



DOJIN
NEWS

2016 No.156
ISSN 0385-1516

ドージンニュース

CONTENTS

●Review

電気化学的手法による DNA/薬剤
相互作用解析

九州工業大学大学院工学研究院
佐藤しのぶ 竹中 繁織

●Topics on Chemistry

蛍光プローブを用いたヒストン
脱アセチル化酵素の活性検出

株式会社同仁化学研究所 吉村 晶大



表紙撮影：南小国町
マゼノ渓谷
photo：永島俊介氏

CONTENTS

Review

電気化学的手法による DNA/薬剤相互作用解析 ●—— [1]

九州工業大学大学院工学研究院 佐藤 しのぶ 竹中 繁織

Topics on Chemistry

蛍光プローブを用いたヒストン脱アセチル化酵素の活性検出 ●—— [6]

株式会社同仁化学研究所 吉村 晶大

Commercial

新製品

細胞内滞留型 β -galactosidase 検出蛍光プローブ ●—— [7]

マイトファジー検出蛍光プローブ ●—— [8]

ミトコンドリア局在型一重項酸素検出蛍光プローブ ●—— [8]

硫化水素ドナー ●—— [9]

お知らせ

第 30 版総合カタログ発行 ●—— [5]

販売中止のお知らせ ●—— [5]

第 26 回フォーラム・イン・ドージン開催後記 ●—— [10]

※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。

細胞内滞留型 β -galactosidase 検出
蛍光プローブ

SPiDER- β Gal

マイトファジー検出蛍光プローブ

Mitophagy Detection Kit

ミトコンドリア局在型一重項酸素検出
蛍光プローブ

Si-DMA for Mitochondrial Singlet
Oxygen Imaging

硫化水素ドナー

-SulfoBiotics-
Sodium sulfide (Na_2S)

-SulfoBiotics-
Stable isotope Na_2S (34) solution

電気化学的手法による DNA/薬剤相互作用解析

Analysis of DNA/Drug interaction using electrochemical technique



佐藤しのぶ

九州工業大学大学院工学研究院
物質工学研究系応用化学部門
准教授



竹中繁織

九州工業大学大学院工学研究院
物質工学研究系応用化学部門
教授

Abstract

Electrochemistry provides a simple and rapid analytical technique for the tiny amount of specific molecule. DNA-immobilized electrode is not only important to detect target DNA with their complementarity, but also to analyze the interaction of drug with DNA using electrochemical technique. Here, we explain the characterization method of surface area on the gold electrode and the estimation method of the amount of the DNA-immobilized electrode using Hexaammineruthenium (III) is demonstrated with chronocoulometric technique and in addition we show the way to analyze the interaction of drug with DNA on the electrode in the case of ferrocenylnaphthalene diimide which is suitable for DNA hybridization indicator. In this method, we will know how many drug bound to one DNA strand with how much in strength.

1. はじめに

DNA をターゲットとする新たな薬剤を開発するためには、様々な DNA 配列のみならず、種々の DNA 高次構造に対し薬剤がどのような機構で作用するのかを解析することが重要である¹⁾。ここでは、電気化学的手法を利用した DNA と薬剤の相互作用解析について述べる。電気化学的手法では、DNA と薬剤の相互作用に基づいた電極表面への酸化還元反応の変化を直接的または間接的に利用して解析する。この手法は、DNA に結合したときに吸収や

蛍光スペクトル特性に変化を示さないような分子に適している。

DNA の核酸塩基は高電位 (1.5 V vs. Ag/AgCl) 側で酸化還元反応が観察される²⁾。しかし、一般に 2 本鎖 DNA では核酸塩基同士が水素結合により溶媒である電解液から隔離されているため、酸化され難い。一方、1 本鎖 DNA では塩基自身が電解液にさらされているため、酸化還元反応は 2 本鎖状態よりも起こりやすくなる。生体内で 1 本鎖領域は DNA ダメージによって引き起こされることもあり、これを電気化学的に検出することもできる³⁾。た

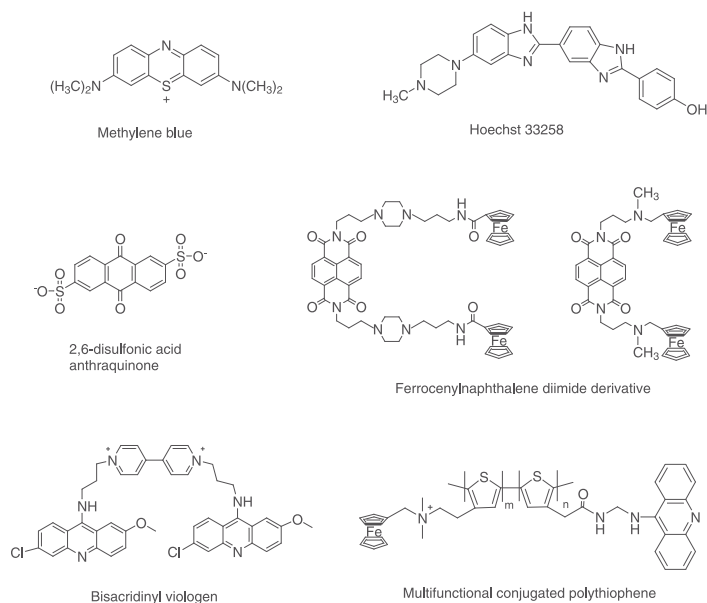


図 1 電気化学的活性な DNA 結合性分子

だし、核酸塩基の酸化還元電位は高いため、測定可能な電極を選択することが重要である。これまでに電子サイクロトロン共鳴 (Electron cyclotron resonance, ECR) スパッタリング法によって調製されたナノカーボンフィルム電極によって、エピジェネティックな DNA 変異であるメチル化シトシンとシトシンの電気化学的な識別も達成されている⁴⁾。

しかしながら、低電位下では DNA は電気化学的に不活性とみなせるので電気化学的に活性な薬剤との相互作用解析を行うことができる。これまでに報告されている電気化学的に活性であり、DNA に結合する小分子の構造例を図 1 に示す^{9),11)}。これらは DNA/薬剤相互作用センサーの指示薬として用いられる。2 本鎖 DNA の溝に結合する Hoechst 33258⁹⁾、アニオン性インターカレータである AQMS⁹⁾、カチオン性インターカレータであるフェロセン化ナフタレンジイミド (FND)⁷⁾、メチレンブルー (MB)⁸⁾ の他に、ビスインターカレータ⁹⁾ やポリマーが付加したインターカレータ¹⁰⁾、DNA のリン酸アニオンと結合するヘキサアンミンルテニウム (III) (Ru(NH₃)₆³⁺)¹¹⁾ など報告されている。

DNA と薬剤の電気化学的な相互作用解析は、いくつかの総説でも紹介されているが、ここでは DNA 固定化電極を用いた薬剤解析を紹介する。

2. DNA 固定化電極

DNA を電極上に固定化する方法はいくつか報告されている。GCE 電極を 2.5% K₂Cr₂O₇、10% HNO₃ 溶液に浸し、1.5 V で 15 秒酸化すると、GCE 電極表面にカルボン酸が生成する。その後、*N*-ヒドロキシコハク酸、水溶性カルボジイミドによって活性化されたカルボン酸は 1 本鎖 DNA のグアニンやシトシンのアミノ基と反応し、これによって DNA を GCE 電極上に固定化することができる¹²⁻¹⁵⁾。しかしながら、この方法では 2 本鎖 DNA は固定化されにくい。2 本鎖 DNA は金電極にチオール化オリゴヌクレオチドを作用させることで、Au-S 結合により固定化することができる。この固定化は温和な条件で行われる。15 塩基 (mer) の 2 本鎖オリゴヌクレオチドは 2.46 × 10¹³ molecules/cm² の密度で固定化される⁸⁾。2 本鎖 DNA の直径は 20 Å であり、これより DNA の被覆率は 55% と計算される。この固定化密度は、*n*-アルカンチオールの自己組織化膜 (SAM) の典型的な固定化密度である 5 × 10¹⁴ molecules/cm² より 1 桁小さくなるが、これにもかかわらず、DNA は電極表面全面に固定化されている。MB はこの方法で固定化された DNA の表面末端 (電極表面から遠い方) のみに結合することが報告されている。すなわち、電極近傍の DNA は込みあっており、MB は電極近傍の DNA までアクセスすることができない。このように固定化された 2 本鎖 DNA と薬剤との相互作用解析は偶発的に Langmuir 型結合等温式で分析することができる⁸⁾。

金表面へのチオール化 DNA の固定化はこれまでに詳細に検討されている¹⁶⁾。固定化されたオリゴヌクレオチドのランダムコイル性は固定化密度に支配される。24 mer よりも短いオリゴヌクレオチドは、DNA が伸びた構造をしていると予想され、それゆえ高い密度で固定化される。対照的に、長いオリゴヌクレオチドはランダムコイルを形成していると予想され、それゆえ密度はかなり低くなる。短いオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド濃度や固定化時間を減らすことで、固定化密度を低くすることができる。2 本鎖 DNA 固定化電極を調製するために、相補的な短いオリゴヌクレオチドを完璧にハイブリダイゼーションするには、10¹² molecules/cm² の固定化密度が適している^{11),17)}。このような

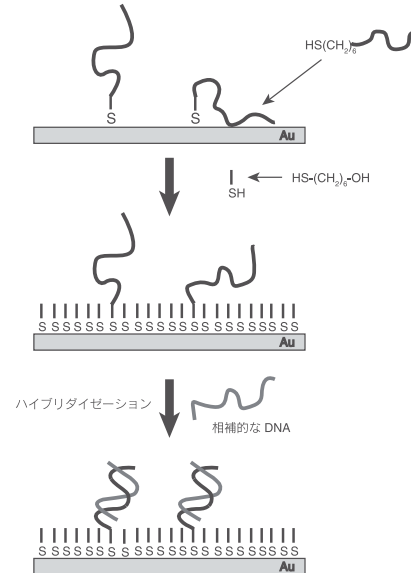


図 2 金電極への DNA の固定化手順

固定化密度では、むき出しの金表面が残っているが、図 2 に示すように、非特異的な吸着を防ぐために、6-メルカプトヘキサノール (MCH) や 2-メルカプトエタノール (MCE) による SAM 形成によりむき出しの表面は覆われる^{18),19)}。MCH による SAM とともに形成された DNA 固定化電極は、75°C でも安定であることが報告されている¹⁹⁾。この DNA 固定化電極に、相補的な DNA を作用させると電極上で 2 重らせんが形成される。

DNA の固定化量は、10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液および 50 μM Ru(NH₃)₆Cl₃、10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液でクロノクーロメトリー (CC) によって、測定することができる¹¹⁾。式 (1) にコツトレルの式を示す。式 (2) に DNA の固定化量を算出する式を示す。

$$Q = \frac{2nFAD^{1/2}C}{\pi^{1/2}} t^{1/2} + Q_{dl} + nFA\Gamma_0 \quad (1)$$

$$\Gamma_{DNA^{SS}} = \Gamma_0 \frac{z}{m} N_A \quad (2)$$

各パラメータは、以下の通りである。*n*: 酸化還元に関係する電子数, *F*: ファラデー定数 (C/equiv), *A*: 電極の表面積 (cm²), *D*: 拡散係数 (cm²/s), *C*: 電気化学活性物質のバルク濃度 (mol/cm³), *Q_{dl}*: 容量性電流 (C), *Γ₀*: 酸化還元物質の量 (mol/cm²), *Γ_{DNA^{SS}}*: プローブ DNA の固定化密度 (molecules/cm²), *z*: 酸化還元物質の荷電, *m*: プローブ DNA の塩基数, *N_A*: アボガド数 (molecules/mol)。

10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液 (Ru(NH₃)₆³⁺ 非存在下) でのクロノクーロメトリー測定における 0 秒での *y* 切片は電気二重層容量である *Q_{dl}* を示す。*nFA Γ₀* は 50 μM Ru(NH₃)₆Cl₃、10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液でのクロノクーロメトリー測定における 0 秒での *y* 切片から *Q_{dl}* を引いたものである。2 本鎖 DNA の固定化量 *Γ_{DNA^{ds}}* は相補鎖をハイブリダイゼーションした後の CC 測定の結果から得られ、これより、ハイブリダイゼーション効率は以下のように計算できる。

$$\begin{aligned} & \text{ハイブリダイゼーション効率 (\%)} \\ & = \{ (\Gamma_{DNA^{ds}} - \Gamma_{DNA^{SS}}) / \Gamma_{DNA^{SS}} \} \times 100 \end{aligned}$$

3. DNA 固定化電極のキャラクタリゼーション

ここからは、具体例を示しながら概説していく。

金ディスク電極（ビー・エー・エス、直径 1.6 mm、理論表面積 0.020 cm²）は 6 μm ダイヤモンドスラリーで 30 分研磨し、電極を超純水で洗浄し、5 分超音波洗浄する。1 μm ダイヤモンドスラリー、0.05 μm アルミナスラリーでも同様にそれぞれ 30 分物理研磨する。物理研磨後、超純水で洗浄（1 min×3 回超音波照射）を行う。続いて、電解研磨を行う²⁰⁾。電解研磨はまず、0.5 M NaOH 溶液でサイクリックボルタメトリー（CV）測定を、掃引速度 2 V/sec、サンプル間隔 0.01 V、-0.35 ~ -1.35 V vs. Ag/AgCl の条件下で、1000-2000 segments（CV でボルタモグラムが一定になるまで）を行う。電極を超純水でよく洗浄する。続いて、0.5 M H₂SO₄ 溶液にて、Multi potential step モードで 2 V で 5 s の酸化、-0.35 V で 10s の還元を行う。同じ溶液で引き続き CV 測定を、掃引速度 4 V/sec、サンプル間隔 0.01 V、-0.35 ~ 1.5 V vs. Ag/AgCl で 40 segments 行う。電極を超純水で洗浄する。真の表面積を算出するために、電極を 0.05 M H₂SO₄ 溶液に浸し、次の条件で CV 測定を行う。掃引速度 0.1 V/sec、サンプル間隔 0.001 V、-0.35 ~ 1.5 V vs. Ag/AgCl で 4 segments、4 segment 目の 0.9 V vs. Ag/AgCl のピーク面積（酸素の脱離ピーク）を算出する。ポリクリスタルの金電極の場合、酸素が脱離するときに 390 ± 10 μC cm⁻² の応答を示す²¹⁾ため、これにより真の表面積を算出する。図 3 の斜線部分で算出された面積は、1.56 × 10⁻⁵ C であり、真の表面積は、1.56 × 10⁻⁵ C / 390 × 10⁻⁶ C/cm² = 0.040 cm² となる。理論表面積（Φ 1.6 mm）：0.020 cm² であるため、電極表面のラフネスファクターは、2.0 と計算される。

販売されているチオール化 DNA はトリチル基もしくは HO(CH₂)₆S によって保護されている。保護基はジチオスレイトールなどによって脱保護する（販売元の指示に従って、脱保護する）。ジチオスレイトールは、ゲルろ過カートリッジ等ですべて除去する（ジチオスレイトールが残存している場合、DNA の固定化効率に影響を及ぼすので、注意が必要である）。ただし、HO(CH₂)₆S によって保護されているジスルフィドオリゴヌクレオチドの場合、さらに MCH によってマスキング操作を行う場合は、脱保護せずにそのまま用いることもできる²²⁾。ここでは、脱保護せずに、ジスルフィドオリゴヌクレオチド (HO(CH₂)₆SS (CH₂)₆-5'-ATG ATC GCG GGC GTC GGC GTG TTT-3') を用いる。前述したとおりの前処理を行った電極表面の水分をエアブローで除いて、直ちに、0.1 μM ジスルフィドオリゴヌクレオチド、0.1

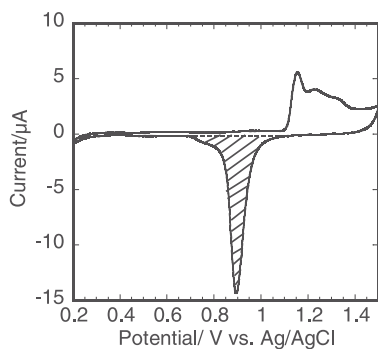


図 3 金ディスク電極を 0.05 M H₂SO₄ 溶液で 100 mV/s で掃引した時のサイクリックボルタモグラム

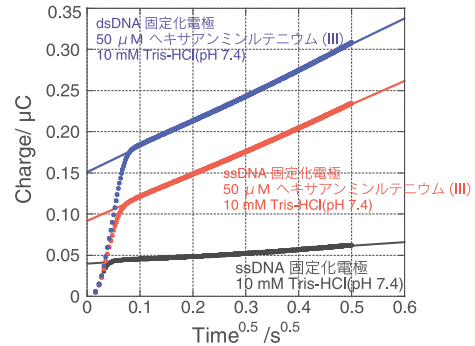


図 4 ssDNA および dsDNA 固定化電極でのクロノクーロメトリー結果

M NaCl 混合液に電極を浸し、37°C で 16 h インキュベートする。その後、電極を超純水で洗浄し、水分をエアブローで除去し、1 mM MCH に浸し、45°C で 1 h インキュベートする。超純水で洗浄後、10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液で CC 測定を行う¹¹⁾。続いて、電極を超純水で洗浄し、50 μM Ru(NH₃)₆Cl₃、10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液で CC 測定を行う。この結果を図 4 に示す。DNA の固定化密度は、式 (1) より、 $\Gamma_{DNA}^{ss} = 1.2 \times 10^{12}$ molecules/cm² と算出される。測定後、電極を超純水で洗浄し、0.4 μM の相補的なオリゴヌクレオチドを含む 2×SSC (30 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.4)、0.3 M NaCl) に浸し、15°C で 2 h インキュベートする。インキュベート後、電極は水洗せずに、エアブローで溶液を除き、50 μM Ru(NH₃)₆Cl₃、10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液で CC 測定を行う。ハイブリダイゼーション後の DNA の固定化密度は、2.5 × 10¹² molecules/cm² と算出された。あらかじめ固定化されている DNA 量は 1.2 × 10¹² molecules/cm² であるため、ほぼ定量的にハイブリダイゼーションしていることが分かる。

4. DNA 固定化電極と薬剤との相互作用解析

前節と同様に調製した DNA 固定化電極と 2 本鎖 DNA に縫込み型でインターカレートするフェロセン化ナフタレンジイミド (FND)^{17), 23)} との相互作用解析を行う。

50 μM FND、0.10 M AcOK-AcOH (pH 5.5)、0.10 M KCl 溶液でハイブリダイゼーション前後での DNA 固定化電極の CV 測定を行うと、図 5 のようなボルタモグラムが得られる。2 本鎖 DNA の密

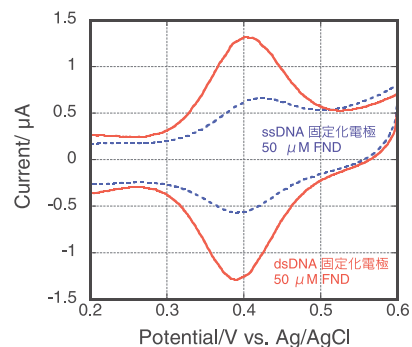


図 5 ssDNA 固定化電極および dsDNA 固定化電極を 50 μM FND、0.10 M AcOK-AcOH (pH 5.5)、0.10 M KCl で 1000 mV/s で掃引した時のサイクリックボルタモグラム

度は、2本鎖DNAをあらかじめ調製して固定化した場合に比べ、10分の1程度であるが、FND由来の電流応答はハイブリダイゼーション後、大きく増大している。FNDは1本鎖DNAに対しては静電的に結合するだけであり、2重らせんが形成されると、1塩基おきに結合するため、電極近傍にFNDが濃縮され、電流が増大する。1本鎖DNA固定化(ssDNA)電極の酸化電位と還元電位はそれぞれ0.416、0.432Vであり、2本鎖DNA(dsDNA)固定化電極ではそれぞれ0.396、0.403Vである。ssDNA固定化電極とdsDNA固定化電極の酸化還元電位の差である ΔE_p はそれぞれ16、7mVである。 ΔE_p は酸化還元種が電極上に固定化されていると0であり、1電子反応の酸化還元種が拡散する場合は58mVである²⁴⁾。dsDNA固定化電極では ΔE_p は0Vに近く、ほぼ固定化されている状態である。ssDNA固定化電極では ΔE_p は16mVであり、溶液中に拡散しているFNDの応答とDNA上に吸着しているFNDの応答が混在していることが分かる。FNDとの結合定数解析のため、MCH修飾電極とdsDNA固定化電極に対して、電解液にFNDを添加した時のCV測定を行う。前節と同様にdsDNA固定化電極を調製する。電解液として0.10M AcOK-AcOH(pH 5.5)、0.10M KCl溶液を500 μ L準備する。測定温度は15 $^{\circ}$ Cとし(dsDNAが解離しないように、低い温度で行う)、電解液500 μ Lに、250 μ M FND、0.10M AcOK-AcOH(pH 5.5)、0.10M KClを添加した時のCV測定(掃引速度を1000mV/sec)を行う。

FND濃度に対して、酸化ピーク面積をプロットしたものを図6に示す。MCH固定化電極にFNDを添加すると、FNDの拡散電流が観察される。この電流は、濃度依存的に増加する。dsDNA固定化電極では、FNDがdsDNAに吸着する成分と溶液中に拡散する成分がともに観察される。そのため、dsDNA固定化電極での応答からMCH固定化電極での応答を差し引くと、dsDNAに吸着したFND成分のみで解析することができる。図6よりFNDとDNAとの相互作用は2段階の結合様式のように見える。電極上には24merのdsDNAが固定化されている。第1段階目までの電荷量は 3.05×10^{-6} C/cm²である。これより、FNDの吸着量を計算する。FNDには2つのフェロセンがついていることより、 $3.05 \times 10^{-6} / (2 \times 96,500) = 1.58 \times 10^{-11}$ mol/cm²のFNDが吸着している。dsDNAの固定化密度は 1.66×10^{-12} mol/cm²であり、これらよりFNDの結合量は10個(= $1.58 \times 10^{-11} / 1.66 \times 10^{-12}$)となる。この挙動はインターカレータが最近接排他説によってDNAに結合することと一致している²⁵⁾。さらに4分子のFNDがDNAに結

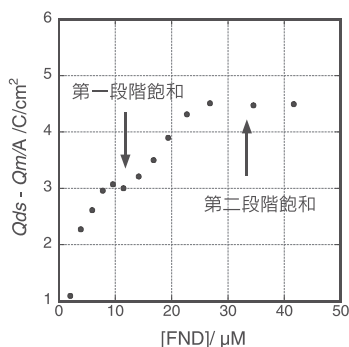


図6 dsDNA固定化電極にFNDを添加した時のCV酸化ピーク(Q_{ds})からマスキング電極にFNDを添加した時の酸化ピークを引いたもの(Q_m)をFND濃度に対してプロットしたもの

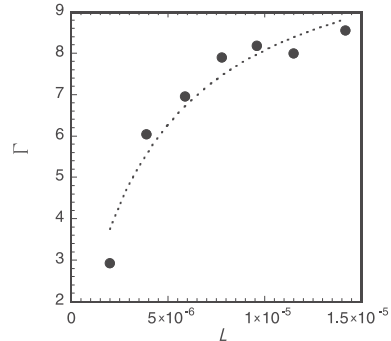


図7 dsDNA固定化電極にFNDを添加した時のCV応答をLangmuir型結合等温式でフィッティングした結果

合しているのが2段階目であり、これはDNA末端へのFND結合だと予想している。

色素同士の相互作用(協同性)がないときには、Langmuirの結合等温式(3)から以下の式が導かれるため、第1段階目のみLangmuirの結合等温式でフィッティングを行うことができる²⁶⁾。

$$\Gamma = \frac{RU}{R_{max}} = \frac{nKL}{(1+KL)} \quad (3)$$

ここで、 RU/R_{max} = [結合した色素のモル数] / [固定化されたDNAのモル数]、 n = 結合個数、 K = 結合定数、 L = フリーなFND濃度 = 添加したFND濃度で計算することができる。フィッティングの結果を図7に示す。この結果、 $K = 2.5 \times 10^5$ M⁻¹、 $n = 11$ が算出された。これは、分光学的な手法で得られた結合パラメータとほぼ同等の値であった²³⁾。

5. おわりに

ここではDNA固定化電極を用いたDNAとDNA結合性電気化学活性分子との相互作用解析について解説した。薬剤が電気化学活性であるならば、電気化学的手法によりDNAに結合するかどうかCV測定を行うことで判別することができる。この解析は、少量のDNA(pgオーダー)や薬剤で解析することができる。本手法は、ここで例として述べた2本鎖DNAのみならず、1本鎖DNAや4本鎖DNA等の特殊高次構造と薬剤との相互作用も同様に行うことができる。電気学的薬剤との競合法などによって電気化学的に不活性な薬剤へも展開できると期待され、今後薬剤開発へと利用できるものと期待される。

[参考文献]

- 1) I. Haq, "Reversible small molecule-nucleic acid interactions". In: *Nucleic Acids in Chemistry and Biology, 3rd Edition*, eds. G. M. Blackburn, M. J. Gait, D. Loakes and D. M. Williams, pp. 341-379. Dorset: RSC Publishing.
- 2) E. Palecek and F. Jelen, "Electrochemistry of nucleic acids". In: *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins. Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics*, eds. E. Palecek, F. Scheller and J. Wang, pp. 73-173. New York: Elsevier B. V.
- 3) M. Fojta, *Electroanalysis*, **2002**, *14*, 1449-1462.
- 4) K. Goto, D. Kato, N. Sekioka, A. Ueda, S. Hirono and O. Niwa, *Anal. Biochem.*, **2010**, *405*, 59-66.
- 5) K. Hashimoto, K. Ito and Y. Ishimori, *Anal. Chem.*, **1994**, *66*, 3830-3833.
- 6) E. L. S. Wong and J. J. Gooding, *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 3845.
- 7) S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto and H. Kondo, *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 1334.

- 8) S. O. Kelley, J. K. Barton, N. M. Jackson and M. G. Hill, *Bioconjugate Chem.*, **1997**, *8*, 31-37.
- 9) S. Takenaka, T. Ihara and M. Takagi, *Chem. Commun.*, **1990**, *21*, 1485-1487.
- 10) L. Zhang, H. Sun, D. Li, S. Song, C. Fan and S. Wang, *Macromol. Rapid Commun.*, **2008**, *29*, 1489-1494.
- 11) A. B. Steel, T. M. Nerne and M. J. Tarlov, *Anal. Chem.*, **1998**, *70*, 4670-4677.
- 12) M. K. Millan and S. R. Mikkelsen, *Anal. Chem.*, **1993**, *65*, 2317-2323.
- 13) M. Kanazawa, S. Sato, K. Ohtsuka and S. Takenaka, *Anal. Sci.*, **2007**, *23*, 1415-1419.
- 14) S. Sato, K. Fujita, M. Kanazawa, K. Mukumoto, K. Ohtsuka and S. Takenaka, *Anal. Chim. Acta*, **2009**, *645*, 30-35.
- 15) S. Sato and S. Takenaka, *Electroanalysis*, **2013**, *25*, 1652-1658.
- 16) A. B. Steel, R. L. Levicky, T. M. Herne and M. J. Tarlov, *Biophys. J.*, **2000**, *79*, 975-981.
- 17) S. Sato, M. Tsueda, Y. Kanazaki and S. Takenaka, *Anal. Chim. Acta.*, **2012**, *715*, 42-48.
- 18) K. A. Peterlinz, R. M. Georgiadis, T. M. Herne and M. J. Tarlov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 3401-3402.
- 19) E. L. S. Wong, E. Chow and J. J. Gooding, *Langmuir*, **2005**, *21*, 6957-6965.
- 20) Y. Xiao, R. Y. Lai and K. W. Plaxco, *Nat. Protocols*, **2007**, *2*, 2875-2880.
- 21) R. F. Carvalhal, R. S. Freire and L. T. Kubota, *Electroanalysis*, **2005**, *17*, 1251-1259.
- 22) H. Wackerbarth, R. Marie, M. Grubb, J. Zhang, A. G. Hansen, I. Chorkendorff, C. B. V. Christensen, A. Boisen and J. Ulstrup, *J. Solid State Electrochem.*, **2004**, *8*, 474-481.
- 23) S. Sato, T. Nojima, M. Waki and S. Takenaka, *Molecules*, **2005**, *10*, 693-707.
- 24) A. J. Bard and L. R. Faulkner, "Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications", **1980**, John Wiley and Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto.
- 25) W. D. Wilson, "Interaction in biological systems". In: *Interaction Chemistry*, eds. M. S. Whittingham, A. J. Jacobson, pp. 445-501. New York: Academic Press, Inc.
- 26) C. Carrasco, M. Facompre, J. D. Chisholm, D. L. Van Vranken, W. D. Wilson and C. Bailly, *Nucl. Acids Res.*, **2002**, *30*, 1774-1781.

[著者プロフィール]

氏名：佐藤しのぶ (Shinobu SATO)
 所属：九州工業大学
 連絡先：〒 804-8550 福岡県北九州市戸畑区仙水町 1-1
 TEL：093-884-3322、FAX：093-884-3322
 E-mail：shinobu@che.kyutech.ac.jp
 出身学校：九州大学工学府化学システム工学専攻
 学位：博士（工学）
 現在の研究テーマ：電気化学的バイオセンサの開発

氏名：竹中 繁織 (Shigeori TAKENAKA)
 所属：九州工業大学
 連絡先：〒 804-8550 福岡県北九州市戸畑区仙水町 1-1
 TEL：093-884-3322、FAX：093-884-3322
 E-mail：shige@che.kyutech.ac.jp
 出身学校：九州大学総合理工学研究科
 学位：博士（工学）
 現在の研究テーマ：生体分子のバイオセンシング技術の開発

第 30 版総合カタログ(2016/2017)発行



2016年2月1日に第30版総合カタログを発行いたしました。カタログ発行と併せて、ホームページの商品カタログ、プロトコルの内容も更新しております。これからも、引き続き皆様のご研究に役立つ情報をご提供して参ります。

カタログのご請求は小社マーケティング部までご依頼ください。その他パンフレット類のご請求も承っております。

<http://www.dojindo.co.jp/technical/catalog.html>
 e-mail:info@dojindo.co.jp

販売中止のお知らせ

平素は、同仁化学研究所製品をご使用いただき誠にありがとうございます。2016年2月1日より、下記製品の販売を中止いたしました。在庫につきましては、小社マーケティング部までお問い合わせください。

販売中止品

メーカーコード	コード番号	品名
A420	-	Anti-Bilirubin Antibody (24G7)
B433	-	Biopyrin EIA Kit
ES02	-	ES/iPS Differentiation Monitoring Kit - Mouse Endoderm
N468	-	11-NUPA
P463	-	11-PIUPA

包装容量削減品

メーカーコード	コード番号	品名	削減容量	代替容量
M002	348-01615	β-Mercaptopropionic acid	500g	→ 50g

Topics on Chemistry

蛍光プローブを用いたヒストン脱アセチル化酵素の活性検出

株式会社同仁化学研究所 吉村 晶大

クロマチンの構造変化や遺伝子発現において、ヒストンのアセチル化やメチル化、リン酸化などの化学修飾が重要な役割を担っていることが明らかとなっている。その中でヒストンのアセチル化/脱アセチル化はそれぞれヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) およびヒストンデアセチラーゼ (HDAC) が関与している。特に HDAC は、遺伝子発現抑制に寄与しており、癌や精神疾患にも関与していることから創薬分野で注目を集めている。そのため、効率的かつ簡便な HDAC の活性検出方法が求められている。

HDAC 活性を検出する手法として、放射性同位体を用いる手法や HPLC、ウェスタンブロットティング等の方法が報告されている。しかしながら、これらの方法は操作が煩雑であり、放射性同位体に関しては取り扱いに制限がある。また蛍光標識ペプチドを用いた手法はすでに市販されているが、酵素反応後にプロテアーゼ処理が必要であるため、酵素活性を経時的にモニタリングすることはできない。

そこで本トピックでは、近年報告されている HDAC 活性を経時的にモニタリングするための蛍光プローブ 2 点について紹介する。

R. Baba らが開発した蛍光プローブ K4(Ac)-CCB は、HDAC の基質ペプチド部位と、蛍光色素である 7-ヒドロキシクマリンから形成される¹⁾。このクマリンの 7 位のヒドロキシル基は炭酸エステル化されており、無蛍光である。しかし、HDAC によって基質ペプチドの脱アセチル化が起こると、フリーになったアミノ基がクマリンの炭酸エステル部位に求核攻撃し、エステル置換反応が起こる。その結果、ヒドロキシクマリンが蛍光を発する (図 1)。このエステル置換反応は自発的に生じるため、蛍光プローブと HDAC を混合するだけで酵素活性を簡便かつ経時的に検出することが可能である。最近 R. Baba らは、基質ペプチドとヒドロキシクマリンの距離の最適化を図ることによって、非常に有用な蛍光プローブの開発に成功している²⁾。

一方 M. Minoshima らは、DNA 結合能の変化を利用した蛍光プローブ (BOXTO-GK(Ac)G) について報告している (図 2)³⁾。このプローブは、基質ペプチドと DNA 染色用蛍光色素 (BOXTO) から形成されている。基質ペプチドがアセチル化されている状態ではプローブの総電荷はゼロであるため、測定系内に存在する DNA と結合せず、ほとんど蛍光は検出されない。しかし、HDAC によって基質ペプチドが脱アセチル化されるとプローブの総電荷がプラスに転じるため、DNA 結合能が回復し、蛍光を発するのである。これにより本プローブは、DNA 存在下で HDAC 活性をリアルタイムモニタリングすることが可能である。また細胞内 DNA を用いることで HDAC 活性の細胞内イメージングへの応用が期待できる点で本プローブは興味深い。

エピジェネティクス研究は今後も重要な研究分野の一つとして活発化していくと考えられる。今回紹介した蛍光プローブのように新しい研究ツールを利用することで研究が加速化されるだけでなく、これまで得られなかった知見が得られるものと期待する。

[参考文献]

- 1) R. Baba, Y. Hori, S. Mizukami and K. Kikuchi, "Development of a Fluorogenic Probe with a Transesterification Switch for Detection of Histone Deacetylase Activity", *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 14310.
- 2) R. Baba, Y. Hori and K. Kikuchi, "Intramolecular Long-Distance Nucleophilic Reactions as a Rapid Fluorogenic Switch Applicable to the Detection of Enzymatic Activity", *Chem. Eur. J.*, **2015**, 21, 4695.
- 3) M. Minoshima, T. Matsumoto and K. Kikuchi, "Development of a

Fluorogenic Probe Based on a DNA Staining Dye for Continuous Monitoring of the Histone Deacetylase Reaction", *Anal. Chem.*, **2014**, 86, 7925.

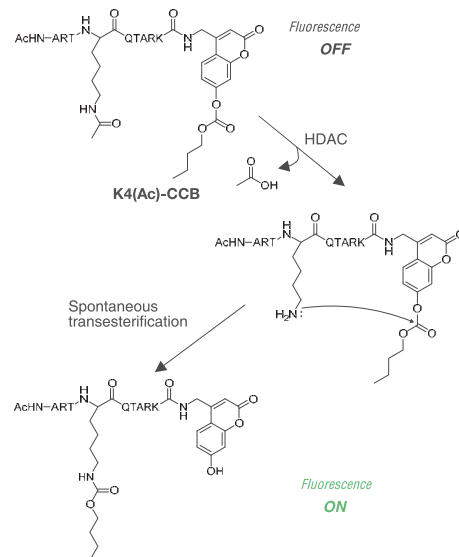


図 1 K4(Ac)-CCB を用いた HDAC 検出機構

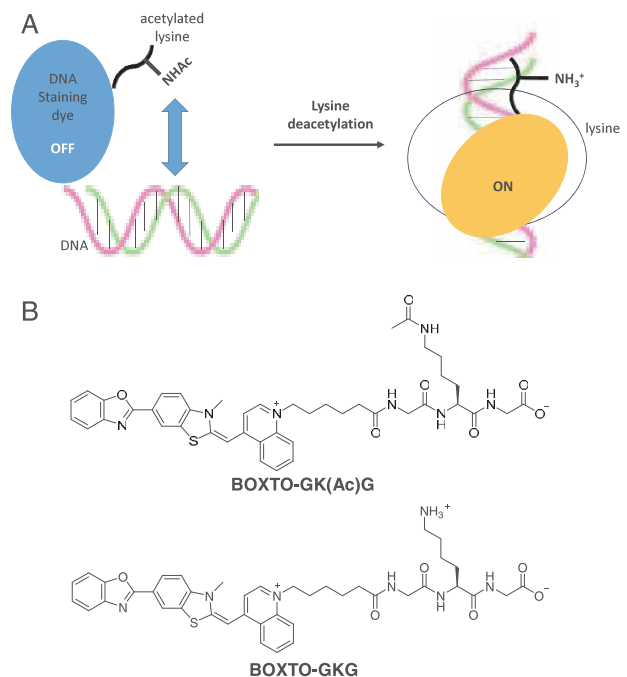


図 2 蛍光プローブ修飾 DNA を用いた HDAC の検出機構 (A)、BOXTO-GK(Ac)G と BOXTO-GKG の構造 (B)

新製品

細胞内滞留型 β -galactosidase 検出蛍光プローブ

SPiDER- β Gal

<特長>

1. 生きた細胞・組織を用いた一細胞レベルでの発現細胞の蛍光イメージングが可能
もちろん、X-gal のように固定化した細胞も使用可能
2. プローブが細胞外へ流出しないため、既存の β -galactosidase 蛍光プローブよりも高感度
プローブが細胞内に滞留するため、FCM の感度も向上

大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) は、レポーター遺伝子アッセイマーカーとして幅広く用いられています。代表的な検出方法として、X-gal 染色が広く利用されていますが、細胞膜透過性が乏しいため、細胞や組織を固定化する必要があります。また、従来の蛍光試薬は細胞内滞留性が低いため、 β -galactosidase 未発現細胞と発現細胞を明瞭に区別できないことが課題でした。

浦野、神谷らが開発した SPiDER- β Gal は、細胞膜透過性と細胞内滞留性を有する新たな蛍光試薬です¹⁾。

本試薬は、 β -ガラクトシダーゼとの酵素反応により、キノンメチドと呼ばれる中間体を形成して、近傍のタンパク質中の SH 基等の求核性基と安定な共有結合を形成し、蛍光性になります。このように、反応した試薬が細胞内タンパク質に固定化されることで優れた細胞内滞留性を有し、その結果、 β -galactosidase 発現細胞を一細胞レベルで明確に検出することが可能となります。

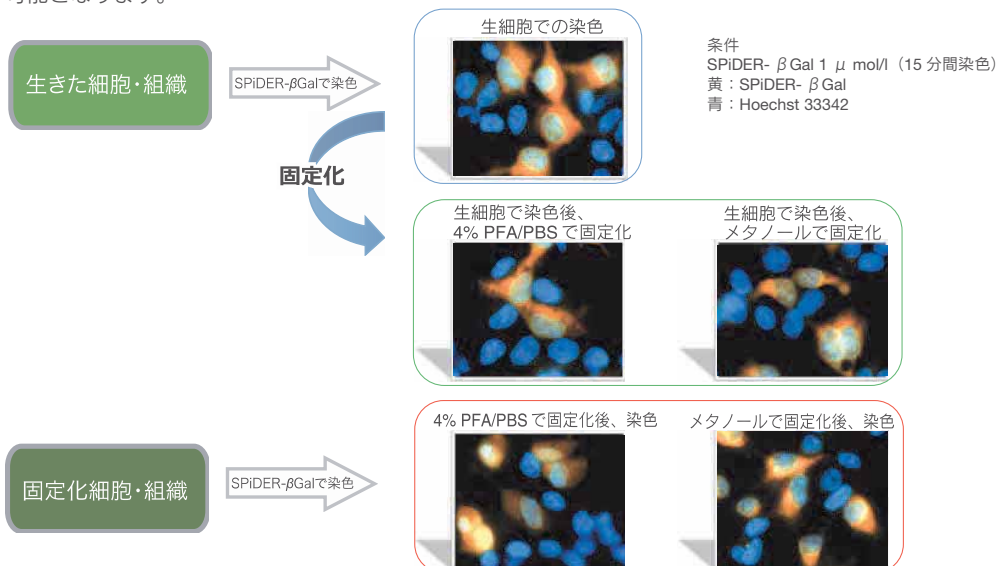
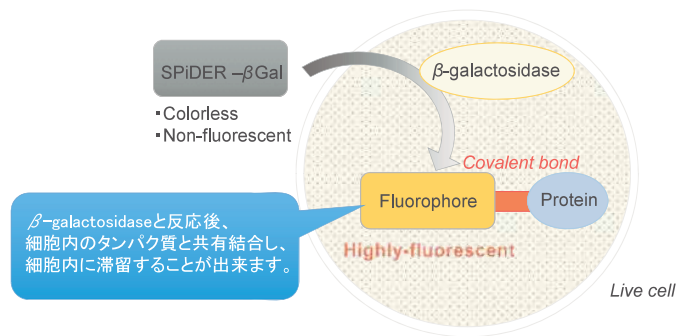


図1 各種条件下での SPiDER- β gal による β -galactosidase の検出 (HEK 細胞懸濁液と β -galactosidase 安定発現株 HEK/LacZ 細胞懸濁液を細胞数比 1:1 となるように播種したティッシュを使用)

[参考文献]

- 1) Y. Urano, M. Kamiya and T. Doura, WO 2015174460, A1, (19, November, 2015).

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
SPiDER- β Gal	20 μ g \times 3	42,000	SG02

本製品は東京大学の浦野泰照教授、神谷真子講師らにより開発された製品です。

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

マイトファジー検出蛍光プローブ

Mitophagy Detection Kit

<特長>

1. 低分子蛍光試薬を用いてマイトファジーを簡便に検出
2. 蛍光顕微鏡による生細胞イメージングにも適用
3. 付属のリソソーム染色試薬との共染色によりマイトファジーの確認が可能

ミトコンドリアはエネルギー産生の場として知られ、細胞内で重要な機能を持つオルガネラの一つです。近年では、アルツハイマー病やパーキンソン病の原因の一つに不良化したミトコンドリアの蓄積が報告され、mitophagy がその中で重要な役割をもった機構であることが明らかになってきています。mitophagy は酸化ストレスや DNA 損傷等により不良化したミトコンドリアを選択的に除去するシステムであり、オートファゴソームにより隔離され、リソソームと融合し消化されます。

小社では mitophagy を検出する蛍光性低分子 (Mtpagy Dye) を製品化したしました。Mtpagy Dye は細胞内のミトコンドリアに集積し、化学結合により固定化され、周りの環境により蛍光強度が低くなっています。一方、mitophagy が誘導されると、ミトコンドリアがリソソームと融合し、その結果 Mtpagy Dye の蛍光強度が増大します。本キットは mitophagy を検出する Mtpagy Dye とリソソームを染色する Lyso Dye で構成されております。

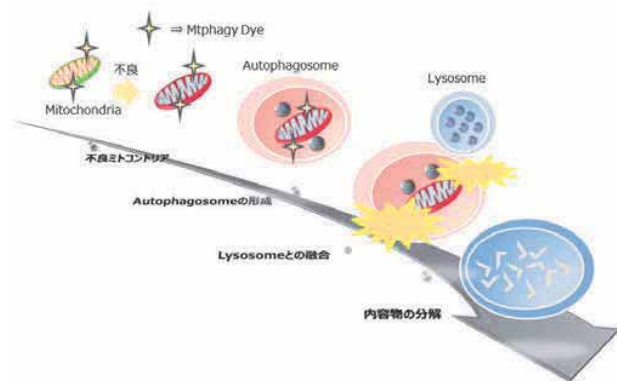


図1 Mtpagy Dye による mitophagy 検出機構

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Mitophagy Detection Kit	1 set	36,000	MD01

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

ミトコンドリア局在型一重項酸素検出蛍光プローブ

Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging

<特長>

1. 細胞内で一重項酸素の蛍光イメージングが可能
2. 一重項酸素に非常に高い選択性

一重項酸素は活性酸素種の一つで、非常に強い酸化力を持ち、皮膚のシミやシワの原因となることが知られております。最近ではレーザー光と光感受性物質により発生する一重項酸素を利用する光線力学的治療法も行われております。一重項酸素を検出する既存の蛍光試薬は、細胞膜を透過しないため細胞で使用できないという欠点がありましたが、真嶋らが開発した一重項酸素検出蛍光試薬 Si-DMA は細胞膜を容易に透過し、ミトコンドリアに集積され一重項酸素に選択的に応答します^{1),2)}。Si-DMA は一重項酸素と反応する前はほとんど蛍光を発生しませんが、一重項酸素と反応すると蛍光強度が増大します。そのため、これまでできなかった、細胞内の一重項酸素蛍光イメージングが可能です。

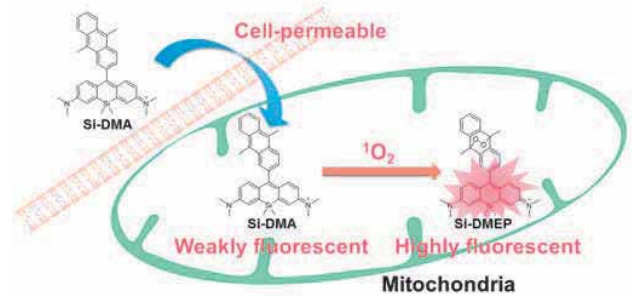


図1 Si-DMA の細胞染色原理

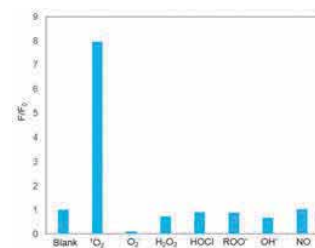


図2 Si-DMA の反応特異性

[参考文献]

- 1) T. Majima, S. Kim, T. Tachikawa and M. Fujitsuka, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136 (33), 11707-11715.
- 2) T. Majima, S. Kim, T. Tachikawa and M. Fujitsuka, WO 2015194606, A1, (23, December, 2015).

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging	2 µg	20,000	MT05

本製品は大阪大学の真嶋哲朗教授らにより開発された製品です。

新製品

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

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になるほか、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製品化いたしました。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

図 1 市販の硫化ナトリウムと新製品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

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
-SulfoBiotics- Sodium sulfide (Na ₂ S)	100 mg×5	9,000	SB01

-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⁻)の状態が存在します。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っています。-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, *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. VandenEkat, C. F. Toombs and C. Szabo, *Br. J. Pharmacology*, **2010**, *160*, 941.

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
-SulfoBiotics- Stable isotope Na ₂ S(34) solution	0.5 ml	21,500	SB05

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

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。
<http://www.dojindo.co.jp/contact/request.html>
 e-mail: info@dojindo.co.jp



26th フォーラム・イン・ドージン開催後記 えにし 「代謝システムと遺伝子発現制御～意外な縁～」

フォーラム・イン・ドージン（以下フォーラム）は前回 25 回目の四半世紀の節目を迎えた。26 回目となる今回のフォーラムは 11 月 13 日熊本市内で開催された。今回のテーマは、フォーラム第 2 四半世紀の幕開けにあたり、21 世紀の生命科学の流れを読んだ世話人の意向に沿ったものである。これまでそれぞれ独立に詳細に研究されてきた代謝システムと遺伝子発現が、意外な縁（えにし）を介して互いに連携しながら全体として個体を支えているということが、最近明らかになってきた。本フォーラムでは、このような観点で、先端的な研究成果をあげておられる先生方に講演を依頼させていただいた。



講演のトップバッターをつとめられた理化学研究所の吉田稔先生は、本フォーラムのメインテーマをわかりやすく概説されながら、ご自身のテーマのタンパク質（エピジェネティクス関連タンパク質）の翻訳後修飾（アセチル化・アシル化）と環境因子・内因性因子による制御について、これまでの膨大な成果とこれからの方向性について詳しく述べられた。群馬大学の北村忠弘先生による二番目の講演では、エネルギー代謝の制御をエネルギーホメオスタシスの観点から見据え、エネルギー（食物）摂取・消費の調節に関与する視床下部転写因子（エネルギーセンサー）を巡るシグナル伝達ネットワークによって全体が管理されていることを示された。ランチブレイクを挟んで、午後のセッションは東北大学の五十嵐和彦先生による講演で始まった。五十嵐先生は、含硫アミノ酸の代謝や様々なメチル基転移反応で中心的な役割を果たす S-アデノシルメチオニン（SAM）が、合成酵素の管理下で核内に存在してヒストンのメチル化修飾が引き金になってエピゲノム制御を司っていることを詳しく説明された。熊本大学の日野信次朗先生は、代謝システム中の様々な酸化還元過程に必須の補酵素フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）が、ヒストンの

リシン脱メチル化酵素の補酵素として、細胞のエピゲノム制御に積極的に関与することを明らかにされ、エピゲノム制御による代謝リプログラミング機構に言及された。東北大学の黒石智誠先生の講演では、糖・脂質代謝、TCA サイクルで二酸化炭素取り込み反応の補酵素ピオチンがヒストンの選択的翻訳後修飾に動員されることが明示され、エピジェネティクス制御の一端が示された。フォーラムの締めくくりに、東京都健康長寿医療センター研究所の遠藤玉夫先生は糖代謝と遺伝子発現の連携に言及され、糖代謝経路の産物が、遺伝子発現・エピジェネティクスに関わるタンパク質の糖修飾に活用されるというタンパク質の糖修飾異常による先天性疾患発症の機序について明らかにされた。

20 世紀の科学では、自然現象を細分化して無数のパラダイムが乱立し、それぞれが独自に進化・深化し、パラダイムシフトを繰り返して全体として目覚ましい発展を遂げた。一方で、先鋭化したパラダイムどうしを統合して全体を俯瞰するという統合主義的なアプローチも 21 世紀の生命科学の潮流の一つと考えられる。本フォーラムでは、代謝システムと遺伝子発現という二つの大きなパラダイムが意外な縁（えにし）を介して互いに連携し全体として統合されている（パラダイム・インテグレーション）ことが明らかにされた。

フォーラムの会場は、若い学生、現役研究者、一般参加者など幅広い層からの参加者で会場が狭く感じられるほどであった。フロアからも各層から活発な質問・議論・コメントが出され、全体として引き締まったフォーラムであった。講演終了後のミキサーでは、互いの交流を深め合い、和やかな中にも成功裏にフォーラムを終えることができた。（三浦冽）



要旨集の残部がございますので、ご希望の方は小社マーケティング部までお問い合わせください。

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