

CONTENTS

●Review

電位感受性色素を用いた
脳活動の *in vivo* 実時間イメージング
熊本大学大学院生命科学研究部 宋 文杰

漢方診療／再発見 ⑥ 漢方薬の水分代謝調節作用
熊本大学大学院生命科学研究部 磯濱 洋一郎

●Topics on Chemistry

ケージド化合物と二波長・二光子励起法
を用いた神経細胞の受容体応答の観察
株式会社同仁化学研究所 田中 由香

紅色細菌由来タンパク質を用いた蛍光標識
株式会社同仁化学研究所 坂本 智昭

2010 No.135

ISSN 0385-1516

DOJIN NEWS

ドージンニュース

目次

Review

電位感受性色素を用いた脳活動の *in vivo* 実時間イメージング
 熊本大学大学院生命科学研究部 宋 文杰…………… 1

漢方診療・再発見

6 漢方薬の水分代謝調節作用
 熊本大学大学院生命科学研究部 磯濱 洋一郎…………… 6

Topics on Chemistry

ケージド化合物と二波長・二光子励起法を用いた神経細胞の
 受容体応答の観察
 株式会社同仁化学研究所 田中 由香…………… 8
 紅色細菌由来タンパク質を用いた蛍光標識
 株式会社同仁化学研究所 坂本 智昭…………… 9

Commercial

新製品
 GSSG/GSH Quantification Kit …………… 10
 自己組織化単分子膜作製用試薬 C16-PEG-SAMs …………… 14

試作品

アセチルコリンエステラーゼ特異的基質 MATP+ …… 12

開発中

ICG Labeling Kit-NH₂ …………… 13

お知らせ

第 21 回フォーラム・イン・ドージン開催 …………… 10

新製品案内

グルタチオン分別定量キット

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
GSSG/GSH Quantification Kit	200 tests	50,000	G257

自己組織化単分子膜作製用試薬 C16-PEG-SAMs

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Amino-EG ₆ -hexadecanethiol, hydrochloride	10 mg	45,000	A505
Carboxy-EG ₆ -hexadecanethiol	10 mg	32,000	C463
Hydroxy-EG ₆ -hexadecanethiol	10 mg	28,000	H396
Hydroxy-EG ₃ -hexadecanethiol	10 mg	28,000	H395



菊池渓谷

熊本県の菊池川上流、水源にある渓谷。広葉樹の深い原生林に覆われている。「日本名水百選」、「日本の滝百選」などに選ばれている。紅葉の名所としても全国的に知られており、九州はもとより全国から多くの観光客が訪れる。

Photo：永島俊介氏

電位感受性色素を用いた脳活動の*in vivo*実時間イメージング Real-time Imaging of Cortical Activity *in vivo*



宋 文杰 (Wen-Jie Song)

熊本大学大学院生命科学研究部
知覚生理学分野

[Abstract]

Sensory physiology requires the recording of activities of many neurons at the same time. Real time imaging using voltage-sensitive dyes has been proved as a powerful technique to this end. We have been using voltage-sensitive fluorescent dyes for the imaging of neural population activity in rodent auditory cortex. Here we first briefly review the technique, stressing on *in vivo* applications, and then present some of the results obtained in our laboratory. Finally we briefly discuss the pros and cons of the technique and future directions.

キーワード：神経活動、多点実時間計測、電位感受性色素

1. はじめに

脳において神経細胞（ニューロン）同士がシナプスによって連結され、複雑なネットワークを形成している。神経細胞は神経インパルスの時系列を発生させ、それを用いて情報を表現すると考えられている。従って、脳における情報処理の理解はニューロンネットワークの構造と神経インパルスの言葉で説明できることが要求される。しかし、現段階においては、少数例を除いて、脳の大部分、特に大脳皮質に関しては、分かっていない部分が多い。

「脳で脳が分かるか」という哲学的な問題を提起し、脳はいつまでも分からないのではないかという主張も存在する。勿論、これは些か短絡過ぎる考えである。我々は脳に対して実験を行うことで調べることができる。実験結果はヒトの思考によらず、脳に潜む物理的・化学的な法則を反映するため、いわゆる予想もつかない、つまり我々の脳では考えられない、結果も出たりするので、脳はいずれ分かることになる。このような考えから、脳研究は演繹的な方法と同じように、帰納的なアプローチが重要であると考えられる。

脳の働きを帰納的なアプローチで探求するために、究極的には、脳の全ての細胞から同時にその活動を計測できることが望ましい。しかし、一個の神経細胞の活動を測ることすら容易でなく、これが脳における情報処理の理解を妨げる一つの大きな要因となっている。個々の神経細胞活動を計測するためには、細くて機械的に強く、化学的に安定で、優れた電気的な特性をもつ電極が必要となる。このような電極を単電極として製作することが可能で、単一細胞活動の計測は現在盛んに行われている。しかし、脳の解剖学的な知見から分かるように、大脳皮質や皮質下の各核も、多くの性質が異なる神経細胞の種類が存在し、複雑なネットワークを構成している。その中で、情報は個々の神経細胞の活動に表現されているだけでなく、細胞間の活動の関係に表現されることも十分考えられるので³⁾、単電極による単細胞の計測から神経情報処理を議論するには不十分である。従って、脳の全ての細胞から同時にその活動を計測できなくても、で

きるだけ多くの細胞（細胞集団）から活動を記録することが望まれる。

細胞集団の活動を計測するために、現在幾つかの方法が考えられているが、主に単電極を束にして多電極にする方法と、神経活動の電気信号を光に変換して計測する方法や神経活動による二次的な現象を計測する方法に大別される。本稿では、電位感受性色素を用いて神経活動を蛍光に変換し、実時間で神経活動を多点計測する筆者らの試みを紹介する。この方法自身はかなり以前からCohenらによって開発されており²⁾、本稿では哺乳類を用いた*in vivo*計測に重点を置く。

2. 光計測法の原理

神経細胞に発生する電気信号とは、細胞膜の両側（細胞内と細胞外）に生じる電位差のことで、数mVのシナプス電位と約100 mVの活動電位がある。これらの電位を直接計測できれば、最もSN比の良い信号が得られるが、細胞内外の電位差を*in vivo*で直接計測する方法として、ガラス微小電極を細胞内に刺入して細胞内電位を計測する細胞内記録法がある。しかし、この方法は悪名高いほど難しい。筆者もこの方法を用いて10年近く研究を行った経験を持つが^{13,15)}、その大変さはよく分かる。細胞膜が数nmほどで大変薄いため、シナプス電位や活動電位により、膜内に強い電場が生じる。例えば、100 mVの活動電位によって、5 nmの細胞膜内に 2×10^7 V/mの電場が生じる。これは液晶テレビの液晶にかかる最大電場に同程度のものである。この強い電場の働きにより、膜に人工的に導入した電位感受性色素の蛍光が変化する、或いは色素の吸光度が変化する⁸⁾。このような変化を光センサーで計測してやれば、比較的簡単に、間接的に神経活動を計測することができる。そして、センサーアレーを用いれば、一点だけでなく、神経活動を多点から同時にイメージングすることができる。これまで、数千の化合物のスクリーニングから、幾つかの種類電位感受性色素が見つかった。これらの多くのはマイクロ秒のオーダーで素早く電位変化に追従し、そして活

動電位の範囲内 (+100 mV ~ -100 mV) で蛍光変化量と膜電位変化量が線形関係にあることが確認されている^{2, 4)}。

3. 計測方法

電位感受性色素を*in vivo*イメージングに応用した場合、色素溶液を脳表に直接加えて神経組織を染色する。染色後に脳表を洗浄し、励起光を与えて蛍光を測定する。神経細胞の電気信号は静止膜電位という直流成分とシナプス電位や活動電位のような“交流成分”に分けられるが、静止膜電位を電位感受性色素で計測することは困難である。蛍光の基線レベル (F) は染色の濃淡や励起光の強さなどで変化するため、静止膜電位との対応関係を割り出すことは困難である。従って、電位感受性色素を用いた計測はシナプス電位や活動電位を反映する蛍光の変化量 (ΔF) を測ることになる。一方、 ΔF も染色や励起光の強さに依存するため、これらの要素の影響を軽減させるために、 $\Delta F/F$ を算出し、シナプス電位や活動電位を反映する信号とする。無論、染色や励起光は計測部位全体において均一にすることが望ましい。

電位感受性色素を用いれば簡単に多点計測できる利点を持つ一方、信号が非常に弱い欠点を持つ。例えば、2000年くらいまで、*in vivo*で用いられる電位感受性蛍光色素の代表例はRH-795であるが⁴⁾、この色素の場合、神経活動に対応する信号として高々0.3%程度の蛍光変化しか得られない。その原因として、電位感受性色素自身の感度の問題もあるが、それ以上に ΔF に寄与しないFの成分が存在するためである。*in vivo*の場合、神経細胞のみならず、柔膜やグリア細胞も染色され、Fに大きく寄与するため、 $\Delta F/F$ が微弱な信号となる。従って、計測系の雑音を最大限に抑える必要がある。当然、励起光源に高い安定性も要求され、出力の変化量が1万分の1以下にすることが望ましい。一方、神経活動がサブミリ秒オーダーからミリ秒オーダーで変化するため、イメージング計測も高いサンプリングレート (1 kHz以上) を持つことが要求される。高速でサンプリングすることは短い蓄積時間を意味するので、ショットノイズが目立つようになる。それを軽減させるために、高出力の光源が望ましい。これらの要求から、現在ハロゲン・タングステン光源が主流となっている。我々は、近年開発された単色光LEDも有効な光源であることを最近示した¹⁰⁾。LEDは音声ノイズを発生させないのみならず、長寿命で省エネ、励起フィルターも必要としない利点も併せ持つため、今後の応用の広がり期待できる。

電位感受性色素を*in vivo*に用いた場合、生体に由来するノイズが大きな問題となる。このなかで、特に呼吸によるものと、心拍によるものが、神経活動に由来する信号よりも強く、上手く取り除く必要がある。我々のグループでは、計測時に短時間 (1秒以内) 呼吸 (人工呼吸) を止めることによって呼吸の影響をなくした。心拍のほうは止めるわけにはいかないので、差分法を用いてその影響を除外する。つまり、心電のR波を計測開始のトリガーにして、心拍に同期してイメージング計測を行う。刺激を提示する試行と提示しない試行を交互に繰り返し、その二者の差分から、心拍の影響を取り除いて刺激による反応を分離するのである。これらのことを行うために、人工呼吸器の位相信号と心電図を計測し、イメージング計測のタイミングを決める必要がある。計測系全体の構成は図1に示した。このような方法で、128チャンネルのフォトダイオード計測システムを用いて得られたモルモット一次聴覚野の反応を図2に示した。

3 mm × 3 mmの部位で1 msの時間分解能で得られた反応を16回加算平均したものである。図3には1万チャンネルのCMOSセン

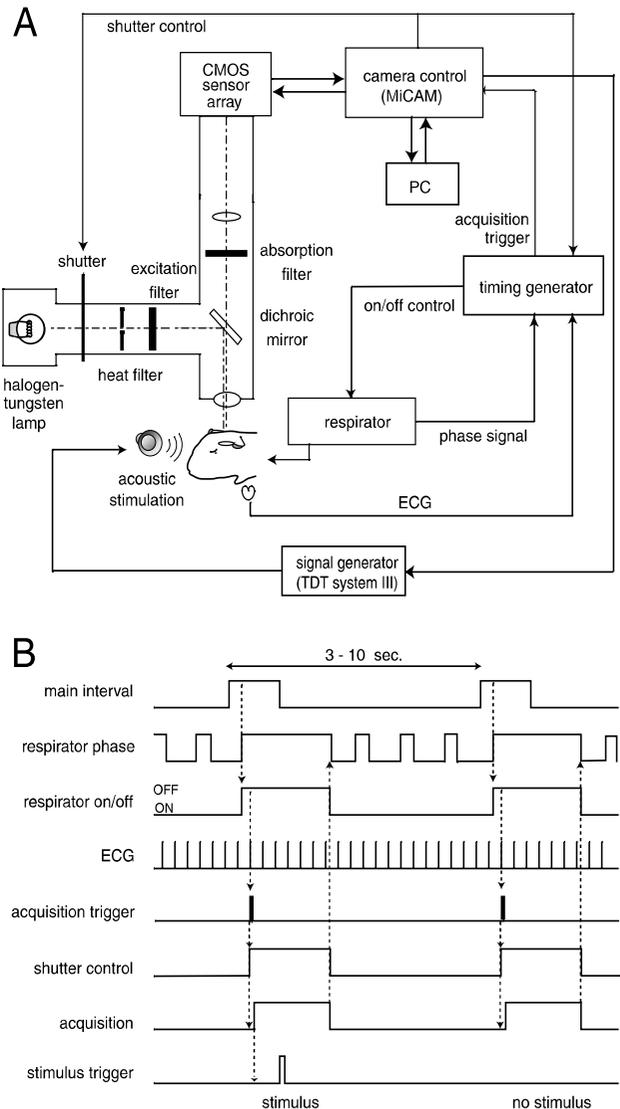


図1 光計測システム(A)とノイズ除去のための計測タイムチャート(B)

サーアレーで得られたモルモット聴覚野6.25 mm × 6.25 mmの部位における反応で、同じく1 msの時間分解能を持ち、16回加算平均したものである。

上記のノイズ除去方法は短時間の計測に有効であるが、長時間に亘って計測したい場合、継続して呼吸を止めるわけにはいかないので、他の方法を考える必要がある。一つの選択は露出した脳の部分に密封チャンバーをつけて呼吸によるノイズを抑える方法が考えられる。しかし、これでは心拍の影響が依然残る。それを除去するために、刺激を提示しないで心拍成分の1周期または数周期の平均を求め、それを計測データから差し引く方法が考えられる。この方法は堅実であるが、心拍の周期自体に揺らぎが存在するため、心拍ノイズを完全に除外することはできない。近年、独立成分解析法が考案され、複数の原信号やノイズが混合された形の観測信号のみを用いて、原信号とノイズを分離する方法である⁶⁾。これは言わばコックテール・パーティー問題を解く方法の一つであるが、その原理は原信号の間の統計的な独立性を仮定

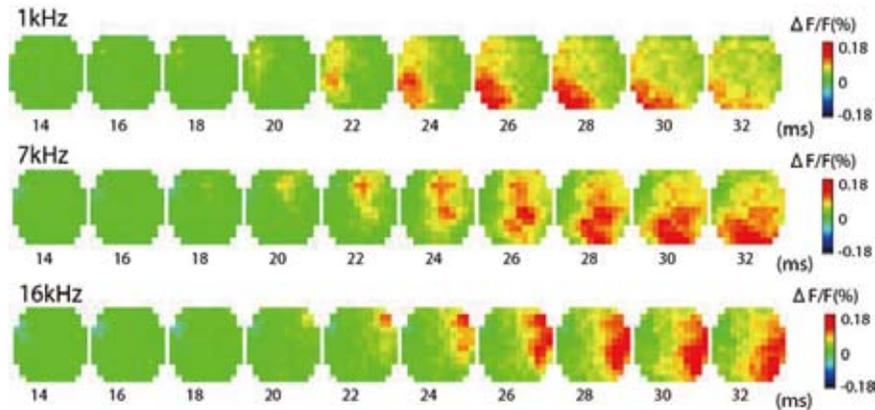


図2 光計測により計測されたモルモット一次聴覚野における純音刺激に対する応答。純音の周波数は図中に示している。各段は反応の時系列で、刺激後の時間をms単位で各図の下に示している。左側は吻側、上は背側。周波数の増加に伴い、反応部位が尾側にシフトすることが分かる。また、各周波数刺激に対して、反応が伝播していることも分かる(文献14より改変)。

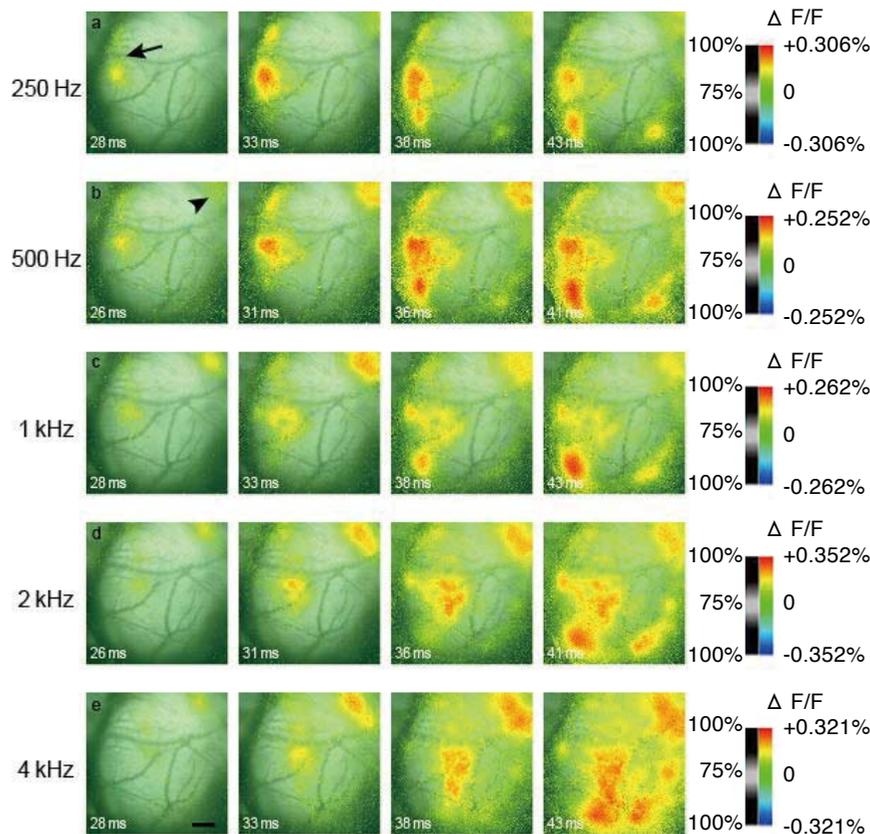


図3 モルモット大脳聴覚皮質の複数領域から記録された聴覚応答。計測領域は6.25 mm x 6.25 mm。刺激に対する反応を脳表に重ねた(文献11より改変)。

し、反復法により、分離行列で分離した信号間の独立性が最大となるように分離行列を定めるものである。神経活動、呼吸によるノイズ、そして心拍によるノイズの三者は互いに独立と考えられるので、これらの分離に独立成分解析法を適用できると考えられる。実際、大脳皮質聴覚野での計測結果に適用したところ、上手

く分離できることが分かった(図4)⁷⁾。

これらの方法を用いて、我々はモルモット大脳皮質聴覚野の聴覚応答や自発活動を計測してきた。これまでの聴覚研究により、内耳聴神経はガンマトン・フィルタのようなインパルス応答を持ち、音声情報を時間・周波数分解することが知られている。応

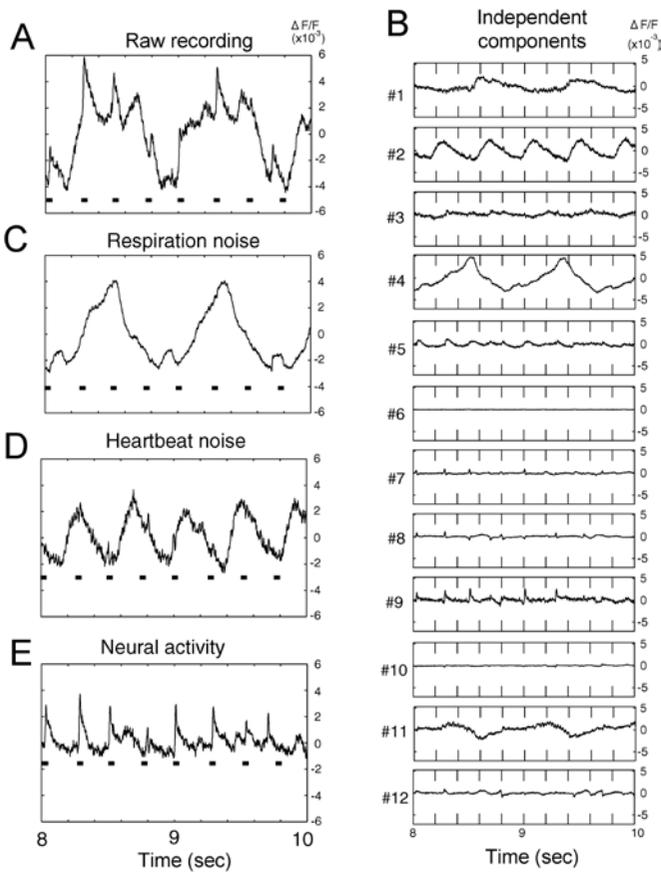


図4 独立成分解析法によるノイズ除去。光信号の生記録(A;全部で128チャンネル)から12個の独立成分(B)に分離し、それにより再構成した呼吸による成分(C)、心拍による成分(D)、および神経活動による成分(E) (文献7より改変)。

答する周波数の高低に従って聴神経線維が蝸牛内において空間的に規則正しく展開されている。このような周波数の空間表現はトノトピーと呼ばれている。光計測法によって、大脳皮質の応答をイメージングすると、大脳皮質の複数の領域において、周波数順に応答部位がシフトし、規則正しいトノトピー構造を示すことが明らかとなった(図2、図3)。また、実時間での計測なので、皮質における活動のダイナミクスもイメージングにより、明らかになり(図2、図3)、その機能的な意義が今後の研究課題として提起された。さらに、聴覚皮質の大規模計測から、これまで報告のなかった皮質聴覚領野の発見にも繋がった¹¹⁾。

RH-795はモルモットやネコなどに応用できるが、マウスとラットに応用した場合、安定した信号の計測が困難であった。近年、RH-795よりもっと長い励起波長をもつ青の電位感受性色素が二つの研究グループから開発された^{9, 12)}。これらの色素はより強い信号を示すとともに、多くの動物や組織に適用できることが示されている。

4. 感覚情報の符号化研究への応用

電位感受性色素を用いた研究は、細胞集団の活動を計測できるので、脳の情報処理の解明に応用できると期待されているが、こ

れまで、刺激に対する脳の応答部位の同定に留まっている場合が多い。最近、計測信号のSN比の向上により、光信号を用いて感覚情報の符号化の議論が始まっている¹⁾。聴覚研究の分野において、音の周波数弁別は長い間、神経細胞集団の活動でなければ、行動レベルの結果を説明できないと考えられているが¹⁷⁾、果たして細胞集団の活動によって周波数弁別が個別の細胞の場合に比べて良くなるのか、そして細胞集団の活動によってどれほど周波数弁別が可能であるかについて、実験的な検討が困難であった。これは言うまでもなく細胞集団活動の計測が困難であるためである。我々のグループでは、青の電位感受性色素を用いてモルモット一次聴覚野から、単一試行で応答を計測することができるようになった。これにより、細胞集団活動による周波数弁別について、情報論的なアプローチで検討することが可能になってきた。周波数が異なる二つの純音の刺激に対する皮質の応答を計測し、その応答から周波数の違いが容易に分かれれば、応答に多くの周波数に関する情報を含むことを意味する。図5に示すように、解析に用いる画素の数が多ければ多いほど、つまり解析に用いる細胞の数が多ければ多いほど、皮質の活動により多くの周波数情報を含むことが分かった。つまり周波数情報は細胞集団の活動によって表現されていることを意味する。このように、光計測データを用いて、感覚情報の符号化の議論が可能な段階にきている。今後の研究の展開が期待される。

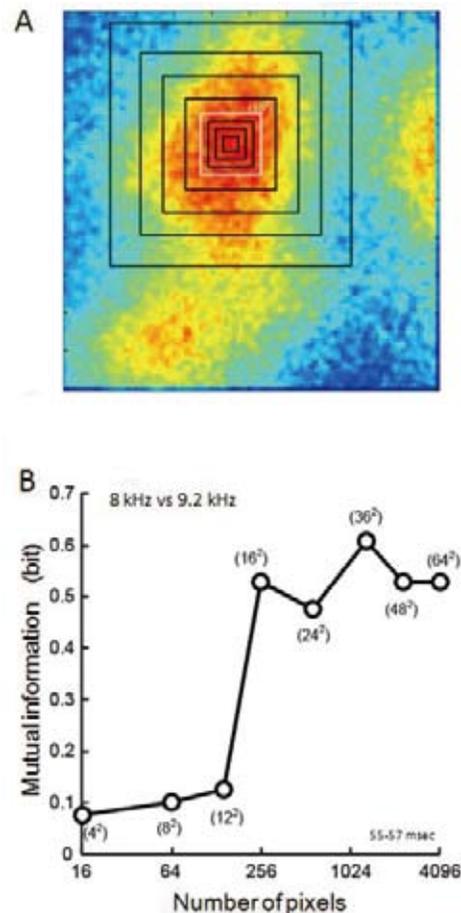


図5 大脳皮質聴覚野の細胞集団による周波数の符号化。A. 解析に用いる活動の範囲を示している。暖色は活動の強い領域。B. 解析に用いる画素数と、皮質活動と周波数の相互情報量の関係(斎藤ら、未発表)。

5. おわりに

本稿では、電位感受性蛍光色素を用いて、大脳皮質活動を長時間でイメージングする方法と、簡単な結果について述べた。長時間イメージングを行うために、高速イメージャーがどうしても必要となるため、これまでイメージング用ハードウェアが高価であった。今後、電子回路技術の発展により、ハードウェアが徐々に入手しやすくなると期待できる。イメージング法で研究を行う際にもう一つ重要なポイントはソフトウェアである。メーカーが付けてくるソフトウェアだけを使用しているだけでは、ユニークなことはできない。従って、少なくとも解析ソフトウェアは自作することが望ましい。現在、Matlabに代表されるような初心者にも分かりやすい開発環境が使用できるようになったので、ソフトウェアを自作することもそれほど困難なことでなくなっている。

現在、電位感受性色素の最大な問題点は細胞選択性がない点である。それにより、SN比が低下し、ある種の神経細胞の活動を選択的に計測しようとしてもできない。これを改善するために、いくつかの研究室においてタンパク性の電位感受性プローブの開発が行われている¹⁶⁾。今のところ*in vivo*に应用できる段階にないが、この方向の研究の発展が大変楽しみである。イメージング法のもう一つの欠点として、組織の深さ方向の情報が得られにくい点である。大脳皮質を例にすると、深さ方向では6つの層からなる層構造を呈しており、層と層の間でどのような情報変換がなされているのかは興味深い問題であるが、イメージング法はこの問題に対して現在無力である。しかし、多電極法や他の計測方法と組み合わせることによって、この問題のある程度の解決が図れる。

我々のグループでは、光イメージング法を大脳皮質の領域同定や音声情報の符号化の研究に応用しているが、ノックアウト動物の解析や神経系や心臓の病態生理の解明など、多くの領域に応用できることは言うまでもない。今後、新しいプローブの開発やイメージングシステムの発展とともに、イメージング技術の応用がますます広がっていくことを期待したい。

謝辞

Loew教授より電位感受性色素をご分与いただいた。ここで述べた仕事は研究室の職員や在籍した大学院生らによるものである。特に、斎藤和也助教、西村方孝君（現在日本学術振興会特別研究員）、前田新一君（現在京都大学助教）、十時慎一郎君（現在島津製作所）らの貢献が大きい。ここで述べた研究は文部科学省特定領域研究および日本学術振興会基盤研究のサポートで行われた。

[参考文献]

- 1) Y. Chen, W. S. Geisler, E. Seidemann, "Optimal decoding of correlated neural population responses in the primate visual cortex.", *Nat. Neurosci.*, **2006**, *9*(11), 1412-20.
- 2) L. B. Cohen, B. M. Salzberg, H. V. Davila, W. N. Ross, D. Landowne, A. S. Waggoner, C. H. Wang, "Changes in axon fluorescence during activity: Molecular probes of membrane potential", *J. Membrane Biology*, **1974**, *19*, 1-36.
- 3) R. C. deCharms, M. M. Merzenich, "Primary cortical representation of sounds by the coordination of action-potential timing", *Nature*, **1996**, *381*(6583), 610-3.
- 4) A. Grinvald, E. E. Lieke, R. D. Frostig, R. Hildesheim, "Cortical point-spread function and long-range lateral interactions revealed by real-time optical imaging of macaque monkey primary visual cortex", *J. Neurosci.*, **1994**, *14*,

- 2545-2568.
- 5) A. Grinvald, R. Hildesheim, "VSDI: A new era in functional imaging of cortical dynamics", *Nature Reviews Neuroscience*, **2004**, *5* (11), 874-885.
- 6) A. Hyvarinen, J. Karhunen, E. Oja, "Independent component analysis", *John Wiley & Sons, Inc, New York*, **2001**.
- 7) S. Inagaki, T. Katura, H. Kawaguchi, and W-J. Song, "Isolation of neural activity from respiratory and heartbeat noises for in vivo optical recordings using independent component analysis", *Neurosci Lett.*, **2003**, *352*, 9-12.
- 8) L. M. Loew, "Design and characterization of electrochromic membrane probes", *J. Biochem Biophys Methods*, **1982**, *6*(3), 243-60.
- 9) A. Matiukas, B. G. Mitrea, M. Qin, A. M. Pertsov, A. G. Shvedko, M. D. Warren, A. V. Zaitsev, J. P. Wuskell, M. D. Wei, J. Watras, L. M. Loew, "Near-infrared voltage-sensitive fluorescent dyes optimized for optical mapping in blood-perfused myocardium", *Heart Rhythm.*, **2007**, *4*(11), 1441-51.
- 10) M. Nishimura, H. Shirasawa, W-J Song, "A light-emitting diode light source for imaging of neural activities with voltage-sensitive dyes", *Neurosci Res.*, **2006**, *54*, 230-234.
- 11) M. Nishimura, H. Shirasawa, H. Kaizo, W-J Song, "New field with tonotopic organization in guinea pig auditory cortex", *J. Neurophysiol.*, **2007**, *97*, 927-932.
- 12) D. Shoham, D. E. Glaser, A. Arieli, T. Kenet, R. Hildesheim and A. Grinvald, "Imaging cortical architecture and dynamics at high spatial and temporal resolution with new voltage-sensitive dyes", *Neuron*, **1999**, *24*, 1-12.
- 13) W-J. Song, M. Kanda, K. Okawa, F. Murakami, "Perinatal development of action potential propagation in cat rubrospinal axons", *J Physiol (London)*, **1995**, *488*, 419-426.
- 14) W-J Song, H. Kawaguchi, S. Totoki, Y. Inoue, T. Katura, S. Maeda, S. Inagaki, H. Shirasawa, M. Nishimura, "Cortical intrinsic circuits can support activity propagation through an isofrequency strip of the guinea pig primary auditory cortex", *Cereb Cortex*, **2006**, *16*(5), 718-729.
- 15) W-J Song and F. Murakami, "Development of functional topography in the corticorubral projection: An in vivo assessment using synaptic potentials recorded from fetal and newborn cats", *J. Neurosci.*, **1998**, *18*, 9354-9364.
- 16) H. Tsutsui, S. Karasawa, Y. Okamura, A. Miyawaki, "Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins", *Nature Methods*, **2008**, *8*, 683-685.
- 17) E. Zwicker, "Masking and psychological excitation as consequences of the ear's frequency analysis. In Frequency Analysis and Periodicity Detection in Hearing (eds R. Plomp and G.F. Smoorenberg)", *Sijthoff, Leiden*, **1970**, 376.

筆者紹介

氏名：宋文杰（Wen-Jie Song）

連絡先：熊本大学大学院生命科学研究部知覚生理学分野 教授
(Tel:096-373-5056 E-mail: song@kumamoto-u.ac.jp)

1984年 中国海洋大学卒業

1989年 大阪大学基礎工学部助手

1990年 大阪大学より学位取得後、米国テネシー大学医学部留学

1998年 大阪大学大学院工学研究科准教授

2006年より現職

現在進行中の主な研究テーマ：聴覚生理学と学習の神経機構

漢方診療・再発見 6 漢方薬の水分代謝調節作用

磯濱 洋一郎
熊本大学大学院生命科学研究部
薬物活性学分野

1. はじめに

漢方薬は、永い使用経験の中でその効果が検証され、現在の我が国の医療の中で、様々な疾患の治療手段として一定の役割を果たしている。漢方薬の多くは現代医学的な薬物とは異なった作用特性をもつが、浮腫など種々の疾患に伴う症状として生じる水分代謝の異常の是正は、漢方薬が最も有効な使用法かも知れない。しかし、漢方薬による水分代謝調節の基礎となる薬理学的機序については、未だ不明な部分が多い。例えば、代表的な水分代謝調節作用をもつ漢方薬である五苓散などは、尿量増加作用の強い方剤であるが、これらは西洋医学的な利尿薬と異なり、血漿中の電解質濃度への影響が少ない¹⁾。すなわち、この方剤は西洋医学的な利尿薬とは異なる機序によって尿量を増やしている可能性が高い。一方、近年になって、細胞膜の水透過性を調節するアควアポリン (aquaporin: AQP) と呼ばれる水チャンネルが見出され、現在までに13種類のアイズフォームが同定されている(表1)。各AQPの欠損マウスが作製され、その表現型の解析が進み、腎臓に存在するAQP1, AQP2およびAQP3の欠損で尿量の著明な増加が生じることや^{2,4)}、脳のアストログリアにあるAQP4の欠損では脳浮腫の形成が抑制されることなどが分かってきた⁵⁾。すなわち、従来、浸透圧や静水圧といった物理化学的ポテンシャルだけで説明されてきた生体内の水の代謝は、AQPにより調節される細胞膜の透過性によって、その効率に大きな影響が出るのである。

我々は、漢方薬のユニークな水代謝調節作用は、このAQPの機能調節ではないかと考え、基礎薬理学的に検討している。本稿では、これまでに明らかにした漢方薬によるAQP類に対する作用の一端を紹介したい。

2. 五苓散およびその構成生薬によるAQP阻害作用

AQP活性に対する薬物の作用は、AQP類を発現する細胞の細胞膜水透過性を調べることで評価できる。細胞懸濁液をストップ・フロー分光光度計という装置の中で、急速に高浸透圧あるいは低浸透圧溶液と混合し、その後の細胞容積の変化を経時的に測定し、変化速度の初速度から透過性を算出する⁶⁾。まずは、AQP5を発現するマウス肺上皮細胞株MLE-12細胞を用いて、細胞膜水透過性に対する五苓散の作用を調べた。その結果、五苓散は、処理濃度(0.03-3 mg/ml)依存的に本細胞の細胞膜水透過性を抑制し、1 mg/ml以上の濃度では、代表的AQP阻害物質の

表1 AQP アイズフォームの体内分布

AQP	水透過性	体内分布
AQP0	Low	レンズ(眼球)
AQP1	High	赤血球, 肺, 腎, 脳, 眼球, 血管内皮
AQP2	High	腎
AQP3	High	皮膚, 腎, 肺, 眼球, 消化管
AQP4	High	腎, 脳, 肺, 消化管
AQP5	High	唾液腺, 汗腺, 肺
AQP6	Low	腎
AQP7	High	脂肪組織, 腎, 睪丸
AQP8	High	腎, 肝, 脾, 消化管, 睪丸
AQP9	Low	肝, 白血球, 脳, 睪丸
AQP10	Low	消化管
AQP11	?	脳, 肝, 腎
AQP12	?	?

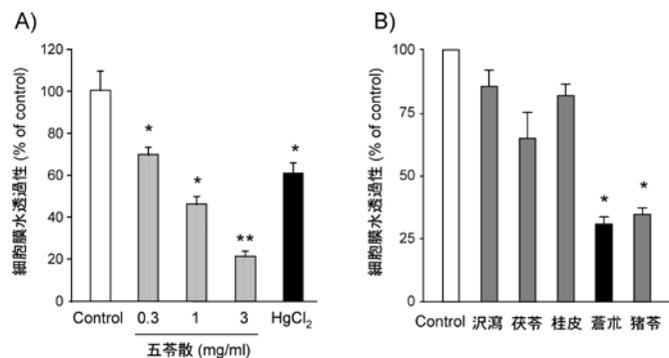


図1 肺上皮細胞の細胞膜水透過性に対する五苓散およびその構成生薬の作用

HgCl₂ (500 μM) と同程度の抑制作用を示した(図1-A)。

五苓散を構成する各生薬エキスの中で、同様の細胞膜水透過性の抑制作用は、蒼朮および猪苓に認められ(図1-B)、これらの生薬が主として関わっていると考えられた。なお、五苓散および蒼朮は細胞膜電位には影響せず、さらに、*in vitro*で合成したAQP5タンパク質を含むプロテオリソソームの水透過性も抑制した。すなわち、五苓散および蒼朮による細胞膜水透過性抑制作用は、電解質の移動や、脂質膜の自然拡散に影響したのではなく、AQPの水チャンネル機能の抑制に基づくことが確認された。

五苓散および蒼朮のAQP阻害作用に関わる活性成分についても追求したが、含有される金属成分が主な活性成分であると考えている。ICP-MS分析で蒼朮エキス中の金属を調べると、マンガン、クロムおよび銅が豊富に含まれることが分かり、さらに、MnCl₂に五苓散と同様のAQP抑制作用が認められた。従って、これらの生薬成分に含まれるマンガンイオンに依存すると推定している。

3. 蒼朮および種々の金属によるAQP阻害のアイソフォーム選択性

興味深いことに、五苓散、蒼朮およびそれらの活性成分であると考えられるマンガンによるAQP阻害作用には、AQP類のアイソフォーム選択性が認められた。アフリカツメガエルの卵母

細胞にAQP1~5の各AQP類を発現させ、これらの水透過性に対する作用を調べると、マンガンを含む薬物はAQP3, AQP4およびAQP5を阻害し、AQP1およびAQP2には著明な作用を示さないことが分かった(図2)。従来、AQP類の阻害物質としては、 HgCl_2 がよく知られている。しかし、 HgCl_2 はAQP4を除く全てのアイソフォームを阻害し、マンガンを含む薬物によるAQP類の阻害作用は HgCl_2 とは明らかにアイソフォーム選択性が異なっていた。

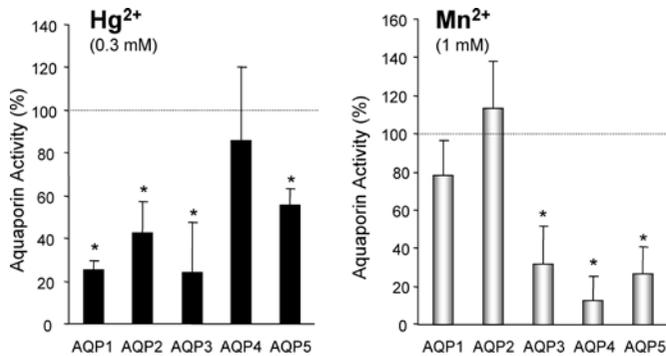


図2 水銀とマンガンのAQP阻害作用の比較

4. 五苓散の水分透過抑制作用の*in vivo*での効果

AQP4の欠損マウスでは、脳浮腫が著明に抑制されることが報告されている⁷⁾。すなわち、AQP4の抑制物質には脳浮腫抑制作用が期待できる。そこで、五苓散によるAQP抑制作用の実効性を*in vivo*で評価するために、マウス水中毒モデルを用いて脳浮腫抑制作用を調べた。マウスの腹腔内に体重の20%の蒸留水および抗利尿ホルモンを投与して脳浮腫を誘発した。本実験において、五苓散を与えないコントロールのマウスは、全て蒸留水の腹腔内投与後2時間以内にけいれんを生じた後に死亡した。しかし、五苓散(1 g/kg)を30分前に経口投与したマウスでは、24時間以内での死亡が5匹中わずかに1匹であり、他の4匹にも著明な中枢神経の興奮症状は認められなかった(図3)。この結果を五苓散に含まれるマンガンによるAQP4抑制と直接結びつけるためには、マンガンを含まない五苓散の作用など、さらに注意深い検討が必要である。しかし、これらのマウスでは、投与した高用量の抗利尿ホルモンのために、尿量の増加は生じなかった。すなわちこれらの結果は、五苓散の抗脳浮腫薬としての有効性を示唆するとともに、五苓散の抗浮腫作用(利尿作用)の機序が利尿作用ではなく、脳浮腫の形成を防ぐ作用であることを示唆する興味深い成績と考えている。

5. おわりに

漢方薬は多成分系の薬物であり、その作用は含有する多くの活性物質の薬理作用が相乗的、相加的あるいは拮抗的に緩衝しあう複合作用の結果として現れる。また、経口投与を原則とするため、生薬そのものに含まれる成分だけでなく、活性代謝物の存在も意識する必要がある。従って、漢方薬の薬効を評価し、その特性を明らかにするためには、ヒトあるいは特定の疾患モデルの動物を用いた*in vivo*の試験が重要なことは言うまでもない。しかしその一方で、本研究のように、特定のタンパク質の機能に着目して漢方薬の作用を調べてみると、新たな作用が見えてくることもある。漢方薬のAQPの調節作用については、本稿で述べた五苓散による抑制作用の他にも、滋潤作用をもつとされる方剤が、

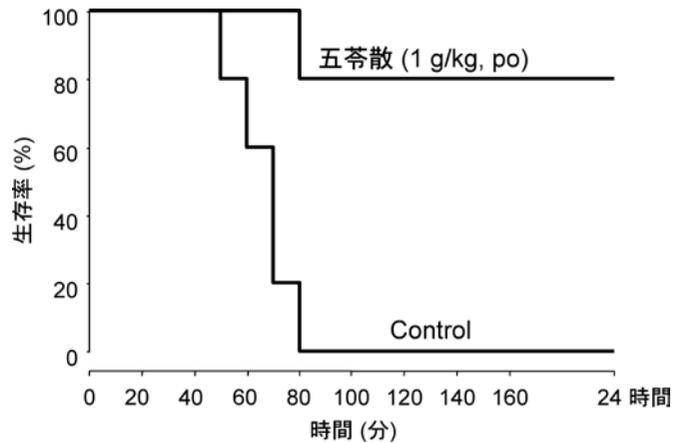


図3 急性水中毒マウスの生存率に対する五苓散の作用

分泌腺型のAQP5の一酸化窒素による阻害を抑制して⁷⁾、その機能を促進することや、皮膚科領域でよく用いられる方剤に含まれる生薬エキスは皮膚型のAQP3の発現を亢進することなども最近になって分かっている。

先述のように、AQP類は新たな水分代謝調節薬の開発のための新たな標的分子として近年、注目を集め、2002年にはその発見者であるP. Agre博士がノーベル化学賞を受賞している。1800年前の書物「傷寒論」に掲載されている漢方薬に、この最新の標的分子の調節作用があるとは、先人の知恵に改めて驚かされるばかりである。

【参考文献】

- 1) 原中瑠璃子・他: Proc. Symp., WAKAN-YAKU, 1981, 14, 105.
- 2) Ma, T. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 4296-4299.
- 3) Canfield, M. C. *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, **1997**, 6, 1865-1871.
- 4) Ma, T., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2000**, 97, 4386-4391.
- 5) Manley, G. T. *et al.*, *Nat. Med.*, **2000**, 6, 159-163.
- 6) Nagai, K. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **2007**, 354, 579-584.
- 7) Song, Y. *et al.*, *J. Gen. Physiol.*, **2001**, 117, 573-582.

筆者紹介



氏名: 磯濱 洋一郎

年齢: 45歳

所属: 熊本大学大学院生命科学研究部・薬物活性学分野 准教授

住所: 〒862-0973 熊本市大江本町 5-1

連絡先: TEL & FAX: 096-371-4182

E-mail: isohama@gpo.kumamoto-u.ac.jp

略歴: 熊本大学薬学部卒, 熊本大学大学院薬学研究科・博士前期課程修了
博士(薬学)
熊本大学薬学部教務員(平成3年), 助手(平成9年), 助教授(平成12年)を経て現職へ

研究テーマ: 呼吸器系の薬理学

アクアポリンの発現と機能調節

趣味: 釣り

Topics on Chemistry

ケージド化合物と二波長・二光子励起法を用いた神経細胞の受容体応答の観察

株式会社同仁化学研究所 田中 由香

近年、様々な手法を用いた神経細胞の機能研究が盛んに行われている。その一つが二光子励起顕微鏡による神経細胞の動態の研究である。この装置の開発により、これまで観察が不可能であった細胞内部のダイナミックな変化を捉えることが可能となった。二光子励起は、一光子励起の約2倍の波長の光で2つの光子が同時に分子に吸収され一光子励起とほぼ同じ励起状態になる。二光子励起を起こすには非常に高い光子密度が必要であり、この現象を起こすためにはフェムト秒レーザーが用いられる。フェムト秒レーザー光は非常に短い時間(約100フェムト秒)で極端に強いレーザー強度をもつパルスレーザーである。これをレンズで集光すると焦点では光子密度が非常に高くなり、通常起こりえない二光子吸収と励起が起きる(Fig. 1)。焦点以外では光子密度が低いので二光子励起は起こらない。また、二光子励起は近赤外の光を用いることで組織のより深部まで観察することができ、厚みのある組織標本内の観察が可能である。本稿では、二光子励起顕微鏡とケージド化合物を用いてニューロン膜電位の観察に成功した研究を紹介する¹⁾。

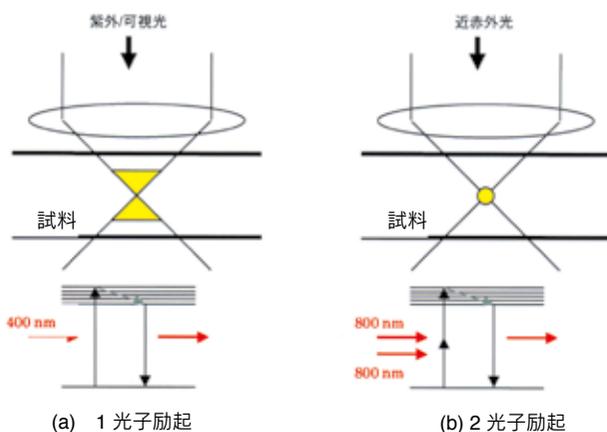


Fig. 1 一光子励起と二光子励起の原理

二光子励起顕微鏡の利点の一つは、生体組織におけるケージド化合物の局所的な放出と蛍光イメージングができる点である。特に神経細胞では710-730 nmの光で分解し、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を生じるニトロインドールケージドグルタミン酸類が二光子励起の実験に広く用いられている。脳切片における二光子励起に良く用いられるのは4-methoxy-7-nitroindolyl-

glutamate(MNI-Glu)である(Fig. 2-(a))。Kantevariと松崎らはグルタミン酸の放出源としてMNI-Gluよりも低濃度でかつ弱いレーザー強度で使用できる4-carboxymethoxy-5, 7-dinitroindolyl-glutamate(CDNI-Glu)を使用した(Fig. 2-(b))。また、抑制性神経伝達物質である γ -aminobutyric acid(GABA)の放出源として、長波長で光分解する7-(dicarboxymethyl)-aminocoumarin-caged GABA(*N*-DCAC-GABA)を新たに開発した(Fig. 2-(c))。N-DCAC-GABAは、380 nm付近に極大吸収をもち、CDNI-Gluの λ_{max} (280-330 nm付近)には吸収を持たない。このため、両者をそれぞれの波長で別々に光分解することが出来る。N-DCAC-GABAは生理的緩衝液中での安定性が高く(pH7.4, 23-25°Cで2ヶ月安定)、効率よく光分解され、GABAを放出する。

彼らはCDNI-GluとN-DCAC-GABAの光分解を利用して、ラットの海馬CA1ニューロンにおける活動電位の制御とCA1錐体細胞におけるグルタミン酸レセプター(AMPA)とGABAレセプターの二波長、二光子励起によるマッピングを試みた。CA1錐体細胞の或る部位では720 nmの照射でグルタミン酸が放出されるとAMPAの素早い応答が観察された。また別の部位では830 nmの照射によりGABAが放出されAMPAレセプターの応答はなく、GABAレセプターのゆっくりとした応答が観察された。これにより、CA1錐体細胞内のAMPAとGABAレセプターの位置をマッピングすることが出来た。このようなマッピング実験を行うには、従来のチタン-サファイアレーザーでは二波長を切り替えるスピードが遅すぎるため二光子励起顕微鏡には不向きであった。このため、彼らは新たに3つのチタン-サファイアレーザーをもつ二光子励起顕微鏡を開発し、二波長変換とイメージングを行えるようにした。この結果、生きた脳切片においてCDNI-GluとN-DCAC-GABAをそれぞれの波長で光分解させ、グルタミン酸とGABAの放出の制御により、神経伝達のON/OFFの制御が可能となり、神経細胞中のレセプターのマッピングを行うことができた。

このように二波長、二光子励起は生体組織深部での細胞内光分解を直接的に制御できる有用な手法である。互いに対となるような神経伝達物質の放出を幅広い波長で行うことが出来れば、今後神経伝達に関する興味深い情報を得ることが期待できる。

[参考文献]

- 1) Srinivas Kantevari, M. Matsuzaki, Y. Kanamoto, H. Kasai, Graham C R Ellis-Davies, *Nature Methods*, **2010**, 7, 123

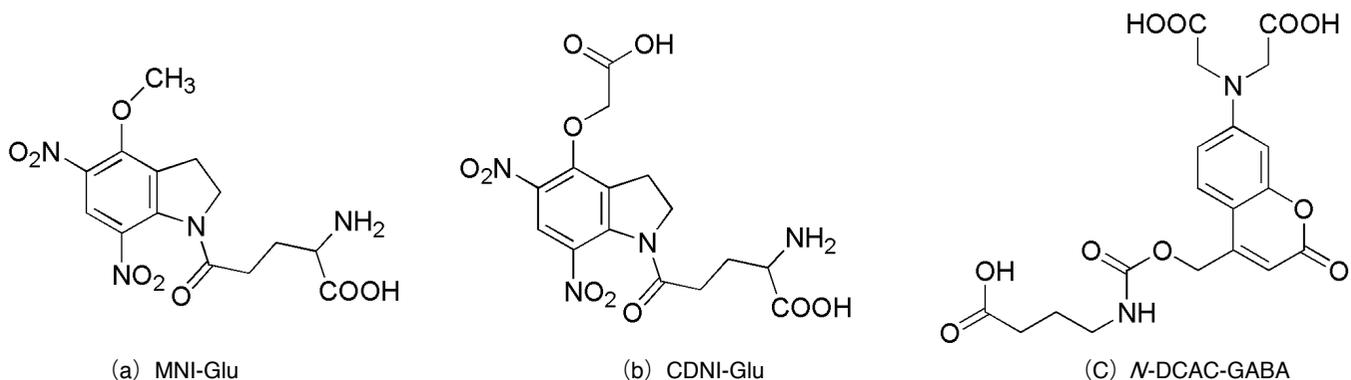


Fig. 2 ケージド化合物の構造式

Topics on Chemistry

紅色細菌由来タンパク質を用いた蛍光標識

株式会社同仁化学研究所 坂本 智昭

ヒトゲノムを始め、種々の生物のゲノム解析が完成されるに伴って、多くのタンパク質遺伝子の塩基配列、つまりアミノ酸配列が明らかになった。しかし、これらのタンパク質の中には、その機能や役割が不明のものも数多い。ポストゲノムの重要な課題の一つは、それぞれのタンパク質の機能や役割を解明することである。タンパク質の挙動・機能・役割を検証する有効な手段として、様々な機能をもった Tag が利用されている。Tag とは、本来、「荷札」や「目印」を意味する言葉であるが、目印として Tag がつけられた標的タンパク質の挙動、機能、役割、分布などを、Tag の機能を利用して検証することができる。

標的タンパク質に Tag をつけるには、通常、タンパク質遺伝子に Tag の塩基配列を繋げた cDNA を生細胞に導入して、Tag 付きタンパク質を発現させればよい。Tag の機能によって、標的タンパク質に対する異なる用途が知られている。たとえば、Tag に固有の基質との反応、蛍光性 Tag の蛍光を利用して標的タンパク質の発現、分布、他のタンパク質との相互作用などの挙動を調べることができる。また、Tag の親和性を利用してタンパク質の精製を行うことも可能である。標的タンパク質の機能への影響を考慮すると、Tag のサイズ（分子質量）は小さい方が望ましい。

His-Tag(0.85 kDa) は、6 個程度の連続するヒスチジン残基からなるペプチドである。His-Tag は、金属イオンに対する親和性が高く、NTA 誘導体の Ni 錯体と結合する。このことを利用して、固定化 Ni 錯体カラムを用いた標的タンパク質の精製は、すでに一般化されている。

GST-Tag(26 kDa) および MBP-tag(40 kDa) は、それぞれグルタチオンおよびマルトースとの親和性が高い。これら 3 つの Tag は、リガンドとの親和性を利用してタンパク質の精製、担体への固定化に利用されている。

GFP(27 kDa) は蛍光性タンパク質で、蛍光性 Tag として利用されている。生細胞内の遺伝子導入により GFP が結合した標的タンパク質を細胞内で発現させて、蛍光によるイメージングでタンパク質の発現や局在化の検証を行うことができる。

Halo-Tag(33 kDa) および CLIP-Tag は、基質と特異的な共有結合を形成するので、基質と結合した蛍光性物質を利用した標的タンパク質の蛍光イメージング、精製、担体への固定化に利用されている。Halo-Tag および CLIP-Tag は、蛍光によるイメージングの際、標的タンパク質に結合した Tag に対する基質に結合した蛍光物質を利用するので、GFP と比べて目的とするタイミングで蛍光イメージングが可能である。しかし、目的の Tag と結合する基質と結合していない基質の蛍光との区別ができないため、結合していない基質を洗浄等により除去する操作が必要となる。このように Tag は、その種類によって標的タンパク質の機能解明に様々な役割を担っており、それぞれの Tag に特徴があり、長所および短所もある。

本稿では、Halo-Tag、CLIP-Tag と同じ、基質と共有結合を形成する photoactive yellow protein(PYP) を Tag として使用したタンパク質標識試薬 CATP 及び FCTP を用いて行ったタンパク質標識について紹介する¹⁾。

この Tag の系において、タンパク質標識試薬の FCTP は、単体ではわずかにしか蛍光を出さないが、PYP と結合するとより強い蛍光を放つようになる。PYP の分子質量は 14 kDa であり他の Tag タンパクと比較して小さい。

PYP は、125 個のアミノ酸より構成される紅色細菌由来の水溶性タンパク質で、動物細胞内には存在しない。PYP は 4-ヒドロキシけい皮酸チオエステルや 7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸誘導体と、PYP の 69 番目のシステインとのトランスチ

オエステル化によって結合する。CATP は、リンカーにアジド基を持った 7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸誘導体である。FCTP は、CATP にアルキン基を持つフルオレセイン (6-carboxy-fluorescein propargylamide, 6-CFA) をクリックケミストリー (アジドと三重結合の反応) により結合したものである (Fig. 1)。

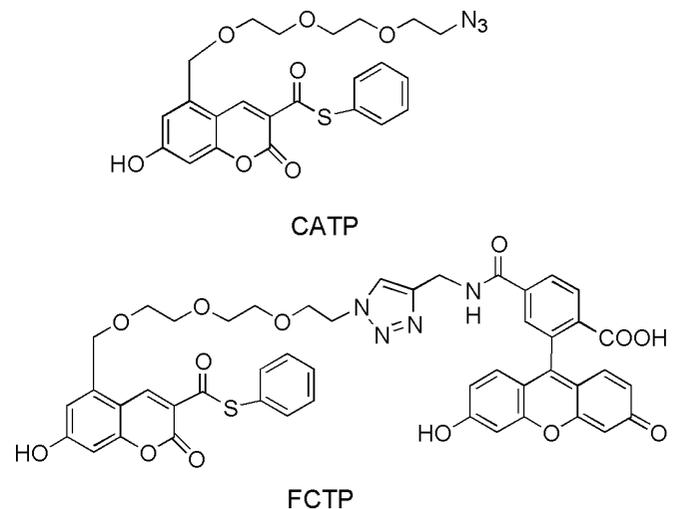


Fig. 1 CATP および FCTP の構造

FCTP はリンカーを介してクマリン骨格にフルオレセインが結合している化合物で、分子内会合により蛍光が消光されていることが確認されている。PYP と結合するとフルオレセインとクマリンが解離してフルオレセインの蛍光を発するようになる (Fig. 2)。

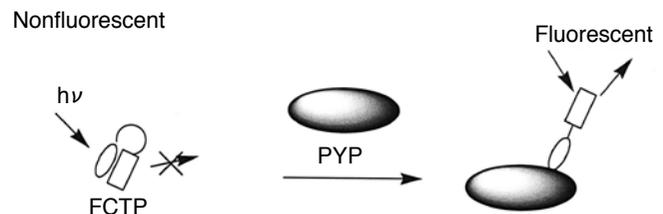


Fig. 2 PYP に基づく FCTP の蛍光標識システム

in vitro でのタンパク質の標識は、緩衝液中で PYP に CATP および FCTP を加えて行われた。SDS-PAGE 分析を行ったところ、PYP より高分子側に蛍光帯が現れた。PYP と CATP および FCTP との結合の確認のために MALDI-TOF MS を測定したところ、CATP および FCTP が結合した PYP の分子量に相当するピークが確認された。CATP および FCTP が PYP のシステインのチオール基と反応する際に、チオールの影響を調べるためにグルタチオン (最大濃度 10 mM) を共存させて標識化を行ったところ影響は全くなかった。

in vivo での標識化は、HEK293T 細胞の細胞膜上に発現させた PYP-PDGFRtm (PYP と血小板増殖因子由来のトランスメンブランドメインの融合タンパク質) に、CATP および FCTP を加

えた。蛍光顕微鏡で確認したところ、PYP-PDGFRtmが発現した細胞で、蛍光が確認された。蛍光の検出は、CATP に対しては 436 nm の励起波長でクマリンの蛍光を見ており、FCTP に対しては、488 nm の励起波長でフルオレセインの蛍光が観測された。FCTP は、細胞膜上の PYP と結合することでフルオレセインとクマリンが解離してフルオレセインの蛍光が放たれるようになる。蛍光標識の際、CATP は細胞膜を透過することがわかった。細胞質中に発現させた MBP-PYP(マルトースと結合する融合タンパク質) への CATP 標識は、細胞内で MBP-PYP が発現した細胞のみで確認された。

PYP の FCTP による標識反応では、FCTP が PYP と特異的に結合して蛍光を発することがわかり、FCTP は、単体では微弱な蛍光を放つのみであるが、PYP と結合することでより強い蛍光を放つようになる。したがって、FCTP による蛍光イメージングの際、PYP と結合していない FCTP の洗浄の操作を省くことができる可能性があると思われる。CATP は、膜透過性があるため、細胞内の蛍光イメージングに利用できることが確認された。また、CATP は、クリックケミストリーによりアジド部分に他のプローブを導入することで応用の可能性が広がると思われる。今回紹介した PYP と CATP および FCTP 系を用いることで、タンパク質の機能・役割・挙動などの解析への利用が期待される。

[参考文献]

- 1) Y. Hori, H. Ueno, S. Mizukami, K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 16610

新製品

グルタチオン分別定量キット

GSSG/GSH Quantification Kit

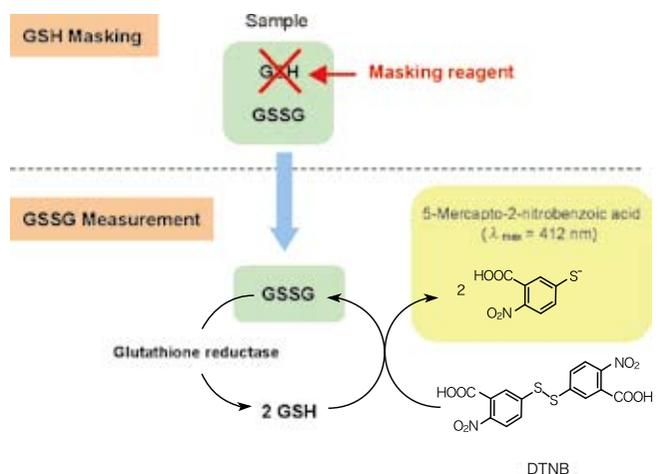
<特長>

- ・グルタチオン（酸化型、還元型）の分別定量が可能
- ・短時間で多検体の測定が可能

グルタチオン (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine) は生体内に存在するトリペプチドで、Glutathione Peroxidase、Glutathione S-Transferase および Thiol Transferase 等の酵素基質として抗酸化や薬物代謝などに関与しています。グルタチオンは通常、生体内で還元型 (GSH) として存在しています。しかし、酸化ストレスなどの刺激によって還元型 (GSH) から酸化型 (GSSG) に変換されるため、GSH と GSSG の比率が酸化ストレスの指標として注目されています。小社では総グルタチオン量を定量するためのキット Total Glutathione Quantification Kit (品コード: T419) を販売しておりますが、GSSG および GSH をそれぞれ定量したいという要望が数多く寄せられました。そこで、このたび GSH と GSSG を分別定量できるキットを開発致しました。本キットには、GSH を隠蔽するためのマスキング剤が含まれています。このマスキング剤をサンプルに添加することによって、サンプル内の GSH のみを隠蔽することができます。その後、酵素リサイクリング法を用いた DTNB (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)) の発色 ($\lambda_{\max} = 412 \text{ nm}$) を測定することによって GSSG のみを定量することができ、別途測定した総グルタチオン量から GSSG 量を差し引くことで GSH 量を求めることが可能です。なお総グルタチオンの測定範囲は 0.5 ~ 50 $\mu\text{mol/l}$ 、GSSG の測定範囲は 0.5 ~ 25 $\mu\text{mol/l}$ となっております。

以下に赤血球中の GSSG および GSH を定量した例を示します。本キットを用いた測定の結果、赤血球中の総グルタチオン濃度 433 $\mu\text{mol/l}$ (GSSG 濃度 23 $\mu\text{mol/l}$ 、GSH 濃度 387 $\mu\text{mol/l}$; GSSG/GSH=0.059) という値を得ることができました。一般的に赤血球中の GSSG 量は GSH の数%程度であることが知られています。

<測定原理>



第 21 回 フォーラム・イン・ドージンのご案内

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

タイトル：エビジェネティクスによる細胞のメタモルフォーゼ

日 時：2010年11月26日(金)

場 所：熊本ホテルキャッスル
熊本市城東町 4-2

<赤血球中の GSSG / GSH 測定例>

サンプルの前処理

- 1) 抗血液凝固剤を加えた血液を、1000 x g で 10 分間 4℃にて遠心した。
- 2) 上清を捨て、4 倍量の 5% 5-スルホサリチル酸 (SSA) で溶血した。
- 3) 8,000 x g で 10 分間 4℃にて遠心した後、上清を測定試料とした。

総グルタチオンの定量

- 1) 0.5% SSA で 10 倍に希釈した測定試料および GSH standard solution 40 μl を各ウェルに添加した後、Buffer solution 120 μl を各ウェルに添加した。
- 2) Substrate working solution 20 μl を各ウェルに添加した後、Coenzyme working solution および Enzyme working solution を 20 μl ずつ各ウェルに添加した。
- 3) 37℃で 10 分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダーを用いて 405 nm 吸光度を測定した。

測定試料の 405 nm 吸光度 (実測値 1.397) から試料中の総グルタチオン濃度を検量線 (Fig. 1) より求めた。その結果、総グルタチオン濃度は 43.3 μmol/l (原液の測定試料中は 433 μmol/l) であった。

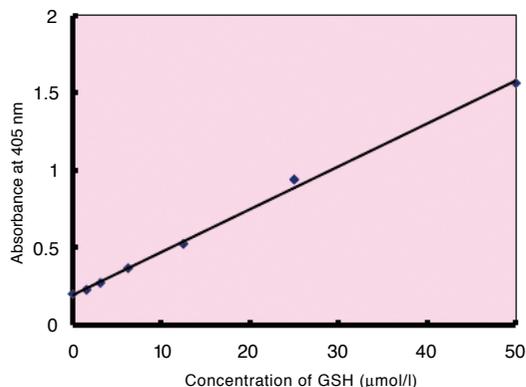


Fig. 1 総グルタチオン定量のための検量線 (405 nm のフィルターを使って吸光度を測定)

酸化型グルタチオン (GSSG) の定量

- 1) 0.5% SSA で 10 倍に希釈した測定試料および GSSG standard solution 200 μl に Masking reagent 4 μl を添加した後、40 μl を各ウェルに添加した。
- 2) Buffer solution 120 μl を各ウェルに添加した後、37℃で 1 時間インキュベートした。
- 3) Substrate working solution 20 μl を各ウェルに添加した後、Coenzyme working solution および Enzyme working solution を 20 μl ずつ各ウェルに添加した。
- 4) 37℃で 10 分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダーを用いて 405 nm 吸光度を測定した。

測定試料の 405 nm 吸光度 (実測値 0.312) から試料中の GSSG 濃度を検量線 (Fig. 2) より求めた。その結果、GSSG 濃度は 2.3 μmol/l (原液の測定試料中は 23 μmol/l) であった。

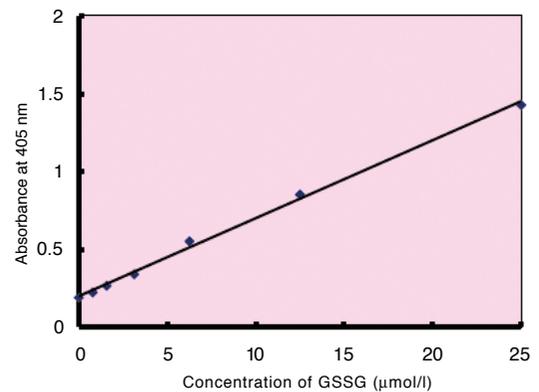


Fig. 2 GSSG 定量のための検量線 (405 nm のフィルターを使って吸光度を測定)

還元型グルタチオン (GSH) の算出

下記の数式に当てはめて GSH 濃度を算出した結果、GSH 濃度は 38.7 μmol/l (原液の測定試料中は 387 μmol/l) であった。

$$\text{GSH 濃度} = \text{総グルタチオン濃度} - (\text{GSSG 濃度} \times 2)$$

※操作に必要な試薬類 (5-スルホサリチル酸 (SSA)、エタノールは除く) は、キットに含まれています。

<キット内容>

- ・ Enzyme solution 50 μl × 1 本
- ・ Coenzyme 2 本
- ・ Buffer solution 60 ml × 1 本
- ・ Substrate (DTNB) 4 本
- ・ Standard GSH 1 本
- ・ Standard GSSG 1 本
- ・ Masking reagent 20 μl × 1 本



品名	容量	希望納入価格 (¥)	メーカーコード
GSSG/GSH Quantification Kit	200 tests	50,000	G257

試作品

アセチルコリンエステラーゼ特異的基質

MATP+

<特長>

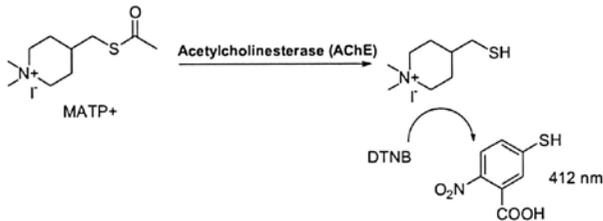
- ・アセチルコリンエステラーゼに対する高い選択性
- ・ブチリルコリンエステラーゼ阻害剤添加は不要
- ・DTNBを用いた Ellman 法によりアセチルコリンエステラーゼ活性を簡便に測定可能

アセチルコリンエステラーゼ (AChE) は、神経伝達物質であるアセチルコリンを分解して神経伝達系をコントロールする重要な酵素の一つであり、脳や血中等に存在することが知られています。この酵素は有機リン系およびカルバメート系の農薬や殺虫剤などによって活性が低下することから、これら薬物の暴露指標として用いられています。また、アルツハイマー病では神経障害によってアセチルコリン量が減少するため、AChE 阻害剤がアルツハイマー病治療薬として注目されています¹⁾。

現在、AChE 活性測定には、基質であるアセチルチオコリンと検出試薬である DTNB を用いた Ellman 法が一般的に用いられています^{2,3)}。しかしながら、アセチルチオコリンは、AChE 選択性が低く、生体内に存在する非特異的コリンエステラーゼ (ブチリルコリンエステラーゼ; BChE) に対しても反応します。そのため、AChE 活性を測定するためには BChE 阻害剤を添加する必要がありますが、操作が煩雑でした⁴⁻⁶⁾。

MATP+ は、独立行政法人 放射線医学総合研究所 (NIRS) によって開発された新規のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 基質です⁷⁾。

<測定原理>



この基質は、一般的に用いられているアセチルチオコリンに比べ、非常に高い AChE 選択性を有しています (Fig.1, 2)。そのため、BChE 阻害剤を添加することなく AChE 活性を選択的かつ簡便に測定することができます。

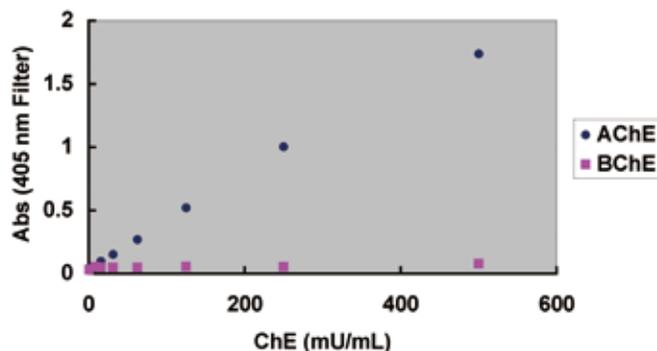


Fig. 1 MATP+ の AChE 選択性 (DTNB 発色)

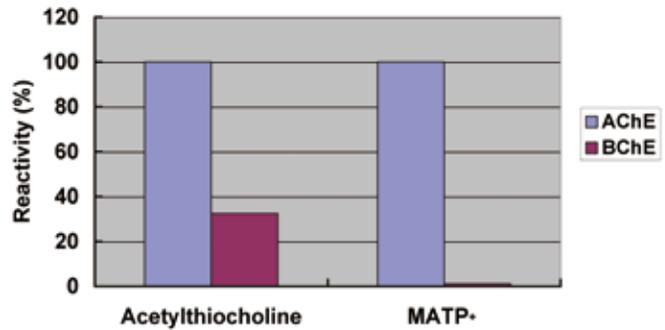


Fig. 2 AChE 選択性の比較

注) AChE に対する反応性を 100% とした場合の値を示す。

本試薬は、既存のアセチルチオコリンと同様の方法によって使用することが可能です。本試薬を中性バッファーに溶解した後、AChE を含むサンプルおよび DTNB を添加し、反応に伴う 412 nm 吸光度を測定することによって AChE 活性を測定することができます。また、Karnovsky/Roots 法を用いた神経組織の AChE 染色にも有用です。

[参考文献]

- 1) 杉本八郎 日薬理誌, 2004, 124, 163.
- 2) Vanessa Battissi et al., Clin. Chim. Acta., 2009, 402, 114.
- 3) M. Salud Garcia-Ayllon et al., Hepatology, 2006, 43, 445.
- 4) Stephen Brimijoin and Pamela Hammond, J. Neurochemistry, 1988, 51, 1227.
- 5) Franz Worek et al., Clin. Chim. Acta, 1999, 288, 73.
- 6) Ramachandra S. Naik et al., Chem. Biol. Interact., 2008, 175, 298.
- 7) T. Kikuchi, T. Okamura, K. Fukushi, and T. Irie, Biol. Pharm. Bull., 2010, 33, 702.

関連製品

DTNB

DTNB はチオール基を比色定量する試薬で、Ellman 試薬と呼ばれています。DTNB は SH 基が存在すると SH 基の量に相当する量の S-S 結合が切れて、安定な 5-Mercapto-2-nitrobenzoic acid を生成します。この生成したチオールの吸光度 ($\lambda_{max} = 412 \text{ nm}$, $\epsilon = 1.55 \times 10^4$) から SH 基を定量します。しかもこのチオールの吸収極大波長は、DTNB の吸収 ($\lambda_{max} = 325 \text{ nm}$) とほとんど重ならないので、未反応の DTNB が残っても測定に支障とはなりません。

なお、亜硫酸イオン (SO_3^-) も同様の反応を起こすので、共存する場合には妨害イオンとなりますが、共存しない条件では SO_3^- の比色試薬としても使用できます。

DTNB の至適 pH は 7 以上の弱アルカリ性ですが、弱酸性でのチオール基の測定には、類似化合物である 2-PDS、4-PDS が使用できます。

応用可能な物質 生体試料中の微量 SH 基の検出、比色定量

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
DTNB	1 g	4,400	D029
2-PDS	1 g	14,200	P016
4-PDS	1 g	14,200	P017

開発中

近赤外蛍光標識キット

ICG Labeling Kit - NH₂

<特長>

- ・ 50 ~ 200 µg の抗体やタンパク質を簡単に標識可能
- ・ 色素量やバッファーを最適化することにより標識抗体の不溶化が起こりにくい
- ・ 試料細胞への傷害や自家蛍光の少ない長波長の励起光が使用可能

ICG (Indocyanine Green) は肝機能、肝予備能検査のための色素負荷試験にも用いられているシアニン色素で、近赤外領域に蛍光を持ちます。励起波長は 774 nm 付近、蛍光波長は 805 nm 付近であり、生体内で用いた場合でも、ヘモグロビンなどによる妨害を受けにくいという蛍光特性があり、近赤外蛍光を利用した *in vivo* 蛍光イメージングへの応用が期待されています。ICG Labeling Kit - NH₂ はアミノ基を有するタンパク質、特に抗体に ICG を標識するためのキットです。既に発売している Fluorescein Labeling Kit - NH₂ や Hilyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH₂、Hilyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH₂ と同様にキット付属の NH₂-Reactive ICG は分子内に活性エステルを有しているため、アミノ基を有する標的分子と混合するだけで安定な共有結合を形成します (Fig.1)。タンパク質に ICG を標識する場合、標識反応を阻害するような低分子化合物 (トリスなど) や未反応の NH₂-Reactive ICG は付属の Filtration Tube を用いて容易に除去することができます。ICG 標識 IgG の場合、励起・蛍光波長は 774/805 nm です (Fig.2)。本キットには標識に必要なすべての試薬と作製した ICG 標識体を保存するための溶液が含まれています。

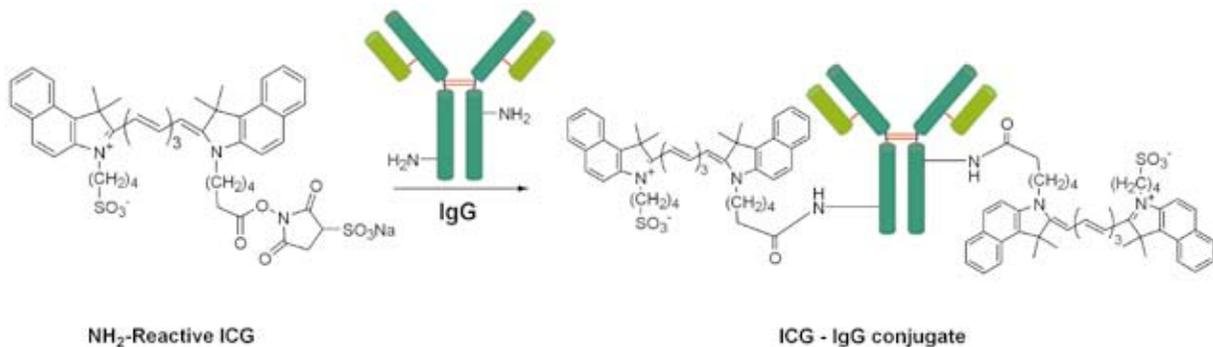


Fig.1 抗体への標識反応

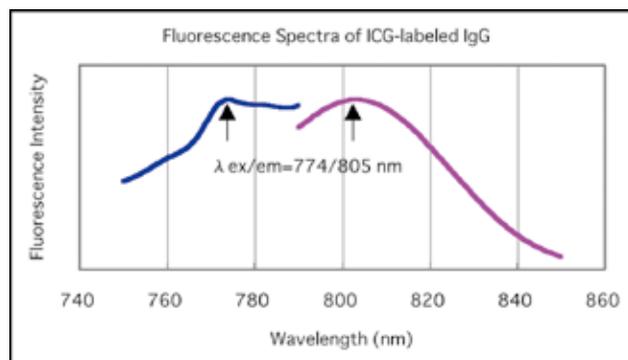


Fig.2 ICG 標識抗体の蛍光スペクトル

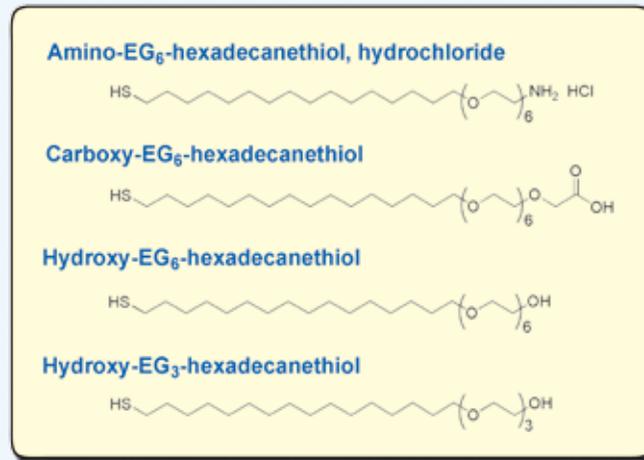
[参考文献]

- 1) Dual-Modality Molecular Imaging Using Antibodies Labeled with Activatable Fluorescence and a Radionuclide for Specific and Quantitative Targeted Cancer Detection, M. Ogawa, C. A. S. Regino, J. Seidel, M. V. Green, W. Xi, M. Williams, N. Kosaka, P. L. Choyke and H. Kobayashi, *Bioconjugate Chem.*, **2009**, *20* (11), 2177.
- 2) *In vivo* Molecular Imaging of Cancer with a Quenching Near-Infrared Fluorescent Probe Using Conjugates of Monoclonal Antibodies and Indocyanine Green, M. Ogawa, N. Kosaka, P. L. Choyke and H. Kobayashi, *Cancer Res.*, **2009**, *69* (4), 1268.
- 3) Clinical implications of near-infrared fluorescence imaging in cancer, N. Kosaka, M. Ogawa, P. L. Choyke, H. Kobayashi, *Future Oncology*, **2009**, *5* (9), 1501.

新製品

自己組織化単分子膜作製用試薬

C16-PEG-SAMs



特長

- ▶ 非特異的吸着が少なく、安定なSAMを形成できる
- ▶ タンパク質をはじめとした様々な物質をSAM上に固定化できる (Amino、Carboxyタイプ)

アルカンチオールやジスルフィド類が金属基板上で形成する自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayers : SAMs) は光スッチング・光電池などの薄膜光学材料、超微細フォトリソなどのパターン化材料、つや出し・濡れ性などの表面改質といった機能性材料分野から、マイクロアレイ、化学修飾電極、QCM や SPR 等を用いたバイオセンサーなどの分野で広く応用されています。

オリゴエチレングリコールを有する SAMs (PEG-SAMs) は非特異吸着を抑えることができることから、SPR や QCM 等のバイオセンサーで汎用されています。この度、発売した上記 4 種の C16-PEG-SAMs (オリゴエチレングリコール含有長鎖アルキルチオール類) は既存のものよりも長いアルキル鎖 (C16) を有しており、より安定な非特異吸着の少ない SAMs が作成されると期待されます。

末端にアミノ基を持つ C16-PEG-SAM は、グルタルアルデヒドで活性化してタンパク質を固定化したり、二価試薬を用いてマレイミド化し、チオール基を有する DNA やペプチドなどを固定化する際に有用です。

末端にカルボキシル基を有する C16-PEG-SAM は、WSC などの縮合剤で活性化することによりアミノ基を有するタンパク質などを金基板に固定化することができます。

末端にヒドロキシル基を有する C16-PEG-SAM 類は、SAM 表面への非特異的吸着を抑制する効果があることから、カルボキシル基やアミノ基を有する C16-PEG-SAM と混合して用いることにより、バックグラウンドを抑えた高感度検出可能なセンサーが作製できると期待されます。

品名	容量	希望納入価格 (¥)	メーカーコード
Amino-EG ₆ -hexadecanethiol, hydrochloride	10 mg	45,000	A505
Carboxy-EG ₆ -hexadecanethiol	10 mg	32,000	C463
Hydroxy-EG ₆ -hexadecanethiol	10 mg	28,000	H396
Hydroxy-EG ₃ -hexadecanethiol	10 mg	28,000	H395

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