



CONTENTS

●Review

エピジェネティクス機構による細胞状態とリプログラミング
熊本大学発生医学研究所 中尾 光善

「蛍光生物学」の最前線 2
1 分子蛍光イメージングの生命科学研究への応用
東京大学大学院薬学系研究科 船津 高志

●Topics on Chemistry

近赤外蛍光標識抗体による担癌モデルマウスの *in vivo* イメージング
株式会社島津製作所 基盤技術研究所 軸屋 博之

Diarylethene と Perylenebisimide の二成分からなる単分子の
蛍光による光スイッチ —繰り返し蛍光の読み出し—
株式会社同仁化学研究所 白石 賢央

2011 No.139

ISSN 0385-1516

Dojin NEWS

ドージンニュース

目次

Review

エピジェネティクス機構による細胞状態とリプログラミング
熊本大学発生医学研究所 中尾 光善 1

「蛍光生物学」の最前線 2

1分子蛍光イメージングの生命科学研究への応用
東京大学大学院薬学系研究科 船津 高志 6

Topics on Chemistry

近赤外蛍光標識抗体による担癌モデルマウスの *in vivo* イメージング
株式会社島津製作所 基盤技術研究所 軸屋 博之 10
Diarylethene と Perylenebisimide の二成分からなる単分子の
蛍光による光スイッチ—繰り返し蛍光の読み出し—
株式会社同仁化学研究所 白石 賢央 12

Commercial

新製品

近赤外蛍光色素標識キット

ICG Labeling Kit - NH₂ 11

新規デタージェント

Trehalose エステル型 15

自己組織化単分子膜作製用試薬

Carboxylic acid-SAM Formation Reagent 17

Amine Coupling Kit 18

近日発売

膜タンパク質可溶化剤

n-Undecyl-β-D-maltoside 15

試作品

アセチルコリンエステラーゼ活性測定用キット

AChE-Specific Assay Kit 16

自己組織化単分子膜作製用試薬

アルカンチオール類 17

開発中

新規デタージェント

Trehalose エーテル型 15

お知らせ

学会展示のご案内 15

第 22 回フォーラム・イン・ドージン開催 9

新製品案内

近赤外蛍光色素標識キット

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
ICG Labeling Kit - NH ₂	1 sample	20,000	LK31
	3 samples	45,000	

新規デタージェント

Trehalose エステル型

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Trehalose C8	500 mg	20,000	T459
Trehalose C10	500 mg	20,000	T460
Trehalose C12	500 mg	20,000	T461
Trehalose C14	500 mg	20,000	T464
Trehalose C16	500 mg	20,000	T465

自己組織化単分子膜作製用試薬

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Carboxylic acid-SAM Formation Reagent	1 μmol × 3	16,000	C488
Amine Coupling Kit	2 ml × 4	24,000	A515



熊本県高森町 湧水トンネル

宮崎県延岡市と熊本市を結ぶ鉄道のトンネルとして掘削されたが、坑道
が湧水流出で廃止になり現在は公園となっている。また、常時毎分32ト
ンの湧水量があり水源地としても利用されている。

エピジェネティクス機構による細胞状態とリプログラミング

Cellular state and reprogramming are controlled by epigenetic mechanisms



中尾 光善 (Mitsuyoshi Nakao)

熊本大学
発生医学研究所
細胞医学分野

要約

Epigenetic gene regulation is involved in normal development and human diseases with particular emphasis on cancer and metabolic diseases. Basically, variously differentiated somatic cells in our body have identical genome, but each of these cells has distinct morphology and function, probably due to different use of gene information. The term epigenetic is defined as "heritable changes in gene expression that occur without a change in DNA sequence". Epigenetic regulatory mechanism mainly includes cytosine methylation, protein modification,

chromatin formation, and nuclear substructures in the cell. These are involved in determining cell identity during development, regeneration, aging and diseases. To understand the essence of these phenomena, we perform medical science-oriented researches, by studying how genes function via epigenetic regulatory network. Our current work is focused on 1) investigating the molecular mechanism of gene regulation by DNA methylation and methylated DNA binding proteins; 2) studying the role of chromatin proteins and their modifying enzymes in physiology and diseases; 3) identifying the mechanisms involving in chromatin insulators that produce tissue-specific or cell state-specific gene activities; 4) studying nuclear structure, function and dynamics, including PML bodies and nuclear speckles; and 5) testing epigenetic regulatory molecules useful for medical diagnosis and therapy.

キーワード：

エピゲノム、DNA メチル化、クロマチン、細胞核、癌、幹細胞、生活習慣病

1. はじめに

エピジェネティクス機構には、DNA のメチル化、ヒストン等のタンパク質の翻訳後修飾、クロマチンの形成、核内構造体の形成が含まれており、これらで修飾されたゲノムをエピゲノムと呼び、遺伝情報発現に基づく細胞機能を制御している。近年、エピジェネティクス機構が生命現象や様々な疾患の基盤に関わることが明らかになりつつある。本稿では、エピジェネティクス機構の全体像を踏まえて、癌や生活習慣病、幹細胞を用いた再生医学において、細胞恒常性とリプログラミングに関するエピジェネティクスを概説し、我々の研究成果を紹介するとともに、これからの医学・生命科学の進展を目指した契機としたい。

2. エピジェネティクスの分子機構

ひとつの受精卵が増殖分化することで、組織・器官そしてひとつの個体を形成する過程が発生であり、その後、個体は成長し、時間経過とともに老化し、時には癌や生活習慣病などの病気を患うこともある。しかし、細胞や組織の異常が起こっても、自然治癒又は医療を受けることで再生されることがある。また、個体は生殖細胞を通して次の世代にゲノムを伝える遺伝現象がある（図1）。これらは、基本的に、同じゲノムをもつ細胞が性質の異なる細胞に変化するというエピジェネティックな生命現象であると理解することができる^{1,2)}。細胞の分化や老化は、その具体例として考えられる。多種多様の細胞の個性はどのように創られるのか。有力な考え方として、その細胞の遺伝子発現のパターンで決めら

れると考えられる。ゲノム上の総遺伝子数を3万個とすると、ひとつ分化細胞では、約1万個の遺伝子が発現し、残りの遺伝子は不活性化されている。つまり、ゲノム上の遺伝子を選択的に活用することによって、細胞個性がエピジェネティックに確立・維持・消去されることを意味している。

エピジェネティックな生命現象

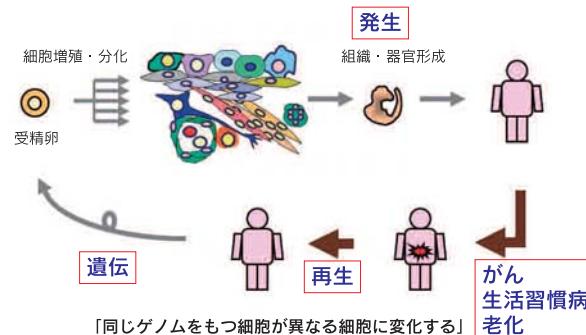


図1 エピジェネティクスの関わる生命現象

ひとつの受精卵から組織・器官、個体を形成する発生、その後の老化、癌や生活習慣病などの病気、自然治癒又は医療による再生、生殖細胞を通しての遺伝は、同じゲノムをもつ細胞が性質の異なる細胞に変化するというエピジェネティックな生命現象である。

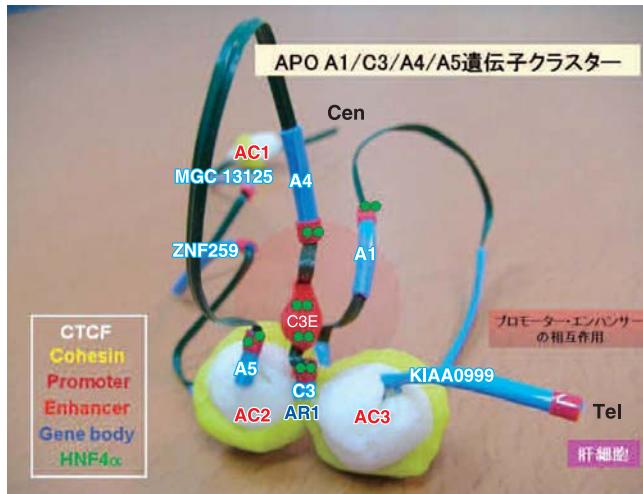


図2 アポリポタンパク質遺伝子クラスターのクロマチンループ形成
ヒトのアポリポタンパク質の遺伝子クラスターの発現異常は高脂血症の発症につながるが、CTCF インスレーターの相互作用によって、肝細胞で少なくとも 2 つのクロマチンループを形成してエンハンサー・プロモーターの働きを調節している（文献 3）。

エピジェネティクスの制御システムには、DNA のメチル化、クロマチン、タンパク質の修飾・脱修飾、転写調節因子が遺伝子制御に重要な役割を果たしている。今までに、DNA メチル化酵素、メチル化 DNA 結合タンパク質、ヒストン修飾酵素、クロマチン構造因子、クロマチンリモデリング因子、クロマチンインスレーター（クロマチンの境界）等の新しい分子群や機能的な複合体が相次いで発見されている。これらのエピジェネティクス機構によって、遺伝子制御とクロマチン構造の形成がなされるのである。さらに、ゲノム上の個々の遺伝子は、組織特異的に、分化特異的に、状況特異的に発現していることは、遺伝子が独立して制御される仕組みがあることを示している。細胞核内のエピゲノムは直線ではなく、興味深いことに、多数の機能的なループを形成していることを我々は明らかにしている。ヒトのアポリポタンパク質の遺伝子クラスター領域（その発現異常は高脂血症の発症につながる）が、CTCF インスレーターの相互作用によって、少なくとも 2 つのクロマチンループを形成してエンハンサー・プロモーターの働きを調節していることを報告した（図2）³⁻⁵。エピジェネティクスの制御システムの作動原理を解析して、細胞制御と病態の理解を深めることで、ヒト疾患の新しい診断・治療・予防法の開発を目指している。

3. 癌のエピジェネティクス

自然発生の癌細胞のほとんどに、DNA メチル化とクロマチンの異常があると言つても過言ではない。癌細胞では、ゲノム全体の DNA メチル化の低下が染色体不安定性を増大するとともに、プロモーター領域の高メチル化によって癌抑制遺伝子の発現が抑制されていることが知られている。ゲノム全体の低メチル化と癌抑制遺伝子の高メチル化は、一見、逆の現象のように見えるが、トランスポゾン等のリピート配列に富むゲノム領域と遺伝子のプロモーター領域では、DNA のメチル化の制御機構が異なることを示唆している。また、核構造異常（核異型）は癌細胞に共通した特徴

癌で高発現するMCAF1によるエピジェネティックな制御異常

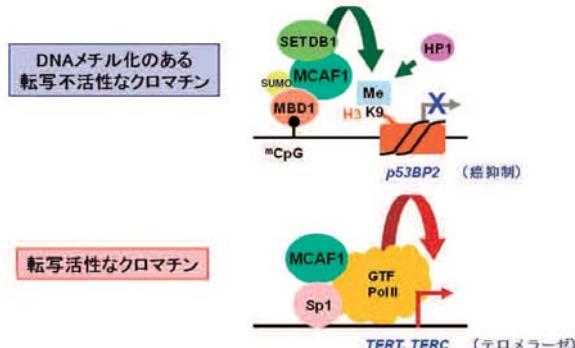


図3 MCAF1は異なる複合体を形成し、転写抑制又は転写活性化に働く MBD1 と相互作用する因子として同定された MCAF1 は、MBD1-MCAF1-SETDB1 複合体で転写抑制に働くが、他方、Sp1-MCAF1 複合体としては転写活性化に働いている。MCAF1 は 70%以上のヒト癌組織で高発現している（文献 8）。

して知られているが、ゲノム全体の低メチル化によるクロマチンの変化を反映するものと推測されている。このように、癌におけるエピジェネティックな制御異常は、癌細胞に共通の特性のひとつとして理解することができる。高メチル化された遺伝子の不活性化に関わる MBD1 と zinc finger タンパク質^{6,7}、癌細胞で高発現して遺伝子制御を変化させる MCAF1⁸、癌細胞の悪性形質に関わる構造的クロマチン因子 HMGA1 と HMGA2⁹⁻¹¹などに着目して、癌のエピジェネティックな異常について解析を進めている（図3）。

4. 幹細胞のエピジェネティクス

発生過程では、胚性幹細胞（ES 細胞）、組織幹細胞、そして分化した細胞が順次に創出される。それぞれの分化段階の細胞のエピゲノムが異なる印付けをされている。通常、ES 細胞と組織幹細胞は正常な組織を形成するものである。また、興味深いことは、ES 細胞は全能性（pluripotency）をもつために、組織特異性に乏しいが、組織幹細胞は多能性（multipotency）という組織特異性を有している。例えば、マウス ES 細胞は、神経幹細胞（神経前駆細胞）、そしてニューロンやグリア等の神経系の細胞に分化誘導できる。このような幹細胞分化が、遺伝子制御とエピゲノムで規定されていることを明らかにしている（図4）¹²。

ES 細胞および組織幹細胞で、その細胞状態は均一ではなく、少なくとも 2~3 の metastable な平衡状態にあることが知られている。ある幹細胞状態が分化に進みやすくなっていると推測されている。実際に、エピジェネティックな平衡状態は、転写因子やクロマチン修飾のパターンと相關していると推測されている。実際に、エピジェネティクス機構において、クロマチンの修飾または脱修飾に関わる酵素群、特定の修飾または脱修飾を認識する分子群が同定されており、可変的に調節されている。他方、分化した細胞では、エピゲノムは比較的安定に維持されていると考えられる。

再生医療を実現するために、体細胞から幹細胞にリプログラム

ES細胞分化におけるOct3/4遺伝子領域のエピゲノム制御

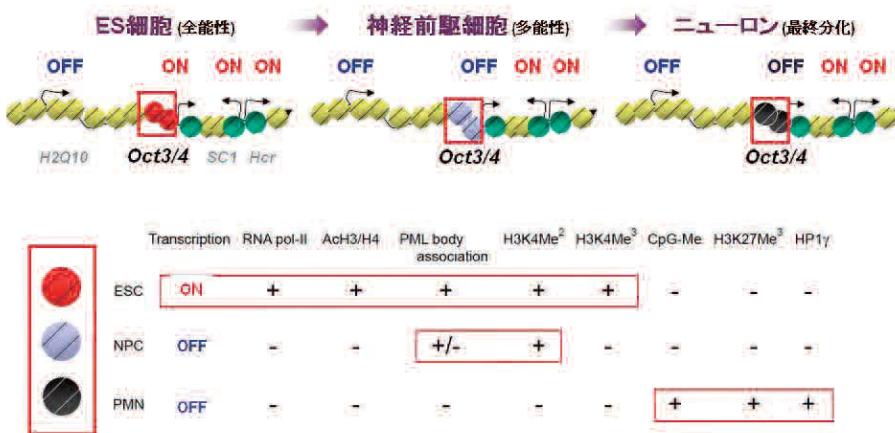


図4 マウスES細胞の神経分化におけるエピゲノムの動態

マウスES細胞の神経分化において、PMLボディー及びヘテロクロマチン（クロモセンター）の形成が大きく変化する。Oct3/4遺伝子座では、ヒストンのアセチル化とメチル化、DNAメチル化のマークが分化段階に特異的に付されている（文献12）。

する技術として、iPS細胞（induced pluripotent stem cell）の開発がなされた。現在、導入する転写因子や化合物等の組み合わせで、リプログラムの効率化、生じたiPS細胞の癌原性の阻害、安全かつ有効なiPS細胞の選択など、様々な取組が世界中で進行中にある。学術的には、iPS細胞に至るリプログラムというエピジェネティックな経路を解明することは重要な研究に位置づけられており、エピゲノムと細胞核構造の観点から、その制御基盤について解析を進めている。

5. 生活習慣病のエピジェネティクス

エピゲノムの状態は、多くの環境因子の影響を受けることが判明し、生活習慣病との関係が注目されてきた。DNAのメチル化やクロマチン修飾は、細胞応答として変化するか、影響を与える因子には、栄養や食事、物質代謝、成育環境と生活習慣、天然化合物、薬剤・化学物質などが挙げられている（図5）。

一卵性双生児は、遺伝学的に同一であるために、成育環境が及ぼす個体レベルの影響について重要な示唆を与えている。例えば、X連鎖性副腎白質ジストロフィー（X-linked adrenoleukodystrophy）の同じ遺伝子変異をもつ一卵性双生児が、臨床的に全く異なる症状や経過を示すことが報告された。また、一卵性双生児における統合失調症（schizophrenia）の発症不一致例についても報告がなされている。近年、欧米で大規模スタディーが行われて、一卵性双生児のふたりにおいて、加齢とともに、調べた細胞のDNAメチル化やヒストンの修飾に差異が生じていることが証明された¹³⁾。このように、成育環境がエピゲノムに影響すること

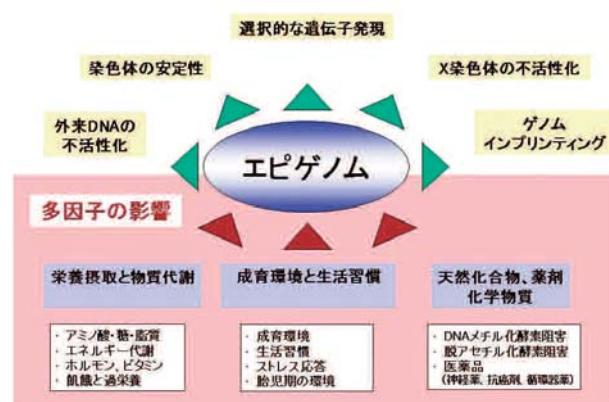


図5 遺伝子制御を担うエピゲノムは多因子の影響を受ける
エピゲノムは、遺伝子発現、染色体の安定性と不活性化、インプリンティング、外来DNAの不活性化に働いている。エピゲノムの状態は、多くの環境因子の影響を受けることから、生活習慣病との関係が注目されている。

が明らかになっている。

*agouti A^v*マウスを用いた研究では、母マウスの餌にDNAメチル化に必要なコファクター（葉酸、B12、ベタイン）を添加すると、添加しない場合と比較して、仔マウスの毛色が黄色から黒色に変わることが示された¹⁴⁾。黄色色素をメラノサイトで合成する

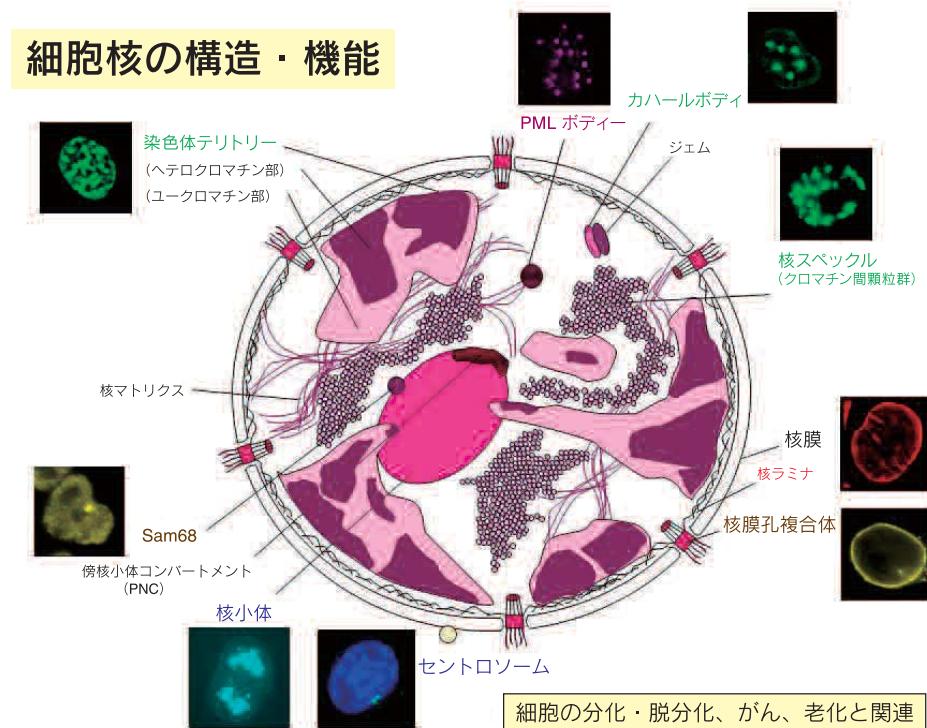


図 6 細胞核内に形成される構造体のバイオイメージング

クロマチンを基盤として転写、複製、修復、組換えなどのゲノム機能が実行されている。クロマチン間領域には、核小体、核スペックル、PML ボディー、カハールボディーなどが形成されている。これらの構造体は細胞状態や病態で大きく変化するので、細胞同定や診断法への応用が可能である。

働きをもつ A^{yy} 遺伝子が高くメチル化されて発現が抑制されていた。これは、食物が個体レベルのエピゲノム型（エピジェノタイプ）に影響することを示唆するものである。

しかしながら、これらの環境因子に対する細胞側の応答機序については、不明な点が極めて多い。ヒストン H3 の 9 番目リジン (H3K9) の脱メチル化酵素である Jhd m2a は、精巣や褐色脂肪組織、骨格筋において高発現している。Jhd m2a を欠損するマウスは通常食供与下で脂質代謝異常を伴う肥満を呈することが、最近報告された^{15,16}。このマウスでは、骨格筋や褐色脂肪組織において脂肪酸酸化及び呼吸鎖などミトコンドリアでのエネルギー消費に関わる遺伝子の発現が低い。最近、我々は H3K4 脱メチル化酵素 LSD1 による代謝関連遺伝子群の発現制御機構を見出しており、これらは、特定のクロマチン修飾因子がエネルギー代謝調節に関わる可能性を示唆している。

ヒトの低出生体重児に関するスタディーにおいて、心疾患、2 型糖尿病や肥満などの成人病の発症率が高くなるという報告がなされている^{17,18}。母胎内で栄養不足の状態にあった低出生体重児は、少ない栄養を効率よくエネルギー源とできるように適応しており、出生後に通常の栄養を受ける環境に置かれた場合には、過栄養の状態に陥りやすいと考えられるモデルである。このモデル

は、胎児期の飢餓状態に適応するように、細胞内のエピゲノムや遺伝子制御を獲得するのではないかと解釈されている。低栄養状態がエピゲノムに記憶されるために、代謝メモリーまたはエピジェネティック・メモリーとも呼ばれている。環境因子がエピゲノムに影響を与える仕組み、多因子疾患の発症に関わる責任遺伝子座のエピゲノム制御を通して、多因子疾患（肥満、高脂血症、糖尿病など）の素因と病態解明、そして個体差としての体质のメカニズムが明らかになることを期待している。

6. 細胞核構造のバイオイメージング計測

細胞核は細胞自体の司令塔にあたる役割を果たしており、細胞内外の刺激によるシグナリングを集約して、遺伝子発現として応答している（図 6）¹⁹。核と細胞質は核膜で隔てられると共に、核膜孔を通して様々な分子輸送がなされている。クロマチンにおいては、主に転写、複製、修復、組換えなどのゲノム機能が実行されており、他方、クロマチン間領域には、核小体、その他の核内構造体（核スペックル、PML ボディー、カハールボディーなど）が形成されている。興味深いことに、これらの核内構造体には、膜構造はなく、いわゆる分子集合体として形成と離散という動的な

平衡状態にあるという点である。分子集合体として分子密度を局所的に高めることで、生化学反応を効率よく進めることができなくなっている。さらに、異なる核内構造体が機能的に連携することで、遺伝子発現からRNAのプロセシングや核外輸送などがスムーズに行われるようである。このように、細胞核の構造機能は密接に相關しているが、例えば、核スペックルやPMLボディーがどのように形成されて機能を果たすのかは不明な点が多い。細胞応答において、核内構造体や分子集合体が時空間的に協調的に作動する仕組みについて解析を進めている²⁰⁾。さらに、細胞核構造は、癌、神経筋疾患、感染症、発生異常、早老症などで大きく変化することから、DNA/RNA/タンパク質の可視化および最新のバイオイメージング計測解析を用いて、細胞と細胞核構造、細胞集団としての組織構築の形態を定量評価することで、細胞同定法および組織診断法を開発中にある。

[参考文献]

- 1) 中尾光善, エピジェネティクス医学, 実験医学(増刊号), **2006**, 24, 1038-1044.
- 2) 中尾光善, 疾患エピジェネティクスの新展開, 細胞工学, **2009**, 28, 522-527.
- 3) T. Mishiro, K. Ishihara, S. Hino, S. Tsutsumi, H. Aburatani, K. Shirahige, Y. Kinoshita, M. Nakao, Architectural roles of multiple chromatin insulators at the human apolipoprotein gene cluster, *EMBO J.*, **2009**, 28, 1234-1245.
- 4) K.S. Wendt, K. Yoshida, T. Itoh, M. Bando, B. Koch, E. Schirghuber, S. Tsutsumi, G. Nagae, K. Ishihara, T. Mishiro, K. Yahata, F. Imamoto, H. Aburatani, M. Nakao, N. Imamoto, K. Maeshima, K. Shirahige, J.M. Peters, Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor, *Nature*, **2008**, 451, 796-803.
- 5) K. Ishihara, M. Oshimura, M. Nakao, CTCF-dependent chromatin insulator is linked to epigenetic remodeling, *Mol. Cell.*, **2006**, 23, 733-742.
- 6) N. Sasai, M. Nakao, P.A. Defossez, Sequence-specific recognition of methylated DNA by human zinc-finger proteins, *Nucleic Acids Res.*, **2010**, 38, 5015-5022.
- 7) Y. Sakamoto, S. Watanabe, T. Ichimura, M. Kawasaji, H. Koseki, H. Baba, M. Nakao, Overlapping roles of the methylated DNA binding protein MBD1 and polycomb group proteins in transcriptional repression of HoxA genes and heterochromatin foci formation, *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 16391-16400.
- 8) L. Liu, K. Ishihara, T. Ichimura, N. Fujita, S. Hino, S. Tomita, S. Watanabe, N. Saitoh, T. Ito, M. Nakao, MCAF1/AM is involved in Sp1-mediated maintenance of cancer-associated telomerase activity, *J. Biol. Chem.*, **2009**, 284, 5165-5174.
- 9) S. Watanabe, Y. Ueda, S. Akaboshi, Y. Hino, Y. Sekita, M. Nakao, HMGA2 maintains oncogenic RAS-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells, *Am. J. Pathol.*, **2009**, 174, 854-868.
- 10) S. Akaboshi, S. Watanabe, Y. Hino, Y. Sekita, K. Araki, K. Yamamura, M. Oshima, T. Ito, H. Baba, M. Nakao, HMGA1 is induced by Wnt/β-catenin pathway and maintains cell proliferation in gastric cancer, *Am. J. Pathol.*, **2009**, 175, 1675-1685.
- 11) Y. Ueda, S. Watanabe, S. Tei, N. Saitoh, J. Kuratsu, M. Nakao, The high mobility group protein HMGA1 inhibits retinoblastoma protein-mediated cellular G0 arrest, *Cancer Sci.*, **2007**, 98, 1893-1901.
- 12) T. Aoto, N. Saitoh, T. Ichimura, H. Niwa, M. Nakao, Nuclear and chromatin reorganization in the MHC-Oct3/4 locus at developmental phases of embryonic stem cell differentiation, *Dev. Biol.*, **2006**, 298, 345-367.
- 13) M.F. Fraga, E. Ballestar, M.F. Paz, S. Ropero, F. Setien, M.L. Ballestar, D. Heine-Suñer, J.C. Cigudosa, M. Urioste, J. Benitez, M. Boix-Chornet, A. Sanchez-Aguilera, C. Ling, E. Carlsson, P. Poulsen, A. Vaag, Z. Stephan, T.D. Spector, Y.Z. Wu, C. Plass, M. Esteller, Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, 102, 10604-10609.
- 14) G.L. Wolff, G.L. Wolff, R.L. Kodell, S.R. Moore, C.A. Cooney, Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice, *FASEB J.*, **1998**, 12, 949-957.
- 15) K. Tateishi, Y. Okada, E.M. Kallin, Y. Zhang, Role of Jhdma2 in regulating metabolic gene expression and obesity resistance, *Nature*, **2009**, 458, 757-761.
- 16) 日野信次朗, 坂元顕久, 中尾光善, エネルギー代謝病のエピジェネティクス、疾患エピジェネティクスの新展開, 細胞工学, **2009**, 28, 535-540.
- 17) D.J.P. Barker, P.D. Winter, C. Osmond, B. Margetts, S.J. Simmonds, Weight in infancy and death from ischaemic heart disease, *Lancet*, **1989**, 2, 577-580.
- 18) D.J.P. Barker, The origins of the developmental origins theory, *J. Intern. Med.*, **2007**, 261, 412-417.
- 19) 中尾光善, 細胞核と機能ドメイン、細胞核再発見:解明が進む機能ドメインとその役割, 細胞工学, **2002**, 21, 1138-1142.
- 20) N. Saitoh, Y. Uchimura, T. Tachibana, S. Sugahara, H. Saitoh, M. Nakao, In situ SUMOylation analysis reveals a modulatory role of RanBP2 in the nuclear rim and PML bodies, *Exp. Cell Res.*, **2006**, 312, 1418-1430.

著者プロフィール

氏名：中尾 光善 (Mitsuyoshi Nakao)

所属：熊本大学 発生医学研究所 細胞医学分野
(熊本大学大学院医学教育部)

住所：〒860-0811 熊本市本荘2-2-1

TEL: 096-373-6800 FAX: 096-373-6804

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

URL: <http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp>

略歴：

1985年 島根医科大学医学部卒業

1991年 久留米大学大学院医学研究科修了・医学博士

1992年 ベイラー医科大学およびハーバードヒューズ医学研究所・研究員

1995年 熊本大学医学部・助手、講師

2002年 発生医学研究センター・教授

2006-2008年 発生医学研究センター長（併任）

2009年 発生医学研究所・教授

2010年 発生医学研究所長（併任）

研究室のコンセプト：ひとと学問を育てる

（挑戦する若い方の参加を望みます）

趣味：絵画、テニス

「蛍光生物学」の最前線

2 1分子蛍光イメージングの 生命科学研究への応用

船津 高志
東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室

1. はじめに

生物は様々な、そして多数の生体分子から構成されている。なかでもタンパク質分子は生命現象の主要な担い手である。1990年代に、1個の生体分子を蛍光を用いて可視化する技術（1分子蛍光イメージング法）が開発され、1分子の酵素反応^{1,2)}、モーター・タンパク質の運動³⁾、タンパク質間相互作用⁴⁾などがイメージングされてきた。最近では、4種類の異なる蛍光色素で標識したスクレオチドを用いて1分子のDNAの複製過程をイメージングする1分子DNAシーケンサーが開発され⁵⁾、ゲノム解析の効率が飛躍的に高まるとともにDNAのメチル化などの解析に革新的な成果がもたらされている⁶⁾。また、蛍光標識した分子の位置をナノメートルの精度で計測することが可能であることが示され⁷⁾、蛍光を一つずつ確率的に光らせる技術と組み合わせることにより、光の回折限界を超えた超解像蛍光顕微鏡法が開発された⁸⁾。本稿では、1分子蛍光イメージング法の原理と最新の応用例を解説する。

2. 1分子計測の意義

従来の生物科学研究では、生体分子の性質を、試験管内の多数分子の平均値として表してきた。例えば、濃度1 μM、体積1 mLの溶液中には、約10¹⁵個の分子が含まれている。この場合、個々の分子の平均値からのずれを表す標準偏差と平均値との比は10⁻⁷以下になり、測定装置に由来する誤差に比べて無視できるほど小さい。このように、多分子計測では平均値を非常に正確に求めることができるが、分子のダイナミクスを研究することは困難である。生体分子モーターの化学・力学エネルギー変換のように、1分子が担っている2種類の反応のタイミングを明らかにするには、1分子ごとに計測しない限り不可能である⁹⁾。多分子計測のもう一つの欠点は、平均値から1分子の機能を推論するためには、「全ての分子は同様に振る舞う」という仮定を必要とする。しかし、1分子計測によって、生体分子モーターの力発生⁹⁾や、コレステロール酸化酵素などの酵素反応²⁾や、受容体のシグナル伝達¹⁰⁾に履歴作用があることが分かり、この仮定が必ずしも成立しないことが明らかになっている。1分子計測は技術的に難しいが、仮定のない明快な結論を導き出すことができるという長所がある。

3. 1分子蛍光イメージングによるタンパク質の機能解析と1分子DNAシーケンサー

タンパク質の大きさは光の波長よりもずっと小さいので、これを検出するには特別の工夫が必要である。生体分子に蛍光色素を結合させ、蛍光によって分子の存在が分かるようにしたのが蛍光顕微鏡法である。1980年代になって、DNAやアクチン（筋タンパク質の一種）などの纖維状の巨大分子を、1分子レベルで蛍光顕微鏡観察できるようになったが、これらの観察は、生体分子に数百個の蛍光色素を結合させて、ようやく見えるものだった。1分子の蛍光色素は超高感度カメラならば検出可能な数の光を放出しているが、強い励起光をあてると様々な光学部品より蛍光が発生し背景光となるため、この背景光をいかにして少なくするかが1分子観測の最大の問題点であった。1990年代になって、顕微鏡部品の改良などによって、背景光の問題を解決することにより、1分子の蛍光観察が可能になった。さらに、「エバネッセント場」を利用した局所励起を行うことにより、1分子の生体分子が酵素反応している様子^{1,2)}や運動している様子³⁾をイメージングすることが可能となった。エバネッセント場を発生させる最も簡単な方法は、全反射を利用する方法である（TIRFM; total internal reflection fluorescence microscopy）¹⁾。高屈折率の媒質（ガラス）から低屈折率の媒質（水溶液）に臨界角以上で光を入射すると全反射が起こり、低屈折率の媒質の界面近傍にエバネッセント場が生成される。エバネッセント場は、界面から深さ方向に指數関数的に減衰する局所場である。このため、波長よりも短い領域を照明することができる。エバネッセント場も伝播光と同様に、物体による散乱を受けたり蛍光色素を励起することが可能である。散乱光や蛍光のみを伝播光として検出できるので、背景光が極めて小さく、1分子の蛍光色素の観察に適している。エバネッセント場は界面のごく近傍しか照明しないので、背景光を抑えられるだけでなく、蛍光標識した生体分子を局所励起できるという利点がある。

全反射によるエバネッセント照明を利用して生物分子モーターであるキネシンを蛍光標識し、1分子のキネシンが微小管上を滑り運動する様子を観察した例を紹介する³⁾。キネシンは神経細胞において、神経伝達物質が入った小胞などの軸索輸送を担っているタンパク質である。キネシンは二量体からなり、N末端側はATPase活性を有する2つのモーター部位がある。C末端側はコイルドコイルの尾部になっておりこの部位が小胞などの荷物を結合する。荷物の有無でキネシンの運動はどうに変化するだろうか？この疑問に答えるため、蛍光色素Cy3で標識した微小管をガラスに非特異的に固定し、Cy5で蛍光標識したキネシンを荷物の有無の条件でATPとともに加え、全反射によるエバネッセント場蛍光顕微鏡で観察した（図1a）。その結果、1分子のキネシンが500 nm/sの速さで微小管上を滑り運動している様子が観察された（図1b）。滑り運動距離の度数分布は、平均1,000 nmの指數分布となった。キネシンは8 nmのステップで微小管上を移動するので、平均120ステップで微小管から外れることになる。一方、ビーズを結合していないキネシンの速度は約100 nm/sだった。ビーズを結合していないキネシンの尾部が折れたままのようにモーター部位に結合し、その結果ATP加水分解速度が低下することが生化学研究で示唆されている。荷物を運んでいない（輸送していない）キネシンはATP消費を抑制して細胞内のエネルギーの無駄使いを防いでいる。このように1分子イメージングにより、1分子のキネシンには連続歩行という機能だけでなく制

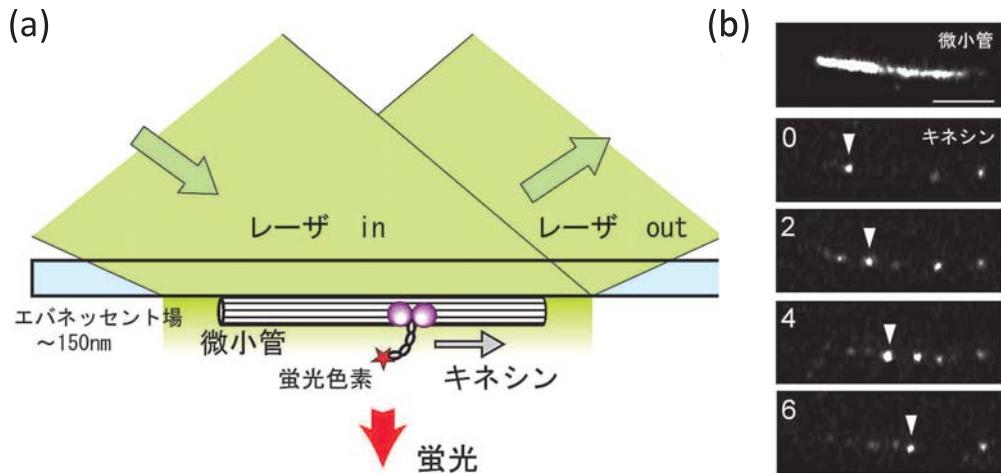


図1 蛍光標識したキネシン1分子の運動アッセイ法

(a)全反射照明による蛍光標識キネシンの運動観察の原理図。微小管上を蛍光標識したキネシンが運動する様子を全反射蛍光顕微鏡で観察する。(b)微小管と、その上を滑り運動するキネシン分子の連続写真。矢尻は運動しているキネシン。スケールは5 μm。数字は経過時間(秒)を示す。

御機構も備わっていることが示された。

蛍光色素が放出した光子をカメラなどで検出する場合、光の回折により波長の1/2程度に広がってしまう。しかし、単一蛍光分子からの蛍光(10,000光子)の輝度分布を冷却CCDカメラで撮影して解析すれば、中心位置を0.5秒の時間分解能、1.5 nmの精度で検出することが可能である⁷⁾。キネシンやミオシンVなどの生物分子モーターのモーター部位に結合した蛍光をナノメートル計測することにより、分子モーターが2つのモーター部位を交互に前進させていることが明らかになった。

このように、全反射によるエバネッセント照明は、ガラス近傍のみを照明するのに有効であるが、2次元的には局所励起を実現できていない。このため、ブラウン運動する蛍光分子が背景光になり、1分子の蛍光分子を見るためには、溶液中の分子の濃度を50 nM以下に抑える必要があった。また、生体分子がガラスに吸着されにくい性質であることが必要条件であった。このように厳しい制約があるので、多分子系の実験を、全て一分子系の実験に移行できるわけではなかった。しかし、ガラス基板上に金属薄膜を蒸着し直径数十ナノメートルの微小開口を配列させた構造(zero-mode waveguides)が考案され、エバネッセント場が縦、横、奥行き方向に3次元的に制御できるようになった(図2a)¹¹⁾。zero-mode waveguidesを用いると、全反射型エバネッセント照明の場合よりも照射領域を1/1,000にすることができる。このため従来の濃度の限界より1,000倍も高い濃度(数十 μM)の生体分子を溶液中に漂わせながら、蛍光相関分光法や1分子蛍光イメージング技術を用いて生体分子間相互作用をイメージングすることができるようになつた。私たちはzero-mode waveguidesを用いて大腸菌のシャペロニンの反応サイクルをイメージングすることに成功している(図2b)¹²⁾。シャペロニンは、あらゆる生物において生存に不可欠な分子シャペロンである。シャペロニンは2つの樽型のリングが背中合わせに向かい合せになつた構造をしており、細胞内では自発的に折れたたみを介助する役割を担つてゐる。中でも大腸菌のシャペロニンGroELの反応サイクルは約20年に及び詳細に解析されてきており、反応サイクルのモデルが世界中の生化学の教科

書に記述されている。そのモデルは「GroELの2つのリングに補因子のGroESが交互にGroELに相互作用することで機能する」というものであり、GroELの2つのリングにGroESが同時に結合した状態(フットポール型複合体)は存在しないと考えられてきた。一方、電子顕微鏡の観察、および化学架橋の実験からGroELとGroESが1:1で結合した弾丸型複合体のほかに、フットポール型複合体の存在が確認されている。しかし、多くの研究者の間で、フットポール型複合体を確認した実験は反応サイクルを停止させて測定したものであり、真にGroELの反応サイクルを反映したものではないと考えられてきた。この論争に決着を付けるため、シャペロニンの反応サイクルを1分子イメージングした。フットポール型複合体の1分子観測のためには、高濃度の蛍光標識GroESを必要とするためzero-mode waveguidesを利用した。ビオチン及びAlexa488で標識したGroESをビオチン化BSAとストレプトアビジンを介してZMWs基板底面に固定し、50 nM Cy5標識GroEL(Cy5-GroEL)、300 nM Cy3標識GroES(Cy3-GroES)、および変性タンパク質である還元型ラクトアルブミンを溶液中に存在させ、Cy3-GroES及びCy5-GroELの蛍光を同時計測した。その結果、Alexa488-ビオチン化GroESが存在する位置にCy3-GroES、Cy5-GroELの輝点が共局在する様子が確認できた。すなわち、フットポール型複合体が存在することが示された。共局在の様式は主にCy3-GroESとCy5-GroELが同時に結合して同時に解離する様式(タイプ1)、Cy3-GroESとCy5-GroELが同時に結合して、先にCy3-GroESが解離する様式(タイプ2)に分類され、タイプ1が31%、タイプ2が48%、その他の結合様式が21%であった。フットポール型複合体の2つのGroESは先に結合したものが先に解離する場合(タイプ2)が若干多いものの、後から結合したGroESが先に解離すること(タイプ1)もかなりの割合で起こることが明らかとなった。また、Cy3-GroESとCy5-GroELが共局在した時間を解析したところ、フットポール型複合体が形成されている時間は平均約3秒であることが分かった。シャペロニンは細胞内の変性タンパク質の濃度を検出しておらず、低濃度の時は2つのリングを交互に、高濃度の時は2つのリングを総動員して変性タンパク質の巻き戻りを介助していると思われる。

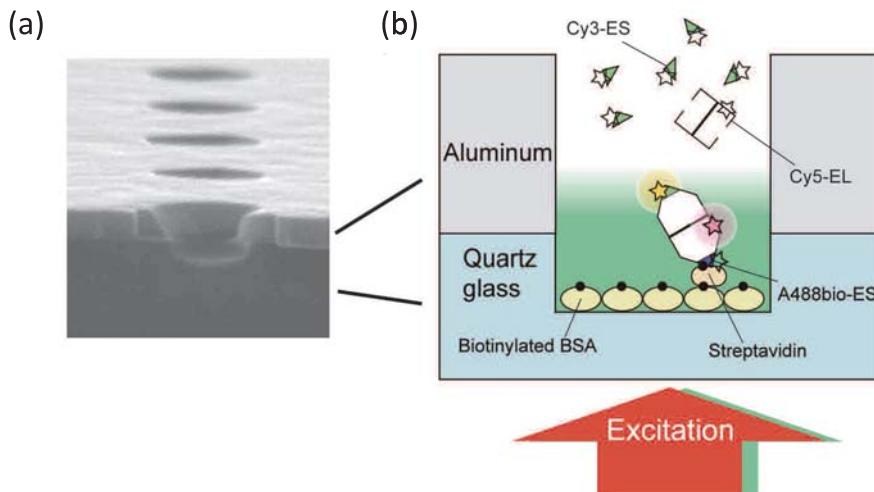


図2 Zero-mode waveguidesによるシャペロニンGroEL、GroESの相互作用の解析法
(a)ガラス基板にアルミニウムを100 nm蒸着し、穴を開けたzero-mode waveguidesの断面のSEM写真(早稲田大学谷井研究室提供)。(b)Zero-mode waveguidesの穴の底にGroELを固定し、溶液中のGroESとの結合、解離をイメージングする原理図。

zero-mode waveguidesは1分子DNAシークエンスにも応用されている。DNA合成酵素がγリン酸を異なる蛍光色素で標識した4種類のヌクレオチドを取り込みながらDNAを合成するのを利用して、1分子のDNAの塩基配列をリアルタイムに解読することに米国のPacific Biosciences社が成功している⁹。同社は、この原理に基づく1分子DNAシークエンサーを開発しており、15分でゲノムのシークエンスを完了する性能に達成することを目指している。

4. 超高解像光学顕微鏡への応用

光は波動としての性質を持つため、回折により点像は波長の1/2程度に広がってしまう。このような限界があるため、点像の広がりよりも近接する2点を分離してイメージングすることは不可能と思われてきた。しかし、最近、STED(Stimulated Emission Depletion)法、構造化照明法やローカリゼーション法などによる超解像光学顕微鏡法が考案された⁸。ここでは、ローカリゼーション法による超解像光学顕微鏡法について説明する。光の回折限界よりも接近した2つの蛍光分子が同時に蛍光を発する場合、これらを2つの分子としてイメージングすることはできない。しかし、2つの分子が別々に光る場合は、前章で述べたように分子輝度分布の中心位置をナノメートルの精度で求めることができるので、2つの分子を分離して認識することが出来る。ローカリゼーション法では、蛍光分子の明滅(ON-OFF)を上手く制御して別々に光らせることにより、分子の位置を光の回折限界を超えた精度で決定する。蛍光のON-OFFを制御する方法として、紫外線の照射によって蛍光を発するようになったり、蛍光波長が変化する緑色蛍光タンパク質の変異体を利用する方法がある(PALM; photo-activated localization microscopy)¹³。また、Cy5やAlexa 647のようなシアニン系の蛍光色素を用いて、検出用の強いレーザー(例えば647 nm)を照射して全体の蛍光色素をOFF状態にし、微弱な405 nmのレーザーを照射したり、近傍に短波長の蛍

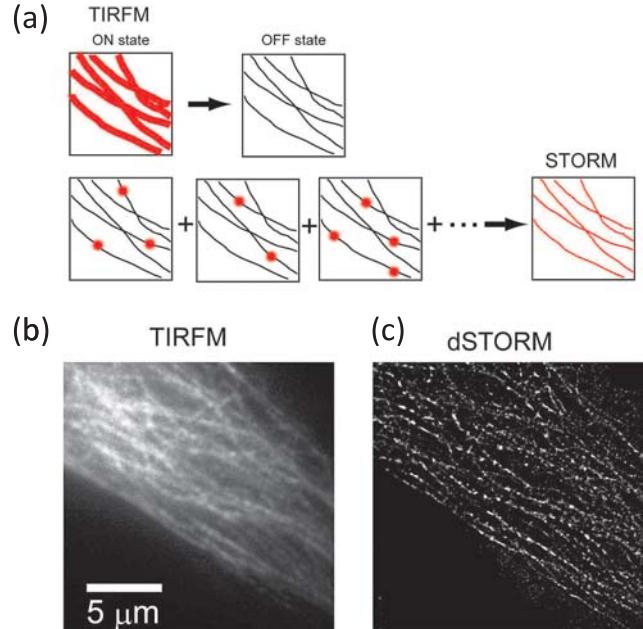


図3 微小管の超解像顕微鏡観察
(a)STORMの原理図。まず全蛍光色素を励起(ON state)し続けてOFF stateにする。その後、1分子の蛍光が分離できるように少数分子をONにしながら画像を1万枚以上取得し、これを足し合わせることによりSTORM像を構成する。(b)、(c)細胞内微小管の蛍光顕微鏡像。化学固定したHeLa細胞の微小管にAlexa647標識した抗α-tubulin抗体を結合させ、TIRFM(b)とdSTORM(c)で観察した。

光色素を存在させてこれを励起することにより、わずかな頻度でON状態に戻すことが行われている(STORM; stochastic optical reconstruction microscopy)¹⁴⁾。これらの色素は自発的にOFFからON状態に遷移するので、1種類の色素だけでも検出用の強いレーザーを当て続けてON-OFFを観測することが可能である(dSTORM; direct STORM)。ON-OFFが10,000回以上なるよう画像を取得してそれぞれの蛍光分子の輝度分布の中心位置に直径約20nmの点をプロットして、スーパーインポーズすることにより全体像を再構成する。このように、点描画のようにして超解像の画像が出来上がる。この場合、焦点面上では約20nm、奥行き方向には約60nmと、従来の光学顕微鏡の10倍の解像度を得ることができる。ただし、奥行き方向の位置を決めるためにはカメラの前に円筒レンズを置き、1分子の点像の楕円率を計測する必要がある。図3は、化学固定したHeLa細胞の微小管にAlexa647標識した抗 α -tubulin抗体を結合させ、TIRFMとdSTORMで観察した例である。dSTORMにより鮮明で解像度の高い画像が得られている。超高解像光学顕微鏡により、従来の顕微鏡では捉えることの出来なかつた微細構造が明らかになつたり、複数種の分子の共局在をより厳密に調べることが可能になった。

5. おわりに

1分子イメージング技術の開発により、さまざまな研究室で、日常のように分子を扱えるようになってきた。本稿では、生物分子モーターを中心に解説したが、ここで紹介した1分子イメージング技術は、あらゆる種類の生体分子の1分子機能アッセイ、例えば、DNAとポリメラーゼやヘリカーゼなどとの相互作用、蛋白質間相互作用、蛋白質とリガンドの相互作用などの解析に応用されつつある。1分子の機能を解析することにより、多分子系では見過ごされていた生体分子機械の動作原理の本質に迫れるであろう。また、次に重要なのは、個々の生体分子が生体というシステムの中でどのように振る舞っているかを解明することである。生体システムの中で物質、エネルギー、情報の流れを分子レベルで追跡することができたので、近い将来、生体システムの構築原理も明らかにされるであろう。

謝辞

zero-mode waveguidesの製作は、谷井孝志、島本直伸、三宅雄、園部弘典、赤堀玲、大泊巖氏（早稲田大学）によるものである。また、dSTORMによる観察は坂本明彦、菅原皓氏（東京大学）によって行われた。記して感謝します。

[参考文献]

- 1) T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, T. Yanagida, *Nature*, **1995**, 374, 555.
- 2) H. P. Lu, L. Xun, and X. S. Xie, *Science*, **1998**, 282, 1877.
- 3) D. S. Friedman, R. D. Vale, *Nat. Cell Biol.*, **1999**, 1, 293.
- 4) T. Ueno, H. Taguchi, H. Tadakuma, M. Yoshida, T. Funatsu, *Mol. Cell*, **2004**, 14, 423.
- 5) J. Eid et al., *Science*, **2009**, 323, 133.
- 6) B. A. Flusberg et al., *Nat. Methods*, **2010**, 7, 461.
- 7) A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, P. R. Selvin, *Science*, **2003**, 300, 2061.
- 8) S. W. Hell, *Nat. Methods*, **2009**, 6, 24.
- 9) A. shijima, H. Kojima, T. Funatsu, T. Tokunaga, H. Higuchi, H. Tanaka, T. Yanagida, *Cell*, **1998**, 92, 161.
- 10) M. Morimatsu, H. Takagi, K. G. Ota, R. Iwamoto, T. Yanagida, Y. Sako, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **2007**, 104, 18013.
- 11) M. J. Levene, J. Korlach, S. W. Turner, M. Foquet, H. G. Craighead, W. W. Webb, *Science*, **2003**, 299, 682.
- 12) T. Sameshima et al., *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285, 23159.
- 13) E. Betzig et al., *Science*, **2006**, 313, 1642.
- 14) M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods*, **2006**, 3, 793.

筆者プロフィール



氏名：船津 高志 (Funatsu, Takashi)

所属：東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室

住所：〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

Tel: 03-5841-4760

E-mail: funatsu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

略歴：

1982年 早稲田大学理工学部物理学科卒業

1987年 早稲田大学大学院博士後期課程単位取得退学

1988年 理学博士（早稲田大学）

早稲田大学理工学部物理学科・助手、日本学術振興会特別研究員、新技術事業団柳田生体運動子プロジェクト・グループリーダー、早稲田大学理工学部物理学科・助教授、教授を経て2004年 東京大学大学院薬学系研究科・教授、現在に至る

現在の研究テーマ

分子シャペロンやリボソームなどの生体分子機械の動作原理の研究、細胞内mRNAのプロセシングと輸送の1分子蛍光イメージング、生体分子間相互作用を解析するためのマイクロ・ナノデバイスの開発

第22回 フォーラム・イン・ドージンのご案内

今年も下記日程にて、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：

「RNAの識別と管理－自己、異常な自己、そして非自己－」

期日：2011年11月4日(金)

場所：熊本ホテルキャッスル(熊本市城東町4-2)

Topics on Chemistry

近赤外蛍光標識抗体による担癌モデルマウスの *in vivo* イメージング

株式会社島津製作所 基盤技術研究所 軸屋 博之

1. はじめに

“生きている状態”で、生体内の生理機能を確認したいという研究者の要求に応えるために、「分子イメージング」と呼ばれる技術が発展してきた。これは生体内のターゲットに観察マーカ（プローブ）を結合・集積させることで微小な病変を発見したり、生体機能や代謝を高感度に検出させたりする手法として期待が高まっている。小動物を対象とした *in vivo* 観察手法の中でも光を用いたイメージングは MRI・PET・CT のような特殊な設備や環境が不要であり、測定時間も短く高スループットに化合物の体内動態や治療効果などを“手軽に”観察することが出来るため、医薬品開発などに有効なツールとして今後益々の発展が期待される。

2. Clairvivo OPT の紹介

島津製作所では、小動物用分子イメージング装置群を開発しており “Clairvivo シリーズ” として PET・CT・光イメージ（OPT）を販売している。

“Clairvivo” とは「千里眼、内部を透視すること、深い洞察力」を意味する「Clairvoyance」と「生きたままの観察」を意味する「*in vivo*」を組み合わせた造語であり、実験小動物を解剖することなく、同一個体の経時的な生体変化・機能を画像化できる。

“Clairvivo OPT” (Fig. 1) は、a) 多面ミラー方式の採用により、一回の測定でマウスなどを 5 方向から観察し、生体内部からの微弱蛍光を捉えること b) 励起光源として半導体レーザや発光ダイオードを採用することにより、バックグラウンドを抑えながら、高輝度励起ができること c) 高検出効率の CCD カメラを採用することにより、長時間積算観察が可能になること等の特徴を有している。

光を使用する *in vivo* イメージングを行う場合、可視光を含む 600 nm 以下の波長域では、ヘモグロビン等の吸収により光が透過せず内部の情報を得ることは出来ない。また波長 1400 nm 以上の光を使用すると、今度は水の吸収により光が透過されない。その為、光を使用する場合はおよそ 650 ~ 900 nm の近赤外の波長域（所謂「生体の窓」といわれている波長域）を使用することが重要である。島津製作所の Clairvivo OPT はこの「生体の窓」からの観察に強いという特徴を持つ装置である。さらに、5 面観察により、測定時にマウスの体勢を変更する手間を掛けずに全方位の観察が可能となる他、体勢の入れ替えに伴うマウス内部の臓器位置の移動を考慮する必要がなく、各臓器の位置関係がはつきりして安定して撮影することが出来るという利点も持っている。

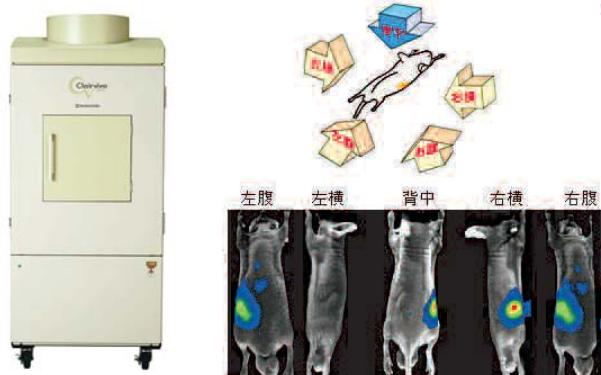


Fig. 1 小動物 *in vivo* 光イメージング装置 (Clairvivo OPT)

3. 近赤外光の優位性

光を利用して *in vivo* 観察を行う場合、バックグラウンドとなる生体由来の自家蛍光を出来る限り抑えて、画像の S/N 比を高くする必要がある。自家蛍光の要因の 1つとして、食餌に含まれる植物成分に由来するものが知られており、植物成分を含まない低蛍光バックグラウンド飼料を利用することにより影響を抑えることが出来る。自家蛍光の他の要因としては、元々生体に含まれる成分によるものがあるが、これに由来する蛍光強度は測定する波長により影響が異なっている。4 点の励起波長で観察したヌードマウスの自家蛍光の様子を Fig. 2 に示す。左上は励起 635 nm 蛍光 670 ± 15 nm、右上は励起 658 nm 蛍光 710 ± 20 nm、左下は励起 690 nm 蛍光 810 ± 45 nm、右下は励起 785 nm 蛍光 845 ± 27.5 nm で観察したもので、強度を揃えて表示したものです。この結果から、観察される自家蛍光は、励起波長 785 nm での強度を「1」とすると 690 nm でおよそ 12 倍、658 nm で 25 倍、635 nm ではおよそ 65 倍の自家蛍光が観察される。この結果より、波長の長い蛍光色素を使用することで、自家蛍光の影響を少なくすることが可能となる。特に、インドシアニングリーン (ICG; 励起: 774 nm 蛍光; 805 nm) は、現在知られている蛍光色素の中で、特に長波長領域の蛍光特性を持っており、*in vivo* 観察に非常に適していると言える。

4. ICG による生体観察

近年、癌をはじめとする難治性疾患の発症や悪化に関わる分子が次々と同定されている。このような中、これらの分子を標的とした分子標的医薬に大きな期待が寄せられており、特に抗体医薬に関する研究が活発に行われている。そこで、生体内における抗体の標的指向性を検証するために、同仁化学研究所製キット「ICG Labeling Kit - NH₂」と島津製作所製「Clairvivo OPT」を用いた蛍光標識抗体による *in vivo* イメージングを試みた。

ICG はもともと肝機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あり、安全性が高い色素である。この ICG を抗体のアミノ基に標識するための同仁化学研究所製キット (ICG Labeling Kit - NH₂) を用いて移植皮下癌の検出をおこなった。方法：HeLa 細胞をヌードマウスの右腋皮下に移植した。4 週後、尾静脈注射により ICG ラベル化抗体（抗インテグリン抗体）50 µg を投与し、投与後 1, 24, 48, 72, 96 時間後において Clairvivo OPT により測定した。

結果：ICG Labeling Kit - NH₂ により標識精製した抗体を SDS-

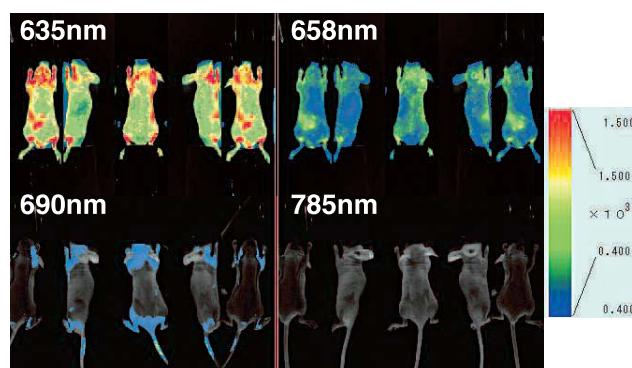


Fig. 2 自家蛍光の励起波長依存性 (低蛍光飼料給餌 1 週間後)

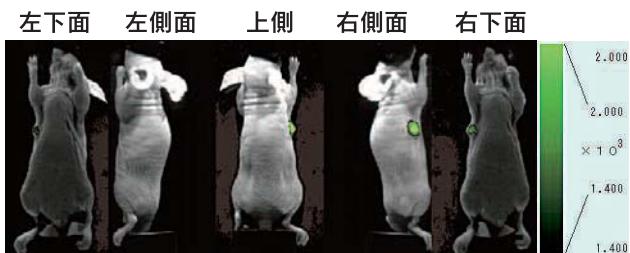


Fig. 3 ICG 標識抗体による担癌モデルマウスの 5 方向同時観察結果

PAGE にて分離後、Clairvivo OPT で測定したところ、効率良く標識されていることが確認できた。この抗体をマウスに投与したところ、24 時間までは集積しなかつた抗体が体外へ排出される様子が強く観察されたが、48 時間にになると、これらのバックグラウンドがほぼ無くなり、ICG 標識抗体が皮下移植した腫瘍細胞に集積している様子が観察された(Fig. 3)。これらの結果により、*in vivo* イメージングにおいて ICG と抗体を用いた本手法が有効であることが示された。

従来までは、研究者が ICG を購入して条件を試行錯誤しながら、対象抗体に標識を行う必要があった。そのため、抗体を使用した研究を“手軽に”おこなうことが出来なかつたが、この新しい「ICG Labeling Kit - NH₂」を使用することにより、研究者が高スループットに化合物の体内動態や治療効果などを観察することが出来るようになった。

「Clairvivo OPT」と「ICG Labeling Kit - NH₂」を使用することで、創薬分野における体内分布観察や癌転移メカニズム解明などの研究開発の一助になることを期待する。

[参考文献]

- M. Ogawa, C.A.S. Regino, J. Seidel, M.V. Green, W. Xi, M. Williams, N. Kosaka, P.L. Choyke and H. Kobayashi, Dual-Modality Molecular Imaging Using Antibodies Labeled with Activatable Fluorescence and a Radionuclide for Specific and Quantitative Targeted Cancer Detection, *Bioconjugate Chem.*, **2009**, 20 (11), 2177.
- M. Ogawa, N. Kosaka, P.L. Choyke and H. Kobayashi, *In vivo* Molecular Imaging of Cancer with a Quenching Near-Infrared Fluorescent Probe Using Conjugates of Monoclonal Antibodies and Indocyanine Green, *Cancer Res.*, **2009**, 69 (4), 1268.
- N. Kosaka, M. Ogawa, P.L. Choyke, and H. Kobayashi, Clinical implications of near-infrared fluorescence imaging in cancer, *Future Oncology*, **2009**, 5 (9), 1501.
- B.J. Tromberg, N. Shah, R. Lanning, A. Cerussi, J. Espinoza, T. Pham, L. Svaasand and J. Butler, Non-invasive *in vivo* characterization of breast tumors using photon migration spectroscopy, *Neoplasia*, **2000**, 2, 26.
- 伏木洋司, 早川芳弘, 精製飼料 D10001 飼育による生体の自家蛍光軽減効果の *In vivo* 蛍光イメージングにおける有用性, 日薬理誌, **2009**, 134, 13-16.

著者プロフィール

氏名：軸屋博之 Jikuya Hiroyuki (52 歳)
所属：株式会社島津製作所 基盤技術研究所
住所：京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1
TEL : 075(823)1590 FAX : 075(823)2604
E-mail : jikuya@shimadzu.co.jp
URL : <http://www.shimadzu.co.jp>

新製品

開発元 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

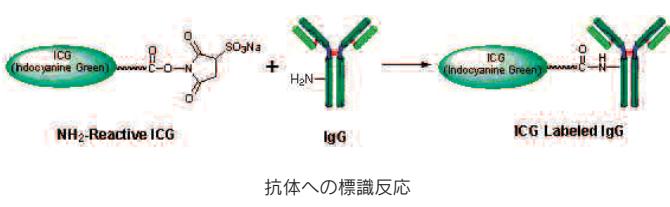
近赤外蛍光色素標識キット

ICG Labeling Kit - NH₂

<特長>

- 50~200 μg の抗体やタンパク質に ICG (Indocyanine Green) を簡単に標識可能
- 細胞損傷や自家蛍光の影響が少ない近赤外蛍光イメージングに有用 (励起波長 / 蛍光波長 = 774 nm/805 nm)
- Filtration tube を用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる

ICG (Indocyanine Green) は肝機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ます。抗体に標識して近赤外蛍光を利用した蛍光内視鏡への応用が報告され、*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。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、励起波長/蛍光波長は 774 nm/805 nm です。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。



抗体への標識反応

<キット内容>

	[1 sample]	[3 samples]
· NH ₂ -Reactive ICG	1 tube	3 tubes
· WS Buffer	1.5 ml × 1	4 ml × 1
· Reaction Buffer	250 μl × 1	500 μl × 1
· Filtration Tube	1 tube	3 tubes

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
ICG Labeling Kit - NH ₂	1 sample	20,000	LK31
	3 samples	45,000	

Topics on Chemistry

Diarylethene と Perylenebisimide の二成分からなる单分子の蛍光による光スイッチー繰り返し蛍光の読み出しー

株式会社同仁化学研究所 白石 賢央

光互変性（ホトクロミック）蛍光分子は单分子で蛍光と光互変性を併せ持つ分子であり、光メモリー、分子スイッチや生物学的蛍光マーカーなどへの活用が期待される興味深い分子である。光互変性（ホトクロミズム）は、光によって物質の色が可逆的に変化する性質であり、その典型例は光互変性色素部分と蛍光性色素部分とからなる分子で、光互変性色素の光互変反応によって蛍光性色素の蛍光が変動を受ける。このような分子には低分子化合物だけでなく、“Dronpa”のような光によって活性化される蛍光タンパク質（PAFPs）などの光互変性蛍光色素が挙げられる。そのような低分子やタンパク質を用いた单分子レベルの蛍光スイッチングは、超高密度光メモリーや超高感度蛍光イメージング開発の可能性を切り開いており、実際にPAFPsは高感度イメージングの開発に多大な貢献をしている。本稿では、Fukaminato らによって新たに報告された光互変性でかつ繰り返し蛍光の読み出しが可能な蛍光プローブを紹介したい¹⁾。

Fukaminato らはこれまでに、单分子光メモリーのための蛍光性 diarylethene (DE) 誘導体をいくつか開発している²⁾。それら一連の検討の中では、分子内エネルギー移動と分子内電子移動との2種類の機構による蛍光消光を利用しておらず、分子内エネルギー移動を利用する蛍光ホトスイッチとしては、分子内に光互変性蛍光色素である diarylethene と bis-(phenylethynyl)anthracene または perylenebisimide (PBI) を有する分子が利用されている。それらの分子の蛍光スペクトルは、DE の閉環体の吸収スペクトルと重なっているが、閉環型の吸収スペクトルは蛍光スペクトルよりも短波長側にある。そのため、閉環型では蛍光は消光されないが、DE の閉環型が閉環型に変化する際、分子内のエネルギー移動によって効率よく蛍光が消光される。このような分子は、单分子レベルで蛍光による光スイッチングを示すが、残念なことに蛍光消光によって DE 部分の閉環型から開環型への変換が誘導され、繰り返し使用が途絶える。すなわち、蛍光性部分の励起エネルギーが分子内で DE の閉環構造にエネルギー移動して、DE の閉環が誘導される。この反応は光メモリー情報の致命的な破壊に繋がることから、write-many-read-many (WMRM) 素子へ応用するためには、蛍光変化と読み出し工程とを分離し、それぞれ独立して制御されることが望まれる。

読み出しが損なわれる問題を克服するためには、屈折率の変化を利用したり、スイッチ機能をもつ部分の吸収領域から離れた波長領域の赤外吸収帯を利用したり、酸・塩基反応によるシグナルの安定化、電子移動効率、分子の極性、超分子のコンホーメーションなどの変化によるスイッチング機能など、いくつかの方法が考案されている。これらの手法には固体で繰り返し読み出しが可能なものもあるかも知れないが、感度、安定性や効率性などが不十分であるといった分子固有の特性や、固体状態での操作性の悪さなどのために、单分子レベルで有効な分子系素子は実現していない。

そのような問題点を回避し、繰り返し読み出し機能をもつた可逆的かつ高効率な蛍光を利用した光スイッチングを実現させるために、Fukaminato らは光スイッチングの機構として光誘導電子移動(photoinduced electron transfer: PET)を利用している。PET が有効に機能するためには、光スイッチによる DE 部分の酸化還元電位が変化する必要がある。DE 部分と PBI 部分の酸化還元電位の差が十分であれば、PBI 部分と DE 部分との間に電子移動が起こる。続いて、DE の異性化によって蛍光のスイッチが起こる。

この電子移動機構では、DE 异性体の両方の吸収波長が蛍光色素の蛍光スペクトルよりも短波長側にあるような分子を設計すればよいことになる。すなわち、このような分子では吸収帯が短波長側にあるために光互変反応は蛍光検出に影響を及ぼさなくなる。

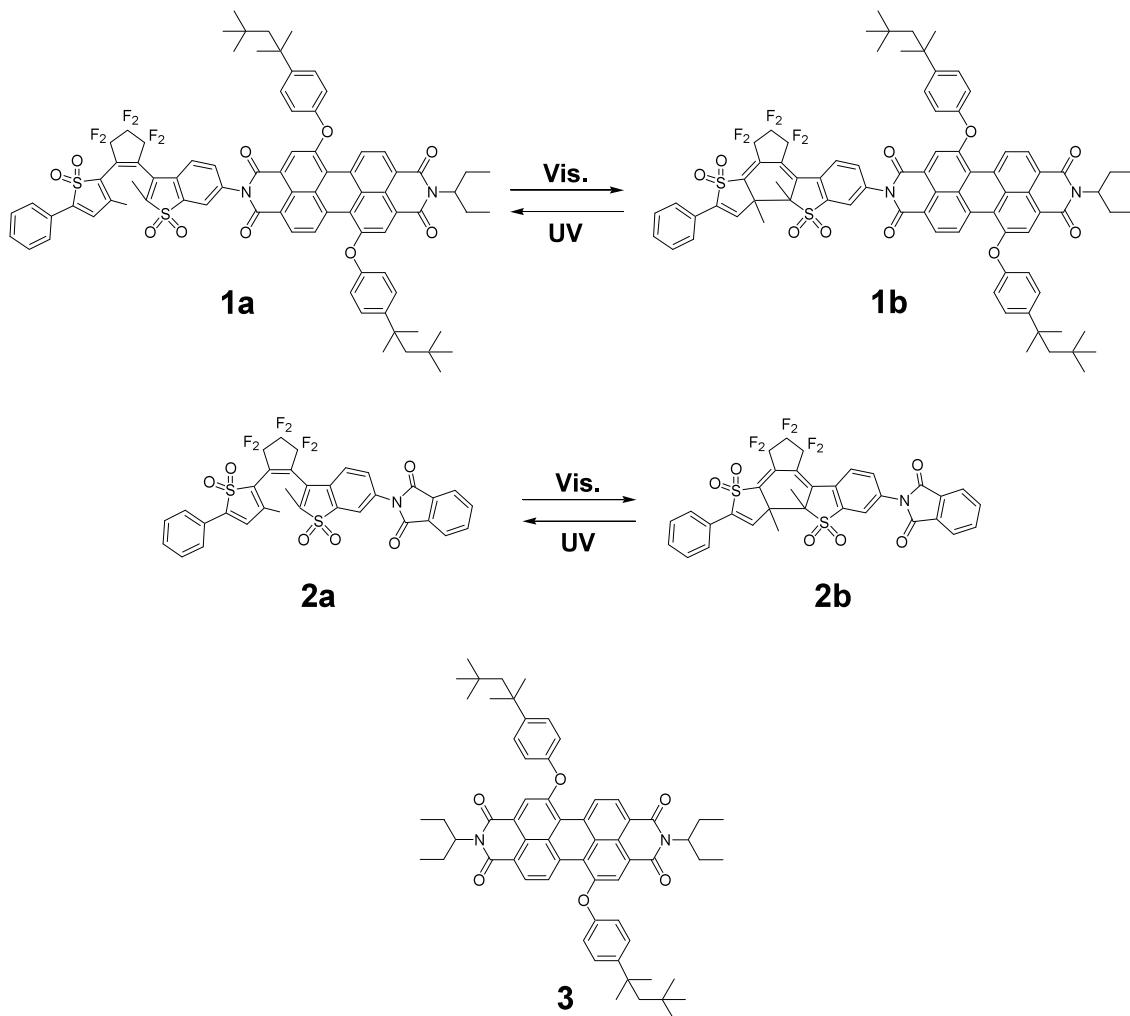
この発想に従って、蛍光色素 PBI と DE 誘導体とを結合させた化合物が合成されたが、この分子では、エネルギー移動の消失を伴う閉環反応を首尾よく回避し、電子移動を介した効率的かつ可逆的な蛍光消光が確認されたものの、三重項状態を経由する予期せぬ光環化反応によって繰り返し読み出し能力を検出することができなかつた。PBI 部分の S₁ 状態（最低励起一重項状態）のエネルギーが DE 部分の T₁ 状態（最低励起三重項状態）のエネルギーよりも低い場合に、三重項状態経由は回避される。その後いくつかの試行の末、Fukaminato らは繰り返し読み出し能力を持つ diarylethene-perylenebisimide (DE-PBI) の設計に成功している (**1a** 及び **1b**, Scheme 1)。以下に化合物 **1** の溶液中または单分子レベルにおける蛍光を用いた光スイッチングと蛍光の繰り返し読み出しについて紹介する。

1,4-ジオキサン中における蛍光色素 N,N'-bis(ethylpropyl)-1,7-bis[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxy]perylene-3,4:9,10-tetracarboxylbisimide (**3**, Scheme 1) の蛍光スペクトルは、光互変性 DE の閉環型 (**2a**, Scheme 1) と閉環型 (**2b**, Scheme 1) の吸収スペクトルと重ならないので、化合物 **3** から化合物 **2a** または **2b** への分子内エネルギー移動は回避される。化合物 **3** の吸収極大波長は 537 nm であり、4-(tetramethylbutyl) phenoxy 基を持たない PBI の吸収極大波長よりも 15 nm 長い。この僅かな長波長シフト (S₁ 状態のエネルギーが低くなる) によって三重項状態経由が回避される。

分子内電子移動による光スイッチの実現可能性は、**1a** と **1b** の励起状態における電荷分離(すなわち電子移動)の自由エネルギー変化 ΔG° (詳細は省くが、DE、PBI の酸化還元電位などから、Rehm-Weller 式を使って計算できる) から確認することができる。その ΔG° は、ジクロロメタン中 (誘電率 $\varepsilon = 8.93$) において閉環型 (**1a**) では 1.23 kcal/mol、閉環型 (**1b**) では -8.55 kcal/mol となり、この結果はジクロロメタン中では閉環型 (**1b**) に対してのみ電子移動が可能であることを示している。

混合溶媒中 (1,4-ジオキサン / メタノール = 50/50 誘電率 $\varepsilon = 17.4$) において、**1a** に可視光 ($\lambda = 445$ nm) を照射すると、360 nm 付近の吸収帯が徐々に上昇し、紫外光 ($\lambda = 365$ nm) を照射すると、吸収スペクトルは初期状態にもどる。光互変反応に伴つて蛍光強度が可逆的に変化することも同様に確認された。一方、純粋な 1,4-ジオキサン中 (誘電率 $\varepsilon = 2.21$) では、DE 部分の光閉環反応と光開環反応に伴う蛍光による光スイッチ現象は見られない。この溶媒への依存性は、蛍光消光が分子内電子移動によって引き起こされることを示している。

蛍光消光の機構を直接的に解明するために、時間分解蛍光強度変化と過渡吸収スペクトル変化が測定された。まず、1,4-ジオキサンまたは 1,4-ジオキサン-メタノール二成分混合溶媒 (50/50) 中における **1a** または **1b** の時間分解蛍光を測定した。**1a** については、どちらの溶媒中であっても、PBI 部分の蛍光が閉環型の DE 部分によって効果的な消光を受けない。一方、**1b** においては、純粋な 1,4-ジオキサン (非極性溶媒) 中では PBI 部分の蛍光は閉環



Scheme 1 DE-PBI(1), DE deriv.(2)ならびにPBI deriv.(3)の構造

型DE部分による効果的な消光を受けないものの、混合溶媒（極性溶媒）中では、PBI部分の蛍光が混合溶媒中でDE部分の閉環型によって効率よく消光されていることが確認された。

蛍光消光の機構をさらに詳しく調べるために、Fukaminatoらは、可視光530 nmのフェムト秒レーザーパルスを励起光源とした**1b**の過渡吸収スペクトル測定を行い、以下の結論を導いた。1,4-ジオキサン（非極性溶媒）中では、PBI部分のS₁状態は閉環型DE部分の影響を受けない。一方、混合溶媒（1,4-ジオキサン-メタノール50/50：極性溶媒）中では、180ピコ秒の時定数で励起PBI部分とDE部分の間に電荷分離反応（励起PBI部分からDE部分への電子移動）が起こり、30ピコ秒の時定数で電荷再結合が起こり元の状態に戻る。

また、Fukaminatoらは以下の実験により蛍光を用いた光スイッチと繰り返し読み出しを単分子レベルで確認している。すべての分子が光反応性をもつ逆平行コンホメーションをとるように、

極性ポリマーである2wt%ポリアクリル酸メチル（PMA）または非極性ポリマーである1.2wt%のZeonex（T_g～130°C）を含む**1b**のトルエン溶液を回転成形することで試料を調製した。彼らは、これらの試料に532 nmで励起して570 nmで蛍光測定し、その照射部位の広視野蛍光顕微鏡画像を観察した。532 nmのレーザーのみを照射した状態では**1b**のPMAフィルムは暗画像のままであるが、サンプルに紫外光（300～380 nm）を約5秒間照射後には、個々の**1a**分子に相当する明るい蛍光スポットが観察される。紫外光の照射を停止した後、レーザーによって532 nmで励起すると蛍光は保持されており、サンプルに可視光（440～490 nm）を5秒間照射すると、明るい蛍光スポットは突如消失する。可視光の照射を停止した後も、次に紫外光を照射するまでの間、暗画像のままであり、これら蛍光スイッチの“ON-OFF”は、数回確認することができる。その際の蛍光変化の模式図をFig.1に示す。

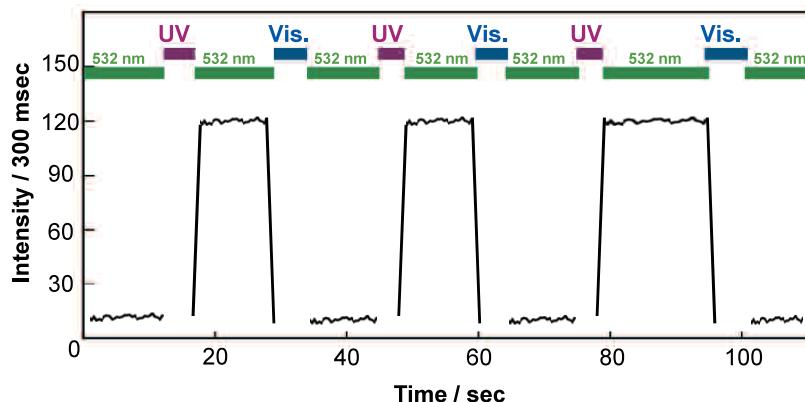


Fig. 1 PMA 薄膜中における DE-PBI の蛍光変化模式図

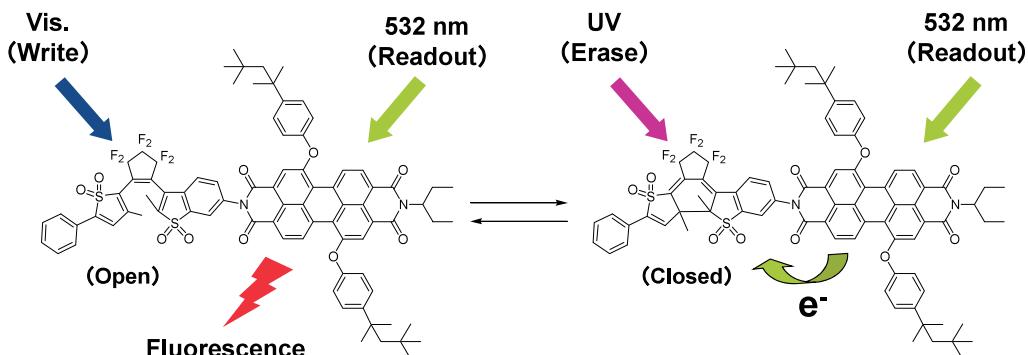


Fig. 2 DE-PBI 分子の蛍光読み出しメカニズム

一方で、非極性の Zeonex フィルムにおいては可視または紫外光を照射しても鮮明な蛍光スイッチが確認されない。すなわち、分子内電子移動による蛍光の消光には、極性環境が必要であり、溶液中の実験と同様に極性環境でのみ蛍光スイッチが起ることが確認されている。また、以上の実験によって蛍光スイッチは個々の二成分化合物 1 分子の光互変反応によるものと確認された。特筆すべきは、532 nm のレーザーで励起している間も蛍光の“ON-OFF”が安定に保持されることであり、この結果は単分子レベルであっても繰り返し蛍光の読み出しが可能であることを示している。

以上のように、光スイッチが可能な蛍光 DE-PBI (Fig. 2) が合成され、溶液中および単分子レベルで蛍光スイッチングと繰り返

し蛍光の読み出しが確認された。**1b** の蛍光量子収率は溶媒の極性に強く依存し、誘電率の増加に伴って減少する。時間分解蛍光スペクトルと過渡吸収スペクトル解析の結果から、分子内電子移動過程によって蛍光が消光されると結論付けることができる。溶液中でも単分子レベルでも 532 nm のレーザー光で **1a** と **1b** を励起している間、繰り返し蛍光の読み出しが確認された。以上の結果は、二成分を繋げた分子系が超高密度光メモリーや超高感度蛍光イメージングに有用であることを示している。今後この蛍光プローブの研究がさらに発展することを期待したい。

[参考文献]

- 1) T. Fukaminato, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 4984-4990.
- 2) T. Fukaminato, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 14843-14849.

新製品

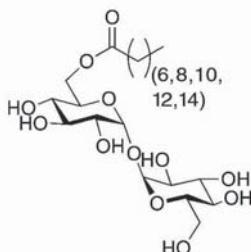
新規デタージェント

Trehalose エステル型

Trehalose C8、Trehalose C10、Trehalose C12、Trehalose C14、Trehalose C16は、親水基がトレハロース、親油基が直鎖脂肪酸エステルで構成される、新しいタイプの非イオン性界面活性剤です。

トレハロースは、グルコース2分子が、 α , α -1,1で結合した非還元性の糖であり、天然に存在します。トレハロースを添加することにより、タンパク質や脂質の変性を抑制することから、食品・菓子原料に幅広く利用されています。それはトレハロースが細胞内で水に代わる働きを有し、細胞から水が失われた場合でもそのダメージを抑制するためです。

このように、他の糖にはない性質をもつトレハロースを基本骨格としたトレハロース型デタージェントは、特異な性質を有することが期待されます。



品名	cmc (mmol/l)
Trehalose C8	5.6
Trehalose C10	3.0
Trehalose C12	0.15
Trehalose C14	0.012
Trehalose C16	0.0061

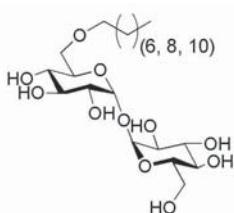
品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Trehalose C8	500 mg	20,000	T459
Trehalose C10	500 mg	20,000	T460
Trehalose C12	500 mg	20,000	T461
Trehalose C14	500 mg	20,000	T464
Trehalose C16	500 mg	20,000	T465

開発中

新規デタージェント

Trehalose エーテル型

既存の Trehalose エステル型に加え、Trehalose エーテル型を開発しております。開発中の3種のトレハロース型デタージェントは、エーテル結合で親油基と結合しているため、広いpH領域で水溶液安定性が高く、トレハロースを基本骨格としていることから特異な性質を有することが期待されます。



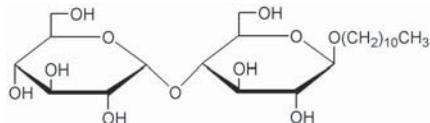
近日発売

膜タンパク質可溶化剤

n-Undecyl- β -D-maltoside

目的とするタンパク質を可溶化する場合、タンパク質との相性の良い界面活性剤は予測しがたく、最初にいくつかの界面活性剤を試してみることが必要です。また、同じ糖を親水部に持つものでもアルキル鎖長のわずかな違いでタンパク質の結晶化や安定性が異なる場合があります。現在、親水部にマルトースを持つ界面活性剤として *n*-Decyl- β -D-maltoside (アルキル鎖長 = 10)、*n*-Dodecyl- β -D-maltoside (アルキル鎖長 = 12) を既に販売しておりますが、お客様のご要望によりアルキル鎖長の異なる *n*-Undecyl- β -D-maltoside (アルキル鎖長 = 11) を新製品として発売致します。小社の *n*-Undecyl- β -D-maltoside は α 体含量を既存の製品よりも低く抑えた高純度品です。Christain Lange らは、*n*-Undecyl- β -D-maltoside を用いて出芽酵母の一種 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の cytochrome bc₁複合体の結晶化を行い、2.3 Å の解像度で解析を行っています¹⁾。

n-Decyl- β -D-maltoside、*n*-Undecyl- β -D-maltoside 及び *n*-Dodecyl- β -D-maltoside の各 cmc 値は 1.8、0.55、0.17 mmol/l と異なり、それぞれ特徴ある性質を持つと期待されます。ご興味のある方は小社まで御問い合わせ下さい。



[参考文献]

- 1) C. Lange, J.H. Nett, B.L. Trumpower and C. Hunte, "Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc₁ complex structure", *EMBO J.*, 2001, 20, 6591.

展示のご案内

日本生物物理学会第49回年会

期日：2011年9月16日(金)～18日(日)
会場：兵庫県立大学 姫路書写キャンパス
(姫路市書写2167)

第84回日本生化学会大会

期日：2011年9月22日(木)～24日(土)
会場：国立京都国際会館イベントホール・ロビー
(京都市左京区宝ヶ池)

第34回日本分子生物学会年会

期日：2011年12月13日(火)～16日(金)
会場：パシフィコ横浜展示ホール
(横浜市西区みなとみらい1-1-1)

試作品

アセチルコリンエステラーゼ活性測定用キット

AChE-Specific Assay Kit

<特長>

- ・新規の基質である MATP+ を使用
- ・高選択的にアセチルコリンエステラーゼ活性を測定できる
- ・DTNB を用いた簡単な比色法
- ・アセチルコリンエステラーゼ阻害活性も測定できる

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、これらの薬物の曝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用いられています¹⁾。

本キットは、AChE 活性を測定するためのキットです。キットには、新規基質である MATP+ が含まれており、一般的な基質であるアセチルチオコリンに比べ、高選択的に AChE 活性を測定することができます (Fig. 2)²⁾。検出には DTNB を用いた比色法を利用しています。キット付属の Standard AChE を用いることで、これまで煩雑であった BChE 阻害剤の添加や赤血球の単離を行うことなく、簡単に AChE 活性を求めることができます (Fig. 3)。また、AChE 阻害活性を測定することも可能であり、農薬の検出や AChE 阻害物質のスクリーニングにも有用です (Fig. 4)。

* MATP+ は、独立行政法人 放射線医学総合研究所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。

<キット内容>

- ・MATP+ × 2 本
- ・DTNB × 2 本
- ・Assay buffer 100 ml × 1 本
- ・Standard AChE × 1 本

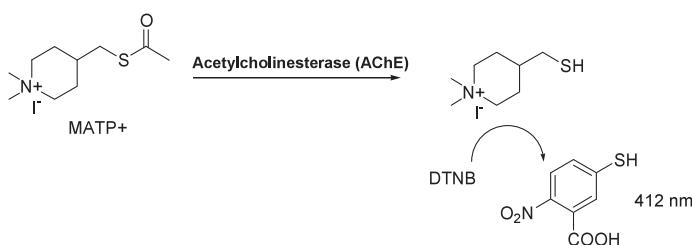


Fig. 1 アセチルコリンエステラーゼ活性測定法の原理

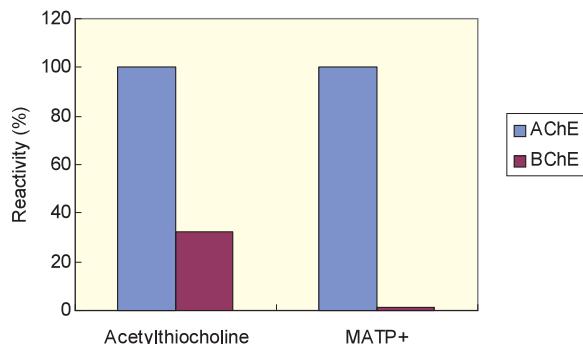


Fig. 2 Acetylthiocholine と MATP+ の BChE に対する AChE 選択性の比較
注) AChE に対する反応性を 100% とした場合の値を示す。

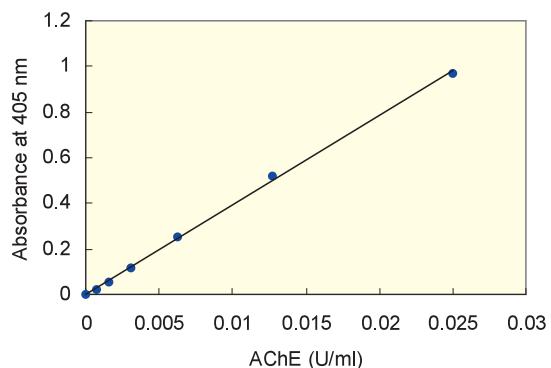


Fig. 3 Standard AChE で作成した検量線の例

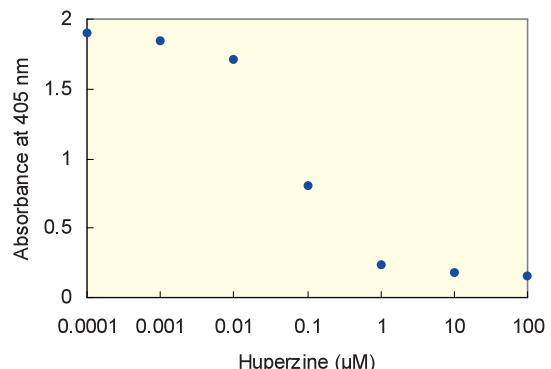


Fig. 4 AChE 阻害剤 (Huperzine) を用いた阻害活性曲線の例

[参考文献]

- 1) 杉本八郎, 日薬理誌, 2004, 124, 163.
- 2) T. Kikuchi, T. Okamura, K. Fukushi, and T. Irie, Biol. Pharm. Bull., 2010, 33, 702.

新製品

自己組織化单分子膜作製用試薬

Carboxylic acid-SAM Formation Reagent

<特長>

- ・簡単に Carboxylic acid-SAMs を形成することができる
- ・非特異的吸着を抑制することができる

センサーとしてタンパク質を基板に固定化するにあたってよく用いられている SAM 試薬のひとつにカルボン酸末端を持つアルカンチオールがあります。カルボン酸末端を有するためアミンカップリング法等によりタンパク質を固定化することが可能です。しかし、同時に負電荷を持つためタンパク質の非特異的吸着が起こるなどの問題が生じます。そこで、小社ではより非特異的吸着を抑えることのできるカルボン酸 SAM 試薬を開発いたしました。本試薬は、一般的なカルボン酸 SAM に比べ、Bovine serum albumin (BSA) や Fetal bovine serum (FBS) 等のタンパク質の非特異的吸着を抑制いたします。

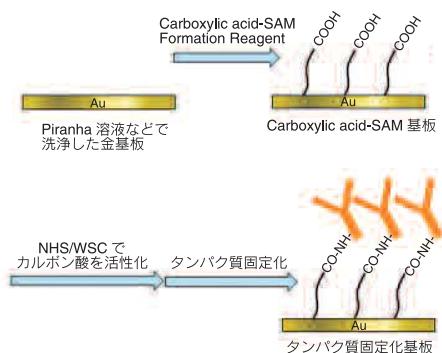


Fig. 1 アミンカップリング法を用いたカルボン酸 SAM 表面へのタンパク質固定化

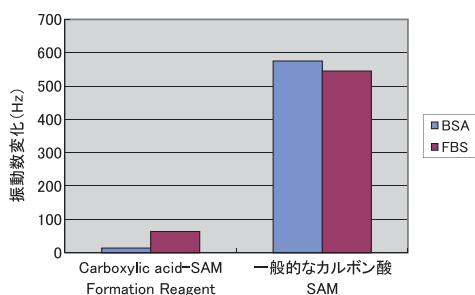


Fig. 2 QCMにおける本試薬を用いた SAM と一般的なカルボン酸 SAM へのタンパク質の非特異的吸着量の比較

カルボン酸末端にタンパク質を固定化したい場合は、小社の Amine Coupling Kit をご使用下さい。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Carboxylic acid-SAM Formation Reagent	1 μmol × 3	16,000	C488

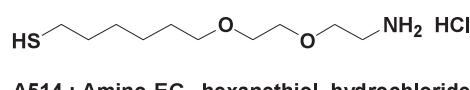
試作品

自己組織化单分子膜作製用試薬

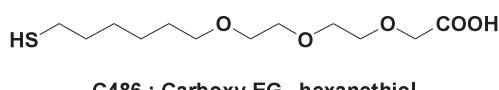
アルカンチオール類

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单分子膜 (Self-Assembled Monolayers: SAMs) は、光スイッチング・光電池などの薄膜光学材料、超微細フォトレジスト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。

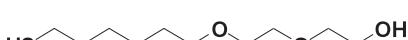
小社では様々な特性を有するチオールやジスルフィド類を販売しており、このたび、下記のようなオリゴエチレングリコール含有短鎖アルカンチオールをラインナップに追加いたしました。オリゴエチレングリコールを導入することで非特異的な吸着が抑制され、また、鎖長を短くすることで電流の減衰を最小限に抑えられることから、特に化学修飾電極への応用が期待されます。



グルタルアルデヒドで活性化してタンパク等を固定化できます。また、二価性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も有用です。



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等を固定化できます。



カルボキシル基やアミノ基を有するアルカンチオールと混合して用いることにより、非特異的な吸着の抑制効果が期待できます。

新製品

自己組織化单分子膜作製用試薬

Amine Coupling Kit

<特長>

- カルボン酸を有する SAM 表面上に簡単にタンパク質を固定化することができる
- カルボン酸の活性化、タンパク質の固定化およびブロッキング操作まで行うことができる
- 1 shot type で溶液調製が簡単

QCM や SPR 等の基板上にタンパク質を固定化する方法のひとつとしてアミンカップリング法があります。アミンカップリング法とは、センサーチップ上のカルボン酸を N-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) と 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (WSC) で活性化し、タンパク質中のアミノ基と反応させて固定化する方法です。このたび、小社ではカルボン酸を有する SAMs (Self-Assembled Monolayers) 表面に簡単にタンパク質を固定化するためのキットを開発いたしました。

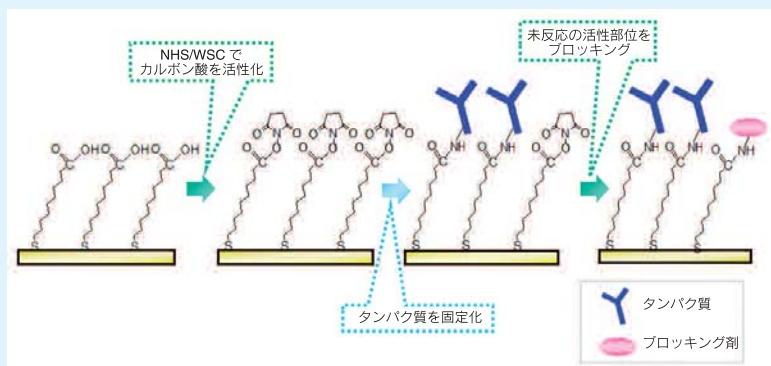


Fig. 1 アミンカップリング法によるカルボン酸 SAM 表面へのタンパク質固定化

本キットに含まれる WSC と NHS は、付属の Activation buffer で溶解するだけですぐ使用できる 1 shot type のため、試薬調製の手間がかかりません。またタンパク質固定化後、付属の Blocking solution を用いることで、タンパク質の非特異的吸着を抑えることができます。

本キットには、アミンカップリングを行うための試薬およびバッファー類が全て含まれており、カルボン酸の活性化、タンパク質の固定化、そしてブロッキングまでの操作すべてを行なうことができます。

<キット内容>

- WSC × 4 本
- NHS × 4 本
- Activation buffer × 1 本
- Reaction buffer × 1 本
- Blocking solution × 1 本

品名	容量	希望納入価格 (¥)	メーカーコード
Amine Coupling Kit	2 ml × 4	24,000	A515

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