



DOJIN NEWS

2014 No.151

ISSN 0385-1516

ドージンニュース

CONTENTS

●Review

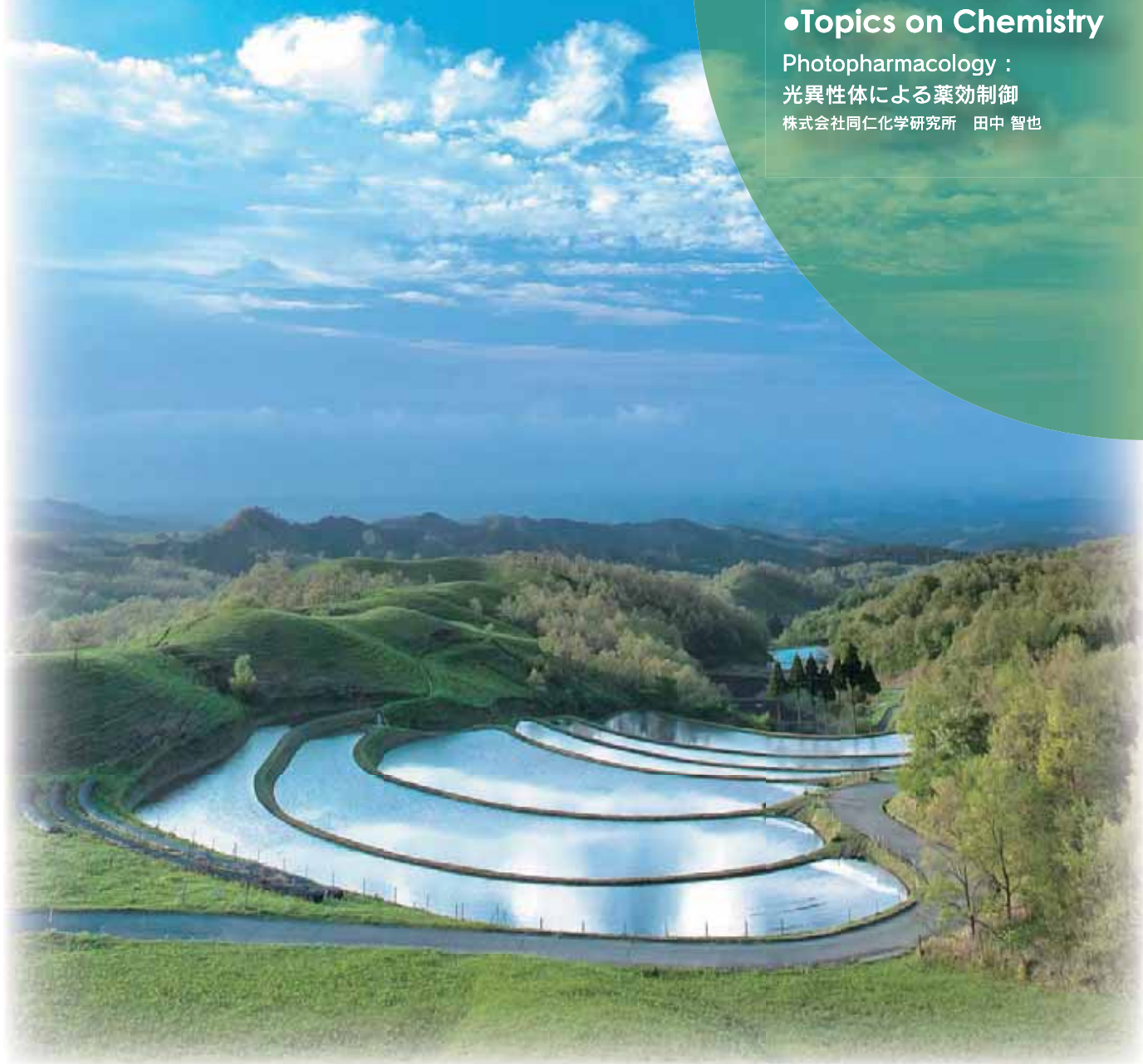
がんターゲットングのためのナノメディスン
九州大学大学院 片山 佳樹

連載

新しいナノ材料としてのカーボンナノチューブ
— グラフェンの合成と可溶化ならびにその応用展開 — ⑥
九州大学大学院 藤ヶ谷 剛彦・中嶋 直敏

●Topics on Chemistry

Photopharmacology :
光異性体による薬効制御
株式会社同仁化学研究所 田中 智也





表紙撮影：産山村扇棚田
photo：永島俊介氏

CONTENTS

Review

がんターゲットングのためのナノメディスン ●—— [1]

九州大学大学院 片山 佳樹

連載

新しいナノ材料としてのカーボンナノチューブ
—グラフェンの合成と可溶化ならびにその応用展開—⑥ ●—— [6]

九州大学大学院

藤ヶ谷 剛彦・中嶋 直敏

Topics on Chemistry

Photopharmacology：光異性体による薬効制御 ●————— [12]

株式会社同仁化学研究所 田中 智也

Commercial

近日発売予定

ミトコンドリア膜脂質過酸化物検出蛍光試薬 ●—— [11]

試作品

N⁶-2AE-NAD ●————— [14]

バイオセンサ向けホスホン酸誘導体 ●—— [14]

開発中

硫化水素研究用試薬およびキット ●————— [15]

お知らせ

第29版総合カタログ発行のご案内 ●————— [13]

パンフレットのご案内 ●————— [13]

学会展示のご案内 ●————— [18]

がんターゲットングのためのナノメディスン



片山 佳樹

九州大学大学院工学研究院
応用化学部門教授

Cancer chemotherapy has serious drawback with its poor cell specificity. Polymer-based nano-medicine will be one of the most promising strategies to access this issue. In this strategy, many researches have focused on how we can accumulate nanomedicines in tumor selectively. Probably the most versatile and important strategies for this purpose is "enhanced permeability and retention effect (EPR effect)". The effect based on enhanced extravasation of huge molecules in tumor neovasculature. As an additional effect, cancer specific ligand-receptor interaction (so-called active targeting) is also available to enhance the binding ability of nano-medicine to cancer cells. Although these strategies realize significant drug accumulation in tumor comparing with small drug administration, greater amount of nano-medicine may still distribute to other normal organs. In this context, Stimuli-responsive polymers have been applied to enhance the contrast of drug concentration between tumor and normal cells. In this review, recent progress of cancer DDS materials using stimuli-responsive strategy is reviewed. Future direction for ideal cancer nano-medicine is also considered.

1. はじめに

がんは、糖尿病合併症などと並んで、深刻な疾患である。罹患数が多いにもかかわらず、早期発見と外科的処置が可能な場合を除いて、有効な治療法も確立していない。それ以外の治療法では、例えば、放射線療法、免疫療法があり、さらには放射線療法と免疫療法の組み合わせでの有効性が指摘されている。これは、放射線療法で崩壊したがん細胞が免疫提示効率を上げるなどの効果によるものと考えられる。これらの方法はある種のがんでは効果がみられているものの、がんが免疫の低下に関係する疾患であることに加え、制御性T細胞などががんを免疫から保護しているなど、難しい問題が多く、すべてのがんですべての効果が挙げているとは言えない。一方、これとは別に薬物を用いる化学療法がある。もし、薬物ががんを治癒できれば理想的であるが、実際には、これも一部のがんを除き有効とはいえないのが現状である。特に、化学療法において問題になるのは、重篤な副作用である。制癌剤の多くは増殖活性の高いがん細胞を殺傷するためのものであり、これが他の増殖性の正常組織にも強い副作用を生じさせてしまう。期待された分子標的薬も、単一遺伝子の異常で起こる場合には良いが、多段階発癌などの場合にはがんそのものの不均一性のために効果が一定でなかったり、結局他の正常臓器に副作用がみられたりする。また、反復投与により耐性が獲得されることも、大きな問題の一つである。これらの問題を克服するには、投与量を可能な限り減らすことと、そのうえで効果を維持するため、がんへの薬物分布を可能な限り大きくすることが重要である。これらを可能にする試みとして、高分子量材料を用いる種々のナノメディスンが注目され、世界的に多くの研究がなされている。ここではそれらの戦略と材料についてまとめてみた。

2. パッシブターゲットングとアクティブターゲットング

薬物投与量を減らしつつ、がんに対する有効濃度をあげるには、薬物をコンテナに濃縮し、これをがんにより多く分布することが基本となる。このために、ナノ粒子を基本とする非常に多くのドラッグキャリアが開発されている。これらナノ粒子をよりがんに集積させるための戦略として、最も基本となるのががん新生血管における透過性向上と、がん周辺でのリンパ管未発達の状態を利用する EPR 効果である¹⁾。がん新生血管では、通常の血管に比べ内皮細胞の構築が不完全で、通常では漏出しない高分子量物質が血管外に漏出する。さらにがん部は慢性炎症を起こしていることが多く、これによる血管透過性向上も引き起こされている。さらに、急増組織であり老廃物を除去するリンパの構築も不完全であるため、漏出した巨大分子ががん部に滞留しやすくなっている(図1)。そこで、通常血管では漏出しないナノ粒子を血中に安定に循環させることができれば、結果としてナノ粒子はがん部に集積する。これがパッシブターゲットングで、ナノメディスンを用いるがんターゲットングのほとんどすべてが、何らかの形でこの効果を用いており、最も重要な戦略である。たしかに、この効果を有効に利用することは制癌剤の投与量の削減と副作用の軽減を可能とする。最も有効にこの効果を利用するためには、ナノ粒子の大きさは、腎排泄を抑えるため 10 nm 以上、脾臓などのマクロファージや肝臓のクッパー細胞などに捕捉されないために、200 nm 以下である必要がある。また、十分な EPR 効果が得られるまでである程度長時間安定に血中を循環する必要がある。片岡らの高分子ミセルを用いるナノキャリアーがその代表例であり、疎水コアに制癌剤や遺伝子を内包でき、外側の PEG 鎖からなるシェルで補体や血清アルブミンなどの血液成分との相互作用を回避し、安定に血中を循環できる。ブロック共重合体を精密に設計することで、粒径を厳密に制御でき、粒径によるがんへの集積

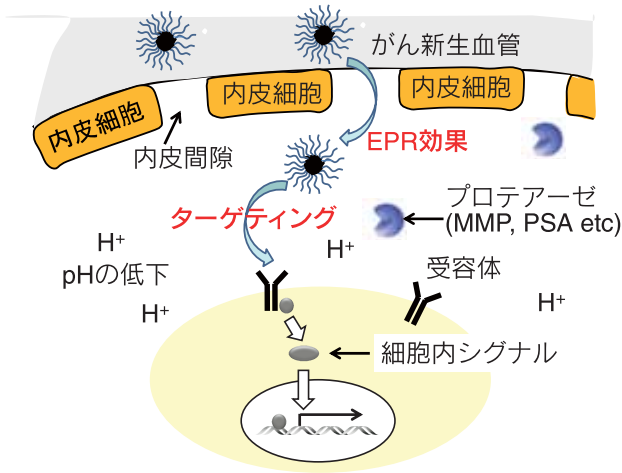


図1 がんの微小環境と、ナノメディスンをがん部に蓄積させる戦略

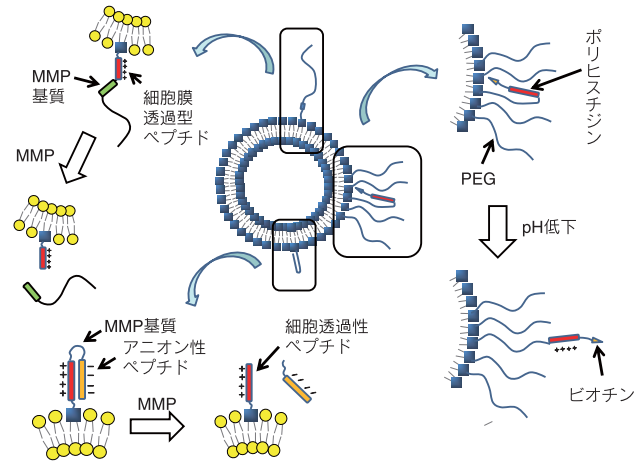


図2 pH低下に反応してナノメディスンをがん細胞に導入する戦略

と、がん組織内部への浸透を調べている。その結果、例えば EPR 効果が出にくい膵臓がんなどでは、粒径を 30 nm と小さくすることで、集積と組織内浸透を劇的に改善できると報告している²⁾。ただ、EPR 効果によってがん組織に濃縮されるナノ粒子は投与量の数%であることに注意を要する。すなわち、残りの95%は標的以外の組織や臓器に分布する可能性がある。そこで、さらにナノ粒子のがん部への集積コントラストを向上させるために、正常細胞に比べがん細胞表面や、がん血管で特に発現が亢進している分子に対する特異的リガンドをナノ粒子に導入し、その特異的相互作用を利用するアクティブターゲティングがしばしば組み合わせられる(図1)。リガンドとしては、葉酸、フェリチン、インテグリンに対する RGD ペプチド、グルタミンなど、種々の分子が利用される。ただし、この場合、がん部への漏出はあくまで EPR 効果で決まるのであり、特異リガンドがナノ粒子のがん部への漏出を加速するわけではない。特異相互作用に基づくがん組織へのナノキャリアの滞留性が向上され、結果として見かけ上のコントラストが上がったように見えるということになる。特定のがんでは一定の効果を与えるが、実際のがん組織は、不均一な細胞群からなり、これらの標的分子の発現レベルは均一ではなく、しかも、がんのステージによっても変化するので、現実のがんに対して期待されるほどの効果を与えない場合も多い。

3. がん細胞特異的に薬物を蓄積させる戦略

上述したように、EPR 効果はナノメディスンのがん部へのターゲティングの基本的戦略である。また、リガンドの利用は、EPR 効果を補足する一般的戦略として、広く研究されてきた。しかしながら、これらの戦略だけでは、薬物をがん細胞へ十分蓄積させつつ、正常細胞(組織)への分配を副作用を回避できるまでに抑制することは困難である。この問題の解決策としては、EPR 効果で蓄積してきたナノキャリア中の薬物を積極的にがん細胞に短時間で蓄積あるいは放出させ、有効濃度を上げることである。

この方策のためには、まず、がん細胞を他の正常細胞と識別し、さらにはがん細胞近傍、あるいはがん細胞内でナノ粒子からの薬物

の放出を加速する必要がある。まず、がん細胞を特異的に識別して取り込まれるようにするには、がん細胞あるいはがん組織に特徴的な性質を利用する必要がある。例えば、がんは増殖活性が高く代謝が激しい組織であり、酸素消費が激しく低酸素になっている。この場合、乳酸が蓄積し、また二酸化炭素濃度も高くなることから、周囲よりも低 pH になっている。また、細胞外マトリクスを分解して増殖、あるいは浸潤していくために、マトリクスメタロプロテアーゼ(MMP)活性が存在する(図1)。これらを利用してナノ粒子の細胞取り込み能を向上させる材料が報告されている(図2)。例えば、ナノ粒子に血中循環能を付与するために、しばしばナノ粒子表面を PEG 鎖で覆うが、PEG 鎖は EPR 効果によりがん部へ到達しても、がん細胞への取り込み効率が極めて低い。そこで、ポリ乳酸粒子表面を PEG 鎖でコーティングしたナノ粒子の PEG 末端にオリゴヒスチジンペプチドを介してビオチンを導入すると、弱塩基性のオリゴヒスチジンは、体内の pH 7.4 では中性であり、疎水性のため PEG 層に埋もれているが、がん組織周辺に達すると pH 低下によりプロトン化され、伸びきって PEG 層から外部に露出する。そのため連結していたビオチンも露出するので、ビオチン受容体を発現しているある種のがん細胞に結合し、エンドサイトーシスされる³⁾。同じく、pH 変化を利用するものとして、バクテリオドプシン C ヘリックス由来のペプチドを同様にナノ粒子表面に修飾したものも報告されている⁴⁾。この場合では、pH 低下に伴いペプチドが細胞膜透過性を有する α -ヘリックスを形成して粒子の細胞への取り込みを加速する。これらに対し、がん組織近傍の MMP 活性を利用する方法としては、オリゴアルギニンなどの細胞膜透過性のカチオン性ペプチドを特定の MMP で切断できる基質配列を介してアニオン性のオリゴアスパラギン酸と連結したペプチドをリポソームなどの表面に導入したものがある⁵⁾。正常細胞近傍では、膜透過ペプチドがアニオン性配列と結合しマスクされているが、がん近傍では基質配列が切断されてオリゴアスパラギン酸が切除されて細胞に取り込まれやすくなる。これとよく似た方法として、リポソームによく似た多機能性エンベロープ型ナノ構造体(MEND)を用いる方法がある⁶⁾。MEND は遺伝子とプロタミン誘導体などからなる核を

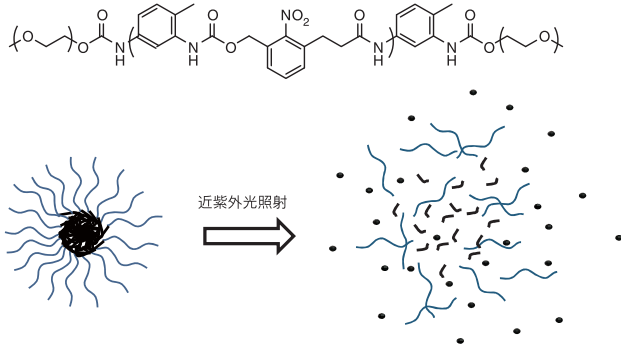
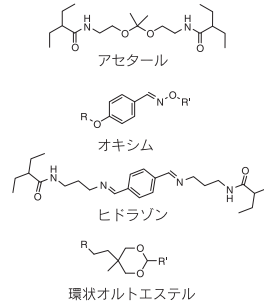


図3 光照射でキャリアーを分解してがん部で薬物を放出させる戦略

膜脂質でコートし、表面にリガンドを配したナノ粒子であるが、表面は血中循環のため PEG で覆われている。ここで、PEG は脂質分子に連結しているが、両者のリンカーに MMP の基質配列を導入しておく、がん細胞近傍でだけ PEG 鎖が切断され、細胞への取り込みが促進される。

一方、ナノメディスンからの薬物放出を加速する戦略も考えられる。ナノメディスンは本来、血中を循環している間は、薬物の漏出を抑制しなければならないので、できるだけ安定に薬物を内包できる必要がある。一方、がん部での薬物濃度を急激に上昇させるには、薬物の内包能を下げる必要がある。薬物の放出は、がん細胞の外と内の双方が考えられる。一般にナノ粒子のように大きな構造体は、がん組織内部での拡散は制限を受ける場合が多い。このため、がん部周辺までは薬物をキャリアーに濃縮して運び、その近傍で一度に放出させてやる方が効率が良いという考え方もできる。ただしこの場合は、放出された薬物は自由拡散で組織内に浸透していくため、各がん細胞内の薬物濃度の上昇は、いかにその周辺まで多くの薬物を運搬できたかに大きく依存する。一方、がん細胞内で放出する方法ではがん組織内への浸透では不利であるが、キャリアー内に濃縮された薬物が同一細胞内で一度に放出されるため、薬物濃度を、より急激に上昇させられる利点がある。特に P-糖タンパクなどが活性化している薬剤耐性細胞などでは有効な戦略である。いずれにしても、これらを実現するには、何らかの刺激によりキャリアーを壊すか、薬物との相互作用を減弱してやる必要がある。がん細胞外での放出を加速する例としては、抗癌剤をキャリアーに MMP で切断可能な基質ペプチド配列で担持するもの⁷⁾ や、3 本鎖ヘリックスを形成するペプチドを脂質に連結し、これを含むリポソームを用いる方法がある⁸⁾。後者では、MMP-9 によりペプチドが切断されると、リポソームが不安定化して薬物の漏出が加速する。また、ポリヒスチジンと PEG を連結したブロック共重合体と、ポリ乳酸と PEG を連結したブロックポリマーからなる粒子では、pH 低下により弱塩基であるヒスチジンがプロトン化して高分子ミセルが崩壊する⁹⁾。あるいは、ナノキャリアーを物理刺激などで崩壊させることも考えられる。例えば、ヘッドグループを光分解性基を介して導入した特殊な脂質を含むリポソームは、光照射により分解してリポソ

pH 低下で切断される構造ユニット



グルタチオン還元で切断される構造ユニット

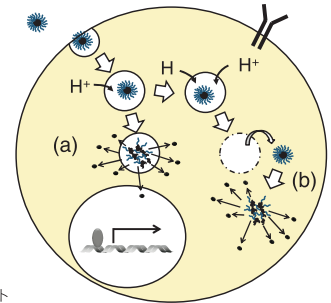
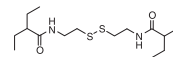


図4 がん細胞内でキャリアーを崩壊させる戦略

(a) pH 低下によるキャリアーの加水分解による崩壊
(b) プロトンスポンジ効果によるエンドソーム脱出の後、グルタチオンにより還元

ムが崩壊するので、光照射部位のみで薬物を放出できる¹⁰⁾。ただし、一般に光分解性基は紫外光のような波長の短い光で分解するので、*in vivo* では使えない。2 光子励起のような技術を用いる必要がある。実際、キャリアー高分子に光分解性ユニットを組み込んでおき、生体透過性の高い近赤外光を用いた 2 光子励起を用いて薬物放出をした例が報告されている¹¹⁾ (図 3)。このような物理刺激は、ナノメディスンががん部にのみ集積している場合には良いが、例えば、がんが臓器内に散在している場合には困難である。

これらに対し、がん細胞内でキャリアーを崩壊させ、薬物濃度を急激に上昇させる戦略は、トロイの木馬型戦略 (Trojan Horse Strategy) と呼ばれる (図 4)。このような方法論は、近年、EPR 効果を補強し、がん細胞への特異性を高めるものとして注目され極めて多くの研究が報告されているが、そのほとんどは、ナノメディスンがエンドサイトーシスにより取り込まれ、後期エンドソームに移行する過程で起こる pH の低下、あるいは、細胞内に高濃度に存在するグルタチオンによる還元を利用するものである。pH の低下により切断される官能基としては、オキシム¹²⁾、ヒドラゾン¹³⁾、アセタール¹⁴⁾、環状オルトエステル¹⁵⁾ などが報告されており、これらのユニットで高分子型キャリアーの主鎖を連結したり、薬物をキャリアーに連結したりすると、エンドソーム内で薬物放出が加速される。また、ブロック共重合体ミセル型キャリアーのコア部分にカルボン酸を配し、これにシスプラチン型の薬物を配位させておくと、pH 低下により薬剤が後期エンドソームが存在する核近傍で放出され、薬剤耐性を有するがんでも効果が得られると報告されている¹⁶⁾。還元反応を利用するものは、ジスルフィド結合を利用するのが一般的である。高分子鎖に組み込んだり、粒子内の架橋点として導入することで、粒子を安定化して薬剤放出を抑制しておき、細胞内のグルタチオンでジスルフィドが還元されて切断されることに伴い薬剤の放出が加速される仕組みである¹⁷⁾。

また、薬物が核酸医薬など、ナノ粒子がエンドサイトーシスで細胞に取り込まれた場合、リソソームでの分解が無視できない場合には、プロトンスポンジ効果がよく利用される。エンドソームにナノ粒子が取り込まれると、リソソームに運ばれる過程でエンドソーム膜状のプロトンポンプからプロトンが流入して pH 低下

が起こるが、同時に対アニオンとして塩化物イオンも流入する。ここで、キャリアー内に弱塩基性の官能基を多数導入しておく、これらが pH 緩衝剤として働き、pH 低下が抑制され、プロトンと塩化物イオンが流入し続ける。その結果、エンドソーム内の浸透圧が上がることで水が流入してエンドソームを崩壊させて細胞質にナノ粒子を脱出させて分解を防ぐ。

最近、これらの刺激を組み合わせることで、複数の制癌剤を決まった量比、それぞれ独立の放出プロフィールで細胞に投与できるナノメディスンが報告された¹⁸⁾。このキャリアーは、加水分解、光分解、還元反応による切断の3種の分解反応でそれぞれ切断可能なリンカーで各制癌剤（ドキソルピシン、カプトテシン、シスプラチン）を連結したマクロモノマーを共重合したもので、正確に混合比を統一したナノ粒子を調製できる。また、各制癌剤を放出する刺激が異なっているため、それぞれの放出プロフィールを独立に制御でき、制癌剤の正確なコンビネーション投与が可能な初めてのトロイの木馬型ナノメディスンである。従来ナノメディスンに複数の制癌剤を内包する場合には、混合比を制御することや、放出プロフィールをそれぞれ最適なものに制御することは不可能であったが、このシステムでは、制癌剤の混合比を変えることで、種々のがん最適な剤形が可能となる。

ただし、これらは正常の細胞でエンドサイトーシスされても起こりうる事柄であり、がん細胞特異的なトロイの木馬ではない。従って、前述したがん細胞を識別するための種々の要素を同時に利用して、がん特異性を確保しておく必要がある。

4. がん細胞特異的なトロイの木馬

前述のトロイの木馬は、がん細胞への特異性はEPR効果を含む既存の手法で確保し、あくまで細胞内で薬物放出を加速する仕組みを加えたものであり、がん細胞以外の細胞に取り込まれた場合にも同様のことが起こってしまう。一方、もし、細胞内での薬物放出ががん細胞に特異的な刺激で起これば、正常細胞では薬物の急激な放出は起こりえず、理想的なトロイの木馬となる。ただ、そのような原理を実現するには、がん細胞で極めてコントラストよく存在する刺激が必要である。がん細胞と正常細胞を比較する場合、最もコントラストよく異なる部分は、細胞の情報プロセシングの部分、すなわち、細胞内情報伝達系である。なぜなら、この部分の異常ががんの直接原因であるからである。なかでも、多くのがんで普遍的に異常活性化しており、しかも、正常細胞ではその活性がほとんど見られないいくつかの酵素がある。プロテインキナーゼCα (PKCα) は、未分化細胞で用いられる酵素であり、生体内では活性が高いのは血球幹細胞くらいであるが、多くのがん細胞で悪性度に比例して活性が亢進する酵素である。PKCαは、がんの増殖活性維持、転移時の細胞の浸潤、P糖タンパクなどを介する薬剤耐性の維持に必須の酵素であり、この酵素活性と予後の悪さが明確に相関することが知られている。また、近年、肺がんなどを用いて、がん幹細胞の必須酵素であることもわかっており、重要な薬物ターゲットとみなされている¹⁹⁾。従ってPKCαを、がん細胞を識別する刺激にえば、がん細胞でのみ薬物を放出できると考えられる。この場合、通常の化学療法では、がん組織中の比較的分化の進んだ悪性度の低い細胞ほど効果があるのに対し、PKCαを薬物放出刺激として用いると、悪性度の高い細胞ほど効果が出ることが期待でき、これまでの化学療法にはない大きなメリットとなることが考えられる。特にがん幹細胞を効率よく殺傷できれば大きな意味がある。

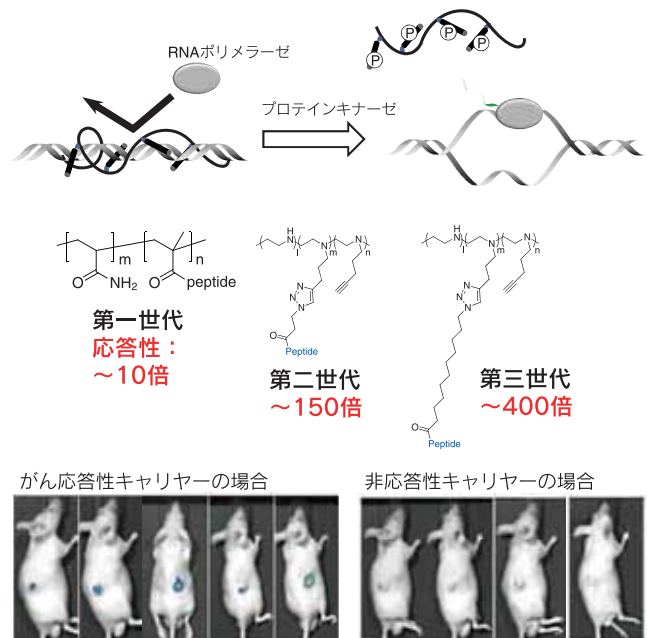


図5 PKCαで遺伝子を開放するキャリアー
 上段：プロテインキナーゼ応答型キャリアーの概念
 中段：PKCα応答型キャリアーの構造と遺伝子活性化率
 下段：実際にかん部に投与した際のルシフェラーゼ発現イメージング
 応答性キャリアーではPKCα基質と、非応答性キャリアーでは、セリン残基をアラニン残基に変えたキャリアーを使用

そこで、PKCαで薬物を放出する材料を設計すればよい訳であるが、PKCαはタンパク質リン酸化酵素（セリン/スレオニンキナーゼ）である。我々は、これまでに特定のプロテインキナーゼやプロテアーゼに反応して遺伝子を開放するキャリアーを開発してきた（図5）。このキャリアーは標的酵素でリン酸化、あるいは切断される特異基質を総荷電がプラスになるように設計しておいて、高分子に複数個側鎖として担持したものである。それにより、キャリアーは、治療用遺伝子とポリイオン錯体となりナノ粒子を形成する。この際、この種のペプチド-高分子コンジュゲートは、高効率に遺伝子を抑制できるため、標的酵素活性が低い、あるいは、キナーゼの場合、一時的に活性化するのみ（この場合は、活性が収まれば直ちにホスファターゼが脱リン酸化を起こす）の正常細胞では遺伝子を開放しないが、標的酵素が持続的に活性化している疾患細胞では、基質部分がリン酸化されることに伴う負荷電の導入、あるいはプロテアーゼでは、カチオン部位の切除が生じ、ポリイオン錯体が崩壊することで、疾患細胞内でのみ遺伝子を活性化できる。この原理を使ってこれまでにプロテインキナーゼA、Src、I-κ-キナーゼ、Akt、HIVキナーゼ、ココサツキウウイルスプロテアーゼ、カスパーゼなど種々の酵素に反応するシステムを開発してきた²⁰⁾。これらは、疾患細胞特異的な刺激を用いる真のトロイの木馬システムである。ただ、この原理をPKCαに適用するには、PKCα特異的な基質ペプチドが必要である。しかし、PKCは10種類のサブファミリーがあり、α以外のサブタイプは種々の組織で働いている。これらの基質アミノ酸配列は、いずれも似通ったコンセンサス配列を持っており、ペプチド基質で

は、 α 特異基質を設計することは不可能とされていた。そこで、1000 種以上のライブラリを設計スクリーニングしたところ、PKC α に特異性の高い基質を見出すことに成功した²¹⁾。さらに、この基質をポリアクリルアミド型高分子主鎖に担持したキャリアーを合成し、ルシフェラーゼ遺伝子と複合体化したところ、予想通りがん組織内投与で発現がみられる一方、正常組織では発現を抑制することに成功した²²⁾。この遺伝子発現は、基質ペプチド内のリン酸化部位であるセリン残基をアラニン残基にかえると消失することから、確かに PKC α によるリン酸化によるものと考えられた。ただし、この遺伝子発現の上昇は高々 10 倍であり、正常組織での発現を完全に抑制すると発現量が低くなる欠点があった。そこで、高分子主鎖をポリエチレンジイミンにしたキャリアーを設計合成したところ、リン酸化に伴う遺伝子発現亢進が 150 倍に改善された²³⁾。これは、遺伝子とキャリアーの複合体が細胞に取り込まれた後、ポリエチレンジイミン主鎖のプロトンスポンジ効果で、複合体のエンドソーム脱出能力が向上したことに基づくものである。さらに最近、これに疎水基を導入してやると、遺伝子活性化効率を 400 倍にまで改善させることに成功している²⁴⁾。カスパーゼ-8 遺伝子を用いた担癌マウスにおけるがん治療を検討したところ、顕著に増殖を抑制し、肺転移も抑制できることが明らかになった。ただし、このナノ粒子複合体は、腫瘍内投与では効果を発揮するが、血中投与すると複合体が血液成分と相互作用して崩壊してしまう問題があったが、最近、我々はこれを回避する新しい方法の開発に成功した。

5. おわりに

がんを標的としたナノメディスンに関して、がんの特異性を発揮させるための方法論と、それを可能にするキャリアーの実際を紹介した。現実のがんは、単一遺伝子の異常による白血病などの一部を除き、極めて多様性の高い疾患であり、また、同一のがん組織中でも非常に不均一な細胞集団から構成されている。従って、これらに対し逐一有効な薬剤、あるいは薬剤カクテルを開発し、さらに、どの薬剤が個々のがんの有効であるかを的確に判断していくことは非常に難易度の高い課題である。一方、もしがんが薬剤を特異的に運べれば、すでに断念された薬剤が投与可能となり、経済的にも有利である。そのため極めて多くのナノメディスンが研究されてきたが、がん部への蓄積に限界があり、しかも、固形がんでも多くの微小がんとして偏在したり転移したりするものには適用が難しく、実際には、壁細胞などの存在により EPR 効果が得られないものも存在する。これらの問題を解決するには、さらなる蓄積効率を実現する全く新規な原理か、5%の蓄積率を容認して副作用を回避させる新たな DDS 戦略が必要である。

[参考文献]

- H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura and K. Hori, *J. Control. Release*, **2000**, 65, 271-284.
- H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M. R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama and K. Kataoka, *Nature Nanotechnol.*, **2011**, 6, 815-823.
- E. S. Lee, K. Na and Y. H. Bae, *Nano Lett.*, **2005**, 5, 325-329.
- O. A. Andreev, A. D. Dupuy, M. Segala, S. Sandugu, D. A. Serra, C. O. Chichester, D. M. Engelman and Y. K. Reshetnyak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, 104, 7893-7898.
- E. A. Goun, R. Shinde, K. W. Dehnert, A. Adams-Bond, P. A. Wender, C. H. Contag and B. L. Franc, *Bioconjugate Chem.*, **2006**, 17, 787-796.
- H. Hatakeyama, H. Akita, K. Kogure, M. Oishi, Y. Nagasaki, Y. Kihira, M. Ueno, H. Kobayashi, H. Kikuchi and H. Harashima, *Gene Ther.*, **2007**, 14, 68-77.
- Y. Chau, R. F. Padera, N. M. Dang and R. Langer, *Int. J. Cancer*, **2006**, 118, 1519-1526.
- J. Banerjee, A. J. Hanson, B. Gadani, A. I. Elegbede, S. Tobwala, B. Ganguly, A. V. Wagh, W. W. Muhonen, B. Law, J. B. Shabb, D. K. Srivastava and S. Mallik, *Bioconjugate Chem.*, **2009**, 20, 1332-1339.
- E. S. Lee, K. Na and Y. H. Bae, *J. Control. Release*, **2005**, 103, 405-418.
- B. Chandra, R. Subramaniam, S. Mallik and D. K. Srivastava, *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 1730-1740.
- D. Han, X. Tong and Y. Zhao, *Macromolecules*, **2011**, 44, 437-439.
- Y. Jin, L. Song, Y. Su, L. Zhu, Y. Pang, F. Qiu, G. Tong, D. Yan, B. Zhu and X. Zhu, *Biomacromolecules*, **2011**, 12, 3460-3465.
- J. A. MacKay, M. Chen, J. R. McDaniel, W. Liu, A. J. Simnick and A. Chilkoti, *Nat. Mater.*, **2009**, 8, 993-999.
- H. T. T. Duong, C. P. Marquis, M. Whittaker, T. P. Davis and C. Boyer, *Macromolecules*, **2011**, 44, 8008-8019.
- W. Chen, F. Meng, F. Li, S.-J. Ji and Z. Zhong, *Biomacromolecules*, **2009**, 10, 1727-1735.
- M. Murakami, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Wu, M. R. Kano, T. Yamori, N. Nishiyama and K. Kataoka, *Sci. Transl. Med.* **2011**, 3, issue 64, 64ra2.
- Y.-L. Li, L. Zhu, Z. Liu, R. Cheng, F. Meng, J.-H. Cui, S.-J. Ji and Z. Zhong, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 9914-9918.
- L. Liao and J. Liu, E. C. Dreaden, S. W. Morton, K. E. Shopsowitz, P. T. Hammond, J. A. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 5896-5899.
- W. L. Tam, H. Lu, J. Buikhuisen, B. S. Soh, E. Lim, F. Reinhardt, Z. J. Wu, J. A. Krall, B. Bierie, W. Guo, X. S. Liu, M. Brown, B. Lim and R. A. Weinberg, *Cancer Cell*, **2013**, 24, 347-364.
- D. Asai, M. Kuramoto, Y. Shoji, K. B. Kodama, J.-H. Kang, K. Kawamura, H. Miyoshi, T. Mori, T. Niidome, H. Nakashima and Y. Katayama, *J. Controlled Release*, **2010**, 141, 52-61.
- J.-H. Kang, D. Asai, S. Yamada, T. Riki, J. Oishi, T. Mori, T. Niidome and Y. Katayama, *Proteomics*, **2008**, 8, 2006-2011.
- J.-H. Kang, D. Asai, J.-H. Kim, T. Mori, R. Toita, T. Tomiyama, Y. Asami, J. Oishi, Y. T. Sato, T. Niidome, B. Jun, H. Nakashima and Y. Katayama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 14906-14907.
- R. Toita, J.-H. Kang, T. Tomiyama, C.-W. Kim, S. Shiosaki, T. Niidome, T. Mori and Y. Katayama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 15410-15417.
- C.-W. Kim, R. Toita, J.-H. Kang, K. Li, E. K. Lee, G. X. Zhao, D. Funamoto, T. Nobori, Y. Nakamura, T. Mori, T. Niidome and Y. Katayama, *J. Controlled Release*, **2013**, 170, 469-476.

[著者プロフィール]

氏名：片山 佳樹 (Katayama Yoshiki)

所属：九州大学大学院工学研究院応用化学部門 教授

九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点 拠点長

九州大学先端医療イノベーションセンター

九州大学分子システムセンター

連絡先：〒819-0395 福岡市西区元岡 744 番地

TEL/FAX：092-802-2850

E-mail：ykatatcm@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

学位：工学博士・九州大学大学院工学研究科・合成化学専攻

研究テーマ：細胞シグナル工学（新規治療・診断・イメージング・創薬支援ツール）

連載

**新しいナノ材料としての
カーボンナノチューブ
— グラフェンの合成と可溶化ならびにその応用展開 —**

⑥

藤ヶ谷剛彦、中嶋直敏
九州大学大学院

今回、「グラフェンの合成と可溶化ならびにその応用展開」について概説する。

1. グラフェンの構造と定義

グラフェンは2次元平面上でベンゼン環が縮環した構造の、1原子層の厚みの炭素ナノシートである。グラフェンを積層させた物質がグラファイト（石墨。身近なところでは鉛筆の芯、電池材料など多彩な分野で利用）に相当する。2010年のノーベル物理学賞は、この「グラフェンの研究」で Geim と Novoselov が受賞し、これがグラフェンの研究を著しく加速した。彼らは、スコッチテープ（セロテープ）で HOPG（高配向熱分解グラファイト）を劈開し、この中のグラフェンを基板面に転写し¹⁾、その特異な電子特性（ヘリウム温度での量子ホール効果や超高速キャリア移動）を明らかにした²⁾。原料となるグラファイトは世界では100万吨以上の需要があり、先に注目を浴びていたカーボンナノチューブと異なり、安価に調達できることも研究を加速させた理由の一つである。厳密には、一層ナノシートがグラフェンであるが、グラフェンが何層、何十層にも重なった積層物もグラフェンと呼んだり、グラファイトを酸化処理して得られるいわゆる「酸化グラフェン」に対してもグラフェンと記述する論文が多く見受けられるので注意が必要である。

2. グラフェンの基本特性

グラフェンは電子が平面に閉じ込められているために、グラファイト、CNTやバルクカーボンなどと異なるバンド構造を持ち、図1に示したように、伝導帯と価電子帯が、ディラック点と呼ばれる1点で交わる特異な構造をしている。グラフェン中の電子は、一種の自由状態であり、質量のない電子のような振る舞いをする。電子とホールの移動度が同程度であり、両極性伝導体である。グラフェン中の電子は、室温でも長距離にわたって衝突せずに弾道のように移動することが可能となる。その結果、電流を導くグラフェン電子の能力は、室温のシリコンのような通常の半導体の能力をはるかに凌ぐことになる。Geimらは、キャリア移動度10,000 cm²/Vsを報告しており、これがノーベル賞につながる成果となった¹⁾。キャリア移動度はその後、200,000 cm²/Vsが報告された（シリコンの約100倍）。電流密度耐性が200,000,000 A/cm²（Cuの約100倍）、熱伝導率は～5,000 W/mK、ヤング率は～1,100 GPa、比表面積～2,500 m²/gであり、まさに極限機能

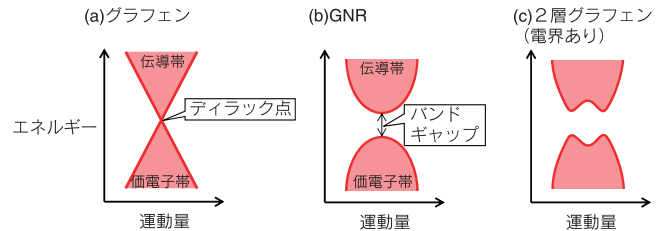


図1 グラフェンのバンド構造

をもったナノ材料である。この電子構造、特性から、次世代半導体（フレキシブル）デバイス、通信デバイス、エネルギー材料、次世代（高分子）複合材料、スピントロニクス材料として大きな期待が集まっている。

3. グラフェン研究の歴史

グラフェン研究の歴史を概観する。1947年にはグラフェンの電子構造理論が発表された。1970年代にはグラファイト層間に異種物質をインターカレートすることにより高い伝導性や超伝導が発現することが見出された。カーボンナノチューブ（CNT）同様、グラフェン研究においても日本人研究者が重要な研究足跡を残している。1971年水島らは、グラファイトからセロハンテープによる劈開により～30層グラフェンを作製し、その電気伝導度、移動度、ホール係数を報告した³⁾。吉澤ら⁴⁾、藤田ら⁵⁾、榎ら⁶⁾のグラフェン端（エッジ）に関する理論と実験、安藤ら⁷⁾の電子輸送現象の理論など先駆的研究がわが国から報告された。

4. グラフェンの層数の決定と分離精製

「グラフェンの層数」の決定はグラフェン研究において重要である。これらに対して光学顕微鏡観察、原子間力顕微鏡（AFM）およびラマン分光測定が利用できる。光学顕微鏡観察により干渉効果を利用してグラフェンを観察する方法である。この方法は、光の透過の差を見ているため、透過の弱い積層数が多い場合（6層～）は判別が困難になる弱点がある。この場合、走査型電子顕微鏡（SEM）では、グラフェン付シリコン基板に電子線照射をすると、層数が多いほど基板からの2次電子の量が減るために、加速電圧の調整により層数に応じたコントラストを得られる。ラマン分光法も層数決定において強力である。単層グラフェンではG'バンドが2678.8 cm⁻¹に現れ、層数が増えるごとに高波数にシフトし、ピークはブロードになる。さらにGバンドとG'バンドの比が、5層までは直線的に増加しそれ以上では飽和する事実も層数決定の有効な手がかりになる⁸⁾。マッピング機能が付いた顕微鏡ラマン分光システムであれば、光学顕微鏡像と対応させ信頼度の高い層数決定ができる。観察範囲は狭くなるがAFMも層数決定に利用できる。グラフェン1層は～0.34 nmだから、高さ測定を行うことにより層数が決定できる。一方で、数μm以下のフレーク状になることが多い酸化グラフェンを観察する場合、光学顕微鏡での層数決定や形状観察が困難になるため、この材料に対しては、AFMの利用が推奨できる。

5. グラフェンの合成（作製）

5.1. 機械的剥離法

次の方法を用いる。i) HOPGを市販のスコッチテープで剥離後、

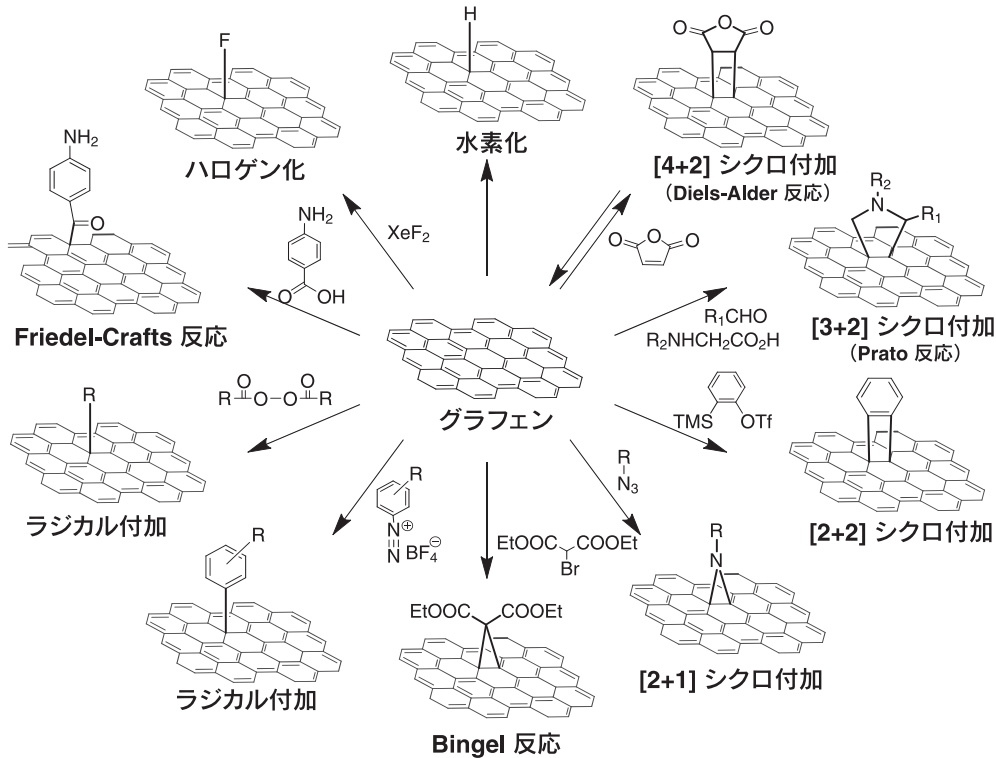


図 2 化学修飾によるグラフェン機能化

テープを有機溶媒で溶解させるか、もしくは基板上に転写し、単層のグラフェンシートを作製する。効率が良いとは言えないが非常にシンプルである。ii) CNT を分散する *N*-メチルピロリドン (NMP) や *N,N*-Dimethylformamide (DMF) 中でグラファイト超音波照射処理をする⁹⁻¹⁰。これらの溶媒中で剥離グラフェン分散能は 0.01 mg mL^{-1} であるが、Tour らは *o*-Dichlorobenzene (ODCB) 中でグラファイト剥離を行うことで、 0.02 mg mL^{-1} 以上のグラフェン分散溶液が得られることを報告している。彼らはこの分散溶液を用いて化学修飾を行うことで、有機溶媒でグラフェンを分散する有用性を示した¹¹。iii) 界面活性剤やピレン誘導体溶液中で、グラファイトや HOPG に超音波照射し、物理的に剥離させ、単層あるいは～5層以下のグラフェン可溶性溶液が作製できる¹²。また、イオン液体は、カーボンナノチューブ同様、グラフェンに対しても良好な分散能を示す¹³。詳細は後述する。

5.2. CVD 法

最も一般的なのはニッケル、白金、イリジウムなどのさまざまな金属基板を用いた熱分解化学気相成長法 (熱分解 CVD 法) でのグラフェン合成である。炭素源としてメタンのような炭化水素化合物を用い、一般に $800 \sim 1,000^\circ\text{C}$ の高温で合成する。単層グラフェンの合成には、適切な条件設定が必要である。中でも銅箔上での熱分解 CVD では、ほぼ単層グラフェンが合成できる。これはニッケルにおける生成メカニズムとは異なり、銅表面への炭素吸着を経て触媒作用により生成するからと考えられている。銅箔上では、キャストした高分子フィルムの熱分解でもグラフェン

が生成することが報告されている。最近、東北大学の加藤らは、rapid heating プラズマ CVD で、ニッケルナノバーを原料として、位置および配向を制御した半導体グラフェンナノリボンの作製に成功している¹⁴。

5.3. 酸化グラフェン (Oxidized Graphene: OG) の還元¹⁵

酸化グラフェンを得る方法の歴史は古く、1840年に最初の報告がある。低コストで大量合成ができる Brodie 法、Staudenmaier 法、Hummer 法、改良 Hummer 法が知られている。しかし、単層グラフェンを意識した合成に注目が集まったのは2006年の Ruoff らの報告以降であろう¹⁶。基本は、グラファイトを硫酸/過硫酸カリウム/過マンガン酸カリウムなどの強酸で酸化し、水酸基、カルボン酸、エポキシ基、カルボニル基を含む水溶性の酸化グラファイト/グラフェン (コロイド溶液) を合成し、これに還元剤 (ヒドラジンが一般的。ビタミン C も使える) を加えて、あるいは光 (カメラフラッシュ、レーザー含む) 照射で薄層グラフェンを得る方法である (このとき、界面活性剤や、ピレンアンモニウムなどの存在下で行うと薄層グラフェンの凝集を防ぐことができる)。サイズは数百 nm が多いが、数 μ サイズも可能である。還元後においても水酸基やカルボン酸基の反応基が残存するため「グラフェン」ではなくあくまでも「酸化グラフェン」である。実際に、得られる生成物は抵抗が～kΩと高い。しかし、応用展開を考えると、これら残存した官能基を反応の足掛かりとすれば「機能性酸化グラフェン」に展開しやすいというメリットがある。

6. グラフェンの修飾

グラフェンの修飾アプローチにおいて CNT の可溶性・機能化で蓄積された戦略がそのまま生かされている。手法としても、CNT と同様、 sp^2 表面への共有結合的修飾である化学修飾 (6.1) と、非共有結合的な修飾である物理修飾法 (6.2) に大別できる。

6.1. 化学修飾¹⁷⁾

最も簡便な化学修飾法は酸化グラフェンに生成されているカルボキシル基、ヒドロキシル基、エポキシ基を足掛かりとして反応を行う手法である。この場合、出発物質である酸化グラフェンが有機溶媒に対して分散性が高いために、反応がやり易い利点がある。それ以外の化学修飾法に関して図 2 にまとめた。

有機化合物による修飾ではないが水素プラズマを用いるグラフェンの水素化はグラフェン物性の変調という意味で注目されている。得られる水素化グラフェンはグラファン (Graphane) と呼ばれ、理論計算も含めて多くの研究がなされている。また、グラフェンのフッ素化も劇的な電子的・光学的変化を伴うために興味深い。フッ素化は XeF_2 との反応や炭化フッ素高分子へのレーザー照射で生じるフッ素ラジカルとの反応などにより達成される。フッ素化グラフェンの物性や他のハロゲン化手法もまとめた優れた総説¹⁸⁾がある。

6.2. 物理修飾¹⁹⁾

ここでも CNT で用いられていた非共有結合修飾の手法が活用されている。グラフェンの場合は、グラファイトを修飾分子 (= 分散剤) 存在下、溶媒中で超音波分散させる。分散性の高い酸化グラフェンを出発物質として物理修飾を行う例も数多く報告されている。

グラフェンの分散に用いられる分散剤にはエントロピー的利得で駆動されるミセル分散型とエンタルピー的利得が得られる物理吸着型とがある。前者は両親媒性分子 (界面活性剤) が相当し、ピレンのような芳香族分子を含む場合は後者である。これまで、CNT の分散能の良好であった分散剤のうち、いくつかを試され、実際にグラフェン剥離能と分散能力を示した。

2011 年、Guardia らは様々な両親媒性分子によるグラファイト剥離および得られるグラフェンの分散量比較を行った。イオン性界面活性剤として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)、コール酸ナトリウム (SC)、デオキシコール酸ナトリウム (DOC)、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (HTAB) 等や非イオン性両親媒性分子として Pluronic[®] P-123、Tween 80、Triton X-100、Polyvinylpyrrolidone (PVP) 等が検討され、イオン性より非イオン性界面活性剤の分散能が高い傾向にあり、中でも Pluronic P-123 が最も分散能に優れていることが明らかとなった。また、これまで CNT 分散で明らかとされたように両親媒性を持つ poly[styrene-*b*-(2-vinylpyridine)] (PS-*b*-P2VP) や poly(isoprene-*b*-acrylic acid) (PI-*b*-PAA) のようなブロックコポリマー⁵⁵⁾ や 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy (polyethyleneglycol)-5000] (DSPE-mPEG) のようなリン脂質誘導体も剥離・分散に有効である。

物理吸着型では図 3 で示したピレン誘導体において剥離・分散能の評価が行われている。この結果、1-pyrenesulfonic acid sodium salt (Py-SASS) が最も剥離・分散能効率が高く 0.8 ~ 1.0 mg mL⁻¹ にも及ぶ。CNT 可溶性にも用いられるアントラセン誘導体、ポルフィリン誘導体も剥離・分散能が報告されている。5, 10, 15, 20-tetrakis(4,11-acetylthioundecyl-oxyphenyl)-21*H*,23*H*-porphyrin (TATPP) はグラフェンとの強い相互作用により剥離後得られる複合体において明確な UV 吸収のシフトがみられる。以上の分散剤は π - π 相互作用を吸着に利用しているが、カチオン- π 相互作用、アニオン- π 相互作用の利用もグラフェンの可溶性、機能化には有効であろう。

7. バンドギャップをもつグラフェンの合成

グラフェンの高い移動度は半導体材料として大きな魅力であるが、バンドギャップがないために、トランジスタとしてのオンオフ比は 10 程度である。従ってグラフェンのバンドギャップ形成が重要である。これに対して、グラフェンの 1) ナノリボン化、

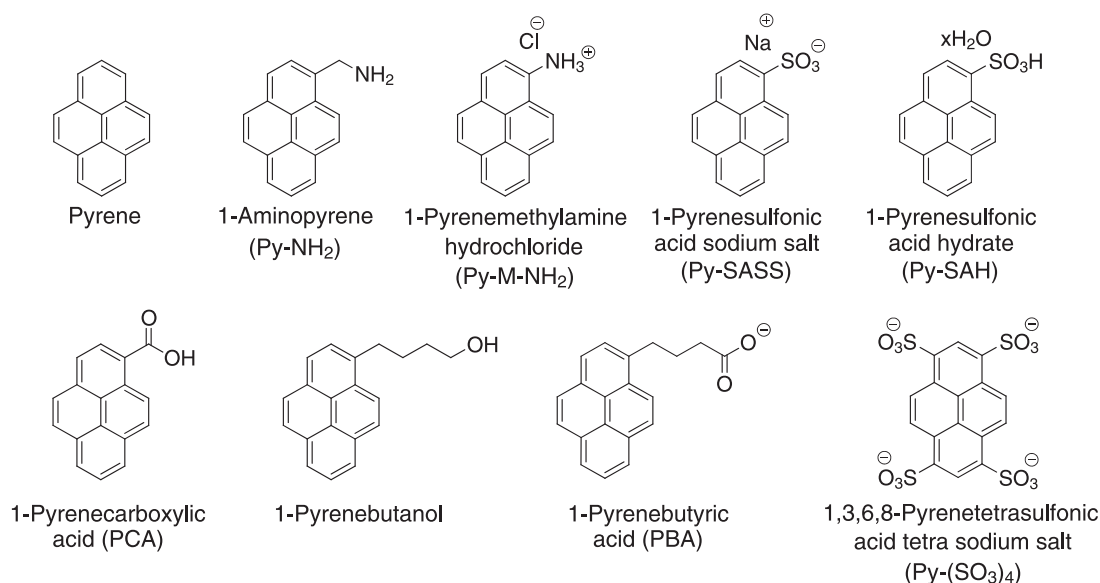


図 3 ピレン誘導体分散剤の構造式

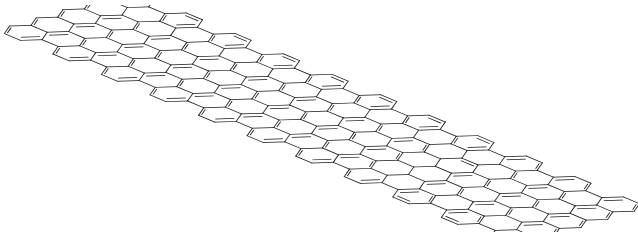


図4 GNRの構造式

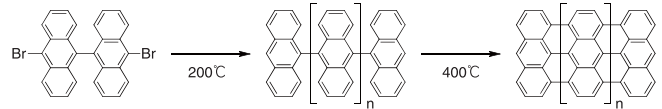


図5 ベンゼン3つ分の幅を持つGNRの合成

2) 2つの一層グラフェンの重ね合わせ(二層化)、3) ナノメッシュ化、4) 化学修飾によるバンドギャップ生成などが報告されている。

7.1. グラフェンナノリボン (GNR) の合成

グラフェンは幅 10 nm 以下の擬一次元形状、いわゆるグラフェンナノリボン (GNR、図4) にすることでバンドギャップが形成され、半導体として振る舞うことが日本のグループから理論的に予言されていた(しかもグラフェンブーム以前に)²⁰⁾。この理論的予想は、電子線リソグラフィーを用いたグラフェンの加工による GNR 作製により確かめられた。リソグラフィー法とはまったく異なる GNR 作成法が2009年のNature 4月号に掲載された。これは、CNT を縦に割いて GNR を作製する斬新な報告で、2報同時に提出された。Dai らはポリメチルメタクリレート (PMMA) フィルムから部分的に露出させた MWNT をアルゴンプラズマエッチングし、MWNT を割いて GNR の作製に成功した²¹⁾。一方、Tour らは酸処理という簡単な手法で MWNT を割くことができることを示した²²⁾。Tour らの手法は簡単で高収率ではあるが、酸処理という厳しい条件なためにリボン幅の細い GNR は酸化分解により残存せず、得られる幅 100 nm 以上の GNR も多くの欠陥が存在する。その後の条件最適化により 100 nm 以下の GNR も高収率で合成されるようになった²³⁾。彼らは青山学院大学の春山や産業総合研究所の末永らと共同で GNR の高温水素アニーリングによりおよそ 100 nm 幅のナノリボンに~ 50 meV のバンドギャップを作り出し、これが、リソグラフィーにより作製した GNR よりも高性能の FET デバイスとして動作することを報告している²⁴⁾。

一方、Dai のグループは、熱処理した膨張黒鉛の分散溶液から幅 10 ~ 50 nm の GNR を共役系高分子である poly(*m*-phenylenevinylene-co-2,5-dioctoxy-*p*-phenylenevinylene) (PmPV) を用いて抽出した報告や²⁵⁾、CNT に空気酸化で「切れ込み」を入れてから PmPV 存在下超音波照射することで収率よく CNT を「開いて」GNR 作製を行う極めてユニークなアプローチも報告している²⁶⁾。彼らのグループで得られた GNR においては 10⁷ に迫る極めて高いオンオフ比が得られている。移動度に関しても 100 ~ 200 cm²/Vs 程度であり、オンオフ比と移動度の組み合わせとして

は GNR で最高値であろう。

多環芳香族化合物をモノマーとし、これを重合および縮環することで幅の定まったナノリボン様物質を合成する試みが Mullen ら²⁷⁾ により展開されている。彼らは多環芳香族分子を金の結晶面上で加熱重合させることでベンゼン環 3 つ分の幅を持つグラフェンを作製し、走査型トンネル顕微鏡観察で構造を示した(図5)。また有機合成によりベンゼン環 4 つ分の幅を持つグラフェンナノリボンをフラスコ中で合成することに成功している(図6)。

7.2. 二層グラフェンの利用

二層化したグラフェンに電界をかけることでもバンドギャップが形成することが理論的に予想されていた²⁸⁾(図1)。Zhang らはグラファイトからの剥離法で作製した二層グラフェンフレークをシリコン基板に固定し、層に垂直に電界を印可し、バンドギャップ (250 meV) を形成した²⁹⁾。Tour らはシリコン基板上のニッケルに炭素源となる高分子を塗布し、1,000°C で焼成すると、炭素がニッケル層内を拡散し、シリコン基板とニッケル層との間に二層グラフェンを形成することを見出した³⁰⁾。また、篠原らは、多層 CNT から、内部の CNT を機械的に抜き取り、20 ~ 30nm の SWNT を圧縮、重ね合わせることで、バンドギャップをもつグラフェンナノリボンが合成できることを示した。³¹⁾

7.3. ナノメッシュ化

グラフェンに規則的に穴を開けた「グラフェンナノメッシュ構造(図7)」でもバンドギャップが形成される。穴の間の「ネック」の部分が GNR と同様に働き、ギャップを形成する³²⁾。グラフェンのナノメッシュ化に関しては、ブロック共重合体の生み出す規則的なパターンを利用して規則的な穴を開ける方法で達成されている⁷⁵⁾。グラフェン上に塗布したブロックコポリマーの一方の成分をドライエッチングし、そのままグラフェンにパターンを描画する方法である。この手法は共重合比を制御することで、穴の大きさや間隔を精密に制御することが可能である。また、ナノインプリントリソグラフィー法やコロイドリソグラフィー法を用いてもグラフェンナノメッシュ構造が作製できる³³⁻³⁴⁾。

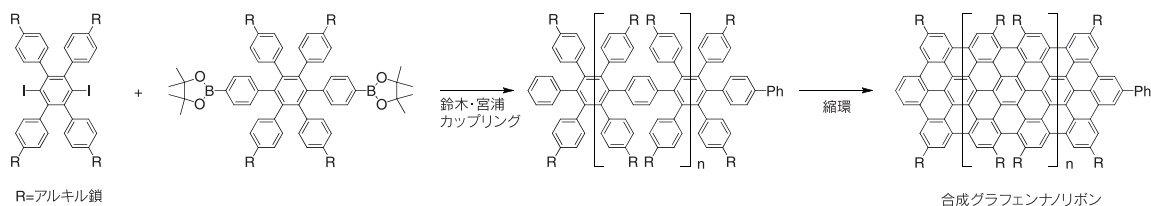


図6 ベンゼン4つ分の幅を持つGNRの合成

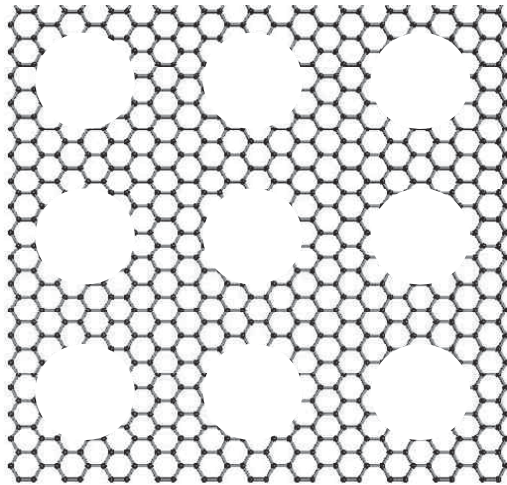


図7 グラフェンナノメッシュ構造の模式図

8. グラフェンの応用

8.1. フレキシブル透明電極

1原子分の厚みからなるグラフェン1枚は高い透明性と導電性を有すると期待でき、フレキシブル透明導電性膜の有望な候補と期待されている。計算では、表面抵抗値はドーピングすることにより層の数(N)に応じて $R_s = 62.4/N \Omega/\square$ 、透過率T(%)は $T = 100 - 2.3N(\%)$ と予想されている。例えば1層のグラフェンでは $62.4 \Omega/\square$ 、97.7%となり、数層重ねることで太陽電池用透明電極用途 ($10 \Omega/\square$)にも使えたと予想される。大面積のグラフェン薄膜を作製するには溶媒分散性の比較的良好、大きさ数十nm～数十 μm 程度のフレーク状のグラフェン(または酸化グラフェン)を基板に塗布するウェットプロセスと、金属基板上にCVD成長させたグラフェンを透明基板に張り合わせるドライプロセスがある。

溶液法はCNT薄膜作製と同様なプロセスが転用できるが、分散の段階で酸化されたグラフェンの完全還元は困難である。後者の方法では純度の良いグラフェンを切れ目なく作製できる長所がある。2010年、成均館大学(韓国)のBaeら³⁵⁾は、銅箔上に成長させポリマー基板に転写し、 $30 \Omega/\square$ 、90% 30インチのグラフェン薄膜を合成したが、まだ実用化には至っていないようである。

8.2. トランジスタ

一方、グラフェンは次世代半導体デバイスとしても極めて有望である。2次元平面であるグラフェンは2次元基板平面上にリソグラフィベースでデバイスを作りこむ現行のトップダウン型プロセスにとって好都合と考えられる。実際に、炭化シリコン上に成長させた数層グラフェン膜上にレジストを塗布し、電子リソグラフィと酸化エッチングを組み合わせることでグラフェンの必要部分だけを残し電極を取り付けるという手法でデバイス作製が行われている。IBMはこの手法により作製したグラフェントランジスタで遮断周波数100GHzを達成している³⁶⁾。

実際のデバイス化においてはグラフェンが基板から摂動を受ける可能性を考慮する必要がある。より高いオンオフ比獲得のためにさらにバンドギャップを開ける構造にする必要がある。

8.3. スピン輸送デバイス

スピン輸送デバイスとは電子のスピン向きを制御して伝播させるデバイスである。電子の持つ電荷に加えて、スピンの向きも利用して従来のエレクトロニクスを高機能化させようというスピントロニクスという分野では、スピン輸送デバイスが必須になる。これまでシリコンやガリウムヒ素などの半導体を中心として研究されていたが、極低温でのみの実現にとどまっていた。グラフェンは軽元素である炭素しか含まないことから、グラフェン内の電子はそのスピンの原子核による攪乱を受けにくい(スピン-軌道相互作用が小さく、電子の平均自由行程が長い)。そのためグラフェン中ではスピンの向きをほとんど変えることなく長距離を伝播させることが可能となる。大阪大学の白石らは、室温でグラフェンへスピンを注入し、スピンが揃った状態で電子が拡散していることを電気的に検出することに成功している³⁷⁾。グラフェンは非磁性体であるにもかかわらず磁石(スピン)の向きを変えずに流せる稀有な物質ということになる。これまでのグラフェンの研究において、ほとんどのアプリケーションはCNTに置き換え可能であったが、室温スピン輸送はグラフェンのみで見いだされている現象である。同様な研究は、海外からも報告されている³⁸⁻³⁹⁾。

9. シリーズのおわりにあたって

カーボン(炭素)はごくありふれた材料であり、人類は古くから用いてきた。その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(CNT)およびグラフェンである。ナノカーボンは、'生まれながらに'金属の銅より電気をよく通す導電性高分子である。さらに、鋼鉄より強度が10～100倍強く、超弾性を示す、銀と同程度の高い熱伝導性を持つ、耐熱性が非常に高い(空気中でも500℃くらいまで、真空だと1000℃までは燃えない)。高分子のようにしなやかで、フィルムを作ることができる、空気中でも安定で、多くの薬品を加えても構造や物性が変化しない(つまり取扱いやすい)など、これまでに存在する物質では考えられないような極限の機能をもった、まさに「夢」の化合物であり、これまでに存在する他の物質、材料を大きく凌駕している。

CNTおよびグラフェンの分散技術は、CNT、グラフェンの応用展開を図る上でキーテクノロジーであり、現在、電池電極触媒や透明導電膜、電子デバイス、超軽量高性能複合材料など実用化が近付いてきている。また、より安定にそして大量生産に向けた分散技術や、半導体CNTと金属性CNTの分離/応用研究も進展している。しかし、CNTおよびグラフェンの分散は、CNTの種類や実験条件によって大きく影響されることから、個別の技術解説に留まることが多かつたり、科学的な理解が十分でないために必要となる性能・機能が引き出せていないという現状もある。CNTおよびグラフェンの分散技術の成書として、文献40、41を参照していただきたい。

本シリーズが、CNTおよびグラフェンの理解に役立てば望外の喜びである。

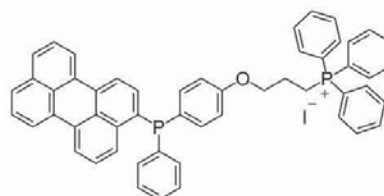
[参考文献]

- 1) K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva and A. A. Firsov, *Science*, **2004**, 306, 666.
- 2) K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, M. I. Katsnelson, I. V. Grigorieva, S. V. Dubonos and A. A. Firsov, *Nature*, **2005**, 438, 197.
- 3) S. Mizushima, Y. Fujibayashi and K. Shiiki, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **1971**, 30, 299.
- 4) K. Yoshizawa, K. Okahara, T. Sato, K. Tanaka and T. Yamabe, *Carbon*, **1994**, 32, 1517.
- 5) M. Fujita, K. Wakabayashi, K. Nakada and K. Kusakabe, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **1996**, 65, 1920.
- 6) Y. Kobayashi, K.-i. Fukui, T. Enoki, K. Kusakabe and Y. Kaburagi, *Phys. Rev. B*, **2005**, 71, 193406.
- 7) N. H. Shon and T. Ando, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **1998**, 67, 2421.
- 8) D. Graf, F. Molitor, K. Ensslin, C. Stampfer, A. Jungen, C. Hierold and L. Wirtz, *Nano Lett.*, **2007**, 7, 238.
- 9) U. Khan, H. Porwal, A. O'Neill, K. Nawaz, P. May and J. N. Coleman, *Langmuir*, **2011**, 27, 9077.
- 10) R. S. Edwards and K. S. Coleman, *Acc. Chem. Res.*, **2012**, 46, 23.
- 11) G. Ruan, Z. Sun, Z. Peng and J. M. Tour, *ACS Nano*, **2011**, 5, 7601.
- 12) X. An, T. Simmons, R. Shah, C. Wolfe, K. M. Lewis, M. Washington, S. K. Nayak, S. Talapatra and S. Kar, *Nano Lett.*, **2010**, 10, 4295.
- 13) R. Peng, Y. Wang, W. Tang, Y. Yang and X. Xie, *Polymer*, **2013**, 5, 847-872 (総説)
- 14) T. Kato and R. Hatakeyama, *Nat. Nanotechnol.*, **2012**, 7, 651.
- 15) C. K. Chua and M. Pumera, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, 43, 291.
- 16) S. Stankovich, D. A. Dikin, G. H. B. Dommett, K. M. Kohlhaas, E. J. Zimney, E. A. Stach, R. D. Piner, S. T. Nguyen and R. S. Ruoff, *Nature*, **2006**, 442, 282.
- 17) C. K. Chua and M. Pumera, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 3222.
- 18) V. Georgakilas, M. Otyepka, A. B. Bourlinos, V. Chandra, N. Kim, K. C. Kemp, P. Hobza, R. Zboril and K. S. Kim, *Chem. Rev.*, **2012**, 112, 6156.
- 19) A. Ciesielski and P. Samori, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, 43, 381.
- 20) K. Nakada, M. Fujita, G. Dresselhaus and M. S. Dresselhaus, *Phys. Rev. B*, **1996**, 54, 17954.
- 21) L. Jiao, L. Zhang, X. Wang, G. Diankov and H. Dai, *Nature*, **2009**, 458, 877.
- 22) D. V. Kosynkin, A. L. Higginbotham, A. Sinitskii, J. R. Lomeda, A. Dimiev, B. K. Price and J. M. Tour, *Nature*, **2009**, 458, 872.
- 23) D. V. Kosynkin, W. Lu, A. Sinitskii, G. Pera, Z. Sun and J. M. Tour, *ACS Nano*, **2011**, 5, 968.
- 24) T. Shimizu, J. Haruyama, D. C. Marcano, D. V. Kosynkin, J. M. Tour, K. Hirose and K. Suenaga, *Nat. Nano*, **2011**, 6, 45.
- 25) X. Li, X. Wang, L. Zhang, S. Lee and H. Dai, *Science*, **2008**, 319, 1229.
- 26) L. Jiao, X. Wang, G. Diankov, H. Wang and H. Dai, *Nat. Nanotech.*, **2010**, 5, 321.
- 27) X. Yang, X. Dou, A. Rouhanipour, L. Zhi and K. Mullen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 4216.
- 28) E. McCann and V. I. Fal'ko, *Phys. Rev. Lett.*, **2006**, 96, 086805.
- 29) Y. Zhang, T.-T. Tang, C. Girit, Z. Hao, M. C. Martin, A. Zettl, M. F. Crommie, Y. R. Shen and F. Wang, *Nature*, **2009**, 459, 820.
- 30) Z. Peng, Z. Yan, Z. Sun and J. M. Tour, *ACS Nano*, **2011**, 5, 8241.
- 31) H. E. Lim, Y. Miyata, R. Kitaura, Y. Nishimura, Y. Nishimoto, S. Irie, J. H. Warner, H. Kataura and H. Shinohara, *Nat. Comm.*, **4**, article no 2548.
- 32) H. Jippo, M. Ohfuchi and C. Kaneta, *Phys. Rev. B*, **2011**, 84, 075467.
- 33) J. Bai, X. Zhong, S. Jiang, Y. Huang and X. Duan, *Nat. Nano*, **2010**, 5, 190.
- 34) X. Liang, Y.-S. Jung, S. Wu, A. Ismach, D. L. Olynick, S. Cabrini and J. Bokor, *Nano Lett.*, **2010**, 10, 2454.
- 35) S. Bae et al. *Nat. Nanotechnol.*, **2010**, 5, 574.
- 36) Y.-M. Lin, C. Dimitrakopoulos, K. A. Jenkins, D. B. Farmer, H.-Y. Chiu, A. Grill and P. Avouris, *Science*, **2010**, 327, 662.
- 37) M. Ohishi, M. Shiraiishi, R. Nouchi, T. Nozaki, T. Shinjo and Y. Suzuki, *Jpn. J. Appl. Phys., Part 2*, **2007**, 46, L605.
- 38) N. Tombros, C. Jozsa, M. Popinciuc, H. T. Jonkman and B. J. van Wees, *Nature*, **2007**, 448, 571.
- 39) S. Cho, Y.-F. Chen and M. S. Fuhrer, *Appl. Phys. Lett.*, **2007**, 91, 123105.
- 40) 中嶋直敏, 藤ヶ谷剛彦, カーボンナノチューブ・グラフェン, 最先端材料システム第1巻, 高分子学会編, 共立出版, **2012**.
- 41) 中嶋直敏, 監修, 「カーボンナノチューブ・グラフェン分散技術の工業化と機能展開」, S&T 出版, pp. 1-133, **2014**.

近日発売予定

ミトコンドリア膜脂質過酸化検出蛍光試薬

MitoPeDPP



<特長>

- ・細胞小器官であるミトコンドリア特異的に集積
- ・ミトコンドリア膜の脂質過酸化物を選択的に検出
- ・励起波長 488 nm、蛍光波長 535 nm で測定可能

小社では脂質過酸化検出試薬として DPPP、Spy-LHP、Liperfluor を販売しております。この度これらの製品に加え、ミトコンドリア膜中の脂質過酸化物を検出する試薬を商品化致します。ミトコンドリアは ATP 産生のみならず、活性酸素を発生する細胞小器官として知られています。活性酸素に代表されるヒドロキシラジカル (HO[•])、スーパーオキシドアニオンラジカル (O₂^{•-})、過酸化水素 (H₂O₂) は膜中の不飽和脂肪酸を酸化的に損傷し過酸化脂質を形成します。このような酸化ストレスで生じる生成物を視覚化することで、ミトコンドリア機能への影響をリアルタイムに解析することが可能になります。

本製品は生細胞膜を透過してミトコンドリアに集積する性能を有しています。ミトコンドリアに集積した MitoPeDPP は、脂溶性過酸化物によって特異的に酸化され蛍光を発します (Fig. 1)。一般に汎用される 488 nm の励起波長で観測することが可能なため、蛍光顕微鏡を用いた過酸化脂質イメージングが可能です。

MitoPeDPP は福岡大学・塩路准教授により開発された試薬です。



Fig. 1 HepG2 細胞での過酸化物添加による過酸化物捕捉イメージング
(A): MitoPeDPP を細胞にロード後、t-BHP*による外部刺激を加え 15 分後に観察
(B): ミトコンドリア染色試薬 MitoRed 染色
(C): (A) と (B) の重ね合わせ画像
* t-BHP: tert-Butylhydrogenperoxide

[参考文献]

- K. Shioji et al., "Synthesis and properties of fluorescence probe for detection of peroxides in mitochondria", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20, 3911.

Topics on Chemistry

Photopharmacology : 光異性体による薬効制御

株式会社同仁化学研究所 田中 智也

最近、光異性体を薬剤開発や細胞内シグナル伝達の解明に利用する Photopharmacology が注目されている¹⁾。光異性体の代表的な化合物としては、アゾベンゼンが挙げられる。アゾベンゼンは特定の波長を照射することでトランス型、シス型に可逆的に変換する。この光による構造変化は化合物の性質にも影響する。つまり、既存の化合物にアゾベンゼンの様な光で可逆的に構造が変化するフォトスイッチ基を導入することで、化合物の性質を時空間的に制御 (on/off) 可能になる。例えば、既存の薬剤にフォトスイッチ基を導入することで、薬剤としての効果を光という外部要因のみで簡単に制御することが可能となり、副作用や毒性の少ない薬剤開発が期待できる。この様な性質を持った化合物はフォトクロミック化合物(分子)と呼ばれ、本トピックスではこのフォトクロミック化合物(分子)の Photopharmacology としての応用例を紹介する。

最新の報告として Schönberger らの設計した、 μ -オピオイド受容体 (MOR) のフォトクロミックリガンドが挙げられる²⁾。オピオイドとはオピオイド受容体 (OR) と親和性を持つ化合物の総称であり、OR は G タンパク質共役型受容体 (GPCRs) に分類され、少なくとも δ 、 μ 、 κ 、NOP の 4 種類が存在する。中でも MOR はモルヒネや内因性の低分子ペプチドと結合し、G タンパク質共役型内向整流性カリウムイオンチャネル (GIRK チャネル) の開口を促すことで、鎮痛作用に関連しており、薬剤の重要なターゲットとされている。

まず初めに、Schönberger らはオピオイドの一つである、フェンタニル (Fentanyl) を基本骨格とする Photofentanyl-1 (PF1) と Photofentanyl-2 (PF2) を合成した。フェンタニルは単純な構造であることに加え、フォトスイッチが導入可能なアリル基を 2 つ有している (Fig. 1A)。PF1 及び PF2 は暗色下と波長 420 ~ 480 nm ではトランス型、波長 360 nm ではシス型に可逆的に構造変化する特性を持つ (Fig. 1B)。

次に、Schönberger らは MOR と GIRK チャネルを発現させた

HEK293t 細胞を用いて、PF2 がリガンドとしての機能を有していることを、カリウムイオンの流出に伴う電流値の変化量から確認した。その結果、*trans*-PF2 (暗色下と波長 420 ~ 480 nm) は MOR のアゴニストとして作用し、MOR が活性化されており、一方、*cis*-PF2 (波長 360 nm) は、MOR が不活性化状態となっていることが示唆された。*trans*-PF2 の MOR 活性化率は内因性の低分子ペプチドであるエンケフェリンと比較して、80%であったことから、*trans*-PF2 はオピオイドとしての機能を十分に有していた。ただし、PF1 は上記のような、生物学的活性を示さなかったことから、フォトスイッチ基の導入部位も活性を制御する上で重要な要素になると言える。

この他にも Velema らは抗菌作用のあるキノロン骨格にアゾベンゼンを導入することで、キノロンの抗菌作用を光で制御することに成功している (Fig. 2A)³⁾。また、Polosukhina らは盲目マウスに AAQ (Acrylamide azobenzene quaternary ammonium) を眼内注射することで、瞳孔の光反射と光回避行動の復元に成功している (Fig. 2B)⁴⁾。

もちろん、フォトスイッチ基はアゾベンゼンだけに限らない。Chen らは光照射により閉環・開環状態をとる 1,2-Dithienylethene 骨格を利用したアセチルコリンエステラーゼ (AChE) の阻害剤を開発した (Fig. 3)⁵⁾。この化合物は 1,2-Dithienylethene 骨格の両端に、AChE 阻害活性を持つタクリンを導入することで、AChE 阻害活性を制御している。

今回挙げた報告例の共通点は既存の化合物にフォトスイッチ基を導入することで、その化合物の性質を光で制御できるところである。フォトスイッチ基の種類や導入部位には検討の必要があるが、この手法は既存の酵素阻害剤やリガンドといった生理活性を持つ多くの化合物に幅広く応用されることが期待できる。Photopharmacology のコンセプトは薬剤の開発だけでなく、生命現象の解明を行う上で、有用なツールとなるだろう。

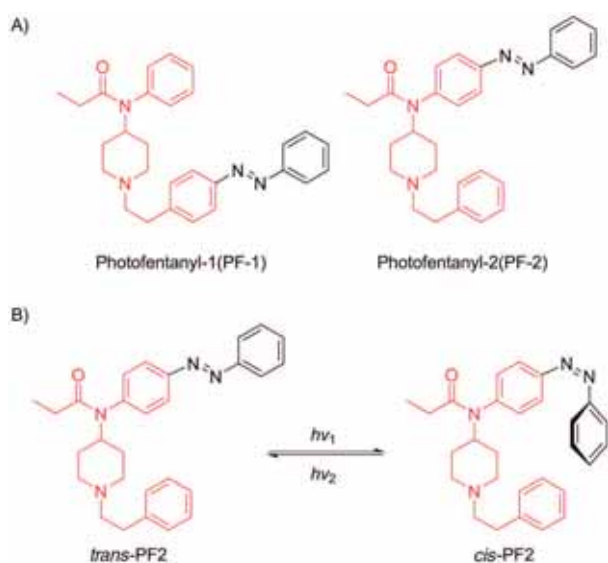


Fig. 1 (A) Photofentanyl の構造式と (B) PF-2 の光異性体
*赤字は Fentanyl 骨格を示す

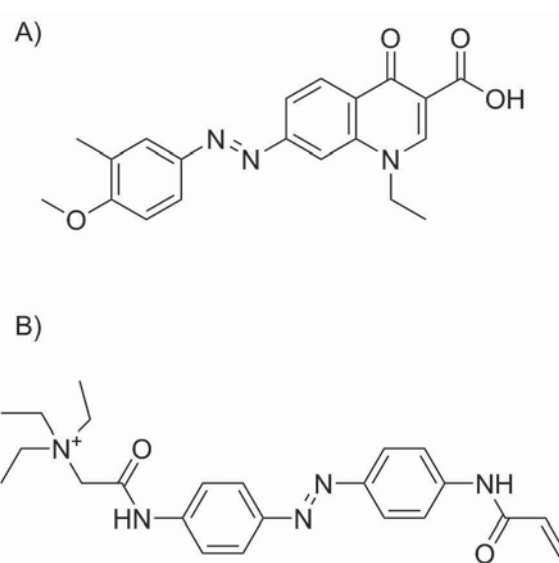


Fig. 2 (A) 抗菌作用を示す化合物と (B) AAQ の構造式

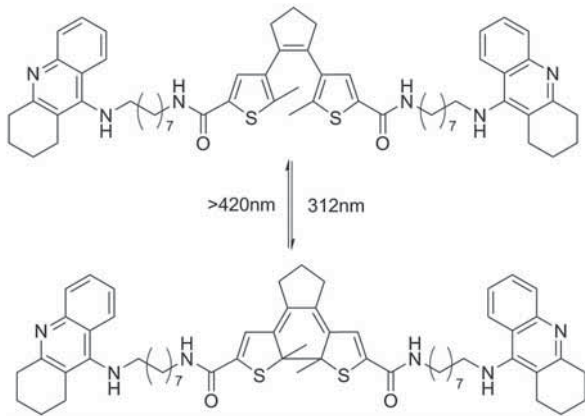


Fig. 3 AChE 阻害剤の構造式

[参考文献]

- 1) W. A. Velema, W. Szymanski and B. L. Feringa, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 2178.
- 2) M. Schönberger and D. Trauner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 3264.
- 3) W. A. Velema, J. P. van der Berg, M. J. Hansen, W. Szymanski, A. J. M. Driessen and B. L. Feringa, *Nat. Chem.*, **2013**, 5, 924.
- 4) A. Polosukhina, J. Litt, I. Tochitsky, J. Nemargut, Y. Sychev, I. De Kouchkovsky, T. Huang, K. Borges, D. Trauner, R. N. Van Gelder and R. H. Krameremail, *Neuron.*, **2012**, 75(2), 271.
- 5) X. Chen, S. Wehle, N. Kuzmanovic, B. Merget, U. Holzgrabe, B. König, C. A. Sotriffer and M. Decker, *ACS Chem. Neurosci.*, **2014**, in press.

第 29 版総合カタログ(2014/2015) 発行



2014年2月1日に第29版総合カタログを発行いたしました。カタログ発行と併せて、ホームページの商品カタログ、プロトコルの内容も更新しております。これからも、引き続き皆様のご研究に役立つ情報をご提供して参ります。

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>

パンフレットのご案内

はじめてシリーズ 3
 「はじめての酸化ストレスマーカー測定プロトコル」

小社カスタマーリレーション部では小社にお寄せいただいたお問合せを基にプロトコル「はじめてシリーズ」を作成しております。

この度、第三弾として「はじめての酸化ストレスマーカー測定プロトコル」を作成いたしました。酸化ストレスマーカーの種類、小社製品を使用した測定方法などをまとめたプロトコルです。

小社では酸化ストレスの指標となる酸化ストレスマーカーを測定する製品をいくつか販売しております。本プロトコルでは「自分が現在使用している酸化ストレスマーカー以外で、良い指標となるマーカーはないか」、「酸化ストレスマーカーを測定するサンプル（細胞・組織）の前処理をどうすればよいのか」などお悩みの際に参考いただけるよう、各酸化ストレスマーカーの説明や試料の前処理方法などを紹介しています。

本プロトコルや酸化ストレス関連試薬をぜひ研究にお役立て下さい。

第一弾の「はじめての細胞内 Ca²⁺ 測定プロトコル」、第二弾の「はじめての抗体標識プロトコル」と共に是非一度ご覧下さい。

各資料のご請求は小社マーケティング部までご連絡下さい。
 フリーダイヤル：0120-489548
 e-mail: info@dojindo.co.jp

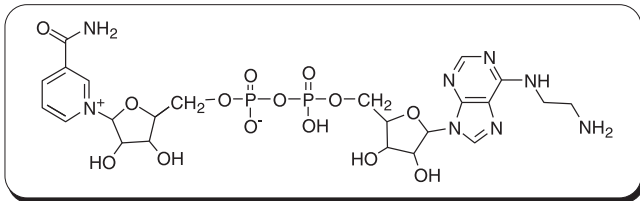
はじめての酸化ストレスマーカー測定プロトコル目次

- I. はじめに
- II. 活性酸素 (ROS) とは
- III. 酸化ストレスマーカー
- IV. 酸化ストレスマーカー測定試薬
- V. 関連製品紹介
- VI. 参考文献



試作品

N⁶-2AE-NAD



NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) は生体内で様々な脱水素酵素 (デヒドロゲナーゼ) の補酵素として重要な働きをしています。例えば、乳酸脱水素酵素 (LDH) による乳酸のピルビン酸への変換や、アルコール脱水素酵素 (ADH) によるエタノールのアセトアルデヒドへの変換において電子の授受に関わっています (Fig. 1)。

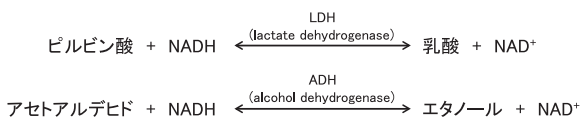


Fig. 1 生体内の様々なデヒドロゲナーゼと NAD の酸化還元反応

小社では現在、反応性基を導入した補酵素の開発を進めており、N⁶-2AE-NAD は NAD のアデニンの N⁶ 位にアミノエチル基を導入した誘導体です。末端のアミノ基を介して電極やタンパク質などに共有結合で固定化することが可能です。酵素による NAD⁺ の NADH への還元率を 100 としたときに、N⁶-2AE-NAD は、80 ほどの還元率を保持していることが報告されています^{1, 2, 3)}。

このような性質を生かして、N⁶-2AE-NAD はバイオセンサに応用されています。Kharitonov らは SiO₂ や金基板上へ NAD を共有結合で固定化し、Field-Effect Transistor (FET) ベースの乳酸検出酵素センサを作製しています (Fig. 2)⁴⁾。

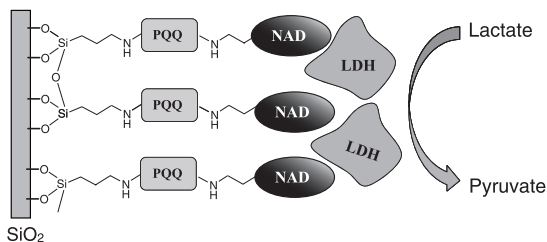


Fig. 2 NAD を固定化した乳酸検出用の酵素センサの模式図⁴⁾

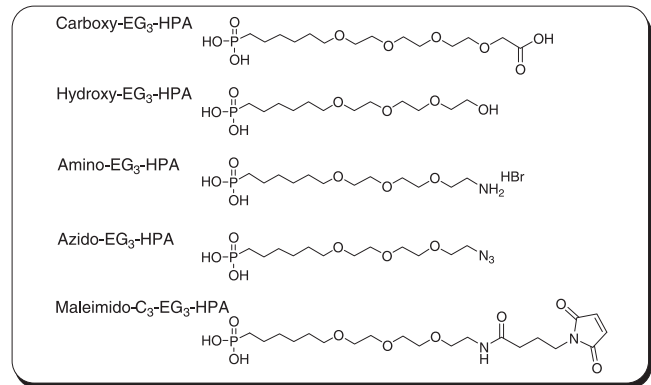
N⁶-2AE-NAD にご興味のある方は、小社までお問合せ下さい。

[参考文献]

- 1) H. L. Schmidt, G. Grenner, *Eur. J. Biochem.* **1976**, 67, 295.
- 2) M. Muramatsu, I. Urabe, Y. Yamada, H. Okada, *Eur. J. Biochem.* **1977**, 80, 111.
- 3) J. Hendle, A. F. Buckmann, W. Aehle, D. Schomburg, R. D. Schmid, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 213, 947.
- 4) A. B. Kharitonov, M. Zayats, L. Alfonta, E. Katz, I. Willner, *Sens. Actuators B*, **2001**, 76, 203.

試作品

バイオセンサ向けホスホン酸誘導体



ホスホン酸誘導体は Al₂O₃ や TiO₂、ITO などの金属酸化物上に結合して自己組織化単分子膜 (SAM) を形成することから、有機デバイスやバイオセンサなど様々な用途で応用され始めています。金属酸化物の表面処理に古くから用いられているシランカップリング剤と比べ、ホスホン酸誘導体は「試薬が安定」「形成される SAM が高密度」「形成される SAM が安定」といった利点を有しています。

バイオセンサに関しては、金基板上のアルカンチオール SAM が良く利用されています。バイオセンサでは非特異結合を抑制することが非常に重要なことから、アルカンチオール SAM では非特異結合抑制効果の高いオリゴエチレングリコール含有アルカンチオールが汎用されています。Al₂O₃ や TiO₂、ITO を基板として用いるバイオセンサにおいてもオリゴエチレングリコールを含有したホスホン酸 SAM が有用であると考えられます。

そこで、小社ではオリゴエチレングリコールを含有し、末端にカルボキシ基、アミノ基、ヒドロキシ基、アジド基、マレイミド基を有するホスホン酸誘導体を試作致しました。

< Biotin PA-SAM Formation Reagent >

また、小社ではアルカンチオール SAM の One Shot タイプとして Biotin-SAM Formation Reagent (品コード: B564) を販売しております。このホスホン酸タイプである Biotin PA-SAM Formation Reagent も試作致しました。

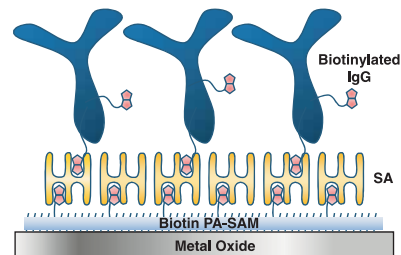


Fig. 3 Biotin PA-SAM Formation Reagent とストレプトアビジン (SA) を用いて作製した抗体固定化センサの模式図

上記バイオセンサ向けホスホン酸誘導体にご興味のある方は小社までお問合せ下さい。

されない細胞応答を引き起こすことが確認されています^{2, 3)}。このような硫化水素ドナーを用いることでより詳細な硫化水素の生体内機能解析や新規の薬剤開発につながる事が期待されます。

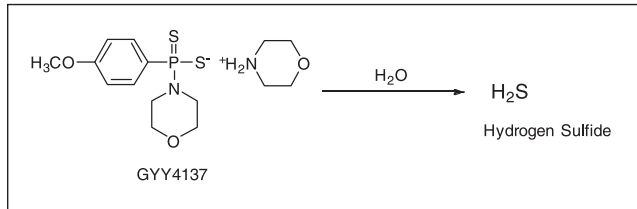


Fig. 4 加水分解性徐放型 硫化水素ドナー GYY4137

還元物質応答性 硫化水素ドナー

硫化水素研究において、硫化水素の量や発生速度はその生理活性を決める重要な因子となります。しかし現在、一般的に硫化水素ドナーとして使用されている硫化ナトリウム (Na₂S) や硫化水素ナトリウム (NaHS) は、水溶液中に添加するだけで硫化水素を生成するため、硫化水素の発生量や発生時間を制御することは困難です。

M. Xian らが開発した硫化水素ドナーは、生体内に存在する還元物質 (グルタチオンやシステインなど) に応答して硫化水素を発生する新規の硫化水素ドナーで、その構造の違いによって硫化水素の発生時間と発生量が異なります (Fig. 5)^{4, 5)}。これらドナーの硫化水素発生機構は、生体内の硫化水素産生メカニズムに基づいており、パーサルファイドを経由して硫化水素を発生します。そのため、硫化水素研究を行う上で大変興味深い化合物だと考えられます。

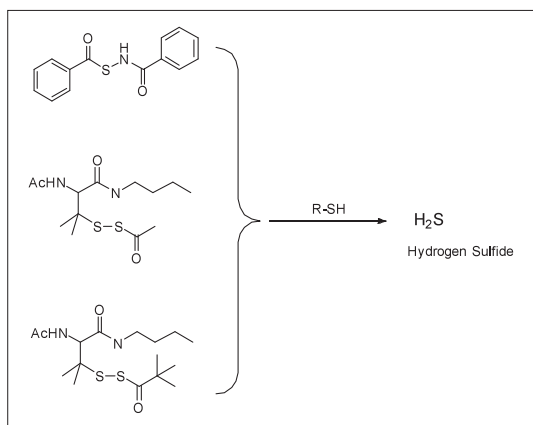


Fig. 5 還元物質応答性 硫化水素ドナー

硫化水素イオン比色定量用キット(メチレンブルー法)

<特長>

- ・ 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
- ・ 酸に不安定な結合型硫黄の影響を受けない

メチレンブルー法は、最も一般的な硫化水素イオン定量法の一

つです。本手法は、酸性条件、塩化鉄 (III) 存在下で *N,N*-Dimethyl-*p*-phenylenediammonium (DPDA) と硫化水素が反応してメチレンブルーを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⁶⁾。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⁷⁻¹⁰⁾。そこで小社では、このような結合型硫黄の影響を受けず、遊離の硫化水素イオンを特異的に検出できるキットの開発を行っております。

【キット内容】

- ・ Na₂S Standard × 1
- ・ 1% Zinc Acetate × 1
- ・ DPDA × 2
- ・ FeCl₃ solution × 1

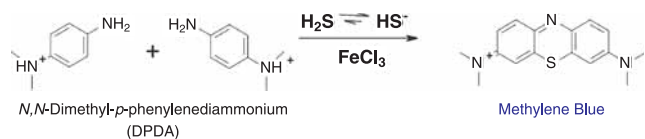


Fig. 6 硫化水素によるメチレンブルー生成反応

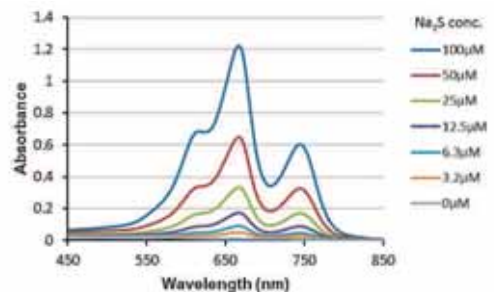


Fig. 7 分光光度計によるスペクトル測定例

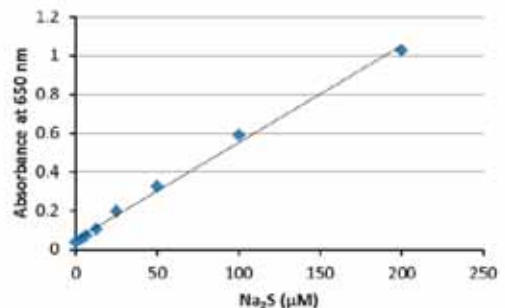


Fig. 8 マイクロプレートリーダーを用いた検量線例

硫化水素 HPLC 検出用キット (Monobromobimane 法)

<特長>

- ・ 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¹¹⁻¹³⁾。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^{14, 15)}。

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。

[キット内容]

- ・ Monobromobimane × 3
- ・ Reaction buffer × 1
- ・ Sulfide-dibimane × 1

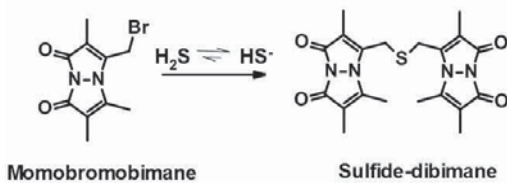


Fig. 9 Monobromobimane と硫化水素の反応

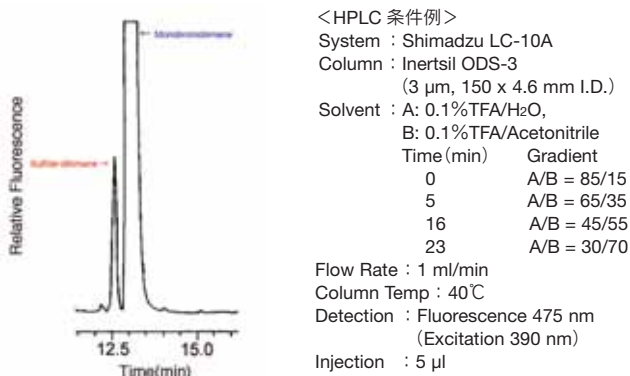


Fig. 10 HPLC チャート例

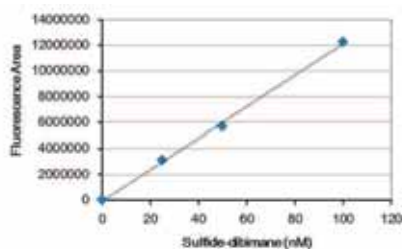


Fig. 11 Sulfide-dibimane 標準液を用いた検量線の例

硫化水素研究用 サルフェン硫黄ドナー類

硫化水素の細胞内機能を議論する上で、硫黄原子が連結したパーサルファイドやポリサルファイドのようなサルフェン硫黄は欠かせない存在となってきました。このようなサルフェン硫黄は、硫化水素の産生や貯蔵、放出だけでなく、スルフヒドリル化などのタンパク質内チオールをターゲットとしたシグナル伝達にも関与していることが示唆されており¹⁶⁾、硫化水素に関連する研究分野は大きな広がりを見せつつあります。木村らは、実際に脳内で硫化水素からポリサルファイドが生成することを発見し、このポリサルファイドが脳内の神経伝達を増強していることを明らかにしています¹⁷⁾。また石井らは、ポリサルファイドである四硫化ナトリウムが Keap1/Nrf2 のスルフヒドリル化を介して酸化ストレスに対する高い細胞保護機能を発揮することを示しています¹⁸⁾。

現在、小社ではこのような幅広い硫化水素関連の研究に対応するため、硫化水素研究用のポリサルファイドを開発しております (Fig. 12)。有機合成用として三硫化ナトリウムや四硫化ナトリウムは市販されていますが、メーカーやロットによって品質が異なります (Fig. 13)。そこで小社では、硫化水素研究用として高品質のポリサルファイドを開発しております。Fig. 14 にはそれぞれの水溶液の吸収スペクトルを示しておりますが、硫黄数に比例した 370 nm 吸光度の増加が観察されております。

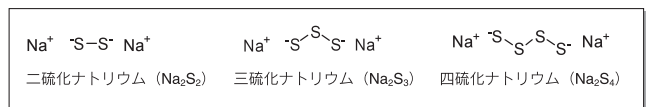


Fig. 12 サルフェン硫黄ドナーの構造



Fig. 13 四硫化ナトリウムの性状 (A社製品と小社製品の比較)

* A社製品は緑がかった黄土色粉末で、水に溶解すると多くの不溶物(不純物)が観察された。

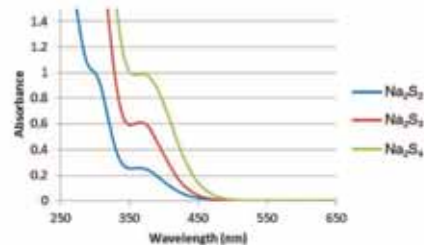


Fig. 14 1 mM Na₂S_n 水溶液の吸収スペクトル

サルフェン硫黄検出用蛍光プローブ

硫黄原子が連なって結合したサルフェン硫黄は、硫化水素の生体内プールとして存在するだけでなく、タンパク質のS-スルフヒドリル化を介したシグナル伝達に寄与していることが明らかとなり、近年非常に注目されてきております。M. Xianらが開発した蛍光プローブ SSP2 は、サルフェン硫黄と特異的に反応して強い蛍光を発する試薬であり、サルフェン硫黄の蛍光検出や細胞内動態の解析に有用です (Fig. 15, 16)¹⁹⁾。現在、小社では SSP2 よりも高感度な蛍光プローブ SSP4 の製品化を検討しております。SSP4 は SSP2 の約 300 倍感度が高く、細胞内イメージングへの適用も可能です (Fig. 17)。

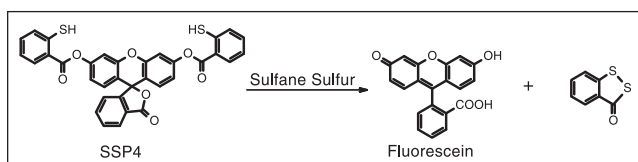
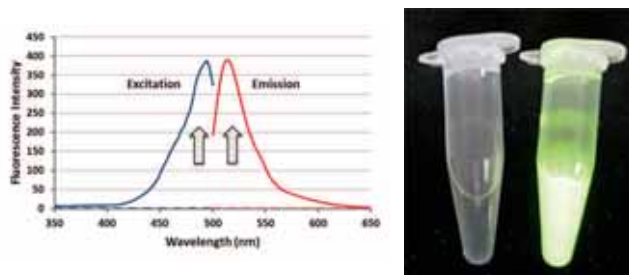
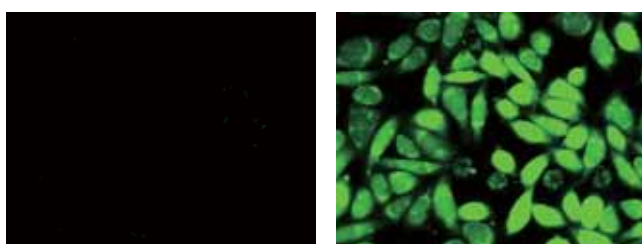


Fig. 15 SSP4 とサルフェン硫黄の反応



左：サルフェン硫黄なし
右：サルフェン硫黄あり

Fig. 16 サルフェン硫黄との反応に伴う SSP4 の励起および蛍光スペクトル変化
* 10 μ M SSP4 (PBS) に三硫化ナトリウム (終濃度 100 μ M) 添加 (Ex: 482 nm, Em: 515 nm)



三硫化ナトリウム添加なし 三硫化ナトリウム添加後

Fig. 17 サルフェン硫黄の細胞内イメージング

* 20 μ M SSP4 を CHO 細胞にロードした後、100 μ M 三硫化ナトリウム (サルフェン硫黄) 添加した (右図)。

【参考文献】

- 1) R. Greiner, Z. Palinkas, K. Basell, D. Becher, H. Antelmann, P. Nagy and T. P. Dick, *Antioxid. Redox Signal.*, **2013**, *19*, 1749.
- 2) L. Li, M. Whiteman, Y. Y. Guan, K. L. Neo, Y. Cheng, S. W. Lee, Y. Zhao, R. Baskar, C-H. Tan and P. K. Moore, *Circulation*, **2008**, *117*, 2351.
- 3) Z. W. Lee, J. Zhou, C-S. Chen, Y. Zhao, C-H. Tan, L. Li, P. K. Moore and L-W. Deng, *PLoS One*, **2011**, *6*, e21077.
- 4) Y. Zhao, H. Wang and M. Xian, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 15.
- 5) Y. Zhao, S. Bhushan, C. Yang, H. Otsuka, J. D. Stein, A. Pacheco, B. Peng, N. O. Devarie-Baez, H. C. Aguilar, D. J. Lefer and M. Xian, *Chem. Biol.*, **2013**, *8*, 1283.
- 6) N. S. Lawrence, J. Davis and R. G. Compton, *Talanta*, **2000**, *52*, 771.
- 7) Y. Kaneko, Y. Kimura, H. Kimura and I. Niki, *Diabetes*, **2006**, *55*, 1391.
- 8) 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.
- 9) M. Fu, W. Zhang, L. Wu, G. Yang, H. Li and R. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, *109*, 2943.
- 10) A. D. Ang, A. Königstorfer, G. I. Giles and M. Bhatia, *Adv. Biol. Chem.*, **2012**, *2*, 360.
- 11) G. L. Newton, R. Dorian and R. C. Fahey, *Anal. Biochem.*, **1981**, *114*, 383.
- 12) E. A. Wintner, T. L. Deckwerth, W. Langston, A. Bengtsson, D. Leviten, P. Hill, M. A. Insko, R. Dumpit, E. VandenEckart, C. F. Toombs and C. Szabo, *Br. J. Pharmacology*, **2010**, *160*, 941.
- 13) X. Shen, C. B. Pattillo, S. Pardue, S. C. Bir, R. Wang and C. G. Kevil, *Free Radic. Biol. Med.*, **2011**, *50*, 1021.
- 14) T. Morikawa, M. Kijimura, T. Nakamura, T. Hishiki, T. Nakanishi, Y. Yukutake, Y. Nagahata, M. Ishikawa, 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.
- 15) M. Nishida, T. Sawa, N. Kitajima, K. Ono, H. Inoue, H. Ihara, H. Motohashi, M. Yamamoto, M. Suematsu, H. Kurose, A. van der Vliet, B. A. Freeman, T. Shibata, K. Uchida, Y. Kumagai and T. Akaike, *Nat. Chem. Biol.*, **2012**, *8*, 714.
- 16) B. D. Paul and S. H. Snyder, *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.*, **2012**, *13*, 499.
- 17) Y. Kimura, Y. Mikami, K. Osumi, M. Tsugane, J. Oka and H. Kimura, *FASEB J.*, **2013**, *27*, 2451.
- 18) S. Koike, Y. Ogasawara, N. Shibuya, H. Kimura and K. Ishii, *FEBS Lett.*, **2013**, *587*, 3548.
- 19) W. Chen, C. Liu, B. Peng, Y. Zhao, A. Pacheco and M. Xian, *Chem. Sci.*, **2013**, *4*, 2892.

学会展示のご案内

第3回国際硫化水素学会 (H₂S 2014)
期日：2014年6月4日(水)～6日(金)
会場：京都大学芝蘭会館2階

開発担当者が展示ブースでお待ちしております。
ぜひ、お立ち寄り下さい。

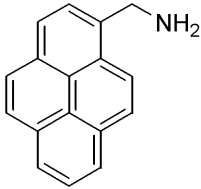
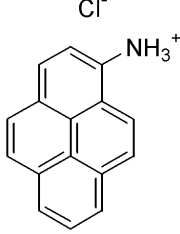
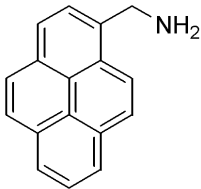
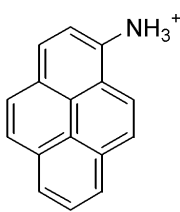
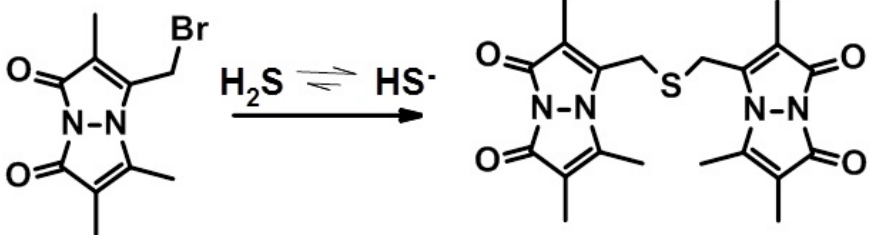
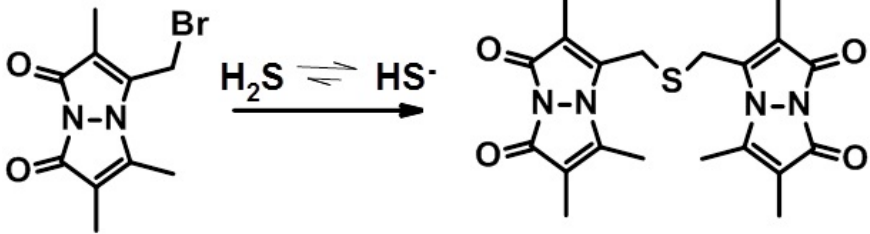
ホームページアドレス

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

「ドージンニュース No. 151」 正誤表

「ドージンニュース No. 151」の掲載内容に、一部誤りがございました。
謹んでお詫び申し上げますとともに、以下の通り訂正させていただきます。

誤	P.8 (図 3) 上段	 <p>1-Aminopyrene (Py-NH₂)</p>	 <p>1-Pyrenemethylamine hydrochloride (Py-M-NH₂)</p>
正		 <p>1-Aminomethylpyrene (Py-C1-NH₂)</p>	 <p>1-Aminopyrene hydrochloride (Py-NH₃⁺)</p>
誤	P.17 (Fig.9)	 <p>Monobromobimane</p> <p>Sulfide-dibimane</p>	
正		 <p>Monobromobimane</p> <p>Sulfide-dibimane</p>	