

【総説】

- 「CRISPR-Cas システムの多様性と応用技術の拡大」 石津 大嗣、塩見 美喜子…………… 2
 〈テクニカルレポート〉
 「Tamavidin[®]2-REV を用いたタンパク質間相互作用の網羅的解析」 上田 修司、吉野 健一、山田 聡一郎…………… 6
 「第 33 回 Wako ワークショップ見聞録 オートファジーの解析法と最新の話題」 守田 啓悟…………… 25

【連載】

- 〈神経変性疾患研究の最前線〉
 「第 4 回 アルツハイマー病 (4) イメージング」 樋口 真人…………… 8
 〈なるほど!! ELISA -基礎とコツ-〉 **最終回**
 「第 4 回 ELISA の操作とそのポイント (後編)」 株式会社シバヤギ編…………… 12
 〈核酸医薬合成 基礎講座〉 **新連載**
 「第 1 回 オリゴヌクレオチド合成」 佐藤 健太郎…………… 14
 〈The Gateway to qNMR ~定量 NMR への扉~〉
 「第 3 話 測定例のご紹介」 三浦 亨…………… 16

【化学大家】

- 「櫻田 一郎」 梶 慶輔…………… 28

【製品紹介】

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 有機合成 | 細胞生物 |
| アルキルホスフィン溶液 …………… 24 | テストステロン, 精製品, 低ヒドロキシ体 …………… 19 |
| ARP 白金 …………… 24 | グルカゴン ELISA キットワコー (サンドイッチ法) …………… 32 |
| 分析 | 遺伝子 |
| 定量 NMR 用内標準物質 …………… 18 | ScreenFect TM A …………… 4 |
| 農薬混合標準液 PL-LM II …………… 22 | ScreenFect TM A plus…………… 5 |
| 高気密保存びん …………… 22 | MagCapture TM タマビジン [®] 2-REV …………… 7 |
| 培養 | PS Capture TM エクソソームフローサイトメトリーキット…………… 20 |
| 脳組織凍結保存溶液…………… 21 | 製造専用原料 |
| 免疫 | 医薬品製造用原料 CertiPro シリーズ …………… 23 |
| 抗 Tau, モノクローナル抗体 …………… 19 | |
| 抗 CD63, モノクローナル抗体 (3-13) …………… 20 | |

〈ScreenFectTM 通信〉

- 「HeLa 細胞への plasmid DNA 導入データ」…………… 5

はじめに

細菌と古細菌が持つウイルス感染に対する獲得免疫機構である CRISPR システムは、2012 年に Jennifer A. Doudna と Emmanuelle M. Charpentier の研究チームによってゲノム編集法としての応用が提唱されて以降、CRISPR-Cas9 システムとして、今や生命科学研究に欠かせないゲノム編集ツールとなった¹⁾。過去に開発されたゲノム編集ツールに比べてはるかに使いやすい CRISPR-Cas9 システムは、ヒトやマウスをはじめとしたモデル生物のみならず、様々な野生生物種への適用例も次々と報告されている。さらには、遺伝性疾患の治療法としての可能性も拡大している。本稿では、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集法の詳細について、最近、著者らが報告したショウジョウバエ由来の培養細胞株に適用した例をもとに解説する²⁾。また、近年、ゲノム解析された細菌と古細菌の数が大幅に増えたことから、驚くほど多様な CRISPR 免疫機構の存在が明らかとなり、Cas9 とは異なる機能を持つその他のタイプの Cas タンパク質を利用した新たな手法の開発も進んでいる³⁾。多様な Cas タンパク質を利用した技術開発の進展について、最新の知見を紹介したい。

CRISPR システムの分類

CRISPR は Clustered regularly interspaced short palindromic repeat の略で、1987 年に石野良純博士（現・九州大学教授）らによって、大腸菌の DNA から初めて発見された⁴⁾。CRISPR は冒頭で述べた通り、細菌と古細菌の外來性遺伝子に対する獲得免疫機構を担っている。CRISPR に隣接する CRISPR 関連 (Cas : CRISPR-associated) 遺伝子群にコードされた Cas タンパク質群がエフェクターとして機能することで、細菌に侵入したウイルスなどの外來

DNA を分解し、自身の CRISPR 領域にスパーサー配列として取り込む。こうして取り込まれた DNA 断片は、過去に感染したウイルスの記憶となり、この領域から転写された RNA が、将来同じウイルスに感染したとき免疫応答を動作させるためのガイドとして利用される (図 1A)。

CRISPR に過去の感染情報を溜め込み、Cas タンパク質群で感染を阻害するといった基本原理は共通するものの、細菌と外來性遺伝子との軍拡競争は進化の過程で驚くほど多様な CRISPR システムを生み出している。現在のところ CRISPR システムは 2 つのクラスに大別され、それらが六種類の型 (クラス 1 は I 型、III 型、IV 型、クラス 2 は II 型、V 型、VI 型) に分類されている⁵⁾。CRISPR-Cas システムを有する細菌及び古細菌のうち、クラス 1 が最も多く約 90% を占めている。クラス 1 では、エフェクターとして複数の Cas タンパク質が複合体を形成して DNA 切断に作用するという特徴がある。現在、ゲノム編集ツールとして主に用いられ

ている化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) に由来する Cas9 は、割合としては少数派のクラス 2 の II 型に属する Cas タンパク質であるが、クラス 1 とは対照的に一つの Cas タンパク質で標的 DNA 切断に作用するという簡便性からゲノム編集ツールとして採用された。Cas9 は、CRISPR RNA (crRNA) 及び *trans*-acting CRISPR RNA (tracrRNA) と複合体を形成し、crRNA と相補的な配列を持つ 2 本鎖 DNA を正確に切断する (図 1B)。crRNA と tracrRNA は、末端が連結したキメラ RNA でも機能することが分かっており、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集法では使い勝手を向上させるためにこれらをつなぎ合わせた single-guide RNA (sgRNA) が使用されている。DNA の切断には、標的配列近傍にプロトスパーサー隣接モチーフ (PAM : protospacer adjacent motif) と呼ばれる Cas9 タンパク質によって認識される特定の塩基配列を必要とする。PAM 配列は、由来する細菌の Cas9 タンパク質によって異なり、*S. pyogenes* の Cas9 の場合、5'-NGG (N

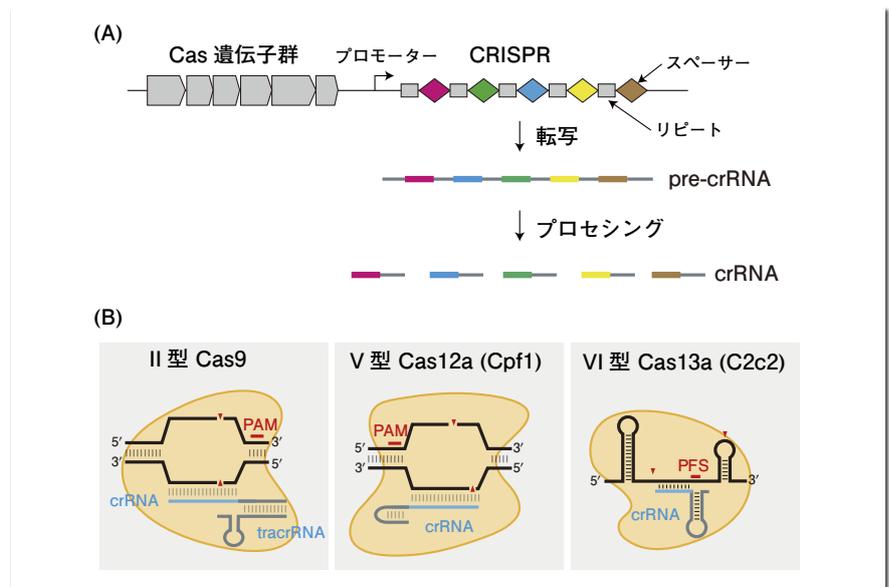


図 1. CRISPR の作用メカニズム

(A) 外來 DNA は切断されスパーサー配列として CRISPR 領域に取り込まれている。CRISPR 領域は 1 本の pre-crRNA として転写され、Cas タンパク質によるプロセッシングを受けて成熟型の crRNA が生成される。
 (B) II 型 Cas9 タンパク質と V 型 Cas12a (Cpf1) タンパク質は、ガイド RNA に相補的な 2 本鎖 DNA を切断する。VI 型 Cas13a (C2c2) タンパク質は、プロトスパーサー隣接部位 (PFS: protospacer flanking site) の下流でガイド RNA に相補的な 1 本鎖 RNA を切断する。

は任意の塩基)を認識する。

CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集

筆者らは、最近、CRISPR-Cas9 システムを用いたショウジョウバエ卵巣由来培養細胞株 (OSC : ovarian somatic cell) のゲノム改変法について報告した。動物の生殖細胞では、レトロトランスポソンの転移により自身のゲノムに有害変異が蓄積することを防ぐ機構として、piwi-interacting RNA (piRNA) 経路と呼ばれる機構が働いている⁶⁾。その原理は、CRISPR-Cas9 システムと類似しており、piRNA と呼ばれる小分子 RNA がエフェクターとなる PIWI タンパク質と複合体を形成し、相補的な配列を持つレトロトランスポソンを認識するためのガイド分子として働くことで発現を抑制する。OSC は、piRNA 経路によるレトロトランスポソン抑制機構が保存された培養細胞株であり、この機構の生化学的解析に適した実験ツールとしてよく用いられている。

培養細胞株のゲノム改変は生物種や細胞種を問わず、① Cas9 及び sgRNA を発現するベクターの作製、② 培養細胞への遺伝子導入、③ ゲノム改変されたクローンの単離、の3つのステップで実施される (図 2A)。PAM 配列により制限される sgRNA の標的配列は、検索ツールを使用して決定するのが一般的である。ショウジョウバエを対象とする場合は、flyCRISPR Target Finder を用いることでオフターゲットを考慮した標的候補配列の検索が可能である⁷⁾。トランスフェクションにより発現した Cas9-sgRNA 複合体によって切断されたゲノムは、非同源性末端結合 (NHEJ : non-homologous end joining) により修復される際に塩基の挿入や欠損 (Indel) が起こることで、フレームシフトによる遺伝子ノックアウト変異を生じる。また、もう一つの修復機構である相同組換え修復 (HDR :

homology-directed repair) を利用することで、特定の配列のノックインが可能となる。OSC のゲノム改変では、piRNA 経路に関連するタンパク質の機能解析をするために、内在遺伝子に FLAG タグを付加した細胞株を作製した。相同組換えによるエピトープタグ挿入などのノックイン細胞株を作製する場合は、Cas9 による切断部位を中心として両側にそれぞれ 500 ~ 800 bp の相同配列を付加したドナー配列を同時に導入する (図 2B)。修復後に再び Cas9 による切断が起こらないように、ドナーの PAM 配列を除去するか同義置換しておく必要がある。*S. pyogenes* 由来 Cas9 は 5'-NGG を PAM 配列として認識するが、5'-NAG もわずかに認識されるので、これらの配列を避けて変異を入れなければならない。

遺伝子導入方法

遺伝子導入は、目的とする細胞株によって最適な方法、試薬を選択する。OSC では、和光純薬が開発した ScreenFect™ A [コード No. 299-73203] を用いることで、高効率の遺伝子導入が可能である。目的とする変異細胞を単離

するために、Blasticidin 耐性遺伝子を Cas9 プラスミドに組み込み、Blasticidin 処理により耐性細胞のみを選別した。また、ドナー配列に GFP などの蛍光タンパク質を組み込むことでノックインの成否を可視化し、場合によってはセルソーターでの分取も可能となる。その後、希釈培養により形成されたコロニーを回収し、エピトープタグの挿入をゲノム PCR やウェスタンブロットティングなどで検証する。より詳細な実験手法に関しては文献 2 を参照されたい。培養細胞株を用いてゲノム改変細胞株を作製する場合、生物種や細胞種によらず同様の手順を進めることになる。目的の細胞に合わせた遺伝子導入法及びクローン単離法を採用することが成功の鍵である。

改変型 Cas9 の利用

改変型 Cas9 を利用したゲノム編集法の開発も進んでいる。例えば、Cas9 ニッカーゼは標的部位において 2 本鎖切断ではなく単一鎖切断でニックを生じさせる変異型 Cas9 である⁸⁾。切断標的部位を挟んで別々のストランドに相補的になるように設計された 2 種類の sgRNA が同時に機能することで 2 本鎖切断を生じさ

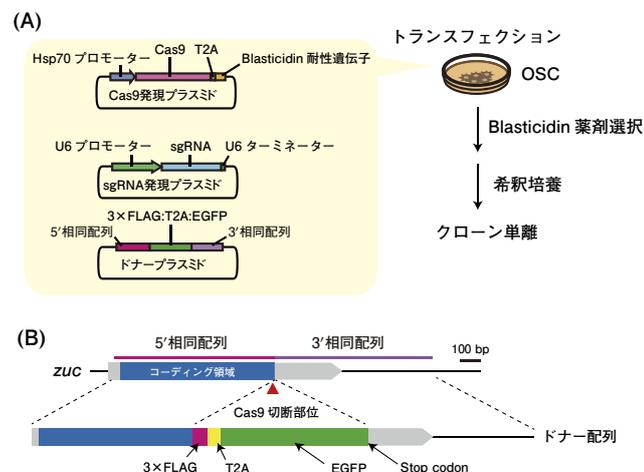


図 2. CRISPR-Cas9 システムによる OSC のゲノム改変

(A) Cas9 発現プラスミド、sgRNA 発現プラスミド、ドナープラスミドを同時にトランスフェクションすることで、相同組換えによる変異細胞株を作製した。
(B) piRNA 生合成に必須の因子である Zucchini (Zuc) の C 末端に 3 × FLAG タグを付加するための、ドナー配列を設計した。自己切断活性を持つ T2A ペプチドを挟んで EGFP を付加することで、ノックイン細胞の可視化が期待できる。

せる。2種類のsgRNAが機能してはじめて2本鎖切断が起こることから、オフターゲット効果の低減が可能となることが示されている。また、DNA切断活性を不活性化したdead Cas9 (dCas9)は、転写活性化やヒストン修飾などに機能する様々なエフェクタータンパク質と融合させることで標的部位でのエピジェネティックな遺伝子発現制御に利用されている⁹⁾。dCas9を利用した発現制御はエピゲノム編集法として幅広い応用が期待されている。

その他の Cas タンパク質

近年、V型のCasタンパク質であるCas12a (Cpf1とも呼ばれる)が、Cas9と同様に標的2本鎖DNAを切断する活性を持ち、ゲノム編集ツールとして利用できることが示された¹⁰⁾。Cas12aとCas9には作用メカニズムにいくつかの違いがあるが、ゲノム編集ツールとして使用する上での重要な違いは、Cas12aは標的2本鎖DNAを切断するだけでなくpre-crRNAプロセッシングも担っているという点にある。Cas12aが持つこの多機能性は、複数の標的配列を連結したpre-crRNAアレイを導入することで一度に複数のガイドRNAを生成し、複数箇所のゲノム改変を同時に行えるという利点をもたらす。複数のガイドRNAプラスミドを調製し同時導入する必要があるCas9と比べて、Cas12aはよりシンプルな方法で複数箇所の同時改変を可能とする。

Casタンパク質には、DNAではなくRNAを認識するものがある。Feng

Zhangのグループは、VI型のCas13a (C2c2とも呼ばれる)がガイドRNAに相補的な1本鎖RNAを認識し切断することを明らかにした¹¹⁾。この結果は、従来のRNA干渉法と同様の遺伝子ノックダウン法への応用を着想させるが、この応用にとっては少し厄介なことに、標的RNAと結合したCas13aは標的RNAだけでなく周囲にあるRNAもランダムに分解する活性(コラテラル効果)を持つことがわかった。遺伝子ノックダウンには不向きと考えられたが、標的RNA存在化で非特異的なRNA切断が誘導される性質は、病原体やウイルスの感染診断などその他の目的に応用可能であることが示されている^{12,13)}。また、Zhangらのグループは複数のCas13aオルソログの中から、*Leptotrichia wadi*のCas13a(LwaCas13a)を用いることで、従来のRNA干渉法と同様の遺伝子ノックダウンが可能であることも示している¹⁴⁾。LwaCas13aによるノックダウンでは、コラテラル効果によって懸念される非特異的な遺伝子の発現量への影響は見られず、従来のRNA干渉法に比べてもオフターゲット効果が低減されていることが示された。今後、従来のRNA干渉法を基盤とした方法を補完する疾患治療法としての応用も期待される。

おわりに

CRISPR-Cas9システムはゲノム編集法としていまや不動の地位を確立したが、CRISPRシステムに関する基礎研究はいまだに多くの発見をもたらす、新たな技術開発への広がりを見せている。



OSC

卵巣が腫瘍化するショウジョウバエの*bag-of-marbles (bam)*変異体から樹立された、卵巣濾胞細胞由来の培養細胞株

RNA干渉

small interfering RNA (siRNA)と呼ばれる21-23塩基長の短いRNAによって相補的な配列を持つmRNAが分解され発現が抑制される現象

特に遺伝子疾患治療に関しては、倫理的な議論が伴う永続的なゲノム改変よりも、RNAをターゲットとした治療法の開発が先行していくのではないかと予想される。実際、RNAをターゲットとしたCRISPRシステムの疾患治療への応用は始まっている¹⁵⁾。今後も、多様なCRISPR-Casシステムを利用したさらなる技術の発展が期待される。

【参考文献】

- 1) Jinek, M. et al. : *Science*, **337**, 816 (2012).
- 2) Ishizu, H. et al. : *Methods*, **126**, 186 (2017).
- 3) Shmakov, S. et al. : *Nat. Rev. Microbiol.*, **15**, 169 (2017).
- 4) Ishino, Y. et al. : *J. Bacteriol.*, **169**, 5429 (1987).
- 5) Makarova, K. S. et al. : *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 722 (2015).
- 6) Siomi, M. C. et al. : *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 246 (2011).
- 7) Gratz, S. J. et al. : *Genetics*, **196**, 961 (2014).
- 8) Ran, F. A. et al. : *Cell*, **154**, 1380 (2013).
- 9) Gilbert, L. A. et al. : *Cell*, **154**, 442 (2013).
- 10) Zetsche, B. et al. : *Nat. Biotech.*, **35**, 31 (2017).
- 11) Abudayyeh, O. O. et al. : *Science*, **353**, 6299, aaf5573 (2016).
- 12) East-Seletsky, A. et al. : *Nature*, **538**, 270 (2016).
- 13) Gootenberg, J. S. et al. : *Science*, **356**, 438 (2017).
- 14) Abudayyeh, O. O. et al. : *Nature*, **550**, 280 (2017).
- 15) Batra, R. et al. : *Cell*, **170**, 899 (2017).

Products

ScreenFect™ A

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
293-73201	ScreenFect™ A	遺伝子研究用	0.2mL	8,000
299-73203			1mL	30,000
297-73204			1mL × 5	120,000

～無料サンプルあります！～

Wako

<http://screenfect.jp> または下記QRコードより専用ホームページへアクセスいただき、サンプル申し込みフォームよりご依頼下さい。現在、サンプル使用後アンケートにお答え下さった方を対象にレーザーポイントをお送りしております。



QRコードは(株)デンソーウェーブの登録商標です。

2～10℃保存 20℃保存 80℃保存 150℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2018年1月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (<http://www.siyaku.com/>) をご参照下さい。



HeLa細胞へのplasmid DNA導入データ

ScreenFect™ A plus を用いた HeLa 細胞への plasmid DNA 導入実績及びリバーストランスフェクションプロトコールをご紹介します。ScreenFect™ A plus のクイックプロトコールは、当社データベースからダウンロード頂けます。(http://db.screenfect.jp/ja/documents/list/protocol)

■ HeLa細胞へのリバーストランスフェクションプロトコール例 (24ウェル)

〈細胞の前培養〉

1. 適当な培養容器 (T-75 フラスコなど) を用いて、HeLa 細胞をセミコンフルエントになるまで培養する。

〈トランスフェクション試薬の調製〉

1. 滅菌処理した 1.5mL 容チューブを 2 本用意する。
2. 1 で用意した 1 本のチューブに ScreenFect™ Dilution Buffer を 22 μ L 添加する。
3. 2 に 3 μ L の ScreenFect™ A plus Reagent を添加して全量で 25 μ L にする。・・・溶液 (A)
- (ScreenFect™ A plus Reagent は使用前にボルテックスして下さい。)
4. 1 で用意したもう 1 本のチューブに ScreenFect™ Dilution Buffer を 24 μ L 添加する。
5. 4 に 1 μ L のプラスミド溶液を添加する。・・・溶液 (B)
- (プラスミド溶液の濃度は 1 μ g/ μ L とする。濃度が薄い場合、添加量が増えるので Dilution Buffer の量を調節して下さい。)
6. 溶液 (A) のチューブに溶液 (B) 全量を添加する。
7. 混合したチューブをタッピングで良く混合し、卓上遠心機でスピンドウンする。
8. 室温で 5 分～ 20 分インキュベーションする。

〈細胞懸濁液の調製〉

1. 〈細胞の前培養〉で用意したフラスコをインキュベーターから取り出す。
2. 培地を捨て、PBS で 1 回洗浄する。
3. トリプシン溶液を 2 mL 添加し、室温または、37°C の CO₂ インキュベーターでインキュベーションし、細胞を培養容器から剥離させる。
4. FBS 添加培地を約 5 mL 添加し反応を止める。
5. ピペッティングでよく細胞を分散させ、遠沈管に全量移す。
6. 150 \times g, 5 分間遠心する。
7. ベレットを捨てないように上清を除く。
8. 新しい培地を 5～10 mL 添加し、ピペッティングで細胞を分散する。
9. 血球計算盤などの細胞カウンターを用いて細胞数を測定する。
10. 測定した結果から計算して、 2.0×10^5 cells/mL の細胞懸濁液を調製する (調製する細胞懸濁液量は実験スケールに応じて適宜調節する)。

〈トランスフェクション〉

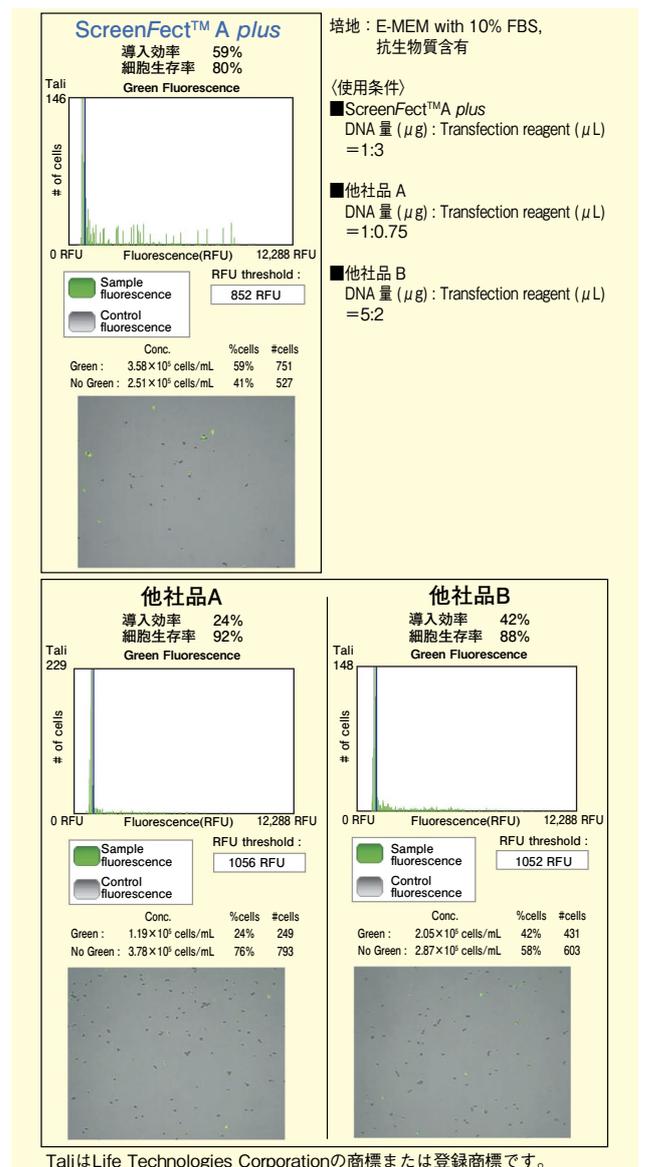
1. 〈細胞懸濁液の調製〉で調液した細胞懸濁液 500 μ L をウェルへ添加する。
2. 〈トランスフェクション試薬の調製〉の 8 でインキュベーションしておいた DNA-lipid complex 50 μ L をウェルに添加し、プレートを軽く揺すって混合させる (ウェルに予め DNA-lipid complex 50 μ L を添加しておき、そこに細胞懸濁液を 500 μ L 添加しても構わない)。
3. CO₂ インキュベーターで 24～48 時間培養し、実験に供する。

■ 実験データ

HeLa細胞へリバーストランスフェクション法でGFP融合遺伝子

子の導入を行い、蛍光顕微鏡にて導入遺伝子の発現効率を比較しました。その結果、ScreenFect™ A plus が最も高いGFP陽性細胞率を示しました。

〈HeLa細胞における性能比較〉(リバーストランスフェクション(1-STEP))



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
293-77101	ScreenFect™ A plus	遺伝子研究用	0.2mL	9,000
299-77103			1mL	35,000
297-77104			1mL \times 5	140,000

上記以外の ScreenFect™ シリーズの詳細情報は専用 HP (http://screenfect.jp/ja/) をご覧下さい。

さまざまな細胞に対するトランスフェクションプロトコール例をご紹介します。

掲載をご希望される細胞がございましたら、こちらのメールアドレスまでご連絡下さい。→ jiho@wako-chem.co.jp

☑️...2～10°C保存 Ⓕ...20°C保存 ☑️...80°C保存 ☑️...150°C保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。
掲載内容は、2018年1月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

Tamavidin[®] 2-REV を用いたタンパク質間相互作用の網羅的解析 Comprehensive analysis of protein-protein interaction using Tamavidin[®] 2-REV

神戸大学大学院農学研究科 上田 修司 神戸大学バイオシグナル総合研究センター 吉野 健一
カリフォルニア大学デイビス校 山田 聡一郎

1. 研究背景

細胞内シグナル伝達の研究は、疾患発症、臓器再生、創薬研究など幅広い分野と関係し、近年、著しい成果を上げている。細胞内のタンパク質間の相互作用は、特異的な抗体を用いた共免疫沈降法、クロスリンカーを用いた架橋反応法などによって研究されている。しかし、従来の実験方法では、相互作用の弱い複合体や微量な結合タンパク質の同定が困難であり、研究に多大な労力と時間を要することが問題となっている。近年、生命現象を解明する糸口として、生体内のタンパク質間の相互作用を包括的に同定・定量するインタラクトーム解析が一つの潮流になっている。現在、タンパク質の相互作用の検出を容易にする方法として、BioID 法、チラミド化合物法、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ法などの酵素標識技術が実用化されている。本稿では、一般的な研究室設備であっても、比較的簡単に導入できる BioID 技術について紹介する。

2. BioID法の原理と特徴

BioID 法は、proximity-dependent biotin identification の略で、近接依存的なタンパク質のビオチン酵素標識法と和訳される。BioID 法のビオチン転化酵素は、大腸菌由来のビオチンリガーゼ (BirA) の基質特異性を欠失させた BirA (R118G) 変異体を用いる^{1,2)}。BirA 変異体は、高濃度なビオチン-5'-AMP (bioAMP) を要するため、ビオチン酵素標識の開始を bioAMP の添加タイミングによって調整でき、従来のビオチン酵素標識法のような特別なビオチン化配列を必要とせず、BirA を中心とした半径 10 nm 程度の近接したタンパク質のリジン残基を非選択的にビオチン標識する特徴を有する (図 1)²⁾。また、ビオチン化タンパク質は、アビジン-ビオチン間のアフィニティー結合 ($K_d=10^{-15}$ M) を利用した様々な方法と組み合わせる

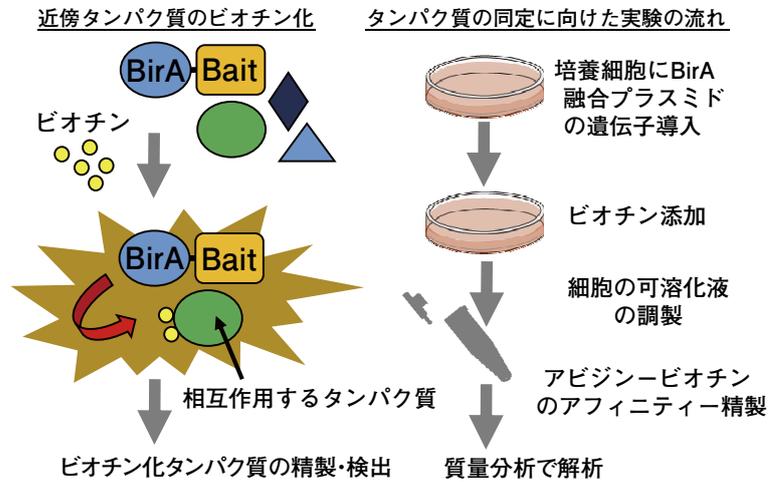


図 1. BirA 酵素標識を用いた BioID 法の原理

BioID 法は、ビオチン転化酵素である BirA 変異体を融合させたタンパク質を培養細胞に発現させ、近傍のタンパク質をビオチン化する酵素標識法である。本法は、模式図で示すように、解析対象タンパク質 (Bait) を BirA 融合タンパク質として細胞に発現させることで、細胞内に蓄積したビオチン化タンパク質をアビジン-ビオチンのアフィニティー結合によって回収することができる。

ことができ、汎用性が高い。ただし、BioID 法は、BirA 変異体の融合位置によってビオチン化タンパク質に違いが生じる点³⁾、内在性のビオチン化タンパク質が疑陽性として検出される点などに注意が必要である。BioID 法の詳細なプロトコールは、BirA 変異体の総説を参照下さい⁴⁾。

3. 実例報告

BioID 法は、核膜²⁾、細胞-細胞間接着³⁾、中心小体⁵⁾ など細胞小器官のタンパク質複合体の解析に応用されてきた。我々は、BirA- α -カテニンの安定発現細胞を作製し、反復伸展収縮刺激による細胞間接着分子を介した機械的シグナルの分子機構の検討を行った。ビオチン化タンパク質を蛍光標識ストレプトアビジンで可視化した結果、機械刺激に依存した α -カテニンとミオシン IIA の相互作用を検出した⁶⁾。また、我々は、低分子量 G タンパク質である RhoA と相互作用するタンパク質の網羅的な解析を進めている (図 2)。タンパク質の同定には、アビジン様タンパク質である MagCaptureTM Tamavidin[®] 2-REV [コード No. : 136-

18341] を使用し、ビオチン化タンパク質を回収後、10 μ M ビオチン溶液で競合的に磁性ビーズから溶出させ、銀染色で得られた各バンドを切り出し、トリプシンによるゲル内消化後の試料をナノ高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析に供している。これまでの解析から RhoA の既知の結合タンパク質の検出に加え、RhoA と相互作用が報告されていない複数のタンパク質を同定している。

酵素標識法は、多くの研究者が開発にしのぎを削る黎明期にあり、分子量の小さな超好熱性真正細菌のビオチン転化酵素を用いた BioID 2 法⁷⁾、BirA 変異体を二つに分割した Split-BioID 法が新たに提案されている⁸⁾。今後もユニークな研究ツールが開発され、BioID 法が様々な研究分野に応用されることを期待する。

【参考文献】

- 1) Chapman-Smith, A. and Cronan, J. E., Jr. : *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 359 (1999).
- 2) Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M. and Burke, B. : *J. Cell Biol.*, **196**, 801 (2012).
- 3) Van, Itallie, C. M., Aponte, A., Tietgens, A. J., Gucek, M., Fredriksson, K. and Anderson, J.

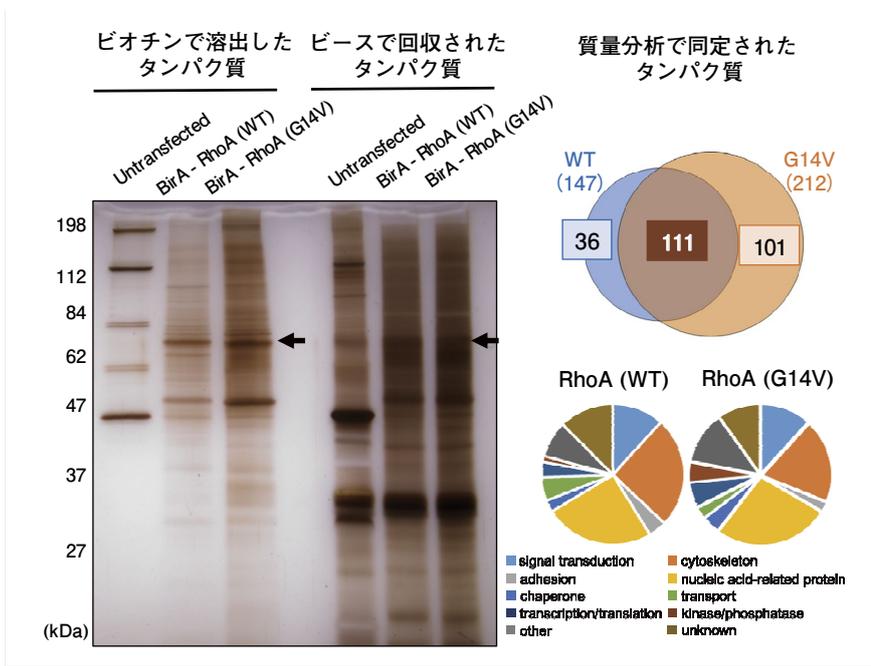


図2. Tamavidin[®] 2-REV Magnetic Beads によるビオチン化タンパク質の解析
 BirA 変異体を融合させた RhoA (WT) と常時活性型変異体 RhoA (G14V) を 293T 細胞に過剰発現させ、50 μ M ビオチン添加培地で 24 時間培養した。ビオチン化タンパク質は、Tamavidin[®] 2-REV Magnetic Beads で回収し (右レーン)、ビオチン溶液で溶出した (左レーン)。グラフは、質量分析で同定されたタンパク質の Venn グラフ (上) と、そのタンパク質の機能を示す分類グラフ (下)。

M. : *J. Biol. Chem.*, **288**, 13775 (2013).
 4) Kim, D. I. and Roux, K. J. : *Trends Cell Biol.*, **26**, 804 (2016).
 5) Gupta, G. D., Coyaud, E., Goncalves, J., Lin, Z. Y., Schueler, M., Hildebrandt, F., Mojarad, B. A., Liu, Y., Wu, Q., Gheiratmand, L., Comartin, D., Tkach, J. M., Cheung, S. W., Bashkurov, M., Hasegan, M., Knight, J. D., Lin, Z. Y., Schueler, M., Hildebrandt, F.,

機能的シグナル
 細胞の圧力や引力などの多様な力学的な環境変化を感知し、細胞骨格のシグナル伝達の分子機構の総称。細胞の増殖、分化、運動などの制御に関わり、癌の悪性転移に関与する。

低分子量 G タンパク質
 約 20 kDa の単量体の GTP 結合タンパク質であり、GTP 結合型と GDP 結合型の 2 つのタンパク質構造を行き来することで細胞内シグナル伝達の ON/OFF を調整する。RhoA は、アクチン細胞骨格の再構築に関わるシグナル伝達に関与する。

Moffat, J., Gingras, A. C., Raught, B. and Pelletier, L. : *Cell*, **163**, 1484 (2015).

6) Ueda, S., Blee, A. M., Macway, K. G., Renner, D. J. and Yamada, S. : *PLoS One*, **10**, e0122886 (2015).
 7) Kim, D. I., Jensen, S. C., Noble, K. A., Birendra, K. C., Roux, K. H., Motamedchaboki, K. and Roux, K. J. : *Mol. Biol. Cell*, **27**, 1188 (2016).
 8) Schopp, I. M., Amaya, Ramirez, C. C., Debeljak, J., Kreibich, E., Skribbe, M., Wild, K. and Bethune, J. : *Nat. Commun.*, **8**, 15690 (2017).

Products

Wako

アビジン-磁気ビーズの決定版

MagCapture[™] タマビジン[®] 2-REV

本品は、タマビジン[®] 2-REV を固相化した磁気ビーズです。タマビジン[®] 2-REV は新規アビジン様タンパク質「タマビジン[®] 2」のアミノ酸改変体で、ビオチンとの結合力を調整することにより、可逆的なビオチン結合複合体を形成することができます。そのため、過剰ビオチンの添加により、ビオチン化分子の競合溶出が可能です。

タンパク質、核酸などさまざまなビオチン化分子の回収・精製にご利用下さい。

〈ライセンスについて〉

Tamavidin[®] / タマビジン[®] は日本たばこ産業株式会社の登録商標です。当社では、日本たばこ産業株式会社からライセンスを受けて販売しています。

関連商品

固定化タマビジン-REV 量が多いタイプです。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
136-18341	MagCapture [™] Tamavidin [®] 2-REV [E]	遺伝子研究用	2mL	40,000

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
133-18611	MagCapture [™] HP Tamavidin [®] 2-REV [E]	遺伝子研究用	2mL	58,000

Ref...2 ~ 10°C 保存 [E]...-20°C 保存 [30]...-80°C 保存 [150]...-150°C 保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。
 掲載内容は、2018 年 1 月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

第4回 アルツハイマー病 (4) イメージング

量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 樋口 真人

はじめに

アルツハイマー病の神経病理学的な特徴は、タンパク凝集体が脳内に沈着することと、進行性の神経細胞死である。アルツハイマー病患者の脳内に沈着するタンパクとして、アミロイドβ (Aβ) とタウが挙げられる。Aβやタウの脳内沈着が引き金となって、炎症性グリアの活性化、神経伝達異常などの病的イベントが連鎖的に誘発され、神経細胞死に至る病態カスケードが考えられている (図1)¹⁾。これらのイベントを生体脳で可視化することにより、アルツハイマー病に特徴的な病態の進行パターンを明らかにし、診断や重症度評価に有用な指標を得ることができると考えられる。2000年代以前は、アルツハイマー病の診断を補助するイメージング技術は、主として脳萎縮や血管病変の有無を評価するためのCTやMRI、ならびに脳血流画像を得るための単一光子放射断層撮影

(SPECT) や、脳糖代謝画像を得るためにフルオロデオキシグルコースをトレーサーとしたポジトロン断層撮影 (PET) であった。これらの技術は現在でも診断に役立つ画像所見をもたらしているが、上記カスケードでは比較的下流の、神経伝達異常 (による脳活動異常) や神経細胞死を検出するため、超早期の病態を捉えることは困難である。アルツハイマー病の中核病変であるAβとタウの脳内沈着は、臨床的な発症よりも約20年早く出現すると考えられ、これらの変化を画像で捉えられれば、無症候の段階から病態診断が可能になる。また、Aβやタウの沈着度に基づいて、最適なタイミングでこれらの病変を標的とする治療を開始できれば、病態の進行を抑止する予防や治療が実現すると見込まれる。

Aβ病変のイメージング

Aβの細胞外沈着物である老人斑は、Aβ分子がβシートの2次構造を取りながら重合して線維化することで形成される。βシートに結合する低分子化合物としては、蛍光物質であるチオフラビンTが以前より知られていた。チオフラビンTは4級アミンを有し、極性が高いため血液脳関門をほとんど通過しないが、これを中性化して脳移行性を高めた誘導体がピッツバーグ大学により開発され、ピッツバーグ化合物B (Pittsburgh Compound-B; PiB) と名付けられた²⁾。PiBをPET用のラジオアイソトープである¹¹Cで標識したトレーサーが臨床PET研究

で用いられ、アルツハイマー病患者脳におけるAβ沈着を画像化できることが、2004年の論文で報告された²⁾。¹¹Cは放射能半減期が約20分と短いため、普及性に限界があるが、半減期が約110分と長い¹⁸Fで標識されたAβ病変トレーサーがPiBに次いで開発され、我が国でも現時点で2種類の化合物が、デリバリーPET薬剤として入手可能である。

AβのPETイメージングにより得られた主要所見は、以下の通りである^{3,4)}。
 (1) 正常高齢者でもPETでAβ病変が検出されることがあり、その確率は加齢に伴い増加する。
 (2) PETでAβ蓄積を認める正常高齢者や軽度認知障害患者は、蓄積を認めない場合よりも高率にそれぞれ軽度認知障害およびアルツハイマー病へと移行する。
 (3) PETプローブの結合量は軽度認知障害の段階で頭打ちとなるため、それ以降における病態進行の指標とはならない (図2)。
 (4) PETで検出されるAβ沈着部位と脳萎縮部位はあまり一致せず、Aβ蓄積が顕著な神経脱落を起こす可能性は低い。
 (5) アルツハイマー病以外にも、レビー小体型認知症患者の半数以上で、Aβ沈着がPETにより検出される。

上記(1)~(4)を鑑みて、正常高齢者、軽度認知障害患者、認知症患者におけるAβ病変PETの意義は、表1のようにまとめられる。画像所見が陰性の場合には確度の高いと言えるが、陽性の場合に言えることの確度はそれよりも低い。特に認知障害のない高齢者でAβ沈着が認められた場合、

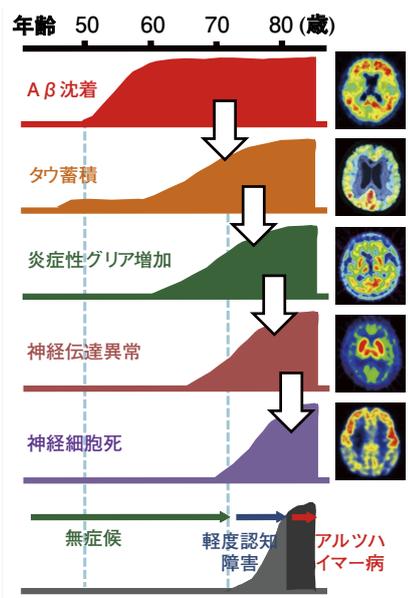


図1. アルツハイマー病の病態カスケードとイメージング技術

PET および MRI の技術を駆使することで、カスケードを構成する主要なイベントを、網羅的に生体脳で画像化できる。

表1. Aβ病変PET検査における陽性および陰性所見の意義

	陽性	陰性
認知症あり	アルツハイマー病、レビー小体型認知症の可能性大 (それ以外の認知症の可能性が低い)	アルツハイマー病ではない (それ以外の認知症である)
軽度認知障害	数年以内にアルツハイマー病へ進行する可能性が高い	数年以内にアルツハイマー病へ進行する可能性はほぼない
認知障害なし	5~10年以内にアルツハイマー病を発症する可能性が高い (要検証)	5~10年以内にアルツハイマー病を発症する可能性はほぼない

本シリーズの企画・構成に際し、東京大学大学院医学系研究科 岩坪威先生にご助言頂きました。

アルツハイマー病の超初期とってよいのかどうかは、今後の縦断的研究により明らかになると予想される。Aβ病変PETは、現在のところ我が国では医療保険の適応ではなく、適応を認めている他国でも、主として画像所見陰性を根拠とする除外診断が主目的である。Aβ病変PETが保険収載になるためには、今以上に有効性を証明することが求められ、そのためにはAβ沈着を標的とする抗Aβ療法が実用化することが要件となる。これまでのところ、Aβワクチンをはじめとする抗Aβ療法の治験は、医薬品承認に至った成功例がなく、認知機能低下がない段階や、軽度認知障害の早期の段階で、治療を開始する必要性が支持されている⁵⁾。このような被験者を同定する上でも、PETイメージングは有用性を発揮しうる。

Aβ沈着のイメージングは、臨床のみならず基礎の研究開発でも役立つ。脳内でAβ沈着をきたすアミロイド前駆体タンパクトランスジェニックマウスのPETイメージングにより、ヒトとモデルマウスのAβ病変の異同や、Aβ沈着と神経炎症および神経機能異常との関連性が解析されている(図3)⁶⁾。PiBの誘導體やそれ以外のβシート結合性化合物の中には、蛍光特性に優れたものが存在し、モデルマウスに全身投与することで、インビボ二光子レーザー蛍光顕微鏡により個々のAβ病変を画像化できる(図3)⁷⁾。こうした蛍光およびPETイメージングにより、生体脳でAβ重合体が病変を形成する速度を解析し、ワクチンなどの抗Aβ治療がこの速度をどこまで減少させるのかを検証することも可能である^{6,7)}。

タウ病変のイメージング

抗Aβ療法がアルツハイマー病の病態を抑止する効果を十分に発揮しないのであれば、むしろタウ沈着を標的

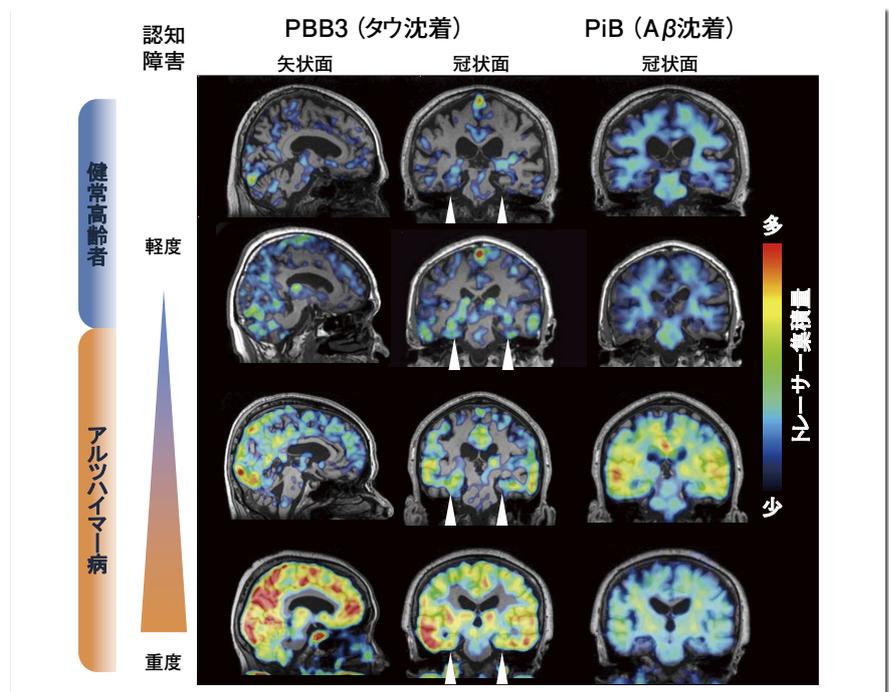


図2. 正常加齢からアルツハイマー病の発症および進行を捉えたPETイメージング
Aβ病変およびタウ病変を、それぞれPiBおよびPBB3で画像化している。海馬体付近(矢頭)では、一部の健康高齢者(上から2段目)において、Aβ沈着が無くともタウが沈着する。アルツハイマー病の発症後もタウ沈着部位は拡大を続けるが、Aβ沈着は発症時点ですでに頭打ちとなっている。

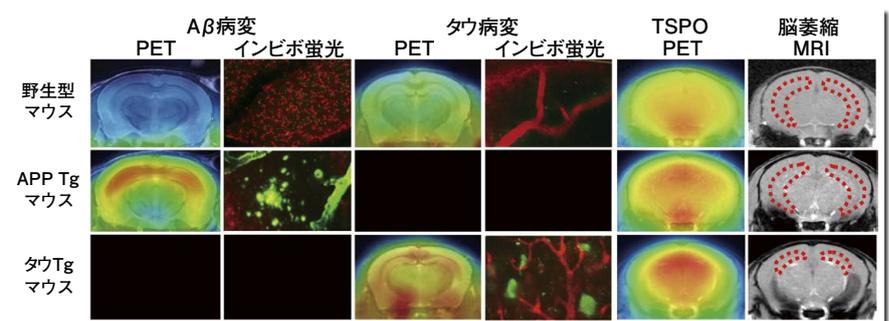


図3. モデルマウスにおけるAβ・タウ沈着、神経炎症、脳萎縮の生体イメージング
タウトランスジェニック(Tg)マウスでは、タウ沈着が観察され、これに伴って神経炎症マーカーであるTSPOの増加もPETで検出される。MRIでは海馬(点線領域)などの萎縮を認める。一方、アミロイド前駆体タンパク(APP)Tgマウスでは、Aβ沈着が観察されるが、海馬の萎縮は見出されず、攻撃的なTSPO陽性ミクログリアはほとんど存在しない。

とした治療を開発することが妥当であるという見解があり、このような考えに基づいて、タウワクチンやタウ凝集抑制剤をはじめとする抗タウ療法の開発も、製薬企業や研究機関により進められている⁵⁾。タウはアルツハイマー病のみならず、前頭側頭葉変性症など

の神経変性型認知症において、Aβ沈着を伴わずに封入体を形成し、神経変性と密接な結び付きを有する⁸⁾。タウ遺伝子の突然変異を原因とする家族性神経変性疾患でも、Aβ沈着なしでタウが沈着し、神経細胞死が起こることから、タウ沈着が神経変性ひいては神

経細胞死の原因となりうると考えられる⁸⁾。さらに上記変異を有するヒトタウ遺伝子を組み込んだタウトランスジェニックマウスでは、タウ沈着に加えて顕著な神経細胞死が起こり、タウの凝集が神経毒性をもたらすと考察できる⁹⁾。これに対して、前述のアミロイド前駆体トランスジェニックマウスでは顕著な神経細胞死は認められず、Aβ凝集体が強い神経毒性を発揮する可能性は低いと推測される(図3)。

抗タウ療法の開発においても、タウ病変を生体脳で可視化し、病変の量や広がりにもとづいて、最適な治療介入ポイントを同定し、治療効果を客観的に評価できることが求められる。このような要請から、タウ病変をインビボPETで検出するためのイメージング薬剤開発が進められた。タウもAβと同様に、βシート構造を取りながら自己凝集するが、Aβ凝集体よりもタウ凝集体のβシートへ強く結合する化合物が作製され、2010年代前半より臨床PETへの応用が始まった(表2)。代表的なタウ病変PETトレーサーとして、Avid社が開発を進めてきたAV-1451(別名T807、flortaucipir)¹⁰⁾、東北大学が開発してGeneral Electric社が臨床評価を進めたTHK-5351¹¹⁾、筆者ら放射線医学総合研究所のグループが開発したPBB3¹²⁾が挙げられる。タウ病変PETにより得られた主要知見は以下の通りである。(1) 認知機能が正常な高齢者の一部で、海馬体付近におけるタウの沈着がPETで認められる。この沈着はAβ沈着とは独立して起こる。(2) Aβ沈着が起こると、タウ沈着は海馬体から辺縁系全体、次いで大脳新皮質への拡大が加速される可能性がある。タウ沈着部位の拡大は、軽度認知障害ひいてはアルツハイマー病の進行とよく相関し、病態の重症化を表す客観的指標となりうる。(3) 軽度認知障害やアルツハイマー病の患者では、タウの沈着部位と脳萎縮部位がよく一致し、タウが沈着部位に

表2. 臨床応用されている主なタウ病変PETトレーサー

論文ならびに学会発表データに基づく。赤字は「次世代」トレーサー。タウ病変検出コントラストは、初期アルツハイマー病患者(もしくは前段階)における、大脳皮質の薬剤集積を、正常コントロールにおける値で割った比として表示している。MAOはモノアミンオキシダーゼの略。

PETトレーサー	開発元	アルツハイマー病 タウ検出コントラスト	非アルツハイマー型 タウ病変への結合	タウ以外への結合 MAO	結合 脈絡叢
[¹¹ C]PBB3	放射線医学 総合研究所	1.2 - 1.4	4リピートタウ病変 3リピートタウ病変	-	±
[¹⁸ F]AV-1451	Avid/Lilly	1.3 - 1.6	4リピートタウ病変 (低コントラスト)	MAO-A	+
[¹⁸ F]THK-5351	東北大学	1.4 - 1.8	4リピートタウ病変	MAO-B	-
[¹⁸ F]PI-2620	Piramal	2.0 - 2.5	4リピートタウ病変	-	-
[¹⁸ F]GTP1	Genentech	2.0 - 3.0		-	-
[¹⁸ F]RO6958948	Roche	2.0 - 2.5		-	-
[¹⁸ F]MK-6240	Merck	2.0 - 3.0		-	-
[¹⁸ F]PM-PBB3	放射線医学 総合研究所	2.0 - 2.5	4リピートタウ病変 3リピートタウ病変	-	+

おいて神経毒性を発揮することが示唆される。

以上は正常加齢からアルツハイマー病への病態進展におけるタウ病変PETの所見であるが、アルツハイマー病以外の認知症でタウ病変を検出できるかどうか、タウ病変PETの有用性を検討する際に重要なポイントとなる。脳内に存在するタウは6種のアイソフォームからなり、アルツハイマー病では全てのアイソフォームが沈着するのに対して、前頭側頭葉変性症の中でもピック病では繰り返し配列を3個含む3リピートアイソフォームのみが沈着し、進行性核上性麻痺や大脳皮質基底核変性症といった疾患では、繰り返し配列を4個含む4リピートアイソフォームのみが沈着する⁸⁾。このようなアイソフォーム構成の違いが凝集体の構造の違いを生み、化合物の反応性の差異ももたらさう。上記のタウ病変PETトレーサーのうち、AV-1451は3リピートもしくは4リピートアイソフォームのみで構成されるタウ病変への結合が弱いことが判明している¹³⁾。

PBB3はいずれのタイプのタウ病変にも比較的強く結合するが、生体内で代謝されやすいため、他のトレーサーに比べて病変検出のコントラストが高くない^{12,13)}。また、¹⁸Fでなく¹¹Cで標識されるため、診断薬としての汎用性に限界がある。THK-5351はタウのみならずモノアミンオキシダーゼBに結合し、この酵素がアストロサイトに含まれることから、トレーサー集積増加がタウ沈着を反映するのか、それともアストロサイトの増加を反映するのか判別できないという問題がある。

現在、タウ病変をPETで画像化する次世代トレーサーの開発が進められており、これらの化合物は、(1) 高いコントラストでタウ病変を検出する、(2) 脳実質内でモノアミンオキシダーゼなどのタウ以外の分子に結合しにくい、(3) ¹⁸Fで標識されている、といった特徴を有する。また、Piramal社が開発したPI-2620と、放射線医学総合研究所が開発したPM-PBB3は、アルツハイマー病以外のタウ病変にも結合する特性を有する(表2)。こうした

新しいトレーサーを用いながら、より高い精度で脳内タウ沈着を評価し、抗タウ療法治験の適応となる被験者の選択や、タウ病態進行に対する抑制効果の判定に役立てられると期待される。

タウ病変トレーサーのうち、PBB3やPM-PBB3は、モデルマウスのタウ病変にも結合することから、これらを用いてPETで経時的にタウ病態を解析し、神経炎症や脳萎縮との関連性を調べることが可能である(図3)^{12,14)}。また、これらの化合物は蛍光を有することから、インビボ二光子レーザー蛍光顕微鏡で個々のタウ病変の形成を追跡する目的にも利用できる(図3)¹²⁾。このようなモデル動物イメージング評価系が、抗タウ療法の非臨床開発において有用性を発揮すると考えられる。

その他の病態イメージングと今後の展開

図1に示した病態カスケードのうち、最上流に位置するAβやタウの沈着に関しては、これまで述べたようにPETやインビボ蛍光イメージングで可視化が実現している。病的タンパクの沈着と神経伝達異常をつなぐイベントとしては、炎症性グリアの活性化が重要視されるが、炎症性グリアが病態進行のどの時点から出現し、病態を加速して神経細胞を攻撃するのか、そ

れとも病態を抑止し神経細胞を保護するのかに関しては、不明な点が多い。攻撃的な表現型を呈するミクログリアでは、トランスロケータータンパク(TSPO)という分子が増加することが知られており¹⁵⁾、TSPOに結合する低分子化合物をトレーサーとして用いることで、PETイメージングも実現している^{15,16)}。TSPOの増加がAβやタウの沈着、ならびに脳萎縮とどのような関係を有するかを、イメージングにより検討することで、炎症性グリアが病態で果たす役割を解明できる。また、ワクチンのような病態修飾薬でTSPOがどのように変化し、いかなる治療効果が得られたかを解析できれば、炎症性グリアの表現型をどのように変化させることが、治療の有効性向上に結びつくかを明らかにすることが可能である。

臨床PETイメージングのみならず、認知症病態モデルマウスで、PETを用いたTSPOの画像化も実現できており(図3)^{15,17)}、Aβとタウの沈着が、それぞれどのような表現型のグリア細胞を増加させるのかも明らかにされている。TSPO陽性の攻撃的ミクログリアも、神経細胞死に伴う脳萎縮も、アミロイド前駆体トランスジェニックマウスでは認められず、タウトランスジェニックマウスでのみ見出されることから(図3)、TSPO陽性ミクログ

リアが、タウ蓄積と神経細胞死をつなぐ役割を有することが示唆される^{15,17)}。Aβ沈着、タウ沈着、TSPO陽性ミクログリアの増加、神経細胞死(脳萎縮)の関連性を、共通のイメージング技術によりヒトとモデルマウスで比較し、モデルマウスにおける所見をヒトへ外挿可能か検討するとともに、ヒトとの相同性に基づいて病態モデルの妥当性を評価できると見込まれる。

【参考文献】

- 1) Higuchi, M. et al. : *Biochim Biophys. Acta*, **1802**, 373 (2010).
- 2) Klunk, W. E. et al. : *Ann. Neurol.*, **55**, 306 (2004).
- 3) Villemagne, V. L. et al. : *Lancet Neurol.*, **12**, 357 (2013).
- 4) Weiner, M. W. et al. : *Alzheimers Dement.*, **11**, e1-120, (2015).
- 5) Giacobini, E. and Gold, G. : *Nat. Rev. Neurol.*, **9**, 677 (2013).
- 6) Maeda, J. et al. : *J. Neurosci.*, **27**, 10957 (2007).
- 7) Bacskai, B. J. et al. : *Nat. Med.*, **7**, 369 (2001).
- 8) Higuchi, M. et al. : *Neuromolecular Med.*, **2**, 131 (2002).
- 9) Yoshiyama, Y. et al. : *Neuron*, **53**, 337 (2007).
- 10) Johnson, K. A. et al. : *Ann. Neurol.*, **79**, 110 (2016).
- 11) Harada, R. et al. : *J. Nucl. Med.*, **57**, 208 (2016).
- 12) Maruyama, M. et al. : *Neuron*, **79**, 1094 (2013).
- 13) Ono, M. et al. : *Brain*, **140**, 764 (2017).
- 14) Ishikawa, A. et al. : *J. Alzheimer's Dis., in press*
- 15) Ji, B. et al. : *J. Neurosci.*, **28**, 12255 (2008).
- 16) Kreisl, W. C. et al. : *Brain*, **136**, 2228 (2013).
- 17) Maeda, J. et al. : *J. Neurosci.*, **31**, 4720 (2011).

今回は、「パーキンソン病(1)概論」の予定です。

アルツハイマー病、認知症研究試薬

Wako

当社では、Aβやタウ関連試薬を取扱っており、19ページにてタウ抗体をご紹介します。また、当社HPで染色画像などのデータを掲載していますので、ご覧下さい。

抗体

Aβ

製品情報 : http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/Amyloid_b/index.htm

タウ

製品情報 : http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/tau_series/index.htm

ELISAキット

製品情報 : <http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/info/life/article/betaamyloidELISAKit.htm>
http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/hs_amyloid/index.htm

染色キット

製品情報 : <http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/amyloid/index.htm>

第4回 ELISA の操作法とそのポイント (後編)

ポイント⑩: ELISA の反応温度・湿度

キットにより反応温度が指定されていますので一定の温度で指定温度を維持できるよう環境を整えることが重要です。夏は外気温が30℃を超える日も多くなってきます。出入りが多い部屋や開放された部屋では温度管理ができません。反応温度が高いとブランクや高濃度の標準溶液の吸光度の上昇が起きやすくなります。発色反応が進みすぎると高濃度付近の測定が正確にできません。温度管理には充分注意しましょう。

冬になりだんだん気温が下がってくると気を付けなければいけないのが湿度です。室温化時間や反応温度も重要ですが、湿度も重要です。冬は外気の湿度も下がりますが、暖房を入れている部屋の湿度はさらに下がります。湿度が30%以下(目安です)で、なお且つ空気の対流がある場所で反応させることは避けましょう。静置反応中に分注した溶液が蒸散しその部分に非特異吸着が起こり、ブランク値上昇の原因となります。そのような環境でどうしても測定しなければならない場合は静置反応時にプレートシールを貼り反応させるようにしましょう。プレートシールが貼れない場合(測定を機械化している場合)で、プレートカバーで対応可能な場合はプレートカバーを使いましょう。プレートシールに比べると効果は弱いですがしないよりは良いでしょう。

ポイント⑪: ELISA の各過程における偶然誤差(バラツキ)の生じる要因

- 96 ウェルプレートにおける要因
 - ・ 温度が不均一になっていませんか?
- 試料における要因
 - ・ 試料の濃度が不均一(凍結融解で起こる溶質の不均一分布)ではありませんでしたか?
 - ・ 試料の希釈により不均一(攪拌不良による溶液中での濃度の偏り)ではありませんでしたか?
- 試料・標準品添加と結合反応における要因
 - ・ 試料(標準品)のピペッティング(ピペット選択、使用者の手技)に問題はありましたか?
 - ・ 温度のバラツキ(エッジ現象)、時間的バラツキ(測定者の手技)はありましたか?
- 試料添加(1次反応)後の最初の洗浄操作における要因
 - ・ 洗浄液を溢れさせてしまいませんでしたか?隣のウェルに影響がでることがあります。
 - ・ 洗浄液の残りはありませんでしたか?
- 酵素標識抗体(ビオチン標識抗体)添加と反応における要因
 - ・ 温度のバラツキ、時間的バラツキはありましたか?
 - ・ 標識抗体の非特異的吸着はありましたか?ブランク値は高くないですか?

■ 発色液添加と反応における要因

- ・ 温度のバラツキ、時間的バラツキはありましたか?

■ 吸光度測定における要因

- ・ プレートのウェル間の吸光度のバラツキ(ウェル底部の傷、底部の壁の厚さなどによる)はありましたか?
- ・ 吸光度測定の精度(複数光度計の不均一)に問題はありますか?メンテナンス状況を確認しましょう。

【系統誤差: 偏りについて-なぜ偏った測定値が出るのか】

■ 標準品に関して

純度不良、重量測定の偏り(例えば水分吸収)、希釈の偏り、吸着現象、構造上の差異(リコンビナント)など。

■ 測定試料に関して

採取方法(溶血、乳び)、保存方法(変性)、分解酵素の存在、結合タンパクの存在、測定対象物質の構造多様性、測定に用いる酵素の活性を阻害する物質の添加、標準液とは別ピペットで試料を添加など。

■ 抗体に関して

抗体が標準品と試料中の測定対象物質を等しく認識しない。特異性が不十分で他の物質も測り込んでしまう。

■ 測定系、測定法に関して

- ・ 検量線作成系と試料反応系に乖離が生じている。例えば検量線系のウェルが端にあるために起こるエッジ効果、試料の構成成分による抗原抗体反応の速度、反応平衡への影響。
- ・ 吸光度測定装置の測定に偏差(例えば光検出器に偏差)がある。
- ・ 呈色の時間的減衰。
- ・ 検量線回帰式がうまくフィットしていない(真度がずれている)。

ポイント⑫: 手技の比較

ELISAの手技は一見やさしそうでも、それがまたELISAの「売り」でもあります。proficiencyが要求される手技でもあります。分析法バリデーションでの室間再現精度の検討は一方では測定室や測定者の技能検定(proficiency test, PT)にも応用されます。定期的に均一な材料から取り出した試料を測定者に配り、分析の結果を計画実施管理者に報告してもらい、その結果をすべてのデータと共に各測定者にフィードバックします。これによって手技などの見直しが行われ、次の分析に反映されることとなります。技能判定の基準のひとつにZ scoreがあります。

$z = (x - x_a) / \sigma$ x : 一人の測定者で得られた測定値

x_a : 数名のエキスパートの測定値の平均値

σ : 実験結果の標準偏差の目標値
判定は Zスコアの絶対値が 2 よりも小さい場合は満足

できる結果を出したとされ、 $2 < |z| < 3$ の場合には信頼性が低い、 $|z| > 3$ の場合には容認できないとされます。

ELISA トラブルシューティング

D : ブランク (ゼロ濃度) の吸光度が高い 原因と対策

- 1) ウェルの乾燥の可能性
各ウェルの洗浄液を除いてから次の試薬溶液を添加するまでの時間が長い場合、または各ウェルに直接空調機などの風が当たり、ウェルが乾燥した可能性があります。
- 2) 濃縮液として供給されている試薬の希釈率の誤り
指定された希釈率になっているかどうか確認しましょう。
- 3) 洗浄の不完全
自動プレート洗浄機を用いる場合は、キットに適した洗浄条件の設定が必要な場合があります。設定を正しく行ってから使用しましょう。吸引、排出ノズル位置、列ごとの吸引量、洗浄液噴射の圧力、吸引後の残量などの確認が必要です。マニュアルでの洗浄の場合は洗浄効果が不足していることが原因として考えられますので、洗浄回数を所定の回数より増やすことにより解決するケースもあります。特に酵素結合物反応後の洗浄が重要です。洗浄液をウェルに満たし、軽く 10 秒ほど手のひらの上で揺らせてから捨てると効果的です。
- 4) 反応過剰の可能性
プレートは正しい温度で、決められた時間でインキュベートしましょう。

E : 二重測定の実験間のバラツキが大きい 原因と対策

バラツキすなわち測定精度が大きくなってしまふ主な原因は、反応の不均一な進行とピペティングのバラツキ、及び検体の不均一性です。

- 反応を不均一にするさまざまな要因
- 1) 洗浄液を吸引する際、アスピレーターを使ったためにウェルの底を引っかいた。
- 2) 試薬添加の際ピペットの先端がウェルの底を引っかいている。8連、12連ピペットで試薬を加えるとチップをウェルプレートに平行にすることが難しく、ウェルの底部を引っかく可能性が大きくなります。
- 3) プレートが十分に反応温度と同じになっていないため反応進行に差が生じた (エッジ現象)。
- 4) プレートにエアコンの冷風 (夏) や機械の冷却装置の吹き出し口からの温風が当って温度を偏らせた。またプレートの傍にストーブや発熱する機器があると、輻射熱でエッジ現象が起こります。
- 5) エアコンやパソコンなどの温風が当ってウェルを乾燥させてしまった。
- 6) 洗浄液が完全に除去されおらず、ウェルに残っていた。
- ピペティングのバラツキ、特に標準溶液や検体をウェルに加える際のピペティングのバラツキはそのまま測定値のバラツキに結びつきます。
- ピペットの詰まり
血漿を凍結保存すると、融解した際にフィブリンが析出していることがあります。これをそのままピペットでサンプリン

グするとフィブリンがチップの先に詰まり、正しい液量を量り取ることができなくなる可能性があります。

- 検体の不均一
検体は測定まで凍結保存し、測定の際に融解することが多いですが、血清や血漿は凍結の際と、融解の際にタンパク部分が後で凍り、先に融けるということが起こり、その結果保存容器の底部が濃く上部が薄い状態になりやすいです。そのままサンプリングすると 1 回目と 2 回目では濃度が違うことになり、ウェル間のバラツキが大きくなります。凍結保存したタンパク溶液は必ず攪拌して均一にしてからサンプリングしましょう。
 - 8連、12連ピペットをお使いの方は各チップに採取・排出される液量が等しいかどうかを検定してから使用しましょう。
- F : 標準曲線は取扱説明書通りに描けるが、検体の測定値を読み取れないか、読み取れても異常値となる。

原因と対策

- すべての検体で吸光度が低い
測定物質の失活
⇒ 失活防止に分解酵素阻害剤添加 ・ 保存条件の検体検体に酵素阻害剤 (N^3 、F)
⇒ 使用を止める ・ 検体添加後の洗浄を充分にする
- 反応妨害物質の存在
⇒ 添加回収試験 ・ 希釈直線性試験を試みる
- 検体の凍結による影響
⇒ ごく少量の血清や血漿を比較的大きな容器に入れて凍結保存すると水分が蒸散して血清や血漿が濃縮されタンパク濃度が上がり反応を阻害したり、測定物質が変性したりする可能性があります。マウスの検体は特に量が少ないので注意しましょう。できるだけ小さいチューブを使用し測定前に充分に攪拌して下さい。
- 組織や細胞からの抽出検体、クロマトや等電点分離での分画検体で測定値が得られない。
検体の pH が ELISA の測定限界を超えている。
⇒ 緩衝液で希釈し、中性化してから測定する
⇒ 少量の酸、塩基で中和してから測定する
- 抽出液に有機溶媒が入っている
⇒ 有機溶媒は抗原抗体反応を妨害するので緩衝液で希釈する。pH に注意。緩衝液で希釈してみ、アッセイできればその方法が良いでしょう。
- 検体の測定値が高すぎる (低すぎる)
他の報文よりも高い (低い)
⇒ その報文のキットと当該キットの標準品の純度が異なっている
いつもの測定値よりも高い
⇒ 今回のキットの標準品が変性している
いつもの測定値よりも低い
⇒ 検体保存中に失活 (事故)

検体の測定値に関する判定は、管理血清 (positive control) (同一検体などを小分け保管してあるもの) を測定ごとに検体として加え、同一の測定値が得られるかを確認するようにしましょう。

本記事は、若林克己著「ELISA A to Z」(株式会社シバヤギ発行)をもとに、株式会社シバヤギで編集したものです。

～ ELISA A to Z について～

私は微量測定法としての Radioimmunoassay (RIA) の導入を放射線医学総合研究所で始め、その後群馬大学でも研究者への啓蒙を長く続けてきました。RIA はごく少量の抗体と抗原さえあれば簡単に組み立てられる、いわば貧者の測定法ですが、RI を使用する制約と理論的にも測定感度の限界がありました。退官後関与した株式会社シバヤギで、ELISA に乗り換える必要から始めてみると、ELISA の長所が分かり、その技術を brush-up することに努めました。そして総まとめとして“ELISA A to Z”を書き上げました。ELISA の使用法と注意点とを初歩の使用者にも理解できるように作成したものです。 若林克己

第1回 オリゴヌクレオチド合成

タンパク質・核酸・糖鎖の3つは、生体において重要な役割を担う高分子としてよく知られる。タンパク質は20種のアミノ酸、核酸は4種のヌクレオチド、糖鎖は数種の糖が連結したものであり、その組み合わせと配列が機能を決定する。従って、望みの配列の生体高分子を作り出す手法は、生化学にとって鍵というべき技術であり、古くから多くの努力がなされてきた。結果、現在ではそれぞれ多くの知見が蓄積されており、複雑長大な生体高分子の化学合成がいくつも実現している。

核酸合成の技術も、もちろん古くから研究されている。この分野の先鞭をつけたのは、遺伝暗号の解読でノーベル生理学・医学賞を受賞したH. G. Khoranaで、1950年代後半のことであった。その後も核酸合成の手法には多くの改良が重ねられ、DNAのプライマー合成などに欠かせない技術となっている。本稿では4回にわたり、核酸（オリゴヌクレオチド）合成の基礎について述べてゆく。

核酸の基礎

はじめに、核酸について基礎事項をおさらいしておこう。核酸はデオキシリボ核酸（DNA）とリボ核酸（RNA）の総称であり、前者は主に遺伝情報の貯蔵、後者は情報の伝達やタンパク質合成などの役割を担う。

両者はいずれも、5炭糖に核酸塩基が結合した「ヌクレオチド」を単位としてできている。この糖を成す炭素原子には、アノマー炭素から順に1'位から5'位までの番号が振られている。結合の「腕」となるのは3'位と5'位のヒドロキシ基で、これらがリン酸エステル結合を介して長く連結することで、核酸の鎖ができていく。また、核酸の鎖の両端を区別する際、この糖の位置記号をとってそれぞれ「3'末端」「5'末端」という呼び方をする。

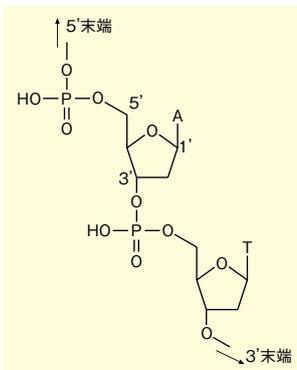


図1. DNAの構造(部分)

DNAとRNAの大きな差は、5員環の糖部分にある。RNAの糖は2'位にヒドロキシ基が結合しているリボースだが、DNAではこのヒドロキシ基を欠いたデオキシリボースとなっている。これは一見小さな差と見えるが、RNAでは2'位ヒドロキシ基がリン酸部位に求核攻撃しうるため、リン酸ジエステル結合が切断を受けやすくなる。

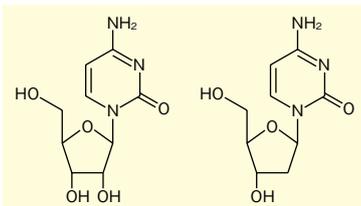


図2. RNAの構成単位・リボヌクレオチド(左)とDNAの構成単位デオキシリボヌクレオチド(右)

DNAが安定で分解を受けにくいのに対し、RNAが触媒能を示す(リボザイム)などアクティブにはたらく化合物であるのは、このあたりに起因している。このため、RNAはDNAより不安定であり、実験の際に取扱いに注意を要する。

また、DNAとRNAにおけるヒドロキシ基の有無という差は、糖の5員環のコンホメーションに影響を与え、これが分子全体の立体構造にも反映される。DNAは二重らせん構造をとりやすいのに対し、RNAは一本鎖のまま分子内で

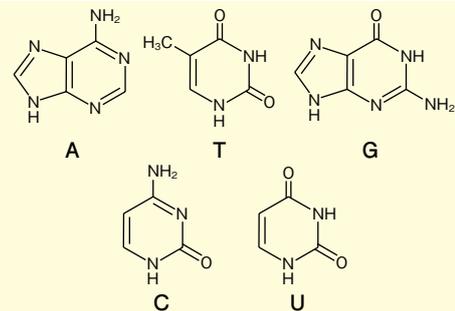


図3. 核酸塩基。左上からアデニン (A)、チミン (T)、グアニン (G)、シトシン (C)、ウラシル (U)

水素結合して複雑な立体構造をとるケースが多い。

さらに、DNAとRNAでは、核酸塩基の種類も異なる。DNAではアデニン (A)、チミン (T)、グアニン (G)、シトシン (C) の4種類だが、RNAではチミンの代わりにウラシル (U) が使われている。このうちアデニン、シトシン、グアニンはアミノ基を持っており、核酸合成の途中にはこれを保護する必要がある(次回以降に詳述)。

広がる核酸の応用研究

近年、オリゴヌクレオチドの化学は急速な広がりを見せている。たとえば医薬分野においては、現在全盛の抗体医薬に続く新たなジャンルとして、核酸医薬が注目を集めている。この核酸医薬は、抗がん剤や抗ウイルス剤などに用いられる「核酸アナログ」(核酸塩基やヌクレオチドの構造を一部改変した形の医薬)とは全くの別物だ。核酸医薬は、ヌクレオチドが数個から百数十個つながった、オリゴヌクレオチドを医薬として用いる。

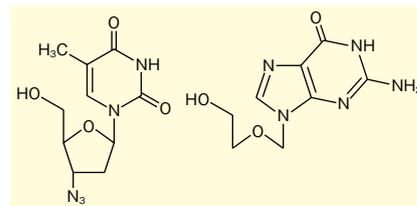
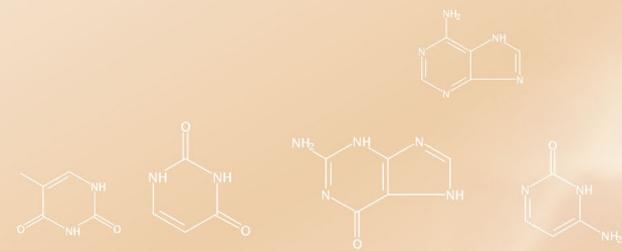


図4. 核酸アナログの例。抗HIV薬ジドブジン(左)、ヘルペス治療薬アシクロビル(右)

一口に核酸医薬といっても、多くのアプローチがある。アンチセンス核酸と呼ばれる手法は、標的のmRNAに相補的な配列のDNAやRNAを投与し、これと二本鎖を形成させてしまう(ハイブリダイゼーション)ことによって、タンパク質の発



現を制御しようとするものだ。また、二本鎖 RNA を投与することで、配列特異的に標的 RNA が分解される現象 (RNA 干渉) を利用する方法も、現在盛んに研究されている。

また、標的タンパク質に特異的に結合できるよう設計された核酸を用いるアプタマー医薬と呼ばれる手法もある。眼病のひとつである、加齢黄斑変性症の治療薬ベガブタニブ (商品名マクジェン) が、最初に実用化されたアプタマー医薬である。

核酸の医薬への応用に際しては、核酸 (特に RNA) は体内で分解されやすいことが問題となる。人体は、侵入してきたウイルスへの防御策としてヌクレアーゼを持っており、外敵の核酸を分解してしまうのだ。

このため、核酸を医薬として用いるためには、分解を防ぐために化学修飾が施されることが多い。例えば、サイトメガロウイルス感染症治療薬のホミビルセンは、リン酸ジエステル結合部分に硫黄原子が導入され、ヌクレアーゼに対する抵抗性を持たせている。その他、近年の核酸医薬には構造にさまざまな工夫が施されており、合成法にも新たな手法が必要となっている。

人工核酸

もちろん医薬以外の分野でも、核酸の研究展開は広く進められている。アデニン (A)、チミン (T)、シトシン (C)、グアニン (G)、ウラシル (U) という天然の核酸塩基に代えて、人工的に設計された核酸塩基を導入し、さまざまな機能を持たせようとするアプローチがそのひとつだ。塩谷光彦¹⁾による、金属イオンへの配位結合を利用した人工 DNA¹⁾、平尾一郎²⁾や F. E. Romesberg ら³⁾による人工塩基対などは、その代表的なものに挙げられる。

また、リボースやデオキシリボースの代わりに人工の糖を導入したものも、さまざまなタイプが提案されている。例えば、リボースの5員環を架橋して二環性骨格とした LNA (locked nucleic acid)・BNA (bridged nucleic acid) といったものが開発されており⁴⁾、これらは天然の DNA や RNA に対する親和性が高いため、核酸医薬などへの応用が期待されている。

DNA を単に素材として使い、さまざまな形を作り上げる「DNA ナノテクノロジー」も急速に進展している分野だ。星型や顔の形、多面体構造など、驚くほど複雑な形状を自由に作り出す手法が開発されており、これらは「DNA オリガミ」とも総称される⁵⁾。

オリゴヌクレオチド合成の手順

こうした多様なニーズに応えるため、核酸合成の技術はさらに重要性を増しつつある。オリゴヌクレオチドの合成の基本的な考え方は、他の生体高分子合成とほぼ同様である。

- (1) 適切に保護された単量体を用意する
- (2) 反応点を脱保護する

- (3) 次の単量体を結合させる
- (4) (2)及び(3)のステップを、必要な数だけ繰り返す
- (5) 全体を脱保護する

天然の核酸合成の際には、5' から 3' 側へ向けて鎖が延長されていく。化学合成の場合にはどちら向きに伸ばすことも原理的に可能だが、天然とは逆に 3' 側から 5' 側へ鎖を延長していくケースが多い。これは、5' ヒドロキシ基が一級であるために反応性が高く、延長反応が行いやすいという事情による。

近年ではオリゴヌクレオチド合成には、速度や操作の簡便さといった観点から、固相合成法が用いられることが多い。すなわち、最初の単量体を、固体の担体 (ガラスビーズなど) に結合させた上で、反応点の脱保護・単量体導入を必要な回数繰り返す。こうしてヌクレオチド鎖を成長させた上で、最後に全体の脱保護及び担体からの切り出しを行ない、目的のオリゴヌクレオチドを得るというものである。

通常の場合 (液相合成) では、脱保護・結合生成などの工程のたびに、抽出・精製などの操作を必要とし、合成に長い期間と多くの手間と熟練を要する。しかし固相合成法では、全ての反応がビーズ上で進行し、過剰の試薬や反応で生じる副生成物などは洗浄処理によって簡単に除去できる。このため煩雑な操作は必要なく、迅速かつ少ない手間で目的物が得られ、自動化も可能である。ただし固相法では、途中で精製を行なうことができないため、不純物の除去が不可能という点が問題となる。例えば、50 塩基のオリゴヌクレオチドを合成する場合を考えてみよう。もし、1 塩基伸ばすサイクルの収率が 95% であったとしたら、目的物の収率は約 7.7% に過ぎず、1 塩基足りない 49 量体が約 20.2% 生成する計算となる。クロマトグラフィーなどの精製技術でこれらを分離するのは、極めて困難である。

一方、各段階の収率が 99% であったなら、目的物の収率は約 60.5%、49 量体の収率が約 30.5% となる。さらに、各段階の収率を 99.9% にまで上げることができたら、総収率は約 95.1% まで上昇する。各ステップの収率を徹底的に向上させることが、いかに重要かわかる。このため固相合成法を行なう場合には、試薬を大過剰量使い、洗浄を徹底的に行なって、できる限り収率の向上を図る必要がある。また、キャッピングと呼ばれる処置を施すことで、不完全なオリゴヌクレオチド鎖の生成を抑えることも行われる。こうした詳細については、次回以降に述べてゆきたい。

【参考文献】

- 1) Tanaka, K. *et al.* : *Science*, **299**, 1212 (2003). Tanaka, K. *et al.* : *Nat. Nanotechnol.*, **1**, 190 (2006).
- 2) Kimoto, M. *et al.* : *Nat. Biotechnol.*, **31**, 453 (2013).
- 3) Maryshef, D. A. *et al.* : *Nature*, **509**, 385 (2014).
- 4) Obika, S. *et al.* : *Tetrahedron*, **54**, 3607 (1998).
- 5) Hong, F. *et al.* : *Chem. Rev.*, **117**, 12584 (2017).

当社は、オリゴヌクレオチドの合成に用いる試薬を取揃えています。水分を極力低減させた低水分保証品や固相合成装置である ÄKTA Oligopilot 用の反応試薬をラインアップしています。容量・濃度のカスタマイズも承ります。

詳細は当社 HP をご覧下さい。

核酸合成 和光

検索

第3話 測定例のご紹介

本シリーズも今回で無事に第3話を迎えることができました。第1話では「qNMR 高精度化のはじまり」を、第2話では「qNMR で精確な測定をするために」をご紹介しましたが、今回は、日本薬局方に記載されている生薬「ペオノール、定量用」の qNMR 純度規定 (Fig. 1) に従った実際の測定例をご紹介させていただきます。なお、日本薬局方では、分子量 300 程度の測定対象化合物の場合、使用機器間誤差を含めて通常の実験室レベルで、有効数字 2 桁を保証しながら値付けが可能 (すなわち、98% なのか 99% なのかを区別可能な) qNMR での試験条件が設定されています。ペオノールに限らず他の化合物についても日本薬局方生薬等における qNMR 純度規定は、「ピークの単一性」と「定量法」の二本立てになっています。ここでいう「定量法」は qNMR での純度測定を指しています。では「ピークの単一性」とは何を指しているのでしょうか？これは、NMR 測定とは関係なく、本品をクロマトグラフで測定した際に、ペオノールのピークに不純物ピークが重複していないこと (すなわちピークが単一であること) を確認する試験を指しています。qNMR が、日本薬局方に適用された背景は、クロマトグラフで使用する標品の純度を qNMR で値付けすることによって、この標品を使ったクロマトグラフでの分析値の信頼性を担保することにあります。これは qNMR に用いる内部基準物質として、国際単位系 (International System of Units ; SI、この場合は物質質量 (モル) を指します) トレーサビリティが確保された認証標準物質 (Certified Reference Material ; CRM) を使用することで、qNMR で測定した純度値を SI

トレーサブルな絶対純度として国際単位系へ紐付けする形で達成することができます。そもそもクロマトグラムにおいて標品ピークに不純物のピークが重複しては、せっかく qNMR で純度を値付けしても正確さを担保することができませんが「ピークの単一性」は、これを回避する目的で設定されています。「ピークの単一性」の詳細なご紹介については、また別の機会に譲ることとして、ここから「定量法」について詳しくご紹介したいと思います。

Fig. 1 に示した定量法本文の序盤には、qNMR での試料調製が記載されています。その中では、本品 5mg と核磁気共鳴スペクトル測定用 1,4-BTMSB- d_4 (内部基準物質) 1mg をウルトラマイクロ化学はかりを使って秤量する旨が規定されています。なお、ウルトラマイクロ化学はかりとは、最小読み取り値が 0.1 μg の天秤 (天秤業界用語ではウルトラマイクロ天秤といいます) のことを指します。このウルトラマイクロ化学はかりを使って秤量操作を行うのですが、これが非常にやっかいです。そもそも、ウルトラマイクロ化学はかりの皿は非常に小さいので、バイアルなどの容器も小さいものしか載りません。そして、この小さいバイアルを秤量皿の上に載せ風袋引きを行い、そのバイアルの中に薬匙を使って本品 5mg と内部基準物質 1mg をバイアルの縁に付着せずに巧みに入れることは非常に難しく、場合によっては、バイアルの外に本品や内部基準物質をこぼすことがあります。これに気付かず測定した結果、大きな誤差を生じる可能性があります。そのため、ウルトラマイクロ化学はかりを使った場合によく利用される精確な秤量を行う手法として、アルミ製の秤量皿などの風袋を利用する

2) 定量用2 (qNMR純度規定)

ピークの単一性 本品 5 mg を移動相 50 mL に溶かす。この液 1 mL を量り、移動相を加えて 50 mL とし、試料溶液とする。試料溶液 10 μL につき、次の条件で液体クロマトグラフ (20) により試験を行い、ペオノールのピークの頂点及び頂点の前後でピーク高さの中間点付近の 2 時点を含む少なくとも 3 時点以上でのピークの吸収スペクトルを比較するとき、スペクトルの形状に差がない。

試験条件

カラム、カラム温度、移動相及び流量は「ボタンビ」の定量法の試験条件を準用する。

検出器：フォトダイオードアレイ検出器 (測定波長 274 nm、スペクトル測定範囲：220 ~ 400 nm)

システム適合性

システムの性能は「ボタンビ」の定量法のシステム適合性を準用する。

定量法 ウルトラマイクロ化学はかりを用い、本品 5 mg 及び核磁気共鳴スペクトル測定用 1,4-BTMSB- d_4 1 mg をそれぞれ精密に量り、核磁気共鳴スペクトル測定用重水素化メタノール 1 mL に溶かし、試料溶液とする。この液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ、核磁気共鳴スペクトル測定用 1,4-BTMSB- d_4 を内部基準物質として、次の

試験条件で核磁気共鳴スペクトル測定法 (2.21) 及び (5.01) により、 ^1H NMR を測定する。内部基準物質のシグナルを δ 0 ppm とし、 δ 6.17 ~ δ 6.25 ppm 及び δ 7.54 ppm 付近のそれぞれのシグナルの面積強度 A1 (水素数 2 に相当) 及び A2 (水素数 1 に相当) を算出する。

ペオノール ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$) の量 (%)

$$= Ms \times I \times P / (M \times N) \times 0.7336$$

M : 本品の秤取量 (mg)

Ms : 核磁気共鳴スペクトル測定用 1,4-BTMSB- d_4 の秤取量 (mg)

I : 核磁気共鳴スペクトル測定用 1,4-BTMSB- d_4 のシグナルの面積強度を 18.000 としたときの各シグナルの面積強度 A1 及び A2 の和

N : A1 及び A2 に由来する各シグナルの水素数の和

P : 核磁気共鳴スペクトル測定用 1,4-BTMSB- d_4 の純度 (%)

試験条件

装置： ^1H 共鳴周波数 400 MHz 以上の核磁気共鳴スペクトル測定装置

測定対象とする核： ^1H

デジタル分解能：0.25 以下

観測スペクトル幅：-5 ~ 15 ppm を含む 20 ppm 以上

スピニング：オフ

パルス角：90°

^{13}C 核デカップリング：あり

遅延時間：繰り返しパルス待ち時間 60 秒以上

積算回数：8 回以上

ダミーキャン：2 回以上

測定温度：20 ~ 30°C の一定温度

システム適合性

検出の確認：試料溶液につき、上記の条件で測定するとき、 δ 6.17 ~ δ 6.25 ppm 及び δ 7.54 ppm 付近の各シグナルの SN 比は 100 以上である。

システムの性能：試料溶液につき、上記の条件で測定するとき、 δ 6.17 ~ δ 6.25 ppm 及び δ 7.54 ppm 付近のシグナルについて、明らかな混在物のシグナルが重なっていないことを確認する。また、試料溶液につき、上記の条件で測定するとき、各シグナル間の面積強度比 (A1/2) / A2 は 0.99 ~ 1.01 である。

システムの再現性：試料溶液につき、上記の条件で測定を 6 回繰り返すとき、面積強度 A1 又は A2 の内標準物質の面積強度に対する比の相対標準偏差は 1.0% 以下である。

Fig. 1. 日本薬局方ペオノール、定量用の qNMR 純度規定

出典：「第十七改正日本薬局方」(厚生労働省) (<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000066530.html>)



Fig. 2. 試料調製のフロー

方法があります。この流れを Fig. 2 に示しましたが、この手法を使うことで本品や内部基準物質がバイアルの縁に付着することや、天秤の皿にこぼれることもなく、巧くバイアルの中に入れることが可能です。

次に、秤量した本品及び内部基準物質が入ったバイアルに重水素化メタノールを 1mL 添加して試料溶液を調製します。この調製した試料溶液を NMR 試料管へ分注し(分注量は、装置メーカーが推奨する量にして下さい)、これを Fig. 1 の「定量法」本文中盤に規定された「試験条件」に従って ^1H NMR 測定に供します。得られた ^1H NMR スペクトルについて、Fig. 1 の「定量法」本文の記載に従って、内部基準物質のシグナルを 0ppm にレファレンス設定し、 δ 6.17 ~ 6.25ppm 付近のシグナルの面積強度 A1 と δ 7.54ppm 付近のシグナルの面積強度 A2 を算出します (Fig. 3 に示した ^1H NMR スペクトル参照)。なお、この際に、シグナルの面積強度 A1 及び A2 については、Fig. 1 の「定量法」に記載の計算式 (ペオノール ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$) の量 (%)) の記号 I の説明にあるように、内部基準物質 (核磁気共鳴スペクトル測定用 1,4-BTMSB- d_4) のシグナルの面積強度を 18,000 に設定したときの規格化した値を算出します。あとは、得られた値 (採取量、面積強度及び内部基準物質の純度) を計算式に代入することで簡単に qNMR での純度を算出することができます。Fig. 3 のスペクトルを使った実際の計算例を以下に示します。

$$\begin{aligned} \text{ペオノール}(\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3)\text{の量}(\%) &= Ms \times I \times P / (M \times N) \times 0.7336 \\ &= 0.9332 \times 20.687 \times 99.8 / (4.7365 \times 3) \times 0.7336 \\ &= 99.5\% \end{aligned}$$

この計算例では、ペオノールの絶対純度は 99.5% と計算されました。なお、計算式中の係数 0.7336 は、ペオノールの分子量 166.17 を内部基準物質 1,4-BTMSB- d_4 の分子量

M : 本品の採取量 (mg)	4.7365
Ms : 核磁気共鳴スペクトル測定用 1,4-BTMSB- d_4 採取量 (mg)	0.9332
I : 核磁気共鳴スペクトル測定用 1,4-BTMSB- d_4 のシグナルの面積強度を 18,000 としたときの各シグナルの面積強度 A1 及び A2 の和	13.796 + 6.891 = 20.687
N : A1 及び A2 に由来する各シグナルの水素数の和	3
P : 核磁気共鳴スペクトル測定用 1,4-BTMSB- d_4 の純度 (%)	99.8

226.50 で除した値です。

実際の定量操作に加えて、日本薬局方の qNMR 純度規定には、システム適合性試験 (System Suitability Test ; SST) が規定されています。システム適合性試験についても、実際の試験例をご紹介します。システム適合性試験に供する試料は、Fig. 1 の定量法本文と同じ組成のものを使用します。この使用溶液について、「検出の確認」、「システムの性能」及び「システムの再現性」を行います。

a. 検出の確認

検出の確認では、ターゲットシグナルの S/N 比が規定された値 (100) 以上であることを確認します。S/N 比の計算ですが、市販の NMR 解析ソフトウェアで簡単に行うことが可能です。今回は、日本電子株式会社から提供されている Delta v5.0.4.2 を使用して Root Mean Square 法 (RMS 法) で検出の確認を行った結果を Fig. 4 に示しました。ペオノールのターゲットシ

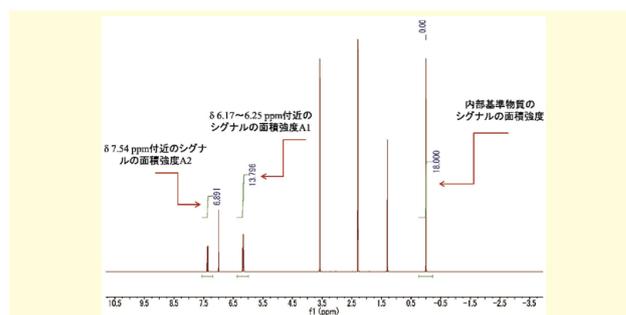


Fig. 3. ペオノール、定量用の ^1H NMR スペクトル



Table 1. システムの性能 (面積強度比の確認)

面積強度 A1	12.108
面積強度 A2	6.067
面積強度比 (A1/2/A2)	1.00

Table 2. システムの再現性

	Run1	Run2	Run3	Run4	Run5	Run6	平均値	相対標準偏差 (%)
内部基準物質の面積強度	18.000	18.000	18.000	18.000	18.000	18.000		
A1 の面積強度	12.108	12.114	12.123	12.119	12.121	12.120		
面積強度比 (内部基準物質 / A1)	1.487	1.486	1.485	1.485	1.485	1.485	1.485	0.046

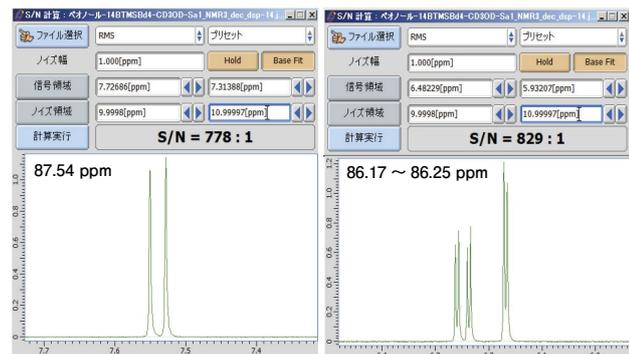


Fig. 4. 検出の確認

グナルの S/N 比は 700 以上となり、本測定系において良好な感度を得られていることが確認できます。なお検出の確認をする際の注意点として、窓関数処理があげられます。窓関数処理をすることによって、S/N 比が実際よりも高く評価される場合があります。NMR 解析ソフトウェアによっては、デフォルトで窓関数処理が設定されている場合があるので注意が必要です。また qNMR での解析全般に言えることですが、窓関数処理の種類によっては、正確な面積強度比を得られない場合がありますので、原則として窓関数処理をしないことをお勧めします。

b. システムの性能

次にシステムの性能についてご紹介します。システムの性能では、ペオノールのターゲットシグナルに混在物のシグナルが重なっていないことを目視で確認することと、ペオノールの各シグナル間の面積強度比が 0.99 ~ 1.01 の範囲内であることを確認します。実際の試験結果を Fig. 5 及び Table 1 に示しました。Fig. 5 の ¹H NMR スペクトルから、ペオノールのターゲットシグナルに混在物のシグナルが重なっていないことが

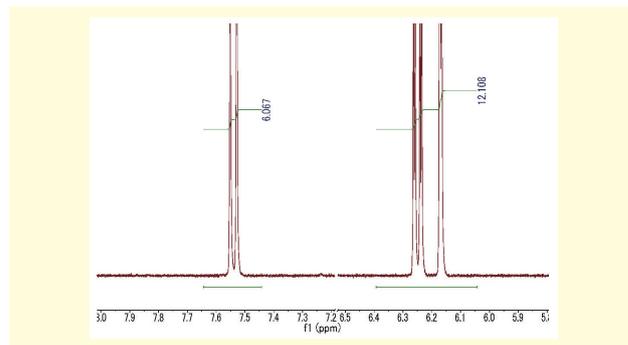


Fig. 5. システムの性能 (混在物の確認)

確認できます。また Table 1 に示したように面積強度比は 1.00 の結果となり、正確な面積強度が得られていることが確認できます。

c. システムの再現性

最後にシステムの再現性についてご紹介します。システムの再現性では、本試料溶液について「試験条件」で 6 回繰り返し測定したときの、面積強度 A1 または A2 の内部基準物質の面積強度に対する比の相対標準偏差が 1.0% 以下であることを確認します。Table 2 に面積強度 A1 を用いた場合のシステムの再現性の結果を示しました。この結果から、本測定系が非常に高精度であることが確認できます。

日本薬局方では、生薬等の分野に限ってですが、これまで 8 化合物について qNMR を使った純度測定が規定されています。みなさまにも、これらの qNMR 純度規定をぜひ参考にして頂き、qNMR での試験条件設定にお役立て頂ければと思います。

最終回である今回は、国内及び海外の動向を中心にお話ししたいと思います。

定量NMR用内標準物質

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
024-17031	1,4-BTMSB-d ₄ Reference Material	TraceSure [®]	50mg	30,000
020-17033			50mg×4	75,000
044-31671	DSS-d ₆ Reference Material	TraceSure [®]	50mg	30,000
040-31673			50mg×4	75,000
048-33271	Dimethyl Sulfone Reference Material	TraceSure [®]	100mg	15,000

Wako

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
135-17951	Maleic Acid Reference Material	TraceSure [®]	100mg	15,000
093-06731	4 Internal Standard Set for Quantitative NMR	定量 NMR 用	1セット	55,000

秤量皿

コード No.	品名	容量	希望納入価格 (円)
013-26351	Aluminium Weighing Dishes (φ8mm, 0.05mL)	100個	20,000

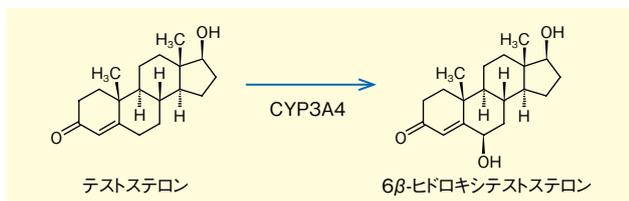
☐²…2 ~ 10℃保存 ☐^F…20℃保存 ☐⁸⁰…80℃保存 ☐¹⁵⁰…150℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2018年1月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

薬物動態試験に

Wako

テストステロン, 精製品, 低ヒドロキシ体

テストステロンは、代謝酵素シトクロム P450 (CYP) の分子種の一つである CYP3A4 の基質で、CYP3A4 によって 6β-ヒドロキシテストステロンに代謝されます。本品は、薬物代謝を解析する際、代謝産物である 6β-ヒドロキシテストステロンのピークを確認しやすいようにヒドロキシ体を低減しています。



特長

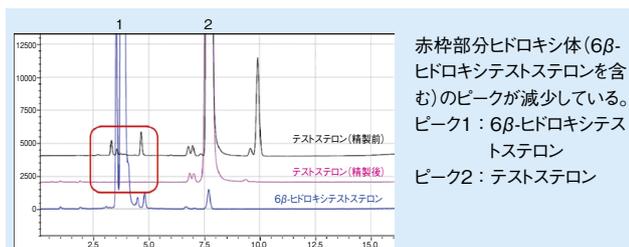
- 高純度
- 低ヒドロキシ体

製品概要

- 外観：白色～わずかにうすい黄色、結晶～粉末
- 含量 (HPLC)：98.0% 以上
- ヒドロキシテストステロン類：
 - 実績値報告 (0.00%：初回ロット実測値)
- 溶解性：1,4 ジオキサンに可溶

データ

■ テストステロン精製前後の比較 (HPLC分析)



〈分析条件〉		グラジエント	
カラム：Wakopak® Wakosil®-II 5C18HG, 4.6φ×250mm	Time (min)	A (%)	B (%)
カラム温度：40℃	1~10	50	50
溶離液：A：水、B：アセトニトリル	10~20	50→10	50→90
流量：1.0mL/min	20~30	10	90
検出器：UV 240nm			

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
200-20761	Testosterone, Purified, Low Hydroxy Compound	薬物動態研究用	1mg	10,000
206-20763		研究用	10mg	30,000

関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
136-18721	Malonyl- ¹³ C ₃ Coenzyme A Lithium Salt	薬理研究用	10mg	75,000

アルツハイマー病の研究に！

Wako

抗 Tau, モノクローナル抗体

Tau には 6 種のアイソフォーム (2N4R, 2N3R, 1N4R, 1N3R, 0N4R, 0N3R) が存在し、40 か所以上のリン酸化箇所があることが知られています。当社では Tau に対する各種抗体 9 種をラインアップしています。

特長

- 特異性が高い
- 少量包装あり

製品概要

認識 Tau	抗体概要	クローン No.
すべての Tau	マウス、ラット、ヒトのすべての Tau を認識する。	RTM38
すべての Tau (ヒト特異的)	ヒト Tau を認識し、マウス、ラットには反応しない。	RTM49
すべての Tau (マウス特異的)	マウス Tau を認識し、ヒト、ラットの Tau には反応しない。	RTM47
リン酸化 Tau T181	T181 がリン酸化された Tau を認識する。	2E2-A6
リン酸化 Tau S199	S199 がリン酸化された Tau を認識する。	5B8-1E2
リン酸化 Tau S262	S262 がリン酸化された Tau を認識する。	TIP1-35
2N-Tau	アイソフォーム 2N4R-Tau と 2N3R-Tau のみを認識する。	2C2
3R-Tau	アイソフォーム 2N3R, 1N3R, 0N3R-Tau を認識する。	2A1-1F4
4R-Tau	アイソフォーム 2N4R, 1N3R, 0N3R-Tau を認識する。	3E8-1A6

クローン No.	適応	交差性	サブタイプ
RTM38	IHC, WB, ICC	マウス、ラット、ヒト	ラット IgG2a・κ
RTM49	IHC, WB, ICC	ヒト	ラット IgG1・κ
RTM47	IHC, WB, ICC	マウス	ラット IgG2b・κ
2E2-A6	WB, IHC	ヒト	ラット IgG2b・κ
5B8-1E2	WB, IHC	ヒト	ラット IgG2a・κ
TIP1-35	ELISA	ヒト	ラット IgG1・λ
2C2	WB, IHC	ヒト	ラット IgM・κ
2A1-1F4	WB, IP	ヒト	ラット IgG2b・λ
3E8-1A6	WB, IP	ヒト	マウス IgG1・κ

ICC：免疫細胞染色、IHC：免疫組織染色、IP：免疫沈降、WB：ウェスタンブロット

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
011-26891	Anti Human/Mouse/Rat Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM38)	免疫化学用	10μL	10,000
017-26893		免疫化学用	50μL	35,000
019-26951	Anti Human Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM49)	免疫化学用	10μL	10,000
015-26953		免疫化学用	50μL	35,000
016-26961	Anti Mouse Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM47)	免疫化学用	10μL	10,000
012-26963		免疫化学用	50μL	35,000
012-26603	Anti Phosphorylated Tau T181, Rat Monoclonal Antibody (2E2-A6)	免疫化学用	10μL	10,000
016-26601		免疫化学用	50μL	30,000
019-26613	Ant Phosphorylated Tau S199, Rat Monoclonal Antibody (5B8-1E2)	免疫化学用	10μL	10,000
013-26611		免疫化学用	50μL	30,000
014-27121	Anti Phosphorylated Tau S262, Rat Monoclonal Antibody (TIP1-35)	免疫化学用	10μL	10,000
010-27123		免疫化学用	50μL	35,000
017-27351	Anti 2N-Tau, Rat Monoclonal Antibody (2C2)	免疫化学用	10μL	10,000
013-27353		免疫化学用	50μL	30,000
012-26583	Anti 3R-Tau, Rat Monoclonal Antibody (2A1-1F4)	免疫化学用	10μL	10,000
016-26581		免疫化学用	50μL	30,000
019-26593	Anti 4R-Tau, Monoclonal Antibody (3E8-1A6)	免疫化学用	10μL	10,000
013-26591		免疫化学用	50μL	30,000

当社 HP にてデータをご紹介します。

Tau 抗体 和光 検索

高感度 CD63 ヒト抗体

Wako

抗 CD63, モノクローナル抗体 (3-13)

本品は、DNA 免疫法で樹立した CD63 (lysosome-associated membrane glycoprotein 3 : LAMP3) に対するマウスモノクローナル抗体です。CD63 は 4 回膜貫通ドメインをもつ膜タンパク質で、細胞外小胞、活性化血小板のマーカータンパク質として使用されています。

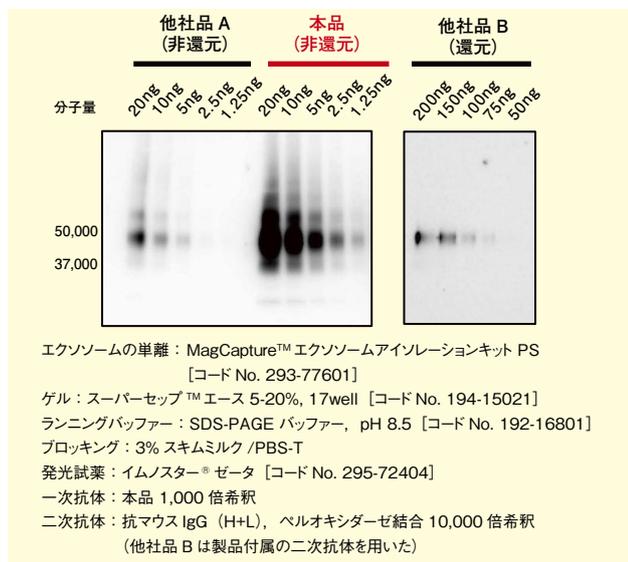
特長

- 高感度
- 安価

製品概要

- 溶液組成 : 1 × TBS (pH 7.2), 50% グリセロール, 0.05w/v% アジ化ナトリウム
- 抗体濃度 : 1.1 mg/mL
- 免疫動物 : マウス
- 抗体サブクラス : IgG1
- 交差性 : ヒト
- アプリケーション : WB 1 : 500 - 1 : 2,000 (非還元条件)
ELISA 1 : 1,000 - 1 : 16,000
FCM 1 : 100 - 1 : 1,000

データ



COLO201 細胞培養上清からエクソソームを精製し、ウエスタンブロットの検出感度を比較した。他社品 A 及び B よりも高感度にエクソソームの CD63 タンパク質を検出できた。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
016-27061	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13)	免疫化学用	20µL	9,000
012-27063			100µL	30,000

サンプルご希望の方は、当社 HP よりご依頼下さい。

CD63 和光

関連商品

エクソソーム単離キット ー超遠心不要ー

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
299-77603	MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS	遺伝子研究用	2回用	20,000
293-77601			10回用	80,000
290-35591	Magnet Stand	遺伝子研究用	1個	60,000

高感度エクソソーム ELISA キット

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
297-79201	PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti Mouse IgG POD)	遺伝子研究用	96回用	58,000

当社 HP にて性能データなどご紹介しています。

エクソソーム 和光

エクソソームマーカータンパク質をフローサイトメトリーにより解析するキット

Wako

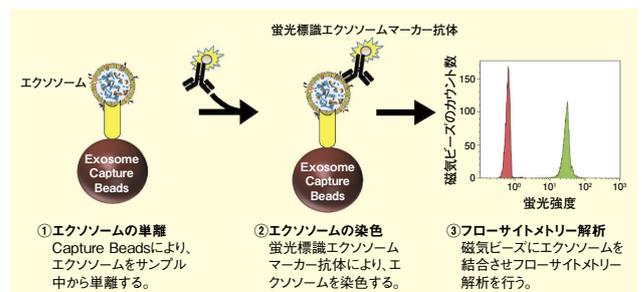
PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキット

本品は、細胞培養上清や体液検体に含まれる細胞外小胞をフローサイトメトリーにより定性解析することができる試薬です。細胞外小胞表面のホスファチジルセリン (PS) と特異的に結合するタンパク質が固相化された磁気ビーズ (Exosome Capture Beads) を用います。この磁気ビーズに細胞外小胞を反応させて固定化した後、任意の細胞外小胞マーカータンパク質に対する蛍光標識抗体を用いることで、目的のマーカータンパク質を高感度に検出できます。

特長

- 磁気ビーズにより操作が簡便
- 濃縮操作不要で、サンプル中の細胞外小胞を直接検出可能
- 任意のマーカータンパク質を表面に有する細胞外小胞を短時間 (3 時間以内) で検出可能

測定法概要



キット構成

- Exosome Capture Beads 3mL × 1本
 - Washing Buffer (10 ×) 45mL × 1本
 - Exosome Binding Enhancer (100 ×) 15mL × 1本
- [次頁に続く]

Ⓜ: 2 ~ 10°C 保存 Ⓧ: 20°C 保存 Ⓢ: 80°C 保存 Ⓛ: 150°C 保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。
 掲載内容は、2018年1月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

データ

抗体固相化磁気ビーズ（他社品）との感度比較

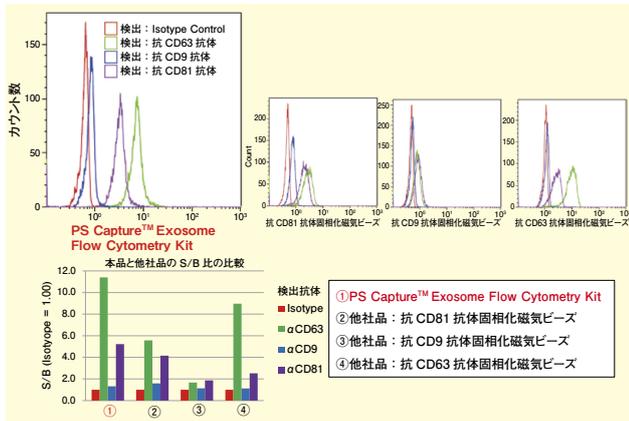


図1. K562 細胞培養上清に含まれるエクソソームを本品または他社品（抗 CD81, CD9, CD63 抗体固相化磁気ビーズ）により単離し、蛍光標識抗 CD63, CD9, CD81 抗体を結合させた後、フローサイトメトリーによりエクソソーム表面抗原の解析を行った。その結果、いずれの検出抗体を用いた場合も、本品は他社品に比べてエクソソーム表面抗原を高感度に検出できることが示された。

各種サンプルに含まれるエクソソームの表面抗原解析

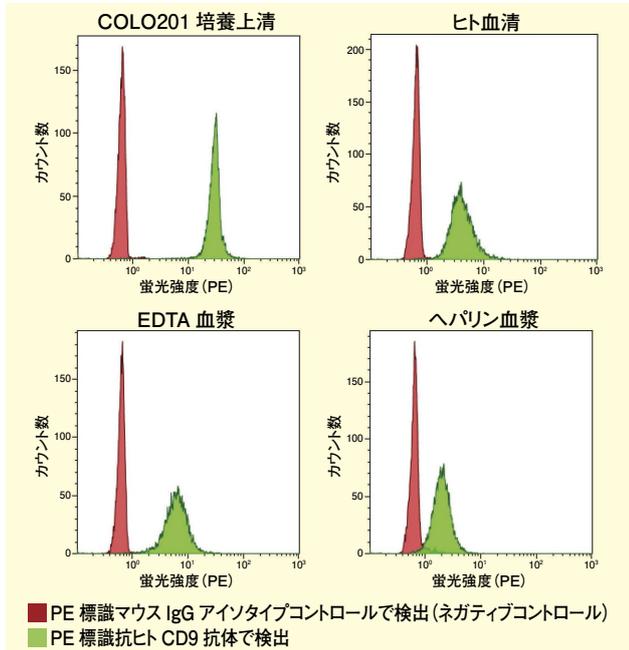


図2. COLO201 培養上清、ヒト血清、ヒト血漿（EDTA 血漿、ヘパリン血漿）から Exosome Capture Beads によりエクソソームを単離し、PE 標識マウス IgG アイソタイプコントロールまたは PE 標識抗ヒト CD9 抗体によりエクソソームの検出を行った。その結果、いずれのサンプルでも PE 標識抗ヒト CD9 抗体により染色した場合に、蛍光強度ピークのシフトが確認された。この結果から、本品は細胞培養上清、血清、血漿中のエクソソームを検出できることが示された。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
297-79701	PS Capture™ Exosome Flow Cytometry Kit	遺伝子研究用	300回用	30,000

Ready-to-use で脳組織を保存可能

Wako

脳組織凍結保存溶液

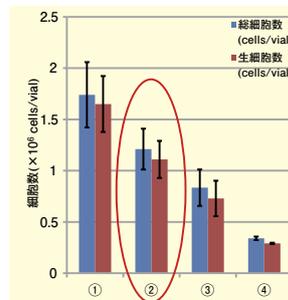
本品は、ラットやマウス胎児の脳組織凍結保存用の凍結保存溶液です。解凍した本品に脳組織を入れるだけで液体窒素中で凍結保存可能です。

特長

- 解剖後のラットやマウスの脳組織を凍結保存可能
- Ready-to-use

データ

凍結保存データ：ラット海馬（胎生 19 日）



各凍結保存溶液を用いて、ラット胎児海馬を凍結保存し、中一日おき、凍結融解後、神経細胞用分散液で細胞を分散回収し、性能比較を行った。本品で脳組織を保存した場合、他社品で保存した場合と比較して3倍以上の生細胞を回収することができた。

		総細胞数 (cells/vial)	生細胞数 (cells/vial)	生細胞率 (%)	生細胞数比 (凍結保存なしの条件の生細胞数を1とした場合)
①	凍結保存なし	1.74×10 ⁶	1.65×10 ⁶	95	1.00
②	脳組織凍結保存溶液	1.21×10 ⁶	1.11×10 ⁶	92	0.67
③	当社凍結保存溶液 (汎用動物細胞用) (血清成分含有)	8.34×10 ⁵	7.29×10 ⁵	87	0.44
④	他社凍結保存溶液 (汎用動物細胞用) (血清成分含有)	3.40×10 ⁵	2.91×10 ⁵	86	0.18

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
029-19161	Brain Tissue Freezing Medium	細胞培養用	1mL×10	24,000

関連商品

上記商品にて保存した脳組織は、解凍後、当社神経細胞用分散液と神経細胞用培地を用いて培養頂くことをおすすめします。

神経細胞用培地

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
148-09671	Neuron Culture Medium	細胞培養用	100mL	50,000

神経細胞用分散液

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
291-78001	Neuron Dissociation Solutions	細胞培養用	4セット	31,100
297-78101	Neuron Dissociation Solutions S	細胞培養用	10セット	50,000

凍結神経細胞

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
030-24881	Cerebral Cortex, from Mouse (embryonic day 15)	細胞培養用	1本	43,800
033-24871	Cerebral Cortex, from Rat (embryonic day 17)	細胞培養用	1本	50,000
036-24861	Cerebral Striatum, from Rat (embryonic day 17)	細胞培養用	1本	50,000
082-10291	Hippocampus, from Mouse (embryonic day 16)	細胞培養用	1本	56,300
085-10301	Hippocampus, from Rat (embryonic day 19)	細胞培養用	1本	62,500

Ⓔ…2～10℃保存 Ⓕ…20℃保存 Ⓖ…80℃保存 Ⓗ…150℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2018年1月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

ポジティブリスト一斉試験法対応

Wako

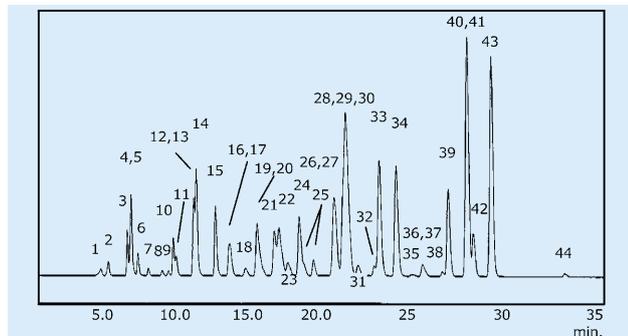
農薬混合標準液 PL-LM II

本品は、食安発 0226 第 1 号において通知された、「LC/MS による農薬等の一斉試験法 II (畜水産物)」に対応した農薬混合標準液です。(1) 及び (2) を使用することにより、測定対象成分を測定することができます。

農薬混合標準液 PL-LM II (1) (LC/MS) (各 20 µg/mL アセトニトリル溶液)

分析例

LC/MS/MS による分析 (ポジティブモード/MRM)



〈分析条件〉

装置: LCMS-8040 (島津製作所製)
 カラム: Wakopak® Ultra C18-3 2.0mm × 150mm
 カラム温度: 40°C
 溶離液: A) 0.01mol/L 酢酸アンモニウム溶液
 B) アセトニトリル
 流速: 0.2mL/min. 注入量: 2.0µg/mL, 1µL
 検出器: 質量検出器 イオン化法: ESI 法

グラジエント条件

時間 (分)	B (%)
0	5
10	40
15	40
30	95
35	95

MS/MS 条件

極性	ポジティブ	乾燥ガス流量 (L/min)	15.0
印可電圧 (kV)	4.5	ヒートブロック温度 (°C)	300
霧化ガス流量 (L/min)	2.0	DL 温度 (°C)	200

〈成分一覧 (44種) (各 20 µg/mL)〉

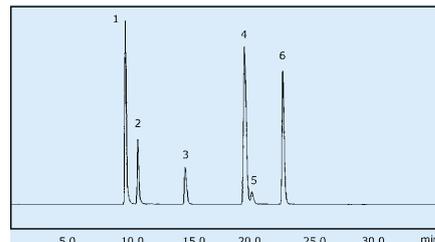
Peak No.	成分名	Peak No.	成分名
1	Acephate	23	Propachlor
2	Omethoate	24	(E)-Metominostrobin
3	Oxydemeton-methyl	25	Dimethomorph (mixture of (E)-, (Z)-isomers)
4	Aldoxycarb	26	Dimethenamid (Racemic Mixture)
5	Oxamyl	27	Chloroxuron
6	Methomyl	28	Dipropyl Isocinchomeronate
7	Thiamethoxam	29	Azoxystrobin
8	Clothianidin	30	Fenamidone
9	Imidacloprid	31	Imazalil
10	Dimethoate	32	Bitertanol
11	Acetamiprid	33	Chromafenozide
12	Ethopabate	34	Tebufenozide
13	Thiacloprid	35	Carpropamid
14	Tebuthiuron	36	Fentrazamide
15	Azamethiphos	37	Coumaphos
16	Propoxur (PHC)	38	Indoxacarb (Racemic Mixture) (Indoxacarb-MP)
17	Bendiocarb	39	Trifloxystrobin
18	Carbaryl (NAC)	40	(Z)-Fenpyroximate
19	Metalaxyl	41	Flumiclorac-pentyl
20	Diuron (DCMU)	42	Fluazifop-P-butyl (Fluazifop-butyl)
21	(Z)-Ferimzone ^{*1}	43	(E)-Fenpyroximate (Fenpyroximate)
22	(E)-Ferimzone ^{*1}	44	Pyridalyl

*1 Ferimzone は E 体と Z 体は合算で 20 µg/mL 含有しています。E 体と Z 体は各 10 µg/mL 濃度で製造しておりますが、比率は保管中に変化する場合があります。

農薬混合標準液 PL-LM II (2) (LC/MS) (各 20 µg/mL DMF 溶液^{*2})

分析例

LC/MS/MS による分析 (ポジティブモード/MRM)



〈成分一覧 (6種)
(各 20 µg/mL)〉

Peak No.	成分名
1	Carbendazim
2	Thiabendazole
3	Flubendazole
4	Parbendazole
5	Chlorantraniliprole
6	Buquinolate

分析条件は左記と同じ

*2 長期安定性及び溶解性を考慮して、製品は N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) に溶解しています。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 162-27653	Pesticide Mixture Standard Solution PL-LMII (1) (LC/MS) (each 20µg/mL Acetonitrile Solution) 国Ⅱ 国 F°	残留農薬試験用	1mL ×5A	25,000
NEW 166-27651	Pesticide Mixture Standard Solution PL-LMII (1) (LC/MS) (each 20µg/mL Acetonitrile Solution) 国Ⅱ 国 F°	残留農薬試験用	1mL ×5A	60,000
NEW 164-28213	Pesticide Mixture Standard Solution PL-LMII (2) (LC/MS) (each 20µg/mL DMF Solution) 国Ⅱ 国 F°	残留農薬試験用	1mL ×5A	12,000
NEW 168-28211	Pesticide Mixture Standard Solution PL-LMII (2) (LC/MS) (each 20µg/mL DMF Solution) 国Ⅱ 国 F°	残留農薬試験用	1mL ×5A	22,000

*製品の詳細情報はパンフレット及び当社 HP をご参照下さい。

関連商品

「LC/MS による農薬等の一斉試験法 II (畜水産物)」では試料の精製過程でゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) によるクリーンアップ工程があります。上記試験法に対応した GPC クリーンアップ用カラムです。

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
635-41451	F6090006	Shodex CLNpak EV2000AC-12F (12.0mmI.D.×300mm) [粒径 16µm, ポアサイズ 30Å]	1 pcs	300,000
632-41461	F6090007	Shodex CLNpak EV-G AC-12C (12.0mmI.D.×100mm) [粒径 16µm, ガードカラム]	1 pcs	120,000

メーカー: 昭和電工 (株)

各種標準液・試料の保管に

Wako

高気密保存びん

本品は、高気密性を維持するオリジナルデザインの試料保存用のびんです。揮発性溶媒、農薬、ダイオキシン類などの各種標準液や試料を保存するのに最適です。

特長

- コンタミの心配が少ない、外ネジタイプのキャップを採用

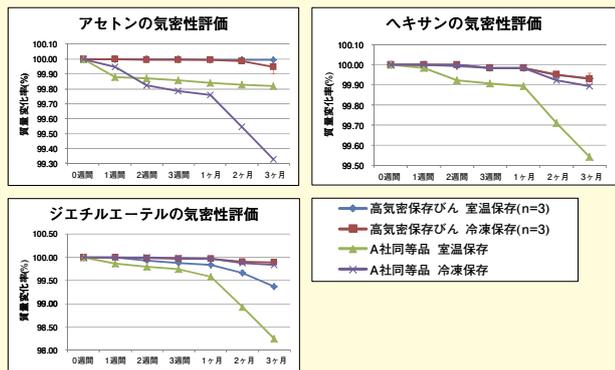


[次頁に続く]

- キャップ上部の採取口からマイクロシリンジで直接サンプルを採取可能
- 1mL、2mL、5mL、10mL の4サイズをラインアップ

データ

気密性試験



高気密保存びん (10mL)、A社同等品 (10mL) に、アセトン 10mL、ヘキサン 10mL、ジエチルエーテル 10mL をそれぞれ入れ、密栓後、室温放置及び冷凍 (-20℃) 保存した。密栓から1週間～3ヶ月目でそれぞれ質量を測定した。

3か月で99%以上の気密性を保つことを示した。(-20℃保管時)

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
296-35691	High-sealed Storage Bottle, Brown, 1mL	1本	12,800
296-35711	High-sealed Storage Bottle, Brown, 2mL	1本	12,800
293-35721	High-sealed Storage Bottle, Brown, 5mL	1本	照会
290-35731	High-sealed Storage Bottle, Brown, 10mL	1本	照会
291-34781	High-sealed Storage Bottle O-ring	2個	4,400

関連商品

破損防止高気密保存びん

本品は、バイアル外部をテフロン製ホルダーで保護した高気密保存びんです。万が一落下した際の破損のリスクを低減します。

- V底バイアルを使用
- ホルダーのスリットから残液量の確認が可能
- 簡単な構造で高気密性を保つことが可能



コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
633-41371	HB0005	High-sealed Storage Bottle, with Protector, Brown, 0.5mL	1本	8,500
630-41381	HB0010	High-sealed Storage Bottle, with Protector, Brown, 1mL	1本	8,500
637-41391	HB0020	High-sealed Storage Bottle, with Protector, Brown, 2mL	1本	8,500
630-41401	HB0050	High-sealed Storage Bottle, with Protector, Brown, 5mL	1本	8,500
637-41411	HB0100	High-sealed Storage Bottle, with Protector, Brown, 10mL	1本	8,500

メーカー：(有) ラブディポット

医薬品製造用原料(日本薬局方、局外規、薬添規、その他)

Wako

CertiPro シリーズ

本品は、医薬品の製造工程に使用可能な製造用原料として、原薬 GMP ガイドラインに基づき生産しています。品質リスクアセスメントに対応し適切にレギュレーション管理された原料です。また、残留溶媒に関する報告書及び各種文書の提供に対応しています (一部有償)。

特長

- GMP 管理を実施
- エントキシシ試験を実施
- USP、Ph.Eur. の最新版管理を実施
- ご要望により微生物限度試験を実施可能 (有償)

コードNo.	品名	規格	規格適合		エンドキシシ試験	容量
			USP	Ph.Eur.		
032-25245	クエン酸水和物 「製造専用」*	日本薬局方	○	○	8EU/g 未満	500g 10kg
038-25247	クエン酸水和物 「製造専用」*	医	○	○	8EU/g 未満	500g 10kg
049-34345	乾燥炭酸ナトリウム 「製造専用」	日本薬局方	—	—	10EU/g 未満	500g
198-18385	精製白糖 「製造専用」	日本薬局方	○	○	10EU/g 未満	500g 10kg
194-18387	精製白糖 「製造専用」	医	○	○	10EU/g 未満	500g 10kg
197-18475	炭酸水素ナトリウム 「製造専用」*	日本薬局方	—	○	10EU/g 未満	500g 10kg
193-18477	炭酸水素ナトリウム 「製造専用」*	医	—	○	10EU/g 未満	500g 10kg
204-20585	トロメタモール 「製造専用」	局外規	○	○	0.03IU/mg 未満	500g 10kg
200-20587	トロメタモール 「製造専用」	医	○	○	0.03IU/mg 未満	500g 10kg
121-06685	乳糖水和物 「製造専用」	日本薬局方	—	—	25EU/g 未満	500g 5kg
129-06681	乳糖水和物 「製造専用」	医	—	—	25EU/g 未満	500g 5kg
047-34385	リン酸水素ナトリウム水和物 「製造専用」	日本薬局方	○	○	0.2EU/g 未満	500g 10kg
043-34387	リン酸水素ナトリウム水和物 「製造専用」	医	○	○	0.2EU/g 未満	500g 10kg
191-18495	リン酸二水素ナトリウム	薬添規	○	○	2.0EU/g 未満	500g 10kg
197-18497	リン酸二水素ナトリウム	医	○	○	2.0EU/g 未満	500g 10kg

価格及びバルク見積り、その他の品目につきましては、当社営業員または代理店にお問合せ下さい。

※USP、Ph.Eur. の注射用、透析用、輸血用の規格項目については適用除外となっています。ご要望によりオプション試験を承ります (有償)。

関連商品

本品は、GMP 管理のもと製造しており、医薬品製造に使用できる商品です。



コードNo.	品名	メーカーコード	容量
323-00085	エタノール「製造専用」	日本薬局方	500mL
329-00087	エタノール「製造専用」	医	18L
320-00095	消毒用エタノール「製造専用」	日本薬局方	500mL
326-00097	消毒用エタノール「製造専用」	医	18L
326-00075	無水エタノール「製造専用」	日本薬局方	500mL
322-00077	無水エタノール「製造専用」	医	18L

製造業者：株式会社ワコーケミカル、販売業者：和光純薬工業株式会社

医…医薬品：ご購入には、製造専用の医薬品販売時の確認書が必要です。

不安定化合物の溶液タイプ

Wako

アルキルホスフィン溶液

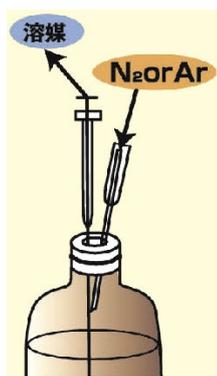
アルキルホスフィン配位子は、さまざまな金属と錯体を形成し、カップリング反応に利用されます。一方で、その物性は空気中の酸素と反応し活性に大きな影響を与えることが知られており、秤量中の短い時間で失活するため、不活性ガス雰囲気下（グローブボックス内など）で秤量を行う必要があります。

当社では、このような不便さを解消する溶液タイプを販売しています。各容量ともシリンジ針で抜き取ることができるため、空気中の酸素と触れることなく使用することができます。また、少量サイズのため、開封後長期保管を避けたい場合など、1回使い切りタイプとして便利にお使い頂けます。

特長

- 使い切りに便利な少量サイズ
- 有機溶媒で希釈しているため秤量時の酸化による失活や発火の危険性が軽減
- シリンジ針刺込用ゴム付キャップ（シリンジ針を刺し込める特殊キャップを使用）

試薬抜き取り方法



図のように N₂ または Ar ガスを吹き込みながら、シリンジにて試薬を抜き取って下さい。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
041-34361	10% Di- <i>t</i> -butylphosphine Hexane Solution	有機合成用	50mL	49,000
208-20441	1mol/L Tri- <i>t</i> -butylphosphine Hexane Solution	有機合成用	50mL	49,000
205-20451	1mol/L Tri- <i>n</i> -butylphosphine Toluene Solution	有機合成用	50mL	17,000
206-20481	3mol/L Trimethylphosphine Tetrahydrofuran Solution	有機合成用	50mL	30,000

両親媒性ポリマー担持触媒

Wako

ARP 白金 (ARP : Amphiphilic Resin Particles)

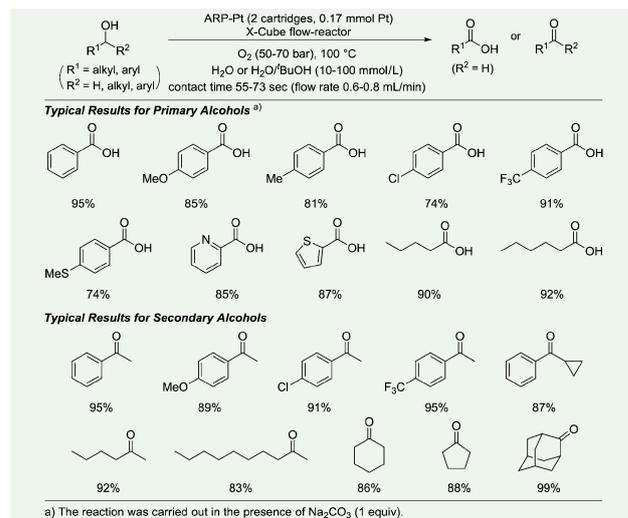
本品は、Polystyren-polyethylene glycol (PS-PEG) に塩化白金を担持した不均一系触媒です。水系溶媒中でアルコールの酸化反応を促進します。また、ポリマー担持型触媒のため、反応後の回収が容易で、繰り返しの使用が可能です。

特長

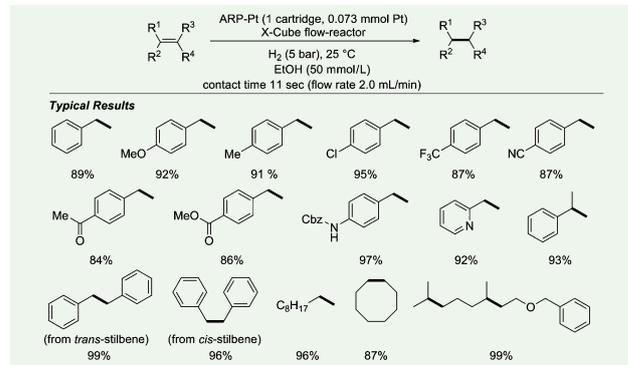
- 一つの触媒で酸素酸化、水素還元の両方の反応が可能
- ポリマー担持型の触媒のため、フロー合成への利用が可能
- 反応後の回収、再利用が可能

フロー合成装置 X-Cube を利用した反応例

酸素酸化反応



水素還元反応



(データご提供：自然科学研究機構 分子科学研究所 生命・錯体分子科学研究領域 魚住泰広先生、大迫隆男先生)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
019-24991	ARP Platinum	有機合成用	250mg	12,000
015-24993	ARP Platinum	有機合成用	1g	36,000

Ⓔ…2 ~ 10°C保存 Ⓕ…-20°C保存 Ⓖ…-80°C保存 Ⓗ…-150°C保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2018年1月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

東京大学 大学院医学系研究科 分子生物学分野 守田 啓悟

2017年11月16日、都内にある全電通ホールにて第33回 Wako ワークショップ『オートファジーの解析法と最新の話』が開催された。昨年大隅良典氏のノーベル賞受賞に沸いたオートファジーについて学ぼうと、高き天を仰ぎながら多数の聴衆が詰めかけ、会場は夏の再訪かと思われるような熱気に包まれた。

オートファジーとはユビキチン・プロテアソーム系と並ぶ細胞内分解系である。厳密に定義すれば、消化酵素の詰まった細胞内小器官であるリソソームに細胞質の基質を輸送するシステムということになる。その種類については複数提唱されているが、最もよく研究されているのがマクロオートファジーである（以下、オートファジー）。オートファジーが誘導されると、二重膜の断片が伸長し、球形になりその口を閉じる。口を閉じたものがオートファゴソームである。オートファゴソームはリソソームと融合し、リソソーム内の酵素が基質を分解する。その現象自体は1960年代頃より知られていたが、詳細の解明は1990年代の大隅氏らの成果を待たなければならなかった。大隅氏は酵母でオートファジーが起こることを確認した上で多数のオートファジー関連因子を同定し、爆発的な分野の発展の礎を築いた。現在では分子機構のみならず、その生理的意義についても詳細な解明が試みられている。飢餓適応や細胞内品質管

理、さらにはがんとの関連まで指摘されている。

総合企画を務める東京大学 大学院医学系研究科 分子生物学分野 水島昇氏の挨拶・講演で幕を開けた。氏は大隅氏のグループに参加して以来、オートファジー研究の分野を牽引し続けている。分子機構はもとより、生理機能の研究にも大きな貢献を果たしてきた。さて、オートファジー研究において最も重要な手法は何であろうか。様々あるだろうが、「オートファジー活性の測定」がその一つであることに異を唱えることは易くないだろう。しかし、特に哺乳類においては、オートファジー活性を測定することは困難を極める。水島氏の挨拶においてもまずはその困難さが指摘された。講演においても従来の測定法の弱点とその超克に向けた取り組みが紹介された。まず、従来から頻繁に使われている手法ですら安易な使用が誤謬を生む可能性を指摘して注意を喚起した。氏は、オートファジーがフラックスの計測を必要とする過程であることに言及し、その正確な測定のためには積算値を測定することで頑強性を獲得する必要があると説いた。氏らのグループが開発した GFP-LC3-RFP-LC3ΔG プローブはその解決の可能性を大いに秘めている。RFP を内部標準とし GFP シグナルの減少でオートファジー活性を測定するため積算値を計測できる上、動物個体でも応用可能である。後半では、オートファジー関連因子のノックアウトマウスにおける表現型の差異について紹介した。その差異を説明しうる知見と

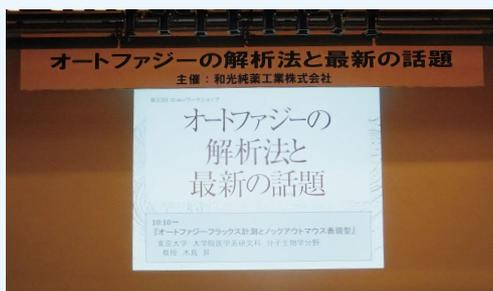
して、新規のオートファゴソームマーカーとリソソームマーカーを用いた氏らのグループによる最新の研究成果を紹介した。

続いて、福島県立医科大学医学部解剖・組織学講座の和栗聡氏より『オートファジーの形態学：電顕と免疫組織』と題した講演を頂いた。氏は電子顕微鏡解析を中心にオートファジーの形態学解析を精力的に進めている。電子顕微鏡は微細構造の観察に非常に適しているが致命的な難点がある。それは、切片作製時に3次元情報の殆どを捨象していることだ。しかし、オートファジー研究では構造体の経時の変化と、他のメンブレントラフィックとの合流を捉える必要があり、3次元情報を包括的に捉える必要がある。そこで、近年発達した様々な手法のうち、特に電子線トモグラフィ法を氏は活用している。電子線トモグラフィ法は、通常よりやや厚めの試料を回転させながら観察し、3次元立体構築を行う手法である。氏はこの手法を用いて小胞体と隔離膜が細い小管でつながっていることを明らかにした。続いて、超解像法・免疫電顕・CLEM 法など、微細構造を観察する種々の手法を紹介し、氏が実際に行っている工夫を述べた。最後に、近年取り組んでいる免疫組織法について、ヒト組織における解析の困難さも交えて紹介した。

昼食休憩をはさんだのち、大阪大学大学院医学系研究科 遺伝学教室の濱崎万穂氏より『ゼノファジーとリソファジー』についての講演を頂いた。昼食後の幾分気だるくなりがちな空気



総合企画の水島 昇先生



会場風景



Wako ワークショップ 見聞録

を一掃するような「ノーベル賞授賞式レポート」も交え、オートファジー研究史における形態学の役割について触れたのち、本題に移った。ゼノファジーは外来の細菌がオートファジーによって分解される現象である。氏らのグループがゼノファジーを捉えた印象的な蛍光顕微鏡画像が数多く披露された。リソファジーは損傷を受けたリソソームがオートファジーによって除去される現象である。エンドソーム・リソソームはさまざまな刺激によって傷害されうえることは既に多数の報告があり、リソファジーが生理的にも重要な現象であることは論を俟たない。糖尿病や高脂血症などの疾患とリソソーム損傷の関連を示唆する報告もあり、オートファジーが生活習慣病に予防的に機能する可能性についても言及した。また、その分子メカニズムについて、未発表データを多数含めた最新の知見を紹介し、聴衆の知的好奇心を満たした。

続いて、『マイトファジーの誘導・検出と病態生理的意義』という題で東京都医学総合研究所 ユビキチンプロジェクトの松田憲之氏から講演を頂いた。マイトファジーは、ミトコンドリアを基質とするオートファジーである。2008年から2009年にかけてなされたR. Youle氏や岡本氏・神吉氏らによる分子機構に関する報告を皮切りに、マイトファジー研究は盛り上がりを見せた。さて、マイトファジーはどのように検出すればよいのだろうか。氏はまず、Mt-KeimaやMt-QCについて詳細に紹介した。KeimaはpH依存的に励起スペクトルが変化する蛍光タンパク質である。Keimaをミトコンドリアに局在させておくと、ミトコンドリアが細胞質（中性）からリソソーム（酸性）に移行したこと（＝オートファジー分解を受けたこと）を励起スペクトルの変化として捉えることができる。Mt-QCはより簡便な手法である。他に、免疫染色やウェスタ



和栗 聡 先生



濱崎 万穂 先生



松田 憲之 先生



山本 林 先生



片山 博幸 先生



小松 雅明 先生

ンプロットを用いる手法も以前から行われてきた。簡便ではあるが、マーカーの選択に注意を要する点や、シグナルの減少を以て評価するため、感度が高くはないことが難点である。最後に、マイトファジーの誘導条件については責任分子について紹介しながら各手法の利点・欠点を整理した。

その後、東京大学 大学院医学系研究科 分子生物学分野の山本林氏による『酵母オートファジーアッセイと初期因子の機能』についての講演が続いた。哺乳類のリソソームは酵母では液胞とよばれる細胞内小器官に当たり、リソソームと比較すると非常に大きい。そのため、液胞と融合した後のオートファゴソーム（オートファジックボディ）の観察が容易に行える。実は、大隅氏らが酵母オートファジーを発見しオートファジー関連因子を同定した際にもこの性質を利用していた。山本氏は大隅氏の足跡を訪ね、聴衆を魅了した。さて、水島氏の講演では哺乳類オートファジーフラックス測定の困難さが強調されたが、酵母では古く

から高感度かつ正確な測定がされてきた。その例として酵母 ALP assay や GFP-Atg8 processing assay と呼ばれる手法を紹介した。さらに、氏はオートファジーが多数の過程を経て実行されることに言及し、素過程の評価の重要性も説いた。素過程についても酵母では評価法が様々に確立しており、オートファジー関連因子の階層性やリン酸化状態を利用した解析について紹介した。後半では、氏らの最近の成果を紹介し、最新の構造生物学や生化学を駆使してオートファジー初期因子の機能と高次集積のメカニズムについて明らかにした過程を鮮やかに追った。

休憩をはさみ、『オートファジー解析用の特殊蛍光プローブ』と題し、理化学研究所 脳科学総合研究センターの片山博幸氏より長所・短所・使用の際の注意点について紹介を頂いた。EGFP-LC3は広く用いられているプローブであるが、オートファジーフラックスの測定は困難である上、マクロオートファジーしか検出できないことなどの難点があった。氏は、簡便か

つ高感度にオートファジーフラックスを測定できるプローブの開発を目指した。オートファジーは細胞質からリソソームへと基質を輸送するシステムである。細胞質からリソソームへと輸送されたときに最も劇的に変わるのが周辺の pH である。この pH の変化と蛍光タンパク質の物性を利用したプローブを多種考案し、改良を重ねてきた。まずは Keima を利用したプローブである。松田氏も紹介したように、Keima は pH 依存的に励起波長の遷移が起こる。この特徴を利用して、マクロオートファジーとミトファジーの検出に成功した。さらに、クラゲ由来の蛍光タンパク質はリソソーム内で急速に分解されるのに対し、サンゴ由来の蛍光タンパク質はリソソーム内で安定であることに着目した。GFP (クラゲ由来) と RFP (サンゴ由来) を用いた方法は既に実例があるが、氏は更なる工夫を加え高い感度を実現しており、その性能で聴衆を唖らせた。

本日の最後を飾ったのは『オートファジーとがん代謝解析：メタボローム解析からわかったこと』と題した新潟大学 大学院医歯学総合研究科 遺

伝子制御講座 分子生物学分野の小松雅明氏の講演である。オートファジーとがんは諸刃の剣である。というのも、細胞の品質管理という点においては腫瘍抑制効果をもつ一方、飢餓応答によってがん細胞の高い代謝要求性を満たすという点においては腫瘍促進効果を持つためだ。がんとオートファジーの架け橋となる分子の一つが p62 である。p62 とはどのような分子なのだろうか。オートファジーは非選択的分解のみならず、選択的分解も担うが、その標的となる分子の代表格が p62 だ。p62 はミスフォールドタンパク質などをオートファジー分解へと誘うアダプターであると同時に、それ自体も分解を受ける。オートファジー異常によって p62 が蓄積すると Cullin3 型ユビキチンリガーゼのアダプタータンパク質 Keap1 と転写因子 Nrf2 との相互作用を p62 が競合阻害し、Nrf2 が活性化される。氏らのグループではメタボローム解析を通してオートファジー欠損マウス肝臓やヒト肝細胞がんにおけるリン酸化 p62 による Nrf2 の恒常的活性化が、グルコースから UDP-グルクロン酸を合成する反応と



展示風景

グルタミンからグルタチオンを合成する反応を促進することを明らかにした。最後に、メタボローム解析における目的に合わせた計測系選択の重要性や、計測系・前処理法の検討とデータ解析／解釈に必要な慎重さについて言及した後、マイクロアレイとメタボロミクスを組み合わせたアッセイを始めとした最新の解析手法について紹介した。

小松氏の講演が終わると、水島氏の総括を以てワークショップは終了した。心なしか日の落ちが早く感じられた。講演者の先生方はもとより、和光スタッフの皆様のご尽力により非常に充実した一日となった。「見聞録」執筆の機会まで頂いたことへの感謝の念を嘸みしめながら、筆を擱くことにする。

第 33 回 Wako ワークショップ 「オートファジーの解析法と最新の話」

日 時：平成 29 年 11 月 16 日 (木)
 会 場：全電通ホール (御茶ノ水) <http://www.zhall.or.jp/> 〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台 3 丁目 6
 総合企画：水島 昇先生 (東京大学 大学院医学系研究科) 主 催：和光純薬工業株式会社

〈講演プログラム〉

10:00	開会挨拶	和光純薬工業株式会社
10:10	「オートファジーフラックス計測とノックアウトマウス表現型」	
		東京大学 大学院医学系研究科 分子生物学分野 教授 水島 昇
11:05	「オートファジーの形態学：電顕と免疫組織」	福島県立医科大学 医学部 解剖・組織学講座 教授 和栗 聡
12:00	休 憩	
13:00	「ゼノファジーとリソファジー」	大阪大学 大学院医学系研究科 遺伝学教室 准教授 濱崎 万穂
13:40	「ミトファジーの誘導・検出と病態生理的意義」	東京都医学総合研究所 ユビキチンプロジェクト 松田 憲之
14:20	「酵母オートファジーアッセイと初期因子の機能」	東京大学 大学院医学系研究科 分子生物学分野 講師 山本 林
15:00	コーヒーブレイク	
15:20	「オートファジー解析用の特殊蛍光プローブ」	理化学研究所 脳科学総合研究センター 片山 博幸
16:00	「オートファジーとがん代謝解析：メタボローム解析からわかったこと」	新潟大学 大学院医歯学総合研究科 遺伝子制御講座 分子生物学分野 教授 小松 雅明
16:50	閉会挨拶	和光純薬工業株式会社

櫻田 一郎 (1904. 1. 1 ~ 1986. 6. 23)

京都大学名誉教授 梶 慶輔

1. はじめに

櫻田一郎先生(写真1)は一般には合成繊維ビニロンの発明者として有名であるが、学問的には「日本の高分子化学の父」(The Father of Japanese Polymer Chemistry)あるいは「日本の高分子科学の父」(The Father of Polymer Science in Japan)として知られている。しかし、余り知られていないのは、先生が大学入学後ザメンホフのエスペラント主義(人類主義)に傾倒されていたことであろう。先生の訳されたザメンホフの著書「夜の空の星の如く」(写真2)によると、人類主義とは「人をしてその自然の祖国、その国語、その宗教徒から切り離すことなく・・・あらゆる国語、宗教に属する人々と中立的な人間の基礎、相互の友愛、平等、正義の原則の上に立って交通することを得せしめる教え」で、人類の共通言語・エスペラント語を通じて実践することである。この考え方は、先生の生涯の行動規範を理解する上で重要と思われる。



写真1. 櫻田一郎先生(日本化学会会長、1968年)



写真2. 櫻田先生の翻訳本「夜の空の星の如く」(カニヤ書店、京都、1924)。国際的相互理解と平和を押し進めるため国際語としてエスペラント(Esperanto)語を創案したザメンホフ(Ludwik Lejzer Zamenhof, 1859-1917)の演説集

2. 生い立ち

櫻田一郎先生は明治37年1月1日に父文吾(1863-1922)、母まさの長男として京都でお生まれになった。「一郎」の名前は続いて何人かの男子の誕生を期待しての命名であったが、2才年上の姉との二人姉弟のままであった。先生のお話ではご自身の誕生日は両親から何も聞いていないので戸籍の記載を信じる他ないが、ご子息の櫻田洋(京都大学工学博士。株式会社クラレ研究開発本部長、ヘネモティクス・ジャパン代表取締役、米国シーラス社顧問などを歴任)の誕生日は1月1日であることは私が確認していると言っておられた。父上は仙台、母上は弘前のご出身で本籍は仙台市である。父文吾は東京法学院(現・中央大学)卒業後、新聞記者(日本新聞社)として活躍された。先生のお生まれになる2年

前に東京から京都に引っ越して来られ、京華社(広告会社)や京都通信社を設立、また京都市の市議員も勤められた。お住まいは京都御所南の堺町御門の近くで、子供の頃は上隣の指物屋の桐箱(掛軸用)造りをいつも眺めていたという。尋常小学校は近くの富有校(現・御所南小学校)に通われた。その後京都府立第一中学校、大正9年(1920)第三高等学校(理科甲)

へと進まれた。卒業後は東京帝国大学に進学する積りでおられたが、卒業の三ヶ月前にお父上が突然脳溢血で亡くなられ断念された。

京都帝国大学進学に当たって化学を選ばれたのは中学時代から興味を持っておられたからであるが、又従兄弟の木村健次郎(東京大学名誉教授、専門は核化学)の影響もあった。木村先生は櫻田先生より8才年上で前年に東京帝国大学理学部化学科の助教授に就任されていた。横浜に住んでおられ時々会われる機会があり、一緒に街を散歩しながら大学ではどの分野に進むのがよいかを尋ねた。木村先生は「化学は幅の広い学問です。化学を選んでも、数学が好きならより数学的なことを、また本来の化学が好きなら化学をやればよいわけです」と助言された。櫻田先生は「まさに健次郎さんの言われる通りであった」と述懐されている。

3. 研究生生活のはじまり

大正12年(1923)京都帝国大学工学部工業化学科入学後、迷わず喜多源逸教授(写真3)の研究室を選ばれた。そのきっかけは工業化学教室の懇親を目的とした研究集会「工化会」での喜多先生の酢酸繊維素(アセトセルロース)に関する話しであった。よく準備された多数のビラを使い、トツトツと、しかし熱を持って話され、研究の面白さにはじめて触れることが出来たからである。三回生での卒業研究は親友・中島正(後に神戸大学教授、1954年交通事故で急死)と共にセルロースの高級脂肪酸エステル合成を行った。この論文は日本の学術誌「繊維素工業」(1925年)に発表された。後に櫻田先生がドイツに留学されたとき、カイザー・ヴィルヘルム生物化学研究所のコロキウムで、ある研究者が植物の細胞内でこのような化学反応が起こり得る証拠として先生の論文を引用したことに驚くとともに学問の幅の広さと国際性を認識された。



写真3. 喜多源逸教授(左)と助教時代の櫻田先生(右)

4. ドイツ留学と高分子説論争

(1) ドイツ留学 大正15年(1926)に京都帝国大学卒業後、直ちに理化学研究所研究生として喜多研究室に入られた。喜多先生が京都帝国大学の工業化学科を新設したとき(1922年)、理研所長の大河内正敏が教室全体を理研の研究室にしていたからである。研究テーマはセルロースの化学反応であった。喜多先生の教育方針は工業化学科であっても純粋化学さらには物理学の知識の習得が重要とした。

櫻田先生は2年後の昭和3年(1928)に理研研究生としてドイツに留学されたが、留学先はベルリン・ダーレム地区のカイザー・ヴィルヘルム化学研究所(Kaiser Wilhelm-Institut [KWI] für Chemie)のヘッス教授(Kurt Heß)(写真4左)の研究室であった。ヘッスは核酸化学の研究で有名なEmil Fischer(1902年ノーベル化学賞受賞)の門下である。しかし、ヘッス先生にお会いすると、今は席(プラッツ)が塞がっているので半年程他の研究室に行ってもらえないかと言われ、ライプチヒ(Leipzig)のヴォルフガンク・オストワルド(Wolfgang Ostwald, 1883-1943)(写真4右)の研究室を紹介された。彼の父ヴィルヘルム・オストワルド(Wilhelm Ostwald)はラトビアのリガ工科大学教授からライプチヒ大学教授となり、「物理化学」の確立に貢献、1909年にノーベル化学賞を受賞した。息子のオストワルドは「分散系の理論」を提出、コロイド化

学の創立者となった。(因にコロイドとは直径が1~500nmの微粒子が分散した系を言う。高分子は分子サイズが大きいため分子自体がコロイド粒子であり、分子コロイドと呼ばれる。)彼は1923年にライプチヒ大学助教授、1935年にコロイド化学の専任正教授に就任しているため櫻田先生が留学された当時は助教時代である。櫻田先生のここでの研究は、「酢酸セルロース粉末の有機液体中における膨潤溶解性に関するもの」で、今日「溶解度パラメーター(δ)」(溶媒と溶質の δ が近いほど互いに溶け易い)として知られる指標の先駆けである。そして僅か半年間で論文を*Kolloid-Zeitschrift*誌に4報も発表された。先生は物理学にも興味をもっておられ、ライプチヒに滞在中物理化学教室のデバイ(P. Debye)や理論物理学教室のハイゼンベルグ(W. Heisenberg)の公開講義に出席され、非常に興奮を覚えたことを述懐されている。



写真4. 左:カイザー・ヴィルヘルム化学研究所ヘッス教授(1950年代末、満70才頃)、右:ライプチヒ大学ヴォルフガンク・オストワルド教授

(2) 高分子説論争 櫻田先生は半年後の1929年初夏に、予定通りライプチヒからベルリンのカイザー・ヴィルヘルム化学研究所(有機化学部門)のヘッス教授の研究室に移られた。ヘッスの研究室は3階にあり、階下には原子核反応で有名なハーン(O. Hahn)とマイトナー(L. Meitner)の研究室があった。

当時、欧州の学会では「物質はすべて

低分子からなる」という低分子説と「低分子からなる物質と巨大分子(高分子)からなる物質がある」とする高分子説との間で大論争が巻き起こっていた。20世紀初頭の一般的な概念では「物質はすべて低分子から成り、それらが分子間力(二次結合)により結合したもの」とされていた。しかし、分子量の測定法が進歩しセルロース、デンプン誘導体、ゴムなどの分子量は非常に大きいことが示唆された。特にドイツの化学者シュタウディンガー(Hermann Staudinger, 1875-1961)は1920年に「重合について(Über Polymerisation)」と題した論文でこれらの物質が低分子の会合体ではなく共有結合(一次結合)によって線状に結合した巨大分子(高分子)であることを主張した。これが「高分子説論争」の開始である。この高分子説に対し真っ向から反対したのは、ベルリン・ダーレム地区のカイザー・ヴィルヘルム研究所の研究者達であった。特に、繊維化学研究所(KWI für Faserstoffchemie)のヘルツォーグ(R. O. Herzog)および化学研究所のヘッスらのグループはその旗頭であった。ヘルツォーグ・グループのポラニー(M. Polanyi)は1921年にセルロースの結晶構造をX線回折図から決定し、「セルロース結晶は無水グルコースが縦一列に無限に繋がった一本の真直ぐな巨大分子であるか、無水グルコースが2個繋がった分子の集合体であるかのどちらかである。」と結論した。しかし、ヘルツォーグは後者の結果を採用し低分子説を支持する証拠としてしばしば用いた。ヘッスは有機化学者の立場からセルロースは5個の無水グルコースからなる環状分子の凝集体と考えていた。

櫻田先生が留学された1929年は、このような高分子説論争が続いており、ヘッス教授の下で低分子説を支持することになった。ヘッス教授は「結晶は低分子からなる」という当時の通

説に従い、もしセルロースの単結晶が出来れば低分子説の証拠になると考え櫻田先生にその作製という難しいテーマを与えられた。(仮に結晶が出来たとしてもそれは低分子説の証拠にはならない。高分子であっても長い分子鎖が結晶表面で折り畳まれて結晶化するからである。)途中でヘッス教授もその難解さを理解され、テーマをシュタオディンガーが分子量測定の根拠としていた粘度式の検証に変更された。この実験には理論物理学者アイゼンシッツ (R. Eisenschitz) も協力した。櫻田先生は1931年の春に帰国されたが、帰国後も低分子説の立場から粘度についてシュタオディンガーと論争された。しかし、最終的に(1935年頃)高分子説の正しさを理解され、戦時中(1940年)に高分子溶液に対する粘度の一般式を提出された。すなわち、濃度をゼロ外挿したときの極限粘度 $[\eta]$ と分子量 M の間に $[\eta] = KM^a$ (K : 比例定数、 a : 溶液中の分子鎖形態を表す指数)なる関係が成り立ち粘度測定から分子量が求まる。この式はMark-Houwink-Sakurada式と呼ばれているが、櫻田先生の寄与の大きさから本来Sakurada-Houwink-Mark式と呼ぶべきものである(文献5参照)。さらにその後(1946年)、異種モノマーを混合重合し共重合体を生成するときの反応理論式Mayo-Lewis-Sakurada式を提出している。

櫻田先生は、この頃から新しい学問である高分子化学の普及にも力を注がれ、戦後教科書「高分子化学概論」(高分子化学協会、1948)を執筆されている。

5. X線回折法による研究

櫻田先生は帰国の3ヶ月前に喜多先生からX線法を修得して帰るように指示された。そのため勤務時間後、研究室の助教授格のトログス (Carl Trogus) から手ほどきを受けた。昭和6年(1931)4月に京都帝国大学内

の理研喜多研究室に帰任した時には、喜多先生の計らいでX線実験の環境が整っていた。櫻田先生のX線図的研究はセルロース繊維はじめ種々の食料品に及んだ。前者では水-セルロース結晶変態の発見をもたらし、後者では多糖類に非晶(α 型)と結晶(β 型)の2状態があるというオランダの研究者の発見を我国の食品でも確認した。例えば、生米は結晶性(β -でんぷん)で消化し難いが、炊いてご飯にすると非晶性(α -でんぷん)になり消化しやすくなる。この研究では新婚早々の奥様が種々の食料品(こんにゃく・かんぴょう・昆布・寒天・カニ・イカ等々)を市場に買いに行かされたそうである。櫻田先生が亡くなられたとき、筆者がこれらのX線図をまとめたアルバムをお返しに上がったとき奥様は大変懐かしがっておられた。その後(1958年以降)の重要なX線研究としては高分子の結晶弾性率測定がある。繊維産業では繊維の機械的性質、特に繊維の弾性率や強度が重要であるが、それらの到達し得る最高値は結晶弾性率(強度はその約10分の1)になる。多くの高分子について測定し結晶中の分子鎖形態と結晶弾性率との関係を明らかにされた。

6. ビニロンの発明

櫻田先生は帰国直後(1931年3月)に「繊維素誘導体に関する研究」論文で工学博士の学位を取得され、5月に奥様(千代子、明治42.6.25生、京都府立第一女学校卒)とご結婚、1934年には助教授(写真3)、1935年には弱冠31才で教授に就任された。さて、1938年に米国デュポン社が発表したナイロン繊維は、絹糸の代替品であり我国の繊維特に絹糸(生糸)産業に衝撃をもたらした。絹糸は軍需用品(落下傘の紐)でもあった。このような状況のなか喜多先生は我国独自の合成繊維開発の要望に答えるための研究グループを組織した。櫻田先生のグルー

プはビニル系合成繊維の研究を行うことになり、セルロースと同様分子中に多数の水酸基(OH)を有するポリビニルアルコール(PVA)を選ばれた。それは水素結合による分子間力で強い繊維が出来ると予想されたからである。しかし、作製してみると繊維が水に溶け易いという欠点があった。これを防ぐにはホルマリン処理が良いと考え開発されたのが「合成1号」である。この名前は櫻田先生が昭和14年(1939)に日本化学繊維研究所講演会で発表されたとき新聞記者の要望に答えて付けたものである。しかし、この繊維は耐熱水性が悪く汎用繊維としては使用出来ない。この欠点は紡糸後に繊維を乾燥熱処理し結晶化を高めることで解決された。これが「合成1号B」すなわち「ビニロン」の誕生である(1940年)。ただし、「ビニロン(vinylon)」という名は戦後(1948年)にポリビニルアルコール系合成繊維に対し関係者が付けた一般名である。残りの問題点は熱処理により繊維が褐色に着色することで、これは紡糸浴をアルカリ性からやや酸性にすることで解決された。1941年には官民一体となり(財)日本合成繊維研究協会が設立され、その支援のもとに「合成1号B」の工業化を目指し京都帝国大学の化学研究所(当時は高槻市)内に中間試験場が建設された(写真5)。その結果、短繊維の製品を得ることに成功

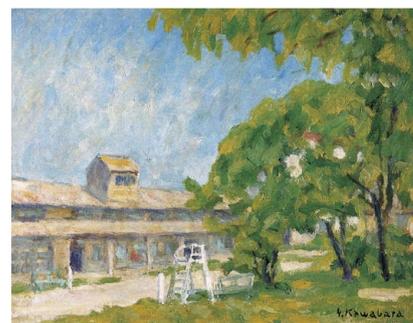


写真5. 合成繊維中間試験工場(高槻市の元京都帝国大学化学研究所キャンパス内、川端弥之助画伯筆)

し物性も予想通りであったが終戦の混乱のなか中断された。戦後中間試験場の運転が再開され工業化の目処がついたので1950年に中間試験場の人員は全員大日本紡績(現ユニチカ)に吸収され、同年兵庫東坂越工場で工業生産が開始された。他方、櫻田先生のドイツ留学時代からの親友で倉敷レイヨン(現クラレ)の友成九十九はかねてからビニロン繊維の工業化を目指しており、1948年に倉敷工場でプラント運転を始め、1950年に岡山工場で本格生産に入った。ビニロンは非常に強靱であることから現在でも広く使用されており、用途としては学生服・レインコート地・漁網・野球のベース袋・コンクリート補強繊維・外科用縫合糸など多数ある。なお、京都大学の化学研究所に保管されている中間試験のための計画書や実験室用の小型紡糸装置、ユニチカおよびクラレの工業化試験資料試作糸などが2012年に日本化学会の化学遺産「世界に誇る我国の化学関連の文化遺産」として認定された。

7. その他の研究、その後の経歴・栄誉など

高分子の分裂崩壊反応の研究(高分子鎖が分裂するときの切断位置と重量平均分子量の関係を示す理論式を誘導)、高分子の化学反応における隣接基による加速効果や高分子触媒(触媒作用をもつ高分子)の発見などがある。また、昭和32年に(財)日本放射線高分子研究協会(放高研)が設立され、その所長として長年高分子化学における放射線利用研究に従事された。特に、放射線グラフト研究では繊維の改質やポリエチレン発泡体の難燃化などが挙げられる。

その後の経歴や受賞・栄誉については右上表に示す。

8. ポパール会のこと

最後に櫻田先生が長年主宰を務められた「ポパール会」に言及しておきた

表. その後の経歴、受賞・栄誉

京都大学工学部長(1965-1967)、京都大学停年退官・同名誉教授(1967)、同志社大学工学部教授(1967-1974)、(財)日本放射線高分子研究協会(放高研)大阪研究所長(1957-1967)、日本原子力研究所大阪研究所長(放高研の移管)(1967-1976)。繊維学会会長(1952-1954)、高分子学会会長(1961-1968)、日本化学会会長(1968)。ドイツ・マインツ大学名誉理学博士。IUPAC高分子化学国際シンポジウム(東京・京都)組織委員長(1966)。谷口コンファレンス(東洋紡谷口財団基金による高分子国際会議)を数回主催(写真6は1975年)。
【受賞】工業化学会有効賞(1937)、毎日新聞第一回工業技術賞(1949)、日本化学会化学工業技術賞(1952)、繊維学会功績賞(1980)。
【栄誉】正五位(1944)、日本学士院賞(1955)、紫綬褒章(1956)、日本学士院会員(1967)、勲二等旭日重光章(1974)、文化勲章・文化功労者顕彰(1977)、京都市名誉市民(1983)、従三位勲一等瑞宝章受位受勲(1986)。



写真6. 高分子科学の指導的研究者の集まりによる国際会議(谷口コンファレンス、1975年)を主催。左から2人目:(左)シュトラースブル高分子研究センター Prof. H. Benoit、櫻田先生、(右)カミュ・ドレフュス研究所 Prof. A. Peterlin、一人おいて(独)マインツ大学 Prof. E.W. Fischer

い。この会は終戦後の昭和22年に創設され大学・研究所などの個人会員および多くの企業会員からなり、ポリビニルアルコール(PVA)はじめ高分子関係の研究を発表討論する場として長年続けられてきた。現在は櫻田先生の弟子である筏義人京都大学名誉教授が主宰を務めておられ、今年で150回を数えている。

9. おわりに

櫻田先生は学問には厳しい方であったが、学問を離れると非常に暖かいお人柄であった。出張先からは必ず奥様にお電話されるという愛妻家でもあった(写真7)。1986年6月23日に83歳で逝去(法名:玉雲院殿学峯一如大居士)され、今は京都大学正門近くの吉



写真7. 櫻田先生ご夫妻(京都センチュリーホテルにて筆者撮影)

田山の南側小高い丘の上に佇む真如堂で奥様と共に安らかに眠っておられる。

謝辞

本稿の執筆を勧めて頂いた京都大学名誉教授の筏義人先生ならびに赤木和夫先生に厚く御礼申し上げます。

【参考文献】

- 1) 桜田一郎 著:「高分子化学とともに」, C-24 (紀伊国屋新書)(1969).
- 2) 朝比奈貞一, 奥野久輝, 桜田一郎, 菅原健 共著:「化学の小径」, 続・科学随筆全集2 (学生社)(1969).
- 3) 桜田一郎 著:「化学の道草」(高分子刊行会)(1979).
- 4) 桜田一郎 著:「繊維・放射線・高分子」(高分子刊行会)(1961).
- 5) Kaji, K.: "Innovation of Concepts in Polymer Science in Japan: Ichiro Sakurada Special Issue", *Polymer Journal*, **44**, (1), 2 (2012).
- 6) Priesner, C., Staudinger, H., Mark, H. und Meyer, K. H.: "Thesen zur Größe und Struktur der Makromoleküle", Verlag Chemie, Weinheim (1980).
- 7) 古川安 著:「繊維化学から高分子化学へ: 桜田一郎と京都学派の展開」, *化学史研究*, **39**, 1 (2012).

