

ドージンニュース

DOJIN NEWS

CONTENTS

Review

“スマートバイオマテリアル”としての超分子ヒドロゲル
松本真治・濱地 格

Topics on Chemistry

モノクローナル抗体の迅速・簡便なペルオキシダーゼ標識
広田次郎・清水真也
新規蛍光プローブを用いた生体内 H_2O_2 のイメージング
園田晋也

2006

ISSN 0385-1516

No. 118

目次

Review

- “スマートバイオマテリアル”としての超分子ヒドロゲル
 京都大学大学院 松本 真治、瀨地 格 1

Topics on Chemistry

- モノクローナル抗体の迅速・簡便なペルオキシダーゼ標識
 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構
 動物衛生研究所 広田 次郎、清水 真也 18
- 新規蛍光プローブを用いた生体内 H₂O₂ のイメージング
 同仁化学研究所 園田 晋也 22

Commercial

新製品案内

- 生菌選択的蛍光染色試薬：CTC 25

Q&A

- 生菌選択的蛍光染色試薬：CTC 23

お知らせ

- IgG 精製キット 17
- 九州大学・同仁化学組織対応型連携 21
- 学会展示 22
- 訂正 24
- 連載休載 22
- 販売中止品および包装容量削減品のご案内 25
- 第 25 版総合カタログ発行 26

製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

IgG Purification Kit - A	17
IgG Purification Kit - G	17
Peroxidase Labeling Kit - NH ₂	20
Peroxidase Labeling Kit - SH	20
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH ₂	20
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - SH	20
Biotin Labeling Kit - NH ₂	20
Biotin Labeling Kit - SH	20
Fluorescein Labeling Kit - NH ₂	20
HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH ₂	21
HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH ₂	21
Allophycocyanin Labeling Kit - NH ₂	21
B-Phycoerythrin Labeling Kit - NH ₂	21
R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH ₂	21
Allophycocyanin Labeling Kit - SH	21
B-Phycoerythrin Labeling Kit - SH	21
R-Phycoerythrin Labeling Kit - SH	21
CTC	25



空気が澄んだ日は西の方角に長崎の普賢岳が見えます。
 (同仁化学研究所の屋上から撮影した普賢岳)

“スマートバイオマテリアル”としての超分子ヒドロゲル The Supramolecular Hydrogel toward “The Smart Biomaterials”



松本 真治
(Shinji Matsumoto)
京都大学大学院
工学研究科



濱地 格
(Itaru Hamachi)
京都大学大学院
工学研究科

[Summary]

The high dense three-dimensional reticulation structures by cross-linking of the polymers provide the nano/micro cavities for encapsulating a large amount of water molecules so that the hydrogels are formed. The hydrogel, in appearance, seems solid-like, while the inside environment remains the high humidity and the fluidity. Thus, we called it as semi-wet materials that show intermediate properties between aqueous solution and dry solid. Recently, a new kind of hydrogels, “the supramolecular hydrogel”, that is distinguished from the conventional polymer gels, is created and attracts much attention. It is constructed with the noncovalently self-assembled gel fibers consisting of monomer molecules. The potential of excellent properties as “the smart biomaterials” are being shown by several researchers. Moreover, it is rationally possible to control the functions and the structures of the gel by designing monomer molecules, so that it is expected to develop the precisely controlled functional hydrogel. Therefore, the supramolecular hydrogel is considered to be “semi-wet materials in next generation”. This review describes in a brief way “*What is the supramolecular hydrogel?*” and then outlines “*Development, Function and Application of supramolecular hydrogel*” using our recent results.

キーワード：超分子ヒドロゲル、超分子ポリマー、人工糖脂質、固相法、外部刺激応答、プロテインチップ、スマートバイオマテリアル

1. はじめに

長鎖高分子が多点で架橋し、高密度な三次元網目構造を形成することで、ナノ・マイクロサイズの空間が構築される。この空孔内に多量の水分子が包接されるとヒドロゲルが形成される。外見は固体のような有形物でありながら、ゲル内の環境は水溶液中を髣髴させる高い湿潤性と流動性を示すため、我々はセミウェットマテリアル（ウェットな液体とドライな固体の中間物性を意味する）と呼んでいる。最も馴染み深いヒドロゲルは、食品の寒天やソフトコンタクトレンズ、紙おむつ、化粧品、芳香剤といった生活日用品などであろう。他にも乾燥地農業やクロマトグラフィーなどの分析化学でも応用されており、分野を問わず現代社会において必要不可欠な存在となっている¹⁾。最近では、熱、電気、光、pH、分子などの外界からの刺激を感知してゲルが自律的に機能する“スマートゲル”²⁾の開発も盛んであり、具体的にpH応答性体積相転移現象を利用したゲルバルブ^{2f, 2g)}や薬物送達システム(DDS)用マトリックス^{2h)}としての利用も検討されている。特に、医療や医薬分野での期待は非常に大きく、DDS以外にも人工皮膚などの再生医学への応用³⁾や、ゲルの三次元環境を利用した三次元細胞培養⁴⁾などが注目されている。

このようなゲルのほとんどは、アガロースゲルなどの天然高分子ゲルや、アクリルアミドゲルのような高分子鎖間を化学架橋した合成高分子ゲルである。したがって、ゲルに機能を付与する場合、高分子鎖に化学修飾するか、機能性分子を組み入れた共重合

反応を行う必要があり、ゲルの調製の煩雑さや未反応物質の残存、特に機能性基の導入率の限界や精密分子設計が難しいといった欠点がある。これらの影響は、生体材料として応用する際の生体適合性や生分解性、または外部刺激に対する応答性の低さへと繋がる可能性が指摘されている。最近、高分子鎖間をコイルド・コイルタンパク質やカルモジュリンで架橋したバイオ・ポリマーハイブリッドゲル⁵⁾が報告され、タンパク質のフォールディング・アンフォールディングを利用した可逆的な温度応答性体積相転移ゲルやゲルゾル転移ゲルの創製が可能となりつつある。しかしながら、生体材料としての適用が十分に可能になったとは言い難い。“スマートバイオマテリアル”を指向したゲルサイエンスの新展開が望まれている⁶⁾。

近年、これまでの「ゲル=高分子ゲル」という固定観念と異なる“超分子ヒドロゲル”という全く新しい種類のヒドロゲルが創出され注目されている⁷⁾。超分子ヒドロゲルは、モノマー分子が自己集合した“超分子ポリマー”という非共有結合性ゲルファイバーから構築されている点を最大の特徴としている。その機能や物性に関しては未知の部分も多いが、幾人かの研究者によりその特性が解き明かされつつあり、“スマートバイオマテリアル”として優れた機能を発揮する可能性が示されてきている⁸⁾。また、理論的にはモノマー分子の設計次第で巨視的なゲルの構造・機能制御が可能であり、精密に機能制御されたゲルの開発も期待されている。つまり、超分子ヒドロゲルは未知なる可能性を秘めた“次世代セミ

ウェットマテリアル”と考えられる。本稿では、先ず“超分子ヒドロゲルとは何か”ということを中心に述べ、次に具体的な超分子ヒドロゲルの“開発、機能、応用”について我々の研究を例に挙げ概説する。本稿を通じて、超分子ヒドロゲルの意義とそのスマートバイオマテリアルとしての可能性について理解して頂ければ幸いである。

2. 超分子ヒドロゲルの分子構造特性

2.1 超分子ポリマーから超分子ゲルへ

1978年、J-M. Lehnは分子の自己組織化の理念を包括的に組み込んだ“超分子化学”という新しい概念を提唱し、分子間相互作用や分子集合体の「弱い非共有結合性相互作用を如何にして制御するか」ということを説いた⁹⁾。この研究では、当初、1:1分子組成(ホスト分子:ゲスト分子)間の相互作用について検討されていたが、次第に高次組成における分子複合体の研究へと発展した。例えば、E.W. MeijerやJ. Rebek, Jr.らにより報告された“超分子ポリマー”もその一例である。E.W. Meijerらは、2-ウレイド-4-ピリミドン骨格が四つの分子間水素結合により強固に二量化(1:1複合体; $K_a > 10^6 \text{ M}^{-1}$)することに着眼し、この骨格を両末端に導入した化合物を設計したところ、1:1:1:1...即ち(1:1)_n複合形成した高い粘性を示すポリマー様分子集合体を見出した(Fig. 1a)¹⁰⁾。一方、J. Rebek, Jr.らは、水素結合能の強いウレア骨格を有するテトラウレア型カリックス[4]アレーン分子(ホスト分子)がゲスト分子とカプセル状の2:1複合形成することに着眼した。彼らは、このホスト分子間を共有結合で連結させたところ、ゲスト分子と2:1:2:1:2...即ち(2:1)_n複合化した線状ポリマーを形成し、機械強度に優れた物性を示すことを見出した(Fig. 1b)¹¹⁾。これらの結果は、弱い非共有結合性相互作用の“精密な配向制御”と“多点認識”の協同効果で、分子を高次に自己組織化させ、ポリマー様の分子集合体(“超分子ポリマー”)構築が可能であることを示した。

それでは、この“超分子ポリマー”の構築が、どのようにして巨視的な高分子物性へと反映されるのだろうか? 一次元に伸張した超分子ポリマーは、分子構造と溶媒に応じた二次構造(テープ構造やリボン構造、ロッド構造、シリンダー構造など)を形成し、さらに三次元に絡み合った高次構造を形成することで先ほど述べたような巨視的な物性を示す。もし超分子ポリマーの凝集性が強ければ網目構造は潰れ、不定形な集合体を形成し沈殿してしまう。また逆に、溶媒との親和性が高ければ超分子ポリマー間の絡み合いは少なくなり粘性の高い溶液状態となる。その中間の場合、すなわち溶媒が網目構造の凝集を防ぎ、逆に網目構造は溶媒の流出を防ぐ場合、高分子ゲルのような物性を示しこれが“超分子ゲル”¹²⁾となる。

当初は、超分子ゲルの研究は有機溶媒中での研究が盛んに行われ、設計が容易な水素結合を主な集合体形成因子とした様々な有機溶媒ゲル“超分子オルガノゲル”¹³⁾が開発された。一方、水をゲル化させる“超分子ヒドロゲル”の開発は水中での水素結合が設計通りには機能しないことが多いため非常に難しく、現在知られている超分子ヒドロゲルのほとんどは、オルガノゲルの開発時にたまたま水をゲル化させたという“偶然の発見”によるものが

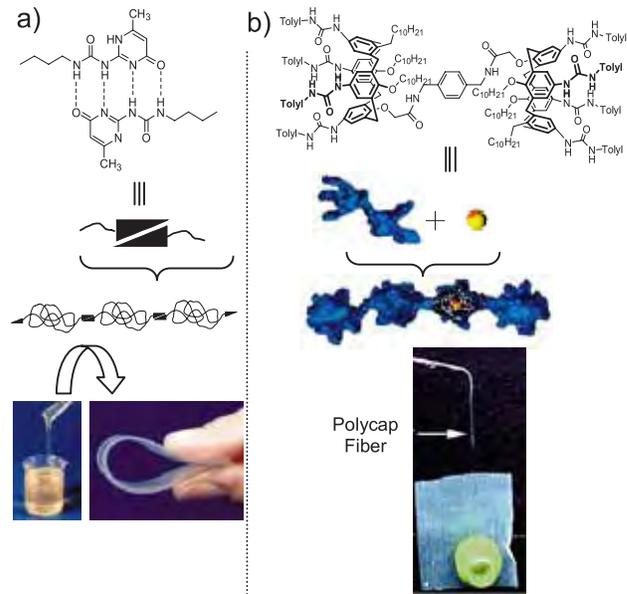


Fig. 1 Illustration of supramolecular polymers; a) Poly(ethylene/butylenes) with OH end groups (left), and poly(ethylene/butylenes) modified with 2-ureido-4-pyrimidone units (right). b) Dimeric assembly of compound comprising covalently linked tetraurea calixarenes leads to form reversible polymers “Polycap”.

多かった。オルガノゲル開発では、一つの化合物に対して多くの有機溶媒をスクリーニングできるのに対し、ヒドロゲル開発では、水という一つの溶媒に対して化合物をスクリーニングしなければいけないという確率論の問題も要因としてあるが、水中での分子自己組織化の基礎的な知見不足が一番の要因であった。未だ系統的な分子設計指針が確立されていないが、現在では、ヒドロゲル化剤ライブラリーが増えつつあり、数種類に類型化することができるようになってきた。

2.2 様々な超分子ヒドロゲル化剤

本項では、これまでに報告されている超分子ヒドロゲル化剤を代表的な分子骨格で類型化し、それぞれの骨格での分子設計戦略についてまとめた。

・両親媒性低分子骨格

T. Kunitakeらは、人工脂質分子が水中で安定な人工二分子膜球状体(リポソーム)を形成することを見出し、水中で分子を自己組織化させる上で両親媒性骨格を基本とした分子設計指針が有効であることを示した。さらに各分子モジュールをスクリーニングし、分子構造と分子集合形態の相関について検討したところ、各分子モジュールの自由度・配向性に依存した分子集合形態(ロッド構造やシート構造など)が確認された¹⁴⁾。これらの成果は、両親媒性骨格を用いた分子設計では、分子全体の疎水・親水性バランスだけでなく、水中で強く働く疎水性相互作用を制御することや、親水部位の発散を抑制することが、高次の分子集合体形成に必要な因子であることを意味した。実際、超分子ヒドロゲル化剤の大半は、この両親媒性骨格を基本骨格としている。また自由度の抑制に関しては、アミド部位やウレア部位の水素結合基を適所

に導入した分子設計が施されている。具体的な分子骨格の例を挙げると、K.Hanabusaら(2-1)、N.Kimizukaら(2-2)の四級アンモニウム塩を親水部位、アルキル長鎖を疎水部位とした界面活性剤型ゲル¹⁵⁾や、二つの界面活性剤型分子の親水モジュール間を連結した双界面活性剤型ゲル¹⁶⁾がF.M.Mengerら(2-3)、I.Hucら(2-4)、A.D.Hamiltonら(2-5,6)により報告されている(Fig. 2)。他にも、親水部位を分子構造の両末端に有する左右対称骨格の双頭型ゲル¹⁷⁾が、T.Shimizuら(2-7)、A.Blumeら(2-8)により報告されている。これらの骨格は、非常にシンプルで且つ規定された分子モジュールから形成されているため合成が容易であること、さらに簡単に分子構造のチューニングを行える点で魅力的である。

・生体内成分をモチーフとした骨格

一方、生体内成分を模倣した分子骨格も報告されている。特にタンパク質の構造安定化因子であるペプチドの二次構造骨格をモチーフとした超分子ヒドロゲルの開発が注目されている。その利点としては、 α ヘリックス構造や β シート構造といった規定された分子設計が可能であること、特に β シート構造に関しては、分子間配向の揃った会合形成が期待されること、合成が容易であること、生分解性がよく、また生体適合性も高いことなどが挙げられる。

この分子構造には、両親媒性骨格であることに付け加え、分子

コンフォメーションも重要な因子となっていることが、D.A.Tirrellらのトリブロック型のコイルド・コイルゲル(2-9)¹⁸⁾やT.J.Demingらのジブロック型のペプチドゲル(2-10, 11, 12)¹⁹⁾の研究で実証された(Fig. 3)。他にも、D.J.Pochanらの β ヘアピン型ゲル(2-13, 14)²⁰⁾、A.Aggiらの β シート型ゲル(2-15)²¹⁾などもある。また、最近ではB.Xuらにより、N末端をFmoc保護したD-Ala-D-Alaジペプチド(2-16)でもヒドロゲルを形成することが報告された²²⁾。以上のように、生体内の精密分子間相互作用制御システムの教えを模倣することは、水中での分子会合を制御する上で最も有効な手法の一つであろう。

・半人工型低分子骨格

生体内で“正確な分子間配向”と“多点認識”を実現しているDNA塩基やペプチド、及び糖鎖をモジュール組み替え型骨格と融合させたハイブリッド型分子も開発されている。例えば、T.Shimizuら(2-17)、B.H.KimらのDNA脂質型ゲル(2-18)²³⁾、またS.I.Stuppらのペプチド脂質型ゲル(2-19)²⁴⁾、T.Shimizuら(2-20, 21)、S.Shinkaiら(2-22)、S.Bhattacharyaら(2-23)、I.Hamachiらの糖脂質型ゲル(2-24)²⁵⁾などがある(Fig. 4)。つまり、との特徴を組み合わせた分子骨格であり、スマートバイオマテリアルを指向した超分子ヒドロゲルを開発する上で、最も有効な設計戦略であると思われる。

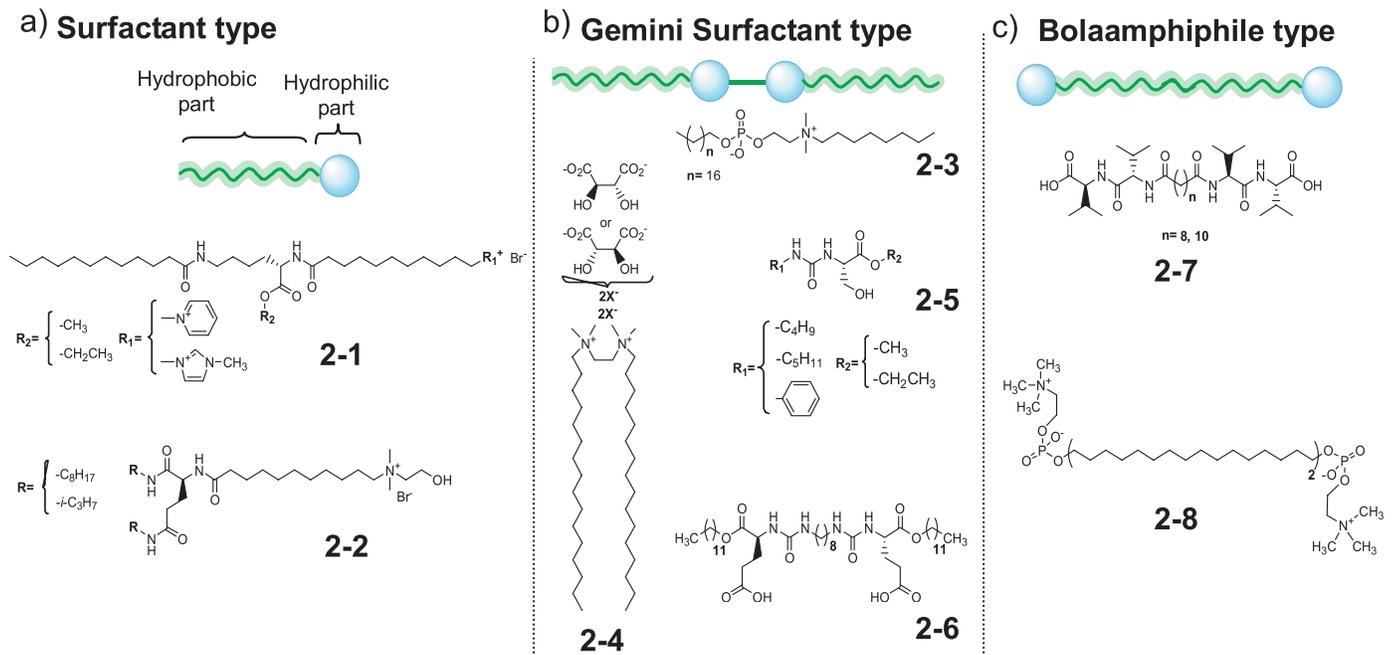


Fig. 2 a) Surfactant based hydrogelators. b) Gemini surfactant based hydrogelators. c) Bolaamphiphile based hydrogelators.

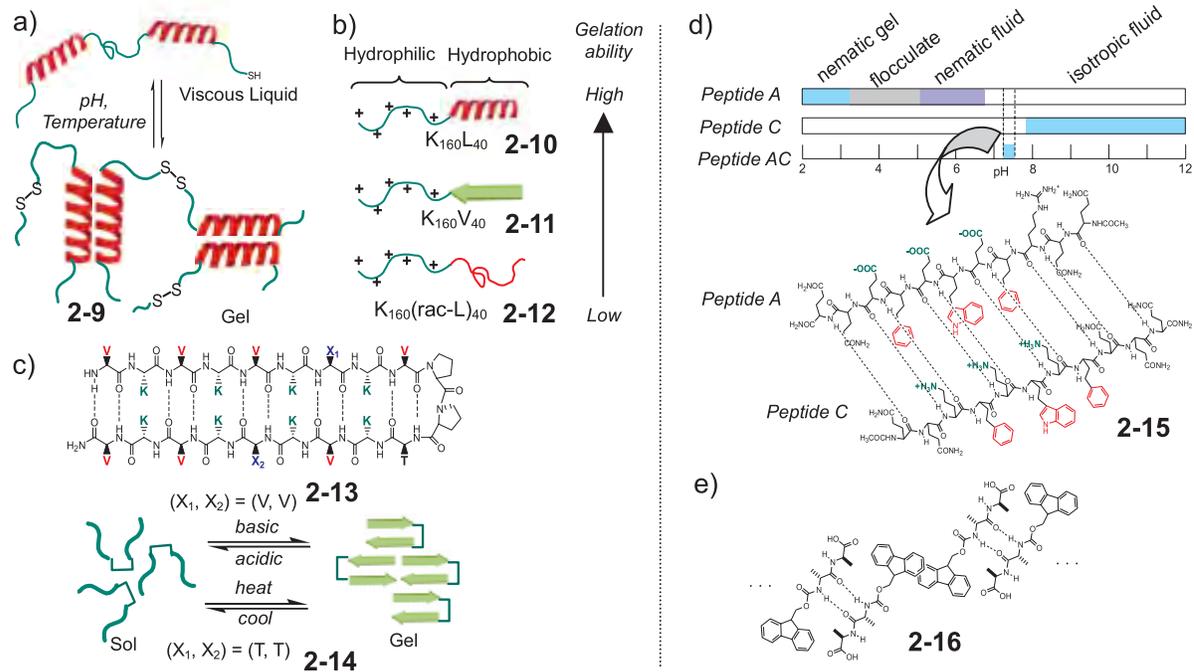


Fig. 3 a) Illustration of hydrogel from self-assembling the coiled-coil proteins consisting of 230 amino acids, 84 of which make up the helix repeat and 90 of which make up the alanyl-glycine-rich repeat. b) Hydrogel from self-assembling diblock copolypeptide amphiphiles. c) β -hairpin hydrogelators. d) Phase behavior of aqueous solutions of peptide A and C as a function of pH. When equal quantities of A and C solution at pH 7.3 were mixed, hydrogel was obtained. e) The structure and proposed self-assembly of Fmoc-D-Ala-D-Ala hydrogelator.

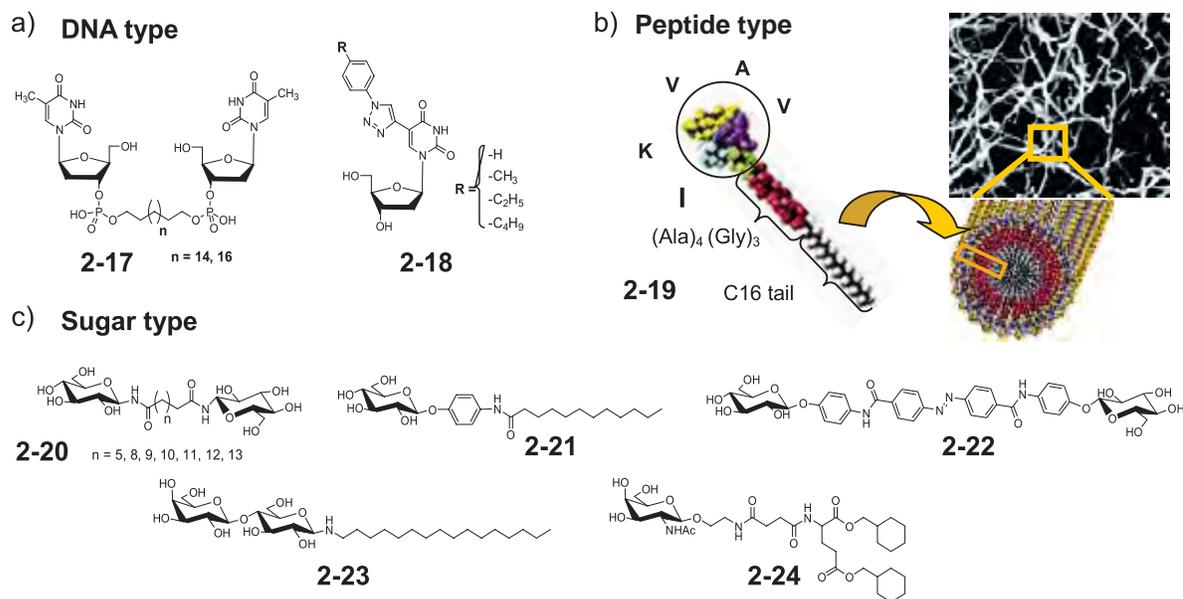


Fig. 4 a) DNA-lipid type hydrogelators. b) Peptide-lipid type hydrogelators. c) Glycolipid type hydrogelators.

3. ケミカルライブラリーを用いた糖脂質型超分子ヒドロゲルの開発

本項では、我々が開発した糖脂質型超分子ヒドロゲル（前項の骨格）の“開発”について概説する。

3.1 固相法を用いたゲル化剤スクリーニング

超分子ヒドロゲル化剤の合理的な分子設計指針が未だ確立していない現状において、我々はケミカルライブラリーからスクリーニング（検索）する戦略をとることにした。そのために糖脂質型分子を四つのモジュール（糖、スペーサー、コネクター、脂質テイル）に分割し、コンビナトリアル的に合成する手法を考案した。勿論、膨大な化合物ライブラリーが必要と予想され、一人の研究者が短期間で構築可能な簡便な合成手法が必要と考えられた。我々は、ペプチド合成などで使用される固相法を利用して、糖、スペーサー、コネクター、脂質テイルと順につなぎ、最後に生成物を樹脂から切り出すという合成方法を開発した。この手法を適用することで、一度に複数の化合物の合成が可能となり、さらに洗浄操作の簡便化、精製過程の簡略化ができると期待した。この固相法を用いた各分子モジュールのコンビナトリアルスクリーニング手法を、我々はSPLS法（Solid Phase (glycol) Lipid Synthesis）と呼んだ。

Fig. 5にSPLS-1（第一世代）とSPLS-2（第二世代）のスキームを示した²⁶⁾。両手法とも6、7ステップの反応をあわせた全収率30～70%で糖脂質型分子の合成が達成された。このことは、各反応ステップが80%～100%の高収率で進行していることになる。しかしながら、幾つか改良すべき点も見つかった。例えば、SPLS-1では、樹脂上にスペーサー部位を連結させるため、樹脂からの切り出し時にその切断部位（ヒドラジドやカルボン酸骨格）が分子構造に残る。また、SPLS-2では糖の水酸基をアセタール保護する必要があり、その切り出し条件の厳しさのためにグリコシル結合やエステル結合の分解という副反応が問題であった。これらの点を改善した方法がSPLS-3（第三世代）である^{25e)}。まず、トリチル活性基が修飾されたポリスチレン樹脂と糖のアジドエチル体をピリジン中で反応させ、糖の水酸基を直接樹脂に連結させる。この反応は糖種に依存しないうえに切断は温和な条件で可能なため、糖種のスクリーニングに柔軟に対応できるようになった。次にStaudinger法により末端アジド基を還元し、その末端一級アミンを酸無水物（スペーサー部位）と反応させる。続けてアミノ酸（コネクター部位）と縮合させ、最後にアルコール（脂質テイル部位）と縮合させた。樹脂からの化合物の切り出しは、弱酸性下で行った。この方法により、種々の官能基を含む糖脂質型分子を得ることが可能となった。

SPLS法を用いた糖脂質型分子のライブラリー合成の最終段階で固相上から化合物1を切り出し、カラムクロマトグラフィーで精製しようとした際、展開溶媒がゲル化しこの化合物がオルガノゲル化剤であることが分かった。このゲル化剤は、ヘキサン、酢酸エチル、ベンゼン、トルエン、アセトニトリルなどをゲル化し、水に対しては不溶であった。他にも数種類のオルガノゲル化剤が見つかり、中でもGalNAc（2位の水酸基がアセチルアミドに変換されたガラクトース誘導体）やGlcNAc（2位の水酸基がアセチルアミドに変換されたグルコース誘導体）を有する分子骨格がもっ

とも多くの有機溶媒をゲル化することに気が付いた。両者ともアミド部位を有していたことから、アミドを介した糖鎖間水素結合が分子配向制御に関与している可能性が示唆された。また、この化合物ライブラリーの中で、*n*-ヘキシルを脂質テイル部位に有する化合物2が唯一水をゲル化するヒドロゲル化剤であることを偶然発見した。このヒドロゲル化剤は、散乱の大きい白濁したゲルを形成し、透明で安定な理想的なヒドロゲルではなかった。そこで再度、この化合物をリード化合物として、脂質テイル、コネクター、リンカー部位の最適化をライブラリーからのスクリーニングによって行った（Fig. 6）。まず、脂質テイル部位をスクリーニングした結果、*n*-ヘキシルの他に、環状骨格を含むメチルシクロヘキシル、メチルシクロペンチルの二種類が透明で安定なヒドロゲルを形成した。一方、 π - π スタッキングが可能なベンゼン骨格では、同じ炭素数の環構造であったが予想に反してゲル化しなかった。次に疎水部位をメチルシクロヘキシル骨格に固定化し、コネクター部位をスクリーニングした。予想に反しコネクター部位はゲル化にさほど影響をしないことが分かった。一方スペーサー部位のスクリーニングでは、面白いことにメチレン鎖長の偶奇効果が確認できた。メチレン鎖長が偶数（ $n=2, 4$ ）の時はヒドロゲルを形成し、奇数（ $n=1, 3$ ）の時はヒドロゲルを形成しない結果となった。これは、スペーサーの両末端のアミドの配向性の違いに基づくのではないかと考察した。この最適化スクリーニングの結果、透明で安定なヒドロゲルを形成するヒドロゲル化剤GalNAc-suc-glu（*O*-methyl-cyc-hexyl）₂（化合物3）を発見した。特筆すべき点として、これは、臨界ゲル化濃度が0.1wt%と極めて低濃度でゲル化（ゲル化剤1gで水1リットルをゲル化できることを意味）することである。また、ゲル化剤1分子で換算すると、ゲル化剤1分子あたり、38,000個もの水分子を固定化・包接していると思われた。このゲル化剤以外にも、計5種類のヒドロゲル化剤が見つかった。中でもGalNAc-suc-glu（*O*-methyl-cyc-pentyl）₂は、先ほどのゲル化剤よりもゲル化能が少し劣るものの、極めて透明度の高い安定なヒドロゲルを形成した。

以上のように、我々は、固相法（SPLS法）を用いた独自のヒドロゲル化剤開発手法を確立させ、実際に糖脂質型分子ライブラリーからのスクリーニングを行った結果、透明でゲル化能に優れた超分子ヒドロゲル化剤の開発に成功した。構造と物性の相関について予想通りのところもあれば予想に反する結果もあり、超分子ヒドロゲルのような複数の相互作用が複雑に絡み合う物質・材料の設計において、ケミカルライブラリーの構築とそこからのスクリーニングという方法論の有効性を実感することとなった。

3.2 構造解析

上記で開発した糖脂質型超分子ヒドロゲルの分子集合形態（モルフォロジー）について顕微鏡観察を行った。透過型電子顕微鏡（TEM）観察では、直径20 nm～100 nmの発達した繊維状集合体が高密度に絡み合っている様子が観察された（Fig. 7a）。走査型電子顕微鏡（SEM）観察からも同様の繊維状集合体が観察され、その集合体同士の絡み合いは三次元網目状に広がっていることが分かった。また、ゲルを乾燥させることなくそのまま観察した場合（微分干渉観察）でも繊維状集合体が鮮明に観察された。すな

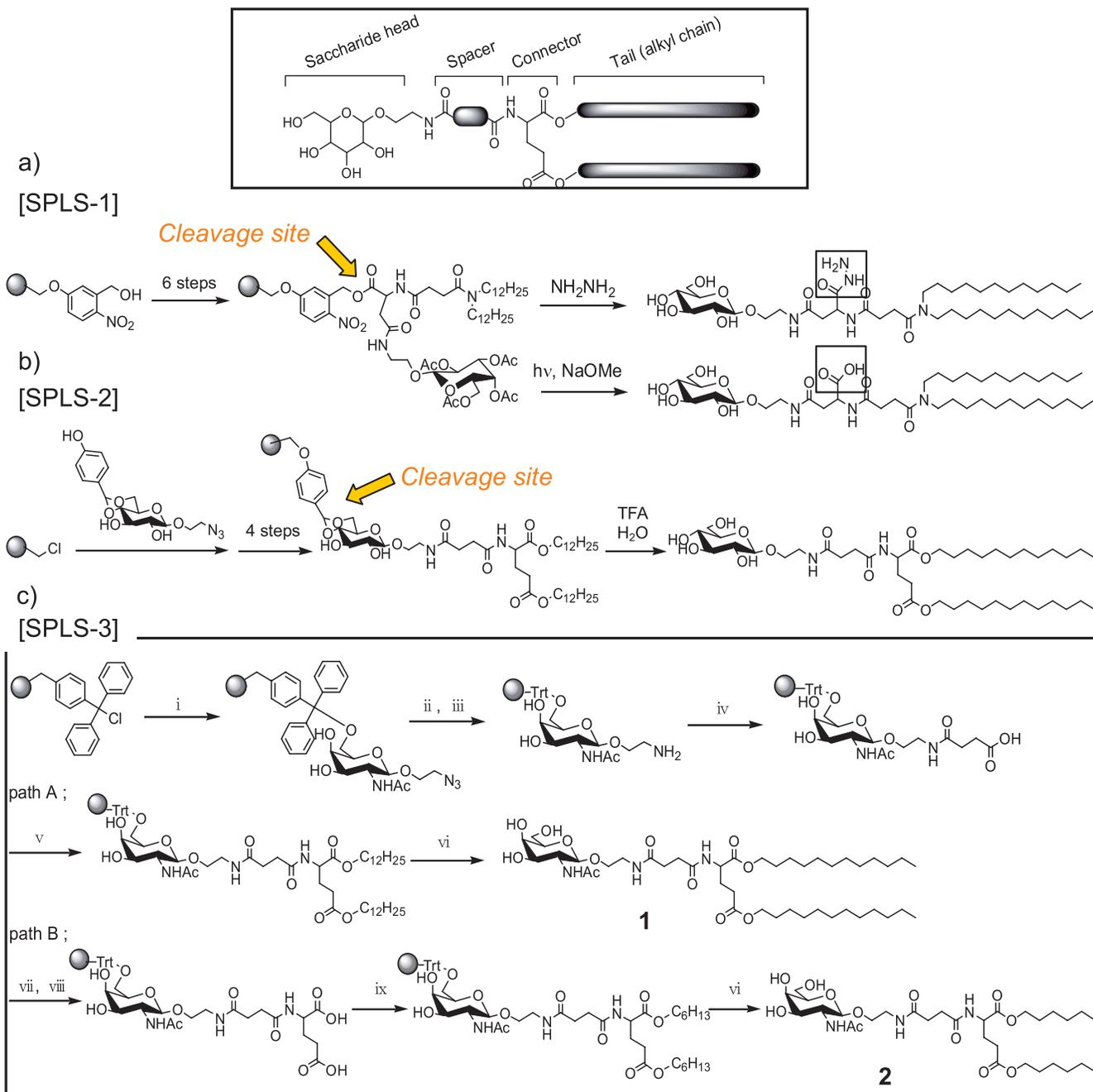


Fig. 5 a) SPLS-1 scheme, b) SPLS-2 scheme and c) SPLS-3 scheme.) 2-azidoethyl B-N-acetyl-galactosamine, dry pyridine;) PPh₃, dry CH₂Cl₂;) 10% H₂O/THF;) succinic anhydride, DIEA, DMF;) H-glu(O-dodecyl)₂, DPPA, DIEA, DMF;) 2% TFA/CH₂Cl₂;) H-glu(O-allyl)₂, DPPA, DIEA, DMF;) Pd (OAc)₂, PPh₃, morpholine, THF;) n-hexanol, HOBt, DMAP, DIC, DMF.

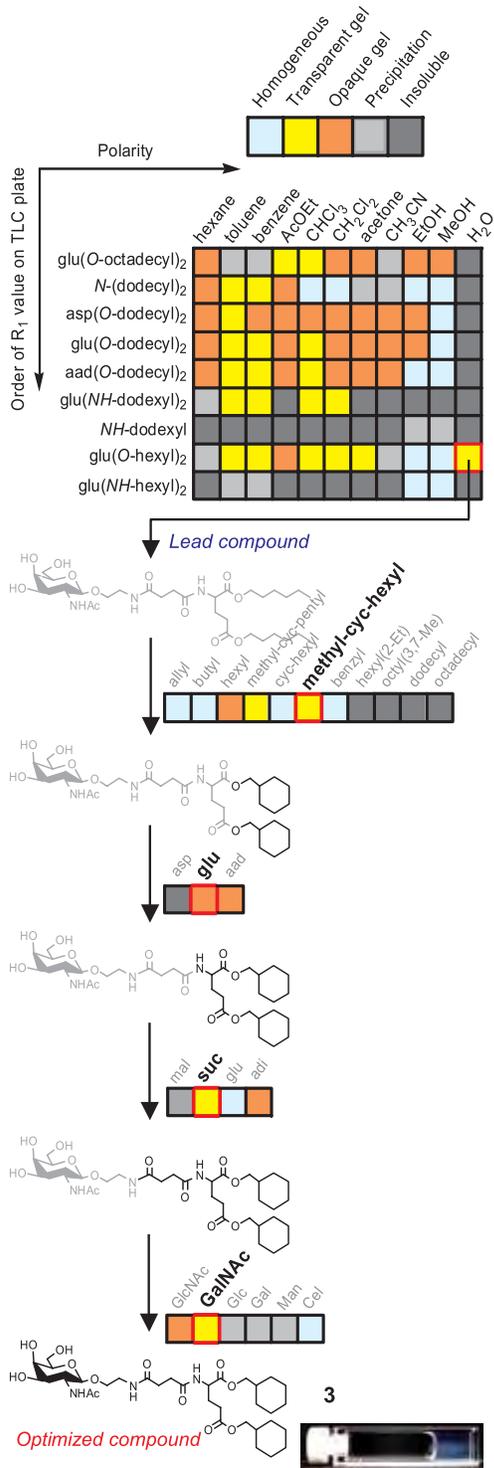


Fig. 6 Gelation test of GalNAc-suc-tail in various organic solvents for screening the tail module (the order of R_f value on silica gel TLC plate roughly indicates to the order of the molecular polarity of glycolipids, [glycolipid] = 25 mM). And the optimized screening of hydrogelator to obtain the stable hydrogel by using GalNAc-suc-glu(O-hexyl)₂ as a lead compound.

わち、ゲル化剤分子は、水中で自己組織的に繊維状集合体を形成し、高分子ゲルファイバーでよく見られるような三次元網目構造を構築していることが明らかとなった。

そこで次に、この繊維状集合体（ゲルファイバー）の構造やその構造形成に必要な因子について検証した。まず、粉末X線回折（XRD）測定から、凍結乾燥させたヒドロゲルの基本構造周期について検討を行った。その結果、小角側（38 Å）と広角側（4 Å）に特徴的な回折ピークが検出された（Fig. 7b）。38 Åは、ゲル化剤分子長の二倍より少し小さい値を示し、一方、4 Åは、メチルシクロヘキシルの分子間距離と一致した。このことから、コネクター部位が少しねじれた状態、あるいは、メチルシクロヘキシル環部位が交互に重なった状態の二分子層形成が予想された。次に、FT-IR（ATR）測定からスペーサー部位のアミド分子間水素結合について検討を行った。アミドカルボニル伸縮振動（C=O（amide））に着目したところ、ヒドロゲル状態では、1615 cm⁻¹に検出され、一方、有機溶媒（CDCl₃ / CD₃OD）に溶解させ、ゲル化剤を単分散させた状態では1646 cm⁻¹に検出された（Fig. 7c）。ゲル形成時のアミドカルボニル伸縮振動がゲル化剤単分散状態と比べて約30 cm⁻¹も低波数（低エネルギー）シフトを示したことは、ゲル化剤分子間で強い水素結合を形成していることを意味した。その水素結合能の強さは、驚くことに固体状態（1622 cm⁻¹）よりも強いことが分かった。あたかもタンパク質構造中のβシート様に発達したアミド間水素結合ネットワーク形成がゲルファイバー形成に寄与していると推察された。

この超分子ヒドロゲルを過飽和になるような高濃度（2wt%）で調製し、数日静置させていたところ、ゲル結晶転移が起こった。そこで、その中から単結晶を探し出しX線構造解析を行い、詳細な分子集合形態について検討を進めた。その結果、糖部位はバルク界面側に配向し、一方、脂質テイル部位は内側に配向した二分子膜様集合体の形成が確認された（Fig. 7d）。二つのメチルシクロヘキシル環から構成される疎水テイル部のうち一つは分子間に入れ子状に交互に重なり合い、もう一つは、同一層面で少し傾いた状態のまま分子間スタッキングしていた。これらの結果は、先ほど述べたXRD測定での推察結果と一致した。また、スペーサー部位では、二組の発達した水素結合ネットワーク形成も確認された。その向きは互いに反対向きであり、タンパク質中の逆平行βシートを髣髴させるものであった。これは、ヒドロゲル状態のFT-IR測定での考察と矛盾しない。糖部位は、水分子を介して糖分子間で結合し、さらに一組のアミド分子間水素結合も確認された。以上より、糖脂質型超分子ヒドロゲルの形成で重要な因子は、糖と疎水部位の親水/疎水性バランスだけでなく、疎水部位のvander Waals パッキング、さらに糖部位のアミド分子間水素結合、そして、スペーサー部位の逆βシート様の発達したアミド分子間水素結合ネットワークの形成であり、これらの協同的な多点分子間相互作用が複雑に絡み合っていることが検証された。このことが次元方向への分子配向を可能とし、さらに発達したゲルファイバーへの成長を促したと考えるのが妥当であろう。また、三次元的な構造形態をヒドロゲルの小角X線散乱（SAXS）解析で調べた。それによると、内径3.5 ~ 4 nmのコア・シェルシリンドラー型モデルと一致する結果を得た。すなわち、二分子膜様構

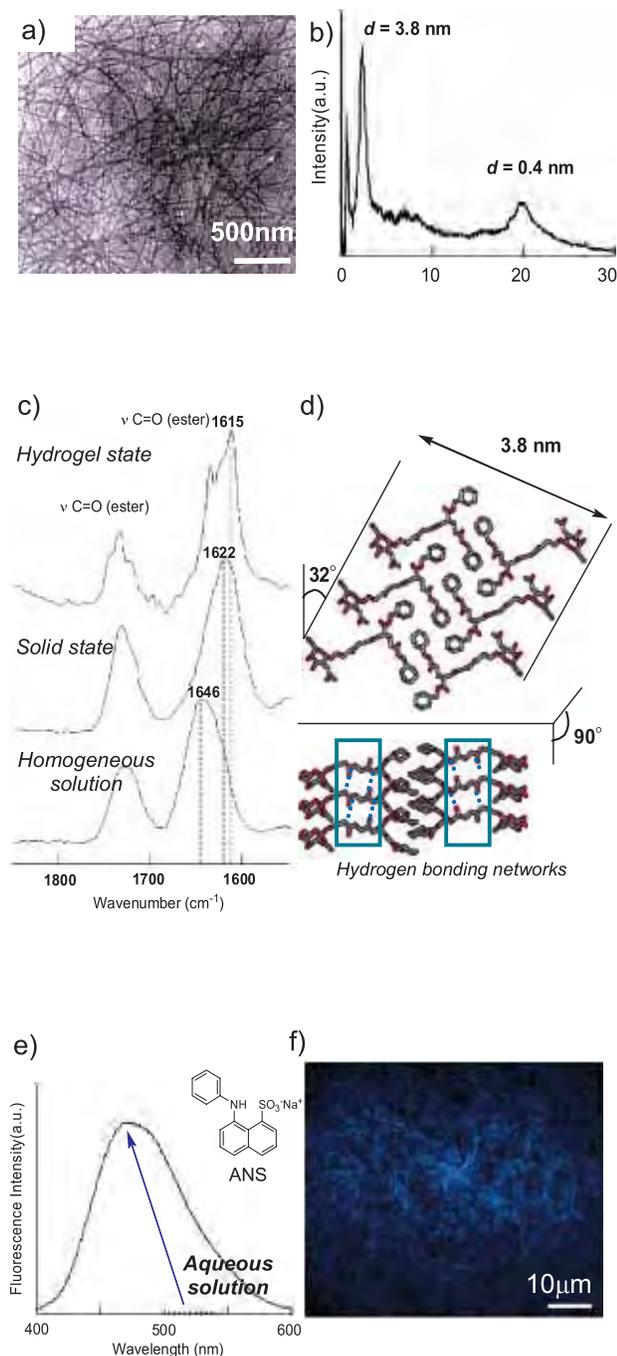


Fig. 7 Structural and physicochemical analyses of the supramolecular hydrogel. a) A TEM image of a hydrogel **3** without staining. b) Powder X-ray diffraction spectrum of the freeze-dried hydrogel **3**. c) FT-IR (ATR) spectra of **3**. d) Crystal structure analysis of the molecular packing of **3** prepared from a hydrogel. e) Fluorescence spectra of hydrogel and solution containing environmental fluorescent probes ANS (excitation wavelength = 380 nm). f) A confocal laser scanning micrograph of a hydrogel containing ANS with a UV laser (351 nm).

造の三次元形態は、ミセルシリンダー状であると推定された。

このミセルシリンダー状のゲルファイバー内に、疎水部位の集積により構築された構造があるとする、ゲルファイバーに包接された自由水とは異なる疎水ミクロ環境の存在が予想される。そこで、極性溶媒中では弱い蛍光を示し、非極性溶媒中では波長の短波長シフトとともに強い蛍光を示すことが知られている環境応答性色素 (ANS) を用いた蛍光測定を行った。ゲル中に可溶化した ANS 蛍光は、溶液中と比較し約 50 nm も短波長シフトし、さらに蛍光強度の 100 倍近い増加が観測された (Fig. 7e)。これは、糖脂質型ヒドロゲル内での疎水ミクロ環境の存在を意味する。実際に ANS で染色したヒドロゲルを共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) で蛍光観察すると、ANS 由来の強い蛍光が、ゲルファイバーに沿って局在していることが観察された (Fig. 7f)。このことから、ゲルファイバー内に発達した疎水場の構築が確認された。

以上の結果をまとめると、我々がコンビナトリアルライブラリーから発見した糖脂質型超分子ヒドロゲルは、ゲル化剤分子の一次元方向への自己組織化 (ポリマー様ファイバーの形成) さらにそのファイバーの集積化、そして三次元網目状の絡み合い形成といった階層的な自己集合過程を踏むことにより構築された超分子集合体であることが明らかとなった (Fig. 8)。そして、ゲルファイバーの構築と共に、必然的にゲルファイバーに沿った疎水ドメインが形成されることも明らかとなった²⁷⁾。

4. 糖脂質型超分子ヒドロゲルの機能

本項では、糖脂質型超分子ヒドロゲルの“機能”と“応用”について概説する。

4.1 タンパク・ペプチドアレイ用セミウェットマトリックス

発見した糖脂質型超分子ヒドロゲル化剤は電荷的に中性であるため、様々な pH (pH5 ~ 8) や塩強度 (0 ~ 250 mM) 条件下、すなわち広域のバッファー条件下でも安定なヒドロゲルを形成することができ、生理条件下で利用可能なバイオ材料としての展開が期待された。そこで我々はその第一段階として、タンパク質を変性させることなく本来の活性を保持したままこのゲル中へ固定化できるかどうかを確かめる、タンパク質の固定化実験を試みた^{25e)}。タンパク質には、酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビン (Mb) を用いた。Mb は、高度に折り畳んだタンパク質構造があっはじめて安定に酸素を貯蔵 (Oxy-Mb) でき、タンパク質構造が若干でも歪むと Oxy-Mb はすぐに自動酸化されて不活性な Met-Mb に戻ることが知られている。そこで、水溶液中とゲル内での Mb の自動酸化速度の半減期を算出し、Fig. 9 にその比較結果を示した。Oxy-Mb の半減期は水溶液中では 6.9 時間であったのに対し、ヒドロゲル中では 8.7 時間といくらか長寿命化し、むしろヒドロゲル内のほうがタンパク質にとっては安定な環境であることを示す興味深いものであった。これは、ヒドロゲル内の流動性の落ちた水分子によるヘム鉄への求核攻撃効率の低下のためと考察された。つまり、このヒドロゲルは包接したタンパク質に水溶液中と類似の居心地の良さを提供することが示された。我々は、このヒドロゲル内の環境を、乾燥した固体 (ドライ状態) とサラサラの液体 (ウェット状態) の中間に位置する“セミウェット”な環境と呼び、タンパク質にとって生き活きとして存在できるユニークな環境で

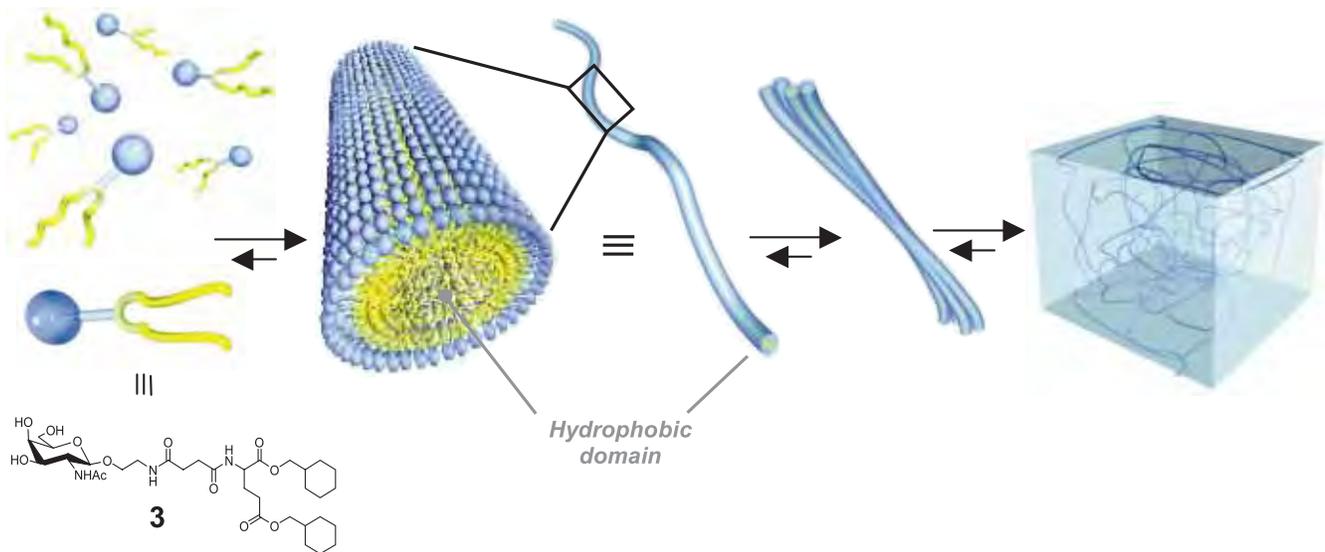


Fig. 8 Schematic representation of the hierarchal molecular assembly of **3** to form a supramolecular hydrogel.

あると考え、次ぎにこのセミウェットな環境を積極的に活用したセミウェットデバイスの展開を行った。

具体的には、超分子ヒドロゲルをセミウェットな固定化マトリックスとした酵素 基質アレイの構築を試みた。また、酵素活性の検出方法としてゲルファイバー中に構築される発達した疎水ドメインと環境応答性色素の組み合わせを利用した。3.2節で述べたように、この疎水ドメインは疎水性の高い環境応答性色素を自発的に取り込み、それに伴って色素の蛍光のブルーシフトおよび蛍光強度の増加という知見を得ている。そこで、基質の末端配列に環境応答性色素を修飾することで、酵素反応後切断された色素部分がゲルファイバー内に取り込まれ、その蛍光変化から反応を

読み出す戦略を考案した。そのモデル酵素として、酵素には Lys の C 末端を切断するプロテアーゼである LEP (リジルエンドペプチダーゼ) を用いた。一方、モデル基質にはリジンの C 末に環境応答性色素の DANSen 色素を修飾した 5 残基からなる親水オリゴペプチド (pep-1; Ser-Ser-Ser-Ser-Lys-DANSen) を設計した。まず、バルクゲル中での酵素反応について調べた。あらかじめ基質ペプチドを内包したヒドロゲルに LEP 溶液を滴下したところ、蛍光波長の短波長シフトおよび蛍光強度の増加が観測された (Fig. 10a)。一方、水溶液中で同様の反応では蛍光は変化せず、また、LEP の代わりに Chym (キモトリプシン; 疎水性アミノ酸の C 末端を切断するプロテアーゼ) を滴下しても蛍光変化は観測されなかった (Fig. 10b)。これらの結果は、LEP により特異的に切断された DANSen がヒドロゲル内の疎水ドメインに取り込まれ、蛍光シフト・増加が起こったことを意味した。この色調変化は肉眼でも明瞭な識別が可能であった (Fig. 10c)。そこで、ガラスプレート上に 10 μ l サイズのヒドロゲルアレイを調製し、酵素スクリーニングを行った。その結果、LEP を滴下した箇所のみ強い黄緑色の蛍光が検出された (Fig. 10d)。また、ゲルの体積を μ サイズにダウンサイジングさせたことで、ゲル全体へのタンパク質の拡散時間を早めることができ、実際に 10 分程度で蛍光変化の飽和を迎えた。同様の方法で種々の酵素阻害剤と LEP を同一ゲル内に固定化し、各ゲルスポットに対してペプチド基質を滴下したところ、LEP に対して特異的な阻害剤が共存するスポットのみ蛍光変化が観察されなかった (Fig. 10e)。この変化は、阻害剤濃度依存性であり、定量的な評価も可能な阻害剤スクリーニングアレイとなることが示された^{27, 28)}。

タンパク質の固定化技術はこれまで共有結合による基板上への固定化が主流であったが、操作の不簡便さ、化学修飾によるタンパク質の変性、さらに乾燥に弱いといった問題が指摘されてきた。我々の提案する超分子ヒドロゲルアレイは、天然のタンパク質を変性させることなく安定に固定化できる、溶液系のように

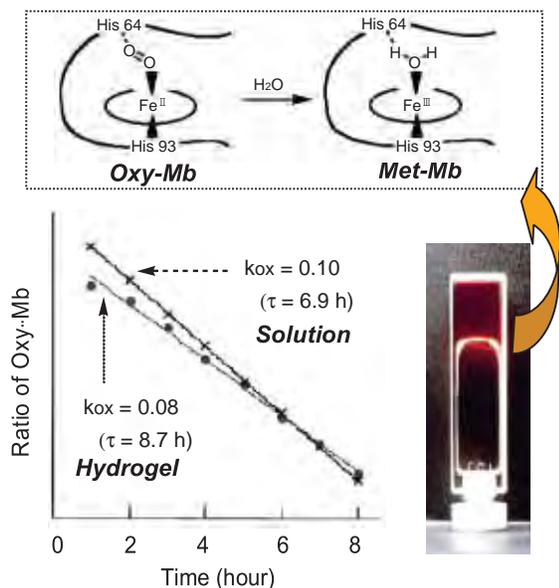


Fig. 9 Time courses of the auto-oxidation of oxy-Mb. (A photo of the hydrogel containing Mb).

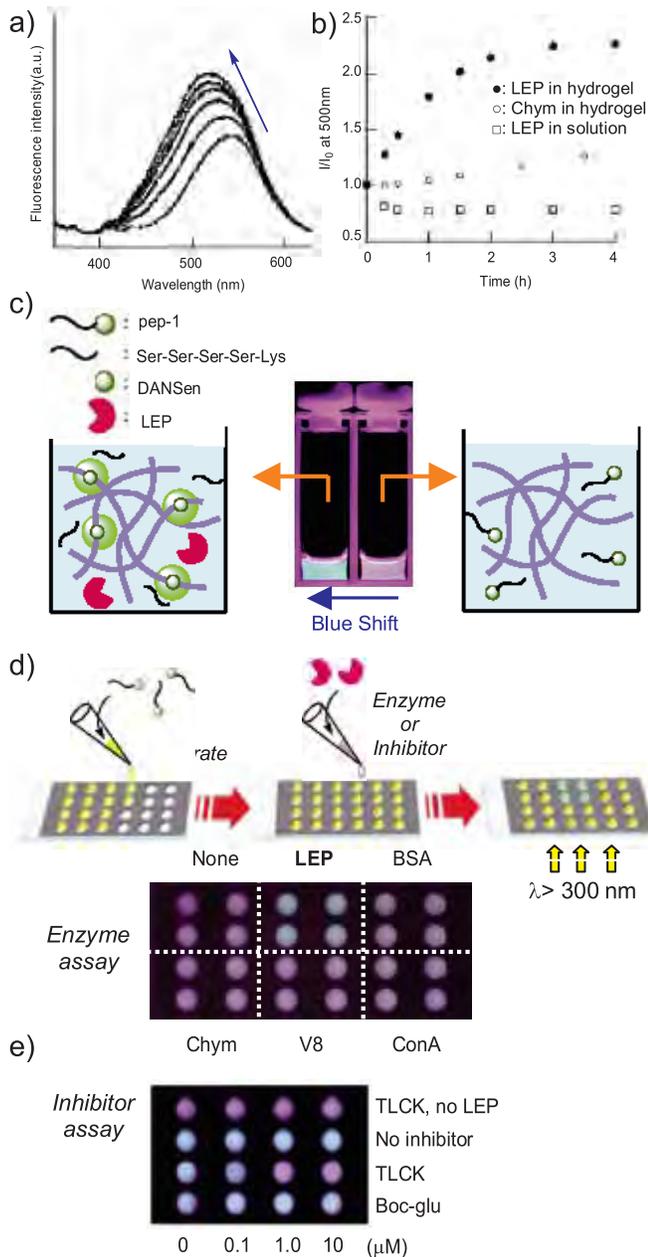


Fig. 10 Fluorometric activity assay of an enzyme entrapped in a supramolecular hydrogel **3**, and semi-wet peptide/protein chip using **3**. a) Fluorescence change by enzymatic hydrolysis. The arrow represents the direction of fluorescence spectral change. b) Time course of the fluorescence spectral change. c) Direct observation of fluorescence change with the naked eyes. **Pep-1** after cleavage by LEP in the hydrogel (left), **Pep-1** in hydrogel without LEP (right). d) Preparation scheme of the supramolecular peptide/protein array. e) Assay of LEP inhibitors using supramolecular hydrogel-based protein chip. Condition: [LEP] = 1.0 μM , [**3**] = 0.25 wt% in 50 mM Tris buffer (pH 8.5), [pep-1] = 40 μM .

ウェットな環境（セミウェット環境）を保持できる、三次元的な固定化により検体の担持量を増やすことができる、ゲル自体が独立したスポットとなるため基板へのウェル加工技術の手間が省ける、といった利点がある。また、ポリマーゲル（高分子化学ゲル、高分子物理ゲル）を使った例²⁹⁾と比べても、重合反応が不要なことや未反応原料の残存によるタンパク質変性の懸念がないという利点がある。また、超分子ヒドロゲルは、ゲルの調製が容易であること（加熱分散し室温で静置しておけば、数分でゲル化する）、検体を回収できるだけでなくゲルのリサイクルも可能であること、さらに自由水の親水環境とは対照的に、ゲルファイバー内に発達した疎水ドメインの局在及びそのドメインを使った反応検出システムの創出が可能であること、透明なゲルであるため蛍光検出感度がよいといった利点もある。このように“合成”がメインであった超分子ヒドロゲルを、本項で述べたような“機能化”へ展開することで新規セミウェットバイオマテリアル³⁰⁾として、新しい存在意義が示された。

4.2 分子認識マトリックスとしての応用

上記のようなセミウェットアレイは酵素・タンパク質に限らず、人工レセプターや人工ケモセンサーの非共有結合的なアレイ化にも適用可能である。近年、細胞内外での必須金属の検出や生体内メカニズム解析、または環境汚染物質の検出などを目的とした多種多様な人工レセプター分子およびケモセンサーが開発されている³¹⁾。通常は、一つの試験管内で一種類の検体と一種類のレセプター分子間の相互作用について検討する。しかし、複数の検体を迅速に調べるためにはハイスループットに且つ網羅的に解析できる手法の開発は極めて重要である。現在まで、ケモセンサーを固体のまま二次元状にアレイ化する手法³²⁾、またはポリスチレンなどの樹脂と共有結合で固定化する手法³³⁾が提案されているが、前者は乾燥に弱くさらに担持量が少ないため検出シグナルが弱いという欠点があった。後者に関して、人工レセプターを化学結合で樹脂上に固定化するため検体に対する本来の親和性の低下が懸念される。我々は、これらの分子認識プロセスを溶液中と同様に行えるマトリックスとして超分子ヒドロゲルを用いることを提案している。前項で記載したように、ヒドロゲルの三次元マトリックス中では、非共有結合的な固定化が可能であり溶液類似の環境を提供するために、本来の被検体の親和性を保持できるだけでなく、担持量を制御して良好な検出シグナルを得ることが可能になると期待された。

その例証実験として、リン酸アニオン種に対して高い親和性を示すアントラセン型ケモセンサー(4)³⁴⁾を用いて(Fig. 11)、超分子ヒドロゲル内と水溶液中での各種リン酸アニオンとの親和性について比較検討を行った。リン酸アニオン(H_2PO_4^-)の蛍光滴定の結果、水溶液中と同程度の結合定数($1.1 \times 10^5 \text{M}^{-1}$)が得られた。それ以外のアニオン、フェニルリン酸、リン酸化チロシンでも水溶液中と同じ親和性を示した。また、このケモセンサーは硫酸アニオンとほとんど親和性を示さないことが知られているが、ヒドロゲル内でも同様に応答しなかった(Fig. 12a)。この分子認識チップによる蛍光変化は、肉眼でも識別できるほど鮮明であった。亜鉛イオン選択的蛍光センサー(5)³⁵⁾や、市販のカルシウムイオンプローブ(CG-2)³⁶⁾、pHプローブ(SNARF-1)³⁷⁾も

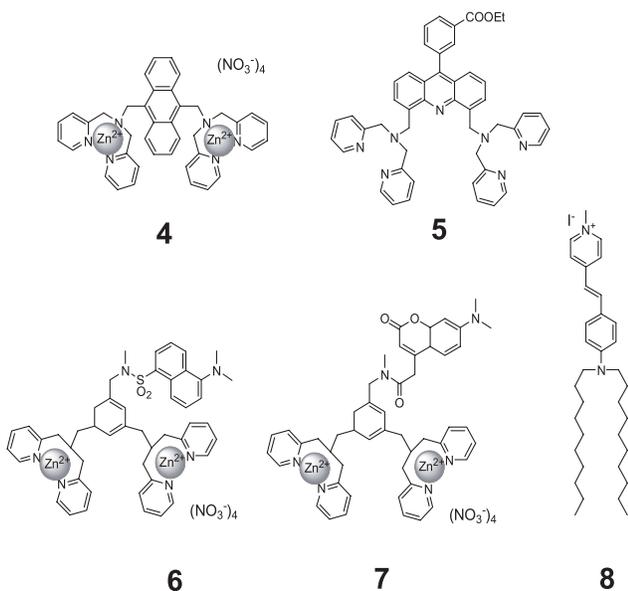


Fig. 11 Chemical structures. Chemosensor **4**, **6** and **7** which bind phosphate derivatives via coordination chemistry in aqueous solution. A fluorescent Zn²⁺ receptor **5**, and a hydrophobic styryl dye **8** as a FRET acceptor for **7**.

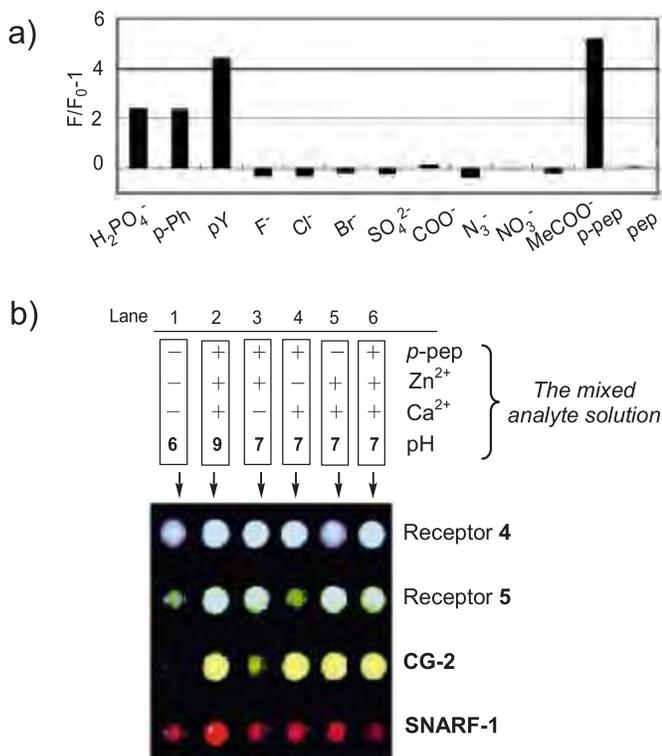


Fig. 12 a) The emission intensity change of a hydrogel array containing **4** by addition of various anions. b) A photograph of an integrated molecular recognition hydrogel chip for mixed solution assay.

このヒドロゲル中で、溶液中と同等の認識機能を示し、この糖脂質型超分子ヒドロゲルが分子認識セミアマトリックスとして汎用性があることが示された。また、各種ケモセンサー分子を別々に固定化したゲルスポットに対して、複数の検体を混ぜた混合溶液を滴下したところ、分子認識検出の直行性も確認することができた (Fig. 12b)³⁸。

この結果は、これまで水溶液中で行われていたホスト・ゲストケミストリーが、超分子ヒドロゲル内でも溶液中と同程度の親和性を保持したまま実現できることを実証し、超分子ヒドロゲルがハイスループット検出可能な分子認識アレイの構築にも有用であることを示したと言える。

分子認識にはヒドロゲル中の水相キャビティだけでなく疎水性のファイバーも利用可能である。我々は前項のタンパク質アレイの時と同様、ゲルファイバー中の発達した疎水ドメインと環境応答性色素を組み合わせることにより、蛍光波長シフトおよび蛍光強度変化を利用した鮮明な分子認識検出システムの構築を行った。我々のグループが開発したリン酸アニオン種に対して特異的認識能を示すダンシル(環境応答性)型蛍光センサー分子(6)を用いて、親水/疎水性リン酸種の識別可能な検出システムを検討した。システム設計原理は以下の通りである。ダンシル型蛍光センサーが疎水的なリン酸種と結合するとホスト・ゲスト錯体全体の疎水性が増加し、ゲルファイバー内へと局在が移動する。その結果、蛍光の短波長シフト(ブルーシフト)および蛍光増加が起こる。一方、親水的なリン酸種と結合した場合、親水性が増加し、錯体はヒドロゲル中のバルク水側へ移動し、上記と逆に蛍光の長波長シフト(レッドシフト)および蛍光強度が減少する (Fig. 13a)。ダンシル型レセプター固定化ヒドロゲルアレイに対し各種リン酸(フェニルリン酸、リン酸化チロシン、リン酸、ATP)の蛍光滴定を行った (Fig. 13b)。疎水性のフェニルリン酸を滴下した場合、蛍光波長の短波長シフトおよび蛍光強度の増加が観測された。一方、他の3つの親水性リン酸種に対しては、逆に長波長シフトおよび蛍光強度の減少が観測された。面白いことに、リン酸種の親水性の違い(ATP > H₂PO₄⁻ > pTyr)が、蛍光波長のシフト変化値の序列(ATP; +16 nm, H₂PO₄⁻; +15 nm, pTyr; +11 nm)と一致した。この親水・疎水性リン酸種と結合したダンシル型レセプターのゲル中での局在を CLSM 観察により直接観察すると、フェニルリン酸を滴下した場合、レセプターのダンシル由来の強い蛍光がゲルファイバーに沿って観察されるのに対し、ATPを滴下した場合は、弱い蛍光が全体的に分散している様子が観察された。

より明確な色彩変化をもたらす検出システムをヒドロゲルファイバーを利用することによって設計することもできる。FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)アクセプターとなる長鎖アルキルを修飾したASP(8)をゲルのファイバードメインに固定化し、FRETドナーとなるクマリンをペンダントとした蛍光センサー(7)をこのヒドロゲル中に共存させた。この分子認識チップに各種リン酸を滴下したところ、クマリン型センサーが疎水性のリン酸種と結合した場合、ゲルファイバー内に取り込まれASPとの強いFRETが検出された (Fig. 13c, d)。一方、ATPのような親水性のリン酸種では、センサーは自由水側へと移動するためASP間のFRETは

弱くなり、クマリン型由来の蛍光が観察された³⁹⁾。

このように、ヒドロゲル中の親水環境とゲルファイバー内の疎水環境、さらにセミウェット状態で保持されている分子の動きを利用することで、リン酸アニオン種間の種類を識別可能な検出システムが構築された (Fig. 14)。

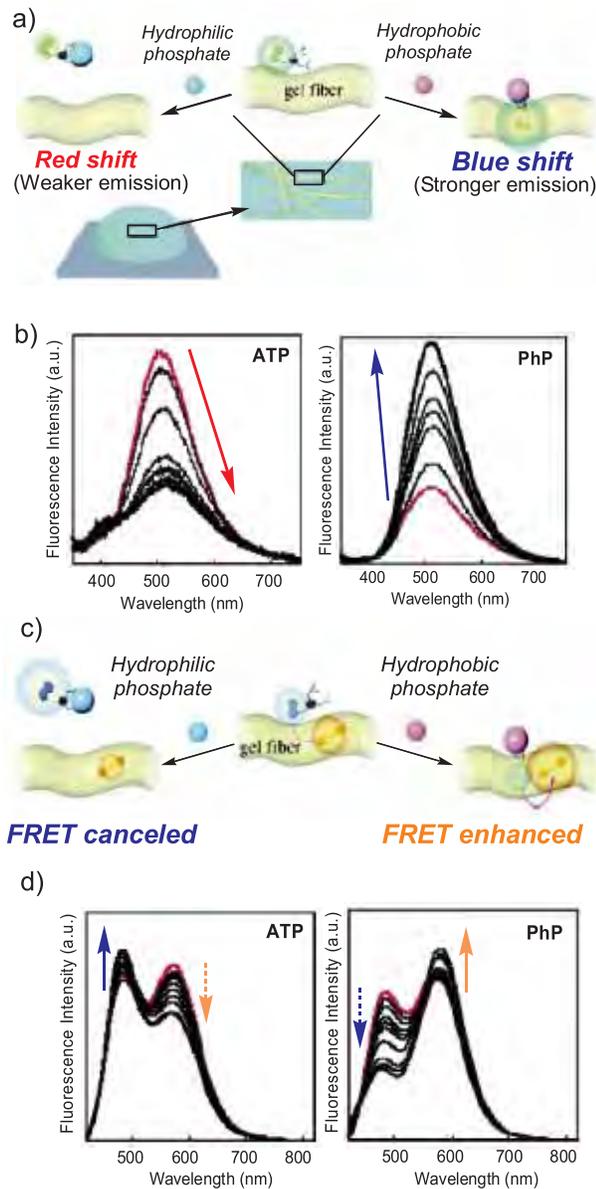


Fig. 13 a) Schematic illustration of the chemosenser redistribution upon the binding to a hydrophobic or hydrophilic phosphate derivative between the hydrophobic hydrogel nanofiber and the hydrophilic cavity. b) Fluorescence spectral change of **6** embedded in hydrogel **3** upon addition of ATP (left) or PhP (right) ($\lambda_{ex} = 322$ nm). c) Illustration of the guest-dependent FRET system using **7** and **8** by the addition of ATP or PhP in the hydrogel **3**. d) Fluorescence spectral change of **3** including **7** and **8** in the titration of ATP (left) or PhP (right) ($\lambda_{ex} = 393$ nm).

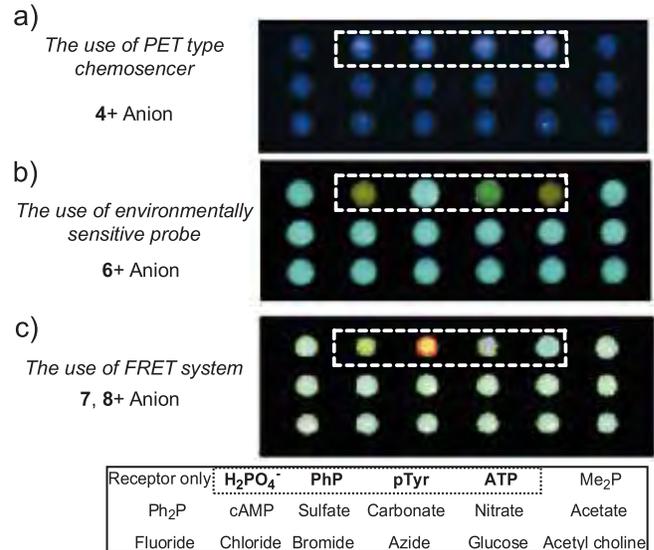


Fig. 14 Digital camera photographs of the sensing patterns of semi-wet molecular recognition (MR) chips of the hydrogel **3** containing **4**, **6** or **7** (**8**) in the presence of various anions. The spotted position of anions is shown in the bottom.

4.3 感温性“体積相転移”ゲル

超分子ヒドロゲルは、弱い非共有結合のみを駆使して構築された分子集合体を基本ユニットとしている。したがって、超分子ヒドロゲルを加熱すれば、ゲル化剤分子間の相互作用は崩壊して、ゾル状態に変化すること(ゲル-ゾル転移)が定説となっていた。そのような中、我々は偶然にも、糖脂質型超分子ゲル化剤分子ライブラリーの中から加熱するとゲルの体積が急激に小さくなる感温性体積相転移ゲルを世界で初めて発見した⁴⁰⁾。

ゲル化剤のコンビナトリアル合成(3.1節を参照)により創出した数種類のヒドロゲル化剤のうち、化合物**3**、**9**、**10**(Fig. 15a)が、それぞれ69、40、30を境にゲルの体積の不連続的な収縮が観察された。その体積変化率は、100倍以上であり、室温まで冷却することで、一旦収縮したゲルは再度膨潤ゲルへと戻る可逆性も確認された(Fig. 15b,c)。

通常のゲル-ゾル転移を示す糖脂質型ゲルのゲル状態とゾル状態のFT-IR(ATR)測定では、ゲル状態では、アミドカルボニル伸縮振動は 1622 cm^{-1} に検出され、一方、ゾル状態では 1630 cm^{-1} に検出された。この 1630 cm^{-1} は、ゲル化しない即ち溶液状態の類似糖脂質型分子のアミドカルボニル伸縮振動数と一致したことから、この値では、糖脂質型分子は単分散状態またはそれに近い状態であると推察された。一方、体積相転移を示すゲル化剤**3**のゲル状態では、アミドカルボニル伸縮振動が 1615 cm^{-1} に検出され、先ほどの単分散状態と比較すると、 15 cm^{-1} も低エネルギーシフトしていることが明らかとなった。すなわち、体積相転移ゲルでは、一般のゲル-ゾル転移を示すゲルよりも強固なアミド間水素結合ネットワークの形成が示唆された。これは、ゲル化剤分子が秩序高く配向していることを意味する。その結果、高温状態でもゲルファイバーは崩壊せずゾル化しなかったと考察された。それ

では、一体このゲルファイバーの安定化が体積相転移現象とどのようにかかわってくるのだろうか。

糖脂質型ゲルファイバーの表面は、ゲル化剤の糖部位が高度に配向してクラスター化している。したがって、細胞表層での糖鎖糖鎖間相互作用のように、このゲルファイバー間も糖鎖水酸基を介した水素結合による引力が働くと推察される。一方で、糖表面へのエピタキシャルな水和量も増え、配向した水の双極子モーメントの増大、すなわちゲルファイバー間の斥力増大へとつながると予想された。実際に、このゲル化剤単分子膜表面の水和構造について表面力測定によって調べたところ、数 10 nm 以上にもわたって積層した水と水の存在が示唆された。これらの結果をまとめると、室温では水と水によりゲルファイバー間の斥力が引力より大きいためゲルは膨潤し、高温では配向水の崩壊を伴う脱水により糖鎖間の引力が斥力を上まわるため収縮したと考察された。また、大きな体積相転移変化は、アミド間水素結合ネットワークの発達によるゲルファイバーの安定化により、ゲルファイバー間の引力と斥力の差を増大させたことが起因していると推察された。

このような超分子ヒドロゲルの体積相転移現象を利用すると薬物放出システムへの展開が可能となる。例えば、あらかじめ DNA を包摂した膨潤状態のゲルを徐々に加熱すると、体積相転移温度を境に不連続的な DNA の放出が確認された (Fig. 15d)。親水性の DNA はゲルファイバー間の自由水中に取り込まれていると予想され、体積収縮により自由水とともにバルク側へと搾り出されるように放出される。また、ビスフェノール A (環境汚染物質) の

ような疎水性物質は、ゲルファイバー内の疎水ドメインに自発的に取り込まれるため、ゲルの体積収縮後もバルク水側に漏れ出すことなく、もとのゲルの体積の 1/100 以下に濃縮できることが分かった。このように、包接物質の物性に依存したキャッチ&リリース制御は、両親媒性環境を有する超分子ヒドロゲルの体積相転移機能を利用したユニークなものとなり、従来のポリマーゲルとは異なる新しいスマートマテリアルとして興味深いものがある。

4.4 pH 応答性 “体積相転移” ゲル

最近では、熱応答性だけでなく、pH 応答性の膨潤・収縮機能を付与することも可能となりつつある。そのデザイン原理は、中性の糖脂質型超分子ヒドロゲル化剤とその類似体で機能性部位を有する化合物 (添加剤) との二成分系超分子ヒドロゲル (超分子コポリマーゲル) を構築することである。具体的にはゲル化剤 3 と、その類似構造で構造末端にカルボン酸部位を導入した添加剤 11 を混合し、pH 応答機能の付与を試みた (Fig. 16a)。その結果、pH に応答し、体積相転移を起こすゲルの創製に成功した (Fig. 16b)⁴¹。

膨潤ゲルと収縮ゲルの TEM および SEM 観察より、両状態とも三次元ゲルファイバーの形成が確認された。また、ファイバー以外の会合体は観察されなかった。XRD 測定では、ゲル化剤 3 単独で形成したヒドロゲルの回折パターンと類似していた。このことは、添加剤分子が、ゲル化剤 3 と相溶したゲルファイバーを形成していることを示唆する。

pH 応答性メカニズムについて FT-IR (ATR) データなどから考察すると、pH に応答したゲルの巨視的な体積変化は、添加剤のカルボン酸部位のプロトン化/脱プロトン化の寄与が示唆された。T. Tanaka らにより明らかにされた高分子ゲルの体積相転移メカニズム^{2a, 2b}) を参考にすると、このプロトン化/脱プロトン化に伴うゲルファイバー間の静電反発や浸透圧効果の発生または緩和により、ゲルの体積が膨潤 収縮したと考察された (Fig. 16c)。

熱相転移の場合と同様にゲルの収縮過程では相当量の水が放出され、これを利用した pH 応答性の薬物放出システムも構築可能である。親水性薬物 (ビタミン B 類) を含んだカルボン酸型二成分系ゲルを酸性下に置くと、ゲルの体積が収縮するに伴って、放出される自由水と共に薬物は水側へ放出された。一方、疎水性薬物 (ポリフェノール類) に関しては、この時間スケールではほとんど放出されなかった (Fig. 16d)。pH 応答性体積相転移現象を、親水性薬物の急激な、また疎水性薬物のゆっくりした選択的な徐放システムへと展開できる可能性が示された。このように、超分子ヒドロゲル化剤に刺激応答部位を導入した添加剤分子を相溶し超分子コポリマー化させた結果、超分子ヒドロゲルに pH 応答性体積相転移機能を付与することに成功した。本手法は、種々の刺激応答性超分子ヒドロゲルを設計する上で、簡便で有用な手法として期待される⁴²。

4.5 光応答性ゲル

第三の刺激応答として光応答性超分子ヒドロゲルの設計と構築を試みた。糖脂質型ゲル化剤分子の二つの発達したアミド分子間水素結合ネットワーク形成がゲル形成に重要な因子であることに着目し (3.2 節参照) この水素結合ネットワークの形成と崩壊を光刺激で制御することにより、光応答性ゲル-ゾル転移を誘起させるというデザインである。具体的には、二つのアミド基間をト

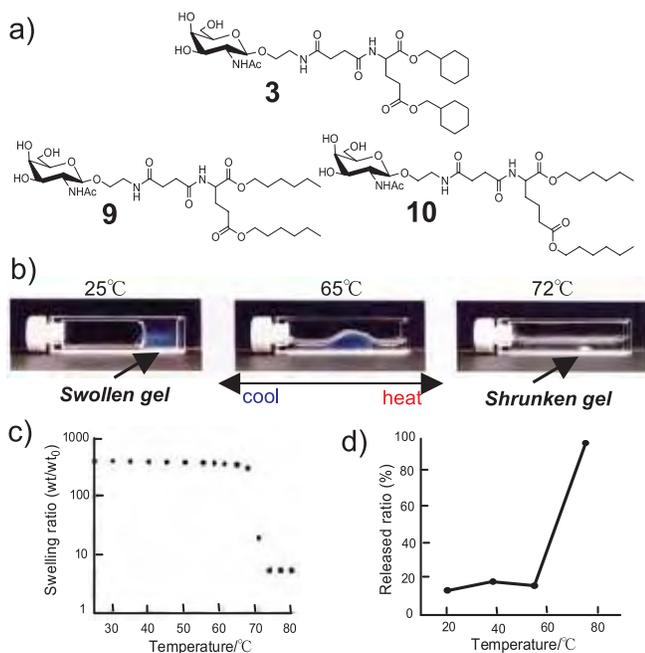


Fig. 15 a) Structure of hydrogelators which show the thermally volume phase transition. b) Direct observation of the thermally induced phase transition of the hydrogel of 3. c) Temperature dependence of the swelling degree of the hydrogel 3. d) Plots of released ratio of DNA versus temperature for 3.

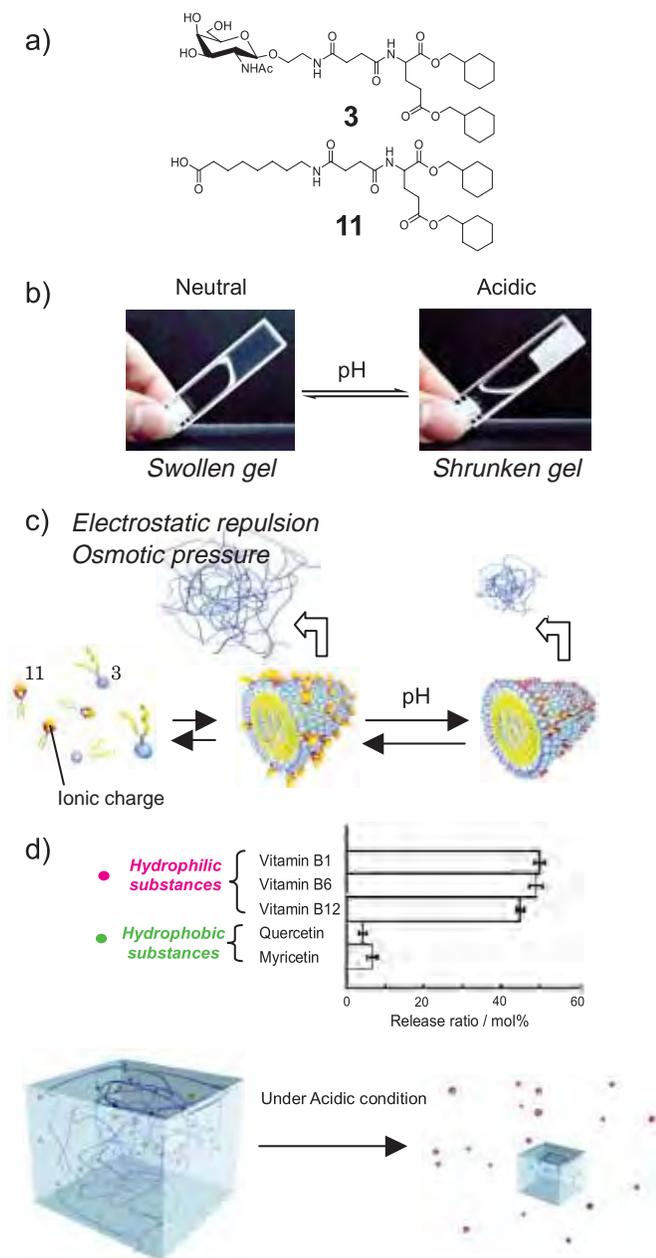


Fig. 16 a) Chemical structures of a hydrogelator **3** and as an additional component, an amphiphilic carboxylic acid derivative **11** bearing the hydrophobic parts of **3**. b) Photographs of a typical example of the pH responsive volume phase transition of the mixed hydrogel (equal quantities of **3** and **11**) before and after shrinkage. c) Schematic illustration of the two-component gel strategy, and the subsequent pH-responsive volume change. d) The amount of five distinct substrates released after 60 min for vitamin B1, vitamin B6, vitamin B12 (hydrophilic substances), quercetin and myricetin (hydrophobic flavone derivatives).

ランス シス光異性化が知られるフマル酸型骨格に置換した分子を設計した。このままではヒドロゲルを形成しなかったため、親水性の糖部位と疎水性の脂質テイル部位に関しては再びコンビナトリアルスクリーニングしゲル化剤の最適化を図った。その結果、透明でゲル化能に優れたフマル酸型ゲル化剤 **12** (臨界ゲル化濃度; 0.1wt%) を見出した (Fig. 17a)。

形成したゲルの構造解析を行ったところ、直径数 10 nm サイズの発達したゲルファイバーが観察され、さらにXRD測定や環境応答性色素を用いた蛍光測定からこのゲルファイバーはゲル化剤 **3** と同様の二分子膜様集合体であることが示された。

このゲルに 10 分間 UV 光照射を行ったところ、ゲルゾル転移させることができた (Fig. 17b)。ゾルの $^1\text{H-NMR}$ 測定から、光照射により分子がフマル酸型からマレイン酸型へと光異性化していることが確認された (Fig. 17c)。また、XRD 測定では二分子膜様構造の崩壊が示唆され、実際、ゾル状態のモルフォロジー観察ではゲルで見られたファイバーは観察されずベシクル様集合体のみが観察された (Fig. 17d)。FT-IR (ATR) 測定からは、ゲルゾル転移前後で $\text{C}=\text{O}$ (amido) が 20 cm^{-1} も高エネルギーシフトすることが確認された。すなわち、UV 光照射によりフマル酸型分子がマレイン酸型へと光異性化し、水素結合ネットワークの崩壊が生じた結果、ゲルファイバーの崩壊、そして巨視的なゲルゾル転移を誘起したと考察された。次にこのゾルに触媒量の臭素を混合し、可視光を 10 分間照射したところ、ゾルが再度ゲル化した。 $^1\text{H-NMR}$ 測定よりフマル酸型分子への再異性化、さらにモルフォロジー観察では発達したゲルファイバーの再構築も確認された。つまり、準可逆的に光ゲルゾル転移を示す超分子ヒドロゲルが創製されたことになる⁴³。

我々はこの光ゲルゾル転移機能を利用して、ゲルの局所的な箇所のみをゾル化させる光“ゲル-ゾル”パターンニングへの応用を試みた。セル内で調製した光応答性ゲルの前に、絵文字を模ったフォトマスクを置き UV 光を照射したところ、光の透過した絵文字の箇所のみゾル化させることができた (Fig. 17e)。これによりゲルという特殊な環境下で、ゾルという新しい環境(ゾル流路)を自由に作り出すことが可能となった。

このようにケミカルライブラリーからスクリーニングによって発見された分子構造に合理的な分子デザインを施すことで、従来のヒドロゲル剤と同様の物性を保持したまま $+\alpha$ の機能を付与させることに成功した。超分子ヒドロゲルの光“ゲル-ゾル”パターンニングはセミウェットマテリアルとして種々の新展開が期待される。

5. 終わりに

本稿では、“超分子ヒドロゲル”の開発から応用まで、我々が発見した糖脂質型超分子ヒドロゲルを例に概説した。まず、“開発”では、四つの規定された分子骨格(糖、スペーサー、コネクター、脂質テイル)に分割し、独自の固相法を用いたコンビナトリアルスクリーニングにより“物性未知の化合物ライブラリー”から複数の超分子ヒドロゲル化剤の創出に成功した。また、世界で最初の感温性超分子ヒドロゲル化剤の“偶然的発見”も本手法を利用したことによる賜物であり、超分子ヒドロゲル化剤開発において有効な合成戦略であることを示した。また、“選別したゲル化剤ラ

イブラリー”から機能性を付与した超分子ヒドロゲルの開発、すなわち“分子をデザインする”ことにも成功した。これらのゲルは、タンパク質アレイ用セミウェットマトリックスとして応用できることや、外部刺激応答性体積相転移現象を利用した薬物放出システムへの可能性も示すことなど“機能”を実証することで、スマートバイオマテリアルとしての可能性を見出すことができた。我々の例以外にも、例えば S.I.Stupp らは、ペプチド脂質型ゲル (IKVAV (laminin) 修飾型) 内で神経前駆細胞を培養した結果、

ポリリジンコート上での培養結果と比較して、アストロサイトにはならず、効率的に神経細胞へと分化することを見出した²⁴⁾。一方、B.Xu らは、バンコマイシンを用いた抗体ゲルを開発し、その薬理活性を調べたところ、単一のバンコマイシンよりも8~11倍も高い薬理活性を示すことを確認した⁴⁴⁾。両者とも機能性分子の集積化 (“超分子ポリマー”) 効果であると考察しており、超分子ゲルファイバー表面を有効に利用した機能発現に成功している。また最近では、薬物を超分子ヒドロゲル構造の一つとして組み入れた骨格 (バンコマイシン型も含む) も提案されており、B.Xu らの二成分系ペプチドゲルドラッグ⁴⁵⁾ や、J.van Esch らの酵素切断型ゲルドラッグ⁴⁶⁾ など次世代 DDS として期待されている。このように超分子ヒドロゲルは高分子ゲルとは異なる特性を有しており、特にナノ・マイクロ領域において機能発現するスマートバイオマテリアルとして重要で様々な可能性が秘められている。今後の“超分子ヒドロゲル”の発展を期待しつつ、本稿を閉じたい。

最後に、本研究の遂行するにあたり、ヒドロゲルの小角 X 線構造解析の測定および解析をして頂きました櫻井和郎教授 (北九州大) 表面力測定をして頂きました栗原和枝教授 (東北大学) のご協力に深く感謝致します。

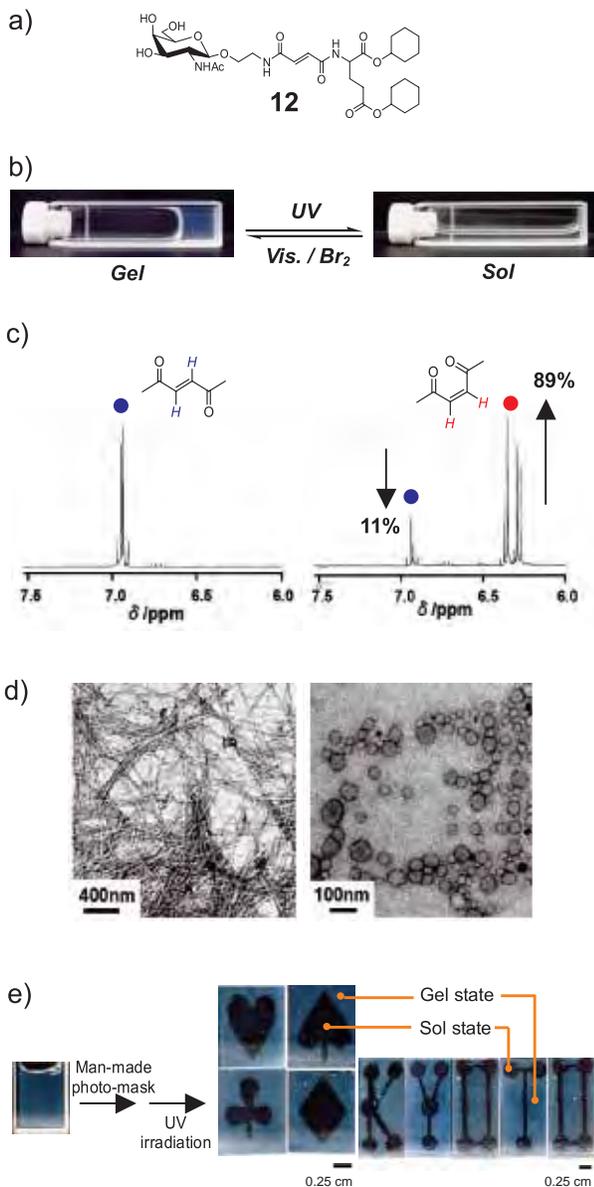


Fig. 17 a) Structure of hydrogelator **12**. b) Photographs of photo responsive gel sol transition for 10min UV irradiation. c) ¹H-NMR spectra of the gel state before UV irradiation and the sol state after UV irradiation. d) TEM images of the gel state and the sol state stained with uranyl acetate solution. e) Photo gel-sol patterning with man-made photo-masks.

参考文献

- 1) 長田義仁, 梶原莞爾, *ゲルハンドブック*, p419-681, エヌ・ティー・エス **1997**.
- 2) (a) T. Tanaka, *Phys. Rev. Lett.*, **1978**, *40*, 820; (b) T. Tanaka, *Sci. Am.*, **1981**, *244*, 124; (c) Y. Osada, A. Matsuda, *Nature*, **1995**, *376*, 219; (d) Y. Osada, J.-P. Gong, *Adv. Mater.*, **1998**, *10*, 827; (e) M. Irie, et al., *Macromol.*, **1986**, *19*, 2476; (f) D. J. Beebe, J. Moore, J. Bauer, Q. Yu, R. H. Lie, C. Devadoss, B. H. Jo, *Nature*, **2000**, *404*, 588; (g) D. T. Eddington, D. J. Beebe, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2004**, *56*, 199; (h) T. Miyata, T. Uragami, K. Nakamae, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2002**, *54*, 79.
- 3) K. Y. Lee, D. J. Mooney, *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 1869.
- 4) (a) Y. Luo, M. S. Shoichet, *Nature Mater.*, **2004**, *3*, 249; (b) M. P. Lutolf, J. A. Hubbell, *Nat. Biotechnol.*, **2005**, *23*, 47.
- 5) (a) C. Wang, R. J. Stewart, J. Kopecek, *Nature*, **1999**, *397*, 417; (b) B. Jeong, A. Gutowska, *Trends Biotechnol.*, **2002**, *20*, 305; (c) B. Jeong, S. W. Kim, Y. H. Bae, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2002**, *54*, 37; (d) J. D. Ehrick, S. K. Deo, T. W. Browning, L. G. Bachas, M. J. Madou, S. Daunert, *Nature Mater.*, **2005**, *4*, 298.
- 6) D. G. Anderson, J. A. Burdick, R. Langer, *Science*, **2004**, *305*, 1923.
- 7) (a) L. A. Estroff, A. D. Hamilton, *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 1201; (b) M. de Loos, B. L. Feringa, J. H. van Esch, *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 3615; (c) N. M. Sangeetha, U. Maitra, *Chem. Soc. Rev.*, **2005**, *34*, 821.
- 8) S. Zhang, *Nat. Biotechnol.*, **2003**, *21*, 1171.
- 9) J.-M. Lehn, *Supramolecular chemistry; Concepts and Perspective*, 化学同人 **1997**.
- 10) (a) R. P. Sijbesma, F. H. Beijer, L. Brunsveld, B. J. B. Folmer, J. H. K. K. Hirschberg, R. F. M. Lange, J. K. L. Lowe, E. W. Meijer, *Science*, **1997**, *278*, 1601; (b) B. J. B. Folmer, R. P. Sijbesma, R. M. Versteegen, J. A. J. van der Rijt, E. M. Meijer, *Adv. Mater.*, **2000**, *12*, 874.
- 11) (a) R. K. Castellano, D. M. Rudkevich, J. Rebek, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 7132; (b) R. K. Castellano, R. Clark, S. L. Craig, C. Nuckolls, J. Rebek, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 12418.
- 12) D. Pasini, and A. Kraft, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, **2004**, *8*, 157.
- 13) (a) P. Terech, R. G. Weiss, *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 3133; (b) D. J. Abdallah, R. G. Weiss, *Adv. Mater.*, **2000**, *12*, 1237; (c) J. H. van Esch, B. L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Edn.*, **2000**, *39*, 2263.

- 14) T. Kunitake, Y. Okahata, M. Shimomura, S. Yasunami, K. Takarabe, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 5401.
- 15) (a) M. Suzuki, M. Yumoto, M. Kimura, H. Shirai, K. Hanabusa, *Chem. Commun.*, **2002**, 884; (b) M. Suzuki, M. Yumoto, M. Kimura, H. Shirai, K. Hanabusa, *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 348; (c) T. Nakashima, N. Kimizuka, *Adv. Mater.*, **2002**, 14, 1113.
- 16) (a) F. M. Menger, A. V. Peresyepkin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 5340; (b) R. Oda, I. Huc, S. J. Candau, *Angew. Chem. Int. Edn.*, **1998**, 37, 2689; (c) G. Wang, A. D. Hamilton, *Chem. Commun.*, **2003**, 310; (d) L. A. Estroff, A. D. Hamilton, *Angew. Chem. Int. Edn.*, **2000**, 39, 3447.
- 17) (a) M. Kogiso, T. Hanada, K. Yase, T. Shimizu, *Chem. Commun.*, **1998**, 1791; (b) K. Kohler, G. Forster, A. Hauser, B. Dobner, U. F. Heiser, F. Ziethe, W. Richter, F. Steiniger, M. Drechsler, H. Stettin, A. Blume, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 16804; (c) J.-H. Fuhrhop, T. Wang, *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 2901.
- 18) W. A. Petka, J. L. Harden, K. P. McGrath, D. Wirtz, D. A. Tirrell, *Science*, **1998**, 281, 389.
- 19) A. P. Nowak, V. Breedveld, L. Pakstis, B. Ozbas, D. J. Pine, D. Pochan, T. J. Deming, *Nature*, **2002**, 417, 424.
- 20) (a) J. P. Schneider, D. J. Pochan, B. Ozbas, K. Rajagopal, L. Pakstis, J. Kretsinger, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 15030; (b) D. J. Pochan, J. P. Schneider, J. Kretsinger, B. Ozbas, K. Rajagopal, L. Haines, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 11802.
- 21) A. Aggeli, M. Bell, N. Boden, L. M. Carrick, A. E. Strong, *Angew. Chem. Int. Edn.*, **2003**, 42, 5603.
- 22) Y. Zhang, H. Gu, Z. Yang, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 13681.
- 23) (a) R. Iwaura, K. Yoshida, M. Masuda, K. Yase, T. Shimizu, *Chem. Mater.*, **2002**, 14, 3047; (b) R. Iwaura, K. Yoshida, M. Masuda, M. O. Kameyama, M. Yoshida, T. Shimizu, *Angew. Chem. Int. Edn.*, **2003**, 42, 1009; (c) S. M. Park, Y. S. Lee, B. H. Kim, *Chem. Commun.*, **2003**, 2912.
- 24) G. A. Silva, C. Czeisler, K. L. Niece, E. Beniash, D. A. Harrington, J. A. Kessler, S. I. Stupp, *Science*, **2004**, 303, 1352.
- 25) (a) I. Nakazawa, M. Masuda, Y. Okada, T. Hanada, K. Yase, M. Asai, T. Shimizu, *Langmuir*, **1999**, 15, 4757; (b) J. H. Jung, G. John, M. Masuda, K. Yoshida, S. Shinkai, T. Shimizu, *Langmuir*, **2001**, 17, 7229; (c) H. Kobayashi, A. Friggeri, K. Koumoto, M. Amaile, S. Shinkai, D. N. Reinhoudt, *Org. Lett.*, **2002**, 4, 1423; (d) S. Bhattacharya, S. N. G. Acharya, *Chem. Mater.*, **1999**, 11, 3504; (e) S. Kiyonaka, S. Shinkai, I. Hamachi, *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 976.
- 26) (a) I. Hamachi, S. Kiyonaka, S. Shinkai, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 6141; (b) I. Hamachi, S. Kiyonaka, S. Shinkai, *Chem. Commun.*, **2000**, 1281.
- 27) S. Kiyonaka, K. Sada, I. Yoshimura, S. Shinkai, N. Kato, I. Hamachi, *Nature Mater.*, **2004**, 3, 58.
- 28) S.-I. Tamaru, S. Kiyonaka, I. Hamachi, *Chem. Eur. J.*, **2005**, 11, 7294.
- 29) (a) H. Zhu, M. Snyder, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2001**, 5, 40; (b) H. Zhu, M. Snyder, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, 7, 55.
- 30) S. Zhang, *Nature Mater.*, **2004**, 3, 7.
- 31) (a) B. Valeur, I. Leray, *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, 205, 3; (b) S. Kubik, C. Reyheller, S. Stuwe, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, **2005**, 52, 137; (c) N. C. Lim, H. C. Freake, C. Bruckner, B. Valeur, *Chem. Eur. J.*, **2005**, 11, 38; (d) P. Jiang, Z. Guo, *Coord. Chem. Rev.*, **2004**, 248, 205.
- 32) (a) A. K. Boal, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 734; (b) T. R. E. Simpson, D. J. Revell, M. J. Cook, D. A. Russell, *Langmuir*, **1997**, 13, 460; (c) D. Y. Sasaki, K. Kurihara, T. Kunitake, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 10994.
- 33) (a) S. Arimori, M. L. Bell, C. S. Oh, K. A. Frimat, T. D. James, *Chem. Commun.*, 1836 (2001); (b) F. M. Raymo, M. A. Cejas, *Org. Lett.*, **2002**, 4, 3183.
- 34) (a) A. Ojida, Y. Mito-oka, M. Inoue, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 6256; (b) A. Ojida, Y. Mito-oka, K. Sada, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 2454.
- 35) A. Ojida, Y. Miyahara, I. Hamachi, *to be submitted*
- 36) M. Eberhard, P. Erne, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1991**, 180, 209.
- 37) J. E. Whitaker, R. P. Haugland, F. G. Prendergast, *Anal. Biochem.*, **1991**, 194, 330.
- 38) I. Yoshimura, Y. Miyahara, N. Kasagi, H. Yamane, A. Ojida, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 12204.
- 39) S. Yamaguchi, I. Yoshimura, T. Kohira, S.-I. Tamaru, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 11835.
- 40) S. Kiyonaka, K. Sugiyasu, S. Shinkai, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 10954.
- 41) S.-L. Zhou, S. Matsumoto, H.-D. Tian, H. Yamane, A. Ojida, S. Kiyonaka, I. Hamachi, *Chem. Eur. J.*, **2005**, 11, 1130.
- 42) A. R. Hirst, D. K. Smith, *Chem. Eur. J.*, **2005**, 11, 5496.
- 43) S. Matsumoto, S. Yamaguchi, I. Hamachi, *submitted*.
- 44) (a) B. Xing, C.-W. Yu, K.-H. Chow, P.-L. Ho, D. Fu, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 14846; (b) J. C. Tiller, *Angew. Chem. Int. Edn.*, **2003**, 42, 3072.
- 45) Z. Yang, H. Gu, Y. Zhang, L. Wang, B. Xu, *Chem. Commun.*, **2004**, 208.
- 46) *Chemical & Engineering News*, August 22, p12, ACS, **2005**.

著者紹介

氏名：松本 真治 (Shinji Matsumoto)

年齢：26歳

所属：京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻
博士後期課程1年

連絡先：〒615-8510 京都府京都市西京区京都大学桂
TEL：075-383-2754 FAX：075-383-2759
E-mail：matsu_shin2005@yahoo.co.jp

出身学校：九州大学大学院工学府物質創造工学専攻（修士取得）
学位：修士（工学）

現在の研究テーマ：ナノ・マイクロソフトマテリアルの創製
趣味：スポーツ観戦（大分トリニータ）

氏名：濱地 格 (Itaru Hamachi)

年齢：45歳

所属：京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻 教授
連絡先：〒615-8510 京都府京都市西京区京都大学桂

TEL：075-383-2754 FAX：075-383-2759
E-mail：ihamachi@sbchem.kyoto-u.ac.jp

出身大学：京都大学大学院工学研究科合成化学専攻
学位：工学博士

現在の研究テーマ：超分子ナノバイオ材料の開発

タンパク質・酵素の精密有機化学および
エンジニアリング
細胞内/外有機化学

主な著書：生命化学のニューセントラルドグマ（化学同人）

趣味：スポーツ観戦（ホークス）、自分勝手な家族サービス

お知らせ (3月31日発売予定)

開発元 **DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.**

IgG 精製キット

IgG Purification Kit - A
IgG Purification Kit - G

各種動物への免疫後に得られる腹水や血清などにはイムノグロブリンG (IgG) の他に、アルブミンなどのタンパク質が多く含まれており、一般的に硫酸塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマト法、あるいはプロテインA/Gクロマト法などによりIgG画分へと精製されます。

IgG Purification Kit - A及びIgG Purification Kit - Gは、各種動物のIgGを単離、精製するためのキットです。キットにはプロテインAまたはプロテインG固定化ゲル、および各種緩衝液が含まれており、わずか30分でIgGを高純度、高回収率で精製することができます。プロテインA/G固定化の担体としてはシリカゲルを採用しています。遠心後のプロテインA/G固定化ゲル上の残液量はごく少量であり、プロテインA/Gへの抗体結合後のゲル洗浄操作によって、プロテインA/G未結合の物質を完全に除去することができます。また、プロテインA/Gへ結合したIgGは溶出時の酸性条件下に長時間さらすことなく素早い溶出操作を行うことで、IgGの活性低下を最小限に抑えることができます。

本キットは1回の精製につき50 µlの腹水や血清、200 µg程度のIgGの精製が可能です。

なお、プロテインA及びプロテインGに対するIgGの親和性は動物種により異なりますので、表1を参考にご選択ください。

表1 血清50 µlからのIgG回収量 (280 nmの吸光度から算出)

	IgG Purification Kit - A (µg)	IgG Purification Kit - G (µg)
Horse	150-250	200-300
Calf	200-300	250-350
Donkey	200-300	200-300
Goat	50-100	150-250
Hamster	150-250	100-150
Chicken	25- 50	10- 20
Porcine	200-300	150-250
Mouse	150-250	150-250
Sheep	50-100	150-250
Guinea Pig	150-200	100-200
Rat	50-100	100-200
Rabbit	200-300	150-250
Human	150-250	200-300
Cat	150-250	100-200
Dog	200-300	100-200

< 特長 >

- 精製操作は約30分で完了
- 高純度・高回収率
- 1回につき50 µlの血清や腹水、200 µgの程度の抗体精製が可能
- プロテインA/G固定化ゲルは約10回の再利用が可能
- 小社ラベリングキットシリーズに適した量の抗体精製が可能

< キット内容 >

- Protein A pack (または Protein G pack) 1 tube pack
- Washing Buffer 10 ml × 1
- Elution Buffer 1.6 ml × 1
- Catching Buffer 0.8 ml × 1

< 本キット以外に必要なもの >

- 200 µl マイクロピペッター
- マイクロチューブ
- 遠心機 (マイクロチューブ用)
- ボルテックスミキサー

< 操作法 >

例) IgG Purification Kit - A の場合



IgG を含む試料溶液と Washing Bufferの混合溶液をプロテインA 固定化ゲルに加え、プロテインA へIgG を吸着させる。



遠心によりプロテインA未結合物質を除去する。



Washing Bufferを加え、遠心し、プロテインA未結合物質を完全に洗浄除去する。



Elution Bufferを加えた後、遠心によりIgGを溶出させる。

品名	容量	本体価格 (¥)	メーカーコード
IgG Purification Kit - A	1 set	Request	AP01
IgG Purification Kit - G	1 set	Request	AP02

Topics on Chemistry

モノクローナル抗体の迅速・簡便なペルオキシダーゼ標識

広田 次郎, 清水 眞也



著者紹介

氏 名：広田 次郎 (Jiro Hirota)
 年 齢：28 歳
 所 属：独立行政法人農業・生物系特定
 産業技術研究機構
 動物衛生研究所 免疫研究部
 免疫病理研究室 非常勤研究員

連絡先：〒305-0856 茨城県つくば市観音台 3-1-5
 Tel : 029-838-7833 FAX : 0298-38-7833
 E-mail : jhirota@affrc.go.jp

学 位：修士 (農学)

研究テーマ：1) アルボウイルスの新規血清診断法の開発
 2) モノクローナル抗体作製とその応用



氏 名：清水 眞也 (Shinya Shimizu)
 年 齢：51 歳
 所 属：独立行政法人農業・生物系特定
 産業技術研究機構
 動物衛生研究所免疫研究部、
 免疫病理研究室、主任研究官

連絡先：〒305-0856 茨城県つくば市観音台 3-1-5
 Tel: 0298-38-7833 FAX : 0298-38-7833
 E-mail : shimizux@affrc.go.jp

学 位：博士 (農学)

研究テーマ：1) 疾病の次世代診断法の開発
 2) IgE モノクローナル抗体の開発
 3) モノクローナル抗体作製とその応用

イムノアッセイは、抗原-抗体反応を利用した高感度で特異性の高い方法であり、様々な物質を検出、定量するために欠くことのできない分析法として、幅広い分野で多用されている。この中でも特に酵素標識抗体を用いる酵素抗体法は、ラジオイムノアッセイと同程度の感度を有し、取扱いの危険性もないことから、検出系として広く用いられている。今日ではイムノアッセイに用いる、標識されたモノクローナル抗体やポリクローナル抗体が多数販売され、種々の解析に用いられている。抗体に標識する手法は表1に示したような方法が開発されてきたが、実験室レベルにおいては標識二次抗体の使用が一般的であり、一次抗体への標識は行われてこなかった。この理由として、抗体に酵素や蛍光物質を標識する技術は高度で熟練が必要である、酵素などを標識する過程で抗体の特異性が著しく減少、あるいは失活することがある、mgオーダーの抗体が必要である、二次抗体に用いる多種類の標識抗体が市販されている、等をあげることができる。特にこの標識過程における抗体の失活についてはモノクローナル抗体において顕著であり、このため、モノクローナル抗体への直接標識は通常行われていない。

一次抗体への直接標識により、実験手順の簡略化、多重染色や競合試験が可能となり、また、二次抗体による影響を排除することができるため、抗体への簡易な標識法はメリットが大きく、要

求性の高い技術である。

(株)同仁化学研究所の Peroxidase Labeling Kit - SH(以下 -SH キット)および Peroxidase Labeling Kit - NH₂(以下 -NH₂ キット)は 標識に必要な抗体量が 50 ~ 200 μg である、精製および濃縮に Filtration Tube を用いるのでゲルろ過や透析の必要がない、標識に要する時間は三時間程度と短い、標識条件が比較的穏和であり抗体が失活しにくい、という特徴を持っているキットである。

今回、モノクローナル抗体を -SH キット、-NH₂ キット、グルタルアルデヒド二段階法、および過ヨウ素酸改良法でペルオキシダーゼ(POD)標識し、ELISA にて酵素標識抗体の活性を比較し、各手法の有効性を検討した。

材料および方法

抗体：ブルータングウイルス抗原に対するモノクローナル抗体 (8A3B.6, IgG2a) を腹水より精製したものをを用いた。

酵素標識：POD 標識は、グルタルアルデヒド二段階法、過ヨウ素酸改良法、(株)同仁化学研究所製 Peroxidase Labeling Kit - SH および Peroxidase Labeling Kit - NH₂ により行った。標識手順はグルタルアルデヒド二段階法⁵⁾、過ヨウ素酸改良法⁷⁾は文献に従い、-SH キット、-NH₂ キットは添付マニュアルに従った。酵素標識抗体の活性比較：各 POD 標識抗体はタンパク質濃度をあわせて、ELISA を行うことで比較した。タンパク質濃度は 280 nm における吸光度 (A₂₈₀) により算出し、各々 10 μg/ml、5 μg/ml、2.5 μg/ml、1.25 μg/ml、0.625 μg/ml、0.313 μg/ml、0.156 μg/ml の濃度に希釈し、用いた。

ELISA：96well プレート (MAXISORP, Nunc) に不活化ブルータングウイルス抗原を 37 °C で 60 分吸着させ、次いで 20% の BlockAce (大日本住友製薬㈱) で 37 °C で 60 分ブロッキングした。このプレートに各標識抗体の希釈系列を分注し、37 °C で 60 分反応させた。反応終了後 POD 基質液 (ABTS, Sigma) を分注し、37 °C で 30 分インキュベーションを行い、プレートリーダーにて 405 nm での吸光度を測定した。なお、プレートの洗浄は各工程ごとに行った。

結果および考察

-SH、-NH₂ キットおよび過ヨウ素酸改良法による各 POD 標識モノクローナル抗体の吸光度を図に示した。なお、グルタルアルデヒド二段階法により POD 標識したモノクローナル抗体は、抗原への反応性が全く確認されなかったため、図には表示していない。

図に示されるように、-SH キットによる標識抗体では、低い抗体濃度でも高い OD 値を示した。0.625 μg/ml 以上のタンパク質濃度では測定限界以上に達したため、検出限界以上の OD 値は 2.0 として示した。この結果は、-SH キットに用いられているマレイミド法が、ヒンジ部への特異的な標識であり、また方法上 self-coupling が少なく、pH 中性域での温和な反応であるために、抗体および POD の活性がほとんど損なわれなかったためであると考えられた。

次に、-NH₂ キットによる標識抗体では、同じタンパク質濃度での OD 値が -SH キットによる標識抗体と比べ、約 1/2 であった。この理由として、-SH キットでは手法の関係上、IgG (分子量

表1 抗体の酵素標識法

標識法名	手順	特徴	問題点
グルタルアルデヒド一段階法 ¹⁾	酵素とタンパク質の混合液にグルタルアルデヒドを加え、室温で1~2時間放置することで標識する。	手法が簡便である。	タンパク質が重合して巨大分子となり、抗体活性が著しく損なわれることがある。
グルタルアルデヒド二段階法 ⁵⁾	酵素を過剰のグルタルアルデヒドで処理した後、ゲル過によって未反応のグルタルアルデヒドを除去する。次にこのグルタルアルデヒドと結合した酵素とタンパク質を反応させて標識する。	グルタルアルデヒド一段階法と比較して標識抗体の重合が起こりにくい。	酵素を過剰グルタルアルデヒドで処理するため、ペルオキシダーゼでは活性が30~50%減少することがある。 ^{2,3,4)}
過ヨウ素酸法 ⁷⁾	ペルオキシダーゼのアミノ基をすべて1-fluoro-2,4-dinitrobenzene(FDNP)によりブロックする。次いでこのDNP化されたペルオキシダーゼの糖の部分に過ヨウ素酸で酸化し、酸素分子に結合したアルデヒド基を作り出す。ペルオキシダーゼのアルデヒド基と抗体のアミノ基を反応させ、シッフ塩基を形成して標識する。	効率的にペルオキシダーゼを標識することができる。	標識物がself-couplingにより重合しやすくなることがある。また、すべてのアミノ基をブロックしても活性が失われない酵素以外には適応できない。
過ヨウ素酸改良法 ^{8,9)}	過ヨウ素酸法での、FDNPの使用を止め、pHを4~5に保った状態でペルオキシダーゼと過ヨウ素酸ソーダを反応させる。	過ヨウ素酸法では、その35%がself-couplingによってdimerとなるのに対し、過ヨウ素酸改良法ではdimerは5%程度に抑えることができる ⁹⁾ 。	アミノ基をブロックしても活性が失われない酵素以外には適応できない。
マレイミド法 ⁶⁾	酵素等をN-hydroxysuccinimide ester(N-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)等で処理し、マレイミド基を導入する。次いでこの酵素と還元したタンパク質とを反応させる。	pH中性域の温和な条件で反応が進行する。マレイミド基やチオール基はタンパク質のアミノ基や水酸基等とはほとんど反応しないため、self-couplingを起こさない。タンパク質にチオール基が無い場合には、アミノ基が存在していれば、これを利用してチオール基を導入することができるため、多くのタンパク質に標識が可能である。	詳細な条件検討が必要である。

150,000)は還元型IgG(分子量75,000)となり、この還元型IgG分子にPODが標識される。これに対し、-NH₂キットではIgG分子にそのままPODが標識される。このためタンパク質量あたりのPOD分子数は、-SHキットで作成したものの方が-NH₂キットで作製したものの2倍近くとなるためであることが考えられた。また-NH₂法では、-SH法とは異なり抗体の特定部位に酵素がラベルされるわけではない。このため、抗原認識部位にも標識され、OD値が若干低下することも考えられた。

過ヨウ素酸改良法で標識した抗体では、-SHキットや-NH₂キットと比べて著しくOD値が低かった。酵素活性自体は失活していなかったため、この現象は操作の過程でモノクローナル抗体の抗原への結合能が大きく低下したためであると考えられた。ポリクローナル抗体では、グルタルアルデヒド二段階法や過ヨウ素酸改良法により酵素標識した場合でも、抗体の活性は充分使用可能な範囲であることが多い。しかし、抗原を認識する部位が単一であるモノクローナル抗体では、pHの影響などで抗体の活性が著し

く低下、あるいは失活することが知られている。今回用いたモノクローナル抗体においても、グルタルアルデヒド二段階法で標識した抗体は抗原との結合性をほぼ失い、過ヨウ素酸改良法においても抗原との結合性は著しく低下していた。モノクローナル抗体の種類により失活の程度は異なると考えられるが、モノクローナル抗体への標識にグルタルアルデヒド二段階法や過ヨウ素酸改良法は適当ではないと考えられる。

-SHキットおよび-NH₂キットは、モノクローナル抗体の抗原への結合性が失活することなく、迅速・簡易に標識することができることから、利用価値の高い優れたキットであった。また、このキットで標識した抗体は、付属の保存液に溶解した状態で、4にて4ヶ月間保存しても活性がほとんど変化しないため、保存も容易であった。なお、ここには示していないが、FITC標識キットでも今回と同様の手順で、抗原結合能の低下もなく簡便・迅速に蛍光標識可能であった。

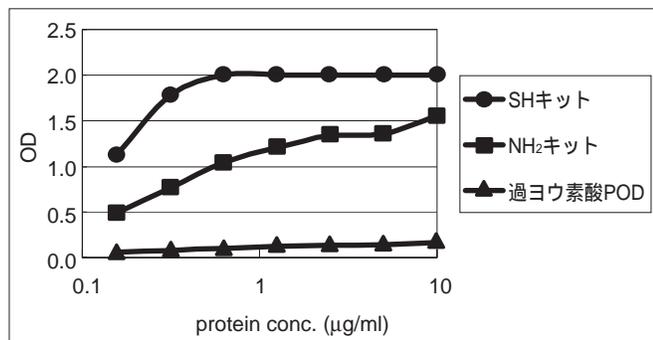


図1 各標識法での抗体濃度に対する酵素活性値の比較

参考文献

- 1) S. Avrameas, "Coupling of enzymes to protein with glutaraldehyde. Use of the conjugate for the detection of antigen and antibodies", *Immunochemistry*, **1969**, 6, 43.
- 2) D. M. Boorsma and G. L. Kalsbeek, "A comparative study of horseradish peroxidase conjugates prepared with one-step and two-step method", *J. Histochem. Cytochem.*, **1975**, 23, 200.
- 3) D. M. Boorsma and J. G. Streefkerk, "Peroxidase-conjugate chromatography. Isolation of conjugate prepared with glutaraldehyde or periodate using polyacrylamide-agarose gel", *J. Histochem. Cytochem.*, **1976**, 24, 481.

- 4) D. M. Boorsma, J. G. Streefkerk and N. Kors, " Peroxidase and fluorescein isothiocyanate as antibody marker. A quantitative comparison of two peroxidase conjugates prepared with glutaraldehyde or periodate and a fluorescein conjugate ", *J. Histochem. Cytochem.*, **1976**, *24*, 1017.
- 5) E. Engvall and P. Perlmann, " Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G ", *Immunochemistry*, **1971**, *8*, 871.
- 6) K. Kato, Y. Hamaguchi, H. Fukui and E. Ishikawa, " Enzyme-linked immunoassay I. Novel method of synthesis of the insulin-¹²⁵I-D-galactosidase conjugate and its applicable for insulin assay ", *J. Biochem.*, **1975**, *78*, 235.
- 7) P. K. Nakane and A. Kawaoi, " Peroxidase-labelled antibody. New method of conjugation ", *J. Histochem. Cytochem.*, **1974**, *22*, 1084.
- 8) P. K. Nakane, " Preparation and standardization of enzyme-labelled conjugates. ", PP.81, in :R. M. Nakamura, W. R. Dito and E. S. Tucker, (eds.) :Immunoassay in the Clinical Laboratory, Alan R. Liss Inc., New York, **1979**.
- 9) M. B. Wilson and P. K. Nakane, " Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase(HRPO) to antibodies ". pp.215, in : W.Knapp, K. Holuber and G. Wick(eds.) : Immunofluorescence and related staining techniques, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, **1978**.

関連商品

標識用キットシリーズ(Dojindo Labeling Kits)

・ 簡単、迅速なラベル化キット

Dojindo Labeling Kits は活性化試薬とフィルトレーションチューブにより抗体等を簡単に標識するためのキットです。前処理 - 反応 - 精製までを全て一つのフィルトレーションチューブ上で行うことができ、3時間以内に標識体を得られます。1回の標識操作で50 ~ 200 µgのサンプルを処理することができます。フィルトレーションチューブを用いた精製はゲルろ過や透析などに比べ標識体の回収率が高く、貴重なサンプルの標識に適しています。キットには保存溶液が付属しており、標識体を安定に保存することができます。

・ 高分子から低分子まで

Dojindo Labeling Kitsは分子量50,000以上の高分子のラベル化を行うことができます。活性化酵素を標識するPeroxidase Labeling KitsとAlkaline Phosphatase Labeling Kitsに関しては、さらに分子量5,000以下の低分子標識も可能です。

・ 2タイプの標識方法

標識方法としてはアミノ基標識用のNH₂タイプとスルフヒドリル基標識用のSHタイプの2種類のキットがあります。NH₂タイプはN-hydroxysuccinimide(NHS)で活性化した試薬を用いており、タンパク質等のNH₂基を標識することができます。SHタイプはMaleimide基で活性化しており、還元抗体などSH基を有するサンプルの標識に利用することができます。使用されるサンプルの特性に合わせお選びください。

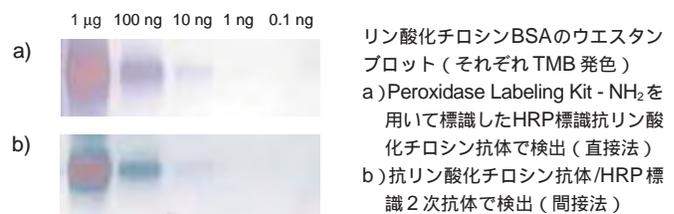
免疫組織染色・ELISA・ウエスタンブロット用

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
Peroxidase Labeling Kit - NH ₂			LK11
Peroxidase Labeling Kit - SH			LK09
	各 3 samples	17,000	

Peroxidase は酵素免疫測定において一般的な検出用酵素で、ELISA やイムノブロットングなど、多くの手法に用いられ、特に免疫組織化学的手法に適しています。

< 実験例：ウエスタンブロット >

リン酸化チロシンBSAをSDS-PAGEで泳動した後、ニトロセルロース膜に転写し、Peroxidase Labeling Kit - NH₂で作製したHRP標識抗リン酸化チロシン抗体を用いて検出した。2次抗体を用いた間接法に比べ、より高感度な検出が可能であった。



リン酸化チロシンBSAのウエスタンブロット(それぞれTMB発色)
 a) Peroxidase Labeling Kit - NH₂を用いて標識したHRP標識抗リン酸化チロシン抗体で検出(直接法)
 b) 抗リン酸化チロシン抗体/HRP標識2次抗体で検出(間接法)

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH ₂			LK12
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - SH			LK13
	各 3 samples	21,000	

Alkaline Phosphatase はペルオキシダーゼと並び酵素免疫測定に汎用されている酵素です。化学発光を利用した検出方法は感度に優れており、特にブロットングや組織染色に広く利用されています。

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
Biotin Labeling Kit - NH ₂			LK03
Biotin Labeling Kit - SH			LK10
	各 3 samples	12,000	

ビオチン - アビジン複合体を用いたシステムはEIAなどの免疫学測定や組織染色の分野で広く利用されており、目的に応じ、酵素または蛍光標識されたアビジン、ストレプトアビジンと反応させることができます。

免疫組織染色・フローサイトメトリー用

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
Fluorescein Labeling Kit - NH ₂			LK01
	3 samples	21,000	

汎用性の蛍光色素であるフルオレセインを標識するためのキットです。FITCと同じ励起・蛍光波長で測定可能です。導入されるフルオレセイン数は、クエンチングが起こらないように最適化されています。

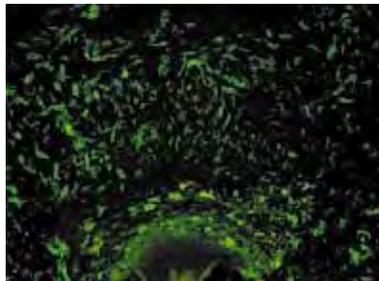
λ_{ex} / λ_{em} = 500 / 525 nm

開発元 **DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.**

九州大学 - 同仁化学組織対応型連携に関するお知らせ

<実験例：免疫組織染色>

モノクローナル抗ラットI-A抗原抗体 (Serotec clone #MRCOX-6) 100 μg を Fluorescein Labeling Kit - NH₂ を用いて Fluorescein 標識し、ラット下顎骨を染色した。



Fluorescein標識抗ラットI-A抗原抗体を用いて染色したラット下顎骨凍結切片の免疫組織染色像

(画像提供：東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科歯随生物学分野
揚光艶先生、川島伸之先生)

九州大学と小社は、九州大学での優れた研究成果を迅速に実用化することを目的に組織対応型(包括的)連携契約を締結致しました。下記の技術に関して現在実用化を検討しております。これらにご興味ございましたら小社までお問い合わせ下さい。

No.007 Protein kinase C eta (η)の特異的基質ペプチド

セリン/スレオニンキナーゼである Protein kinase C (PKC)には12種類のサブファミリーが存在しており、各サブファミリーによる細胞内作用は異なる。Protein kinase C etaは最近グリオーマ(脳腫瘍)のターゲットシグナルとして注目されているが、リン酸化研究に利用可能な基質ペプチドは開発されていない。

九州大学では、10種類の Protein kinase C (alpha, beta, gamma, delta, theta, epsilon, iota, lambdaおよびzeta)にはリン酸化されず、Protein kinase C etaにのみリン酸化される基質ペプチドの開発に成功した(Protein kinase C eta 10 ng/μl濃度で90%以上リン酸化)。今後、診断および治療用基質ペプチドとして、また、各種研究用基質ペプチドとしての利用が期待される。

No.008 Rho-kinase に特異的リン酸化される基質ペプチド

セリン/スレオニンキナーゼである PKA、PKC および Rho-kinaseはRXS/TまたはRXXS/Tという同じリン酸化基質モチーフを有するので、細胞内リン酸化研究のためには特異性を持つ基質ペプチドの開発は必要不可欠なことである。

九州大学では、血管疾病に深く関与している Rho-kinase に特異的にリン酸化される2種類の基質ペプチドを開発した。Rho-kinase に対する基質ペプチドの K_m (mM)と k_{cat} (min⁻¹)は A 基質の場合 0.29 と 6.48、B 基質の場合 0.38 と 20.9であった。

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH ₂			LK14
HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH ₂			LK15
	各 3 samples	21,000	

標識率がよく、蛍光強度の高い標識体が得られます。励起光による褪色も起こりにくく、他社の蛍光標識キットに比べ安価です。
HiLyte Fluor™ 555 : λ_{ex} / λ_{em} = 555 / 570 nm
HiLyte Fluor™ 647 : λ_{ex} / λ_{em} = 655 / 670 nm

フローサイトメトリー用

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
Allophycocyanin Labeling Kit - NH ₂			LK21
B-Phycoerythrin Labeling Kit - NH ₂			LK22
R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH ₂			LK23
	各 3 samples	43,000	
Allophycocyanin Labeling Kit - SH			LK24
B-Phycoerythrin Labeling Kit - SH			LK25
R-Phycoerythrin Labeling Kit - SH			LK26
	各 3 samples	38,000	

蛍光タンパク (Phycobiliprotein) を標識するためのキットです。低分子の蛍光色素に比べ、1分子あたりの蛍光強度が高く、励起スペクトルの幅が広いため種々の波長で励起出来ます。

Allophycocyanin	λ _{ex} / λ _{em} = 650 / 660 nm
B-Phycoerythrin	λ _{ex} / λ _{em} = 564 / 575 nm
R-Phycoerythrin	λ _{ex} / λ _{em} = 564 / 575 nm

Topics on Chemistry

新規蛍光プローブを用いた生体内 H₂O₂ のイメージング

株式会社 同仁化学研究所 園田 晋也

活性酸素種 (ROS) は癌、炎症、動脈硬化を始めとする様々な疾患を引き起こす酸化作用だけでなく、細胞内情報伝達などのシグナルメッセンジャーとしての役割を持つことが知られており、生命化学の幅広い研究領域で注目を集めている。

ROS の一種である H₂O₂ はスーパーオキシド (O₂⁻) の SOD による副産物として知られ、酸化ストレスの指標となっている。また、mitogen-activated protein (MAP) kinase のようなリン酸化酵素、nuclear factor B (NF- κ B), activating protein 1 (AP-1) のような転写因子、protein tyrosine phosphatases (PTPs)、ion channels、G proteins など細胞増殖や細胞死を制御するシグナルタンパク質へのセカンドメッセンジャーとしての役割を担っていることも知られている。このような重要なファクターであるにもかかわらず、その発生、伝達、作用のメカニズムは明らかになっていない。

ROS の生体内での役割を明らかにするために ESR 法、吸光度法、蛍光光度法、化学発光法など種々の検出法が開発されてきた。中でも、蛍光プローブをロードした生細胞を蛍光顕微鏡下で観測する方法 (蛍光イメージング法) は、生きている状態で生物応答を感度良く、リアルタイムで、空間分解能高く捉えることが出来る点で優れており、近年注目されている方法である。

蛍光イメージングを行う際、検出対象分子を可視化する蛍光プローブの存在が不可欠であるが、最も使用事例の多いプローブは強い蛍光を発する色素を2電子還元した構造のロイコ染料である。代表的なものとしては 2',7'-ジクロロジヒドロフルオレセイン (DCFH)、ジヒドロローダミン 123、ジヒドロエチジウムなどが挙げられる。これらのプローブは高い検出感度を持っているが、励起光をあてるだけで著しい蛍光強度の増大が起こり、また、全ての ROS と反応するという選択性の乏しさが問題となっている。

最近、J. Chang らは上記問題点を克服した蛍光プローブの開発を目指し、Fig. 1 に示す Boronate の誘導体である3種類のプローブ Peroxyfluor-1 (PF1)、Peroxyresorufin-1 (PR1)、Peroxyxanthone-1 (PX1) を発表している^{1,2)}。

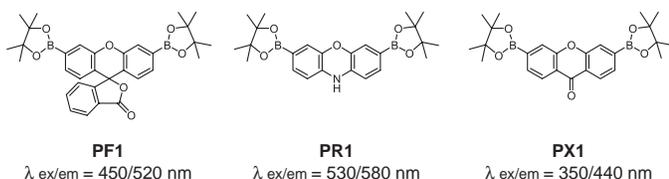
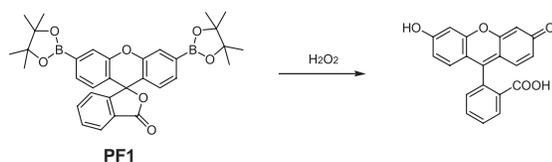


Fig. 1

これらのプローブは ROS と反応することで、Boronate の脱保護が起こり、励起光を照射するとそれぞれ緑、赤、青の蛍光を発する。



これらの蛍光プローブの特徴は、まず第一に高い H₂O₂ 選択性を持つことである。これは、Boronate の脱保護が H₂O₂ に対して選択的に起こるため、他の ROS では Boronate の脱保護がほとんど起こらない。PF1 の場合、NO に対して 6 倍以上、他の ROS (TBHP: *t*-butyl hydroperoxide, O₂⁻, NO⁺, •OH, •O⁻Bu, ClO⁻, O₃, ¹O₂) に対しては 100 ~ 500 倍以上の蛍光強度を示す。PR1 の場合、TBHP, ClO⁻, ¹O₂ に対して 15 倍以上、他の ROS に対しては 500 ~ 1000 倍以上の蛍光強度を示し、PX1 の場合、NO⁺ に対して 6 倍以上、ClO⁻, NO に対して 60 倍以上、他の ROS に対しては 100 ~ 500 倍以上の蛍光強度を示す。このような選択性は従来のプローブには見られないものである。

第二の特長は、高い光耐性を有していることである。細胞内にロードした後、励起光を照射しても、試薬による蛍光ブランクの上昇はほとんど見られない。前述の DCFH をはじめとする既存のプローブは蛍光観察時の励起光照射により蛍光強度の上昇が起こるため正しい解釈が困難であったが、これらの蛍光プローブを使用することにより信頼性の高いデータを得ることができる。

第三の特長は、膜透過性を持ち、細胞内の H₂O₂ をイメージングすることが可能ということである。J. Chang らは、HEK 細胞に各蛍光プローブをロードし、共焦点顕微鏡または、二光子顕微鏡で細胞内 H₂O₂ の蛍光イメージングを行っている。また、PF1 を用い、海馬ニューロンのイメージングにも成功した。しかしながら、イメージング可能なのは μM レベルでの細胞内 H₂O₂ 濃度の変化であり、H₂O₂ の生体内での作用を解明するには必ずしも十分な感度ではない。

ここで紹介した Boronate 誘導体は、H₂O₂ 選択性、光耐性、膜透過性を持ち合わせ、細胞内イメージングが可能という優れた性能を有している。今後、より高感度なプローブが開発されれば、生理学的、病理学的な H₂O₂ のメカニズム解明に繋がるのが期待される。

参考文献

- 1) M. C. Y. Chang, A. Pralle, E. Y. Isacoff and C. J. Chang and *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 15392.
- 2) E. W. Miller, A. E. Albers, A. Pralle, E. Y. Isacoff and C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 16652.

学会展示のご案内

下記会場にて、小社試薬製品のご案内を行います。
皆様のご来場をお待ちしております。

第 79 回日本薬理学会

平成 18 年 3 月 8 日 (水) ~ 10 日 (金) パシフィコ横浜

連載休載のご案内

今号掲載予定でした浜松医科大学の櫻井孝司先生の連載「ライブセルイメージング技術講座」は都合により休載とさせていただきます。

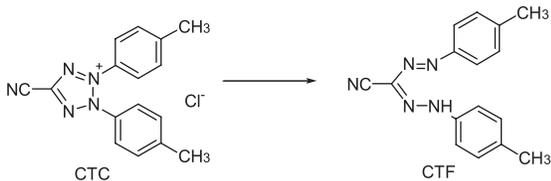
Q & A

生菌選択的蛍光染色試薬：CTC

Q1 CTCが蛍光を発する原理を教えてください。

A1 CTCはテトラゾリウム塩類という化合物に属し、細胞毒性試験などで使用されているMTTに類似した化合物です。細菌細胞内に取り込まれ、NADPH等により還元されて、CTFというホルマザンになります。

CTFはB励起の波長により630 nmの蛍光を発することから、この蛍光により細胞の染色状況を確認できます。



Q2 CTCおよびホルマザン(CTF)の光学特性を教えてください。

A2 CTCは400 nmよりも長波長側には吸収を持たず、無色の溶液で、還元されてCTFとなり450 nm付近に吸収極大をもちます。

CTFは溶液として溶けた状態では蛍光を発せず、固体として析出した状態でのみ蛍光を発します。

450 nm付近の励起により、630 ~ 640 nmの蛍光が確認できます。

蛍光顕微鏡であれば、B励起で蛍光観察可能です。

フローサイトメトリーでは488 nmのArレーザーで励起し、605 ~ 725 nmのチャンネルで検出している報告もあります。

Q3 CTCと他のテトラゾリウムとの比較データはありますか。

A3 NTBやINTと比較した報告がありますが、NTBやINTのホルマザンは蛍光特性がありません。

NTBはシアン化合物の存在下では、CTCの4倍ホルマザンが細胞内に取り込まれることが確認されています。

INTとの比較では、INTではホルマザン濃度が2 mmol/lで極大となり、3 mmol/lでは極大値の70%、4 mmol/lでは60%程度に吸光度が低下します。一方、CTCでは2 ~ 6 mmol/l濃度範囲でほぼ一定の光学強度を示し、その範囲での光学強度の差は約15%程度です。

Q4 細菌類を染色するというのですが、どの細菌も同じように染色できますか？

A4 全ての種が染色できる訳ではなく、染色出来ない種もあると言われています。

下記の菌類は論文で染色が報告されています。

グラム陽性菌(好気性)

Staphylococcus aureus (黄色ブドウ球菌) *Staphylococcus epidermidis* (表皮ブドウ球菌) *Bacillus megaterium* (巨大菌) *Listeria monocytogenes* (リステリア菌)

グラム陰性菌(好気性)

Pseudomonas putida (プチダ菌) *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)

Campylobacter jejuni, *Campylobacter coli*,

Klebsiella pneumoniae (肺炎杆菌) *Enterobacter*

Cloacae, *Vibrio cholerae* (コレラ菌) *Salmonella*,

Escherichia coli (大腸菌)

グラム陽性嫌気性菌が、比較的染色しにくいともいわれていますが、使用するCTCの純度や不適切な条件でのストック溶液の保存による分解が要因という可能性もあります。

Q5 細菌以外の哺乳類細胞も染色できますか。

A5 哺乳類細胞は染色されません。哺乳類細胞のviability assayを行った例がありますが、その際には電子メディエーターとの併用が必須で、かつ細胞外でホルマザンを生じます。つまり、CTCが哺乳類細胞内では単独で還元されないため、細胞が染色されません。

Q6 菌が存在する溶液中にCTCを添加するだけで染色できるのですか？

A6 細菌の懸濁液にCTC溶液を添加し、室温で0.5 ~ 2時間程度インキュベートすることで、細菌を染色することができます。

Q7 CTCは細菌のどこを染色しますか？染色された色素は、どのくらい保持されるのでしょうか？

A7 細菌細胞内でホルマザンが生成沈澱して、細胞内を染色します。

保持時間は正確にはわかりませんが、CTCで染色を行った後にFISH法を行っている例があり、染色して数時間は観察する上で問題ないと考えられます。

Q8 CTFとなり沈澱することということですが、毒性はありませんか？

A8 CTCが高濃度(6 mmol/l以上)であると毒性が生じると記している報告があります。

高濃度でインキュベート時間を長くすると、細菌は死ぬことがあります。CTCの還元生成物であるCTFが結晶として析出し、細菌の細胞膜を壊すためです。この現象はCTCだけでなく、非水溶性のホルマザンを生成するMTTなどのテトラゾリウム類でも起こります。

したがって、適切なCTC濃度、インキュベート時間の検討が必要です。

Q9 どのくらいの菌数を測定できるのですか？

A9 菌数の規定はありませんが、

細菌があまり多すぎると顕微鏡観察がしにくくなります。

視野中100個程度までの細胞数を数えるのが、一般的です。

Q10 CTCは溶液状態で安定ですか？ どの程度の期間保存できますか？

A10 CTCは水溶液中で容易に加水分解を受け、細菌の染色が出来なくなります。そのため、用時調製でお使い下さい。
なお、アルカリ性では分解が早く、弱酸性では比較的安定であることが分かっています。

Q11 基本的な使用方法があれば教えてください。

A11 細菌懸濁液

CTC 水溶液（終濃度: 0.5 ~ 5 mmol/l）
インキュベート（遮光、5分 ~ 24時間）

フローサイトメーターで検出
または、0.2 μm ブラックメンブランフィルターで細菌を捕集し、乾燥後、蛍光顕微鏡観察する。
CTCで染色した後ホルマリンで固定し、DAPIで二重染色を行う例も多くあります。

（詳しくは参考文献2）をご覧ください）

Q12 VNC状態*に関係なく測定できますか？

A12 VNC状態にあっても無くても、呼吸活性を有する細菌であれば染色することができます。ただし、蛍光強度はVNC状態にある場合弱く、その状態を脱すると強くなります。
（* : p25参照）

Q13 CTCを染色に用いるメリットは？またデメリットは？

A13 メリット

- VNC状態にある細菌でも短時間で検出することができる。
- 生じるホルマザンが蛍光性なのでINTに比べ感度が高く、バックグラウンドが低い。

デメリット

- 溶液状態では保存安定性が悪い。
- 細菌の種類により染色されやすさが異なるという報告がある（測定に使用したCTCの純度を考慮していないため、取り込まれやすさがCTCの純度によって違ってきている可能性もあります）。

Q14 CTCと他の染色剤との併用は可能ですか？

A14 DAPI、DiBAC₄(3)、FITC 標識抗体などと併用した報告があります。

DAPIは全細胞を染色し、CTCは生細胞のみを染色しますので、併用することで生菌と死菌の割合を確認できます。
DiBAC₄(3)はVNC状態の菌をフローサイトメトリーで確認するのに併用されています。VNC状態の細胞は脱分極しているため、DiBAC₄(3)が取り込まれやすくなり蛍光は強く

です。細胞がVNC状態を脱するとこの蛍光は弱くなり、その一方でCTCは細胞に還元され易くなって蛍光が強くなります。これを利用して抗生物質の作用による細胞のVNC状態の変化をCTCとDiBAC₄(3)を併用して観察している報告があります。

また、FITCを標識したO-157:H7抗体とCTCを併用することで、生きたO-157を蛍光顕微鏡とフローサイトメトリー法で検出している報告があります。

参考文献

- 1) R. A. Bovill, J. A. Shalloross and B. M. Markey, "Comparison of the Fluorescent Redox Dye 5-Cyano-2,3-ditolyltetrazolium Chloride with p-Iodonitrotetrazolium Violet to Detect Metabolic Activity in Heatstressed *Listeria monocytogenes* Cells", *J. Appl. Bacteriol.*, **1994**, 77(4), 353.
- 2) N. Yamaguchi, M. Sasada, M. Yamanaka and M. Nasu, "Rapid Detection of Respiring *Escherichia coli* O157:H7 in Apple Juice, Milk, and Ground Beer by Flow Cytometry", *Cytometry A*, **2003**, 54A, 27.
- 3) M. T. E. Suller and D. Lloyd, "Flow Cytometric Assessment of the Postantibiotic Effect of Methicillin on *Staphylococcus aureus*", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1998**, 42(5), 1195.
- 4) G. Schaule, H. C. Flemming and H. F. Ridgway, "Use of 5-Cyano-2,3-ditolyl Tetrazolium Chloride for Quantifying Planktonic and Sessile Respiring Bacteria in Drinking Water", *Appl. Environ. Microbiol.*, **1993**, 59(11), 3850.
- 5) D. J. Reasoner and E. E. Geldreich, "A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water", *Appl. Environ. Microbiol.*, **1985**, 49, 1.
- 6) M. Kawai, N. Yamaguchi and M. Nasu, "Rapid Enumeration of Physiologically Active Bacteria in Purified Water Used in the Pharmaceutical Manufacturing Process", *J. Appl. Microbiol.*, **1999**, 86, 496.
- 7) A. W. Coleman, "Enhanced Detection of Bacteria in Natural Environments by Fluorochrome Staining of DNA", *Limnol. Oceanogr.* **1980**, 25, 948.
- 8) E. Severin, J. Stellmach and H.-M. Nachtigal, "Fluorimetric Assay of Redox Activity in Cells", *Anal. Chim. Acta*, **1985**, 170, 341.
- 9) A. Kitaguchi, N. Yamaguchi and M. Nasu, "Enumeration of Respiring *Pseudomonas* spp. in Milk within 6 Hours by Fluorescence In Situ Hybridization Following Formazan Reduction", *Appl. Environ. Microbiol.*, **2005**, 71(5), 2748.
- 10) G. G. Rodriguez, D. Phipps, K. Ishiguro and H. F. Ridgway, "Use of a Fluorescent Redox Probe for Direct Visualization of Actively Respiring Bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, **1992**, 58(6), 1801.

訂正

ドージンニュース No.117 に一部誤りがありましたので以下のように訂正致します。

P15 総合カタログに関して

誤：次版の25版(2006-2007)は来年2月に発行となります。

正：次版の25版(2006-2007)は今年2月に発行となります。

新製品

生菌選択的蛍光染色試薬：CTC

<特長>

- 呼吸活性を有する細菌を選択的に染色可能。
- 寒天平板培地法に比べ短時間で結果が得られる。
- 蛍光顕微鏡・フローサイトメトリーで使用可能。

細菌の検出には、培地で細菌を培養し、生成したコロニー数を計数する寒天平板培地法が主に用いられています。しかし最近になって、生きてはいるが培養できない状態（VNC状態：viable but non-culturable）の存在が明らかとなり、寒天平板培地法ではごく一部の細菌しか検出されないことが分かっています。そのため、新しい原理に基づくVNC細菌検出法の研究がなされており、その1つとしてCTC(5-Cyano-2,3-ditolyl-2H-tetrazolium chloride)が用いられています。CTCはモノテラゾリウム還元色素であり、呼吸活性に伴う電子伝達系の作用で還元され蛍光性のCTC formazan(CTF)になり細菌細胞内に蛍光性沈澱として蓄積します。そのため、CTCで染色された細菌をフローサイトメトリーで検出したり、細菌をブラックメンブランフィルターで捕集した後蛍光顕微鏡観察することで、呼吸活性を有する細菌数を求めることができます。CTCで細菌の染色を行った後にDAPIで二重染色を行うと、全菌数と呼吸活性を有する細菌数を同時に求めることができます。CTC染色に要するインキュベーション時間はおよそ30分から4時間と短時間であるため、寒天平板培地法に比べて迅速に細菌を検出することができます。

細菌をはじめとする微生物による食中毒や感染症が社会問題となることは珍しくありません。CTCによる蛍光染色法は医薬品・食品・飲料やそれらの生産工程の衛生管理の手法としても、期待されます。

小社のCTCは高純度であり、呼吸活性を有する細菌数を、より正確に求めることができます。CTCを溶液状態で保存しておくと、染色能が低下することがありますので、用時調製でお使い下さい。



Fig. 1 CTCによる大腸菌染色画像

大腸菌 *E. coli* DH5 α の細胞懸濁液100 μ lに、CTC水溶液100 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで4時間インキュベートした。そのうちの50 μ lをガラスプレート上、倒立型蛍光顕微鏡で観察した（バンドパス励起フィルター:485 nm、ローカット吸収フィルター:510 nm）。上は同一視野の位相差像である。

（福岡県工業技術センター生物食品研究所
赤尾哲之先生、末永光先生、楠本賢一先生より御提供）

販売中止のご案内

小社都合により下記製品の販売を中止いたしますのでご連絡申し上げます。

ただし在庫あるものに限り対応できますので、小社または販売店までお早めにお問い合わせください。

販売中止品

品名	容量	コード	メーカーコード
TiO(II)-AA	5 g	346-02733	A043
VO(II)-AA	5 g	348-02911	A044
BFA	5 g	340-00271	B006
Capriquat	25 g	349-03362	C005
Capriquat	500 g	343-03365	C005
MTT(Iyophilized)	500 回	344-07631	CK05
MTT(Iyophilized)	2500 回	340-07633	CK05
DPM	5 g	345-01103	D017
DCM,sublimed	100 mg	-	D474
HPPA	1 g	345-05003	H008
HPPA	100 mg	349-05001	H008
NBD-Cl	1 g	343-03701	N019
NO ₂ /NO ₃ Assay Kit-F II	100 回	347-07981	NK04
Nitrosothiol Assay Kit	1 set	-	NK06
PEM	25 mg	-	P253
Ethyl acetate, (Sp)	500 ml	347-01185	SP12
n-Heptane, (Sp)	500 ml	349-01385	SP13
TTA	5 g	347-02861	T030
TTA	25 g	345-02862	T030
TMBZ-PS	1 g	-	T036

包装容量削減品

品名	容量	コード	メーカーコード
Diethyl ether,(AV.POV)	500ml × 6本組	346-03931	AV01
Bathocuproine	1 g	343-00163	B001
Biotin-(AC ₅) ₂ -hydrazide	100 mg	347-06423	B301
Biotin-hydrazide	100 mg	343-06403	B303
Biotin-OSu	100 mg	342-06353	B304
Biotin-AC ₅ -OSu	100 mg	349-06363	B305
Biotin-(AC ₅) ₂ -OSu	100 mg	346-06373	B306
Biotin Sulfo-OSu	100 mg	341-06823	B319
Biotin-AC ₅ Sulfo-OSu	100 mg	344-06813	B320
Biotin-(AC ₅) ₂ Sulfo-OSu	100 mg	347-06803	B321
Coelenterazine-WS	10 mg	-	C397
Cell Counting Kit -F	100 回	347-07741	CK06
BES	250 g	343-00261	GB03
NN solution	500 ml	341-02065	N014
Diphenyl phosphorochloridate	100 g	346-06591	NX19
TMPyP	100 mg	345-03881	T001

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
CTC	100 mg	14,000	C440

お知らせ

第25版総合カタログ発行

第25版総合カタログ(2006/2007)が完成しました。



今回のカタログではプロトコルをカラー化し、操作写真などを追加することで、より見やすく分かりやすくなっております。新製品のプロトコルも追加いたしましたので、是非ご覧下さい。

あわせて、ホームページの商品カタログ・プロトコルも更新致しました。

今後も、皆様のご研究により役立つ情報をご提供して参りたいと考えております。

カタログのご請求は、小社マーケティング部までご依頼ください。
URL: <http://www.dojindo.co.jp/catalog.request.html>
Tel:0120-489548

商品毎のパンフレットをご用意いたしております。

Labeling Kitにはどんなものがあるの？ SAMs 試薬ってどういう風に使い分けるの？

細胞が染まった写真を実際に見てみたいんだけど.....といったご要望に対応できるようにパンフレットをご用意いたしております。是非ご請求下さい。

- ・ Dojindo Labeling Kits データ集
- ・ -Cellstain-細胞染色用色素
- ・ 自己組織化単分子膜研究用試薬 (SAMs 試薬)
- ・ 膜タンパク質可溶化剤
- ・ Reagents for Cell Biology
- ・ 分子生物学関連試薬

ご請求は小社マーケティング部まで

URL: <http://www.dojindo.co.jp/catalog.request.html>

Tel:0120-489548

商品に関するお問合せは、小社カスタマーサービス部にて承っております。お気軽にお問合せください。

E-mail: info@dojindo.co.jp

フリーダイヤル : 0120-489548

フリーファックス : 0120-021557



ホームページアドレス

URL : <http://www.dojindo.co.jp/>

E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス 0120-021557

フリーダイヤル 0120-489548