

2014
No.150

ISSN 0385-1516

**DOJIN**

NEWS

ドージンニュース

CONTENTS

●Review

PYP タグと発蛍光プローブを利用した生細胞タンパク質イメージング技術の開発

大阪大学大学院 堀雄一郎 菊地和也

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)⑤
九州大学大学院 中嶋直敏・藤ヶ谷剛彦

●Topics on Chemistry

生細胞ミトコンドリア内膜の抗酸化状態をモニターするための
 α -トコフェロールアナログ
株式会社同仁化学研究所 久保亮二



CONTENTS

Review

**PYP タグと発蛍光プローブを利用した生細胞タンパク質
イメージング技術の開発** ●———— [1]

大阪大学大学院 堀 雄一郎 菊地 和也

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) ⑤** ●—— [7]

九州大学大学院
中嶋 直敏・藤ヶ谷 剛彦

Topics on Chemistry

**生細胞ミトコンドリア内膜の抗酸化状態をモニターするための
α-トコフェロールアナログ** ●———— [11]

株式会社同仁化学研究所 久保 亮二

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 ●—— [6]

新製品

内胚葉分化モニタリングキット ●———— [16]

金属酸化物表面処理用ホスホン酸誘導体 ●———— [18]

開発中

硫化水素研究用試薬およびキット ●———— [13]

試作品

ICG 誘導体 ●———— [15]

N⁶-2AE-NAD ●———— [17]

バイオセンサ向けホスホン酸誘導体 ●—— [17]

お知らせ

第29版総合カタログ発行のご案内 ●———— [6]

日経バイオテク ONLINE の紹介 ●———— [12]

パンフレットのご案内 ●———— [12]

学会展示のご案内 ●———— [15]

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。

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

金属酸化物表面処理用ホスホン酸誘導体

11-AUPA

10-CDPA

FHPA

FOPA

FDPA

M-EG₃-UPA

11-HUPA

11-NUPA

ODPA

11-PIUPA

PYP タグと発蛍光プローブを利用した生細胞タンパク質イメージング技術の開発

Development of Live-Cell Protein Imaging Technique Based on PYP-Tag and Fluorogenic Probes



堀 雄一郎

大阪大学大学院工学研究科・大阪大学免疫学フロンティア研究センター、助教
JST さきがけ研究者



菊地 和也

大阪大学大学院工学研究科・大阪大学免疫学フロンティア研究センター、教授

Fluorescence protein labeling by synthetic probes is a powerful approach to investigate protein function and localization inside living cells. This chemistry-based technique utilizes a pair of a protein tag and its specific ligands connected to fluorophores. Its potential advantages are that various fluorescent molecules are available as labeling reagents, and the timing of protein labeling is easily controlled. Because of these characteristics, this method is attracting attention as an alternative to fluorescent proteins. On the other hand, in this labeling system, there is a problem that the fluorescence of free probes inside cells prevents the identification of labeled proteins. As a solution to this problem, we developed a protein labeling system based on fluorogenic probes and photoactive yellow protein (PYP) tag. In this review, we describe about the design strategy of the probes, the advances in fluorogenic protein labeling systems and its biological application.

1. はじめに

タンパク質の細胞内局在は、タンパク質の生理的役割を明らかにするうえで重要な情報となる。生細胞における局在情報を可視化するための研究ツールのうち最も汎用されているものは、2008年のノーベル賞受賞対象となった蛍光タンパク質といえる。これまでに、蛍光波長やストークスシフトの異なる様々な蛍光タンパク質が報告されてきた¹⁾。その応用範囲は、局在解析のみにとどまらず、酵素活性や金属イオンの検出系、タンパク質間相互作用解析など多岐にわたり²⁾、その有用性は多くの研究者に認められている。

一方、蛍光タンパク質は万能ではなく、いまだに解決されていない問題が存在する。例えば、蛍光タンパク質は27kDaと比較的大きく、標的タンパク質に与える立体的影響が懸念されている。また、長波長領域において、十分な明るさの蛍光を発するタンパク質がほとんどないために、厚みのある組織や小動物におけるイメージング実験では、感度の低下が問題となることがある。

近年、これらの問題を解決するアプローチとして、合成蛍光プローブを利用した新しいタンパク質標識技術が化学者により開発された。本稿では、この化学に基づいた標識技術の原理と利点及び従来法の問題点について述べ、筆者らのタンパク質標識技術の開発経緯及び応用展開について紹介する。

2. 合成蛍光プローブとタグタンパク質を利用したタンパク質標識技術

合成蛍光プローブを用いたタンパク質標識技術のうち、特定のリガンドと特異的に結合するタンパク質をタグとして用いる方法が、注目を集めている。この方法では、リガンド部分に蛍光色素を繋いだ分子をプローブとして設計し、有機合成する。一方、タグタンパク質には標的タンパク質を遺伝子工学により融合させ、細胞内で発現させる。そのタグタンパク質をプローブにより特異的に標識することで、標的タンパク質の局在をイメージングすることができる。これまでに報告されている代表的なタグタンパク

質として、HaloTag³⁾、SNAP-tag⁴⁾、tetracysteine tag⁵⁾ があげられ、現在市販化されている。

この標識技術の利点として、次の3点を挙げる事ができる。1点目は、特定のタイミングで標的タンパク質を容易に標識できることである。このためある時間に発現しているタンパク質の局在や動態を高い時間精度で可視化することができる。2点目は、様々な優れた蛍光特性を有する色素化合物をプローブに導入できることである。このことは、蛍光タンパク質では達成されていない700 nm以上の近赤外蛍光を発するプローブや蛍光タンパク質より明るく光退色に強い色素を組み込んだプローブの開発が可能であることを意味している。3点目は、比較的小きなサイズのタグタンパク質も利用できることである。タグタンパク質が大きいからといって、必ずしも標的タンパク質の機能に悪影響を与えるわけではないが、一般的に小さなタグタンパク質の方が好まれる。

一方、既存の標識技術では、ほとんどの場合、常時蛍光を放つタイプのプローブを利用していることが問題であるといえる。なぜならば、プローブを細胞に添加しただけでは、多くの場合、タグタンパク質を標識したプローブと遊離プローブの蛍光を区別することができないためである。このことは、細胞を洗浄し遊離プローブを除去することで解決されると考えられる。しかしながら、プローブの構造によっては、洗浄除去に時間がかかる場合や、完全に除去することができないことがあり、迅速なイメージングに支障をきたしS/N比の低下につながるということが問題となる。そこで、この問題の解決策として、遊離の状態では非蛍光性で、タグタンパク質と結合すると蛍光強度が上昇する「発蛍光プローブ」を用いることで、洗浄操作を行うことなく、迅速にタンパク質をイメージングすることができると期待される(図1)。発蛍光プローブの先駆けとしては、前述のTetracysteine tagを用いた手法で用いられる蛍光標識プローブを挙げる事ができる。しかしながら、過去の報告⁶⁾及びメーカーのプロトコールによると、遊離プローブは非蛍光性であるものの、プローブの細胞内成分への非特異結合に伴いバックグラウンド蛍光が上昇するため、やはり洗浄作業が必要となる。したがって、洗浄操作を行うことなく迅

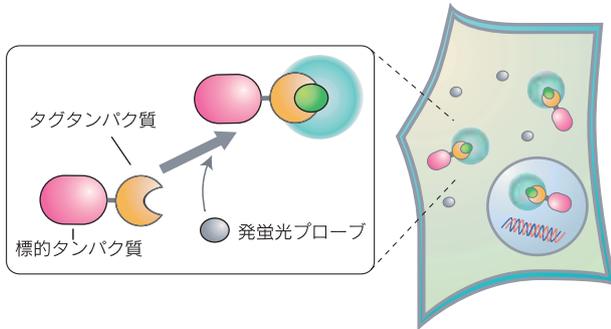


図1 発蛍光プローブとタグタンパク質を利用したタンパク質蛍光イメージング

速かつ高いS/N比でタンパク質をイメージングすることのできる新しい発蛍光プローブの開発が期待されていた。

3. 発蛍光プローブと Photoactive yellow protein (PYP) タグとによるタンパク質標識技術の開発

著者らは、以上の問題を解決するために、新しいタグタンパク質と発蛍光プローブを利用したタンパク質標識技術の開発に取り組んだ。まず、タグタンパク質を次の3つの基準で決定した。(1)動物以外の生物由来のタンパク質の中から探索する。これは、動物細胞で発現するタンパク質を選ぶと、標識反応を行うとき、標的タンパク質以外にその内在性タンパク質が標識されてしまうためである。(2)動物細胞中の小分子と結合することがないことに加え、酵素反応を引き起こすことのないものとする。これは、タグタンパク質の標識反応において細胞内小分子とプローブが競

合しないようにするとともに、細胞内代謝に与える影響を最小限にするためである。(3)タンパク質のサイズができる限り小さいものとする。以上の条件のもと、探し出したタンパク質は紅色硫黄細菌 *Halorhodospira halophila* 由来 PYP であった。

PYP タグは 125 アミノ酸 (14kDa) からなる小タンパク質である⁷⁾。その大きさは、蛍光タンパク質 (238 アミノ酸 : 27kDa) の約半分であり、タグタンパク質として魅力的なサイズである。PYP タグのリガンドとなる化合物は、天然補因子である 4-ヒドロキシ桂皮酸チオエステル誘導体であり、PYP タグの Cys69 とチオエステル交換反応により結合することが知られている⁸⁾。さらに、PYP タグは 7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸チオエステル誘導体とも結合することが報告されており⁹⁾、このことは、発蛍光プローブを設計するうえで極めて重要な点である。以前の報告から、クマリンとフルオレセインの誘導体を柔軟なリンカーで連結すると会合消光を引き起こすことが分かっている¹⁰⁾。このことから、PYP タグリガンドのクマリン誘導体とフルオレセインをエチレンジアミンリンカーでつないだプローブは、遊離の状態では消光すると考えた。また、PYP タグとクマリン部位が結合するとフルオレセインとの会合が解消され、蛍光強度が上昇すると仮説を立てた (図2)。

そこで、この設計指針に基づいて、クマリン誘導体にフルオレセインをつないだ構造を有するプローブ (FCTP) を合成した。クマリン環へのリンカーの導入位置は、タンパク質の立体構造を考慮に入れてクマリンの 5 位とした。

まず、FCTP と精製した PYP タグを反応させ SDS-PAGE (変性ゲルを使用) で解析したところ、タンパク質を示す位置に蛍光バンドが観測されたことから、FCTP と PYP タグは共有結合することが示された。また、細胞溶解液中で FCTP と PYP タグを反応させ、SDS-PAGE で解析したところ、PYP タグの分子量を示す位置に単一の蛍光バンドが確認できたことから、夾雑タンパク質が存在する条件においても、FCTP と PYP タグは特異的に結合することが示された。

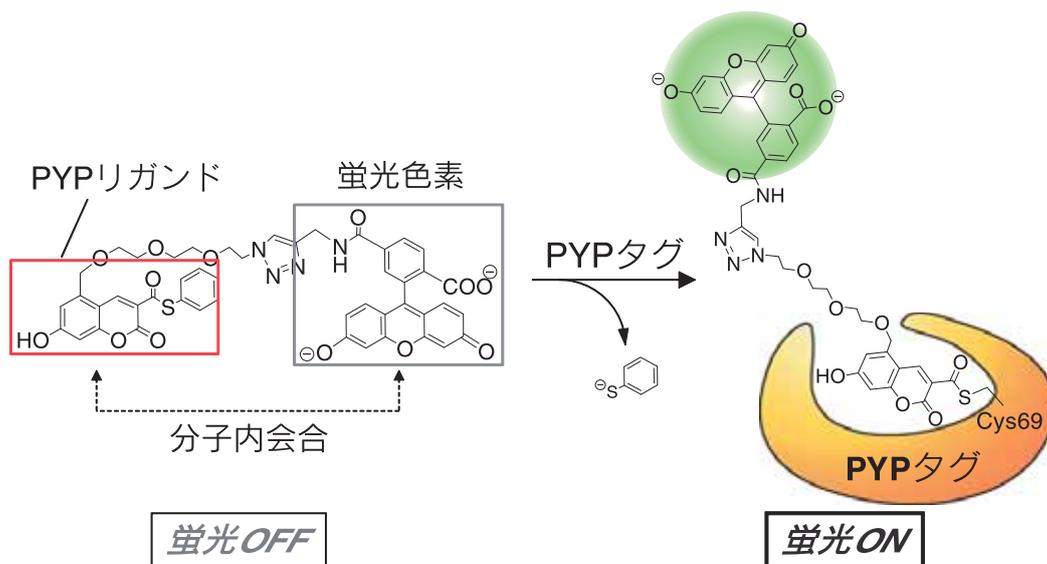


図2 分子内会合消光に基づいた発蛍光プローブ FCTP による PYP タグの標識原理

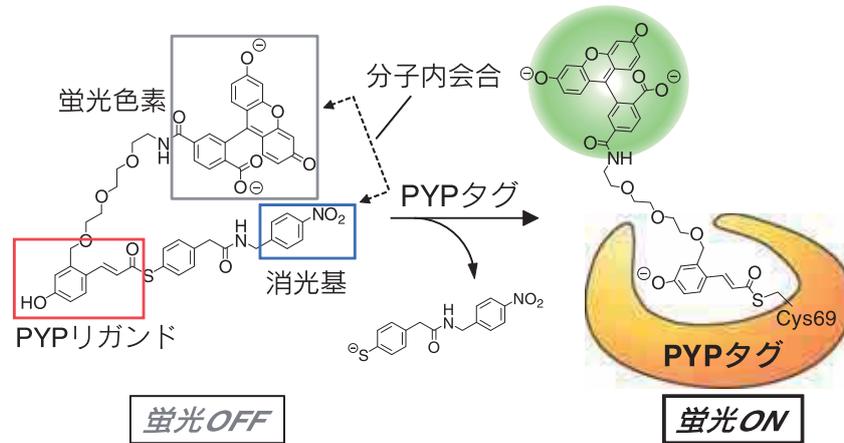


図3 発蛍光プローブ FCANB による PYP タグの標識原理

次に、PYP タグ非存在下で、FCTP の蛍光が消光し、PYP タグとの結合によって蛍光強度が上昇するかを検討した。遊離状態の FCTP の蛍光スペクトルを測定したところ、蛍光強度は極めて低いことが示された。一方、FCTP と PYP タグを 24 時間反応させると、その蛍光強度は約 20 倍上昇することが明らかとなった。以上の結果から、FCTP は PYP タグを特異的に標識する発蛍光プローブであることが示された¹¹⁾。

4. 発蛍光プローブによるタンパク質の無洗浄生細胞イメージング

FCTP は、OFF/ON 蛍光スイッチを持つ分子であるものの、PYP タグに対する結合速度が極めて遅く (50% 結合時間: 470 分以上)、実用的な時間で洗浄操作なしのイメージング実験を行うには、更なる結合速度の向上が必要であった。そこで、結合速度を改良すべく第二世代となる発蛍光プローブの開発に乗り出した。

FCTP と PYP タグの結合速度が遅い理由として考えられたことは、リガンド部位であるクマリンと色素部位であるフルオレセインの会合構造が、PYP タグとの結合において立体障害を引き起こしていることであった。このため、リガンドと色素が会合しない分子構造を有する発蛍光プローブの設計が必要であると考えた。

まず、PYP タグとプローブが結合する際に起こる脱離反応に着目した。結合反応において、チオエステル交換反応によりプローブからチオール化合物が脱離するが、このチオール化合物に色素会合のための消光基を組み込むことで、発蛍光標識と反応速度の向上が同時に達成されると考えた。重要な点は、消光基としてニトロベンゼンを選択したことである。ニトロベンゼンは、種々の蛍光色素との動的・静的消光を引き起こすために、プローブの蛍光色素を変更した場合でも、消光基として汎用的に用いることができると期待される¹²⁾。分子設計のもう一つのポイントは、リガンド部位をクマリンから桂皮酸に変更することで、蛍光色素とリガンドの π - π スタッキングを抑制し、反応速度を向上させようとしたことである。このようにして、蛍光色素は、遊離状態ではリガンド部位ではなくニトロベンゼンと会合・消光し、結合反応に伴いニトロベンゼンが脱離し、蛍光色素の蛍光強度が上昇することを期待した。これらの消光基及びリガンドとフルオレセインを色素として組み込んだプローブを FCANB と名付け、合成した (図 3)。

標識反応を行い SDS-PAGE で解析したところ、FCANB と PYP タグが共有結合していることが示され、細胞溶解液中においても、FCANB と PYP は特異的に結合することが明らかとなった。さらに、蛍光スペクトルを測定したところ、FCANB は遊離状態では消

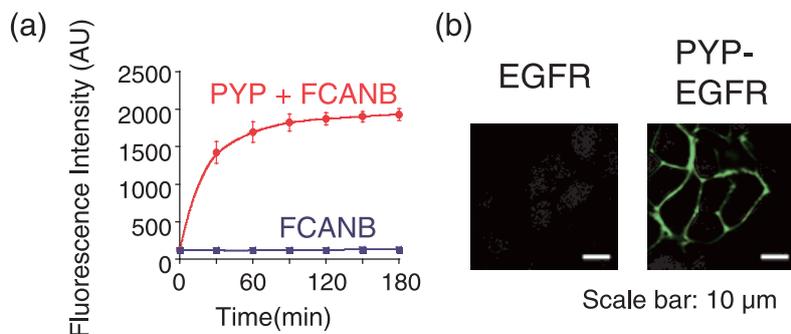


図4 (a) PYP タグ存在下/非存在下における FCANB の蛍光強度の時間変化 (b) PYP タグを融合させた細胞膜タンパク質 EGFR の FCANB による無洗浄蛍光イメージング

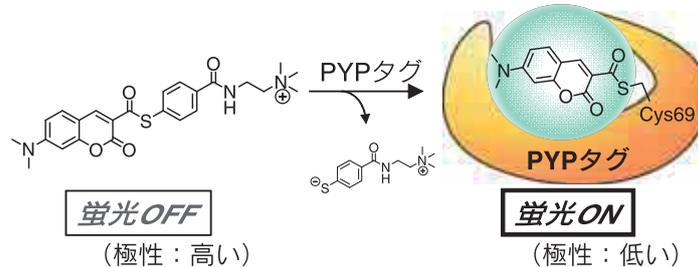


図5 環境応答性発蛍光プローブによる PYP タグの標識原理。図の化合物は TMBDMA である。

光し、PYP タグとの結合により蛍光強度を 15 倍上昇させた。これらの結果から、FCANB は PYP タグの特異的な発蛍光プローブであることが示された。

実際に、プローブと PYP タグの反応速度が向上しているかを検討するために、二次反応速度定数 k_2 を決定した。その結果、FCANB の k_2 は $125 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$ であり、FCTP ($k_2 = 1.11 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$) に比べ 110 倍反応速度が向上し、期待したとおりのプローブの改良ができたといえる (図 4a)。

次に、FCANB を用いて、生細胞に発現させた PYP タグ融合タンパク質を洗浄操作なしでイメージングできるかを検討した。PYP タグには、膜タンパク質の一種である EGFR (上皮成長因子受容体) を融合させ細胞膜上に発現させた。プローブをその発現細胞に添加し、細胞洗浄することなくそのまま共焦点蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、細胞膜上から強い蛍光シグナルが観測された (図 4b)。一方、細胞内や培地からはほとんど蛍光が観測されなかった。このことから、生細胞においても特異的に標識反応が起こることが示された。以上により、プローブの反応速度を大きく向上させた発蛍光プローブを用いることで、生細胞膜上の PYP タグ融合タンパク質を洗浄することなく高感度に観測することに成功したといえる¹³⁾。

5. 環境応答性発蛍光プローブによる生細胞内蛋白質イメージングへの応用

FCANB は細胞膜非透過性であり、細胞内タンパク質を標識す

ることはできなかった。そこで、細胞膜透過性であり細胞内タンパク質を無洗浄で迅速にイメージングすることができるプローブの開発が新たな課題となった。

開発にあたり注目したのは、PYP タグのリガンドの分子構造である。現在までに報告されているリガンド分子は、4- ヒドロキシ桂皮酸、4- ジメチルアミノ桂皮酸及び 7- ヒドロキシクマリンの誘導体などである。これらの分子構造の類似性から、7- ジメチルアミノクマリン (DMAC) 誘導体も PYP タグに結合すると予想した。この分子に着目したのは、DMAC は環境応答性蛍光色素であり、極性の高い溶媒中では蛍光強度を低下させ、極性の低い溶媒中では蛍光強度を上昇させる性質を持っているためである¹⁴⁾。この性質を応用することで、DMAC 誘導体を PYP タグの発蛍光プローブとして利用できるのではないかと考えた (図 5)。プローブは、遊離状態では極性の高い水中にあるため蛍光強度が低下し、標識反応により PYP タグの疎水性ポケットにはまり込むために蛍光強度が上昇すると予想した。DMAC の水溶性向上のため、カチオニックなトリメチルアミノ基またはアニオニックなカルボン酸を導入したプローブ TMBDMA もしくは CMBDMA を設計・合成した。

まず、SDS-PAGE による解析により、両プローブとも共有結合により PYP タグと結合し、細胞溶解液中においてもプローブは PYP タグと特異的に結合することが示された。蛍光スペクトルを測定したところ、プローブの蛍光強度は、遊離状態では低く、PYP タグとの反応により大きく上昇した (TMBDMA : 22 倍、CMBDMA : 16 倍)。このことから、両プローブともに PYP タグ

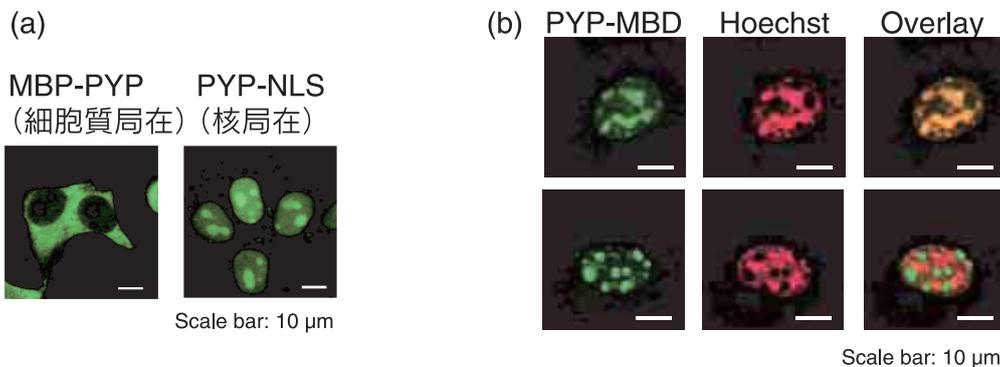


図 6 (a) TMBDMA による細胞内タンパク質の無洗浄蛍光イメージング。
(b) CMBDMA による PYP-MBD の局在イメージング。DNA メチル化阻害剤の非存在下では、Hoechst33342 の染色部位から蛍光が観測される一方、DNA メチル化阻害剤処理細胞からは、Hoechst33342 の染色部位とは異なる部位から蛍光が観測される。

をラベル化する発蛍光プローブであることが示された。更に、二次反応速度定数を決定したところ、TMBDMA は $k_2 = 3,950 (M^{-1}s^{-1})$ 、CMBDMA は $k_2 = 126 (M^{-1}s^{-1})$ であり、TMBDMA に関しては、FCANB に比べ反応速度の大幅な向上 (約 32 倍) がみられた。

次に、これらのプローブを用いて、生細胞内に発現させた PYP タグを標識しイメージングできるかを検討した。まず、マルトース結合タンパク質 MBP と PYP タグの融合遺伝子 MBP-PYP と、PYP タグと核局在化シグナルの融合遺伝子 PYP-NLS を細胞に導入し発現させ、TMBDMA を添加し洗浄操作を行うことなく共焦点蛍光顕微鏡で観察を行った (図 6a)。その結果、MBP-PYP 発現細胞では主に細胞質から、PYP-NLS 発現細胞では核から蛍光が観測された。一方、非発現細胞からは蛍光は観測されなかった。同様の結果が CMBDMA に関しても得られた。以上の結果から、TMBDMA 及び CMBDMA は細胞膜を透過し、細胞内タンパク質を標識できることが示された。また、これらのプローブを用いることで、洗浄操作無しで生細胞内タンパク質をイメージングすることに成功した。さらに、PYP-NLS 発現細胞に TMBDMA を添加し経時的に蛍光画像を撮影したところ、約 6 分で核内の蛍光が飽和することが分かった。このことから、TMBDMA を用いることにより、極めて短い時間で細胞内のタンパク質をイメージングできることが示された。

最後に、著者らは、PYP タグを用いた標識技術を細胞核内の DNA メチル化のイメージングに応用した。DNA メチル化は、遺伝子発現を制御する重要な化学修飾であり、その修飾反応は DNA メチル転移酵素により触媒され、CpG 配列を持つシトシンの 5 位がメチル化されることが知られている¹⁵⁾。まず、メチル CpG に結合するタンパク質である MBD1 (MethylCpG-binding domain 1) と PYP タグの融合遺伝子 PYP-MBD を細胞に導入し発現させた。TMBDMA または CMBDMA を添加し洗浄操作を行わずにイメージングを行ったところ、核内からドット状の蛍光が複数観測され (図 6b)、また、その蛍光は、Hoechst の蛍光と局在が重なった。一般に、Hoechst は、核内のヘテロクロマチンと呼ばれる DNA メチル化の亢進した領域を染色することが知られていることから¹⁶⁾、PYP-MBD は、ヘテロクロマチン領域に局在化していることが示唆された。更に、DNA メチル化阻害剤である 5-AzadC を添加し、イメージング実験を行ったところ、PYP-MBD に結合したプローブの蛍光は、Hoechst 染色部位とは異なる位置から観測された。このことは、DNA メチル化阻害剤非存在下では、PYP-MBD が DNA メチル化領域に結合しており、DNA メチル化の阻害に伴う DNA のメチル化レベルの低下により、DNA から解離し局在を変化させたと考えられた。このように、本技術は、DNA メチル化解析に応用することができ、DNA メチル化阻害剤の生細胞評価ツールとしても利用できると期待される¹⁷⁾。

6. おわりに

本研究では、PYP タグという新しいタグタンパク質を発掘し、PYP タグを標識することのできる発蛍光プローブを化学の原理に基づき設計・開発した。蛍光色素の分子内会合消光や環境応答性を利用した発蛍光スイッチを活用することで、細胞膜上や細胞内のタンパク質を迅速かつ高い S/N 比でイメージングする技術を開発した。タグタンパク質をラベル化する発蛍光プローブは、いくつかのグループで開発されているが、多くの場合、生細胞内のタンパク質を洗浄操作無しで特異的に検出するのに数十分から数時間を要する。これに対し、開発したプローブの中でも

TMBDMA は、数分以内という極めて短い時間での実験を可能にした。このように、迅速に高い S/N 比で生細胞内タンパク質をイメージングできることは、本技術の大きなアドバンテージである。また、PYP タグのサイズが小さいということも、タンパク質の生細胞イメージングにとって理想的な特長といえる。今後は、イメージングの更なる高速化・高感度化に取り組むとともに、蛍光以外の機能も併せ持つ分子をプローブに導入することで、生命科学を探索する新しい化学ツールを創製していきたい。

[参考文献]

- 1) D. M. Chudakov, M. V. Matz, S. Lukyanov and K. A. Lukyanov, *Physiol. Rev.*, **2010**, *90*, 1103-1163.
- 2) S. B. Van Engelenburg and A. E. Palmer, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2008**, *12*, 60-65.
- 3) G. V. Los and K. Wood, *Methods Mol. Biol.*, **2006**, *356*, 195-208.
- 4) A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel and K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86-89.
- 5) B. A. Griffin, S. R. Adams and R. Y. Tsien, *Science* **1998**, *281*, 269-272.
- 6) S. R. Adams, R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis and R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 6063-6076.
- 7) M. Kumachi, M. T. Hara, P. Stalcup, A. Xie and W. D. Hoff, *Photochem. Photobiol.*, **2008**, *84*, 956-969.
- 8) W. D. Hoff, B. Devreese, R. Fokkens, I. M. Nugteren-Roodzant, J. Van Beeumen, N. Nibbering, K. J. Hellingwerf, *Biochemistry*, **1996**, *35*, 1274-1281.
- 9) M. A. van der Horst, J. C. Arents, R. Kort and K. J. Hellingwerf, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2007**, *6*, 571-579.
- 10) H. Takakusa, K. Kikuchi, Y. Urano, T. Higuchi and T. Nagano, *Anal. Chem.*, **2001**, *73*, 939-942.
- 11) Y. Hori, H. Ueno, S. Mizukami and K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 16610-16611.
- 12) K. K. Sadhu, S. Mizukami, S. Watanabe, K. Kikuchi, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 7403-7405.
- 13) Y. Hori, K. Nakaki, M. Sato, S. Mizukami and K. Kikuchi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 5611-5614.
- 14) S. Nad, M. Kumbhakar and H. Pal, *J. Phys. Chem. A*, **2003**, *107*, 4808-4816.
- 15) G. P. Delcuve, M. Rastegar, J. R. Davie, *J. Cell. Physiol.*, **2009**, *219*, 243-250.
- 16) W. H. Zhang, R. Srihari, R. N. Day and F. Schaufele, *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 40373-40376.
- 17) Y. Hori, T. Norinobu, M. Sato, K. Arita, M. Shirakawa and K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 12360-12365.

[著者プロフィール]

氏名：堀 雄一郎 (Yuichiro Hori)

所属：大阪大学大学院工学研究科、大阪大学免疫学フロンティア研究センター、JST さきがけ

略歴：

- 1999年 京都大学薬学部卒業
 - 2001年 京都大学大学院薬学研究所修士課程修了
 - 2004年 京都大学大学院薬学研究所博士課程修了
 - 2004年 米国ロッキーフエラー大学博士研究員 (Tom W. Muir 研究室)
 - 2006年 大阪大学大学院工学研究科 助教 (現職)
 - 2012年 JST さきがけ研究者 (兼任)
 - 2013年 大阪大学免疫学フロンティア研究センター 助教 (兼任)
- 出身学校：京都大学大学院薬学研究所

学位：博士（薬学）
現在の専門：ケミカルバイオロジー、タンパク質・ペプチド化学

氏名：菊地 和也（Kazuya Kikuchi）
所属：大阪大学大学院工学研究科、大阪大学免疫学フロンティア研究センター

略歴：

1988年 東京大学薬学部卒業
1990年 東京大学大学院薬学系研究科修士課程修了
1994年 東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了
1994年 米国カリフォルニア大学サンディエゴ校 博士研究員（Roger Y. Tsien 研究室）
1995年 米国スクリプス研究所 リサーチアソシエイト（Donald Hilvert 研究室）
1997年 東京大学大学院薬学系研究科 助手
2000年 東京大学大学院薬学系研究科 助教授
2001年 JST さきがけ研究者
2006年 大阪大学大学院工学研究科 教授（現職）
2009年 大阪大学大学院免疫学フロンティア研究センター 主任研究者（兼任）

出身学校：東京大学大学院薬学系研究科

学位：博士（薬学）

現在の専門：ケミカルバイオロジー

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。

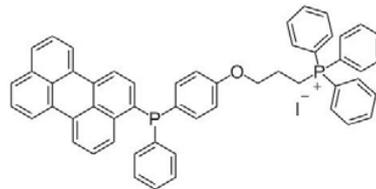
カタログのご請求は小社マーケティング部までご依頼ください。その他パンフレット類のご請求も承っております。

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

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、Liperfluo 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^\cdot)、スーパーオキシドアニオンラジカル (O_2^\cdot)、過酸化水素 (H_2O_2) 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, 3911-3915.

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)
⑤

中嶋直敏、藤ヶ谷剛彦
九州大学大学院

今回、主に、我々が開発した「次世代燃料電池触媒」について解説する。

1. エネルギーデバイス

1.1. 燃料電池

1.1.1. 分類

近年のエネルギー危機に伴い、高性能電池開発は喫緊の課題となっている。電池には、一次電池（アルカリ乾電池など）、二次電池（ニッケル-カドミウム電池、リチウムイオン電池など）、燃料電池、生物電池（微生物電池など）など多彩な種類がある。高性能リチウムイオン電池の開発は、モバイル社会を可能にした。2011年の東日本大震災と福島での原子力発電所の事故により、いわゆる「クリーンエネルギー」や「分散電源」の重要性が高まっており、この両者を満たす「電源」である「燃料電池」¹⁾に大きな期待が寄せられている。ここでは、次世代の燃料電池として、CNTを素材とする私たちの研究を紹介する。詳細は、文献1-4を参照していただきたい。

燃料電池には、i) 酸型高分子電解質膜(PEFC)、ii) アルカリ型、iii) リン酸型、iv) 熔融炭酸塩型およびv) 固体酸化物型(SOFC)

の5種類があり、それぞれに触媒構造、作動環境が異なり、また特長、用途がある(表1)¹⁻⁴⁾。

燃料電池は、純水素、改質水素、メタン、アルコール等の水素源と空気などの酸素源を燃料とし、化学反応により水を生成するプロセスで起電力を生み出す発電機である。燃料電池は、「反応の結果生じるのは水のみ」という究極のクリーンエネルギーであり、エネルギー密度も高く、「クリーンエネルギー」の中でも極めて魅力的である。既に、PEFCとSOFCは、「エネファーム」の名称で市販されている。更なる高性能化と低コスト化の達成で普及の拡大が望まれる。しかし、そのためにはまだ克服すべき課題も多い。

1.1.2. 燃料電池触媒としてのカーボンナノチューブの特長

PEFCは、80～90℃、相対湿度～100%で動作し効率も高いため、家庭用、自動車用といった身近な電源として注目が集まっている。電極触媒には反応効率を高めるために触媒ナノ粒子を高分散状態で担持させ、かつ効率的に反応電子を供給あるいは回収するための導電性担体が必要である。現在は、カーボンブラック(CB)が導電性触媒担体として用いられているが、CBは、必ずしも安定性が十分とは言えない。我々は、「次世代PEFC」を目指して、CBをCNTに置き換えた燃料電池触媒の開発を行なっている。CNTを用いる利点としては、主に以下の5点を挙げることができる。これらはCBに対するCNTの優位性を示すものである。

- i) 結晶性が高いために特に高電位側の電気化学的安定性に優れている。従って耐久性の向上が期待できる。
- ii) CNTの優れた電気伝導性と発達したナノファイバー状の電気伝導ネットワーク形成により電極触媒層での速やかな電子移動が可能である。
- iii) 複雑なナノ細孔を持たない構造のために、担持したナノ粒子が外界に露出し、触媒利用率の向上が期待でき、低白金化に適している。
- iv) CNTネットワークが形成するメッシュ状構造により、燃料ガスの拡散や生成した水の系外への除去に有利である。
- v) 強固なネットワーク構造によりバインダーなしでの成型が可能である。

しかしながら、従来材料であるCBと比較し、短所もある。燃料電池の普及を妨げる原因の一つであるコスト面でもCBと比較し不利である。しかし、CNTは量産によるコスト低減が急激に進

表1. 燃料電池の種類

	酸型高分子電解質膜 (PEFC)	アルカリ型 (AFC)	リン酸型 (PAFC)	熔融炭酸塩型 (MCFC)	固体酸化物型 (SOFC)
電解質 導電イオン	陽イオン交換膜 H ⁺	KOH水溶液 OH ⁻	濃厚H ₃ PO ₄ H ⁺	Li ₂ CO ₃ -K ₂ CO ₃ CO ₃ ²⁻	ZrO ₂ -Y ₂ O ₃ (YSZ) O ₂
作動温度	室温～90℃	室温～240℃	200℃	600～700℃	1000℃
触媒	貴金属 (白金)	貴金属 (白金)	貴金属 (白金)		
燃料 (アノード/カソード)	改質水素/酸素 (空気)	純水素/酸素 (空気)	改質水素/空気	改質水素/空気, CO ₂	改質水素/空気
特徴	高発電効率、水管理が重要、白金触媒が必要	高発電効率、非白金触媒利用可能、CO ₂ による電解質膜変質が問題	白金触媒が必要、電解質漏れ問題	高発電効率、貴金属触媒不要、材料の腐食問題	高発電効率、貴金属触媒不要、触媒材料の変質問題
(想定) 用途	家庭用、電気自動車、宇宙用、軍用	宇宙用 (スペースシャトル)、海底作業船、軍用	オンサイト発電プラント、分散設置型発電	大規模集中発電	大規模集中発電 分散設置型発電
開発段階	市販 (エネファーム)	一部実用化	一部実用化	試験中	市販 (エネファーム)

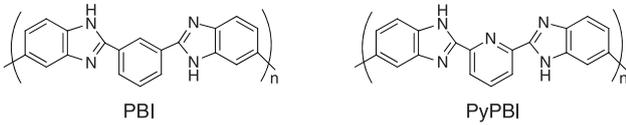


図2 PBI および PyPBI の化学構造

んでいることから、この問題は解決されていくと予想される。分散性の問題もある。CB はアルコール系溶媒に分散し、塗膜等のハンドリングが容易であるが、CNT は強固なバンドル構造のために分散性が悪く、取り扱いが難しいが、以下に述べる様に、私たちは、この問題を解決した。

CNT の燃料電池触媒担体への実用化を目指し、筆者らは PEFC 用 CNT 電極触媒の開発を進めている。現在、PEFC 実用化の鍵は、「高耐久化」、「高温作動」、「高活性化」および「脱白金化」にあるとされている。その中で CNT が最も貢献できるのは結晶化度の高いグラファイト構造がもたらす触媒担体の「高耐久化」である。しかし、CNT 表面に Pt ナノ粒子等の担持は困難であり、これまで行われてきた方法は CNT を酸化処理し、カルボン酸等の官能基を導入し、このサイトに Pt ナノ粒子を担持するというものであった。しかし、この方法では、上述の CNT の特性は活かされない。

1.1.3. CNT を用いる次世代燃料電池

筆者らはプロトン伝導性を持つ高分子電解質であるポリベンズイミダゾール (PBI) およびピリジン型ポリベンズイミダゾール (PyPBI、図2) を用いて CNT を被覆し、その上に Pt を担持することで、酸化処理を経ず (CNT に欠陥部位を導入することなく) 電極触媒を作製することに成功した⁵⁻⁹⁾。すなわち、PBI が CNT をラッピングすることによりそのバンドル構造をほどき、溶剤に分散することを利用するものである。PBI は、PEFC 用電解質として一般的に使用されているパーフルオロスルホン酸を側鎖に有するフッ素系高分子電解質膜である Nafion と比較し、100 ~ 200℃ の高温領域でプロトン伝導 (酸ドープ後) を示すので、「高温作動」に対応できる触媒である。従来型の Nafion 電解質膜は、加湿 (相対湿度 80 ~ 100%) により含水させることで疎水性のフッ素ドメインと親水性スルホン酸の相分離構造が形成され、水和したスルホン酸ドメイン部にプロトン輸送チャンネルが形成される。このようなメカニズムにより高いプロトン伝導度を実現しているが、原理的に水を必要としているために加湿器と 100℃ 以上への過熱を防止する冷却器からなる複雑な水 (湿度) 管理システムが必要となり、高コストの一因となっている。また、高湿度作動条件下では、触媒の白金ナノ粒子の凝集が起こり易く、これが活性低下を誘起する原因の 1 つとなっている。

このような原理的に不可避な欠点を回避するために、プロトン伝導に加湿を必要としないリン酸含浸ポリマー系電解質が注目されている¹⁰⁾。

図3に我々が合成した燃料電池触媒の電子顕微鏡写真を示した。これより、PBI 被覆の有無における Pt 担持の差が顕著である。すなわち、PBI 無しでは、CNT 上の白金ナノ粒子は凝集し、均質な担持は不可能である。これに対して、PBI 被覆 CNT では、PBI が Pt 担持の効率の良い「のり」(グルー)として作用し、Pt の均質な担持が容易に達成できる。また、この手法だと、従来法である白金担持後に高分子電解質 Nafion を混ぜる手法と異なり、白金の被

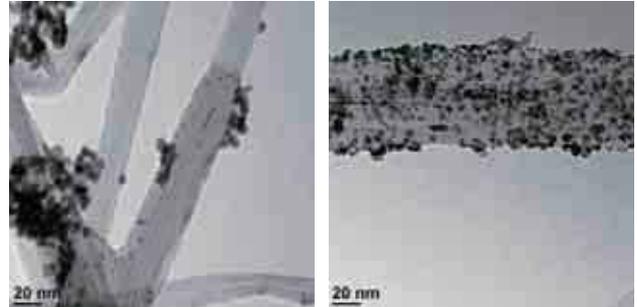


図3 (左)PBI 被覆なし、(右)PBI 被覆ありの CNT への白金担持後の SEM 写真

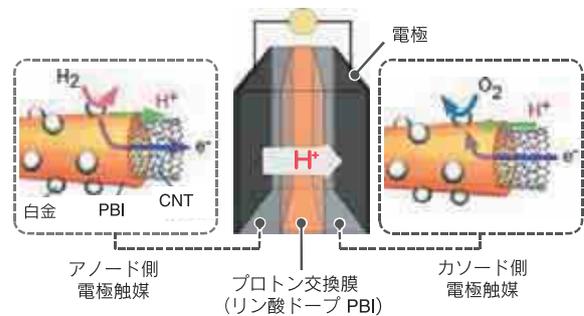


図4 MEA の模式図

覆が抑制でき、触媒の高効率反応につながる、いわゆる「三相界面構造」が形成できる。実際に膜電極接合体 (membrane electrode assembly, MEA) を作製し、電池特性を測定したところ、120℃ 無加湿条件で 180 mW cm⁻² という高い出力密度を示した。さらに同じ触媒にアルカリ (KOH) をドープすることでプロトンの代わりにヒドロキシド (OH⁻) がキャリアとなるいわゆるアルカリ型 PEFC として動作可能であることを実証した。この PBI 被覆 CNT 複合体を用いたアルカリ型 PEFC は 256 mWcm⁻² と非常に高いレベルの出力密度を示した¹¹⁾。

燃料電池でもっとも重要なファクターはその耐久性である。PBI 系では、100 ~ 200℃ という高温で発電できる。このため、発電効率が向上するとともに、100℃ 以下の低温発電で問題となる触媒白金の一酸化炭素による被毒が回避できるという大きなメリットがある。PBI はかつて消防服用途として市販されていた実績もあり、含フッ素電解質 Nafion より安価なため、低コスト化への貢献も期待される。しかし、PBI 単独ではプロトン伝導性が不十分

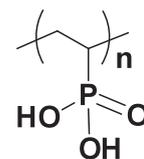


図5 PVPA の化学構造

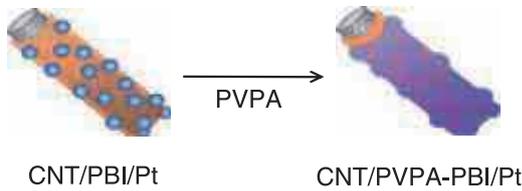


図6 PVPA ドープ型電極触媒の作製スキーム

であり、一般に、リン酸ドープが用いられる。ところが、長時間の発電運転においては、含浸したリン酸の漏れ出しとそれに伴う出力低下が指摘されている¹²⁻¹³⁾。PBIは1ユニットに2つの塩基性イミダゾールを有するため、2等量のリン酸までは酸塩基相互作用により塩形成に消費される。そのため、プロトン伝導には通常5～10等量程の過剰なリン酸のドープが必要となる。それら過剰のリン酸分子は非常に弱く束縛された状態であり、長時間の運転により漏出する。このリン酸の漏出により、電解質膜厚の減少、触媒電解質中のプロトン伝導パスの不均一化が生じ、結果として出力が減少するとされている。

我々はこのリン酸漏出という問題を解決するために液体のリン酸に替えて、高分子酸をリン酸の代わりに用いることを考えた。高分子酸として、ポリビニルホスホン酸 (Polyvinylphosphonic acid: PVPA、図5) を選択した。このポリマーは隣接するホスホン酸基が、主鎖に沿って水素結合ネットワークを形成し、これによるプロトン伝導が可能となる。PVPAは固体であるが、吸水性が非常に高く、単体では強度の高い電解質膜に製膜することが困難なため、PBIとのブレンドが必要となる。PVPAとPBIとのブレンド膜を電解質として検討した研究がこれまでにいくつかなされている。これまで、無加湿条件におけるプロトン伝導性の報告はないが、水素結合の形成が確認されているため、無加湿条件におけるプロトン伝導の可能性は高いと考えた。このフィルムを電解質として、電極触媒として先に述べたPVPAでコートしたCNT/PBI/Pt (図6) を用いMEAを作製し、発電評価を行った。

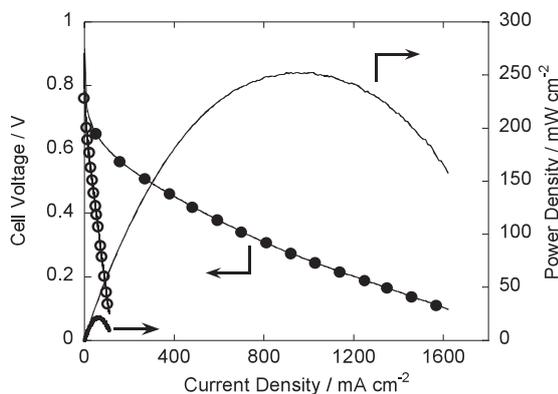


図7 リン酸ドープPBI膜を電解質膜としCNT/PBI/Ptを電極触媒とする単セルの分極曲線(白丸)および出力密度(太線)とPVPA/PBIブレンド膜を電解質膜としCNT/PVPA-PBI/Ptを電極触媒とする単セルの分極曲線(黒丸)および出力密度(太線)。測定条件:120°C、無加湿。アノード:水素100 mL/min、カソード:空気200 mL/min

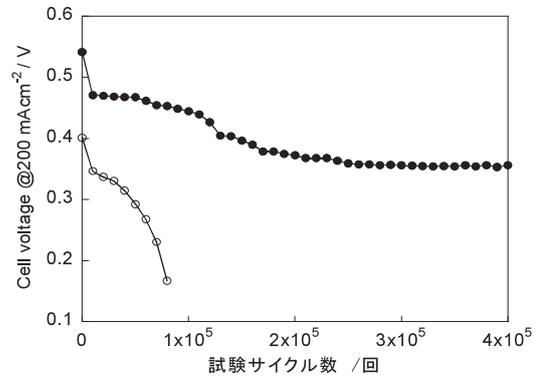


図8 PVPA/PBIブレンド膜を電解質膜としCNT/PVPA-PBI/Ptを電極触媒とする単セル(黒丸)およびリン酸ドープ膜を電解質膜としCNT/PBI/Ptを電極触媒とする単セル(参照セル:白丸)の耐久性試験(分極曲線の200 mA cm⁻²における電圧変化をプロット)

さらにこれを用いて、PBI/PVPAに張り合わせ、MEAを作製した。このMEAを同様の条件で測定したI-V曲線を図7(黒丸)に示してある。PVPA導入前(図7の白丸)と比較し、出力が飛躍的に向上し、最大出力密度は250 mW/cm²に達した⁹⁾。PVPAをドープした結果、プロトン伝導パスが導入され、高い出力が実現できたと考察している。

本系はPVPAを用いることで酸成分の漏出が抑制されている。従って、近年問題として指摘されていた酸漏出による出力低下を抑制でき、長寿命化が達成できると考えた。そこで、燃料電池実用化推進協議会(FCCJ)が定める加速試験のプロトコルを参考に、燃料電池耐久テストを行った(図8)。1.0と1.5Vを往復する電位サイクルを1000セット繰り返すごとにI-V測定を行い、その中から40,000回毎のデータを抽出してプロットしている。比較として、現行のリン酸漏出が生じるリン酸含浸PBIを電解質膜とするMEA(参照MEA)を用いて同様の実験を行った。その結果、参照MEAが80,000サイクル後におよそ初期の50%以下まで電圧低下(@200 mA cm⁻²)しているのに対し、新たに開発した

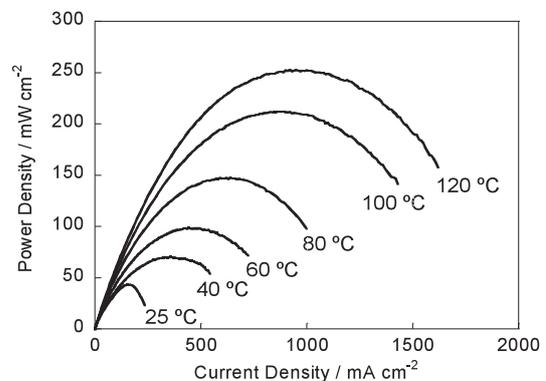


図9 PVPA/PBIブレンド膜を電解質膜としCNT/PVPA-PBI/Ptを電極触媒とする単セルの出力密度の発電温度依存性

MEAは400,000サイクル後においても初期の60%以上の電圧を保っていた⁹⁾。従来の無加湿系は高温領域の発電を得意とする代わりに、100℃以下の低温領域での発電は困難であった。しかし、本系は発達した水素結合ネットワークにより低温領域においても出力を示す(図9)。これにより従来のNafion系をそのまま置き換えることも可能であると期待できる。熱重量減少測定から算出した電極触媒層中のPVPAの量は触媒層全体の5 wt%程度であり、20 wt %以上電解質を含む他の系と比較し、極めて少ない。このような少量で触媒層にプロトンが伝導した(しかも加湿なし条件下で)理由として、CNTが提供するファイバーメッシュ状のネットワーク構造の効果が挙げられる。様々なサイズの凹凸を有し、比表面積が大きいCBに電解質をコーティングする従来の方法では、電解質が無駄になりやすいが、線状でかつスムーズな表面を持ち、かつネットワークを組んでいるCNT上に電解質を均一被覆させることで、プロトン伝導体を無駄なく有効に利用できていると考えている。最小量の電解質で触媒層を構築したことで、ガスが拡散するための空間を確保することを可能にできたため、CBを用いた場合と比較し、高電位側の拡散性が向上しているはずである。今後解析してCNTを用いた特長を追求したい。

本研究により、普及に対する大きな課題であった耐久性の飛躍的な向上を達成した。電極触媒にカーボンナノチューブを用いるブレークスルーにより、市販のPEFCより100倍を超える耐久性を達成した。また、現行の低温・加湿条件下で発電する固体高分子形燃料電池(PEFC)に替えて、低温から高温までを無加湿で発電できるPEFCを開発した。残る課題は高活性化と低コスト化の両立である。本触媒作製法は白金ナノ粒子界面の精密制御が可能であることから、界面構造最適化により触媒利用率を高め、触媒のナノ積層構造の最適化により、高活性化と低白金化の両立が可能であると考えている。現在の担持量0.45 mg/cm²から20分の1を目指して研究を進めている。高活性、高耐久性、低コストを兼ね備えた本系は、NEDOが策定したロードマップの2030年目標にすでに到達していることから、実証実験を経て、早期の実用化にもっていきたいと考えている。

1.2. 白金ゼロの燃料電池触媒

最近、窒素ドーブCNTに酸素還元活性があることが発見され、PEFCカソード触媒として可能性が研究されている。金属を用いないために、強酸条件下で運転するPEFCにおいても溶解劣化が避けられ、長寿命化も期待できる。窒素ドーブにより、CNTの電気伝導度が上昇するために、触媒用途には有利に働く。窒素ドーブCNTはCNTのCVD合成の際に窒素源を共存させて供給するだけで合成できる。ライス大学のグループはスーパーグロース法で窒素ドーブSWNTを合成することに成功し、大量合成に先鞭をつけた¹⁴⁾。また、金属フタロシアニンとフェノール樹脂の混合物を焼成することで得られる窒素含有グラファイト構造に比較的高い酸素還元活性があることが見いだされている。

筆者らはPBI被覆CNTに金属を配位させた後に焼成することでCNT表面に窒素含有グラファイト構造を形成させ導電体(CNT)に酸素還元サイト(窒素含有グラファイト構造)を構築することに成功している¹⁵⁾(図10)。この方法では、酸素還元サイトへのスムーズな電子供給が実現できるメリットがある。

ここで述べたいいくつかの新しい「貴金属を使わない完全メタルフリーな触媒」は、今後、活性サイト構造の特定や触媒作用メカニズムの解明が必要である。

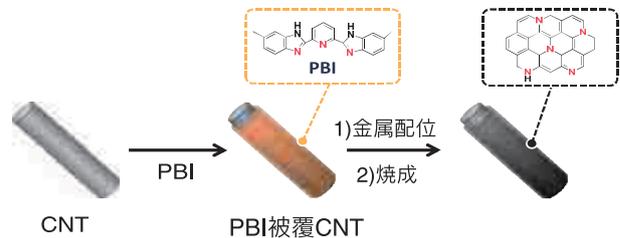


図10 PBI被覆CNTからの酸素還元能を示す触媒複合体の合成の模式図

2. その他の電池デバイス

CNTは太陽電池デバイスへの利用、電気二重層キャパシタの素材としての利用、リチウムイオン電池の負極材料としての利用、およびリチウム(ナトリウム)-空気電池への利用など、次世代の電池材料としての研究が進展しているが、ここでは紙面の都合上割愛する。文献1を参照いただきたい。

[参考文献]

- 1) 中嶋直敏、藤ヶ谷剛彦、「カーボンナノチューブ、グラフェン」、高分子フロンティア、共立出版、**2012**, pp.69-90.
- 2) 「燃料電池」、日本化学会編(渡辺政弘責任編集)、丸善、**2005**
- 3) 「燃料電池と高分子」、高分子学会燃料電池材料研究会編著、共立出版、**2005**
- 4) 「最先端電池と材料」高分子学会編、共立出版、**2012**
- 5) T. Fujigaya and N. Nakashima, *Adv. Mater.*, **2013**, 25, 1666-1681.
- 6) M. Okamoto, T. Fujigaya and N. Nakashima, *Adv. Funct. Mater.*, **2008**, 18, 1776-1782.
- 7) T. Fujigaya, M. Okamoto and N. Nakashima, *Carbon*, **2009**, 47, 3227-3232.
- 8) M. Okamoto, T. Fujigaya and N. Nakashima, *Small*, **2009**, 5, 735-740.
- 9) M. R. Berber, T. Fujigaya, K. Sasaki and N. Nakashima, *Scientific Reports*, **2013**, 3, art. no. 1764.
- 10) J. A. Asensio, E. M. Sanchez and P. Gomez-Romero, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 3210-3239.
- 11) K. Matsumoto, T. Fujigaya, H. Yanagi and N. Nakashima, *Adv. Funct. Mater.*, **2011**, 21, 1089-1094.
- 12) Y. Oono, T. Fukuda, A. Sounai and M. Hori, *J. Power Sources*, **2010**, 195, 1007-1014.
- 13) Y. Oono, A. Sounai, M. Hori, *J. Power Sources*, **2009**, 189, 943-949.
- 14) C. L. Pint, Z. Sun, S. Moghazy, Y.-Q. Xu, J. M. Tour and R. H. Hauge, *ACS Nano*, **2011**, 5, 6925-6934.
- 15) T. Fujigaya, T. Uchinoumi, K. Kaneko and N. Nakashima, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 6843-6845.

Topics on Chemistry

生細胞ミトコンドリア内膜の抗酸化状態をモニターするための α -トコフェロールアナログ

株式会社同仁化学研究所 久保 亮二

ミトコンドリア内膜は電子伝達系における副産物としての活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の主要な生成部位である。ミトコンドリア内膜中の多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は ROS の影響を特に受けやすく、ヒドロキシラジカルなどの ROS によって開始される連鎖的脂質過酸化反応により PUFA は次々と酸化される (Fig. 1)。

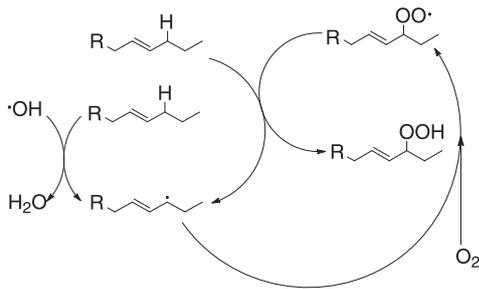


Fig. 1 ROS によって開始される連鎖的脂質過酸化反応

この時、脂質ペルオキシラジカルの反応は他のフリーラジカルが関わる酸化反応より遅いため、最も多い分子種となる¹⁾。McGill大学のKrumovaらは、ミトコンドリアが持つ連鎖的脂質過酸化反応を抑える機能を解析することを目的として、新しいプローブ開発を検討している²⁾。本稿ではミトコンドリア内膜のROSの生成、蓄積、および消費の様子をリアルタイムにモニタリングするための蛍光性プローブを紹介する。

ミトコンドリア内膜の脂質ペルオキシラジカルと特異的に反応する蛍光性プローブに要求される性質として①脂質ペルオキシラジカルと選択的に反応すること②脂溶性かつミトコンドリア内膜に取り込まれること③脂質ペルオキシラジカルとの反応に応答して蛍光を発することが挙げられる。

Krumovaらが開発したプローブ、Mito-Bodipy-TOHは反応基・蛍光団・ミトコンドリア指向性基の3つの部分から成る (Fig. 2)。



Fig. 2 Mito-Bodipy-TOH

脂質ペルオキシラジカルに対する反応基として α -トコフェロールに類似した構造を持つクロマノールを選定した。 α -トコフェロールは脂質ペルオキシラジカルと選択的に反応する脂溶性抗酸化剤である。蛍光団には化学修飾しやすく、最適な蛍光特性を持ち脂溶性があるBodipyが選定された。これにより脂質ペルオキシラジカルとの反応の際、クロマノール部位が酸化されることで光誘起電子移動(photo-induced electron transfer: Pet)効果により蛍光発光する性質を有することになる。このとき、クロマノール部位とBodipy部を接続するビニル結合は反応基と蛍光団の距離を最小にとどめることでPetに有利な条件にすると同時にプローブに脂溶性を与える効果がある。そして、ミトコンドリア内膜への指向性を持たせるために、Murphyらが開発したト

リフェニルホスホニウムカチオン(TPP)を使用した。TPPとBodipyとの結合部にアルキル鎖を使用することでミトコンドリア膜への導入を促進する効果を持たせた。

また、Mito-Bodipy-TOHの他にプローブの機能を評価するために、3種類の化合物を調製している。その構造をFig. 3に、アセトニトリル中の吸収極大・極大蛍光波長および蛍光量子収率、モル吸光係数をTable 1に示す。

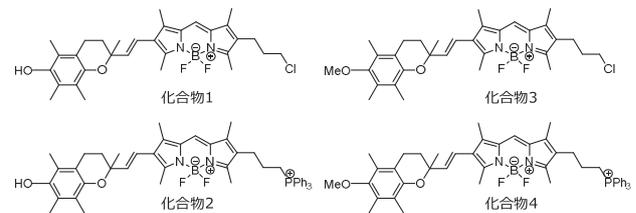


Fig. 3 Mito-Bodipy-TOH(化合物2)およびその類似蛍光性プローブ

Table 1 室温でのアセトニトリル中の化合物1-4の光物性

	$\lambda_{abs\ max}$ (nm)	$\lambda_{em\ max}$ (nm)	Φ_f	$\epsilon \times 10^3$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
1	536	582	0.04	34
2	537	572	0.02	34
3	536	585	0.30	34
4	536	582	0.23	34

化合物1および化合物2(Mito-Bodipy-TOH)はクロマノールの水酸基をメトキシ基に置換した化合物3、4と比べ10分の1の蛍光量子収率であった。これは化合物1、2のクロマノール部位のBodipyへのPeT効果により、蛍光強度が減少していることが示される。

次にMito-Bodipy-TOHのペルオキシラジカルとの反応性を評価するために α -トコフェロールおよび類似の構造物である2,2,5,7,8-ペンタメチル-6-ヒドロクロマン (PMHC) との共存下で均一系 (アセトニトリル中) のペルオキシラジカルとの反応性を調査した。結果、Mito-Bodipy-TOHは均一系において α -トコフェロールやPMHCと同等の反応速度定数を有していることが確認された。これはMito-Bodipy-TOHが α -トコフェロールと同等の脂質ペルオキシラジカルに対する反応性を持つことを示す。また、リポソームを用いた評価では、親水性および脂溶性ペルオキシラジカルによって6倍の蛍光強度増強がみられ、ペルオキシラジカルに対する反応性も、 α -トコフェロールと同等であった。

生細胞におけるMito-Bodipy-TOHのミトコンドリアへの移行性を評価するために、化合物2 (Mito-Bodipy-TOH)、3、4を用いた。生細胞にはマウスの胚繊維芽細胞であるNIH3T3を用いた。NIH3T3を1 μ Mの蛍光性プローブ (化合物2,3,4) および200 nMのMitoTracker Deep Red (市販のミトコンドリア標識剤) を用いて37°Cで5分間染色しそれぞれの選択的波長で励起した。化合物2で染色した細胞は僅かな蛍光が見られ、MitoTracker Deep Redで染色した細胞は強い蛍光が見られる。Mandersの手法³⁾によりそれぞれの共局在係数を算出したところ、M1 = 0.998、M2 = 0.999であり二つの蛍光物質がミトコンドリア内に共局在していることを確認した。同様に細胞染色により強い蛍光を発する化合物4とMitoTracker Deep Redが共局在していることが確認できた。一方、ミトコンドリア移行性基を持たない化合物3では

MitoTracker Deep Red との共局在が認められなかった。この結果からトリフェニルホスホニウム基を持つ Mito-Bodipy-TOH はミトコンドリアへの移行性を持つことが確認できた。

Krumova らは生細胞内における Mito-Bodipy-TOH の酸化状態のモニタリング能力も評価した。ROS 源としてメチルピオロゲン (MV^{2+}) を用いることで、通常の生細胞および ROS を発生させた生細胞を調製した。そこに、Mito-Bodipy-TOH および MitoTracker Deep Red を加えた結果、 MV^{2+} で処理していない細胞では Mito-Bodipy-TOH 添加によって蛍光強度の増大が認められなかったが、 MV^{2+} 酸化によるストレスを受けた細胞の Mito-Bodipy-TOH の蛍光強度は 8 倍の蛍光強度の増大が認められた。これは MV^{2+} によって生成した脂質ペルオキシラジカルと Mito-Bodipy-TOH が反応した結果を示している。

以上の結果から、Mito-Bodipy-TOH は先述の①～③の性質を満たし、生体試料中でのミトコンドリアの酸化状態をモニタリングすることが可能である。よって、Mito-Bodipy-TOH は脂質ペルオキシラジカルに対する反応性と感度を備えた新しい蛍光プローブであるといえる。ミトコンドリア膜、タンパク質、および DNA に対する ROS の障害性はパーキンソン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、運動失調を含む神経変性疾患との関係性が取り沙汰されている。

生細胞のミトコンドリア内膜にてリアルタイムで ROS の生成、蓄積、および消費のモニタリングを可能にする非侵襲的イメージングの方法論は、ROS に関連する細胞病理の背後にある化学的メカニズムを解明するために極めて重要であるといえるため、Mito-Bodipy-TOH などのプローブを利用した研究の発展に注目したい。

[参考文献]

- 1) H. Yin, L. Xu and A. Porter, *N. Chem. Rev.*, **2011**, *111*, 5944.
- 2) K. Krumova, L. E. Greene and G. Cosa, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 17135-17143.
- 3) E. M. M. Manders, F. J. Verbeek and J. A. Aten, *J. Microsc.*, **1993**, *169*, 375.

お知らせ

日経バイオテク ONLINE は国内唯一のバイオポータルサイトとして、多くの国内バイオ研究者から閲覧されています。
<https://bio.nikkeibp.co.jp/>

すでに多くの方がご覧になられたことがあるかと思えます。様々な情報が日々発信されておりますが、同仁化学研究所も「学会・セミナー」「製品・サービス」のご案内を投稿しております。

新製品のご案内や各製品のトピックス、開発中の製品などを随時ご紹介しております。

より多くの研究者にご覧いただく機会を得たことで、国内研究者の研究ツールの一つとなれるものを提供できればと考えております。

今後も様々なツールから皆様に情報を発信してまいります。是非ご覧ください。

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、小社製品を使用する測定方法などをまとめたプロトコルです。

第一弾の「はじめての細胞内 Ca^{2+} 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。

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。

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



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(H₂S)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 (Fig. 1) 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。

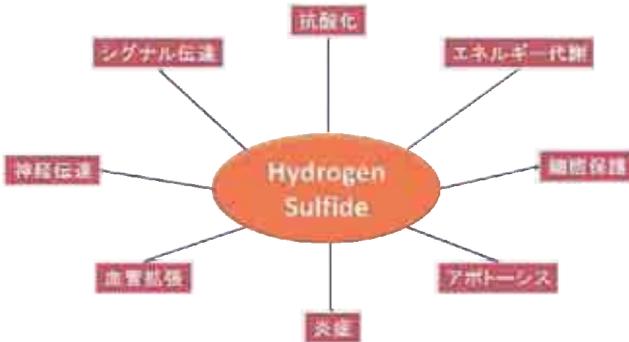
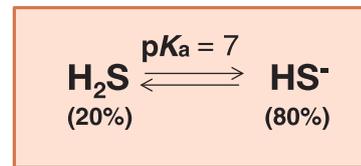


Fig. 1 硫化水素の様々な生体内機能



Hydrogen Sulfide

Fig. 2 生理条件下の硫化水素

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ンβ-シンターゼ (CBS) やシスタチオンγ-リアーゼ (CSE)、3-メルカプトピルビン酸サルファトランスフェラーゼ (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pK_aは約7であり、生理的pHでは約80%が硫化水素イオン(HS⁻)の状態が存在します (Fig. 2)。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 (概要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」および148号「硫化水素による膵B細胞保護」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おります。ご興味、ご要望などありましたら、お気軽に小社までお問合せください。

硫化水素ドナー Na₂S

<特長>

- ・硫化水素研究用として規格化
- ・秤量しやすい粉末タイプ

硫化ナトリウム (Na₂S) 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 (NaHS) と共に汎用されています。しかしながら、現在用いられている硫化ナトリウムは、有機合成用のため数百~数十gという大きな容量で、一つのボトルにペレットの状態販売されています。硫化水素研究において必要となるのはmgオーダーであるため、購入した硫化ナトリウムの多くは無駄となる他、長期保存による劣化の問題が生じます。また、メーカーあるいは製造ロットによって純度や組成が異なるため、実験の再現性に影響を及ぼすことが懸念されます¹⁾。そこで小社では、硫化水素研究用の硫化ナトリウムを開発しております。本試薬は秤量しやすい粉末タイプです。またメチレンブルー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いただけます。



市販の硫化ナトリウム



硫化水素研究用 硫化ナトリウム Na₂S

Fig. 3 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

加水分解性徐放型 硫化水素ドナー

硫化ナトリウム (Na₂S) や硫化水素ナトリウム (NaHS) は、最も一般的な硫化水素ドナーとして硫化水素研究に用いられています。しかしながら、水に溶解するとすべて硫化水素 (イオン) に変換されるため、一過性の硫化水素刺激しか与えることができません。そのため、近年数多くの徐放型の硫化水素ドナーが開発されてきております。GY4137は、P. K. Mooreらによって開発された徐放型の硫化水素ドナーであり、加水分解によって持続的に硫化水素を放出する試薬です (Fig. 4)²⁾。そのため、硫化ナトリウムや硫化水素ナトリウム添加のような一過性の刺激では観察

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体内機能解析や新規の薬剤開発につながることを期待されます。

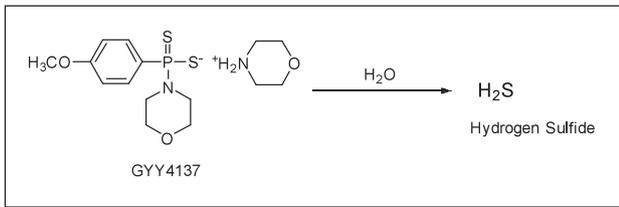


Fig. 4 加水分解性徐放型 硫化水素ドナー GYY4137

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。

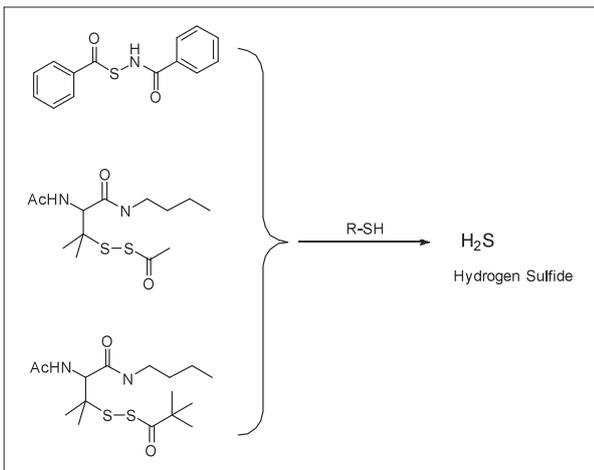


Fig. 5 還元物質応答性 硫化水素ドナー

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、化合物自体の毒性が低く、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。

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ております。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⁶⁾、硫化水素に関連する研究分野は大きな広がりを見せてつあります。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⁷⁾。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転写因子である 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⁸⁾。

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. 6)。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. 7)。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ご提供いたします。

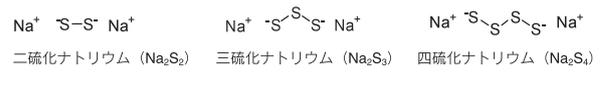


Fig. 6 サルフェン硫黄ドナーの構造

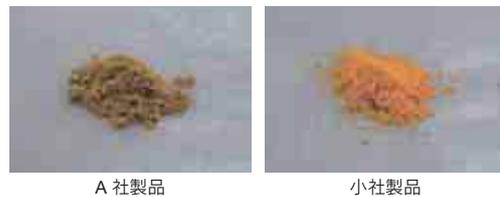


Fig. 7 四硫化ナトリウムの性状 (A社製品と小社製品の比較)

* 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。

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はなく、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. 8, 9)⁹⁾。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。

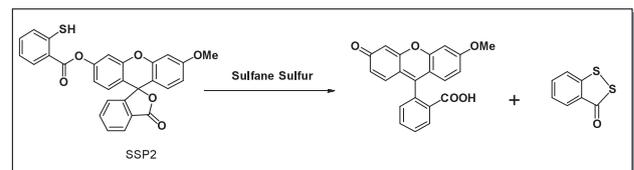


Fig. 8 SSP2 とサルフェン硫黄の反応

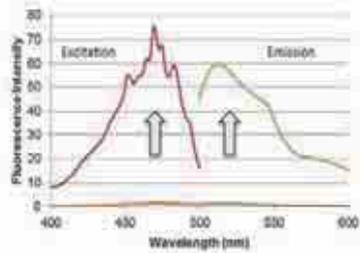


Fig. 9 サルフェン硫黄との反応に伴う SSP2 の励起および蛍光スペクトル変化
* 10 μM SSP2(PBS)に三硫化ナトリウム(終濃度 100 μM)添加(Ex: 482 nm, Em: 515 nm)

[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) B. D. Paul and S. H. Snyder, *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.*, **2012**, *13*, 499.
- 7) Y. Kimura, Y. Mikami, K. Osumi, M. Tsugane, J. Oka and H. Kimura, *FASEB J.*, **2013**, *27*, 2451.
- 8) S. Koike, Y. Ogasawara, N. Shibuya, H. Kimura and K. Ishii, *FEBS Lett.*, **2013**, *587*, 3548.
- 9) W. Chen, C. Liu, B. Peng, Y. Zhao, A. Pacheco and M. Xian, *Chem. Sci.*, **2013**, *4*, 2892.

小社で開発を行っている硫化水素研究に有用な試薬およびキットは小社 HP にて随時情報を更新して参ります。ぜひご覧下さい。なお、ご興味、ご要望などありましたらお気軽に小社までお問い合わせください。

硫化水素 同仁化学

検索

学会展示のご案内

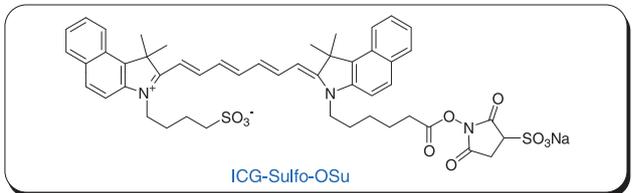
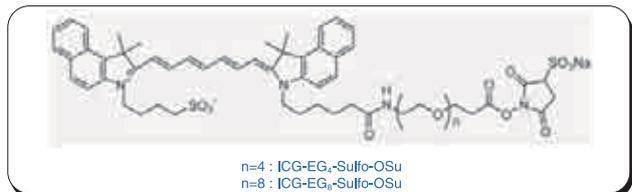
第3回国際硫化水素学会 (H₂S 2014)
期日: 2014年6月4日(水)~6日(金)
会場: 京都大学 芝蘭会館・メルパルク京都

展示ブースでお待ちしております。
ぜひ、お立ち寄りください。

試作品

ICG 誘導体

ICG-EG₄-Sulfo-OSu
ICG-EG₈-Sulfo-OSu
ICG-Sulfo-OSu



<特長>

- ・アミノ基を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用いられているシアニン色素で、励起波長は 774 nm 付近、蛍光波長は 805 nm 付近であり、近赤外領域に蛍光特性を有します。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。本誘導体は、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ため、水溶性が高く非特異的吸着を低減することができます。今後、生体内における分子動態はさら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。



データ提供: NIH, K. Sano, H. Kobayashi

[参考文献]

- K. Sano, T. Nakajima, K. Miyazaki, Y. Ohuchi, T. Ikegami, P. L. Choyke and H. Kobayashi, "Short PEG-Linkers Improve the Performance of Targeted, Activatable Monoclonal Antibody-Indocyanine Green Optical Imaging Probes", *Bioconjugate Chem.*, **2013**, *24*, 811.

新製品

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現化に注目されています。三胚葉のなかでも内胚葉由来の細胞は、膵臓や肝臓といった人にとって重要な機能をもつ臓器へと分化する分岐点に位置するため、効率的な分化誘導、分化度の確認は不可欠です。分化度の確認には、指標となる mRNA や細胞内タンパク質の発現量を一定期間ごとに測定し、それらの発現量の変化で判断するため一部の培養細胞を破壊する必要があります。

本キットを用いて培養上清中のマーカータンパク質を検出することで、ES/iPS 細胞から分化した内胚葉細胞の分化度を測定することができます。このマーカータンパク質は内胚葉マーカーである Sox17、Foxa2 二重陽性細胞率と相関します。本キットでは培養上清中のマーカータンパク質を ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 法により検出するため、細胞を損なわず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、多検体の測定に用いることができるため、分化誘導剤などの薬剤スクリーニングにも有用と考えられます。

本製品は熊本大学発生医学研究所との共同研究成果です。

<キット内容 :-Human Endoderm *>

- ・ Coated 96-well Strip Plate × 1
- ・ Standard × 1
- ・ Reagent A × 1
- ・ Reagent B × 1
- ・ Washing Buffer × 1
- ・ Storage Buffer 0.5 ml × 1
- ・ Substrate Solution 10 ml × 1
- ・ Plate Seal × 3

*- Mouse Endoderm は一部内容が異なります。

[参考文献]

- 1) H. Iwashita, N. Shiraki, D. Sakano, T. Ikegami, M. Shiga, K. Kume and S. Kume, *PLoS ONE*, **2013**, 8(5): e64291.

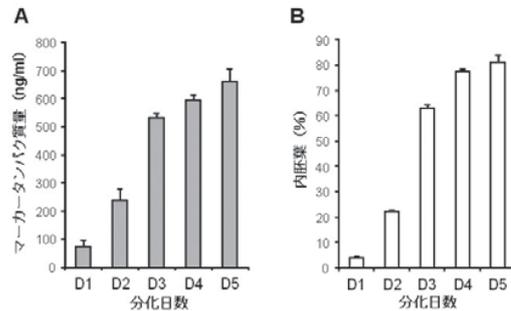


Fig. 1 ヒト iPS 細胞を用いた分化日数毎の培養上清中のマーカータンパク質量 (A) と内胚葉細胞の割合 (Sox17, Foxa2 二重陽性細胞) (B) の関係 (A) 分化日数毎の培養上清中のマーカータンパク質量 (ng/ml) (B) 分化日数毎の内胚葉細胞の割合 (%)

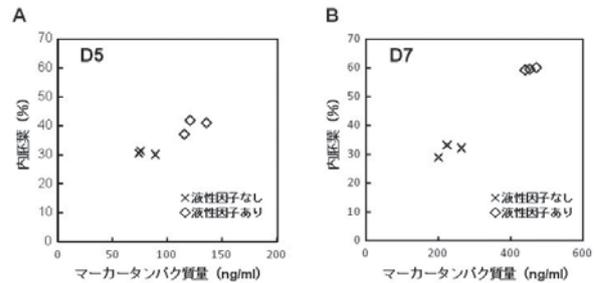
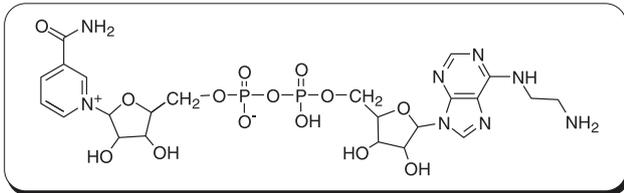


Fig. 2 マウス ES 細胞を用いた異なる培養条件下でのマーカータンパク質量と内胚葉細胞の割合 (Cxcr4, E-Cadherin 二重陽性細胞) の関係 (A) 分化 5 日目、(B) 分化 7 日目

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
ES/iPS Differentiation Monitoring Kit - Human Endoderm			
	96 tests	95,000	ES01
ES/iPS Differentiation Monitoring Kit - Mouse Endoderm			
	96 tests	95,000	ES02

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)。

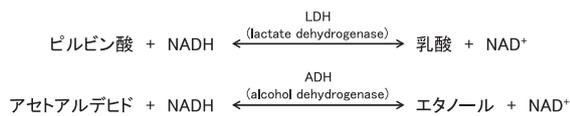


Fig. 1 生体内の様々なデヒドロゲナーゼと NAD の酸化還元反応

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) ベースの乳酸検出用酵素センサを作製しています (Fig. 2)⁴⁾。

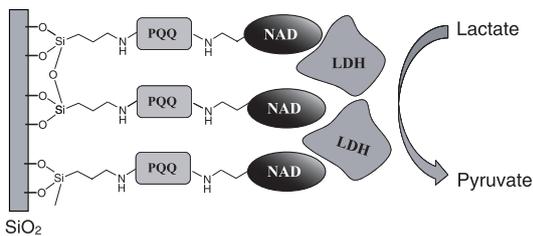


Fig. 2 NAD を固定化した乳酸検出用の酵素センサの模式図⁴⁾

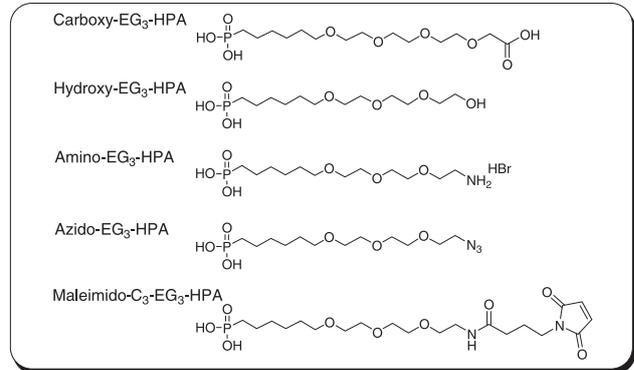
N⁶-2AE-NAD にご興味のある方は、小社までお問合せ下さい。

【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、金基板の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。

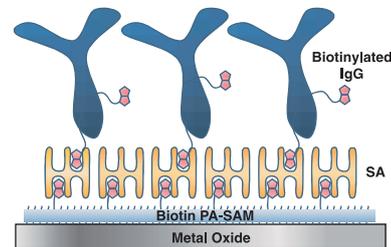


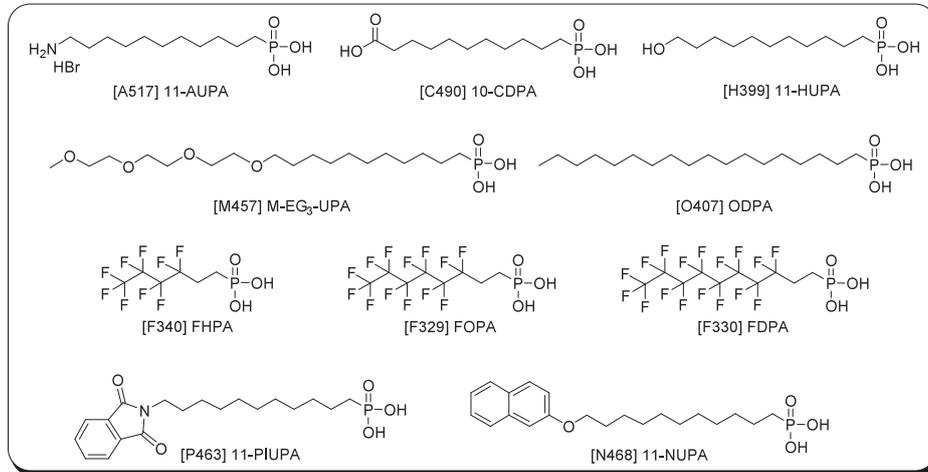
Fig. 3 Biotin PA-SAM Formation Reagent とストレプトアビジン (SA) を用いて作製した抗体固定化センサの模式図

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。

また、小社ではその他のホスホン酸誘導体も取り揃えております。詳細は次ページをご覧ください。

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、Al₂O₃、TiO₂、ZrO₂、シリコン酸化膜 (SiO₂)、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 (シランカップリング剤) 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供給することで OH を産生し、高密度に結合すると考えられています。

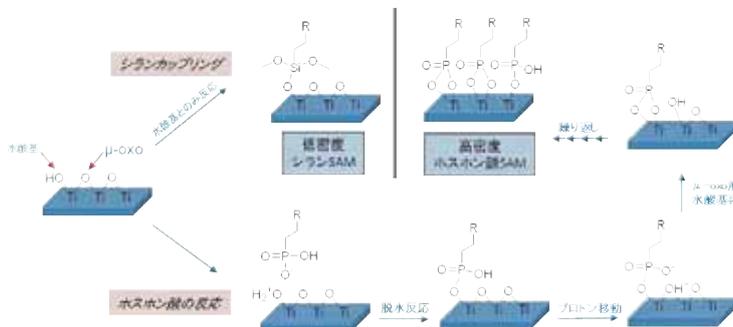


Fig. 1 ホスホン酸誘導体が有機シランより高密度な SAM を形成する理由

＜ホスホン酸 SAM 作製例＞

1. 基板を界面活性剤水溶液 (0.5% SDS) に浸漬し、20 分間超音波洗浄する。
2. 純水、アセトン、エタノールで順次、20 分間超音波洗浄する*2)。
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 ₃ -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

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