

# DOJIN NEWS

No.108  
2003

ドージンニュース

Review

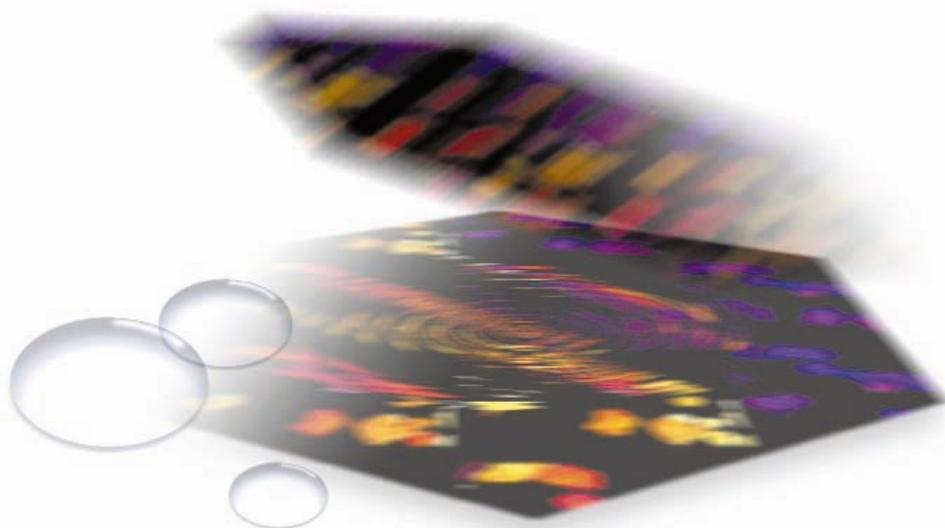
一酸化窒素(NO)の未知機能研究のための制御されたNOドナーの分子設計  
大和田智彦

Topics on Chemistry

金ナノ粒子によって加速される酵素電極反応  
渡辺栄治

連載

ケミストからみたポストゲノム 8  
片山佳樹



## 目次

### Review

- 一酸化窒素(NO)の未知機能研究のための制御されたNOドナーの分子設計
  - 東京大学大学院薬学系研究科 大和田智彦 ..... 1
  - ケミストからみたポストゲノム8
    - 九州大学大学院工学研究院 片山佳樹 ..... 10

### Topics on Chemistry

- 金ナノ粒子によって加速される酵素電極反応
  - 同仁化学研究所 渡辺栄治 ..... 16

### Commercial

- 新製品案内
  - G6PD 分析用キット ..... 18
  - 残留塩素測定キット ..... 20
- 試作品
  - ペルオキシダーゼ標識用キット ..... 19
- 関連商品
  - 脱水素酵素、酸化酵素の補酵素 ..... 17
- Q&A
  - 遺伝子傷害検出抗体 ..... 9

### お知らせ

- 抗ニトログアノシン抗体キャンペーンのご案内 ..... 8
- 学会展示案内 ..... 19
- 容器および保存・輸送温度変更案内 ..... 21
- 訃報 ..... 21
- 第14回フォーラム・イン・ドージン開催案内 ..... 22

## 製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

- Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody  
(Clone#NO<sub>2</sub>G52) ..... 9
- Anti-Nitroguanosine polyclonal antibody ..... 9
- 8-Nitroguanine(lyophilized) ..... 9
- PQQ ..... 17
- G6PD Assay Kit ..... 19
- 残留塩素測定キット-SBT法 ..... 20
- 残留塩素測定試薬-SBT法 ..... 20
- 色素液 ..... 20
- 検水調整液 ..... 20
- Cell Counting Kit-8 ..... 21



中国の研究者への技術支援のため現地スタッフ4名を揃え、本年5月、中国(上海)に事務所を開設いたしました。

# 一酸化窒素 (NO) の未知機能研究のための制御された NO ドナーの分子設計 (Structural Design and Synthesis of Nitric Oxide Donors Aimed to Controlled Release. Chemical Tools to Study and Utilize Unrevealed Biological Roles of Nitric Oxide.)



大和田 智彦  
(Tomohiko Ohwada)  
東京大学大学院薬学系研究科  
分子薬学専攻 薬化学教室

## [ Summary ]

Although many recent studies have established that nitric oxide (NO) is an important bioregulatory molecule of the smallest size, in a range of physiological processes from vasodilation and platelet aggregation to neurotransmission and immune system, possible indirect intervention of endogenous and induced NO carriers, i.e., NO donors, is recently highlighted. Generally the physiological concentration of free NO is very low. In order to understand uncovered Janus-faced actions of NO, and reorganize complicated contribution of the isoforms of nitric oxide synthases (NOS), structural design and synthesis of novel NO donors, which can be qualified with controlled release of NO or NO equivalents in terms of the rate and place (i.e., targeting) are desired. Herein we review briefly the recent studies about the chemical features of potential NO donors, particularly of S-nitrosothiols and N-nitrosamines. The latter compounds can be considered as potential NO<sup>+</sup> donors.

## キーワード :

一酸化窒素, NO ドナー, ニトロソニウムイオン, S- ニトロソチオール, N- ニトロソチオール, NO 合成酵素(NOS)

## 1. 一酸化窒素(NO)ドナー

Furchgottらが、血管弛緩物質を血管内皮細胞が産生していることを発見して以来、1980年代に血管内皮細胞の機能の解明が進んだ<sup>1)</sup>。血管内皮細胞から産生される物質は、血管の弛緩だけではなく、血管壁を構成する血管平滑筋細胞の細胞増殖抑制や内皮細胞表面への血液成分の接着なども調整していることが分かった。そのような血管内皮細胞の司る血管内皮機能をなす物質の本体が一酸化窒素 (NO) であることが解明されたことは記憶に新しい。

NO は生体内の NO 合成酵素(NOS)によって arginine から生合成される (Fig.1)<sup>2)</sup>。NOSには内皮型(eNOS)、誘導型(iNOS)、神経型(nNOS)の3種類のアイソフォームが存在しており、主に存在している場所が異なる (Fig.4 参照)<sup>3)</sup>。すなわち内皮型 NOS(eNOS)は前述のように血管内皮細胞に発現し、誘導型 NOS(iNOS)は単球・マクロファージ・好中球などの炎症性細胞、nNOSは中枢神経系、特に小脳で発現している。産生される物質は同じNOだが、NOSの種類によりNO産生の部位が異なるため

ターゲットとする組織が異なり、またNOの産生量が異なる。一般に低濃度のNOは生体に有効な生理作用をもたらす、高濃度のNOは有害であるという濃度依存的な善玉・悪玉説が広く唱えられている<sup>4)</sup>。

現在このような理解のもとで、NOSのアイソフォーム選択的な活性化剤・阻害剤等が医薬品への展開の可能性を前提として開発されている<sup>5)</sup>。一方でNOSのアイソフォームの発現は生体内の環境変化によって誘導され得ること、またNOSの相互の連帯を司るNOキャリアーの存在が示唆されること(たとえばS-nitrosohemoglobinもその可能性がある)またNOSがNO産生ではなく活性酸素などのNOと正反対の生理活性を有する活性酸素種(Reactive Oxygen Species, ROS)を生成する機構(アンカップリング)の存在も示されつつあり (Fig.1 参照) 単純な善悪論では理解できないNOの科学が存在している<sup>6)</sup>。

ところで血漿中のNO濃度についての興味深い調査が行われ以下の結果が得られている<sup>7)</sup>。すなわちフリーのNOの血漿中の濃度は  $3.4 \pm 0.6$  nM と極めて微量であり、血管平滑筋では同様に数 nM オーダーのNOが恒常的に産生され血圧調節に寄与していると考えられている。血管内皮ではフリーのNOよりも後述するS-NO結合を有するシステインを含む低分子ペプチドや高分子蛋白質に由来するS-ニトロソチオールが  $7.19 \pm 5.73$  μM、S-ニトロソ蛋白質が  $6.92 \pm 5.45$  μM と  $10^4$  倍多く存在する。S-ニトロソ体は生体中でS-N結合をホモリティクに開裂してNOを産生すると考えられているため、NOの貯蔵庫としてS-ニトロソ体が生体中で機能していると考えられている<sup>7)</sup>。

一方血液中に放出されたNOはヘモグロビンの鉄(Fe(II))の配位

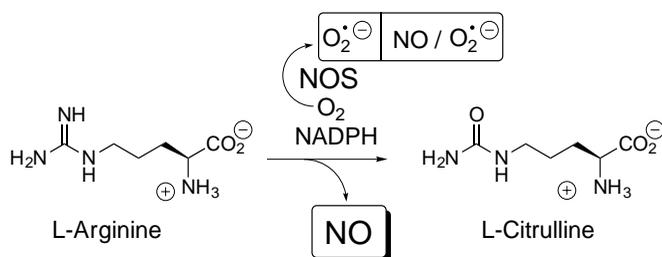


Fig. 1 Nitric oxide synthases (NOS)

子として速やかにFe-NO結合を生じscavengeされるため<sup>8)</sup>、実際の血流中のNOの機能は不明と言って良い。これに対して近年、Stamlerらはヘモグロビンが酸素のみならずNOのトランスポーターであり血圧調整にS-ニトロソ化されたヘモグロビン(S-nitrosohemoglobin)が関与していることを提唱している(Stamler説)<sup>9)</sup>。すなわちヘモグロビンは2つのサブユニットおよび2つのサブユニットからなる4量体構造で各サブユニットがヘムを持ち、サブユニットには反応性に富むシステイン残基のSH基(Cys 93)がある。ヘモグロビンのheme鉄への酸素の結合が、ヘモグロビンの特定のシステイン(Cys 93)のS-ニトロソ化を促進することがわかった。さらにヘモグロビンから酸素の脱離は末端組織の筋肉等で酸素分圧が低くなった際起きるが、それに伴うヘモグロビンの4量体構造の変化によってS-ニトロソヘモグロビンからNOを遊離する機構がある、というものである。解離したNOによって血管は拡張し血流を増やし、酸素が不足した末端組織に酸素吸着したヘモグロビンを運び酸素を供給する、すなわちS-ニトロソヘモグロビンは酸素分圧を感じるセンサー機能を有している事が提唱されている。なお、ヘモグロビンのシステイン(Cys 93)のS-ニトロソ化がNO自身が起こすのかNO<sup>+</sup>様の分子種で起きるのかは明確ではない(S-ニトロソチオールの項参照)。一方ごく最近、Bohle, Jordanら<sup>10)</sup>ならびにHouk, Stamler, Tooneら<sup>11)</sup>によってS-ニトロソチオールの結合性やコンホメーションが研究された。今まで化学的な関心が払われなかったのはむしろ不思議なくらいである。

また、近年、高血圧に処方する降圧剤であるカルシウム・チャネル阻害薬(amlodipineなど)やACE阻害薬(生体内のアングiotenシンIIが血圧を上昇させる物質であるアングiotenシンIIに変

換される酵素反応を抑制する効果をもつ化合物群、enalaprilat, ramipril やcaptoprilなど)によってNO産生の増加が報告されている(Fig.2)<sup>12)</sup>。NO産生の増加が降圧薬の血管保護作用や臓器保護作用の本体ではないかとも考えられる。近年S-nitrosocaptoprilの構造解析が行われたのは興味深い(Fig.3参照)<sup>13)</sup>。

また、高脂血症に用いられるHMG-CoA還元酵素阻害薬であるstatin系薬剤(例えばcerivastatin)はphosphatidylinositol-3 kinase(PI3K)/Akt系を介するNOの遊離が示されている(Fig.2)<sup>14)</sup>。高脂血症は酸化低密度リポタンパク質(LDL)を産生し、血管内膜障害や単球の接着、遊走を引き起こす。動脈硬化の過程である。NO自身もしくはstatin由来の未知のNOドナーが血管内膜の保護に寄与している可能性が高い。

最近、N-nitrosomelatoninの構造解析と生成の可能性が報告され脳内でのメラトニン(melatonin)がNOをscavengeする機能が推測され概日リズム(催眠)との関連がもたれる(Fig.3)<sup>15)</sup>。

このようにNOの関与する生物活性は未だ未知なところがあり、また、NOの存在量による活性調整を、NO合成酵素であるNOSアイソフォームの発現部位特異性のみで制御できるといった単純な話ではないようである。

一方、全てのNO関連の現象が一見NOそれ自身の機能と思われがちであるが、NOは生体内で極めて低濃度に維持されている。そのため生体内での一酸化窒素のキャリアー(NOドナー)の存在が提案されている(Fig.4)。タンパク質のシステイン残基が関与するS-ニトロソ化合物の他にN-ニトロソ化合物もNOドナーの

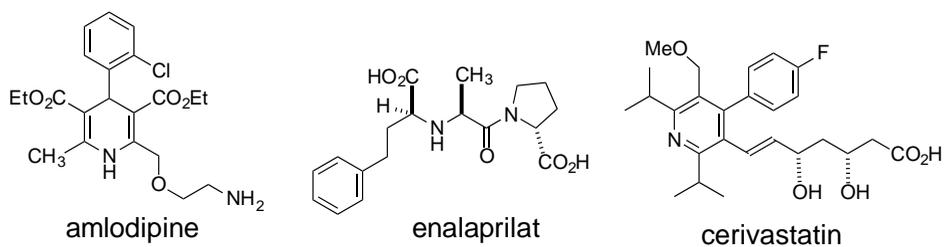


Fig. 2 Medicines Unexpectedly Relevant to NO Synthesis

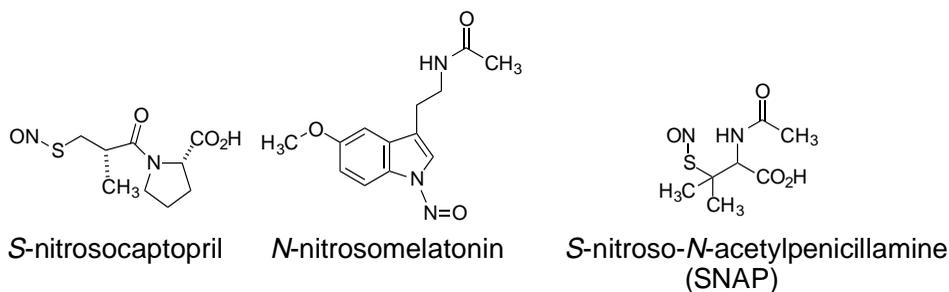


Fig. 3 Potent NO Donors

可能性がある。また一酸化窒素のキャリアー自身が生体機能調節を行う可能性もあり得る。NOの生理的な濃度は小さいため、制御された放出(controlled release)を可能にするNOドナーの分子設計・合成は、NOの真の生理機能解明のtoolとして、また創薬化学のリード化合物としての可能性を秘めている<sup>16)</sup>。また血漿中のS-NO誘導体は能動的な制御を受けたNOの貯蔵庫である可能性もある。本ReviewsではNO機能解明に不可欠な制御されたNOドナーの研究の一端を紹介する。昨年Chemical Reviews誌に同様の特集が組まれたのでこちらも参考にしてほしい<sup>17)</sup>。

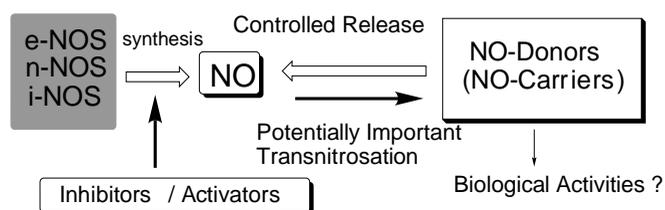
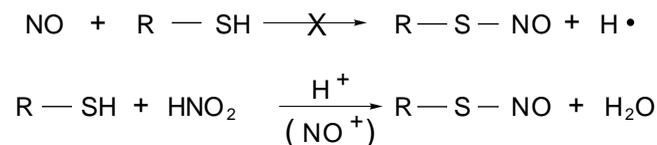


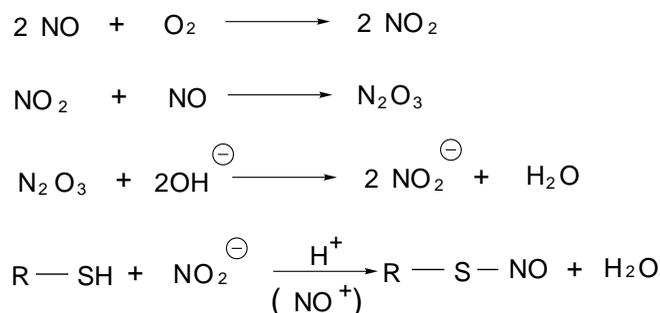
Fig. 4 Chemical control of the concentration of NO through inhibition of NOS and through controlled release from NO-donors

## 2. NOドナーとしてのS-ニトロソチオール

S-ニトロソチオールは比較的不安定で、市販されているS-ニトロソチオールはS-nitroso N-acetylpenicillamine (SNAP) (Fig.3) やS-nitrosoglutathione(GSNO)等が知られているのみである。S-nitroso cysteineは、血漿中のNOドナーである可能性がStamlerによって指摘されていることは既に述べた。さらに興味深いことに、S-nitrosothiolはthiolとNO自身との反応では生成せずに、NO<sup>+</sup> (nitrosonium ion)との反応によってのみ生成することである(下式)<sup>18)</sup>。



一方NOは酸素が共存すると下式のように酸化され亜硝酸イオンが生成するため結果的にNO<sup>+</sup>が生成する。NOが直接チオールをS-ニトロソ化しているのではなく、NO<sup>+</sup>(および等価体)である。



Bohle, Jordanら<sup>10)</sup> および Houkら<sup>11,15)</sup>の研究で、S-NO結合はかなり二重結合性を帯びている事が示唆された(Fig.5)。3級チオールのS-ニトロソ化合物である(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C-S-NO 1 (Fig.5)の温度可変<sup>15</sup>N-NMRから算出した回転障壁(rotational barrier)は10.7 kcal/molで、計算値12.86 kcal/molと良い一致を示した。

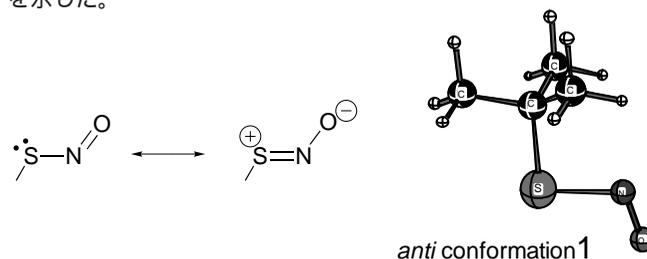
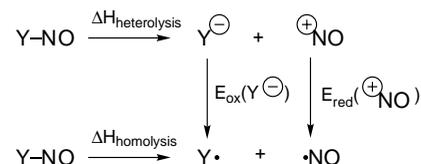


Fig.5 Resonance Structure of S-NO compounds

S-NO結合はホモリティックに開裂してS-ラジカルとNOになりNOドナーとなることが考えられていたが、Wang, ChengらによってRS-NOをはじめとする一連のNOドナーの結合解離エネルギー(Bond Dissociation Energies, BDE)の測定(熱量測定)と計算が行われた(Fig.6)<sup>19)</sup>。S-nitroso-*t*-butylthiol 1およびS-nitrosobenzylthiolのヘテロリティック結合解離エネルギーは56~57 kcal/molであるが、ホモリティック結合解離エネルギーは28 kcal/molである。計算したホモリティックBDEの値と良い一致をした<sup>11)</sup>。S-nitrosothiophenol 2の場合の結果をFig.7に示す。この結果はホモリティックなS-NO結合開裂が溶液中で優先することを示唆している。一方、結合解離エネルギーの大きさから熱的なホモリティックなS-NO結合の開裂は生理的な条件では重要ではないことが示唆された。



$$\Delta H_{\text{homolysis}}(\text{Y-NO}) = \Delta H_{\text{heterolysis}}(\text{Y-NO}) - 23.06 [E_{\text{red}}(\text{NO}^+) - E_{\text{ox}}(\text{Y}^-)] \text{ (kcal/mol)}$$

Fig. 6 Solution Thermodynamic Cycles

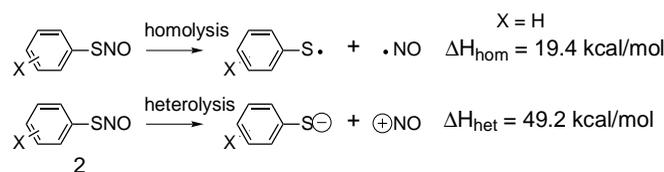


Fig. 7 Homolytic and Heterolytic Cleavage of S-Nitroso Bonds

一方 S-nitrosocaptopril の構造 ( Fig.3 ) の考察が行われていることはこの S-ニトロソ化合物が十分に安定であることを示唆しており captopril の薬理活性との関連で興味深く<sup>11)</sup>、S-nitrosocaptopril 自体が薬理活性の本体の可能性もある。もちろん NO ドナーとして NO の供与機能によって薬理活性を発現している可能性も充分あり得る。

### 3. NONOate の構造を持つ NO ドナー

Keefe らの一連の研究によって市販に耐える NO ドナーとして diazoniumdiolate (NONOates) 類の合成と応用が報告されている ( Fig.8 )<sup>20)</sup>。NO とアミンを反応させると、アニオン性を帯びた diazoniumdiolate 塩が生成することが知られており、さらに水溶液にすると NO を発生する<sup>21)</sup>。Keefe らはポリアミンとの付加物を用い、貯蔵可能な安定性を有する新規な NO ドナーの開発を行い、NO の機能を対象とする薬理学や生化学研究に貢献している。NONOates の問題点は、多くの化合物の半減期が短く分単位 ( 2 min ~ 30 min ) である点である。すなわち、序論で述べたように生体内の NO 濃度は正常状態では濃度調節が行われ低濃度に維持されているが、これらの NO ドナーは一過的に高濃度の NO を生体に作用させることになり、毒性や NO の artifact な生理活性を発現する可能性がある。そこで Keefe らはポリアミンの構造を変えることで半減期の延長を図った ( Fig.8 , **NOC18** など )<sup>22)</sup>。

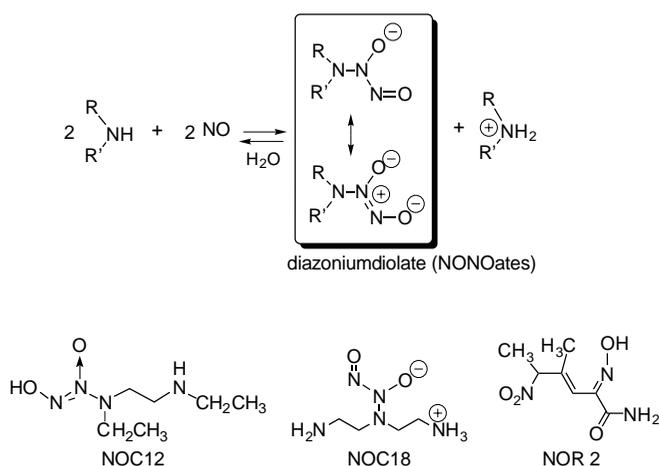


Fig. 8 Diazoniumdiolates (NONOates) as Spontaneous NO Donors

また diazoniumdiolate 基を適切なリンカーを介した活性エステル化合物 **3** を合成し ( Fig.9 ) 蛋白質の塩基性残基 ( 例えば Lysine のアミノ基 ) とのアミド結合生成により、NONOates を蛋白質 ( 例えば bovine serum albumin ) に固定化することで、化合物 1 mg 当たり 30-40 pmol/min の極めて微量に制御された NO の放出速度を実現し、半減期を 3 週間に延長することを達成している<sup>23)</sup>。この際 **3** のアセタール構造である O-methoxymethylene 基は生体内で加水分解され、diazoniumdiolate 基を再生する。

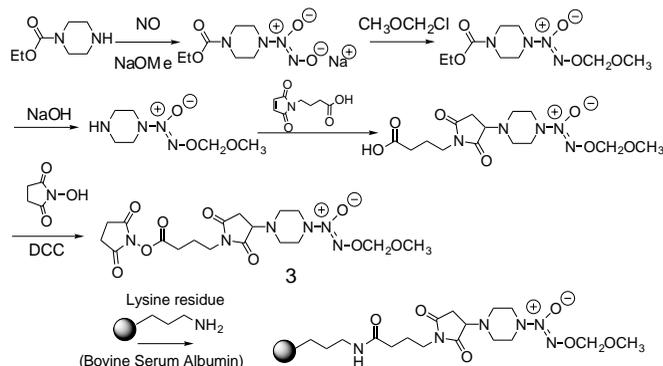


Fig. 9 Synthesis of Protein-Conjugated NO Donors

NO の放出時間の制御に加えて NO ドナーに臓器特異性、すなわち組織へのターゲティングの試みもなされている<sup>24)</sup>。肝ミクロソーム P450 がビニルエテルのビニル基のエポキシ化を触媒することに着目して NONOate の肝細胞選択的な prodrug の解除を期待した誘導体 **4** が合成されている ( Fig.10 )。肝ミクロソーム P450 がビニルエテルのビニル基をエポキシ化し、さらにエポキシド加水分解酵素が作用すると、結果的にビニル基はジヒドロ化され diazoniumdiolate **5** が再生され NO ドナーとなる。実際 **4** は TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) 誘導の肝細胞のアポトーシスを阻害した。NONOate の O-ビニル体は肝細胞選択的な NO 作用発現の可能性を示した。

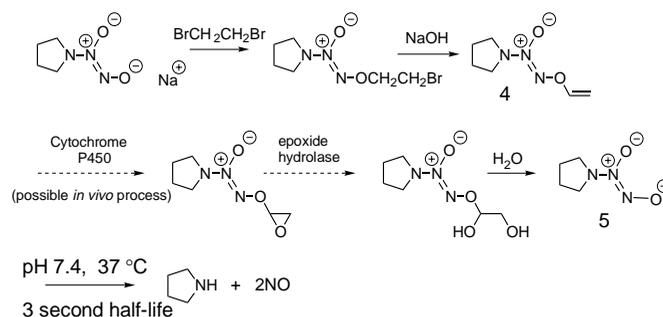


Fig. 10 Liver-Selective NO Donors. Prodrug and Targeting.

NONOates にベンジル基を結合し光照射によって NO の放出の制御するケージ分子のデザインが報告された ( Fig.11 )<sup>25a, b)</sup>。化合物 **7** は Tsien らの化合物 **6** の改良版であるが<sup>25c, d)</sup>、通常光切断に用いられる 2-nitrobenzyl 基よりもベンゼン環上メタ位に電子供与基がある方が Fig.11 に示した NONOate ラジカルの生成の経路が有利になると述べている。

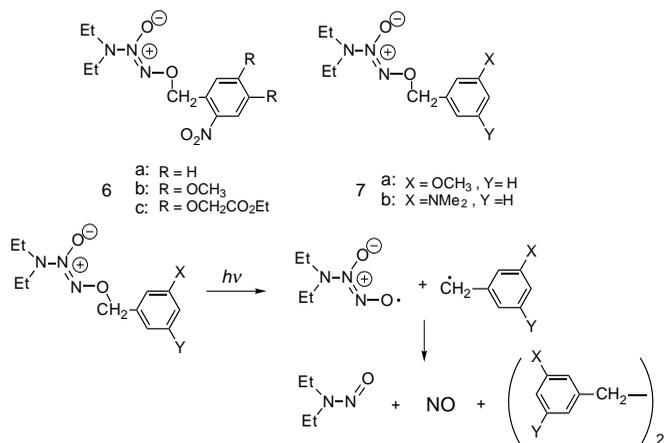


Fig. 11 Controlled Photochemical Release of NO from O<sup>2</sup>-Benzyl Substituted NONOates

#### 4. N-ニトロソアミンの構造とN-NO結合開裂

S-ニトロソ化合物の他にN-ニトロソ化合物もNOドナーとして機能する可能性がある。N-ニトロソアミンのN-NO結合がホモリティックに開裂すれば一酸化窒素(NO)を放出し、ヘテロリティックに開裂すればニトロソニウムカチオン(NO<sup>+</sup>)を放出する可能性がある(Fig.12)。すなわちN-ニトロソアミンはNOドナーまたはNO<sup>+</sup>ドナーとなりうる化合物群である。芳香族N-ニトロソアミン(Fig.14参照)やN-ニトロソウレア(Fig.13参照)ではN-N結合がホモリティックに開裂しNOを放出することが報告されている<sup>26)</sup>。

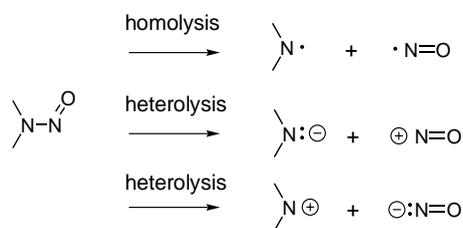


Fig. 12 Three Possible Modes of N-NO Bond Cleavage of N-Nitrosamines

Wangらにより芳香族N-ニトロソウレア(Fig.13)の結合解離エネルギーが熱力学サイクル(Fig.7参照)で実測されており、芳香族N-ニトロソウレアではホモリティック結合解離エネルギー(約30 kcal/mol)はヘテロリティックな結合解離エネルギー(約60 kcal/mol)よりも小さいと見積もられている<sup>27)</sup>。

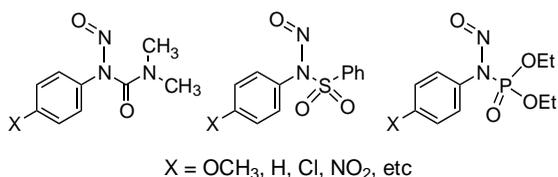


Fig. 13 Vasatile NO Donors Based on N-Nitrosoureas

芳香族N-ニトロソウレアは芳香族N-ニトロソアミンよりもN-NO結合が弱くNO放出能が高いが、脂肪族N-ニトロソウレアのN-NO結合開裂は見られない。筆者らは脂肪族N-ニトロソアミンである7-アザビシクロ[2.2.1]ヘプタンのN-ニトロソアミン誘導体(Fig.14)がN-NO結合開裂によるNO等価体(NO<sup>+</sup>)の徐放機能を明らかにしたので紹介する<sup>28)</sup>。

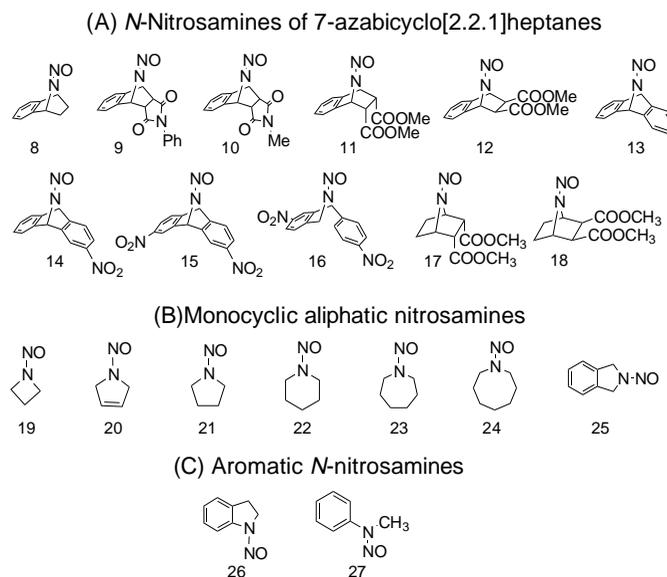


Fig. 14. A New Strategy for New NO Donors based on N-Nitrosamines

7-アザビシクロ[2.2.1]ヘプタンのN-ニトロソアミンは酸触媒のヘテロリティックなN-NO結合開裂を起こすNO<sup>+</sup>ドナーと現時点では考えている(Fig.15)<sup>28b)</sup>。

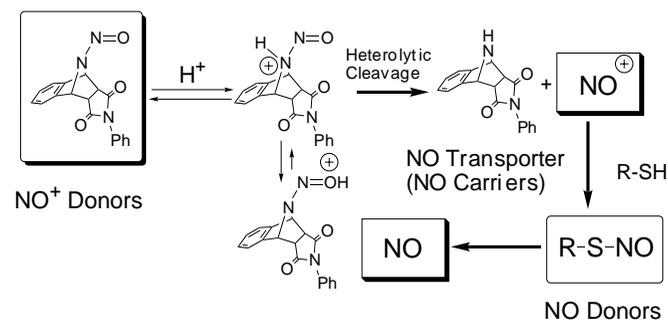


Fig. 15 Function of NO<sup>+</sup> Donor

#### 5. Griess 法によるN-ニトロソ化合物のN-NO結合開裂能の評価

NOを検出する方法としてGriess法が知られている<sup>29)</sup>。Griess法はNOをNO<sub>2</sub><sup>-</sup>に空気酸化して酸性条件下生じるNO<sup>+</sup>をスルファニルアミドとのジアゾニウム塩化合物に変化させ、それとナフチルエチレンジアミンのジアゾカップリングによって生成する赤色色素(545 nm)を検出する方法である(Fig.16)。

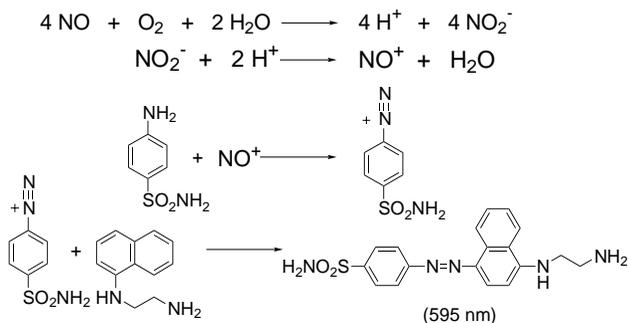


Fig. 16 Griess Reaction to Detect NO and NO<sup>+</sup>

この方法ではNOは直接検出できないが操作が簡便であり、また確立された測定法としてよく用いられている。またGriess法では当然NO<sup>+</sup>そのものを検出できるため、NOとNO<sup>+</sup>を同時に検出できる。すなわち赤色の発色はN-NO結合の開裂を意味する。合成したニトロソアミン化合物にGriess法を適用し、N-NO結合開裂能の評価を行った(Fig.17)。化合物の濃度を0.5 mM、0.25 mM、0.125 mMの3点に変え対照化合物として市販のNOドナーであるNOC12、NOC18 (Fig.8)、SNAP (Fig.3)を用いた。37℃で5時間後の吸光度(545 nm)と生成した色素量をグラフに示した。Fig.17から明らかなように7-アザピシクロ[2.2.1]ヘプタン骨格を持つニトロソアミン(8-18)、芳香族ニトロソアミン

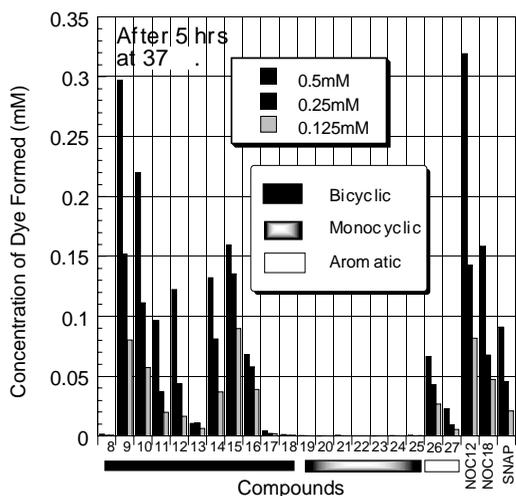


Fig. 17 Griess Assay Results, Reflecting the Ease of N-NO Bond Cleavage of the N-Nitrosamines.

(26,27)では呈色が見られるが単環性脂肪族ニトロソアミン(19-25)では呈色はほとんど見られない。これはGriess法の条件下で8-18,26,27はN-NO結合を開裂してNOまたはNO<sup>+</sup>を生成していることを示している。また、7-アザピシクロ[2.2.1]ヘプタン骨格を持つニトロソアミンの中にはNOまたはNO<sup>+</sup>供与能が既存のNOドナーであるNOC12、NOC18、SNAPと同等もしくは凌ぐもの(例えば9)があることがわかった。

Griess法によるN-NO結合開裂の検出の経時変化を調査した。Griess法の利点の一つにNO/NO<sup>+</sup>を安定な化合物(色素)に変換する点があるため、発色を経時的に観察することが可能である。Griess法は古典的な方法であり検出感度は低いが、この点は蛍光色素法にない利点である<sup>30)</sup>。

6時間までは1時間毎に測定した。10時間後および24時間後を測定した。既存のNOドナー(NOC12、NOC18)は瞬間的にNOの放出があるのに比べて7-アザピシクロ[2.2.1]ヘプタン骨格を持つニトロソアミン8-18では26と同様に徐々に放出されている。除放性のNOドナー分子は、恒常的に低濃度産生され作用を發揮するNOの本当の生理活性を調査するための有用な研究手段を提供する可能性があり、その開発は意義をもつ。

Griess法ではGriess試薬にリン酸が含まれるためpH4.0と酸性に傾いている。蒸留水の代わりにリン酸緩衝液(PBS、pH7.4、0.25M)を用いるとサンプル溶液のpHは5.5になる。pH5.5で同様にGriess法を行うと、NOC12、NOC18、SNAPでは呈色の度合いはpH4.0に比較して程度は小さいが呈色するのに対して、7-アザピシクロ[2.2.1]ヘプタン骨格を持つニトロソアミン9、芳香族ニトロソアミン26ともにNOまたはNO<sup>+</sup>の放出による呈色はほとんど見られなかった。

このことから7-アザピシクロ[2.2.1]ヘプタン骨格を持つニトロソアミン、芳香族ニトロソアミンともにN-NO結合開裂能、すなわちNOまたはNO<sup>+</sup>の放出はpH依存性があり、ある程度pHが低くなければならないことが示唆された。

## 6. ESRによるN-NO結合開裂によって生成するNOの検出

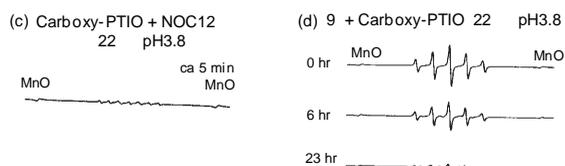
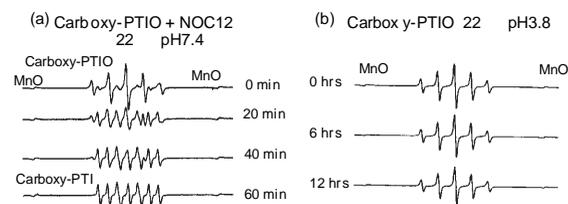
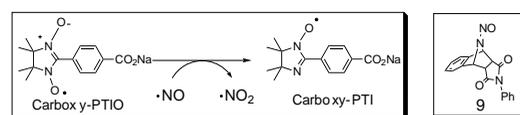


Fig. 18 ESR Detection of Nitrogen Species Released from N-Nitrosamines

N-NO結合開裂によって生成する窒素化学種の検出をCarboxy-PTIOを用いるESR測定によって行った。Carboxy-PTIOは水溶性の安定な有機ラジカルで、Fig.18のようにNOと反応してCarboxy-PTIとなる。Carboxy-PTIはNOとは反応しない。

Carboxy-PTIOとCarboxy-PTIはともに有機ラジカルなのでESRによって特有のシグナルとして検出することが可能である。前田らはこれをNOの選択的消去剤として利用しているが<sup>31)</sup>、Carboxy-PTIOがNO<sup>+</sup>などと反応せずNOのみを検出できることからN-ニトロソ化合物のN-NO結合開裂において生成する化学種としてNOが含まれているかを調査するためにCarboxy-PTIO共存下でのESRスペクトルの測定を行った。

Carboxy-PTIOとNOドナーの標品として**NOC12**を用いて中性条件(pH7.4)でESRスペクトルにおけるCarboxy-PTIOからCarboxy-PTIへのシグナル変化を確認した(Fig.18a)。

同様にニトロソアミン**9**についてCarboxy-PTIO共存下でのESRシグナルの変化の測定を行ったが、Carboxy-PTIOに対して10等量のニトロソアミンを用いているにも関わらず中性条件(pH7.4)では12時間後においても全くCarboxy-PTIOの減少が見られずNOは検出できなかった。pHを下げて酸性(pH3.8)にしたところ7-アザビシクロ[2.2.1]ヘプタン骨格を持つN-ニトロソアミン**9**は**NOC12**と比較して遅いものの、Carboxy-PTIOのシグナルの消失が観測された(Fig.18d)。Carboxy-PTIOは酸性条件でも比較的安定であり、Carboxy-PTIOをpH3.8のPBSに加えて22で24時間放置しても余り変化はない(Fig.18b)。しかしラジカルトラップ後に生成するCarboxy-PTIは酸性条件で非常に不安定であり、生成してもすぐに壊れてしまうため検出できない。Fig.24cはpH3.8での**NOC12**との反応の5分後のESRスペクトルを示している。ニトロソアミン**9**はpH3.8の条件下Carboxy-PTIOのシグナルが減少していることから、このスペクトル変化はニトロソアミン**9**からNOがゆっくり生成しCarboxy-PTIOが消費されCarboxy-PTIが生成したものと解釈するのが妥当である。なぜならGriess法では**9**は6時間後には60%以上の分解率でN-NO結合開裂が起こっているのに対してCarboxy-PTIOを用いたESRスペクトルの検出では6時間でもあまりESRスペクトルに変化が見られない(Fig.18d)からである。すなわち、ニトロソアミン**9**は少なくとも一部はN-NO結合をホモリティックに開裂しNOを生成していると考えられる。

N-ニトロソアミンのpK<sub>BH<sup>+</sup></sub>は決定されていないが、酸性中N-プロトン化ではなくO-プロトン化を起こすことが知られている<sup>32)</sup>。

以上のことから7-アザビシクロ[2.2.1]ヘプタン骨格を持つN-ニトロソアミン**9**はわずかにN-NO結合のホモリティックな切断を起こしNOを生成するが、Griess法条件に対応する酸性条件では大部分がヘテロリティックな切断でNO<sup>+</sup>を生成していると推定できる(Fig.15)。

## 7. まとめ

ある構造を持ったN-ニトロソアミン(ただしNO<sup>+</sup>ドナー)は既存のNOドナーに比べて徐放的であることが示唆された。実際NO<sup>+</sup>ドナーの生体内での機能は未知であるが、持続性の高い血圧

降下作用が期待される。一方S-ニトロソチオールのNO生成の反応機構も明解ではない。S-ニトロソチオール構造を経由するNO(もしくはその等価体)の制御された放出(controlled release)を可能にする分子の分子設計は構造有機化学の理解なくしては実現しない。さらにNOやNO<sup>+</sup>の還元体であるHNO(nitrosyl)XあるいはNO<sup>-</sup>の機能も注目されている<sup>33)</sup>。

また序論で述べたようにNOの生体内での機能は想像以上に混沌としている。生体内物質もしくは医薬品などの外来物質に含まれるヘテロ原子に対するニトロソ化は、リン酸化に匹敵する、あるいはより特異性の高い情報伝達の鍵となる制御反応である可能性もあり新しい機能性NO(またはNO<sup>+</sup>)ドナーの設計と合成は挑戦的な研究課題である。

## 参考文献

- 1) Nobel Lectures (a) R.F. Furchgott, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 1870 (1999). (b) F. Murad, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 1856 (1999). (c) L. J. Ignarro, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 1882 (1999).
- 2) Theoretical study: D. J. Tantillo, J. M. Fukuto, B. M. Hoffman, R. B. Silverman, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 536 (2000).
- 3) Review, P. J. Andrew, B. Mayer, *Cardiovascular Research*, **43**, 521 (1999).
- 4) M. Colasanti, H. Suzuki, *Trends in Physiological Science*, **21**, 249 (2000).
- 5) 例えば P.-E. Chabrier, M. Auguset, B. Spainnewyn, S. Auvin, S. Cornet, C. Demerl, Pallardy, C. Guillard-Favre, J.-D. Marin, B. Pignol, V. Gillard-Roubert, C. Roussillot-Charnet, J. Schulz, I. Viossat, D. Bigg, S. Moncada, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10824 (1999).
- 6) Review, P. J. Andrew, B. Mayer, *Cardiovascular Research*, **43**, 521 (1999).
- 7) (a) J.S. Stamler, O. Jaraki, J. Osborne, D. I. Simon, J. Keaney, J. Vita, D. Siggle, C. R. Valeri, J. Loscalzo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7674 (1992). (b) J. S. Stamler, D. J. Singel, J. Loscalzo, *Science*, **258**, 1898 (1992).
- 8) O. Chen, S. Groh, A. Liechty, D. P. Ridge, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 11910 (1999).
- 9) (a) T. J. McMahon, R. E. Moon, B. P. Lusching, M. S. Carraway, A. E. Stone, B. W. Stolp, A. J. Gow, J. R. Pawloski, P. Watke, D. J. Singel, C. A. Piantadosi, J. S. Stamler, *Nature Medicine*, **8**, 711 (2002). (b) J.S. Stamler, L. Jia, J. P. Eu, T. J. McMahon, I. T. Demchenko, J. Bonaventura, K. Genert, C. A. Piantadosi, *Science*, **276**, 2034 (1997). (c) L. Jia, C. Bonaventura, J. Bonaventura, J. S. Stamler, *Nature*, **380**, 221 (1996). (d) A. J. Gow, J. S. Stamler, *Nature*, **391**, 169 (1998).
- 10) N.Arulsamy, D.S. Bohle, J.A. Butt, G. J. Irvine, P.A. Jordan, E. Sagan, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 7115 (1999).
- 11) M.D. Barberger, K. N. Houk, S. C. Powell, J. D. Mannion, K. Y. Lo, J. S. Stamler, E. J. Toone, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 5889 (2000).
- 12) X. Zhang, T. H. Hintze, *Circulation*, **97**, 676 (1998).
- 13) M.D. Barberger, J. D. Mannion, S. C. Powell, J. S. Stamler, K. N. Houk, E. J. Toone, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8868 (2001).
- 14) (a) M. Sata, H. Nishimatsu, E. Suzuki, S. Sugiura, M. Yoshizumi, Y. Ouchi, Y. Hirata, R. Nagai, *The FASEB Journal*, **15**, 2530 (2001). (b) U. N. Das, *Experimental Biology and Medicine*, **227**, 88 (Minireview)

- (2002).
- 15) A. G. Turjanski, F. Leonik, D. A. Restrin, R. E. Rosenstein, F. Doctorovich, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 10468 (2000).
- 16) (a) S. R. Hanson, T. C. Hutsell, L. K. Keefer, D. L. Mooradian, D. J. Smith, *Advances in Pharmacology*, **34**, 383 (1995). (b) P. G. Wang, M. Xian, X. Tang, X. Wu, Z. Wen, T. Cai, A. J. Janczuk, *Chem. Reviews*, **102**, 1091 (2002).
- 17) Special issue. *Chem. Rev.*, **102**, No.4 (2002).
- 18) (a) Williams, D. L. H. *Acc Chem. Res.*, **32**, 869 (1999). (b) S. A. Lipton, Y.-B. Choi, Z.-H. Pan, S. Z. Lei, H.-S. V. Chen, N. J. Sucher, J. Loscalzo, D. J. Singel, J. S. Stamler, *Nature*, **364**, 626 (1993).
- 19) J.-M. L. J. M. Wittbrodt, K. Wang, Z. Wen, H. B. Schlegel, P. G. Wang, J.-P. Cheng, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 2903 (2001).
- 20) J. A. Hrabie, L. K. Keefer, *Chem. Rev.*, **102**, 1135 (2002).
- 21) (a) C. M. Maragos, D. Morley, D. A. Wink, T. M. Dunams, J. E. Saavedra, A. Hoffman, A. A. Bove, L. Isaac, J. A. Harabie, L. K. Keefer, *J. Med. Chem.*, **34**, 3242 (1991). (b) J. A. Hrabie, J. R. Klose, D. A. Wink, L. K. Keefer, *J. Org. Chem.*, **58**, 1472 (1993). (c) K. M. Davies, D. A. Wink, J. E. Saavedra, L. K. Keefer, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 5473 (2001).
- 22) J. E. Saavedra, P. J. Shami, L. Y. Wang, K. M. Davies, M. N. Booth, M. L. Citro, L. K. Keefer, *J. Med. Chem.*, **43**, 261 (2000).
- 23) J. A. Hrabie, J. E. Saavedra, P. P. Roller, G. J. Southan, L. K. Keefer, *Bioconjugate Chem.*, **10**, 838 (1999).
- 24) J. E. Saavedra, T. R. Billiar, D. L. Williams, Y.-M. Kim, S. C. Watkins, L. K. Keefer, *J. Med. Chem.*, **40**, 1947 (1997).
- 25) (a) P. H. Ruane, K. M. Bushan, C. M. Pavlos, R. A. D'Sa, J. P. Toscano, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 9806 (2002). (b) K. M. Busham, H. Xu, P. M. Ruane, R. A. D'Sa, C. M. Pavlos, J. A. Smith, T. C. Celius, J. P. Toscano, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 12640 (2002). (c) A. Srinivasan, N. Kebede, J. E. Saavedra, A. V. Nikolaitchik, D. A. Brady, E. Yourd, K. M. Davies, L. K. Keefer, J. P. Toscano, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 5465 (2001). (d) L. R. Makings, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.*, **269**, 6282 (1994). (e) O. Arancio, M. Kiebler, C. J. Lee, V. Lev-Ram, R. Y. Tsien, E. R. Kandel, R. D. Hawkings, *Cell*, **87**, 1025 (1996).
- 26) (a) M. Tanno, S. Sueyoshi, N. Miyata, K. Umehara, *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 595 (1997). (b) M. Tanno, S. Sueyoshi, N. Miyata, S. Nakagawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1849 (1996).
- 27) (a) J.-P. Cheng, M. Xian, K. Wang, X. Zhu, Z. Yin, P. G. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 10266 (1998). (b) J.-P. Cheng, K. Wang, Z. Yin, X. Zhu, Y. Lu, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 7925 (1998). (c) X.-Q. Zhu, J.-Q. He, Q. Li, M. Xian, J. Lu, J.-P. Cheng, *J. Org. Chem.*, **65**, 6729 (2000).
- 28) (a) M. Miura, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, T. Ohwada, *Tetrahedron Lett.*, **41**, 3637 (2000). (b) T. Ohwada, M. Miura, H. Tanaka, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, H. Ikeda, S. Inagaki, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 10164 (2001).
- 29) L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, S. T. Tannenbaum, *Anal. Chem.*, **126**, 131 (1982).
- 30) T. Nagano, T. Yoshimura, *Chem. Reviews*, **102**, 1235 (2002).
- 31) T. Akaike, M. Yoshida, Y. Miyamoto, K. Sato, M. Kohno, K. Sasamoto, K. Miyazaki, S. Ueda, H. Maeda, *Biochemistry*, **32**, 827 (1993).
- 32) (a) T. Axenrod, *Spectrosc. Lett.*, **3**, 263 (1970). (b) S. J. Kuhn, J. S. McIntyre, *Can. J. Chem.*, **44**, 105 (1966).
- 33) (a) K. M. Miranda, N. Paolucci, T. Katori, D. D. Thomas, E. Ford, M. D. Bartberger, M. G. Espey, D. A. Kass, M. Feelisch, J. M. Fukuto, D. A. Wink, A biochemical rationale for the discrete behavior of nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9196 (2003). (b) N. Paolucci, T. Katori, H. C. Champion, M. E. St. John, K. M. Miranda, J. M. Fukuto, D. A. Wink, D. A. Kass, From the Cover: Positive inotropic and lusitropic effects of HNO/NO in failing hearts: Independence from  $\beta$ -adrenergic signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5537 (2003).

## 著者紹介

氏名：大和田 智彦 (Tomohiko Ohwada)

所属：東京大学大学院薬学系研究科分子薬学専攻  
薬化学教室

出身校：東京大学薬学部薬学科卒業 (昭和57年卒)

学位：薬学博士

専門：医薬化学, 有機反応化学, 計算化学, 有機合成化学  
研究テーマ：芳香族化合物の官能基化反応の開発  
特徴ある生物活性物質の創製

主な著書等：トップ・ドラッグ (化学同人) (共訳, 2003年)

連絡先：

〒113-0033

東京都文京区本郷7-3-1 (勤務先)

E-mail: ohwada@mol.f.u-tokyo.ac.jp

## 抗ニトログアノシン抗体キャンペーンのご案内

前回、多数のお客様にお試し頂きましたが、現在まだお問い合わせを頂戴しております。

このため第二弾として通常包装容量 50  $\mu$ g のところ、お手軽にお試ししやすい 10  $\mu$ g 包装を期間限定で販売致します。この機会に是非お試しください。

キャンペーン期間: 2003年11月17日(月) ~ 12月19日(金)

キャンペーン商品:

品名	容量	希望納入価格(¥)	和光コード	メーカーコード
Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody(Clone#NO <sub>2</sub> G52)	10 $\mu$ g	16,000	347-90651	AB02
Anti-Nitroguanosine polyclonal antibody	10 $\mu$ g	14,000	344-90661	AB01

キャンペーン問合せ先:

和光純薬工業	学術部	TEL:06-6203-1788
同仁化学研究所	マーケティング部	TEL:096-286-1515

Q & A

遺伝子傷害検出抗体

**Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody(Clone#NO<sub>2</sub>G52)**  
**Anti-Nitroguanosine polyclonal antibody**  
**8-Nitroguanine(lyophilized)**

- Q1 この抗体を用いることで何がわかりますか？
- A1 8-ニトログアノシンは、一酸化窒素(NO)と活性酸素(スーパーオキシドアニオンラジカル)によって生じる過酸化亜硝酸(パーオキシナイトライト)によってRNAがニトロ化された核酸です。生体組織が炎症を起こすと多量のNOが産生され、多くの過酸化亜硝酸が生じて、グアノシン、デオキシグアノシンをニトロ化することが知られております。8-ニトログアノシン残基の局在や量などを調べることにより、8-ニトログアノシン残基の役割や遺伝子傷害、発癌機構の解明に役立つことが期待されます。  
 ポリクローナル抗体で染色された場合、次のような確認を行うことをおすすめします。  
 標準の8-ニトログアノシンと競合させて染色されなくなる  
 こと  
 Sodium hydrosulfite等の還元剤で試料中のニトログアノシン、ニトログアノシンをアミノグアノシン、アミノグアノシンに還元して染色されなくなる  
 こと
- Q2 8-ニトログアノシンはRNA由来ですが、DNA由来の8-ニトロデオキシグアノシンは、抗ニトログアノシン抗体で標識されますか。
- A2 抗ニトログアノシン抗体は8-ニトログアノシン残基を認識しますので、8-ニトロデオキシグアノシンも標識されます。8-ニトログアノシン修飾体を抗原として抗体を作成したので、抗ニトログアノシン抗体と呼んでおります。
- Q3 論文では凍結切片が用いられているようですが、パラフィン切片は染色に使用できないのでしょうか？
- A3 パラフィン切片でも染色は可能です。ただし、凍結切片よりも染色性は劣るようです。組織によっても条件は異なりますので、一度ご検討ください。
- Q4 ホルマリン標本は染色できますか。
- A4 事例がありませんのでわかりません。凍結切片での使用をおすすめします。
- Q5 プロットリングはできますか？
- A5 Cell lysate でのドットプロット、スロットプロットの実績はあります。
- Q6 ニトログアノシンの検出は他の方法で行われたものはありますか？

- A6 *in vitro*でニトログアノシンが発生していることは、これまでもHPLCやESI-MSでの検出報告があります。しかし、これらの方法ではニトログアノシンがあることは分かっても、どこにどのくらいあるのかはわかりませんでした。病理解析を行う上でも顕微鏡写真は必要となります。抗体を用いることでそれを得ることができます。
- Q7 抗ニトログアノシン抗体はどのくらい保存できますか？
- A7 有効期間は設けておりませんが、希釈前の段階で、冷蔵で1年使用できることを確認しています。凍結・融解の繰り返しは劣化を早めますので、一旦解凍後は冷蔵にて保管してください。また、希釈されますと吸着などもあり、期間の保証はできません。
- Q8 使用する濃度はどのくらいでしょうか？
- A8 これまでの報告では、組織染色で10 µg/ml、ELISAで1 µg/ml(モノクロ)となっております。対象とされる組織によっても最適濃度は変わってきますので、上記濃度を目安にご検討ください。
- Q9 ミトコンドリアのDNAを染色したいが可能でしょうか。
- A9 抗ニトログアノシン抗体は開発されたばかりで応用に関する事例がありません。ミトコンドリアについても染色される可能性はありますが、現段階ではわかりません。
- Q10 ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体とどちらを使った方が良いでしょうか。
- A10 ヒトのサンプルなどでは特異性、力価の高いモノクローナル抗体をご使用になることをおすすめします。

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody(Clone#NO <sub>2</sub> G52)	50 µg ( 50 µl/vial )	65,000	AB02
Anti-Nitroguanosine polyclonal antibody	50 µg ( 250 µl/vial )	55,000	AB01
8-Nitroguanine(lyophilized)	100 µg	15,000	N455

# ケミストからみた ポストゲノム

## 8

~ プロテインアレイ (3) 膜タンパクアレイ・生体膜アレイ ~

九州大学工学研究院応用化学部門

片山 佳樹

のみ本来の活性を維持するものであるから、それらを単独で基板上に固定しても変性が著しく、活性が失われてしまう。しかしながら、現在の薬物ターゲットの50%が膜タンパクであることから分かるように、非常に重要な解析対象である。単純に膜タンパクの存在量や存在比を網羅的に解析するには、膜画分を分離後、通常のプロテオーム解析同様、2次元電気泳動による方法や<sup>1)</sup>、最近では、プロテイナーゼなどの処理条件を工夫することで、膜内ドメインや細胞外、細胞内ドメインを分けて解析する網羅的解析法(質量分析)も報告されている<sup>2)</sup>。しかしながら、膜タンパクの機能を評価するためには、基板上に膜と同じ環境を作り上げる必要がある。脂質膜は、本来流動性が高く不安定なものであるから、これを基板上に修飾して取り扱うには、かなりの工夫が必要である。ここでは、まず、生体膜の基板への固定化法、ついで、基板上での膜のパターニングの方法、基板上に配列させた膜の組成をそれぞれ変化させる方法、それを用いた膜タンパク解析例などをご紹介します。固体基板上に膜を形成させると、2分子膜の両側で環境が非対称になるため、組み込んだタンパクの配向が一定になりやすい、表面が膜分子をアンカリングすることで膜の機械強度を高める、表面特異的な分析手法を利用できるなどの利点がある。一方、固体表面と膜が接近するため、膜の流動性やタンパクに悪影響が出る可能性もあるため、この点を考慮したシステムを開発する必要がある。

### 1. はじめに

前回までに種々のプロテインアレイに関してご紹介したが、それらのアプローチが適用困難な対象として膜タンパクがある。膜タンパクは、生体脂質膜という極めて組織化された特殊な環境で

### 2. 生体膜の基板上への固定化法

固体基板表面を、生体膜あるいは類似した構造体で修飾する最も古典的な手法は、Langmuir-Brodjett法である<sup>3)</sup>。また、直接基板上に固定化する手法としては、アルキルシランでガラス表面に

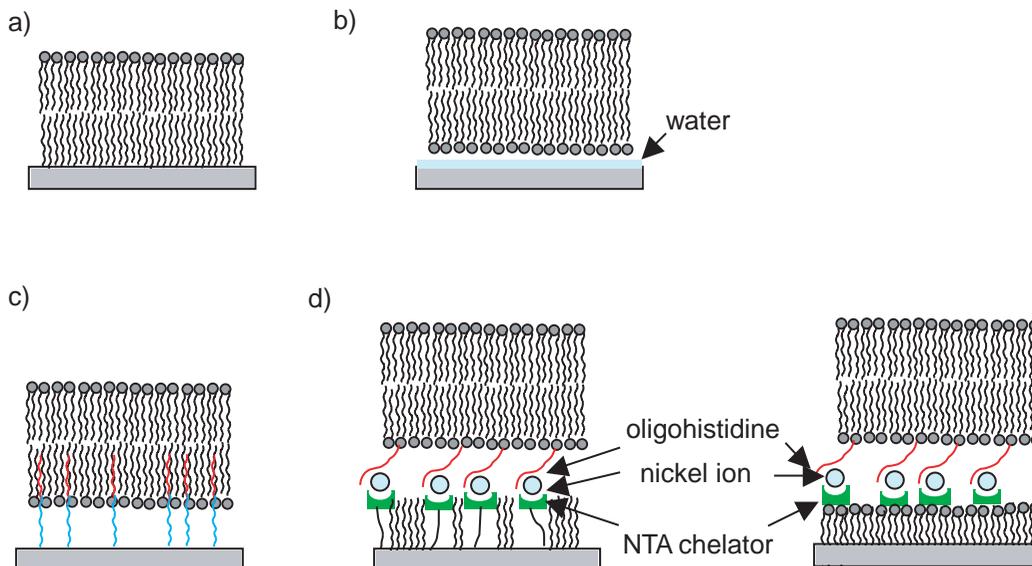


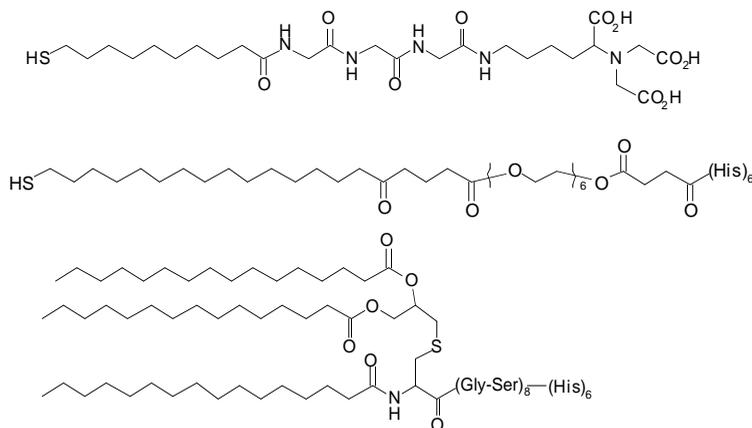
Fig.1 Different types of supported membrane on solid surface

a) highly hydrophobic surface consisting of SAM hydrocarbon tail that result in lipid monolayer, b) lipid bilayer on hydrophilic surface, c) surface presenting amphiphilic tethers anchor lipid bilayer, d) anchoring of lipid bilayer using the interaction between NTA-Ni complex and oligohistidine

疎水膜を作成したり<sup>4,5)</sup>、金基板上にアルカンチオール誘導体で自己組織化膜(SAM)を形成したりする方法がある<sup>6,7)</sup>。また、より生体膜類似の環境を志向して、リン脂質のアルキル鎖末端にチオールを導入して金基板上に膜を化学吸着させる方法がある<sup>8-10)</sup>。しかしながらこれらの手法では、基板と膜関連構造体が直接結合しており、間に空間が無いことから、膜外ドメインを有する膜タンパクの存在する場としては不向きである。SAM上に脂質2分子膜の単分子膜を作ると、脂質分子は親水性のヘッドグループを水相に向けて並び擬似2分子膜となる(Fig.1(a))<sup>11)</sup>が、やはり基板とSAMの間に隙間が無いのが難点である。一般にガラス基板上に脂質2分子膜を作成すると、ガラス表面上に10°程度の水の相が形成され、膜外ドメインが小さなタンパクであれば膜に組み込むことができる(Fig.1(b))<sup>12)</sup>。基板と膜の間にさらに大きな空間を形成させる試みとしては、両親媒性のアンカーを用いる方法がある(Fig.1(c))<sup>13)</sup>。この場合には、基板にSAMを形成させるため、根元部分に親水鎖を有し、その先に疎水部分を有する分子を用い、その上に脂質2分子膜を形成する。親水空間の大きさは、親水性の

リンカー部分の長さで調節できる。その他のアンカーとしては、例えば、アルカンチオールにペプチドを介してトリニトリロ酢酸(NTA)型キレーターを導入したもの<sup>14)</sup>や、リン脂質のヘッドグループにオリゴエチレングリコールを導入して末端をジスルフィドで2分子を結合したもの<sup>15)</sup>、アルカンチオールにオリゴエチレングリコールを介してオリゴヒスチジンを導入したり、脂質誘導体にペプチド鎖を介してオリゴヒスチジンを導入したりしたもの<sup>16)</sup>がある(Fig.1(d))。これらはいずれもNTA-ニッケル錯体とオリゴヒスチジンの3元錯体形成を利用して膜を基板上的リンカー分子と結合させて機械強度を上げるために用いられる。具体的な分子構造はFig.2に示した。基板上的両親媒性アンカーにSAM形成型アルカンチオールを用いると、機械強度は優れているが、これに結合する脂質2分子膜の流動性は制限されてしまう。一方、アンカーに脂質誘導体を用いれば、基板上的アンカーも側面方向にある程度拡散できるので、これに結合する膜の流動性への影響は小さくすむ一方、機械強度は前者に比べ劣ると考えられる。NTA-Ni-オリゴヒスチジンの結合は、発現タンパクの精製に

Different types of amphiphilic tethers



Different types of functionalized lipid for supported membrane

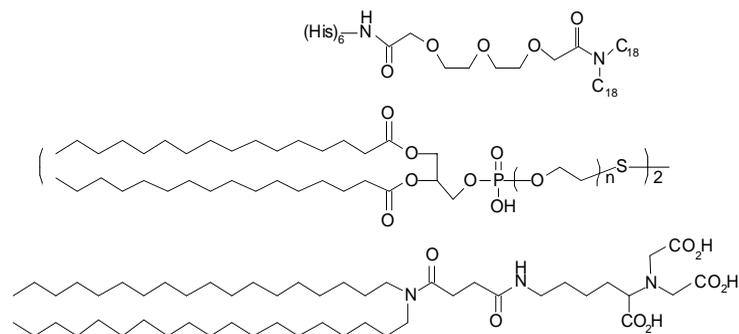


Fig.2 Amphiphilic tethers and functionalized lipid for supported membrane using Ni-NTA complex-His interaction

多用されるが、一般にEDTAやイミダゾール溶液で処理すれば解離する。しかし、基板上への膜の固定に用いる場合、これらの処理によっても固定された膜が外れることはない<sup>16)</sup>。これは、脂質膜が基盤を完全に覆い、膜透過性のないEDTAなどが、膜と基板とのアンカーの間にこれらの入り込めないことを示している。また、機械強度は若干劣るが、硬い基板と脂質膜の間に親水性のポリマーのクッションを敷く方法もある<sup>15,17)</sup>。これらの方法では、膜外ドメインの大きさによる制限は少なく、多くの膜タンパクに適用可能である。膜を基板上に形成する場合、機械強度を上げるために膜を基板に何らかの方法で結合させると流動性が落ちて本来の膜の性質が損なわれてしまう。一方、膜の重要な特性である流動性を高めるために基板との相互作用を減弱させると、膜の機械強度が小さくなり、洗浄操作や繰り返しの気-液界面を通過させる操作を行うと、多くの脂質がはがれて失われてしまうという問題がある。最近、これらの手法とは異なり、ガラス表面を -アミノプロピルシランで処理するとホスファチジルコリンなど、本来の生体膜を乗せても安定に結合することが報告されている<sup>18)</sup>。この場合、蛍光標識脂質を添加しておき、気-液界面を何度も通過させ、蛍光強度の現象をモニターしても、脂質の脱着はほとんど見られないという。また、レーザーにより蛍光消光部分を作り、その回復を観察すると、本来の脂質膜の60%程度の回復率であり、かなりの膜流動性も保持していると見られる。

この様な基板上に脂質膜を形成させるためには、基板上を親水処理してある場合やガラス表面などでは、通常、脂質ベシクルを含む溶液と接触させていると、表面の状態に依存して、数分から3日で表面に平面2分子膜が形成される<sup>16)</sup>。このほかに、ベシクルを形成する力の弱い脂質や基板上に配列しにくい脂質では、脂質溶液にオクチルグルコシドなどのcmc(臨界ミセル濃度)の高い界面活性剤を併用する方法もある<sup>14,15)</sup>。この場合では、まず数秒から1分程度のうちに、基板上に脂質膜が単分子膜として並び、バルク表面に疎水部を向けた表面を形成するが、ここをオクチルグルコシドが覆った状態になり、その後、徐々に界面活性剤濃度を下げていくことで脂質分子が置き換わっていき最終的に基板上に2分子膜が形成される<sup>15)</sup>。そのまま放置しても、数時間で界面活性剤は脂質分子と置き換わる。

### 3. 基板上に膜のパターン(膜アレイ)を形成させる手法

基板上に膜を区別された領域に独立させて並べていく方法は、大きく分けて以下の3種類がある(Fig.3)

基板上に膜を形成した後、ひっかいてパターンを作成する(Scratch Barriers)(Fig.3(a))<sup>19,20)</sup>。

予めパターンを作成した基板上に膜を形成させる(Fig.3(b))<sup>21,22)</sup>。

基板上に膜をスポット、スタンプ、あるいは作成した膜から必要部分の膜を取り去る(Fig.3(c))<sup>18,24)</sup>。

#### 3-1 : Scratch Barriers 法

この方法は、予め基板上に膜をコートしておいてから、ピンセットのようなもので機械的に2~3ミクロンの刻み目を作って膜の間のバリアーとするものである。しかしながら、膜の流動性を保つ

た状態では、安定なバリアーを作るのは難しく、イオンエッチングなどでシャープなエッジを作ることが重要である。スクラッチバリアーの安定性には、シリカなどの表面の水和状態が大きく影響するといわれている<sup>19)</sup>。一般にガラス表面などに膜を置いた場合、pHが低いと広がりやすいが、pHが中性以上になると、水分子が規則正しく配列し、膜の広がりを抑える。ただし、この方法で得られる膜同士の境目のバリアーは、安定性が本質的に低いため、制御が難しい。

#### 3-2 : 基板にパターンを作成しておいてから膜を引く方法

この方法では、基板上に膜分子が相互作用して脂質膜を形成できる表面と、膜分子が相互作用しない(膜が乗らない)表面でパターンを描いておいて、これに膜を乗せる方法である。結果的に、膜が乗らない領域が膜同士のバリアーとなる。ベシクルが相互作用して基板上に平面2分子膜を形成できる材料は、ガラス、シリカ、酸化したポリジメチルシロキサン(PDMS)やある種の高分子などが知られている<sup>25)</sup>。一方、膜が乗らない、バリアーとなりうる材料としては、金、アルミ、チタンなどの金属やアルミナ、酸化チタンなどの金属酸化物、ある種の高分子などが知られている。この方法では、前述したベシクルで処理する操作で自動的に膜のアレイが完成する。バリアーの幅は、10 nmのように細いものも作成できる。

#### 3-3 : 基板上に膜をスポット、スタンプあるいは、要らない部分を取り去る方法

この方法では、パターンが描かれていない基板の必要部分に膜を置いていったり、要らない部分の膜を取り去ってパターンを形成する。膜をスポットしていく場合には、何らかの方法で膜を固定化しないとイケない。前述の金-チオール結合やNTAとオリゴヒスチジンのニッケルイオンを介した結合や、アミノプロピルシラン処理して表面に膜を乗せるという手法がある。単純に膜をガラス表面に乗せても、pHが中性以上では、膜分子同士の相互作用のために膜はそれほど広がらない。卵黄ホスファチジルコリンの膜をガラス表面に置いた場合でも、わずか(106%)しか広がらない<sup>24)</sup>。また、さらに進化した方法では、PDMSを必要なパターンに成型しておき、この上に膜を乗せて、ガラス基板上に移す方法がある(Stamping)<sup>24,26)</sup>。PDMS上に2分子膜を作るには、ベシクルを用いるが、疎水性のPDMS表面では1時間、プラズマなどにより親水処理していると数分で膜が形成される。これをガラス基板に押し付けて膜を移す。蛍光標識脂質を混合しての検討では、1回のスタンピングで、約60%の膜が移し取られる。逆に、ガラス基板上に膜を作っておき、PDMSを押し付けてその部分の膜をはがし取り、膜のパターンを形成する方法(Blotting)もある<sup>24)</sup>。膜を取り除いた後できるバリアーは、膜同士の広がりのため、幅が狭まると期待されるが、実際はPDMSが押し付けた際に変形するために、バリアーの幅はPDMSのパターンより広くなる。これらの方法で基板上に並べられた膜は、いずれも高い流動性を有していることが蛍光消光回復法や電気泳動により実証されている。

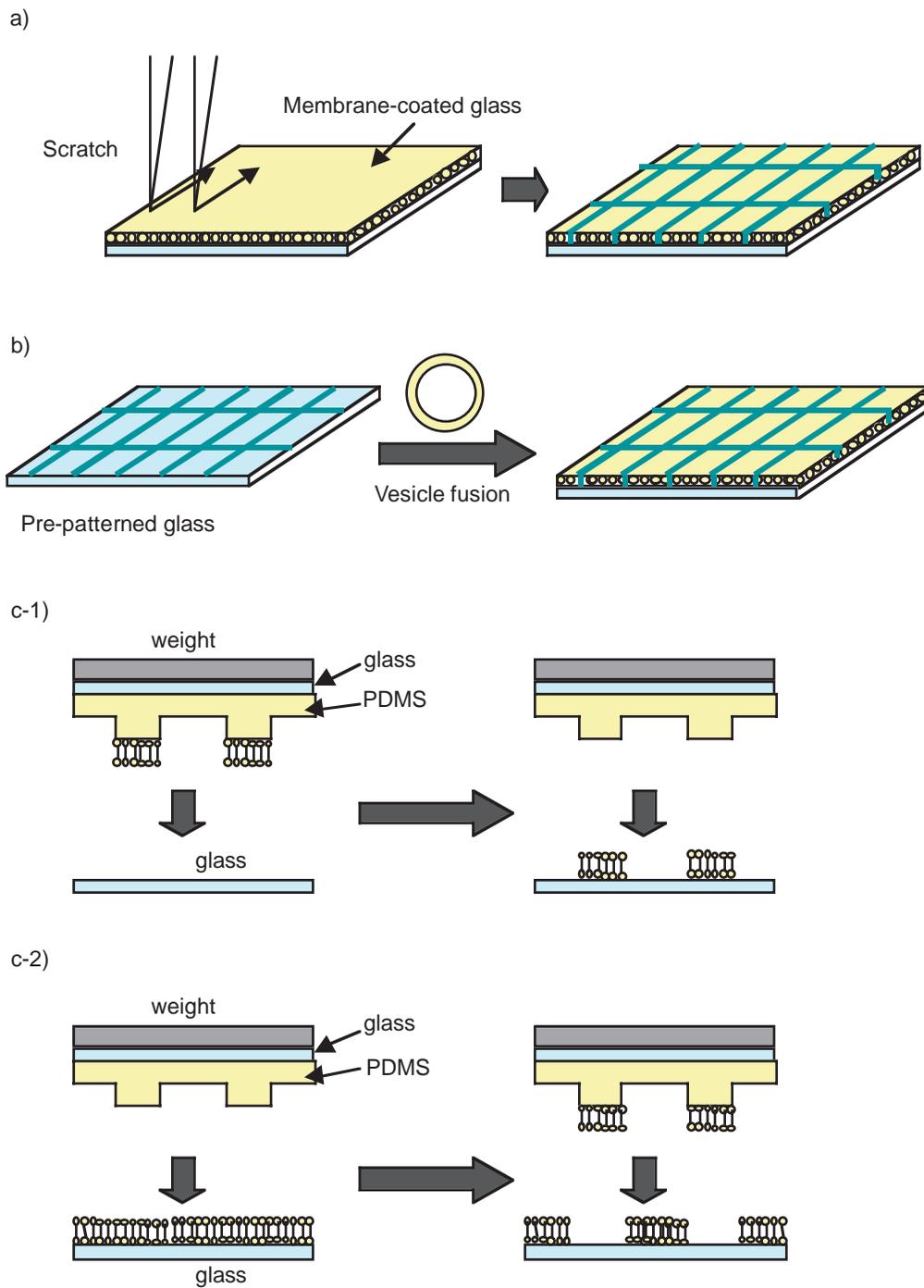


Fig. 3 Patterning of supported membrane

- a) scratch barriers: membrane-coated surface is scratched by various techniques to make barriers
- b) surface is pre-patterned with membrane-binding and non-binding regions
- c-1) Stamping: membrane is transferred to glass surface from PDMS
- c-2) Blotting: membrane on glass surface is removed by PDMS

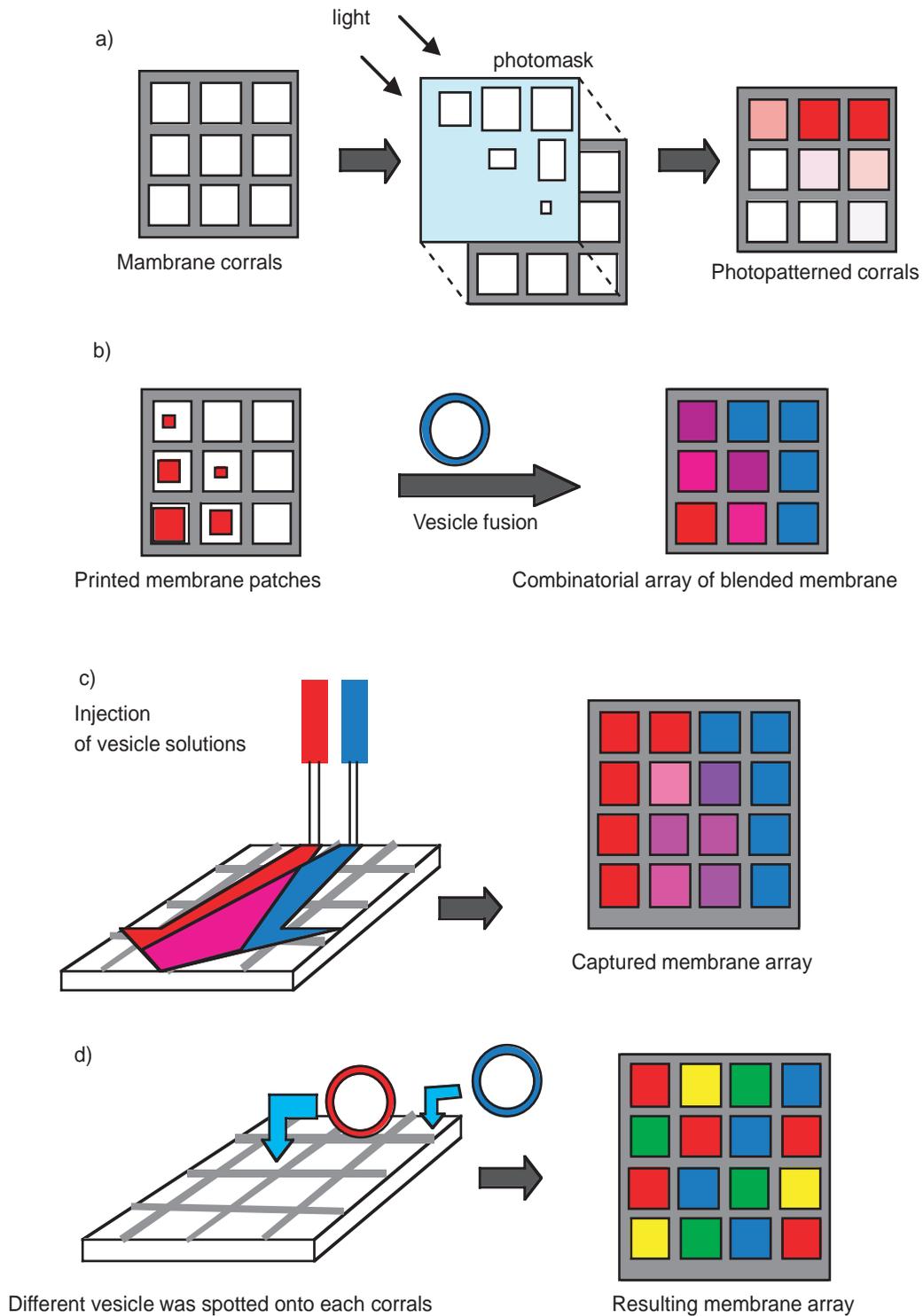


Fig. 4 Methods for making of membrane array in which each corral has different lipid-composition. a) Using of photochemical reaction, b) The first membrane is stamped in variably sized patches using PDMS stamp. The unfilled portions of each corral are then filled with second membrane with vesicle fusion. c) Two or more solutions containing different molecules are flowed over the surface of as pre-patterned substrate. d) Various vesicle solutions containing different molecules are spotted separately in each corral.

#### 4. 膜アレイのそれぞれのスポット(膜)の組成を変化させる方法

生体膜は、その組成が不均一でありこれがタンパクの機能発現などに重要な意味を持っている。パターン化した各膜部分の組成を変化させる方法としては、以下の4種類がある(Fig.4)。

各膜部分に光反応性分子を入れてフォトマスクによりそれぞれの膜である種の機能を活性化したり消去したりする。その際、フォトマスクの大きさを変えることで、膜部分毎の反応量を調節できる(Fig.4(a))<sup>27)</sup>。

区画した基板の各区画にPDMSで様々な量の膜を乗せてから、別の組成のベシクルで処理して、組成の異なる膜を作成する(Fig.4(b))<sup>26)</sup>。

予めパターンを形成した基板に異なる膜分子を流し、各液の混合の度合いに勾配をつけて組成の異なる膜を並べる(Fig.4(c))<sup>28)</sup>。各区分ごとにベシクルを置いて、平面膜を形成させる(Fig.4(d))<sup>29)</sup>。

さらに、各膜区分ごとに電圧をかけることにより一時的に成分に濃度勾配を形成させることも可能である。

#### 5. 膜タンパクアレイ<sup>30)</sup>

この様な膜アレイを膜タンパクの評価にまで用いた例はまだあまりない。Fangらは、アミノプロピルシラン処理したガラス上に膜をスポットしていき膜アレイを作成し、これにGタンパク会合性受容体(GPCR)を組み込んでその機能を評価している。GPCRとしては、ニューロテンシン受容体、各種アドレナリン受容体を用い、蛍光標識リガンドと非標識リガンドの競争を用いて、Kd値などを評価している。その結果、均一系での測定結果と矛盾しない値や選択性が得られ、この膜タンパクアレイが正常に機能していることが実証されている。

#### 6. おわりに

以上、膜タンパクの機能解析に必要な膜アレイの作成法や概念についてご紹介した。膜アレイは、その機械強度やパターンニングなどの点においてまだ改善すべき点も多い技術であるが、基本的に膜タンパクに応用できそうな段階に達しつつある。今後、膜タンパクが網羅的に解析できるようになれば、数多くのオーファン受容体のリガンドの探索や、膜でのタンパクの反応様式などの解明が進むものと期待される。

#### 参考文献

- 1) B. K. Shin, H. Q. Wong, A. Marie, F. L. Naour, F. Brichory, J. H. Jang, R. Zhao, E. Puravs, J. Tra, C. W. Michael, D. E. Misek, S. M. Hanash, *J. Biol. Chem.*, **278**, 7607 (2003).
- 2) C. C. Wu, M. J. MacCoss, K. E. Howell, J. R. Yates III, *Nat. Biotechnol.*, **21**, 532 (2003).
- 3) L. K. Tamm, H. M. McConnell, *Biophys. J.*, **47**, 105 (1985).
- 4) S. R. Wasserman, Y. T. Tao, G. M. Whitesides, *Langmuir*, **5**, 1074 (1989).
- 5) S. R. Wasserman, G. M. Whitesides, I. M. Tidswell, B. M. Ocko, P. S. Parshan, J. D. Axe, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 5852 (1991).
- 6) J. K. Yae, D. B. Parry, K. D. Caldwell, J. M. Harris, *Langmuir*, **7**, 307 (1991).
- 7) C. R. Kassel, S. Granick, *Langmuir*, **7**, 532 (1991).
- 8) W. Fabianowski, L. C. Coyle, B. A. Weber, R. D. Granata, D. G. Castner, A. Sadowik, S. L. Regen, *Langmuir*, **5**, 35 (1989).
- 9) E. Edinger, A. Golzhauser, K. Demota, Ch. Woll, M. Grunze, *Langmuir*, **9**, 4 (1993).
- 10) M. K. Chaudhury, G. M. Whitesides, *Science*, **255**, 1230 (1992).
- 11) C. Duschl, M. Liley, G. Corradin, H. Vogel, *Biophys. J.*, **67**, 1229 (1994).
- 12) T. M. Bayer, M. Bloom, *Biophys. J.*, **58**, 357 (1990).
- 13) S. Heyse, H. Vogel, M. Sanger, H. Sigrist, *Protein Sci.*, **4**, 2532 (1994).
- 14) T. Stora, Z. Dienes, H. Vogel, C. Duschl, *Langmuir*, **16**, 5471 (2000).
- 15) H. Lang, C. Duschl, H. Vogel, *Langmuir*, **10**, 197 (1994).
- 16) U. Radler, J. Mack, N. Persike, G. Jung, R. Tampe, *Biophys. J.*, **79**, 3144 (2000).
- 17) M. Kuhner, R. Tampe, E. Sackmann, *Biophys. J.*, **67**, 217 (1994).
- 18) Y. Fang, A. G. Frutos, J. Lahiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2394 (2002).
- 19) P. S. Cremer, S. G. Boxer, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 2554 (1999).
- 20) J. T. Groves, S. G. Boxer, *Biophys. J.*, **69**, 1972 (1995).
- 21) J. T. Groves, S. G. Boxer, *Acc. Chem. Res.*, **35**, 149 (2002).
- 22) J. T. Groves, N. Ulman, S. G. Boxer, *Science*, **275**, 651 (1997).
- 23) L. Kam, S. G. Boxer, *J. Biomater. Res.*, **55**, 487 (2001).
- 24) J. S. Hovis, S. G. Boxer, *Langmuir*, **16**, 894 (2000).
- 25) E. Sackmann, M. Tanaka, *TIBTECH*, **18**, 58 (2000).
- 26) J. S. Hovis, S. G. Boxer, *Langmuir*, **17**, 3400 (2001).
- 27) L. Kung, J. T. Groves, N. Ulmann, *Adv. Mater.*, **12**, 731 (2000).
- 28) L. Kam, S. G. Boxer, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12901 (2000).
- 29) J. T. Groves, S. G. Boxer, H. M. Bertozzi, *Langmuir*, **17**, 5129 (2001).
- 30) Y. Fang, A. G. Frutos, J. Lahiri, *ChemBioChem*, **3**, 987 (2002).

# Topics on Chemistry

## 金ナノ粒子によって加速される酵素電極反応

(株) 同仁化学研究所 渡辺 栄治

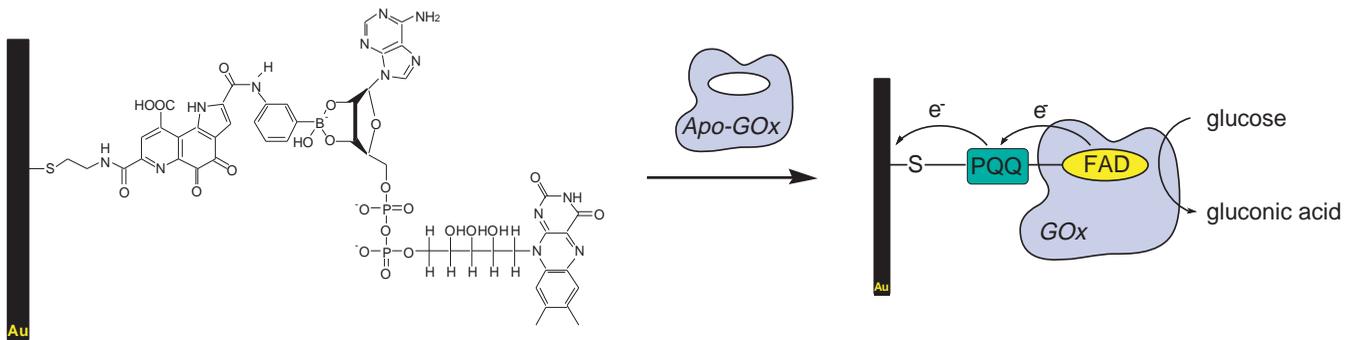


Fig.1 PQQ-GOx 電極の模式図

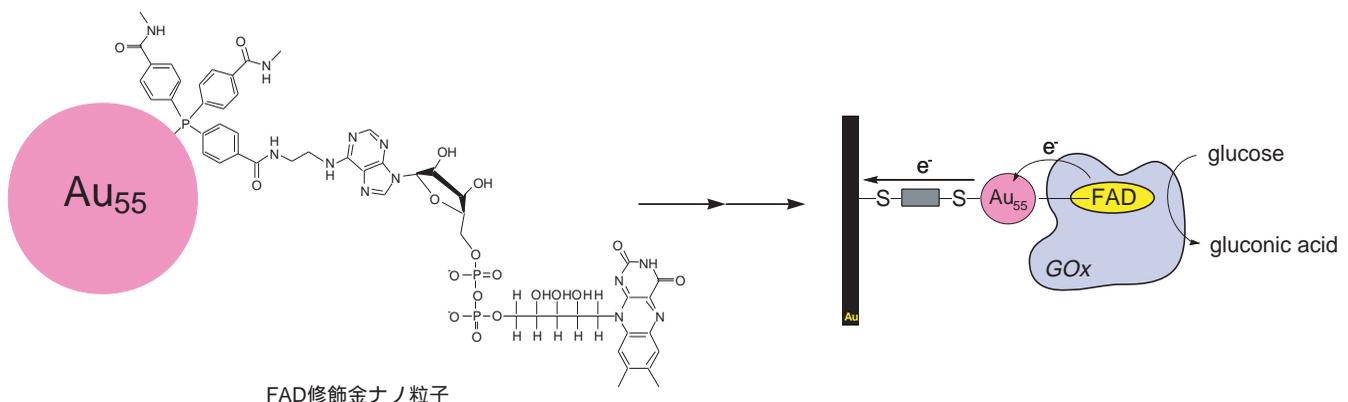
酵素電極において酸化還元酵素と電極の効率的な電子授受は、バイオセンサーやバイオ燃料電池の開発に非常に重要である。効率的な電子移動を達成するため、電子メディエーターによる酵素の修飾や導電性ポリマーによる酵素の固定化などが試みられているが、その多くは電子移動速度は本来の電子アクセプターである酸素には遠く及んでいない<sup>1)</sup>。このような遅い電子移動は、メディエーターが最適な位置に修飾されていない、酵素の配向性が悪いなどのためであると考えられる。

このような問題を解決するため、Zayatsらはグルコースオキシダーゼ(GOx)の補酵素であるFADにピロロキノリンキノン(PQQ)を化学的に修飾した分子をチオール基を介して金電極に結合し、その後Apo-GOxを再構成することにより、メディエーターの位置、酵素の配向性を高めたPQQ-GOx電極を作製している(Fig.1)<sup>2)</sup>。25℃での電子移動速度定数(触媒反応のターンオーバー数)は700 s<sup>-1</sup>であり、これは酸素をアクセプターとした場合とほぼ同様の値である。PQQ-GOx電極での酸化はPQQの酸化還元電位で起こり、またPQQ部位を含まない電極ではGOxは電極と直接電子授受を起こさないことから、PQQがメディエーターとして働いていることが示されている。

Raitmanらは金基板上に固定化した導電性ポリマー(ポリアニンとポリアクリル酸の複合ポリマー)にFADを化学結合し、Apo-GOxと再構成することにより効率的なGOx電極を得ている<sup>3)</sup>。この電極での30℃での電子移動速度定数は1000 s<sup>-1</sup>であり、酸素をアクセプターとした場合とほぼ同様の値であった。

最近、Xiaoらは金ナノ粒子(Au-NP)を結合したGOx電極に関して報告している<sup>4)</sup>。N<sup>6</sup>-(2-アミノエチル)-フラビンアデニンジヌクレオチドと、一ヶ所だけN-ヒドロキシスクシンイミドによって活性化された金ナノ粒子(1.4 nm)を反応させることにより、FAD修飾金ナノ粒子が得られる。これをApo-GOxと再構成した後、ジチオール単分子膜を介して金電極に固定化する、若しくは金基板に固定化した後、Apo-GOxと再構成するという2通りの方法により、Au-NP-GOx電極が得られる(Fig.2)。

Au-NP-GOx電極のグルコース酸化電流は、グルコース濃度がGOxのKm値の2倍の120 mmol/lを超えても上昇を続けた。電子移動速度定数は5000 s<sup>-1</sup>であり、酸素をアクセプターとした場合の約7倍の値を示した。金ナノ粒子を介した電子移動は酸素へのそれよりも非常に早いため、電流値は酸素濃度の変化や、アスコルビン酸のような阻害物質によって影響を受けない。



FAD修飾金ナノ粒子

Fig.2 Au-NP-GOx 電極の模式図

これに対し、活性化金ナノ粒子とGOxをリジン残基を介してランダムに結合し、金電極上のジチオール単分子膜上に固定化したGOx電極では活性な酵素電極は得られなかった。また、金ナノ粒子を用いず、FAD修飾電極とApo-GOxを再構成して得たGOx電極では、GOx活性はあるものの電極との直接の電子授受は起こさなかった。

このように、メディエーターを補酵素と直結し、酵素の配向性を高めることにより、非常に高効率な酵素電極を作製することが可能である。バイオセンサーやバイオ燃料電池へ応用するためには、駆動電圧や電極の安定性などの課題はあるが<sup>5)</sup>、今後の進展が大いに期待される。

#### 参考文献

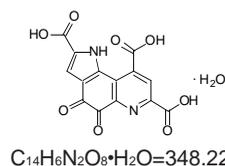
- 1) A. Badia *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7053 (1993).
- 2) M. Zayats *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2120 (2002).
- 3) O. A. Raitman *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6487 (2002).
- 4) Y. Xiao *et al.*, *Science*, **299**, 1877 (2003).
- 5) A. Heller, *Nature BioTech.*, **21**, 631 (2003).

## 関連商品

### 脱水素酵素、酸化酵素の補酵素

#### PQQ

化学名 4,5-Dihydro-4,5-dioxo-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-2,7,9-tricarboxylic acid, monohydrate



#### < 特長 >

- レスポンスが早く溶存酸素に影響されない脱水素酵素、酸化酵素の補酵素
- 生理活性を有するラジカルスカベンジャー
- 半世紀ぶりに見いだされた新種のビタミン

PQQは、グルコース脱水素酵素（GDH）の活性中心となっているため、糖尿病のスクリーニングにおいて注目されています。これまではグルコースセンサーとしては酵素の扱いやすさの面からグルコースオキシダーゼ（GOD）が広く用いられてきましたが、PQQを補酵素とするGDHはGODに比べレスポンスが早く、溶存酸素に影響されないこと<sup>5)</sup>が明らかとなり、実用化へ向けた研究が進められています<sup>6)</sup>。

また、ラジカルスカベンジャーとしての生理活性を有していること<sup>7)</sup>や、金基板に固定化し電子伝達のメディエーターとする電極も報告されたり<sup>8)</sup>、半世紀ぶりに見いだされた新種ビタミンとして新聞等で取り上げられるなど、その利用はますます広がり、今後の研究が期待されます。

#### 参考文献

- 1) J. G. Hauge, *J. Biol. Chem.*, **239**, 3630 (1964).
- 2) J. A. Duine, J. Frank Jzn, J. K. van Zeeland, *FEBS Lett.*, **108**, 443 (1979).
- 3) J. A. Duine, J. Frank Jzn, P. E. J. Verxiel, *Eur. J. Chem.*, **108**, 187 (1980).
- 4) K. Kano, K. Mori, B. Uno, T. Kubota, T. Ikeda, M. Senda, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **23**, 227 (1990).
- 5) E. J. D'Costa, I. J. Higgins, A. P. F. Turner, *Biosensors*, **2**, 71 (1986).
- 6) K. Sode, S. Nakasono, M. Tanaka, T. Matsunaga, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **42**, 251 (1993).
- 7) P. M. Gallop, M. A. Paz, R. Fluckiger, E. Henson, *Connect. Tissue Res.*, **29**, 153 (1993).
- 8) E. Katz, V. Heleg-Shabtai, A. Bardea, I. Willner, H. K. Rau, W. Haehnel, *Biosens. Bioelectron.*, **13**, 741 (1998).

品名	容量	価格( ¥ )	メーカーコード
PQQ	10 mg	Request	P384

## 新製品

## G6PD 分析用キット

## G6PD Assay Kit

## &lt;特長&gt;

- ヘモグロビンと反応しない。
- 産生されたホルマゼンは水溶性が高い。
- 特殊な機械を必要とせず、結果の確認が目視でできる。
- マラリア流行地のような電気が供給されていない地域でも測定ができる。
- MTTホルマゼン法では測定できなかった20-50%程度の欠損者に対しても測定できる。
- マイクロプレートリーダーなどを利用して、少量の試薬で正確な酵素活性を定量的に測定できる。

## &lt;はじめに&gt;

G6PD 異常症とは、グルコース 6 リン酸脱水素酵素(G6PD)の活性が著しく低いため、ヘモグロビンの変性が起こり、溶血性貧血の症状を呈する病気です。G6PDの構造を決定する遺伝子はX染色体に存在し、伴性劣性遺伝の形式を取るため、発症はほとんどが男性です。世界中ではおよそ4億人がG6PDの異常遺伝子を持っているとみなされています。G6PD異常症患者は、平素は無症状ですが、マラリア薬として使用されているプリマキンを服用すると、溶血性貧血を引き起こしてしまいます。従って、マラリア流行地域における住民のG6PD異常症の確認は、大変重要な課題となっています<sup>1)</sup>。

G6PD異常症の確認には、今日までに多くの方法が発表され、蛍光スポット法<sup>2,3)</sup>、ホルマゼン基質の3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT) と発色試薬の phenazine methosulfate (PMS) を使ったホルマゼン法<sup>4,5,6)</sup> などが知られています。しかしながら、いずれの方法でも種々の問題を抱えているのが実情です<sup>7,8)</sup>。

今回開発したG6PD Assay Kitは、ホルマゼン基質である2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H tetrazolium monosodium salt (WST-8)を用いている為、ヘモグロビンと反応せず、G6PD異常症を簡便に判定することが可能となりました(Fig. 1)。また、WST-8のホル

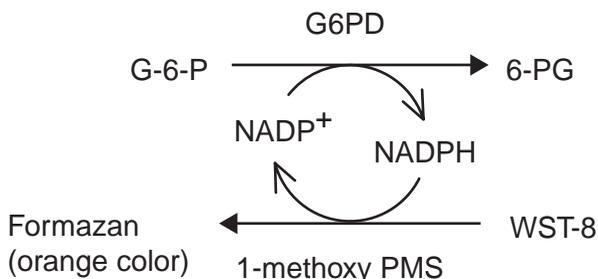
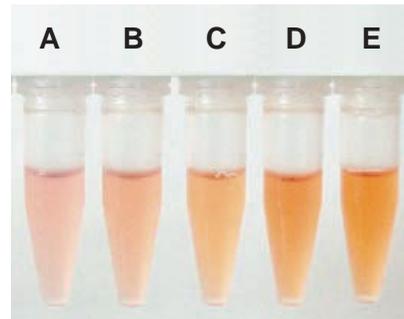


Fig.1 G6PD 発色の原理

マゼンは水溶性で 460 nm に最大吸収を有し、強い橙色を呈するため目視で発色結果の確認が出来ます。従って、マラリア流行地のような電気が供給されていない地域でも、電源や高価な機器類を一切必要とすることなく、その場で測定が可能です。更に本法は、MTTホルマゼン法では測定できなかった20-50%程度の欠損者に対しても測定できるようになりました(Fig. 2)。また、電気が供給されている都市部では、マイクロプレートリーダーなどを利用して、少量の試薬で正確な酵素活性を定量することも可能です(Fig. 3)。



A: G6PD 欠損血液 (< 0.1 IU/g Hb)  
 B: 2 IU (25% activity)  
 C: 4 IU (50% activity)  
 D: 6 IU (75% activity)  
 E: 正常血液, 8 IU (100% activity)

Fig. 2 発色例 (25 で 15 分間反応)

## &lt;キット内容&gt;

- Substrate mixture 2 ml × 5 本
- Dye mixture 2 ml × 5 本

\* 別途必要な器具・試薬は、20 μl, 1000 μl マイクロピペットとチップ、1.5 ml マイクロチューブ、蒸留水および 1 mol/l HCl です。

## &lt;測定操作&gt;

- 1) 1.5 ml マイクロチューブに蒸留水 760 μl を入れ、これに Substrate mixture 20 μl と Dye mixture 20 μl をそれぞれ添加し、よく振り混ぜる。
- 2) 1) のチューブにサンプルの血液を 5 μl 添加し、5 秒間よく振り混ぜる。
- 3) 25 ~ 35 で 15 分間インキュベートする。
- 4) 1 mol/l HCl を 10 μl 添加し、反応を止める。反応停止後、目視で溶液の発色を、ポジティブコントロール溶液\*<sup>1</sup> 及び、ネガティブコントロール溶液\*<sup>2</sup> と比較し、活性を判定する。

\*<sup>1</sup> ポジティブコントロール溶液は上記操作の中で操作 2) の血液に、G6PD の活性が正常値を示す血液を使用して用時調製する。

\*<sup>2</sup> ネガティブコントロール溶液は上記操作の中で操作 1) で Substrate mixture は添加せずに用時調製する。操作 2) で使用する血液はいずれでもよい。

G6PD 分析用キット

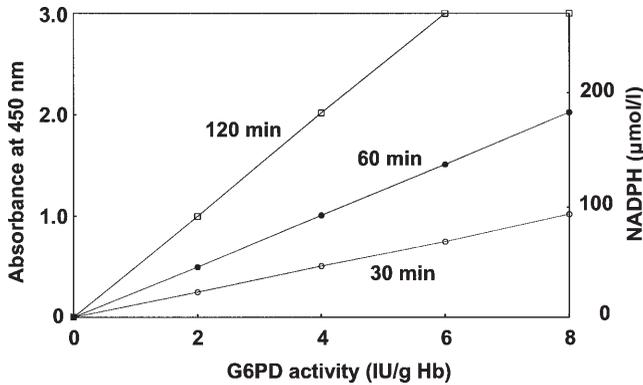


Fig. 3 血液サンプルの発色の時間的増大

< 注意事項 >

1. 本キットは、冷凍にて保存してください。品質の劣化を防ぐ為に、融解後は冷蔵の場合は1ヶ月以内に、常温の場合は10日以内にご使用下さい。
2. 多くの検体を測定する場合、操作1)を簡略化するために Substrate mixture 2 ml と Dye mixture 2 ml を 76 ml の蒸留水で希釈し (Total 80 ml)、1.5 ml のマイクロチューブに 800 μl ずつ小分けして保存されることをお勧めします。希釈後も冷凍・遮光で保存して下さい。もし、冷蔵で保存される場合は、必ず遮光し、3日以内にご使用下さい。
3. HCl を添加し、反応を停止することで、目視でも、正常値の50%の活性しか持たないサンプル血液も容易に判別することができます。
4. マイクロプレートリーダーを用いれば、450-460 nm の吸光度を測定することで、活性を数値化することが出来ます。その際は、より正確な分析の為に、血液中のヘモグロビン量を測定することをお勧めします。
5. 本品は試験研究用です。診断用には使用できません。

参考文献

- 1) A. Ishii, *et al.*, *Japanese Journal of Parasitology*, **43**, 312 (1994).
- 2) E. Beutler, *Blood*, **28**, 553 (1966).
- 3) E. Beutler and M. Mitchell, *Blood*, **32**, 816 (1968).
- 4) V. Fairbanks and E. Beutler, *Blood*, **20**, 591 (1962).
- 5) H. Fujii, *et al.*, *Acta Haematologica Japonica*, **47**, 185 (1984).
- 6) A. Hirono, *et al.*, *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **26**, 1 (1998).
- 7) I. S. Tantular, *et al.*, *Tropical Medicine and International Health*, **4**, 245 (1999).
- 8) A. Pujades, *et al.*, *Int. J. Hematol.*, **69**, 234 (1999).

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
G6PD Assay Kit	500 assays	29,000	G233

試作品

ペルオキシダーゼ標識用キット

Peroxidase Labeling Kit - NH<sub>2</sub>

特長

- 3時間でペルオキシダーゼコンジュゲートを調製することが可能
- 活性化およびブロッキング操作がない
- 調製に必要なすべての試薬がキットに含まれている

ペルオキシダーゼは、エンザイムイムノアッセイ(EIA)や組織染色などに利用される最も一般的な酵素として知られています。多くのペルオキシダーゼコンジュゲートが市販され、利用されていますが、研究の多様性から研究者が自らコンジュゲートを調製するケースが増えてきています。ペルオキシダーゼを標識する方法はいくつか知られていますが、いずれも煩雑で、時間や経験を要します。

本キットは、アミノ基を有する分子にペルオキシダーゼを標識するためのキットです。Amine Reactive Peroxidase は、その構造内に活性エステル基を有しているため、アミノ基を有する目的分子と混合するだけで安定な共有結合を形成します。低分子化合物を本キットで標識する場合には、未反応の低分子化合物は付属の Filtration Tube を用いて容易に除去することができます。また、IgGのような分子量の大きい分子をサンプルに使用する場合、ペルオキシダーゼ活性や標識反応を阻害するような低分子化合物(アジ化ナトリウムやトリスなど)は、Filtration Tube を用いた前処理によって除去されます。本キットには標識に必要なすべての試薬と作製したコンジュゲートを保存するための溶液が含まれています。

キット内容

- Amine Reactive Peroxidase
- Buffer A
- Buffer B
- Storage Buffer
- Filtration Tube

秋から冬の学会展示ご案内

次の学会において、試薬新製品の展示を行ないます。皆様のお越しをお待ちいたしております。

- 日本生化学会第76回大会  
10月16日(木)～18日(土) パシフィコ横浜
- 第26回日本分子生物学会年会  
12月10日(水)～13日(土) 神戸国際展示場

## 新製品

### 残留塩素測定キット

#### 残留塩素測定キット-SBT 法 残留塩素測定試薬-SBT 法

< 特長 >

- 溶かす手間が不要な溶液タイプ
- 判定しやすい青緑色の発色
- DPD の約 2 倍の感度
- DPD より極めて低い毒性・変異原性
- 簡単な操作の測定法

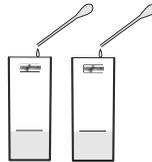
小社が新しい残留塩素測定法として開発しました残留塩素測定キット-SBT法は、簡単な測定法でどなたにも安心してご使用い

< 操作方法 >

1) 2本の試験管それぞれに白線まで検水(浴槽水、プール水など)を入れる。水位の調整は添付のスプイドで行ってください。

2) 1つの試験管の検水に検水調整液(白キャップ)を2滴加え、軽く振り混ぜる(振り混ぜずに次の操作に進んだ場合、色が着かない場合があります)。

3) 次に、色素液(青キャップ)を1滴加え軽く振り混ぜる(残留塩素が含まれている場合、直ちに青緑色の溶液となります)。



ただけるという優れた特色をもっております。

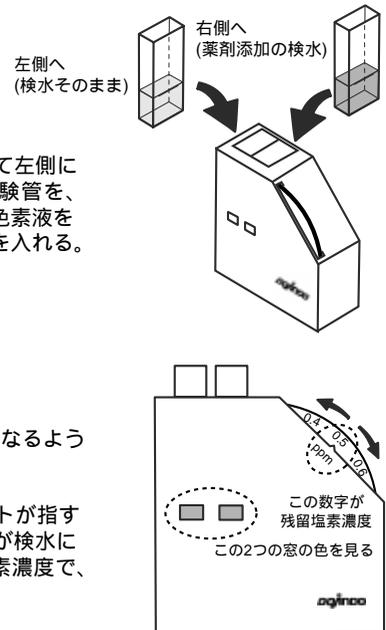
これまで残留塩素測定試薬として汎用されていたオルトトリジンは、毒性が高いため、2000年4月に上水試験公定法から削除され、現在 DPD が公定法として残留塩素測定試薬の主流となっています。ところが、溶液の安定性が悪いDPDは粉末タイプがほとんどで測定の度に開封し溶かす必要があります。特に浴場施設などでは1日に何度も測定が必要のため、この作業の繰り返しで非常に手間がかかっていました。

残留塩素測定キット-SBT法は、溶液タイプですぐに測定ができるため、貴重な時間の節約のお手伝いができる新しい方法です。

4) 色調比色計の向かって左側に検水だけがいった試験管を、右側に検水調整液、色素液を入れた検水の試験管を入れる。

5) 2つの窓の色が同じになるように色調比色板を回す。

6) 色調比色計のポイントが指す数値を読む(この数値が検水に含まれる遊離残留塩素濃度で、ppm表示となります)。



< 測定時の注意事項 >

- 検水温度が高いと色が変化し判別しづらくなります。検水温度により比色板(標準4~25、高温30~35)を使い分けてください。
- 検水調整液、色素液は誤って多く加えても、測定には問題ありません。
- 色調比色板を使って比色する際は、蛍光灯などのあかりにかざして行ってください。
- 使用後の試験管は水で洗浄して保管してください。

#### 残留塩素測定キット-SBT 法のお問合せ先のご案内

本製品は、株式会社同仁グローバルの開発製品です。このためお手数ですが、本製品に関してのご購入・ご質問は、現在、小社製品をお買い求めの和光純薬工業様、販売店様ではなく、直接、同仁化学研究所マーケティング部、カスタマーサービス部へお問合せください。

TEL : 096-286-1515  
フリーダイヤル : 0120-489548  
E-mail : info@dojindo.co.jp

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
残留塩素測定キット-SBT 法			
set		7,000	ZK01-50
残留塩素測定試薬-SBT 法			
100 回用		1,300	ZK01-60
残留塩素測定試薬-SBT 法			
500 回用		5,000	ZK01-60
色素液	100 ml	9,000	ZK01-70
検水調整液	200 ml	5,000	ZK01-80

## お知らせ

### 容器および保存・輸送温度変更のお知らせ

#### Cell Counting Kit - 8

このたび皆様にご好評の Cell Counting Kit- 8 の容器変更に伴い、保存・輸送温度も変更しました。

特長および変更点

- 4 で3ヶ月が12ヶ月とより長期安定に
- ガラスからポリ容器になり、取扱いがより安全に
- 冷凍から冷蔵になり、輸送・保管がより簡便に

今後ともご愛顧いただきますようお願いいたします。

Cell Counting Kit - 8 100 回用



新

旧

Cell Counting Kit - 8 500 回用 /2500 回用



新

旧

Cell Counting Kit - 8 10,000 回用



新

旧

## 訃報



新聞、テレビ等の報道によりすでにご存知の事と存じますが、小社 代表取締役社長 上野景右は 平成15年9月16日午後0時2分 不慮の事故により54歳にて急逝いたしました。ここに生前のご厚誼を深謝し謹んでご通知申し上げます。

尚、葬儀は故人のご家族のご意向により近親者にて相営みました。

また「お別れの会」を9月30日(火)熊本ホテルキャッスルにて相営みました。

ご繁忙の中にもかかわらずたくさんの方々にご来臨、弔電を賜り、まことにありがとうございました。

今後とも変わらぬご愛顧を賜りますようよろしくお願い申し上げます。

品名	容量	価格(¥)	コード	メーカーコード
Cell Counting Kit-8				
	100回用	3,800	341-07761	CK04
	500回用	11,000	347-07621	CK04
	2,500回用	32,000	343-07623	CK04
	10,000回用	99,000	—————	CK04

11月28日開催

## 14th フォーラム・イン・ドージン

## 糖鎖生物医学：多様な糖鎖構造がつくりだす生物機能と病態

日 時 / 2003年11月28日(金) 9:30-17:40 (開場 9:00) 参加費 / 無料  
 場 所 / 鶴屋ホール(テトリア熊本[鶴屋東館]7F・熊本市手取本町6-1) 定員 / 300名  
 代表世話人 / 前田 浩(熊本大学大学院医学薬学研究部 微生物学分野)  
 当番世話人 / 山本 哲郎(熊本大学大学院医学薬学研究部 分子病理学分野)  
 主 催 : 株式会社 同仁化学研究所  
 後 援 : 株式会社 ケミカル同仁

セッション1	糖鎖の構造とあらたな生物機能<座長:前田 浩>
9:45-10:45	谷口 直之 (大阪大学大学院医学系研究科 生体制御医学生化学) 「糖鎖の構造とあらたな生物機能」
セッション2	多様な糖鎖構造と細胞識別機能<座長:川畑 俊一郎(九州大学大学院理学研究院)>
10:45-11:30	入村 達郎 (東京大学大学院薬学系研究科 生体異物学教室) 「ムチンとレクチンの免疫生物学」
11:30-12:15	成松 久 (産業技術総合研究所 糖鎖工学センター) 「バイオインフォマティクスを利用した糖鎖遺伝子の網羅的解析」
12:15-13:30	昼食
セッション3	糖鎖構造異常と病態(1)<座長:山本 哲郎>
13:30-14:15	浅野 雅秀 (金沢大学 学際科学実験センター 遺伝子改変動物分野) 「糖鎖と炎症反応及びIgA腎症 - ガラクトース転移酵素遺伝子KOマウスの解析から - 」
14:15-15:00	古川 鋼一 (名古屋大学大学院医学系研究科 生物化学講座) 「シアル酸転移酵素の異常による病態のメカニズム」
15:00-15:45	宮城 妙子 (宮城県立がんセンター・研究所 生化学部門) 「シアリダーゼ異常とがん・糖尿病」
15:45-16:00	コーヒーブレイク
セッション4	糖鎖構造異常と病態(2)<座長:角田 佳充(九州大学大学院農学研究院)>
16:00-16:45	本家 孝一 (高知医科大学 遺伝子病態制御学教室) 「糖鎖硫酸化の異常による病態の分子機構」
16:45-17:30	遠藤 玉夫 (東京都老人総合研究所 糖蛋白質研究グループ) 「糖鎖構造異常と先天性筋ジストロフィー」

問い合わせ・申し込み先:

熊本県上益城郡益城町田原 2025-5(株)同仁化学研究所内

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

講演終了後、ミキサー(無料)を同開場にて予定しております。(17:45-19:30)

参加ご希望の方は、所属・氏名・連絡先(住所,TEL,FAX,E-mail)・ミキサー参加の有無をご記入の上、E-mailまたはFAXにてお申し込みください。

駐車場は有料となりますので、できるだけ公共の交通機関をご利用ください。

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