

CONTENTS

●Review

アルツハイマー病アミロイド β ペプチド(A β)に結合する人工分子の構築とA β 集合体形成の制御
高橋 剛・三原 久和

漢方診断・再発見
2. 漢方医学の構造
加島 雅之

●Topics on Chemistry

薬の蛍光標識による可視化
岩本 正史

Through-bond energy transfer を利用した
レシオメトリック pH 蛍光プローブ
野口 克也

2009 No.131

ISSN 0385-1516


DOJIN NEWS
ドージンニュース

目次

Review

- アルツハイマー病アミロイドβペプチド(Aβ)に結合する人工分子の構築とAβ集合体形成の制御
 東京工業大学大学院生命理工学研究科 高橋 剛
 三原 久和..... 1

漢方診断・再発見

- 2 漢方医学の構造
 熊本赤十字病院 総合内科
 熊本大学大学院医学教育部 加島 雅之..... 7

Topics on Chemistry

- 薬の蛍光標識による可視化
 株式会社同仁化学研究所 岩本 正史..... 10
 Through-bond energy transfer を利用したレシオメトリック pH 蛍光プローブ
 株式会社同仁化学研究所 野口 克也..... 11

Column

- 最近のレジオネラ感染報告と浴槽の衛生管理..... 9
 株式会社同仁化学研究所 池上 天

Commercial

- 新製品
 アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性測定キット ... 12
 長鎖アルキルチオール類 13
 細菌蛍光染色試薬 14
 改良品
 グルコース-6-リン酸脱水素酵素活性測定キット 6
 開発中
 ビオチンSAM作製用試薬 13
 お知らせ
 フォーラム・イン・ドージン開催のお知らせ 8

新製品案内

容量・価格詳細は各ページをご覧ください。

- グルコース-6-リン酸脱水素酵素活性測定キット
 アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性測定キット
 長鎖アルキルチオール類
 細菌蛍光染色試薬



小国町の鍋ヶ滝(熊本県)
 高さ10 m、幅20 mの優雅な雰囲気のある滝で、滝の裏側を通る事も出来ます。

写真提供：吉田道夫氏(熊本市)

アルツハイマー病アミロイドβペプチド (Aβ) に結合する人工分子の構築とAβ集合体形成の制御 Design of artificial molecules that bind to amyloid β peptide (Aβ) and control of Aβ aggregation



東京工業大学大学院生命理工学研究科
高橋 剛



東京工業大学大学院生命理工学研究科
三原久和

Protein misfolding is closely related to the neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD) and Huntington's disease. In AD, amyloid β-peptide (Aβ) is a principal component of the cerebral plaques found in the brains of patients. In vitro studies revealed that Aβ is capable of self-assembling into amyloid fibrils via several oligomeric states. In recent advances, soluble oligomeric species of Aβ are more toxic to neuronal cells than monomeric form and mature fibrils of Aβ. In this review, we describes the construction of molecules capable of interacting with Aβ to control the aggregation of Aβ. In vitro selection using an RNA pool against Aβ was performed to construct RNA aptamers against Aβ. Selected RNA aptamers bound to Aβ1-40 and inhibited the aggregation of Aβ1-40. We also designed the peptides, based on the sequence of Aβ14-23, capable of forming amyloid-like fibrils by capturing soluble Aβ oligomers. Moreover, designed protein variants, based on the β-barrel proteins such as green fluorescent protein (GFP) and insulin-like growth factor 2 receptor domain 11 (IGF2R-d11), comprising pseudo-Aβ β-sheet structures, inhibited the Aβ aggregation efficiently. These studies contribute to understanding how protein misfolds and designing the therapeutic reagents against AD.

キーワード：タンパク質ミスフォールディング、アルツハイマー病、アミロイド線維、アミロイド ペプチド、RNAアプタマー、設計ペプチド・タンパク質

1. はじめに

超高齢化社会となりつつある現在の日本において、アルツハイマー病などの認知症に関わる病気の克服は、最も重要な課題の一つである。アルツハイマー病の特徴として、患者の10%を占める遺伝性の家族性アルツハイマー病に対して残りの90%は孤発性（非遺伝性）であり、誰もが発症しうる病気であるため、その患者数は社会が高齢化するに従い右肩上がりが増えていくと予想される¹⁾。孤発性アルツハイマー病の多くは、高齢になってから発症することから、その加齢と病気の関わりが指摘されている。アルツハイマー病患者の症例の特徴として、アミロイドβペプチド (Aβ) が繊維状に凝集したアミロイド線維の沈着による老人斑の形成とTauタンパク質の異常リン酸化による神経原線維変化が知られている²⁾。中でもAβの沈着は、タンパク質のミスフォールディングと密接に関連しており、病気と関連した研究のみならず、ペプチド・タンパク質の一般的性質の理解の観点からも興味深い研究対象であり、現在世界中の多くの研究者がAβ関連の研究を推し進めている。これまでの研究から、Aβの集合体、中でも可溶性オリゴマー集合体が高い細胞毒性を示すことが培養細胞を用いた実験から明らかとなってきた^{3,4)}。またマウスを使った実験でもAβオリゴマーがシナプス可塑性の長期増強を低下させることも示されている⁵⁾。しかしながら、生体内においてどのようにAβオリゴマーやアミロイド線維が生成するのか、それがどのように神経細胞の機能を破壊しているのかは未解明の課題として残っているのが現状である。

一方、タンパク質のアミロイド線維形成は、アルツハイマー病のみならずパーキンソン病やハンチントン病などの多くの神経変性疾患の発症に関与している⁶⁾。通常のタンパク質は、構造が崩れたり、フォールディングに失敗した場合、速やかに細胞がもっている品質管理システムにより分解・除去される。ところが、何らかの因子の作用やタンパク質の品質管理システムが機能せず、その結果ミスフォールディングしたタンパク質が凝集し、最終的に不溶性のアミロイド線維へと集合化・構造変換する場合がある。タンパク質のミスフォールディングと疾患との関連について明らかにすることは、多くの神経変性疾患の克服に繋がる可能性を秘めている。筆者らはこれまで、アルツハイマー病Aβのミスフォールディングと凝集体形成に着目し、試験管内においてAβの集合化を制御することができる人工分子の開発を精力的に進めてきている⁷⁻¹²⁾。ここでは、そのいくつかについて簡単に紹介させていただく。

2. Aβ の構造と集合化

まずAβの性質について簡単に述べる。Aβは膜貫通タンパク質であるアミロイド前駆タンパク質から切り出されて生成する約40個のアミノ酸残基からなるペプチドである (Fig. 1A)。生成したAβは通常速やかに代謝経路に従い除去されると考えられている。試験内実験からAβは数十から数百μMでインキュベートすると時間とともに集合化し、最終的にアミロイド線維と呼ばれる安定な繊維状集合体を形成する (Fig. 1B)。特に加齢とともに生成

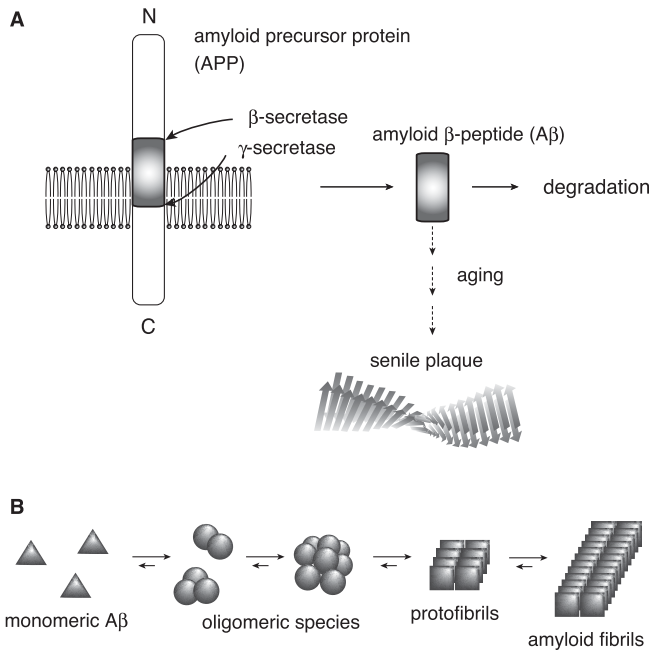


Fig. 1 (A) Schematic representation of the generation of Aβ. Aβ is the main component of senile plaques in patients with Alzheimer's disease. (B) Schematic illustration of Aβ aggregation into amyloid fibrils.

量が増大する42残基からなるAβ1-42は凝集性が高く、nMレベルの低濃度でも会合することが明らかとなっており、通常生成するAβ1-40とAβ1-42の存在比の変化もアルツハイマー病発症に関与していることが示唆されている¹³⁾。

このAβの集合化・凝集体形成における構造的性質として、単量体のAβはランダムコイル構造であり、集合化に伴いβシートの構造形成が誘起される。またNMR測定からアミロイド線維の構造が推定されており、ペプチド鎖が中央付近で折れ曲がった構造をとり、それが平行βシート構造を形成して連なった構造がモデルとして提唱されている^{14,15)}。このAβなどのアミロイド性ペプチド・タンパク質の性質として、自己の配列を認識して集合化する点がある。すなわち、Aβの集合化を阻害する分子デザインとしてAβと似た配列をもつ分子の構築が有効となる。このような設計指針で様々なペプチドが合成され、そのいくつかは効果的にAβの集合化を抑制し、現在臨床応用へ向けた研究が展開されてきている。

3. A に結合するRNAアプタマーの選択とA 集合化阻害

1990年代初頭から盛んに研究されてきているRNAやDNAを用いた試験管内分子進化法は、特定の化合物に結合する分子を獲得する有力なツールとしてファージディスプレイ法と並び発展してきている。RNAはDNAと比較して多様な高次構造を形成しやすいため、より特定の化合物に結合する分子を選別しやすい利点を有している。この方法によりプリオンタンパク質に結合するRNAアプタマーも獲得されている。そこで筆者らはRNAを用いた試験管内分子進化法を適用し、Aβに結合するRNAアプタマーの獲得を試みた⁷⁾ (Fig. 2)。

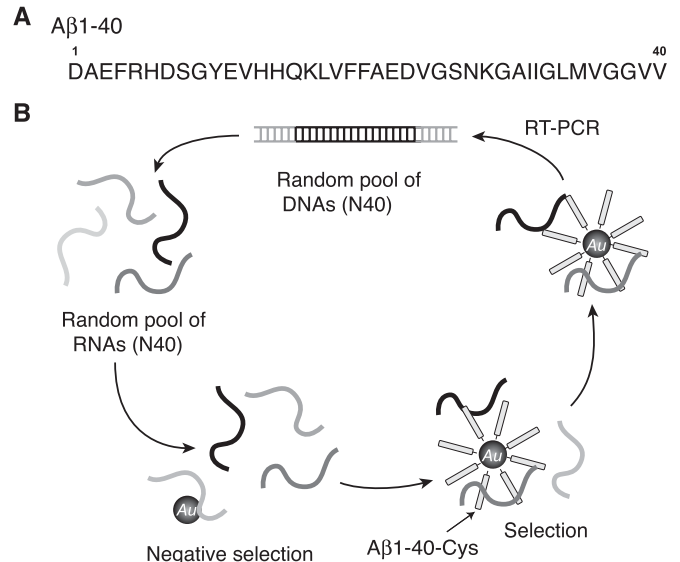


Fig. 2 Schematic illustration of in vitro selection of RNA aptamers that bind to the Aβ1-40 conjugated with the colloidal gold.⁷⁾

まず、40残基からなるAβ1-40を標的化合物として、その配列のC末端にシステインを配置したペプチドを調製した。このペプチドを市販の金コロイド粒子（直径10 nm）にチオールと金との相互作用により集積したAβ結合金ナノ粒子を合成し、これを標的として選別操作を試みた。RNAは、40塩基のランダム領域を含むライブラリを調製し、それをAβ結合金ナノ粒子と相互作用させ、遠心分離によりAβに結合するRNAを選別した。このサイクルを繰り返すことにより、Aβにより強く結合するRNAを獲得した。得られたRNAのいくつかを単離し、Aβ結合金ナノ粒子との結合能を評価した結果、2つのRNA (E2, N2) が強くAβと結合することが分かった。蛍光標識したRNAを調製し、蛍光異方性測定からE2およびN2 RNAとAβ1-40との解離定数を算出したところ、それぞれ10.9 μMと21.6 μMと算出され、本手法で獲得したRNAがある程度の結合力でAβと相互作用することが示された (Fig. 3A)。

次に獲得したRNAを用いてAβ1-40のアミロイド線維形成の阻害能について評価した。RNA (25 μM) 存在下にてAβ1-40 (100 μM) をインキュベートしたところ、Aβの凝集体形成を顕著に阻害することが分かった (Fig. 3B)。N2 RNAよりもE2 RNAがより強くAβの線維形成を阻害したことから、RNAとAβの結合親和性がAβの集合化阻害に寄与していることが強く示唆された (Fig. 3C)。しかしながら、より強い集合化能・線維形成能をもつAβ1-42を用いた場合は、今回獲得したRNAによる集合化阻害はみられなかった。Aβ1-42は、Aβ1-40と比較してより低濃度で集合化することが知られている。今回獲得したRNAはAβに対して解離定数として10 - 20 μM程度の親和性しかもたなかったために、Aβ1-42の集合化を阻害できなかったものと推察される。

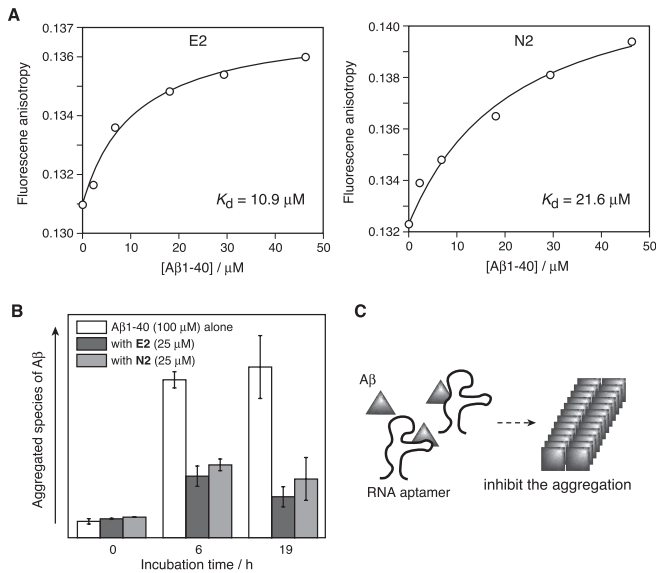


Fig. 3 (A) Fluorescent anisotropy changes of fluorescein-labeled E2 (left) and N2 (right) as a function of Aβ1-40 concentrations. Dissociation constants (K_d) are estimated by using an equation with assumption of 1 : 1 stoichiometry. (B) Inhibition of Aβ1-40 aggregation by E2 and N2 RNA aptamers. Aβ1-40 (100 μM) was incubated with or without RNA aptamer (25 μM) at 37 °C for several hours, and the aggregation of Aβ was detected by an ELISA assay. (C) Schematic representation of the inhibition of Aβ aggregation by RNA aptamers.⁷

今後はより強く結合するRNA分子を獲得することで、凝集能が高いAβ1-42の集合化やアミロイド線維形成を阻害するRNAを創製できると期待される。

4. 設計ペプチドによるAオリゴマーの取り込みと線維形成による毒性制御

上記のRNAを用いた系では、Aβとの結合力はそれほど強くなり、集合化能の高いAβ1-42の集合化を阻害することはできなかった。Aβの集合化は自己認識により引き起こされるが、ひとたびできたAβの凝集体やアミロイド線維が鋳型として機能し、集合化していない単量体のAβや小さいオリゴマーの集合化を促す核依存性を示すことが知られている。そのため、Aβの集合体形成を阻害する分子を構築するためには、ある程度の強さをもって阻害しないと、阻害できずに生成した少量の線維が核として働いてしまう。一方、Aβによる神経細胞毒性は、アミロイド線維よりもAβ分子が数個から数十個集合化した可溶性オリゴマーが高い毒性を示すことが近年の研究から分かってきており、現在ではこの可溶性オリゴマーがアルツハイマー病発症における毒性の本体の一つであると考えられてきている。そこで筆者らは、このAβの可溶性オリゴマーやアミロイド線維に結合して、共線維形成するような人工ペプチドを構築した。これにより、細胞毒性を示す可溶性オリゴマーやアミロイド線維をペプチドが形成する線維の内部に取り込み、結果として生じたアミロイド線維がAβよりも低毒性を示すことを期待した⁸⁻¹⁰⁾ (Fig. 4A)。

ペプチドの設計として、Aβの線維形成に重要な領域である中央付近の14残基目から23残基目までの配列 (Aβ14-23; HQKLVFFAED) を参考にし、その配列を単純化したAc-KQKLLXFLLEE-NH2配列を設計した。この配列のXの位置に種々のアミノ酸 (Leu, Val, Ala, Thr, Phe, Tyr) を導入し (LF, VF, AF, TF, FF, YF) 疎水性度による線維形成能が異なることを期待し

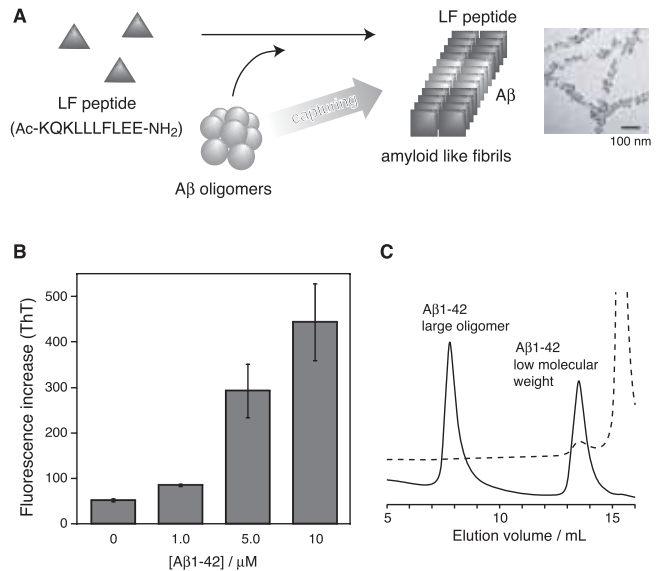


Fig. 4 (A) Schematic representation of capturing Aβ1-42 oligomers using the designed peptide, LF. Transmission electron microscopy measurements revealed that Aβ species detected by immuno-staining with gold nanoparticles appeared with the peptide amyloid-like fibrils. (B) Fluorescence increase of thioflavin T (ThT) before and after 8 hours incubation of the LF peptide (100 μM) with and without matured Aβ1-42 fibrils (0, 1, 5, 10 μM / monomer). Incubation was carried out at 37 °C. (C) Size-exclusion chromatography (SEC) analysis of the supernatants after centrifugation before (solid line) and after 2 hours of incubation with LF (dashed line) on a Superdex 75 column.^{8,9}

た。これら人工ペプチドが、鋳型となるAβアミロイド線維と相互作用してβシート構造が誘起され、それが逆平行βシート構造を形成して集合化することでアミロイド線維を形成することを期待した。

まずペプチド単独での線維形成能をチオフラビンT (ThT) アッセイおよび透過型電子顕微鏡観察 (TEM) により評価した。ThTはアミロイドに結合して蛍光強度が増大する色素である。線維形成を促進するtrifluoroethanol (TFE) 存在下において、LF, FFが顕著にアミロイド線維を形成することが分かった。VFペプチドはThT蛍光は低いもののTEM観察ではアミロイド線維を確認した。これに対し、AF, TF, YFはアミロイド線維を形成しないことが示された。このように単純なアミノ酸配列で設計したペプチドの疎水性度を変えることでペプチド自体の集合化能・線維形成能を劇的に変化させることができた。そこで線維形成能に優れたLFペプチドを使って、Aβの可能性オリゴマー共存下における人工ペプチドの線維形成について検討した。

LFペプチドとあらかじめ調製したAβオリゴマーを含む溶液を混合し、8時間インキュベートしてThTアッセイを行ったところ、Aβ濃度依存的にThT蛍光が増大した (Fig. 4B)。このことからLFペプチドがAβオリゴマーを鋳型として線維形成していることが確認された。次に、核として利用したAβオリゴマーがLFペプチド線維の中に定量的に取り込まれていることを確認するために、インキュベートした溶液を遠心分離し、その上清をサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析した (Fig. 3C)。その結果、Aβオリゴマー由来の溶出体積8 mL付近のピークは完全に消失していることが分かった。これに対し単量体と推察される溶出体積13.5 mL付近のピークは残存していたことから、オリゴマー体がより効率的に人工ペプチドと相互作用して、線維に取り込まれていることが推察された。Aβ抗体と金コロイド粒子を使った実験で

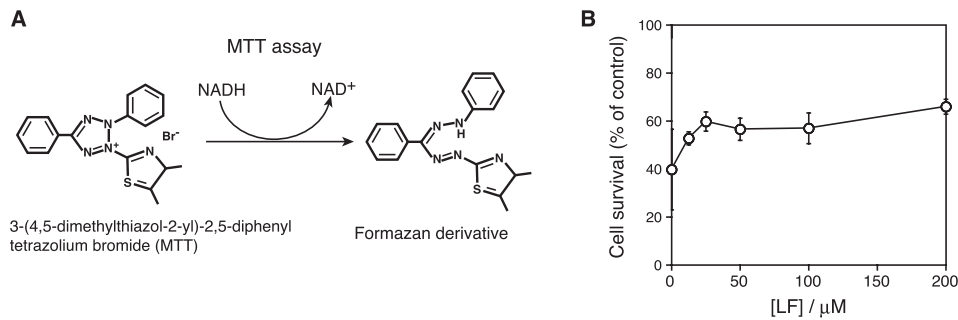


Fig. 5 (A) Schematic representation of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay to assess the live cells. (B) MTT assay of the PC12 cells in the presence of toxic A β 1-42 oligomers (5.0 μ M / monomer) with or without LF peptide. Cells (2×10^4 / wells) were incubated with peptides at 37 C for 6 hours.¹⁰

実際に線維の中にA β オリゴマーが取り込まれているか確認したところ、先ほどのA β アミロイド線維を使ったときと同様にA β 分子が線維の中に取り込まれていることが確認できた。このようにLFペプチドは、A β オリゴマーを鋳型として迅速にアミロイド様線維へと集合化し、その中にA β 分子を定量的にトラップできることが明らかとなった。また詳細は省略するが、LFペプチドは、A β アミロイド線維を鋳型とした場合でも、その線維を鋳型として取り込みながらアミロイド様線維を形成することができる。このように、A β の可溶性オリゴマーやアミロイド線維を鋳型として用いることで、鋳型表面を認識場として疎水的かつ電荷の相互作用により人工ペプチドが結合し、その結果人工ペプチドの線維形成が誘発されていると推察される。

このように構築したLFペプチドは、効率的に細胞毒性が高いA β オリゴマーを取り込むことが分かった。そこで、モデル培養細胞としてPC12細胞を用い、LFペプチドがA β オリゴマーの細胞毒性を抑制できるかについて検討した。細胞の生死判定法である3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)法により評価したところ、A β オリゴマーに対してLFを過剰に加えることでA β の細胞毒性を抑制できることが分かった (Fig. 5)。現在、細胞毒性をより効率よく低減できるLFペプチドの変異体も既に獲得している。まだまだ改良が必要であるが、本手法により構築した人工ペプチドがA β オリゴマーを捕まえて共線維形成することで、その線維を増幅させかつ細胞毒性を抑制できることが示されたことから、将来的な臨床・診断検査応用への展開が強く期待される。

5.A 様 シート構造を提示した パレル型タンパク質の設計とA 集合化阻害

A β の毒性を低下・中和する分子として、現在注目されているものの一つに抗体が挙げられる。抗体は特定の抗原分子に結合し、生体内での異物による毒性を中和する機能を担っている。数年前にアルツハイマー病治療法の一つとしてA β をワクチンとして抗A β 抗体を体内で産生させる試みがなされ、痴呆の進行を遅らせる効果があることが報告された。A β を直接ワクチンとして皮下注射する初期の方法は副作用のため現在中止されているが、この方法が示していることは、A β に強く結合する抗体は、その毒性を低下させ、ひいてはアルツハイマー病の進行を遅らせることができることである。また他にも抗A β 抗体がA β の神経細胞毒性を低下させることができると報告されている。筆者らは先に紹介し

たA β と相互作用する人工ペプチドの設計手法を拡張し、 β パレル型タンパク質表面を認識場として用いる手法の開発を試みてきている。具体的には、A β の β シート構造モデルを参照し、その β シート部分の配列を β パレル型タンパク質の β シート部位にアミノ酸置換により挿入した人工タンパク質を設計した。この設計タンパク質がA β 分子とA β の代わりに抗体様に強く相互作用し、A β 自身の集合化・アミロイド線維形成を阻害することができると期待した。

最初に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を土台とした分子設計を試みた^{8,11)}。GFPは β パレル構造をもち、パレル構造にフォールドすることで自発的に発色団を形成する反応が進行し、結果強い蛍光を発する。このGFP構造は比較的安定で、その表面には平行型および逆平行型 β シート構造を有している。挿入するA β 配列として、先に紹介したLFペプチドの設計において参照したA β 配列の14-23残基の部分を用いた。全長のA β は平行 β シート構造を形成して線維形成することは先に述べたが、14-23残基目の配列は、単独では逆平行 β シート構造を形成してアミロイド線維を形成することが知られている。両構造ともA β の中央付近の疎水性領域のアミノ酸側鎖間の相互作用がA β のアミロイド線維形成に大きく寄与している。筆者らはA β の平行および逆平行 β シートとのモデル構造を参考にし、GFP表面のアミノ酸残基をA β 由来のアミノ酸残基に置換して、GFP表面にA β 様 β シート構造を提示した人工タンパク質を設計した (Fig. 6A)。GFPの β ストランド と の平行 β シート構造部位を利用して、A β 14-23配列のアミノ酸を挿入したP13Hタンパク質を設計した。この際にGFP構造に与える影響を最小限にするために、パレル構造の内側のアミノ酸残基はそのままにした。またGFPの β ストランド と の逆平行 β シート部分にA β 配列を挿入したAP13Qを設計した。

まず設計したタンパク質P13H, AP13Qの蛍光特性について評価した (Fig. 6B)。GFPのスペクトルと比較してP13Hの蛍光強度が幾分小さいが、最大励起波長・蛍光波長がGFPとほぼ同じことから、設計したP13H, AP13Q共にGFPと同様の構造特性を保持していることが示唆された。次にこの人工タンパク質を用いてA β の集合化阻害実験を試みた。ここでは、A β 認識抗体 6E10とピオチン標識した6E10 (bio-6E10) 用いたELISAアッセイによりA β オリゴマーを定量することで各人工タンパク質の阻害能を評価した。人工タンパク質存在下でA β をインキュベートしたところ、インキュベートにより生成するA β オリゴマーの量が低

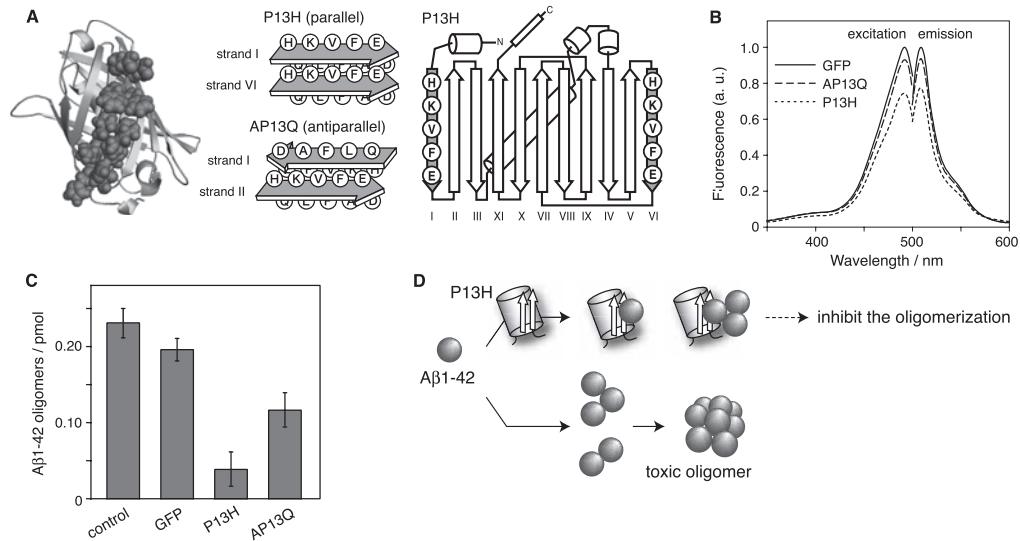


Fig. 6 (A) Schematic illustration of design of the GFP variants in which pseudo-Aβ β-sheets are embedded. Designed protein, P13H and AP13Q mimic the parallel and antiparallel β-sheet models, respectively, of Aβ amyloid fibrils. (B) Fluorescence excitation and emission spectra of GFP, AP13Q, and P13H. λ_{ex} = 490 nm and λ_{em} = 510 nm. (C) Inhibition of Aβ1-42 oligomerization by GFP, P13H, and AP13Q. The amounts of Aβ oligomers were calculated from the data of ELISA. (D) Images of the inhibition mechanism of Aβ oligomerization using P13H variant.¹¹

下した(Fig. 6C)。特に平行βシートを挿入したP13Hでは、オリゴマー生成を約1/6にまで抑制できることが明らかとなった。この結果はGFP表面に提示した擬Aβ平行βシート構造がAβとの相互作用に効果的に寄与し、その結果Aβのオリゴマー形成を強く阻害したものと推察される。

次に、この方法論を拡張するために、インスリン様成長因子2受容体ドメイン11 (IGF2R-d11) を土台として用い、GFPの場合と同様にAβ様アミロイド構造を提示したタンパク質を設計した¹²⁾ (Fig. 7A)。IGF2Rは15個の細胞外ドメインからなる細胞表面レセプターであり、人の組織に遍在する多機能性タンパク質である。ドメイン11は、インスリン様成長因子2 (IGF-II) と相互作用する疎水性ポケットをもち、単独でIGF-IIと高い親和性を有している。その構造はX線結晶構造解析から明らかとなっており、

βパレル様の構造をとり、表面にβシート構造をもっている。ここで、先のGFPの系と同様に、IGF2R-d11の平行βシート部位にAβ由来の配列を挿入したAβ様アミロイド挿入タンパク質 (IG11-KK) を構築した (Fig. 7A)。また逆平行βシート部位にAβ由来の配列を挿入したIG11-KAも合わせて構築した。アミロイド線維を検出するThTアッセイから、構築したIG11-KKは、wild typeのIGF2R-d11やIG11-KAと比較して、効果的にAβ1-42のアミロイド線維形成を阻害した (Fig. 7B)。このことから、GFPの場合と同様、平行βシート部位へのAβ様アミロイド構造の挿入がAβの集合化阻害に有利に働いていることが示唆された。特に、RNAアプタマーでは阻害できなかったAβ1-42の集合化を阻害できることが示された。これらの実験だけではまだ不十分ではあるが、Aβのアミロイド線維構造のモデルと合わせて考えると、Aβの集合化の初期段階からすでに平行βシート構造が形成され、そのAβが形成したシート表面とGFPやIGF2R-d11の分子表面に構築したアミロイド様βシート構造がうまく適合して相互作用していることが予想される。今後はそのようなタンパク質とAβの相互作用メカニズムを明らかにして、Aβ集合化に関する情報を少しでも多く引き出していきたいと考えている。

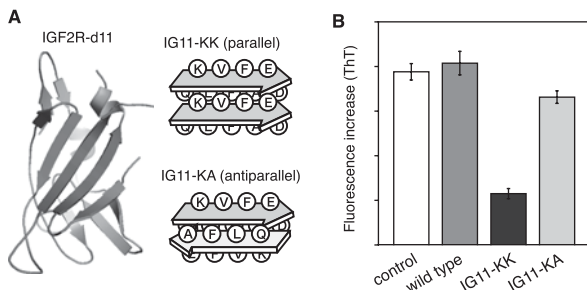


Fig. 7 (A) Schematic illustration of insulin-like growth factor 2 receptor domain 11 (IGF2R-d11) variants in which pseudo-Aβ β-sheets are embedded. IG11-KK and IG11-KA mimic the parallel and antiparallel β-sheet models, respectively, of Aβ amyloid fibrils. (B) Inhibition of Aβ1-42 aggregation by IGF2R-d11 wild type, IG11-KK, and IG11-KA. ThT fluorescence increases after 24 hours of incubation were shown. Aβ1-42 (40 μM) was incubated with or without protein (4.0 μM).¹²

6. おわりに

以上、筆者らがこれまでに行ってきたアルツハイマー病Aβペプチドを標的とした分子構築について簡単に紹介した。Aβの集合化はアルツハイマー病の発症と密接に関連しており、これを制御することのできる分子構築は、将来的なアルツハイマー病治療に繋がるものであると期待される。筆者らが行ってきた研究は未だ試験管内のレベルにとどまっており、今後はこれまで構築してきた人工分子を使い、モデルマウスなどを用いた生体内でのAβの集合化制御についても検討する必要がある。このようなケミカ

ルバイオロジー的な研究を進めることによって、Aβがどのようにアルツハイマー病の発症と関連しているのかを明らかにし、将来的なアルツハイマー病治療を目指した研究へと進展させていけばと考えている。

参考文献

- 1) 井原康夫 編 (1999) アルツハイマー病の新しい展開, 羊土社, 東京.
- 2) K. A. Jellinger, *J. Neural. Transm.*, **2006**, *113*, 1603-1623.
- 3) M. P. Lambert, A. K. Barlow, B. A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T. E. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer, K. L. Viola, P. Wals, C. Zhang, C. E. Finch, G. A. Krafft, and W. L. Klein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 6448-6453.
- 4) D. Walsh, M. L. Klyubin, J. V. Fadeeva, W. K. Cullen, R. Anwyl, M. S. Wolfe, M. J. Rowan, and D. J. Selkoe, *Nature*, **2002**, *416*, 535-539.
- 5) M. Townsend, J. P. Ceary, T. Mehta, J. Hofmeister, S. Lesne, E. O' Hare, D. M. Walsh, and D. J. Selkoe, *Ann. Neurol.*, **2006**, *60*, 668-676.
- 6) D. J. Selkoe, *Nature*, **2003**, *426*, 900-904.
- 7) T. Takahashi, K. Tada, and H. Mihara, *Molecular BioSystems*, submitted.
- 8) T. Takahashi, and H. Mihara, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 1309-1318.
- 9) J. Sato, T. Takahashi, H. Oshima, S. Matsumura and H. Mihara, *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 7745-7752.
- 10) M. Suzuki, T. Takahashi, J. Sato, M. Mie, E. Kobatake, and H. Mihara, *in preparation*.
- 11) T. Takahashi, K. Ohta, and H. Mihara, *ChemBioChem*, **2007**, *8*, 985-988.
- 12) Y. Murakoshi, T. Takahashi, and H. Mihara, *in preparation*.
- 13) A. Güntert, H. Döbeli, and B. Bohrmann, *Neuroscience*, **2006**, *143*, 461-475.
- 14) A. T. Petkova, W. M. Yau, and R. Tycko *Biochemistry*, **2006**, *45*, 498-512.
- 15) T. Lührs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Döbeli, D. Schubert, and R. Riek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 17342-17347.

筆者紹介

氏名：高橋 剛 (TAKAHASHI TSUYOSHI)
 所属：東京工業大学大学院生命理工学研究科
 生物プロセス専攻
 〒226-8501
 神奈川県横浜市緑区長津田町4259-B-40

氏名：三原 久和 (MIHARA HISAKAZU)
 所属：東京工業大学大学院生命理工学研究科
 生物プロセス専攻 教授

改良品

グルコース-6-リン酸脱水素酵素活性測定キット

G6PD Assay Kit-WST

G6PD異常症(G6PD Deficiency)とは、グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PD)の活性が著しく低いため、酸化作用を防御する還元型グルタチオン(GSH)の補充が不十分となり、ヘモグロビンの変性によるHeinz小体の形成、細胞膜の透過性異常の結果、主として血管内溶血をきたす疾患です。G6PD異常症患者は、平素は無症状ですが、マラリア薬として使用されているプリマキンを服用すると、溶血性貧血を引き起こします。従って、マラリア流行地域における住民のG6PD異常症診断は、大変重要な課題となっています。

G6PD異常症の確認には、今日までに多くの方法が発表され、蛍光スポット法、3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT)とphenazine methosulfate(PMS)を使ったホルマザン法などが知られています。しかし、いずれの方法でも種々の問題を抱えているのが実情であり、これらの問題を解決すべく同仁化学では、2003年にG6PD Assay Kitを発売いたしました。

今回、より目視での確認を容易とするために改良した、G6PD Assay Kit-WSTを発売しました。このキットは還元発色基質である2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt (WST-8)を用いており、ヘモグロビンと反応せず、強い橙色を呈するため目視でG6PD活性を簡便に判定することが可能です。

- (100 assays)
 - Substrate mixture 2 ml x 1 本
 - Dye mixture 2 ml x 1 本
- (500 assays)
 - Substrate mixture 2 ml x 5 本
 - Dye mixture 2 ml x 5 本



- 1 ネガティブコントロール G6PD 活性 0%
基質なし；正常血液添加
- 2 男性異常症 G6PD 活性 0%
- 3 女性異常症 G6PD 活性 50%
- 4 正常血液 G6PD 活性 100%

発色画像：25 ,30 分発色。塩酸含まず。

* 本品は試験研究用である。臨床・診断や他の用途で使用しないこと。

品名	容量	希望納入価格 (¥)	メーカーコード
G6PD Assay Kit-WST			
	100 assays	18,000	G256
	500 assays	30,000	G256

漢方診断・再発見

2

漢方医学の構造

加島 雅之

熊本赤十字病院 総合内科
熊本大学大学院医学教育部
病態解析講座 医学情報医学分野

本稿では、漢方医学の主だった伝統的流派とその中でも「中医学」を中心にその構造を紹介する。なお、ここで使用する「漢方」という用語は、約2000年前に中国で原型が形成され、その後、東アジアを中心に広がった伝統医学の諸体系を指している。

1. 漢方医学の主だった伝統的流派

漢方医学は約2000年の歴史と、東アジアのほぼ全域という広大な地域に広がった医学である。また、過去の業績の現代科学のような厳密な検証や証明の上に成立した学問ではない。そのため複数の流派が存在する。ここでは、現在我が国に存在する主だった伝統的流派の概要を解説する。

漢方医学は約2000年前の中国に淵源を發する医学であり、当然、日本も中国の医学を受容する形で医学を形成してきた。特に安土桃山時代に同時代である中国の明代中期の医学を日本に体系的に導入した曲直瀬 道三(まなせ どうさん)を始祖とする曲直瀬流医学(下記に述べる古方派の誕生以降、後世派と呼ばれる)が江戸時代中期まで日本の漢方の主流派を占めていた。しかし、江戸時代後期に吉益 東洞(よします とうどう)を中心とする古方派と呼ばれる、それまでの医学理論の一切を否定し、傷寒論(しょうかんろん)・金匱要略(きんきようりやく)という古典に載った処方を中心に使用する一派が誕生したことで大混乱を来した。以降、個々の医師は程度の差はあれ、自身の中で後世派と古方派の方法論を折衷する医学を形成していくこととなる。時は明治を迎え、政府により漢方の廃止政策がとられ、一旦、江戸時代からの伝統をひく漢方は終焉を迎えることとなったが、明治末より数人の医師の手で復活がはかられ、古方派を中心に復興がなされた。復活後も古方派・後世派の矛盾は存在し続けていたが、昭和初期に漢方の普及を第一目的として、それぞれの流派が齟齬を来さない程度の形で漢方医学の紹介がなされるようになり、現在の日本の漢方医学の原型が形成される。

一方で中国では中華民国時代に日本の明治政府と同様に政府による漢方廃止政策がなされるが、政治的混乱が続いていたために伝統医学の系譜が途絶えることを免れた。中華人民共和国になるに到り、政府の方針の下、正式な医学として漢方医学の再編散がなされた。

これを中医学(ちゅういがく)と呼ぶ。日中国交正常化以降、中

医学が本格的に日本に流入することとなった。古方派を除く伝統漢方医学はその基本的理論を共有しており、その最もまとまった最大公約数的な内容をもつのは中医学である。以降、断りなく漢方医学という語を用いる場合には古方派を除く伝統漢方医学を指して用いる。

2. 漢方医学の構造

漢方では「証」といわれる独自の診断概念に従い治療を行う。漢方医学に近似できる中医学の診断治療体系を「弁証論治(べんしょうろんち)」と表現する。一方で、日本の古方派のそれは「方証相對(ほうしょうそうたい)」と表現される。どちらも「証」に基づいて、治療方針や具体的な治療法を選択することを意味するが、方証相對における「証」はある薬剤が有効な症状・症候の組み合わせ、すなわち「症候群」的表現として理解されるのに対して、弁証論治の意味するところの「証」は漢方医学理論に基づいた疾病の状態の説明、つまりは「病態」を意味する。漢方医学の「証」を理解するためには当然、「何によって、どこで何が、どのように異常な状態となっているのか」というcontextを充足しなくてはならない。よって、変化する主体としての身体の構成要素・病態の場としてのfunctional unitsや病因を理解する必要がある。その主だったものを次項以降、紹介したい。

3. 身体の構成要素の概念

漢方医学では身体の構成要素(総称して「精気」という)を主に気・血・津液の3つの流体に弁別する。「気」とは、生体内のfunctionおよび気体の総称ともいえる概念。具体的な働きとしては、第1に体の物質を動かす作用、第2に適切な場所に物質や組織を留め置く作用、第3に病原に対して闘う作用、第4に物質の代謝を行う作用、第5に組織に熱量を供給する作用の5つとなる。また、病態としては、気が不足した状態である「気虚」、気の流れが停滞した「気滞」に主に2つに分けられる。「血」は物質としては血液と同様のものであるが、想定されている機能は西洋医学のそれとは異なる。血は組織の潤いや円滑な運動を支える存在、過剰な活動を抑える存在として理解される。その病態は血が不足した「血虚」、血の停滞を意味する「血瘀(けつお)、また血瘀を背景に病的な血が存在する「瘀血(おけつ)」という病態がある。瘀血は気や血の流通を障害する。「津液(しんえき)」は体内での血液以外の体液を意味する。その病態は「津液不足」と津液の停滞である「水停内湿」が基本である。また、水停内湿を背景として変性した水分である「痰」がある。ここでいう痰は気道分泌物のみを意味するのではなく、全身の全てに存在し得り、気・血・津液の流通を障害する。

4. 身体のfunctional unitsとしての五臓六腑

身体の器官を漢方医学的にみれば、とりもなおさず精気の流通・生成・代謝・調整を行う組織である。その中でも最も重要な存在は精気の生成・貯蔵・調節を主に行う心・肺・脾・肝・腎の五臓と、精気の流通・代謝を主に行う胃・小腸・大腸・胆・膀胱・三焦(さんしょう)の六腑である。これらの臓器は必ずしも解剖学的な部位のみを意味するのではなく、その作用を担うある組織の一群をさすfunctional unitsとして理解される。それらを統括する存在が五臓であるが西洋医学の同じ名の臓器とはかなり概念が異なる。「心」は血の循環の中核であるとともに、意識の原動力と

して位置づけられる。「肺」は呼吸を行うことで気の産生・代謝を行い、同時に全身の気・津液の分配を行う。「脾」は栄養物の消化吸収、全身への運搬を行い、気や津液の局所循環を管理すると同時に血が血管へ漏出するのを防止する。「肝」は気・血のペクトルをコントロールし情緒に強い影響力を持つ。「腎」は津液の代謝を行い尿の生成を行うのみならず、生まれながらの生命の源となる物質である「精」を貯蔵する器官であるため、成長・老化・生殖能力を支配する。

5. 病因

漢方医学における病因はそれ自身が気の一形態であり、気の運動の異常を来す過度の感情、精気の消耗を来す過労・過度のセックス、精気の停滞を来す運動不足、自然界の気の運動に従わない生活、外傷が想定されている。また、発病因子を「邪」と呼ぶが、外界由来の邪を「外邪」、体内由来の邪を「内邪」と呼ぶ。外邪の代表が風・寒・熱・湿・燥・暑の6つの気候因子である。この中で風が侵襲した場合の症状が「カゼ症候群」の初期症状であり、これを漢字で「風邪」と書く所以である。内邪には前述の痰・瘀血や腸管での消化不十分な食物の停滞したものである「食積(しょくしゃく)」がある。

6. まとめ

漢方医学は独特の理論に基づいた体系に従い病態をとらえて治療を行う。ともすればある種の薬剤が西洋医学的には様々な症状・病態にまたがって有効であり、また西洋医学的には同一の病態に鑑別があることが奇異にとらえられることも多い漢方薬もこうした病態概念の改善を機序としていることを考えれば理解されよう。今後、漢方の理解・研究に際して漢方医学の体系を十分に考慮して行うことは、新たな着想・発展に資するものと考えられる。



筆者紹介

氏名: 加島 雅之(かしま まさゆき)

所属 熊本赤十字病院 総合内科

熊本大学大学院医学教育部 病態解析講座 医療情報医学分野

職歴

2002年 国立宮崎医科大学医学部(現:国立宮崎大学医学部医学科)卒業

2002年 熊本大学医学部総合診療部入局

2002年 熊本大学医学部第2内科(血液・膠原病内科)勤務
熊本赤十字病院勤務

2003年 国立熊本病院(現:国立熊本医療センター)勤務

2004年 沖縄県立中部病院 総合内科国内留学

2004年 熊本赤十字病院 救急部勤務

2005年 熊本赤十字病院 内科勤務～
2006年 亀田総合病院感染症科短期留学
2007年 熊本大学大学院 社会人大学院入学(医療情報医学)

日本東洋医学会熊本県部会 幹事 2007年度～
熊本県東方医学研修会 理事 2008年度～
日本中医交流協会 理事 2008年度～
第15回国際東洋医学会 プログラム委員

研究テーマ

救急疾患・難治性疾患における漢方医学の包括的応用
漢方医学の普遍的法則性の発見と実践応用できるシステムの開発

お知らせ



フォーラム・イン・ドージン
20周年記念国際シンポジウム

「蛍光生物学」
- 分子からシステムへ -

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 / 300名 参加費 / 無料

日 時: 2009年11月27日(金) 9:30～16:50(開場 9:00)

世話人: 山本 哲郎(熊本大学大学院医学薬学研究部)

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

講演予定者

Alan S. Waggoner

Department of Biological Sciences, Carnegie Mellon University
「生きた細胞を用いたタンパク質機能研究のための新たなバイオセンサー」

浦野 泰照 東京大学大学院薬学系研究科 薬品代謝化学教室
「生命現象解明に資する有機小分子蛍光プローブの精密設計」

尹 玉新 北京大学基礎医学院病理学系

「新たなゲノム守護神 PTEN」

方 偉崗 北京大学医学部副部長 病理学系

「腫瘍微小環境における新たな潤滑促進因子としてのアデニンヌクレオチド」

朱 衛国 北京大学基礎医学院 生物化学・分子生物学系

「ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の癌研究への応用」

韓 晶岩 北京大学基礎医学院 中西医结合学教室

「臓器微小循環の可視化研究」

宋 文杰 熊本大学大学院医学薬学研究部 知覚生理学分野

「電位感受性蛍光色素を用いた聴覚皮質神経活動の大規模計測」

問い合わせ・参加申し込み先:

フォーラム・イン・ドージン事務局(担当: 浦野・尾方)

Tel: 0120-489548 FAX: 0120-021557 E-mail: info@dojindo.jp

講演終了後、ミキサー(無料・定員120名)を同会場にて予定しております。

参加ご希望の方は、所属・氏名・連絡先(住所、Tel、Fax、E-mail)、ミキサー参加の有無をご記入の上、E-mailまたはFaxにてお申し込みください。勝手ながら先着順とさせていただきます。

Column

最近のレジオネラ感染報告と浴槽の衛生管理

株式会社同仁化学研究所 池上 天

同仁化学研究所が位置する熊本県は、温泉観光地として知られており、全国的にも有名な温泉旅館をはじめ、500円前後で入浴できる日帰り温泉施設など、県内各地で特色ある泉質の湯を楽しむことができる。最近では、書店の旅行誌コーナーに日帰り温泉のガイド本が数多く並べられ、郊外の大型ショッピングモールや高速道路SAに併設された施設もある。私自身も日帰り温泉施設を利用し、自宅の浴槽とは全く違う開放的な空間で湯に浸ることで、心身ともにリラックスしている。

ところで、浴場施設の脱衣所入り口付近に、温泉成分分析結果と並びレジオネラ検査結果の証明証が掲示されていることはご存知だろうか。私が学生の頃、このような検査結果の表示は無かったと記憶している。これは、公衆浴場で発生したレジオネラ感染症による死亡事故をきっかけとして、厚生労働省の指針に記載された「浴槽水は少なくとも年1回以上レジオネラ属菌の検査を行なう」(レジオネラ症を予防するために必要な措置に関する技術上の指針, 2003年7月25日厚生労働省告示第264号) ことに基づいている。検査結果の表示は、食料品と同様、浴場施設においても「利用者(消費者)に対する安心・安全」が要求されていることを実感させる。

しかしながら、近頃では、レジオネラ感染に関するマスコミ等の報道は減っているように思える。最近の調査結果をみると、今年1月には国立感染症研究所から「レジオネラ菌の感染報告者数がこの5年間で5倍近く増えた」との調査報告が出され、また、浴槽施設等における基準値を超えるレジオネラ菌の検出報告も全国各地から毎月報告されている(アクアス株式会社HP-レジオネラニュースより)。世間の関心が薄れる中、レジオネラ感染被害は、未だ増加の一途を辿っている。

このような状況の中、浴場施設の運営者は、利用者が安心して入浴できる施設の維持・管理に努めており、NPO法人入浴施設衛生管理推進協議会では、浴場施設の衛生管理者を対象とした管理方法の指導・研究を活発に行っている。

浴場施設におけるレジオネラ菌対策としては、営業後の浴槽や配管の洗浄および営業中の浴槽への塩素剤注入が一般的な方法とされており、厚生労働省の指針では、塩素剤が殺菌効果を示す目安として浴槽中の遊離残留塩素濃度を0.2 ~ 0.4 ppmに維持する、としている。しかしながら、浴槽水は水道水と異なり、殺菌効果の高い遊離残留塩素と容易に作用して、より効果の低い結合塩素を生じる成分(身体からの老廃物や蛋白質など)が多数存在するため、入浴者の数に応じて遊離残留塩素と結合塩素の割合が常に変動する。そのため、塩素剤を注入しても、その量が不足して大半が結合塩素として存在する状況下では、殺菌効果がある浴槽水とは言い難い。このことから、浴槽水の遊離残留塩素を選択的に

測定できる方法が要求され始めている。残留塩素測定法として汎用されているDPD法に関しては、結合塩素共存下における遊離残留塩素への選択性が疑問視され、その測定に関する注意が促されている(横浜市衛生研究所 調査情報月報2008年3月号より)。

温泉管理士の小弾正氏らは、各残留塩素濃度測定法(DPD法とSBT法)の簡易測定キットを用いた浴場施設における残留塩素濃度測定の比較検証の結果を温泉工学会誌(Vol. 30, No.2/3, 2008)にて報告している。浴槽水中の遊離残留塩素濃度は、入浴者が増加した時間帯から低下し始め、同時に結合塩素が増えていることが確認された。その際、DPD法による遊離残留塩素測定値は、SBT法の測定値に対して約1.4 ~ 1.8倍高く、結合塩素の測定値に近い値を示した。実際の浴槽施設における一連の実験結果から、SBT法の遊離残留塩素に対する選択性の高さが実証された。また、小弾正氏らは報告の中で、遊離残留塩素濃度の測定結果に応じた新湯の注入、湯の交換を実施できるシステムの必要性や入浴前にカラダを洗うマナーを利用者が守ることも自身の感染予防にも繋がる、と提言している。

このような活動を通して見ると、浴槽の衛生管理は、日々、徹底されたものになり、安心・安全な浴場施設は増えていくと考えられている。

最後に、レジオネラ感染は、感染者全てが発症するものではなく、人間同士の感染もない。正しい知識を持つことも利用者にとっては大切なことである。

ご存知の通り、今年春からETC搭載車の高速料金が抑えられ、また、定額給付金が支給されることから、皆さんで温泉めぐりの旅を計画されてみてはいかがでしょうか？

関連製品

残留塩素測定キット - SBT 法

残留塩素濃度の測定には、安価で操作性の良い *N,N*-Diethylphenylenediamine (DPD) が測定試薬として汎用されているが、1) 検水への溶解・混和が煩雑である、2) 結合塩素と反応しやすい、3) 溶液状態で不安定であるなどの問題があった。

残留塩素測定キット - SBT 法は、新規発色試薬 (SBT) を使用し DPD より高感度で、溶液の安定性の向上を実現した。また、SBT 法は殺菌能力の少ない結合型塩素とは反応しにくい。数箇所から採取した源泉水に次亜塩素酸を添加したものを測定したところ、DPD と高い相関性があることが分かった。このように SBT 法は多種多様な成分が含まれる温泉水においてもより正確に遊離残留塩素濃度を求めることができる。



画像： <http://www.s-hoshino.com/kiyaku.html> より

品名	容量	希望納入価格(¥)	コード
残留塩素測定キット-SBT法	1 set	7,000	ZK01-50
残留塩素測定試薬-SBT法	100 回用	1,300	ZK01-60
残留塩素測定試薬-SBT法	500 回用	5,000	ZK01-60
色素液	100 ml	9,000	ZK01-70
検水調整液	200 ml	5,000	ZK01-80

Topics on Chemistry

薬の蛍光標識による可視化

私たちの生活において、画像には訴求力があり、また多くの情報が含まれている。生物学においても同様で、直接目で見て理解することは重要である。そのため、蛍光標識による可視化は生物学の様々な分野で盛んに取り入れられ、それに伴う近年の生物学の進歩は目覚ましいものがある。今回は抗体やタンパク質などの生体高分子への蛍光標識ではなく、より低分子の薬剤への蛍光標識について紹介する。

Ternatin(1, Fig.1)は、マッシュルームから単離された*N*-メチル環状ヘプタペプチドであり、*in vitro*、*in vivo*において脂肪蓄積抑制効果があることが確認された。しかし、その生物学的作用機構や標的細胞は未だ解明されていない。そこでShimokawaらは、ternatinを蛍光標識し、可視化することでternatinの脂肪蓄積抑制機構の解明を試みた¹⁾。

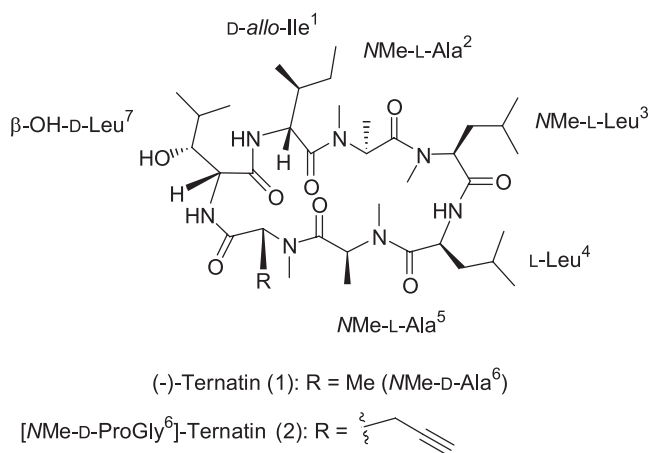


Fig.1 Structures of 1 and 2

初めに、ternatinの構造活性相関を調べ、Ile1とLeu4のアミノ酸残基が脂肪蓄積抑制作用に重要であることを確認した。その結果を基に、高活性の[NMe-D-ProGly⁶]-ternatin (2, Fig.1)を設計、合成し、Huisgen反応(Click Chemistry*)によりFITC標識した化合物3(FITC標識ternatin)を合成した。この蛍光標識化合物はternatinよりも活性は低いものの脂肪蓄積抑制作用を有することが確認された。そこで、この化合物3を用いて、ternatinの細胞内動態観察を行った。実験には3T3-L1細胞を用いたが、これはternatinが3T3-L1細胞(マウス前駆脂肪細胞)の分化を初期段階で抑制していることが最近の研究で示唆されたからである。化合物3で処理した3T3-L1細胞を蛍光顕微鏡で観察すると、細胞内に強い蛍光が見られ、その蛍光は細胞内のある特定の小器官に局在していることが確認された。その詳細については未だ不明であるが、Shimokawaらの合成した蛍光標識ternatinによって、ternatinが3T3-L1細胞の特定器官に作用することが明確になった。本研究はternatinの脂肪蓄積抑制の生物学的作用機構解明の足がかりになるものと考えられる。

ところで、FITCなどの蛍光色素を低分子の生理活性化合物に標識する際には、その本来の性質が失われないような注意が必要である。

株式会社同仁化学研究所 岩本 正史

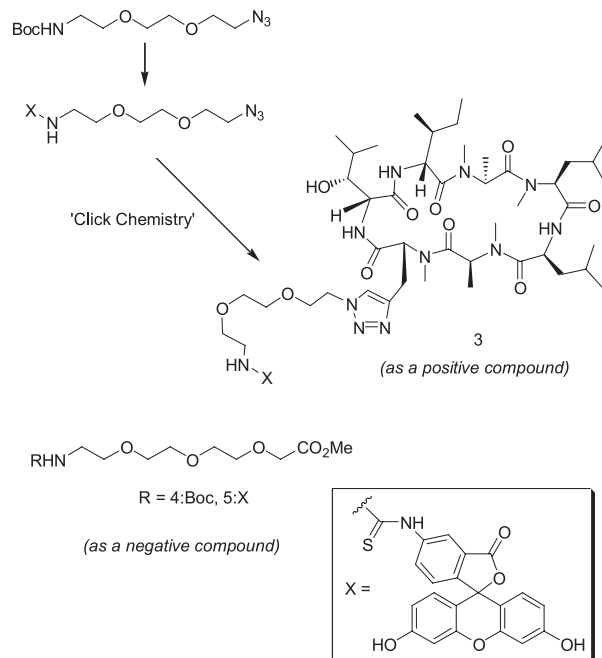


Fig. 2 Structures of 3, 4 and 5

今回Shimokawaらが行ったように、目的化合物の生理活性部位を的確に判断し、生理活性に影響がない部位に蛍光色素を導入しなければならない。また、標識に際しても、抗体やタンパク質と異なり、特定の標識部位(スルフィドやアミノ基)を持たないことも多いため、足場となる官能基を導入しなければならないことなど、低分子の蛍光標識ではより課題が多い。しかし、今回紹介した論文にもあるように、生体内での薬剤の動態観察には、蛍光標識化合物の有用性が高いといえる。どの細胞に作用するのか、さらには細胞のどの部位に作用するのか、その後の代謝はどのように行われるのか、など多くの情報を得られる可能性が秘められている。特に、薬の効用は確認されているがその機構が不明な薬(漢方など)に対しては大いに役立つであろう。今後ますます薬剤の蛍光標識が増えるにしたいが、今まで見えなかったことが見えてくることを期待したい。

参考文献

- 1) K. Shimokawa, O. Ohno, K. Yamada, Y. Oba and D. Uemura, *Chem. Lett.* **2009**, *38*(2), 150-151.

* Click Chemistry

Click ChemistryとはK.B.Sharpleyらが2001年に提唱した概念で、その名の「Click」は、シートベルトがカチッと音を立ててロックされるように、素早く確実な結合を作る様子をたとえた言葉である。その代表的なHuisgen反応は、アルキンとアジド化合物による付加環化反応でトリアゾール環を形成する反応である。この反応は、高収率・高選択性・高速反応性をもち、さらに、溶媒やタンパク質などの共雑物の影響も受けず精製の必要もない。応用例として、強力なアセチルコリンエステラーゼ阻害薬の開発がある。

Topics on Chemistry

Through-bond energy transfer を利用したレシオメトリック pH 蛍光プローブ

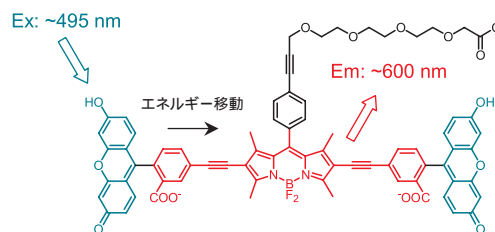
株式会社同仁化学研究所 野口 克也

生体内で起きる反応は、様々な環境変化で引き起こされることが多く、例えばCa²⁺やpHなどの変化がその引き金となることが知られている。特に、細胞内のpH変化はそこで進む諸反応に強い影響を与える。そのため、細胞内のpH測定は様々な生体反応プロセスを理解する上で非常に重要である。

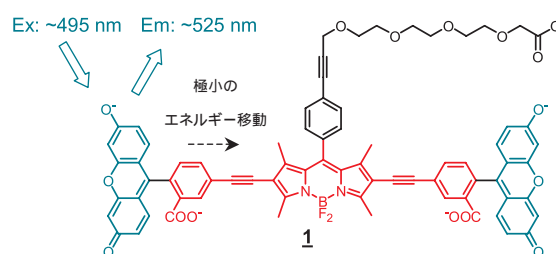
現在、細胞内pHの測定方法として、pHに敏感に反応する蛍光色素を利用する方法が知られており、その蛍光色素として主にBCECFやC.SNARF-1が挙げられる¹⁾。さらに、これら2つの色素はレシオメトリック測定(比率測定)が可能であるため、その測定法を用いれば色素濃度、励起光路長及び励起強度などの測定要因の変動を抑えることができる。レシオメトリック測定時では、BCECFは2波長励起1波長蛍光($\lambda_{ex}=450$ nmと500 nm、 $\lambda_{em}=530$ nm)であるのに対してC.SNARF-1は1波長励起2波長蛍光($\lambda_{ex}=488$ nm、 $\lambda_{em}=580$ nmと640 nm)である。BCECFは励起光側フィルターを逐次切り替えなければならないこと、450 nm励起時のシグナルが小さく500 nm励起時のシグナルが大きいためバランスが悪い等の問題がある。それに対して、C.SNARF-1は1波長励起のため励起光側のフィルターの切り替えが要らず同時に測定でき、また580 nmと640 nmの蛍光強度はどちらも大きい。よって、レシオメトリック測定においては2波長励起1波長蛍光のBCECFと比べ1波長励起2波長蛍光のC.SNARF-1のほうが優れていると言える。そこで今回はJ. Hanらが開発した新規な1波長励起2波長蛍光のpH蛍光プローブ**1**を紹介する²⁾。

1の特徴として、C.SNARF-1とpH範囲が相補的(C.SNARF-1:7.0-8.0、**1**:4.0-6.5)であり、(i)through-bond energy transferを利用し、pHに対する応答性と1波長励起2波長蛍光でレシオメトリック測定可能にしていること、(ii)**1**とBSA(ウシ血清アルブミン)のコンジュゲート(BSA-**1**)を合成し、それをタンパク質導入試薬によって細胞に導入し、細胞内pHを実際に測定できていることが挙げられる。

まず(i)の特徴について述べる。**1**は2つのキサンテンドナー(緑の部分)と1つのBODIPYアクセプター(赤の部分)を有する構造となっている。キサンテンはpH7以上でフェノラート型となるため、強い蛍光を発する($\phi=0.9$)。また、pH6以下ではフェノール型となり蛍光がやや弱くなる($\phi=0.4$)。上記のように、pHによりプロトン化/脱プロトン化するキサンテンの性質から、J. Hanらはキサンテンのプロトン化/脱プロトン化に反応する酸化還元電位変化を蛍光のシグナルとして捉えるように**1**を設計した。また、J. Hanらはキサンテン部分からBODIPY部分へのエネルギー移動はキサンテン部分の酸化還元電位によって影響されると期待した。要するに、**1**がキサンテン部分の極大吸収(495 nm)近くで励起されたとき、エネルギー移動が起こるとBODIPY由来の赤い蛍光(600 nm)を与え、逆に、ある特定のpH域でエネルギー移動が全く無くなったとき**1**はキサンテン部分由来の蛍光(~525 nm)を発するということである。BSA-**1**の吸収スペクトルを測定すると、アクセプターであるBODIPY部分の吸光度(~576 nm)はpH4.1-7.9間で変化しなかったが、キサンテン部分の吸光度(~495 nm)はpHが下がるにしたがって減少した。そして、BSA-**1**の蛍光について着目すると、中性(pH7.0)及び塩基性(pH7.9)条件下で、キサンテン部分由来の緑の蛍光(~520 nm)を強く発するが、酸性(pH4.1と5.0)条件下で、BODIPY由来の赤い蛍光(~600 nm)を強く発した。J. Hanらの期待通り、キサンテンドナーのプロトン化がBODIPYアクセプターへのエネルギー移動に何らかの作用を及ぼしていることが考えられる。また、pHを変化させたときの赤色の蛍光



1
pH < 6.0
フェノール型



1
pH > 6.5
フェノラート型

(575-625 nm)と緑の蛍光(503-553 nm)の比をプロットしてみると、pH4-6の間で直線的になり、レシオメトリック測定が可能であることが分かった。

次に(ii)の特徴について述べる。BSA-**1**をCOS-7細胞にタンパク質導入試薬Pep-1を使用して導入し(1 μ M protein; 1:20 mol ratio protein/carrier, 37 °C, 1 h)、各pHにおける赤色蛍光と緑色蛍光の比を用い、検量線を作成した。その検量線を使用し、cytosol(4 のとき)及びendosome(37 のとき)のpHを読み取ると、それぞれ7.4と5.4であり、一般的に知られているcytosol(中性付近)とendosome(酸性付近)の性質と一致した。また、C.SNARF-1 アセトキシメチルエステル体を4 でCOS-7に導入し、あらかじめ作成したC.SNARF-1の検量線から読み取るとpH7.1であり、BSA-**1**と非常に近い値であった。

このように、**1**がタンパク質とコンジュゲートした状態で実際に生きた細胞内のpH変化のシグナルを観測できたことは大変興味深く、細胞内プロセスの観察を容易にするなど様々な応用の可能性が示唆される。さらにthrough-bond energy transferを利用することにより蛍光分子を設計する上で多彩な色素の組み合わせが可能となり、様々な励起波長が利用できるようになると期待される。

参考文献

- 1) K. J. Buckler and R. D. Vaughan-Jones, *Pflügers Archiv European J. Physiol.*, **1990**, 417 (2), 234.
- 2) J. Han, A. Loudet, R. Barhoumi, R. C. Burghardt, and K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131 (5), 1642.

新製品

アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性測定キット

ACE Kit - WST

アンジオテンシン変換酵素(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 を生成します。また同時に降圧ペプチドであるブラジキニンを分解するなど、血圧上昇に大きく関与している酵素です。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、ACE阻害活性は合成基質 Hippuryl-His-Leu 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ことで算出されます。しかし、酢酸エチルのような有害な有機溶媒を用いることや、操作が煩雑であり測定誤差が生じやすい方法であるため改良が望まれていました。

ACE Kit - WST は 3-Hydroxybutyryl-Gly-Gly-Gly(3HB-GGG) から切り出されてくる 3-Hydroxybutyric acid(3HB) を酵素法により検出します。96穴マイクロプレート対応ですので、一度に多検体の測定が可能です。また、有害な有機溶媒は使用しませんので、安全で迅速・簡便であり再現性の高い測定方法です。

< 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 > 100 tests

- Substrate buffer x 2 vials
- Enzyme A x 2 vials
- Enzyme B x 2 vials
- Enzyme C x 2 vials
- Coenzyme x 2 vials
- Indicator solution x 2 vials

< 測定原理 >

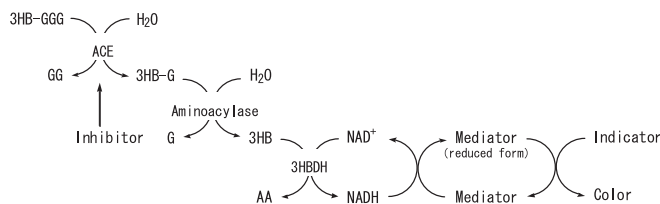


Fig.1, Fig. 2はACE阻害物質であるCaptoprilおよびLisinoprilについて、Fig. 3はラクトトリペプチド含有製品についてACE阻害活性を測定した例です。

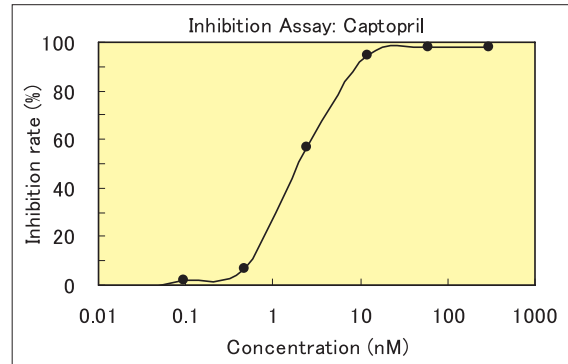


Fig. 1 本キットを用いたCaptoprilによる阻害曲線

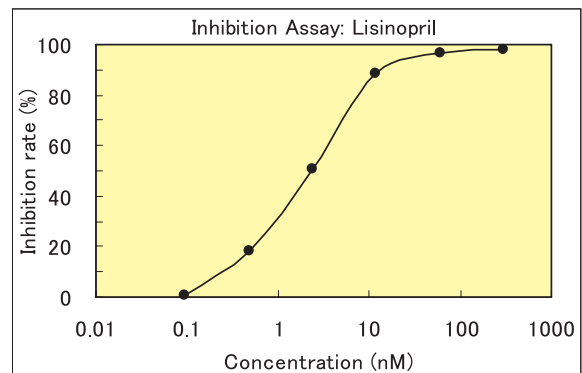


Fig. 2 本キットを用いたLisinoprilによる阻害曲線

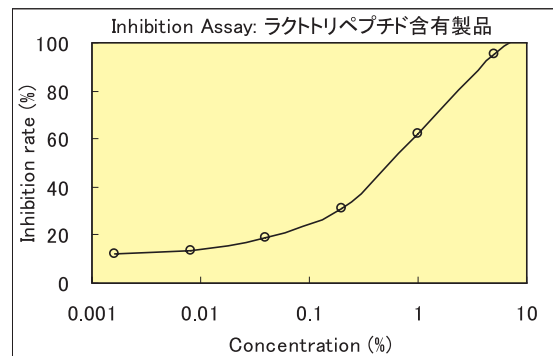
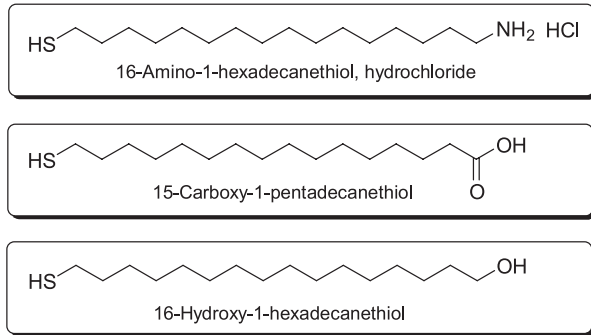


Fig. 3 本キットを用いたラクトトリペプチド含有製品による阻害曲線

品名	容量	希望納入価格 (¥)	メーカーコード
ACE Kit - WST	100 tests	68,000	A502

新製品

長鎖アルキルチオール類



小社ではこれまで、金属基板修飾用のアルキルチオール類として、末端官能基がアミノ基と水酸基のものについてはアルキル鎖が6、8、11、末端官能基がカルボキシル基のものについてはアルキル鎖が5、7、10のものを販売していましたが、この度、それぞれ16、15のアルキル鎖をもつ長鎖アルキルチオール類をラインアップに追加致しました。アルキル鎖長はSAMsの特性に大きく影響を与える因子の1つで、アルキル鎖長が長いほど安定なSAMsが形成されることが知られています。

16-Amino-1-hexadecanethiol,hydrochlorideはこれまで市販されていなかったことから、論文報告は殆どありませんが、SAMs上へのDNAや抗原の固定化に有用であると期待されます。15-Carboxy-1-pentadecanethiolは古くからタンパク質の固定化などに利用されていますが、小社の長鎖アルキルチオール類は他社品に比べ高純度であることから(Fig.1)、より欠陥の少ないSAMsの作製に適していると期待されます。16-Hydroxy-1-hexadecanethiolはアミンやカルボン酸末端の長鎖アルキルチオールと共に用いることで、非特異吸着の少ないSAMsの作製に有用です。

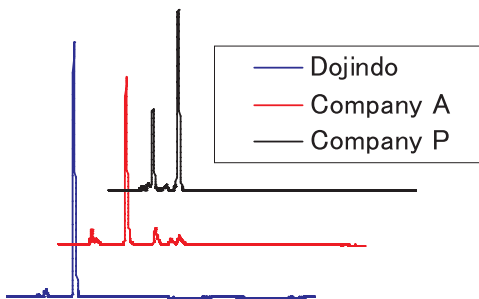


Fig.1 15-Carboxy-1-pentadecanethiolの他社品との比較クロマトグラム。検出：230 nm。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
16-Amino-1-hexadecanethiol, hydrochloride	10 mg	16,000	A458
	100 mg	48,000	A458
15-Carboxy-1-pentadecanethiol	10 mg	13,000	C429
	100 mg	39,000	C429
16-Hydroxy-1-hexadecanethiol	10 mg	13,000	H394
	100 mg	39,000	H394

開発中

ビオチン SAM 作製用試薬

Biotin-SAM Formation Reagent

QCMやSPR等のバイオセンサーにSAMsを介してタンパク質を固定化する方法としては、末端カルボン酸のSAMを活性化してタンパク質のアミノ基と反応する方法、Ni-NTAを有するSAMにHis-Tagタンパク質を固定化する方法、アビジン-ビオチンを利用する方法(Fig.1)などがあります。中でもアビジン-ビオチン法は迅速に且つ強固にタンパク質を固定化できることから汎用されている方法です。

このたび、小社ではNeutrAvidinやStreptavidinなどのアビジン類を効率的に固定化し、非特異吸着の少ないセンサーを作製するためのビオチンSAM作製用試薬を開発致しました。本試薬を用いて作製したビオチンSAMでは、従来品に比べより多くのNeutrAvidinを結合し、NeutrAvidin結合後の表面へのFetal Bovine Serum(FBS)の非特異吸着は従来品に比べ著しく小さいことが分かっています (Fig. 2)

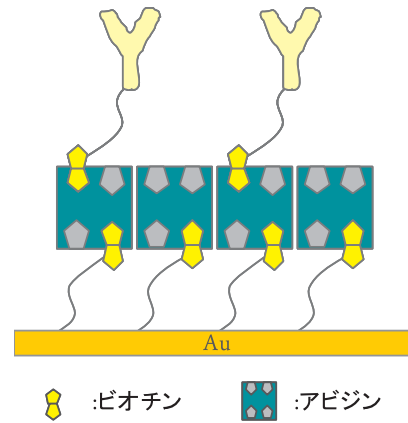


Fig.1 ビオチン-アビジン法による金表面へのタンパク質の固定化の模式図。

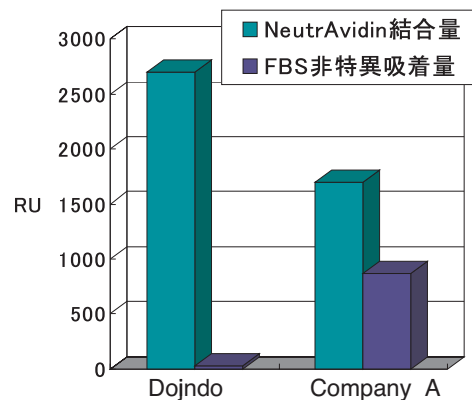


Fig. 2 Biotin-SAM Formation Reagent及び他社Biotin-SAM試薬を用いて作製したSAMへのNeutrAvidinの結合量とNeutrAvidin結合後の表面へのFBSの非特異吸着量の比較。

新製品(7月7日発売)

細菌蛍光染色試薬

-Bacstain- series

Ready-to-Use な蛍光染色試薬、それが -Bacstain- シリーズです。

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

CTC は呼吸活性を指標とした蛍光染色試薬です。本キットに含まれるエンハンサーの効果により従来の CTC 染色に比べ高いシグナルを得ることが出来ます。検出系(フローサイト、蛍光顕微鏡)によって最適なキットをお選びいただけます。

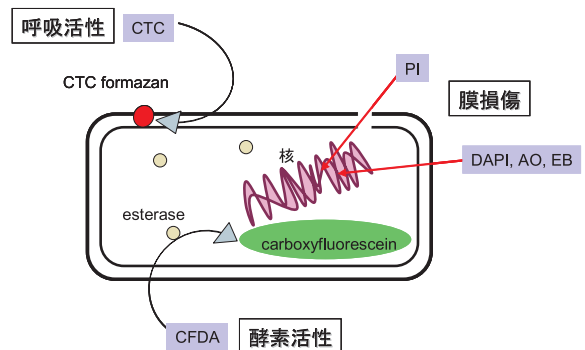
- Bacstain - CFDA solution

CFDA (Carboxyfluorescein diacetate) は細胞内エステラーゼ活性を求める色素として汎用されております。本製品は CFDA を DMSO 溶液としていますので、試薬調製の操作なくご使用頂けます。

- Bacstain - DAPI solution, PI solution, AO solution, EB solution

核酸染色剤として汎用される蛍光試薬類を溶液としており、試薬調製の手間がございません。また、少量小分子ですので必要量を使い切りサイズで使用できます。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
-Bacstain- CTC Rapid Staining Kit (for Flow cytometry)	100 assays	20,000	BS01
-Bacstain- CTC Rapid Staining Kit (for Microscopy)	100 assays	20,000	BS02
-Bacstain- CFDA solution	100 assays	15,000	BS03
-Bacstain- DAPI solution	100 assays	7,800	BS04
-Bacstain- AO solution	100 assays	7,800	BS05
-Bacstain- EB solution	100 assays	7,800	BS06
-Bacstain- PI solution	100 assays	7,800	BS07



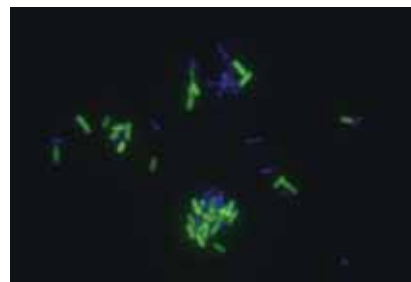
-Bacstain- による染色例

CTC/DAPI 二重染色 (*L.casei* NBRC15883)



- 1) 前培養した *L.casei* を遠心分離後、PBS(-) に再懸濁する。
- 2) 細胞懸濁液 1 mL (細胞密度 10^8 CFU/mL) に対し CTC 溶液 100 μ L 及び reagent B 5 μ L を加え、37 °C で 5 分間インキュベート。
- 3) -Bacstain- DAPI solution 1 μ L を加え、室温で 5 分間インキュベート。
- 4) プレパラートを作成後、蛍光顕微鏡で観察。

CFDA/DAPI 二重染色 (*B.cereus* NBRC13474)



- 1) 前培養した *B.cereus* を遠心分離後、PBS(-) に再懸濁する。
- 2) 細胞懸濁液 1 mL (細胞密度 10^8 CFU/mL) に対し CFDA solution 15 μ L 及び DAPI solution 1 μ L 加え、室温で 3 分間インキュベート。
- 3) メンブラン濾過や遠心分離操作により余分な試薬を除去し、PBS(-) などに再懸濁する。
- 4) プレパラートを作成後、蛍光顕微鏡で観察。

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