

〔総説〕

「超高速アミノ酸分析用試薬の開発と応用」

宮野 博 …… 2

「アルツハイマー病と BACE1 阻害剤の設計」

濱田 芳男、木曾 良明 …… 5

「第 26 回 Wako ワークショップ見聞録 幹細胞・iPS 細胞研究の最前線」

西原 浩司 …… 29

〈テクニカルレポート〉

「新しい免疫沈降実験ツールの紹介」

西部 隆宏、吉居 華子 …… 8

「細胞内タンパク質複合体（プロテオーム）解析」

菅野 新一郎、洪 沢輝、安井 明 …… 10

〔製品紹介〕

有機合成

PI 金属触媒シリーズ …… 16

有機合成用 超脱水溶媒 …… 18

環境・分析

アミノ酸分析用試薬「アミノタグワコー」 …… 4

シクロデキストリンポリマー …… 15

定量 NMR (qNMR) 用 内標準物質 …… 18

TRM (Traceable Reference Material) …… 19

TraceSure™ (認証標準物質) シリーズ 容量分析用標準物質 …… 19

免疫

抗体固定化キット IP …… 9

抗タグ抗体ビーズ、タグペプチド …… 20

抗ラット P2X₄, モノクローナル抗体 …… 20

細胞培養

アドヘサシン …… 25

完全合成三次元マトリックス「QGel™ MT 3D Matrix」 …… 26

三次元細胞培養ツール「NanoCulture® Plate」 …… 27

ES 細胞培養用試薬「StemSure® シリーズ」 …… 28

細胞生物・生化学

β-セクレターゼ (BACE1) 阻害剤 …… 7

タンパク質細胞内複合体 (プロテオーム)

解析サポートサービス …… 14

りん酸基アフィニティー電気泳動用試薬

「Phos-tag® アクリルアミド」 …… 21

LPS (リボポリサッカリド) …… 22

TGF-β ファミリー …… 22

PKC 阻害剤 …… 23

Nogo-66 (1-40) …… 23

核酸系逆転写酵素阻害剤 …… 24

パロキセチン塩酸塩 …… 24

DNA-PK 阻害剤「NU7025」 …… 24

α-アマニチン …… 25

遺伝子

X-α-Gal …… 20

pEBMulti ベクター …… 32

アミノ酸の発見と背景

1806年、アスパラギンがアスパラガスの芽から抽出された。これがアミノ酸の最初の発見である¹⁾。東京帝国大学理科大学（現・東京大学理学部）の教授であった池田菊苗博士が、L-グルタミン酸塩に特徴的な呈味「うま味」があることを発見したのは、それから約100年後の1908年であった。グルタミン酸は、日本では昆布出汁で馴染み深いですが、トマトやチーズにも多く含まれている。

アミノ酸は食品栄養素として重要であるが、人の身体は約20%がアミノ酸で構成されていて、そのほとんどはタンパク質として存在している。体内に存在するアミノ酸単体（遊離アミノ酸）は「アミノ酸プール」と称され、細胞内に約45g、細胞間に約5g、血漿中に約1gが、それぞれ含まれる²⁾。

血液（血漿）中のアミノ酸濃度は、通常、かなり正確に制御されている。アミノ酸代謝が活発な臓器は、筋肉、肝臓、脳、腎臓、小腸などであり、各臓器でのアミノ酸代謝の増減の結果が、血液中での濃度に反映される。つまり、各臓器の代謝バランスが大きくずれると、血液中のアミノ酸バランスの変化となってあらわれる。

そのため、生体液中のアミノ酸の変動は、身体の代謝や疾患の指標として利用されている。新生児の先天性の代謝異常症スクリーニング（newborn screening）は代表的な例である。生後数日（3～7日程度）の新生児を対象として、フェニルケトン尿症（検査項目：フェニルアラニン）、ホモシステイン尿症（検査項目：メチオニン）、メープルシロップ尿症（検査項目：ロイシン）が検査されている。分岐鎖アミノ酸は主に肝臓で産生され、芳香族アミノ酸は主に肝臓で代謝を受ける。血液中の分岐鎖アミノ酸（Branched Chain Amino Acid：BCAA）と芳香

族アミノ酸（Aromatic Amino Acid：AAA）のモル比（フィッシャー比）は、肝機能との相関性があり、肝機能不全の重症度判定や治療の指標である³⁾。また、血液中のアミノ酸濃度は、栄養状態不良の患者の病態把握などに用いられることも多い。さらに、種々の疾患、肝細胞癌、冠状動脈性心臓病、腎不全、糖尿病、複数の悪性腫瘍などで、血液中のアミノ酸濃度が特徴的な変化を示すことが報告されている²⁾。

一方、アミノ酸プロファイリングの変化から疾病の有無を知る可能性についても研究されている。最近、複数のアミノ酸濃度を変数とした多変量解析によって、健康状態や疾患の判別が可能であることが、臨床データからも明らかにになってきた^{4,5)}。

さて、このようにアミノ酸は生理学的に重要であるが、そのほとんどに特徴的な可視または紫外での吸収域がないため、アミノ酸相互を区別し、感度よく測定することは容易ではない。そのため、アミノ酸分析法の開発は、研究者の格好の研究題材であり、さまざまなアプローチがなされてきた。

アミノ酸分析の歴史

アミノ酸分析の歴史は、誘導体化HPLCの歴史ともいえる。

誘導体化とは、試薬と分析対象物を反応させ、特徴的な化合物を生成させる、たとえば、発色させる、蛍光性物質に変化させることで、選択性と感度を向上させる手法である。アミノ酸の代表的な誘導体化試薬は、1910年にRuhemannらにより発見されたニンヒドリンであり、アミノ酸と反応することで鮮やかな紫色（Ruhemann's purple）を呈する⁶⁾。1958年には、Stein、Mooreらは、アミノ酸を陽イオン交換樹脂で分離した後に、ニンヒドリン試薬と混合し、可視光領域の波長で検出する方法（ポストカラム誘導体化法）の自動

化に成功した⁷⁾。両名はのちにノーベル賞を受賞することになる。

現在、市販されている自動アミノ酸分析装置は、未だにこの原理を用いている。

当初、たんぱく質加水分解アミノ酸の分析に、約1日を要していたが、液体クロマトグラフィーの発展やコンピュータの進歩により、分析時間は格段に短縮され、現在では1時間以内での測定が可能である。また、生体中のアミノ化合物も含めた約40成分を約2時間で測定することができる。

また、アミノ酸のアミノ基をあらかじめ誘導体化したのちにカラム分離に供するプレカラム誘導体化法の研究も盛んに行なわれ、アミノ酸分析の高感度化を図るという視点で、数多くの蛍光検出用の試薬が開発されてきた。

LC/MS アミノ酸分析用試薬の開発

さて、アミノ酸は、 $H_2N-CH(R)-COOH$ で表されるように、アミノ基とカルボキシル基、及び、Rで表される側鎖からなり、Rが異なるだけの類似した構造を有する化合物群である。誘導体化試薬の構造に由来する吸光度や蛍光で検出するかぎりにおいて、ポストカラム誘導体化ではアミノ酸そのものを、プレカラム誘導体化ではアミノ酸と試薬の反応体を、それぞれカラムで完全に分離しなければ、個々のアミノ酸を区別して定量することはできない。側鎖のわずかな構造的差異を利用してカラム分離することは容易でなく、特に生体内の遊離アミノ酸の分析時間は、長くならざるをえなかった。分析時間が長ければ、集められるデータの数は少なくなり、このことは、アミノ酸の生理学的研究が進まないひとつの原因であった。逆にいえば、今後の生命科学研究の更なる発展のためには、アミノ酸分析法は、高感度であるだけでなく、高速である必要がある。

アミノ酸分析の高速化を実現する全

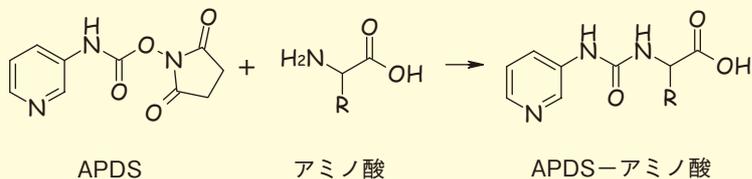


図1. APDSの構造とアミノ酸との反応スキーム

く新しいアプローチとして、質量分析計の利用とそれに適したプレカラム誘導体化試薬3-アミノピリジル-N-ヒドロキシサクシンイミジルカルバメート (APDS; 図1)、アミノタグ法が開発された⁸⁾。

近年の高速液体クロマトグラフと質量分析計とのインターフェース部の発展は、高速液体クロマトグラフィーの検出方法として、質量分析計の利用を可能にした。質量分析計は、不連続な質量電荷比 (mass-to-charge ratio: m/z) により化合物を検出することから、選択性の非常に高い方法である。新たに、質量電荷比の軸が加わることで、保持時間が同一であっても、質量電荷比が異なれば、それぞれを区別することができるので、分析時間の大幅な短縮にもつながることになる。

また、アミノ基誘導体化試薬 APDS は、逆相 LC/MS を前提に、以下の考えのもとついでデザインされた。

- 1) アミノ基と特異的に温和な条件下で反応する活性基を有すること。
- 2) 逆相 HPLC で保持・分離が容易とするため、誘導体はアミノ酸そのものに比べて疎水性を高めること。
- 3) カラム分離では、アミノ酸の側鎖 (R) の差異をできるだけ活かせるように、誘導体の構造が、高

くならないこと。

- 4) 質量分析計での高感度化をはかるため、試薬にはイオン化効率を高める部分構造を持たせること。

APDS には、アミノ基と反応する活性基として活性カルバメートを導入した。弱アルカリ性条件、55 ~ 60°C の加温でほぼ瞬時にアミノ酸誘導体が生成する。試薬母核には、アミノ酸に比べ、誘導体の疎水性が高められるもので骨格の小さいアミノピリジル基を導入した。また、アミノピリジル基はイオン化効率が高く、質量分析計でのイオン化に有利であるため、アミノ酸の検出能も高くなり、分析に必要な血漿量は数 μL であり、新生児や高齢者など、採血量に制限のある被験者の検体測定が可能となる。

APDS プレカラム誘導体 LC/MS 法では、さらに移動相と溶出条件を工夫することで、生体内に含まれる主なアミノ酸をわずか7分間で、すなわち従来のアミノ酸分析計の約 1/15 の分析

時間で測定できる⁹⁾。

ヒト血漿に含まれる代表的なアミノ酸についてのバリデーション結果を表1と図2に示した。良好な結果であり、また、既存の方法との定量値の比較においても、よい相関を示した。また、尿検体においても同様の結果が示されている。

新生児の先天性代謝異常症の検査で検討が進められているフローインジェクションによるタンデムマス法は、さらに短時間でのアミノ酸分析が可能であるが、血漿中のアミノ酸の一斉分析には適当でない。質量分析計を検出器として利用しているが、カラムでの分離をおこなわないため、分子量の同一のアミノ酸、たとえば、ヒドロキシプロリン、ロイシン、イソロイシンやザルコシン、 β アラニン、アラニンなどを区別して定量することができない。

APDS によるプレカラム誘導体化 LC/MS は、質量分析計を三連四重極型 (Triple quadrupole) MS/MS にした場合、さらにその威力を発揮する。この装置は二つの四重極質量フィルターと衝突室 (コリジョンセル) を有する構造を取っており、特定の質量を持つ分子から生じる特徴的な断片イオンのみを検出し、定量することができる。

APDS の第 5 の特徴は、その誘導

表1. APDS プレカラム誘導体化 LC/MS による血漿中アミノ酸の測定範囲と最小検出感度

	測定範囲 ($\mu\text{mol/L}$)	最小検出感度 ($\mu\text{mol/L}$)
セリン	30 ~ 300	0.27
プロリン	50 ~ 500	0.05
チロシン	20 ~ 200	0.07
イソロイシン	20 ~ 200	0.02
ヒスチジン	20 ~ 200	0.36

島津製作所 LCMS 2020 を使用した場合

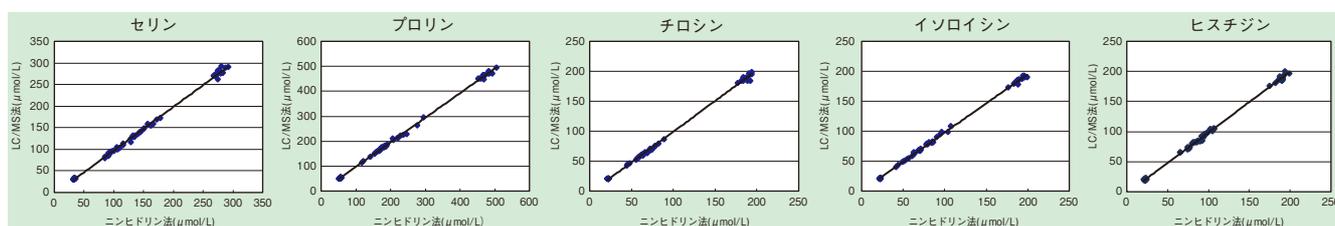


図2. APDS (アミノタグ法) と既存品 (ニンヒドリン法) との相関性試験

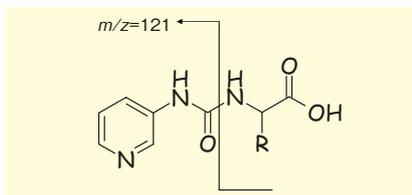


図3. APDS-アミノ酸の特異的開裂

体、活性カルバメートとアミノ基が反応して生成したウレア結合体が、三連四重極質量分析計で、きわめて選択的にその結合部位が開裂し、規則的なプロダクトイオンが生成することにある(図3)。すなわち、APDSに由来する共通のフラグメントイオン $m/z = 121$ をきわめて選択的に検出することができるのが、この試薬によるアミノ酸分析の特徴である。第二マスフィルターに $m/z = 121$ を設定し、プリカーサーイオンスキャンで測定すれば、APDS-アミノ酸誘導体だけをすべてMS上に検出することができる。新たに他のアミノ酸を測定したい場合でも、APDSで誘導体化しておけば、衝突誘起解離(Collision-induced dissociation: CID)によるマススペクトルを取得する必要がなく、分析メソッドの開発も簡便である。

105種のアミノ基を有する化合物の一斉分析を試みた結果を図4に示した。分析時間は約10分である。この測定で、親イオン(第一マスフィルター)には、分析対象化合物のAPDS誘導

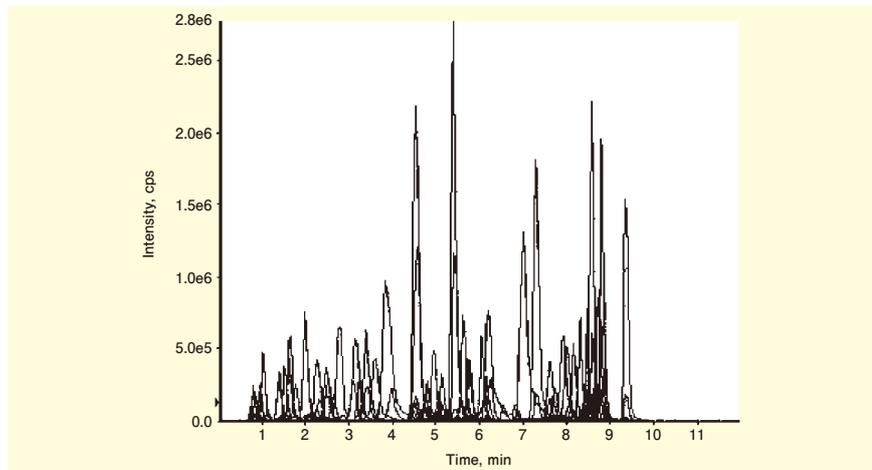


図4. APDSプレカラム誘導体化LC/MS/MSによる105種類のアミノ化合物の一斉分析
Shimbo, K. et al.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**, 1483 (2009). より転載

体化物の質量電荷比を入力し、フラグメントイオン(第二マスフィルター)には、すべて $m/z = 121$ を入力している。

今回紹介したプレカラム誘導体化試薬APDSによるLC/MS分析法では、従来のニンヒドリンによるアミノ酸分析計と同等の結果を、1桁以上の処理速度で得ることができるため、臨床的な意義が大きいと考える。

また、MS/MSを利用すれば、発酵、創薬、食品などの各分野での研究の新たな展開を期待できる。興味のある方は、参考文献^{10,11)}を参照いただきたい。

【参考文献】

1) 味の素株式会社編:「アミノ酸ハンドブック」(工業調査会)(2003).

2) 朽久保修、安東敏彦:「アミノ酸と生活習慣病—最新アミノグラムで探る「いのち」の科学」(女子栄養大学出版部)(2010).

3) Freud, H. et al.: *Ann. Surg.*, **190**, 571-576 (1979).

4) Zhang, Q. et al.: *Hepatol. Res.*, **34**, 170-177 (2009).

5) Okamoto, N. et al.: *Int. J. Med. Sci.*, **1**, 1-8 (2009).

6) Ruhemann, S.: *J. Chem. Soc.*, **97**, 2025-2031 (1910).

7) Spackman, D. H. et al.: *Anal. Chem.*, **30**, 1190-1206 (1958).

8) Shimbo, K. et al.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**, 1483-92 (2009).

9) Shimbo, K. et al.: *Biomed. Chromatogr.*, **24**, 683-91 (2010).

10) Shimbo, K. et al.: *Anal. Chem.*, **81**, 5172-9 (2009).

11) Iwatani, S. et al.: *J. Biotechnol.*, **128**, 93-111 (2007).

LC/MS法による新しいアミノ酸分析用試薬



アミノタグワコー

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
293-70401	アミノタグワコー* [キット内容 反応試薬 100mg、溶解液 5ml]	アミノ酸自動分析用	500回用	50,000
010-23061	アミノタグワコー用 溶離液	アミノ酸自動分析用	1 l	6,000
019-23151	アミノタグワコー用 ほう酸緩衝液	アミノ酸自動分析用	1 l	9,000

*アミノタグワコーは体外診断用医薬品です。
※アミノタグワコー用アミノ酸内部混合液につきましては、別途お問合せ下さい。

関連商品

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)	コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
011-14463	アミノ酸混合標準液, AN-2型	アミノ酸自動分析用	1ml × 5 5ml	9,200 6,200	019-08393	アミノ酸混合標準液, H型	アミノ酸自動分析用	1ml × 5 5ml	6,300 4,200
012-08643	アミノ酸混合標準液, B型	アミノ酸自動分析用	1ml × 5 5ml	9,200 6,200	016-14131	L-アスパラギン標準液	アミノ酸自動分析用	1ml × 5	6,200
016-08641					202-17151	L-トリプトファン標準品	アミノ酸分析用	500mg	10,000

*単品アミノ酸標準品は、多数取り揃えております。別途お問合せ下さい。

1 はじめに

1906年にドイツの精神科医で神経病理学者でもある Alois Alzheimer (1864 - 1915) は、彼が診た一人の女性患者の症例を学会で発表した。後にアルツハイマー病 (AD) と呼ばれることになるこの認知障害を伴う神経変性疾患には、最初の報告からは100年以上経った現在においても根本的治療薬は存在していない。最近、AD発症の原因物質がアミロイドβペプチド (Aβ) であることが有力視されており、アルツハイマー病の根本的治療法としてAβの産生、代謝もしくはその凝集過程に関与する薬剤が注目されている。本稿ではアルツハイマー病治療薬としてのBACE1阻害剤開発の背景と我々のBACE1阻害剤開発研究を紹介する。

2 アルツハイマー病と BACE1

AβはAD患者の脳において特徴的に見られる老人斑の主要な構成成分であり、その前駆体たんぱく質 (APP: amyloid precursor protein) から2種類のプロテアーゼによる切断で切り出される¹⁾ (図1・左)。AβはAPPの膜外領域から膜貫通領域にかけて含まれ、β-セクレターゼ (BACE1: β-site APP cleaving enzyme) はAβのN末端部分を切断し、次にγ-セクレターゼがAβのC末端部分を切断する。Aβは40番目のアミノ酸残基Valで終わるAβ₄₀とさらに2個のアミノ酸残基 (Ile-Ala) が伸びたAβ₄₂があり、Aβ₄₀よりAβ₄₂の方が凝集性および神経毒性が高く、Aβ₄₂がAD発症により深く関わっていると考えられる。APPをコードする遺伝子は21番染色体上に位置し、21番染色体トリソミーに起因するダウン症患者がADを発症しやすいことから、トリソミーによるAPPの過剰発現との関連性が

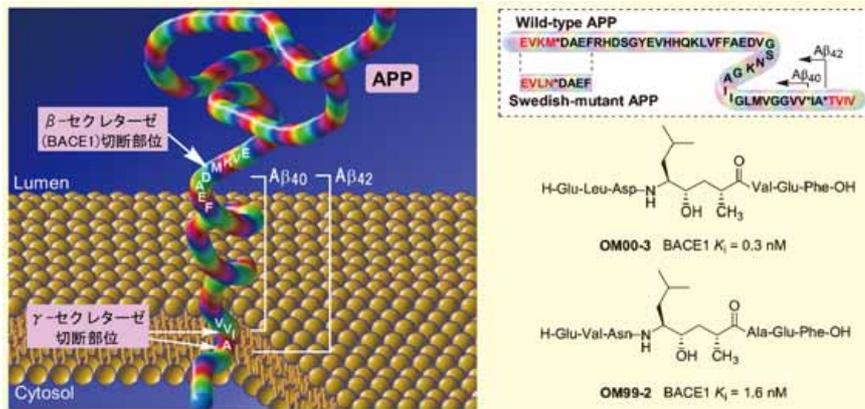


図1. APPの切断様式と変異型APPのアミノ酸配列に基づいたBACE1阻害剤

示唆された。また家族性アルツハイマー患者から発見されたBACE1の切断部位EVKM*DAEF (*は切断箇所)がEVNL*DAEFに変異したSwedish mutant APPはwild-type APPに比べてBACE1により切断されやすい。さらにAβが凝集しやすくなるAPPの変異もいくつか見つかっており²⁾、これらのAPPから産生されるAβの量・質に影響を及ぼす遺伝子変異は、AβがAD発症の原因物質であるとするAβ仮説の有力な根拠となっている。この仮説によれば、ADの根本的治療薬としてAβの産生、代謝もしくはその凝集過程に関与する薬剤が考えられるが、BACE1のノックアウトマウスが普通に生存できることから³⁾、BACE1がアルツハイマー病治療薬開発の分子ターゲットとして最も有望であると考えられる。一方、γ-セクレターゼは膜上に構築された高分子複合体であり、触媒中心を含むプレセニン以外にニカストリン、APH-1、PEN-2など数種類の蛋白質からなる⁴⁾。このような膜上の蛋白質複合体はX線回折のための結晶化が困難であり、立体構造が不明では計算化学を用いた効率的な阻害剤の設計・探索ができない。また、γ-セクレターゼはAPP以外に、発生・分化に深く関与しているNotchや細胞接着分子であるカドヘリンなどのAPPと同じ1回膜貫通蛋白質のいくつかを基質とすることから、

その阻害剤には重篤な副作用が予想された。しかしながらNotchへの影響を回避したいいくつかのγ-セクレターゼ阻害剤も開発されている⁵⁾。

3 ペプチド型 BACE1 阻害剤

TangとGhoshらは変異型 (Swedish mutant) APPのアミノ酸配列を参考にし、基質遷移状態アナログとしてヒドロキシエチレン構造を有する強力なペプチド型のBACE1阻害剤を開発している⁶⁾ (図1・右)。我々も、HIVプロテアーゼ阻害剤開発でその有用性が確かめられた基質遷移状態アナログとしてHMC (ヒドロキシメチルカルボニル) 構造を有するKMI-008を設計し、KMI-008をリード化合物として低分子化したKMI-429を開発した⁷⁾。KMI-429は強力なBACE1阻害活性を持ち、BACE1を発現させたHEK293細胞において用量依存的にBACE1を阻害し、野生型およびAPPトランスジェニックマウスの海馬に投与することによりAβの産生を阻害することが確認された⁸⁾。さらに膜透過性を改善するため、KMI-429のカルボキシル基をその生物学的等価体で置き換えたKMI-574およびKMI-684を開発した⁹⁾ (図2)。KMI-574は*in vitro*での酵素阻害活性は低下したものの、BACE1を安定的に発現させたHEK293細胞における阻害活性の向上がみられた。これ

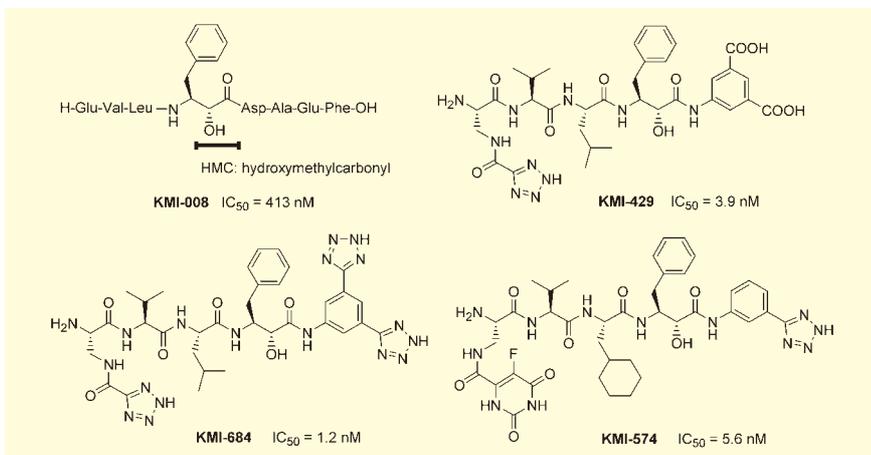


図2. 基質遷移状態アナログ HMC 構造を有する BACE1 阻害剤

は疎水性-親水性バランスの改善による細胞膜透過性向上によるものと思われる。また、KMI-574はBACE1の脂質ラフトにおける局在に影響を及ぼすことが報告された¹⁰⁾。脂質ラフトは細胞膜を介した情報伝達に重要な役割を担っており、Aβ産生の場合でもありと考えられ、これらの阻害剤は創薬分野だけでなく、Aβ産生プロセスの解析などケミカルバイオロジー研究の有用なツールとしてもその活用が期待される。

4 非ペプチド型 BACE1 阻害剤

一方、非ペプチド型BACE1阻害剤を最初に報告したのは武田薬品工業(株)で、その後Vertex Pharmaceuticals、Elan Pharmaceuticals、Merck (MSD)、Bristol-Myers Squibb、Pfizer、Glaxo-SmithKline、Schering-Plough、Wyethなど多くの製薬企業が非ペプチド型BACE1阻害剤を報告している。紙面の都合上、すべてを紹介できないため参考文献に総説を記載しておく¹¹⁾。

我々もペプチド型BACE1阻害剤KMI-429をリードとし、非ペプチド型BACE1阻害剤を設計した。今までに報告されている非ペプチド型BACE1阻害剤の多くはP₂部位にイソフタル酸誘導体を有している。これは

BACE1のS₂部位におけるフラップとクレフトの隙間が狭いため、阻害剤のP₂部分は平面構造が好まれるものと思われる。そこで我々もP₂位にイソフタル酸を有する仮想的な阻害剤を考え、*in silico*でBACE1と結合した時のコンホメーションを固定する設計手法“*in-silico* conformational structure-based drug design¹²⁾”を用いてP₂位に複素環、P₃位に5員環を導入したKMI-1027、KMI-1036を設計した¹³⁾(図3)。

BACE1のArg235側鎖は阻害剤と相互作用しうるアミノ酸側鎖の中で唯一フラップの外側に位置し、Arg235側鎖と阻害剤との相互作用は阻害メカ

ニズムにおいて重要な役割を担っていると考えられる。そこで、報告されているBACE1-阻害剤複合体のX線結晶構造を調べてみると、BACE1のArg235のグアニジル平面と阻害剤のP₂部分との距離がほとんど同じ(3 Å)であることに気がついた。阻害剤の大きさに係わらず距離が同じということは、阻害剤の大きさに合わせてArg235が動いていることを意味する。そこで、Arg235のグアニジル平面は阻害剤のP₂部分を押しさえ込むことにより阻害剤をBACE1の活性中心に固定しており、このような結合はグアニジル平面と阻害剤P₂部分とのスタッキングやσ-π相互作用のようなごく弱い量子的相互作用により安定化しているのではないかと考えた。多くの分子設計ソフトウェアは原子を剛体として処理しており、このような弱い量子的効果は正確に評価されないので注意が必要である。そこでグアニジルπ電子と相互作用させるため、阻害剤のP₂部分に着目した。電子密度の高いハロゲンは電子密度の低いグアニジルπ軌道と弱い相互作用をするのではないかと考え、P₂位にハロゲンを導入したKMI-1303は予想通り強力なBACE1阻害活性を示した¹⁴⁾(図4)。

以上のようなsubstrate-based designにより設計したペプチド鎖を有する阻

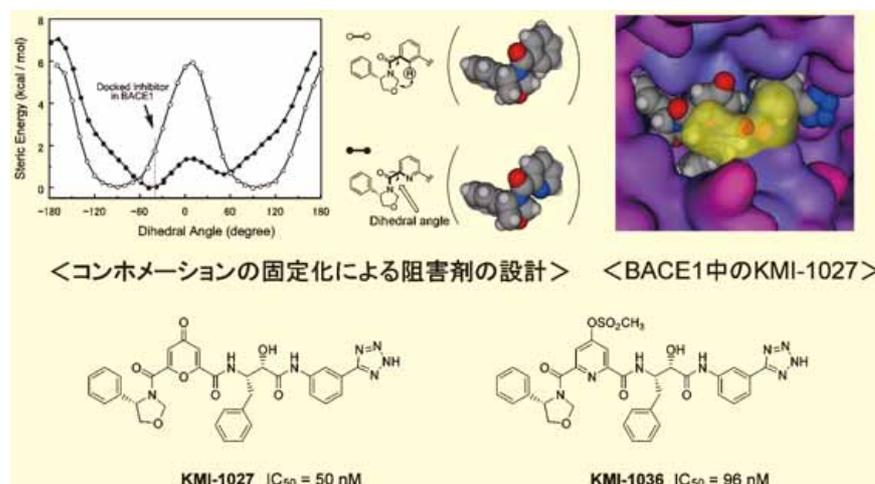


図3. 非ペプチド型 BACE1 阻害剤 KMI-1027, -1036 の設計

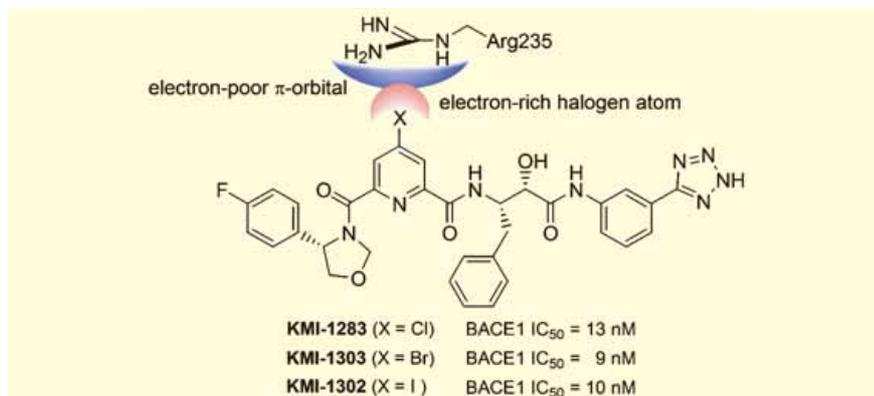


図4. BACE1 阻害剤 KMI-1303 の設計

害剤から実際の臨床応用が可能な (drug-like) 化合物を設計する創薬アプローチは HIV プロテアーゼ阻害剤開発では大成功し、AIDS 治療において多大な貢献があった。しかしながら、ペプチドからの創薬は設計手法として確立されたものでなく、企業での創薬現場ではペプチドを排除した (Lipinski's rule of five により) 化合物ライブラリーを用いた High-throughput screening (HTS) や *in silico* 創薬が主流である。しかしながらこれらの手法には問題点もある。例えば、多くの企業は独自に化合物ライブラリーを構築もしくは外部から購入する努力をしているが、企業の業務形態によっては化合物に偏りがあり、化合物ライブラリーの diversity が欠けていることが多い。また *in silico* HTS においては、現在の技術レベルでは薬物と標的蛋白質のドッキングエネルギーを精度よく評価できないため、一般的にヒット率は低い。ドッキング計算の精度が低いため、Pharmacophore という 100 年前

に考案された設計概念の導入や、MTS (Multiple target screening) 法などの精度を上げる試みもされているが、設計概念にもっと別のパラダイムシフトが必要なのかもしれない。それに対して substrate-based design によって得られたペプチドからの創薬は、偶然やセレンディピティによらず論理的に阻害剤を設計できる唯一の方法であり、*in-silico* conformational structure-based drug design はペプチドから非ペプチドへの創薬の有用なツールの一つではないかと思われ、その活用が期待される。

5 おわりに

近年、AD 発症のメカニズムが明らかになりつつあり、AD の根本的治療薬を目指してセクレターゼ阻害剤、Aβ 抗体、Aβ 凝集阻害剤などが精力的に研究されている。BACE1 阻害剤に関しては多くの化合物が報告されているが、他酵素に対する選択性や脳血液

関門への透過性が問題となっている。エーザイの開発パイプライン上に BACE1 阻害剤 E2609 (前臨床段階) があるが、現在 BACE1 阻害剤で臨床試験段階にあるのは CoMentis 社の開発した CTS-21166 のみであることから開発の困難さがうかがえる。AD 克服のため、今後の研究の進展が期待される。

【参考文献】

- (a) Selkoe, D. J. : *Nature*, **399**, A23 (1999).
(b) Sinha, S. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 11049 (1999).
- Theuns, J. *et al.* : *Hum. Mutat.*, **27**, 888 (2006).
- Roberds, S. L. *et al.* : *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 1317 (2001).
- Takasugi, N. *et al.* : *Nature*, **422**, 438 (2003).
- (a) Kreft, A. F. *et al.* : *J. Med. Chem.*, **52**, 6169 (2009). (b) Imbimbo, B. P. : *Drug Discov. Today : Ther. Strateg.*, **5**, 169 (2008).
- (a) Ghosh, A. K. *et al.* : *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 3522 (2000). (b) Hong, L. *et al.* : *Science*, **290**, 150 (2000). (c) Ghosh, A. K. *et al.* : *J. Med. Chem.*, **44**, 2865 (2001).
- (a) Shuto, D. *et al.* : *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 4273 (2003). (b) Kimura, T. *et al.* : *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 1527 (2004). (c) Kimura, T. *et al.* : *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 211 (2005).
- Asai, M. *et al.* : *J. Neurochem.*, **96**, 533 (2006).
- (a) Kimura, T. *et al.* : *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 2380 (2006). (b) Hamada, Y. *et al.* : *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 4354 (2006). (c) Hamada, Y. *et al.* : *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 1649 (2008).
- Ebina, M. *et al.* : *J. Neurosci. Res.*, **87**, 360 (2009).
- Hamada, Y. and Kiso, Y. : *Expert Opin. Drug Discov.*, **4**, 391 (2009).
- 濱田芳男、木曾良明 : 日本薬学会第 130 年会要旨集 2, p83 (2010).
- Hamada, Y. *et al.* : *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 1654 (2008).
- Hamada, Y. *et al.* : *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 2435 (2009).

β-セクレターゼ (BACE1) 阻害剤



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
115-00901	KMI-429	細胞生物学用	1mg	45,000
112-00911	KMI-574	細胞生物学用	1mg	45,000
119-00921	KMI-1027	細胞生物学用	1mg	45,000
116-00931	KMI-1303	細胞生物学用	1mg	45,000

新しい免疫沈降実験ツールの紹介

和光純薬工業株式会社 ゲノム研究所 西部 隆宏、吉居 華子

はじめに

免疫沈降法は、ビーズに固定化した抗体が抗原（目的のタンパク質）と反応し沈殿することを利用した抗原の分離・精製法です。この方法は単に抗原タンパク質を精製するための方法ではなく、抗原タンパク質と相互作用するタンパク質や核酸などを共沈させることができるため、タンパク質間相互作用の同定、クロマチン免疫沈降（Chromatin Immunoprecipitation : ChIP）、RNA免疫沈降（RNA Immunoprecipitation : RIP）などの実験に応用されており、プロテオミクス、エピジェネティクス、non-coding RNA 研究など幅広い研究分野で重要な技術となっています。この度、当社では免疫沈降法に適した抗体固定化ビーズを簡便に作製することができる Antibody Immobilization Kit IP を開発しましたのでご紹介します。

Antibody Immobilization Kit IP の特長

免疫沈降法で使用するビーズには一般的に多孔性アガロースやセファロースまたは磁性体などが用いられていますが、本キットではシリカビーズの表面に特殊ポリマーをコーティングした非特異吸着性の低い新しいタイプのビーズを採用しています。粒子径が1~8 μm と小さく、アガロースやセファロースに比べ高密度であることから、遠心分離後のビーズがチューブの底にしっかりと吸着し、上清の除去をデカンテーションにより行うことが可能です。また抗体のビーズへの固定化法は一般的

に Protein A や Protein G などを通してアフィニティー結合により固定化する方法とビーズ表面の官能基と抗体のアミノ基をカップリングさせ化学結合により固定化する方法が用いられていますが、本キットでは化学結合による固定化法を採用しています。ビーズ表面の PNP (*p*-ニトロフェニルオキシカルボニル) 基と抗体のアミノ基が反応することで抗体をビーズに固定化することができます (図1)。化学結合による固定化法はアフィニティー結合による固定化法に比べ操作ステップが多く時間も要するのですが、固定化した抗体が剥がれにくい、抗体の動物種やサブクラスによる固定化効率への影響を受けにくい、抗体以外のタンパク質も固定化可能などの利点を有しています。本キットにはビーズに抗体を化学結合させるために必要な試薬がすべてセットされており、簡便に抗体固定化ビーズを作製することができます。

浄するプロトコール1と、中性bufferと酸性bufferで交互に洗浄するプロトコール2を設定しています。ビーズから剥がれた抗体が免疫沈降溶出液中に混入するのを改善したい場合にはプロトコール2が有効です。この2通りのプロトコールで抗ヒト血清アルブミン(HSA)モノクローナル抗体を固定化したビーズを用いて、HeLa細胞ライセート(1 $\times 10^6$ cells由来)に抗原のHSAを添加した溶液からの添加抗原の回収実験を行いました。その結果、どちらのプロトコールで作製したビーズを用いても、HeLa細胞由来の非特異吸着タンパク質の混入は少なく、添加したHSAが高純度に回収できることが示されました(図2)。また、プロトコール2により作製したビーズを用いた場合、免疫沈降溶出液中にビーズから剥がれた抗体の混入が抑えられていることが示されました(図2)。

RNA 免疫沈降法への応用

次に、本キットにより作製した抗体固定化ビーズをRNA免疫沈降法に応用した例をご紹介します。当社では本

抗体固定化ビーズの免疫沈降能

本キットでは抗体を固定化した後の洗浄条件として、中性bufferのみで洗



図2. 抗体固定化ビーズの免疫沈降性能

本キットを用いて抗体固定化時の洗浄条件が異なる2通りのプロトコール(プロトコール1: 中性bufferのみで洗浄、プロトコール2: 中性bufferと酸性bufferで交互に洗浄)により抗ヒト血清アルブミン(HSA)モノクローナル抗体固定化ビーズ(抗体固定化量2.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ beads)を作製した。そのビーズ2mgを使用して、HSA 200ngを添加したHeLa細胞ライセート(1 $\times 10^6$ cells由来)から免疫沈降法による添加抗原の回収実験を行った(抗原溶出には0.1 mol/l glycine-HCl (pH 2.5)を使用)。免疫沈降回収液をSDS-PAGEにかけ、銀染色により検出した結果、免疫沈降回収液中にHeLa細胞由来の非特異吸着タンパク質の混入は少なく、添加したHSAが高純度に回収できることが示された。また、プロトコール2により作製したビーズを用いた場合、免疫沈降回収液中にビーズから剥がれた抗体の混入が抑えられていることが示された。

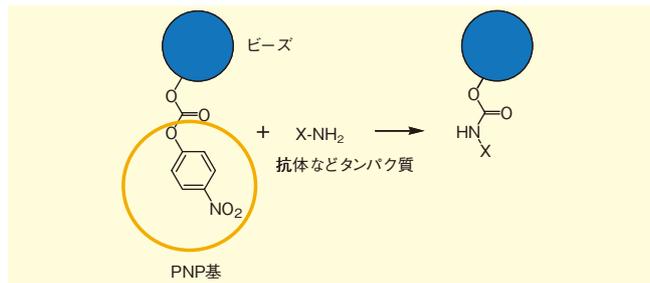


図1. ビーズ表面PNP (*p*-ニトロフェニルオキシカルボニル) 基とアミノ基の反応

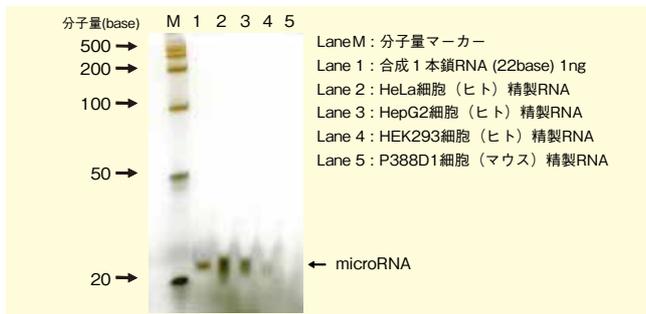


図3. 抗体固定化ビーズのRNA免疫沈降法への応用

RNA免疫沈降試薬のmicroRNA Isolation Kit, Human Ago2では、本キットで用いているシリカビーズに抗ヒトAgo2抗体を固定化したビーズを使用している。このmicroRNA Isolation Kit, Human Ago2を用いて、ヒト培養細胞株3種類（HeLa、HepG2、HEK293）、及びマウス培養細胞株（P388D1）からAgo2に結合したmicroRNAを精製した。精製サンプルをUrea-PAGEの後、銀染色によって検出した結果、ヒト培養細胞株からAgo2に結合した約22塩基のmicroRNAが高純度に精製されていることが示された（抗体が反応しないマウス細胞株からはmicroRNAは精製されなかった）。使用細胞数は 5×10^6 cells相当。

キットで用いているシリカビーズに抗Argonaute抗体を固定化したビーズを使用して、RNA免疫沈降法によりArgonauteタンパク質に結合したmicroRNAを取得できるmicroRNA Isolation Kitシリーズを販売しております。その中の1つで抗ヒトAgo2抗体を固定化したビーズを用いているmicroRNA Isolation Kit, human Ago2により、ヒト細胞株の細胞ライセートからAgo2に結合したmicroRNAを精製しました。その結果、さまざまなヒト細胞株から高純度のmicroRNAが取

得できることが示されています（図3）。

抗体以外のタンパク質の固定化

最後に、抗体以外のタンパク質をビーズに固定化する1例として、Protein Gタンパク質をビーズに固定化し、そのビーズを用いて溶液中の抗体回収能を評価しました。その結果、Protein G固定化ビーズの量に依存して、溶液中のマウスIgGを回収できることが示され、抗体以外のタンパク質をビーズに固定化したアフィニティー実験にも本キットを用いることができることが示

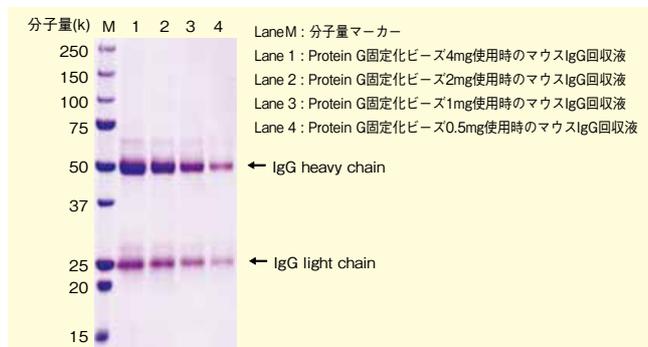


図4. 抗体以外のタンパク質の固定化

本キットによりProtein Gタンパク質をビーズに固定化し（Protein G固定化量 $20 \mu\text{g}/\text{mg}$ beads）、そのビーズ $0.5 \sim 4 \text{mg}$ を用いてTBS溶液に添加したマウスIgG（ $5 \mu\text{g}$ ）の回収能を評価した。回収液をSDS-PAGEにかけ、CBB染色により検出した結果、Protein G固定化ビーズの量に依存して溶液中のマウスIgGが回収でき、抗体以外のタンパク質をビーズに固定化してもアフィニティー実験に用いることができることが示された。

されました（図4）。

おわりに

以上のようにAntibody Immobilization Kit IPにより作製した抗体固定化ビーズは免疫沈降をベースとしたさまざまな実験に応用することができ、また、抗体以外のタンパク質のアフィニティー実験にも利用することができます。ぜひ皆様のご研究にお役立て頂ければと考えます。

RIP (RNA Immunoprecipitation)、IP (Immunoprecipitation) に最適



抗体固定化キット IP

アガロースよりも低バックグラウンド

本キットは、抗体をはじめとするタンパク質をビーズ担体に固定化する試薬キットです。本キットのビーズはmicroRNA Isolation Kitシリーズに使用しており、RIP Assayで多くの使用実績があります。

キット内容

- Antibody Immobilization Beads 200mg × 1本
- Antibody Immobilization Buffer 10ml × 1本
- Blocking Buffer 10ml × 1本
- Washing Buffer (Neutral) 80ml × 1本
- Washing Buffer (Acidic) 20ml × 1本
- Storage Buffer 20ml × 1本

※本キットは抗体・タンパク質をビーズ表面に固定化するキットであり、免疫沈降実験に必要な細胞溶解用試薬や抗原溶出用試薬は含まれておりません。用途に応じて必要試薬をご準備下さい。

※免疫沈降に使用するビーズ量によって使用回数が異なります。例えば2.0mg/免疫沈降で使用いただく場合には100回用に相当します。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
290-69301	Antibody Immobilization Kit IP	免疫化学用	1キット	50,000



細胞内タンパク質複合体（プロテオーム）解析

東北大学・加齢医学研究所・加齢ゲノム制御プロテオーム寄附研究部門
菅野 新一郎、洪 沢輝、安井 明

はじめに

細胞内のタンパク質は他のタンパク質と複合体を作って機能し、一つのタンパク質の多機能性は異なったタンパク質と形成する複合体の違いであると言えます。複合体を作る機構が進化して、一つのタンパク質が多くの機能を行なえる様になったとも言えます。従って、細胞内でのタンパク質の形成する複合体の決定が、そのタンパク質の細胞内機能の指標となります。これまで複合体解析の主な方法であった酵母を使った2-hybrid実験系は間違っただけで多量に産み出してきたことが検証の過程で明らかになり、代わりに、ヒト細胞エキストラクトの免疫沈降によるタンパク質複合体の単離と質量分析による結合タンパク質の決定が最も役に立つことが示されてきました。免疫沈降と質量分析による複合体同定では、ウイルスによるタンパク質発現を使った特異性の高い、しかし技術的に難しい方法や、一過性発現で簡単に始められるが超クリーン設備が必要な方法等が知られていて、一般に実験が困難と誤解されている方もおられるかもしれません。しかし、実際は、少しの注意をすれば誰にでも出来る方法があります。私達は細胞内でのDNA損傷の修復機構を理解するために、損傷に応答するタンパク質を可視化して顕微鏡で解析し、同時にその際に働くタンパク質複合体の決定をする必要から、簡単に始められ、成功する確率の高い、最適化したプロトコルを開発致しました。複合体解析から得られる情報は大変役に立ちます。未知のタンパク質の細胞内機能を知り、既知のタンパク質の新しい機能を発見する方法です。

タンパク質の細胞内複合体（プロテオーム）の決定

今ここに研究者のA先生は、興味を持っている或るヒトタンパク質Xが細胞内でどのような働きをしているかを知りたいと思っておられます。発

現のノックダウンをやってみました。細胞の増殖がおかしくなり、このタンパク質がこれまでに知られている以上の重要な機能を持っている事が示唆されました。しかし、何をしているかは全く分かりません。データベースで調べてみると、酵母の2-hybrid実験の結果等から幾つものタンパク質と結合することが出ていますが、論文を探してもそのような根拠は無く、一度Westernで調べてみましたが、2-hybridのデータベースの情報は当てにならない事が分かりました。そこで知り合いを通じて私達を尋ねてくれました。Aさんのご質問は、どうしたら実際の細胞の中で形成されるタンパク質複合体を決定できるか、さらに特定の機能を行なっているときの複合体を決めたいのだが、どうしたら良いかというご質問です。

DNA修復の研究での可視化解析とプロテオーム解析の重要性

私達はDNAに傷が出来たときにどのように修復されるかを研究してきましたが、これまでの知識は細胞が感受性になる遺伝子の欠損は何かという遺伝的解析か、精製タンパク質と傷を持ったDNAを使った*in vitro*の解析で得られた知識で、実際の細胞ではDNAの傷がどのように直されるかという重要な質問には答えられませんでした。DNA修復に働くタンパク質の機能欠損は発癌の原因となり、また同時にその欠損を持つ癌細胞の治療のターゲットにもなります。もともとDNAに傷が出来たときに細胞内でどのように修復されるかを知るために、顕微鏡のレンズを通してレーザー光を細胞核の一部に当て、そこに集る修復タンパク質の動態解析を行ないつつ、その修復タンパク質の複合体を決める目的で色々な方法を試みました。私達は遺伝子の種々の発現方法を培養細胞で試み、最も確実にしかも早く複合体が同定出来る方法を決め、免疫沈降法を改善し、nanoLC-MS/MS質量分析

機と免疫沈降法を用いて機能により形成される複合体を同定する方法を確立しました^{1,2,3}。

ポリコーム (Polycomb-group, PcG) タンパク質は細胞分化の際の遺伝子発現抑制に関わる制御因子です。その中でヒトhPHF1タンパク質はマウスのホモログをmPc1と称し、H3K27メチル化で働くEED-EZH2複合体のサブユニットとして知られています。GFP-PHF1をHeLa細胞に発現させ、405 nmのレーザー光を顕微鏡のレンズを通して細胞核に照射すると二重鎖切断の指標である γ H2AXと同じ様にGFP-PHF1が集積し(図1A)hPHF1抗体でも確認出来ました(図1B)²。集積のタイムコースは素早い集積と解離を示しています(図1C)。二重鎖切断の修復は非相同末端結合(non-homologous end-joining, NHEJ)と呼ばれ、Kuタンパク質が二重鎖切断に結合して直接に再結合する機構で修復されますが、種々のmutant CHO細胞を使ってGFP-PHF1の集積を調べると、この集積はKuタンパク質依存的である事が分かりました(図1D)。

そこで、hPHF1の結合タンパク質を調べる目的で、PHF1遺伝子にFLAG[®]タグを付け、ヒトHEK293細胞に組換えで一コピーを入れ、CMVプロモーターを付けた定常発現細胞を樹立しました²。この細胞とベクターのみを入れたコントロール細胞の核エキストラクトをFLAG[®]抗体ビーズに吸着させ、免疫沈降して得られたゲルが図2Aです。nanoLC-MS/MS質量分析機でFLAG[®]-hPHF1のレーンを調べるとポリコームPcGの構成タンパク質として知られるものと、p53を含むDNA損傷応答に関わるものが多数見つかりました(図2B)。この際に樹立したHEK293細胞は大変役に立ち、質量分析で決定したタンパク質は免疫沈降で再度確認出来ます(図2C)。ここではKu70タンパク質がhPHF1と結合している事も分かりました。さら

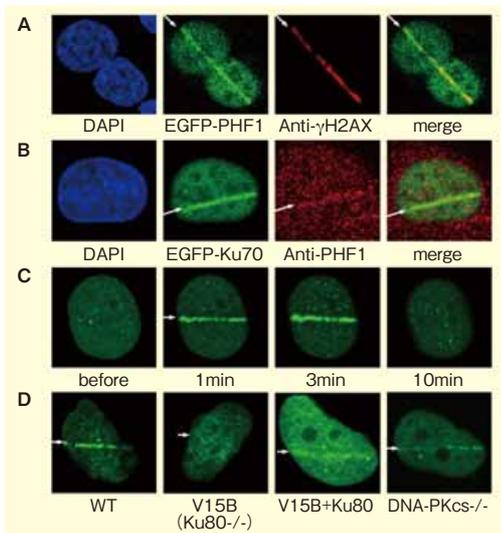


図 1.

に、hPHF1をノックダウンした細胞ではX線に感受性になることも分り、ポリコムタンパク質で転写の制御因子hPHF1 (mPc11) がDNA損傷応答やDNA修復に機能していることを証明致しました。癌とPcG遺伝子の関係が報告されていることから、これらの発見はPHF1タンパク質が発癌や癌

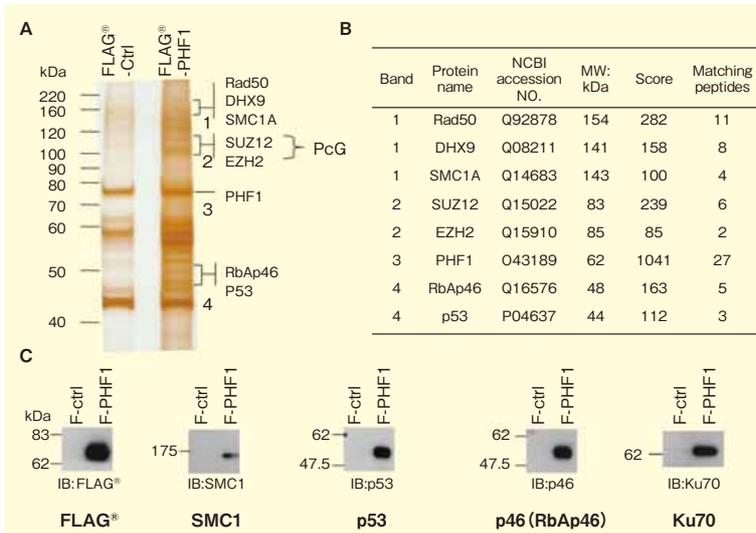


図 2.

治療との関係からも注目されます。PHF1の欠損の癌細胞が見つければ、X線に感受性であることが期待されるからです。

研究者のAさんが持って来られた機能未知タンパク質Xについて、ヒト細胞で一過性に発現させたGFP融合タンパク質Xの過酸化水素処理後の細胞内分布の変化を図3Aに示しています。このタンパク質はこの処置に細胞内局在を大きく変えていますので、その際にXタンパク質が形成する複合体を決定しようと試みました。FLAG[®]タグを付けたXタンパク質の定常発現細胞をヒトHEK293細胞に樹立して、免疫沈降で得られた相互作用タンパク質のバンドが図3Bに示してあります。タンパク質Xについては過酸化水素で誘導されるタンパク質も決める事ができそうです。このようにして決めた結合タンパク質が実際に損傷に応答しているかを調べるには、同定したタンパク質のcDNAを取り、GFPをつないで発現させ、同じような反応をするかどうかを調べます。良く似た挙動をする場合には、いずれかをsiRNAで発現抑制し、それが他方の集積に影響するかどうかを見てみると、集積の依存性(複合体形成のヒエラルキー)が明らかになります。ま

た、それぞれのdeletionを作りGFPにつないで、タンパク質のどこの部分が応答するかを調べます。このようにして、細胞内のタンパク質複合体の機能と構造を明らかにすることが出来ます。

この小稿では定常発現細胞の樹立と免疫沈降の方法についてご紹介いたします。それぞれの過程では特別な技術を前提にしません、プロテオーム解析で成功するためにはいくつかのコツが必要です。どこにも書いていない必須のコツをお伝えします。

タンパク質複合体決定実験の順序は定常発現細胞の樹立

私達の経験から、まず必要なのは、Xタンパク質のcDNAにタグ(例えばFLAG[®])を付けてヒト細胞のゲノムに一カ所のみ組み入れて、発現させる細胞を樹立する事です。組み入れるにはヒト細胞のゲノムに組み込まれるサイトを持ち、組み込むサイトを持つプラスミドに発現コンストラクトを作り組み込む酵素遺伝子とともに導入するFlp-In[®]システム等が便利です。使えるヒト細胞はHEK293細胞が便利ですが、神経細胞などを必要とされる場合はStable細胞を樹立する必要があります。一過性発現でも複合体が同定出

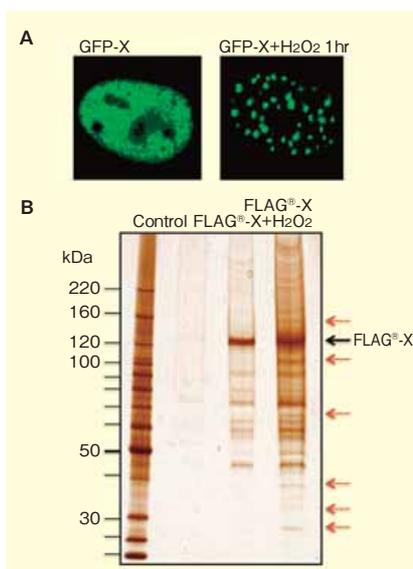


図 3. タンパク質の可視化解析とプロテオミクス

A. 核タンパク質XはH₂O₂やアルキル化剤MMS処理で核内に大きなfociを形成します。B. この現象を理解するために、Flp-In[®]システムでFLAG[®]-Xを発現するヒトHEK293細胞を樹立し、通常の状態とH₂O₂処理した細胞を免疫沈降しました。

来ますが、発現量が多すぎて細胞内で僅かに存在する結合分子が見つからないことが起きます。定常発現細胞を一度樹立すると、この細胞は色々な条件で培養出来、特定の機能での複合体を決めるのに役立ち、さらに決定した複合体をWesternで検証するのにも大変役に立ちます。是非細胞を作ってみられる事をお勧めいたします。Flp-In®の場合、通常一ヶ月以内に細胞が樹立出来ます。ただ知っておくべき事は、遺伝子によっては定常発現が毒性を発揮し、細胞が樹立出来ない事がありますので、そのときは発現誘導の掛かる系(テトラサイクリン誘導系など)を使う必要があります。遺伝子によっては非誘導状態での発現レベルでも細胞が樹立出来ないこともあります。そのときはタグをGFPのように大きくすれば、細胞が樹立できることがありますが、何らかの重要な相互作用が見られない事を意味しています。しかし、全く見られないよりは、ましでしょう。

免疫沈降法

相互作用するタンパク質を同定するにはどのくらいの量の細胞が必要か? 10 cmシャーレ1枚でできると言う人もいますが、十分余裕をもって解析するためには15 cmシャーレ(70~80%コンフレント)2~4枚培養した細胞の量で行うのが最適です。ここではFLAG®タグを付けたXタンパク質の安定発現細胞株を用いた実験方法をご紹介します。

1) 細胞の破碎と分画

A. 回収した細胞(発現させた細胞とコントロール用にベクターのみを発現させたもの、15 cmシャーレ2~4枚)をSHE緩衝液で一度洗い遠心してペレットにします。これに3~4 ml量のSHE緩衝液を加え、ポッター型ホモジェナイザーを使って細胞を破碎します。ストローク数は10~20回の間で壊れ具合を見ながら作業します。

B. 破碎した細胞を2~3,000×gで10分ぐらい遠心して上清と沈殿に分離します。それらを粗細胞質画分と粗核画分とします。粗核画分の沈殿はSHE緩衝液を加えて再度けん濁し遠心して一度washします。

C. 粗核画分のペレットに3~4 ml量のNE緩衝液を加えて、ポッター型ホモジェナイザーか超音波破碎機を使って再度けん濁して、氷上で10分置いた後、超遠心機か卓上冷却遠心機で10,000×g以上で15分遠心し上清を回収します。同様に粗細胞質画分も10,000×g以上で15分遠心し上清を回収します。

D. 遠心して回収した細胞質画分と核エキストラクトにそれぞれRNase A (10 µg/ml), DNase I (10 µg/ml), Benzonase® (50 U/ml)を加えます。シリンジを使って0.45µmのタンパク質低吸着性フィルターで濾過します。

* SHE緩衝液組成

HEPES pH7.5 (10 mM), mannitol (210 mM), sucrose (70 mM), EDTA (1 mM), EGTA (1 mM), spermine (0.15 mM), spermidine (0.75 mM)

* NE緩衝液

HEPES pH7.5 (50 mM), NaCl (0.35 M), NP-40 (0.1%), Protease Inhibitor Cocktail

2) エキストラクトと抗体ビーズのインキュベーション

調整した細胞質エキストラクトと核エキストラクトをそれぞれ1.5 mlチューブに移し(1~1.5 ml)、抗体ビーズ(ここではANTI-FLAG® agarose 50 µl)を加えます。ローテーターを使って4~8度で3~4時間インキュベーションします。オーバーナイトでのインキュベーションは避けます。

3) 抗体ビーズの洗浄

A. インキュベーション後、低速で遠

心して(1,000×g, 2 minぐらい)細胞質エキストラクトと核エキストラクトをそれぞれ除きます。ビーズに0.15 M NaCl洗浄緩衝液を加え何度かインバートし、低速で遠心後上清を除きます。0.3 M NaCl洗浄緩衝液を加えて同様に洗浄します。

B. 0.3 M NaCl洗浄緩衝液を加えローテーターを使って4~8度で10分インキュベーションします。

C. インキュベーション後、低速で遠心して上清を除きます。PBSを加えて同様に洗浄します。上清を除いたあとに再度高速遠心して、十分に上清を除きます。

* 0.15 M NaCl 洗浄緩衝液

HEPES pH7.5 (50 mM), NaCl (0.15 M), NP-40 (0.1%)

* 0.3 M NaCl 洗浄緩衝液

HEPES pH7.5 (50 mM), NaCl (0.3 M), NP-40 (0.1%)

4) ペプチド溶出

抗原ペプチド(ここではFLAG® peptide (500 µg/ml in HEPES buffer)を60 µl加える)を加え室温で10分間インキュベーションします。インキュベーション後、高速で遠心して上清を回収します。もう一度回収したペプチド溶出液を遠心して完全に抗体ビーズを除きます。回収したペプチド溶出液にSDS-PAGE用サンプルバッファーを加え、加熱処理してサンプルの調整を終了します。

免疫沈降のコツ

〈細胞抽出液の調整〉

a) 分画をしよう!

コンタミを少なくし、微量にしか存在しない相互作用タンパク質を同定するにはtotal cell-lysateでIPするよりも、細胞質や粗核、粗ミトコンドリア画分などに分画してIPすると効果的です。細胞や臓器の破碎用バッファーは等張で膜を保護する組成のものを使います。例えば、SHE緩衝液はポリアミンを添加してマイナスにチャージ

した膜表面を安定化し核やミトコンドリアを保護するよう工夫してあります。

b) Filtrationをしよう！

細胞質や核抽出液などは直接IPしないで、一度フィルターを通してIPする。抽出液調整の過程で、膜がミセル化したり、細胞の破片などが混在している。遠心して透明になったように見えても脂質のミセルがべたべたとresinに付いてコンタミを引き起こす原因になります。ただし、目的のタンパク質が疎水性であったり、膜結合性のタンパク質の場合はフィルターに吸着されないように注意しよう。

〈インキュベーション〉

a) サンプルにDNase, RNaseを添加しよう！

コンタミの割合の多くを占めるのがRNA関連、DNA関連のタンパク質。ribosomal proteinやRNAスプライシング因子などのRNA結合タンパク質、また、Ku70, Ku80, DNA PKcsなどのDNA結合タンパク質がRNAやDNAによってIPしたビーズにコンタミしてくる。サンプルにDNase, RNaseを添加してコンタミを防ごう！

b) インキュベーションは4時間以内にしよう！ オーバーナイトはだめ！

抗体・抗原の結合は早くて強い。数時間もすれば抗原は結合しているので、インキュベーション時間は長くても4時間以内にしよう。オーバーナイトで反応させるのは*in vitro*で無差別級タンパク質結合実験をしているようなもの、誰が勝者になるのか・・・？
〈Resinの洗浄〉

a) まずは情け容赦なく洗浄

生理的に重要な相互作用タンパク質の結合は立体的に密着するようになっていて、外界の溶媒の影響を受けづらい。実際、0.6 MのNaClを含む洗浄液で洗浄しても外れないことが多い。そこで、コンタミするタンパク質を洗い流すために、0.3～0.5 MのNaCl

0.1～0.5% detergentを含む洗浄液で十分洗浄しよう。

*時々細胞抽出液を長い時間透析して0.1 Mぐらいの塩濃度にしてからIPする人がいますが、百害あって一利無しです。新たな無差別級タンパク質結合試合をしています。

b) バッファーの組成を変えた洗浄液でさらに洗浄

洗浄には塩やdetergentの組成だけではなくバッファーの組成、HEPESからリン酸バッファーやTris HClからリン酸バッファーへ変えて洗浄すると効果が上がります。

〈サンプルの溶出とSDS-PAGE用サンプルの調整〉

a) タグのペプチド溶出は少し高めの濃度で、resinはすべて除くことが重要です。FLAG® タグやMycタグなどのIPのペプチド溶出は少し高めの濃度で行う。マニュアルにある濃度では十分に溶出されずにサンプルのボリュームが増えるので、2～3倍高めの濃度で容量が増えないように溶出する。また、resinは確実に除くことが重要です。

b) SDS-PAGE用のサンプルバッファーは用時調整する。

SDS-PAGEサンプルバッファー由来のケラチン汚染を防ぐため、ペプチド溶出のサンプルや抗体で直接IPしたresinは用時調整した（あるいはMass解析用にストックした）サンプルバッファーを使ってサンプルを調整する。

質量分析機によるタンパク質の同定

SDSゲルに沈降タンパク質を流し、コントロール細胞の免疫沈降と比べてユニークなバンドを切り出し、質量分析機で同定します。コントロール細胞はベクターのみを入れた細胞や、同じ細胞を別な条件で育てた場合も使えます。細胞の培養条件や処置を変える事により、特定の機能で形成されるタンパク質複合体を決定することが出来ます。例えば、細胞にX線を照射した場

合等です。多くのタンパク質は細胞内で種々の機能に関わっていて、それぞれ形成する複合体が異なっているのです。その複合体を決定することにより新しい機能が発見出来ます。

質量分析機にはいくつかの種類がありますが、それぞれ得意・不得意な分析があってここでは機械についてはコメントしません。しかし、タンパク質同定にとって共通の問題はサンプルにコンタミしてくるケラチンです。nanoLC-MS/MSでは通常分解したフラグメントの量の多いものから測るシステムになっていますので、自分の目的のタンパク質量が少ないとケラチンに邪魔されて測れなかったり、スコアが大変低く評価されたりします。通常の研究室ではケラチンのコンタミを避けることは不可能ですが、少しでもケラチンのコンタミを避けるように工夫します。以下のような注意が必要です。

1) ラボのミリQ水を信用しない。

ミリQ水の機械が悪いというわけではないのですが、通常はラボ共通に使用され、またオープン系で採水されるものですからミリQ水といえどもケラチンのコンタミを考えなくてははいけません。できればMassサンプル調整に使用する水（SDS-PAGE用のサンプルバッファーの調整など）はHPLC用の蒸留水として市販されているものを使用します（和光HPLC用蒸留水3L 042-16973がお勧め）。

2) サンプル調整用にタンパク質低吸着性のチューブ・チップを使用する。

免疫沈降法でペプチド溶出したサンプルは銀染レベルのタンパク質量を扱うこととなりますので、ロスさせないためにタンパク質低吸着性のチューブ・チップを使用します。シリコン処理のものもいいですが、一般用の低吸着性のチューブ・チップでOKです（スミロンプロテオセーブマイクロチューブ、MBプラチナチップがお勧め）。

3) 電気泳動用のゲルは自作せずプレキャストゲルを使用する。

2つの理由から自作ゲルではなくプレキャストゲルの使用を勧めます。1つはやはり作成時にケラチンのコンタミがあること、また2つ目はアクリルアミドの重合不足により泳動したタンパク質がアクリルアミドによって修飾される可能性があるからです。値段が高いと思ってもここは無難にプレキャストゲルを使用します。

4) 銀染色をする場合はクロスリンク剤を使用していないキットを使う。

銀染色のキットを使う場合、増感剤としてクロスリンク剤を使用しているものがあるので注意しましょう。クロスリンク剤を使ってしまうとタンパク

質同定が非常に困難になります。はじめからMass用として市販している銀染色キットがあります(和光Silver Stain MS Kit 299-58901脱色液付き)。

ゲルから切り出したサンプルは還元処理、アルキル化処理をしてトリプシンなどのペプチダーゼで切って質量分析機にかけます。このような目的の質量分析には少量のタンパク質を正確に決める事の出来るnanoLC-MS/MS質量分析機が適している。私達は、プロテオーム研究のサポートをするために、定常発現ヒト細胞の樹立とnanoLC-MS/MS質量分析機を使ったタンパク質決定のお手伝いをする会社を立ち上げました(下記参照)。ホームページをお尋ね下さい。

ホームページは<http://www.jbios.co.jp/proteomicsbindingprotein.html>で、お尋ねはpro@jbios.co.jpにお寄せ下さい。

さて、このようにしてA先生のもって来られたタンパク質Xの機能が分って来ました。驚くべき多彩な機能に関わり合っていることは、これから発表される論文で明らかにされます。

【参考文献】

- 1) Kanno, S., Kuzuoka, H., Sasao, S., Hong, Z., Lan, L., Nakajima, S. and Yasui, A. : *EMBO J.*, **26**, 2094-2103 (2007).
- 2) Hong, Z., Jiang, J., Lan, L., Nakajima, S., Kanno, S., Koseki, H. and Yasui, A. : *Nucleic Acids Res.*, **36**, 2937-2947 (2008).
- 3) Lan, L., Ui, A., Nakajima, S., Hatakeyama, K., Hoshi, M., Watanabe, R., Janicki, S. M., Ogiwara, H., Kohno, T., Kanno, S. and Yasui, A. : *Mol. Cell.* in press.

タンパク質細胞内複合体(プロテオーム)解析サポートサービス (株)日本バイオサービス

受託名	解析内容	希望納入価格(円)
タンパク質同定*	ゲル内消化のうえ、nanoLC-MS/MS装置を用いて解析を行い、Mascot searchによりタンパク質を同定します。	60,000

※お客様にてSDS-PAGE等により得られたゲル断片をお送りいただいた場合も対応可能です。ご依頼及び受託内容についてはlab-tec@wako-chem.co.jpまでお問合せ下さい。

関連商品

ポリアクリルアミドプレキャストゲル

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
195-15171	SuperSep™ Ace, 6%, 13well	電気泳動用	10枚	18,000
198-14941	SuperSep™ Ace, 7.5%, 13well	電気泳動用	10枚	14,000
191-14931	SuperSep™ Ace, 7.5%, 17well	電気泳動用	10枚	14,000
195-14951	SuperSep™ Ace, 10%, 13well	電気泳動用	10枚	14,000
192-14961	SuperSep™ Ace, 10%, 17well	電気泳動用	10枚	14,000
199-14971	SuperSep™ Ace, 12.5%, 13well	電気泳動用	10枚	14,000
196-14981	SuperSep™ Ace, 12.5%, 17well	電気泳動用	10枚	14,000
193-14991	SuperSep™ Ace, 15%, 13well	電気泳動用	10枚	14,000
190-15001	SuperSep™ Ace, 15%, 17well	電気泳動用	10枚	14,000
197-15011	SuperSep™ Ace, 5-20%, 13well	電気泳動用	10枚	14,000
194-15021	SuperSep™ Ace, 5-20%, 17well	電気泳動用	10枚	14,000
191-15031	SuperSep™ Ace, 10-20%, 13well	電気泳動用	10枚	14,000
198-15041	SuperSep™ Ace, 10-20%, 17well	電気泳動用	10枚	14,000
198-15301	SuperSep™ Ace, 15-20%, 13well (Tricine Gel)	電気泳動用	10枚	19,500

銀染色キット

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枚用	19,000



タグ抗体・タグ抗体ビーズ・ペプチド

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
018-22381			200 µg	24,000
014-22383	Anti DYKDDDDK tag, Monoclonal Antibody	免疫化学用	1mg	48,000
012-22384			5mg	77,000
015-22391	Anti DYKDDDDK tag, Monoclonal Antibody, Peroxidase Conjugated	免疫化学用	200 µl	45,000
012-22781			1ml	48,000
018-22783	Anti DYKDDDDK tag Antibody Beads	免疫化学用	5ml	90,000
016-22784			25ml	290,000
044-30951			5mg	18,000
040-30953	DYKDDDDK Peptide	遺伝子研究用	25mg	80,000

HPLC用蒸留水

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
046-16971			1 l	1,500
042-16973	Distilled Water	高速液体クロマトグラフィー用	3 l	2,600

新しい素材



シクロデキストリンポリマー【CDP】

シクロデキストリンポリマー（CDP）は、シクロデキストリンを3次元架橋してポリマー化しているため、シクロデキストリンの特性を持ちながら水や有機溶剤に溶けない新しい素材です。

SDS、ポリフェノール類やフラボノイド類、インドール化合物などに高い吸着能があり、さまざまな用途への応用が期待できます。

特長

- 水や有機溶媒に不溶
- 低分子有機化合物を選択的に包接
- 包接している化合物を徐々に放出
- メタノールなどの有機溶媒中では、包接した化合物を容易に放出

使用例

■ ビスフェノールAの吸着率（参考値）

	α-CDP	β-CDP	γ-CDP
吸着率(%)	20～40	60～80	40～60

（試験方法）

ビスフェノールA標準品60mg+メタノール30ml+水(→500ml)(A液)。CDP 0.1g+A液100ml→5時間かき混ぜる→10分間静置する→その上澄液1mlをガラスシリンジ1mlで吸い取り0.2μmフィルターでろ過する→ろ液(B液)。

A液及びB液それぞれ20μl→高速液体クロマトグラフィー

$$C = \frac{A-B}{A} \times 100$$

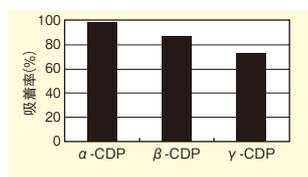
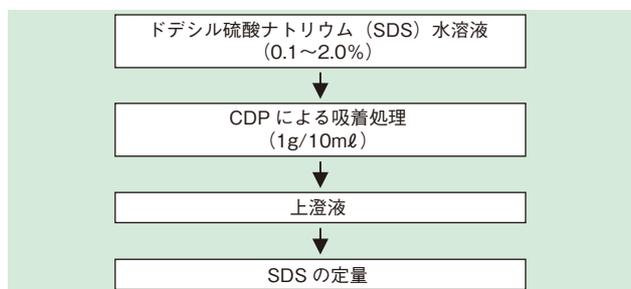
C：ビスフェノールA吸着率(%)

A：A液のビスフェノールAのピーク面積

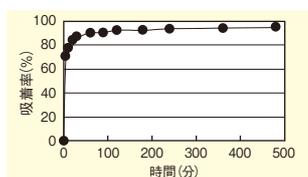
B：B液のビスフェノールAのピーク面積

応用例

■ 界面活性剤の吸着試験



CDPのSDS吸着率
(SDS吸着能：約120mg/g CDP)



SDS吸着率における接触時間の検討

SDS吸着の温度の影響

温度(°C)	20	4
吸着率(%)	92.4	90.4

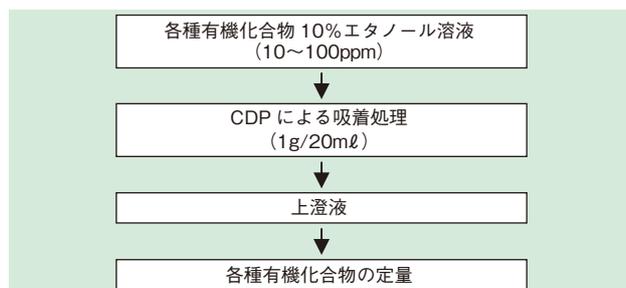
SDS吸着のpH及び塩の影響

溶液の種類	水	0.1mol/l HCl	0.1mol/l NaOH	1mol/l NaCl
吸着率(%)	92.4	99.7	99.9	99.4

その他の界面活性剤の吸着率

界面活性剤	ポリ(オキシエチレン)オクチルフェニルエーテル			アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム			塩化セチルピリジニウム		
	α	β	γ	α	β	γ	α	β	γ
CDP	96.3	99.3	99.2	96.4	94.3	88.4	94.2	96.6	93.8

■ その他有機化合物吸着試験



CDPによる各種化合物の吸着率(%)

	α-CDP	β-CDP	γ-CDP
フラボン	96.5	98.9	97.1
フラボノール	73.9	93.2	83.8
フラバノン	92.3	97.8	94.7
没食子酸	82.2	59.6	65.0
カテキン	56.0	97.5	66.7
没食子酸エピガロカテキン	90.5	83.2	86.6
ケルセチン	96.9	98.5	97.9
ヘスペリジン	35.1	86.1	77.7
ダイジン	61.1	93.4	86.4
ゲニスチン	92.0	96.7	96.2
インドール	90.6	93.6	90.1
インドール酢酸	85.6	87.6	72.8
ヨヒルビン	70.2	93.2	60.4

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
037-21611	α-Cyclodextrin Polymer【α-CDP】	5g	8,000
035-21612		25g	30,000
034-21621	β-Cyclodextrin Polymer【β-CDP】	5g	8,000
032-21622		25g	30,000
031-21631	γ-Cyclodextrin Polymer【γ-CDP】	5g	8,000
039-21632		25g	30,000

高分子固定化触媒



PI 金属触媒シリーズ

高分子固定化金属触媒は、東京大学大学院理学系研究科の小林修教授が開発した高分子カルセランド (Polymer-Incarcerated) 型金属触媒です。

今回、新たに「PI/カーボンブラック金(0)」、「PI白金(0)/金(0)」、「PI白金(0)、酸化触媒」の3品目をラインアップしましたのでご紹介します。

高分子固定化金触媒

PI/カーボンブラック 金(0)

アルコールの酸化反応は有機合成化学において重要な反応です。PI/カーボンブラック 金(0) [PI/CB Au] は、酸素雰囲気下、温和な条件でアルコールをケトンに酸化することができます。

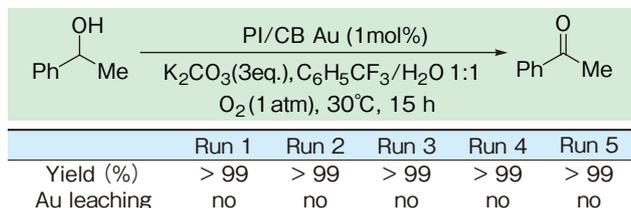
本品は、架橋型ポリスチレンに加えてカーボンブラックを担体に用い、両者に金が担持された固定化触媒です¹⁾。担体にカーボンブラックを加えたことで金の凝集による触媒の不活性化を防ぎ、且つ金の担持量を増加させることが可能となりました。その結果、取扱いが容易になり、より安定な触媒活性が得られるようになりました。

特長

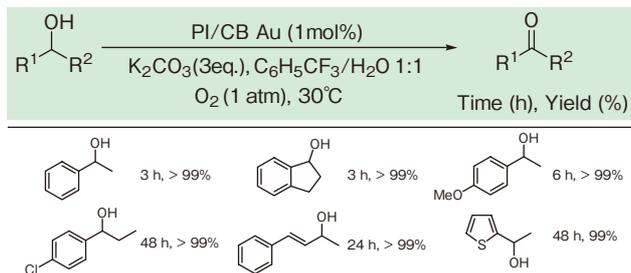
- 反応生成物または原料との分離が容易
- 取扱いが容易
- 温和な条件で酸化反応が行える
- 繰り返し使用が可能

反応例

1-フェニル-1-エタノールの酸化反応で触媒の回収・再使用を5回行うと、いずれも金の流出を伴うことなく定量的にアセトフェンが得られます。



PI/CB Auを用いてさまざまな2級アルコールの酸化反応を行うと、それぞれ対応するケトンを高収率で与えます。



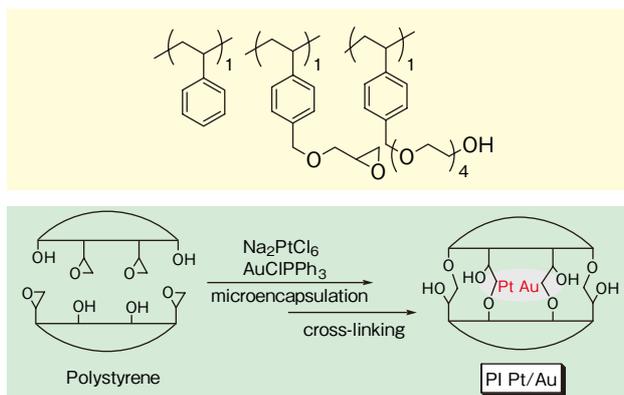
【参考文献】

- 1) Lucchesi, C., Inasaki, T., Miyamura, H., Matsubara, R. and Kobayashi, S.: *Adv. Synth. Catal.*, **350**, 1996 (2008).

高分子固定化白金/金触媒

PI白金(0)/金(0)

本品は、高分子カルセランド (Polymer-Incarcerated) 型白金/金触媒 [PI Pt/Au] です (下図参照)¹⁾。これは架橋型ポリスチレンに白金と金を担持させたもので、初めて塩基を添加せずに室温でアルコールの酸素酸化反応を達成した不均一系触媒です。本品は、1級または2級アルコールをアルデヒドまたはケトンに酸化でき、金に強く配位する硫黄や窒素などのヘテロ原子を持つアルコールでも酸化することができます。



特長

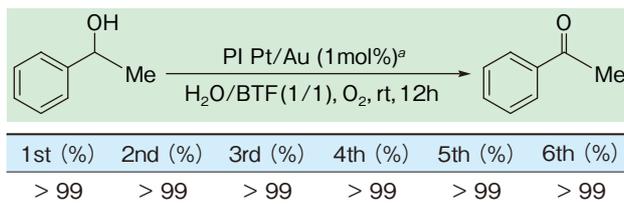
- 反応生成物または原料との分離が容易
- 室温で酸化反応が行える
- 繰り返し使用が可能
- 塩基の添加が不要

反応例

1-フェニル-1-エタノールの酸化反応で触媒の回収・再使用を6回行うと、いずれも定量的にアセトフェンが得られます (表1)。

さまざまなアルコールを用いても高い収率でアルデヒドまたはケトンが得られます (表2)。

表1. 触媒のリサイクル



^aCatalyst loading based on Au. Ratio of Pt to Au is 1 : 1. Collected catalyst was heated at 170°C for 5 h under hydrogen atmosphere without solvent before next use.

[次頁に続く]

表2. さまざまなアルコールの酸化反応

Entry	Product	x	Time (h)	Yield ^b (%)
1	Acetophenone	1	5	> 99
2	Benzaldehyde	1	5	93
3	<i>p</i> -Tolualdehyde	1	5	88
4	<i>o</i> -Tolualdehyde	1	5	84
5	<i>p</i> -Anisaldehyde	1	5	90
6	<i>p</i> -Chlorobenzaldehyde	2	5	86
7	2-Acetonaphthone	1	18	> 99
8	1-Naphthalaldehyde	1	18	93
9	Cinnamaldehyde	1	36	94
10	4-Phenyl-2-butanone	3	72	> 99
11	2-Butanone	1	8	67
12	Cyclopentanone	2	115	90
13	2-Acetylthiophene	2	96	94
14	2-Acetylpyridine	1.5	48	80

^aCatalyst loading based on Au. Ratio of Pt to Au is 1 : 1.

^bDetermined by GC analysis.

【参考文献】

1) Miyamura, H., Matsubara, R. and Kobayashi, S.: *Chem. Commun.*, 2031 (2008).

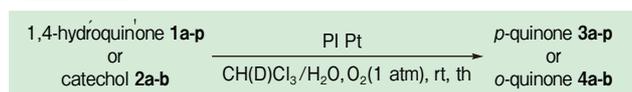
高分子固定化白金触媒 PI 白金(O)、酸化触媒

本品は、高分子カルセランド (Polymer-Incarcerated) 型白金触媒【PI Pt】です。酸化触媒として有用です。従来の触媒では困難であったクロロヒドロキノンを含む広範囲なヒドロキノンやカテコール誘導体の酸素酸化を室温でスムーズに行えます。

特長

- 反応生成物または原料との分離が容易
- 室温で酸化反応が行える
- 繰り返し使用が可能

反応例



Product	Amount PI Pt (mol% Pt)	Time (h)	Yield (%)	Product	Amount PI Pt (mol% Pt)	Time (h)	Yield (%)
	0.1 0.05	1 5 1	> 99 ^b 99 ^b > 99 ^{b, d}		1	0.5	80 ^b
	0.1	2	75 ^b		0.5	7	93 ^b
	0.2	3.75	89 ^a		1	3	99 ^b
	0.1	2	93 ^a		1 0.5	3 3	99 ^b 90 ^a
	0.1	3.5	> 99 ^b		1	3	65 ^b
	0.1	1	94 ^b		2	3	92 ^c
	0.1	1	75 ^a		2	6	88 ^a
	1	3	76 ^c		1	3	98 ^c
	0.1	2	> 99 ^a		1	8	> 99 ^a

^a Yield of isolated product. ^b Yield determined by GC (internal standard : anisole), standard curve method. ^c Yield was determined by ¹H NMR analysis (internal standard : acetophenone). ^d HCl (1equiv.) was added.

【参考文献】

1) Miyamura, H., Shiramizu, M., Matsubara, R. and Kobayashi, S.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47, 8093 (2008).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 166-24611	PI/Carbon Black Gold (O)	有機合成用	500mg	20,000
NEW 160-24631	PI Platinum(O)/Gold(O)	有機合成用	500mg	20,000
NEW 166-24731	PI Platinum(O), Oxidation Catalyst	有機合成用	500mg	20,000

水分含量 10ppm 以下



有機合成用 超脱水溶媒

水分含量を 10ppm 以下まで抑えた超脱水グレード溶媒に新たに 500ml 容量が加わりました。使いきりの便利な容量です。

500ml 容量品は開栓せずにシリンジで溶媒を抜き取る特殊キャップを使用しています。

9ℓ、18ℓ 容量品は SUS 製キャニスター缶を使用しています。ご使用の際は別途接続配管が必要となりますので、当社代理店までお問合せ下さい。



規格(例) テトラヒドロフラン(超脱水) (安定剤不含)

試験項目	規格値
外観	無色透明の液体
密度(20℃)	0.884 ~ 0.889g/ml
屈折率 n_D^{20}	1.406 ~ 1.409
水分	0.001% (10ppm) 以下
含量(キャピラリーカラムGC)	99.5% 以上

コード No.	品名 (安定剤)	水分含量	容量	希望納入価格(円)
NEW 010-22905	Acetonitrile, Super Dehydrated	10ppm 以下	500ml	4,800
016-22907	Dehydrated		18ℓ	照会
NEW 044-31235	Dichloromethane, Super Dehydrated		500ml	3,800
040-31237	(2-Methyl-2-butene 0.0005-0.005%)		18ℓ	照会
NEW 088-09105	Hexane, Super Dehydrated		500ml	3,600
084-09107			18ℓ	照会
164-24391	Pentane, Super Dehydrated		9ℓ	照会
NEW 207-17905	Tetrahydrofuran, Super Dehydrated, with Stabilizer (BHT 0.03%)		500ml	4,300
203-17907			18ℓ	照会
NEW 207-17765	Tetrahydrofuran, Super Dehydrated, Stabilizer Free		500ml	4,200
205-17761		9ℓ	照会	
203-17767		18ℓ	照会	
NEW 204-17915	Toluene, Super Dehydrated	500ml	3,500	
200-17917		18ℓ	照会	

※ 超脱水溶媒には使用期限がございます。使用期限内にご使用下さい。
 ※ キャニスター缶はリンク容器です。ご使用後は当社代理店までご返却下さい。

NMR での定量分析に!



定量 NMR (qNMR) 用 内標準物質

当社が供給する定量 NMR 用内標準物質は、NMIJ を通じて SI にトレーサブルであり、計量トレーサビリティを確保しているため、信頼性の高い純度が保証された標準物質としてご使用頂けます。

* NMIJ: (独) 産業技術総合研究所計量標準総合センター

* SI: (国際単位系) The International System of Units の略称

特長

- 第三者 (NMIJ) による純度保証 (不純物が少なく、不確かさの小さな純度値を付加)
- 揮発性が低く、質量測定 (秤量) しやすい
- 測定対象物質と化学シフトが重ならない (0 ppm 付近)



証明書 (製品 1 本毎に添付しています)

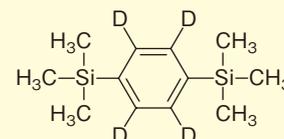
非水系溶媒用

1, 4-BTMSB-d₄ [1, 4-Bis(trimethylsilyl)benzene-d₄]

溶解性

Chloroform-d [CDCl ₃]	○
Acetone-d ₆ [(CD ₃) ₂ CO]	○
Methanol-d ₄ [CD ₃ OD]	△
Dimethyl Sulfoxide-d ₆ [DMSO-d ₆]	▲

※each 1 mg/mL, at 20℃



$$C_{12}H_{18}D_4Si_2 = 226.50$$

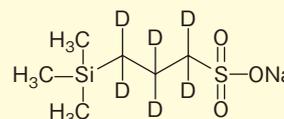
水系溶媒用

DSS-d₆ [Sodium 3-(Trimethylsilyl)-1-propane-1, 1, 2, 2, 3, 3-d₆-sulfonate]

溶解性

Deuterium Oxide [D ₂ O]	○
Dimethyl Sulfoxide-d ₆ [DMSO-d ₆]	○

※each 1 mg/mL, at 20℃



$$C_6H_9D_6NaO_3SSi = 224.36$$

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
021-16441	1,4-BTMSB-d ₄ Reference Material	TRM	50mg	30,000
048-31071	DSS-d ₆ Reference Material	TRM	50mg	30,000

SIトレーサブルな標準物質 TRM (Traceable Reference Material)

純度保証において、NMIJでSIトレーサブルな方法で測定した特性値〔純度（質量分率）〕に、当社小分け時の均質性及び、商品の保存安定性による不確かさを付加したTRMシリーズを残留農薬試験用の農薬を中心に順次追加しております。

特長

- 特性値として純度（質量分率）を記載した証明書を商品に添付
- 純度（質量分率）はNMIJトレーサブル
- 特性値の不確かさの要因として、小分け時の均質性及び保存安定性による不確かさを付加

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
019-22431	Acephate Reference Material	TRM	100mg	9,000
013-22331	Anilofos Reference Material	TRM	100mg	17,000
019-22311	Asulam Reference Material	TRM	100mg	6,000
018-22261	Atrazine Reference Material	TRM	100mg	8,500
028-16331	Bensulfuron-methyl Reference Material	TRM	100mg	25,000
020-16391	Bensulide Reference Material	TRM	100mg	11,000
020-16271	Benthiocarb Reference Material	TRM	100mg	6,000
025-16341	Bethrodine Reference Material	TRM	100mg	10,000
022-16351	Bifenox Reference Material	TRM	100mg	10,000
027-16281	BPMC Reference Material	TRM	100mg	7,000
 038-21381	Chlorfenapyr Reference Material	TRM	100mg	12,000
033-21071	Chlorfluazuron Reference Material	TRM	100mg	10,000
 035-21391	Chloro IPC Reference Material	TRM	100mg	8,000
 037-20871	Chloroneb Reference Material	TRM	100mg	15,000
 035-21531	CNP-amino Reference Material	TRM	100mg	30,000
031-21251	Coumaphos Reference Material	TRM	100mg	18,000
030-21081	Cumyluron Reference Material	TRM	100mg	25,000
 037-21231	Cymoxanil Reference Material	TRM	100mg	20,000
034-21241	Cyprodinil Reference Material	TRM	100mg	20,000
049-30881	DCMU Reference Material	TRM	100mg	7,000
049-30641	DEP Reference Material	TRM	100mg	12,000
044-30831	Diazinon Reference Material	TRM	100mg	8,000
041-31181	Diflubenzuron Reference Material	TRM	100mg	14,000
045-30861	Dimepiperate Reference Material	TRM	100mg	20,000
042-30871	Dithiopyr Reference Material	TRM	100mg	15,000
052-07841	Echloomezol Reference Material	TRM	100mg	12,000
058-07821	EPN Reference Material	TRM	100mg	13,000
059-07851	Esprocarb Reference Material	TRM	100mg	16,000
054-07801	Etofenprox Reference Material	TRM	100mg	5,000
060-05501	Famoxadone Reference Material	TRM	100mg	20,000
063-05351	Flazasulfuron Reference Material	TRM	100mg	9,000
068-05421	Flufenoxuron Reference Material	TRM	100mg	13,000
066-05581	Flusulfamide Reference Material	TRM	100mg	15,000
065-05311	Flutolanil Reference Material	TRM	100mg	6,000
070-05541	Glyphosate Reference Material	TRM	100mg	8,000
097-05771	Imazosulfuron Reference Material	TRM	100mg	12,000
 093-05871	Indanofan Reference Material	TRM	100mg	20,000
091-05671	Iprodione Reference Material	TRM	100mg	8,000
094-05661	Isoprothiolane Reference Material	TRM	100mg	6,000
097-05651	Isoxathion Reference Material	TRM	100mg	6,000

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
129-05841	Linuron Reference Material	TRM	100mg	10,000
134-15961	Malathion Reference Material	TRM	100mg	11,000
131-16191	MCP Reference Material	TRM	100mg	12,000
136-16021	MCCPP Reference Material	TRM	100mg	15,000
133-16031	Mefenacet Reference Material	TRM	100mg	12,000
137-15951	MEP Reference Material	TRM	100mg	8,000
135-15991	Mepronil Reference Material	TRM	100mg	10,000
132-16001	Metalaxyl Reference Material	TRM	100mg	9,000
139-16011	Molinate Reference Material	TRM	100mg	15,000
139-16131	Myclobutanil Reference Material	TRM	100mg	16,000
148-08691	NAC Reference Material	TRM	100mg	8,000
164-23791	2,4-PA Reference Material	TRM	100mg	6,000
162-24071	PCP Reference Material	TRM	100mg	10,000
164-23811	Pendimethalin Reference Material	TRM	100mg	13,000
160-23911	cis-Permethrin Reference Material	TRM	100mg	10,000
165-24061	trans-Permethrin Reference Material	TRM	100mg	25,000
161-23821	Probenazole Reference Material	TRM	100mg	20,000
162-24191	Prochloraz Reference Material	TRM	100mg	15,000
165-23461	Procymidone Reference Material	TRM	100mg	13,000
162-23611	Propyzamide Reference Material	TRM	100mg	12,000
 168-24291	Pyrazoxyfen Reference Material	TRM	100mg	13,000
167-23801	Pyributicarb Reference Material	TRM	100mg	9,500
168-23831	Pyridaphenthion Reference Material	TRM	100mg	6,000
198-15541	Silafuofen Reference Material	TRM	100mg	14,000
198-15281	Simetryn Reference Material	TRM	100mg	7,000
207-17841	Teflubenzuron Reference Material	TRM	100mg	13,000
 209-18021	Thiacloprid Reference Material	TRM	100mg	16,000
206-17551	Thiamethoxam Reference Material	TRM	100mg	20,000
201-17501	Thiophanate Reference Material	TRM	100mg	20,000
204-17471	Thiuram Reference Material	TRM	100mg	5,000
203-17821	Tiadinil Reference Material	TRM	100mg	25,000
208-17491	Tolclofos-methyl Reference Material	TRM	100mg	7,000
200-17831	Triadimefon Reference Material	TRM	100mg	13,000
206-17811	Trifloxystrobin Reference Material	TRM	100mg	22,000
225-01751	Vinclozolin Reference Material	TRM	100mg	14,000
235-02411	Warfarin Reference Material	TRM	100mg	10,000

TraceSure™(認証標準物質)シリーズ

第1弾 容量分析用標準物質

当社では、(独)製品評価技術基盤機構(NITE)の付け業務終了に伴い、ASNITE『標準物質生産者の認定プログラム』により標準物質生産者の認定を取得しました。また新たに、認証標準物質であることを示すシリーズ名、『TraceSure™』を設定しました。

第1弾として、アミド硫酸、しゅう酸ナトリウム、フタル酸水素カリウムの3品目の販売を開始します。他の品目につきましても順次、ASNITEを取得し『認証標準物質』として供給してまいります。国際MRAにも対応した認証標準物質として、安心してお使い頂けます。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
 015-23371	Amidosulfuric Acid	TraceSure™	50g	照会
 192-15941	Sodium Oxalate	TraceSure™	50g	照会
 161-24661	Potassium Hydrogen Phthalate	TraceSure™	50g	照会

新製品追加ラインアップ!!



抗タグ(DYKDDDDK, HA, c-Myc, 6×His)抗体ビーズ

タグ(DYKDDDDK, HA, c-Myc, 6×His)ペプチド

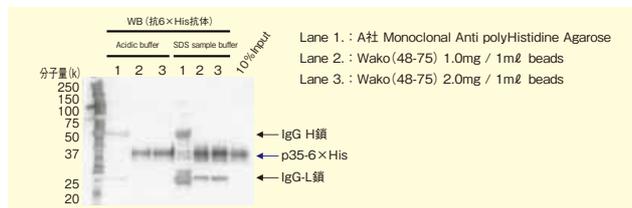
DYKDDDDK, HA, c-Myc, 6 × His を認識する高品質なアフィニティービーズと、抗原溶出用の高純度精製ペプチドをラインアップしました。

タグ抗体ビーズ一覧

タグ	DYKDDDDK	HA	c-Myc	6×His
組成	1×PBS (pH 7.4), 50% glycerol, 0.02w/v% sodium azide.			1×TBS (pH 7.4), 0.05w/v% sodium azide.
使用担体	4% アガロース			
抗体結含量	7.5mg/ml	8.5mg/ml		2.0mg/ml
結合抗体クローンNo.	1E6	4B2	9E10	48-75
結合抗体サブクラス	IgG ₁			IgG ₃ ・κ
抗原結含量	約 1.0mg/ml	約 1.5mg/ml	約 0.9mg/ml	約 1.0 ~ 2.0mg/ml
Setting Volume	1.8 ~ 2.1 ml slurry/ml beads			
保存条件	- 20°C			2 ~ 10°C

使用例

6 × His タグ融合タンパク質の免疫沈降



抗原溶出用ペプチド

- 含量 (HPLC) : ≥ 95%
- アミノ酸配列 : DYKDDDDK, HHHHHH (6 × His), YPYDVPDYA (HA), EQKLISEEDL (c-Myc)
- MULDI-TOF MS による分子量チェック

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
タグ抗体ビーズ				
012-22781	Anti DYKDDDDK tag Antibody Beads	免疫化学用	1ml	48,000
018-22783			5ml	90,000
016-22784			25ml	290,000
014-23081	Anti HA Antibody Beads	免疫化学用	1ml	65,000
010-23083			5ml	150,000
017-23071	Anti c-Myc Antibody Beads	免疫化学用	1ml	65,000
013-23073			5ml	150,000
019-23391	Anti 6×His Antibody Beads	免疫化学用	1ml	照 会
015-23393			5ml	照 会
タグペプチド				
044-30951	DYKDDDDK Peptide	遺伝子研究用	5mg	18,000
040-30953			25mg	80,000
088-09161	HA Peptide	遺伝子研究用	5mg	30,000
084-09163			25mg	120,000
132-16361	c-Myc Peptide	遺伝子研究用	5mg	25,000
138-16363			25mg	100,000
087-09251	6×His Peptide	遺伝子研究用	5mg	照 会
083-09253			25mg	照 会

神経障害性疼痛の研究に



抗ラット P2X₄, モノクローナル抗体

本品は、P2X₄ に対するモノクローナル抗体です。P2X₄ はリガンド開口型イオンチャネル P2X ファミリーに属する膜透過型の受容体で、主に脊髄や脳などの中枢神経系に発現しています。

神経障害性疼痛はモルヒネなどの麻薬性鎮痛薬でさえ効果がありません。その神経障害性疼痛は、異常に活性化した脊髄ミクログリアに過剰発現した P2X₄ への刺激により、脳由来神経栄養因子 (BDNF) がミクログリアから大量に放出され、この影響で神経細胞の働きを抑制する GABA が通常とは逆に神経細胞を興奮させ、強い痛みを引き起こすことが確認されています。

製品概要

- 形状 : PBS 溶液
- 抗原 : ラット P2X₄ タンパク質の細胞外ドメイン
- 精製 : プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーにより精製
- 特異性 : ラット P2X₄ (ヒト P2X₄ と交差しない)
- 実用希釈倍率 : ウェスタンブロット 1 : 500 ~ 1,000
免疫組織染色 1 : 5,000

【参考文献】

1) Tsuda, M. et al. : *Nature*, **424**, 778 (2003).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
016-23281	Anti Rat P2X ₄ , Monoclonal Antibody	免疫化学用	50μg	40,000

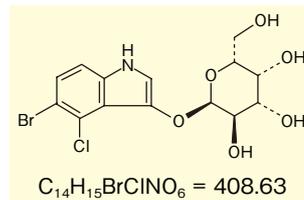
α-galactosidase 検出試薬



5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-α-D-ガラクトピラノシド [X-α-Gal]

本品は、α-galactosidase の呈色基質です。最近では、MEL1 遺伝子をレポーターとした酵母ツーハイブリッドシステムで用いられています。LacZ 遺伝子を用いる方法では β-galactosidase 活性の検出に酵母を溶解させる必要があります。MEL1 遺伝子は分泌型酵素 α-galactosidase をコードするため、その活性化を X-α-Gal を含む培養プレート上で直接検出できます。そのため、簡便に陽性クローンを検出できます。

- 含量 (HPLC) : 98.0% 以上
- CAS No. : 107021 - 38 - 5



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
024-16791	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-α-D-galactopyranoside [X-α-Gal]	遺伝子研究用	25mg	9,000
020-16793			100mg	24,000

りん酸基アフィニティー電気泳動用試薬 NARD Institute, Ltd.

Phos-tag® アクリルアミド

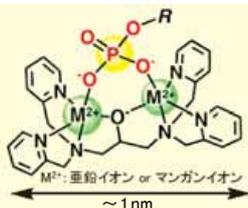
Phos-tag® Acrylamide をアクリルアミド溶液に混ぜて重合させるだけで、りん酸化タンパク質と非りん酸化タンパク質を分離する SDS-PAGE ができます。

特長

- 同一レーンでタンパク質のりん酸化と非りん酸化を検出可能
- タンパク質のりん酸化と非りん酸化の経時的变化が観察可能
- Phos-tag® の結合性はアミノ酸組成に依存しない
- 実験操作は通常の SDS-PAGE とほぼ同様

Phos-tag® とは？

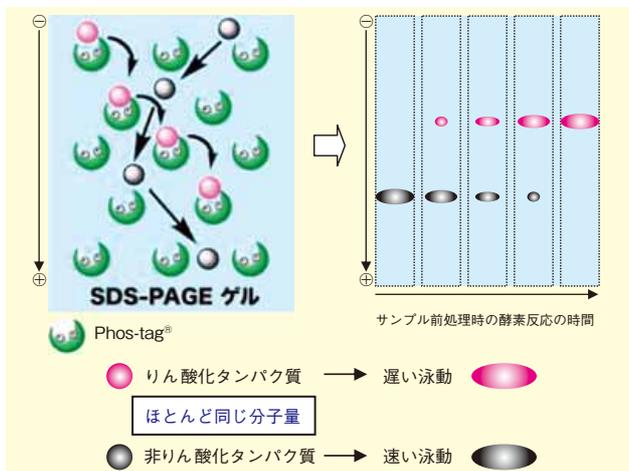
Phos-tag® は広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 医薬分子機能科学研究室にて開発されたりん酸モノエステルアニオンを捕捉する画期的な機能性分子で、りん酸化タンパク質の分離・精製・検出に応用されています。



Phos-tag® 基本構造

- ・ 2個の金属イオンが協力してりん酸化イオンを捕捉
- ・ りん酸化イオンへの高い親和性と選択性 (カルボン酸イオンの 10,000 倍以上)
- ・ pH 5~8 の生理条件下で機能

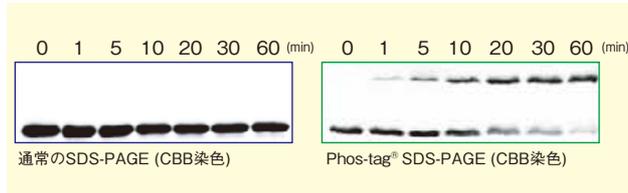
りん酸基アフィニティー電気泳動法の原理



ゲル中の Phos-tag® にりん酸化タンパク質がトラップされながら泳動が進行するため、りん酸化タンパク質を非りん酸化タンパク質から分離できる。

使用例

Abl によるりん酸化反応の経時的变化の観察



チロシンキナーゼ Abl とその基質ペプチド (Abtide) と GST の融合タンパク質を用い、ペプチドのチロシンがりん酸化される反応をりん酸アフィニティー電気泳動にて検出した。

通常の SDS-PAGE (左図: Phos-tag® 非存在下) では、基質がりん酸化されていることは全く確認できない。

一方、Phos-tag® SDS-PAGE (右図: 100 μmol/ℓ Phos-tag®) においては、りん酸化反応の進行に伴って泳動が遅れるバンドが出現し、それと対照的に泳動の速いバンドが減少した。

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
300-93523	AAL-107M	Phos-tag® Acrylamide AAL-107	2mg	25,000
304-93521	AAL-107		10mg	60,000

※本品 2mg はミニゲル 8 枚分に相当します。

関連商品

抗体不要のウエスタンブロットによるりん酸化タンパク質の検出に

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
301-93531	BTL-104	Phos-tag® Biotin BTL-104	10mg	70,000
308-93541	BTL-105	Phos-tag® Biotin BTL-105	10mg	70,000

※BTL-104 と BTL-105 は、Phos-tag® と Biotin を結合するリンカーの長さが異なります。

MALDI-TOF/MS によるりん酸化タンパク質の分析に

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
305-93551	MS-101KIT	Phos-tag® Mass Analytical Kit	1キット	100,000

カラムクロマトグラフィーによるりん酸化タンパク質の分離・濃縮・精製に

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
302-93561	AG-501	Phos-tag® Agarose	0.5ml	20,000
308-93563	AG-503		3ml	98,000

詳しくは、当社ホームページをご参照下さい。

<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/phos-tag/>

歯周病菌（ジンジバリス菌）・ピロリ菌由来 LPS 新発売！



LPS (リポポリサッカリド)

当社では、各種 LPS を販売しております。この度、歯周病菌（ジンジバリス菌：*P. gingivalis*）、ピロリ菌（*H. pylori*）及び大腸菌 O86a（*E. coli*: O86a）由来の製品を発売しました。

本品には、菌体より Westphal 法（フェノール抽出法）にて得られた製品（フェノール抽出品）と、さらに超遠心で2回精製した製品（超遠心品）があります。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
Helicobacter pylori 超遠心品				
NEW 120-05871	Lipopolysaccharide, from <i>H. pylori</i> CA2* ※胃がん患者由来菌	細胞生物学用	2mg	30,000
NEW 229-01911	Lipopolysaccharide, from <i>H. pylori</i> GU2* ※胃潰瘍患者由来菌	細胞生物学用	2mg	30,000
Porphyromonas gingivalis 超遠心品				
NEW 127-05881	Lipopolysaccharide, from <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	細胞生物学用	2mg	35,000
Campylobacter jejuni フェノール抽出品				
128-05671	Lipopolysaccharide, from <i>C. jejuni</i> Penner O:19	細胞生物学用	5mg	17,000
Escherichia coli フェノール抽出品				
120-05131	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O26	細胞生物学用	25mg	14,000
127-05141	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O55	細胞生物学用	25mg	14,000
125-05201	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O111	細胞生物学用	25mg	14,000
124-05151	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O127	細胞生物学用	25mg	14,000
Escherichia coli 超遠心品				
121-05161	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O26	細胞生物学用	5mg	17,000
128-05171	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O55	細胞生物学用	5mg	17,000
NEW 222-01901	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O86a	細胞生物学用	5mg	20,000
126-05471	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O103	細胞生物学用	5mg	17,000
125-05181	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O111	細胞生物学用	5mg	17,000
122-05191	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O127	細胞生物学用	5mg	17,000
129-05461	Lipopolysaccharide, from <i>E. coli</i> O157	細胞生物学用	5mg	17,000
Proteus フェノール抽出品				
124-05271	Lipopolysaccharide, from <i>P. vulgaris</i> OX2	細胞生物学用	25mg	15,000
121-05281	Lipopolysaccharide, from <i>P. vulgaris</i> OX19	細胞生物学用	25mg	15,000
128-05291	Lipopolysaccharide, from <i>P. mirabilis</i> OXK	細胞生物学用	25mg	15,000
Salmonella minnesota 超遠心品				
124-05651	Lipopolysaccharide, from <i>S. minnesota</i> 1114	細胞生物学用	5mg	18,000
121-05661	Lipopolysaccharide, from <i>S. minnesota</i> R595	細胞生物学用	5mg	18,000

サイトカイン



TGF-β ファミリー

TGF-β ファミリーは共通した構造を持つサイトカインの一群です。細胞内において、I 型受容体または II 型受容体及び受容体に続く Smad 活性化を主としたシグナル伝達を介してさまざまな生理作用を発現します。

多細胞生物では個々の細胞の増殖、遊走、分化など多様な活動が、細分化された細胞間シグナル伝達によって制御されています。TGF-β ファミリーに分類される各因子は、生物の発生段階から成熟体の恒常性維持・疾病など多様な生体プロセスの制御に関与しています。

構造上の特長

- 200～400 アミノ酸残基から成る前駆体として発現され、110～140 アミノ酸の C 末端側ペプチドとしてプロセッシングを受けて活性型となる
- 活性を持つ C 末端側ペプチドには共通した 7 つのシステイン残基が保存されている

コード No.	品名	別名/略名	規格	容量	希望納入価格 (円)
026-14811	Bone Morphogenetic Protein 2, Human, recombinant	BMP-2	生化学用	5μg	35,000
NEW 024-16811	Bone Morphogenetic Protein 3, Human, recombinant	BMP-3, Osteogenin	細胞生物学用	20μg	39,000
023-14821	Bone Morphogenetic Protein 4, Human, recombinant	BMP-4	生化学用	5μg	35,000
NEW 022-16731	Bone Morphogenetic Protein 6, Human, recombinant	BMP-6	細胞生物学用	10μg	39,000
NEW 029-16741	Bone Morphogenetic Protein 7, Human, recombinant	BMP-7, OP-1	細胞生物学用	10μg	39,000
024-15071	Bone Morphogenetic Protein 13, Human, recombinant	BMP-13, GDF-6, CDMP-2	細胞生物学用	10μg	39,000
072-05121	GDF-3, Human, recombinant	—	細胞生物学用	20μg	39,000
073-04931	GDF-11, Human, recombinant	BMP-11	細胞生物学用	20μg	39,000
205-16541	Transforming Growth Factor-β1, Human, recombinant	TGF-β1	細胞生物学用	5μg	39,000
201-16543	Transforming Growth Factor-β1, Human, recombinant	TGF-β1	細胞生物学用	1mg	照会
201-15661	Transforming Growth Factor-β2, Human, recombinant	TGF-β2	生化学用	2μg	30,000
205-16661	Transforming Growth Factor-β2, Human, Insect Cells recombinant	TGF-β2	細胞生物学用	5μg	39,000
NEW 205-18361	Transforming Growth Factor-β3, Human, recombinant	TGF-β3	細胞生物学用	10μg	39,000

関連商品

BMP アンタゴニスト

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
148-08451	Noggin (Dimer), Human, recombinant	細胞生物学用	20μg	39,000

TGF-β ファミリー シグナル阻害剤

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
018-22521	A-83-01	細胞生物学用	2mg	16,000
014-22523	A-83-01	細胞生物学用	10mg	55,000
NEW 012-23021	ALK5 Inhibitor	細胞生物学用	1mg	20,000
NEW 126-05851	LDN193189 Hydrochloride	細胞生物学用	2mg	43,000
194-15521	SB431542 n-Hydrate	細胞生物学用	5mg	18,000
190-15523	SB431542 n-Hydrate	細胞生物学用	25mg	75,000

がん、心血管疾患、自己免疫疾患などの Wako シグナル伝達研究に

PKC 阻害剤

Protein Kinase C (PKC) は、現在までに少なくとも 10 種類のサブタイプが報告されているセリン/トレオニンキナーゼであり、構造の違いから cPKC (conventional あるいは classical PKC。サブタイプ: α 、 β 、 γ)、nPKC (novel PKC。サブタイプ: δ 、 ϵ 、 η 、 θ 、 μ)、aPKC (atypical PKC。サブタイプ: ζ 、 λ) の 3 種類に大別されています。

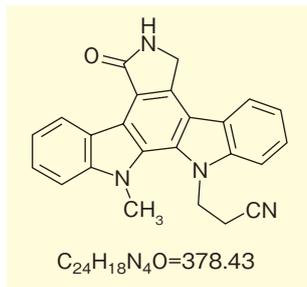
cPKC の調節領域には、ジアシルグリセロール (DG) や ホルボールエステル、ホスファチジルセリンが結合する 2 つの C1 ドメインと、 Ca^{2+} が結合する C2 ドメインがあります。一方、nPKC は、C2 ドメインが欠損し、aPKC は 1 つの C1 ドメインと C2 ドメインが欠損しています。

PKC は、細胞の増殖や分化、アポトーシスなど非常に多様な細胞応答を制御しており、がんや心血管疾患、自己免疫疾患などの発症に関与していると考えられています。

Go 6976

本品は、PKC 阻害剤 (IC_{50} PKC (rat brain) : 7.9 nmol/l) であり、 Ca^{2+} 依存性の PKC α 、 β 1 と PKC μ を阻害 (IC_{50} PKC α : 2.3 nmol/l、PKC β 1 : 6.2 nmol/l、PKC μ : 20 nmol/l) しますが、 Ca^{2+} 非依存性の PKC δ 、 ϵ 、 ζ には $\mu\text{mol/l}$ レベルでも阻害しません。

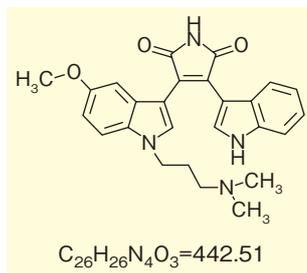
- 含量 (HPLC) : 98.0% 以上
- ジメチルスルホキシド溶状 : 試験適合
- CAS No. : 136194-77-9



Go 6983

本品は、PKC 阻害剤 (IC_{50} PKC α : 7 nmol/l、PKC β : 7 nmol/l、PKC γ : 6 nmol/l、PKC δ : 10 nmol/l、PKC ζ : 60 nmol/l、PKC μ : 20 $\mu\text{mol/l}$) です。

- 含量 (HPLC) : 97.0% 以上
- ジメチルスルホキシド溶状 : 試験適合
- CAS No. : 133053-19-7

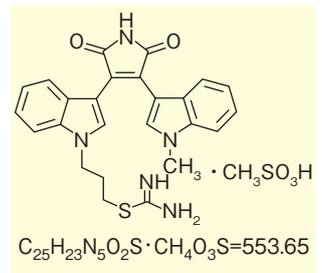


Ro 31-8220 メタンサルホン酸塩

本品は、スタウロスポリンの構造類似体で、PKC 阻害剤 (IC_{50} PKC α : 5 nmol/l、PKC β 1 : 24 nmol/l、PKC β 2 : 14 nmol/l、PKC γ : 27 nmol/l、PKC ϵ : 24 nmol/l) です。

PKA、CaM キナーゼ II に対しての選択性は低いです (IC_{50} PKA : 0.9 $\mu\text{mol/l}$ 、CaM kinase II : 17 $\mu\text{mol/l}$)。

- 含量 (HPLC) : 97.0% 以上
- 水-エタノール溶状 : 試験適合
- CAS No. : 138489-18-6



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 077-05791	Go6976	細胞生物学用	1mg	35,000
NEW 070-05801	Go6983	細胞生物学用	1mg	21,000
NEW 186-02591	Ro31-8220 Methanesulfonate	細胞生物学用	1mg	13,000

関連商品

コード No.	品名	概要	規格	容量	希望納入価格 (円)
019-22791	Anti Human Diacylglycerol Kinase δ , Rabbit	ヒト DGK δ 抗血清。WB に使用可能。	ブロッティング用	50 μl	20,000
012-22801	Anti Rat Diacylglycerol Kinase γ , Rabbit	ラット DGK γ 抗血清。WB、IP、ICC、IF に使用可能。	免疫沈降用	50 μl	20,000
018-23001	Anti Rat Diacylglycerol Kinase γ , Rabbit	ラット DGK γ 抗血清。WB、IP、ICC、IF に使用可能。	免疫化学用	50 μl	20,000
079-03811	GF 109203X	スタウロスポリンの構造類似体。PKC の阻害剤 ($\text{IC}_{50} = 10 \text{ nmol/l}$)。	生化学用	1mg	33,000
086-07761	Hypericin	PKC、インスリンレセプター、EGF レセプター、カゼインキナーゼ II、MAP キナーゼの阻害剤。抗ウイルス、抗レトロウイルス活性あり。	生化学用	1mg	12,500
082-07763				5mg	38,000
197-10251	Staurosporine	微生物アルカロイド。PKC 阻害剤 ($\text{IC}_{50} = 2.7 \text{ nmol/l}$)。A キナーゼ ($\text{IC}_{50} = 8.2 \text{ nmol/l}$) や p60 ^{src} チロシンキナーゼ ($\text{IC}_{50} = 6.4 \text{ nmol/l}$) も阻害する。	生化学用	100 μg	11,000
193-10253				500 μg	43,000

軸索再生研究に



Nogo-66 (1-40)

本品は、Nogo-66 受容体 (NgR) の阻害剤です。Nogo タンパクの 66 残基ドメイン (Nogo-66) は、軸索膜上の NgR を介して軸索伸長阻害作用を示し、外傷による脊髄内軸索が再生しない原因の一つです。本品は、Nogo-66 の部分ペプチドであり、NgR の拮抗剤として作用し Nogo-66 による軸索伸長阻害作用をブロックします。

- 含量 (HPLC) : 94.0% 以上
- 配列 : Ac-RIYKGVIIQAIQKSDEGHPFRAYLSEVAIS EELVQKYSNS-NH₂
- 分子式・分子量 : C₂₀₆H₃₂₄N₅₆O₆₅ = 4625.11
- CAS No. : 475221-20-6

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 143-08901	Nogo-66 (1-40)	細胞生物学用	1mg	50,000

抗ウイルス剤

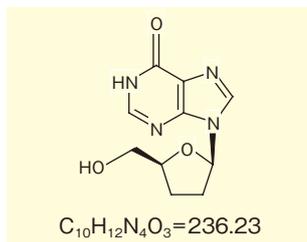
Wako

核酸系逆転写酵素阻害剤

抗ウイルス剤として使用されている逆転写酵素阻害剤を新たにラインアップしました。本品は、ウイルス DNA ポリメラーゼによる基質の取り込みを競合的に阻害し、DNA 鎖の伸長を停止することにより、ウイルスの増殖を阻害します。

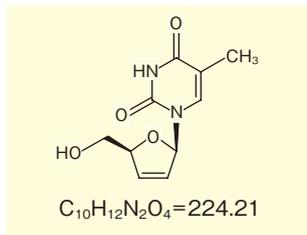
ジダノシン

- 含量 (HPLC) : 98.0% 以上
- 水溶状 : 試験適合
- CAS No. : 69655-05-6
- 標的ウイルス : HIV



スタブジン

- 含量 (HPLC) : 97.0% 以上
- 水溶状 : 試験適合
- CAS No. : 3056-17-5
- 標的ウイルス : HIV



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
040-31391	Didanosine	薬理研究用	100mg	照会
046-31393			1g	照会
197-15871	Stavudine	薬理研究用	100mg	4,700
193-15873			1g	20,000

関連商品

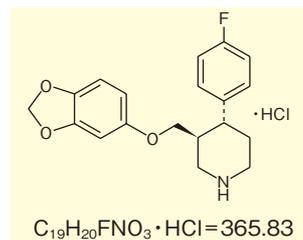
コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
019-17421	Acyclovir	生化学用	250mg	8,000
015-17423			1g	22,000
015-14704	3'-Azido-3'-deoxythymidine 【Zidovudine】	生化学用	100mg	2,500
011-14706			250mg	4,200
011-14701			1g	10,000
017-14703			5g	40,500
019-14702			25g	193,000
056-07981	Emtricitabine	薬理研究用	100mg	8,500
052-07983			500mg	32,000
078-04481	Ganciclovir	生化学用	250mg	10,000
074-04483			1g	29,000
128-05811	Lamivudine	薬理研究用	100mg	6,000
124-05813			1g	35,000
169-24221	Penciclovir	薬理研究用	100mg	6,500
165-24223			1g	39,000
182-02331	Ribavirin	薬理研究用	250mg	9,000
188-02333			1g	28,000
207-17961	Tenofovir	薬理研究用	100mg	6,000
203-17963			1g	35,000

選択的セロトニン再取込阻害剤 (SSRI) Wako

パロキセチン塩酸塩

パロキセチン塩酸塩は、脳内セロトニン神経のシナプス前末端で、セロトニントランスポーターを強力かつ選択的に阻害することでセロトニンの再取込みを阻害し、脳内シナプス間隙のセロトニン濃度を増加させる働きがあります。抗うつ、抗不安作用があることが知られています。

- 含量 (HPLC) : 98.0% 以上
- 水溶状 : 試験適合
- CAS No. : 78246-49-8



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
168-24431	Paroxetine Hydrochloride	薬理研究用	100mg	26,000

関連商品

コード No.	品名	概要	規格	容量	希望納入価格 (円)
072-05621	Granisetron Hydrochloride	セロトニンセプター-5-HT _{2A} アンタゴニスト、制吐作用あり	細胞生物学用	10mg	14,000
078-05623				50mg	56,000
113-00821	Ketanserin Tartrate	セロトニンセプター-5-HT _{2A} アンタゴニスト、降圧作用あり	細胞生物学用	10mg	8,400
119-00823				50mg	22,600
184-00691	Reserpine	小脳モノアミントランスポーター阻害剤	生化学用	1g	17,000
188-02311	Risperidone	セロトニンセプター-5-HT _{2A} アンタゴニスト、ドーパミンセプター-D ₂ アンタゴニスト	薬理研究用	50mg	15,000
184-02313				250mg	45,000

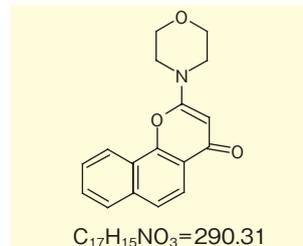
DNA-PK 阻害剤

Wako

NU7025

DNA-PK 阻害剤を新たにラインアップしました。DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) は、NHEJ (非相同末端結合) による DNA 二重鎖切断修復において中心的な役割を担うタンパク質リソ酸化酵素です。DNA-PK 阻害剤は、放射線治療増強剤として注目されています。

- 含量 (HPLC) : 97.0% 以上
- CAS No. : 154447-35-5



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
145-08841	NU7025	細胞生物学用	5mg	25,000

関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
163-24241	PI-103	細胞生物学用	1mg	10,000
169-24243			10mg	47,000

RNAポリメラーゼ2阻害剤

Wako

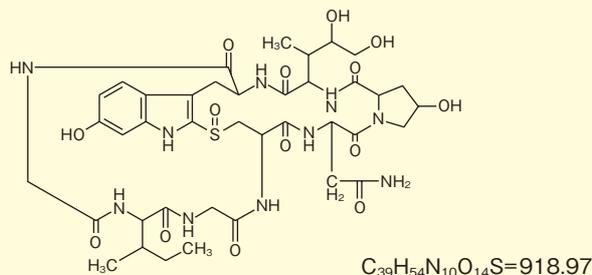
α-アマニチン

本品は、*Amanita* 属の有毒きのこ種が生成する、環状ペプチド構造を持つ有毒成分（アマトキシン）の一つです。アマトキシン群の中でも特に毒性が強いことが知られています。

経口的に投与すると、初期に嘔吐、下痢などの消化器症状が現れコレラに似た症状が起こり、その後、肝臓、腎臓が侵され、最後には、血圧の急激な低下、興奮、痙攣、昏睡などの中枢神経系の障害が起こり、死に至ります。

細胞レベルでは真核生物のRNAポリメラーゼ2と特異的に結合し、RNA鎖合成を低濃度 ($10^{-9} \sim 10^{-8}$ mol/l) で阻止します。高濃度 ($10^{-5} \sim 10^{-4}$ mol/l) ではRNAポリメラーゼ3に対しても阻害作用を示しますが、低濃度では影響しません。また、RNAポリメラーゼ1には阻害作用を示しません。このようなRNAポリメラーゼの種類による感受性の差を利用して、真核生物RNAポリメラーゼの識別やRNAポリメラーゼ2の定量に使用されています。

- 含量 (HPLC) : 94.0% 以上
- 水溶状 : 試験適合
- 由来 : *Amanita phalloides*
- CAS No. : 23109-05-9



コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
010-22961	α-Amanitin	細胞生物学用	1mg	28,000

フィブロネクチン様細胞接着促進低分子化合物

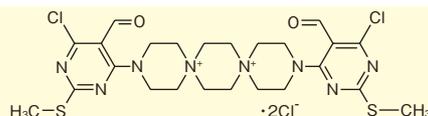
Wako

アドヘサミン

本品は、細胞の培養容器へのフィブロネクチン様の接着及び細胞増殖を促進する合成低分子化合物です。本品を培地に添加すると浮遊性の細胞を培養容器に接着させて培養できるようになります。接着した細胞は培地交換を行い、アドヘサミンを洗い流すと培養容器から剥がれます。HeLa、HEK293、CHO、マウスES細胞などにおいて、その効果が確認されています¹⁾。また、培養が容易でない細胞では本品を培地に添加すると細胞増殖の改善が期待できます²⁾。

特長

- フィブロネクチン様の細胞接着作用を示す
- 合成品であるため感染症の危険性が無く、ロット間差も少ない
- 細胞接着と細胞増殖を促進する
- 培養容器のコーティング、培地への添加のどちらでも使用可能



CAS No. : 462605-73-8
 $C_{24}H_{32}Cl_4N_8O_2S_2=670.51$

使用例

- ① アドヘサミン10mgをDMSO 1mlに溶解（5分間程度の超音波処理）。
- ② ①で調製したものを原液とし、0.5、1.0、2.5、5.0mg/mlの希釈溶液を調製。
- ③ 各濃度のアドヘサミン溶液を24ウェルプレートに5μlずつ分注。
- ④ 各ウェルに0.5 × 10⁶ cellsのJurkat細胞（浮遊細胞）を播種。
- ⑤ 37°C、5% CO₂で5時間培養。⇒ 図1
- ⑥ PBS(-)で洗浄。
- ⑦ 4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定。
- ⑧ 5mg/mlクリスタルバイオレットで染色。
- ⑨ 余剰分のクリスタルバイオレットを洗浄後、乾燥。
- ⑩ 2%SDS溶液によりクリスタルバイオレットを溶出し、OD₅₅₀を測定。⇒ 図2

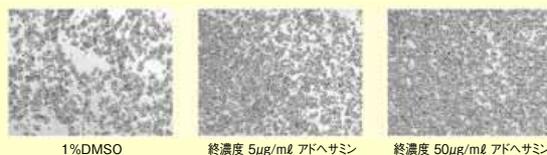


図1. アドヘサミン添加によるJurkat細胞（浮遊細胞）の接着

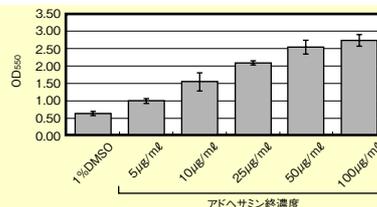


図2. アドヘサミン添加により接着したJurkat細胞数 (OD₅₅₀換算)

【使用上の注意】

DMSOに溶解後、溶液状態で保存すると析出する可能性があります。析出した場合、再溶解しない場合がありますので、用時調製をお勧めします。

【参考文献】

- 1) Yamazoe, S. et al. : *Chem. Biol.*, **16**, 773 (2009).
- 2) Hoshino, M. et al. : *Biochem. J.*, **427**, 297 (2010).

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
010-23201	Adhesamine	細胞培養用	1mg	30,000

完全合成三次元マトリックス



QGel™ MT 3D Matrix

QGel™ MT 3D Matrix は PEG を材質とした完全合成三次元マトリックスです。

特長

- QGel™ は完全合成のため、従来の動物由来の三次元マトリックスと違い、ロット間の差もなく、トランスコンタミネーションのリスクを低減できる。
- MMP 分解性があり細胞自身がゲルの中を自由に移行することができるので、安定性、再現性に優れている。
- 細胞溶液と QGel™ バッファーを QGel™ MT 3D Matrix 粉末に加えるだけで、約 5 分から 10 分でゲルが形成される。温度調節の必要がなく、カプセル化の過程で非生理学的な pH に暴露されることもない。

用途にあわせて 3 種類の商品をラインアップしています。

- ① REF1001：MMP 分解性があり、RGD ペプチド*が含まれています。
- ② REF1004：MMP 分解性があり、RGD ペプチドは含まれていません。実験系に応じて添加するペプチドを選択できます。
- ③ REF1007：MMP 分解性はありません。RGD ペプチドが含まれています。

MMP 分解性と RGD 含有をお好みの用途でお選びいただけます。

* RGD ペプチド：R=Arginine, G=Glycine, D=Aspartic Acid.
RGD ペプチドは細胞接着を促進します。

	分解性	非分解性
細胞接着性	<p>①</p> <p>QGel™ MT 3D Matrix 500µlゲル ゲル硬度：軟性 RGDペプチド含有 MMP分解可能</p>	<p>③</p> <p>QGel™ MT 3D Matrix 500µlゲル ゲル硬度：軟性 RGDペプチドなし MMP分解不可能</p>
非細胞接着性	<p>②</p> <p>QGel™ MT 3D Matrix 500µlゲル ゲル硬度：軟性 RGDペプチドなし MMP分解可能</p>	

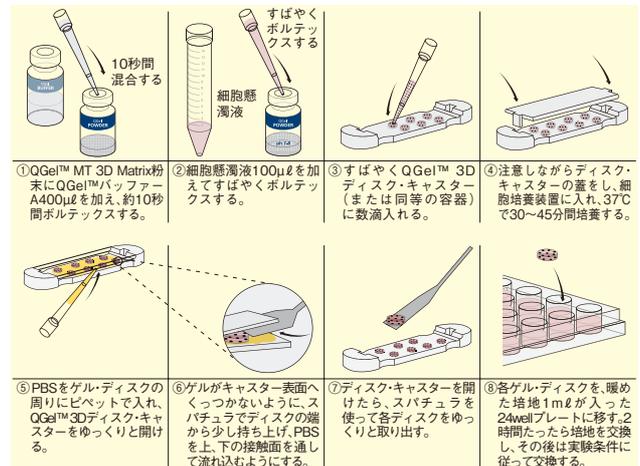
QGel™ MT 3D matrix は、凍結乾燥粉末品でバイアルに入っており、1 バイアルで 500 µl のゲルが作製できます。QGel™ バッファーを使用することにより、優れたゲルの作製が可能となりますので、バッファーもあわせてご購入下さい。

また、ゲルディスクを作成する際に、ディスクキャスターを使用されることをお勧めします。

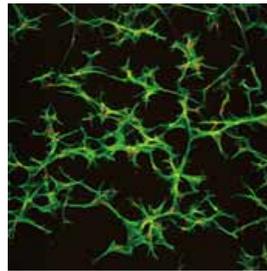


QGel™ REF 4001 ディスクキャスター

ゲルの作製方法



データ



REF1001 QGel™ MT 3D MATRIX を使用し、3 週間経過したヒトの包皮繊維芽細胞 (350,000 cells/ml) の共焦レーザー顕微鏡イメージ

使用例

- rhBMP-2 を QGel™ マトリックスに取り込ませて、細胞性分解によって放出させて、骨の欠損部を修復。
- rVEGF (血管内皮細胞増殖因子) を QGel™ マトリックスに共有結合させ、血管形成組織の成長を促進。

【参考文献】

- 1) Lutolf, M. et al. : *Nat. Biotechnol.*, **21**, 513 (2003).
- 2) Zisch, A. et al. : *FASEB J.*, **17**, 2260 (2003).
- 3) Lee, S. et al. : *Biomaterials*, **31**, 1219 (2009).

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
510-87611	REF1001	QGel™ MT 3D Matrix MMP-Degradable, with RGD-peptide	20mg	25,000
517-87621	REF1004	QGel™ MT 3D Matrix MMP-Degradable, without RGD-peptide	20mg	25,000
514-87631	REF1007	QGel™ MT 3D Matrix Non-Degradable, with RGD-peptide	20mg	25,000
511-87641	REF2001	QGel™ Buffer	4ml	2,500
518-87651	REF4001	QGel™ Disc Caster	1ピース	2,500

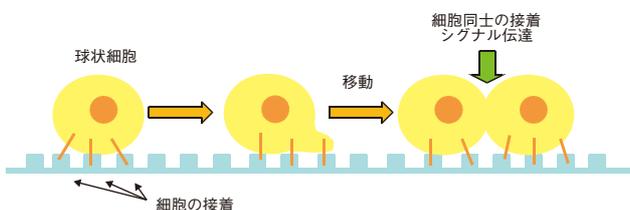
三次元細胞培養ツール

SCIVAX CORP.

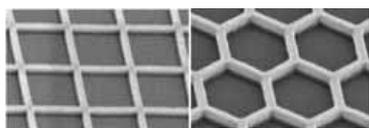
NanoCulture® Plate

ナノカルチャープレートは、細胞の三次元培養に使う培養プレートです。平面培養容器と同様に細胞を播種するだけで、細胞が細胞塊（スフェロイド）を形成します。

がん細胞、正常細胞を問わず、接着細胞はナノカルチャープレート上に丸い形で接着し、パターン上を歩き回って細胞間接着によりスフェロイドを形成します。

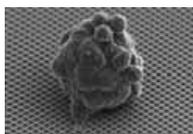


ナノカルチャープレートの底面には均一な微細パターンを特殊な技術で形成してあります。

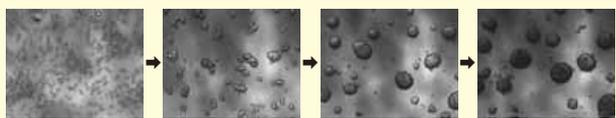


ナノカルチャープレート培養表面のパターン

スフェロイドの形態は細胞により異なり、細胞外マトリックスを大量発現し高密度のスフェロイドを形成する細胞や、極性を示し管腔形成する細胞もあります。ナノカルチャープレートは、細胞が自己の由来を表現したくなる足場を提供します。



ナノカルチャープレートのマイクロスクエア (MS) パターンとスフェロイドの様子
細胞が培養表面のパターンを掴んで接着している
(データご提供：早稲田大学 並木秀男先生)



HT29細胞のスフェロイド形成の経時変化

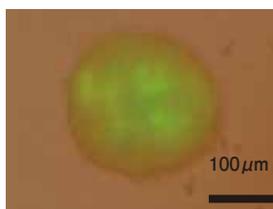
特長

- 生体由来成分を含まない
 - ⇒ ナノパターン加工した合成樹脂ポリマー
 - ⇒ ロット間差がなく一定の品質を保っている
 - ⇒ マトリックスやゲル成分を一切含まない
 - ⇒ 透過率が高く観察性に優れている
- 簡単操作：従来の培養操作で、細胞をNCPに撒くだけでスフェロイドができる
 - ⇒ 90種類以上の株化細胞でスフェロイド形成を確認済み

- ⇒ ウェル間差・プレート間差がない
- ⇒ 再現性の高いスフェロイド形成
- ⇒ 初代がん細胞も間質細胞と共存してスフェロイドを形成
- スフェロイドになっても培養面に接着
 - ⇒ 高い生存率と増殖性を保持
 - ⇒ 化合物の添加・観察・細胞回収が容易

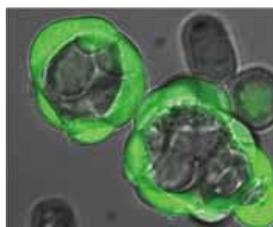
使用例

スフェロイドの低酸素領域の観察



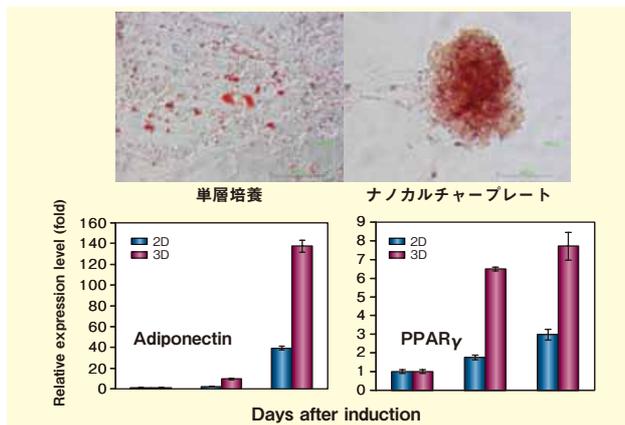
HIF (低酸素誘導因子) エンハンサー (HRE: 低酸素応答性領域) で発現制御された GFP ベクターを導入した HT 29 細胞を 7 日間ナノカルチャープレートで培養した。スフェロイド内部で HIF が活性化している。
(データご提供：福井大学 吉井幸恵先生)

管構造を形成する細胞



MCF 7 細胞をナノカルチャープレートで 3 日間培養し、Calcein AM で染色して共焦点顕微鏡で観察した。管腔を形成している様子がわかる。
(データご提供：早稲田大学 並木秀男先生)

分化や機能発現が亢進



ヒト間葉系幹細胞 UET-13 をナノカルチャープレート上で脂肪細胞に分化させると、スフェロイドを形成し短期間に丸い成熟脂肪細胞に分化した。
(データご提供：国立成育医療研究センター研究所 大喜多肇先生)

【参考文献】

- 1) Mizushima, H. *et al.* : *J. Cell Sci.*, **122** (23), 4277 (2009).
- 2) Fukuda, M. and Sakashita, H. : *Hosp. Dent. (Tokyo)*, **21** (2), 85 (2009).
- 3) Waki, A. : *BIO Clinica*, **25** (11), 89 (2010).
- 4) Matsuda, Y. *et al.* : *Med. Mol. Morphol.*, in press.
- 5) Miyagawa, Y. *et al.* : *Tissue Eng. Part A*, in press.

詳しくは、SCIVAX 社ホームページをご参照下さい。
<http://www.scivax.com/>

ES細胞・iPS細胞の培養に



StemSure® シリーズ

StemSure® シリーズは、マウス ES 細胞 D3 株を用いて、コロニー形成試験とアルカリホスファターゼ (ALP) 染色を行い、細胞増殖と未分化能を品質保証した製品群です。

製品ラインアップ

- StemSure® 10mmol/ℓ 2-メルカプトエタノール溶液
- StemSure® 50mmol/ℓ モノチオグリセロール溶液
- StemSure® 0.1w/v% ゼラチン溶液

試験項目

- コロニー形成試験 (マウス ES 細胞)
- ALP 染色 (マウス ES 細胞)
- 無菌試験
- マイコプラズマ試験
- エンドトキシン試験 など

2ME (毒物) の代替品

StemSure® モノチオグリセロール溶液

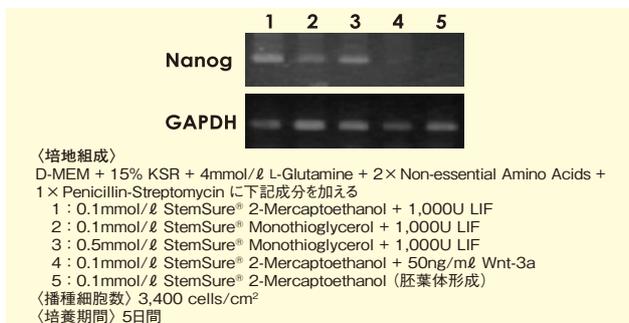
モノチオグリセロール (MTG) は、マウス ES 細胞 D3 株の培養において培地に添加し、2-メルカプトエタノール (2ME) の代替品として使用できます。2ME は、ES 細胞培養に必須の因子です。しかし、2008 年の法改正により毒物に指定され、濃度による除外規定がないため、2ME を含む培地が毒物として扱われます。MTG は、毒物に指定されていないため、MTG を含む培地や廃液は一般品として扱うことができます。

特長

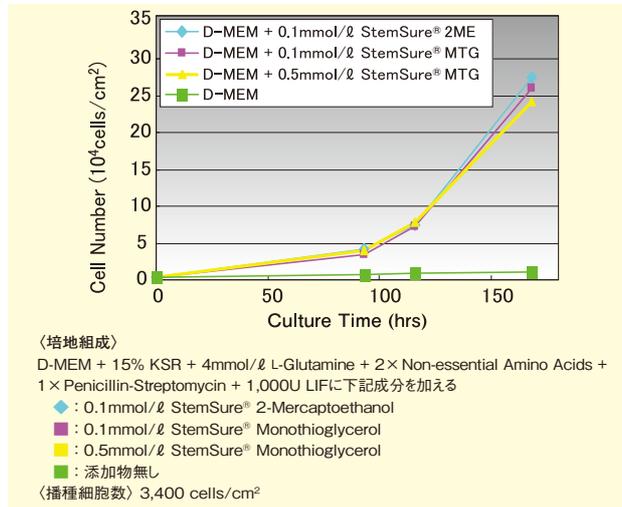
- 2-メルカプトエタノールと同等に使用できるうえに毒物ではない

データ

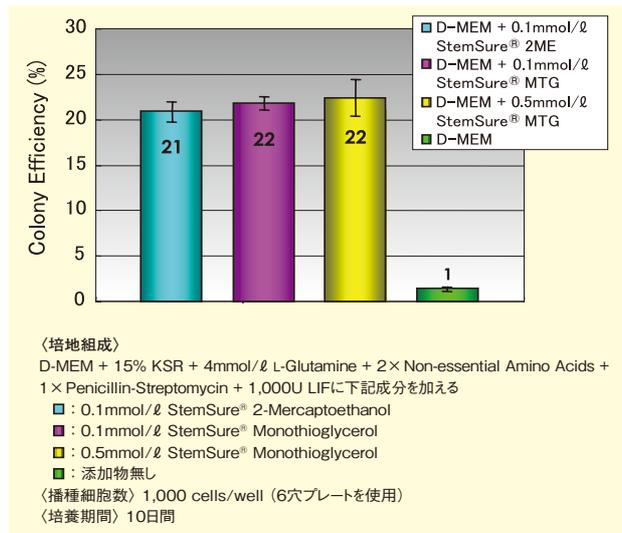
未分化マーカーの発現確認 (RT-PCR)



細胞増殖能



コロニー形成能試験



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
198-15781	StemSure® 10mmol/ℓ 2-Mercaptoethanol Solution (×100)	細胞培養用	100ml	7,000
195-15791	StemSure® 50mmol/ℓ Monothioglycerol Solution (×100)	細胞培養用	100ml	8,000
190-15805	StemSure® 0.1w/v% Gelatin Solution	細胞培養用	500ml	7,000

お知らせ

1992年より、和光純薬時報に「化学大家」、「百年前の化学」をご執筆頂いておりました芝哲夫先生が、2010年9月永眠されました。ご生前のご厚情に深く感謝致しますとともに、ご功績を偲び、心からご冥福をお祈り申し上げます。誠に勝手ながら、「百年前の化学」は、Vol. 78, No. 1を以って終了とさせていただきます。

慶應義塾大学医学部生理学教室 西原 浩司

第26回 Wako ワークショップ「幹細胞・iPS 細胞研究の最前線」が2010年11月26日に東京・品川の THE GRAND HALL にて開催されました。幹細胞医学は、わが国発である iPS 細胞作製技術の確立も相俟って加速度的に発展しており、特に2007年のヒト iPS 細胞樹立の報告以降、近年の再生医療の波を受けて最も注目すべき研究分野の一つとなっています。今回のワークショップでは、第一線で活躍されている七名の先生方がそれぞれのご専門の分野での最新の研究内容についてご講演されました。

まずはじめに、本ワークショップを総合企画されました慶應義塾大学大学院・医学研究科の岡野栄之先生からご挨拶がありました。「京都大学の山中先生らによる iPS 細胞の樹立のみならず、転写因子の研究など幹細胞研究において、我が国が寄与している役割は非常に大きいと考えます。日進月歩の急速な研究が進む幹細胞医学や再生医学において、いかに新しい道を作っていくかがこれからの課題となるでしょう。ことに神経疾患に関しては、幹細胞医学の知見を実際の医療にいかにつなげていくか、すなわち幹細胞と神経疾患研究をフュージョンさせることがこれからのサイエンスにおいて重要であります」とまとめられ、様々な角

度から幹細胞・iPS 細胞研究を掘り下げる今回のワークショップをご発案された背景、意図をご説明されました。

最初の演者、京都大学・理学研究科の阿形清和先生は、「ES/iPS 細胞から臓器を作ることを目指すプラナリアにその方法を学ぶ」というタイトルでご講演されました。「1998年のヒト ES 細胞樹立をきっかけとしてヒト幹細胞医学が本格的に始まり、2007年のヒト iPS 細胞の登場に至る中で、どうやってそれらを再生医療に応用していくか。それを考える上で、ユニークな特色を支える全能性幹細胞をもつプラナリアに学ぶべき所は大きい」という導入から、プラナリアの脳再生における位置情報の制御機構についてお話しされました。nou-nashi や nou-darake といった遺伝子の解析を通じて、前方化に関わる FGF 遺伝子や ERK シグナル、後方化に関わる Wnt1 あるいは Hh の知見などから、神経系の形成に位置情報システム（座標軸）が重要であったことを明快にご説明されました。「幹細胞は、周囲の分化した細胞と相互作用をしながら的確な位置情報を得ることによって、正しい細胞構築に至る。幹細胞の機能維持だけでなく、

周囲の細胞がどのようにして幹細胞へ位置情報（発生分化の場）を提供しているかの理解へつながった」と非常に示唆に富んだご講演でした。

続いては、京都大学大学院・医学研究科の斎藤通紀先生より「生殖細胞の形成機構とその再構成」というタイトルでご講演いただきました。生殖細胞系列が形成される際には、体細胞化の抑制および潜在的な多能性の再獲得、genome wide epigenetic modification（生殖細胞で、運命決定直後にゲノムワイドなエピゲノム修飾の変換が行われること）が起こりますが、単一細胞解析によって始原生殖細胞の誕生に関わる遺伝子を網羅的に解析し、Blimp1 および Prdm14 遺伝子はその形成のキーになっていることを証明された経緯についてお話しされました。また、胚体外胚葉から始原生殖細胞を選択的に効率よく誘導する系についてもご紹介されました。不妊症の解明・治療などに向けた展望として多能性幹細胞（ES 細胞や iPS 細胞）から生殖細胞系列を試験管内で誘導する技術の可能性にも触れられ、解析の緻密さに驚かされるとともに臨床応用が強く期待される内容でした。



総合企画の岡野 栄之 先生



講演風景

Wako ワークショップ 見聞録

昼食をはさんでの最初のご講演では、鳥取大学大学院・医学系研究科の押村光雄先生より、「ヒト人工染色体と幹細胞の出会い—遺伝子・再生医療を目指して—」というタイトルでお話いただきました。まず、理想的な遺伝子治療・機能再生医療を達成する上で有用なベクターとして構築されたHACベクターについて解説されました。これは、ヒト21番染色体を改変し、目的の遺伝子をカセット方式で部位特異的に挿入できる新規の人工染色体ベクターで、従来のベクターとはかなり異なる性質を持つものです。このHACベクターを用いた研究として、第Ⅷ因子やジストロフィン遺伝子をHACベクター上へクローニングするという遺伝子治療を目指した試み、ヒト型の薬物代謝を有する実験動物（ヒト型代謝モデル）としてヒト型CYP3Aクラスターゲノム全長を導入したマウスの作製、ヒト染色体を保持するモデル動物としてヒト21番染色体が挿入されたダウン症モデルマウス

の解析などをご紹介されました。ヒト人工染色体を応用し遺伝子・再生医療を目指してこれから何ができるかという観点から、外来遺伝子のゲノムへの挿入がない、品質管理システム・分化誘導因子・自殺遺伝子を導入した理想的なiPS細胞の作製、幹細胞を用いた研究の展望にも言及され、将来的に非常に応用範囲の広い技術になるだろう

と感じました。

続いては、東京大学・分生研の後藤由季子先生が「マウス大脳神経幹細胞の運命制御機構」というタイトルでご講演をされ、学習記憶や損傷修復に関与している成体神経幹細胞（Adult NSC）の起源を探るという研究についてお話しされました。まず、Adult NSCの特徴であるslow dividingな細



阿形 清和 先生



齋藤 通紀 先生



押村 光雄 先生



後藤 由季子 先生



井上 治久 先生



中西 淳 先生

第26回

Wako ワークショップ

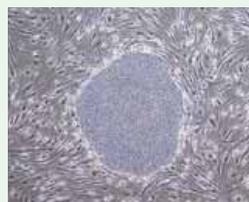
幹細胞・iPS 細胞研究の最前線

開催日：平成22年11月26日（金）

開催場所：THE GRAND HALL

総合企画：慶應義塾大学 医学部 生理学教室

教授 岡野 栄之 先生



ヒトiPS細胞（写真提供：慶應義塾大学 医学部 生理学教室 教授 岡野 栄之 先生）

講演プログラム

開会挨拶 和光純薬
はじめに 慶應大・医 岡野 栄之
「ES/iPS細胞から臓器を作ることを目指す
—プラナリアにその方法を学ぶ—」
京大院・理 阿形 清和
「生殖細胞の形成機構とその再構成」
京大院・医 齋藤 通紀
(昼 食)
「ヒト人工染色体と幹細胞の出会い
—遺伝子・再生医療を目指して—」
鳥取大・染色体工学研究センター 押村 光雄

「マウス大脳神経幹細胞の運命制御機構」
東大・分生研 後藤 由季子
「疾患特異的iPS細胞を用いた神経変性疾患の研究」
京大・iPS細胞研究所 井上 治久
(コーヒーブレイク)
「iPS細胞を用いた創薬研究の新展開」
武田薬品工業 中西 淳
「iPS細胞技術を用いた再生医学・疾患・創薬研究」
慶應大・医 岡野 栄之
慶應大・医 岡野 栄之
おわりに
閉会挨拶 和光純薬

胞が胎生期の脳室帯に存在することを証明し、胎生期の slow dividing な細胞群が Adult NSC の起源であるという作業仮説を立てられました。次に、Adult NSC が長期間維持されるためには Niche 細胞が必要ですが、その機構において Notch 活性が重要であること、Dll1 が成体の subventricular zone において Notch 活性化に必要であることを明らかにされました。さらに細胞の分裂様式を探った結果、Adult NSC は非対称分裂により Adult NSC (B 細胞) と一過的増殖細胞 (C 細胞) に分裂し、Adult NSC ではその傍らにある一過的増殖細胞の Dll1 発現の影響で Notch シグナルが活性化され、p57 の発現が誘導された結果、細胞周期の遅い幹細胞としての機能を維持していることが分かったという内容でした。神経幹細胞が非対称性分裂によって Niche 細胞を自ら生み出すという興味深い現象をクリアカットに説明され、非常に勉強になりました。

続いてのご講演、「疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経変性疾患の研究」では、京都大学・iPS 細胞研究所の井上治久先生が筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の患者由来 iPS 細胞を用いたの研究について紹介されました。SFEB 法によって iPS 細胞から EB 形成を行う上で、HB 陽性細胞を含む脊髄前角細胞群の分化誘導を促進する Dorsomorphin を用いることによって、脊髄運動ニューロンが効率的に作製され、それを用いて得られた機能的脊髄運動ニューロンを筋と共培養しての解析など、これまでに先生が行われた多岐にわたる研究方法について詳細

にお話しされました。また研究の目的として神経疾患の病態解明と iPS 細胞などの科学技術をいかに融合するかというところが肝要であるという点を強調され、まず病態解明の観点から、ALS 発症の病態背景として注目されている SOD1 や TDP43 の変異型をもつ ALS 由来の iPS 細胞を作製して正常細胞と組み合わせる培養する、iPS 細胞に ALS の病理所見である封入体を強制的に発現させるなどの手法を通じて ALS 発症のメカニズムを解明する戦略をご紹介されました。

コーヒーブレイクをはさみ、武田薬品工業株式会社の中西淳先生より「iPS 細胞を用いた創薬研究の新展開」というタイトルでご講演がありました。まず、ヒト iPS 細胞から Neurosphere 法により誘導した神経細胞を用いて A β の産生および A β オリゴマー誘発細胞死について解析された知見、ES 細胞由来の心筋細胞で成体心筋と類似した特定の遺伝子発現が見られたことなどから、iPS 細胞由来神経細胞を用いた創薬評価系が構築できるというお話をされました。また、すでにヒト ES/iPS 細胞から分化誘導したヒト組織細胞を用いて薬効評価や毒性評価の検討が開始されていること、患者組織から作製した疾患特異的 iPS 細胞を用いて薬剤感受性の個人差等を考慮したテーラーメイド医療が期待されることなどにも触れられ、ES/iPS 細胞を用いた創薬研究に関する国内外の最新の取り組みを紹介されるとともに、臨床医学へ向かう前段階の「in vitro clinical trial」という概念や今後解決すべき課題についてもグローバルな視点から展望を語られました。

講演の最後は、ワークショップの総合企画をされました慶應義塾大学大学院・医学研究科の岡野栄之先生より「iPS 細胞技術を用いた再生医学・疾患・創薬研究」というお話でした。再生医療や iPS 細胞研究の世界的な動向について概観された後、幹細胞・iPS

細胞研究周辺の広い研究成果についてご紹介されました。iPS 細胞を用いた脊髄損傷への脊髄再生戦略に関しては、移植後の腫瘍原性が治療効果を測る上でも重要であることに着目され、integration free であるなど適切なクローンを得るために、FACS、遺伝子解析などを含めた詳細な前評価が鍵を握ることを強調されました。次に、神経・精神疾患や小児疾患など多くの疾患を対象とした疾患特異的 iPS 細胞の研究について言及され、パーキンソン病を一例としてマイクロアレイ、メタボローム、ミトコンドリア機能・動態などの多角的な解析についてご紹介されました。また、世界で初めて次世代まで導入遺伝子の発現が見られた遺伝子改変霊長類 (マーモセット) として先日 Nature 誌に掲載された遺伝子改変技術にも触れられ、神経難病のモデルマーモセットの作出と霊長類の脳構造・機能解析を進めることで、iPS 細胞技術と相補的な技術として発展させたいとの展望を語られました。

全ての講演が終了後、岡野先生より「現在、わが国を含め世界のサイエンスは iPS 細胞による夜明けを迎えています。今こそ、エビジェネティクス、疾患研究、幹細胞研究などわが国の底力が試される時でしょう」と大きな意気込みを語られ、閉会の言葉とされました。

私ごとになりますが、現在慶應義塾大学医学部生理学教室の岡野栄之先生の下で iPS 細胞や神経疾患研究に携わっている関係で、この見聞録を書かせていただきました。紙面の制限上、ご紹介できなかった興味深いお話もたくさんございましたが、神経のみならず生殖、発生など多彩で示唆に富んだ内容のお話を伺うことができ、非常に有意義でした。最後になりましたが、今回ご講演された諸先生方と和光純薬の皆様へ厚く御礼申し上げます。



当社展示風景



簡単に安定発現株が作製できるEpisomal型複製ベクター

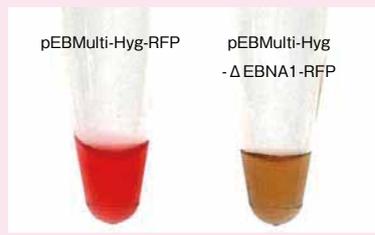
pEBMulti ベクター

安定発現株
樹立まで約1週間!!

本品は、霊長類（ヒト、サル）、イヌなどの細胞に導入可能な遺伝子発現ベクターです。
本品は、Epstein-Barr Virus (EBV) 由来の複製起点OriPとEBV Nuclear Antigen 1 (EBNA1) 遺伝子の働きにより、遺伝子導入細胞中においてPlasmidが娘細胞に分配されるEpisomal型ベクターです。

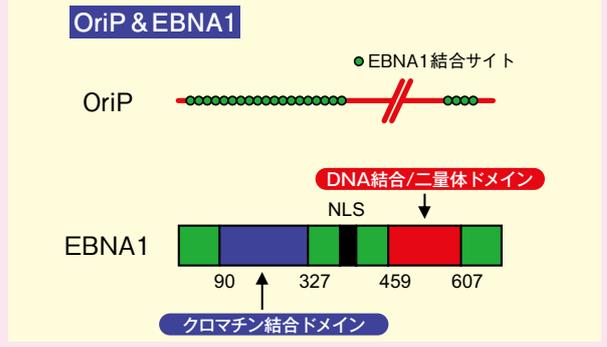
特長

- 簡単に安定発現株を樹立できる
 - 宿主ゲノムDNAに組込まれない
 - シャトルベクター*として使用できる
- *: 1種類の抗生物質で大腸菌・動物細胞のクローンを選抜できるベクター

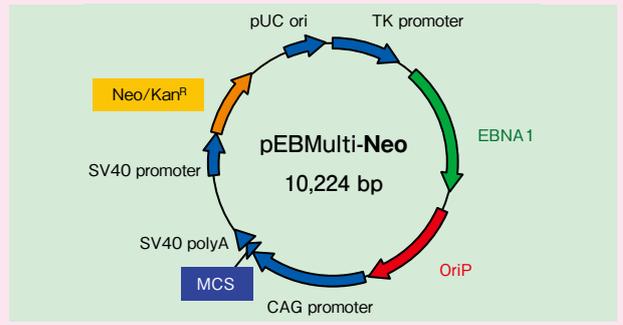
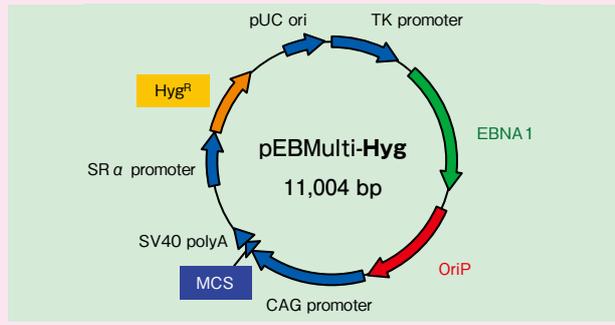


性状

- ベクターサイズ: 約11 kbp
- 精製法: 塩化セシウム密度勾配遠心法
- 組成: 10 mmol/l Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/l EDTA
- 濃度: 1 μg/μl
- 大腸菌・動物細胞選抜抗生物質:
pEBMulti-Hyg...Hygromycin B
pEBMulti-Neo...G 418またはGeneticin®
- Nuclease 混入チェック: 電気泳動で確認済み
- MCS プロモーター: CAG



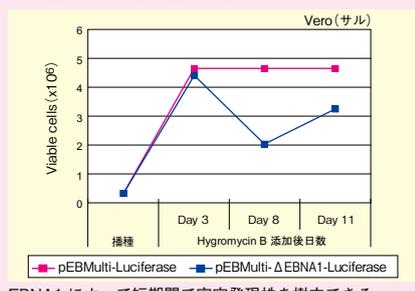
ベクター概要



その他、詳細情報は、本品に添付されている現品説明書に記載しております。

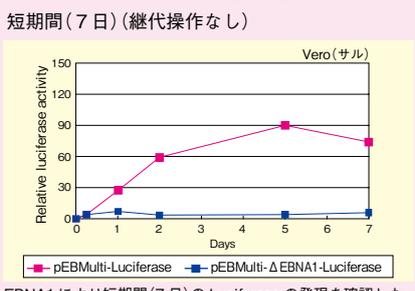
データ

■ 短期間で安定発現株を樹立



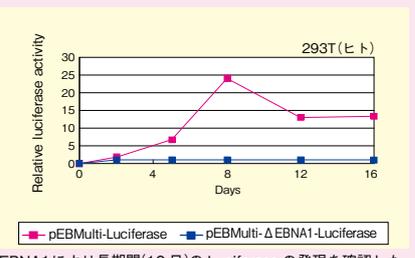
EBNA1 によって短期間で安定発現株を樹立できる。

■ Luciferase の発現持続性



EBNA1 により短期間(7日)のLuciferaseの発現を確認した。

■ 長期間(16日)(継代操作あり)



EBNA1 により長期間(16日)のLuciferaseの発現を確認した。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
050-08121	pEBMulti-Hyg	遺伝子研究用	20 μg	60,000
057-08131	pEBMulti-Neo	遺伝子研究用	20 μg	60,000

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、「医薬品」、「食品」、「家庭用品」などとしては使用できません。

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. 79 No. 1
2011年1月25日発行
発行責任者 糸博之
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 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