



DOJIN NEWS

2015 No.155

ISSN 0385-1516

ドージンニュース

CONTENTS

●Review

ビタミンB₁₂酵素機能をもつバイオインスパイアード触媒

九州大学工学研究院 久枝 良雄

●Topics on Chemistry

生体内ホルムアルデヒドを検出するための蛍光プローブ

株式会社同仁化学研究所 大内 雄也





表紙撮影：九重町飯田高原
千町無田水田公園
photo：永島俊介氏

CONTENTS

Review

- ビタミンB₁₂酵素機能をもつバイオインスパイアード触媒 ●—— [1]
九州大学工学研究院 久枝 良雄

Topics on Chemistry

- 生体内ホルムアルデヒドを検出するための蛍光プローブ ●—— [8]
株式会社同仁化学研究所 大内 雄也

Commercial

新製品

- LDH 測定キット ●—— [9]
レドックス応答性タンパク質解析キット ●—— [10]
Ab-10 Rapid Labeling Kit シリーズ ●—— [12]

開発中

- 硫化水素ドナー ●—— [13]

お試し包装のご案内

- 抗体・タンパク質標識キットシリーズ ●—— [11]

関連製品

- Cell Counting Kit-8 ●—— [9]
MTT ●—— [9]
-Cellstain®- PI solution ●—— [9]

※希望納入価格には消費税等は含まれておりません。

新製品案内

*容量・価格等の詳細は各ページをご覧ください。

LDH 測定キット

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST

レドックス応答性タンパク質解析キット

-SulfoBiotics-

Protein Redox State Monitoring Kit

-SulfoBiotics-

Protein Redox State Monitoring Kit

Plus

Ab-10 Rapid Labeling Kit シリーズ

Ab-10 Rapid Fluorescein Labeling Kit

Ab-10 Rapid Peroxidase Labeling Kit

Ab-10 Rapid R-Phycoerythrin Labeling Kit

ビタミン B₁₂ 酵素機能をもつバイオインスパイアード触媒 Bioinspired Catalysts with Vitamin B₁₂ Enzyme Functions



久枝 良雄

九州大学工学研究院 応用化学部門
教授

The B₁₂-dependent enzymes catalyze various molecular transformations. For example, the rearrangement reactions as typified by the conversion of methylmalonyl-CoA to succinyl-CoA, the methylation reaction as in the synthesis of methionine, and the dehalogenation reaction of perchloroethylene. An alkylated complex which has a cobalt-carbon bond is a key compound in such enzymic reactions. This cobalt-carbon bond is cleaved by the stimulus such as light, heat, or redox, and generates active species such as organic radicals. As part of a study directed toward design of good catalytic systems based upon a hydrophobic vitamin B₁₂, heptamethyl cobyrinate perchlorate, the preparation and functions of various nanomaterials with the vitamin B₁₂ derivative and photosensitizers are reported. Examples include a vesicle-type vitamin B₁₂ artificial enzyme, a vitamin B₁₂-Ru complex combined system, a vitamin B₁₂-titanium dioxide hybrid catalyst, vitamin B₁₂-hyperbranched polymers (HBP), vitamin B₁₂-metal-organic framework(MOF)system, and a vitamin B₁₂-Rose Bengal combined system. These bioinspired materials have potential as catalytic systems for degradation of organic halide pollutants and for molecular transformations via radical intermediates under irradiation with UV or visible light, and offer scope for applications that are of great interest in terms of green chemistry.

1. はじめに

バイオミメティクスとは、生体系の優れた機能を模倣し、人工的に再現する化学である。近年では生体系の機能を模範とした化学は、さらに工学的な発想を加味して、生体系の機能を凌駕する技術を目指すバイオインスパイアード化学へと進化している。この手法は、生体由来のタンパク質やアミノ酸に拘ることなく、その機能を代替、さらには凌駕できるものであれば、有機物・無機物・半導体など生体とは関係ない物質であっても様々な組み合わせで、優れた材料を開発しようとするものである。このようなコンセプトにより、生体機能を単に模倣する材料開発から脱却し、新しい材料や物質変換システムの開拓が可能となる。

筆者らは図1に示すように、無機半導体・金属錯体・有機化合

物・高分子化合物・タンパク質などの異種材料をハイブリッド化したバイオインスパイアード触媒の開発を行っている。天然の金属酵素は、高活性・高選択的であるが、構造安定性に欠け応用範囲が狭いなどの欠点も多い。そこで、ナノ空間材料と金属錯体等の組み合わせにより、天然酵素を凌駕する機能をもつ革新的触媒の開発を目指している。本稿では、ビタミン B₁₂ 酵素機能をもつバイオインスパイアード触媒の開発に焦点を当て、環境汚染物質の分解反応や物質変換反応への応用について述べる。

2. ビタミン B₁₂ 依存性酵素と酵素反応

ビタミン B₁₂ は、生体内で葉酸とともに赤血球をつくり出す働きをもつ重要な栄養素の一つである。1948年に悪性貧血の特効

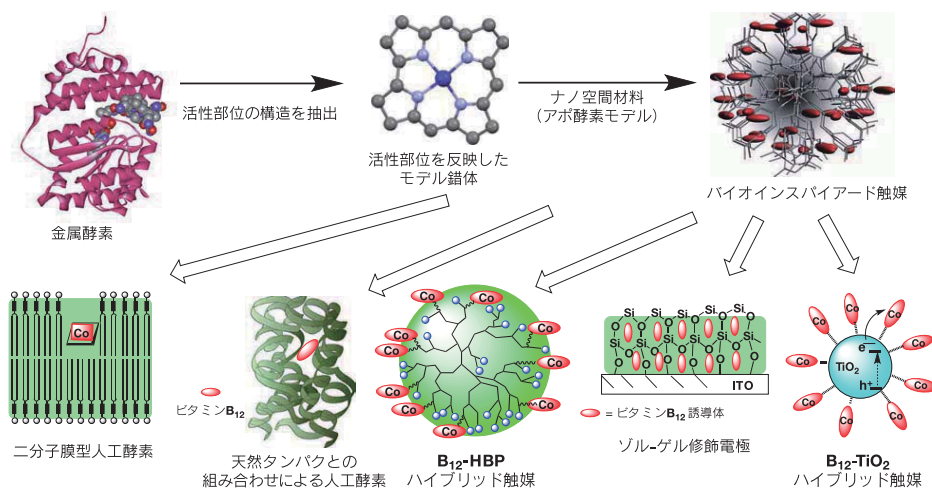


図1 バイオインスパイアード触媒の分子設計

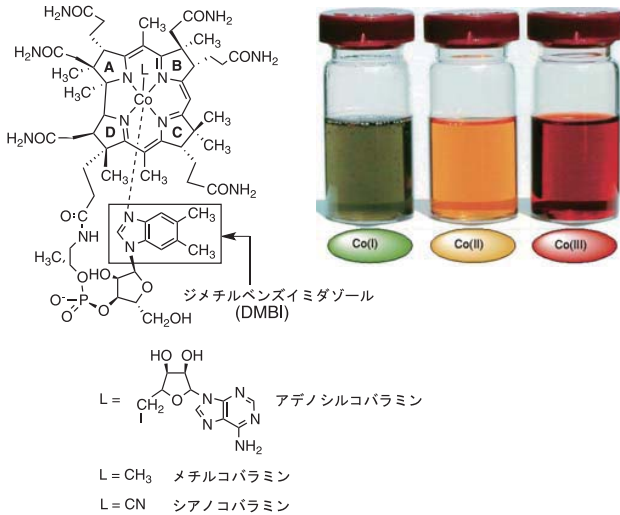


図2 ビタミンB₁₂類の化学構造と酸化状態で変わる色

薬として発見され¹⁾、後に Hodgkin らによる X 線構造解析によりその複雑な構造が明らかにされた²⁾。コリン環部分のみでも不斉炭素を 9 個も含む複雑極まる構造は有機合成化学上最大のターゲットとなり、1972 年には Woodward や Eschenmoser らによる全合成が達成された³⁾。

ビタミン B₁₂ は、「中心金属コバルト」と「コリン環骨格」をもつ有機金属錯体であり、化学名はコバラミンである。図 2 に示すように、テトラピロール系の平面配位子であるコリン環内の 4 個の窒素原子にコバルトが配位した金属錯体である。ヘムタンパクの活性部位にあるヘムの配位子であるポルフィリンと構造は似ているが、配位子の塩基性が異なる。すなわち、コリン環はピロールの A 環と D 環が直結しており、モノアニオン性の配位子である。従って、低酸化状態のコバルト錯体の生成に有利な構造と言える。また、周囲に多数の不斉炭素をもっておりキララな反応場を与えている。通常ビタミン B₁₂ の呼称は、生体から効率良く抽出され

る誘導体であるシアノコバラミンに対し用いられているが、生体内で実際に作用しているのはメチルコバラミンおよびアデノシルコバラミンである⁴⁾。

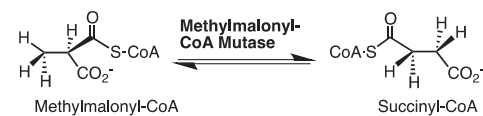
このビタミン B₁₂ の中心金属コバルトは通常 +1 ~ +3 の酸化状態をとることができ、+1 価では灰緑色、+2 価では黄色～橙色、+3 価では赤～紫という色を示す⁵⁾。ビタミン B₁₂ の酸化還元を伴う反応は、緑-黄-赤と反応により色が変わるので、「交通信号反応」に喩えられる。

ビタミン B₁₂ が関与する酵素反応は図 3 に示すように 3 つに大別される。1 つはアデノシルコバラミン依存で炭素骨格の組み換えを伴う異性化反応であり、2 つ目はメチルコバラミン依存のメチル基転移反応であり、3 つ目は脱ハロゲン化反応である。

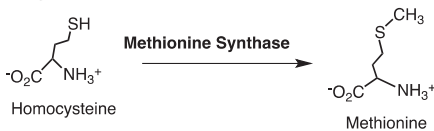
アデノシルコバラミンは、炭素骨格の組み換えを伴う官能基転位反応の触媒として働く。たとえば、メチルマロニル-CoA ムターゼはメチルマロン酸骨格からコハク酸骨格への変換を行う。この反応においては、図 4 に示すようにコバルト-炭素結合の開裂が引き金となり酵素反応が開始する。補酵素 B₁₂ のコバルト-炭素結合のホモリス開裂により生成したアデノシルラジカルが基質の水素原子を引き抜き、そこで生成した基質ラジカルが中間体となり異性化反応が進行する。メチルマロニル-CoA ムターゼの X 線構造解析は 1996 年に報告されたが、下方配位子は分子内ジメチルベンズイミダゾール (DMBI) ではなく、タンパク質由来のヒスチジン残基のイミダゾールであった⁶⁾。

メチルコバラミンは、生体内ではメチオニンの生合成を司る酵素中に存在する補酵素である。メチオニンシンターゼはホモシステインからメチオニンを生合成する過程において、メチル基転移の触媒として働いている⁴⁾。この反応においては、コバルト-炭素結合がイオニックに開裂する。すなわち、メチルコバラミンはグリニャール試薬のように作用し、ホモシステインをメチル化する。この酵素については、1994 年に X 線結晶構造解析が報告され、タンパク質に結合したメチルコバラミンの構造が明らかにされた⁷⁾。コバラミンの下方配位子と考えられていたヌクレオチド部のジメチルベンズイミダゾール (DMBI) はコバルトに配位しておらず、あたかもコリン環から降ろされた錨のごとく、タンパク質鎖の中に突きささっていた。そのかわりにタンパク質由来のヒスチジン

1) 1,2-Migration of the functional group



2) Methyl-transfer reaction



3) Dechlorination reaction

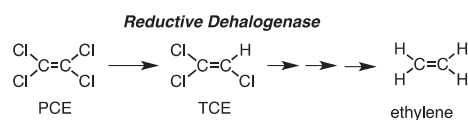


図3 ビタミン B₁₂ が関与する酵素反応

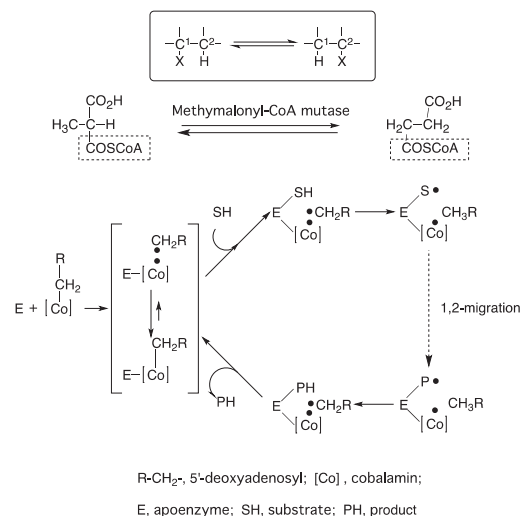


図4 アデノシルコバラミンが関与する酵素反応機構

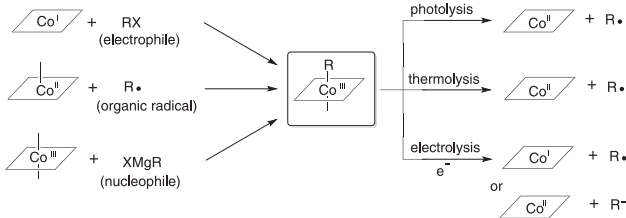


図5 コバルト-炭素結合の形成と開裂

残基のイミダゾールがコバルトに配位していた。

一方、嫌気性細菌中に見出された脱塩素化酵素の活性中心にも、これらコリン環を有する錯体(コバラミン)が存在することが、近年の研究で明らかになっている。この脱塩素化反応は、 B_{12} 依存性酵素の新しい機能としてその反応および機構解明が注目されている⁹⁾。嫌気性細菌中に見出された酵素には、コリノイド1分子と電子源である鉄・硫黄クラスターが2つ以上存在する。菌体中ではCo(I)体が活性種となり、テトラクロロエチレン(PCE)が2電子還元されトリクロロエチレン(TCE)への脱塩素化反応が進行する。酵素側から見ればこの反応はエネルギー物質であるATPの合成を行う脱塩素化呼吸に相当し、PCEを電子受容体、水素分子を電子供与体として用い、エネルギー生産を行っている。この脱塩素化反応は、環境汚染物質として社会問題になっている有機塩素化合物の分解に相当し、環境浄化触媒としての応用が期待されている⁹⁾。

3. バイオインスパイアード触媒の開発と反応特性

ビタミン B_{12} 酵素反応の鍵はコバルト-炭素結合の生成と開裂にある。ここで、Co-C結合の生成と開裂について説明する。図5に示すように、化学的には種々の方法でCo-C結合を作ることができる。Co(I)種とハロゲン化アルキルのような求電子剤との反

応、Co(II)種と有機ラジカルとの反応、Co(III)種とグリニヤール試薬のような求核剤との反応によりCo-C結合は生成する⁴⁾。一方、Co-C結合は光照射や熱によるホモリシス開裂、酸化還元による開裂などがある。すなわち、ビタミン B_{12} アルキル錯体のCo-C結合は、外部刺激によりラジカル種やイオン種を発生させることができる感応性化学種である。

天然ビタミン B_{12} は水以外の溶媒には難溶解性であるため、図6に示すようにこれを化学修飾し、構造的に安定な修飾体(疎水性ビタミン B_{12})を合成することで、その応用を広げることができる¹⁰⁾。この錯体は天然ビタミン B_{12} の骨格を保持しているため、中心コバルトの酸化還元電位、電子状態などは天然 B_{12} と類似している。また側鎖エステルの種類により多様な溶媒に高い溶解性をもつため、種々の有機溶媒中での反応やアポタンパクモデルへの取り込みに有利であり、天然酵素同様の高い反応性が期待できる。

著者らのグループは本稿の最初に述べたような考え方で、バイオインスパイアード触媒の開発を行っている。これまで、天然タンパク質の一つであるヒト血清アルブミン(HSA)¹¹⁾、合成二分子膜¹²⁾、分岐高分子¹³⁾などのアポタンパクモデルとの組み合わせによりビタミン B_{12} 人工酵素の構築に成功している。また、ゾル-ゲル法によりビタミン B_{12} 誘導体をシリカゲル中に取り込んだり¹⁴⁾、半導体である酸化チタンにビタミン B_{12} 誘導体を結合させる¹⁵⁾などとして新しい触媒系の構築に成功している。以下では、いくつかの例を紹介したい。

3.1. 合成二分子型ビタミン B_{12} 人工酵素

最初の例として、合成二分子膜と疎水性ビタミン B_{12} の組み合わせによるビタミン B_{12} 人工酵素について説明する。ビタミン B_{12} 酵素のX線構造解析の結果をもとに、反応に重要な役割を果たしていると考えられるアルギニンやヒスチジン残基を含む合成ペプチド脂質を用いる¹⁶⁾。これらの合成ペプチド脂質は水中で安定な二分子膜構造を形成する。この合成二分子膜に、ビタミン

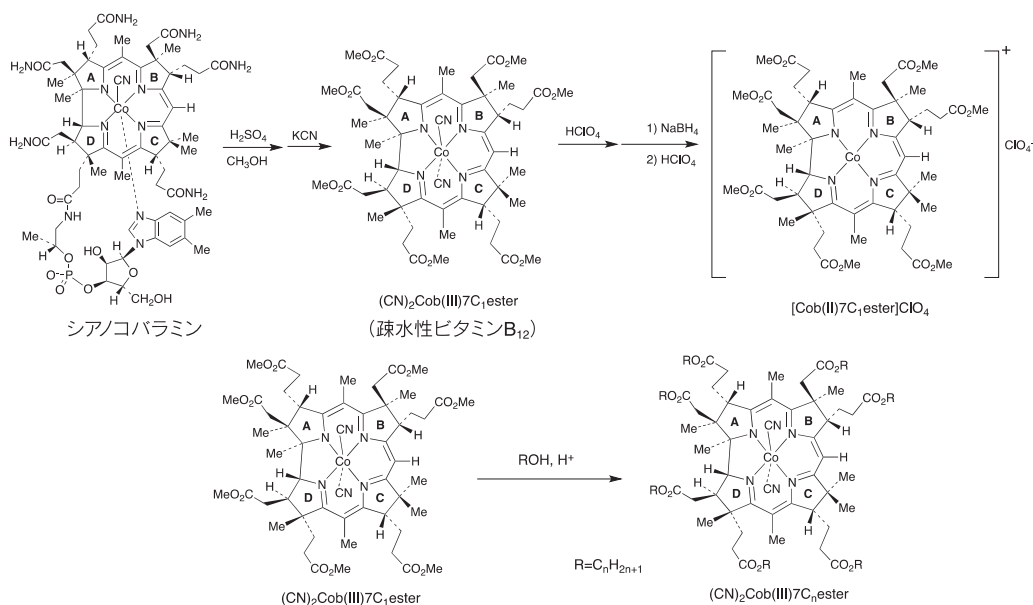


図6 ビタミン B_{12} の化学修飾(疎水性ビタミン B_{12} の合成)

B₁₂を疎水的に化学修飾した化合物を取り込ませることにより、二分子膜型ビタミンB₁₂人工酵素を構成できる。図7に二分子膜型ビタミンB₁₂人工酵素の模式図を示す。この人工酵素系では、合成二分子膜のミクロ環境効果によるアポタンパク機能が発現し、均一溶液中では進行しない官能基の1,2-転位反応を効果的に進行させることができる。本人工酵素により、ジメチルマロン酸骨格からメチルコハク酸骨格への変換やメチルアスパラギン酸からグルタミン酸への骨格変換反応が可能である。同様な反応は、二分子膜の代わりに天然タンパク質であるHSAをアポタンパクモデルとして用いた系でも可能である¹¹⁾。

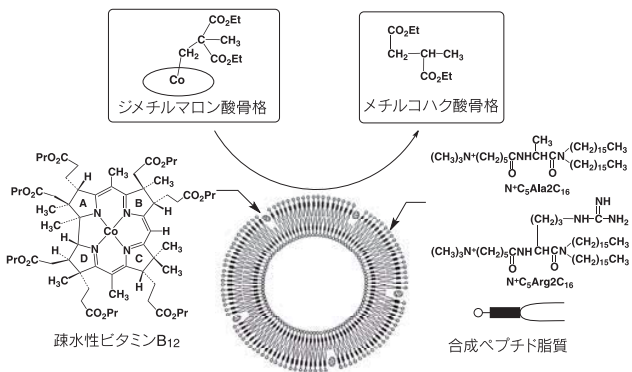


図7 二分子膜型ビタミンB₁₂人工酵素

3.2. B₁₂-Ru 光増感剤による触媒システム

ビタミンB₁₂誘導体のCo(I)種は超求核剤であり、その生成には通常は化学的還元剤が、電気化学的還元を用いる。しかし、これらの手法は環境への負荷が小さくはない。そこで、クリーンな手法として光増感剤を用いるCo(I)種の生成法を開発した。光増感剤として良く用いられるルテニウム(II)トリスピリジン錯体に着目し、図8に示すような光駆動型電子移動反応を利用した触媒サイクルを構築した¹⁷⁾。Ru(II)トリスピリジン錯体は可視光照射により励起され、犠牲還元剤(トリエタノールアミンなど)共存下では還元的消光を受け、高い還元力を有するRu(I)錯体を与える(-1.35 V vs. Ag/AgCl)。この還元力を利用すればビタミンB₁₂錯体 ($E_{1/2}(\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}) = -0.65 \text{ V vs. Ag/AgCl}$)を活性なCo(I)種へと還元することができる。光増感剤によるCo(II)錯体のCo(I)錯体への還元は、電子スピン共鳴(ESR)による反応追跡により確認することができた。

ビタミンB₁₂誘導体のCo(I)種は高い求核性を示すために有機ハロゲン化合物と反応し脱ハロゲン化反応が速やかに進行する。ビタミンB₁₂類を含む脱塩素化酵素における活性種はCo(I)種であり、この反応性は種々の有機ハロゲン化物の還元的脱ハロゲン化反応に応用できる。ジクロロジフェニルトリクロロエタン(DDT)やクロロホルムなどのトリハロメタン類を始めとした広範な有機ハロゲン化物に対し優れた脱塩素化能を示し、特に多置換塩素化合物には著しく高い反応性を示すことが明らかとなっている。このビタミンB₁₂誘導体による脱ハロゲン化反応における最大の特徴は、有機ハロゲン化合物中のハロゲン原子を、無害なハロゲンイオンの形で脱離できる点である。

そこで、疎水性ビタミンB₁₂を触媒として用い、エタノール中Ru光増感剤および犠牲還元剤存在下で、環境汚染物質であるDDT(有機塩素化合物)に可視光照射したところ、3時間でほとん

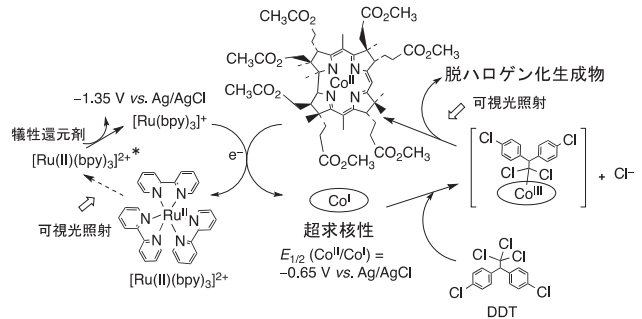


図8 B₁₂-Ru 光増感剤による触媒サイクル

どのDDTが消失し、主生成物としてモノ脱塩素体である1,1-ビス(4-クロロフェニル)-2,2-ジクロロエタン(DDD)が得られた。暗所や疎水性ビタミンB₁₂不在の場合には反応はほとんど進行せず、光駆動型電子移動反応により生成するCo(I)種が活性種となり、反応が進行していると推察される。図8に示したような反応スキームで進行しており、可視光を照射するだけで、光誘起電子移動反応により疎水性ビタミンB₁₂が活性化し、環境汚染物質であるDDTを分解できる¹⁷⁾。

3.3. B₁₂-酸化チタンハイブリッド触媒

酸化チタン(TiO₂)の光照射により生成する伝導帯の励起電子は、-0.5 V vs. NHE (pH7.0, H₂O)の還元力を有し、理論上はビタミンB₁₂誘導体をCo(I)種へと還元することが可能である。また酸化チタンは粉末や薄膜として用いるので、その表面にビタミンB₁₂誘導体を固定化すれば、不均一触媒として利用できる。そこで側鎖にカルボキシル基を有するビタミンB₁₂誘導体を合成し、酸化チタン表面に固定化したハイブリッド触媒を合成し、その反応特性を検討した(図9)¹⁸⁾。

まず、紫外線照射下での酸化チタンのビタミンB₁₂誘導体との反応性を検討するため、反応を電子スペクトルにより追跡した。疎水性ビタミンB₁₂をエタノールに溶解し、酸化チタンの粉末を加えた。最初は470 nmに特徴的な吸収をもつオレンジ色の溶液であったが、脱酸素条件で紫外線照射すると390 nmに吸収をもつ暗緑色の溶液へと変化した。390 nmの吸収極大はCo(I)種の

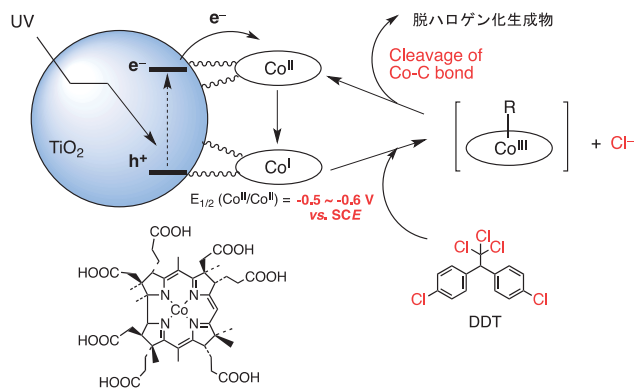


図9 B₁₂-TiO₂ハイブリッド触媒

ビタミン B₁₂ 誘導体の特徴的なスペクトルであり、紫外線照射により酸化チタンの励起電子により還元されて Co(I) 種が生成したことが明らかになった。さらに、同様にこの反応を ESR スペクトルにより追跡した。Co(II) 種の疎水性ビタミン B₁₂ をエタノールに溶解し、酸化チタン粉末を加えた。この状態で ESR を測定すると、典型的な低スピン状態の Co(II) 種のシグナルが観測された。脱酸素条件下で紫外線照射すると、Co(II) 種はほとんど消失した。この化学種を空気酸化すると、再び Co(II) 種の ESR シグナルが表れた。この ESR による反応追跡からも、酸化チタンは紫外線照射下でビタミン B₁₂ 誘導体を Co(I) 種に還元活性化できることが明らかとなった。

次に、電子移動を効率良く行うために、酸化チタン表面上に B₁₂ 誘導体を固定化した。これには、7つの側鎖がすべてカルボン酸となったコピリン酸を用いた。コピリン酸をエタノールに溶解し、酸化チタン粉末を加えて1日攪拌すると、ピンク色の粉末が得られた。この B₁₂-酸化チタンハイブリッド触媒の同定は、MALDI-TOF による質量分析、拡散反射スペクトルによる可視部の吸収測定、IR スペクトルによるカルボキシレート振動測定などにより行った。元素分析から見積もった B₁₂ の固定化率は 7.0 × 10⁻¹¹ mol/cm² であり、比較的高密度で酸化チタン表面に固定化されていることが明らかになった。

このように調製した B₁₂-酸化チタンハイブリッド触媒をエタノールに懸濁し、脱酸素条件下で紫外線照射（ブラックライトを使用）すると、Co(I) 種の生成を示す暗緑色へと変化した。アルコール溶媒を用いることは本反応の鍵であり、アセトニトリル中では本反応は進行しない。それはアセトニトリル中では光照射により発生した正孔（ホール）が励起電子と再結合するため、Co(I) 種が生成できないためである。一方、エタノール中では溶媒のエタノール自身が正孔により酸化され（アセトアルが生成）、再結合を防ぐことにより励起電子が Co(II) 種を Co(I) 種へと還元する。

このように酸化チタンの光還元作用により Co(I) 種の生成が可能であるので、基質として DDT（有機塩素化合物）を加え、紫外線照射しながら反応させると、種々の脱塩素化合物が得られた。反応時間を延ばすことにより、トリ脱塩素体（塩素が3つ脱離した化合物）を生成させることができる。酸素不在下では B₁₂-酸化チタンハイブリッド触媒は安定であり、優れた触媒であると言える。B₁₂ 誘導体を酸化チタン表面に固定化することで、好気条件下でも Co(I) 種の生成が可能となり、酸素添加反応も進行した。

この B₁₂-酸化チタンハイブリッド触媒は、有機ハロゲン化物の分解のみならず、有機ハロゲン化物からのラジカル生成反応にも利用できる^{19, 20)}。従って、従来のスズ化合物を用いたラジカル反応の代替として用いることができ、環境調和型のグリーン触媒として魅力的である。更に、可視光応答型の酸化チタンを用いることにより、可視光で反応させることも可能である。

3.4. B₁₂-HBP 触媒

分岐高分子をアボタンパクモデルとして利用することができる。機能性物質としてハイパーブランチポリマー（HBP）を用い、ビタミン B₁₂ 誘導体との組合せにより B₁₂ 修飾ハイパーブランチポリマー（B₁₂-HBP）の創製に成功している²¹⁾。上述の酸化チタンとの組合せにより、環境適合型物質変換に応用できた。

図 10 に示すように、ビタミン B₁₂ 誘導体を共有結合で HBP に固定化した B₁₂-HBP を合成した。電子スペクトル、ESR、および NMR などにより分光学的性質を評価し、B₁₂-HBP が種々の有機溶媒に高い溶解性を有し、溶液中で HBP に固定化された B₁₂ 部位

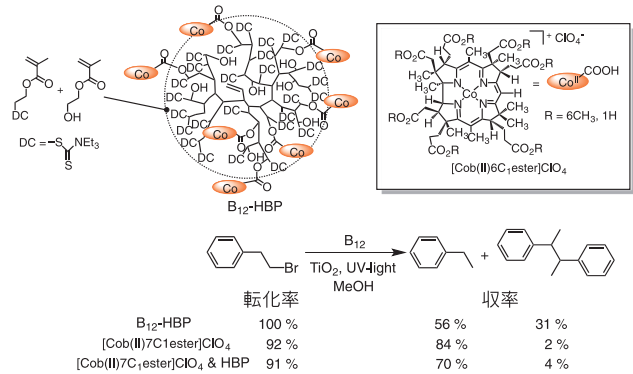


図 10 B₁₂-HBP 触媒

が溶媒和していることが明らかになった。更に、原子間力顕微鏡や透過型電子顕微鏡によりモルフォロジー観察を行い、B₁₂-HBP が HBP 本来の粒子性を保持していることも明らかになった。また、B₁₂-HBP の二座配位子に対する軸配位修飾から、ビタミン B₁₂ 誘導体が高密度に修飾されていることが明らかになった。

この B₁₂-HBP の触媒機能を検討したところ、選択的二酸化反応に有用なことを見出した。具体的には、臭化フェネチルを含む B₁₂-HBP メタノール溶液に酸化チタン共存下、紫外線照射を行うと B₁₂-HBP が B₁₂ 単体と同等の転化率を示し、二酸化反応選択性が向上した。高分子であるがその小さな粒子性のため粘度が低いので反応速度は速く、高密度修飾に起因するラジカル種の二酸化反応選択性の向上が要因であると解釈できる²²⁾。

3.5. B₁₂-MOF 触媒

近年、種々の多孔性錯体フレームワーク（MOF）が合成され、ガス吸着剤や高分子合成触媒としての応用が活発に研究されている。そこで、多孔性錯体フレームワークに新たに光増感機能を付与したものを創製し、可視光を駆動力とした固体触媒の開発を行った。光増感剤としてはルテニウム錯体を用い、触媒分子としては疎水性ビタミン B₁₂ 誘導体を用いた。多孔性錯体フレームワークを構成できる金属イオンとして亜鉛（II）イオンを採用し、補助配位子、光増感能をもつルテニウム錯体の組み合わせにより、大きな空孔を有する多孔性錯体フレームワークを構築した。図 11 に示すよ

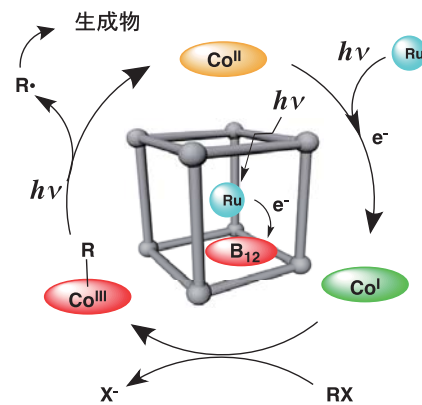


図 11 B₁₂-MOF 触媒

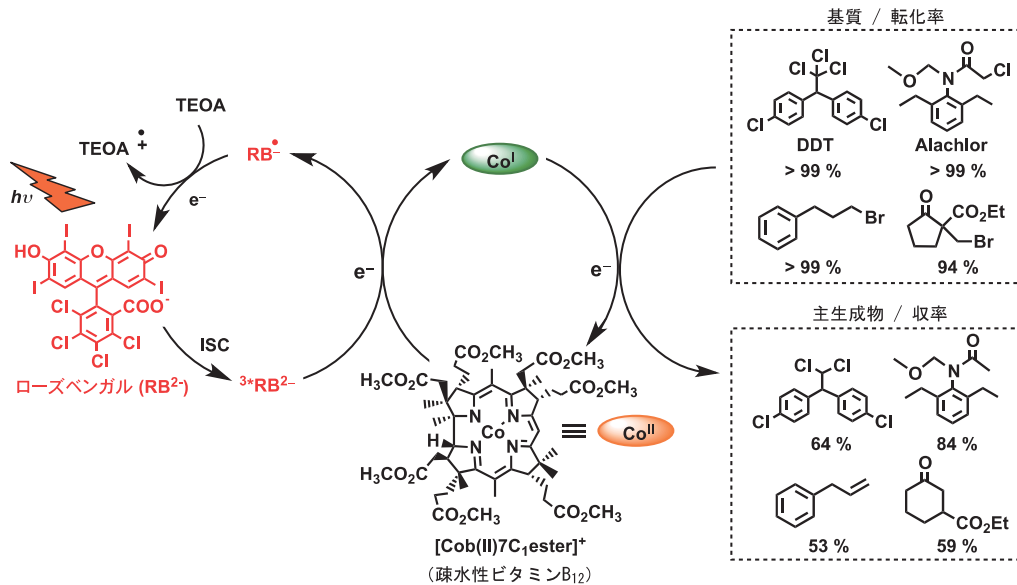


図 12 B₁₂-有機光増感剤(ローズベンガル)による触媒サイクル

うに、多孔性錯体フレームワークに導入した光増感剤は可視光により励起され、疎水性ビタミン B₁₂ 誘導体を還元して活性な Co (I) 種を生成した。本固体触媒を用いた可視光照射による有機ハロゲン化物 (環境汚染物質) の分解反応および官能基の 1,2- 転位反応に成功している²³⁾。

3.6. B₁₂-有機光増感剤による触媒システム

ビタミン B₁₂ 誘導体を用いた貴金属フリー可視光駆動型物質変換システムの構築にも成功している。有機色素増感剤としてローズベンガル(RB)を用い、ビタミン B₁₂ 誘導体の光還元反応を行った。ごく少量の RB は犠牲還元剤であるトリエタノールアミン共存下で、可視光照射によりビタミン B₁₂ 誘導体を還元し Co (I) 種を生成した。この反応系を用いることにより、DDT、アラクロール、プロモ酢酸などの脱ハロゲン化反応が効率良く進行した。反応は図 12 に示すような機構で進行することを明らかにしている²⁴⁾。さらに、本システムを有機ラジカル反応に応用し、アシル基の 1,2- 転位による環拡大反応やラジカル付加による C-C 結合形成反応にも成功している。本システムも有効なスズ代替触媒として応用できる。

4. メチル基転移反応を利用した無機ヒ素の無毒化反応

ビタミン B₁₂ 依存性酵素の 1 つであるメチオニンシンターゼは、メチルコバラミンが補酵素として働き、ホモシステインからメチオニン合成している。メチルコバラミンは生体内でのグリニャール試薬のような働きをしており、その応用として環境適合型のメチル化試薬としての利用が期待される。しかし、非酵素系でのメチル化反応において効率的な触媒反応を達成した例はなかった。そこで、著者らのグループではビタミン B₁₂ 誘導体によるアルキルチオールや無機ヒ素のメチル化反応について検討した²⁵⁻²⁷⁾。

このメチル基転移反応は重金属にも起こり、水銀がメチル化して有機水銀が生成し、水俣病の原因となったことは有名である。

水銀はメチル化して有機水銀となると猛毒であるが、ヒ素はメチル化すると逆に毒性が著しく下がる。生体系におけるヒ素のメチル化については、以前はビタミン B₁₂ 酵素の作用であると考えられたこともあったが、現在では B₁₂ 酵素ではなく S-アテノシルメチオニンによりメチル化されることが明らかになっている。従って、有効なメチル化反応を見出せばヒ素の新規な無毒化法への応用が期待できる。そこでメチル化疎水性 B₁₂ 誘導体を用いて、無機ヒ素のメチル化反応を検討した。本研究は、北里大学および日本板硝子(株)との共同研究により行った。

ヒ素化合物の急性毒性値は化学構造および酸化状態に依存する。高酸化状態の 5 価のヒ素は低酸化状態の 3 価のヒ素より急性毒性は低い。また、水銀や鉛のような重金属とは異なり、図 13 に示すようにヒ素はメチル化されると毒性は著しく低下する²⁸⁾。無機ヒ素をトリメチル化して更にアルセノベタイン(AB)に変換することにより、毒性は 1/300 になる。ヒ素化合物の中で、5 価のトリメチルヒ素であるアルセノベタイン(AB)は砂糖よりも毒性は低く、無毒と見なせる。従って無機ヒ素をトリメチル化し、さらにアルセノベタイン(AB)に変換することにより無毒化することができる。すなわち、無機ヒ素を効率よくトリメチル化することができれば、新規な無毒化方法の開発に繋がるものと期待される。

そこで、グルタチオン(GSH)の存在下で無機ヒ素とビタミン B₁₂ 誘導体のメチル化錯体を反応させ、ヒ素のメチル化反応を検討した^{26, 27)}。図 14 に示すように、メチル化疎水性 B₁₂ の加水分解物であるメチルアココピリン酸過塩素酸塩をメチル供与体とした場合、100℃ の反応条件でヒ素がほぼ全てトリメチル体となることを見出した。

B₁₂ 誘導体によるヒ素のメチル化は、新たなヒ素の無毒化法として有望であるが、よりマイルドな反応条件で反応が効率良く進行することが望まれる。また触媒的に反応を進行させる手法はいくつか考えられるが、効率の良い反応系の開発には至っていない。今後の進展が期待される。

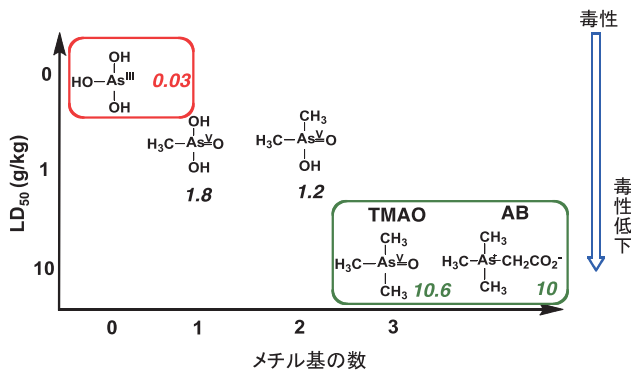


図 13 ヒ素化合物におけるメチル基の数と毒性の関係

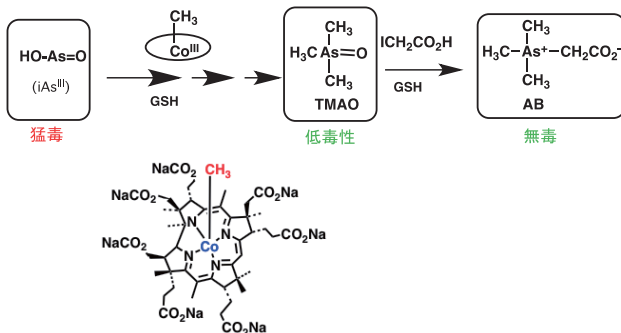


図 14 メチル化反応による無機ヒ素の無毒化

5. おわりに

近年、さまざまな分野で環境問題への注目度は大きく、化学の分野においても環境への配慮を組み入れたグリーンケミストリーへのアプローチが主流となっている。「バイオミメティクス」や「バイオインスパイアード」のような生体に学んだ手法は、その高効率と無駄のなさによって、環境への負荷を最大限に減らし、革新的な技術を生み出すことに大きく寄与すると考えられる。

本稿で紹介したビタミン B₁₂ 酵素機能をもつバイオインスパイアード触媒は、その一つの試みである。ビタミン B₁₂ 酵素は、生体内において 10 数種類の反応に関与し、通常の有機化学や触媒化学では不可能な反応を可能にする優れた触媒である。そのようなビタミン B₁₂ 酵素の活性中心にヒントを得て、金属錯体と光増感反応をハイブリッドさせる手法は、環境汚染物質のクリーン分解など、環境の改善に大いに貢献できるグリーンケミストリーである²⁹⁾。また、これらの反応系は官能基転位やメチル基転移を伴う有機合成にも応用できる。基本原理を生体系に学ぶことにより、環境との調和を保った新しい材料創製の道が拓けるものと確信する。

本稿で紹介した研究は、九州大学での筆者の研究室のスタッフおよび学生の皆さんの協力のもとに行われたものである。この場を借りて御礼申し上げます。

[参考文献]

- 1) E. L. Ricks, N. G. Brink, F. R. Koniuzu, T. R. Wood and K. Folkers, *Science*, **1948**, 107, 396.
- 2) D. C. Hodgkin, J. Kamper, M. Mackay, J. Pickworth, K. N. Yrueblood and J. G. White, *Nature*, **1956**, 178, 64.
- 3) R. B. Woodward, *Pure Appl. Chem.*, **1973**, 33, 145.
- 4) B. Kräutler, D. Arigoni and B. T. Golding (ed), *Vitamin B₁₂ and B₁₂-Proteins*, Wiley-VCH, Weinheim (1998).
- 5) J. M. Pratt, *Inorganic Chemistry of Vitamin B₁₂*, Academic Press, London (1972).
- 6) F. Mancia, N. H. Keep, A. Nakagawa, P. F. Leadlay, S. McSweeney, B. Rasmussen, P. Bosecke, O. Diat and P. R. Evans, *Structure*, **1996**, 4, 339.
- 7) C. L. Drennan, S. Huang, J. T. Drummond, R. G. Matthews and M. L. Ludwig, *Science*, **1994**, 266, 1669.
- 8) R. P. H. Schmitz, J. Wolf, A. Habel, A. Neumann, K. Ploss, A. Svatos, W. Boland and G. Diekert, *Environ. Sci. Technol.*, **2007**, 41, 7370.
- 9) S. Kliegman and K. McNeill, *Dalton Trans.*, **2008**, 4194.
- 10) Y. Murakmai, Y. Hisaeda and A. Kajihara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1983**, 56, 3642.
- 11) Y. Hisaeda, T. Masuko, E. Hanashima and T. Hayashi, *Sci. Tech. Adv. Mater.*, **2006**, 7, 655.
- 12) Y. Murakami, Y. Hisaeda and T. Ohno, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1991**, 405.
- 13) T. Tahara, H. Shimakoshi, A. Tanaka and Y. Hisaeda, *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 5065.
- 14) H. Shimakoshi, M. Tokunaga, K. Kuroiwa, N. Kimizuka and Y. Hisaeda, *Chem. Commun.*, **2004**, 50.
- 15) H. Shimakoshi and Y. Hisaeda, *ChemPlusChem*, **2014**, 79, 1250.
- 16) Y. Hisaeda, E. Ohshima and M. Arimura, *Colloids and Surfaces A*, **2000**, 169, 143.
- 17) H. Shimakoshi, M. Tokunaga, T. Baba and Y. Hisaeda, *Chem. Commun.*, **2004**, 1806.
- 18) H. Shimakoshi, E. Sakumori, K. Kaneko and Y. Hisaeda, *Chem. Lett.*, **2009**, 38, 492.
- 19) H. Shimakoshi, M. Abiru, S. Izumi and Y. Hisaeda, *Chem. Commun.*, **2009**, 6427.
- 20) S. Izumi, H. Shimakoshi, M. Abe and Y. Hisaeda, *Dalton Trans.*, **2010**, 39, 3302.
- 21) K. Tahara, H. Shimakoshi, A. Tanaka and Y. Hisaeda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2010**, 83, 1439.
- 22) K. Tahara, H. Shimakoshi, A. Tanaka and Y. Hisaeda, *Dalton Trans.*, **2010**, 39, 3035.
- 23) J. Xu, H. Shimakoshi and Y. Hisaeda, *J. Organometal. Chem.*, **2015**, 782, 89.
- 24) K. Tahara and Y. Hisaeda, *Green Chem.*, **2011**, 13, 558.
- 25) L. Pan, H. Shimakoshi, T. Masuko and Y. Hisaeda, *Dalton Trans.*, **2009**, 38, 9898.
- 26) K. Nakamura, Y. Hisaeda, L. Pan and H. Yamauchi, *Chem. Commun.*, **2008**, 5122.
- 27) K. Nakamura, Y. Hisaeda, L. Pan and H. Yamauchi, *J. Organometal. Chem.*, **2009**, 694, 916.
- 28) H. Yamauchi, Y. Aminaka, K. Yoshida, G. Sun, J. Pi and M. P. Waalkes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2004**, 198, 291.
- 29) Y. Hisaeda, K. Tahara, H. Shimakoshi and T. Masuko, *Pure Appl. Chem.*, **2013**, 85, 1415.

[著者プロフィール]

氏名：久枝 良雄 (Hisaeda Yoshio)

所属：九州大学大学院工学研究院応用化学部門 教授

連絡先：〒 819-0395 福岡市西区元岡 744

TEL : 092-802-2826、FAX : 092-802-2827

E-mail : yhisatcm@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

出身学校：九州大学大学院工学研究科合成化学専攻

学位：工学博士

専門：錯体化学、有機電子移動化学、生体機能関連化学

Topics on Chemistry

生体内ホルムアルデヒドを検出するための蛍光プローブ

株式会社同仁化学研究所 大内 雄也

ホルムアルデヒドはシックハウス症候群の原因物質として知られる“毒”であり、癌や糖尿病、アルツハイマー病など多くの疾患にも関連していることがわかっている。生体内ではエピジェネティクスを調節している脱アセチル化酵素 LSD1 やその他の酸化酵素によってホルムアルデヒドは産生され(図1)、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ/ S- ニトロソグルタチオンレダクターゼやアルデヒドデヒドロゲナーゼなどの酵素によって分解されることで生体内のホルムアルデヒド濃度は 100 ~ 400 μM に調節されている。このようなホルムアルデヒドの産生/代謝バランスの異常や外的要因による生体内のホルムアルデヒド量の増加は、多くの疾病につながる事が確認されており、アルツハイマー病モデルマウスの脳組織では高濃度のホルムアルデヒドが検出されている。τタンパク質の過剰リン酸化やポリマー化、あるいはβアミロイドタンパク質のミスフォールディングや凝集がホルムアルデヒドの主な作用と考えられている。

ホルムアルデヒドを検出するには、ガスクロマトグラフィー、放射性同位体を用いたトレース法、HPLC やマスマスペクトロメトリーなど、いくつかの方法が挙げられる。しかしこれらの方法ではサンプルを処理する必要があり、生体内のホルムアルデヒドを直接観察することはできない。

そこで本トピックでは、非侵襲的に生体内のホルムアルデヒドを検出するための蛍光プローブについて紹介する。

A. Roth らが開発した蛍光プローブ (FP1) は、silicon rhodol を蛍光色素の基本骨格としており、その構造内に消光基であるニトロベンジル基を有している。そのため、FP1 自体はほとんど蛍光を発しないが、ホルムアルデヒドと反応してニトロベンジル基が脱離すると蛍光を発することとなる(図2)。FP1 はホルムアルデヒド 250 μM に対して3時間で約7倍、ホルムアルデヒド 5 mM に対しては 33.5 倍の蛍光増加を示す。

一方、T. F. Brewer らが開発した蛍光プローブ (FAP-1) は、蛍光色素として silicon rhodamine を用いており、スピロ環の開裂に基づく発光システムを利用している。FAP-1 自体はスピロ環構造をしているため、その蛍光は非常に弱い。しかし、ホルムアルデヒドが FAP-1 と反応して、スピロ環形成に関わるアミノ基が脱離するとスピロ環化が解消され、強い蛍光を発するのである(図2)。FAP-1 は FA 100 μM に対して1時間で約8倍の蛍光増加を示すことから、FP1 よりも反応性が高いと考えられる。

いずれの蛍光プローブも選択性は高く、アセトアルデヒドなどの他のアルデヒド類や生体内に mM オーダーで存在するグルタチオンや主な活性酸素種である過酸化水素には反応しないことが確認されている。このような高い選択性はその反応機構に起因しており、いずれのプローブにおいてもホルムアルデヒドとの反応に加え、2-aza-cope 転位反応を介した多段階の反応を利用している(図3)。

これらのプローブは細胞イメージングへの適用も可能であり、生体内濃度のホルムアルデヒドを検出できることが示されている。さらに FAP-1 を用いた実験においては、LSD1 過剰発現によってホルムアルデヒド量が増加している MCF7 (ヒト乳癌細胞) 内で蛍光増加が観察され、この蛍光増加は LSD1 阻害剤によって低減されることが確認されている。これらの結果は、FAP-1 は生細胞内のホルムアルデヒド量を可視化できるプローブであることを支持するものである。

ホルムアルデヒドは長年にわたって多くの疾患に関連していることが示唆されているが、そのメカニズムに関しては未だ不明な点が残されている。またエピジェネティクスとの関連も示唆され

ており、ホルムアルデヒドと疾病あるいはエピジェネティクスとの関連を調査する上でこのような蛍光プローブは強力なツールとなりうる。今回紹介したプローブには反応速度や感度の面で課題が残されているが、今後さらなる改良によって実用的なプローブ開発への展開が期待できる。

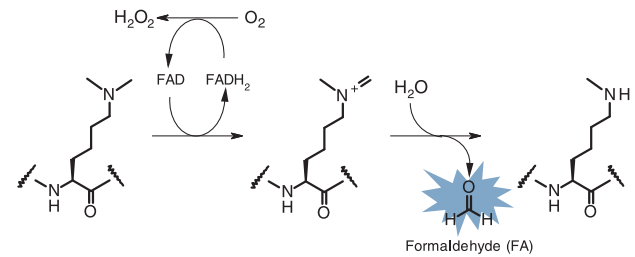


図1 LSD1によるリジン脱メチル化反応

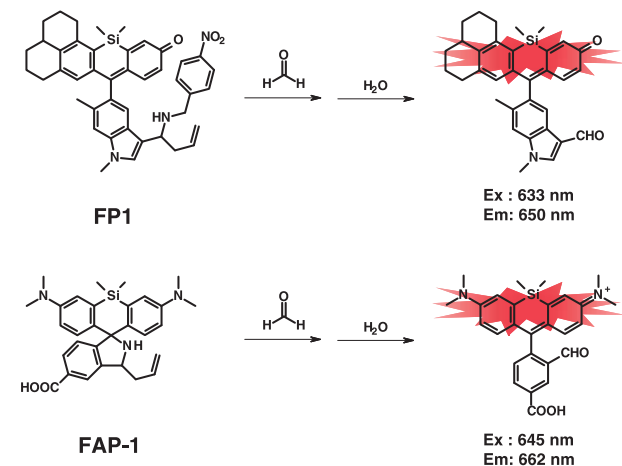


図2 ホルムアルデヒド検出用蛍光プローブ FP1 および FAP1

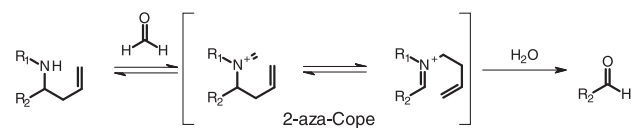


図3 ホルムアルデヒドと蛍光プローブの反応機構

[参考文献]

- 1) Y. Shi *et al.*, "Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1", *Cell*, **2004**, 119, 941.
- 2) J. Lu, J. Miao, T. Su, Y. Liu and R. He, "Formaldehyde induces hyperphosphorylation and polymerization of Tau protein both *in vitro* and *in vivo*", *Biochem. Biophys. Acta.*, **2013**, 1830, 4102.
- 3) K. Chen, J. Maley and PH. Yu, "Potential implication of endogenous aldehydes in beta-amyloid misfolding, oligomerization and fibrillogenesis", *J. Neurochem.*, **2006**, 99, 1413.
- 4) A. Roth, H. Li, C. Anorma and J. Chan, "A Reaction-Based Fluorescent Probe for Imaging of Formaldehyde in Living Cells", *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137, 10890.
- 5) T. F. Brewer and C. J. Chang, "An Aza-Cope Reactivity-Based Fluorescent Probe for Imaging Formaldehyde in Living Cells", *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137, 10886.

新製品 **DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.**

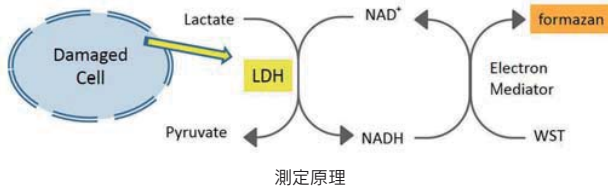
LDH 測定キット

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST

500 tests 追加!!

<特長>

1. 生細胞存在下 (ホモジニアス)、および細胞培養液のみ (ノンホモジニアス) の両方の系で死細胞数の測定が可能
2. 測定毎の溶液調製が不要
3. ^{51}Cr リリースアッセイのようなラジオアイソトープは不要



Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST は、細胞から培地中に放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定することにより細胞傷害を測定するキットです。

本キットは、生細胞と反応せず、かつ、細胞にダメージを与えないため、生細胞と死細胞が混在する細胞培養液中に直接試薬を加えて細胞傷害を測定することが可能です (ホモジニアスアッセイ)。なお、一般的に用いられる細胞培養液を取り出して LDH 活性を測定する方法も可能です (ノンホモジニアスアッセイ)。また、調製した試薬溶液は長期間保存でき、用時調製する必要がありません (表 1)。そのため、多検体アッセイから、少検体数の測定にも対応することができます。

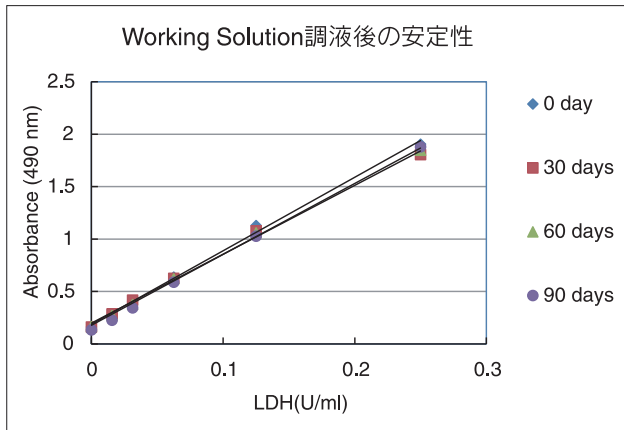


表 1 各社指定の Working Solution の保存条件

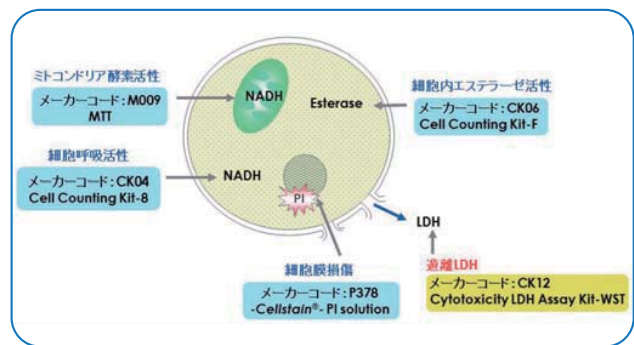
製品	保存条件	使用期限
Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST	冷蔵	2 か月
他社 P (ノンホモジニアス)	冷凍	6 ~ 8 週間
他社 R (ホモジニアス)	—	用時調製
他社 R (ノンホモジニアス)	—	用時調製

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST	100 tests	9,600	CK12
Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST	500 tests	25,400	CK12

生細胞/死細胞の測定指標

細胞増殖アッセイや死細胞アッセイは、ドラッグスクリーニングや各種物質の毒性分析に用いられています。これらのアッセイは、酵素活性や細胞膜の状態、細胞接着性、ATP 生産量、補酵素量、ヌクレオチド取り込み活性などといった細胞機能を対象にした様々な方法が存在し、複数の指標で測定することが望まれています。

小社では下記に示す指標を基にした試薬を販売しており、各測定方法の特徴を理解した上で、研究の目的に適した測定方法を併用することをお勧めしています。



関連資料のご紹介

MTT 法や Cell Counting Kit-8 (WST 法) を用いた細胞増殖アッセイ、また PI などの蛍光色素を用いた細胞染色のプロトコルなどを、分かりやすく一冊にまとめました。各製品の使用方法等は、こちらのパンフレットをご覧ください。



関連製品

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Cell Counting Kit-8	100 回用	4,800	CK04
Cell Counting Kit-8	500 回用	12,800	CK04
Cell Counting Kit-8	2500 回用	36,200	CK04
Cell Counting Kit-8	10000 回用	100,000	CK04
Cell Counting Kit-F	500 回用	13,600	CK06
MTT	100 mg	3,200	M009
MTT	1 g	15,600	M009
MTT	5 g	55,600	M009
-Cellstain®- PI solution	1 ml	5,400	P378

新製品

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

レドックス応答性タンパク質解析キット

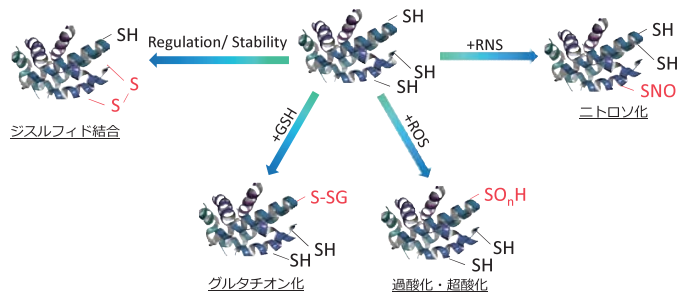
-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit
-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit Plus

<特長>

- ・タンパク質のSH基数が目視で分かる
- ・ウェスタンブロット解析が可能 (Kit Plus)
- ・使いきりタイプで操作が簡便

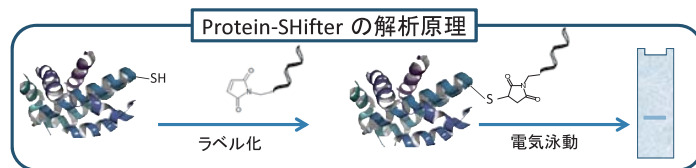
タンパク質システインのチオール基修飾は、代表的な翻訳後修飾の一つであり、生体内のレドックス変化にตอบสนองして生じます。近年、このようなチオール基の修飾が、転写やタンパク質発現、細胞死などの様々な細胞応答を制御していることが明らかにされてきています。チオール基の翻訳後修飾によるタンパク質の機能制御を理解するためには、個々のチオール基の酸化還元状態を解析することが必要不可欠です。

本製品を用いることで、タンパク質のチオール基のレドックス状態を可視化することが可能です。さらに Kit Plus においては、ウェスタンブロット法に適用可能です。



複数種の修飾が生体内でコントロールされ、様々な生命現象に関わっている。

-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit の解析原理



マレイミド基を有する Protein-SHifter はタンパク質のSH基と反応することで、結合したタンパク質の分子量を増加させます。そのため、タンパク質のSH基数は Protein-SHifter の結合数に応じて、異なるバンドとして分離することが可能となります。

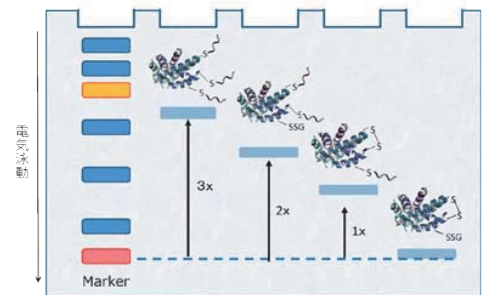
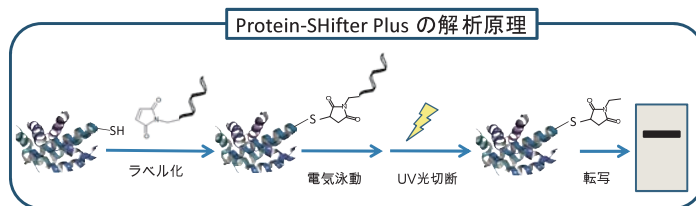


図1. 電気泳動によるタンパク質 SH 基数の可視化

-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit Plus の解析原理



Protein-SHifter Plus では、タンパク質へのラベル化後に UV 光の照射によりラベル化物を切断することが可能であるため、ウェスタンブロットによる解析が可能となります。※ Kit Plus は、動物細胞用に最適化されています。

実験例：GAPDH チオールの酸化剤応答

酸化剤である Diamide や H₂O₂ 刺激にตอบสนองして、HeLa 細胞中の GAPDH の SH 基が酸化されていることを確認した。



1. 未処理, ラベル化
2. Diamide 酸化, ラベル化
3. H₂O₂ 酸化, ラベル化

[参考文献]

- 1) S. Hara, Y. Tatenaka, Y. Ohuchi and T. Hisabori, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2015**, 456(1), 339-343.
- 2) S. Hara, T. Nojima, K. Seio, M. Yoshida and T. Hisabori, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2013**, 1830(4), 3077-3081.

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit	5 samples	18,000	SB11
-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit Plus	5 samples	23,000	SB12

本製品は東京工業大学の久堀教授らにより開発された製品です。

抗体・タンパク質標識キットシリーズ

Labeling Kit

<特長>

1. 簡単、迅速なラベル化キット
フィルトレーションチューブ中で 3 時間以内に完了
2. 少量サンプルを処理できる
1 回の標識操作で 50 ~ 200 µg のサンプル処理が可能
3. 高分子から低分子まで
分子量 50,000 以上の高分子をラベル可能
酵素標識タイプでは分子量 5,000 以下もラベル可能

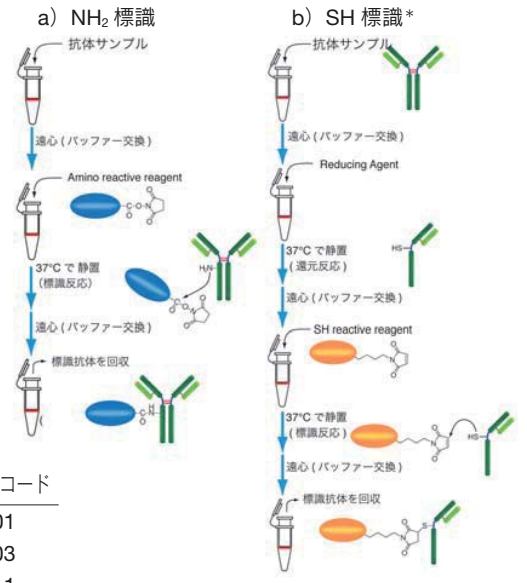
Dojindo Labeling Kits は活性化試薬とフィルトレーションチューブにより、一次抗体やタンパク質等を簡単に標識するためのキットです。前処理-反応-精製まで全て一つのフィルトレーションチューブ上で行うことができ、3 時間以内に標識体が得られます。

お試し容量を数量限定で
ご用意しました!

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Fluorescein Labeling Kit - NH ₂	1 sample	9,000	LK01
Biotin Labeling Kit - NH ₂	1 sample	5,250	LK03
Peroxidase Labeling Kit - NH ₂	1 sample	7,500	LK11
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH ₂	1 sample	9,000	LK12

その他、Labeling Kit のラインナップは右記までアクセス！ <http://dominoweb.dojindo.co.jp/goodsr7.nsf/ByChuInfo/05>

NH₂ 標識、SH 標識の操作手順

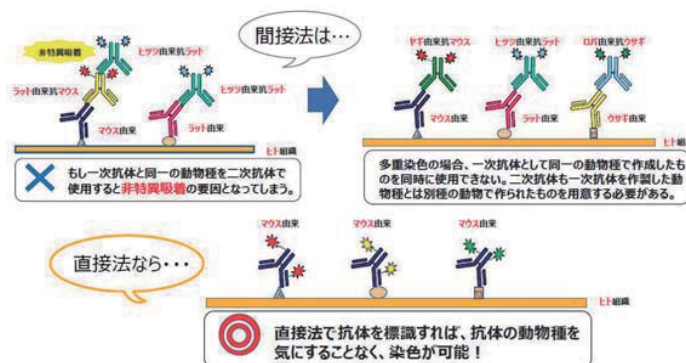


*ヒンジ部以外の SS 結合が還元される場合があります。

直接法のメリット

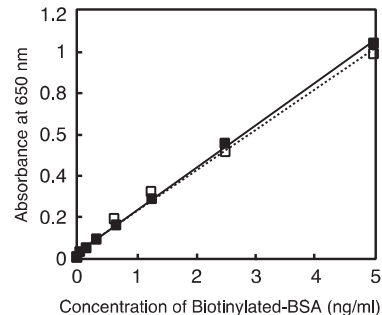
- ✓ 交差反応を気にしなくても良い!
- ✓ 多重染色を行う際に、抗体の種を選ばなくても良い!
- ✓ 二次抗体の影響 (二次抗体による非特異吸着など) を気にする必要がない!
- ✓ 実験操作の簡略化! (抗体のスクリーニングに最適)

多重染色の場合



ELISA (直接法と間接法の感度比較)

小社 Peroxidase Labeling Kit-NH₂ で標識した一次抗体を用いた直接法と、市販の HRP 標識二次抗体を用いた間接法の感度比較を行ったところ、ほぼ同等の感度を示した。



ビオチン化 BSA の ELISA の感度比較 (TMB 発色)

- : 直接法 (HRP 標識抗ビオチン抗体で検出)
- : 間接法 (抗ビオチン抗体と HRP 標識二次抗体で検出)

新製品

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

Ab-10 Rapid Labeling Kit シリーズ

10 µg の抗体へ短時間で標識

Ab-10 Rapid Fluorescein Labeling Kit

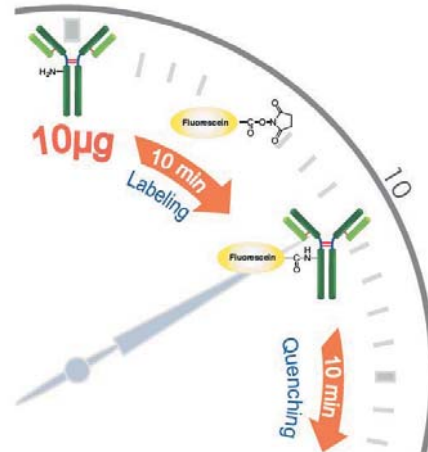
Ab-10 Rapid Peroxidase Labeling Kit

Ab-10 Rapid R-Phycoerythrin Labeling Kit

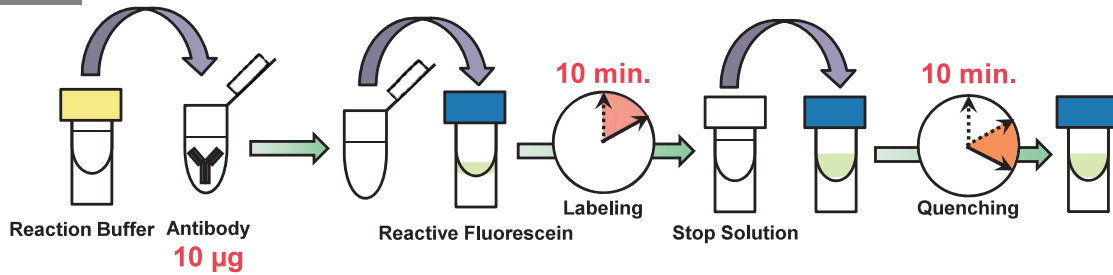
<特長>

1. 少量の抗体 (10 µg) で標識抗体を調製できる
2. 抗体と標識剤を混ぜるだけで標識できる
3. 30 分以内に標識できる

Ab-10 Rapid Labeling Kit シリーズは、10 µg の抗体に 30 分以内で標識するためのキットです。本キットに含まれる標識剤は、活性エステル基を導入しており、抗体と混合するだけで安定な共有結合を形成します。本キットには標識に必要なすべての試薬が含まれています。



操作方法

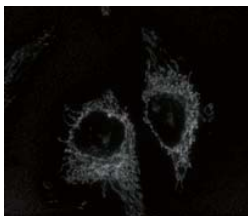


例：Ab-10 Rapid Fluorescein Labeling Kit の操作手順

※本誌では Ab-10 Rapid Fluorescein Labeling Kit (品コード：LK32) で表現しております。

1. 抗体量が 10 µg に相当する量の 0.5 ~ 1 mg/ml に調製した抗体溶液をマイクロチューブに入れる。
2. 操作 1 の抗体溶液に Reaction Buffer を加え、ピペッティングにより混合する。
3. 操作 2 の溶液を Reactive Fluorescein に加え、ピペッティングにより混合する。
4. 37°C で 10 分間反応する。
5. 操作 4 の溶液に Stop Solution を加え、ピペッティングにより混合する。
6. 室温で 10 分間反応する。
7. 操作 6 の標識抗体を実験に用いる。または、冷蔵で保存する。

本キットで作製した標識抗体の性能評価



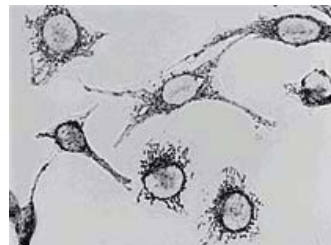
蛍光画像



明視野画像

HeLa 細胞のミトコンドリアの免疫染色画像

※ Fluorescein- 標識抗ミトコンドリア抗体を用いた ([LK32] Ab-10 Rapid Fluorescein Labeling Kit 使用)



HeLa 細胞のミトコンドリアの免疫染色画像

※ Peroxidase- 標識抗ミトコンドリア抗体を用いた ([LK33] Ab-10 Rapid Peroxidase Labeling Kit 使用)

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Ab-10 Rapid Fluorescein Labeling Kit	3 samples	24,000	LK32
Ab-10 Rapid Peroxidase Labeling Kit	3 samples	19,000	LK33
Ab-10 Rapid R-Phycoerythrin Labeling Kit	3 samples	28,000	LK34

開発中

硫化水素ドナー

-SulfoBiotics- Sodium sulfide (Na₂S)

<特長>

1. 硫化水素研究用として規格化
2. 秤量しやすい粉末タイプ

硫化ナトリウム (Na₂S) は、硫化水素研究には欠かせない硫化水素ドナーであり、硫化水素ナトリウム (NaHS) と共に汎用されています。しかしながら、現在用いられている硫化ナトリウムは、有機合成用のため数十～数百 g という大きな容量で、一つのボトルにペレットの状態の販売されています。硫化水素研究において必要となるのは mg オーダーであるため、購入した硫化ナトリウムの多くは無駄となるほか、長期保存による劣化の問題が生じます。また、メーカーあるいは製造ロットによって純度や組成が異なるため、実験の再現性に影響を及ぼすことが懸念されます¹⁾。そこで小社では、硫化水素研究用の硫化ナトリウムを開発しております。本試薬は秤量しやすい粉末タイプです。またメチレンブルー法による分析によって品質を管理しておりますので、硫化水素研究用として安心してご使用頂けます。



市販の硫化ナトリウム

硫化水素研究用 硫化ナトリウム Na₂S

Fig. 1 市販の硫化ナトリウムと現在開発中の硫化水素研究用硫化ナトリウム

[参考文献]

- 1) R. Greiner, Z. Palinkas, K. Basell, D. Becher, H. Antelmann, P. Nagy and T. P. Dick, *Antioxid. Redox Signal.*, **2013**, *19*, 1749

-SulfoBiotics- Stable isotope Na₂S (34) solution

生体内に存在する硫化水素は、主に L-システインを基質としてシスタチオンβ-シンターゼ (CBS) やシスタチオンγ-リアーゼ (CSE)、3-メルカプトピルビン酸サルファトランスフェラーゼ (3-MST) と呼ばれる酵素類によって産生され、生理活性を示すと共に、システイン側鎖の SH 基に付加した結合型硫黄として生体内に貯蔵されると考えられています。硫化水素は、NO や CO と同様にガス状分子として認知されていますが、その pK_a は約 7 であり、生理的 pH では約 80% が硫化水素イオン (HS⁻) の状態で存在します。また、硫化水素イオンは生体内で様々な結合形態や構造をとるため、その作用機序の詳細は未だ不明であり、硫化水素を中心とした硫黄の生体内機能の解明が待ちまわっています (概略に関しては、ドージンニュース 146 号「生理活性物質としての硫化水素」をご参照ください)。

質量分析装置の飛躍的な発展に伴い、安定同位体標識化合物を用いたトレーサー実験は強力な代謝研究のツールとなつています。-SulfoBiotics- Stable isotope Na₂S (34) solution は、安定同位体 ³⁴S を含む硫化水素ドナーであり、天然に最も多く存在する硫黄 ³²S とは質量数が [+2] 異なるため、硫化水素の生体内動態を MS 装置によって解析することができます^{1,2)}。なお本品は 20 mmol/l Na₂S (34) を含む 0.3 mol/l NaOH 水溶液となっております。

[参考文献]

- 1) M. Nishida, T. Sawa, N. Kitajima, K. Ono, H. Inoue, H. Ihara, H. Motohashi, M. Yamamoto, M. Suematsu, H. Kurose, Albert van der Vliet, B. A. Freeman, T. Shibata, K. Uchida, Y. Kumagai and T. Akaike, "Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydrylation", *Nat. Chem. Biol.*, **2012**, *8*, 714.
- 2) E. A. Wintner, T. L. Deckwerth, W. Langston, A. Bengtsson, D. Leviten, P. Hill, M. A. Insko, R. Dumpit, E. VandenEkar, C. F. Toombs and C. Szabo, "A monobromobimane - based assay to measure the pharmacokinetic profile of reactive sulphide species in blood", *Br. J. Pharmacology*, **2010**, *160*, 941.

関連資料のご紹介

小社では、これから生体硫黄関連の研究を始められる研究者の方々向けに生体硫黄研究の概要をまとめた資料をご用意しております。

本資料のご請求は小社マーケティング部までご連絡下さい。

フリーダイヤル : 0120-489548

e-mail: info@dojindo.co.jp



関連試薬

その他の生体硫黄関連試薬は下記キーワードで検索下さい。

生体硫黄

検索する





26th Forum in DOJIN

代謝システムと 遺伝子発現制御

～意外な縁～

2015.11.13 [金] 10:00～17:00
(開場9:30)

熊本ホテルキャッスル 熊本市中央区
城東町4-2

代表世話人 山本 哲郎 (元熊本大学大学院生命科学研究部分子病理学分野)
主催 株式会社同仁化学研究所 後援 株式会社ケミカル同仁

Program

10:00～10:05 主催者挨拶 上野 右一郎 (株式会社同仁化学研究所)

10:05～10:15 世話人挨拶 山本 哲郎
(元熊本大学大学院生命科学研究部分子病理学分野)

Session 1

座長 中尾 光善 (熊本大学発生活医学研究所発生制御部門細胞医学分野)

10:15～11:15 吉田 稔 (国立研究開発法人 理化学研究所 吉田化学遺伝学研究室)
「タンパク質の新しい翻訳後修飾と
環境因子・内因性分子による制御」

11:15～12:00 北村 忠弘 (群馬大学生体調節研究所生活習慣病解析センター)
「FoxO1、Sirt1によるエネルギー代謝制御」

12:00～13:30 昼食 (株式会社同仁化学研究所) [製品紹介] 12:30～13:15

Session 2

座長 富澤 一仁 (熊本大学大学院生命科学研究部分子生理学分野)

13:30～14:15 五十嵐 和彦
(東北大学大学院医学系研究科医科学専攻 生物化学分野)
「S-アデノシルメチオニン(SAM)の核内産生機構と
そのエピゲノム制御における役割」

14:15～15:00 日野 信次朗
(熊本大学発生活医学研究所発生制御部門細胞医学分野)
「FAD依存性ヒストン脱メチル化酵素による
代謝制御機構」

15:00～15:15 コーヒーブレイク

Session 3

座長 山本 哲郎 (元熊本大学大学院生命科学研究部分子病理学分野)

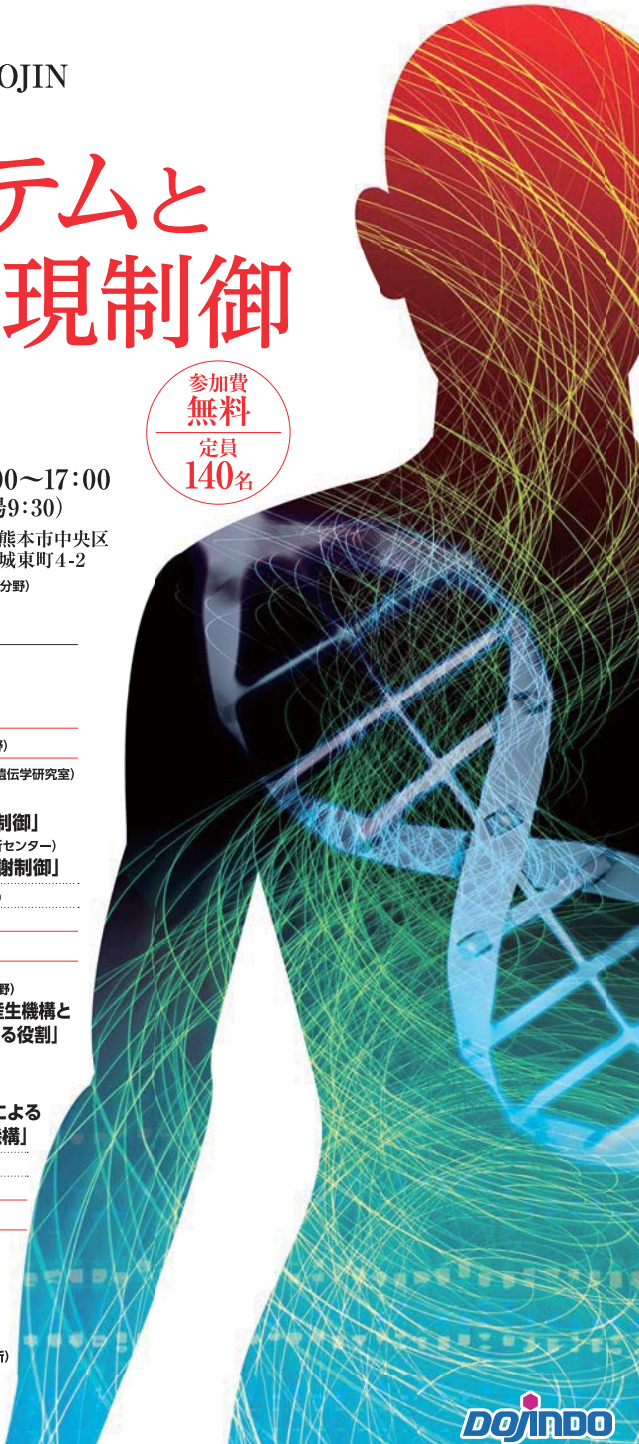
15:15～16:00 黒石 智誠
(東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座)
(口腔分子制御学分野)
「ヒオチンによる代謝制御と
遺伝子発現制御」

16:00～16:45 遠藤 玉夫
(地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所)
「糖代謝とタンパク質の糖修飾」

16:45～17:00 閉会の挨拶 三浦 洵 (株式会社同仁化学研究所)

17:00～18:30 ミキサー

参加費
無料
定員
140名



DOJINDO

問い合わせ 0861-2202 熊本県上益城郡益城町田原2025-5 株式会社同仁化学研究所内「フォーラム・イン・ドージン事務局」(担当:江口・平川)
参加申込先 Tel:0120-489548 Fax:0120-021557 E-mail:info@dojindo.co.jp

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
フリーダイヤル

0120-021557
0120-489548

DOJIN News No.155

ドージンニュース No.155 平成 27 年 10 月 30 日発行
株式会社同仁化学研究所 DOJINDO LABORATORIES
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒861-2202
発行責任者 満田健一 編集責任者 江口太一 年 4 回発行 許可なくコピーを禁ず