

CONTENTS

●Review

Through-bond Energy Transfer Cassettes
Department of Chemistry Texas A & M University
Kevin Burgess

漢方診療・再発見 8 消化器外科と漢方
国際医療福祉大学三田病院 外科・消化器センター
太田 恵一郎

●Topics on Chemistry

盛んに開発が進むバイオセンサー向け
生体物質固定化法

株式会社同仁化学研究所 藤野 怜香

植物バイオマスを原料とした大腸菌による
バイオディーゼル生産

株式会社同仁化学研究所 前田 雄一

2011 No.137

ISSN 0385-1516

DOJIN NEWS

ドージンニュース

目次

Review
 Through-bond Energy Transfer Cassettes
 Department of Chemistry, Texas A & M University
 Kevin Burgess 1

漢方診療・再発見
 8 消化器外科と漢方
 国際医療福祉大学三田病院 外科・消化器センター
 太田 恵一朗..... 8

Topics on Chemistry
 盛んに開発が進むバイオセンサー向け生体物質固定化法
 株式会社同仁化学研究所 藤野 怜香..... 12
 植物バイオマスを原料とした大腸菌によるバイオディーゼルの生産
 株式会社同仁化学研究所 前田 雄一..... 14

Commercial
 新製品
 二価性試薬 (NTA Type)
 Isothiocyanobenzyl-NTA 11
 二次元電気泳動用タンパク質溶解剤
 SpotRight™ シリーズ 16
 新規デタージェント 17

試作品
 自己組織化単分子膜作製用試薬..... 13

開発中
 表面処理用ホスホン酸誘導体..... 13

お知らせ
 フォーラム・イン・ドージン開催報告..... 18

新製品案内

二価性試薬 (NTA Type)

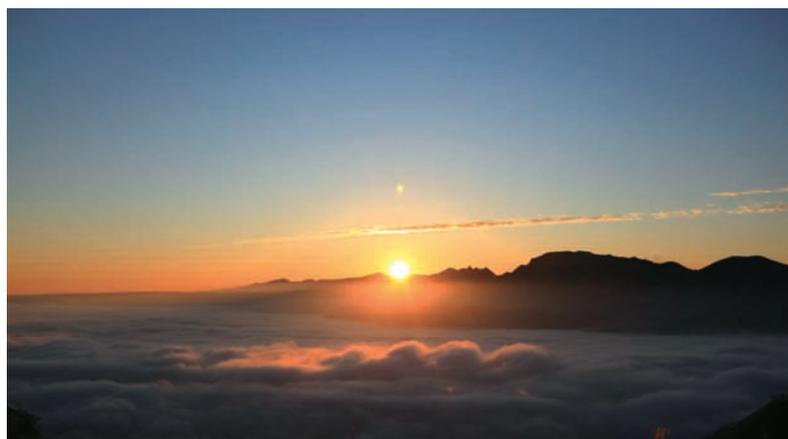
品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Isothiocyanobenzyl-NTA	10 mg	18,400	I279

二次元電気泳動用タンパク質溶解剤 SpotRight™ シリーズ

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
SpotRight™-Trial	1 set	15,000	S351
SpotRight™-I	1 ml × 10	25,000	S352
SpotRight™-II	1 ml × 10	25,000	S353
SpotRight™-III	1 ml × 10	25,000	S354
SpotRight™-IV	1 ml × 10	25,000	S355

新規デタージェント

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Trehalose C8	500 mg	20,000	T459
Trehalose C10	500 mg	20,000	T460
Trehalose C12	500 mg	20,000	T461



大観峰 (熊本県阿蘇市)
 日中との気温差等、条件がうまく揃うと雲海が発生し、カルデラ全体が雲海で覆われます。五岳は、お釈迦様の涅槃の時の寝姿を思わせるところから、涅槃像とも呼ばれています。

Photo : 永島俊介氏

Through-bond Energy Transfer Cassettes

Aurore Loudet, Cliferson Thivierge, and Kevin Burgess*



Department of Chemistry,
Texas A & M University,
Box 30012, College Station, TX 77841, USA

Through-bond Energy Transfer What Is It?

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) is one means by which energy can relay between fluorophores in close proximity. Underlying theories for FRET, as described by Förster,^{1,2)} highlight its physical limitations: distance between the donor and acceptor is the most important, but others include orientation between the fluor transition dipoles, and the overlap integral. Overlap integral represents the intersection of the donor fluorescence with the acceptor absorbance;^{1,3)} poor overlap gives inefficient energy transfer (Figure 1).⁴⁾

Unlike FRET, energy transfer can occur through *bonds* in which a donor relays energy to an acceptor predominantly via twisted π -electron systems. These have been investigated in materials research^{5,6)} and for model photosynthetic systems;^{† 9-11)} while our group was the first to form fluorescent labels for biotechnological applications¹²⁾ using this concept.¹³⁻²⁰⁾ Theories describing through-*bond* energy transfer (TBET) are vague; indeed, TBET may really be a summation of several means of transferring energy. These mechanisms may operate simultaneously with FRET, but are usually much faster.

There are at least two key differences between through-*space* and through-*bond* energy transfer. First, there is no known constraint in TBET that corresponds to the overlap integral. Secondly, the donor and acceptor parts are more intimately connected in TBET systems than in ones where there is no possibility of π -orbital overlap between them. For instance, the behavior of each fluor entity might be more sensitive to REDOX events than it is in FRET systems.²¹⁻²⁴⁾

There are several implications of the discussion above in the applications of TBET in biotechnology. First, separation of excitation and observation wavelengths is potentially useful where large dispersion between the donor absorbance and acceptor fluorescence facilitates visualization of the dye. Second, the “greater intimacy” of the donor and acceptor pairs relative to FRET means there are more possibilities to switch the TBET between on and off states. This is potentially useful since even if TBET is not occurring, the cassettes may still fluoresce from the donor part, *ie* they are always on. Finally, if the donor fluor is sensitive to photobleaching, it may be less so in the cassette. Figure 2 outlines the reasons for this in the example of a fluorescein-like donor and a rhodamine-like acceptor.

The Overlap Integral in FRET

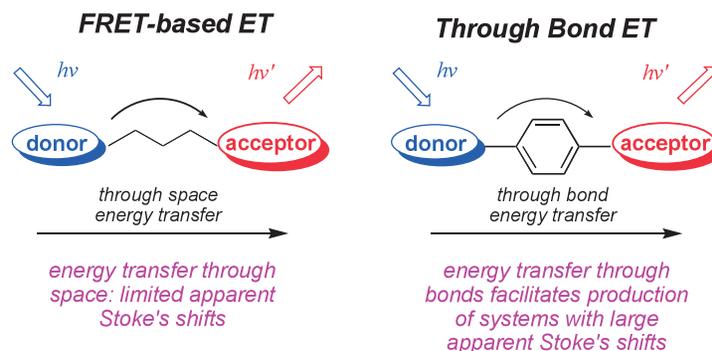
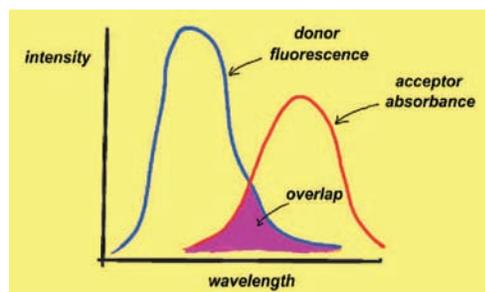


Figure 1. Overlap integral is critical in FRET, and it is the limiting factor in how far to the red a through space energy transfer system can fluoresce for a given donor. Through bond energy transfer systems have no known limitation of this kind.

[†]Through bond energy transfer effects have been studied in detail for long conjugated polymers.⁷⁾ Studies indicate that emissions tend to occur from the lowest energy state in the polymer conformation. Related to this, a single “defect” in the polymer chain can cause the whole system to photobleach in a single step, *ie* the system does not behave as if it was a series of dyes in a chain isolated by twists in the conformation.⁸⁾

Fluoresceins are unstable to photobleaching, mainly because their excited states undergo rapid singlet-to-triplet crossover, and the triplet states are longer-lived and reactive towards oxygen. If donor-to-acceptor energy transfer in a TBET cassette is faster than the crossover process, then the energy is preferentially relayed to the rhodamine part. Rhodamines tend to fluoresce quicker than they undergo singlet-to-triplet crossover, hence the photostability of the cassette overall is better than the fluorescein donor; it is more like that of the rhodamine acceptor.

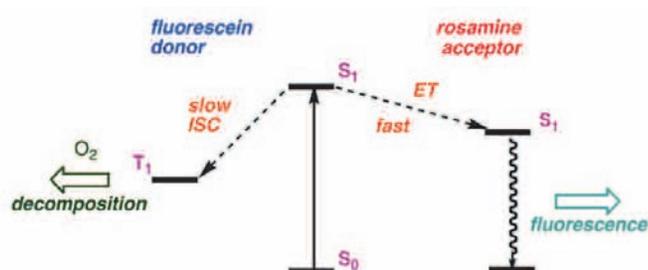


Figure 2. Excitation of the donor in a TBET cassette may lead to radiationless decay (not shown), crossover to a triplet states that are prone to photobleaching, or energy transfer to the acceptor and fluorescence at a longer wavelength.

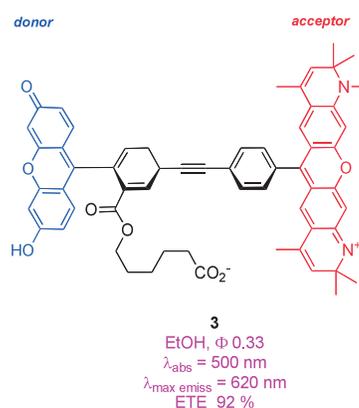
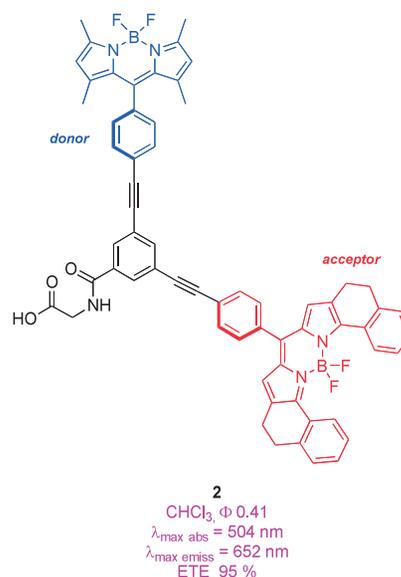
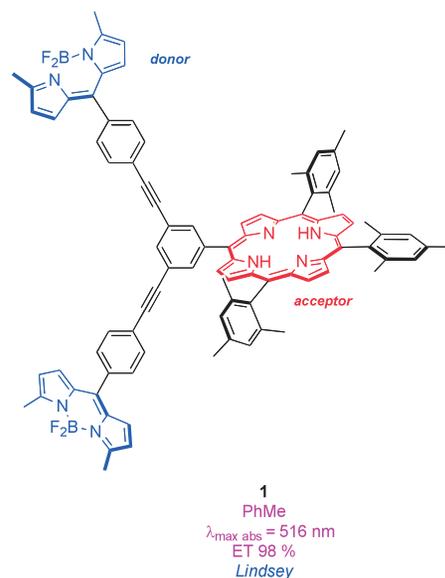
Design of TBET Systems For Biotechnology

When preparing TBET cassettes, the following parameters are critical:

- donor with high extinction coefficients at a relevant excitation wavelength (eg corresponding to a relevant laser source);
- a twist between the donor π -system and that of the acceptor; and,
- acceptors that fluoresce with high quantum yields and sharp emissions at appropriate wavelengths.

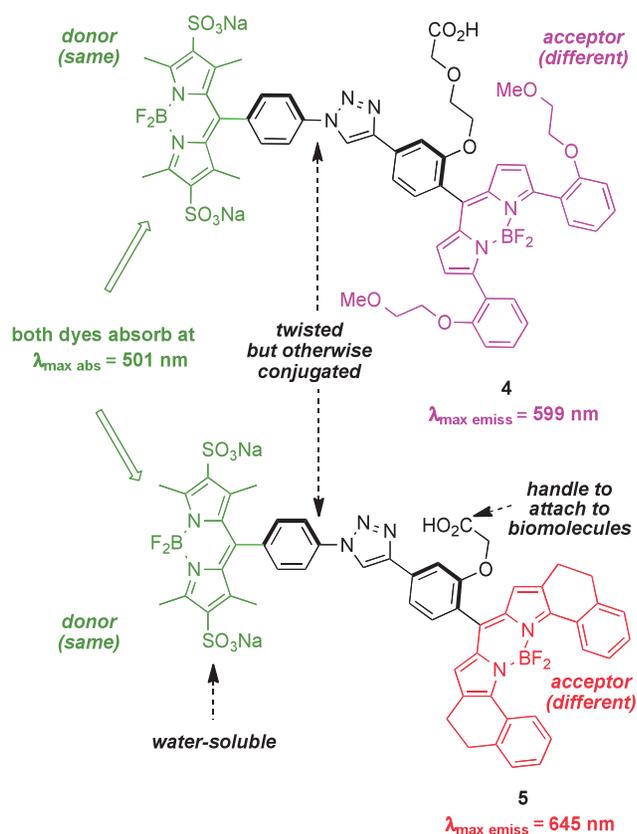
Outside of materials research, the Lindsey group were one of the first to prepare through-bond energy transfer cassettes that absorb above ca 488 nm, one example being the porphyrin derivative **1**. Lindsey was interested in compounds like this as models for photosynthesis.²⁵⁾ Our work on preparing smaller systems intended for biotechnology¹²⁾ began with some lipophilic cassettes like **2** and the surprisingly insoluble compound **3**.^{14,15,17)} Other groups, notably Akkaya²⁶⁻²⁹⁾ and Ziesse^{30,31)} have since made other lipophilic TBET cassettes, mainly to examine their fluorescence properties.

We defined a parameter we call “energy transfer efficiencies” (ETEs) as $\{\Phi_d/\Phi_a\} \times 100$ ³²⁾ where Φ_d is the quantum yield of the cassette when excited at the donor, and Φ_a is the same parameter except when the cassette is excited at the acceptor.



This reflects the efficiency with which the cassette transfers energy from the donor to the acceptor. The brightness of a TBET cassette depends on the extinction coefficient of the donor part(s), the efficiency of the energy transfer, and the quantum yield of the acceptor fluor in the cassette.

Unfortunately, dyes like **1** - **3** are insoluble in aqueous media. Cassettes **2** and **3** have functional groups to allow attachment to biomolecules, and **3** has the type of structure that looks like it might have water solubility, but it does not. In general, it is far more difficult to prepare water-soluble TBET cassettes^{18,33} than lipophilic ones. A breakthrough for our research came when we realized a practical method to sulfonate BODIPY dyes.³⁴ Eventually, this facilitated the syntheses of a series of TBET cassettes including **4** and **5**.³² These are sufficiently fluorescent on proteins in aqueous media to be used in multiplexing experiments in which the dyes are excited at about 500 nm, and fluoresce at 600 or 650 nm respectively.



Application of TBET Cassettes In Observing Protein-protein Interactions

Our concept of multiplexing with TBET cassettes is outlined in Figure 3. The hypothetical purpose of this experiment is to determine which of several (here four) proteins **A**–**D** interact with protein **1**. Thus, **1** is labeled with a FRET donor, **A**–**D** are labeled with four different cassettes each having the same TBET-donor. That donor also serves as a FRET acceptor for the dye on protein **1**. Four different acceptor parts are used in the cassettes, ones that emit in distinct spectral regions. If **1** interacts with **B** and **D** simultaneously then two different emissions will be seen when the FRET donor is excited.

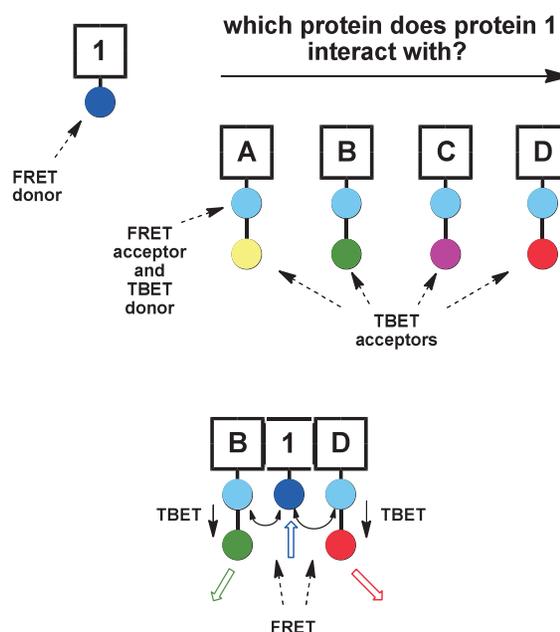


Figure 3. Multiplexing to observe protein-protein interactions with TBET cassettes.

To obtain proof of principle, we engineered a system wherein the protein Bovine Serum Albumin (BSA) was surface functionalized with biotin, and with a coumarin-based FRET-donor dye (Atto425). One of the cassettes was placed on avidin, the other was attached to streptavidin, and the FRET donor was excited *in vitro*. In that way it was shown that outputs from cassettes **4** and **5** could be observed simultaneously, indicative of the type of interaction shown between the proteins **B**, **1**, and **D** in Figure 3.

The next step was to attempt to observe this interaction in living cells. Figure 4 shows data obtained by using non-covalently bound peptide transporter systems like Pep-1 (Chariot)^{35,36} to import the dye-labeled proteins into cells.

Excitation of the FRET donor in the presence of only 4-streptavidin gives emission at about 600 nm (though some leakage into the red channel is observed) (Figure 4a). When both 4-streptavidin + 5-avidin were introduced then fluorescence is seen in the 600 nm and 650 nm channels indicative of two FRET interactions exciting both the TBET cassettes simultaneously (Figure 4b).

Application of TBET Cassettes In Measurement of Intracellular pH

Cassette 6 illustrates how TBET can be used to produce probes for intracellular pH (pH).³⁷⁾ In its protonated form, energy

transfer from the xanthene donors to the BODIPY acceptor is efficient, so excitation at 488 nm leads to red fluorescence (ca 600 nm). At pH values above 6.5, however, the xanthate donor exists in the phenolate form, energy transfer is no longer efficient, and excitation at 488 nm gives green (fluorescein-like) fluorescence from the donor. Attributes of this system are: (i) it is always fluorescent, irrespective of the pH in the cell; (ii) the presence of two donors doubles the absorption maxima, *ie* the crosssection for collection of photons by the dye is high; and, (iii) the quantum yield of this system when excited is superior to many other pH_i markers.³⁷⁾ More recently, a Chinese group has reported the same concept but using an analog of cassette 3 with a coumarin donor and a simple rhodamine acceptor.³⁸⁾

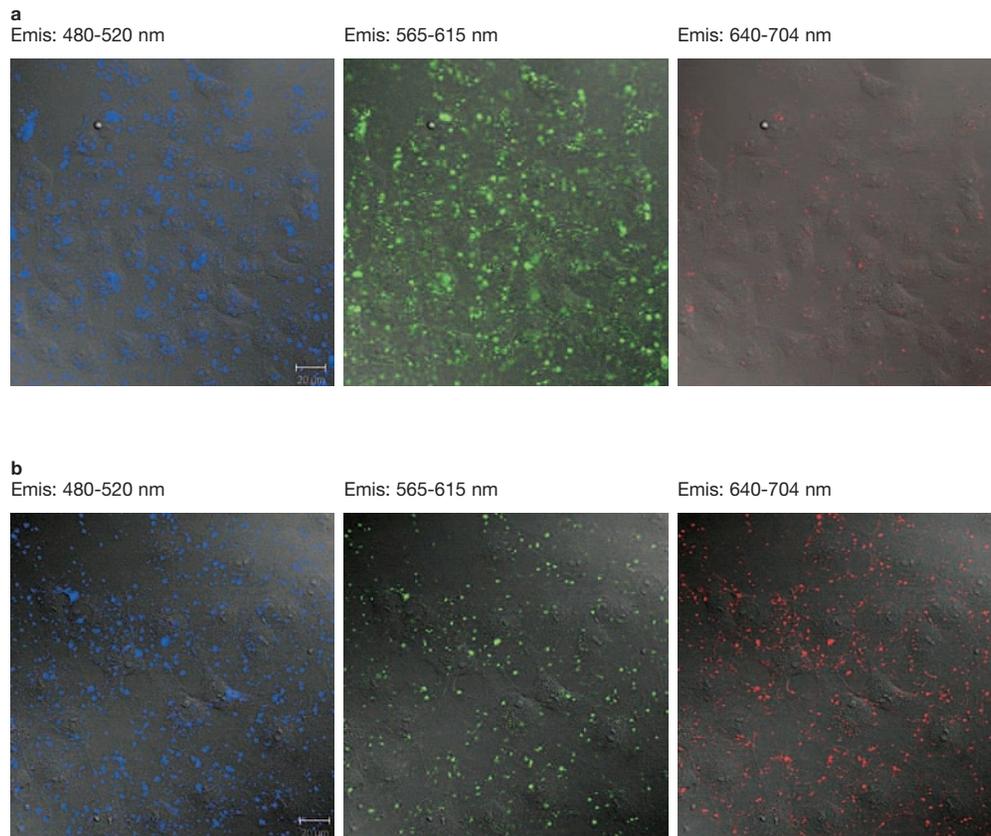
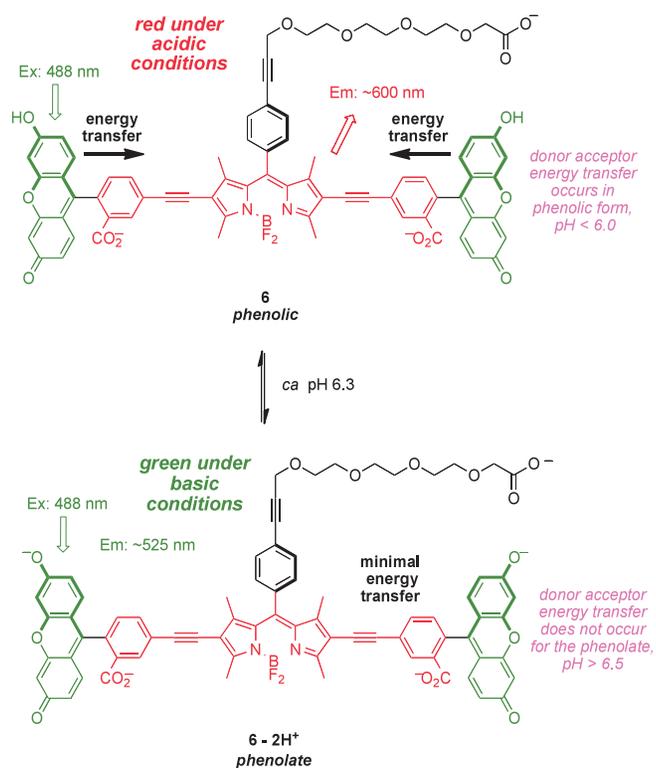
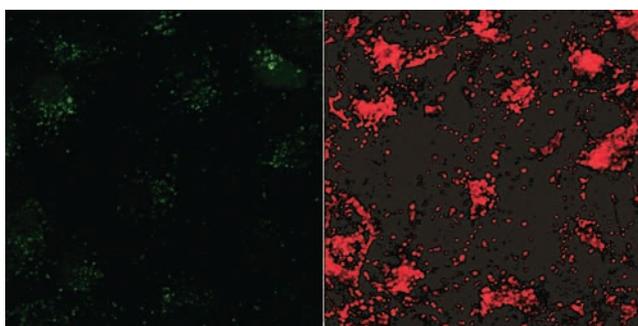


Figure 4. Protein-protein interactions observed in live cells. **a** Atto425-BSA-biotin + 4-Streptavidin; **b** Atto425-BSA-biotin + 4-Streptavidin + 5-avidin. Overlay of fluorescence and DIC images of cells. Blue channel 480-520 nm, green channel 565-615 nm, and red channel 640-704 nm; all excited at 458 nm. Images were collected after 10 min incubation at 37°C with the FRET donor, washing, and another 10 min incubation at 37°C with the acceptors. Scale bar is 20 μm.



a
 Exc. 488 nm; Emis: 503-553 nm Emis: 575-625 nm



b
 Exc. 488 nm; Emis: 503-553 nm Emis: 575-625 nm

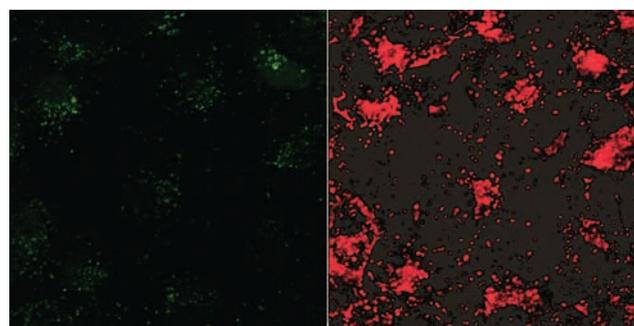


Figure 5. Pep-1 mediated cellular uptake of **BSA-6** (1 μ M) into COS-7 cells after 1h incubation at **a** 37 °C and **b** at 4 °C. The cells were irradiated at 488 nm and fluorescence from the donor (503-553 nm) and the acceptor (575-625 nm) was detected respectively.

In our view, it is justifiable to introduce a distinction between *stains* and *probes* for gauging intracellular pH (pH).³⁷ When cells are bathed in a medium containing a pH-sensitive *stain*, this may permeate across the lipid bilayer and give a “global indication” of pH. Conversely, when a fluorescent pH *probe* is attached to a protein or some other biomolecule, and that conjugate is then introduced into a cell (by whatever method) then the *probe* may be used to *track the location of the biomolecule target in the cell and the pH of its immediate environment*. *Stains* do not have to have a functional group for attachment to biomolecules, and they need not give brilliant fluorescence. Indeed, most *stains* could not be used as *probes* because they are insufficiently fluorescent to be detected at small intracellular concentrations within the cell.

In 2008 we reported that when the non-covalently bound protein carrier Pep-1 (and other synthetic systems we designed) was used to introduce fluorescently labeled proteins into COS-7 cells at 37°C, they are imported into endosomes, but *into the cytosol when the experiment is performed at 4°C*. The second outcome is the desired one since to track the natural movement of proteins inside cells they cannot be trapped in endosomes.

Endosomes in cells are markedly more acidic (pH 5.0–5.5) than the cytosol,³⁹ and they appear as vesicles when stained. Thus, it follows from the discussion above that Pep-1 mediated import of a protein labeled with **6** at 37°C should place the conjugate in endosomes where the probe would fluoresce *red*. However, if the import were performed at 4°C then the probe would fluoresce *green and red* in the {neutral} cytosol. In the event, import of **BSA-6** at 37°C gave almost nothing in the green channel and red vesicles in the long wavelength one (Figure 5a), whereas import at 4°C gave diffuse green and red fluorescence in the cytosol (Figure 5b; the intensity is weak relative to Figure 5a where the probe is concentrated in vesicles). This is exactly the data that was expected from these experiments.

Outlook and Conclusions

There are more applications of TBET in biotechnology, some we cannot yet disclose, others that we are working on, and some based on published observations that have not yet been applied. For instance, cassettes **7** and **8** provide an answer to a question few researchers are asking at the moment: "how to obtain relatively long wavelength (>520 nm) chemiluminescence from probes based on luminol?"²⁰ Activation of these cassettes with peroxide in the presence of a metal salt causes energy transfer from the luminol part to the acceptors shown, hence the probes fluoresce green and red (corresponding to fluorescence from fluorescein and Nile Red, respectively) *over a period of a second or two*. This may be useful because methods to detect chemiluminescence can be *more* sensitive than fluorescence-based techniques.

In general, the notion of through-bond energy transfer, even if it is just one of several possible mechanisms of donor-acceptor energy transfer, is an exciting motivational force for the development of new fluorescent probes.

References

- (1) T. Förster, *Discussions of the Faraday Society*, **1959**, 27, 7-17.
- (2) T. Förster, *Naturwissenschaften*, **1946**, 6, 166-175.
- (3) T. Förster, *Ann. Phys.*, **1948**, 2, 55-75.
- (4) J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Second ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, **1999**.
- (5) U. H. F. Bunz, *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 1605-44.
- (6) J. M. Tour, *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 537-53.
- (7) P. Kumar, T.-H. Lee, A. Mehta, B. G. Sumpter, R. M. Dickson, M. D. Barnes, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 3376-3377.
- (8) D. A. Vanden Bout, W.-T. Yip, D. Hu, D.-K. Fu, T. M. Swager, P. F. Barbara, *Science*, **1997**, 277, 1074-1077.

oxidatively activated cassettes

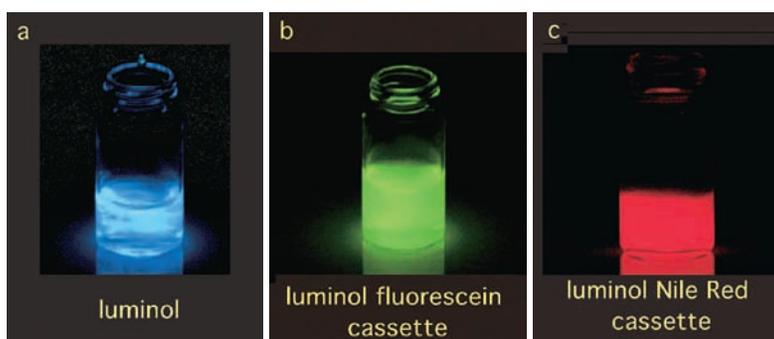
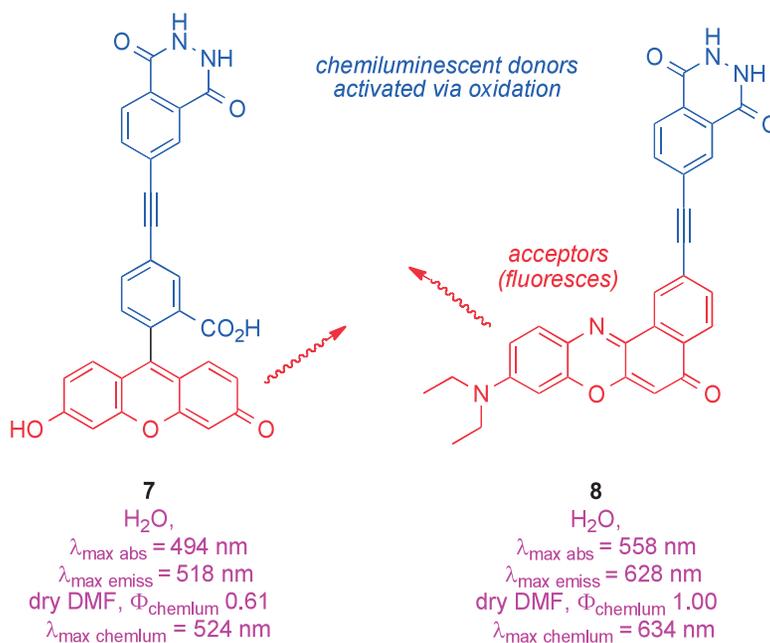


Figure 6. Luminescence from probes activated with peroxide and a metal catalyst at pH ca 9. **a** Luminol; **b** cassette **7**; and, cassette **8**.

- (9) P. G. Van Patten, A. P. Shreve, J. S. Lindsey, R. J. Donohoe, *J. Phys. Chem. B*, **1998**, *102*, 4209-16.
- (10) F. Li, S. I. Yang, Y. Ciringh, J. Seth, C. H. Martin, D. L. Singh, D. Kim, R. R. Birge, D. F. Bocian, D. Holten, J. S. Lindsey, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 10001-17.
- (11) R. W. Wagner, J. S. Lindsey, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 9759-60.
- (12) K. Burgess, "Through-bond energy transfer cassettes, systems and methods", US 2009/0192298 A1, July 30, 2009.
- (13) A. Burghart, L. H. Thoresen, J. Chen, K. Burgess, F. Bergstrom, L. B. A. N. G. Johansson, *Chem. Commun.*, **2000**, 2203-2204.
- (14) K. Burgess, R. Gibbs, "Through Bond Energy Transfer in Fluorescent Dyes for Labeling Biological Molecules", U.S. 6340750 B1, January 22, 2002.
- (15) G.-S. Jiao, H. Thoresen Lars, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 14668-14669.
- (16) C.-W. Wan, A. Burghart, J. Chen, F. Bergstroem, L. B. A. Johansson, M. F. Wolford, T. G. Kim, M. R. Topp, R. M. Hochstrasser, K. Burgess, *Chem. Eur. J.*, **2003**, *9*, 4430-4441.
- (17) K. Burgess, "Fluorescent through-bond energy transfer cassettes based on xanthine and pyronin derivatives", U.S. Patent No. 7402677, February 10, 2005.
- (18) R. Bandichhor, A. D. Petrescu, A. Vespa, A. B. Kier, F. Schroeder, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 10688-89.
- (19) T. G. Kim, J. C. Castro, A. Loudet, J. G. S. Jiao, R. M. Hochstrasser, K. Burgess, M. R. Topp, *J. Phys. Chem. A*, **2006**, *110*, 20-27.
- (20) J. Han, J. Jose, E. Mei, K. Burgess, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2007**, *46*, 1684-1687.
- (21) K. Tanaka, T. Miura, N. Umezawa, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 2530-2536.
- (22) T. Ueno, Y. Urano, K. Setsukinai, H. Takakusa, H. Kojima, K. Kikuchi, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 14079-14085.
- (23) H. Sunahara, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 5597-5604.
- (24) T. Ueno, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 10640-10641.
- (25) D. Holten, D. Bocian, J. S. Lindsey, *Acc. Chem. Res.*, **2002**, *35*, 57-69.
- (26) N. Saki, T. Dinc, E. U. Akkaya, *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 2721-2725.
- (27) G. Barin, M. D. Yilmaz, E. U. Akkaya, *Tetrahedron Lett.*, **2009**, *50*, 1738-1740.
- (28) O. A. Bozdemir, Y. Cakmak, F. Sozmen, T. Ozdemir, A. Siemiarzczuk, E. U. Akkaya, *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 6346-6351.
- (29) M. D. Yilmaz, O. A. Bozdemir, E. U. Akkaya, *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 2871-2873.
- (30) S. Diring, F. Puntoriero, F. Nastasi, S. Campagna, R. Ziessel, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 6108-6110.
- (31) T. Bura, R. Ziessel, *Tetrahedron Lett.*, **2010**, *51*, 2875-2879.
- (32) L. Wu, A. Loudet, R. Barhoumi, R. C. Burghardt, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 9156-9157.
- (33) R. Bandichhor, A. D. Petrescu, A. Vespa, B. Kier Ann, F. Schroeder, K. Burgess, *Bioconjugate Chem.*, **2006**, *17*, 1219-25.
- (34) L. Li, J. Han, B. Nguyen, K. Burgess, *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 1963-1970.
- (35) M. C. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz, G. Divita, *Nature Biotech.*, **2001**, *19*, 1173-1176.
- (36) A. Loudet, J. Han, R. Barhoumi, J.-P. Pellois, R. C. Burghardt, K. Burgess, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 4516-4522.
- (37) J. Han, K. Burgess, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 2709-2728.
- (38) W. Lin, L. Yuan, Z. Cao, Y. Feng, J. Song, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 375-379.
- (39) M. J. Geisow, W. H. Evans, *Exp. Cell. Res.*, **1984**, *150*, 36-46.

Author

Kevin Burgess

CONTACT

Department of Chemistry
Texas A & M University
PO Box 30012
College Station, TX 77843-3255, USA
phone: (+1) 979-845-4345 ; fax: (+1) 979-845-8839 ;
email: burgess@tamu.edu

EDUCATION

BSc	The University of Bath, England	1979
MS	The University of East Anglia, Norwich, England.	1980
	Advisor: Professor A. R. Katritzky	
PhD	The University of Cambridge Cambridge, England.	1983
	Advisor: Lord Lewis	
	<i>Reactions of Triosmium Clusters with 1, 3-Dipolar Compounds</i>	
	Awards: Sir Henry Stracosh Travel Grant Fulbright Travel Award	
	Research Lectureship at Christ Church, Oxford (1984)	
	Junior Research Fellowship at Girton College, Cambridge (1985)	

EMPLOYMENT

Postdoctoral Fellow	University of Wisconsin (with Professor B. M. Trost)	1983-84
Research Fellow	University Chemical Laboratory Cambridge, England	1984-87
Assistant Professor	Rice University	1987-92
Associate Professor	Texas A & M University	1992-96
Professor	Texas A & M University	1996-present

HONORS AND AWARD

B Sc Chemistry Prize, Bath University, UK	1979
Master's Thesis Award in Chemistry, UEA	1980
Sir Henry Stracosh Travel Grant	1983
Fulbright Travel Award	1983
Research Fellowship at Christ Church, Oxford, UK	1984-5
Junior Research Fellowship, Girton College, Cambridge, UK	1985-7
NIH Research Career Development Award	1992-7
Alfred P. Sloan Research Fellow	1993-5
Novartis International Lectureship	2002-3
Rachal Professor (endowed chair)	2005
TAMU AFS Distinguished Achievement Award in Research	2010

漢方診療・再発見

8

消化器外科と漢方

太田 恵一郎

国際医療福祉大学三田病院
外科・消化器センター

1. はじめに

消化器外科、とりわけ消化器癌の手術療法が局所療法であることは言うまでもない。しかし、われわれは術前術後の周術期はもちろんのこと、遠隔時においても常に患者の全身状態を十分に観察しながら診療に当たっている。こうした診療態度は、心身一如を基本とする漢方診療の基本姿勢と大いに共通点があり、消化器外科医は漢方診療に溶け込みやすい¹⁾²⁾。

本稿では、消化器外科と漢方治療の特徴について述べ、よく用いられている方剤について解説する。

2. 消化器外科領域での漢方治療の特徴

漢方治療は、手術により固定あるいは慢性化した状態に応用されることが多い。また、手術による直接あるいは間接的な臓器の機能異常に対して補助的に使用される場合もある。

術前術後の全身状態の改善、術後愁訴や合併症に対する治療、術前術後の補助化学療法、あるいは放射線治療などの有害事象の防止と軽減といった支持療法が漢方の良い適応となる。しかも、漢方薬による治療は西洋薬と違い画一的な治療ではなく、各々の患者の状態に応じて処方できるという特徴がある。特に体力や抵抗力の低下した、東洋医学で言う虚証の患者にも十分対応できるのも特徴である。

診断は西洋医学的に行い、有効な外科的処置や薬物療法が存在する場合はそちらを優先するのは当然であるが、根本的な治療法がないか効果が少ないと考えられる場合に漢方治療を選択することになる。

漢方医学的に悪性腫瘍の進行した病態は「陰虚証」の状態であり、そのために体力低下を補う人參、黄耆、乾姜、附子などの「補劑」により体力や免疫力を高めることが可能であり、また代謝を促進させる「温熱薬」が使用される。

東洋医学の「氣、血、水」の中で最も高次のものが「氣」であり、他を支配すると考えられている。「氣」は生命エネルギーであり、生体の機能的活動を制御する。漢方治療では消化器機能を改善することを最優先に考え、生命活動のエネルギーを供給しようとする。補劑の構成の中核を担う生薬は人參と黄耆であり、人參は「脾肺」すなわち消化吸収機能および全身の氣の流れを促進する。黄耆は氣を全身に供給する働きを持つ。補劑は消化吸収機能

を改善し、全身の栄養状態を改善し免疫機能を高め、生体防御機構の回復と治癒促進を促す。

3. 消化管癌手術に用いられる代表的方剤

3.1 大建中湯

消化器外科で最も使用されている方剤である。構成生薬の人參は消化管の消化吸収を促す働きを有し、山椒は弛緩した組織に活力を与え、腸管を温めて停滞ガスを促進し、乾姜にも腸管を温める作用がある。Endo等は胃全摘、空腸間置再建術後患者における消化管排出能や運動能に対する大建中湯の改善効果を報告した³⁾。著者等は開腹胃癌症例連続40症例を対象とし、前期10例の大建中湯非投与群と後期30例の大建中湯投与群（第1病日から7.5g分3経口投与）との比較を行った。大建中湯の開腹術後排ガス促進効果は少ないものの、全粥摂取まで順調に食事内容を上げることが可能であり、入院期間短縮に有用であることが示された。これを胃癌術後のクリニカルパスに採用している（表1）。

久保等や大藪等の腹部手術後の癒着性イレウスに対して、大建中湯が安全で有用な方剤であることがRCTで示され⁴⁾⁵⁾、高木等は大腸癌術後イレウス発症そのものは減少しなかったが、術後の腹痛や便通異常の発症を減少させたと報告した⁶⁾。永嶋等は大腸癌術後の腸管麻痺の改善に有用であると報告した⁷⁾。今津や壁島等は、大建中湯の投与により、大腸癌術後の入院日短縮効果を示した⁸⁾⁹⁾。

今後、大建中湯に関しては、DKTフォーラムにより行われる胃癌、大腸癌術後のプラセボ対照多施設二重盲検群間比較試験により、信頼性の高い臨床的エビデンスが得られることになるであろう。

3.2 六君子湯

水野等は胃切除後の消化器症状を有する46例を対象とし、六君子湯投与群（25例）と非投与群（21例）の無作為化比較試験を行い、六君子湯が術後の逆流性食道炎に有用であり、術後平均在院日数の短縮にも寄与したと報告した¹⁰⁾。西田、Takahashi等は幽門保存胃切除術後、六君子湯による排泄促進によって停滞症状を改善することを報告した¹¹⁾¹²⁾。

六君子湯には消化管運動促進作用や胃排出能促進作用が明らかになされており、上部消化管手術後の食欲不振や上腹部不快感などに使用される。さらに最近、グレリンの分泌促進作用が明らかとなり、食欲増進のメカニズムが解明されてきており、術後の化学療法などによる副作用予防としても六君子湯は頻用される¹³⁾。

3.3 参耆劑

胃切除後の骨代謝障害を抑制し、改善作用を持つと報告されたものに補中益氣湯がある。この方剤は術後や病後の体力低下時や衰弱時にも用いられてきた。斎藤等は進行胃癌、大腸癌症例に術前の補中益氣湯投与で手術侵襲の軽減効果あることを示した¹⁴⁾。大原等は胃癌や大腸癌を含むテガフル製剤による化学療法を受けている症例に対する補中益氣湯または人參養榮湯併用の有用性を報告した¹⁵⁾。阿部等も同様に術後化学療法の副作用を補中益氣湯が軽減することを症例集積研究で示した¹⁶⁾。

十全大補湯も術後の体力低下や疲労倦怠感などに用いられてきたが、上部消化管術後は貧血傾向になりやすく、血虚に合う十全大補湯は理に叶った方剤である。山田等は食道癌、胃癌、大腸癌術後の抗癌剤併用時の免疫抑制を十全大補湯が改善することを報

表 1 大建中湯が導入された胃癌患者のクリニカルパス

	手術当日	第1病日	第2病日	第3病日	第4病日	第5病日	～	第7病日～	
総輸液量 mL/kg/day (PPFを含む)	通常 50、拡大郭清例では 尿量に応じて増量	40～50	40～50	口径摂取に 応じて減量	口径摂取に 応じて減量	通常 ゼロ		退院の条件：全粥または常食 を毎食半分以上摂取。ない しは、毎食 1/3 前後に栄養剤 により 400 kcal 摂取。 遅くとも 14 日以内の退院を 目指し、工夫すること。	
静脈栄養	帰室後よりグルコースを必ず投 与。(例) フィジオゾール・3号ま たはアミノフリード	高カロリー輸液 (CPN) は不要。 PPN で十分 (フィジオゾール・3号 またはアミノフリードを利用)			飲水が十分できれば、OFF				
経口栄養： Oral Intake	OP室で NG チューブ除去	TJ-100(白濁 100 mL 溶解) 1P × 3 PPG および噴切症例はラコーラー一日 100 mL × 3 とする							
飲水	絶飲食 (希望で氷片可)			自由					
食事	絶飲食			排ガス後三分粥開始、以後 1 日ずつ五分、七分、 全粥へアップ					
呼吸管理	Room Air で PaO ₂ > 90 mmHg あれば、酸素投与不要								
ネブライザー	呼吸器合併症リスクのない患者では不要								
抗生剤	執刀 30 分前から開始 第一選択は CEZ	○	○ or OFF	トラブルなければ終了					
硬膜外麻酔	○	○	○	○	OFF				
尿道カテーテル	○	○	可能なら抜去	抜去					
体位	Semi-Fowler 位			自由					
離床・歩行		積極的に開始	積極的に	完了している こと					
ドレーン管理	不要となれば直ちに抜去								
創部の管理	ナイロン糸で縫合	必要であれば消毒		包交・消毒不要 ドレーンがなければ、シャワー可			抜糸		

告した¹⁷⁾。黒川等も同様に胃癌、大腸癌を含む悪性腫瘍術後の抗癌剤による副作用に対する十全大補湯の効果を報告した¹⁸⁾。著者らは根治切除が施行された Stage II から IV までの進行胃癌症例を対象として、十全大補湯の投与の有無による術後一年目の QOL を比較する無作為化比較試験を多施設共同で行った。詳細なデータ解析を行い、近く結果を公表する予定である。

戸田等は大腸癌術前術後にフツ化ピリミジン系経口抗癌剤投与された症例を対象とし、十全大補湯により腫瘍組織内の 5-FU 濃度が上昇し正常組織内では低下することを報告した¹⁹⁾。佐々木等は大腸癌術後補助化学療法に十全大補湯を併用することで、転移抑制作用の可能性を示唆した²⁰⁾。さらに小柴胡湯が大腸癌術後患者の免疫機能賦活化と肝転移抑制効果を持つことを報告し²¹⁾、荒木等は人参養栄湯²²⁾が、西村等は補中益気湯が大腸癌術後の免疫能や栄養状態改善効果を示すことを報告した²³⁾。

4. おわりに

消化器外科と漢方治療の特徴につき述べ、消化管癌手術で頻用される方剤について解説した。術後の「証」は必ずしも解明されておらず、随証治療を行うには困難を伴うことが予想される。しかし、可能な限り漢方的診察を行い、その努力をしなければならぬ。一方で大規模な臨床研究の推進と高いエビデンスの構築に期待が寄せられている。

[参考文献]

1) 太田恵一郎, “外科における漢方診療の位置づけ”, *外科治療*, **2007**, 97, 455-460.
2) 太田恵一郎, 北島政樹, “消化管手術と漢方”, *G. I. Research*, **2010**, 18, 306-312.

3) S. Endo, T. Nishida, K. Nishikawa, *et al.*, “Dai-kenchu-to, a Chinese herbal medicine, improves stasis of patients with total gastrectomy and jejunal pouch interposition”, *American Journal of Surgery*, **2006**, 192, 9-13.
4) 久保宣博, 内田雄三, 秋吉毅, ほか, “イレウスに対する大建中湯の効果 - 多施設による検討 -”, *Progress in Medicine*, **1995**, 15, 1962-7.
5) 大敷久則, 松田昌三, 栗栖茂, ほか, “癒着性イレウス発症例に対する randomized trial による大建中湯の評価”, *Progress in Medicine*, **1995**, 15, 1954-8.
6) 高木和俊, 永田仁, 堀江徹, ほか, “直腸結腸癌切除後の腸障害に対する大建中湯を用いた予防的漢方治療の効果 - 前向き無作為化試験 -”, *漢方研究*, **2007**, 429, 270-1.
7) 永嶋裕司, 田中宣威, 古川清憲, ほか, “大腸癌術後腸管麻痺に対する大建中湯 (TJ-100) の効果”, *Progress in Medicine*, **1998**, 18, 903-5.
8) 今津嘉宏, 渡辺賢治, 今井栄子, ほか, “大腸癌手術における大建中湯投与の入院日数短縮効果について”, *Progress in Medicine*, **2004**, 24, 1398-1400.
9) 壁島康郎, 高橋洋子, 亀山哲章, ほか, “大腸癌手術症例における大建中湯を用いた術後リハビリテーションの検討”, *日消外会*, **2005**, 38, 592-597.
10) 水野修吾, 山際健太郎, 岩田真, ほか, “胃切除後の消化器症状に対するツムラ六君子湯の術後早期投与効果 - 逆流性食道炎を中心に -”, *Prog. Med.*, **2001**, 1366-1367.
11) 西田俊朗, “胃切除術後の消化管機能に及ぼす六君子湯の効果”, *Progress in Medicine*, **2006**, 26, 3224-5.
12) T. Takahashi, S. Endo, K. Nakajima, *et al.*, “Effect of rikkunshito, a chinese herbal medicine, on stasis in patients after pylorus-preserving gastrectomy”, *World Journal of Surgery*, **2009**, 33, 296-302.
13) H. Takeda, C. Sadakane, T. Hattori, *et al.*, “Rikkunshito, an herbal medicine, suppresses cisplatin-induced anorexia in rats via 5-HT₂ receptor antagonism”, *Gastroenterology*, **2008**, 134, 2004-13.
14) 斎藤信也, 岩垣博巳, 小林直哉, ほか, “胃癌・大腸癌の手術侵襲に対する漢方補劑 TJ-41 の効果について”, *日本臨床外科学会雑誌*, **2006**, 67, 568-74.
15) 大原毅, 恩田昌彦, 二川俊二, ほか, “補中益気湯, 人参養栄湯のテガフルとの併用療法に関する有用性の検討”, *薬理と治療*, **1993**, 21, 4423-34.

- 16) 阿部憲司, “癌術後化学療法時の副作用に対する補中益気湯の効果” *Progress in Medicine*, **1989**, 9, 2916-2922.
- 17) 山田輝司, “食道癌・胃癌・大腸癌術後における十全大補湯投与の臨床的検討ー手術侵襲と術後化学療法の細胞性免疫への影響についてー”, *和漢医薬学会誌*, **1992**, 9, 157-64.
- 18) 黒川胤臣, 今井順, 玉熊正悦, “十全大補湯による抗癌剤副作用防止効果および臨床免疫学的検討”, *Biotherapy*, **1989**, 3, 789-795.
- 19) 戸田智博, 松崎圭祐, 川野豊一, ほか, “大腸癌に対する Tegafur 徐放性製剤 (SF-SP) と十全大補湯 (JTX) の術前および術後併用療法の検討ーとくに組織内濃度と Thymidine Phosphorylase (TP) 活性についてー”, *癌の臨床*, **1998**, 44, 317-23.
- 20) 佐々木一晃, 高坂一, 古畑智久, ほか, “癌化学療法と漢方診療”, *外科治療*, **2007**, 97, 504-10.
- 21) 佐々木一晃, 高島健, 北川一彦, ほか, “漢方薬による大腸癌術後免疫機能賦活化と肝転移抑制効果について”, *Progress in Medicine*, **1992**, 12, 1652-5.
- 22) 荒木靖三, 田中保, 緒方裕, ほか, “大腸癌術後に及ぼす漢方方剤の免疫学的検討”, *新薬と臨床*, **1992**, 41, 1670-6.
- 23) 西村元一, “大腸癌手術例の栄養・免疫状態に対する補中益気湯の臨床効果の検討”, *Progress in Medicine*, **2009**, 29, 84-5.

日本癌治療学会臨床試験登録医
 日本がん治療認定医機構認定医、暫定教育医
 日本リンパ学会評議員
 日本緩和医療学会理事、代議員、ガイドライン作成委員、暫定指導医
 日本東洋医学会専門医、指導医
 日本死の臨床研究会世話人
 癌とリンパ節研究会幹事
 CART 研究会代表世話人
 外科漢方研究会幹事
 港区在宅緩和ケア・ホスピスケア支援推進協議会委員、中核病院部会長

学位：
 医学博士（日本大学第 5820 号）
 胃癌における Cisplatin の腹腔内投与時の薬物動態に関する検討。



筆者紹介

氏名：太田 恵一郎（おおた けいいちろう）
 所属：国際医療福祉大学 教授
 三田病院 医療相談・支援・緩和ケアセンター長（兼任）

略歴：

昭和29年2月25日生まれ（熊本市）
 昭和47年3月 熊本県立済々黌高等学校卒業
 昭和53年3月 鹿児島大学医学部卒業
 昭和53年4月～昭和57年5月 虎の門病院外科病棟医
 昭和57年6月～昭和60年5月 国立がんセンターレジデント（外科）
 昭和60年6月～平成15年5月（勸業研究会附属病院外科）
 平成15年6月～筑波大学臨床医学系外科
 平成16年4月～筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床医学系外科
 平成18年1月～国際医療福祉大学三田病院外科・消化器センター
 現在に至る

役職：

日本胃癌学会評議員
 日本臨床外科学会評議員
 日本外科学会指導医、専門医、認定医
 日本消化器外科学会指導医、専門医、認定医、
 消化器がん外科治療認定医
 日本外科系連合学会フェロ一会員、評議員

漢方診療・再発見（全8回）

- 1 漢方医学／医療の必要性
 熊本大学医学部附属病院 宇宿 功市郎
- 2 漢方医学の構造
 熊本赤十字病院 総合内科
 熊本大学大学院医学教育部 加島 雅之
- 3 気道炎症と漢方薬
 崇城大学薬学部 宮田 健
- 4 感染症と漢方
 熊本大学エイズ学研究センター 岡田 誠治
- 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
- 6 漢方薬の水分代謝調節作用
 熊本大学大学院生命科学部 磯濱 洋一郎
- 7 中医・韓医と日本漢方
 熊本赤十字病院総合内科
 熊本大学大学院医学教育部 加島 雅之
- 8 消化器外科と漢方
 国際医療福祉大学三田病院
 外科・消化器センター 太田 恵一郎

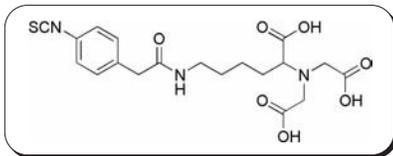
今回をもちまして、連載「漢方診療・再発見」は終了いたします。次号より、新連載「蛍光生物学の最前線」をお届けいたします。どうぞご期待ください。

新製品

二価性試薬 (NTA Type)

Isothiocyanobenzyl-NTA

N-[5-(4-Isothiocyano-benzyl)amido-1-carboxypentyl]iminodiacetic acid



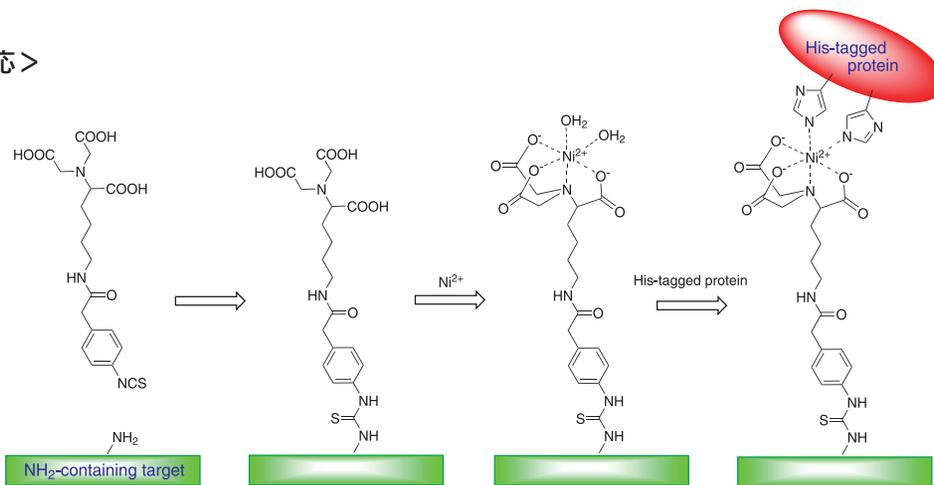
Isothiocyanobenzyl-NTA (ITC-Bz-NTA)*は、生理的条件下においてアミン化合物、アミノ基を有する生体分子や固体表面など様々な物質にキレート部位を導入できます。NTAは重金属と安定な錯体を形成するため、NTAと結合した化合物や生体分子、固体表面などに金属イオンを導入することが可能です。これら金属キレート化合物は、金属イオンと相互作用する特定の物質の検出や分離に用いることができます。

まず、Isothiocyanobenzyl-NTAを1級アミノ基を有する物質と反応させ、次いでNi(II)を加え錯形成させます。しかしこの段階では、Ni(II)の配位座はIsothiocyanobenzyl-NTAによって完全には満たされず、空いた部分には水が配位しています。このIsothiocyanobenzyl-NTAのNi(II)錯体に6個のヒスチジンを発現させたタンパク質(His-tagged protein)を加えると、ヒスチジン部分がNi(II)に配位するため、特異的かつ一定方向に固定化することができます(この結合は強固ですが、フリーのヒスチジンやイミダゾールによって可逆的に解離します)。

これまでの化合物に比べ、容易な導入が可能となったことから、“His-Tag”技術へのますますの応用が期待されます。

*NTA : Nitrilotriacetic acid

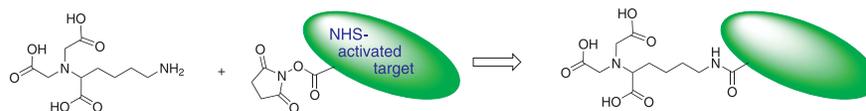
< 標識反応 >



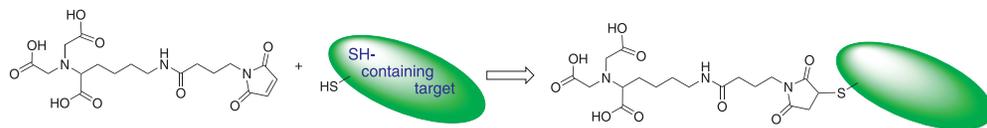
品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Isothiocyanobenzyl-NTA	10 mg	18,400	I279

関連製品

AB-NTA free acid



Maleimido-C3-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-C3-NTA	10 mg	16,600	M035

Topics on Chemistry

盛んに開発が進むバイオセンサー向け生体物質固定化法

株式会社同仁化学研究所 藤野 怜香

現在、生体物質の特異的な機能を物質認識デバイスとして利用し、対象となる物質を検出・定量する方法が、医療、環境、食品分野など幅広く用いられており、センサー部分に抗体、微生物、酵素、細胞などの生体物質を固定化する技術が必要不可欠になっている。特に、特異的な反応性を持つ官能基を導入した自己組織化単分子膜 (SAM) をセンサー基板上に作製し、生体物質を固定化する手法が多く利用されている。一般に汎用されている固定化方法は、アミンと *N*-ヒドロキシスクシンイミドエステル、スルフィドリルとマレイミド、ピオチンとアビジン、アジドとアルキンなどの結合を利用したものである。しかし、これらの方法だけに留まらず、現在もなお利用価値の高い固定化方法の開発が盛んに行われている。そこで本稿では、最近報告された2つの固定化方法について、その手法と有用性について簡単に紹介する。

1. *p*-キノニンイミンとシステインの付加反応を利用した固定化¹⁾

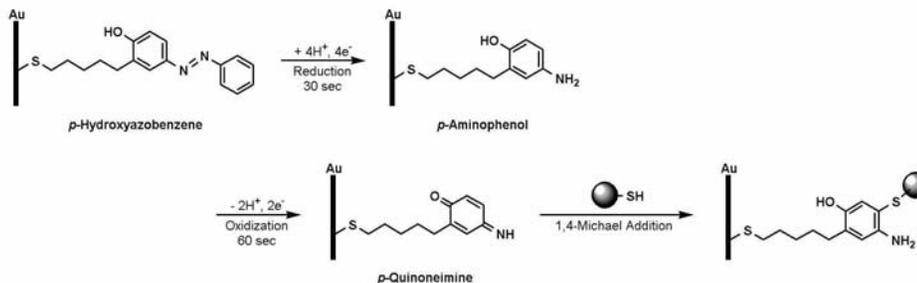
Jung らは、*p*-ヒドロキシアゾベンゼンを電気的に還元分解し *p*-アミノフェノールを生成させ、さらに *p*-キノニンイミンへと電気的に酸化することで、ペプチドなどのシステイン残基を 1,4-マイケル付加により固定する方法を報告した (Scheme 1)。この

手法の優れているところは、不活性な SAM 表面を簡単に短時間で活性化できることと、元々生体物質に備わっている反応サイトを利用して固定化できる点である。

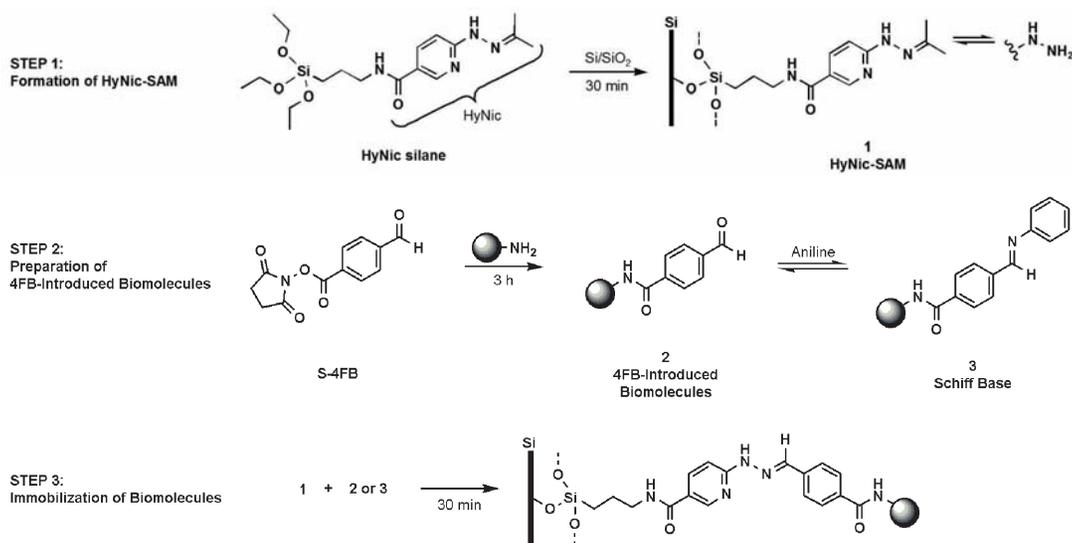
過去 Jung らは、アゾベンゼンの電気化学的に制御された開裂反応を利用して二段階還元によりアニリンを生成させ、生体物質を固定化する手法を報告した。この手法の改良を続けた結果、アゾベンゼンのパラ位にヒドロキシル基を導入すると、一段階還元で開裂を起こせることがわかった。

そこで Jung らは、*p*-ヒドロキシアゾベンゼンの SAM を作製し、Britton-Robinson バッファー (pH 2.0) 中、-0.3 V の還元電位を 30 秒かけ、*p*-アミノフェノールが効率よく生成することを確認した。さらに PBS (pH 7.4) に置換し、+0.3 V の酸化電位を 60 秒かけ、*p*-キノニンイミンへと酸化すると、システインと速やかに付加反応が起きることを示した。この付加反応はシステイン特異的であり、他のアミノ酸類とは反応が起きないことも確認している。

この固定化法を利用し、基板表面に神経突起の伸長促進物質であるラミニンペプチド:CGG-IKVAV を固定化したところ、2 日間の培養を経て、海馬ニューロンの正常な神経突起が伸張していることが確認された。この結果は、マイクロスケールで神経細胞を



Scheme 1. Immobilization of CysteinyI Biomolecules over Functionalized-SAM using 1,4-Michael Addition



Scheme 2. Coupling Reaction of HyNic-SAM and 4FB-Introduced Biomolecules

パターンニングできる可能性を示唆しており、脳科学分野の解析に今後応用されることが期待できる。

2. アニリン触媒ヒドラジン-アルデヒド縮合反応を利用した固定化²⁾

ヒドラジンとアルデヒドをアニリン存在下反応させると効率よくカップリングが起きることは知られているが、Byeon らは、この反応を様々な条件下で行い、従来の一般的な固定化方法よりも利用価値が高いことを示した。反応スキームを Scheme 2 に示す。

Byeon らは、マイクロリング共振器で SAM 形成から抗体の固定化、抗原捕捉までをリアルタイムモニターし、HyNic(6-Hydrazinonicotinamide) 基と 4FB(4-Formylbenzamide) 基のカップリング反応条件による反応性の差とセンサー感度を観察した。まずは、HyNic-SAM と 4FB- 抗体のカップリングにおけるアニリン触媒のあり/なしの影響と、異なる pH 条件 (pH 7.4, 6.0, 4.0) による反応効率の差を、固定化された抗体の密度により評価した。その結果、アニリンが存在する条件では、存在しない時と比較して SAM 表面の抗体密度は 4 倍も高く、また、酸性側になるほど固定化量が多くなることがわかった。これは、4FB はアニリンが存在するとシッフ塩基を形成し、酸性条件下でより容易にプロトン化し、ヒドラゾン結合を作ることができるためと考えられる。さらに抗体を導入したセンサーの抗原捕捉能力を測定したところ、アニリンを用いて固定化したセンサーの方が高感度であることがわかった。また、その固定化能力と感度は、一般的なアミンと *N*-ヒドロキシスクシンイミドエステルを利用した場合よりもはるかに良いというデータも報告している。しかも、カップリング反応にかかる時間は、HyNic-4FB カップリングの方が大幅に短縮できるという利点もある。

固定化反応の効率が低 pH 側で高かったのに対して、SAM 表面と抗体との非特異的な相互作用 (吸着) は高 pH 側で大きく観測された。この結果が示唆するのは、アニリンを触媒として用いれば、抗体濃度が低い場合、つまり抗体使用量を減らした場合でも、中性付近では SAM 表面との相互作用により反応サイトが近づくため、固定化効率を上げられる可能性を持っているということである。実際、固定化時に抗体量を減らした場合でも、感度は少々劣るが、抗原の検出が十分に可能なレベルのセンサーを作製することに成功している。今後もさらなる最適化が進められ、より優れた固定化法として汎用されることが期待できる。

以上 2 つの生体物質固定化方法は、現在盛んに開発が進む固定化方法のひとつにすぎない。今後新たに開発される新手法、また、現在汎用されている方法の改良などにより、高感度で簡便、かつコストパフォーマンスに優れたバイオセンサーを用いた分析技術が飛躍的に発展していくことを期待したい。

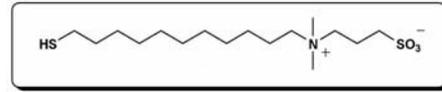
[参考文献]

- 1) H. J. Jung, I. Hwang, B. J. Kim, H. Min, H. Yu, T. G. Lee, T. D. Chung, *Langmuir*, **2010**, 26 (19), 15087-15091.
- 2) J.-Y. Byeon, F. T. Limpoco, R. C. Bailey, *Langmuir*, **2010**, 26 (19), 15430-15435.

試作品

自己組織化単分子膜作製用試薬

SB-SAM 3-[(11-Mercaptoundecyl)-*N,N*-dimethylammonio]propanesulfonate



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) は光スライディング・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。

現在小社では、上記のようなスルホベタインタイプのアルカンチオール; SB-SAM を試作しております。Holmlin らは、スルホベタインを導入した SAM を作製し、イオン強度 200 mmol/l 以上の条件下、または、弱アルカリ領域でタンパクの非特異吸着抑制効果が見られることを確認しています¹⁾。また、防汚性表面処理への応用なども期待されます。

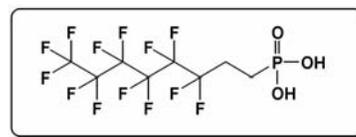
[参考文献]

- 1) R. E. Holmlin, X. Chen, R. G. Chapman, S. Takayama, G. M. Whitesides, *Langmuir*, **2001**, 17 (9), 2841-2850.

開発中

表面処理用ホスホン酸誘導体

FOPA 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-Perfluorooctyl phosphonic acid



ホスホン酸誘導体は酸化アルミニウムや ITO 等の金属酸化物の表面処理・改質剤として、近年、注目されています。

Klauk ら¹⁾や Someya ら²⁾は、アルキルホスホン酸を有機トランジスタの絶縁膜として使用しています。また、Traina らはオリゴエチレングリコール部位を有するアルキルホスホン酸で酸化イットリウム微粒子を修飾し、水溶化することに成功しています³⁾。

最近、Sharma らは ITO 基板をパーフルオロアルキル基を有するホスホン酸 (FOPA) で修飾することにより、酸素プラズマ処理と同様に、ITO 基板の仕事関数が増大することを報告しています。

酸素プラズマ処理によって増加した仕事関数は直ぐに低下しますが、FOPA 修飾により増加した仕事関数は安定性が高く、246 時間後も低下しないことが示されています⁴⁾。

FOPA は上記のような ITO 修飾以外にも、種々の金属酸化物表面の撥水処理への応用が期待されます。

[参考文献]

- 1) H. Klauk, U. Zschieschang, J. Pflaum, M. Halik, *Nature*, **2007**, 445, 745
- 2) T. Someya, T. Sekitani, Y. Noguchi, U. Zschieschang, H. Klauk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, 105, 4976.
- 3) C. A. Traina, A. Christopher, J. Schwartz, *Langmuir*, **2007**, 23(18), 9158
- 4) A. Sharma, B. Kippelen, P. J. Hotchkiss and S. R. Marder, *Appl. Phys. Lett.*, **2008**, 93, 163308.

Topics on Chemistry

植物バイオマス为原料とした大腸菌によるバイオディーゼル生産

株式会社同仁化学研究所 前田 雄一

現在、化石燃料の枯渇が危惧されている。また、化石燃料の使用による二酸化炭素の増加が地球温暖化の要因の1つとして指摘されている。その解決策として、環境にやさしいクリーンエネルギーが求められている。

クリーンエネルギーには、代表的なものに太陽光、風力、水力、バイオマスなどがあり、それぞれに長所と短所がある。

太陽光では、太陽電池を用いて光エネルギーを電気エネルギーに変換する。日光が当たる場所であればどこでもエネルギーが得られ、野外のみならず、建築物の屋根や壁面にも太陽電池を設置することができ、設置する場所の制約が少ない。しかし、エネルギー源が太陽光であることから、夜間にはエネルギーを生産できず、天候や季節によっても日照量が変化するため、エネルギー生産量が変動するという問題がある。

風力では、風の力を利用して風車を回転させ、その回転運動を発電機に伝えることで電気エネルギーを得る。風力エネルギーは、小規模で導入しやすく、分散型である(1つ1つ独立している)ため、メンテナンスが容易で、稼働率が高く、採算性も高い。しかし、風速の変動に伴い、出力電力が需要と関係なく変動してしまうことや騒音の問題がある。

水力では、発電用水車を水の力によって回転させることで電気エネルギーを得る。大規模水力発電では、ダムなどに貯水した水でタービンを回し発電する。安定した出力が得られ、需要の変化に対応しやすいが、建設に伴う環境負荷・費用が大きいという問題がある。

それに比べ、バイオマスは、植物が光合成により、太陽エネルギーを有機化合物として蓄えたエネルギーである。バイオマスは燃焼してエネルギーを得るため二酸化炭素が排出されるが、再び光合成により二酸化炭素は吸収されるので、その環境への実効排出量はゼロと考えてよい(この考え方をカーボンニュートラルという)。

バイオマスのユニークな特徴として、種々の工程を経ることにより、固体、液体、気体と様々な形態で取り出すことが可能で、燃料として貯蔵できることが挙げられる。特に輸送用燃料としてのガソリンやディーゼル油(軽油)の代替燃料としてバイオエタノールやバイオディーゼルが生産されている。これらは、主要な移動手段の一つである自動車のシステムを変更することなく使用できることや、既存のガソリンスタンドを使用できるためインフラストラクチャーの整備の必要がなく、クリーンな燃料として今後も需要が高まることが予想される。

バイオエタノールの原料には、糖質原料とデンプン質原料の2種類がある。サトウキビの精糖を分離した後のモラセス(廃糖蜜)は糖質原料の一つで、発酵によってバイオエタノールを得ることができるが、モラセスから得られるバイオエタノールだけでは、増大する需要を満たすことはできない。その不足分を補うために、デンプン質原料のバイオエタノールも生産されている。デンプン質原料は主にトウモロコシやイモ類であるが、食糧との競合が実用化の上で問題となる。

バイオディーゼルは主に植物油脂から作られており、菜種油、ヒマワリ油、大豆油、パーム油などがその原料油脂としてよく知られている。その成分は、脂肪酸メチルエステルや脂肪酸エチルエステルであり、その多くは化学的エステル交換により製造されている。この製造工程の問題点は、加熱するためのエネルギーを必要とすることや、副生するグリセリンを除去しなければならないことである。副生したグリセリンは、食品添加物、石鹼や化粧品などに用いられるが、供給過剰となっている。

現在のバイオエタノールやバイオディーゼルの生産では、前述のような様々な問題がある。原料については、植物の主要成分であるセルロースやヘミセルロースを利用できれば、問題の解決に大きく寄与できると考えられる。しかし、現状では、これらを分解するために高価な酵素(セルラーゼ、ヘミセルラーゼ)を添加することや、粉碎、熱処理などの前処理が必要となるなどの問題がある。そこで本稿では、大腸菌に遺伝子を導入することにより種々の酵素を発現させ、グルコースやヘミセルロースから、バイオディーゼルの生産に成功した成果について紹介する¹⁾。(図1)

Steenらはバイオディーゼル生産の第一段階として、バイオディーゼルの原料となる脂肪酸を多く産生する大腸菌株作製を目指した。

脂肪酸の産生を高めるためには、チオエステラーゼを細胞質内で高発現させれば良いことが既に知られている^{2,3)}。脂肪酸は、アシル-ACP(アシルキャリアータンパク質)複合体を経由して合成されるが、この複合体が蓄積されると脂肪酸の合成が阻害される。チオエステラーゼは、この複合体を分解し、脂肪酸の合成を促進し産生量を増大させる。細胞内膜と外膜の間に存在するチオエステラーゼ *TesA* を細胞質内で発現させることにより、グルコースから脂肪酸を最大で 0.32 g/L 産生する大腸菌株が得られた。さらに、脂肪酸産生を高めるために、脂肪酸のβ酸化に関与する酵素をコードする遺伝子 *fadE* を除去した。*fadE* を除去し、同時に *TesA* を細胞質内で発現させた株では、*TesA* のみを細胞質内で発現させた株の3倍以上となる 1.2 g/L の脂肪酸を産生した。

次に、大腸菌からバイオディーゼルである脂肪酸エチルエステルを直接生産するため、アシネトバクター菌由来の脂肪酸エステル合成酵素をコードする遺伝子 *atfA* を導入し、グルコースとエタノールから脂肪酸エチルエステルを産生する大腸菌株を作製した。この株は、400 mg/L の脂肪酸エチルエステルを産生した。

脂肪酸エチルエステル生産工程を簡単にするために、サイモナス菌由来のピルビン酸デカルボキシラーゼをコードする *pdC* 遺伝子と、同じ細菌由来のアルコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子 *adhB* を大腸菌に導入した。ピルビン酸デカルボキシラーゼは解糖系の最終産物であるピルビン酸を二酸化炭素とアセトアルデヒドに分解し、アルコールデヒドロゲナーゼは、アセトアルデヒドからエタノールを生成する。したがって、これらの遺伝子の導入により、エタノールを加えることなく、グルコースのみから脂肪酸エチルエステルを 37 mg/L 産生する株が得られた。

一般的に、ディーゼル油は自己着火性が高いほどアンチノック性が高く、燃料としての性能が高いとされる。その性能は、セタン価で表される。セタンは炭素鎖長 16 の直鎖炭化水素であり、この炭素鎖長に近いほどセタン価が高く、ディーゼル油の性能が良いとされる。バイオディーゼルの性能を向上させるために、炭素鎖長に対する特異性の異なるチオエステラーゼを導入することにより、脂肪酸の炭素鎖長分布をセタンの炭素鎖長である 16 に近づけた。*TesA* を細胞質内で発現させた株では、脂肪酸の炭素数が 12~18 の脂肪酸エチルエステルが得られ、脂肪酸炭素鎖長 16 の脂肪酸エチルエステルは約 40% しか得られなかった。一方、*TesA* の代わりに植物(シロイヌナズナ)由来のチオエステラーゼ *AtFatA3* を発現させた株では、脂肪酸炭素鎖長が 16 と 18 の脂肪酸エチルエステルが得られた。そのうち脂肪酸炭素鎖長 16 の脂肪酸エチルエステルが約 75% とチオエステラーゼ *TesA* 導入株と比較して炭素鎖長 16 の高い比率が得られ、バイオディーゼルとしての性能が向上した。このように、大腸菌を用いて、グルコースから実用的にバイオディーゼルの生産する工程が確立さ

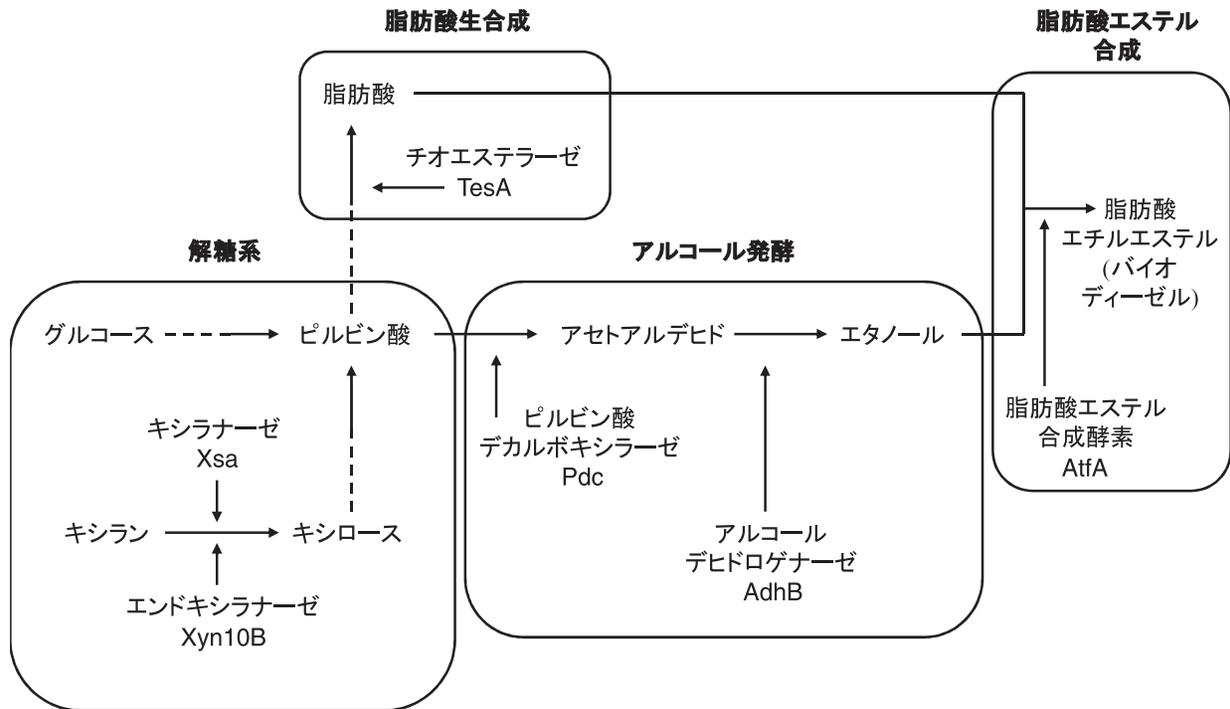


図1 大腸菌によるバイオディーゼル生産過程

れた。

次に、Steen らはヘミセルロースの1種であるキシランから、脂肪酸エチルエステルを産生する大腸菌株を作製した。グルコースから脂肪酸エチルエステルを産生する株に、クロストリジウム菌由来のエンドキシラーナーゼ触媒ドメインをコードする遺伝子 *xyn10B* と、バクテロイデス菌由来のキシラーナーゼをコードする遺伝子 *xsa* を導入した。キシランは、 β 1-4 結合したキシロースを主鎖とする多糖類で、エンドキシラーナーゼとキシラーナーゼは、キシランの β 1-4 結合を切断し、キシロースを生成する酵素である。したがって、この2つの酵素の働きによってキシランから生成したキシロースは、大腸菌の解糖系に入ってピルビン酸にまで分解され、ピルビン酸は導入されたピルビン酸デカルボキシラーゼとアルコールデヒドロゲナーゼによってエタノールに変換される。この大腸菌株では、0.2% グルコースを含む培地で脂肪酸エチルエステルを 3.5 mg/L 産生した。0.2% グルコースを含む培地に、さらに 2% キシランを加えることにより、11.6 mg/L の脂肪酸エチルエステルを産生した。グルコースのみを培地に加えた場合と比較して3倍以上の脂肪酸エチルエステルを得ることができた。これによって、培地中にヘミセルロースの分解酵素を加えることなく、有用で低コストな、ヘミセルロースを原料としたバイオディーゼル生産が可能となった。

以上のように、大腸菌に適切な酵素遺伝子を導入し、それらを

発現させることによって、バイオディーゼルの生産性や性能を向上させた。また、ヘミセルラーゼを分泌する大腸菌を作製し、ヘミセルロースを原料として、バイオディーゼルを生産することにも成功した。この結果は、植物の主要成分で豊富なバイオマス資源であるが、有効利用されていないヘミセルロースからバイオディーゼルの生産が可能であることを示しており、今後の応用が期待される。さらに、これまでの化学的製法と違い、副生成物であるグリセリンの生成がなく、高価な酵素であるヘミセルラーゼを加える必要もないため、有用で低コストの製造工程であると考えられる。

種々の環境に優しいクリーンエネルギーは、今後益々重用されていくであろう。そのクリーンエネルギーの一翼として、この研究の大腸菌によるヘミセルロースを原料としたバイオディーゼルが大いに貢献していくことを期待したい。また、この研究によって、ヘミセルロースよりも多く存在するセルロースがバイオディーゼルの原料となる可能性も視野に入ってきたと言える。

[参考文献]

- 1) E. J. Steen, Y. Kang, G. Bokinsky, Z. Hu, A. Schirmer, A. McClure, S. B. del Cardayre, J. D. Keasling, *Nature*, **2010**, 463.
- 2) P. Jiang, J. E. Cronan, Jr., *J. Bacteriol.*, **1994**, 176.
- 3) H. Cho, J. E. Cronan, Jr., *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270.

新製品

開発元 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

二次元電気泳動用タンパク質溶解剤 SpotRight™ シリーズ

二次元電気泳動法は、タンパク質の網羅的解析法の一つとして欠かせない技術となっています。しかしながら、膜タンパク質などの難溶性タンパク質は、その溶解性の低さから二次元電気泳動での解析が困難とされています。このたび、難溶性タンパク質の溶解性を飛躍的に向上させた二次元電気泳動用のタンパク質溶解剤を開発いたしました。

< 特長 >

- ・ 難溶性タンパク質の溶解性能を向上。
 - ・ 変性剤・還元剤・界面活性剤は 1 ボトルに含まれ、秤量・混合は不要。
 - ・ 溶液調製はセットに含まれるバッファーを加えるだけ*。
- 試薬の溶解性も向上し煩わしさを解消。

* キャリアアンフォライトは別途添加していただく必要があります。

< 測定例 >

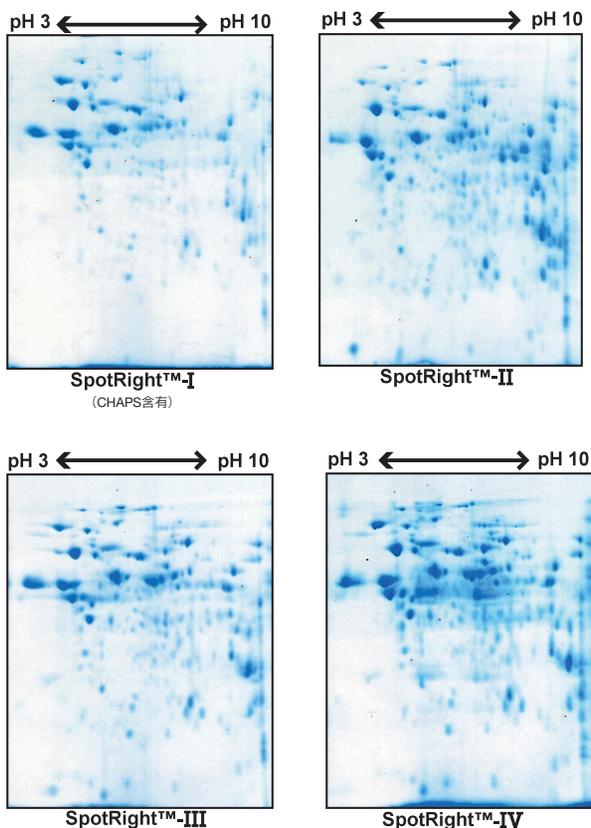
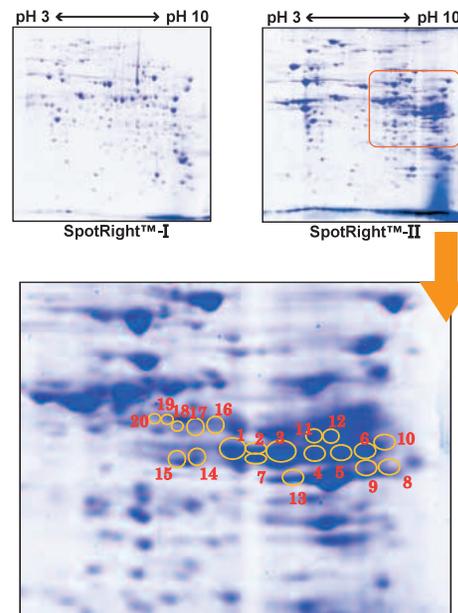


図1 市販マイクロゾームを用いた二次元電気泳動

市販マイクロゾーム (タンパク量: 200 µg/サンプル) にアセトン 1 ml を加えて混合し、遠心 (15,000 × g、4℃、10 分間) 後に上清を除去した。遠心後の沈殿物に SpotRight™ 溶液 200 µl を添加して、ボルテックス後、超音波照射にて溶解した。この溶解液 125 µl を二次元電気泳動用サンプルとして泳動、CBB で染色した。それぞれ特徴的なスポットが見られた。

SpotRight™-II で検出されたスポットから、膜タンパク質として知られる Cytochrome P450 が多数同定されました。



スポット番号	
1~6	Cytochrome P450 2C11
7	Cytochrome P450 2C6
8~9	Cytochrome P450 2A1
10	Cytochrome P450 2C7
11~12	Cytochrome P450 2E1
13	Cytochrome P450 2A2
14	Cytochrome P450 2C13
15	Cytochrome P450 2D1
16~18	Cytochrome P450 4F4
19	Cytochrome P450 2B2
20	Cytochrome P450 2B1

図2 MS解析によるタンパク質の同定

二次元電気泳動にて検出スポット数が向上した領域 (上図 右の赤線部分) のスポットに関して、MS 解析にてタンパク質を同定した。

SpotRight™-Trial は、界面活性剤の種類が異なる 4 つの試薬とバッファーで構成され、Reagent-I には電気泳動用のタンパク質溶解剤に汎用されている CHAPS が、Reagent-II, -III, -IV にはタンパク質の溶解性能を向上した界面活性剤が含まれています。

これまで、得ることが出来なかったタンパク質情報の解析への活用が期待されます。

<セット内容>

SpotRight™ -Trial

Reagent - I	× 1
Reagent - II	× 1
Reagent - III	× 1
Reagent - IV	× 1
Reconstitution Buffer	5 ml × 1

SpotRight™ - I

Reagent - I	× 10
Reconstitution Buffer	5 ml × 2

SpotRight™ - II

Reagent - II	× 10
Reconstitution Buffer	5 ml × 2

SpotRight™ - III

Reagent - III	× 10
Reconstitution Buffer	5 ml × 2

SpotRight™ - IV

Reagent - IV	× 10
Reconstitution Buffer	5 ml × 2



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
SpotRight™-Trial	1 set	15,000	S351
SpotRight™- I	1 ml × 10	25,000	S352
SpotRight™- II	1 ml × 10	25,000	S353
SpotRight™- III	1 ml × 10	25,000	S354
SpotRight™- IV	1 ml × 10	25,000	S355

新製品

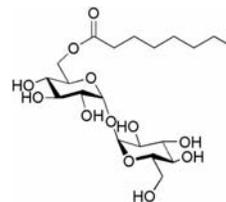
新規デタージェント

Trehalose C8、Trehalose C10、Trehalose C12 は、親水基がトレハロース、親油基が直鎖脂肪酸エステルで構成される、新しいタイプの非イオン性界面活性剤です。

トレハロースは、グルコース 2 分子が、 $\alpha, \alpha-1, 1$ で結合した非還元性の糖であり、天然に存在します。トレハロースを添加することにより、タンパク質や脂質の変性を抑制することから、食品・菓子原料に幅広く利用されています。それはトレハロースが細胞中で水に代わる動きを有し、細胞から水が失われた場合でもそのダメージを抑制するためです。

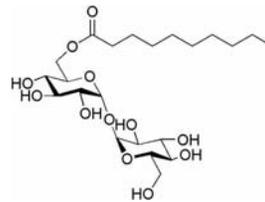
このように、他の糖にはない性質をもつトレハロースを基本骨格としたトレハロース型デタージェントは、特異な性質を有することが期待されます。

● Trehalose C8



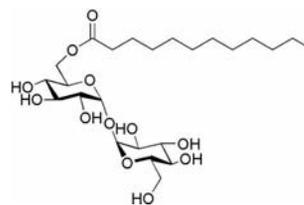
cmc = 5.6 mmol/l

● Trehalose C10



cmc = 3.0 mmol/l

● Trehalose C12



cmc = 0.15 mmol/l

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Trehalose C8	500 mg	20,000	T459
Trehalose C10	500 mg	20,000	T460
Trehalose C12	500 mg	20,000	T461

21st フォーラム・イン・ドージン開催報告

エピジェネティクスによる細胞のメタモルフォーゼ

フォーラム・イン・ドージンは、昨年第20回の節目を国際シンポジウムという形で飾り、今年からは、次の新たな段階へと進むことになった。初期のフォーラムは、どちらかというと言葉的な色彩が強かったが、この数年、昨年の記念シンポジウムに象徴されるように、熊本から外に向かって情報を発信するという性格を帯びようになった。これは成長の証であり、ひとえに関係者の努力と様々な方々のご支援の賜物である。今年のフォーラムのメイン・テーマは、昨年のフォーラム時のアンケートで最も希望の多かった「エピジェネティクス」を基本に、細胞の機能・形態の変転を意味するメタモルフォーゼを組み合わせ、「エピジェネティクスによる細胞のメタモルフォーゼ」となった。

世話人の中で議論を重ね、我が国のエピジェネティクス分野の先駆的重鎮から新進気鋭の研究者までの幅広い層の先生方を演者として選び、そしてそれぞれの先生方からは講演を快諾していただいた。おかげで、重厚な演者の布陣の下、最先端の研究内容に触れることができた。演者の先生方には、改めて感謝申し上げたい。

エピジェネティクスは、生命科学の中でポストゲノム時代の研究の大きな流れの一つであることは間違いなく、「エピジェネティクスは、ジェネティクスと並んで、生物の遺伝現象を理解するための二大柱である」という演者のお一人の石野史敏先生の指摘は、その本質をついたものである。しかし、多くの演者から指摘されたように、エピジェネティクスに対する適切な訳語がなく、そのことがこの分野を不必要に分かりにくくしているようでもある。

各演者から、専門外の聴衆にも分かりやすい丁寧な概説をしていただいたのも、非常に有意義であった。これは、エピジェネティクスの重要性を理解してもらいたいという各演者の熱意の現れと、多くの出席者から好意的に受け止められた。最初の田嶋正二先生（大阪大学）は、本フォーラムのオーバービューを兼ねたエピジェネティクスの概説と、遺伝学、タンパク質科学、酵素化学、構造生物学などにわたる広範な背景に裏付けられた格調高い講演で、フォーラムのトップバッターを務められた。二人目の演者の中尾光善先生（熊本大学）は、われわれの生活に密着した生活習慣病の背景にあるエピジェネティクスについて講演された。午前の最後の演者、胡桃坂仁志先生（早稲田大学）は、構造生物学（関連タンパク質とDNAとの複合体の立体構造など）を駆使して、エピジェネティクスの制御機構について講演された。午後の最初のセッションでは、石野史敏先生（東京医科歯科大学）が、ほ乳類の特徴であるゲノムインプリンティングの概要とその制御機構を、ご自身の研究に基づいて解説された。中山潤一先生（理化学研究所）は、単細胞生物である酵母におけるエピジェネティクスという一見相矛盾するかのような現象を、酵母における本質的な生命現象の一つとして解説された。本フォーラムの最後のセッションでは、近藤豊先生（愛知県がんセンター研究所）が、

がん細胞の分化を制御するエピジェネティクスを解説され、最後の演者、沖昌也先生（福井大学）は、酵母細胞におけるエピジェネティクスによる遺伝子発現制御という難解な現象を、カラフルな静止画像や動画を使って視覚的に解説された。

以上のように、各演者の先生方の特徴を生かしたプレゼンテーションがなされ、フロアからも活発な議論が続いて、盛会裡にフォーラムを閉会した。今年のフォーラムの会場は、例年と違ったところだったが、出席者からは、落ち着いた雰囲気のある会場に、概ね好評をいただいた。引き続き別会場で催されたミキサーでは、演者の先生方と聴講者の方々、とくに若手の参加者との間で、和やかな交歓が行われ、来年のフォーラムへの期待を込めて、すべての企画を終えることができた。例年のことではあるが、同仁化学研究所のフォーラム事務局、関係者、そして開発部の若い人達の、裏方としての支えがあって、フォーラムの円滑な進行ができた。裏方、演者、聴衆のネットワークによって実りの多かった今回のフォーラムに、満足することができた。

（文責 同仁化学研究所 三浦 洸）

尚、講演要旨をご希望の方は、小社マーケティング部までご連絡ください（free dial: 0120-489548）。



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
フリーダイヤル

0120-021557
0120-489548