

21世紀のバイオハイブリッド物質の設計と創造

桐蔭横浜大学 人間科学工学センター 教授

稲田 祐二

1. はじめに

1970年頃、大腸菌より単離したL-アスパラギナーゼは白血病の治療剤として著効を呈し、脚光を浴びていた。唯一の欠点は同酵素が人にとって異物(not-self)であるため、頻回投与が不可能であった。1975年当時東工大在籍中の私達と、阪大医の和田教授との共同で、L-アスパラギナーゼの抗原性を消失させる手段とし、ポリエチレングリコール(PEG)を同酵素と結合させたPEG-アスパラギナーゼを合成した。¹ このハイブリッド酵素は抗原性を消失し、患者への頻回投与が可能となり、現在米国でリンパ性白血病の治療薬となっている。さらに1984年、酸化還元酵素および加水分解酵素にPEGを結合させたPEG-酵素は有機溶媒に可溶化するのみならず酵素活性を発現させる現象を発見した。従ってPEG-リパーゼは有機溶媒中で加水分解の逆反応すなわちエステル合成、エステル交換反応等の進行を可能にする一連の研究に成功した。²

以上の研究はその後国内外において同様の研究が行われ、新しい研究分野として注目された。当時、武田薬品工業(株)よりの要請で、バイオハイブリッド研究会(旧タンパク質ハイブリッド研究会)が1986年に開催され2000年までに15回研究会が開催された。²² 図1は以上述べたハイブリッド物質の組み合わせを示したもので、タンパク質、生理活性物質、合成高分子および無機物質の4つの物質の組み合わせによるハイブリッドは2つの組み合わせに限らず、3つ、あるいは4つの組み合わせのハイブリッド化も可能である。目的とすることは組み合わせられたハイブリッド物質が単独の物質の有する機能の欠点を補うのみならず、ハイブリッド化することにより機能発現の相乗効果を期待する新しいテクニックである。実際、この構想は世界的にも認識されたのであろうか、Bioconjugate chemistryと名付けられた国際誌が米国で1990年第一巻が出版された。種々の物性を有するバイオ物質のハイブリッド化によって合成されるBioconjugate物質のサイエンスを報告した国際誌である。

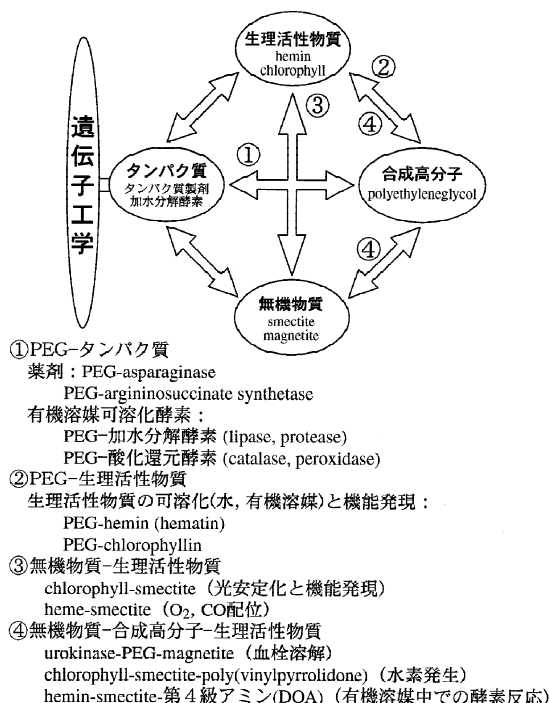


図1 バイオハイブリッド物質の組み合わせと機能

本稿では、21世紀に開花すると思われるバイオハイブリッド物質創製の現在までの業績を述べると共にハイブリッド物質の活躍する分野を想定しオリジナリティーのある研究に発展することを期待している。ここでは私たちの研究室で行った研究に焦点を合わせ図1に示した4つの部門のハイブリッド化について述べる事にする。

2. バイオハイブリッド物質

2.1 PEG - タンパク質

ポリエチレングリコール (PEG) は直鎖状の高分子で $-(CH_2CH_2O)_n-$ の繰り返し構造で両端に OH 基を持つ。水にも有機溶媒にも可溶の両親媒性高分子 (amphipathic property) で毒性が無い。現在、タンパク質分子中のアミノ基に結合させるためにポリエチレングリコールの一方の OH 基をメトキシ化した分子量 5,000 の monomethoxypolyethylene glycol (PEG) を用いる。一方、タンパク質は遺伝子工学的手段を用い合成可能であり生体内にごく微量存在するタンパク質を大量合成することが可能になった。一般にタンパク質は特定のアミノ酸配列を持つ鎖状の高分子であり、その鎖は折れ曲がり重なり合って特徴ある立体構造を保持して、個々の機能を発現する。

a) PEG - アスパラギナーゼ^{3, 4}

L - アスパラギナーゼは分子量 13.6 万、321 個のアミノ酸が結合したポリペプチド鎖が、4 つ会合した球状構造 (8.7×5.8 nm) で、その分子中に 92 個のアミノ基 (Lys および N 末端アミノ基の総和) がある。そのアミノ基に PEG を結合させるが、92 個の何% を PEG で修飾するかを修飾率 (degree of modification) で表す。図 2 はタンパク質のアミノ基に PEG

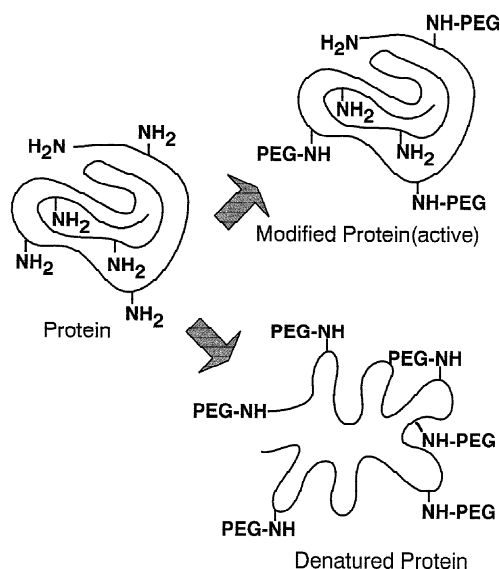


図2 タンパク分子中のアミノ基にポリエチレングリコール (PEG) を結合させたPEG - タンパク質

を結合させるのに必要な条件を示した。タンパク質は特定の立体構造を有するがその中で Lys の ϵ - アミノ基は分子の表面に存在するもの、また分子の内側に存在するものの2種が存在する。全てのアミノ基に PEG を結合させると、タンパク質の特定の立体構造が破壊され、その機能は消失する。従ってタンパク質分子表面に存在するアミノ基に PEG を結合させ、タンパク質の機能を失わない程度に修飾することが大切である。N 末端の α - アミノ基はタンパク質分子表面に存在する場合が多いので修飾されやすい。終局の目的は L - アスパラギナーゼであれば PEG で修飾することによって抗

原性の消失（白血病患者に頻回投与が可能である）、体内停滞時間の延長（体内で長時間薬効を示す）により著しい薬効が現れることを期待する。現在薬学分野で焦点となっているドラッグデリバリーシステム（DDS）の特徴の一つはこの現象である。1996年までのDDSの主な研究開発動向を表1に示す。L-アスパラギナーゼを嚙矢としインターロイキン、インターフェロン α 、アデノシンデアミナーゼ、スーパーオキシドディスムターゼが開発段階より商品化に進行中である。

表1 ドラッグ・デリバリー・システム(DDS)の主な研究開発動向

提携・組織名	対象・物質名	開発段階	概要
[ポリエチレングリコール(PEG)修飾] 米国Rhône-Poulenc Rorer社、 米国Enzon社(商品化)米国 食品医薬品局(FDA)(販売許可)	PEG修飾アスパラ ギナーゼ	製造承認申請 (91年1月) 販売許可取得 (94年2月)	ポリエチレングリコールで修飾したL-アスパラギナーゼ の販売許可を取得。対象疾患はリンパ芽球性白血病。 Enzon社が製造し、RPR社が販売する予定。
米国Enzon社 米国Rhône- Poulenc Rorer社	PEG修飾アスパラ ギナーゼ	技術供与 (93年12月)	PEG修飾アスパラギナーゼ(急性リンパ芽球性白血病の 抗ガン剤)をEnzon社がライセンス。米国での販売許可 後に500万ドルを受け取る。同社はPEG修飾アスパラギ ナーゼを製造、利益の50%を得る。
ロシア厚生省 米国Enzon社	PEG修飾アスパラ ギナーゼ	販売許可 (ロシア 93年 4月)	急性骨髄性白血病治療薬など幅広い抗ガン剤として認可。
米国Enzon社(ニュー・ ジャージー州 Piscataway)	「LYSODASE」 PEG修飾グルコセ レブロシダーゼ	フェーズ I (95年3月現在)	ゴーシェ病
米国Enzon社 米国食品医薬 品局	PEG修飾ヘモグロ ビン	臨床試験許可 (米国 95年 1月)	ポリエチレングリコール(PEG)で修飾したヘモグロビンの 臨床試験認可。Enzon社は火傷や手術後の輸血の代替とし て開発する計画。
米国Enzon社(ニュー・ ジャージー州 Piscataway) 米国 SanofiWinthrop社(New York)	「DISMUTEC」 PEG修飾スーパー オキシド・ディ スムターゼ	フェーズ III (95年3月現在)	頭部の傷害
フランスSanofi社	PEG-SOD	フェーズ III (95年初夏現在)	頭部の傷害が対象
米国Enzon社	PEG修飾アデノシ ンデアミナーゼ	発売(90年10月)	重傷免疫不全の治療薬としてポリエチレングリコールで 修飾したアデノシンデアミナーゼを発売。米国で初の PEG修飾薬となった。
米国Chiron社(カリフォ ルニア州 Emeryville)	PEG修飾インター ロイキン 2	フェーズ II (95年3月現在)	HIV感染症(「レトロビル」と併用)
米国Schering-Plough社、 米国Enzon社	PEG修飾インター フェロン α 「Intron A」	臨床試験フェー ズ I (米国 92年 夏現在)	効果を持続させるためインターフェロン α 2bをPEG化。 Schering社は全世界の62カ国で16の適応でIntron Aを商品 化しており、91年の売り上げは2億5100万ドルに達した。
米国Immunex社	PEG修飾顆粒球 マクロファージ・ コロニー刺激因子 (GM-CSF)	販売認可 (米国 91年 3月)	PEG修飾GM-CSF Leukineを骨髄移植後にマクロファー ジや顆粒球の増殖を促進する治療薬として販売許可。

日経バイオ年鑑(1996)

b) PEG - 酵素（加水分解酵素，酸化還元酵素）

酵素が有機溶媒中で活性を発現する現象は酸化還元酵素の1つであるカタラーゼ（分子量24.8万，アミノ基数112，牛肝臓由来）で成功し1984年論文が掲載された。⁵ カタラーゼ分子中には112個のアミノ基があるがその何%をPEGで修飾するかによりPEG-カタラーゼの性質は変化する。図3は横軸にアミノ基の修飾率，縦軸に過酸化水素を分解する

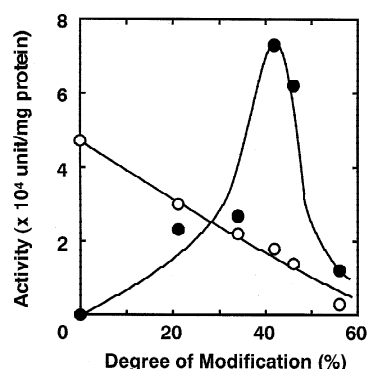


図3 カタラーゼのアミノ基をPEGで修飾する修飾率の増大に伴うカタラーゼ活性(●:ベンゼン中, ○:水溶液中)

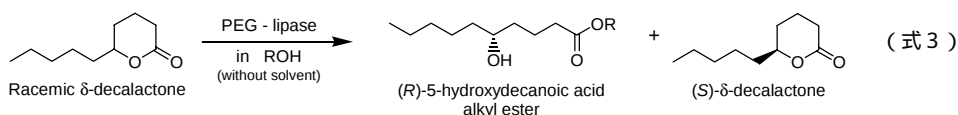
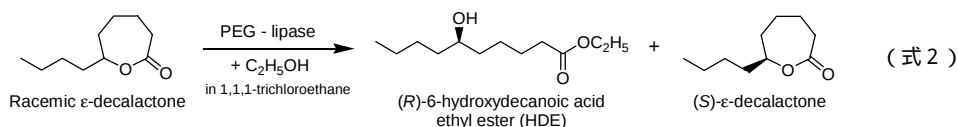
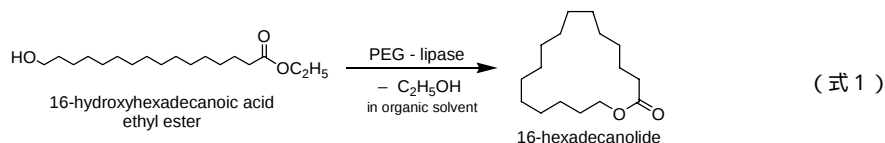
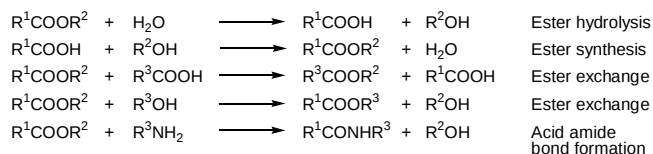
カタラーゼ活性を示したものである。未修飾のカタラーゼは水には溶解し活性を発現するが、ベンゼンでは不溶であり活性は発現しない。PEGによる修飾が進むに伴いベンゼンに可溶となり過酸化水素の分解活性が著しく増大する(●印)修飾率42%で最大活性を示すが、42%以上の修飾によって、多分カタラーゼ分子の立体構造が破壊され、急激な活性の減少が起こると推定される。一方水溶液中での活性(○印)は未修飾カタラーゼで最大の活性があるが、修飾の増加に伴い活性は減少する。興味あることは、PEG-カタラーゼはベンゼン中において、未修飾カタラーゼの水溶液中での活性の約1.5倍の活性を示す結果となった。46%修飾カタラーゼのベンゼン中での溶解度は常温で0.64 mg/mlであり、未修飾カタラーゼではベンゼンには不溶である。

この研究の成功が、PEG-リパーゼを用い加水分解反応の逆反応、すなわちエステル合成、エステル交換反応を有機溶媒、あるいは疎水的環境で進行させる研究に導いた。⁶ 表2はPEG-リパーゼによる疎水的環境での反応である。エステル合成、エステル交換、酸アミド形成反応、ラクトン合成、光学分割等が可能である。いずれの反応も有機溶媒(ベンゼン、トルエン、1,1,1-トリクロロエタン、トリグリセリドなど)で合成反応が常温で進行する。またベンゼン中に常温で溶解したPEG-リパーゼは安定で150日間放置しても約40%の活性を保持する。PEG-酵素のメリットを列記すると、

- 1) 有機溶媒可溶のものが基質になる。
- 2) 熱に対して不安定な物質の合成に適する。
例えば不飽和脂肪酸のエステル化で、副生成物の過酸化物が通常の有機合成の1/20~1/40に抑えられる。
- 3) 2種の液状状態の基質がお互いに混じり合う系の中でPEG-酵素を溶解すると、有機溶媒無しで反応が進行する。

表2に記載の反応式を簡略に説明すると、エステル合成、エステル交換、酸アミド結合等が水の存在しない有機溶媒中で進行する。さらに式1は16-ヒドロキシヘキサデカン酸エチルエステル(10mM)を1,1,1-トリクロロエタンに溶解し、PEG-リパーゼを添加し、65℃で24時間の反応で17員環ラクトンが48%の収率で得られる。⁷ この反応は懸濁状態ではなく透明な均一系で反応が進行する。式2はラセミ体のε-デカラクトンを1,1,1-

表 2 PEG-リパーゼの有機溶媒中の反応



トリクロロエタンに溶解し、PEG - リパーゼを加え、65℃、72時間反応によって反応が進行する。(S) - 体は反応に関与せず(R) - 体のみがアルコールに分解されるため、(R) - 6 - ヒドロキシデカン酸エチルエステル(HDE)が生成する。つまりPEG - リパーゼがラセミ体より選択的に(R) - 体のみのアルコール分解を触媒する。⁸ 上述の反応はいずれも有機溶媒1, 1, 1 - トリクロロエタンを用いた反応であるが、有機溶媒を用いず2つの基質中でのアルコール分解反応を式3に示す。 δ -デカラクトン(ラセミ体)をn-デカノール(ROH)と混合し、PEG - リパーゼを加えると光学選択的にアルコール分解が起こり(R) - δ -デカラクトンが(R) - ヒドロキシデカン酸デシルエステルになり、一方(S) - δ -デカラクトンは反応に関与しない。反応温度50℃、3時間で収率69%である。⁹ 式3の反応は有機溶媒を使わず2つの基質が混じり合い、しかもPEG - リパーゼがその基質に溶解するために進行する反応である。

2.2 PEG - 生理活性物質(低分子)

ここで述べる生理活性物質は、核酸、タンパク質および多糖類の高分子物質を除く、低分子生理活性物質のPEG化について述べる。動物、植物にとって最も重要な役割を果たす2つの色素ヘミンおよびクロロフィルに焦点をあわせた。前者はタンパク質と結合しヘモグロビン(Fe^{2+})として酸素を体内に運ぶ役割を、またペルオキシダーゼ(Fe^{3+})は過酸化物の分解に、後者はタンパク質と結合し光合成反応を担っている。タンパク質より遊離したヘム、クロロフィルは機能を消失するのみならず水に不溶であり、共に光に対して極めて不安定である。図4はヘミンおよびクロロフィルaとその誘導体およびPEG誘導体の構造式を示す。

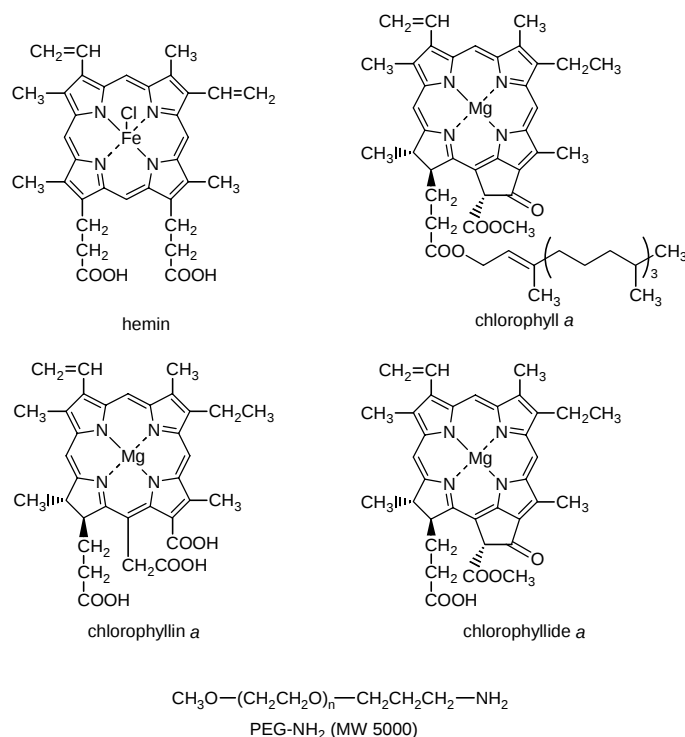


図 4 hemin, chlorophyll a, chlorophyllin a, chlorophyllide a, PEG(polyethylene glycol)-NH₂の構造

a) PEG - ヘミン

α -(3-Aminopropyl)- ω -methoxypoly(oxyethylene), PEG-NH₂ をヘミンのカルボキシル基と酸アミド結合により複合体を合成する。ヘミンは水に不溶（中性）であるが PEG を結合させることにより、水および有機溶媒（1,1,1-トリクロロエタン等）に可溶となる。PEG - ヘミンはトリクロロエタン中でロイコクリスタルバイオレット（AH）存在化で、ペルオキシドを還元する。¹⁰ つまり Scheme 1 に示すように PEG - ヘミンはペルオキシダーゼ活性を有機溶媒中で発現する。従って、不飽和脂肪酸の酸化によるペルオキシドが色素（クリスタルバイオレット）の発色の強さにより分光学的に定量が可能となった。

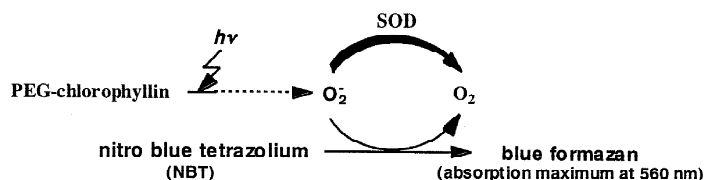


Scheme 1

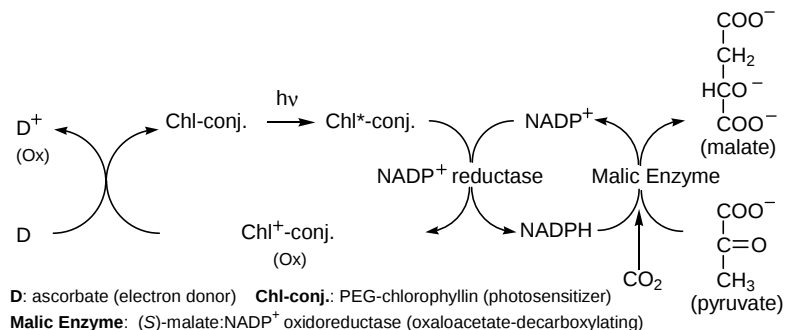
b) PEG - クロロフィリン (chlorophyll a)

クロロフィル a 分子 (chlorophyll a) には長鎖のフィトール基 (C₂₀H₄₀O, MW 296) が結合しているため PEG を結合させる事は不可能である。従って加水分解による反応により

クロロフィル 1 分子より 3 つのカルボン酸を有するクロロフィリン a (図 4) と PEG-NH₂ を反応させ PEG - クロロフィリンを合成した。¹¹ 水に不溶であるクロロフィルを加水分解して得られるクロロフィリンは、PEG と結合させることにより水にも有機溶媒にも可溶となる。さらに光に対し安定となり水溶液中で光増感剤として光化学反応に利用できる可能



性が出現した。そこで好氣的条件下で酸化還元色素ニトロブルーテトラゾリウム(nitro blue tetrazolium, NBT)溶液(pH 7.8)にPEG - クロロフィリンを加え60W白熱電球で、反応液に照射するとNBTの還元が起こり560 nmに極大波長を持つブルーホルマザン(blue formazan)になる。この反応系にSOD(Superoxide dismutase)を加えると、NBTの還元が起こらないことにより、光照射によりPEG - クロロフィリンによるO₂⁻の発生が示唆される。さらにScheme3はPEG - クロロフィリンの光化学反応系によるCO₂ガスの固定、すなわちピルビン酸よりリンゴ酸の合成を電子供与体としてアスコルビン酸、NADP⁺、NADP⁺レダクターゼおよびリンゴ酸脱水素酵素の共存化で光を照射するとリンゴ酸合成が観察される。¹²

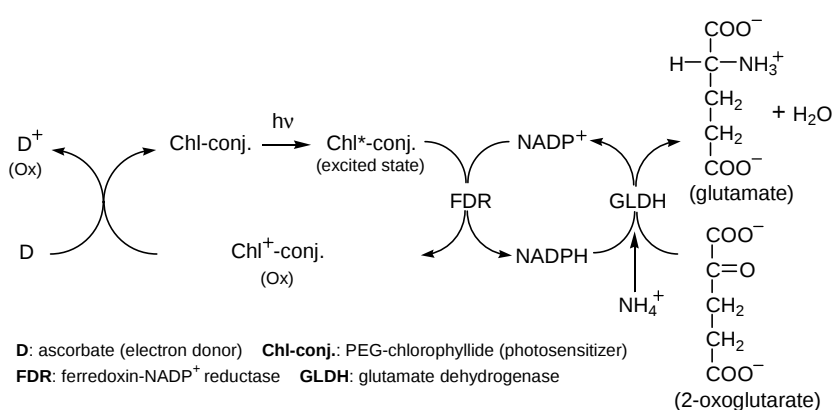


c) PEG - クロロフィリド (chlorophyllide)

クロロフィル a にクロロフィラーゼを作用させクロロフィル a のフィトール基を除いたクロロフィリド (chlorophyllide) (図 4) に PEG-NH₂ を反応させ PEG-chlorophyllide を調製した。PEG-chlorophyllide は水溶液に溶解し光に対する安定性も向上した。表 3 には PEG 鎖の分子量変化に伴う光安定性と水溶液中での溶解性を示した。PEG - chlorophyllide は chlorophyllide または chlorophyll よりも光に対し安定化し、さらにクロロフィリドに結合した PEG の分子量が大きくなるにつれ光に対する安定性も水溶液に対する溶解性も向上して

表3 PEG鎖の分子量変化に伴うPEG-chlorophyllideの光安定性と水溶液中での溶解性

PEG鎖の分子量	光安定性 (%)	水溶液への溶解性
12000	77.1	+++
2000	66.1	++
500	62.3	+
chlorophyllide	46.1	±
chlorophyll <i>a</i> in benzene	7.6	-



Scheme 4

いるのが解る。また，分子量 12,000 の PEG と結合した PEG-chlorophyllide 複合体を光増感剤として用い，水溶液中で酵素触媒 NADP⁺ レダクターゼおよび電子供与体アスコルビン酸共存下において，可視光照射により NADP⁺ が NADPH へ光還元された。さらに Scheme 4 に示すように NADPH を補酵素とするグルタミン酸デヒドロゲナーゼを加えると NH₄⁺ と 2-oxoglutarate からグルタミン酸が合成された。¹³

2 .3 無機物質-生理活性物質

a) スメクタイト - クロロフィル

粘土鉱物ベントナイトはモンモリロナイトの一種で主として Al₂O₃・4SiO₂*n*H₂O で示される。塩基交換能が極めて大きく，イオン交換樹脂の基となったものである。オパール色で水に対する膨潤度は高い。一方合成粘土鉱物スメクタイトは層状の粘土鉱物でケイ酸塩層は 1 枚の八面体シートを 2 枚の 4 面体シートがサンドイッチ状にはさんだ構造をしている (図 5)。主な組成は Si と Mg でメチレンブルーに対する吸着量は 101 ミリ等量 / 100 g スメクタイトである。このスメクタイトの興味ある特徴は，水中で透明なコロイド状液体になることで実際 1% スメクタイト水溶液の 500 nm における透過率 (transmittance) は 95% である。上述の無機物とヘミンあるいはクロロフィルと結合させたバイオハイブリッドについて述べる。

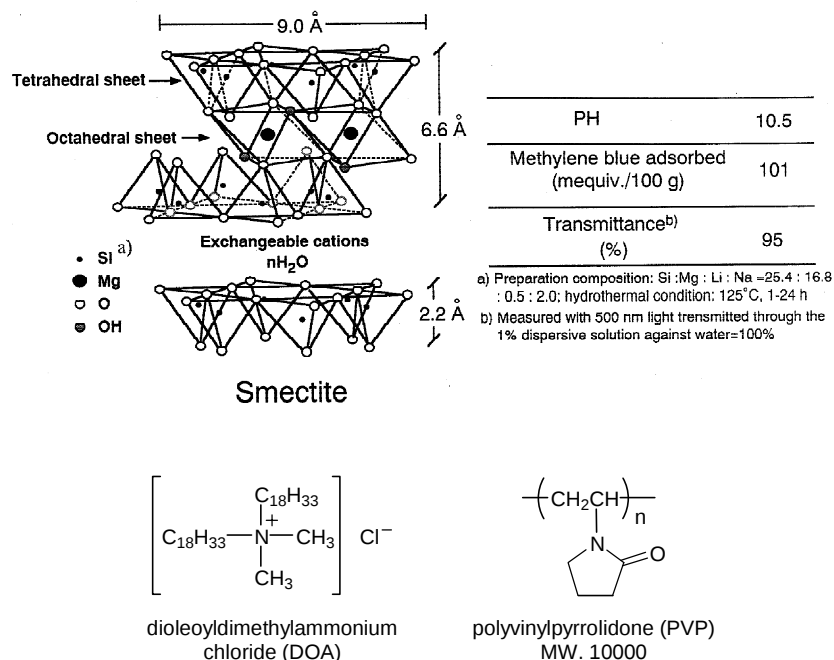
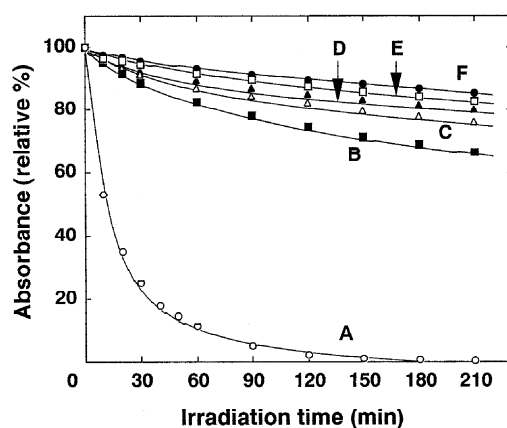


図5 dioleoyldimethylammonium chloride (DOA), Polyvinylpyrrolidone (PVP) およびスメクタイトの構造と性質

クロロフィルは生体より単離すると極めて不安定で、特に光照射により速やかに褪色するが、ベントナイトを結合させたベントナイト-クロロフィルは著しく光に対し安定となる。¹⁴ 次に水に可溶なスメクタイトとクロロフィルを結合させると、スメクタイト-クロロフィル複合体が生じ、この複合体は水に可溶となる現象を見いだした。また、光に対する安定性を調べた結果を表4に示す。100 mgのスメクタイトに0.22~1.03 mgのクロロフィルを結合させた複合体の吸収極大波長と、その複合体に210分の光照射による褪色の程度を示したものである。この複合体の調製は、極めて簡単でクロロフィルをベンゼンに溶解し、その溶液中にスメクタイトを添加すれば、色素がスメクタイトに吸着し沈殿する。100 mgのスメクタイトに結合させるクロロフィルを変化させた(A→F)複合体を作り光に対する安定性を表と図で示した(表4)。下図は種々の複合体(A→F)の光照射時間に対する褪色(それぞれの吸収極大波長の低下)を示したものである。ベンゼン中のクロロフィルは吸収極大波長665 nm、210分の光照射で完全に褪色するが(A)、スメクタイトに吸着されるクロロフィル量が増加するにつれ(B→F)光安定性が増加すると共に吸収極大波長は長波長側にシフトする。緑葉中のクロロフィルは678 nmが吸収極大波長である事実より、スメクタイトに結合するクロロフィルの量の増加に伴い長波長側にシフトする現象は(669→673 nm)、クロロフィルが生体内に近い状態になりつつあることを示していると推測している。¹⁵

表4 クロロフィル - スメクタイトの吸収極大波長と光安定性

	Smectite (mg)	Chlorophyll <i>a</i> adsorbed (mg)	Absorption maximum (nm)	Stabilization of chlorophyll <i>a</i> (%)
F	100	1.03	673	85.4
E	100	0.63	672	82.8
D	100	0.53	671	80.2
C	100	0.45	670	76.2
B	100	0.22	669	66.5
A chlorophyll <i>a</i> in benzene			665	0
chlorophylls in intact leaves			678	100



b) スメクタイト - ヘミン (ヘム)

動植物界に広く分布するヘムタンパク質の主な機能として酸素と結合しそれを運搬するヘモグロビン, ミオグロビンおよび生体中の酸化還元反応における触媒作用を行うカタラーゼ, ペルオキシダーゼが知られている。全てのヘムタンパク質は, 鉄原子がポルフィリン誘導体に配位した補欠分子族ヘム, ヘミンを持っている。ヘム, ヘミン自身では, ヘムタンパク質の機能はほとんど無くヘムタンパク質が機能を示すためには, ヘム, ヘミンとタンパク質の結合が必要である。著者は, タンパク質の代わりにスメクタイトを用いヘムタンパク質に似た機能発現に成功した。

アセトンに溶解したヘミン(Fe^{3+})中にスメクタイトを入れるとヘミン - スメクタイト複合体となり沈殿として得られる。その複合体は水に溶解し黒褐色となり, その吸収スペクトルは398 nmにSoret bandを持ち, その分子吸光係数より, 単量体のヘムがスメクタイトと結合していることが判明した。一般にヘミンは水溶液中で会合し易いにもかかわらずスメクタイトと結合したヘミンは単量体である。この複合体は水に可溶であるため, 水溶液中でペルオキシダーゼ活性を発現する。スメクタイト - ヘミン複合体を還元するとスメクタイ

ト - ヘム (Fe^{2+}) 複合体となりその水溶液中におけるスペクトルはオキシヘモグロビンに類似し、さらに CO を吹き込むと CO - ヘモグロビン類似のスペクトルが得られる。表 5 はそれぞれのヘム複合体とヘムタンパク質の吸収極大波長と分子吸光係数を示した。スメクタイト - ヘミン複合体を還元して得られたスメクタイト - ヘム複合体はオキシヘモグロビンの特徴的な α と β の吸収が現れる。そして CO を吹き込んだ CO - スメクタイト - ヘムは α と β の吸収が短波長側にシフトした。この現象がオキシヘモグロビンに CO を吹き込んだ時に生じるカルボキシヘモグロビンの場合と類似している。さらにスメクタイト - ヘムの分子吸光係数を 1 とした場合の CO - スメクタイト - ヘムの比率は 1.59 そしてオキシヘモグロビンの分子吸光係数を 1 とした場合のカルボキシヘモグロビンの比率は 1.52 となりその比率も類似している。このことからスメクタイト - ヘムはオキシヘモグロビンと同様の性質を持っていることが示唆される。¹⁶

表 5 ヘム(ヘミン) - スメクタイト複合体とヘム(ヘミン) - タンパク質複合体の分光学的性質の比較

Compound	Oxidation state of Fe	Ligands		λ_{max}			
		Fifth	Sixth	α	β	Soret	(ϵ_{mM})
O ₂ -heme-smectite	Fe ²⁺	(SME	O ₂)	568	534	411	(93)
CO-heme-smectite	Fe ²⁺	(SME	CO)	561	530	408	(148)
Oxyhemoglobin	Fe ²⁺	His	O ₂	577	541	414	(125)
Carboxyhemoglobin	Fe ²⁺	His	CO	570	538	418	(191)
Hemin-smectite	Fe ³⁺	(SME	Cl ⁻)	610	490	398	(116)
Monomeric hematin	Fe ³⁺	OH ⁻	H ₂ O	---	---	398	(122)
Hemoglobin	Fe ³⁺	His	H ₂ O	630	500	406	

The absorption spectra of hemin and heme-smectite conjugates in water, a transparent colloidal solution, was measured with a Shimadzu spectrophotometer MPS-2000 (Kyoto, Japan). Soret (ϵ_{mM}): The peak position (λ_{max}) of Soret band with molar extinction coefficient (ϵ_{mM}).

2 . 4 無機物質 - 合成高分子 - 生理活性物質

a) ウロキナーゼ - PEG - マグネタイト (磁性化ウロキナーゼ)

ウロキナーゼは組織プラスミノゲンアクチベーター (TPA) と共に血栓溶解作用を有する酵素タンパク質である。血液中のプラスミノゲンをプラスンに変換する反応を触媒する線溶系亢進の役割を果たす。つまり血液中で血栓形成に関与するフィブリン重合体を可溶化する作用があり、血栓症の治療に用いられている。ウロキナーゼ - PEG - マグネタイト複合体は磁力を用いて血栓部位にウロキナーゼを輸送する、PEG は両者を結合させる役割

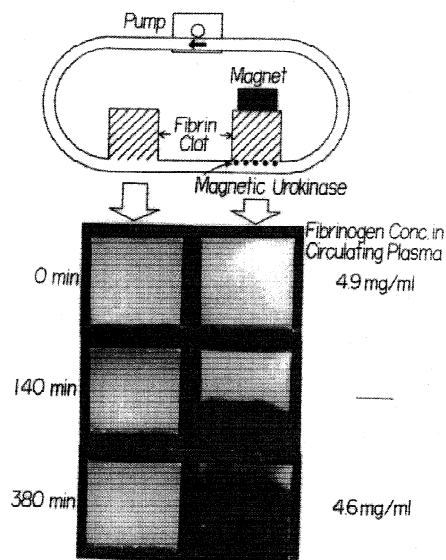


図6 磁性化ウロキナーゼによる血栓溶解

と抗原性の消失を伴っている。¹⁷ 図6は2つの部屋にフィブリン重合体(血栓)を入れ、その間を細いチューブで連結し、血漿(血液より血球を除いたもの)をポンプを用いて循環させる。実験開始と共に上記の磁性化ウロキナーゼを注入する。その際、2つのフィブリン重合体の入った部屋の右側の部屋の上に磁石(250Gs)を置き、磁性化ウロキナーゼの入った血漿を循環させ観察する。図の下段は左右の部屋の血栓(白い部分)の状態の写真である。磁石の置いてある部屋(右側)内のフィブリンは速やかに溶解され血栓が溶解され写真で黒い部分となるが磁石のない対極(左側)では線溶現象は観測されない。すなわち磁性化ウロキナーゼをチューブで血中に入れ血栓形成部位に磁石を置けば血栓が溶解する現象を示している。この際血漿中のフィブリンの前駆体、フィブリノゲン量は減少しない。この研究はその後マウスを用いた血栓溶解の研究に発展している。¹⁸ ウロキナーゼ以外にリパーゼの磁性化の研究もある。¹⁹

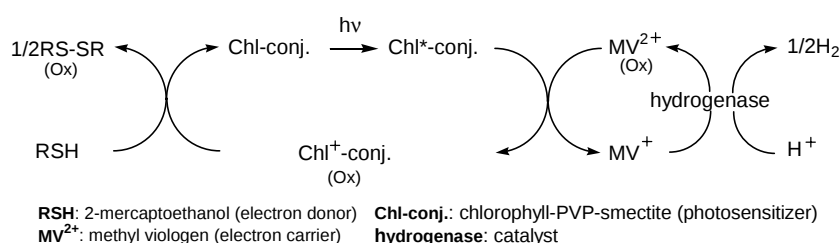
b) クロロフィル - スメクタイト - ポリビニルピロリドン (PVP)

クロロフィルをスメクタイトに吸着させ光に対する安定化について述べたが、さらなるクロロフィルの高い安定化と新しい機能を発現させるためにスメクタイトの層間にポリビニルピロリドン (PVP) (図5) をインターカレートし、クロロフィル-スメクタイト-PVPを調製した。表6はクロロフィル - スメクタイト - PVP, クロロフィル - スメクタイト, クロ

表6 クロロフィル - スメクタイト複合体の光安定性および吸収極大波長

	Chlorophyll conjugates	Absorption maximum (nm)	Stabilization of chlorophyll (%)
A	chlorophyll in benzene	665	< 8
B	chlorophyll-PVP	672	23
C	chlorophyll-smectite	673	62
D	chlorophyll-smectite-PVP	677	80
E	chlorophylls in intact leaves	678	100

ロフィル - PVP およびクロロフィル（ベンゼン中）の光に対する安定性およびそれぞれの吸収極大波長を示した。ベンゼン中のクロロフィルは665 nm に吸収極大を持ち、光照射360分で吸収極大波長の吸光度が8%以下に減少するのに対し、クロロフィル複合体ではクロロフィル - PVP（23%）、クロロフィル - スメクタイト（62%）、クロロフィル - スメクタイト - PVP（80%）の順に光に対して安定化している。²⁰ さらにクロロフィル - スメクタイト - PVP は吸収極大波長が677 nm に移行し、緑葉中のクロロフィルの吸収極大波長678 nm にほぼ一致することにより *in vivo* の状態に近づいたことを示している。さらに、光安定性が増すにつれて吸収極大波長が長波長に移行する現象より生体内のクロロフィルの状態を反映しているように思われる。そこでクロロフィル - スメクタイト - PVP を光増感剤とした水溶液中からの水素発生を Scheme 5 の反応により観察した。



Scheme 5

光の照射によりクロロフィル - スメクタイト - PVP 複合体は励起しメチルビオローゲンを還元する。この還元されたメチルビオローゲンから触媒であるヒドロゲナーゼに電子が渡り、活性中心にある水素イオンに電子が渡り水素が発生する。酸化されたクロロフィルはメルカプトエタノールから電子を引き抜き一連のサイクルが回転する。図7はScheme 5による水素発生を示したもので縦軸は発生した水素の量、横軸は光の照射時間を示す。クロロフィル - スメクタイト - PVP に光を照射すると60分後より直線的に水素が発生し続ける（曲線A）。一方電子供与体であるメルカプトエタノールを除いた試料（曲線B）、あるいは光を照射しなかった試料（曲線C）では反応が全く進行しない。

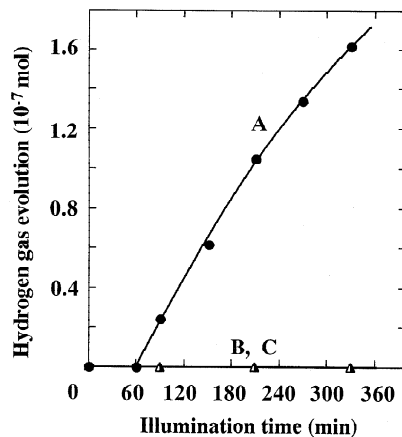


図7 クロロフィル-PVP-スメクタイト複合体を光増感剤とした水溶液中からの水素の発生

c) ヘミン - スメクタイト - 第4級アミン (DOA)

スメクタイトは101 meq/100 gの塩基交換能を有する粘土鉱物であるため(図5), 第4級のアミンである dioleoyldimethylammonium chloride (DOA)(図5)を添加すると結合しスメクタイト - DOA となりベンゼン等の有機溶媒に可溶となる。従って最初にヘミンをスメクタイトに結合させた複合物にDOAを添加するとヘミン - スメクタイト - DOA 複合体が合成される。この複合体の吸収スペクトルは400 nm にシャープな Soret bond ($\epsilon_{\text{mM}} = 75$), および568 nm に吸収帯を持ち, 重合しやすいヘミンがスメクタイトと結合することによりモノマーの状態では有機溶媒に可溶となる。ヘミン, スメクタイト, DOA はそれぞれ生理活性物質, 粘土鉱物, 第4級アミンであり個々の特性の有する物性を生かしハイブリッド化したものである。現在この物性の利用面を検討中である。²¹

3. おわりに

本稿は21世紀を迎え, 現在のバイオハイブリッド物質の現状を披露し, 次世代のバイオサイエンスの発展につながればと思っている。ここに記した内容は, すべて私の研究室のスタッフおよび博士, 修士課程の学生の研究業績であり, 参考図書23~26を参照頂きたい。更なる国内外の情報はバイオハイブリッド研究会(タンパク質ハイブリッド研究会を含む)1986~2000年の抄録に記されている(参考図書22)。

謝辞 本研究に協力いただいた西村裕之教授, 松島(二見)瑞子教授, 廣戸三佐雄助教授, および小寺洋講師に深く感謝致します。

参考文献

1. Wada, H., Imamura, I., Sako, M., Katagiri, S., Tarui, S., Nishimura, H. and Inada, Y. (1990) Antitumor enzyme: polyethylene glycol-modified asparaginase. *Ann. NY Acad. Sci.*, **613**, 95-108.
2. Kodera, Y., Hiroto, M., Matsushima, A., Nishimura, H. and Inada, Y. (2000) Application of PEG-modified enzymes in biotechnological processes. in *Stereoselective Biocatalysis* (Patel, R. N. ed.), Marcel Dekker, Inc., p. 713-740.
3. Ashihara, Y., Kono, T., Yamazaki, S. and Inada, Y. (1978) Modification of *E. coli* L-asparaginase with polyethylene glycol: Disappearance of binding ability to anti-asparaginase serum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 385-391.
4. Kodera, Y., Tanaka, H., Matsushima, A. and Inada, Y. (1992) Chemical modification of L-asparaginase with a comb-shaped copolymer of polyethylene glycol derivative and maleic anhydride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 144-148.
5. Takahashi, K., Ajima, A., Yoshimoto, T. and Inada, Y. (1984) Polyethylene glycol-modified catalase exhibits unexpectedly high activity in benzene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **125**, 761-766.
6. Inada, Y., Takahashi, K., Yoshimoto, T., Ajima, A., Matsushima, A. and Saito, Y. (1986) Application of polyethylene glycol-modified enzymes in biotechnological processes: Organic solvent-soluble enzymes. *Trends Biotechnol.*, **4**, 190-194.
7. Kodera, Y., Furukawa, M., Yokoi, M., Kuno, H., Matsushita, H. and Inada, Y. (1993) Lactone synthesis from 16-hydroxyhexadecanoic acid ethyl ester in organic solvents catalyzed with polyethylene glycol-modified lipase. *J. Biotechnol.*, **31**, 219-224.
8. Furukawa, M., Kodera, Y., Uemura, T., Hiroto, M., Matsushima, A., Kuno, H., Matsushita, H. and Inada, Y. (1994) Alcoholysis of ϵ -decalactone with polyethylene glycol-modified lipase in 1,1,1-trichloroethane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 41-45.
9. Uemura, T., Furukawa, M., Kodera, Y., Hiroto, M., Matsushima, A., Kuno, H., Matsushita, H., Sakurai, K. and Inada, Y. (1995) Polyethylene glycol-modified lipase catalyzes asymmetric alcoholysis of δ -dicalactone in *n*-decanol. *Biotechnol. Lett.*, **17**, 61-66.
10. Ajima, A., Cao, S. G., Takahashi, K., Matsushima, A., Saito, Y. and Inada, Y. (1987) An attempt to determine lipid peroxides with polyethylene glycol-modified hemin. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **9**, 53-57.
11. Itoh, T., Ishii, A., Kodera, Y., Hiroto, M., Matsushima, A., Nishimura, H. and Inada, Y. (1996) Chlorophyllin coupled with polyethylene glycol: A potent photosensitizer. *Res. Chem. Intermed.*, **22**, 129-136.
12. Itoh, T., Asada, H., Tobioka, K., Kodera, Y., Matsushima, A., Hiroto, M., Nishimura, H., Kamachi, T., Okura, I. and Inada, Y. (2000) Hydrogen gas evolution and carbon dioxide fixation with visible light by chlorophyllin coupled with polyethylene glycol. *Bioconjugate Chem.*, **11**, 8-13.
13. Asada, H., Itoh, T., Kodera, Y., Matsushima, A., Hiroto, M., Nishimura, H. and Inada, Y. (2001) Photostable chlorophyllide coupled with polyethylene glycol catalyzes synthesis of glutamate via photoreduction of NADP^+ . *Biotechnol. Bioeng.*, **76**, 86-90.
14. Kodera, Y., Kageyama, H., Sekine, H. and Inada, Y. (1992) Photostable chlorophylls conjugated with montmorillonite. *Biotechnol. Lett.*, **14**, 119-122.
15. Ishii, A., Itoh, T., Kageyama, H., Mizoguchi, T., Kodera, Y., Matsushima, A., Torii, K. and Inada, Y. (1995) Photo-stabilization of chlorophyll *a* adsorbed to smectite. *Dyes Pigments*, **28**, 72-82.
16. Itoh, T., Yamada, T., Tobioka, K., Kodera, Y., Matsushima, A., Hiroto, M., Sakurai, K., Nishimura, H. and Inada, Y. (2001) Hemin (Fe^{3+})- and heme (Fe^{2+})-smectite conjugates as a model of hemoprotein based on spectrophotometry. *Bioconjugate Chem.*, **12**, 3-6.

17. Yoshimoto, T., Ohwada, K., Takahashi, K., Matsushima, A., Saito, Y. and Inada, Y. (1988) Magnetic urokinase: targeting of urokinase to fibrin clot. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **152**, 739-743.
18. Yoshimoto, T., Saito, Y., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., Tsukada, T., Kanmatsuse, K., Koder, Y., Matsushima, A. and Inada, Y. (1989) Targeting of urokinase by magnetic force. *Drug Delivery Syst.*, **4**, 121-122.
19. Mihama, T., Yoshimoto, T., Ohwada, K., Takahashi, K., Akimoto, S., Saito, Y. and Inada, Y. (1988) Magnetic lipase adsorbed to a magnetic fluid. *J. Biotechnol.*, **7**, 141-146.
20. Itoh, T., Ishii, A., Koder, Y., Matsushima, A., Hiroto, M., Nishimura, H., Tsuzuki, T., Kamachi, T., Okura, I. and Inada, Y. (1998) Photostable chlorophyll a conjugated with poly-(vinylpyrrolidone)-smectite catalyzes photoreduction and hydrogen gas evolution by visible light. *Bioconjugate Chem.*, **9**, 409-412.
21. Kurosawa, M., Itoh, T., Koder, Y., Matsushima, A., Hiroto, M., Nishimura, H. and Inada, Y. Formation of the bioconjugate composed of hemin, smectite and quaternary ammonium chloride soluble and active in hydrophobic media. Submitted to *Bioconjugate Chem.*

参考図書

22. 稲田祐二 編 (2000)「バイオハイブリッド研究会(タンパク質ハイブリッド研究会)抄録集 1~15」桐蔭横浜大学, 東京工業大学, 国立国会図書館.
23. 稲田祐二 著 (1987)「タンパク質ハイブリッド - ここまで来た化学修飾」共立出版.
24. 稲田祐二, 前田浩 編 (1988)「タンパク質ハイブリッド - これからの化学修飾」共立出版.
25. 稲田祐二, 和田博 編 (1990)「タンパク質ハイブリッド - 化学修飾最前線」共立出版.
26. 稲田祐二, 川崎敏祐 編 (1995)「糖鎖ハイブリッド」共立出版.

執筆者紹介 稲田 祐二 (いなだ ゆうじ) 桐蔭横浜大学 人間科学工学センター 教授
東京工業大学名誉教授, 理学博士 (東京大学 昭36)

[ご経歴] 1952年京都大学農学部卒。京大食糧科学研究所, 徳川生物研究所, 東京工業大学理学部化学科教授, 中国医科大学顧問教授。スウェーデン王立カロリンスカ医学研究所, 米国カリフォルニア大学留学(1976~77), 日本生化学会, 日本血栓止血学会, 日本バイオマテリアル学会(評議員), The New York Acad. Sci., (Active Member)。

[ご専門] バイオサイエンス バイオテクノロジー