



2007 No.

123

ISSN 0385-1516

CONTENTS

Review

人工脂質分子による核酸輸送

楠本 賢一

エイズから見た感染症研究の最前線

原田 信志

Topics on Chemistry

新規アンジオテンシン変換酵素

(ACE) 阻害活性測定法

野口 克也

ドージンニュース

DOJIN NEWS

目次

Review

人工脂質分子による核酸輸送

福岡県工業技術センター生物食品研究所 楠本 賢一 1

エイズから見た感染症研究の最前線

その3 ウイルスのレセプターへの吸着と感染の機構

熊本大学大学院医学薬学研究部感染防御学分野 原田 信志 8

Topics on Chemistry

新規アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性測定法

株式会社同仁化学研究所 野口 克也 11

Commercial

新製品

IC dye 12

分子生物学用 Good's buffer 14

IgG 精製キット 15

試作販売品

タンパク質標識用キット(1 mg タンパク質標識用) 17

試作品

Self Assembled Monolayers 研究用試薬 13

蛍光ラベル化キット 16

お知らせ

学会展示のお知らせ 10

フォーラム・イン・ドージン開催 11

九州大学 - 同仁化学組織対応型連携 12

販売中止 12,18

製品案内

製品価格詳細は掲載ページをご覧ください

IC dye

Self Assembled Monolayers 研究用試薬

分子生物学用 Good's buffer

タンパク質標識用キット



阿蘇の云海

“フリーデスクトップ壁紙・熊本ふるさと百景” 提供

西原村の依山中腹から撮影。云海は冬と思われがちですが、条件が揃えば年中見れます。

撮影は2006年6月29日ものです。

人工脂質分子による核酸輸送 Nucleic Acid Delivery with Artificially Synthesized Lipid Compounds



楠本 賢一
(Ken-ichi Kusumoto)
福岡県工業技術センター
生物食品研究所

[Abstract]

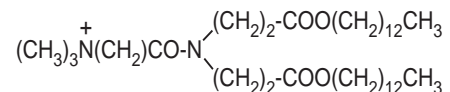
Modifying the gene transfer process by using artificially constructed compounds is fundamental for research in the field of genomics, cell biology, tissue engineering, and gene therapy. However, few reports have focused on the structural characteristics using a library of artificially synthesized amphiphiles for gene transfer in mammalian cells. In this study, we have demonstrated that film-like self-assembly of amphiphilic compound TMA-C2-DEA-C14 prepared by incubating at room temperature results in more than a 15-fold enhancement in the transfection efficiency with regard to mouse neural stem cells as compared to that of dispersion state by ultrasonication. Electron microscopic analysis revealed that the film-like microstructures were dramatically altered to liposome-like structures, including a number of transport vesicles, on association with nucleic acids. Moreover, we have demonstrated that TMA-C2-Glu-C12 has the potential to efficiently transfer siRNA, which has recently emerged as a powerful tool for gene silencing in the field of RNA interference, into mammalian cells. Our findings may improve the development of the liposome/lipid-mediated gene transfer process and the research regarding the novel biological functions with artificial materials.

キーワード：デリバリーシステム、人工脂質分子ライブラリー、マウス神経幹細胞、DNA、siRNA

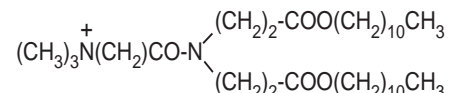
1. はじめに

核酸 (DNA / RNA) は、すべての生物において遺伝情報を担う生体物質である。そのため、哺乳類細胞を標的とした核酸デリバリーシステムは、ゲノム解析、細胞生物学、再生医療学、臨床医療分野まで必要とされている技術である。DNA / RNA を単独で細胞内に輸送することは困難であることから、カチオン性脂質などを利用したリポソーム法^{1,2)}、ウイルスベクター法³⁾、ポリペプチドのようなポリマーを用いた導入法⁴⁾、特殊な装置を用いたマイクロインジェクション法⁵⁾、エレクトロポレーション法^{6,7)}、遺伝子銃 (パーティクルガン) 法⁸⁾ など、種々のデリバリーシステムが考案されている。各方法には長所と短所がある。我々が研究対象としているリポソーム法は、インビトロジェン社の Lipofectamine2000 をはじめ多くの研究用試薬が開発されていることから分かるように、簡単なプロトコールに沿って核酸を細胞内に導入できる最も利用されている手法である。リポソーム法からなる核酸デリバリーシステムでは、実質的に、脂質分子は DNA や RNA を分解酵素や免疫応答から保護する脂質外皮となり、細胞膜を通過させる役割が知られている。本稿では、人工脂質分子の化学構造とそれらが発揮する細胞内輸送機能にフォーカスを向けて、これまでの研究を紹介したい。将来、人工脂質分子ライブラリーが生み出す輸送機能に関する分子情報の蓄積が、バイオ機能を担う分子材料についてボトムアップからの構造設計を可能とし、優れた機能と安全性を兼ね備えたデリバリーシステムの発展に繋がるものと期待される (概念図)。

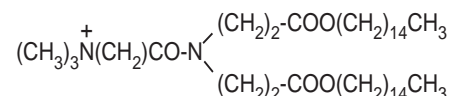
TMA-C2-DEA-C14



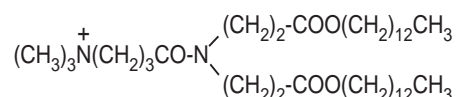
TMA-C2-DEA-C12



TMA-C2-DEA-C16



TMA-C4-DEA-C14



概念図 「人工脂質分子ライブラリーから輸送機能を発揮する分子材料の開発へ」

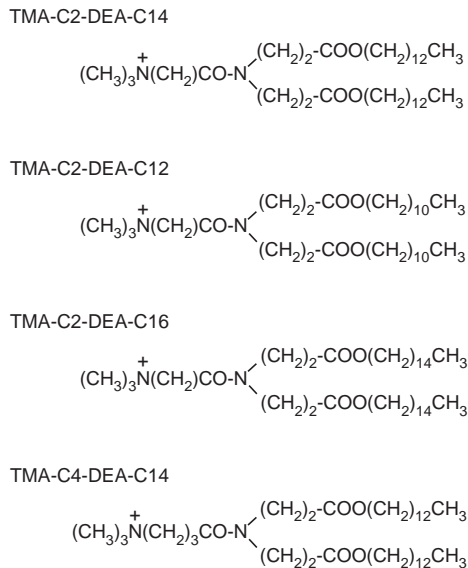


Fig. 1 Chemical structures of artificially synthesized amphiphilic compounds.

TMA-C2-DEA-C14 comprises a head region consisting of trimethylamine (TMA) and a hydrophobic chain comprising 2 carbon atoms (C2), a connector region consisting of diethanolamine (DEA), and 2 tail regions consisting of a hydrophobic chain comprising 14 carbon atoms (C14).

2. 人工脂質分子による DNA 輸送

リポソーム法においては、まず脂質分子の持つ正電荷をDNAの持つ負電荷と静電的相互作用を利用して複合体形成させることにより、細胞膜を通過させ核内にDNA輸送を高めるといった戦略である。リポソーム法は幅広く利用されHEK293細胞やHeLa細胞などの培養細胞では、ほぼ100%に近い導入効率により遺伝子発現を可能にしている一方で、生体組織由来の初代細胞などに対しての遺伝子発現効率は、アデノウイルスベクターと比較して決して高くない。今回、我々が保有する人工脂質分子について、DNA導入が困難とされている中枢神経系細胞に注目して、マウス胎児脳組織由来の正常神経幹細胞に対するDNA輸送能力を評価した。

2.1. 人工脂質分子

Kunitake T.らは、人工脂質分子の構造と集合形態の相関について詳細に検討を行い、人為的にH₂O中で安定なリポソームを形成させることに成功している⁹⁻¹¹⁾。我々は、これまでに合成・構築してきた人工脂質分子ライブラリーの中から、医療用タンパク質の生産を担う有用な細胞株であるCHO細胞に対してDNAを効率よく細胞内に導入・発現することのできるカチオン性脂質分子 ditetradecyl-acetyldiethanolamine-trimethylammonium (TMA-C2-DEA-C14) を報告した¹²⁾。TMA-C2-DEA-C14の化学構造は、ジエタノールアミン(DEA)をコネクターとして、ヘッド領域に正電荷のトリメチルアミン(TMA)とカーボン数2を持つ炭化水素鎖(C2)、テイル領域にカーボン数14を持つ2つの炭化水素鎖(C14)を有する(Fig. 1)。



Fig. 2 Photographs of opaque emulsion and transparent solution of TMA-C2-DEA-C14 prepared by different methods.

The opaque emulsion of TMA-C2-DEA-C14 was prepared by incubating in H₂O for a month at room temperature. The transparent solution was dispersed in H₂O by ultrasonication at a final concentration of 1.3 mM for 1.0 min. Photograph: left, the transparent solution (dispersion); right, the opaque emulsion (self-assembly).

2.2. TMA-C2-DEA-C14 溶液の調製

脂質分子を利用して遺伝子を細胞内に運ぶための手法では、DNAとの複合体形成前に、まず、どのような溶液にどのような方法で脂質分子を分散・溶解させるのか？ということを考えなければならない。脂質分子/DNA複合体は最終的に細胞と相互作用させるため、用いる溶媒は細胞毒性を示し難いもの、例えば、H₂O、メタノール、エタノール、DMSOなどが好まれる。今回、我々は、H₂Oを選択し、一般的に使用されている超音波処理によりカチオン性脂質 TMA-C2-DEA-C14 の分散を試みた。TMA-C2-DEA-C14はH₂O中で1分間の超音波処理により完全に分散され透明の溶液になった(Fig. 2)。さらに、TMA-C2-DEA-C14の相転移温度が約34℃であり、相転移温度以下で調製された脂質分子水溶液が発揮するバイオ機能を評価するために、TMA-C2-DEA-C14をH₂O中で1ヶ月間、室温(25℃)にてインキュベーションし白濁溶液を得た(Fig. 2)。

2.3. マウス正常神経幹細胞の樹立

神経幹細胞は胚期や成人期の中枢神経系に存在し、未成熟で運命付けられていない自己再生型の組織性幹細胞である^{13,14)}。神経幹細胞が神経疾患への細胞治療/再生治療や脳組織発生における機能解明のために不可欠とされるため、神経幹細胞への核酸デリバリーシステムの確立は重要である。我々は、Barnes D.W.らが提唱する神経幹細胞の無血清培養法¹⁵⁾に則って、マウス胎生14日目の脳組織から神経幹細胞の樹立を試みた。神経幹細胞のための増殖因子として知られているEGFとFGF2存在下で培養・増殖した細胞集団は、神経幹細胞マーカーであるNestinを発現しており(Fig. 3)。さらに、樹立されたマウス正常神経幹細胞は、増殖因子を除いた培養液にて神経分化因子の刺激により神経細胞(β-Tub.III-positive)ならびにグリア細胞(GFAP-positive)への分化能を有していた。

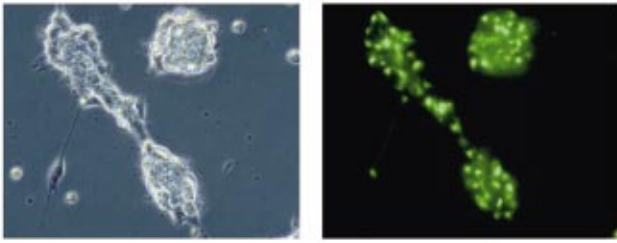


Fig. 3 Immunocytochemistry of mouse embryonic neural stem cells. Neural stem cells were cultured for 24 h in the DMEM/F12 medium with insulin, transferrin, chemically defined lipid concentrate, selenium, EGF, and FGF-basic in a fibronectin-coated 24-well plate. The cells were fixed with 2.0% paraformaldehyde solution and stained with anti-nestin antibody and Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody. Fluorescence images of nestin-positive neural cells: left, phase contrast image ($\times 400$); right, fluorescence image ($\times 400$).

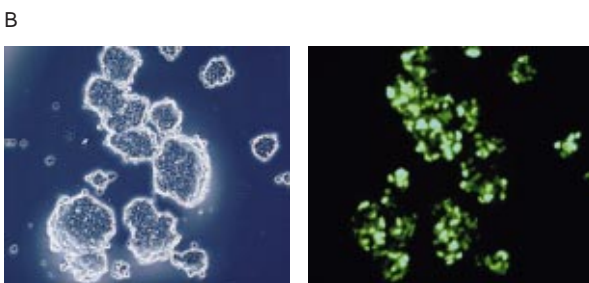
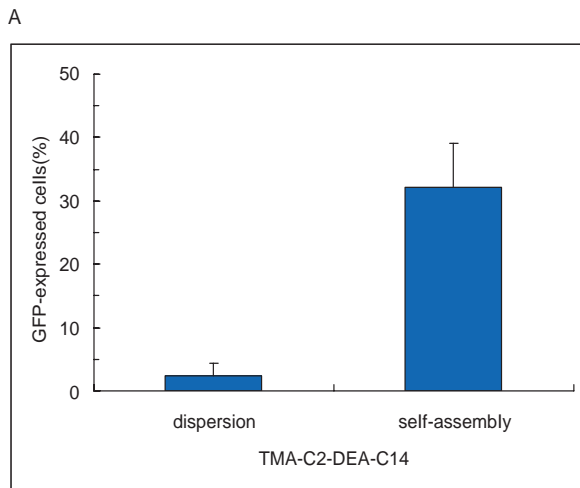


Fig. 4 Transfection efficiencies of TMA-C2-DEA-C14 solutions prepared by using different methods for neural stem cells.

A) Neural stem cells were precultured in 24-well plates and transfected for 3.0 h with the DNA/TMA-C2-DEA-C14 mixture (1.5 $\mu\text{g}/5.0 \mu\text{l}$). At 24 h post-transfection, fluorescent cells were counted under a fluorescence microscope in more than 3 different views (a minimum of 300 cells/view). All the data points are averages obtained from 2 replications performed on different days and expressed as the mean \pm standard deviation. B) Fluorescence images of GFP-expressed cells transfected DNA with the TMA-C2-DEA-C14 emulsion (1.5 $\mu\text{g}/5.0 \mu\text{l}$) for 3.0 h and cultured for 24 h: left, phase contrast image ($\times 100$); right, fluorescence image ($\times 100$).

2.4. TMA-C2-DEA-C14による神経幹細胞へのDNA導入

人工脂質分子による神経幹細胞へのDNA導入能力を評価するために、cytomegalovirus由来のプロモーター + エンハンサー (CMV-IE) 制御下に蛍光タンパク質 (GFP) を連結したプラスミド DNA (pCMV-IE-GFP) を作製し、TMA-C2-DEA-C14 溶液と pCMV-IE-GFP の複合体を形成させ、poly-L-lysine でコートした plate にて前培養した神経幹細胞に対して複合体を作用させ、GFP 発現した細胞を蛍光顕微鏡下で測定し、DNA 導入効率として評価した。超音波処理で調製した TMA-C2-DEA-C14 溶液を用いた DNA 導入効率は $2.3\% \pm 2.0\%$ であり (Fig. 4)、水溶液中で十分に分散させた TMA-C2-DEA-C14 から生み出された脂質 / DNA 複合体では、低い DNA 輸送能力であった。一方、室温にてインキュベーションを行い調製した TMA-C2-DEA-C14 白濁溶液による DNA 導入効率は $34.0\% \pm 2.4\%$ であり、超音波処理により水溶液中に分散させたものと比較して、およそ 15 倍の導入能力を示した (Fig. 4)。興味深いことに、白濁溶液中にみられるような人工脂質分子 TMA-C2-DEA-C14 を自己集合体としてマクロ形成させることにより、マウス正常神経幹細胞への DNA 輸送能力を大きく伸ばすことができた。人工脂質分子が発揮するバイオ機能を抽出する際に、脂質分子を組織化させることも新たな機能を生み出すために必要な要素なのかもしれない。

2.5. TMA-C2-DEA-C14 自己集合体の光学顕微鏡観察

TMA-C2-DEA-C14 は、室温にて自己集合化 (白濁溶液状) させることで、超音波処理により分散化させたものと比較して、神経幹細胞への高い DNA 導入能力を発揮できるようになった。我々は、この白濁溶液を成している TMA-C2-DEA-C14 自己集合体がどのような脂質形状なのか？ また、DNA と結合する際にどのような複合体形状であるのか？ 光学顕微鏡ならびに透過型電子顕微鏡のもとで観察した。はじめに、最終的な電子顕微鏡観察で注意しなければならないことは、サンプル作製時の染色処理による標的構造物の形状が崩れることである。本来の TMA-C2-DEA-C14 自己集合体の形状を電子顕微鏡下で観察するために、まず光学顕微鏡を用いて無処理の TMA-C2-DEA-C14 自己集合体を観察した。TMA-C2-DEA-C14 白濁溶液をスライドガラスに滴下し 1,000 倍にて観察を行うと、その自己集合体はフラットなフィルム様の構造物であり、それら多くは丸いエッジを持った多角体形状であった (Fig. 5A)。さらに、TMA-C2-DEA-C14 自己集合体に DNA を相互作用させた場合には、フラットなフィルム様構造物は、丸みを帯びた構造に変化し、そこから突出した繊維状の構造物がいくつも観察された (Fig. 5B)。一方、超音波処理により十分に分散させた TMA-C2-DEA-C14 溶液では、フラットなフィルム様構造物は観察されず、また、DNA と相互作用させた際に生じた丸みを帯びた構造も観察されなかった (Fig. 5C)。このように、光学顕微鏡下で観察された TMA-C2-DEA-C14 白濁溶液は、フラットなフィルム様構造物として特定の形状で組織化された自己集合体であり、超音波処理により分散化させたものとは全く異なる形状であった。このことから、TMA-C2-DEA-C14 からなるフィルム様自己集合体がマウス神経幹細胞への高い DNA 輸送能力を発揮しているものと考えられる。

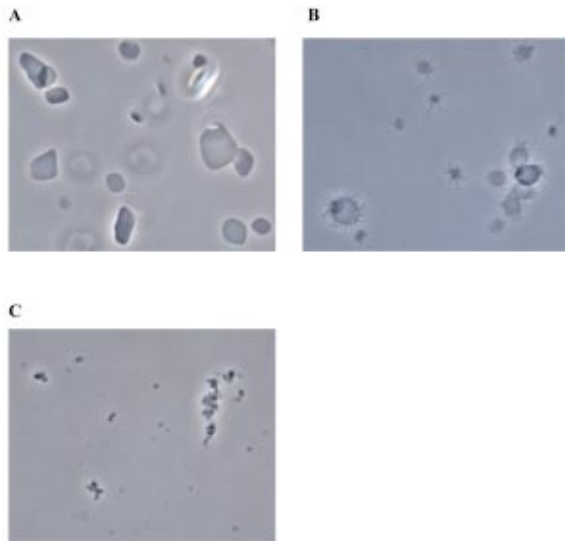


Fig. 5 Optical images of TMA-C2-DEA-C14 self-assembly.

A) TMA-C2-DEA-C14 self-assembly. B) DNA/TMA-C2-DEA-C14 self-assembly complex. C) DNA/TMA-C2-DEA-C14 dispersion complexes. Each solution was applied on a micro slide glass and observed under an Axiovert optical microscope ($\times 1,000$).

2.6. TMA-C2-DEA-C14 自己集合体の電子顕微鏡観察

光学顕微鏡下で観察されたTMA-C2-DEA-C14自己集合体の形状を更に詳細に観察するために、白濁溶液をカーボングリッドに滴下し電顕用染色処理を行わずに透過型電子顕微鏡を用いて観察した。電子顕微鏡下で観察されたフィルム様自己集合体は、 $0.5 \mu\text{m} \sim 6.5 \mu\text{m}$ の範囲で平均 $2.7 \mu\text{m} \pm 1.5 \mu\text{m}$ の脂質分子から組織化された構造物であった (Fig. 6A)。また、一般的に使用されているNegative染色処理を介した自己集合体の観察では、光学顕微鏡下でみられたフィルム様多角形状を壊す結果となり、今回の試験では無染色により全て観察した。次に、TMA-C2-DEA-C14 自己集合体にDNAを相互作用させた場合には、脂質分子からなる幹のような繊維形状とそこから分岐した細い脂質繊維も観察され、それらが集まってリボソーム様の小胞を多く生み出していた (Fig. 6B)。一方、超音波処理により分散したTMA-C2-DEA-C14とDNAの複合体の形態は、全く異なるものであり、リボソーム様小胞も僅かに観察されるだけであった (Fig. 6C)。以上の結果から、TMA-C2-DEA-C14によるフィルム様自己集合体は、DNAと結合する際に多くのリボソーム様小胞を生み出し、神経幹細胞へのDNA輸送能力を格段に上昇させていると考えられる。TMA-C2-DEA-C14脂質分子は、一般的な超音波処理により分散させた分子形態を出発点としてDNA複合体を形成させるよりも、組織化したフィルム様の脂質構造体からDNA複合体を形成させることにより、多くのリボソーム様小胞を生み出し、結果としてマウス神経幹細胞へのDNA輸送能力を高めることができた。興味深いことに、人の手によって作られたTMA-C2-DEA-C14のフィルム様脂質構造体は、DNAとの相互作用によりその形状を劇的に変化させ、リボソーム様小胞を形成するというユニークな特徴を持っていた。

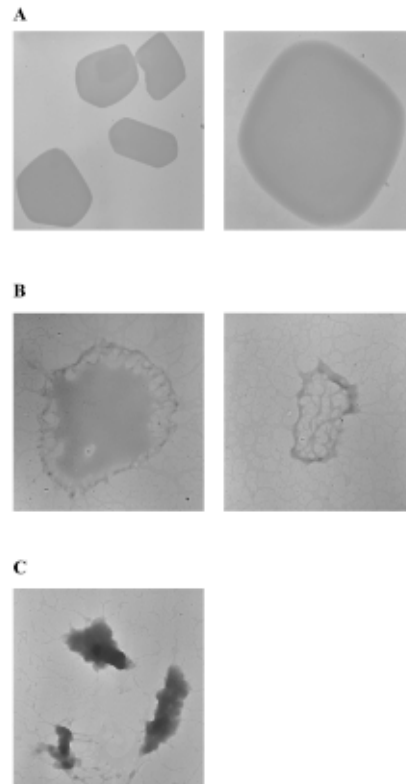


Fig. 6 Transmission electron images of TMA-C2-DEA-C14-RT self-assembly.

A) TMA-C2-DEA-C14 self-assembly: left image, $\times 3,000$; right image, $\times 15,000$. B) DNA/TMA-C2-DEA-C14 self-assembly complexes ($\times 15,000$). C) DNA/TMA-C2-DEA-C14 dispersion complexes ($\times 15,000$). Each solution was applied on a carbon-coated grid and observed under an electron microscope (Hitachi H-7100, 75 kV).

2.7. TMA-C2-DEA-C14 化学構造とDNA輸送機能の相関

本稿で人工脂質分子TMA-C2-DEA-C14が発揮するバイオ機能；DNA輸送能力を紹介してきた。TMA-C2-DEA-C14は、室温中にてインキュベーションを行うことで、フィルム様の多角構造体として自己組織化され、DNAと相互作用する際には分散形態ではみられない多くのリボソーム様小胞を生み出すことができた。では、TMA-C2-DEA-C14の化学構造とフィルム様自己集合体を介したDNA輸送機能にはどのような相関があるのだろうか？そこで、我々が保有する人工脂質分子ライブラリーの中から、TMA-C2-DEA-C14の類似化合物 (Fig. 1；炭化水素鎖の長さが異なる脂質分子TMA-C2-DEA-C12、TMA-C2-DEA-C16、TMA-C4-DEA-C14) を選抜き、TMA-C2-DEA-C14と同様な試験を行った。その結果、TMA-C2-DEA-C12、TMA-C2-DEA-C16、TMA-C4-DEA-C14によるDNA導入効率は、TMA-C2-DEA-C14と比較して非常に低いものであった (Fig. 7)。TMA-C4-DEA-C14の炭化水素鎖の長さを変化させるだけで、DNA輸送能力は失わ

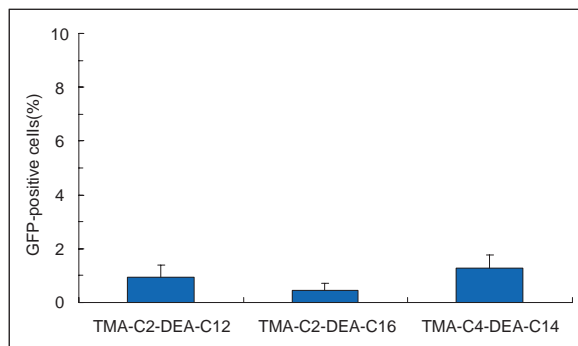


Fig. 7 Transfection efficiencies of amphiphilic compounds similar to TMA-C2-DEA-C14.

The cells were transfected for 3.0 h with mixtures of DNA/similar amphiphile (1.5 μ g/5.0 μ l). At 24 h post-transfection, fluorescent cells were counted under a fluorescence microscope in more than 3 different views (a minimum of 300 cells/view). All data points are averages obtained from 2 replications performed on different days and expressed as the mean \pm standard deviation.

れ、TMA-C4-DEA-C14の持つ炭化水素鎖のバランスはDNA輸送機能に大きな影響を与えた。TMA-C2-DEA-C14は、フィルム様自己集合体の形成、DNAとの相互作用で生み出されるリポソーム様小胞、神経幹細胞へのDNA輸送能というポテンシャルを発揮する化学構造を持った人工脂質分子である。

近年、開発されてきたリポソーム法は、汎用されているHEK293細胞やHeLa細胞などの培養細胞に対して高効率に遺伝子を導入・発現させることができる。しかしながら一方で、神経幹細胞のような生体組織に存在する正常細胞などに対しては、アデノウイルスベクターと比較して、その遺伝子発現効率は決して高くない¹⁶⁻¹⁸⁾。その理由として、細胞膜の通過効率、細胞核への移行効率、発現遺伝子の転写効率などウイルスベクターの持つ能力と比較して人工ベクターが劣っていることにあると考えられる。これは、人の手によって短期間で開発させてきた人工脂質ベクターと長い進化の過程で獲得してきたウイルスベクターの能力との大きな差であり、ウイルスが獲得してきた機能は洗練されているということである。本稿で述べたTMA-C2-DEA-C14自己集合体によるDNA導入技術についても、汎用されているリポソーム法と同様に、マウス正常神経幹細胞への導入効率は最大でも約40%であり、ウイルスベクターと比較すると決して高いDNA輸送能力ではない。今後、どのような技術により人工ベクターが発展していけるのか、我々は、人工脂質分子の化学構造が持つバイオ機能に関する情報を蓄積することにより、将来、神経幹細胞のような組織性幹細胞をはじめ導入が困難とされている細胞種（多くの分野で遺伝子導入が必要とされている細胞種）に対して高いDNA輸送能力を発揮する新しい脂質分子の発見やリポソーム法の発展への貢献を行っていきたいと考えており、ウイルスベクターで懸念されている腫瘍活性などの副作用^{19, 20)}を生じない優れた人工ベクターの創出に繋がれば幸いである。

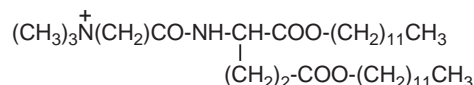
3. 人工脂質分子による小さなRNAの輸送

近年、遺伝情報を持たないジャンクRNAとされていた non-coding RNA (ncRNA) の新しい機能が次々と明らかになりつつある。Fire A. と Mello C.C. らによるRNA干渉 (RNAi) の発見は、二本鎖RNAをベースとする新たな遺伝子発現の制御メカニズムに関する研究の礎を成した²¹⁾。近い将来、RNAiが安全かつ有効に遺伝子発現を制御する手法となりつつあり、低分子化合物とタンパク質に続く第三の標的薬剤としてRNA分子に熱い視線が注がれている。ncRNAを細胞内で機能させるためには、DNAと同様にncRNAを単独で外部から細胞内に輸送することは難しいため、効率の良い細胞内輸送についての手段が必要になる。これまでに我々は、核酸デリバリーシステムのために人工脂質分子ライブラリーの構築を進めてきた。そこで本稿では、我々が保有する分子ライブラリーを用いてncRNA輸送を発揮する脂質分子の化学構造について紹介したい。

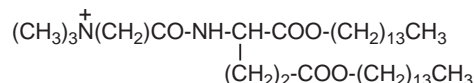
3.1. 人工脂質分子ライブラリー

第1項で述べてきたように分子ライブラリーは、我々に「核酸の細胞内輸送」を行うために必要な構造的情報を与えてくれる。第2項では、我々が保有する人工脂質分子を用いて、ncRNAとして注目を集めている small interfering RNA (siRNA) を輸送するために必要な脂質分子の化学構造について紹介する。人工脂質分子ライブラリーは、glutamate (Glu) をコネクターとして、ヘッド領域にトリメチルアミン (TMA)、テイル領域に2つの炭化水素鎖 (C) を有する化学構造からなり (Fig. 8)、それぞれ炭化水素鎖のカーボン数が異なる脂質化合物からなる。

TMA-C2-Glu-C12



TMA-C2-Glu-C14



TMA-C2-Asp-C12

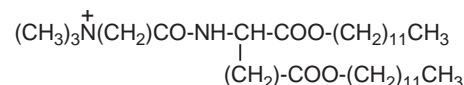


Fig. 8 Chemical structures of artificially synthesized amphiphilic compounds.

TMA-C2-Glu-C12 is represented by a structure made up of a head region consisting of trimethylamine (TMA) and a hydrophobic chain comprising 2 carbon atoms (C2), a connector region consisting of glutamic acid (Glu), and 2 tail regions consisting of a hydrophobic chain comprising 12 carbon atoms (C12).

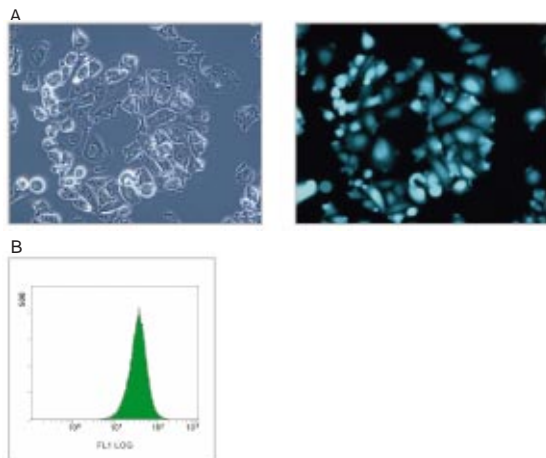


Fig. 9 Characterization of CHO-EGFP cell line.

A) Fluorescence images of CHO-EGFP cells; left, phase contrast image ($\times 400$); right, fluorescence image ($\times 400$). CHO cells were transfected with pCMV-IE EGFP and established by a cloning assay using a 96-well plate. The constant expression of the EGFP gene in the CHO-EGFP cells was analyzed under a fluorescence microscope. B) Flow cytometry analysis of CHO-EGFP cells. The cells were gently harvested using 0.2% trypsin-EDTA solution and EGFP expression was analyzed on a flow cytometer (5.0×10^4 events, 488-nm excitation laser wavelength, 500 V).

3.2. 人工脂質分子による siRNA 導入

人工脂質分子による siRNA の輸送効率を簡便に評価するために、我々は蛍光タンパク質 (EGFP) を恒常的に発現する CHO-EGFP 細胞を作製した (Fig. 9)。次いで、脂質分子の細胞内輸送効率は anti-EGFP siRNA duplex (Wako ; target site, CGAAGCTGAAGTTCA) を用いて細胞内 EGFP の発現低下を観察することにより評価した。人工脂質分子は超音波処理により H_2O 中で分散・溶解させた。まず、didodecyl-acetylglutamate-trimethylammonium (TMA-C2-Glu-C12) をベースに、ヘッド領域の炭化水素鎖のカーボン数を増加させた脂質分子 (C2 C4 C6 C11) による siRNA 導入効率を比較検討した。その結果、炭化水素鎖の長さが伸びるほど siRNA による EGFP の発現阻害効果が減少していた (Fig. 10A)。次に、TMA-C2-Glu-C12 のテイル領域にある 2 つの炭化水素鎖のカーボン数を 14 とした脂質分子 TMA-C2-Glu-C14 について siRNA 導入試験を検討した場合は、TMA-C2-Glu-C12 と比較して低い siRNA 導入効率であった (Fig. 10B)。また、TMA-C2-Glu-C12 の結果と同様に、TMA-C2-Glu-C14 のヘッド領域の炭化水素鎖のカーボン数を増加させた場合 (C2 C6) でも、siRNA の導入能は向上しなかった (Fig. 10B)。このように、TMA-C2-Glu-C12 の化学構造は、siRNA を細胞内に輸送するために適した炭化水素鎖の長さを持ち、炭化水素鎖の長さのバランスを変えるだけで siRNA 輸送能力に大きな影響を与えた。さらに、我々は、コネクター領域をグルタミン酸 (Glu) から アスパラギン酸 (Asp) に交換した脂質分子 TMA-C2-Asp-C12 の持つ siRNA 導入能力についても評価した結果、TMA-C2-Glu-C12 とほぼ同等の能力であった (Fig. 10C)。以上の結果

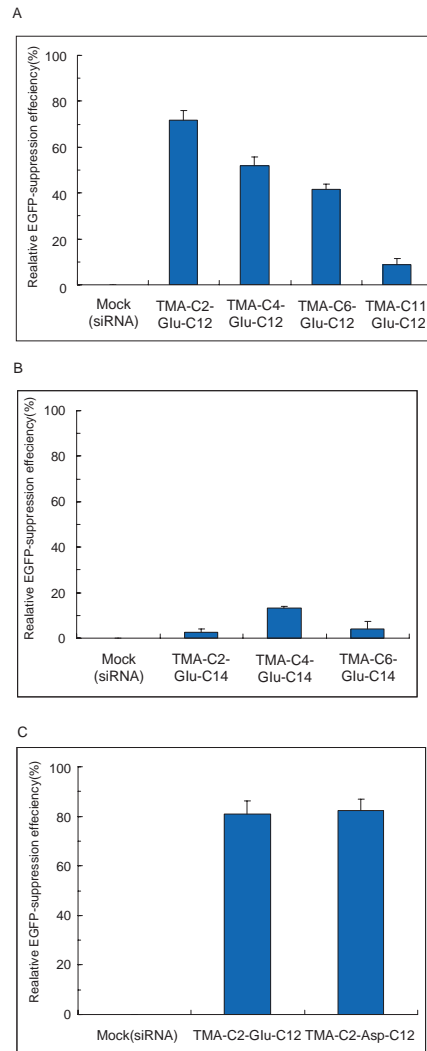


Fig. 10 Transfection efficiencies of siRNA by amphiphilic compounds with different structures.

A) Transfection efficiencies of siRNA by TMA-C2-Glu-C12, TMA-C4-Glu-C12, TMA-C6-Glu-C12, or TMA-C11-Glu-C12. CHO-EGFP cells were precultured in 24-well plates and transfected for 3.0 h with a mixture of EGFP siRNA and amphiphile (50 pmol/5.0 μ l); transfection efficiencies were estimated as a decreased range of EGFP expression on a flow cytometry histogram at 24 h post-transfection. All data points are averaged from 2 replications on different days and expressed as the mean \pm standard deviation. B) Transfection efficiencies of siRNA by TMA-C2-Glu-C14, TMA-C4-Glu-C14, or TMA-C6-Glu-C14. C) Transfection efficiencies of siRNA by TMA-C2-Asp-C12.

から、siRNA 輸送のための脂質分子の化学構造は、ヘッド領域の炭化水素鎖の長さがカーボン数2、テイル領域の炭化水素鎖のカーボン数12であり、コネクターとしての Glu / Asp は重要な要素ではなかった。今後、分子ライブラリーにより示された構造的情報をもとに、細胞内 ncRNA 輸送のために優れた人工脂質分子ベクターの開発を行っていききたい。

4. おわりに

本稿で、我々が保有する人工脂質分子ライブラリーによるDNAとsiRNAの細胞内輸送というバイオ機能を脂質分子の化学構造にフォーカスを向けて紹介してきた。ユニークなフィルム様自己集合体やsiRNA輸送のための炭化水素鎖の長さのバランスなど、人工脂質分子が発揮するバイオ機能を明らかにしてきた。我々が人工脂質分子材料に興味を持つ理由は、「化学構造とバイオ機能」の相関からアプローチを行いながら、どのように設計すれば脂質分子に発揮させたいバイオ機能を付加できるようになるのか？大袈裟に言えば、如何にして分子の持つ記憶を見出しながら優れた分子材料を創り出すのか？という面白さである。今後、人工脂質分子が発揮するバイオ機能についての情報を蓄積することにより、脂質分子材料を用いたデリバリーシステムの発展に繋げていけるのではないだろうか。例えば、輸送したい分子を核酸だけでなく低分子化合物やタンパク質に対しても可能とする人工脂質分子を創り出すことも大いに興味深い。実際、我々が保有する約120種類の人工脂質分子の中には、医療分野でも注目を集めているIgG抗体を高効率に細胞内へ輸送可能な脂質分子も存在しており、細胞内にあるシグナルタンパク質などを生きた細胞の状態で染色することも可能であろう。このように、核酸をはじめ単独では導入し難い分子をボトムアップ技術により人為的に輸送することができれば大きな意義になるのではないだろうか。

また現在、優れた分子材料が創りだされている一方で、人為的に生み出されたナノ材料（我々が保有する人工脂質分子も含まれる）による人への安全性が問われている。本稿で紹介してきた人工脂質分子は、直接的に細胞を死滅させるような効果を有していないが、人工脂質分子材料の一部には、細胞に直接作用し細胞膜障害を介してアポトーシス/ネクローシス様の細胞死が誘導されることを確認している。ある特定の化学構造を持つ脂質分子を介して細胞死が誘導されるという情報は、今後、人工脂質分子材料の安全性を考える上で重要となるだろう。

以上、これまでの研究について、我々の保有する人工脂質分子が発揮するバイオ機能を紹介してきた。今後、人工脂質分子の研究開発には克服すべき課題も多く発展途上の段階ではあるが、将来のデリバリーシステムの確立のために、分子材料の開発をより安全にかつ高い能力を発揮させるための情報と議論が積み上げられ、優れた人工分子材料が開発されることを期待したい。

謝辞

本研究では、神経幹細胞の樹立・培養方法について、The Mount Desert Island Biological LaboratoryのDavid W. Barnes教授からご教示していただいた。現在の「人工脂質分子ライブラリーの構築とバイオ機能」ならびに「同仁化学研究所・遺伝子導入試薬“HilyMax”の開発」について、京都大学工学研究科の浜地格教授、同仁化学研究所の方々からのご支援をいただいた。また、本研究を進めるにあたり、福岡県生物食品研究所の研究員（石川智之、山下聡子、赤尾哲之、水城英一）をはじめ多くの方々のサポートに深く感謝します。

参考文献

- 1) Schaeffer-Ridder M., Wang Y., and Hofschneider P. H. *Science* (1982) 215: 166–168.
- 2) Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringolds G., and Danielsen M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1987) 84: 7413–7417.
- 3) Cone R. D. and Mulligan R. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1984) 81: 6349–6353.
- 4) Zenke M., Steinlein P., Wagner E., Cotton M., and Brinstiel M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1990) 87: 3655–3659.
- 5) Capecchi M. R. *Cell* (1980) 22: 479–488.
- 6) Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., and Hofschneider P. H. *EMBO J.* (1982) 1: 841–845.
- 7) Chu G., Hayakawa H., and Berg P. *Nucleic Acids Res.* (1987) 15: 1311–1326.
- 8) Johnston S. A. and Tang D. C. *Genet Eng.* (1993) 15: 225–236.
- 9) Kunitake T. and Okahata Y. *J. Am. Chem. Soc.* (1977) 99: 3860–3871.
- 10) Kunitake T., Nakanishi N., Shimonura M., Okahata Y., Kano K., and Ogawa T. *J. Am. Chem. Soc.* (1980) 102: 6642–6644.
- 11) Kunitake T. *Ann. NY Acad. Sci.* (1986) 471: 70–82.
- 12) Kusumoto K., Akao T., Mizuki E., and Nakamura O. *Cytotechnology* (2006) 51: 57–66.
- 13) Eriksson P. S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T., Alborn A. M., Nordborg C., Peterson D. A., and Gage F. H. *Nature Med.* (1998) 4: 1313–1317.
- 14) Noctor S. C., Flint A. C., Weissman T. A., Dammerman R. S., and Kriegstein A. R. *Nature* (2001) 409: 714–720.
- 15) Loo D. T., Fuquay J. I., Rawson C. L., and Barnes D. W. *Science* (1987) 236: 200–202.
- 16) Ma H., Zhu J., Maronski M., Kotzbauer P. T., Lee V. M., Dichter M. A., and Diamond S. L. *Neuroscience* (2002) 112: 1–5.
- 17) Kato K., Yoneda Y., Okada Y., Kiyama H., and Shiosaka S. *Brain Res Mol Brain Res.* (1994) 25: 359–363.
- 18) Lakkaraju A., Dubinsky J. M., Low W. C., and Rahman Y. E. *J Biol Chem.* (2001) 276: 32000–32007.
- 19) Marshall E. *Science* (1999) 286: 2244–2245.
- 20) Check E. *Nature* (2005) 433: 561.
- 21) Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., and Mello C. C. *Nature* (1998) 391: 806–811.

著者プロフィール

氏名：楠本 賢一（Ken-ichi Kusumoto）

年齢：36歳

所属：福岡県工業技術センター 生物食品研究所 生物資源課
研究員

連絡先：〒839-0861 福岡県久留米市合川町 1465-5
TEL (0942) 30-6644 FAX (0942) 30-7244
kkusumoto@fitc.pref.fukuoka.jp

出身大学：九州大学大学院農学研究科 遺伝子資源工学専攻
細胞制御工学講座

学位：農学博士

現在の研究テーマ：

- ・人工脂質分子材料とバイオ機能
- ・セラミックス材料と三次元細胞培養
- ・脳神経細胞への抗ストレス因子

エイズから見た 感染症研究の最前線

その3 ウイルスのレセプターへの吸着と感染の機構
multiple-site binding

熊本大学大学院医学薬学研究部感染防御学分野 原田信志

1. はじめに

ウイルスは細胞への感染なしには増殖できない。ウイルスが細胞へ感染するためには、まず、ウイルス表面の蛋白リガンドの細胞表面に存在するレセプターへの附着が必要である。この現象を「吸着」と呼んでいる。ウイルス学的には、その後、ウイルスコアの細胞への「侵入」と「脱殻」という過程を経て初期の感染が進行する。ウイルスにもいろいろな種類があり、いろいろな分類法が使われるが、そのひとつにエンベロープを持つものと持たないウイルスに大別する方法がある。エンベロープを持たないポリオウイルスは、吸着後、単なるtranslocationで侵入・脱殻が行われると思われる。エンベロープを持つインフルエンザウイルスではendocytosis、エイズのウイルスであるHIV-1ではdirect fusionで感染が成立すると言われる。しかし、それらの詳細な吸着後の機序にはまだ分からない点が多い。

個々のウイルスでレセプターの同定は盛んに行われる。インフルエンザウイルスのsialic acid、HIV-1のCD4とケモカインレセプター(CXCR4かCCR5)などである。これらのレセプターの同定は、ウイルスの感染をその最初のステップで抑えるという意味で、抗ウイルス剤開発の有効な手段となりえる。しかしながら、ウイルス特有の酵素を阻害する他の抗ウイルス剤やワクチンにも共通していることだが、このようなウイルス感染症治療薬の最大の欠点は、極めて狭いウイルス株にしか有効でないことである(そのためウイルス感染症の治療では、もし有効な抗ウイルス剤があれば、どのウイルスに感染しているかの診断が極めて重要になる)。もうひとつの大きな問題は、ウイルスの変異による耐性株が^{1, 2, 3)}、ほとんどのウイルスで簡単に出現することである。

これらの問題点を克服することは、ウイルス感染症で可能であろうか? 広範囲のウイルスに効く抗ウイルス剤; どんなウイルスの変異にも対応できる抗ウイルス剤の開発の可能性は? それらの可能な方策は、多くのウイルスの感染成立に共通して重要な役割を担っている宿主細胞側の因子をつきとめることである。そして、その因子を抑制することで、可能であれば、それらの感染を制御することであろう。

2. エンベロープウイルスの侵入機構

エンベロープを持つウイルスでは、endocytosisかdirect fusionでウイルスは細胞内へ侵入する。この時、エンベロープと細胞膜との融合fusionが起こることは、両者に共通している。この過程はrabies⁴⁾、baculovirus⁵⁾、influenza virus⁶⁾、Semliki Forest virus⁷⁾などでかなり詳細に報告されている。エンベロープに存在

する三量体のウイルス糖蛋白スパイクと細胞膜上のレセプター分子が結合し、その結合物が複数集合(multiple-site binding)することによりfusion poreを形成するためとされている。HIV-1でもこのような過程が感染成立に要求されるのか、fusion pore形成に必要な要素は何か、この要素を阻害することによりHIV-1の感染を抑制できるか、など調べた。

3. HIV-1 における multiple-site binding

HIV-1の感染効率はウイルス1個当たりのgp120の量が多いか、あるいは細胞表面のウイルスレセプターの発現量が多いと上昇する。また、CD4とCXCR4のcolocalizationが起こると、CD4とCXCR4をレセプターとするX4タイプのHIV-1の感染価が増強する⁸⁾。これらの現象は1分子のgp120(実際是三量体)と1セットのレセプターとの結合が感染成立に充分であると仮定すると、説明できない。またsCD4を利用したHIV-1感染抑制のデータからも、HIV-1は複数のgp120とレセプターの結合complex、つまりmultiple-site bindingが必要であると報告されている⁹⁾。このmultiple-site bindingはウイルスエンベロープと細胞膜(両者とも脂質二重膜)の流動性に依存して形成されると考えられている。膜流動性は温度依存적であるとされるが、HIV-1の吸着を25、37、40で行うと、感染価は吸着時の温度に依存して増加する。

4. 細胞膜とエンベロープの流動性の測定

細胞膜とエンベロープの流動性を5-doxyl stearic acidを用いた電子スピン共鳴法(ESR)で測定した(図1)。細胞膜の流動性order parameterは0.582~0.598であった。一方、ウイルスエンベロープのorder parameterは0.685~0.738で、細胞膜より流動性の低い硬い膜であった。

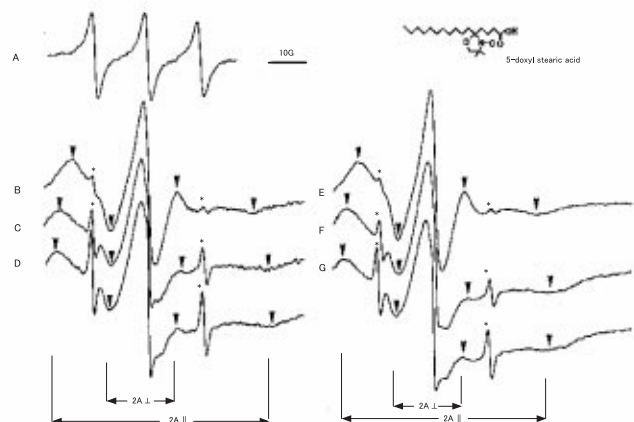


図1 ESRを用いた細胞膜とウイルスエンベロープの流動性
A; Freeの5-doxyl stearic acid. B; MOLT/C-2細胞でorder parameterは0.611. C; HIV-1 C-2ウイルスで0.729. D; CD45-depleted C-2ウイルスで0.776. E; MT-2で0.585. F; C-2(MT-2)ウイルスで0.704. G; CD45-depleted C-2(MT-2)で0.721.

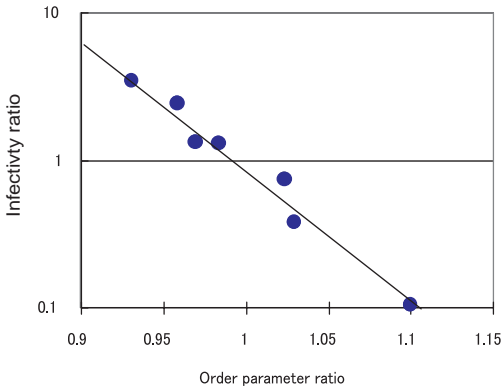


図2 膜流動性と HIV-1 の感染性との関連
 図の左から、40℃ 処理、0.2% xylocaine、0.05% Tween 20、200 µg/ml DPPC、10 µg/ml DPPC、anti-HLA-II、25℃ 処理を示している。

ウイルスのエンベロープでは細胞膜よりコレステロールの含量が高く、このことが膜の流動性を低くしていると考えられた。また、HIV-1 はコレステロール含量の高い膜部分 raft から選択的に出芽していることを示している。細胞膜およびエンベロープの流動性は温度依存的であり、低温では低く、高温では高かった。ESR を用いることにより、正確に生細胞の膜とウイルス粒子エンベロープの流動性を測定できた。

5. 流動性と感染性との関連

細胞膜の流動性に影響をあたえる因子であるキシロカイン、d- α -phosphatidylcholine dipalmitoyl (DPPC)などを作用させ、細胞膜と HIV-1 感染性との関連を求めた。細胞膜の流動性が亢進すると、対数的に感染性は増加した。流動性が5%増加すると感染価は2.4倍、5%低下すると HIV-1 感染は56%抑制された(図2)。

このように細胞膜あるいはエンベロープの僅かな流動性の変化は、HIV-1 の感染成立に大きく反映されることがわかった。細胞膜流動性を抑制する物質は、少なくとも HIV-1 の感染を阻害するものとして使えることも示唆されている。

細胞に室温で HIV-1 を吸着させ洗浄後、40℃ あるいはキシロカイン(37℃)で1時間処理すると、感染価の増加が認められる。この吸着後感染増強は、高温あるいはキシロカイン処理時に CXCR4 のアンタゴニストである T140 を加えると完全に抑制される¹⁰⁾。このことは、高温やキシロカインによる膜流動性の亢進が、室温下で細胞にゆるやかに吸着したウイルスのエンベロープの流動性をも亢進させ、multiple-site binding を促進させたと思われる。また、T140 で感染増強が阻止されることから、multiple-site binding が起こっていると考えた。

6. HIV-1 gp120 の不均一性

室温、37℃、40℃ で吸着し感染可能なウイルスは、ある特定のウイルス群が選択されているのか、あるいは偶然の確率で感染価が増加していくのか検討した。ウイルスを中和抗体あるいは細胞を T140 で処理し、その後、室温、37℃、40℃ で吸着を行い、それぞれのウイルスの抗体や T140 に対する感受性が同じか、異なるかで gp120 の不均一性が証明できるか試みた¹¹⁾。室温吸着で感染可能なウイルスは、中和抗体や T140 に対して感受性が低かった。このことは、通常のウイルスサンプルは必ずしも均一ではなく、吸着時の温度の条件である一定の性質を持ったグループが選択されると考えられた。つまり、低温吸着の条件では膜流動性が低く、感染に十分な multiple-site binding を形成するためには、ウイルスが多く gp120 あるいは多くの functional gp120 を持っている方が感染成立のためには有利である。このような多くの gp120 を持った HIV-1 は、また、中和抗体や T140 に耐性である。

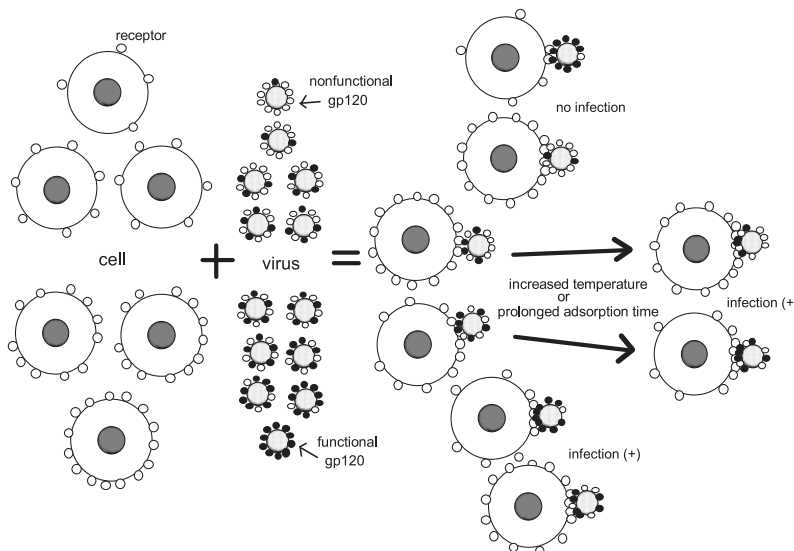


図3 HIV-1 感染成立のための multiple-site binding の伝説

また、X4株のウイルスにルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだNL43-lucとR5株であるJR-FL-lucでは、JR-FL-lucが80倍も感染性が高い。しかも、JR-FL-lucではgp120/p24がNL43-lucより高く、多くのgp120がJR-FL-lucでは存在していると考えられる。このようなJR-FL-lucはNL43-lucより、その感染性が温度非依存的であった。これらのデータはmultiple-site bindingが感染に重要であり、それを左右する因子として膜の流動性とウイルスのgp120の量が考えられた(図3)。

7. おわりに - 膜流動性制御と感染抑制の可能性

Fusion poreの形成にmultiple-site bindingが必要だという概念は、ほとんどのエンベロープを有するウイルスに適用できると思われる。そうであれば、細胞膜あるいはエンベロープの流動性を制御して、エンベロープを有する多くのウイルスの感染をコントロールすることが可能であろう。コレステロールの脂質二重膜内での存在は膜の流動性をliquid ordered、つまり低下させることが良く知られている。コレステロールそのものは、直接ウイルスに作用させても感染性に影響を与えないという報告もあるが、コレステロール類似の構造を持った分子で、多くのエンベロープウイルスに抗ウイルス作用を持つものをスクリーニングして、その作用機序を解明すべきであろう。

参考文献

- Masuda, T., S. Matsushita, M.J. Kuroda, M. Kannagi, K. Takatsuki, and S. Harada. 1990. Generation of neutralization-resistant HIV-1 in vitro due to amino acid interchanges of third hypervariable env region. *J. Immunol.* **145**: 3240-3246.
- El-Farrash, M.A., M.J. Kuroda, T. Kitazaki, T. Masuda, K. Kato, M. Hatanaka, and S. Harada. 1994. Generation and characterization of a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) mutant resistant to an HIV-1 protease inhibitor. *J. Virol.* **68**: 233-239.
- Maeda, Y., M. Foda, S. Matsushita, and S. Harada. 2000. Involvement of both the V2 and V3 regions of the CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 envelope in reduced sensitivity to macrophage inflammatory protein 1a. *J. Virol.* **74**: 1787-1793.
- Roche, S., and Y. Gaudin. 2002. Characterization of the equilibrium between the native and fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein indicates that the fusion complex is made of several trimers. *Virology* **297**: 128-135.
- Plonsky, I., and J. Zimmerberg. 1996. The initial fusion pore induced by baculovirus GP64 is large and forms quickly. *J. Cell Biol.* **135**: 1831-1839.
- Markovic, I., E. Leikina, M. Zhukovsky, J. Zimmerberg, and L.V. Chernomordik. 2001. Synchronized activation and refolding of influenza hemagglutinin in multimeric fusion machines. *J. Cell Biol.* **155**: 833-844.
- Gibbons, D.L., I. Erk, B. Reilly, J. Navaza, M. Kielian, F.A. Rey, and J. Lepault. 2003. Visualization of the target-membrane-inserted fusion protein of Semliki Forest virus by combined electron microscopy and crystallography. *Cell* **114**: 573-583.
- Song, W., S. Yahara, Y. Maeda, K. Yusa, Y. Tanaka, and S. Harada. 2001. Enhanced infection of an X4 strain of HIV-1 due to capping and colocalization of CD4 and CXCR4 induced by capsianoside G, a diterpene glycoside. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**: 423-429.
- Layne, S.P., M.J. Merges, M. Dembo, J.L. Spouge, and P.L. Nara. 1990. HIV requires multiple gp120 molecules for CD4-mediated infection. *Nature* **346**: 277-279.
- Harada, S., T. Akaike, K. Yusa, and Y. Maeda. 2004. Adsorption and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 are modified by the fluidity of the plasma membrane for multiple-site binding. *Microbiol. Immunol.* **48**: 347-355.
- Harada, S., K. Yusa, and Y. Maeda. 2004. Heterogeneity of envelope molecules shown by different sensitivities to anti-V3 neutralizing antibody and CXCR4 antagonist regulates the formation of multiple-site binding of HIV-1. *Microbiol. Immunol.* **48**: 357-365.

筆者紹介



氏名：原田信志

所属：熊本大学大学院医学薬学研究部 感染防御

住所：熊本市本荘 1-1-1

学会展示のお知らせ

日本食品科学工学会 第54回大会

期日：2007年9月6日(木)～8日(土)

会場：中村学園大学

(福岡市城南区別府 5-7-1)

・展示 9月6日～8日

・ランチョンセミナー 9月8日

皆様のお越しをお待ちしております。

Topics on Chemistry

新規アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性測定法

株式会社同仁化学研究所 野口 克也

昔から日本人には高血圧の人が多く、現在、30歳以上の男性の約50%、女性の約40%が高血圧である。高血圧は自覚症状が少ないため、放置する人が多いが、高血圧の状態が長年続くと、血管を徐々に痛めていき、動脈硬化を引き起こし、最終的に心筋梗塞や脳卒中などを発症してしまう。血圧を調節するメカニズムは人体に数々備わっており、その中で重要なものの一つとしてレニン-アンジオテンシン系が挙げられる。

レニン-アンジオテンシン系において、アンジオテンシン変換酵素(ACE)は昇圧ペプチドであるアンジオテンシンの生成を触媒する。アンジオテンシンの生成を抑制すれば、血圧上昇を防ぐことができるため、高血圧の患者にはACE阻害薬が処方されている。しかし、ACE阻害薬は副作用として味覚障害、発疹およびアレルギーなどを生じることもある。これらの理由から、安全で安価なACEの阻害活性をもつ天然の基質は研究者たちに注目されている。ACEの阻害活性を持つイワシ由来のジペプチド(Val-Tyr)、発酵乳由来のトリペプチド(Val-Pro-Pro、Ile-Pro-Pro)などが発見され、それらを含む食品は機能性食品とされている。また、ACE阻害活性をもつ機能性食品は、厚生労働省が認可する特定保健用食品として売り出され、消費者の関心を集めており、ACE阻害活性を測定することは非常に重要である。

現在、主に利用されているACE阻害活性測定法は、合成基質Hippuryl-His-Leu(HHL)から切り出されてくる馬尿酸を酢酸エチルで溶媒抽出後、濃縮乾固し、それを再溶解して紫外吸収(228 nm)を測定するという煩雑な方法である。これらの点を克服するため、新規合成基質である3-Hydroxybutyryl-glycyl-glycyl-glycine(3HB-GGG)と市販の酵素分析キット(F-kit)を用い、受田らと小社が共同開発した迅速・簡便なACE阻害活性測定法を紹介する¹⁾。

この測定法の原理を図に示す。合成基質3HB-GGGとACEを反応させると、ペプチドのC末端側をジペプチド単位で切断し、3-Hydroxybutyryl-glycineとGlycyl-glycineが生成する。そこにAminoacylaseを作用させることで3-Hydroxybutyric acidとGlycineが生成する。生成した3-Hydroxybutyric acidをF-kitで定量し、試料のACE阻害活性を測定する。

実際に3HB-GGGとACEとの反応により、3-Hydroxybutyryl-glycineとGlycyl-glycineが生成することをTNBS法及びNBD-F法により確認した。また、Aminoacylaseによって3-Hydroxybutyryl-glycineからGlycineが生成されることをNBD-F法によって確かめた。そして、迅速・高感度という観点からACE濃度、Aminoacylase濃度の最適化を行い、30分で反応できるようにした。

代表的なACE阻害薬であるカプトプリルについて従来法と本法を比較した結果、IC₅₀値は従来法で0.086 μmol/l、本法で0.081 μmol/lとほぼ同じ値であった。また、ACE阻害活性をもつ食品についても比較した結果、従来法と本法の相関係数は0.872であり、よい相関性を示した。

従来法では酢酸エチルでの抽出操作や濃縮乾固の操作(120分)が必要であり、残存した酢酸エチルはアッセイの結果に影響を与える。それに対し、本法は酢酸エチルの残存を気にせず、ま

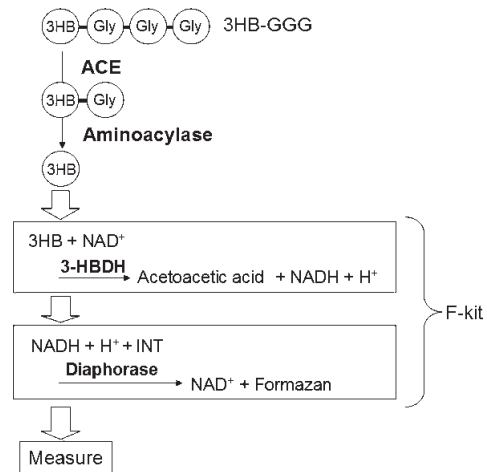


図 ACE 阻害活性測定法の原理

た迅速・簡便であるため、操作ミスが減り、再現性のよい結果が得られる。さらに、煩雑な操作が少なくなるため、本法は試料を分析する時間を従来法と比べ1/3に抑える事ができる。

新規合成基質3HB-GGGとF-kitを用いた迅速・簡便・再現性の高いACE阻害活性測定法はACE阻害物質のスクリーニング分野への応用の可能性がある。それにより、新たなACE阻害薬の開発や機能性食品の探索が期待される。

参考文献

- 1) Le Hoang Lam, Tomoko Shimamura, Ken Sakaguchi, Katsuya Noguchi, Munetaka Ishiyama, Yume Fujimura and Hiroyuki Ukeda, *Anal. Biochem.*, **2007**, 104.

第18回フォーラム・イン・ドージンのご案内

今年も下記の日程にてフォーラム・イン・ドージンを開催いたします。
多数のご参加をお待ちしております。

タイトル：感染症をめぐる宿主の応答と微生物の戦略
日時：2007年11月30日(金)9:30～17:00
場所：鶴屋ホール(熊本市)

演者(順不同敬省略)

中西義信(金沢大学医学系研究科)
鎮西康雄(三重大学医学系研究科)
黒川健児(東京大学薬学系研究科)
嘉糠洋陸(帯広畜産大学原虫病研究センター)
Bok-Luel Lee(釜山国立大学薬学部)
福井宣規(九州大学生体防御医学研究所)
佐々木雄彦(秋田大学医学部)
住本英樹(九州大学生体防御医学研究所)
白土明子(金沢大学医学系研究科)

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ております。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.007 Protein kinase C 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/μl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} (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。

No.010 PKC α 特異的阻害剤ペプチド

従来、ペプチドをはじめ、種々のPKC阻害剤が有るが、PKC α に特異的なもの存在しなかった。PKC α はガンなどにおいて他のPKCと全く異なる挙動を取り、発ガンに極めて重要なシグナルであることが分かってきている。したがって、PKC α 特異的な阻害剤は非常に有用な物質であると考えられる。

九州大学では、種々のPKCサブタイプに特異的な基質ペプチドを開発する中で、これまでに存在しなかったPKC α に特異的な阻害ペプチドを見いだした。この阻害剤ペプチドは、PKC α 、あるいはそれが深く関与するガンの研究に有用であると考えられる。

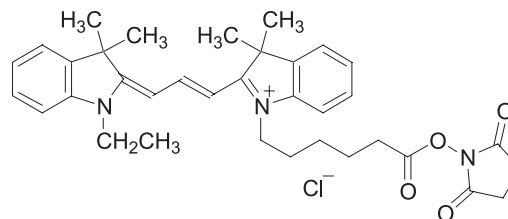
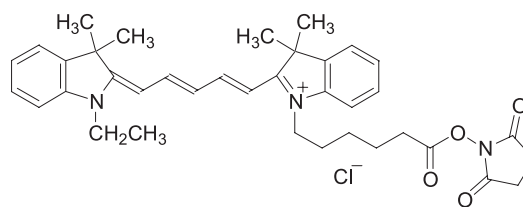
販売中止のお知らせ

下記製品を販売中止とさせていただきます。
これまでのご愛顧ありがとうございました。在庫に関しては、お近くの代理店まで、お問い合わせ下さい。

Drynap 500 g 包装(コード: 342-01135)
Chromotropic acid 25 g 包装(コード: 347-00661)
5 g 包装(コード: 345-00662)
Sucrose monocholate 1 g 包装(コード: 344-07751)
5 g 包装(コード: 340-07753)

IC Dye 販売再開のお知らせ

昨年、12月に販売を中止いたしておりました IC3-OSu, IC5-OSuに関して、販売を再開して欲しいとの強いご要望を受け、包装容量を改め販売を開始することいたしました。また改めてのご愛顧をよろしくお願いたします。

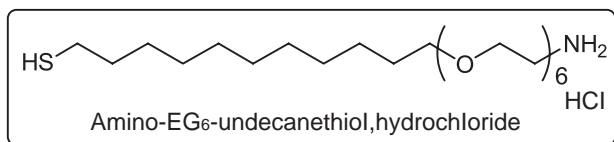
IC3-OSu $\lambda_{ex} \sim 550 \text{ nm}$, $\lambda_{em} \sim 570 \text{ nm}$ IC5-OSu $\lambda_{ex} = 640 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 660 \text{ nm}$

インドシアニン化合物は、分子中のメチン炭素数によって色調が変化します。長波長域の強い蛍光を利用することにより、試料の自家蛍光を避け、高感度に検出することが可能です。励起光源としてHeNeレーザー(543 nmまたは633 nm)を利用できることから、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)を用いた免疫組織染色や、全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)を用いた一分子イメージング等への応用が期待されます。アミノ酸やペプチドなどのアミノ基を選択的に標識することができます。

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
IC3-OSu special packaging	20 μg × 3	38,000	I271
IC5-OSu special packaging	20 μg × 3	38,000	I272

試作品

Self Assembled Monolayer 研究用



< 特長 >

- 非特異的吸着の少ないSAMを形成できる。
- 蛋白質、DNAなど、様々な物質をSAM上に固定化できる。

固体表面に種々の分子を配向・集積させる方法の一つである自己組織化法は、簡便に高密度・高配向な自己組織化単分子膜(Self-Assembled Monolayers: SAMs)を構築することができるため、研究・応用が活発に行われています。

SAMsの性質は、そのアルキル鎖長や末端の官能基、主鎖の親水性などにより変化し、多彩な機能を固体表面に導入することが可能であり、表面プラズモン共鳴(SPR)や水晶振動子マイクロバランス(QCM)など、金属板を利用するセンサーに広く用いられております。

SPRやQCMを用いた測定においては、特異的吸着と非特異的吸着を区別することが困難であるため、非特異吸着を抑制することが重要となります。

近年、蛋白質等の表面固定化にオリゴエチレングリコールを導入したSAMs試薬が頻りに用いられています。オリゴエチレングリコールには蛋白質や細胞の吸着を抑制する効果があることが、Whitesidesらにより実証されております¹⁾。

上記のAmino-EG₆-undecanethiolはエチレングリコール部位と末端にアミノ基を有しており、カルボキシル基を持つタンパク、ペプチド、その他分子認識サイトを導入する際に有用です。

Hodenlandらは、Amino-EG₃-undecanethiolとHydroxy-EG₃-undecanethiolを混合したSAMを作製し、Calmodulinを固定化してCalcineurinとの相互作用をSPRにて測定しています²⁾。

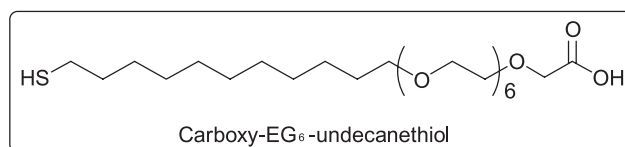
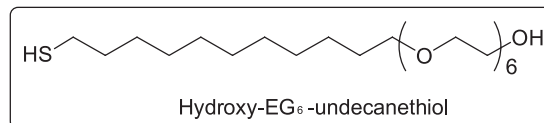
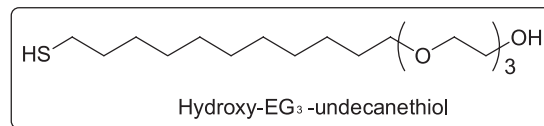
また、Bamdadらは、Amino-EG₃-undecanethiolを基にDuplex DNAを基板上に結合させ、ハイブリッド形成の様子をSPRにて観測しております³⁾。

小社では、他にもエチレングリコール部位を有した右記のSAM試薬を取り扱っております。他社品と比較して高純度であり、単分子膜形成を阻害する可能性が有る不純物をほとんど含んでおりません。

< 参考文献 >

- 1) C. Pale-Grosdemange, E. S. Simon, K. L. Prime, and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 777-790.
- 2) C. D. Hodneland, Young-Sam Lee, D. Min, and M. Mrksich, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **2002**, 99, 5048-5052.
- 3) C. Bamdad, *Biophysical Journal.*, **1998**, 75, 1997-2003.

関連商品



品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Carboxy-EG ₆ -undecanethiol	10 mg	24,000	C445
	100 mg	60,000	C445
Hydroxy-EG ₃ -undecanethiol	10 mg	14,400	H354
	100 mg	36,000	H354
Hydroxy-EG ₆ -undecanethiol	10 mg	18,000	H355
	100 mg	38,800	H355
11-Amino-1-undecanethiol, hydrochloride			A423
8-Amino-1-undecanethiol, hydrochloride			A424
6-Amino-1-undecanethiol, hydrochloride	各 10 mg	13,200	A425
	100 mg	39,400	
10-Carboxy-1-decanethiol			C385
7-Carboxy-1-heptanethiol			C386
5-Carboxy-1-pentanethiol	各 10 mg	11,400	C387
	100 mg	31,000	
10-Carboxydecyl disulfide	10 mg	11,400	C404
	100 mg	33,000	
7-Carboxyheptyl disulfide			C405
5-Carboxypentyl disulfide	各 10 mg	11,400	C406
11-Hydroxy-1-undecanethiol			H337
8-Hydroxy-1-octanethiol			H338
6-Hydroxy-1-hexanethiol	各 10 mg	12,000	H339
	100 mg	35,000	
11-Ferrocenyl-1-undecanethiol	10 mg	16,000	F246
	100 mg	48,000	
8-Ferrocenyl-1-octanethiol			F247
6-Ferrocenyl-1-hexanethiol	各 10 mg	15,000	F269
	100 mg	45,000	
N-Fmoc-Aminoundecanethiol			F287
N-Fmoc-Aminooctanethiol			F288
N-Fmoc-Aminohexanethiol	各 10 mg	14,800	F289
	50 mg	45,000	

分子生物学用 Good's buffer

分子生物学用グレードの HEPES, MOPS, PIPES を発売致しました。

ご要望の多い、分子生物学用 Good's Buffer 3種(HEPES, MOPS, PIPES)に、エンドトキシン試験(試験適合) DNase, RNase 試験(不検出)を行い、かつ純度を従来の99.0%以上から HEPES, PIPES : 99.7%以上、MOPS : 99.5%以上の超高純度品となっております。

HEPES 分子生物学用

<試験規格>

純度(滴定): 99.7%以上、DNase, RNase: 不検出、エンドトキシン: 試験適合

白色結晶性粉末、水溶状: 試験適合 0.025以下(320 nm)、乾燥減量: 0.20%以下、強熱残分(硫酸塩): 0.10%以下、重金属(Pbとして): 0.0005%以下、鉄(Fe): 0.0005%以下

MOPS 分子生物学用

<試験規格>

純度(滴定): 99.5%以上、DNase, RNase: 不検出、エンドトキシン: 試験適合

白色結晶性粉末、水溶状: 試験適合 0.020以下(300 nm)、乾燥減量: 0.30%以下、強熱残分(硫酸塩): 0.10%以下、重金属(Pbとして): 0.0005%以下、鉄(Fe): 0.0005%以下

PIPES 分子生物学用

<試験規格>

純度(滴定): 99.7%以上、DNase, RNase: 不検出

白色結晶性粉末、アルカリ溶状: 試験適合 0.030以下(300 nm)、乾燥減量: 0.50%以下、強熱残分(硫酸塩): 0.10%以下、重金属(Pbとして): 0.0005%以下、鉄(Fe): 0.0005%以下

品名	容量	価格(¥)	コード	メーカーコード
HEPES 分子生物学用				
	100 g	9,600	344-08231	GB70
	500 g	34,400	346-08235	GB70
MOPS 分子生物学用				
	100 g	9,600	341-08241	GB71
	500 g	34,800	343-08245	GB71
PIPES 分子生物学用				
	100 g	9,400	348-08251	GB72
	500 g	34,000	340-08255	GB72

関連商品: 分子生物学用 buffer

0.5M EDTA	1 L	10,000	347-07481	MB01
10 × MESA	1 L	12,000	344-07491	MB02
10 × TBE	1 L	10,000	344-07511	MB04
10 × TE	500 ml	8,200	344-07555	MB08
20 × SSC	500 ml	8,800	340-07535	MB06
20 × SSPE	500 ml	8,800	347-07545	MB07
1M Tris-HCl	500 ml	8,200	348-07575	MB10

関連商品

Good's Buffer (一般規格品)

品名	容量	価格(¥)	コード	メーカーコード
ACES				
	25 g	8,000	347-04882	GB01
	100 g	24,600	349-04881	
ADA				
	25 g	3,400	346-04732	GB02
	100 g	8,200	348-04731	
BES				
	25 g	2,800	341-00262	GB03
	100 g	8,000	347-00264	
	500 g	31,600	345-00265	
Bicine				
	25 g	2,800	347-03282	GB04
	100 g	7,000	343-03284	
Bis-Tris				
	25 g	4,800	343-04742	GB05
	100 g	14,000	345-04741	
CAPS				
	25 g	4,000	347-00482	GB06
	100 g	10,800	343-00484	
CHES				
	25 g	3,800	342-04692	GB07
EPPS				
	25 g	5,800	348-03192	GB09
HEPES				
	25 g	2,400	348-01372	GB10
	100 g	6,400	346-01373	
	250 g	14,000	340-01371	
	500 g	23,000	342-01375	
	1 kg	44,200	340-01376	
HEPPSO				
	25 g	6,200	340-04132	GB11
MES				
	25 g	2,600	341-01622	GB12
	100 g	6,400	349-01623	
	250 g	14,000	343-01621	
	500 g	26,000	345-01625	
	1 kg	47,000	343-01626	
MOPS				
	25 g	2,800	349-01802	GB13
	100 g	6,400	345-01804	
	250 g	15,600	341-01801	
	500 g	24,000	343-01805	
	1 kg	43,000	341-01806	
MOPSO				
	25 g	3,800	341-04162	GB14
PIPES				
	25 g	3,200	341-02222	GB15
	100 g	7,800	347-02224	
	500 g	28,400	345-02225	
PIPES sesquisodium				
	25 g	3,800	340-08032	GB25
POPSO				
	25 g	5,200	344-04152	GB16
TAPS				
	25 g	3,200	344-02572	GB17
	100 g	9,400	340-02574	
TAPSO				
	25 g	4,800	348-04172	GB20
TES				
	25 g	5,200	346-02652	GB18
	100 g	12,800	344-02653	
	500 g	53,400	340-02655	
Tricine				
	25 g	2,800	341-02842	GB19
	100 g	7,800	347-02844	
HEPES buffer solution				
	100 ml	11,000	345-06681	GB60
MOPS buffer solution				
	100 ml	11,000	342-06691	GB61

上記以外の包装容量も承ります。小社マーケティング部までお問い合わせください。

新製品

開発元 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

IgG 精製キット

IgG Purification Kit – A
IgG Purification Kit – G

本製品は『試作販売品』として2006年3月に発売を開始いたしました。その間、ユーザーの皆様のご意見・ご要望を取り入れ、『製品』として作り上げました。

今後もこのような『試作販売品』という形で皆様のご意見を取り入れた製品作りを目指していきたいと考えております。

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、表1を参考にご選択ください。

表.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回の繰り返し使用が可能

< キット内容 >

- Protein A Cartridge tube(またはProtein G Cartridge tube) × 1
- Washing Buffer 10 ml × 1
- Elution Buffer 1.6 ml × 1
- Catching Buffer 1 ml × 1
- 1.5 ml Microtube 5 tubes × 2

< 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™ 750 Labeling Kit – NH₂

HiLyte Fluor™ 750 Labeling Kit – NH₂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(図1)。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。現在小社で販売しております488 nm 励起の Fluorescein、より長波長の550 nm、650 nm 付近で励起可能な HiLyte Fluor™ 色素と比較して、更に長波長の近赤外光で励起されるため、免疫染色などのアッセイにおいて低バックグラウンドでの観察が可能となります。

標識タンパク質量は1サンプルあたり50-200 µgです。わずか2時間で HiLyte Fluor™ 750 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染色などの様々な用途に利用することができます。

HiLyte Fluor™ 色素はAnaSpec社が開発した蛍光色素であり、HiLyte Fluor™ 750 標識抗体は λ_{ex} = 760 nm、λ_{em} = 780 nm という蛍光特性を示します(図2)。

<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を得られる。
- ・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>

NH ₂ -Reactive HiLyte Fluor™ 750	X 1
WS Buffer	1.5 ml X 1
Reaction Buffer	200 µl X 1
Filtration Tube	X 1

<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

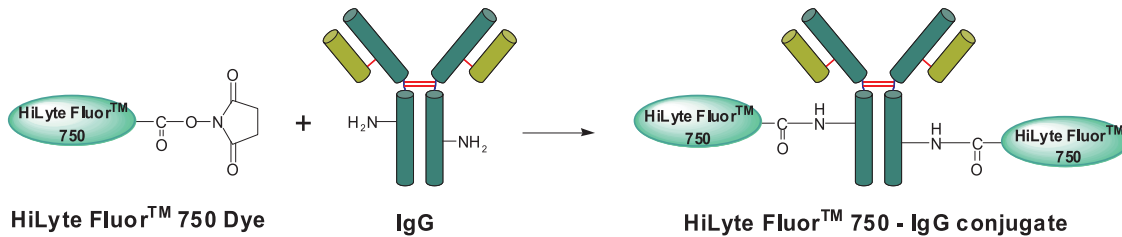


図1. HiLyte Fluor™750 標識 IgG の調製法

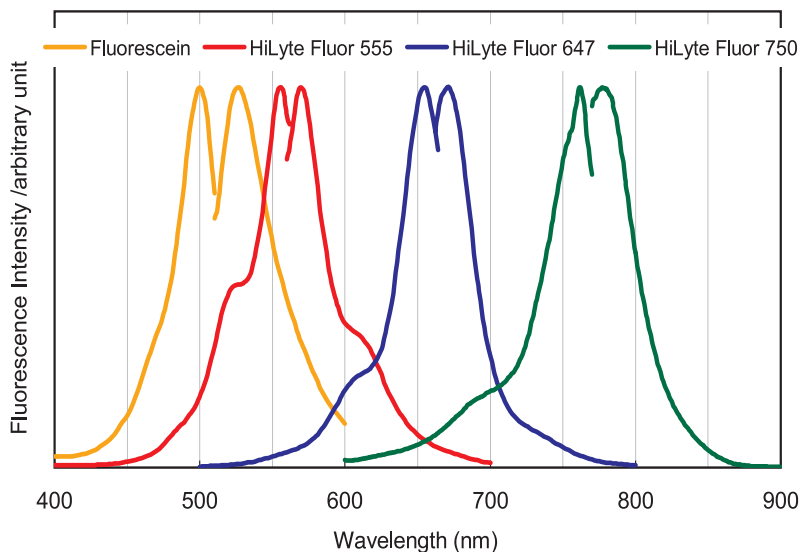


図2. Fluorescein 及び各 HiLyte Fluor™ 色素の励起・蛍光スペクトル

試作販売品

タンパク質標識用キット (1 mg タンパク質標識用)

Biotin Labeling Kit - NH₂ (for 1 mg)

本製品は、アミノ基を有するタンパク質、特に抗体ヘビオチンを標識するためのキットです。従来の0.1 mg タンパク質標識用キットと同様に、NH₂-Reactive Biotin と標的分子を混合するだけで簡単にビオチン標識体を得ることができます。

NH₂-Reactive Biotin は、その分子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安定な共有結合を形成します。標識反応を阻害するような低分子化合物 (トリスやグリシンなど) や未反応のNH₂-Reactive Biotin は付属の Filtration Tube を用いて容易に除去することができます。本キットには、DMSOを除く標識に必要なすべての試薬と作製したビオチン標識体を保存するための溶液が含まれています。

<特長>

- ・ 1 mg のタンパク質を標識可能である。
- ・ 3 時間以内にビオチン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を得られる。

<キット内容>

- | | | |
|-------------------------------------|--------|-----|
| ・ NH ₂ - Reactive Biotin | | X 1 |
| ・ WS Buffer | 13 ml | X 1 |
| ・ Reaction Buffer | 1.2 ml | X 1 |
| ・ Filtration Tube *1 | | X 1 |
| ・ 15 ml Tube (for counterbalance) | | X 1 |

*1 Filtration Tube を使用する際は、15 ml 容量の遠沈管に対応する遠心機が必要です。Filtration Tube の外径と遠心機ローターが一致しない機種がありますので、事前に Filtration Tube および遠心機ローターのサイズをご確認ください (Filtration Tube: 外径 17.3 mm、全長 124 mm)。また、7,000 xg での遠心を推奨しますが、1,500 xg の場合でも遠心時間を 20-30 分間延長することで対応可能です。

*他にも下記の大容量タイプを試作販売品としてご用意いたしております。

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Biotin Labeling Kit -NH ₂ (for 1 mg)	1 sample	25,000	LK55
Alkaline Phosphatase Labeling Kit -NH ₂ (for 1 mg)	1 sample	36,000	LK59
Alkaline Phosphatase Labeling Kit -SH (for 1 mg)	1 sample	36,000	LK61
Peroxidase Labeling Kit -SH (for 1 mg)	1 sample	30,000	LK53

関連製品

開発元 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

今回ご紹介しております試作販売品、試作品以外にもタンパク質標識キットシリーズとして、下記の製品を販売いたしております。用途にあわせてご使用ください。

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Biotin Labeling Kit - NH ₂	3 samples	12,000	LK03
Biotin Labeling Kit - SH	3 samples	12,000	LK10
Peroxidase Labeling Kit - NH ₂	3 samples	17,000	LK11
Peroxidase Labeling Kit - SH	3 samples	17,000	LK09
Peroxidase Labeling Kit - NH ₂ (for 1mg)	1 sample	30,000	LK51
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH ₂	3 samples	21,000	LK12
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - SH	3 samples	21,000	LK13
Fluorescein Labeling Kit - NH ₂	1 sample	10,000	LK01
	3 samples	21,000	LK01
HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH ₂	1 sample	10,000	LK14
	3 samples	21,000	LK14
HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH ₂	1 sample	10,000	LK15
	3 samples	21,000	LK15
Allophycocyanin Labeling Kit - NH ₂	1 sample	17,000	LK21
	3 samples	43,000	LK21
B-Phycoerythrin Labeling Kit - NH ₂	3 samples	43,000	LK22
R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH ₂	1 sample	17,000	LK23
	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

遺伝子導入試薬

HilyMax(ハイリーマックス)

< 特長 >

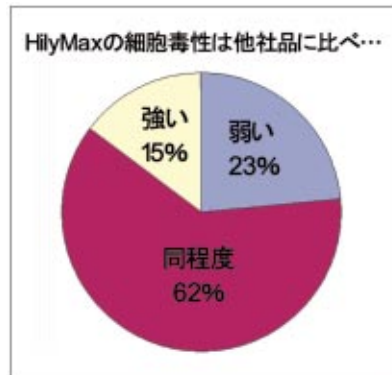
- ・多岐にわたる細胞へ DNA を高効率に導入
- ・血清を含む培地での導入が可能
- ・導入遺伝子の細胞内シグナル応答が良好
- ・コストパフォーマンスに優れた純国産導入試薬

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
HilyMax	1 ml	20,000	H357

発売開始より好評を得ております。
ご要望の多かった細胞種毎プロトコールも現在、ホームページにて17種掲載しております。是非お試しください。

<http://www.dojindo.co.jp/whatsnewsj/newpro/hilymax/hilymax.html>

これまでお試しいただいたユーザーより「より導入できる」「低価格」とのご意見をいただいております。



導入実績細胞種

—多岐にわたる細胞への導入実績—

動物細胞

細胞名	由来	細胞名	由来	細胞名	由来
COS-1	アフリカミドリザル 腎臓	HEK293	ヒト 胎児 腎臓	NB1	ヒト 神経芽細胞腫
COS-7	アフリカミドリザル 腎臓	HeLa	ヒト 子宮頸部	PA-1	ヒト テラトカルシノーマ
Vero	アフリカミドリザル 腎臓	HeLaS3	ヒト 子宮頸部	PC3	ヒト 前立腺ガン
MDCK	イヌ 腎臓	HepG2	ヒト 肝臓 胆嚢	T98G	ヒト 脳グリオブラストーマ
CHO	チャイニーズハムスター 卵巣	HFL-1	ヒト 胎児 肺	UtSMC	ヒト 子宮平滑筋
DT40	ニワトリ 血球・リンパ系	Human hepatic Stellate	ヒト 肝臓	3T3-L1	マウス 胚
CEF	ニワトリ 胚	Jurkat	ヒト 白血病性 T細胞	C2C12	マウス 骨芽
COV	ニワトリ 卵巣	K562	ヒト 血球・リンパ系	L929	マウス 繊維芽
A172	ヒト グリア芽腫	LNcap	ヒト 前立腺ガン	Neuro2a	マウス 神経系
A549	ヒト 肺上皮	MCF-7	ヒト 哺乳器	NIH3T3	マウス 胎仔
AGS	ヒト 胃上皮	Mesenchymal cell	ヒト 間葉系幹	L6	ラット 筋組織
Caco2	ヒト 腸管上皮	MG63	ヒト 骨肉腫	RBL2H3	ラット 血球・リンパ系
HC	ヒト 胎児 肝臓	MKN	ヒト 胃	VSMC	ラット 血管平滑筋

昆虫細胞

細胞名	由来
BMN	カイコ 卵巣
Sf9	ヤトウガ

販売中止のお知らせ

遺伝子導入試薬 -Dofect-GT1 を販売中止とさせていただきます。

これまでのご愛顧誠にありがとうございました。

今後は HilyMax をご使用ください。

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