

# DOJIN NEWS

ドージンニュース

## Review

### 酸素スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の 活性測定法

受田浩之

## Topics on Chemistry

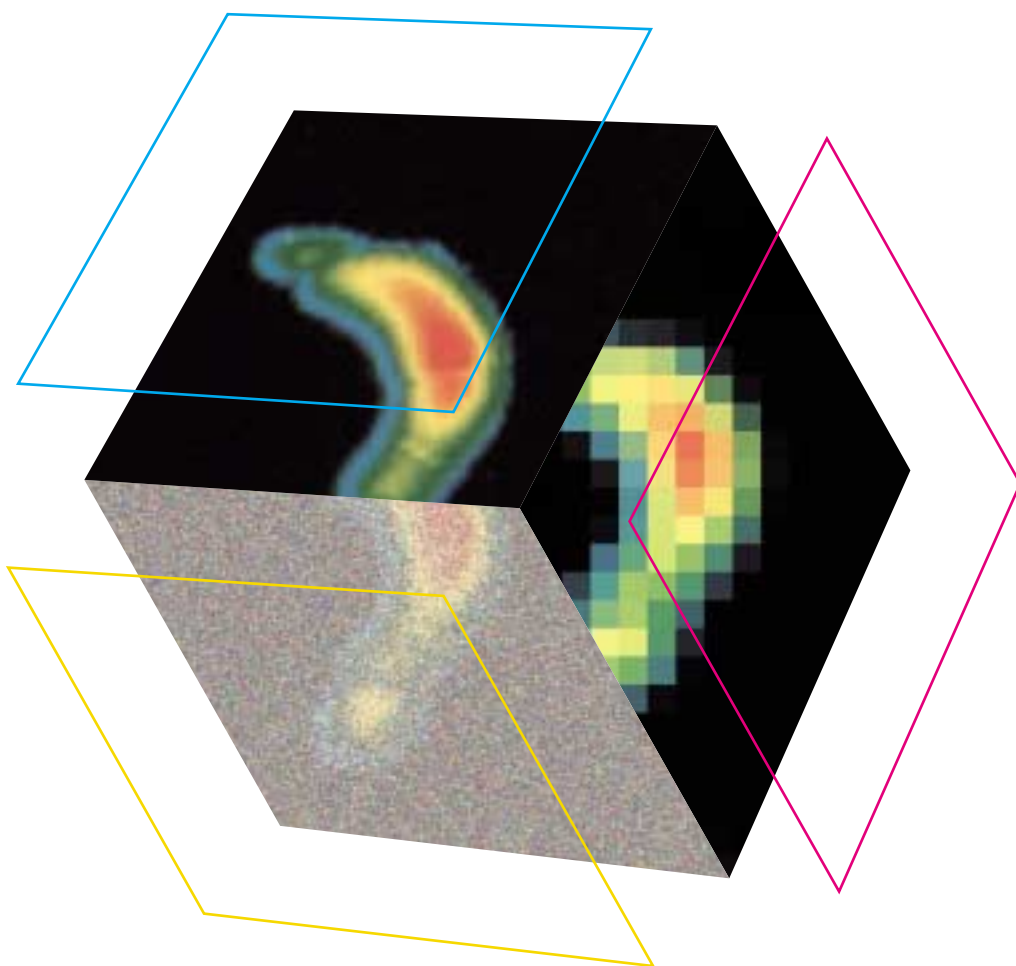
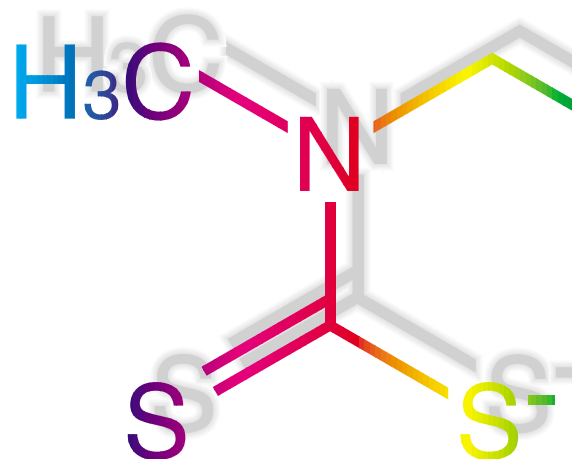
### 細胞膜の過酸化を見る試薬

佐々本一美

## 連載

### 実用的蛍光誘導体化6

山口政俊・能田 均



## 目次

### Review

酵素スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の活性測定法

高知大学農学部 受田 浩之

1

実用的蛍光誘導体化 6

福岡大学薬学部 山口 政俊、能田 均

10

### Topics on Chemistry

細胞膜の過酸化を見る試薬 - DPPP

13

### Commercial

SOD Assay Kit-WST

7

Total Glutathione Quantification Kit

8

BMC

9

NO releasers

14

蛋白糖化研究物質

15

細胞染色用色素

16

C14-K22B5

17

Biotinylation Kit(Sulfo-OSu, Designed for use with BIACORE<sup>®</sup> instrument systems)

18

Self-Assembled Monolayers(SAMs)研究用試薬

20

### お知らせ

第 11 回フォーラム・イン・ドージン開催ご案内

22

販売中止品

9

パンフレット完成ご案内

21

出版物ご案内

17

## 新製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

SOD Assay Kit-WST

7

Total Glutathione Quantification Kit

8

BMC

9

NO releasers

14

蛋白糖化研究物質

16

細胞染色用色素

16

C14-K22B5

17

Biotinylation Kit(Sulfo-OSu, Designed for use with BIACORE<sup>®</sup> instrument systems)

19

Self-Assembled Monolayers(SAMs)研究用試薬

20



# 酵素スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の活性測定法 (Assay of Enzyme Superoxide Dismutase)



受田 浩之  
(Hiroyuki UKEDA)  
高知大学農学部生物資源科学科

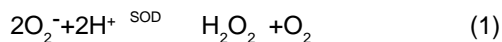
## [ Summary ]

The enzyme superoxide dismutase (SOD) catalyses the breakdown of superoxide anion ( $O_2^-$ ) and provides the first line of defense against oxygen toxicity. The activity and the assay techniques are associated with diverse fields such as medicine, biochemistry, plant physiology and food chemistry. During the past decades, various assay methods of SOD have been developed. However, those methods have some drawbacks in the selectivity, rapidity, cost or convenience. Recently, we found that novel water-soluble tetrazolium salts such as XTT, WST-1 and WST-8 are suitable for the detection of  $O_2^-$  and applicable to the assay of SOD. Among them, WST-1 appears to be most promising for the SOD assay in the sensitivity, low absorbance of the oxidized form and the solubility against water. The SOD assay method based on the use of WST-1 could be applied to practical biochemical samples such as erythrocytes, liver and heart from rats. A novel flow injection assay system for SOD was also developed using WST-1. In the system, a rapid assay (sampling frequency=30 samples/h) was achieved.

キーワード：スーパーオキシドアニオン、テトラゾリウム塩、XTT、WST-1

## 1. はじめに

酵素SODは2つのスーパーオキシドアニオン( $O_2^-$ )を過酸化水素と酸素に不均化する酵素である(式1)



酸化ストレスに対する第一防御ラインを担う重要な抗酸化酵素の一つであるが、さらに生物の寿命を決定する因子であることがCutlerらによって指摘され<sup>1)</sup>、その活性に関する知見が、様々な生命現象の解明に重要な意義を有すると考えられている。McCordとFridovichによるSODの発見(1969年)以来<sup>2)</sup>、様々な活性測定法が提案されているが、選択性、迅速性、簡便性及び適用範囲の広さの全てにおいて、満足のいく方法はない。本稿では、従来法が有する様々な問題点を克服するために著者らが開発した、水溶性テトラゾリウム塩を利用する新しいSOD活性測定法を中心に紹介する。

## 2. 活性酸素とSOD

SODの活性測定は生物が関わるすべての研究領域に必要とされる。初めに、ヒト、植物、食品を対象とした3つの研究領域について活性酸素とSODとの関わりについて述べ、それぞれの分野でSOD活性測定技術の果たす役割を考えてみる。

### 2.1 ヒト

生体内に取り込まれた酸素数%は、常に種々の酵素代謝系などで $O_2^-$ 、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル( $OH\cdot$ )などの活性酸素種に変化する。このうち、不対電子を持つ $O_2^-$ と $OH\cdot$ は寿命が短い。 $OH\cdot$ が最も高い反応性を有しており、ほとんど拡散律速で様々な分子と反応する。 $O_2^-$ は $OH\cdot$ のような高い反応性はなく、それが直接脂質やタンパク質、糖、核酸を攻撃することはないと言われている。しかしながら、金属イオンとの相互作用で $OH\cdot$ を生成したり(Fenton反応)一酸化窒素(NO)と反応して、NOのもつ生理作用(血管弛緩など)を消失させる。同時に、ペルオキシナイトライト( $ONOO^-$ )を生成させ酸化障害を起こす。生体は活性酸素種の有する高い毒性から身を守るために、SODを始めとす

る様々な抗酸化防御系を獲得した。それらの防御系は活性酸素が発生する組織や細胞内の局所に存在している。ところが何らかの理由で、これらの防御能を上回る量の活性酸素種が生じると、重篤な病態を誘起しうる。その代表的なものがガンであり、その他、動脈硬化を始めとする多くの生活習慣病が発症する<sup>3)</sup>。さらに近年、アルツハイマー病や血管障害性脳疾患の発症機序の一つとして、老人斑への $\beta$ アミロイドの酸化的凝集沈着が注目されている。さらに活性酸素による細胞障害は、加齢に関係して発症する各種疾患の成因の一つとして重視されており、ラジカル捕捉剤の治療への応用も検討されている。

様々な疾患の直接的原因ともなる活性酸素の中で、 $O_2^-$ の消去に関わるSODの活性は様々な病気の発症と関連があると考えられている。これまでにヒトの場合でその関連が明らかにされている例として、Werner症候群、筋萎縮性側索硬化症(SOD活性の低下)、ダウン症(活性の上昇)などが挙げられる<sup>4,5)</sup>。また、SODは生体内メイラード反応を受けるとその活性が著しく低下することから<sup>6)</sup>、糖尿病患者で活性は低くなる<sup>5)</sup>。SOD活性の低下は酸化ストレスに対する防御能も低下させることから、さらに様々な疾病が糖尿病合併症として発症する。今後も種々の疾病とその活性との関連が次々に明らかにされていくと予想されるが、SODの活性測定は病気の発症機構の解明のみならず、診断や健康状態を反映する指標としても利用されていくものと考えられる。

### 2.2 植物

植物は動物のように自由に移動ができないことから、外部環境の変化に対して身を守るための高度な防御手段を備えている。パラコートなどの農薬の散布、大気中の $SO_2$ 濃度の上昇、干ばつや高濃度の垂鉛、マグネシウムの曝露により、植物体内中のSOD活性が上昇する<sup>7)</sup>。このことは、それらの刺激により植物体内に活性酸素種が生成していることを意味する。また生成する活性酸素種のうち $O_2^-$ の毒性を低下させることが、酸化ストレスに抵抗する上で重要な防御手段になることを示唆している。従って植物の生理学的研究に対してSOD活性測定技術の果たす役割は大きいと考えられる。

### 2.3 食品

生体の酸化防御能を強化すれば、活性酸素が関与する疾病のリスクを低下させることができるという考え方がある。赤ワインを始め、お茶、ココアなど特に植物が有する酸化防御能、特にSODと同様にO<sub>2</sub><sup>-</sup>の消去作用(superoxide anion scavenging activity: SOSAとも言われる)を有する成分が注目されている<sup>8)</sup>。最近では、植物性の食品素材のみならず、動物性タンパク質由来<sup>9, 10)</sup>のO<sub>2</sub><sup>-</sup>消去活性を求める研究も進められており、高い活性を有する食品素材の開発が今後も活発に展開されていくと予想される。

### 3. 従来のSOD 活性測定法

上に述べたように、SODの活性測定技術は様々な研究分野で利用されることから、分析対象は極めて多岐にわたり、ありとあらゆる試料が測定に供されることになる。この点から測定技術に求められる第一の要件として、守備範囲の広さ、言い換えれば試料中に共存する他成分の影響を受け難い高い選択性が必要とされる。

SODの基質となるO<sub>2</sub><sup>-</sup>の発生には、酵素キサンチンオキシダーゼによるキサンチンの酸化反応が利用される。反応溶液には生成したO<sub>2</sub><sup>-</sup>を検出するためのプローブを共存させておく。試料を添加していないときのプローブの変化をコントロールとして、各試料を添加した際のプローブ変化の抑制率をその試料が示す阻害率と表現する。

通常、各試料が50%の阻害を示す濃度を各試料の活性評価に利用する(IC<sub>50</sub>)。一方、本活性測定法において発生したO<sub>2</sub><sup>-</sup>は自発的な不均化反応で酸素と過酸化水素に変化している。この自発的不均化反応は酸性領域で速く、生理的pH付近(7~8)での速度は8.5 × 10<sup>5</sup> ~ 8.5 × 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>である。従って、活性測定に用いるO<sub>2</sub><sup>-</sup>と検出プローブとの反応の2次反応速度定数はその不均化反応速度定数よりも大きいことが望ましい。両者がほとんど変わらない場合には、使用するプローブ濃度を高くする必要がある。用いられるプローブはO<sub>2</sub><sup>-</sup>との反応で色が変化するもの(発色プローブ)、光を発するもの(化学発光プローブ)、並びに特徴的なラジカル種を生成するもの(スピントラップ剤)に分類される。

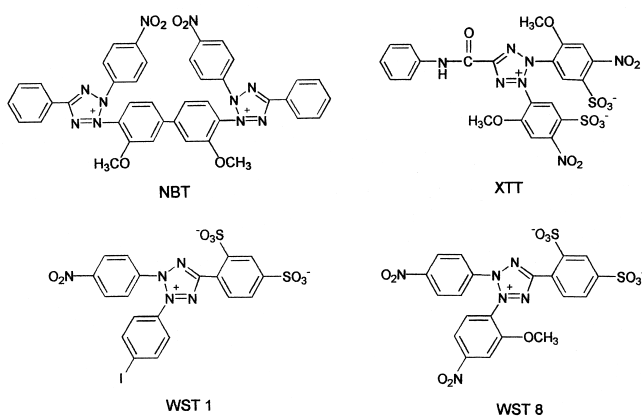
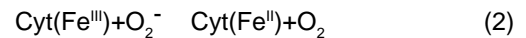


Fig. 1 Structures of tetrazolium salts used in SOD assay.

### 3.1 吸光光度法

色の变化でO<sub>2</sub><sup>-</sup>を検出する方法は最も典型的なSOD活性測定法で、特にそのプローブとしてはシトクロムcとニトロブルーテトラゾリウム(NBT)(Fig. 1)が用いられる。

シトクロムc還元法によるO<sub>2</sub><sup>-</sup>の検出は酸化型シトクロムcが還元されると550 nmに強い吸収をもつ還元型に変わることを利用したもので(式2)、SODの発見以来用いられている標準的な方法である<sup>2)</sup>。



しかしながらシトクロムcはO<sub>2</sub><sup>-</sup>以外にNADPHレダクターゼなどの還元酵素や様々な還元物質によっても還元を受けることから、試料中の夾雑物質の影響を常に考慮する必要がある。またこの方法では1.5分間の連続記録が推奨されており、多検体の分析には向かない。

NBT還元法はNBTがO<sub>2</sub><sup>-</sup>により還元され水不溶性のブルーホルマザン(吸収極大560nm)を生じることを利用したものである<sup>11)</sup>。水不溶性であるため、長時間の分析では不均一な分散が生じ測定再現性に影響が出てくる。これを可溶化させるために、反応溶液に牛血清アルブミンを添加した変法も開発されているが、余計なタンパク質を外から加えることは結果の解釈を複雑にする場合がある。さらにNBTも様々な還元性の物質で還元を受ける。この性質が、糖尿病のマーカーであるメイラード反応中間体のケトアミンの定量に利用されている<sup>12)</sup>。NBT法の最も大きな欠点は、SODの阻害曲線においてSOD濃度を高くしても100%の阻害が得られないことである(Fig. 2)。これはNBTとO<sub>2</sub><sup>-</sup>の発生に用いるキサンチンオキシダーゼとの間の直接的な相互作用によると考えられている。

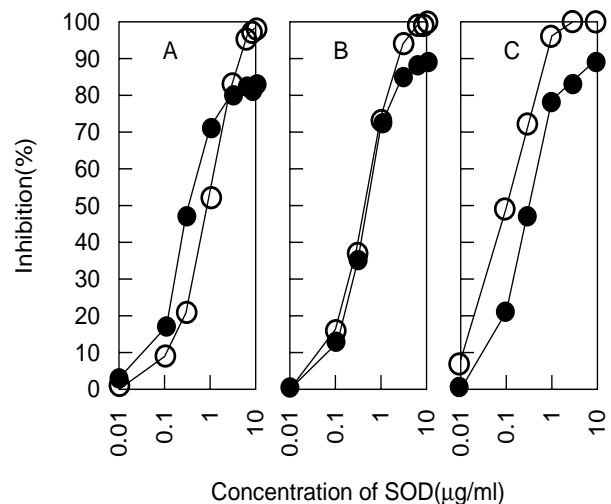


Fig. 2 SOD inhibition curves using NBT (○) and XTT (●). The reaction mixture contained 2.5 ml of 50 mM carbonate buffer (B, pH 9.4; C, 10.2) or 50 mM phosphate buffer (A, pH 8.0) and 0.1 ml each of 3 mM EDTA, 3 mM xanthine, 56.1 mU/ml xanthine oxidase, 0.75 mM XTT or NBT, and sample solution containing SOD at the concentration shown at abscissa. In the NBT method, 0.1 ml of BSA was also added.

### 3.2 化学発光法

$O_2^-$ の検出に用いられている化学発光プローブがSODの活性測定にも利用されている。SODの活性測定に用いられるプローブはウミホタルルシフェリン類縁体(MCLA)<sup>13)</sup>とルシゲニン<sup>14)</sup>である。化学発光はpH依存性が極めて強く、特にルシゲニンの発光はpH 9以上のアルカリ領域で極端に強くなる<sup>15)</sup>。従って、生理的な条件でのSODの活性測定には向かない。これに対してMCLAは中性領域でも強い発光を示すことから、pH 7.8においてヒト脳中のCu,Zn-SOD活性の測定に利用されている<sup>13)</sup>。ただしMCLAは $O_2^-$ だけではなく、一重項酸素とも反応性があること、溶存酸素と反応してバックグラウンド発光を示すこと、さらに遷移金属イオンにより酸化反応が促進されることなどから、あまりSODの活性測定には利用されていない。

### 3.3 電子スピン共鳴分光(ESR)法

$O_2^-$ は室温、溶液中ではESRシグナルは観測できないが、スピントラップ法を用いることで間接的に測定される。現在用いられている最も汎用性の高いスピントラップ剤は5,5-ジメチル-1-ピロリンN-オキシド(DMPO)である<sup>16)</sup>。 $O_2^-$ を捕捉したDMPOは特徴的なESRスペクトルを示すので、ESR法は $O_2^-$ に対する最も特異性の高い方法と言える。しかしながら、生理的条件におけるDMPOと $O_2^-$ の2次反応速度定数は $O_2^-$ の自発的不均化反応の速度定数に比べて小さく、その結果、反応系に大過剰のDMPOを添加する必要がある(例えば終濃度で0.45 M)。この結果、ESR法では測定コストが高つくという欠点が生じてくる。また比較的大型のESR装置を必要とすることも欠点の一つである。

## 4. 水溶性テトラゾリウム塩を用いた新規SOD活性測定法

上述の従来法が持つ欠点を克服するには、簡易な装置を用いた経済的な分析法で、pHに対する依存性も低く、かつ $O_2^-$ に対する特異性が高い方法を考案する必要がある。簡便な装置として一般的な分光光度計を考えると、シトクロムcやNBTなどと同様に $O_2^-$ との反応で色が変化するプローブを用いることが望ましい。この際に重要なことはSODの阻害曲線で100%の阻害率が認められること、さらに $O_2^-$ 以外の共存物質の影響を受けにくいことが必要とされる。

著者らはこのような性質を有する発色プローブを求めて、還元型ホルマザンが水に可溶性の新規テトラゾリウム塩の適用を試みた。

### 4.1 XTT

XTTは1988年に報告された水溶性テトラゾリウム塩である<sup>17)</sup>。その後、微生物や動物細胞の電子伝達系の基質として利用されてきた<sup>18)</sup>。その構造をFig. 1に示す。ジテトラゾリウムであるNBTと比較してモノテトラゾリウム構造を有しており、分子内に2つのスルホン基を有することを特徴とする。

著者らはこのXTTをSODの活性測定に適用してみた<sup>19)</sup>。Fig. 2に示したように、SODの添加濃度を上昇させると、NBTでは不可能であった100%の阻害が認められた。活性測定の条件を最適化し、様々なpHで同様の実験を行っても、100%阻害がそれぞれ

のpHで認められた。100%の阻害を示したということは、アッセイ系においてXTTが $O_2^-$ により特異的に還元を受けたことを示し、NBTの欠点を克服したことを意味する。NBTはキサンチンオキシダーゼとの相互作用の他に、グルコースオキシダーゼとも直接的な相互作用を示すことが報告されている<sup>20)</sup>。そこで我々はグルコースオキシダーゼによるグルコースの酸化反応に、NBTとXTTをそれぞれ共存させて各ホルマザンの生成を調べた(Fig. 3)。 $O_2^-$ を生成しないグルコースオキシダーゼの反応でもNBTは還元を受け経時的にホルマザンを生成しているのに対して、XTTは吸光度変化を示さなかった。XTTの濃度を増すと反応開始時点から吸光度が増加しているが、これは酸化型XTTがもつバックグラウンドとしての吸収による。これらの結果から、XTTはいくつかのオキシダーゼの反応過程で生成する還元型酵素と直接的な相互作用を示さず、SOD活性測定に適したプローブであることが明示された。

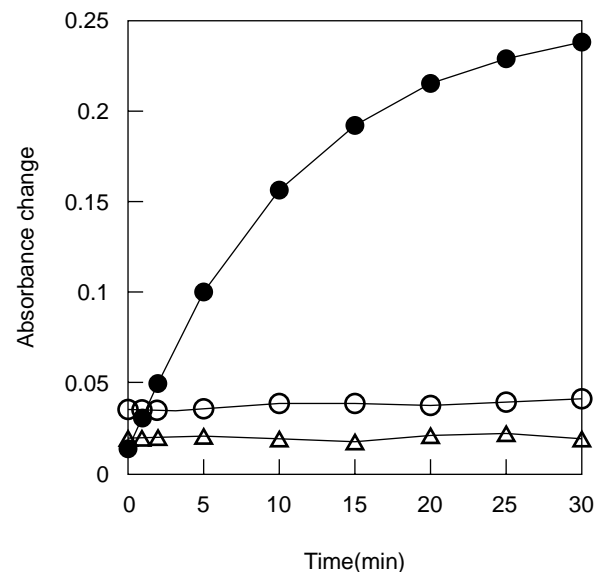


Fig. 3 Time course of the reduction of NBT and XTT during the oxidation of glucose by glucose oxidase. The assay mixture (2.8 ml) contained the following components as the final concentration: 50 mM glycine-NaOH (pH 9.5), 0.1 mM glucose, and 0.1 mM NBT (●), 0.1 mM XTT (○) or 0.2 mM XTT (△). The reaction was initiated by the addition of glucose oxidase solution. The absorbance at 470 (XTT) or 560 nm (NBT) was monitored at 25 °C.

次に、実試料への適用性を調べるために、ウサギ赤血球のSOD活性を測定してNBT法で得られる結果と比較した(Fig. 4 : pH 10.2で測定)。ウサギ血液からの赤血球の分離とSOD画分の粗抽出は常法に従った<sup>21)</sup>。両者の測定値には高い直線の相関が認められた(相関係数0.954)。その直線の傾きからXTT法で得られる結果が約2倍、NBT法の結果と比べて高くなっているが、これはFig. 2に見られる両者の検出感度の違いを反映するものである。次に本法を食品試料のSOSA測定に適用してみた<sup>22)</sup>。周知の通り、食品は非常に複雑な多成分混合系で、含まれている成分が多岐にわたる。これまでにSOSAを示すことが明らかにされている赤ワイン、お茶、コーヒー、ココアを試料に選び、その活性測定を試みた。予想通り、食品試料を希釈せずに本活性測定に供すると、食品試料の色の影響が見られることと、さらに食品試料中にXTTを直接還元する物質が存在していることが明らかとなった。それらの影響に起因する吸光度が、コントロールの吸光度変化に対して10%以下の値であれば許容できると仮定すると、例えばpH 8.0の測定において、緑茶(玉露)で100倍、赤ワインで10倍、インスタントコーヒーで50倍、ココアで10倍以上に希釈すればそれらの影響を抑えることが可能であった。それぞれの希釈倍率で各試料は阻害率50%以上を示し、本法により食品のSOSAを測定できることが明らかとなった。なお得られた活性はESR法で得られている結果と良好に一致していた。これらの結果から、XTT法は生体試料や食品試料に適用可能であることが明らかとなった。

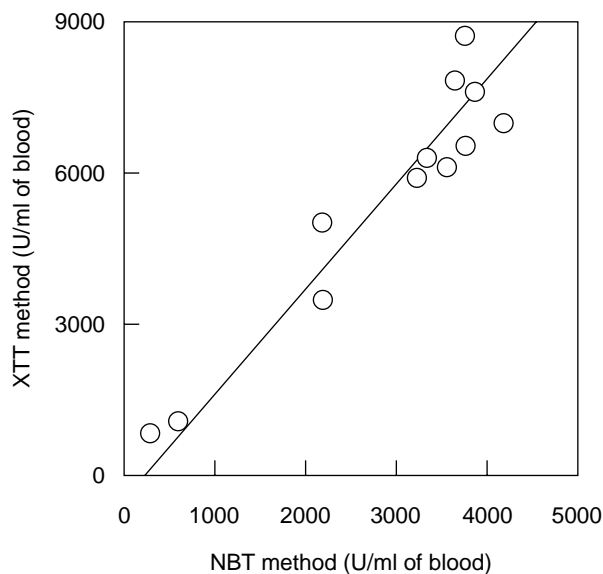


Fig. 4 Relationship between SOD activity in rabbit erythrocytes obtained by XTT and NBT methods.

XTT法はNBT法の欠点を克服し、一步理想に近づいたSOD活性測定法であると言えるが、一連の研究を通じて、さらに克服しなければならない欠点も見られた。一つは測定pHに依存して検出感度が変化することである(Fig. 2)。NBTはpH 8から10.2の範囲で比較的一定した $IC_{50}$ を示すのに対して、XTTはpHが低下す

るに従い、検出感度が低下した。その結果、pH 8.0ではNBTよりも検出感度が低くなった。さらに、XTTの溶解性は十分であるとは言い難い。XTTの最大の溶解度は2mM程度で、最適濃度である0.75 mMの調製には加熱が必要であった。さらにFig. 3に示されているように酸化型のバックグラウンドに相当する吸光度も気になるところである。そこでこれらのさらなる改良を試みた。

## 4.2 WST-1とWST-8

1993年から97年にかけてIshiyamaらは様々な水溶性テトラゾリウム塩の開発を行った<sup>23-25)</sup>。いずれも水に対して数十から数百mMオーダーの溶解性を有していることから、我々はそれらの水溶性テトラゾリウム塩をSOD活性測定へ適用してみることにした<sup>26)</sup>。用いた水溶性テトラゾリウム塩はFig. 1に示したWST-1とWST-8である。どちらも分子内にスルホン基を有するモノテトラゾリウムである。

はじめに各WSTを用いて測定条件の最適化を行い、pH 8.0、9.4、10.2でSOD標品の阻害曲線を描いてみた(Fig. 5)。

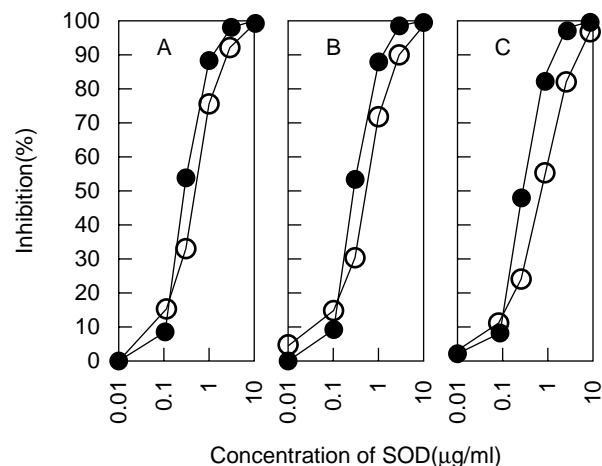


Fig. 5 SOD inhibition curves using the WST-1 (○) and WST-8 (●) systems. The reaction mixture contained 2.5 ml of a phosphate buffer (A, pH 8.0) or 50 mM carbonate buffer (B, pH 9.4; C, pH 10.2) and 0.1 ml of 3 mM EDTA, 3 mM xanthine, 58 mU/ml of xanthine oxidase, 0.75 mM WST and the sample solution containing SOD at the concentration shown on the abscissa.

どちらのWSTもXTTと同様に、高濃度のSODの添加により100%の阻害を示した。特筆すべきは、pHの違いにより、 $IC_{50}$ を与えるSOD濃度に差が認められなかったことである。このことは、WSTがNBT、XTT両者の欠点を完全に克服した $O_2^-$ の理想的な発色プローブであることを示す。100%の阻害が認められたことから、XTTと同様にグルコースオキシダーゼの反応においてWST-1とWST-8を共存させ、ホルマザンの生成が認められるかどうかを調べた(Fig. 6)。

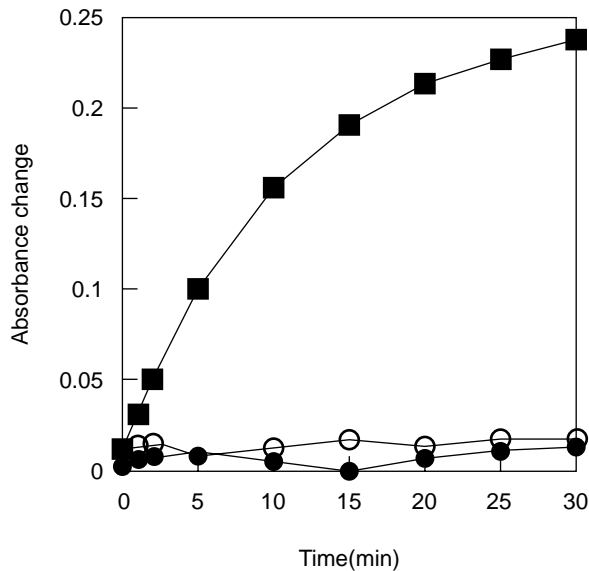


Fig. 6 Time course of the reduction of NBT and WST during the oxidation of glucose by glucose oxidase. The assay conditions were same as those in Fig. 3. The assay mixture contained 0.1 mM NBT (■), 0.2 mM WST-1 (○) or 0.2 mM WST-8 (●). The absorbance at 438 (WST-1), 460 (WST-8) or 560 nm (NBT) was monitored at 25 °C.

予想通り、グルコースの酸化反応ではWSTホルマザンの生成は認められなかった。またXTTと比較してWSTは濃度を上げてほとんどバックグラウンドの吸光度が上昇せず、ローblankでの測定が可能であることもわかる。感度的な比較を行うために、NBT、XTT法で得られる $IC_{50}$ とWST-1、WST-8の値を比較してみた(Table 1)。この値はpH 10.2の結果であるが、WST-1が最も高感度にSODを検出できることが明らかとなった。そこでWST-1法を用いてラット赤血球のSOD活性測定を行い、XTT法で得られた結果と比較してみたところ、両者の間には相関係数0.968(n=7)の良好な直線関係が認められた。

Table1. Comparison of  $IC_{50}$  obtained by various tetrazolium salts at pH 10.2

tetrazolium	$IC_{50}$ ( $\mu$ g/ml)
WST-1	0.22
WST-8	0.75
XTT	0.26
NBT	0.55

ごく最近、WinterbournのグループもSOD活性測定におけるWST-1の有用性を認め、SOD活性測定のマイクロプレート法を確立した<sup>27)</sup>。かれらはその方法を用いてヒト赤血球及びラットの肝臓・心臓ホモジネートについて分析を行い、得られた結果がこれまでに報告されている値と一致することを報告している。従って、WST-1は生体試料について広い適用性を有していると言える。他の試料群、例えば植物組織や食品試料に対する適用性については現在詳細な検討を行っているところである。

著者らはさらに本WST-1法を迅速化・自動化する目的で、フローインジェクション分析(FIA)法の開発を行った<sup>28)</sup>。試作したFIAシステムをFig.7に示した。

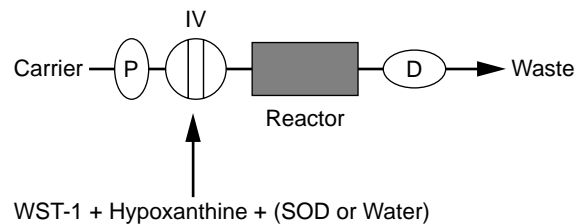


Fig. 7 FIA manifold for SOD assay. P, pump; IV, injection valve; D, detector.

本システムではキサンチンオキシダーゼを固定化したリアクターを用いており、測定のたびに酵素を添加する必要がない。従って迅速性と共に経済性を備えた分析法である。種々の検討を重ねた結果、キサンチンオキシダーゼの安定性を高めるために、リアクター内にカタラーゼを同時に固定化し、基質としてヒポキサンチンを用いることとした。ヒポキサンチンとWST-1を含む発色液を予め試料溶液と1:9の比率で混合しておき、その混合液20 $\mu$ lをリアクター内に注入した。試料にSODが含まれていない場合には最大のWST-1ホルマザンの生成が認められ、最大のピーク高が観察される。そこにSODが添加されると、その活性に依存してピーク高が下がってくる(Fig. 8)。

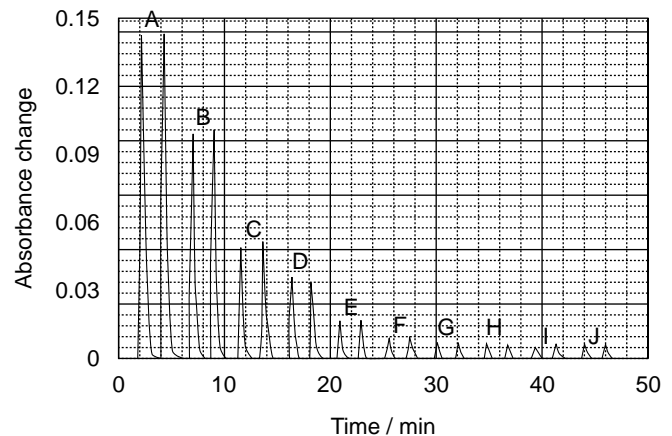


Fig. 8 Typical response curve of SOD preparation obtained under the optimum conditions. A, 0; B, 1; C, 2.5; D, 5; E, 10; F, 25; G, 50; H, 100; I, 250; J, 500 $\mu$ g/ml.

そのピーク高の低下の割合を阻害率として、SOD標品の阻害曲線を作成した。得られた阻害曲線から求められた $IC_{50}$ 値は $2.7\mu\text{g/ml}$ で、絶対量としては $50\text{ng}$ に相当する。この値はパッチ手順での $20\text{ng}$ に比べるとやや劣るが、1時間当たり30検体以上の分析が可能であり、迅速性は極めて高い。本FIAシステムを用いてラット赤血球のSOD活性を測定し、NBT法で得られる結果と比較した(Fig. 9)。両者の間には高い直線的相関関係が認められ、迅速分析法であるにもかかわらず、その分析結果は従来法の結果と良好に一致することが明らかとなった。

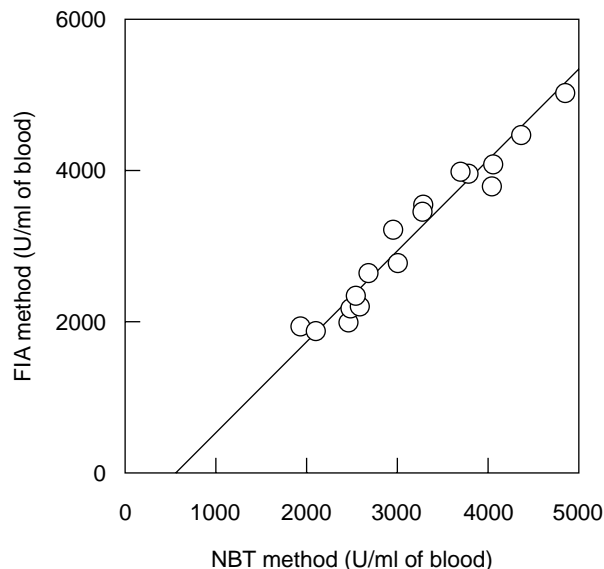


Fig. 9 Relationship between SOD activity in rabbit erythrocytes obtained by NBT method and WST-1-FIA method.

## 5. おわりに

SODの活性測定の重要性、その測定法の現状について述べてきた。SODの発見以来、毎年数多くの新しいSOD活性測定法が提案されている。このことは標準法として認知される満足のいく方法がこれまでに確立されていないことを意味している。今回我々が開発したWST-1に基づくSOD活性測定法はその特性から見て、従来法の多くの欠点を克服した極めて魅力のある方法であると言える。この方法をSOD活性測定の標準法として育てていくためには、 $O_2^-$ プローブとしてのWST-1の特異性をさらに詳細に調べていく必要があると考えている。

### 参考文献

- 1) J.M. Tolmasoff, T. Ono and R.G. Cutler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2777 (1980).
- 2) J.M. McCord and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049(1969).
- 3) 吉川敏一、谷川徹、化学と生物、**37**, 475 (1999).
- 4) H.R. Warner, *Free Radic. Biol. Med.*, **17**, 249 (1994).
- 5) N. Taniguchi, *Adv. Clin. Chem.*, **29**, 1 (1992).

- 6) H. Ukeda, Y. Hasegawa, T. Ishii and M. Sawamura, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 2039 (1997).
- 7) L.S. Monk, K.V. Fagerstedt and R.M.M. Crawford, *Physiol. Plant.*, **76**, 456 (1989).
- 8) F. Khanom, H. Kayahara and K. Tadasa, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 837 (2000).
- 9) 末綱邦男、受田浩之、日水誌、**65**, 1096 (1999).
- 10) K. Suetsuna, H. Ukeda and H. Ochi, *J. Nutr. Biochem.*, **11**, 128 (2000).
- 11) C. Beauchamp and I. Fridovich, *Anal. Biochem.*, **44**, 276 (1971).
- 12) R.N. Johnson, P.A. Metcalf and J.R. Baker, *Clin. Chim. Acta*, **127**, 87 (1982).
- 13) A. Nishida, Y. Misaki, H. Kurata and S. Takashima, *Brain Dev.*, **16**, 40 (1994).
- 14) P. Corbisier, A. Houbion and J. Remacle, *Anal. Biochem.*, **164**, 240 (1980).
- 15) M.M.J. Oosthuizen, M.E. Engelbrecht, H. Lambrechts, D. Greyling and R.D. Levy, *J. Biolumin. Chemilumin.*, **12**, 277 (1997).
- 16) Y. Noda, K. Anzai, A. Mori, M. Kohno, M. Shinmei and L. Packer, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **42**, 35 (1997).
- 17) K.D. Paull, R.H. Shoemaker, M.R. Boyd, J.L. Parsons, P.A. Risbood, W.A. Barbera, M.N. Sharma, D.C. Baker, E. Hand, D.A. Scudiero, A. Monks, M.C. Alley and M. Grote, *J. Heterocyclic Chem.*, **25**, 911 (1988).
- 18) N.W. Roehm, G.H. Rodgers, S.M. Hatfield and A.L. Glasebrook, *J. Immunol. Methods*, **142**, 275 (1991).
- 19) H. Ukeda, S. Maeda, T. Ishii and M. Sawamura, *Anal. Biochem.*, **251**, 206 (1997).
- 20) S.I. Liochev and I. Fridovich, *Arch. Biochem. Biophys.*, **318**, 408 (1995).
- 21) J. Maral, K. Puget and A.M. Michelson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1525 (1977).
- 22) 島村智子、前田進、受田浩之、沢村正義、農化、**72**, 1181 (1998).
- 23) M. Ishiyama, M. Shiga, K. Sasamoto, M. Mizoguchi and P. He, *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 118 (1993).
- 24) M. Ishiyama, Y. Miyazono, M. Shiga, K. Sasamoto, Y. Ohkura and K. Ueno, *Anal. Sci.*, **12**, 515 (1996).
- 25) M. Ishiyama, Y. Miyazono, K. Sasamoto, Y. Ohkura and K. Ueno, *Talanta*, **44**, 1299 (1997).
- 26) H. Ukeda, D. Kawana, S. Maeda and M. Sawamura, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 485 (1999).
- 27) A.V. Peskin and C.C. Winterbourn, *Clin. Chim. Acta*, **293**, 157 (2000).
- 28) H. Ukeda, A.K. Sarker, D. Kawana and M. Sawamura, *Anal. Sci.*, **15**, 353 (1999).

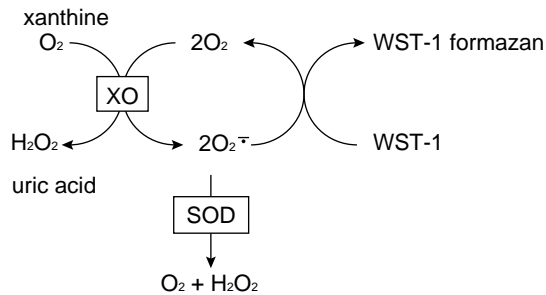
### 著者紹介

氏名 受田 浩之 (Hiroyuki Ukeda)  
 高知大学農学部生物資源科学科助教授  
 出身大学 九州大学大学院農学研究所  
 学位 農学博士  
 専門 食品化学、食品分析学、食品機能化学  
 趣味 スポーツ (野球)  
 連絡先 〒783-8502 南国市物部乙 200  
 Tel:088-864-5189, Fax:088-864-5200  
 メールアドレス : hukeda@cc.kochi-u.ac.jp



## 新製品

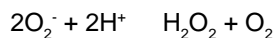
### SOD Assay Kit - WST



#### 特長

- ・100% SOD 阻害率を測定できます。
- ・ホルマザンの溶解操作を必要とせず、操作が簡単です。
- ・一度に多検体の測定が可能です。

近年、活性酸素と老化および発癌との関わりが活発に研究され、その真相が解明されつつあります。中でも活性酸素の一つであるスーパーオキシドを消去する、superoxide dismutase (SOD)およびSOD様物質が注目されています。SODは以下のスーパーオキシドの不均化反応を触媒する酵素です。



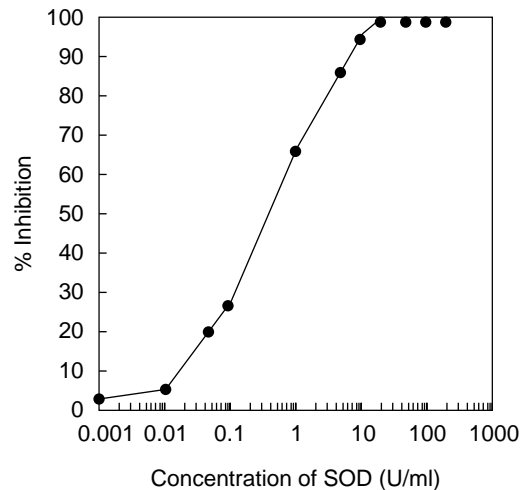
SOD 活性を測定する方法として、シトクロム法、NBT 法、エピネフリン法および亜硝酸法などが知られています。xanthine/xanthine oxidaseをスーパーオキシド生成系とし、テトラゾリウム塩の還元反応を利用したNBT法は操作が簡便であることから汎用されていますが、生成するホルマザンが不溶性の沈殿物であることや、NBTがxanthine oxidaseと直接反応し100% SOD 阻害率を測定することができない等の問題をかかえています。

SOD Assay Kit-WSTは高水溶性ホルマザンを生成するテトラゾリウム塩WST-1を使用しているため、ホルマザンの溶解操作を必要としません。またWST-1はxanthine oxidaseと直接反応しないため、100% SOD 阻害率を測定できます。また96穴マイクロプレート対応ですので、一度に多検体の測定が可能です。

#### キット内容

- ・WST solution 5 ml x 1 本
- ・Enzyme solution 100 μl x 1 本
- ・Buffer solution 100 ml x 1 本
- ・Dilution buffer 50 ml x 1 本

SOD inhibition curve



#### 操作

- 1) WST solution 1 ml を Buffer solution 19 ml で希釈する。
- 2) Enzyme solution 15μl を Dilution buffer 2.5 ml で希釈する。
- 3) サンプル溶液を 20μl well に入れる。
- 4) WST working solution を 200μl 加え、ピペッティングもしくはプレートミキサーでよく混ぜる。
- 5) Enzyme working solution を 20μl ずつ加える。
- 6) 37 °C で 20 分間インキュベートする。
- 7) プレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定する。
- 8) 得られた吸光度より、SOD 活性値(阻害率%)を求める。

(本品は Dojindo Molecular Technologies, Inc. が開発した製品です。)

品名	容量	価格( ¥ )
SOD Assay Kit - WST	500tests	18,000

#### 参考文献

- 1) H. Ukeda, D. Kawana, S. Maeda and M. Sawamura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 485 (1999).
- 2) H. Ukeda, A. K. Sarker, D. Kawana and M. Sawamura, *Anal. Sci.*, **15**, 353 (1999).

## 新製品

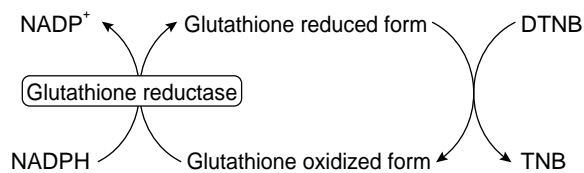
### Total Glutathione Quantification Kit

#### 特長

- ・高感度に total glutathione を定量できます(検出限界：1 $\mu$ mol/l)。
- ・短時間(30分以内)で測定ができます。
- ・一度に多検体の測定が可能です。

glutathione (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinylglycine)は哺乳動物に存在するトリペプチドで、glutathione peroxidase、glutathione S-transferase および thiol transferase 等の酵素基質として関与しています。また glutathione は酸素ラジカル捕捉能があり、アスコルビン酸と同様の抗酸化作用が認められています。

glutathione は下記の酵素リサイクル法によって高感度に検出されます。



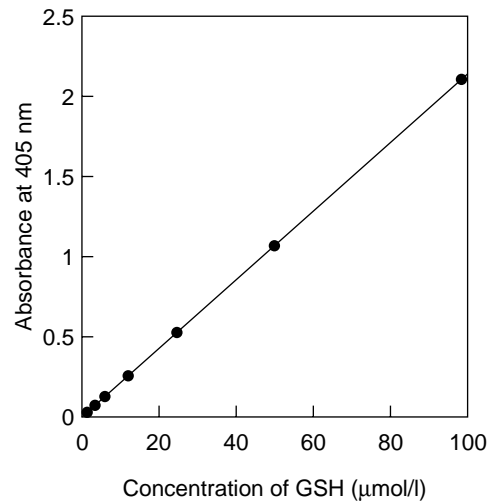
5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)はジスルフィドを分子内に含有し、glutathione を酸化すると同時に自身は5-mercapto-2-nitrobenzoic acidに還元されます。このチオールは吸光度( $\lambda_{max}$ =412 nm)より glutathione を定量することができます。

Total Glutathione Detection Kitはこの酵素リサイクル法を利用した96穴マイクロプレート用キットです。短時間(30分以内)で、高感度に total glutathione を定量することが可能です。

#### キット内容(100tests用)

- |                   |    |
|-------------------|----|
| ・ Substrate       | 2本 |
| ・ Coenzyme        | 2本 |
| ・ Standard GSH    | 1本 |
| ・ Buffer solution | 1本 |
| ・ Enzyme solution | 1本 |

#### Standard curve



#### 操作

- 1) Substrateに1ml、Coenzymeに7ml Buffer solutionを加えて溶解する。
- 2) Standard GSHに測定サンプルと同じ酸性溶液(例:0.5-1% 5-sulfosalicylic acid)を2ml加えて溶解する。
- 3) Enzyme solutionをBuffer solutionで200倍希釈する。
- 4) Coenzyme 140 $\mu$ l、Enzyme solution 20 $\mu$ lを各wellに添加し、30・5分間インキュベートする。
- 5) Standard GSH、及び測定サンプル20 $\mu$ lを添加し、30・10分間インキュベートする。
- 6) Substrateを20 $\mu$ lを添加し、室温で10分間インキュベートする。
- 7) プレートリーダーで吸光度(405nm)を測定する。

(本品はDojindo Molecular Technologies, Inc.が開発した製品です。)

品名	容量	価格(¥)
Total Glutathione Quantification Kit	100tests	25,000

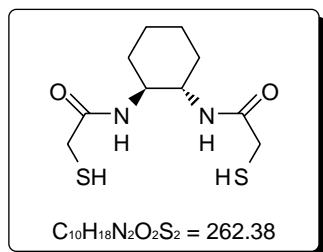
#### 参考文献

- 1) O. W. Griffith, *Anal. Biochem.*, **106**, 207 (1980).
- 2) M. E. Anderson, *Methods Enzymol.*, **113**, 548 (1985).
- 3) M. A. Baker, G. J. Cerniglia and A. Zaman, *Anal. Biochem.*, **190**, 360 (1990).
- 4) C. Vandeputte, I. Guizon, I. Genestie-Denis, B. Vannier and G. Lorenzon, *Cell Biology and Toxicology*, **10**, 415 (1994).

## 新製品

### 新規ジチオール化合物

#### BMC



#### 特長

重金属のキレート剤です。

タンパク質のリフォールディング剤です。

BMCは1986年Kasinaら<sup>1)</sup>によって報告されたテクネチウム(<sup>99m</sup>Tc)のキレート剤で、腎尿管の機能解析に有用であることが示されています。彼等は、種々の類似ジチオール化合物を合成し、それぞれの<sup>99m</sup>Tcキレートをマウスに注入した時の、様々な器官への分布や、腎排泄の効率をBMCと比較しています。BMCは、同じシクロヘキサン誘導体のcis型に比べ、肝臓への吸収は遅く、血液中の保持時間は長いことが報告されています。

また最近ではRainesら<sup>2)</sup>によって、誤って形成されたタンパク質のジスルフィド結合を解き、正しい対を再形成するリフォールディング反応を触媒することが報告されています<sup>3)</sup>。BMCは細胞膜を透過した後、小胞体内でタンパク質のリフォールディングを

触媒すると考えられ、生体中でリフォールディングを担っている酵素 protein disulfide isomerase (PDI) と同様の触媒作用をもつことが分かりました。細胞培養系へ添加することによって組換えタンパク質の発現量や活性を向上させることも可能です。また低分子であるため安定であり、容易に系から除去することもできます。表1に、種々の溶媒に対するBMCの溶解性を示しています。参考文献および特許情報

- 1) S. Kasina, A. R. Fritzberg, D. L. Johnson and D. Eshima, *J. Med. Chem.*, **29**, 1933 - 1940 (1986).
- 2) K. J. Woycechowsky, K. D. Wittrup and R. T. Raines, *Chemistry & Biology*, **6**, 871 - 879 (1999).
- 3) BMCを用いるリフォールディングの手法については, Wisconsin Alumni Research Foundation から用途特許が出願されています(US5910435 / 特表平 11-514017)。

\* 弊社からの購入は、上記特許実施を認めたものではありません。  
ご使用に際しては、ご注意ください。  
\* 本品は、試験・研究用途に限ります。

#### 注意事項

DMSO溶解後は安定性が良くないため、溶媒としてのご使用をお控え下さい。

品名	容量	価格(¥)
BMC	10mg	Request

表1 BMCの溶解度

	1 mol/l	500 mmol/l	100 mmol/l	50 mmol/l	10 mmol/l	1 mmol/l
Methyl alcohol	×	×				
Ethyl alcohol	×	×	×			
10mmol/l Phosphate Buffer(pH=7.0)	×	×	×	×	×	
H <sub>2</sub> O	×	×	×	×	×	

溶解： 、難溶： 、不溶： ×

#### 販売中止のお知らせ

品名	容量	コード	備考
DTCS	5g	342-04511	1g 包装を発売
TMBZ solution	50ml		
AEC solution	set		
DAB solution	set		
BCIP/Nitro-TB solution	50ml		

# 実用的蛍光誘導体化

## 6

福岡大学薬学部

山口政俊・能田 均

### 5 アルデヒド及びケトン類の蛍光誘導体化

カルボニル基（アルデヒド及びケトン）を有する化合物は、生体、食品、環境中に広く分布している。また種々の薬物にも、その構造中にカルボニル基を有するものが多く存在している。これら化合物の高感度HPLC蛍光検出に、Fig.1に示す種々の蛍光ラベル化剤が用いられている。

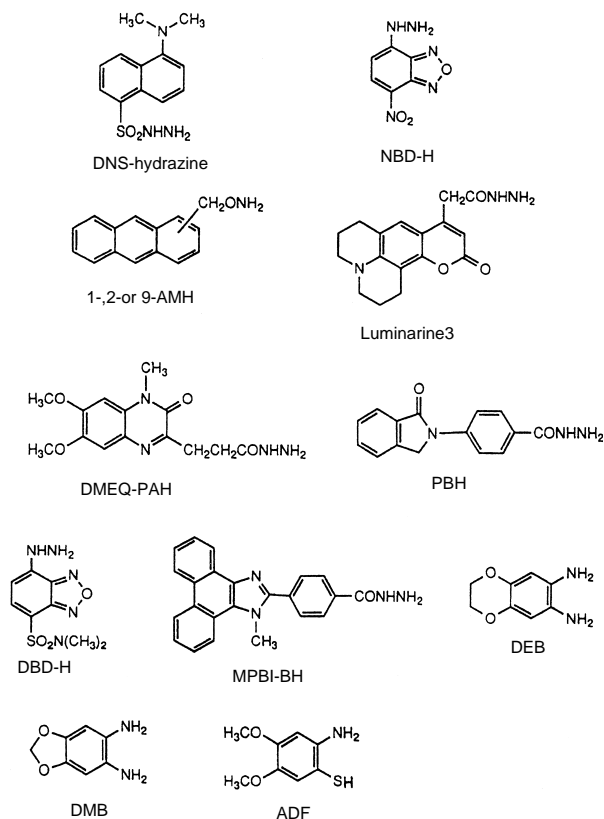


Fig.1 Fluorescence reagents for aldehydes and ketones

### 5.1. アルデヒド及びケトン用蛍光ラベル化試薬と特性

アルデヒドやケトンに対する反応活性基としてヒドラジノ基やアミノ基を有する多くのラベル化試薬が開発されている。DNS-hydrazine やNBD-Hはコルチゾールやオリゴ糖の測定に利用されている。NBD-H（試薬自身は無蛍光性）はトリフルオロ酢酸の存在下、室温でカルボニル基と蛍光反応（Ex.470nm；Em・530 - 570nm；検出限界 subpmol ~ pmolレベル）する。AMHは胆汁酸の計測に使用されている。胆汁酸を酵素により3-オキソ胆汁酸に変換後、AMHによりオキシム体に導き、その蛍光を検出することに基づくものである（検出限界20fmol）。Luminarin3は、脂肪酸及び芳香族カルボニル化合物と希硫酸中で反応する（反応時間：1~4時間；室温；遮光下）。反応液に炭酸水素ナトリウム溶液を加えpH7.0に調整し、ジクロロメタンで抽出後、窒素気流下で乾固する。残渣をアセトニトリルや酢酸エチルに溶解後、HPLCに注入し蛍光検出する（Ex.380 - 400nm；Em.450 - 470nm；検出限界60fmol ~ 2pmol）。DMEQ-PAHは、中性~トリクロロ酢酸酸性中、緩和な条件（20~60,20分間）で脂肪酸及び芳香族アルデヒドと蛍光反応する（Ex.362nm；Em.442nm）。検出限界は13~18fmolと極めて高感度である。PBHは脂肪酸アルデヒドの蛍光ラベル化試薬として開発された。反応は酢酸酸性で、25、5分間で完了する。本試薬はラット肝細胞中のマロンジアルデヒドの測定に使用されている。

### 5.2. 芳香族アルデヒド用蛍光ラベル化試薬と特性

芳香族1,2-ジアミノ化合物（DDB,DMB,EDB）や2-アミノ-4,5-ジメトキシチオフェノール（ADF）は芳香族アルデヒドと反応し、それぞれイミダゾールやチアゾールを形成する（Fig.2）。この反応に基づく蛍光ラベル化法は芳香族アルデヒドに選択的であり、極めて高感度である。ADFは、芳香族アルデヒドと希塩酸中で50、70分で反応し、8~20fmolの検出限界を与える。DDBはフェニルアセトアルデヒドに対しても強い蛍光を与えるため、ペスタチン〔(2S,3R)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl-S-leucine〕の計測に使用されている。ペスタチンを過ヨウ素酸酸化によりフェニルアセトアルデヒドに変換後、DDBで蛍光ラベル化することに基づく。

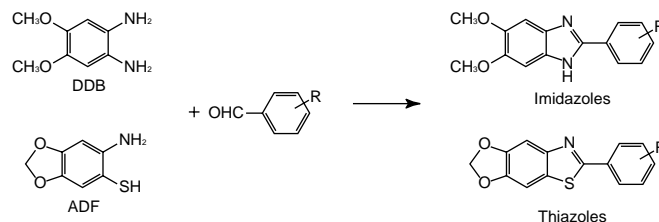


Fig.2 Fluorescence Reaction of Benzaldehydes with DDB (or ADF)

### 5.3. 1,2-ジカルボニル基

DMBは、前述の芳香族アルデヒドとは全く異なる条件で1,2-ジカルボニル化合物と反応し、強蛍光性のキノキサリン誘導体を生成する (Fig.3)。このようにして、DMBは1,2-ジカルボニル化合物の特異的蛍光ラベル化試薬として開発された。本試薬は食品中のメチルグリオキサールや生体試料中のコルチコステロイド類の定量に利用されている。

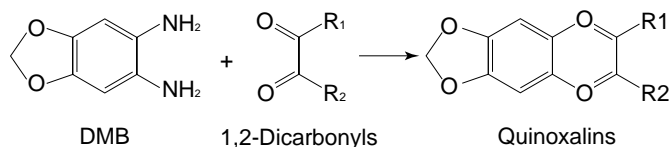


Fig.3 Fluorescence Reaction of 1,2-Dicarbonyls with DMB

### 5.4. 1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼン(DMB)の実用例

1,2-ジカルボニル化合物 [グリオキサール (G)、メチルグリオキサール (MG)、ジアセチル (DA)、2,3-ペンタンジオン (PD) など] は生体、環境、食品など自然界に広く存在し、重要な生理的役割を担っている。これらジカルボニル化合物の研究には、高感度かつ選択的な計測法は欠かせないものである。

(1) 発酵食品中の1,2-ジカルボニル化合物の定量<sup>1)</sup> (Chart 1, Fig.4) DAやPDはアルコール飲料や乳製品などの発酵食品中の重要な芳香成分の一つで、発酵過程において微生物の働きにより作られる。そのように、品質管理の点で発酵食品中のDAやPD量を計測することは極めて重要である。一方、GやMGも発酵食品中に存在し、それらの計測は発酵食品の品質チェックに重要である。

Chart 1 Determination of Glyoxal, Methylglyoxal, Diacetyl, and 2,3-Pentanedione in Fermented Foods

Food (yoghurt, beer or wine)	ca.0.1 g or 0.1ml
MeOH	5.0ml

Centrifuge at 1000g for 5min

Supernatant	100μl
7.0mmol/l DMB solution (0.2mol/l β-mercaptoethanol, 0.25mol/l Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )	100μl

Warm at 60 for 40min  
Apply onto HPLC(10μl)

HPLC conditions

Column : L-Column ODS(100X4mm i.d.;5μm)

Mobile phase : CH<sub>3</sub>CN-0.5M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>(35:65, v/v)

Flow-rate : 1.0ml/min

Fluorescence detection : Ex.350nm;Em.390nm

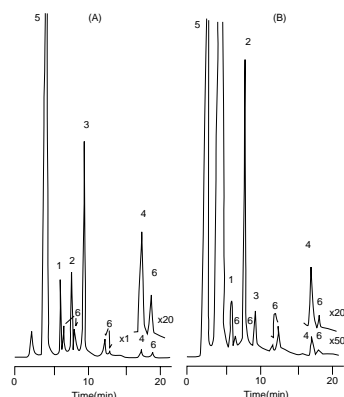


Fig. 4 Chromatograms obtained with (A) yoghurt and (B) beer. Peaks : 1 = glyoxal; 2 = methylglyoxal; 3 = diacetyl; 4 = 2,3-pentanedione; 5 = DMB; 6 = unidentified endogenous compound.

(2) マウス血液中のメチルグリオキサールの定量<sup>2)</sup> (Chart 2, Fig.5) メチルグリオキサール (MG) は生体試料中に広く分布しているが、その詳細な生理的意義については不明な点が多い。その研究には、高感度かつ選択的な計測法が必要である。

Chart 2 Determination of Methylglyoxal in Mouse Blood

Blood	5μl
Water	100μl

Ultrafiltrate through a Centricon 30 ultrafilter(1500g,20min)

Filtrate(blood sample)	50μl
7.0mmol/l DMB solution(1.0mol/l β-mercaptoethanol, 28mmol/l Na <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )	50μl

Warm at 60 for 40min  
Apply onto HPLC(10μl)

HPLC conditions

Column: Radial-Pak cartridge C<sub>18</sub>(100X8mm i.d.;5μm)

Mobile phase : MeOH-CH<sub>3</sub>CN-40mmol/l phosphate buffer(pH 7.0)(44:7:49, v/v)

Flow-rate: 1.0ml/min

Fluorescence detection : Ex.355nm;Em.393nm

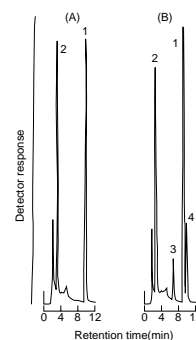


Fig.5 Chromatograms obtained with (A) a standard solution and (B) mouse blood. Peaks: 1 = methylglyoxal; 2 = DMB; 3 = glyoxal; 4 = unidentified endogenous compound.

(3) 尿中6β-ヒドロキシコルチゾール(6β-OHF)とコルチゾール(F)の同時定量<sup>3)</sup>(Chart 3, Fig.6)

肝薬物代謝酵素誘導能を有する薬剤のヒトへの投与により、6β-OHFの尿中排泄量が増加するため、尿中6β-OHF量が薬物代謝能を評価する指標となる。さらに、6β-OHF/Fの比がより良い指標となることが知られており、6β-OHFとFの同時定量法が必要である。

本法は、6β-OHF及びFを酢酸銅により酸化し、グリオキサール誘導体に変換した後、これらをDMBで蛍光ラベル化することに基づく(Fig.6)。このような2段階のラベル化は操作が煩雑であるという欠点を有しているが、一方ではより選択性が高まるという利点も有する。クロマトグラム(Fig.6)が比較的シンプルであるのは、2段階のラベル化による高選択性のためである。

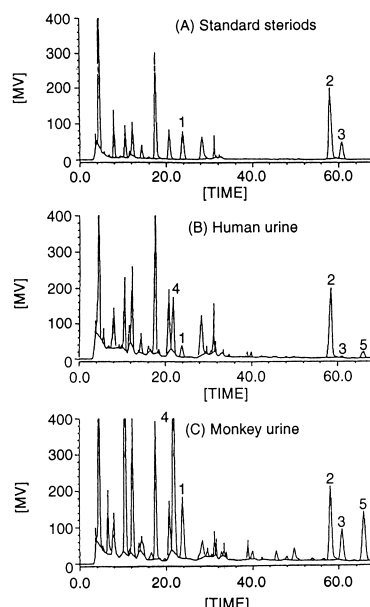
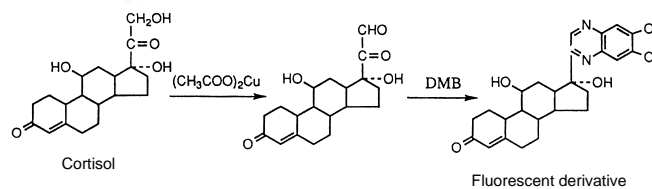


Fig. 6 Chromatograms obtained with (A) standard steroids, (B) human urine, and (C) monkey urine. Peaks : 1 = 6β-OHF ; 2 =F-E ; 3 =F ; 4 =unknown urinary component ; 5 = cortisone ; others = reagent blank components.

Chart 3 Determination of 6β-Hydroxycortisol and cortisol in urine

Urine

Centrifuge at 1000g for 30min

Supernatant	1ml
5μmol/l Fludrocortisone(F-E;I.S.)	200μl
Ethyl acetate	6ml

Vortex-mix for ca.3min

Organic layer

Wash with 1mol/l NaOH(1 ml)and ultra pure water (2ml)

Centrifuge at 1000g for ca. 3min

Supernatant (Organic layer)	4.5ml
Evaporate to dryness under N <sub>2</sub> gas	

MeOH	100μl
39 mM CH <sub>3</sub> COOCu(II)	20μl

Stand at room temperature for 1 h

1mg/ml DMB solution (50μl/ml β-mercaptoethanol, 50mg/ml Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )	100μl
---	-------

Warm at 60 for 40min

Apply onto HPLC(10μl)

HPLC conditions

Column:L-Column ODS(250X4.6mmi.d.;5μm)  
 Mobile phase:MeOH-CH<sub>3</sub>CN-0.5M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>(gradient elution)  
 Flow-rate:1.0ml/min  
 Fluorescence detection:Ex.350nm;Em.390nm

参考文献

1. M. Yamaguchi, J. Ishida, Z. Xuan - Xuan, M. Nakamura, T. Yoshitake, *J. Liquid Chromatogr.*, **17**, 203 (1994).
2. M. Yamaguchi, S. Hara, M. Nakamura, *J. Chromatogr.*, **221**, 163 (1989).
3. S. Inoue, M. Inokuma, T. Harada, Y. Shibutani, T. Yoshitake, B. Charles, J. Ishida, M. Yamaguchi, *J. Chromatogr. B*, **661**, 15 (1994).

# Topics on Chemistry

## 細胞膜の過酸化を見る試薬－DPPP

(株) 同仁化学研究所 佐々本 一美

我々の体は、長い進化の過程で酸素分子を積極的に取り入れることで、陸上生活に必要な大きなエネルギーを産みだすことができるようになった。同時に、酸素分子がもつ負の側面、すなわち「酸化性」の脅威に晒されている。生体はこの酸化ストレスを常に受けているが、その本体である（スーパーオキシドアニオン、ヒドロキシラジカル、過酸化水素などの）活性酸素種による生体分子の酸化的修飾は、各種の疾病や老化との関連で注目されている。例えば、核酸の酸化損傷の代表的なものは8-ヒドロキシグアニンであり、タンパク質ではカルボニルタンパクがそうである。核酸の障害は癌にむすびつき、また、タンパク質の場合は機能障害を引き起こし、さらには、アミロイドーシスのような疾病との関係も議論されている。

脂質は、これら核酸やタンパク質よりも酸化をうけ易く、ヒドロペルオキシド（LOOH、図1）や、さらに分解が進んだ二次生成物であるアルデヒド化合物などを生成する。それらはさらにタンパク質の求核部位と反応し複雑な修飾体が形成され、タンパク質の劣化を引き起こすことになる。特に、脂質過酸化の初期に多量に生成するヒドロペルオキシド類は、酸化ストレスマーカーとして近年関心を集めている。

脂質過酸化は細胞膜の構成成分であるリン脂質の不飽和脂肪酸部分に活性酸素が付加する反応であるが、良く知られた病態として、脂質部分が酸化されたLDLをマクロファージが取り込み、泡沫細胞化されることによって起こる動脈硬化がある。また臨床検査の分野では、生体内での活性酸素産生や臓器の酸素障害、防御機構の低下などの推測に用いられている（因みに、血清中の脂質過酸化物濃度は2.0～6.0 μmol/l）。

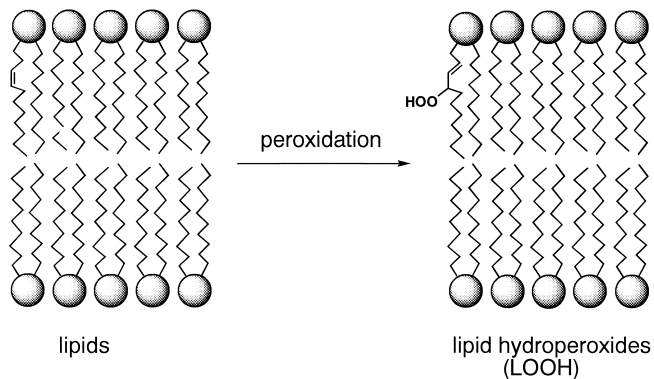


図1 リン脂質の過酸化反応

その簡便性から汎用されている脂質過酸化物測定法として、チオバルビツール酸（TBA）法<sup>1)</sup>があるが、この方法はヒドロペルオキシド類を測定するのではなく、その代表的な二次生成物であるマロンジアルデヒド（MDA）を主に測定している。試料はもちろん化学的な処理で破壊されるが、他の過酸化脂質由来の化合物とも反応するため、必ずしもヒドロペルオキシド類の定量法とは言えない。過酸化脂質の多様性や安定性の低さなどが、選択的な測定を難しくしている。

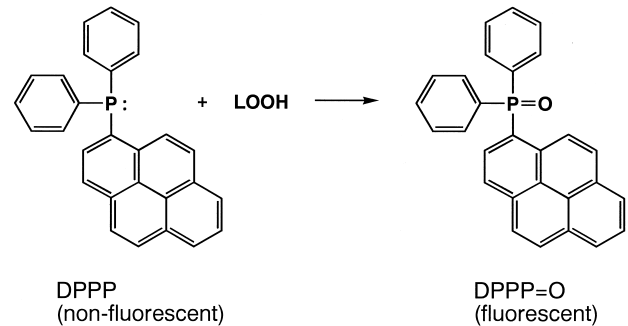


図2 DPPPと過酸化脂質との反応

DPPPはヒドロペルオキシド類と定量的に反応し、蛍光性の酸化物（DPPP=O、図2）を与えるため、これまで主としてHPLCポストカラム分析系に応用され、生体試料や食品中のヒドロペルオキシド類の高感度定量法として報告されている。<sup>2)</sup> 最近、沖本らはDPPPのマウス好中球（PMN）細胞膜の過酸化物の非破壊的な定量分析への応用を報告している。<sup>3)</sup> DPPPは細胞とインキュベーション（37℃、10分）することで容易に細胞に導入される。これに過酸化水素あるいはメチルリノレン酸ヒドロペルオキシド（MeLOOH）を加えたところ、濃度依存的に蛍光増強が見られた。過酸化水素と比較し、MeLOOHでは非常に大きな蛍光増強があり、導入されたDPPPが細胞膜にとどまり、膜中での濃度が高いMeLOOHと選択的に反応していることが確かめられた。さらに、蛍光顕微鏡下で細胞膜リン脂質の過酸化を可視化することができた。また、DPPPを導入した細胞をPMAで刺激後、時間をおいてDPPP=Oの蛍光が増強する様子も確認されている。

このようにDPPPは膜の過酸化のみを選択的に捕らえることができ、また、反応が化学量論的に進むため、定量性にも優れている。他の蛍光性プローブとしてフルオレッセイン系のDCFHやローダミン系のDHR 123があるが、これらはLOOHのみならず過酸化水素やパーオキシナイトライト（ONOO<sup>-</sup>）にも反応するなど、選択性に問題がある。また、細胞質内の過酸化を測定するためのもの（DHR 123はミトコンドリア集積性がある）主な過酸化の場である細胞膜を見ることができない。DPPPは生きた細胞の膜の過酸化を、直接蛍光シグナルとして捕えることができる唯一のプローブとして、今後の応用が期待される。

### 参考文献

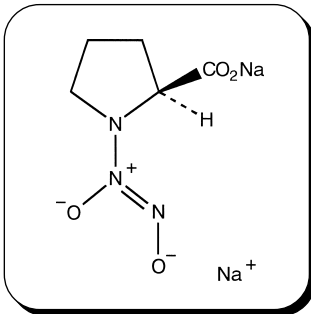
- 1) K. Yagi, *Methods Enzymol.*, **105**, 328 - 331 (1984).
- 2) K. Akasaka, T. Suzuki, H. Ohruai and H. Meguro, *Anal Lett.*, **20**, 731-745, 797-807 (1987).
- 3) Y. Okimoto, A. Watanabe, E. Niki, T. Yamashita and N. Noguchi, *FEBS Lett.*, **474**, 137-140 (2000).

品名	容量	価格(¥)	コード番号
DPPP	10mg	8,500	340-07471

## 新製品

### 新規 NO 発生剤

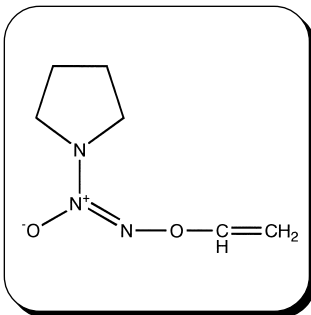
#### PROLI/NO



特長  
非常に短い半減期をもつ NO ドナーです。  
半減期  $t_{1/2} = 1.8 \text{ sec}$  (37 °C、pH7.4)<sup>1)</sup>

$C_5H_7N_3O_4Na_2=219.11$

#### V-PYRRO/NO



特長  
肝臓集積性の NO ドナーです。

$C_5H_{11}N_3O_2=157.17$

PROLI/NO 及び V-PYRRO/NO は L.K. Keefer らによって開発された NO ドナー (NONOate) です。

内皮細胞由来の血管弛緩因子として発見された NO は、種々の病態の発症や増悪因子、保護因子としての役割が明らかとなるに従い、病態の改善に内因性の NO の産生を制御するような手段が有効であると考えられています。しかし、NO はあらゆる組織で産生されており、その他の調節因子と共に生体防御機構に作用しているため、非特異的に NO 産生を上昇させたり阻害したりすることは生体の恒常性の維持を乱すおそれがあります。そのため、特定の細胞、組織にのみ作用する NO 発生剤や消去剤の開発が期待されています。今回紹介します PROLI/NO と V-PYRRO/NO は、その一部を担う効果が期待されます。

PROLI/NO はアミノ酸である L-Proline に NO 分子が 2 分子付加した形をとっており、その NO 放出速度は従来の NONOate あるいは NOC に比べて、半減期  $t_{1/2}=1.8 \text{ sec}$  (37 °C、pH7.4)<sup>1)</sup> と非常に短いのが特長です。そのため *in vivo* で投与した場合には、血流によって拡散する前に NO を放出させることができ、局所での NO による抗血小板凝集抑制作用、血管弛緩作用などを観察することが可能です。Keefer らは 4  $\mu\text{mol/l}$  の PROLI/NO をヘパリン処理しないヒトのポリエステル血管移植部直近の上流に与えると、通常に比べて移植表面での血栓形成が抑制されること、また誘導型の肺高血圧を持つヒツジの右心房に PROLI/NO を投与すると、全身の血圧には影響せずに、濃度依存的に肺血管を選択的に弛緩させて血圧を低下させることを報告しています<sup>1)</sup>。PROLI/NO はポリウレタンの

ような不溶性のポリマーに分散させることで長期間 NO を放出するようにさせることもできるとされており、また、放出された NO が仮にアミノ酸と反応してニトロソプロリンを形成した場合も、ニトロソプロリンに発癌性は無いことが報告されています<sup>1)</sup>。PROLI/NO の NO 放出は、NOC と同様 pH 依存的に起こり、pH が低くなるほど速く逆に高くなるほど安定となります。中性付近においても非常に短い半減期をもつために、生体内において非特異的な部分での血管弛緩を起こす心配がありません。全身血圧に影響を与えずに局所的に NO の作用を見ることができると、実験動物の血管平滑筋細胞や<sup>3)</sup>、肺静脈<sup>2)</sup>、頸動脈<sup>4)</sup>などの組織に投与し、肺高血圧<sup>2)</sup>、クモ膜下出血に關与する大脳血管攣縮における<sup>4)</sup>NO の薬理効果を見るなど、実験動物を用いた系での研究が報告されています。今後はさらに様々な病態の解明および改善への応用が期待されます。

V-PYRRO/NO は Pyrrolidine に 2 分子の NO が付加した NONOate ですが、通常 NONOate のジアゼニウムジオレート部分にビニル基を導入して安定性を高めています。このため通常の緩衝液中では安定ですが、肝細胞のシトクローム P450 でビニル基が代謝分解されて Pyrrolidine/NO となって初めて NO 放出性となるため、肝臓集積性の NO ドナーであることが報告されています。代謝後の Pyrrolidine/NO になった際の半減期は  $t_{1/2}=3 \text{ sec}$  (37 °C、pH7.4) です。<sup>6)</sup>

Keefer らは、V-PYRRO/NO をラットの肝細胞と 6 時間インキュベートすると 1 mmol/l の V-PYRRO/NO からは 40  $\mu\text{mol/l}$  の NO が、0.1 mmol/l からは 12.5  $\mu\text{mol/l}$  の NO が放出されることを NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> レベルの増大として観察しています。ラットを用いた *in vivo* の実験では、V-PYRRO/NO は肝臓の cGMP レベルを亢進し、TNF $\alpha$  とガラクトサミンの投与によるアポトーシスと肝毒性に対して保護的に作用したことが明らかとなっています<sup>6)</sup>。従って V-PYRRO/NO は肝臓集積性の NO ドナーであり、これらの結果はこの NONOate が *in vivo* での NO 輸送に応用でき、劇症肝炎のような肝臓機能不全の治療に利用できる可能性を示唆しています。

#### 参考文献

- 1) Joseph E. Saavedra, Garry J. Southan, Keith M. Davies, Anders Lundell, Chris Markou, Stephen R. Hanson, Christophe Adrie, William E. Hurford, Warren M. Zapol, Larry K. Keefer, *J. Med. Chem.*, **39**, 4361(1996).
- 2) Adric C, Hirani WM, Holzmann A, Keefer L, Zapol WM, Hurford WE, *Anesthesiology*, **88**(1), 190(1998).
- 3) Chen C, Hanson SR, Keefer LK, Saavedra JE, Davies KM, Hutsell TC, Hughes JD, Ku DN, Lumsden AB, *J. Surg. Res.*, **67**(1), 26(1997).
- 4) Pluta RM, Oldfield EH, Boock RJ, *J. Neurosurg.*, **87**(5), 746(1997).
- 5) Champion HC, Bivalacque TJ, Wang R, Kadowitz PJ, Keefer LK, Saavedra JE, Hrabie JA, Doherty PC, Hellstrom WJ, *J. Urol.*, **161**(6), 2013(1999).
- 6) Joseph E. Saavedra, Timothy R. Billiar, Debra L. Williams, Young-Myeong Kim, Simon C. Watkins, Larry K. Keefer, *J. Med. Chem.*, **40**(13), 1947(1997).

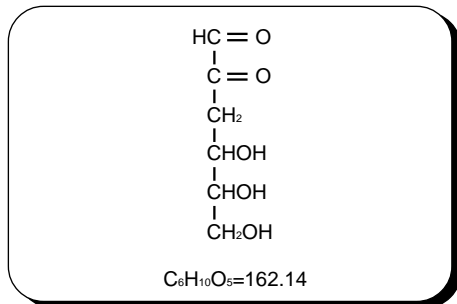
品名	容量	価格( ¥ )
PROLI/NO	10mg	9,200
V-PYRRO/NO	10mg	18,000



## 新製品

### 蛋白質糖化研究物質

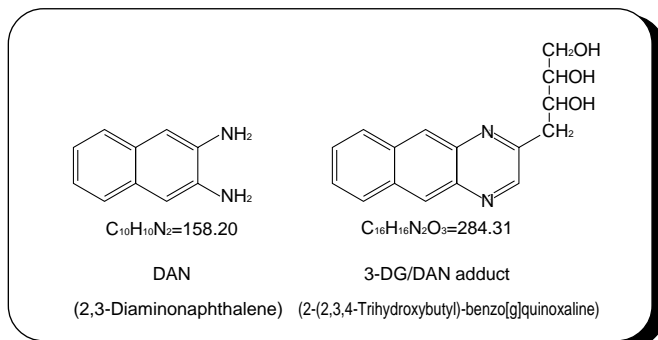
#### 3-Deoxyglucosone



#### 特長

生体由来のジカルボニル化合物。  
定量分析の標準あるいは AGE 生成の前駆体として使用。

#### 3-Deoxyglucosone Detection Reagents



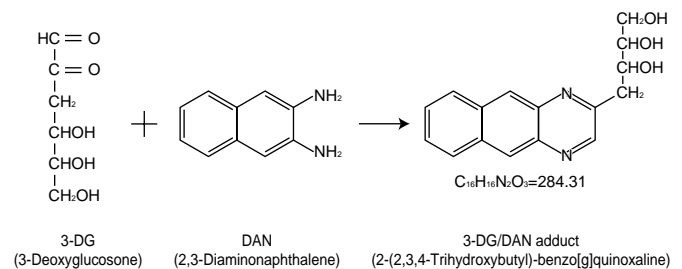
#### 特長

生体内に存在する 3-Deoxyglucosone の高感度定量が可能。検量線作成用として 3-Deoxyglucosone と DAN の蛍光性付加体と DAN を組み合わせてあります。

糖尿病合併症の成因の一つとして蛋白質糖化反応の後期生成物である AGE (Advanced Glycation End Products) が注目されています。AGE は蛋白質のアミノ基と還元糖のアルデヒド基が反応して、シッフ塩基、アマドリ転位生成物 (前期生成物) を経由して、脱水、酸化、縮合などの反応を経て得られる後期生成物です。この過程においてアマドリ生成物から生じる 3-Deoxyglucosone (3-DG) は、グルコース由来の反応活性の高いジカルボニル化合物であり、さらに蛋白と反応することでピラリン<sup>1,2)</sup>、ペントシジン<sup>3,4)</sup>、ピロピリジン<sup>5)</sup>、イミダゾロン<sup>6)</sup> といった AGE を生じるため、AGE の前駆体として重要な位置を占めています<sup>7,8)</sup>。また蛋白と糖との反応物であるアマドリ生成物を経るルート<sup>9)</sup> 以外にもフルクトースの自己酸化によっても生じ、この場合蛋白質は必要としません。フルクトースは糖尿病で亢進しているポリオール経路の最終産物であり、また糖尿病ラットの水晶体にフルクトース-3-リン

酸が存在しこれがレンズ蛋白の架橋形成を促進するという報告もあり<sup>10)</sup>、フルクトース-3-リン酸経由の 3-Deoxyglucosone の生成が白内障など合併症の成因を考える上で興味深く、近年その生体内存在と病態との関連が研究されています。

生体内 3-Deoxyglucosone の検出法は現在、HPLC による方法<sup>11,12)</sup> と MS による方法<sup>13-17)</sup> が用いられています。特に HPLC 法は 3-Deoxyglucosone の反応性を利用して DAN を用いて反応させ生じた蛍光付加体を検出する方法が知られています。



ヒト血漿での検出例としては例えば 1ml の血漿を 60% 過塩素酸添加後に 4 で 3000g, 20min の遠心で除蛋白した後上清を bicarbonate 緩衝液で中和、0.1% DAN のメタノール溶液 0.1ml 及び内部標準として 1ppm 3,4-hexanedione メタノール溶液 0.025ml を加えて、4 で一夜インキュベーションします。反応物を 4ml の酢酸エチルで抽出、濃縮した後、50% メタノール溶液として逆相 HPLC で 268nm の紫外吸収あるいは  $\lambda_{\text{ex/em}}=271/503\text{nm}$  の蛍光で分析します。糖尿病患者では  $31.8 \pm 11.3 \text{ ng/ml}$  と健康人  $12.8 \pm 5.2 \text{ ng/ml}$  に比べて顕著に高値を示し、さらに血漿 3-Deoxyglucosone レベルは血漿グルコース及び HbA<sub>1c</sub> のレベルと良い相関を示すことが報告されています<sup>12)</sup>。

ラット血漿の場合も同様の方法で測定されており、宮田らは糖尿病モデルで 918nmol/l、コントロールで 379nmol/l と糖尿病で高値を示していたものが、蛋白質糖化反応を阻害するアミノグアニジンを投与する (50mg/kg/day) と、3 週間後の血漿 3-Deoxyglucosone 値は 695nmol/l と増加が抑制されていたと報告しています。3-Deoxyglucosone はアミノ基と速やかに反応するため、この例ではアミノグアニジンが 3-Deoxyglucosone を消去した結果と考えられ、蛋白質糖化反応阻害薬の作用点としての可能性が示唆されています<sup>11)</sup>。このように 3-Deoxyglucosone は糖尿病によって有意に増加しており、さらに丹羽らは尿毒症患者で有意に高く、糖尿病を合併した場合にはさらに高値であることを報告しています<sup>18)</sup>。これらは糖尿病以外の疾患にも 3-Deoxyglucosone が関わっている可能性が考えられます。また培養細胞系では DNA 合成阻害を介して細胞増殖を抑制するという報告<sup>19)</sup> もあり生体内での作用については未知な部分が多く残っています。

## 新製品

### 細胞染色用色素(-Cellstain-)

生体内での3-Deoxyglucosoneの濃度については、HPLCかMSかといった測定方法によって幾分異なった結果が報告されており、今後更なる研究の進展が期待されます。

HPLCを用いた3-Deoxyglucosoneの検出ではDANの他、1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzene(DDB)<sup>20)</sup>、2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzene(MDB,DMB)<sup>21)</sup>も応用できます。また、生体内には3-Deoxyglucosone以外にもグリオキサール、メチルグリオキサールといった同様の反応活性の高いジカルボニル化合物がグルコースの自己酸化によって生じ、これらも3-Deoxyglucosoneと並んでAGE生成に関与しています<sup>20)</sup>。

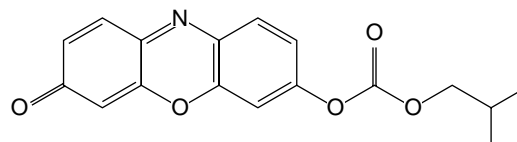
今回発売します3-Deoxyglucosoneは、血漿、血清中の3-Deoxyglucosoneの検出定量における標準物質、AGE生成モデル実験に使用することができます。また、3-Deoxyglucosone検出の定量標準として、3-DeoxyglucosoneとDANの蛍光性付加体である2-(2,3,4-Trihydroxybutyl)-benzo[g]quinoxalineはHPLC分析における標準物質として定量に使用できます。

なお、3-Deoxyglucosoneの開発にあたっては、明治大学農学部早瀬文孝教授のご指導をいただきました。

#### 参考文献

- 1) F. Hayase et al., *J. Biol. Chem.*, **264**, 3758(1989).
- 2) S. Miyata et al., *J. Clin. Invest.*, **89**, 1102(1992).
- 3) S. Taneda et al., *Clin. Chem.*, **40**, 1766(1994).
- 4) D. G. Dyer et al., *J. Biol. Chem.*, **266**, 11654(1991).
- 5) F. Hayase et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 1936(1994).
- 6) F. Hayase et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1407(1995).
- 7) T. Niwa et al., *J. Chromatogr. B*, **731**, 23(1999).
- 8) 宮田哲、蛋白糖化反応マーカーとしての3-DG、「蛋白の糖化」(繁田幸男、谷口直之編) p.57, 医学書院(1997)
- 9) D. V. Zyzak et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **316**,547(1995).
- 10) B. S. Szwegold et al., *Science*, **247**, 451(1990).
- 11) H. Yamada et al., *J. Biol. Chem.*, **269**(32), 20275(1994).
- 12) Y. Hamada et al., *Diabetes Care*, **20**, 1466(1997).
- 13) T. Niwa et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **196**, 837(1993).
- 14) K. J. Knecht et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **294**, 130(1992).
- 15) T. Niwa et al., *Kidney Int.*, **51**, 187(1997).
- 16) S. Lal et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **342**, 254(1997).
- 17) T. Niwa et al., *Kidney Int.*, **49**, 861(1996).
- 18) T. Niwa et al., *Nephron*, **69**, 438(1995).
- 19) T. Shinoda et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 2215(1994).
- 20) P. J. Thornalley et al., *Biochem. J.*, **344**(pt.1), 109(1999).
- 21) E. Fujii et al., *J. Chromatogr. B*, **660**, 265(1994).

#### -Cellstain- CytoRed solution

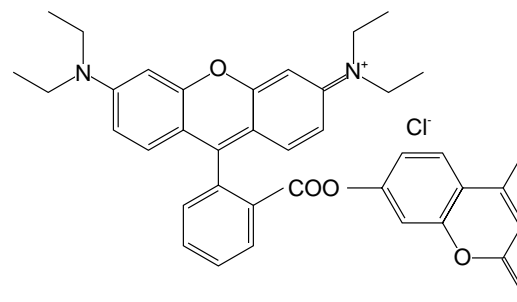


C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub>=313.30

#### 特長

生細胞を赤色蛍光に染色します。

#### -Cellstain- MitoRed



C<sub>38</sub>H<sub>37</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>=637.16

#### 特長

ミトコンドリアを選択的に染色します。

低濃度(20nmol/l)で染色可能です。

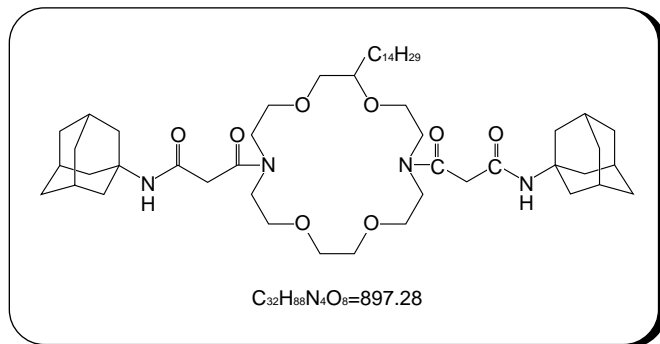
細胞染色剤として2つの化合物を開発しました。-Cellstain- CytoRedはCalcein-AM同様細胞内エステラーゼの基質となります。生細胞内に取り込まれたのち加水分解され赤色蛍光物質のresorufinに変化することにより生細胞を赤色に染色することが出来ます。一方、-Cellstain- MitoRedはrhodamineを基本骨格とする色素で細胞に取り込まれたのち、ミトコンドリアに集積する特長があります。Mitotrackerよりも高感度で、終濃度20 nmol/lの低濃度で感度良くミトコンドリアのみを赤色蛍光に染色することが出来ます。

品名	容量	価格(¥)
3-Deoxyglucosone	10mg	14,000
3-Deoxyglucosone Detection Reagents set		18,500

品名	容量	価格(¥)
-Cellstain- CytoRed solution	1ml	9,800
-Cellstain- MitoRed (DMSO(1ml)添付)	50µg×8	11,000

## 新製品

## C14-K22B5



4,13-Bis[N-(1-adamantyl)carbamoylacetyl]-8-tetradecyl-1,7,10,16-tetraoxa-4,13-diazacyclooctadecane

## 特長

マグネシウムイオン選択性が高い (logK = -2.5)  
脂溶性が高く、膜の安定性が高い (logP<sub>TLC</sub> = 10.0)

これまで diaza-18-crown-6 を基本骨格とするマグネシウムイオンフォアが開発されており、その中でも側鎖にβジケトン構造とかさ高いアダマンチル基を有するK22B5が高いマグネシウム選択性を示すことが報告されています。しかしながら、この化合物の脂溶性は低く (logP<sub>TLC</sub>=3.0)、マグネシウムイオン選択性電極膜としての耐久性に問題がありました。

ここに紹介する新規マグネシウムイオンフォア、C14-K22B5は、diaza-18-crown-6 骨格に長鎖アルキル基として tetradecyl 基を導入したもので、そのため分子全体の脂溶性が増大し (logP<sub>TLC</sub>=10.0) したがって電極膜の耐久性を大幅に向上することが可能となりました。

電極膜組成としてイオンフォア 3wt%、可塑剤として NPOE を 67wt%、PVC を 30wt% とし、アニオン排除剤として K-TCPB をイオンフォアに対して 90 ~ 120mol% 加えた膜を作成しそのマグネシウムイオン選択性電極としての選択性を検討した結果を Fig に示します。C14-K22B5 はこれまで開発されたマグネシウムイオンフォアの中で最も高いマグネシウムイオン選択性を示し、電位応答曲線は 10<sup>-5</sup> ~ 10<sup>-1</sup>M のマグネシウム濃度範囲で良好な直線性を示しました。K-TCPB の添加量の最適化を行ったところ、イオンフォアに対して 115mol% 加えた時に最も良好なマグネシウム選択性を示しました。環境分析などの今後の応用が期待されます。

## 参考文献

- 1) K. Suzuki, K. Watanabe, Y. Matsumoto, M. Kobayashi, S. Sato, D. Siswanta, H. Hisamoto, *Anal. Chem.*, **67**, 324 (1995).
- 2) 小澤 寛、池田貴文、川崎直哉、佐々木真一、ダニエルツッテリオ、山本憲子、鈴木孝治、日本化学会第 78 春季年会予稿集、1C231(2000).

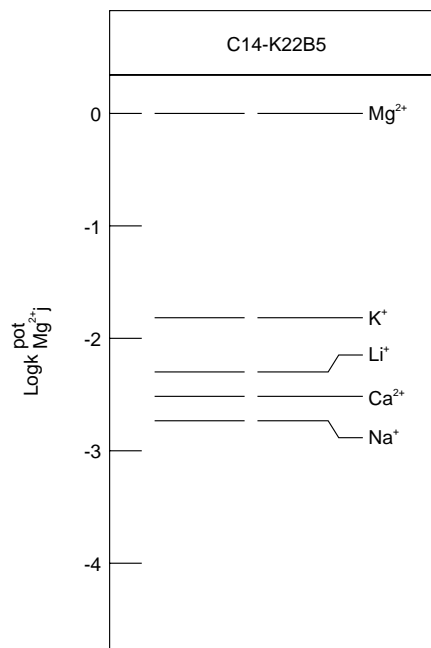


Fig. C14-K22B5 の金属イオン選択係数

品名	容量	価格(¥)
C14-K22B5	10mg	22,000

## 出版物のご案内

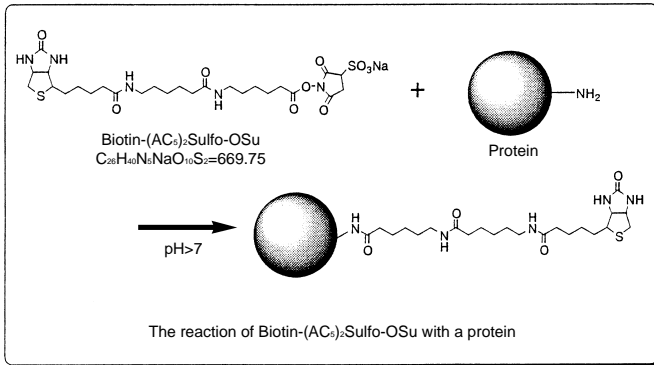


最近の10年間で飛躍的に研究が進み、生体内での働きがかなり解明されてきた一酸化窒素 (NO)。この NO に関して、吉村哲彦先生を編者に日本国内の著名な研究者の方々が執筆された実験プロトコール集が発売されました。現在 NO に関する研究を進められている方、これから始めようとしていらっしゃる方にぴったりの一冊です。

「生体内一酸化窒素 (NO) 実験プロトコール」  
吉村哲彦 編集 B5 判 304 頁、6,500 円 (本体)  
共立出版株式会社  
〒112-8700 東京都文京区小日向 4-6-19  
TEL 03-3947-2513 FAX 03-3947-2539  
<http://www.kyoritsu-pub.co.jp>

新製品

Biotinylation Kit (Sulfo-OSu, Designed for use with BIACORE® instrument systems)



特長

- ・このキットだけで、タンパク質のビオチンラベル化と精製だけでなく、SPR 測定が可能です。
- ・1ショットタイプ (10mg × 4 vials) なので、それぞれ異なる4種類のタンパク質ラベル化が可能です。
- ・ビオチンラベル化剤であるBiotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub> Sulfo-OSuの秤量等の手間がかかりません。
- ・用時調製タイプなので、開封を繰り返すことによるビオチンラベル化剤の劣化がありません。
- ・水溶性のビオチンラベル化剤のため、DMF や DMSO などの有機溶媒を使用する必要がありません。
- ・ビオチンラベル化剤添加量を変えることで、ラベル化率のコントロールが可能です。
- ・ビオチンラベル化剤 1 vial 当り、1 ~ 5mg までのタンパク質のラベル化と精製が可能です。

アビジン - ビオチン複合体を用いたシステムは、EIA(エンザイム免疫アッセイ)などの免疫学的測定や組織染色の分野で広く利用されています。ビオチンはタンパク質、抗体、酵素の活性を消失することなく標識することが可能であり、アビジンはビオチンに対して強い親和性 ( $K_D \sim 10^{15}$ l/mol) をもっています。ビオチンは、それ自身に化学修飾を施すことにより、タンパク質の各種の官能基に結合させることが可能です。

Biotinylation Kit ( Sulfo-OSu )に用いたビオチン化試薬 : Biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub> Sulfo-OSuは、タンパク質の遊離のアミノ基(リジンの - アミノ基など) と結合する水溶性の活性エステルタイプ (Sulfosuccinimidyl biotins) であり、長いスパーサーをもっています。

キットには、タンパク質のビオチンラベル化用として、1ショットタイプのBiotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub> Sulfo-OSu( 10mg ) ラベル化用NaHCO<sub>3</sub> 緩衝液用粉末、ゲルろ過カラムを入れております。またSPR測定用として、ランニングバッファー 1 パック、再生用バッファーとして、pH 1.5 ~ 3.0 の Glycine 緩衝液、センサーチップ洗浄用 NaOH 溶液も同梱しております。

タンパク質のビオチンラベル化の操作方法

- 1) 純水で NaHCO<sub>3</sub> 緩衝液用粉末を溶解する。
- 2) サンプルチューブに、タンパク質を精秤する。
- 3) 2)に 1)を添加し、ボルテックス等を用いて攪拌溶解する。
- 4) Biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub> Sulfo-OSu チューブに、タンパク質の種類に合わせて、純水 を入れて溶解する。(表 1 参照)
- 5) 溶解後すぐに、4)を表 1 に従い、3)に添加する。
- 6) よく混和し、25 °C で 2 時間恒温槽中で反応させる。
- 7) ゲルろ過カラムで、タンパク質の精製を行う

表1 ラベル化剤添加量とラベル化率

タンパク質	タンパク量 (mg/500μl)	ラベル化剤		ラベル化率** (mol/mol)
		純水添加量 (μl)	添加量* (μl)	
rProtein A MW=42KDa	5	355	5.7	1.8
	2.5	355	2.9	1.5
	1.25	355	1.4	1.8
BSA MW=68KDa	5	567	5.7	1.5
	2.5	567	2.9	1.6
	1.25	567	1.4	1.2
IgG MW=150KDa	5	1218	5.7	1.7
	2.5	1218	2.9	1.4
	1.25	1218	1.4	1.5

\* )タンパク質をラベル化する際に添加したラベル化剤水溶液の量。  
\*\* )タンパク質 1 分子当りに結合したビオチンの個数。

ビオチン化されたタンパク質の最終濃度は、タンパク質の秤量量を X g、タンパク質を溶解させた NaHCO<sub>3</sub> 溶液の量を Y ml、タンパク質の分子量 MW、ゲルろ過カラム操作によりタンパク質濃度は0.50mlロードして1.0ml流出することとなり1/2に希釈されることを考慮にいれると、下記の式より算出されます。

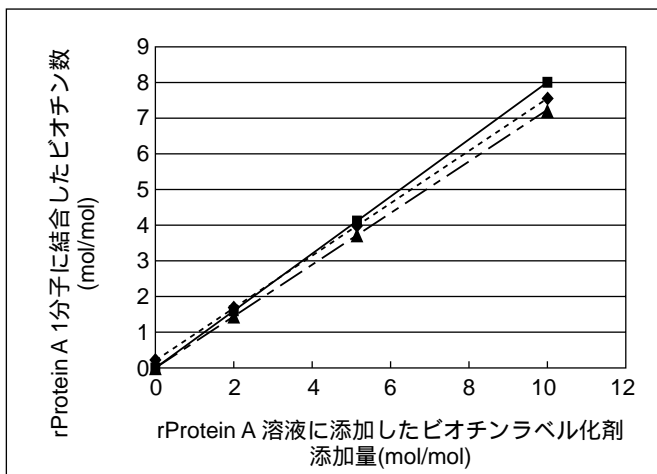
$$A \text{ (mol/l)} = ( X \text{ g} / MW_{\text{Protein}} ) \times ( 1000 \text{ ml} / Y \text{ ml} ) \times 0.5$$

( A:タンパク質の最終濃度 )

SPR 装置での測定及びセンサーチップの洗浄  
SPR 装置での測定方法及びセンサーチップの洗浄については、Biacore 社の操作マニュアルをご参照ください。

<HABA 法によるタンパクのビオチン化率の算出>

タンパク質にどのくらいのビオチンがラベル化されたかを調べる手段として、HABA(4-Hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid)を用いた算出方法が知られています。測定原理は、HABA-アビジン溶液にビオチンを添加することで、HABAよりもビオチンの方がアビジンに対して高い親和性をもつため、HABAに代わってビオチンがアビジンと吸着します。その時の500nmの吸光度の減少からビオチンラベル化率を算出する方法です。



rProtein A (和光純薬 免疫化学用 161-13051)を用いたビオチン添加量に対するラベル化率

:rProtein A 5mg (120 $\mu$ mol) :rProtein A 2.5mg (60 $\mu$ mol)

:rProtein A 1.25mg (30 $\mu$ mol)を500 $\mu$ l NaHCO<sub>3</sub>溶液に溶解し、ビオチンラベル化した後、ゲルろ過処理した。溶出液を4倍に希釈しAvidin-HABA法によりラベル化率を測定した。表1にビオチンラベル化剤を溶解する際に加えた純水量を示した。

測定方法

- 1) サンプルチューブにHABAを精秤し、DMSOで溶解する。
- 2) メスフラスコにAvidinを精秤し、PBSを入れ溶解する。これに1)を加え、PBSでメスアップしてよく混和する。
- 3) ミクロセルに、2)を入れ、500 nmの吸光度を3回測定し、平均値をAbs Aとする。
- 4) サンプルチューブに入れた2)にビオチン化したタンパク溶液を添加し、攪拌する。5分以上静置し、セルに移し変え500 nmの値を読み、Abs Bとする。タンパク濃度が高い場合、正確なビオチン数が算出できなくなるので溶液を希釈(希釈倍率:Z)してから、HABA-アビジン溶液に添加してラベル化率を算出する。

$$B \text{ (mol/l)} = [10^4 \times (0.9 \times \text{Abs A} - \text{Abs B}) / 34] \times 10^{-6}$$

(B:サンプル中のビオチン濃度)

$$(B / A) \times Z = \text{タンパク1分子に結合したビオチンの数 (mol/mol)}$$

キット内容

- Biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub> Sulfo-OSu 10mg × 4 vials
- NaHCO<sub>3</sub> 緩衝液用粉末 4 本  
(ボトル中のNaHCO<sub>3</sub>粉末に10mlの純水を添加・溶解することで、50mmol/lの緩衝液が調製できます。)
- ゲルろ過用カラム 4 本
- ランニングバッファー (HBS-N) 200ml × 1 パック
- Glycine 緩衝液 (pH 1.5 ~ 3.0) 2ml × 各 1 本
- NaOH 溶液 2ml × 1 本
- サンプルチューブ 12 本

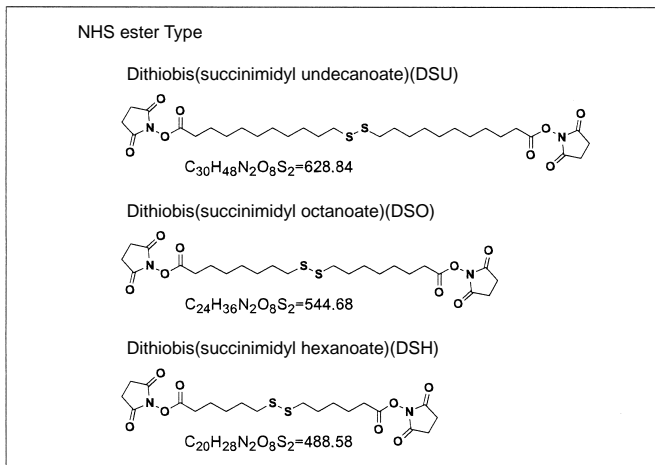
参考文献

- 1) J. Wormmeester, F. Stiekema and C. Groot, *Methods Enzymol.*, **184**, 314(1990).
- 2) J. J. Leary, D. J. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4045(1983).
- 3) W. T. Lee, D. H. Conrad, *J. Exp. Med.*, **159**, 1790(1984).
- 4) D. R. Gretch, M. Suter, M. F. Stinski, *Anal. Biochem.*, **163**, 270(1987).
- 5) M. Shimkus, J. Levy, T. Herman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2593(1985).
- 6) W. J. LaRochelle, S. C. Froehner, *J. Immunol. Methods*, **92**, 65(1986).
- 7) P. S. R. Anjaneyulu, J. V. Staros, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **30**, 117(1987).
- 8) H. M. Ingalls, C. M. Goodloe-Holland, E. J. Luna, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4779(1986).
- 9) J. Guesdon, T. Ternyck, S. Avrameas, *J. Histochem. Cytochem.*, **27**, 1131(1979).

品名	容量	価格(¥)
Biotinylation Kit(Sulfo-Osu, Designed for use with BIACORE® instrument systems)	set	38,000

新製品

Self Assembled Monolayers(SAMs)研究用試薬



特長

- 自己組織化単分子膜(SAM)を形成する試薬であり、SAMに様々な分子認識サイトを導入する際に有用です。
- 活性エステル型の試薬であり、アミノ基と反応し、アミド結合を形成します。
- すでに活性エステル化してあるため、末端部分を変換する必要がありません。

近年、チオール化合物やジスルフィド化合物を金表面に吸着させ、自己組織化単分子膜(Self-Assembled Monolayer:SAM)を形成する方法は、高度な配向性を持った単分子膜を容易に作成できるため、金修飾電極、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance:SPR)や水晶発振子マイクロバランス(Quartz Crystal Microbalance:QCM)等へ盛んに利用されています。いずれの手法においても、基板上に金を蒸着し、これにチオールあるいはジスルフィドで膜を作り、その末端でプローブ分子を固定します。金修飾電極では電流変化、SPRでは反射角、QCMでは水晶発振子の振動数を検出することにより、目的とする基質との相互作用を調べることができます。

カルボキシル基を有するチオール化合物<sup>1)</sup>やジスルフィド化合物<sup>2)</sup>は、種々のペプチドやタンパク質及び低分子化合物を金基板上に固定する際に利用されています。その際には、まず、チオールやジスルフィドでSAMを形成し、活性エステル化させた後、ペプチドなどを反応させて固定するのが一般的でした。

今回発売するNHSタイプジスルフィドは、すでに末端がNHS活性エステルとなっているため、直接、様々な有機分子のアミノ基とアミド結合を形成することができます。したがって、SAM形成後、ペプチドなどを添加するだけでそれらを固定することができ、従来のような他段階の反応を行なう必要がありません。

E.DelamarchらはNHS活性エステル基を有するジスルフィド化合物を用いて金基板上にSAMを形成させた後、ベンゾフェノン誘導体と反応させ、光反応性のSAMを作成しています。さらに、この光反応性のSAMを抗体の光固定に用いています。<sup>3)</sup>今後、これらの化合物のさらなる相互作用解析への利用が期待されます。

表1に種々の溶媒に対する溶解性を示していますので、SAMを形成する際にご利用下さい。

注意事項

- 水分により劣化しますので、取扱い及び保管の際は吸湿を避けてください。
- 溶媒中の水で分解する恐れがありますので、脱水した溶媒を使用してください。
- アルコール類やアミン類などのプロトン性溶媒とは、反応する恐れがありますので、使用しないで下さい。

参考文献

1)Dojin News, 90, 16 (1999).  
 2)Dojin News, 95, 20 (2000)  
 3)E. Delamarche, G. Sundarabaru, H. Biebuyck, B. Michel, Ch. Gerber, H. Sigrist, H. Wolf, H. Ringsdorf, N. Xanthopoulos, H. J. Mathieu, Langmuir, 12, 1997 (1996).

品名	容量	価格( ¥ )
Dithiobis(succinimidyl undecanoate)	10mg	13,200
	50mg	39,800
Dithiobis(succinimidyl octanoate)	10mg	13,200
	50mg	39,800
Dithiobis(succinimidyl hexanoate)	10mg	13,200
	50mg	39,800

表1 溶解性データ

	CHCl <sub>3</sub>				CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>				THF				CH <sub>3</sub> CN			
	10mmol/l	1mmol/l	100μmol/l	10μmol/l	10mmol/l	1mmol/l	100μmol/l	10μmol/l	10mmol/l	1mmol/l	100μmol/l	10μmol/l	10mmol/l	1mmol/l	100μmol/l	10μmol/l
10-CDD	×				×				×				×			
7-CHD																
5-CPD																
DDA					×								×			
DSU																
DSO																
DSH																

	AcOEt				Hexane				DMSO				DMF			
	10mmol/l	1mmol/l	100μmol/l	10μmol/l	10mmol/l	1mmol/l	100μmol/l	10μmol/l	10mmol/l	1mmol/l	100μmol/l	10μmol/l	10mmol/l	1mmol/l	100μmol/l	10μmol/l
10-CDD	×				×	×	×	×								
7-CHD					×	×	×	×								
5-CPD					×	×	×	×								
DDA					×	×	×	×								
DSU					×	×	×	×								
DSO					×	×	×	×								
DSH					×	×	×	×								

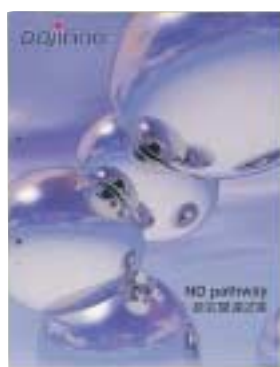
:溶解 :難溶 ×:不溶

10-CDD:10-Carboxydecyl disulfide

7-CHD:7-Carboxyheptyl disulfide

5-CPD:5-Carboxypentyl disulfide

DDA:4,4'-Dithiodibutyric acid



### パンフレット完成ご案内

No pathway, タンパク質定量キット、分子生物学関連試薬 Cell Biology に関する説明をパンフレットとしてまとめました。ご希望の方は弊社マーケティング部までご依頼下さい。

## 11th フォーラム・イン・ドージン 自然免疫の分子基盤

場所/熊本県立劇場 大会議室(熊本市大江2丁目7番1号) 参加費/無料  
 日時/平成12年11月24日(金)9:40~18:00 定員/180名  
 オーガナイザー/岩永貞昭(九州大学名誉教授)  
 川畑俊一郎(九州大学大学院理学研究院)  
 牟田達史(九州大学大学院医学研究院)

### < 特別講演 >

改正恒康(大阪大学微生物病研究所)  
 「自然免疫にかかわる Toll-like receptors とそのシグナル伝達」

倉田祥一郎(東北大学大学院薬学研究科)  
 「昆虫の自然免疫を制御するシグナル伝達カスケード」

川畑俊一郎(九州大学大学院理学研究院)  
 「カプトガニの自然免疫関連因子による異物認識」

前田 浩(熊本大学医学部)  
 「内因性に生ずる S - ニトロソ -1- プロテアーゼインヒビターの多面的生体防御作用」

藤田禎三(福島県立医科大学)  
 「フィコリンによる補体レクチン経路の活性化」

野中 勝(東京大学大学院理学系研究科)  
 「補体系の進化、自然免疫から獲得免疫へ」

赤司祥子(佐賀医科大学)  
 「Toll ファミリーレセプターと会合する MD タンパクによるエンドトキシン認識機構」

泥谷直樹(大分医科大学)  
 「Innate immunity および組織障害における CD14 の意義」

協賛: 株式会社ケミカル同仁

お申込先: 11th フォーラム・イン・ドージン事務局(担当: 斉藤素子、石田和彦)  
 〒861-2202 熊本県上益城郡益城町田原 2025 - 5 株式会社同仁化学研究所内  
 TEL:0120-489-548(フリーダイヤル) FAX:0120-021-557  
 e-mail: motoko@dojindo.co.jp 若しくは ishida@dojindo.co.jp

参加ご希望の方は、所属・氏名・連絡先(住所 TEL FAX e-mail)・ミキサー(20時終了)参加の有無を御記入の上、e-mail、FAX またはハガキでお申し込みください。

ホームページアドレス  
 URL: [http:// www. dojindo.co.jp/](http://www.dojindo.co.jp/)  
 E-mail: [info@dojindo.co.jp](mailto:info@dojindo.co.jp)

フリーファックス 0120-021557  
 フリーダイヤル 0120-489548