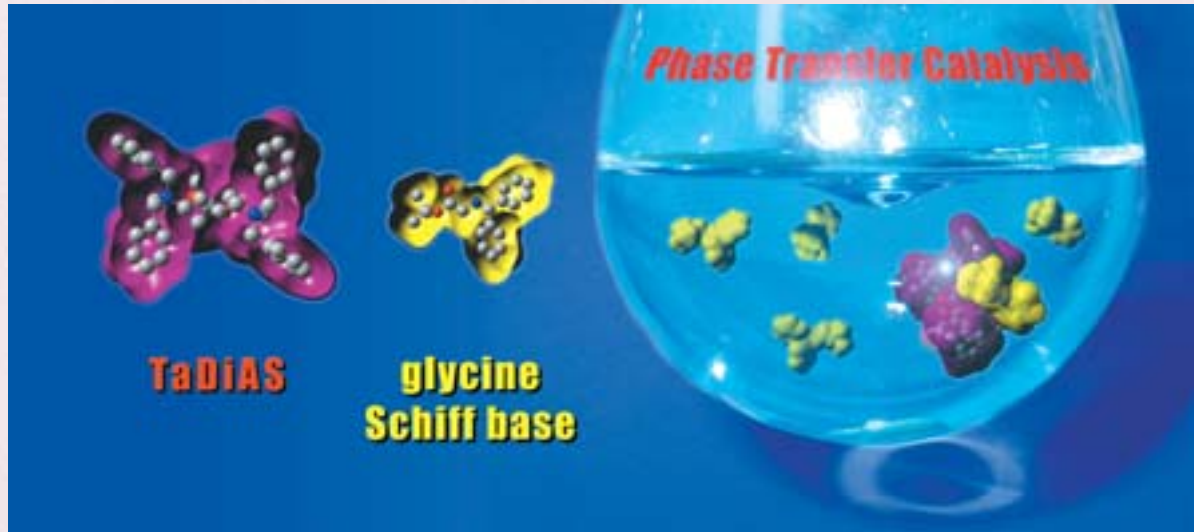


# 和光純薬時報

April 2004  
Vol.72 No.2



## 〔総説〕

- 「分子内に二つの認識点を有する新規不斉相間移動触媒」 柴崎正勝、大嶋孝志 …… 2
- 「DNA塩基配列を正確に認識するピロール-イミダゾールポリアミド」 杉山 弘 …… 5
- 「新規トリアジン型脱水縮合剤の合成と用途開発」 国嶋崇隆 …… 8

## 〈テクニカルレポート〉

- 「ゲル電気泳動を出発点とするプロテオーム解析で成功するために」 田尻道子、和田芳直 ……12
- 「LC-MS法による農薬の一斉分析」 吉田貴三子 ……14

## 〈Talking of LAL〉

- 「第55話 エンドトキシンと添加剤」 土谷正和 ……15

## 〔化学大家〕

- 「ロバート・ボイル」 島尾永康 ……24

## 〔製品紹介〕

### 有機合成

- 新規不斉相間移動触媒 …… 4
- ピロール、イミダゾール …… 7
- 新規トリアジン系縮合剤 …… 11

### 生化学

- 高純度マトリックス …… 17
- プレキャストゲル「スーパーセップ™」 …… 18
- クイックCBBプラス …… 19

(株)ホクドー ネイティブオステオボンチン

- ELISAキット …… 21
- 蛍光試薬 …… 22

### 環境・分析

- アフラトキシン分析関連製品 …… 16
- 毒素測定試薬 …… 28
- 12種揮発性有機化合物混合標準液 …… 28

### 細胞生物

- ユビキチン関連試薬 …… 20
- アルドステロン …… 20

### 遺伝子

Evrogen社 新規DNAヌクレアーゼ …… 23

## 〔お知らせ〕

- 「環境分析用試薬総合カタログ2004」発行のご案内 ……28

### 1 はじめに

医薬品、農薬、機能性材料などの機能性分子を大量・容易に、しかも必要なエナンチオマーのみを実用レベルで供給することは、21世紀の有機化学における最も重要な研究課題の一つである。光学活性体として目的物を得る方法として、アトムエコノミー、環境調和性、反応コストなどの観点から、極微量の不斉源を用いて大量の光学活性化化合物を合成し得る触媒的不斉合成が最も理想的である。しかしながら、プロセス化学のみならず学術領域の研究ですら触媒的不斉反応が用いられている例は少なく、そのほとんどが不斉水素化か不斉酸化反応を用いたものである。このような状況の中我々の研究室では、実用的な触媒的不斉炭素-炭素結合形成反応の開発を目指し研究を行い、これまでに、希土類あるいは13属金属などを含有する多機能不斉金属触媒の開発に成功し、様々な高選択的な触媒的不斉反応を実現するとともに、天然物の不斉全合成や工業スケールでの反応への展開を行ってきた<sup>1-3)</sup>。我々は触媒的不斉反応の更なる展開の一つとして、金属触媒の機能を有機分子で実現できないであろうか、そして有機分子触媒の特徴を生かすことで、金属触媒では実現困難な反応を効果的に促進させることができるのではないかと考え、新規不斉有機分子触媒の開発研究をスタートさせた。これまでに様々な不斉有機分子触媒反応が開発されているが、我々はその中で不斉相間移動触媒反応に特に興味を持った<sup>4)</sup>。それはKOHなどの強塩基存在下でのエノラートのアルキルハライドによる

不斉アルキル化反応といった、一般に金属触媒が苦手とする反応を相間移動触媒が実に効果的に促進させるからである。そこで本稿では、最近我々が行った分子内に二つの認識点を有する新規不斉相間移動触媒 (TaDiAS) の創製<sup>5)</sup>とその応用<sup>6-8)</sup>について概要する。

### 2 新規不斉相間移動触媒の設計

相間移動触媒反応は、一般に含水溶媒中、解放系で反応を行うことができるため、特殊な反応装置や反応操作を必要とせず、反応コストの面からも工業プロセスに適した反応であり、また最近、地球環境に優しい触媒反応としても注目を集めている。その不斉反応への展開はシンコナルカロイド由来の不斉相間移動触媒を中心に行われ、また最近になって、人工的にデザインされた骨格を有する触媒もいくつか報告されるようになった<sup>4)</sup>。これらの触媒の内いくつかは高い不斉誘起を発現するものの、触媒の不安定さ、触媒合成の困難さとコストの高さ、それに伴う触媒の多様性の低さなどが問題であった。我々がこれまで検討を行ってきた金属触媒の場合、中心金属を変えることで微妙な触媒のチューニングが可能である。特に希土類金属とアルカリ金属とからなる複合金属触媒の場合、市販の16種類の希土類元素とLiからKまでの3種のアルカリ金属の組み合わせにより、不斉配位子を変えことなく触媒の不斉空間の大きさ、Lewis酸性、Brønsted塩基性を微妙に調整することが可能であり、このことが本触媒系の大きな成功の理由の一つであると考えられる<sup>1-3)</sup>。一方、有機分子触媒はこのようなアプロ

チが事実上不可能であるため、有機分子自身に高い多様性が要求される。そこで我々は、種々の反応系に柔軟に対応可能な多様性を有し、強塩基性条件下でも安定な不斉相間移動触媒を新規にデザインすることとした。まず、分子内の適当な位置に二つの認識点(この場合四級アンモニウム塩)を配置し、それらが協同的に不斉空間内にアニオンを位置固定することを基本コンセプトとし、次にこれまでの全合成研究で培った経験から、安価に、大量に、そして様々な誘導体を簡単に合成できる触媒として、図1に示す酒石酸由来の触媒TaDiAS (Tartrate-derived DiAmmonium Salt) (1)を設計した<sup>5)</sup>。本触媒はケタール部位(R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>)、芳香環部位(Ar)、カウンターアニオン部位(X)の3カ所を、3次元的に最適化することが可能であり、またその合成は、安価なキラル源である酒石酸エステルから5工程で、安価な試薬と簡便な反応操作のみで行うことができる(式1)<sup>5,6)</sup>。

### 3 光学活性α-アミノ酸の合成

様々なケタール部位(R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>)、芳香環部位(Ar)を変化させた触媒ライブラリーを構築し、氷冷下50%KOH水溶液-トルエン-塩化メチレンという条件で不斉アルキル化反応における触媒のスクリーニングを行ったところ、ケタール部位が非対称な、C<sub>2</sub>対称性を持たない触媒1aが最も良い結果を与えることが分かった。この反応条件ではその不斉収率は70%ee程度にとどまるものの、すべての反応基質を試験管に入れて氷冷下数時間攪拌させるだけで反応が完結するため、触媒ライブラリーのスクリーニングに

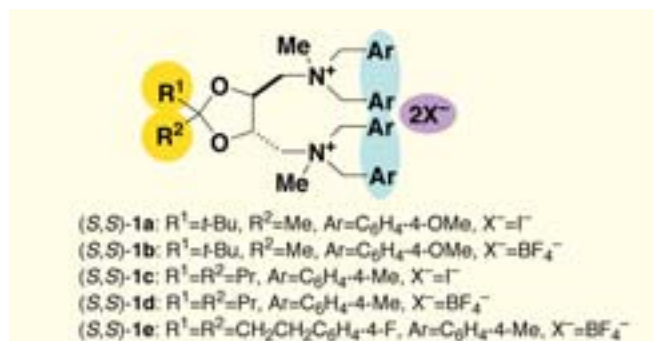
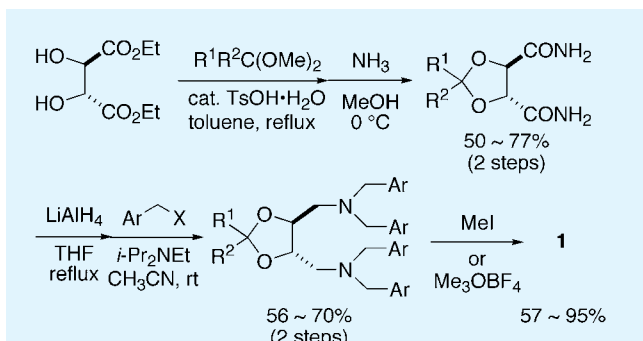
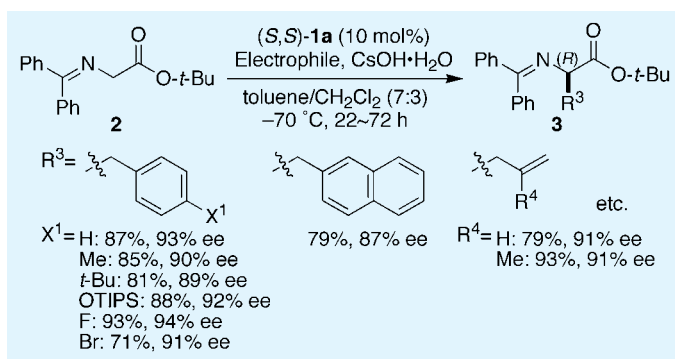


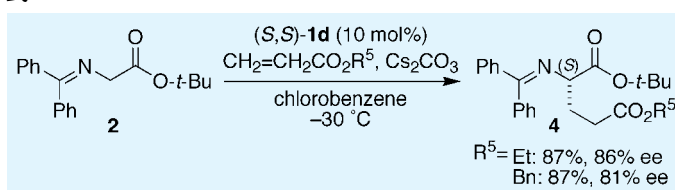
図1.



式1.



式2.



式3.

は非常に適している。最終的に最適化した条件で基質一般性を調べたところ、様々な求電子剤との反応が90%eeを超える選択性で進行することが分かった(式2)<sup>5, 6)</sup>。同様にして、不斉Michael反応の検討を行ったところ、この場合はC<sub>2</sub>対称性を有する触媒1cが最も良い結果を与えることが分かった。しかしながら、触媒活性が十分満足のいくものではなかったため、更なる検討を行った結果、劇的なカウンターアニオン効果を見出すことができた<sup>6)</sup>。カウンターアニオンをI<sup>-</sup>(1c)からハードなアニオンであるBF<sub>4</sub><sup>-</sup>(1d)に変更すると、触媒量を1/10に、用いる塩基の量を1/100にしても依然4倍以上の速さで反応は進行し、不斉率も向上することが分かった。その結果、まだ満足のいく結果ではないが、最適条件下では最高86%eeの選択性でMichael付加体4を得ることができるようになった(式3)。このような劇的なカウンターアニオンの効果はこれまで報告されておらず、また、同じ触媒を用いた場合にも不斉アルキル化反応と不斉Michael反応によって得られてくる化合物の絶対配置が異なるという現象も初めての報告であり、分子内に二つのカチオン性認識点を有する本相間移動触媒に特徴的な反応性であると考えられる。このカウンターアニオン効果は、大過剰の強塩基(CsOH)存在下での不斉アルキル化反応においても観測され、触媒1bを用いることでこれまで

反応性の低さが問題であった $\alpha,\alpha$ -ジアルキルアミノ酸の不斉合成も可能となった<sup>6)</sup>。

#### 4 触媒の回収再利用

次項で述べる全合成研究のために、大量スケールで触媒1aを用いる不斉アルキル化反応を行っていた時、反応後処理(水とエーテルの添加)水層と有機層との間に白色固体が析出することが分かった。得られた白色固体を調べてみると触媒1aそのものであることが分かった。そこで、触媒の回収方法を種々検討したところ、反応の後処理後さらに攪拌を続けると、析出した白色固体は反応容器のガラス壁面に付着し、これにより生成物を含む有機層と水層を分液ロートに移し替えるだけで触媒を容易に分離することができるようになった。ガラス壁面に付着した触媒を酢酸エチルで一度溶解し、ろ紙濾過によって無機塩を分離すると90%程度の収率でほぼ純粋な触媒1aを回収することができた<sup>6)</sup>。また、回収した触媒を用いて再度不斉アルキル化反応を行ったところ、触媒活性、選択性とも全く同じ結果を与えた。このことは本触媒が強塩基性条件下でも非常に安定であることを示すとともに、更なる検討は必要であるが、特別な操作なしで簡単に触媒を回収再利用できる工業プロセスの可能性を示すものである。

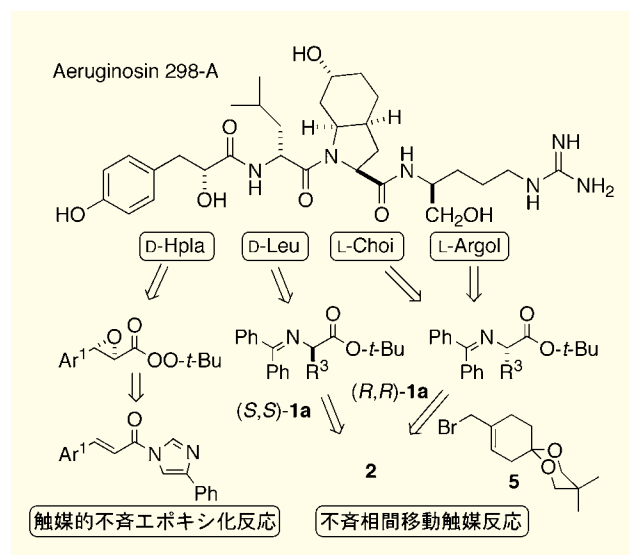


図2.

#### 5 Aeruginosin 298-A および誘導体の不斉合成への応用

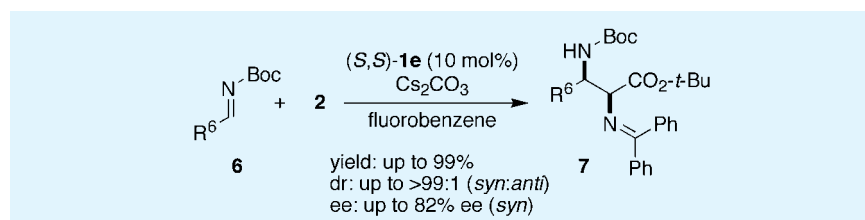
高い基質一般性を有する実用的な光学活性 $\alpha$ -アミノ酸合成法の開発は、天然物およびその誘導体の不斉合成への適応も可能とした(図2)<sup>6)</sup>。Aeruginosin類は村上らによってアオコから単離された、二環性アミノ酸部位(Choi)と3-(4-hydroxyphenyl)lactic acid部位(Hpla)を特徴とする天然ペプチドである<sup>9)</sup>。Aeruginosin類の中でAeruginosin 298-Aはセリンプロテアーゼ活性を有することが報告されており、医薬品としての応用も期待される化合物である。これまでにBonjochら<sup>10)</sup>、Wipflら<sup>11)</sup>によって光学活性な天然アミノ酸を出発原料とする全合成が達成されているが、我々は構造活性相関研究を視野に入れ、天然物のみならずその誘導体合成も容易に可能とする、一般性の高い柔軟な合成ルートの確立を目的とし検討を行った。D-Hpla部位は先に我々が報告していた基質一般性の高い $\alpha,\beta$ -不飽和イミダゾライドの触媒的不斉エポキシ化反応で、残り3つのアミノ酸部位(D-Leu, L-Choi, L-Argol)は不斉相間移動触媒反応で合成することとした。最も合成の困難であったL-Choi部位に関しては、求電子剤として5を用い、得られた化合物をメタノール中4N塩酸と処理することで二環式化合物を効率よく合成することができた。また誘導



体に関しては、我々の合成法はエナンチオマーを含めて多種多様な天然および非天然光学活性アミノ酸を容易に合成できることから、その組み合わせは無限であるが、今回は Aeruginosin の構造的な特徴となっている Hpla および Choi 部位を固定し、他の2つのアミノ酸部位を変換することとした。触媒的不斉エポキシ化反応および不斉相間移動触媒反応で合成した各部位から、まず左ジペプチド(Hpla-Leu部位)と右ジペプチド(Choi-Argol部位)を合成し、最後に両フラグメントをHATUを用いてカップリング反応を行い、最終的に Aeruginosin 298-A および9つの誘導体の合成を達成した<sup>6, 7)</sup>。北海道大学の沖野助教授にご協力いただき、これらの化合物のトリプシンに対する阻害活性評価を行った結果、Argol部位の構造だけでなく立体配座が活性の発現に非常に重要であることが分かった。今後、計算化学的手法も取り入れ、更なる誘導体の論理的なデザインと合成を通して構造活性相関研究を行い、メデイナルケミストリーに貢献したいと考えている。

## 6 光学活性 $\alpha, \beta$ -ジアミノ酸の合成

本触媒はその多様性を生かすことで他の触媒的不斉反応にも柔軟に対応することができる。ここでは最近我々が行ったイミンに対する不斉Mannich型反応による光学活性 $\alpha, \beta$ -ジアミノ酸の合成を紹介する<sup>8)</sup>。光学活性 $\alpha, \beta$ -ジアミノ酸の潜在需要は非常に高いものの、アキラルな原料から直接的、触媒的に合成する方法はごく最近 Jørgensen らによって報告されたキラル銅触媒による不斉Mannich型反応以外に例が



式4.

ない<sup>12)</sup>。種々検討したところ、基質として Boc で保護されたイミン**6**を用い、触媒として **1e**を用いることで、依然エナンチオ選択性は十分満足のいくレベルには達していないものの、高い *syn* 選択性で目的とする光学活性 $\alpha, \beta$ -ジアミノ酸**7**の保護体を得ることができた。本反応系は Jørgensen らの方法に比べ、芳香族イミンを用いた場合のジアステレオ選択性が高い点、二つの保護基を温和な条件下で選択的に脱保護できる点で優れている (Jørgensen らは Ts で保護されたイミンを基質として用いている)。

## 7 おわりに

以上、最近我々が行った新規不斉相間移動触媒 (TaDiAS) の創製とその応用について紹介した。本研究は相間移動触媒に関して何の経験的蓄積がない状態から試行錯誤を繰り返しながら行ったものであり、苦勞をともにした学生諸氏に深く感謝したい。また、本研究はまだ検討の初期段階であり、触媒反応の機構解明や他の反応系への適応等を現在積極的に検討している。今後、我々の最終目標である環境調和性の高い工業プロセスの実現、新規多機能不斉有機分子触媒の創製などを通して社会に貢献していきたいと考えている。

### 【参考文献】

- 1) Shibasaki, M., Sasai, H., Arai, T.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **36**, 1237 (1997).
- 2) Shibasaki, M., Iida, T., Yamada, Y. M. A.: 有機合成協会誌, **56**, 344 (1998).
- 3) Shibasaki, M., Yoshikawa, N.: *Chem. Rev.*, **102**, 2187 (2002).
- 4) Maruoka, K., Ooi, T.: *Chem. Rev.*, **103**, 3013 (2003).
- 5) Shibuguchi, T., Fukuta, Y., Akachi, Y., Sekine, A., Ohshima, T., Shibasaki, M.: *Tetrahedron Lett.*, **43**, 9539 (2002).
- 6) Ohshima, T., Gnanadesikan, V., Shibuguchi, T., Fukuta, Y., Nemoto, T., Shibasaki, M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 11206 (2003).
- 7) Fukuta, Y., Ohshima, T., Gnanadesikan, V., Shibuguchi, T., Nemoto, T., Kisugi, T., Okino, T., Shibasaki, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
- 8) Okada, A., Shibuguchi, T., Ohshima, T., Shibasaki, M. submitted.
- 9) Murakami, M., Okita, Y., Matsuda, H., Okino, T., Yamaguchi, K.: *Tetrahedron Lett.*, **35**, 3129 (1994).
- 10) Valls, N., López-Canet, M., Vallribera, M., Bonjoch, J.: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 11248 (2000).
- 11) Wipf, P., Mthot, J.-L.: *Org. Lett.*, **2**, 4213 (2000).
- 12) Bernardi, L., Gothelf, A. S., Hazell, R. G., Jørgensen, K. A.: *J. Org. Chem.*, **68**, 2583 (2003).



### 相間移動触媒

相間移動触媒としてはアミンやクラウンエーテルも知られているが、長鎖アルキル基を有する四級オニウム塩 (特にアンモニウム塩) が広く用いられている。これらは親水性と疎水性の両方の性質を有しており、水相に存在するイオンをイオン対の形で有機相に移動させ、有機相に存在する反応剤との反応を加速化する働きを持つ。

## Products

### 金属触媒の機能を有機分子で実現！ 新規不斉相間移動触媒



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
201-16141	TaDiAS-[(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-2- <i>t</i> -butyl-2-methyl- <i>N,N,N',N'</i> -tetrakis(4-methoxybenzyl)]Diiodide	有機合成用	100mg	8,500
208-16151	TaDiAS-[(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-2- <i>t</i> -butyl-2-methyl- <i>N,N,N',N'</i> -tetrakis(4-methoxybenzyl)]Diiodide	有機合成用	100mg	8,500
205-16161	TaDiAS-[(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-2,2-dipropyl- <i>N,N,N',N'</i> -tetrakis(4-methylbenzyl)]Bis(tetrafluoroborate)	有機合成用	100mg	8,500
202-16171	TaDiAS-[(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-2,2-dipropyl- <i>N,N,N',N'</i> -tetrakis(4-methylbenzyl)]Bis(tetrafluoroborate)	有機合成用	100mg	8,500

### 1 はじめに

ゲノムプロジェクトの完了と分子生物学の急速な進歩によって、ガンや遺伝病を含む多くの疾病がDNA配列レベルで理解されるようになった。これらの知見を生かした診断、治療、予防が期待され、研究が急速に進んでいる。最近、N-メチルピロール (Py)とN-メチルイミダゾール (Im)を基本ユニットとするPy-Imポリアミドが任意のDNAの塩基配列を正確に認識することが見いだされた。これらのPy-Imポリアミドは転写因子などに匹敵する配列認識能と結合力をもち、細胞膜や核膜の透過性にもすぐれている。特定遺伝子の発現を選択的にコントロールできることが様々な実験で示されているので、新しいアンチセンス法として応用が期待されている。

### 2 Py-Imポリアミドによる塩基配列認識

図1に示すようにN末端→C末端が逆平行に配向したPy-ImポリアミドはDNAのマイナーグループに結合し、Py-Imの並び方 (ペアリングコード)によって2本鎖DNAの塩基配列を認識できる。即ち、G・C塩基対を認識するためにはIm/Pyペア、C・G塩基対にはPy/Imペア、A・T塩基対とT・A塩基対にはPy/Pyペアを並べればよい<sup>1-3)</sup>。A・T塩基対のAとTを読み分けるために、ヒドロキシピロール (Hp)も開発されたが、化合物の安定性に問題が

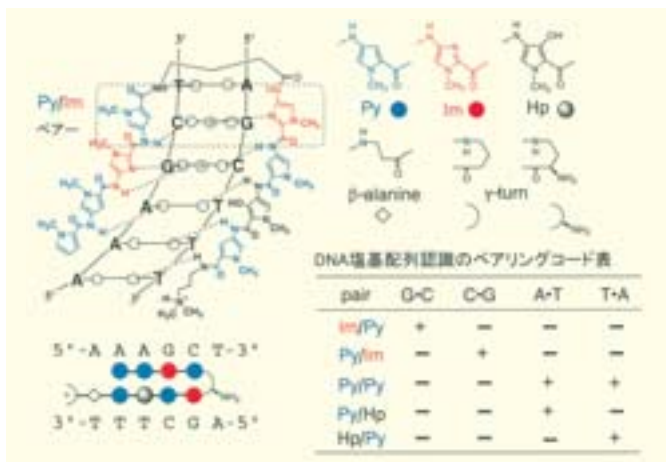


図1. DNAマイナーグループから見たPy-ImポリアミドによるDNA塩基配列の認識の模式図とペアリングコード表

あり、遺伝子発現の制御などの応用にはあまり利用されていない<sup>4)</sup>。またPy/Imペアと塩基対との間には微妙にピッチのずれがある。そのため長い塩基配列をポリアミドで読むにはこのひずみを解消するために3、4塩基対ごとにA・T塩基対に対して柔軟なβ-アラニン/β-アラニンのペアを導入することが必要である。これを利用したホモダイマーにより最長16塩基対を認識した例もある<sup>5)</sup>。また、Py-Imアミドをγ-アミノ酪酸 (γ-turn)で連結するとヘアピン型に分子がおれまがり、γ-turn部分には強いA・T塩基対選択性がある。またこれによって、逆平行に配向したポリアミドのPy、Imのユニットを組み合わせることで特定塩基配列に選択的に結合する分子が設計できるようになった<sup>6)</sup>。このようなヘアピン型ポリアミドは1分子でターゲットの塩基配列に強く結合をするので、特定の遺伝子の発現の制御には、主にこのヘアピン型ポリアミドが用いられている。Py-Imポリアミドの化学合成についてはBoc法<sup>7)</sup>、Fmoc法<sup>8)</sup>による固相合成について報告があり、市販の自動合成機を用いて合成が可能である。

### 3 Py-Imポリアミドによる特定遺伝子の発現制御

DervanとGottesfeldらはZnフィンガータンパクであるTFIIIAの認識配列中の4番目のフィンガーの結合配列である5'-AGTACT-3'を標的とするヘアピンポリアミドを設計し、TFIIIAの結合を阻害することにより5S-rRNA遺伝子の転写の選択的な抑制に成功した<sup>9)</sup>。DervanらはさらにHIV-1の複製の阻害を目的として、転写因子であるTATA-box結合蛋白 (TBP)、Lymphoid-enhancer結合因子 (LEF-1)、Ets-1に拮抗して結合するPy-Imポリアミドを合成し、HIV-1の転写と複製を押しやることも成功している<sup>10)</sup>。図2にまとめたように、これまでに様々な遺伝子の発現のコントロールが試みられている<sup>2)</sup>。さらにDNA結合部分をPy-Imポリアミドに置き換えたアクチベーターも設計され、転写の活性化も可能であることも示されている。これらの結果は、Py-Imポリアミドにより遺伝子の発現がコントロールできることを示している。しかし、このアプローチには問題点もある。それは多くの遺伝子の発現の調節が共通の転写因子を利用しているため、特定遺伝子



図2. Py-Imポリアミドによる遺伝子発現制御の例

に対する正確なターゲティングがむずかしい点である。Py-Imポリアミドの設計の際にユニークな周辺配列を含ませるのもその理由である。

## 4 アルキル化Py-Imポリアミド

ガンはDNAの変異が原因であるので、変異した塩基配列を分子標的とすることができれば、様々なガンに対応した、抗ガン剤が理論的にはできる。しかし変異はコード領域にみられるので、コード領域をターゲットにできるポリアミドの開発が必要である。そこで我々はPy-Imポリアミドにアルキル化剤を結合させて配列特異性をもつアルキル化剤の開発を試みた。天然の抗生物質であるデュオカルマイシンAとデスタマイシンAが共存下、DNAのマイナーグループ内でヘテロダイマーを形成し、配列特異的にアルキル化する現象を見い出したのでこの系を利用した<sup>11)</sup>。このマイナーグループ内でのダイマー形成による配列認識は先のPy-Imポリアミドと非常に類似している。実際、デュオカルマイシンAのPyをImに置換することにより反応する配列が変わる<sup>12)</sup>。そこで、我々は、デュオカルマイシンAのアルキル化部と配列認識へアピン型ポリアミドを連結した1を合成し、DNAアルキル化能を評価した。その結果、DNA中のターゲット配列を認識し、特異的なアルキル化を観察できた<sup>13)</sup>。しかし、1によるアルキル化反応の完結には時間がか

かり、反応の効率も低かった。分子モデリングの結果、反応するシクロプロパン部分の位置が反応するアデニンやグアニンのN3位から遠すぎることがこれらの原因であることが示唆された。そこで、1の末端Pyをビニルを変えることにより距離を修正し、さらにアルキル化部分を安定化させた分子2を合成した。その結果、反応性が劇的に向上し、反応は5分でもほぼ完了するアルキル化分子が完成した<sup>14)</sup>。興味深い点は1に新しいアルキル化部を直接結合させた3では全く反応が起らなかった点である。この結果はアルキル化部の反応性よりも反応する部位の位置が重要であることを示している。

## 5 アルキル化Py-Imポリアミドによる特定遺伝子の発現の抑制

次にアルキル化ポリアミドが、コード領域でアルキル化することによって実際にRNAポリメラーゼによる転写を阻害するかどうかを調べた。GFP遺伝子をコードするDNAを2により、アルキル化し、それを鋳型として用いて転写により生成するmRNAを観察した<sup>15)</sup>。その結

果、コード領域におけるテンプレートのDNA鎖のアルキル化が転写を阻害し、2の特異的なアルキル化による短いmRNAが生成した。対照的に、非テンプレート側では4か所のアルキル化が起こるがRNAポリメラーゼの阻害は起らない。さらに、2を加水分解してアルキル化能を失活させた4を用いて、転写阻害が全く起らないので、転写の阻害にはアルキル化が必須であることが示された。

現在、アルキル化ポリアミドを用いて細胞内での選択的発現阻害の実験を行なっている。ホタルおよび海椎茸ルシフェラーゼをコードするベクターを用い、それぞれを選択的にアルキル化する2種類のアルキル化ポリアミドAとBを用意した。2種のベクターをコトランスフェクトしたHeLa細胞に対して100nMのAまたはBを投与した結果、ホタルおよび海椎茸ルシフェラーゼの発現が、選択的に抑制されることが明らかとなった。この結果は、DNAのアルキル化により特定の遺伝子の発現を翻訳レベルでも阻害できることを示している。アルキル化能のあるポリアミドによる発現制御は、反応性のないポリアミドと比べて非常に低濃度で起こることが示された。

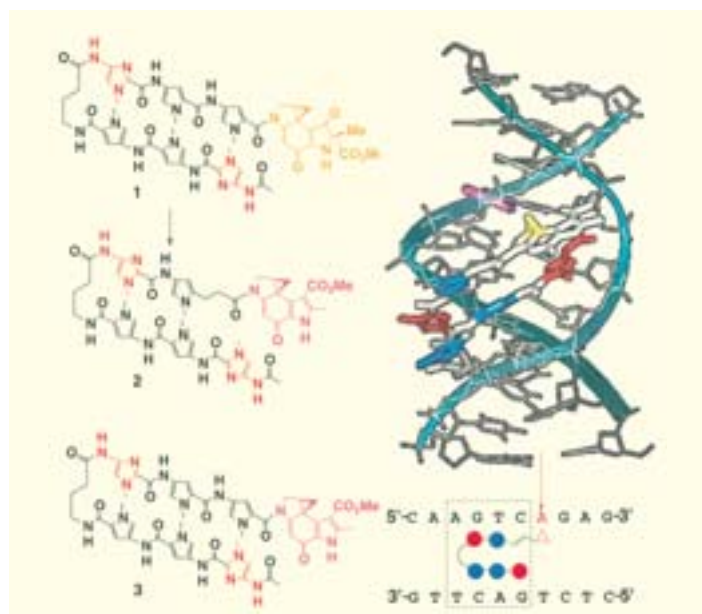


図3. ポリアミド1-3の構造とDNAとの複合体モデル

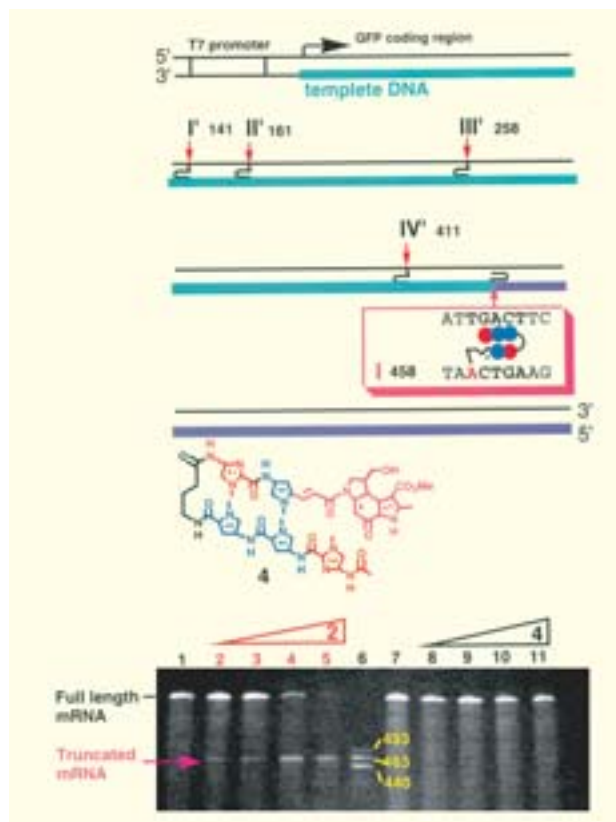


図4. ポリアミド2による転写阻害と短いmRNAの生成



## 6

## アルキル化ポリアミドの抗ガン活性

アルキル化ポリアミドはヒト培養ガン細胞に対して比較的強い活性(39種類の平均logIC<sub>50</sub>は-6~-9)をもち、配列特異性と 관련된興味深い抗ガン活性を示す。例えばポリアミド2と5は、構造はほとんど同じであるが、1箇所NとCHが異なっている。図5に示すように、両者は非常に類似した構造でありながら、異なる塩基配列認識能をもち、ヒト培養ガン細胞に対しての活性を示すフィンガープリントパターンもかなり異なり、低い相関係数をもつことが明らかになった<sup>16)</sup>。アルキル化ヘアピンポリアミドのアルキル化部分は、天然物のデュオカルマイシンから合成しており、動物実験に必要な量の供給は非常に困難である。しかし、ナフタレンジオールから合成される誘導体に置き換えることによって、この問題は克服できることが最近明らかになった。さらに、39種ガン細胞のスクリーニングパネルの結果でも、さらに強い活性が得られている。

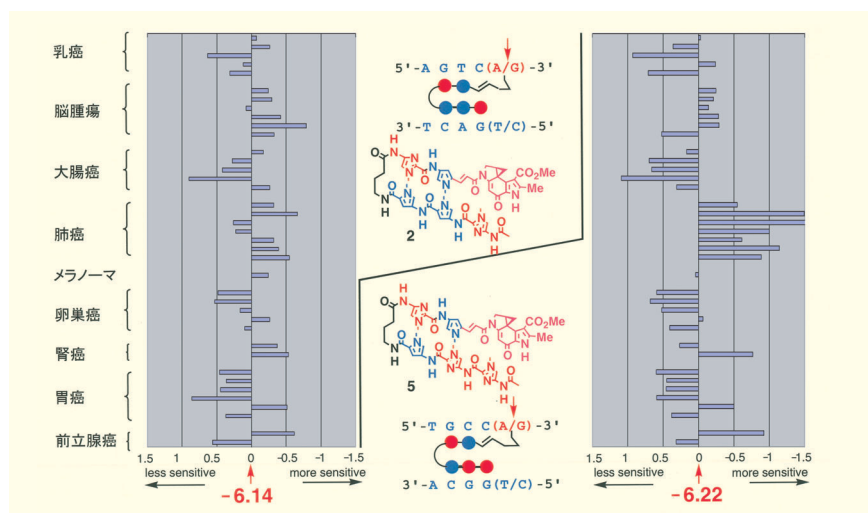


図5. ヘアピンポリアミドのヒトがん細胞パネルによる評価 (両者の相関係数=0.65)

## 7 おわりに

Py-Imポリアミドはディスタマイシンやネトロブシンなどの抗生物質によるDNAの塩基配列の読み取り機構を詳しく検討することによって生まれた画期的な人工分子である。転写因子などのDNA結合蛋白による認識の機構と比べ単純であり、分子の大きさという点でも非常に経済的なシステムである。特定の遺伝子の発現のコントロールは遺伝子の機能解析のツールとして利用可能である。またPy-Imポリアミドを蛍光色素でラベルすることによって配列選択的な標識試薬としての利用も検討されている<sup>18-19)</sup>。酵素により加水分解を受けない性質を生かし、経口投与可能な薬剤となる可能性もある。前半で紹介したDNAに可逆的に結合する分子は、新しいタイプの抗生物質や生活習慣病などの治療薬として、後半で示したアルキル化ポリアミドはテーラーメイド抗ガン剤としての可能性を今後追求したいと考えている。

## [参考文献]

- 1) Dervan, P.B., Edelson, B.S.: *Curr. Opin. Stru. Biol.*, **13**, 284 (2003).
- 2) Murty, M.S.R.C., Sugiyama, H.: *Biol. Pharm. Bull.*, in press.
- 3) 飯田博一, 杉山 弘: 有合化(1999).
- 4) Marques, M.A., Doss, R.M., Urbach, A.R., Dervan, P.B.: *Helv. Chem. Acta*, **85**, 4485 (2002).
- 5) Trauger, J.W., Baird, E.E., Dervan, P.B.: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 3534 (1998).
- 6) White, S., Szcwyczyk, J.W., Turner, J.M., Baird, E.E., Dervan, P.B.: *Nature* (London), **391**, 468 (1998).
- 7) Baird, E.E., Dervan, P.B.: *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6141 (1996).
- 8) Wurtz, N.R., Turner, J.M., Baird, E.E., Dervan, P.B.: *Org. Lett.*, **3**, 1201 (2001).
- 9) Gottesfeld, J.M., Neely, L., Trauger, J.W., Baird, E.E., Dervan, P.B.: *Nature* (London), **387**, 202 (1997).
- 10) Dickenson, L.A., Gulizia, R.J., Trauger, J.W., Baird, E.E., Mosier, D.E., Gottesfeld, J.M., Dervan, P.B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 12890-12895 (1998).
- 11) Sugiyama, H., Lian, C., Isomura, M., Saito, I., Wang, A.H.-J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14405 (1996).
- 12) Fujiwara, T., Tao, Z.-F., Ozeki, Y., Saito, I., Wang, A.H.-J., Lee, M., Sugiyama, H.: *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 7706 (1999).
- 13) Tao, Z.-F., Fujiwara, T., Saito, I., Sugiyama, H.: *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4961 (1999).
- 14) Bando, T., Narita, A., Saito, I., Sugiyama, H.: *Chem. Eur. J.*, **8**, 4781 (2002).
- 15) Oyoshi, T., Kawakami, W., Narita, A., Bando, T., Sugiyama, H.: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4752 (2003).
- 16) Bando, T., Narita, A., Iwai, A., Kihara, K., Sugiyama, H.: *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 3406 (2004).
- 17) Shinohara, K., Narita, A., Oyoshi, T., Bando, T., Teraoaka, H., Sugiyama, H.: *J. Am. Chem. Soc.*, in press.
- 18) Rucker, V.C., Foister, S., Melander, C., Dervan, P.B.: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1195 (2003).
- 19) Maeshima, K., Janssen, S., Laemmli, U.K.: *EMBO J.*, **20**, 3218 (2001).

Products

株式会社ワコーケミカル

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
320-64531	4-(Fmoc-amino)-1-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic Acid	1g	9,000
326-64533		5g	32,000
327-64541	4-(Fmoc-amino)-1-methyl-1H-imidazole-2-carboxylic Acid	1g	9,000
323-64543		5g	32,000
324-64551	1-Methyl-4-nitro-2-(trichloroacetyl)-1H-pyrrole	1g	6,000
320-64553		5g	18,000
321-64561	1-Methyl-4-nitro-2-(trichloroacetyl)-1H-imidazole	1g	6,000
327-64563		5g	18,000

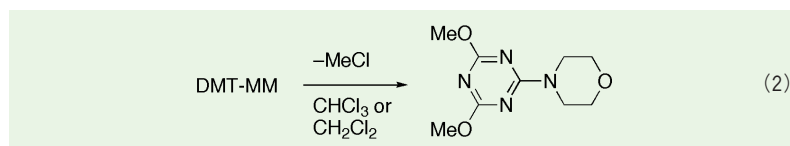
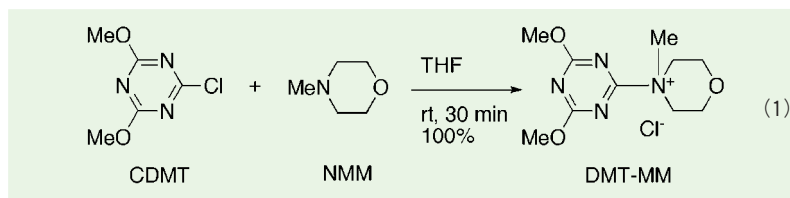
### 1 はじめに

酸アミドやエステルは医薬品、化成品、高分子から生体分子にいたるまで広く存在する重要な構造単位であり、その最も一般的で直接的な構築法は、カルボン酸誘導体とアミンやアルコールを原料にする方法である。それ故、いわゆる脱水縮合剤を用いるものから、酸クロリドや酸無水物を始めとする活性化したカルボン酸誘導体を利用する方法に至るまで、多岐に亘る試薬や反応系が開発されてきた。従って、新しい手法として評価を受けるためには、化学量論的条件の下、温和、高収率に進行することは今や最低限の条件であり、広く利用されるためにはこれらに加えて、安定性、安全性、簡便性、および経済性など実用面で優れていることが必須であると思われる。さらに来るべき持続可能社会にマッチした次世代の試薬としては、リサイクルや環境調和が一層求められると考えられる。一方で、合成化学の視点からは、複雑化した化学物質の合成に役立つ新機能、新用途がなお要求されており、優れた脱水縮合反応の開発は古いテーマでありながら、依然として高いニーズを有している。

このような背景の下に我々は、新しい脱水縮合剤の開発を目指して研究を行ってきた。ここではこれまでの成果について述べたい。

### 2 新規縮合剤の開発

新規縮合剤開発に当たって、我々は2-クロロ-4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン(CDMT)に着目した<sup>1)</sup>。良好な反応性を持ちながら、刺激性が強く、ジシクロヘキシルカルボジミド(DCC)などの既存の汎用試薬と比べて、取り立てて優れた特徴が知られておらず、ほとんど利用されていなかった。しかしながら、原料の塩化シアヌルが安価なことから潜在的な経済性に優れており、刺激性の問題を解決できれば、その有用性は格段に高まると考えられた。我々は、CDMTのTHF溶液に*N*-メチルモルホリン(NMM)を加えると、室温数分でトリアジン環上での求核置換反応が進行し、四級アンモニウム塩である4-



(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM) が沈殿として定量的に生成することを見出した<sup>2)</sup>(式1)。脂溶性で飛散性の固体であったCDMTを不揮発性の塩にすることによって、水溶性を獲得させるとともに、刺激性をも抑えることができた。

奇しくも同時期にKaminskiらがDMT-MMの構造とその反応性に関する論文を報告したが<sup>3)</sup>、結論から述べると、彼らはDMT-MMの分解物である脱メチル化体を間違えて同定したため、縮合剤としての収率も悪く、DMT-MMが本来有するポテンシャルを見出すことができなかった。我々は、DMT-MMの塩素イオンがこの脱メチル化反応を起こすことを初めて見出し(式2)、DMT-MMならびにその分解物の構造を正しく同定するとともに、それらの化学的性質を明らかにする中で<sup>1)</sup>、以下に述べるような用途開発へと展開することに成功した。

### 3 酸アミド合成

我々は、DMT-MMがMeOHや水の中で予想外の安定性を有することを見出したこ

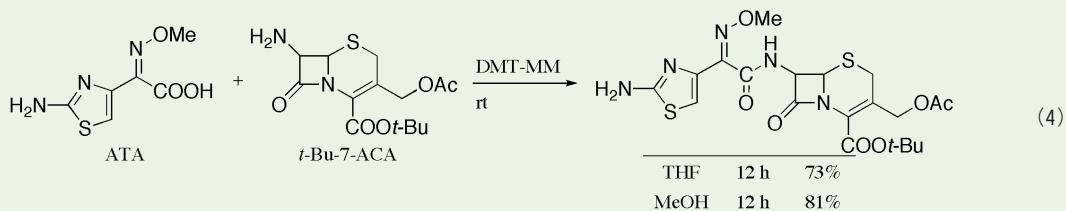
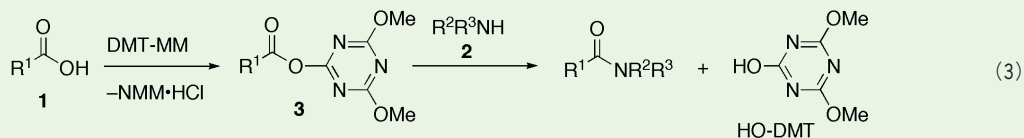
とから、アルコール中でのカルボン酸とアミンとの脱水縮合反応を検討した。多くの脱水縮合剤がプロトン性溶媒と反応することや、アルコール中での脱水縮合反応はエステル生成を伴うこと等の理由から、酸アミド合成の溶媒としてアルコールを使用することは、有機化学者にとって常識とは言い難いことであった。しかし、低分子アルコール(MeOH, EtOH, 2-PrOH)は、水と比べて多様な有機物を可溶化すること、ロータリーエバポレータで除去が容易であること、安価であることから、これらの溶媒を利用できればDMFやDMSOのような高い沸点を有する非プロトン性の極性溶媒より、合成上の有用性が高いと考えられた。

そこで、フェニルプロピオン酸**1a**とフェニルアミン**2a**のMeOH溶液にDMT-MMを加え室温で3時間攪拌したところ、酸アミド98%に対して、エステル1%と非常に高い収率と選択性で酸アミドが得られた(表1)<sup>4)</sup>。比較のためにDCCや水溶性カルボジミド(EDC)を用いて同一条件で反応を行ったが、収率、選択性ともにDMT-MMには及ばなかった。この反応は、式3に示すような二段階機構で進行していると考えられる。すなわち、

表1. メタノール中での酸アミド合成

Ph(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH + Ph(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> $\xrightarrow[\text{MeOH, rt, 3h}]{\text{Condensing Agent}}$			
Condensing Agent	Amide	Ester	Amide/Ester
DMT-MM	98%	1.0%	98
DCC	27%	7%	3.9
EDC	53%	16%	3.3





カルボン酸がトリアジノ基に付加し、活性エステル中間体3を与え、次にそのカルボニル基をアミノ基が攻撃して酸アミドを与える。一連の反応で発生する塩酸は、一段階目で脱離したNMMによって捕捉されるため、

特別な中和剤を加えることなく反応が進行する。表1の結果から、3のアミノリシ速度は少なくともアルコールの2万倍以上速いことになる。メタノール中での反応例を幾つか表2に示すが、いずれも多用なカルボン酸

やアミンに対して高収率で進行することが明らかである。当然のことながら、アミノエタノールではアミノ基での反応が完全な選択性で進行する(run 12)。セフェム系化合物の合成に於いては、ATAのアミノ基を保護することなく選択的に7-ACA誘導体のアミノ基とカップリングさせることができる(式4)。

ジカルボン酸は殆どの有機溶媒に難溶であるため、ジアミドへの直接的な変換は容易ではない。しかしながら、DMT-MMを用いれば、水を溶媒にすることで高収率にジアミドへと変換できる(式5)。グルコサミン塩酸塩の*N*-アセチル化は、取扱い容易な酢酸ナトリウムをアセチル化剤に用いて、90% MeOH水溶液中で定量的に進行する(式6)。

DMT-MMは有機溶媒に難溶であるが、殆どの有機溶媒中で利用できる。例えば表2に示すようにTHF中でのアミド化反応は、MeOH中の結果と比べて若干の収率低下を伴うものの、十分に良好な収率で進行する。DCCを用いた反応ではしばしば溶媒効果を受けることが知られているが<sup>5)</sup>、これと比べて、DMT-MMは溶媒を選ばないため、反応基質の物性に合わせた最も適切な溶媒を用いることができる。特にアルコール-水やTHF-水のような混合溶媒系も自由に利用できることは大きな利点である。

表2. DMT-MMを用いた酸アミド合成

R <sup>1</sup> COOH (1;1.0 eq) + R <sup>2</sup> R <sup>3</sup> NH (2;1.1 eq)		DMT-MM(1.1 eq), rt		R <sup>1</sup> CONR <sup>2</sup> R <sup>3</sup>	
		MeOH or THF			
run	carboxylic acid	amine	MeOH time yield(%)	THF time yield(%)	
1	Ph(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH ( <b>1a</b> )	Ph(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ( <b>2a</b> )	3h 98	4h 84	
2	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH ( <b>1b</b> )	<b>2a</b>	overnight 96	overnight 83	
3	PhCH=CHCOOH ( <b>1c</b> )	<b>2a</b>	4h 92	4h 70	
4	<i>t</i> -BuCOOH ( <b>1d</b> )	<b>2a</b>	3h 84	3h 62	
5	<i>p</i> -MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH <sub>2</sub> COOH ( <b>1e</b> )	<b>2a</b>	4h 85	4h 82	
6	PhCOOH ( <b>1f</b> )	<b>2a</b>	2h 97	4h 81	
7	<i>p</i> -O <sub>2</sub> N-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH ( <b>1g</b> )	<b>2a</b>	2h 93	3h 82	
8	<i>p</i> -MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH ( <b>1h</b> )	<b>2a</b>	3h 100	3h 95	
9	<b>1a</b>	PhCH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ( <b>2b</b> )	3h 96	3h 77	
10	<b>1a</b>	Et <sub>2</sub> NH ( <b>2c</b> )	2h 98	4h 68	
11	<b>1a</b>	PhCH <sub>2</sub> NMeH ( <b>2d</b> )	3h 100	not performed	
12	<b>1a</b>	HO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ( <b>2e</b> )	0.5h 96	not performed	
13	<b>1f</b>	<i>cyclo</i> -C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NH <sub>2</sub> ( <b>2f</b> )	3h 91	3h 92	
14	<b>1g</b>	PhNH <sub>2</sub> ( <b>2g</b> )	3h 82	20h 92	

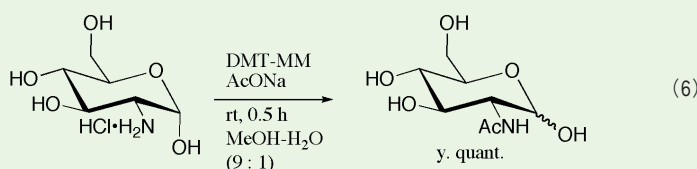


表3. オリゴペプチドの固相合成におけるDMT-MMとPyBOPの比較

peptide	Using DMT-MM		Using PyBOP	
	yield	purity	yield	purity
Bz-Phe-Leu-Gly-OH	90%	91%	90%	90%
Fmoc-Ala-Ser-Phe-Met-OH	86%	89%	80%	88%
Fmoc-Phe-Pro-Asp-Met-OH	91%	90%	90%	91%
DMT-Leu-Met-Phe-Met-OH	87%	85%	89%	88%

表4. セグメント縮合におけるラセミ化と溶媒効果

$$\text{Z(OMe)-Gly-Ala-OH} + \text{H-Phe-OBzI} \cdot \text{HCl} \xrightarrow{\text{DMT-MM, Et}_3\text{N}} \text{Z(OMe)-Gly-Ala-Phe-OBzI} + \text{Z(OMe)-Gly-D-Ala-Phe-OBzI}$$

Solvent	Conditions	Ratio (%)		Yield(%)
		-L-Ala-	-D-Ala-	
AcOEt	rt, 2.5h	>99.9	<0.1	quant
THF	rt, 3h	>99.9	<0.1	quant
DMF	rt, 2h	>99.9	<0.1	quant
CH <sub>3</sub> CN	rt, 2h	>99.9	<0.1	quant
DMSO	rt, 2h	97.7	2.3	97
2-PrOH	rt, 20 min	99.3	0.7	quant
EtOH	rt, 2h	96.6	3.4	quant
MeOH	rt, 5.5h	96.7	3.3	96
Water	rt, 24h	89.5	10.5	69

## 4 ラセミ化

DMT-MMは、ペプチド合成においても有望なカップリング剤である。一般にウレタン型の保護基を有するアミノ酸のラセミ化が起きにくいとおり、Boc-Leu-OHとH-Phe-OMeとのMeOH中での脱水縮合反応では、生成物であるジペプチド(Boc-Leu-Phe-OMe: 収率88%)のラセミ化体は全く確認されていない<sup>4)</sup>。TaddieらはオリゴペプチドのFmoc法による固相合成において、DMT-MMが、収率、純度ともbenzotriazol-1-ylxytripyrrrolidinophosphonium hexafluorophosphate(PyBOP)と同等の結果を与えることを報告している(表3)<sup>6)</sup>。

木曾らの方法に従ったZ(OMe)-Gly-L-Ala-OHとH-L-Phe-OBzIを用いたトリペプチドのセグメントカップリングモデルでは<sup>7)</sup>、DMSOを除く非プロトン性溶媒(酢酸エチル、THF、アセトニトリル、DMF)中の場合には、アラニン残基のラセミ化はほとんど進行しない(表4)<sup>8)</sup>。一方、水中では10%以上のラセミ化が起きるのに対し、MeOH、EtOH中では3%程度に、2-PrOH中では1%未満までラセミ化の割合を下げる事ができる。カルボジイミド系で有効性が認められているヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)の添加は、全く効果が無く、逆に15%と収率は大幅に低下する。

## 5 エステル化

アミド合成に於いて、アルコール中で殆どエステルが生成しないからといって、エステル化が進行しないわけではない。カップリングするアミンが存在しなければ、活性エステル中間体は溶媒のアルコールと速やかに反応する<sup>9)</sup>。すなわち、カルボン酸とNMMのアルコール溶液にDMT-MMを加えると、多くの場合に室温数時間で高収率にエステルが得られる(表5)。アルコールは市販品を乾燥せずそのまま使用しても殆ど問題ない。DMT-MMは理論上1当量で十分だが、過剰に用いれば収率は更に向上する。*t*-BuOHを溶媒にすれば、*t*-ブチルエステルが良好な収率で得られる。THF中、化学量論程度アルコールを用いてもエステル化は進行するが、反応時間の延長が必要であり、収率の低下も無視できない。これは、活性エステルのアルコールシスに対する反応性が控えめであることを考えれば、当然の結果かも知れない。Fischerエステル化反

応が、アルコール中、強酸性条件下に進行するのに対して、DMT-MMを用いた本反応は弱塩基性条件下に進行することから、相補的なFischer型反応として価値が高い。

## 6 環境調和を目指した利用

上述のとおり有機溶媒を使用せず、水や生分解性のアルコールが利用できることから、DMT-MMは環境にやさしい試薬と位置づけることができる。しかしながら、試薬に由来する化合物のヒドロキシトリアジン(HO-DMT)<sup>10)</sup>の発生は免れない。これは例えば縮合反応が100%の収率で進行したら、必ず100%の収率で副生する避けようのない廃棄物である。HO-DMTは水溶性が高いので水洗によって容易に除去できるが、可能なら回収して再利用することが最も望ましい。そこで、MeOH中での反応をモデルにして回収を検討したところ、図1に示すような濃縮、濾過という簡単な操作で純度よく単離できることが明らかとなった<sup>11)</sup>。

表5. DMT-MMを用いたエステル化反応

$$\text{R}^1\text{COOH} (1) \xrightarrow{\text{DMT-MM, R}^4\text{OH}} \text{R}^1\text{COOR}^4$$

carboxylic acid	alcohol	DMTMM (eq)	NMM (eq)	temp	time	yield(%)
Ph(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH (1a)	MeOH (solvent)	1.2	1.2	rt	2h	90
1a	MeOH (2.0 eq) in THF	2.0	2.0	rt	22h	67
1a	EtOH (solvent)	2.0	1.2	rt	1.5h	95
1a	<i>i</i> -PrOH (solvent)	2.0	1.2	rt	5h	72
1a	<i>t</i> -BuOH (solvent)	2.0	1.2	50°C	21h	72
PhCH=CHCOOH (1c)	PhCH <sub>2</sub> OH (1.1 eq) in THF	3.0	3.0	rt	22h	89
Boc-Leu-OH	MeOH (solvent)	1.2	1.2	rt	5h	83
<i>p</i> -CH <sub>2</sub> =CH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH	MeOH (solvent)	2.0	1.2	50°C	2h	88

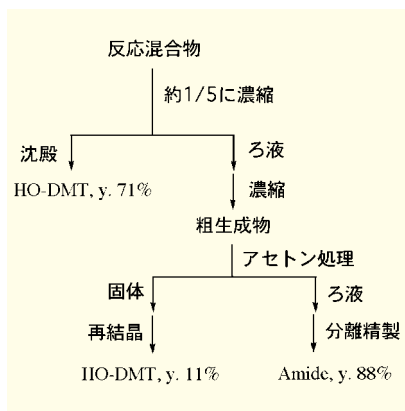


図1. HO-DMTの単離

得られたHO-DMTは、オキシ塩化リン/ジエチルアニリンで処理することにより高収率でCDMTへと再生でき、このものはNMMと混ぜるだけでDMT-MMへと変換できる(図2)<sup>11)</sup>。一方、HO-DMTをトリフルオロメタンスルホン酸無水物で処理し、得られた中間体にそのまま過剰量のNMMを加えると、対アニオンとして塩素イオンの代わりにトリフラートを有するDMT-MM(OTf)が得られる。

DMT-MM(OTf)は、従来の塩素イオンを有するDMT-MMと比べて、縮合剤として全く同じ反応性を示すが、有機溶媒中で式2のような分解反応を起こさないので、有害なクロロメタンの発生しない試薬として特に環境面から好ましい。

## 7 おわりに

DMT-MMの特徴として特筆すべき点は、市販の溶媒中で基質と試薬を同時に混ぜるだけで進行するため、合成の知識が殆どなくても簡単に反応を行うことができること

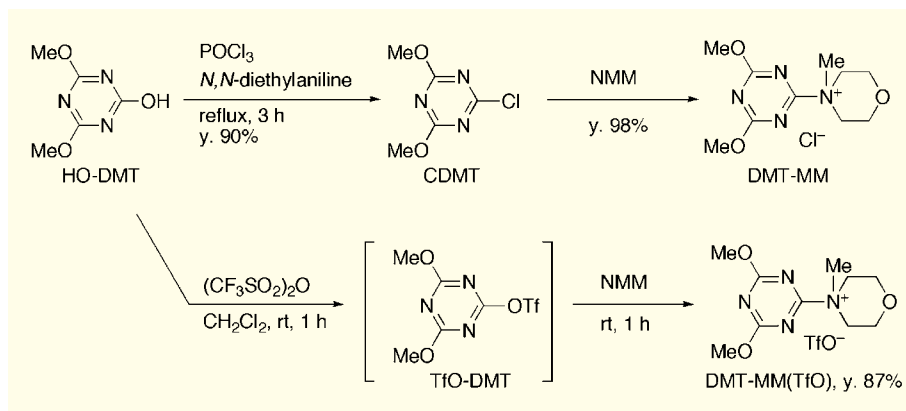


図2. DMT-MMの再生

であろう。その他にも、(1)利用できる基質の多様性が高い;(2)条件が温和(室温、中性)(3)短時間、高収率で進行;(4)多用な有機溶媒や水、あるいはこれらの混合液中でも縮合が進行;(5)ラセミ化が起きにくい;(6)添加剤が不要;(7)アレルギー性が観察されない;(8)コプロダクトのHO-DMTは水洗により除去容易で、リサイクルも可能である;(9)吸湿性が無く安定な固体;(10)安価な塩化シアヌルから短工程で調製可能等を列挙でき、汎用性、簡便性、経済性に加え、環境面でも優れた試薬であると言える。これらの特徴や新用途は、多様化したニーズ、複雑化した化合物の合成にもうまくマッチし得るものであり、今後その利用は一層高まるものと期待される。

- (a) Kaminski, Z. J.: *Tetrahedron Lett.* **26**, 2901-2904 (1985). (b) Kaminski, Z. J.: *Synthesis*, 917-920 (1987).
- Kunishima, M., Kawachi, C., Iwasaki, F., Terao, K., Tani, S.: *Tetrahedron Lett.*, **40**, 5327-5330 (1999).
- Kaminski, Z. J., Paneth, P., Rudzinski, J.: *J. Org. Chem.*, **63**, 4248-4255 (1998).
- Kunishima, M., Kawachi, C., Hioki, K., Terao, K., Tani, S.: *Tetrahedron*, **57**, 1551-1558 (2001).
- Balcom, B. J., Petersen, N. O.: *J. Org. Chem.*, **54**, 1922-1927 (1989); Albert, J. S., Hamilton, A. D.: "Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis", Ed: John Wiley & Sons: Chichester, Paquette, L. A., Vol. 3, pp 1715 (1995).
- Falchi, A., Giacomelli, G., Porcheddu, A., Taddei, M.: *Synlett*, 275-277 (2000).
- Kiso, Y., Satomi, M., Miyazaki, T., Hiraiwa, H., Akita, T.: "Peptide Chemistry," ed. by Okawa, K., Protein Research Foundation, pp. 71-74 (1980).
- Kunishima, M., Kitao, A., Kawachi, C., Watanabe, Y., Iguchi, D., Hioki, K., Tani, S.: *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 549-550 (2002).
- Kunishima, M., Morita, J., Kawachi, C., Iwasaki, F., Terao, K., Tani, S.: *Synlett*, 1255-1256 (1999).
- 化合物単体としてはケト互変異性体のトリアジンが安定と考えられるが、ここでは便宜上エノール構造を用いる
- Kunishima, M., Hioki, K., Wada, A., Kobayashi, H., Tani, S.: *Tetrahedron Lett.*, **43**, 3323-3326 (2002).

**Products**

株式会社ワコーケミカル

### 新規トリアジン系縮合剤

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
329-53751	4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride n-Hydrate	5g	7,000
327-53752	【DMT-MM】	25g	21,000



## ゲル電気泳動を出発点とするプロテオーム解析で成功するために

科学技術振興機構 研究成果活用プラザ大阪 田尻 道子  
大阪府立母子保健総合医療センター研究所 和田 芳直

今世紀に入って、ゲノムや遺伝子cDNA情報の充実が、ゲル電気泳動によって分離したタンパク質の同定に革新的な変化をもたらした。ここではその基本的な方法であるゲル内消化やペプチドマスマフィンガープリント法の概要と、それらを実施する上での注意点などについて、全体の操作の流れ(図1)に沿って解説する。

### Step1. 組織や血清などからタンパク質混合物を抽出し、一次元ないし二次元電気泳動によって分離する。

同定・定量されるタンパク質群の種類と数は最初の抽出により最大値が決まるので、例えば膜タンパクを逃さないような抽出が必要であるが、完璧な方法はまだ確立されていない。

### Step2. 染色によって分離したタンパク質を可視化する。

例えば、銀染色は1-10ngのタンパク質を検出する感度があるとされているが、以下の分析はこの程度の量のタンパク質に対して十分適用できる。ただし、微量分析を可能にするには、染色に際してグルタルアルデヒドを使わず、低い銀濃度によって染色を行う必要があり、そのための染色キットも市販されている。また、ネガティブ染色ではタンパク質が修飾を受けないので、以下の分析に適していると考えられる。

### Step3. 分離タンパク質をゲル内消化法でペプチドに断片化し、ペプチド混合物を得る。

酵素としてはトリプシンが最もよく用いられる。その際、リシルエンドペプチターゼを併用することでリシン残基における切断が改善され、切れ残りのないペプチド質量情報を得ることができるし、トリプシンだけでは切り出されないタンパク部分に由来するペプチドを得ることも期待できる(図2)。その結果、PMF法によるデータベース検索において、いっそう確かな同定ができることになる。

酵素消化によってゲル内で生成したペプチドはゲルから遊出させて回収する。しかし、この状態では不純物や塩類が混入しており、逆相樹脂を充填した微量脱塩器具などを用いて試料を精製する必要がある。実際、Na<sup>+</sup>

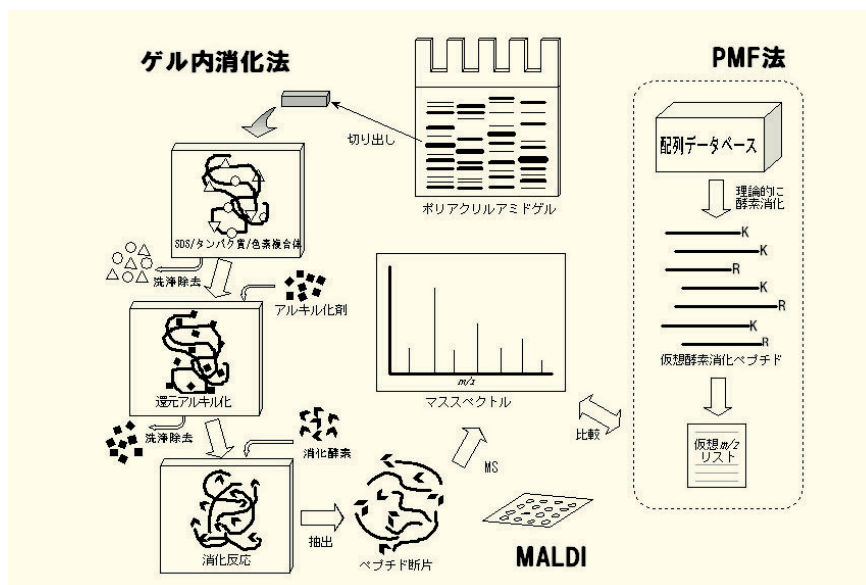


図1.

などアルカリ金属イオンが残った場合には、質量分析(MS)において単一ペプチドのイオンが、プロトンH<sup>+</sup>付加以外に、Na<sup>+</sup>付加イオンなど複数のイオン種として観測されるため、質量測定の対象となるプロトン付加分子イオンのシグナル強度が相対的に下がるだけでなく、ペプチド質量の決定にも困難を来すからである。

なお、一連の操作の過程において、セラチンなど分析環境からのタンパク質混入は、特に微量試料を解析する際に、深刻な問題となるので、ゲルを直接手で触れたりしないなど細心の注意が必要である。

### Step4. MSによってペプチドの質量や配列情報を得る。

ペプチドの質量を得るためのイオン化法には、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI)法とエレクトロスプレーイオン化(Electrospray ionization; ESI)法がある。多検体を短時間に処理するスループットにおいてMALDIが優れており、タンデムMSでペプチドの配列情報も得たい場合にはESIを用いるのが一般的である。ただ、ESIの場合にはペプチド混合物試料をMSに導入する前にある程度分離しておく必要があり、高速液体クロマトグラ

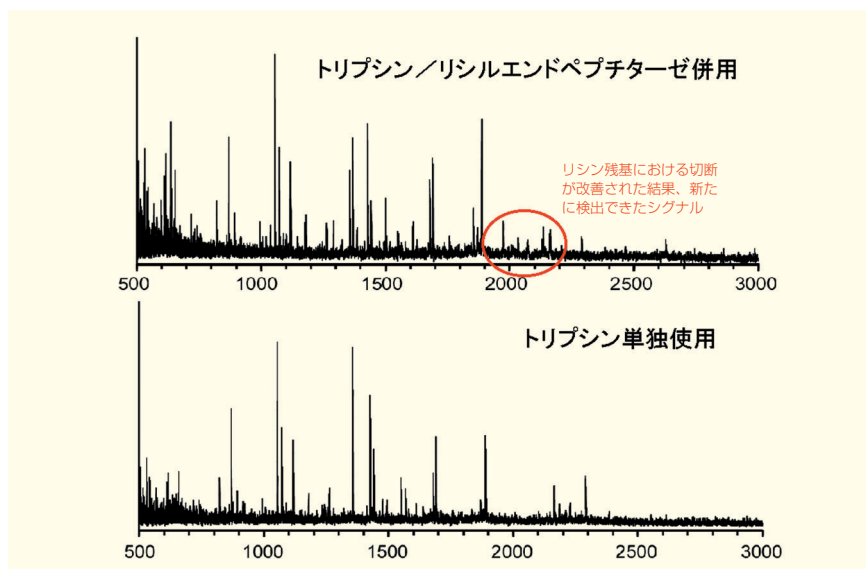


図2.

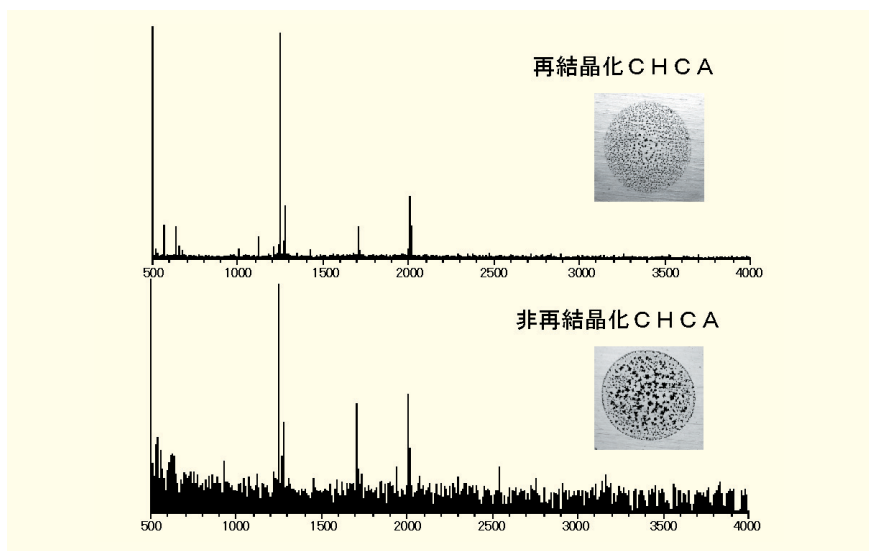


図3.

フィー (LC) とオンラインで接続した LC-MS として用いるのが一般的である。

以下、MALDI法による測定について説明する。

MALDIでは試料に化学マトリックスと呼ばれる小分子溶液を加えて混合結晶を作製し、それにレーザー光を照射して励起してイオン化する。混合結晶の励起には一般的に安価でハンドリングが容易な窒素レーザー (337nm) が多く用いられている。従って、マトリックスには337nmに吸収帯をもつ物質が使用され、ペプチド試料に対しては $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシシナイ酸 (CHCA)、タンパク質試料にはシナピン酸 (SA)、ペプチド、糖、糖脂質には2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) が使用されることが多い。

MALDI法では混合結晶のでき方によって、得られるマススペクトルの質が大きく左右され

る。混合結晶を観察したときにマトリックスが細かく一面に均一に広がっている場合は、よいスペクトルが得られやすいようである。そのこととも関係するが、マトリックスの純度はマススペクトルの質 (すなわち感度) に影響するので、再結晶化したものを用いるべきである。再結晶化CHCAと非再結晶化CHCAのサンプルプレート上の結晶の状態を観察し、スペクトルを比較してみると、非再結晶化のものは不均一で塊になっておりスペクトルもノイズが多いのに対し、再結晶化したものは細かく均一でスペクトルもノイズが少なくきれいである (図3)。

### Step5. 質量データあるいはタンデムMSIによる開裂断片の質量データをゲノム・タンパク質データベースに対して検索して、タンパク質を同定する。

ペプチドマスフィンガープリント法 (peptide

mass fingerprinting; PMF) とは、リシルエンドペプチターゼやトリプシンなどの特異性の高い酵素でタンパク質を分解し、得られたペプチド混合物のMSスペクトルと、配列データベースに登録されているタンパク質のアミノ酸配列から予想されるペプチドの質量の組合せを比較することによりタンパク質を同定する方法である。その際、ペプチド質量の測定精度は検索による同定の切れ味を高める上で重要な要素である。著者らはゲル内消化過程で生じる酵素タンパク質自体に由来するペプチドを、内部質量校正用に用いることで、質量測定精度を向上させている。

PMFによって得られるのはあくまで同定の「確からしさ」であり、「決定」ではない。しかし、検索によってヒットしたペプチド配列が本当にマススペクトルにおいて検出された質量をもつペプチドであるかどうかは、観測されたイオンをタンデムMS法によって配列解析することで判定できる。上でタンデムMSIにはESIが一般的であると述べたが、最近ではMALDIにおいてもタンデムMSを実施できる装置が普及しつつある。

以上、銀染色の感度限界である数ngのタンパク質をゲル上に検出できれば、それぞれの操作段階における熟練が必要ではあるが、ヒトやマウスなど遺伝子データベースの充実している種のタンパク質については、かなりの成功率で同定できるはずである。

### 【参考文献】

丹羽利充編：「ポストゲノム・マススペクトロメリー-生化学のための生体高分子解析」(化学同人)。

## プロテオーム解析関連試薬



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
299-58901	Silver Stain MS Kit	電気泳動用	20回用	19,000
293-57701	Negative Gel Stain MS Kit	電気泳動用	20回用	11,000
125-05061	Lysyl Endopeptidase <sup>®</sup> , Mass Spectrometry Grade	プロテオーム研究用	20 $\mu$ g × 5本	15,000
202-15951	Trypsin, from Porcine Pancreas, Mass Spectrometry Grade	プロテオーム研究用	20 $\mu$ g × 5本	15,000
037-19261	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid【CHCA】	プロテオーム研究用	50mg × 5本	20,000
192-13361	Sinapic Acid【SA】	プロテオーム研究用	50mg × 5本	20,000
044-29101	2,5-Dihydroxybenzoic Acid【DHB】	プロテオーム研究用	50mg × 5本	20,000
—	SuperSep <sup>™</sup> シリーズ (プレキャストゲル)	電気泳動用	—	—

## LC-MS法による農薬の一斉分析

和光純薬工業株式会社 試薬研究所 吉田貴三子

水道水質管理の充実・強化が求められる状況で、水質検査の合理的、効率的なあり方について検討がなされており、水道水質基準の見直しが全面的に行われている。厚生労働省より平成15年5月30日に水道水質基準に関する省令が公布され、平成16年4月1日から施行されることとなった。

農薬に関しては、地域、時期による格差が大きく、毒性評価値の1/10に相当する値を超えて検出される可能性が少ないことから水質基準項目から削除され、水質管理目標設定項目に位置付けられた。101種の農薬が目標値とともに示され、精度の高い測定方法としてGC法が削除されGC-MS法(73農薬)へ移行し、新たにLC-MS法(30農薬)が採用された。筆者らは、新たに採用されたLC-MS法による一斉分析の対象となっ

ている28種類の農薬について、分析条件の検討と固相抽出カラムによる農薬の回収率を確認したので紹介する。

分析用カラムにはWakopak® MS-Agri-9GT(2.0φ×150mm)を、移動相にはLC-MSに対応可能な酢酸緩衝液とアセトニトリルを使用してグラジエント分析法による一斉分析条件を設定した。その時の分析条件とクロマトグラムを図1~3に示したが、ポジティブモードにより22種類の農薬を、ネガティブモードにより14種類の農薬を検出した。MSによる検出は、UV検出に比べて保持時間が重なる農薬も効率よく検出可能であり、分析時間はカラムの安定化も含めて30分となった。農薬の回収率の確認は、固相抽出カラムにPresep®-C Agri(short)を使用して、公定法に準拠した方法で検討した。操作方法を

図4に、結果を表1に示したが、UVで検出されないダラポンを除く27種類の農薬のうち25種類について良好な回収率が得られた。酸で分解し易いベンフラカルブはpH3.5に調整した検水からは回収できなかったが、pH未調整の検水からは回収可能であった。また、極性の高いメソミルは固相への保持が弱く回収率は約50%となった。

以上、Wakopak® MS-Agri-9GTとPresep®-C Agri(short)を使用したLC-MS法への適応性を紹介した。今後さらなる至適条件の検討は必要であるが、LC-MS分析の前処理と分離にWakopak® MS-Agri-9GTとPresep®-C Agri(short)が有効なツールであると考える。本稿が何かのお役に立てれば幸いです。

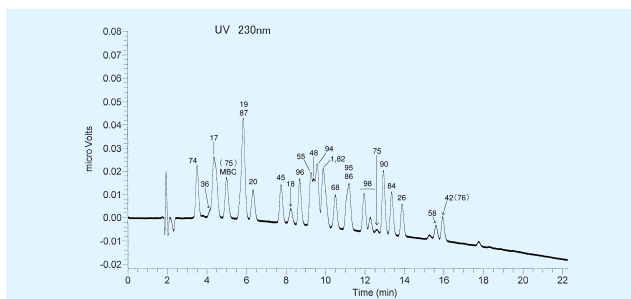


Fig.1.

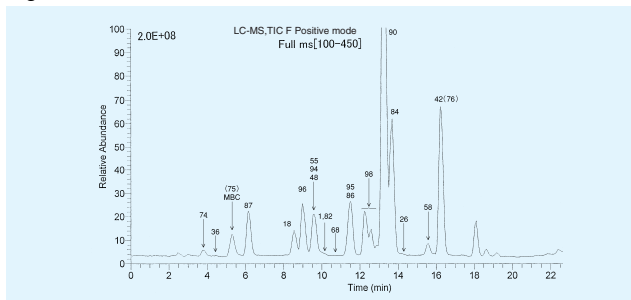


Fig.2.

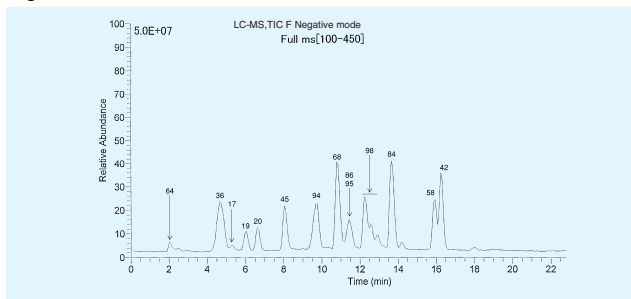


Fig.3.

Fig.1~3

**HPLC Conditions**  
 Column : Wakopak® MS-Agri-9GT, 2.0mmφ×150mm  
 Eluent : A) 10mmol/L CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (pH 3.7)  
 B) CH<sub>3</sub>CN  
 0~20min. B 20~80%  
 Flow rate : 0.2ml/min. at 40°C  
 Detection : (1) UV230nm  
 (2) TIC Full : ESI (+)  
 (3) TIC Full : ESI (-)  
 Inj.vol. : 2μl

**MS Conditions**  
 LCQ (Thermo Quest) : ESI (+), ESI (-)  
 Sheath Gas Flow (arb) : 80  
 Aux Gas Flow (arb) : 10  
 Spray Voltage (kV) : 5  
 Capillary Twmp (°C) : 240  
 Capillary Voltage (V) : -46  
 Tube Lens Offset (V) : -20

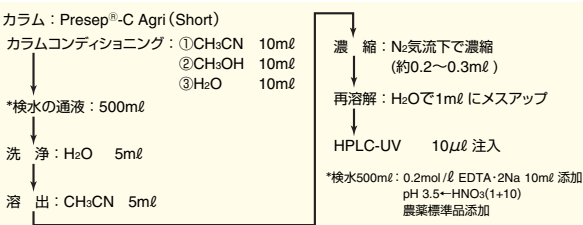


Fig.4. 農薬回収率測定 固相抽出条件

表1. 農薬回収率測定結果

101種農薬No.	品名	回収率(%)	101種農薬No.	品名	回収率(%)
1	チウラム	94.3	68	ジウロン(DCMU)	100.4
17	ベンタゾン	99.3	74	メソミル	50.8 (85.2)
18	カルボフラン(カルボスルファン代謝物)	103.1	75	ペノミル	91.0
19	2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)	99.1	76	ベンフラカルブ	分解(85.5)
20	トリクロピル	101.2	82	プロベナゾール	98.6
26	イプロジオン	98.9	84	ダイムロン	99.6
28	オキシ銅	96.2	86	ペンシルフロメチル	100.7
36	アシュラム	99.6	87	トリシクラーゾール	99.1
42	ベンスリド(SAP)	96.7	90	アゾキストロピン	99.6
45	メコプロップ(MCPPP)	99.9	94	ハロスルフロメチル	99.1
48	カルバリル(NAC)	101.0	95	フラザルスルフロ	98.6
48	カルバリル2	99.3	96	チオジカルブ	99.6
55	チオファネートメチル	96.9	98	シデュロン	99.7
58	カルプロバミド	101.8	98	シデュロン2	98.3
64	ダラポン	未確認	75+	メチル-2-ベンジイミダゾールカルバマート(MBC)	97.5

\* ベンフラカルブ: 酸で分解し易い、pH 3.5の検水から回収できない。カルボフラン他に変化する( )内はpH未調整の検水からの回収率  
 \* メソミル( )内の回収率はPresep®-Agri使用時  
 \* ペノミル: 分解し易い、MBCに変化する  
 \* シデュロン: 2ピーク検出  
 \* カルバリル、ベンタゾン: 条件によってピーク分割する  
 \* ダラポン: UV検出不可、回収率未確認

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
296-32651	Presep®-C Agri (Short)	試料前処理用	10個×5	38,000

コードNo.	品名	カラムサイズ	記号	希望納入価格(円)
001-00030	Wakopak® MS-Agri-9GT	2.0φ×150mm	シ AD	73,000



## 第55話 エンドトキシンと添加剤

エンドトキシン標準品にはいろいろな添加剤が使用されています。添加剤はそれぞれ目的をもって使用されていますが、時としてエンドトキシン測定に影響を与える場合があります。今回は、この添加剤について考えてみましょう。

エンドキシンの添加剤として、日本薬局方標準エンドトキシン10000に使用されているマンニトール、米国標準エンドトキシンに使用されているラクトースとポリエチレングリコールなどの他、アルブミンやグリシンなどが使用されています。これらの添加剤は、主にエンドキシンの分散性を向上させ、溶液中のエンドトキシン活性を一定に保つために添加されています。

エンドキシンを扱う場合の注意点としては、エンドキシンの分散性の他、容器への吸着、共存物質の影響、などがあります。添加剤はこれらの点でも影響を与える場合があります。例えば、アルブミンを添加剤として使用しているエンドトキシンでは、プラスチック容器への吸着が認められたり、ガラスから溶出するアルミニウムイオンや鉄イオンの影響を受けにくいなどの現象が認められます。

吸着の例について、もう少し詳しくご紹介しましょう。筆者らは、滅菌済使い捨てポリスチレン試験管をエンドトキシン溶液の希釈にしばしば使用します。ガラス製試験管とポリスチレン製試験管を用いて、米国標準エンドトキシン Lot EC-6と牛血清アルブミン (BSA) を添加剤としたエンドトキシン (CSE) を希釈して、シングルESタイプのLALで活性を測定しました。その結果、EC-6ではトキシノメーターにおけるゲル化時間 (Tg) がほとんど変わらなかったのに対し (表1)、BSA入りCSEではTgの延長が認められました (表2)。EC-6で得られた結果をもとに検量線を作成しCSEの濃度を計算

したところ、ポリスチレン製試験管を使用して調製した希釈液では、ガラス製試験管を使用した場合に比べて約60%の活性しか示さないことがわかりました (表2)。この原因の証明は難しいのですが、BSAがエンドトキシンとよく結合すること、また、ポリスチレンは蛋白をよく吸着することが知られており、BSAと結合したエンドトキシンがBSAと共にポリスチレン製試験管の表面に吸着したというのが、最も可能性の高い説明ではないかと思うのですがいかがでしょう。BSAは、エンドトキシンを分散させ、活性をよく発現させます。また、金属イオンの影響も受けにくくなるため、添加剤としてはよい面も持っています。以前はよく使用されたBSAですが、最近あまり使用されていません。その理由として、BSA自体がエンドトキシンに汚染されていることが多く、これを取り除くことが難しいこと、吸着の問題、天然素材なのでロット管理が難しいなどが考えられます。

日本薬局方標準エンドトキシン10000に添加されているマンニトールについて、筆者の経験をご紹介します。Westphal法と呼ばれる熱フェノールを用いた方法で大腸菌エンドトキシンを精製した時の話です。精製品は最終的に凍結乾燥を行います。この凍結乾燥品を水に懸濁させ、レーザー粒度分布計でその粒度分布を測定してみました。その結果、凍結乾燥品の平均粒度は得られず、分布が非常に広いことがわかりました。この懸濁液を超音波処理していくと粒度が揃ってくる様子が観察されました。最終的に60nm程度の粒度ピークが観察されるようになりました。これを凍結乾燥して再度水に懸濁させ、粒度分布を測定すると、またランダムな分布が得られ、元に戻ってしまいました。超音波処理したエンドトキシン

にマンニトールを添加して凍結乾燥を行うと、凍結乾燥後の水懸濁エンドトキシンに、若干平均粒度が大きくなっているものの、粒度のピークが認められました。当時の国立衛生試験所の先生方がマンニトールを日本薬局方標準エンドキシンの添加剤として選択されたのですが、この結果を見てなるほどと感心してしまいました。

エンドキシンの添加剤によって、リムルス試験に及ぼす試料や容器の影響が異なることがわかります。このような現象はエンドトキシン添加剤でのみ認められるわけではなく、試料の種類によっては、エンドキシンの挙動に影響を与える場合があります。これらのことは、エンドトキシン測定における注意点を再確認させてくれます。以下に注意点を挙げてみます。

- (1) 測定への影響は、リムルス試薬に対するものとエンドトキシンに対するものがあること。
- (2) 測定条件の決定時には、エンドトキシンに対する影響を回避した状態で行うこと。
- (3) 試料の影響を調べるときは、エンドトキシンへの影響が少ない適切なエンドトキシン標品を選ぶこと。
- (4) 測定への影響は、リムルス試薬とエンドトキシンだけではなく、容器にも注意が必要であること。

エンドトキシンはやんちゃ坊主のようなものです。ちょっと注意を怠ると、すぐにわれわれの目を盗んでいたずらをしてきます。リムルス試験が採用されて20年以上が過ぎていますが、未だにこのやんちゃ坊主を完全に管理することはできていないのではないのでしょうか。

今回は、第56話「再認識されるペプチドグリカン」の予定です。

表1. 米国標準エンドトキシンLot EC-6の活性に対する容器の材質の影響

EC-6 (EU/ml)	Tg (min)	
	Glass	Polystyrene
0.02	29.4	29.2
0.2	17.2	17.2
2	11.6	11.6
20	9.4	9.2

表2. アルブミン添加エンドトキシンの活性に対する容器の材質の影響

CSE (ng/ml)	Glass (GL)		Polystyrene (PS)		
	Tg (min)	Endotoxin (EU/ml)	Tg (min)	Endotoxin (EU/ml)	PS/GL
0.005	26.2	0.0304	29.6	0.0197	65%
0.05	15.6	0.313	17.2	0.187	60%
0.5	10.6	4.73	11.4	2.52	53%

## アフラトキシンの簡易迅速検査から 精密検査までサポート

### アフラトキシン分析関連製品

アフラトキシンは *Aspergillus flavus* などから産生されるカビ毒で、最も強力な天然由来発がん物質として知られています。収穫前や収穫後貯蔵された作物中に生じるカビが産生するため、食品、飼料検査で特に重要な規制項目となっています。食監発第0326001号の「穀類、豆類、種実類及び香辛料中のアフラトキシンB<sub>1</sub>試験法」(平成14年3月26日)など<sup>1)</sup>に分析法が示されています。

分析には簡易迅速分析と機器定量分析が行われ、簡易迅速分析はスクリーニングを目的にELISAキットが、機器定量分析には試料のクリーンアップ用カートリッジ及びHPLC用カラムがそれぞれ用いられます。

#### 【参考文献】

- 1) 白井裕治ら：「多機能クリーンアップカラム法／高速液体クロマトグラフィーによる飼料中のアフラトキシンB<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>及びG<sub>2</sub>の同時定量」, 飼料研究報告, 24, 10-26 (1999).

### 簡易迅速分析ELISAキット

アフラトキシンB<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>に特異的な抗体を使用した直接競合法によるELISAキットです。

#### Agri-Screen™ For Aflatoxin



- 簡便:目視定性判定が可能で、5分以内に判定が可能
- 正確:コントロールとの比較により正確な評価が可能
- アメリカUSDA／FGISによる承認済
- AOAC-International (990.32) の公定法

#### AgraQuant™ AFL (4/40) 96



- 手操作によるブレが極少
- 4-40ppbの範囲で定量が可能

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
—	8010	Agri-Screen™ For Aflatoxin	18検体用	26,000
637-05251	COKAQ1000	AgraQuant™ AFL(4/40)96	96回用	80,000

※Agri-ScreenはNeogen社、AgraQuantはRomerLabs, Inc.の商標です。

### クリーンアップ用カートリッジ



逆相用樹脂に陽イオン交換樹脂と陰イオン交換樹脂を加えた多機能カートリッジです。

#### MycoSep™ #226、#228

- コンディショニングが不要
- わずか30秒のワンブッシュだけで操作が完了
- MycoSep™ #226は一般用、#228は色素など夾雑物の多い試料用



MycoSep™ #228

#### MultiSep™ #228

- MycoSep™ #228のシリンジタイプ

#### Autoprep® MF-A 1000

- MycoSep™、MultiSep™とともに食監発第0326001号の「穀類、豆類、種実類及び香辛料中のアフラトキシンB<sub>1</sub>試験法」に掲載
- コンディショニングが不要でランニングコストの低減が可能なシリンジタイプ

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
638-03221	MycoSep™ #226	25本	37,500
635-03231	MycoSep™ #228	25本	40,000
633-03271	MultiSep™ #228	25本	40,000
636-03881	Autoprep® MF-A 1000	50本	48,000

※MycoSep、MultiSepはRomerLabs, Inc.、Autoprepは昭和電工株式会社の商標です。

### HPLC用カラム

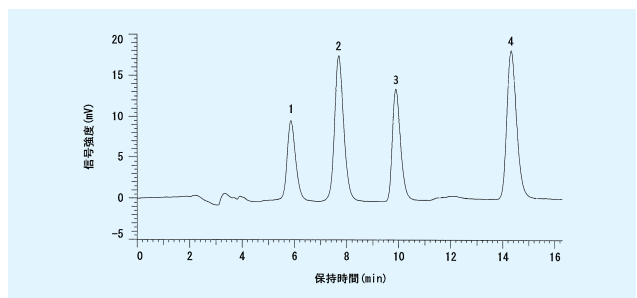


#### Wakopak® Navi C18-5

親水性の高いアフラトキシンを保持可能なODSカラムです。

- ODS基の導入法の改良、徹底的なエンドキャッピングによりアフラトキシン分析に適したカラム

#### 分析例



Sample : 1. Aflatoxin G<sub>1</sub> 2. Aflatoxin B<sub>1</sub> 3. Aflatoxin G<sub>2</sub> 4. Aflatoxin B<sub>2</sub>

品名	カラムサイズ	規格	容量	希望納入価格(円)
Wakopak® Navi C18-5	4.6φ×150mm	高速液体クロマト	1本	45,000
	14.6φ×250mm	グラフ用	1本	48,000

#### 関連商品

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
019-17661	Aflatoxin B <sub>1</sub>	生化学用	10mg	20,000
016-17671	Aflatoxin B <sub>2</sub>	生化学用	10mg	36,000
010-17691	Aflatoxin G <sub>2</sub>	生化学用	10mg	58,000
018-18351	Aflatoxin M <sub>1</sub>	生化学用	100μg	30,000
012-18371	Aflatoxin (B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> ) セット	生化学用	1mg×4	20,000

## プロテオーム研究用 高純度マトリックス



プロテオーム解析では、質量分析計を用いてタンパク質の同定や翻訳後修飾の研究が行われています。質量分析計には、イオン化法と分析計の組み合わせにより様々な種類がありますが、ペプチド質量を測定する場合には、MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization、マトリックス支援レーザー脱離イオン化) 法やESI (Electrospray ionization: エレクトロスプレーイオン化) 法によりイオン化します。MALDI法は多検体の短時間処理に優れており、一方、ESI法はタンデムMSでペプチドの配列情報を得たい場合に有用です。

MALDI法では、マトリックスと呼ばれる化合物を試料に加えて混合結晶を作成し、この結晶表面にレーザー光を照射してイオン化します。マトリックスとして汎用されているのは、 $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (CHCA) やSinapic Acid (SA)、それに2,5-Dihydroxy benzoic acid (DHB) です。これらのマトリックスはサンプルによって使い分けられ、一般的に、ペプチド試料に対してはCHCAを、タンパク質試料に対してはSAを、ペプチド、糖、糖脂質に対してはDHBを使用します。しかし、市販されているマトリックスをそのまま使用すると、質量分析データにマトリックス由来のピークが現れ、バックグラウンドが高くなり、SN比が低くなります。そのため、使用前に再結晶処理を行い、マトリックス由来のピークをできるだけ除く必要があります。

本品は、再結晶処理済の高純度マトリックスです。再結晶処理を行わなくても非常にきれいなマススペクトルが得られます。

### CHCAの再結晶処理の効果

市販されているCHCAと再結晶処理したCHCAのMALDI-TOFMSデータを比較した。図1は、マトリックスのみのマススペクトル。図2は、マトリックスとペプチドサンプルの混合結晶を作成し、レーザー照射したマススペクトル図。再結晶化した高純度CHCAのマススペクトルの方がノイズが少なくきれいであることが分かる。(データ提供:大阪府立母子保健総合医療センター 和田芳直先生)

### マトリックスのみのマススペクトル

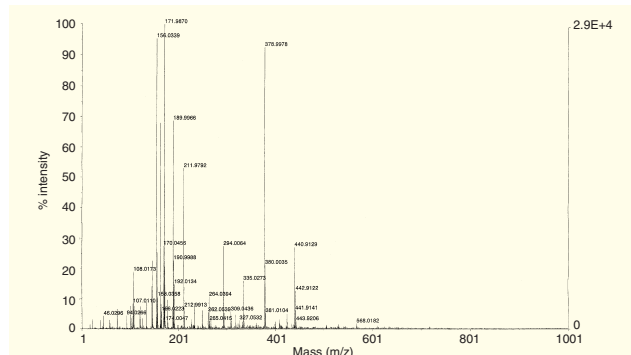


図1-a. 未処理CHCA

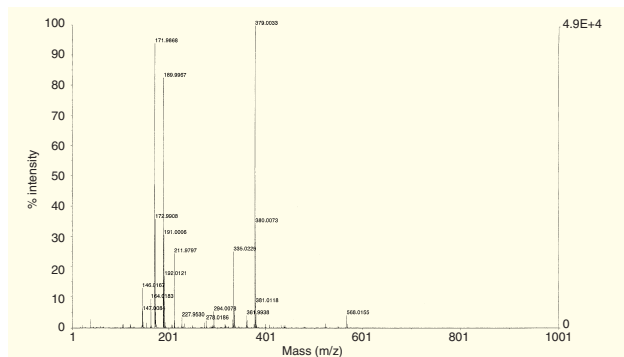


図1-b. 再結晶処理 CHCA

### ペプチド試料を測定したマススペクトル

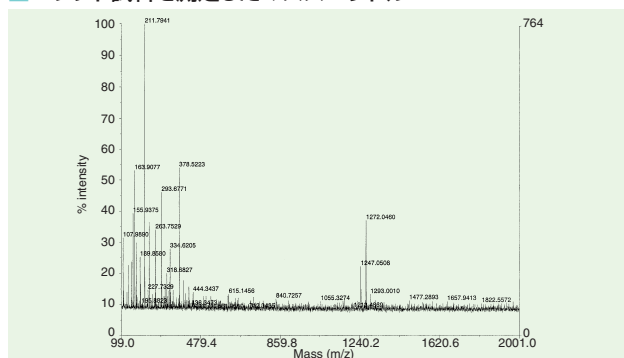


図2-a. 未処理CHCA

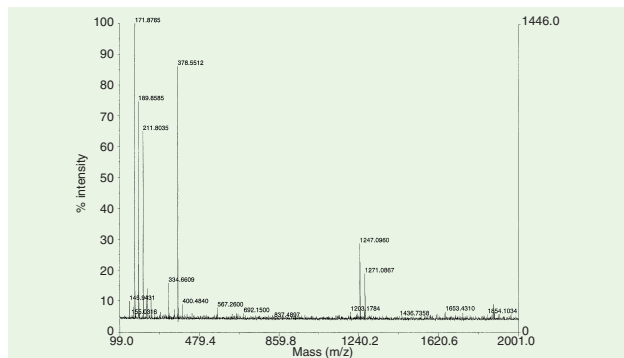


図2-b. 再結晶処理 CHCA

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
037-19261	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid【CHCA】	プロテオーム研究用	50mg × 5本	20,000
192-13361	Sinapic Acid【SA】	プロテオーム研究用	50mg × 5本	20,000
044-29101	2,5-Dihydroxybenzoic Acid【DHB】	プロテオーム研究用	50mg × 5本	20,000

### 関連商品

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
125-05061	Lysyl Endopeptidase®, Mass Spectrometry Grade	プロテオーム研究用	20 $\mu$ g × 5本	15,000
202-15951	Trypsin, from Porcine Pancreas, Mass Spectrometry Grade	プロテオーム研究用	20 $\mu$ g × 5本	15,000
293-57701	Negative Gel Stain MS Kit	電気泳動用	20回用	11,000
299-58901	Silver Stain MS Kit	電気泳動用	20回用	19,000



## 安定性、再現性の良い 低コストプレキャストゲル



### SuperSep™

本品は、タンパク質、核酸の電気泳動用ポリアクリルアミドプレキャストゲルです。ゲル中には、SDSが含まれておりませんが、SDSを含む緩衝液を用いることにより、SDS-PAGEに使用できます。また、SDS不含の緩衝液を用いることによりNative-PAGEにも使用できます。



### 特長

- 濃縮ゲルにより、シャープなバンドが得られます。
- 再現良く泳動できます。
- 保存安定性が良く、製造日から6ヶ月使用できます。
- 17ウェルは8連ピペットに対応しており、多検体処理に有効です。
- SDS-PAGE、Native-PAGEに使用できます。

### 泳動例

[SDS-PAGE]



ゲル：SuperSep™ 5-20%, 12well [コードNo. 194-12961]  
 サンプルバッファー：Sample Buffer Soln. (×2, 2-ME+) [コードNo. 196-11022]  
 泳動バッファー：Running Buffer Soln. (×10) [コードNo. 184-01291]  
 染色：Quick CBB [コードNo. 299-50101]  
 サンプル：Lane1, 2, 7, 8 ..... ラダーマーカー  
 Lane3, 4, 9, 10 ..... 低分子量マーカー  
 Lane5, 6, 11, 12 ..... 高分子量マーカー

### 分画分子量範囲

	分子量	核酸のbp
SuperSep™ 7.5%	40,000~200,000	100~2,000
SuperSep™ 10%	20,000~130,000	50~500
SuperSep™ 12.5%	14,000~80,000	30~300
SuperSep™ 15%	6,000~60,000	20~300
SuperSep™ 5-20%	10,000~200,000	50~750
SuperSep™ 10-20%	10,000~130,000	50~500

### 二次元電気泳動用ゲルが新発売!

一次元目に等電点電気泳動、二次元目にSDS-PAGEを行う二次元電気泳動は、タンパク質の分離が良いため、プロテオーム解析で汎用されています。本品は、二次元目のSDS-PAGEに使用するポリアクリルアミドゲルです。ウェル幅が7cmのミニゲルサイズですので、市販されている7cmの等電点電気泳動用ストリップゲルに対応します。

### 泳動例



ゲル：SuperSep™ 5-20%, 2D [コードNo. 197-13291]

染色：銀染色

サンプル：培養細胞(TM4マウスセルトリ細胞)

(データ提供：大阪府立大学大学院 農学生命科学研究科 獣医学専攻 細胞生物学研究室 竹中重雄先生)

### 保存条件

2~10℃保存(凍結不可)・遮光保存

コードNo.	品名	濃縮ゲル	規格	容量	希望納入価格(円)
192-12901	SuperSep™ 7.5%, 12well	5%	電気泳動用	10枚	12,000
199-12911	SuperSep™ 7.5%, 17well	5%	電気泳動用	10枚	12,000
196-12921	SuperSep™ 10%, 12well	5%	電気泳動用	10枚	12,000
193-12931	SuperSep™ 10%, 17well	5%	電気泳動用	10枚	12,000
190-12941	SuperSep™ 12.5%, 12well	5%	電気泳動用	10枚	12,000
197-12951	SuperSep™ 12.5%, 17well	5%	電気泳動用	10枚	12,000
194-13061	SuperSep™ 15%, 12well	5%	電気泳動用	10枚	18,000
191-13071	SuperSep™ 15%, 17well	5%	電気泳動用	10枚	18,000
194-12961	SuperSep™ 5-20%, 12well	—	電気泳動用	10枚	12,000
191-12971	SuperSep™ 5-20%, 17well	—	電気泳動用	10枚	12,000
198-12981	SuperSep™ 10-20%, 12well	—	電気泳動用	10枚	12,000
195-12991	SuperSep™ 10-20%, 17well	—	電気泳動用	10枚	12,000
190-13301	SuperSep™ 12.5%, 2D	—	電気泳動用	10枚	18,000
197-13291	SuperSep™ 5-20%, 2D	—	電気泳動用	10枚	18,000

## 有機溶媒を使用せず簡単に Wako CBB染色できます!

### クイックCBB プラス

電気泳動後のタンパク質バンドの染色には、クーマシーブリリアントブルー (CBB) が汎用されています。当社でも、CBBを色素に用いた脱色操作のいらない簡易染色キット『クイックCBB』やCBB粉末を販売しております。

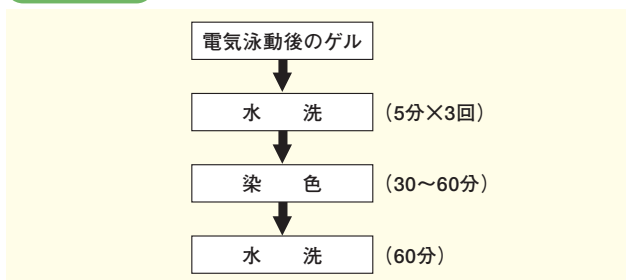


これらの商品群に加えて『クイックCBBプラス』が新発売となりました。本品は、『クイックCBB』と同様に脱色操作を必要としないだけでなく、固定処理も要りませんので、酢酸やメタノールなどの有機溶媒の廃液がでません。また、バックグラウンドが低いのも特長です。操作法も簡便になり、どなたでも安心してお使い頂けます。

### 特長

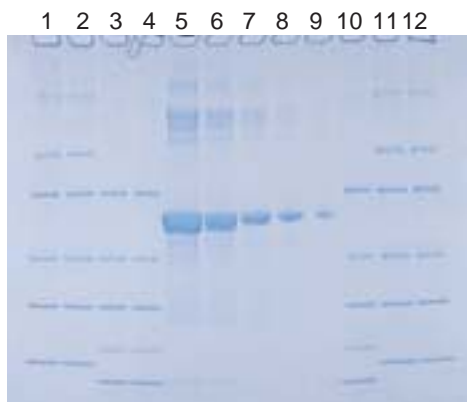
- メタノールや酢酸などの有機溶媒を使用しません。
- 簡単かつ迅速に染色できます。
- バックグラウンドはほとんど染まりません。

### 使用方法

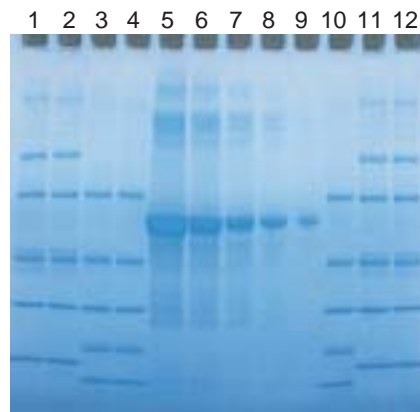


### 染色例

#### 1. クイックCBBプラス染色



#### 2. クイックCBBプラスとネガティブ染色の二重染色



ゲル：SuperSep™5-20%, 12well [コードNo. 194-12961]  
 サンプル：Lane1, 2, 11, 12……タンパク質分子量マーカー、高分子[コードNo. 134-14501]  
 Lane3, 4, 10……タンパク質分子量マーカー、中分子[コードNo. 131-14511]  
 Lane5, 6, 7, 8, 9…BSA 10μg, 5μg, 2.5μg, 0.6μg

**Q&A 01.** ゲルを染色液に浸すと数分でタンパク質バンドが確認できました。水洗して、染色を終わらせても良いですか？

- A1.** 本品を用いた染色では、多くの場合、10~20分でタンパク質バンドが現れます。そのまま水洗して、染色を終わらせても構いませんが、確実に染色するためには、30~60分の染色時間をお勧めします。
- Q2.** 染色後、水洗しなくてもタンパク質バンドをはっきりと確認できます。バックグラウンドも低いです。このような場合でも水洗が必要ですか？
- A2.** 水洗しなくても問題はありません。しかし、水洗をすることにより、よりきれいな染色像が得られます。もし60分水洗してもタンパク質バンドが薄く感じる場合には、一晩水洗して下さい。そうするとさらにきれいな染色像が得られます。
- Q3.** 廃液の処理方法を教えてください。
- A3.** 本品は、特に有害な物質を含んでおりません。しかし、染色液は濃青色をしていますので、専用容器などに集めて廃棄して下さい。
- Q4.** 染色の感度はどれくらいですか？
- A4.** 10ng前後のタンパク質バンドを確認できます。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
174-00553	Quick-CBB PLUS	電気泳動用	250ml	4,200
178-00551			1ℓ	11,000

### 関連商品

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
<b>■染色液</b>				
299-50101	Quick-CBB	電気泳動用	2ℓ用	9,000
299-13841	Silver Stain Kit wako	電気泳動用	10枚用	9,000
291-50301	Silver Stain II Kit wako	電気泳動用	10枚用	9,000
299-58901	Silver Stain MS Kit	電気泳動用	20回用	19,000
293-57701	Negative Gel Stain MS Kit	電気泳動用	20回用	11,000

<b>■色素</b>				
038-17932	CBB G-250	電気泳動用	25g	5,200
031-17922	CBB R-250	電気泳動用	25g	5,200

<b>■泳動用緩衝液</b>				
196-11022	Sample Buffer Soln. (x2,2-ME+)	電気泳動用	25ml	3,100
193-11032	Sample Buffer Soln. (x2,2-ME-)	電気泳動用	25ml	3,100
184-01291	Running Buffer Soln. (x10)	電気泳動用	1ℓ	5,200

<b>■タンパク質分子量マーカー</b>				
134-14501	Molecular Weight Marker, High Range	電気泳動用	1ml用	12,800
131-14511	Molecular Weight Marker, Middle Range	電気泳動用	1ml用	12,800





## 天然オステオポンチンを用いた オステオポンチンELISAキット

Hokudo

### Native OPN ELISA kit

オステオポンチン(OPN)は分子量約6万前後のりん酸化糖タンパク質です。最近、オステオポンチンがHIV感染症に合併する難治性日和見真菌症における感染防御機構に大きく関与していることが示されました<sup>1)</sup>。また、オステオポンチンの機能がTRAP(酒石酸抵抗性ホスファターゼ)に制御されていることも報告されており<sup>2)</sup>、多くの関心を集めています。

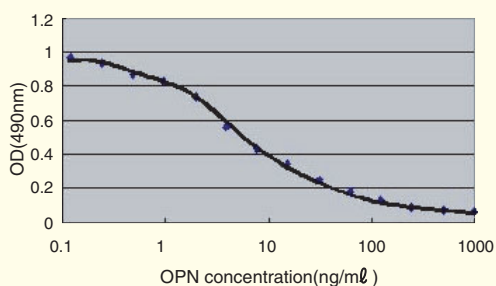
本キットはヒト初乳由来の天然オステオポンチンを抗原として得られた抗オステオポンチンモノクローナル抗体5D10を用いたOPN定量キットです。Antibody capture assay法を採用することにより天然オステオポンチン量を高感度(100pg/ml-100ng/ml)で定量することが可能です。母乳中、各組織中、培養上清中などのオステオポンチン含量測定にご利用下さい。

### キット内容

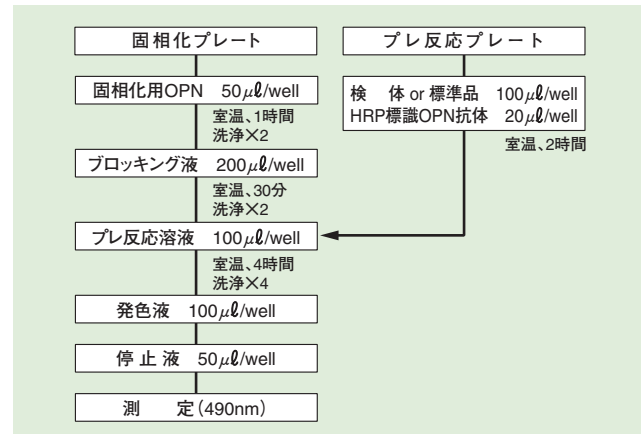
- ヒト初乳OPN(固相化用) 5μg/tube×2本
- ヒト初乳OPN(スタンダード) 0.5μg/tube×1本
- HRP標識抗OPNモノクローナル抗体 4ml×1本
- ブロッキング原液 10ml×2本
- OPD tablet 13mg×2錠
- 洗浄原液(20倍濃縮) 20ml×1本
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40μl×1本
- PBS 30ml×1本
- ELISA用96wellプレート 96well×4枚
- 発色停止液(2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 10ml×1本

注意：●OPNは微量であり、壁面に付着する場合がありますので、フラッシングしてからお使い下さい。  
●ブロッキング原液、洗浄原液はお手持ちの精製水で希釈してお使い下さい。

### 標準曲線

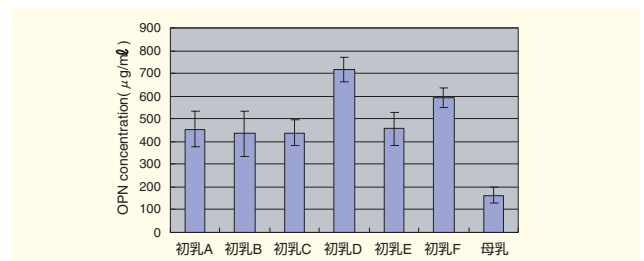


### 測定方法



### 測定例

#### 1. Human milk中のOPN濃度の比較(参考データ)



#### 2. ヒト初乳OPN精製(gel permeation chromatography)過程におけるOPN含量

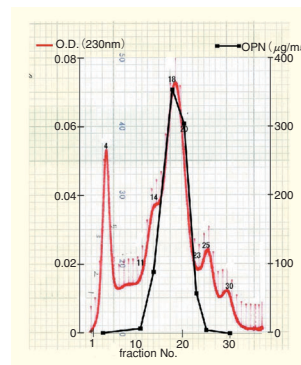


Fig. 1. Gel permeation chromatography chart に各フラクションのOPN測定結果を重ねた図。メインピークにOPNが集中していることがわかります。

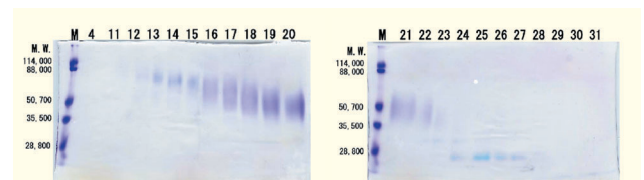


Fig. 2. Gel permeation chromatographyの各フラクションをSDS-PAGEし、Stains Allゲル染色キット(コードNo.307-08881)で染色したものです。Fig. 1において認められたメインピークが、50-80kDaの intact OPNであることがわかります。

#### 【参考文献】

- 1) Koguchi, Y. et al.: *Infect. Immun.*, 70, 1042 (2002).
- 2) Hayman, A.R. and Cox, T.M.: *J. Bone Miner. Res.*, 18 (10), 1905 (2003).

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
301-15131	OP20	Native Osteopontin ELISA kit	192回用	90,000

## 蛍光試薬



現在、標識の目的別にさまざまな蛍光試薬が使用されています。その中でも汎用性の蛍光試薬を取揃えました。この機会に是非ご利用下さい。

### 5-Carboxyfluorescein Diacetate

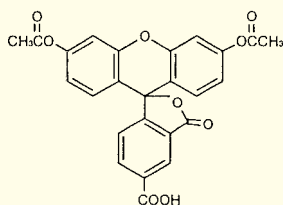
pHプローブ。細胞内で蛍光物質5-Carboxyfluoresceinに加水分解され強い蛍光をもつようになります。

含量 (HPLC) : 94%以上

測定波長 :  $\lambda_{ex}=492\text{nm}$ ,  $\lambda_{em}=518\text{nm}$

溶解性 : DMSO、メタノール、エタノール、アセトン

CAS No. : [79955-27-4]



$C_{25}H_{16}O_9=460.39$

#### [参考文献]

- 1) Boitano, S. *et al.* : *J. Cell Sci.*, **98**, 343 (1991).
- 2) Goodall, H. *et al.* : *Nature*, **295**, 524 (1982).
- 3) Hansson, Y. *et al.* : *J. Immunol. Methods*, **100**, 261 (1987).
- 4) Bruning, J. W. *et al.* : *J. Immunol. Methods*, **33**, 33 (1980).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
038-19291	5-Carboxyfluorescein Diacetate [5-CFDA]	細胞生物学用	100mg	22,000

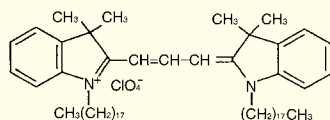
### Dil [DiIC<sub>18</sub>(3)]

生体膜標識蛍光試薬。脂質二重膜中に2つのC<sub>18</sub>アルカン鎖構造を挿入することによって細胞膜をラベル化するカルボシアニン色素です。

測定波長 :  $\lambda_{ex}=550\text{nm}$ ,  $\lambda_{em}=565\text{nm}$

溶解性 : DMSO、エタノール

CAS No. : [41085-99-8]



$C_{59}H_{97}ClN_2O_4=933.87$

#### [参考文献]

- 1) Derzko, Z. *et al.* : *Biochemistry*, **19**, 6050 (1980).
- 2) Leuther, M.D. *et al.* : *J. Immunol.*, **127**, 893 (1981).
- 3) Honig, M.G. and Hume, R.I. : *Trends Neurosci.*, **12**, 333 (1989).
- 4) McConnell, S.K. *et al.* : *Science*, **245**, 978 (1989).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
048-29121	Dil [DiIC <sub>18</sub> (3), 1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine Perchlorate]	細胞生物学用	50mg	17,000

### Di-4-ANEPPS

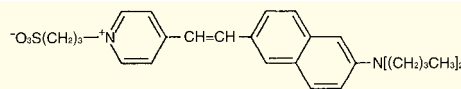
膜電位感受性蛍光試薬。

含量 (HPLC) : 94%以上

測定波長 :  $\lambda_{ex}=496\text{nm}$ ,  $\lambda_{em}=705\text{nm}$

溶解性 : DMSO、メタノール、エタノール、DMF

CAS No. : [90134-00-2]



$C_{28}H_{36}N_2O_3S=480.66$

#### [参考文献]

- 1) Davidenko, J.M. *et al.* : *Nature*, **355**, 349 (1992).
- 2) Fromherz, P. *et al.* : *Biochim. Biophys. Acta*, **1068**, 149 (1991).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
041-29111	Di-4-ANEPPS [Pyridinium, 4-[2-[6-(dibutylamino)-2-naphthalenyl]ethenyl]-1-(3-sulfopropyl)-hydroxide, inner salt]	細胞生物学用	5mg	31,000

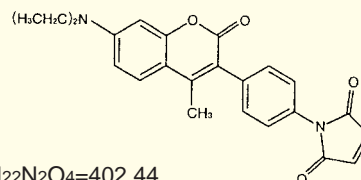
### CPM

チオール反応性蛍光試薬。

含量 (HPLC) : 94%以上

溶解性 : DMSO

CAS No. : [76877-33-3]



$C_{24}H_{22}N_2O_4=402.44$

#### [参考文献]

- 1) Grossman, H. S. : *Biochemistry*, **22**, 5369 (1983).
- 2) Zot, G. H. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **265**, 14796 (1990).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
045-29131	CPM [7-Diethylamino-3-(4-maleimido-phenyl)-4-methylcoumarin]	細胞生物学用	25mg	30,000

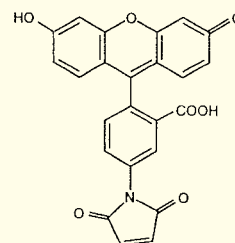
### Fluorescein-5-maleimide

特異性の高いチオール反応性蛍光試薬。

測定波長 :  $\lambda_{ex}=492\text{nm}$ ,  $\lambda_{em}=515\text{nm}$

溶解性 : DMF、水(pH>6)

CAS No. : [75350-46-8]



$C_{24}H_{13}NO_7=427.36$

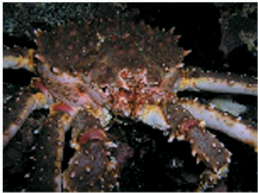
#### [参考文献]

- Bigelow, J. D. *et al.* : *Biochemistry*, **30**, 2113 (1991).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
066-04501	Fluorescein-5-maleimide	細胞生物学用	25mg	39,000

## カムチャッカカニの肝臓由来の **EVRΩGEN** 新規のDNAヌクレアーゼ **Duplex-specific nuclease [DSN]**

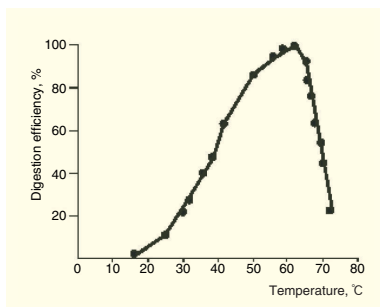
Evrogen社では、カムチャッカカニの肝臓由来の新規のDuplex-Specific Nuclease (DSN) を販売しています。DSNは、1本鎖DNAに比べ、2本鎖DNA、DNA-RNAハイブリッド中のDNAを優先的に切断するDNA分解酵素です。さらに、2本鎖中の不完全一致部分より、完全一致部分を特異的に分解する特長があるため、SNP分析へ応用できます。また、cDNA Normalizationができるため、rare遺伝子のクローニングに威力を発揮します。



*Paralithodes camtschaticus*

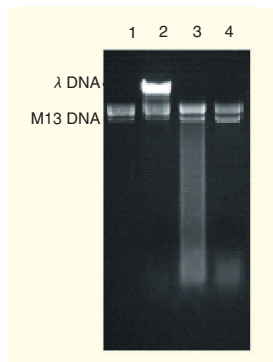
### 特長

- 2本鎖DNA、DNA-RNAハイブリッド中のDNAを認識して切断
- RNAには作用しない
- Mg<sup>2+</sup>要求性 (7mmol/ℓ) で、EDTAにより阻害
- 至適pH: 7~8
- 至適温度: 55~65℃
- スクレアーゼ活性: pH 6以上、75℃以下で安定に作用
- rare遺伝子のクローニングに有用
- cDNA Normalizationにも応用可能<sup>1)</sup>
- SNP解析にも応用<sup>2)</sup>

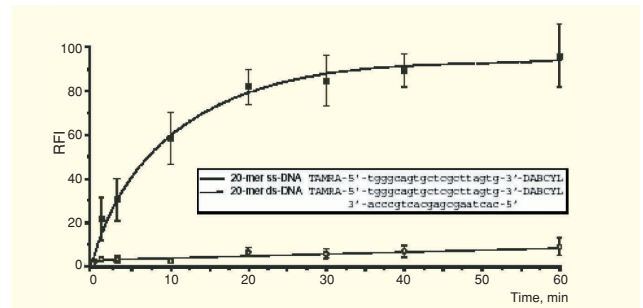


温度におけるDSNの酵素活性

### 基質となるDNAの特異的構造に対するDSNの作用



(A) 1本鎖M13ファージDNAと2本鎖λファージDNAにおけるDSNの効果  
lane1:ss M13 phage DNA  
lane2:dsλ DNA  
lane3:ss M13 phage DNAとdsλ DNAを加え、DSN処理70℃、1.5分間処理  
lane4:ss M13 phage DNAとdsλ DNAを加え、DSN処理70℃、5分間処理

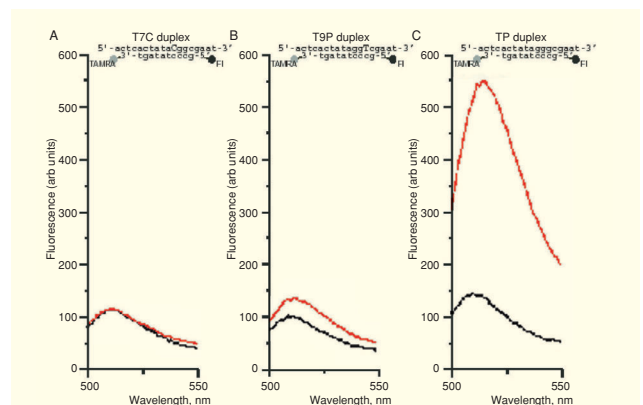


(B) 1本鎖オリゴヌクレオチド (20mer) 及び蛍光標識した2本鎖オリゴヌクレオチド (20mer) に対するDSNの効果

蛍光標識オリゴヌクレオチドは、5'末端にfluorescein、3'末端にクエンチアをつけている。酵素処理は、35℃、各処理時間行った。蛍光強度は、励起波長550nm、蛍光波長570nmで測定した。オリゴヌクレオチド中のRFI (相対的蛍光増加) は、(Fi-Fo/Fmax-Fo) x 100%で決定した。Fi: DSN処理後の基質の蛍光強度、Fo: 酵素なしでの基質の蛍光強度、Fmax: 100%分解時の蛍光強度をそれぞれ示す。

### 基質特異性の実験

RNAに対しての分解は認められないが、DNA-RNAハイブリッド中のDNAを特異的に分解します。8-12bpの完全一致のDNA-DNAハイブリッドと少なくとも1塩基のミスマッチのある同じ長さのDNA-DNAハイブリッドを区別して切断することができます。



ミスマッチ (A、B) 及び完全一致のDNA duplexに対するDSNの基質特異性

5-carboxyfluorescein (FI)-5'-gccctatagt-3'-TAMRAシグナルプローブとそれと相補的な各オリゴヌクレオチドとのduplex形成後、35℃で15分間、DSN処理した。蛍光スペクトルは、480nmの励起波長により得られた。赤線は、酵素なしの基質蛍光強度、黒線は、DSN処理後の基質蛍光強度。

### 内容

- Duplex-specific nuclease (凍結乾燥品)
- DSN storage buffer 50mmol/ℓ Tris-HCl (pH 8.0)
- DSN reaction buffer 100mmol/ℓ Tris-HCl (pH 8.0), 10mmol/ℓ MgCl<sub>2</sub>, 2mmol/ℓ DTT

### 【参考文献】

- 1) Zhulidov, P. A. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, 32 (3), e37 (2004).
- 2) Shagin, D. A. *et al.*: *Genome Res.*, 12, 1935 (2002).

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
580-69991	EA001	Duplex-specific nuclease, lyophilized (50 Kunitz-units)	1Set	86,000



## ロバート・ボイル (1627.1.25~1691.12.30)

科学史家 島尾 永康

### 生涯とその時代

ロバート・ボイルは1627年1月25日、初代コーク伯爵、リチャード・ボイルの14人の子の末っ子、男児としては7男として、二番目の妻キャサリンによってアイルランド、マンスターのリスマア城で生まれた。父は22歳のとき徒手空拳でアイルランドに渡り、才覚と貪欲と人間的魅力と幸運によってアイルランドで広大な領地と絶大な権力をもつ人物にのし上がった。他の兄弟姉妹と同様、ロバートも生まれるとすぐ、強く育つように3、4年も農家へ里子に出され、質素で不便な生活に慣らされた。満2歳のとき母が亡くなった。ロバートは母を知らずじまいだったことを生涯の不幸とした。8歳になるとすぐ上の兄とともに、紳士の子弟の学校であるイートン校へ遣られた。イートン校は5時半起床の生活だった。4年後、教育のためフランス人チューターとともに大陸旅行に出かけ(1639)、主としてスイスとイタリアで過ごした。このとき父が死んだ。ジュネーヴでは「生涯の最も重大な出来事」を体験し、キリスト教徒としての強い自覚をもつにいたった。以後、積極的なキリスト教徒となった。1644年(17歳)、イギリスに帰国した。

イギリス革命はすでに始まっており、王党・国教派と議会議会・清教徒派とが戦った内戦ではボイルの一族は二つに分かれた。兄弟たちはみな王党についてたが、ロバートが大陸から帰国早々身を寄せた、最も頼りにしていた姉キャサリンは議会議派であった。嫁して子爵夫人、レディ・ラネラーとなっていた12歳年長のこの姉は、内戦時に詩人ミルトンを庇護し、主なピューリタン知識人たちと親しくしていた。彼女は終生ロバートの面倒をよく見た。サムエル・ハートリブの「インヴィジブル・カレッジ」にロバートを紹介したのも彼女である。その影響で錬金術文献を広く渉猟し、1649年、化学実験に興味を持ち始めた。毎日熱(マラリア)を患い(1649)、全身浮腫を患った(1654)、多病なボイルは自分用の医薬を作った。オックスフォードで自然研究が活況を呈し始めたので、1655年、そこへ移った。裕福なボイルは大金をかけて研究室を設け、それは人々が集う研



図1. ロバート・ボイル

究センターとなった。最初の科学的著書、『空気の弾性と重量』(1660)で急速に名声を確立した。1660年、王政復古になると、王立協会設立の発起人となり(図2)、創設期の評議員や短期間の会長も務めた。オルデンバーグとフックという2人の重要な専門職員を協会に与えたのもボイルである。王立協会での真空実験の披露に臨席したチャールズ2世は、長時間かけて空気の重さを測っているだけではないかと大笑した。ボイルは大学には入らなかったが、1665年にオックスフォード大学から医学博士を授与された。ロンドンがペストと大火に見舞われ、ミルトンが『失樂園』を書き、レンが大聖堂の建築を設計したころ、ボイルは科学の象徴的存在だった。1668年、ロンドンに移り、生涯の終わりまで姉キャサリンの家に住み、研究室を作り化学を研究した。1680年、王立協会会長に選出されたが病身といって断った。

ボイルは、空気の重量、気体の法則、



図2. 王立協会設立の発起人としてのボイルの署名(1660年12月5日)。

呼吸、燃焼、温度計、寒剤、光、色、指示薬、血液と尿、リン、蛍光、電気、気圧計、気象学などあらゆる問題を扱った。これほど多様な研究をしたものは稀であろう。徹底的な実験家であり、抽象的な理論の構築には興味がなかった。22歳から64歳で死ぬまでほとんどの時間を研究室で過ごした生涯は、同時代の誰よりも現代の実験科学者の生涯に似ている(図1)。富裕なボイルはロンドンの貧困層やアイルランドのプロテスタントを財政的に支持し、マレー語、トルコ語、ウェールズ語、アイルランド語への聖書の翻訳を財的に援助した。信仰心において同時代に突出していたボイルは、科学に親しむと無神論になるという非難につきよく反論し、科学は宗教を確証するという「ボイル説教」が毎年おこなわれるよう遺贈した。

ロバートは他の兄弟とは異なり、政治とのかかわりを避け、知的探求を続けた。実験研究への没頭と著作の量は群を抜いている。ボイルはなぜそのような生涯を送ったのか。これについては次のような解釈がある。生まれてすぐ乳母に預けられたが、アイルランドには新生児をミイラのように布でくるむ習慣があり、新生児は手足の自由を奪われ、大小便ぐるみになって苦しんだ。ボイルには生涯続いた吃音があったのは、幼児期のこの苦しい体験と、ほとんど母親の愛情を受けなかったことによると考えられる。ボイルが生涯結婚しなかったのは、父親が早くから決めた婚約者が他の男性と結婚してしまったことと関係があるかもしれない。女性から逃れ、研究室という非人間的な環境にいるとき安堵感をもったというのである。母親代わりであった姉レディ・ラネラーの存在は大きい。彼女が死んだ8日後に後を追うようにボイルも死んだ。しかしこの解釈に対してはボイルの吃音がどの程度だったか不明であり、研究室には絶えず訪問者がいて孤独だったことはなく、王立協会の中心的な存在だったボイルが、人から逃げたことはないという反論がありうる。

### 空気学の実験

真空の発見は17世紀半ばの劇的な出来

事であった。最初に真空を作ったのはトリチェリであるが(1643)、真空ポンプを発明したのはゲリッケ(1654)である。かれのポンプは屈強な男が2人がかりで操作するという代物だったので、ボイルは簡単に操作できるポンプの製作を助手に命じた。これに成功したのがロバート・フックである(1658)。ボイルはそれを「空気エンジン」と呼び(図3)、それによっておこなわれる空気の研究は当時、「空気学」(pneumatics)と呼ばれた。この新分野の科学に独創的な貢献をしたのがボイルである。真空ポンプは19世紀末のX線管や20世紀のサイクロトロンのように新しい科学機器となった。ボイルは、真空は音、燃焼、生命を消滅するが、電気、磁気の力を妨げないこと、温水を沸騰させることなど多数の実験を考案した。昆虫は真空中で死なないというボイルの観察は、20世紀になって確認された。43篇の実験記述からなる『空気の弾性と重量』(1660)が最初の科学の著書であり、これによって一挙に名声を博した(図4)。ボイルの実験とその解釈に対して、強く攻撃してきたのが政治哲学書、『リヴァイアサン』の著者として有名なトーマス・ホブズとイエズス会士フランシス・リーヌスだった。ホブズは真空否定論者で、リーヌスは空気が水銀柱76センチという巨大な重量を支えられるはずがないと主張した。この論争から、空気の圧力(弾性)と体積とは反比例するというボイルの法則が生まれた。ホイヘンスその他、

ボイルの空気学を追試した者は多かったが、ボイルほど独創的な研究をしたものではなく、器用さと技量でボイルに及ぶものはいなかった。ボイルとフックは第2号機ポンプも考案した(1669年発表)(図5)。第3号機はドニ・パパンが考案し、ボイルのところで研究するときフランスから持参した(1676)。ボイルは真空計も考案し、圧力下の空気を研究するため圧搾ポンプも作った。ちなみにbarometerという語の初出はボイルである。

ボイルは、真空とは何か、についても考えざるを得なかった。ガラス器の真空中の対象が見えるのは光が通るからであり、同様に磁気も真空中を通る。これは空気より微細な物質が残留していて光や磁気の媒質となると考えられた。とすれば完全に空虚ではなく、単に空気がないだけではないか。そこでボイルは微細物質を検出するため巧妙な装置を考案したが、微細物質は実験的には検出できないことを示す結果となった(図6)。

ボイルは呼吸や燃焼で消費される物質は空気ではなく、空気中の別の物質と考えていた。実質的に水素、二酸化窒素、炭酸ガスなどの「人工空気」を発生させていたが、それらと大気の違いは解明しなかった。空気は化学的に不活性と見ていた。しかし18世紀の空気化学を誘発したのはボイルの空気学の研究である。死後に出版された最後の著書は『空気概説』(1692)であり、ボイルの科学研究は空気に始まり空気に終

わっている。この書物は空気に関するあらゆる問題を網羅した、永年の研究の総括である。気象学的現象も論じ、研究協力者ジョン・ロックの17年間のオックスフォードの気象観測記録も含まれている。

## 懐疑的化学者

当時の化学者の間では、四元素説(火、空気、水、土)、もしくは三原質説(塩、イオウ、水銀)がおこなわれており、どの物質を熱分解しても四元素または三原質のすべてを生じるとされた。このような元素・原質の存在を経験主義の立場から否定したのがボイルの『懐疑的化学者』(1661)である。ボイルが提出した、元素は一定数かという疑問は、四元素より多い多数元素を誘発する問いである。また、すべての物質は同数の元素からなるかという疑問も、当時の元素概念の否定であった。にもかかわらずボイルは現代的な元素概念には到達せず、具体的な化学元素の提示もない。ボイルは化学に、新しい科学の基本理念である機械論、とくに原子論に触発された粒子論を導入しようとした。粒子論を化学にもち込んで、錬金術師や職人の技として知識人から低く見られていた化学を学問的なものとし、化学者の社会的地位を高めようとしたのである。しかしそのボイルの粒子論では金属の相互転換は可能である。ボイルの『金の劣化』



図3. ボイルの最初の真空ポンプ。ガラス製の受器の容量は約28.5リットル、真鍮製の円筒型ポンプの長さは35.6センチであった。



図4. 『空気の弾性と重量』(1660)。ボイルの最初の科学の著書。



図5. ボイルの真空ポンプ、第2号機。円筒は水に浸けて気密性を高め、ガラス受器は円筒から分離して管でつないである。

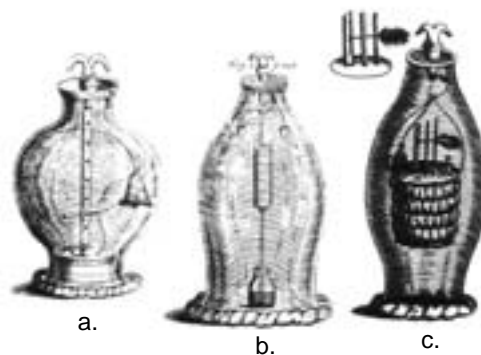


図6. ボイルの真空実験の装置。a) 真空中の音の伝播を検証。b), c) 空気より微細な媒質の検出の装置(『続・空気の弾性と重量』、1669)。

(1678) は金を卑金属に転換するという、錬金術の逆の実験である。匿名出版だが、ボイルが錬金術を信じていたことを示す著作である。

## 化学の研究

1) 指示薬の研究。『色に関する実験と考察』(1664) はボイルの著作中でも重要なもので、白色、黒色、色一般、溶液の色を扱っている(図7)。ボイルは「プリズムの虹彩」(のちニュートンはスペクトルと呼んだ)に注目したが、白色光からの色光の生成には思い及ばなかった。ボイルは光よりも溶液の色に興味をもったので、化学とくに指示薬を発展させた。リグスム・ネフリテイクムという南米産の樹木の浸出液は腎臓結石(ボイルの生涯の病気でもあった)に効くとされていたが、その黄色い溶液に青色のオパール状の閃光がある。これは酸によって消え、アルカリによってまた元に戻る。これを指示薬として最初に使ったのはボイルである。簡単に入手しやすいスマレの青い汁が酸で赤くなり、アルカリで緑色になることは古くから知られていたが、ボイルは、これはすべての酸に適用でき、したがってこれで酸を定義できるとした。中性点を決定できたので、おおまかに定量的でもあった。これによって始めて物質を酸、アルカリ、中性に分類できた。赤、白、黄などあらゆる色のおびただしい植物の汁の色の変化も調べた。リトマスの記述もある。ボイルが使わな



図7. 『色に関する実験と考察』(1663)。ボイルの重要著作の一つ。

かった新しい植物性の色は19世紀半ばまで現れなかった。

2) リンの研究。夜光物質は熱を伴わない光として古来人々の好奇心を誘った。ボイルはドイツ人ダニエル・クラフトの「冷たい火」(燐光)を見て刺激され、わずかなヒントを得ただけで、人間の尿から独自にリンを遊離した。リンは1667年にドイツ人ヘンツヒ・ブランドが発見し遊離したのであるが、ボイルもリンを独立に発見したとされている。ボイルはその製法を死後発表されるべく王立協会へ委託したが、それまでに著書、『気状のノクティルーカ』(1680)と『氷状のノクティルーカ』(1682)で発表した。いずれもボイル著作中でも有名なものとなっている。前者はリンの水への懸濁液を扱い、後者は純粋の、無色透明の固体リンを扱っている。リンの英語 phosphorus には「光を発する」というギリシア語に由来する意味があるにもかかわらず、ボイルは noctiluca (夜光虫)を好んで使った。リンは空気存在下でのみ燐光を放つこと、リンの可燃性、固体リンは水中で保管できること、白リン(黄リン)と赤リンがあること、リン酸を生じること、種々の溶剤への溶解度、きわめて微量のリン(水の50万分の1)でも燐光を検出できることなどを明らかにした。19世紀後半までこれ以上のリンの研究は出なかった。

3) 血液と尿の研究。ボイルの医学的著作で最も重要なのが『人間の血液』(1684)である。生理化学の始まりというべきものである。「健康な人体の血液の記述」の見出しで、動脈血と静脈血の色、人血の味、臭、不燃性、比重、鮮血の熱、人血の漿液と赤色部分の相違、人血の化学分析、人血から化学的に得られる諸種の物質の比率、人血の化学的用途、体質の異なる人の血液の相違、人血と哺乳類、鳥、魚、昆虫などさまざまな動物の血液との類似と相違など30項目を扱い、また「健康な人体の放出する尿の記述」についても30項目を扱っている。血液と尿には多くの共通の性質があることをボイルは十分に知っていた。ボイルは実験のための血液の入手には困らなかった。当時、瀉血がおこなわれていたから、散髪屋で5、6オンス(約160ml)ほどの新鮮な血液は簡単に手に入った。かれは

血液の凝固を遅らせる塩類にも詳しく、さまざまな物質の抗凝血作用の実験をおこなっている。血液を蒸留して得られるエキスが、初期の卒中、しびれ、喘息、てんかん、肺結核、頭痛に効き、尿のエキスが、ヒステリー、肋膜炎、咳、壊血病、脳溢血、発熱、黄疸、に効くと述べているが、ボイルは本当にこれだけの効能を信じていたのだろうか。

4) 鉱水の研究。当時、鉱水は医療に広く用いられたので、化学者はたえず鉱水の有用性や成分についての助言を求められた。ボイルの『鉱水の実験誌』(1685)は未完だが、最良の概説書である。鉱水の物理的、化学的性質に関する30項目の検査には味、臭、酸性度、粘性などが含まれる。最後はさまざまな鉱水の医学的効用の論述で結んでいる。ボイルはまた海軍が大きな関心をもっていた海水から真水を製造する問題も扱った。ちなみに chemical analysis の語はボイルが初出であり、ジョンソンの英語辞典でも、オックスフォード英語辞典でもボイルの文章が初出例として引用されている(図8)。



図8. ボイルのメダイオン(ジャン・カヴァリエールの象牙のメダイオンから鋳造した真鍮製)。「Robertus Boyleus 1690」の銘がある(大英博物館蔵)。

## 膨大な著作

ボイルは著書42篇、その他を含めて300万語という膨大な著作を遺した。筆者はかつて一つの書棚全部がボイル著作の初版本というコレクションをケンブリッジ大学で見ることがある。筆者の手許にあるトーマス・バーチ編、『ロバート・ボイル著作集』全6巻



(1772)は、著作94篇、ボイル書簡、ボイル宛書簡、その他を含めて総4769ページである。この他、未完という理由で除外された草稿が56編ある。ジョン・フルトンの労作、『ロバート・ボイル書誌』第2版(1961)は、著書42篇、論文39篇を収録している。最近、ハンター及びデーヴィス編、決定版『ロバート・ボイル著作集』、全14巻(1999～2000)と、『書簡集』、全6巻(2001)が出版された。著作には結構長編が多い。比較のためパーチ編、『ボイル著作集』でのページ数をカッコで示して主なものを列挙すると、『懐疑的化学者』(129)、『空気の弾性と重量』(117)、『続・空気の弾性と重量』(115)、『続々・空気の弾性と重量』(88)、『空気概説』(134)、『実験哲学の有用性』(246)、『色についての実験と考察』(127)、『冷気についての実験と観察』(273)、『形相と性質の起原』(137)、『人間の血液』(165)などである。中世ロマンズの形をとった神学論、『清らかな愛』(51)、『神学の長所』など神学の著作も多く、『折々の想い』(139)など自伝的なものもある。著者名の前に付いているThe Honourableという肩書きは、伯爵の子息への敬称である。ボイルはよく出版社に現れてはページ付けが済んでいる本に、削除や追加をさせる癖があり、出版社を困らせた。裕福なボイルはその費用を十分に支払ったので、出版社は天才人の奇癖と諦めていた。ベーコンと同じく、ボイルは体系を嫌い、体系に対して不信の目を向けていたから、ボイル著作は体系的でなく、文体は冗長で脱線が多く、とりとめがない。しかし科学報文としては新しい



図9. ロバート・ボイル彫像(ライスブラック作、ケンジントン宮殿蔵)。

型のもので、それまでボイルほど装置や操作法を詳しく記したのもなければ、かれほど失敗や困ったことを率直に述べたものもなかった(図9)。

## ボイル研究室の協力者たち

物理実験に巧みなフックがボイルの空气学の研究にどれほど関与したかは明らかでない。ボイルはフックの役割について何も述べていないし、自己を主張してやまないフックもとくに主張していない。給料をもらっている助手には発見の権利はなかったのかも知れない。2人が同じ問題を別個に発表したのは毛細管現象で、これはフックの最初の著作となっている。メイヨーも同じ頃、ボイルの助手だった。ボイルの血液研究に協力したのは、後年、哲学で有名になるロックである。ボイル研究室の協力者たちの顔ぶれは国際的でもあった。フランスからパバンとギヨーム・オンベルグが来た。創設期のフランスの科学アカデミーにはボイルほどの化学者はいなかったので、オンベルグはパリへ帰ると科学アカデミー会員として化学の改革に乗り出した。ドイツの神秘思想家、フロギストン説の創始者ヨーハン・ベッヒャーもボイ



図10. ロバート・ボイル肖像、62歳。(ヨーハン・ケルセボーム画、1689年)。図1はこの一部分の拡大。

ルのところで研究したことがある。アンブローズ・ハンクウィッツはボイルの助手としてリンを研究し、ボイルの死後ロンドンで化学薬品製造業を始め、固体リンのヨーロッパでの販売を独占した。

## 後世に遺された実験記録の豊饒

知識人が実験研究を不信の目で見ていた時代にボイルは実験に専心した。ボイルが死んだときホイヘンスやライブニッツは、ボイルが実験にその才能を浪費し、理性より観察に重きをおきすぎて、統一した思想体系を残さなかったと哀悼の意を表した。しかしこれはボイルを理解しないものの言葉だった。演繹的なデカルト哲学が廃れても、ボイルの実験的発見は減りなかったのである。ニュートン科学の成功がボイルの影を薄くしたのは確かだが、そのニュートンはボイルの著作を徹底的に研究し、それを発展させたのである。18世紀にボイル著作集がよく読まれたのは、その豊富な実験記録のためである。ボイルの百年後、ラヴォワジエほどの科学者でさえも実験結果がボイルと一致しなかったときはそれを気にした。実験家ボイルにはそれほど権威があった。1人の科学者の実験が百年後の科学者に読まれたこと自体、希有といわねばならない(図10)。

### 〔参考文献〕

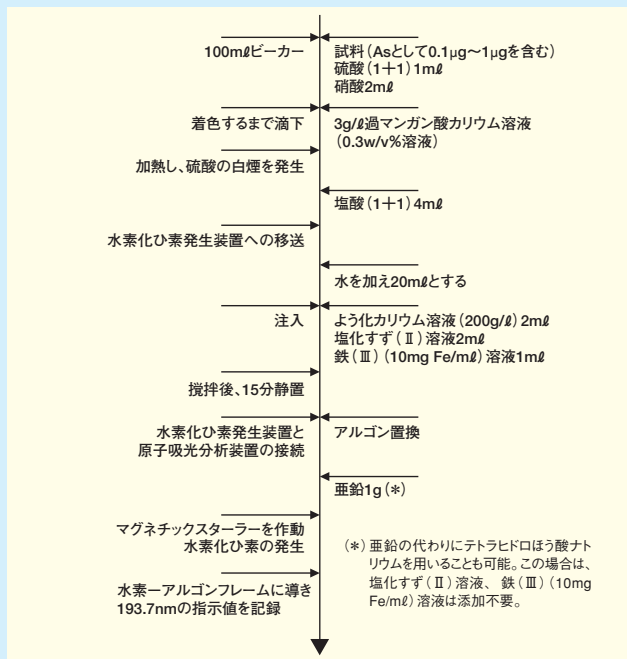
- T. Birch ed., *The Works of Robert Boyle*, 6 vols., (1772), reprinted in 1965; J.F. Fulton, *A Bibliography of Robert Boyle*, Oxford University Press, (1961), second edition; M. Hunter ed., *Robert Boyle by Himself and his Friends*, W. Pickering, (1994); M.B.Hall, *Robert Boyle on Natural Philosophy*, Indiana University Press, (1966); Y.S.Kim, "Another Look at R. Boyle's Acceptance of Mechanical Philosophy," *Ambix*, 38, 1~10 (1991); D.T.Burns, "R. Boyle: A Foundation Stone of Analytical Chemistry in British Isles," *Anal. Proc.*, 19, 224~233, 288~295 (1982); B. Kahr, "R. Boyle: a Freudian perspective on an eminent scientist," *British J. History of Science*, 32, 277~284 (1999).

## ◆◆JIS K 0102対応◆◆ Wako

### ◆◆ひ素 測定試薬◆◆

ひ素は、農薬・顔料・染料・医薬品などの製造に用いられ、これらの工場排水から検出されることがあります。JIS K 0102(工場排水試験法)では、ひ素の分析法としてジエチルジチオカルバミド酸吸光度法、水素化物発生原子吸光法、水素化物発生ICP発光分光分析法が記載されています。当社では、これら公定法に対応した試薬を取揃えています。

#### 分析のフローシート 水素化物発生原子吸光法 (JIS K 0102)



【参考】3g/l過マンガン酸カリウム溶液は、JIS K 0102工場排水試験法 クロム、バナジウム、スズの分析でも使用します。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
013-15481	Arsenic Standard Solution (As:1000mg/l)	JCSS	100ml	2,600
013-15501	Arsenic Standard Solution (As:100mg/l)	JCSS	100ml	2,900
084-01086	Hydrochloric Acid	ひ素分析用	500ml	850
097-00835	Ammonium Iron (III) Sulfate 12-Water	試薬特級	500g	2,300
091-00872	Iron (III) Chloride	試薬特級	25g	1,150
095-00875	Hexahydrate		500g	2,600
143-01326	Nitric Acid (1.42)	試薬特級	500ml	950
141-06785	35% Nitric Acid (1+1)	—	500ml	1,400
168-21175	0.3w/v% Potassium Permanganate Solution	排水試験用	500ml	3,000
164-03972	Potassium Iodide	試薬特級	25g	1,200
166-03971			100g	2,100
168-03975			500g	4,500
196-10542	Sodium Tetrahydroborate	原子吸光分析用	25g	3,100
198-10541			100g	9,400
206-06681	Tin (II) Chloride Dihydrate	有害金属測定用	100g	2,200
266-00901	Zinc, Powder	ひ素分析用	100g	2,200
268-00905			500g	3,500
267-00095	Zinc, Sandy	ひ素分析用	500g	3,300
266-00065	Zinc, Shot	ひ素分析用	500g	3,300

## ◆◆土壌汚染物質測定用◆◆ Wako

### ◆◆12種揮発性有機化合物混合標準液◆◆

「土壌汚染対策法」は2002年に制定され、2003年3月より施行されました。この法律では、有害物質を扱っていた工場を廃止する場合や、土壌汚染の恐れがあり人の健康に被害を及ぼす場合に、その土地の所有者が土地の汚染状況を調査することを義務づけています。当社では、第1種特定有害物質に規定されている揮発性有機化合物をガスクロマトグラフなどで一斉分析するための混合標準液を発売しました。

#### 内 容

1,1-ジクロロエチレン, ジクロロメタン, *cis*-1,2-ジクロロエチレン, 1,1,1-トリクロロエタン, 四塩化炭素, 1,2-ジクロロエタン, ベンゼン, トリクロロエチレン, *cis*-1,3-ジクロロプロペン, *trans*-1,3-ジクロロプロペン, 1,1,2-トリクロロエタン, テトラクロロエチレン (各1mg/ml メタノール溶液)

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
228-01481	12 VOC Mixture Standard Solution	土壌汚染物質測定用	2ml×10A	14,000

## 「環境分析用試薬総合カタログ2004」発行

環境分析用試薬をすべて網羅したカタログの「環境分析用試薬総合カタログ」の2004年度版を発行しました。



#### ◆◆内 容◆◆

- 残留農薬試験用試薬：試験用溶媒、標準品、標準液、サロゲート、クロマト器材、測定キット
- 水質試験用試薬：標準品、標準液、分析例、測定キット、キットの使用法
- 大気分析用試薬：標準品、標準液、分析例
- ダイオキシン類分析用試薬：標準品、標準液、試験用溶媒、前処理試薬、測定キット
- 難燃剤分析用試薬：標準品、標準液
- 環境ホルモン分析用試薬：標準品、標準液、試験用溶媒、測定キット
- 食品分析用試薬：標準品
- 動物医薬品試験用試薬：標準品
- 原子吸光分析用試薬：金属標準液、ICP分析用多元素混合標準液
- 有害金属測定用試薬
- 精密分析用試薬
- 高速液体クロマトグラフ用溶媒/LC/MS用溶媒
- 分析機器・その他機器：マイクロプレートリーダー、ウォッシャー、有機溶媒回収装置、標準液用バイアル瓶
- 確約書
- 索引

標準品等は物性、含量、分析データの有無、構造式、CASナンバー、分子式、別名などをできる限り記載しました。また、危険性情報、保存条件、法規制なども各項目の試薬について記載しました。

※カタログをご希望の方はご請求下さい※

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

記載希望納入価格は本体価格であり消費税などが含まれておりません。

和光純薬時報 Vol.72 No.2

2004年4月15日 発行

発行責任者 松田知憲

編集責任者 大西礼子

発行所 和光純薬工業株式会社

〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号

TEL.06-6203-3741 (代表)

URL <http://www.wako-chem.co.jp>

印刷所 株式会社 林欧文堂

●和光純薬時報に対するご意見・ご感想はこちらまでお寄せ下さい。

E-mail [oonishi.reiko@wako-chem.co.jp](mailto:oonishi.reiko@wako-chem.co.jp)

●製品に対するお問合せはこちらまでお寄せ下さい。

フリーダイヤル 0120-052-099

フリーファックス 0120-052-806

E-mail [labchem-tec@wako-chem.co.jp](mailto:labchem-tec@wako-chem.co.jp)