

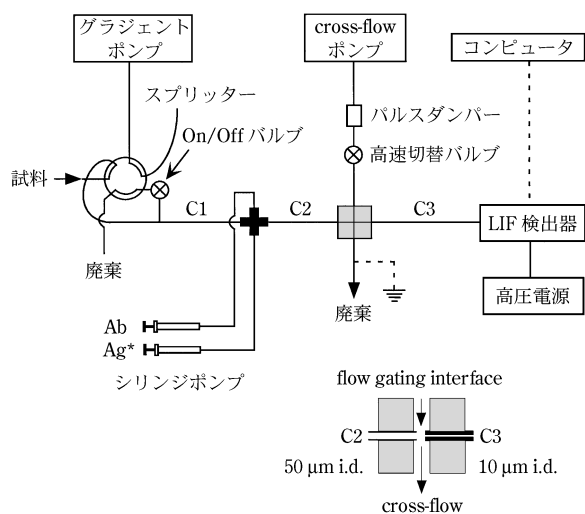
トピックス

—逆相キャピラリークロマトグラフィーをオンライン濃縮に用いるキャピラリー電気泳動イムノアッセイ

キャピラリー電気泳動イムノアッセイ (CEIA) は、免疫反応により生じた抗原-抗体複合体と遊離の抗原 (抗体) を CE により迅速に分離する手法で、レーザー誘起蛍光 (LIF) を用いることで高感度検出が可能である。German らは、先に、競合反応をキャピラリー中で行う on-line 型の CEIA システムによるペプチドホルモン分析法を報告¹⁾⁻³⁾しているが、最近、キャピラリー逆相液体クロマトグラフィー (RPLC) と競合 CEIA を on-line で組み合わせて、さらに高感度な分析法を開発した (図 1)⁴⁾⁵⁾。

抗原 (Ag) を含む試料は、6 方バルブと RPLC カラム間に設置したキャピラリーループにより注入され、内径 50 μm の RPLC カラムで前濃縮される。溶出された Ag は、抗体 (Ab) およびフルオレセインで標識された抗原 (Ag^*) と混合され、内径 50 μm の反応キャピラリー中で免疫複合体を形成する。キャピラリーを通過した反応液は、flow gating interface⁶⁾を介して、反応液の流入を遮る cross-flow を 0.125 秒間停止させることにより 1.5 秒サイクルで分離キャピラリーに導入され、遊離型 Ag^* と複合型 $\text{Ag}^*\text{-Ab}$ が分離・LIF 検出される。1.5 秒ごとに得られるフェログラムから (Ag^*)/($\text{Ag}^*\text{-Ab}$) 蛍光強度比を算出し、これを連続的にプロットすることにより Ag のクロマトグラムが得られる。

本法の検出限界濃度 (5 μl 注入時) はグルカゴン (Glu) で 20 pM⁴⁾、ニューロペプチド Y (NPY) で 40 pM⁵⁾ となり、オンライン濃縮を用いない場合に比べて各々 45 倍³⁾、21 倍改善され、ラット・ランゲルハンス島、視床下部神経核細胞から分



C1: RPLC カラム, C2: 反応キャピラリー, C3: 分離キャピラリー

図 1 RPLC/CEIA システムの概略図

泌される微量な Glu, NPY の測定が可能となった⁴⁾⁵⁾。また、濃縮・溶出・反応の各条件の変更により、Glu と NPY の同時定量も可能である⁵⁾。本法のもう一つの利点は、免疫反応以前に交差反応種を分離できることにあり、例えば、酸化型 Glu は溶出条件の変更により Glu と容易に分離可能である⁴⁾。この工程を on-line で行うことのできる本法は、従来の HPLC 分画とラジオイムノアッセイを組み合わせた off-line 法に比して迅速な分析が可能であり、複合体混合物の親和性スクリーニングやウエスタンブロット型の分析法への応用が可能であると考えられる。また、microfluidics を用いて、バンドのブロード化を抑制することで、より高性能で実用的なシステムの構築が期待される。

- 1) L. Tao, R. T. Kennedy: *Anal. Chem.*, **68**, 3899 (1996).
- 2) L. Tao, C. A. Aspinwall, R. T. Kennedy: *Electrophoresis*, **19**, 403 (1998).
- 3) I. German, R. T. Kennedy: *J. Chromatogr. B*, **742**, 353 (2000).
- 4) I. German, R. T. Kennedy: *Anal. Chem.*, **72**, 5365 (2000).
- 5) I. German, M. G. Roper, S. P. Kalra, E. Rhinehart, R. T. Kennedy: *Electrophoresis*, **22**, 3659 (2001).
- 6) T. F. Hooker, J. W. Jorgenson: *Anal. Chem.*, **69**, 4134 (1997).

〔旭川工業高等専門学校 館田尚弘〕

—フェptomol濃度レベルの細胞内フリー亜鉛イオンに 応答する金属量調節タンパク質

亜鉛 (Zn) は生体内において鉄に次ぐ 2 番目に多い遷移金属であり、必須微量元素の一つである。Zn²⁺ イオンは、生体内では 100 以上に及ぶ酵素活性中心として存在し、基質の加水分解反応、タンパク質の構造保持あるいは DNA 複製など生命活動を営む上で重要な役割を果たしている。これまでに、Zn の細胞内から外あるいはその逆の輸送において、Zn ポンプとして働く膜内在性タンパク質 (ZnACB および ZntA) の存在、およびその輸送機構は徐々に明らかとなってきたが、Zn²⁺ イオンの細胞内挙動は依然明確には解明されていない。このことは、細胞内 Zn の定量に関する問題点に基因する。すなわち、 μM ~ pM であると推測されている細胞内のフリーの Zn²⁺ 濃度レベルを、サイトゾルだけを分離して直接決定することは交差汚染を受けるため非常に困難であり、また Zn 蛍光プローブも開発されているが現状では感度が低い。現在のところ、生体内 Zn はその大部分がタンパク質などと結合していることが知られているが、細胞内の Zn 量調節において、Zn を必要とする酵素や転写因子は、サイトゾル内の極微量フリー Zn²⁺ イオンを直接受け取るのではないかという、“サイトゾルプール説” が有力視されている。

O'Halloran らは、大腸菌由来の、Zn の摂取および排出にかかわる金属量センサーかつ調節タンパク質である Zur および ZntR の細胞内 Zn 量調節機構についてフットプリント法によって詳細に検討した¹⁾。その結果、Zur および ZntR は、fM レベルで Zn 量調節センサーとして相補的に働くと同時に、Zn ポンプとなる膜内在性タンパク質の合成を誘発すること、および Zn ポンプタンパク質との間で Zn の授受を行うことが明らかとなった。また、彼らは、生理学的 pH における ZntR Zn の条件解離定数 K_d を、ZntR のチロシン残基由来の蛍光強度

変化を利用して決定し、それが他の亜鉛フィンガーに比べ非常に小さい ($K_d \approx 10^{-15}$) ことを示した²⁾。以上から、細胞内での厳密な Zn 量制御は、Zur および ZntR Zn 複合体生成の平衡によって、熱力学的に支配されていると予想されている。今後、それらの Zn 複合体の構造や Zn の取り込み機構について、さらに調査を行うことが必要であるが、細胞内 Zn²⁺ イオンの蛍光プローブとして、ZntR が有用であることが示唆されたことは興味深い。

- 1) C. E. Outten, T. V. O'Halloran : *Science*, **292**, 2488 (2001).
- 2) Y. Hitomi, C. E. Outten, T. V. O'Halloran : *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8614 (2001).

〔東北大学大学院工学研究科 藁科知之〕

集束イオンビームを用いる透過型電子顕微鏡の試料加工

近年、半導体材料をはじめとする先端材料の分野では、機能の向上を目的とした材料の複合化、デバイスの高集積化が急速に進行している。このような先端材料分野では電子顕微鏡が重要な評価方法となっている。とくに透過型電子顕微鏡 (TEM)

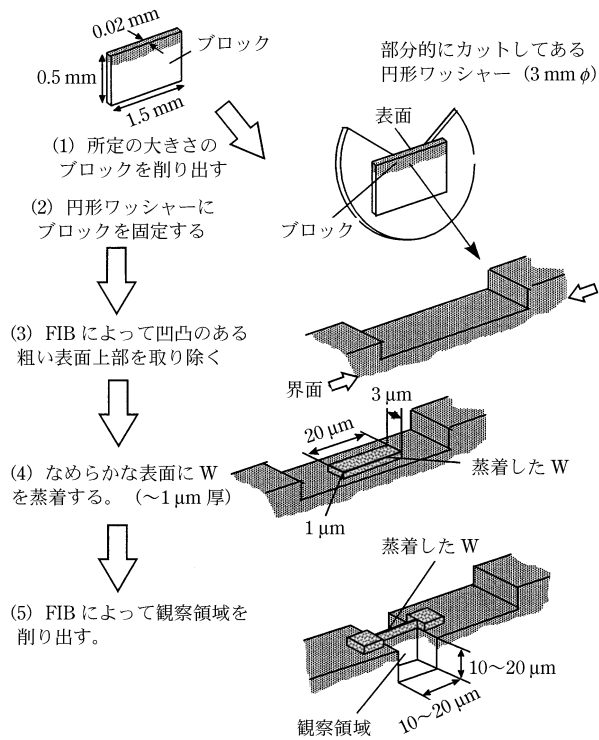
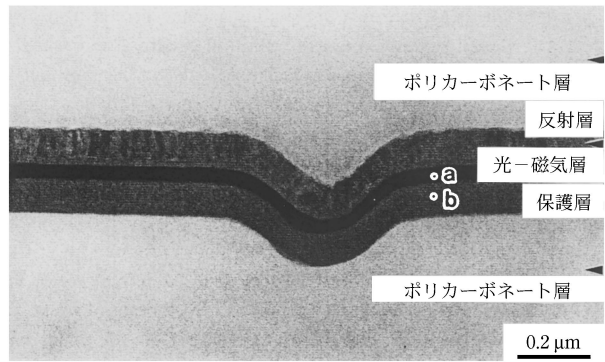


図1 FIB法による試料加工²⁾



(a) MO層, (b) 保護層

図2 光磁気ディスクの断面 TEM 像¹⁾

はナノオーダーの構造を直接的に観察でき、また EDX や EELS 等の分析装置を付属させることによって微小領域の化学成分も明らかにすることができる。しかし、TEM で観察する試料はすべて電子線を透過するものでなくてはならず、バルク体ではそれを切断して薄膜化する必要がある。この試料作製技術が TEM の観察結果を大きく左右する。一般に高分子材料のような柔らかい材料にはウルトラマイクロトム法を、金属材料には電解研磨法を、セラミック材料にはイオンミリング法をそれぞれ選択する。しかし、集束イオンビーム加工法 (FIB 法) が開発され、最近では Yaguchi ら¹⁾⁻³⁾ によって試料作製法による材料評価の論文がいくつか発表されている。これは走査イオン顕微鏡像を観察しながら試料を薄膜加工する方法で、観察したい部位の試料加工が可能となり、また、材質の異なる試料でも均一な厚みの試料ができるため、複合材料の微小領域の評価にも使える。具体的な方法を図1に示す。加工に用いるイオンビーム径はビーム電流によって 30 nm ~ 600 nm に変えることができ、精密な加工を可能としている。図2には Yaguchi らが報告した MO ディスクの断面方向の TEM 像を示す。材質が変わっていても所望の微小領域を精度よく試料加工ができていることがわかる。今後も材料の高機能化が進行すれば、ますますこのような加工法による電子顕微鏡観察の役割が重要となってくる。

- 1) T. Yaguchi, T. Kamino, T. Ishitani, R. Urao : *Microsc., Microanal.*, **5**, 365 (1999).
- 2) T. Yaguchi, T. Kamino, M. Sasaki, G. Barbezat, R. Urao : *Microsc., Microanal.*, **6**, 218 (2000).
- 3) T. Yaguchi, H. Matsumoto, T. Kamino, T. Ishitani, R. Urao : *Microsc., Microanal.*, **7**, 287 (2001).

〔千葉工業大学 橋本和明〕