

# WAKO 和光純薬時報

和光純薬工業株式会社

## Mass Spectrometry 用銀染色キット Silver Stain MS Kit

電気泳動用

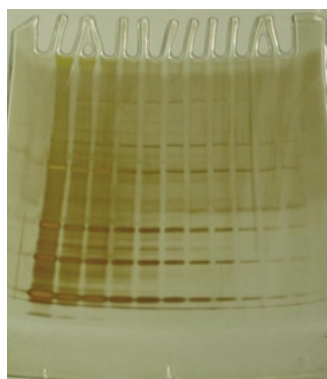
Shevchenko らの方法をもとに作られた質量分析 (Mass Spectrometry) 用の銀染色キットです。ゲル内消化の効率が良く、操作が簡便で高感度化されています。

### 特長

1. グルタルアルデヒドが含まれておらず、タンパク質のゲル内消化の効率が良い
2. 短時間 (約 70 分) で高感度 (1ng 以下) に染色できる

### 内容

1 増感原液	200ml × 1 本
2 染色原液	200ml × 1 本
3 現像原液	100ml × 1 本
4 現像粉末	20g × 1 本
5 停止液	200ml × 1 本
6 脱色液 A	50ml × 1 本
7 脱色液 B	50ml × 1 本



299-58901 20 枚用 19,000 円

詳しくは、p.13 をご参照下さい。

### 目次

化学大家 「吉田彦六郎」	芝 哲夫	.....2
総説 「細胞増殖因子ベータセルリン - 臍臓再生と糖尿病研究へのニューマテリアル - 」	妹尾 昌治	.....6
「プロテイング法の革命」	荒川 力	.....10
シリーズ < Talking of LAL > 「第 48 話 エンドトキシン試験法再考」	土谷 正和	.....18
< How to 組織イメージング > 「第 8 回 非上皮性腫瘍 (5) 横紋筋腫・横紋筋肉腫」	石川喜美男、石川 琢也、三瓶 接子、 宮 哲正、久川 芳三、牛込新一郎	...20
< 脳科学一口メモ > 「グリアにおける脳虚血ストレス抵抗性蛋白質の発現」	上原 孝、野村 靖幸	.....24
テクニカルレポート 「生体試料直接分析用充填剤の開発の試み その 3 HPLC 用生体成分前処理カラムの開発」	吉田貴三子	.....14
新製品フラッシュ 銀染色 MS キット		.....1,13
象牙質切片、ノルゾアンタミン塩酸塩、骨形成因子 BMP		.....5
ベータセルリン、AD-5467、TMP-153		.....9
20/20 GeneSystems, Inc. マルチ-レプリカプロテイングキット		.....12
プロテアソーム阻害剤		.....13
プレセップ®-C DNPH、ワコーバック® WS DNPH-、専用溶離液		.....15
HPLC 用アセトニトリル溶液、武田薬品工業株式会社生活環境カンパニー エストロン (E1) ELISA キット		.....16
日本ハム株式会社 FAST ELISA キットシリーズ		...17
SLP-HS シングル試薬セット		.....19
マツソントリクローム染色試薬		.....22
MMP <i>in situ</i> Zymo-Film、MMP-PT <i>in situ</i> Zymo-Film、ビープリックスカーレット染色液		...23
ノビレチン、タンゲレチン		.....25
GFP/BFP ベクター		.....26
amaxa 社新規遺伝子導入システム Nucleofector™		.....27
受託シークエンス		.....28
お知らせ 第 18 回 Wako ワークショップ開催のご案内		.....25

# 吉田彦六郎 (1859 .2.25 ~ 1929 .3.3)

大阪大学名誉教授 芝 哲夫

今から20年余り前に、米国の生化学者 Howard S. Mason 博士が来日した時に、世界で最初に酸化酵素を発見した日本人吉田彦六郎の事蹟について尋ね廻ったが、日本の生化学者でこの名を知る人が少なかったという話が残っている。

吉田彦六郎は明治10年代に日本の伝統的工芸の原料漆の化学的研究を行って、漆の硬化が空気による酵素酸化によることを解明して、その酸化酵素の正体をつきとめていたのである。東京大学理学部化学科が開設されて間もない日本の化学研究が始まったばかりの最も初期の時代に行われたこの研究は化学史に残る世界的レベルの仕事であった。

吉田彦六郎は安政6年1月23日(1859年2月25日)に備前福山西町の阿部藩家老吉田豊辰の4男として生まれた。明治4年(1871)に東京大学の前身の南校に入学し、開成学校を経て、同10年(1877)に、この年創立された東京大学の理学部化学科に入学した。ここで英国人教師アトキンソン R. W. Atkinson の教えを受けて、その指導の下に行った卒業論文は薄荷の成分メントールに関するもので、メントンが光学活性で右旋性であることを初めて見出し、それを還元してメントール、さらに脱水してメンテンを得て、それらの旋光度と沸点を報告し、早くも化学実験の腕の良さを見せている<sup>1)</sup>。

後年、吉田は後進に対し、化学における実験に当っては常に大胆で、しかも小心でなければならないことをくりかえし説き、自分は珪酸化合物は何千種も分析したので、一目見ただけでその組成が分かると豪語して、その実験における自信を吐露したという<sup>2)</sup>。

吉田は明治13年(1880)に卒業後、農商務省地質調査所分析係に勤務し



写真1. 吉田彦六郎肖像  
(京都大学工学研究科材料化学専攻会議室)

た。この時代に始めた研究が漆の研究であって、その最初の報告<sup>3)</sup>は分析係長であったコルセルト O. Korschelt と共著であるとはいえ、其の後の研究は吉田の単独名で、この研究が吉田により独自に展開されたことを証している。

Japan の名で西欧でも知られている東洋特産の漆に関する研究は、吉田の研究以前には石松決(後の平賀義美)の予備的研究の報告<sup>4)</sup>があるのみで、化学的には未開拓の領域であった。吉田の研究の目的は、漆成分の分析的研究に止まらず、その漆硬化の生化学的機構を解明し、実地の漆工業の改良にも役立てたいという、駆け出しの日本の化学研究の時代としては特筆すべき実に破天荒の志向であった。

まず吉田は各地に生育する漆を調べて、奈良県吉野産の樹齢15年の漆樹が研究材料として最良であることを突き止め、その幹の内外皮の間を傷つけて得られる生漆(きうるし)を原料として、成分の分離精製の研究に入った。その結果無水エタノール抽出物から得た主成分は金属塩を作る酸であるとして漆酸の名を与え、分子式を  $C_{14}H_{18}O_2$  とした。さらに水溶性成分として、蛋白質様の  $C_{72}H_{110}N_6O_{24}$  と

アラビアゴム様の糖質  $C_{12}H_{22}O_{11}$  が存在するを見出した<sup>5,6)</sup>。以下にこの研究結果を英文報告<sup>5)</sup>中の結論として述べている部分を和訳して示す。

「漆汁は主として4成分すなわち漆酸とゴムと水と特異なジアスターゼ様物質(a peculiar diastatic matter)より成っている。漆の硬化は漆酸  $C_{14}H_{18}O_2$  がオキシ漆酸に酸化されることに基づいていて、それは酸素と湿気の下にこのジアスターゼの作用によって起る」

これは漆の主成分の漆酸すなわち今日でいうウルシオールが酵素(ジアスターゼ)の作用で酸化されることにより、漆の硬化が起ると実に適確にこの作用機構の解明に成功しているのである。さらに成分のゴム様物質は含窒素化合物すなわち酵素と漆酸と空気との接触をよくして漆酸の空気酸化を促進することを明らかにしている。

この研究報告をまず J. Chem. Soc. に英文で出し<sup>5)</sup>、その後で東京化学会誌に邦文報告を出している<sup>6)</sup>。その英文は実に流暢である。吉田は手紙など平常文章を書く時、まず英文で書いてからそれを日本語に訳して書き直したと伝えられていて、日頃から英文による思索の訓練を積んでいたであろう。しかしこの英文報告を作成するに当たって、Mr. J. Sakurai すなわち桜井錠二の援助を受けたことの謝辞を述べているから、桜井の英文校閲を受けたのであろう。その桜井が明治17年(1884)の東京化学会年會に会長として、特に吉田のこの漆の研究に触れて「実に貴重と言うべきなり」として賞賛しているのである<sup>7)</sup>。

この吉田の漆の研究は明治18年(1885)に英国で開催された万国森林博覧會に日本政府から「日本産漆採取法、化学的成分、効用及工業上の適

用「(An essay on Lacquer)」として出品されて、銀賞牌を受けている。後にまた京都における漆器博覧会でも金賞を得ている。

そこでこの論文の書かれた明治16年(1883)という年を考えてみたい。酵素enzymeという言葉が生まれたのは1878年、Kuhneの提唱によるもので、吉田の研究をへだたるわずか数年前である。しかもそれまでにわかっていた酵素作用はいずれも加水分解酵素のみで、酵素で酸化反応が起るといふことは誰もまだ考えていなかった。吉田がジアスターゼという語を用いているのはそのためであって、酵素の代名詞として使っているのである。正に吉田彦六郎は世界における酸化酵素の最初の発見者であるといえる。冒頭に述べたMason博士の驚きもそれであったのである。しかし、現在でもそのことをしかと認識している生化学者や漆研究者は日本には多くない。

吉田はこの研究の結論を実際に漆器製作の時の固化膜の形成が空気の乾燥した冬期より、雨の多い夏季がよいという塗師の経験とも一致することを確かめた。G. Bertrandは1894年にトンキン産の漆の研究を行った時に、この酸化酵素をラッカーゼLaccaseとはじめて命名した<sup>8)</sup>。後にJ. B. Sumnerはその著書の中で、吉田彦六郎こそ酵素ラッカーゼの発見者であることを認めている<sup>9)</sup>。

日本の有機化学の開拓者と目されている眞島利行がその最初の研究題目に漆の構造研究を選んだのは、この吉田の研究がその前にあったからである。眞島によって日本産漆の主成分ウルシオールすなわち吉田の見つけた漆酸は次式で表され、Rが種々の不飽和アルキル基より成る混合物であることが決められたのは明治38年(1905)から大正11年(1922)にかけてであって<sup>10,11)</sup>、ここに吉田の研究と併せて日本の化学における世界に誇れる独自の研究が完成した。



吉田彦六郎は明治19年(1886)に東京帝国大学理科大学助教授になり、師範中等教員学力検定委員、大蔵省印刷局嘱託、東京石油会社主任研究員などを兼任しながら、研究を続け、明治24年(1891)に理学博士の学位を得た。翌年学習院教授となり、明治29年(1896)に京都へ移り、第三高等学校教授となり、明治31年(1898)から2年間ドイツへ留学した。その留学中に京都帝国大学理工科大学教授に任命され、帰国後その化学第三講座、のちには第四講座を担当した。第三講座の教授職は吉田の後に、福島郁三、喜多源逸、小田良平と継がれて行った。

吉田の漆の研究以外の研究に目を移すと、まず漆の成分のゴム質の灰分の分析でかなりの酸化アルミニウムが存在することを見い出していた<sup>2)</sup>。それまでアルミニウムは顕花植物中には存在しないというのが通説であったので、これは世界最初の報告であった。さらに吉田はマメ科、イネ科の植物にも探索を進め、アルミニウムは広くこれらの植物一般に存在することを明らかにした<sup>12)</sup>。

さらに吉田は地質研究所時代に樟脳油に関する先駆的な研究結果を報告している。吉田は当時の不完全な蒸留装置を用いて、実に65回の再蒸留を重ねて、樟脳油の成分を分析し、テレベンチン terebenthene およびサイトリン citrene と称する新成分を分



写真2. 吉田彦六郎(38歳前後)

離、報告している<sup>13,14)</sup>。前者は $\alpha$ -ピネン、後者はリモネンに相当するものであるが、O. Wallachが樟脳油から後者と同じものを単離して、リモネンlimonenと名づけたのは吉田の発表と同年であった<sup>15)</sup>。しかし吉田が樟脳油の成分として最も関心を抱き続けたのは、カンフォロチノール camphorogenol と名づけた樟脳 camphor の前駆体であった。この前駆体から湿気と紫外線の作用で樟脳が生成するのではないかという仮説の下に、樟脳生産の実地に結びつけようとした研究であった。当時の日本においては稀有な動的天然物化学的発想であったといえる。吉田は最後の日までこの問題が頭を離れなかったといわれているが、惜しくも未完に終わった。

明治30年(1897)に京都帝国大学理工科大学が創設されたが、吉田は、後にその学長となる久原躬弦を勧誘して、京都大学の創立に参加することを強く要請し、実験家の久原によって、新設の理工科大学化学教室に実験を重んじる学風を興したいと考えたのであった。吉田は「書物の上の学問は死せる骸で、実際にふれてみなければならぬ」と常に人に語っていたという。実際に吉田は各種の化学会社の顧問

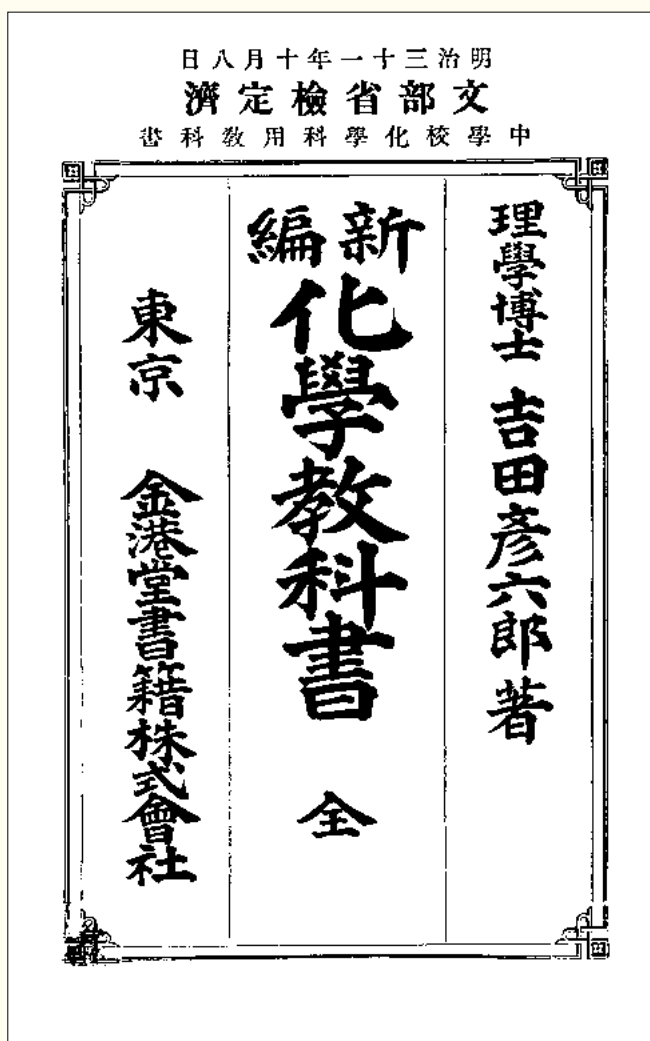


写真 3. 吉田彦六郎著『新編 化学教科書』

を引き受け実学を実行した。そのことにも関連して、吉田は大正2年(1913) 54歳にして京都大学を依願退職し、其の後は専売局中央研究所、大蔵省印刷局などの研究嘱託として過ごした。その輝かしい業績に比して恵まれない晩年であった。昭和4年(1929)3月3日、東京本郷西片町の自宅で享年70歳の生涯を閉じた。

この一文を草するに当って先人たちの報告<sup>2,16-21)</sup>を参考にさせて頂いた。ここにまとめて謝意を表する。

#### [参考文献]

1)Yosida, H. Atkinson, R. W. : On Peppermint Camphor (Menthol)

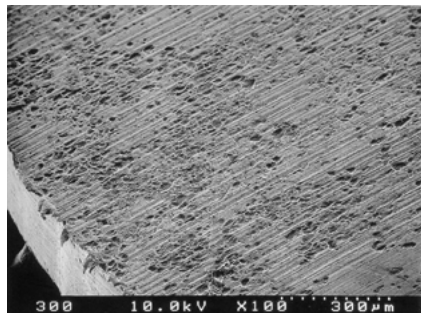
and Some of Its Derivatives. *J. Chem. Soc.*, 41, 49 (1882)

- 2)小松茂「化学者としての吉田彦六郎先生」*京都化学会報*, 19, 1(昭和5年).
- 3)吉田彦六郎、オ・コルセルト「漆ノ化学的研究ノ報告」『*地質調査書*明治十六年報第号』, 219(1884).
- 4)Ishimatsu, S. : On a Chemical Investigation of Japan Laquer or Urushi, *Memor. Proc. Manchester Lit. Phil. Soc.*, 3, 249 (1882)
- 5)Yosida, H. : Chemistry of Lacquer (Urushi), Part 1, *J. Chem. Soc.*, 43, 472 (1883)
- 6)吉田彦六郎「漆ノ化学的研究」*東化*, 5, 1, 91 (1884)
- 7)桜井錠二「事業報告」, *東化*, 5, 本会記事, 5(1884).

- 8)Bertrand, G. : Sur le latex de l'arbre à laque, *Compt. Rend.*, 118, 1215 (1894)
- 9)Sumner, J. B. et al., "Chemistry and Methods of Enzymes", p.239, p.242 (1947)
- 10)眞島利行、中村郁哉「漆汁の主成分たるウルシオールの研究報告(第三報)」*東化*, 35, 113 (1914)
- 11)Majima, R., : Über den Hauptbestandteil des Japan lacks. VIII Mitteilung, Stellung der Doppelbindungen in der Seitenkette des Urushiols und Beweisführung, dass das Urushiol eine Mischung ist, *Ber.*, 55, 172 (1922)
- 12)Yoshida, H., : On Aluminium in the Ashes of Flowering Plants, *J. Chem. Soc.*, 51, 748 (1887)
- 13)吉田彦六郎「樟脳油成分化学的研究」, *東化*, 6, 128, 163 (1885)
- 14)Yoshida H., : Examination of the Constituents of Camphor Oil, *J. Chem. Soc.*, 47, 779 (1885)
- 15)Wallach, O., : Zur Kenntnis der Terpene und der Ätherische Öle, *Ann. Chem.*, 277, 296 (1885)
- 16)中村恒「吉田先生を憶ふ」*京都化学会士会報*, 19, 102(昭和5年).
- 17)松井悦造「漆の研究史」*科学史研究*, 44, 10(昭和32年).
- 18)道家達将「黎明期の日本の生化学」『*近代の生化学*』上代皓三編、化学同人、16~18頁(1968).
- 19)久保田尚志『*日本の化学百年史*』化学同人、466頁(1978).
- 20)木下圭三、後藤良造「吉田彦六郎と彼の研究」*化学史研究*, 31, 86(1985).
- 21)中村隆雄「酵素学のはじまり」『*酵素学のはなし*』学会出版センター、96~98頁(1991).

## 破骨細胞の骨吸収能測定「ピットフォーメーションアッセイ」に！

### 象牙質切片、象牙由来



象牙質切片上に形成されたピットの走査型電顕写真  
(写真提供:北海道大学 歯学部 電顕室 野田坂佳伸先生)

骨粗鬆症は、骨吸収と骨形成のバランスが崩れ骨吸収が骨形成よりも亢進するために起こる疾患で、高齢化社会

への移行に伴い患者数は増加しています。現在、骨吸収抑制剤の開発研究が盛んに行われている中、破骨細胞の骨吸収能を測定することは重要な手段です。ピットフォーメーションアッセイでは象牙質切片上で培養した破骨細胞により形成された切片上のピット(吸収窩)をヘマトキシリン染色し光学顕微鏡で観察したり、電子顕微鏡で観察することでピットの数、面積などから破骨細胞の骨吸収能を評価します。

本品は、優れた品質の象牙から加工しており、ピットフォーメーション

アッセイに適しています。切片厚は150 $\mu$ m、300 $\mu$ mの2種類です。実験条件に合わせてお選び下さい。

形状：直径...6mm  
厚さ...150 $\mu$ m、300 $\mu$ mの2種類

加工方法：象牙の象牙質部分から上記形状の切片を作製後、無菌蒸留水で超音波洗浄し、70% エタノールで滅菌、最後に紫外線照射により滅菌しています。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
044-28621	象牙質切片、象牙由来 [6mm(直径)× 150 $\mu$ m(厚)]	生化学用	24 枚	36,000
041-28631	象牙質切片、象牙由来 [6mm(直径)× 300 $\mu$ m(厚)]	生化学用	24 枚	39,000

## ～骨代謝・骨粗鬆症の研究に～

### Norzoanthamine Hydrochloride

生化学用

ノルゾアンタミンはスナギンチャク (*Zoanthus*)由来のアルカロイドであり、IL-6\*生成抑制 ( $IC_{50}=13\mu\text{g/ml}$ )による結果、骨吸収阻害作用・抗骨粗鬆症作用を有する生理活性物質です<sup>3,4,5</sup>。

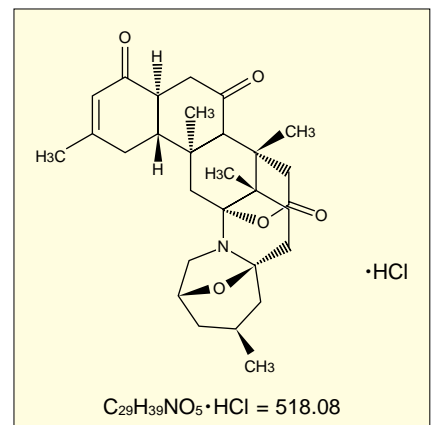
\* IL-6: 免疫応答、造血系や神経系細胞の増殖分化など多彩な作用をもつサイトカインであり、T細胞、B細胞など多くの細胞で産生されるが、特に骨代謝の分野では骨吸収のメディエーターとして重要な作用をもつ。

〔規格〕

含量(HPLC): 96.0%以上  
溶解性: 水に可溶

〔参考文献〕

- 1) Fukuzawa, S. et al. : *Heterocyclic Communications*, 1, 207(1995)
- 2) Kuramoto, M. et al. : *Tetrahedron Lett.*, 38(32), 5683(1997)
- 3) Tsuji, T. et al. : *Anim. Cell Technol. : Basic & Appl. Aspects*, 9, 137(1998)
- 4) Kuramoto, M. et al. : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 71, 771(1998)
- 5) Kuramoto, M. et al. : *Drugs Sea*, 98(2000)
- 6) Yamaguchi, K. et al. : *Biol. Pharm. Bull.*, 22, 920(1999)



145-07481 1mg 30,000円

## BMP ～骨形成因子

BMP( Bone Morphogenetic Protein )は TGF- $\beta$ ( Transforming Growth Factor- $\beta$  )スーパーファミリーに属

するサイトカインで骨形成因子として同定され、細胞増殖、分化など様々な機能をもつことが分かってきました。

骨形成機構の解明や再生医療の研究にご利用下さい。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
026-14811	Bone Morphogenetic Protein 2, Human, recombinant	生化学用	5 $\mu$ g	35,000
023-14821	Bone Morphogenetic Protein 4, Human, recombinant	生化学用	5 $\mu$ g	35,000
201-15661	Transforming Growth Factor- 2, Human, recombinant	生化学用	2 $\mu$ g	30,000

詳細はご照会下さい。

# 細胞増殖因子ベータセルリン

## - 膵臓再生と糖尿病研究へのニューマテリアル -

岡山大学 大学院 自然科学研究科 妹尾 昌治

ベータセルリン(BTC)はTGF- $\alpha$ と高い相同性をもつ上皮成長因子(EGF)ファミリーのペプチド性因子で、インスリン遺伝子のプロモータ領域とSV40T抗原遺伝子の融合遺伝子を導入したトランスジェニックマウスに生じるインスリノーマから樹立された細胞株が産生する細胞増殖因子として発見された<sup>1)</sup>。最近の研究からBTCはEGFファミリーでは唯一、膵内分泌細胞の分化を誘導してインスリン産生を促す細胞増殖因子である可能性が強く示唆され、年々患者数の増加している糖尿病治療への応用、さらに人工膵臓や膵臓再生への応用が期待されている。

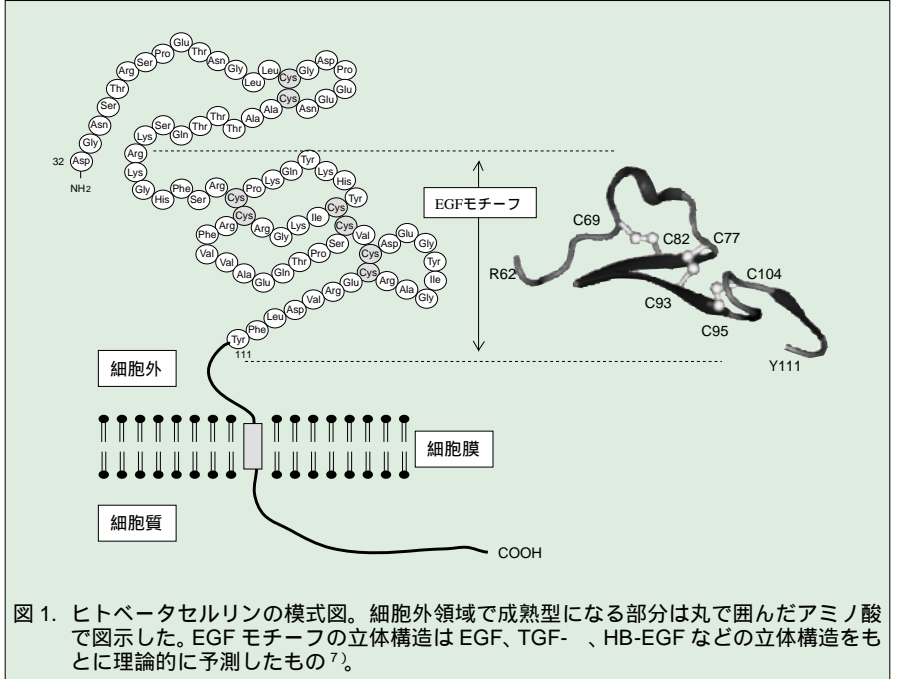


図1. ヒトベータセルリンの模式図。細胞外領域で成熟型になる部分は丸で囲んだアミノ酸で図示した。EGFモチーフの立体構造はEGF、TGF- $\alpha$ 、HB-EGFなどの立体構造をもとに理論的に予測したもの<sup>7)</sup>。

### 1 構造

BTCの前駆体は大きく分けて分泌シグナル、細胞外領域、膜結合領域、細胞内領域の4つのドメインから構成される(図1)。細胞外領域にEGFに特徴的な6個のシステインを含むモチーフ、および細胞内領域には特徴的な塩基性アミノ酸のクラスターが存在する。マウスの他にもラット<sup>2,3)</sup>、ヒト<sup>4)</sup>、ウシ<sup>5)</sup>の遺伝子が明らかにされ、ラットはマウスと同じ177アミノ酸で構成されるが、ヒト、ウシでは細胞内領域の塩基性クラスターの中に1アミノ酸の挿入があり全体で178アミノ酸になっている(図2)。相同性に関しては、ラットとマウスの間が最も高く93%で、ヒトはウシと相同性が高く88%である。BTCは翻訳後修飾として糖鎖が付加し<sup>6)</sup>、細胞表面上に膜結合型のタンパク質として存在するが、プロテアーゼ消化を受けて細胞外領域が切り離される。現在もっとも解析が進んでいるのはこの細胞外領域として知られる80アミノ酸残基からなる部分である。この

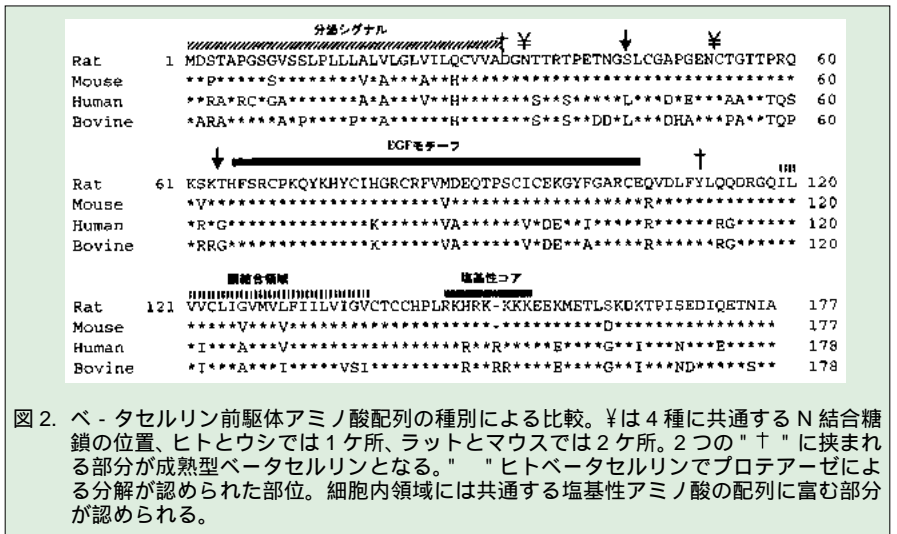


図2. ベータセルリン前駆体アミノ酸配列の種別による比較。¥は4種に共通するN結合糖鎖の位置、ヒトとウシでは1ヶ所、ラットとマウスでは2ヶ所。2つの「+」に挟まれる部分が成熟型ベータセルリンとなる。" "ヒトベータセルリンでプロテアーゼによる分解が認められた部位。細胞内領域には共通する塩基性アミノ酸の配列に富む部分が認められる。

部分を動物細胞と大腸菌で発現させて活性を調べても現在のところ両者に差は認められていない。立体構造の全体像はまだ解明されていないが、少なくともEGFモチーフを手がかりとする理論的な構造予測<sup>7)</sup>とNMR<sup>8)</sup>の両方の側面から解析が行われている。後述するようにBTCは同じファミリーに属するEGFやTGF- $\alpha$ の受容体分子とは異なる受容体分子へも結合する。こ

の受容体識別のメカニズムが立体構造の解明により明確にされることが期待される。また、遺伝子のスプライシングの変化により膜結合領域を欠失した分子も存在するが、この分子はEGFモチーフ中のシステイン残基2個を含むC-loopを欠失し、さらに細胞内領域を保持している<sup>9)</sup>。この分子は、EGFが示す細胞増殖促進活性を持たないので、この分子の存在意義につい

てはさらに詳細な解析が必要である。

## 2 分布

BTC の発現は主に膵臓、小腸、腎臓、肝臓に認められ、心臓、肺、精巣、卵巣、大腸での発現は弱く<sup>4,5,10)</sup>、脳、胎盤、脾臓、胸腺および末梢白血球では発現が検出されない<sup>4,5,10)</sup>。ラットでも胃および腸管での詳細な発現が調べられているが、広く全般に渡り上皮での発現が観察される<sup>3)</sup>。広い分布を示すものの、BTC の発現量はやはり膵臓と十二指腸で強く認められる。また、ヒト胎児の膵組織や膵島細胞腫にも強い発現が認められる他、正常な膵臓では、グルカゴンを分泌する A 細胞および導管細胞に発現が認められ、インスリンを分泌する B 細胞に隣接するパターンを示す<sup>11)</sup>。即ち、インスリン産生細胞は BTC を産生していないか産生していても非常に低いレベルであると考えられる。

## 3 増殖促進活性と受容体

BTC は当初、増殖因子として発見されたのでその細胞増殖促進能については種々の細胞で調べられた。その結果、線維芽細胞、血管平滑筋細胞、腎上皮細胞、網膜色素上皮細胞、膵島 B 細胞、乳腺細胞などの増殖を促進することが知られている。この活性は EGF 受容体ファミリーとして知られる ErbB タンパク質を介していると考えられている。EGF 受容体(EGFR)は膜結合型チロシンキナーゼで増殖因子が細胞外領域に結合することによって二量体化し、細胞内領域のチロシンキナーゼが活性化してリン酸化のカスケードによって細胞内に増殖のシグナルを伝達するが、ErbB ファミリーはこの EGFR の他に ErbB2、ErbB3、ErbB4 の三つが知られている<sup>12)</sup>。BTC はこのうち EGFR と ErbB4 に結合することができる。また、EGFR や

ErbB4 が ErbB2 と二量体を形成してもリン酸化のシグナル伝達が起こる。興味深いのは、BTC が ErbB2 と ErbB3 に結合しないのに ErbB2 と ErbB3 を共発現する細胞において ErbB2 のリン酸化を引き起こすことである<sup>13)</sup>。この場合、BTC の ErbB2 と ErbB3 の二量体への顕著な結合は認められないので、BTC の受容体結合に他の要因が示唆される。BTC は膜結合型の前駆体としても受容体を活性化することができる。通常増殖因子が細胞を刺激するメカニズムはパラクリン型およびオートクリン型で説明されるが、膜結合型増殖因子の場合、細胞表面の接触が必要なためにジャクスタクリン型として説明される<sup>14)</sup>。これは最初 TGF- $\alpha$  のメカニズムとして報告されたが、ヘパリン結合性 EGF や BTC でも示されている<sup>15,16)</sup>。さらに、これらの因子は遊離型すなわち成熟型へとプロセスされるがこの時に作用するプロテアーゼが BTC の場合は TGF- $\alpha$  や HB-EGF と異なりフォルボールエステルにより促進されることはない。BTC が膜結合型から成熟型になるメカニズムについてはまだ不明である。

## 4 分化誘導活性とインスリンの発現

この BTC が増殖因子としてだけでなく、分化誘導因子としての活性をもつことが分かったのは、ラット膵臓癌由来細胞株 AR42J を用いた研究からである<sup>17)</sup>。AR42J 細胞はアミラーゼを分泌する膵外分泌系の形質を備えた細胞である。この細胞はアクチピン A により膵ポリペプチドとグルコーストランスポーター 2 を発現し神経細胞様の形態を示すようになる。さらに、この時 BTC を共存させるとインスリンを発現する形質に変化する。この様になった細胞を代表的な糖尿病薬として知られるトルブタミドで処理するとインスリンの分泌が観察できることから、

AR42J 細胞が膵島 B 細胞の形質を獲得していることが示唆された。このような結果は、EGF や TGF- $\alpha$  のような他の EGF ファミリーの増殖因子では認められない。さらに、この AR42J から細胞株を新たに樹立し、BTC が結合する受容体の解析を行なったところ、ErbB ファミリーの抗体とは交叉しない BTC 結合タンパク質の存在が確認された<sup>18)</sup>。このタンパク質の実体はまだ明らかではないが、先に述べた ErbB2/ErbB3 共発現細胞の知見とあわせて ErbB ファミリーとは異なる BTC 特異的受容体の存在が考えられる。成熟型 BTC のアミノ末端側の 23 アミノ酸残基とカルボキシル末端側 4 アミノ酸残基を欠失したペプチドの細胞増殖促進活性が成熟型 BTC の 1/10 であるのに対して AR42J の分化誘導活性は 2.5 倍に上昇するという報告<sup>19)</sup> は二つの活性が独立したものであり、ErbB 受容体以外の未知の受容体の存在を支持する。BTC による分化誘導は、他の細胞でも同様の効果を示すことができる<sup>21,22)</sup>。膵島 A 細胞由来の  $\alpha$ TC-1 細胞は、膵島 B 細胞に特異的な転写因子 PDX-1 を発現させると膵島アミロイドポリペプチドの発現が認められるが、まだインスリンの産生は起こらない。しかし、この細胞を BTC で刺激すると、グルコキナーゼとインスリンの発現が認められる様になる。さらに、ラットの膵島由来細胞株 IEC6 でも同様の観察ができる。これらの現象は AR42J の場合と同様に他の EGF ファミリーの因子には認められない BTC に特異的な効果である。

## 5 膵臓の再生

このように BTC には膵島 B 細胞の分化を誘導しインスリンの発現を促す活性があることを示唆する結果が蓄積してきている。これらのデータは現実的に BTC が糖尿病治療および膵臓再生医療へ応用できる可能性があること

を示唆している。このアプローチとして最初に報告されたのは、マウスを使ったアロキサン膵部分灌流法による糖尿病モデルに対するBTCの効果である<sup>23)</sup>。上腸間膜動脈をクランプして静注によりアロキサンを膵尾部のみへ灌流するとこの部分の膵島B細胞が死滅する。この後、膵尾部においてBTCの発現の上昇と膵島B細胞の新生が起これり症状が自然治癒に向かう。このモデルにBTCを2ヶ月間皮下投与しても破壊された膵島B細胞を含め膵島内分泌細胞の新生はほとんど起こらない。ところが、導管細胞や腺房細胞などの外分泌組織から膵島B細胞の新生が起これり、これに伴い糖尿病の症状もBTC投与群で有意に改善される。また、膵臓組織の90%を切除したラットの膵臓再生をBTCの静注による投与で試みた例では、切除直後から10日間の投与でBTCを投与したマウスでは投与しなかったマウスに比較して有意に血中インスリン濃度が高くなり血糖値も低くなる<sup>24)</sup>。この状態は膵切除後4週間継続した。切除1ヶ月後、腹腔にグルコース溶液を注射して血中のグルコース濃度とインスリン濃度を測定すると、BTCを投与しなかった対照ではインスリン濃度が上昇せず、グルコース濃度の低下は観察されないのに対して、投与したラットは僅かだがインスリン濃度が上昇し、グルコース濃度の低下が観察される。切除後1ヶ月でラットの膵組織を観察するとインスリン産生細胞の増殖が認められ膵島B細胞の質量とインスリン含量の増加が認められた他、膵島様細胞塊の数などがBTC投与群で有意に増加していた。これらのin vivoの実験例はBTCが膵臓の膵島B細胞の再生に有効であることを示している。ここに紹介したBTCを用いるin vitroおよびin vivoの実験例を図3にまとめた。

BTCを用いることにより、膵島B細胞の減少が原因となるII型糖尿病な

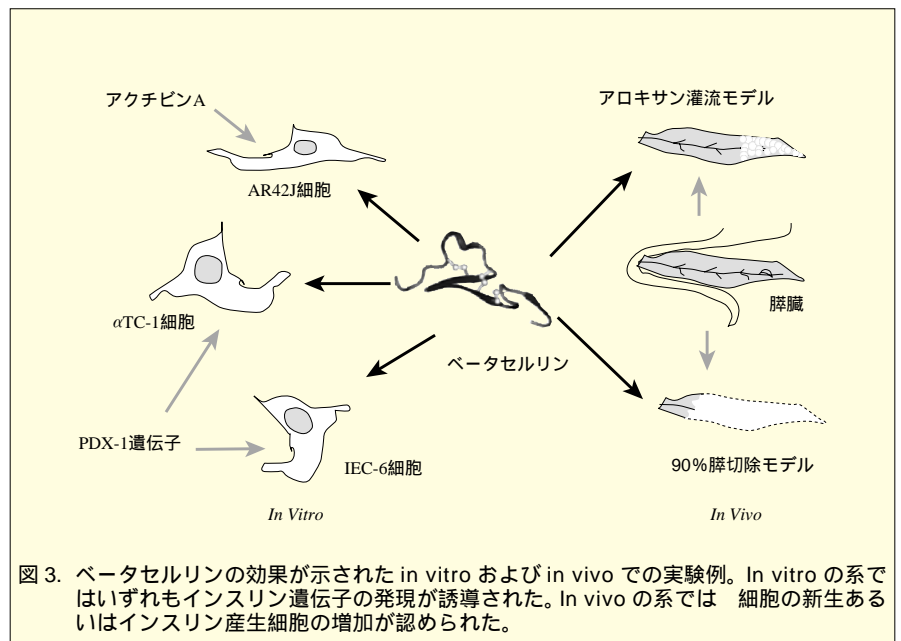


図3. ベータセルリンの効果が示されたin vitroおよびin vivoでの実験例。In vitroの系ではいずれもインスリン遺伝子の発現が誘導された。In vivoの系では細胞の新生あるいはインスリン産生細胞の増加が認められた。

どで考えられる膵島移植やインスリン遺伝子治療とは異なる膵島B細胞を増加させる新たな治療法の可能性が出てきた。さらに、最近ではインスリン分泌を行なう人工膵臓の開発も行なわれているが、ここにもBTCの応用が考えられるのではないだろうか。臓器には血管が無数に走っていることも見逃せない。血管は生体のあらゆる組織の呼吸代謝と栄養の供給を司っているが、この血管の内側にある血管内皮細胞が実は発生期の器官形成に重要な役割を果たしていることが示された<sup>25)</sup>。発生段階で血管に隣接した部分に組織に特異的な細胞が現れてくるというもののだが、膵臓の場合PDX-1が発現してくる。このようなステップを利用してBTCがインスリン発現を誘導できるなら、応用の可能性はさらに現実に近づく。

〔参考文献〕

1. Shing, Y. et al. *Science* 259 : 1604 (1993)
2. Tada, H. et al. *Biochim. Biophys. Acta* 1492 : 285 (2000)
3. Dunbar, A. J. et al. *J. Mol. Endocrinol.* 27 : 239 (2001)
4. Sasada, R. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190 : 1173 (1993)
5. Dunbar, A. J. et al. *Biochem. J.* 344 : 713 (1999)

6. Watanabe, T. et al. *J. Biol. Chem.* 269 : 9966 (1994)
7. López, I. et al. *J. Mol. Model.* 8 : 131 (2002)
8. Miura, K. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294 : 1040 (2002)
9. Dunbar, A. J., and C. Goddard. *Growth Factors* 18 : 169 (2000)
10. Seno, M. et al. *Growth Factors* 13 : 181 (1996)
11. Miyagawa, J. et al. *Endocr. J.* 46 : 755 (1999)
12. Olayioe, M. A. et al. *EMBO J.* 19 : 3159 (2000)
13. Alimandi, M. et al. *EMBO J.* 16 : 5608 (1997)
14. Wong, S. T. et al. *Cell* 56 : 495 (1989)
15. Iwamoto, R., and Mekada, E. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11 : 335 (2000)
16. Tada, H. et al. *J. Cell. Biochem.* 72 : 423 (1999)
17. Mashima, H. et al. *J. Clin. Invest.* 97 : 1647 (1996)
18. Ishiyama, N. et al. *Diabetologia* 41 : 623 (1998)
19. Itoh, T. et al. *J. Biol. Chem.* 276 : 40698 (2001)
20. Watada, H. et al. *Diabetes* 45 : 1826 (1996)
21. Kojima, H. et al. *Diabetes* 51 : 1398 (2002)
22. Yamamoto, K. et al. *Diabetes* 49 : 2021 (2000)
23. Li, L. et al. *Endocrinology* 142 : 5379 (2001)
24. Lammert, E. et al. *Science* 294 : 564 (2001)



## 糖尿病研究用

### Betacellulin

ベータセルリン<sup>2)</sup>は、マウス膵臓ベータ細胞腫由来細胞株  $\beta$ TC-3 より単離された EGF ファミリーの増殖因子です。細胞膜結合型分子は 177 アミノ酸からなり、プロセッシングにより 80 アミノ酸からなる成熟型になります。ベータセルリンは、ラット膵臓がん由来 AR42J 細胞のインスリン産生能を誘導する<sup>3,4)</sup> 他、線維芽細胞、血管平滑筋細胞、網膜色素上皮細胞などの増殖促進作用を示します。

ベータセルリン, ヒト, 組換え体<sup>2,5)</sup>

形状：凍結乾燥品 (100 $\mu$ g/ml PBS(含 0.1% BSA)より凍結乾燥)

起源：Human betacellulin cDNA expressed in *E.coli*

分子量：9.1k(80アミノ酸からの理論値)

エンドトキシン：0.1ng/ $\mu$ g 以下

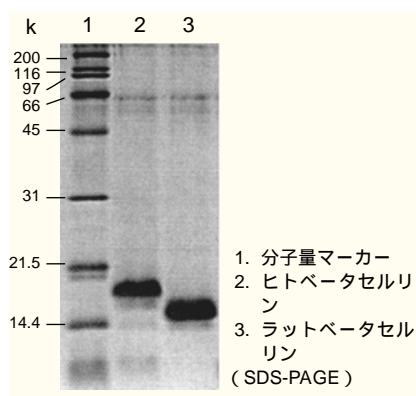
ベータセルリン, ラット, 組換え体<sup>1)</sup>

形状：凍結乾燥品 (100 $\mu$ g/ml PBS(含 0.1% BSA)より凍結乾燥)

起源：Rat betacellulin cDNA expressed in *E.coli*

分子量：9.2k(80アミノ酸からの理論値)

エンドトキシン：0.1ng/ $\mu$ g 以下



〔参考文献〕

- 1) Tada, H., Seno, M., Yamada, H., Sasada, R. and Igarashi, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1492, 285 (2000)
- 2) Seno, M., Tada, H., Kosaka, M., Sasada, R., Igarashi, K., Shing, Y., Folkman, J., Ueda, M. and Yamada, H.: *Growth Factors*, 13, 181 (1996)
- 3) Ishiyama, N., Kanzaki, M., Seno, M., Yamada, H., Kobayashi, I. and Kojima, I.: *Diabetologia*, 41, 623 (1998)
- 4) Mashima, H., Yamada, S., Tajima, T., Seno, M., Yamada, H., Takeda, J. and Kojima, I.: *Diabetes*, 48, 304 (1999)
- 5) Tada, H., Sasada, R., Kawaguchi, Y., Kojima, I., Gullick, W. J., Salomon, D.S., Igarashi, K., Seno, M. and Yamada, H.: *J. Cell. Biochem.*, 72, 423 (1999)
- 6) Mashima, H., Ohnishi, H., Wakabayashi, K., Mine, T., Miyagawa, J., Hanafusa, T., Seno, M., Yamada, H. and Kojima, I.: *J. Clin. Invest.*, 97, 1647 (1996)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
025-14381	Betacellulin, Human, recombinant	生化学用	10 $\mu$ g	36,000
022-14391	Betacellulin, Rat, recombinant	生化学用	10 $\mu$ g	36,000

### AD-5467

生化学用

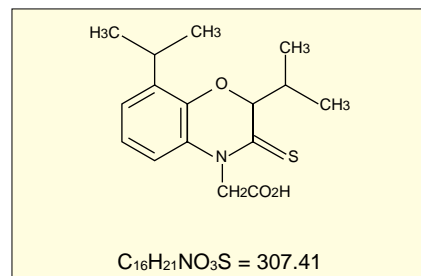
アルドースレダクターゼ阻害作用 (IC<sub>50</sub>=51nmol/l) 血小板凝集抑制作用物質です<sup>1,2)</sup>。

糖尿病の病態では組織内でソルビトールの過剰蓄積、血小板凝集機能亢進が起きていることから糖尿病合併症の予防、治療効果に関する研究に有用です。

〔参考文献〕

- 1) Tawada, H. et al: *Chem. Pharm. Bull.*, 38(5), 1238 (1990)
- 2) Sugiyama, Y. et al: *Elsevier Science Publishers BV*, 645 (1990)

017-19421 500mg 10,000円



### TMP-153

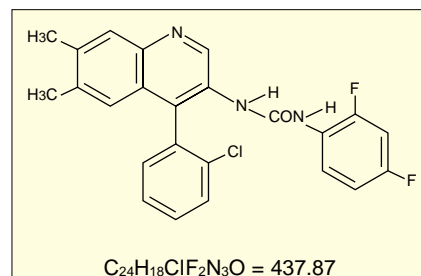
生化学用

ACAT (acyl-CoA : cholesterol acyltransferase) 阻害剤 (IC<sub>50</sub>=5 ~ 10nmol/l) でコレステロール吸収抑制物質です<sup>1,2)</sup>。

〔参考文献〕

- 1) Tawada, H. et al: *J. Med. Chem.*, 37, 2079 (1994)
- 2) Sugiyama, Y. et al: *Atherosclerosis*, 113, 71 (1995)

207-15641 500mg 10,000円



# ブロッティング法の革命

ALLIANCE PROTEIN LABORATORIES 荒川 力

タンパク質の分離・分析に液体クロマトグラフィーと電気泳動は必須の技術である。中でも、電気泳動は2次元へと展開することによりその分解能をさらに高めることができる。電気泳動の解析能力はブロッティング法の開発により飛躍的に拡まった。このブロッティング能力をさらに革命的なものにしようとしているのが、今度、20/20GeneSystems社により開発された Multi-Replica Blotting Kit である。これは一枚の電気泳動ゲルから一挙に10枚のプロットを得ようとするものである。実際、私も4度使ってみたが、操作は至って簡単、今までのブロッティングと何の差もない。

生命科学、薬品開発の主流はゲノム、遺伝子の時代からタンパク質へと、いわゆるプロテオミクス時代に移行中と言われている。プロテオミクスと言うと2次元電気泳動と質量分析ということになるが、この Multi-Replica Blotting Kit は質量分析による解析を補足する有用な技術となるものと思われる。勿論通常の細胞レベルでのタンパク質解析に有用なことは言うに及ばない。

この10枚の膜へのブロッティングは3次元への電気泳動と考えても良い。即ち図1に示すようにゲル上のバンドAタンパク質が電場の存在下で陰極から陽極へ10枚の膜を通過移動していくと考えられる。但し、タンパク質の大きさに比べると膜の孔ははるかに大きいので膜内での分子ふるい効果が起こらない。もし、分子ふるい効果があれば大きなタンパク質ほど移動しにくくなり、後方の膜には到着しなくなってしまう。

10枚膜への移動をこのように分子ふるい効果のない3次元への電気泳動とみなすと、何故、膜10枚にバンドが均等に分配されるのであろうか。それ

は次の様に考えられる。膜の孔を筒状のものと考えて図式すると図2の様になる。即ちバンドA中のタンパク質が膜孔を通過して陰極から陽極へと移動していく時、膜孔表面と吸着反応を起こす。当然このような吸着反応は吸着サイトの数と吸着力とに依存する。使用されている膜は多孔性に富むと同時に吸着力の強いものから出来ていると想像できる。

さて、1枚のゲルから10枚のプロットがとれるとどのような利点があるだろうか。その最大のものとして血液や細胞等の複数のタンパク質を含むサンプルの分析が考えられる。例えば Well1 に血液サンプルをのせ SDS - 電気泳動下で移動分離すると、その分離の結果が10枚のプロットとして得られることになる。そして膜1は血清アルブミンに対する抗体、膜2はトリプシンに対する抗体、膜3はさらに異なる抗体を用いて膜を染色することにより血液中のタンパク質の分析が可能となる。ゲルに10Wellがあれば10個の血液サンプルを同時に比較することが可能となる。

細胞を用いた実験でも同じ様なことが可能になる。例えば或る細胞に異なる薬物を投与したとする。そうすると薬物投与による細胞のタンパク質発現、或いは活性化への影響が観察され得る。膜1はその細胞に発現し薬物と関係していると予想される受容体、膜

2は抗リン酸化アミノ酸に対する抗体、膜3はMAPキナーゼ抗体というように、シグナル系に関係するタンパク質をとりあげて薬物の影響を調べることができる。受容体やシグナルに寄与するタンパク質群の機能調節の一つはリン酸化によって行われているので、抗リン酸化アミノ酸抗体を使うことによって薬物のこれらシグナル分子の機能調節への効果を調べることができる。

Native 電気泳動と組み合わせれば、次の様な分析も可能となる。Native 電気泳動とは、SDSを用いない電気泳動のことでタンパク質はそれ自身の電荷でゲル中を移動することになる。SDSが存在しないのでタンパク質は変性を起こさず、また複合状態をとっている場合には解離することはない。タンパク質AとBが溶液中で会合している場合、これをNative電気泳動にかけるとABの複合体として移動する。

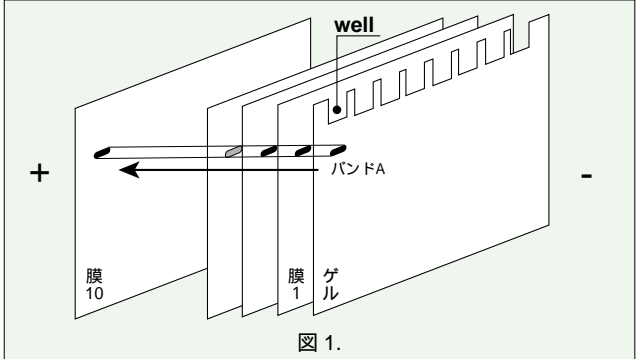


図1.

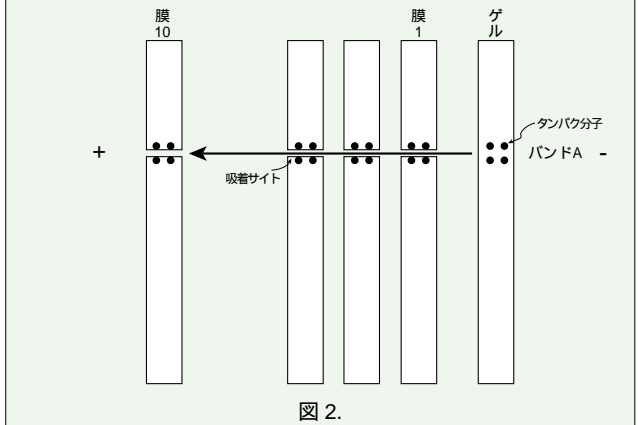


図2.

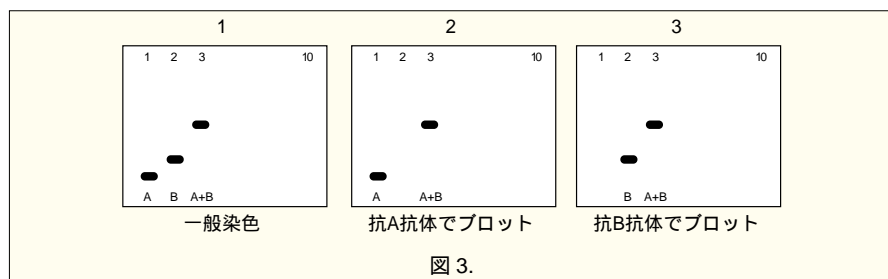


図 3.

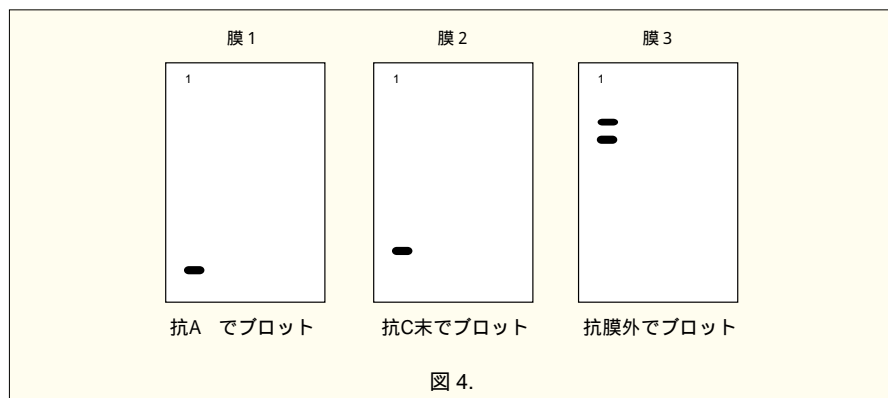


図 4.

模式的に書くと図 3 のようになる。膜 1 を通常に染色すると全てのタンパク質が染まるので 1 のようなものが得られる。Well1 と Well2 には純品の A と B がのせられているので、1 で見られるバンドは A、B それぞれに相当する。A と B を混ぜて新しいバンドが Well3 に現れるので当然 AB 複合体ということになるが、それは膜 2 を抗 A 抗体で (図 3 の 2)、膜 3 を抗 B 抗体で (図 3 の 3) プロットすることにより証明する事ができる。

部位特異抗体があればタンパク質の分解酵素によるプロセッシングにも有用である。アルツハイマー病の一原因タンパク質として APP が知られている。APP は脳細胞にも多く発現している膜タンパク質でその機能は未だに完全には解明されていない。APP は膜性のタンパク質分解酵素によって膜外に存在する N 末領域、膜近辺の Aβ、そして残りの膜内 C 末領域の 3 断片に分解され、この Aβ の蓄積がアルツハイマー病の原因とみなされている。しかしながら、C 末領域の細胞内シグナルへの影響も細胞死と関係している可能性が示唆されている。図 4 に示す様に APP の膜外領域、Aβ、C 末領域に

特異的な抗体を用いればこの膜タンパク質のプロセッシングをプロットングによって容易に行うことが可能である。

先にも述べたように遺伝子解析の進展にともない、遺伝子即ちタンパク質の機能解析が進められている。その一つの方法として目的とするタンパク質と結合するタンパク質を同定するのも一つの方法である。それには次の方法がよく用いられる。まず目的タンパク質 DNA にタグを付け、それを細胞に発現させる。そして発現細胞を壊した後、抗タグ抗体で発現タンパク質を集めそれを電気泳動にかけると当然目的タンパク質とそれに結合しているタンパク質を分離することができる (図

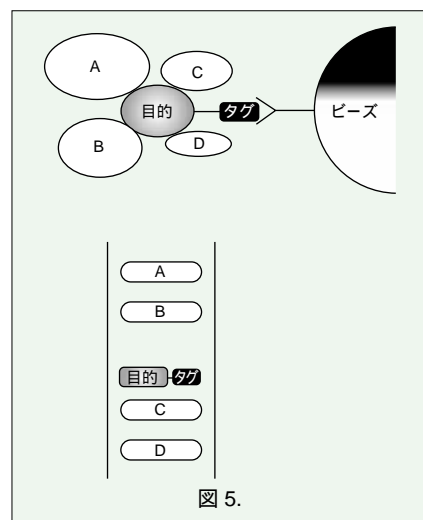


図 5.

5)。これを 10 枚膜にプロットしてたとえば膜 1 を抗タグ抗体、膜 2 を抗リン酸化アミノ酸抗体、膜 3 を目的タンパク質と結合することが予想されるタンパク質に対する抗体と反応させることにより、目的タンパク質と結合するタンパク質の性質を明らかにすることができる (図 6)。このような実験を細胞への薬物やサイトカイン等の投与効果と組み合わせることにより、さらに目的タンパク質と結合するタンパク質の性質を詳しく解明することが可能となる。この結合タンパク質の性質から目的タンパク質の性質を推定することができる。

この Multi-Replica Blotting Kit の有用性は抗リン酸化アミノ酸抗体のように汎用性のある抗体と組み合わせることによりさらに高まるものと思われる。また、電気泳動ゲルの種類の拡大も Kit の有用性を高めるであろう。

荒川 力 E-mail: tarakawa2@aol.com

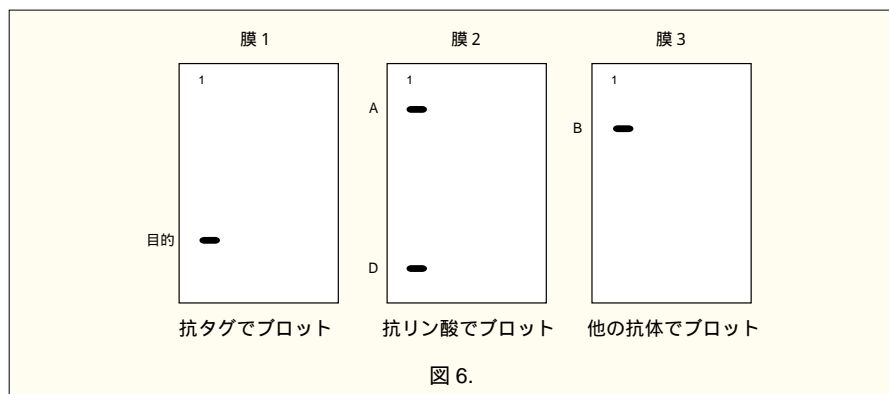


図 6.

1枚のゲルから同時に10枚のプロットが得られます！



## Multi Replica Blotting Kit

本キットは、タンパク質を分離後の1枚のアクリルアミドゲルから同時に10枚のウエスタンプロットを得ることができます。キット中のメンブランは積層された10枚のメンブランで、タンパク質と強いアフィニティを有し、かつバックグラウンドが低くおさえています。作業手順により2種類のメンブラン枚数を選ぶことができます。5-Stackキットには5層のメンブランが2個入っていますので、一度に10枚の転写が不要な場合に適しています。Coreキットは必要最低限な試薬で構成され、Completeキットは実験に便利な試薬器具が追加されています。

### 〔特長〕

#### 経済的

1回の電気泳動で10種類のタンパク質のウエスタンプロットができますので、10枚のゲルを作成するよりも、貴重な試料、時間、試薬の節約ができます。

#### 高い再現性

複数ゲルの電気泳動や1枚のプロットをストリッピング後再プローブするよりも複数タンパク質解析の一貫性が向上します。

#### 特殊な器具は不要

キットには専用のバッファーが入っており従来のウエスタンブロッティングと同じ簡単な操作で行うことができ、特別な器具は不要です。タンク式・セミドライ式どちらにも対応できます。

### 〔キット内容〕

- Multi Replica Blotting Kit : Complete (GS1001)
- Membrane Stack (10 layers) 1個
- 5 × Transfer Buffer 200ml × 1本
- Reaction Folders 5枚
- CoverEasy Plastic Squares 10枚
- Labeling Pen 1本
- Product Manual 1部
- Multi Replica Blotting Kit : Core (GS1002)
- Membrane Stack (10 layers) 1個
- 5 × Transfer Buffer 200ml × 1本
- Product Manual 1部
- Multi Replica Blotting Kit : 5-Stack Complete (GS1003)
- Membrane Stack (5 layers) 2個
- 5 × Transfer Buffer 200ml × 2本
- Reaction Folders 5枚
- CoverEasy Plastic Squares 10枚
- Labeling Pen 1本
- Product Manual 1部
- Multi Replica Blotting Kit : 5-Stack Core (GS1004)
- Membrane Stack (5 layers) 2個
- 5 × Transfer Buffer 200ml × 2本
- Product Manual 1部

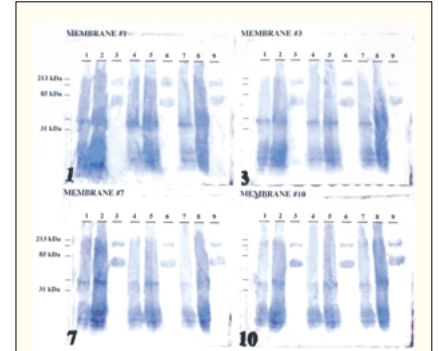


図1. メンブラン間の転写効率の比較  
タンパク質転写後のメンブラン染色例  
(1,3,7,10枚目)

レーン1、4、7: Jurkat細胞からのタンパク質抽出物 8µg  
レーン2、5、8: Jurkat細胞からのタンパク質抽出物 40µg  
レーン3、6、9: ウシ血清アルブミン 10µg

定量結果は10枚のメンブランにおいて5~15%の誤差であった。

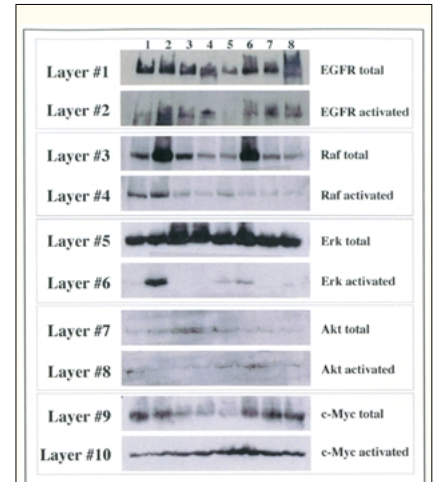


図2. 異なった抗体を用いた検出例  
ケラチノサイト細胞のプロテオミクス解析。  
一つのゲルから転写したメンブランを用いて、EGFR シグナルパスウェイに関連したタンパク質を検出。

### 〔参考文献〕

- 1) Kaufmann, S. H. *et al.* : *Anal. Biochem.*, 161, 89 (1987)
- 2) Albanell, J. *et al.* : *Cancer Res.*, 61, 6500 (2001)

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
578 31301	GS1001	Multi Replica Blotting Kit : Complete	1キット	35,000
505 99191	GS1002	Multi Replica Blotting Kit : Core	1キット	29,000
575 32891	GS1003	Multi Replica Blotting Kit : 5-Stack Complete	1キット	39,000
578-32881	GS1004	Multi Replica Blotting Kit : 5-Stack Core	1キット	33,000

## Mass Spectrometry 用 銀染色キット

### 銀染色 MS キット

本品は、Shevchenkoらの方法<sup>1)</sup>をもとに、質量分析 (Mass Spectrometry) 用サンプル調製のために作製された銀染色キットです。従来の銀染色キットは、増感剤に含まれるグルタルアルデヒドなどによりアミノ基を架橋するため、質量分析前のタンパク質のゲル内消化の効率が悪く、質量分析には向きませんでした。本品では、グルタルアルデヒドを使わずゲル内消化の効率を高めていますので、質量分析に有効です。

〔貯法〕 2 ~ 10 保存

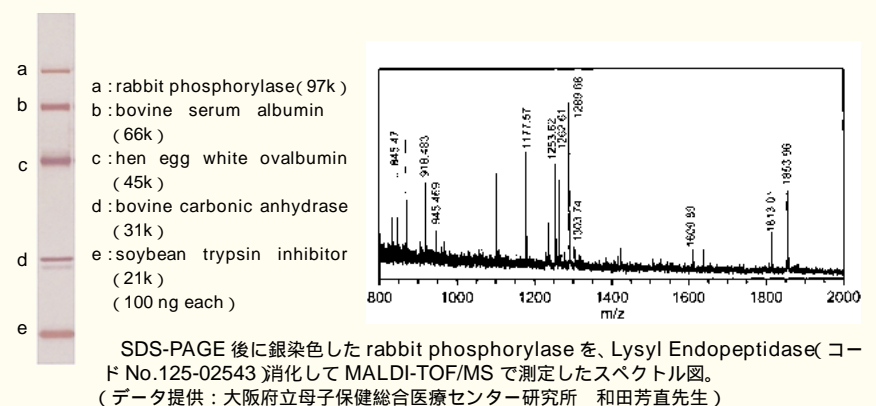
#### 〔参考文献〕

1) Shevchenko, A. *et al.* : *Anal. Chem.*, 68, 85(1996)

#### 〔染色方法〕

固 定 1	固 定 2	洗 浄	増 感	洗 浄	染 色	洗 浄	現 像	停 止	洗 浄
20分	10分	10分	1分	1分×2回	20分	1分×2回	3 ~ 10分	1分	1分×3回

#### 〔質量分析データ〕



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
299-58901	Silver Stain MS Kit	電気泳動用	20 枚用	19,000

#### 〔関連商品〕

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
299-50101	Quick-CBB	電気泳動用	20 用	9,000
299-13841	Silver Stain Kit Wako	電気泳動用	10 枚用	9,000
291-50301	Silver Stain Kit Wako	電気泳動用	10 枚用	9,000
293-57701	Negative Gel Stain MS Kit	電気泳動用	20 回用	11,000

## ユビキチン / プロテアソームシステムの研究に プロテアソーム阻害剤

細胞機能の制御において重要な役割をするユビキチン / プロテアソームシステムでは、まず、標的タンパク質にユビキチンが結合して、タンパク質分解シグナルを出します。これを認識したプロテアソームが標的タンパク質を分解します。本品は、このプロテ

アソームの阻害剤です。

#### 〔参考文献〕

- 1) Saito, Y. and Kawashima, S. : *Neurosci. Lett.*, 89, 10(1988)
- 2) Saito, Y., Tsubuki, S., Ito, H. and Kawashima, S. : *Neurosci. Lett.*, 120, 1(1990)
- 3) Rock, K. L. *et. al* : *Cell*, 78, 761

(1994)

- 4) Lopes, U. G., Erhardt, P., Yao, R. and Cooper, G. M. : *J. Biol. Chem.*, 272, 1289(1997)
- 5) Shinohara, K., Tomioka, M., Nakano, H., Tone, S., Ito, H. and Kawashima, S. : *Biochem. J.*, 317, 38(1996)

コード No.	品名	作用	規格	容量	希望納入価格 (円)
131-14011	MG-115 (Z-Leu-Leu-Nva-CHO)	キモトリプシン様活性をもつプロテアソームの特異的阻害剤。p53 依存性アポトーシスを誘導する <sup>1,2,3,4)</sup> 。	生化学用	5mg	24,000
138-14021	MG-132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO)	細胞透過性をもつプロテアソームの阻害剤。p53 依存性アポトーシスを誘導する <sup>5)</sup> 。	生化学用	5mg	19,000
135-14031	MG-262 [Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)]	細胞透過性をもつプロテアソームの阻害剤。p53 依存性アポトーシスを誘導する <sup>5)</sup> 。	生化学用	100µg	39,000

## 20S プロテアソーム基質

### 20S Proteasome Fluorogenic Substrate ( Suc-LLVY-AMC )

生化学用

キモトリプシン様のプロテアーゼ活性を持つ 20S プロテアソームの基

質です。阻害剤と合わせて用いると、プロテアソーム活性の特異性の研究

に使用できます。

164-20511	5mg	24,000 円
-----------	-----	----------

# 生体試料直接分析用充填剤の開発の試み その3 HPLC 用生体成分前処理カラムの開発

和光純薬工業株式会社 試薬研究所 吉田 貴三子

血清などタンパク質を多量に含む生体試料中の成分、薬物を ODS などの充填剤で分析する場合、前処理として除タンパク操作が必要です。近年、前処理操作を行うことなく生体成分の直接分析可能な充填剤の開発が進められ、筆者等のグループでも生体試料直接分析用充填剤 Wakosil GP-N6 を開発し、本誌 Vol.64 No.2, No.3 に使用例を紹介しました。本充填剤は、前処理カラムとして除タンパクと濃縮を行い、ODS などの分析用カラムに注入し分析を行うカラムスイッチング用としてだけでなく、除タンパクと目的成分の分離を 1 本のカラムで達成できることをコンセプトとして開発したため、粒子径 5 $\mu\text{m}$  のシリカゲルを基材としました。そのため、血清注入量が数十  $\mu\text{l}$  の分析では問題無く使用可能ですが、血清注入量が多くなるとカラム圧力が上昇し耐久性にやや難がありました。また、親水性化合物の保持が小さくタンパク成分との分離が達成されない等の問題もありました。

これら問題点の改善を目的として改良検討を行った結果、親水性逆相型ポリマー充填剤を開発することにより、親水性化合物の保持の確保、シリカゲル系充填剤で問題となるシラノール基の影響を回避することが可能となりました。また、前処理カラム専用として、ポリマーの粒子径を 30 $\mu\text{m}$  に設定したために耐久性が改善し、生体試料の前処理カラムとして理想的となっています。

耐久性の検討として、牛胎児血清 (FBS) を 100 $\mu\text{l}$ 、500 回の連続注入分析を行い、50 回毎に標準液を分析してカルバマゼピンピークの保持時間、理論段数の変化を観察しました。その時の変化とクロマトグラムを図 1、図 2 に示しました。分析開始時と 500 回分析後のカラム圧力の上昇は無く、また保持時間、理論段数の変化はほとんど認められず 500 回以上の使用が可能であることを確認しました。

また、血中濃度のモニタリングが必要とされている気管支拡張薬のテオフィリンは、Wakosil GP-N6 では血清中のタンパク成分との分離が不十分でカラムスイッチング条件の設定が困難であったが、新規に開発した充填剤を前処理カラムとして使用すれば、カラムサイズが 4.0mm $\phi$   $\times$  10mm でも十分に分析可能となりました。分析例としてテオフィリン、カフェインのカラムスイッチング分析時のクロマトグラムを図 3 に、血清添加標準液の検量線と添加回収率を図 4、表 1 に示しました。

以上紹介した新規充填剤は、粒子径 30 $\mu\text{m}$  の親水性逆相型ポリマー充填剤で、親水性化合物の保持が大きくタンパク成分との分離が良い、シリカゲル系充填剤で問題となるシラノール基の影響を回避することが可能、耐久性に優れている、という特長を有しており、今まで除タンパク操作が必要であった生体試料、血清中の成分、薬物を直接注入分析できるシステム開発への適応が広がると考えます。

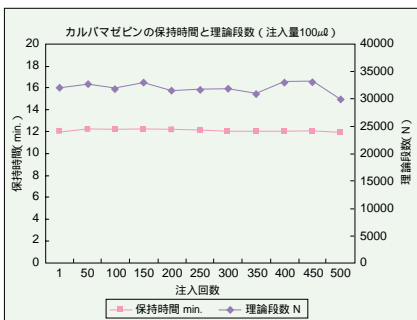


Fig. 1 カラム耐久性(カラムスイッチング分析)

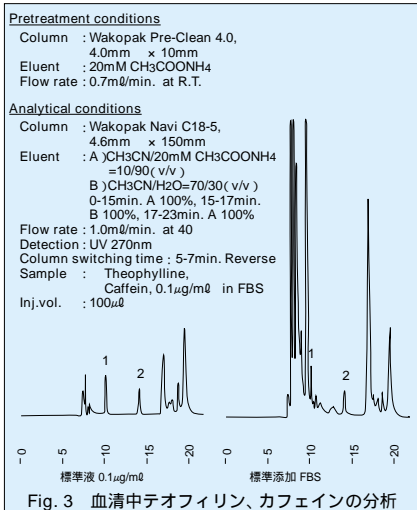


Fig. 3 血清中テオフィリン、カフェインの分析

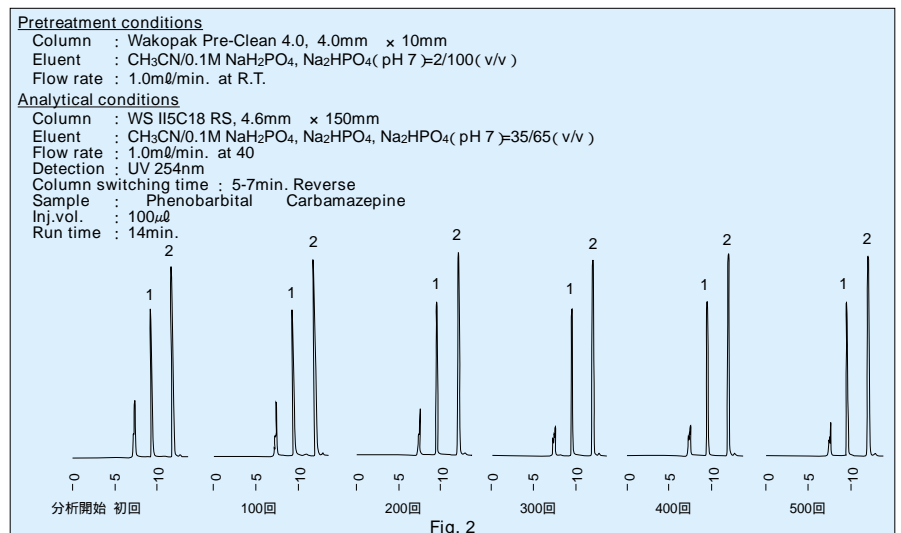


Fig. 2

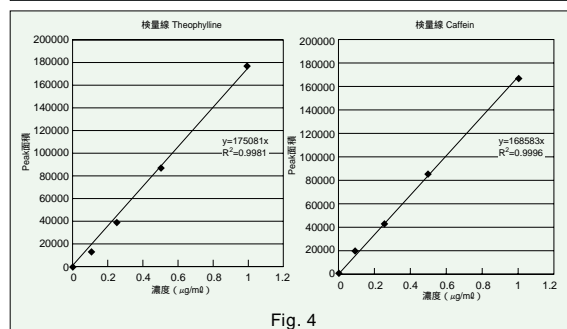


Fig. 4

Table 1

Theophylline 血清添加回収率			
濃度 $\mu\text{g/ml}$	回収率 (%)	n=4	CV (%)
0.10	78.3		3.2
0.25	85.1		5.4
0.50	93.7		4.9
1.00	96.0		3.5

Caffein 血清添加回収率			
濃度 $\mu\text{g/ml}$	回収率 (%)	n=4	CV (%)
0.10	115.0		3.0
0.25	107.3		1.1
0.50	102.7		4.0
1.00	102.2		2.9

## DNPH- アルデヒド分析をトータルサポート アルデヒド類捕集 / 誘導体化専用カートリッジ

### Presep®-C DNPH

アルデヒド類は有害大気汚染物質として、国内では大気汚染防止法、悪臭防止法により規制、測定の対象となっています。Presep®-C DNPH はカルボニル化合物の捕集ならびに 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン (DNPH) による誘導体化を行う専用捕集管です。外装はルアーフィッティングタイプのポリエチレン製カートリッジを採用、大

気捕集や溶媒抽出時の接続、取扱いが容易です。

#### 〔特長〕

低ブランクの実現  
ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド及びアセトンによる汚染を極力抑えました。

(分析例、Fig.1 参照)

#### 〔捕集管の仕様〕

基 材：破砕状シリカゲル  
粒 子 径：75 ~ 150 $\mu$ m  
細 孔 径：7.0nm  
比 表 面 積：450m<sup>2</sup>/g  
充 て ん 量：約 0.8g  
DNPH 量：約 1.8mg  
全 長：5.2cm  
最 大 幅：1.9cm $\phi$   
充 て ん 部：1.0 $\phi$  × 1.7cm

### DNPH アルデヒド分析用システム

#### ワコーパック® WS DNPH- 、専用溶離液

ワコーパック® WS DNPH- は、DNPH- アルデヒドを分析するための HPLC カラムです。専用溶離液を用いることで、米国 EPA で規制されてい

る 15 成分を 20 分以内に分離することが可能です。

(分析例、Fig.2 参照)

#### 〔特長〕

1. 短時間分析が可能
2. グラジエント溶出による多成分一斉分析が可能
3. 優れた耐久力

#### 〔分析例〕

ワコーパック® Wakosil DNPH- を用いた、15 成分モニタリングを行った際の、Presep®-C DNPH ブランク( 捕集管ブランク )、空気サンプリング( 室内空気 )及び DNPH 誘導体標準品のクロマトグラム

ブランク測定 (Fig.1 参照)  
標準品 (Fig.2 参照)

Presep®-C DNPH1 本をアセトニトリルで抽出、5ml メスアップ後 HPLC 測定。  
DNPH 誘導体 15 成分標準品のクロマトグラム

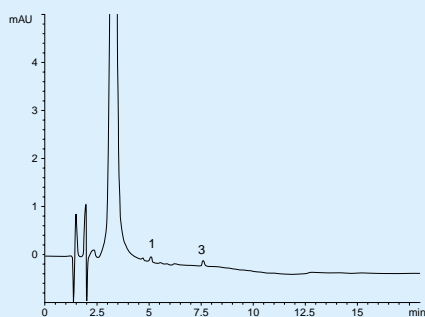


Fig.1 Cartridge Blank

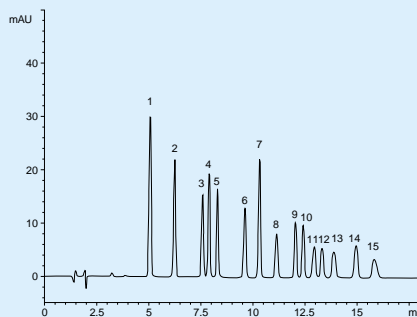


Fig.2 15 Derivatives

#### 〔分析条件〕

Column : Wakosil DNPH- 4.6 × 150mm  
Gradient : A; Wakosil DNPH- 溶離液 A, B; Wakosil DNPH- 溶離液 B  
0-10min. Eluent A 100% Eluent B 100%, 10-16min. Eluent B 100%  
Flow rate : 1.0ml/min. at 35  
Detection : UV 360nm  
Sample : 1) Formaldehyde-2,4-DNPH, 2) Acetaldehyde-2,4-DNPH,  
3) Acetone-2,4-DNPH, 4) Acrolein-2,4-DNPH,

5) Propionaldehyde-2,4-DNPH, 6) Crotonaldehyde-2,4-DNPH,  
7) *n*-, Iso-butylaldehyde-2,4-DNPH,  
8) Benzaldehyde-2,4-DNPH, 9) Isovaleraldehyde-2,4-DNPH,  
10) *n*-Valeraldehyde-2,4-DNPH,  
11) *o*-Tolualdehyde-2,4-DNPH, 12) *m*-Tolualdehyde-2,4-DNPH,  
13) *p*-Tolualdehyde-2,4-DNPH, 14) Hexaldehyde-2,4-DNPH,  
15) 2,5-Dimethylbenzaldehyde-2,4-DNPH  
each 0.5 $\mu$ g/ml (as aldehyde, ketone) 10 $\mu$ l inject

コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格 (円)
290-34251	Presep®-C DNPH	試料前処理用	20 個	29,000
	品 名	カラムサイズ	カラムタイプ	記 号
	Wakopak® WS DNPH-	4.6 × 150mm	デュボン	ワ GD
			ウォーターズ	ワ GW
				希望納入価格 (円)
				60,000
コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格 (円)
236-02181	Wakosil DNPH- Eluent A	高速液体クロマトグラフ用	1 $\ell$	6,000
233-02191	Wakosil DNPH- Eluent B	高速液体クロマトグラフ用	1 $\ell$	6,000

#### 〔関連商品〕

コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格 (円)
011-17741	Acetonitrile Solution	アルデヒド分析用	200ml	4,000

## 調液の手間不要 !!

### アセトニトリル溶液

高速液体クロマトグラフ用

HPLC 分析において、溶媒として各種濃度のアセトニトリルが頻繁に用いられます。本品目群は、HPLC 用アセトニトリルと蒸留水をそれぞれ、1:9、2:8、3:7.....9:1 の割合で混合調液した製品です。調液後、UV や蛍光物質

について保証をしており、HPLC 分析用溶媒として安心してご使用いただけます。

〔規格例〕

外 観 : 無色透明の液体  
 吸 光 度 : 200nm 0.05 以下  
 210nm 0.03 以下  
 220nm 0.02 以下  
 225 ~ 400nm 0.01 以下  
 蛍光試験 : 試験適合

コード No.	品 名	内 容(ml)	容 量	希望納入価格(円)
010-19911	Acetonitrile Solution( 1+9 )	CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O=1:9	1ℓ	4,000
017-19921	Acetonitrile Solution( 2+8 )	CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O=2:8	1ℓ	4,500
014-19931	Acetonitrile Solution( 3+7 )	CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O=3:7	1ℓ	4,500
011-19941	Acetonitrile Solution( 4+6 )	CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O=4:6	1ℓ	5,000
018-19951	Acetonitrile Solution( 5+5 )	CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O=5:5	1ℓ	5,000
015-19961	Acetonitrile Solution( 6+4 )	CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O=6:4	1ℓ	5,500
012-19971	Acetonitrile Solution( 7+3 )	CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O=7:3	1ℓ	5,500
019-19981	Acetonitrile Solution( 8+2 )	CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O=8:2	1ℓ	6,000
016-19991	Acetonitrile Solution( 9+1 )	CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O=9:1	1ℓ	6,000

## タケダ環境汚染診断薬

▲ 武田薬品工業株式会社  
 生活環境カンパニー

### エストロン(E1)ELISA キット

〔キットの特長〕

モノクローナル抗体を使用しているため、製造ロット間で抗体性能にばらつきがなく、環境水中のエストロン(E1)を特異的に検出・測定できます。

定量範囲は 0.05-5 $\mu$ g/l(ppb)と高感度で、固相抽出によりさらに低濃度の試料も測定できます。

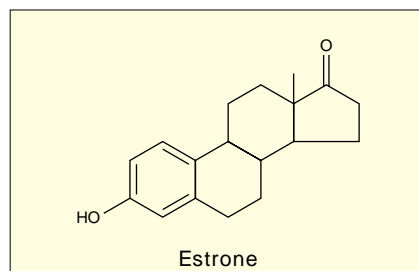
測定値のCV(変動係数)は10%以下で、ばらつきが少なく、高精度です。試料の調製から定量まで2.5時間で測定が完了します。

簡単な操作で多検体を同時に処理できるため、経済的です。

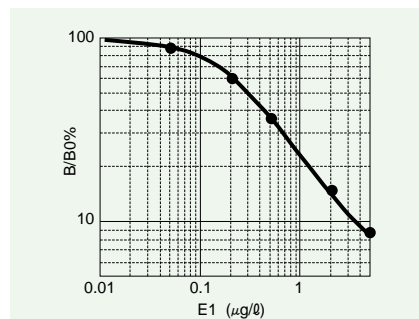
〔エストロンとは〕

環境中には、17 $\beta$ - エストラジオール(E2)以外にも比較的活性の高いエストロゲンが存在しており、ニジマスを用いたピテロゲン生成試験では、エストロン(E1)はE2の1/2 ~ 1/5程度の活性を有するとの報告があります。

一方、河川水ではE2の約5 ~ 20倍濃度のE1が検出されており、総エストロゲン活性に占めるE2以外の女性ホルモンの寄与も、無視できない状況となっています。



〔E1 測定用標準曲線〕



定量範囲は 0.05 ~ 5 $\mu$ g/l(ppb)と高感度で、固相抽出によりさらに低濃度の試料も測定できます。測定値のCV(変動係数)は10%以下で、ばらつきが少なく、高精度です。



〔抗 E1 抗体の交差反応性〕

化合物	交差反応性(%)
Estrone(E1)	100
2-methoxy E1	0.2
17 $\beta$ -Estradiol(E2)	0.3
16-keto-E2	0.2
E2-17-glucuronide	<0.1
E2-3-glucuronide	<0.1
E2-3-sulfate-17-glucuronide	<0.1
Estriol(E3)	<0.1
16-epi-E3	<0.1
E3-16-glucuronide	<0.1
Ethynyl E2	<0.1

〔参考文献〕

- 1) 廣部将人 他:「エストロン定量用ELISAの開発」第36回水環境学会年会講演集, p. 43(2002)

コード No.	メーカーコード	品 名	容 量	希望納入価格(円)
307-13151	92379	Estrone(E1)ELISA Kit	96 回用	70,000



## 食品中のアレルゲン検査キット

### NIPPONHAM FAST ELISA Kit ( Food Allergen Screening Test )シリーズ

マルチアンチゲン - ポリクローナル抗体を用いた ELISA の系で、原材料から加工食品までアレルゲンを含む卵、牛乳、小麦、そば、落花生のタンパク質検出が可能！

〔アレルギー物質を含む食品に関する表示について〕

食品衛生法関連法令の改定により「アレルギー物質を含む食品に関する表示」が新たに定められました。表示が義務付けられるものは、卵、牛乳、小麦、そば、落花生の5つです。これらは特定原材料として指定され、原材料に含まれる場合には定められた方法での表示が義務づけられています。今回の改定では原材料として使用していない場合でも、「混入」や「キャリアオーバー」等により食品中に「含まれる」場合には表示義務の対象になっています。

〔検出法について〕

平成 13 年度厚生科学研究補助金生活安全総合研究事業の食物アレルギー表示に伴う特定原材料の検出法検討会(略称；特定原材料検出法検討会)において、特定原材料の検出法として日本ハムの FAST KIT が検討されています。

〔特長〕

複数の抗原タンパク質を同時検出  
加熱、加圧された加工食品からも検出可能

キットはすべて溶液タイプ

卵、牛乳、小麦、そば、落花生の各専用キットをラインアップ

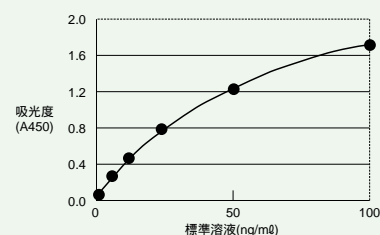
〔キット構成〕

抗体固相化プレート 96 ウエル × 1 枚  
標準溶液 250 μl × 1 本  
希釈用緩衝液 60ml × 1 本  
ビオチン結合抗体 150 μl × 1 本  
酵素 アビジン結合物 150 μl × 1 本  
発色剤 12ml × 1 本  
濃縮抽出用緩衝液 100ml × 1 本  
反応停止液 12ml × 1 本  
濃縮洗浄液 60ml × 1 本



〔FAST ELISA Kit 標準曲線〕

(例：牛乳キット)



上記データはTECAN社のマイクロプレートリーダー「サンライズクラシック」を使用したデータです。(反応時間、反応温度、プレートリーダーの種類により吸光度が変化することがあります。)

〔キット性能〕

測定範囲：1 ~ 100ng/ml

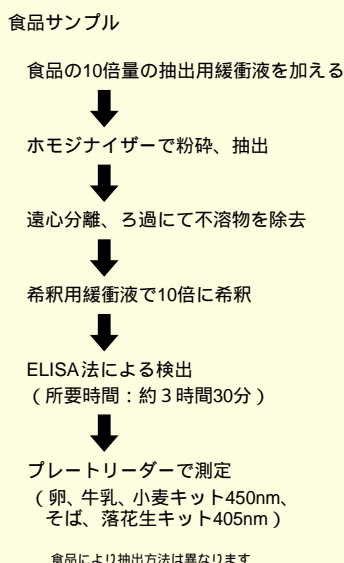
C V 値：10 %以下

有効期限：製造から6ヶ月

〔注意〕

FAST ELISA Kit はあくまで食品中の特定原材料を測定するための研究用試薬であり、食物アレルギー発症の有無を診断する臨床検査薬などではありません。アレルギー発症には大きな個人差があり、アレルゲンの摂取量とアレルギー症状との相関は不明です。

〔食品からの検出操作(例)〕



コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
309 10311	NH RDC KT01	FAST ELISA Kit 卵	96 回用	78,000
306 10321	NH RDC KT02	FAST ELISA Kit 牛乳	96 回用	78,000
303 10331	NH RDC KT03	FAST ELISA Kit 小麦	96 回用	78,000
300 10341	NH RDC KT04	FAST ELISA Kit そば	96 回用	78,000
307 10351	NH RDC KT05	FAST ELISA Kit 落花生	96 回用	78,000

## 第48話 エンドトキシン試験法再考

今回のテーマは、国際調和案の合意をふまえ、日局エンドトキシン(ET)試験法の今後を考えることです。

14局では、国際調和案による変更を取り入れているので、13局と違いが出てきています。第十四改正日本薬局方解説書<sup>1)</sup>には、主な改正点として以下の7点が挙げられています。

(1)「LAL 試薬」が「ライセート試薬」に変更されたこと。これは、ライセート試薬の原料として、アメリカ産 *Limulus polyphemus* とアジア産 *Tachypleus tridentatus* の2種が指定されたためです。

(2)試験結果をめぐる表現で「係争が生じた場合」という文言が追加されたこと。最終的な判定方法として、ゲル化法が取り上げられていることに変更はありません。

(3)耐熱性用具の乾熱処理条件が「通例、250 で少なくとも1時間」から「通例、少なくとも250 で30分間」に変更されたこと。ET不活性化条件を統一することと理解できます。

(4)ゲル化法の限度試験における試料溶液の希釈倍数が「最大有効希釈倍数を超えない範囲」任意に設定できるようになったこと。13局では希釈倍数は最大有効希釈倍数に固定されていました。少ない希釈で検査したい場合や希釈操作の簡単な倍数が好ましい場合があるので、実情に即した変更と思われます。

(5)光学的測定法の反応干渉因子試験及び定量試験における試料溶液へのET添加濃度を、「検量線の中点または中点付近の濃度」と変更されたこと。13局では、検量線の中点濃度となるようにETを添加していました。希釈系列の作り方によっては、中点濃度にすることが困難な場合があっ

たので、これも実情に即していると言えるでしょう。

(6)光学的測定法の反応干渉因子試験及び定量試験における最大有効希釈倍数を、検量線の最小ET濃度を定量限界として計算するように変更されたこと。13局では、検量線の中点濃度をライセート試薬の実質的な定量限界と見なしていました。以前からのFDAの考え方が受け入れられた形です。この方が、定量範囲が広く使い、定量法の利点が有効に使えます。

(7)光学的測定法の反応干渉因子試験における添加ETの回収率の許容範囲が、測定法に関わらず50%~200%と規定されたこと。13局では、検量線が実数目盛りときは75%~125%、対数目盛るときは50%~200%となっていました。すべての方法をゲル化法の許容範囲に合わせたとの見方ができます。

その他の変更点で筆者が興味深いと思うのは、これまでの内径10mmの試験管に試薬と試料を0.1mlずつ添加するという規定がなくなり、試験方法に自由度が出てきたことです。例えば、試験管の径を小さくすることで、同じ感度のライセート試薬でもゲル化感度が高くなると思いますし、試薬の使用量を減らすことで1回あたりの試験費を軽減することができるようになります。これらの方法は、ラベル感度や操作法と関連しますからメーカーの取り組みが必須ですが、商品形態の可能性が広がったという点で興味が持たれます。

これらの変更点も考慮し、これからのET試験を考えてみましょう。

まず、結果について問題が起こった場合はゲル化法で最終の判定を行うという規定は、ゲル化法が他の方法に対して優位であるという印象を与えま

す(日局の見解は、3法は同等とのことですが)。これ以外にも、ゲル化法には、限度試験を行ったとき最も使用試薬の量が少なく経済的であるという利点があります。すると、今後はゲル化法が主流になっていくのでしょうか。確かに、十分な経験と検証によって製造法と試験条件が確立された品目にとって、ゲル化法は優れた方法といえるでしょう。しかし、蛋白製剤など、混入したETが除きにくく、測定への影響が原料や製造ロットによって変わりやすいものは、工程検査の段階からETの定量的検査が必要と思われます。また、ゲル化法では、最大希釈倍数以下の希釈倍率で試験を行ったとき陽性結果が得られると、これが規格に適合しているかどうか分かりません。この場合、もう一度最大希釈倍数で希釈して、試験を行う必要があります。さらに、ゲル化法の判定は、光学的方法に比べて人為的な誤差が出やすいことや必ず測定開始1時間後に人による判定が必要であることも忘れてはなりません。トキシノメーターなら、測定を開始した後は、自動的に機械がET濃度を算出しますし、測定者の拘束時間もありません。試薬の使用量も、検量線作成用に少しよけいにかかるだけなので、それほど問題ではないでしょう。今後のET試験法の方向として、工程管理を含め主な試験には定量法、一部の確立された品目の最終試験にはゲル化法という棲み分けになるのではないのでしょうか。

## 【参考文献】

- 1)第十四改正日本薬局方解説書, p.B-63(廣川書店)(2001)

次回は「第49話 透析療法とエンドトキシン」の予定です。

## ペプチドグリカン、グルカンの高感度検出に

### SLP-HS シングル試薬セット

カイコ (*Bombyx mori*) の体液中にはフェノール酸化酵素前駆体 (Pro-PO) カスケードと呼ばれる生体防御機構が存在し、ペプチドグリカン (PGN) 及び (1-3)- $\beta$ -D-グルカン ( $\beta$ -グルカン) によって反応が開始され、最終的にフェノール酸化酵素前駆体 (Pro-PO) が活性化されます<sup>1,2)</sup>。Pro-PO の活性化機構は、複数のセリンプロテアーゼの活性化を含むカスケード機構であると推測されていますが、まだ十分には解明されていません。このカスケード機構は、異物侵入の際に昆虫体内で認められるメラニン形成に重要な役割を果たしています。

SLP 試薬はカイコの体液をメラニン形成させることなく無菌的に採取・調製した、Pro-PO カスケードの因子を含んだ凍結乾燥品です。本試薬は PGN 及び  $\beta$ -グルカンによって活性化され、試薬に含まれる DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) を酸化し、メラニン色素を生成します。PGN はほとんどの細菌の細胞壁に、 $\beta$ -グルカンも多くの細菌の細胞壁に認められる成分であることから、生成したメラニン色素を指標として、各種微生物の検出が可能です。

#### 〔特長〕

1. 高感度に PGN 及び  $\beta$ -グルカンの検出・定量ができます。
2. 特別な測定装置を必要としない目視判定法による測定が可能です。
3. 冷蔵 (2 ~ 10 ) で 24 ヶ月安定です。

#### 〔セット内容〕

1. SLP-HS 0.2ml 用 × 20 バイアル  
感度 : 10pg/ml (PGN) ×  
1pg/ml ( $\beta$ -グルカン)  
(トキシノメーターで 120 分  
以内に検出)
2. SLP 溶解液 1.0ml × 20 バイアル
3. 標準液 0.5ml × 1 バイアル

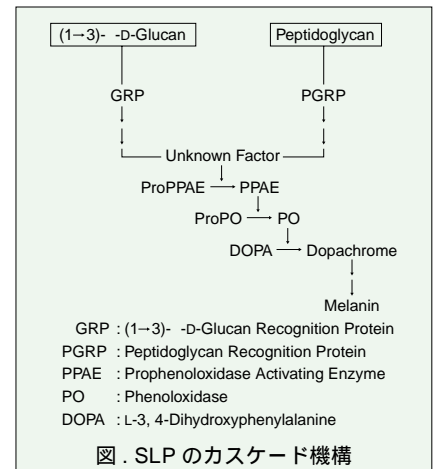
#### 〔原理〕

SLP の活性化機構は右の図のように考えられています。すなわち PGN または  $\beta$ -グルカンがそれぞれの認識タンパク質 (PGRP または  $\beta$ GRP) と結合することにより、Pro-PO カスケードの反応が開始され、最終的に Pro-PO が活性化されます。活性化した PO によって試薬に含まれる DOPA が酸化され、結果として黒色のメラニン色素が生じます。

目視判定法では、一定時間反応させた後、反応液の色調の変化を観察することにより判定を行います。

トキシノメーターを用いた比色時間分析法では、活性化に伴って生じる色素量を透過光量比の変化として測定し、透過光量比があらかじめ設定したしきい値に達するまでの反応時間を活性化時間 (Ta) として、Ta を指標に SLP 活性化物質 (PGN 及び  $\beta$ -グルカン) を定量します。

#### 〔貯法〕 2 ~ 10 保存



#### 〔参考文献〕

- 1) 芦田正明: 「無脊椎動物の生体防御」名取俊二ら編, p.111 (学会出版センター (株) (1992))
- 2) Ashida, M. and Yamazaki, H. I. : "Molting and Metamorphosis" ed. by Ohnishi, E. and Ishizaki, H., Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, p.239 (1990)
- 3) Tsuchiya, M., et al. : *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 15, 129 (1996)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
293-58301	SLP-HS Single Reagent Set	微生物検出用	20 回用	45,000

#### 〔関連商品〕

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
297-51501	SLP Reagent Set	微生物検出用	3ml 用 (マイクロプレート法で約 60 回の測定ができます)	19,000
293-26551	Limulus Test Tube (12 × 75mm, エンドトキシンフリー)	エンドトキシン検出用	10 本入 × 10	12,000
293-28251	Aluminium Cap (14.7 × 18mm, エンドトキシンフリー)	エンドトキシン検出用	10 個 × 10	10,800
294-31351	Bio-Clean tips Wako 1000	-	100 本入	2,800
290-31451	Bio-Clean tips Wako 200	-	100 本入	2,800
298-32851	Bio-Clean tips Wako Extend S	-	100 本入	6,000

KIA 株式会社 ケーアイエー細胞病理研究所 石川喜美男、石川 琢也  
 株式会社 保健科学研究所 三瓶 接子  
 京浜予防医学研究所 診断病理センター 宮 哲正、久川 芳三  
 牛込新一郎

## 第 8 回 非上皮性腫瘍 (5) 横紋筋腫・横紋筋肉腫

非上皮性腫瘍の中で横紋筋性の腫瘍は数少なく、良性は横紋筋腫、悪性は横紋筋肉腫がある。

### 横紋筋腫

分化した横紋筋細胞より発生する良性腫瘍で、過誤腫性格をもち咽頭部や頭頸部などに発生しやすく、珍しい腫瘍である。腫瘍細胞は紡錘形で、内部に横紋様構造を認める。

### 横紋筋肉腫

幼若な横紋筋細胞より発生する悪性腫瘍で、頭頸部、四肢の筋肉、精巣周囲などに発生しやすく、小児期に見

られることが多い。胎児型、包巣型、多形細胞型に分類される。

悪性度の高い腫瘍で、腫瘍細胞は HE 染色やマッソントリクローム染色で好酸性に染色され、グリコゲンを含むことが多い。また、組織型により発生部位などが異なる。リンタングステン酸ヘマトキシリン染色で、腫瘍細胞に横紋と筋原線維が見られることが多い。これは腫瘍細胞の特異的な像である。胞巣型横紋筋肉腫では、鍍銀染色で細網線維が腫瘍細胞に密着し「干し柿状」に見えることが多い。免疫学的検査ではミオグロビン、デスミンなどが用いられ、電顕の特徴として、細胞質内に Z

帯様の構造を示す myofilament、r-ER の発達、pinocytotic vesicle の出現などが見られる。円形～類円形の腫瘍細胞が増殖し、時に横紋筋肉腫の特徴を示さない場合もあるが、免疫学的検査(ミオグロビン抗体)で有用な情報を得ることがある。

### 〔参考文献〕

- 1) 石川栄世, 遠城寺宗知, 牛込新一郎 他: 軟部腫瘍アトラス. 東京文光堂. 第一版第一刷. 1989.
- 2) 石川喜美男, 三瓶接子 他: 軟部腫瘍の免疫組織化学と電顕像 - 低分化な軟部腫瘍への応用 -. 第 20 回日臨技病理研究会テキスト. 1994.
- 3) 田所衛, 石川喜美男, 三瓶接子 他: 実践病理組織細胞学カラー図鑑. HBJ. 1997.

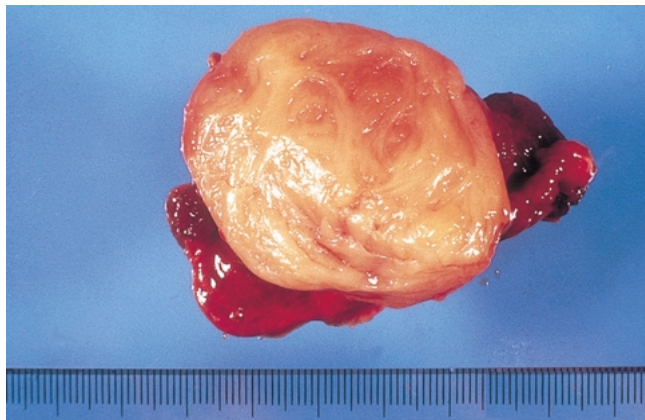


図 1. 横紋筋腫 (28 歳男性)  
 頸部に発生したもの。過誤腫瘍性格の腫瘍。稀である。

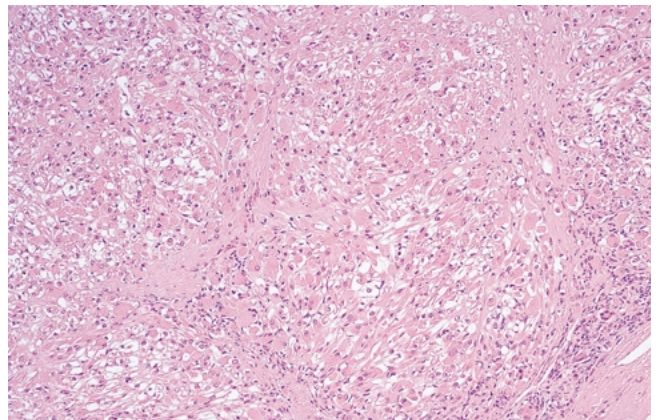


図 2. 横紋筋腫 HE 染色 × 10  
 紡錘形や円形の腫瘍細胞が認められる。核異型などはなく良性腫瘍であることがわかる。

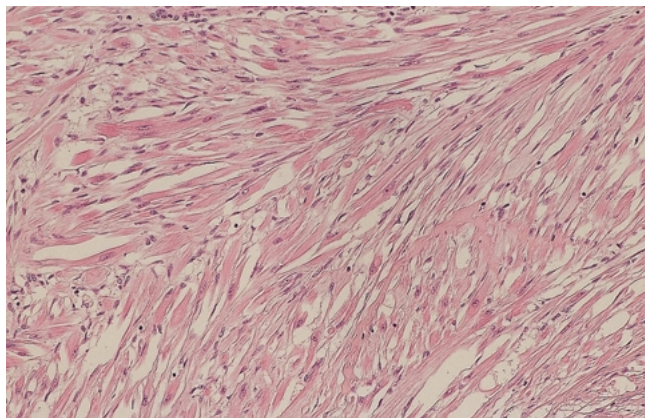


図 3. 横紋筋腫 HE 染色 × 20  
 紡錘形の細胞を中心に撮影したもので、円形の腫瘍細胞に混ざって横紋をもった細胞が認められる。

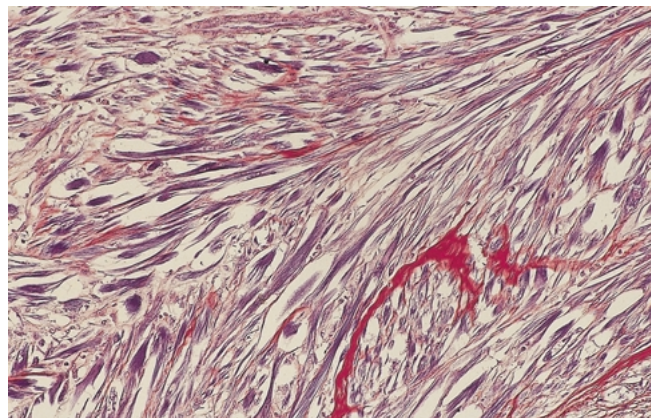


図 4. 横紋筋腫 PTAH(リンタングステン酸ヘマトキシリン)染色 × 20  
 長い紡錘形の腫瘍細胞内に、青紫色に染まる横紋構造が明瞭にわかる。

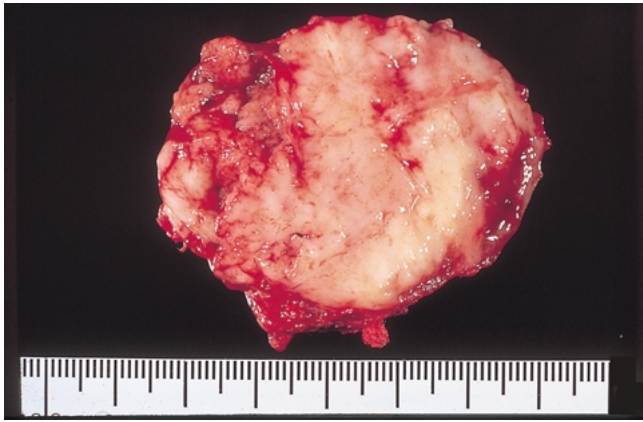


図5. 横紋筋肉腫(胎児型)  
5才男児の頸部に発生したものの。被膜を欠く。

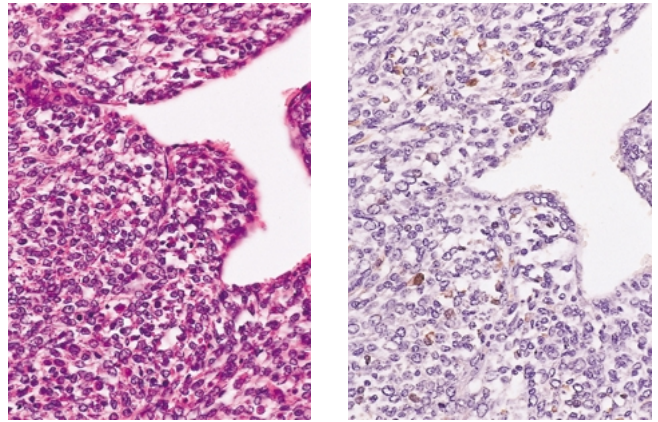


図6. 横紋筋肉腫(胎児型) 左:HE染色、右:酵素抗体法(SAB法) × 20  
左では円形~類円形の腫瘍細胞が増生している。右は腫瘍細胞にミオグロビン抗体で陽性を示し、横紋筋肉腫の特徴を示している。

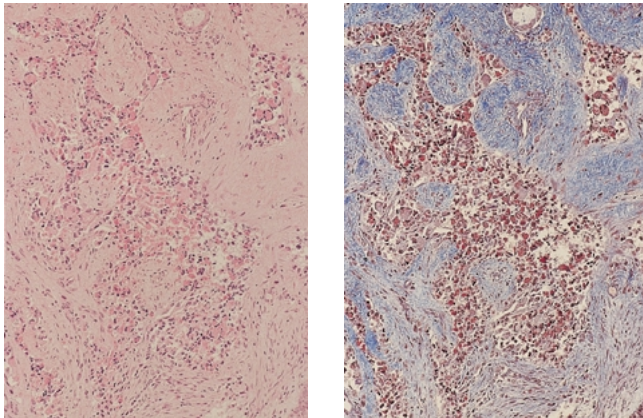


図7. 横紋筋肉腫(胞巣型) 左:HE染色、右:マッソントリクローム染色 × 40  
円形の核異型の強い腫瘍細胞集簇が線維で囲まれ、胞巣を作っている。右では膠原線維が青く染色され、腫瘍細胞の細胞質は好酸性に染色されている。

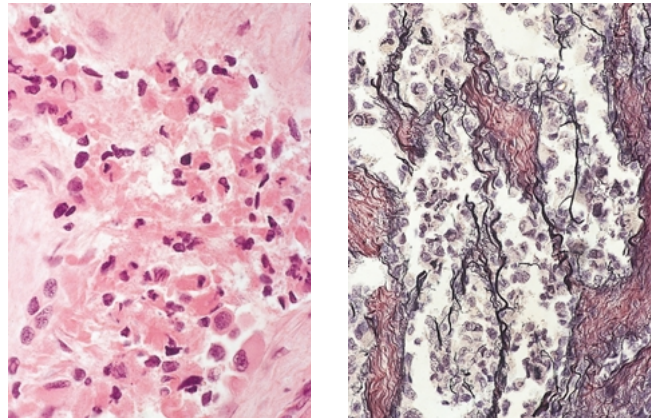


図8. 横紋筋肉腫(胞巣型) 左:HE染色、右:鍍銀染色 × 10  
左は図7の拡大像で腫瘍細胞の細胞質は好酸性に染色され、右では細網線維が黒色に鍍銀され、胞巣内に伸び腫瘍細胞に密着し「干し柿状」に見える。

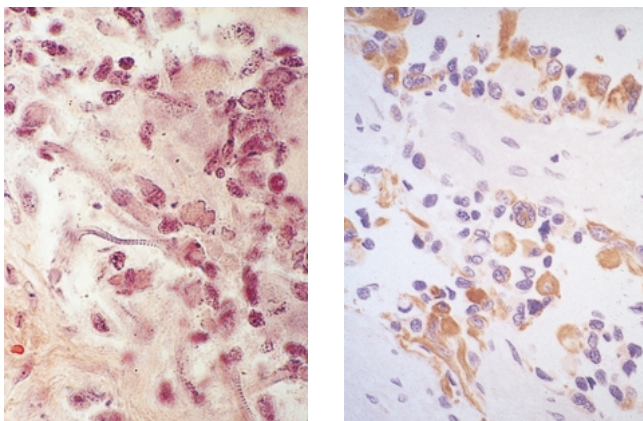


図9. 横紋筋肉腫(胞巣型) 左:PTAH染色 × 60、右:酵素抗体法(ABC法) × 40  
左では、未熟な腫瘍細胞に混じって紡錘形の分化した細胞の胞体内に横紋が明瞭に確認できる。右ではミオグロビン抗体で陽性を示している。

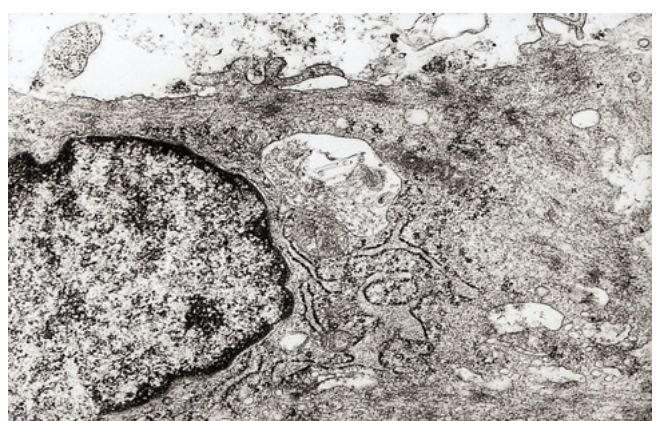


図10. 横紋筋肉腫(胞巣型) TEM像 × 10000  
多数のmyofilamentesをもつ腫瘍細胞内に一部、Z帯様構造を呈している。r-ERは発達し、pinocytotic vesicleも見られる。



図 11. 横紋筋肉腫(多形細胞型)  
28才男性の臀筋内に発生したものの。出血、壊死が目立っている。

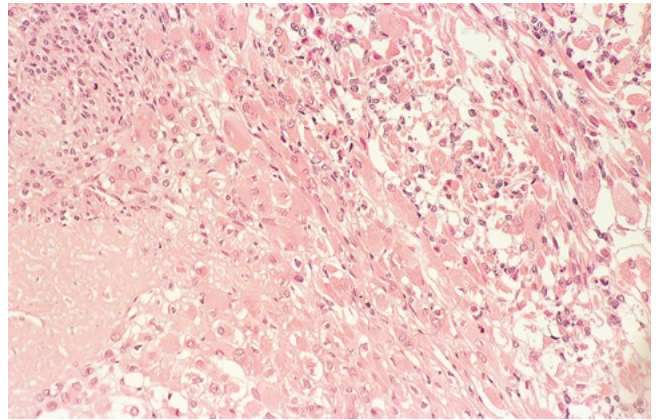


図 12. 横紋筋肉腫(多形細胞型) HE 染色 × 10  
腫瘍細胞は紡錘形～円形からなる。細胞質は好酸性かつ細線維状で核異型がある。

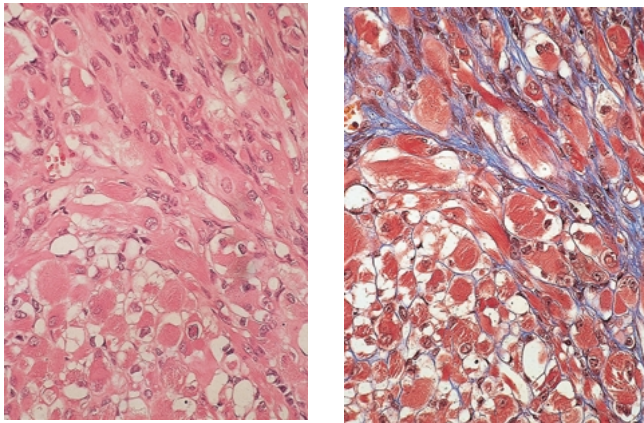


図 13. 横紋筋肉腫(多形細胞型) 左:HE 染色、右:マッソントリクローム染色 × 40  
核異型のある腫瘍細胞は紡錘形～円形を呈し、好酸性に染色されている。右では一部横紋構造が明瞭にわかる。

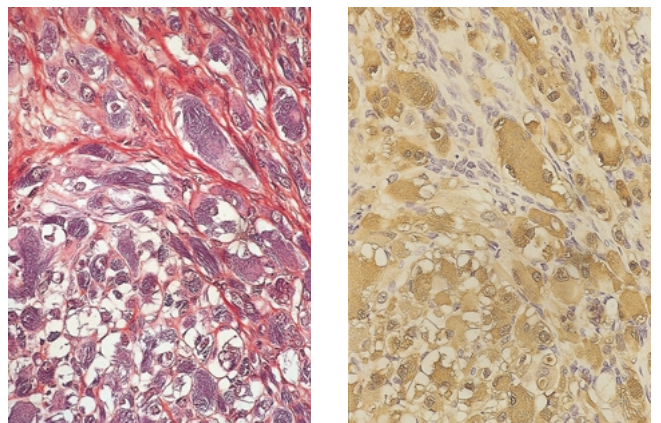


図 14. 横紋筋肉腫(多形細胞型) 左:PTAH 染色、右:酵素抗体(ABC)法 × 40  
左は紡錘形の腫瘍細胞内に横紋様構造が明瞭に確認できる。また円形に腫瘍細胞内の細網線維も明瞭に分かる。右では、ミオグロビン抗体で腫瘍細胞が陽性を示している。

今回で非上皮性腫瘍シリーズは終了です。

## 組合組織の染色 ~マッソントリクローム染色~

マッソントリクローム染色は膠原線維の染め分けを目的とした染色法で鉄ヘマトキシリンで核を黒く、マッソ液で細胞質を赤く、アニリンブルーで膠原線維を青く染めるため、トリクローム(3色染色)と呼ばれています。

### ワイゲルト鉄ヘマトキシリン染色セット

〔構成〕

ワイゲルト鉄ヘマトキシリン液 ...  
500ml × 1本  
(1% ヘマトキシリン-96% アルコール)  
ワイゲルト鉄ヘマトキシリン液 ...  
500ml × 1本  
(2% 塩化第二鉄-0.25% 塩酸)

〔調製法〕

用時、 : = 1 : 1 混合して下さい。

### マッソ液

〔基本組成〕

1% ポンソー酸水溶液  
1% 酸フクシン液 100ml + 氷酢酸  
0.2ml  
0.5% アゾフロキシリン液 100ml +  
氷酢酸 0.2ml

〔調製法〕

60ml + 20ml + 20ml を蒸  
留水 400ml に溶かし、氷酢酸 20ml  
を添加して下さい。

### アニリンブルー液

〔基本組成〕

アニリンブルー : 0.4g  
蒸留水 : 100ml  
氷酢酸 : 8ml

### 0.8% オレンジ G 溶液

〔基本組成〕

オレンジ G : 0.8g  
蒸留水 : 100ml  
氷酢酸 : 適宜

〔参考文献〕

田所 衛、石川喜美男、小沼利光:『実  
践 病理組織細胞学カラー図鑑』、p287  
(HBJ 出版局) 1993)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
298-21741	Weigert's Iron Hematoxylin Staining Set	病理研究用	1set	12,000
133-13775	Masson Slution	病理研究用	500ml	4,000
015-18045	Aniline Blue Solution	病理研究用	500ml	2,200
159-02245	0.8%Orange G Solution	病理研究用	500ml	2,600

## MMP 活性の局在検出法 Film in situ Zymography

### MMP in situ Zymo-Film

### MMP-PT in situ Zymo-Film

Zymo-Film には特殊処理されたゼラチンがコートされており、プロテアーゼにより分解されたゼラチンの消化痕を可視化することにより、凍結組織切片や新鮮細胞の MMP (Matrix metalloproteinase) 活性を簡単に検出することができます。がんの浸潤・転移、リウマチ、動脈硬化薬などの研究にご利用下さい。

#### 〔特長〕

- MMP in situ Zymo-Film は、MMPs、トリプシンを始めゼラチンを基質とする種々のプロテアーゼ活性を検出することができます。
- ゼラチン膜に 1,10- フェナントリン (MMP 阻害剤) を含有する MMP-PT in situ Zymo-Film と組合せて使用することにより、プロテアーゼ活性が MMP 由来かどうか確認することができます。
- 従来、不可能であった組織中の MMP 活性の局在を検出することができます。
- 他法との組合せにより、MMP の種類を特定することができます。

#### 〔キット内容〕

Zymo-Film	50 枚
Holder	2 枚
Cover film	52 枚

#### MMP in situ Zymo-Film

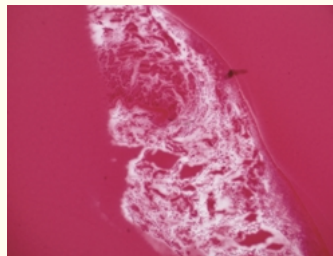
MMPs、トリプシンを始めゼラチンを基質とする種々のプロテアーゼ活性を検出することができます。

#### MMP-PT in situ Zymo-Film

ゼラチンには MMP 阻害剤である 1,10- フェナントリンが含まれており、プロテアーゼ活性が MMP 由来かどうか確認する事ができます。

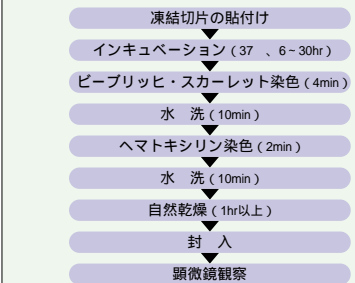
#### 〔検出例〕

マウス小腸

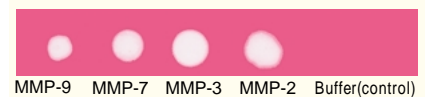


ビーブリッヒスカーレット / ヘマトキシリン染色

#### 〔使用法〕



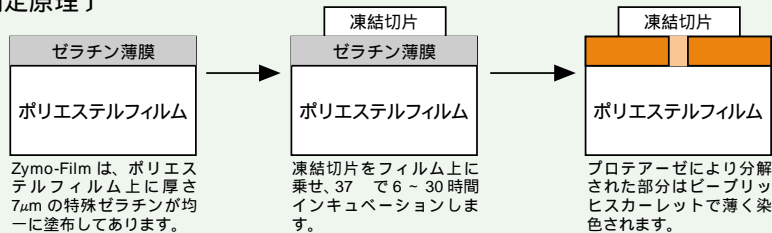
#### 〔特異性〕



#### 〔参考文献〕

- 1) 根守良一、立川哲彦：組織培養工学，25，29 (1999)
- 2) Nakada, M. et al. : Am. J. Pathol., 154, 417 (1999)
- 3) Nakamura, H. et al. : Cancer Res., 59, 467 (1999)
- 4) Ohashi, K. et al. : Cancer, 88, 2201(2000)
- 5) Koyama, H. et al. : Eur. J. Cancer, 36, 2164 (2000)
- 6) Furuya, M. et al. : Gynecol. Oncol., 78, 106 (2000)
- 7) Furuya, M. et al. : Human Pathology, 32, 163 (2001)
- 8) Lengyel, E. et al. : Gynecol. Oncol., 82, 291 (2001)
- 9) Iwata, H. et al. : Breast Cancer, 8, 111(2001)
- 10) Kaneyoshi, T. et al. : Clin. Cancer Res., 7, 4027(2001)
- 11) Yamanaka, H. et al. : Lab. Invest., 80, 677 (2000)
- 12) 伊東宏絵、井坂恵一他：日本産婦人科学会雑誌，52，79(2000)
- 13) M.A.M. Yahia Khandoker et al. : Biol. Reprod., 65, 72(2001)
- 14) Ikeda, M. et al. : Clin. Cancer Res., 6, 3290 (2000)
- 15) 高橋美穂、杉浦剛他：第 10 回日本がん転移学会総会，2A12 (2001)

#### 〔測定原理〕



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
295-58001	MMP in situ Zymo-Film	生化学用	50 回用	25,000
291-58101	MMP-PT in situ Zymo-Film	生化学用	50 回用	35,000

## MMP in situ Zymo-Film 用染色液

### Biebrich Scarlet Stain Solution

#### 病理研究用

MMP in situ Zymo-Film 用の染色液です。この染色法では、ヘマトキシリンとの二重染色により形態観察も同時に行えるのが特長ですが、プロテアーゼ活性の強さに限定して評価したい場合はビーブリッヒスカーレット単独染色をお勧めします。

MMP in situ Zymo-Film は、この他、アミドブラック 10B による染色も可

能です。この場合は、コントラストが強くなる見えますが、ヘマトキシリン等の核染色をしても見えにくいので、二重染色には適しません。

#### 〔製法〕

ビーブリッヒスカーレット 0.45g を蒸

留水 75ml に添加し、トリクロロ酢酸 4.5g 及び 100% エタノール 75ml を添加。スターラーで攪拌して溶解させ、ろ過して不溶分を取除いています。

021-14861 200ml 6,500円

#### 〔関連商品〕

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
131-09665	Mayer's Hematoxylin Solution	病理研究用	500ml	4,200
015-02192	Amido Black 10B	和光一級	25g	2,800

# グリアにおける脳虚血ストレス抵抗性蛋白質の発現

北海道大学・大学院薬学研究科 上原 孝、野村 靖幸

前回は脳虚血ストレスによるニューロン死惹起機構について述べたが、今回はグリアの反応についてまとめることとする。

一般にニューロンは虚血ストレスに対して脆弱であり細胞死に陥るのに対して、グリアは抵抗性を示し、ニューロンが脱落した部位においてはグリオシスと呼ばれる細胞増殖が観察される。このようなことから、グリアでは強度なストレスが負荷された際に、何らかの防御機構が働くことによって抵抗性を新たに獲得していることが推定され、その因子の単離・同定が進められている。また、脳虚血ストレス、低酸素ストレスは小胞体ストレスとして作用し、変性蛋白質の蓄積をもたらす。小胞体はこの異常を感知し、UPR (unfolded protein response) と名付けられた特異的な反応 (情報伝達系) を活性化させる。これらの反応によって、種々のストレス蛋白質が誘導され、細胞死惹起や細胞死抑制/生存の制御を行っていると考えられている。

脳虚血によって発現が上昇する蛋白質として初期に同定されたものの一つに、熱ショック蛋白質 (HSP) がある。HSP にはその分子量から様々な種類が報告されている。中でも、細胞質に存在する 70 kDa HSP (HSP70) は脳虚血モデル動物脳において発現が上昇し、抵抗性に関わっていることが報告されている<sup>1)</sup>。HSP70 は変性した蛋白質を正常に戻す分子シャペロンとして働くばかりでなく、Apaf-1 に結合してカスパーゼ活性化を抑制することが近年報告された<sup>2)</sup>。したがって、ストレスによる HSP70 の誘導はデスシグナルを抑制することで、抵抗性を獲得することが推定されている。

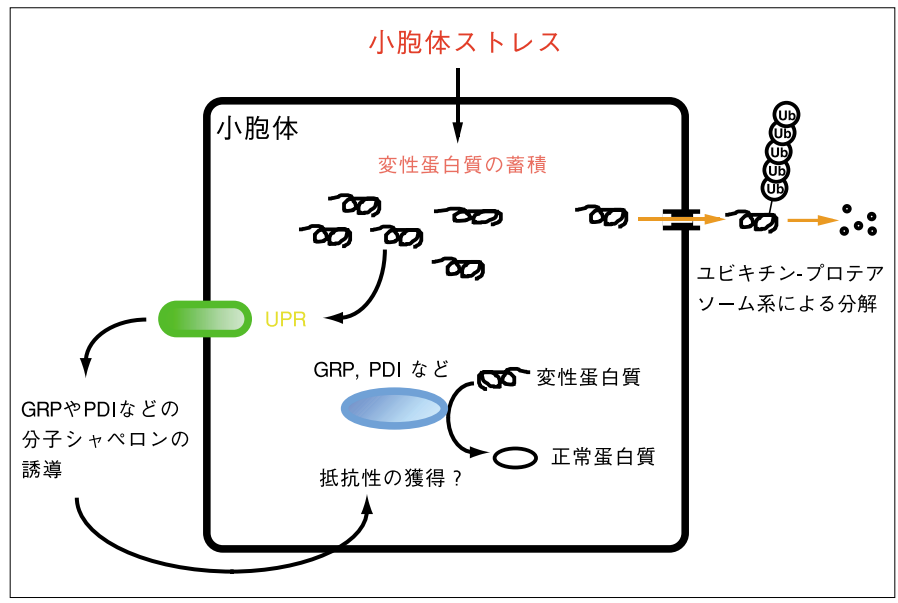
また、HSP と並んで解析が進められ

ている蛋白質として、グルコース調節蛋白質 (GRP) がある。とくに GRP78 (BiP) は小胞体に存在し、HSP70 と同様に分子シャペロンとして機能している。さらに、GRP78 の機能として、UPR を介する小胞体膜一回貫通型キナーゼである IRE1 や PERK と結合し、その活性を制御することが挙げられる。小胞体では GRP78 は IRE1 や PERK などの分子と結合することでその活性を負に調節している。脳虚血などの小胞体ストレス負荷はこの結合を解離させ、IRE1 や PERK の二量体化 (あるいは多量体化) を促進させることでキナーゼ活性を亢進させ、下流にシグナルを伝達させる<sup>3)</sup>。最終的に本シグナルは GRP などの小胞体特異的に存在する蛋白質、とくに分子シャペロン群の誘導をもたらす。したがって、ストレス負荷により GRP78 などの up-regulation が観察され、変性蛋白質の修復が亢進することにより危機的な状況 (あるいは細胞死) から逃れられると推定されている。

新生蛋白質の成熟の過程で必須な酵素の一つに蛋白質ジスルフィドイソ

メラーゼ (PDI) が広く知られているが、本蛋白質も脳虚血や低酸素ストレスで誘導される。PDI は小胞体内腔に存在しており、システイン残基間の S-S 結合の形成や既に形成されている S-S 結合を開裂し、他の部位との新規 S-S 結合を形成する rearrangement に関与している。さらに、PDI はチオレドキシソ様構造を分子内に二カ所有しており、分子シャペロンとしても機能することが明らかとなっている。したがって、PDI は蛋白質成熟に関与するばかりでなく、ストレス環境下での抵抗因子として機能することが予想される。PDI のニューロンへの強制発現によって低酸素や小胞体ストレスによるアポトーシスが解除されることから、変性蛋白質の修復によって細胞死が免れると推定される<sup>4)</sup>。

ここに示した以外にも、抵抗性獲得に関与していることが示されている蛋白質は数多く報告されている。神経栄養因子もその一つであるが、ORP150 と呼ばれる蛋白質も疾患時に誘導が観察され、その強制発現によって細胞死が特異的に抑制されることが明らか





となっている<sup>5)</sup>。

アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の発症に小胞体機能の異常が関わっていることが明らかにされつつある。病原遺伝子の変異によって、異常蛋白質の蓄積、あるいは排除機構の低下がもたらされ、蛋白質の品質管理が損なわれる結果、疾患が進行するという説が唱えられている。ストレス抵抗性獲得機構と神経

変性疾患の発症機構の解明はリンクしていることが充分予想され、将来の創薬のターゲットになる可能性も考えられる。

〔参考文献〕

- 1) Ohtsuki, T., Matsumoto, M., Kitagawa, K., Taguchi, A., Meda, Y. et al. : Brain Res. 614, 279( 1993 )
- 2) Saleh, A., Srinvaula, S.M., Balkir,

- L., Robbins, P.D., and Alnemri, E.S.: Nat. Cell Biol. 2, 476( 2000 )
- 3) Bertolotti, A., Zhang, Y., Hender-shot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. : Nat. Cell Biol. 2, 326( 2000 )
- 4) Tanaka, S., Uehara, T., and Nomura, Y. : J. Biol. Chem. 275, 10388( 2000 )
- 5) Tamatani, M., Matsuyama, T., Yamaguchi, A., Mitsuda, N., Tsukamoto, Y. et al. : Nat Med. 7, 317( 2001 )

## ◆New Products◆

### シークワーシャー由来フラボノイド

#### ノビレチン、タンゲレチン

ノビレチン、タンゲレチンは柑橘系果実シークワーシャーの果汁に含まれるポリメトキシフラボノイドです。血圧上昇抑制作用、血糖値上昇抑制作用など、その多様な作用が注目されています。

〔参考文献〕

- 1) 石浜恵規、青山美子、林 薫 他 : 日本栄養・食糧学会総会講演要旨集, 54, 16( 2000 )
- 2) 指田 豊 : 果実日本, 54( 8 ) 7( 1999 )
- 3) Rooprai, H. K., et al. : Neuropathol. Appl. Neurobiol., 27( 1 ), 29( 2001 )

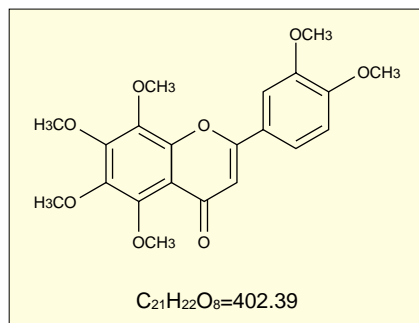
#### Nobiletin

生化学用

〔規格〕

含量( HPLC ): 95.0% 以上

溶解性: メタノールに可溶



149-07521 10mg 20,000 円

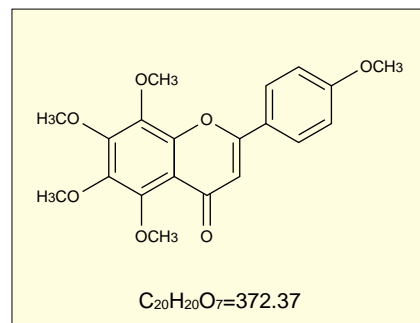
#### Tangeretin

生化学用

〔規格〕

含量( HPLC ): 95.0% 以上

溶解性: メタノールに可溶



208-15671 10mg 20,000 円

### 第 18 回 Wako ワークショップ

#### 「糖尿病におけるトランスレーショナルリサーチの展望」

日 時: 平成 14 年 11 月 19 日( 火 )10 時 ~ 17 時

場 所: 千里ライフサイエンスセンター 5 階ライフホール( 大阪府豊中市新千里東町 1 丁目 4 番 2 号 )

総合企画: 神戸大学 大学院 医学系研究科 糖尿病代謝・消化器・腎臓内科 春日 雅人 教授

講演プログラム:

開催挨拶	和光純薬工業(株)	遺伝素因と糖尿病の発症	門脇 孝	東京大院・医
はじめに	春日雅人 神戸大院・医	肥満と糖尿病の発症	松澤佑次	大阪大院・医
インスリン分泌の分子機構	清野 進 千葉大院・医	糖尿病細小血管症の分子機構	山本 博	金沢大院・医
インスリン分泌と糖尿病の発症	清野 裕 京都大院・医	糖尿病大血管障害の分子機構	山田信博	筑波大・医
小胞体ストレスと糖尿病	荒木栄一 熊本大・医	おわりに	春日雅人	神戸大院・医
インスリン作用機構と糖尿病の発症	春日雅人 神戸大院・医	閉会挨拶		和光純薬工業(株)

申込・連絡先: 和光純薬工業株式会社 試薬営業本部 学術部 ワークショップ係

TEL: 03-3270-8243 FAX: 03-3270-8582 E-mail: labchem-tec@wako-chem.co.jp

定 員: 450 名( 先着順 )

## BFP pQBI 50-fA GFP/BFP pQBI 25/50-fN

本品はオワンクラゲ由来の GFP/BFP ベクターです。熱、広範囲 pH、界面活性剤等の各種条件下で哺乳細胞中にて安定に GFP/BFP フュージョンタンパク質の発現及び細胞内でのタンパク質の挙動を観察するためにデザインされています。個々のベクターには MCS 中に Polyglycine (Gly × 5) のフレキシブルリンカーを含むことに

よりフュージョンタンパク質が発現しやすいようになっています。

調製：それぞれの pQBI 50-fA, pQBI 25/50-fN を保持した *E. coli* より、CsCl-EtBr 密度勾配遠心法により分離、精製

波長：BFP Ex. 384nm Em. 450nm (フィルター：Excitation filter 460/40 nm Emission filter 360/40 nm)

GFP Ex. 474nm Em. 509nm (フィルター：Excitation filter 530/30 nm Emission filter 485/20 nm)

純度：OD260/OD280=1.7 ~ 1.9  
形状：10 mmol/Tris-HCl, 1.0 mmol/l EDTA (pH 8.0)

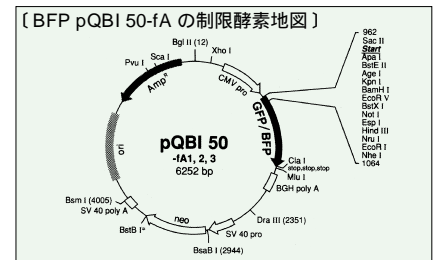
貯法：-20

## BFP pQBI 50-fA1,-fA2,-fA3

本品は BFP の N 末端側にフュージョンタンパク質を作り Flexible linker と kozak 配列により短いペプチドのクローンを容易にするようになっています。開始コドンの前に kozak 配列を導入することにより発現効率を高め

ています。また MCS に各々 3 種類のリーディングフレームを持つベクターを用意しています。

並び方は MCS の前に kozak 配列 ATG 開始コドン、MCS、BFP シークエンスの順に配置しています。



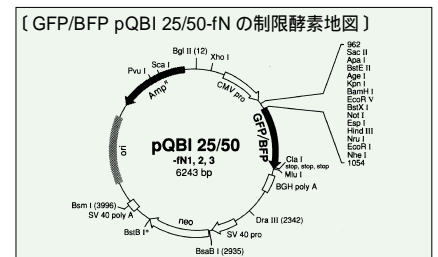
〔BFP pQBI 50-fA1,-fA2,-fA3 のクローニングサイト〕

ベクター	クローニングサイト
-fA1	SacII ↓ optimized ATG ↓ ApaI ↓ BstEII AgeI ↓ KpnI ↓ BamHI ↓ EcoRV ↓ BstXI ↓ NotI ↓ CellIII ↓ HindIII NruI ↓ EcoRI ↓ Flexible Linker ↓ NheI ↓ ... CCG CGG GCC ACC ATG GGG CGG TTA CCG GTA CCG GAT CCA GAT ATC TGG GCG GCC GGT CAG CAA GCT TCG CGA ATT C GA GGC GGA GGT GGA GCT AGC ... Met Gly Ala Arg Leu Pro Val Pro Asp Ile Trp Ala Ala Gln Gln Ala Ser Arg Ile Arg Gly Gly Gly Gly Ala Ser ... GFP cds
-fA2	SacII ↓ optimized ATG ↓ ApaI ↓ BstEII AgeI ↓ KpnI ↓ BamHI ↓ EcoRV ↓ BstXI ↓ NotI ↓ CellIII ↓ HindIII NruI ↓ EcoRI ↓ Flexible Linker ↓ NheI ↓ ... CCG CGG GCC ACC ATG G G GGC CCG GTT ACC GGT ACC GGA TCC AGA TAT CTG GCG GGC CGC TCA GCA AGC TTC GCG AAT TC GA GGC GGA GGT GGA GCT AGC ... Met Glu Gly Pro Val Thr Gly Thr Gly Ser Arg Tyr Leu Gly Gly Arg Ser Ala Ser Phe Ala Asn Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser ... GFP cds
-fA3	SacII ↓ optimized ATG ↓ ApaI ↓ BstEII AgeI ↓ KpnI ↓ BamHI ↓ EcoRV ↓ BstXI ↓ NotI ↓ CellIII ↓ HindIII NruI ↓ EcoRI ↓ Flexible Linker ↓ NheI ↓ ... CCG CGG GCC ACC ATG G GGG CCC GGT TAC CCG TAC CGG ATC CAG ATA TCT GGG CGG CCG CTC AGC AAG CTT CGC GAA TTC GA GGC GGA GGT GGA GCT AGC ... Met Glu Gly Pro Gly Tyr Arg Tyr Arg Ile Gln Ile Ser Gly Arg Pro Leu Ser Lys Leu Arg Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ala Ser ... GFP cds

## GFP/BFP pQBI 25/50-fN1,fN2,fN3

本品は GFP/BFP の N 末端側に融合タンパク質を作ります。転写が目的のクローニング遺伝子に含まれている開始コドンから始まっていることを保障しています。MCS に各々 3 種類のリー

ディングフレームを持つベクターを用意しています。



〔GFP/BFP pQBI 25/50-fN1,fN2,fN3 のクローニングサイト〕

ベクター	クローニングサイト
-fN1	SacII ↓ ApaI ↓ BstEII AgeI ↓ KpnI ↓ BamHI ↓ EcoRV ↓ BstXI ↓ NotI ↓ CellIII ↓ HindIII NruI ↓ EcoRI ↓ Flexible Linker ↓ NheI ↓ ... CCG CGG GGG GCC CCG TTA CCG GTA CCG GAT CCA GAT ATC TGG GCG GCC GGT CAG CAA GCT TCG CGA ATT CG A GGC GGA GGT GGA GCT AGC ... Pro Arg Gly Ala Arg Leu Pro Val Pro Asp Pro Asp Ile Trp Ala Ala Ala Gln Gln Ala Ser Arg Ile Arg Gly Gly Gly Gly Ala Ser ... GFP cds
-fN2	SacII ↓ ApaI ↓ BstEII AgeI ↓ KpnI ↓ BamHI ↓ EcoRV ↓ BstXI ↓ NotI ↓ CellIII ↓ HindIII NruI ↓ EcoRI ↓ Flexible Linker ↓ NheI ↓ ... CCG CGG G G G GGC CCG GTT ACC GGT ACC GGA TCC AGA TAT CTG GCG GGC CGC TCA GCA AGC TTC GCG AAT TCG A GGC GGA GGT GGA GCT AGC ... Pro Arg Glu Gly Pro Val Thr Gly Thr Gly Ser Arg Tyr Leu Gly Gly Arg Ser Ala Ser Phe Ala Asn Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser ... GFP cds
-fN3	SacII ↓ ApaI ↓ BstEII AgeI ↓ KpnI ↓ BamHI ↓ EcoRV ↓ BstXI ↓ NotI ↓ CellIII ↓ HindIII NruI ↓ EcoRI ↓ Flexible Linker ↓ NheI ↓ ... CCG CGG G GGG CCC GGT TAC CCG TAC CGG ATC CAG ATA TCT GGG CGG CCG CTC AGC AAG CTT CGC GAA TTC G A GGC GGA GGT GGA GCT AGC ... Pro Arg Glu Gly Pro Gly Tyr Arg Tyr Arg Ile Gln Ile Ser Gly Arg Pro Leu Ser Lys Leu Arg Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ala Ser ... GFP cds

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
543-02141	Blue Fluorescent Protein Vector pQBI 50-fA1 【BFP pQBI 50-fA1】	遺伝子研究用	20 µg	35,000
540-02151	Blue Fluorescent Protein Vector pQBI 50-fA2 【BFP pQBI 50-fA2】	遺伝子研究用	20 µg	35,000
547-02161	Blue Fluorescent Protein Vector pQBI 50-fA3 【BFP pQBI 50-fA3】	遺伝子研究用	20 µg	35,000
548-02071	Green Fluorescent Protein Vector pQBI 25-fN1 【GFP pQBI 25-fN1】	遺伝子研究用	20 µg	35,000
545-02081	Green Fluorescent Protein Vector pQBI 25-fN2 【GFP pQBI 25-fN2】	遺伝子研究用	20 µg	35,000
542-02091	Green Fluorescent Protein Vector pQBI 25-fN3 【GFP pQBI 25-fN3】	遺伝子研究用	20 µg	35,000
542-02111	Blue Fluorescent Protein Vector pQBI 50-fN1 【BFP pQBI 50-fN1】	遺伝子研究用	20 µg	35,000
549-02121	Blue Fluorescent Protein Vector pQBI 50-fN2 【BFP pQBI 50-fN2】	遺伝子研究用	20 µg	35,000
546-02131	Blue Fluorescent Protein Vector pQBI 50-fN3 【BFP pQBI 50-fN3】	遺伝子研究用	20 µg	35,000

## 新規遺伝子導入システム



### Nucleofector™

### Primary Cell に対し、驚異的な高い遺伝子導入効率を実現

遺伝子導入は、遺伝子の機能の研究や、遺伝子治療の開発等において重要な手法の1つであり、現在までリポソーム法やエレクトロポレーション法等、様々な方法が試みられています。しかしながら、Primary Cell への遺伝子導入に関しては、従来の方法では目的の遺伝子を導入し発現させるのは困難であり、ウイルスを用いて遺伝子導入を行う方法も、コストと操作面で問題があります。

「Nucleofector™」は、簡単な操作で、短時間に低コストで高い効率に遺

伝子導入を行うことが可能です。細胞とDNAを、専用の特殊緩衝液に混ぜ、遺伝子導入装置にセットし、細胞毎のプログラムにあわせボタンを押すだけで、下記の通り高効率に遺伝子導入ができます。機能ゲノム研究や薬理ゲノミクス、また医薬品開発や遺伝子治療の開発研究に有効です。

#### 〔特長〕

- 非ウイルス法による遺伝子導入装置・専用試薬
- 短時間、低コストで操作が容易
- Primary Cell に対し高い遺伝子導入効率

#### 〔Primary Cell を用いた遺伝子導入効率\*〕

Human B Cells	25%
Human Aortic Smooth Muscle Cells	30%
Human Coronary Artery Endothelial Cells	34%
Human Umbilical Vein Endothelial Cells	50%
T Cell	60%
CD34 Stem Cell	70%
Normal Human Dermal Fibroblast-Neonatal	90%
Normal Human Epidermal Melanocytes-Neonatal	88%

\*of living cell, after 16h

#### 〔株化細胞を用いた遺伝子導入効率〕

HeLa	20%
Jurkat	52%
NIH3T3	58%
COS	58%
CHO	78%
293	54%
C6	20%
HepG2	60%
HL60	75%
K562	77.3%
PC12	48%
THP-1	25%



コード No.	メーカーコード	品名	内容	希望納入価格(円)
500-98921	AAD-1001	Nucleofector™ Device	1 セット	2,500,000
507-98931	VPA-1001	Nucleofector™ for Human B Cell	25 回用	60,000
504-98941	VPA-1002	Nucleofector™ for Human T Cell	25 回用	60,000
501-98951	VPA-1003	Nucleofector™ for Human CD34 Hematopoietic Progenitor Cell	25 回用	60,000
579-32671	VPA-1004	Nucleofector™ for Human Dendritic Cell	25 回用	60,000
508-98961	VPB-1001	Nucleofector™ for Human Coronary Artery Endothelial Cell	25 回用	60,000
505-98971	VPB-1002	Nucleofector™ for Human Umbilical Vein Endothelial Cell	25 回用	60,000
502-98981	VPC-1001	Nucleofector™ for Human Aortic Smooth Muscle Cell	25 回用	60,000
509-98991	VPD-1001	Nucleofector™ for Normal Human Dermal Fibroblasts-Neonatal	25 回用	60,000
506-99001	VPD-1002	Nucleofector™ for Normal Human Epidermal Keratinocytes-Neonatal	25 回用	60,000
503-99011	VPD-1003	Nucleofector™ for Normal Human Epidermal Melanocytes-Neonatal	25 回用	60,000
500-99021	VCA-1001	Nucleofector™ Kit R for Cell Line (e.g. for HeLa, NIH 3T3)	25 回用	60,000
507-99031	VCA-1002	Nucleofector™ Kit T for Cell Line (e.g. for CHO)	25 回用	60,000
504-99041	VCA-1003	Nucleofector™ Kit V for Cell Line (e.g. for 293, COS)	25 回用	60,000
573-26341	VCO-1001	Cell Line Optimization Nucleofector™ Kit	50 回用	140,000
576-35481	VPE-1001	Nucleofector™ for Human Mesenchymal Stem Cell	25 回用	近日発売予定
573-35491	VPB-1003	Nucleofector™ for Human Microvascular Endothelial Cell-Lung	25 回用	近日発売予定
573-35511	VPF-1001	Nucleofector™ for Human Chondrocyte	25 回用	近日発売予定
570-35521	VPG-1001	Nucleofector™ for Mouse Neuron	25 回用	近日発売予定
577-35531	VPG-1002	Nucleofector™ for Chicken Neuron	25 回用	近日発売予定

## 完全解読保証の受託シーケンスを始めました！

### プラスミド・PCR 産物からの受託シーケンス

高 GC 含量、反復配列、二次構造形成誘型などのシーケンスに威力を発揮

RNA polymerase の転写反応を利用した「転写シーケンス法」<sup>1,2</sup>を、当社独自に反応系の改善を進め、難解読領域の高精度なリードスルーを実現しています。従来ケミストリーの DNA シーケンス法 (DNA polymerase) が苦手とする領域を「解読」するための有用な手段として威力を発揮します。

#### 〔本反応系の性能と特長〕

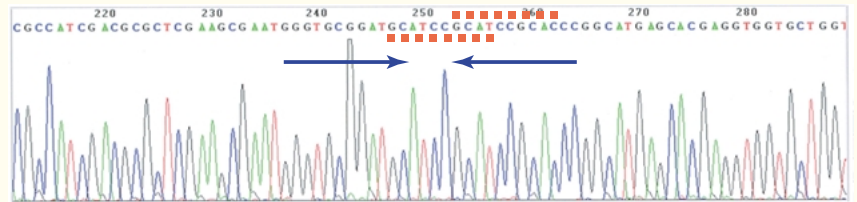
- 高い信頼性
- ヘアピン構造などの二次構造を形成する誘型配列に対するパワフルな伸長反応を確認。
- 短い反復配列 (Simple Sequence Repeat=SSR) に対する均一なピークあるいは、逆向き反復配列や直列反復配列のリードスルーを実現。
- 高 GC 含量 (75%以上) の配列に対してもシグナル減衰はなく、正確なベースコールが可能。
- G-run 及び C-run (G or C homopolymeric stretches) への適応で大きな効果。
- 1 パスで 700 塩基の解析
- プラスミド DNA : 200ng の使用で 700bp 強程度の readable length (99% accuracy) を提示。

解析結果はテキストまたは波形イメージングファイル (PDF 形式) を電子メールにより迅速にお届けします。

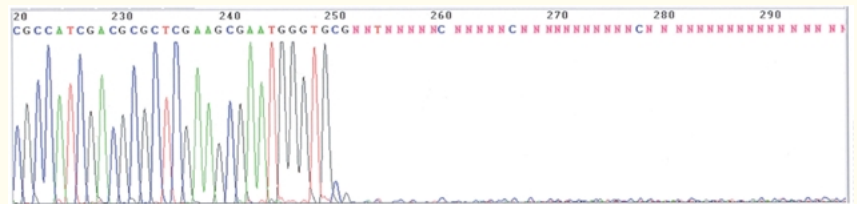
#### 〔参考文献〕

- 1) Sasaki, K. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 3455 (1998)
- 2) 伊澤真樹、石川友一、林崎良英 : Mol. Med (Tokyo), 36, 1339 (1999)

(A) Wako 受託シーケンス (転写反応によるシーケンス技術)



(B) 従来型シーケンス・キットの適用 (A 社サイクルシーケンス技術)



二次構造 (ヘアピン) 形成サンプル

誘型はラン藻由来 (Gloeobacter violaceus PCC7421) かずさ DNA 植物遺伝子第一研究室 (田畑室長) より依頼されたサンプル。難解読に特化・改良した転写シーケンス技術の適用例。ABI PRISM 377 DNA Sequencer にて解析。12bp の逆向き反復配列 (GGGTGCGGATGC) [ ← → ] かつ、そのヘアピン内部に部分的にオーバーラップした直列反復配列 (GCATCCGCA) [ ■■■■■ ] を持つ事が本解析より明らかとなっている。(従来技術の適用では、複合的な要因を抱えている問題箇所において伸長反応の停止を確認。)

## プラスミドからのシーケンス

シーケンスの種類	希望納入価格 (円)
Single Extension (ベクター・クローニングサイトを利用)	
難解読シーケンス (GC リッチや高次構造等の影響で解析困難な試料)	15,000/Single run
一般シーケンス	15,000/Single run
Primer Walking を必要とする場合	
難解読シーケンス (GC リッチや高次構造等の影響で解析困難な試料)	別途ご相談
一般シーケンス	別途ご相談

## PCR 産物からのシーケンス

シーケンスの種類	希望納入価格 (円)
難解読シーケンス (GC リッチや高次構造等の影響で解析困難な試料)	15,000/Single run
一般シーケンス	15,000/Single run

転写シーケンス技術については、株式会社ニッポンジーンテックからサブライセンスを得ています。

掲載されている試薬は、試験・研究の目的にのみ使用されるものであり、家庭用、医療用等の用途には用いられません。

記載価格は希望納入価格であり消費税等は含まれておりません。

発行所 和光純薬工業株式会社  
〒540-8605  
大阪市中央区道修町三丁目1番2号  
TEL. 06-6203-3741 (代表)

発行日 2002年7月15日  
発行責任者 金澤 廣 継  
編集責任者 大西 礼子  
印刷所 共進社印刷株式会社