

pH 依存的に結合形態が変化するナノ粒子

神奈川工科大学工学研究科 安達 稔

バイオセンサーの分子認識素子に酵素を固定化する主な技術に、物理的吸着法、共有結合法、架橋化法、包括法が開発されているが、これらは酵素配向性を考慮していないことから、固定化酵素の活性を絶対的に発揮させるのは難しい事に加えて、酵素活性は pH や温度といった条件に大きく左右されるので、これに即した固定化法を選択する必要がある。これらの問題を解決する事が、単位面積当たりの酵素活性を増加させ、感度の高いバイオセンサーに繋がる。

酵素配向性を保つためには、酵素の非活性部位と担体を結合させる固定化が考えられ、代表例としてビオチンとアビジンの結合を用いた技術が開発されている¹⁾。また、至適条件下で配向性が変化する結合によって活性が上昇するとも考えられる。結合様式の変化を用いた分析技術として、pH 変化によって結合形態が変化するナノ粒子が Guo らによって開発された²⁾。

このナノ粒子は、酸化グラフェン(GO)とシアニン色素(Cypate)を PEG で結合させた化合物(GO-Cypate)であり、言い換えれば GO に PEG を用いて Cypate が固定化されたものである。GO-Cypate の性質は、Cypate が近赤外線(NIR)によって励起された近赤外線蛍光(NIRF)が蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)し、GO がハイパーサーミア(熱)を発揮する。さらに、GO と Cypate の物理的距離が、中性付近から弱酸性に変化するにつれて徐々に近づいていく性質があり、弱酸性で最も FRET し熱を発する(Fig. 1)。

GO-Cypate は、粉碎した GO に amino-terminated six-armed PEG (以降 PEG と表記)を EDC によってアミド結合させ GO-PEG を作製した後、GO-PEG に Cypate を EDC によってアミド結合させている。GO-Cypate の TEM 像から平均 24.5 ± 6.5 nm の大きさ及び、AFM 像から平均 3.2 ± 0.9 nm の厚さである事が示唆され、Cypate 及び GO-Cypate とともに 785 nm で最大吸光波長を示していた。GO-Cypate の蛍光波長は pH 8.0 で 810 nm から 830 nm 付近に強い蛍光を示しているが、pH 5.0 では蛍光を示さなかった。GO-Cypate および GO-PEG を pH 5.0, 7.4, 8.0 の各条件下で 785 nm の励起波長を 1.5 W cm^{-2} の強さで 300 秒間照射し、光熱(PT)効果を測定した。その結果、GO-PEG は温度変化していないが、GO-Cypate は pH 依存的温度変化を示した(Fig. 2)。筆者らはこの現象を Fig. 1 で示しているような構造の変化によるものだと述べている。

Guo らは、当該論文の後半では、pH 変化に伴う発熱反応に着目し、GO がエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、弱酸性を示すリソソーム内部で発熱、非侵襲的なガン治療法である光熱治療(PTT)³⁾に用いる事を例証し

ているが、この配向性を持たせた物質の固定化法や FRET が、蛍光強度の減少のみではなく、熱量に変換される点など、フロー分析に応用できる点が多いと考えられる。例えば、アンモニアや二酸化炭素といった pH を変化させる物質を産生させる酵素反応は多く(ウレアーゼや各種デカルボキシラーゼなど)、これらの酵素を識別素子としたバイオセンサーでは、pH 変化を指示薬を用いて蛍光や吸光光度法により計測しているが、GO-Cypate を用いることで、指示薬を用いない直接的な計測(FRET による蛍光測定)が可能になると考えられる。また、検出器にカロリメトリーを用いた pH 計測法などにも応用が可能だと思われる。

本稿で紹介した論文は、酵素固定化に応用出来る事及び、*in vivo* でも利用可能な蛍光による pH 測定法への応用、pH 変化による発する熱のアクチュエーターへの応用などが期待できるユニークな技術が報告されていると思われる。

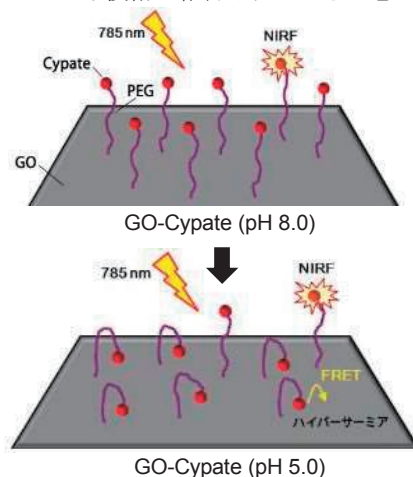


Fig. 1.各 pH 条件下での GO-Cypate の形態

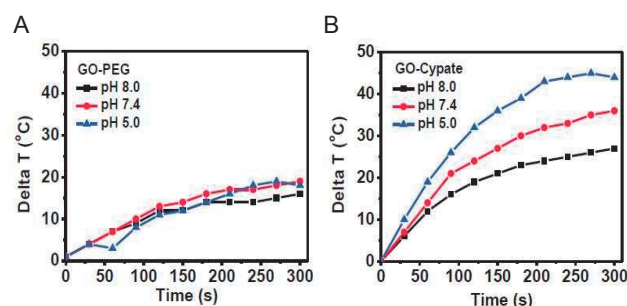


Fig. 2.GO-Cypate の pH 依存的温度変化

A)GO-PEG の PT 効果(16.5 ml⁻¹GO)、B)GO-Cypate の PT 効果(16.5 ml⁻¹GO)

- [1]H. Mao, et al., *Anal. Chem.*, **74**, 379-385 (2002)
- [2]M. Guo, et al., *Adv. Funct. Mater.*, **25**, 59-67 (2015)
- [3]K. Yang, et al., *Chem. Soc. Rev.*, **42**, 530-547 (2013)