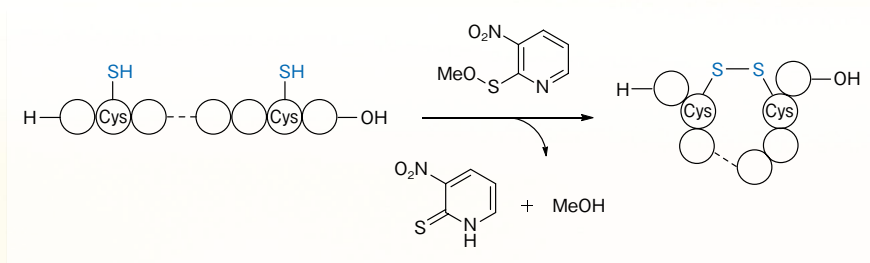


# 和光純薬時報

October 2018  
Vol.86 No.4



## 【総説】

「環状ペプチド合成に有用なジスルフィド形成試薬 Npys-OMe の創製」 田口 晃弘、小谷 明、袴田 秀樹、林 良雄…………… 2

「プロテインシーケンサ PPSQ™-50 グラジエントシステムの開発」

栗木 智子、秋永 伸幸、楠本 美紀、山田 裕子、水井 浩司、早川 昌子、安藤 英治…………… 6

## 〈テクニカルレポート〉

「細胞外小胞の蛍光標識とその問題点」

請川 亮…………… 16

## 【連載】

### 〈アミノ酸分析 ～新たな潮流～〉

「第2回 アミノ酸分析の新しい潮流① 質量分析を利用したアミノ酸分析」

角田 誠、住田 有子…………… 9

### 〈核酸医薬合成 基礎講座〉 最終回

「第4回 オリゴヌクレオチド合成におけるキャッピング及び酸化・硫化反応」

佐藤 健太郎…………… 12

### 〈エクソソームと生命現象〉

「第3回 細胞老化とエクソソーム」

岡田 遼、高橋 暁子…………… 14

### 〈神経変性疾患研究の最前線〉 最終回

「第7回 筋萎縮性側索硬化症 (ALS)」

渡邊 征爾、山中 宏二…………… 18

## 【化学大家】

「ハワード・スタンレー・メイソン」

鈴木 晋一郎…………… 28

## 【製品紹介】

### 有機合成

- ジスルフィド結合形成試薬「Npys-OMe」…………… 5
- RAFT 重合試薬…………… 26
- 有機半導体材料…………… 26

### 分析

- PPSQ シリーズ (グラジエントシステム) 用製品…………… 8
- HM1000A 用 校正試料 DOTP Fragment…………… 25
- ポジティブリスト関連標準品…………… 27

### 細胞生物

- Phos-tag® SDS-PAGE 用試薬…………… 21

### 遺伝子

- EV-Save™ 細胞外小胞ブロッキング試薬…………… 17
- PA タグ-EGFP-6 × His タグ, 組換え体, 溶液…………… 22
- 標識抗 PA タグ抗体…………… 22
- 細胞外小胞マーカーモノクローナル抗体…………… 23

### 免疫

- 抗りん酸化 Tau S422, モノクローナル抗体 (AP422) …… 24

### 培養

- マイコプラズマ標準品…………… 24

## 【お知らせ】

第34回 Wako ワークショップ開催のご案内…………… 32

### はじめに

ペプチドやタンパク質に見られるジスルフィド結合は、ペプチド鎖の環状化により立体構造を固定化することで、その生理機能の発現に寄与する重要な官能基である。当該結合を有する生理活性ペプチドは数多く知られ、インスリン、カルシトニンやナトリウム利尿ペプチドなどは医薬品として臨床適用されている。このような環状ペプチドの化学合成では、ジスルフィド架橋は非常に重要な工程となる。そのためペプチド化学は、これまで多くのジスルフィド架橋法を開発してきた。一般に1組のジスルフィド結合の構築には、従来法として空気酸化 (DMSO酸化) やヨウ素 (I<sub>2</sub>) 酸化が多用されるが、複数のジスルフィドを有するペプチドの場合、当該結合を一挙に構築すると架橋異性体が副生しやすい。そこで、位置選択的なジスルフィド架橋法として、システイン (Cys) 残基側鎖チオール (SH) 基の直交型保護基を利用した段階的ジスルフィド架橋法が開発されてきた。

1980年に松枝らによって開発された3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル (Npys) 基<sup>1)</sup>は、ペプチド合成においてCys残基側鎖SH基の直交型保護基の一つとして利用されるが、同時に活性ジスルフィドとしても機能する<sup>2)</sup>。そのため、他に側鎖無保護のCys残基が共存すれば、ジスルフィド交換反応が選択的に進行し、ペプチド内あるいはペプチド間でジスルフィド結合が形成される (図1A)。我々は、このNpys基の化学に着目し、ケミカルバイオロジー研究やペプチド合成化学に有用な、固相担持型ジスルフィド形成試薬の開発を精力的に行ってきた<sup>3-5)</sup>。その開発の中で、硫黄-酸素結合を有する3-ニトロ-2-ピリジンスルフェン酸エステル (Npys-OR) の構造に興味を持った (図1B)。当該エ

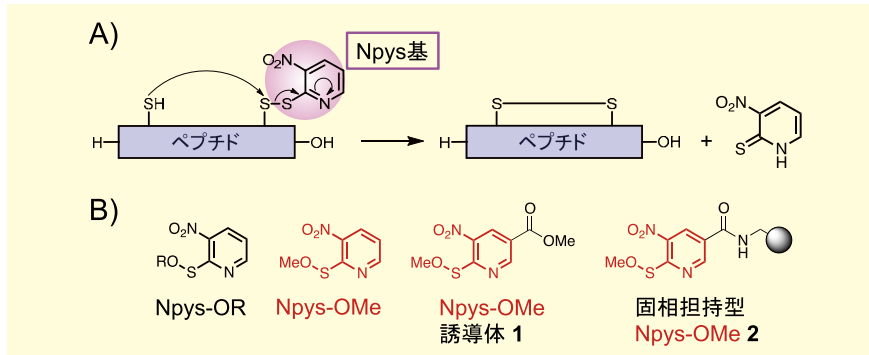


図1. A) 3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル (Npys) 基によるジスルフィド結合の構築。 B) 3-ニトロ-2-ピリジンスルフェン酸メチルエステル (Npys-OMe) およびその誘導体1, 2の化学構造。

ステルの合成法は松枝らにより報告<sup>6)</sup>されているが、その性質に関しては研究がなされていなかった。

今回我々は、Npys-ORのジスルフィド形成における酸化剤としての可能性を模索した。その結果、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェン酸メチルエステル (Npys-OMe) およびその誘導体1, 2 (図1B)が、環状ジスルフィドペプチドの合成に有用なジスルフィド形成試薬となることを新たに見出した<sup>7, 8)</sup>。本稿では、これらの試薬の合成、および環状ジスルフィドペプチド合成への応用について紹介する。

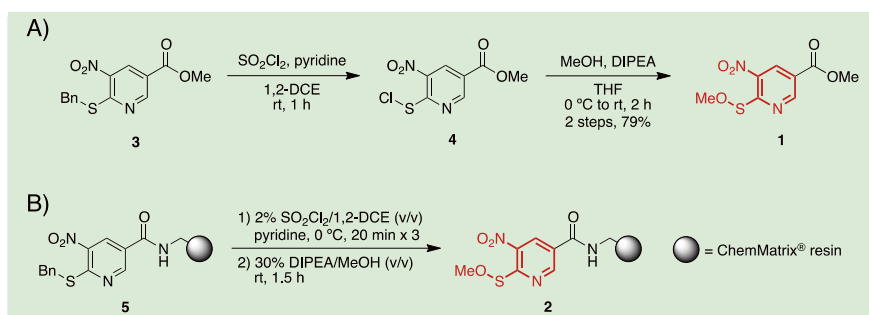
ジン存在下、塩化スルフリル (SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) と反応させ、クロロ体4へと導いた。得られた4を精製すること無く、THF溶媒中、メタノールおよび塩基で処理することで誘導体1を合成した (2工程79%)。一方で、固相担体として水系および有機溶媒にて使用可能なChemMatrix<sup>®</sup> resinを用い、固相担持型Npys-OMe 2を合成した。樹脂5<sup>9)</sup>よりクロロ化、続くメタノール処理により樹脂2を得た (Scheme 1B)。

### Npys-OMe誘導体1のジスルフィド形成能評価<sup>7)</sup>

還元型オキシトシン (6) からオキシトシン (7) への酸化反応をモデルとし、Npys-OMe誘導体1のジスルフィド形成能を評価した。反応中に生成するオキシトシンをHPLCにて追跡し、検量線に基づきHPLC収率を算出した。表1にその酸化反応の結果を示す。始めにペプチド6のDMF:

### Npys-OMe誘導体の合成<sup>7)</sup>

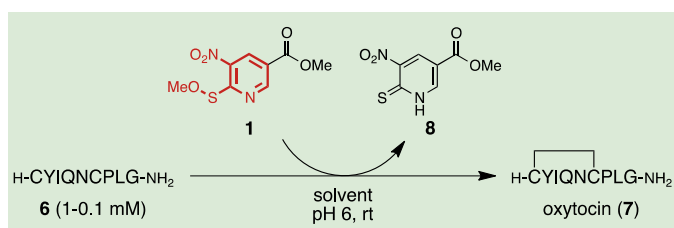
Npys-OMe誘導体1および固相担持型Npys-OMe 2の合成をScheme 1に示す。誘導体1の合成では、まず、6-ベンジルチオ-5-ニトロニコチン酸メチル (3)のベンジル基を1,2-ジクロロエタン (1,2-DCE) 溶媒中、ピリ



Scheme 1. A) Npys-OMe誘導体1および、B) 固相担持型Npys-OMe 2の合成<sup>7)</sup>

表1. オキシトシン合成によるジスルフィド形成能の評価<sup>7)</sup>

[a] 反応6時間後におけるオキシトシン(7)のHPLC収率。  
[b] オリゴマーのHPLC収率。[c] 反応3時間後におけるオキシトシン(7)のHPLC収率。



Entry	1 (equiv.)	Solvent	Peptide 6 conc. (mM)	Yield of oxytocin (%) <sup>a</sup>	Oligomer (%) <sup>b</sup>
1	2	DMF : H <sub>2</sub> O (1 : 1)	1	77	16
2	2	DMF : H <sub>2</sub> O (1 : 2)	1	79	16
3	2	CH <sub>3</sub> CN : H <sub>2</sub> O (1 : 2)	1	86	14
4	2	CH <sub>3</sub> CN : H <sub>2</sub> O (1 : 3)	1	88	19
5	2	CH <sub>3</sub> CN : H <sub>2</sub> O (1 : 3)	0.5	87	8
6	2	CH <sub>3</sub> CN : H <sub>2</sub> O (1 : 3)	0.1	90	2
7	5	CH <sub>3</sub> CN : H <sub>2</sub> O (1 : 3)	0.1	92 <sup>c</sup>	1
8	0	CH <sub>3</sub> CN : H <sub>2</sub> O (1 : 3)	0.1	1	0

H<sub>2</sub>O (1 : 1, ペプチド濃度 1 mM) 溶液に対し、誘導体 1 を 2 当量添加し、室温にて 6 時間攪拌したところ、オキシトシンを収率 77% で得た (Entry 1)。また、Entry 2 および 3 に示すように反応溶媒を DMF : H<sub>2</sub>O から

CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O に変更すると収率の向上が見られた。更に Entry 4 の CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O (1 : 3) の条件下では、収率 88% と良好な結果を示した。しかし、副生成物としてペプチド 6 のオリゴマーが観察されたため、これらの

生成を抑制すべく、反応条件の最適化を図った。CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O (1 : 3) におけるペプチド 6 の濃度を 0.5 および 0.1 mM に調整し、酸化反応を実施したところ、ペプチド濃度の低減によりオリゴマーの生成は減少し、0.1 mM では 2% にまで抑えることができた。またこれに伴い、反応 6 時間後のオキシトシン (7) の収率はそれぞれ 87、90% と高値であった (Entry 5 および 6)。更に、ペプチド 6 の CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O (1 : 3, ペプチド濃度 0.1 mM) 溶液に対し、誘導体 1 を 5 当量用いると、3 時間で反応は完結し、オキシトシンを 92% の収率で合成することができた (Entry 7, 図 2)。一方で、Entry 8 の様に Npys-OMe 誘導体 1 を添加しないとオキシトシンがほとんど生成しないことから、pH 6.0 ではオキシトシンの空気酸化によるジスルフィド形成は起こらず、当該誘導体の添加によりはじめて酸化反応が効率的に進行することが示唆された。また、構造を簡素化させた Npys-OMe も、同様の反応条件にてオキシトシンを高収率 (95%) で合成することが可能である (図 3)<sup>8)</sup>。一方で、樹脂 2 を用いる条件でも良好な収率 (85%) でオキシトシン (7) が生成する (Data not shown)。この

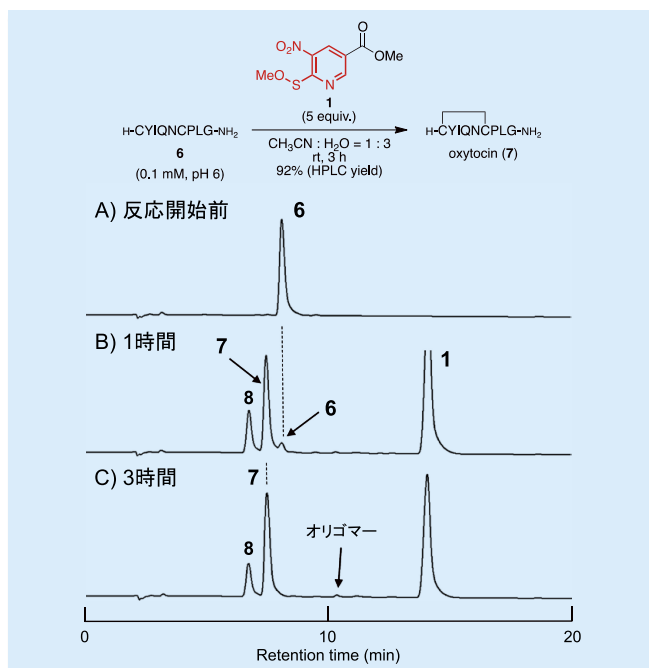


図2. 表1, Entry 7 の反応条件におけるオキシトシン合成の HPLC チャート<sup>7)</sup>

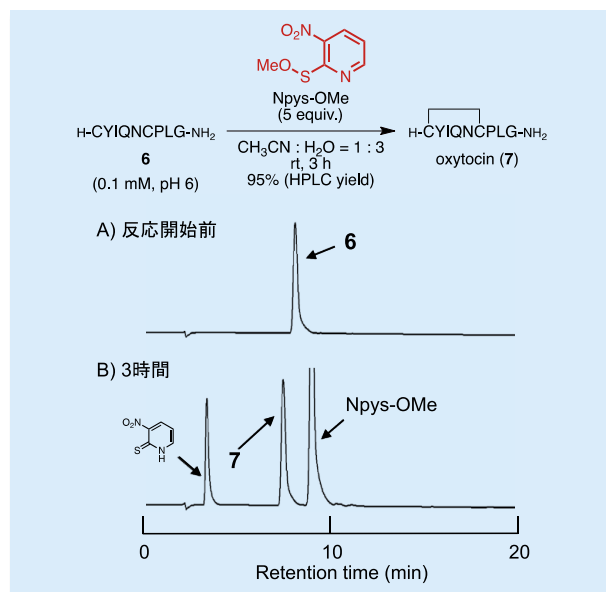


図3. Npys-OMe によるオキシトシン合成<sup>8)</sup>

方法では、試薬成分が樹脂上に残るため、反応溶液のろ過操作のみで、純度の高いペプチドの回収が可能である<sup>7,8)</sup>。

## Npys-OMe 誘導体 1 の酸化還元特性の評価<sup>7)</sup>

誘導体 1 のサイクリックボルタンメトリー<sup>9)</sup>で観察された還元波のピーク電位 ( $E_{pc}$ ) は  $-0.541$  V であり、酸化型グルタチオン (GSSG) の  $-1.55$  V よりも正側であった (表 2)。この結果は、Npys-OMe 誘導体 1 により 2 つの SH 基をジスルフィドへと酸化可能であることを示唆している。一方

表 2. サイクリックボルタンメトリーで測定した還元波のピーク電位 ( $E_{pc}$ )<sup>7)</sup>

測定対象物質	$E_{pc}$ (V vs. Ag/AgCl)
I <sub>2</sub>	+0.437
NCS	-0.175
Npys-OMe 誘導体 1	-0.541
酸化型グルタチオン (GSSG)	-1.55

ボルタンメトリー条件：作用電極，プラスチックフォームドカーボン；参照電極，Ag/AgCl；対極，白金；電解質溶液，0.1 M KCl 含有 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0)；CH<sub>3</sub>CN (3:1, v/v)；掃引速度，20 mV/s。

で、ジスルフィド形成に使われる既存の酸化剤 I<sub>2</sub> および最近ジスルフィド形成試薬として報告された *N*-クロロスクシニミド (NCS)<sup>10)</sup> の  $E_{pc}$  は、それぞれ +0.437 および  $-0.175$  V であった。Npys-OMe 誘導体 1 の  $E_{pc}$  ( $-0.541$  V) は、I<sub>2</sub> および NCS の値よりもはるかに負側であることから、誘導体 1 は温和な酸化剤として機能することが電気化学的手法により確認された。

## Npys-OMe 誘導体 1 を用いたペプチド合成<sup>7)</sup>

我々は、Npys-OMe のペプチド合成化学への更なる応用に向け、オキシトシン (7) よりも複雑な構造を有する環状ペプチドの合成を試みた。

### (1) ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド (hANP (9)) の合成

還元型 hANP (10) の CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O (1 : 3、ペプチド濃度 1 mM) 溶液に Npys-OMe 誘導体 1 を 5 当量添加し、室温にて攪拌した。図 4 に示すように時間経過に伴い、還元型ペプチド 10 のピークは減少し、hANP (9) のピークの増大を確認できた。反応 24 時間

後では、10 のピークは完全に消失した。また、本反応中、酸化されやすいアミノ酸の 1 つである 12 残基目のメチオニンには全く影響を与えなかった。反応溶液を HPLC にて精製することで 9 を単離収率 50% で得た。本結果より、Npys-OMe 誘導体 1 は、中分子ペプチドのジスルフィド結合構築においても効率的に機能することが示された。

### (2) $\alpha$ -コノトキシン ImI (11) の合成

続いて、2 組のジスルフィド結合を有する  $\alpha$ -コノトキシン ImI (11) の合成検討を実施した (図 5)。保護 Cys 残基を有する還元型ペプチド 12 を用い、酸化反応を段階的に行うことで、位置選択的なジスルフィド架橋を試みた。即ち、まず、Npys-OMe 誘導体 1 により無保護 Cys<sup>2</sup>-Cys<sup>8</sup> 残基間を架橋した後、次いで I<sub>2</sub> 酸化により保護 Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>12</sup> 残基間を架橋し、 $\alpha$ -コノトキシン ImI (11) の合成を目指した。まず、Cys 保護ペプチド 12 の CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O (1 : 3、ペプチド濃度 1 mM) 溶液に誘導体 1 (2 当量) を添加し、室温にて攪拌した。時間経過に伴い、Cys<sup>2</sup>-Cys<sup>8</sup> 間でジスルフィド結合したペプチド 13 の生成が確認さ

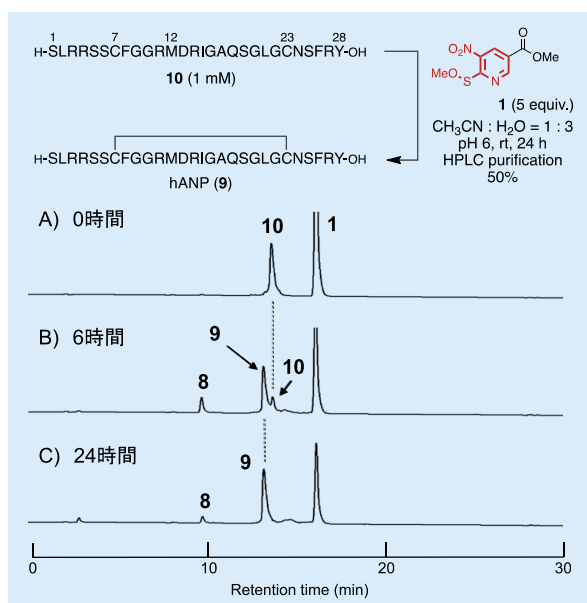


図 4. hANP (9) の合成<sup>7)</sup>

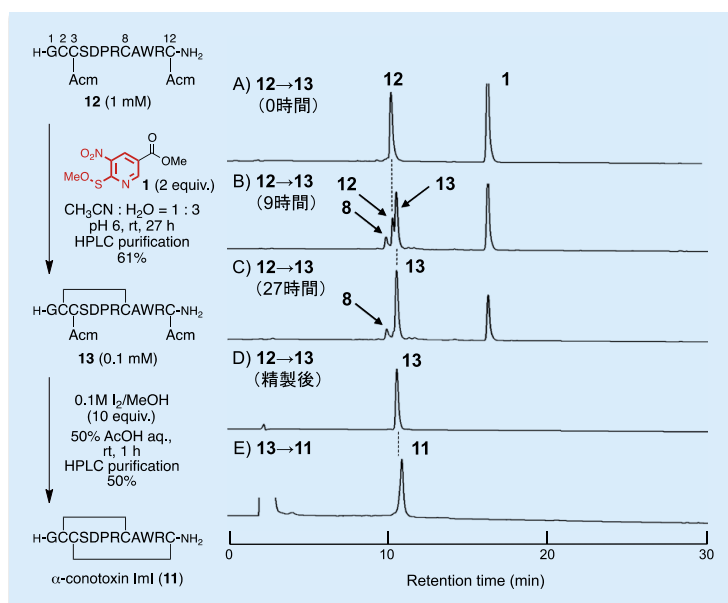


図 5.  $\alpha$ -コノトキシン ImI (11) の合成<sup>7)</sup>



れ、27時間後でペプチド **12** のピークは消失した。また、本反応中では、オリゴマーや保護 Cys 残基間の架橋体などの副生成物は生じなかった。HPLC 精製により、所望のジスルフィドペプチド **13** を単離収率 61% で得た。この結果から、誘導体 **1** は無保護 SH 基間の選択的なジスルフィド架橋形成に有効なことが、再び示された。次に、ペプチド **13** に対して I<sub>2</sub> 酸化を行い、アセトアミドメチル (Acm) 基で保護された Cys 残基間を架橋した **11** を単離収率 50% で得た。本方法にて得られたペプチド **11** と標品との HPLC の重ね打ちにより、ピークが一致したことから、構築した 2 組のジスルフィド結合は位置選択的であることが示された。この結果から、Npys-OMe 誘導体による酸化法と他の酸化法を組み合わせることで、ジスルフィド結合の新たな位置選択的合成法の提供が可能となった。

## おわりに

今回、Npys-OMe およびその誘導体が、温和なジスルフィド形成試薬として機能することを見出した。本試薬を用いると、比較的高濃度な還元型ペプチド溶液においても、環状ジスルフィドペプチドを効率的かつ簡便に得ることが可能である。従って、有機化学合成または創薬研究を行う研究者が用いる試験研究用試薬として、また製薬企業での医薬品等の製造における反応試薬として、本試薬は高い有用性が期待できる。また、Npys-OMe は安定な化合物で、取り扱いも容易であることから、ジスルフィド化合物を扱われる研究者の方に幅広くご利用いただければ幸いである。

### 【参考文献】

- 1) Matsueda, R. *et al.* : *Int. J. Pept. Protein Res.*, **16**, 392 (1980).
- 2) Bernatowicz, M. S. *et al.* : *Int. J. Pept. Protein Res.*, **28**, 107 (1986).
- 3) Fukumoto, K. *et al.* : *Tetrahedron Lett.*, **53**, 535 (2012).
- 4) Fukumoto, K. *et al.* : *Asian J. Org. Chem.*, **4**, 1030 (2015).
- 5) Taguchi, A. *et al.* : *Org. Biomol. Chem.*, **13**, 3186 (2015).
- 6) Matsueda, R. *et al.* : *Heterocycles*, **15**, 1089 (1981).
- 7) Taguchi, A. *et al.* : *Chem. Eur. J.*, **23**, 8262 (2017).
- 8) 林 良雄、田口 晃弘、福元 謙太郎：特願 2016-101812, PCT/JP2017/019086.
- 9) Kotani, A. *et al.* : *Electrochemistry*, **83**, 363 (2015).
- 10) Postma, T. M. *et al.* : *Org. Lett.*, **15**, 616 (2013).



### サイクリックボルタンメトリー

静止溶液中に電極を配置し、電極電位を繰り返し掃引しながら電流を測定する電気化学分析法である。本法は、電気化学的に活性な化学種の電極反応を把握するために最初に行う方法であり、酸化還元電位や電極反応の可逆性などの情報も得られるので、様々な研究領域において多用されている。

## ジスルフィド結合形成試薬

Wako

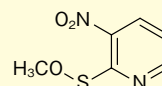
### Npys-OMe

本品は、東京薬科大学の林良雄教授の研究グループが開発したジスルフィド形成試薬です。

SH 基を複数有する化合物と反応し、ジスルフィド結合形成により選択的な分子内環化反応が進行します。有機合成、特に、ペプチド合成に効果的な試薬です。創薬研究にご検討下さい。

#### 特長

- SH 基を複数有する化合物と反応してジスルフィド結合を形成
- 選択的な分子内環化反応が可能
- 空気酸化と比較して高濃度かつ迅速に反応
- よう素酸化と比較して穏和な条件下で反応



C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S=186.19  
CAS RN® 68118-08-1

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
NEW 148-09791	Npys-OMe [2-(Methoxythio)-3-nitropyridine]	ペプチド合成用	100mg	22,000

☐…2~10℃保存 ☐…20℃保存 ☐…80℃保存 ☐…150℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。  
掲載内容は、2018年10月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

## プロテインシーケンサ PPSQ™-50 グラジエントシステムの開発

株式会社島津製作所分析計測事業部グローバルアプリケーション開発センター 栗木 智子  
 株式会社島津製作所分析計測事業部ライフサイエンス統括事業部バイオ臨床ビジネスユニット 秋永 伸幸、安藤 英治  
 富士フイルム和光純薬株式会社 試薬化成品事業部 楠本 美紀、山田 裕子、水井 浩司、早川 昌子

### 1 はじめに

ゲノムデータベースに登録されているタンパク質は、多くは前駆体タンパク質として登録されているため、成熟タンパク質のN末端配列を同定することは、タンパク質の機能を解明する上で重要となる。質量分析装置の技術的発展に伴い、質量分析装置を用いたタンパク質の末端解析方法<sup>1)</sup>や、データベースに依存せずに行う方法<sup>2)</sup>等が報告されている。

一方、プロテインシーケンサの特長としては、配列結果の信頼性が高く、確実なアミノ酸配列決定が可能、タンパク質の酵素消化等を行わずそのまま分析可能、同じ質量数を有するIleとLeuを区別できる、ジスルフィド結合(S-S結合)の有無とその位置を決定できる、操作が容易であることなどが挙げられ、タンパク質のN末端配列解析を行う上で欠かせないものになっている。

近年、バイオ医薬品の開発が進み、多くのバイオ医薬品が販売されている。タンパク質性医薬品、抗体医薬品はその特性解析にN末端部アミノ酸配列解析が必要とされており、研究・開発の分野だけでなく品質管理の分野においても、プロテインシーケンサは不可欠な装置となっている。また、タンパク質の前処理技



図1. プロテインシーケンサ PPSQ-50 グラジエントシステム

術の進歩により、微量の未知のタンパク質を精製することが可能になった。その結果、微量サンプルのアミノ酸配列を同定するためにプロテインシーケンサの高感度化が期待されている。著者らは、研究分野、生産分野における様々な需要に対応するため、従来のイソクラティックシステムの特長を活かし、グラジエント溶離により、疎水性の高いPTH-アミノ酸の検出の改善を行い、より高感度化を実現した「PPSQ-50 グラジエントシステム」を開発した(図1)。本稿では、PPSQ-50 グラジエントシステムの特長とその応用例について紹介する。

### 2 島津プロテインシーケンサの歴史

タンパク質の一次構造決定方法として、1950年にペール・エドマンが、タンパク質・ペプチドのN末端より、逐次的にペプチド結合を切断するエドマン分解<sup>3)</sup>を提唱した。その後、1967年にエドマンら

により、液相でエドマン分解を自動処理する装置が開発された<sup>4)</sup>。1980年代に気相式でエドマン分解を自動処理し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によりPTH-アミノ酸をイソクラティック溶離し分析する国産初の気相式プロテインシーケンサPSQ-1が開発された<sup>5)</sup>。

エドマン分解の原理を図2に、自動分析処理のフローを図3に示す。本システムでは、フェニルイソチオシアネート(PITC)、N末端部のアミノ基とカップリングするための塩基性雰囲気下を作り出すために用いるトリメチルアミン(TMA)、およびペプチド結合を切断するためのトリフルオロ酢酸を気相状態でリアクタに供給し、サンプルへのダメージ、副反応の軽減を可能にしている。エドマン分解で得られたアニリノチアゾリノン(ATZ)-アミノ酸の転換反応を行い、安定なフェニルチオヒダントイン(PTH)-アミノ酸を生成させ、HPLCで同定する。PTH-アミノ酸の同定は、移動相をリサイクルするイソクラティック溶離とし、各PTH-アミノ酸の安定した溶出時間、低ランニングコストを実現した。

島津製作所プロテインシーケンサは、初代モデルPSQ-1から始まり、コストダウンの実施、分析部の改良に取り組み、1996年に発売したPPSQ-20シリーズでは、エドマン分解を行うシーケンサ本体の

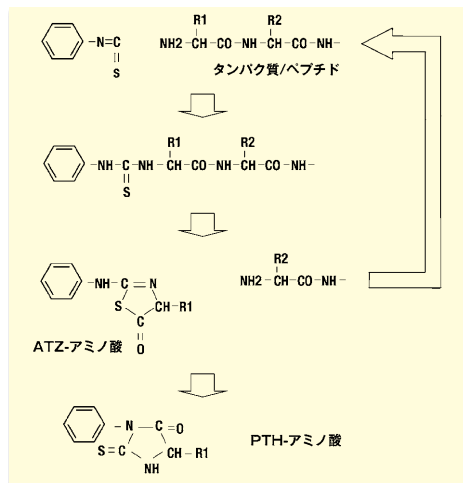


図2. エドマン分解のスキーム

ATZ; 2-アニリノ-5-チアゾリノン、PTH; 3-フェニル-2-チオヒダントイン

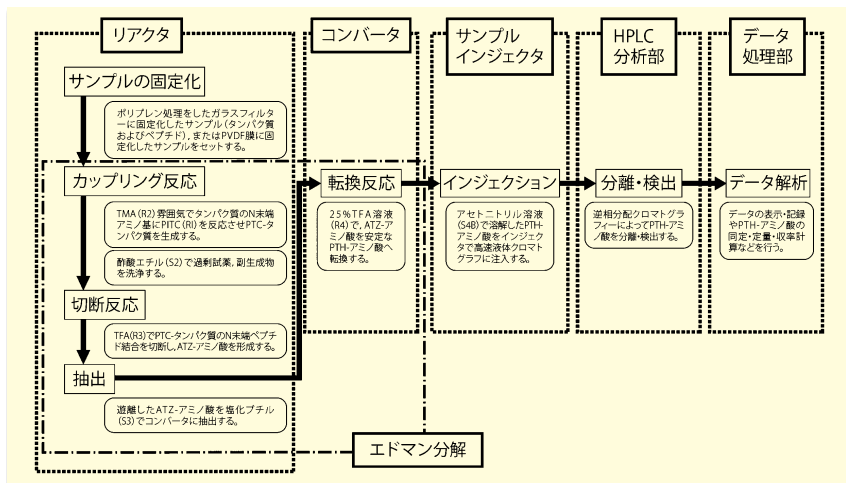


図3. アミノ酸配列分析のフローチャート

PITC; フェニルイソチオシアネート、TMA; トリメチルアミン、TFA; トリフルオロ酢酸、PTC; フェニルチオカルバミル、PVDF; ポリフッ化ビニリデン

設計を一新し、本体の小型化、複数のリアクタの搭載、ワークステーションでの制御を可能にした。さらに、分析部およびデータ処理ソフトウェアの開発を行い、PPSQ-30 シリーズ、PPSQ-50 シリーズへと進化してきた。

### 3 PTH-アミノ酸のグラジエント分離

PPSQ-50 では、エドマン分解終了後に分析カラムに注入するサンプル容量は 50 $\mu$ L である。この点を変更することなくグラジエント溶離を行うために、セミマイクロカラムを用いている。移動相には、A 液に、酢酸緩衝液/アセトニトリル、B 液に、酢酸緩衝液/メタノール/2-プロパノールを使用した。PTH-アミノ酸標準混合品 2 pmol のグラジエント溶離によるクロマトグラムを図 4 (a) に、イソクラティック溶離によるクロマトグラムを図 4 (b) に示す。PTH-アミノ酸が溶出される順番は若干異なるが、グラジエント溶離で得られる PTH-アミノ酸のピークの高さは、イソクラティック溶離よりも、全体的に 3~5 倍程度高く検出された。プロテインシーケンスは、当該サイクルとその前サイクルとの PTH-アミノ酸ピークの増減を比較し、特異的に検出されている PTH-アミノ酸の同定を行う。イソクラティック溶離は、移動相の組成が一定のため、遅い溶出時間の疎水性アミノ酸はピークの高さが低くなる。一方、グラジエント溶離では、分

析時間が経つにつれ、溶出力の高い移動相 B の濃度が高くなるため、疎水性の高い PTH-アミノ酸の分離が改善される (図 4 a)。グラジエント溶離では、500 fmol の PTH-アミノ酸の分離および検出も可能となり (図 5)、微量のサンプルをプロテインシーケンスで分析を行う場合でも、特異的に増加している PTH-アミノ酸を容易に検出することが可能となった。

### 4 バックグラウンドの軽減

クロマトグラム上に現れるバックグラウンドは、主にエドマン分解の副生成物であるジメチルフェニルチオウレア (DMPTU)、ジフェニルチオウレア (DPTU) とジフェニルウレア (DPU)、および、エドマン試薬に含まれている物質が挙げられる。これらは、カップリング試薬である PITC と塩基性雰囲気下をつくる TMA から生成される。サンプルが微量になると、この副生成物である DMPTU のピークが PTH-His のピークの検出を妨害し、同定することが困難になる。また、転換反応に用いる 25 %トリフルオロ酢酸の中に含有されている試薬の酸化防止剤、ジチオスレイトール (DTT) のピークは 4.1 分付近に検出され、PTH-Asp の検出を妨げる。

これらの問題点を解決するために、塩基性雰囲気下を作る試薬を TMA から N-メチルピペリジンに、さらに DTT を含まない 25 %トリフルオロ酢酸を採用した。その結果、微量分析における PTH-Asp および PTH-His の検出の問題、さらにクロマトグラム全体のベースラインの軽減を実現できた (図 6)。

### 5 微量サンプルのシーケンス分析

ウマミオグロビン (SIGMA cat#A8673) 5 pmol のアミノ酸配列結果を図 7 に示す。すべてのサイクルとも生クロマトグラムを表示している。生クロマトグラムでは、特異的に増加している PTH-アミノ酸だけでなく、エドマン分解で生成される副反応物も検出され、PTH-アミノ酸の同定が容易ではない場合がある。その場合には、差クロマトグラム表示にすることで、バックグラウンドとして前のサイクルに検出されている PTH-アミノ酸および副反応物を取り除くことができ、特異的に増加している PTH-アミノ酸を容易に確認することが可能となる。さらに、本グラジエントシステムでは、ソフトウェアにクロマトグラムを上下移動させる新しい機能を搭載した。同定したいクロマトグラムとその前のクロマトグ

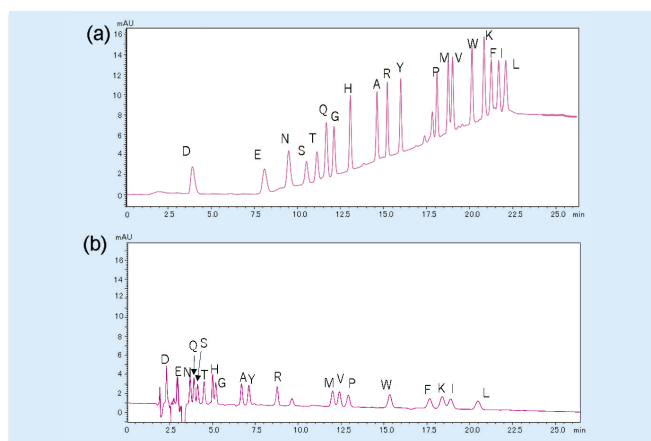


図 4. PTH-アミノ酸標準混合品の分析 (2 pmol)  
(a) グラジエントシステム、(b) イソクラティックシステム

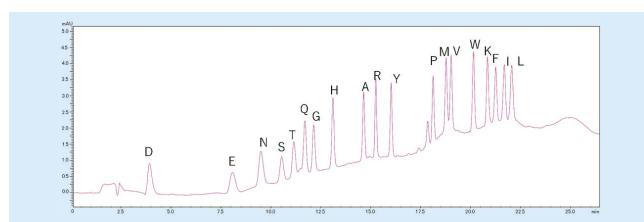


図 5. PTH-アミノ酸標準混合品の分析 (500 fmol)

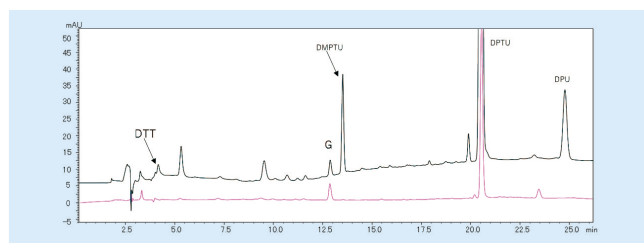


図 6. 改良試薬を用いた 1 サイクル目のクロマトグラム (ウマミオグロビン 10 pmol)  
黒色; 既存エドマン試薬、赤色; 改良エドマン試薬



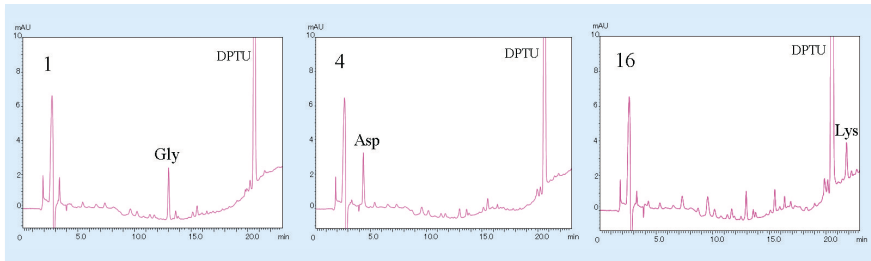


図7. ウマミオグロビン (5 pmol) のアミノ酸配列分析  
クロマトグラム左上の数字はサイクル数を示す。

ラムを重ね合わせて、特異的に増加しているピークを容易に探すことができる。

## 6 システイン含有サンプルについて

タンパク質の三次元構造の形成に関与する要因の一つに、分子内のシステインによるジスルフィド結合の分子内架橋がある。ジスルフィド結合は、タンパク質の立体構造を安定にするという働きがあると考えられており、タンパク質の一次構造解析において、システインの位置を同定することが重要とされている。ジスルフィド結合が形成されているタンパク質をそのままアミノ酸配列分析を行うと、N末端側の半シスチン残基は、エドマン分解によりATZ-半シスチンに変換された後も、C末端側の半シスチンとジスルフィド結合を有しているため溶出されず、特異的に増加するピークを検出することができない。そのため、アミノ酸配列分析では、分析前に前処理としてシスチンの還元アルキル化を行

うことが一般的である。本システムでは、従来のタンパク質シーケンサと同様に還元アルキル化としてピリジリエチル化を推奨している。ピリジリエチル化されたシステインは、他のPTH-アミノ酸、エドマン分解の副生成物の溶出位置と異なり、容易に同定することが可能である。

## 7 むすび

タンパク質シーケンサによるタンパク質のアミノ酸配列分析は、操作性が優れていることから広く普及してきた。最近のPPSQを利用した応用例では、<sup>32</sup>P 標識とタンパク質シーケンサを用い、リン酸化部位を決定した報告もある<sup>6)</sup>。近年では質量分析装置の技術的な進化とタンパク質の高感度アミノ酸配列解析が可能となりつつある。著者らは、2015年に検出部に高感度フローセルを搭載し、分析・制御部ソフトウェアを一新し、FDA21 CFR

Part 11にも対応できるPPSQ-50 イソクラテックシステムを発売した。今回、グラジエント溶離を用い、より高感度分析が可能なPPSQ-50 グラジエントシステムを開発した。

タンパク質シーケンサの高感度化を実現できたことにより、質量分析装置を利用したアミノ酸配列分析のさまざまな問題点を補うことが可能であると考えている。質量分析装置およびタンパク質シーケンサを補完的に利用することにより、タンパク質の一次構造解析のさらなる発展を期待している。

最後に、本共同開発は、試薬開発を富士フイルム和光純薬株式会社、装置開発を株式会社島津製作所の担当で実施された。

PPSQは株式会社島津製作所の商標です。本書に記載されている会社名、製品名/サービスマークおよびロゴは、株式会社島津製作所、その関連会社または各社の商標および登録商標です。

### 【参考文献】

- 1) Nakazawa, T. et al. : *Proteomics*, **8**, 673-685 (2008).
- 2) Yamaguchi, M. et al. : *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 3313-3319 (2008).
- 3) Edman, P. et al. : *Acta Chem. Scand.*, **4**, 283-293 (1950).
- 4) Edman, P. and Begg, G. : *Eur. J. Biochem.*, **1**, 80-91 (1967).
- 5) 上田 昭他 : 島津評論, **46** (4), 207-215 (1989).
- 6) Kazlauskaite, A. et al. : *Biochem. J.*, **460**, 127-139 (2014).

## 島津製作所製全自動タンパク質一次構造分析装置 PPSQシリーズ(グラジエントシステム)用製品

Wako

### 試薬

コード No.	品名	略称	規格	容量	希望納入価格(円)
163-28261	PTH-amino Acids Mobile Phase A (for Gradient Elution)	—	島津タンパク質一次構造分析装置用	1L	10,000
160-28271	PTH-amino Acids Mobile Phase B (for Gradient Elution)	—	島津タンパク質一次構造分析装置用	1L	10,000
168-14161	5% Phenyl Isothiocyanate, <i>n</i> -Heptane Solution	R1 試薬	島津タンパク質一次構造分析装置用	40mL	10,000
132-18821	30% <i>N</i> -Methylpiperidine Solution (for Gradient Elution)	R2GR 試薬	島津タンパク質一次構造分析装置用	200mL	24,000
204-10771	Trifluoroacetic Acid	R3 試薬	島津タンパク質一次構造分析装置用	40mL	15,700
202-20721	25% Trifluoroacetic Acid Solution (for Gradient Elution)	R4GR 試薬	島津タンパク質一次構造分析装置用	40mL	20,000
054-04981	Ethyl Acetate	S2 試薬	島津タンパク質一次構造分析装置用	200mL	6,450
021-09851	1-Chlorobutane	S3 試薬	島津タンパク質一次構造分析装置用	200mL	6,200
014-13831	37% Acetonitrile Solution	S4B 試薬	島津タンパク質一次構造分析装置用	200mL	4,500

### 専用カラム

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
236-63981	Wakopak <sup>®</sup> Wakosil PTH-GR (S-PSQ) (for Gradient Elution)	1本	95,000

Ref. 2 ~ 10°C 保存    Ref. 20 ~ 20°C 保存    Ref. 80 ~ 80°C 保存    Ref. 150 ~ 150°C 保存    表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。  
掲載内容は、2018年10月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。



## はじめに

「あなたは、あなたが食べたものでできている。」というCMがあったのをご存知だろうか。

私たちの体の20%はタンパク質でできている。タンパク質の構成成分であるアミノ酸を、私たちは食物から摂っている。特に、私たちの体内で合成することのできない必須アミノ酸は、食物から摂取する必要がある。アミノ酸は、タンパク質のもとになるだけでなく、神経伝達物質やその前駆体としての役割も担っており、私たちの生命活動を支えている。

私たちの体内のアミノ酸濃度変化は様々な病態と関連していることが報告されており、たとえば、血中アミノ酸分析は新生児マススクリーニングなどに利用されている。アミノ酸分析法のほとんどは、分離分析を利用している。タンパク質を構成するアミノ酸だけでも20種あり、それらを分離することが必須だからである。分離分析法として最も利用されているのが、液体クロマトグラフィー (LC) である。

LCを用いたアミノ酸分析法は、ノーベル化学賞受賞者のS. MooreとW.H. Steinによって、1958年に初めて開発された。本連載第1回において詳しく述べられているように、現在も、MooreとSteinによって開発された原理に基づくアミノ酸自動分析計が汎用されている。その原理は、イオン交換クロマトグラフィーによるアミノ酸分離とニンヒドリンを用いたポストカラム誘導体化・吸光度検出を組み合わせたものである。本分析法は精度に優れた分析法であるものの、分析時間が大変長い。また、試料によっては感度が十分でない場合もある。そのため、これまでに、非常に多くの分析法が開発されてきた。実際、1958年から2017年の60年間に原著論文として報告されている、LCを用いたアミノ

酸分析法だけでも1600報以上ある<sup>1)</sup>。しかし、何れの分析法にも何らかの欠点があり、未だに、どんなアミノ酸でも簡単に精度良く分析できる方法は開発されていない。それは、アミノ酸の分子構造が類似しているために分離が難しいこと、また、アミノ酸が吸収団や蛍光団を有しないことから検出が容易でないことに起因する。

近年の質量分析装置の発展に伴い、高い検出感度と選択性を有する分析法として、質量分析計 (MS) を検出系とする、LC/MS法が開発されるようになってきた。LC/MS法は、LCにおける溶出時間とMSにおける $m/z$ 値の組み合わせによる高い選択性を有する。そのため、LCによる分離が不十分な複数成分であっても、それぞれの質量ごとに分離して検出することにより分析が可能となる。LC/MS法は、アミノ酸を含む低分子化合物の定量からタンパク質などの高分子化合物の分析まで広く用いられている。過去5年のLCを用いたアミノ酸分析法の原著論文は230報あり、そのうちの半数(118報)がLC/MS法を用いている<sup>2)</sup>。

本稿では、アミノ酸分析の新しい潮流として、LC/MS法を用いたアミノ酸分析法について概説する。LC/MS法を用いたアミノ酸分析法は、非誘導体化分析法と誘導体化分析法の2つの方法に大別される。以下、それぞれについて述べる。

## LC/MS法を用いた非誘導体化アミノ酸分析

非誘導体化とは、その名のとおり、誘導体化を行わずに分析する方法である。つまり、アミノ酸分析においては、アミノ酸そのものを分離、検出することになる。誘導体化を行う手間や時間が不要だけでなく、分析における再現性や生成物の安定性など、誘導体化に伴う問題を回避することができる。しかし、アミノ酸をそのままの状

態で感度良く検出できる方法がなかったため、MSが検出系として用いられるようになるまで、アミノ酸の非誘導体化分析が主要な方法として注目されることはなかった。

アミノ酸の非誘導体化分析において、最も困難を伴うのは分離である。LC/MS法による分析を行う場合、MSにおける高い選択性を利用することにより、アミノ酸の完全分離は必要ないように考えられる。しかし、同じ $m/z$ をもつアミノ酸 (代表的なものとしてロイシン (Leu) とイソロイシン (Ile) がある。他にも多くの組み合わせが存在する。) は、MSにて分離することは不可能であるため、LCにおける分離が必須である。

一般的な低分子化合物の分離には、オクタデシルシリル (ODS) カラムのような逆相カラムが広く用いられている。アミノ酸は、アミノ基とカルボキシル基を持つ化合物の総称であり、通常は水溶液中でイオンとして存在するため親水性が高い。そのため、疎水性分子を強く保持する逆相カラムでアミノ酸を保持させることは困難である。保持できなければ分離できないことは言うまでもない。

LC/MS法を用いたタンパク質構成20種アミノ酸の分析法が初めて報告されたのは、1999年のことである<sup>3)</sup>。この分析においては、揮発性イオンペア試薬であるトリデカフルオロヘプタン酸 (TDFHA) を含む移動相が用いられた。2005年には、同様の移動相を用いたLC/MS分析によって、血漿中の76種アミノ酸が同定された。また、安定同位体標識内標準物質を用いることにより、16種アミノ酸の定量に成功した<sup>4)</sup>。

しかし、イオンペア試薬は、MSにおけるイオンサプレッションやMS装置の汚染の原因となることが報告されている。イオンペア試薬を用いた逆相カラムにおけるアミノ酸分離は、LC/MS法におけるベストな分離法である



とは言い難い。

近年、LCにおける新たな分離モードとして、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) が注目されている。HILICにおいては、イオンペア試薬を用いることなく、親水性化合物を保持、分離することができる。さらに、用いられる移動相がアセトニトリルを多く含むことから、逆相カラム使用時(基本的な移動相に水を多く含む)と比較して、分析対象物のMSにおけるイオン化を容易にし、その結果、より感度良く検出することが可能になる。そのため、非誘導体化アミノ酸の分離において、HILICが主に用いられるようになってきた。

HILICの固定相には、多くの種類がある。代表的な官能基として、シラノール基、アミド基、スルホバタイン基がある。分離対象物に適した固定相を選択することが、HILICにおいて良い分離をするために最も重要である<sup>5)</sup>。これまでの研究から、アミノ酸の分離にはアミドカラムが適していることが明らかになっている。

アミドカラムを用いたアミノ酸の分析例を一例紹介する<sup>6)</sup>。カラムには、Acquity BEH Amide column が用いられた。ギ酸とギ酸アンモニウムを含む水溶液とアセトニトリルの2つの移動相を用いたグラジエント溶離を行ったときに、最もよい分離が達成された。図1のクロマトグラムに示すように、23種アミノ酸の12分での分離に成功した。開発した分析法を用いて、ナツメに含まれているアミノ酸の定量が行われている。

非誘導体化分析は、アミノ酸を誘導体化せずに分析できる利点があることは前述のとおりである。しかし、生体試料や食品などの複雑なマトリックスを分析するときには、何らかの前処理が必須であることを最後に申し添える。

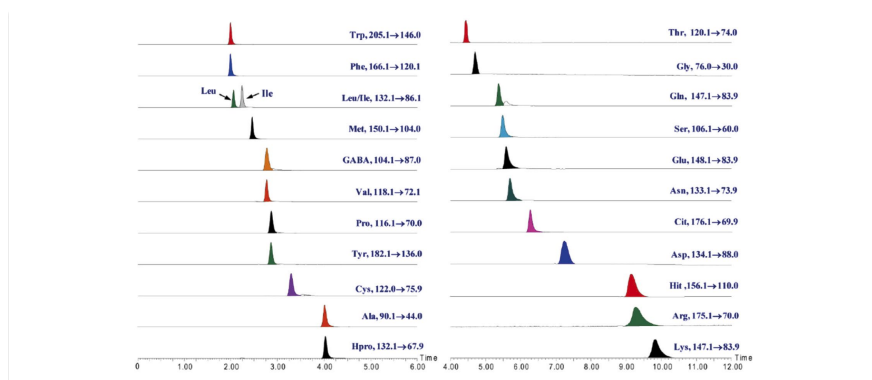


図1. アミドカラムを用いた非誘導体化アミノ酸の分離 (参考文献6)

## LC/MS法を用いた誘導体化アミノ酸分析

本連載第1回にて述べられているように、誘導体化には、プレカラム誘導体化とポストカラム誘導体化の2つの方法がある。LC/MS法を用いたアミノ酸分析においては、プレカラム誘導体化が主たる誘導体化法であることから、以下、プレカラム誘導体化を用いた方法についてのみ述べる。

LC/MS法におけるプレカラム誘導体化には、LC分離とMS検出の両面において利点がある。LC分離においては、アミノ酸を誘導体化することにより、多くの場合、疎水性が高くなる。そのため、汎用されているODSカラムでの分離が容易となる。アミノ酸そのものの分離が難しいことは、前述のとおりである。MS検出においては、誘導体化したアミノ酸を測定することになるため、アミノ酸そのものより大きな $m/z$ 値を検出することになる。実試料中には、アミノ酸と同程度の分子量の化合物が多く存在する。アミノ酸を誘導体化することにより、それらの化合物による影響を抑えることができる。また、疎水性が高い化合物はイオン化効率が高いことが知られている。結果として、高感度検出が可能となる。

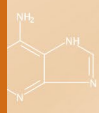
誘導体化において重要なことは、より良い分離をし、より高感度に検出を

可能にする誘導体化試薬を選ぶことである。MSに用いられる誘導体化試薬の中には、吸光度あるいは蛍光検出用に開発された既存の誘導体化試薬を転用した例が報告されている。6-アミノキノリル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメート (AQC)、ダンシルクロリド (DNS-Cl)、9-フルオレニルメチルクロロフォルメート (FMOC-Cl)、4-フルオロ-7-ニトロ-2,1,3-ベンズオキサジアゾール (NBD-F) やオルトフタルアルデヒド (OPA) などの誘導体化試薬である。これらの試薬による誘導体化アミノ酸の分離条件はこれまでに最適化されており、分離の面においては優れている。しかし、必ずしも、MSに適した誘導体化試薬ではない。一方、MSにおける感度向上を目的とした誘導体化試薬として、*N,N*-ジメチル-2,4-ジニトロ-5-フルオロベンジルアミン (DMDNFB) や*N*-アルキルニコチン酸*N*-ヒドロキシスクシンイミドエステル (C<sub>n</sub>-NA-NHS) などが開発された。これらは、それぞれ第3級アミンや第4級アンモニウム部位を有するため、アミノ酸誘導体のMSにおけるイオン化効率が高くなり、高感度検出を可能にしている。

2009年に*p*-トリメチルアンモニウムアニリル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメート (TAHS) と3-アミノピリジル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメート (APDS) の2つの誘導体化試薬が開発された。両試







## 第4回 オリゴヌクレオチド合成におけるキャッピング及び酸化・硫化反応

前回までに、オリゴヌクレオチド合成における官能基の保護及び脱保護、カップリング反応について記してきた。今回は、キャッピング及び酸化・硫化反応について解説し、全体を総覧したい。

### キャッピング

何度も述べている通り、核酸合成においては一段階ごとの収率をできる限り100%に近づけなければならない。もしカップリング反応が完全に進行せず、未反応のヒドロキシ基が残ったまま次のステップに進むと、目的とするオリゴヌクレオチドから、一塩基だけ抜けた形のものでできてしまう。これらを精製操作によって分離するのは、現代の技術をもってしても至難の業である。

これを防ぐため、カップリング反応終了後、「キャッピング」という操作を行う。大過剰の無水酢酸で処理することで、未反応のヒドロキシ基をアセチル化し、「キャップ」することを指す。こうしてそれ以上の核酸鎖延長を防いでおけば、最終段階での精製が容易になる。

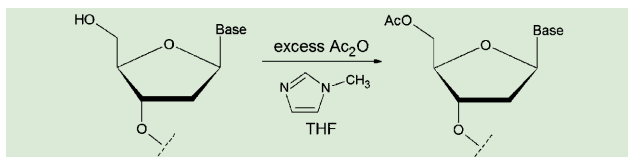


図1. キャッピングの工程

キャッピングは、ヌクレオチド鎖の結合した担体に、無水酢酸と1-メチルイミダゾール（またはジメチルアミノピリジン）のテトラヒドロフラン溶液を加え（ここにピリジンを加えることもある）、数分処理することで行われる。これらの試薬があらかじめ溶解されたキャッピング用溶液が市販されているので、これを用いるのが簡便である。

### 酸化反応

前回述べたホスホロアミダイト法によるカップリングでは、垂リン酸エステル結合が生成される。これは安定性がやや低く、さらなる延長反応の際に副反応を起こす危険がある。これを防ぐため、キャッピングが済んだらすぐに酸化反応を行い、安定なリン酸エステルに変換する必要がある。

酸化剤としては、安価かつ簡便なヨウ素 ( $I_2$ ) が最もよく用いられる。ヨウ素の水/テトラヒドロフラン溶液 (0.02 ~ 0.1M)

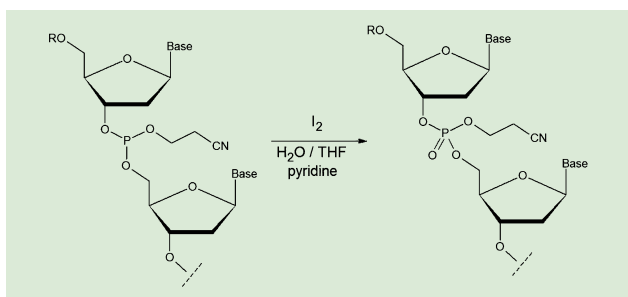


図2. 酸化工程

に、ピリジンやルチジンなどの弱塩基を加えたもので、数分間処理する。これもまた、あらかじめ各種濃度に調製された溶液が市販されており、適切なものを選んで使用することができる。

特殊な塩基を組み込んでいる場合など、含水溶媒や塩基性溶液による処理ができない場合には、次亜塩素酸 *tert*-ブチル (*t*BuOCl) を用いて酸化を行う例がある<sup>1)</sup>。また、(10-カンファースルホニル)オキサジリジンを用いるケースもある<sup>2)</sup>。

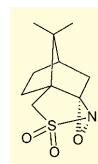


図3. (10-カンファースルホニル)オキサジリジン

### 硫化反応

近年、オリゴヌクレオチドを医薬として応用する、核酸医薬が急速に注目を集めている。ただし核酸医薬の問題点に、体内のヌクレアーゼによってリン酸エステル結合が切断されてしまい、患部に到達する前に医薬分子が分解されてしまうことが挙げられている。

そこで、酵素の標的となるリン酸エステル結合を、チオリン酸エステル結合（ホスホロチオエート）に変換することが広く行われている。ホスホロチオエート結合を持つオリゴヌクレオチド鎖は、ヌクレアーゼに対する耐性を持ちつつ、ワトソン＝クリック塩基対の形成は可能であり、アンチセンス鎖とのハイブリダイゼーションなどは問題なく行える特徴を持つ。また、簡便で低コストに合成できるため、ホミビルセン、オプリメルセン、アリカホルセンなど多くのアンチセンス型核酸医薬が、このホスホロチオエート結合を採用している。

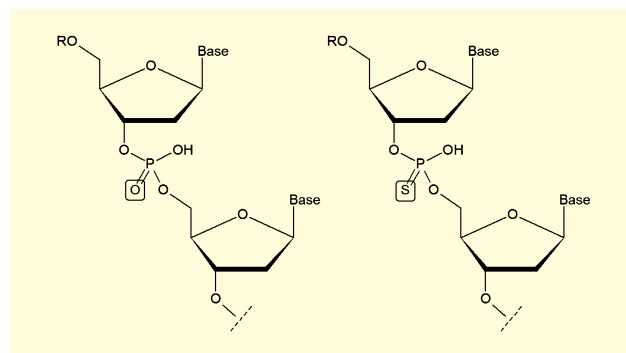


図4. 通常のリン酸ジエステル結合（左）と、ホスホロチオエート（右）

ホスホロチオエートの合成は、先に述べた垂リン酸エステルの酸化の代わりに、硫化反応を行うことで達成される。この目的に、当初用いられたのは分子状ヨウ素  $S_8$  であった。その後、フェニルアセチルジスルフィド、Beaucage 試薬他、いくつかの硫化剤が試されている。

現在ではこの目的に、安定性及び反応性に優れた、((ジメチルアミノ)メチリデン)アミノ)-3*H*-1,2,4-ジチアゾリン-3-チオン (DDTT) が最もよく用いられている。オリゴヌクレオチド鎖



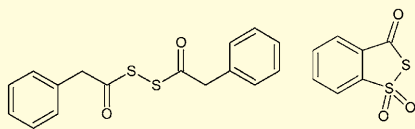


図5. フェニルアセチルジスルフィド(左)と Beaucage 試薬(右)

の結合した担体を、DDTT の 0.03 ~ 0.1M 溶液で 30 秒 ~ 5 分程度処理するだけで、硫化が進行する。

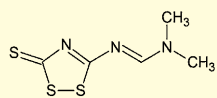


図6. 硫化剤 DDTT

ただしホスホロチオエート結合は、通常のリン酸ジエステル結合と異なり、リン原子上にキラリティが発生する。当然、DDTT などによる硫化反応では、立体選択性はない。たとえばアンチセンス型核酸医薬のミボメルセンは 20 量体のオリゴヌクレオチドであり、19ヶ所のホスホロチオエート結合を持つ。このため、 $2^{19} = 524,288$  種類の異性体が存在するが、ミボメルセンはこれらの混合物のまま製造・販売されている。

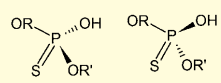


図7. ホスホロチオエートのキラリティ

しかし、立体的に純粋なミボメルセンを合成してみたところ、立体化学の差が薬理作用に大きな影響を及ぼすことが判明している<sup>3)</sup>。低分子医薬同様、立体選択的な合成が望ましいのは明らかである。

ごく最近、立体選択的なホスホロチオエートの合成法が Science 誌に掲載された<sup>4)</sup>。従来のホスホロアミダイト法と、DDTT などによる硫化のステップを踏むのではなく、下図のようなりボネン由来の試薬を、順次保護されたヌクレオチドと反応させることで、直接にキラルなホスホロチオエート結合を得ている。リボネンは両鏡像異性体が安価に手に入るため、比較的 low cost で両ジアステレオマーを合成可能である。

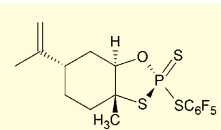


図8. キラルホスホロチオエート合成試薬

簡便な操作によって、高立体選択的なホスホロチオエート結合生成が行える点で、この反応は優れている。ただしカップリングの収率は 61 ~ 97% にとどまっており、長いオリゴヌクレオチド鎖をこの方法のみで合成するのは、現状では困難を伴うとみられる。

### 合成のステップ

以上、ここまで主に紹介してきた、ホスホロアミダイト法によるオリゴヌクレオチドの固相合成をまとめると、次のようになる。各段階の反応の後、徹底的に洗浄を行い、余分な試薬や副生成物を除去することが肝要である。

1. 担体に、最初の保護されたヌクレオチドを導入する (購入も可)
2. 5' 位の脱保護 (トリクロロ酢酸)
3. カップリング (ホスホロアミダイト)
4. キャッピング (無水酢酸)
5. 亜リン酸エステルの酸化 (ヨウ素)
6. 2 ~ 5 の工程を繰り返し、必要なだけ鎖を延長
7. 脱保護及び担体からの切り出し (濃アンモニア水)

ホスホロチオエート合成の場合も、ほぼこれと同じ手順を踏む。ただし、通常の核酸合成の場合はキャッピングのあとで酸化を行うが、ホスホロチオエート合成の場合はカップリングの直後に DDTT などでの硫化を行い、その後でキャッピングを行う。

すでにこうした核酸類をコンピュータ制御のもと、自動で合成する機械が市販されており、数十量体の DNA を短時間で作り出せるようになっている。RNA やホスホロチオエートなどにも対応可能なものが出てきているが、特殊な核酸を含むものなどは手動での合成が必要なケースも多い。

### 【参考文献】

- 1) Alul, R. H. *et al.* : *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1527 (1991).
- 2) Manoharan, M. *et al.* : *Org. Lett.*, **2**, 243 (2000).
- 3) Iwamoto, N. *et al.* : *Nat. Biotechnol.*, **35**, 845 (2017).
- 4) Knouse, K. W. *et al.* : *Science*, DOI : 10.1126/science.aau.3369

## オリゴヌクレオチド合成用試薬

当社では、キャッピング試薬、酸化試薬、硫化試薬を含む、オリゴヌクレオチドの合成に用いる試薬をラインアップしています。

詳しくは、当社 HP をご覧下さい。

Wako

オリゴヌクレオチド合成 富士フイルム和光純薬

検索

## 第3回 細胞老化とエクソソーム

公益財団法人がん研究会 がん研究所 細胞老化プロジェクト 岡田 遼  
 国立研究開発法人科学技術振興機構 さきがけ 高橋 暁子

### はじめに

日本人の平均寿命は年々延長し続けており、現在では我が国は世界有数の長寿国として知られている。その一方で、がん・動脈硬化・アルツハイマー・肺線維症・骨粗鬆症のように加齢と共に罹患率が上昇する疾患（加齢性疾患）の増加が深刻な社会問題となっている。加齢性疾患の発症には様々な複合的な要因があげられるが、その原因の一つとして加齢とともに体内に蓄積した老化細胞が関与している可能性が最近指摘されている。老化細胞とは生体内で「細胞老化」をおこして不可逆的に細胞増殖を停止した細胞であり、様々な炎症性蛋白質を分泌することが知られているが、我々は老化細胞が炎症性蛋白質だけではなくエクソソームの分泌も亢進していることを見出し、加齢性疾患とエクソソームの解析を続けている。本稿では、老化細胞が分泌するエクソソームに関する我々の研究を中心に最新の知見について概説したい。

### 細胞老化とは

一部の組織幹細胞を除いて、我々の体を構成している細胞の多くは細胞分裂の回数に限界があり、正常な体細胞が分裂寿命を迎えて不可逆的に増殖を停止した状態は細胞老化とよばれている<sup>1)</sup>。また、若い正常な細胞に発がんの危険性のあるストレス（テロメアの短小化、がん遺伝子の活性化、酸化的ストレスなど）が加わった場合にも、やはり細胞老化が誘導され細胞の増殖は不可逆的に停止することから、細胞老化はアポトーシスとならんで異常が生じた細胞が増殖するのを防ぐ重要ながん抑制機構として働いていると考えられている<sup>2)</sup>。しかし、老化した細胞は細胞死とは異なり生体内で長期間生存し続けることから、加齢とともに

に体内に老化細胞が蓄積してゆくことも明らかとなっている<sup>3)</sup>。一方で、老化細胞は持続的なDNA損傷応答によってクロマチン構造が変化しており、炎症性サイトカイン・ケモカイン・マトリックス分解酵素や増殖因子のような様々な炎症性蛋白質の遺伝子発現が活性化している<sup>4)</sup>。そして、老化細胞はそれらの炎症性蛋白質を細胞外へと分泌することが知られており、このような細胞老化の表現型はSASP (Senescence-associated secretory phenotype) と呼ばれている。老化細胞から分泌されたSASP因子は周囲の組織に慢性的な炎症を引き起こすことから、あらゆる加齢性疾患の要因となっている可能性が示唆されている<sup>5)</sup>。我々は老化細胞が分泌するSASP因子の解析を行う過程で、老化細胞では細胞外分泌膜小胞の一種であるエクソソームの分泌も亢進していることを見出した<sup>6)</sup>。

### エクソソームとは

エクソソームは、後期エンドソームである多胞性エンドソーム (Multivesicular body) を経由して細胞から分泌される直径50-150nm程の細胞外膜小胞であり、蛋白質、脂質、核酸のような様々な細胞内構成分子がエクソソームに含まれて他の細胞に伝達することから、細胞間コミュニケーションに働いていることが近年報告され大変に注目を集めている<sup>7)</sup>。

### 細胞老化とエクソソーム

ヒトの正常線維芽細胞を用いて複製寿命による細胞老化 (Replicative senescence) と活性化型がん遺伝子 (RasV12) による細胞老化 (Oncogene-induced senescence) を誘導し、細胞が分泌するエクソソームの量をNTA法 (Nanoparticle Tracking Analysis) で計測したところ、老化細胞ではエク

ソソームの分泌量が若い細胞の約30倍亢進していることが明らかとなった<sup>6)</sup>。そこで、我々は老化細胞で分泌が亢進しているエクソソームの生物学的機能に着目し解析を行った。老化細胞でエクソソームの生合成と分泌に重要なAlixとRab27aをそれぞれノックダウンしエクソソーム経路を阻害したところ、アポトーシス様の細胞死が誘導された。驚くべきことに、老化細胞だけではなく若い増殖中の正常細胞においても、エクソソーム経路の阻害はDNA損傷応答の活性化と細胞死を誘導したことから、正常な細胞はエクソソーム経路によって何か有害な物質を細胞外へと分泌している可能性が示唆された。そこで、エクソソームに含まれて分泌され正常細胞にDNA損傷を誘発する分子を探索したところ、それが細胞質のゲノムDNA断片であることを見出した。細胞質に存在するDNA断片は細胞質DNAセンサー (cGAS-STING経路) によって感知され、自然免疫応答を引き起こすことが知られている。つまり、正常な細胞はエクソソームによって細胞質の有害なゲノムDNA断片を細胞外へと分泌し、自己DNAに対する自然免疫応答を防いでいると考えられる。さらに、エクソソームはアデノウイルスなどの外来性のDNAに対してもウイルス感染のバリアとして働いていることから、エクソソーム経路は細胞の恒常性を維持するための重要な生体防御機構の一つであることが示された<sup>6)</sup>。

また正常な細胞では、細胞質に存在するDNA断片はDNase2aやTREX1のようなDNA分解酵素によって速やかに除去されることが知られているが、我々は老化細胞ではDNA分解酵素の発現レベルが低下することを見出した<sup>8)</sup>。そのため、老化細胞では細胞質に蓄積したゲノムDNA断片がDNAセンサー経路の活性化を介して自然免疫応答を引き起こし、SASPを誘導することで肥満誘導性の肝がんの発症に



関与していることを報告した(図1)。

### SASP としてのエクソソーム

がん微小環境中の老化細胞は SASP 因子を介してがん細胞の増殖や転移・浸潤を助長する CAFs (Cancer-associated fibroblasts) として機能することが知られている。我々は老化細胞が分泌するエクソソームの機能を調べるために、若い細胞と老化した細胞から回収したエクソソーム画分をそれぞれ乳がん細胞株 (MCF-7) に加えたところ、老化細胞が分泌したエクソソーム画分のみでがん細胞の増殖促進作用が観察された。次に、それぞれの細胞から回収したエクソソーム画分のプロテオーム解析を行った結果、老化細胞が分泌したエクソソームではチロシンキナーゼ型受容体の一つでありがん転移促進因子として知られる EphA2 (EphA2) の含有量が顕著に増加していることが明らかとなった。そして、老化細胞では EphA2 の脱リン酸化を制御する PTP1B が失活しているためにリン酸化された EphA2 が選択的にエクソソームへ取り込まれるというエクソソームの積荷の選択性を決定するメカニズムがあることを見出した。そのため、老化細胞が分泌したエクソソーム膜上の EphA2 が、がん細胞で高発現している受容体 (EphA2) と結合し、下流の Erk シグナルが活性化することで、がん細胞の増殖が促進することが示された。この研究の中で我々は、老化細胞由来の細胞外分泌膜小胞が、がん細胞の増殖促進を促す SASP 因子として働くことを明らかにした<sup>9)</sup>。

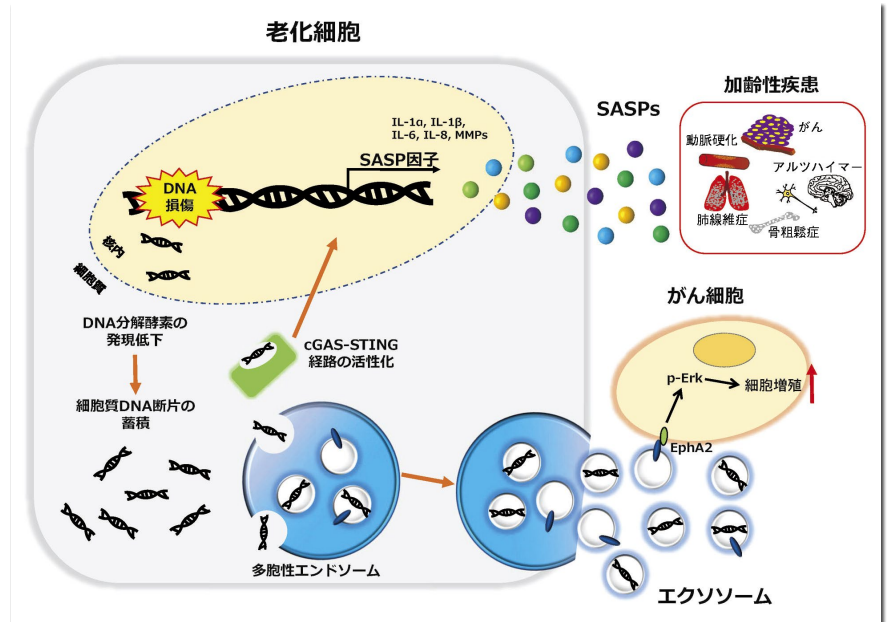


図1. 老化細胞とエクソソーム

### おわりに

エクソソームはこれまで、その細胞間コミュニケーションツールとしての機能や診断ツールとしての有用性が特に注目され研究が進んできたが、細胞が何故エクソソームを分泌するのか、その生物学的な意義についてはまだまだ未知の部分が多い。最近、視床下部幹細胞と前駆細胞を除去した早老症モデルマウスを用いた解析によって、視床下部幹細胞に由来するエクソソーム中の miRNA 量を調節することで加齢性疾患の発症速度と個体の寿命が変化することが報告されている<sup>10)</sup>。さらに治療効果のある特定の siRNA や mRNA をエクソソームに積み込み標的細胞へと送り込む技術が次々と開発されていることから<sup>11,12)</sup>、今後エクソ

ソームは単に疾患のバイオマーカーになるだけでなく、有用な DDS (Drug delivery system) として利用できる可能性が期待される。

### 【参考文献】

- 1) Hayflick, L. : *Exp. Cell Res.*, **37**, 614 (1965).
- 2) Takahashi, A. et al. : *Nat. Cell Biol.*, **8**, 1291 (2006).
- 3) Yamakoshi, K. et al. : *J. Cell Biol.*, **186**, 393 (2009).
- 4) Takahashi, A. et al. : *Mol. Cell*, **45**, 123 (2012).
- 5) He, S. et al. : *Cell*, **169**, 1000 (2017).
- 6) Takahashi, A. et al. : *Nat. Commun.*, **8**, 15287 (2017).
- 7) Tkach, M. and Théry, C. : *Cell*, **164**, 1226 (2016).
- 8) Takahashi, A. et al. : *Nat. Commun.*, **9**, 1249 (2018).
- 9) Takasugi, M. et al. : *Nat. Commun.*, **8**, 15729 (2017).
- 10) Zhang, Y. et al. : *Nature*, **548**, 52 (2017).
- 11) Kamekar, S. et al. : *Nature*, **546**, 498 (2017).
- 12) Kojima, R. et al. : *Nat. Commun.*, **9**, 1305 (2018).

当社では、エクソソーム研究関連試薬を多数取り扱っています。詳しくは、当社 HP をご覧下さい。

<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/Exosome/index.htm>

エクソソーム 富士フイルム和光純薬

検索

## 細胞外小胞の蛍光標識とその問題点

富士フイルム和光純薬株式会社 ライフサイエンス研究所 請川 亮

### はじめに

Exosome を始めとする細胞外小胞はさまざまな細胞から放出される膜小胞であり、細胞間情報伝達のメッセンジャーとしての役割や疾患バイオマーカーとして近年高い関心を集めている<sup>1)</sup>。それ故に、ここ数年でさまざまな研究分野において exosome 研究が広がってきているが、実験技術は発展途上であり、改善すべき課題が数多く存在する。その中で、我々は新規アフィニティー単離法である「PS アフィニティー法」を開発し、従来法に比べ、各種サンプルからインタクトかつ高純度な exosome 精製を可能にし、さらに、その技術を exosome 検出に応用した PS アフィニティー ELISA 法の開発にも成功している<sup>2,3)</sup>。

Exosome 研究において、単離・精製した exosome の生物活性を評価するため、細胞や動物への添加・投与実験が行われている。一般的な手法は、対象に exosome が取り込まれていることを確認するため、蛍光色素標識による可視化及びトレースが用いられる。しかしながら、先に述べたように exosome 実験技術は依然発展途上であり、蛍光色素標識においても非常に注意を要する問題点が存在している。本稿では、種々のメーカーから販売されている蛍光標識色素を用いた exosome 標識検討と注意すべき問題点について述べる。

### Exosome 蛍光標識実験における未標識色素除去時の吸着ロスについて

Exosome を含む細胞外小胞の蛍光標識試薬には、脂質や核酸、細胞膜を蛍光標識する試薬が転用されており、種々のメーカーから販売されている。その標識方法は、各種サンプルから単離・精製した exosome サンプルと蛍光色素を反応させ、未反応の蛍光色素をゲルろ過や限外ろ過デバイスを用いて除去するものである。今回、我々はこの蛍光標識の過程で、特に未反応の蛍光色素を除去するステップにおいて、exosome サンプルを著しく吸着ロスすることを明らかにし、

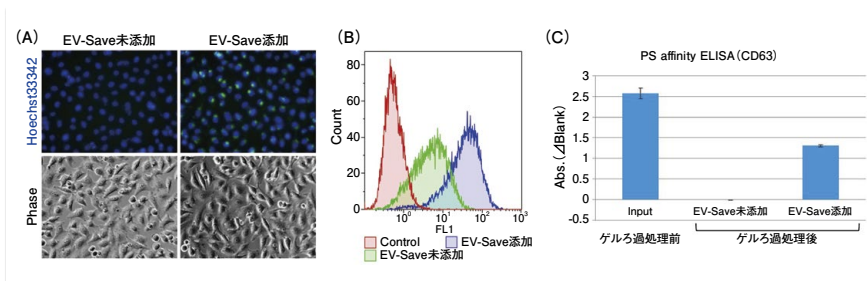


図1. 蛍光標識 exosome サンプルの取り込み確認と EV-Save による吸着ロス抑制効果  
MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS を用いて単離した COLO201 由来 exosome サンプル ( $1 \times 10^{10}$  particles) について、A 社蛍光標識試薬によるラベリングを行った後、HeLa 細胞への取り込みを蛍光顕微鏡 (A) とフローサイトメーター (B) で確認した。同様の exosome サンプル ( $5 \times 10^9$  particles) を用意し、ゲルろ過処理前後のロスについて、PS Capture™ Exosome ELISA Kit を用いて CD63 シグナルの比較を行った (C)。

同時に我々が開発した EV-Save™ Extracellular Vesicle Blocking Reagent (以下、EV-Save と略す) を exosome サンプルに添加することで、その吸着ロスを強力に抑制できることが確認できた (図1)。MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS を用いて COLO201 細胞培養上清から単離・精製した exosome サンプルについて、A 社蛍光標識試薬を用いて蛍光標識を行い、B 社ゲルろ過カラムを用いて未反応色素の除去を行った。得られた蛍光標識 exosome サンプルを HeLa 細胞へ添加し、24 時間経過時点での細胞への取り込みを蛍光顕微鏡及びフローサイトメーターを用いて検出した。その結果、蛍光色素標識時に予めサンプルに EV-Save を添加しておくことで、EV-Save 未添加時と比較して細胞内で検出される蛍光シグナルが大きく増強されることが確認された (図1, A, B)。さらに、PS Capture™ Exosome ELISA Kit を用いて、ゲルろ過前後の exosome サンプルの吸着ロス比較を行ったところ、

EV-Save 未添加サンプルではゲルろ過処理後に exosome 表面マーカーである CD63 のシグナルが検出されないのに対し、EV-Save 添加サンプルでは CD63 のシグナルが検出され、EV-Save はゲルろ過処理による吸着ロスを強力に抑制できることが確かめられた (図1, C)。

### 各蛍光標識試薬を用いた Exosome 染色手法とその特異性における問題点

次に各蛍光標識試薬を用いた exosome 蛍光標識及び細胞への取り込み性能の比較を行った。今回、A、B 及び C 社の蛍光標識試薬を用いた。COLO201 細胞培養上清から MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS により精製した exosome サンプルを各蛍光標識試薬を用いて蛍光標識し、HeLa 細胞への取り込み確認を行った (図2, A, B)。結果、蛍光顕微鏡観察において各蛍光標識試薬により標識された exosome が細胞内に取り込まれていることが確認され (図2, A)、さらに、フローサイトメーター

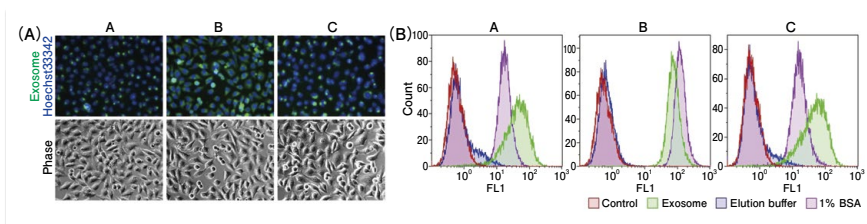


図2. 各蛍光標識試薬を用いた exosome 標識と HeLa 細胞への取り込み確認  
MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS を用いて単離した COLO201 由来 exosome サンプル ( $1 \times 10^{10}$  particles) について、各蛍光標識試薬による標識を行った後、HeLa 細胞への取り込みを蛍光顕微鏡 (A) とフローサイトメーター (B) で確認した。また、コントロールとして同様に蛍光標識処理を行ったキット添付の Elution buffer 及び 1% BSA 溶液も用意し、細胞へ添加した (B)。



による解析においても、コントロールの無添加及び Elution buffer を標識したネガティブコントロールと比較してピークが大きくシフトしていることから、蛍光標識された exosome がレシピエント細胞に取り込まれていることが確認できた (図 2, B)。しかしながら、ネガティブコントロールとして用いた 1% BSA 溶液を各試薬で標識し、他のサンプルと同様に細胞へ添加したところ、蛍光標識された exosome サンプルと同様に、フローサイトメーター解析においてピークシフトが観察された (図 2, B)。このことから、各蛍光色素標識試薬は、その原理上 exosome のみならずタンパク質に対しても標識作用があり、exosome 標識試薬として用いる目的においては特異性に大きな問題点が存在することを示唆している。この結果を鑑みると、市販の蛍光標識試薬を用いて標識・細胞への取り込み確認実験を行う場合は、レシピエント細胞内で検出される蛍光シグナルが exosome に由来するシグナルなのか、または exosome 単離時にコンタミネーションしたタンパク質などの不純物に由来するシグナルなのか、結果の解釈には細心の注意を払う必要があり、それ故に細胞への取り込み確認検証を行う際は、調製した exosome サンプルの純度が非常に重要になり得るといえる。

そこで、我々の PS アフィニティー法と超遠心分離法で同量の培養上清サンプルから単離・精製した exosome サンプルを A 社蛍光標識試薬を用いて標識し、細胞への取り込み確認実験を行った (図 3)。蛍光顕微鏡解析の結果、超遠心分離法で単離・精製した exosome サンプルの方が PS アフィニティー精製 exosome サンプルよりレシピエント細胞へ多く取り込まれていることが明らかとなった (図 3, A)。しかしながら、精製 exosome サンプルの詳細な解析を行ったところ、タンパク質濃度や粒子数解析からは超遠心分離サンプルの方がより exosome 量が多

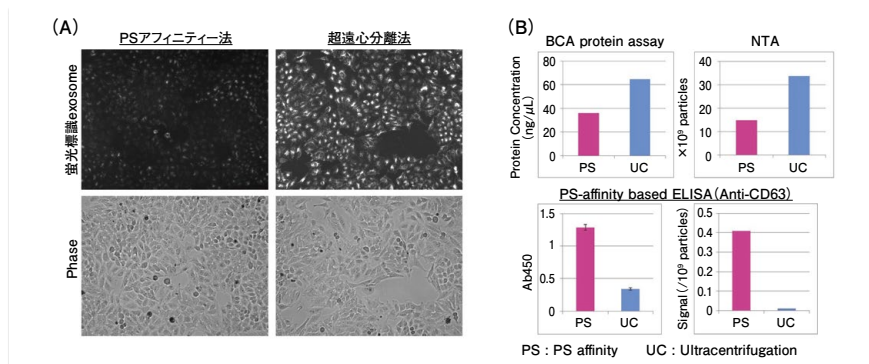


図 3. PS アフィニティー精製と超遠心精製 exosome の取り込み効率比較

MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS と超遠心法を用いて単離した COLO201 由来 exosome サンプル ( $8 \times 10^9$  particles) について、A 社蛍光標識試薬による標識を行った後、HeLa 細胞への取り込み効率を蛍光顕微鏡にて比較した (A)。各精製法で調製した exosome サンプルについて、BCA assay 及び NanoSight を用いた NTA にてタンパク濃度と粒子数を測定し、同時に PS アフィニティー ELISA 法にて CD63 のシグナル測定を行った (B)。

いことが示されているにもかかわらず、exosome マーカーである CD63 シグナルを PS Capture™ Exosome ELISA Kit を用いて測定すると、粒子当たりの CD63 シグナル強度は PS アフィニティー法で単離・精製したサンプルの方が圧倒的に高く、超遠心法で単離・精製した exosome サンプルより高純度であることが明確に示されている (図 3, B)。このことから、夾雑物が非常に多くコンタミネーションする単離・精製手法である超遠心分離法で調製された exosome サンプルを用いた場合、レシピエント細胞における取り込みシグナルの実体は exosome のみならず、夾雑タンパク質などに由来している可能性が強く示唆される。

### おわりに

以上、exosome の蛍光標識法及び細胞への取り込み確認を行う上で注意すべきポイントとして、exosome が有する吸着特性によって大きな収量低下に繋がる可能性があること、現状市販されている蛍光標識試薬は exosome の染色を目的としたものではなく、exosome への特異性が低いことを挙げた。そして、高純度な exosome サンプルを如何にして調製するか、その単離・精製手法の重要性を指

摘した。しかしながら、これまで (現在も) exosome を含む細胞外小胞の単離・精製法のゴールドスタンダードは超遠心精製法とされてきており、最も主たる方法として数多くの論文報告で採用されているが、実際は非細胞外小胞由来の夾雑タンパク質が多く混入する exosome サンプル調製手法であり、夾雑物が下流の実験結果に与える影響を十分に精査しているとは言い難い状況が続いている。なお、International Society for Extracellular Vesicles の機関誌「Journal of Extracellular Vesicles」においてもこの問題は提起されている<sup>4)</sup>。その中で、我々が開発した「PS アフィニティー法」をベースとした MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS は、現状改善の余地を残しているが、超遠心分離法や各単離・精製キットと比較して、簡便かつ高純度な exosome サンプルの取得を可能にしている。今後、当社製品が exosome を始めとする細胞外小胞研究の更なる発展に貢献できることを切に願う。

### 【参考文献】

- 1) Tkach, M. et al. : Cell, 164, 1226 (2016).
- 2) Nakai, W. et al. : Sci. Rep., 6, 33935 (2016).
- 3) Saito, S. et al. : Sci. Rep., 8, 3997 (2018).
- 4) Gardiner C. et al. : J. Extracell. Vesicles, 5, 32945 (2016).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
058-09261	EV-Save™ Extracellular Vesicle Blocking Reagent	遺伝子研究用	1mL	9,800

☐…2~10℃保存 ☐…20℃保存 ☐…80℃保存 ☐…150℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2018年10月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

## 第7回 筋萎縮性側索硬化症 (ALS)

名古屋大学 環境医学研究所 病態神経科学分野 渡邊 征爾、山中 宏二

### はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis ; ALS) は、大脳皮質運動野および脳幹の上位運動ニューロンと、脊髄の下位運動ニューロンが変性をきたし、全身の筋萎縮を主症状とする進行性の神経変性疾患である。本邦では、1974年に特定疾患に認定された指定難病であり、7~10人/10万人程度の有病率と推定され、発症率は約2人/10万人/年である<sup>1)</sup>。本稿では、ALSの主に神経細胞における分子病態と、それら病態に基づいた治療薬やバイオマーカーについて現状を概説する。

### ALSの臨床・病理像

ALSでは、上位運動ニューロンの障害に伴って病的反射や痙縮などの症状を呈し、また下位運動ニューロンの障害により進行性の筋力低下、筋萎縮を呈する。症状の進行に伴って、歩行障害、発音機能の低下、嚥下障害が現れ、末期には呼吸筋麻痺による呼吸不全をきたす。一般に、感覚障害、眼球運動障害、膀胱直腸障害、褥瘡は出現せず、ALSにおける四大陰性徴候と呼ばれる。また、ALSの約30%近くで性格変化、言語障害、認知機能障害を示す前頭側頭型認知症 (Frontotemporal Dementia ; FTD) を併発することが報告されている。

病理学的には、上位および下位運動ニューロンの選択的な変性と脱落を認める。特に、脊髄では髄鞘の崩壊やグリア細胞の異常活性化が顕著である。2006年、Araiら<sup>2)</sup> およびNeumannら<sup>3)</sup> により、ALSおよび一部のFTDの神経細胞に共通して蓄積が認められるユビキチン陽性封入体の主要な構成因子がTDP-43 (TAR DNA binding protein-43) タンパク質であることが報告された。この発見により、ALS

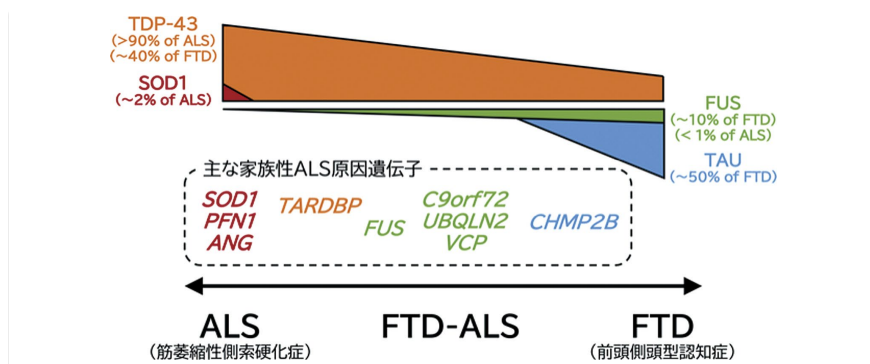


図1. ALS-FTD スペクトラム

ALSとFTD (前頭側頭型認知症) は、TDP-43の蓄積を特徴とする共通の病態をもった疾患スペクトラムを構成し、ALSでも高次脳機能障害を合併するFTD-ALSが多く見られる。本図では、ALS-FTD スペクトラムの各位置で、上段に顕著な異常蓄積を示すタンパク質を示し、下段には表現型に近い家族性ALSの原因遺伝子を示した。

と少なくとも一部のFTDはTDP-43の蓄積を特徴とする連続した疾患群と考えられ、TDP-43の異常化を伴う共通の疾患機序に基づくことが明らかとなった (ALS-FTD スペクトラム) (図1)。

### ALSの遺伝学と動物モデル

ALSの90%以上は孤発性、すなわち遺伝的背景を持たないが、一部に家族性にALSを発症する家系が存在し、現在までに20種類以上の原因遺伝子が同定されている。本邦で最も頻度が高いのは、SOD1遺伝子の異常で家族性ALSの約20%を占める。一方、欧米では、C9orf72遺伝子中のイントロンが過剰に伸長したFTDを合併するALSの割合が高く、家族性ALSの30~50%程度を占めて最も高頻度である。TDP-43をコードするTARDBP遺伝子も家族性ALSの原因遺伝子のひとつであり、このことからTDP-43の蓄積は神経細胞の病的変化に伴う二次的なものではなく、直接的にALSの分子病態に関わっているとみられる。

ALS患者由来の変異をもつSOD1遺伝子を過剰発現させた変異SOD1マウスは、運動ニューロンの変性に伴って進行性下肢の麻痺および筋萎縮を呈し、ALSの症状や病理をよく再現することから、ALSの動物モデル

ルとして広く使われてきた<sup>4)</sup>。しかし、変異SOD1マウスではTDP-43陽性の封入体が蓄積しないなど、孤発例との病態の乖離が指摘されている。そこで、近年はALSの大部分を占める孤発性ALSに近い動物モデルを作る試みが盛んである。ALS患者由来の変異TDP-43を発現するマウス<sup>5)</sup>やC9orf72遺伝子の異常伸長したイントロンを導入したマウス<sup>6)</sup>などが報告されているが、運動ニューロン選択的な細胞死が生じるモデル動物の樹立には至っておらず、重要な課題となっている。

### ALSの病態生理

これまでALSの分子病態として、興奮毒性、酸化ストレス、ミトコンドリア障害、小胞体ストレス、タンパク質分解系の破綻、RNA代謝異常など、様々な機序が報告されてきた (表1)。特に、酸化ストレスに関しては後述するエダラボン (商品名: ラジカット) がALSにおける機能障害の進行抑制について適応を追加承認され、興奮毒性については抗てんかん薬であるペランパネル (商品名: フィコンパ) の有効性が動物モデルで示された<sup>7)</sup>。TDP-43の凝集体はALSで広範に観察されるため、病態への関与は疑いがなく、その分子メカニズムについて

本シリーズの企画・構成に際し、東京大学大学院医学系研究科 岩坪威先生にご助言頂きました。



表1. ALSにおける神経細胞内の病態仮説  
現在までに提唱されている病態メカニズムと、それに関与する代表的なALS関連遺伝子を示した。

病態仮説	関与する、代表的なALS関連遺伝子
興奮毒性	運動神経細胞の過剰な活性化 Ca <sup>2+</sup> の過剰な細胞質放出 SOD1, ADARB1 TARDBP
タンパク質分解障害	異常タンパク質の蓄積 プロテアソーム障害 小胞体ストレス SOD1, TARDBP, FUS SQSTM1, TBK1 VAPB, VCP
ミトコンドリア障害	活性酸素種の増加 ATP合成能の低下 SOD1, TARDBP VAPB, SIGMAR1
RNA代謝異常	RNA凝集体の形成 スプライシング制御の破綻 TARDBP, FUS, C9orf72 HNRNPA1
細胞内輸送障害	軸索輸送障害 細胞骨格異常 SOD1, DCTN1 PFN1, TUBA4A

は議論がある。変異TDP-43によるALSが優性遺伝することやTDP-43過剰発現マウスが運動障害を示すことは、毒性獲得説 (gain-of-toxicity) を示唆している。一方、TDP-43欠損マウスは胎生致死で、成体でもTDP-43を除去すると神経細胞死が引き起こされること、およびALSではTDP-43が本来、局在する核から消失することから、機能喪失による神経変性機序 (loss-of-function) も考えられ、今後の研究による解明が待たれる。また最近、我々を含めた複数のグループがALSにおけるミトコンドリア・小胞体接触領域 (Mitochondria-Associated Membrane; MAM) の機能破綻を報告した<sup>8,9)</sup> (図2)。MAMは、ミトコンドリア外膜に非常に近接した小胞体膜上の領域を指し、ミトコンドリアへのCa<sup>2+</sup>供給や自然免疫、オートファジーの制御など、多彩な生理機能を担う微小ドメインであることが知られている。MAMの破綻は、ALSにおけるミトコンドリアと小胞体という、異なる2つのオルガネラの障害を統一的に説明することが可能であると期待される。

パーキンソン病における $\alpha$ -シヌクレインや、アルツハイマー病におけるタウと同様、TDP-43も $\beta$ -sheet構造を介して病的な凝集体がプリオン様に伝播する可能性が指摘されている<sup>10)</sup>。細胞質にできた異常なTDP-43凝集体は、正常なTDP-43の構造を変化させ、凝集体内部にTDP-43を引き込ん

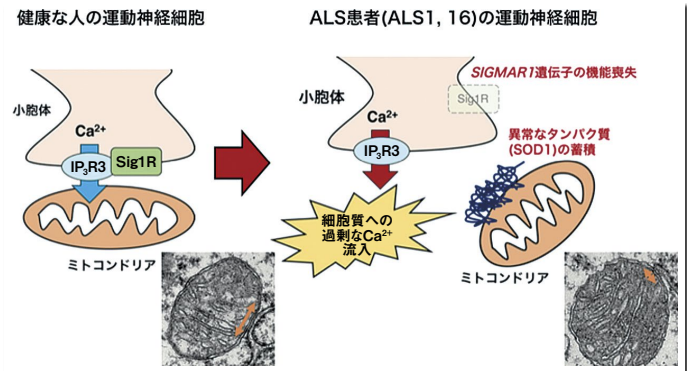


図2. ALSにおけるミトコンドリア-小胞体染色領域(MAM)の破綻  
家族性ALSの原因となる遺伝子異常をもつマウスでは、MAM (橙矢印) が野生型よりも減少していた。このことから、ALSにおいてMAMの破綻はCa<sup>2+</sup>の制御異常を介して神経細胞変性を促進すると考えられる。  
(Watanabe et al. (2016) EMBO Mol. Med. から一部改変)

でしなうと考えられ、実際、TDP-43陽性封入体を細胞質にもつALS患者の神経細胞では核に局在する正常なTDP-43が消失していることが知られている。最近、このような凝集体が「液-液相分離」(Liquid-Liquid Phase Separation) と呼ばれる現象によって引き起こされることが明らかになってきた<sup>11,12,13)</sup> (図3)。液-液相分離は、特にRNA結合タンパク質などで見られ、生理的には自己会合性によって細胞質に膜で隔てられない微小なオルガネラを構築してRNAの代謝を制御していると考えられている。通常、このような液-液相分離による凝集と分散は可逆的であるが、環境中のストレスなど、様々な要因によって凝集が不可逆化し、異常な凝集体形成の核となる

と推測される。実際にALSでは、TDP-43以外にも液-液相分離を生じる複数のRNA結合タンパク質の遺伝子 (HNRNPA1, FUS, TIA1 など) が家族性ALSの原因遺伝子として知られており、液-液相分離の異常はALSにおけるRNA代謝異常の基盤となる分子病態かもしれない。

### 非細胞自律性の神経細胞死

ALS患者および動物モデルの脊髄では顕著な反応性グリオシスの亢進が見られ、ミクログリアやアストロサイトの活性化が観察されてきた。これは従前、運動ニューロンの変性に伴う二次的なものと考えられてきたが、グリア細胞選択的に変異SOD1を除去

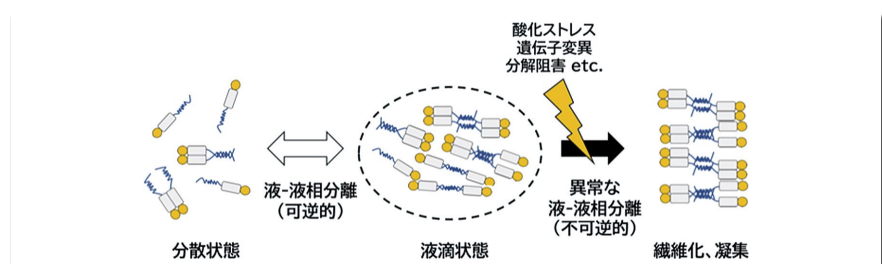
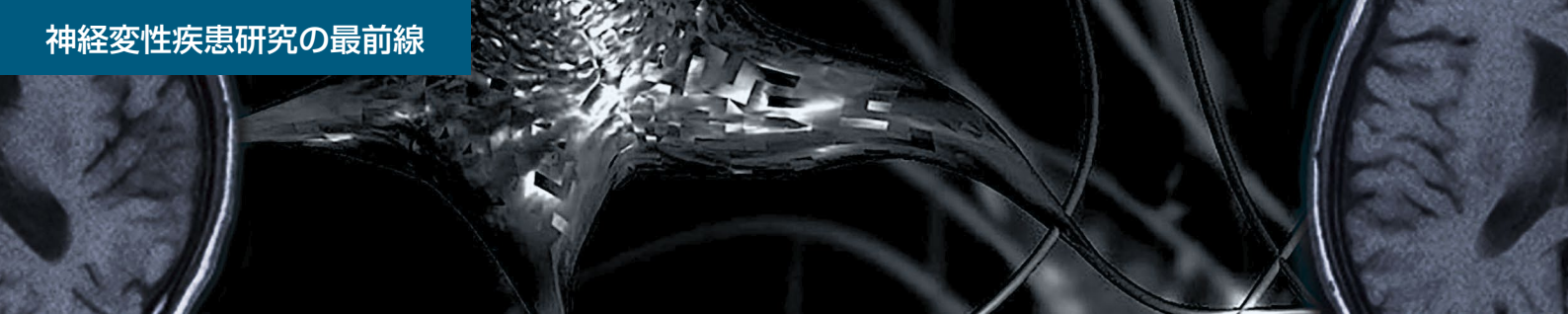


図3. 液-液相分離によるTDP-43凝集仮説  
TDP-43を含めたRNA結合タンパク質は構造的に不安定な領域 (青線部) をもち、この領域同士が相互作用して液滴状に集合する。このような相分離は、通常、可逆的で生理的なものであるが、外部のストレスなどがかかると異常化して凝集や封入体形成の原因となると考えられる。



すると変異 SOD1 マウスの生存期間が延長することから、グリア細胞が積極的に ALS の病態に関与して運動ニューロンの変性を制御していることが明らかとなった<sup>14,15)</sup>。このように非神経細胞であるグリア細胞の異常が神経細胞死を引き起こすことを「非細胞自律性の神経細胞死」(non-cell autonomous neuronal death)と呼ぶ。近年、グリア細胞の異常化に着目した病態の解析が進みつつあり、グリア細胞におけるサイトカイン TGF- $\beta$ <sup>16)</sup> や細胞内転写因子 NF $\kappa$ B<sup>17)</sup> などの分子が活性化と疾患の増悪化に関与していることが判明してきた。疾患の進行を規定すると考えられるグリア細胞は、ALS 発症後の疾患修飾療法の標的として重要であり、今後、得られつつある知見をもとにグリア細胞の活性化を制御していく方法の開発が求められる。

## ALS の疾患修飾療法

残念ながら、現在でも ALS を根本的に治療する方法は存在しない。しかし、病態理解に基づいて疾患の進行を抑制し、患者の生存期間の延長と生活の質 (QOL) の向上を目指した、疾患修飾療法のための新薬開発が進められている。ALS 治療薬としては、まず 1996 年にリルゾール (商品名: リルテック) が初めて承認され、現在でも第一選択薬として広く使用されている。さらに近年、本邦ではエダラポン

が新規に承認された。エダラポンは、ALS 患者において増加し、運動ニューロンの変性を加速する酸化ストレスを抑制して、疾患の進行を遅延させると考えられている。このほかにも、現在、メチルコバラミンの早期大量投与や肝細胞増殖因子の髄腔内投与など、本邦を含めて世界各地で様々な臨床試験が進められている<sup>18)</sup>。ALS の治療においては、発症後の進行が極めて速いこと、発症時には運動ニューロンの障害が既に相当程度進行していると考えられることから、可能な限り早期からの実施が望ましい。また、疾患の進行と予後には個人差も大きく、発症後の生存期間は概ね数年程度であるが、全体の 10% 程度の患者は発症後 1 年以内に死亡する一方、逆に 10 年以上にわたって生存する例も報告されている<sup>1)</sup>。現時点で、このような ALS の早期診断や各患者の予後を予測できる、信頼に足るバイオマーカーは確立されていない。今後の研究によって、有用なバイオマーカーが開発されることが強く期待される。

## おわりに

近年、ALS を含めて神経変性疾患の病態解明が進み、多くの知見が得られてきた。しかし、未だ ALS に対して進行抑制効果を示した治療薬はわずかであり、その効果も極めて限定的である。これは、上述した動物モデルや

バイオマーカーの不足、家族性と孤発性の間の病態の差異などが、大きな原因であると考えられる。今後、iPS 細胞やゲノム編集技術などを含む新しい技術に基づいた研究を通じて、これらの課題を克服し、より有効性の高い治療法を開発していくことが求められる。

## 【参考文献】

- 1) 辻 省次, 祖父江 元: 「すべてがわかる ALS・運動ニューロン疾患 (アクチュアル脳・神経疾患の臨床)」(中山書店) (2013).
- 2) Arai, T. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **351**, 602-611 (2006).
- 3) Neumann, M. et al.: *Science*, **314**, 130-133 (2006).
- 4) Gurney, M. E. et al.: *Science*, **264**, 1772-1775 (1994).
- 5) McGoldrick, P. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1832**, 1421-1436 (2013).
- 6) Chew, J. et al.: *Science*, **348**, 1151-1154 (2015).
- 7) Akamatsu, M. et al.: *Sci. Rep.*, **6**, 28649 (2016).
- 8) Stoica, R. et al.: *Nat. Commun.*, **5**, 3996 (2014).
- 9) Watanabe, S. et al.: *EMBO Mol. Med.*, **8**, 1421-1437 (2016).
- 10) Nonaka, T. et al.: *Cell Rep.*, **4**, 124-134 (2013).
- 11) Conicella, A. E. et al.: *Structure*, **24**, 1537-1549 (2016).
- 12) Murakami, T. et al.: *Neuron*, **88**, 678-690 (2015).
- 13) Patel, A. et al.: *Cell*, **162**, 1066-1077 (2015).
- 14) Yamanaka, K. et al.: *Nat. Neurosci.*, **11**, 251-253 (2008).
- 15) Boillee, S. et al.: *Science*, **312**, 1389-1392 (2006).
- 16) Endo, F. et al.: *Cell Rep.*, **11**, 592-604 (2015).
- 17) Ouali Alami, N. et al.: *EMBO J.*, e98697 (2018).
- 18) 岸川忠彦: 「今動いている臨床研究・試験と治験情報」, 日本 ALS 協会会報, **101**, 16-17 (2017).

## 「神経変性疾患研究の最前線」シリーズ：結びのことば

東京大学大学院医学系研究科 神経病理学 岩坪 威

和光純薬時報 2017 年第 2 号より 7 回にわたって連載された、神経変性疾患を対象とするレビューシリーズも、本号の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に関する論文をもって完結することになった。アルツハイマー病に関する総論には始まり、タウ、アミロイド  $\beta$ 、分子イメージング、パーキンソン病、 $\alpha$  シヌクレイン、ALS と、最新の知見をわかりやすく、息もつかせぬ迫力で解説いただくことができた。多忙な研究の寸暇にご執筆をいただいた、当代随一のエキスパート執筆陣に改めて心より感謝を申し上げるとともに、先生方の論文から、神経変性疾患のメカニズムに即した治療法確立が手の届くところまで来ていることを確信できる喜びを読者と分かちつつ、擲筆したい。

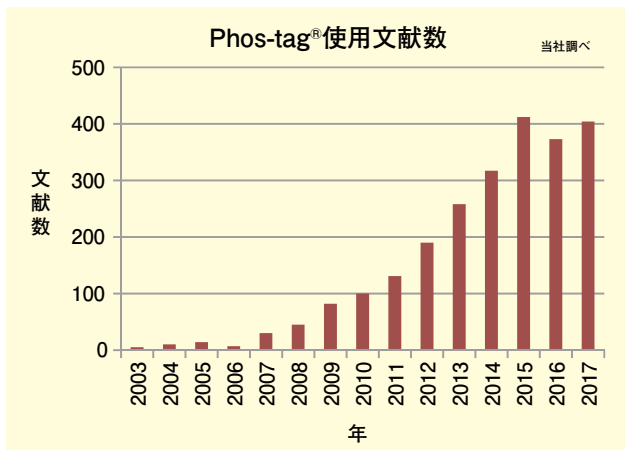


## りん酸化タンパク質研究手法 NARD Wako Phos-tag® SDS-PAGE

Phos-tag® SDS-PAGE は、Phos-tag® アクリルアミドもしくはスーパーセップ Phos-tag® を用いた SDS-PAGE です。りん酸化タンパク質のりん酸化レベルをバンドの移動度の差として検出できます。

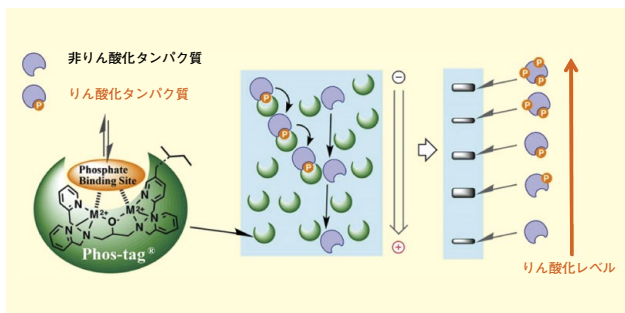
### 特長

- タンパク質のりん酸化レベルに応じて SDS-PAGE のバンドがシフト
- Phos-tag® 使用文献が多数



### Phos-tag® SDS-PAGEの原理

1. SDS-PAGE ゲル中の Phos-tag® がりん酸化タンパク質を捕捉します。
2. 泳動中のりん酸化タンパク質の移動速度が遅くなります。
3. りん酸化タンパク質のバンドがりん酸化レベルに応じてシフトアップした位置に現れます。



Phos-tag® は、広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 医薬品分子機能科学研究室にて開発されました。

Phos-tag® は、広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 医薬品分子機能科学研究室 小池透教授の登録商標です。

### Phos-tag® SDS-PAGE データ集のご案内

広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 医薬品分子機能科学研究室より、Phos-tag® SDS-PAGE を用いた実験結果が多数公開されています。是非ご覧下さい。

Phos-tag® SDS-PAGE データ集

<http://phostag.hiroshima-u.ac.jp/>

Phos-tag データ集

検索

〈公開されているデータのタンパク質名(2018年8月時点)〉

Abltide-GST	Erk1/2-2	Ovalbumin-3
Abltide-GST (inhibitor profiling)	Erk2	p38 MAPK
Abltide-GST (Phosphatase assay)	EvgS/EvgA-1	p42 MAPK
Abltide-GST (ATP-γS assay)	EvgS/EvgA-2	p53
A-Raf	EnvZ	Pepsin-1
ArcB/ArcA	FANCI	Pepsin-2
ATF2	FixL/FixJ	Pepsin-3
ATM-1	GSK3β-1	PhoR/PhoB
ATM-2	GSK3β-2	PI3K p110β
53BP1	Histone H1	PKC zeta
BarA/UvrY	Histone H2A	Raptor
α-Casein-1	Histone H3-1	Rictor
α-Casein-2	Histone H3-2	SAPK/JNK
α-Casein-3	Histone H3-3	SHC-1
α-Casein-4	JAK2	SHC-2
β-Casein-1	JNK1/JNK3	SRF
β-Casein-2	JNK1/JNK2	STAT1
β-Casein-3	Jun	STAT3
β-Casein-4	Keratin8	STAT6
β-Casein-5	Keratin18	Tau
β-Catenin-1	LaminA/C	Tau (Tyr kinase assay -1)
β-Catenin-2	MAPKAPK2	Tau (Tyr kinase assay -2)
CDK2	mTOR	Tau (kinase assay 2D analysis)
CHK1	MEK1-1	Thymosin β10
CipX	MEK1-2	Vimentin-1
EGFR-1	Myelin Basic Protein-1	Vimentin-2
EGFR-2	Myelin Basic Protein-2	Vimentin
Elongation Factor 2	Ovalbumin-1	
Erk1/2-1	Ovalbumin-2	

### アクリルアミド

コード No.	メーカーコード	品名	メーカー	容量	希望納入価格(円)
300-93523	AAL-107M	Phos-tag® Acrylamide AAL-	ナード	2mg	25,000
304-93521	AAL-107	107		10mg	60,000
304-93526	AAL-107S1	Phos-tag® Acrylamide AAL-107 5mM Aqueous	研究所	0.3mL	15,000

### 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)
192-17401	SuperSep™ Phos-tag™ (50μmol/L), 6%, 13well	電気泳動用	5枚	30,000
199-17391	SuperSep™ Phos-tag™ (50μmol/L), 6%, 17well	電気泳動用	5枚	30,000
195-17371	SuperSep™ Phos-tag™ (50μmol/L), 7.5%, 13well	電気泳動用	5枚	30,000
192-17381	SuperSep™ Phos-tag™ (50μmol/L), 7.5%, 17well	電気泳動用	5枚	30,000
193-16711	SuperSep™ Phos-tag™ (50μmol/L), 10%, 13well	電気泳動用	5枚	30,000
190-16721	SuperSep™ Phos-tag™ (50μmol/L), 10, 17well	電気泳動用	5枚	30,000
195-16391	SuperSep™ Phos-tag™ (50μmol/L), 12.5%, 13well	電気泳動用	5枚	30,000
193-16571	SuperSep™ Phos-tag™ (50μmol/L), 12.5%, 17well	電気泳動用	5枚	30,000
193-16691	SuperSep™ Phos-tag™ (50μmol/L), 15%, 13well	電気泳動用	5枚	30,000
196-16701	SuperSep™ Phos-tag™ (50μmol/L), 15%, 17well	電気泳動用	5枚	30,000

### SuperSep™ 用電気泳動槽

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
058-07681	EasySeparator™	電気泳動用	1セット	53,000

Ref...2~10℃保存 E...-20℃保存 S...-80℃保存 H...-150℃保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。  
掲載内容は、2018年10月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (<http://www.siyaku.com/>) をご参照下さい。

## PA タグ関連製品

Wako

### PAタグ-EGFP-6×Hisタグ, 組換え体, 溶液

本品は、配列中に PA タグ、EGFP 及び 6 × His タグを含むペプチドで、N 末端もしくは C 末端にそれぞれ PA タグ配列が存在します。ウエスタンブロッティングや免疫沈降において、コントロールとしてご利用いただけます。

#### 新規アフィニティータグ “PA タグ” とは？

PA タグはヒトポドプラニンの PLAG 領域内の配列 (GVAMPGAEDDVV) を利用したアフィニティータグです。抗 PA タグ抗体との結合力が強く、特異性も高いため、目的タンパク質を効率よく精製することが可能です。また中性条件下で抗体結合ビーズを再生し、繰り返し使用できるため、ランニングコストを低く抑えることができます。

また PA タグはタンパク質のループ構造で見られる II 型の β ターン構造を形成することが分かっており、抗 PA タグ抗体はループ領域内に挿入された PA タグと結合することができます。そのため PA タグシステムはループ構造を持つ、膜タンパク質の精製・検出への応用が期待されています。

#### 製品概要

- 濃度：約 0.75mg/mL
- 溶液組成：10mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 120mmol/L NaCl, 50v/v% Glycerol
- 分子量：約 29,000 (理論値として)
- 宿主：大腸菌
- ペプチド配列：  
〈N 末端 [コード No.169-28361]〉

NH<sub>2</sub>- PA tag - EGFP - 6×His tag -COOH

〈C 末端 [コード No.166-28371]〉

NH<sub>2</sub>- 6×His tag - EGFP - PA tag -COOH

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 169-28361	PA tag (Amino-terminal)-EGFP-6×His tag, recombinant, Solution	遺伝子研究用	150µg	16,500
NEW 166-28371	PA tag (Carboxy-terminal)-EGFP-6×His tag, recombinant, Solution	遺伝子研究用	150µg	16,500

PA tag 関連製品は、当社 HP をご覧下さい。

PA tag 富士フイルム和光純薬

: 2 ~ 10°C 保存 : -20°C 保存 : -80°C 保存 : -150°C 保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2018 年 10 月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

## PA タグ関連製品

Wako

### 標識抗 PA タグ抗体

本品は、抗 PA タグ、ラットモノクローナル抗体にフルオレセイン、ビオチン、赤色蛍光色素を標識した抗体です。フローサイトメトリーにて使用可能であることを確認しています。

#### 特長

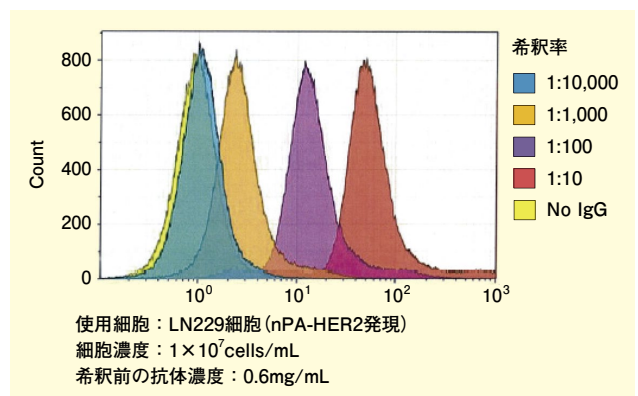
- 標識済みのため二次抗体不要
- フローサイトメトリーに使用可能

#### 製品概要

- 抗体サブクラス：IgG2a
- 溶液組成：0.05% アジ化ナトリウムを含む 1×PBS 溶液
- 濃度：約 0.5 mg/mL (ラベルに記載)
- 免疫動物：ラット
- クローン No.：NZ-1
- 適用：フローサイトメトリー
- 推奨濃度：フルオレセイン標識 1 : 10 - 1,000  
ビオチン標識 1 : 10 - 10,000  
赤色蛍光色素標識 1 : 10 - 1,000

#### 使用例

##### 赤色蛍光色素標識抗 PA タグ抗体によるフローサイトメーター解析



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
NEW 010-27721	Anti PA tag, Rat Monoclonal Antibody, Fluorescein Conjugated	免疫化学用	100µL	30,000
NEW 017-27731	Anti PA tag, Rat Monoclonal Antibody, Biotin Conjugated	免疫化学用	100µL	30,000
NEW 014-27741	Anti PA tag, Rat Monoclonal Antibody, Red Fluorochrome (635) Conjugated	免疫化学用	100µL	30,000

## 細胞外小胞の解析に

### 細胞外小胞マーカー モノクローナル抗体

Wako

テトラスパニンファミリーである CD9、CD63、CD81 は、細胞外小胞のマーカータンパク質として使用されています。当社では DNA 免疫法により、CD9、CD63 及び CD81 に対するモノクローナル抗体を樹立しました。

#### ■ 抗CD63抗体 (clone No. 3-13), 蛍光色素結合

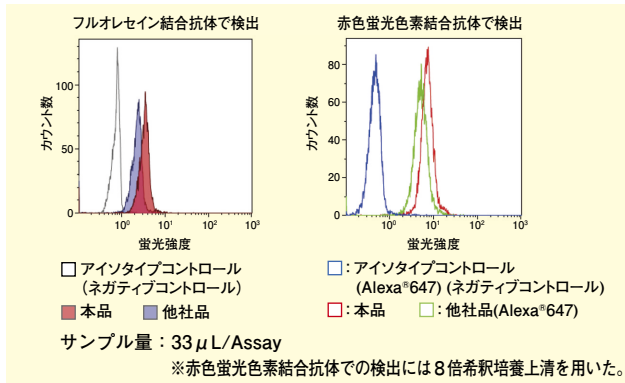
本品は、CD 63 に対するモノクローナル抗体 (clone No. 3-13) に蛍光色素を結合させた抗体です。PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキット (コード No. 297-79701) と合わせてご使用下さい。

#### 製品概要

標識蛍光物質	フルオレセイン	赤色蛍光色素 (635)
Ex / Em	494 nm / 521 nm	634 nm / 654 nm
クローン No.	3-13	
免疫動物	マウス	
抗体サブクラス	IgG1	
交差性	ヒト由来 CD63 [非還元サンプル] (マウス、ラット及びウシと交差しないことを確認済み)	
アプリケーション	FCM	

#### データ

#### ■ COLO201 細胞培養上清由来エクソソーム表面のCD63の検出



COLO201 細胞培養上清中のエクソソームを PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキット [コード No. 297-79701] によって単離し、他社抗体製品との検出感度比較を行った。

本抗体は他社蛍光色素結合抗 CD63 抗体に比べ、エクソソーム表面の CD63 を高感度に検出できることが示された。

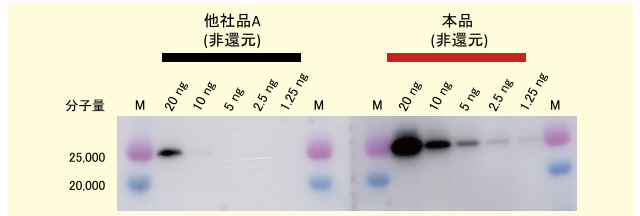
#### ■ 抗CD9, モノクローナル抗体 (1K)

#### 製品概要

クローン No.	1K
免疫動物	マウス
抗体サブクラス	IgG1
交差性	ヒト、ウシ由来 CD9 [非還元サンプル] (マウス、ラットと交差しないことを確認済み)
アプリケーション	ELISA、WB、FCM、IP

#### データ

#### ■ COLO201 細胞培養上清由来精製エクソソームのCD9検出



MagCapture™ エクソソームアイソレーションキット PS [コード No. 293-77601] によって単離した COLO201 細胞培養上清由来精製エクソソーム (1.25 ~ 20 ng) を、本品 (1K) 及び他社品 A で検出した。

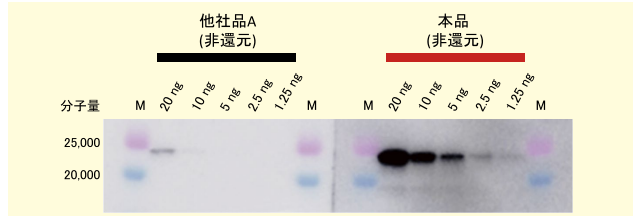
#### ■ 抗CD81, モノクローナル抗体 (17B1)

#### 製品概要

クローン No.	17B1
免疫動物	マウス
抗体サブクラス	IgG2b
交差性	ヒト、ウシ由来 CD81 [非還元サンプル] (マウス、ラットと交差しないことを確認済み)
アプリケーション	ELISA、WB、FCM、IP

#### データ

#### ■ COLO201 細胞培養上清由来精製エクソソームのCD81検出



MagCapture™ エクソソームアイソレーションキット PS [コード No. 293-77601] によって単離した COLO201 細胞培養上清由来精製エクソソーム (1.25 ~ 20 ng) を、本品 (17B1) 及び他社品 A で検出した。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
018-27641	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13), Fluorescein Conjugated	免疫化学用	25回用	13,000
014-27643	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13), Red Fluorochrome (635) Conjugated	免疫化学用	100回用	45,000
011-27751	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13), Red Fluorochrome (635) Conjugated	免疫化学用	25回用	照会
017-27753	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13), Red Fluorochrome (635) Conjugated	免疫化学用	100回用	照会
018-27761	Anti CD9, Monoclonal Antibody (1K)	免疫化学用	20µL	9,000
014-27763	Anti CD9, Monoclonal Antibody (1K)	免疫化学用	100µL	30,000
015-27771	Anti CD81, Monoclonal Antibody (17B1)	免疫化学用	20µL	9,000
011-27773	Anti CD81, Monoclonal Antibody (17B1)	免疫化学用	100µL	30,000

#### 関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
299-77603	MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS	遺伝子研究用	2回用	20,000
293-77601	MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS	遺伝子研究用	10回用	80,000
297-79201	PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti Mouse IgG POD)	遺伝子研究用	96回用	58,000
297-79701	PS Capture™ Exosome Flow Cytometry Kit	遺伝子研究用	300回用	30,000

※2 ~ 10℃保存    [F]... -20℃保存    [R]... -80℃保存    [S]... -150℃保存    表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。  
 掲載内容は、2018年10月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。



## アルツハイマー病研究に

### 抗りん酸化Tau S422, モノクローナル抗体(AP422)

Wako

Tau は、微小管結合タンパク質の一つで、主に中枢神経系の神経細胞に発現しており、微小管の安定化を制御しています。アルツハイマー病患者の脳では、りん酸化Tau が蓄積した神経原線維変化が形成され、その出現の程度が認知症の重症度と相関すると報告されています。そのため、Tau はアルツハイマー病の原因究明や治療薬開発のために盛んに研究されています。当社では各種 Tau 抗体をラインアップしています。その1つとして、この度りん酸化 Tau S422 抗体を販売しました。

### 特長

#### ● 使用実績豊富なモノクローナル抗体

※本抗体使用論文

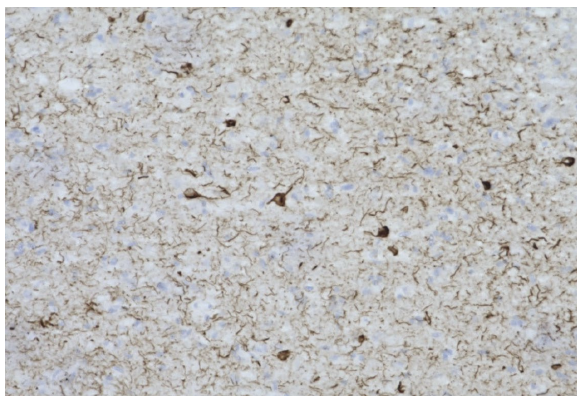
- 1) Hasegawa, M. *et al.*: *FEBS Lett.*, **384** (1), 25 (1996).
- 2) Goedert, M. *et al.*: *FEBS Lett.*, **409** (1), 57 (1997).
- 3) Buée-Scherrer, V. *et al.*: *FEBS Lett.*, **515** (1), 151 (2002).
- 4) Delobel, P. *et al.*: *J. Neurochem.*, **83** (2), 412 (2002).
- 5) Bellucci, A. *et al.*: *Am. J. Pathol.*, **165** (5), 1643 (2004).
- 6) Le Corre, S. *et al.*: *Proc. Natl. Sci. USA*, **103** (25), 9673 (2006).
- 7) Schindowski, K. *et al.*: *Am. J. Pathol.*, **169** (2), 599 (2006).
- 8) Audouard, E. *et al.*: *Am. J. Pathol.*, **186** (10), 2709 (2016).

### 製品概要

抗原	CGGIDMVD(pS)PQLAT (CGG+ ヒト Tau 417-427 amino acid)
抗体サブクラス	マウス IgG1・κ
種交差性	ヒト、マウス
クローン No.	AP422
適応	ウエスタンブロッティング (1:250-1,000) 免疫組織染色 (1:250-1,000)

### 使用例

#### ● 免疫組織染色像 (アルツハイマー病患者脳切片)



(データご提供: 東京都医学総合研究所 長谷川成人先生)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
016-27681	Anti Phosphorylated Tau S422, Monoclonal Antibody (AP422) [F°]	免疫化学用	10μL	12,000
012-27683	Anti Phosphorylated Tau S422, Monoclonal Antibody (AP422) [F°]	免疫化学用	50μL	50,000

### 関連商品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
011-26891	Anti Human/Mouse/Rat Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM38) [F°]	免疫化学用	10μL	10,000
017-26893	Anti Human/Mouse/Rat Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM38) [F°]	免疫化学用	50μL	35,000
019-26951	Anti Human Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM49) [F°]	免疫化学用	10μL	10,000
015-26953	Anti Human Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM49) [F°]	免疫化学用	50μL	35,000
016-26961	Anti Mouse Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM47) [F°]	免疫化学用	10μL	10,000
012-26963	Anti Mouse Tau, Rat Monoclonal Antibody (RTM47) [F°]	免疫化学用	50μL	35,000
017-27351	Anti 2N-Tau, Rat Monoclonal Antibody (2C2) [F°]	免疫化学用	10μL	10,000
013-27353	Anti 2N-Tau, Rat Monoclonal Antibody (2C2) [F°]	免疫化学用	50μL	30,000
012-26583	Anti 3R-Tau, Rat Monoclonal Antibody (2A1-1F4) [F°]	免疫化学用	10μL	10,000
016-26581	Anti 3R-Tau, Rat Monoclonal Antibody (2A1-1F4) [F°]	免疫化学用	50μL	30,000
019-26593	Anti 4R-Tau, Monoclonal Antibody (3E8-1A6) [F°]	免疫化学用	10μL	10,000
013-26591	Anti 4R-Tau, Monoclonal Antibody (3E8-1A6) [F°]	免疫化学用	50μL	30,000
012-26603	Anti Phosphorylated Tau T181, Rat Monoclonal Antibody (2E2-A6) [F°]	免疫化学用	10μL	10,000
016-26601	Anti Phosphorylated Tau T181, Rat Monoclonal Antibody (2E2-A6) [F°]	免疫化学用	50μL	30,000
019-26613	Anti Phosphorylated Tau S199, Rat Monoclonal Antibody (5B8-1E2) [F°]	免疫化学用	10μL	10,000
013-26611	Anti Phosphorylated Tau S199, Rat Monoclonal Antibody (5B8-1E2) [F°]	免疫化学用	50μL	30,000
014-27121	Anti Phosphorylated Tau S262, Rat Monoclonal Antibody (TIP1-35) [F°]	免疫化学用	10μL	10,000
010-27123	Anti Phosphorylated Tau S262, Rat Monoclonal Antibody (TIP1-35) [F°]	免疫化学用	50μL	35,000

## マイコプラズマ否定試験のバリデーションや陽性対照に



### マイコプラズマ標準品

マイコプラズマは、マイコプラズマ肺炎の原因として知られている真正細菌に分類される微生物です。細胞培養においては、汚染微生物の一つとして知られており、マイコプラズマに感染した細胞は、代謝や遺伝子発現に影響を受けるため、細胞培養の結果を正しく得るためには、マイコプラズマの感染がないことを確認する必要があります。しかし、マイコプラズマは一般的な細菌や真菌と比較して菌体のサイズが小さいため目視での発見が難しく、また、感染による培地の pH 変化もありません。そのため、細胞を用いてバイオ医薬品や生物学的製剤を製造する際には、培養法や核酸増幅法などによるマイコプラズマ否定試験の実施が義務付けられています。また近年では、再生医療等製品においてもマイコプラズマ否定試験の実施が求められています。

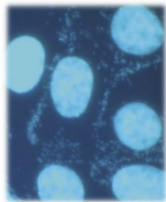
Mycoplasma Biosafety Services GmbH (MBS 社) は、継代困難なマイコプラズマ株の培養技術を有しており、マイコプラズマ標準株、マイコプラズマ標準株由来 DNA など、バイオ医薬品のプロセスバリデーションに最適な製品をラインアップしています。

[次頁に続く]





MBS社 本社 (オーストリア/ウィーン)



マイコプラズマ

## 特長

- 最新の各薬局方 (USP、EP、JP) に対応したマイコプラズマ標準株、マイコプラズマ標準株由来 DNA をラインアップ
- 各薬局方及び FDA<sup>\*1</sup>、CBER<sup>\*2</sup> で参照されているすべての株を保有
- EMA<sup>\*3</sup> 及び FDA により NAT<sup>\*4</sup> バリデーション向け標準株として承認

## 製品ラインアップ

### ●菌体製品

製品カテゴリ	種類	力価 (/100μL)
マイコプラズマ標準株	27 種類	≥ 100,000CFU
		1,000CFU
		100CFU
		10CFU
マイコプラズマ標準株パネルセット (JP、EP 収載株のパネルセット)	6 種類	≥ 100,000CFU
		1,000CFU
		100CFU
		10CFU

### ●DNA 製品

製品カテゴリ	種類	力価 (/μL)
マイコプラズマ標準株由来 DNA	26 種類	100,000GC
		100GC
マイコプラズマ標準株由来 DNA パネルセット (JP、EP 収載株由来 DNA のパネルセット)	6 種類	100,000GC
		100GC

詳細は当社 HP をご覧下さい。

Mycoplasma Biosafety Services GmbH 紹介ページ  
(<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/MycoplasmaBiosafetyServicesGmbH/index.htm>)

- \*1: 米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration)
- \*2: 生物製剤評価研究センター (Center for Biologics Evaluation and Research)
- \*3: 欧州医薬品庁 (European Medicines Agency)
- \*4: 核酸増幅検査 (Nucleic acid Amplification Techniques)

## 関連商品

### MycoTOOL シリーズ

マイコプラズマを NAT により検出するキットです。MBS 社製品を陽性対照としてお使いいただけます。

コード No.	メーカーコード	品名	メーカー	容量	希望納入価格 (円)
632-41081	08146829001	QC Sample Preparation Kit	ロシュ・ダイアグノス ティックス (株)	1キット	195,000
632-24981	05184240001	MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Amp Kit		1キット	190,000
636-25001	06495605001	MycoTOOL Real-Time PCR Kit		1キット	330,000
632-25341	05619424001	MycoTOOL Carrier DNA		320μL×5	120,000

## (株)日立ハイテックスサイエンス HM1000A 用校正試料

Wako

### HM1000A 用校正試料 DOTP Fragment

2019年7月より新たに、可塑剤として広く使用されているフタル酸エステル類4種 (DEHP、DBP、BBP、DIBP) が改正 RoHS 指令の規制対象に追加されます。

規制対象のフタル酸エステルの4種のうち、代表的な可塑剤として DEHP が多く使われています。DEHP 異性体には不純物として DOTP (非規制物質) があるため、測定時に DOTP 量の補正が必要となります。本品は日立ハイテックスサイエンス社加熱脱離質量分析計 HM1000A 用の校正試薬です。



※本品の形状は、DOTP を含んだ樹脂の断片です。

## DOTP と DEHP の物性比較

	DOTP	DEHP
RoHS 規制	非規制物質	改正 RoHS 規制物質
名称	テレフタル酸ビス(2-エチルヘキシル)	フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)
構造式		
分子量	390.56	390.56
分子式	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>
沸点	400°C (文献値)	386°C (文献値)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
030-25481	Correction sample for HM1000A DOTP Fragment	フタル酸エステル 試験用	1g	28,000

※本品の製法上、製品の一部が茶色や黒色に変色している場合があります。ご使用の際は変色した製品を取り除いてお使い下さい。HM1000 にもお使いいただけます。

## 精密ラジカル重合

### RAFT 重合試薬

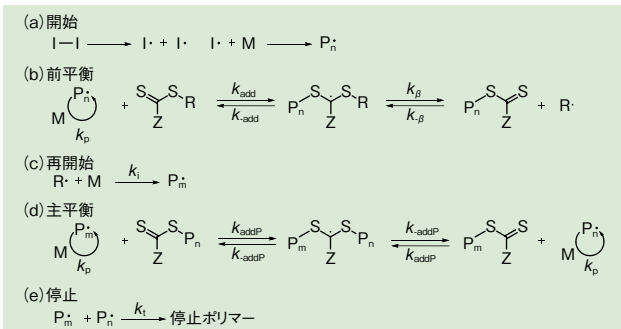
Wako

RAFT 重合は制御リビングラジカル重合手法の一つで、分子量の分布範囲が狭いポリマーの合成に有効です。ポリマーの分子量分布を制御することで、熱・光学特性などの物性を制御できるため高機能性ポリマーを合成することが可能です。近年、その論文・特許件数は徐々に増加している注目の重合法です。当社では、RAFT 重合に用いられる連鎖移動剤（以下、RAFT 剤）を多数販売しています。

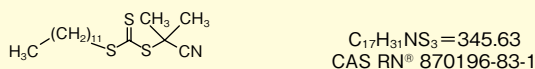
### 特長

- 分子量の分布範囲が狭いポリマーを合成可能
- 反応系にハロゲン・重金属を含まないため環境負荷が低い
- アニオン重合のような極低温を必要としない
- 適した RAFT 剤を用いることで広範囲のラジカル重合性モノマーの重合制御が可能
- 水やイオン性物質の影響を受けにくい重合系であるため、官能基をもつモノマーや水系での重合にも比較的容易に適用可能
- 両末端反応型の RAFT 剤を用いて得られるポリマーは、鎖延長反応や架橋反応、ブロックコポリマー合成にも利用可能

### 反応機構



〈製品例〉 2-シアノ-2[(ドデシルスルファニルチオカルボニル)ボニル]スルファニル]プロパン



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
033-25471	2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	有機合成用	1g	16,800

その他の RAFT 剤は当社 HP をご覧下さい。

<https://labchem.wako-chem.co.jp/products/000128/>

## 高移動度、高溶解性

### 有機半導体材料

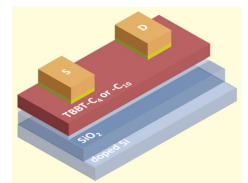
Wako

有機電界効果トランジスタ (OFET) は、機械的に柔軟かつ軽量な材料として注目されています。特に低コスト・低環境負荷の塗布プロセスによって作製可能な有機半導体材料を活性層に用いているプリントド・フレキシブルデバイスは次世代エレクトロニクスとして応用が期待されています。

この度、高いホール移動度を有し、溶解性の高い p 型半導体材料をラインアップしました。本品は東京大学 竹谷教授、岡本准教授と富士フィルム (株) の共同研究によって開発された新規材料です。

### 特長

- 高いホール移動度  
5cm<sup>2</sup>/Vs を超えるホール移動度
- 高耐熱性  
OSC パターニングに必要な温度履歴を経ても特性が劣化しない
- 高溶解性  
トルエン溶解度：0.5wt%
- 高い再現性  
パイクリスタル社によるトランジスタ特性評価で良好な再現性を確認
- 昇華精製品  
純度 99% 以上を保証



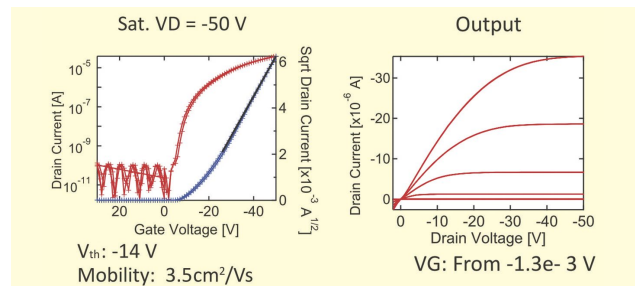
有機半導体イメージ

### データ

■ エッジキャスト法による結晶膜作製・トランジスタ特性評価 (TBBT-C<sub>4</sub>)

Chemical structure of TBBT-C<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>C<sub>4</sub> and C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> substituents).

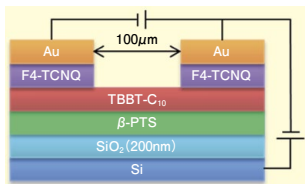
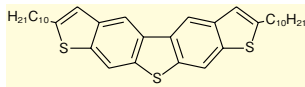
塗布膜作成条件	
溶媒	トルエン
濃度	0.05wt%
溶かした温度	60°C
Hot plate 温度	50°C
基板	SiO <sub>2</sub> 200nm
SAM	β-PTS
滴下量	1 滴
乾燥	減圧下 50°C, 8h



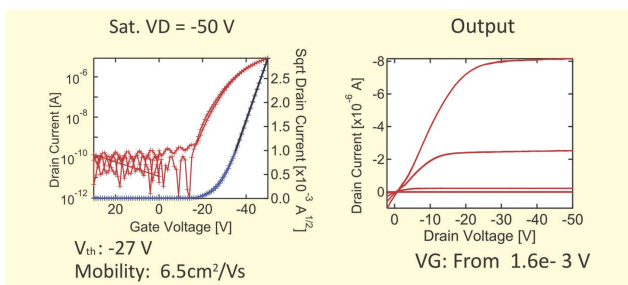
[次頁に続く]

Ref<sup>1</sup>... 2 ~ 10°C 保存    Ref<sup>2</sup>... 20°C 保存    Ref<sup>3</sup>... 80°C 保存    Ref<sup>4</sup>... 150°C 保存    表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。掲載内容は、2018 年 10 月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

## 〈TBBT-C<sub>10</sub>〉



塗布膜作成条件	
溶媒	アニソール
濃度	0.05wt%
溶かした温度	70°C
Hot plate 温度	40°C
基板	SiO <sub>2</sub> 200nm
SAM	β-PTS
滴下量	1 滴
乾燥	減圧下 70°C, 24h



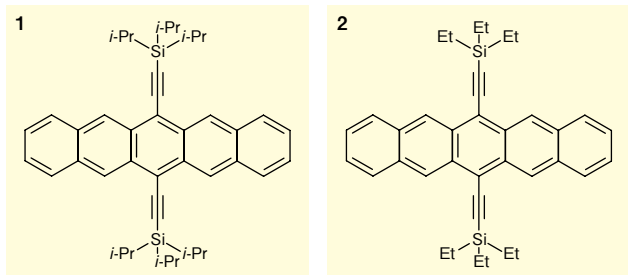
### 〔参考文献〕

- 1) Okamoto, T. *et al.*: *Adv. Mater.*, **25**, 6392 (2013).
- 2) Okamoto, T. *et al.*: *J. Mater. Chem. C*, **5**, 1903 (2017).
- 3) 岡本敏宏: 和光純薬時報, **86** (2), 10 (2018).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
208-20821	TBBT-C <sub>4</sub>	機能性有機材料用	100mg	75,000
205-20831	TBBT-C <sub>10</sub>	機能性有機材料用	100mg	75,000

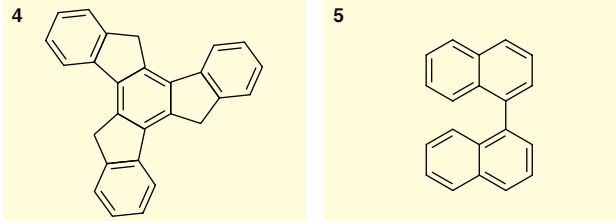
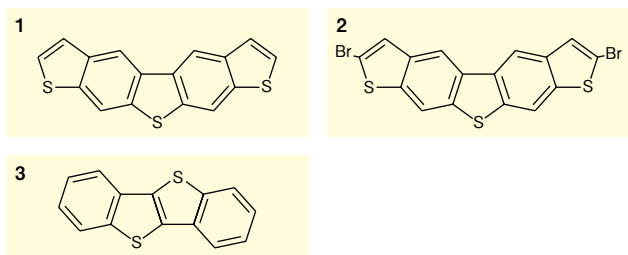
### 関連商品

#### 有機半導体材料



No.	コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
1	029-19281	6,13-Bis(triisopropylsilylethynyl) pentacene [TIPS pentacene]	機能性有機材料用	100mg	照会
2	026-19291	6,13-Bis(triethylsilylethynyl) pentacene [TES Pentacene]	機能性有機材料用	100mg	照会

#### ビルディングブロック



No.	コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
1	204-20801	TBBT-H <sub>2</sub>	機能性有機材料用	250mg	照会
2	201-20811	TBBT-Br <sub>2</sub>	機能性有機材料用	250mg	照会
3	026-19311	Benzo[b]benzo[4,5]thieno[2,3-d]thiophene [BTBT]	機能性有機材料用	1g	照会
4	206-20861	Truxene	機能性有機材料用	1g	照会
5	023-19321	1,1'-Binaphthyl	機能性有機材料用	5g	照会

### 追加品目のお知らせ

## ポジティブリスト関連標準品

Wako

当社ではポジティブリスト制度の対象となる農薬標準品、動物用医薬品標準品を品揃えしています。下記品目を新たに発売しました。

### 農薬標準品

- ジクロベニル代謝産物 E 標準品
- ジメトエート標準品
- エトフェンプロックス標準品
- エトフメセート代謝産物 M2 標準品
- イプロジオン標準品
- ピカルブトラゾクス標準品
- ピカルブトラゾクス代謝産物 B 標準品
- プロメトリン標準品
- キザロホップ標準品
- トリアジメホン標準品

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
045-34401	Dichlobenil Metabolite E Standard	残留農薬試験用	100mg	6,000
041-15843	Dimethoate Standard	残留農薬試験用	100mg	12,000
051-05194	Ethofenprox Standard	残留農薬試験用	100mg	5,000
053-09211	Ethofumesate Metabolite M2 Standard	残留農薬試験用	100mg	30,000
092-02384	Iprodione Standard	残留農薬試験用	100mg	11,500
160-28391	Picarbutrazox Standard	残留農薬試験用	100mg	25,000
163-28401	Picarbutrazox Metabolite B Standard	残留農薬試験用	100mg	30,000
167-15373	Prometryn Standard	残留農薬試験用	100mg	11,000
178-00791	Quizalofop Standard	残留農薬試験用	100mg	35,000
203-08494	Triadimefon Standard	残留農薬試験用	100mg	13,000

随時、当社 HP のリストに発売品目を追加・更新しています。詳細は、当社 HP をご覧下さい。

試薬事業ホーム > 分析 > 食品分析 > ポジティブリスト > ポジティブリスト制度 関連試薬 取扱い標準品一覧

Ref. 2 ~ 10°C 保存    F ~ 20°C 保存    30 ~ 80°C 保存    150 ~ 150°C 保存    表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。  
 掲載内容は、2018年10月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。



## ハワード・スタンレー・メイソン (1914.8.20~2003.4.2)

大阪大学名誉教授 鈴木 晋一郎

2002年の故芝哲夫阪大名誉教授による本時報70巻No.3化学大家391・吉田彦六郎の文頭に、「米国の生化学者Howard S. Mason博士が来日した時に、世界で最初に酸化酵素を発見した日本人吉田彦六郎の事蹟について尋ね廻ったが、日本の生化学者でこの名を知る人が少なかったという話が残っている」と記されている。このDr. Masonは「O<sub>2</sub>代謝に含まれる酵素の研究」で極めて顕著な研究成果を上げ、科学・自然・ポートランドをこよなく愛した有機化学出身の生化学者である(図1)。

## 1. 生い立ちとポートランド移住まで

Dr. Masonの両親は現在のリトアニアからの移民で、1913年にメイン州ルイストンで結婚し、翌1914年8月20日にマサチューセッツ州、メルローズで彼が生まれた。幼児期をボストンで過ごした彼は、16歳でMITに入学し、1935年に化学と生物で学士号を取得した。そして、1936年に修士号を得た後、キューバのハバナにあるアメリカンロストンアカデミーで数学と化学の教鞭をとった。その後、彼は1938年にMITに戻って、酸化機構を研究する合成有機化学のMilasのPhD院生となり、1939年に化学でMITからPhD(学位論文はOsO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系触媒の酸化反応)を取得している。それからの1年間は、ミカエル縮合反応を発見したArthur Michaelの下でポストクの仕事をするために、ハーバードに移っている。1940年の第二次世界大戦勃発直後には、軍関係のプロジェクトの仕事をしたNIH(メリーランド州、ベセスダ)の工業衛生学部門に加わった。そこでは、マスタードやルイサイトのようなびらん性物質の検出や防護の方法を開発するために、ツタウルシやカシウナツツの樹液を用いて研究を行った。さらにその時期に、彼はチロシナーゼに関する初期の研究であるフェノール類の酵素酸化反応の研



図1. 晩年のDr. Mason。研究室メンバーは、彼をDr. Masonと呼んでいた。

究も始めている<sup>1)</sup>。彼はチロシンやドーパからメラニンを生成する過程(メラニン生成のRaper-Masonスキーム<sup>2)</sup>)における生成物の構造、触媒反応中間体、多機能酸化機構の論文を発表した<sup>3)</sup>。この論文は酵素を扱ってはいるが、内容的には有機化学の研究である。後の1977年には、このメラニン研究の業績により、国際色素細胞学会からMyron Gordon Awardを受賞している。

1948年、英国ケンブリッジのA. R. Toddの研究室に移ったDr. Masonがヌクレオチド化学の研究をしているとき、後に「彼によって、呼吸生物学の歴史の中で、自分の酸素の生化学研究が、重要な意義を持つことを強く認識させられた。」と述べたDavid Keilinに出会った。このKeilinとの出会いが、彼の将来の研究に大きな影響を与えることになった。

## 2. ポートランドでの研究生生活

1952年、Dr. Masonはケンブリッジで研究をしていた時に知り合ったマーガレットと結婚して、アメリカ西

海岸オレゴン州のポートランドに移住した。ここが2003年に亡くなるまで、彼のホームタウンとなった。ポートランドは北海道旭川市とほぼ同緯度にあり、市内から東方向に富士山よりも少し低いフッド山、北には1980年の大噴火で山頂が吹飛んだセントヘレンス山(ワシントン州)を望む自然豊かなバラの街である。ダウントウン西南の小高い丘にあるオレゴン大学医学部(1974年、Oregon Health Sciences Universityに改組)に赴任してから1985年の退職までの33年間、彼は酸素の生化学に関する独創的な仕事を続け、学生や世界中からの研究者の教育と研究指導を通して、彼の長く豊かなキャリアを積んで行った。その中で、23名の日本人研究者がMason研究室で仕事をしている<sup>4)</sup>。以下にDr. Masonを代表する3つの研究について触れるが、そのうちの2つについては、全く独立に、日本人研究者も研究を行っていたことは興味深い。

(1) 1955年、Dr. Masonらはマッシュルーム由来のチロシナーゼ(活性中心に2個の銅イオンをもっていることは知られており、論文ではphenolase complexと書かれている)の酵素反応を、本来の基質であるチロシンの代わりに3,4ジメチルフェノールと、酸素の同位体である<sup>18</sup>O<sub>2</sub>を用いて行った(Mason, H. S., Fowlks, L., Peterson, E.)<sup>5)</sup>。その結果、彼らは酸化生成物である4,5ジメチルカテコールに取り込まれたO原子が、H<sub>2</sub>OからではなくO<sub>2</sub>に由来していることを発見し、チロシナーゼは酸素転移酵素(oxygen transferase)であると報告した(図2)。奇しくも同じ年に、早石修京大教授らは、ピロカテカーゼ(活性中心に1個の鉄イオンを含む)がO<sub>2</sub>の2つのO原子を基質であるカテコールに挿入することを、同じく<sup>18</sup>O<sub>2</sub>を用いて証明した(早石修, 片桐正之, Rothberg, S.)<sup>6)</sup>。酸素転移酵素は一般的に酸素添加酵素(oxygenase)と呼ばれるが、

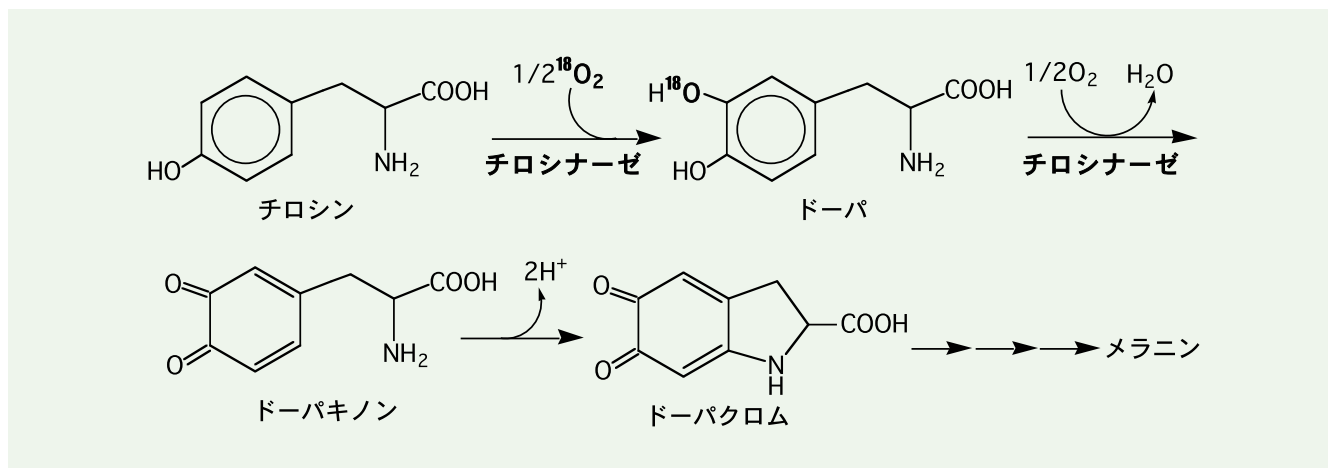


図2. チロシナーゼによるチロシンへの<sup>18</sup>O原子の取り込みと、チロシンからメラニン生成の Raper-Mason スキームの概略

両グループが独立に、同時にこれまで知られてなかった酸素添加酵素を発見したことになる。その後、Dr. Mason は「酸素代謝の機構」の論文で、O<sub>2</sub>を活性化する酵素を3つのグループに分類し、酸化酵素に関する優れたコンセプトを発表している<sup>7)</sup>。

グループ1：O<sub>2</sub>の両方のO原子を基質に取り込み、基質分子あたり1分子のO<sub>2</sub>の消費を触媒する oxygen transferase (別名ジオキシゲナーゼ)。基質分子をSとすると、S + O<sub>2</sub> → SO<sub>2</sub> (ピロカテカーゼの場合) と 2S + O<sub>2</sub> → 2SO

グループ2：混合機能酸化酵素 (mixed-function oxidase、別名モノオキシゲナーゼ) で、チロシナーゼのように酸化される基質分子あたりO<sub>2</sub>を1分子消費するが、O<sub>2</sub>中の一つのO原子が生成物に取り込まれ、他のO原子は還元されて水となる。つまり、O<sub>2</sub>の転移とその還元を同時に行う。  
 $\text{SH} + \text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{SOH} + \text{H}_2\text{O}$

グループ3：O<sub>2</sub>分子をH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>やH<sub>2</sub>Oに還元する電子移動酸化酵素 (electron-transfer oxidase、別名は単に酸化酵素)。このクラスの酵素は、基質からO<sub>2</sub>への2電子移動を触媒してH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を生成 (O<sub>2</sub> + 2e<sup>-</sup> + 2H<sup>+</sup> → H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、あるいは4電子移動を触媒して、2分子のH<sub>2</sub>Oを生成する (O<sub>2</sub> +

4e<sup>-</sup> + 4H<sup>+</sup> → 2H<sub>2</sub>O)。なお、文頭の吉田彦六郎が研究した漆の酸化酵素のラッカーゼは、後者の4電子移動の酸化反応を触媒する。

(2) Dr. Mason は、1950年代末から電子スピン共鳴 (electron spin resonance, ESR) 装置を用いて研究を始めている (図3)。そして、1960年代～1970年代に、ESRを用いた多くの研究成果が発表されている。その中の大きな成果は、1962年にDr. Masonら (箸本雄吉、山野俊雄、Mason H. S.) が、ミクロゾーム Fe<sub>x</sub> と名付けたウサギ

肝臓ミクロゾーム由来のヘムタンパク質を、ESRを用いて発見したことである<sup>8)</sup>。ミクロゾームでNADPHによって還元されるヘムタンパク質について、彼は酸化状態 (Fe<sup>3+</sup>) のヘムが低スピンであることを初めて明らかにした。同じ年の初めに、佐藤了阪大教授ら (大村恒雄、佐藤了) は、彼らがP450と名付けたウサギ肝臓ミクロゾームのシクロムの分光学的研究を報告している (P450: CO結合ヘム鉄(II)の差スペクトルが450nmに吸収帯を持つことに由来し、Pはpigment)<sup>9)</sup>。

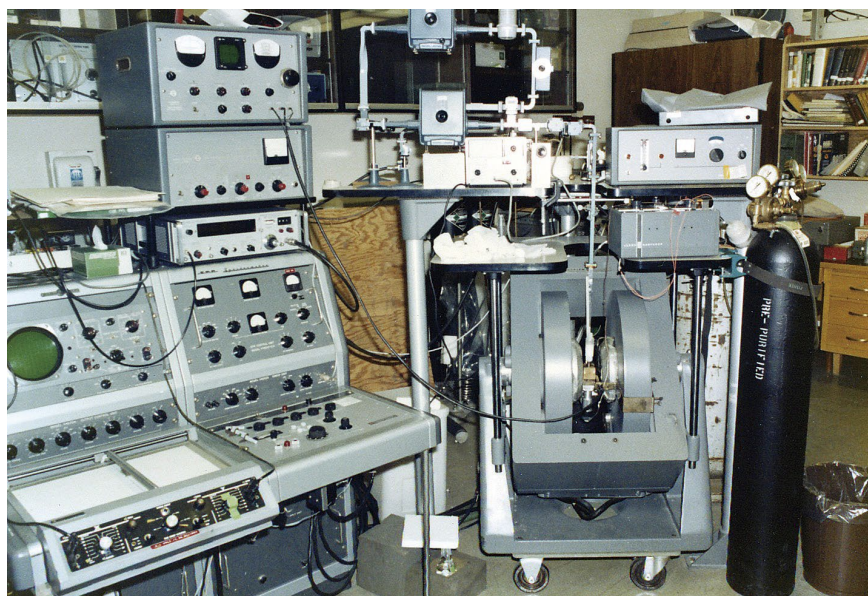


図3. Mason 研究室の多くの研究者が使ったバリアン V-4500 電子スピン共鳴装置



1962年の段階では、Dr. Masonはミクロゾーム  $Fe_x$  がP450と同じものかどうか迷っていたが、やがてミクロゾーム  $Fe_x$  とP450は同じヘムタンパク質で、グループ2に分類される混合機能酸化酵素（モノオキシゲナーゼ）であることを発表した<sup>10)</sup>。その後、P450はヒトなどのほ乳類をはじめとして、昆虫、植物、微生物などに広く分布して、様々な生物機能に関わりを持った重要なヘム酵素であることが明らかになって行った。

(3) 1973年にDr. Masonら（井柳堯、Mason, H. S.）は、ミクロゾームからのNADPH-P450還元酵素（ミクロゾームP450を還元するミクロゾームフラボタンパク質）が、それまで言われていたように2個のFAD分子を含むのではなく、1個のFADと1個のFMNを含んでいることを決定した<sup>11)</sup>。

1980年から1985年のOHSU退職までのDr. Masonの研究の一つに、牛心筋由来のヘム鉄と銅イオンを含んだシトクロムc酸化酵素（CcO）の研究がある<sup>12)</sup>。彼はCcOの13個から成るサブユニットを電気泳動で分離し、それぞれの金属がどのサブユニットに含まれ、シトクロムcからの電子がどのように酵素の中を移動して $O_2$ が水になるかを研究し、さらにはそのサブユニットの再構成を考えていた。しかしながら、分離したサブユニット中の金属部位は、変性により本来の構造を維持しておらず極めて困難な研究であったが、彼はこの研究のためには大学を辞めたくないと考えており、研究に対する並々ならぬ強い情熱が感じられた。その10年後、1995年に日本とドイツのグループによって、X線結晶構造解析によりCcOの分子構造が明らかになった。Dr. Masonが退職した80年代の頃から、タンパク質や酵素のサイエンスは、遺伝子工学とX線結晶構造解析の手法を用いることによって、分子レベルでの理解の時代に入って行った。

### 3. 研究以外のDr. Mason

Dr. Masonはオレゴンに移る前からメラニンの研究を行っていたが、ポートランドに移った初期の時代に、人種差別の撤廃の観点から、 $O_2$ が皮膚の色素細胞にどのように働いているかについても研究を行っている。彼は、人類全てが同じ色素生成システムを持っていることを理解する必要があると考えた。しかし、現実には感情や論争が問題を困難にしており、彼は科学的研究という理にかなったことがこの問題解決の最良の策ではなく、人の心を変えることであるという結論に達している。このことは、推測ではあるが、Dr. Masonが敗戦国と有色人種という二重の差別を受けていた日本の研究者を、1950年代終わり頃からポートランドに招いたことと関連しているように思えてならない。彼は前述のMyron Gordon Awardをはじめ数多くの賞を受賞しているが、その中の一つである1988年の勲三等旭日中綬章は、多数の日本人研究者<sup>4)</sup>に対する貢献によるものである。

Dr. Masonは、ポートランドが国際的に高いレベルの街であることを望んで、地域に様々な貢献をしている。ポートランド動物園協会の会長として、人々が楽しめる動物園づくりのために指導を行った。彼は全米の動物園で、24時間周期リズムの重要性を最初に言った人であった。つまり、日中寝ている夜行性の動物に暗い灯りをつけると、眠っている動物ではなく、生き生きとした動物を見ることができた。さらに彼は放送用タワーからの電磁波の問題に注目し、人々の健康を守るため、鉄塔区画の作成をしてポートランド市に助言をしている。また、マーガレット夫人と共に植物（特に日本の植物）を育てる趣味をもっていた彼は、ベリー植物園協会のメンバーとして、世界園芸コミュニティの注目を集める場所に庭園を造ることに努める一方、大学の裏山の中腹にあるポートランド市街が一望できる自宅の庭で、多くの植物を育てた（図4）。彼の自慢は、素晴らしい青色のリンドウであった。さらに、彼の趣味はクラシック音楽（図5）やバレエ鑑賞など



図4. 1982年5月、Mason邸の庭でのパトラックパーティ。Dr. Masonの右がマーガレット夫人、後方が長女エリザベス。写真左の中国人研究者の後方が次女サラ。庭には、ライラック、ジャクナゲ、ボタン、ヒマラヤの青いケンシなど多数の植物が花開いていた。





図5. 音楽を楽しむ Dr. Mason

であった。また、寿司などの日本食も大好きであった。1995年に夫人を亡くした彼は、住み込みのヘルパーの女性に支えられて自宅で生活をしてきたが、庭の園芸や果樹の収穫だけでなく、アートミュージアム、動物園、映画、コンサート、日本食レストラン、OHSUで開催されるMason記念講演会、友人との交流と、屢々彼女よりもエネルギーに駆り出されることを楽しんできた。そして、彼は毎日、良く聞き、良く見、良く笑っていたとヘルパーさんは言う。

小さな川の源流がやがて大河となるように、酵素が空気中の $O_2$ のO原子を基質に導入するという発見は、 $O_2$ を利用する生体系の様々な現象の理解に重要な意味をもっていった。その源流の発見者の一人であるDr. Masonの次のような言葉がある。

『私は新しい知識を発見する可能性に魅力を感じる。知識を得ることは、最も光栄な仕事の一つであるから。』

本稿は、科学雑誌の酸素添加酵素発見50周年記念号<sup>13)</sup>、サラさんとエリザベスさん、さらにヘルパーのドーナさんからの私信、2003年4月22日付

オレゴン州のThe Oregonian新聞記事などを参考にまとめたものである。また、桜井弘京都薬科大学名誉教授には執筆のお褒めを頂き、桜井武金沢大学名誉教授には、Mason研究室での情報を頂いた。両先生に心から御礼申し上げます。

#### 【参考文献】

- 1) Mason, H. S., Schwartz, L. and Peterson, D. C. : "The Allergenic Principles of Poison Ivy IV. On The Mechanism of The Enzymatic Oxidation of Catechols". *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 1233 (1945).
- 2) Prota, G. : "Progress in the Chemistry of Melanins and Related Metabolites", *Med. Res. Rev.*, **8**, 525 (1988).
- 3) Mason, H. S. : "The Chemistry of Melanin III. Mechanism of the Oxidation of Dihydroxyphenylalanine by Tyrosinase", *J. Biol. Chem.*, **172**, 83 (1948).
- 4) Mason研究室の日本人研究者と研究を始めた年 : Kerry Yasunobu (1955) ; Koichi Anan (1957) ; Isao Yamazaki (1959) ; Takao Nakamura (1960) ; Yoshikatsu Sakagishi (1960) ; Yukichi Hashimoto (1961) ; Toshio Yamano (1961) ; Yuhei Morita (1962) ; Kyoden Yasumoto (1962) ; Kazuo Murakami (1963) ; Takeshi Shiga (1964) ; Yoshihiro Miyake (1965) ; Yoshio Imai (1967) ; Kazuko Imai (1968) ; Masazumi Hiraga

- (1968) ; Yoshiyuki Ichikawa (1970) ; Toshihiro Tsudzuki (1971) ; Takashi Iyanagi (1971) ; Nobuo Makino (1972) ; Yukio Nishimoto (1978) ; Shinnichiro Suzuki (1982) ; Toshihiro Sugiyama (1982) ; Takeshi Sakurai (1983).
- 5) Mason, H. S., Fowlks, L. and Peterson, E. : "Oxygen Transfer and Electron Transport by the Phenolase Complex", *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2914 (1955).
- 6) Hayaishi, O., Katagiri, M. and Rothberg, S. : "Mechanism of the Pyrocatechase Reaction", *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 5450 (1955).
- 7) Mason, H. S. : "Mechanisms of Oxygen Metabolism", *Science*, **125**, 1185 (1957).
- 8) Hashimoto, Y., Yamano, T. and Mason, H. S. : "An Electron Spin Resonance Study of Microsomal Electron Transport", *J. Biol. Chem.*, **237**, PC3843 (1962).
- 9) Omura, T. and Sato, R. : "A New Cytochrome in Liver Microsomes", *J. Biol. Chem.*, **237**, PC1375 (1962).
- 10) Murakami, K. and Mason, H. S. : "An Electron Spin Resonance Study of Microsomal  $Fe_x$ ", *J. Biol. Chem.*, **242**, 1102 (1967).
- 11) Iyanagi, T. and Mason, H. S. : "Some Properties of Hepatic Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Cytochrome c Reductase", *Biochemistry*, **12**, 2297 (1973).
- 12) Mason, H. S. : "The Subunits of Cytochrome c Oxidase", *The Biological Chemistry of Iron* eds. by Dunford, H. B. *et al.*, D. Reidel Publishing Company, p. 459 (1982).
- 13) Waterman, M. R. : "Professor Howard Mason and Oxygen Activation", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 7 (2005).

