



Amyloid -Protein Immunohistostain Kit (A 40, A 42 specific) 免疫組織染色用

特長

1. C 末端特異抗体によりアルツハイマー病脳組織に沈着するアミロイド β - プロテイン(1-40) 及びアミロイド β - プロテイン(1-42) のそれぞれを特異的に染色します。
2. 高感度に染色できます。

内容

- 1) 抗アミロイド β - プロテイン(1-40) , モノクローナル抗体(クローン No. : BA27) 7ml \times 1
- 2) 抗アミロイド β - プロテイン(1-42) , モノクローナル抗体(クローン No. : BC05) 7ml \times 1
- 3) ABC 溶液 (ストレプトアビジン- ビオチン- ペルオキシダーゼ複合体溶液) 10ml \times 1
- 4) 抗マウス IgG(H+L) , ヤギ , ビオチン結合 10ml \times 1
- 5) ブロッキング用血清 10ml \times 1
- 6) ぎ酸 (90%) 15ml \times 1
- 7) トリプシン , 結晶 100mg \times 1

299-56701	50 回用	90,000 円
-----------	-------	----------

キットの性能につきましては、p.8 をご参照下さい。

目次

百年前の化学
「1901年の化学を顧みて」 芝 哲夫2

総説
「 β アミロイド：C末端特異抗体が明らかにしたこと」 岩坪 威6
「ポリ(ADP-リボース)代謝の生理的役割」 丸田 英晴12
「キラル化合物の絶対配置決定試薬としての亜鉛ポルフィリン二量体」 Victor Borovkov、井上 佳久31

シリーズ
< Talking of LAL >
「第42話 エンドキシンの糖鎖」 土谷 正和25
< How to 組織イメージング >
「第2回 骨・軟骨系病変2」 石川喜美男、三瓶 接子、宮 哲正、久川 芳三、牛込新一郎20
< 脳科学ーロメモ >
「GDNFファミリーとニューロトロフィンファミリーの相互作用」 松岡 一郎10
テクニカルレポート
「Fast LCにおける検出器のレスポンスの影響」 福本 昌巳28

新製品フラッシュ
アミロイド β - プロテイン免疫組織染色キット ...1.8
PTP、フルオロスパーク™ PTP アッセイキット ...5
W-5 塩酸塩、W-7 塩酸塩11
オステオゲニック成長ペプチド、ペプチドグリカン ...15
PIERCE 社 Restore™ ウェスタンプロットストリッピングバッファー 他16
高効率ハイブリダイゼーション溶液、プロテイン G 他17
(株)シバヤギ レビス® IgE-ELISA キット ...18
Genzyme TECHNE 社 ヒト AN' ALYZA 化学発光イムノアッセイキットシリーズ19
脱灰液、脱灰中和液22
オステオレジン™ 包埋キット、カルノア液23
ベンゾジアゼピン系化合物、バシトラシン亜鉛、エンドセリン24
EGFレセプター溶液、ZAP-70、ヒト、組換え体、溶液、硫酸転移酵素、ヒト、組換え体、サイトゾル抽出液26
0.347mol/l クロム酸カリウム溶液、0.347mol/l チオ硫酸ナトリウム溶液、テアフラビン27
t-ブチルメチルエーテル 300、2000、Trikonex AB 社 クロマトフラッシュチューブ29
プレセップ® けいそう土、顆粒状30
亜鉛ポルフィリン二量体33
脱水溶媒34
PARP ウェスタンプロットキットワコー36

1901年の化学を顧みて

大阪大学名誉教授 芝 哲夫

放射性エネルギーが測定される

Pierre Curie(1859-1906)がラジウムから放射される放射線の熱量を測定し、1グラムあたり、1時間に140カロリーであることがわかった。これは燃焼や爆発などの通常の化学変化で放出されるエネルギーに比較してはるかに大きいものであり、原子内部に歴大なエネルギーが内蔵されていることがはじめて認識された。

光の圧力が測定される

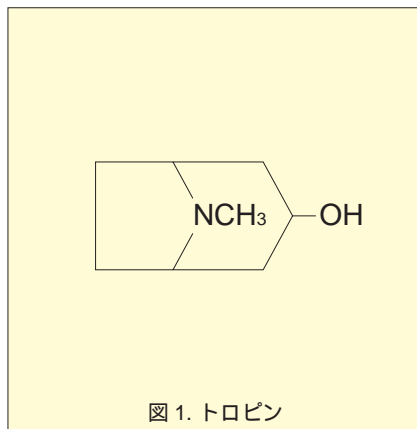
ロシアのPetr Nikolaevich Lebedev(1866-1912)がガラスファイバーで吊るした金属板にアーク灯の光を照射して、そのねじれから光の圧力をはじめて測定し、電磁気学の理論と一致することを発表した。この現象は後にコンプトン効果の発見によって追認された。

新希土類元素ユーロピウムが分離される

この年までに希土類元素としては11種が知られるのみであった。W. Crooks¹⁾とP. E. L. de Boisbaudran²⁾は鉱石サマルスキー石のスペクトル分析によって新元素の存在を予告していたが、この年にEugène Anatole Demarcay(1852-1903)によってceria 鉱石の分別結晶により、その新元素に当る原子番号63の希土類元素が分離されて、ユーロピウムEuropium Euと命名された³⁾。

トロピン合成法確立される

1880年代にアルカロイドのアトロピンやコカインの骨格構造であるトロピン tropin について A. Ladenburg や



G. Merling による構造研究が行われていたが、1897年に至って R. Willstätter はトロピンの化学構造を確定した^{4,5)}。

Willstätter は1901年から始まる3報^{6,7,8)}において、トロピン合成法と呼ばれるその骨格の合成法を発表した。この Willstätter のトロピン合成はアトロピナルカロイドの重要性にかんがみ、その後、有機化学者の注目を集め、R. Robinson^{9,10)}や C. Schöpf¹¹⁾らによる生理的条件下における有機合成の改良合成法の報告が続いた。



写真 1. 高峰譲吉

高峰譲吉、上中啓三によりアドレナリンが結晶化される。

高岡で生まれ、大阪医学校、工部大学で学んでから渡米した高峰譲吉(1854-1922)はニューヨークに高峰研究所を設立した。1900年7月21日に助手の上中啓三の手によってウシの副腎から血圧上昇作用を持つホルモンアドレナリンの抽出、結晶化に成功し、翌1901年に発表して^{12,13,14)}、第4785号の特許が得られている。

それまで副腎の血圧上昇作用は J. J. Abel や O. von Fürth によって研究されていて、その有効成分をそれぞれ epinephrine, suprarenin と名付けられていたが、純粋な結晶を得るに至っていなかった。高峰、上中によって得られたアドレナリン adrenaline は世界最初のホルモンの結晶化であった。現在、高岡市に「高峰譲吉博士」の胸像、西宮市名塩に「上中啓三翁顕彰碑」が建っている。



▶ 写真 2. 上中啓三

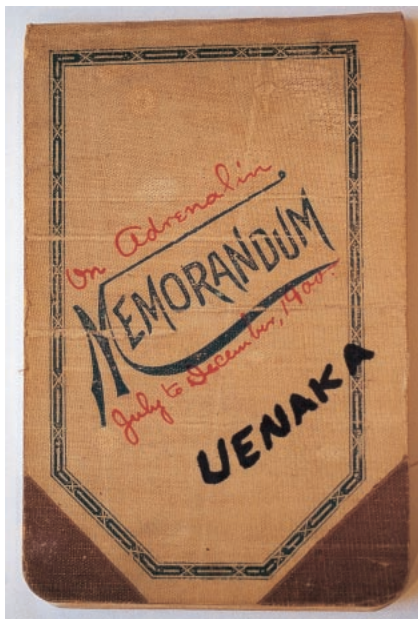


写真3. 上中啓三のアドレナリン結晶化の実験ノート

エチレンに植物ホルモン作用発見される

この年オーストリアの Neljubow が戸外でまっすぐに伸びるエンドウの芽生えが実験室内では横向きに伸長することに気がついた。これは実験室の照明用ガス灯の中に含まれる物質によるに違いないと考えて、ガス中の揮発性炭化水素をテストして、0.06ppm



写真4. R. ボーン

のエチレンに植物ホルモン作用があることをはじめて明らかにした。

インダンスレン染料発明される

Renè Bohn (1862-1922) がインジゴのアントラキノン誘導体の合成研究を行っていた1901年に2-アミノアントラキノンのアルカリ溶融によって、インジゴよりも安定で明るい色の色素を得た¹⁵⁾。これはanthracenから得たindigoの意味でindanthren インダンスレンと名づけられ、BASFによりこの年、Indanthren-Blau RSとして特許が出された¹⁵⁾。さらにそのハロゲンやスルホン酸誘導体をはじめとする各種のIndanthren-Blau系の染料の開発に発展した^{16,17)}。

石灰窒素が合成される

ドイツの Adolf Frank と Nikoden Caro がカーバイドを700 ~ 1000 で窒素ガスと反応させて石灰窒素を得ることに成功した。石灰窒素はカルシウムシアナミド CaCN_2 を主成分とする窒素肥料として、1906年からイタリアで工業生産が開始された。

エジソン電池発明される

発明王 Thomas Alva Edison (1847-1931) が水酸化ニッケル(II)を正極として、鉄粉から成る板を負極として、水酸化カリウムを電解液とするアルカリ電池の一種、いわゆるエジソン電池を発明した。これは鉱山や貨物車などの携帯移動用ランプに使われた。

人造絹糸ベンベルグレーヨンの工業化が行われる

この年、ドイツの J. P. Bemberg 社において、セルロースを銅アンモニア法により、人造絹糸ベンベルグレーヨンとする工業化に成功した。日本では旭化成工業株式会社がベンベルグの商品名を用いている。

ノーベル賞制定される

ダイナマイトの発明で巨万の富を得た Alfred Bernhard Nobel (1833-1896) が、世界の平和と科学の進歩を念願して残した遺言にしたがって、この年ノーベル賞が制定された。第1回の物理学賞にはドイツの Wilhelm Conrad Röntgen (1845-1923) が「X

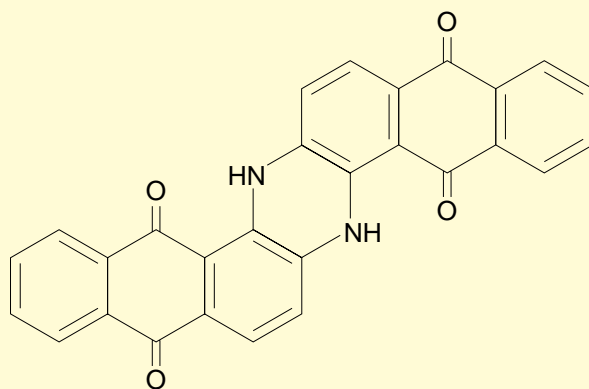


図2. インダンスレン



(実物大×1.65)

写真5. 1901年のスウェーデンのノーベル賞切手。左よりファントホッフ、ベーリング、一人おいてレントゲン。

線の発見」で、化学賞にはオランダの Jacobus Henricus Van't Hoff(1852-1911)が「化学熱力学の法則および溶液の浸透圧の発見」により、また医学・生理学賞にはドイツの Emil Adolf von Behring(1854-1917)が「ジフテリアに対する血清療法に関する業績」によりそれぞれ受賞した。

NBS が設立される

米国の National Bureau of Standards 規格標準局がこの年創立された。ここで検討された長さ、質量等に関する標準方式を NBS 方式と呼ばれる。

ベルツが日本の科学を批判する

明治9年(1876)に東京医学校教師として招かれて来日したドイツ人 Ervin von Bälitz(1849-1913)が明治34年(1901)の来朝25周年の記念講演で、「外人教師は元来学問の培養者たるべきであり、亦然らんと努力せしに係らず、日本人は教師から最新の収穫を受取ることで満足してしまったのである。この新しい収穫をもたらす根元を学ぶことをせず」と語り、日本人の西洋学問に対する態度を痛烈に批判した。

ペッテンコーフェル逝く

ドイツの衛生学者で化学者で副腎障害のアドインソン病を報告し、Zeitschrift für Biologieを発刊した Max Joseph von Pettenkofer(1818-1901)が、この年2月10日に亡くなった。

ラウール逝く

希薄水溶液の凝固点降下と蒸気圧降下が溶質のモル濃度に比例し、物質の種類によらないというラウールの法則を発見し、溶質の分子量決定に道を開いたフランスの François Marie Raoult(1830-1901)がこの年4月1日にグルノーブルで死去した。

ノーベル賞切手を借用させて頂いた伊藤良一氏に感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1) W. Crookes, Compt. Rend., 102, 1464 (1886)
- 2) P.E.L. de Boisbaudran, Compt. Rend., 114, 575 (1892)



写真6. ミュンヘン旧南墓地のペッテンコーフェルの墓

- 3) E.A. Demarcay, Compt. Rend., 132, 1484 (1901)
- 4) R. Willstätter, Ber., 30, 2679 (1897)
- 5) R. Willstätter, Ber., 31, 1534 (1898)
- 6) R. Willstätter, Ann. Chem., 317, 204 (1901)
- 7) R. Willstätter, Ann. Chem., 326, 1 (1903)
- 8) R. Willstätter, Ann. Chem., 326, 23 (1903)
- 9) R. Robinson, J. Chem. Soc., 111, 762 (1917)
- 10) R. Robinson, J. Chem. Soc., 111, 876 (1917)
- 11) C. Schöpf, G. Lehmann, Ann. Chem., 518, 1 (1935)
- 12) J. Takamine, Amer. J. Pharmacy, Nov., 523 (1901)
- 13) J. Takamine, J. Soc. Chem. Ind., Jul. 746 (1901)
- 14) 高峰讓吉, 東京化学会誌, 23, 416 (1902)
- 15) D. R. P. 129 845 (1901/1902) (BASF)
- 16) D.R.P. 129 846 (1901) A.P. 692,762.
- 17) D.R.P. 129 847 (1901)

シグナル伝達の制御機構の解明に

プロテインチロシンホスファターゼ(PTP)

タンパク質のチロシン残基のリン酸化反応は、細胞増殖・分化、がん化、アポトーシスなど様々な生命現象で重要な働きを担っています。プロテインチロシンホスファターゼ(PTP)はチロシンキナーゼ(PTK)とともに、チロシンリン酸化を介した情報伝達系で重要な調節的役割を果たしています。

CD45 PTP, Human, recombinant

起源：Human CD45 cytoplasmic domain(residues 584-1281) expressed in yeast

活性：約 20,000 units/mg

分子量：95kD

LAR PTP, Human, recombinant

起源：Human soluble catalytic LAR-D1 domain, expressed in *E. coli*

活性：約 15,000 units/mg

分子量：37kD

T-cell PTP, Human, recombinant

起源：Human cytoplasmic 38kD T-cell PTP, expressed in *E. coli*

活性：約 5,000 units/mg

分子量：38kD

YOP PTP, *Y. enterocolitica*, recombinant

起源：*Y. enterocolitica* yop51, expressed in *E. coli*

活性：約 170 units/mg

分子量：33.5kD

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
037-17941	CD45 PTP, Human, recombinant	生化学用	20 μ g (100 μ l)	40,000
122-04851	LAR PTP, Human, recombinant	生化学用	100 units	25,000
208-15051	T-cell PTP, Human, recombinant	生化学用	100 units	25,000
250-00481	YOP PTP, <i>Y. enterocolitica</i> , recombinant	生化学用	50 μ g (100 μ l)	45,000

消光蛍光法を用いた PTP 活性アッセイキット

Fluorospark™ PTP Assay Kit

Fluorospark™ PTP アッセイキットは、消光された蛍光性リン酸化ペプチドを基質として、RI 法に匹敵する感度で簡単にプロテインチロシンホスファターゼ(PTP)活性を測定することができます。

マイクロプレートへの適用が可能ですので、多検体処理に非常に有用です。

〔特長〕

1. RI 法に匹敵する感度(リン酸の絶対量としてサブピコモル)で測定可能。
2. 遊離したリン酸を測定しませんので、リン酸存在下でも測定可能。
3. 操作が簡便で、短時間に測定することができます。
4. 細胞抽出物を用いた測定が可能。
5. マイクロプレートを用いた多検体処理が可能。

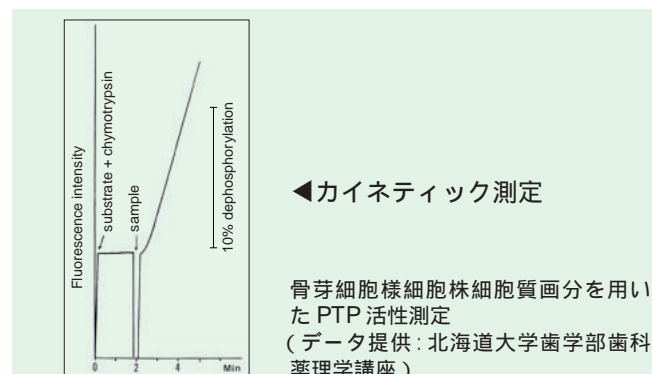
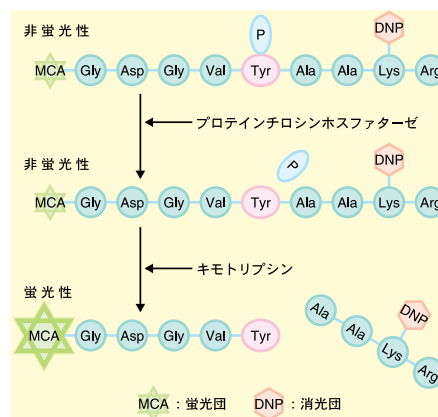
〔キット内容〕

Substrate Solution	110 μ l
Reaction Buffer	1.5ml
Chymotrypsin Solution	220 μ l
Calibrator	40 μ l
Stop Solution(10mmol/l Vanadate)	220 μ l

299-55601 100 回用 30,000 円

〔測定原理〕

非蛍光性のリン酸化ペプチドを基質として、ホスファターゼで脱リン酸化した後、キモトリプシン消化により生じた蛍光性ペプチドを測定します。



アミロイド：C末端特異抗体が明らかにしたこと

東京大学大学院 薬学系研究科 臨床薬学教室 岩坪 威

1. はじめに

アルツハイマー病(AD)は老年期痴呆の原因として最も頻度の高い神経変性疾患であり、病理学的には大脳を中心とする広汎な神経細胞脱落とともに、老人斑(senile plaque)神経原線維変化(neurofibrillary change)と呼ばれる2種類の蓄積物が出現することが特徴である。タウ蛋白からなる神経原線維変化は進行期に至って出現する病変であり、神経細胞死との高い相関が指摘されているのに対して、老人斑は最も初期から出現し、疾患特異性上もADにより関係の深い病変とされる。このため老人斑の主要な構成成分であるβアミロイドの生成過程はADの病因との関連において注目を集め、βアミロイドは過去十数年にわたりAD研究の主要な対象たり続けてきた。本稿では著者らの研究成果をまじえつつADにおけるβアミロイド、特にそのC末端の意義について考察したい。

2. アミロイドの同定

老人斑は大脳皮質などに出現するシミ状の構造物で、細胞外に蓄積したアミロイド物質と、変性腫大した神経突起、反応性ミクログリアやアストロサイトなどのグリア細胞から構成される。鏡銀染色を主に用いた従来の病理学では神経突起の意義が強調されることが多く、老人斑はneuritic plaqueなどの名称で呼ばれることも多かったが、1984年にGlennertとWongらは、脳におけるもう一種類のアミロイド蓄積性病変である脳血管アミロイドから分子量約4キログルトン(アミノ酸数約40個)の新規蛋白を同定し、βアミロイド蛋白と名付けた(現在 amyloid β peptide を略して Aβ と標記されることが多いため、以下この略語を用いる)。翌年にはMasters, Beyreutherらにより老人斑アミロイドも同じくAβからなることが示された。Aβの前駆体としてクローニングされたβAPPは、695-770アミノ酸からなる一回膜貫通型蛋白であり、Aβはその細胞外から膜内

にかけての一部分として切り出されることが明らかになった(図1)。即ち、Aβの形成にはN末端を切り出すβセクレターゼ(1999年に新規のアスパラギン酸プロテアーゼとして同定され、BACEと命名された)と、膜内でC末端を切り出すγセクレターゼという2種類のプロテアーゼの作用が必要であり、その性状に興味が集まった。

3. Aβの形成過程とC末端特異抗体

脳アミロイドから回収されるAβのC末端は第42番目のAlaまで伸びたAβ42が多いのに対して、正常細胞が分泌するAβは第40番目のValで終わるAβ40が90%を占める。この2残基の差が何を意味するものかは当初明らかでなかったが、1993年、MITのLansburyらはAβ1-40, 1-42を合成し、後者は前者に比してはるかに凝集し易いこと、Aβ1-42から形成されたseedをもとにアミロイド蓄積が進行することを*in vitro*の実験から示唆した。

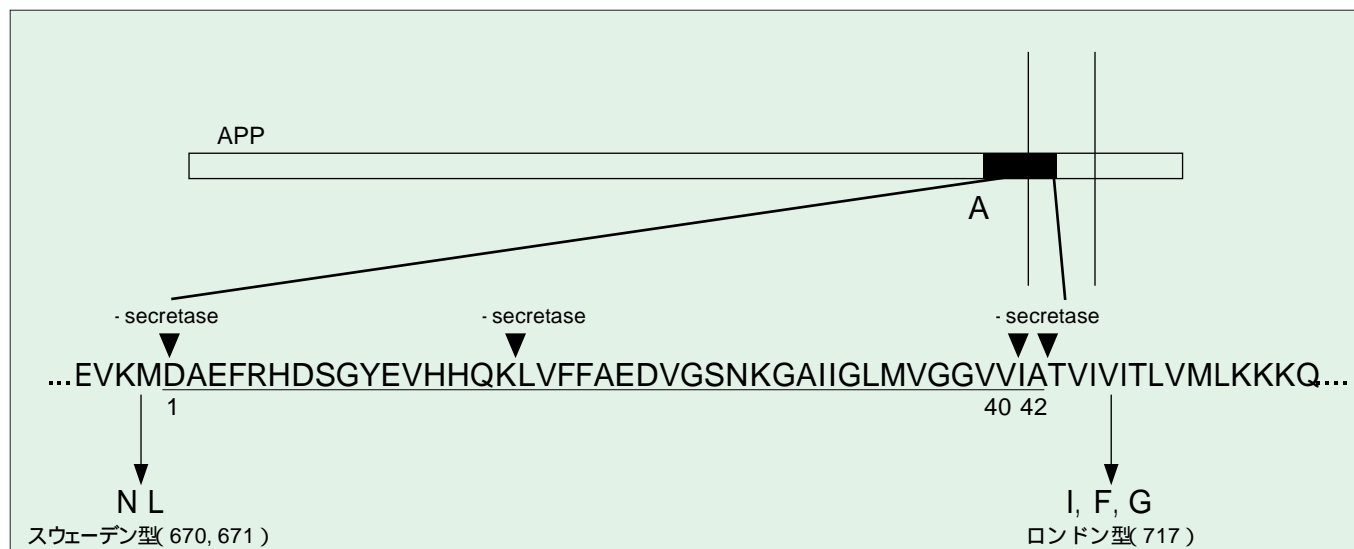


図1. APPの構造(アミノ酸番号は770アミノ酸型最長アイソフォームに準じる)。各種セクレターゼによる切り出し部位を矢頭、FAD変異の位置を矢印で示した。London型変異では第717残基のVal Ile置換が生じる。

同じ頃、武田薬品工業筑波研究所の鈴木伸宏博士は、独自のアイデアで A β 40 と A β 42 の C 末端を識別するモノクローナル抗体を作出しつつあった¹⁾。蛋白質を配列特異的に認識する抗体は通常数アミノ酸からなる抗原決定部位(エピトープ)を認識するため、第 40 位と 42 位を区別することは困難であ

る。しかしフリーの C もしくは N 末端構造を認識する抗体(end-specific antibody)は、1 アミノ酸の相違でも識別が可能である。鈴木博士らは A β 1-40 を抗原として、A β 40 末端に特異的なモノクローナル抗体 BA27、A β 35-43 を用いて A β 42 及び 43 末端に特異的な BC05 を作出した。

ヒト脳における老人斑形成過程において、A β 40 と A β 42 がいかなる時間・空間的關係をもって出現するのかに興味をもっていた筆者らは鈴木博士と共同研究を開始し、AD 脳において最初に蓄積を開始するのは A β 42 であり、A β 40 の蓄積はこれより遅れて開始することを免疫組織化学的に示すことができた^{2,3)}(図 2)。これに威力を發揮したのは、AD 脳、特にダウン症脳を BC05、BA27 で免疫組織化学的に解析することである。ダウン症はヒトの染色体異常症として最も頻度の高い疾患であるが、脳においては 20-30 代に老人斑、50 代に至って神経原線維変化が出現し、AD の病変が時間を追って完成されてゆくのを観察することが可能である。30 代初頭のダウン症脳では、AD の最初期病変とされるびまん性老人斑は BC05 のみに陽性を示し、BA27 には陰性であったが(図 2A、B)、40 代で一部の老人斑が BA27 陽性を

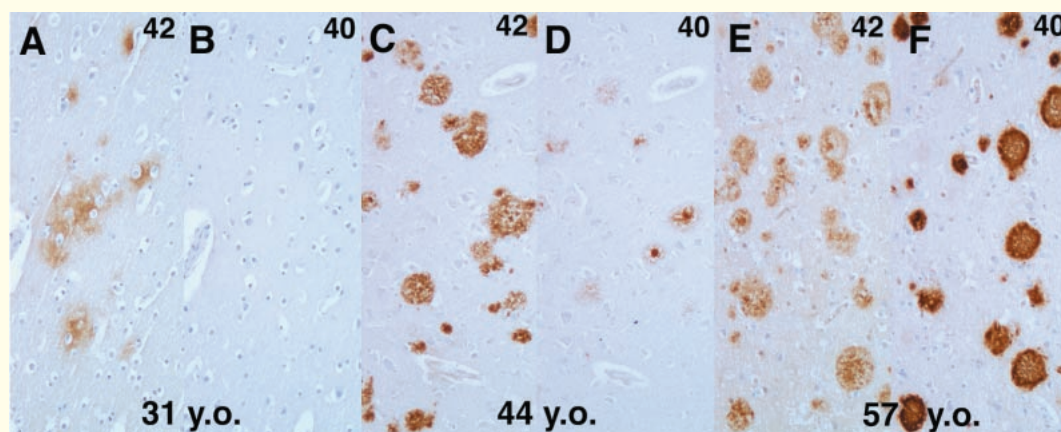


図 2. ダウン症脳における A β 42、A β 40 蓄積の経時変化(31, 44, 57 歳例)。若年ではびまん性老人斑は BC05 陽性(A)だが BA27 陰性(B)である。40 代に入り BC05 陽性斑(C)の一部が BA27 陽性を示し始め(D)、50 代後半に至って BC05 陽性斑(E)の多くが BA27 陽性を示すようになる(F)。

示し始め(図 2C、D)、50 代では多くの斑が BC05 とともに BA27 陽性となる(図 2E、F)。ここに至って A β の C 末端長の差が *in vivo* の脳内においても A β 蓄積性の決定要因となっていることが示されたのである。

ちなみに A β C 末端の染色には、他の多くの A β 抗体と同様、アミロイド構造を破壊し、抗原性を高めるギ酸前処理が必要である。A β C 末端は構造上内部に埋まった形をとっているのかもしれない。また BC05 による染色は、当初通常レベルの希釈(抗体濃度数 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を用いていたところ、背景と特異染色の十分なコントラストが得難かったが、A β 1-42 ペプチドによる吸収を試みたところ、不完全な吸収ではかえって特異的染色性が向上することから、比較的低めの濃度が適切であることも判明した。さらに今回和光純薬・河野氏らの検討により、ギ酸処理に引き続いてトリプシンによる前処理を行うことも有効であることも明らかになり、多様な固定状態のヒト剖検例における汎用性が向上した。

4. A C 末端と家族性 AD

AD のごく一部は常染色体性優性遺伝形式をとる家族性 AD (FAD) とし

て発症する。FAD の責任遺伝子として A β の前駆体である β APP そのものが最初に同定された(図 1)が、A β の N 末端近傍の Sweden 型変異は A β の産生総量を顕著に増加させたのに対し、最も頻度の高い London 型変異(A β C 末端からさらに数残基 C 末端寄りの 717 位が Val から Ile に置換される)をもつ β APP 遺伝子を培養細胞に導入しても A β の総分泌量に変化は見られなかった。BC05、BA27 を検出抗体に用いた ELISA 系を創出して間もなく、この問題に取り組んでいた米国の Younkin 教授の研究グループに合流した鈴木博士は、London 型変異は、正常では 10% 前後に保たれている A β 42 の産生比率を特異的に増加させることを証明し¹⁾、ここにおいて AD 発症における β アミロイド、特に A β 42 の意義が確立されるに至った。

β APP 変異は FAD のごく一部を占めるに過ぎず、半数以上が第 14 染色体上の locus と連鎖することが判明していた。この主要な FAD 遺伝子は 1995 年、St George-Hyslop 博士のグループによりクローニングされ、presenilin (PS) と命名された。PS は 6 ~ 8 回膜を貫通する膜蛋白であり、すでに 60 種類以上の変異が報告されている。PS 変異が AD を発症する機序

が次の焦点となったが、1996年から97年にかけて、その病的効果も β APPのLondon型変異と同じく、 $A\beta_{42}$ 産生の選択的上昇にあることが筆者らのグループを含む多数の研究室から報告された⁴⁾。2000年に入り、PSが $A\beta$ C末端の切り出しに関わる γ セクレターゼの触媒サブユニットそのものであるとの見解が急速に広がり、PSとその作用により切り分けられる $A\beta$ C末端は、ますます熱い注目を浴びるに至っている。

企業から相次いで公表され、その一部は既に臨床試験にも入りつつある。これらの治療薬開発にも、BC05, BA27を草分けとする $A\beta$ C末端特異抗体を利用した測定系が不可欠であり、これらの抗体がAD研究の進展に果たした役割は計り知れない。21世紀初頭の数年間で、 $A\beta$ の産生・蓄積防止がADの発症・進行を遅延する効果を有するかどうかについても決着がつくと予想される。もしこれらの治療方策によりADの発症が幾分なりとも抑制可能であれば、人類の福祉に大きく貢献することであろう。

- Odaka, A., Otvos, L.Jr., Eckman, C., Golde, T.E. and Younkin, S.G. Science 264, 1336-1340, (1994)
- 2)Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N. and Ihara, Y. Neuron 13, 45-53, (1994)
- 3)Iwatsubo, T., Mann, D.M.A., Odaka, A., Suzuki, N. and Ihara, Y. Ann. Neurol. 37, 294-299, (1995)
- 4)Tomita, T., Maruyama, K., Saido, T.C., Kume, H., Shinozaki, K., Tokuhiro, S., Capell, A., Walter, J., Grünberg, J., Haass, C., Iwatsubo, T. and Obata, K. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 2025-2030, (1997)

5. 終わりに

2000年に入り、 $A\beta$ C末端を形成する γ セクレターゼの阻害剤が大手製薬

〔参考文献〕

- 1)Suzuki, N., Cheung, T.T., Cai, X.-D.,

New Products

C末端特異抗体によりA 40とA 42それぞれを特異的に染色します！

アミロイド - プロテイン免疫組織染色キット

免疫組織染色用

アルツハイマー病の病因論については様々な報告がなされていますが、病理学的変化の一つとしてアミロイド β -プロテイン($A\beta$)の脳内沈着が知られています。本品は、脳組織に沈着した $A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$ のそれぞれを特異的に染色するキットです。

〔操作法〕

脱パラフィン

洗浄(蒸留水中で2分間×2回洗浄します。)

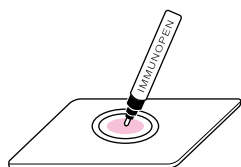
イムノペン処理

ぎ酸処理

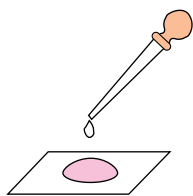
-1 洗浄

-2 洗浄

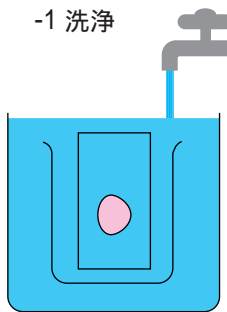
トリプシン処理



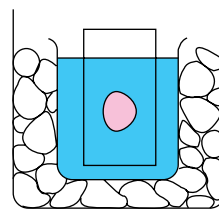
イムノペンで切片を囲みます。



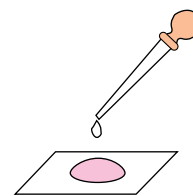
ぎ酸を約150 μ l滴下し、室温で5分間静置します。



水道水で5分間洗浄します。

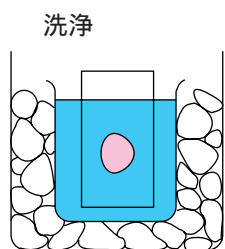


冷PBS-Tween20に2分間浸漬します。

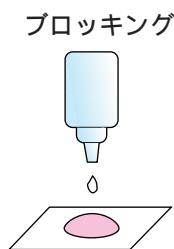


0.05%トリプシン溶液を約150 μ l滴下して、37℃で15分間反応させます。

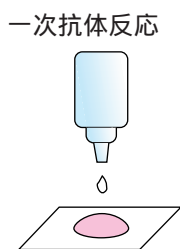
〔次頁へ続く〕



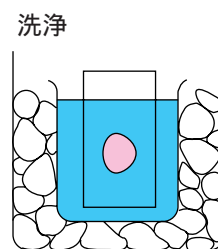
氷浴中、冷PBS-Tween 20で5分間×2回洗浄します。



ブロッキング用血清を2滴滴下して、37℃で30分間反応させます。



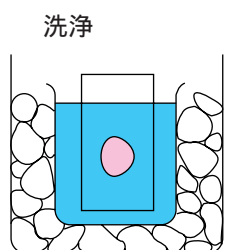
余分な水分を除いた後、A β 40抗体溶液または、A β 42抗体溶液を2滴滴下して、37℃で1時間反応させます。



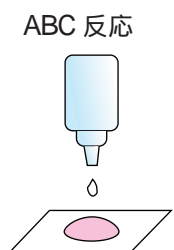
氷浴中、冷PBS-Tween 20で2分間×5回洗浄します。



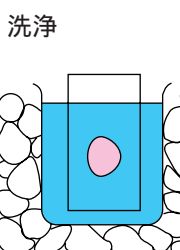
抗マウスIgG(H+L)、ヤギ、ビオチン結合溶液を2滴滴下して、37℃で1時間反応させます。



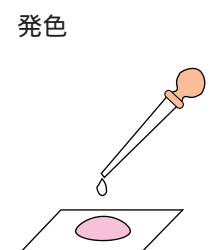
氷浴中、冷PBS-Tween 20で2分間×3回洗浄します。



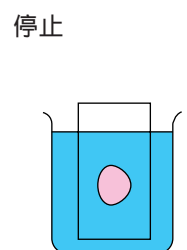
ABC溶液を2滴滴下して、30分間静置します。



氷浴中、冷PBS-Tween 20で2分間×3回洗浄します。



DAB溶液を約150 μ l滴下して、室温で2~10分間反応させます。

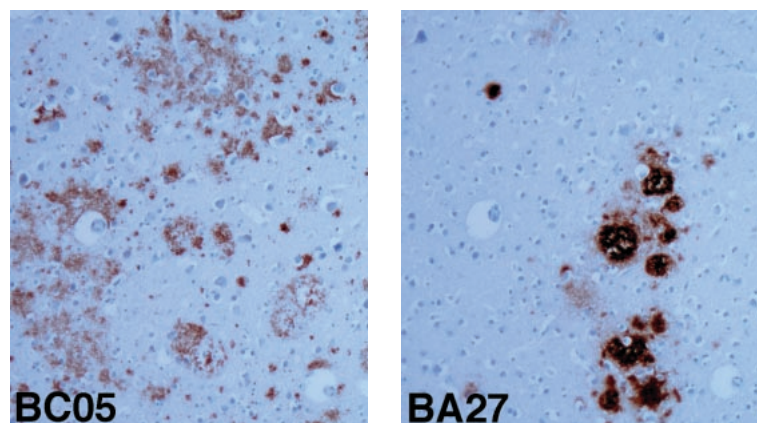


蒸留水で1分間洗浄し、反応を停止します。

対比染色(マイヤーヘマトキシリン溶液)洗浄、封入、検鏡します。

(注意)組織により反応温度・反応時間等最適条件をご検討下さい。

A β 40、A β 42の染め分けは同一切片上では困難です。連続切片をご利用下さい。



アルツハイマー病脳由来連続切片の染色例

左:Anti A β 40(クローン No.:BC05)によるA β 40の染色

右:Anti A β 42(クローン No.:BA27)によるA β 42の染色

(写真提供:東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室 岩坪 威 教授)

[参考文献]

- 1)Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N. and Ihara, Y. : *Neuron*, 13, 45(1994)
- 2)Saido, T.C., Iwatsubo, T., Mann, D. M., Shimada, H., Ihara, Y. and Kawashima, S. : *Neuron*, 14, 457(1995)
- 3)Odaka, A., Ishibashi, Y., Kikuchi, T., Kitada, C. and Suzuki, N. : *Biochemistry*, 34, 1027(1995)
- 4)Fukumoto, H., Odaka, A., Suzuki, N., Shimada, H., Ihara, Y. and Iwatsubo, T. : *Am. J. Pathol.*, 148, 25(1996)
- 5)Fukumoto, H., Odaka, A., Suzuki, N. and Iwatsubo, T. : *Neurodegeneration*, 5, 13(1996)

コード No.	品名	規格	包装	希望納入価格(円)
299-56701	Amyloid β -Protein Immunohistostain Kit	免疫組織染色用	50回用	90,000

[関連商品]

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
019-18761	Amyloid β -Protein(1-40)(Trifluoroacetate)	生化学用	1mg	36,000
016-18771	Amyloid β -Protein(1-42)(Trifluoroacetate)	生化学用	0.5mg	38,000
542-01011	Tau Protein, Human, recombinant, Solution	生化学用	50 μ g	25,000

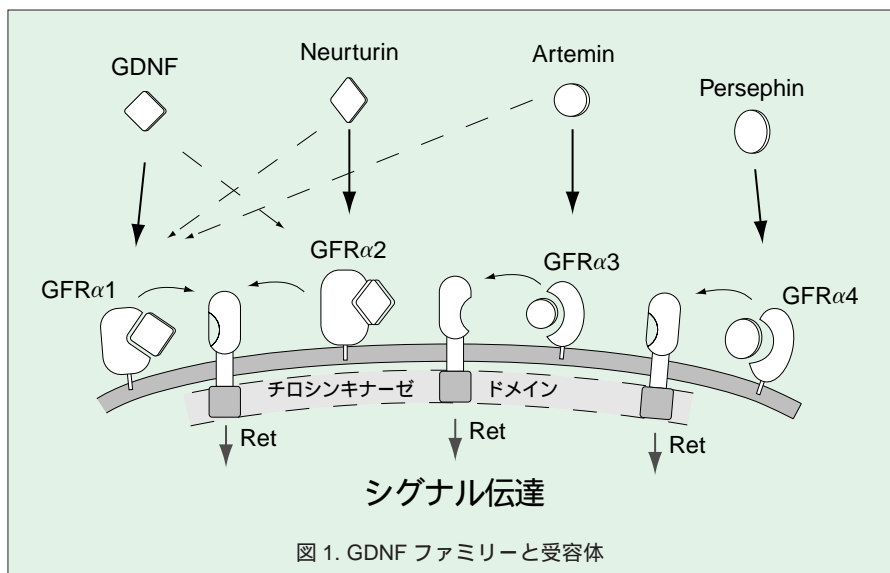
GDNF ファミリーとニューロトロフィンファミリーの相互作用

北海道大学大学院 薬学研究科 神経科学分野 松岡 一郎

前回は、ニューロトロフィンを中心に、神経栄養因子による神経細胞の機能制御に関して述べた。そこで今回は、もう1つの代表的な神経栄養因子ファミリーであるGDNFファミリーについて、その生理的な役割やニューロトロフィンファミリーとの関係について紹介したい。

グリア細胞株由来神経栄養因子 (Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) は、1993年にグリオーマ細胞株の条件培養液より中枢の黒質ドパミン作動性神経に特異的に作用する神経栄養因子として見つかった¹⁾。GDNFは、1次構造上TGFβスーパーファミリーのリガンドと低いながらも相同性(約10%)を有している。その後、脊髄運動神経や種々の末梢神経細胞に対する作用が続々と報告されており、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症(ALS)などにおけるGDNFの臨床応用の可能性が注目されている²⁾。1996年になり、GDNFと約44%の相同性を有するニューチュリン(neurturin)³⁾が見つかり、GDNFファミリーと呼ばれるようになった。さらにこの2つの因子の相同性をもとにして、縮重プライマーを用いたPCRやデータベースの検索からGDNFファミリー第3と第4の因子、アルテミン(artemin)⁴⁾とパーセフィン(persephin)⁵⁾が現在までに見つかった。

当初、GDNFの受容体も他のTGFβスーパーファミリーの受容体と同様に、セリン/スレオニンキナーゼ型の受容体であろうと考えられていた。ところが意外なことに、1996年になって、これまでリガンドが不明であった受容体型チロシンキナーゼのRetと新たに見つかったGFRα1が機能的なGDNF受容体を形成することが明ら



かになった(図1)⁶⁾。GFRα1は、発現クローニングによりGDNF結合活性を指標に同定された蛋白質である。GFRα1は、C末端でGPIアンカーを介して細胞膜に結合しているが、膜貫通部分や細胞内ドメインを持たずシグナル伝達能はない。しかしGFRα1は、GDNFを細胞膜上に濃縮する役割を持っている可能性もある。さらに、GFRα受容体もファミリーを形成しており、GDNFを特異的に認識するGFRα1以外に、neurturin、artemin、persephinをそれぞれ特異的に認識するGFRα2、GFRα3、GFRα4がこれまでに見つかった⁷⁻⁹⁾。また、図1に示すように各リガンドと受容体間の弱いクロストークも存在するようである。

Retは単独でGDNFファミリーのリガンドを結合できないが、各GFRαは単独でリガンドを特異的に結合することができる。続いてGFRα-リガンド複合体は、共通なシグナル伝達受容体Retと会合してこれを活性化し、チロシンリン酸化を引き起こす。Retのチロシンリン酸化によって引き起こされるシグナル伝達のカスケードの下流は、やはりチロシンキナーゼ型受容体であ

るTrk-ニューロトロフィン受容体のシグナル伝達のカスケードに類似すると考えられている。

GDNFは、脳内の多くの部位に発現しているが、中でも黒質ドパミン作動性神経が投射する線条体の神経細胞における発現が比較的高く、逆行性神経栄養因子として生理的にも機能していると考えられる。しかしGDNFノックアウトマウスでは黒質ドパミン作動性神経はほとんど影響受けないので、単一ではなく複数のGDNFファミリーのリガンドや他の神経栄養因子も作用していると想像される¹⁰⁾。一方、中枢および末梢の神経傷害時には、傷害部位周辺のグリア細胞からGDNFの産生が昂進することが多い^{11,12)}。また末梢神経系にもGDNF応答性の神経細胞が一定の割合で存在している。中でも、GDNFノックアウトマウスの解析から、大部分の内臓神経系や三叉神経節、交感神経節、後根知覚神経節の一部の神経細胞の生存・発達に必須な役割が明らかになっている¹⁰⁾。特に後根知覚神経節では、痛みを伝える小型神経細胞がGDNF応答性であり、NGF応答性との関連が注目される。

また neurturin は、中枢の黒質ドパミン作動性神経に対する作用に加えて、ニューロトロフィンファミリーが作用しないことが知られる毛様体神経や顎下神経などの末梢副交感神経細胞に対する逆行性神経栄養因子としての役割が注目されている。一方、artemin は、交感神経細胞の移動や生後の成熟における役割が示唆されている¹³⁾。

このように GDNF ファミリーとニューロトロフィンファミリーは、種々の神経組織において互いに異なるタイプの神経細胞に作用したり、あるいは同じタイプ神経細胞に作用している。ではこのような神経細胞ごとの神経栄養因子応答性の特異性はどのようにして決定され、そのことにはどのような生理的な意味があるのだろうか。例えば、神経堤細胞の分化により生じた発達初期の交感神経細胞は、TrkC や Ret を発現し、まず NT3 や GDNF に対する応答性を獲得しているが、その後標的細胞との接続が確立する時期になると NGF に対する特異的受容体である TrkA を発現して、末梢標的細胞から供給される NGF に依存して生存するようになる。著者らは発達期の交感神経細胞の有する NT3 と GDNF に対する応答性は、骨形成因子とレチ

ノイン酸が協同的に作用して TrkC と GFR α 1 の発現を誘導することによることを見いだしている^{14,15)}。さらに本来 NGF 応答性の神経細胞を含む大脳基底部中隔由来の神経幹細胞株を塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) で処理すると、TrkA が誘導されることも見いだしている¹⁶⁾。このように各神経細胞には、特定の神経栄養因子に対する応答性を誘導する因子やメカニズムが存在することが明らかになった。また発達初期の交感神経細胞には NT3 と GDNF の両者が働きうるのであるが、著者らはその両者を培養下で作用させると、GDNF による Ret のチロシンリン酸化が NT3 の存在によって著しく増強されるとともに生存細胞数も著しく増加することを見いだしている¹⁷⁾。これは本来独立であると考えられていた、trk 受容体と Ret 受容体の間でチロシンリン酸化を介した相互作用が存在することを示すものであり、限られた受容体量、限られた量のリガンドのもとでも神経細胞が生存・機能していくことを可能にするメカニズムであるともいえる。また今後、複数種の因子が同時に作用することによってもたらされる新しい神経機能がみつかるかもしれない。

〔参考文献〕

- 1) Lin, L.F., et al. Science 260:1130-1132 (1993)
- 2) Gash, D. M., et al. Ann. Neurol. 44, 121(1998)
- 3) Kotzbauer, et al. Nature 384, 467 (1996)
- 4) Baloh, R. H., et al. Neuron 21, 291 (1998)
- 5) Milbrandt, J., et al. Neuron 20: 245 (1998)
- 6) Jing, S.Q., et al. Cell, 85, 1113(1996)
- 7) Baloh, R.H., et al. Neuron 18, 793 (1997)
- 8) Baloh, R.H., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 5801(1998)
- 9) Enokido, Y., Curr Biol 8, 1019(1998)
- 10) Baloh, R. H., et al. Curr. Opin. Neurobiol. 10, 103 (2000)
- 11) Lin, L.-F., et al. J. Neurosci. 19, 1708 (1999)
- 12) Trupp, M., et al. J Cell Biol. 130, 137 (1995)
- 13) Nishino, J., et al. Neuron 23, 725 (1999)
- 14) Kobayashi, M., et al. Mol. Brain Res. 53, 206(1998)
- 15) Thang, S.-H., et al. J. Neurosci. 20, 2917(2000)
- 16) Miyasaka, N., et al. Neurochem. Int., 31, 557(1997)
- 17) Kobayashi, M. & Matsuoka, I. Neuro Report 11, 2541(2000)

カルモジュリンアンタゴニスト

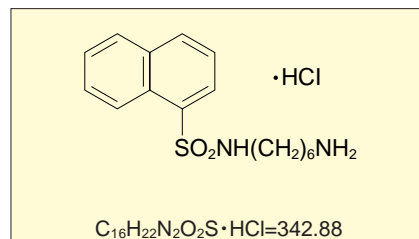
Ca²⁺/カルモジュリン依存性のホスホジエステラーゼ (IC₅₀=240 μ M (W-5)、28 μ M (W-7))とミオシン軽鎖キナーゼ (IC₅₀=230 μ M (W-5)、51 μ M (W-7))を阻害するナフタレンスルホンアミド系のカルモジュリンアンタゴニストです。

W-5 HCl

生化学用

外 観：白色～わずかにうすい褐色、結晶性粉末～粉末

溶解性：水、メタノールに可溶



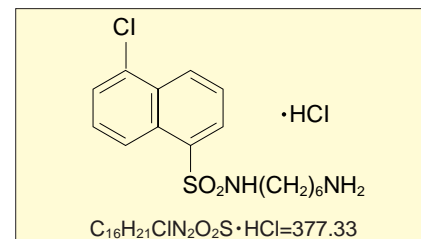
236-01721	5mg	4,500 円
232-01723	25mg	16,000 円

W-7 HCl

生化学用

外 観：白色～わずかにうすい褐色、結晶性粉末～粉末

溶解性：水、メタノールに可溶



233-01731	5mg	2,600 円
239-01733	50mg	9,500 円
237-01734	250mg	34,000 円

ポリ(ADP-リボース)代謝の生理的役割

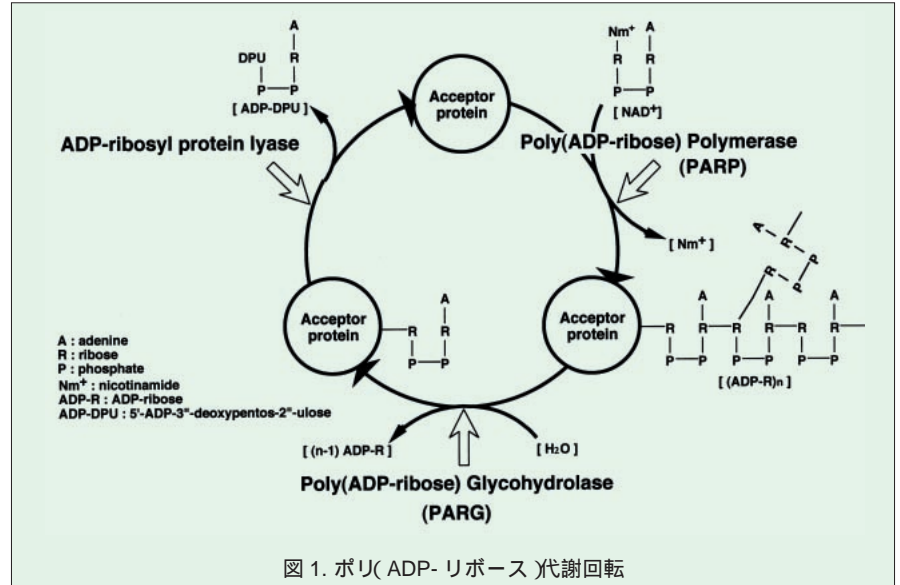
東京理科大学 薬学部 生化学教室 丸田 英晴

はじめに

ポリ(ADP-リボシル)化反応は真核細胞に特有なタンパク質の可逆的修飾反応の一つであり、主に核内において観察される。この反応では、ヒストン H1、H2B や HMG タンパク質などのクロマチンタンパク質を中心としたアクセプタータンパク質のグルタミン酸残基に、酸化還元反応の補酵素として知られる NAD⁺ の ADP-リボース部分が転移した後、リボース-リボース間のグリコシド結合により重合し、ADP-リボースのポリマーが合成される。このポリマーの合成はポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)が司る。また、合成されたポリマーはポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ(PARG)により分解され、さらに ADP-リボシルプロテインリナーゼによりアクセプタータンパク質との切断がなされる(図1)。この修飾反応はリン酸化やアセチル化などの他の修飾反応とは異なり、タンパク質に大量に負電荷及び分子量の大きな基を導入することになるため、タンパク質自身のコンフォメーションばかりでなく、DNA とタンパク質やタンパク質-タンパク質間の相互作用を大きく変化させ、ヌクレオソームのコンフォメーションやさらに高次な構造の変化を生じさせる可能性が考えられる¹⁾²⁾。本稿では、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼの解析から得られた情報を主にして、ポリ(ADP-リボース)代謝機構の生理的役割について紹介する。

ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼファミリー

ポリ(ADP-リボース)を合成する酵素は現在5種類知られている(表1)。



古くから解析されノックアウトマウスも作製されているものが PARP-1 で、一般的にポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)と書かれている場合はこれを示す。詳しくは後述する。

PARP-1 のノックアウトマウスにもポリ(ADP-リボース)が存在すること、ポリ(ADP-リボース)合成活性が存在することが明らかとなり、PARPファミリーの存在が示唆された。そこでとられてきたものが PARP-2 である³⁾。PARP-2 の大きさは約 62 kDa であり、PARP-1 と同様に(後述)DNA 鎖の切断により活性化する。

ゲノム末端に存在し、細胞の老化に関与していると考えられているテロメアに結合し、テロメア長維持を負に制御するタンパク質として知られている TRF-1 と相互作用する分子として Yeast Two-hybrid System により単離された PARP が Tankylase である⁴⁾。Tankylase は膜タンパク質や細胞骨格との相互作用に関与する 24 個のタンデムなアンキリンリピート構造を持ち、PARP-1 の BRCT モチーフ及び、触媒ドメイン(後述)とホモロジーを持つ。Tankylase の大きさは 142 kDa で、TRF-1 を修飾することにより、TRF-1

表 1. PARP ファミリー

名前	分子量	機能
PARP-1	113 kDa	DNA 傷害に依存した細胞内 NAD ⁺ の消費、ポリ(ADP-リボース)の合成
PARP-2	62 kDa	DNA 傷害に依存した細胞内 NAD ⁺ の消費、ポリ(ADP-リボース)の合成
Tankylase	142 kDa	テロメア維持
PARP-3	60 kDa	?
vPARP (PH5P)	192 kDa	ヴォールトを構成?

の DNA 結合能を失わせ、テロメラーゼの活性を制御していると考えられている。

さらに、機能の知られていない2つの PARP を紹介する。ゲノム解析から PARP とホモロジーを持つものとして見出された PARP-3⁵⁾、大きさは約 60 kDa で機能は全く分かっていない。inter- α -trypsin inhibitor のホモロジー解析でとられた PH5P⁶⁾、大きさは 192 kDa である。この PH5P と同じ分子であるが、全く別に得られた vPARP は、機能の分かっていない細胞内小器官のヴォールトを構成するタンパク質であった⁷⁾。vPARP の機能はヴォールトを構成するタンパク質である MVR (major protein component of vaults) を修飾する以外何も分かっていない。興味深いことにヴォールトを構成するタンパク質としてテロメラーゼ複合体の構成タンパク質である TEP-1 が報告されている¹⁾。

また、最近 PARP-1 と同じ遺伝子からなるが長さが短いタイプの PARP (sPARP) も報告されている⁸⁾。

ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ-1 の構造と機能

前述した PARP ファミリーでもっとも多く解析されているのが PARP-1 である。PARP-1 は 1014 アミノ酸からな

る約 113 kDa の比較的大きなタンパク質で、非常に構造的に特異な構造を持っている(図2)⁹⁾。まず、N 末端の 1-372 部分が主に DNA と結合する部分である。DNA 結合ドメインの N 末端部位に二つの Zn フィンガーモチーフを持つ。この Zn フィンガーにより切断された DNA を認識している。PARP-1 の Zn フィンガーは他の DNA 結合タンパク質が持つ Zn フィンガーよりも長く(ループが約 30 アミノ酸、一般的には 12 ~ 13 個)のように長いタイプの Zn フィンガーを持つものは DNA リガーゼ III しか知られていない。DNA 結合ドメインの中央には双極型の核移行シグナルが存在する。この核移行シグナルの双極性を分断する箇所ではアポトーシスの実行プロテアーゼであるカスパーゼ-3 により切断される。核移行シグナルの後半部分に重なるようにしてヘリックス-ターン-ヘリックス構造があり DNA との相互作用に参与する。

PARP-1 の中央部に位置するのが自己修飾ドメイン(374-525)でグルタミン酸のクラスターが存在し、そのグルタミン酸クラスターで自己修飾を受ける。この自己修飾ドメインには二つのモチーフが存在する。一つはロイシンジッパー構造でもう一つは BRCT モチーフである。両モチーフともタンパク質-タンパク質相互作用を示すモ

チーフであり、特に BRCT モチーフは多くの DNA 修復関連因子に共通に見られ、DNA 修復過程におけるポリ(ADP-リボシル)化の関与を示唆するものである。

PARP-1 の C 末端側にはポリ(ADP-リボース)合成活性を持つ触媒ドメイン(526-1014)がある。この触媒ドメインが PARP ファミリー間で極めて類似している。触媒ドメイン中の 656-1014 が活性に必要な領域で、859-908 が系統学的に保存されている。活性中心は⁸⁹³K であり、NAD⁺ 結合モチーフの GKG 中に存在する。

ポリ(ADP-リボシル)化と DNA 修復

PARP-1 は DNA 鎖の切断により活性化される。このため DNA 鎖切断が起きる様々な現象にポリ(ADP-リボシル)化が関与していることが推察されている。特に、最近のノックアウトマウス解析から、DNA 損傷の回復の遅れ、線感受性の増大、ゲノム不安定性の増大が観察され、PARP-1 が DNA 修復の効率、速度を増大させるために働いていると考えられている¹⁾。

また、ポリ(ADP-リボース)ポリマーに様々な DNA 修復因子が非共有的に結合することが報告されており、DNA 損傷部位に DNA 修復因子を向

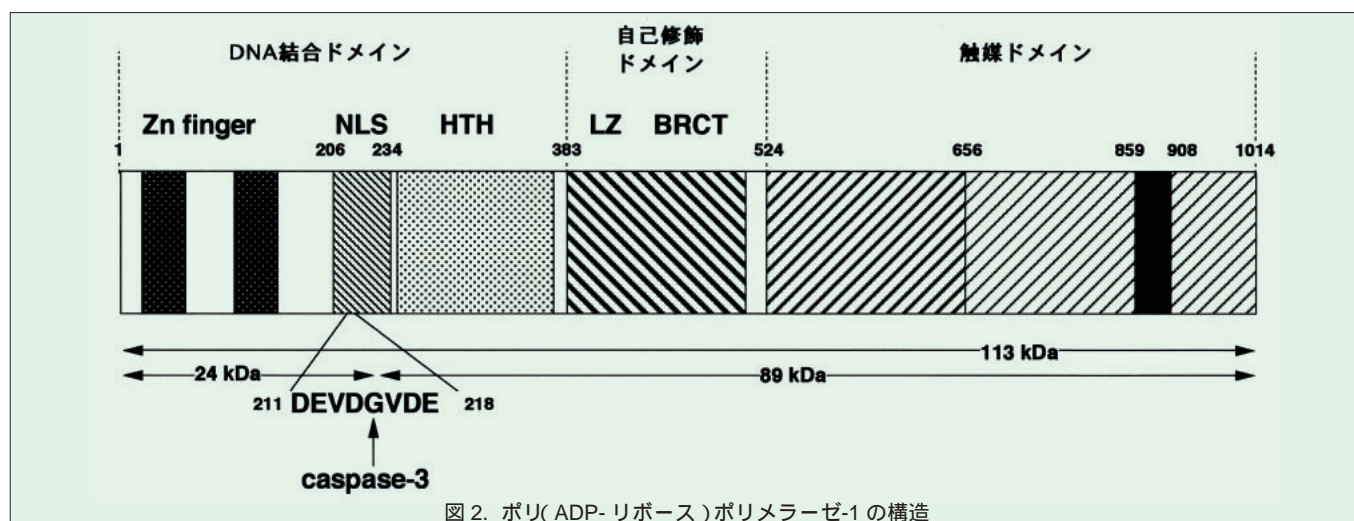


図2. ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ-1 の構造

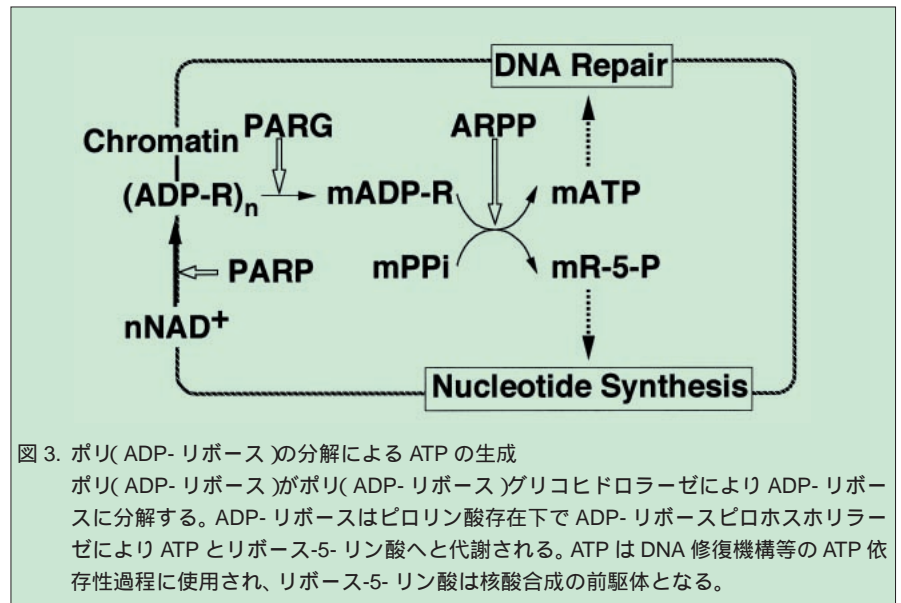
かわせるリクルーターとしての働きをポリ(ADP-リボース)ポリマーが担っている可能性が考えられている⁹⁾。

さらに、ポリ(ADP-リボース)が代謝される過程で生じる ATP が修復過程に使用されている可能性が報告されている(図3)^{10),11)}。DNA 損傷部位で合成されたポリ(ADP-リボース)がポリ(ADP-リボース)グリコヒドラーゼによって速やかに分解され ADP-リボースとなる。生成した ADP-リボースはピロリン酸存在化で ADP-リボースピロホスホリラーゼにより ATP とリボース-5-リン酸へと変換される。この反応により、DNA 損傷部位局所的に ATP の濃度が上昇し、DNA リガーゼ等の反応に効率良く利用されると推測されている。

ポリ(ADP-リボシル)化と細胞死

ポリ(ADP-リボシル)化反応は基質として NAD⁺ を使用する。NAD⁺ は生体エネルギー代謝に不可欠な因子である。生体内での NAD⁺ レベルは NAD⁺ の合成と分解で調節される。NAD⁺ の合成は NAD⁺ ピロホスホリラーゼによって司られ、分解は様々な酵素が関与するが、PARP の活性化が NAD⁺ の大量消費を促していることが報告されている¹²⁾。NAD⁺ の大量消費に引き続いて細胞内 ATP が減少する。これらの現象が細胞死を引き起こしていることが示唆されている。また、過剰の PARP 活性化により大量の NAD⁺、ATP が消費され細胞内レベルを維持できなくなると細胞はネクローシスを起こす。

また、アポトーシスの過程において PARP-1 がカスパーゼ-3 によって 113 kDa のタンパク質が 89 kDa と 24 kDa に限定分解を受ける^{13),14)}。この限定分解は PARP-1 の双極性核移行シグナルの双極性を分断するように起きる(図2)。カスパーゼ-3 による限定分



解により PARP-1 は DNA 損傷に依存した活性を失う。この PARP-1 の限定分解はアポトーシスの過程で過剰の NAD⁺ の消費を抑制し、細胞をネクローシスではなくアポトーシスに向かわせるために起こると考えられている¹⁵⁾。

さらに、PARP-1 ノックアウトマウスが MPTP (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine) 誘導モデルパーキンソン病やストレプトゾトシン誘導モデル糖尿病、脳虚血に対して抵抗性を持つことが報告されている¹⁾。これらのことは神経細胞や膵細胞の細胞死に PARP-1 が重要な役割を果たしていることを示唆している。

おわりに

ポリ(ADP-リボシル)化反応は多岐にわたる機能を持つため、特定の現象に研究対象を絞るのが非常に困難である。しかし、今までの報告を考えあわせると、ポリ(ADP-リボース)代謝は、ゲノム維持機構に重要な役割を果たすことにより、生体が外界の環境因子に対する抵抗性を獲得するために進化してきた機構だと考えられる。

【参考文献】

1) Shall, S. and de Murcia, G. Mutat.

- Res. 460, 1-15 (2000)
- 2) D'Amous, D. et al. Biochem. J. 342, 249-268 (1999)
- 3) Ame, J. C. et al. J. Biol. Chem. 274, 17860-17868 (1999)
- 4) Smith, S. et al. Science 282, 1484-1487 (1998)
- 5) Johansson, M. et al. Genomics 57, 442-445 (1999)
- 6) Jenn, L. et al. FEBS Lett. 446, 6-8 (1999)
- 7) Kickhoefer, V. A. et al. J. Cell Biol. 146, 917-928 (1999)
- 8) Sallmann, F. R. et al. J. Biol. Chem. 275, 15504-15511 (2000)
- 9) Pleschke, J. M. et al. J. Biol. Chem. (2000) in press as Manuscript M006520200
- 10) Maruta, H. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 236, 265-269 (1997)
- 11) Oei, S. L. and Ziegler, M. J. J. Biol. Chem. 275, 23234-23239 (2000)
- 12) Wielckens, K. et al. J. Biol. Chem. 258, 4098-4104 (1983)
- 13) Lazebnik, Y. A. et al. Nature 371, 346-347 (1994)
- 14) Tewari, M. et al. Cell 81, 801-809 (1995)
- 15) Smulson, M. E. et al. Adv. Enz. Regul. 40, 183-215 (2000)

PARP Western Blot Kit wako アポトーシス研究用

295-56801 24 レーン用 35,000 円
p.36 の商品説明をご参照下さい。

骨形成増殖因子ペプチド試薬

Osteogenic Growth Peptide

生化学用

オステオゲニック成長ペプチドは Bab *et al.*, Gazit *et al.*, らによって骨形成の作用を持つ因子として骨髄中から単離されたアミノ酸 14 個からなるペプチドであり、そのシーケンスはヒストン H4 の C 末端部分と共通の構造を有していることが分かりました。*in vitro* では骨芽細胞 (MC3T3 E1) の増殖を促進させたり、アルカリホスファターゼ活性を上昇させる生理活性作用があります。ラットに投与した *in vivo* の系では骨密度の増加が確認されています。骨芽細胞の増殖や分化における新しい因子として注目を浴びています。なお本品は固相法によって合成されたペプチドです。さらに当社では関連商品として破骨細胞吸収試薬を新たに取揃えました。

〔ペプチド配列〕

H-A-L-K-R-Q-G-R-T-L-Y-G-F-G-G-OH

$C_{68}H_{110}N_{22}O_{18} = 1523.74$

〔規格〕

含量 (HPLC): 97.0% 以上

水溶状: 試験適合

〔参考文献〕

1) Bab, I. *et al.* : *Endocrinology*, 123, 345 (1988)

2) Gazit, D. *et al.* : *Connect Tissue Res.*, 23, 15 (1989)

3) Greenberg, Z. *et al.* : *J. Cell Biochem.*, 65, 35 (1997)

4) Greenberg, Z. *et al.* : *Biochem. Biophys. Acta*, 1178, 27 (1993)

152-02311	1mg	24,000 円
-----------	-----	----------

〔関連商品〕 破骨細胞吸収試薬

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
159-02321	Osteostatin	生化学用	5mg	8,500
155-02323			25mg	30,000
032-17751	Calcitonin Acetate (Salmon)	生化学用	200 μ g	7,000
038-17753			1mg	25,000

Peptidoglycan

生化学用

ペプチドグリカンとは、N-アセチルまたは N-グルコシルムラミン酸と D-アミノ酸を含むことを特長とする糖ペプチドのポリマーで、細菌の細胞壁成分として菌の形状の保持に重要な役割を担っています。また、ペプチドグリカンは、Bリンパ球、Tリンパ球等の免疫応答細胞に対する種々の作用、血小板の破壊、繊維芽細胞の増殖促進等、様々な生物活性を示すことが知られています¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。

本品はそれぞれ *Enterococcus*

faecalis, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus aureus* より調製したペプチドグリカンです。発熱作用や SLP 試薬に対する反応など、様々な生物活性の研究に有効です。

形状: 凍結乾燥品

製法⁵⁾: 一晚培養を行った各細菌を集菌し、10% トリクロロ酢酸に懸濁して 20 分間煮沸後、37 $^{\circ}$ C、2 時間トリプシン処理を行い調製。

貯法: -20 $^{\circ}$ C 保存

〔参考文献〕

1) 土谷正和: 「透析エンドトキシンがよくわかる本」, p.135 (東京医学社)

2) 竹内理、審良静男: 実験医学, 18, 34 (2000)

3) 小谷尚三、高田春比古: 薬学雑誌, 103, 1 (1983)

4) Kotani, S., Tsujimoto, M., Koga, T., Nagao, S., Tanaka, A. and Kawata, S.: *Fed. Proc.*, 45, 2534 (1986)

5) Schleifer, K. H. and Kandler, O.: *Bacteriol. Rev.*, 36, 40 (1972)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
167-20241	Peptidoglycan Type (起源 <i>Enterococcus faecalis</i>)	生化学用	1mg	20,000
164-20251	Peptidoglycan Type (起源 <i>Lactobacillus acidophilus</i>)	生化学用	1mg	20,000
161-20261	Peptidoglycan Type (起源 <i>Staphylococcus aureus</i>)	生化学用	1mg	20,000

〔関連商品〕

微生物汚染等の検出可能

ペプチドグリカン、-グルカン検出用試薬

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
297-51501	SLP Reagent Set	微生物検出用	3ml 用	19,000
295-53001	SLP Single Reagent Set	微生物検出用	25 回用	49,000

SLP 試薬セットの標準に使用

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
162-18101	Peptidoglycan (起源 <i>Micrococcus luteus</i>)	生化学用	2ml (2 μ g)	2,700

ウエスタンブロッティング用抗体除去バッファー

PIERCE Restore™ Western Blot Stripping Buffer

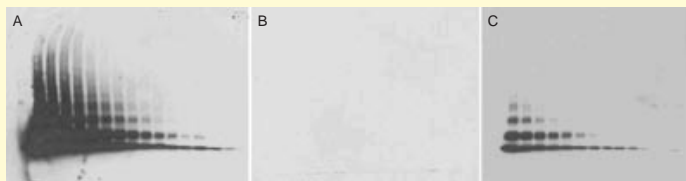
ウエスタンブロッティングによる検出において、満足な結果が得られず、再プローブするときのための抗体除去バッファーです。一次抗体や抗体濃度の再検討のために電気泳動を再度行う手間が省けます。所要時間は5～15分です(但し、一次抗体のアフィニティーに影響されません)。

〔特長〕

- 時間の節約：再泳動は必要ありません。
- 貴重なサンプルを節約：一度検出に使用した同じメンブレンを再プローブします。
- 十分な除去効果：ピアス社独自処方での十分な効果が期待できます。
- 緩和な組成：標的タンパク質にダメージを与えません。
- 悪臭なし：メルカプタンを使用していない還元剤なので、刺激臭がありません。

8 × 10cm プロット 1回に対して約 20ml 使用

〔使用例〕アッセイ条件の最適化



ピアス社のスーパーシグナル West Pico (メーカーコード: 34080) を使用した例。本品による1回の抗体除去とその後の再プローブによって二次抗体がどのように最適化されたかを示します。

- (A) 最初のプロット: 抗マウス IL-2, ラット抗体の 1,000 倍希釈された一次抗体と二次抗体として 5,000 倍希釈 HRP 標識抗ラット, ヤギを使用
- (B) (A) を 5 分間 (室温) Restore™ Western Blot Stripping Buffer でインキュベート
- (C) (B) を再プローブ: 5,000 倍希釈した一次抗体と 20,000 倍希釈した二次抗体を使用

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
527-79775	21059	Restore™ Western Blot Stripping Buffer	500ml	17,000
525-79771	21062		30ml	7,000

〔関連商品〕 HRP 標識を用いてウエスタンブロット、ドットブロットを高感度に検出するための化学発光基質セットです。

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
536-44191	34080	SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	500ml	36,300
532-44193	34079	SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Trial Kit	50ml	7,300
531-50251	34075	SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	100ml	61,600
537-50253	37071	SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate Trial Kit	20ml	13,300
534-84551	34095	SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	100ml	62,500
530-84553	34094	SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate Trial Kit	20ml	15,500

レンジで簡単染色 !!

PIERCE InstaStain™ Blue Gel Stain Paper

Coomassie® Blue-G250 をコートした電気泳動ゲル染色用シートです。

〔特長〕

- 1) 染色液の調製が不要
- 2) 短時間で染色完了
染色 10 秒、脱色 1 時間
- 3) 固相なので扱いが容易



〔使用手順〕

- 1. 前洗浄** 電気泳動後、ゲルカセット/ガラスプレートの片側を取除き、緩やかに振とうしながら、脱イオン水で3×5分間洗浄する。
- 2. 固定** 脱イオン水を捨てて、十分な量の脱色液を加え、振とうせずに室温で10分間固定する。
- 3. 染色** 脱色液からゲルとプレートを取出し InstaStain™ Blue Gel Stain Paper をゲルサイズにカットし、青色の面を下にしてゲルの上に乗せる。その上にゲルサイズにカットした3枚のフィルター紙を脱色液で湿らせて、置く。ゲルカセットのもう片方をフィルター紙の上に置きそれを、電子レンジ (500-1000W) で10秒加熱する。
- 4. 脱色** 一番上のゲルカセットとすべての紙を取除き、脱色液の中に移し、振とうしながら約1時間室温で脱色する。タンパク質のバンドはこの時点で現れる。(注意: 振とう速度の変化は脱色時間に影響を与えません。)

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
523-94633	24825	InstaStain™ Blue Gel Stain Paper	25 sheets	18,500
527-94631	24802	InstaStain™ Blue Gel Stain Paper Trial Pack	2 sheets	1,000

Coomassie® は ICI Americas の登録商標です。

1 sheet : 10cm × 10cm

High Efficiency Hybridization Solution

High Efficiency Hybridization Solution with 50% Formamide

遺伝子研究用

本品は、ノーザン、サザン及びドットプロットングのために用いる調製済みハイブリダイゼーション溶液です。通常のハイブリダイゼーション溶液に含まれるNaClとSDSの他に、ハイブリダイゼーションシグナルを上げるためデキストラン硫酸及びハイブリダイゼーションプローブの非特異的な結合をブロックするための特殊な試薬(及び50%ホルムアミド)を含んでい

ます。バックグラウンドを抑え、高いハイブリダイゼーション効率を得る事ができます。調製したトータルRNA中に存在する低含量のmRNAを、poly A⁺フラクションの分離を行うことなく検出する事ができます。またRIまたは非RI検出の両方で使用可能です。

〔貯法〕 室温

〔参考文献〕

- 1) Chomczynski, P. and Mackey, K. : *Anal. Biochem.*, 221, 303(1994)
- 2) Chomczynski, P. : *Anal. Biochem.*, 201, 134(1992)
- 3) Cornish, E. C., Beckham, S. A. and Maddox, J. F. : *Biotechniques*, 25, 948(1998)

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
544-01331	High Efficiency Hybridization Solution	100ml	13,000
541-01341	High Efficiency Hybridization Solution with 50% Formamide	100ml	14,000

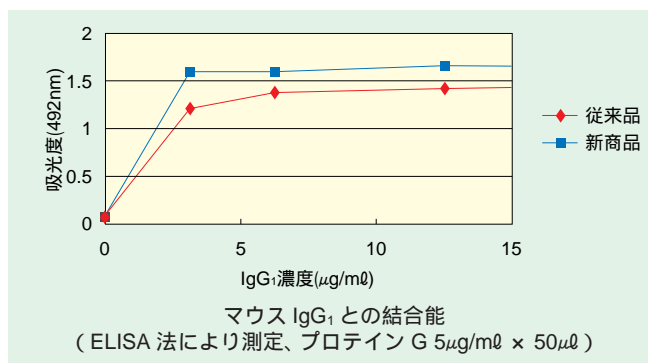
Protein G

免疫化学用

プロテイン G は免疫グロブリン G(IgG) のFcフラグメントに強く結合することが知られており、アフィニティークロマトグラフィーのリガンドとしてIgGの精製に利用されます。本品は従来品よりもIgGとの結合能が優れているのが特長です。

Source : *Streptococcus* sp.

保存条件 : 2 ~ 10 保存



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
168-20271	Protein G	免疫化学用	1mg	28,000

電気泳動用の分子量マーカー



BlueRanger™ Prestained Protein Molecular Weight Marker Mix

〔特長〕

一回使用分ずつにマイクロチューブに小分けされているので、毎回フレッシュなものが使用できます。凍結乾燥品なので室温で安定です。青色に着色されており、電気泳動の進行状況の確認に便利です。

- Myosin, 215kD
- Phosphorylase B, 120kD
- BSA, 84kD
- Ovalbumin, 60kD
- Carbonic Anhydrase, 39.2kD
- Trypsin Inhibitor, 28kD
- Lysozyme, 18.3kD

1 チューブに10µlの水を加えて溶解後、4-20% トリス・グリシン SDS-PAGE プレキャストゲルで泳動。



コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
524-79741	26681	BlueRanger™ Prestained Protein Molecular Weight	1 プレート(48 チューブ)	17,700
520-79743	26685	Marker Mix	5 プレート(5 × 48 チューブ)	66,700

Shibayagi

レビス® IgE-ELISA キット(マウス)

レビス®IgE-ELISAキット(マウス)は、マウスの血中IgE濃度をELISA法により簡便に測定できます。キットはすべて溶液タイプになっており、わずらわしい試薬の調製の必要がありません。測定時間は約5.5時間で、短時間にIgE濃度を測定する事ができます。また、測定に必要な検体量はわずか5 μ lで検体を多量に調製する必要がありません。アレルギーの治療薬の開発、研究に最適なキットです。



〔特長〕

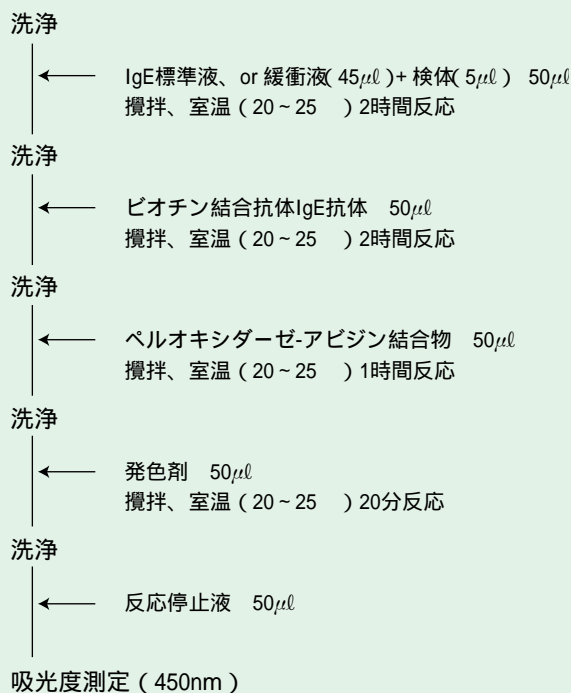
1. 約5.5時間で測定可能
2. 微量検体(5 μ l)から測定可能
3. すべての試薬が溶液タイプ
4. 幅広い測定範囲(1 ~ 100ng/ml)
5. 溶血(ヘモグロビン40mg/dl以下)の影響がない
6. 高い特異性
(IgG、IgA、IgMとの交差反応0.01%以下)

〔キット構成〕

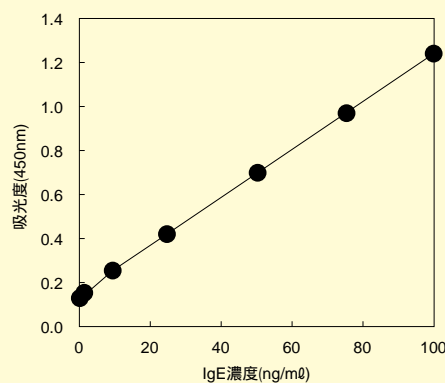
A : 抗体固相化プレート	96ウェル1枚
B : IgE標準液 100ng/ml	600 μ l × 1
C : 緩衝液	60ml × 1
D : ビオチン結合抗IgE抗体	10 μ l × 1
E : ペルオキシダーゼ-アビジン結合物	20 μ l × 1
F : 発色剤(TMB)	10ml × 1
H : 反応停止液	10ml × 1
I : 濃縮洗浄液(10×)	50ml × 1

〔操作手順〕

抗体固相化プレート



〔IgE標準曲線〕



〔同時再現性試験(N=5)〕

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean	76.98	21.02	9.58
SD	0.47	0.57	0.29
CV(%)	0.61	2.71	3.03

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
639-02891	AKRIE-010	レビス® IgE-ELISA キット(マウス)	96回用	58,000

Human AN'ALYZA Chemiluminescent Immunoassay Kit Series

Human AN'ALYZA Chemiluminescent Immunoassay Kit Series は、ヒトサイトカインを化学発光により測定する ELISA キットです。HRP 標識検出抗体、ルミノール、 H_2O_2 によりサイトカイン濃度を測定します。化学発光を用いているため、従来の発色法による ELISA キットより測定範囲が広くまた、高い感度が得られます。測定時間も約 5 時間で、短時間に測定できます。未知濃度のサイトカインの定量に有効なキットです。

〔特長〕

- 高感度
- 測定範囲が広い
- 再現性は良好
- 短時間で測定可能
- 血清、血漿、培養上清のどれでも測定可能

〔キット構成〕

- | | |
|--------------------|--------|
| 1. サイトカイン抗体固相化プレート | 1枚 |
| 2. サイトカイン標準品 | * |
| 3. HRP 標識サイトカイン抗体 | 21ml |
| 4. 測定緩衝液 | 6ml |
| 5. 標準品希釈液** | 21ml |
| 6. 10 倍濃縮洗浄液 | 100ml |
| 7. 発色基質 A | 12.5ml |
| 8. 発色基質 B | 12.5ml |
| 9. プレートカバー | 4枚 |

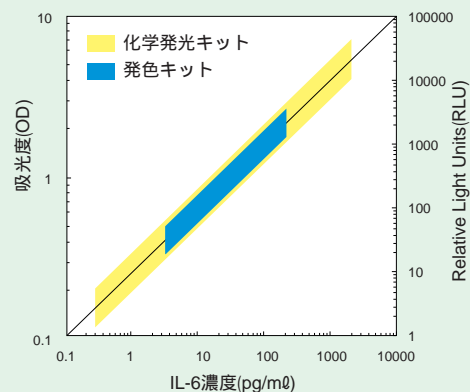
* サイトカイン標準品の容量はキットにより異なります。

** IL-2、IL-4、IL-12、TNF- α のキットには標準品希釈液が 2 種類 (血清サンプル用、培養上清サンプル用) 含まれています。

〔各キットの性能一覧〕

測定物質	感度 (pg/ml)	測定範囲 (pg/ml)	測定時間	同時再現性 CV 値 (%)	日差再現性 CV 値 (%)
Endothelin-1	0.16	0.32-1000	5 時間	2.1	7.1
GM-CSF	0.5	0.7-7000	4.5 時間	3.8	6.7
Interleukin-1	0.4	0.5-5000	5.5 時間	2.3	6.5
Interleukin-2	0.8	1.6-5000	5.5 時間	3.2	7.4
Interleukin-4	1.0	1.6-5000	5.5 時間	5.4	8.8
Interleukin-6	0.2	0.3-3000	5.5 時間	2.8	9.4
Interleukin-8	0.8	1.6-5000	5.5 時間	5.1	8.2
Interleukin-12	0.6	0.7-7000	5.5 時間	1.8	8.5
TNF-	0.5	0.7-7000	6.5 時間	3.1	6.7
VEGF	0.4	6.4-20000	5.25 時間	5.0	7.9

〔測定範囲の比較 (IL-6)〕



コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
538-76381	84004	Endothelin-1	96 回用	90,000
521-45561	84009	GM-CSF	96 回用	90,000
533-75091	84005	Interleukin-1	96 回用	90,000
524-45551	84008	Interleukin-2	96 回用	90,000
532-75181	84001	Interleukin-4	96 回用	90,000
530-75241	84002	Interleukin-6	96 回用	90,000
535-75291	84003	Interleukin-8	96 回用	90,000
530-75361	84000	Interleukin-12	96 回用	90,000
531-75771	84006	TNF-	96 回用	90,000
527-45541	84007	VEGF	96 回用	90,000

第2回 骨・軟骨系病変 2

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

軟骨肉腫：軟骨形成性の骨悪性腫瘍。腫瘍細胞による類骨形成がないのが骨肉腫と異なる。骨肉腫より発生頻度は低く、30～60才の骨盤骨、大腿骨、肋骨などに発生しやすい。悪性度は一般的に低く、発育は緩徐、遠隔転移をするものは少ない。腫大した類円形の腫瘍細胞と豊富な軟骨基質から

成る。核は濃染し、粗大なクロマチンをもつ核をみる。通常型の軟骨肉腫の他に、間葉性軟骨肉腫、脱分化型軟骨肉腫などがある。軟骨肉腫の病理学的検査法には、特殊染色法としてPAS染色とアルシアン青の重染色が用いられる。PAS染色では、腫瘍細胞の細胞質が赤紫色に染まり、アルシアン青

では、軟骨基質は青色に染色され独特な染色像を示す。また、鍍銀染色では、腫瘍細胞の細胞突起は羽毛状に黒く鍍銀され特徴的な像を示す。免疫学的検査法ではS-100蛋白およびⅡ型コラーゲンの抗体が用いられる。

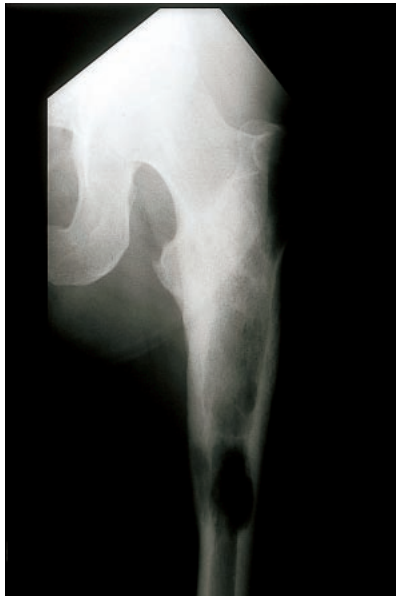


図1. 脱分化型軟骨肉腫(大腿骨)
 大腿骨の骨幹部上半部に分葉状部分と境界明瞭な透過像(脱分化部分)から成っている病変である。

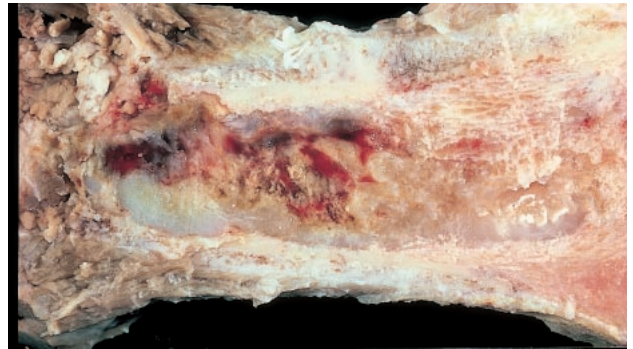


図2. 脱分化型軟骨肉腫の肉眼像
 骨髓腔を置換する半透明状の軟骨肉腫の部分に、出血、破壊を伴う未分化肉腫像の部分の割合境界明瞭にみられるが特徴像である。(図1と同一症例)



図3. 大腿骨に発生した間葉性軟骨肉腫
 骨外に半球状に突出し、骨本質と骨髓内に発育する腫瘍、出血と破壊巣を伴い悪性を示唆している。



図4. 大腿骨の軟骨肉腫
 分葉状の骨透過像を特徴とする大きい腫瘍である。



図5. 大腿骨の軟骨肉腫
 転子間に骨破壊を伴う軟骨性腫瘍(半透明状)で一部骨外に浸潤している。

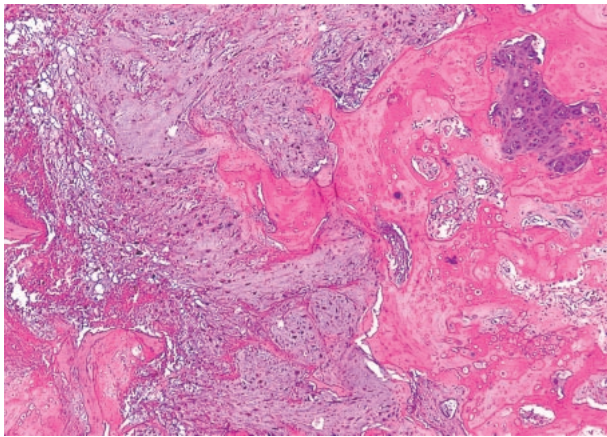


図6. 軟骨肉腫 H・E 染色 × 10.
核異型のある腫瘍細胞が分葉状に増殖した構造内に見られる。基質はヘマトキシリンに強く(紫色)染色され、その中に核異型の強い腫瘍細胞が多くみられる。また、骨組織は桃赤色に染色され、ヘマトキシリンで青紫色を帯びている。

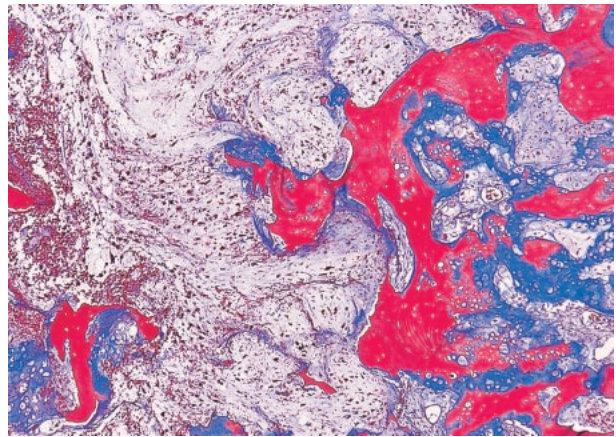


図7. 軟骨肉腫 マッソントリクローム染色 × 10.
軟骨基質は淡青色に染色され、腫瘍細胞が鉄ヘマトキシリンで黒褐色に基質内に埋もれているのがわかる。骨組織は赤色を呈している。

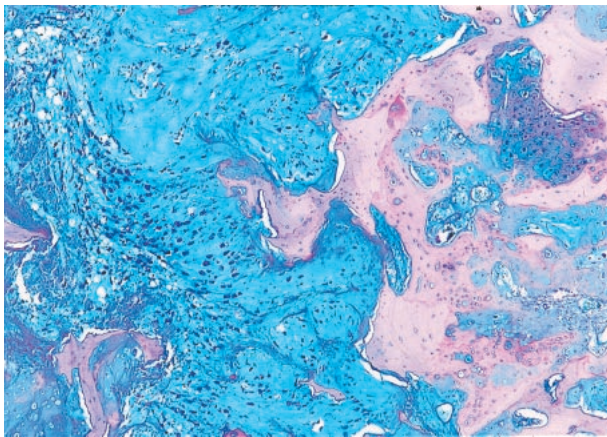


図8. 軟骨肉腫 アルシアン青とPASの重染色 × 10.
軟骨基質はアルシアン青で強陽性(青緑色)に染色され、この腫瘍の特徴を示している。また、骨組織はPASで弱陽性(淡紫色)を呈している。

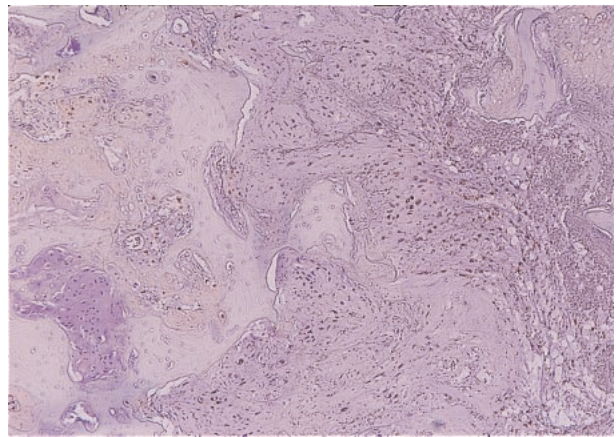


図9. 軟骨肉腫 酵素抗体法(S-100蛋白抗体) × 10.
軟骨基質内の腫瘍細胞は、S-100蛋白抗体で強陽性を示している。

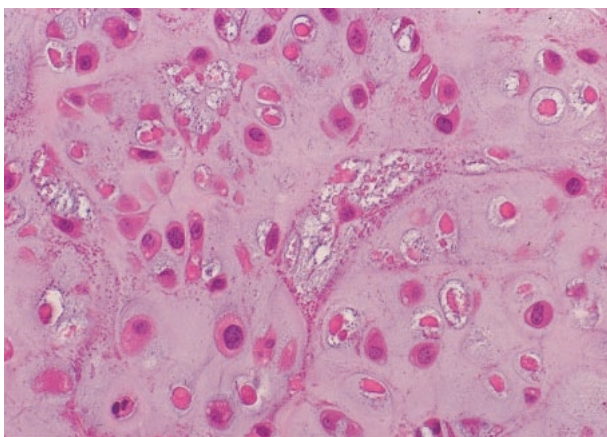


図10. 軟骨肉腫 H・E 染色 × 40.
ヘマトキシリンで青色に染色された基質を背景に大小不同のある核異型の強い腫瘍細胞が多数認められる。

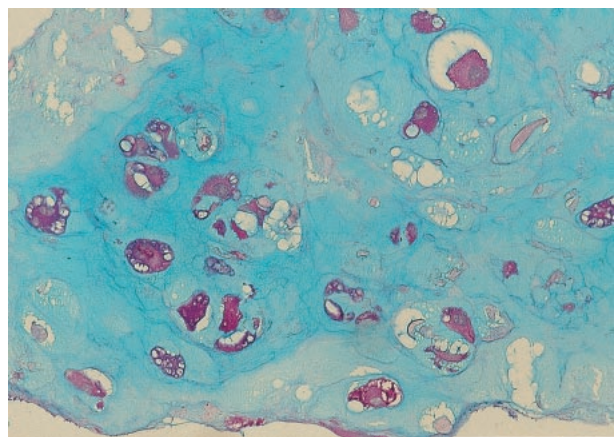


図11. 軟骨肉腫 アルシアン青とPASの重染色 × 40.
軟骨基質はアルシアン青で緑青色に、軟骨肉腫細胞の細胞質はPASで赤紫色を呈している。

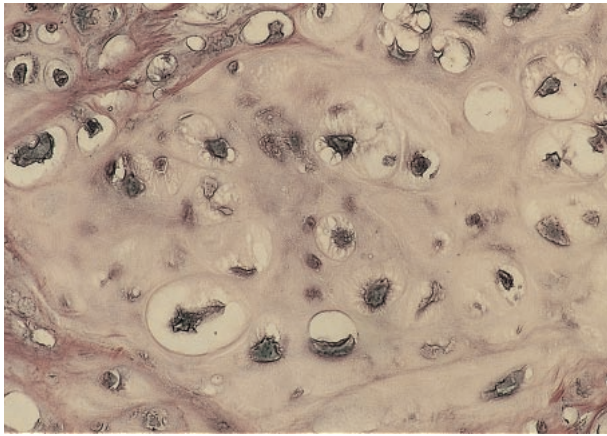


図 12. 軟骨肉腫 鍍銀染色 × 40.
腫瘍細胞の細胞突起の細線維は羽毛状に黒く鍍銀され、この腫瘍細胞の特徴を示している。

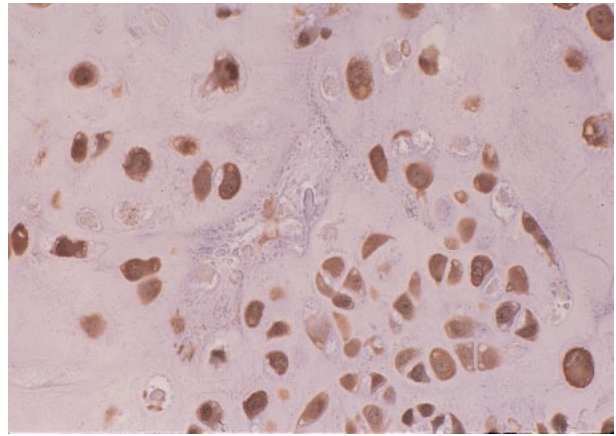


図 13. 軟骨肉腫 酵素抗体法 (S-100 蛋白抗体) × 40.
大小不同のある腫瘍細胞が S-100 蛋白抗体で褐色強陽性を示している。

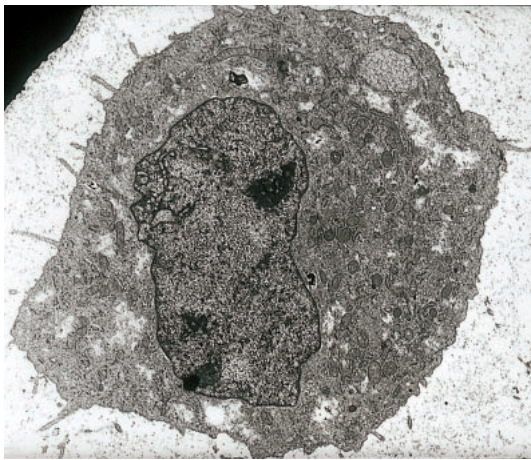


図 14. 軟骨肉腫 TEM 像 × 3000.
絨毛状の胞体突起をもつのが特徴で、細胞質内には糸粒体や粗面小胞体を見る。また、明るく抜けている部分は糖原を示す。細胞周囲には微細な線維が目立つ。

〔参考文献〕

- 1) 牛込新一郎, 町並陸生他: 骨・軟部腫瘍の病理 - 診断へのアプローチ: 骨腫瘍ならびに腫瘍様病変. 病理と臨床. 文光堂.
- 2) 水口國雄, 石川喜美男, 三瓶接子, 宮哲正, 牛込新一郎 他: 組織アトラス - 正常と病変 -. Medical technology. 医歯薬出版
- 3) 田所衛, 石川喜美男, 宮哲正, 牛込新一郎 他: 実践病理組織細胞学カラー図鑑 [肉眼像・組織像・細胞像]. HBJ 出版局

硬組織の病理標本作製に！

骨や歯といった硬組織の薄切片作製にはパラフィン包埋の場合、脱灰処理が必要です。一方で、近年硬組織分野の研究において、その無機塩の存在や分布・石灰化度の違いを知るために非脱灰での標本作製の重要性も高まっています。

硬組織の病理標本作製に必要な試薬類を各種取揃えておりますので目的に合わせてお選び下さい。

脱灰標本作製用

I. 脱灰液

脱灰法	脱灰液	成分	特性
無機酸 (塩酸)	塩酸	10% 塩酸	脱灰能力は良いが染色性低下の影響あり
	硝酸	8% 硝酸	
有機酸	ぎ酸	5% ぎ酸	無機酸より組織への障害は少ない
	トリクロロ酢酸	5% トリクロロ酢酸	
迅速脱灰法 (混合酸)	脱灰液 A (ブランク・リュクロ処方)	塩化アルミニウム (結晶) 7.0g 塩酸 8.5ml ぎ酸 5.0ml 蒸留水で全量 100ml にする	脱灰時間: ぎ酸、硝酸の約 3 倍 抗原性の保持は良くない
中性脱灰法	脱灰液 B (EDTA 処方)	0.5mol/l EDTA 溶液が主成分 (pH7.0 ~ 7.5)	中性で脱灰でき染色性に優れるが処理時間は長い 免疫染色に最適

II. 脱灰中和液: 5% 硫酸ナトリウム溶液

〔次頁へ続く〕

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
089-07675	10% 塩酸	病理研究用	500ml	2,300
146-07075	8% 硝酸	病理研究用	500ml	2,100
062-04025	5% ぎ酸	病理研究用	500ml	2,100
205-14905	5% トリクロロ酢酸溶液	病理研究用	500ml	2,400
047-21911	脱灰液 A(ブランク・リュクロ処方)	病理研究用	1ℓ	3,600
041-22031	脱灰液 B(EDTA 処方)	病理研究用	1ℓ	5,200
196-11985	5% 硫酸ナトリウム溶液	病理研究用	500ml	3,000

非脱灰標本作製用

オステオレジン™ 包埋キット

非脱灰硬組織用の樹脂包埋キットであり、特長として樹脂重合開始剤に当社開発の V-601 を使用しています。この V-601 は非ニトリル系アゾ化合物であり、従来から使用されている過酸化ベンゾイルと比較して一般に衝撃に対し安定で、爆発などの危険性も少ない等の特性をもっています。樹脂は疎水系の MMA(メタクリル酸メチル, モノマー) を基剤としています。本キットから得られた非脱灰硬組織切片は脱樹脂後、一般染色をはじめ、ピラヌエバ骨染色、免疫染色などが可能です。



歯牙・顎骨部(イヌ)
 (アリザリンレッド:石灰化骨(赤茶色)
 アルシアンブルー:軟骨(青色)
 ヘマトキシリン:核(濃青紫色))
 (× 200)

[キット内容]

樹脂基剤 MMA:メタクリル酸メチル,モノマー)	500ml
重合開始剤 V-601)	1g × 5
脱樹脂剤 AME:1-アセトキシ-2-メトキシエタン)	500ml
コロジオン(10%)	100ml

* キットの詳しい使用方法につきましてはパンフレットを用意しておりますので
 ご照会下さい。



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
297-56001	オステオレジン™ 包埋キット	病理組織包埋用	1キット	20,000

病理組織固定液

カルノア液

組織固定用

代表的なアルコール系固定液であり、大腸などの粘液質組織の固定に使用されグリコーゲンや酸性ムコ多糖類などの水溶性物質の保存に適します。特長として浸透力が強く、早く固定でき、通常2~3時間固定後、純エタノールに移します。

カルノア液は、氷酢酸による溶血やエタノールによる細胞収縮を起こしま

すので目的に合わせて各種固定液*をお選び下さい。

[組成]

純エタノール	600ml
クロロホルム	300ml
氷酢酸	100ml

*: 希釈ホルマリン液、中性緩衝ホルマリン液の他、ホルマリンの刺激臭を抑えた"マイルドホルム"もあります。ご照会下さい。

034-17711	1ℓ	3,600円
-----------	----	--------

ベンゾジアゼピン系化合物

～ 新製品追加しました! ～

ベンゾジアゼピン骨格を基本構造とする化合物群は中枢抑制作用として抗不安作用、筋弛緩作用、催眠作用、抗痙攣作用、馴化作用を有しています。ベンゾジアゼピンに特異的な受容体は神経終末に局在しており、この受容体に結合するとGABA (γ -aminobutyric acid) のGABA受容体との結合能が増し、結果的に神経細胞膜の興奮性が抑制されると考えられています。これらは主に動物を使った神経系の薬理実験に使用されます。

	コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
	* 016-17171	Alprazolam	生化学用	500mg	30,000
	* 020-13471	Bromazepam	生化学用	500mg	25,000
NEW	* 023-14321	Brotizolam	生化学用	500mg	30,000
	* 031-17221	Chlordiazepoxide	生化学用	500mg	15,000
	* 038-17231	Chlonazepam	生化学用	500mg	25,000
	* 045-18901	Diazepam	生化学用	500mg	3,780
NEW	* 051-06831	Estazolam	生化学用	500mg	30,000
NEW	- 057-06811	Etizolam	生化学用	500mg	25,000
	* 067-03791	Flunitrazepam	生化学用	500mg	25,000
	* 060-03801	Flurazepam	生化学用	500mg	20,000
	* 122-04591	Lorazepam	生化学用	500mg	25,000
	* 139-12971	Medazepam	生化学用	500mg	20,000
NEW	* 135-13791	Midazolam	生化学用	500mg	30,000
	* 142-04831	Nitrazepam	生化学用	500mg	3,600
	* 158-02031	Oxazepam	生化学用	500mg	25,000
	* 162-19181	Prazepam	生化学用	500mg	30,000
NEW	- 203-15121	Tofisopam	生化学用	500mg	25,000
	* 205-14221	Triazolam	生化学用	500mg	30,000

* 印品は向精神薬該当品目ですのでご購入の際には「向精神薬試験研究施設設置者登録証」が必要です。また、ここに記載されている試薬は試験・研究用にのみ使用されるものであり、医療には用いられません。

Bacitracin Zinc Salt

生化学用

バシトラシンは *Bacillus subtilis* から得られるペプチド系抗生物質です。グラム陽性菌に有効で、細菌の細胞壁ペプチドグリカン合成系に作用します。

本品は力価が高く、70,000units/g以上を保証しています。

〔規格〕

力価(乾燥物計算): min. 70,000units/g

希塩酸溶状: 試験適合

乾燥減量(60、減圧): max. 5.0%

Source: *Bacillus subtilis*

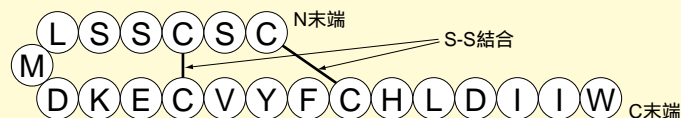
025-14283	5g	6,000円
029-14281	20g	20,000円

高血圧の研究に

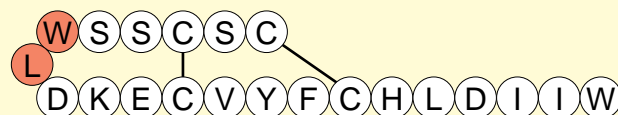
エンドセリン

エンドセリンは、内皮細胞の培養上清から単離・同定された物質で、強力な血管収縮作用・細胞増殖作用を持つ生理活性ペプチドです。異なる遺伝子にコードされる3つのアイソフォームがあり、いずれも21残基のアミノ酸から成ります。

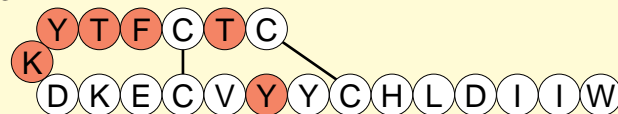
エンドセリン-1



エンドセリン-2



エンドセリン-3



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
052-06861	Endothelin-1(human, porcine, dog, rat)	生化学用	0.5mg	43,000
059-06871	Endothelin-2(human)	生化学用	0.5mg	43,000
056-06881	Endothelin-3(human, rat)	生化学用	0.5mg	43,000

第42話 エンドトキシンの糖鎖

エンドトキシン、すなわちリポ多糖(LPS)は、リポドAと呼ばれる脂質部分と、コア糖鎖・O抗原多糖からなる糖鎖部分で構成されています。リムルス試験に関わる方々は、リムルス試験の活性化をはじめとしたエンドトキシンの生物活性の多くを担うリポドAに興味を持たれることが多いと思います。エンドトキシンの糖鎖の部分については、いかがでしょう。著者自身もどちらかというリポドAの方に興味を持ってきました。実際 Talking of LALでも、第26話でO抗原多糖を取り上げた以外は、エンドトキシンの糖鎖にあまり触れていません。今回は、エンドトキシンの糖鎖部分について、少し考えてみたいと思います。

大腸菌の中にも、丸くなめらかなコロニーを形成する菌株と周辺がギザギザのコロニーを形成する菌株が認められます。これらはS型菌、R型菌と呼ばれており、O抗原多糖を持った菌株はS型、O抗原多糖を欠いた菌株はR型を示すと言われていました。R型菌のLPSは糖鎖が短いため、疎水性が

高くなり精製方法や物理化学的な性質がS型菌のLPSと異なることが知られています¹⁾。

コア糖鎖の部分は、比較的菌種間で共通の構造が認められる部分です。特に腸内細菌では共通部分がよく保存されており、サルモネラではすべての血清型のコア糖鎖は同一だそうです²⁾。しかし、種々の細菌のコア糖鎖を比較すると多くのバリエーションが認められます。例えば、コア糖鎖に特徴の一つと考えられるKdo(3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid)がVibrio属ではりん酸化されていたり、Acinetobacter calcoaceticusでKdoの代わりにKO(D-glycero-D-talo-2-octulosonic acid)が見つかったりしています。このような違いは、LPSの分解性などに影響を及ぼすことがわかっています³⁾。

細菌の糖鎖の中には、病原性に強く関わっているものがあります。

Neisseria gonorrhoeae(淋菌)やN. meningitidis(髄膜炎菌)はO抗原を持たないR型菌です。これらの菌のコア糖鎖は、ヒト赤血球上の糖脂質と同一の構造を持っており、菌が宿主から異物としての認識を受けないようにする働きがあります²⁾。同様の糖鎖がHaemophilus influenzae(インフルエンザ菌)でも認められています。これらの菌は、宿主の抗原と同じ抗原を持つという戦略で、細胞内寄生を可能にしていると考えられます。

神経や筋肉の麻痺を引き起こすギラン・バレー症候群やフィッシャー症候群も、

Campyrobacter jejuniのコア糖鎖が深く関わっている病気です⁴⁾。この菌の中には、動物神経細胞のガングリオシドと同じ構造を持つものがあります。「そのような菌が感染することによって、宿主の生体防御系が抗ガングリオシド抗体を作ってしまう、感染菌のみならず宿主自身の神経細胞にも傷害を与えてしまう」というシナリオは、単純ながらもなかなか恐ろしいと思うのですがいかがでしょう。

エンドトキシンの活性を考えると、発熱性やサイトカインの誘導といった華々しい生物活性を担うリポドAと共に、抗原性などで動物に大きな影響を与えている糖鎖部分の作用も重要と考えられます。糖鎖部分の難しさは、リポドAのように種々の菌で(強さに違いはあるものの)同様の生物活性を持っているのではなく、個々の菌で作用が異なる点ではないでしょうか。分析技術の進歩によって、菌株ごとのLPSの構造がどんどん明らかになってくるものと思われます。今後、私たちは「エンドトキシン」の個性にも目を向ける必要があるのかもしれません。

[参考文献]

- 1) Galanos, C. and Luderitz, O.: "Handbook of Endotoxin, vol.1: Chemistry of Endotoxin" ed. by Rietschel, E.T., Elsevier, Amsterdam, p.46 (1984)
- 2) 川原一芳, 一色恭徳: 日細菌誌, 50, 451 (1995)
- 3) 中野昌康, 小玉正智編: 「エンドトキシン」, p.15, (講談社サイエンティフィック 1995)
- 4) 結城伸泰: 日細菌誌, 50, 991 (1995)

今回は「第43話 LALの特異性をもう一度」の予定です。



忍法「似たもの仮面」
私は誰？ 実はエンドトキシンです。

EGF Receptor Solution, from Human Carcinoma A431 Cell

生化学用

EGFレセプター(上皮増殖因子受容体)は、分子量約130kのタンパク質に糖鎖が付加した糖タンパク質で、EGF、TGFとの結合部位である細胞外ドメイン(糖鎖が付加したドメイン)、膜貫通ドメイン、細胞質内に位置するチロシンキナーゼドメイン(がん遺伝子v-erbBの産物と相同性をもつことが知られている)及びそのC末端の自己リン酸化部位からなっています。EGFが細胞膜のEGFレセプターに結合すると、染色体DNAの複製が開始され細胞分裂が起こり、その過程で、細胞膜ではEGFレセプターのリン酸化、インターナリゼーション(陥入)が起こり、細胞内ではイオンやpHの急速な変動、さまざまな生化学反応を司

る酵素の活性化やc-fos、c-myc等のプロトオンコジーン発現の誘導等が起こります。

本品は、アフィニティークロマトグラフィーを用いてA431細胞から精製したEGFレセプターです。抗がん剤等の開発研究に有効です。

形状: 20 mmol/l HEPES (pH 7.4), 130mmol/l NaCl, 10% Glycerol, 0.05% Triton X-100.

純度: 90%以上(SDS-PAGE)

活性: ロット毎に表示
(活性の定義)30、1分間でAngiotensinに1 pmolのリン酸を転移するのに必要なEGFレセプター量を1unitとする。

[貯法] - 80 (注意:凍結融解を繰り返さないで下さい。)

[参考文献]

- 1) Hunter, T.: *Nature*, 311, 414 (1984)
- 2) Gamou, S., Shimagaki, M., Minoshima, S., Kobayashi, M. and Shimizu, N.: *Exp. Cell Res.*, 183, 197 (1989)
- 3) Miller, J.A.: *Chem. Biol. Interact.*, 92, 329 (1994)
- 4) McCall, J. et al.: *J. Med. Chem.*, 26, 1791 (1983)
- 5) Weinshilboum, R.M. et al.: *FASEB J.*, 11, 3 (1997)
- 6) Raftogianis, R.B. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 239, 298 (1997)
- 7) Campbell, N.R. et al.: *Biochem. Pharmacol.*, 36, 1435 (1987)

546-01391 10units 照会

ZAP-70, Human, recombinant, Solution

生化学用

ZAP-70は、サイトゾルタンパクチロシンキナーゼの一種で、T細胞とナチュラルキラー細胞にのみ発現します。T細胞受容体刺激により活性化され、抗原刺激を伝達するうえで重要な因子です。またヒト免疫不全症の一つである重症複合免疫不全症はZAP-70遺伝子の変異が発症の原因になっている事が知られています。

本品はヒトZAP-70の全長をクローニングし、バキュロウイルスにより発

現させたヒスチジン-タグを有する組換えタンパク質です。免疫機能等の研究に有効です。

起源: バキュロウイルスより昆虫細胞に感染させ発現したヒスチジン-タグを有するヒトZAP-70。

形状: 25 mmol/l HEPES (pH 7.4), 0.5 mmol/l DTT, 150mmol/l NaCl, 50% Glycerol.

純度: 90%以上(SDS-PAGE)

活性: 150nmol/min/mg using E4Y (polyglutamic acid: tyrosine) as the substrate.

[貯法] - 20

[参考文献]

- 1) Isakov, N. et al.: *J. Biol. Chem.*, 271, 15753 (1996)
- 2) Chan, A. et al.: *Cell*, 71, 649 (1992)

549-01381 20µg 照会

薬物代謝の研究等に有効

Sulfotransferase, Human, recombinant, Cytosolic Extract Solution

硫酸転移酵素は、水酸化合物やアミン化合物等の様々な生体外異物や内因的な基質に対し、硫酸化を触媒します。また、薬剤等の生体外異物を硫酸抱合し、尿と共に排出させるため硫酸抱合酵素とも呼ばれ、薬物代謝の研究に用いられます。

本品は、ヒトの硫酸転移酵素1E及び2A1をコードするcDNAをバキュロウイルスにより発現させたサイトゾル抽出液です。

比活性: 1E 150 pmol/min/mg toward the substrate estrone.

2A1 300 pmol/min/mg toward the substrate dehydroepiandrosterone (DHEA)

[貯法] - 80

[参考文献]

- 1) Miller, J.A.: *Chem. Biol. Interact.*, 92, 329 (1994)
- 2) McCall, J. et al.: *J. Med. Chem.*, 26, 1791 (1983)
- 3) Weinshilboum, R.M. et al.: *FASEB J.*, 11, 3 (1997)
- 4) Raftogianis, R.B. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 239, 298 (1997)
- 5) Campbell, N.R. et al.: *Biochem. Pharmacol.*, 36, 1435 (1987)

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
540-01311	Sulfotransferase 1E, Human, recombinant, Cytosolic Extract Solution	生化学用	250µg	39,000
547-01321	Sulfotransferase 2A1, Human, recombinant, Cytosolic Extract Solution	生化学用	250µg	39,000

果実飲料のエタノール分測定に！

0.347mol/l クロム酸カリウム溶液

0.347mol/l チオ硫酸ナトリウム溶液

果実飲料試験用

JAS 規格(日本農林規格)の「果実飲料の日本農林規格に定める基準の測定方法」に記載されている試験項目、エタノール分測定の際に使用される試薬です。

既に調液済みですので、そのままお使い頂けます。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
161-20205	0.347mol/l Potassium Chromate Solution	果実飲料試験用	500ml	3,000
192-12185	0.347mol/l Sodium Thiosulfate Solution	果実飲料試験用	500ml	3,000

ポリフェノール テアフラビン

紅茶の色素であるテアフラビンは、緑茶等に含まれるカテキン類が酸化的に縮重合した構造を有するポリフェノールです。抗酸化作用、胃がん抑制作用等の生理活性が報告されています。

〔参考文献〕

- 1) Lin, J.K., Chen, P.C. *et al.* : *J.Agric. Food Chem.*, 48, 2736(2000)
- 2) Hibasami, H., Komiya, T., Achiwa, Y. *et al.* : *Int. J. Mol. Med.*, 1, 725(1998)

コード No.	品名	含量	規格	容量	希望納入価格(円)
201-15161	Theaflavin	90%	生化学用	1mg	12,000
202-15191	Theaflavin-3-gallate	90%	生化学用	1mg	15,000
204-15271	Theaflavin-3'-gallate	90%	生化学用	1mg	15,000
208-15171	Theaflavin-3,3'-digallate	90%	生化学用	1mg	15,000

〔関連商品〕

コード No.	品名	含量	規格	容量	希望納入価格(円)
059-06751 055-06753	(-)Epicatechin, from Green Tea	98%	生化学用	10mg 50mg	8,000 24,000
052-06741 058-06743	(-)Epicatechin Gallate, from Green Tea	98%	生化学用	10mg 50mg	12,000 38,000
056-06761 052-06763	(-)Epigallocatechin, from Green Tea	98%	生化学用	10mg 50mg	12,000 38,000
059-05411	(-)Epigallocatechin Gallate	90%	生化学用	100mg	13,000
040-27741 046-27743	Daidzin, from Soybean	98%	生化学用	10mg 100mg	13,500 98,000
043-28071 049-28073	Daidzein, from Soybean	98%	生化学用	10mg 100mg	5,000 29,800
077-04691 073-04693	Glycitin, from Soybean	98%	生化学用	10mg 100mg	13,500 98,000
070-04701 076-04703	Glycitein, from Soybean	98%	生化学用	10mg 100mg	13,500 98,000
070-04681 076-04683	Genistin, from Soybean	98%	生化学用	10mg 100mg	13,500 98,000
546-00171	Genistein	98%	生化学用	20mg	5,000

Fast LC における検出器のレスポンスの影響

和光純薬工業株式会社 大阪研究所 福本 昌巳

近年、環境問題への関心の高まりから HPLC 分析に使用される有機溶媒量の削減やその努力が行われ、また、ドラッグディスカバリー分野に代表される分析検体数の増加に伴う分析時間の短縮が強く求められている。有機溶媒量の削減にはカラム内径を細くする方法とカラムの長さを短くする方法とがあり、分析時間を短縮するためには流速を上げる方法とカラムの長さを短くする方法とがある。特に、これら方法の中でカラムサイズのショート化は環境、コスト及び処理時間の面から大きなメリットがあるものと考えられる。

カラムサイズのショート化が可能に

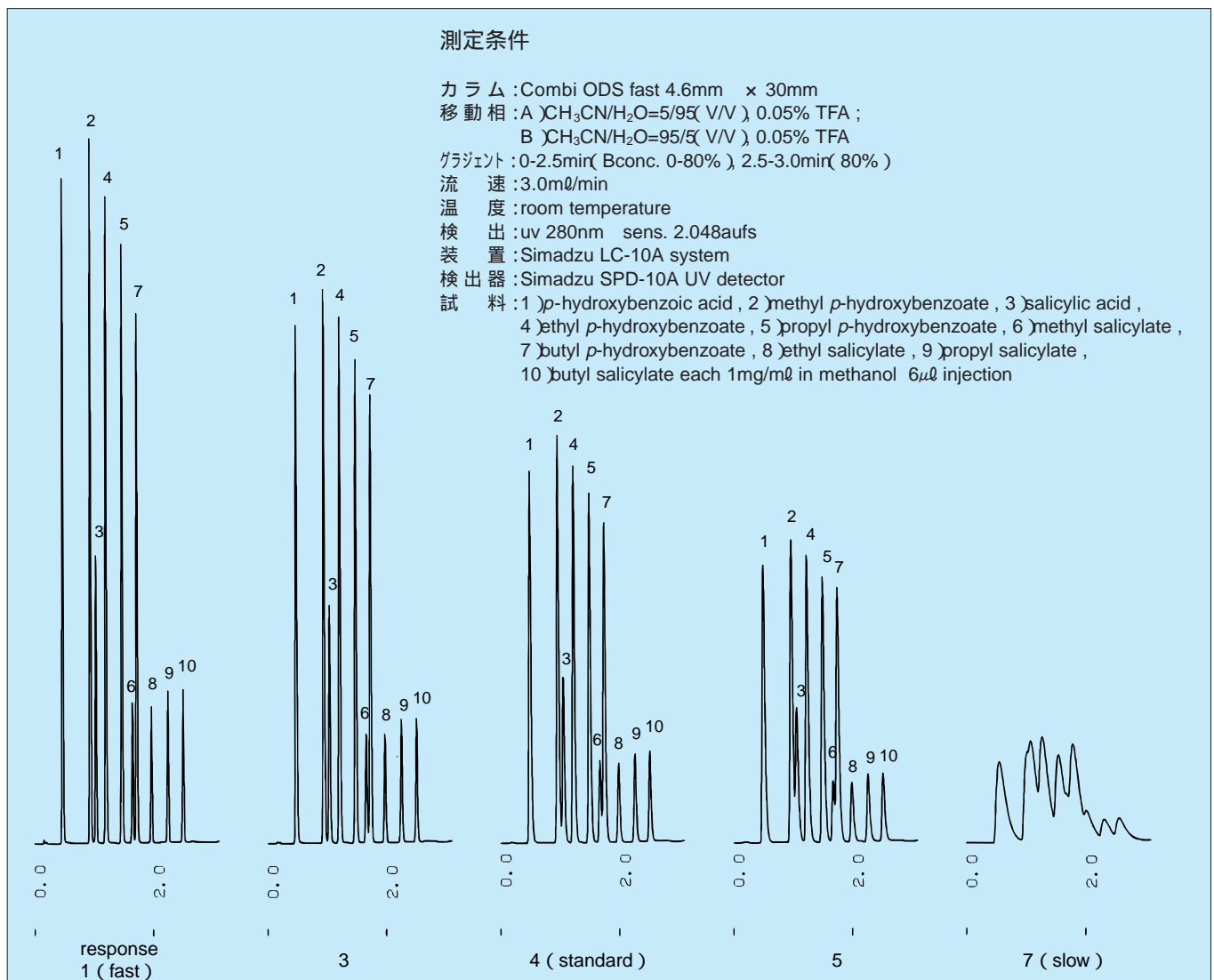
なった背景には、HPLC 装置の高性能化(配管系での拡散が少なく、検出器のレスポンスをより細かく調節できるようになった)と充てん剤の製造技術及び充てん技術の進歩によるところが大きい。しかし、ショートカラムの性能を十分に引き出すためには取り扱い上いくつかの注意が必要である。ポンプの流量精度、インジェクターの注入機能、分析セルの適正、カラムと配管の接続などに注意を払うことは一般の分析と同じであるが、Fast LC では検出器のレスポンス設定も重要になる。下図に検出器のレスポンスを変化させたときのクロマトグラムの変化を示した。

Fast LC ではピーク幅、ピーク間隔が狭いのでレスポンスの設定がクロマトグラムに大きく影響することがわかる。

以上、Fast LC でカラムが本来持つ高い分離性能を得るためにはポンプの流量精度、インジェクターの注入機能、分析セルの適正、カラムと配管の接続などのほかに検出器のレスポンスの速さも重要であることがわかる。

[参考資料]

Wakopak Combi ODS fast の分離性能
和光時報 p14, Vol.68, No.4 (2000)



ラインナップ充実!!

t-ブチルメチルエーテル 300, 2000

残留農薬・PCB 試験用

本品は 300 倍及び 2000 倍濃縮液中に妨害物質を含まないことを保証しています。被検物質から農薬や PCB を抽出、精製するのに最適です。

〔規格〕

外 観：無色透明の液体
 密度(20℃): 0.739 ~ 0.742g/ml
 水分：0.1%以下
 揮発物：2ppm 以下
 残留農薬・PCB 試験適合性：試験適合

残留農薬・PCB 試験適合性
 300 倍及び 2000 倍濃縮液中に
 GC-ECD において、不純物が有機塩素系農薬 -BHC(20pg) のピーク高の 1/2 以下であること
 GC-FPD において、不純物が有機りん系農薬 MPP(0.5ng) のピーク高の 1/25 以下であること

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
024-14351	t-ブチルメチルエーテル 300	残留農薬・PCB 試験用	1ℓ	6,500
021-14361	t-ブチルメチルエーテル 2000	残留農薬・PCB 試験用	1ℓ	7,000

〔関連商品〕


残留農薬試験用

蒸留水(ヘキサン洗浄品)

本品は n-ヘキサンにて洗浄した蒸留水です。適合性試験により農薬分析時の妨害物質を含まないことを保証しており、残留農薬分析における抽出溶媒として最適です。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
040-28081	蒸留水(ヘキサン洗浄品)	残留農薬試験用	1ℓ	2,000
046-28083			3ℓ	4,800

コンビナトリアルケミストリー合成における迅速精製に! 分取 TLC にかわる新しいツールです!!

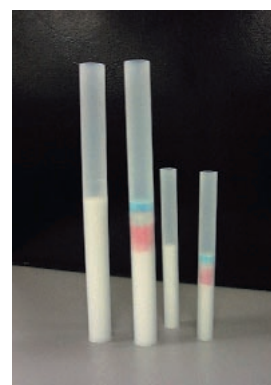
 **Trikonex** 分取クロマトグラフィー用
 クロマトフラッシュチューブ

〔特長〕

- 少量のサンプルを迅速に精製可能です。
- 特別な装置を必要としません。
- 分離化合物はカラムチューブを専用カッターで切断して簡単に取出せます。
- 分取用 TLC などのように固着剤は使用していません。
- UV 蛍光指示薬(254nm)入りで、UV ランプで分離状況を確認できます。

〔操作例〕

1. あらかじめ適当な展開条件を TLC で設定する
2. 溶離溶媒でカラム上部を湿らせる
3. 溶媒に溶かした試料をアプライする
4. 溶離溶媒を加え展開する
5. カラムを UV ランプで照射する
6. バンドを専用カッターで切断する
7. 適当な溶媒で抽出する



	フラッシュチューブ 2002	フラッシュチューブ 2008
サイズ	12 × 125mm	17 × 200mm
チューブ	ポリエチレン製	
担体	破碎状シリカゲル(粒子径 30μm 以下) UV 蛍光指示薬(254nm)入り	
担体量	2.0g	8.0g
試料負荷量	2 ~ 50mg	20 ~ 200mg

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
522-77341	FTT2002	Flash Tube2002	20 本入り	20,000
529-77351	FTT2008	Flash Tube2008	20 本入り	25,000
526-77361	FTC2008	2002,2008 用 Tube Cutter	1 個	3,200

コンビナトリアルケミストリーに最適

プレセップ® けいそう土、顆粒状

顆粒状けいそう土を充てんした前処理用シリンジ型カラムです。水系試料をけいそう土カラムに保持させた後、有機溶媒を流すことで、けいそう土の表面上で液-液分配抽出が行われます。カラム内での処理のため、分液漏斗や試験管を用いた場合に比べ、効率の良い液-液抽出が可能です。

各種カラムサイズを取揃えておりますので、試料の量にあわせて選択下さい。

〔特長〕
短時間での抽出が可能
溶媒使用量の低減が可能
回収率・再現性に優れた手法



〔仕様・規格〕

カラム

カラム容量	充てん剤量	保持容量
6ml	1g	水 1ml
15ml	2g	水 2ml
25ml	4.5g	水 5ml

けいそう土

外観	白色顆粒状
粒度分布	0.5 ~ 1.4mm:60%以上
乾燥減量	2.0%以下

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
292-35051	プレセップ® けいそう土、顆粒状(カラム容量 6ml)	試料前処理用	100本	22,000
298-35151	プレセップ® けいそう土、顆粒状(カラム容量 15ml)	試料前処理用	100本	24,000
294-35251	プレセップ® けいそう土、顆粒状(カラム容量 25ml)	試料前処理用	100本	26,000

その他のサイズがご入用な場合は、当社までご連絡下さい。

〔関連商品〕

コンビナトリアルケミストリー用 HPLC カラム

ワコーパック® Combi ODS, Combi ODS fast, Combi CN

コンビナトリアルケミストリーにおいて要求される、迅速な分析・分取精製を可能にした HPLC 用ショートカラムです。

Wakopak® Combi ODS(粒子径 5 μm)

カラムサイズ	カラムタイプ	記号	希望納入価格(円)
2.0 × 50mm	ウォーターズ	エニW	27,000
4.6 × 50mm	デュボン	エカD	27,000
	ウォーターズ	エカW	
4.6 × 50mm × 4本セット	デュボン	エイD	80,000
	ウォーターズ	エイW	
20.0 × 50mm	ウォーターズ	エXW	90,000
28.0 × 50mm	ウォーターズ	エツW	220,000

Wakopak® Combi CN(粒子径 5 μm)

カラムサイズ	カラムタイプ	記号	希望納入価格(円)
2.0 × 30mm	ウォーターズ	ナナW	27,000
2.0 × 50mm	ウォーターズ	ナニW	27,000
	デュボン	ナQD	
4.6 × 30mm	ウォーターズ	ナQW	27,000
	デュボン	ナカD	
4.6 × 50mm	ウォーターズ	ナカW	27,000
	デュボン	ナイD	
4.6 × 50mm × 4本セット	ウォーターズ	ナイW	80,000
	デュボン	ナXD	
20.0 × 50mm	ウォーターズ	ナXW	90,000
28.0 × 50mm	ウォーターズ	ナツW	220,000

Wakopak® Combi ODS fast(粒子径 3 μm)

カラムサイズ	カラムタイプ	記号	希望納入価格(円)
2.0 × 30mm	ウォーターズ	メナW	30,000
4.6 × 30mm	デュボン	メQD	30,000
	ウォーターズ	メQW	

キラル化合物の絶対配置決定試薬としての 亜鉛ポルフィリン二量体

ERATO 井上光不斉プロジェクト・大阪大学 Victor Borovkov、井上 佳久

はじめに

パストゥールが酒石酸ナトリウムアンモニウムの結晶を顕微鏡で観察し、互いに鏡像関係にある2種類の結晶を見つけて顕微鏡下で選り分け、それぞれの結晶を溶かした水溶液が逆の旋光性(直線あるいは円偏光に対する振舞いが違う)を示したことから、分子にキラリティー(掌性:ギリシャ語の *cheir*(掌)に由来)があることを発見してからすでに150年以上がすぎた。しかし、分子キラリティーの研究はむしろ近年になって大きな進展を見せ、現在、化学、生物学のみならず医学、薬学、生理学、農学など多岐にわたる分野の中心的課題の一つとして、基礎・応用両面において活発に研究されている。

分子キラリティーには中心性・軸性・面性のキラリティーが存在するが、いずれの場合も分子中の原子あるいは原子群の絶対配置(空間的な配列の位置関係)がその分子が持つキラリティーを一義的に決め、結果として互いに鏡像関係にある一対の異性体が逆の旋光性を持つことになる。逆のキラリティーを持つ鏡像異性体はほとんどの化学的・物理的性質が同じであるが、キラルな光、分子、環境(場)に対して異なった挙動をする。特に、生物において分子キラリティーは決定的な役割を演じている。その意味で、これまでの分子キラリティーの長い研究の歴史の中で絶対配置を決定するためのさまざまな理論、実験的手法ならびに経験則が提唱されてきたのは当然のことといえる。

先験的に絶対配置を決めることができる唯一の方法は、異常分散効果を利用したX線結晶解析であるが、非結晶性の化合物については適用できな

い。このようなキラル化合物については、円二色(CD)スペクトルを用いる経験則が有効であるばかりでなく、分光学的絶対配置決定法は必要とする試料量もきわめて少量ですむ利点もある。中でもDjerassiらが提唱したオクタント則は有名であり、ステロイドやテルペノイドなどのシクロヘキサノン誘導体に幅広く適用される。多環ラクトンについては、Klyneらのラクトンセクター則が知られている。

これらはいずれもカルボニルの $n \rightarrow \pi^*$ 吸収帯に現れるコットン効果の符号の正負で絶対配置を決定する経験則であるが、1,2-ジオールの絶対配置の決定に対して提唱された中西・原田のジベンゾエート・キラリティー則では、ジオール部位に導入された2つの発色団(安息香酸エステル)間の励起子相互作用によって現れるCDスペクトルにおける同強度・逆符号の分裂型コットン効果を利用している。

これから紹介する亜鉛ポルフィリン二量体を用いた光学活性アミンおよびアルコールの絶対配置決定法も同じ励起子相互作用に基づいている。しかし本法は、亜鉛ポルフィリン二量体のキラルな超分子錯体形成反応を利用しているため、近傍に位置する高い分子吸光係数をもつ2つのポルフィリン発色団間のきわめて大きな励起子相互作用が期待できる。実際、本法では被検出物質の誘導体化が不要なため、ただ単に絶対配置未知の試料溶液にこの試薬を溶かしてCDスペクトルを取り、ポルフィリンの430 nm付近のソーレ吸収帯に現れる分裂型コットン効果の符号を見るだけで即座に絶対配置が決定できるという大きな特徴を持っている。また、操作は簡便・効率的で、極微量の検出試薬で、超高感度で、かつ一義的に絶対配置を決定可

能である。さらに、この波長に重ならない限り、芳香族などのかかなり大きな発色団をもつ試料に対しても全く問題なく適用できることもこの試薬の重要性和汎用性を高めている。

高感度キラリティーセンサーとしての亜鉛ポルフィリン二量体

図1(上)に示すように、キラリティーセンサーとなる亜鉛ポルフィリン二量体は2つのオクタエチルポルフィリンの亜鉛錯体を短いジメチレン鎖でつないだものである。この二量体の特徴は、低極性溶媒中では強い分子内相互作用により2つの亜鉛ポルフィリンが重なったかなり安定な *syn* 構造を取るが、アミンやアルコールなどの配位性化合物を系に添加すると亜鉛に配位して超分子錯体を形成し、2つの亜鉛ポルフィリンがすぐさま *anti* 構造に切り替ることである。この *syn* 体と *anti* 体の間には、可視紫外吸収スペクトルのソーレ吸収帯において明確な違いが認められる。つまり、*syn* 体ではソーレ帯は400 nm付近に単一ピークとして現れるが、*anti* 体では長波長シフトし430-450 nmに2つに分裂した幅広いピークとして現れる。

この亜鉛ポルフィリン二量体の亜鉛原子に光学活性なアルキルアミン($RR'R''CNH_2$; 置換基サイズ: $R > R' > R''$) またはアルコール($RR'R''COH$)が配位すると、*anti* 体が生じる。そのコンフォメーションは、図1(中)に示すように、オクタエチルポルフィリンのエチル基とキラルアミンの α -炭素に結合した最大の置換基Rとの立体反発により、2つのポルフィリンはキラルなねじれ構造を取るようになる。そのねじれの方向はアミン配位子の絶対配置のみによって一義的に決り、(R)-

体のアミンが配位した時は左回り(図1b)(*S*)体が配位した時には右回り(図1a)となって、それに基づく超分子キラリティーが発現することになる。これが、アキラルな検出試薬(亜鉛ポルフィリン二量体)を用いながらも、配位性化合物の絶対配置が決定できる本キラリティーセンサー法の基本原理であると考えられる。

このように2つのポルフィリン発色団がキララなねじれ配置を取る結果、ポルフィリンの主要な2つの遷移モーメント $B_{||}$ と B_{\perp} はそれぞれ互いに励起子相互作用を起し、光学活性な吸収帯となって、CD スペクトルにより検出可能となる。例えば、(*S*)アミンが配

位した右ねじれ構造の *anti*-ポルフィリン二量体(図1a)では、2つの $B_{||}$ 遷移が時計回りに結合し、 B_{\perp} 遷移は反時計回りに結合する(図1c)。それらの励起子相互作用の結果、CD スペクトルの長波長側に出る第1コットン効果ピークは負の値となり、第2ピークは正となると予測される。一方、左ねじれ構造の (*R*)アミンが配位したもの(図1b)では、2つの $B_{||}$ 遷移が反時計回りに結合し、 B_{\perp} 遷移は時計回りに結合する(図1d)。その結果、逆の符号を持つ分裂型のコットン効果ピークを与える(図1d)。

このような機構に基づいて得られるコットン効果ピークの大きさは、ねじ

れ角の大きさを決める α -炭素に結合した置換基 *R* の大きさのみならず、実際に配位子が結合している亜鉛ポルフィリン二量体の濃度に比例するので、用いる配位子との結合定数にも依存すると考えられる。その意味で、より大きな置換基を有する配位子が、アルコールよりもアミンが、高温より低温の方が、高極性より低極性の溶媒の方が、検出感度が高くなると予測される。また、多座配座が可能なキララ化合物についてはより複雑な配位様式が考えられるので、ここで述べたような単純な励起子相互作用の解析はそのまま適用できない。

亜鉛ポルフィリン二量体をキラリティーセンサーとする絶対配置決定法

実際に 10^{-6} M 程度の濃度の亜鉛ポルフィリン二量体のジクロロメタン溶液に光学活性なアミン(室温で測定)またはアルコール(配位能が低いため、低温で測定)を添加すると、CD スペクトルは図2のような顕著な分裂型のコットン効果を示した。これまでさまざまな置換基を有するキララなモノアミンやモノオールについて検討したが、いずれの場合も例外なく、*R* の絶対配置を有するものはポルフィリンのソーレ帯が負の分裂型コットン効果(長波長側が負、短波長側が正)を、*S* の絶対配置のものは逆に正のコットン効果を示した(図2)。この実験結果は、上の各遷移モーメント間の励起子相互作用から予測されるコットン効果の符号とも完全に一致する。(代表例を表1に示す)。

分子内にいくつかの不斉中心を持つキララ化合物の場合(例えば、ボルニルアミン、イソピノカンフェニルアミン、ミルタニルアミン)には、ある程度予測されることであるが、もっとも配位原子(ここでは窒素または酸素)に近い不斉中心の絶対配置が、観測されるコットン効果を決定していることが明ら

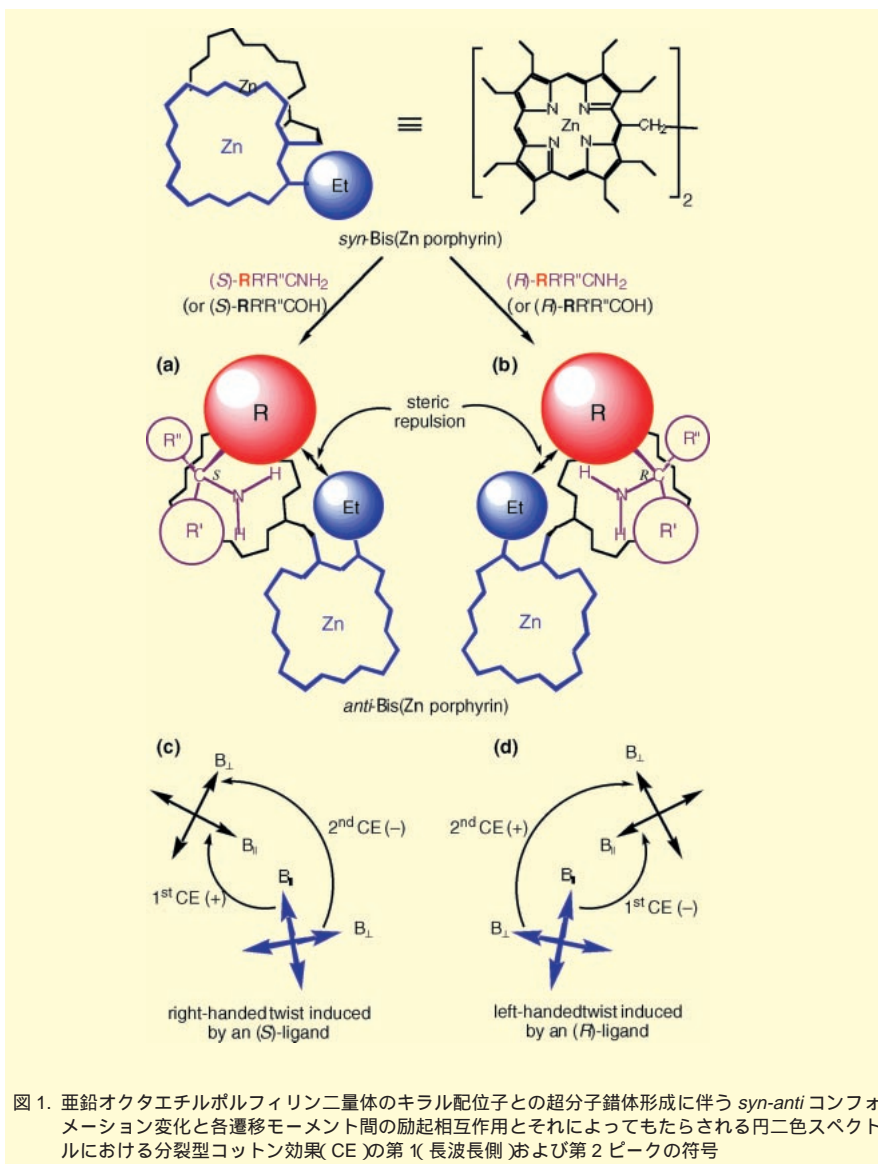


図1. 亜鉛オクタエチルポルフィリン二量体のキララ配位子との超分子錯体形成に伴う *syn-anti* コンフォメーション変化と各遷移モーメント間の励起相互作用とそれによってもたらされる円二色スペクトルにおける分裂型コットン効果(CE)の第1(長波長側)および第2ピークの符号

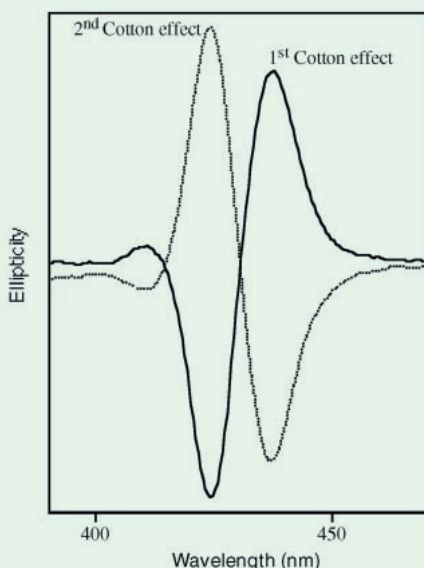


図2. 亜鉛ポルフィリン二量体のジクロロメタン溶液に光学活性アミンを添加したときに現れる典型的な誘起CDスペクトル(*R*-体を添加したときは、図1dに示すように左回りのねじれが誘起されて負の分裂型コットン効果(点線)が、(*S*-体では逆のねじれが生じて正のコットン効果(実線)が誘起される)

Table 1. Correlation between the absolute configuration of chiral compounds and the sign of CD couplet induced upon complexation with bis(Zn porphyrin)

ligand	absolute configuration	sign of Cotton effect	
		2 nd peak	1 st peak
2-butanol	(<i>R</i>)(-)	+	-
	(<i>S</i>)(+)	-	+
1-phenylethanol	(<i>R</i>)(+)	+	-
	(<i>S</i>)(-)	-	+
2-butylamine	(<i>R</i>)(-)	+	-
	(<i>S</i>)(+)	-	+
1-phenylethylamine	(<i>R</i>)(+)	+	-
	(<i>S</i>)(-)	-	+
1-(1-naphthyl)ethylamine	(<i>R</i>)(+)	+	-
	(<i>S</i>)(-)	-	+
1-cyclohexylethylamine	(<i>R</i>)(-)	+	-
	(<i>S</i>)(+)	-	+
N-methyl-1-phenylethylamine	(<i>R</i>)(+)	+	-
	(<i>S</i>)(-)	-	+
N-benzyl-1-phenylethylamine	(<i>R</i>)(+)	+	-
	(<i>S</i>)(-)	-	+
2-methyl-1-butylamine	(<i>S</i>)(-)	-	+
<i>cis</i> -myrtanylamine	(<i>S</i>)(-)	-	+
bornylamine	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)(+)	-	+
isopinocampheylamine	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)(-)	+	-
	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)(+)	-	+
2-(methoxymethyl)pyrrolidine	(<i>S</i>)(+)	-	+
1-(2-pyrrolidinylmethyl)pyrrolidine	(<i>S</i>)(+)	-	+
1-amino-2-(methoxymethyl)pyrrolidine	(<i>R</i>)(+)	+	-
	(<i>S</i>)(-)	-	+

かになった。この結果は、さまざまな位置に多数の不斉中心を有するキラル化合物へも不安なく適用できることを示している。

不斉中心まわりの置換基の立体障害の差がもっとも小さいメチル基とエチル基の場合(例えば、2-ブタノール、2-ブチルアミン、2-メチル-1-ブチルアミン)も、同様に高感度で区別して正しい絶対配置をCDスペクトルで決定できることも明らかになった。

さらに、この亜鉛ポルフィリン二量体は、不斉中心がより遠い配位原子のβ位にあるキラル化合物の場合(例えば、2-メチル-1-ブチルアミン、ミルタニルアミン、1-アミノ-2-(メトキシメチル)ピロリジン)でも正しい絶対配置をCDスペクトルで分光学的に決定できた。

ここで特筆すべきことは、これらの測定にはわずか2-3 mgのサンプルしか必要とせず、低温で測定すれば結合定数が増大するのでさらに少量ですむことである。しかもこの高感度に加えて、誘導体化など何の前処理も必要なく、従って、貴重なサンプルの場合にはこの検出試薬とともにサンプルを完全に回収することも可能である。

まとめ

亜鉛ポルフィリン二量体のキラル超分子錯体形成に伴う励起子相互作用に基づくCDコットン効果を利用するキラリティーセンサー法を新たに開発した。この方法は、きわめて少量の検出試薬ならびに試料量で、キラルアミンやアルコールの絶対配置を、前処理なしで、超高感度に、再現性よく、例外もなく一義的に、確実・簡便・高効率に決定することができる。α-あるいはβ-位に不斉中心を持つさまざまなキラルアミンやアルコールに適用可能であり、複数の不斉中心のある化合物では亜鉛に配位するアミノ基や水酸基に最も近い位置にある不斉中心の絶対配置が決定できる。

現在、さらに検出感度を高め、対象化合物を広げ、用途を拡大するための研究を展開しているが、上記のような特長を持つこの新しい絶対配置決定試薬が、今後さまざまな分野において幅広く活用されることを期待している。

【参考文献】

- 1) Borovkov, V. V.; Lintuluoto, J. M.; Fujiki, M.; Inoue, Y. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 4403-4407.
- 2) Borovkov, V. V.; Lintuluoto, J. M.; Inoue, Y. *Org. Lett.* 2000, 2, 1565-1568.
- 3) Borovkov, V. V.; Lintuluoto, J. M.; Inoue, Y. *J. Phys. Chem. A* 2000, 104, 9213-9219.
- 4) Borovkov, V. V.; Yamamoto, N.; Lintuluoto, J. M.; Tanaka, T.; Inoue, Y. *Chirality*, in press.

キラル化合物の絶対配置決定試薬

Zinc Porphyrin Dimer

CD用

亜鉛ポルフィリン二量体はCD分光計を用いて簡単にキラルなアミン類やアルコール類などの絶対配置を決定することができます。従来のX線結晶解析法などに比べて、サンプル試料も少なくすみ、前処理なしで、高感度に、再現性よく検出することができます。

*本品を用いて、すべてのキラル化合物についての検証は行っておりません。

267-01651 20mg 20,000円

18ℓ キャニスター缶 大入包装追加及び品目追加！

脱水溶媒

有機合成用

18ℓ キャニスター缶

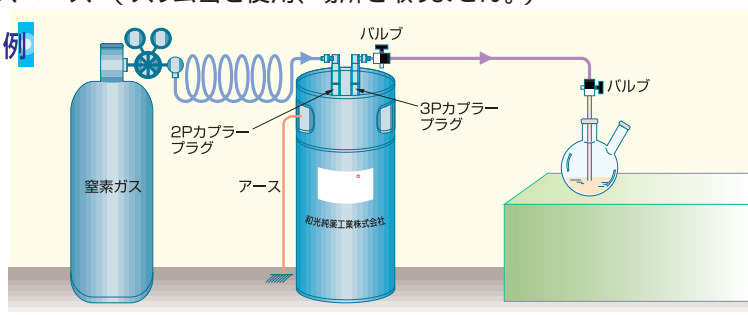
ご好評頂いております、脱水溶媒シリーズに 18ℓ 大入包装 (5 品目) を追加しました。配管に必要な部品もお見積りします。当社営業または代理店へお問合せ下さい (18ℓ 容器はリンク容器です。使用後はご返却下さい。)



〔18ℓ キャニスター缶包装の特色〕

1. 安定した品質 (SUS 密閉容器を使用。)
2. 廃棄ピンゼロ (空容器は回収します。)
3. 低価格 (大入包装のため、低価格です。)
4. 省スペース (スリム缶を使用、場所を取りません。)

配管例



コード No.	品名	水分含量	容量	希望納入価格 (円)
208-13437	Tetrahydrofuran, Dehydrated, with Stabilizer	50ppm 以下	18ℓ	照会
047-25497	Diethyl Ether, Dehydrated	50ppm 以下	18ℓ	照会
205-13447	Toluene, Dehydrated	30ppm 以下	18ℓ	照会
040-25507	Dichloromethane, Dehydrated	30ppm 以下	18ℓ	照会
043-25477	N,N-Dimethylformamide, Dehydrated	50ppm 以下	18ℓ	照会

* 希望納入価格につきましては、代理店もしくは当社営業までお問合せ下さい。*

脱水溶媒

クロロホルム(脱水) アミン添加品 とテトラヒドロフラン(脱水) 安定剤不含 を追加販売しました。

コード No.	品名	水分含量	容量	希望納入価格 (円)	
010-15533	Acetone, Dehydrated	50ppm 以下	100ml	1,700	
016-15535			500ml	3,100	
014-15531			3ℓ	13,000	
017-15543	Acetonitrile, Dehydrated	50ppm 以下	100ml	1,700	
013-15545			500ml	3,600	
011-15541			3ℓ	13,000	
022-12853	Benzene, Dehydrated	30ppm 以下	100ml	1,700	
028-12855			500ml	3,600	
026-12851			3ℓ	12,900	
020-13035	1-Butanol, Dehydrated	50ppm 以下	500ml	3,600	
028-13031			3ℓ	13,000	
027-13045	2-Butanone, Dehydrated	50ppm 以下	500ml	3,600	
025-13041			3ℓ	13,100	
027-13263	Butyl Acetate, Dehydrated	50ppm 以下	100ml	2,000	
023-13265			500ml	4,000	
035-16283	Chloroform, Dehydrated	30ppm 以下	100ml	1,700	
031-16285			(Ethanol 0.3~1.0%)	500ml	3,600
039-16281				3ℓ	13,000
032-16813	Chloroform, Dehydrated, Amylene added	30ppm 以下	100ml	1,800	
038-16815			(Amylene 150ppm)	500ml	3,500
036-16811				3ℓ	13,000

NEW

〔次頁へ続く〕

脱水溶媒

コード No.	品名	水分含量	容量	希望納入価格(円)
036-16595 034-16591	Cyclohexane, Dehydrated	30ppm 以下	500ml 3l	3,600 13,000
048-25503 044-25505 042-25501	Dichloromethane, Dehydrated (2-Methyl-2-butene 0.0005~0.005%)	30ppm 以下	100ml 500ml 3l	2,000 3,500 13,000
041-25495	Diethyl Ether, Dehydrated(BHT 0.0003%)	50ppm 以下	500ml	5,700
042-25285 040-25281	N,N-Dimethylacetamide, Dehydrated	50ppm 以下	500ml 3l	5,200 20,000
041-25473 047-25475 045-25471	N,N-Dimethylformamide, Dehydrated	50ppm 以下	100ml 500ml 3l	1,800 4,200 15,000
046-26023 042-26025	Dimethyl Sulfoxide, Dehydrated	50ppm 以下	100ml 500ml	2,500 7,000
044-25485 042-25481	1,4-Dioxane, Dehydrated(BHT 0.0005%)	50ppm 以下	500ml 3l	3,600 13,000
055-06133 051-06135 059-06131	Ethanol, Dehydrated	50ppm 以下	100ml 500ml 3l	2,100 4,200 15,700
050-06183 056-06185 054-06181	Ethyl Acetate, Dehydrated	50ppm 以下	100ml 500ml 3l	1,700 3,100 12,000
053-06313 059-06315	Ethylene Glycol, Dehydrated	50ppm 以下	100ml 500ml	2,500 7,000
089-07273 085-07275	Heptane, Dehydrated	30ppm 以下	100ml 500ml	2,500 5,000
089-07033 085-07035 083-07031	Hexane, Dehydrated	30ppm 以下	100ml 500ml 3l	1,700 3,100 11,000
136-12383 132-12385 130-12381	Methanol, Dehydrated	50ppm 以下	100ml 500ml 3l	1,700 3,550 12,700
131-12713 137-12715	4-Methyl-2-pentanone, Dehydrated	50ppm 以下	100ml 500ml	2,500 5,000
138-12723 134-12725	1-Methyl-2-pyrrolidone, Dehydrated	50ppm 以下	100ml 500ml	2,500 5,000
166-18305 164-18301	1-Propanol, Dehydrated	50ppm 以下	500ml 3l	4,200 14,000
165-17993 161-17995 169-17991	2-Propanol, Dehydrated(Iso- ")	50ppm 以下	100ml 500ml 3l	1,800 3,100 12,000
161-18453 167-18455 165-18451	Pyridine, Dehydrated	50ppm 以下	100ml 500ml 3l	2,500 7,500 20,000
206-13433 202-13435 200-13431	Tetrahydrofuran, Dehydrated(BHT 0.03%)	50ppm 以下	100ml 500ml 3l	1,700 3,700 13,100
207-13963 203-13965 201-13961	Tetrahydrofuran, Dehydrate(no Stabilizer)	50ppm 以下	100ml 500ml 3l	1,700 3,500 13,000
203-13443 209-13445 207-13441	Toluene, Dehydrated	30ppm 以下	100ml 500ml 3l	1,700 3,000 10,500
242-00685 240-00681	Xylene, Dehydrated	30ppm 以下	500ml 3l	3,500 13,000

NEW

アポトーシスの初期判定に

PARP Western Blot Kit wako

アポトーシスの実行過程において、様々なタンパク質がカスパーゼによって分解されます。ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)もその一つで、アポトーシスの初期にカスパーゼ3によって分解されることが知られています。本キットはこのPARPの分解産物を生化学的解析手法の一つであるウエスタンブロット法を用いて検出するシステムです。アポトーシスの生化学的な検出法には従来よりアネキシン染色法、TUNEL法などが知られていますがそれらと本キットを組合せて使用することでより正確なアポトーシスの判定が可能になります。

〔特長〕

- 1) 各ステップの主な反応試薬をセット化
- 2) PARP分解産物を特異的に検出

〔キット内容〕

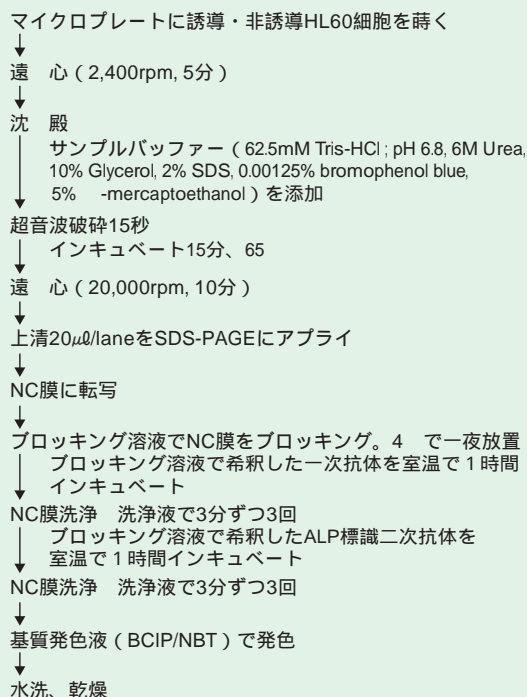
I 一次抗体	40 μ l × 1本
II ALP 標識二次抗体	40 μ l × 1本
III 洗浄液	70ml × 1本
IV ブロッキング溶液	90ml × 1本
V 基質発色液(BCIP)	70 μ l × 1本
VI 基質発色液(NBT)	150 μ l × 1本
VII 発色用緩衝液	25ml × 1本

メンブレンはキットに付属しておりません。別にご用意下さい。PVDF膜ではバックグラウンドが高く、検出感度が低いため本キットには適していません。ニトロセルロース膜(ミリポア社イモビロン-NC Standard)を推奨します。

お使いになる細胞によって実験プロトコールが変わりますので最適な系を実験毎にご確認の上ご使用下さい。

サンプルバッファー中に6M Ureaを添加、また超音波破碎を行っているのはPARP/DNA結合体から効率よくPARPを分離するためです。

〔プロトコール例〕



フリーダイヤル: 0120-052-099
フリーファックス: 0120-052-806

コードNo.	品名	規格	包装	希望納入価格(円)
295-56801	PARP Western Blot Kit wako	アポトーシス研究用	24レーン用	35,000

〔関連商品〕

種別	コードNo.	品名	規格	包装	希望納入価格(円)
Screening	291-55801	Apoptosis Screening Kit wako	アポトーシス研究用	96回用	46,000
in situ	295-53501	Apoptosis <i>in situ</i> Detection Kit wako	アポトーシス研究用	40回用	60,000
Ladder	297-53201	Apoptosis Ladder Detection Kit wako	アポトーシス研究用	96レーン用	58,000
	291-53204			24レーン用	33,000
FACS	297-55901	Annexin V Fluorescein Staining Kit	アポトーシス研究用	50回用	40,000
PARP 阻害剤	018-18611	4-Amino-1,8-naphthalimide	生化学用	20mg	11,000
PARP 阻害剤	166-20211	α (5H)-Phenanthridinone	生化学用	500mg	24,000
酵素	168-18821	Poly(ADP-ribose) polymerase, from Bovine Thymus	生化学用	100 μ g	52,000

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

記載価格は希望納入価格であり消費税等は含まれておりません。

発行所	和光純薬工業株式会社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号 TEL. 06-6203-3741(代表)	発行日	2001年1月15日
		発行責任者	岸井松司
		編集責任者	大西礼子
		印刷所	共進社印刷株式会社