



2009 No.
129
ISSN 0385-1516

CONTENTS

Review

硫酸転移酵素の持つ多様な生理機能

宮崎大学農学部 榊原 陽一

東海大学農学部 安田 伸

宮崎大学農学部 水光 正仁

Topics on Chemistry

チオールバイオイメージングに特化した
新規蛍光プローブ

株式会社同仁化学研究所 藤野 怜香

糸状菌とナノテクノロジーが融合した
新規血管新生阻害剤

株式会社同仁化学研究所 平島 義紀

ドージンニュース

**DOJIN NEWS**

目次

Review

硫酸転移酵素の持つ多様な生理機能	1
宮崎大学農学部 榊原 陽一	
東海大学農学部 安田 伸	
宮崎大学農学部 水光 正仁	

Topics on Chemistry

チオールバイオイメージングに特化した新規蛍光プローブ 株式会社同仁化学研究所 藤野 怜香	7
糸状菌とナノテクノロジーが融合した新規血管新生阻害剤 株式会社同仁化学研究所 平島 義紀	8

Commercial

新製品	
微生物検出キット(比色)	10
試作品	
微生物検出キット(蛍光)	12

お知らせ

パンフレットのお知らせ	6
学会展示のお知らせ	6
販売中止のお知らせ	6
フォーラム・イン・ドージン開催報告	14

新製品案内

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Microbial Viability Assay Kit-WST	500 tests	20,000	M439

製品案内

品名	容量	価格(¥)	コード	メーカーコード
-Cellstain- DAPI	1 mg	3,800	342-07431	D212
-Cellstain- DAPI solution	1 ml	4,800	340-07971	D523
-Cellstain- PI	1 mg	3,800	343-07461	P346
-Cellstain- PI solution	1 ml	4,800	341-07881	P378
-Cellstain- EB	1 mg	3,800	346-07451	E262
-Cellstain- EB solution	1 ml	4,800	348-07891	E272



2008年11月3日より、中国北京に新しく事務所を開設いたしました。
上海事務所と共に中国における研究者支援および製品販売を幅広く行って参ります。

Dojindo Laboratories Beijing Office
北京市朝陽区徳外馬甸裕民路12号 元辰鑫大厦 E1-703号

硫酸転移酵素の持つ多様な生理機能 Functional Diversity of the Cytosolic Sulfotransferases



榊原 陽一 (Yoichi Sakakibara)
宮崎大学農学部応用生物科学科 准教授



安田 伸 (Shin Yasuda)
東海大学農学部バイオサイエンス学科 講師



水光 正仁 (Masahito Suiko)
宮崎大学農学部応用生物科学科 教授

Summary:

In mammals, sulfate conjugation as mediated by the cytosolic sulfotransferases (SULTs) has been shown to be involved in the biotransformation/excretion of xenobiotics as well as endogenous compounds such as steroid hormones and catecholamine neurotransmitters. Based on our recent evidences, it has been clearly demonstrated that sulfation catalyzed by the cytosolic SULTs may play an important role on the detoxification of endocrine disruptors as well as the metabolism of biologically active components, e.g (poly)phenolic compounds, from natural foods. In this review, we summarized the available information regarding the multifunctional role of cytosolic SULTs. Functional implications of the sulfation of harmful oxidated/nitrated products, nitrotyrosine and hydroxylated monoamine compounds, in the pathological settings are discussed.

要約:

生体内における硫酸化は、生体外異物や薬物の解毒代謝機構として、さらにステロイドホルモンや神経伝達物質の濃度調節機構として広く知られている。近年、解毒代謝機構としての内分泌かく乱物質の代謝機構や、食品機能性成分の代謝機構として注目されつつある。さらに、酸化/ニトロ化ストレスの結果生じるニトロチロシンの硫酸化などについて、硫酸転移酵素研究に関する最近の研究動向を紹介する。

Keywords: Sulfotransferase, sulfation, endocrine disruptor, nitrotyrosine, tyrosine nitration

1. はじめに

生体内における硫酸化は、生体外異物や薬物の解毒代謝機構、そしてステロイドホルモンや神経伝達物質であるカテコールアミン類の濃度調節機構として古くから研究されてきた。この様な背景から、硫酸転移酵素は我々の生体内で不必要となった化学物質を体外に排泄する機能を担っていると考えられている¹⁾。近年、筆者らの研究グループをはじめ硫酸転移酵素の研究分野にも積極的に分子生物学的手法が導入された。その結果、従来の酵素学あるいは生化学的な研究からでは困難な知見が明らかになってきた。分子生物学的手法を導入し、ヒト、マウスおよびゼブラフィッシュをモデル生物として精力的に硫酸転移酵素cDNAのクローニングを行った。その結果、少なくともヒトにおいて11種類、マウスにおいて14種類、ゼブラフィッシュにおいては14種類の硫酸転移酵素遺伝子が存在することを明らかにした²⁻⁴⁾。これらの研究により、同じく解毒代謝機構の酵素として知られるシトクロムP-450酵素群と同様に硫酸転移酵素が、遺伝子スーパーファミリーを形成していることが判明した。現在までの研究により硫酸転移酵素遺伝子スーパーファミリーは、少なくとも5つのファミリーから形成されることが明らかとなった⁵⁾。これらの多様な硫酸転移酵素は、最近注目される食品機能性成分(植物性ポリフェノール)や内分泌かく乱物質の代謝にも関与する。さらに、最新の結果より、酸化/ニトロ化ストレスの結果生じるニトロチロシンの代謝へ硫酸化が関与することが明らかとなった。ここでは、筆者らのグループの成果を中心に硫酸転移酵素に関する研究を紹介する。

2. 活性硫酸 PAPS の合成と硫酸化

生体内における硫酸化に関してまずその反応を簡単に説明する。生体内での硫酸化はまず硫酸の活性化、すなわち1950年代にLipmannらにより発見された哺乳動物に普遍的な硫酸供与体としての活性硫酸PAPS(3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate)がATPと無機硫酸塩から合成されることが必要である⁶⁾。この反応では、生体内においてエネルギー源として大切なATPを2分子消費して1分子の活性硫酸(PAPS)を合成することからも硫酸化がいかに重要か容易に予想される。このPAPS合成には、ATP sulfurylaseとadenosine 5'-phosphosulfate kinase (APS kinase)の二つの酵素反応が関与することが知られている(Fig.1)。これら二つのPAPS合成に関与する酵素は、大腸菌、カビといった微生物や植物においては二つの異なる酵素タンパク質として存在する。しかし、哺乳動物(ヒト、マウスなど)や昆虫(ショウジョウバエなど)などにおいては二つの酵素が進化の過程で融合し二つの機能を持ったPAPS合成酵素(PAPS synthetase)とし

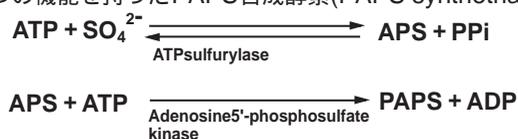


Fig. 1 活性硫酸 PAPS の合成

PAPS: 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate

APS: adenosine 5'-phosphosulfate

PPi: pyrophosphate

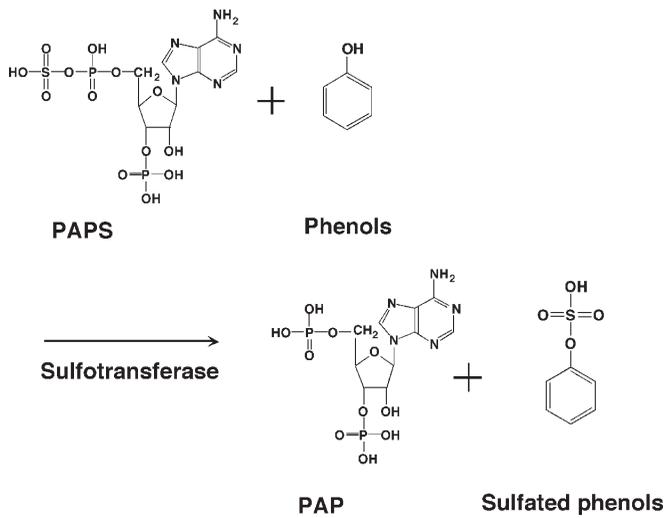


Fig. 2 フェノール性化合物の硫酸化
 PAPS: 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate
 P A P: 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate

て存在する。このことから、生物は進化の過程でより効率よくPAPSを合成できるようになってきたと考えられる。1998年に我々はヒトのPAPS合成に関与するPAPS synthetase (Bifunctional ATP sulfurylase/adenosine 5'-phosphosulfate kinase)をクローニングし、大腸菌で発現させることに成功している⁷⁾。

このように酵素的に合成された活性硫酸PAPSを用いて、PAPS上の硫酸基を水酸基またはアミノ基に転移する反応が硫酸化でありFig.2に反応の概要をまとめた。

現在、筆者らの研究室では遺伝子工学的に大腸菌で発現したヒトPAPS合成酵素を用いて硫酸転移酵素研究に不可欠な^[35S]-放射活性ラベルした活性硫酸PAPSを酵素的に合成している。さらに同じく大腸菌で発現したリコンビナントヒト硫酸転移酵素を調製し、これらを用いて研究している。今後の応用の可能性として、リコンビナント硫酸転移酵素を利用することで、有機化学的な合成では難しい様々な化学物質の硫酸体の調製が、酵素的に合成(硫酸化)可能となり様々な分野に利用できると考えている。

3. 硫酸転移酵素遺伝子ファミリー

硫酸転移酵素に関する研究は1980年代までは臓器由来の酵素タンパク質を扱う生化学的な研究が中心であった。1997年当時の硫酸転移酵素に関する総説においてさえ、ヒトにおける硫酸転移酵素はフェノール硫酸転移酵素2種、ヒドロキシステロイド硫酸転移酵素1種、エストロゲン硫酸転移酵素1種の合計4種の酵素の存在が知られているにすぎなかった⁸⁾。1990年代後半にはヒト、マウス、ラットを始め様々な動物種において硫酸転移酵素のクローニングが盛んに行われ新規の硫酸転移酵素が多数発見された。筆者らの研究も含めて、現在までに少なくともヒトで11種類、マウスにおいて14種類、ゼブラフィッシュにおいて14種類の硫酸転移酵素が存在しヒトクロムP-450同様に硫酸転移酵素も遺伝子スーパーファミリーを形成していることが判明した(Fig.3)²⁻⁴⁾。

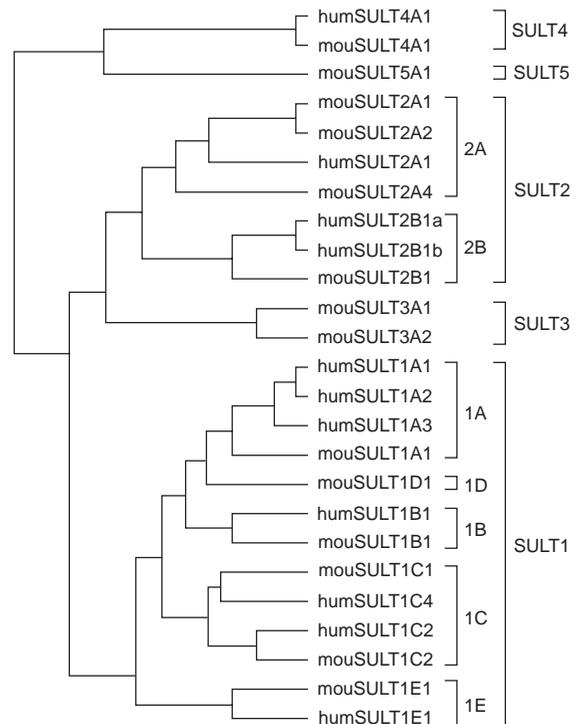


Fig. 3 ヒトおよびマウス硫酸転移酵素遺伝子ファミリーの分子系統樹

現在、硫酸転移酵素の分類に関しては硫酸転移酵素ワークショップにおいて提唱された分類法によりアミノ酸配列をもとに分類することが推奨されている⁸⁾。分類法としては、硫酸転移酵素はSULTという略号を用いて、その後にファミリーを表す数字を付ける。例えば、SULT1はフェノール硫酸転移酵素ファミリー、SULT2はヒドロキシステロイド硫酸転移酵素ファミリーというように分類される。さらにこれらのファミリーごとにアミノ酸配列が60%以上一致するグループをサブファミリーとし、アルファベットをAから順に付けていく。その結果、例えばヒトP型フェノール硫酸転移酵素の場合は生化学的な解析のみでは判らなかつた異なる遺伝子にコードされた酵素が二種存在するためにSULT1A1、SULT1A2の二種が存在し、ヒトM型硫酸転移酵素の場合はSULT1A3となる。以下はこの硫酸転移酵素分類法に基づく分類名を用いることとする。

筆者らの研究グループによる最近の研究により、マウスにはSULT3A1とSULT3A2の2種類のSULT3ファミリー硫酸転移酵素が存在することが明らかになった⁹⁾。このSULT3ファミリー硫酸転移酵素は、ナフチルアミンなど芳香族アミンのアミノ基を特異的に硫酸化するユニークな性質の硫酸転移酵素である。マウスでは2つの機能的なSULT3硫酸転移酵素遺伝子を持つのに対し、ヒトゲノム上には機能的なSULT3硫酸転移酵素遺伝子が見いだせない。よって、ヒトにおいて芳香族アミンの硫酸化に関与する酵素がこれとは別に存在している可能性が考えられる。また、ヒトゲノム上には4つのSULT1A硫酸転移酵素遺伝子(1A1~1A4)が存在するのに対し、マウスゲノムには1つSULT1A1しか存在しない。このように、硫酸転移酵素遺伝子スーパーファミリーはゲノム上で重複等によってコピー数が増加することで多様になつ

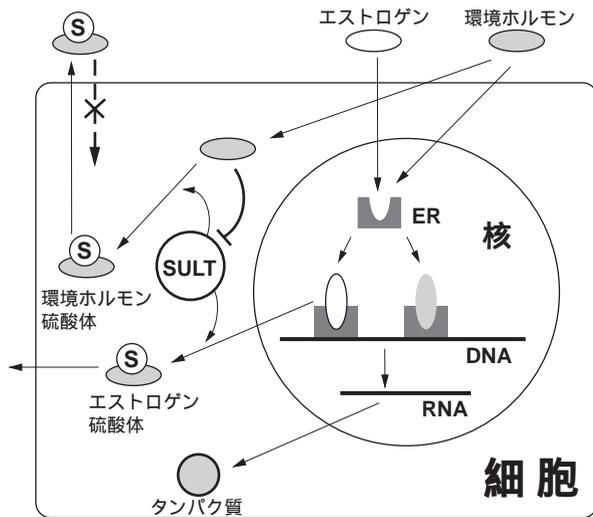


Fig. 4 内分泌かく乱物質（環境ホルモン）の作用メカニズムおよびその硫酸化

てきたと考えられるが、ヒトとマウスの種間では一部にそのゲノム構造に大きな違いが見られる。このことは、今後の硫酸転移酵素研究において種間で機能的に相補している硫酸転移酵素を特定することの難しさを示唆するものである。

4. 内分泌かく乱物質（環境ホルモン）と硫酸化

近年、女性ホルモンであるエストロゲン様のホルモン作用（Fig.4中の）あるいは男性ホルモン作用をかく乱する環境中の化学物質すなわち「内分泌かく乱物質」（環境ホルモン）の危険性が報告されている。一般に「環境ホルモン」は生体内に取り込まれると蓄積し、最終的に内分泌系の異常を誘発するといった悪いイメージが持たれている。これまでに述べてきたように硫酸化は親油性の化合物に硫酸基という親水性の高い官能基を導入することで尿中への排泄を促す解毒代謝機構である。

これらのことより、ヒドロキシル基またはアミノ基を持つ「環境ホルモン」の生体内代謝における硫酸化の関与は、ホルモン制御に大きく影響していることが推察された。筆者らの研究グループは、7種のヒトの硫酸転移酵素によるビスフェノールA、アルキルフェノール、ジエチルstilbestrol(DES)そしてエチニルエストラジオール等の環境ホルモン候補物質に対する硫酸化を検討し報告した（Fig.4中の）。

その結果より、これらの環境ホルモン候補物質は全てヒト硫酸

転移酵素の基質となりうるということが明らかになった。この研究では、試験した7種のヒト硫酸転移酵素がそれぞれの環境ホルモンに対して異なった基質特異性を示した（Table 1）。これらの酵素は生体内で臓器特異的に発現調節がなされている酵素も多く、環境ホルモンの種類によってはその影響を受けやすい臓器の存在が示唆された¹⁰⁾。

さらに、筆者らの研究グループは内分泌かく乱物質（環境ホルモン）として知られるトリブチルスズなど有機スズが、エストロゲン硫酸転移酵素SULT1E1活性を阻害することを見いだした¹¹⁾。このことは、トリブチルスズをはじめ多くの内分泌かく乱物質が持つエストロゲン様作用メカニズムの一つとしてエストロゲンの濃度調節機構としての硫酸化に影響することを示している（Fig.4中の）¹²⁾。

5. 酸化/ニトロ化ストレスと硫酸化

今から遡ること約15年前、筆者らの研究グループは生命現象として生体内で生じる遊離チロシン硫酸体の起源を探っていた。そしてHepG2ヒト肝腫瘍細胞などを用いて、遊離チロシンやドーパなどの硫酸化が培養細胞レベルで起こることを見だし、またこれらモノアミン系化合物の硫酸化はヒトSULT1A3（別名：M型フェノール硫酸転移酵素、またはカテコールアミン型フェノール硫酸転移酵素）によって触媒されることを世界に先駆けて明らかにした^{13,14)}。SULT1A3がチロシンとよく似た構造を有する様々なモノアミン系化合物の活性調節を担うこともあいまって、筆者らの関心は本酵素が有する多面的な機能の解明、とくに疾病リスクに対する生体防御機構としてのSULT1A3の機能に関する研究へと次第に向かっていった。

5.1 ニトロチロシン

過度の酸化/ニトロ化ストレスにより生じた一酸化窒素由来の反応性窒素酸化物ペルオキシナイトライトは、生体内における遊離アミノ酸あるいはタンパク質アミノ酸残基としてのチロシンを容易にニトロ化することが知られている。その反応産物であるニトロチロシンは、動脈硬化症、脳卒中、肺炎患、肝炎、および慢性リウマチをはじめ様々な病態において検出されており、体内での酸化/ニトロ化ストレス状態とこれらストレスに惹起される疾患とのリスク関係を知る上で有効なバイオマーカーとして広く認知されている。最近の研究では、とくに遊離型のニトロチロシンがDNAの酸化損傷を引き起こし、培養細胞レベルでアポトーシスを誘導すること、そしてマウス脳内では神経変性を引き起こして正常な神経伝達を阻害することが明らかとなっており、ニトロ

Table 1 ヒト硫酸転移酵素の内分泌かく乱物質（環境ホルモン）に対する基質特異性

	SULT1A1	SULT1A3	SULT1B1	SULT1C2	SULT1C4	SULT1E1	SULT2A1
Bisphenol A	965 ± 206	N.D.	3.9 ± 0.2	N.D.	173 ± 12	51.9 ± 11.0	19.9 ± 3.5
4-Octylphenol	1920 ± 152	675 ± 81	17.1 ± 8.7	N.D.	1920 ± 103	475 ± 34	18.3 ± 5.8
p-Nonylphenol	1969 ± 117	39.7 ± 1.7	52.7 ± 4.3	N.D.	268 ± 63	221 ± 18	39.9 ± 12.2
Diethylstilbestrol	1538 ± 233	19.0 ± 7.9	3.2 ± 0.1	N.D.	296 ± 45	188 ± 27	11.3 ± 7.1
17a-Ethynylestradiol	1200 ± 79	N.D.	1.6 ± 0.1	N.D.	N.D.	243 ± 57	26.9 ± 10.1

Specific activity refers to pmol substrate sulfated/min/mg purified enzyme

N.D. : Activity not detected.

チロシンもまた疾病リスク因子であることが提唱されるようになってきた。一方、生体内での硫酸化の機能は、(i) 生体外異物の解毒代謝としての硫酸化、(ii) ホルモンなどの生体内内因性物質の濃度調節機構の2つがこれまで主軸として考えられてきた。そこで筆者らは、「我々の体もまたリスク因子としてのニトロチロシンを代謝変換により濃度調節あるいは除去するメカニズムが備わっているのでは？」と考え、硫酸化がその役割を担う可能性について検証することとした。

5.2 ニトロチロシン硫酸体の発見とSULT1A3

まず筆者らは、遊離型ニトロチロシン存在下でHepG2細胞および $[^{35}\text{S}]$ -放射活性硫酸を用いた代謝ラベル実験を行った。その結果、培地中に添加された遊離ニトロチロシンが培養細胞内に取り込まれ、硫酸化による代謝調節を受けて $[^{35}\text{S}]$ -ニトロチロシン硫酸体として培地中に放出されることが初めて明らかになった¹⁵⁾。さらに、酸化/ニトロ化ストレス研究に用いられるSIN-1 (3-morpholininosydnonimine)をペルオキシナイトライド供給剤として代謝ラベル実験を行ったところ、 $[^{35}\text{S}]$ -ニトロチロシン硫酸体が細胞より産生されて培地中へ放出されることが認められた¹⁵⁾。興味深いことに、ニトロチロシンの硫酸化はHepG2細胞のみでなく、他のヒト由来初代内皮培養細胞(HUVEC、HPAECおよびHLMVEC)、肺上皮細胞(H441およびBEAS-2B)、および乳腺上皮細胞(MCF-7およびMCF 10A)においても同様に観察された¹⁶⁾。このことは、ニトロチロシン硫酸化が、多様な臓器由来の細胞種において一般的に起こりうることで、そしてニトロチロシンが代謝変換されることを示唆するものであった。さらに $[^3\text{H}]$ -チロシンを用いた代謝ラベル実験を行ったところ、SIN-1処理後に産生された多くの $[^3\text{H}]$ -ニトロチロシン(90.4-94.8%)が非抱合体としてHepG2細胞内で検出され、培地中には多くの硫酸化された $[^3\text{H}]$ -ニトロチロシン(23.2-59.2%)が時間依存的に放出されることを明らかにした¹⁵⁾。これらの結果は、酸化/ニトロ化ストレスによって生じた遊離ニトロチロシンの細胞内代謝調節には硫酸化が機能しうることを意味するものであった。しかしながら、これまで安定な最終産物またはバイオマーカーとして認識されてきた遊離ニトロチロシンがどのように抱合体として生成するのか、さらにグルクロン酸抱合体などの他の代謝経路の存在については未だ全容解明には至っていない。

これまでに我々は、ヒト硫酸転移酵素について大腸菌を用いたリコンビナント酵素の大量精製を行ってきており、すでに既知の11種類の硫酸転移酵素のコレクションを有している。そこで、これら11種類のうちニトロチロシンを硫酸化する酵素の特定を試みたところ、SULT1A3のみで有意な活性が認められ、同濃度100 μM のチロシンを基質としたときよりも高い比活性値(2.11 nmol/min/mg enzyme vs. 0.01 nmol/min/mg enzyme)が得られた¹⁵⁾。さらにニトロチロシンはSULT1A3による遊離チロシンの硫酸化を競争的に阻害することも判明した¹⁵⁾。一方で、ヒトの体内では95%以上のドーパミンや70%程度のノルエピネフィリンといったモノアミン系化合物が硫酸抱合体として血中を循環していることが報告されており、生体内のカテコールアミン類の恒常性や生体外モノアミン類の代謝変換にはSULT1A3が重要な役割を担っていると考えられている。これまでの筆者らの研究結果により、SULT1A3がドーパミンだけでなく、遊離チロシンやその異性体、そしてドーパなどのモノアミン系化合物に対しても有

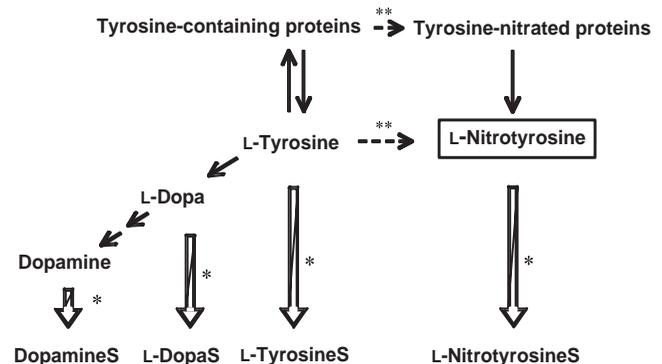


Fig.5 ヒト SULT1A3 によるチロシンおよび関連化合物の硫酸化

* : ヒト SULT1A3 による硫酸化反応

** : 活性酸素種によって生じるニトロ化反応

詳細は筆者らの総説を参照のこと¹⁶⁾。

意に硫酸化活性を示すことが判明している¹⁴⁾。今回明らかとなったニトロチロシンの硫酸化を含めると、SULT1A3は非常に多面的な生理機能を有すること(cf. Fig. 5¹⁶⁾)、そして酸化/ニトロ化ストレスによって生じるリスク因子としてのニトロチロシンに対して防御的に機能しうることを示唆された。遊離ニトロチロシン硫酸体は、タンパク質中のニトロ化チロシンの分解を経由して生じることなどが考えられるが、その生成経路についての詳細な検討も必要である。今後、*in vivo*における遊離ニトロチロシンおよびその硫酸抱合体あるいは代謝物の体内レベルを評価することが酸化/ニトロ化ストレスを介した疾病状態を予測する上で重要であり、これらもまた有効なバイオマーカーとして利用されることが予想される。

6. 神経疾患リスクと硫酸化

近年、医療技術の向上および衛生面など生活環境の改善によって我々の寿命は伸びてきており、わが国をはじめ先進国ではすでに高齢化社会を迎えつつある。それに付随して注目されてきた疾病のひとつにアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経疾患が挙げられるが、これまで原因究明と治療法の確立に関する研究に重点が置かれてきた。その発症の原因としてセロトニンやドーパミンなどを介した神経伝達の異常や過度の酸化ストレスなどが考えられているが、これら疾病リスクに対する防御機構については明らかにはなっていない。一方で、酸化ストレス下で生じうる7-ヒドロキシセロトニンや6-ヒドロキシドーパミンといったモノアミン系の酸化型神経伝達物質が神経細胞の損傷を引き起こすことが報告されており、筆者らは硫酸化の視点よりSK-N-MCヒト神経芽腫細胞を用いてこれらの疾病リスク因子に対する防御機構について調べることにした。

6.1 7-ヒドロキシセロトニンと6-ヒドロキシドーパミン

我々の体内では、セロトニンとドーパミンはよく知られたモノアミン系神経伝達物質であり、これらはセロトニンまたはドーパミン作動性レセプター特異的な神経伝達の調節を行うことにより、

感情や記憶などの精神状態や物理的行動を制御すると考えられている。これら化合物もまた硫酸抱合化により代謝調節され、体内では血液、尿および脳髄液内に硫酸体として存在することが報告されている。近年の研究により、セロトニンやドーパミンに水酸基が付与された酸化型産物7-ヒドロキシセロトニン(5,7-ジヒドロキシトリプタミン)および6-ヒドロキシドーパミンが、ヒドロキシルラジカルを介した酸化反応により生じること、酸化ストレスとともにこれらが神経細胞に損傷を与えることでアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経疾患を惹起することが提唱されている。そこで筆者らは、「7-ヒドロキシセロトニンや6-ヒドロキシドーパミンなどの有害なモノアミン系化合物による神経疾患リスクに対して、我々の体もまた防御機構が備わっている」と考え、前章と同様のアプローチを用いて硫酸化がその役割を担う可能性について検証することとした。

6.2 7-ヒドロキシセロトニンおよび6-ヒドロキシドーパミンの硫酸化と SULT1A3

既知の11種類のヒト由来SULTsを用いて、7-ヒドロキシセロトニンおよび6-ヒドロキシドーパミンを硫酸化する酵素の特定を試みた結果、SULT1A3がこれら酸化型物質を硫酸化する主酵素であること、続いてSULT1C#2およびSULT1A1もまた低い活性ながらこれらの基質を硫酸化しうることが明らかとなった¹⁷⁾。さらに7-ヒドロキシセロトニンはSULT1A3によるセロトニンの硫酸化を競争的に阻害し、6-ヒドロキシドーパミンもまたドーパミンの硫酸化を同様に阻害することも判明した¹⁷⁾。このことより、これら酸化型モノアミン系化合物は硫酸化により代謝変換されるものの、同時にセロトニンやドーパミンの硫酸化による代謝調節にも影響を与える可能性が考えられた。つぎに筆者らは、7-ヒドロキシセロトニンまたは6-ヒドロキシドーパミンとともにSK-N-MC細胞および放射線標識硫酸^[³⁵S]を用いた代謝ラベル実験を行った。その結果、培地中に添加された7-ヒドロキシセロトニンは培養細胞内に取り込まれ、硫酸化による代謝調節を受けて7-ヒドロキシセロトニン^[³⁵S]硫酸体として培地中に放出されることが明らかになった¹⁷⁾。興味深いことに6-ヒドロキシドーパミンの場合、6-ヒドロキシドーパミン^[³⁵S]硫酸体に加えて6-ヒドロキシドーパミン由来の^[³⁵S]硫酸体がいくつも検出された。さらに阻害剤を用いた試験により、これら6-ヒドロキシドーパミン由来硫酸体のいくつかはカテコール O-メチル基転移酵素およびモノアミンオキシダーゼなどの酵素による代謝変換および硫酸転移酵素による硫酸化を経て細胞外へ産出されていることがわかった¹⁷⁾。この結果は、ドーパミンが硫酸化だけでなくメチル化やモノアミン酸化など複数の酵素のはたらきによって代謝変換されうるというこれまでの報告と一致している。つぎに、これら化合物の硫酸化反応にはSULT1A3が関わっているかどうかを調べるため、SULT1A3特異的なsiRNAを用いてSK-N-MC細胞内のSULT1A3レベルを人為的に低減させる実験を行った。その結果、細胞抽出液による7-ヒドロキシセロトニンと6-ヒドロキシドーパミンの硫酸化活性は有意に低下したことから、これら酸化型モノアミンは主に細胞内のSULT1A3によって硫酸化されることが明らかとなった。

これらの結果より、7-ヒドロキシセロトニンや6-ヒドロキシドーパミンといった有害なモノアミン系化合物が神経細胞内で代謝変換され、そこでもSULT1A3による硫酸化が積極的に機能していることが判明した。一方、6-ヒドロキシドーパミン硫酸体

については他の代謝経路の存在も示唆され、疾病リスク因子となりうる化合物によってはSULT1A3だけでなく複数酵素による防御機構が細胞内に備わっていることが窺えた。

7. おわりに

以上述べてきたように、生体内における硫酸化は、単に生体外異物の解毒代謝および体内物質の濃度および活性調節を行うだけでなく、エストロゲン代謝阻害を介した環境中内分泌かく乱物質の活性発現メカニズムの標的となりうること、さらに疾病環境における酸化/ニトロ化ストレスの結果生じるニトロロチロシンなど有害な酸化物もしくはニトロ化物に対して生体防衛的に働きうるものが次々に明らかになってきた。しかしながら、我々身体の恒常性を維持するその多様な生理機能の解明にはまだまだ未開拓の余地があるのかもしれない。

筆者らのグループは、これまでにマウス由来のある種のSULTがプロスタグランジンやロイコトリエンといった炎症反応のメディエーターとなるエイコサノイド類を硫酸化することが、炎症応答の沈静化にも機能しうることを見出している¹⁸⁾。今後ヒトSULT1A3をはじめ各種硫酸転移酵素が有する多面的な生理機能と疾病環境における機能について明らかにされることが期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり終始ご指導とご協力をいただき、そして現在も共同で硫酸転移酵素の機能解明に向けた研究を実施している米国トレド大学薬学部Ming-Cheh Liu博士に心よりお礼申し上げます。また、研究にご協力いただきました、宮崎大学医学部の中山建男教授と高見恭成准教授、愛媛大学農学部の菅原卓也准教授にお礼申し上げます。

本研究は厚生労働科学研究費「萌芽的先端医療技術推進研究事業(トキシコゲノミクス)」、文部科学研究費「基盤研究B、若手研究B」および科学技術振興機構の地域結集型共同研究事業の支援により遂行されています。

参考文献

- 1) W.B., Jakoby, *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 20715-20718.
- 2) M. Suiko, Y. Sakakibara, M.-Y. Liu, Y.-S. Yang, M.-C. Liu, *J. Pestic. Sci.*, **2005**, 30, 345-353.
- 3) T.A. Liu, S. Bhuiyan, R. Snow, S. Yasuda, T. Yasuda, Y.S. Yang, F.E. Williams, M.-Y. Liu, M. Suiko, G. Carter, M.-C. Liu, *Aquat. Toxicol.*, **2008**, 89, 94-102.
- 4) T. Yasuda, S. Yasuda, F.E. Williams, M.-Y. Liu, Y. Sakakibara, S. Bhuiyan, R. Snow, G. Carter, M.-C. Liu, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **2008**, 294, 29-36.
- 5) 榊原陽一、水光正仁：生化学，**2002**，74，539-546.
- 6) P.W. Robbins, F. Lipmann, *J. Biol. Chem.*, **1958**, 233, 681-685.
- 7) K. Yanagisawa, Y. Sakakibara, M. Suiko, Y. Takami, T. Nakayama, H. Nakajima, K. Takayanagi, Y. Natori, M.-C. Liu, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1998**, 62, 1037-1040.
- 8) R.M. Weinshilboum, D.M. Otterness, I.A. Aksoy, T.C. Wood, C. Her, R.B. Raftogianis, *FASEB J.*, **1997**, 11, 3-14.
- 9) S. Takahashi, Y. Sakakibara, E. Mishihiro, H. Kouriki, R. Nobe, K. Kurogi, S. Yasuda, M.-C. Liu, M. Suiko, *Biochem. Biophys. Res.*

Commun., **2008**, 375, 531-535.

- 10) M. Suiko, Y. Sakakibara, M.-C. Liu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2000**, 267, 80-84.
- 11) K. Ohkimoto, Y. Sakakibara, M. Suiko, H. Yoshikawa, M.-C. Liu, H. Tamura, *Pesticide Biochem. Physiol.*, **2005**, 81, 32-38.
- 12) 榊原陽一、水光正仁：化学と生物，**2000**，38，776-778.
- 13) Y. Sakakibara, M. Suiko, M.-C. Liu, *Eur. J. Biochem.*, **1994**, 226, 293-301.
- 14) Y. Sakakibara, J. Katafuchi, Y. Takami, T. Nakayama, M. Suiko, H. Nakajima, M.-C. Liu, *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**, 1355, 102-106.
- 15) S. Yasuda, S. Idell, M.-C. Liu, *Biochem. J.*, **2007**, 401, 497-503.
- 16) M.-C. Liu, S. Yasuda, S. Idell, *IUBMB Life*, **2007**, 59, 622-627.
- 17) S. Yasuda, M.-Y. Liu, M. Suiko, Y. Sakakibara, M.-C. Liu, *J. Neurochem.*, **2007**, 103, 2679-2689.
- 18) M.-C. Liu, Y. Sakakibara, C.-C. Liu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1999**, 254, 65-69.

著者紹介

榊原 陽一 (Yoichi Sakakibara)

宮崎大学農学部応用生物科学科 准教授

〒889-2192 宮崎市学園木花台西 1-1

電話：0985-58-7211 Fax：0985-58-7211

e-mail：ysakaki@cc.miyazaki-u.ac.jp

出身大学：宮崎大学農学部農業化学科

学位：博士（農学）鹿児島大学

現在の研究テーマ：翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の機能解明、プロテオーム解析による食品機能性評価

安田 伸 (Shin Yasuda)

東海大学農学部バイオサイエンス学科 講師

〒869-1404 熊本県阿蘇郡南阿蘇村河陽 東海大学農学部

電話：0967-67-3946 Fax：0967-67-3960

e-mail：shin.yasuda@agri.u-tokai.ac.jp

出身大学：九州大学大学院生物資源環境科学府
生物機能科学専攻食糧科学

学位：博士（農学）

現在の研究テーマ：食品素材の機能性に関する研究
生理活性物質の機能性と代謝調節に関する研究

水光 正仁 (Masahito Suiko)

宮崎大学農学部応用生物科学科 教授

〒889-2192 宮崎市学園木花台西 1-1

電話：0985-58-7215 Fax：0985-58-7215

e-mail：msuiko@cc.miyazaki-u.ac.jp

出身大学：九州大学農学部農芸化学科

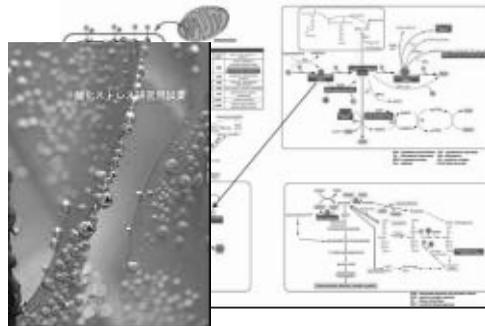
学位：農学博士 九州大学

現在の研究テーマ：細胞質硫酸転移酵素の網羅的機能解析、翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の機能解明、ハイスループット食品機能性評価法の開発

パンフレットのお知らせ

酸化ストレス研究関連試薬のパンフレットを作成いたしました。

疾患と活性酸素(由来)フリーラジカルの関わりを示すとともに、生体内の代謝とその機構解析のための製品を紹介しています。ご請求は、小社マーケティング部まで。



学会展示のお知らせ

日本農芸化学会 2009 年度大会 附設展示会

日時：2009 年 3 月 28 日(土)～29 日(日)

会場：マリンメッセ福岡

福岡市博多区沖浜町 7-1

* ランチョンセミナーも開催予定です。

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。
これまでのご愛顧有り難うございました。

Arsenazo-III

メーカーコード：A013

1g (コード：349-00143)

5g (コード：347-00144)

Topics on Chemistry

チオールバイオイメージングに特化した新規蛍光プローブ

株式会社同仁化学研究所 藤野 怜香

古くからチオールは生命科学分野において盛んに研究されてきた。グルタチオン、システイン、ホモシステインなどに代表される生体チオールは、生体酸化還元ホメオスタシスを維持し、代謝をつかさどる重要物質のひとつである。例えば、グルタチオンは酸化ストレスと密接に関係していることがわかっており、ホモシステインなどの特定チオールは多くの疾患に関連していることが報告されている。

これらチオール研究に欠かせないのが光学的検出法である。チオールプローブとしてよく知られているDTNB(エルマンズ試薬)は、紫外-可視吸収スペクトルでチオールの検出・定量を可能にする(Fig.1)。その他、求電子基を有することでチオール選択性を持たせた多くの色素が存在しているが、それらはon/offシグナル比が低く、また、洗浄・単離を必要とするため迅速な定量は難しいという欠点がある。

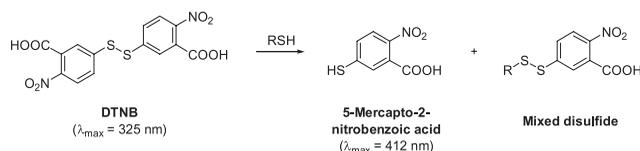


Fig. 1 Reaction of DTNB with Thiol

現在、チオール検出色素は蛍光 turn-on プローブが開発されたことにより目覚ましい進歩を遂げている。これらの色素は、チオールとの反応により分子内のPET効果(Photoinduced Electron Transfer Effect)が遮断され、元々消光分子であった物質が蛍光分子に変換されることで蛍光を発するようになる。しかし、これらの多くは水溶性が低いために共溶媒として有機溶媒の使用を余儀なくされる。また、チオール以外の求核攻撃や加水分解を受けやすく、副反応による感度・選択性の低下が認められる。

最近、これら欠点を克服し、赤色発光するチオールプローブが Bouffardらによって報告されたので¹⁾、ここに紹介する。現在一般的に用いられている蛍光プローブは、紫外-緑色励起で発光するものがほとんどであるが、長波長プローブは光散乱を抑え、光透過性を増し、自家蛍光を減らし、細胞の光安定性を増大させることから、バイオイメージングに最適なプローブであると言える。

チオール高選択性を兼ね備えたプローブ 1 はドナー-アクセプター型の骨格で構成されている。電子吸引性のスルホニル基はチオールと反応して脱離し、吸収・発光スペクトルで大きく長波長シフトした色素 2 を生成する(Fig.2)。

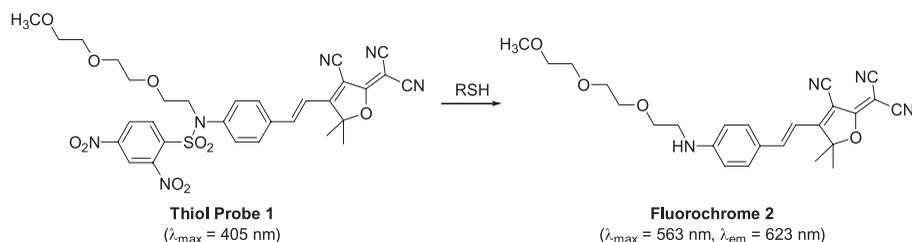


Fig. 2 Formation of Fluorochrome from Thiol Probe

電子吸引基は今までアレーンスルホナートを用いるのが主流であったが、アレーンスルホンアミドに変換したことで、酸素・窒素の求核攻撃に対して耐性が増し、同時にチオール選択性も向上している。また、エチレングリコール鎖の効果で高い水溶性も備わっている。

プローブ 1 のチオール選択性は非常に高く、系中にチオールが共存するときのみしか蛍光反応を示さない。さらに蛍光シグナルはブランクと比較して 60-120 倍強度を増すことが確認されている。またブランクの上昇は、アミン類、活性酸素種、還元剤が存在しても観測されることはない。加えて、加水分解に対する耐性も非常に高いことがわかっている。

水溶液中では、プローブ 1 は極大吸収波長 405 nm で、蛍光を発生しない($\lambda_{\text{ex}} = 560 \text{ nm}$, $\Phi_{\text{F}} = 0.0008$)。これは、スルホンアミド保護された状態では電荷移動の性質がなく、電子吸引基に効果的なドナー励起PET効果があることに起因している。脱保護により生成する色素 2 は極大吸収波長 563 nm と赤色域に長波長シフトすることから、push-pull型の発色団に効果的に非局在化が起こっていることがわかる。

色素 2 の蛍光量子収量は 0.01($\lambda_{\text{em}} = 623 \text{ nm}$)と元々はほんのわずかである。しかし、蛍光量子収量は培地に依存して変化が見られる。生体高分子存在下では、細胞表面での相互作用または吸着作用により、色素 2 の蛍光量子収量は大きく増加する。一方、プローブ 1 は発光しないままである。この培地依存性はバイオイメージングにおいて大変都合がよい。

生細胞内チオールモニタリングでは、プローブ 1 は細胞透過性を示し、蛍光顕微鏡で強い蛍光が見られる。遊離のチオールがない細胞では蛍光シグナルはまったく観測されていない。このことは、生細胞における他の検体においてもプローブ 1 のチオール選択性が保持されることを意味する。

以上のように、プローブ 1 は高いon/off比を持つチオール選択的 turn-on 蛍光プローブである。従来のチオールプローブの欠点をなくし、生体高分子の存在下でプローブとしてのより良い効果を発揮することから、今後 *in vivo*での小動物イメージングへの応用が期待される。また、この合成法を利用することで、スルホニル基、側鎖、 π -共役ブリッジ、電子受容体それぞれのコンポーネントを多様に組み合わせることが可能になる。近赤外発光チオールプローブや、その他さまざまな新規プローブの合成への応用も期待される。

参考文献

- 1) J. Bouffard, Y. Kim, T. M. Swager, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Org. Lett.*, **2008**, *10* (1), 37-40.

Topics on Chemistry

糸状菌とナノテクノロジーが融合した新規血管新生阻害剤

株式会社同仁化学研究所 平島 義紀

癌とは正常細胞が変異により異常増殖能を獲得する疾患であり、その由来が自己の細胞であることから、異生物侵入により引き起こされる感染症などに比べ薬物治療による効果を見出すことが困難である。

現在使用されている抗癌剤の多くがこの癌細胞の異常増殖性を選択性としているため、生体内で増殖の盛んな骨髄細胞・粘膜細胞などの正常細胞も障害を受け免疫低下・消化管障害などの重篤な副作用を伴うことが問題となっている。そこで、新たな作用機構を持った抗癌剤が望まれている。また、近年、癌の拡大が血管新生に依存しているという新しい概念が提唱され、この血管新生を標的とした抗癌剤の探索および開発が非常に盛んになってきている。

ここでは、血管新生とその阻害物質について概説するとともに、さらに現在最も注目されている血管新生因子である血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor:VEGF)に対する阻害物質について極めて強力な経口の血管新生阻害剤であるLodamin(ロダミン)によるモデル実験の研究結果¹⁾も合わせて紹介する。

1. 血管新生とは

通常の生理的状態では、血管新生はその促進因子と抑制因子によって高度に制御された現象である。しかし、癌(腫瘍)細胞では制御不能の血管新生が見られる。

腫瘍に誘発される血管新生は既存の血管を囲む基底膜が溶解することから始まる。本プロセスは腫瘍細胞や周辺支持組織により作られるマトリクスメタロプロテアーゼ(MMPs)により促進される。続いて血管芽細胞が崩壊した組織細胞外マトリックスを通じて腫瘍細胞へ向けて移動する。そして、細胞外マトリックスの崩壊により血管新生因子の放出が容易になりMMP活性の増加により腫瘍細胞の転移、血管新生能力が増加する。

現在、腫瘍細胞から産生され、内皮細胞に対する特異性が高く、消化器癌の進展に最も関与しているとされるのがVEGFである。種々の悪性腫瘍において、VEGFが悪性細胞から直接産生されることが報告されており、この事は癌治療の標的因子として、VEGFが利用できることを示唆している。

2. 血管新生阻害剤による癌治療

血管新生阻害剤は、その標的が血管内皮細胞であり、抗癌剤の様な腫瘍細胞による薬剤感受性の差が無く、また、耐性が獲得される可能性も少ないために固形癌の新しい治療戦略として有望である。

血管新生阻害剤は、特異的に血管新生因子を阻害するものと、非特異的に血管内皮細胞の増殖、浸潤、管腔形成を阻害するものとに大別される。前者の代表がVEGF中和抗体であり、後者の代表が日本で開発されたTNP-470を挙げる事が出来る。

TNP-470は、血管内皮細胞の培養中に混入した糸状菌(*Aspergillus fumigatus fresenius*)が内皮細胞の増殖を阻害したことから偶然発見された低分子物質フマギリン(Fig. 1)を基にして、後述のFolkmanと武田薬品工業がその毒性軽減を目的として、共同開発した合成誘導体である²⁾。TNP-470は血管内皮細胞の増殖を強く阻害するが、癌細胞に対しては、より高い濃度でないと作用しないという欠点を持っている。作用機構の詳細は

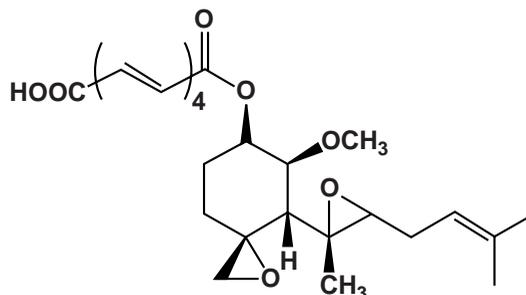


Fig. 1 Fumagillin (フマギリン)

不明だが、血管内皮細胞のCDKs(サイクリン依存性キナーゼ)活性阻害による細胞周期の停止と、メチオニンアミノペプチダーゼ阻害活性が報告されている。その血中半減期は5~10分と極めて短い。

血管新生阻害剤によって癌治療を行った場合、その作用の特徴として、多くの抗癌剤治療の場合に併発する骨髄毒性などの重篤な副作用は起こらないものと考えられる。遺伝子変化が起こりにくいとされる血管内皮細胞を標的とするため、癌細胞を標的とした今までの抗癌剤のような獲得薬剤耐性という問題は無いと考えられる。腫瘍血管は、癌の血行性転移にも関与しており、血管新生阻害は転移阻害にも有効であると考えられる。

このように、抗癌剤が癌細胞に直接的(cytotoxic)に作用するのに対して、血管新生阻害剤は、「兵糧攻め」による間接的(cytostatic)な作用であることが大きく異なっている点である。そのため血管新生阻害剤は、既存抗癌剤のように、癌を退縮・消失させることが困難である。従って、血管新生阻害剤による癌治療においては、癌の退縮を期待するのではなく、癌の増殖を抑え、休眠(dormancy)の状態に保つことを期待する治療法として特徴付けられる。血管新生阻害剤は既存抗癌剤と比べて利点が多く、既にアメリカでは数種類の血管新生阻害剤の臨床試験が開始されている。

3. Lodamin(ロダミン)~Folkmanらによる抗血管新生の新経口阻害剤~

前述のフマギリン類似化合物であるTNP-470は、“血液供給増加のための血管新生を妨げることによって腫瘍を飢えさせる”というFolkmanの血管新生阻害療法のアイディアによって開発された極めて強力な広域の血管新生阻害剤である。しかし、この薬は脳に作用し、うつやめまいなどの副作用を引き起こした。また、経口での利用能が低く半減期が短いという大きな臨床的制約があり、高頻度で連続的な非経口投与が必要となる。そこで、Folkmanらはその問題解決に取り組み、カプロスタチンの改良薬でナノテクノロジーを合わせ持った初の合成抗血管新生剤であるLodamin(ロダミン)を開発した。

まず、水に溶けにくいTNP-470をモノメトキシポリエチレングリコール-ポリ乳酸ジブロック共重合体に結合させ、この共重合体をナノポリマーミセルに自己組織化させることで、この経口製剤Lodaminを合成した(Fig. 2, Fig. 3)。なお、このポリマーはすでに商業的にも汎用されているものであり、胃酸環境でも保護

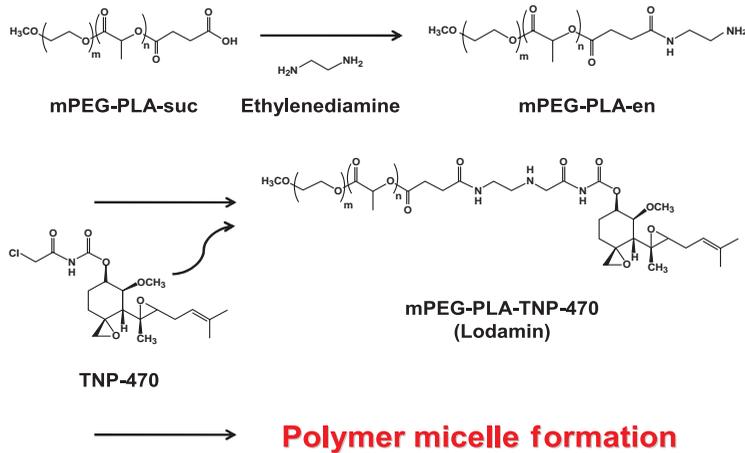


Fig. 2 Synthesis of Lodamin

されるため、経口投与可能なものである。

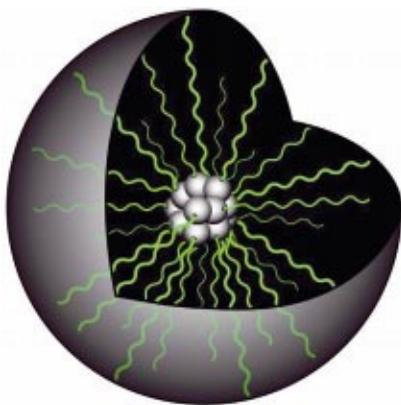
そこで、Lodaminがマウスで腫瘍の増殖を顕著に阻害することを実証するために、培養細胞および腫瘍異種移植片において蛍光色素でラベル化したナノポリマーミセルがエンドサイトーシスによって内皮細胞に取り込まれることを明らかにした。また、血管新生因子である塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF) や VEGF を含有させたペレットをマウス角膜のマイクロポケットに移植して(マイクロポケット法)³⁾、輪部血管から生じた新生血管がナノポリマーミセルを処理することによって抑制されるかどうかを検討したところ、血管新生を抑制することを認めた。

そして、遊離型の TNP-470 が血液脳関門 (blood-brain barrier) を通過するのに対して、ロダミンは脳に浸透しないことから、ロダミンは、TNP-470 の効力を保持しているものの、TNP-470 が有する神経毒性を示さないこと、ロダミンは半減期が長く、経口投与すると腸で吸収され、最初に肝臓に到達し、選択的に肝臓と腫瘍組織に蓄積して血管新生を阻害することが明らかとなった。

さらに、肝臓に高転移性のマウスメラノーマ細胞(B16/F10)を接種したところ、ロダミンは毒性なく蓄積した。また、マウスの皮下に転移したルイス肺癌細胞とマウス黒色腫細胞の増殖を顕著に阻害し、脾臓に注入したマウス黒色腫細胞の肝転移を有意に抑制して生存期間を延長したことは特筆すべき点であり、同時に、マウスでは特に癌の致命的合併症で適切な治療がない肝転移予防に有効であることを示唆している。他にも目の黄斑に異常が起きて視野の中央が暗く見える、よく見えない、線がゆがむといった症状を有する加齢黄斑変性症の異常血管成長による疾患にも有効であると考えられる。

今後は、薬剤耐性癌細胞の発生にロダミン単独で対処可能なものか、もしくは別の抗血管新生剤との併用が必要なのかを見極めるために、さらに実験を積み重ねる必要があると感じる。

このように、経口での利用能が低いという大きな臨床的制約を克服するために、不溶性の TNP-470 をナノポリマーミセルに自己組織化させ、経口投与可能な薬剤とする発想は、汎用性が高く非常に興味深い。医薬品分野のみならず、その応用性は更に広がっていき、様々な分野で利用されることが期待される。



Headline: New Oral Angiogenesis Inhibitor Offers Potential Nontoxic Therapy for a Wide Range of Cancers

Link: <http://www.sciencedaily.com/releases/2008/06/080630114209.htm>

Source: Science Daily / University of Toronto

Fig. 3 Polymer Micelle Formation of Lodamin

参考文献

- 1) O. Benny, O. Fainaru, A. Adini, F. Cassiola, L. Bazinet, I. Adini, E. Pravda, Y. Nahmias, S. Koirala, G. Corfas, R. J D'Amato and J. Folkman., "An orally delivered small-molecule formulation with antiangiogenic and anticancer activity", *Nature Biotechnology*, **2008**, 26, 799.
- 2) D. Ingber, T. Fujita, S. Kishimoto, K. Sudo, T. Kanamaru, H. Brem and J. Folkman, "Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth", *Nature*, **1990**, 348, 555.
- 3) M. Rogers, A. Birsner and R. D'Amato, "The mouse cornea micropocket angiogenesis assay", *Nature Protocols*, **2007**, 2, 2545.

新製品

微生物検出キット (比色)

Microbial Viability Assay Kit-WST

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、10月30日より発売を開始致しました。本製品は、水溶性テトラゾリウムであるWST-8 (特許2757348)を発色試薬として用いた微生物の比色検出キットです。

<特長>

- 寒天培地法や微量液体希釈法に比べ、短時間での検出が可能 (Fig. 2-5, Table 1)。
- マイクロプレートを使った多検体処理が可能。
- 培地成分による影響を受けにくい (Fig. 6)。

<キット内容> 500 tests/ 1 kit (96 well プレート5枚分)

- WST solution 1 ml × 5 tubes
- Electron mediator reagent 0.5 ml × 1 tube

<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
- 1.5ml チューブ
- インキュベーター

<原理>

微生物はエネルギー代謝活動により細胞内に NAD(P)H を生成します。

WST-8は電子メディエーターを介する事で、このNAD(P)Hにより還元され、水溶性formazan(オレンジ色)を生成します (Fig. 1)。formazanの生成量は微生物のエネルギー代謝活性に比例するため、オレンジ色への呈色を見ることで、その微生物の生存率や活性度合を確認できます。

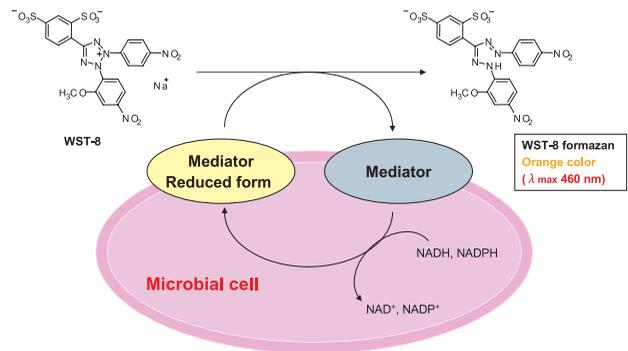


Fig.1 発色原理

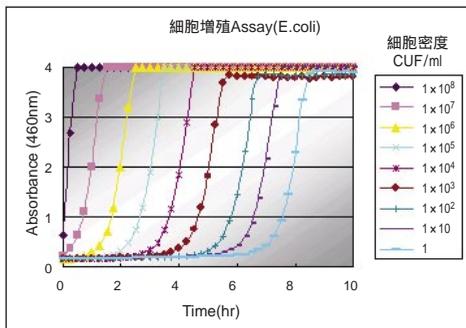


Fig.2 E.coliの発色曲線

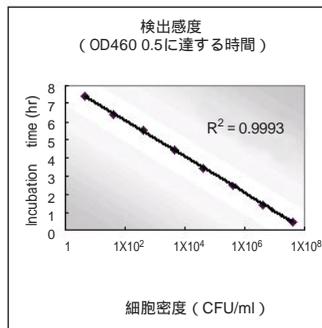


Fig.3 E.coliの菌体密度と発色時間

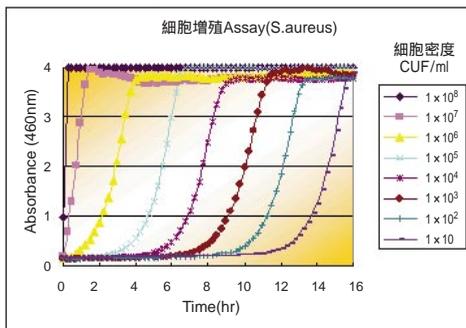


Fig.4 S.aureusの発色曲線

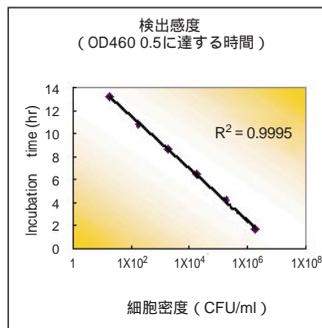


Fig.5 S.aureusの菌体密度と発色時間

<微生物増殖試験>

細菌 (E.coli, S.aureus) 懸濁培地を 10 倍希釈系列で 96 well マイクロプレートに播種した。各wellに発色試薬を添加し、37°Cでインキュベーターしながら一定時間ごとの吸光度 (460 nm) をマイクロプレートリーダーにて測定した (Fig. 2, 4)。それぞれの菌体密度において OD₄₆₀ が 0.5 に達した時間を求めると、菌体密度と OD₄₆₀=0.5 到達時間との間に高い直線関係が得られた (Fig. 3, 5)。

< 薬剤感受性試験 >

各細菌を抗生物質を含む 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。各薬剤濃度において、発色が確認されなかった濃度を同キットにおける Minimum Inhibitory Concentration(MIC)とした。Microdilution method (日本化学療法学会標準法) では22時間のインキュベーション後に目視で MIC を求めるが、本キットを用いた場合、8時間で Microdilution method と同等の MIC(μg/ml)を得ることができた。

Table 1 Microbial Viability Assay Kit-WST と Microdilution method での MIC 値の比較

抗生物質	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	
	Microbial Viability Assay Kit-WST	Microdilution method	Microbial Viability Assay Kit-WST	Microdilution method
Ampicillin	2	2-4	0.125	0.125-0.25
Cefotaxime	0.062-0.125	0.031-0.125	4	4
Chloramphenicol	8	16	8	8
Gentamicin	0.5-1	1	0.031	0.031-0.062
Ciprofloxacin	0.062	0.031-0.062	1	0.25

薬剤感受性試験の手順

- 1) 微生物を最適な培地で培養する。
- 2) 培養した菌懸濁液を滅菌生理食塩水で OD₅₅₀ が約 0.125 (0.5 McFarland 相当) となるように希釈し、さらに滅菌生理食塩水で 10 倍希釈し接種用菌液とする (約 10⁷ CFU/ml)。
- 3) 抗生物質などの被検物質を Ca 及び Mg イオン濃度調整済み Muller-Hinton broth を用いて 2 倍希釈系列に調製する。(例えば、64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.12, 0.06 μg/ml)。
- 4) 96well プレートへ抗生物質含有 Muller-Hinton broth 180 μl/well を分注する。
- 5) 各 well へ接種用菌液 10 μl を分注する (約 10⁴ CFU/well)。
- 6) 微生物に適した温度で 6 時間インキュベーションする。
- 7) WST solution と Electron mediator reagent を 9 : 1 で混合し、検出試薬とする。
- 8) 6 時間 インキュベーションしたマイクロプレートに、手順 7) で作成した検出試薬を 10 μl/well 添加し、更に、2 時間インキュベーションする。
- 9) マイクロプレートリーダーにて 450 ~ 490 nm の吸光度を測定する。

* グラム陽性菌や真菌を検体とされる場合は、Electron mediator reagent を滅菌水もしくは DMSO にて 8 倍希釈したもので、検出試薬の調製を行って下さい。

* 必ずブランクを測定して下さい (菌を含まない抗生物質含有培地)。

< 培地成分の影響を受けにくい >

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。よって、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 で採用している WST-8 は、培地成分による還元を殆ど受けませんので、より比色検出に適したテトラゾリウム化合物です。

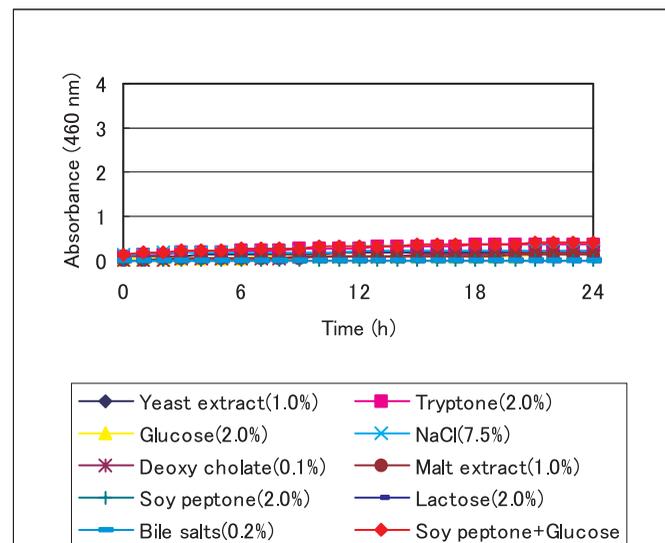


Fig. 6 培地成分によるバックグラウンドへの影響

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

測定波長 WST-8 formazan 460 nm

品名	容量	価格(¥)	メーカーコード
Microbial Viability Assay Kit-WST	500 tests	20,000	M439

試作品

微生物検出キット（蛍光）

-Bacstain- CTC Rapid Staining Kit for Flow cytometry, for Microscopy

細菌検出用の蛍光試薬として、EB, DAPI, SYBR Green などのような生・死全菌染色剤、Invitrogen 社の LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (以下、BacLight) に代表されるような、生・死二重染色キットが汎用されています¹⁻³。BacLight は細胞膜透過性の異なる2つの核染色試薬 (SYTO 9 及び PI) により同時染色することで、生細胞 (膜損傷なし) 及び死細胞 (膜損傷あり) を見分けます。このように膜損傷の有・無で細菌の生・死判定を行います。

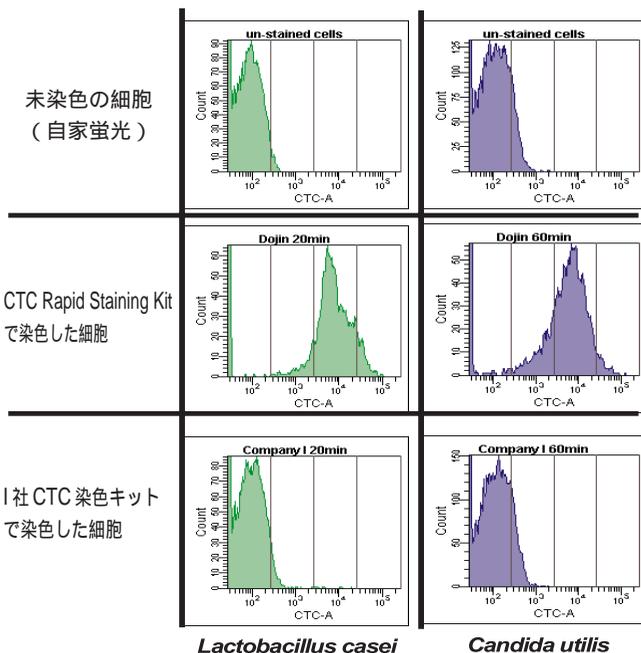
一方、CTC は呼吸活性による電子伝達系により還元され、蛍光性の formazan を生成するという特性をもちます。この菌の代謝に応じ蛍光を発する点で注目され、生菌に選択的な蛍光試薬として汎用されてきましたが、染色性が悪いという問題を抱えておりました。

この度、小社で開発しました -Bacstain- CTC Rapid Staining Kit は、CTC 染色時に enhancer を加えることで、CTC での染色をより迅速・高感度にできるキットです。CTC 単独では染色されなかった乳酸菌や真菌においても、同キットにて染色されることが確認できました。

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



《特長》

- スピーディーで高感度な生菌の 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。

《キット内容》 各 100 assay 用

for Flow cytometry と for Microscopy 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) 0.1 ml

for Microscopy

- CTC 10 mg × 3 tubes
- enhancing reagent B (aqueous solution) 0.5 ml

《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)

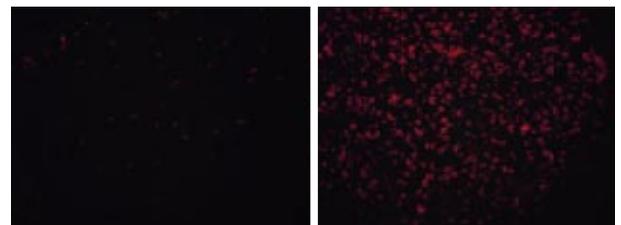
Microscopy

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。

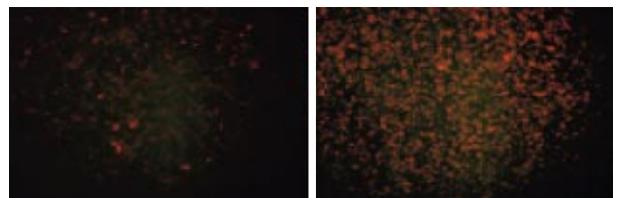
Staphyrococcus aureus subsp. Aureus (× 400)

CTC だけの染色 CTC + enhancing reagent B での染色



Klebsiella pneumoniae (× 400)

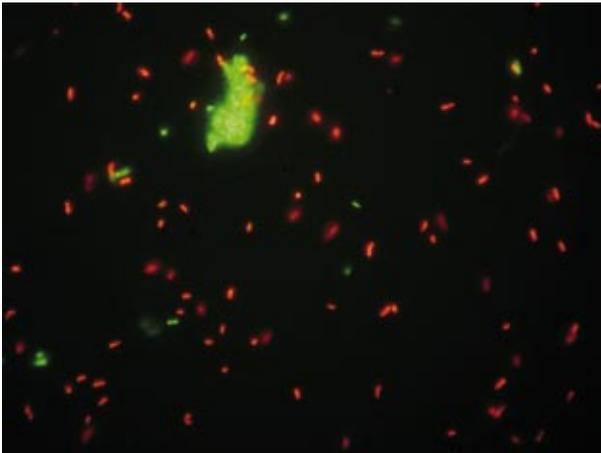
CTC だけの染色 CTC + enhancing reagent B での染色



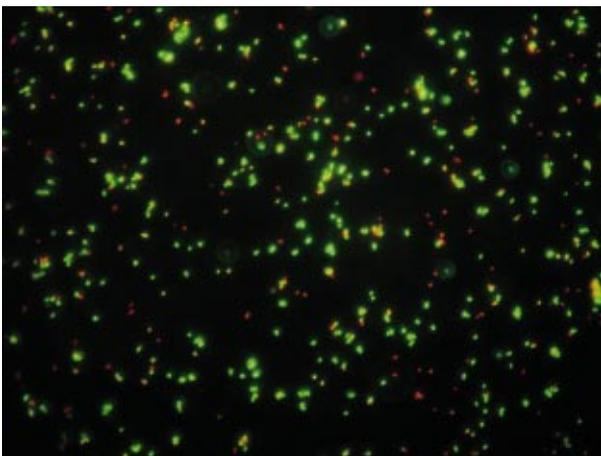
福岡県工業技術センター生物食品研究所のご指導、ご協力のもと染色実験を行いました。

関連製品

<染色例>
CTCによる菌の染色例を下記に示します。
対比染色として、SYBR® Green Iを用いております。



50%live *B.cereus* CTC-SYBR® Green I B 励起(400倍)



Staphyrococcus aureus CTC-SYBR® Green I B 励起(400倍)

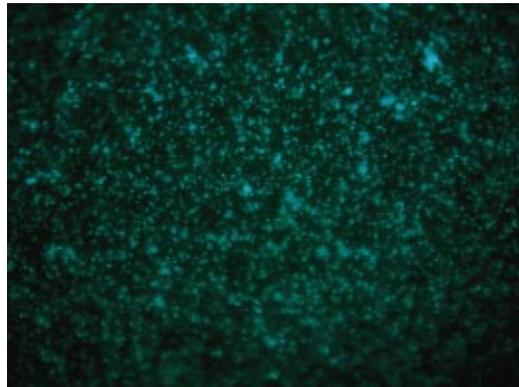
関連製品

その他、核染色剤として使用される製品をご紹介します。

-Cellstain- DAPI

-Cellstain- DAPI solution

DAPIは蛍光顕微鏡下、酵母のミトコンドリア、葉緑素、ウイルス、マイコプラズマ、染色体中のDNA 検出に使用されている。460 nmに青色の蛍光を持ち(励起波長360 nm)、DNAのAT配列に特異的な minor groove binderである。



S.aureus DAPI(終濃度 1µg/ml)UG 励起、4%ホルマリン固定

-Cellstain- PI

-Cellstain- PI solution

Propidium iodide (PI) はDNAの二重らせん構造に intercalate することにより特有の赤色蛍光が増強される核酸染色色素である。一部は二本鎖構造のRNAとも結合するため、正確なDNA染色を行うには、二本鎖構造のRNAの除去が必要である。一般に生細胞の細胞膜は透過せず、死細胞にのみ入り込み核内のDNAに intercalate し赤色蛍光を発する。したがって死細胞染色色素として利用され、フローサイトメトリーへの応用例も数多い。

-Cellstain- EB

-Cellstain- EB solution

PIと同じく phenanthridium 系染料に分類されるカチオン性の蛍光色素である。DNAの二重らせん構造に intercalate することにより特有の赤色蛍光が増強される核酸染色色素である。

参考文献

- 1) 染谷 孝, “ 蛍光染色による土壌微生物の検出法 ”, 月刊 海洋 培養不能細菌 -VNC 研究の現状と課題 -, 2003, 33, 14 .
- 2) 平石 明, 吉田 奈央子, “ 活性汚泥における培養不能な細菌の検出 ”, 月刊 海洋 培養不能細菌 -VNC 研究の現状と課題 -, 2003, 33, 48 .
- 3) M. Kawai , N. Yamaguchi and M. Nasu, *J. Appl. Microbio .*, 1999 , 86 , 496 .

品名	容量	価格(¥)	コード	メーカーコード
-Cellstain- DAPI	1 mg	3,800	342-07431	D212
-Cellstain- DAPI solution	1 ml	4,800	340-07971	D523
-Cellstain- PI	1 mg	3,800	343-07461	P346
-Cellstain- PI solution	1 ml	4,800	341-07881	P378
-Cellstain- EB	1 mg	3,800	346-07451	E262
-Cellstain- EB solution	1 ml	4,800	348-07891	E272

19th フォーラム・イン・ドージン開催報告

細胞膜脂質のダイナミクス

19回目を迎える今年のフォーラム・イン・ドージンが「細胞膜脂質のダイナミクス」と題して、さる11月28日、熊本市の鶴屋ホールで開催された。この時期、市内は黄色く色づいた街路樹の銀杏が美しい。当日は前日までの雨もあがり、爽やかな初冬の日、会場では熱気に溢れた討論が行われた。参加者は延140人程度とほぼ例年並だったが、東京などの遠方からの参加者もあり、徐々にこのフォーラムの存在も知られるようになってきたのではないと思う。今年から小社の三浦 洵顧問（熊本大学名誉教授）も世話人として参加し、さらに充実した内容になった。

脂質はいうまでもなく細胞膜を形づくる基本分子だが、核酸やタンパク質、あるいは糖鎖が担う高度な機能や情報と比べて、何となく魅力に欠ける気がしていた。しかし、生命を司る反応の多くは、われわれが親しんでいる均一な溶液中で起こる化学反応とは異なり、高度に組織化された場のうえで起こる全く別の世界である。生体膜はまさにそのような反応場であり、それを構成する脂質の働きを理解することは、生命現象の深い理解に欠かせないものだ。今回のフォーラムでは、脂質がもつ多彩な機能について最新の研究成果が紹介され、非常に魅力的な研究分野であることを再認識させられた。生命は一個の細胞に宿っており、その生命を包み込む細胞膜は単なる包装紙ではなく、生命活動の場そのものである。

講演内容は、「1分子で見る、細胞膜がはたらく仕組み」と題して、梶見先生（京大再生研）がラフトでのシグナルの授受を1分子イメージングによって「見る」研究を紹介された。理研の小林先生は、細胞膜の動態を脂質蛍光プローブを用いて可視化する試み、国立感染症研究所の花田先生が、脂質セラミドの小胞体からゴルジ体膜への選択的な輸送について話された。

午後のセッションでは、応用に主眼をおいた4件の講演が行われた。熊本大（薬）の佐藤先生は生体内で発生する脂質ラジカルを、スピントラップ剤と有機溶媒への抽出とを組み合わせ、ESRで測定する手法を紹介された。続いて、野口先生（同志社大生命医科学部）は脂質酸化生成物やshear stressに対する遺伝子発現応答について、また東城先生（大阪大医）が脂質代謝と病態について、最後に有馬先生（熊本大薬）がシクロデキストリンのラフトへの作用について講演された。いずれも、フロアからの質問は同じ分野の専門的なものが多く、真剣な議論が交わされた。



来年はこのフォーラムも20周年を迎える。小社が現在の場所に移転したのをきっかけに、ヨチヨチ歩きから始めたこのフォーラムも、ようやく成人になるのを記念して、何か特別な企画を検討したいと考えている。

これからもよりいっそう充実した内容のフォーラムを目指していきたいと思っておりますので、ご意見、アドバイスなどお寄せいただければ幸いです。また、講演予稿集をご希望の方は、小社カスタマーサービス部（info@dojindo.co.jp / free dial: 0120-489-548）までご連絡下さい（佐々本 一美）。



ホームページアドレス

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

E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス 0120-021557

フリーダイヤル 0120-489548