

## CONTENTS

### ●Review

進化分子工学による人工酵素の設計と創出  
大阪府立大学大学院理学系研究科 藤井 郁雄

漢方診断／再発見5 漢方医学教育の難しさ  
熊本大学医学部附属病院 宇宿 功市郎

### ●Topics on Chemistry

抗体医薬を目指した Bicyclic peptides の作製技術  
株式会社同仁化学研究所 池上 天

蛍光シリカナノ粒子の可能性  
株式会社同仁化学研究所 上野 右一郎

2010 No.134

ISSN 0385-1516

# DOJIN NEWS

ドージンニュース

## 目次

### Review

- 進化分子工学による人工酵素の設計と創出  
大阪府立大学大学院理学系研究科 藤井 郁雄…………… 1

### 漢方診断・再発見

- 5 漢方医学教育の難しさ  
熊本大学医学部附属病院 宇宿 功市郎…………… 10

### Topics on Chemistry

- 抗体医薬を目指した Bicyclic peptides の作製技術  
株式会社同仁化学研究所 池上 天…………… 12  
蛍光シリカナノ粒子の可能性  
株式会社同仁化学研究所 上野 右一郎…………… 14

### Commercial

- 新製品  
自己組織化単分子膜作製用試薬…………… 16

### 開発中

- Isothiocyanobenzyl – NTA …………… 13

### Q & A

- Microbial Viability Assay Kit – WST …………… 15

### お知らせ

- 展示のご案内…………… 13  
27 版カタログ発行

## 新製品案内

自己組織化単分子膜作製用試薬 C16-PEG-SAMs

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Amino-EG <sub>6</sub> -hexadecanethiol, hydrochloride	10 mg	45,000	A505
Carboxy-EG <sub>6</sub> -hexadecanethiol	10 mg	32,000	C463
Hydroxy-EG <sub>6</sub> -hexadecanethiol	10 mg	28,000	H396
Hydroxy-EG <sub>3</sub> -hexadecanethiol	10 mg	28,000	H395



熊本城  
名将加藤清正により築城され、日本三名城の一つに数えられる。  
2007年に築城400年を迎えている。

写真提供：田代順一（熊本市）

## 進化分子工学による人工酵素の設計と創出 Generation of Artificial Enzymes in Directed Evolution.



藤井 郁雄 (Ikuo Fujii)

大阪府立大学大学院理学系研究科  
生物科学専攻生体分子科学分野

### 要約

Advances in methods for conformational prediction, structural analysis and site-directed mutagenesis of proteins and peptides have contributed to the understanding of their structure and function. However, with the exception of a few successes, the generation of practical functional molecules solely by rational design remains a difficult challenge. The aim of our study is to investigate molecular design relying on evolutionary processes, called as “directed evolution”, to generate a novel class of biofunctional molecules. This evolutionary approach consists of three steps; 1) constructions of protein/peptide libraries based on structural information, 2) expressions of the libraries on phage particles, and 3) selections with investigator-imposed selective pressures. In this work, we study on generation of artificial

### 1. はじめに

新しい機能を持つ人工タンパク質を自由自在に創り出すことは、化学・生物工学の最終目標の1つである。この20年の遺伝子工学や構造生物学のめざましい進展は、タンパク質の大量調製や部位特異的変異操作による修飾酵素の合成を可能にしている。今や、タンパク質は、対応するDNAを合成するだけで、機械的に合成できる。しかしながら、これまでの研究からわかるように、水素結合などのネットワークを考慮して機能発現に必要なアミノ酸を適切な部位に正確にならべることは難しい。研究者はDNA合成機の前で「どのような設計図を書いたらいいのだろうか」と苦吟しているのが現状である。

それでは、生細胞のDNA上にあるすばらしいタンパク質の設計図は、どのようにして書かれたのだろうか？いまのところ、この設計図はダーウィン進化の過程でDNA上に間接的に書き込まれたと考えられている。すなわち、生細胞は、長い年月をかけて突然変異を蓄積して分子多様性をもたらす、選別を繰り返して酵素のような高度な触媒機能をもつタンパク質を獲得する。最近、このような自然界における進化の過程「多様性の発生と選別」を人為的にコントロールして、機能性タンパク質の創出を目指す進化分子工学（自然進化と区別するためにコンビナトリアル・バイオエンジニアリングとも呼ばれる）が注目されている。多様な化合物を一挙に合成する「コンビナトリアル・ケミストリー」が知

biocatalysts by immune system that uses the evolutionary processes to give receptor-like molecules. As a natural enzyme binds the transition state of the chemical reaction to lower the activation energy, immunization with a putative transition-state analog (TSA), with the expectation that the induced antigen-combining site could be both geometrically and electronically complementary to the transition-state, provides catalytic antibodies. We have succeeded to generate antibodies catalyzing highly stereo and regio-specific hydrolyses with immunization of phosphonate transition-state analogs. Furthermore, to evolve catalytic antibodies toward higher catalytic activity, phage-displayed antibody (Fab) libraries were constructed to screen antibodies with optimized differential affinity for the transition state relative to the ground state. Recently, we have demonstrated a new strategy for generating catalytic antibodies, namely, by the generation of antigen-combining site that function as an apoprotein for binding functionalized components, called “holoabzyme”. Replacement of the functionalized components enables a single antibody to catalyze multiple reactions,  $\beta$ -elimination, decarboxylation and aldol reactions. Catalytic antibodies have great potential for generating novel catalysts as well as for providing opportunities to examine the evolutionary dynamics of enzymes.

キーワード：

1) 抗体、2) 抗体酵素、3) 進化分子工学、4) ファージ表層提示ライブラリー、5) 遷移状態アナログ、6) ホロ抗体酵素、7) 立体選択的  
化学反応

られているが、進化分子工学では、生物学的手法を組み合わせ、人工的な生体触媒や生理活性分子を創出することを狙っている。すなわち、免疫システム（抗体ライブラリー）やファージ表層提示法（ペプチドやタンパク質ライブラリー）により、多様な分子ライブラリーを効率的にスクリーニングし、目的とした機能を持つ生体分子を獲得する手法である。本稿では、免疫システムから生まれる抗体タンパク質を取り上げて、進化分子工学による人工酵素の創出について紹介する。

### 2. 免疫システム

免疫システムは、外から侵入してくる抗原に应答し、高い親和性と特異性を持つ抗体タンパク質を産生する。侵入してくる抗原は多種多様なので、それらに対応するためには特別な抗体産生の仕掛けが必要になる。抗体タンパク質は、「多様性の発生、提示、選別」の過程を経て創られている（図1）。すなわち、免疫システムは、生体が私たちに与えた進化分子工学であり、これを利用することで目的とした触媒活性をもつ人工酵素を手に入れることができる。

抗体タンパク質の多様性は、抗体の抗原結合部位をコードする遺伝子セグメント（H鎖：V<sub>H</sub>, D, J<sub>H</sub> 遺伝子群、L鎖：V<sub>L</sub>, J<sub>L</sub> 遺伝子群）の組み合わせ（コンビナトリアル）により生ずる。マウスの場合、V<sub>H</sub> 遺伝子群は100個以上の遺伝子があり、D 遺伝

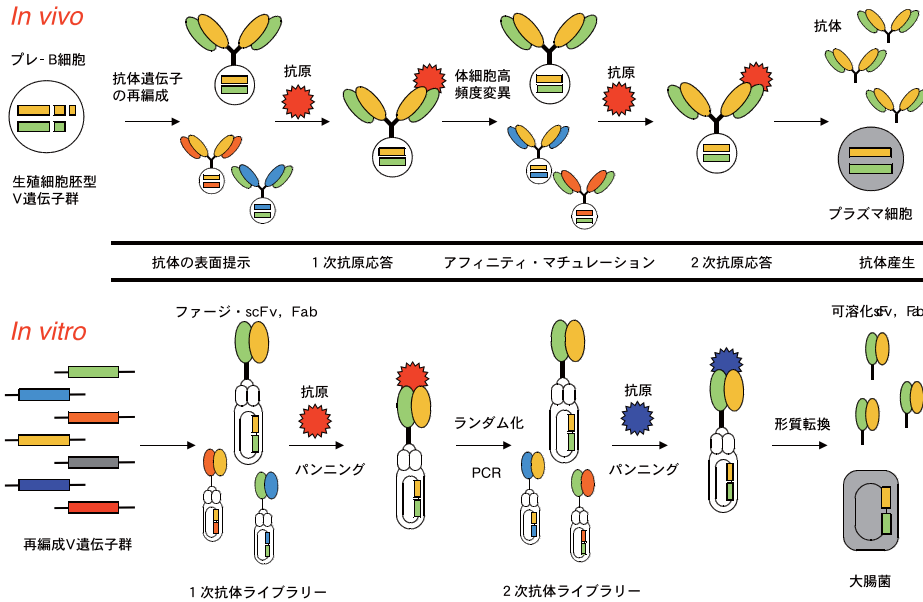


図1 抗体タンパク質ができる仕組み

抗体タンパク質は、多様性の発生、提示、選別の過程を経て創られている（上段：生体内）。繊維状ファージを利用して、免疫システムにおける抗体産生の過程を試験管の中で再現することができる（下段：試験管内）

子は約 15 個、 $J_H$  遺伝子は 5 個存在する。また、L 鎖を形成する  $V_K$  遺伝子群は 200 ~ 300 個、 $J_K$  遺伝子群は 5 個の遺伝子からなる。これらの遺伝子が、B 細胞が骨髄中の幹細胞から成熟 B 細胞に分化・成熟する過程で再編成される。このような仕組みで生じた特異性の異なる抗体タンパク質 ( $10^8$  種) は、B 細胞表面に提示され、外来抗原の侵入に備えている。第 1 免疫応答では、抗原に親和性のある抗体を提示している B 細胞がプラズマ細胞あるいは記憶細胞へと分化・増殖を始める。この増殖の過程で体細胞高頻度変異が起こり、抗体の多様性がさらに増える。あるものは体細胞高頻度変異の結果、親和性が低下し、あるものでは親和性が向上する。そこで、第 2・第 3 免疫に应答して、親和性のより高い抗体を提示している B 細胞が選択され、分化・増殖する（この過程をアフィニティー・マチュレーションと呼ぶ）。すなわち、免疫システムは、生体が私たちに与えた進化分子工学であり、これを利用することで目的とした結合活性をもつ生体機能分子を手に入れることができる。

### 3. テーラーメイド人工酵素：抗体酵素

抗体タンパク質を使って酵素の触媒機能を創出する試みがある。しかしながら、酵素の触媒機能を抗体で再現するには、抗体の選択基準を工夫する必要がある。その 1 つは遷移状態アナログに対する親和性を基準として抗体を選択する方法である。すなわち、酵素が化学反応の遷移状態と結合し安定化することによって触媒機能を発揮しているように、遷移状態アナログに結合する抗体タンパク質は、化学反応の遷移状態と結合し触媒機能を獲得するようになる。このような触媒活性を持つ抗体を「抗体酵素」と呼ぶ<sup>1,2)</sup>。酵素が何十億年という長い年月をかけて進化したのに対し、抗体の進化は数週間で行われるので、実験室で測定可能な時間内に分子進化の過程を再現して、テーラーメイドの生体触媒を創ることができる。

### 3.1. 抗体酵素の原理

一般に化学反応の触媒現象は、エントロピー因子、酸-塩基触媒、静電的効果などの触媒因子の組み合わせによって起こるものと理解されている。これに対して酵素触媒反応の大きな特徴の一つは、酵素が化学反応の遷移状態に結合し、それを安定化することによって反応の活性化エネルギーを減少させ、化学反応を促進していることである（図 2）。抗体酵素の触媒作用も、酵素と同様に反応の遷移状態を安定化するというに基づいている。すなわち、反応の遷移状態と立体的かつ電子的によく似ている化合物「遷移状態アナログ」をハプテンとして免疫すると、得られた抗体は反応の遷移状態と結合し、安定化することによって反応を触媒する。ハプテンとは、それ自身では抗原性をもちない低分子化合物で、キャリアータンパク質（ウシ血清アルブミンなど）と結合させることにより抗原性を獲得する。

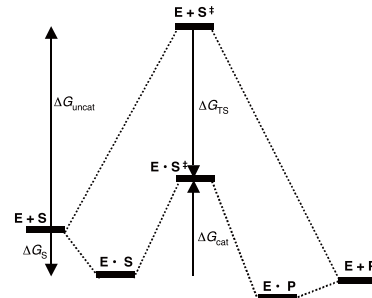


図 2 酵素触媒反応と非触媒反応の自由エネルギー変化

化学反応は高エネルギーの遷移状態 ( $S^\ddagger$ ) を経て進行し、生成物 (P) を与える。基質が基底状態 (S) から遷移状態 ( $S^\ddagger$ ) になるためには、高い活性化エネルギー ( $\Delta G_{uncat}$ ) を必要とする。酵素触媒反応では、酵素 (E) が遷移状態 ( $S^\ddagger$ ) に結合し、それを安定化 ( $\Delta G_{TS}$ ) することによって反応の活性化エネルギー ( $\Delta G_{cat}$ ) を減少させ化学反応を促進する。一方、基質の基底状態 (S) とは弱く結合 ( $\Delta G_S$ ) して、活性化エネルギー ( $\Delta G_{cat}$ ) をより減少させている。言い換えれば、酵素は遷移状態への親和性 ( $K_{TS}$ ) と基底状態への親和性 ( $K_m$ ) の差を最大にすることによって触媒活性を最大にする ( $K_m/K_{TS} = K_{cat}/K_{uncat}$ )。

図3にエステル結合の加水分解反応の例を示した。エステルの加水分解はカルボニル基の酸素原子上に負の電荷を持つ高エネルギーな四面体遷移状態(A)を経て進行する。この四面体遷移状態(A)に立体的かつ電子的に相補的な抗原結合部位を持つ抗体は、反応の活性化自由エネルギーを減少させ、加水分解反応を触媒する。現在、遷移状態アナログとしてリン酸エステル(B)が使われており、これを免疫する事によってエステル加水分解を触媒する抗体の作製が行われている<sup>3)</sup>。これまでに筆者らは、独自の遷移状態アナログ設計により立体選択的<sup>4-6)</sup>や位置選択的<sup>7-9)</sup>反応を触媒する抗体の作製に成功している。

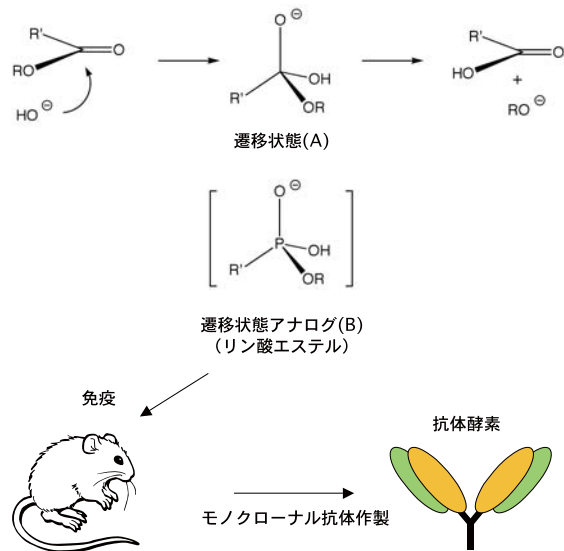


図3 遷移状態アナログの免疫による抗体触媒の作製(エステル加水分解反応)

### 3.2. 抗体酵素によるプロドラッグ医薬品の活性化

免疫システムを利用して、プロドラッグ医薬品を特異的に活性化させる人工酵素を作製した<sup>10, 11)</sup>。プロドラッグとは、医薬品の物性の改善や毒性軽減を目的として化学修飾された化合物であり、それ自身は薬理活性を示さないが、投与後生体の酵素やpHの変化により元の医薬品(親化合物)に変換されて薬理作用を発揮するものである。もし、生体内の天然酵素に対して安定なプロドラッグをテーラーメイドの抗体酵素で活性化することができれば、病巣特異的なドラッグ・デリバリーが可能になる。そこで、

表1 抗体触媒の親和性と触媒活性

Anti-bodies	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ (nM)	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{min}^{-1}\text{M}^{-1}$ )	$k_{cat}/k_{uncat}$	$K_m/K_i$
6D9	$0.129 \pm 0.006$	$61.4 \pm 8.4$	68.5	2,101	935	896
4B5	$0.032 \pm 0.001$	$3.7 \pm 0.3$	17.4	8,525	230	214
8D11	$0.034 \pm 0.002$	$2.6 \pm 0.6$	19.9	12,863	244	132
9C10	$0.008 \pm 0.000$	$0.9 \pm 0.1$	14.3	9,038	56	60
3G6	$0.006 \pm 0.000$	$1.3 \pm 0.2$	42.5	4,943	47	31
7C8	$0.115 \pm 0.005$	$3.8 \pm 0.3$	310.0	30,263	833	12

モデル医薬品として抗生物質であるクロラムフェニコール(1)を取り上げ、そのプロドラッグであるエステル(2)を加水分解する抗体を作製した(図4)<sup>11)</sup>。

エステル(2)の加水分解反応の遷移状態アナログであるリン酸エステル(3)を合成した。これをキャリアタンパク質(KLH)と縮合後、抗原としてマウスに免疫し、モノクローナル抗体を作製してハプテンに結合活性を持つ12種類の抗体を得た。この抗体について、エステル(2)の加水分解活性を検討したところ、6種類の抗体に顕著な触媒活性が観測された。もっとも活性の高かった抗体(6D9)は、抗体のない場合に比べて反応を800倍以上加速した(表1)。

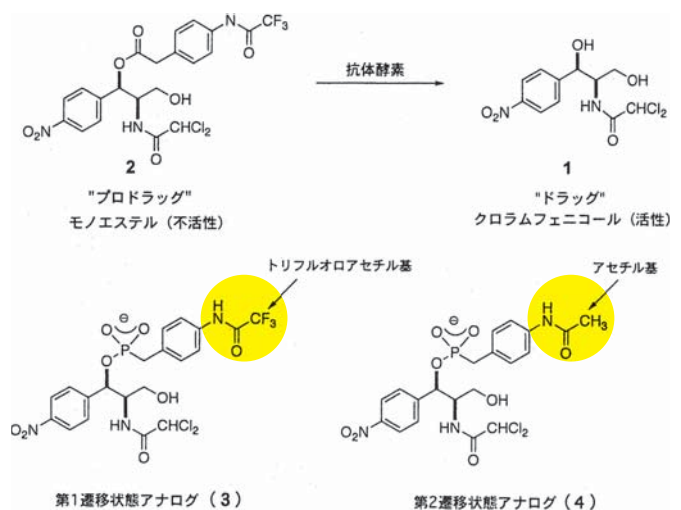


図4 触媒抗体によるプロドラッグ医薬品の活性化

### 3.3. 抗体酵素の触媒機構

遷移状態アナログ(3)の免疫から得られた抗体の結合活性と触媒活性を表1に示す。抗体酵素の反応速度論量を比較することによって、遷移状態アナログに対して高い親和性を持つ抗体が、必ずしも高い触媒活性を示すとは限らないということが判明した<sup>12)</sup>。最も親和性の高い抗体(抗体9C10:  $K_{TSA} = 0.014 \mu\text{M}$ )は最も触媒活性( $k_{cat} = 0.008 \text{ min}^{-1}$ )が低く、また高活性の抗体6D9

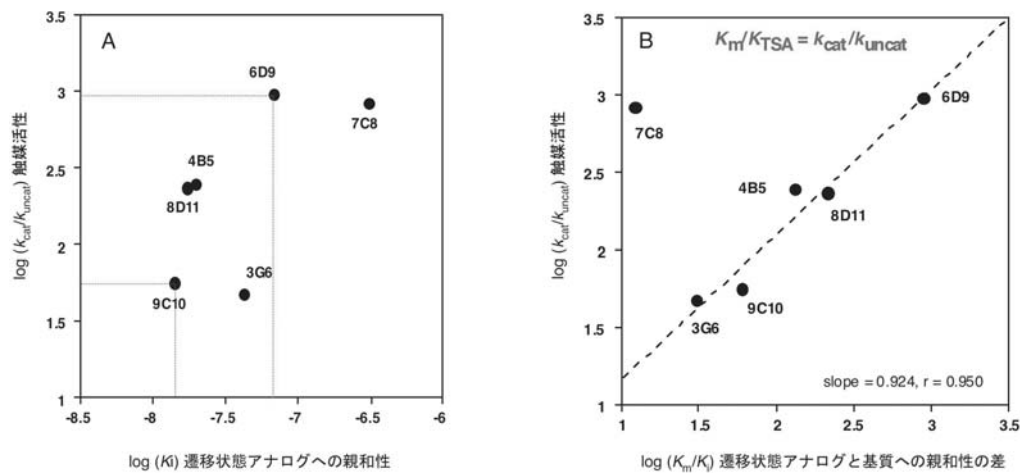


図5 遷移状態への親和性と触媒活性の相関

( $k_{cat} = 0.129 \text{ min}^{-1}$ ) は中程度の親和性 ( $K_{TSA} = 0.068 \mu\text{M}$ ) を示す (図 5A)。一方、反応加速 ( $k_{cat}/k_{uncat}$ ) と基質の基底状態と遷移状態に対する結合活性の差 ( $K_m/K_{TSA}$ ) に相関性が観測された。抗体 6D9 をはじめとして 8D11, 4B5, 9C10, 3G6 の 5 種の抗体では、 $k_{cat}/k_{uncat}$  値と  $K_m/K_{TSA}$  値がほぼ一致した (図 5B)。この解析から、触媒作用の発現するために重要なことは、遷移状態に対する強い結合と基底状態への弱い結合であり、親和性の差の大きい抗体が高い触媒活性を持つことが判明した。すなわち、抗体酵素に高い活性を付与するためには、遷移状態への結合だけでなく、遷移状態と基底状態との親和性の差が最大になるような抗原結合部位を構築する必要がある。

抗体酵素の触媒機構を明らかにするために、抗体 6D9 の X 線結晶解析を行った<sup>13)</sup>。抗体酵素 6D9 では図 6 に示すように、ハプテンの 2 個のベンゼン環は、Tyr (H58) と Trp (H100i) と  $\sigma-\pi$  相互作用で抗原結合部位の深い位置に取り込まれている。また、遷移状態を模倣しているホスホン酸エステル部の酸素原子は、抗

原結合部位の入り口に位置する His(L27d) と水素結合している。部位特異的変異操作により His(L27d) を Ala に置換した抗体は全く触媒活性を失う<sup>14)</sup>。以上の結果より、抗体酵素 6D9 においては、L 鎖 CDR-1 領域の His(L27d) が遷移状態のオキシアニオンと水素結合あるいは静電的相互作用し、遷移状態を安定化して触媒機能を発現している<sup>15, 16)</sup>。

以上のように、一連の抗体酵素はハプテンの設計から期待される遷移状態の安定化を触媒因子として、その機能を発現している。すなわち、抗体の触媒機能は、免疫系の多様性から生まれる偶発的なものではなく、合理的なハプテンの設計によって発現されるものといえる。

## 4. ファージ・ディスプレイ・システム

繊維状ファージは、大腸菌に感染する非常に単純なウイルスであり、遺伝子工学においてさまざまな用途に用いられている。このような繊維状ファージを利用することによって、免疫システムにおける抗体産生の過程を試験管の中で再現し、抗体タンパク質の機能を改良することができる<sup>17)</sup>。

### 4.1. 抗体の進化分子工学

ファージディスプレイを用いた抗体分子の選択は、基本的には、図 1 に示したような生体内の免疫系の働きである「多様性の発生」「提示」「選別」を模倣している。すなわち、1) 多様性を持つ抗体遺伝子を増幅する、2) ファージを抗体産生 B 細胞になぞらえ提示する、3) 目的とする機能で選択するの 3 段階をすべて試験管内で行うことになる。さまざまな特異性を有する分子を分子ごとに表面にディスプレイすることで、コンビナトリアルライブラリーを作り出し、ディスプレイされた抗体タンパク質を持つ機能に基づいて、新しい分子を選択することができるわけである。この手法により、実験動物の免疫化を経ることなく抗体分子を手にするようになっていくほか、免疫化が困難で取得が困難であった抗体の選択・調製が可能となり、さまざまな応用に成功を収めている。ここでは、ファージディスプレイを利用した抗体酵素の機能改変について述べる<sup>18, 19, 20)</sup>。なお、ファージディスプレイの詳細な手法については、参考文献に挙げた論文や他の成書を参照していただきたい<sup>21)</sup>。

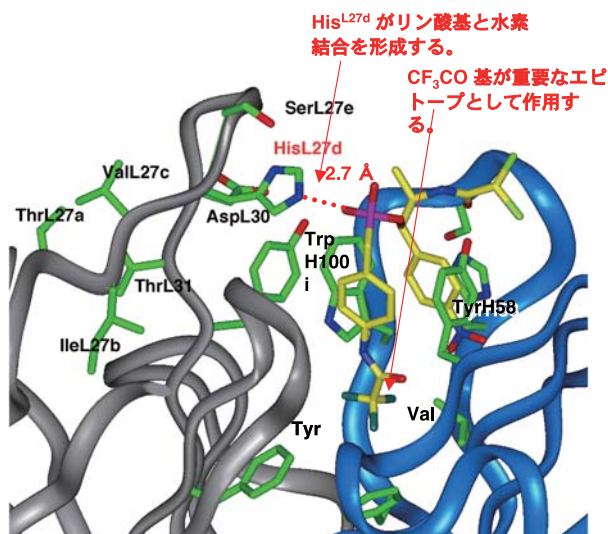


図6 抗体触媒 6D9 の X 線構造解析  
Fab 部分 (L 鎖: グレー, H 鎖: ブルー), ハプテン (イエロー)

## 4.2. 抗体酵素の高活性化

先に述べたプロドラッグ医薬品を特異的に活性化する抗体酵素(6D9)の高活性化に際して、ファージ・ディスプレイ・システムを利用した<sup>19, 20)</sup>。この方法により免疫法では取得することのできない高い活性を持つ抗体酵素の作製が可能になる。

酵素などの生体触媒の活性発現に重要なことは、遷移状態に対する強い結合と基底状態への弱い結合である。先に述べたように、抗体酵素の場合にも、高い活性を得るためには、遷移状態への結合だけでなく、遷移状態と基底状態との親和性の差が最大になるような抗原結合部位を構築する必要がある。ところが、抗体産生のメカニズムを考えると、一度の免疫で2つの分子種(遷移状態と基底状態)の情報をもつ抗体を作製することは不可能である。そこで、抗体産生の過程をファージ抗体を用いて試験管内で再現し、遷移状態と基底状態との親和性を差を最大にさせるように抗体の分子認識を最適化した。この方法は、従来の免疫法とは異なり、抗体遺伝子に任意に変異を導入したり、また多種の抗原で何度もスクリーニングしたりできることから、自由自在に抗原への親和性や抗原特異性を変化させることができる。

遷移状態と基底状態との親和性の差を大きくするためには、ハプテン分子全体よりも遷移状態を模しているリン酸エステル部分(四面体構造)に強く結合する抗体を選択する必要である。そこで、第1遷移状態アナログ(3)のトリフルオロアセチル基をアセチル基に変換した第2遷移状態アナログ(4)を合成し、これを使ってファージ抗体ライブラリーのスクリーニングを行った(図4)。遷移状態アナログ(3)のトリフルオロアセチル基は重要なエピトープなので、アセチル基に変換することで抗体の親和性が弱められる。こうすることで、一旦、抗原全体への親和性を下げ、リン酸エステルの四面体構造部分により強い結合を持つようになった抗体を選別する。

X線構造解析や部位特異的変異実験から、抗体6D9のL鎖CDR1のHis(L27d)が触媒残基として働いていることが判明している(図6)<sup>13,14)</sup>。そこで、活性中心のHis残基は固定し、その周辺のアミノ酸6残基に対してランダム変異を行い、抗体ライブラリーを作製した(図7)。そして、第2遷移状態アナログ(4)に対して、この抗体ライブラリーを8回パンニングし、ハプテン結合性の抗体を選別した。

得られた変異体は野生型(6D9)に比べて高い活性を示し、変異体(8Hg)では20倍以上強い触媒活性を獲得していた(表2)。従来の免疫法から得られた抗体酵素が、無触媒反応に比べ50~1000倍程度の反応加速を示すのに対し、ファージ抗体ライブラ

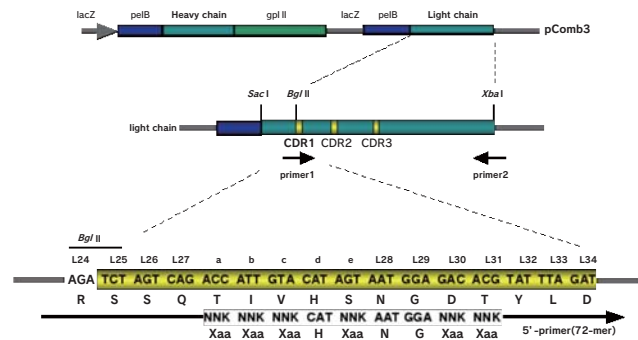


図7 抗体酵素6D9L鎖CDR1ファージライブラリーの構築

リーからは反応加速が6000~20000倍の抗体酵素を得ることに成功した。変異体の分子モデルを作成したところ、触媒残基His(L27d)のとなりにあるSer(L27e)がTyrに変わっていることが判明した(図6)。すなわち、野生型ではHis(L27d)が遷移状態と水素結合を形成し安定化させ、一方、変異体ではHis(L27d)とともに新しく導入されたTyr(L27e)とで2つの水素結合を作り、より強く遷移状態を安定化する。さらに、アミノ酸配列の比較により、ファージディスプレイ法の有用性が示された。Tyr(L27e)はSerから変異したものであるが、Ser(AGT)からTyr(TAT, TAC)への変異には核酸レベルで隣り合った2つの変異が起こることが必要である。このような突然変異は抗体産生の過程(体細胞変異による親和性成熟)では起こり難い。すなわち、得られた高活性抗体酵素を従来の免疫法で得ることは困難であり、ファージディスプレイ法の有用性が示された。

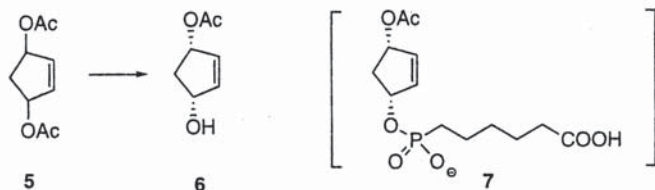
## 5. 抗体酵素が触媒する化学反応

抗体の特徴は、抗原に対して特異的に結合する高い分子認識である。特に、抗体酵素の抗原結合部位は天然酵素と同様に「不斉反応の場」となっているため、不斉反応への展開がもっとも期待される(図8)。通常、この種の反応は、①メソ化合物のエナンチオ場別反応、②プロキラル化合物のエナンチオ面別反応、③エナンチオマー区別反応(速度論的光学分割)の3つに分類することができる。エステル結合を加水分解する抗体酵素によって、このようなエナンチオ区別反応が可能になる。

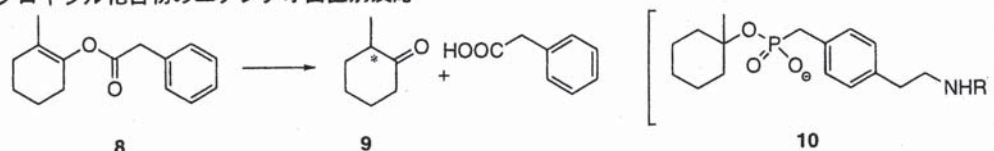
表2 抗体触媒変異体の親和性、触媒活性、アミノ酸配列(L鎖CDR1)

Abs	Sequences (LCDR1)														$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{TSA}$ (nM)	$k_{cat}/k_{uncat}$	$K_m/K_{TSA}$		
	24	25	26	27	a	b	c	d	e	28	29	30	31	32						33	34
3Ha	R	S	S	Q	P	L	V	H	Y	N	G	E	V	Y	L	D	1.358 ± 0.099	367.5 ± 48.4	29.0	9,841	12,672
8Hf	R	S	S	Q	P	I	V	H	Y	N	G	G	I	Y	L	D	2.264 ± 0.275	141.5 ± 41.8	8.8	16,406	16,080
8Hg	R	S	S	Q	P	I	V	H	Y	N	G	D	I	Y	L	D	2.593 ± 0.152	283.5 ± 31.0	12.6	18,791	22,500
8Hh	R	S	S	Q	P	V	V	H	Y	N	G	E	V	Y	L	D	0.760 ± 0.044	154.6 ± 21.0	40.1	5,507	3,855
6D9 (wild type)	R	S	S	Q	T	I	V	H	S	N	G	D	T	Y	L	D	0.129 ± 0.006	61.4 ± 8.4	68.5	935	896

メソ化合物のエナンチオ場区別反応



プロキラル化合物のエナンチオ面区別反応



エナンチオマー区別反応 (速度論的光学分割)

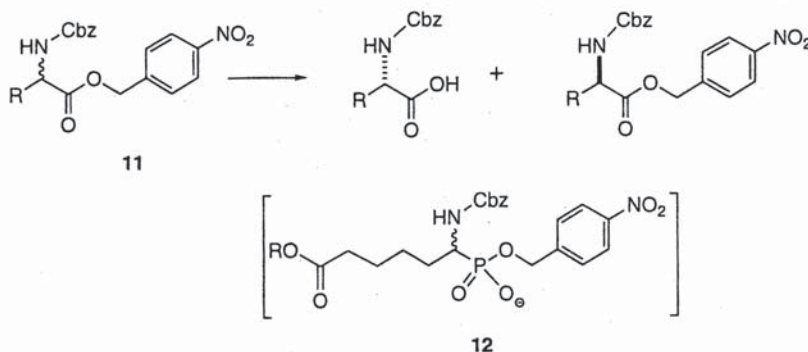


図8 抗体酵素による不斉反応

### 5.1. メソ化合物のエナンチオ場区別反応

メソ化合物 (5) から光学活性アルコール (6) へ加水分解反応を触媒する抗体が、ホスホン酸エステル (7) をハプテンとして作製された<sup>22)</sup>。得られた抗体の触媒活性は、本反応を触媒するアセチルコリンエステラーゼに比べてかなり低いものであったが、生成したアルコール (6) は 86% の光学純度を示す。

### 5.2. プロキラル化合物のエナンチオ面区別反応

ホスホン酸エステル (10) を免疫して得られる抗体酵素は、 $\alpha$  位にメチル基をもつエノールエステル (8) の加水分解において、プロトン化が片方の面から優先的に起こり光学活性の  $\alpha$  - メチルケトン (9) を与える<sup>4)</sup>。

### 5.3. エナンチオマー区別反応 (速度論的光学分割)

$\alpha$  - 置換基を有するアミノ酸エステル誘導体 (11) の両エナンチオマーのそれぞれに対して、エナンチオ選択的加水分解反応を触媒する抗体がハプテン (12) の免疫によって作製される<sup>5)</sup>。ハプテン自身はラセミ体だが、抗体を光学活性のアミノ酸エステルを

基質としてスクリーニングすることにより、L-体選択性抗体およびD-体選択性抗体を得ることができる。これらの抗体はアラニン、ロイシン、ノルロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、バリン、フェニルグリシンや非天然アミノ酸の4-ヒドロキシフェニルグリシンに対しても触媒活性を示し、高い立体選択性と同時に幅広い基質特異性がある。

### 5.4. 位置選択的反応

抗体酵素の厳密な分子認識は、分子内に多くの同一官能基を有する糖類の位置及び立体特異的の反応に適している。安価で容易に入手できる糖類は、有機合成の不斉制御素子や不斉配位子の出発原料として繁用されている。糖類を基質として合成を行うには、任意の水酸基を他の水酸基と区別することが重要な問題となってくる。特に、糖鎖合成の場合には、特定の水酸基から結合をさせようとすると、水酸基の保護-脱保護の操作を繰り返さなければならず、結果的に目的物を低収率でしか得られないことが多い。このような糖基質中の水酸基の保護-脱保護にかかる労力を軽減できれば、糖質関連化合物の合成をより効率的に行える。そこで、糖基質の構造を認識して複数のエステル結合の1つを選択的に切



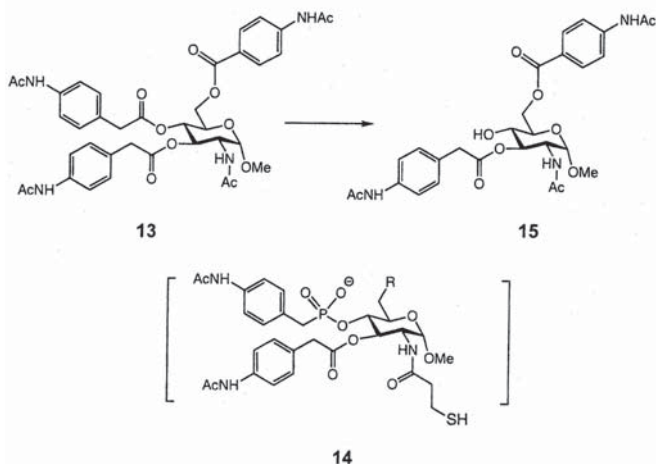


図9 抗体酵素による糖エステル誘導体の位置選択的脱保護反応

断する抗体酵素が作製された(図9)<sup>7)</sup>。

基質としてグルコサミンの3、4、6位の水酸基の4-トリフルオロアミノベンジルエステル基で保護したトリエステル(13)が用いられた。この基質の4位エステル基だけを位置選択的に脱保護するために、4位にホスホン酸エステル基をもつハプテン(14)の免疫により抗体が作製された。得られた抗体は、Michaelis-Menten型反応速度式に従って4位エステル基を加水分解し( $k_{cat} = 0.182 \text{ min}^{-1}$ ,  $K_m = 6.6 \text{ }\mu\text{M}$ ,  $k_{cat}/k_{uncat} = 2700$ )、生成物(15)を与える。この抗体酵素は位置選択性とともに立体選択性を示し、4位の立体異性体であるガラクサミン誘導体には作用しない。

## 6. ホ口抗体酵素

これまでに多くの抗体が創られ多種多様な有機化学反応を触媒することが示されている。これらの触媒抗体の多くは遷移状態アナログの免疫によって作製されている。そこで、筆者らは、従来の遷移状態アナログを免疫する手法とは全く異なる新しい触媒抗体の作製法の開発を目指して、ホ口酵素型触媒抗体の分子設計を検討した<sup>23)</sup>。ホ口酵素は、活性部位に低分子有機化合物のコファクターをもち、これを触媒基として化学反応を触媒する。そこで、抗体をアポ酵素として利用し、基質分子に加えて、人工合成コファクター分子に対する抗原結合部位の構築を行った。図10に示すように、反応性の異なる人工合成コファクター分子を設計し、それらを入れ替えることにより、抗体が触媒できる反応の種類や触媒機構を制御することを目指した。

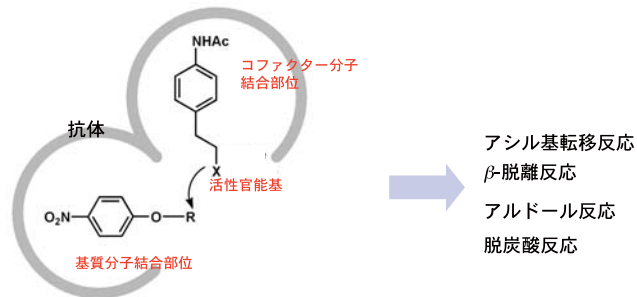


図10 ホ口抗体酵素：Holoabzyme  
人工コファクター分子の入れ替えにより、単一の抗体が多種の化学反応を触媒する。

## 6.1. ホ口抗体酵素の作製

リン酸モノエステル(B)をマウスに免疫することにより作製されたエステルの加水分解反応を触媒する抗体は、その抗原結合部位に遷移状態を安定化するアミノ酸残基(ヒスチジン、チロシンなど)が(B)の有する負電荷により誘導されるため、エステルの加水分解反応の遷移状態に特異的に結合し、安定化することによって反応を加速する。また、抗体はもともと非常に高い特異性を有しているため、この抗体がエステルの加水分解以外の反応つまり、遷移状態の全く異なる反応を触媒することは不可能である。これは、天然酵素であっても同様である。そこで、複数の有機化学反応を高効率で触媒するホ口酵素型触媒抗体の開発を目指し、図11に示すようなリン酸ジエステルハプテン(16)の設計を行った。

ハプテン(16)は2つの特徴を持っている(①*p*-ニトロフェニルリン酸エステル部分は、アシル基転移反応の遷移状態を模擬すると同時に抗原結合部位に基質分子結合部位を与える、②*N*-アセチルフェネチル部分は種々の人工コファクター分子結合部位を抗原結合部位に構築する)。また、電荷を持たないリン酸ジエステルハプテンを免疫に用いることにより、アシル基転移反応の遷移状態を強く安定化するようなアミノ酸残基が誘導されることに起因する遷移状態の安定化を触媒因子とするというよりも、基質分子および人工コファクター分子の2分子を幾何学的に適切な位置に置くことによる近接効果を主要な触媒因子とする触媒抗体の作製が期待される。これにより求核触媒、酸・塩基触媒能をもつ補酵素あるいは人工コファクター分子を抗原結合部位に導入し、それらを入れ替えるという新しい概念を導入することにより、人工コファクター分子により触媒できる反応の種類を制御可能な、天然にはない機能性をもつ触媒抗体の開発につながると期待される。

基質分子としてエステル(17)を用い、人工コファクター分子としてヒドロキシル基をもつ化合物(18)、アミノ基をもつ化合物(19)、チオール基をもつ化合物(20)を添加すれば求核触媒としてアシル基転移反応を、基質としてβ-ハロケトン(23)を用い、人工コファクター分子としてカルボキシル基をもつ化合物(24)を添加すれば塩基触媒としてβ-脱離反応を、人工コファクター分子としてアミン分子(19)を添加すればエナミン機構を経るアルドール反応および脱炭酸反応を触媒することが期待される(図11)。

## 6.2. アシル基転移反応

ハプテン(16)を担体タンパク質であるスカシ貝ヘモシアニン(KLH)やウシ血清アルブミン(BSA)への縮合を行い、KLH-ハプテン縮合体(KLH-1)をBalb/cマウスに免疫した。常法により、ハプテン(16)を特異的に認識する50種類のモノクローナル抗体が得られた。

次に、50種の抗体に関して活性スクリーニングを行った。ハプテン(16)の設計からまず考えられるエステル(17)とアルコール(18)とのアシル転移反応を検討した結果、22種の抗体に顕著な触媒活性を観測した。そこで最も活性の高かった2種の抗体(25E2, 27C1)について、詳細な反応速度論的解析を行った。人工コファクター分子としてアルコール(18)、アミン(19)、チオール(20)のいずれを用いた場合にも高い触媒活性を示した。アルコール(18)を用いた場合198倍(25E2)、109倍(27C1)、アミン(19)を用いた場合 $1.4 \times 10^4$ 倍(25E2)、 $5.5 \times 10^4$ 倍(27C1)、チオール(20)を用いた場合 $4.2 \times 10^3$ 倍(25E2)、 $3.0 \times 10^3$ 倍(27C1)の速度加速を示した。また、両抗体はハプテン(16)に対し非常

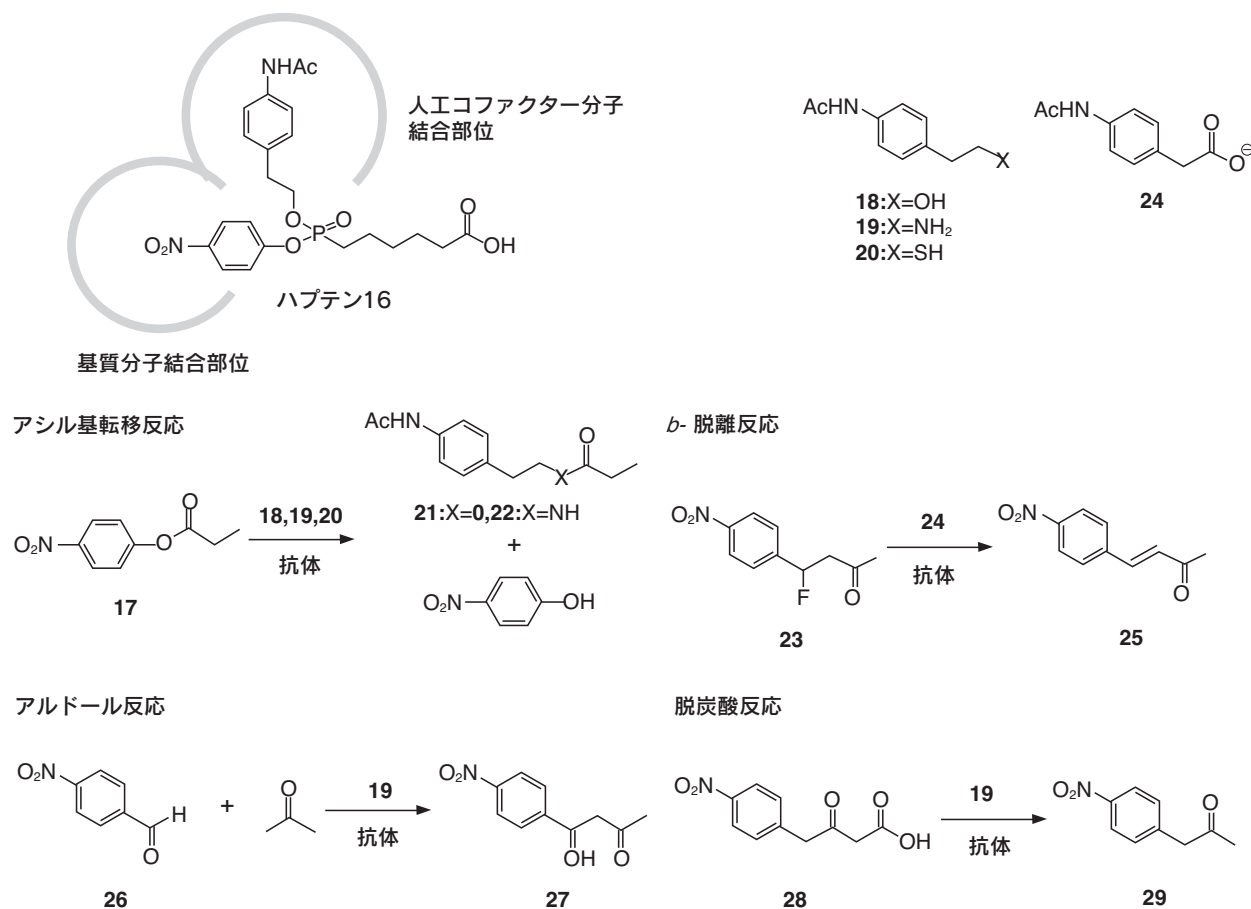


図 11 ホロ抗体酵素の分子設計と触媒反応

に高い結合能を有し (25E2:  $K_d = 27$  nM; 27C1:  $K_d = 8.7$  nM)、さらに抗体の触媒するすべての触媒反応 (アシル転移反応、 $\beta$ -脱離反応、アルドール反応および脱炭酸反応) はハプテン (16) の添加あるいは各種人工コファクター分子を反応系から除くことによって完全に阻害された。このことより、本抗体が触媒する反応は抗体の抗原結合部位で起こり、その触媒反応には人工コファクター分子が必須であることが判明した。

### 6.3. $\beta$ -脱離反応

前項で述べたアシル基転移反応の結果から、抗原結合部位に人工コファクター分子結合部位を構築できたことが明らかとなった。また、ホロ酵素型触媒抗体の最大の特徴と利点は、人工コファクター分子を入れ替えることにより触媒反応の種類およびその触媒機構を制御できることである。そこで、人工コファクター分子としてフェニル酢酸誘導体 (24) を用い、塩基触媒による  $\beta$ -脱離反応を検討した。その結果、抗体 25E2 が  $\beta$ -ハロケトン (23) からエノン (25) への  $\beta$ -脱離反応を触媒することがわかった。一方、抗体 27C1 はこの  $\beta$ -脱離反応を触媒しなかった。詳細な反応速度論的解析の結果から、 $K_m$  24 = 122  $\mu$ M,  $K_m$  23 = 864  $\mu$ M,  $k_{cat} = 0.89$  min<sup>-1</sup> と決定した。また  $k_{cat}/K_m$  23/ $k_{uncat}$  =  $2.4 \times 10^5$  と非常に大きな速度加速を示した。

### 6.4. アルドール反応および脱炭酸反応

アルドール反応は有機合成化学のみならず、生物学においても C-C 結合形成反応として最も重要で基本的な反応のひとつである。天然においても、アルドール反応を触媒する多くの酵素が見いだされている。これらアルドラーゼはその触媒機構に基づき大きく二つのクラスに分けることができる。その中でも、クラス I アルドラーゼはその活性部位にリジン残基をもち、アルドール供与体である基質とのシッフ塩基の形成を経て、アルドール反応を触媒する。そこで、一級アミンコファクター (19) を用い、クラス I アルドラーゼ型のアルドール反応の検討を行った。その結果、両抗体とも  $4.4 \times 10^4$  倍の速度加速を示し、非常に効率的にアルドール反応を触媒することがわかった。また、エナミンの前駆体であるイミニウムイオン中間体を捕捉できたことにより、両抗体が触媒するアルドール反応はクラス I アルドラーゼと同様にエナミン機構で反応が進行することが示唆された。

クラス I アルドラーゼは同様のエナミン機構により  $\beta$ -ケト酸の脱炭酸反応も触媒することが知られている。そこで、一級アミンコファクター (19) を用い、クラス I アルドラーゼ型の  $\beta$ -ケト酸 (28) の脱炭酸反応を検討した (図 11)。その結果、両抗体とも非常に効率的に脱炭酸反応を触媒することがわかった。抗体 27C1 の詳細な反応速度論的解析の結果から、 $K_m$  19 = 6.9 mM,

$K_m$  28 = 2.1 mM,  $k_{cat}$  = 1.29 min<sup>-1</sup> と決定した。また、 $k_{cat}/K_m$  28/ $k_{uncat}$  = 1.4 × 10<sup>5</sup> と非常に大きな速度加速を示すことがわかった。

ホ口酵素型触媒抗体の開発を目指して、ハプテンの設計および合成、マウスへの免疫、モノクローナル抗体の作製、活性スクリーニングを行い、触媒抗体 25E2, 27C1 の獲得に成功した。また、これら抗体は人工コファクター分子を入れ替えることによりアシル基転移反応、β-脱離反応、アルドール反応および脱炭酸反応と触媒反応の種類および触媒機構を制御可能であり、さらに、これまで作製されてきた類似反応あるいは同様の反応を触媒する触媒抗体と比較しても同程度あるいはそれ以上の触媒活性をもつことがわかった。また、このように一つの生体触媒が触媒機構の異なる様々な反応を効率よく触媒する例は触媒抗体においてはもちろんのこと天然酵素にも例がなく非常に興味深い。

## 7. おわりに：酵素と抗体

酵素は、多様な分子の発生と適応による選択を繰り返し、長い年月をかけて進化してきた。まず、エクソン・シャッフリングや遺伝子重複によって多様性が生まれ、初生の酵素が選択される。その後、突然変異の蓄積にもなってさらに多様性を増やし、より適応した活性をもつ酵素が選択される。このように酵素の分子進化は多様性の発生と触媒効率に基づく選択によって起こるわけだが、免疫システムの抗体タンパク質の産生機構と比較した時、図 12 に示すように多くの類似点を見いだすことができる。すなわち、免疫システムも酵素と同じ分子進化の仕組みを使って、目的とした抗原結合性の抗体タンパク質を産生する。抗体にしる、酵素にしる、分子進化の原動力は多様性の発生と選択である。しかも、免疫システムの場合、2～3週間で抗体タンパク質が産生するので、免疫システム自身を進化分子工学の手法として利用することができる。

抗体酵素とは生体のもつ免疫システムを利用して、多種多様な抗体タンパク質のレパートリーの中から、ハプテンのデザインにより望んだ触媒機能を持つ抗体を選別しようとするものである。これは、酵素が何億年という長い年月をかけて進化を繰り返し選別されることによって、高度な機能を獲得してきたのと似ており、機能デザインのための最も合理的な方法とも考えられる。1986年に最初の抗体酵素が見いだされてから、今日までに多くの抗体酵素が作製され、ペリ環状反応から加水分解反応までのいろいろな化学反応が抗体によって触媒されることがわかってきた。現在の物質生産プロセスは化学法や酵素法によって行われているが、その幾つかは抗体酵素で置き換えることが可能であろう。近い将来、第3番目の方法として抗体酵素法が確立されることを期待している。

### 酵素の分子進化

- エクソン・シャッフリング
- 突然変異
- 自然選択：触媒効率
- 期間：数十億年

### 抗体の分子進化

- 抗体遺伝子 (V, D, J) の再編成
- 体細胞高頻度変異
- クローン選択：親和性
- 期間：数週間

図 12 酵素と抗体の分子進化の類似点

## REFERENCES

- 1) Schultz P. G., Lerner R. A., *Science*, **1995**, 269, 1835.
- 2) 藤井郁雄, *ファルマシア*, **1999**, 35, 695.
- 3) Teraishi K., Saito M., Fujii I., Nakamura H., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 7153.
- 4) Fujii I., Lerner R. A., Janda K. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 8527.
- 5) Tanaka F., Kinoshita K., Tanimura R., Fujii I., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 2332.
- 6) Tanaka F., Oda M., Fujii I., *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 5057.
- 7) Iwabuchi Y., Miyashita H., Tanimura R., Kinoshita K., Kikuchi M., Fujii I., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 771.
- 8) Iwabuchi Y., Kurihara S., Oda M., Fujii I., *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 5341.
- 9) Kurihara S., Tsumuraya T., Suzuki K., Kuroda M., Liu L., Takaoka Y., and Fujii I., *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, 1656.
- 10) Kakinuma H., Fujii I., Nishi Y., *J. Immun. Method*, **2002**, 269, 269.
- 11) Miyashita H., Karaki Y., Kikuchi M., Fujii I., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 5337.
- 12) Fujii I., Tanaka F., Miyashita H., Tanimura R., and Kinoshita K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 6199.
- 13) Kristensen O., Vassilyev D. G., Tanaka F., Morikawa K., Fujii I., *J. Mol. Biol.*, **1998**, 281, 501.
- 14) Miyashita H., Hara T., Tanimura R., Fujii I., *J. Mol. Biol.*, **1997**, 267, 1247.
- 15) Oda M., Ito N., Tsumuraya T., Suzuki K., Sakakura M., and Fujii I., *J. Mol. Biol.*, **2007**, 369, 198-209.
- 16) Tsumuraya T. and Fujii I., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2008**, 81, 1039-1052.
- 17) Hoogenboom H. R., *Trends Biotechnol.*, **1997**, 15, 62.
- 18) Fujii I., Fukuyama S., Iwabuchi Y., Tanimura R., *Nat. Biotechnol.*, **1998**, 16, 463.
- 19) Takahashi N., Kakinuma H., Liu L., Nishi Y., Fujii I., *Nat. Biotechnol.*, **2001**, 19, 563.
- 20) Takahashi-Ando N., Kakinuma H., Fujii I., Nishi Y., *Journal of Immunological Methods*, **2004**, 294, 1.
- 21) 藤井郁雄, タンパク質のはたらきを知る, 化学同人, **2009**, 77-102.
- 22) Ikeda S., Weinhouse M., Janda K. D., Lerner R. A., Danishefsky S. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 7763.
- 23) Ishikawa F., Tsumuraya T., Fujii I., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 456-457.

## 筆者紹介

氏名：藤井 郁雄 (Ikuo Fujii)

連絡先：大阪府立大学大学院理学系研究科  
生物科学専攻生命化学研究室・教授  
〒599-8570 大阪府堺市中央区学園町1-1  
Tel: 096-373-5313  
Fax: 096-373-5314  
e-mail: fujii@b.s.osakafu-u.ac.jp  
HP: http://if.b.s.osakafu-u.ac.jp/

## 略歴：

- 1986年 九州大学院薬学研究所博士課程修了(薬学博士)
- 1986年 九州大学薬学部助手
- 1988年 ロックフェラー大学(米国) 博士研究員
- 1989-1991年 スクリプス研究所(米国)にて、博士研究員として触媒抗体の開発に従事
- 1991-2003年 タンパク工学研究所および生物分子工学研究所にて抗体工学に従事
- 2003年- 4月より現職

## 現在の研究テーマ

進化分子工学を基盤とする新規生体機能分子の設計と創出

**漢方診療・再発見**  
**5**  
**漢方医学教育の難しさ**

宇宿 功市郎  
熊本大学医学部附属病院  
医療情報経営企画部

表1

平成22年度/熊本大学医学部『漢方医学』講義

平成22年		水曜日2時限目10:30-12:00 対象：熊本大学医学部医学科4年、必修		内容	担当
月	日	回			
7	28	1		漢方医学概論	宇宿
9	8	2		生薬実習(薬物学、処方学)	吉富
9	15	3		漢方診断の実際①(気血津液の病態を知る)	宇宿 加島
9	22	4		漢方診断の実際②(臓腑の病態を知る)	宇宿 加島
9	29	5		漢方診断の実際③(八綱から始まる弁証)	宇宿 加島
10	6	6		基礎研究の成果①	宮田
10	13	7		基礎研究の成果②	磯濱
10	20	8		鍼灸学 理論と実践	長尾
10	27	9		ワークショップ：症例から診断、処方を考える	宇宿 加島 吉富 村上

7月21日：2時限、9月9日～10月28日：2時限  
 担当紹介：吉富 誠(吉富徳陽堂医院院長、日本東洋医学会評議員、日本東洋医学会熊本県支部長)、  
 村上和憲(NTT西日本九州院循環器内科)、宮田 健(熊本大学名誉教授)、  
 磯濱洋一郎(熊本大学生命科学研究部)、長尾和治(博光会御幸病院名誉院長)、  
 加島雅之(熊本日赤病院、熊本大学大学院医学教育部)

## 1.はじめに

昨年の本稿では、日本での漢方診療の変遷、近年の医学教育の変化と漢方医学教育、今後の漢方への取り組み方、漢方診療の経済効果についての概説を行い、漢方医学/医療が今後必要となること、どういう役割を果たすことができるかを簡単に述べさせていただきました。今回は昨今の状況も踏まえて、漢方医学教育の際に考えておくべきことをまとめておきたいと思っております。

## 2.昨年起きたこと、感じたこと

さて、昨年の事業仕分けでは、漢方製剤をめぐる医療保険での取り扱いを継続するか否かで大きな議論となりました。幸いにも漢方関連や東洋医学関連の各学会、各団体の署名活動等が実り、今回は保険収載から外れないことになりました。このことは大変良かったと思っておりますが、この議論は医療費削減の検討の中で毎回出てくるもので、今後もどうなるかわかりませんし、漢方製剤や、鍼灸をはじめとする東洋医学、漢方医学に対する理解が少ないことの反映なのかと、やや釈然としないものがあります。医療費全体の中からすると漢方製剤使用に係る医療費は決して高いものではないのですが(平たく言うと安い)、また費用対効果が良いことや、時に副作用もあることからしますと今後とも医療保険で取り扱えるようになっていたほうが患者さんにとっては良いというのが、私の素直な気持ちです。先にも書きましたが、保険診療に漢方薬を含めるか否かの議論がこのように起きることは、やはり東洋医学、漢方、鍼灸などに多くの方の理解が少ないことが一因と考えておりますし、また医学部で教育を行う中で、どうかこの状況を変えていきたいと考えているところです。

## 3.漢方医学教育の際に忘れてならない点

本年も昨年とはほぼ同様のカリキュラムで医学科4年生(表1)に漢方医学教育を行うのですが、日々考えているのは、如何に分かりやすくそして腑に落ちるように、かつ将来漢方薬処方を求められた際の基盤を作るためには何を伝えればいいのかということです。90分9回の講義、週半日の漢方外来見学でこのことを実現できるかは甚だ疑問ではあるのですが、出来ないとはばかり言ってもおれませんが、何か工夫をしなければと悩んでいるわけです。

ここでちょっと脱線して、診断と治療ということ、更には研究

(基礎研究、臨床研究)、学問そして教育というもの、医師という仕事、その医療の中での役割(これまでとこれから)を今一度考えてみたいと思っております。と言いますか、学部や大学院での教育の中でいつも疑問に感じ、どのように工夫をすれば、学生が腑に落ちる講義や実習ができるか、悩んでいるのが実情なのです。この冊子を読まれる方の大半は基礎研究、開発研究を現場でなさっており、日々のことからすれば、別の機会にとも思われることかもしれませんが、ちょっと骨休みのつもりでお付き合いいただければと思います。

よく言われることですが、後輩を育てる、後進を指導する点では、「教育」が最も大切です。ただ、それと同じくらい重要なのは「研究」と、これをささえている「学問」と考えていいのではと思っています。もちろん、このように簡単には片付けられないものと思っておりますが、ただ、教育と研究は車の両輪ということは論を待たないと思っております。では教育、研究と学問、これに加えて、日常業務をはじめとする仕事というものの関係はどうなっているのでしょうか。私なりに、わからないこと、困ったことがあり、この問題をあらかじめ体得した解決策で処理することが仕事であると考えており、あらかじめわかっている解決策がない場合に、それまでの知識・知恵や、知られていない工夫をして解決することが、事例をもとにした研究と思っています。そして学問とは、これら事例研究を積み重ねていく過程で、個々の事例研究の中にある共通点を見出して、後輩や多くの人々に、疑問や解決策がわからないものへの取り組み方を「まとめたもの」と言えると感じています。つまり、仕事→研究→学問→教育の流れになっているのではと思っています。医学の現実的応用が医療であり、医学教育をおこなうことで医師という仕事を行う人材を養成しているわけであり、医師は日常の診療という仕事の中から診断診療技術向上、治療成績向上の研究を行っているものと考えられます。そういう意味では、医学教育は、医療のアマチュアである学生を一定の期間で医師というプロフェッショナルもしくはその入口にたたせないといけないのですから、これは大変な仕事と言えます。また漢方医学、現代医学、臨床医学、基礎医学、臨床研究、基礎研究のどれもが重要なのですが、やはり学生には医師という現実在即した学問から教育し、送り出さないといけないのではと考えています。

以上の点を考えてみますと、医学部教育、漢方(医学)教育で、

様々な問題点が見えてきますし、どこがポイントなのかも見えてきます。更には、問題点の解決策に行きつくこともあるのではと思っています。

#### 4. 漢方診療の流れを知る

では、医学部教育のなかで、漢方医学を学生に伝える意義は何であり、そしてそれはどのように行われるべきなのでしょう。

私自身の神経内科医の経験からしますと、漢方製剤を使用した方がよいと感じることがあるのも事実ですし、そうでない場合があるのも事実ですので、どのように使われているか、どう使うべきかを学生に伝える意義はあると考えています。

問題は、どう伝えるかなのです。学生や後輩に聞いてみますと、取りかかりにくい、言葉がわかりにくいという意見もありますが、中には途中から分からなくなるという声も聞くことがあります。これはどうしてかと考えましたところ、漢方診療への取り組み方で少しばかり視点が異なった教育が行われており、これが少なからず混乱をきたしているのではと考えるに至っています。本当はもっと分かり易く教えるべきところで、漢方診療の優位なところを示そうとして、却って理解しづらくしていることがあるのではということなのです。

現在日本国内では、漢方診療に関しては大きく分けて4つの流れがあるように感じています。1つは、腹診を重視し、それを中心に患者の証を考へて、その証と治療を一体として考へる「方証相対」の流れ（日本漢方と呼ばれることが多い）、2つめは漢方独特の臓器の病態生理に基づいた疾病の捉え方とそれに対する処方考へる「弁証論治」の流れ（中医学と呼ばれることが多い）、3つめは現代医学の病名に対して漢方薬を用いるまたは漢方製剤の効果を大規模試験で証明しようとする流れ、4つめは生薬の構成成分から効能を明らかにしようとする流れです。多くの臨床医の先生方は3つめの流れで診療に取り入れられていると思いますし、それで十分な場合もありますし、なかには不十分なことがあり、やはり1の流れや2の流れに取り組む必要が出てくることが多いようです。表2は、医学教育コアカリキュラムに出てくるE. 診療の基本、1 症候・病態からのアプローチですが、このなかに出てこないけれども日常臨床で大変多く聞く患者さんの訴えがあります。表2の症候・病態からのアプローチではどうしても各臓器の問題として捉えて、その原因を探ろうとしますが、それでは対応できない訴えです。この代表が、「冷え」と「ほてり」です。この2つの症候は漢方診療が得意とするところの一つです。漢方では「冷え」は体の中の「気」が不足して元気がなく、寒さを感じたり、かぜをひきやすくなっている状態と考へ（気虚）、これに対応する生薬の人参や黄耆を使い、「ほてり」は「津液（体内の血液以外の水分を指す）」が不足して手足が熱く感じると解釈し、津液不足を補う生薬、地黄、五味子などを使います。この考へ方は気血津液弁証に則ったもので、このためには、「気」「血」「津液」への理解が欠かせないわけです。「血」が不足する状態は血虚といい、筋肉のつり、眼の疲れ、髪がやせる、などの症状がみられ、当帰、芍薬、地黄などの生薬が使われます。もちろん不足があれば、余ったり、流れが滞ったりして症状が出現することもあり、「気」「血」「津液」の各々に気滞、血瘀、瘀血、水滞、湿、痰などの病態が知られています。このように臓器別にだけで捉えようとする無理がある症候に漢方は役に立つことがあるわけであり、この面からの患者へのアプローチが、いわゆる全人的アプローチとして求められているものと考えています。

つまり学生には、余りにも大きな漢方医学という世界の中で道

表2

E 診療の基本		
1 症候・病態からのアプローチ		
(1) ショック	(13) リンパ節腫脹	(25) 悪心・嘔吐
(2) 発熱	(14) 浮腫	(26) 嚥下困難・障害
(3) けいれん	(15) 動悸	(27) 食思（欲）不振
(4) 意識障害・失神	(16) 胸水	(28) 便秘・下痢
(5) チアノーゼ	(17) 胸痛	(29) 吐血・下血
(6) 脱水	(18) 呼吸困難	(30) 腹部膨隆（腹水を含む）・腫瘍
(7) 全身倦怠感	(19) 咳・痰	(31) タンパク尿
(8) 肥満・やせ	(20) 血痰・喀血	(32) 血尿
(9) 黄疸	(21) めまい	(33) 尿量・排尿の異常
(10) 発疹	(22) 頭痛	(34) 月経異常
(11) 貧血	(23) 運動麻痺・筋力低下	(35) 関節痛・関節腫脹
(12) 出血傾向	(24) 腹痛	(36) 腰背部痛

に迷わないように、何を自分が学んでいて、そしてどの位置にいるか、何のために学んでいるかが理解できるように教育を行いたい、そのための方法を考へないといけなど考へているというわけです。大きな枠組みを理解してもらい、そして具体的に役に立つ知識をまず学んでもらい、次いでその背景にある漢方独特の臓器感、処方の流れを伝えたいと考へて、講義を組み立てているところです。

#### 5. 漢方診療の流れを知る

今回は、漢方診療、漢方製剤使用への理解がまだ不足していることを昨年の事業仕分けで実感し、今後も漢方医学教育を効果的に行うかを日々考へている中での雑文になりました。この連載をきっかけとして、漢方というものを再考していただければと感じています。

大学の医学教育担当者が行うべきことは、疾病に侵され困っている人々に効果的に解決策を提示することができる人材を養成することであり、これが最も大切な任務であるわけです。そのためには、如何に分かりやすく現場の医学医療を伝え、そして将来にわたって医師という仕事を自らブラッシュアップできる人材を送り出すことが肝要と考へています。医療現場の現状を伝え、一緒に解決できる人材が育ってくれることを祈っているというところです。



氏名：宇宿 功市郎  
所属：熊本大学医学部附属病院  
医療情報経営企画部 教授  
連絡先：〒860-0811 熊本市本荘1-1-1  
E-mail :space-usk@fc.kuh.kumamoto-u.ac.jp

# Topics on Chemistry

## 抗体医薬を目指した Bicyclic peptides の作製技術

株式会社同仁化学研究所 池上 天

2009年、英国 Medical Research Council 分子生物学研究所（所長 Greg Winter）が開発した新たなペプチド抗体の作製技術が話題となった。この手法は、抗体医薬品の開発・製造工程から生物学的プロセスを減らした化学的手法により、これまでの抗体作製の課題である性能の不確実性や製造コストの低下を目標に進められている。今回は、この技術によって産み出される bicyclic peptide について紹介する。

抗体の高い特異性を活かした抗体医薬は、人工的に作製された抗体を患者に投与することで、体内内の特定物質のみを標的に攻撃・治療するため、低分子医薬品と比較して副作用が少ないと言われている。抗体医薬の開発は、欧米の製薬企業が先行しているものの、国内の大手製薬企業もガン、自己免疫疾患、新型インフルエンザ等を標的とした抗体の開発を加速している。国内市場も現状を反映し、2004年の433億円から3年で1130億円へ増加、2017年には3400億円へ達する見込みである（富士経済調べ）。このような流れの中、抗体医薬の作製技術は、医薬品開発に向けた幾多の課題を克服する度、日々、進化を遂げている。マウス抗体に始まり、その副作用を抑えるキメラ抗体、ヒト化および完全ヒト抗体の作製法が開発された。その後、phage display、ribosome display、mRNA display など無細胞系作製法の登場により、その作製能力が飛躍的に向上したことで、様々な抗体ライブラリーの作製が、また、抗体の低分子化が可能となった。Bicyclic peptide は、抗体作製技術を更に進化すると期待され、特徴は化学反応により形成する二つのループ構造を有するペプチドで、抗体の相補性決定領域（complementarity determining region, 以下、CDR）に存在するペプチドのループ構造を模している。

Heinis らは、一定間隔で三つのシステイン残基が位置するよう設計されたペプチドを phage display で発現させた後、Tris-(bromomethyl)benzene (以下、TBMB) を足場とした二つのループ構造を形成するペプチド作製を試みた (Fig. 1)<sup>1)</sup>。この手法は、Timmerman らの報告<sup>2)</sup>を参考とし、ペプチドヘルプ構造を導入するアプローチとして利用されている<sup>3)</sup>。ペプチドと TBMB との反応は、室温 (20 ~ 25℃)、水溶液中で速やかに進行するため、特別な装置、操作を必要としない点でも有効な手段である。

実施例として、各システインの間にランダムに6つのアミノ酸を有する (Cys-(Xxx)<sub>6</sub>-Cys-(Xxx)<sub>6</sub>-Cys) ペプチドを phage display により作製し、ヒト血清中のタンパク分解酵素 (human protease plasma kallikrein) に対する阻害活性評価を行った。4.4 × 10<sup>9</sup> 種類のペプチドライブラリーからバイオパニングによる絞り込み (Mutant: PK1 ~ 13)、これらを基に遺伝子配列の改変を経てより親和性の高いペプチド (Mutant: PK14 ~ 23) を作製した (Fig. 1, 2)。更に、高い阻害活性を示す PK2, PK4, PK6, PK13,

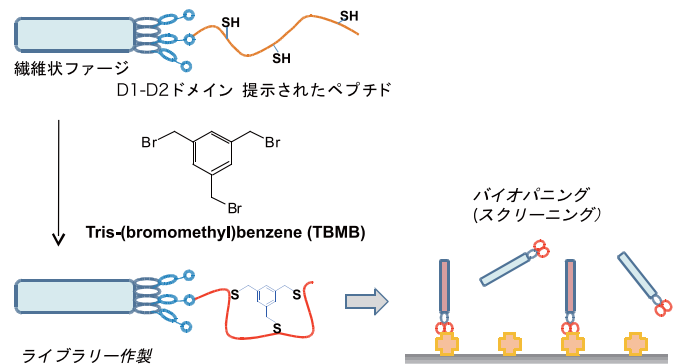


Fig.1 TBMB を用いたペプチド作製

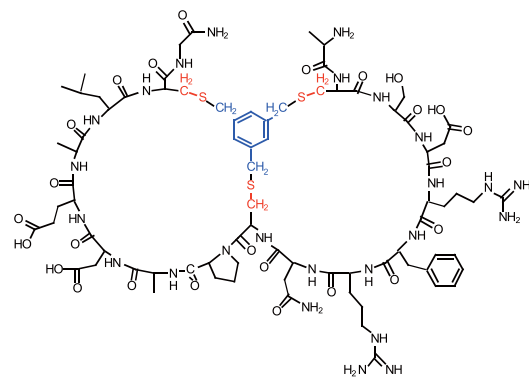


Fig.2 PK15 (plasma kallikrein inhibitor)

PK15 のペプチドに対して、固相合成法により、17 残基のペプチド 5 種類を作製した。

これらのペプチドの酵素阻害活性は、TBMB 存在の有無、つまり、2ループ型か直鎖型かの違いにより大きな差が現れ、ループ型とすることで最も低いケースでも 250 倍阻害活性が高められた (Table1)。また、同じループ型においても、phage display で得られたペプチド PK15 の IC<sub>50</sub> 値が 30 nmol/L であるのに対して、固相合成ペプチド PK15 は IC<sub>50</sub> 値 1.7 nmol/L と、その効果が高められたことも判明した。Heinis らは、前者のペプチド末端に連結する繊維ファージ由来のコートタンパク質 gp3 の D1-D2 ドメインによる立体障害が原因と考察している。

更に、血液凝固第 XII 因子は、plasma kallikrein による加水分解を受けて第 XIIa 因子へと変換されるのだが、160 nmol/L の PK15 の存在で、第 XIIa 因子の活性が 50% 低下した。これは、

Table1 各ペプチドの plasma kallikrein 阻害活性

	Amino acid sequence	IC <sub>50</sub> (nmol/L)	
		Linear peptide (w/o TBMB)	Bicyclic conjugate (with TBMB)
PK2	H-ACSDRFRNCPLWSGTOG-NH <sub>2</sub>	> 10,000	28.6
PK4	H-ACSTERRYCPPIEFPCG-NH <sub>2</sub>	7,181	33
PK6	H-ACAPWRTACYEDLMWCG-NH <sub>2</sub>	5,707	21.2
PK13	H-ACGTGEGRCRVNWTPCG-NH <sub>2</sub>	> 10,000	39.1
PK15	H-ACSDRFRNCPEALCG-NH <sub>2</sub>	> 10,000	1.7

plasma kallikrein 阻害剤として知られている aprotinin (6 kDa, セリンプロテアーゼ阻害剤) を 5  $\mu\text{mol/L}$  とした場合と同等の効果を示す。なお、類似した系の血液凝固第 XIa 因子や mouse plasma kallikrein に対しては、阻害活性を示さないことも確認された。*in vitro* での評価結果ではあるが、天然の抗体や阻害物質に匹敵する性能を示していると言えるだろう。

この他、Litovchick らは、mRNA display により HCV IRES RNA に対するモノループ型ペプチド阻害剤を、dibromo-*m*-xylene を用いて達成している<sup>3)</sup>。勿論、mRNA display の系においても、TBMB が適用され、2 ループ構造のペプチドは作製可能と推察できる。今後、ペプチド固相合成と TBMB による化学合成によって、アミノ酸配列を自由に設計でき、かつ、一定品質のペプチド抗体の大量生産が実現性を帯びてきた。

専門家の間では、実用化は 10 年先頃と目されている。それは、生体内での効果や安定性、毒性などの検証が数多く残されているためである。ただ、実現すると、高コストの抗体医薬製造において革新的な技術であることには違いない。しかし、前述した通り、現在、大手製薬メーカーは、開発費が高くとも低分子医薬品に比べ上市の確率が高いとされる抗体医薬に注力している。これは、抗体医薬そのものの構造解析が難しく、また、高度な製造ノウハウが要求されるため、後発製薬メーカーを振り切る意味でも当然の選択だが、全化学合成による抗体作製の実用化が近づくにつれ、これら抗体医薬開発を取り巻く環境も変化していくと考えられる。

#### [参考文献]

- 1) C. Heinis, T. Rutherford, S. Freund and G. Winter, *Nat. Chem. Biol.*, **2009**, *5*, 502-507.
- 2) P. Timmerman, J. Beld, W. C. Puijk and R. H. Melen, *ChemBioChem.*, **2005**, *6*, 821-824.
- 3) A. Litovchick and J. W. Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, *105*, 15293-15298.

## 展示のご案内

下記会場にて、小社製品のご紹介を行います。  
皆様のご来場をお待ちしております。

日本農芸化学会  
3月28日(日)～3月30日(火)  
東京大学 駒場キャンパス 第2体育館

第6回 国際NO学会  
The 6th International Conference of the  
Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric  
Oxide

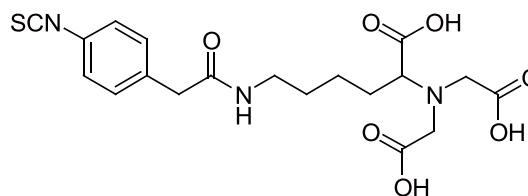
6月14日(月)～6月18日(金) 国立京都国際会館

## 開発中

### Isothiocyanobenzyl-NTA

タンパク質を固体表面に並べる手法に“His-tag”と呼ばれる技術があります。現在開発中の Isothiocyanobenzyl-NTA (品コード I279) は、アミノ基と反応するイソチオシアノ基を導入した化合物であり、チオールをもたないタンパク質などの生体高分子の NTA 化に用いることができます。その他、基盤表面への NTA 化によるタンパク質の固定化や、マイクロアレイなどへの応用が期待できます。

### Isothiocyanobenzyl-NTA



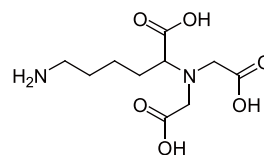
### 関連商品

これまで小社ではこの技術に使用する試薬として、AB-NTA free acid (品コード A459)、Maleimido-C<sub>3</sub>-NTA (品コード M035) を開発してきました。

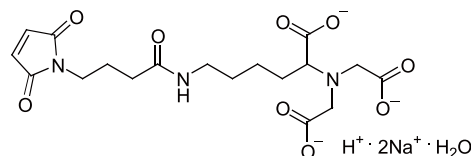
AB-NTA は活性化したカルボン酸と反応するため、カルボキシル基を持つ化合物や基盤に NTA を結合させることができます。

一方、Maleimido-C<sub>3</sub>-NTA は SH 基と反応するため、SH 基を持つ化合物や基盤表面に NTA を結合させることができます。

#### AB-NTA free acid



#### Maleimido-C<sub>3</sub>-NTA



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
AB-NTA free acid	100 mg	12,600	A459
Maleimido-C <sub>3</sub> -NTA	10 mg	16,600	M035

# Topics on Chemistry

## 蛍光シリカナノ粒子の可能性

株式会社同仁化学研究所 上野右一郎

近年、蛍光ナノ粒子を用いた生化学における研究、特に細胞染色やタンパク質標識が盛んに行われるようになってきた。量子ドット (Quantum Dots: QDs) が代表的な粒子であり、強い蛍光、高い光安定性 (フォトブリーチングが遅い)、幅広い蛍光波長特性、単一波長励起による多波長蛍光が可能、というように多くの利点を持っている。しかしながら量子ドットの核は、毒性元素であるセレン、カドミウム、鉛などで構成されており、その安全性は未だ十分には確立されていない。

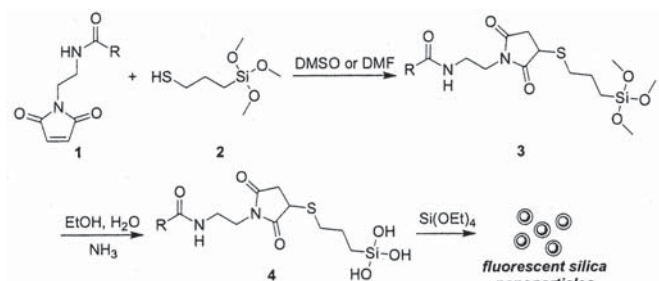
有機色素はナノ粒子に比べて非常に小さく、タンパク質への標識なども容易である。ほとんどの有機色素化合物は、有機溶媒中では比較的高い量子収率 (fluorescent quantum yield) を持つが、水溶液中でのそれは減少する傾向が強い。これは有機色素化合物が水溶液中では、分子間会合を起こし蛍光が抑えられるためであり、スルホン酸やカルボン酸のような水溶性置換基を導入しても完全に会合を抑える事は難しい。また励起状態ではエネルギーが高いため、非常に反応性に富んだ状態になっており、分子構造が変化して消光を起こしやすい。量子ドットのような強い蛍光や高い光安定性を持ち、なおかつ水溶性の色素であれば、DMSOなどの有機溶媒を使う事もなく生体内で使用でき、また環境にもやさしいというメリットもある。

上記に関連してここ数年、注目されているのがシリカ (二酸化ケイ素) ナノ粒子である。1968年、Stöberらはシリカ前駆体の重合反応を利用したコロイド分散状のシリカナノ粒子の合成を報告した<sup>1)</sup>。近年、Cornell UniversityのWiesnerらは、Stöber法を改良して tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) を、そのシリカナノ粒子の中に導入する事で蛍光シリカナノ粒子を合成した。蛍光シリカナノ粒子は遊離の TRITC よりも約 10 倍明るく、また遊離の TRITC 及び fluorescein とのフォトブリーチング比較実験により、光安定性が非常に高い事が証明された<sup>2)</sup>。分かり易く言えば、蛍光シリカナノ粒子は、有機蛍光色素が二酸化ケイ素によってコーティングされたナノ粒子であり、また使用したい有機色素が反応性置換基を持っていれば、それを活性化させて反応する事で、ほとんどの場合、目的のシリカナノ粒子を合成する事が可能である。

今回のトピックでは、シリカナノ粒子の一般的な合成法とその光物理学的性質、そして multiplexing への応用として Dyomics 社 (ドイツ) の 4 つの水溶性色素の蛍光性質を、シリカナノ粒子と遊離の色素で比較した研究を紹介する<sup>3)</sup>。

Multiplexing とは、一つの励起波長を用いて、多数の異なる蛍光色を同時に得る事である。ほとんどの有機色素は、蛍光を発するためにそれぞれに固有の励起波長を必要とし、その都度励起フィルターを交換する必要がある。それに比べて量子ドットは、紫外線吸収の幅が大きく、例えば 3 つの量子ドットを用いた場合、それらの紫外線吸収が互いに重なり合い、一つの波長で励起する事で多重色蛍光を同時に得る事が可能である。Dyomics 社の 4 つの色素は、coumarin を基本構造にして非常によく設計されており、置換基を変えたり、芳香族環を増やすことで一つの励起波長 (514 or 488 nm) で、同時に 4 つの異なる蛍光を得る事を可能にした。Wiesner らはこの性質に着目し、これらの 4 つの色素 (DY485, DY510, DY480, DY521) をシリカナノ粒子の中に導入し、その蛍光特性を調べた。

蛍光シリカナノ粒子の合成を Scheme 1 に示す。DMSO もしくは DMF に溶解したマレイミドで活性化された色素 (1) は、窒素雰囲気下、3-mercaptopropyltrimethoxysilane (2) と反応し、蛍光シリカ前駆体 (3) を形成する。次にシリカ前駆体の 3 つのメ



Scheme1 蛍光シリカナノ粒子の合成ルート

トキシ基は、エタノール、水、アンモニアの混合溶媒中で加水分解されシリケート (4) を生成し、最後に tetraethylorthosilicate (TEOS) と縮合させる事で、蛍光シリカナノ粒子を形成する。TEOS の濃度や滴下速度、反応時間を調節する事で、形成するシリカナノ粒子の粒径をコントロールする事ができる。マレイミド (1) の構造中の R は Fig. 1 に示された Dyomics 社の 4 つの色素を表す。

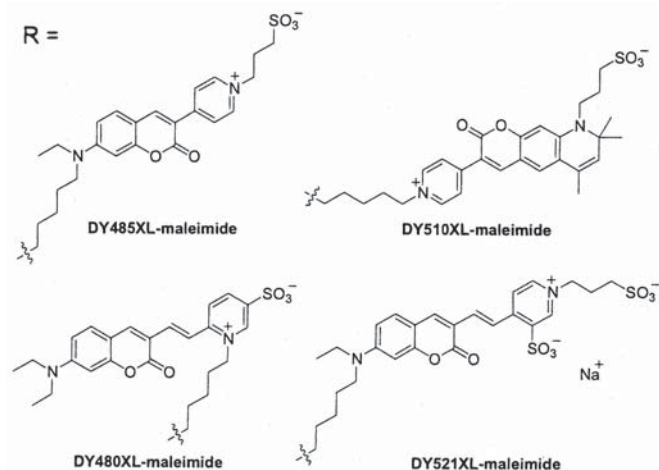


Fig.1 Dyomics 社の coumarin をベースにした 4 つの水溶性蛍光色素

論文中では DY510 を例に挙げ、動的分散 (Dynamic Light Scattering, DLS) により、形成されたナノ粒子の一つの粒径を測定した結果、約 7 ~ 8 nm であった。また走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope, SEM) では、ナノ粒子が 10 nm 以下の均一の球状をしている事が示された。これらのデータは、シリカナノ粒子がいかに均一なサイズで合成できるかを表しており、これは生物物質の標識時に大きな利点となる。DY485, DY480, DY521 についても DY510 とほぼ同様の結果が得られ、その粒径は 7 ~ 11 nm であった。

得られたシリカナノ粒子 (DY510) と遊離の DY510 の紫外線吸収強度を一致させ、それら両方の蛍光強度を測定したところ、シリカナノ粒子 (DY510) の蛍光は、その遊離色素よりも約 10 倍明るかった (DY485 : 12 倍、DY480 : 11 倍、DY521 : 6.5 倍)。色素を周りの環境 (分子間会合、溶媒、酸素など) から保護し、そしてシリカコーティングにより得られたその分子の強硬さは、このように小さな粒子サイズにもかかわらず、遊離状態の色素より



も明るさを顕著に増加させた。脱イオン水中で遊離状態の色素 DY485, DY510, DY480, DY521 とそれらのシリカナノ粒子の蛍光は、識別された4つの色、黄色 (DY485)、オレンジ色 (DY510)、朱色 (DY480)、赤色 (DY521) となり、シリカナノ粒子の蛍光の方が視覚的にも、そのフリー色素よりも明るかった。

ナノ粒子における研究で最も重要な事の一つは、それらの水溶液中や緩衝溶液中でのコロイド安定性である。純水中では、シリカナノ粒子はシリカ上の有効負電荷により静電的に安定化される(二酸化ケイ素の等電点は pH2 ~ 3)。また緩衝溶液中では、その高い塩濃度のために、粒子が凝集する傾向がある。それを防ぐために polyethylene glycol(PEG) などシリカナノ粒子の表面を修飾し、互いに反発させる事でその凝集を防ぐ手法も報告されている。

細胞染色において一つの光源で多重色を同時に発生させる事で、多くの情報を一度に得る事ができる。ここで紹介した4つの蛍光シリカナノ粒子は、実際に目で確認できるほど色が識別されており、multiplexing へ応用できる可能性を秘めている。また、これらの蛍光シリカナノ粒子は、有機蛍光色素よりも非常に明るく、高い光安定性と水溶性、および高安全性を兼ね備えたナノ粒子であり、量子ドットに変わる粒子として、これからの生化学への応用が期待される。シリカナノ粒子に導入される有機色素は、水溶性である必要がなく、使用できる色素の幅が広がるという事も大きな利点である。例えば水溶性近赤外色素のような合成では、精製過程が非常に困難であり、非水溶性の色素を合成する方が容易である。それをシリカナノ粒子に導入する事で、これまでとは違った新しいアプローチで水溶性の近赤外色素をより効率よく合成する事ができる。現在、蛍光シリカナノ粒子の研究は多くの科学者によって行われており、その顕著な多くの性質のために、遊離の有機色素の使用ではできなかったような事にも応用できると考えられる。

[参考文献]

- 1) W. Stöber, A. Fink, J. Colloid Interface Sci. **1968**, *26*, 62.
- 2) H. Ow, D. R. Larson, M. Srivastava, B. A. Baird, W. W. Webb, U. Wiesner, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 113.
- 3) E. Herz, A. Burns, D. Bonner, U. Wiesner, *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, *30*, 1907.

Q&A

Microbial Viability Assay Kit-WST

本製品は、福岡県工業技術センターと共同開発した微生物の比色検出キットです。水溶性テトラゾリウムである WST-8 (特許 2757348) を発色試薬として用いています。

<原理>

微生物はエネルギー代謝活動により細胞内に NAD(P)H を生成します。

WST-8 は電子メディエーターを介することで、この NAD(P)H により還元され、水溶性 formazan (オレンジ色) を生成します (Fig. 1)。formazan の生成量は微生物のエネルギー代謝活性に比例するため、オレンジ色への呈色を見ることで、その微生物の生存率や活性度合を確認できます。

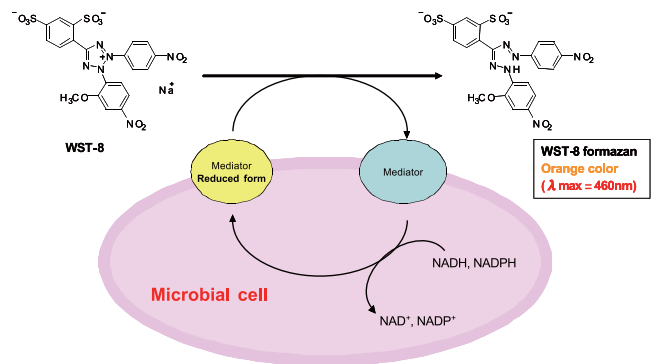


Fig.1 発色原理

<特長>

- ・寒天培地法や微量液体希釈法に比べ、短時間での検出が可能
- ・マイクロプレートを使った多検体処理が可能
- ・培地成分による影響を受けにくい
- ・薬剤感受性試験への応用が可能

<キット内容> 500 tests / 1 kit (96 well プレート 5 枚分)

- ・ WST solution 1 ml × 5 tubes
- ・ Electron mediator reagent (DMSO solution) 0.5 ml × 1 tube



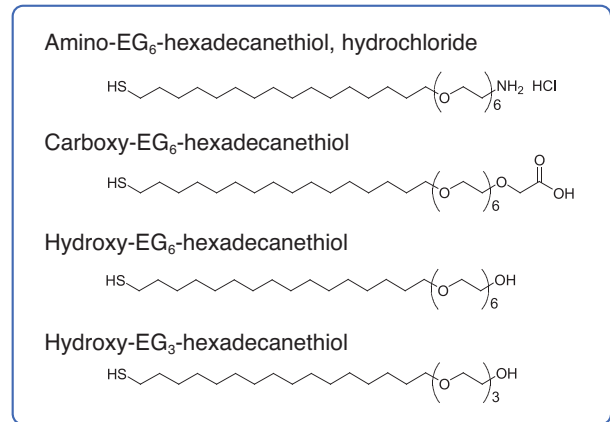
Microbial Viability Assay Kit-WST

- Q1.発色試薬の保存方法及び使用期限は？  
 A1.発色試薬溶液調製後は、冷蔵（4℃）保存で、1ヶ月以内にお使い下さい。
- Q2.酵母菌、グラム陽性菌及びグラム陰性菌も測定できますか？  
 A2.菌の種類にもよりますが、測定できます。
- Q3.発色反応を37℃で行ってはいけませんか？  
 A3.微生物に最適な温度でインキュベートしていただければ、問題ありません。
- Q4.菌の増殖試験を行う場合、インキュベート時間はどれくらい行えばよいでしょうか？  
 A4.微生物種（菌）の細胞密度により、インキュベート時間が異なります。例えば、細胞密度が $1 \times 10^6$  CFU/mlで、約6時間後にコンフルエントに達する場合、2～5.5時間の間でインキュベートすることで、菌数を確認することができます。
- Q5.糸状菌での使用実績はありますか？  
 A5. *Aspergillus*属の麹菌を使用した実績があります。
- Q6.偏性嫌気性菌の測定は可能ですか？  
 A6.偏性嫌気性菌は、酸素に暴露することで死滅し、十分な発色が得られないため測定できません。
- Q7.微生物の細胞数が同じでも、細胞そのものの活性が低い状態では、発色は低くなるのでしょうか？  
 A7.細胞そのものの活性が低い状態であれば、発色も弱くなります。その場合は、インキュベート時間を長くすることで検出できます。
- Q8.波長450 nmあるいは460 nmで測定するとありますが500 nmでも測定はできるのでしょうか？  
 A8.450～490 nmのフィルターを使用して測定下さい。500 nmだと十分な感度が得られません。
- Q9.1 cmや0.25 cmのセルを使って測定はできますか？  
 A9.基本的には測定は可能です。但し、96ウエルマイクロプレートと比較して、発色試薬量を多く必要としますので、実際に測定可能な検体数が減少します。

近日発売 (4月6日発売予定)

自己組織化単分子膜作製用試薬

C16-PEG-SAMs



<特長>

- ・非特異的吸着が少なく、安定な SAM を形成できる
- ・タンパク質をはじめとした様々な物質を SAM 上に固定化できる (Amino, Carboxy タイプ)

アルカンチオールやジスルフィド類が金属基板上で形成する自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayers : SAMs) は光スッチング・光電池などの薄膜光学材料、超微細フォトレジストなどのパターン化材料、つや出し・濡れ性などの表面改質といった機能性材料分野から、マイクロアレイ、化学修飾電極、QCM や SPR 等を用いたバイオセンサーなどの分野で広く応用されています。

オリゴエチレングリコールを有する SAMs (PEG-SAMs) は非特異吸着を抑えることができることから、SPR や QCM 等のバイオセンサーで汎用されています。この度、発売する上記4種の C16-PEG-SAMs (オリゴエチレングリコール含有長鎖アルキルチオール類) は既存のものよりも長いアルキル鎖 (C16) を有しています。何れも新規化合物であり、論文報告はありませんが、より安定な非特異吸着の少ない SAMs が作成されると期待されます。

末端にアミノ基を持つ C16-PEG-SAM は、グルタルアルデヒドで活性化してタンパク質を固定化したり、二価試薬を用いてマレイミド化し、チオール基を有する DNA やペプチドなどを固定化する際に有用です。

末端にカルボキシル基を有する C16-PEG-SAM は、WSC などの縮合剤で活性化することによりアミノ基を有するタンパク質などを金基板に固定化することができます。

末端にヒドロキシ基を有する C16-PEG-SAM 類は、SAM 表面への非特異的吸着を抑制することから、カルボキシル基やアミノ基を有する C16-PEG-SAM と混合して用いることにより、バックグラウンドを抑えた高感度検出可能なセンサーが作製できると期待されます。

品名	容量	希望納入価格 (¥)	メーカーコード
Microbial Viability Assay Kit - WST	500 tests	20,000	M439

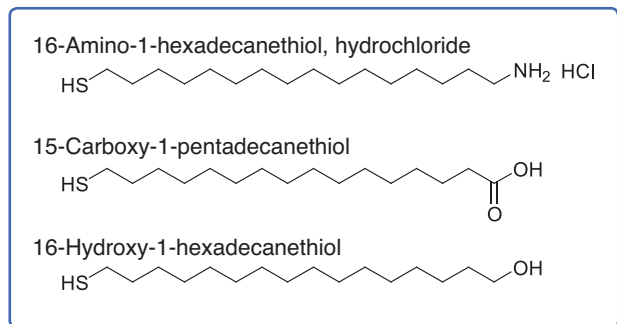


品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Amino-EG <sub>6</sub> -hexadecanethiol, hydrochloride	10 mg	45,000	A505
Carboxy-EG <sub>6</sub> -hexadecanethiol	10 mg	32,000	C463
Hydroxy-EG <sub>6</sub> -hexadecanethiol	10 mg	28,000	H396
Hydroxy-EG <sub>3</sub> -hexadecanethiol	10 mg	28,000	H395

### 関連製品

#### 長鎖アルキルチオール類

小社ではこれまで、金属基板修飾用のアルキルチオール類として、炭素数が6,8,11のものを販売しておりましたが、最近、それぞれ炭素数16の長鎖アルキルチオール類をラインアップに追加しております。アルキル鎖長はSAMsの特性に大きく影響を与える因子の1つで、アルキル鎖長が長いほど安定なSAMsが形成されることが知られています。



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
16-Amino-1-hexadecanethiol, hydrochloride	10 mg	16,000	A458
	100 mg	48,000	
15-Carboxy-1-pentadecanethiol	10 mg	13,000	C429
	100 mg	39,000	
16-Hydroxy-1-hexadecanethiol	10 mg	13,000	H394
	100 mg	39,000	

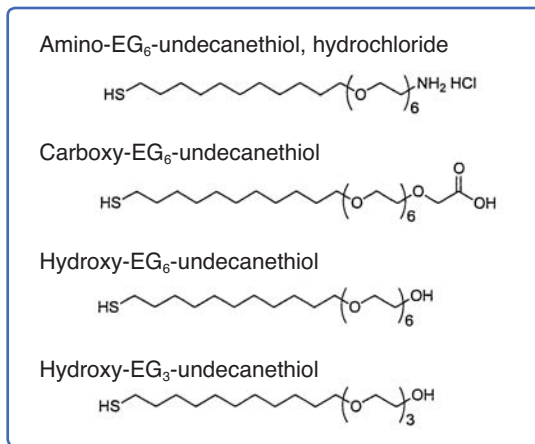


#### Ethylene Glycol 導入 type

近年、タンパク質等の固定化に非特異吸着を抑制する効果があるオリゴエチレングリコール部位を導入したSAMs試薬が頻繁に用いられています。

Whitesidesらは、Carboxy-EG<sub>6</sub>-undecanethiolとHydroxy-EG<sub>3</sub>-undecanethiolを混合したSAMを作製し、非特異吸着の抑制効果があることを実証し、更にovalbumin, cytochrome cをはじめとした、様々なタンパク質を固定化しています。

小社のEthylene Glycol導入typeのSAMsは他社品に比べ高純度であり、単分子膜形成を阻害する可能性がある不純物をほとんど含んでいません。



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Amino-EG <sub>6</sub> -undecanethiol, hydrochloride	10 mg	38,000	A483
	100 mg	Request	
Carboxy-EG <sub>6</sub> -undecanethiol	10 mg	24,000	C445
	100 mg	60,000	
Hydroxy-EG <sub>6</sub> -undecanethiol	10 mg	18,000	H355
	100 mg	38,800	
Hydroxy-EG <sub>3</sub> -undecanethiol	10 mg	14,400	H354
	100 mg	36,000	

## お知らせ

## 第 27 版総合カタログ（2010 / 2011）発行しました。



今回のカタログより、カタログ本体からプロトコルが着脱できるタイプに改良しました。新製品のプロトコルも新たに追加しておりますので、ぜひご覧ください。

また、本体カタログへの画像情報の追加、巻末には参考資料の追加を行っております。

更に、INDEX もより見やすく、検索が容易になっております。

カタログ、その他パンフレット類のご請求は、小社マーケティング部までご連絡下さい。

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



あわせて、ホームページの商品カタログ、プロトコルの内容も更新しております。これからも引き続き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。

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。お気軽にお問合せ下さい。

## ホームページアドレス

URL : <http://www.dojindo.co.jp/>  
E-mail : [info@dojindo.co.jp](mailto:info@dojindo.co.jp)

## フリーファックス

0120-021557

## フリーダイヤル

0120-489548