



ドージンニュース

DOJIN NEWS

CONTENTS

Review

電子スピン共鳴分光装置(ESR)による生物ラジカルの計測技術
河野雅弘

連載

ライブセルイメージング技術講座 6
櫻井孝司

Topics on Chemistry

リボヌクレアーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ活性のON-OFF制御
丸山達生・後藤雅宏

多光子励起によるタンパク質機能阻害法
菅原由子

2006

ISSN 0385-1516

No. 117

目次

Review

電子スピン共鳴分光装置(ESR)による生物ラジカルの計測技術
- ESR-スピントラッピング法 -
東北大学未来科学技術共同研究センター 河野雅弘 1

ライブセルイメージング技術講座 6
浜松医科大学光量子医学研究センター 櫻井孝司 7

Topics on Chemistry

リボヌクレアーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ活性の
ON-OFF 制御
九州大学大学院 丸山達生、後藤雅宏 12

多光子励起によるタンパク質機能阻害法
同仁化学研究所 菅原由子 13

Commercial

新製品案内
蛍光ラベル化キット 14

試作品案内
IgG 精製キット 16

Q&A

蛍光タンパク標識キット 17

お知らせ

総合カタログに関して 15

学会展示のご案内 15

九州大学・同仁化学組織対応型連携 15

第16回フォーラム・イン・ドージン開催報告 18

製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

Fura 2 11

Fura 2-AM 11

Fura 2-AM special packaging 11

Fura 2-AM solution 11

Fluo 3 11

Fluo 3-AM 11

Fluo 3-AM special packaging 11

Fluo 4-AM 11

Fluo 4-AM special packaging 11

Calcium Kit - Fluo 3 11

HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH₂ 14

HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH₂ 14

Biotin Labeling Kit - NH₂ 16

Biotin Labeling Kit - SH 16

Peroxidase Labeling Kit - NH₂ 16

Peroxidase Labeling Kit - SH 16

Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH₂ 16

Alkaline Phosphatase Labeling Kit - SH 16

Fluorescein Labeling Kit - NH₂ 16

Allophycocyanin Labeling Kit - NH₂ 16

B-Phycoerythrin Labeling Kit - NH₂ 16

R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH₂ 16

Allophycocyanin Labeling Kit - SH 16

B-Phycoerythrin Labeling Kit - SH 16

R-Phycoerythrin Labeling Kit - SH 16



16th フォーラム・イン・ドージン 講演者と座長の先生方

電子スピン共鳴分光装置(ESR)による生物ラジカルの計測技術 - ESR- スピントラッピング法 -



河野 雅弘
(Masahiro Kohno)
東北大学未来科学技術共同研究センター
量子生命反応工学創製部門

[Summary]

スピントラッピング法と連結した電子スピン共鳴装置(Electron Spin Resonance : ESR)は活性酸素(ROSs)やフリーラジカル計測のための最も強力な手段である。それ故に1970年から今日まで、ESR測定は生物ラジカル研究において主要な観測手段として使われてきた。本稿では、この計測法が “ 生物ラジカル研究に対してどのように応用できるか ” をあらためて紹介する。同時に、新たな応用展開が期待される新規スピントラッピング試薬について述べる。

An electron spin resonance spectrometer (ESR) coupled with spin-trapping method is the most powerful tool for observing reactive oxygen species (ROSs) and free radicals. Therefore, from the first stage of 1970s to now, ESR measurement has been used as main equipment for bio-radical research. In the present article, I introduce again to “how to applied for bio-radical?”, and spin-trapping reagent which will be expected to new application deployment.

キーワード：活性酸素、フリーラジカル、ESR、スピントラップ剤

1. はじめに

好気性生物の多くは生命維持活動のために大量の酸素を消費している。その過程において酸素由来の活性酸素や一酸化窒素(NO・)、二酸化窒素(NO₂・)などを生成する。これらの分子種は、生命維持のメディエーターとしての役割を担っているが生体に障害を与える場合もあり生命科学の幅広い研究領域で関心がもたれている^{1,2)}。

活性酸素とは、酸素がより反応性の高い分子種であるスーパーオキシド(O₂⁻)、過酸化水素(H₂O₂)、ヒドロキシルラジカル(HO・)、一重項酸素(¹O₂)に変化した場合の呼称である。一方フリーラジカルは不対電子を有する原子または分子のことをいい、NO・、NO₂・、O₂⁻、HO・などがある。フリーラジカルは反応性が高く、常温常圧では安定に存在する時間(寿命)が短いといった性質を示す。H₂O₂は比較的安定な分子種で、酵素反応の基質としての働きや酸素貯蔵の役割を担っておりフリーラジカルではない。¹O₂は、反応性は高いが不対電子を有してないのでフリーラジカルとは呼ばない。

生体内には図1に示すような活性酸素の生成系と消去系が共存している。活性酸素研究では試験管レベルでの実験結果を積み重ねて、生体障害等との因果関係を明らかにする努力が払われてきた。しかし生体内で生成する活性酸素種の特定制量や定量はなされておらず、推論や仮説の域を出ていない。活性酸素の体内挙動を明らかにするには、どの部位で、どのような分子種が、どのくらいの濃度(量)生成され、どのような作用(反応)をしているのかを観測する必要がある。そのためには、反応性の高いフリーラジカルを選択的に計測し定量する方法の確立が不可欠である。

一般的な活性酸素測定は発光・発色試薬を用いた化学発光分析計や蛍光分析計、吸光分光計で行われている。しかし、これらの計測では非特異的な発光や発色が観測されることが多く、図1中に示したミトコンドリア内の電子伝達系、白血球のNADPH酸化酵素系、血管内皮細胞のキサンチン酸化酵素系、肝臓組織のP450

酸化酵素系などから生成する活性酸素種を特定して測定することは難しい。唯一、短寿命のフリーラジカルを選択的かつ定量的に測定することができる方法として、ESR-スピントラッピング法があげられる。生物ラジカル研究では最も信頼性の高い計測手段であるといえる³⁻⁶⁾。

本稿では、このESR-スピントラッピング法について紹介すると同時に、新しい特徴を持つスピントラッピング試薬の開発とその応用性について紹介する。

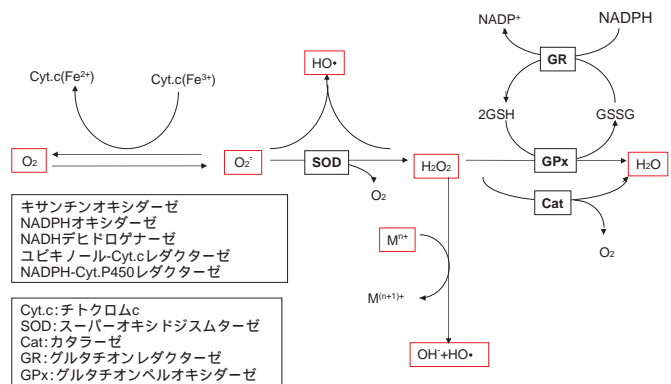


図1 Generation and Scavenging Mechanisms of Reactive Oxygen Species in Biology System

2. ESR- スピントラッピング法

ESR測定には直接と間接の二つの計測方法がある。直接法は溶液中のフリーラジカルを瞬間的に低温にし、ラジカル反応を停止させて測定する方法である。そのため、ESRスペクトルが観測されるとフリーラジカルの直接証明となる。しかしこの方法は溶液を低温にするまでにフリーラジカルが消滅することがあり定量性

に欠ける。この直接法の欠点を補う目的で考案されたのが短寿命のフリーラジカルを間接計測するスピントラッピング法である。スピントラッピング法は1960年代の後半 E. G. Janzen ら数人によって提案された⁷⁻¹¹。本法は、図2に示したようにスピントラッピング剤（ニトロソ化合物やニトロソ化合物）とフリーラジカル（ $R\cdot$ ）を反応させ（捕捉と呼ぶ）共有結合によって安定なアミノオキシドラジカル（スピンアダクトと呼ぶ）を生じさせ、ESR分光装置で観測する方法である。スピンアダクトのESRスペクトルを解析することで捕捉されたフリーラジカル種の特定と定量ができる。

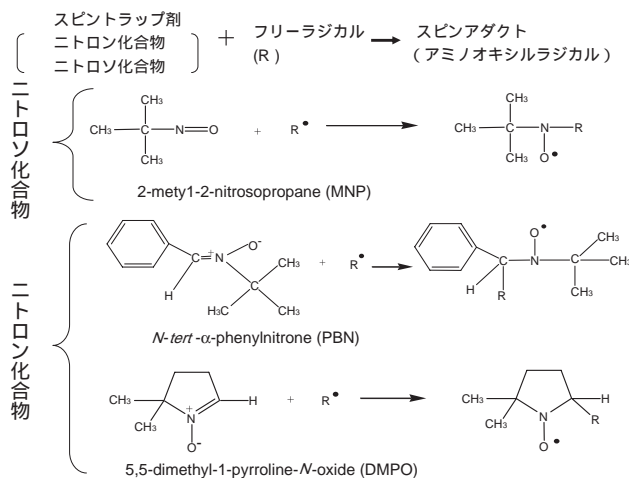


図2 Reaction Mechanism of Spin Trapping Method

フリーラジカルの特性はESRスペクトルの解析によって行われる。スペクトルの解析は、ESRパラメータと呼ばれる g 値（信号の観測される磁場の強度と共振周波数で決定される）と超微細結合定数（ H_{fcc} : a で表す）によって行われる。 H_{fcc} はESRスペクトルの分裂を表す測定値（パラメータ）で、スピンアダクトが示すスペクトルの分裂の仕方によって決定される。直接法とは違ってスピンアダクトのスペクトルは単純な分裂を示すことが多く解析も容易である。

超微細分裂（ H_{fs} ）を示す原子は、窒素（N）、水素（H）、重水素（D）、リン（P）など限られている。 H_{fcc} はスペクトルの分裂幅を示しており、分裂の大きさは磁場の強さ（mT）で表示され、 a_N , a_H , a_P などと表される。 O_2^- 、 $HO\cdot$ 、アルコキシラジカル（ $RO\cdot$ ）、パーオキシラジカル（ $ROO\cdot$ ）、炭素ラジカル（ $C\cdot$ ）などのスピンアダクトの H_{fcc} 値が論文にまとめられている¹²。

H_{fcc} や g 値の他に、波形（ガウス型、ローレンツ型）、分裂したスペクトルの数、分裂した信号の強度比が解析に使われる。

フリーラジカルの量（濃度）はスピンアダクトのESRスペクトルの積分値（面積）から求めることができる。ESRスペクトルは波形が微分形であるので面積を求めるには2回積分する方法が取られている。最新のESR装置には積分値をスピンの数（フリーラジカルの数、量）に変換するプログラムも内蔵されているのでこれを用いるとよい。安定な既知のフリーラジカルを標準物質として用い、スピンアダクトから求められた面積を標準物質の面積と比較することにより定量ができる。この方法では、スピントラッピ

ング剤が生成するフリーラジカルを100%捕捉していること、捕捉したスピンアダクトのスペクトルが安定であることの確認が必要となる。

ESR-スピントラッピング法の特徴についてまとめてみた。

利点は、

1. スピンアダクトのESRスペクトルが観測されることによって、化学反応系あるいは生物反応系にフリーラジカルが生成していることが確認できる。
2. スピンアダクトのESRスペクトルを解析（ g 値、超微細結合定数： H_{fcc} 、 a 値、線形、線幅）することで、フリーラジカルの特定ができる。
3. スピンアダクトの面積を求め標準物質との比較により、フリーラジカルの間接定量ができる。
4. スピンアダクトの量を指標として速度論的な解析を行い、フリーラジカル反応における生成速度や消去速度が求められる。

一方、欠点は、

1. トラッピング剤と反応する前に、フリーラジカルが同種あるいは他の分子種と反応するとスピンアダクトが生成せず測定ができない。
2. スピンアダクトが二次反応により短時間で消失することがある。
3. スピンアダクトが分解して新たなスピンアダクトを生成させ、定量的な誤差が生じる。
4. スピンアダクトのESRスペクトルからもとまる超微細結合定数（ H_{fcc} ）は、スピンアダクト分子の局所における電子密度と構造に関係していて、捕捉したフリーラジカルの分子内の電子分布や分子構造に関する直接情報が得られない。

などである。

3. スピントラッピング剤

ESR-スピントラッピング法が生物ラジカル研究に本格的に応用されたのは1970年代半ばからである¹³⁻¹⁴。スピントラッピング法の開発初期には試薬は市販されていなかったので比較的合成が簡単なニトロソ系のPBNやPOBNなどを使って研究がなされた。

図3には代表的なスピントラッピング剤であるニトロソ系とニトロソ系の化合物の構造を示した。ニトロソ系試薬はスーパーオキシドやヒドロキシルラジカルなど酸素ラジカル（活性酸素）の計測に、ニトロソ系の試薬は炭素ラジカル、窒素ラジカルの測定に用いられる。

生物ラジカル研究でスピントラッピング剤に要求される特性として、水に対する溶解度が高いこと、溶解後に試薬が安定であること、捕捉するラジカル分子への選択性が高いことなどがあげられる。反応性については研究分野や用途によって異なってくる。例えば、フリーラジカルの生成過程を捉えるには反応性が高いことが望まれ、一方、消去活性の測定では反応性が低いことが要求される。さらに、スピンアダクトの寿命が長く、ESRスペクトル解析が容易であることも理想的なスピントラッピング剤の条件となる。

生物ラジカル研究で使われる代表的なスピントラッピング剤が5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide(DMPO)である。DMPOが多

用されている理由は、活性酸素由来のDMPOのスピニアダクトのESRスペクトルの解析が容易であった、高純度の試薬が(株)同仁化学研究所で開発され安定的に供給された、初心者が容易に扱えたなど利便性がすぐれていたことによる。しかし、DMPOも万能ではなく、試薬の安定性や二次分解など計測上の問題を抱えている。そのため、新規のスピントラッピング試薬開発の期待は大きい。後で紹介する新規試薬は生物ラジカル研究の応用に有望であるが、試薬の特性をよく理解し、実験の手技を熟知してなければならぬことは従来と同様である。

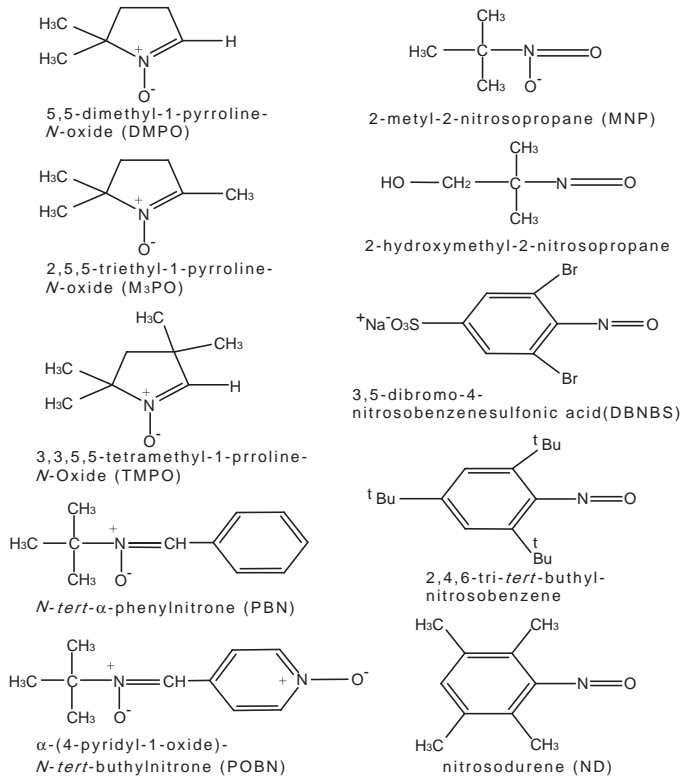


図3 Molecular Structure of Various Spin Traps

生体ラジカル種の特定に消去物質による競争反応を使って行われることがある。図4の上段はキサンチン酸化酵素系で生成する、 $O_2^{\cdot -}$ のスピニアダクトDMPO-OOHの信号である。ESRパラメータによって同定が行われるが、生化学的にはスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)を反応系に添加し、SOD濃度に依存したESRスペクトル強度の減衰を調べ、スピニアダクトが $O_2^{\cdot -}$ 由来の信号であることを確認している。他のフリーラジカルについても同様の方法が使われる。

4. ESR-スピントラッピング法の応用

スピントラッピング法が開発された1970年代には放射線照射下で生じるアミノ酸のラジカルや有機ラジカル、過酸化化物から生成する酸素ラジカルの計測がおこなわれた。同じ頃に、活性酸素研究に関係する過酸化水素から生成した $O_2^{\cdot -}$ と $HOO\cdot$ の観測例が報告されている。また、スピニアダクト定量が可能になって、速度論を展開することができるようになった。その後、アミノ酸の放射線照射

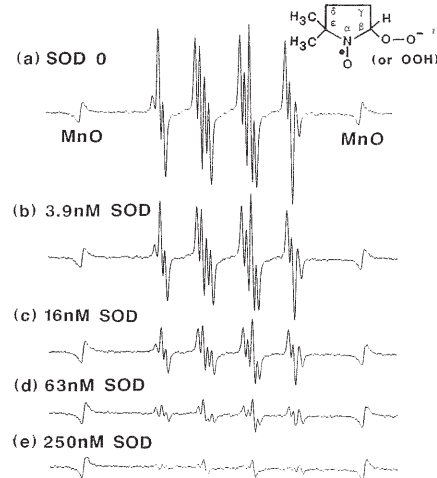


図4 ESR Spectra of DMPO-OOH formed from HPX-XOD system under the coexistence to Various concentration of Cu/Zn-SOD.

の研究は積極的に進められアミノ酸の分解物の同定などが行われた。他にも、核酸や塩基の酸化反応、フラビンの光反応、アミノ酸分解、ペプチドおよび核酸の放射線照射、脂質過酸化反応あるいは薬物の活性化、抗炎症剤の研究に幅広く利用された⁸⁻¹¹⁾。

活性酸素の研究が重要であると認識されるようになったのはフリードビッチによるSODの発見以降で、活性酸素を産生する酵素や好中球の刺激後の $O_2^{\cdot -}$ 生成の測定に利用された。

活性酸素の計測にDMPOが多用されたのは、捕捉するフリーラジカルの違いにより異なるESRスペクトルを与え、スペクトルの解析が容易であったことによる。図5は $O_2^{\cdot -}$ 、 $HO\cdot$ 、水素原子($H\cdot$)、

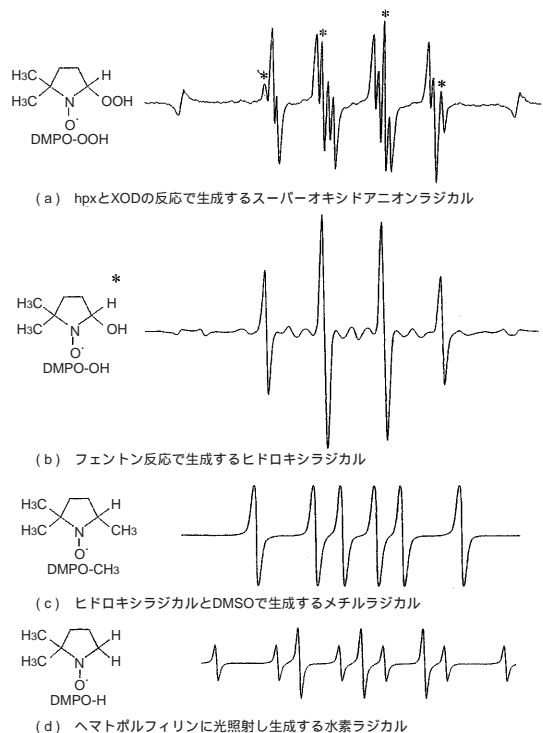


図5 ESR spectra of Spin Adducts of reactive oxygen species and related compounds

炭素中心ラジカル (C·) の DMPO スピンアダクトの典型的な ESR スペクトルを示している。PBN や POBN を使った場合、それぞれのスピンアダクトスペクトルが類似しており、ラジカル分子種が違って解析が容易でない。

5. スピントラッピング法の高度利用

5.1 速度論的解析

ESR-スピントラッピング法が動的計測法 (kinetic method) になることは1974年に報告された。フリーラジカルの捕捉量はスピントラッピング剤の反応速度 (k) と試薬濃度 (C) の積で決まる。そのため、フリーラジカルの生成が少ない条件下や反応性の低いフリーラジカルの計測では、より高濃度のスピントラッピング剤を用いねばならない。DMPO の反応速度を例にとると、O₂^{·-} を捕捉する反応速度は 16 M⁻¹s⁻¹ と反応性が低く、酵素反応で生成する O₂^{·-} を確実に捕捉するには高濃度 DMPO (1M 以上) を用いる必要がある。酸性条件下で、DMPO と HOO· の反応速度は 6.6×10³ M⁻¹s⁻¹ との報告がある。一方、HO· に対する DMPO の反応速度は、3-5×10⁹ M⁻¹s⁻¹ である¹⁵⁾。発生系の HO· 量にもよるが DMPO 濃度を 0.1 m M 以上にすると、HO· がほぼ 100% 捕捉できる。

5.2 酵素反応への応用

DMPO-スピントラッピング法を使ってキサンチン酸化酵素 (XOD) や NADPH 酸化酵素などの酵素反応速度を求めることができる^{16,17)}。XOD 反応において、基質であるヒポキサンチン (HPX) の濃度を変化させて1分間に生成する O₂^{·-} の量を求め、図6に示したように Lineweaver-Burk プロットすることで、酵素反応速度と解離定数 (V_{max} と K_m) が求まる。

5.3 消去活性測定への応用

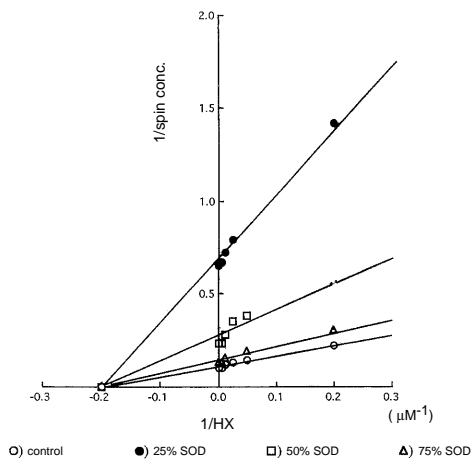


図6 Lineweaver-Burk plot of Superoxide spin adduct observed using ESR spin trapping Method

フリーラジカル消去力の測定は、図7に示したようにスピントラッピング試薬とフリーラジカルに対する反応物質(消去物質)との競争反応を利用して測定される。表1は O₂^{·-} に対する消去力を速度論的に解析した結果を示した。HO· の消去力についても同様の研究がされている。ESR 法ではこの二つの消去力を、スーパーオキシド スカベンジング アピリティ (SOSA) とヒドロキシラジカルスカベンジング アピリティ (HRSA) と呼ぶ¹⁸⁻²⁰⁾。

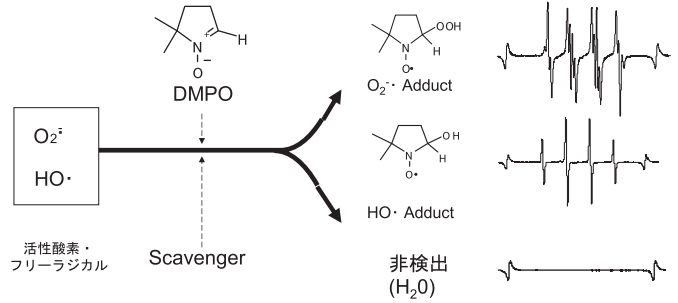


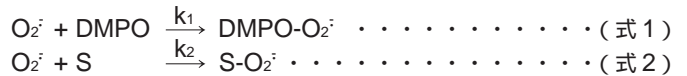
図7 Principle of measurement of scavenging of reactive oxygen species (O₂^{·-} and HO·)

SOSA の測定は、体液 (血液, 髄液, 尿) や皮膚組織、臓器などに応用できる。また、抗炎症剤、抗酸化剤、漢方薬剤などの測定もできる。

SOSA の測定値は、未添加の ESR スペクトルが 50% 消去される濃度 (IC₅₀) で表される。

表1はSODを標準試薬とし各種薬剤の消去活性を測定しているが、SOD の O₂^{·-} 消去能が他の物質に比べ、飛びぬけて強い。さらに、IC₅₀ の値を使って、速度論的な取り扱いができるので、表1のように SOSA を反応速度定数として求めることもできる。

反応速度定数を求める計算式は、スピントラッピング剤 (DMPO) と消去物質 (S) が共存している系を想定して記述される。反応系から一定量の O₂^{·-} が供給されると、O₂^{·-} は DMPO, S の両方と反応して 2 種類の反応中間体を生じる。



ここで、k₁, k₂ は各反応速度定数である。すると、反応速度式は次のようになる。

$$d[DMPO-O_2^{\cdot-}] / dt = k_1 [DMPO][O_2^{\cdot-}] \dots \dots \dots (式3)$$

$$d[S-O_2^{\cdot-}] / dt = k_2 [S][O_2^{\cdot-}] \dots \dots \dots (式4)$$

式(3)と式(4)から DMPO-O₂^{·-} の減少量は、消去物質によって奪われる O₂^{·-} の量と等しいはずであるから、2つの反応式には次の関係が成り立つ。

$$d[DMPO-O_2^{\cdot-}] / dt : d[S-O_2^{\cdot-}] / dt = (1-X) : X \dots \dots \dots (式5)$$

ここで変数 X は DMPO-O₂^{·-} の減少率 (0 < X < 1) を表す。式(3)から式(5)を整理すると、次の式が得られる。

$$k_2 = k_1 \{ X / (1-X) \} [DMPO] / [S] \dots \dots \dots (式6)$$

DMPO-O₂^{·-} が 50% 減少する場合 (X=0.5 のとき) 式6 は更に簡略化される。

$$k_2 = k_1 [DMPO] / IC_{50} \dots \dots \dots (式7)$$

このように、フリーラジカル消去活性は、IC₅₀ で表示される場合 (相対値) と速度定数 (絶対値) で表される場合がある。

HO· の研究も O₂^{·-} と同様で、発生系と消去系の研究がある。生成系としてはフェントン反応がよく知られている。DMPO を使っ

表1 IC₅₀ and Second-Order Rate Constants Various Biological Substances

生体関連物質 ^{※1}	IC ₅₀ 値 (M)	IC ₅₀ 値 (mg/ml) ^{※2}	反応速度定数	文献値	文献pH
Cu, Zn-SOD ^{※1}	7.5 × 10 ⁻⁹	0.00024 ^{※2}	1.6 × 10 ⁹	~2 × 10 ⁹	5~9.5
Mn-SOD ^{※1}	6.5 × 10 ⁻⁹	0.00026 ^{※2}	1.9 × 10 ⁹	1.8 × 10 ⁹	7.8
Fe-SOD ^{※1}	5.1 × 10 ⁻⁹	0.00020 ^{※2}	2.4 × 10 ⁹	1.6 × 10 ⁹	7.8
セルロプラスミン ^{※1}	1.5 × 10 ⁻⁵	2.0 ^{※2}	8.1 × 10 ⁵	3.04 × 10 ⁵	7.8
アスコルビン酸オキシダーゼ ^{※1}	2.5 × 10 ⁻⁶	0.35 ^{※2}	4.8 × 10 ⁶	6.2 × 10 ⁵	7.8
フェリシトクロムc ^{※1}	2.7 × 10 ⁻⁵	0.33 ^{※2}	4.5 × 10 ⁵	6.2 × 10 ⁵	7.8
ペルオキシダーゼ ^{※1}	5.0 × 10 ⁻⁷	0.020 ^{※2}	2.4 × 10 ⁷	1.6 × 10 ⁶	7~8.8
カタラーゼ ^{※1}	1.3 × 10 ⁻⁵	3.0 ^{※2}	9.6 × 10 ⁵	2 × 10 ⁵	7.4
アスコルビン酸オキシダーゼ ^{※1}	3.4 × 10 ⁻⁵	0.0060 ^{※2}	3.5 × 10 ⁵	2.7 × 10 ⁵	7.4
DMPO ^{※1}				1.8 × 10 ¹	7.8

※1 次のような分子量を用いた: Cu, Zn-SOD (32000); Mn-SOD(4000); Fe-SOD(39000); セルロプラスミン(134000); アスコルビン酸オキシダーゼ(140000); フェリシトクロムc (12400); ペルオキシダーゼ(40000); カタラーゼ(240000); アスコルビン酸(176.13); DMPO(113.16).

※2 モル濃度は、これらを分子量で割った値である。

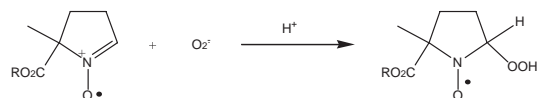
て、フェントン反応で生成するHO・の定量が行われ、フェントン反応の反応速度を求める試みが山崎らによって行なわれている。同じように、超音波照射によって水の分解で生成するHO・の定量も、牧野らによって報告されている。様々なHO・消去物質の反応速度が決定されている²¹⁻²²⁾。

6. 新しいスピントラッピング剤の開発

新しいスピントラッピング剤の開発は、スピントラッピング法が生物ラジカル研究に応用されていることが多いこともあって、DMPOの類縁化合物の合成を中心に進められている。

図8には、DMPOおよびその類縁化合物とスピニアダクトの構造を示している²³⁻²⁶⁾。

新規スピントラッピング剤の分子設計を行うに当たり、スピントラッピング剤の機能として、スピニアダクトの寿命、反応速度が重要である。つまり、新しい試薬はDMPOに比較して、O₂^{•-}に対しては反応性が高く、HO・に対しては低いといった相反する反応性が求められる。さらに、多くのアダクトの寿命が長く、解析



- | | |
|--|---|
| R = C ₂ H ₅ : 7 | R = C ₂ H ₅ : 13 |
| R = CH ₃ : 8 | R = CH ₃ : 14 |
| R = CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃ : 9 | R = CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃ : 15 |
| R = CH(CH ₃) ₂ : 10 | R = CH(CH ₃) ₂ : 16 |
| R = C(CH ₃) ₃ : 11 | R = C(CH ₃) ₃ : 17 |
| R = CH ₂ CH(CH ₃) ₂ : 12 | R = CH ₂ CH(CH ₃) ₂ : 18 |

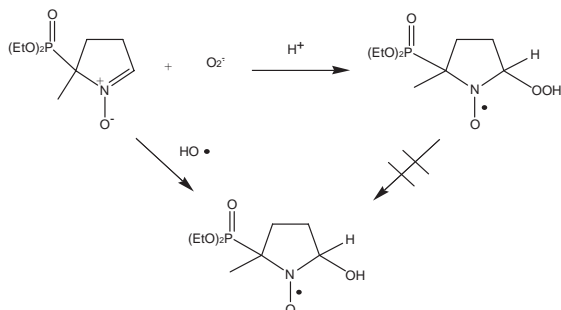


図8 Synthesis Pathway of DMPO related compounds.

が容易である必要もある。加えて、試薬の価格が安価でないと幅広く研究に用いることができない。

これらの要求を満足させる新たなスピントラッピング剤として開発されたのが、DMPO類縁化合物であるDPPMPOである。図9には、XOD系で生成するO₂^{•-}とフェントン反応で生成するHO・のESRスペクトルを示した。DMPOの信号に比べると、スペクトルは複雑であるが、解析は容易である。Hfccは表2に示した。試薬に求められるのはスピニアダクトの寿命で、短寿命のフリー

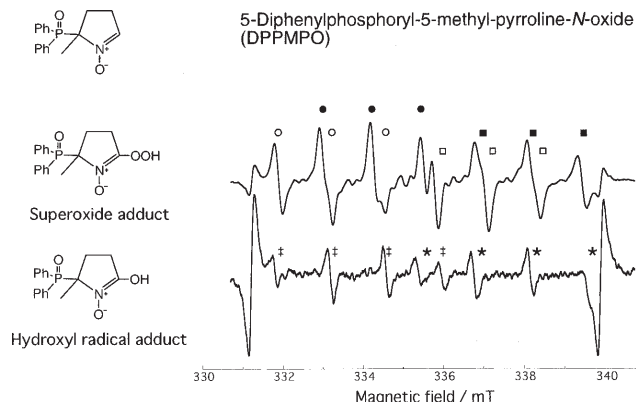


図9 ESR spectra of DPPMPO-OOH and DPPMPO-OH

表2 Hyperfine coupling Constants(mT) of Spin Adducts of HO₂・ and HO・ observed by various spin traps

Spin trap	untrapped radical	a _N	a _{Hβ}	a _{Hγ}	a _P
DMPO	HO・	1.49	1.49		
	HO ₂ ・	1.42	1.15	0.13	
M4PO	HO・	1.52	1.71		
	HO ₂ ・	1.46	0.64		
DEPMPO	HO・	1.40	1.30		4.74
	HO ₂ ・	1.34	1.19		5.25
DEPPMPO	HO・	1.35	1.05		4.99
	HO ₂ ・	1.17	0.83		3.72
*DPPMPO	HO・	1.35	1.19		1.88
	HO ₂ ・	1.37	1.49	0.043	3.18
	HO・	1.26	1.10		3.90
	HO ₂ ・	1.22	1.18		3.95
	HO・	1.37	1.37		3.55

表3 Half-Life of Aminooxyls Trapped Superoxide

Aminooxyl	t _{1/2} (min) at pH 7.4
DMPO	1
DEPMPO	15
DPPMPO	8

表4 Rate Constants for Spin Trapping O₂^{•-} and HO[•] by Nitrones

Hydroxyl Radical	
Spin trap	Rate constants (M ⁻¹ s ⁻¹)
DMPO	3.4 X 10 ⁹
TMPO	8.1 X 10 ⁹
DEPMPO	7.1 X 10 ⁹
DPPMPO	8.5 X 10 ⁹
Superoxide	
Spin trap	Rate constants (M ⁻¹ s ⁻¹)
DMPO	16
TMPO	7
DEPMPO	24
DPPMPO	42 ± 2

ラジカルの定量性を高めることができる。表3には、DPPMPOに捕捉されたO₂^{•-}スピニアダクトの寿命を半減期で表したが、DMPOに比べると、寿命は8倍であった。次にO₂^{•-}とHO[•]に対する反応速度を表4に示した。DPPMPOは反応速度がDMPOの3倍で、捕捉率も高いことが分かった。これらの特徴はスピントラップ法の新たな応用展開を可能とする。DPPMPO試薬は結晶であり、DMPOのように長期保存による分解が起こらない、さらに溶解させた後の試薬が長期安定であるなど、従来の試薬にない特徴を有している。

7. まとめ

本稿ではESR-スピントラッピング法の説明と生物ラジカル研究への応用について述べた。活性酸素研究の多くはDMPOによってなされてきたが、この試薬の欠点を補うスピントラッピング剤の開発が進められ、新しい試薬の開発が実現しつつある。新たに開発されたDPPMPOが安定に供給されることになれば、活性酸素・フリーラジカル研究への利用が期待できる。特に、白血球細胞や培養がん細胞、皮膚表面の炎症誘発物質などに活性酸素生成の測定が可能となる。

今後、多くの生物ラジカル研究者が新しい試薬を武器として、新しい発見をされることを期待したい。

参考文献

- 1) D. T. Sawyer and J. S. Valentine., *Acc. Chem. Res.*, **1981**, *14*, 393.
- 2) B. M. Babior, J. T. Gurnutte and B. J. McMurrich, *J. Clin. Invest.*, **1976**, *58*, 989.
- 3) E. Wertz and J. B. Bolton, "Electron Spin Resonance" McGraw-Hill, New York, **1972**.
- 4) H. M. Swartz, J. R. Bolton and D. C. Borg, "Biological Application of Electron Spin Resonance," Wiley-Interscience, New York, **1972**.
- 5) 大矢博昭, 山内淳著 電子スピン共鳴、講談社サイエンティフィック, **1989**.
- 6) 河野雅弘著 電子スピン共鳴、オーム出版社, **2003**.
- 7) J. Parkins, *Chemical Society*, **1970**, *24*, 97.
- 8) C. Lagererantz, *J. Phys. Chem.*, **1970**, *75*, 3466.
- 9) E. G. Janzen, *Acc. Chem. Res.*, **1971**, *4*, 31.
- 10) E. G. Janzen and C. A. Evans, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, 8205.
- 11) J. R. Harbor, V. Chow and J. R. Bolton, *Can. J. Chem.*, **1974**, *52*, 3549.
- 12) G. R. Buettner, *Free Radic. Biol. Med.*, **1987**, *3*, 259.
- 13) E. Finkelstein, G. M. Rosen and E. J. Rauckman, *J. Arch. Biochem. Biophys.*, **1980**, *200*, 16.
- 14) E. Finkelstein, G. M. Rosen, E. J. Rauckman and J. Paxtom, "Spin trapping of Superoxide." *Mol. Pharmacol.*, **1979**, *16*, 676.
- 15) H. Miyazawa, T. Yoshikawa, M. Tanigawa, N. Yoshida, S. Sugino, M. Kondo, M. Nishikawa and M. Kohno, *J. Clin. Biochem. Netr.*, **1988**, *5*, 1.
- 16) K. Mitsuta, Y. Mizuta, M. Kohno, H. Hiramatsu and A. Mori, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1990**, *63*, 187-191.
- 17) M. Hiramatsu and M. Kohno, *JEOL NEWS*, **1987**, *23A*, 7-9.
- 18) M. Kohno, M. Kusai-Yamada, K. Mitsuta, Y. Mizuta and T. Yoshikawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1991**, *64*, 1447-1453.
- 19) Y. Noda, M. Kohno, A. Mori and L. Packer, *Methods in Enzymology*, **1999**, *299*, 28-34.
- 20) I. Yamazaki and I. H. Piette, *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 13589.
- 21) K. Makino, A. Hagi, H. Ide, A. Murakami and A. M. Nishi, *Can. J. Chem.*, **1992**, *70*, 2818.
- 22) C. Frejville, H. Karouni, B. Tuccio, F. Le Moigene, A. Mercier, A. Rockenbauer and P. Tordo, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1994**, *15*, 1793.
- 23) N. Sankurati and E. G. Janzen, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 5313.
- 24) P. Tsai, K. Ichikawa, C. Mailar, S. Pou, H. J. halpern, B. Robinson, R. Nielsen and P. M. Rosen, *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 7811.
- 25) O. Inanami, T. Yamamori, T. A. Takahashi, H. Nagahata and M. Kuwabara, *Free Radic. Res.*, **2000**, *34*, 81.
- 26) K. Shioji, S. Tsukimoto, H. Tanaka and K. Okuda, *Chem. Lett.*, **2003**, *32*, 604-605.

著者紹介

氏名：河野 雅弘 (Masahiro Kohno)
 所属：東北大学未来科学技術共同研究センター
 量子生命反応工学創製部門
 連絡先：〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-10
 TEL: 022-795-4113 FAX: 022-795-4110
 E-mail: mkohno@niche.tohoku.ac.jp
 出身大学：愛媛大学文理学部化学科
 学位：博士(理学、医学)
 研究テーマ：磁気分光学 (ESR) 生物物理学、環境科学
 著書：活性酸素・フリーラジカルのすべて(丸善) 水と活性酸素(オーム社) わかりやすい抗菌・殺菌の基礎知識(オーム出版) 電子スピン共鳴装置(オーム出版) 強酸性電解水の基礎知識(オーム出版)

ライブセルイメージング技術講座

6

～ダイナミックレンジを拡げる1～

浜松医科大学光量子医学研究センター

櫻井 孝司

(浜松医科大学・21世紀COEプログラム
「メディカルホトニクス」の活動として掲載)

1. はじめに

星座は冬季の方が良く見えるという印象がある。理由は大気温度が低く、霧などの影響が少ないからだろう。加えて、新月のとき街灯から離れた場所がよい。通常の微弱光観察ではノイズや背景光を下げる事が鉄則であり、対象の明るさは調整できない。一方、ライブセル蛍光イメージングで整えるべき測定条件は2種類ある。1つは星観察と同じく背景光の抑制であり、もう一方は蛍光信号の増大である。連載第4回において、S/N比向上が高コントラスト像の取得につながるとした。今回は信号量の変化幅、すなわちダイナミックレンジ (dynamic range, Dレンジ) を拡げる方法に焦点をあわせる。イメージング例として細胞内Caイオン濃度測定を取り上げながら、より良い応答を得るコツについて解説する。

2. Caイメージングとは?

2.1 原理

細胞内 Ca 信号の生理機能への重要な役割は多くの総説による¹⁾。Ca濃度に依存してスペクトル変化するプローブを用いて細胞をライブステイニングすることで、細胞内におけるCaイオンのダイナミクスが解る(Fig.1)²⁾。Ca感受性蛍光色素³⁾、^{1, 2)}はCaキレートと蛍光団 (fluorophores) から成る。例えば Fura 2 では2-(5-carboxy-2-oxazolyl)benzofuran と BAPTA (O,O'-Bis(2-aminophenyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid, tetraacetoxymethyl ester) から、Fluo 4 は2,7-Difluoro-6-hydroxy-3-oxo-9-phenylxanthene と BAPTA から成る。キレートの化学構造によってCa親和性が決まる。Caとの結合によって特定波長におけるピーク値の強度が変動する。ピーク域の蛍光強度を測ることでCa²⁺濃度や分布が判り、時間経過から分子や細胞内信号の動態が見える。Ca応答から投薬効果や細胞内信号解析が解る。測定系はライブステイニング (live staining)、照明系

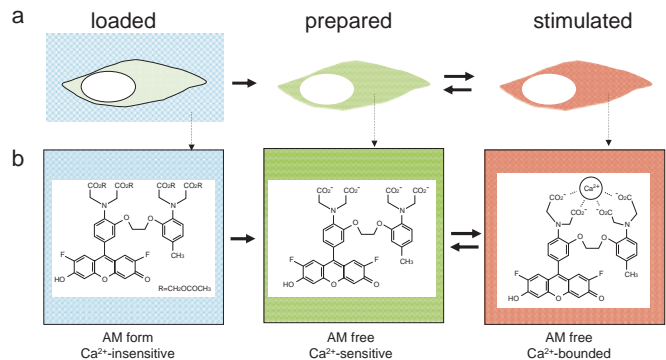


Fig. 1 Illustration of live cell fluorescent staining with Ca-sensitive dyes. a, different 3 states of cells as loaded (left), prepared (center), and stimulated (right). b, varieties of chemical forms of Fluo 4 depending on both water solubility and Ca sensitivity.

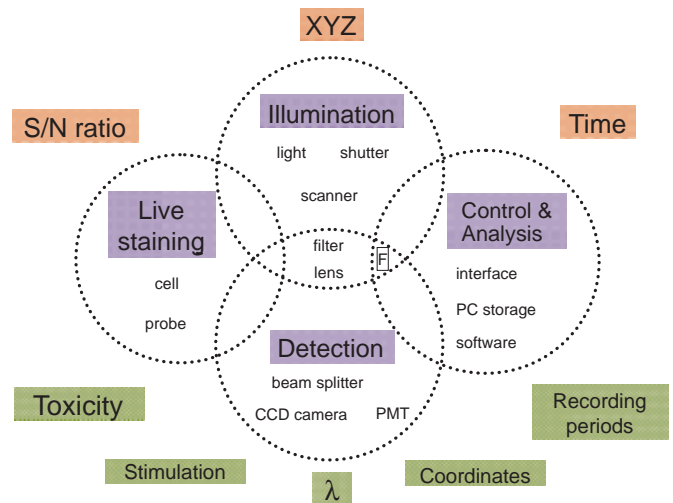


Fig. 2 4 imaging steps (violet), 3 essential performance (red) and 5 necessary parameters (green) for live cell fluorescence imaging.

(illumination) 撮像系 (detection)、制御解析系 (control & analysis) の4要素から成り(Fig.2)、そのままイメージング操作の4ステップ⁴⁾である。

2.2 8大イメージング性能

リアルタイムイメージングは4大性能といわれる3次元空間 (XYZ) の分解能、速度 (T)、S/N比、波長 (wavelength, λ) が向上すれば、より微小な応答を早く綺麗に画像化できる。また、次の4つを加えた全8性能が重要である。

- 座標 (coordinate)
- 記録期間 (recording period)
- 刺激法 (stimulation)
- 光毒性 (phototoxicity)

では多点測定における座標が安定し、測定数を容易に増やすことができる。では長期にわたる変化が連続的に追えるようになる。では投薬や電気刺激などの適用範囲がひろがれば、試験の回数や効率が増す。は細胞の励起光量が下がれば、細胞への光

毒性を抑えることができ、これまで抑制されて見えなかった応答まで検出することもできる。細胞の活性が維持できれば記録時間もさらにのびる。以上にあげた8性能は定量性や再現性だけでなく、細胞の応答性とも関係がある。

3. Caプローブを選択する

Ca用プローブは波長特性、親和性、細胞膜透過性、Dレンジの4点に留意して選択する^{1,2)}。用いる細胞との相性もあるので複数種を比較するほうがよい。

波長特性：紫外励起用と可視域用の2種類があり、現有している光源、細胞への光毒性、自家蛍光 (autofluorescence)、空間分解能など考慮する。可視域プローブの方がバランスがよい。励起と蛍光検出様式には1波長励起1波長蛍光検出、2波長励起1波長蛍光検出、1波長励起2波長蛍光検出がある。検出速度とS/N比にあわせて選ぶ。

K_d 値 (親和性)：蛍光強度が50%となるとき Ca^{2+} 濃度である。 K_d 値が低いものは高親和性、高いものは低親和性となる。細胞の Ca^{2+} 濃度変化量に応じて使い分ける。通常は数百 nM ぐらいの K_d 値を一次選択に用い、細胞応答が予想外に大きければ μM レンジのプローブを検討する。

細胞膜透過性：水溶性色素は細胞膜非透過性であり、脂溶性は細胞膜透過性である。色素が細胞膜を透過した後、細胞内に滞留するためには両方の性質を有している必要がある。水溶性色素におけるカルボン酸基をアセトキシメチルエステル化 (acetoxymethyl ester, AM) した AM 体は細胞膜を透過した後で、非透過型となるため、細胞質領域にとどまり、色素量は徐々に濃縮される。脱 AM 体となった色素の細胞外への漏出を防ぐためにデキストラン (dextran) を結合して分子量を高くしたものもある。色素を負荷したら、1時間以内に測定するのが望ましい。

Dレンジ：静止時と応答時における蛍光強度の変化幅である。相対的に大きいもの (Fluo 4) と小さいもの (Fluo 3) があり (Fig.3)、測定目的に応じて使い分ける。2種類のCaプローブを同時に用いるときはDレンジが近くて波長クロストークが小さいもの同士 (例えばFluo 3とFura red) を組み合わせるとよい。Calcium Green-1はFluoシリーズに比べて静止時において明るく (Dレンジは低い)、静止時に細胞形態をとる用途にむく。

4. 色素をロードする

色素の細胞への導入や移行様式について細胞内の濃度と分布に留意して述べる^{5,6)}。

細胞内濃度：AM体は細胞膜を透過するときエステラーゼにより、脱AM体となって細胞質に移行・集積する。集積の割合は添加したプローブ濃度、導入時間、温度に依存する。数 μM 濃度を細胞外溶液として添加し、室温で20分ほど負荷すると、細胞質での濃度は細胞外の約50倍程度になる。筆者の予備実験によると、応答Dレンジをあげるには細胞内濃度は50 μM 程度が適切であった。Caプローブ濃度が高くなり overload となると、光毒性増大が原因のためか、初期応答におけるピーク値は低下した。負荷する濃度が低すぎると、蛍光強度が弱くなり、ノイズ成分が相対的に増える。

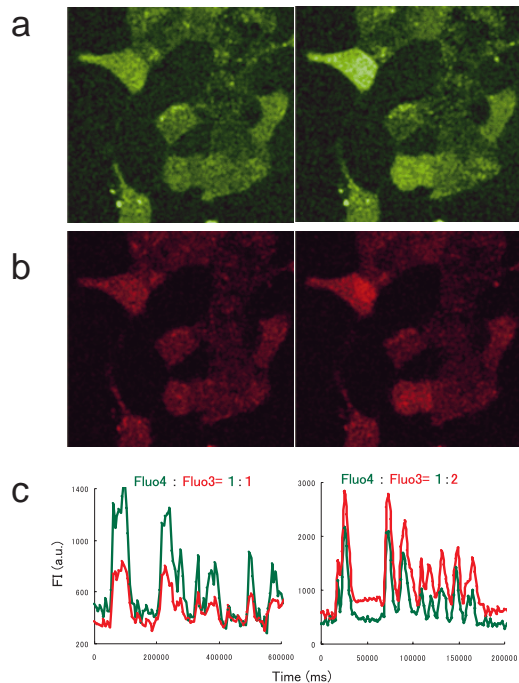


Fig. 3 Dynamic ranges of fluorescence signals in INS-1 cells stained with Fluo 4 and Fluo 3. a-b, simultaneous imaging of Fluo 4 (green) and Fluo 3 (red). c, Ca transients in cells stained with different doses (as shown in each graph) of dyes. Data were obtained at 14 th Medical Photonics Course Hamamatsu, 2005.

細胞内分布：色素のロード条件によって分布が変わる。細胞外から細胞質に移って脱AM体となった色素は次のいずれかとなる：1)そのまま留まる、2)外側へリークする、3)オルガネラに再分配される。細胞内における局在様式は色素の極性に依存し、疎水性の高い色素は核やオルガネラへ再分配されやすい。Fluoシリーズは核へ移行しやすい傾向がある。色素がオルガネラに不正に移行した場合、Caダイナミクスは細胞質領域と異なる挙動になる場合が多いので、再分配は背景光上昇の原因になる。したがって細胞質領域におけるCa変動だけを見たい場合は再分配の抑制に留意する。分布は親水性だけでなく標本との相性に左右されることもある。急性の脳スライスではFura 2が良好とされ、Fluo 3は非特異的な吸着が多い。ロードの初期手順における色素溶解の作業も注意を要する。溶解が不十分だと、残留した色素塊が細胞膜に吸着して測定精度を落とす。

5. 照明法を選ぶ

ライブステイニングした細胞に励起光を照射して蛍光分子を励起する。光照射の方式は見たい領域・範囲・S/N比など測定の目的に応じて、落射・共焦点・全反射法などから選ぶ。これら照明法の特長をごく簡単に説明する。

5.1 落射照明法 (epi-illumination)

比較的広い範囲を均一に見ることができる (Fig.4a)。核や細胞質を見たい場合に有効である。光源はランプを用いるので広い帯域を用いることができる。紫外領域を用いる場合は光源やフィル

ターの選択に注意が必要である。さらに自家蛍光の発生やDNAへの吸収の問題があるので、できることなら可視光を光源として用いた方がよい。Caイメージングにおいて静止時で細胞質や核が明るい細胞は状態が好ましくない場合が多い。

5.2 共焦点法 (confocal laser scanning)

細胞における濃度分布を落射法よりも高S/N比で三次元測定したい場合に向く。光走査法においてシングルビーム法とマルチビーム法に大別される。前者はガルバノミラーによる走査であり、任意の範囲 (ROI) 走査や分光が特長である (Fig.5)³⁾。後者は回転ディスクによる高速走査や低光毒性が特徴である (Fig.6)。マルチビーム法では光エネルギーを分散することができ、褪色が有意に遅延する⁷⁾。可視域レーザー光を用いるためCaプローブはFluo 3, Fluo 4, Rhod 2などが適用できる。

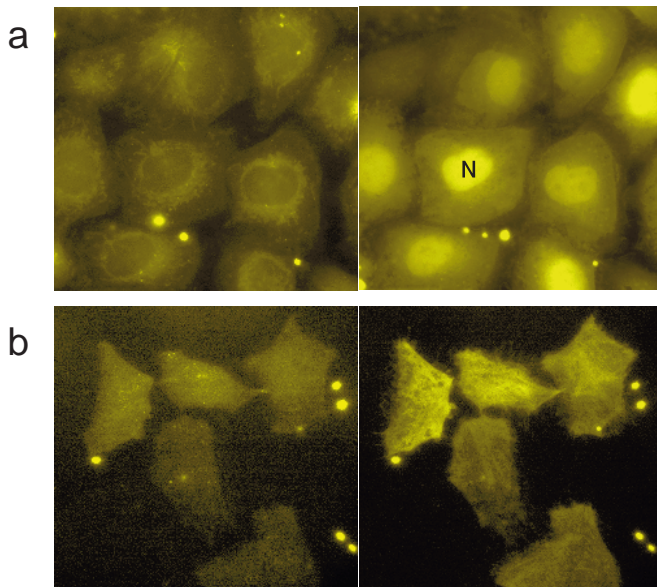


Fig. 4 Multimode observations of Fluo 4 fluorescence in HeLa cells. a, conventional epillumination mode, b, total internal reflection illumination with Hg arc lamp. Images were captured before (left side) and immediately after (right side) stimulation by drug administration. Nikon objective lens (60x TIRF, NA=1.45) with focus-correction system was used for the timelapse recording.

5.3 全反射法 (total internal reflection, TIRF)

ガラスと水の界面付近 (細胞膜近傍) におけるダイナミクスを分子レベルで測定できる。細胞内へのCaイオン流入、細胞膜近傍に存在するシグナル変化がわかる。光源としてレーザー式とランプ式³⁾がある (Fig.4b)。前者は汎用法であり、後者は明るさが暗いが均一な照明ができる。

6. 細胞を選ぶ

6.1 主観か客観か

細胞の選択基準は何か? 形態・明るさ・強度分布などが目安となるが、細胞ごとに表現が違っていて、一定の基準など無い。それでも応答が良いと予想できる、高期待値な細胞は存在する。熟練者は経験則に基づく基準があるらしく一目見るだけで期待値が

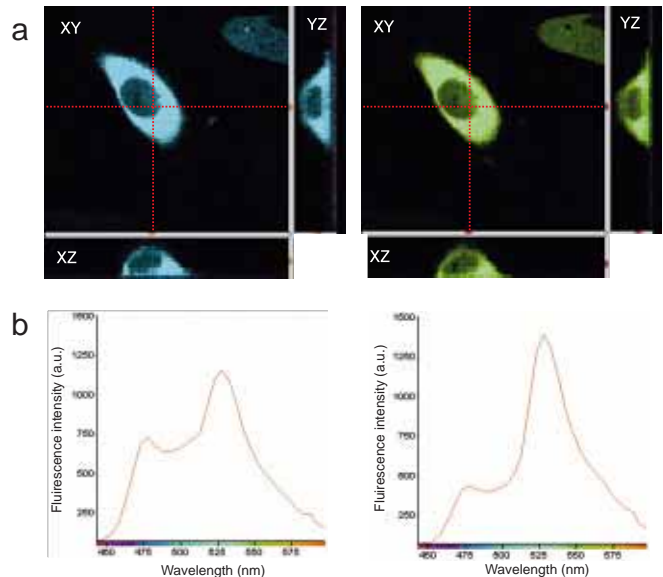


Fig. 5 5-dimensional analysis of Ca-dependent fluorescence signals by spectral confocal microscopy. a, 3D images (XY, XZ and YZ) of Yellow Cameleon 3.6 (YC 3.6)-expressed HeLa cell before and after stimulation. b, spectral changes in YC3.6 fluorescence upon Ca-dependent FRET between CFP and YFP. Data was courtesy from Cell Imaging Press, Nikon.

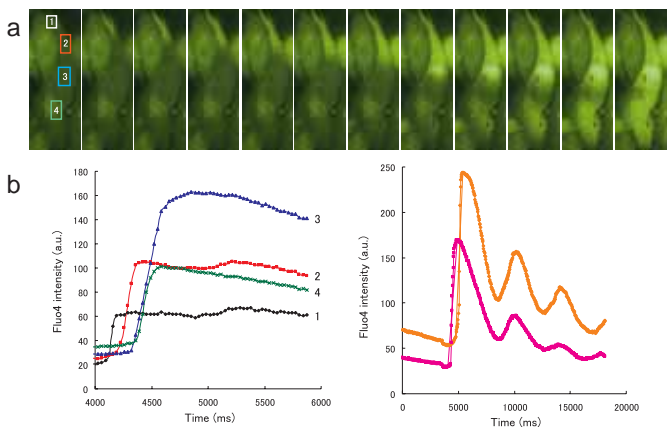


Fig. 6 Video rate Ca imaging by spinning disk confocal microscopy. a, Ca wave in HeLa cells. b, timecourse of Ca signals as an initial rise in a cell (left) or oscillatory changes in different cells (right). Images (Fluo 4 stained cells) were recorded with Olympus confocal scanner (DSU) and Andor EM-CCD camera.

判るという。一方でランダムに選んで実験の結果次第ということも聞く。実際、静止時の画像がどんなに美しくても投薬などにより反応が良好とは限らない。全ての細胞が一様に反応する場合もあるし、一部だけのこともある (Fig.3 & 4 参照)。測定を繰り返すにしたがって徐々に独自の判断基準ができるようになればしめたものである。最低限これだけという鉄則が1つある。それはできるだけ「素早く候補を決めること」である。色素ロードや光照

射を開始した時点から細胞の状態は急速に悪化しはじめるので、じっくり選ぶメリットはあまりない。

6.2 素早く決断・測定数を増やす

細胞への照射量はできるだけ抑えたい。ところが、実際は測定開始まで長時間照射してしまう。測定前に必ずピントを合わせる必要があり、これが最も時間を要する。投薬など刺激の回数に限度があるのも問題である。苦勞して調整した大切なサンプルはできるだけ効率的に用いたい。刺激回数を増やすためにパフィンギベット、光刺激、電気刺激などの適用を試行してほしい。投薬法に制限がある場合は、一度で記録される細胞数を増やすしかない。倍率が低くても、十分に明るい対物レンズがあるので(例: SFluor 4x, NA=0.2, Nikon) これらを活用する手もある。

7. レシオ法は何がよい?

2波長の光で色素を励起し、蛍光強度の比 (ratio) の演算による解析法⁹⁾には2つのメリットがある。

測定条件の差がキャンセルできる

励起光パワー、蛍光色素濃度などがキャンセルされる。それぞれの褪色速度が同程度ならベースラインが一定になる。

数値があがる

Fura 2による2波長励起1波長検出が有名である。Ca濃度に依存して、340 nm 蛍光強度は上がり、380 nm は下げるので両者の比をとれば数値があがる。Indo では1波長で励起し、2波長蛍光で比を演算する。青色を励起光としたとき、Calcium Green-1はCa濃度に依存して緑蛍光強度があがり、他方Fura-redは赤蛍光がCa濃度に依存して下がる。2種類の色素で標識してレシオ法を適用する方法もある(Fig. 7)。

レシオ法には1回の測定時間を要するという欠点がある。2波長を同時に追跡できない場合は早い動きを呈す標本への適用は不向きである。1波長励起2波長蛍光検出であれば、分割光学系を用いる方法がある。この場合の短所は光量のロスであるので、暗い対象を追跡する場合は不向きとなる。

8. 検出法を工夫する

8.1 時間軸

時間方向に対する輝度変化からROIのタイムコースを求める。3次元(XYZ)とあわせると4次元解析になり、細胞質と核、または異なる細胞間での信号伝播が解析できる。速度を上げると記録枚数が増えてしまうという欠点がある。OSやメモリの仕様により、一度では2Gまでしか取得できない場合がある。このような場合は取得するHDDに直接書き込む、関心領域を狭めるなど工夫する。

8.2 Z軸

Z軸(3次元): Z軸方向に対する輝度変化(フォーカスの画像)から3次元構築する。ピエゾドライブによるフォーカス変位と画像取込みの同期により、最速で毎秒10立体以上を取得できる⁴⁾。筋細胞や線虫など動きの大きな標本の信号をとらえることができる。

8.3 波長

蛍光スペクトル特性の違いから複数の信号を分離する。フィルタによる簡易法、グレーティングによるスペクトル法がある。フィルタによる簡易法では分割光学系を用いた検出がある。スペクトル法

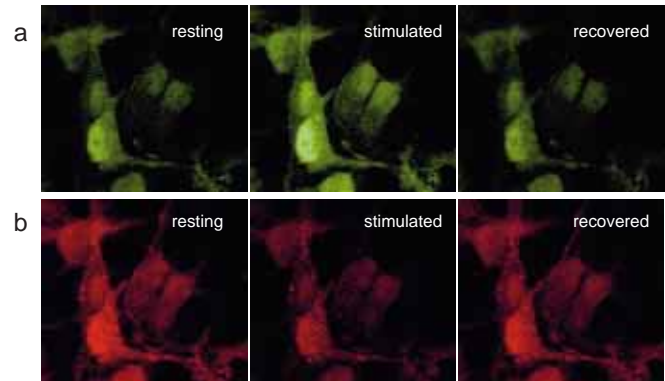


Fig. 7 Dual confocal imaging of Fluo 3 (green-colored in a) and Fura red (red-colored in b). Cultured hippocampal neurons were stained with the Ca-sensitive dyes, and stimulated with glutamate.

では10 nmのスペクトルピーク差があれば分離できるとされる。そのためFluo 4とGFPの分離・同時イメージングもできる(Fig. 8)。1種のレーザー励起だけで複数の信号を区別することができる。

9. ピントを維持する

ピント位置の自動補正によっても、記録時間、記録座標などのDレンジが拡張する。ピントの補正は、これまで手動によるものだったが常時正確とはいかない。カバーガラスと水の界面で発生する部分反射光の利用を原理とした焦点維持システムを適用するとよい。カバーガラス越しで対物レンズ先端と標本の距離が一定の距離で保たれ、任意に定めたピント位置を半自動的にリアルタイムで維持できる。熱膨張や衝撃等で、ピントが一瞬ずれても即座に復帰する。このようにピントを高度に維持することは、多くの奏功がある。1つはピント位置のナビゲーションができていたので、ピント位置の見失いから開放されることである。2番目は投薬直後における初期応答の見逃しがなくなったことである。3つめは手動によるピント補正が減ったので、手間を他の作業に割り当てることができるようになったことである。ピント維持技術はライブセルイメージング技術における定量性や再現性を安定させる効果があり、必須な技術となるであろう。

10. おわりに

今回はCaイメージングにおける細胞応答や測定性能向上のために留意すべきポイントを紹介した。従来の蛍光イメージングでは“より早く”“より細かく”“より明るく”撮ることに留意されていたが、“より拡く”“より確実に”、しかも“よりやさしく”撮ることが求められるようになってきている。星座の撮影ではベストショットにつながる測定環境は偶然に訪れる。他方で夜景なら人為的に施せる改善の余地がある。イメージング技術の向上によって、細胞の撮影はかなり身近で手軽になりつつある。これは細胞イメージングを低侵襲で行う新たなステージの到来を意味し、これまで見たこともないような高次機能を録る機会遭遇となるであろう。次回はワイドレンジタイムラプス法についてGFPイメージングを例にして紹介する。

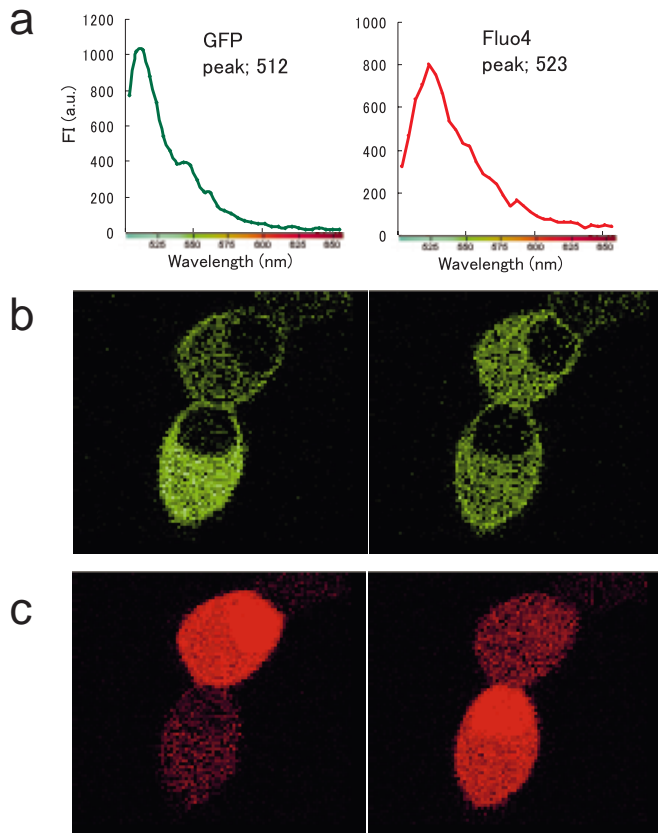


Fig. 8 Unmixing of Fluo 4 and GFP by spectral confocal microscopy for simultaneous imaging of Ca and PKC signal. a, Spectral curves of PKC-GFP (left) and Fluo4 (right). b-c, dynamic changes in the signal intensities of PKC (green) and Ca (red).

謝辞

本原稿執筆において㈱ニコンとオリンパス㈱よりデータ提供と助言をいただいた。

参考文献

- 1) M. J. Berridge, *Annu. Rev. Physiol.*, **2005**, 67, 1.
- 2) 細胞内カルシウム実験プロトコール (工藤佳久編), 羊土社, **1996**
- 3) R. Y. Tsien, *Methods Cell Biol.*, **1989**, 30, 127.
- 4) 櫻井孝司, 寺川進, 実験医学バイオイメージングがわかる (高松哲郎編), p22, 羊土社, **2005**.
- 5) Y. Kudo, 日本薬理学雑誌, **1993**, 102, 313.
- 6) T. Kawanishi, 日本薬理学雑誌, **1998**, 112, 89.
- 7) E. Wang, C. M. Babbey and K. W. Dunn, *J. Microsc.*, **2005**, 218, 148.
- 8) R. B. Silver, *Methods Cell Biol.*, **2003**, 72, 369.

* 1) <http://www.dojindo.co.jp>
 * 2) <http://www.invitrogen.com/>
 * 3) Cell Imaging Press, June, Nov (2005) ㈱ニコンインステック
 * 4) <http://www.yokogawa.co.jp/SCANNER/>

関連商品

細胞内カルシウムイオン測定用試薬

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
Fura 2	1mg	24,200	F014
Fura 2-AM	1mg	28,800	F015
Fura 2-AM special packaging	50 µg × 8	18,200	F025
Fura 2-AM solution	1ml	38,800	F016

特長:

- 1) 錯体形成により励起波長がシフトする ($\lambda_{ex} = 380 \text{ nm} \sim 340 \text{ nm}$) ことから ratiometry が可能。
- 2) ratiometry により、プローブ濃度や励起光強度、試料の厚みの影響が避けられる。

Solution は、Fura 2-AM の DMSO 溶液 (1 mmol/l) です。

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
Fluo 3	1mg	25,000	F019
Fluo 3-AM	1mg	33,400	F023
Fluo 3-AM special packaging	50 µg × 8	23,800	F026

特長:

- 1) 可視光励起であるため、紫外光照射による細胞損傷の影響が少ない。
- 2) Ar レーザー (488 nm) を励起光源として利用可能。

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
Fluo 4-AM	1 mg	39,000	F311
Fluo 4-AM special packaging	50 µg × 8	29,000	F312

特長:

- 1) Ar レーザー励起 (488 nm) による蛍光強度が Fluo 3 の約 2 倍である。
- 2) Fluo 3 と同様に共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) やフローサイトメーターなどのレーザー励起機器が利用可能。

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
Calcium Kit - Fluo 3	2000 assays	65,000	CS21

特長:

- 1) probenecid や界面活性剤を組み込んであり、任意に濃度設定が可能である。
- 2) ハイスループットスクリーニングに用いられる各種蛍光プレートリーダーで測定可能である。
- 3) 96穴マイクロプレート、384穴マイクロプレートの両方に対応している。

AM 体は、カルボキシル基を AM 化することにより脂溶性を高めたもので、細胞膜を容易に透過します。そのため、細胞懸濁液に混ぜるだけで細胞内に Ca プローブを導入できます。

Topics on Chemistry

リボヌクレアーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ活性の ON-OFF 制御

九州大学大学院 丸山 達生, 後藤 雅宏

遺伝子工学のめざましい進歩に伴い、遺伝子操作ツールとしての核酸関連酵素の重要性が日に日に高まってきている。一方で RNA 操作におけるリボヌクレアーゼ活性の抑制、DNA 操作におけるデオキシリボヌクレアーゼ活性の抑制は必須のプロセスであり、効果的かつ多様なヌクレアーゼ活性抑制剤（阻害剤）が求められている。また核酸調製あるいは遺伝子解析において、これらヌクレアーゼを用いる方法がいくつも開発され、ただ単にヌクレアーゼ活性を抑制するだけでなく、人為的に活性を On-Off 制御する技術も必要になると考えられる。

最近筆者らは貴金属イオンとタンパク質の非常に強い相互作用を見出し、比較的広い pH 領域で貴金属イオンがタンパク質に吸着すること、貴金属イオンとのより強い相互作用を有する錯化剤（チオ尿素等）の添加によりタンパク質から貴金属イオンを脱着可能なことを明らかにしてきた¹。そこで、この相互作用を酵素活性の On-Off コントロールに利用できるのではないかと考えた（Fig. 1）。検討した酵素は、リボヌクレアーゼ A（RNase A）とデオキシリボヌクレアーゼ I（DNase I）である²。

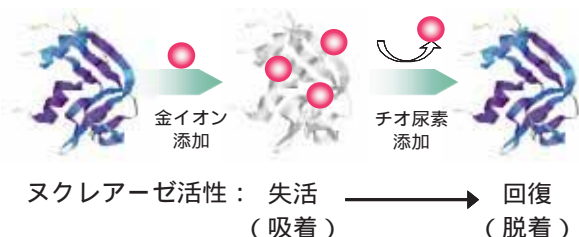


Fig. 1 Schematic illustration of nuclease-activity control by gold(III) ions.

中性条件下で、RNase A および DNase I に金イオン（テトラクロロ金酸）を添加したところ、金イオンの濃度増加に従いヌクレアーゼ活性をどちらも抑えることに成功した（Fig. 2、青色）。RNase A では 3 モル等量で活性をほぼゼロに、また DNase I では 30 モル等量で活性を 0.1% 以下にまで抑制できた。ここに金イオンの強力な錯化剤であるチオ尿素を添加すると、即座にその酵素活性が回復した（Fig. 2、緑色）。先のヌクレアーゼ活性を抑制可能な金イオンのモル等量では 90% 弱の RNase 活性の回復、および 60% 弱の DNase 活性の回復が見られた。つまり金イオンの添加によりヌクレアーゼ活性を Off に、チオ尿素の添加によりヌクレアーゼ活性を On にすることに成功した。

RNase A は非常に安定（熱失活後も Refolding する）かつどこにでも存在する酵素であり、RNA を用いる操作では一般に RNase 阻害タンパク質が必須である。市販の RNase 阻害タンパク質は、ヒト胎盤由来あるいはブタ肝臓由来のものであり、非常に高価である（～数万円）。一方、今回見出した金イオンは非常に安価で、RNase 阻害における必要コストは RNase 阻害タンパク質の 1000 分の 1 以下に抑えられる。また同時に DNase も阻害可能なことから、RNase 活性フリーおよび DNase 活性フリーな環境を同時に調製可能になると考えられる。しかもチオ尿素添加により容易にヌクレアーゼ活性を回復（活性 On）させることができるため、金イオンは今後有用な遺伝子操作ツールとして期待される。

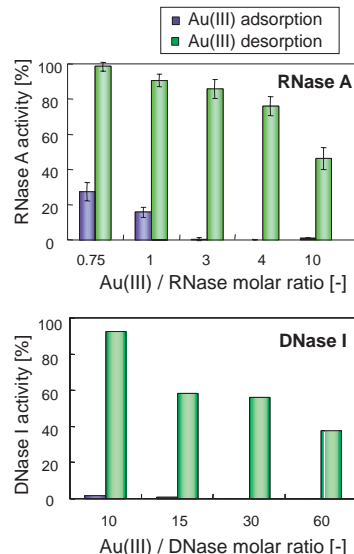


Fig. 2 Effects of Au(III) ions on ribonuclease A and deoxyribonuclease I activity.

参考文献

- 丸山ら、農芸化学会 2005 年度大会要旨集、29K012β
- 園川ら、第 70 回化学工学会年會要旨集、F315

著者紹介

氏名：丸山達生（Tatsuo Maruyama）
 年齢：31 歳
 所属：九州大学大学院工学研究院応用化学部門 助手
 連絡先：〒819-0395 福岡市西区元岡 744
 TEX: 092-802-2919, FAX: 092-802-2810
 E-mail: tmarutcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp
 学位：博士（工学）
 研究テーマ：

- 貴金属イオンと生体分子の相互作用を利用した分離場・酵素反応場の構築
- 脂質ナノ分子集合体を利用したナノリアクタの構築
- 酵素の物質認識能を利用した分離システムの構築

氏名：後藤雅宏（Masahiro Goto）
 年齢：44 歳
 所属：九州大学大学院工学研究院応用化学部門 教授
 連絡先：〒819-0395 福岡市西区元岡 744
 TEL: 092-802-2806, FAX: 092-802-2810
 E-mail: mgototcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp
 学位：博士（工学）
 研究テーマ：

- 新規遺伝子解析方法の開発
- イオン液体中における酵素反応
- 界面活性剤を利用した新規 DDS システムの開発
- 分子認識化合物を用いた溶媒抽出

Topics on Chemistry

多光子励起によるタンパク質機能阻害法

株式会社 同仁化学研究所 菅原 由子

ポストゲノム時代を迎えた今日、タンパク質の網羅的機能解析が広く行われている。様々な生命現象を担うタンパク質の機能解析を行う上で、特定タンパク質の機能を制御、阻害する技術は有効な手段の一つである。現在までにRNAiやノックアウトなどといったタンパク質機能阻害法により、様々なタンパク質の機能解析が進められてきたが、これらの方法ではタンパク質が機能する場所と時間を正確に解析することは十分とは言えない。生体内におけるタンパク質の機能解析において最も重要なことは、生体や生細胞において、そのタンパク質が実際に機能を発揮する場所と時間での解析であり、より高度な時空間的分解能を有するタンパク質機能阻害技術が必須である。

レーザー分子不活性化法 (Chromophore-assisted laser inactivation: CALI) は高い時空間分解能を持つ方法として1988年に報告¹⁾されて以来、多くの研究者に用いられている。CALI法は、マラカイトグリーン等の色素を化学標識した抗体やリガンドと目的タンパク質が特異的に結合した状態でレーザー光を照射することで色素の発色団から活性酸素種(フリーラジカル)が生じ、そのラジカルが目的タンパク質の構造変化を誘起させ、結果として目的タンパク質の機能を不活性化するというものである²⁾。現在、様々な手法により行われている蛍光イメージングにおいて緑色蛍光タンパク質(GFP)が汎用されているが、CALI法を用いた研究論文ではフルオレセインやマラカイトグリーンなどと比較して、GFPはフリーラジカル放出効率が200~1000倍も低いといった理由により、CALI法では使用できないとされてきたのが現状であった。

しかし最近、田辺らによってEGFP(enhanced GFP)および多光子励起を応用したMP-CALI(multiphoton excitation-evoked chromophore-assisted laser inactivation)を用いて特定タンパク質の機能阻害が可能であるという興味深い報告がなされ、MP-CALIによりGFPが使用可能であることが示唆された³⁾。多光子励起にはフェムト秒パルスレーザーを用いるが、フェムト秒という非常に短い時間幅に高強度の光を集中させた複数の光子を1フェムトリットルという非常に狭い空間へレンズを通して集光することができる。したがって、一光子励起と比較してレーザーが通過する領域が制限されるため、焦点のごく近傍にある蛍光物質のみが励起され、焦点の周辺にある蛍光物質は励起されない(図1)。この性質を利用することによって、目的タンパク質分子の周辺にある構造を破壊することなくピンポイントで特定のタンパク質分子のみを破壊することができるため、周辺タンパク質分子の機能は保持したまま破壊したタンパク質のみの機能制御が可能となる(図2)。

田辺らはMP-CALIを用い、細胞膜間構造であるギャップ構造を構成するコネキシン43(Cx43)とEGFPとの融合タンパク質を細胞へトランスフェクションし、Cx43のC末端にEGFPが結合したCx43-EGFPを発現させている。その後、EGFPの緑色蛍光が観察される部位を850 nmのフェムト秒パルスレーザーで多光子励起すると、EGFPは素早く退色すると同時に、ギャップ結合の機能が失われたことを確認している。その他、染色体の動原体を紡錘糸に正常に結合させる機能を持つとされるaurora Bに対するMP-CALIが行われ、aurora Bの不活性化により機能が抑制

され、細胞分裂が中止することも明らかにされた³⁾。この結果は、既にRNAiで得られていたaurora Bの機能と合致するものである。現時点でMP-CALI法による機能不活性化機構はまだ完全に明らかにはなっておらず、今後の研究が大いに期待されるが、MP-CALIはRNAiなどの他のタンパク質機能阻害法にはない高い時間分解能、空間分解能を有しており、先に述べた報告はタンパク質機能阻害法としてのMP-CALIの有用性を十分示唆するものである。

一光子励起に用いる紫外、可視光と比較して、多光子励起に用いる赤外光は2倍程度の波長を持つゆえ一つの光子のエネルギーが1/2程度となるため、生体細胞へのダメージも少なく、光散乱も少ないため試料中の深部でも観察が可能であるという特長も持つ。現在までに多光子励起を用いた*in vivo*でのタンパク質機能解析も報告されており^{4,5)}、将来的には細胞レベルだけではなく、個体レベルでのタンパク質機能不活性化も十分可能である。MP-CALIを含め、多光子励起の幅広い分野における応用が今後期待される。

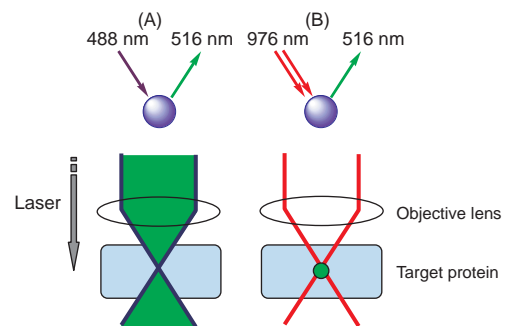


図1. 一光子励起 (A) と多光子励起 (B) ...励起される領域

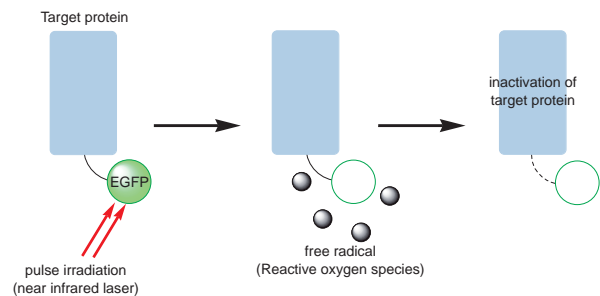


図2. MP-CALI法の原理

参考文献

- 1) D. G. Jay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, *85*, 5454.
- 2) E. Horstkotte, T. Schroder, J. Niewohner, E. Thiel, D. G. Jay and S. W. Henning, *Photochem. Photobiol.*, **2005**, *81*(2), 358
- 3) T. Tanabe, M. Oyamada, K. Fujita, P. Dai, H. Tanaka and T. Takamatsu, *Nature Methods*, **2005**, *2*, 503
- 4) W. D. Kenneth, R. M. Sandoval, K. J. Kelly, P. C. Dagher, G. A. Tanner, S. J. Atkinson, R. L. Bacallao and B. A. Molitoris, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2002**, *283*, C905.
- 5) E. C. Rothstein, S. Carroll, C. A. Combs, P. D. Jobsis and R. S. Balaban, *Biophys. J.*, **2005**, *88*, 2165.

新製品

蛍光ラベル化キット

HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH₂ HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH₂

本製品は、抗体など分子量50,000以上で反応性のアミノ基を有する少量のタンパク質を蛍光標識するためのキットです。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。これまでのFluorescein Labeling Kit - NH₂に加えて、550 nm付近、650 nm付近のより長波長で励起できるHiLyte Fluor™色素をラインナップに追加いたしました。Fluorescein Labeling Kit - NH₂を含めた波長特性は、表1または図3をご参照ください。50 ~ 200 μgのタンパク質を、わずか2時間で蛍光標識することができ、得られた標識体はそのまま免疫染色などの様々な用途に利用することができます。1キットで3サンプル標識できます。

HiLyte Fluor™色素はアメリカのAnaSpec社が開発した蛍光色素です。HiLyte Fluor™ 555 は Alexa Fluor® 555 や Cy3 と、HiLyte Fluor™ 647 は Alexa Fluor® 647 や Cy5 とそれぞれ類似した波長特性を持っています。蛍光強度は Alexa Fluor® Dye や Cy Dye より強く、一方、蛍光顕微鏡下で励起光を照射し続けた場合の蛍光強度の減少（褪色）の程度は Alexa Fluor® Dye と同等です。

標識操作



- (1) タンパク質 50 ~ 200 μg を含むサンプル溶液と WS Buffer 100 μl を Filtration Tube に入れ、ピペティングにより軽く混合する。
- (2) 8,000 x g で 10 分間遠心する。
- (3) NH₂-Reactive HiLyte Fluor 555/647 に 10 μl の DMSO を加え、ピペティングにより溶解する。
- (4) Filtration Tube のメンブレン上に Reaction Buffer 100 μl を加えた後、NH₂-Reactive HiLyte Fluor 555/647 を含む DMSO 溶液 8 μl を加える。
- (5) ピペティングによりメンブレン上のタンパク質と混合した後、37 °C で 10 分間反応させる。
- (6) WS Buffer 100 μl を Filtration Tube に入れ、8,000 x g で 10 分間遠心する。遠心後、ろ液を捨てる。
- (7) WS Buffer 200 μl を Filtration Tube に入れ、8,000 x g で 10 分間遠心する。この操作をもう一度繰り返す。
- (8) WS Buffer 200 μl を Filtration Tube に入れ、10 回程度ピペティングし、標識体を回収する。マイクロチューブに移し、0 ~ 5 °C で保存する。

<特長>

- 約 2 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保存ができる。

<キット内容>

NH ₂ -Reactive HiLyte Fluor™ dye	3 本
WS Buffer	4 ml × 1 本
Reaction Buffer	500 μl × 1 本
Filtration Tube	3 本
HiLyte Fluor™ 555 または 647	

<本キット以外に必要なもの>

- 10 μl, 200 μl マイクロピペッター
- インキュベーター (37 °C)
- マイクロチューブ (標識体保存用)
- 遠心機 (マイクロチューブ用)
- DMSO

HiLyte Fluor™ は AnaSpec 社の商標です。

Alexa Fluor® は インビトロジェン株式会社の登録商標です。

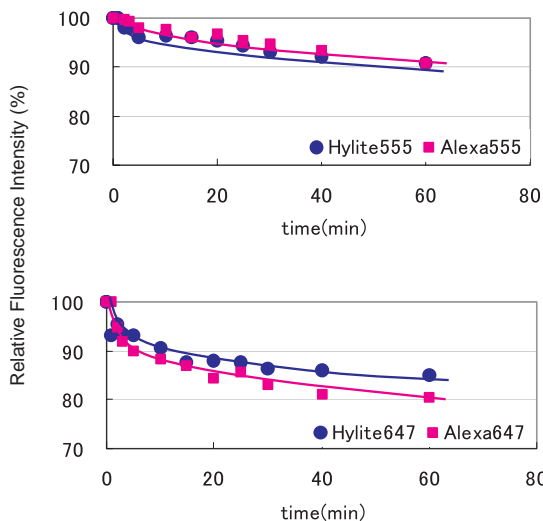


図1 HiLyte Fluor™ と Alexa Fluor® を蛍光顕微鏡でG励起光を照射した場合の蛍光強度の変化

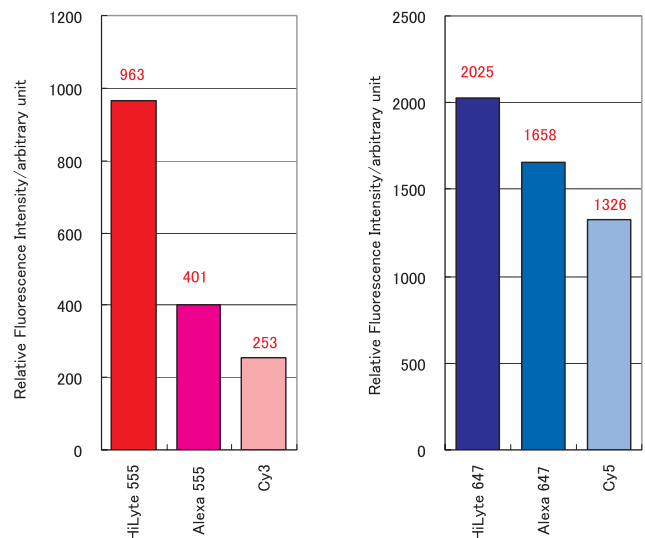


図2 色素の蛍光強度比較 (10 ppb 硫酸キニーネの蛍光を 100 とした場合の相対蛍光強度)

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

九州大学 - 同仁化学組織対応型連携に関するお知らせ

表 1 標識体の波長比較

品名	標識体の励起・蛍光波長
Fluorescein Labeling Kit - NH ₂	$\lambda_{ex/em} = 500 / 525 \text{ nm}$
HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH ₂	$\lambda_{ex/em} = 555 / 570 \text{ nm}$
HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH ₂	$\lambda_{ex/em} = 655 / 670 \text{ nm}$

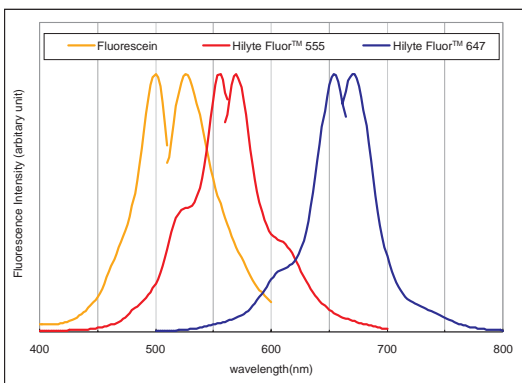


図 3 Fluorescein 及び HiLyte Fluor™ 色素の励起・蛍光スペクトル

< ご使用上の注意 >

分子量が50,000以上で、反応性のアミノ基を有するサンプルへ標識することができます。

試料溶液中に標識対象以外の分子量10,000以上の物質が含まれる場合は、標識反応を阻害する恐れがあります。特に市販の抗体は安定化剤としてゼラチンやアルブミンなどの高分子が添加されている場合があります。このような安定化タンパクが添加された抗体や、抗血清、マウス腹水のような未精製抗体をご使用の場合は、あらかじめアフィニティーカラムなどにより精製してご使用ください。精製方法に関してご不明な点がございましたら、小社までご相談ください。

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH ₂	3 samples	21,000	LK14
HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH ₂	3 samples	21,000	LK15

総合カタログに関して

小社の総合カタログ24版(2004-2005)の在庫が無くなり、皆様にご迷惑をおかけしております。
次版の25版(2006-2007)は2006年2月に発行となります。もうしばらくお待ち下さいませよう、お願い申し上げます。

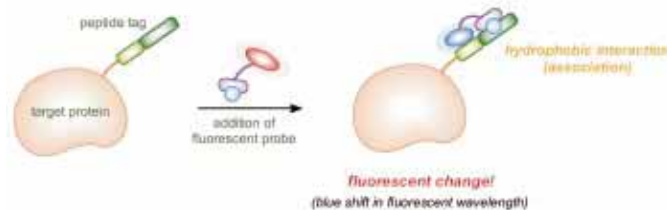
学会展示のご案内

下記会場にて、小社試薬製品のご案内を行います。
皆様のご来場をお待ちしております。
第79回日本薬理学会
平成18年3月8日(水)~10日(金) パシフィコ横浜

九州大学と小社は、九州大学での優れた研究成果を迅速に実用化することを目的に組織対応型(包括的)連携契約を締結致しました。下記の技術に関して現在実用化を検討しております。これらにご興味ございましたら小社までお問い合わせ下さい。

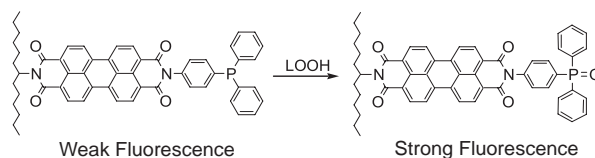
No.001 タンパク質蛍光標識技術

タンパク質の蛍光標識技術として、場感受性の蛍光基を結合した新規キレート錯体化合物と新規タグ(通常のアミノ酸タグの近傍に更に疎水性部位を有するアミノ酸を複数個有するペプチドタグ)とを組み合わせる新規な手法を開発した。例としてダンシルアミドとニトリロ三酢酸(NTA)を結合した新規Ni()錯体化合物とWWHHHHHHタグ(W:トリプトファン、H:ヒスチジン)を利用した場合、錯体化合物のタグ認識に伴い蛍光の大きな変化(蛍光強度の増大と最大蛍光波長のブルーシフト)が観測されることを既に確認している。これは、タンパク質を効率的に蛍光標識するための有用且つ全く新しい技術である。



No.002 過酸化脂質計測用蛍光試薬

ジフェニルホスフィンのリン原子に対して極めて優れた蛍光特性を有するペリレン類を連結した過酸化脂質計測用蛍光試薬を開発した。例としてジフェニルホスフィンに perylene 3,4,9,10-tetracarboxyl bisimide 誘導体を連結した過酸化脂質計測用蛍光試薬を合成し、脂溶性過酸化物質である m-chloroperoxybenzoic acid (MCPBA) を添加したところ、ホスフィンオキシド体の形成に伴い蛍光が大きく増強した。本化合物の蛍光波長は十分に長く($\lambda_{ex} = 524 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$ in methanol)、DPPP のような短波長励起が必要な従来の過酸化脂質計測用蛍光試薬で問題となる生体試料由来の自家蛍光の影響や生細胞へのダメージを大きく軽減できる。また本化合物の反応体(ホスフィンオキシド体)の蛍光量子収率は極めて高くなっている(~ 1 in methanol)、このように本試薬は、過酸化脂質計測用蛍光試薬として非常に優れた特徴を有している。



試作品

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

IgG 精製キット

IgG Purification Kit - A
IgG Purification Kit - G

<特長>

- 精製操作は約 30 分で完了
- 高純度・高回収率
- 1 回につき 50 μ l の血清や腹水、200 μ g の程度の抗体精製が可能
- プロテイン A/G 固定化ゲルは約 10 回の再利用が可能
- 小社ラベリングキットシリーズに適した量の抗体精製が可能

各種動物への免疫後に得られる腹水や血清などにはイムノグロブリン G (IgG) の他に、アルブミンなどのタンパク質が多く含まれており、総タンパク質量の 60% 以上を占めています。しかし、ほとんどのアッセイにおいて必要な成分は IgG 画分のみであり、IgG 以外のタンパク質成分を除去することによりバックグラウンドが低減し、アッセイ感度を上げることができます。また、酵素や蛍光標識などを行うためには IgG 画分のみへ精製することが必要とされます。

腹水や血清、培養上清中に含まれる抗体は、硫酸塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマト法、あるいはプロテイン A/G クロマト法などにより精製されます。IgG Purification Kit - A 及び IgG Purification Kit - G は、各種動物の IgG を単離、精製するためのキットです。キットにはプロテイン A またはプロテイン G 固定化ゲル、および各種緩衝液が含まれており、わずか 30 分で IgG を高純度、高回収率で精製することができます。

プロテイン A/G 固定化の担体としてはシリカゲルを採用しています。遠心後のプロテイン A/G 固定化ゲル上の残液量はごく少量であり、プロテイン A/G への抗体結合後のゲル洗浄操作によって、プロテイン A/G 未結合の物質を完全に除去することができます。また、プロテイン A/G へ結合した IgG は溶出時の酸性条件下に長時間さらすことなく素早い溶出操作を行うことで、IgG の活性低下を最小限に抑えられます。

本キットは 1 回の精製につき 50 μ l の腹水や血清、200 μ g 程度の IgG の精製が可能です。

なお、プロテイン A 及びプロテイン G に対する IgG の親和性は動物種により異なりますので、表 1 を参考にしてください。

<キット内容>

- Protein A pack (または Protein G pack) • Washing Buffer
- Elution Buffer • Catching Buffer

<本キット以外に必要なもの>

- マイクロピペッター • マイクロチューブ
- 遠心機 (マイクロチューブ用) • ボルテックスミキサー

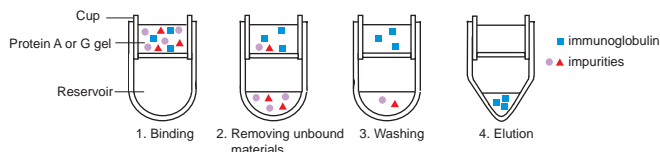


図 1 精製手順

表 1 プロテイン A およびプロテイン G に対する IgG の結合性

	プロテインA	プロテインG
マウス		
ラット		
ハムスター		
ニワトリ	x	x
ヒト		
ウサギ		
ヤギ		
ヒツジ		
ブタ		
ウマ		
ウシ		

:非常に強い :強い :弱い x:非常に弱い

関連商品

標識用キットシリーズ(Dojindo Labeling Kits)

Dojindo Labeling Kits は活性化試薬と Filtration tube により、抗体等を簡単に標識するためのキットです。前処理 - 反応 - 精製までを全てフィルター上で行うことができ、3時間以内に標識体を得られます。1 回の標識操作で 50 ~ 200 μ g のサンプルを処理することができます。Filtration tube 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。

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
Biotin Labeling Kit - NH ₂			LK03
Biotin Labeling Kit - SH			LK10
各 3 samples		12,000	
Peroxidase Labeling Kit - NH ₂			LK11
Peroxidase Labeling Kit - SH			LK09
各 3 samples		17,000	
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH ₂			LK12
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - SH			LK13
各 3 samples		21,000	
Fluorescein Labeling Kit - NH ₂			LK01
3 samples		21,000	
Allophycocyanin Labeling Kit - NH ₂			LK21
B-Phycoerythrin Labeling Kit - NH ₂			LK22
R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH ₂			LK23
各 3 samples		43,000	
Allophycocyanin Labeling Kit - SH			LK24
B-Phycoerythrin Labeling Kit - SH			LK25
R-Phycoerythrin Labeling Kit - SH			LK26
各 3 samples		38,000	

Q & A

蛍光タンパク標識キット

Labeling Kitシリーズとして蛍光タンパク(Phycobiliprotein)を標識するキットを発売いたしました。少量のタンパク質を効率良く標識することにより、免疫染色やFACSに使用することができます。

研究の多様化にあわせ、目的に応じたLabelingが可能となります。

Q1 蛍光タンパクの波長特性を教えてください。

A1 図1～3もご参照ください。
 Allophycocyanin (以下: APC) $\lambda_{ex} = 650 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 660 \text{ nm}$
 B-Phycoerythrin (以下: B-PE) $\lambda_{ex} = 564 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 575 \text{ nm}$
 R-Phycoerythrin (以下: R-PE) $\lambda_{ex} = 564 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 575 \text{ nm}$

Q2 通常の蛍光色素と比べて蛍光タンパクのメリットは何でしょうか？

A2 以下のような点が挙げられます。
 ・1分子あたりの蛍光強度が大きいので、IgGに1分子が蛍光標識された場合、Fluoresceinなどの数倍の蛍光強度が得られます。
 ・励起スペクトルの吸収域が広いので、極大を外れた波長でも、励起できます。

Q3 IgG 1分子に対して幾つの蛍光タンパクが標識されますか？

A3 IgG 1分子に対して、1～2分子の蛍光タンパクが標識されます。

Q4 標識対象となるタンパク質の分子量はどの程度でしょうか？ また、必要なタンパク質量はどの程度でしょうか？

A4 分子量 50,000以上で、官能基として反応性のNH₂基もしくはSH基(S-Sも可)を持つタンパク質が対象となります。タンパク質量は50～200 μg です。

Q5 サンプルが溶液になっても問題ありませんか？

A5 溶液になっていること自体は問題ありません。ただし、下記の点をご確認いただいた上でご使用ください。

- 濃度 -
 サンプルの濃度が0.5 mg/ml以下(50 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 以下)である場合は、Filtration tubeを用いてサンプル量が50～200 μg となるように遠心して濃縮を行ってください。フィルター上に残ったサンプルは再溶解させる必要はありません。そのまま反応にご使用ください。

- 溶液量 -
 Filtration tubeの容量に制限がありますので、溶液の容量は100 μl 以下でご使用ください。

- 共存物 -

- ・不溶性の低分子が含まれる場合は、予め遠心して上清のみを使用してください。
- ・分子量 10,000以上の物質が含まれる場合には、別途精製を行ってからご使用ください。

* IgG 精製キットを試作しております。(前ページをご覧ください)

Q6 蛍光タンパクは分子量が大きいと聞いていますが、それぞれの分子量はどのくらいですか？

A6 それぞれ以下の通りとなっています。

- ・APC 約 105,000
- ・B-PE 約 240,000
- ・R-PE 約 240,000

Q7 WS Bufferで長期保存できますか？

A7 標識体の安定性はタンパク質に依存しますが、長期保存される場合には等量のグリセロールを添加して-20℃で保存してください。WS Bufferに防腐剤は含まれておりません。また、別途ご用意いただいた保存液で保存していただいても結構です。

Q8 防腐剤としてアジ化ナトリウムを使用できますか？

A8 使用できます。0.1%程度のアジ化ナトリウムの添加は蛍光強度、抗体力価には影響しません。

Q9 蛍光観察する際の、フィルターについて教えてください。

A9 下記のようなフィルターがご使用になれます。

メーカー 色素	Omega Optical 社 型番	Chroma Technology 社 型番
APC	XF44, XF45, XF70, XF110-2, XF51	31006, 41013
B-PE, R-PE	XF32, XF33, XF37, XF34, XF38, XF101-2, XF108-2	31003, 41003

	Olympus	Nikon
APC	U-MWIY2	Cy5
B-PE	U-MWG2, U-MNG2, U-MWIG2	G-1A, G-2A, G-1B, G-2E/C, Cy3
R-PE	U-MWG2, U-MNG2, U-MWIB2	G-1A, G-2A, G-1B, G-2E/C, Cy3

詳細は各社のHPでご確認ください。

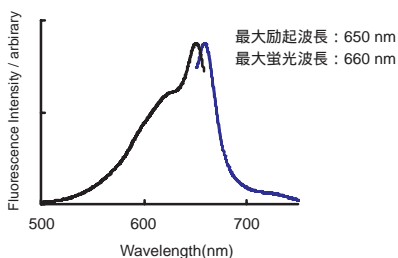


図1 Allophycocyanin標識タンパクの励起・蛍光スペクトル

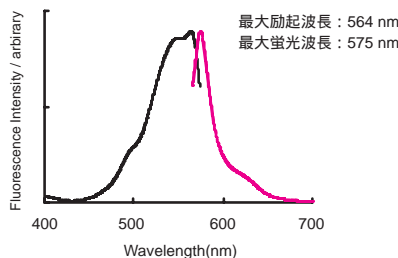


図2 B-Phycoerythrin標識タンパクの励起・蛍光スペクトル

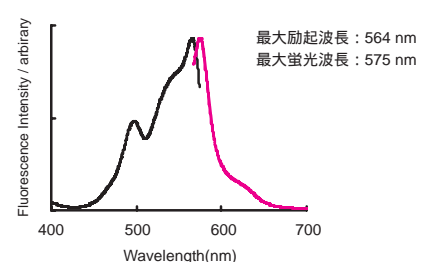


図3 R-Phycoerythrin標識タンパクの励起・蛍光スペクトル

第16回フォーラム・イン・ドージン開催報告

RNA 干渉 - その可能性 -

第16回のフォーラム・イン・ドージンが12月2日、熊本市の鶴屋ホールで開催された。今年は「RNA干渉 - その可能性 - 」と題して、多比良先生（東大院工） 宮岸先生（東大院医） 桑原先生（産総研） 野村先生（九大院理） 西原先生（創価大工） 小原先生（東京都臨床医学研） 落谷先生（国立がんセンター） 横田先生（東京医科歯科大）の8名の講演が行われた。当日は朝からあいにくの雨模様であったが、延べ参加者数は地元の大学を中心に約130名と例年より多く、RNAiへの関心の高さが窺われた。多比良先生の基調講演に続き、遺伝子機能解析への応用、さらには臨床応用など、RNAiの可能性や課題などその広がりや深さについての熱心な議論があった。多比良門下の宮岸、桑原両先生はそれぞれ、siRNA 発現ライブラリーを用いた機能遺伝子探索と、non-coding RNAによる神経新生について話された。野村先生と西原先生は、それぞれ線虫とショウジョウバエの違いはあるものの、RNAiの糖鎖機能の解析への応用について講演された。最後に臨床の立場から小原先生、落谷先生、横田先生がそれぞれ、HCV、転移性がん、神経疾患のsiRNAによる治療の可能性について議論された。臨床応用を考えると、*vivo*でのデリバリーが重要な課題のようである。

ヒトの遺伝子の数は思いのほか少なく、DNAの殆どは遺伝子をコードしない意味のない不要なジャンク領域だと思われていたのが、実はその大半がRNAに転写され遺伝子発現の調節を行っているらしい。これは、ワトソン・クリックによるDNA二重らせん構造の発見から僅か50年余りしか経っていないが、その間に起こった生物学上の発見でもとりわけ大きなインパクトを持っている。生命についての我々の理解はまだまだ遠く及ばない。今回のテーマであるRNAiは、その新しい生物学を産みだす原動力に



なっている。そういった大きな潮流のなかにある今こそ、このテーマを取り上げるのに相応しい気がしていたが、今回はこの分野で世界的に活躍されている多比良先生に演者の先生方の選定もお願いした。多忙を極める同先生の快諾が得られた段階で、半ばフォーラムの成功は約束されたようなものであったが、開催地熊本という不利な条件になか、学術的に質の高い内容にするには、演者の先生方の顔ぶれが特に重要である。その意味で今回も、お世話いただいた山本先生（熊大院医薬） 多比良先生のおかげで非常に充実した内容になったと思っている。また、参加者の反応も総じて良かったせいか、来年のテーマにはRNAの続編という声も聞かれた。恐らく今回の内容だけでは、新しく起きている生物学の潮流を十分伝えきれなかったのではないかと、non-coding RNAの役割については、次回のテーマとしても検討する必要があるかも知れないと感じた。このフォーラムは15年前、小社が現在の地に移転したのをきっかけに細々と始めたが、その頃の要旨集を見ると、生物学の進歩には隔世の感がある。

尚、要旨集をご希望の方は小社カスタマーサービス部までご連絡下さい。（佐々本 一美）

ホームページアドレス

URL : <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