FG WAVE

FG beads® Magazine

2016
5
May

ユーザーボイス

信州大学　高木優二 先生

生殖細胞を用いたアニマルバイオテクノロジー

無料講習会定期開催のご紹介

新商品

クリックケミストリー用磁性ビーズ　アルキンビーズ発売

展示会情報

「The inside12-02」©Keisuke Kojima

ユーザーボイス　高木 優二　先生

信州大学大学院 総合理工学研究科
先端生命科学分野 動物生殖学教室

研究紹介　生殖細胞を用いたアニマルバイオテクノロジー

当研究室では、哺乳動物の生殖についての研究を行っています。元々は牛の卵子についての研究を行っていました。しかし、現在では特に、精子の元となる精原幹細胞（Spermatogonial Stem Cell）に注目し、多能性、多分化能を維持した細胞として、基礎研究、応用研究を進めています。精原幹細胞を幹細胞の能力を維持しながら自由に増やすことが出来れば、体外での精子形成、精原幹細胞の精細管への移植により生体での精子生産が可能となり、遺伝子改変など生殖細胞の人為操作がより容易になるものと思われます。また、受精卵、未受精卵子のガラス化保存、非凍結低温保存技術および精子の保存技術の開発も行っています。これらの研究成果により、動物生産、人の不妊治療応用を目指しています。

マウス胚性幹（ES）細胞や始原生殖（PGC）細胞由来のEG細胞、精原細胞由来のGS細胞のように多能性を維持し、さらに次世代の子孫が得られる細胞株は、家畜では得られていません。そこで我々は、家畜で出来ないかと考え、ブタに着目、精原細胞の単離の検討を開始しました。

しかし、マウスと同様な方法では上手く行かず、精原細胞由来の細胞ではなく、目的外の細胞ばかりが増加するという結果になりました。そこで、精原細胞を精製する必要が生じ、試行錯誤の末、ブタ精原細胞に特異的なモノクローナル抗体「PSS1」を作出することに成功しました。面白いことに、このPSS1抗体はマウスやラットといったブタ以外の精巣には反応せず、未分化な精原細胞の細胞質及び細胞膜を認識することが分かりました。そこで、このPSS1抗体とFACSを用いて幼若ブタ精巣より精原細胞の単離を試みたところ、見事に精製できました。しかし、FACSを使用した分離は時間もかかり、容易ではないため、より容易な磁気ビーズを使用した精製を検討することにしました。

FG beads®（Protein G）とPSS1抗体を用いたブタ精原細胞の高純度精製

ブタ精原細胞の単離は、まず、生後数日のブタから精巣を採取しました。精巣を細切りした後、メッシュにて精細管を取り出しました。精細管をパパイン酵素処理し、細胞懸濁液を得ました。再度メッシュを通し、ここにPSS1抗体を添加、反応させて精原細胞に抗体を標識しました。更にProtein G-FG beads®（Code. TAS8848N1173）を添加、精原細胞をビーズで標識し、15mL遠沈管用磁石スタンド（Code. TA4899N20）にて回収／洗浄操作を3回行いました。この結果、精製前は3～4%程度であったブタ精原細胞を90%以上の純度で回収することが出来ました。これによりブタ精原細胞の短時間、高収率での単離系が構築できました。

この検討の際、抗体を先にProtein G-FG beads®へ固定化してから細胞懸濁液に添加、精原細胞を回収する方法も検討しましたが、ビーズの凝集と再現性の点で前述の手法を採用することとしました。また、臓器から酵素処理にて採取した細胞懸濁液は、死滅した細胞からのDNA溶出によりドロドロ状態になります。そのためドロドロ状態を解消するためにDNaseを添加しますが,このドロドロ状態の度合いにより磁気分離後の純度が著しく変動します。再現性良く、しかも高純度で単離するためには、細胞の優しい取扱いとDNaseを通常よりも高濃度で頻繁に添加することが重要です。またEDTAはDNaseの阻害剤となりますので注意が必要です。

精製前の細胞懸濁液　磁気回収されなかった上清細胞　磁気回収された精原細胞

今後は、精製した精原細胞を培養して精巣に打ち込み精子が出来ることを確認します。ゲノム編集により精原細胞の遺伝子を改変し、ブタで臓器を生産（代替臓器）することに取り組んでみたいと思っています。また、既知のタンパク質である可能性はありますが、PSS1抗体についても抗原が何かまだ分かっていませんのでそのターゲット探索についても検討を進めていく予定です。

●研究について熱く語る高木先生

□経歴

高木 優二（たかぎ ゆうじ）　ytakagi@shinshu-u.ac.jp

1990年	東北大学大学院 農学研究科 博士後期2年中退
1990年～1999年	信州大学 農学部 助手
1992年	農学博士（東北大学）
1995年～1996年	米国農務省ベルツビル農業研究所 文部省在外研究員
1998年～2001年	山梨県酪農試験場客員研究員
1999年～	信州大学 農学部 准教授、現在に至る

無料講習会定期開催のご紹介 ―ビーズご購入の方向けに随時開催―

FG beads®をご購入頂いたお客様向けの講習会を随時開催しております。FG beads®へのモデル化合物（Methotrexate:MTX）の固定化およびアフィニティ精製を実施し、FG beads®を使いこなすための標準スキルが確認できます。このFG beads®講習会は、初めてアフィニティ精製を実施される研究者の方向けの短期集中トレーニングです。

2日間でしっかりマスターできます。

1日目
- FG beads®概要、講習会内容説明
- NHSビーズへのリガンド固定化
- 標的タンパク質のアフィニティ精製（前半）

2日目
- 標的タンパク質のアフィニティ精製（後半）
- 電気泳動　● 銀染色　● 結果の解析
- 質疑応答

●講習会の様子

◆今後の開催予定
第46回　2016年　5月26日（木）～27日（金）
第47回　2016年　8月25日（木）～26日（金）
第48回　2016年11月10日（木）～11日（金）

場所：多摩川精機株式会社　東京事務所
住所：東京都大田区新蒲田3丁目19番9号
※予定は変更となる可能性がございます。詳しくは弊社HPをご覧ください。
http://www.magneticnanoparticle.jp

新商品 クリックケミストリー用磁性ビーズ アルキンビーズ 発売

クリックケミストリー反応を使用することにより、アジド基をもつ化合物と容易に反応するアルキンビーズを発売しました。化合物が官能基を複数有する場合は、アジド基を導入した化合物を合成することにより部位選択的にアルキンビーズへ固定化することが可能です。

アルキン、アジドは多くの有機化合物に導入可能であり、アルキン構造またはアジド構造をもつリガンド（化合物、タンパク質など）を固定化し、細胞破砕液などの生体試料中から標的タンパク質をアフィニティ精製することができます。反応効率が非常に高く、アルキン化リガンド、アジド化リガンドが小量でも固定化が可能です。是非お試しください。

アジドビーズと併せてご検討ください!!

■使用例（抗がん剤 MTXの標的タンパク質の精製）

MTX（Methotrexate）をアルキン化あるいはアジド化し、アジドビーズまたはアルキンビーズへ固定化。

アジドビーズ

アルキンビーズ

HeLa細胞破砕液中から標的タンパク質であるDHFR（Dihydrofolate reductase）をアフィニティ精製。

標的タンパク質DHFRを高純度で精製できました

品　名	型　式	内容量	容量（濃度）	価　格
アジドビーズ	TAS8848N1160	5mg	0.25 mL × 1tube (20mg/mL)	70,000円
		10mg	0.25 mL × 2tubes (20mg/mL)	100,000円
アルキンビーズ	TAS8848N1161	20mg	0.25 mL × 4tubes (20mg/mL)	160,000円

お問い合わせは裏面記載の研究所、または各営業所まで

FG beads Immunoprecipitation Chemical biology

展示会情報 ～学会附設展示会出展／ポスター発表～

6月 第68回 日本細胞生物学会 第11回 日本ケミカルバイオロジー学会

●2016年6月15日（水）～6月17日（金）　●会場:京都テルサ

学会附設の展示会へ出展致します。FG beads®や磁石スタンドなど関連製品の展示を行います。また、当研究所の研究員がポスター発表を致します。是非ご来場ください。

●展示の様子

ポスター発表

広島大学大学院医歯薬保健学研究科 治療薬効学研究室との共同研究で実施しています。

レプチン抵抗性の分子メカニズム解析

レプチンは脂肪細胞から分泌され、主に脳（視床下部）に作用し、エネルギー代謝亢進、摂食抑制効果により抗肥満作用を惹起するホルモンである。多くの肥満患者は血中レプチン濃度が高いにも関わらず肥満が改善されないレプチン抵抗性の状態であり、肥満の原因として問題視されている。レプチン抵抗性のメカニズム解明が肥満の回避に繋がると考え、レプチン抵抗性の原因を明らかにすることを試みた。

我々は、Adenosineがレプチン抵抗性を誘発することを見出した。Adenosineはレプチン刺激によって認めるSTAT3のリン酸化を濃度依存的に抑制し、その結果リン酸化STAT3の核移行も低下させた。その後の検討で、Adenosineが直接細胞に取り込まれることでレプチン抵抗性を引き起こしている可能性が示唆された。そこで今回はAdenosineの結合タンパク質の探索をFG beads®を用いて行った。本発表では、上記解析結果を示すと共に、レプチン抵抗性のメカニズムについて考察する予定である。

FG beads®や磁石スタンド、超音波分散装置など展示予定です!

編集後記

ユーザーボイスでは生殖細胞を用いたアニマルバイオテクノロジーの研究をされている、信州大学の高木先生にお話を伺いました。FG beads®は細胞分離においても優れた性能を発揮します。既存の手法で満足な結果が得られていない皆様、是非FG beads®をお試しください。当社ではより良い情報をお届けするため、皆様のご意見･ご感想をお待ちしています。
ご意見･ご感想はこちらまで ▶ FGbeads@tamagawa-seiki.co.jp

Tamagawa 多摩川精機株式会社

【技術的なお問い合わせ】
多摩川精機株式会社　バイオトロニックス研究所
〒395-8515 長野県飯田市大休1879番地
FGbeads@tamagawa-seiki.co.jp
TEL（0265）21-0501（平日9:00~17:00）
FAX（0265）21-1896

【ご注文･販売に関するお問い合わせ】
多摩川精機販売株式会社
バイオ営業部　TEL（0265）21-0501　FAX（0265）21-1896
北関東営業所　TEL（048）833-0733　FAX（048）833-0766
福 岡 営 業 所　TEL（092）437-5566　FAX（092）437-5533

http://www.tamagawa-seiki.co.jp
http://www.magneticnanoparticle.jp

販売店

●2016年5月1日発行　●編集･発行／多摩川精機株式会社　バイオトロニックス研究所