

2013
No.146

ISSN 0385-1516

**DOJIN**

NEWS

ドージンニュース

CONTENTS

●Review

生理活性物質としての硫化水素
独立行政法人国立精神・神経医療研究センター
渋谷典広・木村英雄

新連載

新しいナノ材料としてのカーボンナノチューブ
—最近の展開(バイオからエネルギーまで)①
九州大学 中嶋直敏・藤ヶ谷剛彦

●Topics on Chemistry

血中アスコルビン酸の簡便迅速な
検出: 蛍光ニトロキシドの利用
株式会社同仁化学研究所 竹中 聡



CONTENTS

Review

生理活性物質としての硫化水素 ●—— [1]

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター
渋谷典広・木村英雄

新連載

新しいナノ材料としてのカーボンナノチューブ —最近の展開 (バイオからエネルギーまで) ① ●—— [7]

九州大学
中嶋直敏・藤ヶ谷剛彦

Topics on Chemistry

血中アスコルビン酸の簡便迅速な検出： 蛍光ニトロキシドの利用 ●—— [12]

株式会社同仁化学研究所 竹中 聡

Commercial

新製品

プロテオーム解析用試薬 ●—— [15]

NTA-SAM Formation Reagent

金属酸化物表面処理用ホスホン酸誘導体 ●—— [16]

試作品

近赤外蛍光標識試薬 ●—— [16]

開発中

内胚葉分化モニタリングキット(仮) ●—— [14]

新製品案内

*容量・価格等の詳細は各ページをご覧ください。

金属酸化物表面処理用ホスホン酸誘導体

10-AUPA
10-CDPA
FHPA
FOPA
FDPA
M-EG₃-UPA
11-HUPA
11-NUPA
ODPA
11-PIUPA

プロテオーム解析用試薬

NTA-SAM Formation Reagent

生理活性物質としての硫化水素 Hydrogen sulfide, a bioactive molecule



渋谷 典広

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所



木村 英雄

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所

要約

Hydrogen sulfide(H₂S) is recognized as a neuromodulator, smooth muscle relaxant, cytoprotectant, and the regulator of insulin release. H₂S is produced from L-cysteine by cystathionine β-synthase(CBS), cystathionine γ-lyase(CSE), and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase(3MST) coupled with cysteine aminotransferase(CAT). A part of H₂S produced by enzymes is stored in cells as bound sulfane sulfur, which in turn releases H₂S when cells are stimulated. The current methods such as gas-chromatography and poralography for H₂S detection require the process of extracting H₂S from cells and tissues. In contrast, recently developed fluorescent probes sensitive to H₂S enabled a real-time monitoring of living-cells.

This review will focus on the function and metabolism of H₂S as well as the recent advance in the detection of H₂S.

キーワード：硫化水素、システイン、CBS、CSE、3MST、結合型硫黄、硫化水素プローブ

1. はじめに

近年、一酸化窒素(NO)と一酸化炭素(CO)に次ぐ第3番目の生理活性物質として、硫化水素(H₂S)が注目されている。H₂Sは、受容体・イオンチャネル・酵素・転写因子などを標的とし、神経伝達調節・平滑筋弛緩・細胞保護・インスリン分泌調節など実に多彩な作用を示す。H₂Sの生産酵素としては、シスタチオンβ-シンターゼ(CBS)・シスタチオンγ-リアーゼ(CSE)・3-メルカプトピルビン酸サルファトランスフェラーゼ(3MST)が同定されている。生体によるH₂Sの制御機構を解明することは生理学上の重要なポイントであるが、酵素によって生産されたH₂Sがどのような挙動を示すのか、その貯蔵と放出のメカニズムも徐々に明らかとなってきた。最近では、H₂Sを可視化する蛍光プローブ

が開発され、従来では不可能であった生細胞内のH₂Sをリアルタイムで検出する試みが行われるなど、H₂Sをめぐる研究は著しい進展をみせている。

本稿では、H₂Sの機能と代謝に関する基礎的知見を概説するとともに、H₂Sの動態解明に向けた新たなアプローチとして注目されている蛍光プローブの開発状況を紹介する。

2. 生体内硫黄の存在様態

硫黄は、人体を構成する主要4元素(水素・炭素・窒素・酸素)に次いでカルシウムやリンとともに多く含まれる。生体内の硫黄を存在様態に応じて区別すると、安定型と不安定型に類別できる。システインは、最も安定な還元状態(-2価)の硫黄を有するアミ

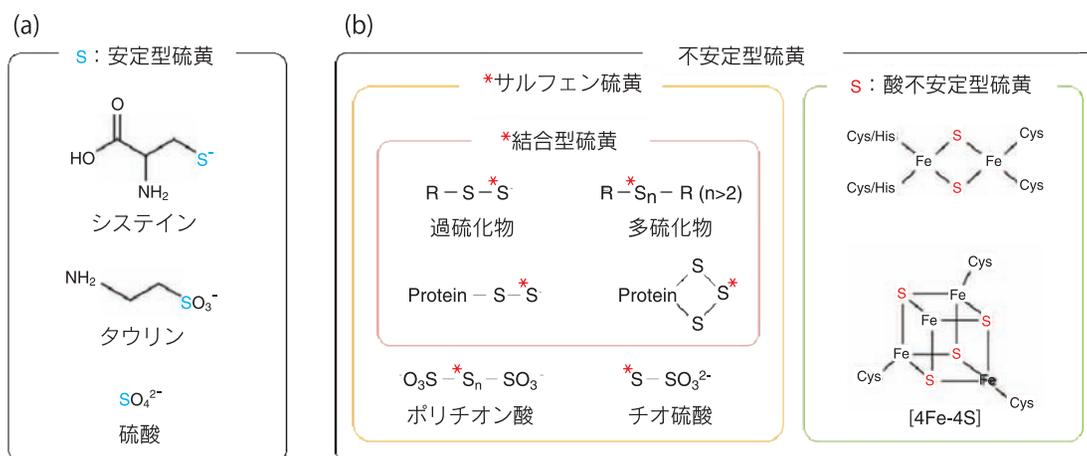


図1 安定型硫黄と不安定型硫黄
(a)安定型硫黄 最も安定な還元状態(-2価)または酸化状態(+6価)にある硫黄は、DTTなどの還元剤や液性の影響を受けない。(b)不安定型硫黄 過硫化合物・多硫化物・ポリチオン酸・チオ硫酸は、不安定な還元状態(0価または-1価)を維持したサルフェン硫黄をもつ。このうち過硫化合物と多硫化物のサルフェン硫黄は、DTT還元によってH₂Sとして放出される性質をもち、このようなサルフェン硫黄を特に結合型硫黄と呼ぶ。電子伝達系酵素複合体の鉄硫黄クラスターは酸性条件下で不安定な硫黄原子をもつ。

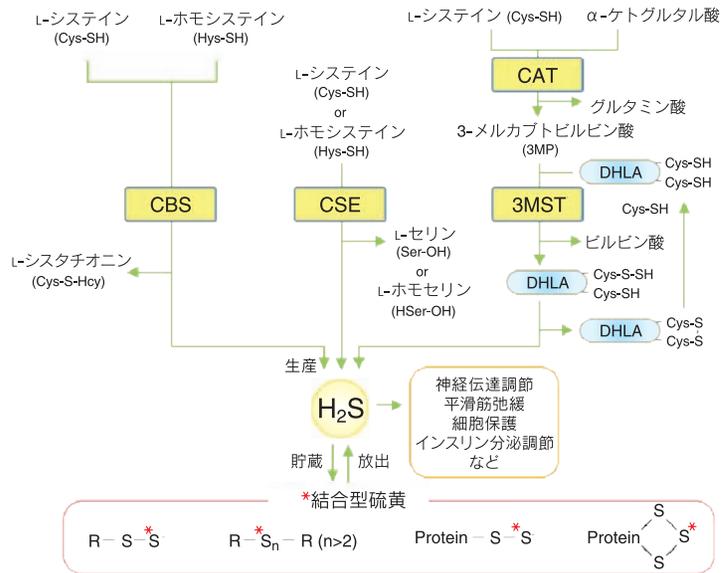


図2 内在性 H₂S の生産・貯蔵・放出
L-システインから H₂S を生産する酵素として、シスタチオン β-シンターゼ (CBS)・シスタチオン γ-リアーゼ (CSE)・3-メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素 (3MST) がある。3MST の基質 3-メルカプトピルビン酸 (3MP) は、L-システインと α-ケトグルタル酸からシステインアミノ基転移酵素 (CAT) によって供給される。生産された H₂S は結合型硫黄として貯蔵され、生理的的刺激に応じて H₂S を放出する機構が存在する。

ノ酸であり、体内に取り込まれると、最も安定な酸化状態 (+6 価) の硫黄をもつタウリンや硫酸などに代謝される (図 1a)。安定型硫黄は、酸やアルカリ、あるいはジチオスレイトール (DTT) などの強力な還元剤で処理しても切断されることはない。一方、過硫化物・多硫化物・ポリチオン酸・チオ硫酸などの硫黄は、不安定な還元状態 (0 価または -1 価) を維持しており、サルフェン硫黄 (sulfane sulfur)¹⁾ と呼ばれている (図 1b)。このうち過硫化物と多硫化物のサルフェン硫黄は、DTT 還元によって H₂S として放出される性質をもち、このようなサルフェン硫黄を特に結合型硫黄 (bound sulfur)²⁾ と呼んでいる。また生体には、酸性条件下で H₂S を放出する酸不安定型硫黄が存在している (図 1b)。生体試料を pH 5.4 以下の酸性溶液で処理すると H₂S が放出されるが³⁾、この H₂S は、電子伝達系酵素複合体の鉄硫黄クラスターに由来している。

H₂S の測定法の 1 つに、強酸性条件下で発色反応を行うメチレンブルー法がある。メチレンブルー法は、排水中の遊離型 H₂S を測定する際に広く利用されるが、この方法を生体試料に適用する場合には、遊離型 H₂S を測定しているのか、酸不安定型硫黄に由来する H₂S を測定しているのかを区別する必要がある。

なお、H₂S がタンパク質システイン残基のチオールと反応した場合には結合型硫黄が生じるが、最近、この反応はスルフヒドリル化⁴⁾ と呼ばれている。H₂S によるスルフヒドリル化は、ATP 依存性カリウムチャネルや転写因子 Nf-κB などの活性を調節するメカニズムとして注目されている。

3. H₂S の生産・貯蔵・放出

H₂S を生産する酵素としては、これまでに 3 種類が同定されている (図 2)。シスタチオン β-シンターゼ (cystathionine β-synthase, CBS) は、L-システインと L-ホモシステインから H₂S を生産し、肝臓・腎臓・膵臓・脳などに存在している。シスタチオン γ-リアーゼ (cystathionine γ-lyase, CSE) は、L-システインまたは L-ホモシステインを加水分解することで H₂S を生産する。CSE は、肝臓・腎臓・膵臓・血管などに多く存在しており、脳では活性は確認されているが、CSE タンパク質は検出されていない。おそらく、CSE と同様の活性をもつ酵素が脳に存在すると

思われる。3-メルカプトピルビン酸サルファトランスフェラーゼ (3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, 3MST) は、ユビキタスな酵素であり、ジヒドロリポ酸やチオレドキシニンなどの生体内ジチオール存在下、3-メルカプトピルビン酸 (3-mercaptopyruvate, 3MP) から H₂S を生産する⁵⁻⁶⁾。なお 3MP は、L-システインと α-ケトグルタル酸からシステインアミノ基転移酵素 (cysteine aminotransferase, CAT) によって供給される。

酵素によって生産された H₂S は細胞内ではどのような振舞いを示すのだろうか。その一端が、組織抽出液を用いた検討から明らかになってきた。脳抽出液に H₂S を添加すると、H₂S は徐々に吸収され、あたかも存在しないかのような挙動を示す³⁾。ところが、この抽出液に DTT を添加すると H₂S が再び放出される。この現象は、H₂S を添加していない抽出液でも認められることから、結合型硫黄が脳に存在することは確かである。この結果から、内在性 H₂S は、酵素によって生産される以外にも、貯蔵型の結合型硫黄から刺激に応じて放出される場合があると思われる (図 2)。

では、結合型硫黄を H₂S として放出する生理刺激とはどのようなものだろうか。一般に、還元性物質はアルカリ域でその還元力を発揮するが、生理的濃度のシステインとグルタチオンを細胞抽出液に添加すると、pH 8.4 であれば H₂S が放出されることがわかった³⁾。問題は、このレベルまで細胞内がアルカリ環境となり得るかであるが、神経細胞が興奮するとグリア細胞の NaHCO₃ トランスポーターが活性化される結果、グリア細胞内の液性が pH 8.4 まで上昇することを確認している。この結果から、神経活動に伴い H₂S を放出する機構があると思われる。

4. シグナル分子としての H₂S 神経伝達の調節因子

H₂S は、海馬における長期増強の誘導を促進する⁷⁾。それまで毒物としてのみ扱われてきた H₂S がシグナル分子として機能することを初めて報告したことにより、H₂S に対する研究者の見方が大きく変わった。現在 H₂S は、NO と CO に次ぐ第 3 番目の生理活性物質として認識されており、その生理作用や薬理作用が国内外を問わず数多く研究されている。

H₂S は、NO や CO と同様に神経伝達を調節するが、そのメカ

ニズムが異なる。NOは、シナプス後細胞でL-アルギニンから生産された後、シナプス前細胞へ拡散しグアニル酸シクラーゼを活性化する。その結果、cGMP依存性リン酸化酵素が活性化し、タンパク質のリン酸化を介した神経伝達物質の放出へと至る。一方H₂Sは、グアニル酸シクラーゼには影響せず、NMDA受容体のグルタミン酸感受性を増大させる⁷⁾。NMDA受容体のジスルフィド結合が切断されるとグルタミン酸感受性が増大することから、H₂Sの還元力が活性化の一因とみられる。ただし、H₂Sによる感受性増強作用は、より強力な還元力をもつDTTの効果を上回ることから、H₂Sの還元力のみでは説明できない。この点については、さらなる解析が必要であるが、グリア細胞に関する下記の知見を考慮すると新たな示唆が得られると思われる。

グリア細胞の1つにアストロサイトがある。細胞内カルシウム濃度の上昇が近隣の細胞へ伝搬する現象はカルシウムウェーブとして知られるが、H₂Sは、アストロサイトの膜電位依存性カルシウムチャンネルを活性化することでカルシウムウェーブを誘起させる⁸⁾。カルシウムウェーブの生理的意義については未だ不明点が多いが、シナプスを取り囲んでいるアストロサイトは神経伝達を調節する上で重要な役割を担うと考えられている。このアストロサイトにはCBSが存在し、一方の神経細胞には3MSTが存在している⁵⁾。これらのことから、シナプス前後細胞およびアストロサイトの3者間をH₂Sが制御している可能性がある。

平滑筋の弛緩因子

内皮細胞由来平滑筋弛緩因子(EDRF)は、アセチルコリンなどの刺激に応じて放出される平滑筋の弛緩因子であり、血圧調節に重要な役割を果たす。EDRFがNOであると同定されて以降、NOのみでは説明のつかない現象が確認されており、現在、EDRFにはNO以外の成分も含まれると考えられている。その可能性のひとつがH₂Sである⁹⁾。H₂Sは、単独でも平滑筋を弛緩させるが、NOが共存した場合には弛緩作用が相乗的に発揮される。問題は、H₂Sの生産酵素が内皮細胞に存在するかであるが、CATと3MSTが内皮に共同存在することを確認している¹⁰⁾。H₂Sには、Aktを介して内皮型NO合成酵素を活性化しNOの生産量を高める作用¹¹⁾が確認されており、このはたらきが相乗効果の一因と考えられる。

血圧を調節する要素としては、内皮細胞のみならず血管周囲の脂肪細胞も重要なはたらきを示すことが明らかとなりつつあるが、その脂肪細胞からもH₂Sが生産される様子である。大動脈血管にセロトニンを作用させると血管平滑筋が収縮するが、脂肪組織が付着した血管においては収縮が減弱する¹²⁾。減弱効果は、平滑筋に存在するKCNQ型電位依存性カリウムチャンネル(KCNQチャンネル)の阻害剤で抑制されることから、脂肪細胞からはKCNQチャンネルを開口させる「脂肪細胞由来平滑筋弛緩因子(ADRF)」が放出されると考えられている。ADRFの実体は不明であるが、CSEが脂肪細胞に存在することに加えて、CSE阻害剤がKCNQチャンネル阻害剤と同様の効果を示すことから、H₂SがADRFの候補となっている¹³⁾。しかし、H₂SがADRFそのものであるか、ADRFの調節因子であるかは不明である。

カルシウム濃度の調節因子

H₂Sの新たな知見として、視細胞におけるカルシウムイオン濃度の調節作用が明らかとなった¹⁴⁾。網膜が物体の輪郭を認知する際には、水平細胞から光受容細胞に対するネガティブフィードバック機構が重要な役割を果たす。そのメカニズムとしては、水平細胞の液胞型プロトンポンプの1つであるV型ATPaseがプロ

トンを放出し、そのプロトンが光受容細胞のL型カルシウムチャンネルを阻害する経路が想定されている。これに対してH₂Sは以下のように関わると考えている。網膜に光が照射されると、光受容細胞内のcGMP濃度が低下する。これによりcGMP依存性イオンチャンネルが閉じ、光受容細胞内のカルシウムイオン濃度は低下する。その結果、近傍の水平細胞に対するグルタミン酸の放出が抑制されるが、この状態では水平細胞のグルタミン酸受容体活性が阻害されているため、同細胞内へのカルシウムイオンの流入は抑制される。光受容細胞と水平細胞にはCAT-3MST経路が存在するが、この経路ではカルシウムイオン濃度の低下にともないH₂Sの生産活性が増加する。H₂Sの生産量が増加すると、水平細胞のV型ATPaseが活性化されプロトンの放出が促進される結果、光受容細胞周辺のpHが低下する。酸性条件下では光受容細胞のL型カルシウムチャンネルは阻害されるため、最終的に光受容細胞内へのカルシウムの流入は抑制されることになる。

5. H₂Sの細胞保護作用

細胞には興奮毒性を有するグルタミン酸を排出しシスチンを取り込むアンチポーターが存在するが、グルタミン酸が過剰に生産されるとアンチポーターが阻害され、細胞内のシスチン濃度が低下する。その結果、細胞内のグルタチオンの合成量が低下し、酸化ストレスに対する抵抗性が損なわれる。これに対してH₂Sは、アンチポーターを活性化することでシスチンの取り込みを促進するとともに、グルタチオン合成の律速酵素であるγ-グルタミルシステインシクターゼを活性化することでグルタチオン濃度の低下を防ぐ作用がある¹⁵⁾。

H₂Sの細胞保護作用に関して注目すべき点は、単回投与で顕著な効果が得られることである。妊娠マウスの子宮卵巣動脈を閉塞した後、血流を再開させると、24時間後には胎児脳内のグルタチオン濃度はコントロールの24%まで減少し、全胎児が浸軟する。しかし、母体にH₂Sドナーの硫化水素ナトリウム(NaHS)を単回投与(0.4 μmol/kg)すると、グルタチオン濃度は75%まで回復し、胎児の3/4は浸軟を免れる¹⁶⁾。培養細胞を用いた検討では、培地中に高濃度のグルタミン酸を添加すると、神経細胞は8時間後から死滅が始まり、16時間後には細胞数が10%程度まで低下する。しかし、あらかじめH₂Sを培地に添加すると、死滅開始時間が12時間後へ遅れ、死滅率も大幅に低下する。H₂Sは、添加してから1時間でほぼすべてが揮発してしまうことから、H₂Sのシグナルは添加直後から発動されているものと思われる。

神経系におけるH₂Sの保護作用が明らかとなって以来、心血管系・消化器系・泌尿器系などにおける保護効果が相次いで報告されるようになった。たとえば、エネルギー消費の激しい心筋で梗塞が生じ、その後に血液が再灌流すると、活性酸素・炎症・アポトーシスなどが惹起される¹⁷⁾。これに対して、再灌流前にNaHSを投与すれば、損傷を軽減し機能を回復できる¹⁸⁾。H₂Sは、心筋のグルタチオン合成系に作用するだけでなく、Nrf-2を介した酸化ストレス応答系を活性化することで細胞を保護する。免疫系においては、NF-κB・TNF-α・ILなどの炎症性メディエーターの放出を抑制するとともに、白血球の内皮への接着を調節することで血管透過性の亢進を抑制する作用がある。さらに、アポトーシスのイニシエーターとして機能するカスパーゼ9の増加を抑制し、アポトーシス抑制因子であるBcl-2の低下を防ぐ。その他にも、細胞障害性に作用するMAPKスーパーファミリー(MAPK、p38、JNK)によるリン酸化を抑制することなども確認されている。

現在、H₂Sによる細胞保護効果は、臓器移植にともなう虚血再

還流障害の予防にも有効と考えられている。それにともない、除光性のH₂Sドナーが開発されるなど治療対象に応じた効果的な投与方法が模索されている¹⁹⁾。

網膜に過剰な光が照射すると、酸化ストレスが惹起されるとともに、大量のカルシウムイオンが細胞内へ流入するために障害が起きる。これに対して、H₂Sは光障害から細胞を保護することが新たに判明した¹⁴⁾。マウスの眼球に光を長時間照射すると、光受容細胞の層構造が破壊される。しかし、腹腔にNaHS(0.4375 μmol/kg)を前投与すると層構造は維持される。その際、活性酸素による核酸の損傷が顕著に低下しており、TUNEL陽性細胞は非投与群の約80%まで低下する。H₂Sには網膜細胞内のカルシウムイオン濃度を低下させる作用があるため、この作用も保護的にはたらく要因と考えられる。

6. H₂S とエネルギー生産

一部の細菌や古細菌が電子伝達系を駆動する際にH₂Sを電子供与体として利用することは知られているが、哺乳動物でも同様の事例が報告されている²⁰⁻²¹⁾。哺乳動物細胞には、細菌のサルファイド：キノンオキシドレダクターゼ(SQR)と類似の酵素SQRDLが存在しており、このSQRDLがH₂Sの電子を補酵素Qに転移することでATPを生産すると考えられている。興味深いことに、ラット肝臓から単離したミトコンドリアを用いた検討では、H₂SによるATP生産の増強作用が3MPでも認められることや、肝癌細胞株の3MSTをノックダウンすると酸素消費量が低下することから、3MSTがエネルギー生産に関与するとの見解が示されている²¹⁾。この報告の8ヶ月前には、同じくエネルギー生産に関してストレス環境におけるH₂Sのはたらきが報じられている²²⁾。マウス腸間膜動脈から単離した平滑筋細胞にカルシウムイオノフォアA23187を低酸素条件下で作用させると、サイトソルのCSEがミトコンドリアに移行し、ミトコンドリアのATP含量が増加することが示されている。ATPの増加はCSE阻害剤で抑制されることから、CSEによって生産されたH₂Sが、ATP量を維持することで、低酸素ストレスに対する抵抗性を細胞に付与するとしているが、この検討ではA23187による処理が24時間と長く、極度のストレスを細胞に与えた特殊な環境を想定したものと思われる。

7. H₂S の物性

H₂Sは、無色の気体だが腐卵臭がするのでその存在がわかる、といわれる。しかし、国際化学物質簡潔評価文書(CICAD)によれば、H₂S濃度が140 mg/m³(99 ppm)以上ではヒトの嗅覚が麻痺するとされる。560 mg/m³(398 ppm)以上では呼吸困難をきたすため、臭いに気づかず死に至る危険性があることを認識しておく必要がある。

NOとCOは水に溶けにくく、溶解度(g/100 ml, H₂O/20°C)はそれぞれ0.006と0.003程度である。一方、H₂Sの溶解度は0.5と比較的高い。H₂Sが水に溶解した場合には、HS⁻とS²⁻に解離するが、その解離度はpHに依存する。pH 7.4では8割がHS⁻に解離し、残りの2割はH₂Sガスとして残存する。

H₂Sの特徴は油にも良く溶けることである。ただし、この場合にはHS⁻には解離せず、H₂Sガスとして油中に存在する。Dilauroylphosphatidylcholineを含むリポソームを用いた検討²³⁾では、H₂Sの膜/水分分配係数は2.0であるが、膜透過性の良好なNOとCO₂の分配係数がそれぞれ3.6と0.95であることから、細胞膜はH₂Sにとって物理的な障壁にはならないと考えられている。数理モデルを用いたH₂Sの拡散シミュレーションでは、細胞内の

H₂Sがわずか1秒間で近隣の200細胞に拡散することが示されている²³⁾。このモデルでは、夾雑タンパク質等の影響は考慮されていないが、H₂Sの血中半減期が151秒と比較的長いことから、拡散時の損失は最大7%程度と低く、実際の細胞においても夾雑物による影響は低いとしている。

H₂Sの構造は水(H₂O)と類似している。H₂Oは、アキュアポリン(AQP)を介して膜を通過するが、H₂Sにも同様の機構が存在するのだろうか。少なくとも古細菌*Archaeoglobus*属のAQPを用いた検討では、H₂SがAQPを通過することを示す結果は得られていない²⁴⁾。ただし最近、真正細菌*Clostridium*属からHS⁻チャネルが同定された²⁵⁾。このチャネルは、formate/nitrite transport (FNT)ファミリーに属する輸送体であり、細菌内に蓄積したHS⁻を速やかに排出すると考えられている。哺乳動物にはFNTホモログは存在しないが、同様の機能をもつチャネルが存在している可能性も否定できない。

8. H₂S の検出法

H₂Sは、反応性が比較的高いため、蛍光誘導体化の対象となることが多い。誘導体化により高感度な検出が可能となる反面、前処理やその後のHPLCによる分離に多少の時間を要する。一方、誘導体化処理を施さずにH₂Sを測定する方法もある。ここではガスクロマトグラフィー法と電極法を紹介する。

1. ガスクロマトグラフィー法

炎光光度検出器(FPD)が開発されたことで高感度な検出法が可能となった。現在、揮発性の硫黄化合物のみならずリンやスズ化合物を検出する際に幅広く利用されている。移動相には不活性ガスが用いられ、試料中の硫黄化合物が水素炎で燃焼される際に発する波長394 nmの光を検出する。化学発光硫黄検出器(SCD)を搭載したガスクロマトグラフィーでは、ステンレスパーナーを用いて従来よりも高温で硫黄化合物を燃焼することで、FPDよりも10倍以上の高感度を実現しており、1 ppm(1.41 mg H₂S/m³)以下まで定量性を示す。最近では半導体ガスセンサを検出器に使用することで、ppbレベルからの計測を可能とするシステムも開発されている。このシステムは、小型設計で移動相用のガスボンベを必要としないという特徴をもつ。

ガスクロマトグラフィー法では、生体試料におけるH₂Sの生産活性や不安定型硫黄を測定できるが、組織や細胞を破砕することが前提となる。しかし一旦破砕してしまうと、内在性のH₂Sは生体成分に吸収されてしまうため、正確に測定することは難しいのが実状である。

2. 電極法

ポーラログラフィーの原理を応用したH₂Sセンサーが開発されている²⁶⁻²⁷⁾。センサーの先端部にはシリコンとポリカーボネートの共重合膜が皮覆されており、H₂Sが選択的に膜を透過すると、アルカリ性の電解液内でHS⁻とH⁺に解離する。電極液にはフェリシアン化カリウム(K₃[Fe(CN)₆])が含まれており、HS⁻によってフェロシアン化カリウム(K₄[Fe(CN)₆])に還元された後、白金電極近傍で再びフェリシアン化カリウムに酸化される際に生じる電子を電流値として計測する。システインやグルタチオンをはじめ、酸素や窒素酸化物の妨害を受けることがなく、液相のみならず気相中のH₂Sを測定できる。検出限界は10 nMであり、H₂Sの濃度変化を30秒程度で感知するため、高感度かつリアルタイムに近い検出が可能となっている。ただし、H₂Sを検出するためには、

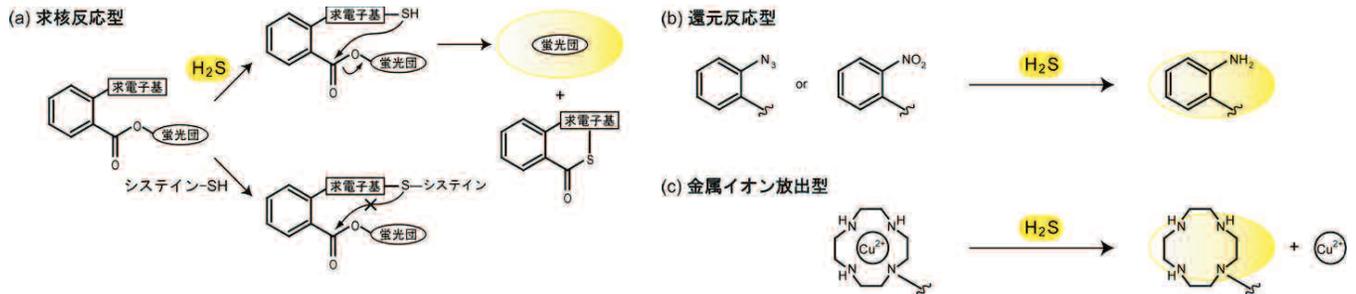


図3 H₂S プローブの反応機構

(a) 求核反応型 このプローブは求電子性基と蛍光色素をもつ。通常は photo-induced electron transfer (PET) 効果により消光しているが、H₂S による求核攻撃を受けると、官能基が脱離し消光が解除される。システインなどの低分子チオール化合物は、求核攻撃を一度しか行えないため、蛍光を発することができない。(b) 還元反応型 プローブのアジド基(-N₃)またはニトロ基(-NO₂)を H₂S の還元力でアミノ基(-NH₂)に変換することで蛍光を生じる。(c) 金属イオン放出型 銅錯体を形成した azamacrocyclic 環などを蛍光色素に付加した化合物であり、通常は消光状態を保っているが、H₂S によって Cu²⁺ が放出されると蛍光を発する。

ガスクロマトグラフィーと同様に組織や細胞を破碎する必要がある。

9. 蛍光プローブによる H₂S の検出法

不衛生な口内環境を放置すると、嫌気性菌が繁殖し H₂S が生産される。H₂S は口臭の主因であり、これを予防する観点から呼気中の H₂S を蛍光検出する方法が開発されている²⁸⁾。蛍光物質 2,2'-Pyridylbenzimidazole は、Hg²⁺ と錯体を形成することで消光状態を保つ化合物である。しかし H₂S が存在すると錯体は解離し、2,2'-Pyridylbenzimidazole 本来の蛍光を発する。この原理を利用して、測定開始から 2 分以内に H₂S を検出できるシステムが構築されており、比較的迅速な検査が可能となっている。

工場排水中の H₂S は水質汚濁の原因ともなる。その対策として H₂S 検出用の蛍光プローブが開発されている²⁹⁾。2,4-dinitrobenzenesulfonyl 基を有する蛍光物質は微弱な蛍光(F₀)を発するが、H₂S との反応によって 2,4-dinitrobenzenesulfonyl 基が脱離する結果、強い蛍光(F)を発する。25%アセトンを含む水溶液では、F/F₀ は 5.02 であり比較的良好な検出感度を示すが、有機溶媒を含まない場合では F/F₀ が 1.44 と低値であるため、生細胞を対象とした測定に適用することは難しいと思われる。

2011 年に入り、生細胞に適用できる H₂S プローブが相次いで開発された。現在も多くのプローブが開発され続けており、より高感度かつ選択的に検出するための改良も進んでいる。これらのプローブは反応機構に応じて 3 つに類別できる。

(i) 求核反応型

H₂S による 2 段階の求核置換反応により蛍光を生じるプローブである(図 3a)。このプローブは、求電子性官能基と蛍光色素からなり、通常は photo-induced electron transfer (PET) 効果により消光状態を保っている。しかし、H₂S による求核攻撃を受けると、官能基が脱離し消光状態が解除される。求核反応型のプローブは、H₂S の硫黄原子が官能基に取り込まれるタイプと、蛍光団に取り込まれるタイプの 2 通りに分けられる³⁰⁾。後者は、H₂S そのものを検出する点で特徴的である。なお、システインやグルタチオン等の低分子チオール化合物は、求核攻撃を一度しか行うことができない。そのため、官能基とともにチオール化合物は蛍光色素に保持され、消光状態を保ったままとなる(図 3a)。選択性が高い反面、最大蛍光強度を得るまでに 1 時間程度を要するものが多い。内在性の H₂S は比較的速やかに代謝されるため、リアルタイムでのモニタリングには不向きと思われたが、H₂S との反応から 2 分

程度で約 30 倍の蛍光を生じるプローブが開発されるなど改良が進んでいる³¹⁾。

(ii) 還元反応型

アジド基(-N₃)またはニトロ基(-NO₂)を H₂S の還元力でアミノ基(-NH₂)に変換することで蛍光を生じるプローブである(図 3b)。現時点ではこの反応を利用したプローブが多く、全体の半数以上を占める。求核反応を利用した場合よりも H₂S との反応に要する時間が短いものが多い。なかでも Dansyl azide (DNS-Az)³²⁾ は、強力な電子吸引性をもつスルホニル基にアジドを付加した化合物であり、H₂S との反応を加速させることに成功している。秒単位で反応が終了し、選択性も比較的高いため、短時間で代謝される H₂S を追跡する上で効果的と思われる。

他の多くが化学的に合成した蛍光色素をプローブとして用いるのに対して、遺伝的にコードされる蛍光タンパク質を利用した H₂S プローブも開発されている³³⁾。人工 tRNA を用いて p-Azidophenylalanine (pAzF) を付加した変異型 GFP (cpGFP-Tyr66pAzF) は、H₂S で還元されると強力な蛍光を発する。反応は数分で終了し、GFP にシグナルペプチドを付加すれば、特定のオルガネラにおける H₂S の動態を解析できると考えられている。

(iii) 金属イオン放出型

銅錯体を形成した azamacrocyclic 環または 8-hydroxyquinoline を蛍光色素に付加した化合物である³⁴⁻³⁵⁾。通常は、消光状態を保っているが、H₂S によって Cu²⁺ が放出されると消光が解除される(図 3c)。比較的短時間に反応が終了し、10 分以内に最大蛍光強度を示す。還元反応型のプローブとは異なり DTT による影響を受けにくいのが特徴で、0.1 mM DTT 存在下でも精製 3MST から生産される H₂S を検出することができる³⁴⁾。細胞抽出液を調製する際には、酵素の失活を防ぐ目的で還元剤を添加することが多いため、*in vitro* での解析に有効である。マルチウェルプレートを用いれば、短時間かつ簡便に H₂S を検出できるため、多検体解析時に特にその威力を発揮すると思われる。

これまでに開発されている H₂S プローブの多くは可視光で励起するが、可視光域ではヘモグロビンなどの生体成分の吸収率が高く、透過性が低いために生体深部の観察は不向きである。この点を考慮して、近赤外光 (near-infrared, NIR) で蛍光を発するプローブが最近開発された³⁶⁻³⁸⁾。還元反応型の Cy-N₃ は、励起波長 625

nm の NIR で蛍光を発するプローブである。H₂S 非存在下では、Cy-N₃の極大蛍光波長は710 nm であるが、H₂S 存在下では極大波長が750 nm に移行する。両波長の比率はH₂S の濃度に相関するため、レシオメトリックなプローブとして利用することができる。単波長で検出する場合とは異なり、不均一なプローブ分布に伴う蛍光強度の誤差を補正できる利点がある。その他にも、2光子励起顕微鏡を用いたH₂Sの検出が試みられている³⁹⁾。還元反応型のプローブFS1は、励起波長750 nm の NIR で2光子励起すると蛍光を発する。この方法により、海馬スライスの深部領域(90 ~ 190 μm)において内在性のH₂Sを蛍光検出できるとしている。ただし、検出時には400 ~ 680 nm の広域帯の蛍光をとらえており、H₂S以外の生体成分による可能性も否定できない。特異性に関する更なる検討が必要と思われる。

10. おわりに

H₂Sは、上述の通り多彩なはたらきを示すが、NOと共存した場合には、ニトロソチオール(HSNO)を形成することで単独では認められない新たな作用を発揮することもわかりつつある⁴⁰⁾。現在開発が進んでいるH₂Sプローブに加えて、他の生理活性物質との反応生成物や不安定型硫黄等を可視化できるプローブを利用できれば、H₂S動態の理解は一層深まると思われる。分子間クロストークにも注目が集まりつつあるなか、H₂S研究の進展に寄与したいと考えている。

謝辞

本研究は、独立行政法人国立精神・神経医療研究センターの研究補助金および日本学術振興会学術研究助成基金助成金若手研究(B)(23700434)による助成を受けて行いました。

[参考文献]

- 1) J. F. Schneider and J. Westley, *J. Biol. Chem.*, **1969**, *244*, 5735-5744.
- 2) Y. Ogasawara, T. Suzuki, K. Ishii and S. Tanabe, *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**, *1334*, 33-43.
- 3) M. Ishigami, K. Hiraki, K. Umemura, Y. Ogasawara, K. Ishii and H. Kimura, *Antioxid. Redox Signal.*, **2009**, *11*, 205-214.
- 4) A. K. Mustafa, M. M. Gadalla and N. Sen, *Sci. Signal.*, **2009**, *2*, ra72.
- 5) N. Shibuya, M. Tanaka, M. Yoshida, Y. Ogasawara, T. Togawa, K. Ishii and H. Kimura, *Antioxid. Redox Signal.*, **2009**, *11*, 703-714.
- 6) Y. Mikami, N. Shibuya, Y. Kimura, N. Nagahara and H. Kimura, *Biochem. J.*, **2011**, *439*, 479-485.
- 7) K. Abe and H. Kimura, *J. Neurosci.*, **1996**, *16*, 1066-1071.
- 8) Y. Nagai, M. Tsugane, J. Oka and H. Kimura, *FASEB J.*, **2004**, *18*, 557-559.
- 9) R. Hosoki, N. Matsuki and H. Kimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, *237*, 527-531.
- 10) N. Shibuya, Y. Mikami, Y. Kimura, N. Nagahara and H. Kimura, *J. Biochem.*, **2009**, *146*, 623-626.
- 11) B. L. Predmore, D. Julian and A. J. Cardounel, *Front. Physiol.*, **2011**, *2*, 104.
- 12) C. Köhn, G. Dubrovskaya, Y. Huang and M. Gollasch, *Int. J. Biomed. Sci.*, **2012**, *8*, 81-86.
- 13) J. Schleifenbaum, C. Kohn, N. Voblova, G. Dubrovskaya, O. Zavarirskaya, T. Gloe, C. S. Crean, F. C. Luft, Y. Huang, R. Schubert and M. Gollasch, *J. Hypertens.*, **2010**, *28*, 1875-1882.
- 14) Y. Mikami, N. Shibuya, Y. Kimura, N. Nagahara, M. Yamada and H. Kimura, *J. Biol. Chem.*, **2011**, *286*, 39379-39386.
- 15) Y. Kimura and H. Kimura, *FASEB J.*, **2004**, *18*, 1165-1167.
- 16) Y. Kimura, Y. Goto and H. Kimura, *Antioxid. Redox Signal.*, **2010**, *12*, 1-13.
- 17) J. W. Elrod, J. W. Calvert, J. Morrison, E. J. E. Doeller, D. W. Kraus, L. Tao, X. Jiao, R. Scalia, L. Kiss, C. Szabo, H. Kimura, C. W. Chow and D. J. Lefer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *104*, 15560-15565.
- 18) B. L. Predmore and D. J. Lefer, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, **2011**, *4*, 83-96.

- 19) 渋谷典広, 木村英雄, *LiSA*, **2012**, *19*, 1284-1289.
- 20) M. Goubern, M. Andriamihaja, T. Nübel, F. Blachier and F. Bouillaud, *FASEB J.*, **2007**, *21*, 1699-1706.
- 21) K. Módos, C. Coletta, K. Erdélyi, A. Papapetropoulos and C. Szabo, *FASEB J.*, **2012**, Epub ahead of print
- 22) M. Fu, W. Zhang, L. Wu, G. Yang, H. Li and R. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, *109*, 2943-2948.
- 23) E. Cuevasanta, A. Denicola, B. Alvarez and M. N. Möller, *Pros ONE*, **2012**, *7*, e34562.
- 24) J. C. Mathai, A. Missner, P. Kögler, S. M. Saparov, M. L. Zeidel, J. K. Lee and P. Pohl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, *106*, 16633-16638.
- 25) B. K. Czyzewski and D. N. Wang, *Nature*, **2012**, *483*, 494-497.
- 26) D. W. Kraus and J. E. Doeller, *J. Exp. Biol.*, **2004**, *207*, 3667-3679.
- 27) J. E. Doeller, T. S. Isbell, G. Benavides, J. Koenitzer, H. Patel, R. P. Patel, J. R. Lancaster Jr., V. M. Darley-Usmar and D. W. Kraus, *Anal. Biochem.*, **2005**, *341*, 40-51.
- 28) J. Rodríguez-Fernández, J. M. Costa, R. Pereiro and A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta*, **1999**, *398*, 23-31.
- 29) X. F. Yang, L. Wang, H. Xu and M. Zhao, *Anal. Chim. Acta*, **2009**, *631*, 91-95.
- 30) Y. Qian, J. Karpus, O. Kabil, S. Y. Zhang, H. L. Zhu, R. Banerjee, J. Zhao and C. He, *Nat. Commun.*, **2011**, *2*, 495.
- 31) X. Zheng, L. Xu, J. Zhou, Y. Xu, W. Zhu and X. Qian, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 10871-10873.
- 32) H. Peng, Y. Cheng, C. Dai, A. L. King, B. L. Predmore, D. J. Lefer and B. Wang, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2011**, *50*, 9672-9675.
- 33) S. Chen, Z. J. Chen, W. Ren and H. W. Ai, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 9589-9592.
- 34) K. Sasakura, K. Hanaoka, N. Shibuya, Y. Mikami, Y. Kimura, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, H. Kimura and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 18003-18005.
- 35) F. Hou, L. Huang, P. Xi, J. Cheng, X. Zhao, G. Xie, Y. Shi, F. Cheng, X. Yao, D. Bai and Z. Zeng, *Inorg. Chem.*, **2012**, *51*, 2454-2460.
- 36) M. Y. Wu, K. Li, J. T. Hou, Z. Huang and X. Q. Yu, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 8342-8347.
- 37) X. Cao, W. Lin, K. Zheng and L. He, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 10529-10531.
- 38) R. Wang, F. Yu, L. Chen, H. Chen, L. Wang and W. Zhang, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 11757-11759.
- 39) S. K. Das, C. S. Lim, S. Y. Yang, J. H. Han and B. R. Cho, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 8395-8397.
- 40) M. R. Filipovic, J. L. Mijlkovic, T. Nausser, M. Royzen, K. Klos, T. Shubina, W. H. Koppenol, S. J. Lippard and I. Ivanović-Burmazović, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 12016-12027.

[著者プロフィール]

氏名：渋谷 典広 (Norihiko Shibuya)
 所属：独立行政法人国立精神・神経医療研究センター
 神経研究所 神経薬理研究部 室長
 連絡先：〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1
 TEL：042-346-1725 FAX：042-346-1755
 E-mail：shibuyan@ncnp.go.jp
 出身大学：明治薬科大学薬学部
 学位：博士(薬学)

氏名：木村 英雄 (Hideo Kimura)
 所属：独立行政法人国立精神・神経医療研究センター
 神経研究所 神経薬理研究部 部長
 連絡先：〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1
 TEL：042-346-1725 FAX：042-346-1755
 E-mail：kimura@ncnp.go.jp
 出身大学：東京大学薬学部
 学位：博士(薬学)

新連載

新しいナノ材料としての カーボンナノチューブ —最近の展開(バイオからエネルギーまで)

①

中嶋直敏、藤ヶ谷剛彦
九州大学

今回から4回の予定で、「新しいナノ材料としてのカーボンナノチューブ—最近の展開(バイオからエネルギーまで)—という題目でカーボンナノチューブの基礎物性と最近の応用・展開について解説する(より詳細は、文献1-2を参考にいただきたい)。カーボンのごくありふれた材料であり、人類は古くから用いてきた。カーボンに近年脚光が集まる一因として「ナノテクノロジー」の発展がある。「ナノテクノロジー」とは、ナノスケールの大きさの分子や原子を、「創る」、「組織的に並べる」、「観る」、「操作する」などの手法で、目的の機能を持つナノ物質やデバイス、あるいはシステムを創製制御する科学、技術である。ナノテクノロジーの世界で、21世紀の科学技術の鍵物質として期待されているスーパー物質の代表格が、カーボンナノチューブおよびグラフェンである。

1. ナノカーボンとは

ナノサイズの炭素物質をナノカーボンと呼ぶ。フラーレン、カーボンナノチューブ(CNT)、グラフェン、ダイヤモンド様カーボン、カーボンナノクリスタルなどがこれに含まれる(図1)。また、フラーレンに金属を内包した物質は、金属内包フラーレン、カーボンナノチューブにフラーレンを内包した物質は、フラーレンピーポッドとよばれる。フラーレン、カーボンナノチューブおよびグラフェンは、明確な構造をもっており、次元で分類すれば、それぞれ0次元、1次元、および2次元の構造体である。いずれも sp^2 炭素から構成されている。これに対してダイヤモンドは



図1 代表的なナノカーボンの構造

sp^3 炭素構造体である。フラーレン C_{60} は分子量720の低分子化合物であるが、カーボンナノチューブ、グラフェンは、巨大な分子量をもつ電導性「高分子」である。

ナノカーボン研究の歴史は「セレンディピティ」(偶然の発見)に満ちている。ナノカーボン研究に火がついたのは、1985年のフラーレンの発見であった。しかしその15年前、大澤は、12個の正五角形と20個の正六角形をもつサッカーボール分子(C_{60})を提案した。しかしこれを化学合成する手法は見つからず、 C_{60} の発見までには15年の歳月が流れた。1985年KrotoがSmalleyらとの共同研究でレーザー蒸発超音速クラスター分子線中にごく微量に存在した C_{60} を偶然に発見した³⁾。1990年、ドイツのKratschmerらは、 C_{60} の大量合成法(抵抗加熱法)を偶然発見した。フラーレン研究が過熱している中の1991年、飯島は、アーク放電法でのフラーレン合成の際の電極の陰極堆積物の中心部分から多層カーボンナノチューブ(Multi-walled Carbon Nanotube; 以下MWNT)を偶然に発見した。さらに飯島らは1993年には単層カーボンナノチューブ(Single-walled Carbon Nanotube; 以下SWNT)を発見した。1998年ルツツイらは、酸処理をしたSWNTの内部空間に C_{60} が内包した物質フラーレン内包SWNT(ピーポッドという)が生成していることを偶然に発見した。その後、板東ら、片浦らは昇華法で C_{60} の充填率が高いピーポッドの合成法を確立した。その後、さまざまな分子を内包したSWNTが合成され、特性が研究されている。1999年、飯島らはドリヤ状をしたナノカーボン、カーボンナノホーンを偶然発見した。このように、すべて「セレンディピティ」に彩られているのである。化学の歴史が偶然の発見に彩られていることはよく知られている。人間の叡智は、「偶然」により得られるエキサイティングなサイエンスを予知、計画するところまで及ばないということなのであろうか。

2. カーボンナノチューブの構造、特性

CNTはグラフェンシートを円筒状に丸めた構造をしている。円筒が一本のみからなるCNTをSWNT、直径の異なる2本のSWNTが同軸で重なったCNTを2層カーボンナノチューブ(Double-walled Carbon Nanotube; 以下DWNT)、多層に重なったCNTを多層カーボンナノチューブ(MWNT)と呼ぶ(図2)。SWNTは直径0.5~数nmとかなり細いが、MWNTは5~100nmである。層数の多いMWNTは細い気相成長炭素繊維(VGCF)と類似するものとみなすことができよう。CNTの合成後の長さは数十nmから、長いものでは数mmに及ぶものがあり、合成法により様々な長さ分布を持つ混合物として得られる。



図2 CNTの構造
(左)SWNT、(中央)DWNT、(右)MWNT

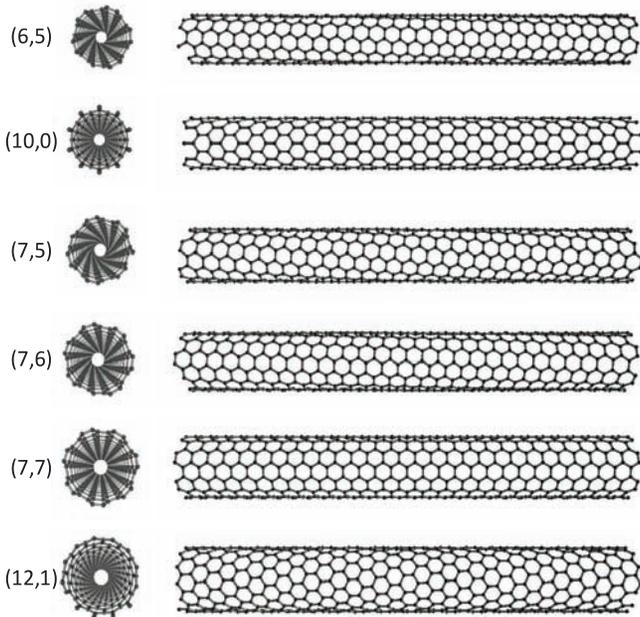


図3 カイラリティの異なる様々なSWNTの構造
(左)断面図 (右)側面図

SWNTには、多くの巻き方のタイプが存在し、この巻き方を「カイラリティ」と呼んでいる。合成後のSWNTは様々なカイラリティを持つSWNTの混合物である。カイラリティの違いにより、電気物性、光学物性が少しずつ異なるためにベクトル表示を用いて区別している。SWNTの展開図において原点(基準点)とどの点を重ねるように丸めるかにより一義的にSWNTのタイプを決める方法である。aベクトルとbベクトルを定義し、原点と重ねる点をa、bの合成ベクトルで表現する。原点と重ねる点がa方向にn、b方向にm進んだ点だったとき、そのSWNTを(n, m)SWNTと2つの数字列を用いて表記する。この(n, m)をカイラル指数と呼ぶ。そのいくつかを図3に示した。カイラリティの違いにより巻き方や直径が異なることがわかる。(n, m)はSWNTの物性を判断する場合に便利で、例えばn-mが3の倍数の時SWNTは金属性を示し、それ以外は半導体性を示す。また、幾何学的な特徴から(n, n)となるSWNTをアームチェア型、(n, 0)と表記されるSWNTをジグザグ型、それ以外のSWNTをらせん型(キラル型)と呼ぶ。

3. CNTの合成

CNTの作製法としては炭素源となるガスを加熱炉にキャリアガスとともに吹き込んでCNTを合成する化学気相成長(CVD)法、グラファイト電極に直流または交流を印加してCNTを成長させるアーク放電法、炭素源となるグラファイトなどをレーザー照射により加熱蒸発させてCNTを得るレーザー蒸発法などがよく用いられる。現在では様々な金属を触媒とした合成法が見出され、大量合成も可能になっており市販で入手できる。アーク放電法で作製されるSWNTは結晶化度(SWNT上にどれだけ欠陥が少ないか)が比較的高く直線性の良い長所があるが、炭素系不純物や触媒粒子を多く含み純度(全生成物量に対するSWNTの量)が低い(~30%)のが欠点である。一方、レーザー蒸発法はおよそ70%近くまでの高純度なSWNTを合成することができる。レーザー蒸発法で合成されるSWNTは、アーク放電法より結晶化度の高く、生成温度の調整が可能のために直径などの制御がアーク放電法より精密にできるという特長がある。しかし出力の高いレーザーを必要とし、一度に得られる量に限度があり、大量生産には不向きである。CNTの有用性が明らかになるにつれ、大量合成に適したCVD法が大きな発展を見せている。CVD法はもともと1960年代に気相成長炭素繊維(VGCF: vapor-grown carbon fiber)の作製で確立された技術であったが、CNT合成に拡張されていった。

CVD法には触媒としては主に炭素原料である炭化水素やアルコールを分解する作用を示すことが知られる鉄族(鉄、コバルト、ニッケル)が用いられている。金属ナノ粒子からのCNT成長のメカニズムは、まず分解された炭素が金属ナノ粒子中に溶解し、過飽和になった後に表面に析出し成長していくと考えられている。析出初期にフラレンを半分にしたような構造(キャップ構造)がナノ粒子表面で形成され、そこを始点に炭素が円筒状に析出していくモデル(CNT成長メカニズム(JST webサイト <http://www.jst.go.jp/kisoken/nano/fruit/contents/article/1a-11.html>))が一般的に受け入れられている。

炭素源の分解はプラズマやホットフィラメントで促進させる方法(プラズマCVD、ホットフィラメントCVD)もあるが(特に基板を高温にできない場合に有効)、一般的には加熱のみで行い、熱CVD法と呼び分けられることもある。CVD法の中でも特に研究が盛んなのは、金属微粒子触媒を炭素源ガスの気相中に流動させながらSWNTを成長させる「気相流動法」と、基板上に塗布した金属触媒に炭素源を供給することで成長させる「基板成長法」である。気相流動法は触媒となるフェロセンとチオフェンを用いてベンゼンを熱分解することで得ていたVGCF製造にルーツを持ち、この方法においてまずMWNTの製造に成功した後、1998年

表1 代表的なCNTメーカー

	主なCNT	直径	製造法	特徴
Unydym (米国)	HiPco (SWNT)	0.8 ~ 1.2 nm	CVD法	ライス大学 R. E. Smalley らの手法で製造。垂直配向 MWNT 膜の販売も
South West Nano Technologies (米国)	CoMoCAT (SWNT)	0.6 ~ 1.1 nm	CVD法	オクラホマ大学 D. Resasco らの手法で製造。最近では 50% 以上 (6,5) SWNT または 50% 以上 (7,6) SWNT の CoMoCAT もある CNT インクも販売
Nanocyl (ベルギー)	SWNT	~ 2 nm	CVD法	ベルギー Namur 大学 B. Nagy らの技術で製造。MWNT の分散液、エポキシ複合体、樹脂複合体等幅広く展開
	DWNT	~ 3.5 nm		
	MWNT	~ 9.5 nm		
Hyperion Catalysis (米国)	MWNT	~ 10 nm	CVD法	最も歴史の長い MWNT メーカー
Arknano (中国)	MWNT	~8, 10 ~ 20, 20 ~ 30, 30 ~ 50 nm	CVD法	多数の直径 MWNT を取りそろえる。SWNT や化学修飾 SWNT も販売
Carbon Solutions (米国)	SWNT	~ 1.4 nm	アーク法	
名城ナノカーボン (日本)	SWNT	~ 1.4 nm	アーク法	分離された半導体性 SWNT や金属性 SWNT も販売 SWNT 塗布細胞培養皿も取り扱う
昭和電工 (日本)	VGCF®-X (MWNT)	10 ~ 15 nm	CVD法	VGCF の最も細いグレードだが、事実上の MWNT

に中国科学院の Cheng らが SWNT の製造に成功している⁴⁾。その後、様々な触媒、炭素源、触媒導入方法が検討されたが、市販され世界中の研究者が研究対象として用いているいわゆる HiPco 法が有名である。HiPco 法は鉄を触媒とし、一酸化炭素を炭素源として成長させる手法で、フラーレンでノーベル賞を受賞した米国ライス大学の Smalley らにより開発された手法である⁵⁾。HiPco 法で得られる CNT は残存触媒が多く、およそ 40 wt% 程度の鉄微粒子が残存していて、通常精製して使用する必要がある。気相流動法の発展における日本のグループの貢献は非常に大きい。

2012 年現在、30 社以上のメーカーが CNT を製造販売している。それぞれ製造法、直径分布、純度、結晶化度等に差があり、一口に CNT と言っても多様性があることを認識して使わなければならない。表 1 に代表的な CNT メーカー（2012 年 1 月現在）を挙げた。

4. CNT の基本物性

CNT は直径数ナノメートルでありながら、長さが数マイクロメートルに及び高アスペクト比（～数千）を持ち、sp² カーボンの強固な化学結合のみから構成されるユニークな構造により非常に優れた機械的強度や、電気伝導度、熱伝導度などを有する（表 2）。一方で炭素のみから構成されるために比重は 1.3～2.0 g/cm³ 程度と鋼の 5 分の 1 程度と非常に軽い。これら CNT 1 本における優れた物性を効率的に材料として反映させ、いかに実用化につなげるかは重要な CNT 研究のターゲットになっている。

表 2 CNT の特性

	SWNT	MWNT	比較物質
ヤング率 [GPa]	1000	270～950	180～240(鋼鉄) 270(PBO)
引張強度 [GPa]	13～53	11～150	0.38～1.55(鋼鉄) 5.8(PBO)
密度 [g/cm ³]	1.3～1.5	1.8～2.0	0.9～1.5(高分子)
比表面積 [m ² /g]	1900(開端前) 2700(開端後)	直径に依存	1000～3500(活性炭)
破断点伸度 [%]	16	15.6～17.5	15～50(鉄鋼)
熱伝導率 [W/mK]	3000		420(銀)

4-1. 機械的強度

CNT の大きな魅力の理由の一つとして、優れた機械的強度がまず挙げられる。SWNT でおよそ弾性率 1 TPa、引っ張り強度 13～53 GPa、破断点伸度 16%、MWNT で弾性率 270～950 TPa、引っ張り強度 11～150 GPa、破断点伸度 16% と報告されている。これらの値は表 2 に示すように金属材料と比較して優れており、「史上最強」の物質と言って過言ではない。さらに、同じカーボン系材料として、すでに普及し始めている炭素繊維（カーボンファイバー）の物性（弾性率：900 GPa、引っ張り強度：6.4 GPa、破断点伸度：2.2%）と比較しても圧倒的に優れている。

ただし、CNT は金属材料のように熔融することで任意の形状に成型加工することができないために、直ちに金属の代替材料になるわけではない。

CNT ワイヤーには、SF のようだがその強度と軽量性ゆえ宇宙と地上とを結ぶ「宇宙エレベーター」のワイヤーとしての夢が持たれている。現在では触媒失活と触媒への炭素源拡散の制約上数 mm で止まってしまう CNT の成長を飛躍的に伸ばす技術の登場に期待したい。

CNT を他の材料に添加剤として分散させるアプローチとして、金属、セラミックなどへの添加の他、強度や導電性などにおいて最も補強効果が見込める高分子材料への添加が多く研究されている。高分子との複合体においては高分子材料の特色である軽さ（密度 1～1.5 g/cm³）を損なうことなく高分子の強度を劇的に向上させられる可能性が高い。理論的には補強により金属系材料に匹敵する強度も実現できるとされている。

金属材料からの置き換えが進めば例えば航空機や自動車の軽量化による燃費向上が見込め、省エネルギー化にも大きく貢献できるであろう。CNT の極限的性質を複合体に効率的に反映させるためにはまず CNT を高分子中に均一に孤立分散することが重要であることがわかっている。しかし大きなアスペクト比と 1 nm あたり 0.9 eV（計算値）というバンドル形成力を解いて高分子樹脂中均一に分散することが困難なため、理論通りのナノ複合体作製添加効果を得るには至っていないのが現状である。高分子複合体内での分散状態の正確な理解や、界面相互作用の解析などにに基づき、用いる高分子ごとに最適な手法を選択することが必要だと考えられている。

4-2. 熱伝導度

金属材料を凌駕する CNT 物性の一つに熱伝導度がある。円筒構造という端のない特徴的な構造から、熱伝導のキャリアであるフォノンの散乱が抑制され、一次元構造上を長距離にわたって熱を伝播させることができる。SWNT、MWNT とともに 1 本単独では 3000 W/mK の熱伝導性を示す（理論値 6000 W/mK）。高い熱伝導度を持つ金属である銅でさえ 385 W/mK と一桁低く（ただしバルク固体としての物性）、いかに CNT の熱伝導度が高いかがわかる。このような高い熱伝導度を持つ材料は熱交換器やヒートシンクなどの放熱デバイスとして最近の電子材料分野、自動車、家電分野と様々なデバイスでも注目されている。実際にアルミニウム合金や炭化ケイ素に CNT を添加した放熱材料が開発されている。

4-3. 比表面積

CNT はゼオライトやメソポーラスシリカ等の多孔質材料を上回る大きな比表面積を有し、計算では直径 1.36 nm の SWNT の表面で 1900 m²/g もの表面積がある。合成後にはキャップされている片端を開端して内壁も吸着に寄与できるとすると、合計で 2700 m²/g もの比表面積を与えると見積もられている。一本一本が比較的疎になっている垂直配向 SWNT などにおいては凝集が最小限に抑制できるため、計算値に近い比表面積（2240 m²/g）が得られる。CNT の大きな比表面積を利用する応用の際には十分に分散した状態で用いることが極めて重要であることがわかる。

4-4. 分光学的性質

CNT は一種の共役系高分子でありその発達した π 共役により吸収が赤外波長域まで拡張している。SWNT 一本一本は特長ある光吸収挙動を示す。SWNT においては形状の一次元性のためにバンド構造が量子化したファンホープ特異点と呼ばれる状態密度が特異的に高いバンドを持っている。これはちょうど低分子化合物における分子軌道と類似の構造で、バンド間遷移に伴う明確な吸収や発光を持つことになる。図 4 に SWNT 分散溶液の吸収スペクトルを示す。発達した共役系のためにバンド間は狭く、半導体性 SWNT におけるエネルギーの最も小さい遷移に対応する吸収（v₁ → c₁ 遷移）は近赤外領域（800 nm～1600 nm）に現れる。巻き方のわずかな違いによりこのバンド幅が異なるため、様々なカイ

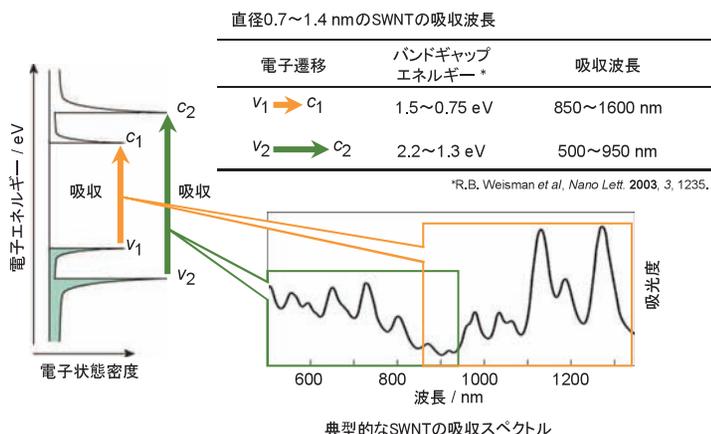


図4 SWNTのバンド構造と吸収スペクトルの対応

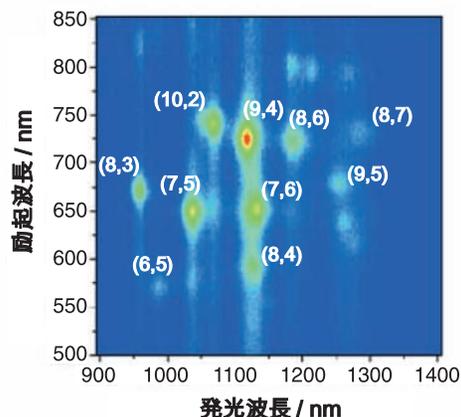


図5 SWNT溶液の発光スペクトルの2次元マッピング

ラリティ SWNT の混合物である SWNT 分散溶液中で複数のカイラリティに帰属できるシャープな吸収が観測される。金属性 SWNT の E_{11} 遷移は可視域部に現れるので吸収スペクトルを測定すると SWNT に含まれる金属性 SWNT と半導体性 SWNT の割合も大まかに理解できる。半導体性 SWNT の $v_2 \rightarrow c_2$ 遷移も可視域部に現れるため、カイラリティごとに分離した金属性 SWNT および半導体性 SWNT からは様々なそれぞれの吸収に応じた着色が視認できる。SWNT は、本当は黒くないのである。

光を吸収して励起された SWNT のうち、半導体 SWNT はバンド間に対応する近赤外発光を伴って緩和する。ただし、SWNT には蛍光消光剤として作用する金属性 SWNT が共存するために、バンドル状態を解き、完全に孤立分散しないと発光（フォトルミネッセンス, PL）は観測されない。逆に言えば PL の有無により溶液中に孤立分散 SWNT が存在するかが判断できる。

図5に SWNT 分散溶液の発光スペクトルを示す。縦軸に励起波長を、横軸に PL 波長を示しており、様々な励起波長における PL スペクトルを順に重ね合わせて上から眺めて高さの差を色のコントラストの差として表現した 2D マッピングである。このようにプロットすることで各カイラリティ由来する発光が個別に観察されることになる。図には帰属も合わせて示してある。含まれる SWNT の直径が比較的小さい HiPco や CoMoCAT は 900 ~ 1300 nm 付近に PL を示す。この付近の PL は比較的明るいため、レーザーを励起に用いずともインジウムガリウムヒ素 (InGaAs) 検出器を搭載した分光器であれば検出可能である。

一方、アーク放電法で合成された SWNT は直径が太く (1.2 nm ~)、PL の量子収率が低く暗いため励起にレーザーが必要となる。CVD 法由来 SWNT の PL 検出のしやすさは基礎研究に CVD 法 SWNT が好まれる一つの理由である。SWNT の PL は構造的堅牢さから通常の色素と異なり、ほとんど退色しないことが特長である⁶⁾。

近赤外領域は血液や水の吸収がなく生体透過性の高い領域であり、この領域に吸収や発光を持ち、退色のない SWNT は生体内プローブなどとして期待されている。ただし、この蛍光量子収率は 3 ~ 5% と小さく、ほとんどは無輻射的な過程により失活し熱運動に変換される。逆に、この高い発熱効率を高い熱伝導度と合わせて「分子ヒーター」として光照射による局所的加熱に使うアイデアも生まれてくる。この性質を巧みに利用した CNT のがんに

対する温熱療法については後に詳細を紹介する。また SWNT の近赤外域吸収には過飽和吸収という特殊な非線形光学効果があり、近赤外領域が次世代通信帯であることと合わせて次世代光通信材料としての利用も期待されている。

ところで、PL を示すのは半導体性 SWNT のみであるため、PL 測定ではサンプルに含まれる金属性 SWNT の情報は得られない。金属性 SWNT のカイラリティ分布理解のためにはラマン分光法を用いて CNT の直径が振動するモードであるラジアルブリージングモード (RBM) を解析する方法が有効である。図6に界面活性剤を用いて水溶液中に孤立分散させた SWNT のラマンスペクトルを示す (励起 785 nm)。100 ~ 350 cm^{-1} 付近に現れるのが RBM に由来するピークであり、ラマンシフトを ω_{RBM} (cm^{-1}) とすると直径 d (nm) = $248/\omega_{\text{RBM}}$ というシンプルな式で測定している SWNT の直径が求められる。

ラマン分光で注意すべき点としては、強いラマン散乱光は物質

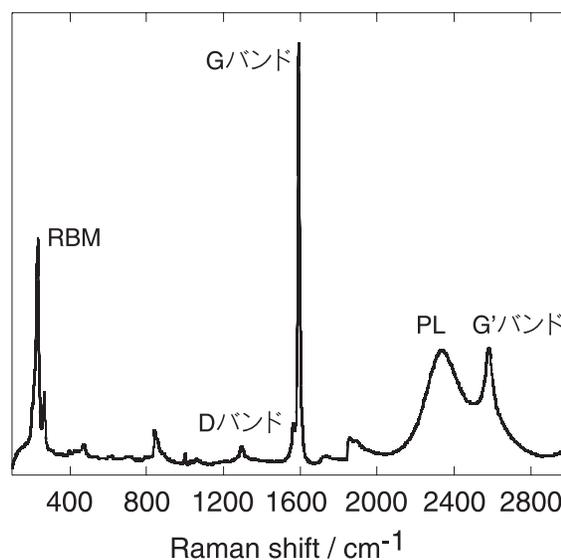


図6 界面活性剤で水溶液中に分散させた SWNT (HiPco) のラマンスペクトル

の光学遷移エネルギーと一致した場合に生じるという共鳴ラマン散乱効果を観測している点である。換言すれば、励起波長に一致する光学遷移エネルギーを持つSWNTのみを観察しているということである。従ってPLと同様サンプル中に含まれる全てのSWNTを見ているわけではなく、多くのカイラリティを網羅的に調べようとする場合、多くの励起波長を使って調べなければならないということになる。図6に示すようにラマン分光法ではRBMの他、Dバンド(1300 cm⁻¹付近)、Gバンド(1590 cm⁻¹)、G'バンド(2700 cm⁻¹)という格子振動に由来する特徴的なピークが現れ、それぞれ有用な情報をもたらしてくれる。Gバンドはグラファイト構造中の6員環構造の面内伸縮振動に、Dバンドはその欠陥構造に由来する。従ってGバンドとDバンドの強度比(G/D比)はCNT中(グラフェンやグラファイトも)の結晶性の高さを表す指標として極めて有用である。またGバンドはドーピングによってシフトするために、ドーブ状態を理解するプローブとなる。G'バンドはDバンドの倍音ピークであるが、比較的強く出るために観察に便利である。外部圧力などによりシフトするために環境にตอบสนองしたプローブとして使うことができる。また、SWNTが孤立分散したときに得られるPLが高波数側に観察され、孤立溶解状態か否かをラマン分光測定からも判断できて便利である。

[参考文献]

- 1) 中嶋直敏、藤ヶ谷剛彦、「カーボンナノチューブ、グラフェン」、高分子ラマンポイント、共立出版、2012。
- 2) “ナノチューブ・グラフェンハンドブック”, 監修: 飯島澄男, 遠藤守信, コロナ社、2011。
- 3) H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl and R. E. Smalley, *Nature*, **1985**, 318, 162.
- 4) H. M. Cheng, F. Li, G. Su, H. Y. Pan, L. L. He, X. Sun and M. S. Dresselhaus, *Appl. Phys. Lett.*, **1998**, 72, 3282-3284.
- 5) P. Nikolaev, M. J. Bronikowski, R. K. Bradley, F. Rohmund, D. T. Colbert, K. A. Smith and R. E. Smalley, *Chem. Phys. Lett.*, **1999**, 313, 91-97.
- 6) D. A. Heller, S. Baik, T. E. Eurell and M. S. Strano, *Adv. Mater.*, **2005**, 17, 2793-2799.



[著者プロフィール]

氏名: 中嶋 直敏 (なかしま なおとし)
 所属: 九州大学大学院工学研究院 教授
 所在地: 〒 819-0395

福岡市西区元岡 744 番地

TEL & FAX: 092-802-2840

E-mail: nakashima-tcm@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

URL: <http://nakashima.cstm.kyushu-u.ac.jp/jp/>

略歴: 昭和 55 年 3 月 九州大学大学院工学研究科博士課程単位修得退学

昭和 55 年 4 月 九州大学工学部助手

昭和 57 年 5 月 九州大学工学部助教授

昭和 62 年 5 月 長崎大学工学部助教授

平成 5 年 4 月 長崎大学工学部教授

平成 13 年 4 月 長崎大学大学院生産科学研究科物質科学専攻教授

平成 16 年 4 月 九州大学大学院工学研究院 教授 現在に至る

生まれ、育ちは熊本。趣味はテニス、家庭菜園、スポーツ観戦(テレビ)、雑誌など

受賞: 昭和 61 年 4 月

日本化学会進歩賞(日本化学会) 受賞「合成二分子膜の組織化と機能」

平成 12 年 5 月

高分子学会賞受賞(高分子学会)「ナノ分子組織膜を素材とした新電子機能システムの設計・構築」

平成 19 年 9 月

2007 トムソンサイエンスティフィックリサーチフロント Award 受賞(The Thomson Corporation)「カーボンナノチューブ可溶化・機能化デザインへの戦略的なアプローチ」(Strategic Approaches for Carbon Nanotube Solubilization and Functionalization)

平成 22 年 9 月

高分子化学三菱化学賞「カーボンナノチューブ・ポリマーハイブリッド材料のデザイン・創成に関する基礎および応用研究」



氏名: 藤ヶ谷 剛彦 (ふじがや つよひこ)

所属: 九州大学大学院工学研究院応用化学部門 准教授

TEL & FAX: 092-802-2842

E-mail: fujigaya-tcm@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

略歴: 1995 年 埼玉県立浦和高校卒業

1996 年 東京工業大学工学部第3類入学

2000 年 東京工業大学工学部高分子工学科卒業

2002 年 同大学院有機・高分子工学科修士課程修了(上田研究室)

2005 年 東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻博士課程(相田研究室)2004年から日本学術振興会特別研究員(2年間)

2005 年 米国ノースウェスタン大学 博士研究員(Chad.Mirkin 研)

2006 年 九州大学学術研究員

2007 年 九州大学高等研究院 特任准教授

2011 年 九州大学大学院工学研究科 准教授(現職)

受賞等:

2003 年 The Photopolymer Science and Technology Best Paper Award

2004 年 日本化学会第 84 春季年会 学生講演賞

2009 年 ポリマー材料フォーラム優秀発表賞

2009 年 高分子学会若手研究奨励賞

Topics on Chemistry

血中アスコルビン酸の簡便迅速な検出：蛍光ニトロキシドの利用

株式会社同仁化学研究所 竹中 聡

アスコルビン酸は生体内で還元剤として働き、また、様々な機能を備えた重要な物質で、生体内におけるコラーゲン合成過程にも関与している。コラーゲンプロペプチド上のリジンおよびプロリンの酵素によるヒドロキシル化はコラーゲンの α ペプチドの架橋を促進し三重らせん構造を形成する。この反応は補酵素としてアスコルビン酸を要求する。このように、アスコルビン酸はコラーゲン合成過程で重要な役割を果たし、アスコルビン酸摂取量の不足はリジンとプロリンのヒドロキシル化量の減少をもたらす。それがコラーゲンの三重らせん構造の不完全化などを引き起こし、組織間をつなぐコラーゲンや象牙質、骨の間充組織の生成や保持の障害となり壊血病を発症することになる。また、アスコルビン酸は生体内の最も重要な抗酸化剤の1つで、スーパーオキシドアニオンや様々なラジカルを消去することができる。アスコルビン酸はフリーラジカルを直接除去することに加え、グルタチオンとともに、新陳代謝の産物である過酸化水素を取り除くグルタチオン-アスコルビン酸回路を担っている。他にもカルニチン生合成経路やノルエピネフリン生合成経路、ペプチドホルモンのアミド化およびチロシン新陳代謝経路において酵素の電子供与体となる。このように、アスコルビン酸は生体内で多くの重要な役割を担っており、前述の壊血病や炎症のような様々な病態と関連している。従って、アスコルビン酸の迅速で簡便な検出は疾病診断のための有用な手法となる。

本稿では、蛍光性基を持つニトロキシドプローブ（以下、蛍光ニトロキシドプローブ）を利用したアスコルビン酸の迅速で簡便な検出法について紹介する。アスコルビン酸の定量にはヨウ素溶液などを用いた酸化還元滴定法やクロマトグラフィー法のような様々な分析法が用いられてきた。それらの方法はそれぞれに長所と短所を持っている。例えば、2,6-dichloroindophenol（以下、DCIP）の還元を用いた方法は、DCIPがアスコルビン酸と速やかに反応するため、定量によく利用される。しかし、DCIP法は遠心分離や溶媒抽出など操作が煩雑であることと、DCIPはアスコルビン酸だけでなく、グルタチオンとも反応するため、DCIPの還元を用いた方法ではアスコルビン酸と深く関与しているグルタチオンがアスコルビン酸定量において誤差を引き起こす可能性がある。また、高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLC）を用いた測定方法は高い選択性を持っているが、分析にはホモシステイン還元や2,4-Dinitrophenyl hydrazine（以下、DNPH）を用いたDNPH誘導体化などによるサンプルの前処理が必要であることと、結果を分析するのに時間がかかることが課題である。

そこで、山田らはアスコルビン酸を特異的かつ迅速、簡便に検出することを目的として、蛍光ニトロキシドプローブを用いてアスコルビン酸定量のための新しい手法の開発を行っている¹⁾。蛍光団とニトロキシドのカップリングは電子交換相互作用や光誘起電子移動によって分子内消光を引き起こす。しかし、アスコルビン酸と反応し、ニトロキシドラジカルが還元されて、不対電子が減少すると、カップリング体の蛍光強度は回復する（Fig. 1）。

ニトロキシドはニトロキシルラジカル体、還元されたヒドロキシルアミン体、酸化されたオキソアンモニウムカチオン体をとる。オキソアンモニウムカチオン体はヒドロキシルラジカル、あるいはスーパーオキシドとニトロキシルラジカルが反応して生成され、またNADHによってヒドロキシルアミンに還元される。また、ニトロキシルラジカル体も、アスコルビン酸やミトコンドリアの電子伝達系中の酵素の複合体IおよびIIによって対応するヒドロキシルアミンに直接還元される。これらの反応に基づくニトロキシド

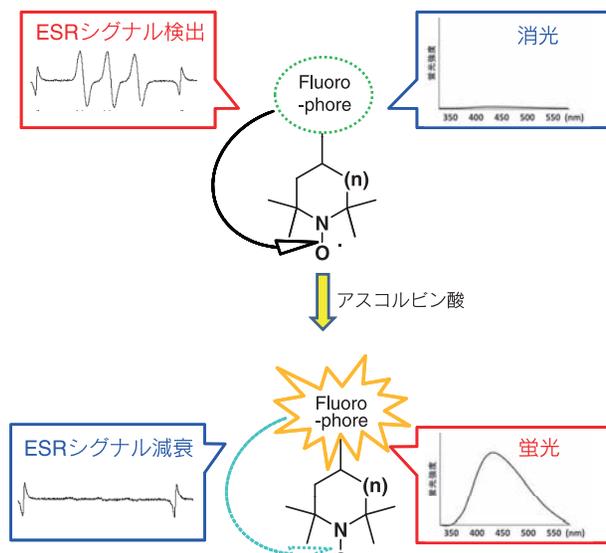


Fig. 1 蛍光ニトロキシドプローブとアスコルビン酸の反応

ドの還元は酸化還元状態を評価するための有用な指標となる。しかしながら、ニトロキシドを用いた診断用製品を開発するためには、反応種への特異性が重要となる。

過去に山田らは2,6位がピペリジンで置換されたニトロキシドがアスコルビン酸や脂質由来ラジカルとの反応性を持つことを報告している^{2,3)}。また、アスコルビン酸とニトロキシドの間の酸化還元電位の差から計算されたギブズエネルギーはニトロキシドの還元率と直線関係を示した⁴⁾。これらの結果は2,6位がピペリジンで置換されたニトロキシドの構造がアスコルビン酸との反応特異性に寄与していることを示唆している。そこで、山田らは、2,6位がピペリジンで置換されたニトロキシドの化学的性質を利用して発展させ、新規に3つの誘導体を合成した¹⁾（Fig. 2）。

これらの誘導体は蛍光量子収率の低さを除き、ナフチルアミンと同様の光化学的性質を示した（Table. 1）。

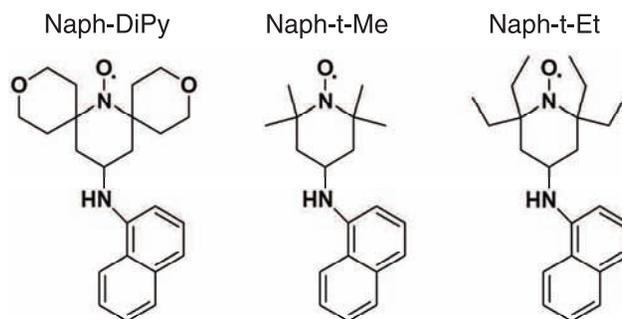


Fig. 2 新規合成蛍光ニトロキシドプローブ

Table 1 誘導体の光化学的性質

化合物	極大吸収波長 (nm)	モル吸光係数 ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)	最大蛍光波長 (nm)	蛍光量子収率 Φ_f
Naph-DiPy	313	6.7×10^3	430	0.022
Naph-t-Me	313	5.5×10^3	430	0.006
Naph-t-Et	313	—	430	—

Table 2 誘導体のアスコルビン酸との反応性

化合物	蛍光強度 (a.u.) 反応時間 5 分	蛍光強度 (a.u.) 反応時間 20 分
Naph-DiPy	1.0×10^4	1.5×10^4
Naph-t-Me	0.18×10^4	0.5×10^4
Naph-t-Et	—	—

※波長：Ex. 310 nm, Em. 430 nm

それらの誘導体のうち、Table 2 に示すように、Naph-DiPy nitroxide がアスコルビン酸に対して高い反応性を持つことが分かった。

以下、Naph-DiPy nitroxide を用いたデータを紹介します。

Naph-DiPy nitroxide はアスコルビン酸と混合した時、アスコルビン酸によってラジカルが消去されるため ESR シグナルが減衰し、また、蛍光強度はアスコルビン酸の濃度依存的に上昇しプラトーに達する (Fig. 3)。

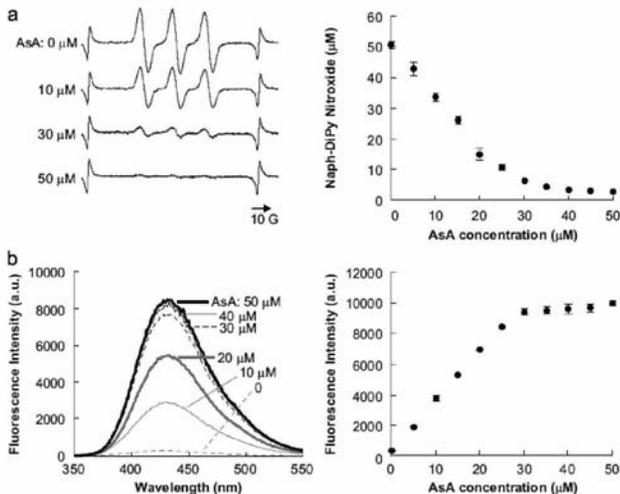


Fig. 3 ESR 及び蛍光による Naph-DiPy nitroxide とアスコルビン酸との反応性測定

また、0 ~ 30 µM のアスコルビン酸溶液添加時の蛍光強度には ESR シグナル強度および HPLC シグナルエリアと相関がそれぞれ見られた (Fig. 4)。

以上のように、Naph-DiPy nitroxide はアスコルビン酸と反応して濃度依存的に蛍光強度が増加する。また、ESR 及び蛍光測定の結果には相関性があり、いずれの機器分析にも用いることができる。蛍光及び ESR の二つの指標で測定できることは、Naph-DiPy nitroxide がアスコルビン酸の定量に非常に有用であると考えられる。

しかしながら、生体内には様々な還元剤や酸化剤が存在しており、アスコルビン酸の定量に用いるためには、アスコルビン酸と特異的に反応することが求められる。そこで、生体内の主な還元物質との反応性を確認した結果、Naph-DiPy nitroxide はアスコルビン酸とのみ反応して蛍光性となり、グルタチオンなどの還元物質による蛍光変化は見られなかった。また、Reactive Oxygen Species (以下、ROS) との反応性を確認した結果、スーパーオキシド、ヒドロキシラジカル等による蛍光変化は見られなかった。

以上のことから、Naph-DiPy nitroxide が生体内の物質の影響を受けず、アスコルビン酸と特異的に反応することが示唆される。

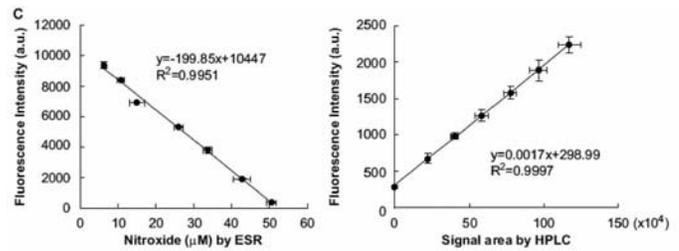


Fig. 4 蛍光強度と ESR シグナル強度および HPLC シグナルエリアとの相関性

次に、蛍光ニトロキッドプローブの実用性の確認のために、Osteogenic Disorder Shionogi (以下、ODS) ラットのプラズマ中のアスコルビン酸の定量に Naph-DiPy nitroxide を使用した。まず、ニトロキッドの還元は生体内のグルタチオン-アスコルビン酸酸化還元系のデヒドロアスコルビン酸の還元によって増強される可能性がある。そのため、Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADP⁺)、Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen (NADPH)、グルタチオンあるいは Diethylenetriamine-N,N,N',N',N"-pentaacetic acid (DTPA) 添加の影響を確認したが、これらの物質は蛍光強度に影響しなかった。

ODS ラットを2つのグループに分け、アスコルビン酸溶液または水 (アスコルビン酸欠乏食) をそれぞれ2週間与え、それらのラットのプラズマ中でアスコルビン酸を測定した。アスコルビン酸溶液を飲ませた ODS ラットのプラズマ中のアスコルビン酸の濃度はずっと一定であったが、アスコルビン酸欠乏食を与えた ODS ラットのプラズマ中のアスコルビン酸のレベルは日を追って著しく減少した (Fig. 5)。ODS ラットはL-アスコルビン酸合成に変異を持つため、L-アスコルビン酸を合成できない。よって、アスコルビン酸欠乏食を与えられた時、組織およびプラズマ中のアスコルビン酸量は減少する。この測定結果はその状況を支持するものである。

また、Naph-DiPy nitroxide を使用した蛍光測定法と HPLC 測定でのプラズマ中のアスコルビン酸レベル間には相関性があった (Fig. 6)。

以上のことから、Naph-DiPy nitroxide を用いることで、生体内のアスコルビン酸を特異的に定量できることが示唆された。

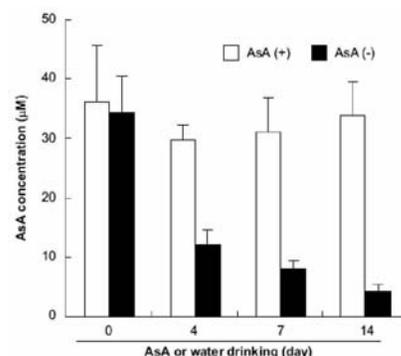


Fig. 5 ODS ラットのプラズマ中のアスコルビン酸測定

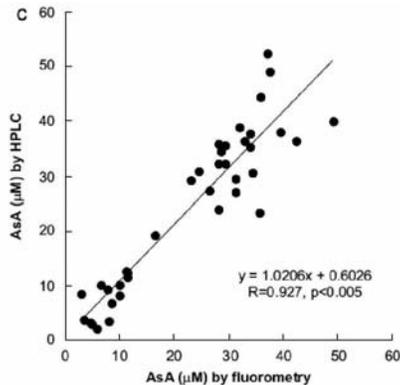


Fig. 6 蛍光測定法と HPLC 測定の相関性

Naph-DiPy nitroxide を使用したアスコルビン酸検出は生体内の様々な物質に影響を受けず、アスコルビン酸を特異的に検出でき、酸化還元法や HPLC 法で必要となるような煩雑な前処理の必要がない。また、サンプル中のアスコルビン酸と直接反応させて検出するため、簡便かつ迅速である。

アスコルビン酸の還元力は酸化ストレス下で減少するため、ニトロキシドの還元の変化は病態を評価する指標となる⁵⁾。一般的に血液中のアスコルビン酸濃度は 23 ~ 85 μM 程度であるため、検出感度としても Naph-DiPy nitroxide は適していると考えられる。近年では、ガンの治療方法として「高濃度ビタミン C 療法」が注目を集めている。その際には病変部の血液中のアスコルビン酸濃度を通常の 1000 倍程度、22 ~ 23 mM に高める必要があるため、血液中のアスコルビン酸濃度をモニタリングすることは非常に重要である。よって、アスコルビン酸を特異的に迅速かつ簡便に定量することができる Naph-DiPy nitroxide は、生理学および病態におけるアスコルビン酸の役割を理解するための有用なバイオプローブとなることが期待される。また、蛍光波長の長波長側への改良など、さらなる発展の可能性を多く秘めている。

[参考文献]

- 1) Y. Matsuoka, M. Yamato, T. Yamasaki, F. Mito, and K. Yamada, *Free Radic. Biol. Med.*, **2012**, 53, 2112-2118.
- 2) Y. Kinoshita, K. Yamada, T. Yamasaki, H. Sadasue, K. Sakai, and H. Utsumi, *Free Radic. Res.*, **2009**, 43, 565-571.
- 3) T. Yamasaki, Y. Ito, F. Mito, K. Kitagawa, Y. Matsuoka, M. Yamato, and K. Yamada, *J. Org. Chem.*, **2001**, 76, 4144-4148.
- 4) T. Yamasaki, F. Mito, Y. Ito, S. Pandian, Y. Kinoshita, K. Nakano, R. Murugesan, K. Sakai, H. Utsumi and K. Yamada, *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 435-440.
- 5) M. Yamato, T. Shiba, K. Yamada, T. Watanabe, and H. Utsumi, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **2009**, 29, 1655-1664.

Fig. 3, 4, 5, 6
Reprinted from *Free Radical Biology and Medicine*, 53, Y. Matsuoka, et al., "Rapid and convenient detection of ascorbic acid using a fluorescent nitroxide switch", 2112, Copyright (2012), with permission from Elsevier.

開発中

内胚葉分化モニタリングキット (仮)

<特長>

- ・内胚葉への分化を特異的に検出できる
- ・細胞を損なわずに継続培養しながら分化状態をモニターすることができる
- ・短時間で多検体の測定が可能である

胚性幹細胞または多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) は、三胚葉 (内胚葉・中胚葉・外胚葉) を経由しあらゆる細胞に分化できるため再生医療の実現化に注目されています。三胚葉のなかでも内胚葉由来の細胞は、膵臓や肝臓といった人にとって重要な機能をもつ臓器へと分化する分岐点に位置するため、効率的な分化誘導、分化度の確認は不可欠です。

分化度の確認には、指標となる mRNA や細胞内タンパク質の発現量を一定期間ごとに測定し、それらの発現量の変化で判断するため、一部の培養細胞を破壊する必要がありました。本キットは、分化した内胚葉由来細胞から培養上清に分泌されるタンパク質を ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 法により検出します。そのため、細胞を継続培養しながら分化の状態をモニターすることができます。また、一度に多検体の測定に用いることができ、分化誘導剤などの薬剤スクリーニングにも有用です。なお、このタンパク質は一般的に内胚葉マーカーとして用いられる Sox17 (*Sry-box containing gene 17*) と相関することも確認しています。ヒト用、マウス用の 2 種類のキットを開発中です。

※本製品は熊本大学発生医学研究所 糸昭苑教授・白木助教・坂野特任助教との共同研究成果です。

第 28 版総合カタログ(2012/2013) 配布中



28 版総合カタログを配布中です。それぞれの試薬の特長や用途を分かりやすく記載しております。プロトコルも操作写真が掲載されており、わかりやすいと好評をいただいております。

カタログのご請求は小社マーケティング部までご依頼ください。その他パンフレット類のご請求も承っております。

Free dial : 0120-489548 free fax : 0120-021557
<http://www.dojindo.co.jp/technical/catalog.html>

近日発売予定

プロテオーム解析用試薬

NTA-SAM Formation Reagent

＜ NTA-SAM 基板の特徴 ＞

1. タンパク質を His-Tag を介して固定化するため、固定化による変性の影響が少ない。
2. イミダゾールや EDTA など His-Tag と Ni-NTA 間の相互作用を解消することで His-Tag タンパク質を脱着できる。(Fig. 3)
3. タンパク質の吸・脱着が可能のため基板を再利用できる。

QCM (Quartz Crystal Microbalance: 水晶振動マイクロバラン) や SPR (Surface Plasmon Resonance: 表面プラズモン共鳴) 等のバイオセンサーに SAM (Self-Assembled Monolayer: 自己組織化膜) を介してタンパク質を固定化する方法のひとつに Ni-NTA (Nitrilotriacetate: ニトリロ三酢酸) を介した His-Tag タンパク質固定化法¹⁾ があります。この “His-Tag” 技術により、複雑な高次構造を持つタンパク質を、その活性を損なわずに固体表面に化学的に結合させることが可能になっています。

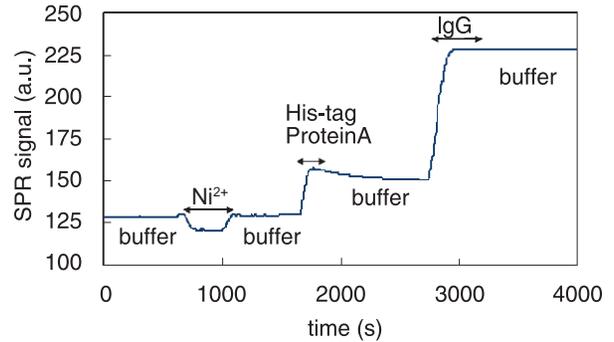
QCM や SPR 以外にも活用されており、SELDI (Surface Enhanced-LDI) -TOF-MS²⁾ は、質量分析法である LDI (Laser Desorption/Ionization) -TOF (Time of Flight) -MS (Mass Spectroscopy) と NTA-SAM を組み合わせ、表面のタンパク質の検出や相互作用の検討が可能です。また、NTA 部位を有する金ナノ粒子を利用して、His-Tag タンパク質を粒子にコートし、目的タンパク質との相互作用を TEM (Transmission Electron Microscope) で高感度に観察する³⁾ など、NTA 表面を利用した様々なアプリケーションが報告されています。

小社では、表面カルボン酸とタンパク質などのアミノ基の結合反応を利用した方法 (Carboxylic acid-SAM Formation Reagent : メーカーコード C488) や Biotin-Avidin の特異的で強力な結合を利用した方法 (Biotin-SAM Formation Reagent : メーカーコード B564) でタンパク質を固定化できる製品をすでに販売しております。これらの製品は、タンパク質を効率的に固定化し、かつ非特異的吸着の少ない SAM を作製できるという特長があることから多くの方にご利用いただいております。更に、今回 His-Tag タンパク質を効率的に固定化し、非特異的吸着の少ないセンサーを作製するための NTA-SAM Formation Reagent を開発いたしました。本製品には、表面に NTA 部位が存在する SAM 形成試薬が含まれており、エタノールに溶解して金基板上にアプライするだけで NTA-SAM を金基板上に形成することができます。

Fig. 1 に本試薬を用いて作製した SPR センサグラムを示します。His-Tag を介し、タンパク質を特異的に結合させることができます。

[参考文献]

- 1) G. B. Sigal, C. Bamdad, A. Barberis, J. Strominger and G. M. Whitesides, "A self-assembled Monolayer for the Binding and Study of Histidine-tagged Proteins by Surface Plasmon Resonance", *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 490.
- 2) T. W. Hutchens and T. T. Yip, "New Desorption Strategies for the Mass Spectrometric Analysis of Macromolecules", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1993**, 7, 576.
- 3) T. Kitai, Y. Watanabe, Y. Y. Toyoshima, T. Kobayashi, T. Murayama, H. Sakaue, H. Suzuki and T. Takahagi, "Simple Method of Synthesizing Nickel-nitrilotriacetic Acid Gold Nanoparticles with a Narrow Size Distribution for Protein Labeling", *Japanese Journal of Applied Physics*, **2011**, 50, 095002-1.



Ni²⁺: 40 mmol/l NiSO₄ aq
 Buffer: 10 mmol/l HEPES (pH 7.5)
 150 mmol/l NaCl, 0.05% Tween20
 His-tag ProteinA: 0.1 mg/ml His-tagged ProteinA in buffer
 IgG: 0.1 mg/ml IgG (Rabbit) in buffer
 EDTA: 10 mmol/l HEPES (pH 7.5)
 150 mmol/l NaCl, 200 mmol/l EDTA

Fig. 1 SPRを用いた Protein A と IgG の特異的結合の検出
 NTA-SAM 表面に Ni²⁺ をキレートさせ、His-tagged ProteinA、続いて IgG を表面に固定した。

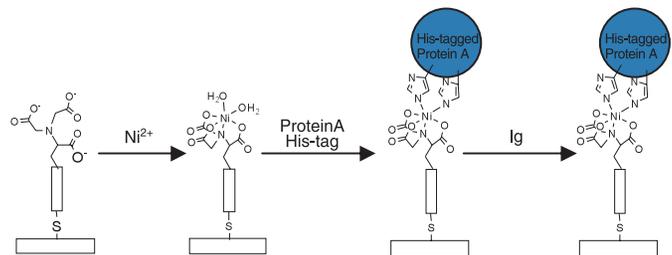


Fig. 2 Protein A と IgG の特異的結合の模式図

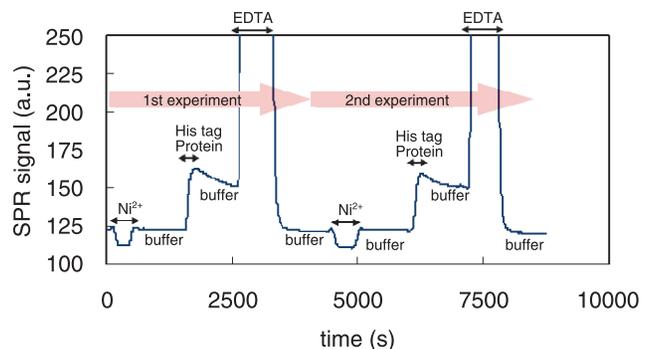
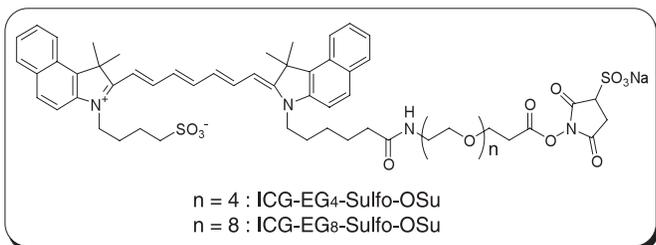
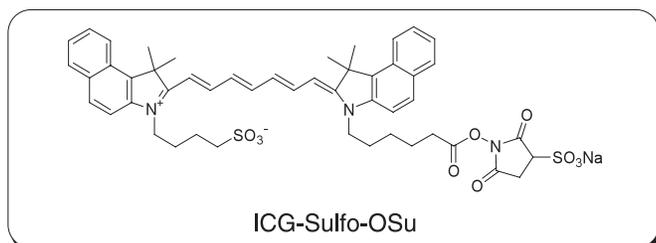


Fig. 3 NTA-SAM 基板のリサイクル性の評価
 NTA-SAM 表面に Ni²⁺ をキレートさせ、His-tagged ProteinA を表面に固定した。続いて EDTA を作用し、ProteinA を脱離させた。この操作を2回連続して行った。

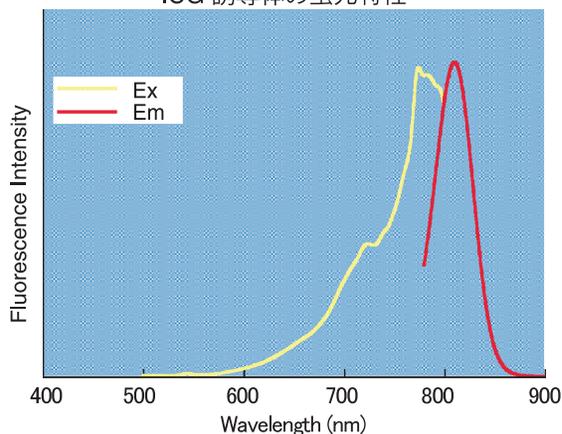
試作品

近赤外蛍光標識試薬

ICG 誘導体



ICG 誘導体の蛍光特性



<特長>

- ・アミノ基選択的に標識できる活性エステル体である。
- ・近赤外蛍光を用いた低バックグラウンド検出が可能である。

ICG (Indocyanine Green) は肝機能、肝予備能検査のための色素負荷試験にも用いられているシアニン色素で、近赤外領域に蛍光を持ちます。励起波長は 774 nm 付近、蛍光波長は 805 nm 付近であり、生体内で用いた場合でもヘモグロビンなどによる妨害を受けにくいという蛍光特性があります。ICG 誘導体は分子内に活性エステルを有しているため、アミノ基を有する分子と混合するだけで安定な共有結合を形成します。また、オリゴエチレングリコールを有する化合物は、水溶性を高めることで非特異吸着をより防ぐことができます。今後、生体内における分子動態は更に注目されていくものと考えられ、近赤外蛍光を利用した *in vivo* 蛍光イメージングへの更なる応用が期待されます。

新製品

金属酸化物表面処理用ホスホン酸誘導体

<特長>

1. 有機シランに比べ、試薬の安定性が高い。
2. 有機シランより、高密度な SAM が形成される (Fig. 1)。
3. 有機シランの SAM よりも、安定な SAM が形成される。

ホスホン酸誘導体は、 Al_2O_3 、 TiO_2 、 ZrO_2 、 SiO_2 、マイカ、ステンレス (SS316L)、ニチノール、ヒドロキシアパタイト、 ZnO 、ITO 等の種々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。これまで用いられてきた有機シラン系の表面処理剤に比べ、多くの利点を有することから、有機半導体デバイスやバイオセンサ、微粒子修飾など様々な分野で応用され始めています。金属酸化物の表面処理には古くから有機シラン系の自己組織化単分子膜 (SAMs) が用いられていますが、安定性が低く、試薬同士の重合が起こるなど必ずしも使い易いものではありません。ホスホン酸誘導体はそれ自身は非常に安定な化合物であるにもかかわらず、有機シラン同様に金属酸化物表面に SAM を形成します。また、ホスホン酸誘導体は有機シランに比べ、密度が高く安定な SAM を形成します。

Schwartz らは、Ti 酸化膜上に 11-HUPA の SAM を形成して蛍光分子を修飾し、ホスホン酸 SAM が有機シランよりも 4 倍高密度で、アルカリ溶液中で安定性が高いことを示しています。有機シランが Ti 酸化膜上に存在する OH 基としか反応できないのに対し、ホスホン酸誘導体は基板にプロトンを提供することで OH を産生し、高密度に結合すると考えられています。

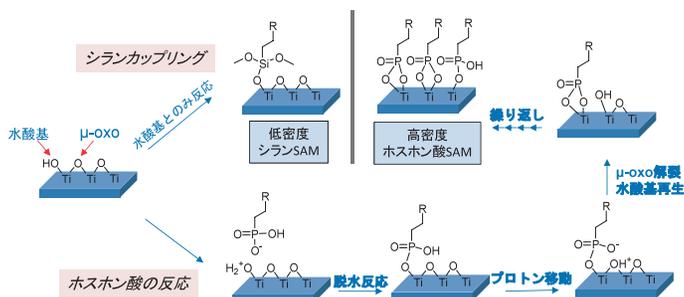


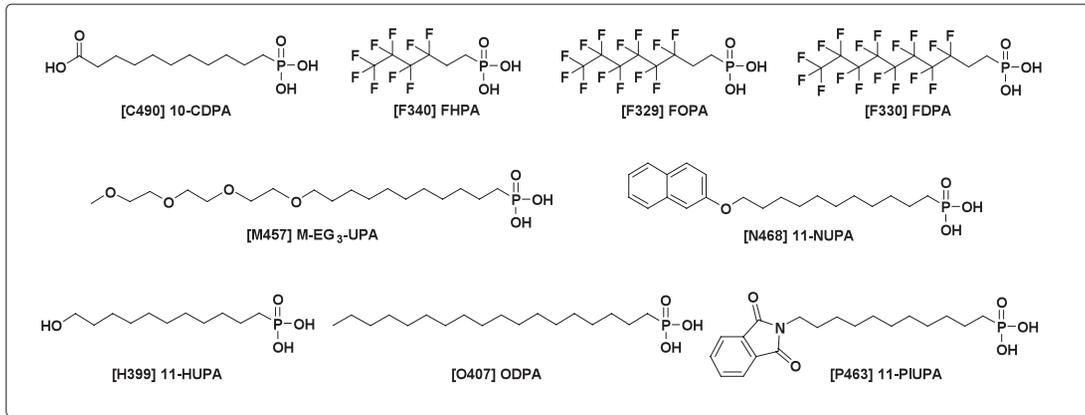
Fig. 1 ホスホン酸誘導体が有機シランより高密度な SAM を形成する理由

<ホスホン酸 SAM 作製例>

1. 基板を界面活性剤水溶液 (0.5% SDS) に浸漬し、20 分間超音波洗浄する。
2. 純水、アセトン、エタノールで順次、20 分間超音波洗浄する*1)。
3. 1 mmol/l ホスホン酸誘導体のエタノール溶液に 1 時間浸漬する。
4. エタノールで洗浄後、窒素で風乾する。
5. 120°C で 1 時間加熱処理する*2)。

*1) 基板の洗浄は、酸素/プラズマ、UV/オゾン処理などで代替できる。

*2) 加熱処理により基板の水酸基とホスホン酸の脱水縮合が進み、SAM が安定化する。



<ホスホン酸 SAM 接触角測定例>

前述の方法で ITO 基板*3)をホスホン酸誘導体で修飾し、水の接触角を測定した例を Table 1 に示す。

製品：FOPA、ODPA、M-EG₃-UPA、11-HUPA、11-PIUPA、10-CDPA、11-PUPA

試作品：MC-PUPA、DF-PUPA、DC-PUPA

* 3) ジオマテック株式会社の FLAT ITO 膜付きガラスを 20 mm x 20 mm に切断したものを使用した。

Table 1 各種ホスホン酸誘導体で修飾した ITO 基板の水の接触

サンプル名	測定 1	測定 2	平均
未洗浄 ITO	58.60	61.70	60.15
洗浄後 ITO	14.80	16.50	15.65
FOPA	83.50	85.40	84.45
ODPA	100.30	100.10	100.20
M-EG ₃ -UPA	67.40	66.90	67.15
11-HUPA	65.00	68.60	66.80
11-PIUPA	71.50	68.20	69.85
10-CDPA	66.20	65.40	65.80
11-PUPA	84.40	84.90	84.65
MC-PUPA	85.40	85.80	85.60
DF-PUPA	79.60	81.80	80.70
DC-PUPA	80.50	84.90	82.70

<有機デバイスへの応用例>

Klauk らや Sekitani らは、Al₂O₃ 上のアルキルホスホン酸 (ODPA) SAM を有機トランジスタの絶縁膜として使用し、トリクロロシラン誘導体よりも密度が高く、有用であることを示しています。また、Kraft らはフッ化アルキルホスホン酸 (FDDPA：試作品) の SAM をゲート絶縁膜として利用して、低電圧有機薄膜トランジスタのしきい値電圧の制御に成功しています。FDDPA はフッ化アルキル鎖の強い電気吸引性のため、アルキルホスホン酸に比べ、しきい値電圧を約 1 V 変化させると報告されています。

更にフッ化アルキル鎖を有するホスホン酸誘導体は ITO の修飾により仕事関数を増加することから、注目を集めています。Sharma らは ITO 基板を 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¹⁰⁾。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 (Fig. 2)。また、FOPA 修飾 ITO を用いて作製した有機 EL デバイスは発光量、駆動電圧ともにより安定で、長寿命化されています。

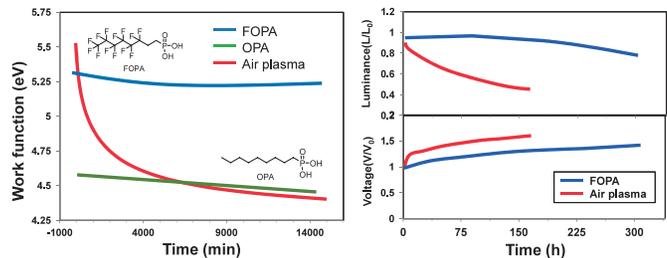


Fig. 2 FOPA により増加した ITO の仕事関数の安定性 (右)、及び FOPA 処理 ITO を用いて作製した有機 EL デバイスの安定性 (左)。

<その他の応用例>

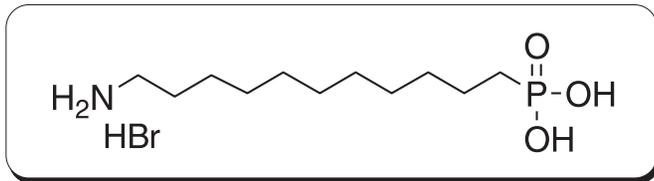
- 有機デバイス以外にも最近様々な応用例が報告されています。
- ITO 基板にアルテヒドとカルボン酸二種類の表面パターンを作製。
- Y₂O₃ 微粒子を修飾し、水溶化。
- ZnO 上に抗体を固定化し、バイオセンサーへの応用。
- ゾルゲル法で作製したアルミナゲルを FDPA で修飾し、超疎水性表面を作製。

品名	容量	希望納入価格 (¥)	メーカーコード
10-CDPA	10 mg	11,000	C490
	100 mg	30,000	
FHPA	10 mg	9,800	F340
	100 mg	28,000	
FOPA	10 mg	9,800	F329
	100 mg	28,000	
FDPA	10 mg	13,000	F330
	100 mg	36,000	
M-EG ₃ -UPA	10 mg	13,800	M457
	100 mg	38,200	
11-NUPA	10 mg	11,000	N468
	100 mg	30,000	
11-HUPA	10 mg	11,000	H399
	100 mg	30,000	
ODPA	10 mg	11,000	O407
	100 mg	30,000	
11-PIUPA	10 mg	11,000	P463
	100 mg	30,000	

新製品

金属酸化物表面処理用ホスホン酸誘導体

11-AUPA



金属酸化物の表面処理には古くから有機シラン系の自己組織化単分子膜 (SAM) が用いられていますが、安定性が低く、試薬同士の重合が起こるなど必ずしも使い易いものではありません。これに対し、ホスホン酸誘導体はそれ自身は非常に安定な化合物であるにもかかわらず、有機シラン同様に金属酸化物表面に SAM を形成します。また、ホスホン酸誘導体は有機シランに比べ、密度が高く安定な SAM を形成すると報告されています。

タンパク質等を金属酸化物基板に固定化するためには、APTS (3-アミノプロピルトリエトキシシラン) のような、末端アミノ基を有する有機シランの SAM がよく利用されます。11-AUPA は APTS 同様に 1 級アミノ基を反応性官能基として有しており、APTS の代替として、より高密度で安定な SAM による表面処理が期待できます。

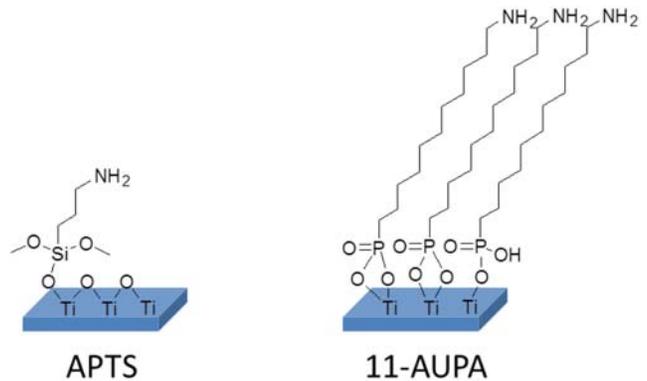
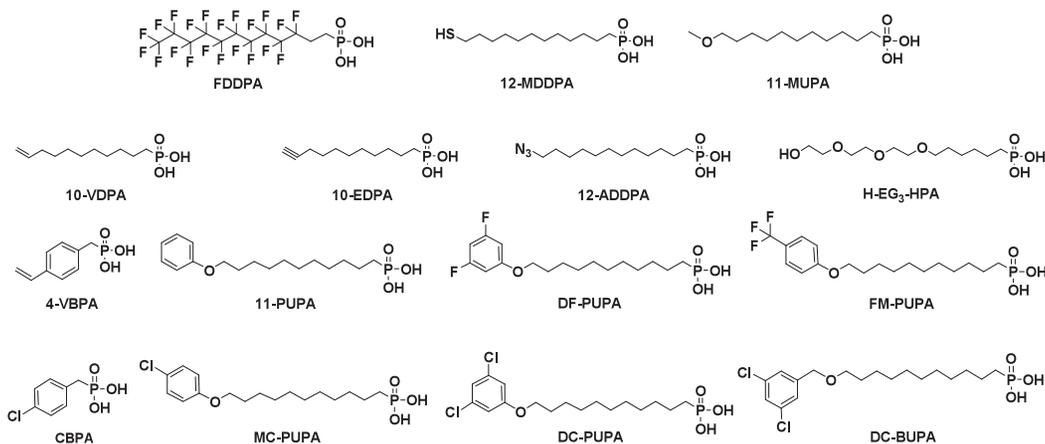


図 TiO₂ 上の APTS と 11-AUPA の形成する SAM の模式図

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
11-AUPA	10 mg	13,800	A517
	100 mg	38,200	

<試作品のご紹介>

同仁化学研究所では様々なニーズに対応できるよう種々の末端官能基を有するホスホン酸誘導体の開発を進めており、下記のような試作品をご紹介します。試作品にご興味、ご要望などありましたら小社までご連絡下さい。



ホームページアドレス
 URL : <http://www.dojindo.co.jp/>
 E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス 0120-021557
 フリーダイヤル 0120-489548