

2013  
No.147

ISSN 0385-1516

**DOJIN**

**NEWS**

ドージンニュース

## CONTENTS

### ●Review

超分子ゲル系化学の新展開  
～分子認識化学との融合による  
ブレイクスルー～

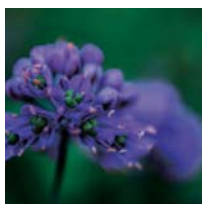
崇城大学工学部ナノサイエンス学科  
田丸俊一・新海征治

### 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)②  
九州大学 中嶋直敏・藤ヶ谷剛彦

### ●Topics on Chemistry

凝集を利用した新規蛍光プローブによる  
生体由来リン酸化合物の turn-on 検出  
株式会社同仁化学研究所 大山 誠



## CONTENTS

### Review

超分子ゲル系化学の新展開 ●———— [1]

～分子認識化学との融合によるブレイクスルー～

崇城大学工学部ナノサイエンス学科

田丸 俊一・新海 征治

### 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）② ●—— [7]

九州大学

中嶋 直敏・藤ヶ谷 剛彦

### Topics on Chemistry

凝集を利用した新規蛍光プローブによる

生体由来リン酸化合物の turn-on 検出 ●—— [13]

株式会社同仁化学研究所 大山 誠

### Commercial

新製品

プロテオーム解析用試薬 ●———— [14]

金属酸化物表面処理用ホスホン酸誘導体 ●———— [18]

試作品

近赤外蛍光標識試薬 ●———— [16]

内胚葉分化モニタリングキット ●———— [17]

開発中

硫化水素研究用試薬およびキット ●———— [15]

### お知らせ

第24回フォーラム・イン・ドージン開催 ●———— [16]

## 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-EG<sub>3</sub>-UPA

11-HUPA

11-NUPA

ODPA

11-PIUPA

プロテオーム解析用試薬

NTA-SAM Formation Reagent

## 超分子ゲル系化学の新展開 ～分子認識化学との融合によるブレイクスルー～

## Innovations in Supramolecular Gel Chemistry realized by the fusion with Molecular Recognition



田丸 俊一

崇城大学工学部ナノサイエンス学科



新海 征治

崇城大学工学部ナノサイエンス学科

## Abstract

Interest in stimuli-responsive materials has persevered over several decades and in the last decade, the remarkable progress to develop environmentally sensitive macromolecules and supramolecular architectures has been achieved toward the construction of a new class of smart materials. The supramolecular gels possessing the molecular recognition triggered stimuli-responsiveness are strong candidates to develop the stimuli-responsive soft materials. This review describes our recent findings relating with the development and applications of the stimuli-responsive supramolecular gel as follows; 1) controlling the gel-to-sol phase transition utilizing the crown-alkali metal interactions, 2) creation of thixotropic gels applicable to a memory-erasing recycle system, 3) colorimetric sensing of the positional isomers of dihydroxynaphthalene in a supramolecular gel matrix, 4) guest-induced controlling of thixotropy, and 5) functionalization of the polymer gel system on the bases of molecular recognition.

## 1. はじめに

ゲルは、例えばこんにやくなどの食品としてもなじみ深い、最も身近な素材の形態の一つである。古くからの定義では、ゲルとは複数成分の組成を持つ凝集体の分散系であり、固体の特徴を持つ力学的挙動を示し、分散質・分散媒のいずれもが試料全体に連続的に広がっているもの、とされる<sup>1)</sup>。一般的に分散質であるゲル化剤は分散媒（溶媒）中で緻密な繊維状ネットワークを形成し、このネットワーク内に溶媒を取り込むことで、全体として固化している。ゲルには様々な分類の方法があるが、全ての分散質が共有結合によって三次元的に結ばれたものは化学ゲルと呼ばれる。化学ゲルは安定な共有結合によって架橋されているため、一般的に物理的に堅固で脆いゲルが形成し、ゲル形成過程は不可逆である。これに対して、分散質が非共有結合によって架橋されているものを物理ゲルと呼ぶ。物理ゲルは温度などの外部刺激によって架橋点が解離できるため、ゾル-ゲル間の相転移が可逆的に進行する。

超分子ゲルは物理ゲルの代表的な系のひとつであるが、一般的に分子量が数百程度の小分子が溶媒中で非共有結合により集積した繊維状会合体を形成し、これが絡み合うことでゲルを形成する。このようなゲルは元々、小分子を再結晶操作によって精製する際に期せずして形成してしまう「厄介者」として見出されていた。それでも、1990年代になると、超分子ゲルも徐々に研究対象として注目を集め、その形成機構やゲルを形成する超分子会合体（非共有結合的に集合した、明確な規則構造を持つ分子組織体）の構造の解明を中心とした研究が進められるようになってきた<sup>2)</sup>。その後それらの研究から得られた知見を基に、近年では物理ゲルとしての特徴を大いに活用して、様々な刺激応答型材料の構築が精力的に進められている。

一方、分子認識化学（ホスト-ゲスト化学）は C. J. Pedersen によるクラウンエーテルの開発（1967年発表）<sup>3)</sup>に端を発し、現在も各分野で精力的に研究が進められている、古くて新しい研究分野である。分子認識化学における根底的な理念は、「特定の標

的（ゲスト）に対する高選択的な捕捉」であり、このゲスト捕捉過程において化学・物理変化が誘起されれば、例えば標的ゲスト捕捉を色調変化により高感度に読み出すようなセンサへの応用に繋がる。このために、良好なホスト分子にはゲストとの錯形成に連動して、特定の物理的・化学的な変化が誘起されるような分子設計が求められる。

超分子ゲルおよび分子認識化学に関する研究は、ともにここ20～30年の間に勃興して急速に成長した分野であるが、それぞれを見比べてみるとお互いが極めて相性が良い研究課題であることに気づく。すなわち、超分子ゲル化剤を設計するに当たって、ゲスト捕捉前後でそのゲル形成能に摂動を与えるホスト部位を分子内に効果的に導入することで、ゲストの捕捉・解離をトリガーとしたゲル状態の変化（たとえばゾル-ゲル相転移の制御）が実現できると考えられる。このようなシステムは分子認識という分子レベルで進行する極めて微弱な変化を、ゾル-ゲル相転移というヒューマンサイズのマクロな変化に増幅できるため、高感度な分子センサ開発にも応用することが可能である。本稿では、以上のような超分子ゲルと分子認識の融合により達成した超分子ゲル研究の新展開について、当グループが近年発表した研究成果<sup>4)</sup>を紹介しながら解説する。

## 2. 分子認識を利用した超分子ゲルの機能制御

前述のように、クラウンエーテルは分子認識化学における最も古典的なホスト分子であり、環サイズに適合する金属イオンを選択的に捕捉する。この過程で、本来中性のクラウンエーテルがカチオン性の金属錯体となり、結果として錯形成前後での分子全体の極性（溶解性）が大きく変化する。一方、 $\pi$ 共役系オリゴマーはその豊富な $\pi$ 電子の存在により導電性材料などの電子材料としての応用が可能であるばかりでなく、光吸収特性、発光特性を利用した応用展開も可能である。これらの分子は共役系が拡張するほどに $\pi$ - $\pi$ スタッキングを主な駆動力とした自己会合力が増強される。よって適度な $\pi$ 共役系の拡張は分子集積に優位に働くが、



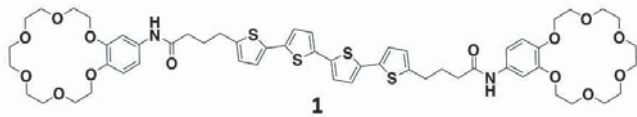


図2 キラルゲスト添加に伴う1の会合状態の変化の概念図

過度の拡張は分子の溶解性を著しく低下させる結果となる。そこで、 $\pi$ 共役系オリゴマーに溶媒への溶解性を付与し、かつ分子認識部位として機能し得るクラウンエーテル骨格を導入したオリゴチオフェン型 $\pi$ 電子系小分子を合成し、その分子集合過程の精密な制御および外部刺激による分子集積体の形態・機能変換について検討した。

スペーサー部位に水素結合部位としてアミド基を導入したベンゾクラウンエーテル型の分子(1)は種々の有機溶媒とクロロホルムの混合溶媒に対して良好なゲル形成能を示すことが明らかとなった<sup>5)</sup>。形成するゲルは $K^+$ および $Cs^+$ の添加に伴ってゲルの安定性が低下した。興味深いことに、このゲル強度の変化は1と金属イオンのモル比に鋭敏に反応していた。すなわち、ゲルの不安定化は添加量が1:金属イオン=1:1に至ったところで劇的に進行し、ゾルへの相転移が誘発されることが確認された。一次元構造のゲル組織の中で、クラウン/金属イオン錯体が空のクラウンに挟まれている間はその構造は安定であるが、1:1のモル比を越えると隣にもクラウン/金属イオン錯体が存在することになり、静電反発でゲルの不安定化が誘起されるものと考えられる。顕微鏡観察結果から、この相転移に伴って、超分子ゲル繊維の消失が確認されたことから、クラウンエーテル部位と金属カチオンの錯形成に伴って、1の溶解性が向上し、その結果相転移が誘起されたと考えられる。この超分子ゲル系は、特定の金属カチオン濃度に閾値応答を示す鋭敏なセンサシステムへの応用が期待される。

さらに、化合物1が形成するゲルは、シクロヘキサン-1,2-ジアンモニウムのようなキラルなビスアンモニウム型のゲスト分子の添加に伴って、円二色性(CD)活性となることが明らかとなった<sup>6)</sup>。キラルなモノアンモニウム型分子共存下ではCDが発現しないことから、ビスアンモニウムとクラウンが相互作用することにより2分子の1がキラル配向することで、ゲルがCD活性になるものと理解される。また、ゲルが示すCD強度はビスアンモニウム型分子の添加に伴って上昇し、クラウンエーテル部位とアンモニウムカチオンの量論比が等しくなる1:ビスアンモニウム=1:1までの添加で飽和することが確認された。このことから、 $K^+$ 添加時と同様に、ゲストのアンモニウムカチオン部位はクラウンエーテルと一対おきに錯形成していることが示唆された。

興味深いことに、ゲスト不在下でのゲルは物理的振動による破壊に対して不可逆であり、ゲルを自己修復(self-healing)することはないのに対して、ビスアンモニウム型のゲスト分子存在下では物理的破壊に対して可逆的にゲルが修復・再形成する「チキソトロピー性」を獲得することが明らかとなった。しかし、再形成したゲルには破壊前に存在したCD活性が消失していた。この結果は、次のように考察される。熱的に溶解した後冷却に伴って形成するゲルは熱力学的に安定化されるため、ビスアンモニウム型ゲストのキラリティーを反映した1の配向が生まれCD活性となる。一方、物理的振動による破壊の後、自己修復を経て再形成したゲルは動力学的に安定化されるため、ビスアンモニウム型ゲストのキラリティーの反映に乏しい無秩序なものとなる。このような「熱モード」と「振動モード」による変換は、本系がメモリーとして有用なことを示している。

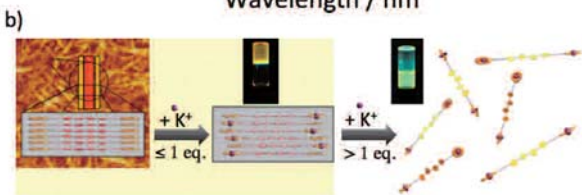
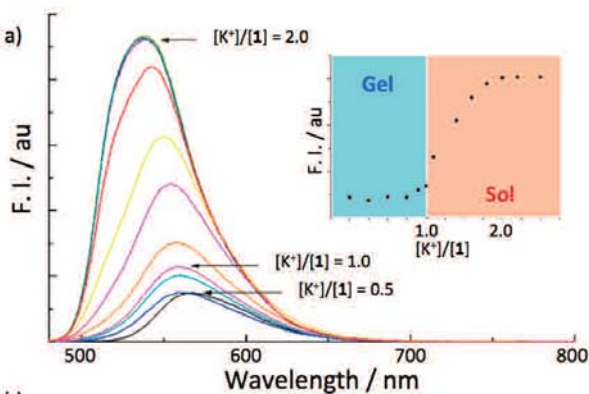


図1 a) KOAc 添加に伴う1のゲル(0.25 wt%、エタノール/クロロホルム(8:2))の蛍光スペクトルと575 nmにおける蛍光強度変化。b) KOAc 添加に伴うゾル-ゲル相転移の概念図

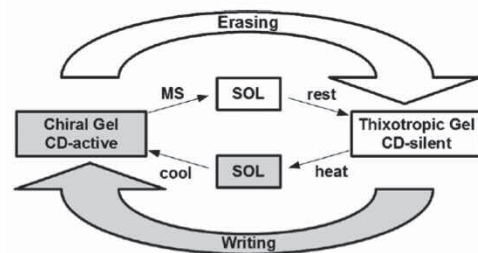


図3 1のゲルが示す外部刺激応答性とキラルメモリー機能

### 3. 超分子ゲル系で見出された特異な分子認識様式

ナフタレンジイミドもまた広い $\pi$ 共役平面を有し、 $\pi$ - $\pi$ スタッキングによる一次元的会合体を発現する分子である。このナフタレンジイミドの両端にアミド結合を介してアルコキシ没食子酸骨格を導入した分子2-1は、様々な有機溶媒に適用可能な良好な有機ゲル化剤として機能する。我々はこの有機ゲルがチキソトロピー性を発現することを見出し、その発現機構を明らかにしてきた<sup>7)</sup>。さらに興味深いことに、ゲル系では特異な分子認識能が

発現することが見出された<sup>8)</sup>。1,5-ジメトキシナフタレンとナフタレンジイミドは良好なドナー・アクセプター関係にあり、溶液中でも選択的に相互作用し、特有の色調を呈することが知られている。ところが、1,5-ジメトキシナフタレンもしくはその類縁体不在・共存下で形成するシクロヘキサゲルでは、一切の色調変化が観測されなかった。これは**2-1**にゲル形成能を付与する目的で導入したアルキル鎖やアミド基が効率よく van der Waals 相互作用や水素結合を形成し、その結果として**2-1**の自己会合力が1,5-ジメトキシナフタレンとのドナー・アクセプター型の複合体形成力を凌駕したため、本来の分子認識が発現しなかったものと考えられる。このように、ゲル形成を伴う本系では極めて強力なセルフソーティング（自己識別・他者排除）機構が発現していることが判る。

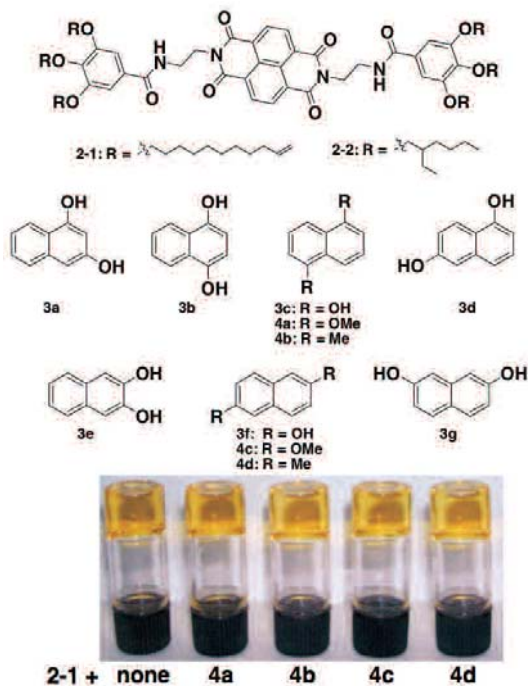


図4 **4a**～**4d** 不在/共存下での**2-1**のシクロヘキサゲル (3.5 mM) の状態

そこで、このゲル化剤が持つ自己会合能と競合できるゲスト分子として、環境汚染物質としても知られる一連のジヒドロキナフタレンに着目した。ジヒドロキナフタレンは、1,5-ジメトキシナフタレンのメトキシ基を水酸基に変えただけのものであるが、これによってメチル基による立体障害の緩和と水酸基による水素結合形成能の付与が期待できる。**2-1**のヘキサゲルに2,6-ジヒドロキナフタレン(**3f**)を添加したところ、CT錯体に典型的な青紫色を呈した。電荷移動錯体に対応する600 nmの吸光度変化は**2-1**に対する**3f**のモル比が1:1に至った時点で飽和したことから、このゲル系でのCT錯体は1:1の化学量論比を持つことが確認された。次に、水酸基の導入位置が異なる様々のジヒドロキナフタレンを添加すると、それぞれ異なる色調を示した。興味深いことに、ゲル形成能を有しない**2-1**の類縁体(**2-2**)の溶液に同濃度のジヒドロキナフタレンを添加しても、わずかな色調変

化が観測されるにとどまった。以上のように、本系ではゲル化剤が持つ自己会合能に調和できるゲスト分子のみを高選択的に識別できるが、この発現機構はDNA系に見られるインターカレーションに類似性を見出すことができる。

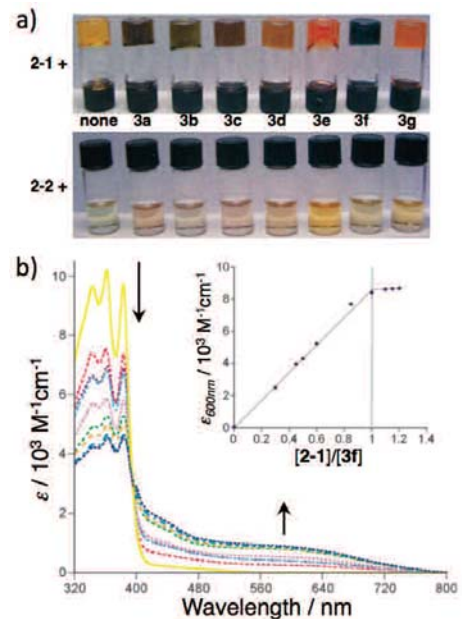
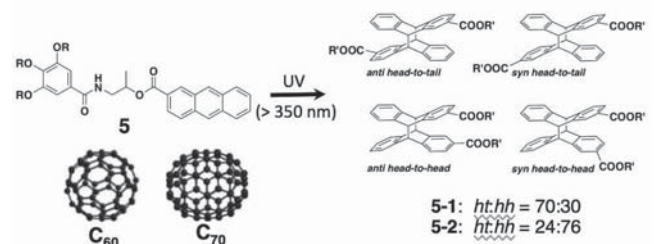


図5 a) 各種ジヒドロキナフタレン不在/共存下での**2-1**のシクロヘキサゲル (3.5 mM) および**2-2**のシクロヘキサゲル/クロロホルム (1:1) 溶液の色調変化。b) **3f**添加に伴う**2-1**のシクロヘキサゲル (3.5 mM) の吸光スペクトルと600 nmにおける吸光度変化。

#### 4. 分子認識によるチキソトロピー性の制御



ここまでで紹介してきた超分子ゲル系はいずれもチキソトロピー性を発現することが確認されているが、そもそもチキソトロピー性の発現は特異な現象であり、その発現機構などについては未知な部分が多い。我々は、このチキソトロピー性を分子認識によって制御することに成功している<sup>9)</sup>。アントラセンにアミド結合を介してアルコキシ没食子酸骨格を導入した化合物 **x** は飽和炭化水素系溶媒をゲル化するが、この超分子ゲルはチキソトロピー性を示さない熱可逆的な物理ゲルである。興味深いことに、**5**を光二量化して得られる構造異性体混合物**5-2**はゲル形成を喪失してしまうのに対して、**5-2**とは異なる混合組成を持つ**5-1**はチキソトロピー性を有する超分子ゲルを形成することが明らかとなった。走査型電子顕微鏡観察結果から、**5-1**は二次的に集合した



ディスク状の一次会合体を形成し、これが経時的に積層することで一次元的な超分子ファイバーを二次会合体として形成していることが明らかとなった。さらに、このゲルを物理的に破壊して得られるゾル中には二次会合体である超分子ファイバーが消失し、ディスク状の一次会合体が再形成していることが確認された。

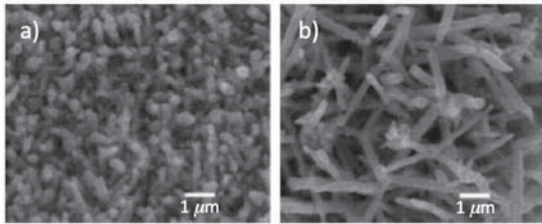


図6 5-1が形成するデカリンゲル(1.5 wt%)の超分子ファイバー構造。a) 50°Cで調製したゲル。b) 20°Cで調製したゲル。

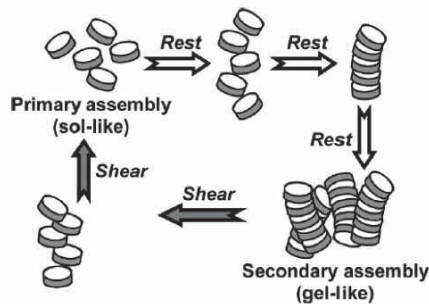


図7 5-1のデカリンゲル超分子ファイバーにおける物理破壊と自己修復過程の模式図

5-1が形成するゲルのチキソトロピー性は、フラレンをゲストとすることで制御することができた。前項で議論したように、ゲル化剤と強く相互作用する分子は、ゲル化剤の一次元的な会合形成を阻害するため、ゲル形成を強く阻害する。よって、チキソトロピー性を制御する目的で使用されるゲスト分子には、1) ゲル化剤と適度に相互作用し、2) ゲル化剤の自己会合様式を大きく変化させることがない、という点が求められる。その点、フラレンはその球状の分子構造がアントラセン二量体を持つ湾曲したπ平面に良く適合しており、非極性の有機溶媒中で適度な強度のvan der Waals相互作用を形成すると期待される。また、フラレン分子そのものは極めて等方性の分子であり、ホストと相互作用する上で分子の方向性を考慮する必要がない。つまり、フラレンを捕捉するためには、「ゲスト捕捉に有効な特定の相互作用を特定の位置に正しい向きに配置する」という予備組織化をそれほど必要としない。このことにより、フラレン分子はゲル形成においてホスト分子(ゲル化剤)の自己会合を著しく阻害せず、適度なvan der Waals相互作用を形成できる位置におとなしく捕捉されると考えられる。さらに、外部からの物理的破壊によって分子配列が乱されても、フラレン自身はその前後であまり影響を受けない(分子配向が変わっても事実上何の変化もない)ので、ゲルの物理破壊後のゲル組織修復過程で効率よく機能すると考えられる。実際に5-1にC<sub>60</sub>またはC<sub>70</sub>を混合したところ、チキソトロピー性を保持した超分子ゲルが形成した。このゲスト混合ゲル

を物理的に破壊しその回復過程を経時的に調査したところ、興味深いことに、ゲスト不在条件よりもより早いゲル状態の回復が確認された。この自己修復過程はC<sub>70</sub>混合時に最も早く、C<sub>60</sub>混合時にはそれよりも若干遅かった。以上のように、超分子ゲルのチキソトロピー性を分子認識的に制御することに成功し、さらに本戦略が、ゲストの選択性を自己修復過程の差として読み出す新しいタイプのセンサとしての応用に繋がることを明らかにした。

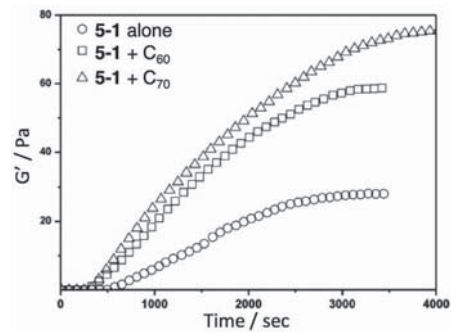


図8 C<sub>60</sub>およびC<sub>70</sub>存在、不在下で5-1のシクロヘキサゲル(1.8 wt%)が物理破壊後の自己修復過程で示す貯蔵弾性率変化(G')の時間依存性

## 5. 分子認識化学の高分子物理ゲルへの応用

小分子が自己会合して形成する超分子ゲルは、弱い分子間相互作用を基調としているため、外部刺激に対して鋭敏であり、刺激応答型のソフトマテリアル開発に極めて有望である。一方、高分子を基調とするゲルは、ゲル化剤となる高分子鎖を合成する際に多様な機能(感温性、感光性、イオン性など)を盛り込むことができるため、多機能性のゲルを生み出すのに有用である。これら

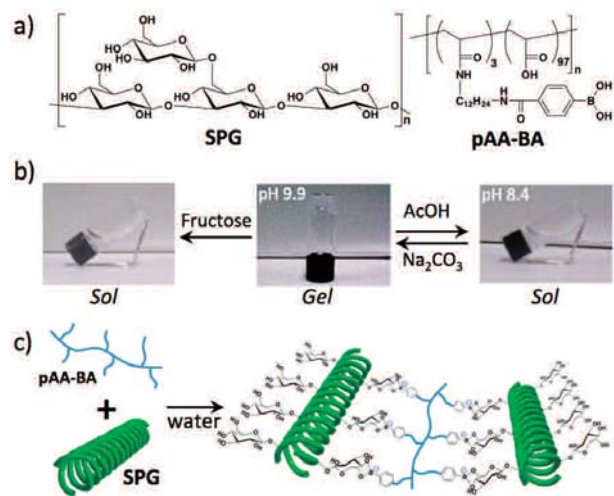


図9 a) SPGとpAA-BAの構造。b) SPG/pAA-BAヒドロゲル(SP/pAA-BA = 5 gL<sup>-1</sup>/3.5 gL<sup>-1</sup>)のpH応答的相転移とフルクトース添加に伴うゾル化。c) SPGとpAA-BAが形成する架橋構造の模式図。

両者の特徴を併せ持つゲル系では多様な機能設計が可能であり、特に分子認識化学を盛り込んだ多機能性物理ゲルの創出に繋がると期待される。そこで先ず我々は、近年特異な分子捕捉能を発現する天然高分子として様々な応用例を報告してきたらせん性多糖類・ $\beta$ -1,3-グルカンを、分子認識機能を持つ物理ゲルへと発展させる研究を進めた。

カードラン (CUR)、シゾフィラン (SPG) に代表される $\beta$ -1,3-グルカン類は三重らせん構造を有する天然多糖類である。我々のグループではすでに、このらせん構造の内部に疎水性相互作用を駆動力としてカーボンナノチューブ (CNT) などの機能性高分子を取り込むことが可能であること、更に DNA などのらせん性高分子との共らせん形成による複合化が可能であることを報告している<sup>10)</sup>。これらを物理ゲル系へと展開するために、我々は SPG の側鎖のグルコースに着目した。我々のグループではすでに、フェニルホウ酸とシスジオールが pH 依存的に可逆的な共有結合を形成することを利用して、糖分子を識別するフェニルホウ酸型分子センサを数多く報告してきた<sup>11,12)</sup>。そこで、SPG の側鎖間をフェニルホウ酸による分子認識によって架橋することで、pH 応答によりゾル-ゲル相転移を発現する高分子物理ゲルを開発した<sup>13)</sup>。架橋剤には側鎖にフェニルホウ酸部位を導入した (導入率 3%) ポリアクリル酸 (pAA-BA) を採用した。SPG と pH 9.9 の水中で混合したところ、透明なヒドロゲルが形成した。このゲルをホウ酸-ジオール間の結合が解裂する pH 8.4 にすると、速やかにゾルへと相転移を起こした。ゾルへの相転移は、単純なシスジオールよりもホウ酸の有効なゲストとなり得るフルクトースを系中に添加することでも誘起された。以上のゾル-ゲル相転移現象は、このゲル形成が SPG 側鎖のグルコースユニットとポリアクリル酸上のフェニルホウ酸間の分子認識によるものであることを示している。さらに、SPG が持つ CNT 認識能を利用することで、水中でありながら著しく疎水性である CNT が網目状に分散した超分子ヒドロゲルの構築にも成功した。

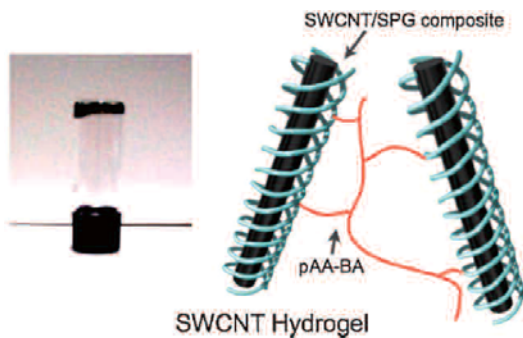


図 10 単層カーボンナノチューブ (SWCNT) 包摂 SPG と pAA-BA の架橋によって形成した、SWCNT 分散ヒドロゲル。

シクロデキストリンはその内部空孔に適合した疎水性分子を選択的に取り込んで錯形成する。この分子認識を利用して、CUR の側鎖にシクロデキストリン (CD) を導入した CD-CUR とアゾベンゼンを導入したポリアクリル酸 (pAC<sub>12</sub>-Azo) を混合することで、超分子ヒドロゲルの形成に成功した<sup>14)</sup>。アゾベンゼンは UV 光を照射することでトランス型からシス型へと構造変換され、

さらに可視光を照射することでトランス型に戻るが、シス型アゾベンゼンは立体障害により CD に包摂されないため、UV 照射後の pAC<sub>12</sub>-Azo は CD-CUR と錯形成できない。そこで、CD-CUR と pAC<sub>12</sub>-Azo が形成した超分子ゲルに UV 光 (365 nm) を照射したところ、予想通りゾルへの相転移が誘起され、さらに可視光を照射することでゲル状態を復活させることに成功した。このような相転移は繰り返し可能であることも確認された。

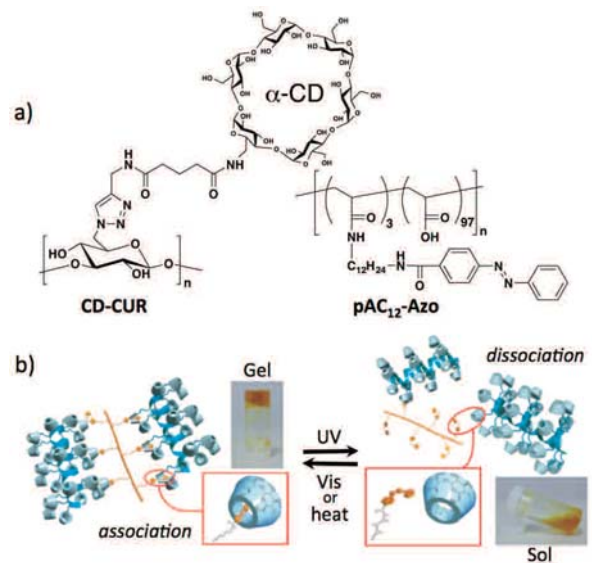


図 11 a) CD-CUR と pAC<sub>12</sub>-Azo の構造。b) CD によるアゾベンゼンの包摂を架橋点とした CD-CUR/pAC<sub>12</sub>-Azo ヒドロゲル形成と光照射によるゾル-ゲル相転移制御の模式図

## 6. 分子認識能を持つ高分子化学ゲル

化学ゲルはゲル組織全体が共有結的に架橋されているため、基本的に物理ゲルよりも外部刺激応答に鈍く、特に外部刺激によりゾル-ゲル相転移を誘起することは困難である。しかし、十分な柔軟性をもつゲル組織を構築することで、分子認識に伴う状態変化を引き起こすことが可能となる。オクタデシルアクリル酸エステルと *p*-ニトロフェニルチオ尿素骨格を持つアクリル酸エステル、および架橋剤となるエチレングリコールジメチルアクリル

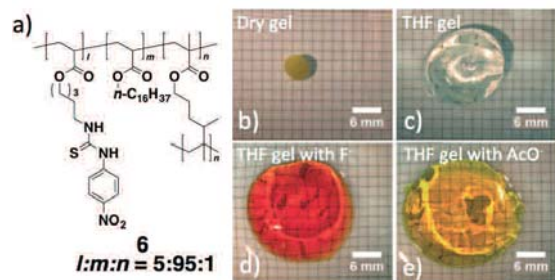


図 12 a) 架橋ポリマー 6 の構造。b) 6 の乾燥状態。c) 6 の THF ゲル。d) フッ化 TBA 共存下で形成する 6 の THF ゲル。e) 酢酸 TBA 共存下で形成する 6 の THF ゲル。

酸エステルを 95 : 5 : 1 の比でベンゼン・メタノール混合溶液中にて混合し、ラジカル重合反応を行うことで架橋ポリマー **6** を合成した<sup>15)</sup>。この架橋型ポリマーを乾燥させた後 THF に浸すと、溶媒を吸収し大きく膨潤することが確認された。さらにここに種々のアニオンのテトラブチルアンモニウム (TBA) 塩を共存させたところ、特にフッ素アニオン、または酢酸アニオンが共存条件下でさらなる膨潤によるゲルの肥大化が観測された。さらに興味深いことに、得られた膨潤ゲルはそれぞれ特有の赤色もしくは黄色を呈した。このような色調の発現はアニオン種が *p*-ニトロフェニルチオ尿素骨格と水素結合形成したことを示している。

## 7. おわりに

以上のように、分子認識化学と超分子ゲルの融合は、特に刺激応答型のソフトマテリアルを開発する上で極めて有効な戦略である。刺激応答型のソフトマテリアルは、高感度な分子センサの開発に役立つだけでなく、薬物輸送システムのような特定条件下での刺激応答とそれに伴う薬効の発現を実現する上で極めて有用な素材である。また、生体内分子に対する分子認識機構を盛り込んだソフトマテリアルは、上記のような薬剤としてはばかりでなく、疾病の早期発見を助ける診断剤の開発にも有用である。今後、様々なゲストに対する分子認識能を有する超分子ゲルの開発と、ゾル-ゲル相転移に代表される状態変化を活用した新しい分子システムが構築されることで、工業的・医療的な視野に留まらず広く応用される超分子ゲルシステムの開発が望まれる。

### [参考文献]

- 1) P. H. Hermans, *Gels in Colloid Science, Vol. II*, 483, Elsevier Pub. Inc., New York, (1949).
- 2) 杉安 和憲, 藤田 典史, 新海 征治, 有機合成化学協会誌, **2005**, 63, 359.
- 3) C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 7017.
- 4) A. Dawn, T. Shiraki, S. Haraguchi, S. Tamaru and S. Shinkai, *Chem. Asian J.*, **2011**, 6, 266.
- 5) A. A. Sobczuk, S. Tamaru and S. Shinkai, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 3093.
- 6) A. A. Sobczuk, Y. Tsuchiya, T. Shiraki, S. Tamaru and S. Shinkai, *Chem. Eur. J.*, **2012**, 18, 2832.
- 7) P. Mukhopadhyay, N. Fujita, A. Takada, T. Kishida, M. Shirakawa and S. Shinkai, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 6338.
- 8) P. Mukhopadhyay, Y. Iwashita, M. Shirakawa, S. Kawano, N. Fujita and S. Shinkai, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 1592.
- 9) A. Dawn, T. Shiraki, H. Ichikawa, A. Takada, Y. Takahashi, Y. Tsuchiya, L. T. N. Lien and S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 2161.
- 10) K. Sakurai, K. Uezu, M. Numata, T. Hasegawa, C. Li, K. Kaneko and S. Shinkai, *Chem. Commun.*, **2005**, 4383.
- 11) T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake and S. Shinkai, *Nature*, **1995**, 374, 345.
- 12) T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake and S. Shinkai, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1996**, 35, 1910.
- 13) S. Tamesue, M. Numata and S. Shinkai, *Chem. Lett.*, **2011**, 40, 1303.
- 14) S. Tamesue, Y. Takashima, H. Yamaguchi, S. Shinkai and A. Harada, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 7461.
- 15) J. Krishnamurthi, T. Ono, S. Amemori, H. Komatsu, S. Shinkai and K. Sada, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 1571.

### [著者プロフィール]

氏名：田丸 俊一 (Shun-ichi Tamaru)  
 所属・職位：崇城大学工学部ナノサイエンス学科准教授  
 連絡先：〒 860-0082 熊本市西区池田 4-22-1  
 TEL&FAX : 096-326-3494  
 E-mail : stamaru@nano.sojo-u.ac.jp  
 出身大学：九州大学  
 学位：博士 (工学)  
 専門：分子集積化学、高分子化学、分子認識

氏名：新海 征治 (Seiji Shinkai)  
 所属・職位：崇城大学工学部ナノサイエンス学科教授  
 九州先端科学技術研究所所長  
 九州大学高等研究院特別主幹教授  
 九州大学名誉教授  
 連絡先：〒 860-0082 熊本市西区池田 4-22-1  
 TEL : 096-326-3111  
 E-mail : shinkai\_sj@nano.sojo-u.ac.jp  
 出身大学：九州大学  
 学位：博士 (工学)  
 専門：超分子化学、分子認識、機能性高分子

## 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>



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)  
②

中嶋直敏、藤ヶ谷剛彦  
九州大学

1. カーボンナノチューブ(CNT)の可溶化

1-1. 可溶化の重要性

前回紹介したように、CNTは突出した特性、機能をもつ1次元導電性分子ナノワイヤーであるが、固体状態ではファンデアワールス力等により束(バンドル)構造体を形成し、水や汎用の溶媒には極めて分散困難である。超音波照射により一部分散するが、水や有機溶媒はCNTを十分に溶媒和できないため、超音波照射を止めると、すぐさまバンドル状態に戻ってしまう。CNTを可溶化するためにはCNTの溶媒和が必要になる。これに対して2つの手法を用いる。1つは、「化学修飾法(化学修飾可溶化)」でありもう一方は「物理修飾法(物理修飾可溶化)」である(図1)。

可溶化によりCNTの利用、応用は飛躍的に広がる。CNTの可溶化はCNTの基礎研究、応用研究へのキーサイエンス・テクノロジーとして重要な意味を持つ。

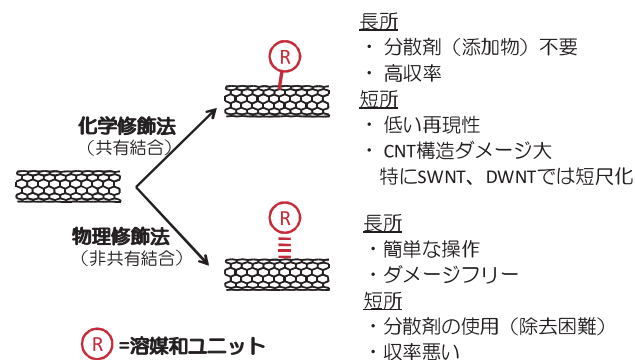


図1 可溶化法の分類

1-2. 一般的な溶媒による分散

可溶化剤なしでCNTを分散できる溶媒がある。N-メチルピロリドン(NMP)が良く分散できる溶媒である。DMFやDMSOも比較的分散できる。NMPはCNTのみならず、グラフェンも分散でき<sup>33, 34)</sup>、ナノカーボン分散には特別な「マジックソルベント」とも呼べる溶媒である。しかしながら、これら有機溶媒中での分散は一時的なものであり、CNT長さ等にも依存するが、時間とともに凝集する。したがって安定的な分散には以降に述べる積極的な溶媒和の導入処理が必要となってくる。

1-3. 化学修飾可溶化(共有結合による可溶化処理)

溶媒和を可能にする官能基を共有結合でCNTに導入する手法である。これまでに実に多種多様な化学修飾法が報告されており、すでに総説<sup>1-2)</sup>にまとめられているので参照して頂きたい。共有結合による化学修飾は、修飾の度合いにもよるが、CNTを形成する結合を切断するのでCNTがもつ本来の性質が失われる可能性がある。

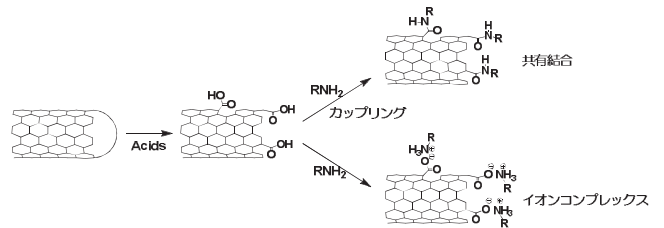


図2 酸処理による化学修飾法

最も一般的なアプローチは、CNTの強酸処理による表面酸化である(図2)。強酸(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HNO<sub>3</sub>=3/1 v/v、40~70°C)にCNTを加え、超音波(例えばバス型超音波装置)を照射すればCNT表面にカルボン酸が導入された酸化CNTが生成する。導入されたカルボン酸は水への親和性を高め、水への分散を可能にするばかりでなく、さらなる化学修飾の足場とすることもできる。すなわち、酸化CNTを塩化チオニルと反応させたのち、アルキルアミンやアルキルアルコールと反応させれば、有機溶媒に溶解する化学修飾CNTが得られる。ポリエチレングリコール等の水溶性官能基を持つアミンやアルコールと反応させれば水に溶解するCNTが合成できる。また、酸化CNTを足場として重合を行うまたは高分子末端と酸化CNTを結合させることでCNT/高分子複合体を作製することも可能である。しかし「過剰の酸化」による構造欠陥生成に注意が必要である。

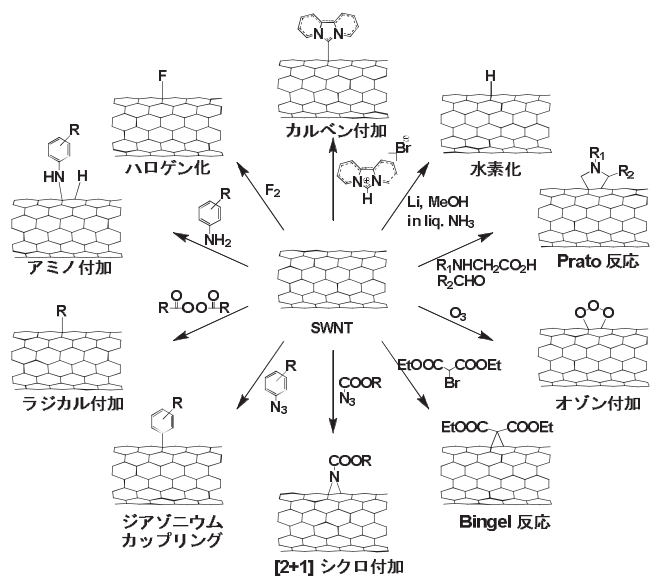


図3 付加反応を中心とする化学修飾法

酸化CNTを経由しない置換基導入方法も数多く報告されている。図3に挙げた i) カルベンとの反応、ii) Birch還元反応による水素化、iii) [2+1] 双極子付加環化反応 (Prato 反応)、iv) オゾンとの反応、v) Bingel 反応、vi) ナイトレンの [2+1] 付加環化反応、vii) アリールジアゾニウム塩との反応、viii) アルキル過酸化物との反応、ix) アニリンとの反応、x) フッ素との反応 (フッ素化) をはじめとして  $AlCl_3$  存在下でのクロロホルムの親電子付加反応、Diels-Alder 反応、など多彩な化学修飾などが行われている。簡便な合成法として、クリックケミストリーを利用したCNTの化学修飾も報告されている<sup>3)</sup>。

#### 1-4. 物理修飾可溶化 (非共有結合による可溶化処理)

物理修飾可溶化として、「ミセル可溶化」および「物理吸着可溶化」がある (表1)。これらに対する総説も多く発表されている<sup>4)</sup>。

表1 可溶化剤の分類と特徴

| 可溶化剤   | 低分子系             |                                    | 高分子系                |                                    |
|--------|------------------|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|
|        | ミセル可溶化 (水系)      | 物理吸着可溶化                            | ミセル可溶化              | 物理吸着可溶化                            |
| 可溶化法   | 疎水性相互作用          | $\pi$ - $\pi$ 、ファンデルワールス、CH- $\pi$ | 疎水性相互作用             | $\pi$ - $\pi$ 、ファンデルワールス、CH- $\pi$ |
| 相互作用   | 疎水性相互作用          | $\pi$ - $\pi$ 、ファンデルワールス、CH- $\pi$ | 疎水性相互作用             | $\pi$ - $\pi$ 、ファンデルワールス、CH- $\pi$ |
| 代表的な分子 | 界面活性剤            | ピレン、ポリフィリン、コレステロール                 | 両親媒性ブロック共重合体、高分子電解質 | 芳香族ポリマー、糖、DNA、共役系高分子               |
| 特徴     | ・除去が可能<br>・大過剰必要 | ・除去が困難                             | ・除去が困難<br>・効率的な可溶化  |                                    |

##### 1-4-1. 低分子系可溶化剤

界面活性作用を示す分子はミセル可溶化剤としてCNTの可溶化によく用いられる。種々の界面活性剤、例えばドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、ドデシルベンゼン硫酸ナトリウム (SDBS) などがよく使われる。膜タンパク質可溶化剤として知られているコール酸ナトリウム (SC)、デオキシコール酸ナトリウム (DOC) などのステロイド系界面活性剤もよく使われる。これらのミセル水溶液中にSWNTを入れ、超音波照射 (バス型あるいはチップ型)、次に超遠心機による不溶部の分離 (上部の可溶部分のみを回収する) によりSWNT溶解・分散溶液が得られる。一般に  $100000 \times g$  以上の速度で超遠心を行えば、1本1本分離した孤立溶解SWNTが調製できる。

一方の物理吸着可溶化剤として、筆者らは多環芳香族基を有する化合物が $\pi$ - $\pi$ 相互作用により強く物理吸着し、優れた可溶化剤となると考えた。すなわち、図4に示すように、「多環芳香族基に極性基を連結すれば水中での可溶化が、疎水基を連結すれば有機溶媒での可溶化が可能となる」というコンセプトである<sup>5-6)</sup>。

このコンセプトを実証するために、図5に示すような、ベンゼ

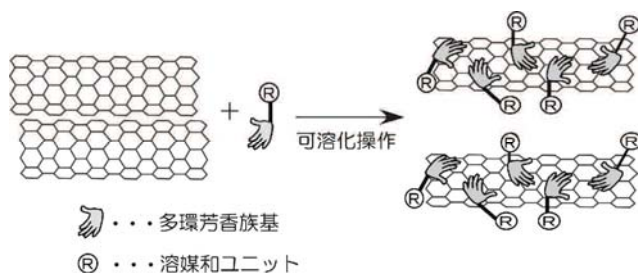


図4 多環芳香族基による可溶化のイメージ

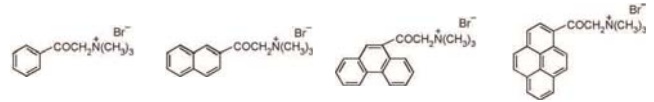


図5 アンモニウムブロマイド (水溶性基) を持つ種々の多環芳香族化合物

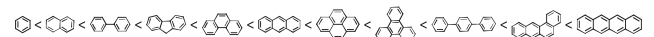


図6 アフィニティークロマトグラフィー評価から明らかになったCNTとの相互作用の順位

ン、ナフタレン、フェナンスレン、ピレンをCNT吸着ユニットとし、極性基としてアンモニウム塩を連結した化合物を合成し、これらを用いて水中でのSWNT可溶化能を調べた。その結果フェニル基、ナフチル基をもつ化合物は可溶化を示さず、フェナンスレンをもつ化合物はわずかに可能化能を示し、ピレンをもつアンモニウム化合物はSWNTを非常によく溶解する、というものであった。その後、多彩なピレン誘導体が合成され、CNT可溶化に利用されている<sup>4)</sup>。また、その効率的な吸着ゆえ可溶化のみならず、金属ナノ粒子やタンパク質などをCNTに担持する際のリンカー分子としてもピレン誘導体は多く利用されている。

筆者らは、分子とCNT表面との相互作用の大きさを評価するためにSWNTを固定相とする液体クロマトグラフィー用カラムを作製し、様々な多環芳香族分子に対してアフィニティークロマトグラフィーを行った。その結果、図6に示すような順列の相互作用の強さを明らかにした<sup>7)</sup>。今後、このような知見が可溶化分子の分子設計に活用できると考え研究を展開している。

また、筆者らは巨大 $\pi$ 系分子であるポリフィリンも物理吸着可溶化ユニットとして有効であることを世界に先駆けて報告している<sup>8)</sup>。ポリフィリンは光合成中心を担う色素としても知られ、古くから電気化学や光化学の分野において膨大な研究が行われている機能性分子であり、SWNTとの組み合わせは光誘起電子移動研究の新素材として展開している。

低分子系の可溶化剤は、多くの場合CNT上に吸着している可溶化分子とバルク溶液中で遊離 (フリー) の状態にある可溶化分子とが動的な平衡状態にある。従って透析操作などでフリーの可溶化分子を除去するとCNT上の可溶化分子もやがて減少し、最終的には可溶化分子を失ったCNTのバンドル化による析出をもたらすので注意が必要である。

##### 1-4-2. 高分子系可溶化剤

高分子系の可溶化剤も多く報告されており、低分子系と同様にミセル可溶化剤と物理吸着可溶化剤に分類できる<sup>4)</sup>。高分子系物理吸着可溶化剤の場合、多点でCNT表面と相互作用するために、バルク中に遊離している可溶化剤との交換が遅くなっている点である。耐熱性高分子であるポリベンズイミダゾール (PBI) や電

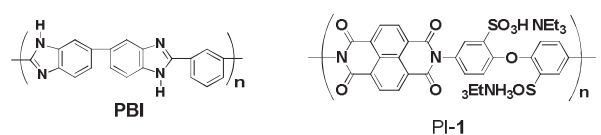


図7 PBI (左) と PI-1 (右) の化学構造式

子材料用部材として実用化されているポリイミド (PI) 誘導体 (図 7) は、DMF などの溶媒中で SWNT を極めて高効率に可溶化する<sup>9)</sup>。PI/CNT 複合体からは超高強度材料が、PBI/CNT 複合体からは新しい燃料電池触媒が創成できる。

### 1-4-3. DNA/RNA の利用

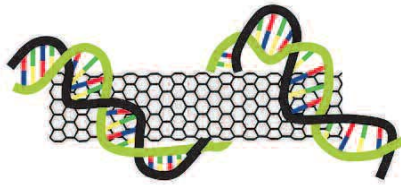


図 8 DNA/SWNT 複合体の模式図

CNT 科学において大きな研究領域を形成している高分子系可溶化剤がある。それが DNA である。2003 年に筆者ら<sup>10)</sup>により二本鎖 DNA が (図 8)、また、ほぼ同時に Zheng ら<sup>11)</sup>により一本鎖 DNA が SWNT を溶液中に安定に分散させることがそれぞれ報告され、細胞取り込みやドラッグデリバリーシステムなどのバイオアプリケーションを中心として多くの報告がなされている。DNA による CNT 可溶化は極めて安定で、フリーの DNA を含まない DNA/SWNT 複合体は、1 カ月後においても複合体からの DNA の解離は見られない<sup>12)</sup>。SWNT の孤立溶解に対しては高分子量の DNA である必要はなく、10 量体程度のオリゴ DNA で充分である。高い複合安定性は、バイオ分野応用研究における多くの成果に役割を果たしている。

## 2. カーボンナノチューブの電子準位

CNT の発見以来、数多くの研究グループが解明に取り組んできた SWNT の電子準位は、ナノチューブの基本特性のなかでも最も重要な特性であり、ナノチューブ科学の基盤をなす。SWNT のバンドギャップ、フェルミ準位、仕事関数はカイラル指数に強く依存し SWNT の基礎的な電子特性の理解に不可欠な物理量である。これまでに、走査トンネルマイクロコピー、酸化還元滴定、ラマン分光電気化学測定などの手法によりカーボンナノチューブの電子特性に関する研究が報告されている<sup>13-14)</sup>。

しかし、ラマンスペクトルや吸収スペクトルでは各カイラリティのスペクトルの重なりが大きいので、個々のカイラリティの電子準位は決定できていない。筆者らは、カイラリティごとに明確なスペクトルが得られる SWNT の蛍光を用いて「その場分光電気化学測定」を行い、ネルンスト式による解析を行ない、各カイラリティの電子準位を実験的に決定できることを示した (表 2)<sup>15)</sup>。

本研究の「その場蛍光分光電気化学測定法」は非常にシンプルな測定法であり、蛍光が検出できるすべての SWNT の電子状態を正確に評価できる。得られた基礎的な実験結果は SWNT を用いたナノデバイスの設計、作製等に対しても重要であり、CNT の基礎科学、物性解明を推し進めるものである。

## 3. SWNT のカイラリティ分離

### 3-1. なぜ分離が必要か？

SWNT はカイラル指数  $(n, m)$  により決定される幾何構造により、金属性あるいは半導体性となる。 $n - m = 3$  の倍数の場合は金属性 SWNT に、 $n - m = 3$  の倍数でない場合は半導体性 SWNT と

表 2 実験的に決定した 15 種のカイラリティの電子準位とバンドギャップ

| カイラル指数 $(n, m)$ | ナノチューブ直径 / nm | 酸化電位 / V vs. 真空 | 還元電位 / V vs. 真空 | フェルミ準位 / V vs. 真空 | 電気化学バンドギャップ / eV |
|-----------------|---------------|-----------------|-----------------|-------------------|------------------|
| (6, 5)          | 0.757         | 5.08            | 4.01            | 4.55              | 1.07             |
| (8, 3)          | 0.782         | 5.03            | 3.95            | 4.49              | 1.08             |
| (7, 5)          | 0.829         | 4.98            | 3.97            | 4.48              | 1.01             |
| (8, 4)          | 0.840         | 4.96            | 4.05            | 4.50              | 0.91             |
| (10, 2)         | 0.884         | 4.93            | 3.95            | 4.44              | 0.98             |
| (7, 6)          | 0.895         | 4.94            | 4.03            | 4.49              | 0.91             |
| (9, 4)          | 0.916         | 4.92            | 4.01            | 4.47              | 0.91             |
| (10, 3)         | 0.936         | 4.89            | 4.09            | 4.49              | 0.81             |
| (8, 6)          | 0.966         | 4.90            | 4.05            | 4.47              | 0.85             |
| (9, 5)          | 0.976         | 4.89            | 4.09            | 4.49              | 0.79             |
| (12, 1)         | 0.995         | 4.93            | 4.03            | 4.48              | 0.90             |
| (11, 3)         | 1.014         | 4.87            | 4.05            | 4.46              | 0.82             |
| (8, 7)          | 1.032         | 4.88            | 4.09            | 4.49              | 0.79             |
| (10, 5)         | 1.050         | 4.86            | 4.08            | 4.47              | 0.78             |
| (9, 7)          | 1.103         | 4.85            | 4.10            | 4.47              | 0.75             |

なる。これらは、金属系素材、半導体素材として既存物質を凌駕する極めて優れた物性を示すため、これらを用いたデバイス開発等が期待されている。合成法にもよるが、多くの複数のカイラル指数をもつ SWNT 混合物として合成され、金属性 SWNT と半導体性 SWNT の混合物として得られる。合成された SWNT には金属的性質を示す SNNT と、半導体的性質を示す SWNT が 1 : 2 の割合で存在する。

両者を分離するためには、まず SWNT のバンドルをほどこき、孤立溶解させることからスタートしなければならない。前述した可溶化の発展がいかにか重要であったか理解できよう。可溶化技術の発展により可能になった分離研究の進展を以下に紹介する。

### 3-2. 半導体性・金属性 SWNT の分離

#### 3-2-1. 化学反応を利用した分離法

金属性 SWNT と半導体性 SWNT を比較すると、金属性 SWNT に存在する自由電子により化学反応性が異なり、金属性 SWNT に優先的に起こる反応が存在する。例えばジクロロカルベン誘導体、ニトロニウムなど様々な付加試薬は金属性 SWNT に優先的に反応させることができる。臭素と SWNT との電荷移動錯体形成は金属性 SWNT で優先的に進行し、わずかに重くなった金属性 SWNT と未反応の半導体性 SWNT の密度差から遠心操作による分離が可能となる。ベンゼンジアゾニウム塩も金属性 SWNT に優先的に付加反応が起こることから、有機溶媒への分散を担うアルキル鎖を持つベンゼンジアゾニウム塩と SWNT を注意深く反応させるとアルキル鎖で修飾された金属性 SWNT が優先的に得られ、有機溶媒への抽出で分離することができる<sup>16)</sup>。同様に、アルキルアミンが金属性 SWNT へ優先的に付加することを利用して金属性 SWNT を抽出した例も報告されている。このように金属性 SWNT への優先的反応の例が多く報告されている中で、半導体性 SWNT への優先的反応およびその反応に基づく分離法も提案されている。その一例として、過酸化水素による酸化溶解は半導体性 SWNT へ優先的に進行し、金属性 SWNT が濃縮される。

これまでに報告されているこれら反応の速度差は小さく、極めて条件を最適化しても、もう一方の SWNT への反応が起こらなくなるわけではない。従って、「分離」というより「濃縮」と言った方が正しい。



### 3-2-2. クロマトグラフィーを利用した分離法

KrupkeらはSDSによる可溶化溶液において誘電泳動による金属性、半導体性SWNTの分離を達成している<sup>17)</sup>。産業総合研究所の片浦らは、アガロースゲル電気泳動（これはDNAの分離に利用されている方法である）で、金属性SWNTと半導体性SWNTの分離が可能であることを示した<sup>18)</sup>。この方法では金属性SWNTのみが泳動するために分離が達成される。後にこの方法は改良され、電場印加なしでアガロースゲルを‘絞る’だけでも金属性SWNT溶液が得られることが明らかにされた。彼らはさらにこの方法を発展させ、アガロースゲルを用いたカラムクロマトグラフィーによる半導体・金属性SWNTの分離を開発した<sup>19)</sup>。この方法ではSDS分散SWNT溶液をカラムに展開させることで金属性SWNT（純度～90%）が得られるだけでなく、ゲル中に閉じ込められた半導体性SWNTを特異的相互作用をもたらさないSDS溶液で溶出させ半導体性SWNT溶液（純度～95%）も得られることが特長である。このカラム分離法は操作が簡便であり、かつカラムの繰り返し利用も可能で、大量分離への道を拓いた。

### 3-2-3. 密度勾配超遠心分離（DGU）を利用した分離法

DGU法は、タンパク質分離法として古くから知られた手法である。iodixanolやスクロースなど分子量の大きい物質を含む溶液を長時間、超遠心機に施すと沈降とブラウン運動が釣り合う沈降平衡が生じ、密度が液面から底に向かって連続的に変化する。DGU法は密度勾配によって試料の沈降速度の差を拡大させ、あるいは遠心力と浮力が釣り合う密度が同じ場所に粒子にバンドを作ることによって、分離を行う方法である（図9）。2006年、米国ノースウェスタン大学のHersamらはこれをナノチューブの分離に導入した<sup>20)</sup>。DGU法で、ステロイド系界面活性剤と、アルキル鎖系界面活性剤の混合ミセル溶液で孤立溶解させたSWNT水溶液から、金属性SWCNTと半導体性SWNTの分離が可能である。純度は高く99%に達する。現在ではこの方法で分離されたそれぞれのSWNTが市販されている。しかし、不純物として密度勾配用試薬であるiodixanol（コストも高い）を含み、精製が必要という欠点がある。

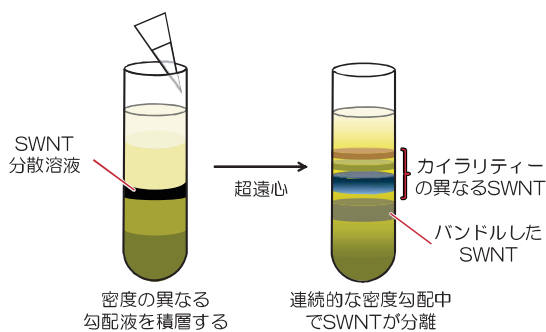


図9 DGU法による分離の概念図

### 3-2-4. 選択的可溶化法

2007年に選択的可溶化能を持つ高分子が2つのグループからほぼ同時に報告された<sup>21-22)</sup>。どちらもポリフルオレン（polyfluorene; PFO）やPFO交互共重合ポリマー（図10）が半導体性SWNTのみを可溶化するという報告であった。これらの報告は、これまで報告がなかった半導体性SWNTの高選択的可溶化であったために、非常にセンセーショナルであった。そればかり

か、PFOのアルキル鎖長および交互共重合相手の構造により可溶化する半導体性SWNTのカイラリティ分布も変化するという極めて興味深い挙動を示した。選択性発現メカニズム、すなわち、なぜ半導体SWNTのみを認識、溶解するのか謎が多い点がさらに研究者の好奇心を集め、次々と選択性を示す新たなPFO交互共重合体が報告された（図10）。

筆者らはPFOランダム共重合体（図11）においても選択性を確認し、共重合比によってもカイラリティ分布が変化することを見出した<sup>23)</sup>。PFOによる選択的可溶化には強い溶媒依存性があり、芳香族溶媒であるトルエン、キシレンおよびそれらの類縁体を溶媒として用いた時は選択性が見られるが、その他の溶媒（クロロホルム、THF、アセトン、DMF、DMSO、アルコール、水など）では選択性が発現しない。超分子化学的な分子認識という観点からも非常に興味を魅かれる系である。ただし、収率は極めて低く、大量分取には不向きである。それでも純度の高さは魅力的で、金属性SWNTの混入のために阻まれていたSWNTの半導体デバイス開発への道を開いたと言える。例えば、半導体性SWNTは高いオン/オフ比と移動度を持つ電界効果型トランジスタ（FET）の作製へ有望な材料であることが知られているが、未分離SWNTで作製したFETでは金属性SWNTの存在によりオン/オフ比 $10^2 \sim 10^3$ 程度のものしか得られていなかった。しかし、PFOで分離された半導体性SWNTはオン/オフ比 $>10^5$ と非常に大きいものであった<sup>24)</sup>。さらにPFO共重合体の分子設計自由度の高さを利用することでPFO/半導体性SWNT複合体に幅広い修飾を施すこともできる。

筆者らは、金属ナノ粒子を担持可能なチオール基やポルフィリン基を持つPFO共重合体を合成し（図12）、金属ナノ粒子をSWNTの長さ方向に沿って配列出来ることを示した。これらを用いて作製したFFTは、オン/オフ比が $\sim 10^5$ で、デバイスの移動特性は、金属ナノ粒子の有無で変化することを報告している。最近、ウィスコンシン大学のM. ArnoldらはPFO/半導体性SWNTを太陽電池に組み込むことで近赤外光からのエネルギー取り出しに成功している<sup>25)</sup>。これにより従来の色素では回収できなかった近赤外領域の太陽光エネルギーを回収できることになり、応用はFETにとどまらない。今後の展開に期待できよう。

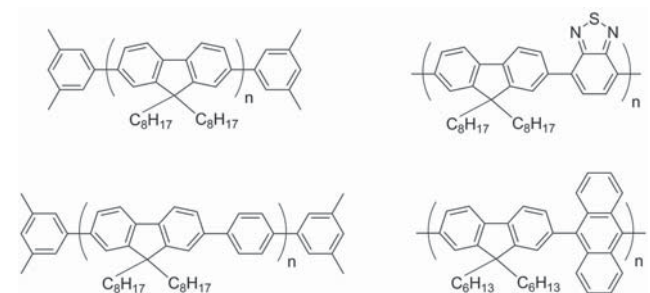


図10 最初に半導体性SWNTの選択的可溶化が報告されたPFOとPFO交互共重合体

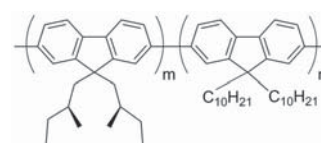


図11 半導体性SWNT選択的可溶化能を有するPFOランダム共重合体

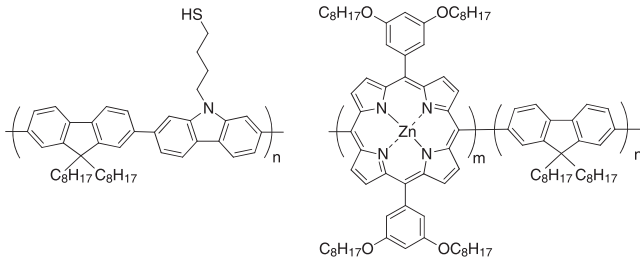


図 12 半導体性 SWNT 選択的可溶化能を有する PFO 共重合体

### 3-3. 固有のカイラル指数 (n, m) をもつ SWNT の分離

DGU 法やゲルクロマトグラフィー法による金属性・半導体性 SWNT の分離は SWNT 分離技術に飛躍的進歩をもたらした。次なる課題は、固有のカイラル指数 (n, m) をもつ SWNT の分離 (以下、カイラリティ分離と呼ぶ) である。SWNT の直径の差や構造的な差異は極めてわずかであり SWNT 発見当時に存在した既存分離精製技術にはこれらを分別できそうな技術はないと思われていた。それではこれらの分離精製にはどのような戦略で臨んできたか、以下に解説する。

#### 3-3-1. クロマトグラフィーの利用

Zheng らは、表 3 に示したように、配列の異なるオリゴ DNA を精密設計、合成し、イオン交換とサイズ排除の二つのカラムクロマトグラフィーを併用することによって、12 種の半導体 SWNT および 2 種の金属性 SWNT の単一カイラリティ (n, m) SWNT の分離に成功している<sup>26)</sup>。特に (6, 6)、(7, 7) SWNT はこれまでに単一カイラリティ分離がなされていなかった金属性の SWNT であり、これらの分光特性が明らかにするための貴重な素材を提供した。また、片浦らは、第 5 章 2C で述べたアガロースゲルによる半導体・金属性 SWNT の分離をさらに発展させ、デキストラン系ゲルを充填したカラムを多段階にし、さらに導入する量を調整することでカイラリティ分離を達成した。このように、CNT のわずかなオングストロームの直径の差と、これに起因する構造の違いを認識分離する分子が存在するという事実は極めて興味深い。

表 3 SWNT のカイラリティ分離に用いるオリゴ DNA の配列

| カイラル指数 | DNA 配列                                   |
|--------|--|
| (9,1)  | (TCC) <sub>10</sub>                      |
| (8,3)  | (TTA) <sub>3</sub> TTGTT                 |
| (6,5)  | (TAT) <sub>4</sub>                       |
| (7,5)  | (ATT) <sub>4</sub> AT                    |
| (10,2) | (TATT) <sub>2</sub> TAT                  |
| (8,4)  | (ATTT) <sub>3</sub>                      |
| (9,4)  | (GTC) <sub>2</sub> GT                    |
| (7,6)  | (GTT) <sub>3</sub> G                     |
| (8,6)  | (GT) <sub>6</sub>                        |
| (9,5)  | (TGTT) <sub>2</sub> TGT                  |
| (10,5) | (TTTA) <sub>3</sub> T                    |
| (8,7)  | (CCG) <sub>2</sub> CC                    |
| (6,6)  | (ATTA) <sub>3</sub> AT                   |
| (7,7)  | (TTA) <sub>2</sub> C(TAT) <sub>2</sub> T |

#### 3-3-2. 密度勾配超遠心分離 (DGU) 法の利用

前述した DGU 法が有効である。たとえば、iodixanol を密度勾配培地として用い、コール酸ナトリウムで可溶化した SWCNT の密度勾配遠心を三回繰り返すことで、97% が直径誤差 0.2 nm 以内の (6, 5)、(8, 3) および (9, 1) SWNT を含む溶液を得ることができる。DGU 法の分離の原理は、界面活性剤等で可溶化した SWNT の密度の差を利用することであり、SWNT 直径の差が小さい、たとえば (6, 5) SWNT (直径 0.76 nm) と (8, 3) SWNT (直径 0.78 nm) の密度はほぼ等しく、これらの分離は困難である。筆者らは、SWNT のレドックス機能に着目した。(n, m) SWNT は固有の電子状態を持っており、それぞれ酸化還元電位が異なる<sup>27)</sup>。

一方、塩化金酸は SWCNT と反応すると表面に金として還元析出することが知られている。塩化金酸と SWNT を反応させると、(6, 5) SWNT 以外の SWNT は、塩化金酸を還元することができ、金ナノ粒子が SWNT 表面に形成される。ところが、(6, 5) SWNT ではこのような還元反応が進行しない (図 13)。結果として、(6, 5) SWNT とそれ以外の金ナノ粒子吸着 SWNT に「重さ」の差が生じる。この結果、これらの溶液に DGU を行なうことにより、高純度で (6, 5) SWNT を単離できる。

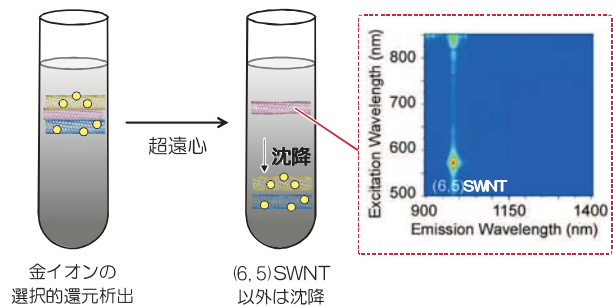


図 13 SWNT の酸化還元電位の差を利用した選択的金析出と DGU による未反応 SWNT との分離

ライス大学の Weisman らは DGU 法を発展させ、非平衡非線形の密度勾配を作り、これを用いて従来の DGU よりさらに高純度な (n, m) カイラリティ分離を可能にした<sup>28)</sup>。Weisman らの報告は、遠心操作後に (n, m) SWNT それぞれの等密度点ができる限り離れるような非線形の勾配を用いて、多くの (n, m) SWNT を一回の操作により分離する方法である。この方法で彼らは、10 種類のカイラリティの SWNT を高純度分離した。

#### 3-3-3. 選択的可溶化法

いくつかの可溶化剤では特定のカイラリティを優先的に可溶化することが知られている。前述した半導体性 SWNT 選択的可溶化能を示す PFO 可溶化においてもいくつかの系で 1 つのカイラリティをもつ SWNT の濃縮が達成されている。筆者らは図 11 で示したランダム共重合体において高い置換基をもつ PFO 基が増加するにつれて、可溶化できる SWNT のカイラル角が小さくなる傾向に気づいた<sup>29)</sup>。モノマー構造やその共重合比と可溶化される SWNT カイラリティとの相関をさらに精密化することにより、任意のカイラリティの SWNT を選択的に認識、分離できる PFO 誘導体が合成できるかもしれない。

### 3-3-4. エナンチオマー分離

キラル型に分類されるSWNTには互いにエナンチオマーの関係をなす右巻きSWNTと左巻きSWNTが存在する。両者の間で電子物性の差は見い出されていないが、これらを分離することは、純粋な科学的興味から興味を持たれる。この目的においても上述した各種分離法が駆使されている。いち早くエナンチオマー分離を達成したのは、選択的可溶化法であった。小松らはポルフィリンピンセットと呼ばれる2つのポルフィリンのなす角度の固定されたポルフィリン2量体によるSWNT可溶化において、ポルフィリン側鎖にキラルユニットを導入することでエナンチオマー分離を達成した。この結果は、ポルフィリンの $\pi$ スタッキングだけでなく、側鎖もSWNT表面を認識していることを端的に示す点でも興味深い。また、Weismanの非線形DGU法では、不斉をもつコール酸誘導体で可溶化された右巻きSWNTと左巻きSWNTが異なる密度を示すため、異なるバンドとして分離することができる。この方法では7種類のキラル型SWNTの光学分割に成功している<sup>30)</sup> 我々は、バルキーなキラル基を持つPFO誘導体を分子設計、合成し、これにより、半導体性のみならず右巻き/左巻きSWNTの分離に成功した<sup>31)</sup>。

22) F. Chen, B. Wang, Y. Chen and L.-J. Li, *Nano Lett.*, **2007**, 7, 3013-3017.  
 23) H. Ozawa, T. Fujigaya, Y. Niidome, N. Hotta, M. Fujiki and N. Nakashima, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 2651-2657.  
 24) N. IZARD, S. Kazaoui, K. Hata, T. Okazaki, T. Saito, S. Iijima and N. Minami, *Appl. Phys. Lett.*, **2008**, 92, 243112-243113.  
 25) D. J. Bindl, M.-Y. Wu, F. C. Prehn and M. S. Arnold, *Nano Lett.*, **2010**, 11, 455-460.  
 26) X. Tu, A. R. Hight Walker, C. Y. Khripin and M. Zheng, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 12998-13001.  
 27) Y. Kato, Y. Niidome and N. Nakashima, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 5435-5438.  
 28) S. Ghosh, S. M. Bachilo and R. B. Weisman, *Nat. Nano*, **2010**, 5, 443-450.  
 29) H. Ozawa, T. Fujigaya, Y. Niidome, N. Hotta, M. Fujiki and N. Nakashima, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 2651-2657.  
 30) S. Ghosh, S. M. Bachilo and R. B. Weisman, *Nat. Nano*, **2010**, 5, 443-450.  
 31) K. Akazaki, F. Toshimitsu, H. Ozawa, T. Fujigaya and N. Nakashima, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 12700-12707.

#### [参考文献]

1) D. Tasis, N. Tagmatarchis, V. Georgakilas and M. Prato, *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 4000-4008.  
 2) S. Rana and J. W. Cho, *Chemistry - A European Journal*, **2011**, 17, 11092-11101.  
 3) S. Rana and J. W. Cho, *Nanoscale*, **2010**, 2, 2550-2556.  
 4) T. Fujigaya and N. Nakashima, *Polymer J.*, **2008**, 40, 577-589.  
 5) H. Murakami, T. Nomura and N. Nakashima, *Chem. Phys. Lett.*, **2003**, 378, 481-485.  
 6) Y. Tomonari, H. Murakami and N. Nakashima, *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 4027-4034.  
 7) J. Yoo, H. Ozawa, T. Fujigaya and N. Nakashima, *Nanoscale*, **2011**, 3, 2517-2522.  
 8) H. Murakami, T. Nomura and N. Nakashima, *Chem. Phys. Lett.*, **2003**, 378, 481-485.  
 9) M. Okamoto, T. Fujigaya and N. Nakashima, *Adv. Funct. Mater.*, **2008**, 18, 1776-1782.  
 10) N. Nakashima, S. Okuzono, H. Murakami, T. Nakai and K. Yoshikawa, *Chem. Lett.*, **2003**, 32, 456-457.  
 11) M. Zheng, A. Jagota, D. Semke Ellen, A. Diner Bruce, S. McLean Robert, R. Lustig Steve, E. Richardson Raymond and G. Tassi Nancy, *Nat. Mater.*, **2003**, 2, 338-342.  
 12) Y. Yamamoto, T. Fujigaya, Y. Niidome and N. Nakashima, *Nanoscale*, **2010**, 2, 1767-1772.  
 13) D. Paolucci, M. M. Franco, M. Iurlo, M. Marcaccio, M. Prato, F. Zerbetto, A. Pénicaud and F. Paolucci, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 7393-7399.  
 14) K.-i. Okazaki, Y. Nakato and K. Murakoshi, *Phys. Rev. B*, **2003**, 68, 354341-354345.  
 15) Y. Tanaka, Y. Hirana, Y. Niidome, K. Kato, S. Saito and N. Nakashima, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 7655-7659.  
 16) S. Toyoda, Y. Yamaguchi, M. Hiwatashi, Y. Tomonari, H. Murakami and N. Nakashima, *Chem. Asian J.*, **2007**, 2, 145-149.  
 17) R. Krupke, F. Hennrich, H. V. Loehneysen and M. M. Kappes, *Science*, **2003**, 301, 344-347.  
 18) T. Tanaka, H. Jin, Y. Miyata and H. Kataura, *Appl. Phys. Express*, **2008**, 1, 1140011-1140013.  
 19) T. Tanaka, H. Jin, Y. Miyata, S. Fujii, H. Suga, Y. Naitoh, T. Minari, T. Miyadera, K. Tsukagoshi and H. Kataura, *Nano Lett.*, **2009**, 9, 1497.  
 20) M. S. Arnold, A. A. Green, J. F. Hulvat, S. I. Stupp and M. C. Hersam, *Nat. Nanotech.*, **2006**, 1, 60-65.  
 21) A. Nish, J.-Y. Hwang, J. Doig and R. J. Nicholas, *Nat. Nanotech.*, **2007**, 2, 640-646.

### Good's Buffer ポスターのお知らせ

| 水への溶解度 (0°C, mol/l) | pKa(20°C) | $\Delta pK_a/^\circ C$ | pH 範囲 |     |
|---------------------|-----------|------------------------|-------|-----|
|                     |           |                        | 5     | 7   |
| 0.65                | 6.15      | -0.011                 | 5.5   | 7.0 |
| >1.0                | 6.46      | -                      | 5.7   | 7.3 |
| 難溶                  | 6.60      | -0.011                 | 5.8   | 7.4 |
| 難溶                  | 6.80      | -0.0085                | 6.1   | 7.5 |

生化学用緩衝剤 グッド緩衝剤のポスターを作成いたしました (A2 サイズ)。pH 範囲や pKa、調製方法など記載しています。

お近くの販売店様もしくは小社マーケティング部までご請求ください。

e-mail: info@dojindo.co.jp  
 tel: 0120-489548



## Topics on Chemistry

### 凝集を利用した新規蛍光プローブによる生体由来リン酸化合物の turn-on 検出

株式会社同仁化学研究所 大山 誠

蛍光色素による分析は、光学顕微鏡と画像処理システムの発展により、操作が非常に容易で感度が高く、空間解析能力が高いことから、生物学的に重要な化学物質の分析に利用されてきた。従来の蛍光プローブは基本的に認識部位と蛍光性を示す2つの部位からなり、認識部位での標的物質との非共有結合性分子間相互作用により標的物質は蛍光を発するようになる。しかしながら、多くの蛍光物質は、近接することにより自己消光する。それが結果的に低いS/N（シグナル/ノイズ）比となり、高感度分析においては不都合となる。また、従来の蛍光プローブにおいては、類似した構造の識別も困難である。

本トピックスでは、最近、新海らによって報告された、上記の欠点を克服した蛍光プローブを紹介する。新海らは、凝集誘起発光性（Aggregation-Induced Emission; AIE）分子に着目し、テトラフェニルエテン（Tetraphenylethene; TPE）を基本骨格とする新規蛍光プローブ（TPE-4G）を開発した。まず、細胞内での重要なエネルギー源であり、細胞内シグナル伝達においても重要な役割を担っているアデノシン三リン酸（ATP）を標的物質とした。TPE-4Gは、ATPのリン酸基と相互作用させるためのグアニジニウム基をスペーサーを介して発光部位であるTPEに連結した構造をしている（Fig. 1）。

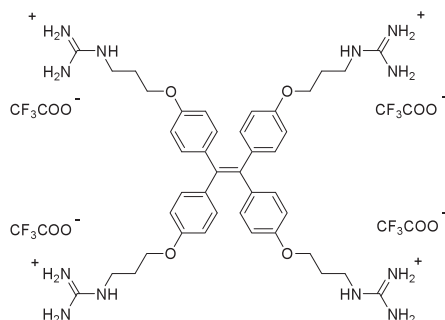


Fig. 1 グアニジニウム基で修飾された TPE-4G の化学構造

TPE-4G が ATP 選択的に、S 字型の非線形蛍光応答 ( $\lambda_{ex} = 335$  nm,  $\lambda_{em} = 463$  nm) を示すことを確認し、その蛍光応答は最大で約 90 倍の変化を示した。後に述べるが、この応答には閾値が存在する。この閾値の存在により、標的物質である ATP を高い S/N 比で turn-on 検出できることを示した<sup>1)</sup> (Fig. 2)。「turn-on 検出」とは、電気のスวิตช์を入れるように、ある濃度域以上で急激にシグナルが得られる状態を表現したものである。

さらに、TPE-4G による生体由来リン酸化合物の識別は、ATP だけではなく、NAD 類の補因子においては NADPH とのみ非線形な蛍光応答が観測され、最大 14 倍の変化を示した<sup>2)</sup> (Fig. 3)。NADH の場合も蛍光強度の増加が見られるが、これは NADH 由来の蛍光であり、その証拠に直線的な増加をしている。

これは、NADPH と ATP に共通するリン酸基の 4 つの陰イオンと TPE-4G のグアニジニウム基の 4 つの陽イオンの一致が分子の凝集を促進させると考えられる。動的分散法（Dynamic light scattering; DLS）を用いた測定を行ったところ、ATP では直径約 674 nm、NADPH では直径約 580 nm の粒子が観測された。光散乱強度が最も著しく変化したのは、NADPH の濃度が約 7.5  $\mu$ M の時であった。これは、蛍光応答で得られた結果と一致している。その他のリン酸化合物との測定では散乱強度の大きな変化は確認されなかった。さらに ATP または NADPH と TPE-4G の混合物で

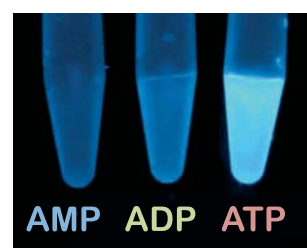
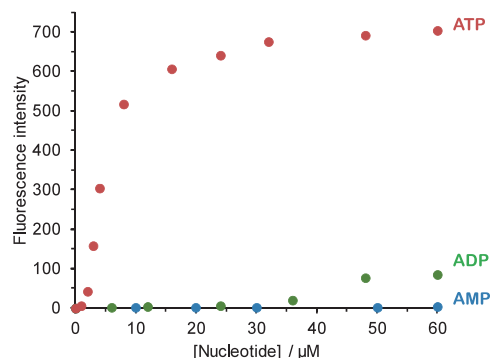


Fig. 2 ATP, ADP, AMP と TPE-4G との蛍光滴定曲線

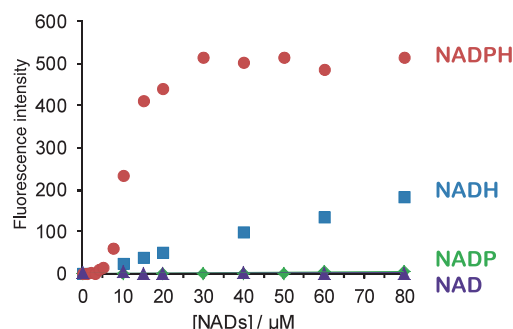


Fig. 3 NAD<sup>+</sup>, NADH, NADP<sup>+</sup>, NADPH と TPE-4G との蛍光滴定曲線 (Fig. 2, 3 データ提供:九州大学高等研究院 新海征治先生、野口誉夫氏)

は蛍光顕微鏡においても、1  $\mu$ m 程度の粒子が観測されている。このことから、蛍光の非線形応答時には、凝集体が存在していることが示唆される。

以上のように、紹介した新規蛍光プローブは ATP や NADPH と共同的に凝集体を形成し、高い S/N 比で S 字型の非線形蛍光応答を示し、他の類似した構造体から標的物質のみを turn-on 検出することができる。TPE-4G は従来の蛍光プローブでは成しえなかった標的物質の高感度な識別と直接的な検出ができる新規蛍光プローブである。今後、発光部位、スペーサー、認識部位などを標的物質にあわせてデザインすることで、様々な生体内の標的物質を turn-on 検出することができる蛍光プローブの開発が期待される。

#### [参考文献]

- 1) T. Noguchi, T. Shiraki, A. Dawn, Y. Tsuchiya, L. T. N. Lien, T. Yamamoto and S. Shinkai, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 8090.
- 2) T. Noguchi, A. Dawn, D. Yoshihara, Y. Tsuchiya, T. Yamamoto and S. Shinkai, *Macromol. Rapid Commun.*, **2013**, 34(9), 779.

## 7月末発売予定

### プロテオーム解析用試薬

#### NTA-SAM Formation Reagent

##### < NTA-SAM 基板の特長 >

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 で 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。

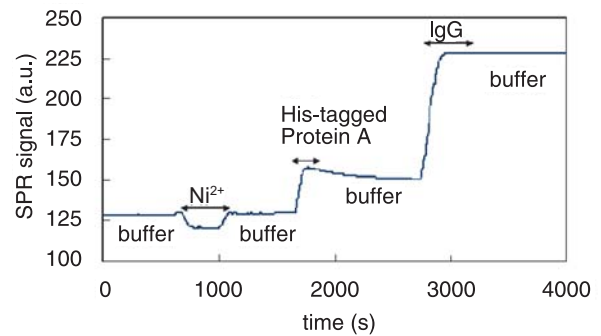
QCM (Quartz Crystal Microbalance: 水晶振動マイクロバラン) や SPR (Surface Plasmon Resonance: 表面プラズモン共鳴) 等のバイオセンサーに SAM (Self-Assembled Monolayer: 自己組織化膜) を介してタンパク質を固定化する方法のひとつに Ni-NTA (Nitrilotriacetate: ニトリロ三酢酸) を介した His-Tag タンパク質固定化法<sup>1)</sup> があります。この "His-Tag" 技術により、複雑な高次構造を持つタンパク質を、その活性を損なわずに固体表面に化学的に結合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-MS<sup>2)</sup> 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<sup>3)</sup> 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す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できると同時に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、NTA 部位を有する SAM 形成試薬が含まれており、簡便に NTA-SAM を金基板上に形成することができます。

##### [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.



Ni<sup>2+</sup>: 40 mmol/l NiSO<sub>4</sub> 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 Protein A 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 Ni<sup>2+</sup> をキレートさせ、His-tagged Protein A、続いて IgG を表面に固定した。

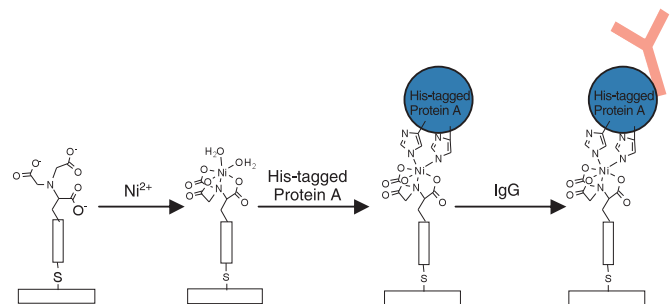


Fig. 2 Protein A と IgG の特異的結合の模式図

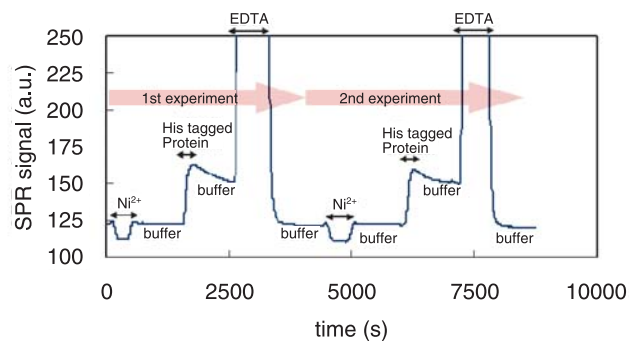


Fig. 3 NTA-SAM 基板のリサイクル性の評価  
 NTA-SAM 表面に Ni<sup>2+</sup> をキレートさせ、His-tagged Protein A を表面に固定した。続いて EDTA を作用し、Protein A を脱離させた。この操作を 2 回連続して行った。

## 開発中

## 硫化水素研究用試薬およびキット

近年、毒ガスとして知られている硫化水素 ( $\text{H}_2\text{S}$ ) が、血管拡張や細胞保護、インスリン分泌や神経伝達調節など様々な生理活性を示すことが明らかにされ、一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) に続く第3のガス状シグナル分子として注目されています。

生体内に存在する硫化水素は、主に L-システインを基質としてシスタチオニン  $\beta$ -シターゼ (CBS) やシスタチオニン  $\gamma$ -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 (3-MST) と呼ばれる酵素類によって産生され、生理活性を示すと共に、システイン側鎖の SH 基に付加した結合型硫黄として生体内に貯蔵されると考えられています。硫化水素は、NO

や CO と同様にガス状分子として認知されていますが、その pKa は約 7 であり、生理的 pH では約 80% が硫化水素イオン ( $\text{HS}^-$ ) の状態で存在します。また、硫化水素イオンは生体内で様々な結合形態や構造をとるため、その作用機序の詳細は未だ不明であり、硫化水素を中心とした硫黄の生体内機能の解明が待ち望まれています (概略に関しては、ドージンニュース 146 号「生理活性物質としての硫化水素」をご参照ください)。

小社では現在、このような研究背景の中、硫化水素研究に有用な試薬およびキットの開発を行っています。

硫化水素研究用 硫化ナトリウム  $\text{Na}_2\text{S}$ 

## &lt;特長&gt;

- ・硫化水素研究用として規格化
- ・少量小分け済のため、秤量の必要がない
- ・個別包装で、安定した品質

硫化ナトリウムは、硫化水素研究には欠かせない硫化水素ドナーであり、硫化水素ナトリウム ( $\text{NaHS}$ ) と共に汎用されています。小社では、規格化した硫化水素研究用の硫化ナトリウムを 10 mg ずつに小分けしております。そのため、秤量の必要なく、実験の度にフレッシュな状態の硫化ナトリウムを使用することができます。また、この硫化ナトリウムは、メチレンブルー法による定量および Monobromobimane 法による分析によって規格化し、品質を管理しておりますので、硫化水素研究用として安心してご使用頂けます。



市販の硫化ナトリウム

硫化水素研究用 硫化ナトリウム  $\text{Na}_2\text{S}$ 

Fig. 1 市販の硫化ナトリウムと現在開発中の硫化水素研究用硫化ナトリウム

安定同位体化  $\text{Na}_2^{34}\text{S}$  水溶液

質量分析装置の飛躍的な発展に伴い、安定同位体標識化合物を用いたトレーサー実験は強力な代謝研究のツールとなっています。安定同位体化  $\text{Na}_2^{34}\text{S}$  は、安定同位体  $^{34}\text{S}$  を含む硫化水素ドナーであり、天然に最も多く存在する硫黄 ( $^{32}\text{S}$ ) とは分子量が [+2] 異なるため、硫化水素の生体内動態を MS 装置によって解析することができます。西田、赤池らの研究グループは、チオール特異的蛍光ラベル化剤である Monobromobimane を用いた LC-MS 分析法と組み合わせることによって、硫化水素関連物質の細胞内動態の解析に成功しています<sup>8)</sup>。

## 硫化水素比色定量用キット (メチレンブルー法)

## &lt;特長&gt;

- ・比色法により硫化水素を定量することができる
- ・マイクロプレートを用いた多検体測定が可能

メチレンブルー法は、最も一般的な硫化水素定量法の一つです。本手法は、酸性条件、塩化鉄 (III) 存在下で *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediammonium と硫化水素が反応してメチレンブルーが生成する機構に基づいており、生成したメチレンブルー由来の 650 nm 付近の吸光度から硫化水素を定量することができます<sup>1)</sup>。ただし、本手法は酸性条件下で反応を行うため、生体試料中に含まれる酸に不安定な結合型硫黄由来の硫化水素の反応への関与が示唆されており、実際の生体内硫化水素の絶対定量には適していないと考えられています。そのため、本手法は主に硫化水素合成酵素の活性測定や外部刺激による硫化水素の産生量変化の解析などに利用されています<sup>2-4)</sup>。小社では上記問題を解決したキットの開発を行っています。

## 硫化水素 HPLC 検出用キット (Monobromobimane 法)

## &lt;特長&gt;

- ・ Monobromobimane を用いた高感度 HPLC 検出が可能
- ・標準物質である Sulfide-dibimane を付属

Monobromobimane を用いた HPLC 分析法は、最も高感度で汎用性の高い硫化水素検出法として利用されています。Monobromobimane は、チオール特異的蛍光ラベル化剤であり、硫化水素 1 分子に対し、Bimane 2 分子が標識された特異的な化合物 (Sulfide-dibimane) を生成します。そのため、グルタチオンやシステインなどの他のチオール基を有する物質との分離が可能であり、また生成した化合物が蛍光を有するため、蛍光検出による高感度分析ができます<sup>5-7)</sup>。また、最近では質量分析装置と併用することでさらに高感度化と高選択性を達成した方法が報告され、硫化水素だけではなく、SH 基を有する種々の生体物質の詳細な解析法として確立されつつあります<sup>3,8)</sup>。

本キットには、反応に必要な試薬類および標準物質である Sulfide-dibimane が含まれています。



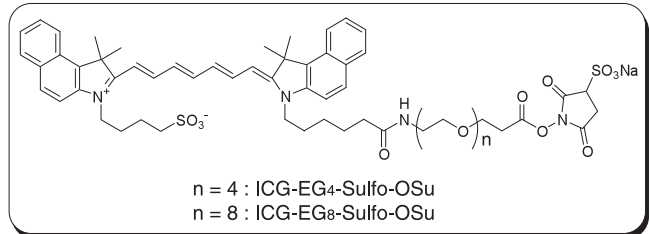
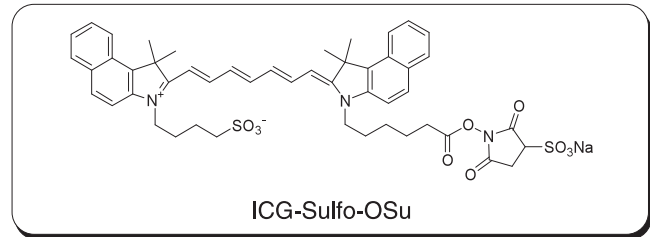
[参考文献]

- 1) N. S. Lawrence, J. Davis and R. G. Compton, *Talanta*, **2000**, 52, 771.
- 2) Y. Kaneko, Y. Kimura, H. Kimura and I. Niki, *Diabetes*, **2006**, 55, 1391.
- 3) T. Morikawa, M. Kijimura, T. Nakamura, T. Hishiki, T. Nakanishi, Y. Yukutake, Y. Nagahata, M. Isikawa, K. Hattori, T. Takenouchi, T. Takahashi, I. Ishii, K. Matsubara, Y. Kabe, S. Uchiyama, E. Nagata, M. M. Gadalla, S. H. Snyder and M. Suematsu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, 109, 1293.
- 4) M. Fu, W. Zhang, L. Wu, G. Yang, H. Li and R. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, 109, 2943.
- 5) G. L. Newton, R. Dorian and R. C. Fahey, *Anal. Biochem.*, **1981**, 114, 383.
- 6) E. A. Wintner, T. L. Deckwerth, W. Langston, A. Bengtsson, D. Leviten, P. Hill, M. A. Insko, R. Dumpit, E. VandenEkart, C. F. Toombs and C. Szabo, *Br. J. Pharmacology*, **2010**, 160, 941.
- 7) X. Shen, C. B. Pattillo, S. Pardue, S. C. Bir, R. Wang and C. G. Kevil, *Free Radic. Biol. Med.*, **2011**, 50, 1021.
- 8) M. Nishida, T. Sawa, N. Kitajima, K. Ono, H. Inoue, H. Ihara, H. Motohashi, M. Yamamoto, M. Suematsu, H. Kurose, Albert van der Vliet, B. A. Freeman, T. Shibata, K. Uchida, Y. Kumagai and T. Akaike, *Nat. Chem. Biol.*, **2012**, 8, 714.

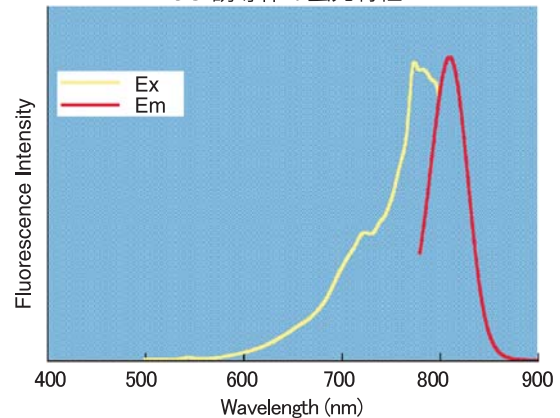
試作品

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。

お知らせ

本年もフォーラム・イン・ドージンを下記要領にて開催いたします。

本年は「生体硫化水素 (bioH<sub>2</sub>S) - 原始環境が用意したシグナル分子-」と題し、硫化水素 (H<sub>2</sub>S) をめぐる最近の研究をテーマに取り上げました。

酵素反応によって細胞内で発生した H<sub>2</sub>S が、種々の細胞機能の発現に重要な役割をしている可能性があり、一酸化窒素 (NO)、一酸化炭素 (CO) に次ぐ第3のシグナル分子として最近大きな話題になっています。H<sub>2</sub>S、あるいはそれによって修飾される多くのチオール分子など、それらの生体内での役割は多くの謎につつまれています。将来の研究の方向性や課題などについて議論を深める場になればと考えております。

第24回フォーラム・イン・ドージン

**生体硫化水素 (bioH<sub>2</sub>S)**  
- 原始環境が用意したシグナル分子 -

日時： 2013年11月15日 (金)

場所： 熊本ホテルキャッスル (熊本市中央区城東町4-2)

講演予定

- 木村 英雄 (国立精神・神経医療研究センター 神経薬理研究部)
- 野中 孝昌 (岩手医科大学 薬学部 構造生物薬学講座)
- 木村 俊秀 (大分大学医学部医学科 薬理学教室)
- 中川 秀彦 (名古屋市立大学大学院薬学研究科 薬化学分野)
- 永原 則之 (日本医科大学 基礎放射性同位元素教室)
- 梶村 真弓 (慶應義塾大学医学部 医化学教室)

## 試作品

### 内胚葉分化モニタリングキット

#### ES/iPS Differentiation Monitoring Kit - Human Endoderm

#### ES/iPS Differentiation Monitoring Kit - Mouse Endoderm

##### <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用化において注目されています。三胚葉のなかでも内胚葉は、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、効率的な分化誘導が必要であり、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。

本キットは細胞を使用せず、培養上清を測定することで分化度の確認ができます。本キットの原理は分化した内胚葉由来細胞から培養上清に分泌される Cerberus 1 タンパク質を ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法により検出するものです。

マウス ES 細胞を内胚葉へ分化した場合、Cerberus 1 は内胚葉マーカーとして用いられる Sox17 (Sry-box containing gene 17) と遺伝子発現レベルにてほぼ同時期に発現し、培養上清中に分泌された Cerberus 1 量も分化日数に比例して増大します (Fig. 1)。これらは内胚葉細胞表面マーカーである Cxcr4 (C-X-C chemokine receptor type 4)、ECD (E-Cadherin) 二重陽性細胞の割合と相関することが確認されています<sup>1)</sup>。またヒト iPS 細胞を用いた内胚葉への分化においても、培養上清中の Cerberus 1 分泌量は内胚葉マーカーである Sox17、Foxa2 (Forkhead box protein A2) 二重陽性細胞数と相関します (Fig. 2)。

このように培養上清中の Cerberus 1 を測定することで、内胚葉細胞の分化度を確認することができます。測定には培養した上清を用いるため、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可能です。また、一度に多検体の測定に用いることができるので、分化誘導剤などの薬剤スクリーニングにも有用だと考えられます。ヒト用、マウス用の 2 種類のキットをご用意しております。

尚、分化誘導法、細胞密度により Cerberus 1 量と内胚葉の割合は異なる場合がございます。

##### <キット内容>

- ・ Pre-Coated, 96-well Strip Plate
- ・ Standard
- ・ HRP Conjugated Antibody
- ・ Washing Buffer
- ・ Storage Buffer
- ・ TMB Solution

※キット形態は変更になる場合がございます。

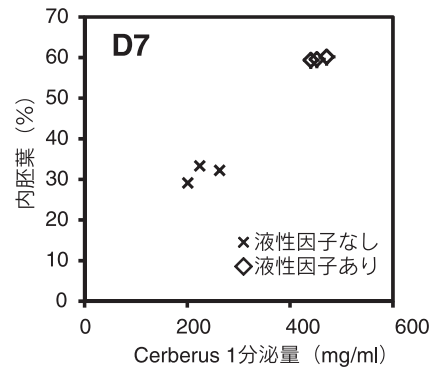


Fig. 1 マウス ES 細胞を用いた分化 7 日目の内胚葉の割合 (Cxcr4, E-Cadherin 二重陽性細胞) と培養上清中の Cerberus 1 分泌量との相関 (液性因子: Activin 10 ng/ml, bFGF 5 ng/ml)

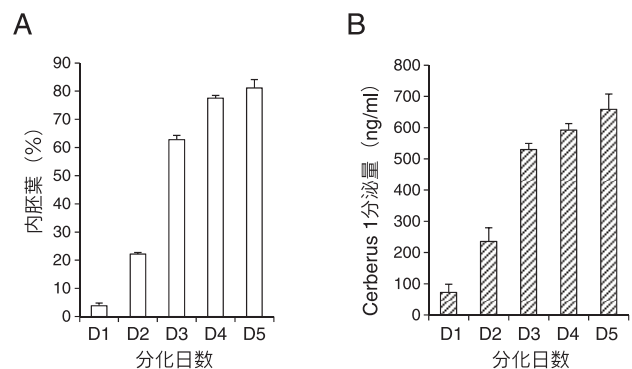


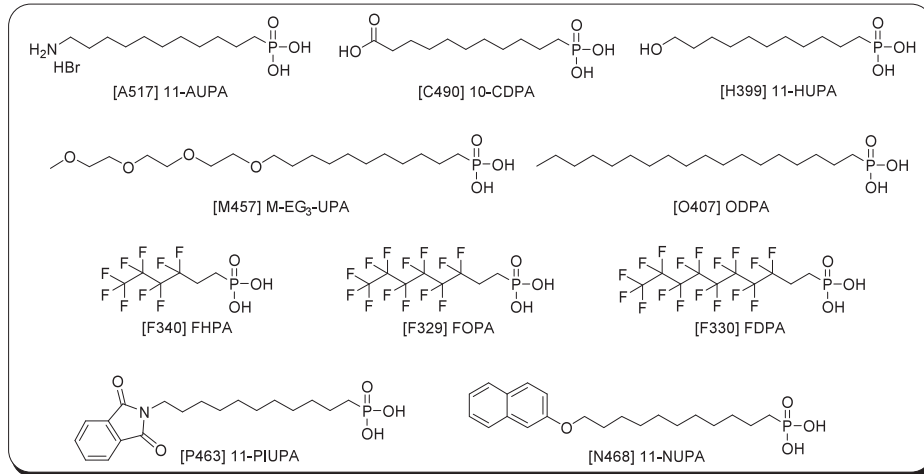
Fig. 2 ヒト iPS 細胞を用いた分化日数毎の内胚葉細胞の割合 (Sox17, Foxa2 二重陽性細胞) (A) と培養上清中の Cerberus 1 量 (B) の関係

※本製品は熊本大学発生医学研究所 桑昭苑教授・白木助教・坂野特任助教との共同研究成果です。詳細は以下の論文をご参照ください。

H. Iwashita, et al., "Secreted Cerberus1 as a marker for quantification of definitive endoderm differentiation of the pluripotent stem cells", *PLoS ONE.*, **2013**, 8(5), e64291.

新製品

金属酸化物表面処理用ホスホン酸誘導体



ホスホン酸誘導体は、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、TiO<sub>2</sub>、ZrO<sub>2</sub>、SiO<sub>2</sub>、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。

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

11-AUPAは1級アミノ基を反応性官能基として有しており、APTS(3-アミノプロピルトリエトキシシラン)のような有機シランの代替として、金属酸化物の表面処理に利用可能です。

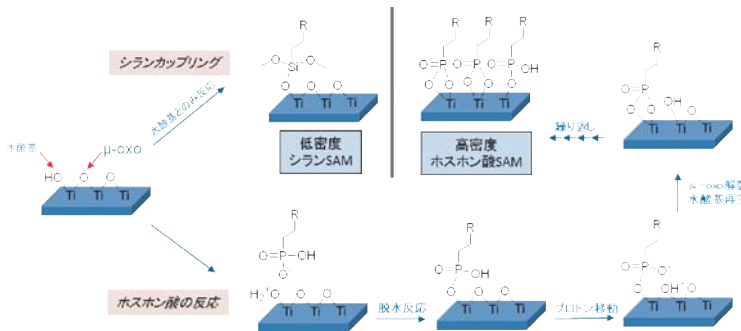


Fig. 1 TiO<sub>2</sub>上での有機シラン SAM とホスホン酸 SAM 形成の模式図

＜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℃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。

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

| 品名                     | 容量     | 希望納入価格(¥) | コード  |
|------------------------|--------|-----------|------|
| 11-HUPA                | 10 mg  | 11,000    | H399 |
|                        | 100 mg | 30,000    |      |
| M-EG <sub>3</sub> -UPA | 10 mg  | 13,800    | M457 |
|                        | 100 mg | 38,200    |      |
| 11-NUPA                | 10 mg  | 11,000    | N468 |
|                        | 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    |      |

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

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