

ドージンニュース

DOJIN NEWS

CONTENTS

Review

真菌 -1,3-グルカン類の構造と宿主応答性
大野 尚仁

Topics on Chemistry

プロテインキナーゼ活性を直接測定する「Mass-tag法」
佐藤 求美

VNC細菌の検出法
高木真由美

2005 ISSN0385-1516

No.114

目次

Review
 真菌 β -1,3- グルカン類の構造と宿主応答性
 東京薬科大学薬学部免疫学教室 大野尚仁 1

Topics on Chemistry
 プロテインキナーゼ活性を直接測定する「Mass-tag 法」
 同仁化学研究所 佐藤求美 11
 VNC 細菌の検出法
 同仁化学研究所 高木真由美 12

Column
 身近なものの Ca、Mg を調べてみよう 13

Commercial
 新製品案内
 ビオチン標識用キット 18

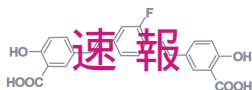
試作品
 NO 検出キット 14
 蛍光タンパク標識用キット 16

お知らせ
 連載休載 13
 ドージンニュースご愛読者の皆様へ 14
 残留塩素測定キット 15
 販売中止 17
 ポナールキットケース・ラベル変更 17

製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

0.01M 滴定液 13
 Universal BT 13
 NN diluted with potassium sulfate 13
 NN solution 13
 NO₂/NO₃ Assay Kit-F (Fluorometric)
 ~ 2,3-Diaminonaphthalene Kit ~ 14
 NO₂/NO₃ Assay Kit-C (Colorimetric)
 ~ Griess Reagent Kit ~ 14
 残留塩素測定キット -SBT 法 15
 残留塩素測定試薬 -SBT 法 15
 色素液 15
 検水調整液 15
 Peroxidase Labeling Kit - NH₂ 17
 Peroxidase Labeling Kit - SH 17
 Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH₂ 17
 Alkaline Phosphatase Labeling Kit - SH 17
 Biotin Labeling Kit - NH₂ 17
 Fluorescein Labeling Kit - NH₂ 17
 Biotin Labeling Kit - SH 18



速報 アルツハイマー病の発症前診断へ大きく前進 Nature Neuroscience 3/13電子版 掲載
 - MRIでアミロイド斑の可視化に世界で初めて成功 -

独立行政法人理化学研究所と小社が共同開発したFSBをMRIプローブとすることにより、アルツハイマー病発症の引き金となるアミロイド β ペプチド (A β) が蓄積したアミロイド斑をMRIで可視化することに世界で初めて成功しました。

M. Higuchi, N. Iwata, Y. Matsuba, K. Sato, K. Sasamoto, T. C. Saido, *Nature Neurosci.*, 8 (4), in press (2005); <http://dx.doi.org/10.1038/nn1422>

in vivo MRI画像例

*MRIでの使用例については上記文献をご参照いただくか、または小社までお問い合わせください。



FSB静脈内投与後に撮影したin vivo MRI画像。アルツハイマー病モデルマウス脳におけるアミロイド沈着(老人斑)が可視化されている。A : ¹⁹F-MRI画像、B : ¹H-MRI T2強調画像、C : 蛍光顕微鏡による蛍光画像(ex vivo)。

Bで老人斑部分は低信号(黒)で観察される。FSBの分布はCの蛍光像で確認され、同じ部分がAの¹⁹F-MRI画像で検出されており、Bよりさらに細かい老人斑まで検出されている。

(画像提供：理化学研究所脳科学総合研究センター神経蛋白質制御チーム 樋口真人先生, 西道隆臣先生)

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
FSB solution	100 μ l	25,000	F308

* 大容量のご提供も可能です。
 ご希望の方は小社までお問い合わせください。

真菌 β -1,3-グルカン類の構造と宿主応答性 Structure and immunomodulating activity of fungal β -1,3-glucan



大野 尚仁
(Naohito Ohno)
東京薬科大学薬学部免疫学教室

[Summary]

This article has provided an overview of the structures and the biological activities of β -Glucans (BGs), focusing primarily on results that we obtained. BGs demonstrate a diverse range of structure and biological activities, and this diversity is so great that a "common activity" could not be identified to this day. Although which activity is truly significant should probably be determined from the viewpoint of the effective utilization of BGs, as "broad spectrum" is one of the characteristics of BGs, it is expected that future research will be conducted to clarify this matter. In addition, BGs are present in large amounts in the environment, and it was found that humans and animals not only react to BGs in the form of innate immunity, but also recognize BGs via acquired immunity. This suggests that it is necessary to additionally expand and revise the conventional mechanism of action associated with BGs in order to develop a new mechanism of action. BGs consist of both "old" and "new" materials. When immune-regulation is considered, there is the question of whether recently discovered cytokines, gene therapy or cancer vaccines may serve as a substitute for BGs. It is preferable that all of these be allowed to coexist.

キーワード：ベータグルカン、真核微生物、細胞壁、受容体、特異抗体、免疫調節、粘膜免疫

1. はじめに

β グルカン (BG) は真菌、細菌、植物など自然界に広く分布している。 β 配位したグルコピラノースを主構成糖とする多糖類のことであり、定義の上では、種々の結合様式のものを含んでいる。最も汎用される β -1,4-結合した多糖はセルロースであり、この呼び名が固有名称として一般化されているので、BG としては、 β -1,3-ならびに β -1,6-グルカンをイメージして使われている。科学用語としてはいかにも曖昧であるが、巷にも言葉が氾濫するほど魅力的なものともいえる。本稿でも β -1,3-ならびに β -1,6-結合を有するグルカンに的を絞って概説する。

BG は各々の生物において生物学的な機能を発揮するのは勿論の事、生物間のやり取りにおいても様々な役割を演じ(たとえば、生体防御系の刺激作用など)あるいは産業上も重要な素材である。論文報告、特許、学会発表が様々な領域で多数なされている。これまでに構造解析された例も多く、おのおのの構造の細部を比較すると微妙に異なっている。しかし、これらは生物(微生物)由来であり、用いた材料の菌株、培養条件、個体差、抽出方法の微妙な違い(これは抽出過程での部分分解も含む)分析方法並びにそれらの精度を考慮したとき、何が本当に意味のある差なのかについては一概に結論を出すことはできない。さらに、細胞壁を構築する成分の代表の一つであるので、例えば酵母形態をとるものについては、卵形の形態そのものが、微妙にコントロールされたネットワークによって構築されているものであり、糖ユニットの単なる繰り返し構造とは考えにくい。また、酵母の基本的増殖様式は出芽であるが、増殖の後には出芽痕が残ることが知られてお

り、この部分の構造も特徴的であると予測される。この例のように、微生物の形態そのものが BG の一次構造のネットワークの構築の現れであるとする、精製という操作そのものにも BG ならではの条件や背景を含んでいる。例えば BG は機能的に頑丈な細胞壁を作るので水溶性は低く、これを精製するためには部分的に分解する、という過程も必ず背景に潜んでいる。さらにまた市販品の中には、粗製のもの、純度の低いものがあり、測定された生物活性が夾雑物に由来することもしばしばである。一流の専門誌に掲載されているからといって、成果を鵜呑みにすることには危険が伴う。低分子の有機天然化合物や酵素、脂質と比較して、単一性や均一性の評価が困難であるがゆえに、このような危険性は他の物質よりも高いことになる。一方で、微生物の菌体外に可溶性の多糖として分泌される BG も存在する。これも分子量が厳密に決まっているわけではないので、上記の例と類似の背景を有していることになるが、そもそも可溶性の物質として分泌されるので、ネットワークという観点では細胞壁構築成分と比較すると単純化できているものと思われる。はじめから混乱を招きかねない記載になったが、これらの背景を関連分野の方々、お一人お一人にご理解いただき、正しい目で個々のデータを評価できるようにならなければならない。

菌類 BG が医学薬学領域で注目されたのは 1960 年代まで遡ると思われる。現在医薬として利用されているレンチナン (Lentinan, LNT)、ソニフィラン (Schizophyllan, Sonifilan, SPG) の基礎研究はこのころより始まる。更に“民間伝承薬”にまで遡るとすると“菌類生薬”として猪苓、靈芝など多くの研究

が展開されており、研究の根本を探するのは現実的ではない。当然、これらにまつわる総説、解説、書籍も先達により、多数報告されている。一方で高度医療の発展と関連し、免疫機能の低下した患者さん、所謂 immunocompromised host が増加した。この分野では早期診断、潜在的病原因子として着目された。我々は1980年ごろより BG の解析を開始した。大学における卒論研究、大学院研究の一環としての要素も強いことから、余り細かく目的を絞らず医薬のターゲット、あるいは真菌症の潜在的病原因子として広範に興味を持って研究を行ってきた。これまでに、何種類かのカビ、茸や酵母から BG を抽出、単離、構造解析を行うと共に、生物活性についても解析してきた。本稿では、我々がやってきた解析結果を中心に、BG 研究の現状を概説したい。ページ数の関係で概略の記載しかできていない部分もある。2000年以前の内容については、総説を参照していただければ幸いである¹⁻⁴⁾。

2. 深在性真菌症の早期診断と BG

深在性真菌症は増加傾向にある。これには、超高齢化や高度先端医療の普及に伴う、ハイリスク、免疫不全患者の増加など複合的な原因が関与していると思われる。抗菌物質の作用は一般的に選択毒性が高く、細菌に対する抗菌剤は真菌に対しては効果を示さない。逆もまた同様である。免疫不全者が増加するなかで、抗生物質の予防投与はやむなく汎用されてきているが、このこと自体、耐性菌を増加させるリスクを含むものであり、最善の対応策とはいえない。また医薬品は化学物質であり、宿主に対し副作用が全くゼロとなるような理想的な医薬品は無い。抗菌剤も副作用としてアレルギー発症を起こしやすい医薬品のひとつである。細菌感染であれ、真菌感染であれ、予防投与には同様のリスクがある。

そこで重要なのは、早期診断法の確立である。代表的な深在性真菌症としては、*Candida* と *Aspergillus* が上げられるが、いずれの細胞壁にも β -1,3-グルカンが共通して存在するので、血中に存在する極微量の BG を測定することは早期診断として有用である。幸いにして、わが国では、この診断法が保険適用されている⁵⁾。ヒト血中の BG 測定法の確立は新たな展開を生んだ。ひとつは、血中にある BG の構造に関することであり、もう一方は、この測定法の応用範囲についてである。

血中にある BG は極微量であるが、カプトガニの血中に β -1,3-グルカンに特異的に反応する防御系が存在し、それを特異的に測定する方法が開発されたことによって測定が可能になってきた。リムルテストとして知られるものであり、エンドトキシン測定法との関連性から日本薬局方にも記載がある (Fig. 1)^{6,7)}。この方法の普及は患者にとっては大変な福音である。保険適用されているキットを用いた場合、20 ピコグラム / ml という値が感染を見極める濃度として良く用いられる。これは測定法の開発過程で利用された所謂“標準物質”に基づき算出されたものである。BG 研究の歯がゆいところは、実はここにも潜んでいる。この測定法の基礎的な解析を種々検討してわかってきたことであるが、BG は特徴的な螺旋構造をとり、この中で最も安定と思われる三重螺旋構造では、ほとんど反応性が無いことである (Fig. 2)。分岐の度合いや分子量も反応性を著しく左右する。上述の20ピコグラムという値

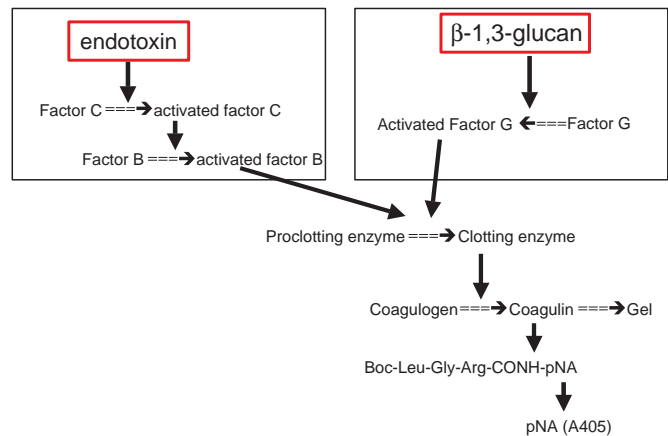


Fig. 1 Limulus coagulation cascades for endotoxin and β -1,3-glucan

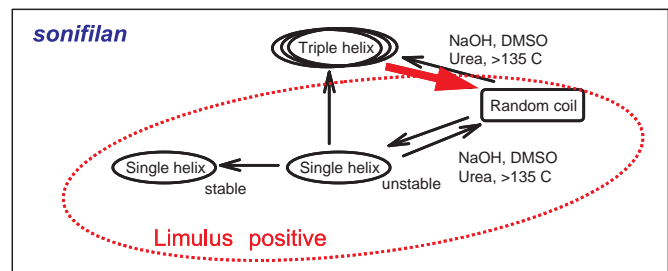


Fig. 2 Conformational changes of β -1,3-glucan and limulus reactivity

は検査値としては非常に重要な意味を持つが、基礎研究を行うものとしては、真の血中濃度を見ているわけではないことは忘れてはならない⁸⁾。それでは真の血中濃度はいくつなのか。これは非常に難題である。血液は高濃度のたんぱく質、糖たんぱく質、脂質などで満たされているので、微量の異常成分を検知することはできても、単離することは至難の業である。特に患者さんの体液中に微量に存在するのであるから、良いモデルを用いて解析する以外に方法は考えにくい。我々は、*Candida albicans* を完全合成培地で培養し、そのとき菌体から放出された可溶性の画分を調整し、リムルテストに反応するか否かを検討したところ、確かに反応性を示すことを確認した⁹⁾。大変興味あることに、この画分は単なる BG ではなく、mannoprotein との複合体が主な成分であった。さらに分析を進めてみたところ、菌体の代謝物であるから、案の定、分子量分布は広く単一物質とはいえないものであった。この画分を CAWS と命名し、種々の生物活性を評価したところ、急性致死作用、血管炎惹起作用など多彩な活性を有することがわかってきた¹⁰⁻¹³⁾。それでは、これが血中に存在する本体とってよいのだろうか？ そう単純でもないのではないかと、結論は先送りせざるを得ない状況にある。

次に前述したBG測定法の応用についてであるが、臨床検体以外にもリムルステストが適用可能ではないかと考えたい。BGは健康産業全般に渡って非常に興味ある活性を有するので、簡便な方法でこれを定量したいというのは当然のニーズである。ここで、着目しなくてはならないのは、標準物質についてであり、また個々のBGの構造と相対活性についてである。BGは分岐を有するものが多い。医薬品として用いられるソニフィランでは主鎖3残基ごとに分岐がある。一方、食品添加物として利用されるカードランは分岐を持たない。両者ともに精製度の高い標品が存在するので、両者の相対活性を比較してみると、100倍以上は異なっていた。Fig. 3にはSPGとCSBGとの比活性の対比を示したが、この場合も同様であった(Fig. 3)。世のニーズは、食品など種々の成分が混在するなかでのBGの含量を測定したいのであるから、構造が異なると相対活性が異なるとすれば、何を測っているのか

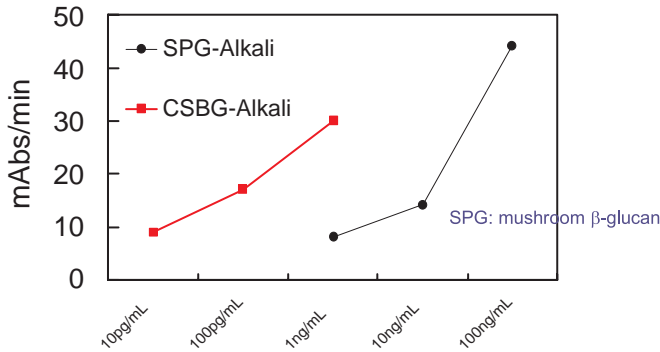


Fig. 3 Relative activity of limulus factor G activation by SPG and CSBG Fungitec G test MK was used for measurement.

わからなくなるというのが実感である。また、前述した螺旋構造も活性に著しい影響を与えることも重要な因子である。適切な前処理方法を選択しないと、活性本体の分解が起きたり、逆に活性の阻害が起こったりする。このような観点からもより良い方法の発見が切望される。

3. 免疫機能強化とBG

超高齢化社会に伴って、健康に対する一般市民の関心は非常に高まってきた。不老不死はあり得ないことではあっても、少しでも健康でいたいと願うのは当然の願望である。このことは“免疫力向上”と切り離しては考えられない。いわゆる、健康食品、サプリメント、特定保健用食品などが医薬品市場に匹敵する規模を示すのはこのためである。BGはこの代表格のひとつである。20年以上も前にクレスチンが経口の抗腫瘍剤として上市され、レンチナン(LNT)やソニフィラン(SPG)が注射剤として上市された。いずれも高等微生物の産物であり、宿主の免疫機能を賦活化することにより、腫瘍免疫を改善し、延命、治癒を目指す薬剤である。クレスチンは化学的には粗製だが、経口投与であることは重要な特徴である。医薬品とするために厳しい臨床試験が行われた成果である。一方で、粗製であることは思わぬ誤解を生む原因にもなってしまう。極端な話、「精製したBGは何でも、どんな量でも経口投与されればどんな癌にも効く？」と手放しで思い込む、あるいは思い込まれることである。前述のごとく、粗製のクレスチンは経口だが、精製BGであるLNTやSPGは注射である。また、添付文書には放射線療法や化学療法との併用が記されており、医薬品としては種々の条件を課しているのである。現在でも、細胞免疫療法、腫瘍ワクチン、遺伝子導入などさまざまな新規治療法が開発されているのは、現在の治療法に決して満足できないか

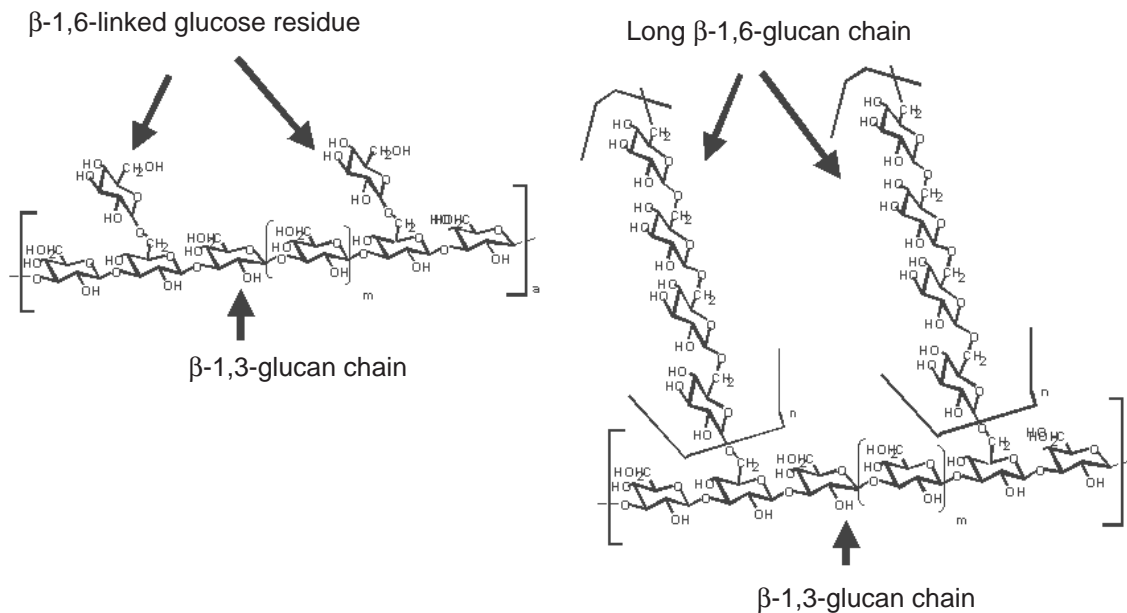


Fig. 4 Schematic representation of fungal β -1,3-glucans
 Left: present mainly in edible mushrooms, such as *Grifola frondosa*, *Sparassis crispa*, *Lentinus edodes*
 right: present mainly in yeast and fungi, such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Agaricus blazei*

らである。BGの魅力と可能性もその中に含まれるものであり、結論の出ていることは多数存在する。とにかく積極的に取り組み、事実を着実に積み重ねる以外には方法は無い。我々はこの点に少しでも貢献できればありがたいと願っている。以下にBGに関する基礎的成果の一部を紹介する。

4. β グルカンの構造と物性

我々が主に解析してきたBGは、*Grifola frondosa* (マイタケ)、*Sclerotinia sclerotiorum* (菌核菌)、*Sparassis crispa* (ハナビラタケ)、*Agaricus brasiliensis* (アガリクス)、*Candida albicans* (カンジダ)、*Aspergillus fumigatus* (アスペルギルス)などから種々の方法で調製したものである。いずれも真核微生物に属するが、食用、薬用のみならず病原性真菌も含む。

4 - 1 . 食用・薬用茸のBG: 最も初期に解析を始めたマイタケについては、子実体、菌蓋(子実体の根元の部分) 菌糸体の発酵によって菌体外に放出された画分について検討した。前二者については熱水抽出、冷アルカリ抽出、熱アルカリ抽出を順次行い多糖画分を得て精製した。基本構造の類似した6分岐 β -1,3-グルカンが得られ、グリフォラン(Grifolan, GRN)と命名した^{14,15)}。精製の簡便さから、現在では発酵法によって得られたものを主に用いている。分岐点には単糖の β グルコース1残基が結合しており、この基本構造はLNT、SPGとも類似している。この基本構造のBGはハナビラタケ、菌核菌、雷丸、ブナシメジ、オオチャワンタケからも得られた。ただし分岐の頻度は菌ごとに差があり、雷丸由来のOL-2が最も高頻度であり(主鎖3残基あたり2分岐点)、オオチャワンタケ由来PVGでは分岐は5残基に1残基程度であった(Fig. 4)。一方、アガリクスの主要BGは β -1,6-鎖を多く含み、少量の β -1,3-鎖を含んでいた。この結合は酵素分解に抵抗したことから、高分岐であると推定している。食用・薬用茸の子実体は個々に特徴的な形態を有している。この形態形成には骨格物質の代表としてBGが関与していると思われる。微細構造は個々の茸で異なると予測され、今後、丹念な解析が求められる。

4 - 2 . *Candida albicans*のBG: パン酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)から調整されたZymosanは古くから汎用される試薬であり、炎症、免疫研究に汎用されてきた。我々も多用してきた。これを用いることで実に多くのパラメータが明らかにされてきた。酵母の主要細胞壁成分がBGであることから、何となくZymosanの活性はBGの受容体を介しておきる、あるいはBGが補体系を活性化しておきるとイメージされてきた。さらに80年代にはZymosan由来の精製BGとしてZymocelが上市され、Zymosanは粗製であっても、活性はBGが担っているとの思いがますます強くなってきた。90年代後半になってToll-like-receptor (TLR)など自然免疫の解析が急速に進展する中、Zymosanの受容体も一流紙をにぎわすこととなった^{16,17)}。当然の流れである。しかし、これは大きな落とし穴だったのではないと思われる。そもそもZymosanの開発者は補体活性化能を指標として作成したのであって、BG研究とは直接はかかわりの無いことである。Zymosanはエンドトキシンフリーで調整されたわけでもない。多くの試薬がready-to-useで市販されているので、これもそのつもりで、菌体の洗浄無しで使用すれば、粒子状のはずのZymosanが

ら可溶性の活性成分が得られることになる。時代の流れとして、受け入れざるを得ない惨状である。前置きはさておき、BGには可溶性のものと不溶性(粒子状)のものがある。両者の生物活性は著しく異なる。端的な例はマクロファージからの活性酸素産生である。粒子はこの活性を示すが、可溶性のものは示さない(または弱い)。他にも種々の活性についてこのようなことが起きている。しかし、これらの考えは、実は一次構造が異なる物質を用いて導き出されたものである。同一の一次構造であって、可溶性と粒子状と比較はできないものか、との発想に至った。種々の試行錯誤の末に、次亜塩素酸酸化をすると、都合の良いものが得られることがわかった^{18,19)}。次亜塩素酸は強力な酸化剤であって、たんぱく質、脂質、核酸など、ありとあらゆるものを酸化分解してくれた。幸いにして、このような処理に対してもBGは比較的抵抗性を示した。結果的にこの方法を応用することで、粒子状のBGが得られ、これをアルカリやDMSOに溶解すると可溶性のBGが得られた(次亜塩素酸-DMSO法と称する)(Fig. 5)。すなわち、この方法を用いることで、「一次構造は同一であって、可溶性(CSBG)と粒子状(OX-CS)のBGを調整できた」のである。この方法は古典的な手技ではあるが、汎用性は高く、我々はパン酵母、*Candida*、*Aspergillus*に適用した^{20,21)}。この方法を用いることで免疫系の刺激作用に対して、高次構造、立体構造がどのように影響を及ぼすのか、種々の解析をする方法を作り上げることができた。この方法で*Candida*から作成したCSBGは長い β -1,3-鎖に重合度10~50程度の β -1,6-鎖が結合し、更にこの β -1,6-鎖が少量の分岐を持つ構造であった。これは、酵母細胞壁の生合成ルートとも矛盾しない構造と思われる。また、*Candida*は二形性を示し、菌糸状にも生育する。菌糸状の*Candida*からもBGを調製したところ、基本構造は類似していた²²⁾。しかし、ここで最も特徴的であったのは、収量である。そもそも菌糸形の細胞壁は含量が低く、結果的にBGの量もかなり少ないものであった。

BGはいずれも高分子量であり、ゲル濾過分析では100万前後の分子量を示すが、分布もかなり広い。これは抽出過程でアルカリ処理等を行い、部分的に鎖の切断が起きていることにも起因しているであろう。CSBGは一端アルカリに溶解すると、中和後も水溶性である。*Candida*細胞壁は β -1,3-並びに β -1,6-グルカンから構成されており、細胞壁の物理的強度を与えるため、構成多糖

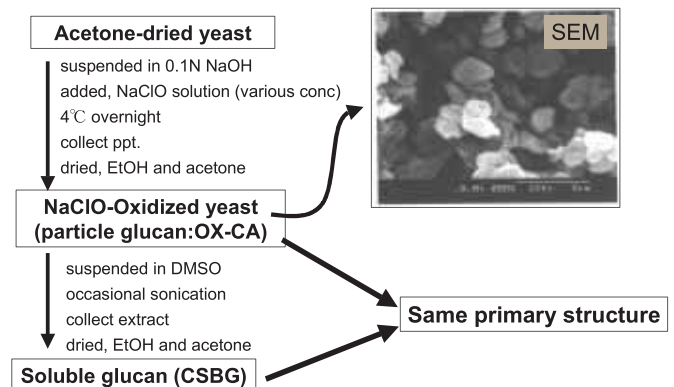


Fig. 5 Preparation of OX-CA and CSBG from *Candida albicans*

は水不溶である。CSBGは可溶性BGを得るために、ジ亜塩素酸酸化というかなり激しい処理を加え、部分的に細胞壁を切断して、可溶化しえたものである。このことから、本来は巨大で不溶性であったものを部分分解して、可溶化したといえる。SPGは製造過程で超音波処理を行うことで棒状三重螺旋体を導き、分子量をそろえて医薬品として用いている。このような処置を行わない限り、分子量分布はかなり広いと考えるべきであろう。

4 - 3 . *Aspergillus* の BG : *Candida* 症と *Aspergillus* 症は代表的な深在性真菌症であることから、両者を多角的に比較することは重要である。そこで、*Aspergillus* の細胞壁BGについて解析するために、上述の次亜塩素酸 - DMSO法を適用した²⁰⁾。DMSOに可溶性の細胞壁画分は調整できたが、これは多量の α グルカン含有していた。真菌細胞壁の多様性を端的に現した例である。この酸化体からいかにしてBGを精製するか、種々検討した結果、尿素処理で比較的効果的に α と β グルカンが分離できることがわかった。この方法を用いて、*Aspergillus* の細胞壁BG(ASBG)を調製することにした。真菌症の早期診断に利用されるリムルテストにおける、*Candida*由来のBGと*Aspergillus*由来のBGの比活性の比較は重要である。我々が調製したCSBGとASBGを用いて比較検討した結果、両BGの相対活性はほぼ同様であり、この点においてリムルテストに問題は無いことがわかった。一方、種々の*Aspergillus*属菌種を比較してわかってきたことであるが、細胞壁の α 、 β グルカンの比率はかなり異なるようである(Fig. 6)。この点についても詳細な解析が求められる。

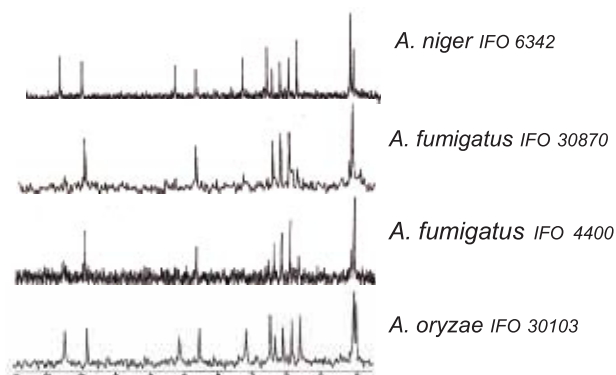


Fig. 6 Carbon-13 NMR spectra of α and β -1,3-glucan of *Aspergillus* species. Mycelia of *Aspergillus* species were oxidized with NaClO and the resistant part were dissolved in DMSO-d6 and measured carbon-13 NMR spectra.

4 - 4 . *Schizosaccharomyces pombe* の BG : 日本女子大、大隈正子先生のグループとの共同で実施した^{23,24)}。この菌の細胞壁には α -1,3-グルカン、 β -1,3-グルカン、 β -1,6-グルカンが含まれることが知られているが、微細構造について不明な点があった。段階的抽出の後、部分酵素分解や二次元NMRなどを応用し、高分岐 β -1,6-グルカンの存在を明らかにした(Fig. 7)。*Candida*においても比較的長鎖の β -1,6-グルカン鎖があることがわかっているが、*S. pombe*の場合、これが高度の分岐した構造になっているものと思われる。

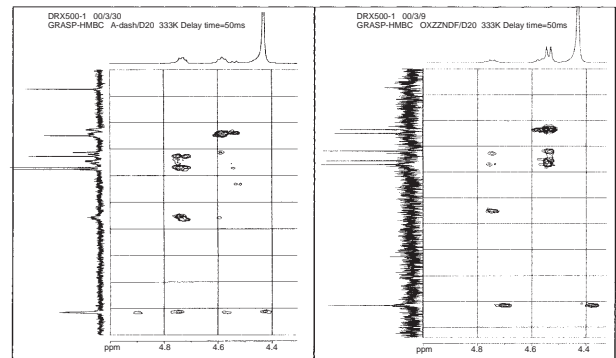


Fig. 7 GRASP-HMBC spectra of β -1,6-glucan segments of *S. pombe* (left) and *C. albicans* (right). Cross peaks at 87/4.73 ppm strongly suggested highly branched structure in *S. pombe*.

4 - 5 . β グルカンの高次構造 : BGの中性水溶液はゲルを形成する。キノコの濃厚な抽出液を長期保存すると寒天状になることがある。これは分子間相互作用の証であり、X線解析などの結果から、三重螺旋構造が示唆されている。しかし、天然に存在するBGが全て三重螺旋で存在しているわけではなく、一部は水分子と配位して一重螺旋を形成したり、ランダムコイル状態で存在している。これらの高次構造は生物活性に著しい影響を与える。我々はリムルテストを用いてこの点を詳細に解析し、一重螺旋ならびにランダムコイル構造のときに活性を示すことを明らかにしている。高次構造依存性は、免疫担当細胞を用いた解析でも認められており、BGの活性評価においては高次構造の制御が必要である。この点は後述する。

高次構造について更に詳細に検討するためには、顕微鏡を用いた画像解析が必須である。BG鎖が細胞壁でどのように配向し進展しているか、細胞壁の部位によって特定のBGが局在するか、など免疫化学的手法をもちいた画像解析、電子顕微鏡の解析など、形態的解析に興味もたれる。

4 - 6 . β グルカン生合成の分子生物学 : ゲノム解析が種々の微生物で進む中、真核微生物についても、*Saccharomyces cerevisiae*を筆頭に*Candida albicans*、*Aspergillus fumigatus*など代表的な病原性真菌の解析が進んでいる²⁵⁻²⁸⁾。細胞壁BGの生合成研究は80年代初頭にはかなり詳細に解析が始まっている。Cabibらは、BGはUDP-Glcを出発物質として細胞膜の内側で合成され、合成の進展と共に徐々に細胞膜を通過して細胞壁に運搬されることを提唱した。また、この反応には触媒部位を持つFkspと、小型のGTPase活性を有する調節因子としてのRho1pが関与することが知られている。FKSと類縁の遺伝子は、*Candida*、*Cryptococcus*、*Paracoccidioides*、*Pneumocystis*、*Aspergillus*、*Coccidioides*などから広範に見出されている。このように、BG生合成は比較的類似した基本的仕組みを利用しているのであろう。しかし、上述のごとく、構造面からは、非常に多岐にわたる多様性が形成されていることは事実であり、今後、詳細な解析が待たれる。最近、真菌症治療薬として、BG合成酵素阻害活性を有するキャンディン系抗真菌薬が上市された²⁸⁾。新たな角度からの興味も膨らみ、この分野の研究も益々加速されるものと思われる。

Table 1 Comparison of antitumor activity of several β-glucans to transplantable tumors in mice.

β-glucan	tumor	route	dose x times	inhibition (%)
CRD (0/3)	S-180	i.p.	100 x 5	26
SPG (1/3)	S-180	i.p.	100 x 5 500 x 5	74 97
GRN (1/3)	S-180	i.p.	100 x 5	> 99
		i.v.	100 x 5	> 99
		i.l.	100 x 5	94
	Meth A	p.o.	200 x 5	15
		i.p.	100 x 5	85
		i.v.	100 x 5	45
		i.l.	100 x 5	97
	MM 46	i.p.	100 x 5	44
		IMC	i.p.	75 x 10
	SSG (1/2)	S-180	i.p.	100 x 5
Meth A			i.p.	200 x 5
Meth A		i.v.	250 x 10	89
		i.l.	100 x 5	81
IMC		p.o.	2000 x 5	63
		i.p.	250 x 10	90
OL-2 (2/3)	S-180	i.p.	100 x 5	29
			500 x 5	62
		i.l.	100 x 5	73

(括弧内は分岐度)

5. 免疫薬理作用と構造活性相関

BGは当初「抗腫瘍多糖」として注目された。それに関連したさまざまな評価系で検討されてきているが、我々が最初に得た、最も興味深い成績は分岐度と活性の関連である(Table 1)^{1,2)}。すなわち、Sarcoma180固形腫瘍に対する *in vivo*での抗腫瘍効果は、高分岐のOL-2(分岐度2/3)では著しく弱く、中等度の分岐頻度があると活性が強くなり、また、分岐が無いと活性は弱いのである。どうも適度な分岐度が必要とされているらしい。しかし、OL-2は化学療法剤との併用で効果を発揮し、白血球減少症からの回復も促進した。活性のベクトルが他のBGとは若干異なるが、活性が無いということではないらしい。この特徴については更にサイトカインmRNA発現のパターンにおいても異なっていることを報告している。CRDについても、カルボキシメチル基やヒドロキシエチル基を導入したり、酸化したりすると活性を發揮した。この過程で、適度に置換基を導入するとゾル化したがるが、それでも活性を示した。活性発現への三重螺旋構造の必要性が示唆されてきたが、ここで得られた結果は、この考えに合致しなかった。一方、SPGでは活性発現への至適濃度が高次構造を変えると著しく異なるとの報告がされている。抗腫瘍活性に三重螺旋構造が重要であることは半ば定説になっている。しかし、ここに示した結果は定説では解釈できない部分を含むものである。我々は、実験動物での *in vivo*、*in vitro*解析ならびに、ヒト末梢白血球や細胞株を用いて高次構造の影響を検討してきた。この過程で、マクロファージのNO産生、インターロイキン-8産生など、さまざまな活性が高次構造依存性を示すことが明らかとなっている。

さらに、前述したように、*Candida*の細胞壁BGを調製する過程でシ亜塩素酸-DMSO法を開発し、これを用いることで、同一

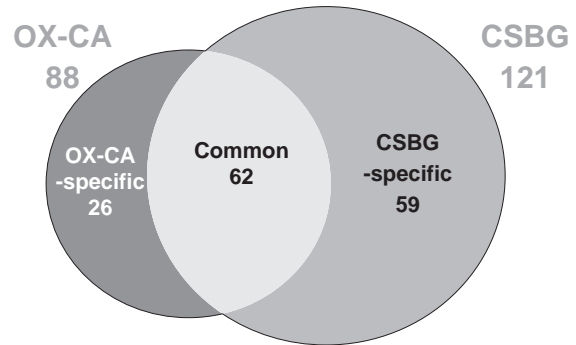


Fig. 8 Influence of solubility on gene expression in human PBMC stimulated with OX-CA or CSBG

Table 2 Characteristic genes of *Candida* BG-induced in human PBMC assessed by cDNA array

Gene/Protein name	OX-CA	CSBG	Gene/Protein name	OX-CA	CSBG
IL-8	++	++	CC chemokine R1	+	+
MIP-1 α	+++	+	G-protein-coupledR	+	-
			HM74		
MIP-1 β	++	-	C5aR	-	+
MIP-2 α	++	++	IL-1R1	-	+
MCP-1	-	+			
GCP-2	-	+	Integrin α 7B	+	+
			Integrin β 3	+	+
TNF-α	+++	+	α1 catenin	+	+
IL-1 α	+	+	Integrin α 5	+	-
IL-1 β	+	+	ICAM-1	+	+/-
			Integrin β 1	-	+
IL-10	+	+	CD11c	-	+
TGF-β	+	+			

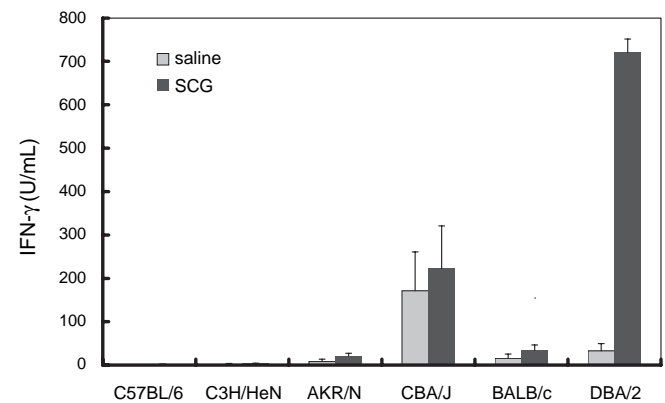


Fig. 9 Interferon-γ production of spleen cells stimulated *in vitro* with BG. SCG: BG from *Sparassis crispa*

一次構造を有する、粒子状(OX-CA)と可溶性(CS BG)のBGを作成することができた。これらの活性を比較検討したところ、活性発現への補体依存性の違いが認められた。さらに、DNAマイクロアレイ法を用いてヒト末梢血単核球刺激における発現遺伝子を比較したところ、単に強弱があるというより、可溶性と粒子状では活性化が質的に異なることが明らかとなった(Fig. 8, Table 2)^{21,29,30)}。

活性評価に関しては評価系そのものにも興味深い点がある。たとえば種差や系統差に関するものである。リウマチモデルとして知られる型コラーゲン誘発関節炎はDBA/1系統にほぼ限局して発現する。BGの抗体産生に対するアジュバント活性も系統によって著しい差がある。単に強弱ではなく、産生される抗体のクラスの違いを生じさせる。さらに、脾臓細胞の*in vitro*培養系でのBGによるサイトカイン産生作用はDBA/2で著しく強い (Fig. 9)。この反応のキーはGM-CSF産生にあることが最近明らかになった^{31,32}。ヒトにおいても個体差は著しく認められる。我々はハナビラタケ由来のSCGを何人かのボランティアの白血球に添加してサイトカイン産生を測定したが、産生量には著しい差が認められた³³。このように、活性評価にあたっては、構造側の要因のみならず、宿主側についての情報も整理する必要がある。

以上のように *in vivo*、*in vitro* で生物活性を比較してみると、個々の活性ごと、由来する菌ごとに強度が実にさまざまであった。いずれも同レベルの純度を確保して解析しているため、BGの構造と活性を一般論として論じることの難しさを実感している。*In vivo*においては、吸収、分布、代謝・排泄系、組織適合性抗原などさまざまな要素の総和としての活性を評価している。個々の活性評価系にかかわる全ての要素が分子レベルで解析されているわけではないので、今後さらに評価系を整理して議論する必要がある。

6. β グルカンの粘膜免疫賦活作用

茸産業を中心にBGの経口投与での有用作用に期待が集まっている。厳密に考えるならば、茸にはBG以外の様々な有効成分が含まれているので、評価するにあたっては、精製BGでの効果を評価する必要がある。当然の理屈のように見えるが、現実にはいくつもの壁があるのも事実である。その一つは、有用作用とは何を示すのか。二つ目は繰り返し構造を有するBGのなかで、機能を発揮するBGの構造を完全に特定しうるか。そして第三には、抽出効率が上げられる。更に上述のごとく、BGの物性はかなり複雑であるので、低分子性化合物を扱う以上に問題は膨らむ。

我々は86年に、子囊菌の1株、*Sclerotinia sclerotiorum* IFO9395株の培養外液から高分岐のBG、SSGを単離し報告した^{34,35}。SSGの解析の過程で、これが経口投与でも抗腫瘍活性を発揮することを見出した。そこで、90年代中ごろにかけてSSG経口投与の免疫系に与える影響を体系的に検討したところ、複数の同種同系固形菌に効果を有すること、転移抑制効果を示すこと、脾臓細胞のConA並びにLPSに対する応答性が上昇すること、NK活性が上昇すること、腹腔並びに肺マクロファージ活性化作用(酸性ホスファターゼ、貪食、殺菌、過酸化水素、IL-1)を示すこと、IgA産生増強作用を示すことなどの作用を見出した。更に、これらの作用にはバイエル板機能の上昇が関与していることを明らかにした。一見、これらの作用は腹腔内並びに静脈内投与で認められた効果と類似しているが、至適投与量は腹腔内投与よりは一桁以上必要であり、経口と非経口での薬効発現のメカニズムにはかなり異なる部分があると思われる。また、ハナビラタケ由来のSCGでは白血球減少症モデルにおいて、経口投与によって造血促進効果を示すことを明らかにしている。この一連の研究によって、

Table 3 Recovery of orally administered BG in mice

	% recovery
Blood	0.04
Liver	0.25
Kidney	0.07
Heart	n.d.
Spleen	n.d.
Stomach	0.94
Intestine	0.25
Lung	n.d.
Feces	98.42
Excrement	n.d.

2mg 3H-SSG po, organs were prepared 24h later

BGは経口投与によっても、有用作用を示しうることを明確に提示できた。さらに、経口投与したSSGは検出可能なレベルでは吸収されなかった (Table 3)。すなわち、BGは吸収されて活性を発現しているとは考えにくいのである。消化管粘膜に存在する免疫担当細胞の活性化を介した作用であると推定できるが、詳細に関しては、今後さらに解析が必要である。

7. β グルカンの代謝

BGは正常な状態では体内に吸収されるとは考えにくいものであるため、代謝や蓄積に関する知見は少ない。これらを考慮しなければならぬ状況があるとすれば、深在性真菌症で体内に多量の真菌が増殖した場合、あるいは、抗腫瘍剤として知られるLNT、SPGが投与された場合であろう。さらに、付記するならば、種々の医薬品、医療用具などがどの程度、BGに汚染されているかは詳細には解析されていない。そもそも、エンドトキシンのように毒

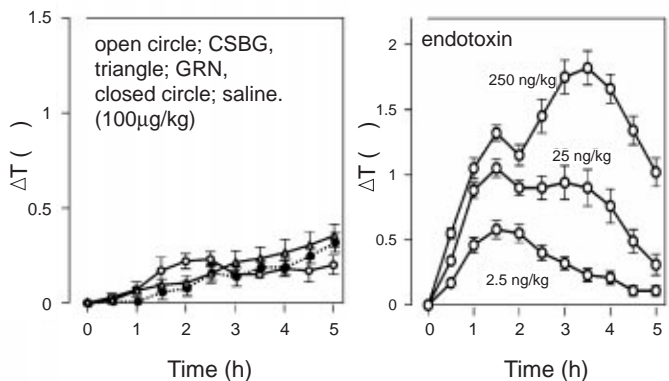


Fig. 10 Pyrogenicity of β-glucan in rabbits
Endotoxin and β-glucan were intravenously administered to rabbits. Temperature were monitored kinetically. Endotoxin content of tested BG were as follows: CSBG:<70 pg LPS/mg, GRN :<50 pg LPS/mg
Experiments were done with collaboration with Dr. Murai and Dr. Y. Nakagawa in National Institute for Health Sciences

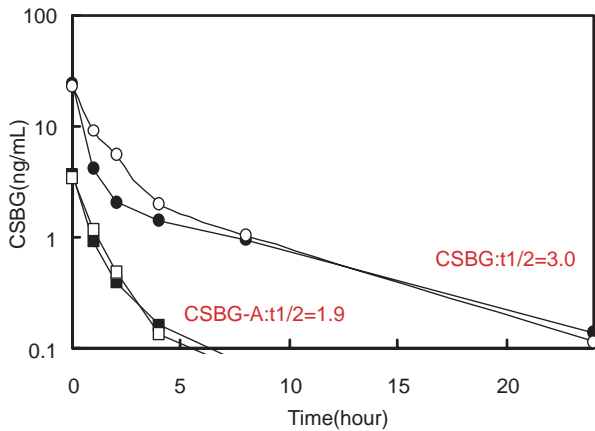


Fig. 11 Blood clearance of CSBG in mice. CSBG was administered intravenously and blood was sampled repeatedly from tail vein. CSBG: triple helix form, CSBG-A: single helix form. Concentration of BG in the blood was measured by Fungitec G test MK after alkaline pretreatment.

性が明確であれば、あらゆる製品に対して測定の義務と汚染の無いことの証明が必要であるが、BGの毒性は限局されており、一般的にはそれがクローズアップされることはない(Fig. 10)。このような状況であるから、BGの体内蓄積と代謝に関する知見は少ないことになる。

我々は、BGの作用機構の解析を行なう過程で、いくつかの観点からこの点を解析した。ひとつは血中からの消失に関することであり、他方は消失したBGの蓄積に関することである。前者は主に、リムルステストを用いて実施した。用いたBGによって、半減期は著しく異なり、SPGでは6時間程度となり、ほとんど血中から消えないのではないと思われるほどであった^{36,37)}。一方、CSBGでは比較的速やかに消失した。また、この速度には高次構造依存性があり、三重螺旋体は一重螺旋体よりも半減期が長い傾向を示した(Fig. 11)。

体内の蓄積については、リムルス試薬を用いて検出する方法ならびにアイソトープで代謝ラベルしたBGを調整し、それをマウスに投与して、体内動態を調べた³⁸⁻⁴⁰⁾。その結果、マウスに注射されたBGはきわめて長く、ほとんど分解されることなく、主に肝臓と脾臓に蓄積することがわかった。きわめて長くとは、半年、一年といった単位であり、マウスの生存期間を通じてということになる。

経口投与されたものはほとんど吸収されないのではないかと上記したが、仮に大量に体内に吸収されたとすれば、それは一生代謝されずに体内に蓄積するリスクを背負うのではないだろうか。結論を示すことはできないが、経口投与されたものの吸収・蓄積・代謝・排泄に関する詳細な解析は必須のものと思われる。

8. βグルカンの認識機構に関する進歩

21世紀に入り、ヒトゲノム解析が完了したことに伴い、分子生物学的な解析は急速に進展した。これはBGの分野についても同様である。自然免疫にはToll-like-receptor (TLR)が中心的な役割を果たすことが明らかとなり、これらの分子に対するさまざまな

リガンド分子が同定された。BGについてもTLRの関与は否定できないが、BG特異的受容体の解析も進んでいる。80年代後半より補体受容体であるCR3が受容体のひとつであるとの報告がRoss博士らによって体系的に報告された。我々も組換え型のCR3、CR4を作成し、培養細胞上に人為的に発現させると、細胞への結合が著しく増加することを確認した。また、90年代末には、新たな受容体としてDectin-1が注目され始めた⁴¹⁾。我々は本受容体に対する組換え体も作成し、BGが結合することを明らかにした⁴²⁾。これらの受容体を介した情報伝達機構の解析は世界的に注目を集めている領域であり、近い将来、活性化機構の詳細が明らかになるのではないと思われる。

9. βグルカンに対する特異抗体

BGに対する抗体産生に関する解析も進んできた。これまでBGの抗原性は低く、抗体産生は起きにくいと考えられてきた。確かに、医療用のSPGに対する抗体産生は起きにくいことは事実であり、同様にマイタケから得たGRNに対する単クローン抗体を作成しようと試みたが、なかなかできなかった。しかし、マウスに酵母菌体を投与すると、抗BG抗体が産生された。これらの事実から、抗体産生が起き難いのはSPGタイプの多糖であり、全てのBGが抗体産生を起こしにくいわけではないことが強く示唆された。そこで実際に、ヒトグロブリン製剤を用いてCandida由来のCSBGに対する抗体価を測定したところ、IgGクラスの抗体の存在することが明らかとなった⁴³⁾。さらに、特異性は主に側鎖部分に対するものであった。そこで、健康人ボランティアで測定したところ、全てのヒトで抗体の存在が確認された。さらに、癌患者さん、自己免疫疾患の患者さん、真菌症の患者さんなどを対象に血中の抗CSBG抗体価を測定したところ、疾患によって変動が見られた(Fig. 12,13,14)^{44,45)}。同様の抗体は豚、牛でも認められた。

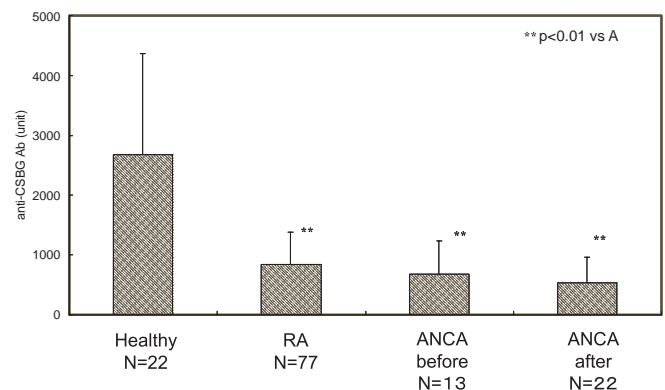


Fig. 12 Anti-BG antibody titer of rheumatoid arthritis and ANCA-associated vasculitis patients

ELISA plate was coated with CSBG (25 μg/mL was used to coat plate). The sera of patients or healthy donors was added to the plate, and the plate-bound Ig was determined with peroxidase-conjugated anti Human IgG+IgM. Enzyme activity was measured by the addition of TMB substrate. In collaboration with Dr. M. Yoshida in Tokyo Medical University Hachioji Medical Center.

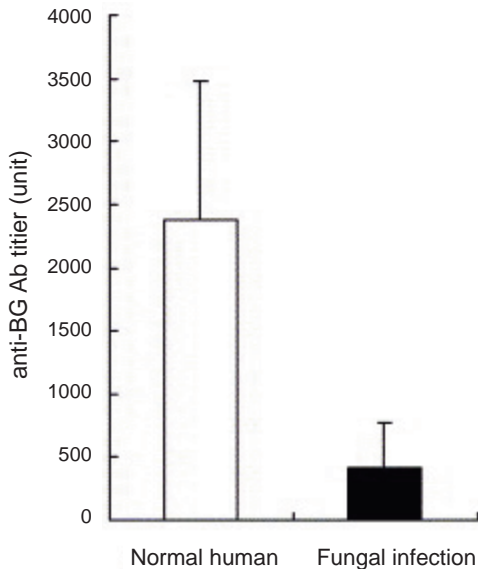


Fig. 13 Comparison of anti-BG antibody titer in patients with fungal infection and healthy volunteers. ELISA plate was coated with CSBG (25 μ g/ml). The plate-bound immunoglobulin was determined using peroxidase-conjugated anti-human IgG + M + A antibody. In collaboration with Dr. M. Yoshida in Tokyo Medical University Hachioji Medical Center.

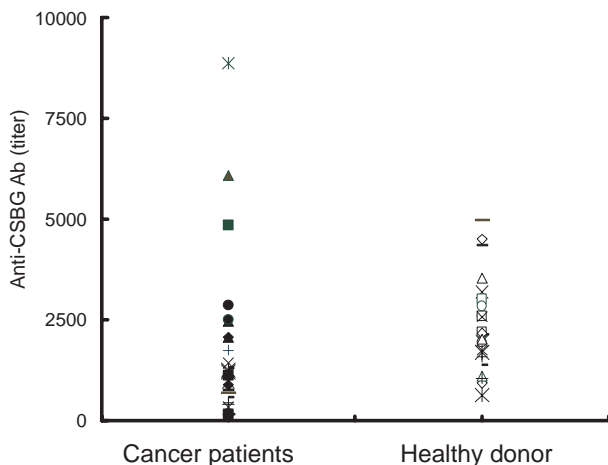


Fig. 14 Anti-BG antibody titer of cancer patients

ELISA plate was coated with CSBG (25 μ g/mL was used to coat plate). The sera of cancer patients (N=26) or healthy donor (N=24) was added to the plate, and the plate-bound Ig was determined with peroxidase-conjugated anti Human IgG+IgM. Enzyme activity was measured by the addition of TMB substrate. In collaboration with Dr. O. Mizukami in Tokyo Adventist Hospital.

また、マウスにおいては特定の系統においてのみ BG に対する抗体が認められた。これらのことから、ヒトや動物は食物や環境中の BG に対して自然感作され、自然免疫のみならず獲得免疫も動員して応答していることが明らかになってきた。

この抗体の機能についてさらに検討するために、マウスに BG を投与し、血中の抗体価の変動をしらべたところ、BG 投与によって、確かに、一過性に抗 BG 抗体の力価は低下した。このことは、抗 BG 抗体は真菌感染など、体内に侵入した BG に対し、防御因子として働くことを示唆している。自然免疫に関する興味が高まりつつあるが、抗体・補体・血小板を介した免疫系の活性化も BG による免疫活性化機構を論じるうえで重要なものである。抗 BG 抗体については、存在が明らかになったというのが現状であり、研究は著についたばかりである。深在性真菌症が増加する傾向にあり、一方では真菌系の機能性食品も汎用されている。身の回りには、多様な真核微生物、微生物産物が共存している。抗 BG 抗体の測定は、真菌症や食品の機能性を評価するうえで重要な項目になるものと期待される。今後詳細な解析が必要である。

10. まとめ

BG の構造と生物活性について、我々の得た結果を中心に概説した。BG は多彩な構造と生物活性を示すことがわかってきたが、「共通した活性」としては特定できないほど多様に富んでいた。BG の有効利用という観点からどの活性が指標となるかを決定すべきであろうが、「Broad spectrum」であることが BG の特徴でもあるので、それは今後の研究の発展に期待したい。また、BG は環境中に多量に存在しており、ヒトや動物は自然免疫で BG に対応するばかりでなく、獲得免疫を動員して BG を認識していることがわかった。これは従来まで考えられてきた BG の作用機構を更に拡張し、修正して構築することが必要であることを示唆している。

BG は茸に多量に含まれている。茸並びに菌糸培養品はいわゆる健康食品として健康の維持と向上に貢献している。しかし、例えば癌などの特定の疾患を対象として、臨床上統計学的に有意な差をもって有効であるとする医薬品の領域に達するには、これまで以上の努力が必要であることは間違いのないことであろう。今後は多施設共同研究といった大型プロジェクトで早期解決を期待したい。

BG に対する逆風ともとれる報道が時々見受けられる。多くの医薬品で検証されていることであるが、副作用や有害作用は回避できないことである。適正使用こそが求められるのである。有害作用のために販売が中止となる医薬品もあるが、例外的と捕らえるべきであろう。少なくとも BG に関する限り、古くより用いられてきた背景があるのであるから、有効性が勝っていることに違いはないはずである。多少の逆風に対しては、個々に風化させることなく、正確に解析をし、将来のための事実として蓄積することが重要である。これらの逆風を単に忘れ去ることは望ましいこととは思われない。グローバル化されるマーケットを意識するのであれば、当然これらの経験を蓄積し、財産とすべきであろう。

BG は古くて新しい素材である。免疫調節を考えると、近年登場した、サイトカイン、遺伝子治療、癌ワクチンなどを用いることで、BG の持つ多彩な効果が代替できるのだろうか。共存することこそ必要なのではないだろうか。BG は樹状細胞を強力に活性化させる。樹状細胞は免疫系の制御に欠かせない細胞のひとつである。最近明らかになってきた受容体や樹状細胞といった分野から BG の応用範囲もさらに広がっていくであろう。

参考文献

- 1) 宿前利郎, 真菌β1, 3 - グルカンの構造と活性, 薬学雑誌, **120**,413 (2000).
- 2) 宿前利郎, β グルカンの魅力, 東洋医学舎, 2000.
- 3) 大野尚仁, β グルカンの生体防御修飾作用, 日本細菌学雑誌, **55**,527 (2000).
- 4) 大野尚仁, 微生物菌体成分による免疫機能調節, 食品機能素材, **24** (2001).
- 5) T. Obayashi, M. Yoshida, T. Mori, H. Goto, A. Yasuoka, H. Iwasaki, H. Teshima, S. Kohno, A. Horiuchi, A. Ito, *et al.*, *Lancet*, **7**, 17 (1995).
- 6) H. Tamura, S. Tanaka, T. Obayashi, M. Yoshida, T. Kawai. *Clin Chim Acta*, **15**, 35 (1991).
- 7) T. Miyazaki, S. Kohno, H. Koga, M. Kaku, K. Mitsutake, S. Maesaki, A. Yasuoka, K. Hara, S. Tanaka, H. Tamura, *J. Clin. Lab. Anal.*, **6** 315 (1992).
- 8) 大林民典, 吉田稔, 山田俊幸, 河合忠, 玉熊正悦, 小玉正智, 直江史郎, 山口英世, 医療と検査機器・試薬, **25**, 291 (2002).
- 9) K. Kurihara, NN. Miura, M. Uchiyama, N. Ohno, Y. Adachi, M. Aizawa, H. Tamura, S. Tanaka, T. Yadomae, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **29**, 69 (2000).
- 10) K. Kurihara, Y. Shingo, NN. Miura, S. Horie, Y. Usui, Y. Adachi, T. Yadomae, N. Ohno, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 233 (2003).
- 11) N. Nagi-Miura, Y. Shingo, Y. Adachi, A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, S. Naoe, K. Suzuki, N. Ohno, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **26**,527 (2004).
- 12) N. Ohno, *J. Infect. Dis.*, **57**, S9 (2004).
- 13) N. Ohno, *Microbiol. Immunol.*, **47**,479 (2003).
- 14) K. Iino, N. Ohno, I. Suzuki, K. Sato, S. Oikawa, T. Yadomae, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4950 (1985).
- 15) N. Ohno, Y. Adachi, I. Suzuki, S. Oikawa, K. Sato, M. Ohsawa, T. Yadomae, *J. Pharmacobiodyn.*, **9**, 861 (1986).
- 16) S.-H. Young, J. Ye, D. G. Frazer, X. Shi, V. Castranova, *J. Biol. Chem.*, **276** 20781 (2001).
- 17) S. N. Diniz, R. Nomizo, P. S. Cisalpino, M. M. Teixeira, G. D. Brown, A. Mantovani, S. Gordon, L. F. L. Reis, *J. Leukoc. Biol.*, **75**, 649 (2004).
- 18) NN. Miura, N. Ohno, Y. Adachi, T. Yadomae, *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 2137 (1996).
- 19) N. Ohno, M. Uchiyama, A. Tsuzuki, K. Tokunaka, NN. Miura, Y. Adachi, MW. Aizawa, H. Tamura, S. Tanaka, T. Yadomae, *Carbohydr. Res.*, **316**, 161 (1999).
- 20) K. Ishibashi, NN. Miura, Y. Adachi, H. Tamura, S. Tanaka, N. Ohno, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **42**,155 (2004).
- 21) K. Ishibashi, NN. Miura, Y. Adachi, N. Ogura, H. Tamura, S. Tanaka, N. Ohno, *Int. Immunopharmacol.*, **2**, 1109 (2002).
- 22) NN. Miura, Y. Adachi, T. Yadomae, H. Tamura, S. Tanaka, N. Ohno, *Microbiol. Immunol.*, **47**,173 (2003).
- 23) T. Sugawara, S. Takahashi, M. Osumi, N. Ohno, *Carbohydr. Res.*, **339**, 2255 (2004).
- 24) T. Sugawara, M. Sato, T. Takagi, T. Kamasaki, N. Ohno, M. Osumi, *J. Electron Microsc.*, **52**, 237 (2003).
- 25) C. M. Douglas, J. A. D'Ippolito, G. J. Shei, M. Meinz, J. Onishi, J. A. Marrinan, W. Li, G. K. Abruzzo, A. Flattery, K. Bartizal, A. Mitchell, M. B. Kurtz., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 2471 (1997).
- 26) C. M. Douglas, *Med. Mycol.*, **39** (Suppl. 1) 55 (2001).
- 27) C. M. Douglas, J. A. Marrinan, W. Li, and M. B. Kurtz, *J. Bacteriol.*, **176**, 5686 (1994).
- 28) A. S. Ibrahim, J. C. Bowman, V. Avanesian, K. Brown, B. Spellberg, J. E. Jr. Edwards, C. M. Douglas, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 721 (2005).
- 29) K. Ishibashi, NN. Miura, Y. Adachi, N. Ogura, H. Tamura, S. Tanaka, N. Ohno, *Int. Immunopharmacol.*, **4**, 387(2004).
- 30) K. Ishibashi, NN. Miura, Y. Adachi, N. Ohno, T. Yadomae, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1993 (2001).
- 31) T. Harada, NN. Miura, Y. Adachi, M. Nakajima, T. Yadomae, N. Ohno, *J. Interferon Cytokine Res.*, **24**, 478 (2004).
- 32) T. Harada, NN. Miura, Y. Adachi, M. Nakajima, T. Yadomae, N. Ohno, *J. Interferon Cytokine Res.*, **22**, 1227 (2002).
- 33) S. Nameda, T. Harada, NN. Miura, Y. Adachi, T. Yadomae, M. Nakajima, N. Ohno, *Enhanced Cytokine, Sparassis crispa Immunopharmacology and Immunotoxicology*, **25**, 321 (2003).
- 34) N. Ohno, T. Yadomae, *Carbohydr. Res.*, **159**, 293 (1987).
- 35) N. Ohno, I. Suzuki, T. Yadomae, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1362 (1986).
- 36) NN. Miura, N. Ohno, J. Aketagawa, H. Tamura, S. Tanaka, T. Yadomae, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **13**, 51 (1996).
- 37) NN. Miura, N. Ohno, Y. Adachi, J. Aketagawa, H. Tamura, S. Tanaka, T. Yadomae, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 185 (1995).
- 38) NN. Miura, N. Ohno, J. Aketagawa, H. Tamura, S. Tanaka, T. Yadomae, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **13**, 51 (1996).
- 39) M. Suda, N. Ohno, Y. Adachi, T. Yadomae, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**,131 (1994).
- 40) M. Suda, N. Ohno, Y. Adachi, T. Yadomae, *J. Pharmacobiodyn.*, **15**, 417 (1992).
- 41) GD. Brown, J. Herre, DL. Williams, JA. Willment, AS. Marshall, S. Gordon, *J. Exp. Med.*, **197**, 1119 (2003).
- 42) Y. Adachi, T. Ishii, Y. Ikeda, A. Hoshino, H. Tamura, J. Aketagawa, S. Tanaka, N. Ohno, *Infect. Immun.*, **72**, 4159 (2004).
- 43) S. Masuzawa, M. Yoshida, K. Ishibashi, N. Saito, M. Akashi, N. Yoshikawa, T. Suzuki, S. Nameda, NN. Miura, Y. Adachi, N. Ohno, *Drug Dev. Res.*, **58**, 179 (2003).
- 44) M. Motoi, K. Ishibashi, O. Mizukami, NN. Miura, Y. Adachi, N. Ohno, *Int. J. Medicinal Mushrooms.*, **6**, 41 (2004).
- 45) K. Ishibashi, M. Yoshida, I. Nakabayashi, H. Shinohara, NN. Miura, Y. Adachi, N. Ohno, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2005 in press.

著者紹介

氏名: 大野尚仁 (Ohno Naohito)

年齢: 50歳

所属: 東京薬科大学薬学部免疫学教室 教授

連絡先: 〒192-0392 東京都八王子市堀之内1432 - 1

E-mail: ohnonao@ps.toyaku.ac.jp

<http://www.toyaku.ac.jp/>

出身大学: 東京薬科大学大学院薬学研究科

学位: 薬学博士

研究テーマ: (1) 免疫関連疾患の病態解明と治療薬の開発: 血管炎、敗血症、アナフィラキシーショックモデルを作成し、メカニズム解析をすると共に治療薬開発を行っている。(2) 微生物菌体成分による免疫機能の調節機構の解析: 真核微生物の菌体成分を中心に、免疫調節剤の開発を行っている。

Topics on Chemistry

プロテインキナーゼ活性を直接測定する「Mass-tag 法」

同仁化学研究所 佐藤 求美

タンパク質のリン酸化は細胞内シグナル伝達カスケード中で中心的な役割を担い、遺伝子発現や細胞増殖、分化およびアポトーシスなどのさまざまな細胞機能をコントロールしている。リン酸化に関するプロテインキナーゼの活性が異常に変化するとこれらのシグナル伝達において目的遺伝子の活性を変化させ、癌や炎症性疾患など様々な疾病を誘発することにもなる。細胞内のプロテインキナーゼ活性を直接測定することは、これらの病気の診断にも有用である。

プロテインキナーゼ活性測定方法としては、 ^{32}P を用いたオートラジオグラフィや抗プロテインキナーゼ抗体を利用したELISAなどが多用されるが、感度は良いものの非常に手間と時間がかかる。近年、プロテオーム研究においてハイスループット化への期待から、質量分析(MS)が高頻度で用いられている。発現プロテオミクスから機能プロテオミクスへ移行する潮流の中で、MSによるリン酸化解析法も現れてきた。例えば、安定同位体 ^2H 、 ^{15}N 、 ^{13}C を含む培地と通常の培地を用いてそれぞれ細胞培養し、安定同位体標識されたタンパク質とコントロールとの質量分析のピークの強度比で存在比を評価するものがある¹⁾。システイン残基などのチオールに安定同位体標識されたピオチン化試薬を結合させ、アビジンカラムで精製後、質量分析する Isotope-coded Affinity Tag(ICAT)法も報告されている²⁾。最近ではSILAC(Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture)を応用し³⁾、安定同位体標識したアミノ酸を含む培地で培養した細胞に遺伝子導入を行い、タンパク質を発現させてMS/MSでリン酸化タンパク質の定量を行った例がある⁴⁾。

片山らはプロテインキナーゼ活性測定する方法として、安定同位体標識プローブを利用した質量分析の新しい方法「Mass-tag 法」を開発した⁵⁾。この方法では2つの状態間にある細胞の特定のプロテインキナーゼ活性変化を直接比較でき、操作も簡便で多サンプルのスクリーニングなどに適している。原理をFig. 1に示す。着目するキナーゼの基質配列にアセチル基または重水素化アセチル基を導入する。その各々を2種検体細胞の溶解液に加えてMSで強度を比較するというものである。既に数種類のプローブが開発されており(Fig. 2)、各種キナーゼ活性の同時測定も可能である。そのうちの1つはプロテインキナーゼA(PKA)の自己リン酸化基質配列を持つペプチドプローブで、N末にリシンを導入し、アミノ末端と側鎖のアミノ基をアセチル化したものである。そのア

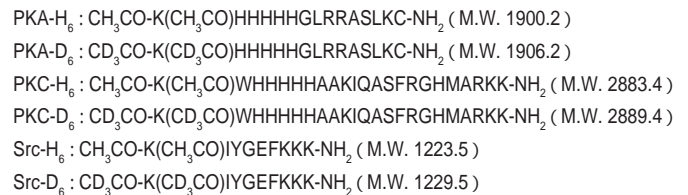


Fig.2 Mass-tag プローブの構造

セチル基が重水素(D)化された PKA-D₆ と、通常のアセチル基を持つPKA-H₆を用いる。このプローブを2種の細胞試料のライセートに別々に入れ、反応する。両反応液を混合して、精製することなしに質量分析すると、未反応のプローブとリン酸化されたプローブが、それぞれ質量数の6ずれた二重線で得られる。そのピークの高さから、それぞれの細胞試料中の標的プロテインキナーゼ活性を直接比較することができる。質量分析にはMALDI-TOF MSや、ESI-TOF MSが利用可能である。

Mass-tag法による活性測定はリン酸化の副生成物であるADP量変化をcoupled enzyme assayで測定した結果と一致していることが確認された。また最近では、Mass-tag法とレポーター遺伝子アッセイとの間に良好な相関が示された⁶⁾。NIH3T3細胞では、アデニル酸シクラーゼ活性化剤フォルスコリン(Fsk)を添加するとPKAの活性上昇が、反対に阻害剤であるプロテインキナーゼインヒビター(PKI)を添加すると活性低下がMass-tag法で確認された。また、PC-12細胞ではFsk、PACAP、NGF、TPA、EGFなどの薬物で刺激し、PKA依存性のCREBによる遺伝子発現を、ルシフェラーゼを用いたレポーター遺伝子アッセイで比較した。その結果、PKAを活性化するFskとPACAPで刺激した場合のみ、ルシフェラーゼの発現がコントロールに比べ約500倍増加し、そのほかの刺激剤では変化はなかった。この結果はMass-tag法での活性測定結果と完全に一致した。

Mass-tagプローブとしてプロテインキナーゼC(PKC)や、非受容体型プロテインチロシンキナーゼSrcのプローブも開発されており(Fig. 1)、それぞれの活性測定に成功している⁶⁾。

今後、様々なプローブが開発されることで一度に多種の活性プロテインキナーゼの測定が可能になる。さらにはホスファターゼやプロテアーゼなど他の機能を持つ酵素の活性測定にも有効であることが予測される。Mass-tag法は簡便かつ短時間で結果が得られることから、ドラッグスクリーニング等にも有用であると考えられ、今後の発展が期待される。

参考文献

- 1) Y. Oda, K. Huang, F. R. Cross, D. Cowburn and B. T. Chait, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6591 (1999).
- 2) S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb and R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.*, **17**, 994 (1999).
- 3) S. -E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey and M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics*, **1**, 376 (2002).
- 4) B. A. Ballif, P. P. Roux, S. A. Gerber, J. P. Mackeigan, J. Blenis, J. Blenis and S. P. Gygi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 667 (2005).
- 5) T. Sonoda, S. Shigaki, T. Nagashima, O. Okitsu, Y. Kita, M. Murata and Y. Katayama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 847 (2004).
- 6) T. Sonoda, S. Shigaki, T. Nagashima, O. Okitsu, Y. Kita and Y. Katayama, *personal communication*.

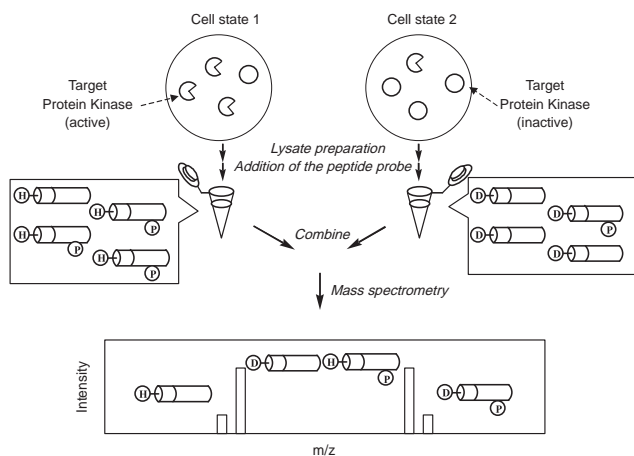


Fig. 1 Mass-tag 法の測定原理

Topics on Chemistry

VNC 細菌の検出法

同仁化学研究所 高木 真由美

食品・環境中に存在する細菌を検出することは、衛生上非常に重要である。現在、細菌の検出には培地で細菌を培養し、生成したコロニー数を数える寒天平板培地法が主に用いられている。しかし最近になって、生きてはいるが培養できない状態(VNC状態: viable but non-culturable)にある細菌が環境中に多く存在していることが分かってきた¹⁾。VNC細菌がどのような機序で培養可能な状態にもどるのか、またその逆の経路をとる引き金は何なのかは、まだはっきりしていない。寒天平板培地法は、培養に時間がかかる、VNC細菌の検出が難しいために細菌数を過小評価してしまうといった欠点がある。食品中でVNC状態にあり寒天平板培地法では検出できなかった細菌が、増殖しやすい環境に置かれることにより急激に増殖し、人体に悪影響を及ぼす危険性も考えられる。そのため寒天平板培地法に代わる新しい細菌検出法が研究されている²⁻⁴⁾。

現在用いられている、主な細菌検出法をいくつか挙げる。

1) 全菌数直接計数法 (TDC 法)

acridine orange(AO)、DAPI等でDNA、RNAを蛍光染色するなどして、蛍光顕微鏡で細菌を数える。全菌数を求めることができるが、死菌も数えてしまう。

2) 蛍光活性染色法

6-carboxyfluorescein diacetateは生細胞内でエステラーゼによって分解され、緑色蛍光性を示す6-carboxyfluoresceinを生成するため、エステラーゼ活性を有する細菌を数えることができる。また、呼吸活性を有する細菌の検出には5-cyano-2,3-ditolyl-tetrazolium chloride(CTC)が用いられている。

3) 小暮法 (DVC 法)

細菌の分裂を阻害する抗菌剤を試料に加えて、増殖能を有する細菌を伸張させる。伸張した細菌を数えることにより増殖能を持つ細菌数を求めることができるが、環境中に存在する細菌は大きさが多様のため計数が難しい。

4) Quantitative DVC 法(qDVC 法)

増殖能を持つ細菌を特異的に溶菌させ、処理前後の菌数を比較することにより生菌を数える。

5) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法(FISH 法)

菌体内のrRNAを標的としたオリゴヌクレオチドをプローブとして用いて、細菌を検出する。検出感度は細胞内のrRNAに依存するため、貧栄養な環境に生息する細菌に対しては十分な蛍光強度が得られないことがある。

6) 遺伝子増幅法

in situ PCR 法や *in situ* LAMP 法により、細胞内でPCRを行い、細胞内の特定遺伝子を増幅して、特定細菌を検出する方法である。

7) 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE 法)

同じ長さのDNA断片を塩基配列の違いに基づき分離する電気泳動法である。多種多様な細菌を解析できる。

このように細菌の検出法は目的によって様々であるが、その中でも呼吸活性を有する細菌の検出にはCTCが有用である。CTCは当初、エールリッヒ腹水腫瘍細胞の酸化還元活性の研究に用いられて

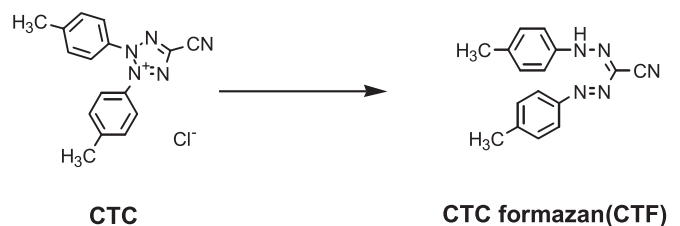
いたが⁵⁾、最近では主に環境中の細菌の検出に用いられている。

CTCは、細菌の呼吸活性に伴う電子伝達系の作用でCTC formazan(CTF)に還元され、水に不溶性となり細菌細胞内に蛍光性沈澱として蓄積する。CTCは水溶性で、水溶液中で無蛍光である。一方CTFは低粘性溶液中では蛍光を持たないが、高粘性溶液中や固体状態では赤色蛍光を発する。染色された細菌をフローサイトメトリーで検出したり、細菌をブラックメンブランフィルターで捕集した後蛍光顕微鏡で観察することで、呼吸活性を有する細菌数を求めることができる。シアン化物など電子伝達阻害剤によって還元抑制されることも確認されている。インキュベーション時間はおよそ30分から4時間と短時間であるため、寒天平板培地法に比べ迅速に細菌を検出することができる。

Coallierらは、環境水中の *Enterobacter cloacae* を試料として、AOによる全菌数直接計数法、寒天平板培地法、DVC法、CTC法の比較を行った²⁾。全菌数直接計数法は死菌も検出してしまいうため細菌数は最も多く数えられ、続いてCTC法、DVC法、寒天平板培地法の順に計数値は小さくなった。CTC法は、DVC法とほぼ同じ計数を与えたが、インキュベーション時間が短く細菌の計数も容易であったと報告されている。また、遊離残留塩素による影響は寒天平板培地法が最も大きかったため、CTC法が環境水中のVNC細菌検出に適した方法であることを示した。

最近では、汚染させた食品を試料として用い、CTCとFITCラベル化抗O157:H7抗体とで二重染色を行い、蛍光顕微鏡観察及びフローサイトメトリーを行った例がある³⁾。CTCの、食品衛生における有用性を示唆する報告である。

私達が安全に生活するためにVNC細菌を迅速簡便に検出できる方法は必要不可欠である。上に述べてきたようにCTC法を初めとする優れた細菌検出法が既に報告されている。しかし、その一方で寒天平板培地法の簡便性に及ばないことも事実である。新しい細菌検出法の開発が、今後期待される。



参考文献

- 1) e. g. R. A. Bovill, J. A. Shalloross, B. M. Markey, *J. Appl. Bacteriol.*, **77**, 353 (1994).
- 2) J. Coallier, M. Prévost, A. Rompré, *Can. J. Microbiol.*, **40**, 830 (1994).
- 3) N. Yamaguchi, M. Sasada, M. Yamanaka, M. Nasu, *Cytometry*, **54A**, 27 (2003).
- 4) 見坂武彦, 那須正夫, *ファルマシア*, **39**, 137 (2003).
- 5) E. Sevrin, J. Stellmash, H.-M. Nachtigal, *Anal. Chim. Acta*, **170**, 341 (1985).

Column

身近なもののCa、Mgを調べてみよう

牛乳、醤油、酒類これらの中にはCa、Mgが含まれている。Ca、Mgをどのくらい含むかということが、その「味」にも関係があるといわれている。

自分の身近にあるこれらのものがどのくらいのCa、Mgを含んでいるのか調べてみよう。

<牛乳>

牛乳にはカゼイン・油脂などが含まれており、Ca、Mgはカゼインと結合している。そのためカゼインなどを分離した後に測定しなければならない。

1. カゼインの酸沈殿法

牛乳 10 ml をメスフラスコ(50 ml)にとり、純水 20 ml を加える。次に 1 mol/l HCl 2 ml を加えて 10 分間静置したのち 1 mol/l KOH 1.3 ~ 1.5 ml を加える。pH が 4.6 ~ 4.8 となりカゼインは沈殿して Ca、Mg は溶液中に溶ける。しばらく静置し溶液が透明になった後、純水を加え全量 50 ml とし、よく混合した後、ろ過する。

2. 乾式分解法

牛乳 10 ml をとり湯浴上で蒸発乾固し、ついで強熱灰化した後 1 mol/l HCl 溶液に溶解し、メスフラスコで 100 ml とする。

<醤油>

醤油などは種々の有機物を含んでいる上、着色しているの、そのまま使用できない。

1. 灰化法

醤油 25 ml をルツボにとり、100 ℃ にて乾固後、濃硝酸 0.2 ml を加えて電気炉で灰化する。残渣は 1 mol/l HCl 40 ml を加えて溶解し、メスフラスコに移して 500 ml とする。

2. 脱色法

醤油は着色が著しいが、活性炭を用いれば容易に脱色できる。醤油 5 ml を取り、純水で正確に 100 ml とする。乾燥ピーカーに移し、活性炭 1 g を加えてよくかき混ぜ、乾燥ろ紙を用いてろ過する。

<酒類>

赤ワインなどは、醤油と同様に有機物を含んでいる上に着色しているため脱色が必要である。(ビールのように着色も強くなく、リン酸含量が低いCa、Mg量が比較的高いものは希釈するだけでも測定出来る。)

清酒やビールなどはそのまま適当に純水で希釈することで試料溶液とすることができる。しかし、着色の強いものは下記と同様に活性炭で脱色する。

また、ビールの発泡は滴定の障害になるので、あらかじめかき混ぜ、または加温して十分泡が出てしまった後、数時間放置して滴定する。

脱色法

赤ワイン 50 ml を取り、純水で正確に 100 ml とする。活性炭 1 g を加えてよくかき混ぜ、乾燥ろ紙を用いてろ過する。試料によっては含有量が少なく検出しにくいことがあります。必要に応じて試料溶液の量や滴定液の濃度を変えてください。

<滴定方法>

試薬

- 0.01M 滴定液
- Universal BT

- NN diluted with potassium sulfate あるいは NN solution
- 1 mol/l KOH
- 約 8 mol/l KOH

- 操作方法 -

Ca + Mg の定量

試料溶液 10 ml を純水で 50 ~ 100 ml 程度に希釈する。

これに Universal BT 1 ~ 2 ml を加える。

pH10 になると同時に赤色溶液となる。

(* 有機物や金属などが多いと変色を阻害する場合があります。

必要であれば 5% KCN 1 ~ 5 滴、10% トリエタノールアミン 1 ~ 2 ml を加え、マスキング操作を行ってください。)

その後、滴定液で「青色」になるまで滴定する。その滴定値を [A] ml とする。

Ca の定量

試料溶液 10 ml を純水で 100 ml 程度に希釈する。

これに 8 mol/l KOH を 2 ~ 4 ml 加え、よく振り混ぜ、pH12 ~ 13 とする。(必要であれば 5% KCN 1 ~ 5 滴、10% トリエタノールアミン 1 ~ 2 ml を加える)

NN diluted with potassium salt 20 ~ 50 mg もしくは NN solution 2 ~ 3 滴を加える。(赤色となる)その後、滴定液で青色になるまで滴定する。この滴定値を [B] ml とする。

計算

$$\text{Ca(mg)} = B \times 0.400 \times \text{滴定液のファクター(必要あれば)}$$

$$\text{Mg(mg)} = (A - B) \times 0.243 \times \text{滴定液のファクター(必要あれば)}$$

参考値	種類	Ca	Mg
	牛乳	110 mg/100 g	10 mg/100 g
	醤油	0.5 ~ 1 g/l	0.4 ~ 1.2 g/l
	赤ワイン	30 ~ 250 mg/l	30 ~ 100 mg/l
	ビール	20 ~ 80 mg/l	60 ~ 100 mg/l
	日本酒	20 ~ 80 mg/l	5 ~ 40 mg/l

* この内容は、過去に小社が発行しました「ドータイト分析法シリーズ」を再編したものです。

関連商品

品名	容量	本体価格(¥)	コード	メーカーコード
0.01M 滴定液	500 ml	2,600	342-02615	T013
Universal BT	50 ml	1,800	348-02891	U002
	500 ml	5,400	340-02895	U002
NN diluted with potassium sulfate	25 g	1,600	343-02042	N012
	500 g	13,000	347-02045	N012
	50 ml	1,800	349-02061	N014
NN solution	50 ml	1,800	349-02061	N014
	500 ml	10,800	341-02065	N014

お知らせ

今号掲載予定の浜松医科大学 櫻井孝司先生の連載「ライブセルイメージング技術講座」は都合によりお休みさせていただきます。

試作品

NO 検出キット

NO₂/NO₃ Assay Kit-FX (Fluorometric)
 ~ 2,3-Diaminonaphthalene Kit ~

<改良点>

- キットの安定性が向上
- 酵素反応におけるインキュベーション時間が30分(従来比1/2)
- 容量を200回用に変更(従来比2倍)

「NO₂/NO₃ Assay Kit-FX」は、「NO₂/NO₃ Assay Kit-F」と同様にNO₂⁻とDAN (2,3-Diaminonaphthalene)の反応を利用して、試料中のNOを蛍光法で間接的に測定するキットです。酵素反応条件等を見直すことによって「NO₂/NO₃ Assay Kit-F」と比較して、安定性が向上し、アッセイにかかる時間を短くしました。また、容量を従来の2倍の200回用としています。

一酸化窒素(NO)が情報伝達物質として多くの生理的現象に関与していることが明らかとなり、NOに関する研究が盛んに行われています。NOは水中で加水分解され最終的にNO₂⁻とNO₃⁻になるため、NO₂⁻と同時にNO₃⁻も測定する必要があります。本キットは還元酵素を含み、NO₃⁻をNO₂⁻に還元できるのでNO₂⁻とNO₃⁻両方の濃度測定が可能です。本キットは1~10 μmol/lの濃度領域に適しています。より高濃度の場合、「NO₂/NO₃ Assay Kit-C」をご利用ください。

<検量線例>

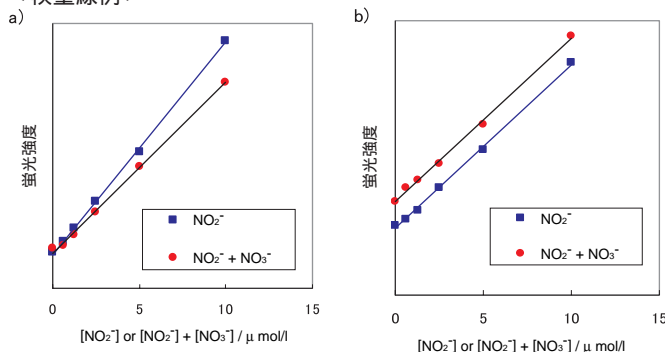


Fig. NO₂/NO₃ Assay Kit-FX を用いて測定した、NO₂⁻ と NO₂⁻ + NO₃⁻ の検量線
 a) Buffer Solution 中 b) 培地 (DMEM) 中

<キット内容> 200回用

Buffer Solution (1本 = 200回用)	1本
NaNO ₂ Standard Solution (1本 = 100回用)	2本
NaNO ₃ Standard Solution (1本 = 100回用)	2本
Nitrate Reductase (1本 = 100回用)	2本
Enzyme Cofactors (1本 = 100回用)	2本
Fluorescence Reagent (DAN) Solution (1本 = 200回用)	1本
Stop Solution (1本 = 200回用)	1本

関連商品

NO₂/NO₃ Assay Kit-C (Colorimetric)
 ~ Griess Reagent Kit ~

Griess法は、古くから良く知られているNO₂⁻の定量法で、SulfanilamideとNO₂⁻が反応して生じるジアゾニウム塩化合物と、Naphthylethylenediamineのアゾカップリングを利用しています。

一酸化窒素(NO)の代謝物であるNO₂⁻を測定するという間接的な方法ではありますが、簡便で信頼性も高いため、NOの間接的定量法として広く用いられています。

本キットは、Griess法を用いて、簡便にNO₂⁻とNO₃⁻を定量するために還元酵素、標準液等を組合せたものです。10~100 μmol/lの濃度領域測定に適しています。

品名	容量	本体価格(¥)	コード	メーカーコード
NO ₂ /NO ₃ Assay Kit-F (Fluorometric) ~ 2,3-Diaminonaphthalene Kit ~	100回用	23,000	347-07981	NK04
NO ₂ /NO ₃ Assay Kit-C (Colorimetric) ~ Griess Reagent Kit ~	100回用	24,800	344-07991	NK05

ドージンニュースご愛読者の皆様へ

小社ではお客様からご登録頂いた情報により、ドージンニュースを発送いたしております。

すでにご存知のように「個人情報の保護に関する法律」が4月1日より施行されましたが、既にご登録頂いているお客様の住所等の個人情報を使用して、今後もドージンニュースをお届けしたいと考えておりますので、ご了解いただきたく案内させていただきました。なお、送付をご希望されないお客様、個人情報の変更、削除を希望されるお客様がございましたら、お手数ですが同封の用紙に希望事項をご記入の上、小社宛にお送り下さいますようお願いいたします。ご要望に添って対応させていただきます。

小社個人情報保護法に関する方針はこちらをご覧ください。 <http://www.dojindo.co.jp/jyoho/index.html>

お知らせ

残留塩素測定キット

残留塩素測定キット-SBT法

小社開発の残留塩素測定キット-SBT法が「衛生試験法・注解2005」(日本薬学会編/金原出版株式会社)P733に、残留塩素測定用キットとして紹介されました。

DPD法より優れたSBT法の三つの特長をご案内いたします。

<遊離残留塩素の高選択性>

(DPD法より高い遊離残留塩素選択性)

下記のように調製した結合塩素 1 mg/l のサンプルを SBT 法と DPD 法で発色させ、吸光度の時間経過を測定しました。

DPD は結合塩素と反応して次第に発色しますが、SBT は発色がほとんどありませんでした。

その後、ヨウ化カリウム溶液を添加し総残留塩素を測定すると、SBT と DPD は同等の値を示しました。以上のことから、SBT は遊離塩素に対して選択性が高いということがわかりました。

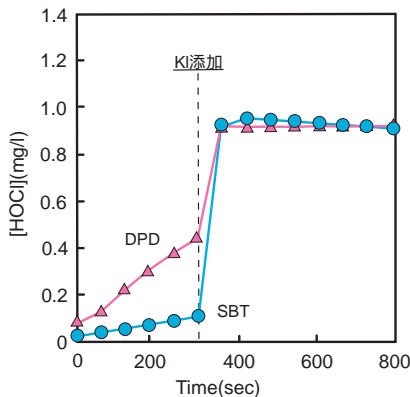


Fig. 1

<SBT法>

サンプル 2.5 ml
3 mol/l 酢酸緩衝液
(pH5.2, cont. 0.25% CyDTA) 30 μ l
20 mmol/l SBT 溶液 15 μ l
吸光度測定 (675 nm, 5 分間)
ヨウ化カリウム溶液 2.5 mg/50 μ l
吸光度測定 (675 nm, 15 分間)

<DPD法>

DPD 試薬 (4% DPD- Na_2SO_4) 25 mg
0.2 mol/l リン酸緩衝液
(pH6.5, cont. 0.1% CyDTA) 125 μ l
サンプル 2,375 μ l
吸光度測定 (510 nm, 5 分間)
ヨウ化カリウム溶液 25 mg/50 μ l
吸光度測定 (510 nm, 15 分間)

サンプル調製
2 mg/l HOCl 溶液
2 mg/l NH_4Cl
溶液 (等量)
30 分間室温放置
測定サンプル

<水溶液として安定>

10 mmol/l に調整した SBT および DPD 水溶液を透明ガラス瓶に入れ、実験室内に 7 日間放置しました。SBT は 675 nm、DPD は 510 nm の吸光度を測定しています。

上水試験での公定法である DPD は、溶液にすると次第に着色するため溶液として保存が出来ません。一方、SBT は溶液状態でも着色 (吸光度の上昇) が認められず、使いやすい溶液タイプでの提供が可能となりました。

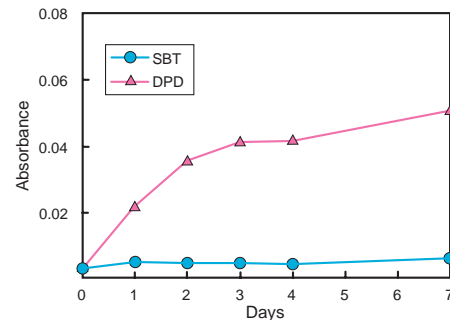


Fig. 2

<低い毒性> (発ガン性が低いと言われている DPD 法よりさらに低い 300 分の 1 以下の細胞毒性)

ヒト子宮ガン細胞 (HeLa 細胞) を用いて、SBT および DPD の細胞毒性を細胞増殖アッセイキット (CCK-8) により求めました。

図から求めた LD_{50} は SBT:13,500 $\mu\text{mol/l}$ 、DPD:50 $\mu\text{mol/l}$ となり、SBT は DPD に比べて非常に低い毒性であることがわかりました。

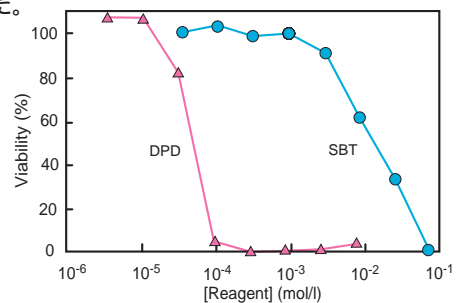


Fig. 3

品名	容量	本体価格 (¥)	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

初めてご使用の際は、キットをお求めください。試薬(100回用、500回用)および色素液・検水調整液(組み合わせると2000回相当)は、測定回数にあわせて補充用としてお求めください。

試作品

蛍光タンパク標識キット

蛍光タンパク標識キットはモノクローナル抗体などの少量のタンパク質にAllophycocyanin(APC)、B-Phycoerythrin(B-PE)またはR-Phycoerythrin(R-PE)の蛍光タンパク(Phycobilli-protein)を標識するためのキットで、それぞれNH₂タイプ、SHタイプの2種類があります。NH₂タイプ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標的分子と、SHタイプはその構造内にマレイミド基を有しているためスルフヒドリル基を有する標的分子と、それぞれ混合するだけで安定な共有結合を形成します。標的タンパク質がスルフヒドリル基をもっていない

場合には付属の還元剤を用いて遊離SH基を調製することが可能です。(ただしS-S結合の切断によってタンパク質の活性が失われる場合があります。)本キットは、簡便な操作性、高い回収率、高い再現性などの特長を持っています。短時間で蛍光標識タンパク質を得ることができ、得られた標識体はそのまま免疫組織染色、FACSなどの様々な用途に利用することができます。本キットには標識に必要なすべての試薬と作製した蛍光タンパク標識体を保存するための溶液が含まれています。



Fig. 1 蛍光タンパク標識キットNH₂タイプの標識反応

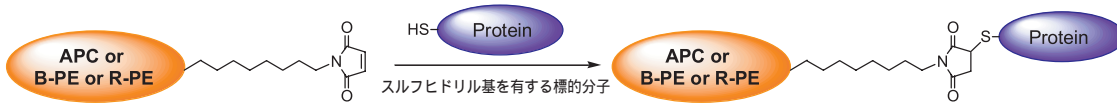


Fig. 2 蛍光タンパク標識キットSHタイプの標識反応

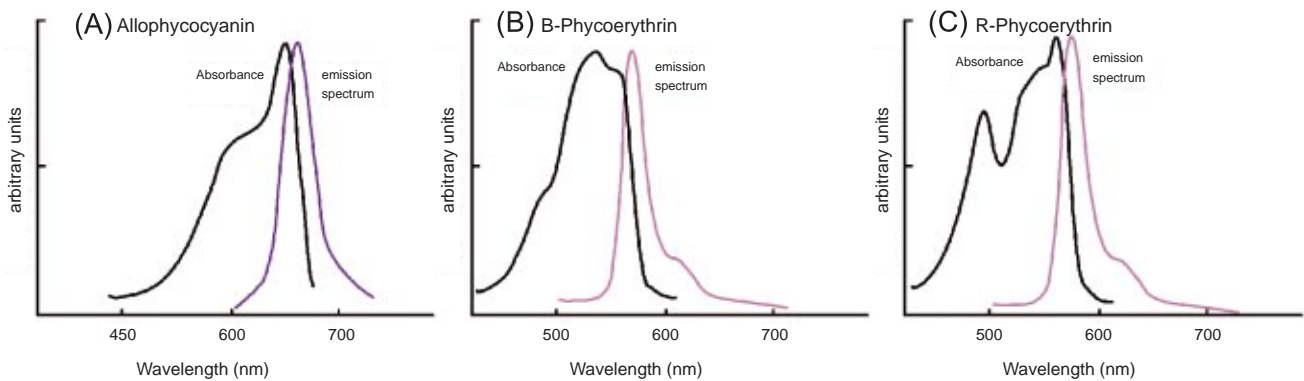


Fig. 3 蛍光タンパクの励起・蛍光スペクトル

< 標識体の波長 >

品名	標識体の極大吸収波長	標識体の極大蛍光波長
Allophycocyanin Labeling Kit - NH ₂ , -SH	650 nm	660 nm
B-Phycoerythrin Labeling Kit - NH ₂ , -SH	546 nm	575 nm
R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH ₂ , -SH	566 nm	578 nm

< 本キット以外に必要なもの >

- ・ 10 μl, 200 μl, 1000 μl マイクロピペッター
- ・ インキュベーター (37 °C)
- ・ 0.5 ml チューブ
- ・ 遠心機 (マイクロチューブ用)

開発元 **DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.**

Allophycocyanin Labeling Kit - NH₂
B-Phycoerythrin Labeling Kit - NH₂
R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH₂

< 特長 >

約 2.5 時間で標識体が調製できる。
 Filtration Tube を用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
 付属の保存溶液で標識体の長期保存ができる。

< キット内容 >

NH₂- Reactive Phycobiliprotein
 Washing Buffer
 Reaction Buffer
 Storage Buffer
 Filtration Tube

Phycobiliprotein : Allophycocyanin または B-Phycoerythrin または R-Phycoerythrin

Allophycocyanin Labeling Kit - SH
B-Phycoerythrin Labeling Kit - SH
R-Phycoerythrin Labeling Kit - SH

< 特長 >

約 2.5 時間で標識体が調製できる。
 Filtration Tube を用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
 付属の保存溶液で標識体の長期保存ができる。

< キット内容 >

SH- Reactive Phycobiliprotein
 Reducing Agent
 Solution A
 Solution B
 Reaction Buffer
 Storage Buffer
 Filtration Tube

Phycobiliprotein : Allophycocyanin または B-Phycoerythrin または R-Phycoerythrin

ポナールキットケース・ラベル変更のお知らせ

ポナールキットのケースおよびラベルを順次、変更して参ります。新タイプは、すべて焼却可能な素材を使用しております。引き続き、ご愛顧くださいますようお願い致します。



対象ポナールキット：

-ABS、-Cr・6-II、-Cr・T-II、-Cu、-DO、-F、-Fe、-Ni、-WH

関連商品

開発元 **DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.**

標識用キットシリーズ

Dojindo Labeling Kits は活性化試薬とフィルトレーションチューブにより、抗体等を簡単に標識するためのキットです。

標識方法としてはアミノ基標識用のNH₂タイプとスルフヒドリル基標識用のSHタイプの2種類のキットがあります。NH₂タイプはN-hydroxy succinimide (NHS)で活性化した試薬を用いており、タンパク質等のNH₂基に標識することが出来ます。SHタイプはmaleimide基で活性化しており、還元抗体などSH基を有するサンプルへ標識することができます。

前処理-反応-精製まで全て一つのフィルトレーションチューブ上で行うことができ、3時間以内に標識体が得られます。1回の標識操作で50 ~ 200 μgのサンプルを処理することができます。フィルトレーションチューブを用いた精製はゲルろ過や透析などに比べ標識体の回収率が高く、貴重なサンプルの標識に適しています。キットには保存溶液が付属しており、標識体を安定に保存することができます。また、得られた標識体は、免疫組織染色、ELISA、ウエスタンブロットなどの様々な用途に利用することができます。Peroxidase、Alkaline Phosphatase、ビオチン、蛍光など各種キットをシリーズで取り揃えておりますので、ご利用ください。

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
Peroxidase Labeling Kit - NH ₂	3 samples	17,000	LK11
Peroxidase Labeling Kit - SH	3 samples	17,000	LK09
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH ₂	3 samples	21,000	LK12
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - SH	3 samples	21,000	LK13
Biotin Labeling Kit - NH ₂	3 samples	12,000	LK03
Fluorescein Labeling Kit - NH ₂	3 samples	21,000	LK01

販売中止のお知らせ

小社都合により、下記製品の販売を中止いたしますのでご連絡申し上げます。

n-Heptane, (Sp)は在庫ある限りは対応できますので、小社または販売店までお早めにお問い合わせください。

品名	容量	コード	メーカーコード
Capriquat	25 g	349-03362	C005
	500 g	343-03365	C005
n-Heptane, (Sp)	500 ml	349-01385	SP13
Oyster™-556 Labeling Kit - NH ₂	3 samples	344-90921	LK04
Oyster™-656 Labeling Kit - NH ₂	3 samples	341-90931	LK07

新製品

開発元 **DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.**

ビオチン標識用キット

Biotin Labeling Kit - SH

<特長>

- 3時間以内にビオチン標識体が調製できる。
- SH-Reactive Biotinと混ぜるだけで、安定な共有結合を形成する。
- 付属の還元剤を用いることで、遊離SH基を持たないタンパク質への標識も可能である*。
- Filtration Tubeを用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 付属の保存溶液でビオチン標識体の長期保存ができる。

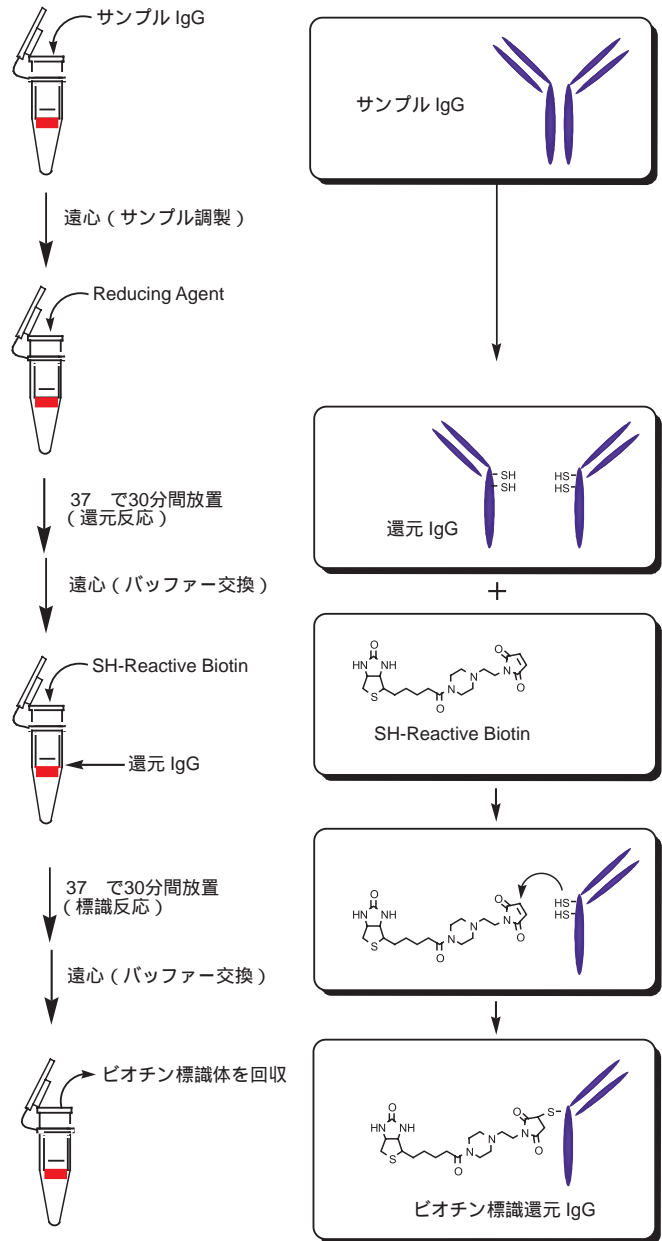
* S-S結合の切断によって、タンパク質の活性が失われる場合があります。

<キット内容> 3 サンプル標識用

SH-Reactive Biotin	3 tubes
Reducing Agent	3 tubes
Reaction Buffer	1 ml x 1
WS Buffer	4 ml x 1
Filtration Tube	3 tubes

Biotin Labeling Kit - SHは、SH基を有するタンパク質、特に抗体へビオチンを標識するためのキットです。キット付属のSH-Reactive Biotinは、その分子内にマレイミド基を有しているため、SH基を有する標的分子と混合するだけで安定な共有結合を形成します。標的タンパク質がS-S結合を持つ場合には、付属の還元剤を用いて遊離SH基を調製することが可能です(ただし、S-S結合の切断によってタンパク質の活性が失われる場合があります)。イムノグロブリンG(IgG)のような高分子タンパク質にビオチンを標識する場合、付属のFiltration Tubeを用いて簡単にサンプルの前処理を行うことができ、ヒンジ領域のSH基を標識に利用すれば、抗体活性を損なわずにビオチン標識還元IgGを調製することができます。また、未反応のSH-Reactive Biotinは反応後のFiltration Tubeを用いた精製操作により除去されるため、透析やゲルろ過などの処理を行う必要がなく、高純度の標識体を高い回収率で得ることができます。

1回の標識操作に必要なタンパク量は50~200 µgと少量であり、少量の標識体を調製するのに最適です。



ビオチン標識還元IgGの調製法

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
Biotin Labeling Kit - SH	3 samples	12,000	LK10

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