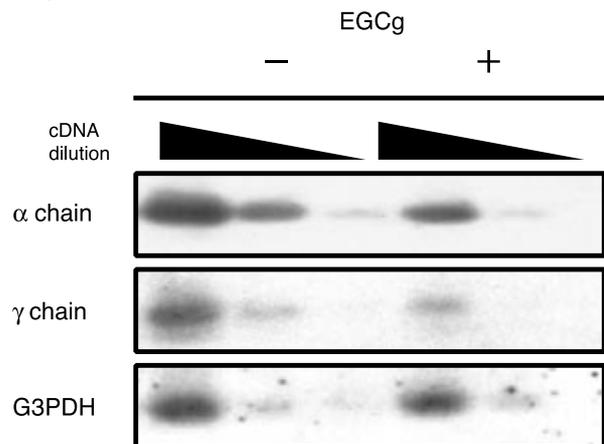


Fig.5 Analysis of the mRNA level for F_{cε}RI α, β and γ in KU812 cells treated with EGCg.

After treatment with 50 μM EGCg for 24 h, total RNA was isolated from the cells. F_{cε}RI α, γ and G3PDH mRNA were analyzed by RT-PCR. Southern blotting using a specific probe for F_{cε}RI α, γ and G3PDH was performed to assess the PCR products.

7)おわりに

ヒト培養細胞株を利用することにより、茶葉成分であるメチル化EGCgおよびStrictininの有する抗アレルギー活性を明らかにした過程について述べてきた。現在、メチル化EGCgおよび

Strictininを活用した抗アレルギー食品の開発が産学官連携で進行中である。今後、こうした評価系を用いることにより茶葉のみならず幅広い食品の中から新たな抗アレルギー成分が見出されることを期待している。今回、抗アレルギー性を評価する観点からヒト培養細胞株の利用法について述べてきたが、逆に、アレルギー性（アレルギー反応誘導活性）の評価にも活用できると考え、その実験系作りに取り組んでいる。

参考文献

- 1) T. Ichiki, W. Takahashi, and T. Watanabe, *Int. Immunol.* **4**, 747 (1992).
- 2) H. Tachibana, T. Kubo, T. Miyase, S. Tanino, M. Yoshimoto, M. Sano, M. Yamamoto-Maeda, and K. Yamada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **280**, 53 (2001).
- 3) J. Hou, U. Schindler, W. J. Henzel, T. Z. Ho, M. Brasseur, and S. L. McKnight, *Science* **265**, 1701 (1994).
- 4) T. Hara, K. Yamada, and H. Tachibana, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**, 542 (1998).
- 5) T. Hara, H. Tachibana, and K. Yamada, *Cytotechnology*, **34**, 213 (2000).
- 6) 山本万里、佐野満昭、立花宏文、*バイオサイエンスとインダストリー*, **57**, 41 (1999).
- 7) H. Tachibana, Y. Sunada, T. Miyase, M. Sano, M. Maeda-Yamamoto, and K. Yamada, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 452 (2000).
- 8) M. Sano, M. Suzuki, T. Miyase, K. Yoshino, and M. Maeda-Yamamoto, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1906 (1999).
- 9) Y. Fujimura, H. Tachibana, H. and K. Yamada, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 2527 (2001).

著者紹介

氏名：立花 宏文 (Hirofumi Tachibana)
 年齢：36才
 所属：九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門 助教授
 連絡先 〒812-8581
 福岡市東区箱崎 6-10-1
 TEL & FAX 092-642-3008
 e-mail: tatibana@agr.kyushu-u.ac.jp

出身大学：九州大学
 学位：博士（農学）

現在の研究テーマ：

- 1 抗アレルギー食品成分を利用したアレルギー予防食品の創製
- 2 植物由来ポリフェノール応答性に関わる遺伝子のクローニング
- 3 抗体遺伝子の発現制御とヒト型触媒抗体創製への応用
- 4 ガン予防に関わる食品成分の検索とその作用機構

カスタマーサービス部からのお知らせ

弊社では、お客様ご支援のため、昨年平成13年9月よりカスタマーサービス部を新設し、お客様からの技術的お問い合わせに対し、これまで以上に充実した回答を図っております。下記窓口をご利用ください。

技術お問い合わせ窓口：技術専門スタッフがご質問承ります。
 (1) TEL:0120-489-548 FAX:0120-021-557
 (2) e-mail:info@dojindo.co.jp

価格・営業お問い合わせ窓口：マーケティング部員が承ります。
 (1) TEL:096-286-1515 FAX:096-286-1525
 (2) e-mail:info@dojindo.co.jp

また、これまでお客様からお寄せいただきましたご質問を、近々Web上でFAQとして公開させていただく予定です。改めましてご案内させていただきますのでご活用ください。

Q & A

SOD Assay Kit-WST

Q1 サンプル毎の前処理法を教えてください。

A1 下記のような方法があります。

ー培養細胞ー

(1) 培養した細胞をPBSで2回洗浄する。接着細胞の場合は、トリプシン処理を行なった後洗浄する。

(2) PBSを除去後、細胞膜を破壊する。

例 - 20 で20分、室温で10分静置。これを2回繰り返す。
超音波処理

(3) 新たにPBSを加え、良く混合する。

(4) 10000 × g で15分間遠心する(冷蔵庫内で行なう)。

(5) 上清をSOD Assayする。

必要に応じて、たんぱく定量も同時に行ない、全たんぱく量に対するSOD活性を算出する。

ー赤ワイン・緑茶ー

緑茶：緑茶10gに沸騰水60mlを加え、2.5分間静置して抽出する。これをろ紙でろ過した後、更にメンブランフィルター(ポアサイズ0.45 μm)でろ過し、測定試料とする。

ワイン：直接メンブランフィルターでろ過し、測定試料とする。緑茶や赤ワイン等はそのもの自体に着色がありますが、100倍程度に希釈すると測定に対する着色の影響は回避できます。

ー植物・野菜類ー

(例：人参、レタス、ポテト、キャベツ、トマト、カリフラワー、ほうれん草、ブロッコリ、胡椒、玉葱など)

(1) 蒸留水(野菜の重量に対し5倍量程度)で、4・1分間ホモジナイズする。

(2) ホモジネートをろ紙でろ過し、ろ液(水での抽出物)を凍結乾燥する。

(3) 凍結乾燥したものを、0.1 mol/l リン酸バッファー(pH 7.4)に溶かし、これを測定試料とする。溶かしたものはなるべく早く使用する。

上記測定試料により得られた活性値は、水による抽出物の凍結乾燥後の重量、もしくはホモジナイズ前の野菜の重量当たりの活性値とする。

参考文献

- 1) 受田浩之・森山洋憲・川名大介・片山泰幸・中林錦一・沢村正義、日本食品科学工学会誌, **49**, 25 (2002).
- 2) 浅田浩二・中野稔・柿沼カツ子編、「活性酸素測定マニュアル」(講談社サイエンティフィック), p.196
- 3) Pietarinen-Runtti P, Lakari E, Raivio KO, Kinnula VL, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **278**, C118 (2000).

Q2 Mn-SODやCu,Zn-SODを分別して測れる方法はありますか？

A2 KCN添加(Cu,Zn-SOD失活)により、Mn-SODのみの活性を測定し、トータルの活性から差し引く事でCu,Zn-SODの活性が分かります。ただ、これは従来から用いられている方法で、本キットでうまくいった例があるかどうかは不明

です。SODの測り分けですが、以下の文献が参考になると思います。

亜硝酸法の文献に詳しい操作法が記載されています。

この方法はテトラゾリウム法にも対応できます。

(亜硝酸法での測定)

1) Y. Oyanagui, *Anal. Biochem.*, **142**, 290 (1984).

(NBT法での測定)

2) J. A. Sykes, *Cancer Res.*, **38**, 2759 (1978).

3) 谷口直之 監修, 細胞工学別冊「活性酸素実験プロトコール」, 秀潤社, P120.

Q3 他の活性酸素種の・OHや一重項酸素なども反応しますか？

A3 還元物質との反応になります。・OHは酸化物質のため反応しないと考えられます。

他の活性酸素種に関しては、還元作用を示すものであれば反応する可能性はあります。

Q4 SOD Assay Kit-WSTにSODの標品はついていますか？

A4 キサンチンオキシダーゼは付いていますが、標品となるSODは別途ご購入ください(弊社での取扱いございません)。

Q5 superoxideとWSTの反応の阻害が0(発色が100%)となるとところが全く発色しません。酵素(Xanthine Oxidase)が失活しているのでしょうか？

A5 Enzyme solution(Xanthine Oxidase)は酵素の懸濁液になってますので、静置しておくで酵素が沈んでしまいます。よく振ってからご使用下さい。上澄みだけを取ってしまうとsuperoxideは全く発生しませんので発色もしません。

Q6 酵素はどのくらい安定ですか？

A6 37 保存で1ヶ月、4 保存だと1年以上安定であることを確認しています。

Q7 前処理等の際に界面活性剤を使うと影響はありますか？

A7 影響はあるかもしれませんが、界面活性剤の種類によっても違います。実際に使用する界面活性剤をブランクのwellに加えた場合と加えない場合とで比較、確認して下さい。

Q8 取説に載っているプレートのレイアウトの例では、blank2は1つしかありませんが、sampleが違えばそのsample毎に必要なのでしょうか？またその場合測定できるsample数は減るのでしょうか？

A8 このKitは450 nmの吸光度で検出しますので、着色等で450 nmに吸収のあるようなsampleであれば同じsampleでも希釈倍率毎にblank2は必要になります。また、その場合は測定できるsample数は減ってきます。ただし450 nmに吸収の無いようなsampleであればそのような必要はありません。

ケミストからみた ポストゲノム

2

~ SNP タイピング その1(蛍光法による検出)~

九州大学工学研究院応用化学部門

片山佳樹

1.はじめに

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。ある遺伝子が次世代に受け継がれる場合、その近傍にある多型部分も同時に受け継がれる場合が多いため、多型は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。すなわち、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。一塩基多型(SNP)は、最も頻度の高い多型(1000塩基に一つ)であり、最も有用性が高い。そのため近年、この位置を特定するマッピングにより、既に膨大なSNPデータが収集されている。しかしながら、得られたSNPを用いて診断や解析を行う場合、特定のSNPがどんな塩基になっているか(SNPのタイプ)を知る必要がある。これをSNPタイピングという。SNPタイピングでは、いかに正確かつ迅速、安価に行えるかがポイントとなる。

SNPタイピングを行う場合、以下の4つの戦略が用いられる。

- 1) アレル特異的なオリゴプローブを用いるハイブリダイゼーション
- 2) プライマー伸長法: SNP部位、あるいはそれより1塩基上流までのプライマーを結合させておいて、SNP特異的におこる伸長反応の生成物から判断。
- 3) kinetic PCR: 特定のSNP特異的なPCRを利用し、増幅過程を追跡する。
- 4) PCRが不要な手法

検出には、蛍光法とマススペクトルが利用される。特に最近、プライマー伸長法とマススペクトルを組み合わせたものが非常に多く報告されているため、これに関しては、次回改めてご紹介することにし、今回は蛍光法を利用したSNPタイピングを概説する。

2. アレル特異的なオリゴプローブ(ASO)を用いる SNPタイピング

SNPを見分ける手法として最も単純に思いつくのは、通常のDNAマイクロアレイの手法を利用してSNP部位を含むオリゴDNAプローブでアレル特異的な2本鎖形成反応を介してジェノタイプングする手法である^{1,2)}。この手法は、最も早くから検討された手法であるが、固定化プローブのG/C含量や熱力学的パラメータなどを同程度にし、しかもクロスハイブリダイゼーションを避けられるようにする必要があるので、ハイブリダイゼーションの条件の最適化が難しく、同時に多くのコントロールを必要とするなど、実用的観点からは多くの問題を含んでいる。

3. プライマー伸長法と蛍光法を利用するSNPタイピング

プライマー伸長法は、ポリメラーゼなどの配列特異性の高い酵素反応を用いるため、ASOを利用する手法に比べ識別能が高く、近年、マススペクトルとの併用で多くの報告例がある。蛍光法を組み合わせた手法に関する報告はそれほど多くは無いが、幾つかの優れた手法が報告されている。それらは手法上から、均一系で行うものと、基板や担体上で行うものに分類できる。

3-1: 均一系によるプライマー伸長アッセイ

プライマー伸長によるアレル特異的産物の生成を均一系で蛍光検出するには、プライマー伸長に伴い、蛍光シグナルが変化する仕組みが必要である。その様な例として、蛍光エネルギー移動(FRET)を利用するTDI assayがある(Fig.1a)³⁾。これは、SNP部位の1塩基上流までの配列に相補的なフルオレセイン標識プライマーを用い、これに対し、それぞれ異なる蛍光基(ROXとTAMRA)で標識したジデオキシヌクレオチド3リン酸(ddNTP)を用いてプライマー伸長反応を行う。ジデオキシ体であるので、伸長は1塩基で止まるが、この時組み込まれた塩基に標識されている蛍光基へフルオレセインからFRETが生じてフルオレセインの蛍光が減弱するとともに、対応する塩基に標識された蛍光基のシグナルが増大する。これを計測すればジェノタイプングができるというものである。この手法は、条件の最適化などが簡単である半面、同一チューブ内で全ての操作ができるようにするため、PCR後、過剰のプライマーやdNTPを酵素消化し、その後、その酵素を熱失活するなど、多段階の操作が必要で、煩雑さを伴う。純粋なプライマー伸長法では無いが、これを改良した手法にDOL assayがある(Fig.1b)⁴⁾。この手法では、ポリメラーゼによる塩基伸長の代わりに、2つのオリゴヌクレオチドをDNAリガーゼで結合することを利用する。すなわち、5'末端にフルオレセイン標識したSNP部位の1塩基上流までの配列に相補的なオリゴプローブと、3'末端に蛍光標識し、SNP部位を含み、それより下流の配列に相補的なオリゴプローブを用意する。後者は、SNP部位の相補塩基の違いにより、標識する蛍光基をROXとTAMRAと言う風に変えておく。これらのプローブとDNAリガーゼをPCR反応溶液に同時に加えておくと、SNP部位を含むPCR産物の増幅に伴い、リガーゼにより結合したプローブが生成してくる。その際、結合されるプローブはSNP部位に相補的なものに限られるから、フルオレセインの励起波長で励起すると、FRETの結果増加する蛍光波長がいずれのものであるかによりSNPが判定できる。DOL

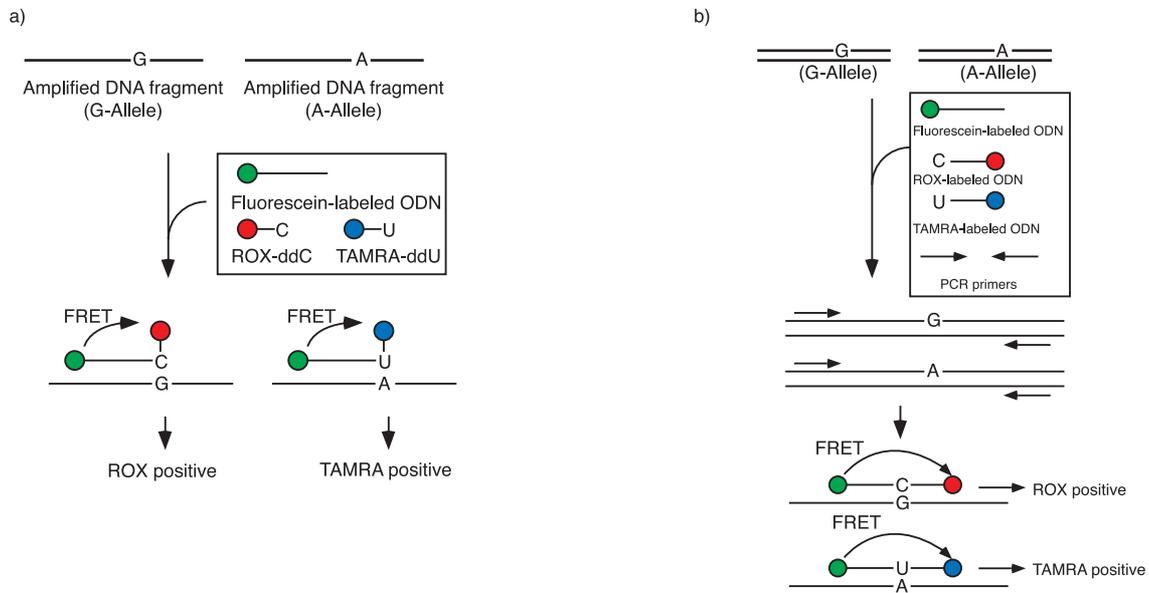


Fig.1 Endogenous SNPs typing using FRET
a) TDI assay, b) DOL assay

assay では、全ての反応が1つのチューブ内で一度に行え、非常に簡単であるが、多検体処理には向かない欠点もある。

3-2 : 基板や担体上でのプライマー伸長アッセイ

蛍光検出の場合、プライマー伸長を基板上で行うと、蛍光標識の種類が最低1種類あればよいことと、多くのコントロールが必要ないことから高密度のアレイは必要なく、さらにプライマーを合成してからアレイを作成できる利点がある。1塩基伸長を用いるものとしては、Affymetrixのオリゴヌクレオチドタグアレイを利用した方法や、Pastinenらの方法がある。

Affymetrixの手法は、従来のマイクロアレイが初めから決められた目的にしか使えないという欠点を克服するために、プローブではなく、特定の配列を認識するためのタグ配列を固定化してアレイとしたものを用いる手法である (Fig.2a)⁵⁾。この場合、標的のSNPに対するプローブをタグに結合したプライマーを合成し、タグアレイ上に固定化し、SNP部位を含むPCR産物をテンプレートとして、蛍光標識 ddNTP を用いて1塩基伸長反応を行う。この手法は、30 × 30 μmの基板上に32000種づつのパーフェクトマッチとミスマッチのプローブを固定できるが、タグの設計にはASOでのプローブ設計同様の最適化の困難さを伴う。これに対し、Pastinenらは表面をイソチオシアネート処理したガラスプレートに末端アミノ化オリゴDNA型プライマーを固定したプライマーアレイを調製している。これとPCR産物を2本鎖形成後、蛍光標識 ddNTP で一塩基伸長すると加えた標識塩基に対応するSNPのスポットのみが蛍光を発することになる (Fig.2b)⁶⁾。彼らはこの手法を一塩基伸長だけでなく、さらに多くの塩基配列を伸長させる手法にも応用している (Fig.2c)⁷⁾。この場合には、PCR産物からT7RNAポリメラーゼでRNAとして2000倍程度増幅し、プライマーアレイと逆転写酵素によって伸長反応を行う。

そうすることで、PCRの際に、1%程度なら複数の副産物が生成しても影響が無いようにしている。この手法では、PCRに4時間、検出までに1時間、検出に10分という時間で、40の変異に対し8000以上のジェノタイピングが可能であるという。

基板ではなく、蛍光ビーズ担体上にプライマー伸長産物を捕捉し、フローサイトメトリー分析を用いることで多検体処理を可能にした方法としてLuminex assayがある (Fig.2d)^{8,9)}。この手法では、各プライマーは、5'端にそれぞれ異なるZipCodeと呼ばれる配列を付加してある。このプライマーを用いてSNP部位を含むPCR産物をテンプレートとして、蛍光標識 ddNTP を用いて一塩基伸長反応を行う。こうして得られる蛍光性伸長産物を蛍光性ビーズで捕捉するが、各ビーズ表面には、それぞれ別のZipCodeと相補的なcZipCode配列が修飾してあるため、ビーズごとに同種のプライマーを捕捉する。その後、ビーズの蛍光と伸長した塩基に標識された蛍光の種類をセルソーターで分析して55種類のSNPに関し181のジェノタイピングを一度に行っている。最近では、異なる波長の蛍光ビーズを多く用いることにより、さらに多検体の処理も可能であるとされている。

4 . Kinetic PCR (Real time PCR)を利用する SNP タイピング

Kinetic PCRは、PCR産物の生成過程を蛍光法などでモニターする手法である。この時、PCR産物がアレル特異的に生成すれば、SNPタイピングに利用できる。TaqManPCR法は、代表的なKinetic PCRの手法である (Fig.3a)¹⁰⁻¹²⁾。この場合、SNP部位を含む配列に相補的なPCRプライマーと分子内にFRETを起こす2種類の蛍光基を標識し、2つのPCRプライマーにはさまれた領域のどこかに相補的なプローブを用いる。ここで用いるTaqDNAポリメラーゼは、5' 3'エンドヌクレアーゼ活性を持つ

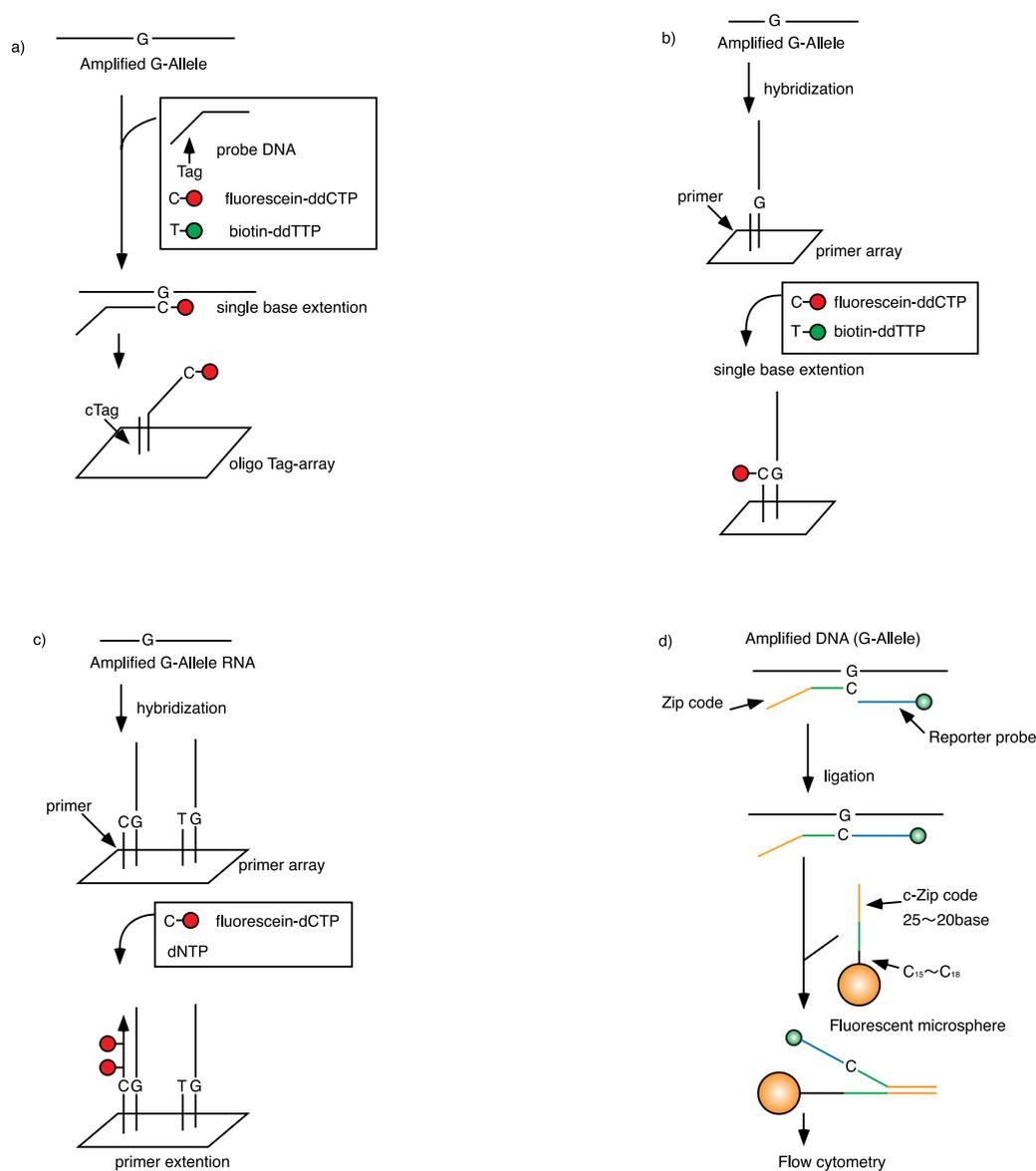


Fig.2 SNPs typing using primer extension on a chip or microsphere
 a)Oligo-Tag array, b) Primer array with single-base extension
 c)Primer array with multi-base extension, d) Luminex assay

ているので、テンプレート上に相補鎖が合成されていく過程で、その途中に結合している蛍光オリゴプローブは分解される。そのため、2種の標識蛍光基間のFRETが解消され、蛍光波長が変化する。両者の蛍光波長の強度変化をリアルタイムにモニタリングすることでPCR産物の生成過程が追跡できる。PCRは、用いるプライマーが結合できるアレルでのみ起こるから、PCR産物生成からSNPの判定ができる。同様にFRETを利用するものに、分子ビーコンを用いる手法がある (Fig.3b)^{13,14}。分子ビーコンは両末端に蛍光基と消光基を標識した一本鎖DNAで、分子内で相補的配列を有し2本鎖を形成すると、2つの色素が近接して蛍光が消光す

る。しかし、中央の配列に相補的な配列にハイブリダイズすると、2つの色素間距離の増大に伴って蛍光が回復する。そこで、SNP部位の塩基と、それに対応して標識された蛍光基がそれぞれ異なる4種の分子ビーコンを用いると、標的部位のPCRによる増幅に伴って回復する蛍光波長を測定することでSNPタイピングが均一系で可能となる。この手法は、スマートな方法であるが、PCR増幅条件が難しく、ゲノムDNAで実際に行うと条件設定に難がある。分子ビーコンは、これとは別に後述するSniper assayで威力を発揮する。

TaqMan PCR法と同じアレル特異的PCR反応を利用し、蛍光

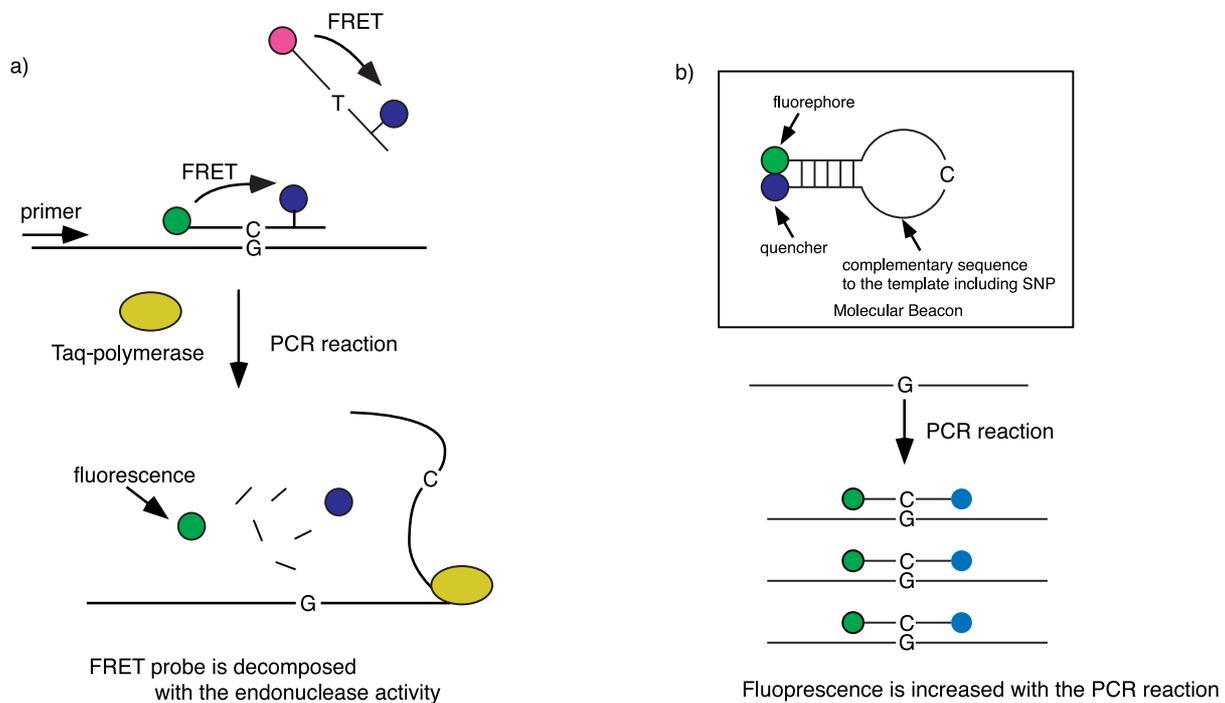


Fig.3 SNPs typing using kinetic-PCR strategy
a) Taq-Man PCR, b) Allele-specific molecular beacon

ではなく、PCR反応の進行に伴いdNTPが消費される際に生成する副産物であるピロリン酸を、アデノシン5'-ホスホサルフェートとATP スルフィラーゼを用いてATPに変換して化学発光分析するPyrosequencingも報告されているが、実用性の程は定かでは無い¹⁵⁾。また、各アレルに対応するPCRプライマーをアダマンタンやDANSYL等の異なるハプテンで修飾し、これを用いてPCRを行い、抗体標識ビーズでPCR産物を捕捉して、酵素標識抗体で検出するLCx assay等も報告されている。単純にアレル特異的PCRを行って、生成する2本鎖DNAの増加を2本鎖特異的蛍光プローブであるPicoGreenで追跡する簡易法も報告例がある¹⁶⁾。

アレル特異的Kinetic PCR法は簡便さが長所であるが、プライマーの結合が完全にアレル特異的とはならないため、別のアレルでも遅いながらPCRが進行する等、条件設定と正確性に難がある。また、多検体処理に適さない。

5. PCRが不要な手法

PCRは、サンプル量が限られるゲノムDNAを用いてSNP判定をする際に、シグナルを増幅するために非常に有効であるが、副生成物が生じる危険性と共に、時間がかかると言う欠点がある。もし、PCRを用いることなくシグナルが増幅できれば、非常に操作性のよい多検体処理に適した手法が開発できると考えられる。その様な可能性を有する手法としてInvader assayとSniper assayがある。

Invader assayは、2つのアレルに特異的なレポータープローブ、InvasiveプローブとFlapエンドヌクレアーゼによる切断反応を利用する手法である (Fig.4a)¹⁷⁻¹⁹⁾。レポータープローブは、テ

ンプレートDNAに対しSNP部位から3'末端側に相補的な配列を有し、さらにプローブの5'側にフラップと呼ばれる配列が存在する。Invasive プローブは、テンプレートのSNP部位に対し5'側に相補的な配列を有し、SNP部位にあたる部分の塩基は任意のものでよい。この2つのプローブをテンプレートDNAと混ぜて2本鎖形成反応を行うと、レポータープローブとテンプレートで形成される2本鎖のSNP部位にInvasive プローブが一塩基侵入することになる。Flapエンドヌクレアーゼは、この構造を認識してレポータープローブの2本鎖を形成していないフラップ配列部分を切断する。溶液内には、Fig.4aの様には2種のレポータープローブのフラップ配列に相補的な一本鎖部分を有するFRETプローブが入っており、切断されたフラップは相当するFRETプローブに結合する。FRETプローブは、その他は分子内で2本鎖を形成する構造をもち、蛍光基と消光基で標識されており、分子内で消光している。ところが、フラップが結合すると、ここに先ほど同様の構造が生じ、蛍光基を標識した一本鎖部分が切断され、FRETが解除されて蛍光が増大する。増大する蛍光波長から、どちらのアレルであるかが判定できるわけである。ただし、フラップ部位は切断されなくてもFRETプローブに結合する可能性があるため、弱いながら切断反応は進行する。したがって、2種の蛍光増大のタイムコースを追跡して、その差からアレルを判定する。この手法では、蛍光標識プローブは共通のものを使用でき、また一定温度で行え、PCRも不要であることからコストが抑えられる利点がある。ただし、サンプルDNAが他の手法に比べ大量に必要となる欠点もある。

PCR 不要の手法として、前述の分子ビーコンを用いる Sniper

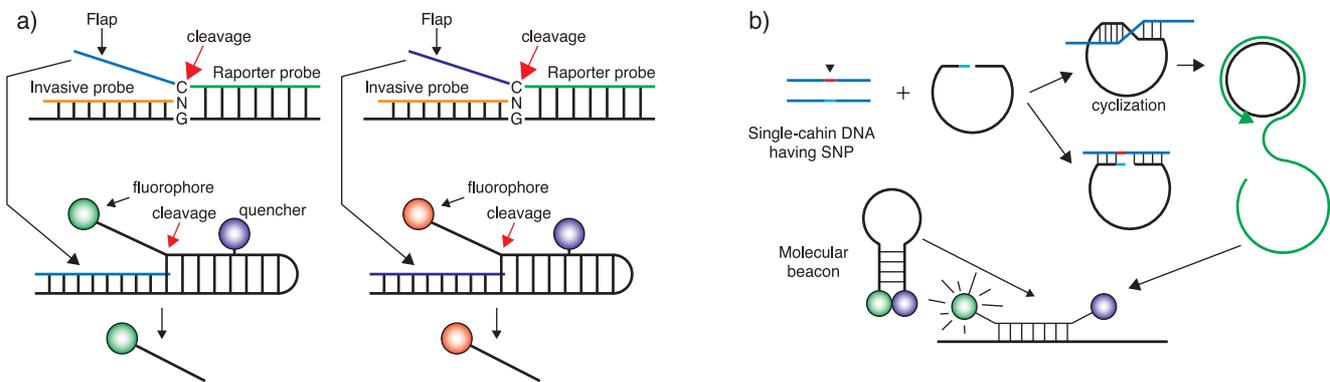


Fig.4 SNP typing without PCR
a) Invader assay b) Sniper assay

assay という手法も報告されている (Fig.4b)^{20,21)}。この手法では、両端にサンプル SNP 部位を含む領域に相補的な配列を含み、一方の末端1塩基が各アレルの SNP 部位に相当するように設計した一本鎖プローブを用いる。このプローブとテンプレート DNA をハイブリダイズすると、SNP 部位が相補的であったプローブのみがリガーゼで環状 DNA に変換される。プローブの残りの部分には、分子ビーコンと相補的な配列が組み込まれており、環状になったものはここで用いる特殊なポリメラーゼにより連続して相補鎖が合成され、次々に分子ビーコンが結合するため、蛍光が大きく変化する。この手法は、迅速にジェノタイピングできる可能性を有している。

6. おわりに

以上、蛍光を用いる SNP 判定法を述べた。どの手法にも一長一短はあるが、今後、多検体処理の面から考えると、Pastinen らのアレイ法や Luminex assay、迅速性からは DOL assay、Invader assay、Sniper assay などが有望である。ただし、いずれの手法も、より少量のサンプルで行えるようにすることや、S/N 比をあげる、自動化の工夫など、今後更に改良が必要であろう。次回はマスマスペクトルを用いる SNP タイピングについてご紹介する。

参考文献

- 1) J.G. Hacia, B. Sun, N. Hunt, K. Edgemon, D. Mosbrook, C. Robbins, S.P.A. Fodor, D.A. Tagle, F.S. Collins, *Genome Res.*, **8**, 1245 (1998).
- 2) D.G. Wang, J.B. Fan, C.J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubbell, E. Robinson, M. Mittmann, M.S. Morris, N. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T.J. Hudson, R. Lipshutz, M. Chee, E.S. Lander, *Science*, **280**, 1077 (1998).
- 3) X. Chen, B. Zehnbauser, A. Gnirke, P.-Y. Kwok, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10756 (1997).

- 4) X. Chen, K.J. Livak, P.-Y. Kwok, *Genome Res.*, **8**, 549 (1998).
- 5) J.-B. Fan, X. Chen, M.K. Halushka, A. Berno, X. Huang, T. Ryder, R.J. Liphutz, D.J. Lockhart, A. Chakravarti, *Genome Res.*, **10**, 853 (2000).
- 6) T. Pastinen, A. Kurg, A. Metspalu, L. Peltonen, A.-C. Syvanen, *Genome Res.*, **7**, 606 (1997).
- 7) T. Pastinen, M. Raitio, K. Lindroos, P. Tainola, L. Peltonen, A.-C. Syvanen, *Genome Res.*, **10**, 1031 (2000).
- 8) J. Chen, M.A. Iannone, M.-S. Li, J.D. Taylor, P. Rivers, A.J. Nelsen, K.A. Slentz-Kesler, A. Roses, M.P. Weiner, *Genome Res.*, **10**, 549 (2000).
- 9) M.A. Iannone, J.D. Taylor, J. Chen, M.S. Li, P. Rivers, K.A. Slentz-Kesler, M.P. Weiner, *Cytometry*, **39**, 131 (2000).
- 10) T. Morris, B. Robertson, M. Gallagher, *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 2933 (1996).
- 11) M.A. Doll, D.W. Hein, *Anal. Biochem.*, **288**, 106 (2001).
- 12) K.J. Livak, J. Marmaro, J.A. Todd, *Nature Genet.*, **9**, 341 (1995).
- 13) S. Tyagi, D.P. Bratu, F.R. Kramer, *Nature Biotech.*, **16**, 49 (1998).
- 14) A.S. Piatek, S. Tyagi, A.C. Pol, A. Telenti, L.P. Miller, F.R. Kramer, D. Alland, *Nature Biotech.*, **16**, 359 (1998).
- 15) A. Alderborn, A. Kristofferson, U. Hammerling, *Genome Res.*, **10**, 1249 (2000).
- 16) S. Germer, M.J. Holland, R. Higuchi, *Genome Res.*, **10**, 258 (2000).
- 17) V. Lyamichev, A.L. Mast, J.G. Hall, J.R. Prudent, M.W. Kaiser, T. Takova, R.W. Kwiatkowski, T.J. Sander, M.de Aruda, D.A. Arco, B.P. Neri, M.A.D. Brow, *Nature Biotech.*, **17**, 292 (1999).
- 18) V. Lyamichev, M.A.D. Brow, V.E. Varvel, E. Dahlberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6143 (1999).
- 19) C.A. Mein, B.J. Barratt, M.G. Dunn, T. Siegmund, A.N. Smith L. Esposito, S. Natland, H.E. Stevens, A.J. Wilson, M.S. Phillips, N. Jarvis, S. Law, M.de Arruda, J.A. Todd, *Genome Res.*, **10**, 330 (2000).
- 20) P.M. Lizardi, X. Huang, Z. Zhu, P. Bray-Ward, D.C. Thomas, D.C. Ward, *Nature Genet.*, **19**, 225 (1998).
- 21) A.S. Piatek, S. Tyagi, A.C. Pol, A. Telenti, L.P. Miller, F.R. Kramer, D. Alland, *Nature Biotech.*, **16**, 359 (1998).

Topics on Chemistry

細胞内情報伝達におけるリスク管理 ~ PKA 活性の可視化プローブ ~

(株) 同仁化学研究所 佐々本 一美

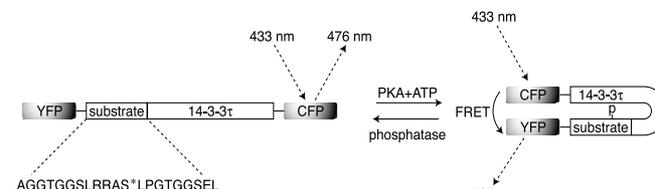
細胞はそれ自体独立して生きているわけではなく、細胞社会を構成するメンバーとして常に外部からの情報を受けている。情報というと、聞き流してもよさそうないい加減なイメージだが、増殖や分化や細胞死といった生死を決定する重要な情報も含まれている。むしろ一個一個の細胞は、何のために生きるかという目的すら、外からの情報に依存してるといった方がいいのかも知れない。

絶え間なく入ってくる数多くの情報を同時に処理し、しかも情報ごとに異なった応答をしなければいけない。聞き流してもいいような情報と、生死を分けるような重要な情報とが混線しないように適切に処理されるには、どんな情報処理の仕組みが必要なのだろうか。細胞内は無数のタンパク質が高濃度に存在する混沌とした世界だが、そこにある秩序を見いだすべく、それらの相互作用の全体像を解明する試みも盛んに行われている。

個々の情報に対して個別の伝達経路をもつのは非効率であり、大変なコストがかかるだろう。したがって、この部分はかなり統合化・共通化されているが、同時に情報伝達の混線のリスクが常につきまとうことになる。細胞内での情報の受け渡し方には基本的に2通り存在する。一つは、リン酸化カスケードのように相手を認識した1:1のリレー形式である。情報の送り手と受け手とは、酵素(キナーゼ)と基質との特異的な関係であり、情報はタンパク質の形(活性)として担われる。一方、セカンドメッセンジャーを介するものは、情報がいったん低分子(あるいはイオン)の濃度に置き換わる。濃度の違いによって情報の受け手が異なるもので、いわば不特定多数に向けて情報発信を行うようなものである。多くの情報がここでは1種類のセカンドメッセンジャーに姿を変えるわけで、情報の流れの結節点とも考えられ混線のリスクが大きいと思われる。前者のケースでも、素早くパートナーを見つけださなければならず、どのように混線を回避しているのか不思議である。正確に情報を伝えるという点では、一見危うい機構にも思えるが、何か生物学的な合理性があるに違いない。

そうした疑問を解く一つの鍵は、伝達分子の局在化である。送り手と受け手が近接した位置関係であれば、情報はよりスムーズに流れる筈である。したがって、伝達分子の細胞内での空間的な位置情報を得ることが重要になってくる。これまで、代表的なセカンドメッセンジャーであるCa(II)に対しては、プローブと呼ばれる蛍光性の試薬が数多く開発されてきた。それによって、細胞内でのCa(II)濃度の変化が蛍光強度の変化として可視化され、Ca(II)を介した細胞機能の発現機構の解明に大きく貢献してきた。ところが、cAMPを始めとするその他のセカンドメッセンジャーについては、Ca(II)に対するキレート剤のような認識素子がないため、化学的なアプローチは困難である。さらにもう一方の伝達機構であるリン酸化カスケードにいたっては、これまで直接情報の流れを見ることはまったく不可能だった。特に、Ca(II)以降関心を集めてきたのは、セカンドメッセンジャーcAMPからAキナーゼ(PKA)へと向かう情報の流れで

ある。生物学的にももちろん重要なパスウェイであるが、前述の2通りの伝達機構の交差点にも位置し、技術的な困難さも予想される。最近になって、工藤ら¹⁾による蛍光標識された合成基質ペプチドによるPKAの可視化技術や、萩原ら²⁾や梅澤ら³⁾による遺伝子工学的なアプローチによるPKAプローブも相次いで報告されている。またTsienら⁴⁾も同様の手法で、PKAによってリン酸化される基質部分に良く知られたKemptideのアナログ(LRRASLP)そしてそのリン酸化認識ドメインとして14-3-3 τ を用い、さらにそれらの両端を、それぞれ変異GFP(YFP, CFP)で挟んだキメラタンパク質によるイメージングを報告している。



PKA プローブの原理

基質部分のセリン残基がPKAによってリン酸化されると、今度はその部分が14-3-3 τ によって認識される。14-3-3 τ の正に荷電したArg/Lysリッチな認識部位と、負に荷電したリン酸化セリン部位とが接近することで、蛋白質の高次構造のダイナミックな変化が引き起こされる。それによって、蛍光性のYFPとCFPとが接近し、CFPからYFPへの蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が観測される。実際、HeLaその他の生きた細胞を刺激したとき、刺激が伝わる様子がうまく捕らえられているが、論文にもあるように、キナーゼと表裏一体をなすフォスファターゼによる脱リン酸化の部分はまったく不明である。効率的な情報伝達を行うため、PKAは細胞内の特定の足場にアンカーリングプロテインを介して係留されていることが最近分かってきたが⁵⁾、これらのプローブを用いて情報伝達のリスク管理の機構が少しずつ解明されていくと思われる。

参考文献

- 1) H. Higashi, K. Sato, A. Ohtake, A. Omori, S. Yoshida, Y. Kudo, *FEBS Lett.*, **414**, 55 (1997).
- 2) Y. Nagai, M. Miyazaki, R. Aoki, T. Zama, S. Inouye, K. Hirose, M. Iino, M. Hagiwara, *Nature Biotech.*, **18**, 313 (2000).
- 3) 日本分析化学第50年会講演予稿集(2001)p205.
- 4) J. Zhang, Y. Ma, S. S. Taylor, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 14997 (2001).
- 5) S. Edwards, J. D. Scott, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 217 (2000).

関連商品

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
AR	500 μ g	29,000	A407
DR	500 μ g	29,000	D510

新製品

Detergent Screening Set

Detergent Screening Set (first choice)

よく使われている代表的なDetergent 5種類を組み合わせたタイプ。

セット内容

CHAPS, *n*-Dodecyl-β-D-maltoside, *n*-Octyl-β-D-glucoside, Sodium cholate(purified), Sucrose monolaurate

以上5種類の各200 mg 包装

Detergent Screening Set (for crystalization)

タンパク質の構造解析のための結晶化に用いられた実績のある5種類のDetergentを組み合わせたタイプ。

セット内容

n-Decyl-β-D-maltoside, *n*-Dodecyl-β-D-maltoside, *n*-Octyl-β-D-glucoside, *n*-Octyl-β-D-maltoside, MEGA-10

以上5種類の各200 mg 包装

結晶化への応用例

n-Decyl-β-D-maltoside

ウシ心臓: cytochrome c oxidase¹⁾

グラム陰性菌: tetracyclin cation/proton antiporter²⁾

n-Dodecyl-β-D-maltoside

ウシ心臓ミトコンドリア: ATP synthase³⁾

n-Octyl-β-D-glucoside

Trypanosoma cruzi: Trypanothione reductase⁴⁾

Rhodobacter sphaeroids: reaction center⁵⁾

Thermus thermophilus HB8: DNA excision repair enzyme UvrB⁶⁾

ヒト: 17β-hydroxysteroid dehydrogenase (17β-HSD1)⁷⁾

MEGA-10

ウシ心臓ミトコンドリア: ubiquinol-cytochrome c reductase⁸⁾

参考文献

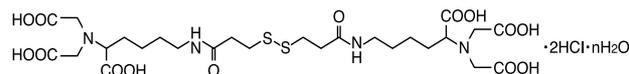
- 1) T. Tsukihara, *et al.*, *Science*, **269**, 1069 (1995).
- 2) C. Yin, *et al.*, *Molecular Microbiology*, **38**, 482 (2000).
- 3) R. Lutter, *et al.*, *Biochem. J.*, **295**, 799 (1993).
- 4) R. L. Krauth-Siegel, *et al.*, *FEBS Lett.*, **317**, 105 (1993).
- 5) J. P. Allen, *Proteins*, **20**, 283 (1994).
- 6) A. Shibata, *et al.*, *Acta Cryst.*, **D55**, 704 (1999).
- 7) S. Lin, *et al.*, *J. Endocrinol.*, **150**, S13 (1996).
- 8) W. Yue *et al.*, *Biochemistry*, **30**, 2303 (1991).

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Detergent Screening Set (first choice)	1 set	14,000	DS04
Detergent Screening Set (for crystalization)	1 set	18,000	DS05

試作品

自己組織化単分子膜 (SAMs)研究用試薬

Dithiobis(C₂-NTA)



C₂₆H₄₄N₄O₁₄S₂Cl₂=771.68(ただし無水物として)

特長

- NTA末端を持つ自己組織化単分子膜(Self-Assembled Monolayers: SAMs)を作製することができる。
- “His-tag”技術により、特定の配向を維持したまま蛋白質を結合できる。

近年、“His-tag”技術により、複雑な高次構造を持つ蛋白質を、その活性を損わずに固体表面に化学的に結合させることが可能になっています。その基本原理は、NTA誘導体を官能基(通常、活性エステル、チオール、エポキシなどの反応性基)で修飾した固体表面と反応させ固定化した後、Ni(II)を加えて錯形成させます。その時、Ni(II)の配位座は完全には満たされず、空いた部分には水が配位しています。この状態で6個のヒスチジンを末端に発現させた融合蛋白質を加えると、ヒスチジン部分がNi(II)に配位するため、特異的かつ一定方向に固体表面に結合されます(この結合は強固ですが、フリーのヒスチジンやイミダゾール、EDTA等のキレート剤によって可逆的に解離します)。この“His-tag”技術は、人工蛋白質の精製や表面プラズモン共鳴(SPR)等に使用されています。

今回、NTA末端を持つジスルフィド、Dithiobis(C₂-NTA)を御用意いたしました。アルキルジスルフィド化合物は、アルカンチオールと同様に、金表面と反応してAu-S結合すると共に、アルキル鎖同士の相互作用によって高い配向性を持つ単分子膜を形成することが報告されています。Dithiobis(C₂-NTA)も、他のアルキルジスルフィドと同様にSAMsを形成することをサイクリックボルタンメトリー(CV)で確認しております(データ未掲載)。このDithiobis(C₂-NTA)は、金表面上にSAMsを形成させた後、“His-tag”技術を用いることで、特定の配向を維持したまま蛋白質を結合できる可能性があります。各種センサー等への応用が期待されます。

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)の回収が可能。
- 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も回収可能。
- 1 sample あたり ¥75 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、という問題を抱えていました。

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を簡便に高回収率で得ることができます。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。

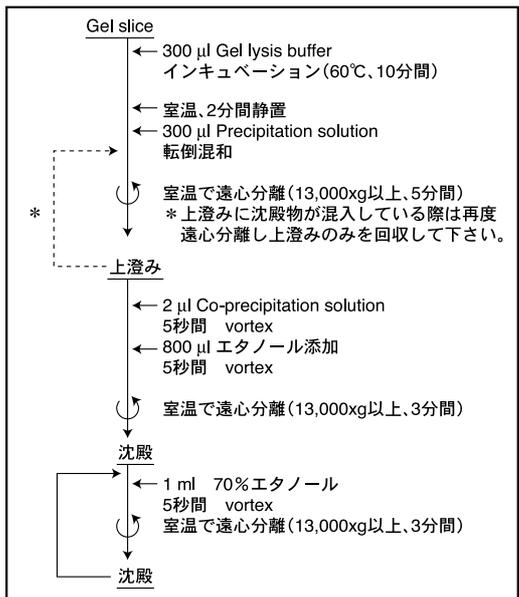
キット内容

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

保存方法

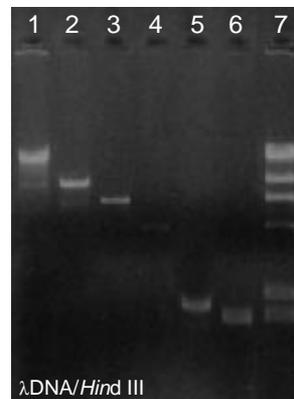
本キットは冷蔵(0 ~ 5)で保存して下さい。

操作方法



Q & A

- Q1 このキットで使用可能なアガロースゲルの濃度は？
 A1 ゲル濃度3%以内でご使用下さい。それ以上の濃度ゲルから回収する際、Gel lysis bufferにゲルが溶解しにくい場合があるので加温時間を延長し完全に溶解して下さい。またTAE及びTBE bufferで泳動したゲルをご使用頂けます。
- Q2 このキットで処理可能なゲル量はどれくらいですか？
 A2 余分なゲルを含まないように切り出し、ゲル断片200 mg以内でご使用ください。それ以上のゲル重量を取り扱う場合、試薬量を比例倍に増やしてご使用ください。またその際1.5 ml チューブは使えませんのでご注意ください。
- Q3 回収したDNAフラグメントはどのようなアプリケーションに使用できますか？
 A3 ライゲーション、制限酵素消化反応、PCR増幅などにそのまま使用できます。
- Q4 Co-precipitation solution(20 mg/ml glycogen)を使用しても回収後のアプリケーションに影響しませんか？
 A4 A3のアプリケーションにも問題なくご使用頂けます。Co-precipitation solution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上澄み除去の際にはDNAペレットを吸い取らないようご注意ください。
- Q5 シリカパウダーや遠心フィルターを用いた方法との違いは何ですか？
 A5 汎用されているシリカパウダーや遠心フィルターを用いた場合、(1)スピニングカラムを用いるため処理できるゲル量に制限がありました。(2)一旦DNAをシリカ担体に吸着させた後、指定のbufferにて溶出しますが、その際高分子量のDNA回収率が低いという問題がありました。一方、本キットでは(1)ゲル量に合わせてスケールアップが可能です。(2)DNAを担体に吸着させることなくエタノール沈殿で回収するので、回収量もDNAサイズにほとんど影響しません。さらには(3)DNAをペレットとして回収できるため目的濃度のDNA水溶液を調製できるという点が異なります。



Lane 1 23.0 kbp
 Lane 2 9.42 kbp
 Lane 3 6.56 kbp
 Lane 4 4.36 kbp
 Lane 5 2.32 kbp
 Lane 6 2.02 kbp
 Lane 7 回収前

0.8% Agarose, 100V, 60 min

λDNA/Hind III

λDNA/Hind IIIの各フラグメントの回収

新製品

Get pureDNA Kit-Blood, Get pureDNA Kit-Cell, Tissue

Get pureDNA Kit-Blood Get pureDNA Kit-Cell, Tissue

特長

- 高純度な DNA を高い回収率で得られる。
- フェノール、クロロホルムなど有害な有機溶媒は使用しない。
- スピニングカラムを使わないため各種スケールに対応でき、大量のサンプルを一度に処理できる。
- 回収したゲノム DNA の A_{260}/A_{280} 値は 1.7 ~ 1.9 となり、様々なアプリケーションにそのまま使用可能。
- 1 sample あたり ¥143 と低コスト。
- キットには酵素類が含まれており別途準備する必要がない。

はじめに

ゲノム解析法の一つであるサザンブロット法、ゲノムライブラリーの作製、および PCR には、高純度のゲノム DNA を簡便かつ短時間に抽出することが求められます。本キットは、サンプルを溶解する、溶解液から RNA およびタンパク質を除く、エタノール沈殿により DNA を回収する、という3ステップで、高純度のゲノム DNA を簡便に抽出できます。本キットは、フェノール/クロロホルムを必要としないので抽出した DNA は制限酵素反応、PCR 反応等にそのまま使用できます。

<キット内容>

-Blood (200 samples)		-Cell, Tissue (200 samples)	
Lysis buffer	44 ml	Lysis buffer	110 ml
Precipitation solution I	18 ml	Precipitation solution I	22 ml
Precipitation solution II	18 ml	Precipitation solution II	22 ml
Proteinase K solution	2.1 ml	Proteinase K solution	2.1 ml
RNase solution	0.5 ml	RNase solution	0.5 ml
Co-precipitation solution	0.5 ml		

保存方法

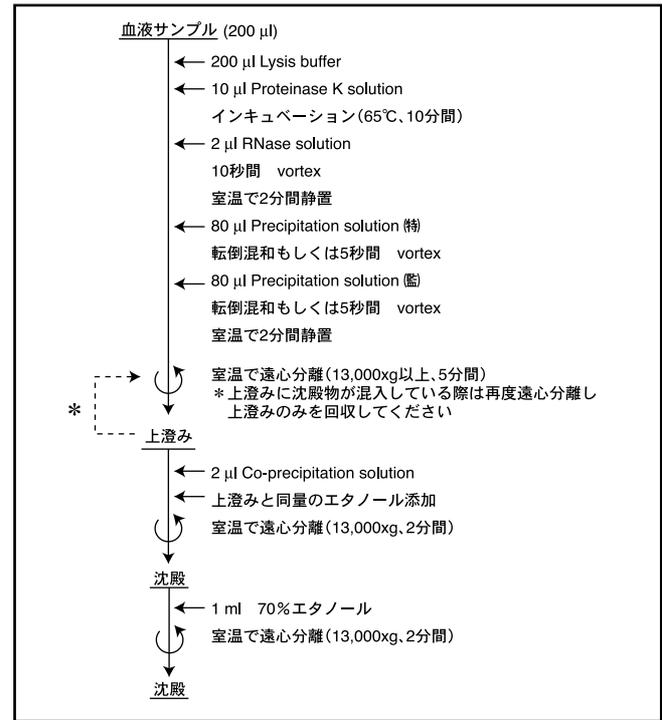
本キットは冷蔵(0 ~ 5 °C)で保存して下さい。

キット以外に必要な試薬・機器類

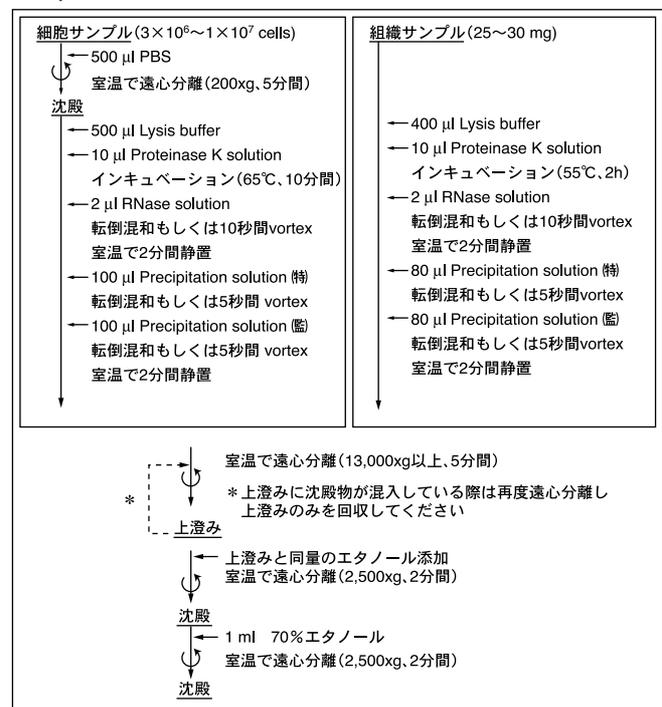
- エタノール
- 70% エタノール
- 1.5 ml 遠心チューブ
- マイクロピペット及びチップ
- 遠心分離器
- ボルテックスミキサー
- 65 °C 恒温槽

<操作方法>

Get pureDNA Kit-Blood



Get pureDNA Kit-Cell, Tissue



< Q&A >

Q1 「Get pureDNA Kit-Cell, Tissue」で抽出できるサンプル量と回数は？

A1 培養細胞 $3 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells、動物組織25 ~ 30 mg (肝・腎・心臓等)、マウス尾0.5 ~ 1.0 cm からの抽出は1キット200回分です。また培養細胞 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ cellsからの抽出は400回分です。

Q2 ゲノム DNA の純度と回収量はどのくらいですか？

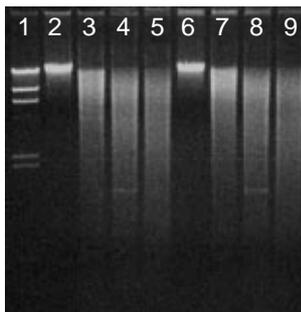
A2 どのサンプルも A_{260}/A_{280} は 1.7 ~ 1.9 になります。回収量はサンプルの種類によっても異なりますので下表をご参照ください。

Table 各試料から得られるゲノム DNA 量

Sample	Recovery(μg)	A_{260}/A_{280}
HeLa cell(1×10^7 cells)	80 ~ 120	1.7 ~ 1.9
HL60 cell(1×10^7 cells)	40 ~ 60	1.7 ~ 1.9
Mouse liver(25 ~ 30 mg)	40 ~ 100	1.7 ~ 1.9
Mouse brain(25 ~ 30 mg)	20 ~ 40	1.7 ~ 1.9
Mouse tail(0.5 ~ 1 cm)	40 ~ 60	1.7 ~ 1.9
Whole blood(200 μl)	3 ~ 10	1.7 ~ 1.9

Q3 「Get pureDNA Kit-Cell, Tissue」を使って全血からの DNA 抽出はできますか？

A3 可能です。但し、使用前に一旦 PBS(-)にて血球層を洗浄してからご使用ください。



Lane 1 : λ DNA/*Hind* III
 Lane 2 ~ 5 : mouse heart DNA
 Lane 6 ~ 9: mouse kidney DNA
 Lane 2, 6: undigested
 Lane 3, 7: *Bam*H I-digested
 Lane 4, 8: *Eco*R I-digested
 Lane 5, 9: *Pst* I-digested

0.8% Agarose, 100V, 60 min

マウス組織からの抽出 DNA とその制限酵素消化反応

試作品の評価にご協力頂いた先生方の感想

・「小型の淡水魚の PCR フィンガープリンティングを行うため、Get pureDNA Kit-Cell, Tissue を使って、ゲノム DNA を抽出しました。全てのサンプルから 2 kb の PCR 産物を得ることができました。」
 (香川大学 池田 滋 先生)

・「操作が簡便で実験時間の短縮になりました。動物の胃からの DNA 抽出を行いました。サンプルの破碎はホモジナイザーを使わずに完全に溶解できました。他社のキットでは表示時間内の溶解ができないものが多く、また不溶物が残ってしまう場合がありますが、今回はそういったこともなく純度・回収率共に良かったです。」
 (獨教医科大学 片岡 しのぶ 先生)

・「サンマ、ノコギリガザミ、クルマエビから DNA を抽出しました。サンマは少し抽出量が少ないようですが他は充分量抽出できていました。スミアリングが極めて少なく DNA の切断や RNA のコンタミが少ないと思いました。操作は私どもが常法にしているフェノクロ法より簡単で時間もかかりません。この抽出で重要なのは組織を最初によくホモジェナイズしておくことだと思いました。(中略)フェノール、ジエチルエーテルなど怪しげなものを使わないので、廃棄に気を付ける必要がないのはよい点です。」
 (東海大学 沼知 健一 先生)

・「ブタの耳刻片、ニワトリの肝臓、脳、腎臓からゲノム DNA を取り出しました。高分子の DNA を抽出する際は vortex やピペッティング操作の多用が懸念されます。しかし抽出されたゲノム DNA は通常のサザン解析や PCR 解析には十分に適用できるものと思います。」
 (九州東海大学 山下 秀治 先生)

・「ハブ毒腺からゲノム DNA を抽出しました。電気泳動では従来のフェノール/クロロホルム抽出に比べ、より高分子領域に濃いバンドが確認できたことから、かなり長いままのゲノム DNA を大量に抽出できたと考えられます。」
 (崇城大学 千々岩 崇仁 先生)
 平成 13 年 10 ~ 12 月 モニター調べ

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
Get pureDNA Kit-Blood	200 samples	28,500	GK02
Get pureDNA Kit-Cell, Tissue	200 samples	28,500	GK03

試作品 (3月29日発売予定)

FDSS専用 Calcium Screening Kit

Calcium Screening Kit

特長

- 高感度のシグナル検出が可能である。
- 細胞洗浄の必要がなく、操作が簡便。
- 96well, 384wellの両方のマイクロプレートに対応。
- trial version でより最適な Assay Buffer の選択ができる。

キット内容

Calcium Screening Kit (Fura 2, type A)

- Fura 2-AM 1 mg × 1 本
- DMSO 1 ml × 1 本
- Assay Buffer A 2 本
- * Fluo 3タイプキットには、Fura 2-AMの代わりにFluo 3-AM 1mg × 1本が含まれます。
- * type Bのキットには、Assay Buffer Aの代わりにAssay Buffer Bが含まれます。

本キットは、細胞内 Ca²⁺ 測定試薬である Fluo 3-AM または Fura 2-AM と、その測定に必要な Buffer 等を全て組み込んだキットです。近年、High-Throughput Screening (HTS) に使用されている FDSS (浜松ホトニクス株式会社) での測定に、最適な構成としています。

操作は、Fluo 3-AM または Fura 2-AM を Assay Buffer に溶かして、細胞を培養したマイクロプレートに添加するだけで簡便です。従来必要とされていた細胞の洗浄をせずに測定できるので、短時間で多くのサンプルを処理することが可能となりました。

1キットで2,000 assays (96穴プレート20枚分) の測定が可能です。

使用法 (マイクロプレート20枚を処理する場合)

1. マイクロプレート中で細胞を培養する (培地 100 μl/well)。
2. Fluo 3-AM または Fura 2-AM 1 mg を添付の DMSO 1 ml で溶解する。
3. Assay Buffer を 200 ml の純水で溶解し、Fluo 3-AM または Fura 2-AM の DMSO 溶液 1 ml を添加した Loading Buffer を作成する。
4. 培地に 100 μl/well の Loading Buffer を添加し、37 °C で 1 時間インキュベートする。
5. そのまま薬剤添加による蛍光強度変化を FDSS にて測定する。

【trial version のご案内】

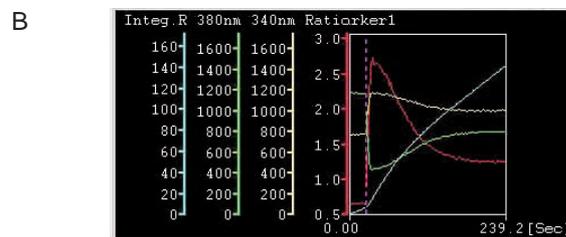
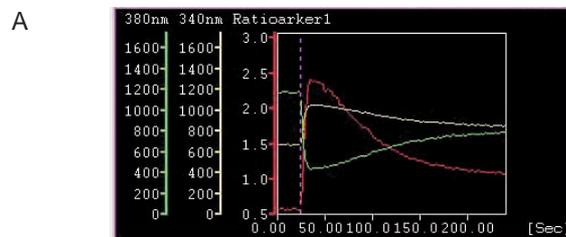
弊社では、測定条件に応じてより最適な Assay Buffer を選んでいただけるように、Calcium Screening Kit (Fluo 3, trial version) と Calcium Screening Kit (Fura 2, trial version) をご用意しております。

これらのキットには、2 ~ 3種類全ての Assay Buffer が組み込まれております。(Fluo 3 では typeA, B, C, Fura 2 では typeA, B)

Assay Buffer には、細胞外に存在する Fluo 3 または Fura 2 の蛍光を消去するためにそれぞれ異なった試薬が入っております。細胞種や添加する薬剤などの測定条件によっては、「レスポンスが低い」「リガンドとの相互作用がある」などの問題が生じる可

性がございます。

各々の Assay Buffer でアッセイを行ない、2 ~ 3種類のうちから、より最適な結果が得られる Assay Buffer をお選びください。各 Assay Buffer 1 本で 100 assays (96穴プレート1枚分) が可能です。最適な Assay Buffer が決まりましたら、同一の Assay Buffer を含む 2000 assays キットをご使用ください。



orexin receptor を発現させた CHO 細胞 (15,000 cells/well) を使用し、100 nmol/l orexin で刺激した際の蛍光強度変化。

FDSS 6000 で測定 : Sens.ID

A) は最終濃度 2.5 μmol/l の Fura 2-AM で染色後、細胞洗浄したもの。

B) は Calcium Screening Kit (Fura 2, type B) で染色 (洗浄過程なし) したもの。

* 発売時までには仕様の一部変更になる可能性がありますのでご了承ください。

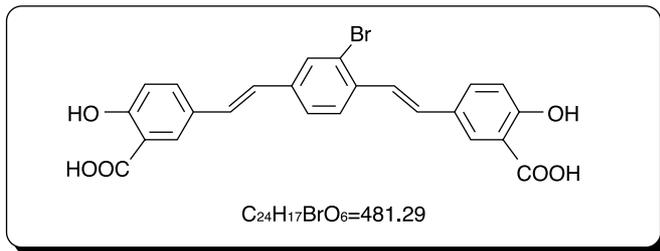
品名	容量	価格 (¥)	メーカーコード
Calcium Screening Kit(Fluo 3, trial version)	1set	Request	CS05
Calcium Screening Kit(Fluo 3, typeA)	2,000assays	Request	CS06
Calcium Screening Kit(Fluo 3, typeB)	2,000assays	Request	CS07
Calcium Screening Kit(Fluo 3, typeC)	2,000assays	Request	CS08
Calcium Screening Kit(Fura 2, trial version)	1set	Request	CS02
Calcium Screening Kit(Fura 2, typeA)	2,000assays	Request	CS03
Calcium Screening Kit(Fura 2, typeB)	2,000assays	Request	CS04

試作品

アミロイド染色試薬

BSB

化学名 1-Bromo-2,5-bis(3-carboxy-4-hydroxystyryl)benzene



特長

- アミロイドβペプチド(Aβ)に対して高い親和性($K_i = 0.4 \mu\text{mol/l}$)¹⁾をもつ。
- 従来色素に比べ検出感度が高い蛍光色素である。
- 脂溶性物質で、脳・血液関門を透過する。

アミロイドーシスはアミロイドが臓器や組織細胞の外に沈着してこれらの臓器や組織の働きを阻害する病気です。アミロイドーシスには、全身の様々な部分にアミロイド沈着が起こる「全身性アミロイドーシス」と一部の臓器のみに沈着が起こる「限局性アミロイドーシス」があります。全身性アミロイドーシスには熊本地方で患者の多い家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)と呼ばれる遺伝性のものがあり、肝臓でアミロイドを作り出し、それが全身の臓器などに沈着して障害を起こします。発症後約10年で死に至る難病ですが、現在はドミノ肝移植などの治療により命を落とす危険性は少なくなっています²⁾。他にも高齢で非遺伝的に発症する老人性アミロイドーシスや、透析患者の治療で使用する透析膜では除けないタンパク質が変化したアミロイドが引き起こす透析アミロイドーシス、リウマチで発現するタンパク質が切れて出来るアミロイドによる二次性アミロイドーシスなどがあります。限局性アミロイドーシスには、アミロイドが脳に蓄積する老人斑(SP)があり、アルツハイマー病の特徴の1つです³⁾。また、現在問題となっている狂牛病(牛海綿状脳症, BSE)や新型クروتツフェルト・ヤコブ病(vCJD)も限局性アミロイドーシスの一種です。

BSBはアルツハイマー病の研究において最初に用いられ、Skovronkyらはアミロイド前駆体タンパク質(APP)を発現するトランスジェニックマウスTg2576にBSBを静注し、18時間後の脳組織のSPに色素が集積していることを確認したと報告しています¹⁾。

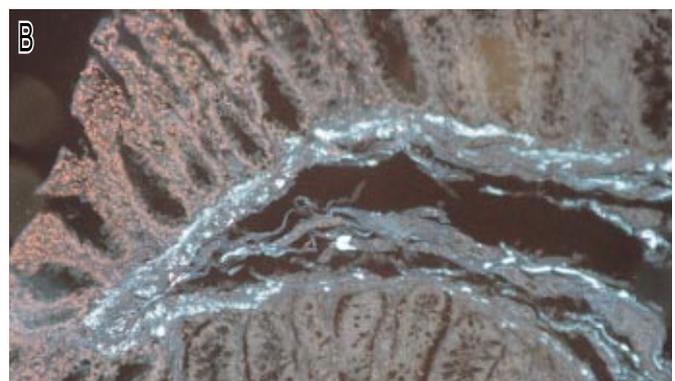
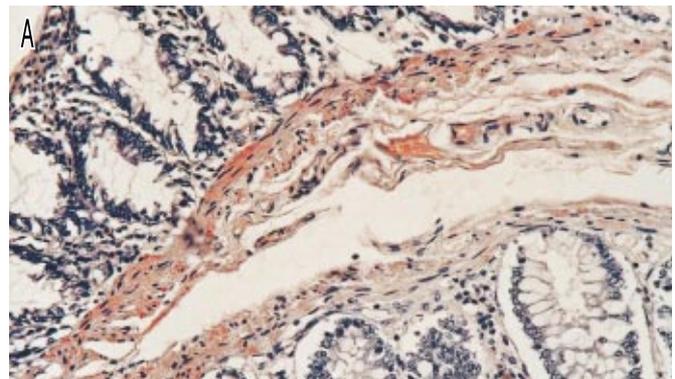
同様にアミロイドが沈着するその他のアミロイドーシスでもBSBを用いた研究が進められておりFAP、透析アミロイドーシスや二次性アミロイドーシスなどの組織染色を行なった結果、アミロイドが沈着した部分を感度よく染色していることが確認されました。また、BSEやvCJDを発症した組織でも同様の結果が得ら

れています。

BSBは、従来色素に比べ、親和性・検出感度共に高い蛍光色素です。Skovronkyらの結果から*in vivo*の系での使用も可能であると考えられます。従来色素では組織染色など*in vitro*でしか検出できないものも多く、*in vivo*の系で沈着アミロイドを検出した報告はありません。BSBは安定性や毒性などの研究は必要ですが、FAPやBSEを含めたアミロイドーシスの診断・治療などの研究へのさらなる応用が期待されます。

参考文献

- 1) D. M. Skovronsky, B. Zhang, M.-P. Kung, H. F. Kung, J. Q. Trojanowski, V. M.-Y. Lee, *Proc. Natl. Acad. Soc. U.S.A.*, **97**, 7609 (2000).
- 2) 安東 由喜雄, *臨床病理*, **48**, 425 (2000).
- 3) 佐々本 一美, *Dojin News*, **97**, 11 (2001).



FAP患者の小腸スライス切片の染色像。粘膜下層部分にアミロイドの沈着が見られる。

A: Congo Red 染色で、赤褐色に染まった部分がアミロイド。
B: BSBで染色したもので、白く光っている部分がアミロイド。
(画像提供: 熊本大学医学部臨床検査医学 安東由喜先生)

カタログご案内

Web 版カタログが新しくなりました

今までの Web 版カタログは、“検索ができない”、“見つけにくい”など使い勝手が悪いというご意見をいただいております。お客様のご要望にお応えして変更を加え、このたびリニューアルいたしました。

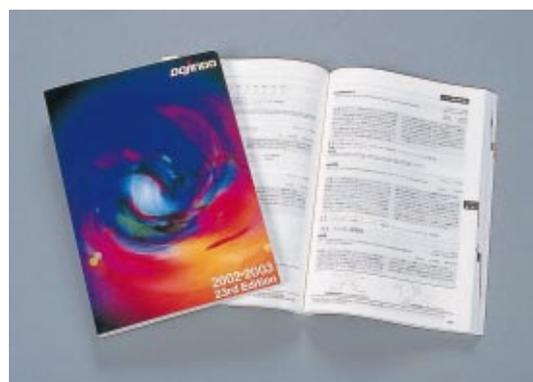
- 1) 全文検索が可能になりました。(* * により曖昧検索も可能です。“and” “or” による複合検索も可能です。)
- 2) 商品名一覧の横には、目的・特徴がわかるように説明を加えました。
- 3) 商品名順、化学名順、カテゴリ別、分析対象別にわかりやすくまとめました。
- 4) 今まで通り、商品の説明はできるだけ詳しく表示しております。

本カタログはデスクトップタイプによく使われている 800 × 600 ピクセルのモニターを対象に設計しております。サイズの大きなモニターをお使いの方は若干操作しづらいかもかもしれませんがご了承ください。



総合カタログ第 23 版(2002 2003)が完成しました

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。



<p>ホームページアドレス URL : http:// www. dojindo. co. jp/ E-mail : info@dojindo.co.jp</p>	<p>フリーファックス 0120-021557 フリーダイヤル 0120-489548</p>
--	--