

2008 No.  
**128**  
ISSN 0385-1516

## CONTENTS

### Review

オキシダーゼとデヒドロゲナーゼのフラビン学  
株式会社同仁化学研究所 三浦 洸

### 連載

エイズから見た感染症研究の最前線(最終回)  
その8 液性免疫-中和抗体  
熊本大学大学院医学薬学研究部 木村 哲也

### Topics on Chemistry

トリパンプルーを用いた皮膚真菌症の迅速診断  
大牟田天領病院 / 熊本大学大学院 池田 勇

簡単にエコな定性分析  
株式会社同仁化学研究所 上園 貴広

ドージンニュース

**DOJIN NEWS**

## 目次

### Review

- オキシダーゼとデヒドロゲナーゼのフラビン学  
 株式会社同仁化学研究所 三浦 洸 ..... 1  
 エイズから見た感染症研究の最前線（最終回）  
 その8 液性免疫 - 中和抗体  
 熊本大学大学院医学薬学研究部 木村 哲也 ..... 7

### Topics on Chemistry

- トリパンブルーを用いた皮膚真菌症の迅速診断  
 大牟田天領病院 / 熊本大学大学院 池田 勇 ..... 10  
 簡単にエコな定性分析  
 株式会社同仁化学研究所 上園 貴広 ..... 11

### Commercial

#### 新製品

- 分子生物学用 Good's Buffer ..... 12  
 微生物検出キット（比色） ..... 14

#### 試作品

- 微生物検出キット（蛍光） ..... 16  
 アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性測定キット ..... 17

### 関連製品

- 細胞染色色素 ..... 10  
 細胞増殖 / 細胞毒性測定用試薬使用文献集 ..... 13

### お知らせ

- Biopyrrin EIA Kit 容器変更 ..... 9  
 NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kits 前処理方法について ..... 9  
 学会展示のお知らせ ..... 9  
 フォーラム・イン・ドージン開催 ..... 18

## 製品案内

製品詳細は掲載ページをご覧ください。

- 分子生物学用 Good's Buffer  
 細胞染色色素  
 細胞増殖 / 細胞毒性測定用試薬



熊本県山都町(旧：矢部町)の通潤橋からの放水  
 水路橋としては日本一の規模を誇り、現在も水路として活用されています。  
 週末の正午には橋の中央から放水が行われ、壮大な水のアーチを描きます。  
 （時期により行われないことがありますのでご注意ください）

写真提供：吉田道夫氏（熊本市）

# オキシダーゼとデヒドロゲナーゼのフラビン学 Flavonology of Oxidases and Dehydrogenases



三浦 洵  
株式会社同仁化学研究所

[ SYNOPSIS ]

Flavooxidases, *i.e.*, flavin-dependent oxidases, and flavodehydrogenases, *i.e.*, flavin-dependent dehydrogenases, differ from each other in their oxidative-half reaction. The former use molecular oxygen as oxidant, while the latter utilize other types of oxidant than oxygen. The reactivity of reduced flavin to oxygen is crucially different between these types of flavoenzymes, in accordance with their individual physiological roles. The molecular strategy that each type of enzymes deploys in regulating the reactivity toward molecular oxygen in the oxidative half-reaction is discussed on the bases of chemical as well as structural aspects of flavooxidases and flavodehydrogenases.

## 1. はじめに

標題にあるフラビン学 (Flavonology) は造語で、化学や生化学、医学関連の辞書、教科書には掲載されていない言葉である。Flavonology とは、フラビンを研究対象にする化学者や生物化学者が自らの研究領域を指してよく使われる言葉で、要するに、フラビンの化学と生化学、酵素化学などをひくくめた領域を指している。Flavonology の直訳がフラビン学ということになる。(フラボ (flavo) はフラビンを表す接頭語である。紛らわしいが、植物成分のフラボン (flavone) はフラビン (flavin) とはまったく別の分子種である。) 本稿では、筆者が平成 20 年 3 月まで所属していた熊本大学大学院医学薬学部分子酵素化学分野において行った研究に基づいて、オキシダーゼとデヒドロゲナーゼのフラビン学を概説したい。

フラビンとは、イソアロキサジン骨格を持った化合物の総称であるが、一般にフラビン分子種といえば、リボフラビン、FMN (flavin mononucleotide)、FAD (flavin adenine dinucleotide) を指す (Fig.1)。ただし、厳密に言えば、FMN も FAD もヌクレオチドではない。フラビンのもっとも重要な生理的機能は、補酵素としてのそれであるが、フラビンの補酵素型は FMN と FAD で、リボフラビン (ビタミン B<sub>2</sub>) には補酵素作用はないと言われている。FMN または FAD を補酵素とする酵素群は、フラビン酵素

(flavoenzyme) と称され、通常は酸化還元反応を触媒するが、酸化還元反応以外の反応を触媒するフラビン酵素もごく例外的に知られている。酵素タンパク質に結合して酵素固有の触媒作用を担う補酵素は、基質型と触媒型に大別されるが、FMN, FAD は後者に属する。(前者の代表的なものはピリジヌクレオチド補酵素 (NAD(P)<sup>+</sup>, NAD(P)H) である。) 触媒型補酵素には、フラビンの他にピリドキサルリン酸、チアミンピロリン酸、葉酸、ピオチン、コバラミンなど、多くのビタミン (誘導体) が知られているが、フラビン補酵素は、その触媒する反応の種類、基質の種類の内においても、その多様性は触媒型補酵素の中で群を抜いている。その理由は、フラビン分子の構造とそれに基づく反応性にあることは言うまでもない。Fig. 2 に示すように、フラビンには三つの酸化還元状態 (酸化型、セミキノン型 (1 電子還元型)、還元型 (2 電子還元型)) と三つのイオン化状態 (陽イオン型、中性型、陰イオン型) があり、pKa 値から判断して少なくとも 6 種類の状態が生理的には可能である。これらの状態はそれぞれ固有の化学的特性を示すが、それが酵素タンパク質に結合することで、その酵素に特有の触媒機能が発揮される。フラビンには、酸化型・セミキノン型・還元型の三つの酸化還元状態が可能であることから、フラビン補酵素は、1 電子過程と 2 電子過程のいずれにも関与することができる。したがって、1 電子過程と 2 電子過程が混在する反応には、必ずと

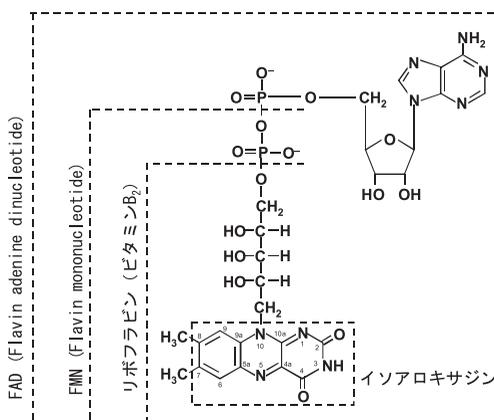


Fig. 1 フラビン分子種の構造

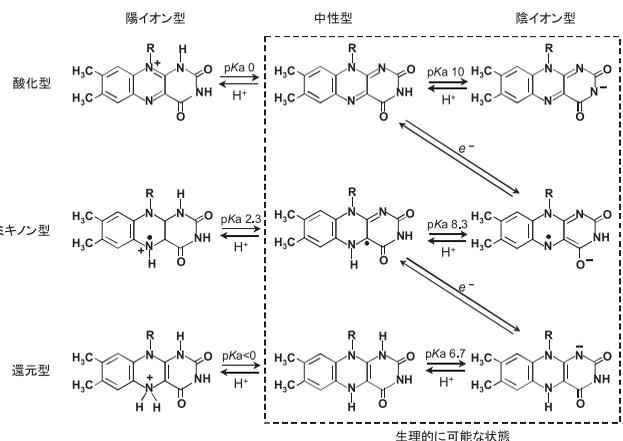


Fig. 2 フラビンの酸化還元状態とそれぞれのイオン化状態

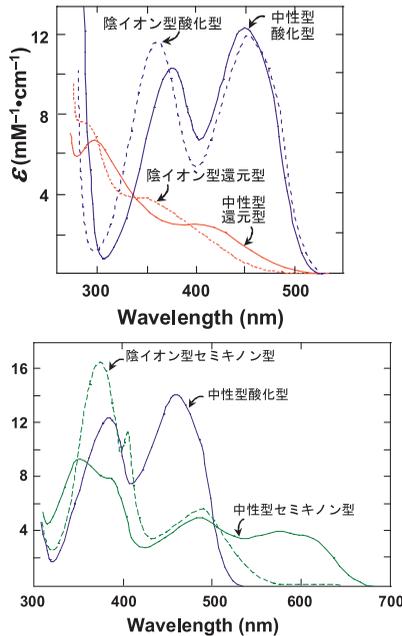


Fig. 3 フラビンの紫外可視吸収スペクトル<sup>1)</sup>

言ってよいほどフラビン酵素が関与する。たとえば、フラビン酵素のNADPHシトクロムP450レダクターゼは、NADPHから2電子を受け取り、シトクロムP450のヘム鉄に1電子を2回供給する。さらに、フラビンは高い光感受性を示し、それを利用した光増感作用を示すフラビン酵素も知られている。たとえば、損傷DNAを光増感的に修復するDNAホトリアーゼはフラビン酵素である。また基質との反応によって励起されたフラビンが発光するのが、発光細菌の細菌ルシフェラーゼで、FMNを補酵素とするフラビン酵素である。

上述の6種類の酸化還元/イオン化状態の紫外可視吸収スペクトルはFig. 3に示すように、それぞれ際立った特徴をもっている。中性型酸化型フラビンは鮮やかな黄色を呈している( flavusはラテン語の黄色である )しかし、フラビンには、生理的に可能なこれらの6つの状態以外に、電荷移動状態という特異な電子状態があって、しばしば酵素反応に重要な役割を果たしている。電荷移動状態( charge-transfer state )とは、電子1個に相当する電荷量の一部が、電荷供与体から電荷受容体へ移動して、供与体と受容体の間に相互作用が生じて複合体が形成される状態である。この複合体は電荷移動複合体( charge-transfer complex )と呼ばれる。フラビンは、電荷供与体、電荷受容体のいずれにもなり得るので、フラビンとしての電荷移動状態は、電子1個に相当する電荷量の一部を受け取った状態または、除かれた状態である。電荷移動状態にあるフラビンの吸収スペクトルは、Fig. 3とは全く異なる特徴を示す。このような様々な状態のスペクトルの特徴を利用して、フラビンの結合状態や、酵素反応を定常状態的、迅速反応的にモニターすることが可能である。また、酸化型フラビンは強い蛍光を示すことから、発光スペクトルを利用して、反応や結合状態をモニターすることも可能である。さらに、フラビンの吸収スペクトルがタンパク質のそれとはまったく重ならないことを利用して、共鳴ラマン分光の特異なプローブとしても有用である。

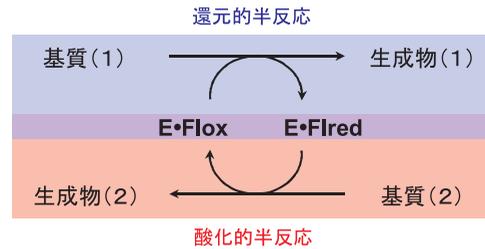


Fig. 4 フラビン酵素の触媒サイクル

Flox, E・Flox はそれぞれ、酸化型フラビン、酸化型酵素。  
 Fired, E・Fired はそれぞれ、還元型フラビン、還元型酵素。  
 基質(2) = O<sub>2</sub>:フラボオキシダーゼ  
 基質(2) O<sub>2</sub>:フラボデヒドロゲナーゼ

以上のように、フラビン酵素を全体としてながめると、多岐多様な基質を、多岐多様な反応に供することができるが、その基本は酸化還元反応である。酸化還元に関わるフラビン酵素の触媒サイクルは、Fig. 4に示した形式によって一般化される。基質(1)は、酵素(E)に結合した酸化型フラビン(Flox)によって酸化され生成物(1)となるが、この時、フラビンは還元型(Fired, この還元型フラビンは通常アニオン型である(Fig. 2))となる。この過程は、還元的半反応と呼ばれる。一方、還元型フラビン(Fired)は別の基質(2)によって酸化されて酸化型(Flox)にもどり、生成物(2)ができる。この過程は、酸化的半反応と呼ばれ、この過程によって酵素は最初の状態に戻り、新たな触媒サイクルに備えることができる。生体内の種々の代謝過程に関与するフラビン酵素でもっとも一般的なものが、オキシダーゼとデヒドロゲナーゼである。Fig. 4の酸化的半反応の基質(2)が酸素の場合、酵素はオキシダーゼ(フラボオキシダーゼ、すなわち、フラビンを補酵素とするオキシダーゼ)であり、それ以外の場合、通常デヒドロゲナーゼ(フラボデヒドロゲナーゼ、すなわち、フラビンを補酵素とするデヒドロゲナーゼ)と呼ばれる。

ヒトを含む酸素呼吸をする動物は、燃料となる分子(たとえばグルコース)を酸素で酸化(燃焼)して、その過程で得られる自由エネルギーを利用してエネルギー通過ATPを合成している。しかし、燃料物質は決して酸素によって直接酸化されることはなく、酸素が関与するのは、ミトコンドリア電子伝達系(呼吸鎖)の末端に位置するシトクロム酸化酵素が酸素を水に還元するところであり、この呼吸鎖によって大量のATPが合成される。したがって、燃料物質が直接酸素と反応すると、ATP産生が回避され、燃料物質としての役割、すなわちATP産生という目的、が果たされなくなる。燃料物質が、エネルギー産生目的のために酸化される場合は、少しずつデヒドロゲナーゼで酸化(脱水素)されながら、その都度生じた電子が電子伝達系に供給され、ATP合成に利用される。一方、酸素を直接の酸化剤として基質を酸化する酵素反応は、ATP産生以外の目的のための酸化反応である。たとえば、特定の化合物の生合成や分解、活性酸素の生成などがこれらの目的に相当する。(ちなみに、ヒトを含む好気性動物の体内で消費される酸素の90%以上は、電子伝達系によるATP産生に使われ、それ以外の目的に使われる酸素は10%以下である。)したがって、フラビン酵素の酸化的半反応(Fig. 4)において、酸素との反応を促進するか(フラボオキシダーゼ)、抑制するか(フラボデヒドロゲナーゼ)は、酵素そのものの生理的役割と密接に関連している。以下

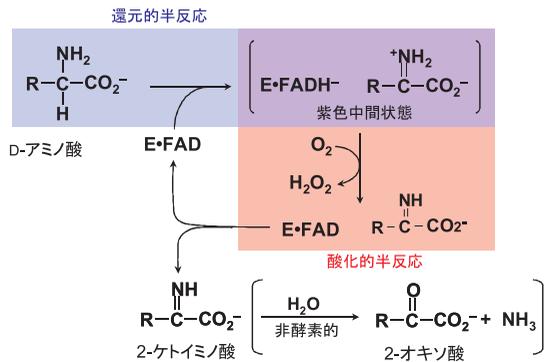


Fig. 5 D-アミノ酸オキシダーゼ (DAO) の反応

に、酸素との反応の制御に関して、フラビン酵素がどのような分子の戦略を駆使しているかを、筆者らが得た知見を中心に解説する。

## 2 .D-アミノ酸オキシダーゼとアシルCoAデヒドロゲナーゼ：化学的側面

D-アミノ酸オキシダーゼ (D-amino acid oxidase, DAOと略) は、D-アミノ酸を酸化的脱アミノ化する (Fig. 5) 典型的なフラボオキシダーゼである。この反応で酸素が関与する過程は、還元型酵素 (E·FADH<sup>-</sup>) と生成物の2-ケトイミノ酸との複合体 (紫色中間状態と呼ばれる) のアニオン型還元型フラビン (FADH<sup>-</sup>: FADのフラビン部分がアニオン型還元型になっている) が酸素によって酸化されて、酸化型フラビンに戻る過程である。この過程が、DAOにおける酸化の半反応である。

筆者らは、種々の還元型フラビン酵素と酸素の反応速度がアニオン型還元型フラビンの4a-炭素 (C(4a)、フラビンの原子の番号付けは、Fig. 1を参照) の電子密度と相関することを明らかにした。この背景を理解するには、アニオン型還元型フラビンと酸素の反応 (Fig. 6) とアニオン型還元型フラビンの共鳴混成 (Fig. 7) の考察が必要である。すなわち、一般に還元型フラボオキシダーゼ、還元型フラボデヒドロゲナーゼの還元型フラビンはアニオン型 (Fig. 2) であり、アニオン型還元型フラビンが酸素によって酸化される反応は、フラビンのC(4a)から酸素への求核攻撃によって開始される (Fig. 6)。さらに、アニオン型還元型フラビンは、Fig. 7に示す共鳴混成として存在し、負電荷はいくつかの位置に非局在化する。

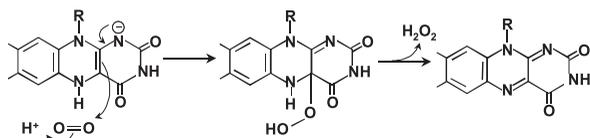


Fig. 6 酸素によるアニオン型還元型フラビンの酸化反応

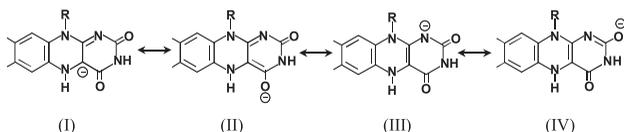


Fig. 7 アニオン型還元型フラビンの共鳴混成

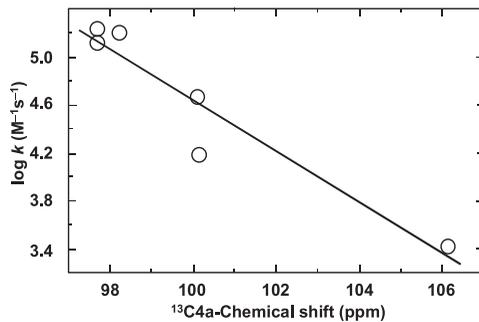


Fig. 8 アニオン型還元型フラビンの4a-<sup>13</sup>C-化学シフトと酸素との反応の速度定数との関係<sup>2,3)</sup>

筆者らが明らかにしたのは、アニオン型還元型フラビンのC(4a)の<sup>13</sup>C-NMR信号が高磁場にあるほど、酸素との反応速度定数が大きいという相関である (Fig. 8)<sup>2,3)</sup>。<sup>13</sup>C-NMR信号は、その炭素原子の電子密度に敏感であり、電子密度が高いほどその信号位置は高磁場 (低い化学シフト値) に検出される。したがって、Fig. 8が意味するのは、C(4a)の電子密度が高いほど、酸素との反応性が高いということである。この結果は、アニオン型還元型フラビンと酸素の反応がC(4a)から酸素への求核攻撃によって開始される (Fig. 6) ことと緊密に対応している。

それでは、フラボオキシダーゼや、フラボデヒドロゲナーゼでは、C(4a)の電子密度がどのように調節されているのであろうか。このことを検証するために、ブタ腎臓D-アミノ酸オキシダーゼ (DAO) の紫色中間状態の結晶構造を大阪市立大学の広津建教授 (当時) のグループとの共同研究によって完成させた<sup>4)</sup>。(われわれは、1996年にすでにブタDAOの酸化型の結晶構造解析を完成させている<sup>5)</sup>。)酸化型DAOの結晶に、嫌気的条件下に基質D-プロリンをソーキングすることで紫色中間状態の結晶を得ることができた。基質にD-プロリンを用いたのは、生成物のΔ<sup>1</sup>-ピロリジン-2-カルボン酸 (Δ<sup>1</sup>-pyrrolidine-2-carboxylate, DPCと略) が非酵素的加水分解を受けにくく、紫色中間状態が維持されやすいからである。この紫色中間状態の結晶に、嫌気状態、低温状態 (100K) でX線回折を行い、Fig.9に示す紫色中間状態の三次構造を得ることができた<sup>4)</sup>。全体は同一構造のサブユニットからなる二量体を形成しているが、ここには単量体構造が示されている。DAOの紫色中間状態は、アニオン型還元型フラビンと対イオン型生成物DPCとの間の電荷移動相互作用によって安定化されていることが以前から知られていたが、その電荷移動相互作用の軌道間相互作用様式も Fig. 9に示した。

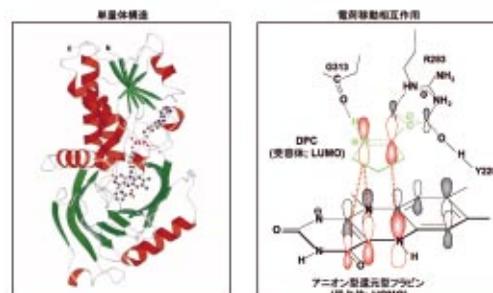


Fig. 9 ブタ DAO の紫色中間状態の三次構造 (左) と、アニオン型還元型フラビンと生成物 DPC との間の電荷移動相互作用 (右)<sup>4)</sup>

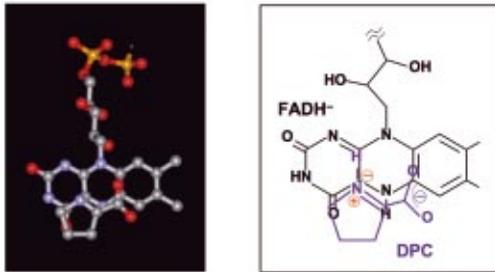


Fig.10 DAOの紫色中間状態におけるアニオン型還元型フラビンと生成物DPCとの相互配置<sup>4)</sup>

アニオン型還元型フラビンとDPCの相互配置を詳しく調べたところ、DPCの正電荷をもつ窒素原子がアニオン型還元型フラビンのC(4a)に接近していることが判明した (Fig.10)。すなわち、このDPCの正電荷の静電効果によってアニオン型還元型フラビンの負電荷がC(4a)に引き寄せられる。その結果、アニオン型還元型フラビンの共鳴混成を形成する極限構造のうちの( )の極限構造の寄与が高くなることが理解される。そのことによってDAOの紫色中間状態のC(4a)の電子密度が高められる。

このような分子戦略は、一般化されているのであろうか。そのことを検証するために、フラボデヒドロゲナーゼの紫色中間状態を調べた。アシルCoAデヒドロゲナーゼは、ミトコンドリアの脂肪酸β酸化経路の初発段階を触媒する典型的なフラボデヒドロゲナーゼで、FADを補酵素にしている。ミトコンドリアβ酸化経路は、脂肪酸をエネルギー産生に動員する代謝経路で、アシルCoAをtrans-エノイルCoAに酸化し、その時に基質から除去された電子は電子伝達系(呼吸鎖)に供給される (Fig. 11)。したがって、

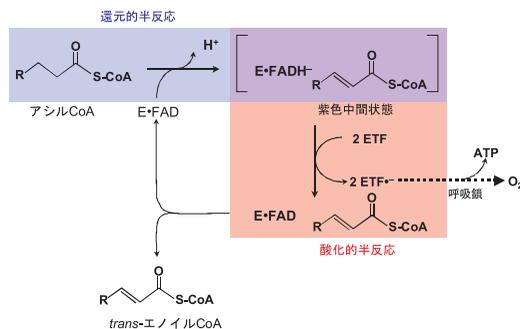


Fig. 11 アシル CoA デヒドロゲナーゼの反応  
ETF: electron-transferring flavoprotein

その酸化的半反応においては、酸素との反応は厳しく抑制されている。アシルCoAデヒドロゲナーゼは、アシル鎖の長さ・形状に対して特異性の異なる複数のメンバーから成るスーパーファミリーを構成している。その中で、特に研究の進んでいるのがアシル鎖長C6 ~ C12に優先的活性をもつ中鎖アシルCoAデヒドロゲナーゼ (medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, MCADと略)である。Kimらによって明らかにされているブタ肝臓のMCADの紫色中間状態(生成物trans-エノイルCoAとアニオン型還元型フラビンとの電荷移動状態)の結晶構造解析<sup>6)</sup>に基づいて、生成物とフラビンの相互配置をFig. 12に示す。生成物のtrans-エノイルCoAのアシル部分は疎水性が高く、そこには電荷はなく、したがって、DAOの紫色中間状態に見られたような静電

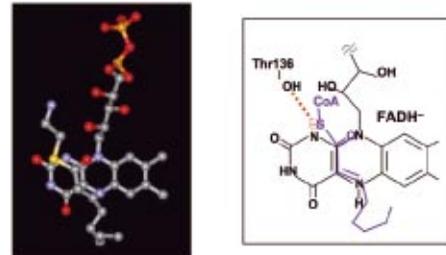


Fig.12 ブタMCADの紫色中間状態におけるアニオン型還元型フラビンと生成物trans-エノイルCoAとの相互配置<sup>6)</sup>。(左の図は、Kimらの論文<sup>6)</sup>に基づいてProtein Data Bank (PDB)に登録された原子座標を用いて再現したものである。)

効果は存在しない。一方、フラビンの1-窒素(N(1))とThr136の側鎖ヒドロキシル基との間には強い水素結合が観察されている。この強い水素結合によって、アニオン型還元型フラビンの負電荷は、N(1)に優先的に局在することとなる。したがって、アニオン型還元型フラビンの共鳴混成 (Fig. 7)において、極限構造( )の寄与が大きくなりC(4a)の電子密度は、DAOに比べて低くなる。その結果、MCADの紫色中間状態のアニオン型還元型フラビンと酸素の反応は抑制される。すなわち、フラボオキシダーゼでは、C(4a)に負電荷が局在する極限構造( )の寄与が高くなり、フラボデヒドロゲナーゼでは、C(4a)からできるだけ負電荷が遠い位置に局在する極限構造( )の寄与が高くなるという、化学的には合理的な解釈が成り立つ。いいかえれば、フラボオキシダーゼとフラボデヒドロゲナーゼを選別するメカニズムとして、酸化的半反応において、アニオン型還元型フラビンの共鳴混成を構成する極限構造の寄与の分布を変動させるという精緻かつ巧妙な分子戦略が明らかになった。

このことを、さらに確かにする実験結果がラマンスペクトルの解析からもたらされた。種々のフラボオキシダーゼとフラボデヒドロゲナーゼの紫色中間状態の共鳴ラマンスペクトルを測定して、C(4a)-C(10a)結合の伸縮振動に由来するラマン線を比較したのがFig.13である<sup>7)</sup>。フラボオキシダーゼのラマン線が1602 ~ 1609 cm<sup>-1</sup>の範囲に観測されるのに対して、フラボデヒドロゲナーゼでは、1612 ~ 1620 cm<sup>-1</sup>の範囲に観測された。すなわち、Fig.7の共鳴混成において、フラボオキシダーゼで寄与が大きいとされる( )のC(4a)-C(10a)結合次数は、フラボデヒドロゲナーゼで優先される( ), ( )のC(4a)-C(10a)結合次数よりも低く、その伸縮振動ラマン線は、前者で低波数側、後者で高波数側に観測されることが予想される。Fig.13の実験結果は、このことをよく支持している。

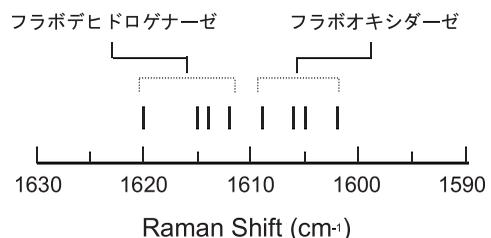


Fig.13 紫色中間状態におけるC(4a)-C(10a)伸縮振動のラマン線 (Nishina et al. の論文<sup>7)</sup>のTable IIIを図にした)

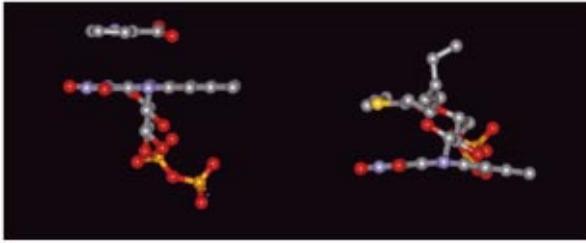


Fig.14 DAO<sup>4</sup>(左)およびMCAD<sup>6</sup>(右)の紫色中間状態における生成物とフラビンの相互配置

DAOとMCADの紫色中間状態の比較で、別の興味深いことが明らかになった。これらの中間状態における生成物とフラビンの相互配置を Fig. 10, 12 の紙面方向から眺めたのが Fig. 14 である。図から明らかなように、DAOにおけるフラビン環は平面であるのに対して、MCADのそれは、N(5),N(10)のところで折れ曲がっている。Fig. 2の構造に示されるように、還元型フラビンのN(5)およびN(10)は  $sp^3$  混成軌道を作っているために、通常は平面とはならず、キシレン部分とピリミジン部分の共鳴系は互いに分断される。事実、MCADの還元型フラビン環は、N(5), N(10)のところで平面性が崩れ二つの共鳴系は分断されている。ところが、DAOの紫色中間状態では、還元型フラビン環は平面性を保っていて、二つの共鳴系はN(5), N(10)の孤立電子対を仲介して互いに連続している。このために、DAOの紫色中間状態において、生成物 D P C の静電効果によって、キシレン部分の  $\pi$  電子までも動員が可能となつて、C(4a)の電子密度上昇を増強することができる。われわれは、この場合にキシレン部分(未発表)の電子密度が低下していることを実験的に確認することができた(未発表)。

### 3. アシルCoAデヒドロゲナーゼとアシルCoAオキシダーゼ：構造的側面

前節では、フラボオキシダーゼとフラボデヒドロゲナーゼの選別のための分子戦略の化学的側面を明らかにしたが、本節では、構造的側面から同じ問題を考察する。

脂肪酸の  $\beta$  酸化には、二つの経路が知られていて、一方はミトコンドリアに局在する  $\beta$  酸化経路で、もう一方はペルオキシソームに局在する  $\beta$  酸化経路である。前節で取り上げたMCADは前者に属し、ミトコンドリア電子伝達系(呼吸鎖)につながり、したがってエネルギー産生(ATP合成)を目的とした経路である。もう一方の、ペルオキシソーム  $\beta$  酸化経路は呼吸鎖には連携せず、したがってエネルギー産生とは無関係である。どちらの経路もその初発段階はアシルCoAを *trans*-エノイルCoAに酸化する過程で、ミトコンドリア  $\beta$  酸化系ではアシルCoAデヒドロゲナーゼ、ペルオキシソーム  $\beta$  酸化系ではアシルCoAオキシダーゼによって触媒される。どちらの酵素もFADを補酵素とするフラビン酵素であり、興味深いことに、両酵素群(それぞれが複数のメンバーから構成されている)は、全体として同じスーパーファミリーを形成している。名称が示すように、アシルCoAデヒドロゲナーゼは酸素を酸化剤としないのに対し、アシルCoAオキシダーゼは酸素を酸化剤とする。すなわち、酸化的半反応において、アシルCoAオ

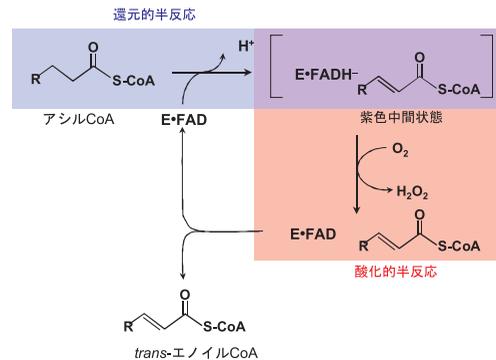


Fig.15 アシル CoA オキシダーゼの反応

キシダーゼの還元型フラビンは、酸素によって直接酸化され酸化型に戻る (Fig. 15)。Fig. 11, 15 に示すように、両酵素の還元半反応は同じであるのに対し、酸化的半反応では酸素に対する反応性が全く異なっている。しかも両酵素は、同じスーパーファミリーに属している。したがって、酸素に対する反応性制御の比較をするには、この二つは極めて適切な組み合わせである。

筆者らは、以上の視点から、アシルCoAオキシダーゼの結晶構造解析を大阪市立大学の広津建教授(当時)との共同研究によって行った<sup>9)</sup>。結果を Fig. 16 に示す。図には、比較のために中鎖アシルCoAデヒドロゲナーゼ(MCAD)の二量体構造<sup>6)</sup>も示している。ラット肝臓には基質特異性の異なる二つのアシルCoAオキシダーゼ(ACO<sup>-</sup>, ACO<sup>-</sup>)が存在しているが、筆者らが構造を解いたのは、そのうちのACO<sup>-</sup>である。ACO<sup>-</sup>の全体構造は二量体であるのに対し、MCADは四量体構造をとるが、図には、ACO<sup>-</sup>との比較のために、二量体部分を示した。MCADの四量体は、図の上部を二量体間の接触領域として、head-to-head型の四量体を形成する。このMCADの二量体間の接触領域に相当する領域は、ACO<sup>-</sup>ではヘリックスの集団が覆っており、MCADのような四量体形成を不可能にしている。この図から明らかなように、MCADとACO<sup>-</sup>は類似の三次構造を示しているが、二量体、四量体の違い以外に、それぞれが独自の特徴を持っている。とく

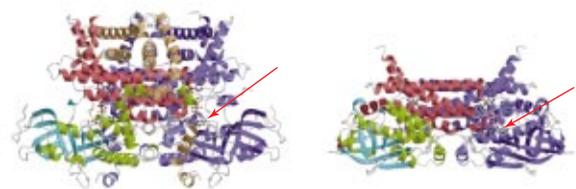


Fig.16 (左)ラットアシルCoAオキシダーゼ<sup>-</sup>(ACO<sup>-</sup>)の三次構造<sup>9)</sup>。(右)ブタ中鎖アシルCoAデヒドロゲナーゼ(MCAD)の二量体構造<sup>6)</sup>。補酵素FADはball-and-stick形式で示されている。矢印は活性部位を示す。

に、ACO<sup>-</sup>では、補酵素FADを含む活性域ポケットが広いのに比べ、MCADでは、密に詰まった状態になっている。実際フラビン環の溶媒への露出度を比較すると (Fig. 17, 32Å<sup>2</sup>と12Å<sup>2</sup>)、ACO<sup>-</sup>の露出表面積はMCADの3倍近くあることが分かった。とくに、酸素との反応に重要な位置C(4a)はACO<sup>-</sup>では、十分

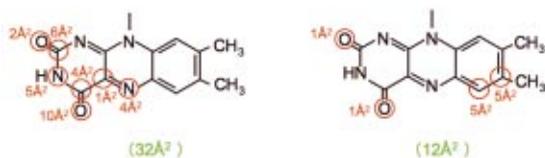


Fig. 17 フラビン環の溶媒への露出表面積の比較。

- (左) ラットアシル CoA オキシダーゼ - (ACO-) <sup>8)</sup>  
 (右) ブタ中鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ (MCAD) <sup>6)</sup>

に溶媒に露出しているのに対し、MCADではタンパク質にしっかりと埋もれていて、溶媒に溶けた酸素は容易には近づくことができない構造になっている。このことは、タンパク質の外部から活性域への入り口に向かって眺めたFig.18によって、より視覚的に確認することができる。すなわち、ACO- の活性域への入り口は広く開いていて、フラビン環のC(4a)は溶媒に十分に露出している。したがって、酸化的半反応において、溶媒に溶けた酸素は容易にC(4a)に近づくことができ、酸素によるアニオン型還元型フラビンの酸化反応は容易に進行し得る。一方、MCADは、サブユニットが密に会合した四量体を形成し、しかも、フラビン環のC(4a)はタンパク質部分に埋まり込み、溶媒に溶けた酸素の接近を妨げている。

以上のように、ACO- とMCADの三次構造の比較から、前者(フラボオキシダーゼ)では酸素のフラビン環、とくにC(4a)への接近が保証されているのに対し、後者(フラボデヒドロゲナーゼ)ではタンパク質によってフラビン環への酸素の接近が厳しく遮断されていることが分かった。

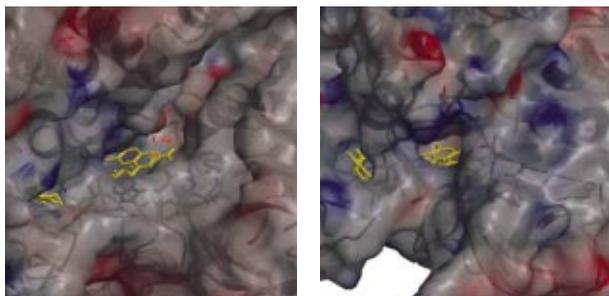


Fig.18 活性域への入り口に向かって眺めた分子表面の比較。

- (左) ラットアシル CoA オキシダーゼ - (ACO-) <sup>8)</sup>  
 フラビンのC(4a)を赤色で示す。  
 (右) ブタ中鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ (MCAD) <sup>6)</sup>

#### 4. まとめ

フラビン酵素の酸化的半反応で、酸素が直接還元型フラビンを酸化するかどうかは、その生理的役割と密接に関連している。エネルギー産生を目的とする酵素系では、酸素との反応は厳しく阻止されなければならない。これがフラボデヒドロゲナーゼである。一方、エネルギー産生以外の生理的役割をもつフラボオキシダーゼでは、酸素との反応は促進されなければならない。そこには、アニオン型還元型フラビンの共鳴混成を変動させるといふ、巧妙な仕組みが潜んでいることを知ることができた。さらに、酸素との反応を物理的に促進/遮断する、構造的戦略も知ることができた。生体が進化させたこのフラボデヒドロゲナーゼとフラボオキシダーゼを選別する分子戦略は、われわれの想像を越えた精緻で巧妙なものである。

本稿で紹介した内容は、筆者が平成20年3月まで所属していた熊本大学大学院医学薬学研究部分子酵素化学分野において行われた研究成果に基づいたものである。当時、それに参画していただいた諸氏のお名前を以下に記し、深く感謝申し上げます。瀬戸山千秋准教授、玉置治彦助教、二科安三准教授(現医学部教授)、志賀潔教授(以上熊本大学(当時))、広津研教授、宮原郁子准教授、水谷尚志博士、中嶋義隆博士、(以上大阪市立大学(当時))、

#### 参考文献

- 1) Active-site probes of flavoproteins. V.Massey, P.Hemmerich, *Biochem. Soc. Trans.*, **1980**, *8*, 246-257.
- 2) <sup>13</sup>C-NMR studies on the reaction intermediates of porcine kidney D-amino acid oxidase reconstituted with <sup>13</sup>C-enriched flavin adenine dinucleotide. R.Miura, Y.Miyake, *J. Biochem.*, **1987**, *102*, 1345-1354.
- 3) <sup>13</sup>C- and <sup>15</sup>N-NMR studies on medium-chain acyl-CoA dehydrogenase reconstituted with <sup>13</sup>C- and <sup>15</sup>N-enriched flavin adenine dinucleotide. R.Miura, Y.Nishina, K.Sato, S.Fujii, K.Kuroda, K.Shiga, *J. Biochem.* **1993**, *113*, 106-113.
- 4) Three-dimensional structure of the purple intermediate of porcine kidney D-amino acid oxidase. Optimization of the oxidative half-reaction through alignment of the product with reduced flavin. H.Mizutani, I.Miyahara, K.Hirotsu, Y.Nishina, K.Shiga, C.Setoyama, R.Miura, *J. Biochem.*, **2000**, *128*, 213-223.
- 5) Three-dimensional structure of porcine kidney D-amino acid oxidase at 3.0 resolution. H.Mizutani, I.Miyahara, K.Hirotsu, Y.Nishina, K.Shiga, C.Setoyama, R.Miura, *J. Biochem.*, **1996**, *120*, 14-17.
- 6) Crystal structures of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase from pig liver mitochondria with and without substrate. J.J.-P.Kim, M.Wang, R.Paschke, *Proc. Nat. Acad. Sci.USA*, **1993**, *90*, 7523-7527.
- 7) Resonance Raman study on reduced flavin in purple intermediates of flavoenzyme: Use of [4-carbonyl-<sup>18</sup>O] enriched flavin. Y.Nishina, K.Sato, R.Miura, K.Matsui, K.Shiga, *J. Biochem.*, **1998**, *124*, 200-208.
- 8) Three-dimensional structure of the flavoenzyme acyl-CoA oxidase-II from rat liver, the peroxisomal counterpart of mitochondrial acyl-CoA dehydrogenase. Y.Nakajima, I.Miyahara, K.Hirotsu, Y.Nishina, K.Shiga, C.Setoyama, H.Tamaoki, R.Miura, *J. Biochem.*, **2002**, *131*, 365-374.

#### 著者プロフィール

氏名：三浦 洵 (Retsu Miura)

所属：株式会社同仁化学研究所 顧問

住所：熊本県上益城郡益城町田原 2025-5

# エイズから見た 感染症研究の最前線

## その8 液性免疫 - 中和抗体

熊本大学大学院医学薬学研究所感染制御学寄附講座 木村 哲也

### 1. はじめに

ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus type-1; HIV-1) は、主にCD4陽性の単球、マクロファージおよびCD4陽性Tリンパ球に感染し、直接的あるいは間接的にこれらの細胞を傷害し、後天性免疫不全症候群 (Acquired Immunodeficiency Syndrome; AIDS) を引き起こす。

HIV-1 感染に対する免疫応答のひとつとして、多くのウイルス感染症と同様に、HIV-1 特異的な抗体が誘導される。これらの抗体の有無は、HIV-1 感染症において、診断の指標の一つとして利用されている。それらの抗体には、HIV-1 のウイルス粒子と結合し、標的細胞への感染を阻止することができる抗体 (中和抗体; neutralizing antibody) が含まれている。HIV-1 特異的な中和抗体は、ウイルス粒子の表面に存在するエンベロープタンパクに結合し、標的細胞への侵入を様々な段階で阻害することで、感染を阻止することが知られている。

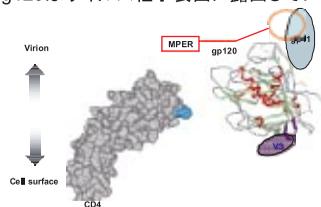
本連載の第5回、抗HIV剤開発で詳述されているように、HIV-1に対する様々な化学療法剤が実用化されており、適切な治療を受

けることで、AIDSの発症を阻止することができるようになった。しかし、世界的に見て、そのような治療を受けることができる感染者はごく一部であり、また、潜伏感染しているウイルスのため、多くのウイルス感染症と異なり、治療を行っても“治癒”はきわめて困難であると考えられている。そのため、感染の拡大を阻止することができるワクチンの、早急な開発が求められている。HIV-1に対するワクチン開発においては、HIV-1 特異的な細胞性免疫とともに、液性免疫、特に HIV-1 の感染を阻止しうる中和抗体を誘導することが重要な目標である。今回は、HIV-1 に対する中和抗体と、その標的となるウイルスエンベロープタンパクの構造解析に関する最近の知見を通して、ワクチンの開発に対する取り組みを紹介したい。

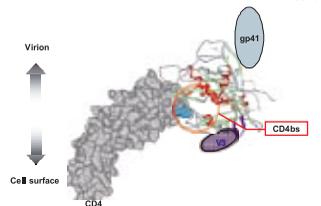
### 2. HIV-1エンベロープタンパクの構造と抗原認識部位

HIV-1 のウイルス粒子は、感染細胞に由来する脂質二重層で被膜され、その表面にエンベロープタンパクを持つ。HIV-1 に対する中和抗体は、一般にエンベロープタンパクを認識し、ウイルス粒子表面に結合することでHIV-1 の感染を阻害すると考えられている。HIV-1 のエンベロープタンパクは、160kDaの糖化タンパクであるgp160として感染細胞内で合成され、細胞由来のプロテアーゼにより、gp120およびgp41に切断される。これらのタンパクは、非共有結合により緩やかに結合し、1つのgp120と1つのgp41からなるエンベロープタンパク単量体 (monomer) を形成する。さらに、golgi体において、エンベロープタンパク単量体は、非共有結合による緩やかな結合により、3量体 (trimer) となり、細胞膜表面に輸送される。細胞表面に輸送されたエンベロープタンパク3量体は、ウイルス粒子に取り込まれ、出芽 (budding)

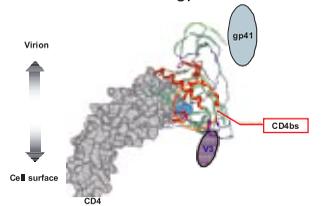
A. gp120はウイルス粒子表面に露出している



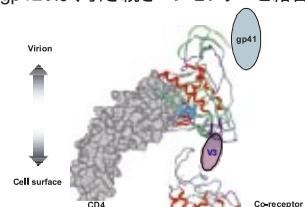
B.エンベロープタンパクは、CD4分子と結合する



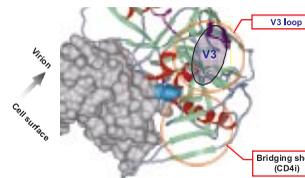
C. CD4との結合により、gp120の構造変化が生じる



D.gp120は、引き続きコレセプターと結合する



E.CD4iiは、CD4との結合により形成される



F.コレセプターとの結合により、gp41が活性化される

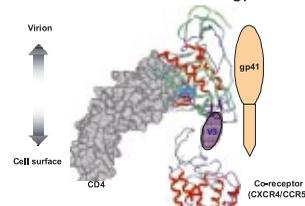


Fig. 1 HIV-1エンベロープタンパクの、感染過程における構造変化

する。

ウイルス粒子上では、gp120はウイルス表面側に位置している。gp41は膜貫通部位を持ち、エンベロープタンパクをウイルス粒子の脂質二重層上に保持している。

HIV-1の標的細胞への感染は、標的細胞表面のレセプターであるCD4、およびコレセプターであるCXCR4またはCCR5とエンベロープタンパクが結合し、標的細胞とウイルス粒子が膜融合を生じることで成立する (Fig. 1)。CD4は、ウイルス粒子上のgp120のCD4結合部位 (CD4 binding site; CD4bs) と結合し、gp120の立体構造変化を引き起こす。その結果、コレセプターとgp120との結合部位の一部を構成する、4つの $\beta$ -strandからなるbridging sheetが形成される。この部位は、CD4との結合の結果形成されるため、CD4i (CD4 induced epitope) と呼ばれる。また、gp120上には5ヶ所の比較的変異に富む部位 (Variable loop 1 ~ 5; V1 ~ V5) が存在するが、その中のV3 loopは、bridging sheetと同様に、コレセプターとの結合に重要な役割を果たしている。コレセプターとの結合により、エンベロープタンパクにはさらなる立体構造変化が生じ、gp41のN端部分に存在するfusion peptideが活性化され、標的細胞との膜融合が生じる。

従来、ウイルスエンベロープの立体構造は、精製された単量体のgp120単独、あるいはgp120とCD4分子、およびCD4iに対する抗体を結合させた状態でのX線結晶解析により同定されてきた。しかし、ウイルスエンベロープタンパクの単量体は、熱力学的な解析により、ウイルス粒子表面の3量体とは異なる立体構造を持つことが示唆されている。中和抗体は、ウイルス粒子上のエンベロープタンパク3量体をその標的としており、その立体構造の解析は、中和抗体の結合様式の理解、そしてそのような中和抗体を誘導するワクチンを開発する上で、きわめて重要であると考えられる。近年、cryo-EMとelectron-tomography法を用い、ウイルス粒子表面に存在するエンベロープの立体構造を可視化することに、複数のグループが成功している。これらにより、3量体構造の概要、CD4との結合によるエンベロープタンパクの立体構造変化の様式、中和抗体とエンベロープタンパクとの結合様式などに重要な知見が得られている。しかし、技術的な問題により、X線結晶解析に比べると低解像度であり、また、解析に用いた材料、手法の違いが影響していると考えられるが、各グループで得られたエンベロープタンパク3量体の構造は、それぞれ異なる特徴を持ち、類似性に乏しい部分が存在する。そのため、エンベロープタンパク3量体の構造を明らかにするためには、より精密な解析が必要とされている。

### 3. HIV-1 に対する中和抗体

HIV-1感染者においても、他のウイルス感染症同様、HIV-1特異的な中和抗体が産生される。しかし、HIV-1は、ウイルス自身の逆転写酵素の特性上、高率に突然変異が生じること、また、ウイルス間での遺伝子組み換えが生じることなどのために、中和抗体に耐性を持つウイルスが、比較的速やかに選択される。そのため、多くの感染者で誘導される中和抗体は、抗体が検出された時点より数か月前に存在したHIV-1に対しては中和活性を示すものの、抗体が検出された時点のウイルスは中和できないものである。その結果、多くの感染者では、特異的な中和抗体が産生されているにもかかわらず、ウイルスの増殖を抑制し、排除することがで

Table1 広範なウイルスに対する中和抗体

エピトープ	抗体
CD4 binding site (CD4bs)	IgG1 b12
V3 loop	447-52D
CD4 induced epitope (CD4i)	17b
Carbohydrate	2G12
Membrane proximal external region (MPER)	2F5, 4E10

きない。

いままでに、感染者の骨髄細胞などを元に作成されたファージディスプレイライブラリーや、末梢血B細胞由来のハイブリドーマ細胞を用い、様々な中和抗体が精製されている。それらの多くは、上記の通り、ある特定のHIV-1は中和できるものの、異なるアミノ酸配列を持つHIV-1は中和できない、型特異的なものであった。その一方、少数ではあるが、HIV-1感染者より、広範なHIV-1を中和できる抗体が分離されている (Table1)。そのような中和抗体の抗原認識部位 (epitope) は、CD4bs、V3 loop、CD4iに加え、gp120表面の糖鎖、およびgp41の膜貫通部位近傍 (membrane proximal external region; MPER) の5ヶ所に存在する。

### 4. HIV-1 に対するワクチン開発の現状と問題点

現在有効性の確認されているウイルス感染症に対するワクチンは、主にウイルスに対する中和抗体を誘導することでウイルスの感染を阻止すると考えられている。表1にあげられたような、広範なHIV-1を中和できる抗体を受動免疫することで、ウイルスの新規感染を、個体レベルで阻止しうることが明らかとなり、これらと類似した活性を持つ抗体を誘導することで、HIV-1の感染を阻止しうることが示唆された。そのため、当初は中和抗体を誘導することを主眼においた開発が行われた。しかし、現在のところ、十分な活性を持つ中和抗体を誘導する方法は発見されていない。世界で最初のHIV-1に対するワクチンであるAIDSVAXは、1999年より第3相臨床試験が開始された。これは、精製したgp120を抗原として使用し、主にエンベロープタンパクを認識する中和抗体を誘導することを目的とするものであったが、2003年に、ワクチンとしての有効性がみられないことが明らかとなった。その要因のひとつとして、表1にあげられたような、広範なウイルスを中和できる抗体の特殊性があげられる。CD4bsを認識するb12のエピトープは、エンベロープタンパクの立体構造に依存した、gp120上の非連続的な領域から構成されている。そのため、ペプチドあるいは単量体のエンベロープタンパクを用いた免疫では、誘導することができない。17bは、CD4iを認識するが、このエピトープは、gp120とCD4が結合した結果生じる立体構造変化により形成され、ウイルス粒子と標的細胞膜がきわめて近接した状態でしか存在しない。そのため、Fc部分を含む完全長の抗体は、物理的障害のためにエピトープにアクセスすることができないことが知られている。また、2G12は糖鎖を認識する極めてまれな抗体であるが、そのような抗体を誘導する方法は確立されていない。

い。MPER を認識する 2F5、4E10 のエピトープは、gp41 上の連続した領域に存在するが、エピトープと同一の配列を持つペプチドの免疫では、類似した活性を持つ中和抗体は誘導されなかった。これらの抗体は、カルジオリピンなどの自己抗原と交差反応を示すことが知られており、ヒトにおいては誘導が困難である可能性が指摘されている。これらの抗体と異なり、V3 loop の持つ高い抗原性のために、特定の V3 loop をエピトープとする中和抗体は、比較的容易に誘導することができる。しかし、そのようにして得られた抗体は、一般に、免疫に用いた V3 loop と異なるアミノ酸配列を持つ V3 loop に対しては中和活性を示さない、型特異的なものである。

そこで、ワクチン開発の主眼は HIV-1 特異的な細胞性免疫を誘導することに重きが置かれるようになった。2004 年より、主に HIV-1 特異的な細胞性免疫を誘導することを目標に、HIV-1 の遺伝子の一部を含むアデノウイルスベクターを用いた、2 つの HIV-1 ワクチンの臨床試験 (STEP study、Phanbili study) が開始された。しかし、これらの臨床試験では、ワクチン投与群の方が、プラセボ投与群よりもウイルス感染の頻度が高い傾向が見られたとして、2007 年に相次いで中止されている。

現在、HIV-1 に対するワクチン開発において、世界的にその方向性が再検討されている。その一つは、中和抗体の重要性が再認識されつつあることである。広範なウイルスを中和できる抗体の誘導法開発を目標に、ウイルスエンベロープ 3 量体の詳細な立体構造解析、立体構造に基づいた抗原の設計、DNA ワクチン、プロテインブーストなど、より誘導能の高い免疫法の開発、新規アジュバント開発などが精力的に行われている。

## 5. おわりに

HIV-1 の持つ多様性のため、有効なワクチン開発は困難を極めている。しかし、HIV-1 感染症は治癒が困難であること、感染者が増え続けていることなどから、その必要性はますます増している。現状を打開し、ワクチン開発を進めるためには、既存の方法にとらわれない、新たな視点、方法が求められている。そのためには、ウイルス学のみならず、免疫学、立体構造学など、研究領域を超えた協力が重要であることは明らかである。本連載が、その一助となることを期待したい。

### 著者プロフィール



氏名：木村 哲也  
 所属：熊本大学大学院医学薬学研究部感染制御学寄附講座  
 住所：〒860-0811 熊本市本荘 1-1-1

### Biopyrrin EIA Kit [Substrate Solution B] 容器変更のお知らせ

日頃より Biopyrrin EIA Kit をご愛顧賜り、誠に有難うございます。

この度、容器メーカーからの供給中止に伴い [Substrate Solution B] の容器を変更させて頂きます。処方内容につきましては変更ありませんので、ご了承ください。

今後とも一層のお引き立てを賜りますようお願い申し上げます。



容器の変更は順次行って参ります。  
 (製造元：株式会社シノテスト)

### NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kits 使用サンプルの除タンパク方法に関するお知らせ

これまで、NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kits に使用するサンプルにタンパク質が含まれる場合、[Centricon10] を使用する除タンパク例を掲載しておりましたが、製造中止となっております。下記の製品で同様に除タンパク操作を行えることを確認しておりますので、今後はこちらの製品をご使用下さい。

[Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-10 membrane ([UFC801008], Millipore 社)]

### 学会展示のお知らせ

第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会

期日：12月9日(火)～12日(金)

場所：神戸国際展示場(神戸市中央区港島中町6-11-1)

第38回日本免疫学会総会・学術集会

期日：12月1日(月)～3日(水)

場所：国立京都国際会館(京都市左京区宝ヶ池)

# Topics on Chemistry

## トリパンブルーを用いた皮膚真菌症の迅速診断

社会保険大牟田天領病院皮膚科 / 熊本大学大学院皮膚機能病態学  
 熊本大学大学院皮膚機能病態学

池田 勇  
 尹 浩信

皮膚科で遭遇する頻度の高い白癬やカンジダ症などの表在性真菌症は病変部の角質片を採取して苛性カリ(KOH)水溶液で溶解し、直接鏡検することで迅速に診断できる。この際、強アルカリに耐え入手性も良いパーカーブルーブラックインクをKOH水溶液に加えることで真菌を染色し鑑別を容易にする事が標準的に行われてきた。(KOH-パーカーインク法)

しかし、パーカーブルーブラックインクは広く用いられるようになってわずか数年後の1958年に違う処方製の製品と置換された(真菌の染色に有用なDirect Blue 1類似成分が減量された)ため、染色性が低下し<sup>1)</sup>、近年ではKOH溶液と混合した際に沈殿、変色を起こすようになるなど本来文具であるものを目的外に使用することのリスクを常に抱えている。また、しばしば角質細胞まで染色されるなど特異性も充分とは言い難い。

代替法としては、Brukeら<sup>2)</sup>により報告されているChlorazol black E (Direct Black 38)を用いる方法があり、染色性、特異性ともに優れているが、パーカーインクの視認性の良い青色とは異なり緑~黒色調に染色される難点がある。Direct Blue 1や、その類似成分を含むパーカーブラックインクを用いる方法もある<sup>1)</sup>が、基本的にKOH-パーカーインク法と同じであるため染色の特異性は不十分である。

著者は既存の有用な染色剤が二つともアゾ色素である点に着目し、入手性の良い2種類のアゾ色素、エバンスブルーとトリパンブルーにつき検討を行った。エバンスブルーは強アルカリの環境下で安定であり、遊離状態の真菌をよく染色したが比較的短期間で退色し、角層内の真菌はほとんど染色することができなかった。これに対しトリパンブルーは染色性、特異性ともにきわめて良好であり、多くの場合数分間で角層内の真菌まで迅速に、鮮やかな青色に染色した(Fig. 1)。白癬菌だけでなくカンジダや、アトピー性皮膚炎との関連も論議されているピチロスポルムも良好に染色された。標本の保存性も良好であった。

トリパンブルーはKOHと混合した状態では時間の経過とともに微細な沈殿を形成する傾向があったが、安定剤としてグリセリンを添加すれば約1ヶ月は保存可能であることが確認され、新規の染色法として報告を行った<sup>3)</sup>。この染色液の調製は比較的容易であるが、試薬の秤量・溶解が必要である。安定剤の改良によりもっと寿命を延ばした処方を開発するか、色素とKOH、安定化剤を各々溶液の形で準備しておき、液の混合のみで調製ができるような形を取ることによってKOH-パーカーインク法と同程度以上の利便性が確保できると考えられる。

### 参考文献

- 1) R.L. Kuranz, Staining of Superficial Fungi in Alkaline Preparations, *Stain Technology*, **1964**, 39, 95-98.
- 2) W.A. Bruke, and B.E. Jones, A Simple Stain for Rapid Office Diagnosis of Fungus Infections of the Skin, *Arch Dermatol*, **1984**, 120, 1519-1520.
- 3) I. Ikeda, K. Nishimoto, K. Sasamoto, K. Nagira, T. Ono, and H. Ihn, Alkaline Trypan Blue as a stain for superficial fungi, *British Journal of Dermatology*, **2008**, 158, 1373-1374.



Fig. 1 トリパンブルーによる真菌染色

### 著者プロフィール



氏名：池田 勇  
 所属：大牟田天領病院 / 熊本大学大学院医学薬学研究部  
 皮膚機能病態学  
 連絡先：福岡県大牟田市天領町 1-100  
 大牟田天領病院皮膚科  
 e-mail : i-ikeda@omutatenryo-hp.jp  
 研究テーマ：医学画像、医用電子

### 関連商品

#### -Cellstain-Trypan Blue

細胞死の一般的な判定方法として、古くから最も多く用いられているものがTrypan Blueを用いた分染法と呼ばれる一種の生体染色法である。dye exclusion testとも呼ばれるもので、通常生細胞は染色されず、死細胞のみが染色されるので、血球計算板を用いて極めて簡便に死細胞を検出・計測できる。細胞死一般の判定法としては広く用いられている方法である。

製品名	容量	価格(¥)	コード	メーカーコード
-Cellstain-Trypan Blue	5 g	4,200	345-0741	T375

# Topics on Chemistry

## 簡単にエコな定性分析

株式会社同仁化学研究所 上園 貴広

ある特定の化合物の検出や化学反応の進行を、目視による色の変化だけで確認することは出来ないのだろうか。

比色指示薬による定性分析は、今もなお、盛んな方法である。この方法では、どのようにターゲット分子と指示薬とを相互作用させるかをまず考えなければならない。近年では、溶液中の水素結合を利用したアニオン分子の定性分析<sup>1,2)</sup>やオルガノゲルでの非共有結合(水素結合、 $\pi$ スタッキング、van der Waals 力)を利用した定性分析<sup>3)</sup>が報告されている。

最近、固相の電荷移動錯体形成(Charge-transfer Complexation)に基づく超分子比色指示薬により、様々な芳香族化合物や芳香族異性体の定性分析が報告されたので紹介する<sup>4)</sup>。

固相では、含まれる分子の立体構造が規則的で特異な反応場になるため、分子間相互作用や規則的配列を利用した化学反応、不斉反応、立体規則性反応、包接結晶形成に基づく分子認識と反応場の提供、機能材料の開発など、幅広く研究されている。また、無溶媒系であることから、環境問題に関心の高い現代に合致しているグリーンケミストリーである。

Darshak らは、アクセプター分子であるナフタレンジイミド(NDI)誘導体と様々な芳香族化合物を 1:1 のモル比で共粉碎し、1分以内に目視による色の変化を確認、更に30分後にはより鮮やかな色の変化を観察している(Fig. 1)。NDIは微黄色であるが、NDIと芳香族類 1-5 が電荷移動錯体形成した 1 NDIは橙黄色、2 NDIは黄色、3 NDIは灰緑色、4 NDIは暗黄色、5 NDIは橙色に変色している(Fig. 2(a))。共粉碎後の可視吸収スペクトルの極大吸収強度はより大きくなっており、これは電荷移動錯体形成による $\pi$ 電子軌道相互作用を示唆している(Fig. 2(b))。共粉碎により目視で識別できる検出下限量は 1.0 mg(約 6.25 nmol)である。NDIと5を共粉碎したものと、溶液から共結晶化したものとのX線粉末回折パターンは同じであることから、両者は同じ結晶構造であると考えられる。また、共結晶化した5 NDIの結晶構造は、NDIと5の分子面が接近しており、分子面間の距離は 3.316 ~ 3.390Åであることから、電荷移動錯体を形成していることが分かっている。

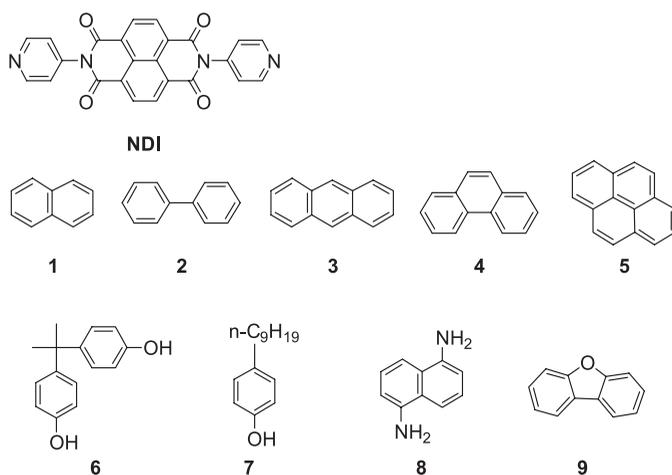


Fig. 1 NDI 誘導体と芳香族類の構造

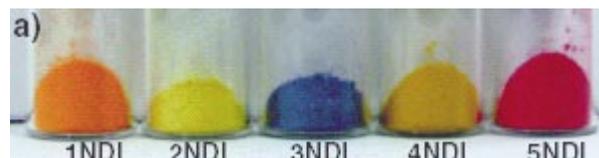


Fig. 2(a) NDI 誘導体とポリ芳香族類 1-5 の共粉碎粉末  
(Darshak R, et al., *Chem.Lett.*, **2008**, 550. Ref.No.CY-RT08-065)

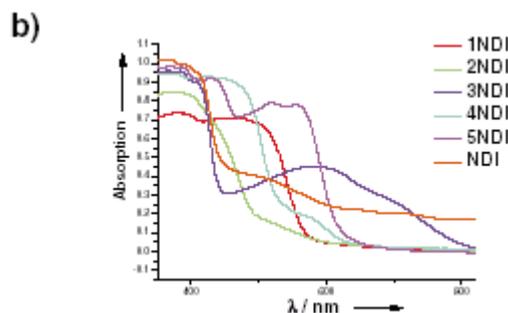


Fig. 2(b) 1NDI-5NDI の固相吸収スペクトル  
(Darshak R, et al., *Chem.Lett.*, **2008**, 550. Ref.No.CY-RT08-065)

更に、ドナー分子として 2-置換ナフタレン類を用いた場合、ドナー性が強い分子ほど電荷移動吸収帯が長波長側へシフトし、Hammett 則と極大吸収波長の相関性が得られていることから、固相の電荷移動錯体形成は、置換基の誘起効果に左右されることが示唆される。

本手法では溶液中で色の変化のない芳香族化合物類でも色の変化が見られており、芳香族化合物の位置異性体の判別にも応用されている。また興味深いことに、室温で液体である *o*、*m*、*p*-クレゾールもそれぞれ異なる色の変化が見られている。

更に、内分泌攪乱化学物質で難分解性の芳香族化合物であるビスフェノール A(6)、4-ノニルフェノール(7)、1,5-ジアミノナフタレン(8)、ジベンゾフラン(9)も検出が可能である。

この手法は、電荷移動錯体以外の相互作用を利用したり、異なったアクセプター分子と組み合わせることで、2次元アレイ<sup>5,6)</sup>に適用でき、より複雑な芳香族化合物や有機化合物の異性体の正確な定性が可能である。今後は、麻薬やさらに高い毒性の環境汚染物質の検出への応用が可能と期待される。

### <参考文献>

- 1) Jong Hwa Jung, Soo Jin Lee, Jong Seung Kim, Woo Song Lee, Yoshiteru Sakata and Takahiro Kaneda, *Org.Lett.*, **2006**, 8, 3009.
- 2) Yu-Ping Tseng, Guan-Min Tu, Chia-Hung Lin, Chi-Tong Chang, Chi-Yung Lin, and Yao-Pin Yen, *Org.Biomol.Chem.*, **2007**, 5, 3592.
- 3) Pritam Mukhopadhyay, Yuya Iwashita, Michihiro Shirakawa, Shin-ichiro Kawano, Norifumi Fujita, and Seiji Shinkai, *Angew.Chem.,Int.Ed.*, **2006**, 45, 1592.
- 4) Darshak R. Trivedi, Yuzo Fujiki, Yuta Goto, Norifumi Fujita, Seiji Shinkai and Kazuki Sada, *Chem.Lett.*, **2008**, 550.
- 5) Neal A. Rakow, Avijit Sen, Michael C. Janzen, Jennifer B. Ponder, and Kenneth S. Suslick, *Angew.Chem.,Int.Ed.*, **2005**, 44, 4528.
- 6) Neal A. Rakow, Kenneth S. Suslick, *Nature*, **2000**, 406, 710.

## 分子生物学用 Good's Buffer

ACES 分子生物学用	ADA 分子生物学用
BES 分子生物学用	Bicine 分子生物学用
Bis-Tris 分子生物学用	CAPS 分子生物学用
CHES 分子生物学用	EPPS 分子生物学用
HEPES 分子生物学用	MES 分子生物学用
MOPS 分子生物学用	PIPES 分子生物学用
TAPS 分子生物学用	TES 分子生物学用
Tricine 分子生物学用	

### <特長>

- 高純度 (99.7% もしくは 99.5% 以上)
- エンドトキシン試験済み (一部製品を除く)
- DNase, RNase 不検出

Good's Buffer は優れた緩衝剤として知られており、幅広い研究に使用されております。特に生化学分野において使用される際には、純度のみならず、エンドトキシンや DNase, RNase free であるかどうかという点も試薬品質として重要な要素であり、これらが保証されている製品を望む声も多く聞かれます。これまでも、同様の目的の製品を発売いたしておりましたが、より多くの製品をという要望にお応えし、Good's Buffer の分子生物学用規格品をご用意致しました。

品名	容量	価格(¥)	コード	メーカーコード
ACES 分子生物学用	20 g	7,800	342-08271	GB73
ADA 分子生物学用	20 g	3,400	349-08281	GB74
BES 分子生物学用	20 g	2,800	346-08291	GB75
Bicine 分子生物学用	20 g	2,800	349-08301	GB76
Bis-Tris 分子生物学用	20 g	4,800	346-08311	GB77
CAPS 分子生物学用	20 g	4,000	343-08321	GB78
CHES 分子生物学用	20 g	3,800	340-08331	GB79
EPPS 分子生物学用	20 g	5,800	347-08341	GB80
HEPES 分子生物学用	20 g	2,200	340-08233	GB70
MES 分子生物学用	20 g	2,800	344-08351	GB81
MOPS 分子生物学用	20 g	2,600	347-08243	GB71
PIPES 分子生物学用	20 g	3,400	344-08253	GB72
TAPS 分子生物学用	20 g	3,000	341-08361	GB82
TES 分子生物学用	20 g	4,800	348-08371	GB83
Tricine 分子生物学用	20 g	2,600	345-08381	GB84

HEPES, MES, PIPES は 100 g, 500 g 包装もご用意しております。

## 細胞増殖 / 細胞毒性測定用試薬

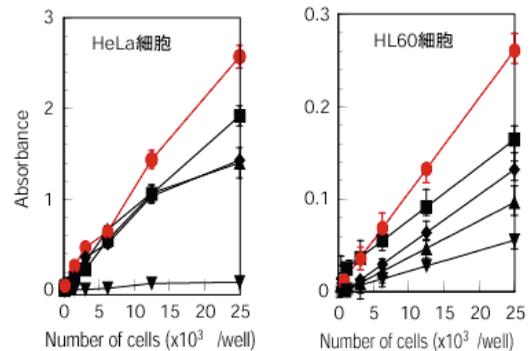
### Cell Counting Kit-8

生細胞を測定する方法として、古くから<sup>3</sup>H-チミジン取り込み法や MTT 法などがあります。MTT 法は放射性同位体を使用しない方法として活用されてきましたが、反応時に難溶性のホルマザンを生成するため、操作が非常に煩雑となり測定の際に問題となっています。小社の Cell Counting Kit-8 (Cell Counting Kit) は、水溶性ホルマザンを生成するテトラゾリウム塩を使用しており、MTT 法のようにホルマザンの溶解操作を必要としません。

そのため、非常に簡便で高感度な細胞数測定キットとして、これまで数多くの研究に活用いただいております。

より、ご活用いただくために、これまで報告されている論文の一部を細胞種毎に分類したものをご紹介いたします。

ご紹介しきれなかった論文は、また違う形で情報を更新していきたいと考えております。



使用培地: HeLa 細胞: DMEM(10% 牛胎児血清)

HL60 細胞: RPMI(10% 牛胎児血清)

呈色反応: HeLa 細胞: 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、2 時間

HL60 細胞: 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、3 時間

測定波長: Cell Counting Kit-8 ( ) : 450 nm (参照波長 650 nm)

Cell Counting Kit ( ) : 450 nm (参照波長 650 nm)

XTT ( ) : 450 nm (参照波長 650 nm)

MTS ( ) : 490 nm (参照波長 650 nm)

MTT ( ) : 570 nm (参照波長 650 nm)

品名	容量	価格(¥)	コード	メーカーコード
Cell Counting Kit-8	100 回用	4,200	341-07761	CK04
	500 回用	12,000	347-07621	CK04
	2500 回用	34,600	343-07623	CK04
	10000 回用	100,000	-	CK04
Cell Counting Kit	500 回用	12,600	349-06461	CK01
	2500 回用	35,600	345-06463	CK01

Cell Counting Kit-8(メーカーコード : CK04) は細胞毒性試験や薬剤感受性試験などに数多く使用されております。  
下記に使用細胞種の一例を報告論文とともに示します。今後ご研究にご活用ください。

Cell Line	Description	Reference
293T	human kidney carcinoma	H. Fuda, <i>et al.</i> , <i>J. Lipid Res.</i> , <b>2007</b> , 48, 1343.
3T3-L1	mouse embryonic fibroblast	D. Huang, <i>et al.</i> , <i>FASEB J.</i> , <b>2005</b> , 19, 2014.
A431	human epithelial carcinoma cell	H. Oho, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , <b>2006</b> , 5, 2563.
A549	human lung cancer cell	C. A. Reilly, <i>et al.</i> , <i>Toxicol. Sci.</i> , <b>2003</b> , 73, 170.; T. Kitamuro, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>2003</b> , 278, 9125. J. Stankova, <i>et al.</i> , <i>Clin. Cancer Res.</i> , <b>2005</b> , 11, 2047.; I. Imoto, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , <b>2006</b> , 66, 4617.; S. Semba, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>2006</b> , 281, 28244.
Alexander cell	pancreatic cancer cell	S. Awale, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , <b>2006</b> , 66, 1751.
AMO1	multiple myeloma	J. Inoue, <i>et al.</i> , <i>Am. J. Pathol.</i> , <b>2004</b> , 165, 71.
AR42J	pancreatic tumor cell	C. Bose, <i>et al.</i> , <i>Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.</i> , <b>2005</b> , 289, G926.
ARO	human anaplastic thyroid carcinoma	F. Furuya, <i>et al.</i> , <i>Endocrinology</i> , <b>2004</b> , 145, 2865.
AsPC-1	pancreatic cancer cell	T. Mori, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , <b>2004</b> , 3, 29.; S. Awale, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , <b>2006</b> , 66, 1751.
B16F1	murine malignant melanoma	S. Shibata, <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> , <b>2006</b> , 177, 3564.
BBMVEC	bovine brain microvascular endothelial	T. Kitamuro, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>2003</b> , 278, 9125.
BEAS-2B	human bronchial epithelial cell	C. A. Reilly, <i>et al.</i> , <i>Toxicol. Sci.</i> , <b>2003</b> , 73, 170.; M. E. Johansen, <i>et al.</i> , <i>Toxicol. Sci.</i> , <b>2006</b> , 89, 278.
BMMSC	bone marrow mesenchymal stem cell	M. Miura, <i>et al.</i> , <i>Stem Cells</i> , <b>2006</b> , 24, 1095.
C33A	human cervical carcinoma	W. Yang, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , <b>2006</b> , 5, 1610.
CHO	chinese hamster ovary cell	A. Kunita, <i>et al.</i> , <i>Am. J. Pathol.</i> , <b>2007</b> , 170, 1337.; S. Yokoe, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , <b>2007</b> , 67, 1935.
cortical neurons, primary	mouse	M. Ikonen, <i>et al.</i> , <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , <b>2003</b> , 100, 13042.
COS7	African green monkey kidney cell	T. Kitamuro, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>2003</b> , 278, 9125.; H. Bando, <i>et al.</i> , <i>Clin. Cancer Res.</i> , <b>2005</b> , 11, 5784.
CV-1	African green monkey kidney cell	J. Peloponese, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>2006</b> , 281, 8927.
Daoy	human medulloblastoma	X. Li, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , <b>2005</b> , 4, 1912.; S. Kim, <i>et al.</i> , <i>Clin. Cancer Res.</i> , <b>2006</b> , 12, 5550.
Daudi	human burkitt lymphoma	M. Ho, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>2005</b> , 280, 607.
DLD-1	human colorectal adenocarcinoma	H. Oho, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , <b>2006</b> , 5, 2563.
DT40	chicken B-lymphocyte cell	F. Shinozaki, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>2006</b> , 281, 16361.
DU145	human prostate carcinoma	P. Davis-Searles, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , <b>2005</b> , 65, 4448.; D. J. Son, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , <b>2007</b> , 6, 675.
G361	human melanoma cell	H. Oho, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , <b>2006</b> , 5, 2563.
GCIY	human gastric carcinoma	H. Oho, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , <b>2006</b> , 5, 2563.
H441	human pulmonary adenocarcinoma	H. Shimura, <i>et al.</i> , <i>Cancer res.</i> , <b>2001</b> , 61, 3640.
HCC1937	human breast cancer cell	D. Iliopoulos, <i>et al.</i> , <i>Clin. Cancer Res.</i> , <b>2007</b> , 13, 268.
HEK293	human embryonic kidney cell	S. Semba, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>2006</b> , 281, 28244.
HeLa	human cervical carcinoma	H. Shimura, <i>et al.</i> , <i>Cancer res.</i> , <b>2001</b> , 61, 3640.; C. Shi, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>2004</b> , 279, 17224.
Hep3B	human hepatocellular carcinoma	J. K. Sicklick, <i>et al.</i> , <i>Carcinogenesis</i> , <b>2006</b> , 27, 748.
HepG2	Human hepatocellular liver carcinoma	C. A. Reilly, <i>et al.</i> , <i>Toxicol. Sci.</i> , <b>2003</b> , 73, 170.; T. Ohuchida, <i>et al.</i> , <i>Cancer</i> , <b>2004</b> , 100, 2430.; T. Shiokawa, <i>et al.</i> , <i>Clin. Cancer Res.</i> , <b>2005</b> , 11, 2018.; H. Oho, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , <b>2006</b> , 5, 2563.
Hippocampal neuron, primary	from Wistar rat embryos	K. Kurata, <i>et al.</i> , <i>J. Pharmacol. Exp. Ther.</i> , <b>2004</b> , 311, 237.
hMSC	human mesenchymal stem cell	D. Huang, <i>et al.</i> , <i>FASEB J.</i> , <b>2005</b> , 19, 2014.; L. Song, <i>et al.</i> , <i>Stem Cells</i> , <b>2006</b> , 24, 1707.
ILT-Hod	T-cell	T. Kasai, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>2002</b> , 277, 5187.
Jurkat	human T cell	T. Kasai, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>2002</b> , 277, 5187.; L. Lu, <i>et al.</i> , <i>J. Biochem.</i> , <b>2007</b> , 141, 157.
Kasumi-1	acute myeloid leukemia cell	G. Zhou, <i>et al.</i> , <i>Blood</i> , <b>2007</b> , 109, 3441.
KMS-11	multiple myeloma	J. Inoue, <i>et al.</i> , <i>Am. J. Pathol.</i> , <b>2004</b> , 165, 71.
KYSE	esophageal squamous cell carcinoma	I. Imoto, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , <b>2001</b> , 61, 6629.; K. Nakakuki, <i>et al.</i> , <i>Carcinogenesis</i> , <b>2002</b> , 23, 19.
L929	mouse fibroblast	Y. Morita, <i>et al.</i> , <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , <b>2000</b> , 97, 5405.
LK87	human lung adenocarcinoma	H. Oho, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , <b>2006</b> , 5, 2563.
LNCaP	human prostate carcinoma	D. J. Son, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , <b>2007</b> , 6, 675.
Macrophage	mouse	Y. Miyake, <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> , <b>2007</b> , 178, 5001.
MDCK	canine kidney epithelial cell	H. Shimura, <i>et al.</i> , <i>Cancer res.</i> , <b>2001</b> , 61, 3640.
MiaPaCa-2	pancreatic cancer cell	A. Aghdassi, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , <b>2007</b> , 67, 616.
MT4	T-cell	T. Kasai, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>2002</b> , 277, 5187.; K. V. Kibler, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>2004</b> , 279, 49055.
NIH3T3	mouse fibroblast	R. Yu, <i>et al.</i> , <i>Toxicol. Sci.</i> , <b>2006</b> , 93, 82.
NT2N	human embryonal carcinoma	J. Tessier, <i>et al.</i> , <i>Infect. Immun.</i> , <b>2007</b> , 75, 1895.
PANC-1	pancreatic cancer cell	T. Mori, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , <b>2004</b> , 3, 29.; S. Awale, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , <b>2006</b> , 66, 1751.; A. Aghdassi, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , <b>2007</b> , 67, 616.
PC6	human lung small-cell carcinoma	M. Spencer, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>2002</b> , 277, 20160.
PCN	primary cortical neuron	T. Chiba, <i>et al.</i> , <i>J. Neurosci.</i> , <b>2005</b> , 25, 10252.
PSN-1	pancreatic cancer cell	S. Awale, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , <b>2006</b> , 66, 1751.
RAW 264	mouse macrophage	M. Shiga, <i>et al.</i> , <i>Anesth. Analg.</i> , <b>2001</b> , 92, 128.
RP9	B lymphoblastoid cell	R. A. Dalloul, <i>et al.</i> , <i>Poult. Sci.</i> , <b>2006</b> , 85, 446.
SH10TC	human gastric cancer cell	H. Oho, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , <b>2006</b> , 5, 2563.
SH-SY5Y	human neuroblastoma	T. Nakagawa, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cell. Biol.</i> , <b>2002</b> , 22, 2575.
SK-N-SH	human neuroblastoma	Y. Wang, <i>et al.</i> , <i>J. Virol.</i> , <b>2004</b> , 78, 7916.

## 新製品（10月末発売予定）

### 微生物検出キット（比色）

#### Microbial Viability Assay Kit-WST

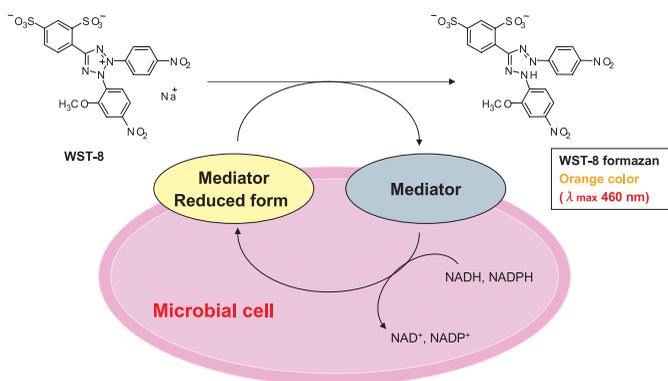
薬剤感受性検査、抗菌物質スクリーニング、食中毒菌検査など微生物の生存率測定は非常に注目される分野です。一般的にコロニー形成能で目視評価されますが、長い時間がかかったり操作に熟練を要したりと煩雑な点があります。

この度弊社では福岡県工業技術センターとの共同開発により、微生物の比色検出キットを開発致しました。各種の微生物検査への応用が期待される製品です。

微生物はエネルギー代謝活動で細胞内に産生するNAD(P)Hを利用して、mediatorを還元することができます。更に、mediator還元体はWST-8を還元し、水溶性formazan（オレンジ色）が生成されます。生成するformazan量は微生物のエネルギー代謝活性に比例するため、微生物のviabilityが高いほどオレンジ色に呈色します。また、WST-8は感度が高く、培地成分の影響を受けにくい（低バックグラウンド）という特長を有します。

このようにMicrobial Viability Assay Kit-WSTは、微生物のエネルギー代謝活性を発色という非常に分かりやすい手法で検出できるキットです。

#### 発色原理



#### 特長

- エネルギー代謝活性を指標とした微生物の比色検出キットです。
- 培地成分による影響を受けにくい製品です。
- マイクロプレートを使ったアッセイが可能です。
- 薬剤感受性試験への応用が可能です。

#### キット内容

- WST-8 solution 1 ml × 5 tubes
  - electron mediator reagent (DMSO solution) 0.5 ml × 1 tube
- 1キットで500 tests（96wellプレート5枚分）が可能です。

#### 本キット以外に必要なもの

- マイクロプレートリーダー（測定波長：450～490 nm）
- 96穴マイクロプレート
- マイクロピペット及びチップ
- インキュベーター（25～37°C）

#### 各種微生物における発色感度

微生物	Cell density (CFU/ml)		
	1h	4h	
Yeast	<i>Candida utilis</i>	5.53 × 10 <sup>7</sup>	6.18 × 10 <sup>6</sup>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8.70 × 10 <sup>5</sup>	2.65 × 10 <sup>5</sup>
	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1.65 × 10 <sup>5</sup>	2.47 × 10 <sup>4</sup>
Gram-positive bacteria	<i>Bacillus cereus</i>	6.70 × 10 <sup>5</sup>	6.77 × 10 <sup>4</sup>
	<i>Bacillus subtilis</i>	2.45 × 10 <sup>6</sup>	6.71 × 10 <sup>5</sup>
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	1.69 × 10 <sup>6</sup>	2.47 × 10 <sup>5</sup>
	<i>Enterococcus faecalis</i>	5.18 × 10 <sup>7</sup>	1.76 × 10 <sup>6</sup>
	<i>Lactobacillus casei</i>	8.40 × 10 <sup>7</sup>	2.34 × 10 <sup>6</sup>
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5.07 × 10 <sup>6</sup>	6.46 × 10 <sup>5</sup>
	<i>Micrococcus luteus</i>	8.29 × 10 <sup>5</sup>	1.29 × 10 <sup>5</sup>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.78 × 10 <sup>6</sup>	2.71 × 10 <sup>5</sup>
Gram-negative bacteria	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5.53 × 10 <sup>6</sup>	1.12 × 10 <sup>6</sup>
	<i>Acetobacter sp.</i>	2.53 × 10 <sup>7</sup>	7.39 × 10 <sup>6</sup>
	<i>Escherichia coli</i>	1.31 × 10 <sup>7</sup>	2.86 × 10 <sup>5</sup>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.76 × 10 <sup>7</sup>	5.59 × 10 <sup>5</sup>
	<i>Proteus mirabilis</i>	7.42 × 10 <sup>6</sup>	1.35 × 10 <sup>6</sup>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.76 × 10 <sup>8</sup>	1.78 × 10 <sup>7</sup>
	<i>Salmonella enteritidis</i>	2.55 × 10 <sup>7</sup>	1.06 × 10 <sup>6</sup>
	<i>Salmonella typhimurium</i>	1.73 × 10 <sup>7</sup>	2.60 × 10 <sup>6</sup>
	<i>Serratia marcescens</i>	7.15 × 10 <sup>7</sup>	5.08 × 10 <sup>6</sup>
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2.90 × 10 <sup>7</sup>	1.03 × 10 <sup>7</sup>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1.92 × 10 <sup>7</sup>	5.46 × 10 <sup>6</sup>	

\*Cell density (CFU/ml)

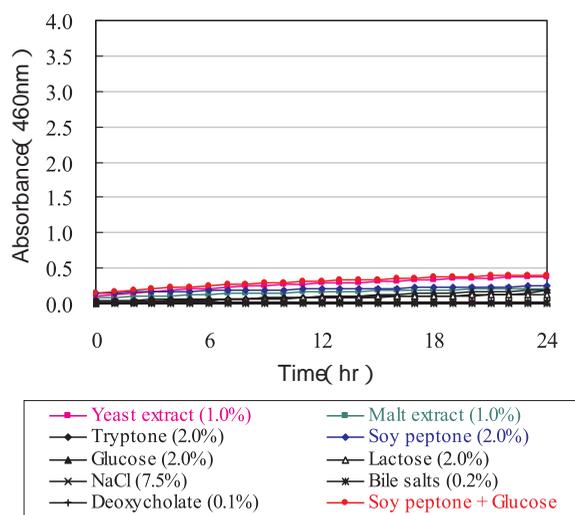
発色試薬添加後、1時間または4時間インキュベートし、測定した吸光度（460 nm）が0.5以上であった各微生物の細胞密度。

## 新製品（10月末発売予定）

### 微生物検出キット（比色）

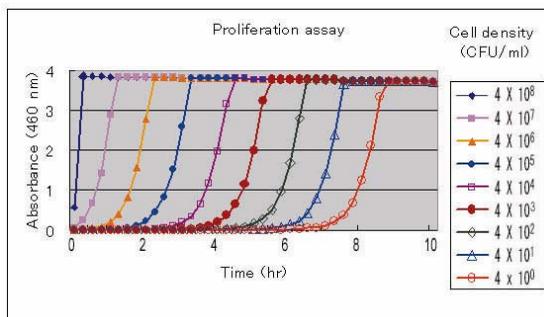
#### 培地成分の影響

微生物の培養には各種培地が使用され、その成分も様々です。つまり、これら培地成分による非特異的な発色（還元反応）が起こりにくいという事が検出試薬にとって重要なポイントです。Microbial Viability Assay Kit-WSTは、培地成分による還元を殆ど受けません。



培地成分を含む PBS (pH 7.0) で、37°C にて 24 時間インキュベートし吸光度を測定した。

#### Proliferation Assay



微生物： *E. coli* (NBRC3972)

培地： Mueller-Hinton 培地

*E. coli* を Microbial Viability Assay Kit-WST を含む Mueller-Hinton 培地でインキュベート (37°C) し、一定時間毎に吸光度を測定した (460 nm =  $\lambda_{max}$  WST-8 formazan )

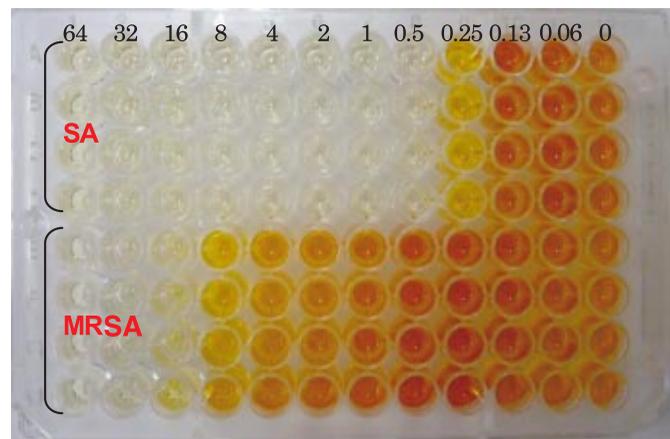
細胞密度は寒天培養法により得られたコロニー形成数より算出した。細胞密度として 4 CFU/ml の大腸菌を約 8 時間で検出できました。

#### 薬剤感受性試験への応用

黄色ブドウ球菌 (SA) 及びメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) を用い、Oxacillin による薬剤感受性試験を実施した。

*Staphylococcus aureus subsp. aureus* (NBRC12732)  
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (JCM8702)

( $\mu$  g/mL - Oxacillin)



SA 及び MRSA を Oxacillin を含む Mueller-Hinton 培地中で 6 時間 (35°C) インキュベートした後、発色試薬を添加し 2 時間 (35°C) 反応させた。(温度は従来法と合わせた)

MRSA は SA に比べ高い薬剤耐性を示した。また、本キットで得られた MIC (最小発育阻止濃度) 値と微量液体希釈法 (日本化学療法学会標準法、CLSI 法) で得られた MIC 値に高い相関性が認められた。

微量液体希釈法は肉眼による菌の発育の有無で MIC 値を決定するため、判定が非常に大変です。また、肉眼により菌の発育を確認するためには少なくとも 20 ~ 24 時間が必要です。

Microbial Viability Assay Kit-WST を用いることで、生育阻害を吸光度として数値化できます。

更に、微量液体希釈法に比べて非常に短時間で結果を得ることが可能です (標準 8 時間程度)。

本製品は、福岡県工業技術センター生物食品研究所との共同開発品です。

## 試作品

### 微生物検出キット（蛍光）

#### -Bacstain- CTC Rapid Staining Kit

##### 特長

- スピーディーで高感度に生菌の CTC 染色が可能です。
- 少量小分け品ですので使いやすくなっております。

これまで、CTCは呼吸活性を有する生菌選択的な蛍光色素として汎用されており、VBNC (viable but non culturable) を初めとする微生物の生態研究に応用されております。

CTC は、呼吸活性に伴う電子伝達により還元され蛍光性の formazan を生成します。しかし、CTC 単独による染色では染色性が十分ではなく、より高い染色性が望まれておりました。

CTC Rapid Staining Kit は CTC 染色効率をより高める enhancing reagent を利用することで、より迅速に、より高感度に CTC 染色ができるキットです。

CTC 単独での染色に比べ、効率よく微生物を染色できるようになりました。

##### 蛍光顕微鏡

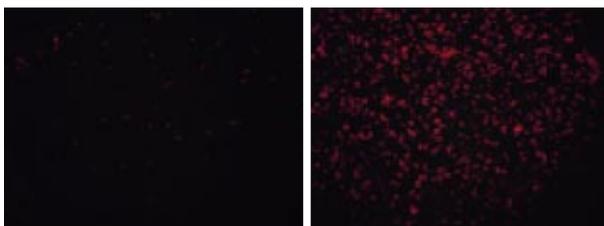
培養した細菌懸濁液を遠心分離し上清（培地）除去後、PBS(-) に再懸濁した。

CTC のみ又は CTC + enhancing reagent-B を添加した。37°C で1時間インキュベートした後、プレパラートを作成し蛍光観察（B 励起）した。

福岡県工業技術センター生物食品研究所のご指導、ご協力のもと染色実験を行いました。

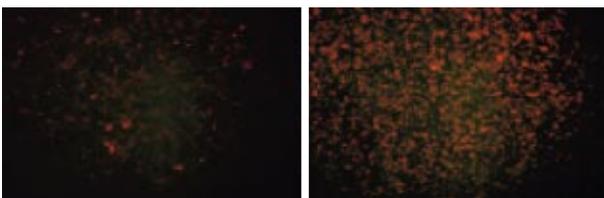
#### *Staphyrococcus aureus subsp. Aureus* (× 400)

CTC のみの染色      CTC + enhancing reagent-B での染色



#### *Klebsiella pneumoniae* (× 400)

CTC のみの染色      CTC+ enhancing reagent-B での染色



キット内容    各 100 assays 用

Flow cytometry用と蛍光顕微鏡用の2種類をご用意しておりますので、検出系にあったキットをお選び頂けます。

for Flow cytometry

- CTC      10 mg × 3 tubes
- enhancing reagent A (DMSO solution) 100 μl

for Microscopy

- CTC      10 mg × 3 tubes
- enhancing reagent B (aqueous solution) 500 μl

本キット以外に必要なもの

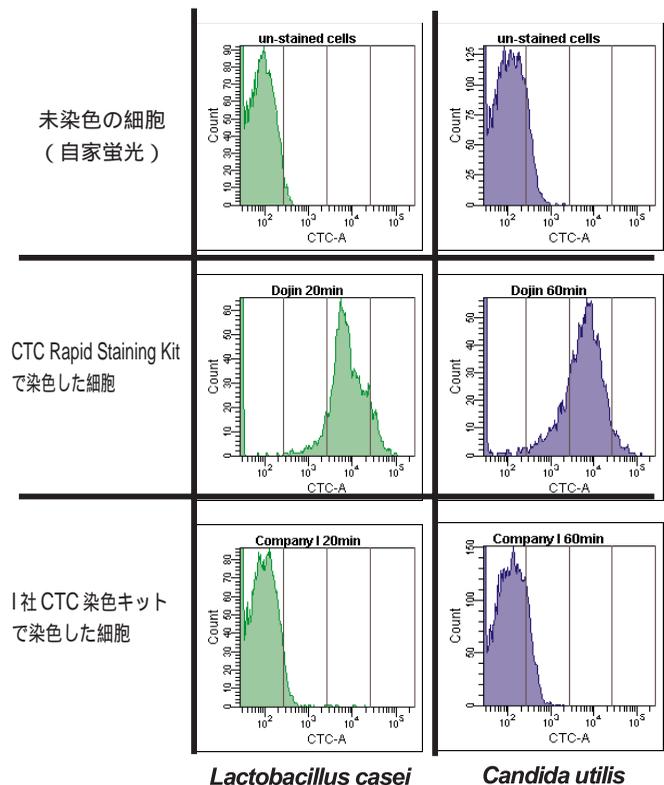
- マイクロピペット
- インキュベーター (25 ~ 37°C)
- マイクロチューブ
- 遠心機 (マイクロチューブ用)

##### Flow cytometry

CTC Rapid Staining Kit (for Flow cytometry) と I 社キットとの染色能比較

細胞密度, CTC 終濃度, インキュベート時間及び温度はすべて同一条件

488 nm 励起、検出波長 670 ~ 735 nm



試作品

アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性測定キット

ACE Inhibition Assay Kit

本キットはアンジオテンシン変換酵素 (ACE) の阻害活性を測定するためのキットです。 ACEは、血圧調節メカニズムの一つであるレニン-アンジオテンシン系において、アンジオテンシンから昇圧作用を有するアンジオテンシンを生成するなど、血圧上昇に大きく関係している酵素です。近年、高血圧予防を目的とした機能食品 (特定保健用食品) が多く販売されるなど、ACE阻害作用を有する食品成分が注目を集めています。

従来の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、再溶解して228 nmの吸光度を測定するという煩雑な方法でした。本キットは、新規合成基質である3-Hydroxybutyrylglycyl-glycyl-glycine(3HB-GGG)と種々の酵素を組み合わせることで、酢酸エチルのような有機溶媒を使用することなく、多くのサンプルを簡便に測定することが可能です。

3HB-GGGはACEにより3-Hydroxybutyrylglycine(3HB-G)とGlycyl-glycine(GG)に分解されます。更にAminoacylaseで処理することにより3-Hydroxybutyric acid(3HB)が生成されます。3HBはD-3-Hydroxybutyrate dehydrogenase(3HBDH)によりAcetoacetic acid(AA)に変換され、その際NADHが産生されます。産生されたNADHは電子メディエーターを介してIndicator solutionを橙色に発色させ、迅速・簡便にACE阻害活性を測定することができます。

Fig.1, Fig.2は、代表的なACE阻害物質であるリシノプリルおよびバリルチロシンについてACE阻害活性を測定した例です。

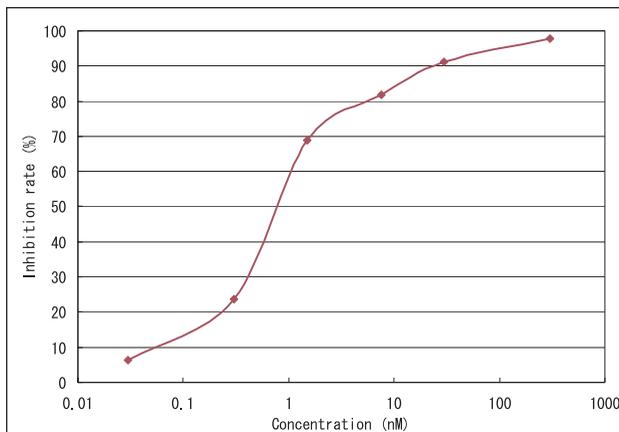


Fig. 1 本キットを用いたリシノプリルによる阻害曲線

<特長>

- 96穴マイクロプレートアッセイ対応。迅速、簡便に多検体を測定できる (分光光度計での測定も可能)。
- 再現性の高いデータを得ることができる。
- 有害な有機溶媒を使用しない。

<キット内容> 50 tests × 2

- Substrate buffer
- Enzyme A
- Enzyme B
- Enzyme C
- Coenzyme
- Indicator solution

\* 内容は変更になる場合があります。

<測定原理>

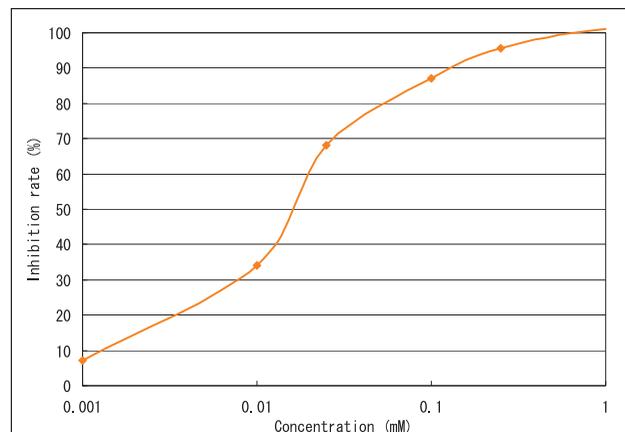
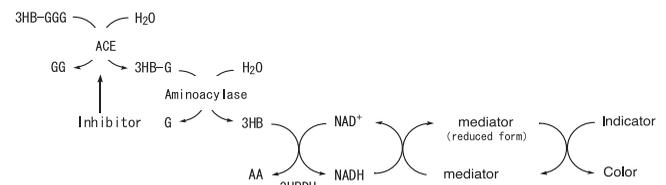


Fig. 2 本キットを用いたバリルチロシンによる阻害曲線

## 開催のご案内

# 19th フォーラム・イン・ドージン

## 細胞膜脂質のダイナミクス

日 時 / 2008年11月28日(金) 9:30-16:50 (開場 9:00) 参加費 / 無料  
 場 所 / 鶴屋ホール(テトリア熊本[鶴屋東館]7F・熊本市手取本町6-1) 定員 / 200名  
 代表世話人 / 山本 哲郎 (熊本大学大学院医学薬学研究部 分子病理学分野)  
 当番世話人 / 赤池 孝章 (熊本大学大学院医学薬学研究部 微生物学分野)  
 入江 徹美 (熊本大学大学院医学薬学研究部 薬剤情報分析学分野)  
 主 催 / 株式会社 同仁化学研究所 後 援 / 株式会社 ケミカル同仁

## 講演プログラム

9:30-9:35 主催者挨拶 / 野田 栄二 株式会社 同仁化学研究所  
 9:35-9:45 世話人挨拶 / 山本 哲郎  
 < Overview > 9:45-9:55 三浦 洵 株式会社 同仁化学研究所  
 「多様で特異な分子種：脂質 ～そのマイクロダイナミズムからマクロダイナミズムまで～」

## Session 1 : &lt;座長：山本 哲郎 (熊本大学大学院医学薬学研究部 分子病理学分野) &gt;

9:55-10:40 楠見 明弘 京都大学 物質-細胞統合システム拠点 (アイセムス)  
 「1分子で見る細胞膜がはたらく仕組み」  
 10:40-11:25 小林 俊秀 独立行政法人 理化学研究所 小林脂質生物学研究室  
 「脂質を見ることで見えてきたもの」  
 11:25-12:10 花田 賢太郎 国立感染症研究所 細胞化学部  
 「セラミドの細胞内選別輸送」

12:10-13:25 <休憩：ランチョンセミナー (12:20-12:50) >

## Session 2 : &lt;座長：赤池 孝章 (熊本大学大学院医学薬学研究部 微生物学分野) &gt;

13:25-14:10 佐藤 圭創 熊本大学大学院医学薬学研究部 薬物治療学分野  
 「脂質ラジカル研究における ESR Spin trap extraction 法の有用性」  
 14:10-14:55 野口 範子 同志社大学生命医科学部 医生命システム学科  
 「脂質酸化生成物による遺伝子発現制御」

14:55-15:10 <コーヒーブレイク >

## Session 3 : &lt;座長：入江 徹美 (熊本大学大学院医学薬学研究部 薬剤情報分析学分野) &gt;

15:10-15:55 東城 博雅 大阪大学大学院医学系研究科 医化学講座  
 「病態リポドミクスの方法と応用」  
 15:55-16:40 有馬 英俊 熊本大学大学院医学薬学研究部 製剤設計学分野  
 「膜脂質マイクロドメイン解析におけるシクロデキストリンの有効利用とその治療への応用」

16:40-16:50 閉会の挨拶 / 三浦 洵  
 17:00-19:00 ミキサー・自由討論

## 問い合わせ・参加申し込み先：

熊本県上益城郡益城町田原 2025-5(株)同仁化学研究所内  
 フォーラム・イン・ドージン事務局 (担当：蒲野)

Tel:0120-489548, Fax:0120-021557 E-mail:info@dojindo.co.jp

講演終了後、ミキサー(無料)を同会場にて予定いたしております。

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

駐車場は有料となりますので(聴講による優待はございません)、できるだけ公共の交通機関をご利用ください。

ランチョンセミナー(無料)は当日の朝、受付時の先着順とさせていただきます。

## 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