

〔総説〕

- 「計量法計量標準供給制度による標準液について」 四角目 和広 …… 2
- 「計量トレーサビリティの確保された残留農薬試験用標準物質の開発」 井原 俊英、齋藤 剛、前田 恒昭 …… 6
- 「トランスサイレチン」 水口 峰之 …… 9
- 「単糖類の4位選択的アシル化触媒」 川端 猛夫 …… 16
- 〈生薬のはなし〉
- 「天然物化学者と民族薬物学調査 大黃と芍薬同属植物の成分研究」 高石 喜久 …… 12
- 〈テクニカルレポート〉
- 「microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2 の開発」 請川 亮、西部 隆宏 …… 14

〔化学大家〕

- 「フリッツ・ハーバー」 島尾 永康 …… 27

〔製品紹介〕

有機合成

- アシル化触媒「川端アシル化触媒」 …… 19
- アルコール酸化触媒「2-アザアダマンタン-N-オキシル」 …… 20

環境・分析

- JCSS 揮発性有機化合物 23 種混合標準液 …… 5
- TRM シリーズ 残留農薬試験用標準物質 …… 8
- 局方生薬試験用試薬 …… 13

細胞生物・生化学

- トランスサイレチン, ヒト, 組換え体 …… 11
- プロテインホスファターゼ2A 二量体, ヒト, 組換え体 …… 20
- カンタリジン …… 20
- TRAP/ALP 染色キット …… 21
- 細胞培養用 抗生物質溶液 …… 21

細胞生物・生化学

- バンドのきれいなプレキャストゲル
スーパーセップ™ エース **Data** …… 22
- 神経伝達物質 カルシウムシグナル関連物質,
GABA 受容体作用物質 …… 26
- ホルボール 12-ミリストート 13-アセタート …… 26

遺伝子

- マイクロRNA アイソレーションキット, マウス Ago2 …… 15
- マイクロRNA アイソレーションキット, ヒト Ago2
~ microRNAの標的mRNA 同定に応用できる実験例の紹介~ **Data** …… 24
- 抗マウス Ago2, モノクローナル抗体 **Data** …… 25
- DNA エキストラクター® TIS キット …… 32

〔お知らせ〕

- 第24回 Wako ワークショップのご案内 …… 11
- 『アクロモペプチダーゼについて』 お知らせ …… 19

1 はじめに

近年、産業界のみならず環境をはじめとする様々な分野で、認証、マネジメントシステム、トレーサビリティなどの用語が用いられている。その背景には、社会や経済のグローバル化に伴い、地球環境問題、製品の質や安全に関する問題、各種化学物質の安全性の問題などがひとつの国だけでは解決できないほど大きな問題として注目を集め、これらの問題を新しい枠組みで解決しようとする国際的な動きがある。このような状況の中で化学分析は、これらの問題に対する現状把握や解決のためには欠かせないものとなっている。近年の社会基盤としての技術の発達、化学分析における濃度の低濃度化や多種多様な化学物質測定に対する要望が強まったことで、質量や体積の測定を基本とした重量分析法や容量分析法から機器分析法へと分析手法がシフトし、最近の化学分析とは機器分析法を指すと言っても過言ではないほど機器分析法が多く用いられている。今日のマスメディアによって伝えられる化学的分析結果の多くが様々な機器分析法によるものである。例えば、ダイオキシンなどは機器分析計によらなければ測定できない物質である。ところがこれらの機器分析の結果として得られる値は電流値や電圧値であるため、測定対象物の濃度として換算するためには電流値や電圧値と測定対象物の濃度との関係が明らかとならなければならない。このために必要となるのが標準物質である。重量分析などの化学分析では、主に分析者の技能が分析結果の質を左右していたが、一般的な機器分析では前処理操作等を除けば、分析者の技能に左右される部分は少なくなり、機器分析法には必要不可欠な標準物質の質がそのまま分析値の質につながっている。このような意味から標準物質の信頼性がそのまま機器分析法による測定結果の信頼性を反映することとなる。標準物質の重要性はこの点にある。特にトレー

サビリティを形成する手順によってその特性値が決定された認証標準物質は、国際社会の中でその重要性が一層増大してきている。

ここでは、計量法に基づく計量標準供給制度（JCSS：Japan Calibration Service System）における標準物質のうち、主に標準液について紹介する。

2 標準物質とは

質量や長さなどの物理量の計測においては、国際単位系（SI）^{注1)}の枠組の中でそれぞれの基本量の基準となるものが定義され、トレーサビリティ体系（実用標準から順次上位の標準を経て国家標準・国際標準に遡及できる体系）が確立されている。一方、化学量の計測においては、SIの基本量であるモルに直接結びつく方法を確立することが難しいため、それに代わる方法として標準物質を基準とする濃度の測定が行われ、測定結果間の整合性が保持されている。標準物質（Reference Material：RM）の正確な定義としては、国際標準化機構の標準物質委員会（ISO/REMCO）がISOガイド30の中で次のように定めている^{注2)}。それによると、「標準物質とは、測定装置の校正、測定方法の評価又は材料に値を付与することに用いるために一つ以上の特性値が十分に均一で、適切に確定されている材料又は物質¹⁾と定義されている。また、現在では世界中で多くの企業が取得しているISO 9000シリーズのなかで、測定に用いる機器の標準物質やトレーサビリティに関して「定められた間隔又は使用前に国際又は国家計量標準にトレーサ可能な計量標準に照らして校正又は検証する。そのような標準が存在しない場合には、校正又は検証に用いた基準を記録する。」という記述がある²⁾。これは、特別な場合を除き測定装置は国際標準又は国家標準にトレーサブルな標準物質を用いて校正する必要があることを意味している。この国家標準にトレーサブルな標準物質とは、ISOガイドに従って作製

され、認証された標準物質すなわち「認証標準物質」がこれに相当するものである。ISO/REMCOではガイド30の中で、認証標準物質（Certified Reference Material：CRM）を「認証書の付いた標準物質で、一つ以上の特性値が、その特性値を表す単位を正確な現示へのトレーサビリティが確立された手順によって認証され、各認証値にはある表記された信頼水準での不確かさが付いているもの¹⁾と定義している。後述する計量法トレーサビリティ制度によって供給される標準ガスや標準液、独立行政法人産業技術総合研究所計量標準総合センター（AIST/NMIJ）から供給されるNMIJ CRM、社団法人日本鉄鋼連盟の日本鉄鋼標準物質などがCRMに相当する。

3 計量法トレーサビリティ制度の化学標準物質

1993年（平成5年）11月施行の計量法のもと、国家計量標準を経済産業大臣が特定標準器または特定標準物質として指定し、国家計量標準にトレーサブルな計量標準を供給するトレーサビリティ制度が始められた。計量法トレーサビリティ制度の開始とともに、標準物質についても標準ガス、pH標準液及びpH標準液以外の標準液（金属標準液、陰イオン標準液等）が特定標準物質として指定された。1993年当時は、標準ガス11種類、標準液30種類が指定されていたが、その後、標準ガス、標準液ごとに特定標準物質が追加指定された。2008年7月現在の特定標準液の種類及び実用標準液の供給の現状を表に示した。

計量法上「標準物質」とは「政令で定める物象の状態の量の特定の値が付された物質であって、当該物象の状態の量の計量をするための計量器の誤差の測定に用いるもの。」と定めている。

計量標準供給制度において、標準物質は計量器の校正に用いる他の計量標準と同じシステムで運用されることとなるが、標準物質は計量器の標準（例えば質量における分銅）と異なり、①品質が経

時変化を起しやすい、②消耗品であり、使用すると無くなってしまふ、③標準物質の値付けの結果を再確認できない等の特性があり、他の計量標準と同じ体制で運用することは、国家計量標準の供給の信頼性等の観点から問題が生ずる恐れがある。このため、登録事業者から供給される濃度に係る標準物質については指定校正機関による濃度信頼性試験^{注(3)}を実施している。これは、認定後の校正能力維持の確認方法として、申請書に添付する「計量器の校正等の実施の方法を定めた書面」の中の「計量器の校正等の事業を適確かつ円滑に行う技術的能力を有していることを定期的に確認する方法に関する事項」として「国の機関又は指定校正機関が行う標準物質ごとの濃度信頼性試験」を受けることをひとつの方法とするということに基づいて始められたものである。

標準物質の供給体系は、次のとおりである。

- 1) 経済産業大臣の指定を受けた指定校正機関（「標準物質」については財団法人化学物質評価研究機構）は、自らが保管する標準物質製造装置を用いて特定標準物質を製造し、維持・管理を行う。
- 2) 指定校正機関は、特定標準物質をもとに特定二次標準物質の濃度の校正（値付け）を行う。この際、指定校正機関はjcssの標章付き証明書を発行する。
- 3) 独立行政法人製品評価技術基盤機構の認定を受けた登録事業者は、特定二次標準物質をもとに实用標準物質の濃度を校正（値付け）する。
- 4) 指定校正機関は、登録事業者が校正（値付け）した標準物質について濃度信頼性試験を実施し、定められた規格値（判定基準）以内であれば「適合」とし、登録事業者に通知する。
- 5) 登録事業者は、濃度信頼性試験に「適合」した標準物質を市販する。この際、登録事業者はJCSSの標章

表. 特定標準液の種類と濃度範囲

標準液の種類		实用標準液の供給の状態
pH標準液	しゅう酸塩pH標準液、フタル酸塩pH標準液、中性りん酸塩pH標準液、りん酸塩pH標準液、ほう酸塩pH標準液、炭酸塩pH標準液	登録事業者が实用標準液供給
無機標準液	アルミニウム標準液、ひ素標準液、ビスマス標準液、カルシウム標準液、カドミウム標準液、コバルト標準液、クロム標準液、銅標準液、鉄標準液、水銀標準液、カリウム標準液、マグネシウム標準液、マンガン標準液、ナトリウム標準液、ニッケル標準液、鉛標準液、アンチモン標準液、亜鉛標準液、塩化物イオン標準液、ふっ化物イオン標準液、亜硝酸イオン標準液、硝酸イオン標準液、りん酸イオン標準液、硫酸イオン標準液、アンモニウムイオン標準液、リチウム標準液、バリウム標準液、モリブデン標準液、ストロンチウム標準液、すず標準液、タリウム標準液、セレン標準液、ルビジウム標準液、臭化物イオン標準液	登録事業者が实用標準液供給
	シアン化物イオン標準液、陰イオン7種混合標準液、金属15種混合標準液、ほう素標準液	2008年7月現在登録事業者なし
有機標準液	揮発性有機化合物23種混合標準液	登録事業者が实用標準液供給
	ジクロロメタン標準液、クロロホルム標準液、1,2-ジクロロエタン標準液、四塩化炭素標準液、トリクロロエチレン標準液、テトラクロロエチレン標準液、トルエン標準液、ベンゼン標準液、 <i>o</i> -キシレン標準液、 <i>m</i> -キシレン標準液、 <i>p</i> -キシレン標準液、1,1-ジクロロエチレン標準液、 <i>cis</i> -1,3-ジクロロプロペン標準液、 <i>cis</i> -1,2-ジクロロエチレン標準液、1,1,1-トリクロロエタン標準液、1,1,2-トリクロロエタン標準液、 <i>trans</i> -1,3-ジクロロプロペン標準液、トリプロモメタン標準液、プロモジクロロメタン標準液、ジプロモクロロメタン標準液、 <i>trans</i> -1,2-ジクロロエチレン標準液、1,2-ジクロロプロパン標準液、1,4-ジクロロベンゼン標準液、フタル酸ジエチル標準液、フタル酸ジ- <i>n</i> -ブチル標準液、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル標準液、フタル酸ブチルベンジル標準液、4- <i>t</i> -オクチルフェノール標準液、4- <i>t</i> -ブチルフェノール標準液、4- <i>n</i> -ヘプチルフェノール標準液、ビスフェノールA標準液、4- <i>n</i> -ノニルフェノール標準液、2,4-ジクロロフェノール標準液、フタル酸ジ- <i>n</i> -ヘキシル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジ- <i>n</i> -ペンチル、フタル酸ジ- <i>n</i> -プロピル、フタル酸エステル8種混合標準液、アルキルフェノール6種混合標準液、アルキルフェノール5種混合標準液、ホルムアルデヒド標準液	2008年7月現在登録事業者なし

下線付きの標準液：2008年5月に特定標準液として追加指定された標準液

付き証明書を1製品につき1枚発行することができる。
これらの供給体系を図に示す。

4 標準物質の開発

社会や経済のグローバル化、環境・安



注(1)：SIは、「国際単位系」という意味のフランス語（Le Système international d'unités）の頭文字。

注(2)：ISOガイド35がThird edition 2006として改訂された。の中で、“reference material”及び“certified reference material”の再定義が行われ、ISOガイド30の定義から多少の変更があった。ISOガイド35の翻訳JISが発行（2008年7月）されている。それによると、「標準物質（reference material；RM）：一つ以上の規定特性について、十分均質、かつ、安定であり、測定プロセスでの使用目的に適するように作製された物質」、「認証標準物質（certified reference material：CRM）：一つ以上の規定特性について、計量学的

に妥当な手順によって値付けされ、規定特性の値及びその不確かさ、並びに計量学的トレーサビリティを記載した認証書が付いている標準物質」となっている。

注(3)：現在、計量法による標準物質の供給体系で供給されている標準液については、濃度信頼性試験が行われ、規格値（判定基準）に適合した实用標準液のみが市場に供給されている。これらの濃度信頼性試験は、登録事業者が特定二次標準液で濃度の校正（値付け）を行った实用標準液について、一定割合で实用標準液を抜き取り、指定校正機関が特定標準液を用いてその濃度を確認するものである。

全問題への関心の高まりとその必要性の増大などの諸問題に的確に対応するためには、ISO等の国際ルールに沿った標準物質などの知的基盤の整備が必要不可欠となっている。JCSS制度が開始された当時、JCSS標準物質は、無機系標準物質（標準液及び標準ガス）が41種類にとどまっておらず、欧米諸国と比較すると不十分な状況にあった。

このような背景のもと、「産業技術審議会・日本工業標準調査会合同会議的基盤整備特別委員会」が「我が国の知的基盤整備の充実に向けて」と題する報告書（1998）のなかで国家標準物質の集中的、加速的整備（環境計測関連物質を中心に1999年には1997年当時の42物質の2倍程度の80物質、2001年前後には120物質の供給を目標）及びそのための体制整備の必要性について報告した。この報告書をもとに標準物質の加速的な開発が、経済産業省（当時、通商産業省）の支援のもと独立行政法人産業技術総合研究所（以下、産総研。当時、通商産業省工業技術院物質工学工業技術研究所）、独立行政法人製品評価技術基盤機構（以下、NITE。当時、通商産業省製品評価技術センター）及び財団法人化学物質

評価研究機構（以下、化評研。当時、財団法人化学検査協会）を中心としてスタートした。この開発は、国家標準としての高純度物質の確立、標準物質の調製方法の確立、濃度測定方法の確立、保存安定性の評価等を行い国家標準物質にトレーサブルな体系を構築し、標準物質を広く普及させることを目標とした。

開発開始時は、単成分の標準物質の開発が中心となり、当時社会的に話題となったSPEED'98^{注4)}などを受けた環境ホルモン関連物質や環境測定項目でも規制対象となっている揮発性有機化合物など、有機標準物質の開発が行われた。

また、リチウム、バリウム、モリブデンなどの単成分の無機標準液10種類が、特定標準液として追加指定され、現時点では、そのうち実用標準液9種類（シアン化物イオン以外）が登録事業者から追加供給されている。

さらに、最近の機器分析計は、多成分同時測定が可能となっている機器が主流を占めつつあることから、混合標準液の開発も行われてきた。2008年6月時点では、揮発性有機化合物23種混合標準液などの有機系混合標準液4種類、陰イオン7種混合標準液などの無機系混合標準液2種類

が、特定標準液として指定されている。

有機混合標準液のうち、揮発性有機化合物23種混合標準液については、2008年6月から登録事業者による実用標準液の供給が可能となった。

無機混合標準液については、2008年5月に新規特定標準液として指定されたものであり、近い将来、登録事業者から実用標準液が供給されることが期待される。

しかしながら、有機標準液の多くが、登録事業者が存在しないため、登録事業者による実用標準液は供給されていない^{注5)}。

5 標準物質関連の情報提供体制の整備

標準物質を広く普及させるには、その情報を広く公開することは勿論のこと、入手しやすい方法で提供する必要がある。国際的には、COMAR（国際標準物質データベース）による情報提供がある。世界25か国で製造された10,000件を超える標準物質が登録されたデータベース（<http://www.comar.bam.de/>）である。2008年7月の時点では、ドイツのBAM（Bundesanstalt für Materialprüfung）が事務局として活動しており、NITEが、窓口となっている。また、我が国では、認証標準物質及び標準物質に関する情報、関連する国内外機関の情報等をインターネットで提供する体制が「標準物質総合情報システム（<http://www.rminfo.nite.go.jp/rminfo/jp/index.do>）」として構築され公開されている。COMARと同様にNITEが維持管理している。また、JCSSに関する情報は、<http://www.iajapan.nite.go.jp/jcss/index.html>、http://www.cerij.or.jp/gaiyou/gyomu_hyojyun.html等から入手できる。

6 トレーサビリティとマネジメントシステム

計量法上の国家標準である特定標準物質を製造するための基準物質は産総研から提供される。産総研では、国際度量衡委員会物質質量諮問委員会が行う国際比較

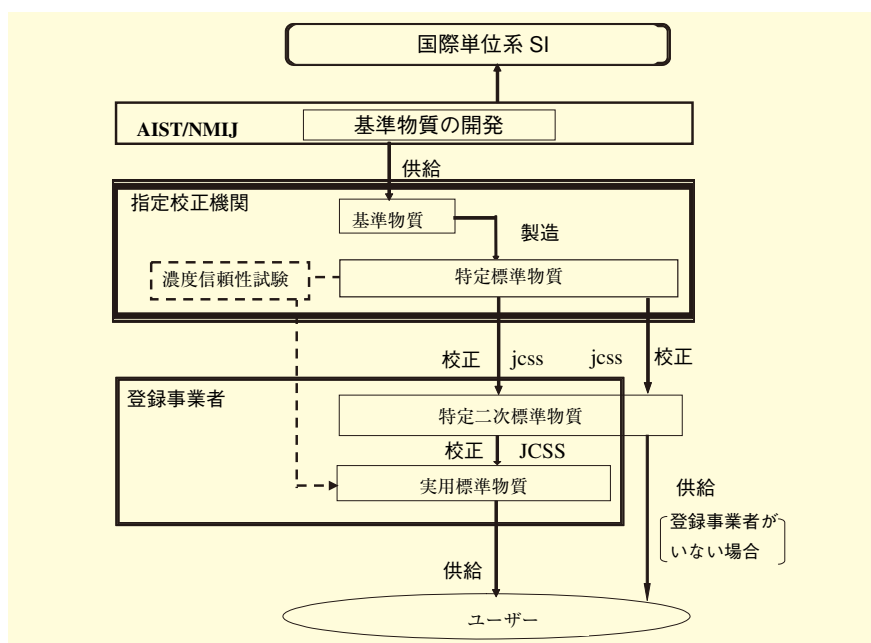


図. JCSS 標準物質の供給体系図

試験へ参加し、標準物質の国際的な同等性を確認し、そのJCSS標準物質の信頼性を担保している^{注6)}。

また、JCSS制度は、1993年11月から計量法に基づく校正事業者認定制度として運営してきたが、2005年7月より校正事業者登録制度となった。

この登録制度は、国際標準化機構及び国際電気標準会議が定めた校正機関に関する基準 (ISO/IEC 17025) の要求事項に適合しているかどうかの審査を行い、校正事業者を登録する制度となっている^{注7)}。登録に当たっては、ISO/IEC 17025によるマネジメントシステム、校正方法、不確かさの見積もり、設備など、校正が適切に実施されるかどうかについて、組織的、技術的な観点から審査される。登録された事業者は、そのトレーサビリティとマネジメントシステムを証明するものとして、JCSSのロゴマーク入りの証明書を発行することができる。JCSSロゴマーク付き証明書は、そのマークにより国家計量標準へのトレーサビリティと校正事業者の技術能力を証明するとともに、事業者から供給される標準物質が信頼性が高いものであることを示すものとなる。

7 おわりに

計量法における化学標準物質 (主に

標準液) の供給の現状について紹介してきた。最近、ISO/IEC 17025等に基づく試験所認定制度や地域又は国際間の相互承認に向けて様々な動きがあるが、この中で、技能試験や測定の不確かさなどが重要なキーワードとなっている。この技能試験や測定の不確かさのいずれも、正確な標準物質を用いることによって初めて、意味をなすものとなる。このように標準物質は、ある特定の範囲内で通用すればよいという時代から、国際的に認知された方法に基づいて製造、値付けされ、その素性

が明確なものでなければ、世界には通用しない時代へと変化しつつある。このためにも使用者、供給者、関係機関の国際的観点での対応が今後一層重要になるものと考えられる。

【参考文献】

- 1) 標準物質に関連して用いられる用語及び定義, 日本工業規格, JIS Q 0030 (1997)
- 2) 品質マネジメントシステム-要求事項, 日本工業規格, JIS Q 9001 (2000)



注(4):1998年5月に環境庁(当時)が、「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」の中で内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質67物質を発表した。これにより一気に「環境ホルモン」という用語が用いられるようになった。

注(5):登録事業者がない場合には、暫定的な措置として指定校正機関から直接、国家標準にトレーサブルな標準物質の供給が可能となっている。

注(6):JCSS標準物質のうち、標準ガスについては、産総研から指名された機関として化評研が国際比較に参加している。

注(7):国際MRA対応事業者については、ISO Guide34(標準物質生産者の能力に関する一般要求事項)の要求事項も適用される。国際MRA対応事業者とは、APLAC(アジア太平洋試験所認定協力機構)の相互承認協定、ILAC(国際試験所認定協力機構)の相互承認協定の要求事項に対応できている事業者のことである。国際MRA対応事業者は、指定された認定マークを用いることができる。なお、MRA(Mutual Recognition Arrangement)とは多国間の相互承認のことであり、JCSS(NITE)は1999年にILAC/APLACの相互承認に署名している。

Products

JCSS (Japan Calibration Service System)

揮発性有機化合物 23 種混合標準液 (メタノール溶液)

特長

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

成分一覧

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

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

当社で取扱っているその他のJCSS標準液については、<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/info/ana/pdf/JCSS23.pdf> をご参照下さい。



はじめに

近年、食品の安全性に関して多くの問題が生じており、国としてもその対応が急務となっている。2003年に改正された食品衛生法においては、食品残留農薬に関して大幅な規制強化がなされており、ポジティブリスト制度（2006年5月施行）の導入により、国内外で流通する約800種類の農薬等が規制の対象となっている。残留農薬試験は食品の安全性と直結するばかりでなく国際的な商取引とも関連するため、分析値の信頼性への要求は高く、公的機関を含め各試験機関ではISO/IEC 17025の認定取得など分析精度管理の維持・向上に努めている。分析精度管理において検量線作成用の標準物質の使用は不可欠であり、既に市販もされているが、きわめて種類が多いことに加えて規制対象物質の追加又は削除などが頻繁に行われるなどの理由により、計量トレーサビリティの確保された標準物質は供給されてこなかった。

そこで、我々は迅速かつ簡便でありながら計量学的に正確な測定法を導入することにより、計量トレーサビリティが表明できる新たな残留農薬試験用標準物質を開発することとした。また、その技術的方法と併せてトレーサビリティシステムについても目的に合わせた見直しを図り、現在、計量法トレーサビリティ制度(JCSS)で行われているような標準物質の値付けの連鎖によるトレーサビリティとは異なる簡易なシステムを選択した。

標準物質の生産プロセス

産業技術総合研究所計量標準総合セ

ンター（以下、当所）における標準物質の生産プロセスは、ISOガイド34に適合した品質システムに基づき、通常、図1に示す①～⑦のような流れで行っている。すなわち、「①標準物質の設計」、「②候補標準物質の選定」、「③調製・小分け」、「④均質性評価」、「⑤値付け」、「⑥安定性評価」、「⑦特性値の決定（認証）」である。値付けについては、可能な限り一次標準測定法（後述）を適用し、また原理的に異なる複数の方法により堅牢性の高い値付けを行うことを方針としている。その上で均質性評価及び安定性評価などにより得られた結果を不確かさとして考慮し、標準物質の特性値を決定する。コアとなる値付け技術はもとより周辺技術も含めて最高精度を追求することもあって、特性値は真値の最良推定値と言えるものである。一方、ほぼ全ての生産プロセスを自らが検証しつつ進めることから、費やす生産期間が1年を超えることも少なくない。したがって、本課題に当所の標準物質生産と同品質のプロセスを適用するのは困難であり、残留農薬試験用標準物質に関しては、計量学的に最高の品質を目指すよりも市場の求める不確かさで迅速に供給することを目標にした。

そこで、当所が標準物質の設計から認証までを行うのではなく、既に市販されているメーカ標準物質を活用することとした。具体的には、残留農薬試験における検量線作成に用いる農薬原体（いわゆる農薬標準品）をターゲットとし、その生産プロセスを見直した。すなわち、「①標準物質の設計」、「②候補標準物質の選定」、「③調製・小分け」については、市販品で過不足無いと判断し、当所は計量トレーサビ

リティの確保のために、抜き取られた特定のロットについて、「⑤値付け」を行うこととした。ここに、市販標準物質のメーカが「④均質性評価」と「⑥安定性評価」等から得られた不確かさを加えて、「⑦特性値の決定」を行う仕組みとした。したがって、特性値はロット毎に管理されており、指定される保存条件を前提に保証期限までの不確かさも含まれるものである。

適用した純度測定法

農薬原体の純度測定法に関しては、確実なトレーサビリティ確保の観点からは国際単位系（SI）に基づく計量学的に高度な計測法を適用することが望ましい。しかしながら、本標準物質の用途から考察した場合、実用的に十分な不確かさが得られればよい。そこで、本開発では、SIトレーサビリティを確保しつつ、迅速かつ正確な純度測定法を新たに構築することを課題とした。SIトレーサビリティ確保の観点では、前述のようにSIに基づく計測法、すなわち一次標準測定法の適用が望ましい。これは国際度量衡委員会傘下の物質質量諮問委員会で「最高の計量学的質を有し、その方法の操作が完全に記述され理解されるものであり、その不確かさがSI単位を用いて完全に記述される方法」と定義されている¹⁾。一次標準測定法の一つに凝固点降下法があり、本課題の対象物質の純度測定には有効であると考えた。このとき、供給される標準物質の用途を考慮し、純度測定（拡張）不確かさを1%程度に設定することで、測定法の簡易化に取り組んだ。さらに、定義を満たし得る計測法として当所で研究を進めて

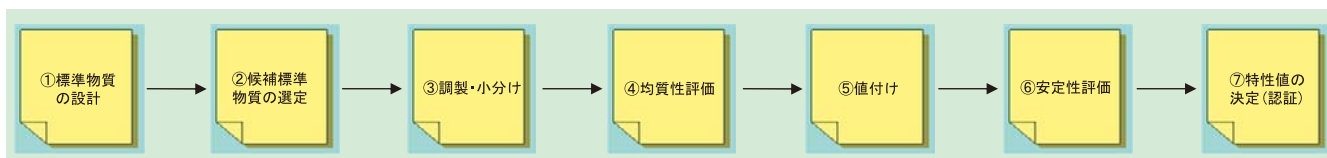


図1. 標準物質の生産プロセス

きた核磁気共鳴法についても、本課題で目標とした不確かさであれば適用可能と考えられた。そこで、示差走査熱量計 (DSC) を用いた凝固点降下法による連続昇温測定、及び核磁気共鳴装置 (NMR) を用いた内標準法による¹H NMR測定を試みた。なお、DSCを用いた測定では、本課題で対象とした物質について揮発成分及び残分 (灰分) が測定できない場合があるため、熱重量天秤 (TGA) による揮発成分測定及び強熱残分測定を併せて行い、DSCの純度を補正した。以下に、一例として表1に掲げる農薬原体について行った純度測定の詳細について述べる。

まず、DSCでの測定であるが、モル凝固点降下現象に基づくため、そもそも熱力学的には平衡状態での議論であり、試料を一定速度で加熱する測定 (連続昇温測定) では不確かさが大きくなることが予測されるため、当所ではこれまで特性値を得るための手法としてはほとんど適用してこなかった。しかしながら、本課題においては1%程度の不確かさを目標値として設定したことから、連続昇温測定も適用できる可能性があると判断した。そこで、インタラクターを備えた熱流束型のDSC (DSC 823^o, Mettler Toledo製) を用い、水銀 (NIST SRM 2225) 及びインジウム (NIST SRM 2232)、又はインジウム及びピスマス (NIST SRM 2235) で温度及び熱量の校正を行った上で、昇温速度0.1℃/分又は2℃/分 (プロピザミドのみ) で純度を求めたところ、表1に示すように4物質について99.7%~99.9% (質量分率) の値を得た (揮発成分及び残分の補正後)。ただし、EPN及びエトフェンブロックスについては凝固が確認されなかったため、純度測定ができなかった。また、本測定における不確かさについては、凝固点降下法の原理に基づく要因の他に、連続昇温測定によるものとして、純度解析に用いる融

解範囲及びファントホッフプロットの補正を不確かさの要因に加え、さらに凝固点降下法で得られる物質分率 (mol/mol) を質量分率 (kg/kg) に変換することによる不確かさを加えた²⁾。その結果、表1に示すように純度の不確かさとして0.2%~0.8% ($k=2$) を得た。

次に、NMRでの測定であるが、¹H NMRでは化合物中の水素原子核の数の比がピーク面積比に対応する特性を持つことから、水素元素の数の比を簡単に確認することができる。したがって、この特性を利用することで純度測定を行うことが可能である。すなわち、内標準物質として純度が既知の物質を定量的に加えて¹H NMR測定を行い、得られたスペクトルの中から定量したい物質および内標準物質それぞれの適当なピークについて面積と寄与する核の数を勘案することで、両者のモル比から定量値を得ることができる。このときピーク面積の比は寄与する核の数に比例することから、本測定は原理的に¹H核の数、言い換えればSIに基づく純度が得られることになる³⁾。ただし、通常の構造解析を主眼として¹H NMRを測定する場合と比べ、定量に焦点を当てた場合では、定量を行おうとする核が、その数に正確に比例する条件下での実験を行うことが不可欠な条件となる。そこで、スピン-格子緩和時間 (T_1) の6倍以上の遅延時間をとる条件とし、さらにピークの形状を良好にするためのシム

調整やS/Nを良くするなどの工夫を行い、純度測定及びそれらの不確かさ評価を試みた。¹H 共鳴周波数599.9 MHzのNMR (^{Unity}INOVA 600 A、Varian製) を用い、スペクトル幅100 ppm、90°パルス (11 μs)、データ取り込み時間4秒、遅延時間60秒、積算回数32回とし、安息香酸 (NIST SRM 350a、純度: 99.9958% ± 0.0027%) を内標準物質として純度を求めたところ、表1に示すように5物質について99.1%~99.6% (質量分率) の値を得た。ただし、 γ -BHC (リンデン) については適正なピーク形状が得られなかったため、純度測定ができなかった。また、本測定における不確かさについては、内標準物質及び対象物質の秤量の不確かさに加え、ピーク選択や緩和によるものが全体への寄与率が大きかった。その結果、表1に示すように純度の不確かさとして0.5%~0.7% ($k=2$) を得た。

以上の測定により得られた2つの純度を平均し、各物質の報告値 (99.4%~99.7%) とした (表1)。その不確かさについては、DSC及びNMRの各測定における不確かさに加えて測定間の純度差を不確かさとして考慮し、最終的に目標を満足する0.2%~0.9% ($k=2$) の不確かさを得た (表1)。

本開発では、SIトレーサビリティを確保しつつ、迅速かつ正確な純度測定法を新たに構築することを課題とし、具体的な目標として純度測定における不確かさを1%に設定して測定法

表1. 純度評価を行った農薬原体とその測定結果の例

農 薬	DSC		NMR		報告値	
	純度 (%)	不確かさ (%、 $k=2$)	純度 (%)	不確かさ (%、 $k=2$)	純度 (%)	不確かさ (%、 $k=2$)
γ -BHC (リンデン)	99.7	0.2	—	—	99.7	0.2
EPN	—	—	99.4	0.7	99.4	0.7
エトフェンブロックス	—	—	99.5	0.5	99.5	0.5
プロシミドン	99.9	0.2	99.3	0.5	99.6	0.7
プロピザミド	99.8	0.8	99.1	0.6	99.4	0.9
DEP (トリクロロホン)	99.7	0.3	99.6	0.5	99.7	0.3

の簡易化に取り組み、ほぼ満足する結果を得ることができた。DSC及びNMRでの純度測定に関する入力量は国家標準を通してSIへのトレーサビリティが実現されており、SIに基づく出力値を与える分析法であることから、得られた純度は原理的にSIトレーサブルな分析値と言える。

計量トレーサビリティについて

本システムは、当所と市販標準物質のメーカーがそれぞれ農業標準物質を生産し、標準物質の値付けを行うことで計量トレーサビリティを確保するのではなく、既述したように一つの標準物質の生産プロセスを分業することで実現したものである。すなわち、当所は抜き取られた農業原体について、SIにトレーサブルな分析法により純度測定を行い、得られた純度とその不確かさを分析結果報告書(図2)として発行した⁴⁾。当該標準物質メーカー(和光純薬工業株式会社)では、分析結果報告書に記載した純度(不確かさを含む)に均質性評価及び安定性評価等から得た不確かさを加えて標準物質の特性値を決定し、証明書付きの標準物質として供給する。したがって、本標準物質の特性値は、当所の分析値を通してSIにトレーサブルであり、計量トレーサビリティが表明できるものである。

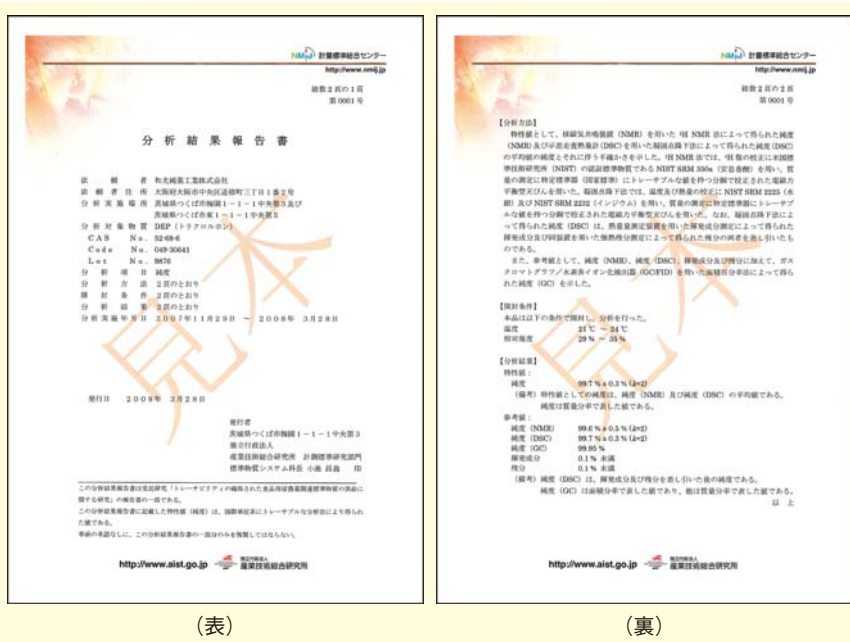


図2. 分析結果報告書の例

おわりに

今般、和光純薬工業株式会社から供給が開始された残留農薬試験用の新しい標準物質(TRMシリーズ)には、これまで市販されていた農業標準品には無い2つの大きな特徴がある。その一つは、証明書に計量トレーサビリティについての記述がされていることであり、もう一つは、標準物質の特性値(純度)に信頼性の証である不確かさが記載されていることである。これらの特徴はどちらもISO/IEC 17025等における測定のトレー

サビリティの要求に応えるものであり、より厳しい精度管理が求められる試験において利用価値がある。

【参考文献】

- 1) 日本分析化学会編：「分離分析化学事典」, p. 350, (朝倉書店) (2001).
- 2) 井原俊英, 飯島由美子, 清水由隆：分析化学, **57**, 493, (2008).
- 3) 齋藤 剛, 井原俊英, 佐藤 浩志, J. Harald, 衣笠晋一：分析化学, **52**, 1029, (2003).
- 4) 産業技術総合研究所計量標準総合センターのホームページの下記サイトで、これまでに発行した残留農薬試験用標準物質の分析結果報告書が閲覧可能。

<http://www.nmij.jp/~measure-sys/topics/wako/>

Products



残留農薬試験用標準物質 (TRM (Traceable Reference Material) シリーズ)

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
049-30641	DEP Reference Material	100mg	12,000
054-07801	Ethofenprox Reference Material	100mg	近日発売
165-23461	Procymidone Reference Material	100mg	近日発売
162-23611	Propyzamid Reference Material	100mg	近日発売

はじめに

トランスサイレチンは、分子量55kDaの血漿タンパク質であり、サイロキシンやレチノールを輸送する機能を有する。このタンパク質は、以前はプレアルブミンとよばれ、1974年にKandaらによってアミノ酸配列が報告されて以来、さまざまな視点からの研究が行われてきた¹⁾。本稿では、トランスサイレチンの特徴について簡単に説明したい。

トランスサイレチンの産生と血中濃度

トランスサイレチンは主に肝臓で合成され血液中に分泌される。肝臓の他には、脳室脈絡叢、網膜、脾臓などにおいても産生される。血液中の濃度は、成人で20-40 mg/dlであり、50歳くらいから徐々に減少する¹⁾。トランスサイレチンの血中半減期は1.9日と短く、また、炎症、妊娠、腫瘍、低栄養などで血中濃度が著しく低下することが知られている²⁾。

トランスサイレチンの立体構造

トランスサイレチンの立体構造はX線結晶構造解析によって明らかにされており、その立体構造は14 kDaの単量体が4つ集まったホモ四量体を形成している¹⁾。単量体には2枚の β シートが含まれ、8本の β ストランドと1本の α ヘリックスがギリシャキーモチーフに類似するトポロジーを形成している(図1A)。単量体と単量体は主に水素結合によって連結され、一方、二量体と二量体の結合には水素結合と疎水性相互作用が重要である。熱力学的安定性に関する研究によると、このタンパク質は熱変性温度が100°C程度であり非常に熱安定性が高い。このような高い安定性は、強固な四次構造に由来するものと予想される³⁾。

サイロキシン結合

トランスサイレチンは、甲状腺ホルモン

であるサイロキシンを血液中に貯蔵し細胞に輸送する。血中のサイロキシンの約20%はトランスサイレチンに結合し、中枢神経系のサイロキシンについては約80%がトランスサイレチンに結合している¹⁾。トランスサイレチンには2つのサイロキシン結合部位があり、1つはサイロキシンを強く結合し(解離定数が ~ 10 nM)、もう1つは弱く結合する(解離定数が ~ 5 μ M)。サイロキシン結合部位は、トランスサイレチンの二量体と二量体が接している領域に位置し、四量体構造ではちょうど中央に位置する(図1B)。

レチノール輸送

トランスサイレチンはレチノールを輸送する機能も有する⁶⁾。サイロキシンの場合とは異なり、レチノールが直接トランスサイレチンに結合することはない。レチノールはレチノール結合タンパク質に結合し、その複合体にトランスサイレチンが結合する(図1C)。遊離のレチノール結合タンパク質はトランスサイレチンと結合しないが、レチノールが結合するとトランスサイレチンに結合できるように立体構造を変化させる。さらに、トランスサイレチンの結合は、レチノールとレチノール結合タンパク質の結合を強める効果がある。これにより、レチノールが目的細胞以外で解離しないようにしていると思われる。トランスサイレチンはレチノール結合タンパク質を2分子結合することができ、その結合部位はサイロキシンの結合部位とは異なっている⁶⁾。

トランスサイレチンと内分泌攪乱物質

トランスサイレチンは、ポリ塩化ビフェニル類(PCB)やポリ臭素化ビフェニル類(PBB)に結合することが知られている⁴⁾。これらの化合物は内分泌攪乱物質と考えられており、トランスサイレチンのサイロキシン結合部位に結合する。その結果、サイロキシンがトランスサイレチンから遊離し、体内から排除されると考えられている。興味深いことに、PCBやPBBのいくつかは、サイロキ

シンよりも強く結合する。また、これらの分子は、他のサイロキシン結合タンパク質であるサイロキシン結合グロブリンには結合しない⁴⁾。したがって、PCBやPBBはトランスサイレチンの機能に大きな影響を与えていると思われる。近年では、トランスサイレチンを利用して内分泌攪乱物質を検出するキットの開発も進められている⁵⁾。

トランスサイレチンとアミロイド病

アミロイド線維は、 β ストランドが線維の進行方向に多数重合した凝集物であり、難溶性で臓器に蓄積しさまざまな機能障害を引き起こす。このような疾患はアミロイド病と総称され、20種以上のタンパク質やペプチドがアミロイド病の原因物質として同定されている。トランスサイレチンはアミロイド病の原因タンパク質の1つとして知られている。トランスサイレチンのアミロイド病は、アミロイド線維が末梢神経、心臓、腎臓、消化管などに蓄積して引き起こされる。したがって、サイロキシンやレチノールの輸送といったトランスサイレチンの機能が損なわれることに由来するのではない¹⁾。

トランスサイレチンが原因のアミロイド病は2つに大別される¹⁾。1つは野生型トランスサイレチンによって起こるタイプで、これは老人性全身アミロイドーシス(senile systemic amyloidosis : SSA)とよばれる。もう1つはアミノ酸が変異することによって引き起こされるタイプで家族性アミロイドポリニューロパシー(familial amyloid polyneuropathy : FAP)が含まれる。FAPの原因となるアミノ酸変異は多数知られており、トランスサイレチン分子のあらゆる部位において変異が起こることがわかっている。また、変異の種類によってアミロイド線維の蓄積部位が異なっている。多くは肝臓で産生されたトランスサイレチンが全身組織に蓄積し末梢神経障害や心筋障害などを発症するが、D18G変異やA25T変異は髄液中のトランスサイレチンが脳に蓄積し中枢神経障害を引き起こす⁷⁾。

FAPの治療法としては肝移植が最も有効

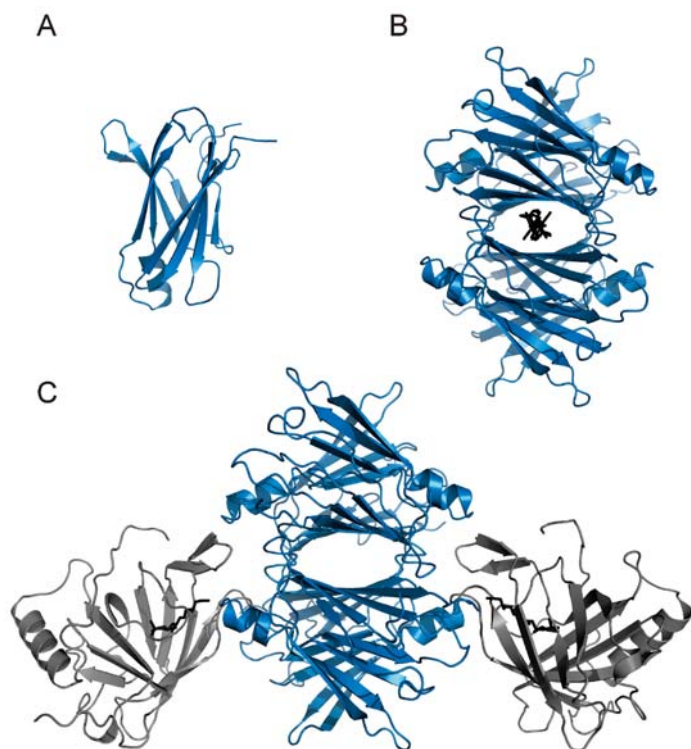


図1. トランスサイレチンの立体構造。トランスサイレチンを青色のリボンモデルで表示した。(A) 単量体構造 (PDB ID : 1TTC)。(B) トランスサイレチンとサイロキシンの複合体 (PDB ID : 2ROX)。サイロキシンは黒色のスティックモデルで表示した。(C) トランスサイレチンとレチノール結合タンパク質の複合体 (PDB ID : 1RLB)。レチノール結合タンパク質を灰色で、レチノールを黒色のスティックモデルで表示した。

であり、1990年にスウェーデンで初めて行われて以来、世界中で試みられている。しかし、肝移植以外には有効な治療法がなく、新しい治療法の開発を目指して活発に研究が行われている⁸⁾。

In vitroの研究によって、トランスサイレチンが不安定になると立体構造が部分的に壊れた中間体に変化しやすくなり、アミロイド線維となって凝集すると提案されている⁷⁾。また、FAPなど遺伝性のアミロイド病を引き起こすアミノ酸変異は、トランスサイレチンの立体構造を不安定化する⁷⁾。以上の観点から、トランスサイレチンの安定化を目的とした治療法の開発が進められている。その1つとして、薬物によってトランスサイレチンを安定化することで線維形成を阻害する試みが行われている。例えば、ジフルニサルなどの非ステロイド性抗炎症薬はサイロキシン結合ポケットに結合しトランスサイレチンを安定化する⁹⁾。この他に、 Cr^{3+} はサイロキシンと協同的にトランスサイレチンに結合し安定化することが知られている^{8, 10)}。 Cr^{3+} はサプリメントとしても利用されていることから、治療への応用が期待される。

トランスサイレチンとアルツハイマー病

興味深いことに、トランスサイレチンは先に述べたアミロイド病以外の疾患にも関与している。例えば、トランスサイレチンはアルツハイマー病を抑制しているのではないかと推測されている。この考えは、アルツハイマー病における老人斑の主要な構成成分であるアミロイド β が髄液のトランスサイレチンによって可溶化されていることを示した研究に端を発する¹¹⁾。この推測を支持する実験結果はこれまでに数多く報告されている。例えば、髄液のトランスサイレチン濃度は、アルツハイマー病患者では正常対照群よりも有意に減少している^{12, 13)}。また、最近のアルツハイマー病のモデルマウスによる研究では、トランスサイレチンは毒性のあるアミロイド β に結合してアルツハイマー病の症状を抑制していると提案されている¹⁴⁾。アルツハイマー病の他にも、うつ^{15, 16)}や統合失調症^{17, 18)}などの精神疾患においてもトランスサイレチンが減少する。これらの疾患の診断にトラン

スサイレチンを利用する試みも行われており^{18, 19)}、今後の研究の発展が期待される。

【参考文献】

- 1) Hamilton, J. A. and Benson, M. D.: "Transthyretin: a review from a structural perspective". *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 1491-521 (2001).
- 2) Ingenbleek, Y., De Visscher, M. and De Nayer, P.: "Measurement of prealbumin as index of protein-calorie malnutrition". *Lancet*, **2**, 106-109 (1972).
- 3) Shnyrov, V. L., Villar, E., Zhadan, G. G., Sanchez-Ruiz, J. M., Quintas, A., Saraiva, M. J. and Brito, R. M.: "Comparative calorimetric study of non-amyloidogenic and amyloidogenic variants of the homotetrameric protein transthyretin". *Biophys. Chem.* **88**, 61-67 (2000).
- 4) Marchesini, G.R., Meulenber, E., Haasnoot, W., Mizuguchi, M. and Irth, H.: "Biosensor recognition of thyroid-disrupting chemicals using transport proteins". *Anal. Chem.* **78**, 1107-1114 (2006).
- 5) Marchesini, G. R., Meimaridou, A., Haasnoot, W., Meulenber, E., Albertus, F., Mizuguchi, M., Takeuchi, M., Irth, H. and Murk, A. J.: "Biosensor discovery of thyroxine transport disrupting chemicals". *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, in press. (2008).
- 6) Monaco, H. L.: "The transthyretin-retinol-binding protein complex". *Biochim. Biophys. Acta.* **1482**, 65-72 (2000).
- 7) Sekijima, Y., Wiseman, R. L., Matteson, J., Hammarström, P., Miller, S. R., Sawkar, A. R., Balch, W. E. and Kelly, J. W.: "The biological and chemical basis for tissue-selective amyloid disease". *Cell*, **121**, 73-85 (2005).
- 8) Ando, Y.: "New therapeutic approaches for familial amyloidotic polyneuropathy (FAP)". *Amyloid*, **10 Suppl 1**, 55-66 (2003).
- 9) Sekijima, Y., Dendle, M. A. and Kelly, J. W.: "Orally administered diflunisal stabilizes transthyretin against dissociation required for amyloidogenesis". *Amyloid*, **13**, 236-49 (2006).

- 10) Sato, T., Ando, Y., Susuki, S., Mikami, F., Ikemizu, S., Nakamura, M., Suhr, O., Anraku, M., Kai, T., Suico, M. A., Shuto, T., Mizuguchi, M., Yamagata, Y. and Kai, H.: "Chromium (III) ion and thyroxine cooperate to stabilize the transthyretin tetramer and suppress in vitro amyloid fibril formation", *FEBS Lett.*, **580**, 491-496 (2006).
- 11) Schwarzman, A. L., Gregori, L., Vitek, M. P., Lyubski, S., Strittmatter, W. J., Enghilde, J. J., Bhasin, R., Silverman, J., Weisgraber, K. H., Coyle, P. K., Zagorski, M. G., Talafous, J., Eisenberg, M., Saunders, A. M., Roses, A. D. and Goldgaber, D.: "Transthyretin sequesters amyloid β protein and prevents amyloid formation", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 8368-8372 (1994).
- 12) Serot, J. M., Christmann, D., Dubost, T. and Couturier, M.: "Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease", *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **63**, 506-508 (1997).
- 13) Merched, A., Serot, J. M., Visvikis, S., Aguilon, D., Faure, G. and Siest, G.: "Apolipoprotein E, transthyretin and actin in the CSF of Alzheimer's patients: relation with the senile plaques and cytoskeleton biochemistry", *FEBS Lett.*, **425**, 225-228 (1998).
- 14) Buxbaum, J. N., Ye, Z., Reixach, N., Friske, L., Levy, C., Das, P., Golde, T., Masliah, E., Roberts, A. R. and Bartfai, T.: "Transthyretin protects Alzheimer's mice from the behavioral and biochemical effects of $A\beta$ toxicity", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 2681-2686 (2008).
- 15) Sousa, J. C., Grandela, C., Fernández-Ruiz, J., de Miguel, R., de Sousa, L., Magalhães, A. I., Saraiva, M. J., Sousa, N. and Palha, J. A.: "Transthyretin is involved in depression-like behaviour and exploratory activity", *J. Neurochem.*, **88**, 1052-1058 (2004).
- 16) Sullivan, G. M., Mann, J. J., Oquendo, M. A., Lo, E. S., Cooper, T. B. and Gorman, J. M.: "Low cerebrospinal fluid transthyretin levels in depression: correlations with suicidal ideation and low serotonin function", *Biol. Psychiatry*, **60**, 500-506 (2006).
- 17) Yang, Y., Wan, C., Li, H., Zhu, H., La, Y., Xi, Z., Chen, Y., Jiang, L., Feng, G. and He, L.: "Altered levels of acute phase proteins in the plasma of patients with schizophrenia", *Anal. Chem.*, **78**, 3571-3576 (2006).
- 18) Huang, J. T., Leweke, F. M., Oxley, D., Wang, L., Harris, N., Koethe, D., Gerth, C. W., Nolden, B. M., Gross, S., Schreiber, D., Reed, B. and Bahn, S.: "Disease biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with first-onset psychosis", *PLoS Med.*, **3**, e428 (2006).
- 19) Gloeckner, S. F., Meyne, F., Wagner, F., Heinemann, U., Krasnianski, A., Meissner, B. and Zerr, I.: "Quantitative analysis of transthyretin, tau and amyloid- β in patients with dementia", *J. Alzheimers Dis.*, **14**, 17-25 (2008).

家族性アミロイドーシスの研究に



トランスサイレチン, ヒト, 組換え体
トランスサイレチン変異体 (V30M), ヒト, 組換え体
トランスサイレチン変異体 (L55P), ヒト, 組換え体

トランスサイレチン (TTR) は、生体内では主に血漿、髄液中に存在している 127 個のアミノ酸からなるタンパク質で、通常これを単量体とする四量体を形成しています。甲状腺ホルモンであるチロキシンや、ビタミン A 輸送タンパク質であるレチノール結合タンパク質の輸送に重要な役割を果たしています。TTR 遺伝子の変異は、家族性アミロイドーシス (FAP) の原因とされています。L55P の FAP は重症であることも報告されています。

外観：凍結乾燥品

バッファー：20mmol/l 重炭酸アンモニウム

本品は、6 × ヒスチジンタグが付加されています。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
209-17301	Transthyretin, Human, recombinant	細胞生物学用	1mg	近日発売
206-17311	Transthyretin Variant (V30M), Human, recombinant	細胞生物学用	1mg	近日発売
203-17321	Transthyretin Variant (L55P), Humna, recombinant	細胞生物学用	1mg	近日発売

第24回

Wako ワークショップ

オートファジー 細胞・個体機能の新たな制御機構 — 基礎から臨床へ —

開催日：平成20年11月6日(木) 10:00~17:10
開催場所：全電通ホール 東京都千代田区神田駿河台3-6
TEL 03-3219-2211

総合企画：順天堂大学大学院 医学研究科神経機能構造学
教授 内山 安男 先生

オーガナイザー：順天堂大 木南 英紀 先生
岡崎基礎生物研 大隅 良典 先生
東医歯大院・医 水島 昇 先生
順天堂大院・医 内山 安男 先生

参加費：無料

定員：300名(申込先着順)

参加申込方法：当社ホームページ

(URL：<http://www.wako-chem.co.jp/>)

よりお申し込み下さい。

お問合せ先：和光純薬工業株式会社 試薬営業本部

学術部 ワークショップ係

TEL：03-3270-8243

講演プログラム

10:00~	開催挨拶	和光純薬
10:05~	はじめに	順天堂大院・医 内山 安男
10:10~	酵母に始まったオートファジーの分子メカニズムの研究	岡崎基礎生物研 大隅 良典
10:50~	オートファジーによるタンパク質代謝の生理的役割	東医歯大院・医 水島 昇
11:30~	選択的オートファジーとその生理的意義	臨床医学総研 小松 雅明
12:10~	(休憩)	
13:10~	心臓におけるオートファジーの役割と病態への関与	阪大院・医 大津 欣也
13:50~	自然免疫応答とオートファジー	阪大・免 斉藤 達哉
14:30~	神経細胞におけるオートファジーの生理と病理	慶大・医 柚崎 通介
15:10~	(休憩)	
15:30~	オートファジーと細胞死	順天堂大院・医 内山 安男
16:10~	“オートファジー”を考える	順天堂大・医 木南 英紀
16:50~	おわりに	順天堂大院・医 内山 安男
17:00~	閉会挨拶	和光純薬

天然物化学者と民族薬物学調査 大黃と芍薬同属植物の成分研究

徳島大学 薬学部 高石 喜久

はじめに

著者は未開拓薬用植物を素材とした新規創薬シード化合物探索研究の一環として、1991年から京都大学の本多教授らとトルコ（4回）、ウズベキスタン（2回）、東京工業大学の藤本教授らと南米コロンビア（3回）、現在は徳島大学薬学部の生薬学教室メンバーらと中国雲南省（6回）を訪問し、伝統薬物情報の収集と成分研究を行っている。年1回は2～8週間の予定で、世界のどこかでフィールドワークを実施していることになる。著者の専門は生薬学に属するが研究面では天然物化学を中心に展開している。本稿ではこの民族薬物学調査とその過程で得られた薬用植物の成分について紹介する。



民族薬物学調査の一場面：お年寄りに薬草の聞き取り調査

民族薬物学調査

最近、民族植物学 (Ethnobotany)、民族薬物学 (Ethnopharmacology) と言う言葉が文献上に使われている。民族植物学の定義は種々あるが、基本的には「植物と伝統的民族社会の相互関係」と解釈される。民族薬物学もこれに準じ、「伝統的民族社会が保持している伝承薬物情報の収集・解析」と解釈される。世界の諸民族はそれぞれ文化、歴史、環境が異なるため、病気治療・健康維持に用いる薬物も独自のものを使用しており、それを民族薬物と言う。民族薬物の中でも有用なものは文明の交流と共に広く世界の市場に出現し、今日流通している生薬、香辛料、ハーブ等として、また一部は医薬品として開発されている。しかし、地球上の資源（植物、動物等）からすると極僅かな伝統薬物が表舞台に出現してい

るに過ぎない。依然として地球上には各民族が伝承してきた貴重な薬物が数多く埋もれている。しかし残念なことに、前世紀末から世界的なグローバル化が進行し、各民族固有の伝統社会が崩壊しつつある。これに伴い各民族が長い時間をかけ伝承してきた民族薬物に関する知恵が失われようとしている。この様な状況に、貴重な人類の遺産である民族薬物の調査、情報収集・解析を行い、文献に残しておこうとする研究が盛んに進められている。論文としてこの情報を残しておくことが可能となる。この様な論文誌として *Journal of Ethnopharmacology* 他が発刊されている。また、*J. Chem. Inf. Comput. Sci* (43巻, 218頁, 2003年) 誌の論文によると、現在流通している医薬品、合成化合物、天然物の3種を構造上の特徴を数値化して、二次元グラフにプロットすると、医薬品及び天然物は同じパターンを示すが、合成品は異なっていることが報告されている。これは天然物が医薬品となる可能性が高いことを示しており、現在使用されている医薬品に天然物をリード化合物としたものが多い事実を考え合わせると、これからの医薬品開発において、民族薬物学からもたらされる情報は更に重要なものとなるだろう。

民族薬物学調査で収集した薬用植物の成分と活性

我々は民族薬物学調査で数多くの材料を入手し、それらの成分と活性についての研究を積極的に進めてきた。その一部を紹介する。

1) マメ科 *Spartium junceum* はトルコの調査で花を胃潰瘍の治療に使用していることが判明した。本植物の花を抽出

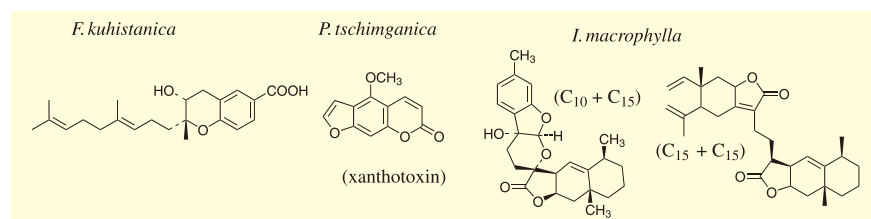
し、胃潰瘍モデル動物実験を指標として活性成分を追求した結果、活性成分としてトリテルペン配糖体を単離した。

2) ジンチョウゲ科 *Daphne oleoides* はトルコでリウマチ痛、腰痛、解熱に民間薬として使用されている。リウマチ症に関与しているサイトカインの1種インターロイキン-1の産生遊離抑制作用を指標として成分検索を進めた結果、活性成分としてジテルペン誘導体2種とクマリン誘導体1種を単離した。

3) セリ科 *Ferula kuhistanica* はウズベキスタンで傷の治療に用いられている。本植物から、抗菌作用を示す新規セスキテルペン1種、新規 *p*-hydroxy benzoic acid 誘導体を多数単離した。これら化合物は抗菌活性を示すことから、現地での使用方法も納得出来る。

4) セリ科 *Prangos tschimganica* はウズベキスタンで白斑病の治療に用いられている。本植物の樹液が皮膚に着くと、皮膚は黒ずみ1週間ほどその色は消えない。本植物から新規クマリン誘導体、新規モノテルペン誘導体を多数単離した。本植物の成分中に xanthotoxin が含まれていた。この化合物は白斑病の治療薬メトキサレンとして市販されており、現地で本植物が使用されているエビデンスを提供するものである。

5) キク科 *Inula macrophylla* はウズベキスタンで広く使用される薬草で、胃潰瘍、リウマチ症などに使用されている。本植物から天然物として珍しい骨格を有する新規化合物（新規骨格セスキテルペン、 C_{10} と C_{15} の2量体、 C_{15} の2量体）を数多く単離し報告 (*Org. Let. T. L*等) した。蛇足であるが、本植物は材料費が安い（現地で50円で購入）にもかかわらず、論文を5報作成でき



民族薬物学調査で収集した薬用植物から単離した成分の例

た。フィールドワークで材料を採集又は購入する時には咄嗟の判断（採集時間が短い、値段が高い、植物名は何か、成分研究はされているのか、材料として面白いかな等）が必要で、その時は天然物屋の勘が働く気がする。この植物はまさに勘が当たったもので、著者に取っては自慢の材料である。



夜なべ仕事：採取した植物を乾燥しやすくするためカット

新しい生薬資源としての可能性を目指して 大黄、芍薬同属植物の成分研究

21世紀に入り医療の分野では代替医療と西洋医療が融合した統合医療が提唱されている。これは①患者中心の医療が求められていること、②欧米諸国を中心として薬草、ハーブ、漢方薬の使用を含む代替医療が盛んとなっていること、③代替医療のエビデンス確立に米国政府が多大な予算を出し研究を推進していること、④欧米諸国、日本を始め諸外国の医療費の高騰に対し政府が国民にセルフメディケーションを求めていることに起因している。

これら時代の流れを考えると生薬の需要は21世紀に入り飛躍的に増大すると考えられる。しかし、一方では生薬生産地における自然破壊、砂漠化が問題となり、中国に於いては生薬輸出を制限する動きが見られている。今後進むと予想される

生薬の需要拡大と供給量の減少を考えると、新しい生薬資源の開発が必須となる。

本研究は民族薬学調査で得られた薬用植物の成分を検索し、現在使用されている生薬との同等性、類似性、及び新たな生薬としての可能性を探索研究するものである。

1) *Rheum maximowiczii* の成分と活性

本植物は中央アジアに広く分布するタデ科植物である。タデ科植物には40属、800種の植物が存在し、このうち *Rheum* 属に属する *Rheum palmatum*, *R. tangutium*, *R. officinale* 等は古来から大黄の基源植物として神農本草経に記載されている重要生薬の1つである。*R. maximowiczii* は、ウズベキスタンで瀉下作用を目的に整腸薬として民間で使用されており、大黄と同属植物である。本植物の成分研究は行われていないことより、大黄の代替生薬として使用出来無いかとの可能性を探るために成分検索を開始した。根の成分を検索した結果、大黄に多く含まれているアントラキノン類の含量は少なく、C₆-C₄配糖体が植物乾燥重量中1.6%と異常に多かった。本植物は成分含量からして残念ながら生薬大黄の代替品としては使用できないとの結論に達した。

2) *Paeonia hybrida* の成分研究

Paeonia 属に属する芍薬 (*P. lactiflora*) は根を鎮痙、鎮痛、緩和、収斂を目標に、牡丹 (*P. suffruticosa*) は根皮を駆瘀血、通経、排膿などを目標に中医学、漢方医学において多くの処方に含まれる古来からの要薬である。*P. hybrida* はウズベキスタンで根を神経症や精神不安に対する民間薬として用いている。本植物に関する成分研究はなされ



夜は植物と添い寝：私の寝る場所はどこだ!!

ていないこと、生薬芍薬の代替生薬として使用出来無いかとの可能性を探るため成分検索を開始した。芍薬の含有成分として paeoniflorin が2%以上含まれることが日本薬局方に記載されていることから、この含量をまず測定した。局方の定量法を参考にし、標品の paeoniflorin (和光純薬) を用い定量した結果、本植物根の含量は2.1%であり、局方の基準は超えていた。更に本植物から、paeoniflorin 関連化合物5種を含む新規化合物6種、既知化合物14種を単離した。本植物が生薬芍薬の代用品になるかどうかの結論はこの研究からはまだ判断できない。

おわりに

世界中にはまだまだ未知の薬用植物が沢山存在する。我々が訪問したコロンビアには約5万種以上の植物が存在すると言われており、これら植物の成分はまだ殆ど明らかにされていない。天然物化学者は材料がそこにあると、どんな化合物が入っているのか、どんな作用があるのか、そしてそれは人の病気治療の役に立つ医薬品にならないかと、何時も考えている。地道な研究であるが何時の日かの役に立つものと確信している。

局方生薬試験用



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
019-20851	Albiflorin	局方一般試験法用	20mg	22,000
164-21731	Paeoniflorin	局方生薬試験用 (薄層クロマトグラフィー用)	10mg	13,000
197-13931	Sennoside A	局方生薬試験用 (成分含量測定用・薄層クロマトグラフィー用)	10mg	16,000
194-13941	Sennoside B	局方生薬試験用 (成分含量測定用)	10mg	18,000

microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2 の開発

和光純薬工業株式会社 ゲノム研究所 請川 亮、西部 隆宏

はじめに

microRNA は約22塩基からなる一群の機能性低分子RNAで、遺伝子発現の転写後調節を担うガイド分子として機能しており、幹細胞の多分化能の維持や細胞分化、がん化など種々の生命現象に深く関わっていることが報告されています^{1, 2, 3)}。現在までにヒトやマウスでは1,000種類以上のmicroRNAの存在が報告されており、その数は増加の一途をたどっています。このように機能未知な新規microRNAの同定や機能解析が活発に世界中で行われていることから、microRNA研究が重要な位置付けにあることは言うまでもありません。

細胞中で複数のステップを通して成熟化したmicroRNAはRISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれるタンパク質複合体に取込まれ、その主要コンポーネントであるArgonauteサブファミリータンパク質と結合することが知られています。このArgonauteサブファミリーはヒトで4種類 (hAgo1, 2, 3, 4)、マウスでは5

種類 (mAgo1, 2, 3, 4, 5) 存在し、それぞれがユビキタスに発現しています⁴⁾。また一群のArgonauteサブファミリータンパク質の中で発現量が最も多いのはAgo2で、唯一標的RNAを切断する slicer 活性を有していることから、microRNAパスウェイにおいて中心的な役割を担っていると考えられています⁵⁾。以上の知見からAgo2タンパク質に結合したmicroRNAを特異的に精製することは、microRNAの機能解明や新規microRNAを同定する上で重要な技術と考えられます。

細胞株からの microRNA 精製

今回開発した microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2 は高性能な抗マウス Ago2 モノクローナル抗体を用いた免疫沈降法によって、Ago2 タンパク質に結合した microRNA を高純度に精製することができます。本キットを用いてヒト細胞株 (HeLa)、マウス細胞株 (P388D1)、チャイニーズハムスター細胞株 (CHO) 及びラット細胞株 (PC-12) から microRNA 精製を

行った結果、げっ歯類細胞株から高純度に microRNA を取得できることが示されました (図1)。さらに、精製した RNA 画分をクローニングした結果、rRNA や tRNA など由来する分解産物の混入がほとんどなく、高純度に microRNA が含まれていることが示されました (図2)。以上から本キットを用いることで電気泳動によるサイズ分画をすることなく効率良く簡単に microRNA をクローニングできることが示されました。

組織からの microRNA 精製

次に本キットを使用してマウス組織からの microRNA 精製を試みました。マウスから肺、肝臓、脳を摘出し、キット添付の Cell Lysis Solution とテフロンホモジナイザーを使用して各組織から組織抽出液を調製しました。その組織抽出液から本キットプロトコルに従って microRNA 精製を行ったところ、使用した3種の組織すべてから高純度の microRNA が精製できることが示されました (図3)。

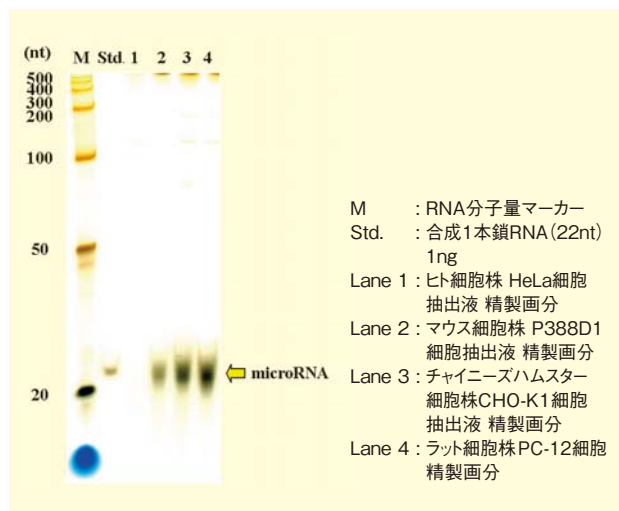


図1. 培養細胞株からの microRNA 精製

microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2 を用いて、ヒト培養細胞 (HeLa) 及びげっ歯類培養細胞株 (P388D1, CHO-K1, PC-12) から精製した microRNA 画分を Urea-PAGE 後、銀染色によって検出した。その結果、3種のげっ歯類細胞株特異的に microRNA 精製が可能であることが示された。使用細胞数は 5×10^6 cells 相当。

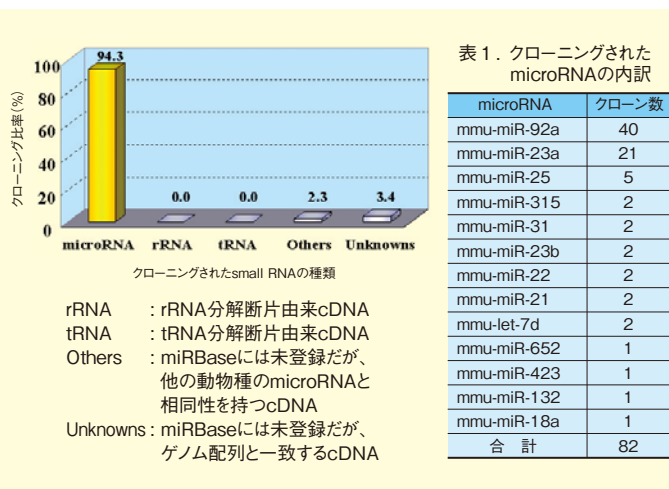


図2. P388D1 細胞から精製した microRNA 画分のクローニング

microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2 を用い、マウス細胞株 P388D1 細胞から microRNA 画分を精製した後、microRNA Cloning Kit Wako (コード No.290-66501) を使用して small RNA のクローニング及びその分布を解析した。ランダムに選抜した 87 クローンの塩基配列を解読し、データベース (miRBase) と照合した結果、87 クローン中 82 クローン (全体の 94.3%) が microRNA であることを確認した。82 クローンの内訳は表1に示した。

以上のことから microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2 は培養細胞のみならず動物組織からも高純度な microRNA を精製することが可能であり、げっ歯類の発生分化過程における microRNA 解析や siRNA 創薬における薬物動態解析などにも利用できる有用なツールになるものと考えられます。

【参考文献】

- 1) Kloosterman, W. P. and Plasterk, R. H. : *Dev. Cell*, **11**, 441 (2006).
- 2) Bushati, N. and Cohen, S. M. : *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **23**, 175 (2007).
- 3) Houbaviy, H. B., Murray, M. F. and Sharp, P. A. : *Dev. Cell*, **5**, 351 (2003).
- 4) Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S. and Shimizu, N. : *Genomics*, **82**, 323 (2003).
- 5) Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. and Tuschl, T. : *Mol. Cell*, **15**, 185 (2004).

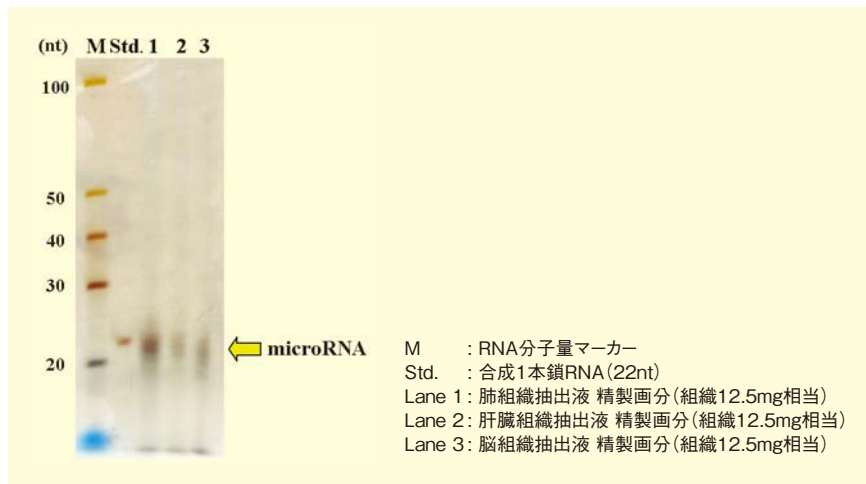


図3. マウス組織からの Ago2 免疫沈降及び microRNA 精製
microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2 を用いてマウス組織から microRNA 精製を行った。各組織から抽出した溶解液から microRNA 精製を行い、Urea-PAGE による分離及び銀染色による核酸検出を行った。その結果、肺、肝臓及び脳組織から microRNA が精製できることが示された。使用した各組織は湿重量 25mg。

Products



Argonaute2 (Ago2) 結合性 microRNA 精製キット

microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2

microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2 は、高品質の抗マウス Ago2 モノクローナル抗体を利用した免疫沈降法により、microRNA-Ago2 複合体を回収し、microRNA を簡便かつ高効率に精製するキットです。

特長

- マウス、ラット、ハムスター Ago2 の免疫沈降が可能
- Ago2 タンパク質に結合した microRNA を高純度に精製可能
- rRNA や tRNA の分解産物や他の small RNA などの夾雑が少ない
- 精製した microRNA 画分をクローニングやマイクロアレイに応用可能



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
292-67301	microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2	遺伝子研究用	10 回用	45,000
014-22023	Anti Mouse Ago2, Monoclonal Antibody	免疫化学用	50 μl	30,000
018-22021			100 μl	50,000
011-22033	Anti Human Ago2, Monoclonal Antibody*	免疫化学用	50 μl	30,000
015-22031			100 μl	50,000
292-66701	microRNA Isolation Kit, Human Ago2	遺伝子研究用	10 回用	45,000
290-66501	microRNA Cloning Kit Wako	遺伝子研究用	8 回用	63,000
298-65103	Single Strand DNA Ligase, thermostable, recombinant, Solution	遺伝子研究用	200units	43,000
292-65101			500units	87,000

* Anti Human Ago2, Monoclonal Antibody のコード No. を変更しました。
旧コード No. 016-20861 (50 μl) → 新コード No. 011-22033 (50 μl)。

はじめに

糖類に代表されるポリオール類は複数の環境の異なる水酸基を持っている。これらの内、特定の水酸基を直接官能基化することは極めて困難である。糖類の合成は盛んに研究されているが、通常保護—脱保護操作を駆使して行われており、位置選択的官能基化は合成技術の進んだ現在でも酵素法の独壇場と言える。これは丁度、十数年前のラセミ体アルコールのアシル化による速度論的分割の状況に似ている。触媒的な速度論的分割が不斉合成研究の中で遅れをとっていたのは、反応点（酸素原子）に隣接する炭素のキラリティーを触媒分子が識別して反応（アシル化）を起こす必要があったためである（図1）。しかし1996年にVedjesら¹⁾、折山ら²⁾、1997年にはFuら³⁾、著者ら⁴⁾が高選択的の不斉アシル化を起こす人工の触媒を報告した。その後この分野は大きく発展し、非酵素法によるラセミ体アルコールの速度論的分割は今やあたりまえとなった。即ち、反応点に隣接する炭素原子のキラリティーを識別する触媒設計は現在では困難ではない。一方、グルコース誘導体の位置選択的アシル化では、

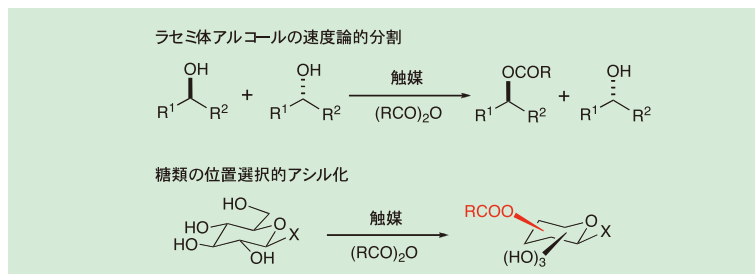


図1.

環境の異なる4つの水酸基を識別しなければならぬ。これには前者の触媒設計に比べて格段に困難である。本稿では糖類の位置選択的アシル化の現状、及び我々の開発した触媒を用いる単糖類の位置選択的アシル化のscope and limitation、さらに反応機構について述べる⁵⁾。

グルコース誘導体のアシル化の位置選択性

グルコース誘導体のアシル化では、最も反応性の高い6位1級水酸基へのアシル化は酵素法により100%の位置選択性で達成されるが⁶⁾、ジアシル化を起こさずモノアシル化に留める制御が困難である（図2）。一方、無保護の1級水酸基存在下での2級水酸基選択的アシル化はさらに困難で、最高で61%の選択性が報告されていた⁷⁾。

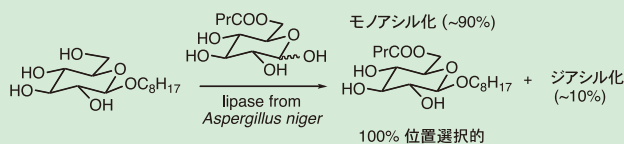


図2.

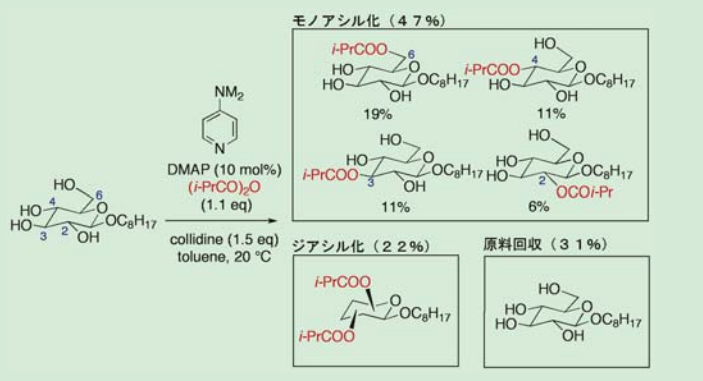


図3.

さて、4つの水酸基を持つグルコース誘導体を最も代表的なアシル化触媒である4-ジメチルアミノピリジン（DMAP）を用いてアシル化するとどうなるだろうか？（図3）モノアシル化はトータル47%収率で、6位1級水酸基へのアシル化がやや優先するものの、選択性は皆無に等しい。原料回収が31%ある状態で、ジアシル化が22%も進行する。これは触媒DMAPに分子認識能がなく、それぞれの水酸基の反応性の差に依存して反応が起こった結果である。そこで我々は分子認識能を持つアシル化触媒を開発すれば位置選択性の制御が可能になると考え、触媒1を開発した（図4）。触媒1はグルコース誘導体の4つの水酸基を厳密に見分けて、反応性の高い6位1級水酸基ではなく、本来反応性の低い4位の2級水酸基のみでアシル化を起こす。これと同じ分子変換を従来法で行えば5工程を要し、総収率も46%と一段階触媒法の半分以下である。

さらに興味深いことに、触媒1の存在下に第1級アルコールである1-フェニルエタノールとグルコース誘導体との競争的アシル化を行うと、前者は全くアシル化を受けず、後者のみが、しかも4位選択性を保持しながらアシル化を受ける（図5）。つまり、本アシルは加速性を伴って進行することがわかる⁵⁾。

触媒1の設計と選択的アシル化の反応機構

次に、このような高度な分子認識を伴った分子変換を可能にする触媒1の設計とその機構について述べる⁵⁾。触媒1は高活性アシル化触媒である4-ピロリジノピリジン（PPY）を活性中心とし、グルコース認識

側鎖として2つのトリプトファン部分を持つ。オクチルエステルは水素結合が有効に働くよう(本触媒の基質認識は水素結合形成に基づいて設計している)、非極性溶媒中での溶解性向上を意図して導入した。勿論、1以外の触媒も種々合成し検討したが、紙面の都合から主に1について述べる。トリプトファン側鎖を持つ触媒1を用いると、常温(20℃)の反応でも2級水酸基である4位のアシル化が主反応となる(Table 1, entries 1~3)。溶媒効果が大きく $\text{CHCl}_3 > \text{トルエン} > \text{THF}$ の順で4位選択性が高く、 CHCl_3 中では4位選択性が91%に達し、ジアシル体の生成(4%)と原料回収(3%)も抑制される(entry 2)。このようにアシル化の位置選択性はモノアシル化/ジアシル化の比と連動している。一方、DMFを溶媒に用いた場合は6位1級水酸基へのアシル化が主反応となり、原料回収(21%)を伴う状態でもジアシル化(26%)が多く進行し、分子認識能を持たないDMAP触媒と類似の反応性を示すようになる。低極性溶媒中で触媒1が良い位置選択性を示すことから、触媒1の分子認識能は水素結合に由来すると推定できる。次に温度効果を検討した。0℃での反応では位置選択性(98%)やモノアシル化の選択性(97%)が20℃での反応に比べて向上した(entries 2 vs. 5)。0℃の反応で触媒量を1 mol%に減らすと位置選択性は若干低下するが(96%, entry 6)、-20℃での反応では1 mol%の触媒量でもジアシル化や原料回収は見られず、4位のアシル化が99%の選択性で進行した(entry 7)。10 mol%の触媒1を用いる-50℃での反応では完全な選択性でアシル化が進行し、4位アシル体のみが得られた(entry 8)。これらの溶媒効果は選択性発現に水素結合が関与すること、また温度効果は選択性発現にエントロピー項の寄与が大きいことを示唆している。以上より、本触媒を用いるアシル化の遷移状態では多重水素結合の関与が推定される(図8)。

一方で、この4位選択的アシル化は、まず反応性の高い6位1級水酸基のアシル化が起きた後、4位に転移した結果とも考え

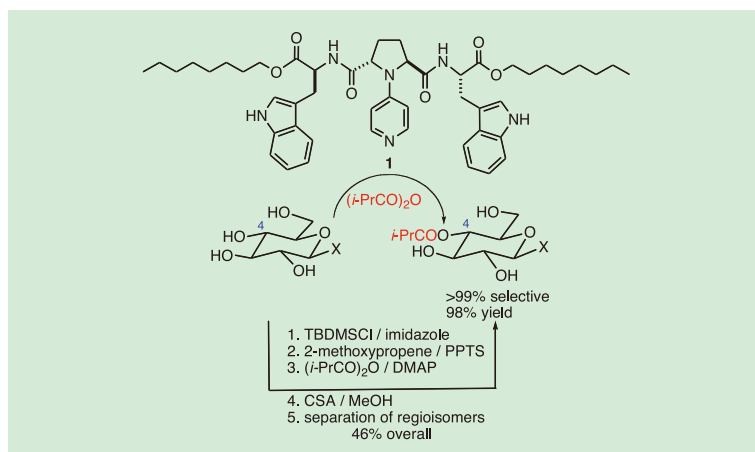


図4. 触媒1は糖の4つの水酸基を厳密に見分けて、本来反応性の低い4位でのみアシル化を起こす。ジアシル化は起きない。同じ分子変換を従来の保護-脱保護法で行うと5工程を要し、収率も46%と低い。

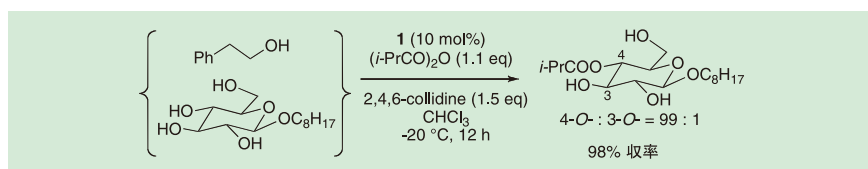


図5. 第1級アルコールとグルコース誘導体の競争的アシル化: 触媒1の存在下にはグルコース誘導体の4位2級水酸基へのアシル化が進行する。

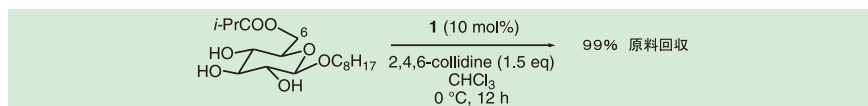


図6. 6位アシル体から4位への転移は全く見られない。

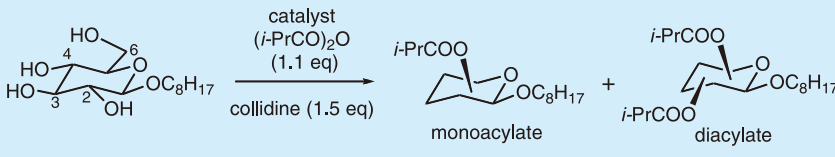
られる。そこで6位アシル体を別途合成し、同反応条件に付したが、6位アシル体が99%回収され、4位への転移は全く観察されなかった(図6)。即ち、このアシル化は触媒1の作用により直接4位で起こることがわかった。

さてなぜ、この反応では通常最も反応性の高い6位1級水酸基がアシル化されないのだろうか? 我々は「6位1級水酸基が先ず、触媒と水素結合を形成することが選択性発現の鍵を握る」と仮定して本触媒を設計した。そこでこの仮説を検証するため、6位1級水酸基をメチル基で保護した基質を別途合成し同反応条件に付したところ、非選択的なアシル化が見られた(図7)。つまり6位1級水酸基は触媒1存在下での選択性発現に必須であることがわかった。また6位水酸基は触媒との水素結合により反応点(アシルピリジニウムイオンのアシ

ル基)から離れて位置するため、アシル化を受けないと推測される。

触媒1のインドールNH基の作用を調べる目的で、そのN-Me体である触媒2を用いて同反応を行った(Table 1, entry 9)。4位アシル化が主反応であるものの(60%)、その選択性は低下した(entries 5 vs. 9)。このことはインドールNHが基質との水素結合に関与することを示唆している。以上の結果を踏まえ、触媒1による選択的アシル化の可能な機構を図8のように考えた。(1) 触媒1とイソ酪酸無水物からアシルピリジニウム中間体が生成する。(2) この中間体で比較的強い水素結合アクセプターであるアミドカルボニルが、基質の水酸基の中で最も反応性の高い6位1級水酸基と水素結合を形成する。(3) その結果、触媒側鎖のインドールNHが基質の3位水酸基に近接し新たな水素結合を形成する、(4) こ

Table 1. グルコース誘導体の位置選択的アシル化



entry	catalyst (mol%)	solvent	temp (°C)	monoacylate (%)	regioselectivity				diacylate (%)	recovery (%)
					6-O	4-O	3-O	2-O		
1	1 (10)	toluene	20	84	11	86	3	<1	12	2
2	1 (10)	CHCl ₃	20	90	4	91	5	0	4	3
3	1 (10)	THF	20	51	27	51	22	<1	28	16
4	1 (10)	DMF	20	46	63	12	24	1	26	21
5	1 (10)	CHCl ₃	0	97	0	98	2	0	2	0
6	1 (1)	CHCl ₃	0	97	2	96	2	0	2	<1
7	1 (1)	CHCl ₃	-20	98	0	99	1	0	0	0
8	1 (10)	CHCl ₃	-50	98	0	>99	<1	0	0	0
9	2 (10)	CHCl ₃	0	69	14	60	26	0	20	8
10	3 (10)	CHCl ₃	0	62	13	66	20	1	13	22

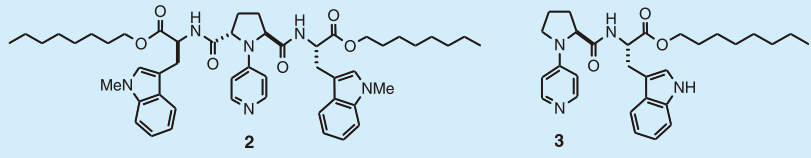
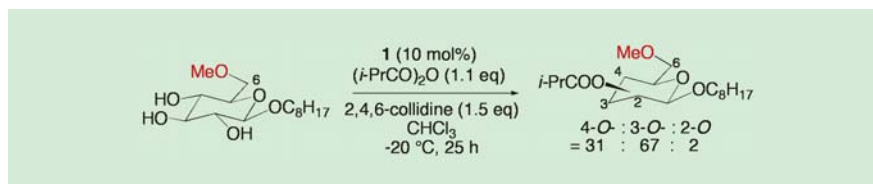



図7. 6位水酸基を保護すると触媒1を用いても非選択的アシル化が進行する。

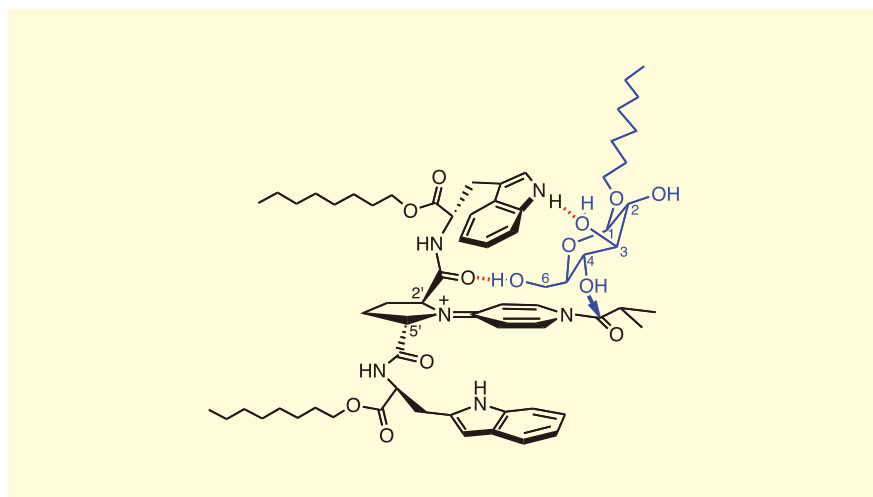


図8. 触媒1による選択的アシル化の可能な機構：触媒分子と基質の糖（青）との間の2つの水素結合（赤）が有効に働いている。

これらの多重水素結合により基質の配座が固定され、4位水酸基がアシルピリジニウムイオンのアシル基に近接する結果、選択的アシル化を受ける。この機構は仮説の域を超えないが、水素結合形成による遷移状態安定化は反応加速性（図5）とも符合する。図8は基質分子が触媒1の上部から接近した場合を図示したもので、この時、基質分子は2'位の側鎖により認識される。一方、基質分子が触媒の下部から接近する場合は、5'位の側鎖が基質認識を担当する。触媒1がC₂対称性を持つため、両方向からの基質の接近は同じ遷移状態に至るため、高選択的なアシル化が進行する。一方、触媒1と同じ側鎖を2'位でのみ持つ触媒3では、基質が2'位の方向から接近すると高選択的なアシル化を起こすが、逆方向から接近すると非選択的アシル化が起こると考えられる。この結果、触媒3では4位選択性がみられるものの、その程度が低下したと理解できる（Table 1, entries 5 vs. 10）。

単糖類のアシル化の位置選択性

触媒1はグルコース誘導体の4つの水酸基を見分け、基質本来の持つ反応性を逆転させた上で、ただ一つの水酸基とのみ反応を起こす。この特性の一般性を調べた（図9）。Octyl β-D-glucopyranosideの無水イソ酪酸を用いるアシル化は98%収率で完璧な4位選択性で進行する（Table 1, entry 8、及び図9）。より一般的なアセチル化は96%収率、96%の4位選択性で進行した。糖鎖合成のグリコシルドナーとして利用可能な octyl β-D-thioglucopyranosideでもイソブチリル化、アセチル化共に高い4位選択性（95～97%）かつ高収率（92～99%）で進行した。一方、α-グリコシドである octyl α-D-glucopyranosideでは4位のアシル体が主生成物ではあるものの、位置選択性（54%）、収率（75%）ともに低下した。2位水酸基がアキシアル配置をとる octyl β-D-mannopyranosideでは高い4位選択性（85%）でアシル化が進行する。一方、4位水酸基がアキシアル配置をとる octyl β-D-galactopyranosideでは様相が一変し、

4位アシル化は全く見られず、6位アシル化が主に進行した(91%選択的)。

おわりに

グルコース誘導体の4位選択的アシル化を可能にする触媒開発について述べた。糖類に代表されるポリオール類への位置選択的な置換基導入は現在でも極めて困難である。本触媒は一般性には欠けるものの、グルコース誘導体の4位選択的アシル化を完全な選択性で起こすことのできる唯一の触媒である。本稿では4位の選択的保護についてのみ述べたが、本触媒はグルコース4位への種々の官能基化が可能で、本触媒を用いる配糖体の短段階合成への応用を現在検討している。

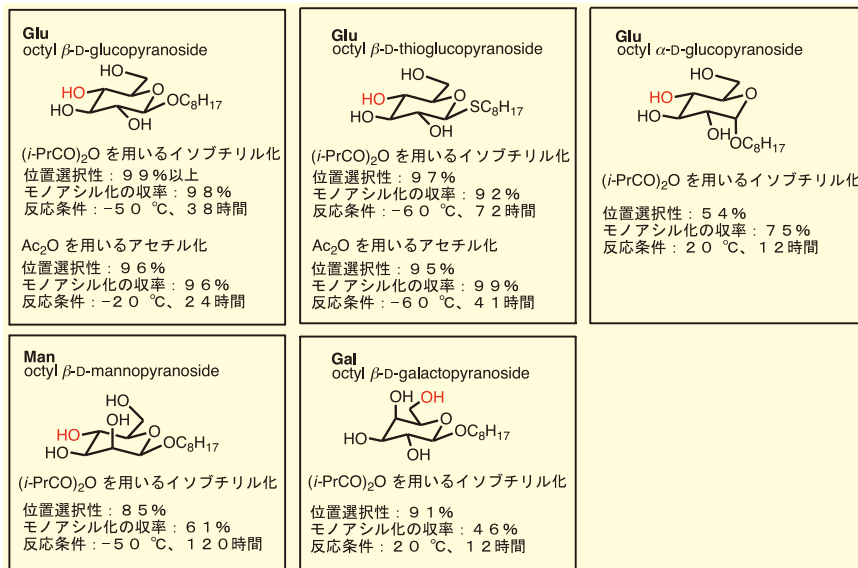


図9. 種々の単糖類の位置選択的アシル化(反応条件: 触媒 1 (10 mol%), CHCl₃ 中、2,4,6-collidine (1.5 eq)): 主にアシル化を受ける水酸基を赤で示した。

【参考文献】

- 1) Vedjes, E., Daugulis, O. and Diver, S. T. : *J. Org. Chem.*, **61**, 430 (1996).
- 2) Oriyama, T., Hori, Y., Imai, K. and Sasaki, R. : *Tetrahedron Lett.*, **37**, 8543 (1996).
- 3) Ruble, J. C., Latham, H. A. and Fu, G. C. : *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 1492 (1997).
- 4) Kawabata, T., Nagato, M., Takasu, K. and Fuji, K. : *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 3169 (1997).
- 5) Kawabata, T., Muramatsu, W., Nishio, T., Shibata, T. and Schedel, H. : *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 12890 (2007).
- 6) (a) Therisod, M. and Klivanov, A. M. : *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3977 (1987). (b) Björkling, F., Godtfredsen, S. E. and Kirk, O. : *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 934 (1989).
- 7) (a) Kurahashi, T., Mizutani, T. and Yoshida, J. : *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 465 (1999). (b) Kurahashi, T., Mizutani, T. and Yoshida, J. : *Tetrahedron*, **58**, 8669 (2002). (c) Griswold, K. S. and Miller, S. J. : *Tetrahedron*, **59**, 8869 (2003). (d) Kattinig, E. and Albert, M. : *Organic Lett.*, **6**, 945 (2004).

Products 選択的アシル化触媒



本品は、選択的にグルコース誘導体の4位をアシル化できる触媒です。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
119-00781	Kawabata Acylation Catalyst [2', 5'-[4-(<i>N</i> -Pyrrolidiny)pyridine] bis[(2-acetylamido)-3-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)]propionic Acid Octyl Ester]	有機合成用	50mg	18,000

お知らせ

アクロモペプチダーゼについて

当製品について、菌発見当時の生理的・形態学的性質の知見から、由来は *Achromobacter lyticus* と表示させていただいておりましたが、近年の細菌分類学に基づいた再同定の結果、由来は *Lysobacter enzymogenes* であると結論いたしました。当製品の生産菌に関する記載ミスによりご迷惑をおかけしましたことをお詫びいたします。

なお、粗精製品には、生産菌由来のDNAが含まれておりますので、ご使用にあたりましてはご留意下さい。

コードNo.	品名	規格	容量
015-09951	Achromopeptidase [®] , Purified, Lytic Enzyme (TBL-1)	生化学用	100,000units
014-09661	Achromopeptidase [®] , Crude, Lytic Enzyme (TBL-1)	生化学用	1g

アルコール酸化触媒

Wako

2-アザアダマンタン-N-オキシド [AZADO]

アルコール類の酸化反応は、医薬、農薬、電子材料など幅広い分野の有機化合物の合成に利用されています。2-Azaadamantane-N-oxyl (AZADO) は堅牢なアダマンタン骨格を持つニトロキシルラジカル型の超高活性なアルコール酸化触媒です。

特長

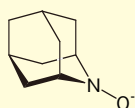
● 超高活性

触媒量：0.01 mol% (TEMPOの20倍以上)

● 立体障害の大きい2級OH基の酸化が可能

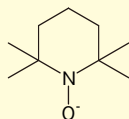
従来、酸化反応には、クロム酸、超原子価よう素試薬 (IBX酸化、Dess-Martin酸化)、ルテニウムなどが用いられていますが、これらは安全性・操作性の面で問題を抱えています。また、ニトロキシルラジカル型の酸化触媒としてTEMPO[2,2,6,6-tetramethyl 1-piperidinyloxy]が知られていますが、かさ高い2級アルコール類の酸化を苦手とする他、派生したオキソアンモニウムイオンが塩基性条件下では分解することが知られています。

AZADOは、TEMPOと比較して、極めて高い触媒活性を発揮する他、立体障害の大きいアルコールに対しても有効に作用します。加えて、アダマンタン骨格の堅牢性から強度が向上し、耐久性も期待できます。



$C_9H_{14}NO = 152.21$

2-Azaadamantane-N-oxyl (AZADO)



$C_9H_{16}NO = 156.25$

2,2,6,6-tetramethyl 1-piperidinyloxy (TEMPO)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
014-22001	2-Azaadamantane-N-oxyl	有機合成用	100mg	8,000

関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
132-15261	1-Methyl-2-azaadamantane-N-oxyl	有機合成用	100mg	8,500
138-15263			500mg	29,000

シグナル伝達研究に！

Wako

PP2A関連 新製品

プロテインホスファターゼ2A (PP2A) は、セリン/スレオニンホスファターゼの一つであり、ホスホリラーゼキナーゼαサブユニットの脱リン酸化に関与する酵素です。細胞周期、増殖、分化などの細胞内プロセッシングに関わる生体内シグナル伝達に重要な役割を果たしており、カンタリジン、カリクリンA、オカダ酸、トートマイシンなどによって阻害されます。

■ プロテインホスファターゼ2A二量体, ヒト, 組換え体, 溶液

本品は、PP2Aの二量体であり、触媒活性をもつCサブユニットと、調節機能をもつAサブユニットから構成されています。

構成

- Protein Phosphatase 2A dimer, Human, recombinant, Solution 50units × 1本
- Enzyme Dilution Buffer 1.0ml × 1本

由来：Human PP2A dimer expressed in baculovirus-infected High Five cell

活性：1.15units/μl (初回ロット実績値)

活性の定義：1unitは、*p*-ニトロフェニルりん酸 (pNPP) を基質としてpH 8.4、30℃において1分間に1nmolの*p*-ニトロフェノールを生成する酵素量とする。

形状：20 mmol/l MOPS (pH 7.5), 150mmol/l NaCl, 1mmol/l EGTA, 1mmol/l DTT, 60mmol/l 2-Mercaptoethanol, 1mmol/l MgCl₂, 0.1mmol/l MnCl₂, 50% Glycerol

Enzyme Dilution Buffer：20 mmol/l MOPS(pH 7.5), 150mmol/l NaCl, 1mmol/l EGTA, 1mmol/l DTT, 60mmol/l 2-Mercaptoethanol, 1mmol/l MgCl₂, 0.1mmol/l MnCl₂, 0.1mg/ml BSA, 10% Glycerol

■ カンタリジン

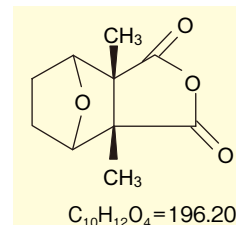
PP2Aの阻害剤 (IC₅₀ = 40nmol/l) です。高濃度では、PP1も阻害 (IC₅₀ = 473nmol/l) します。

由来：Mylabris phalerata

含量 (HPLC)：100.0% (初回ロット実績値)

乾燥減量：1.0%以下

アセトン溶状：試験適合 (50mg + アセトン5ml)



$C_{10}H_{12}O_4 = 196.20$

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
167-23281	Protein Phosphatase 2A dimer, Human, recombinant, Solution	細胞生物学用	50units	40,000
036-20461			25mg	4,000
032-20463	Cantharidin	細胞生物学用	100mg	12,000
030-20464			500mg	48,000

関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
038-14453	Calyculin A	生化学用	10 μ g	11,000
032-14451			100 μ g	30,000
150-01653	Okadaic Acid	生化学用	25 μ g	10,500
154-01651			100 μ g	30,000
156-02211	Okadaic Acid Ammonium Salt	生化学用	100 μ g	20,000
152-02213			500 μ g	75,000
159-02441	Okadaic Acid Sodium Salt	生化学用	100 μ g	20,000
209-12041	Tautomycin	生化学用	100 μ g	31,000

骨代謝の研究に！



TRAP/ALP 染色キット

正常な骨代謝は骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収のバランスの上に成り立っていますが、このバランスが崩れ、破骨細胞の骨吸収が異常に亢進すると骨量が低下し、骨粗鬆症につながります。そのため、破骨細胞と骨芽細胞の代謝を制御する薬剤の開発が、これらの疾患の治療に有効と考えられ、さまざまな研究が行われております。

現在、骨芽細胞のマーカー酵素としてはアルカリホスファターゼ（ALP）が、破骨細胞のマーカー酵素としては酒石酸耐性酸性ホスファターゼ（TRAP）が知られており、組織切片あるいは培養細胞における、骨芽細胞、破骨細胞の存在を示す一つの指標として用いられております。

本キットは、骨組織切片及び培養骨細胞のALP・TRAP酵素活性の染色に使用されます。骨芽細胞や破骨細胞の染色像を観察することにより、細胞の分化状態や、骨組織における分布を調べる事が可能です。

特長

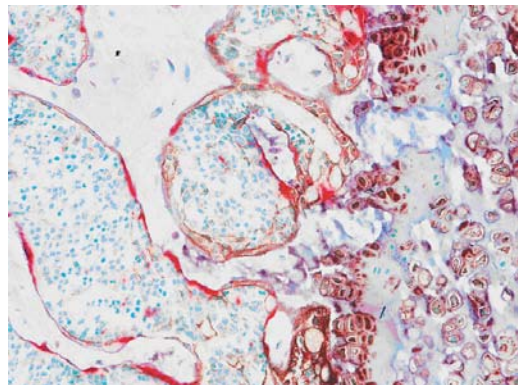
- 2液を混合するだけで、酸性ホスファターゼの酵素活性染色用発色基質液が調製できる（酒石酸耐性評価を行う場合は3液を混合）
- アルカリホスファターゼの酵素活性染色はプレミックス基質液を使用し、簡単に行うことができる
- 酸性ホスファターゼの活性部位を赤紫色に、アルカリホスファターゼの活性部位を青色～茶色がかった青色に2重染色できる
- 培養細胞、骨組織切片（GMA樹脂包埋切片）に使用できる

キット内容

- 酒石酸溶液（×10） 3ml × 1本
- 酸性ホスファターゼ基質液A 30ml × 1本
- 酸性ホスファターゼ基質液B 0.3ml × 1本
- 核染色試薬 10ml × 1本
- アルカリホスファターゼプレミックス基質液 30ml × 1本

データ

骨組織切片のALP及びTRAP酵素活性の染色



標本：マウス 脊髄骨非脱灰GMA樹脂包埋2ミクロン切片
（染色写真ご提供先：河原 元先生）

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
294-67001	TRAP/ALP Stain Kit	病理研究用	60回用*	25,000

※本品は培養細胞では24ウェルマルチプレート5回用、96ウェルマルチプレート6回用、骨組織スライド（1スライドあたり500 μ l使用として）で60枚用に相当

細胞培養のコンタミネーション防止や細胞の選抜に Wako

抗生物質溶液 新製品

各種抗生物質の溶液タイプです。細胞培養時のコンタミネーションの防止や細胞の選抜などにご利用下さい。ろ過滅菌処理されていますので、そのまま液体培地に添加して使用できます。

コード No.	品名					規格	容量	希望納入価格(円)
	活性の対象							
	グラム陽性菌	グラム陰性菌	酵母	カビ	マイコプラズマ			
072-05481	50mg/ml Gentamicin Solution					細胞培養用	10ml	8,000
NEW	●	●			●			
112-00771	50mg/ml Kanamycin Solution					細胞培養用	20ml	5,000
NEW	●	●			●			
161-23201	Penicillin-Streptomycin-L-Glutamine Solution (×100) (Penicillin G 10,000units/ml, Streptomycin 10mg/ml, L-Glutamine 29.2mg/ml)					細胞培養用	100ml	4,000
NEW	●	●						

この他抗生物質の溶液タイプは当社ホームページ(<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/info/bai/article/sosei.htm>)をご参照下さい。

バンドのきれいなプレキャストゲル

スーパーセップ™ エース



本品は、ポリアクリルアミドのプレキャストゲルです。劇物で取扱いに注意を要するアクリルアミドの粉末を使用することなく開封後すぐにSDS-PAGEなどの実験にご利用いただけます。ゲル中にはSDSが含まれていませんのでSDS不含の泳動バッファーを使用することによりNative-PAGEも可能です。



特長

- タンパク質バンドの分離が良い
- ウェル数が13と17でマルチチャンネルピペット対応
- 中性のゲルバッファーにより保存安定性が高い
- リーズナブルな価格

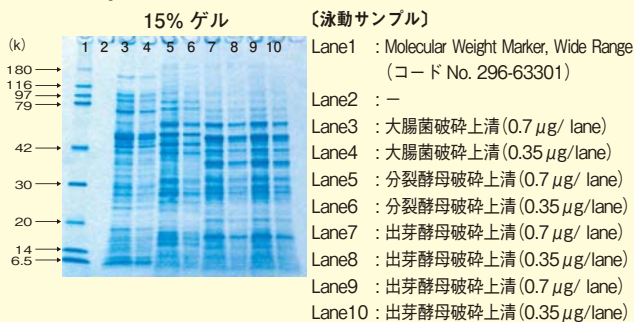
製品仕様

プレートサイズ	100 × 100 × 3 (mm)	
ゲルサイズ	90 × 85 × 1 (mm)	
ウェル数	13	17
ウェル容積 (μl)	30	25
総タンパク質量* (μg)	3.3 ~ 6.5	1.3 ~ 3.9

*きれいに分離できるタンパク質の目安です。

泳動例

CBB染色



13ウェル



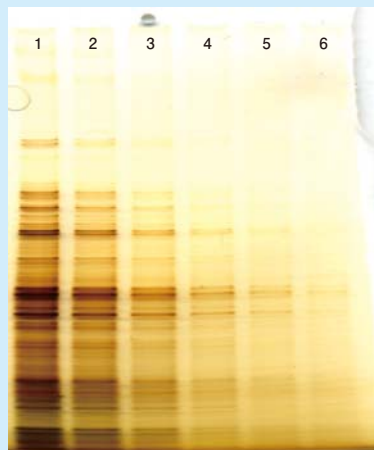
17ウェル



一口メモ

スーパーセップ™ エースを銀染色する時の最適条件

スーパーセップ™ エースを銀染色すると、従来品と比較して少し染まりが悪いとのご指摘がありました。そのような場合には、プロトコルの増感処理を5分から10分に延長していただくと効果的です。現像時間も少し長めの10分くらいが最適です (銀染色Ⅱキットワコー (コード No. 291-50301) の場合)。



【泳動条件】

ゲル : SuperSep™ Ace 5-12%, 13well (コード No.197-15011)

電流 : 20mA/ 枚 定電流

【泳動サンプル】

Lane1 : 大腸菌破碎上清 (0.7 μg/ lane)
Lane2 : 大腸菌破碎上清 (0.35 μg/ lane)
Lane3 : 大腸菌破碎上清 (0.125 μg/ lane)
Lane4 : 大腸菌破碎上清 (0.06 μg/ lane)
Lane5 : 大腸菌破碎上清 (0.03 μg/ lane)
Lane6 : 大腸菌破碎上清 (0.015 μg/ lane)

【プロトコール】

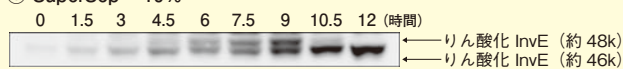
1. 固定液 -1 10min.
- ↓
2. 固定液 -2 10min.
- ↓
3. 増感液 5min. → 10min.
- ↓
4. 洗浄 5min.
- ↓
5. 染色液 15min.
- ↓
6. 洗浄 5min.
- ↓
7. 現像 5min. ~ 10min.
- ↓
- 反応停止 & 洗浄

■ ウェスタンブロット

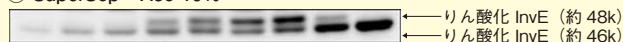
ボルボックス胚の各発生ステージにおけるInvEタンパク質の発現をInvE抗体によりウェスタンブロット解析した。その結果、スーパーセップエースはバンドの形がより真っすぐになり、分子量約48kと約46kの各バンド間の分離が優れていた。

(データご提供先: (独) 理化学研究所 フロンティア研究システム 門田 純 先生)

① SuperSep™ 10%

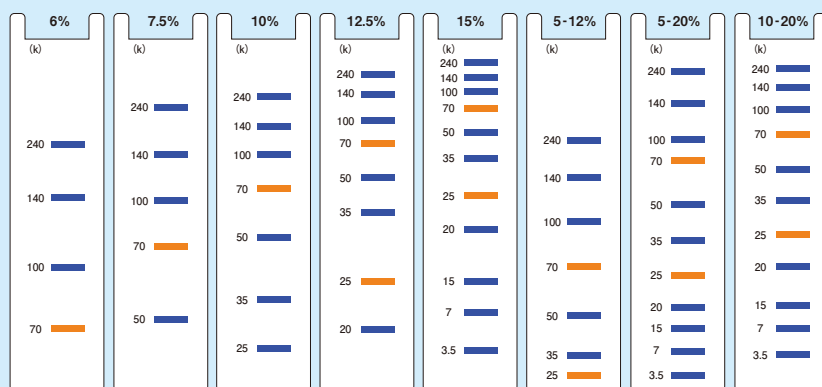


② SuperSep™ Ace 10%



参考分離パターン

(WIDE-VIEW™ Prestained Protein Size Marker II (コード No.239-02291) を用いた場合の分離パターン)



コード No.	品 名	ウェル数	容 量	希望納入価格 (円)
195-15171	SuperSep™ Ace 6%	13	10 枚	18,000
198-14941	SuperSep™ Ace 7.5%	13	10 枚	14,000
191-14931		17	10 枚	14,000
195-14951	SuperSep™ Ace 10%	13	10 枚	14,000
192-14961		17	10 枚	14,000
199-14971	SuperSep™ Ace 12.5%	13	10 枚	14,000
196-14981		17	10 枚	14,000
193-14991	SuperSep™ Ace 15%	13	10 枚	14,000
190-15001		17	10 枚	14,000
199-15191	SuperSep™ Ace 5-12%	13	10 枚	18,000
197-15011	SuperSep™ Ace 5-20%	13	10 枚	14,000
194-15021		17	10 枚	14,000
191-15031	SuperSep™ Ace 10-20%	13	10 枚	14,000
198-15041		17	10 枚	14,000
下記の濃度につきましては、従来品スーパーセップをご利用下さい				
191-14791	SuperSep™ 5%	12	10 枚	19,500
199-14611	SuperSep™ 3-10%	12	10 枚	18,000
196-14621		17	10 枚	18,000
195-14691	SuperSep™ 15-20%	12	10 枚	19,500
198-14701		17	10 枚	19,500

関連商品

	コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格 (円)
サンプル バッファー	196-11022	Sample Buffer Solution (2ME+) (× 2)	電気泳動用	25ml	4,500
	191-13272	Sample Buffer Solution (2ME+) (× 4)	電気泳動用	25ml	7,600
	193-11032	Sample Buffer Solution (2ME-) (× 2)	電気泳動用	25ml	4,500
	198-13282	Sample Buffer Solution (2ME-) (× 4)	電気泳動用	25ml	6,800
泳動バッファー	184-01291	Running Buffer Solution (× 10)	電気泳動用	1 l	5,200
	200-17071	Tricine Running Buffer Solution (2ME+) (× 10)	電気泳動用	1 l	14,000
タンパク質 MW マーカー	239-02291	WIDE-VIEW™ Prestained Protein Size Marker II	電気泳動用	500 μl (約 50-100 回用)	20,000
	230-02221	WIDE-VIEW™ Prestained Protein Size Marker	電気泳動用	500 μl (約 50-100 回用)	18,000
	233-02211	WIDE-VIEW™ Western Size Marker	電気泳動用	250 μl (約 50-250 回用)	20,000
泳動槽	058-07681	EasySeparator™	電気泳動用	1 セット	45,000
銀染色キット	299-13841	Silver Stain Kit Wako	電気泳動用	10 枚用	11,500
	291-50301	Silver Stain II Kit Wako	電気泳動用	10 枚用	9,500

microRNA “特異的” 精製キット



マイクロRNA アイソレーションキット, ヒト Ago2

microRNA の標的 mRNA 同定に応用できる実験例の紹介

microRNA Isolation Kit, Human Ago2は、高品質の抗ヒト Ago2モノクローナル抗体を利用した免疫沈降法により、microRNA-Ago2複合体を回収し、microRNAをはじめ Ago2タンパク質結合性RNAを取得するキットです。

近年 Ago2免疫沈降法により得られる RNA 画分には microRNA の標的 mRNA も含まれていることが報告され^{1, 2)}、注目を集めています。当社では microRNA Isolation Kit, Human Ago2を用いて、その可能性を検討しました。

がん遺伝子として知られている RAS 遺伝子 (N-ras, K-ras など) は、mRNA の 3'UTR 領域に let-7 family の標的となるシード配列を有しており、let-7 family による制御を受けていることが報告されています³⁾。そこで、let-7 family の 1 つである let-7a を 2 本鎖 RNA の状態で肝がん細胞株 HuH-7 に導入し、total RNA 及び Ago2免疫沈降 RNA 中の N-ras mRNA 量を定量 PCR 法により調査しました。

原理及びヒト細胞株・組織からの microRNA 抽出例は和光純薬時報 Vol. 76, No 3, 12 頁または <http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/info/gene/article/microRNAIsolationKit.htm> をご参照下さい。

[Ago2免疫沈降 RNA 中の標的 mRNA 検出]

実験概要

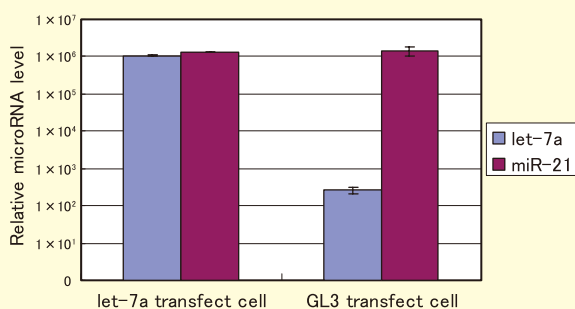
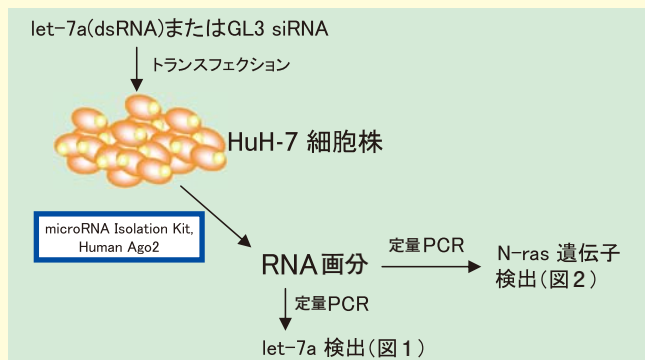


図 1. let-7a 導入細胞から精製した Ago2 免疫沈降 RNA 中の microRNA 量

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

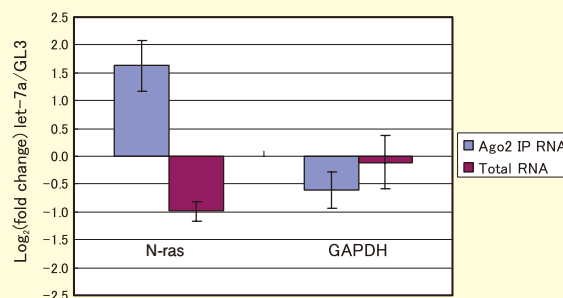


図 2. let-7a 導入による標的 mRNA 量変化

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

この実験から特定の microRNA を過剰発現させることで microRNA とその標的 mRNA が Ago2 免疫沈降 RNA 中に特異的に濃縮されることが示され、Ago2 免疫沈降法により microRNA とその標的 mRNA が共沈することが示されました。

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

[参考文献]

- 1) Beitzinger, M., Peters, L., Zhu, J. Y., Kremmer, E. and Meister, G. : *RNA Biol.*, 4(2), 76-84 (2007).
- 2) Karginov, F. V., Conaco, C., Xuan, Z., Schmidt, B. H., Parker, J. S., Mandel, G. and Hannon, G. J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 19291-19296 (2007).
- 3) Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K. L., Brown, D. and Slack, F. J. : *Cell*, **120**, 635-647 (2005).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
292-66701	microRNA Isolation Kit, Human Ago2	遺伝子研究用	10 回用	45,000
011-22033*	Anti Human Ago2, Monoclonal Antibody	免疫化学用	50 μ l	30,000
015-22031			100 μ l	50,000
290-66501	microRNA Cloning Kit <i>Wako</i>	遺伝子研究用	8 回用	63,000
298-65103	Single Strand DNA Ligase, thermostable, recombinant, Solution	遺伝子研究用	200units	43,000
292-65101			500units	87,000

* Anti Human Ago2, Monoclonal Antibody のコード No. を変更しました。
旧コード No.016-20861 → 新コード No.011-22033 (50 μ l)

待望のマウスAgo2抗体 免疫沈降、ウエスタンブロット、免疫染色に使用可能



抗マウス Ago2, モノクローナル抗体

Argonaute2 (Ago2) は、RNAi 経路において、標的 mRNA へのガイド分子となる siRNA や microRNA に結合し、標的 mRNA の認識、切断を行う RISC (RNA-induced silencing complex) の主要コンポーネントとして同定されたタンパク質です。

特長

- 免疫沈降、ウエスタンブロット、免疫染色に使用可能
- マウス、ラット、ハムスターの Ago2 に交差性を示す
- 免疫沈降により RISC に取込まれた microRNA を精製可能

組成：0.05% Sodium Azide, 10% Glycerol, TBS 溶液, pH 7.4
クローン No.：2D4

サブクラス：IgG₁

抗原：マウス Ago2 N 末端領域の合成ペプチド

保存条件：2 ~ 10°C ・遮光保存, 凍結融解の繰り返しはお避け下さい。

性能

推奨使用濃度

使用用途	希釈倍率
ウエスタンブロット	1 : 200 - 1 : 1,000
免疫沈降	5 ~ 10 μ g / IP
免疫染色	1 : 100 - 1 : 500

交差性

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

NT : Non Tested

使用例

マウス細胞株 P388D1 からの mAgo2 の免疫沈降

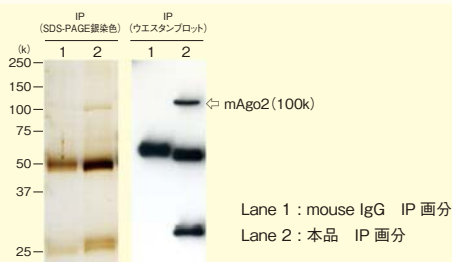


図1. マウス細胞株 P388D1 の細胞溶解液に、本品 5 μ g を固相化した 10% Protein G slurry を 20 μ l 添加し免疫沈降を行った。得られた免疫沈降画分を SDS-PAGE に供し、銀染色及び本品を一次抗体として用いたウエスタンブロットを行った。その結果、ともに 100k 付近に内在性マウス Ago2 のバンドが確認された。使用細胞数は 5 \times 10⁶。ウエスタンブロットの一次抗体希釈倍率は 1/1,000。

げっ歯類細胞株からの Ago2 の免疫沈降

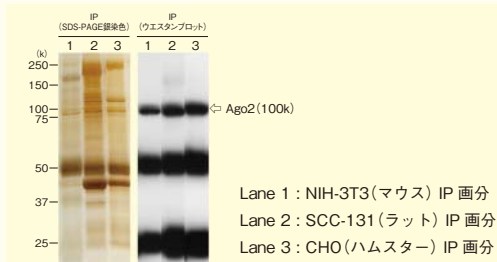


図2. NIH-3T3(マウス)、SCC-131(ラット)、CHO(ハムスター)の細胞溶解液に、本品 5 μ g を固相化した 10% Protein G slurry を 20 μ l 添加し免疫沈降を行った。得られた免疫沈降画分を SDS-PAGE に供し、銀染色及び本品を一次抗体として用いたウエスタンブロットを行った。その結果、マウスだけでなく、ラットとハムスターにおいても 100k 付近に内在性 Ago2 のバンドが確認された。使用細胞数は 5 \times 10⁶。ウエスタンブロットの一次抗体希釈倍率は 1/1,000。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
014-22023	Anti Mouse Ago2, Monoclonal Antibody	免疫化学用	50 μ l	30,000
018-22021			100 μ l	50,000
292-67301	microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2	遺伝子研究用	10 回用	45,000

神経シグナル伝達研究に！ 神経伝達物質 新製品



カルシウムシグナル関連物質

細胞質のカルシウム濃度は、細胞膜上にあるCa²⁺-ATPase、Ca²⁺/Na⁺exchangerによるCa²⁺の細胞外への放出と、小胞体膜上にあるCa²⁺-ATPaseによる小胞体への取込みによって濃度が保たれています。

■ ライアノジン

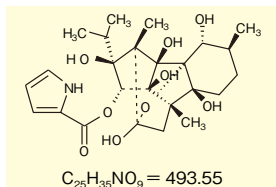
ライアノジン受容体は小胞体上にあるCa²⁺放出チャンネルです。ライアノジンが結合すると開口状態に固定され、小胞体からCa²⁺が漏出すると同時に、細胞内Ca²⁺放出が阻害されます。

含量(HPLC)：98.0%以上

溶状：メタノールに可溶

由来：Ryania speciosa

CAS No.：15662-33-6



■ タブシガルギン

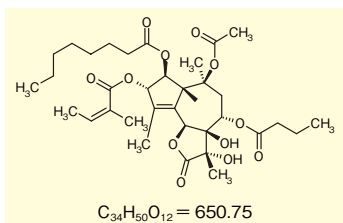
小胞体膜状のCa²⁺-ATPaseを非可逆的に阻害することにより、小胞体へのCa²⁺の取込みが阻害されると同時に、Ca²⁺の小胞体から細胞質への漏出を引き起こします。また、小胞体ストレスによりアポトーシスを誘導します。non-TPA型発がんプロモーターです。

含量(HPLC)：93.3%

(初回ロット実測値)

溶状：アセトニトリル
に可溶

CAS No.：67526-95-8



コードNo.	品名	概要	規格	容量	希望納入価格(円)
181-02281	Ryanodine	ライアノジン受容体 アゴニスト	細胞生物学用	1mg	22,000
187-02283				5mg	88,000
209-17281	Thapsigargin	小胞体膜上のCa ²⁺ - ATPaseを阻害	細胞生物学用	1mg	12,000
205-17283				5mg	48,000

GABA 受容体作用物質

グルタミンが興奮性伝達物質であるのに対し、GABA、グリシンは抑制性伝達物質です。

中枢神経系及び末梢神経系に存在するGABA受容体はAからCまでの3タイプがあり、A型はサブユニットが5個連結して形成されている塩素イオンチャンネルです。GABA_A受容体は抗うつ薬、抗てんかん薬、鎮静剤などの薬のターゲットとして注目を集めています。

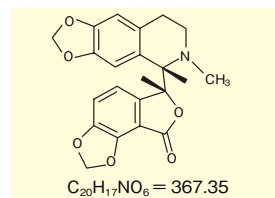
■ (+)-ビククリン

本品はビクシンのラクトンです。けいれん誘発薬として知られています。GABA_A受容体の選択的アンタゴニストです。

含量(HPLC)：98.0%以上

溶状：メタノールに可溶

CAS No.：485-49-4



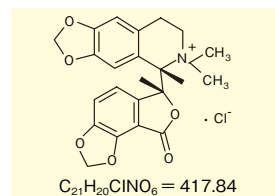
■ (-)-ビククリンメトクロリド

本品は(+)-ビククリンのメトクロリド塩で水溶性タイプです。GABA_A受容体の選択的アンタゴニストです。

含量(HPLC)：98.0%以上

溶状：メタノールに可溶

CAS No.：53552-05-9



コードNo.	品名	概要	規格	容量	希望納入価格(円)
026-16131	(+)-Bicuculline	GABA _A 受容体 アンタゴニスト	細胞生物学用	50mg	9,500
022-16133				250mg	38,000
020-16151	(-)-Bicuculline Methochloride	GABA _A 受容体 アンタゴニスト (+)-Bicucullineの 水溶性タイプ	細胞生物学用	10mg	22,000
026-16153				50mg	88,000

当社では神経伝達物質を各種取揃えております。詳しくは、当社ホームページ (<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/info/men/article/GABACa.htm>) をご参照下さい。

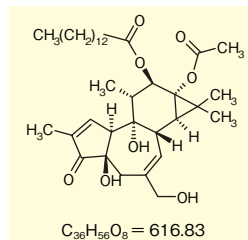
強力な発がんプロモーター



ホルボール12-ミリストート13-アセタート

本品は、ホルボールエステルを代表する1つです。ホルボールエステルは、クロトン油由来の発がんプロモーターであり、プロテインキナーゼC(PKC)の活性化を介して、発がん物質によるがんの形成を強力に促進します。ホルボールエステルは、細胞内で代謝を受けにくく、細胞内に長く留まりPKCを活性化します。本品は、ホルボールエステルの中でも最も強力なプロモーター活性を持ちます。また、ヒトT細胞株JurkatのIL-2産生能を高める効果も持つと報告されています。

本品はWako Chemicals USA 製品
545-00261(1mg)、541-00263(5mg)、
549-00264(10mg)の代替品です。



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
162-23591	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate	細胞生物学用	1mg	近日発売
168-23593			5mg	近日発売
166-23594			10mg	近日発売

彷徨

ハーバーはベルリンのシャルロッテンブルク工科大学のリーバーマンの許で、ピペロナル誘導体を研究し、博士学位はフリートリッヒ・ヴィルヘルム大学（ベルリン大学）に申請して取った（1891）。新しい学科として現れてきた物理化学に惹かれたので、ライプツヒ大学のオストヴァルトにつこうとしたが、リーバーマンに止められた。当時のドイツの化学企業は博士号取得者を採らなかったため、ハンガリーの蒸留会社など、二、三カ所を転々とした。翌年、スイスの連邦工科大学へ入って、1ゼメスター、応用無機化学を学んだ。その後、家業を手伝ったが、父とはそりが合わず、イエナ大学のクノルの助手になった。下働きの仕事しか与えられなかった。イエナからオストヴァルトに手紙を書き、ライプツヒまで面接にいったが、採用されなかった。親しい友人からカールスルーエ行きを勧められた。カールスルーエ工科大学のブンテ教授の応対は冷ややかだったが、助手にはしてもらえた（1894）。

独学で新たな専門分野を開拓

カールスルーエでまたオストヴァルトに助手を申し込んだが、これも成就しなかった。もはや自力でやるしかないと思った。いかなる師にもつかず、いかなる学派にも属さず、独学で物理化学を切り拓いた。ガスと燃料技術の専門家ブンテから与えられたテーマは炭化水素の熱分解だった。独立して書いた最初の論文、「炭化水素の分解と燃焼」（1896）が大学教員資格論文となった。これは熱分解という未開拓分野の古典的研究となった。これで私講師となった。この論文をオストヴァルトに送ったが、これにも応答はなかった。しかしアレニウスの許で物理化学を学んだことがあるオーストリア人ルギンが討論相手になってくれたから、完全に孤独だったわけでもない。私講師になって、電気化学の研究を始めた。ニトロベンゼンの電解還元によるアニリン



Fritz Haber

図1. 総髭のハーバー、51歳。1918年度ノーベル化学賞に決定の通知を受ける（1919年11月）。署名。

製造に成功して、名声を博した。論文集、『理論的基盤による工業的電気化学』（1898）は、電気化学者と有機化学者の両方から注目された。これによって准教授に昇進した。カールスルーエにきてわずか4年である。やがてこの大学にも物理化学研究室を設置する機運がおり、化学科の教授はハーバーを推したが、大学当局はオストヴァルト研究室からル・ブランを招いて教授とした（1901）。ハーバーが選ばれなかったのは独学のアウトサイダーであること以外に、ユダヤ人であるためともいわれる。失意のハーバーの救いとなったのは、ドイツ・ブンゼン協会（電気化学協会）から、アメリカの電気化学工業と教育の実情調査旅行に選ばれたことである（1902）。16週間の旅行で11の大学と主要な化学工場を視察し、アルミニウムの製法の発明者ホールや、ベークライトの発明者ベークランドとも会い、アメリカ人の旺盛な企業意欲、独立心、国民的自負を見てとった。

電気化学的プロセスと気体反応の研究から化学熱力学と取り組んだ。『工業的気体反応の熱力学：七講』（1905）は、工業的に重要な気体反応の熱力学的取り扱いを、余すところなく論じた最初の書物であり、きわめていいタイミングで現れた。

この知識をものにしたことで、アンモニア合成反応の徹底的な研究が可能になる。1906年、ル・ブランがオストヴァルトの後継者としてライプツヒ大学へ移った後、ハーバーが正教授、そして物理化学・電気化学研究室のディレクターとなった。酸素水素爆鳴気反応、ガラス電極、炎反応、燃焼プロセス、化学反応における電子の放出、ガス干渉計など多面的な研究をおこなったが、それを可能にした有能なスタッフが集まっていたことも確かである。そしてこの時期の最大の業績は、空中窒素の固定だった。

元素からのアンモニア合成

ハーバーがアンモニア平衡の研究を始めたのは1904年である。流管法で、鉄を触媒とし、大気圧、1020℃で、得られたアンモニア濃度は0.005~0.012%という、きわめて低いものだった。同じころベルリン大学のネルンストは、50気圧、1000℃で、0.0032%、とハーバーよりさらに小さい濃度を得たが、これがアンモニア合成で初めての高圧実験だったことは注目される。1907年の電気化学学会で、両者はいずれも自己の値が正しいと主張して譲らなかった。ネルンストは43歳、物理化学の教授となって14年目、ハーバーは39歳、教授になって2年目である。ネルンストは容赦なく批判し実験のやり直しを迫った。

ハーバーは30気圧の実験をおこなって、大気圧で得た先の値が正しいことを確認した。高圧装置を作ったのは、ラムゼー研究室からきたイギリス人、ル・ロッシニョールである。鋼鉄製の円筒に反応器を入れて、200気圧を可能にした（1908）。その金工の腕前には、機械工キルヘンパウアーも舌を巻いた。オスミウムの良好な触媒作用を発見し、それを触媒として、175気圧、550℃で8%の濃度を得た。こうして加圧下でのガス循環、生成アンモニアの連続的取り出し、反応器から出る熱いアンモニアと送込ガスとの熱交換という主要原理を確立した。

バーデン・アニリン・ソーダ社（BASF）



図2. アンモニア合成実験に成功したときの、カールスルーエ工科大学ハーバー研究室の研究者たち（1909）。かれらの国籍は13カ国にわたる。一番前、機械工キルヘンパウアー。着席者、左から2人目、ル・ロッシニョール（ラムゼー門下生、イギリス人、アンモニア合成の高圧装置を組み立てた）。5人目、ハーバー。2列目、左端、フリートリッヒ・ベルギウス（ネルンスト研究室から移ってきた。加圧下で石炭液化の実験をした）。左から3人目、コーツ（ラムゼー門下生。ハーバーの科学的業績を詳述した最初の評伝を書く）。4人目、田丸節郎（アンモニアの生成熱、反応ガスの比熱を測定した。のち東京工業大学教授）。後ろから2列目の左から3人目、小寺房治郎（のち東京工業試験所所長）。

はアンモニア合成の工業化には懐疑的だった。1900年、オストヴァルトが鉄を触媒として、空中窒素を固定してアンモニアを作る方法を発見して、BASFに売り込んだ。BASFが追試したところ、アンモニアは触媒に使った鉄に由来することが明らかにされ、オストヴァルトは契約を取り下げたという一件があったからである。1909年7月2日、BASFのミッタシュはハーバーの公開実験に立会って、高圧合成法が可能なることをしかと見届けた（図2）。

アンモニアの大規模合成はBASFのボッシュによって達成された。スケールアップの必須条件は高圧に耐える材料と触媒である。水素が高圧下で鋼を脆くすることが分かり、ボッシュは反応管の内部に、ほとんど炭素を含まない軟鉄を張り、反応管は高圧に耐える鋼鉄製とし、これに何千という小孔を開けて、水素が鋼鉄と反応することなく排出されるようにした。ミッタシュは1万回以上の実験によって、不純物としてアルミナを含む鉄に、触媒作用が増す添加剤を加えたものが、安価で収量が良いことを発見した

（1910）。これより優れた触媒はその後も見つかっていない。1913年9月に年産6500トンの最初のアンモニア工場がオッパウで操業を開始した（図3）。ハーバーは、生産されたアンモニア1kgにつき1.5ペニヒを受け取る契約（1908）によって、1920年までに数百万マルクの収入を得た。ル・ロッシニョールとキルヘンパウアーのそれぞれと取り決めをして、自分の収入から支払った。

「元素からのアンモニア合成」によってハーバーは、1918年度のノーベル化学賞を1920年6月に受賞した。1920年度のノーベル化学賞を受賞したのはネルンストである。ボッシュとベルギウスは、1931年に高圧化学技術の発明と発展に対して、ノーベル化学賞を受賞した。アンモニア合成によって化学と工学の結びつきが始まり、高圧化学は近代化学工業の特徴となった。助手から出発して教授まで昇進し、物理化学者として頭角を現し、アンモニア合成の大業を達成したカールスルーエの17年間は、ハーバーの人生の最も輝かしい時期であり、とくに最後の5年が全盛期だった。



図3. 最初のアンモニア工場を操業開始したときの Carl・ボッシュ、39歳（1913）。

化学戦

次の22年間、ハーバーはベルリン郊外ダーレムの新設のカイゼル・ヴィルヘルム物理化学・電気化学研究所所長となり、ベルリン大学教授を兼任した。設立2年で戦争が勃発し、研究所はそれに巻き込まれた。第一次大戦は始まったかと思うと塹壕戦になり、戦線は停滞した。これを打開するために1914年秋、ネルンストはドイツ陸軍省の諮問に応じて、くしゃみ剤（ジアニシジン塩）、ついで催涙ガス（臭化キシリル）を砲弾に詰めて発射させ



図4. 化学戦の最高指揮者になったときのハーバー、48歳（1916）。自らデザインした軍服で目目を引いた。



図5. 学生時代のクララ・インマーヴァール。ハーバーは人生の節目ごとに記念写真をのこしているが、クララ関係の写真はのこっていない。

たが、いずれも有効でなかった。ハーバーにも諮問があった。ハーバーが強烈な刺激作用と毒性がある塩化カコジルの実験を、始めたばかりの1914年12月17日に研究室で大爆発が起こり、重要なスタッフの一人が死亡し、一人が右腕を失った。その問題は破棄された。ハーバーは大量の塩素ガスをボンベから放射することを提案した。塩素もボンベもすぐ入手できたからである。1915年4月22日、イーブルで5000本のボンベによる塩素雲攻撃がおこなわれた。しかし軍はガスを戦術的に利用できなかった。1916年春、フランス軍がホスゲン（塩化カルボニル）を詰めたガス弾を使用したのが、化学戦の転回点となった。ガス放射からガス弾へと変わった。ドイツ陸軍省は化学戦部局を設立し、ハーバーはその指揮者に任命された（図4）。かれの研究所は毒ガス研究の本拠となった。ヴィルシュテッター教授を含めて、フロイントリッヒ、オットー・ハーン、ジェームズ・フランク、ガイガー、グスターフ・ヘルツなど多数の第一級の化学者を協力させた。ハーバーは実験室での研究から最前線での実践にいたるまで自ら指揮した。ドイツの染料化学工業の比類ない発達毒ガス生産を有利にした。ユダヤ人は将校になれなかった軍で、ハーバーが大尉に任命されたのは異例だった。しかし化学戦の最高責任者だったにもかかわらず、それ以上には

昇進しなかった。

ハーバーは戦後も、化学兵器の研究開発は継続すべきであると主張した。「ガス兵器が飛散する鉄片より残忍ということは全くない」とした（『戦争における化学』1920）。ハーバーの研究所は戦後も1919年から1933年まで毒ガスの秘密生産を続けた。1922年にはスペインへ、さらにソ連へ毒ガスの技術を導入した。日本でもハーバーが関係者に技術指導をおこなったのは確かであろう（1924）。ガス戦とは別に、戦時中（1917年）、害虫による食糧の被害を防止するため害虫駆除専門委員会が発足して、ハーバーがその委員長に就任し、戦後、研究所にも害虫駆除の部門が設けられた。ハーバーの研究所のフルーリの研究室で開発されたチクロンB（本体はシアン化水素）が、1941～45年にアウシュヴィッツで用いられて、400万人のユダヤ人がその犠牲になった。その中にはハーバーの親戚もいた。

妻クララの自殺

ハーバーとクララ・インマヴァールは21歳と19歳のときに出会い、33歳と31歳のときに再会した（図5）。すでにクララはブレスラウ大学の初の女性博士となり、ハーバーと同じ学会で発表する化学者となっていた。クララはハーバーからのプロポーズにかなりためらった末、結婚と研究の両立を期待して結婚に踏み切った。初めの2年間は研究所のセミナーや化学会にも出席した。しかし難産で生まれた息子の肥立ちが悪く、クララは育児と家事で次第にうつになり、一方、ハーバーは仕事に没頭して家庭を全く顧みなかった。結婚して4年目に出たハーバーの『熱力学』には、「妻クララ・ハーバー博士の無言の協力で感謝する、」という献辞がついている。クララがデータの検証や計算に協力したのであろうが、化学の博士号をもつ妻が無言の協力というのは、異様な感じがする。ハーバーがアンモニア合成に成功して栄光に輝いた1909年に、クララは恩師のアベッグ宛てに、「結婚以来この8年間にフリッツが得たものより、

私の失ったものがはるかに大きいのです、」という絶望の手紙を書いている。

ダーレムの研究所で毒ガスの実験が始まると、大爆発が起こって、ブレスラウ以来クララにとって親しかったザックエルが死亡した。クララはハーバーが毒ガス戦にかかわることに強く反対した。しかしハーバーは頑として聞き入れなかった。イーブルでの塩素ガス攻撃が始まってから10日後、ハーバーが一時帰宅し、翌日東部戦線での塩素ガス攻撃に出発する早朝、クララは夫のピストルで自殺した（5月2日）。クララの死については、ハーバーは黙して語らなかったが、知人たちによってさまざまなことが語られた。1990年代に、「自然科学の職業に従事する女性たちの聴聞会」で、クララは第一次大戦時に始まった化学の大量破壊兵器に対して抗議自殺を遂げた女性化学者とされた。化学者の倫理が初めて問われ、クララの死は、新しい科学の定義を告げる、のろしとなった（ゲリート・フォン・ライトナー、『クララ・インマヴァール事情—人間らしい科学のための生涯』（1994）。明快な解釈だが、かたよりすぎ、単純化しすぎるきらいがある（セレジ・ヤンツェ、1998）。ハーバーとシャルロッ



図6. シャルロッテ・ナータンの結婚式の直後（1917）。ハーバー、49歳。左端はクララが生んだ息子ヘルマン。

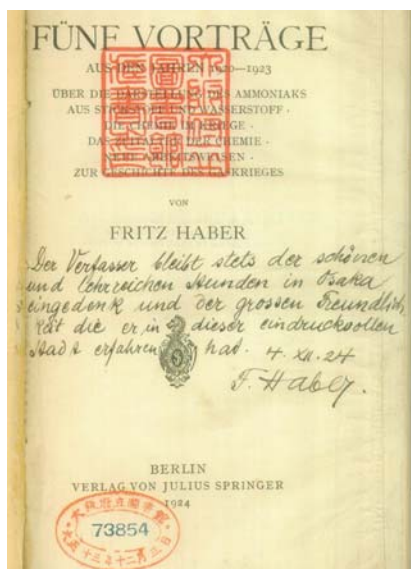


図7. ハーバー著、『講演5題』(1924)のタイトル。ノーベル賞受賞講演や、「戦争における化学」を含む講演集。大阪を訪問したとき、誰かに贈呈したらしく、署名とともに、「この印象的な都市、大阪でのすばらしい、有益な時間と、そこで受けた大きな友情を、著者はつねに銘記します」と記されている。大阪府立中央図書館蔵。

テ・ナートンとの関係を、クララは知っていた。東部戦線へ出発する前夜のハーバー家のパーティーにシャルロットが現れたので、クララがひと悶着おこしたともいわれる。またクララの妹ロットも自殺し、息子ヘルマンもクララとほぼ同年齢で自殺したので、家系の遺伝的要素も指摘された。あらゆることを心配の種にした神経質なクララにとって、毒ガス戦は格好の口実になった(ゴラン、1967)。しかしクララがハーバーに毒ガス戦を止めるように懇願したとか、止めなければ自殺するとまで言ったかどうか、明らかでない(シュトルツェンベルク、1994)。

クララの死の2年後、ハーバーは21歳年少のシャルロット・ナートンと再婚した(図6)。学究肌で、繊細で神経質なクララとは対照的に、快活で楽天的、頭の回転は速いが、知的ではなく、社交好きだった。10年後、離婚し、それ以後、友人関係を保った。この結婚で生まれたルートウィヒ・フリッツ・ハーバーは



図8. 研究所の物理学部長からゲッティンゲン大学教授に転任する、ジェームズ・フランクの送別の集い(1920)。前列、左から2人目、アインシュタイン、4人目から、フランク、リーゼ・マイトナー、ハーバー、オットー・ハーン。後列右端、グスターフ・ヘルツ。このうち5人がノーベル賞受賞者となる。

経済史家となり、『世界巨大化学企業形成史』と『魔性の煙霧—第一次世界大戦の毒ガス攻防戦史』の著述によって知られる。

敗戦と再建

敗戦によってドイツ帝国は崩壊した。1918年、連合国はハーバーを戦犯リストに載せ、身柄の引き渡しを請求したので、一時、スイスへ逃避した。1920年の戦犯リストにはハーバーの名は消えた。しかし非難は生涯つきまとった。このころは総髪を生やし、人中に出ても目立たぬようにしていた(図1)。インフレ下のドイツ科学を財政的に支援するため、ドイツ科学緊急援助協会を設立させ、実質的にこれを主導した(1920-33)。ドイツは戦争賠償金を金で支払うことになっていた

ので、それを軽減するためハーバーは海水から金の経済的抽出を図り、5回の探査航海をおこなったが、期待した結果は得られなかった(1923-26)。ドイツ化学会連合の会長(1928)として、ドイツ科学の戦後の国際的孤立からの脱却に努め、1931年末に、純粋および応用化学の国際

日本訪問

連合(IUPAC)へのドイツの加盟を実現させ、その副会長になった。1924年、ハーバーと夫人シャルロットは、半年にわたる世界一周の旅に出た。日本に2カ月滞在した。政財界、学界、産業界の指導者に会い、各地を訪れた。奮闘の人ハーバーは、プロシア人のように、努力奮闘する日本人に好感をもった。帰国後、官界に働きかけ、ベルリンと東京に、それぞれ日本研究所(1926)とドイツ文化研究所(1927)を設立させた。日本とドイツの姉妹研究所の設立は、ドイツの国際関係修復の一環となった。日本訪問はハーバーの生涯の大きな出来事だった(図7)。

世界的な研究センター

1912年、物理化学、物理学、コロイド化学の3部門で発足したが、戦後1919年の再建で、有機化学、理論物理学、薬学、昆虫学、繊維化学を追加して8部門とした。戦時中は軍事研究に、戦後は海水中の金の問題に集中したので、1926年から



図9. フリッツとクララ・ハーバーの墓（バーゼル、ヘルンリ墓地）。ハーバーの遺言にもとづき、息子ヘルマンがクララの遺骨をダーレムからバーゼルに移して、1937年に合葬した。ハーバーは、「許されるかぎり、戦時も平時も国に尽くした」の句を入れたかった。

1933年までがハーバーの研究所の最盛期である。1929年に研究員60人、その半数が外国人で、国籍は10カ国以上にわたった。1919年10月に始まった、2週間毎の「コロキウム」を、ハーバーは研究所の重要な活動として位置づけた。

フランクを研究所に迎えて物理学部長とした(1919)。かれがグスタフ・ヘルツとともにおこなった、電子と原子の相互作用の実験は、ボーアの原子構造論やプランクやアインシュタインの量子説の実験的証明として重視されたが、その実験を研究所で続行した(図8)。フロイントリッヒのコロイド部門が活況を呈したのも戦争直後である。ハーバーは生涯の科学的テーマだった、ブンゼン炎の問題に復帰した(1922)。ハーバーとボンヘッファーの共著、「バンドスペクトルと炎プロセス」はその豊富なアイデアが目された。ボンヘッファーは原子状水素の優れた研究をおこなった。ボンヘッファーとハルテックは、パラ水素を発見した(1929)。ハーバー、ポランニー、アイリングは、原子構造と、物質とエネルギーの相互作

用の新しい知識の刺激の下で、化学反応の速度論とメカニズムを研究した。

流 浪

ナチスが政権を掌握すると、ユダヤ人を排除する公務員法を制定した(1933.4.7)。ユダヤ人の寄付によって設立され、所長はじめ部長のほとんどがユダヤ人だったハーバーの研究所は真っ先に標的となった。ハーバー自身は大戦での功績によって特免になっていたが、かれはそれを潔しとせず、「わが研究所は22年間、平和時は人類のため、戦時には祖国のために尽くした」という言葉を残して所長を辞任した(4.30)。ハーバーは研究員から秘書にいたるまでの受け入れ先を探すのに奔走した。スペイン、サンタデルの国際化学会議に出たあと、ハーバー自身の身の振り方が決まらなかった。窮状を察して日本から招きがあった。スペインとスウェーデンからも招かれた。結局、イギリス、ケンブリッジのポーブ教授の招きに応じた。そこで2ヶ月間過ごした。「鉄塩を触媒とする過酸化水素の分解の速度論」が最後の研究となった。イギリスに亡命していたフロイントリッヒ、ポランニー、ファークス、ボルン、ハルテックなどが続々とケンブリッジに集まって、束の間、ダーレムのコロキウムを再現した。体調はますます悪く、死を覚悟したのか、息子宛てに、自分の死後、クララと同じ墓に入れること、という遺書を書いた(図9)。

所長辞任後、ハーバーはユダヤ人として対照的な生き方をした、化学者・政治家ハイム・ヴァイツマンと数回会った。ハーバーがドイツに生まれ、ドイツに同化して、ユダヤ人であるがゆえに一層励んで国に尽くしたのに対して、ヴァイツマンはベラルーシ生まれで、イギリスに住んで親英的で、イギリスの委任統治地だったパレスチナ(現、イスラエル)にユダヤ人の国を建設しようとしていた、シオニストである。そこに西欧に劣らない立派な研究所を作るから、その所長にとハーバーを口説いた(図10)。ハーバー



図10. ハーバー彫像（ハーバーが所長として就任することになっていた、イスラエル、レホヴォットのシェフ研究所、1934年設立、にある）。

はこれに応じて、生涯の最後にディアスポラ(離散ユダヤ人)からシオニストへ転換しようとし、パレスチナへ出発直前、バーゼルで死んだ。

【参考文献】

Haber, Fritz, *Thermodynamics of Technical Gas-Reactions: Seven Lectures*, trans. by Lamb, A. B., Longmans, Green and Co. (1908).; Haber, Fritz *Fünf Vorträge*, Julius Springer (1924).; フリッツ・ハーバー、田丸節郎訳、『ハーバー博士講演集—国家と学術の研究』(岩波書店)(1931).; Stoltzenberg, Dietrich, *Fritz Haber, Chemist, Nobel Laureate, German, Jew*, Chemical Heritage Foundation, Philadelphia (2004).; Szöllösi-Janze, Margrit, *Fritz Haber, 1868-1934, Eine Biographie*, C.H.Beck, München (1998).; Gerit von Leitner, *Der Fall Clara Immerwahr. Leben für eine humane Wissenschaft*, C. H. Beck, München (1994).; Goran, Morris, *The Story of Fritz Haber*, University of Oklahoma Press (1967).; Coates, J.E., "The Haber Memorial Lecture," *J. Chem. Soc.*, 1642-1672 (1939).; 高尾楯雄、佐知子訳、『リヒャルト・ヴァイルシュテッター自伝』(日本図書刊行会)(2004).; 山崎和夫訳、『オットー・ハーン自伝』(みすず書房)(1977).; ルッツ・F・ハーバー著、佐藤正弥他訳、『世界巨大化学企業形成史』(日本評論社)(1984).; ルッツ・F・ハーバー著、井上尚英訳、『魔性の煙霧—第一次世界大戦の毒ガス攻防戦史』(原書房)(2001).; 田丸謙二「父田丸節郎とハーバー」『化学史研究』第1号、76-77 (1995).; 広田鋼蔵「アンモニア合成法の成功と第一次大戦の勃発」、『現代化学』1975年2月号. ; 宮田親平、『毒ガス開発の父ハーバー』(朝日新聞社)(2007).

8-OHdG測定用のDNA抽出に最適

ヒト、動物の柔組織 DNA 抽出用

DNA エキストラクター[®] TIS キット

本キットは、主にヒトや動物の柔組織を対象としたDNA抽出キットです。本キットの基本原理であるよう化ナトリウム法は操作中の酸化が比較的少ないDNA抽出法として知られていますが、本キットは酸化抑制剤を用いることにより、さらに酸化が抑制されたDNAの抽出が可能になったため、酸化ストレスマーカーである8-OHdG (8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン) の測定に有用なDNAサンプルの調製が可能です。

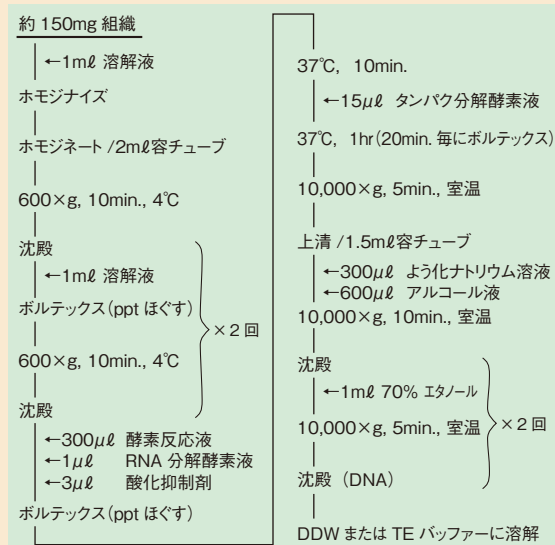
特長

- 酸化ストレスマーカーである8-OHdGの検出・測定に有用
- 酸化抑制剤を使ってさらにDNAの酸化を抑制
- ヒト、動物の柔組織からのDNA抽出に最適

キット内容 (50回用)

- 溶解液 75ml × 2本
- 酵素反応液 15ml × 1本
- RNA分解酵素液 50μl × 1本
- タンパク分解酵素液 750μl × 1本
- 酸化抑制剤 350μl × 1本
- よう化ナトリウム溶液 15ml × 1本
- アルコール液 30ml × 1本
- PEG溶液 20ml × 1本

プロトコール [使用法1]



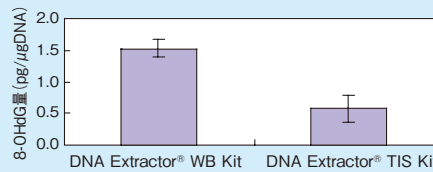
※組織の8-OHdGを測定する場合には、組織より抽出したDNAの加水分解などの前処理が必要で、前処理に使用する酵素・バッファー類をセット化した8-OHdG測定前処理試薬セット(コードNo.292-67801)がございます。

データ

マウス肝臓からのDNA抽出及び8-OHdG量の測定

マウス肝臓(同一個体)からDNA Extractor[®] TIS Kit [使用法1]及びDNA Extractor[®] WB Kit (コードNo.291-50502)を使ってDNAを抽出した。取得したDNAに対し、ヌクレアーゼP₁処理などを行った後、高感度8-OHdG Check (コードNo.307-07921) (ELISA法)及びHPLC/ECDによって8-OHdG量を測定し、両者を比較した。

■ 高感度8-OHdG Check (ELISA法)による測定



■ HPLC/ECDによる測定

	8-OHdG濃度(nmol/l)	dG濃度(μmol/l)	8-OHdG/10 ⁶ dG
DNA Extractor [®] TIS Kit	0.59	692	0.8
DNA Extractor [®] WB Kit	1.41	687	2.1

(HPLC条件)

カラム: Wakopak[®] Wakosil-II 5C18 RS φ4.6mm × 150mm(D) 流速: 1ml/min.
 溶離液: 50mmol/l 酢酸ナトリウム (pH 5.2), 9% メタノール 吸光度: UV260nm
 ECD 電解電位: +600mV

DNA抽出操作時の酸化により8-OHdGが発生することが知られているが、DNA Extractor[®] TIS Kitを用いることにより、DNA Extractor[®] WB Kitに比べて、操作中の8-OHdG発生量を半分以下に抑制することができた。また、デオキシグアノシン中の8-OHdG濃度も非常に低いことが明らかになり、8-OHdG測定用のDNA抽出キットとして優れた性能が示された。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
296-67701	DNA Extractor [®] TIS Kit	遺伝子研究用	50回用	照会

関連商品

コードNo.	品名	規格	用途	容量	希望納入価格(円)
292-67801	8-OHdG Assay Preparation Reagent Set [セット内容] ○酢酸バッファー 950μl × 1本 ○トリスバッファー 1ml × 1本 ○ヌクレアーゼP ₁ 500units × 1本 ○アルカリホスファターゼ 50μl × 1本	遺伝子研究用	8-OHdG測定時のサンプルDNAの前処理用試薬セット	50回用	照会
307-07921	High Sensitive 8-OHdG Check	(日研ザイル株)	8-OHdG測定用ELISAキット	96回用	80,000
238-51471	Wakopak [®] Wakosil-II 5C18 RS φ4.6mm × 150mm (D)	—	HPLC用カラム	1本	45,000
234-51473	Wakopak [®] Wakosil-II 5C18 RS φ4.6mm × 150mm (W)	—		1本	45,000

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

記載希望納入価格は本体価格であり消費税などが含まれておりません。

和光純薬時報 Vol. 76 No. 4

2008年10月24日発行

発行責任者 三浦正寛

編集責任者 鰐部梢子

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 共進社印刷株式会社

●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 jiho@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。

Please contact us to get detailed information on products in this journal.

■和光純薬工業株式会社 (Japan) <http://www.wako-chem.co.jp>

フリーダイヤル (日本のみ) 0120-052-099 / Tel 81-6-6203-3741

フリーファックス (日本のみ) 0120-052-806 / Fax 81-6-6201-5964

E-mail labchem-tec@wako-chem.co.jp

■Wako Overseas Offices :

• Wako Chemicals USA, Inc. <http://www.wakousa.com>

Toll-Free (U.S. only) 1-877-714-1920

Head Office (Richmond, VA) : Tel 1-804-714-1920 / Fax 1-804-271-7791

Los Angeles Sales Office (Irvine, CA) : Tel 1-949-679-1700 / Fax 1-949-679-1701

Boston Sales Office (Cambridge, MA) : Tel 1-617-354-6772 / Fax 1-617-354-6774

• Wako Chemicals GmbH <http://www.wako-chemicals.de>

European Office (Neuss, Germany) : Tel 49-2131-311-0 / Fax 49-2131-311100