

DOJIN NEWS

No.103
2002

ドージンニュース

■ Review

Slow response voltage-dependent fluorescence dye を利用した
イオンチャネル作用薬の効率的探索系の開発と応用

今泉祐治

■ Topics on Chemistry

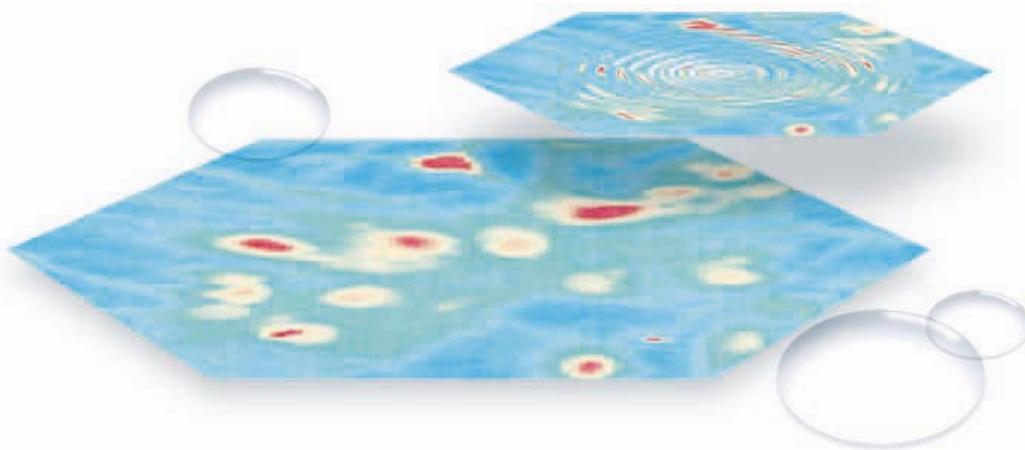
低分子リフォールディング剤

佐々本一美

■ 連載

ケミストからみたポストゲノム3

片山佳樹



目次

Review

- Slow response voltage-dependent fluorescence dye を
利用したイオンチャネル作用薬の効率的探索系の開発と応用
名古屋市立大学大学院薬学研究科 今泉祐治 …………… 1
- ケミストからみたポストゲノム3
~ SNP タイピング その2 (マススペクトルによる検出)
九州大学大学院工学研究院 片山佳樹 …………… 8

Topics on Chemistry

- 低分子リフォルディング剤
同仁化学研究所 佐々本一美 …………… 7

Commercial

- 新製品案内
Calcium Screening Kit …………… 14

試作品案内

- BSB …………… 18

関連商品案内

- DiBAC₄(3) …………… 6

お知らせ

- PRTR 該当品 MSDS 試薬協会 HP 掲載 …………… 13
- 販売中止予定案内 …………… 13
- AI Kit 商品名および仕様変更 …………… 17
- フォーラム開催案内 …………… 17

新製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

- Calcium Screening Kit …………… 16



花しょうぶ

アヤメ科の植物で江戸系・肥後系・伊勢系の3種があり、6月頃美しい花を咲かせます。

江戸時代後期 肥後藩主 細川斎公(なりもり)が江戸より持ち帰り、「花の心のわかる武士であれ」と家臣に諭し品種改良を命じたといわれる肥後しょうぶ。門外不出とされたため、一般にひろまったのは昭和以降で、戦後は花しょうぶの主流を占めています。優雅な大輪の花で、花弁が大きく、豪華で堂々とした風格があります。

ちなみに、端午の節句でおなじみの菖蒲湯に使う「菖蒲」はサトイモ科の植物です。

Slow response voltage-dependent fluorescence dye を利用した イオンチャネル作用薬の効率的探索系の開発と応用

(Development of high throughput screening system for the discovery of new compounds acting on ion channels by use of slow response voltage-sensitive fluorescence dyes)



今泉 祐治
(Yuji Imaizumi)
名古屋市立大学 大学院
薬学研究科

[Summary]

High Throughput Screening (HTS) is getting a new massive wave in drug discovery by pharmaceutical industries. Although ion channels are attractive targets for therapeutic manipulation, assays of drugs acting on them do not always fit to HTS. It has been widely accepted that Ca^{2+} activated K^+ (K_{Ca}) channels play the central roles in the negative feed back mechanism to regulate Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels in excitable cells. Opening of K_{Ca} channels may enhance cellular protective mechanisms under pathophysiological circumstances. The usefulness of slow response voltage-sensitive fluorescence dye such as $\text{DiBAC}_4(3)$, an oxonol anion, for the assay of K_{Ca} channel openers in the scope of HTS was evaluated in heterologous expression system in which BK channel, one of three classes of K_{Ca} channels, was stably expressed. Using this screening system, some new terpenoid compounds having BK channel opening action were actually discovered from natural products and their derivatives. Further possible application of newly developed voltage-sensitive dyes and novel technologies to improve drastically HTS system for the discovery of seed compounds acting on specific ion channels is also discussed.

キーワード :

high throughput screening (高効率探索系) ion channel (イオンチャネル) voltage sensitive fluorescence dye (電位感受性蛍光色素) Ca^{2+} -activated K^+ channel (カルシウム依存性カリウムチャネル) K^+ channel opener (カリウムチャネル開口薬) gene transfection (遺伝子導入) mammalian stable gene-expression system (哺乳動物遺伝子定常発現系)

1) はじめに

医薬品リード化合物の探索法は最近の10年間で大きく発展し、ロボット化したアッセイシステムを用いて、ソースとなる数十万検体の化合物から無作為に目的とする薬物活性を持つ化合物を高速・高効率に探索する方式 (high throughput screening; HTS) によることが多くなってきた。大規模なHTSの稼動に要する費用とそれに拠って得られたリード化合物の有用性のコストパフォーマンスに関しては議論のあるところであるが、大きな方向性としてHTSが定着しつつあると思われる¹⁾。抗高血圧薬や抗不整脈薬などのイオンチャネル作用薬は臨床で使用されている (いわゆる医家向け) 医薬品の売上高として全体の10%程度を占めており、この分野での新薬開発意欲も高いと言われている。従ってイオンチャネル作用薬開発のためのHTSシステムは強い潜在需要を有すると思われる。しかしGTP結合タンパク共役型薬物受容体や酵素をターゲットとした作用薬開発の場合と異なり、イオンチャネル作用薬開発においては、DHP系Ca拮抗薬のように³H-ラベル化合物のチャネル蛋白への結合実験が有効な場合を除くと、高効率アッセイ系を確立することが困難な場合も多い。このこともイオンチャネルに作用する新薬開発の障害要因になっていたように考えられる²⁾。ここでは bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)-trimethine oxonol ($\text{DiBAC}_4(3)$) などの slow response voltage-sensitive fluorescence dye を用いたイオンチャネル作用薬の効率的探索実験系の長所と問題点および展望について、当研究室の研究対象の1つである Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネル開口薬探索を例にして概説したい。

2) イオンチャネル作用薬の探索法と 電位感受性蛍光色素

膜電位感受性蛍光色素を利用したアッセイがイオンチャネル作用薬の高効率検索には特に有効な手法と考えられる。しかし膜電位感受性蛍光色素自体は20年ほど前から開発され、主に生理・生化学系の研究に用いられてきたにもかかわらず、この手法を活用した新薬候補化合物探索あるいは薬理学的検討についての結果が学術誌に報告されるようになったのは、ごく最近である。現在まで用いられてきた膜電位感受性色素を大別すると、膜電位感受性と時間分解能からTable 1に示すような2種類に分類される。一方の色素は電位感受性が低い (100 mV あたり 2-10% の蛍光強度変化) ものの反応は速く (fast response probe: di-4-ANEPPS や RH414 など; 時定数はミリ秒) 脳スライス標本の活動電位伝播の検出などに用いられているが、新薬候補化合物の高効率探索には現在のHTSシステムでは適していない。他方、電位感受性がより高い色素 (slow response probe: oxonol 系陰イオン化合物として $\text{DiBAC}_4(3)$ 、carbocyanine 系陽イオン化合物として $\text{DiSC}_2(5)$ など; 1 mV あたり 1% 程度の蛍光強度変化) は、電位変化に伴う蛍光変化が数十秒の時定数を持つため、活動電位や slow wave など比較的速い電位変化を測定することは不可能であるが、緩徐な膜電位変化を捕らえることはできる³⁾。これをマーカーとして膜電位が消失した細菌数をセルソーターで定量し、抗生物質等の効力を検定すること等にも利用されている⁴⁾。イオンチャネル作用薬に関しては、ATP 依存性 K^+ チャネルを発現させた培養細胞において、 K^+ チャネル開口薬及び経口糖尿病薬を効率的かつ定量的に評価するために $\text{DiBAC}_4(3)$ などが用いられている⁵⁾。次に述べる Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネル作用薬の検索にも活用され

Potentiometric Probes

Structure	Charge	Name	Ex(nm)	Em(nm)
<i>Slow Response</i>				
Oxonol	Anionic	DiBAC4(3)	493	516
		DiBAC4(5)	590	616
		DiSBAC2(3)	535	560
Carbocyanine	Cationic	DiSC3(5)	651	675
SYTO	Cationic	SYTO42	433	460
		SYTO62	652	676
<i>Fast Response</i>				
Styryl	Cationic or Zwitterionic	di-4-ANEPPS	496	705
		di-8-ANEPPS	519	719
		RH414	532	716

Table 1. List of voltage-sensitive fluorescence dyes

始めている。しかし一方ではslow response probeによる薬効評価にはアーチファクトが入りやすいという報告もあり、製薬企業におけるそれぞれのチャンネル作用薬評価系での具体的な結果が論文公表されることは少ないため、評価系としての妥当性は充分明らかとはならない。

3) Ca²⁺依存性K⁺チャンネルの機能と作用薬の有用性

K⁺チャンネルはNa⁺やCa²⁺チャンネルと比較して、蛋白構造的な面からも、また活性化機構の面(電位依存型・リガンド活性型など)からも極めて多様性に富み、大まかに8種類ぐらいに分類される。また、生体内分布に強い組織・部位選択性が見られる場合が多く、様々な疾患・病態に関連しているため、選択的な薬物の標的として魅力的である^{6,7,8)}。Ca²⁺依存性K⁺チャンネルは細胞内Ca²⁺濃度上昇により活性化されるK⁺チャンネルであり、機能的には単一チャンネルの大小のコンダクタンスの違いからBK, IK, SKに分類される⁹⁾。細胞内へのCa²⁺流入は、神経・筋・平滑ラ氏細胞β細胞などの興奮性細胞においては主に電位依存性Ca²⁺チャンネルを介して行われ、化学伝達物質やホルモン遊離・収縮などの細胞機能を発揮するための情報伝達系で最も重要なステップである。同時に過剰な流入はCa²⁺過負荷による細胞障害をもたらすため、殆どの興奮性細胞種はNa⁺チャンネルやCa²⁺チャンネル活性に負帰還を掛ける機構を有する。Ca²⁺依存性K⁺チャンネルは細胞内Ca²⁺濃度上昇により活性化され、膜電位をK⁺の平衡電位(-80 mV程度)に傾ける(過分極させる)ため、活動電位の再分極相や後過分極あるいは静止膜電位の過分極を引き起こす。過分極はNa⁺チャンネルやCa²⁺チャンネルを抑制し、活動電位発生や定常的なCa²⁺流入を抑制するので、結果として細胞内Ca²⁺濃度は低下する。従ってCa²⁺活性化K⁺チャンネルは細胞内Ca²⁺過上昇の負帰還機構の好適な担い手となり得る¹⁰⁾。ここではBKチャンネルの機能と作用薬についてごく簡単に述べる。

BKチャンネルは中枢神経および血管を始めとする臓器全ての平滑筋、腺細胞に高発現しており、それぞれに重要な機能を担っている。

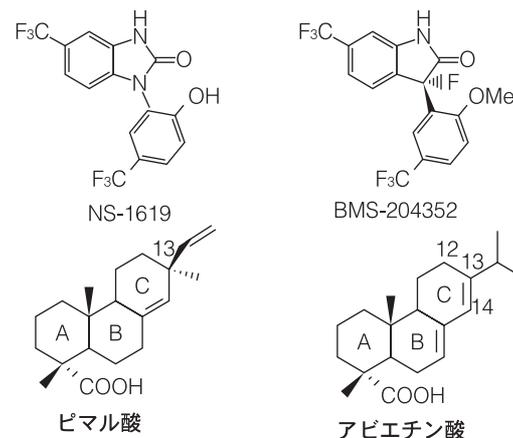


Fig.1 Chemical structures of large conductance Ca²⁺ activated K⁺ channel activators (BK channel openers).

イオンチャンネル本体を形成するBK α サブユニットは遺伝子多型があるものの基本的に1種類であるが、機能調節因子である β サブユニットは現在4種類が知られ、組織特異的に分布している。4量体 α サブユニットのそれぞれに β サブユニットが結合し、機能的BKチャンネルを形成すると推測されている。主に平滑筋に存在しているBKチャンネルの β 1サブユニットのノックアウトマウスが作成されたところ、BKチャンネル機能の低下により血管平滑筋が収縮気味となり、高血圧を発生している事がわかった¹¹⁾。逆にBKチャンネルの活性を上昇させる薬物(開口薬)は高血圧・膀胱過敏症などの平滑筋緊張度の上昇した疾患に有用ではないかと推測され、NS-1619の

誘導体の開発が試みられている (Fig.1)。BMS-189265 が脳血栓による虚血部の神経保護に有効であることも報告された¹²⁾。これまで検討された合成化合物は類似した化学構造に限定され、 α サブユニットに作用する。しかし実際に臨床利用されるBKチャンネル開口薬はまだ得られていない。例えば主に脳・神経に発現する $\beta 4$ サブユニット¹³⁾をターゲットとした $\beta 4$ 選択的BKチャンネル開口薬などは極めて魅力的である。Estradiolなどは β サブユニットに作用してBKチャンネル開口作用を示すが¹⁴⁾、特定の β サブユニットだけに作用するわけではない。特異的なBKチャンネル開口薬の開発には新規の化学構造を見出すことが重要と考えられるが、そのためには高効率の探索系が必須となる。

これまでBKチャンネル作用薬の高効率探索には¹²⁵Iラベルされたペプチド性特異的拮抗物質のカリプトトキシン(ChTX, サソリ毒成分)のBKチャンネルへの結合阻害実験が用いられることが多かった¹⁵⁾。しかし、その方法で見つけられた dihydrosoyasaponin I や maxkidiol などの天然物は、 β サブユニットに結合して作用を発揮するという特徴はあるもののBKチャンネルへ細胞質側からのみ作用し、しかも細胞膜透過性が低いため、シード化合物とは成り得なかった。一方、先に示したNS-1619などの合成化合物は¹²⁵I-ChTX 結合阻害実験では十分な探索ができず、非効率な電気生理学的実験が主に用いられてきた。

4) Slow response dye による Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネル発現細胞の膜電位測定

我々は高コンダクタンス Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネル(BKチャンネル) α サブユニットと平滑筋 $\beta 1$ サブユニットを単独あるいは共発現させたHEK293細胞(HEKBK α 及びHEKBK $\alpha\beta 1$)において、BKチャンネル開口作用を持つ化合物の作用を、DiBAC₄(3)による光学的膜電位測定とパッチ電極を用いた膜電位・電流固定法を併用して評価し、DiBAC₄(3)による膜電位評価の妥当性とHTSへの応用性を検討した¹⁶⁾。同時に細胞内 Ca^{2+} 濃度もFura 2あるいはFura 2-AMを用いて測定した。

Fig.2に示すようにラット子宮平滑筋由来BK α (U55995)および $\beta 1$ サブユニット(AF020712)の遺伝子を哺乳動物細胞への発現ベクターであるpcDNA3.1(+)とpcDNA/Zeo(+)にそれぞれ組み込み、HEK293細胞に導入した。G418/Zeoicin 耐性細胞を選択することにより定常的にこれらのサブユニットを単独あるいは共発現させたHEK293細胞(HEKBK α 及びHEKBK $\alpha\beta 1$)を作成した。機能発現は単一チャンネル電流記録により、 α サブユニットは90%以上、 $\alpha+\beta 1$ サブユニットは80%以上の細胞で発現していることを確かめた。イオンチャンネル作用薬のHTSにおいて最も重要なのは、対象となるチャンネルの定常発現効率を高く保つことである。例えば探索試験に用いる全細胞のうち少なくともBK α を機能発現している細胞が90%以上占め、BK $\alpha\beta 1$ 発現細胞は平均40%(残り50%はBK α のみ)しか機能発現していない場合、Fig.2のようにBK α とBK $\alpha\beta 1$ に対する作用の差から、 $\beta 1$ をターゲットとする化合物を見出すのはかなり困難である。しかし定常発現系で2種類以上の遺伝子を同時に機能発現した細胞を70%以上の確率で得ることは大量培養の場合において、一般的にそれほど容易ではない。1つのベクターに2種の遺伝子(例えば α 及び β 、サブユニット)

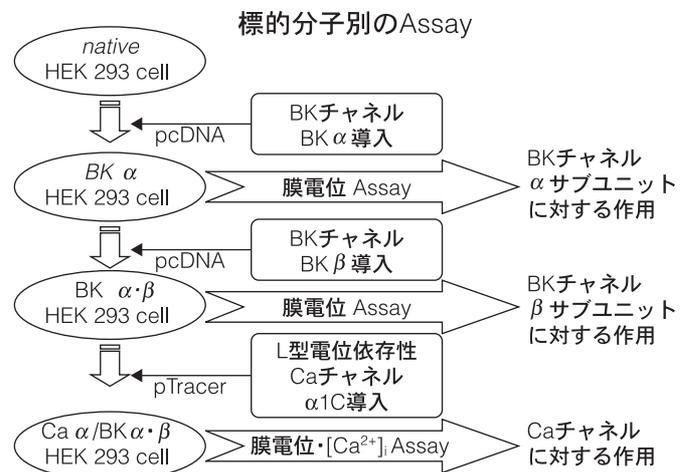


Fig.2 A schematic diagram of the procedure to prepare the high throughput screening system to survey compounds acting on large conductance Ca^{2+} activated K^+ (BK) channel α or β subunit. To examine whether test compounds act on voltage-dependent Ca^{2+} channel would not be sequentially performed in HTS system, because the probability of functional expression of the channel may be lower.

を同時に組み込んだでの発現も行われているが、ごく限られた例にとどまっている。HTSシステム構築の際にアキレス腱となる場合が多い。

DiBAC₄(3)は陰イオンであるが lipophilic であり¹⁷⁾、静止電位においても細胞膜を通過して内にも取り込まれて細胞質蛋白と結合すると推定される¹⁸⁾。励起光(490 nm)照射により発する蛍光(520 nm)は蛋白との結合により寿命が著しく増大する。細胞が脱分極すると細胞内へDiBAC₄(3)の分布が増すため蛍光が増大する。100 nmol/lのDiBAC₄(3)を含む外液にHEK293細胞を20分間浸して色素を取り込ませた後、色素の存在下で実験を行った。490 nmの励起光を用いて、505 nmのダイクロイックミラーとフィルターで選択した520 nm以上の蛍光画像をイメージングシステム(ARGUS-HiSCA, 浜松ホトニクス)により取得した。細胞内 Ca^{2+} 濃度測定は10 μ mol/lのFura 2-AMを含む外液に20分間浸した細胞を用いて、色素非存在下で励起は340および380 nmの紫外光により行い、480 nmでの蛍光画像を取得した。場合によっては同時にホールセルパッチクランプ法による電流記録を行った。

電位固定下に過分極を生じさせると、電位変化に対し最も蛍光強度変化の大きい電位領域(-30 mV付近)で蛍光の減少が観察された。さらに、実験プロトコルの最後に外液 K^+ 濃度を140 mmol/lに上昇させ、電位固定を外すと膜電位はほぼ0 mVになる。この時の蛍光強度を F_K とし、各保持電位での蛍光強度 F との比(F/F_K)の関係を求めたところ、ボルツマン式に適合した定量的関係が見出された。(Fig.3)。さらにこのキャリブレーションが妥当か(実用可能か)を検討するため、電極法を用いて実測した膜電位とその時の F/F_K 値の関係をプロットすると、キャリブレーションと良く適合し、定量的関係が見出された。HEKBK $\alpha\beta 1$ では静止膜電位

が native HEK より深く、BK チャネル抑制薬の 1 mmol/l tetraethylammonium により脱分極した。HEKBK α/β 1 において Evans blue による BK チャネル開口作用を介した過分極は、その青色に阻害されることなく測定された。

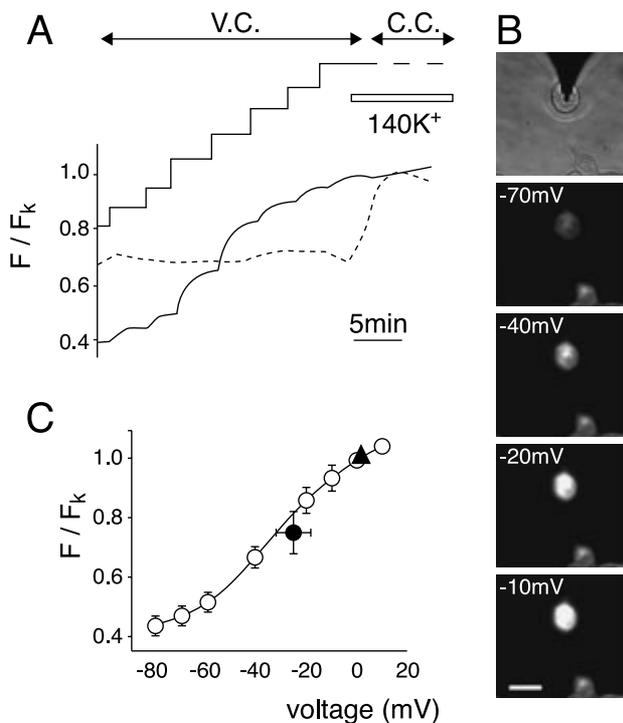


Fig.3 Calibration of the relative fluorescence of DiBAC₄(3) against clamp potentials. (A) Changes in relative fluorescence intensity (F/F_k) were measured in standard solution at depolarization voltage steps in the range of -80 and +10 mV under voltage-clamp (solid line) in HEKBK $\alpha\beta$ stained with 100 nmol/l DiBAC₄(3). V.C. and C.C. indicate voltage-clamp and current clamp, respectively. The F/F_k in not voltage-clamped cells was shown in the same time course by broken line. Single cells were selected for the recording based on cell capacitance (<30 pF). At the end of the procedure, F_k was measured under current-clamp mode in 140 mmol/l K⁺ solution as indicated by horizontal bar. (B) Transmitted images of cells and a pipette and fluorescence images of cells, which were voltage clamped or not clamped. The cell attached by the pipette was voltage clamped. F intensity in the voltage-clamped cell depended on the clamp potentials, but that in non-clamped cell did not. The relationships between F/F_k and clamp potentials and non-clamped cell are shown in "A". (C) The relationship between F/F_k and corresponding clamp potentials. The solid line represents the theoretical fit to the data points using the Boltzmann equation ($n=5$). $F/F_k = 1.1 - 0.7 / \{1 + \exp[(E+31)/17.8]\}$, where E is the membrane potential (abscissa). Closed triangle ($n=5$) and closed circle ($n=5$) represent the results in 140mmol/l K⁺ solution and the standard solution under current-clamp mode, respectively. Reference 16) with the permission from Japanese Pharmacological Society.

Slow response voltage-sensitive dye の欠点は、当然のことながら時定数約30秒という時間分解能の悪さにある。HEK293細胞にもともと存在するムスカリン受容体をアセチルコリンで刺激し、細胞内 Ca²⁺ 濃度を上昇させると、BK チャネルが活性化され過分極を示すが、電極を介して直接測定した速い過分極にくらべ、DiBAC₄(3)による信号は遥かに遅く、一過性の反応は捉えられない。むしろ細胞内 Ca²⁺ 濃度変化を反映する Fura 2 のシグナルの方が遥かに変化が速いことがわかる。

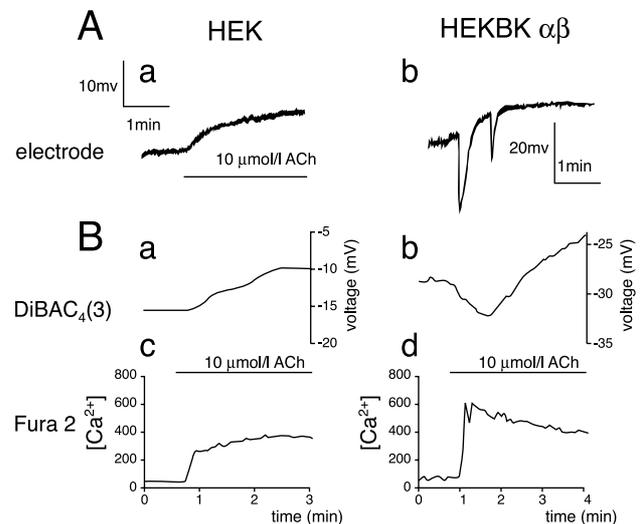


Fig.4 Effects of acetylcholine (ACh) on membrane potentials (MPs) and [Ca²⁺], in native HEK and HEKBK $\alpha\beta$ in a layer. (A) Effects of ACh on MPs measured with microelectrodes. (B) Effects of ACh on MPs (a, b) and [Ca²⁺], (c, d) were simultaneously measured with DiBAC₄(3) and Fura 2, respectively. Reference 16) with the permission from Japanese Pharmacological Society.

HEK $\alpha\beta$ 1 では青色素の Evans blue による BK チャネル開口作用を介した過分極は測定できたが、BK チャネル開口試薬として汎用される NS-1619 は開口作用と対応した速やかな蛍光減少に加えて、アーチファクトとして緩徐な減少も生じさせた。NS-1619 は細胞質蛋白と DiBAC₄(3) の結合に影響を与えている可能性が高い。

5) 高効率探索システムを用いた BK チャネル開口薬リード化合物の探索

上記の HEKBK $\alpha\beta$ 1 と DiBAC₄(3) を用いた探索システムを利用して、植物成分テルペノイドを中心に天然物及びその誘導体化合物数十種類の中から、BK チャネル開口作用を有する化合物を探索した¹⁹⁾。それらのうちピマル酸および関連ピマラン化合物に開口作用を見出した。一方、ピマル酸と極めて効力の近いアピエチン酸には作用が認められなかった (Fig.1)。インサイドアウトパッチクランプ法を用いて検討したこれら化合物の BK チャネル開口作用の効力は、DiBAC₄(3) を用いた結果と非常によく良く一致したので、同検索システムの有用性が裏付けられた。ピマル酸は HEKBK α と HEKBK $\alpha\beta$ 1 で同じ程度単一チャネル活性を増強した

ので、おそらく α サブユニットに作用すると推測される。また同様にDiBAC₄(3)を用いた高効率検索は、中コンダクタンス(IK)あるいは小コンダクタンス(SK)のCa依存性Kチャンネル α サブユニットをHEK293細胞に発現させた系でのchlorzoxazoneとその関連化合物などの開口作用検出も充分可能であった。IKやSK2を発現させたHEK293細胞では、10 μ mol/lのピマル酸はチャンネル開口作用を示さなかったため、Ca²⁺依存性K⁺チャンネルのうち、BKチャンネルだけに作用することが明らかとなった。

ピマル酸及び関連ピマラン系化合物のBKチャンネル開口作用は、細胞外から投与しても有効であり、1 μ mol/l以上で有意な作用が見られることから注目に値する。 α サブユニットに作用し、チャンネルコンダクタンスには影響を与えずCa²⁺依存性及び電位依存性を増大させることにより開口確率を高めると推測される。アピエチン酸は極めて類似した化学構造を持つにもかかわらず開口作用を持たないことは、C13の残基の立体化学的位置関係が作用発現に重要な影響を持っていることを示唆しているかもしれない。

尚、これらのテルペノイド類のなかにも本探索システムでアーチファクトを生じさせるものが数個あり、BKチャンネルを発現させていないHEK293細胞でも有意な蛍光強度変化を生じさせた。しかしその変化の程度は軽度であり、常にnative HEKに対する作用も対照群として検出していればアーチファクトとして検出できる。何よりも見過ごしの過誤よりも行き過ぎの過誤の方が、効率的検索システムとしては罪が軽いので、実際のHTSでアーチファクトが出た場合は更に別途の方法で検討することで製薬企業は対応していると推測される。

6) 今後の展望

本稿ではDiBAC₄(3)や関連のslow response probeは、BKチャンネル開口薬の高効率探索に有用であることを概説した。しかし、アーチファクトの発生を感知するためチャンネルを発現してない対象群でも必ず同時に検討する必要があることも明らかとなった。本探索システムを利用して、実際にBKチャンネル開口作用を持つピマル酸が天然物テルペノイドから発見された。ピマル酸及びその誘導体が有用なBKチャンネル開口薬のリード化合物となる可能性を更に検討している。

数十万検体から、目的の作用を持つリード種化合物をHTSにより検索するには、精度(再現性)が高いことと共に1検索あたりの所要時間が短くコストが低いことが要求される。現在、国内外のいくつかの企業が独自にイオンチャンネル作用薬を含む新薬開発用HTSシステムを開発・販売している。ATP感受性あるいはCa依存性Kチャンネルなどのように不活性化を持たないチャンネル(一部の種類は持つ)の作用薬に関しては、slow response probeを用いたこれらのHTSは極めて有効な手段と考えられ、既にかなりの製薬企業で利用されつつある。その場合の要件は、上記のようにむしろ目的とするチャンネルが少なくとも70%以上の細胞で定常的に機能発現している系を確立することであろう。複数のサブユニットや関連蛋白を同時に定常的に高発現させた培養細胞系の大量調整は容易ではない。例えばFig.2の最下段に示すように、BK $\alpha\beta$ に加えて発現効率の比較的低い電位依存性L型Ca²⁺チャンネルの α 1Cと β 2サブユニットを共発現させ、両イオンチャンネルの

機能的相関を含めた探索を行う必要がある場合は、HTSシステムに繰り入れることは現在のところ極めて困難と思われる。

これらのHTSシステムを利用してイオンチャンネル作用薬開発を行う場合に、最も大きな障害を伴うのは、言うまでもなく速い活性化・不活性化を持つ電位依存性イオンチャンネルに対する作用薬を検索する場合であろう。様々な工夫がされているが、少なくとも従来のslow response probeを用いて正確な検索が可能かどうかは、時間及び電位分解能の点から疑問が大きいように思われる。最近DiBAC₄(3) (acceptor)及びcoumarin-labeled phosphatidylethanolamine (donor)を用いてFluorescence resonance energy transfer (FRET)に基づいた巧妙な膜電位変化記録法が報告されている²⁰⁾。非常に速い電位変化が蛍光強度比変化として捉えられ、HTSにも実用化され得るので²¹⁾、やがて一般化する方法かも知れない。

一方、最近slow response voltage-sensitive dyeにSYTOと呼ばれるcyanine系のカチオン色素が開発された(Table1; 構造式・分子量不明; Molecular Probe社)。カチオン系色素としてはDiSCが従来から知られているが、細胞呼吸抑制作用などを有するため、oxonol系色素ほど利用されていない。アニオン系とカチオン系色素を同時に利用すると、膜電位変化がratiometricなシグナルとして捉えることができ、定量性が格段に上昇しアーチファクト検出も容易になる可能性がある。実際、SYTO62とDiBAC₄(3)を併用した例が、免疫系細胞のSK/IKチャンネルをターゲットとしたHTSシステムを含めて報告されている²²⁾。このようなFRETの応用や新規電位感受性色素の開発を含めた新たなHTS系の確立は、新規イオンチャンネル作用薬開発の可能性を飛躍的に高めるものと期待される。

参考文献

- 1) 尾崎博, 今泉祐治, 大石一彦, 小濱一弘, 日本薬理学会誌, **118**, 187 (2001).
- 2) Denyer J, Worley W, Cox B, Allenby G and Banks M, *Drug Discovery Today*, **3**, 323 (1998).
- 3) Plasek J and Sigler K, *J Photochem Photobiol B: Biol.*, **33**, 101 (1996).
- 4) Shapiro HM, *Methods*, **21**, 271 (2000).
- 5) Gopalakrishnan M, Molinari EJ, Shieh CC, Monteggia LM, Roch JM, Whiteaker KL, Scott VES, Sullivan JP and Brioni JD, *Br. J. Pharmacol.*, **129**, 1323 (2000).
- 6) Lawson K, *Kidney Int.*, **57**, 838 (2000).
- 7) Shieh CC, Coghlan MC, Sullivan JP, Gopalakrishnan M, *Pharmacol Rev.*, **52**, 557 (2000).
- 8) Coghlan MJ, Carroll WA and Gopalakrishnan M, *J Med Chem.*, **44**, 1627 (2001).
- 9) Vergara C, Latorre R, Marrion N and Adelman JP, *Current Opin Neurobiol.*, **8**, 321 (1998).
- 10) Kaczorowski GJ and Garcia ML, *Curr Opin Chem Biol.*, **3**, 448 (1999).
- 11) Brenner R, Perez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, Aldrich RW., *Nature*, **407**, 870 (2000).
- 12) Gribkoff VK, Starrett JE, Dworetzky SI Jr, Hewawasam P, Boissard CG, Cook DA, Frantz SW, Heman K, Hibbard JR, Huston K, *et al. Nat. Med.*, **7**, 471 (2001).

- 13) Meera P, Wallner M and Toro L, *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 5562 (2000).
- 14) Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Bahamonde MI, Mann GE, Vergara C and Latorre R, *Science* **285**, 1929 (1999).
- 15) Starrett JE, Dworetzky SI and Gibkoff VK, *Current Pharmaceut Design*, **2**: 413 (1996).
- 16) Yamada A, Gaja N, Ohya S, Muraki K, Narita H, Ohwada T, Imaizumi Y, *Jpn J Pharmacol.*, **86**, 342 (2001).
- 17) Plasek J and Siger K, *J Photochem Photobiol B: Biol.*, **33**, 101 (1996).
- 18) Epps DE, Wolfe ML, Groppi V, *Chem Phys Lipids*. **69**, 137 (1994).
- 19) Imaizumi, Y., Sakamoto, K., Yamada, A., Hotta, A., Ohya, S., Muraki, K., Uchiyama, M. and Ohwada, T., *Mol Pharmacol* in press.
- 20) Gonzales JE and Tsien RY, *Chem Biol.*, **4**, 269 (1997).
- 21) Gonzalez JE, Oades K, Leychkis Y, Harootunian A and Negulescu PA, *Drug Discovery Today*, **4**, 431 (1999).
- 22) Farinas J, Chow AW and Wada HG, *Anal Biochem.*, **295**, 138 (2001).

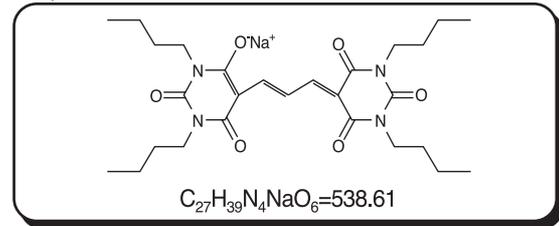
著者紹介

氏 名 : 今泉祐治 (Yuji Imaizumi)
 所 属 : 名古屋市立大学大学院 薬学研究科
 細胞分子薬効解析学分野 教授
 出身大学 : 東京大学薬学部・大学院修士
 学 位 : 薬学博士
 専 門 : イオンチャネルの分子薬理・電気生理学
 連絡先 : 〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通り3-1
 TEL & FAX: 052-836-3431
 E-mail: yimaizum@phar.nagoya-cu.ac.jp

関連商品

膜電位感受性色素

DiBAC₄(3)



< 特長 >

- Ar レーザー(488 nm)を励起光源として利用可能である。
- 膜電位変化に対し、高感度な蛍光変化を示す。
- 蛍光特性(メタノール中) λ_{ex} = 493 nm, λ_{em} = 516 nm

DiBAC₄(3)は、Bis-oxonol型のアニオン性膜電位感受性色素です。細胞外液に添加してインキュベートすると、膜電位に応じた細胞内外の分布を示します。刺激によって細胞膜が脱分極すると、その電位変化を受け、細胞中の存在率が高くなります。細胞質中では、細胞内タンパク質や細胞内膜に結合し、その蛍光が増強します¹⁾。このような機構により、蛍光強度変化から、膜電位の変化を検出することができます。

DiBAC₄(3)は、DiBAC₄(5)やDiSBAC₂(3)などの他のBis-oxonol型や、スチリル系のdi-4-ANNEPS、シアニン系のDiOC₆(3)などの膜電位感受性色素に比べ、高い電位応答性を持っています²⁾。Bräunerらは、BICR/M1R-k細胞(ラット乳癌細胞)において、-25 ~ -90 mVの膜電位範囲で約1%/mVの蛍光強度変化が得られることを報告しています²⁾。電位変化に伴う応答は1次の速度式に従い、その速度定数は0.1 ~ 0.8 /minと報告されています²⁾。カルシウムイオン濃度と膜電位の相関解析³⁾、抗生物質に対する細胞の生存率の分析⁴⁾、ATP感受性カリウムイオンチャネルの活性評価⁵⁾などの研究に応用されています。

Ar レーザー(488 nm)で励起可能なことから、フローサイトメトリー⁴⁾、共焦点レーザー顕微鏡観察⁶⁾などで利用可能です。最近では、High-Throughput Screening(HTS)での細胞応答検出に最も頻繁に使用されている膜電位感受性色素です⁷⁾。

参考文献

- 1) D. E. Epps, M. L. Wolfe, V. Groppi, *Chem. Phys. Lipids*, **69**, 137 (1994).
- 2) T. Bräuner, D. F. Hulser, R. J. Strasser, *Biochim. Biophys. Acta*, **771**, 208 (1984).
- 3) T. T. Rohn, A. Sauvadet, C. Pavoine, F. Pecker, *Am. J. Physiol.*, **273**, C909 (1997).
- 4) D. J. Mason, R. Allman, J. M. Stark, D. Lloyd, *J. Microsc.*, **176**, 8 (1994).
- 5) U. Langheinrich, J. Daut, *J. Physiol.*, **502**, 397 (1997).
- 6) V. Dall'Asta, R. Gatti, G. Orlandini, P. A. Rossi, B. M. Rotoli, R. Sala, O. Bussolati, G. C. Gazzola, *Exp. Cell Res.*, **231**, 260 (1997).
- 7) K. S. Schroeder, B. D. Neagle, *J. Biomol. Screening*, **1**, 75 (1996).

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
DiBAC ₄ (3)	25mg	27,000	D545

Topics on Chemistry

低分子リフォールディング剤

(株) 同仁化学研究所 佐々本 一美

ポストゲノム時代を迎え、組み換え蛋白質の受託生産ビジネスが盛んである。遺伝情報から読みとれるのは蛋白質の配列であり、形、すなわち生物学的な活性については、どのような発現系を用いるかによって全く異なる。最も汎用される大腸菌の場合、多くの外来蛋白質は封入体とよばれる凝集体を形成し、これが組み換え蛋白質合成における最も大きな障害になっている。封入体が生成した場合、変性剤や界面活性剤を用いて可溶化する。この活性を失った状態から正しい構造に蛋白質を巻き戻せるかどうか、最もクリティカルな部分である。このリフォールディングには一般的な効果的手法は存在せず、蛋白質によって試行錯誤が避けられない¹⁾。

ジスルフィド (-S-S-) 結合をもつ蛋白質の場合、正しく S-S 結合を架けるには、チオール化合物 (RSH) からなるレドックス・バッファーに希釈して変性剤を除き、S-S 結合をゆっくり架け直せばよい。チオレートアニオン (RS⁻) が蛋白質内の S-S 結合を求核的に攻撃し、部分的に S-S 結合が切れることでコンフォメーションの自由度が増し、よりエネルギー的に安定なコンフォメーションをとり易くなる。さらに、その状態で新たな分子内 S-S 結合が形成される。このように、基本的にチオール求核反応の連鎖であるリフォールディングを支配しているのは、RS⁻ と S-S 結合との反応の速度論的要因、および、蛋白質側の熱力学的要因であると考えられる。

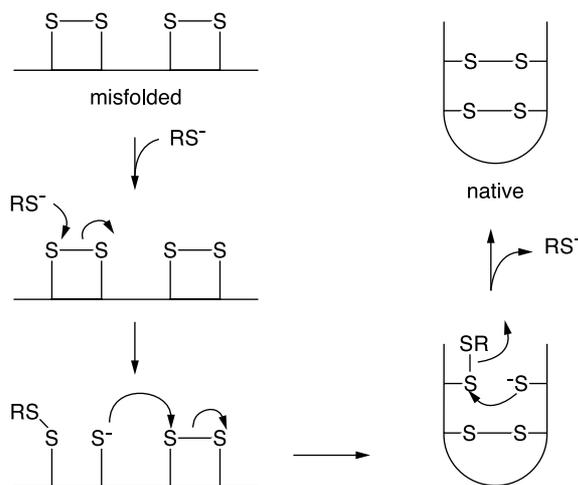


Fig.1 リフォールディング反応

チオール化合物としては、グルタチオン (GSH) やシステイン、DTT などがレドックス・バッファーとして用いられるが、RS⁻ の生成比、すなわちチオールの pK_a 値が反応速度に大きな影響を与えることは、上記の議論からも理解できる。pK_a 値はそれぞれ、GSH やシステインが 8.7、DTT は 9.2 および 10.1 である。したがって中性 pH では殆どが非解離型 (RSH) となっている。

これに対して、生体内でリフォールディングを司っている酵素 protein disulfide isomerase (PDI) は、-Cys-Gly-His-Cys- という配列の活性部位が 2 箇所あり、片方のシステイン残基の pK_a 値は 6.7 と非常に低くなっている。遊離のシステインと比べて 100 倍も酸性が高くなっているのは、空間的に近傍に位置する他の残基の影響だが、低分子でも低い pK_a 値を持ったものであれば同様の効果が期待できる (以前この稿でも紹介した BMC は、比較的低い値をもっている (8.3, 9.9)²⁾。しかしこれまで用いられてきたのは、BMC も含め全て脂肪族チオール化合物であり、低い pK_a 値を達成するのは無理である。かといって、PDI のような酵素を使用するのは、コストが高く、かつ精製操作が複雑になるといった問題を抱えている。

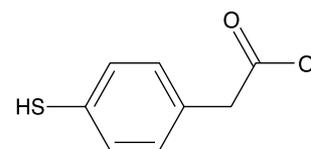


Fig.2 化合物 1 の構造

Lees らが報告している芳香族チオール (化合物 1)³⁾ は pK_a 値が 6.6 と、PDI とほぼ同等の値をもっている (水溶性を付与する意味で、他端にカルボキシル基がついているが、SH 基の求核性に影響しないように共役しない位置にある)。論文では蛋白質として、リフォールディングの研究で汎用される RNase A (4 個の S-S 結合をもっている) を用い、ランダムに S-S 結合が形成された状態 (scrambled) および完全に還元された状態からの巻き戻し反応において GSH と性能を比較している。それによると、この *in vitro* リフォールディングの系において、化合物 1 は GSH の 5 - 6 倍の反応速度を示し、レドックス・バッファーとして有用であると思われる。

蛋白質の機能はいうまでもなく、その形 (フォールド) にあり、その意味で正しい形を作り上げるリフォールディングをコントロールすることは、極めて重要な技術といえる。無論、求核性だけではなく様々な要因がリフォールディングを支配しているが、何ら認識能を持たない低分子でもシャペロンとしての可能性を秘めていることが分かる。培養系へ添加するだけでいい真の低分子シャペロンが開発される日もそう遠くではないかも知れない。

参考文献

- 1) 津本 浩平、三沢 悟、熊谷 泉、蛋白質・核酸・酵素、**2001**, 46, 1238.
- 2) K. J. Woycechowsky, K. D. Wittrup and R. T. Raines, *Chem. Biol.*, **1999**, 6, 871.
- 3) J. D. Gough, R. H. Williams, Jr., A. E. Donofrio and W. J. Lees, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 3885.

ケミストからみた ポストゲノム

3

~ SNP タイピング その2 (マスペクトルによる検出)~

九州大学工学研究院応用化学部門
片山佳樹

1. はじめに

前回、ゲノム上の特定の1塩基多型 (SNP) のタイピング法として蛍光検出を用いる手法をご紹介した。今回は、検出法としてマスペクトルを用いる SNP タイピング法についてまとめてみた。マスペクトルは、ご承知の通り測定対象分子の質量を計測するものである。したがって、蛍光検出に比べ測定結果が明確で擬陽性や擬陰性が出にくいという利点がある。また、蛍光基やハプテンなどの標識を必要とせず、計測時間も短い(数秒から数分)ことも大きな利点である。特に、Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)法は、試料と混合して結晶化させたマトリックスにレーザー光を照射して、マトリックスが光のエネルギーを吸収することに基づき試料をイオン化する手法であり、飛行時間型 (TOF) 質量計測計と組み合わせた MALDI-TOFMS の実用化により、巨大生体分子への適用が可能となり、生化学分野への応用が飛躍的に発展した。DNA などの核酸の場合、イオン化に伴う断片化が顕著で、マスペクトルの利用には問題があったが、マトリックスとして3-ヒドロキシピコリン酸などが開発され、低エネルギーでのイオン化も可能となったことから断片化の抑制が可能となり、近年、マスペクトル分析の核酸への応用が急速に広がっている¹⁾。一方で、質量分析では計測対象の精製が必要な場合が多く、塩の影響などが計測を困難にする場合がある。

マスペクトルを用いる SNP の検出法は、大きく分けて次の4つのタイプに分けられる。このうち、最も活発に実用化が検討されているのはプライマ - 伸長法である。

- 1) アレル特異的な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 特異的に起こる伸長反応の生成物から判断。
- 3) PCR が不要な手法 (Invader 法)
- 4) その他の方法

2. アレル特異的なプローブを用いる ハイブリダイゼーション

前回述べたように、SNP 部分を含む領域を PCR 増幅し、アレル特異的なプローブをハイブリダイズさせると、標的配列に対しフルマッチの配列を有するプローブが安定な2本鎖を形成する。このプローブを何らかの方法で精製して質量分析すると SNP タイピングが可能である。精製には、プローブを含む2本鎖を基板やビーズなどの担体に何らかの方法で固定し洗浄するのが便利である。実際、DNA アレイを利用してこの種の方法が検討されている²⁾。しかし、蛍光検出と同じくこの戦略では、多くの SNP を同時に計測できる利点があるものの、プローブの設計や計測条件の設定が極めて困難である。近年、DNA プローブのかわりに PNA を用いる手法が提案されている。PNA では断片化が起こらないため、マトリックスとして 2,5-DHB などのより使いやすいものが利用でき、低塩濃度でもハイブリダイゼーションの選択性、安定性が優れ、塩の影響もないため、DNA プローブを用いるよりも優れている。一般的な手法としては、ピオチン付加型プライマーを用いて PCR 増幅し、ストレプトアビジン修飾磁性ビーズに結合後、1本鎖とし、プローブを反応して未反応プローブを洗浄除去、その後、ビーズに2本鎖として結合していたプローブを質量分析する (Fig.1a)³⁾。この手の精製法は、VNTR や STR などの特定塩基配列が繰り返すタンデムリピート型の多型分析でも用いられている^{4,5)}。さらに、多くの SNP の同時計測を可能にするため、プローブに 8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸を1個から複数個 PNA プローブ合成時に付加しておき、プローブ間の質量差を増幅する手法も報告されている (Fig.1b)⁶⁾。しかしながら、プローブ間のハイブリダイゼーション能力に大きな差がないため、上記の手法でも一方のアレルの計測でも別アレルの生成物のシグナルも検出され、ASO 法自体の欠点は以然として存在し、擬陽性を出さないという質量分析の長所を活かしきれていない。

3. プライマー伸長法と質量分析を 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、マスペクトルとの併用で多くの報告例がある。

いずれも、対象とする SNP 部位の1塩基上流までの配列に相補的なプローブをハイブリダイズさせ、その後、DNA ポリメラーゼで鎖を伸長させ、アレル間での伸長生成物の質量差を計測する。ポイントは如何に質量差を拡大できるかと、計測対象伸長生成物の長さ (質量) を如何に小さくできるか (質量分析時の断片化を抑え、かつ質量差を相対的に拡大する) である。

3-1: PINPOINT assay

PINPOINT assay は、プライマー伸長反応時に4種類の塩基に対応するジデオキシヌクレオチド3リン酸 (ddNTP) を添加する方法である^{7,8)}。この場合、伸長反応はいずれの塩基の場合でも1塩基で停止する (Fig.2a)。従って、プライマーに1塩基が付加した

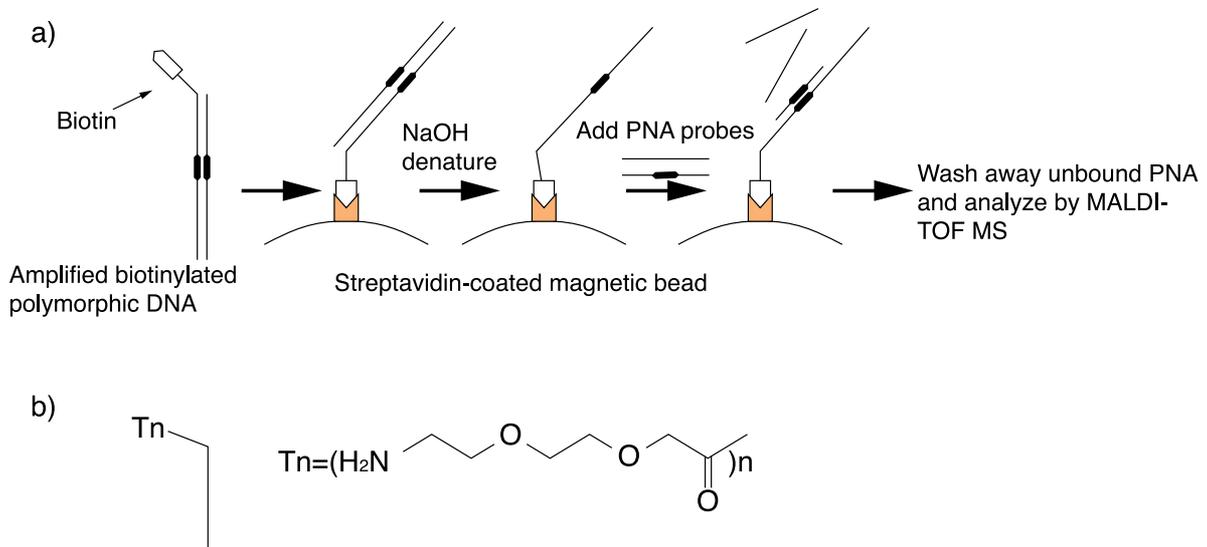


Fig.1 SNP typing using allele-specific PNA probe hybridization
 a) Schematic outline of PNA hybridization MALDI-TOF MS experiment
 b) Mass tag for the PNA probe for improving multiplexity

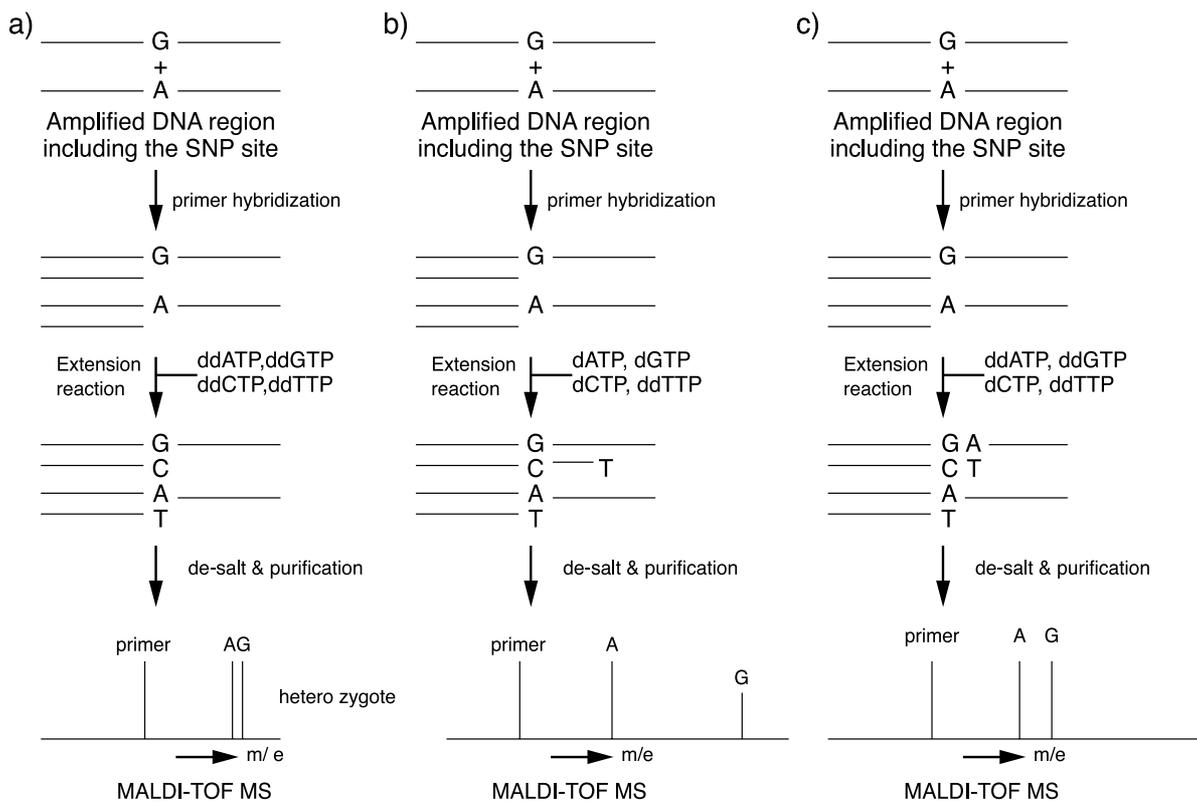


Fig.2 Schematic outlines of primer extension strategies using Mass spectrometry
 a) PINPOINT assay, b) PROBE assay, c) VSET assay

生成物間の質量差を計測することになる。この手法は、プライマー伸長法の質量分析への適用法として最初の実用的手法であり、蛍光や放射性同位体などの高価な標識を必要とせず、質量分析の利点を利用できる。しかし、1塩基間の質量差はそれほど大きくなり、例えば頻度の多いA/T多型では、アデニンとチミンの間の分子量の差は9しかなく、ヘテロ対合などの場合、検出できないことも多い⁹⁾。ナトリウム塩やカリウム塩が混在すると、これらのカチオンとの付加物が生じ、計測をより困難なものにする。このような欠点を補うため、できるだけ計測対象の分子量を小さくする工夫としてプライマーに切断サイトを導入しておき、伸長反応後に切断して計測対象をできるだけ小さくする手法¹⁰⁾や、1塩基間の質量差を拡大するため、例えばDNA配列分析でダイターミネーターとして用いられるフルオレセインやCy5などが標識されたddNTPを利用して伸長反応を行う手法などが報告されている⁹⁾。たとえば、A/Gアレルを判定する場合、ddGTPとフルオレセイン12 ddATPを用いた場合、両アレルでの生成物の分子量差は508Daと大きくなる。PINPOINT assayは、生成物の分子量が小さいため、複数のSNPを一度に計測する場合、分子量の重なりを避けやすいため、多くのSNPを一度に検定する性能に優れている。現在のところ、12種類のSNPをジェノタイピングした例がある⁸⁾。

3-2 : PROBE 法 (Primer Oligobase Extention)

PINPOINT assayの改良のため、マスタグをddNTPに標識したり、プライマー切断反応を利用するのは手間とコストを要する。これに対し、伸長反応時に1種類のddNTPと残り3種類のdNTPを用いるのがPROBE法である¹¹⁾。この場合では、SNP部位にddNTPと相補的な塩基がある場合は1塩基で伸長反応が停止するが、異なる塩基の場合は、次に鋳型鎖にddNTPと相補的な塩基が現れるまで伸長反応が継続する(Fig.2b)。そのため、アレル間で伸長生成物の分子量差は1~10塩基分程度にもなるので、質量差が大きくなり、判定が容易になる。最近、PROBE法をチップ上で行い、実用性を向上させた手法も報告されている¹²⁾。この場合、2cm角のシリコンチップ上に各々2.5mm角の6×6のアレイ状に1μl(1.56 pmol)のDNAを固定化している。固定化法は、3-アミノプロピルトリエトキシシランでシリコン表面を修飾してアミノ基を導入し、N-Succinimidyl(4-Iodoacetyl)aminobenzoate

(SIAB)で処理してチオール反応性基を導入し、5'チオール化プライマーで増幅したSNP部位を含む領域を結合する(Fig.3)。本手法は、伸長生成物の精製が容易で、実用性の高い手法として興味深い。

3-3 : VSET 法 (Very Short Extention)

PROBE法は、伸長生成物間の分子量差を拡大するよい手法であるが、一方のアレルでは複数塩基伸長が起こるので、多くのSNPの一斉計測では別のSNPサイトの生成物との分子量が接近する恐れがある。また、長い生成物の場合、検出されない恐れも出てくる。例えば、19merのプライマーを用いた場合、10塩基伸長した生成物のマスシグナル強度は、1塩基伸長生成物に比べ1/7になってしまう。これを改善した手法がVSET法である¹³⁾。この場合は、伸長反応に1種類のdNTPと残り3種類のddNTPを用いる。VSET法では、一方のアレル(SNPサイトがddNTPのどれかと相補的)では1塩基の伸長が起き、dNTPと相補的なサイトでは、その次まで(2塩基)伸長が起こる(Fig.2c)。従って、PINPOINT法に比べ検出感度は格段によいため、シビアな脱塩などが必要なくなる一方で、PROBE法の欠点も克服できることになる。

3-4 : Survivor assay

プライマー伸長法では、伸長生成物の方を検出するのが普通であるが、Survivor assayでは、系中に加えた4種類のddNTPの残量を計測する(Fig.4)¹⁴⁾。計測にはESI-MSを用いる。ESI(electrospray ionization)は、小分子の定量的測定が高感度で行える利点がある。サーマルサイクラーでの反応(20~30サイクル必要)において、伸長したプライマーが未伸長プライマーと競争しないようにプライマーは大過剰用いる必要があり、加えるddNTPの量の最適化が重要な因子となる。コントロールとテストサンプル間でのマスシグナルのピーク面積比が40%以上であるとき優位な差があるといえる。この手法は、同じ4種類の化合物(ddNTP)を測定するだけで、どんなSNPも計測でき、プログラムやデータ処理が容易かつ迅速である利点があるが、一方で、複数のSNPを同時に計測するのは不可能である。

3-5 : GOOD assay

GOOD assayは、プライマー伸長反応後、生成物を小さな分子

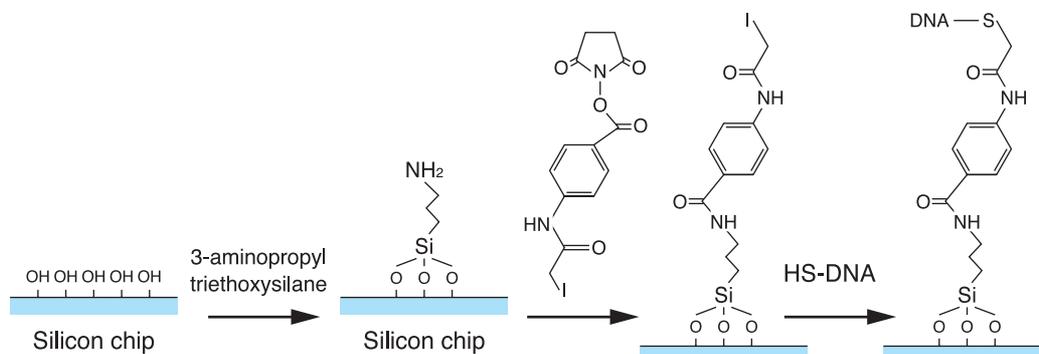


Fig.3 Schematic outline of the DNA-immobilization onto the silicon chip

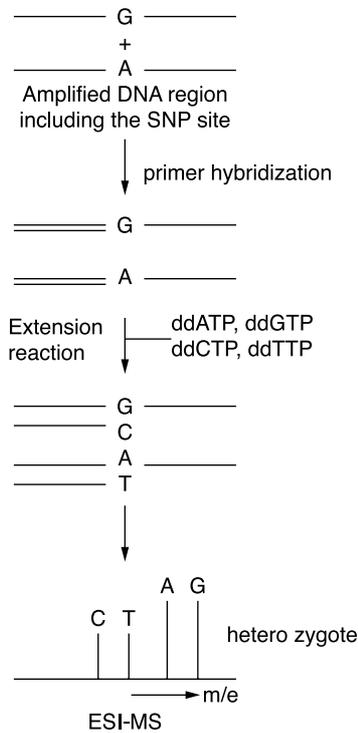


Fig.4 Schematic outline of Survivor assay
The figure shows the case of heterozygote.

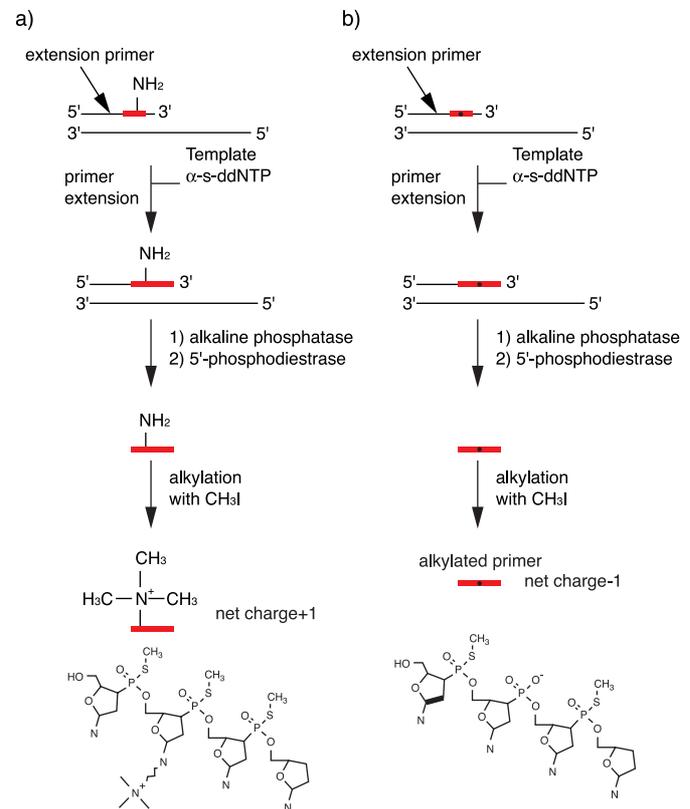


Fig.5 Schematic outline of GOOD assay
a) positive mode, b) negative mode

量の部分まで消化すること、生成物の荷電を + 1 あるいは - 1 にすることの双方により、検出感度と判定精度を向上することを特徴とする手法である (Fig.5)¹⁵⁾。DNA の MALDI-TOF MS 分析では、DNA を総荷電 + 1 あるいは - 1 にすると検出感度が 100 倍向上するため、単一チューブ内で反応するだけで生成物を精製することなく計測できる。計測手法としては、ポジティブモードとネガティブモードがある。ポジティブモードでは、プライマーの 3' 末端にホスホロチオエート結合を介した塩基を 3 つ導入し、その中間の塩基にはトリメチルアンモニウムヘキシル基を導入しておく¹⁶⁾。このプライマーを用いて伸長反応を行うが、液中には α -S-dNTP と α -S-ddNTP を加えておく。したがって、伸長生成物では、プライマーの 3'-末端側はすべてホスホロチオエート結合となる。その後、ヨウ化メチルで処理すると、ホスホロチオエート部分はメチル化されアニオン荷電が消失する。これを 5'-ホスホジエステラーゼ処理すると、通常のリン酸エステル結合を有する塩基部分は消化され、メチル化されて中性となったホスホロチオエート部分のみが残ることになる。これを質量分析することで、高感度に SNP が判定できる。ネガティブモードでは、プライマーの 3' 末端にホスホロチオエート結合を介した塩基を 1 つ導入し、さらにその先に通常のリン酸エステル結合で塩基を 1 つ導入する。これを用いてポジティブモードと同様の条件で伸長反応、メチル化処理、ホスホジエステラーゼ処理を行うと、メチル化したホスホロチオエート結合の中に 1 つだけリン酸エステル結合 (- 1 価

アニオン) が残った生成物が得られるのでこれを計測する。

本手法は、通常の DNA を分析するものではないので、断片化が抑制されるため、マトリックスも自由に効果的なものを選択できる。精製が必要ない点、感度がよい点など魅力的な手法であるが、修飾 α -S-dNTP が必要な点、伸長反応後のステップが長い点が欠点である。

4 . Invader assay の利用

これまでの手法はいずれも、SNP を含む領域を PCR 反応により増幅する必要があった。PCR は、ハイスループット化の大きな障害となるため、これを必要としない手法があれば魅力的である。前回ご紹介したように Invader assay は、レポータープローブと Invasive プローブを用いる PCR が不要の手法である。すなわち、フラップエンドヌクレアーゼを用いてレポーター - プローブの一部を切断し、これを FRET プローブに挿入して再度切断反応を行うことで FRET を解除し、蛍光変化から SNP を判定する手法である。ここで、もし FRET プローブの切断される部分がマスペクトル分析で検出可能であれば、本手法を質量分析に応用できる。具体的には、レポータープローブのフラップ部分 (酵素で切断される部分) をアレルの違いにより、一方のプローブでは 3' 末端にチミンが 2 つ、もう一方のアレルでは 3 つ存在させ、これが第 2 の

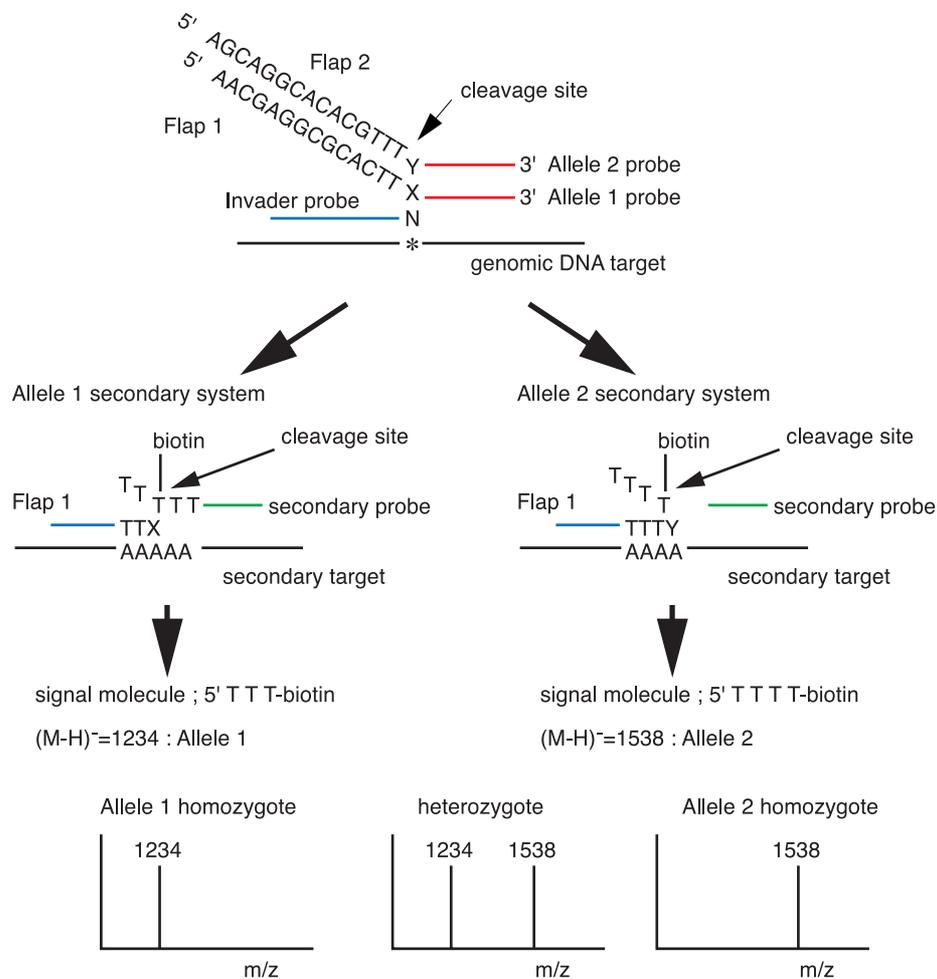


Fig.6 SNP genotyping by the Invader assay and MALDI-TOF MS

プローブにハイブリダイズすると、前者では3' - ビオチン化 T T T が、後者では3' - ビオチン化 T T T T が切断されるように設計されている(Fig.6)¹⁷⁾。これをストレプトアビジン修飾磁性ビーズで捕集し質量分析に供する。オリゴチミジンは、DNA 配列としては質量分析時における断片化が最も起こりにくく、検出感度もよい。マトリックスとしても α -CHCA など、通常の DNA 分析では使えないものも使用可能である。この手法を用いると、第1、第2ステップの反応それぞれ2時間を費やして1 μ g (0.5 amol) の DNA から720 fmol のシグナル分子が得られ、質量分析で計測可能である。現在のところ、12種類の SNP を同時計測可能であることが示されている。この手法では、切断されなかった過剰のビオチン化プローブも捕集されてしまうはずであるが、この様な長いプローブは検出条件では気化されず妨害とはならないという。

5. その他の手法

このほかには、多型部分を含む PCR 産物を利用する手法として、これをペプチド産物に変換して質量分析する手法がある¹⁸⁾。プライマーとしてポリメラ - ゼ結合サイトと翻訳開始サイトを組み

込んだものを用い、増幅産物を *in vitro* 翻訳して得られるペプチドを質量分析で判定する。DNA 配列のままでは PCR 産物のアレル間の質量差は極めて小さく検出不可能であるが、ペプチドにすれば質量分析自体の感度も上がると同時に全体の長さも短く(質量が小さく)なり、しかもアミノ酸の変化に変換されるためアレル間の質量差も拡大する。SNP ではないが1塩基挿入変異などの検出に用いられた例がある。また、安定同位体標識 dNTP を用いた配列分析を利用する手法もある¹⁹⁾、これらの手法はむしろ SNP マッピングに向いているといえる。

6. おわりに

以上、質量分析を用いる SNP 判定法について最近の動向をまとめてみた。マススペクトルを用いる手法は、検出結果が明確で蛍光検出のようなあいまいさが避けられる。また、検出速度にも優れ、自動化が容易という利点がある。反面、生成物の精製が重要になること、複数の SNP の同時計測能力がそれほど高くないことなどの欠点もある。しかしながらプライマー伸長法との組み合わせは今後有効な手法であることは間違いのないであろう。

SNP タイピングは、今後ゲノムワイドで行うとすると、実用性を考えた場合、スループットで現状の手法の1~2桁、コストで少なくとも10分の1になる必要がある²⁰⁾。当初活躍したASOを用いるハイブリダイゼーション法は、多くのSNPを同時に測定するタイピングでは、条件設定が難しい。現在ではプライマー伸長法やライゲーション法など酵素反応を組み合わせたものが主流になりつつある。今後、真に実用的な手法もこのあたりから生まれるかもしれないが、現状を考えるとまったく異なる考え方も必要かもしれない。また、WAVE system²¹⁾の様なHPLC法なども、現在のナノHPLCや2次元HPLCなどの開発を考えると新手法を考える上でのヒントとなるかもしれない。次回からは、DNAをひとまず離れ、プロテオームなど、タンパク分析の新手法について考えてみることにする。

参考文献

- 1) K.J. Wu, A. Steding, C.H. Baker, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **4**, 99 (1993).
- 2) R. Mei, P.C. Galipeau, C. Prass, A. Berno, G. Ghandour, N. Patil, R.K. Wolff, M.S. Chee, B.J. Reid, D.J. Lockhart, *Genome Res.*, **10**, 1126(1998).
- 3) P.L. Ross, K. Lee, P. Belgrader, *Anal. Chem.*, **69**, 4197(1997).
- 4) P.L. Ross, P. Belgrader, *Anal. Chem.*, **69**, 3966(1997).
- 5) P.L. Ross, P.A. Davis, P. Belgrader, *Anal. Chem.*, **70**, 2067(1998).
- 6) T. J. Griffin, W. Tang, L.M. Smith, *Nature Biotechnol.*, **15**, 1368(1997).
- 7) L.A. Haff, I.P. Smirnov, *Genome Res.*, **7**, 378(1997).
- 8) P. Ross, L. Hall, I. Smirnov, L. Haff, *Nature Biotechnol.*, **16**, 1347(1998).
- 9) Z. Fei, T. Ono, L.M. Smith, *Nucleic Acid Res.*, **26**, 2827 (1998).
- 10) J. Li, J.M. Butler, Y. Tan, H. Lin, S. Royer, L. Ohler, T.A. Shaler, J.M. Hunter, D.J. Pollart, J.A. Monforte, C.H. Becker, *Electrophoresis.*, **20**, 1258(1999).
- 11) A. Braun, D.P. Little, H. Koster, *Clin. Chem.*, **43**, 1151 (1997).
- 12) K. Tang, D-J. Fu, D. Julien, A. Braun, C.R. Cantor, H. Koster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10016 (1999).
- 13) X. Sun, H. Ding, K. Hung, B. Guo, *Nucleic Acid Res.*, **28**, e68 i-viii (2000).
- 14) S. Zhang, C.K.V. Pelt, G.A. Schultz, *Anal. Chem.*, **73**, 2117(2001).
- 15) S. Sauer, D. Lechner, K. Berlin, H. Lehrach, J-L. Escary, N. Fox, I.G. Gut, *Nucleic Acid Res.*, **28**, e13 i-viii (2000).
- 16) S. Sauer, D. Lechner, K. Berlin, C. Plancon, A. Heuermann, H. Lehrach, I.G. Gut, *Nucleic Acid Res.*, **28**, e100 i-vi (2000).
- 17) T.J. Griffin, J.G. Hall, J.R. Prudent, L.M. Smith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6301(1999).
- 18) A.M. Garvin, K.C. Parker, L. Haff, *Proc. Nature Biotechnol.*, **18**, 95(2000).
- 19) X. Chen, Z. Fei, L.M. Smith, E.M. Bradbury, V. Majidi, *Anal. Chem.*, **71**, 3118(1999).
- 20) M. Chicurel, *Nature*, **412**, 580(2001).
- 21) A. Kuklin, K. Munson, D. Gjerde, R. Haefele, P. Taylor, *Genet. Test.*, **98**, 201(1997).

お知らせ

PRTR 法該当製品 MSDS の Web 掲載ご案内

日本試薬協会の HP に弊社製品の和文 MSDS を掲載しました。

<http://www.j-shiyaku.or.jp/home/msds/index.html>

弊社 HP リンクからどうぞ。

掲載商品

・ PRTR 法に該当する品目

検索可能項目

・ 弊社カタログ品コード

・ CAS No.

・ 一般的な品名 (和文、英文)

検索不可項目

・ 弊社独自の製品名



販売中止予定のご案内

2002年12月20日をもちまして、下記商品の販売を勝手ながら中止させていただきます。

このたび本製品に原料として用いております非イオン性界面活性剤が、環境ホルモン物質に指定されました。それに伴い、購入メーカーより販売中止の連絡を受けたのが販売中止の理由です。

ご不明な点、詳細につきましては小社マーケティング部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
Scintisol 500	500 ml	344-03915	SC08
Scintisol EX-H	3.8 L	348-04013	SC09

新製品

Calcium Screening Kit

Calcium Screening Kit は、細胞内 Ca²⁺ 測定試薬である Fura 2-AM あるいは Fluo 3-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 Fura 2-AM DMSO 溶液あるいは Fluo 3-AM DMSO 溶液を 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と簡便となっております。Assay Buffer はシグナルが高感度でより安定に得られるよう工夫されており、Hanks-HEPES Buffer をベースに Probenecid や Pluronic F-127 を組み込んだ構成となっております。また、従来必要とされていた細胞の洗浄をせずに測定できることから、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。

trial version には Assay Buffer A と B があり、各々の Assay Buffer でアッセイを行ない、2 種類のうちから、より最適な結果が得られる Assay Buffer をお選び頂けます。trial version は各 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 2,000 assays キットをご使用ください。

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(5X) 40 ml × 1 本
- * Fluo 3 タイプのキットには、Fura 2-AM の代わりに Fluo 3-AM 1 mg × 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。

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(5X) 40 ml を別容器に移し、純水 160 ml を加えて、1X の Assay Buffer を調整する。そこへ、Fluo 3-AM または Fura 2-AM の DMSO 溶液 1 ml を添加し 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。

本 Calcium Screening Kit を用いた場合と通常の方法 (normal assay, 洗浄操作あり) で測定した場合との比較を行いました。キットを用いた測定の場合、normal assay と同等のシグナルが得られることを確認しています。系によってはシグナルの強度や応答反応に若干の差異があったり、シグナル自体が得られない場合 (serotonin receptor を発現させた CHO 細胞を serotonin 刺激した場合など) がありますので御注意下さい。(以降のデータは浜松ホトニクス株式会社のご協力を得て作成しました。)

装置

FDSS-6000 (浜松ホトニクス)

【使用プレート】

オプティカルボトムプレート (NUNC) 黒 96 穴プレート

使用 Buffer

- normal assay では Hanks-HEPES Buffer に 0.08% Pluronic F127 と 2.5 mmol/l Probenecid を添加したもの (pH7.4) を使用。
- Calcium Screening Kit を使用した測定では添付の Assay Buffer A もしくは B を使用。

カルシウムプローブ濃度

- Fluo 3-AM (終濃度 2.2 μmol/l)
 - Fura 2-AM (終濃度 2.5 μmol/l)
- normal assay の場合、Calcium Screening Kit の試薬濃度と等濃度に設定した。

使用細胞と添加薬剤

- 系 1) メラニン凝集ホルモン (MCH) 受容体を発現させた CHO 細胞 (チャイニーズハムスター卵巣細胞, 15,000 cells/well) を 10 nmol/l MCH で刺激した。同様に orexin B, serotonin などの受容体を発現させた CHO 細胞 (15,000 cells/well) を使用し対応するリガンドで刺激した。
- 系 2) Angiotensin II Type-1 receptor を発現させた HEK293 細胞 (15,000 cells/well) を使用し 0.1 μmol/l Angiotensin II で刺激した。
- 系 3) SH-SY5Y 細胞 (ヒト神経芽腫細胞 15,000 cells/well) を 0.1 μmol/l ionomycin で刺激した。

測定方法

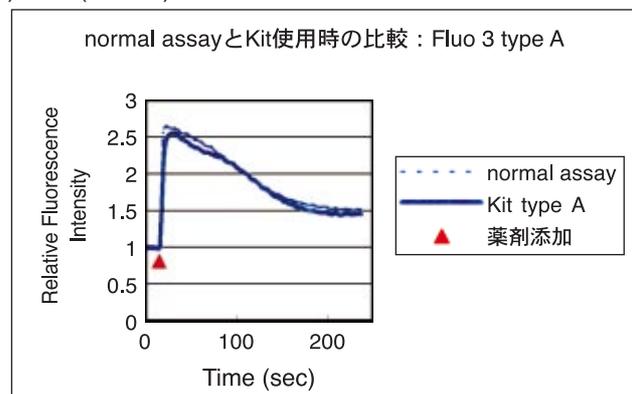
- 1) 各種細胞を 15,000 cells / well でまき一晚培養した。
- 2) カルシウムプローブを含んだ Loading buffer を添加した。
- 3) 37 °C で 1 時間インキュベートした。
- 4) normal assay の場合は、細胞を洗浄した。
- 5) 薬剤添加による蛍光強度変化を FDSS で測定した。

結果

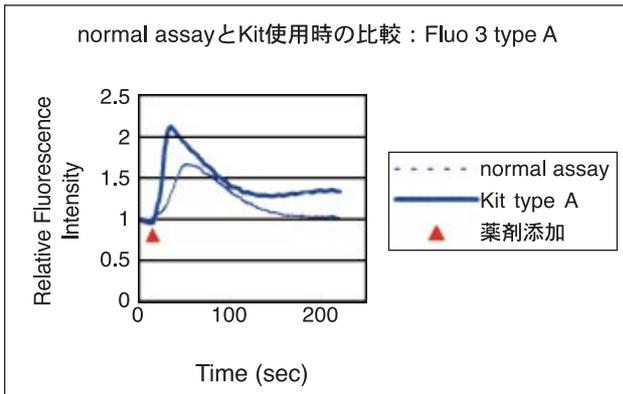
(1) Fluo 3 type の場合

下図 a) ~ d) に Normal assay と Kit 使用時におけるシグナルの比較を示す。初期蛍光強度を 1 とし、薬剤添加の影響を相対蛍光強度変化として表した。横軸は経過時間 (秒) を示し、薬剤の添加時を 0 で表した。

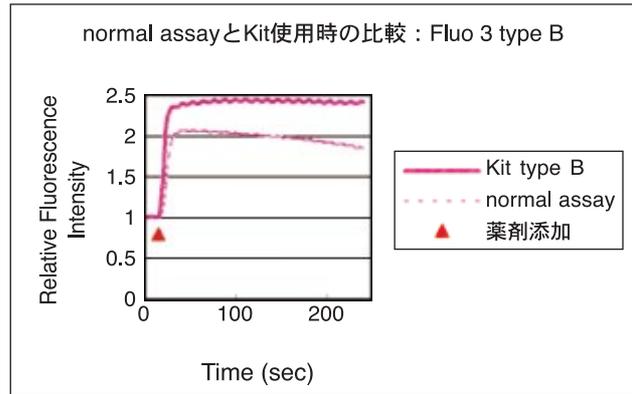
a) 系 1 (orexin)



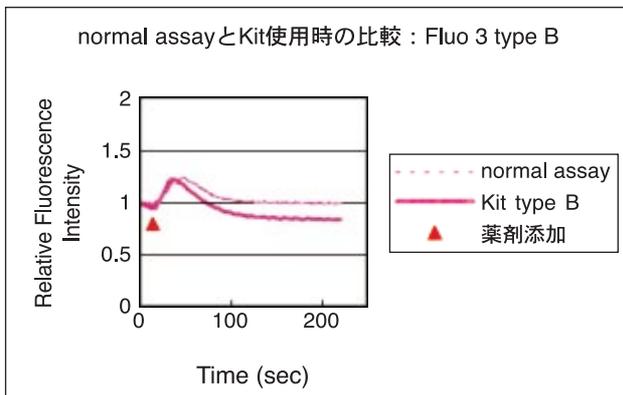
b) 系 1 (MCH)



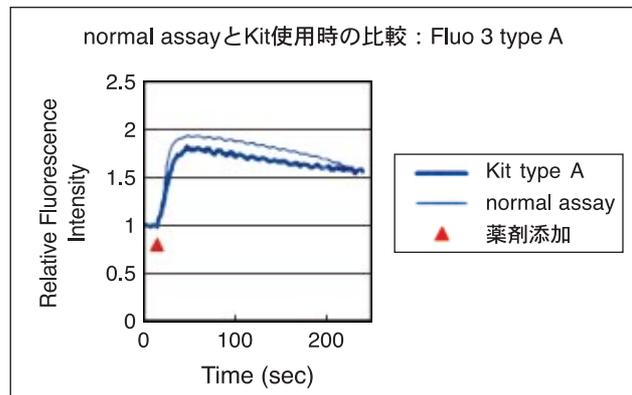
系 2 (Angiotensin II)



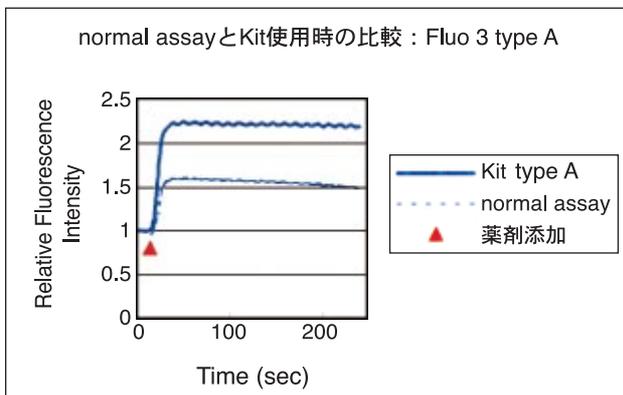
系 1 (MCH)



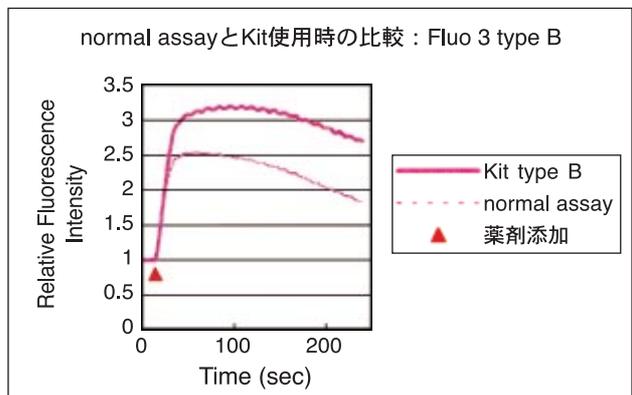
d) 系 3 (ionomycin)



c) 系 2 (Angiotensin II)



系 3 (ionomycin)

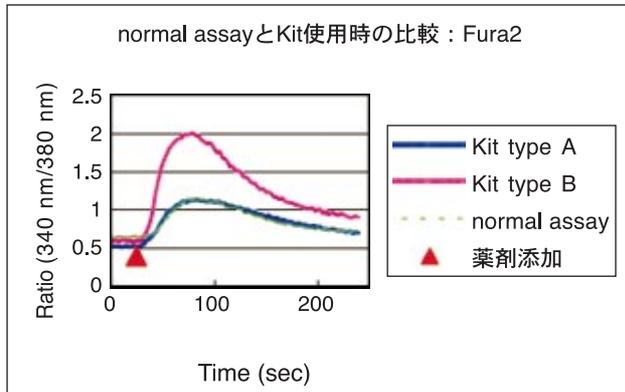


Calcium Screening Kit

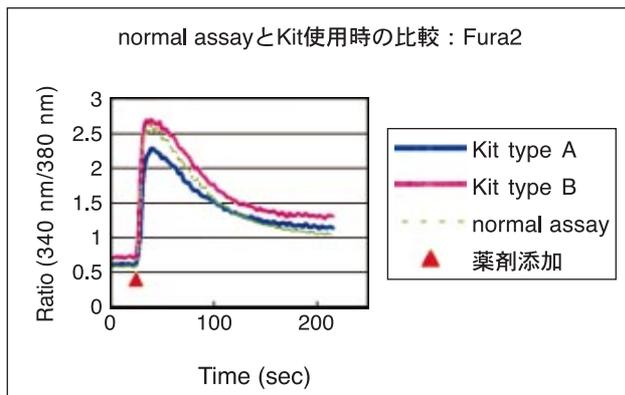
(2) Fura 2 type の場合

e) ~ g)に normal assay と Kit 使用時におけるシグナルの比較を示す。340 nm と 380 nm で励起した場合の蛍光強度の比として表した。横軸は経過時間(秒)を示し、薬剤の添加時を で表した。

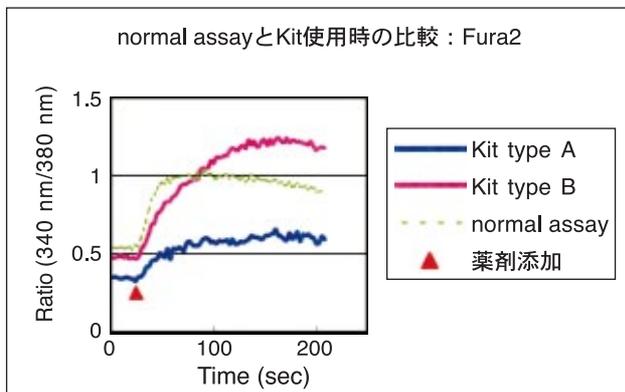
e) 系 1 (MCH)



f) 系 1 (orexin)



g) 系 3 (ionomycin)



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

関連商品

品名	容量	価格(¥)	コード	メーカーコード
Fura 2	1 mg	23,600	347-05421	F014
Fura 2-AM	1 mg	28,000		F015
Fura 2-AM special packaging	50 µg × 8	17,600	348-05831	F025
Fura 2-AM special packaging	50 µg × 40	Request		F025
Fura 2-AM solution	1 ml	38,000	343-05401	F016
Fluo 3	1 mg	24,700	345-05721	F019
Fluo 3-AM	1 mg	33,000		F023
Fluo 3-AM	10 mg	Request		F023
Fluo 3-AM special packaging	50 µg × 8	23,200	349-06961	F026
Fluo 3-AM special packaging	50 µg × 40	Request		F026
Rhod 2	1 mg	26,500	344-05811	R001
Rhod 2-AM	1 mg	43,500	341-05821	R002
Rhod 2-AM	10 mg	Request		R002
Coelenterazine-WS	1 mg	9,900		C397
Coelenterazine-WS	10 mg	72,600		C397
MQAE	50 mg	13,000	348-06051	M024
BCECF	5 mg	9,400	345-05184	B031
BCECF-AM	10 mg	Request		B262
BCECF-AM solution	1 ml	23,800	344-05431	B034
D-Luciferin K salt	25 mg	19,000		L226
D-Luciferin K salt	100 mg	69,000		L226
DiBAC ₄ (3)	25 mg	27,000		D545
Cell Counting Kit-8	500 回用	11,000	347-07621	CK04
Cell Counting Kit-8	2500 回用	32,000	343-07623	CK04
Cell Counting Kit-8	10000 回用	99,000		CK04
Cell Counting Kit-WR(for HTS)	10000 tests	46,000		CK07
Cell Counting Kit-HS(for HTS)	10000 tests	46,000		CK08
MTT	1 g	13,100	341-01823	M009
MTT	5 g	46,200	349-01824	M009
Calcein-AM	1mg	10,500	349-07201	C326

商品名および仕様変更のお知らせ

変更前		変更後
○キット		
商品名	Al Detection Kit (50回)	クロマトレーサーAI ラベル化試薬キット (50回)
コード	AL04	AL10
内容	Al Detection Reagent R-1 (3 ml) Al Detection Reagent R-2 (21 ml) Al Detection Reagent R-3 (350 ml) キットには含まれておりません。	R1 キレート試液 (8 ml、注) R2 キレート形成液 (21 ml) *移動相はキットには含まれておりません。 クロマトレーサーAI サンプルバイアル 1.5 ml (56個)
○別売品 (移動相)		
商品名	Al Detection Reagent R-3 (1 L)	クロマトレーサーAI R3 HPLC溶離液 (1000 ml)
コード	AL03	AL11

注：実際の測定にご使用いただくのは1回あたり50 µl です。
50回測定でも2.5 mlとなり 3 mlの容量でも十分でしたが、今回マイクロチップの共洗い、及び流路洗浄にもお使いいただけるように、大幅増量させていただきました。
なお、容量増加に伴い、容器も変更となっております。

HPLCによる高感度アルミニウム測定試薬におきまして、上記の通りキットの商品名と仕様(内容、各試薬の品名、一部試薬の容量と容器)および別売り分の移動相の商品名を変更いたしましたので、お知らせいたします。

なお、キットおよび移動相ともに価格の変更はございません。また、1キットでの測定回数は従来通り(50回)ですが、HPLC用溶離液は別売りのみとなりましたので、ご注文の際はご注意ください。

<アルミニウム分析専用カラムお取扱い中止のご案内>

また、測定カラム(商品名:アルミニウム分析専用カラム)のお取扱いを中止させていただきます。

株式会社資生堂及び野村化学株式会社より発売される予定です。詳細は以下の連絡先にお問い合わせ下さいませよう、あわせてご案内申し上げます。

【お問合せ先】株式会社シノテスト 相模原事業所
〒229-0011 神奈川県相模原市大野台 2-29-14
TEL: 042-753-1593 FAX: 042-753-1892

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
クロマトレーサー AI ラベル化試薬キット	1Kit (50回用)	Request	AL10
クロマトレーサー AI HPLC 溶離液 (R-3)	1000 ml	Request	AL11

お知らせ

第13回フォーラム・イン・ドージン
開催のご案内

以下の要項で開催を予定しております。
詳細は次号にてご案内いたします。

テーマ:「生命機能と病の中の
蛋白質フォールディング」

オーガナイザー: 山本 哲郎(熊本大学大学院分子病理学 教授)
演 者:
星野 大(大阪大学蛋白質研究所 溶液学研究部門 助手)
永田 和宏(京都大学再生医学研究所 細胞機能調節分野 教授)
森 正敬(熊本大学医学部 分子遺伝学教室 教授)
小椋 光(熊本大学発生医学研究センター 細胞複製分野 教授)
田中 啓二(東京都臨床医学総合研究所 分子腫瘍学研究部門 部長)
西道 隆臣(理化学研究所脳科学総合研究センター神経蛋白質制御研究チームリーダー)
安東由喜雄(熊本大学医学部附属病院 臨床検査医学講座 講師)
吉田 賢右(東京工業大学資源化学研究所 生物資源部門 教授)
堂浦 克美(九州大学医学系研究科脳神経研究施設 病理部門 講師)
(敬称略)

日 時:平成14年11月29日(金) 10:15 ~ 18:20
開 場:10:00 開演:10:15
会 場:鶴屋ホール(テトリア熊本7階)熊本市手取本町6-1
参加費:無料
お問い合わせ・お申し込み先:
フォーラム・イン・ドージン事務局(担当:蒲野、堀口)
TEL:0120-489548 FAX:0120-021557
e-mail: komine@dojindo.co.jp または d-hori@dojindo.co.jp

試作品

アミロイド染色試薬

BSB

特長

- アミロイドβペプチド(Aβ)に対して高い親和性($K_1=0.4 \mu\text{mol/l}$)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(blood - brain barrier, BBB)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であり、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10年で死に至る難病ですが、現在は肝移植などの治療により命を落とす危険性はなくなっています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)や新型クロイツフェルト・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、Skovronsky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⁾。

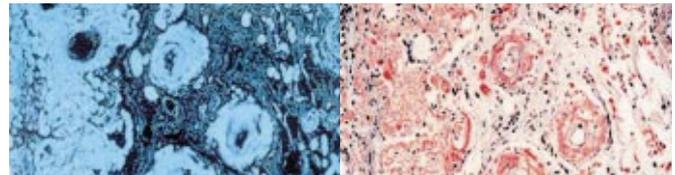
同様にアミロイドが沈着するその他のアミロイドーシスでもBSBを用いた研究が進められておりFAP、透析アミロイドーシスや二次性アミロイドーシスなどの組織染色を行なった結果、アミロイドが沈着した部分を感度よく染色していることが確認されました。また、BSEやvCJDを発症した組織でも同様の結果が得られています。

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。Skovronsky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。

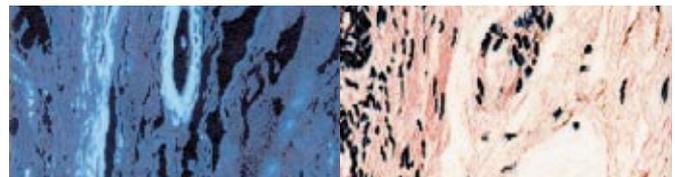
各種アミロイドーシスの染色例

(左列がBSBで染色したもので、白く光っている部分がアミロイドである。右列がCongo Redにより染色したもので赤褐色に染まった部分がアミロイドである。)

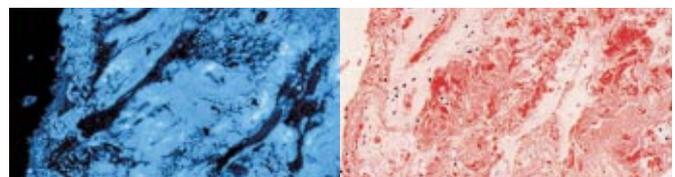
AA amyloidosis



AL amyloidosis



DRA (透析アミロイドーシス)



familial CJD (家族性CJD)



(データ提供：熊本大学医学部臨床検査医学 安東由喜雄先生)

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.*, **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).

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

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