

## CONTENTS

### Review

RNAiのがん創薬への応用  
落谷 孝広

### Topics on Chemistry

新規蛍光性タンパク質定量試薬  
宮崎 公德

# DOJIN NEWS

ドージンニュース

2006  
ISSN 0385-1516

# No. 119

目次

Review  
 RNAi のがん創薬への応用  
 国立がんセンター研究所 がん転移研究室 落谷 孝広 ..... 1

Topics on Chemistry  
 新規蛍光性タンパク質定量試薬  
 同仁化学研究所 宮崎 公德 ..... 5

Commercial  
 技術紹介  
 Labeling Kit シリーズ関連 ..... 7  
 試作販売品  
 IgG 精製キット ..... 9  
 試作品  
 蛍光ラベル化キット ..... 10  
 遺伝子導入試薬 ..... 14

Q&A  
 HiLyte Fluor™ Labeling Kits ..... 11

お知らせ  
 17<sup>th</sup> フォーラム・イン・ドージン開催のご案内 ..... 4  
 九州大学 - 同仁化学組織対応型連携 ..... 6  
 連載休載 ..... 6  
 学会展示 ..... 6  
 溶媒製品へのスペクトルチャート添付について ..... 6  
 ホームページリニューアルのご案内 ..... 13  
 第 25 版総合カタログ発行 ..... 13

製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

IgG Purification Kit - A ..... 9  
 IgG Purification Kit - G ..... 9  
 HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH<sub>2</sub> ..... 11  
 HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH<sub>2</sub> ..... 11  
 Fluorescein Labeling Kit - NH<sub>2</sub> ..... 11  
 Allophycocyanin Labeling Kit - NH<sub>2</sub> ..... 11  
 B-Phycoerythrin Labeling Kit - NH<sub>2</sub> ..... 11  
 R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH<sub>2</sub> ..... 11  
 Allophycocyanin Labeling Kit - SH ..... 11  
 B-Phycoerythrin Labeling Kit - SH ..... 11  
 R-Phycoerythrin Labeling Kit - SH ..... 11



今では日本全国にある風力発電ですが、同仁化学研究所から東に見える俵山の斜面にも十基のプロペラが回っています。  
 「阿蘇にしはらウインドファーム」という施設で、阿蘇の外輪山の風の通り道を利用して発電しています。

## RNAiのがん創薬への応用 (RNAi therapy against cancer)



落谷 孝広  
(Takahiro Ochiya, Ph.D.)  
国立がんセンター研究所  
がん転移研究室

### [Abstract]

Silencing gene expression by siRNAs is rapidly becoming a powerful tool for the experimental analysis of tumor inhibition. Previous research has shown that siRNAs can specifically reduce the expression of genes in certain types of cancers, but siRNA delivery strategies, such as viral- or lipid-based vectors, have had varied success and are prone to activating deleterious immune responses. Atelocollagen is a highly purified type I collagen that is modified to have low immunogenicity. Atelocollagen complexed with siRNA is resistant to nucleases and is efficiently transduced into cells, thereby allowing long-term gene silencing in vivo. Here we introduce our attempts on atelocollagen-mediated delivery of synthetic siRNAs into mice with tumor metastasis and discuss therapeutic potential of RNAi.

キーワード : RNAi(RNA interference), siRNA, delivery, metastasis, cancer

### 1. はじめに

RNA 干渉(RNAi)という現象の発見のもととなったのは1990年代はじめに植物で見つかった転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)、あるいはウイルス誘発性遺伝子サイレンシング(VIGS)と呼ばれる現象である。RNAiが動物である線虫で初めて報告されたのは1998年、まだ記憶に新しいところだが、その後、魚類や昆虫、そして哺乳類でも次々とその存在が報告された。RNAiをもとにした治療法はウイルス感染症からがんに至るまで幅広い疾患をカバーする。2005年暮れにはすでに米国のSirna Therapeutics社が加齢性黄斑変性症に対するsiRNA製剤を用いた第1相臨床試験の良好な結果を公表した。しかし、その多くは合成のsiRNAによる局所の病変を対照とした投与に限られ、感染症や転移性がんの治療に必要な全身性の投与方法についての具体案は提示されていない。siRNAの臨床応用の成否を握るのが、生体へのデリバリー技術である。培養細胞レベルの研究では目的の抑制効果を示すsiRNAであっても、適切なデリバリー方法を用いなければ、動物実験では全く効果がみられない場合が多い。我々は導入効率が高く、安全面でも優れている核酸医薬デリバリーシステムの開発を目指し、生体親和性物質であるアテロコラーゲンに着目して検討を行ってきた。ここでは、アテロコラーゲンと合成siRNAの複合体による転移性がんの治療に関する知見を中心に紹介し、siRNAの全身性投与の有効性について考察する。

### 2. RNAiとは

RNAiとは2本鎖RNA(dsRNA)によって引き起こされる配列特異的な遺伝子発現抑制の現象である。生体内に導入されたdsRNAは、RNaseIIIファミリーに属するDicerと呼ばれる酵素により、3'末端側に2塩基の突出をもつ21塩基のdsRNAであるsiRNA(short interfering RNA)にプロセッシングされる。siRNAはRNA-ヌクレアーゼ複合体であるRISC(RNA induced silencing complex)によって2本鎖がときほぐされた後にアンチセンス

鎖がとりこまれて、そのアンチセンス鎖に相補的な配列をもつRNAを選択的に分解する。Nature publishing グループはweb上でこのプロセスの詳細をアニメーションで紹介している (<http://www.nature.com/focus/rnai/animations/index.html>)。

### 3. RNAiの核酸医薬としての評価

このRNAiに先行して進んでいたのが同じ核酸医薬として開発されていたアンチセンス医薬である。しかし、デリバリー等の問題が引き起こす副作用を上回るほどの有効性を示す結果が臨床で得られず、最終的な承認に届かなかった例が多い。米国のIsis社等のいくつかのベンチャー企業はアンチセンス試薬の開発を続けてはいるものの、RNAi分野で続々と示される抑制の強さと確かさにアンチセンスはかないそうもない。それは、siRNAの持つ1)標的遺伝子に対する高い特異性、2)リスクに取り込まれた一本鎖RNAは使い捨てではなく、連続して標的遺伝子を攻撃するため、毒性の生じにくいごく微量で確実な抑制効果を生む、という2つの理由による。これに加えて、アンチセンスではその配列の決定を多くは経験則にもとづく不確定なものであったのに対し、確実に標的遺伝子の発現を抑制しうるsiRNAのデザインが、簡単なソフトによる検索で、誰にでも簡単に行えることも、RNAiの普及の大きな要因のひとつである。しかし、その研究の歴史が浅い故に、メカニズムを完璧に解明できたとは言えず、思わぬ副作用を招くことがないよう、臨床応用には慎重さが求められるのも事実だ。

### 4. がん治療領域への応用の現状

siRNAの有効性はすでにがん治療の領域でも示されている(表1)。がんでは、がん遺伝子、がん抑制遺伝子などのがん関連遺伝子に変異が起こることにより細胞の異常が生じると考えられている。siRNAを用いることによりこの変異が起きた遺伝子の発現を特異的に抑制し、腫瘍の増殖を阻止することが目的である。さら

表1 がん治療分野での siRNA の応用例

がんの種類	標的となる遺伝子
グリオブラストーマ	MMP-9 + cathepsin B
前立腺がん	VEGF
精巣腫瘍	FGF-4
膀胱がん	PLK-1
肺小細胞がん	Skp-2
Ewing 肉腫	VEGF
膵臓がん	CEACAM6
膵臓がんの肝転移	EphA2
肺がんの肝転移	bcl-2
グリオーマ	EGFR
メラノーマ	c-myc+MDM2+VEGF
大腸がん	MDR1 P-glycoprotein*
乳がん	oncogenic antigen-519*

\*: 薬剤耐性関連

表2 RNAi で用いられる主なデリバリー方法

投与方法
リボソーム
ハイドロダイナミックス法
レンチウイルス
レトロウイルス
アデノウイルス
アデノ随伴ウイルス
バイオマテリアル

に、がん細胞に栄養を供給する血管を標的とした siRNA や、がん細胞にアポトーシスを誘導するような siRNA を導入することも盛んに検討されている。このようにがんの原因となる遺伝子の発現を直接抑制する方法の他に、RNAi による治療法は抗がん剤等の化学療法をサポートシステムとしての利用が考えられている。例えば Imperial College London の研究チームは、多剤薬剤耐性を担う遺伝子を siRNA で抑制することで、白血病細胞の薬剤に対する感受性を回復させ得ることを報告している。さらに、最近では siRNA ライブラリーが各社で開発され、それをを用いたスクリーニングにより、新しいタイプのがん標的遺伝子の同定が相次いでいる。

## 5. RNAi の核酸医薬としての問題点

RNAi による治療研究を進める上での最初のステップは目的とする遺伝子に対する siRNA のデザイン、*in vitro* での評価系の作成である。まずどのような細胞で、最も効果のある siRNA 配列を選ぶかが研究全体の質を左右する。ここでの注意点は、培養細胞への siRNA の導入方法と、動物個体での導入方法をできるだけ一致させることである。次のステップは *in vitro* でのデリバリーとその評価系の構築である。まず生体内へ投入する場合の最初の問題は、いかに血中や組織中での siRNA の安定性を図るかという点である。これまで考案されている方法で効果が良さそうなのは siRNA 自体の化学修飾によるヌクレアーゼ耐性の強化であり、複数のペンチャーからすでに製品化されている。このヌクレアーゼに対する抵抗性は、リボソームとの結合や、後に紹介するアテロコラーゲンのようなデリバリーキャリアーとの複合体を形成した場合にも同様に観察され、血中での安定性の程度を測る上で重要な指標となる。次は生体内での siRNA のデリバリーや標的遺伝子の発現抑制、あるいは腫瘍の縮小等の生物学的効果の評価系の選択である。これには様々な方法があるが、我々は発光イメージングを主体とした評価系を用いている。これは動物に移植するがん細胞自身が例えばルシフェラーゼを発現するように細工しておき、siRNA のデリバリー効果の判定にはルシフェラーゼを抑制する siRNA を用い、ルシフェラーゼ量(フォトン数)を測定することで、目的の細胞へ siRNA がどれだけ到達したのか判別できる。さ

らにがん細胞の増殖に関する遺伝子を標的とした siRNA をデリバリーすることで、がん細胞そのものの増殖抑制も、やはりルシフェラーゼを指標に定量化が可能だ。しかし、このなかでやはり最大の問題点は、いかに効率よく、しかもインターフェロンや炎症性サイトカインなどの非特異的な生体の反応を惹起せずに siRNA をデリバリーできるかどうかである。

## 6. RNAi のがん治療への応用の鍵を握るデリバリー

siRNA のデリバリーに関しては、動物個体レベルでも既に多くの試みがなされている(表2)。例えばマウスの尾静脈から合成 siRNA を体重の 10% もの大量の PBS 溶液で数秒の短時間で注入するハイドロダイナミックス導入法で、動物の肝細胞への siRNA の導入に成功したとの報告がある。しかし、このような生体のホメオスタシスを無視した方法はヒトには到底適応できるものではない。また長期の抑制効果にはウイルスベクターが必要となる。これまでにアデノウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターに組み込んで作製した siRNA 発現ウイルスベクターを用いて、動物個体への siRNA 導入の報告が次々とされているが、臨床応用可能な siRNA の *in vivo* へのデリバリー方法はいまだ確立されていない。リボソーム製剤も siRNA 用に関係が進み、我が国の日本新薬のカチオニックリボソームは臨床応用を目指している。以下に、siRNA の生体へのデリバリー方法として、我々日本の研究チームが独自に開発したアテロコラーゲン DDS を紹介する。

## 7. アテロコラーゲン DDS による siRNA のデリバリー

### 7.1 アテロコラーゲンは

アテロコラーゲンはウシの真皮から抽出した、I 型コラーゲンを原料としている。I 型コラーゲンは 3 本のポリペプチド鎖が、らせん構造を形成しており、長さ 300 nm、直径 1.5 nm の棒状の分子である。N-、C-両末端には、大部分の抗原性を有するテロペプチドと呼ばれるアミノ酸領域があり、アテロコラーゲンは、ペ

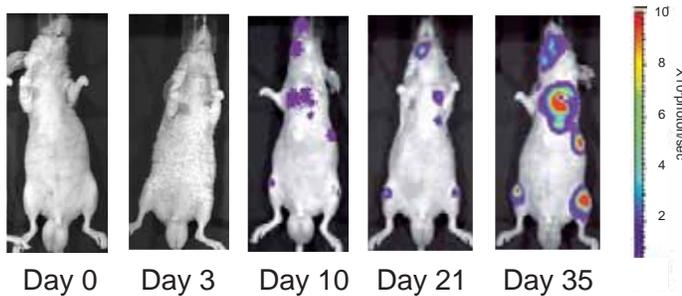


図1 バイオフィトニクスによるヒト前立腺がんのマウス全身性骨転移モデルの作成：

ルシフェラーゼ遺伝子を発現するヒト前立腺がん細胞をマウスの左心室から投与することで、全身の骨にがんが転移するモデルを作成し、*in vivo*イメージングによってその病巣部位を抽出した。データは国立がんセンター研究所がん転移研究室の竹下文隆博士による。

プシン処理によってテロペプチドを消化切断して精製するため、生体へ投与しても免疫応答を惹起したり、毒性を示す可能性はきわめて低い。実際に、軟組織陥凹部の補正修復など様々な医療現場で使用されており、人体への安全性が確認されているバイオマテリアルである<sup>1)</sup>。アテロコラーゲンは低温(2-10℃)では液体(ゲル状)であるため、核酸溶液と混合することが可能である。アテロコラーゲンは正に荷電しているため、負に荷電している核酸分子と静電的に結合し、複合体を形成する<sup>2)</sup>。この際、20ヌクレオチド前後の小さな核酸分子であるアンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNAとは、細胞に取り込まれやすいナノサイズの粒子を形成すると考えられている<sup>3)</sup>。これらはあらかじめプレート上に固定化することが可能なことから、細胞での核酸医薬の機能をハイスループットに解析できるリバーストランスフェクションとしての有用性も証明された<sup>4-7)</sup>。

## 7.2 核酸医薬の局所デリバリー

線維芽細胞増殖因子であるHST-1/FGF-4依存的に増殖するヒト精巣腫瘍細胞をヌードマウスの精巣に移植し、HST-1/FGF-4に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド(AS-ODN)とアテロコラーゲンの複合体を、直接精巣腫瘍に投与したところ、腫瘍の増殖および他臓器への転移を抑制した<sup>8)</sup>。マウスにマウス直腸がん細胞を移植し、ミッドカインに対するAS-ODNとアテロコラーゲンの複合体を頻回投与した結果、AS-ODN単独投与に比べて強力にがん細胞の増殖を抑制できたことが名古屋大学の武井博士らによって報告されている<sup>9,10)</sup>。また、熊本大学の安東博士らのグループは家族性アミロイドニューロパチーの原因遺伝子であるトランスサイレチン遺伝子の特定の塩基を変換する方法に、オリゴヌクレオチドとアテロコラーゲンの複合体を適用した結果、変換効率は培養細胞で11%、マウスの肝臓で8.7%であった<sup>11)</sup>。一方、オリゴヌクレオチド単独では、このような変換はみられず、アテロコラーゲンデリバリーシステムが、オリゴヌクレオチドによる塩基変換効率の向上に寄与し、遺伝子疾患の根本治療に有用であることが示唆された。

siRNAの局所投与に関しては、ヌードマウスの皮下や精巣に移植した腫瘍に、直接siRNAとアテロコラーゲンの複合体を投与

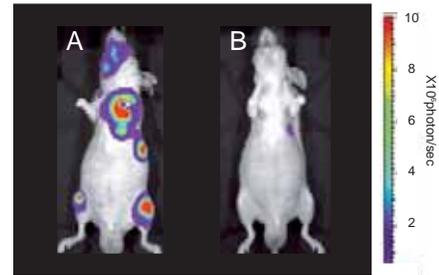


図2 アテロコラーゲン DDS による siRNA の全身性デリバリー：

ヒト前立腺がん細胞のマウスの骨転移モデルを用い、*in vivo*イメージングで評価した(A)。このマウスに尾静脈からアテロコラーゲンとsiRNA(前立腺がんの細胞増殖を抑制する効果を持つ)の複合体を投与すると、Bのように全身に転移したがんの病巣にsiRNAがデリバリーされ、その増殖が抑制され、シグナルが消失している。

し、その効果がsiRNA単独よりも持続し、より高い腫瘍増殖抑制効果を示すことが確認された<sup>12)</sup>。また、ヌードマウスの皮下に移植したヒト前立腺癌細胞の増殖を、VEGFに対するsiRNAとアテロコラーゲンの複合体を投与することで、顕著に抑制できることを報告し、その機序として、複合体の形成により、細胞への取り込み効率が高まると共に、siRNAの半減期が延長されることが報告された<sup>13)</sup>。

## 7.3 アテロコラーゲン複合体によるsiRNAの全身性デリバリー

マウスの末梢部位に炎症を実験的に惹起し、ICAM-1に対するAS-ODNとアテロコラーゲンの複合体をマウスの尾静脈投与によって、炎症抑制効果を確認し、その効果は投与後3日以降も維持された<sup>14)</sup>。この事実は、アテロコラーゲン DDS が全身性の核酸医薬のデリバリーに優れていることを示唆している。そこで、ヒト前立腺がん細胞を、ヌードマウスの左心室に移植して骨転移モデルを作成し(図1)、尾静脈投与によってsiRNAとアテロコラーゲン複合体が、骨を含めた全身の転移巣へとデリバリーされるかを検討した。その結果、siRNA単独投与では標的遺伝子産物の抑制効果は40%以下であるのに対し、siRNAとアテロコラーゲンの複合体の投与では、90%以上の効果がみられ、骨転移巣へのデリバリーにも、アテロコラーゲンが適用可能であることが示された<sup>15)</sup>。さらに前立腺がんの悪性度に関与する2つの遺伝子、EZH2とp100alphaに対するsiRNAのアテロコラーゲンによるデリバリーは、骨転移腫瘍の増殖を顕著に抑制することもわかった(図2)。この2つの標的遺伝子は、前立腺がんのみならずヒトの乳がんの悪性度にも関連するとの報告がある。これらの研究は、siRNAの全身性のデリバリーシステムとしてがん転移モデルでの初めての報告例である<sup>16)</sup>。ただし、同転移モデルマウスでは、骨転移腫瘍部位の他に、正常の多くの臓器へのsiRNAのデリバリーも同時に確認された。がん治療でのデリバリーの問題点のひとつはいかに正常部位への影響を少なくして、目的とするがんにのみ到達できる方法を選択することであり、この点ではアテロコラーゲンDDSによる全身性投与方法もヒトへの応用に関してはまだ越えるべき大きな壁があるのが現状だ。

## 8. おわりに

アテロコラーゲン DDS が、合成 siRNA の局所及び全身性のデリバリーに有用であることを述べた。この投与方法では、動物個体に対してインターフェロンやインターロイキンなどの有害な反応を惹起することも無く、安全な方法であるといえる。しかし、核酸分子とアテロコラーゲンの複合体に、腫瘍標的性を発揮する何らかの修飾を施し、正常臓器への波及をできる限り少なくしたより安全性を高める工夫をする必要がある。欧米を中心に核酸医薬、特に siRNA の臨床開発はさらにスピードアップされると思われる。我が国でも、リボソームやバイオマテリアルなどの独自の優秀な技術や siRNA のデザインシステムを武器に、がん領域における新たな治療戦略の開発が実るよう期待したい。

### 参考文献

- 1) A. Sano, M. Maeda, S. Nagahara, *et al.*, "Atelocollagen for protein and gene delivery", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2003**, *55*, 1651-1677.
- 2) T. Ochiya, Y. Takahama, S. Nagahara, *et al.*, "New delivery system for plasmid DNA *in vivo* using atelocollagen as a carrier material: the Minipellet", *Nat. Med.*, **1999**, *5*, 707-710.
- 3) T. Ochiya, S. Nagahara, A. Sano, *et al.*, "Biomaterials for gene delivery: atelocollagen-mediated controlled release of molecular medicines", *Curr. Gene Ther.*, **2000**, *1*, 31-52.
- 4) K. Honma, T. Ochiya, S. Nagahara, A. Sano, H. Yamamoto, K. Hirai, Y. Aso, M. Terada, "Atelocollagen-based gene transfer in cells allows high-throughput screening of gene functions", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2001**, *289*, 1075-1081.
- 5) K. Honma, T. Miyata and T. Ochiya, "The Role of Atelocollagen-Based Cell Transfection Array in High-Throughput Screening of Gene Functions and in Drug Discovery", *Current Drug Technologies*, **2004**, *1*, 287-294.
- 6) S. Saito, K. Honma, H. Kita-Matsuo, T. Ochiya and K. Kato, "Gene expression profiling of cerebellar development with high-throughput functional analysis", *Physiol. Genomics.*, **2005**, *22*, 8-13.
- 7) Y. Kurokawa, K. Honma, I. Takemasa, S. Nakamori, H. Kita-Matsuo, M. Motoori, H. Nagano, K. Dono, T. Ochiya, M. Monden and K. Kato, "Central genetic alterations common to all HCV-positive, HBV-positive and non-B, non-C hepatocellular carcinoma: A new approach to identify novel tumor markers", *Int. J. Oncol.*, **2006**, *28*, 383-391.
- 8) K. Hirai, H. Sasaki, H. Sakamoto, *et al.*, "Antisense oligodeoxynucleotide against HST-1/FGF-4 suppresses tumorigenicity of an orthotopic model for human germ cell tumor in nude mice", *J. Gene Med.*, **2003**, *5*, 951-957.
- 9) Y. Takei, K. Kadomatsu, S. Matsuo, *et al.*, "Antisense oligodeoxynucleotide targeted to Midkine, a heparin-binding growth factor, suppresses tumorigenicity of mouse rectal carcinoma cells", *Cancer Res.*, **2001**, *61*, 8486-8491.
- 10) Y. Takei, K. Kadomatsu, H. Itoh, *et al.*, "5'-,3'-inverted thymidine-modified antisense oligodeoxynucleotide targeting midkine. Its design and application for cancer therapy", *J. Biol. Chem.*, **2000**, *277*, 23800-23806.
- 11) M. Nakamura, Y. Ando, S. Nagahara, *et al.*, "Targeted conversion of the transthyretin gene *in vitro* and *in vivo*", *Gene Ther.* **2004**, *11*, 838-846.
- 12) Y. Minakuchi, F. Takeshita, N. Kosaka, *et al.*, "Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing *in vitro* and *in vivo*", *Nucleic. Acids Res.*, **2004**, *32*, e109.
- 13) Y. Takei, K. Kadomatsu, Y. Yuzawa, *et al.*, "A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics", *Cancer Res.*, **2004**, *64*, 3365-3370.
- 14) K. Hanai, T. Kurokawa, Y. Minakuchi, *et al.*, "Potential of atelocollagen-mediated systemic antisense therapeutics for inflammatory disease", *Hum. Gene Ther.*, **2004**, *15*, 263-272.
- 15) F. Takeshita, Y. Minakuchi, S. Nagahara, *et al.*, "Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen *in vivo*", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2005**, *102*, 12177-12182.
- 16) Research Highlight, "RNA interference delivers", *Nature*, **2005**, *436*, 892.

### 略歴

氏名：落谷 孝広 (Takahiro Ochiya)  
 所属：国立がんセンター研究所 がん転移研究室  
 連絡先：〒104-0045 中央区築地5-1-1  
 TEL：03-3542-2511 (内線 4452)  
 FAX：03-3541-2685

現在の研究テーマ：

- 1) ステム細胞から肝細胞の分化メカニズム解明と再生医療への応用
- 2) ラット ES 細胞の開発とがん基礎研究への応用
- 3) アテロコラーゲン DDS によるがん治療研究

1988年大阪大学大学院博士課程修了、医学博士。  
 1988年-1992年まで大阪大学細胞工学センター助手。  
 1991-1992年、米国ラホヤ癌研究所(現・バーナム研究所)ポスドク。  
 1992年、国立がんセンター研究所・分子腫瘍学部、主任研究員、  
 1998年より同・がん転移研究室(省令室)・室長。  
 2004年より早稲田大学生命理工学部客員教授。

JB, JDDR, DDTなどの編集委員。日本癌学会評議員。  
 2000年、日経BP賞バイオ医学部門賞受賞(アテロコラーゲン DDS)。  
 2002年、2003年、日本再生医療学会優秀演題賞受賞。

### 第17回フォーラム・イン・ドージン開催のご案内

本年もフォーラム・イン・ドージンを下記日程にて開催いたします。  
 昨年に引き続き『RNA関連』のテーマを予定としておりますが、異なる研究分野の講演を開催できるものと考えております。  
 プログラム詳細は随時ホームページ上に掲載してまいります。  
 ( <http://www.dojindo.co.jp/forum/index.html> )  
 皆様のご参加をお待ちしております。  
 日時：平成18年11月17日(金)  
 9:30 - 17:30 (予定)  
 場所：鶴屋ホール(熊本市)

# Topics on Chemistry

## 新規蛍光性タンパク質定量試薬

株式会社 同仁化学研究所 宮崎 公徳

近年、目覚ましい進展を見せているプロテオミクスは、いつどこでのタンパク質がどれだけ発現しているかを系統的、網羅的に解析する技術や方法論であるが、生化学研究においてタンパク質の検出と定量は、今もなお多くの要望がある分野である。昨年、簡便な操作で高感度にタンパク質の定量と検出が行える、新規な蛍光性プローブが報告されたので、紹介する<sup>1)</sup>。

蛍光性プローブを用いた検出や測定は簡便かつ高感度な分析法であり、プローブ分子がイオンや有機または無機分子と相互作用することで、スペクトルや蛍光強度が変化することを利用して濃度の変化を知る方法であり、Fura 2をはじめ、Fluo 3、Fluo 4に代表されるカルシウムの測定はその代表的なものである。また蛍光色素を抗体やその他の標的分子に標識することで、標的分子の追跡や、抗原物質の存在を検出する方法は、蛍光染色やフローサイトメトリーなどで多く利用されている。一方、溶液中のタンパク定量の方法としては( )吸光法、( )Biuret法、( )Lowry法、( )Bicinchoninate法(BCA法)( )Bradford法、( )蛍光法、( )WST法が知られている。中でも蛍光法は、fluorescamineやCyanin色素を使用し、fluorescamineの場合、タンパク質がないと蛍光を生じないが、タンパクの一級アミンに反応することで、395 nmで励起され495 nmに緑色の強い蛍光を生じる。Cyanin色素はタンパクとSDSとの複合体に疎水的に結合して蛍光強度の増大を示すものである。SDS-PAGEゲル用としてはSYPRO® Rubyなどの蛍光色素が知られている。しかしながら蛍光分光法や他の分析法を用いるこれらの試薬は、タンパク測定において( )反応時間が長いこと、( )色素の会合の問題、( )ストークスシフトの小ささ、( )検量線が非直線的かつS字カーブであるなど幾つかの短所を持っている。SYPRO® RubyはSDS-PAGE中のタンパクをターゲットにした高感度な蛍光色素であるが、ゲルの固定操作や染色、染色後の過剰な色素の除去に長時間を必要とする。

鈴木、横山が開発した蛍光プローブは、( )レーザー光源に適した励起波長を有する( )共存物質による影響を受けにくい( )高いモル吸光係数と量子収率を有するため低濃度でも使用できる( )疎水結合や静電的相互作用を利用する( )ゲル染色時にSDSや過剰の色素の除去操作が不要であるなどの特長を有している。

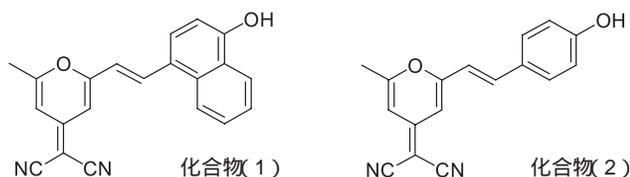


Fig. 1 蛍光性プローブの構造

蛍光色素を用いた検出は、外部環境が疎水的になることで、色素の量子収率が増大し蛍光スペクトルに大きな変化をもたらす分子内電荷移動反応( ICT)が原理となっている。鈴木、横山は、ICTを利用して溶液中のタンパク質と相互作用することで、色素の量子収率がタンパク量に比例して直線的に反応する新規の蛍光プローブを合成した( Fig. 1)。化合物(1)はウシ血清アルブミン

(BSA)の存在下で励起極大582 nm、蛍光波長650 nmの蛍光を発する。化合物(1)自身は量子収率0.001以下で非常に弱い発光しか持たないが、BSAと相互作用することで、量子収率0.31となり、650 ~ 660 nm付近に蛍光を発するようになる。一方、化合物(2)はBSA存在下で480 nmに励起極大を示し、540 nmに蛍光を発する。これらのスペクトル変化は溶液中のBSA量に直線的に反応し、化合物(1)の650 nmの蛍光強度をBSA濃度に対してプロットすると、BSA濃度1000 µg/mlまでの良い直線関係を示し( $r > 0.996$ )、検出下限はBSA濃度100 ng/ml (S/N比3.0)である。

Table 1 タンパク定量試薬の各種タンパク質間の感度差 (BSAを用いた検量線の傾きを1とする)

Protein	化合物(1)	BCA法	Bradford法
BSA	1.00	1.00	1.00
Chymotrypsinogen A	1.02	1.14	0.67
Transferrin	0.92	0.89	1.02
Human IgG	1.02	1.09	0.96
Bovine $\gamma$ -globulin	0.86	1.11	-
Rabbit IgG	0.90	1.12	-
Bovine IgG	0.88	1.21	-
Sheep IgG	0.96	1.17	-

タンパク定量における問題の一つとして、従来のタンパク検出法の多くはタンパク質の種類によって、その定量値が変動することが挙げられる。これはタンパク質のアミノ酸配列、等電点(pI)、タンパク質の構造、特定の側鎖の存在に関係している。多くのタンパク定量法では、BSAまたはIgGを標準サンプルとして検量線を作成するが、これ以外のタンパク質の場合には検量線の傾きが標準サンプルのBSAやIgGの場合とずれるため、その傾きの比を取って補正を行う必要がある。

しかしながら前述の化合物(1)をBradford法やBCA法といった既存のタンパク検出試薬と比較したところ、異なったタンパク質に対しても検量線の傾きのずれが非常に小さい(Table 1)。従ってBSAで作成した検量線がBSA以外のタンパク定量にもそのまま適用できるという特長を持っている。

さらに、多くのタンパク試料溶液にはバッファを始めたとする無機塩や界面活性剤、キレート剤、チオール化合物、還元剤が存在する場合あり、これらがタンパク定量を妨害する場合がある。1000 µg/mlのBSA濃度で1.0 µMの化合物(1)を用いて種々の共存物質の影響を測定したところ、無機塩やキレート剤、還元剤は化合物(1)によるBSAの定量に影響しない。また、多くの界面活性剤も時としてタンパク定量を妨害することが知られているが、化合物(1)がBSAの存在下でその蛍光強度が10%影響される界面活性剤濃度としては、SDSで1%、CHAPSで0.8%、Tween20が0.5%、Triton-X100が1%であり、通常タンパク定量で使用される濃度よりも高濃度であり実際には問題がないと考えられる。

次に、化合物(1)をBSA及びヒツジIgGの電気泳動ゲルの染色

に應用している。

SYPRO® Rubyのような市販の蛍光色素は染色に長時間(一晚)を要し、SDSと過剰の色素を完全に除くために60分洗浄する必要がある。化合物(1)を用いたゲル染色は、ゲル中のSDSや過剰の色素の除去を必要とせず、わずか30分で終了しすぐに蛍光検出によって画像解析ができる。

以上のように、今回紹介した新規のタンパク染色用蛍光色素は、共存物質によって妨害を受けにくく、またタンパク質種間の感度差の小さいタンパク定量試薬としての応用が可能と期待される。さらにSDS-PAGEの簡便なゲル蛍光染色剤としても応用可能であると期待される。

#### 参考文献

- 1) Y. Suzuki and K. Yokoyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 17799.

#### 連載休載のご案内

本号に掲載予定の「ライブセルイメージング技術講座」(浜松医科大学 櫻井孝司先生)は都合により休載させていただきます。

#### 学会案内

下記学会にて小社試薬製品の展示を行います。  
皆様のご来場をお待ちしております。  
第20回国際生化学・分子生物学会議  
平成18年6月19日～23日  
国立京都国際会館、京都宝ヶ池プリンスホテル

#### お知らせ

平成18年12月末日をもって、溶媒(スペクトロゾール、ルミナゾール)製品へのスペクトルチャート添付サービスを終了させていただきます。  
チャートをご要望の場合は、製品のロット番号を小社マーケティング部までご連絡下さい。  
Faxもしくはメールにてお送り致します。  
連絡先  
株式会社同仁化学研究所  
マーケティング部  
フリーダイヤル: 0120-489548

## 九州大学 - 同仁化学組織対応型連携に関するお知らせ

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(II)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かつ全く新しい技術である。詳細は下記参考文献を参照頂きたい。

・N. Soh, D. Seto, K. Nakano and T. Imato, *Mol. BioSyst.*, **2006**, *2*, 128-131.

### No.007 Protein kinase C eta ( $\eta$ ) の特異的基質ペプチド

セリン/スレオニンキナーゼであるProtein kinase C (PKC)には12種類のサブファミリーが存在しており、各サブファミリーによる細胞内作用は異なる。Protein kinase C etaは最近グリオーマ(脳腫瘍)のターゲットシグナルとして注目されているが、リン酸化研究に利用可能な基質ペプチドは開発されていない。

九州大学では、10種類のProtein kinase C (alpha, beta, gamma, delta, theta, epsilon, iota, lambdaおよびzeta)にはリン酸化されず、Protein kinase C etaにのみリン酸化される基質ペプチドの開発に成功した(Protein kinase C eta 10 ng/ $\mu$ l濃度で90%以上リン酸化)。今後、診断および治療用基質ペプチドとして、また、各種研究用基質ペプチドとしての利用が期待される。

### No.008 Rho-kinase に特異的リン酸化される基質ペプチド

セリン/スレオニンキナーゼであるPKA、PKCおよびRho-kinaseはRXS/TまたはRXXS/Tという同じリン酸化基質モチーフを有するので、細胞内リン酸化研究のためには特異性を持つ基質ペプチドの開発は必要不可欠なことである。

九州大学では、血管疾病に深く関与しているRho-kinaseに特異的にリン酸化される2種類の基質ペプチドを開発した。Rho-kinaseに対する基質ペプチドの $K_m$  (mM)と $K_{cat}$  ( $\text{min}^{-1}$ )はA基質の場合0.29と6.48、B基質の場合0.38と20.9であった。

Labeling Kit シリーズ関連 技術紹介～タンパク質精製

1. IgG Purification Kit による標識前の抗体精製法

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います。しかし、多くのイムノ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ってバックグラウンド低減、アッセイ感度の上昇などの効果が期待されます。

IgG Purification Kit - A/Gはわずか30分で各種動物の血清、腹水などからIgGを簡便な操作で高純度、高回収率で単離、精製するためのキットである。1回の精製につき50μlの腹水や血清、200μgのIgG精製が可能であるため、小社の各種Labeling Kits

の推奨抗体量(50~200μg)に見合った量を一回の精製で得ることができます。本キットは血清などの精製にはもちろんのこと、市販抗体に安定化剤として含まれているアルブミン、ゼラチンなどの除去にも使用することができます。その一例をご紹介します。

(1) 血清からの抗体精製

IgG Purification Kit - A/Gを用いて、各種動物の血清50μlを精製し、得られたIgG純度をSDS-PAGEにて確認しました(Fig. 1)。全ての動物種において、1回の精製で高純度の精製IgGを得ることができます。

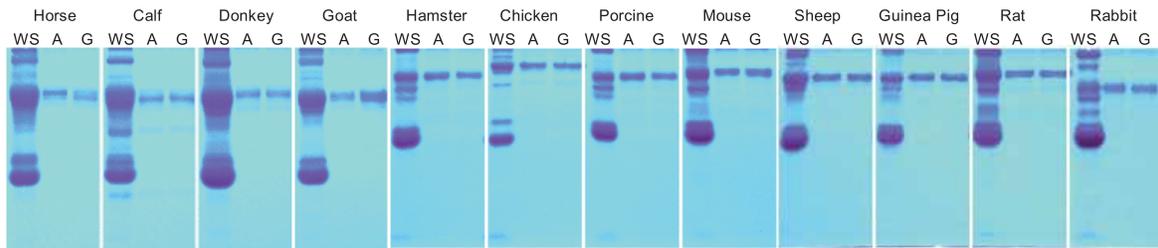


Fig. 1 IgG Purification Kit-A/Gを用いて精製したIgGのSDS-PAGE  
WS: whole serum, A: IgG Purification Kit-Aを用いて精製, G: IgG Purification Kit-Gを用いて精製

(2) 市販のゼラチン含有抗体からのゼラチン除去

ゼラチンは、約10万の分子量をもつ3本のポリペプチド鎖(α鎖)で構成されるコラーゲン分子が熱変性によりランダムな3本のα鎖に分かれたものですが、α鎖の二量体、三量体なども生成するため、通常、数万~数百万の分子量分布を有しています。市販のゼラチン含有抗体を小社Labeling Kitsを用いて標識する際、抗体と各Reactive体との反応を妨害するだけでなく、ゼラチン自体がゲル化しやすいという特徴により、Labeling Kitシリーズで

用いるFiltration Tubeの目詰まりを引き起こします。したがって、市販のゼラチン含有抗体を用いて標識操作を行う前には、ゼラチンを除去し、IgGを単離することが必要とされます。

しかし、ゼラチン除去においては、IgG Purification Kitsのみでゼラチンを完全に除去することはできません。小社では、300K限外濾過チューブを用いて分子量の大きなゼラチンを除去した後、IgG Purification Kitsによる精製によってゼラチンを除去し、IgGを単離しました(Fig. 2)。

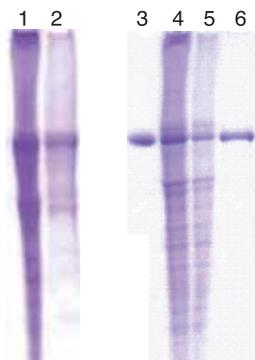


Fig. 2 ゼラチン除去精製後のSDS-PAGE  
1 ゼラチン含有IgG  
2 IgG Purification Kit-Gのみ  
3 IgG  
4 ゼラチン含有IgG  
5 300K限外濾過のみ  
6 300K限外濾過 + IgG Purification Kit-G

## 2. 小社 Labeling Kit により作製した標識体の精製

### (1) Peroxidase Labeling Kit - NH<sub>2</sub> の場合

IgG 精製キットは、Labeling Kit 使用前の抗体精製ばかりでなく、Peroxidase Labeling Kit - NH<sub>2</sub> を用いて得られた Peroxidase 標識抗体の精製にも使用することができます。非特異的吸着の要因の一つである未反応の Peroxidase を標識抗体溶液から除去することで、バックグラウンドの上昇を抑えることが期待できます。

精製前の標識体溶液と IgG 精製キットで精製した標識体溶液の HPLC 測定により、未反応の Peroxidase が標識抗体溶液から分離されたことが確認されました (Fig. 3)。

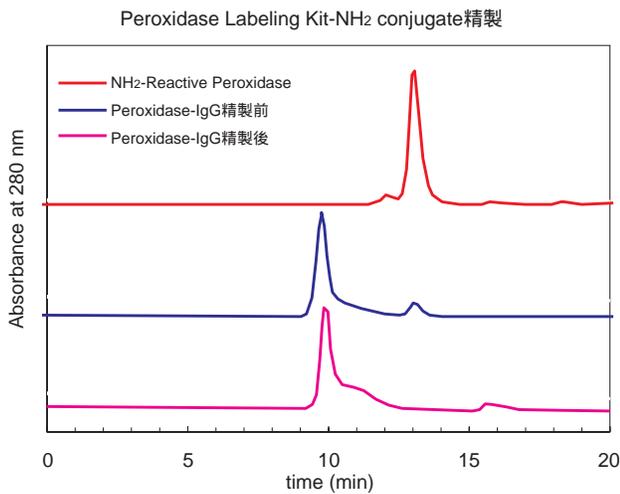


Fig. 3 標識抗体溶液の HPLC チャート  
カラム: TSKgel G3000PWXL 78 × 300 mm,  
溶離液: 100 mmol/l リン酸バッファー, pH 6.8,  
流速: 0.5 ml/min

### (2) 蛍光タンパク Labeling Kit の場合

#### ・ゲル濾過精製 (Gel Filtration)

タンパク質の精製方法の一つであるゲルろ過による蛍光タンパク質標識抗体の精製を行いました。この手法は、タンパク質をその分子量の差を利用して分離する方法で分子量の大きい順番に溶出され、サイズ排除クロマトグラフィーともよばれています。中性バッファーを用いるため、蛍光タンパク質や抗体を温和な条件で分離精製することができます。

ここでは、Sephacryl™ S-300 (GE ヘルスケア バイオサイエンス社製) を用いて、B-Phycoerythrin (B-PE) Labeling Kit - NH<sub>2</sub> により得られた B-PE 標識抗体溶液から未反応の B-PE を分離する例を示しました。

溶出液の吸光度を測定すると分子量の差に応じて二つのピークが現れ (Fig. 4)。各分画の HPLC 測定により、未反応の B-PE が B-PE 標識抗体溶液から分離されたことが確認されました (Fig. 5)。

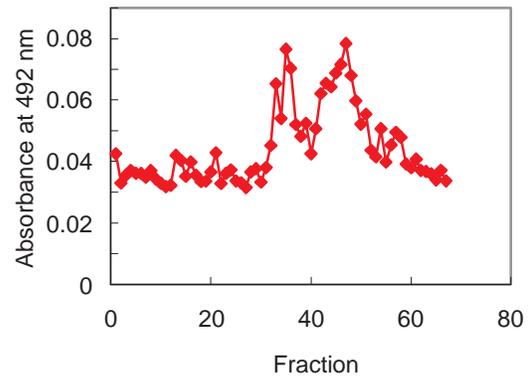


Fig. 4 Sephacryl™ S-300 による B-PE 標識抗体の精製  
カラム長: 55 cm、溶離液: PBS (-) pH7.4、流速: 0.3 ml/min

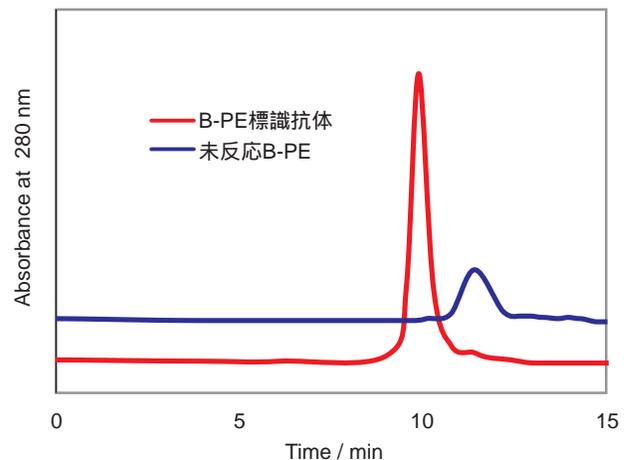


Fig. 5 分離後の標識体および未反応 B-PE の HPLC チャート  
カラム: TSKgel G3000PWXL 78 × 300 mm,  
溶離液: 100 mmol/l リン酸バッファー, pH 6.8,  
流速: 0.5 ml/min

#### ・Ni キレート担体を用いた精製

一般的に、His-tag タンパク質の精製には Ni キレート担体が用いられていますが、IgG の Fc 領域にはヒスチジンリッチな領域が存在するという点を利用して、Ni キレート担体へ IgG のみを結合させることにより未反応の蛍光タンパク質を除去、精製することができます。

試作販売品

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

IgG 精製キット

**IgG Purification Kit - A**  
**IgG Purification Kit - G**

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、一般的に硫酸塩析法、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IgG分画へと精製されます。

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ることができます。

本キットは1回の精製につき50µlの腹水や血清、200µg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、Table 1を参考にご選択ください。

Table 1 血清50µlからのIgG回収量(280nmの吸光度から算出)

	IgG Purification Kit - A (µg)	IgG Purification Kit - G (µg)
Horse	150-250	200-300
Calf	200-300	250-350
Donkey	200-300	200-300
Goat	50-100	150-250
Hamster	150-250	100-150
Chicken	25- 50	10- 20
Porcine	200-300	150-250
Mouse	150-250	150-250
Sheep	50-100	150-250
Guinea Pig	150-200	100-200
Rat	50-100	100-200
Rabbit	200-300	150-250
Human	150-250	200-300
Cat	150-250	100-200
Dog	200-300	100-200

< 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50µlの血清や腹水、200µg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

< キット内容 >

- Protein A pack (または Protein G pack) 1 pack
- Washing Buffer 13 ml × 1
- Elution Buffer 1.8 ml × 1
- Catching Buffer 1 ml × 1

< 本キット以外に必要なもの >

- 200µl 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

< 操作法 >

例) IgG Purification Kit - A の場合



IgGを含む試料溶液とWashing Bufferの混合溶液をプロテインA固定化ゲルに加え、プロテインAへIgGを吸着させる。



遠心によりプロテインA未結合物質を除去する。



Washing Bufferを加え、遠心し、プロテインA未結合物質を完全に洗浄除去する。



Elution Bufferを加えた後、遠心によりIgGを溶出させる。

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
IgG Purification Kit - A	1 set	21,000	AP01
IgG Purification Kit - G	1 set	21,000	AP02

試作品

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

蛍光ラベル化キット

**HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - SH**  
**HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - SH**

< 特長 >

- 約2時間で蛍光標識体が調製できる。
- SH基への標識により抗体活性に影響を与えにくい。
- Filtration Tubeを用いた分離操作により高い回収率で標識体を得られる。
- 付属の保存溶液で標識体の保存ができる。

本製品は、抗体など分子量50,000以上で反応性のスルフヒドリル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。これまでのアミノ基標識用の蛍光ラベリングキットに加えて、抗体の力価に影響を与えないスルフヒドリル(SH)基への蛍光標識を行うHiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit-SH、HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - SHをラインナップに追加いたしました。タンパク質量は50-200 µgで、1キットで3種類のタンパク質を標識することができます。わずか2時間で蛍光標識タンパク質を得ることができ、標的タンパク質が遊離のSH基を持っていない場合、付属の還元剤を用いて遊離SH基を調製し標識を行うことが可能です。\*

HiLyte Fluor™ 色素はアメリカ 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。

< キット内容 > ( 1 sample )

- 1) SH-Reactive HiLyte Fluor™ Dye
- 2) Reducing Agent
- 3) WS Buffer
- 4) Reaction Buffer
- 5) Filtration Tube

HiLyte Fluor™ 555 または 647

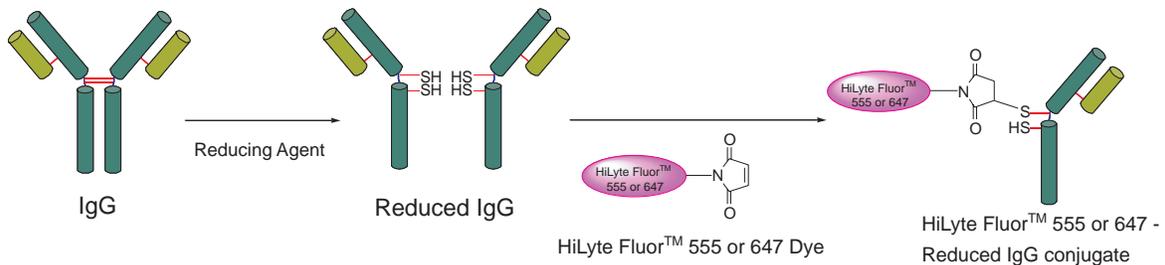
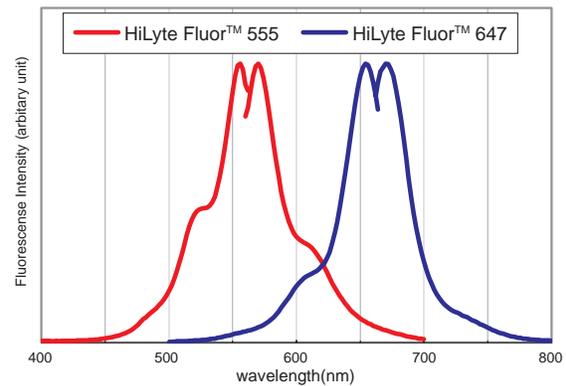
< 本キット以外に必要なもの >

- 10 µl, 200 µl マイクロピペッター
- インキュベーター ( 37 )
- 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

< 標識体の波長 >

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

< 標識体の蛍光スペクトル >



HiLyte Fluor™ Dye による標識反応 \*

\*Reducing Agent による還元反応では IgG のヒンジ部分以外も還元される場合があります。

## Q & A

### HiLyte Fluor™ Labeling Kits - NH<sub>2</sub>



写真は3 samples用のため、試作品包装とは異なります。

#### ご使用上の注意

- 分子量が50,000以上でSH基を有するサンプルへ標識できます。
- 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。
- 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質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カラムなどにより精製してご使用下さい。
- 精製方法に関してご不明な点がございましたら、小社までお問い合わせ下さい。

HiLyte Fluor™ は AnaSpec 社の商標です。

Cy3, Cy5 は GE Healthcare 社 (旧 Amersham Bioscience 社) の登録商標です。

Alexa Fluor® は インビトロジェン株式会社の登録商標です。

## 関連商品

品名	容量	本体価格( ¥ )	メーカーコード
HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH <sub>2</sub>	3 samples	21,000	LK14
HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH <sub>2</sub>	3 samples	21,000	LK15
Fluorescein Labeling Kit - NH <sub>2</sub>	3 samples	21,000	LK01
Allophycocyanin Labeling Kit - NH <sub>2</sub>	3 samples	43,000	LK21
B-Phycoerythrin Labeling Kit - NH <sub>2</sub>	3 samples	43,000	LK22
R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH <sub>2</sub>	3 samples	43,000	LK23
Allophycocyanin Labeling Kit - SH	3 samples	38,000	LK24
B-Phycoerythrin Labeling Kit - SH	3 samples	38,000	LK25
R-Phycoerythrin Labeling Kit - SH	3 samples	38,000	LK26

\*他に酵素(POD, ALP)やBiotin標識のキットも販売しております。

Q1 蛍光特性を教えてください。

A1 HiLyte Fluor™ 555 :  $\lambda_{ex/em} = 555/570$  nm

HiLyte Fluor™ 647 :  $\lambda_{ex/em} = 655/670$  nm

Q2 IgG1 分子に色素が幾つ標識されますか？

A2 このNH<sub>2</sub>タイプでは共に、3 ~ 7個標識されます。

Q3 HiLyte Fluor™ 類の蛍光色素と APC, PE などの蛍光タンパクの違いは何でしょうか？

A3 蛍光物質1分子あたりの蛍光強度は蛍光タンパク色素の方が高いのですが、蛍光タンパク色素は分子量が非常に大きく(約10万と約24万)標識後のタンパク質の分子量が大きくなります。HiLyte Fluor™ は低分子蛍光色素であり、標的タンパク質の分子量が大きく増えることはありません。また、IgG 1分子に対して1個の蛍光タンパク色素が標識されますが、HiLyte Fluor™ は3 ~ 7個標識されることから、蛍光強度も十分なものが得られます。

Q4 どのような測定に使用することが出来ますか？

A4 HiLyte Fluor™ 555 : 細胞染色、組織染色

HiLyte Fluor™ 647 : フローサイトメトリー、細胞染色、組織染色

Q5 蛍光強度はどの程度ですか？ Alexa などより強いのですか？

A5 色素のみの比較を行ったところ Alexa と同等以上の蛍光強度が得られています (Fig. 1, Fig. 2 参照)

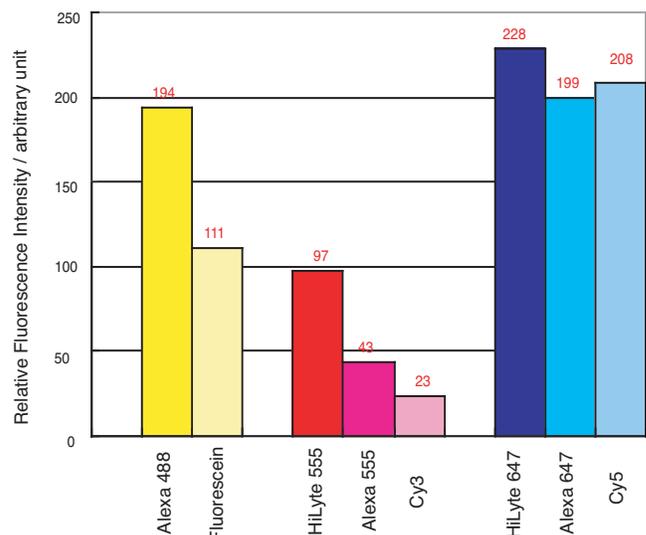


Fig. 1 各色素の蛍光強度比較 (50nM PBS 中)

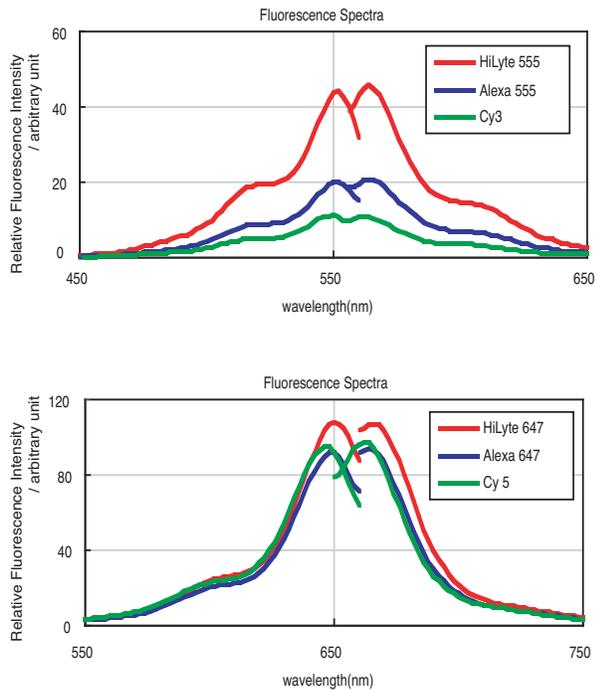


Fig. 2 各色素の蛍光強度比較 (スペクトル)

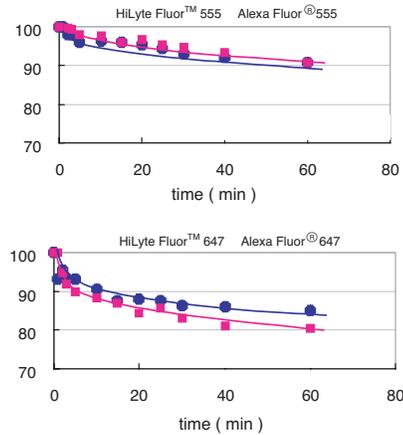


Fig. 4 HiLyte Fluor™ と Alexa Fluor® を蛍光顕微鏡でG 励起光を照射した場合の蛍光強度の変化

各社標識キットを用いた蛍光強度比較データはFig. 3の通りです。

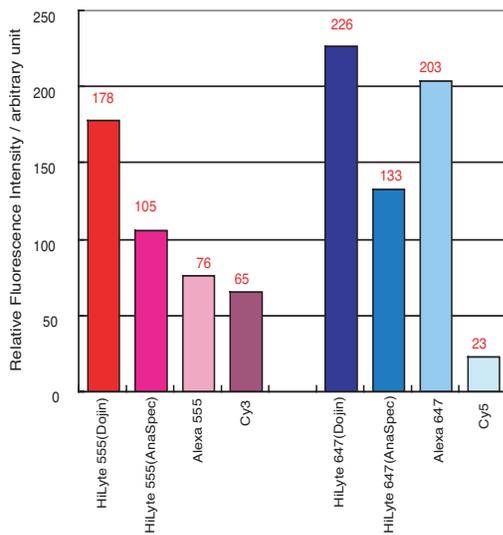


Fig. 3 各キットを用いて標識した標識体蛍光強度 (1 μg IgG/3ml PBS 中)

Q6 光に対する耐性はありますか？

A6 Alexa と同等の光耐性があります。( Fig. 4 参照)

Q7 未反応の色素は除去できますか？

A7 反応後の2回の洗浄で、未反応色素の95%は除去されます。必要であれば、WS Buffer 等での洗浄をさらに2～3回繰り返すことで未反応色素はほとんど除去されます。

Q8 標識に使用する「NH<sub>2</sub>-Reactive 体」はDMSO に溶解後、保存できますか？

A8 溶解後は保存せず、直ぐに使用してください。溶液状態では反応部位が徐々に分解するため、反応率が低下します。

Q9 サンプル溶液中の共存物は、反応に影響しますか？

A9 共存物の種類により影響することがあります。溶液中にどのような物質が含まれるかをご確認の上、状況に応じて精製を行って標識反応にご使用ください。

\* アミノ基を含む高分子化合物(BSA やゼラチンなど)が抗体溶液中に安定化剤として添加されている場合があります。事前に除去を行ってください。

ホームページデザインが変わりました

ホームページ  
リニューアルオープン



ホームページデザインが新しくなりました。  
 ・商品の検索がより簡単に、トップページの「キーワードで探す」から検索サイトにお入り下さい。  
 ・パンフレットのダウンロードが可能。  
 その他新しく見やすくなっております。是非、ご活用下さい。  
 URL;<http://www.dojindo.co.jp/>

第 25 版総合カタログ発行

第 25 版総合カタログ (2006 / 2007) が完成しました。



今回のカタログではプロトコルをカラー化し、操作写真などを追加することで、より見やすく分かりやすくなっております。新製品のプロトコルも追加いたしましたので、是非ご覧下さい。

あわせて、ホームページの商品カタログ・プロトコルも更新致しました。

今後も、皆様のご研究により役立つ情報をご提供して参りたいと考えております。

カタログのご請求は、小社マーケティング部までご依頼ください。  
 URL: <http://www.dojindo.co.jp/catalog/index.html>  
 Tel:0120-489548

## 試作品

### 遺伝子導入試薬

#### HilyMax

< 特長 >

- 血清を含む培地中での遺伝子導入ができる。
- DNA や siRNA を高効率に導入できる。
- 操作が簡便で、迅速に遺伝子を導入できる。
- 非ウイルス性、非動物性なので、安全である。

HilyMax は、新規に開発した陽イオン性合成脂質からなるカチオン性リポソームを利用した遺伝子導入試薬です。培地中の血清の影響を殆ど受けないため、遺伝子導入時の面倒な培地交換をする必要がなく、多岐にわたる細胞種への高効率遺伝子導入が期待できます。

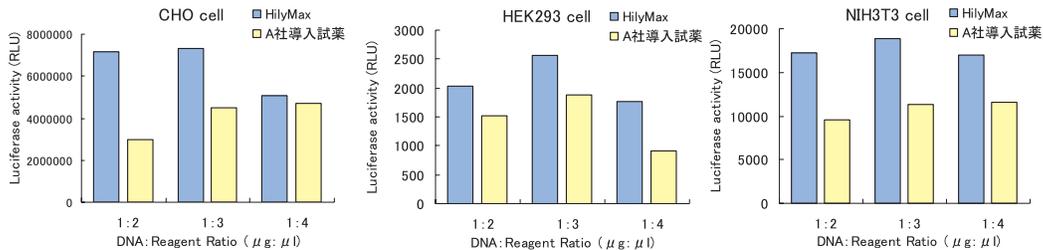
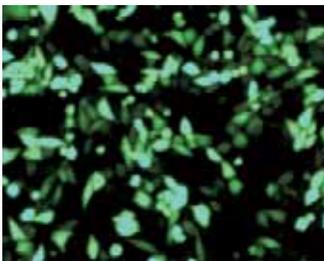


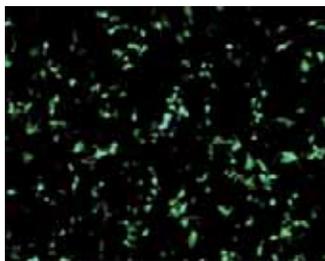
Fig. 1 HilyMax および市販の試薬を用いた導入活性の比較

24-well プレートにて 80%confluence の各培養細胞に、pGL3 遺伝子発現ベクターを血清存在下でトランスフェクションし、24 時間後に Luciferase アッセイにより導入活性を測定した。

CHO cell



HEK293 cell



NIH3T3 cell

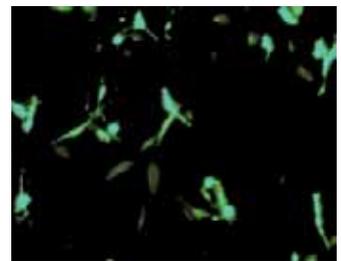


Fig. 2 HilyMax を用いた遺伝子導入による各細胞での GFP 発現

24-well プレートにて 80%confluence の各培養細胞に、hsGFP 遺伝子発現ベクターを血清存在下でトランスフェクションし、24 時間後に蛍光顕微鏡で観察した。

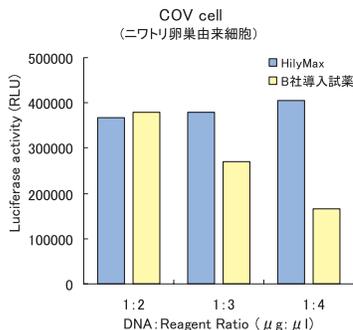


Fig. 3 HilyMax および市販の試薬を用いた導入試薬の比較

24-well プレートにて 80%confluence の COV (ニワトリ卵巣由来) 細胞に、pGL3 遺伝子発現ベクターを血清存在下でトランスフェクションし、24 時間後に Luciferase アッセイにより導入活性を測定した。

(データ提供：就実大学薬学部)

生物薬学科 分子細胞薬学ユニット 工藤 季之先生)

ホームページアドレス

URL : <http://www.dojindo.co.jp/>

E-mail : [info@dojindo.co.jp](mailto:info@dojindo.co.jp)

フリーファックス 0120-021557

フリーダイヤル 0120-489548