

## 〔総説〕

- 「 $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase (GGT) の新規阻害剤 – GGTの生理的意義をさぐる新たな化学ツール–」 平竹 潤 …… 2
- 「ロックアウトマウス技術とその応用」 宮崎早月、田代 文 …… 7
- 〈生薬のはなし〉
- 「シソの香りのバラエティー」 伊藤美千穂 …… 10
- 〈テクニカルレポート〉
- 「microRNA Isolation Kit, Human Ago2 の開発とその応用」 西部隆宏 …… 12
- 「Presep<sup>®</sup>-C PFC を使用したパーフルオロ化合物の分析」 吉田貴三子 …… 14

## 〔化学大家〕

- 「田丸 節郎」 田丸謙二 …… 25

## 〔製品紹介〕

### 環境・分析

- プレセップ<sup>®</sup>-C PFC (Short) …… 14
- 有機りん農薬混合液 …… 15
- ポジティブリスト制度対応 農薬混合液 …… 16
- JCSS 揮発性有機化合物 23 種混合標準液 (メタノール溶液) …… 18
- 日本薬局方収載 生薬試験用標準品類 …… 19

### 細胞生物・生化学

- GGT 阻害剤「GGSTop<sup>™</sup>」 …… 6
- 細菌由来タンパク質毒素 …… 19
- 抗生物質系阻害剤 …… 20
- レビス KLH (TDAR) ラット -IgG/IgM …… 21
- 活性酸素種特異的蛍光プローブ「BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (細胞非透過性)」、  
「BES-So (細胞非透過性)」 …… 28

### 培養

- LIF, ヒト, 組換え体, 培養上清 …… 9, 23
- 液体培地 …… 22
- トリプシン-EDTA 溶液 …… 22
- L-アラニン-L-グルタミン溶液 …… 22
- アルブミン, ヒト, 植物発現組換え体 …… 23
- トリパンプルー溶液 …… 23

### 遺伝子

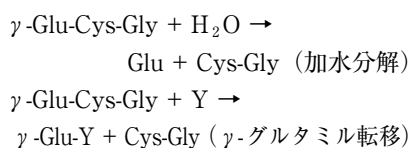
- マイクロ RNA アイソレーションキット, ヒト Ago2 …… 13
- 抗マウス AGO2, モノクローナル抗体 …… 24

### 機器

- インフィニット 200NanoQuant …… 21

### はじめに

$\gamma$ -Glutamyl transpeptidase (GGT) [(5-glutamyl)-peptide : amino acid 5-glutamyltransferase, EC 2.3.2.2] は、グルタチオン ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) およびグルタチオン抱合体の代謝分解の初発段階をつかさどる酵素で、高等動植物から微生物までほとんどあらゆる生物に普遍的に存在する<sup>1-4)</sup>。別名、 $\gamma$ -glutamyltransferase (IUBMBの推奨名)、 $\gamma$ -glutamyl peptidyltransferase とも呼ばれ、後述するように、肝機能を調べるマーカー酵素として人間ドックの検査項目の一つにもなっているため、 $\gamma$ -GTP,  $\gamma$ -GT,  $\gamma$ -GPT などという略称を聞けば、筆者も含め、その数値が気になる向きも多いのではないだろうか。GGTはグルタチオンの $\gamma$ -グルタミル結合(イソペプチド結合)を加水分解するほぼ唯一の酵素で、GluとCys-Glyを生成する一方、各種アミノ酸やジペプチド、アミン類を受容体Yとして $\gamma$ -グルタミル転移生成物( $\gamma$ -Glu-Y)を与える。



GGTの基質特異性は広く、さまざまな構造のグルタチオン抱合体や、DおよびL体の $\gamma$ -グルタミルアミドに作用すること、また、加水分解だけでなく、さまざまな受容体への $\gamma$ -グルタミル転移活性があることから、転移酵素(transferase)として分類されているが、本来の生理的意義はグルタチオンおよび、その抱合体の加水分解にあり、GGTは顕著な転移活性をもったグルタチオン加水分解酵素と考えるのが妥当である<sup>2, 5, 6)</sup>。すなわち、GGTは、細胞のグルタチオン生合成に必要なCysを供給する酵素として、

また、グルタチオンを介した生体異物の解毒代謝の初発酵素として、生体のレドックスバランスや酸化ストレスに影響を与え、それが引き金となる多くの疾患に関与していると考えられ、GGTに関連した医学論文は非常に多い。しかし、状況証拠は多いものの、実際の疾患や病態との因果関係やメカニズムには不明な点が多く、GGTの真の生理作用については謎が多い。

本総説では、これまで報告されているGGTの生理的意義や役割について概観するとともに、筆者らが開発した新規GGT阻害剤について紹介し、これまで用いられてきた阻害剤との違いを中心に、その化学ツールとしての意義や可能性について述べたい。

### GGT の生理的役割

GGTは分子量約40,000(大サブユニット)および20,000(小サブユニット)が非共有結合的に結合したヘテロダイマー酵素である。ホ乳類の酵素では、大サブユニットの疎水性N末端を細胞膜にアンカーさせた形で、活性中心を細胞の外側に向け細胞の表面に局在している一種の膜結合型酵素で、高度に糖鎖修飾されている<sup>1, 3, 5)</sup>。臨床的には、薬物や過度のアルコール摂取によって肝臓でのGGT発現および血中への漏出が顕著に起こるため、アルコール依存症や肝疾患のマーカー酵素として、健康診断に汎用されている<sup>5)</sup>。

GGTに関する報告は実に多い。データベース(SciFinder)を検索すると、過去10年間で、GGTの関係する論文や特許は7000件あまりヒットし、1980年以降、ほぼ毎年、700-900件の報告がある。そのほとんどが医学関係の論文で、たとえば、アテローム性動脈硬化症や心筋梗塞、狭心症などの心血管疾患に関する疫学調査では、血中GGT活性の上昇が、常に有意な危険因子であることが繰り返し報告されている<sup>7-9)</sup>。2型糖尿病との関係も同様

である<sup>9, 10)</sup>。また、ガン細胞ではGGTを高発現するものが多く<sup>11, 12)</sup>、抗ガン剤や放射線療法に対する耐性獲得や転移活性にGGTが関係し、薬物ターゲットとしてのGGTを指摘する報告は多い<sup>13)</sup>。また、抗ガン剤シスプラチンの腎毒性がGGTによるグルタチオン抱合体の代謝活性化に起因するという説<sup>14)</sup>や、炎症メディエーターであるロイコトリエンC<sub>4</sub>(LTC<sub>4</sub>)からLTD<sub>4</sub>への変換をGGTが触媒しており<sup>15)</sup>、グルタチオン代謝との関連から喘息との関係も議論されるなど<sup>16)</sup>、医学研究者の注目度は高い。これらの疾患は、多くの場合、細胞のグルタチオン欠乏が引き金になっていることが多い。そのため、生体内の主要なCysプールであるグルタチオンからCysを切り出しリサイクルするGGTは、実質的に、細胞のグルタチオン生合成を促す抗酸化酵素と考えられる。しかし、その一方、GGTによるグルタチオンの分解産物Cys-Glyはきわめて活性なチオールで、生理的条件下で金属イオンを介して容易に酸素を還元し活性酸素種をつくり出すため、GGT活性の増大はかえって酸化ストレスを亢進させることにつながる(pro-oxidant効果)<sup>17)</sup>。こうした相反する作用が、GGTの生理的役割をわかりにくくしている原因でもあるが、いずれの場合も、GGTの生理作用を明らかにするためには、細胞レベルでGGT活性を抑え、その影響を比較する必要があり、GGT阻害剤の使用は不可欠である。しかし、多くの研究者、特に、医学領域の研究者が容易に入手できるGGT阻害剤は、市販の天然物acivicin以外にはほとんどないのが現状であった。後述するように、acivicinは、GGT以外にも多くの酵素を阻害し、細胞毒性も強い。そこで、筆者らは、より強力で選択性の高いGGT阻害剤の開発をめざし、本酵素の反応機構や基質特異性を考慮して、その遷移状態アナログとなるホスホン酸エステル型の阻害剤

を開発した。

## ホスホン酸モノエステル型 GGT 阻害剤 (第1世代)

GGTは、セリンプロテアーゼと同じく、求核性の活性残基(水酸基)の関与するping-pong機構によって反応を触媒し、 $\gamma$ -グルタミル酵素中間体(エステル中間体)を経て反応を触媒している(図1)<sup>4)</sup>。

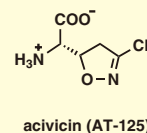
そこで、この反応機構をもとに、GGTの活性残基と反応し、共有結合を作ることで、不可逆的にGGTを失活させる新しい阻害剤の開発をめざし、良好な脱離基をもった、 $\gamma$ -ホスホン酸モノエステル誘導体**1a-e**を合成した(図2)<sup>18, 19)</sup>。

これら第1世代の阻害剤は、反応の遷移状態アナログとして活性残基と反応し、安定なホスホン酸モノエステル結合を形成することで、時間依存的に酵素を失活させる(図2)。しかも、酵素自身の触媒作用の力を借りて酵素と反応する、いわゆる反応機構依存型

の阻害剤であるため、本質的に特異性は高い。そこで、大腸菌GGTについて、阻害剤**1a**によって失活させた酵素を限定加水分解ののち、ESI-MSを用いたペプチドマッピングにより、阻害剤の結合した残基を特定し、これまで謎であったGGTの活性中心が、小サブユニットN末端のThr残基(Thr 391)であることを世界で初めて証明した<sup>18)</sup>。さらに、化合物**1e**を用いて、同じ手法により、ヒトGGTについても、小サブユニットN末端のThr残基(Thr 381)が活性残基であることが証明されている<sup>20)</sup>。

現在、最も広く使われているGGT阻害剤はacivicin[別名AT-125; ( $\alpha$ S, 5S)- $\alpha$ -amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazoleacetic acid]である。

Acivicinは、1970年代からGGT阻害に使われはじめた化合物だが、阻害が不可逆であること、市販され、容易に入手できることから、便利なGGT阻害剤として現在でも最もよく使われている。データベースを検索し



acivicin構造式

てみると、過去10年間で、acivicinに関する報告のうち約70%がGGTの阻害に関するもので、逆に、GGTの阻害に関する報告のうち、実に95%にacivicinが関係していた。まさに、GGT阻害剤と言えばacivicinを指すと言っても過言ではない状況である。しかし、acivicinは、もともと*Streptomyces sviveus*の産生する抗生物質で、グルタミンの代謝拮抗剤として、glutamine amidotransferase (GAT)類<sup>21)</sup>に広く作用し、これら酵素の活性中心CysのSHと共有結合をつくり酵素を不可逆的に失活させる強い活性がある<sup>22)</sup>。そのため、多くのグルタミン依存性の酵素を阻害し、プリン、ピリミジン塩基や、アミノ酸、アミノ糖の生合成を阻害する結果、強い細胞毒性や中枢神経毒性を示す<sup>23)</sup>。その作用機作や生物学的意義からすると、GGTはacivicin本来の標的酵素ではなく、たまたまacivicinによって阻害されるに過ぎない。事実、GATに対する阻害活性に比べて、ヒトGGTに対するacivicinの阻害活性は4桁以上低い。

第1世代のGGT阻害剤**1a-e**は、安定なホスホン酸モノエステル結合を形成するため、GGTの活性残基を同定する目的には適っていた。しかし、負電荷をもつリン酸モノエステルは反応性に劣り、実際、ヒトGGTに対する阻害活性は、たかだかacivicinの3.8倍程度であった<sup>19)</sup>。そこで、より阻害活性が高く、安定で、酵素の基質特異性を反映した分子設計が可能な、ホスホン酸ジエステル型の第2世代GGT阻害剤を開発した。

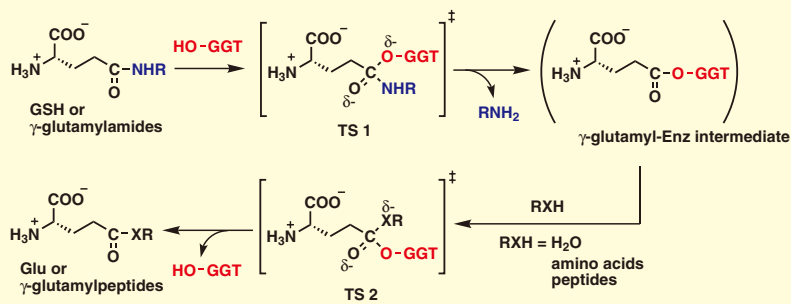


図1. GGTの触媒機構

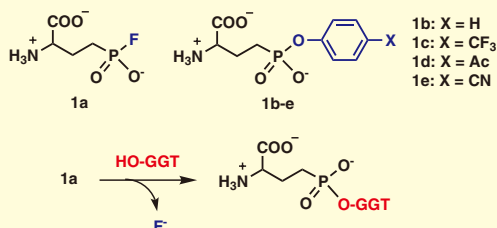


図2. ホスホン酸モノエステル型阻害剤**1a-e**とGGT阻害機構



## ホスホン酸ジエステル型 GGT 阻害剤 (第2世代)<sup>24)</sup>

第2世代のホスホン酸ジエステル型阻害剤の主なものを図3に、大腸菌およびヒトGGTに対するそれぞれの化合物の阻害活性を表1に示す。

これら第2世代の阻害剤は、acivicinや第1世代の阻害剤と同じく、いずれもGGTの活性中心と1:1で反応する不可逆的阻害剤で、時間とともに酵素が失活していくため、通常の阻害定数 $K_i$ が定義できない。そのため、酵素と阻害剤との2次反応速度定数 $k_{on}$ をもって阻害活性をあらわし、この値が大きいほど、酵素が速やかに失活する強い阻害剤である。

第2世代のジエステル型阻害剤は、第1世代のモノエステル型阻害剤**1a-e**に比べて著しく高い阻害活性を示し、同じ脱離基を持つ**2f**と**1e**を比べた場合、**2f**は、大腸菌GGTで44倍、ヒトGGTに至っては380倍もの活性を示した。予想どおり、負電荷がなくなった分、リン原子の求電子性が上がり、酵素の活性残基との反応速度が増した結果である。また、脱離基である置換フェノールの $pK_a$ が下がり脱離しやすくな

るほど、リン原子の化学的反応性が上がり、阻害活性は増大する。その傾向は、単純な構造の**2a-g**については、大腸菌、ヒト由来の酵素に関わらず見られる。ところが、面白いことに、そうした傾向から明らかに外れる化合物がある。たとえば、阻害剤**3**。この化合物と、同程度の脱離能をもった化合物**2f** ( $pK_a = 7.95$ ) とを比較してみると、大腸菌GGTに対する阻害活性はあまり変わらないのに対し、ヒトGGTに対しては、化合物**3**は**2f**の50倍以上の活性を示している。すなわち、化合物**3**は、ヒトGGTに対して、その化学的反応性から予想されるより50倍以上も強い活性をもつことになる。ちなみに、化合物**3**の阻害活性 ( $k_{on} = 2400 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) は、acivicinの6000倍にのぼり、現在、ヒトGGTに対する最強の阻害剤である。さらに著しい差が見られるのが化合物**4**で、同じ脱離能をもつ**2c**と比べると、ヒトGGTに対する阻害活性は188倍に達する。また、化合物**5a**も同様で、ヒトGGT

に対してのみ、**2c**の100倍以上の活性を示す。

なぜ、特定の化合物に、しかも、ヒトGGTに対してだけ、このような例外的に高い阻害活性が見られるのだろうか？ その答えは、化合物**3**、**4**、**5a**の構造と、ヒトGGTの基質認識にあると思われる。すなわち、これらの化合物は、いずれも、グルタチオンのCys-Glyをミミックするような構造を持ち、GGTがグルタチオンを加水分解する際の遷移状態(TS1)とよく似ている(図3)。特に、リン原子から数えて原子8個めに、負電荷を帯びたカルボキシ酸素があり、これがヒトGGTの活性中心との親和性に大きく寄与していると思われる。すなわち、ヒトGGTの活性中心には、グルタチオンのCys-Gly、特に、C末端グリシンのカルボキシ基を厳密に認識する機構(残基)が備わっており、グルタチオンに対して高い基質選択性をもった酵素であることが予想される。ヒトGGTのカルボキシ基に対する認識は

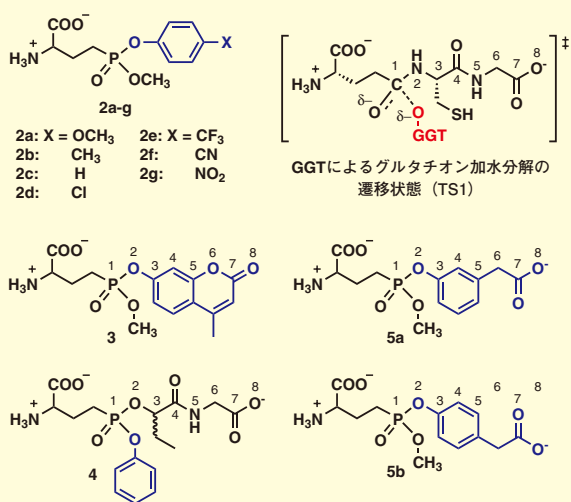


図3. ホスホン酸ジエステル型 GGT 阻害剤

Table 1. Inhibitory activities of phosphonate diesters **2a-g**, **3**, **4**, **5a**, **5b** and acivicin toward *E. coli* and human GGT

inhibitor	leaving group	$pK_a^b$	$k_{on} [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]^a$	
			<i>E. coli</i>	human
<b>2a</b>	HO--OCH <sub>3</sub>	10.40	<b>19</b>	<b>0.16</b>
<b>2b</b>	HO--CH <sub>3</sub>	10.21	<b>24</b>	<b>0.24</b>
<b>2c</b>	HO-	9.98	<b>120</b>	<b>0.40</b>
<b>2d</b>	HO--Cl	9.41	<b>610</b>	<b>5.0</b>
<b>2e</b>	HO--CF <sub>3</sub>	8.51	<b>2900</b>	<b>12</b>
<b>2f</b>	HO--CN	7.95	<b>12000</b>	<b>46</b>
<b>2g</b>	HO--NO <sub>2</sub>	7.15	<b>35000</b>	<b>130</b>
<b>3</b>	4-MU <sup>c</sup>	8.10	<b>16000</b>	<b>2400</b>
<b>4</b>	HO-	9.98	<b>80</b>	<b>75</b>
<b>5a</b>	HO-	9.71	<b>150</b>	<b>51</b>
<b>5b</b>	HO-	9.84	<b>210</b>	<b>0.33</b>
<b>acivicin</b>	HCl	-6.18	<b>4200</b>	<b>0.40</b>

<sup>a</sup> Second-order rate constant for enzyme inactivation.

<sup>b</sup>  $pK_a$  values of the leaving group

<sup>c</sup> 4-Methylumbelliferone

厳密で、たとえば、カルボキシ基の位置がわずかに異なる化合物**5b**の阻害活性は大きく落ち込む。一方、大腸菌の酵素は、末端のカルボキシ基をほとんど認識せず、どんな構造の阻害剤も受入れ、単にその化学的反応性だけで阻害活性が決まっているように見受けられる。その意味では、大腸菌GGTの基質特異性は広く、グルタチオンを本来の基質としないのかも知れない。

さて、ホスホン酸ジエステル型阻害剤は、脱離基の脱離能が上がるほど化学的に活性になる分、加水分解を受けやすくなる。その意味では、化合物**5a**は、単純な構造で水溶性が高く、脱離能が低くて化学的に安定な割には、ヒトGGTに対する阻害活性が強いため、最も実用的なヒトGGT阻害剤と言えよう。そこで、化合物**5a**の安定性を調べたところ、中性の水に溶かして室温で1ヶ月放置しても、全く分解は認められず、きわめて安定な化合物であることがわかった。また、化合物**5a**のGAT（アスパラギン合成酵素のグルタミナーゼドメイン）に対する阻害活性を調べたところ、10mMの濃度で2時間処理しても、全く阻害は見られず、同条件で、0.1 mMのacivicinがGATを10%以下にまで失活させるのと対照的であった。おそらく、第2世代のGGT阻害剤のうち、少なくとも、グルタチオンの部分構造を模した化合物（**3**, **4**, **5a**など）はGGT選択的で、GAT類を阻害しないものと思われる。また、雌雄マウスを用いて、化合物**5a**を30mg/kgおよび100mg/kgの用量で単回静脈内投与を行い、2週間にわたって、一般症状、体重、摂餌量を観察したが、いずれも異常は認められず、また、観察期間終了後の剖検でも、主要臓器・組織に異常は見られなかったことから、急性毒性はないと判断された。同様に、微生物を用いた変異原性試験（エイムス試験）も陰性であった（未発表データ）。

以上のように、化合物**5a**に代表さ

れる第2世代のGGT阻害剤は、きわめて有望な化合物で、多くのGGT研究において、acivicinに取って代わる阻害剤として広く使われることが期待される。阻害は不可逆的で、酵素と1:1で反応してGGT活性を完全に抑えることができ、ヒトGGTに対する阻害活性はacivicinの100倍以上、そして何より、GGT選択的で、GAT類を阻害せず、毒性や変異原性もなく、化学的にも安定となれば、acivicinに対する優位性は明らかだろう。むしろ、さまざまな酵素を阻害するacivicinを用いて得られたこれまでの結果は、ひょっとすると、GGT以外の酵素を阻害した結果かも知れない。阻害剤**5a**は、そうしたリスクを回避し、GGTの真の生理的役割を明らかにする重要な化合物になるだろう。近年、ピロリ菌のGGTが病害性因子として、胃壁細胞のアポトーシスを誘導することや<sup>25)</sup>、GGTが骨再吸収因子として関節炎や骨粗鬆症に関与するなど<sup>26)</sup>、興味深い報告が相次ぎ、植物におけるGGT研究も緒についたばかりである<sup>27, 28)</sup>。GGTをめぐる研究は、今後、ますます盛んになるに違いない。その意味でも、阻害剤の出番は多い。むしろ、この阻害剤がGGTの生理的役割を明らかにする強力な化学ツールとして、GGT研究を大きく発展させる起爆剤となることを願って止まない。

#### 【参考文献】

- 1) Taniguchi, N. and Ikeda, Y. : "γ-Glutamyl transpeptidase : catalytic mechanism and gene expression", *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **72**, 239-278 (1998).
- 2) Hiratake, J., Suzuki, H. and Kumagai, H. : "γ-Glutamyl transpeptidase and its precursor", In *Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd Ed.*, ed. by Barrett, A.J., Rawlings, N.D. and Woessner, J.F., Elsevier, Amsterdam, pp. 2090-2094 (2004).
- 3) Tate, S. S. and Meister, A. : "γ-Glutamyl transpeptidase from kidney", *Methods Enzymol.*, **113**, 400-419 (1985).
- 4) Allison, D. : "γ-Glutamyl transpeptidase : kinetics and mechanism", *Methods Enzymol.*, **113**, 419-437 (1985).
- 5) Whitfield, J. B. : "Gamma glutamyl transferase", *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **38**, 263-355 (2001).
- 6) Hanigan, M. H. : "γ-Glutamyl transpeptidase, a glutathionase : its expression and function in carcinogenesis", *Chemico-Biol. Interact.*, **111-112**, 333-342 (1998).
- 7) Ruttman, E., Brant, L. J., Concin, H., Diem, G., Rapp, K., Ulmer, H., the Vorarlberg Health Monitoring and Promotion Program Study Group : "γ-Glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality", *Circulation*, **112**, 2130-2137 (2005).
- 8) Hozawa, A., Okamura, T., Kadowaki, T., Murakami, Y., Nakamura, K., Hayakawa, T., Kita, Y., Nakamura, Y., Okayama, A., Ueshima, H., The NIPPON DATA 90 Research Group : "γ-Glutamyltransferase predicts cardiovascular death among Japanese women", *Atherosclerosis*, **194**, 498-504 (2006).
- 9) Lee, D.-H., Silventoinen, K., Hu, G., Jacobs Jr., D. R., Jousilahti, P., Sundvall, J. and Tumilehto, J. : "Serum gamma-glutamyl-transferase predicts non-fatal myocardial infarction and fatal coronary heart disease among 28838 middle-aged men and women", *Eur. Heart J.*, **27**, 2170-2176 (2006).
- 10) Meisinger, C., Löwel, H., Heier, M., Schneider, A., Thorand, B. for the Korea Study Group : "Serum γ-glutamyltransferase and risk of type 2 diabetes mellitus in men and women from the general population", *J. Intern. Med.*, **258**, 527-535 (2005).
- 11) Godwin, A. K., Meister, A., O'Dwyer, P. J., Huang, C.-S., Hamilton, T. C. and Anderson, M. E. : "High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase in glutathione synthesis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3070-3074 (1992).
- 12) Hanigan, M. R., Gallagher, B. C., Townsend, D. M. and Gabarra, V. : "γ-Glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increases the resistance of tumors to cisplatin *in vivo*", *Carcinogenesis*, **20**, 553-559 (1999).
- 13) Pompella, A., Tata, V. De, Paolicchi, A. and Zunino, F. : "Expression of γ-glutamyl-transferase in cancer cells and its significance in drug resistance", *Biochem. Pharmacol.*, **71**, 231-238 (2006).
- 14) Hanigan, M. H., Gallagher, B. C., Taylor, Jr., P. T. and Large, M. K. : "Inhibition of γ-glutamyl transpeptidase activity by acivicin *in vivo* protects the kidney from cisplatin-induced toxicity", *Cancer Res.*, **54**, 5925-5929 (1994).
- 15) Mayatepek, E., Okun, J. G., Meissner, T., Assmann, B., Hammond, J., Zschocke, J. and Lehmann, W.-D. : "Synthesis and metabolism of leukotrienes in γ-glutamyl transpeptidase deficiency", *J. Lipid Res.*, **45**, 900-904 (2004).
- 16) Lowry, M. H., McAllister, B. P., Jean, J.-C., Brown, L. S., Hughey, R. P., Cruikshank, W. W., Amar, S., Lucey, E. C., Braun, K.,

- Johnson, P., Wight, T. N. and Joyce-Brady, M. : "Lung lining fluid glutathione attenuates IL-13 induced asthma", *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **38**, 509-516 (2008).
- 17) Dominici, S., Paolicchi, A., Lorenzini, E., Maellaro, E., Comporti, M., Pieri, L., Minotti, G. and Pompella, A. : " $\gamma$ -Glutamyltransferase-dependent prooxidant reactions : A factor in multiple processes", *BioFactors*, **17**, 187-198 (2003).
- 18) Inoue, M., Hiratake, J., Suzuki, H., Kumagai, H. and Sakata, K. : "Identification of catalytic nucleophile of *Escherichia coli*  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase by  $\gamma$ -monofluorophosphono derivative of glutamic acid : N-terminal Thr-391 in small subunit is the nucleophile", *Biochemistry*, **39**, 7764-7771 (2000).
- 19) Han, L., Hiratake, J., Tachi, N., Suzuki, H., Kumagai, H. and Sakata, K. : " $\gamma$ - (Monophenyl) phosphono glutamate analogues as mechanism-based inhibitors of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase", *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 6043-6054 (2006).
- 20) Castonguay, R., Halim, D., Morin, M., Furtos, A., Lherbet, C., Bonneil, E., Thibault, P. and Keillor, J. W. : "Kinetic characterization and identification of the acylation and glycosylation sites of recombinant human  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase", *Biochemistry*, **46**, 12253-12262 (2007).
- 21) Massière, F. and Badet-Denisot, M.-A. : "The mechanism of glutamine-dependent amidotransferases", *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**, 205-222 (1998).
- 22) Chittur, S. V., Klem, T. J., Shafer, C. M. and Jo Davison, V. : "Mechanism for acivicin inactivation of triad glutamine amidotransferases", *Biochemistry*, **40**, 876-887 (2001).
- 23) Earhart, R. H. and Neil, G. L. : "Acivicin in 1985", *Adv. Enzyme Regul.*, **24**, 179-205 (1985).
- 24) Han, L., Hiratake, J., Kamiyama, A. and Sakata, K. : "Design, synthesis, and evaluation of  $\gamma$ -phosphono diester analogues of glutamate as highly potent inhibitors and active site probes of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase", *Biochemistry*, **46**, 1432-1447 (2007).
- 25) Shibayama, K., Kamachi, K., Nagata, N., Yagi, T., Nada, T., Doi, Y., Shibata, N., Yokoyama, K., Yamane, K., Kato, H., Inuma, Y. and Arakawa, Y. : "A novel apoptosis-inducing protein from *Helicobacter pylori*", *Mol. Microbiol.*, **47**, 443-451 (2003).
- 26) Hiramatsu, K., Asaba, Y., Takeshita, S., Nimura, Y., Tatsumi, S., Katagiri, N., Niida, S., Nakajima, T., Tanaka, S., Ito, M., Karsenty, G. and Ikeda, K. : "Overexpression of  $\gamma$ -glutamyltransferase in transgenic mice accelerates bone resorption and causes osteoporosis", *Endocrinology*, **148**, 2708-2715 (2007).
- 27) Ohkama-Ohtsu, N., Radwan, S., Peterson, A., Zhao, P., Fattah Badr, A., Xiang, C. and Oliver, D. J. : "Characterization of the extracellular  $\gamma$ -glutamyl transpeptidases, GGT1 and GGT2, in Arabidopsis", *Plant J.*, **49**, 865-877 (2007).
- 28) Ohkama-Ohtsu, N., Zhao, P., Xiang, C. and Oliver, D. J. : "Glutathione conjugates in the vacuole are degraded by  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase GGT3 in Arabidopsis", *Plant J.*, **49**, 878-888 (2007).



### エイムス試験 (Ames test)

突然変異原性物質やガン原性物質を検出する最も一般的な短期検索法のひとつ。ヒスチジンの生合成系に欠損のあるサルモネラ変異株を用いて、His 要求性から非要求性になる復帰突然変異を、プレート上で効率よく簡便に検出する。既知の発ガン物質のほとんどが、この方法で陽性を示し、変異原性とガン原性を精度よく、かつ、再現性よく検出できる。

## Products

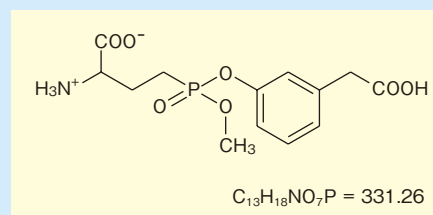


### 新規GGT阻害剤

GGsTop™

#### 特長

- GGT 特異性が高い
- ヒト GGT に対する阻害活性が高い
- 毒性が低い
- 化学的に安定



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
075-05471	GGsTop™	細胞生物学用	10mg	20,000



### はじめに

2007年のノーベル医学・生理学賞は、「胚性幹（ES）細胞を用いてマウスの特定の遺伝子を改変する原理の発見」、すなわちノックアウトマウス作製法の開発に対してM. Evans博士（英国・カーディフ大）、M. R. Capecchi博士（米国・ユタ大）、O. Smithies博士（米国・ノースカロライナ大）の3名に贈られた。ノックアウトマウスは哺乳類における遺伝子の機能を、個体で調べることのできる有力な方法であり、その受賞は医学や生命科学における多大な貢献に対する評価とみることができる。ここではES細胞を用いたノックアウトマウス作製技術の原理とその応用技術を紹介する。

### 背景

ある遺伝子の機能を知りたいとき、その遺伝子が働かない状態を作りそこで現れる表現型を解析できれば、答えを得ることができるだろう。大腸菌などでは、変異体を作製することにより多くの遺伝子の機能解析がなされてきた。そこでマウスで特定の遺伝子を破壊（ノックアウト）することができれば、哺乳動物における当該遺伝子の情報を得られることが予想されたが、実際に可能になると思った研究者は1980年代当初にはほとんどいなかったと思われる。それを可能にしたのは、ES（Embryonic stem）細胞の開発でありgene targeting法である。この2つの技術を組み合わせることにより、特定の遺伝子の機能をなくしたいいわゆるノックアウトマウスの作製が可能となったのである。

### ES細胞

Evansらは、マウス初期胚の胚盤胞の内部細胞塊（将来、胎仔になる）から直接、胚性未分化細胞（ES細胞）

株を樹立することに成功した<sup>1)</sup>。この細胞を胚盤胞に注入し子宮に戻すと、キメラマウスが生まれ、雄のキメラマウスの交配により、次世代にES細胞の遺伝子が伝達されることが示された<sup>2)</sup>。したがって、ES細胞に遺伝子変異を導入できれば、その変異をマウス個体に伝えることが可能となった。

ES細胞を未分化状態で長期培養するためには、いくつかの必須な条件がある。まず、マウスの14～16日胚由来の線維芽細胞の初代培養をマイトマイシンC処理してフィーダー細胞とし、その上でES細胞を培養する。培養液には15%牛胎仔血清を含むDMEMを用いるが、ES細胞の分化を防ぐとされるLIF（Leukemia inhibitory factor）の添加が必須である。また牛胎仔血清のロットも非常に重要で、ES細胞を未分化状態に保ち、増殖の良いロットを予め選別しておく必要がある。なお最近では、フィーダー細胞を必要としないES細胞も開発されている。

### 遺伝子ノックアウトの方法

導入されたDNAのほとんどはランダムに染色体に入るが、その一部は相同組み換え（homologous recombination）で入る。これを選別できれば特定の遺伝子に変異を導入できる（gene targeting法）。SmithiesらのグループとCapecchiらのグループは、マウスのES細胞で標的の遺伝子を相同組換えにより改変することに成功し、ノックアウトマウスの誕生に途を開いた<sup>3,4)</sup>。すなわち、特定の遺伝子に変異を入れたES細胞からマウス個体を得て、その変異をホモに持つ個体、すなわちノックアウトマウスを得ることができたのである。

相同組み換えの頻度は極めて頻度が低いため多くの細胞クローンを調べる必要があり、効率的な選択方法が求められた。これにはCapecchiらのグルー

プにより開発されたポジティブネガティブ選択法が非常に有効である。詳細は文献を参照されたいが、相同組み換えが起こった細胞ではネオマイシン抵抗性・tk(-)となる。FIAUまたはGancyclovirという薬（一種の抗ヘルペス剤）で処理するとHSVのtk遺伝子を発現する細胞のみが殺されるので、G418と両方で処理することにより、相同組み換えの起こった細胞のみを選択できる。ネガティブ選択には、DTA（ジフテリアトキシンAサブユニット）遺伝子も使われる。

### キメラマウスの作製

胚盤胞採取用マウスは近交系のマウスで、毛色の違いによるキメラの識別が容易なマウス（一般的にはC57BL/6）を選択する。ホルモン注射により過剰排卵させた雌マウスを雄マウスと交配し、3日後子宮から胚盤胞を回収する。胚盤胞に10～15個のES細胞を注入し、翌日仮親マウスの子宮へ移植する。得られたキメラを交配して産まれたF1マウスの中に、変異した遺伝子を持つヘテロ接合体が含まれる。さらにヘテロ接合体マウス同士との交配によりホモ接合体を作製する（図1）。

### 誘導可能なノックアウトマウス

上記のノックアウトマウスでは発生当初より体全ての細胞で特定の遺伝子が欠損しているため、当該遺伝子を破壊した影響のみならず、副作用とでも言うべき影響が現れ、遺伝子機能の解析に支障を生じることがある。これを回避するために、特定条件下での遺伝子発現の制御系を組み込んだノックアウトマウス作製方法が開発された。以下に、Cre-loxPシステムや、tamoxifenによる発現制御系を利用したノックアウトマウスについて述べる。

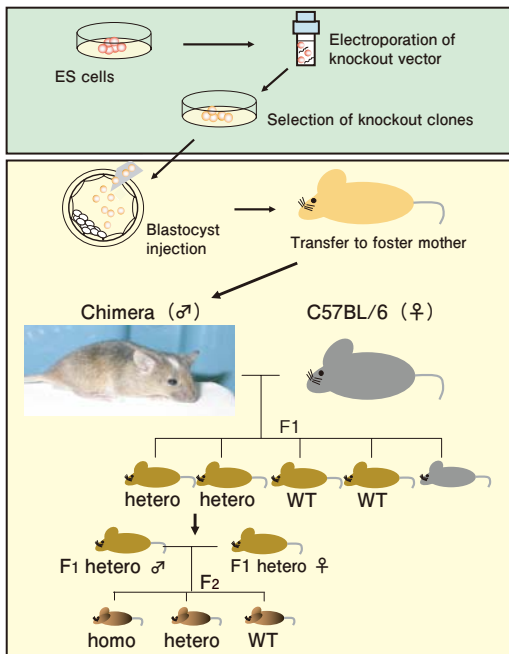


図1. ノックアウトマウス作製法

## 組織特異的ノックアウトマウス

部位特異的組換え系である Cre-loxP システムを用いて組織特異的に遺伝子をノックアウトすることが可能となっている。バクテリオファージP1由来のCre蛋白は特異的な loxP 配列を認識して、2つの loxP 配列で挟み込まれたDNAの切り出しや逆位を起こす(図2)。例えば、ある遺伝子の欠損させたいエクソンを2つの loxP 配列で挟み込むような形の変異遺伝子を持つマウス (floxed mouse) を作製し、このマウスを組織特異的なプロモーター下に Cre を発現するようなトランスジェニックマウスと交配すると、Cre を発現する組織でのみ目的の遺伝子が欠損したマウスが得られる<sup>5,7)</sup>。

## 誘導性組織特異的ノックアウトマウス

変異核内受容体で、tamoxifen というエストロゲンの誘導体と結合するものが報告されている。この蛋白と Cre 酵素の融合蛋白 (Cre-ER) は tamoxifen により核内に移行し、loxP 配列間

の組換えを起こす。組織特異的なプロモーター下に Cre-ER を発現するトランスジェニックマウスと上記の floxed mouse を交配して得られたマウスに tamoxifen を投与することにより、組織特異的に遺伝子ノックアウトを誘導することも成功している<sup>6)</sup>。

## 可逆的発現制御可能な遺伝子導入

ES細胞を用いたノックアウトマウス作製法はさらに応用範囲が広げられ、組織特異的時期特異的に外来性遺伝子を発現するマウスを作製するためにも用いられる。テトラサイクリン遺伝子発現制御システムは、細胞だけでなくマウスにおいても広く用いられ、目的の臓器でトランスジーンをオン/オフ可能なトランスジェニックマウスが多数作製されている。このシステムには、Tet-offとTet-onと呼ばれる二種類のタイプがあり、どちらも飲水中のテトラサイクリンあるいはドキシサイクリンの量を変えることにより、可逆的に遺伝子の発現量を制御できる。しかしながら、多くの場合、臓器特異的

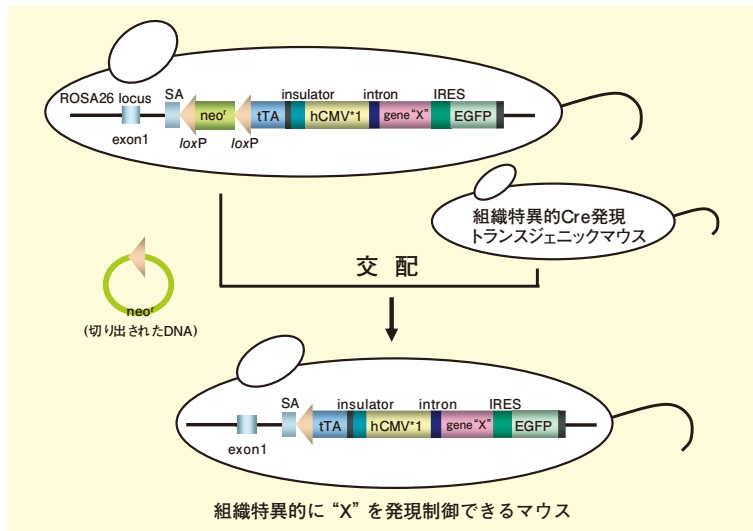


図2. 組織特異的遺伝子発現制御

プロモーター下で tTA を発現するカセットと CMV\*1 プロモーター下で目的の遺伝子を発現するカセットの2つのカセットに分かれており、それぞれから別々にトランスジェニックマウスが作製される。しかし、このシステムでは、厳密な発現制御は困難であった。

そこで、われわれはすべてのユニットをひとつのカセットに組み込み厳密な組織特異的時期特異的遺伝子発現制御を可能にするシステムを開発した。まずこのカセットをマウス ES 細胞の ROSA26 locus にノックインすると、ROSA26 プロモーター下で loxP で挟まれたネオマイシン耐性遺伝子が発現するようになる。ROSA26 locus に組み込まれた遺伝子は発生段階や組織に関係なく、全身で発現することが知られており、この locus にレポーター遺伝子を組み込まれたトランスジェニックマウスが頻繁に使用されている。G418 で薬剤選択して得られた目的の ES 細胞クローンからキメラマウスを得、発現制御カセットを受け継いだ子孫を、臓器特異的に Cre 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスと交配すると、loxP で挟まれたネオマイシン耐性遺伝子が除去され、臓器特異的に目的の遺伝子を発現制御できるマウスが得られる (図2)。さらにこの系



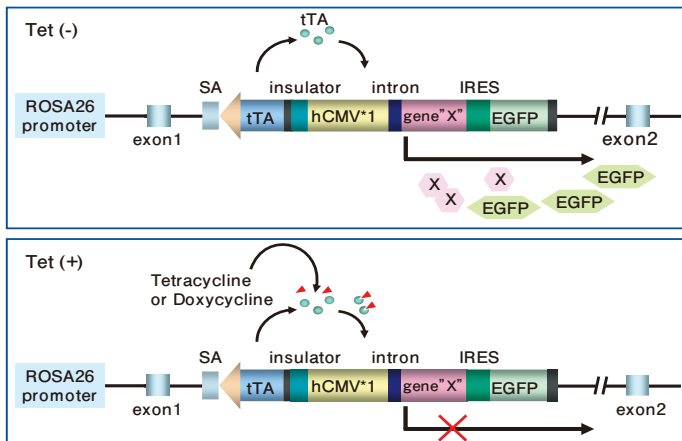


図3. 可逆的遺伝子発現制御

では、マウスにテトラサイクリンを与えると目的の遺伝子の発現は抑制され、テトラサイクリンを与えなければ、時間と共に目的の遺伝子の発現は高くなる (図3)<sup>7)</sup>。

現在、さまざまな種類の臓器特異的プロモーター下でCre遺伝子を発現するトランスジェニックマウスが世界中で作製されている。それらのトランスジェニックマウスとの組み合わせを変えて交配することにより、異なる組織で時期特異的に目的の遺伝子を発現制御することができるマウスが得られる。

### ノックアウトマウスのデータベース

米国ジャクソン研究所等の世界の主要なマウスリソースセンターは Federation of International Mouse

Resources (FIMRe : <http://www.fimre.org>) を設立し、世界中の遺伝子改変マウスを約4000系統、遺伝子改変ES細胞に関しては約15万種類を国際マウスデータベース International Mouse Strain Resource (IMSR : <http://www.informatics.jax.org/imsr/index.jsp>) から公開している。現在、欧米では全ての遺伝子を標的とした網羅的なノックアウトマウスの開発プロジェクトが進んでおり、今後の生命科学の発展にさらなる貢献が期待されている<sup>8)</sup>。

### おわりに

今日、ノックアウトマウスは医学・生命科学の基礎から応用に至るまで、あらゆる分野で利用されている。大型動物に関しては、羊で報告された核移

植の技術を用いれば、遺伝子操作動物を作成することが可能である。このような動物は遺伝子の個体における役割を詳しく解析するための手段であるだけでなく、ヒト疾患のモデルとして治療法、治療薬の開発にも役立っている。

### 【参考文献】

- 1) Evans, M.J. and Kaufman, M.H. : "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.", *Nature*, **292**, 154-156 (1981).
- 2) Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H. and Robertson, E. : "Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines.", *Nature*, **309**, 255-256 (1984).
- 3) Doetschman, T., Gregg, R.G., Maeda, N., Hooper, M.L., Melton, D.W., Thompson, S. and Smithies, O. : "Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells.", *Nature*, **330**, 576-578 (1987).
- 4) Thomas, K.R. and Capecchi, M.R. : "Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells.", *Cell*, **51**, 503-512 (1987).
- 5) Matthaei, K.I. : "Genetically manipulated mice : a powerful tool with unsuspected caveats.", *J. Physiol.*, **582** (Pt 2), 481-488 (2007).
- 6) O'Neal, K.R. and Agah, R. : "Conditional targeting : inducible deletion by Cre recombinase.", *Methods Mol. Biol.*, **366**, 309-320 (2007).
- 7) Miyazaki, S., Miyazaki, T., Tashiro, F., Yamato, E. and Miyazaki, J. : "Development of a single-cassette system for spatiotemporal gene regulation in mice.", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 1083-1088 (2005).
- 8) Friedel, R.H., Seisenberger, C., Kaloff, C. and Wurst, W. : "EUCOMM the European Conditional Mouse Mutagenesis Program.", *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.*, **6**, 180-185 (2007).

## マウスES細胞培養用 LIF新発売



※ P.23

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
129-05601	LIF, Human, recombinant, Culture Supernatant	細胞培養用	1mℓ	25,000
125-05603			1mℓ × 10	130,000

### 関連商品

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
046-28941	1-(2-Deoxy-2-fluoro-β-D-arabinofuranosyl)-5-iodouracil 【FIAU】	遺伝子研究用	1mg	35,000
078-04481 074-04483	Ganciclovir	生化学用	250mg 1g	10,000 29,000
076-05381 072-05383	G-418 Sulfate Solution	遺伝子研究用	20mℓ 100mℓ	20,000 85,000

## シソの香りのバラエティー

京都大学大学院 薬学研究科 伊藤 美千穂

我が国で「紫蘇とは」と言えば、“刺身の下に敷いてある緑色の葉っぱ”、あるいは、“梅干しの色付けに使う赤紫色の枝葉”、というのが一般的で、最も馴染みのあるあの香りは、ペリラルデヒドを主とし、これに少しリモネンが混じった香り、他に同じ匂いを持つ植物はありません。ところが、緑色のつまもの野菜にする紫蘇は、このペリラルデヒドの香りが顕著ですが、例えば前述の梅干し用の赤紫蘇などは、梅雨時にあちこちの店頭で並んでいるものの匂いを嗅いでみると、なかなかペリラルデヒドの匂いを持つものはありません。なぜでしょう。また、自宅の庭先に植えた紫蘇が、当年はいいペリラルデヒドの匂いの個体だったのに、それに花が咲いてできたタネがこぼれ、次の年にそれらから生えてきた個体は、いい匂いがしない、そんな経験をお持ちの方がありませんか。

シソの匂いに関して前述のような事例が起きるのは、シソの香りは1種類、と何となく思われているのに対し、実

際にはたくさんのバラエティーがあり、しかも、その変異の仕組みには、遺伝的制御がかかっているからなのです。

シソの葉の香りは、その表面にたくさん散らばっている腺鱗<sup>セソリン</sup>という小さな器官に、クチクラ層でできたミクロな風船があって、その中に蓄積された精油が、機械的な刺激によって風船が壊れて空気中に揮散し、それが鼻へ届くことによって感じられます。この精油に含まれる化合物は多種類のモノテルペン類やセスキテルペン類、またフェニルプロペン類で、その成分組成の違いによって香りが異なってきます。このような、腺鱗に精油を蓄積するシステムはシソ科植物に一般的で、ミントやバジル、ラベンダーなど、おなじみの洋物ハーブの多くが同じシステムを持っています。腺鱗が壊れなければ、匂いはしませんから、庭に植えたシソ科植物の香りを確かめる時には、その葉を優しく撫でてやって、周りに広がる香りと指先に付着した香りを楽しんでみてください。

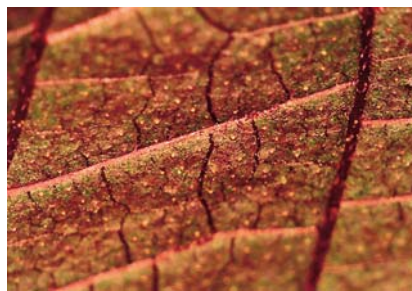
シソの腺鱗は、葉の向軸側（いわゆる表面）よりも背軸側（同裏面）に多く、茎、葉脈や葉柄、また花の萼と苞（花を保護するようについでいる楕状の附属器官）にも多数分布しています。当然ながら、腺鱗の数が多いほど香りは強くなりますが、この腺鱗数の多少も遺伝的に決まっており、栽培条件などで増減するものではありません。しかし、葉1枚あたりの精油量については生長時期によって変化があり、葉が展開しきってから時間が経つと減ってしまうようです。これは、葉の成長とともに大きくなっていく腺鱗が、何かの刺激でクチクラの風船が壊れて中身の精油が揮散してしまうと、同じ場所には再生されないからです。

さて、シソの香り、即ち精油成分組成には多くの種類があると書きましたが、いったい、何種類あるのでしょうか。遺伝的に純系として育種すると、シソの精油成分組成はほぼ一定の割合を保ち、正しく管理すれば世代交代しても大きく変動することはありません。このような成分組成の種類を精油型と呼んでいます。シソの葉と若い枝先は、日本薬局方に定められる生薬「紫蘇葉（蘇葉）」としても使われますが、この場合の基原は、ペリラルデヒド（PA）を主たる成分とするもの、即ち精油型がPA型のものに限られます。PA型の精油は、PAを約50%、リモネンを10~20%含み、PAはその構造中にシクロヘキセン環を含むモノテルペン化合物で、図のようにリモネンを中間体として生合成されます。

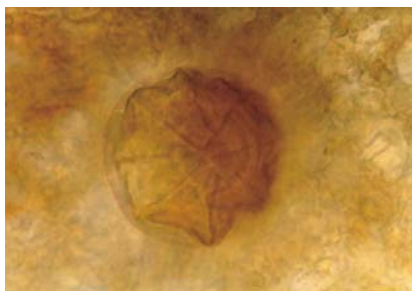
シソの精油型を、その主成分の生合成経路に従って分類すると、大きく2つ、モノテルペン系とフェニルプロペン系に区分されます（図参照）。このうち、シソに含まれるフェニルプロペン系の化合物はヒトには殆ど無臭に感じられるものばかりですが、最近の梅干し用の赤紫蘇はこのタイプが最も多いようです。これは、香りではなく、色を主眼に選抜が繰り返された結果だ



ある年の圃場の様子。多種多様ですがすべて *Perilla frutescens* です。



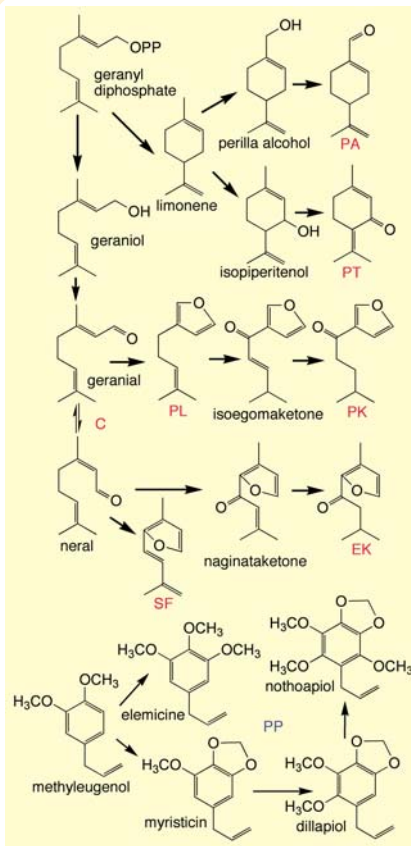
シソの葉表面の拡大写真。黄色く丸いつぶが腺鱗です。



腺鱗。真上から見たもので、風船の中に8つの精油分泌細胞が並んでいるのがわかります。



シソの花。萼にもたくさん腺鱗があります。



と考えられます。一方、モノテルペン系の化合物はいずれも特徴的な匂いを持っており、慣れてくると「鼻クロマトグラフィー」で分類も可能です。モノテルペン系は、推定生合成経路によってさらにリモネン経由型とゲラニオール経由型に分類可能ですが、その詳細は他文献をご参照いただくとして、ここでは、モノテルペン系にはPA型を含めると7つの精油型があることを図に見てください。即ち、PA、

ピペリテノン (PT)、ペリラケトン (PK)、シトラール (C)、ペリレン (PL)、エルショルツィアケトン (EK)、シソフラン (SF) 型です。各精油型の成分組成は、微量成分を含めると数十種類の化合物で構成されますが、組成の30~90%を占める主成分はそれぞれについて1種類です。例えば、前述のPA型他、PK型はPKが90%超を占めます。他に、PK型やEK型には明らかなサブタイプが存在します。

これらシソの精油型は、メンデルの法則に従って説明できる遺伝様式で決定されるものであって、栽培条件や土壌質等によって変動するものではありません。しかし、シソは虫媒花であり、また栽培種同士であれば、形態が大きく異なっても自由に交配が可能であるために、特別に配慮をしなければ遺伝的純系を保つことはほぼ不可能です。エゴマ、あるいはアブラエ、東北地方ではジュウネンと呼ばれるタネ(植物学的には分果)を胡麻のように、また油を搾って使ったり、或いは、韓国で焼き肉と一緒に供される大きめの緑色の葉野菜がありますが、これらの外見的特徴は一般のシソと大きく異なっているものの、いずれも学名は *Perilla frutescens* でシソと同じ、つまり、シソとエゴマは同じ植物で、形態が大きく異なるバリエーションなのです。シソの形態的特徴の変異の幅はこれほど大きいものであるにも関わらず、自然状態で簡単に交雑し、繁殖能力のある子孫を作ることが可能です。

では、精油型や形態的特徴について遺伝的に純系を保つためにはどうすればいいのでしょうか。最も確実な方法—これは即ち伊藤自身が毎年行っている作業ですが—は、蕾の時期に袋掛けをすることで確実に自家受粉させたタネを穫り、毎年この純系だけを使うようにして、自然交配でできたタネから生えてきた個体は使わない、ことです。ところが、研究で使用する量ならこの方法でも可能ですが、商業ベースとなるとそうもいきません。そこで、香りを重視する京都大原のしば漬けに使うシソは、昔から人里離れた山間に隔離栽培する、という形をとっているのだそうです。先人は、シソの香りを維持するためには隔離する必要があることを経験的に知っていた、ということでしょうか。

シソについては、このほかにも、好みの匂いの精油型がお国によって相違があるという話題や、染色体数が倍数関係にある同属の野生種と精油成分生合成経路成立についての話題、タネ(分果)の利用に関する話題等々、書ききれなかったことがいろいろあって、日本人の生活に身近でありながら、研究材料としても非常に面白い植物で、もうしばらく付き合っていきたいと思っています。

【参考文献】

1) Ito, M.: "Studies on perilla relating to its essential oil and taxonomy.", *Phytochemistry Research Progress*, ed. by Matsumoto, T., Nova Publishers, p. 13-30 (2008).

Products 生薬試験用標準品



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
161-22601	(S)-Perillaldehyde Standard	生薬試験用	30mg×5A	15,000
186-02111	Rosmarinic Acid Standard	生薬試験用	20mg	20,000
136-15541	Myristicin Standard	生薬試験用	20mg	照会

※生薬試験用標準品類の新製品は p. 19 をご参照下さい。



### はじめに

microRNAは約22塩基からなる一群の機能性低分子RNAで、遺伝子発現を転写後レベルで制御するガイド分子として機能し、細胞分化やがん化などに深く関わっていることが報告されています。ヒトやマウスでは1,000種類以上のmicroRNAの存在が示唆されており、機能未知な新規microRNAの同定、機能解明が世界中で盛んに進められています。

細胞中で複数のステップを通して成熟化したmicroRNAはRISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれるタンパク質複合体に取り込まれ、その主要コンポーネントであるArgonauteサブファミリータンパク質と結合することが知られています。ArgonauteサブファミリーにはヒトでAgo1~Ago4の4種類が存在し、それぞれユビキタスに発現しています<sup>1)</sup>。中でもAgo2は発現量が最も多く、唯一標的RNAを切断するSlicer活性を有していることから、microRNAパスウェイにおいて中心的な役割を果たしていると考えられています<sup>2)</sup>。従って、Ago2タンパク質に結合したmicroRNAを特異的に精製することは、microRNAの機能解明や新規microRNAを同定する上で重要な技術と考えられます。

### 本キットの使用例

microRNA Isolation Kit, Human Ago2は高性能な抗ヒトAgo2モノクローナル抗体<sup>3, 4)</sup>を用いた免疫沈降法を行うことで、Ago2タンパク質に結合したmicroRNAを高純度に精製することができるキットです。本キットを用いてヒト細胞株(HeLa, HepG2, HEK293)及びマウス細胞株(P388D1)から精製を行ったところ、ヒト細胞株特異的に高純度のmicroRNAを得ることができました(図1)。また、精製したRNAにはrRNAなどの分解産物の混入がほとんどないため、電気泳動によるサイズ分画の必要なしにmicroRNAを効率よくクローニングすることができました(図2)。

### 標的mRNA解析への応用の可能性

最近、Ago2免疫沈降法により得られ

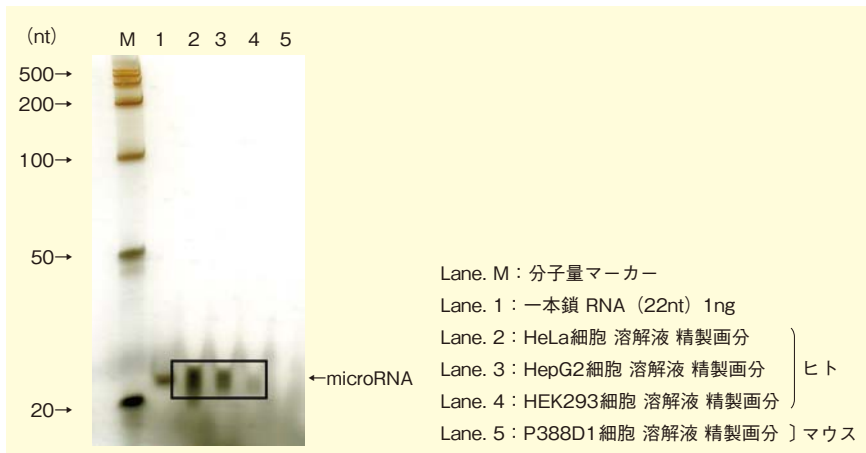


図1. 培養細胞株からのmicroRNA精製

microRNA Isolation Kit, Human Ago2を用いて、ヒト培養細胞株3種類(HeLa, HepG2, HEK293)、及びマウス培養細胞株(P388D1)から精製したmicroRNA画分をUrea-PAGEの後、銀染色によって検出した。その結果、ヒト培養細胞特異的にmicroRNAが精製できた。使用細胞数は $5 \times 10^6$ 相当。

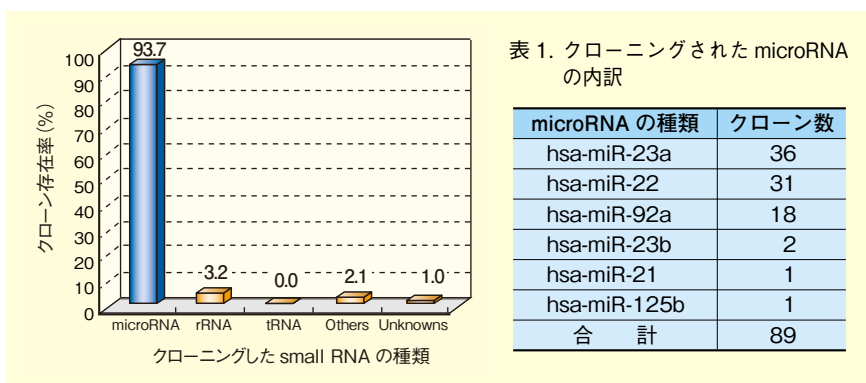
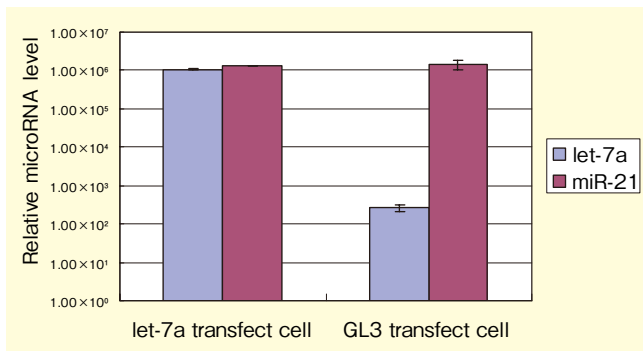


図2. HeLa細胞から精製したmicroRNA画分のクローニング

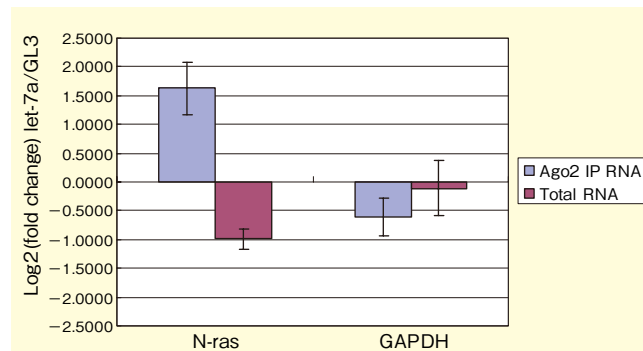
microRNA Isolation Kit, Human Ago2により、HeLa細胞から精製したmicroRNA画分を用いてmicroRNA Cloning Kit Wakoでクローニングし、small RNAの分布を解析した。ランダムに選抜した95クローンからプラスミドを抽出し、塩基配列を解析した後、データベース(Sanger miRNA Registry)と照合したところ、95クローン中89クローン(全体の93.7%)がmicroRNAであることを確認した。89クローンの内訳は表1を参照。

るRNA画分にはmicroRNAの標的mRNAも含まれていることが報告され<sup>5, 6)</sup>、注目を集めています。当社においてもその可能性を検討しました。がん遺伝子として知られているras遺伝子(N-ras, K-rasなど)は、mRNAの3'UTR領域にlet-7 familyの標的となるシード配列を有しており、let-7 familyによる制御を受けていることが報告されています<sup>7)</sup>。そこでlet-7 familyの1つであるlet-7aを2本鎖RNAの状態で肝がん細胞株HuH-7に導入し、total RNA及びAgo2免疫沈降RNA中のN-ras mRNA量を定量PCR法により調査しました(図3)。その結果、

N-ras mRNAはホタルルシフェラーゼsiRNA(GL3)導入細胞に比べlet-7a導入細胞で、total mRNA量が減少したにもかかわらず、Ago2免疫沈降RNA中ではmRNA量が増加しました。一方、let-7aの標的配列を持たないGAPDH mRNAはtotal RNA及びAgo2免疫沈降RNA中で両細胞のmRNA量に有意な差が見られませんでした。この実験から特定のmicroRNAを過剰発現させることでmicroRNAとその標的mRNAがAgo2免疫沈降RNA中に特異的に濃縮されることが示され、Ago2免疫沈降法によりmicroRNAとその標的mRNAが共沈す



A. let-7a導入細胞から精製したAgo2免疫沈降RNA中のmicroRNA量  
let-7a 2本鎖RNAまたはホタルルシフェラーゼsiRNA (GL3) を導入したHuH-7細胞から精製したAgo2免疫沈降RNA中のlet-7a量及びmiR-21量を定量PCR法により測定した。let-7aを導入した細胞ではAgo2免疫沈降RNA中のlet-7a量は約4,000倍増加した。



B. let-7a導入による標的mRNA量変化  
let-7a 2本鎖RNAまたはホタルルシフェラーゼsiRNA (GL3) を導入したHuH-7細胞から精製したAgo2免疫沈降RNA及びTotal RNA中のN-ras、GAPDH mRNA量を定量PCR法により測定した。let-7aを細胞に導入することでlet-7aの標的であるN-ras mRNAが特異的にAgo2免疫沈降RNA中に濃縮された。

図3. Ago2免疫沈降RNA中の標的mRNA検出

ることが示されました。

以上のことからmicroRNA Isolation Kit, Human Ago2はmicroRNAのみならず、その標的mRNAを解析するツールとしても利用できる可能性が考えられます。

【参考文献】

- 1) Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S. and Shimizu, N. : *Genomics*, **82**, 323 (2003).
- 2) Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. and Tuschl, T. : *Mol. Cell*, **15**, 185 (2004).
- 3) Azuma-Mukai, A., Oguri, H., Kin, T., Qian, Z. R., Asai, K., Siomi, H. and Siomi, M. C. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7964 (2008).
- 4) Miyoshi, K., Uejima, H., Nagami-Okada, T., Siomi, H. and Siomi, M. C. : *Methods Mol. Biol.*, **442**, 29 (2008).
- 5) Beitzinger, M., Peters, L., Zhu, J. Y., Kremmer, E. and Meister, G. : *RNA Biol.*, **4** (2), 76 (2007).
- 6) Karginov, F. V., Conaco, C., Xuan, Z., Schmidt, B. H., Parker, J. S., Mandel, G. and Hannon, G. J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 19291 (2007).
- 7) Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K. L., Brown, D. and Slack, F. J. : *Cell*, **120**, 635 (2005).

**Products**  
microRNA “特異的” 精製キット  
マイクロRNA アイソレーションキット, ヒト Ago2



**特長**

- 高効率にmicroRNAを精製可能
- 特異性が高い抗ヒトAgo2モノクローナル抗体を使用
- 非特異的タンパク質の吸着が少ない高性能ビーズを使用
- microRNAクローニング用サンプルの調製に最適
- マイクロアレイの発現解析に使用可能

**キット内容**

- 抗ヒトAgo2抗体ビーズ溶液 500 μl × 1本
- 細胞溶解液 50ml × 1本
- 溶出液 500 μl × 1本
- エタ沈メイト 30 μl × 1本
- 3 mol/l 酢酸ナトリウム 400 μl × 1本

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
292-66701	microRNA Isolation Kit, Human Ago2	遺伝子研究用	10回用	45,000

microRNA Isolation Kit, Human Ago2 は特許出願中です。(平成19年11月30日)

**関連商品**

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
290-66501	microRNA Cloning Kit Wako	遺伝子研究用	8回用	63,000
298-65103	Single Strand DNA Ligase, thermostable, recombinant, Solution	遺伝子研究用	200units	43,000
292-65101			500units	87,000
011-22033	Anti Human AGO2, Monoclonal Antibody	免疫化学用	50 μl	30,000
015-22031			100 μl	50,000
014-22023	Anti Mouse AGO2, Monoclonal Antibody	免疫化学用	50 μl	30,000
018-22021			100 μl	50,000

microRNA Cloning Kit Wako は特許出願中です。(平成19年10月1日)

## Presep<sup>®</sup>-C PFC を使用したパーフルオロ化合物の分析

和光純薬工業株式会社 試薬研究所 吉田貴三子

パーフルオロ化したふっ素化合物であるパーフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS)、パーフルオロオクタン酸 (PFOA) は、近年、野生生物や人への蓄積が進んでいること、広く環境中に残留していることが明らかになり、地球環境汚染の要監視項目として注目されています。国内では化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律で第2種監視物質に指定されています。国際的には2005年、『ストックホルム条約』において、PFOSは残留性有機汚染物質 (POPs) として追加提案され、2009年には廃絶または制限への勧告が報告される見通しで、国内でもPFOSは第1種特定化学物質に指定される見込みです。

筆者らは、パーフルオロ化合物 (PFCs) の分析方法を検討し、本誌Vol.75 No.4 (2007) に“Wakopak<sup>®</sup>を使用したパーフル

オロ化合物のLC/MS/MS分析”を紹介しました。今回、環境水中のPFOS、PFOAの前処理に有効なPresep<sup>®</sup>-C PFC (Short) を開発しましたので、その有用性を紹介します。

PFOA、PFOSの微量分析は、前処理した試料をLC/MS/MSで分析する測定法が有効な手段となっています。そこで、試料の前処理にPresep<sup>®</sup>-C PFC (Short) を、LC/MS/MS分析にWakopak<sup>®</sup> Navi C 18-5 を組合せた分析系を構築し、LC/MS用超純水1,000mlにPFCs標準品を添加した時の標準添加回収率の測定と河川水への応用を検討しました。その時の前処理法を図1に、LC/MS/MS分析条件を図2に示しました。その結果、LC/MS用超純水に添加した標準品の回収率は、PFOA 88%、PFOS 86%と良好な結果が得られ、他6種類の有機ふっ素化合物 (PFCs):

PFHxS、PFDS、PFNA、PFDA、PFUnDA、PFDoDA) においても76%から96%の良好な回収率を得ました。表1に各成分のMRM検出イオンと標準添加回収率及び大阪近辺の河川Aから採水した水中のPFCsの濃度をまとめて示し、図3、4に標準液と河川水のクロマトグラムを示しました。河川Aからは、PFDSを除く7成分が検出され、LC/MS/MSによる測定で各検出イオンにおいて他に溶出するピークもなく良好に測定することができました。なお、環境水を取扱う際には、固相抽出カラムの通液性を確保する目的で、グラスフィルターによるろ過が有効な方法となります。

以上、水試料の前処理にPresep<sup>®</sup>-C PFC (Short) を、LC/MS/MS分析にWakopak<sup>®</sup> Navi C 18-5、2.0×150mmを使用した分析例を紹介しました。これらは、水道水、水道水水源水、環境水のパーフルオロ化合物の分析に有用な商品と考えており、今後もより多くの成分を対象とした一斉分析法の検討を進め、有用な情報をご提供していきたいと考えます。

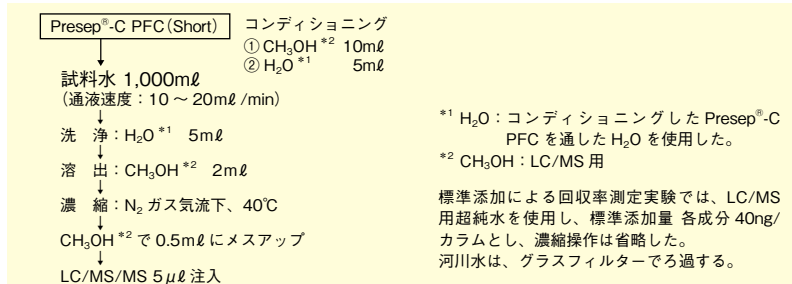


図1. 固相抽出条件

<HPLC 条件>		<MS 条件>	
Column:	Wakopak <sup>®</sup> Navi C18-5、2.0×150mm	Curtain Gas (CUR):	10
Eluent: A)	10mmol/l CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN=65/35(v/v)	Collision Gas (CAD):	5
B)	10mmol/l CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN=10/90(v/v)	IonSpray Voltage (IS):	-4,500
Gradient:	0-25min B: 0-100%, 25-30min B: 100%	Temperature (TEM):	400
	30-35min B: 100-0%, 35-40min B: 0%	Ion Source Gas1 (Gas1):	80
Flow Rate:	0.2ml/min at 40°C	Ion Source Gas2 (Gas2):	70
Injection Vol.:	5 µl		

図2. LC/MS/MS 条件

表1.

Peak No.	Sample Name	Q1 / Q3	標準添加回収率 (%)	河川 A の濃度 ng/ℓ
1	PFHxS	398.8/ 79.6 amu	76	5
2	PFOS	498.8/ 79.6 amu	86	39
3	PFDS	598.9/ 79.9 amu	91	0
4	PFOA	412.9/368.9 amu	88	38
5	PFNA	462.7/418.8 amu	96	8
6	PFDA	512.9/469.0 amu	91	4
7	PFUnDA	562.9/519.0 amu	90	11
8	PFDoDA	612.9/568.9 amu	89	27

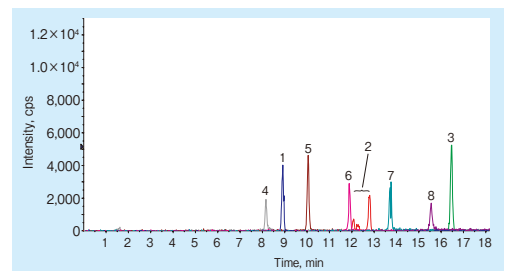


図3. PFCs 8成分混合標準液 5ng/ml, 注入量 5 µl

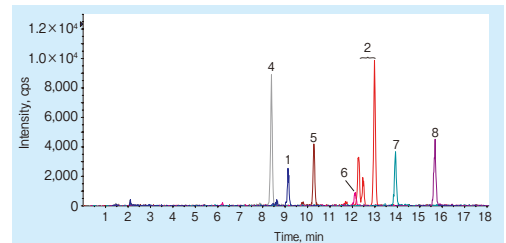


図4. 河川 A の水 1,000ml → 2ml に濃縮、注入量 5 µl (N<sub>2</sub>ガスによる濃縮は省略)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
297-49651	Presep <sup>®</sup> -C PFC (Short)	試料前処理用	10 個 × 5	45,000
品名	カラムサイズ	記号	希望納入価格 (円)	
Wakopak <sup>®</sup> Navi C18-5	2.0 × 150mm	(ケ)	45,000	



## 残留農薬試験用



### 有機りん農薬混合液

相次ぐ輸入冷凍食品からの有機りん系農薬の検出に伴い、平成20年3月7日付けの事務連絡で厚生労働省より「食品中に残留する有機りん系農薬に係る試験法」において一斉試験法が通達されています。

下記FAシリーズ3製品をご使用頂くことで、特定毒物<sup>注1)</sup>を除く上記試験法に記載の54項目(56成分)<sup>注2)</sup>の一斉分析が検討できます。

注1) 通達の成分に含まれる成分で、特定毒物の「パラチオン」、「パラチオンメチル」及び「ホスファミドン」は、本製品群には含まれておりません。

注2) FA-1-1において「ジメチルピビンホス」及び「クロルフェンビンホス(CVP)」はE体、Z体がそれぞれ20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるよう調製されています。

注3) 有機りん系の農薬は注入口やカラムで吸着、分解される場合があります。例えば、スプリットレス注入により分析した場合、ホルメチオンが一部ジメトエートに分解することがあります。

### 成分一覧

#### 有機りん農薬混合液FA-1-1 (24種)

No.	成分名	No.	成分名	No.	成分名
1	DDVP (Dichlorvos)	9	Chlorpyrifosmethyl	17	Fosthiazate
2	Methamidophos	10	Pirimiphos-methyl	18	Propaphos
3	Acephate	11	(E)-Dimethylvinphos	19	Profenofos
4	Cadusafos	12	Malathion	20	Ethion
5	Salithion	13	(Z)-Dimethylvinphos	21	EDDP (Edifenphos)
6	Diazinon	14	$\alpha$ -CVP [(E)-Chlorfenvinphos]	22	CYP (Cyanofenphos)
7	IBP (Iprobenfos)	15	Quinalphos	23	Pyridaphenthion
8	CYAP (Cyanophos)	16	$\beta$ -CVP [(Z)-Chlorfenvinphos]	24	Phosalone

溶媒 (アセトン : シクロヘキサン = 80 : 20)

#### 有機りん農薬混合液FA-2-1 (22種)

No.	成分名	No.	成分名	No.	成分名
1	Ethoprofos	9	Chlorpyrifos	17	Butamifos
2	Phorate	10	Formothion	18	Sulprofos
3	Thiometon	11	MPP (Fenthion)	19	Fensulfothion
4	Terbufos	12	MEP (Fenitrothion)	20	EPN
5	Etrifos	13	Isofenphos	21	PMP (Phosmet)
6	ECP (Dichlofenthion)	14	PAP (Phenthoate)	22	Pyraclafos
7	Dimethoate	15	Prothiofos		
8	Tolclofos-methyl	16	DMTP (Methidathion)		

溶媒 (アセトン : ヘキサン = 96 : 4)

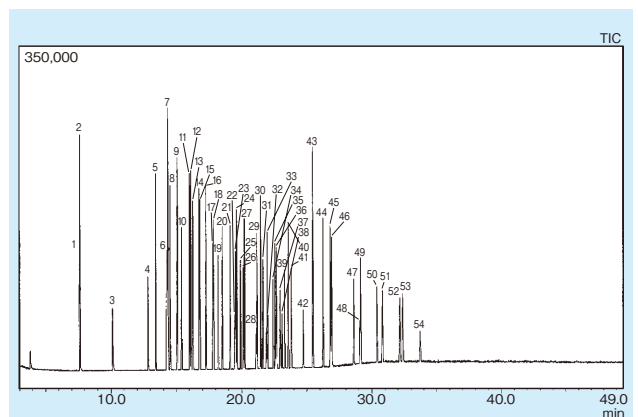
#### 有機りん農薬混合液FA-3-1 (10種)

No.	成分名	No.	成分名	No.	成分名
1	Omethoate	5	Fenamiphos	9	Azinphos-ethyl
2	Ethylthiomethon (Disulfoton)	6	Isoxathion	10	Coumaphos
3	Monocrotophos	7	Vamidothion		
4	Bromophos-ethyl	8	Azinphos-methyl		

溶媒 (アセトン)

### GC/MS による分析例

#### 有機りん農薬混合液FA-1-1, 2-1, 3-1混合 (5ppm) (56種) の分析



Column : BPX-5 0.25 $\mu\text{m}$ , 0.25mm $\times$ 30m  
60 $^{\circ}\text{C}$  (2min) $\rightarrow$ 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  $\rightarrow$ 150 $^{\circ}\text{C}$  $\rightarrow$ 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  $\rightarrow$ 270 $^{\circ}\text{C}$  (20min)  
Injection Volume : 1 $\mu\text{L}$   
Injection : 250 $^{\circ}\text{C}$   
Interface : 250 $^{\circ}\text{C}$   
Scan : m/z 40-450 (TIC)  
Flow : 1.0 mL/min  
Split ratio : 1/10

Peak No.	成分名	Peak No.	成分名	Peak No.	成分名
1	Methamidophos	19	Chlorpyrifosmethyl	37	Vamidothion
2	DDVP (Dichlorvos)	20	Tolclofos-methyl	38	Butamifos
3	Acephate	21	Pirimiphosmethyl	39	Fenamiphos
4	Omethoate	22	MEP (Fenitrothion)	40	Prothiofos
5	Ethoprofos	23	(E)-Dimethylvinphos	41	Profenofos
6	Cadusafos	24	Malathion	42	Isoxathion
7	Monocrotophos	25	Chlorpyrifos	43	Fensulfothion
	Salithion	26	(Z)-Dimethylvinphos		Ethion
8	Phorate	27	MPP (Fenthion)	44	Sulprofos
9	Thiometon	28	Fosthiazate 1 <sup>*</sup>	45	CYP (Cyanofenphos)
10	Dimethoate		$\alpha$ -CVP [(E)-Chlorfenvinphos]	46	EDDP (Edifenphos)
11	Terbufos	29	Fosthiazate 2 <sup>*</sup>	47	Pyridaphenthion
12	Diazinon	30	Isofenphos	48	EPN
13	CYAP (Cyanophos)	31	$\beta$ -CVP [(Z)-Chlorfenvinphos]	49	PMP (Phosmet)
14	Ethylthiomethon	32	PAP (Phenthoate)	50	Phosalone
15	Etrifos	33	Quinalphos	51	Azinphos-methyl
16	IBP (Iprobenfos)	34	Bromophos-ethyl	52	Azinphos-ethyl
17	Formothion	35	Propaphos	53	Pyraclafos
18	ECP (Dichlofenthion)	36	DMTP (Methidathion)	54	Coumaphos

\* Fosthiazate には 2種の異性体が含まれています。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
152-02791	有機りん農薬混合液 FA-1-1 (各 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	残留農薬試験用	1mL	15,000
155-02801	有機りん農薬混合液 FA-2-1 (各 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	残留農薬試験用	1mL	15,000
152-02811	有機りん農薬混合液 FA-3-1 (各 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アセトン溶液)	残留農薬試験用	1mL	12,000

## ポジティブリスト制度対応



### 農薬混合液

ご好評頂いておりますポジティブリスト制度一斉試験法対応の農薬混合液PLシリーズの品目を追加しました。商品の組合せにより、食安発第1003002号の各試験法に記載の成分をほぼ揃えることができます。

#### 成分一覧

#### 農薬混合液 PL-12-1 (26種)

No.	成分名	No.	成分名	No.	成分名
1	Chloretoxyfos	10	2-(1-Naphthyl)acetamide	19	1,1-Dichloro-2,2-bis(4-ethylphenyl)ethane
2	Dicrotophos	11	Methoprene	20	Flufenpyr-ethyl
3	Phorate	12	Mecarbam	21	Carfentrazone-ethyl
4	Clomazone	13	Bromophos-ethyl	22	Epoxiconazole
5	Isazophos	14	Propaphos	23	Picolinafen
6	Disulfoton (Ethylthiomethone)	15	Chlorbenside	24	Fenamidone
7	Formothion	16	Flutriafol	25	Spirodiclofen
8	Fenchlorphos	17	Chlorofenson (CPCBS)	26	Cinidion-ethyl
9	Ethofumesate	18	Carboxin		

#### 農薬混合液 PL-13-1 (15種)

No.	成分名	No.	成分名	No.	成分名
1	Nitrapyrin	6	Flufenacet	11	Triticonazole
2	Methacrifos	7	Triflumizole	12	Boscalid
3	Tebuthiuron	8	Azamethiphos	13	Thiaclopid
4	Oxabetrinil	9	Resmethrin	14	Famoxadone
5	S-Metolachlor	10	Furathiocarb	15	Propaquizafop

#### 農薬混合液 PL-14-1 (31種)

No.	成分名	No.	成分名	No.	成分名
1	Methomyl	12	Dymron (Daimuron)	23	Cycloate
2	Imidacloprid	13	Cumyluron	24	Pentoxazone
3	Oxycarboxin	14	Chloroxuron	25	Oxaziclomfene
4	Bendiocarb	15	Mepanipirim	26	Fenoxaprop-ethyl
5	Thiodicarb	16	Triticonazole	27	Flufenoxuron
6	Pirimicarb	17	Indanofan	28	Cycloprothrin
7	Methabenzthiazuron	18	Tetrachlorvinphos (CVMP)	29	Spinosyn A
8	Furametpyr	19	Carpropamid	30	Spinosyn D
9	Azoxystrobin	20	Imazalil	31	Silaflofen
10	Methiocarb	21	Pencycuron		
11	Acibenzolar-S-methyl	22	Hexaflumuron		

#### 農薬混合液 PL-15-1 (28種)

No.	成分名	No.	成分名	No.	成分名
1	Aldoxycarb(AldicarbSulfone)	11	Flufenacet	21	Hexythiazox
2	Oxarmyl	12	Epoxiconazole	22	(E)-Fenpyroximate
3	Aldicarb	13	Diflubenzuron	23	Diuron (DCMU)
4	Carbofuran	14	Cyprodinil	24	Linuron
5	Tebuthiuron	15	Triflumuron	25	Boscalid
6	Carbaryl (NAC)	16	Clofentezine	26	Tebufenozide
7	Monolinuron	17	Quizalofop-ethyl	27	Novalron
8	Fluridone	18	Lufenuron	28	Teflubenzuron
9	Dimetomorph	19	Propaquizafop		
10	Fenamidone	20	(Z)-Fenpyroximate		

#### 農薬混合液 PL-16-1 (32種)

No.	成分名	No.	成分名	No.	成分名
1	Metsulfuron-methyl	12	Ethametsulfuron-methyl	23	Fluazifop
2	Azimsulfuron	13	Pyrazosulfuron-ethyl	24	Triflurosulfuron-methyl
3	Chlorsulfuron	14	Naptalam	25	Bensulfuron-methyl
4	Cinosulfuron	15	Trifloxysulfuron	26	Primisulfuron-methyl
5	Sulfosulfuron	16	Iodosulfuron-methyl	27	Cyclosulfamuron
6	Propoxycarbazone	17	Metosulam	28	Fenhexamid
7	Flazasulfuron	18	Penoxsulam	29	Halosulfuron-methyl
8	Imazosulfuron	19	Chlorimuron-ethyl	30	2,4-D (2,4-PA)
9	Tribenuron-methyl	20	Ethoxysulfuron	31	MCPA (MCP)
10	Triasulfuron	21	Sulfentrazone	32	Clodinafop acid
11	Mesosulfuron-methyl	22	Prosulfuron		

#### 農薬混合液 PL-17-1 (32種)

No.	成分名	No.	成分名	No.	成分名
1	Pymetrozine	12	Flamprop-methyl	23	Triflumizole
2	3-Hydroxycarbofuran	13	Triflumizole Metabolite	24	Benfuracarb
3	Tepaloxymid	14	Prometryn	25	Fluazuron
4	Carbetamide	15	Clodinafop-propargyl	26	Etoazole
5	Bromacil	16	Carfentrazone-ethyl	27	Chlorfluazuron
6	Sethoxydim	17	Benalaxyl	28	Amitraz
7	Oxabetrinil	18	Mefenpyr-diethyl	29	Carbosulfan
8	Chlorbufam	19	Pyraclostrobin	30	Fenpropimorph
9	Ametryn	20	Phoxim	31	Cymoxanil
10	Pyrimethanil	21	Pyrazophos	32	Triforine
11	Barbamate	22	Trifloxystrobin		

#### 使用例

##### 一斉試験法に記載成分の組合せ例

一斉試験法 (食安発第 1003002 号による)	対応商品 (略号)
GC/MSによる農薬等の一斉試験法 (農産物)	農・PL-1、2、3、4、5、6、11、12
GC/MSによる農薬等の一斉試験法 (畜水産物) [筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び魚介類]	農・PL-1、2、3、9、11、12、13
GC/MSによる農薬等の一斉試験法 (畜水産物) [乳、卵及びはちみつ]	農・PL-1、2、3、9、10、11、12、13
LC/MSによる農薬等の一斉試験法 I (農産物)	農・PL-7、14、15
LC/MSによる農薬等の一斉試験法 II (農産物)	農・PL-8、16
LC/MSによる農薬等の一斉試験法 (畜水産物) [筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び魚介類]	農・PL-7、15、17
LC/MSによる農薬等の一斉試験法 (畜水産物) [乳、卵及びはちみつ]	農・PL-7、15、17
HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)	動・PL-1、動・PL-2
HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法 II (畜水産物)	動・PL-2

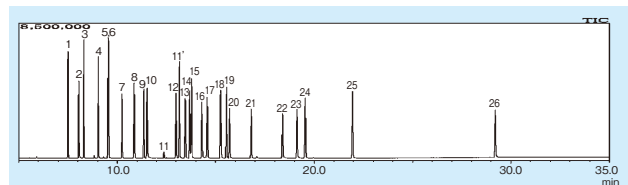
一部、一斉試験法記載の成分で、混合液に含まれていない成分がございます。詳細は、当社ホームページ ([http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/info/env/pdf/positivelist\\_3.pdf](http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/info/env/pdf/positivelist_3.pdf)) をご参照下さい。

農薬混合液 PL-12-1、13-1、14-1、15-1、16-1、17-1 の経日安定性は現在継続的に確認を行っております。

経日安定性に関する情報は当社ホームページ (<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/info/env/article/nouyaku2.htm>) をご参照下さい。

#### 分析例

##### 農薬混合液 PL-12-1 (GC/MS 対応) の分析例



[Instrument]  
Shimadzu QP-2010

[GC]  
Column: BPX 5 0.25µm × 0.32mm × 30m  
Column Temp.: 80°C (1 min) → 20°C/min → 180°C → 5°C/min → 300°C (5 min)

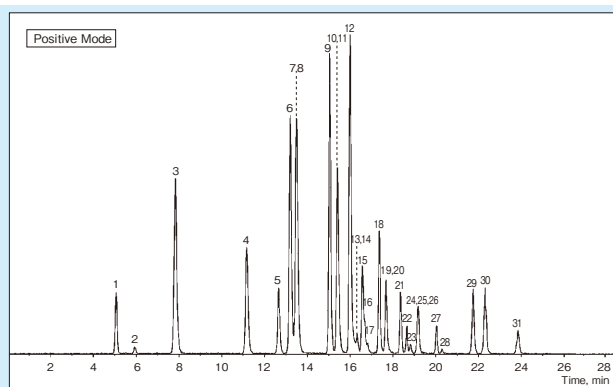
Insert: 220°C  
Carrier Gas: He 50 cm/sec  
Injection: Splitless Injection 1 min  
Injection Volume: 1 µl

[MS]  
Ionization Mode: EI  
Interface: 280°C  
Injection: 260°C  
Scan (m/z): 40-550

[次頁に続く]

Peak No.	Constituent	Peak No.	Constituent	Peak No.	Constituent
1	Chlorethoxyfos	10	2-(1-Naphthyl)acetamide	19	1,1-Dichloro-2,2-bis(4-ethylphenyl)ethane
2	Diclotophos	11	Methoprene	20	Flufenpyr-ethyl
3	Phorate	12	Mecarbam	21	Carfentrazone-ethyl
4	Clomazone	13	Bromophos-ethyl	22	Epoxiconazole
5	Isazofoton (Ethylthiomethone)	14	Propaphos	23	Picolinafen
6	Disulfoton (Ethylthiomethone)	15	Chlorbenside	24	Fenamidone
7	Formothion	16	Flutriafol	25	Spirodiclofen
8	Fenchlorphos	17	Chlorofenson (CPCBS)	26	Cinidon-ethyl
9	Ethofumesate	18	Carboxin		

## ■ 農薬混合液 PL-14-1 (LC/MS ( /MS )) の分析例



### [HPLC]

Column : Wakopak® Wakosil-II 3C18 HG 2.0 × 150mm  
 Eluent : A) 5mmol/l CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O  
 B) 5mmol/l CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> in CH<sub>3</sub>OH

Gradient :

Time	B conc.
0 - 1min.	15 - 40%
1 - 3.5min.	40%
3.5 - 6min.	40 - 50%
6 - 8min.	50 - 55%
8 - 17.5min.	55 - 95%
17.5 - 30min.	95%
30 - 40min.	15%

Flow Rate : 0.2ml/min at 40°C  
 Injection Volume : 0.1ppm 3μl  
 HPLC : Prominence LC-20AD

### [MS/MS]

ESI, MRM  
 Ion Spray Voltage : 5,000V (pos), -4,500 (neg)  
 Temperature : 400°C  
 Curtain Gas : 20 (pos), 30 (neg)  
 Collision Gas : 3 (pos), 3 (neg)  
 Ion Source Gas 1 : 50 (pos), 70 (neg)  
 Ion Source Gas 2 : 80 (pos), 80 (neg)  
 System : 3200Q TRAP (ABI)

Peak No.	Constituent	Monitoring Ions		Mode	Peak No.	Constituent	Monitoring Ions		Mode
		Precursor	Product				Precursor	Product	
1	Methomyl	163.0	88.1	+	17	Indanofan	342.0	176.2	+
2	Imidacloprid	256.9	210.1	+	18	Tetrachlorvinphos (CVMP)	366.8	127.0	+
3	Oxycarboxin	268.0	175.1	+	19	Carpropamid	336.0	103.1	+
4	Bendiocarb	224.0	109.1	+	20	Imazalil	298.0	158.9	+
5	Thiodicarb	355.0	88.0	+	21	Pencycuron	330.0	124.9	+
6	Pirimicarb	239.0	72.1	+	22	Hexaflumuron	462.8	158.1	+
7	Methabenzthiazuron	222.0	165.0	+	23	Cycloate	216.1	83.2	+
8	Furametpyr	335.0	157.2	+	24	Pentoxazone	354.1	286.1	+
9	Azoxystrobin	404.0	372.0	+	25	Oxaziclomefone	377.0	191.3	+
10	Methiocarb	226.0	169.1	+	26	Fenoxaprop-ethyl	363.0	289.2	+
11	Acibenzolar-S-methyl	210.9	136.0	+	27	Flufenoxuron	489.7	158.2	+
12	Dymron (Daimuron)	269.1	151.2	+	28	Cycloprothrin	499.0	181.2	+
13	Cumyluron	304.0	125.1	+	29	Spinosyn A	733.1	142.2	+
14	Chloroxuron	292.0	72.0	+	30	Spinosyn D	747.2	142.0	+
15	Mepanipyrim	224.0	77.1	+	31	Silafluofen	426.1	287.2	+
16	Triticonazole	319.0	70.1	+					

その他の商品の分析例は当社ホームページ ([http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/info/env/pdf/positivelist\\_4.pdf](http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/info/env/pdf/positivelist_4.pdf)) をご参照下さい。

コード No.	品名	略号	成分数	分析機器	容量	希望納入価格 (円)
161-22961	農薬混合標準液 PL-1-1 (各20μg/ml アセトン溶液)	農・PL-1	32	GC/MS	1ml × 5A	40,000
167-22963					1ml	20,000
168-22971	農薬混合標準液 PL-2-1 (各20μg/ml アセトン溶液)	農・PL-2	31	GC/MS	1ml × 5A	40,000
164-22973					1ml	20,000
165-22981	農薬混合標準液 PL-3-1 (各20μg/ml アセトン溶液)	農・PL-3	29	GC/MS	1ml × 5A	40,000
161-22983					1ml	20,000
162-22991	農薬混合標準液 PL-4-1 (各20μg/ml アセトン溶液)	農・PL-4	37	GC/MS	1ml × 5A	45,000
168-22993					1ml	22,000
169-23001	農薬混合標準液 PL-5-1 (各20μg/ml アセトン溶液)	農・PL-5	37	GC/MS	1ml × 5A	45,000
165-23003					1ml	22,000
167-23541	農薬混合標準液 PL-6-2 (各20μg/ml アセトン溶液)	農・PL-6	36	GC/MS	1ml × 5A	45,000
163-23543					1ml	22,000
163-23021	農薬混合標準液 PL-7-2 (各20μg/ml アセトニトリル溶液)	農・PL-7	29	LC/MS	1ml × 5A	45,000
169-23023					1ml	15,000
160-23031	農薬混合標準液 PL-8-1 (各20μg/ml アセトニトリル溶液)	農・PL-8	21	LC/MS	1ml × 5A	35,000
166-23033					1ml	12,000
167-23041	農薬混合標準液 PL-9-1 (各20μg/ml アセトン溶液)	農・PL-9	18	GC/MS	1ml × 5A	30,000
163-23043					1ml	15,000
164-23051	農薬混合標準液 PL-10-1 (各20μg/ml アセトン溶液)	農・PL-10	9	GC/MS	1ml × 5A	20,000
160-23053					1ml	10,000
558-90541	農薬混合液 PL-11-1 (各20μg/ml アセトン溶液)	農・PL-11	15	GC/MS	1ml × 5A	50,000
162-23351	農薬混合液 PL-12-1 (各20μg/ml アセトン溶液)	農・PL-12	26	GC/MS	1ml × 5A	40,000
168-23353					1ml	20,000
169-23361	農薬混合液 PL-13-1 (各20μg/ml アセトン溶液)	農・PL-13	15	GC/MS	1ml × 5A	30,000
165-23363					1ml	15,000
166-23371	農薬混合液 PL-14-1 (各20μg/ml アセトニトリル溶液)	農・PL-14	31	LC/MS	1ml × 5A	40,000
162-23373					1ml	20,000
163-23381	農薬混合液 PL-15-1 (各20μg/ml アセトニトリル溶液)	農・PL-15	28	LC/MS	1ml × 5A	40,000
169-23383					1ml	20,000
160-23391	農薬混合液 PL-16-1 (各20μg/ml アセトニトリル溶液)	農・PL-16	32	LC/MS	1ml × 5A	58,000
166-23393					1ml	29,000
163-23401	農薬混合液 PL-17-1 (各20μg/ml アセトニトリル溶液)	農・PL-17	32	LC/MS	1ml × 5A	58,000
169-23403					1ml	29,000
220-01681	動物用医薬品混合標準液 PL-1-3 (各20μg/ml メタノール溶液)	動・PL-1	21	LC/MS	1ml × 5A	38,000
226-01683					1ml	17,000
227-01691	動物用医薬品混合標準液 PL-2-1 (各20μg/ml メタノール溶液)	動・PL-2	24	LC/MS	1ml × 5A	40,000
223-01693					1ml	20,000

## 関連商品

品名	カラムサイズ	記号	希望納入価格 (円)
Wakopak® Wakosil-II 3C18 HG	2.0 × 150mm	(セ)	47,000



## JCSS (Japan Calibration Service System) Wako

### 揮発性有機化合物 23 種混合標準液 (メタノール溶液)

JCSSは、「IA Japan (独立行政法人製品評価技術基盤機構認定センター)」が計量法に基づいて運営している認定プログラムであり、試験・校正機関の技術的能力と試験、測定データの信頼性を証明する重要な根拠となります。

当社の発行する証明書はISO/IEC 17025:2005 (JIS Q 17025: 試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項) と ISO Guide 34:2000 (JIS Q 0034: 標準物質生産者の能力に関する一般要求事項) に適合しています。この証明書は、その商品が国家計量標準にトレーサブルであることを証明すると同時に、正確で信頼性の高い標準試薬の供給を証明するものです。

#### 特長

- 値付け結果に不確かさがついた証明書を添付
- 証明書に記載の値付け結果はILAC/APLACのMRAを通じて、国際的に受け入れ可能
- 各成分の濃度は1,000mg/l



証明書 (表)

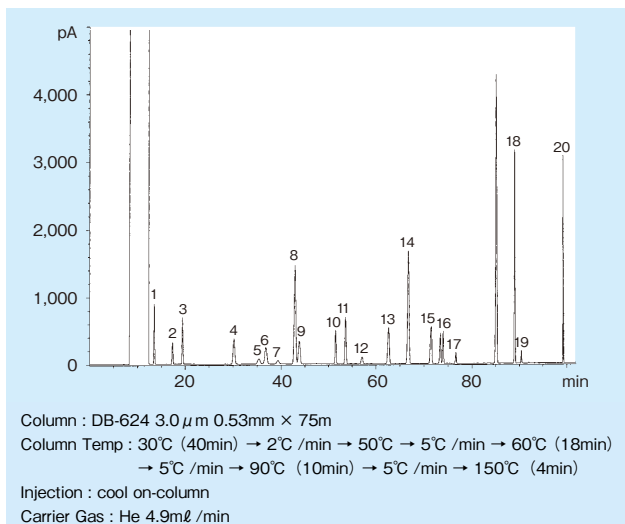


証明書 (裏)

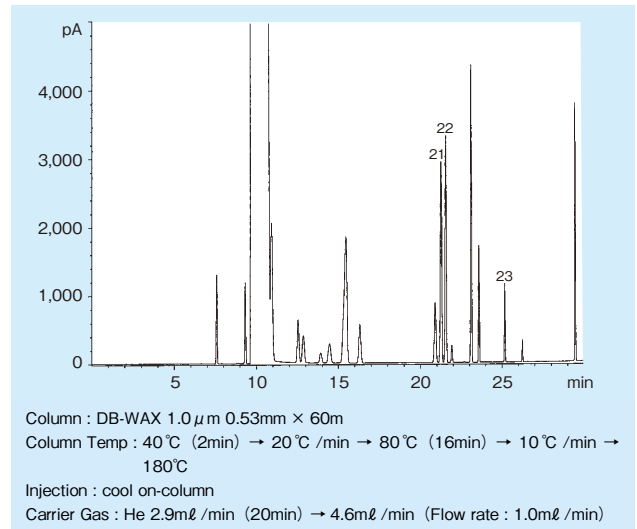
#### データ

##### ■ 値付けの分析条件 (GC/FID)

< Column : DB-624 >



< Column : DB-WAX >



ピーク No.	成分名
1	1,1-ジクロロエチレン
2	ジクロロメタン
3	trans-1,2-ジクロロエチレン
4	cis-1,2-ジクロロエチレン
5	クロロホルム
6	1,1,1-トリクロロエタン
7	四塩化炭素
8	ベンゼン
9	1,2-ジクロロエタン
10	トリクロロエチレン
11	1,2-ジクロロプロパン
12	プロモジクロロメタン
13	cis-1,3-ジクロロプロペン
14	トルエン
15	trans-1,3-ジクロロプロペン
16	テトラクロロエチレン
17	ジブロモクロロメタン
18	o-キシレン
19	トリブロモメタン
20	1,4-ジクロロベンゼン
21	p-キシレン
22	m-キシレン
23	1,1,2-トリクロロエタン

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
224-01721	23VOC Mixture Standard Solution (Methanol Solution)	2mL×5A	16,800

## 日本薬局方収載



### 生薬試験用標準品類

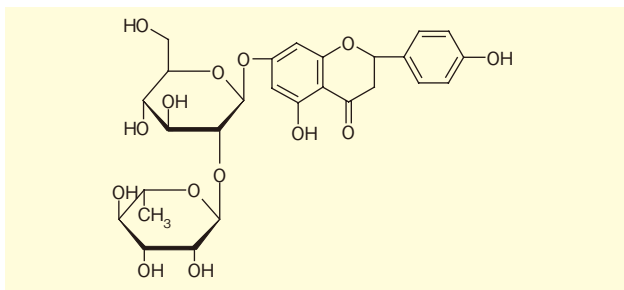
#### ■ ナリンギン

本品はトウヒの確認試験などに用いられます。トウヒはミカン科の植物、ダイダイの成熟果皮で、芳香性苦味健胃薬などの生薬に配合されています。

起源： *Citrus aurantium* Linné

*Citrus aurantium* Linné var. *daidai* Makino  
(Rutaceae)

CAS No. : 10236-47-2

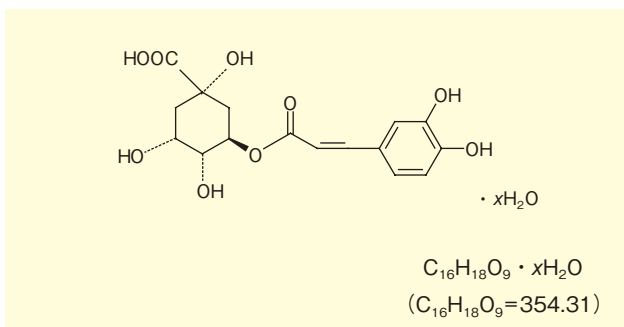


#### ■ (E)-クロロゲン酸

本品はニンドウの指標成分として使用されます。ニンドウの葉及び茎は化膿性疾患の解熱、利尿、解毒などの生薬に配合されています。

起源： *Lonicera japonica* Thunberg (Caprifoliaceae)

CAS No. : 327-97-9



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
149-07901	Naringin	局方生薬試験用(薄層クロマトグラフィー用)	20mg	36,000
039-20331	(E)-Chlorogenic Acid	局方生薬試験用(薄層クロマトグラフィー用)	10mg	26,000

## シグナル伝達の研究に



### 細菌由来タンパク質毒素

毒素のラインナップがさらに充実しました。シグナル伝達などの研究にご利用下さい。

#### ■ コレラ毒素Aサブユニット, 溶液

コレラ毒素を構成するAサブユニットです。Aサブユニットは三量体GTP結合タンパク質であるGsのαサブユニットをADP-リボシル化します。このADP-リボシル化によりアデニル酸シクラーゼが恒常的に活性化され、細胞内cAMP濃度が上昇します。

形状：溶液 (タンパク質濃度：0.41mg/ml\*)

由来： *Vibrio cholerae*

活性：CHO細胞を用いてコレラ毒素で特異的形態変化を認める100倍量の濃度で培養した際に、細胞に特異的形態変化を認めない。

#### ■ コレラ毒素Bサブユニット, 溶液

コレラ毒素を構成するBサブユニットです。Bサブユニットは標的細胞表面のG<sub>M1</sub>ガングリオシドに結合し、細胞内にAサブユニットを送り込む働きがあります。

形状：溶液 (タンパク質濃度：0.93mg/ml\*)

由来： *Vibrio cholerae*

活性：CHO細胞を用いてコレラ毒素で特異的形態変化を認める100倍量の濃度で培養した際に、細胞に特異的形態変化を認めない。

\*記載タンパク質濃度は初回ロットの参考値です。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 036-20601	Cholera Toxin A Subunit, Solution	細胞生物学用	50μg	29,000
NEW 033-20611	Cholera Toxin B Subunit, Solution	細胞生物学用	50μg	29,000

### 関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
010-20761	Adenylate Cyclase Toxin, recombinant, Solution	細胞生物学用	50μg	40,000
030-20621	Cholera Toxin Solution	細胞生物学用	100μg	29,000
038-20041	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin Solution	細胞生物学用	50μg	40,000
041-29851	Dermonecrotic Toxin Solution	細胞生物学用	10μg	40,000
043-30421	Diphtheria Toxin Solution	細胞生物学用	200μg	20,000
040-30431	Diphtheria Toxin Solution, Mutant (CRM197)	細胞生物学用	200μg	20,000
161-22461	<i>Pasteurella multocida</i> Toxin Histidine Tag, recombinant, Solution	細胞生物学用	50μg	40,000
168-22471	Pertussis Toxin Solution	細胞生物学用	25μg	40,000

※「コレラ毒素溶液」、「コレラ毒素Aサブユニット, 溶液」、「コレラ毒素Bサブユニット, 溶液」、「ウェルシュ菌エンテロトキシン溶液」の販売の際には、生物剤・毒素の適正な取扱いをするため、「試験研究用に使用することを認める証」をいただいております。

## がん、シグナル伝達の研究に！ Wako

### 抗生物質系阻害剤

当社では、がん・血管新生・アポトーシス関連の研究用試薬をラインナップしております。製品リストをご用意しております。詳細は当社HP (<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/info/men/pdf/Cancer.pdf>) をご覧下さい。

### ■ プレオマイシン硫酸塩

原核及び真核細胞のDNA合成を阻害する抗生物質です。DNA鎖切断を誘発しDNA合成を阻害するグリコペプチドの混合物であり、水酸基フリーラジカルを生成することによってN-グリコシド結合を切断し、塩基の除去及びホスホジエステル結合を切断します。

主に、扁平上皮がん、精巣腫瘍、悪性リンパ腫などに効果を示します。また、プレオマイシン耐性遺伝子 (*sh ble*) のスクリーニングに用いられます。

力価 (乾燥物換算) : 1,500IU/mg 以上

外観 : 白色～うすい褐色、結晶性粉末～粉末

水溶状 : 試験適合

\*本品はプレオマイシンA<sub>2</sub>、B<sub>2</sub>を主成分とする混合物です。

### ■ (+)-ブレフェルジンA

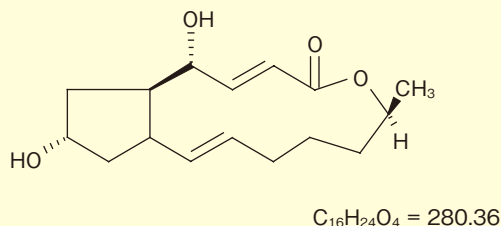
小胞輸送を特異的に阻害するマクロライド系抗生物質です。糖タンパク質細胞輸送阻害、プロセシング部位の特定研究などに用いられます。

細胞を構成する高分子の生合成に作用することなく、小胞体からゴルジ装置を経て細胞表層、あるいは細胞内小器官 (リソソームや分泌顆粒) へ糖タンパク質が転送されていく細胞内での一連の流れの中で、小胞体からゴルジ装置に至る過程を選択的に阻害します。この阻害は速やかで完全な可逆性を示します。

含量 (HPLC) : 99.8% ※初回ロット実績値

外観 : 白色～わずかにうすい褐色、結晶～粉末

メタノール溶状 : 試験適合



### ■ ピューロマイシン二塩酸塩

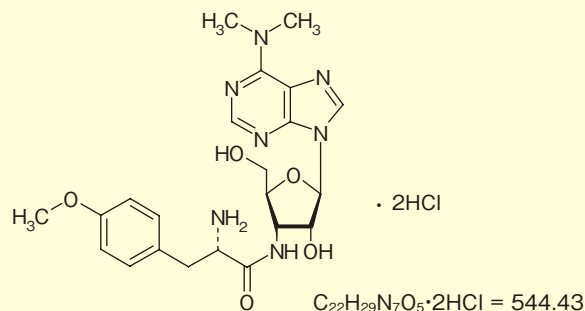
原核及び真核細胞のタンパク質合成を阻害するヌクレオシド系抗生物質です。アミノアシル tRNA 様の構造を持つ本品はリボソームのP部位に結合しているペプチジル tRNA と反応し、ペプチジルピューロマイシンとしてリボソームから遊離することによってタンパク質合成が阻害されます。

主に Puromycin N-acetyltransferase (PAC) をコードする *pac* 遺伝子のスクリーニングに用いられます。

含量 (TLC) : 98.0% 以上

外観 : 白色～うすい褐色、結晶～粉末

メタノール溶状 : 試験適合



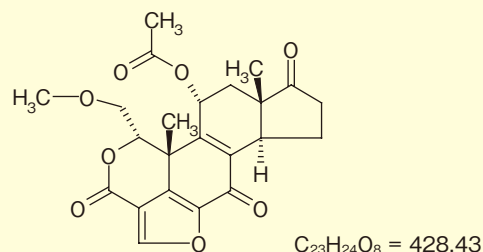
### ■ (+)-ウォルトマンニン

抗炎症作用を有する真菌由来の抗生物質です。平滑筋の収縮などの調節を行っているプロテインキナーゼの一種ミオシン軽鎖キナーゼを選択的かつ不可逆的に阻害する作用、及び細胞内情報伝達機構の一つであるイノシトールりん脂質代謝に関与しているホスファチジルイノシトール3-キナーゼを濃度依存的かつ不可逆的に阻害する作用があります。

含量 (HPLC) : 99.5% ※初回ロット実績値

外観 : 白色～わずかにうすい褐色、結晶～粉末

エタノール溶状 : 試験適合



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
027-15941	Bleomycin Sulfate	薬理研究用	10mg	22,000
023-15943			50mg	88,000
022-15991	(+)-Brefeldin A	細胞生物学用	5mg	11,000
028-15993			25mg	44,000
160-23151	Puromycin Dihydrochloride	生化学用	25mg	6,500
166-23153			100mg	22,000
164-23154			250mg	45,000
230-02341	(+)-Wortmannin	細胞生物学用	2mg	9,000
236-02343			10mg	36,000



## T細胞依存性抗体産生 (TDAR) Shibayagi 機能試験用キット

レビス KLH(TDAR)ラット-IgG

レビス KLH(TDAR)ラット-IgM

本キットはT細胞依存性抗原、KLH (Keyhole limpet hemocyanin) 投与により産生されるラット血清・血漿中の抗KLH IgG/IgMをELISA法により測定するキットです。

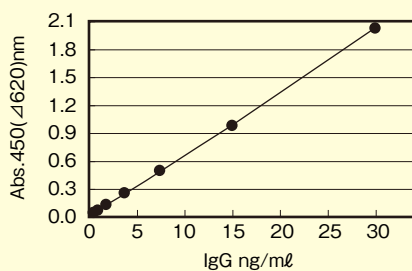
医薬品の免疫毒性試験に関するガイドラインICH S8ではT細胞依存性抗体産生 (TDAR: T-cell Dependent Antibody Response) 試験が推奨されています。



### 特長

- KLH投与後の特異的IgG/IgMを測定  
TDAR機能試験に利用可能
- 高感度 (0.47 ~ 30ng/ml)、微量検体 (血清10μl)、  
短時間測定 (2時間20分)
- 高い再現性

**標準曲線例** 吸光度は測定条件により変動します。



\* プレートリーダー: SUNRISE RAINBOW (TECAN)  
3次多項式処理 横軸の範囲を切り替えて、低濃度領域を拡大できます。

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
632-13751	AKRKG-010	Lbis KLH (TDAR) Rat-IgG	96 回用	52,000
639-13761	AKRKM-010	Lbis KLH (TDAR) Rat-IgM	96 回用	52,000

新発売キャンペーン実施中!!

上記製品の同一キットを2kit同時購入時

通常価格 52,000 円 /kit → 48,000 円 /kit

\* IgG と IgM のセットはキャンペーン対象外です。

キャンペーン期間: 平成 20 年 10 月 31 日まで

## 2μlでDNA定量可能なマイクロプレートリーダー ●TECAN. インフィニットM200NanoQuant インフィニットF200NanoQuant

インフィニット 200 NanoQuant は、従来の吸光マイクロプレートリーダーの機能に加えて、NanoQuant Plate™を用いることにより 2 μl の微量サンプルを一度に 16 サンプルまでわずか数秒間で読み取り、5% 以下の再現性で 1 ng/μl まで DNA 濃度を検出できる吸光リーダーです。モノクロメータータイプ (波長範囲: 230 ~ 1,000 nm 可変) のインフィニット M200 NanoQuant と、フィルタータイプ (UV 干渉フィルター 3枚標準装備: 260, 280, 340 nm) のインフィニット F200 NanoQuant の 2 種類をラインナップしています。

マイクロプレートリーダーとしては、オプションで蛍光、発光、インジェクターなど必要な機能を追加することも可能です。



インフィニット 200 NanoQuant



NanoQuant Plate™

### 特長

- NanoQuant Plate™ を用いてサンプル量 2 μl で DNA、RNA 定量が可能
- 標準添付ソフト i-Control™ で検量線なしで DNA、RNA 濃度演算が可能
- NanoQuant Plate™ 以外にも通常の吸光プレートリーダーとして 6 ~ 384 ウェルマイクロプレートも測定可能



NanoQuant Plate™ へのサンプルの分注はシングルまたはマルチチャンネルピペットが使用可能です。

### 測定結果例

Excel に吸光度、DNA 濃度などが出力されます

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
510-48531	インフィニット M200NanoQuant	1 台	2,940,000
513-48521	インフィニット F200NanoQuant	1 台	2,550,000

## 細胞培養用



### 液体培地

当社では、D-MEM、RPMI-1640をはじめとする汎用液体培地を品揃えしています。新たに、D-MEM/Ham's F-12 (D-MEMとHam's F-12を1:1の割合で混合した培地) フェノールレッド不含品を1種類追加しました。ろ過滅菌済みですので、培養温度 (37℃付近) に温めてそのままご利用下さい。

### 品質試験

無菌試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ試験、細胞増殖能試験など

コードNo.	品名	L-グルタミン	フェノールレッド	ビルビン酸	HEPES	規格	容量	希望納入価格 (円)
044-29765	D-MEM (High Glucose)	●	●	—	—	細胞培養用	500ml	1,200
043-30085		●	●	●	—	細胞培養用	500ml	1,200
048-30275		●	●	—	●	細胞培養用	500ml	1,800
045-30285		—	●	—	—	細胞培養用	500ml	1,200
040-30095		—	—	—	—	細胞培養用	500ml	1,200
041-29775 049-29771	D-MEM (Low Glucose)	●	●	●	—	細胞培養用	500ml 1ℓ	1,200 2,400
051-07615	E-MEM	●	●	—	—	細胞培養用	500ml	1,200
135-15175	MEM α	●	●	●	—	細胞培養用	500ml	1,200
189-02025 187-02021	RPMI-1640	●	●	—	—	細胞培養用	500ml 1ℓ	1,200 2,400
189-02145		●	●	—	●	細胞培養用	500ml	1,500
186-02155		●	—	—	—	細胞培養用	500ml	1,200
183-02165		—	●	—	—	細胞培養用	500ml	1,200
087-08335	Ham's F-12	●	●	●	—	細胞培養用	500ml	1,200
080-08565	Ham's F-12K (Kaighn's Modification)	●	●	●	—	細胞培養用	500ml	3,800
048-29785	D-MEM/Ham's F-12	●	●	●	—	細胞培養用	500ml	1,200
042-30555		●	●	●	●	細胞培養用	500ml	1,600
045-30665		●	—	●	—	細胞培養用	500ml	6,000

## 接着細胞の剥離、細胞分散用



### トリプシン-EDTA溶液

本品はろ過滅菌済みのトリプシン-EDTA溶液です。今回、濃縮タイプを新たに追加しました。培養した接着細胞の剥離や各種組織の細胞分散などにご利用下さい。

### 品質試験

無菌試験、マイコプラズマ試験、ウイルス試験\*、実用試験など

\*ブタバルボウイルス試験済みのトリプシン (1:250) を使用しています。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
202-16931 204-16935	0.05w/v% Trypsin-0.53mmol/ℓ EDTA・4Na Solution with Phenol Red	細胞培養用	100ml 500ml	1,800 6,800
209-16941 201-16945	0.25w/v% Trypsin-1mmol/ℓ EDTA・4Na Solution with Phenol Red	細胞培養用	100ml 500ml	1,800 6,800
208-17251	0.5w/v% Trypsin-5.3mmol/ℓ EDTA・4Na Solution without Phenol Red	細胞培養用	100ml	4,200

## L-グルタミンの代替品



### L-アラニル-L-グルタミン溶液

本品は、L-グルタミンの代替品として使用されるジペプチドです。L-グルタミンは溶液中で不安定であり、細胞にとって有害となるアンモニアなどに分解され、培養細胞に悪影響を与えます。一方、本品は溶液中で安定であり、L-グルタミンより自然分解されにくいので、アンモニアの産生を抑制できます。そのため、本品を培地に添加することで、長期間の培養が可能となり、細胞増殖能、抗体産生能が向上します。

### 品質試験

無菌試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ試験、細胞増殖能試験 適合

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
016-21841	200mmol/ℓ L-Alanyl-L-Glutamine Solution (×100)	細胞培養用	100ml	6,500

### 関連商品

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
073-05391	200mmol/ℓ L-Glutamine Solution (×100)	細胞培養用	100ml	3,000
190-14881	100mmol/ℓ Sodium Pyruvate Solution (×100)	細胞培養用	100ml	1,800
139-15651	MEM Non-essential Amino Acids Solution (×100)	細胞培養用	100ml	2,800
132-15641	MEM Essential Amino Acids Solution (×50)	細胞培養用	100ml	3,000

## FBSの代替に ⓂWako アルブミン, ヒト, 植物発現組換え体

本品は、Human Serum Albumin (HSA) を植物で発現させ精製しているためヒト由来のウイルスや、その他の夾雑物を含有しません。HSAは細胞培養や組織培養時の培地基本構成物質として広く使用されています。さまざまな培地に添加した際には、ネイティブな血漿中HSA (pHSA) と同等以上の細胞増殖効率を示します。また、細胞培養で使用されるFBSの代替としてロット間差を気にせず使用でき、BSE原因物質の混入の心配がありません。

### 特長

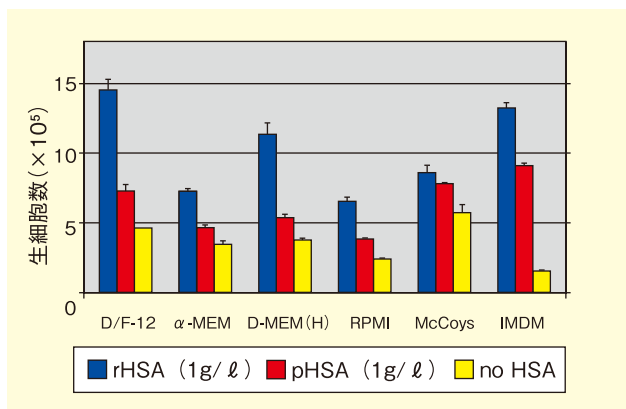
- ヒト由来夾雑物の混入がない
- 血漿中HSA (pHSA) と同等以上の生理活性
- FBSの代替試薬として使用可能
- さまざまな培地での細胞増殖効率を亢進

### 使用法

- 使用濃度：0.5g～5.0g/l
- ストック溶液の調製：50mmol/l 塩化ナトリウム溶液で10w/v%に調製する。

### データ

#### ■ 各無血清培地での細胞増殖活性



無血清培地における、pHSAとrHSAのハイブリドーマの増殖活性比較。培養開始から72時間後の生細胞を計数したところ、いずれの無血清培地においても、rHSAが高効率に細胞増殖を亢進した。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
018-21541			1g	11,000
014-21543	Albumin, Human, recombinant expressed in plants	細胞培養用	5g	45,000
016-21542			25g	210,000

## マウスES細胞培養用 安価! ⓂWako LIF, ヒト, 組換え体, 培養上清

LIF (Leukemia Inhibitory Factor) は、白血病細胞の増殖を阻害し、マクロファージに分化誘導する因子として発見されました。他にも、神経分化、骨形成、脂肪細胞の脂質輸送、副腎皮質ホルモンの産生など、多くの機能が知られています。また、LIFはマウスES細胞の分化抑制作用があるため、ES細胞の未分化状態を維持するために細胞培養時に用いられます。

本品は、ヒトLIFの組換え体を含む培養上清です。マウスES細胞の培養に最適であり、マウスiPS細胞の培養にも応用が考えられます。

### 製品概要

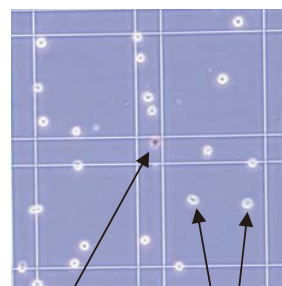
- 由来：BMT-10 cell-expressed human LIF
- 形状：D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine and Phenol red containing 10% FBSを含む培養上清
- 0.2 μm フィルターろ過滅菌済み
- マイコプラズマ確認試験済み
- 実用希釈倍率：1：1,000

本品1mlは、1ℓのマウスES細胞培養用培地の調製に適しています。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
129-05601	LIF, Human, recombinant,	細胞培養用	1ml	25,000
125-05603	Culture Supernatant		1ml×10	130,000

## 細胞数・細胞生存率の算定に ⓂWako トリパンブルー溶液

本品は、細胞の生死を判断するために使用される細胞染色液です。死細胞は青く染色されますが、生細胞は染色されないため、血球計算盤を用いて細胞数・細胞生存率を算定できます。



〔細胞種〕  
ヒト急性単球性白血病細胞株  
〔混合比率〕  
細胞懸濁液：トリパンブルー溶液  
= 1：1

死細胞 (細胞は青く染まる)      生細胞 (細胞は染まらない)

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
207-17081	0.4w/v% Trypan Blue Solution	細胞染色用	100ml	1,800



## 待望のマウス AGO2 抗体 免疫沈降、免疫染色、ウエスタンブロットに使用可能



### 抗マウス AGO2, モノクローナル抗体

Argonaute2 (AGO2) は、RNAi経路において、標的 mRNA へのガイド分子となる siRNA や microRNA に結合し、標的 mRNA の認識、切断を行う RISC (RNA-induced silencing complex) の主要コンポーネントとして同定されたタンパク質です。

本品は、ウエスタンブロットや免疫染色だけでなく、免疫沈降 (IP) に使用できます。免疫沈降により回収した AGO2 タンパク質は、RNAi 経路に存在する RNA (microRNA、siRNA など) と結合しています。

#### 特長

- 免疫沈降、免疫染色、ウエスタンブロットに使用可能
- マウス、ラット、ハムスターの AGO2 に交差性を示す
- 免疫沈降により AGO2 に取込まれた microRNA を精製可能

#### 性状

- 組成：0.05% Sodium Azide, 10% Glycerol を含む TBS 溶液 (pH 7.4)

- クローン No. : 2D4

- サブクラス : IgG1

- 抗原 : マウス AGO2 N 末端領域の合成ペプチド

- 使用濃度 : ウエスタンブロット… 1 : 200 – 1 : 1,000

免疫沈降… 5 ~ 10  $\mu$ g / IP

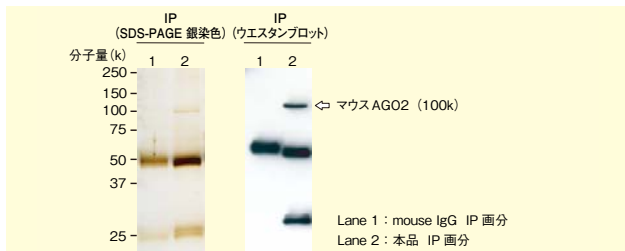
免疫染色… 1 : 100 – 1 : 500

● 交差性 :	生物種	Mouse	Hamster	Rat	Human
	細胞種	P388D1 NIH-3T3	CHO	SCC-131	NCI-H460
	ウエスタンブロット	○	○	○	×
	免疫沈降	○	○	○	×
	免疫染色	○ (NIH-3T3)	NT	NT	×
	microRNA 精製	○ (P388D1)	○	○	×

NT : Non tested

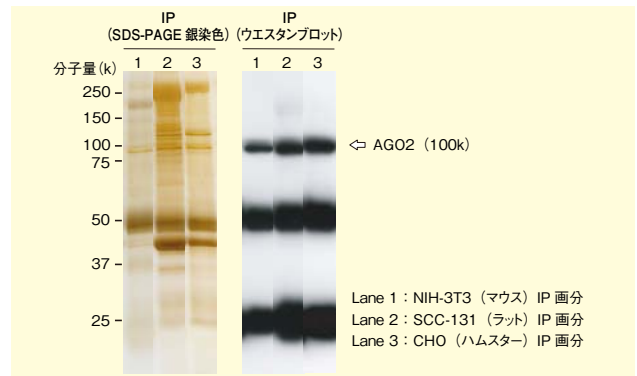
#### データ

### ■ マウス細胞株 P388D1 からマウス AGO2 の免疫沈降



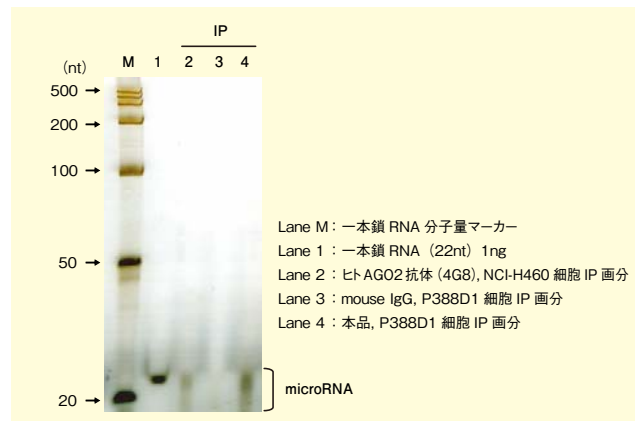
マウス細胞株 P388D1 の細胞溶解液に、本品 5  $\mu$ g を固相化した 10% Protein G slurry を 20  $\mu$ l 添加し免疫沈降を行った。SDS-PAGE により免疫沈降画分を分離し、銀染色及び本品を一次抗体として用いてウエスタンブロットを行った。その結果、ともに 100k 付近に内在性マウス AGO2 のバンドが確認された。使用細胞数は 5  $\times$  10<sup>6</sup> cells。ウエスタンブロットの一次抗体希釈倍率は 1 / 1,000。

### ■ げっ歯類細胞株からの AGO2 の免疫沈降



NIH-3T3 (マウス)、SCC-131 (ラット)、CHO (ハムスター) の細胞溶解液に、本品 5  $\mu$ g を固相化した 10% Protein G slurry を 20  $\mu$ l 添加し免疫沈降を行った。SDS-PAGE により免疫沈降画分を分離し、銀染色及び本品を一次抗体として用いてウエスタンブロットを行った。その結果、ともに 100k 付近に内在性 AGO2 のバンドが確認された。使用細胞数は 5  $\times$  10<sup>6</sup> cells。ウエスタンブロットの一次抗体希釈倍率は 1 / 1,000。

### ■ マウス細胞株 P388D1 細胞からの microRNA の精製



マウス細胞株 P388D1 の細胞溶解液に、本品 5  $\mu$ g を固相化した 10% Protein G slurry を 20  $\mu$ l 添加し免疫沈降を行った。その後、RNA 精製を行い、RNA 画分を Urea-PAGE により分離し、核酸染色 (銀染色) を行った。その結果、マウス細胞株 P388D1 から microRNA が精製できることを確認した。使用細胞数は 5  $\times$  10<sup>6</sup> cells。

#### 保存条件

2 ~ 10 $^{\circ}$ C ・ 遮光保存

※凍結融解の繰返しは避け下さい。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
014-22023	Anti Mouse AGO2, Monoclonal	免疫化学用	50 $\mu$ l	30,000
018-22021	Antibody		100 $\mu$ l	50,000

#### 関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
011-22033	Anti Human AGO2, Monoclonal	免疫化学用	50 $\mu$ l	30,000
015-22031	Antibody		100 $\mu$ l	50,000
292-62701	microRNA Isolation Kit, Human Ago2	遺伝子研究用	10 回用	45,000

田丸節郎は南部藩士〔その先祖は三重県、田丸の城主だった〕田丸十郎の4男として1879年11月に盛岡で生まれた。兄に東大の物理の教授であった田丸卓郎、弟に京城帝国大学、大阪府立大学の教授をした田丸莞爾、義弟に東大の数学の教授であった坂井英太郎がいる。一高、東京帝国大学化学科を卒業、文部省外国留学生として1908年2月ドイツのKarlsruheの工科大学のFritz Haberの研究室に留学した<sup>1)</sup>。

### アンモニア合成反応

よく知られているように、窒素肥料は農作に不可欠と言われながら、それまでその原料を主にチリ硝石(硝酸ナトリウム)に頼っていたが、チリ硝石の枯渇も目に見えて来ていた一方で、人類の人口は増加するし、飢餓が待ち受けていると言う危機感が世界を広く覆っていた。これに対して数多くの研究者、特にOstwald、Le Chatelier、Ramsay、Nernstなど超一流の連中もこの問題に取り組んでいた。Haberも1905年には常圧1300Kで水素と反応性の乏しい窒素とからのアンモニアの平衡値を求めようとしているが、その頃までに多くの人たちが試みながらうまく行かなかった反応であり、1905年以後3年間放置して、むしろ空気中の放電で酸化窒素を作る反応に興味を示していた<sup>2)</sup>。一方でNernstは初めて高圧(30~75気圧)で1000K~1300Kの温度範囲で白金などを触媒としてアンモニア合成の実験を行い平衡定数を求めたが、不正確な実験で、工業化するのは無理な話であると結論していた。しかし、Haberは丁度亡父がHaberグループに参加した1908年2月頃になって再びこの反応に戻り、父や助手のR. Le Rossignolとで常圧更には高圧下で、循環法を用いながら正逆反応からの実験結果を得、さらに触媒の開発に努めたのである。Haberは反応気体が触媒を通してアンモニアが



生成され、循環してもとの触媒反応塔に戻る前にアンモニアを分離するようになればアンモニアだけを集めることになり、工業的にも成り立つという見通しを立てその実験室サイズの装置で反応を進めて行った。その結果1909年の7月2日触媒はオスミウム98グラム、820K、約180気圧で実験が行われ、実験は見事に成功し、いわゆる「ハーバー法」が実現したのである。

私が3年間アメリカのPrinceton大学でお世話になったSir Hugh Taylor先生(触媒分野の有名な開拓者の一人で実際に昔Haberの研究室を訪れて亡父にお会いになっている話によると、Haberが他の多くの連中をさし置いてアンモニア合成に成功した大きな理由はその下にLe RossignolやTamaruのような優れた実験家がいたためであると言われていた。)実際にHaber自身が言っていたように、亡父は正に「死ぬほど頑張って」実験に励んだそうである。Haberもそれを高く評価して40人もの大勢の仲間の中から抜擢して大学の正式の助手に任命している。その頃の亡父が求めた反応ガスの比熱など、平衡定数の計算に不可欠な材料として、精密正確であったとのことである。アンモニア合成は殊にNernstが初めて高圧下での実験をしていながら、結局はHaberの名前だ

けが残って、1918年にノーベル賞を受けている。世に言う「空気からパンを作った」正に人類の危機を救った大きな業績だからである。更にアンモニア合成の副産物として、その工業化に向けた成果として、BASFのBoschが高圧化学工業の創始者として1931年にノーベル賞を受けているし、触媒探しを担当したMittaschのお蔭で、触媒毒、助触媒、熱効果など、触媒の基本的な性質が初めて明らかになった。その工業化は1913年にOppauで日に30トンのアンモニアが生産された。

1912年にHaberが招かれてBerlinのKaiser Wilhelm物理化学及び電気化学研究所〔現在のHaber研究所〕の所長に移る際に亡父も一緒に移り、Berlinの研究所の正式の所員に任命されている<sup>1, 3)</sup>。当時のドイツはOstwald、Planck、Einstein、Laue、Willstaetter、Haber、Nernstなど正に科学の世界のトップを行く国であったし、その中心的な研究所に正式の地位を得ていたのは日本人としては非常に珍しく貴重なことであった。当時の日本からの駐独大使も「日本からの職の話は私がみんな断ってあげるから」と言ったというし、沢山の人が日本からこの研究所に留学している。

〈このハーバー研究所の所長だったG. Ertlさんが2007年度のノーベル化学賞を受賞した。ハーバーが開発したアンモニア合成も含めて、素性の分かった金属表面の上での化学反応の基本的本姓を解明した功績によるものである。相変わらず世界のトップの研究所の一つであることが分かる。〉

1914年6月第一次世界大戦が勃発して、日独は敵国関係になったため、亡父はドイツから逃れてHarvard大学、New Yorkの高峰研究所に籍を置いた後丁度理化学研究所が設立されるのを機会に、1917年に帰国した。理研は高峰謙吉の貢献で設立されたということであるが、New York時代に亡父とその設立の重要性を議論していたに違い

ないし、その縁もあって亡父は設立した理研の主任研究員になっている。

## 理化学研究所の設立

理研創立25周年記念〔昭和17年〕に鈴木梅太郎博士が書いておられる記事に次のものがある。「今の一号館〔化学部〕は空中窒素からアムモニアを作ったハーバー博士の高弟で、当時ドイツから帰ったばかりの田丸節郎博士が設計したものだ、博士は緻密な人で、こんな馬鹿丁寧な建築をしてどうするのだ、と一部からいわれたものだが、間もなくあの大震災である、他の建物は耐震性が少なく、設計を変えなければならなかったが、1号館だけは微動だにせずガラス1枚破れなかった。さすが科学的基礎に建っただけであると、科学の徒が科学に反省させられた」。この建物は近代的設備が完備し、当時の日本には最先端のモデル的なものであった。多分ドイツでの研究所の建物に負けないものを日本にも作りたかったし、それと共に日本が模倣時代から脱却して独り立ちする機運をもたらす理化学研究所設立への強い期待と希望が込められていたとも思えるのである。

1924年、震災の翌年Haber夫妻は星

一氏の招きに応じて来日され、各地で大変な歓迎を受けた<sup>3)</sup>。Haber夫妻が鎌倉の我が家に来られた折の写真を載せておく。私は母の腕の中に抱かれている。震災後ということで家は余震に備えてその時も未だ木の棒で支えられていた。

## 東京工業大学

昭和4年〔1929年〕東京工業大学が設立された。当時は初めての工業大学であり、帝国大学の工学部と重複して無駄であると言う反対論もあった。東工大名誉教授の佐藤一雄氏の記録<sup>4)</sup>を引用する。「先生はこの大学の将来の発展のために必要な要件について深く考えられた。そして1929年4月に待望の東京工業大学が生まれたとき、一部に退職を余儀なくされた人ができ、一方1934年10月には岡の上に白亜の研究の大会堂が出現した。明暗二つのこの大変革の影には先生があるともっぱらの噂であった」。亡父は本館ができる前、木造の建物の中で、時には13名の若い研究者〔後の塩見賢吾東大教授、永廻登、佐藤一雄、安藤暹東工大教授など〕を抱えて、研究に取り組んでいた。大学院生がいない時代に、よく研究ができたものとも思えるが、今

の流行の産学協同路線で、頑張ったのである。研究テーマも多岐にわたり、錫の化学、無機化合物の熱解離平衡の新測定、化学反応速度、燃料電池、木材の物理化学的研究、活性炭の研究などの研究報告が出されている。亡父が考案したテルマノワーゲ（高温真空天秤）が活躍したのもこの頃である。

## 学術振興会の設立

第一次大戦の後、巨額の賠償金を負い、ドイツが復興するにはまず「科学の振興」からというので、Haberが率先して「ドイツ学術研究維持促進会」を作り、学術振興に乗り出した。ドイツでは科学の振興が国家の繁栄と結びつく歴史的伝統と実績があった。亡父はHaberの影響を強く受けて、日本が自立して繁栄するには科学技術の振興は絶対に不可欠であることを固く信じていた。柴田雄次先生（元学士院長）の日本学術振興会創立30周年記念祝辞より抜粋する。《そもそも本会（学振）の設立が計画されたのは昭和五年の秋頃かと思います。当時東京工大の教授であった田丸節郎博士と東大医学部の林春雄教授で、ご両人から私にもご勧誘がありました。田丸氏は、八年間もドイツにいてハーバーの協力者で、非常に理想家肌の学者でした。しかし吾人三人では到底如何ともすることのできない程問題が大きいので、やはり当時学会は申すに及ばず政界（枢密顧問官）財界にも顔の広い桜井鏡二先生の出馬を煩わす外はないと一日桜井先生の前に出て、吾人の考えを申し述べ是非に先生に先頭に立つことのご決意をお願いしました。昭和五年と申しますと財界不況、農業界恐慌、の時期で、……当時桜井先生は、自分は七十才を越し、到底その活動はできないとって固辞されましたが、理想家肌の田丸氏は熱意を以って先生を説き殆ど強引に先生の承諾を得ました。》<sup>5)</sup>





しかし当時の極めて酷しい不況の真っ只中に、研究費は削られこそすれ、新しく学術振興に乗り出すには余りにも困難が大きく、苦勞の連続であったが、最後には昭和天皇が、「自分の身の回りのことは何程節約してもよしいから出来るだけの援助を学術振興のために与えよ」と仰って、ご下賜金150万円を賜ったことが直接のきっかけとなり、政府もこれに答えて、「学術振興会」が1932年12月に発足し、その結果研究助成が飛躍的に増え学術論文数も格段に急増した。そのお蔭で、後に日本の基礎学問を支えた若い有能な学者が多数育ったのである。亡父はその発足を目前にして、それまで東奔西走の無理がたたってすっかり健康を害してしまった。亡父が病気が悪いのに、無理を押し出かけるのを、母が必死で止めるのを振り切って何度も出かけて行った亡父の姿が子供なりに今でも忘れられない。

学術振興会の設立については桜井先生の遺稿集<sup>6)</sup>に次の文がある。『学術振興の運動を起こしてより、約二年の間終

始一貫尋常ならざる熱意をもって、この運動に参加し、しかも好んで椽の下力持ちに任じられた田丸節郎君の努力に対して自分は常に感謝の念を禁ずること能わざるものがある。而も目的達成と共に弥々事業に着手せんとするに当たり不幸にして同君は病魔の襲う所となり久しきに涉って病床に親しまるるの止むなきに至ったことは誠に遺憾至極であり気の毒千萬である。同君が速に全快されて再び学会の為に貢献せられんことを自分は祈願して止まない』

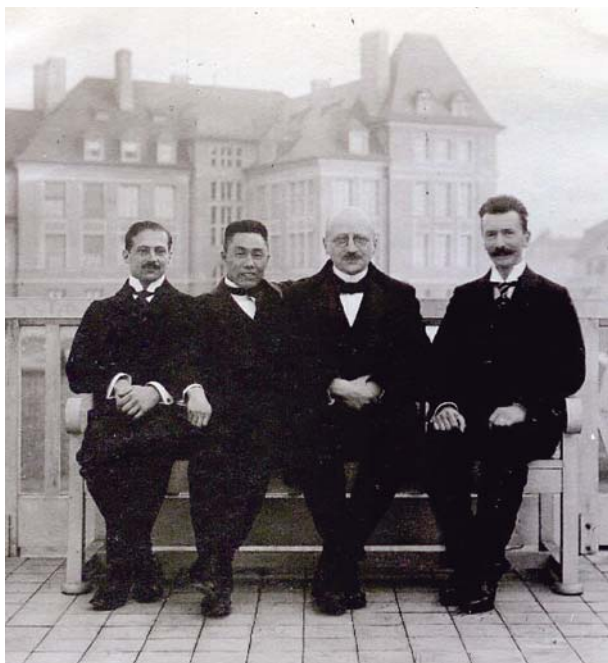
### 終わりに

亡父がドイツに留学していた頃は取り組んだ問題自身が世界の注目を集める大きい問題であった幸運もあったが、その頃の文字通り「死ぬほど働いた」テンションは相当なものであったと想像される。久しぶりに欧米から帰国した当時も日本の格段の学問的格差のある中で、この格差を何としても早くなくしたいという思いに駆られるままに、努力した一面では、周囲の関係者

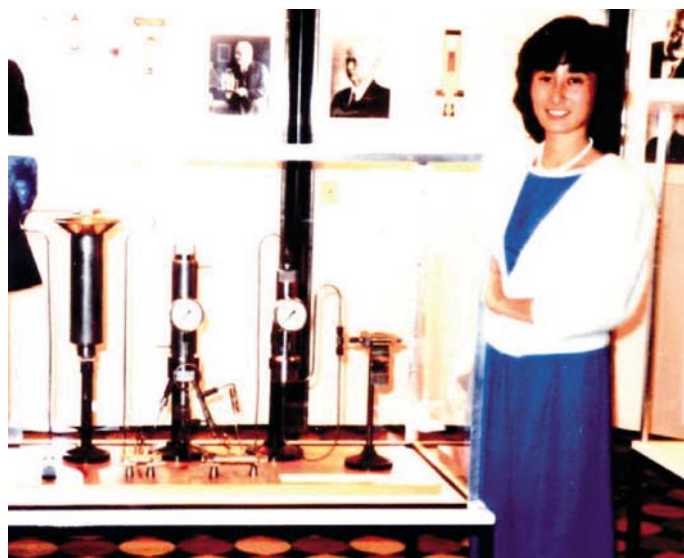
とのテンションも大きかったと思われる。常に周りとのテンションを覚悟で、「学術の進展がわが国の発展に繋がる、学術を振興して一刻も早く欧米に負けない国にしよう」という心根が強く感じられる。最後は病軀に鞭打って学術振興会設立のために駆け回ったが、その点「生真面目過ぎた」とも言えるが、本人にとってはそれなりに悔いのない人生であったとも思える。亡父は鎌倉、扇が谷の海蔵寺の縁に囲まれた墓の中で、日本の敗戦も知らず、更には日本がこんなに立派(?)になったことも知らずに静かに眠っている。

### 【参考文献】

- 1) 田丸節郎：「ハーバー先生を悼む」, 科学, 305 (1934).
- 2) "Nobel Lecture, Chemistry", Elsevier, 326 (1966).
- 3) 田丸節郎：「欧州大戦に活躍せる学者の面影と思出」, 科学, 8, 185 (1938).
- 4) 佐藤一雄：「田丸先生」, 化学, 19, 1 (1964).
- 5) (昭和三十七年) (内外学会雑誌：交詢社での講演).
- 6) 男爵桜井錠二遺稿：「思い出の数々」, 九和会, 57 (化学史学会編集) 1999年9月8日受理.
- 7) 化学史研究, 27 (1), 16 (2000) 1999年9月8日受理.



第一次世界大戦の直前(1914年)の、現在ベルリンにあるハーバー研究所の主要スタッフ。田丸節郎、ハーバー、左端はHerbert F. Freundlich。研究所を背景にしている。



ハーバーが初めてアンモニア合成に成功した装置。1984年ベルリンで国際触媒学会の折「ハーバーの展示コーナー」が設けられた。(娘の大山秀子と)



# 活性酸素種特異的蛍光プローブ

## BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (細胞非透過性)

## BES-So (細胞非透過性)

活性酸素種の検出に汎用されている種々の蛍光・発光プローブの多くが酸化反応に基づいて反応しているため、その非特異的応答がしばしば指摘されてきました。本品は酸化に基づかない反応により脱保護反応が起きているため、他の活性酸素種の影響を受けにくい蛍光プローブです。

本品は生体試料中の過酸化水素及びスーパーオキシドに直接作用します。蛍光基質としてマルチプレートを用いた多検体測定に使用することができます。

細胞内過酸化水素及びスーパーオキシドを測定する場合には既発売品の BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac、BES-So-AM をご使用下さい。

### ■ BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (細胞非透過性)

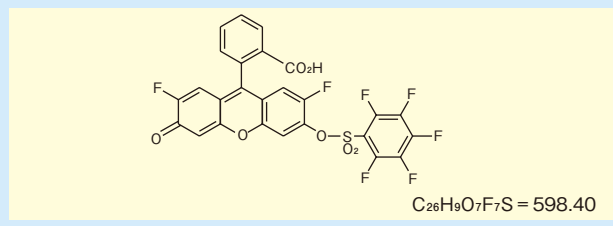
過酸化水素の検出に汎用されている 2,7-ジクロロフルオレセインは、過酸化水素だけではなく、他の活性酸素種や酸化酵素に対しても反応することが知られています。一方、本品は過酸化水素に非常に高い特異性を示します。

#### 特長

- 過酸化水素に反応して蛍光を呈する
- 細胞非透過性
- エタノール、DMSO に可溶
- エタノール溶液を HEPES などの緩衝液で希釈し、水溶液として用いることができる

#### 測定

励起波長：485nm、蛍光波長：530nm



#### 【参考文献】

1) Maeda, H. et al. : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 2389 (2004).

### ■ BES-So (細胞非透過性)

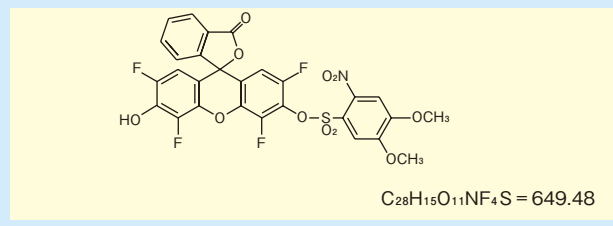
スーパーオキシドの検出に汎用されているヒドロエチジンは、スーパーオキシドだけではなく、他の活性酸素種に対しても反応することが知られています。一方、本品はスーパーオキシドに高い特異性を示します。

#### 特長

- スーパーオキシドに反応して蛍光を呈する
- 細胞非透過性
- エタノール、DMSO に可溶
- エタノール溶液を HEPES などの緩衝液で希釈し、水溶液として用いることができる

#### 測定

励起波長：505nm、蛍光波長：544nm



#### 【参考文献】

1) Maeda, H. et al. : *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 68 (2005).  
 2) Maeda, H. et al. : *Chem. Eur. J.*, **13**, 1946 (2007).

近日発売

コード No.	品名	細胞透過性	規格	容量	希望納入価格 (円)
021-16201	BES-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (cell-impermeant)	×	細胞生物学用	1mg	25,000
028-16211	BES-So (cell-impermeant)	×	細胞生物学用	1mg	25,000

#### 関連商品

コード No.	品名	細胞透過性	規格	容量	希望納入価格 (円)
過酸化水素プローブ					
029-15381	BES-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Ac <sup>※1</sup>	○	細胞生物学用	1mg	25,000
スーパーオキシドプローブ					
021-15601	BES-So-AM <sup>※2</sup>	○	細胞生物学用	1mg	25,000
チオール / セレノールプローブ					
025-15481	BES-Thio	×	細胞生物学用	1mg	25,000

※1 旧商品名 BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と同一商品です。  
 ※2 旧商品名 BES-So と同一商品です。

記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、医療用など他の用途には用いられません。

記載希望納入価格は本体価格であり消費税などが含まれておりません。

<p>和光純薬時報 Vol. 76 No. 3                  2008年7月15日発行                  発行責任者 三浦正寛                  編集責任者 大西礼子                  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)                  URL <a href="http://www.wako-chem.co.jp">http://www.wako-chem.co.jp</a>                  印刷所 共進社印刷株式会社</p> <p>●和光純薬時報に対するご意見・ご感想はこちらまでお寄せ下さい。                  E-mail <a href="mailto:jiho@wako-chem.co.jp">jiho@wako-chem.co.jp</a></p>	<p>●製品に対するお問合せはこちらまでお寄せ下さい。                  Please contact us to get detailed information on products in this journal.</p> <p>■和光純薬工業株式会社 (Japan) <a href="http://www.wako-chem.co.jp">http://www.wako-chem.co.jp</a>                  フリーダイヤル (日本のみ) 0120-052-099 / Tel 81-6-6203-3741                  フリーファックス (日本のみ) 0120-052-806 / Fax 81-6-6201-5964                  E-mail <a href="mailto:labchem-tec@wako-chem.co.jp">labchem-tec@wako-chem.co.jp</a></p> <p>■Wako Overseas Offices :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Wako Chemicals USA, Inc. <a href="http://www.wakousa.com">http://www.wakousa.com</a>                      Toll-Free (U.S. only) 1-877-714-1920                      Head Office (Richmond, VA) : Tel 1-804-714-1920 / Fax 1-804-271-7791                      Los Angeles Sales Office (Irvine, CA) : Tel 1-949-679-1700 / Fax 1-949-679-1701                      Boston Sales Office (Cambridge, MA) : Tel 1-617-354-6772 / Fax 1-617-354-6774</li> <li>• Wako Chemicals GmbH <a href="http://www.wako-chemicals.de">http://www.wako-chemicals.de</a>                      European Office (Neuss, Germany) : Tel 49-2131-311-0 / Fax 49-2131-311100</li> </ul>
--	---