

二官能性試薬グルタルアルデヒドの織りなす 多様な科学の世界

受田 浩之*

グルタルアルデヒドは高い架橋特性を有する二官能性試薬である。電顕の試料固定剤、殺菌・消毒剤、酵素固定化試薬としての実用的な利用をはじめ、酵素免疫測定などの各種分析試薬として、また人工弁の調製などの医学的分野でも幅広く利用されている。しかし、応用面での華やかさとは対照的に、その化学的性質や反応の詳細に関する理解は進んでいない。最近、グルタルアルデヒドとB型肝炎ウイルスの感染やアルツハイマー病の病態との関わりも報告されており、グルタルアルデヒドの化学的性質の解明は多様な科学分野の発展に大いに貢献するものと考えられる。

グルタルアルデヒド(GA)は、 $\text{HOC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$ の構造を有する二官能性試薬である。小数点以下を四捨五入すると分子量はちょうど100となるが、その歯切れのよい分子量とは裏腹に、GAの有する化学的性質はきわめて複雑で奥が深い。そのため、応用面での多様性とは対照的に、GAの作用は本質的には理解されていないのが現状であると言える。

GAが科学の表舞台に登場したのは1908年である。登

場の仕方は華やかだったとは言えないようで、その後1957年になって、皮のなめしに利用できることが報告されるまで、比較的目立った活躍はなかった⁽¹⁾。それが60年代になって殺菌剤としての高い活性や⁽²⁾、電顕の試料固定剤としての有用性⁽³⁾、あるいは酵素の固定化剤としての簡便性⁽⁴⁾が次々に明らかにされるに至って、文献に登場する機会も飛躍的に多くなった。70年代に入り、機器分析技術の発展とともに、GAの化学的性質やアミノ化合物、タンパク質との反応性も徐々にわかってきた。ちょうどその頃、生化学の分野では、B型肝炎ウイルス(HBV)の感染に関わるヒト血清アルブミンの翻訳後修飾反応のモデルとしてGAを利用できることが明らかにされ、GAが医学の領域とも深く関わっていることを強く印象づけた⁽⁵⁾。さらに最近では、アルツハイマー病の典型的な病態の一つである神経原繊維変化の研究に対してもGAが用いられており⁽⁶⁾、GAの活躍の場はさらに広がりを見せる様相を呈している。そこで本稿では、これまでに明らかにされてきたGAに関する化学的性質を整理し、多様なGAの応用分野とその裏にある化学的背景について解説する。

Diverse Scientific Fields Fabricated by Bifunctional Reagent
Glutaraldehyde

* Hiroyuki UKEDA, 高知大学農学部

グルタルアルデヒドの化学的性質

まず、溶液中での GA の姿について考えてみる⁽⁷⁾。アルデヒド基の C=O の紫外吸収に基づく、GA のアルデヒド基のうち、遊離の状態で存在する割合は全体の 11~16% 程度であると推定される。これは GA 分子の水化* によるもので、一般的な GA の構造(1)は図 1 の 2~5 と平衡状態にある。各構造の存在割合は GA 濃度によって大きく変化し、希薄な 0.4% 濃度の場合、1~5 はそれぞれ 11%, 10%, 3%, 76%, 0% 程度の比率で存在する。市販の 70% 溶液では水の濃度が減るため、平衡は水化重合物 5 の構造を生成する側に傾いて、各々の存在比率は 11%, 6.8% 以下, 0%, 50%, 32.5% 以上となる。70% 溶液中ではかなりの部分がガラス状態にあるので、その溶液を希釈すると濁りを生じることがある。しかし、希薄溶液中では次第に水化重合物が減少していき、1~4 の構造へと変化していくために、やがて濁りはとれていく。透明になるまでに時間を要するが、これは特に 5 が変化していく速度が遅いためである。したがって、GA を希釈して用いる場合には、希釈後の時間を考慮して使用しなければならない。

光散乱光度法による GA 溶液の分子量測定から考えて、GA 溶液は 2~7% の間の濃度ではほとんど単量体として、すなわち分子量 100 として存在する。この分子量

は GA 溶液の pH が 8 以下であれば、25°C において数日間には変化しない。しかし、それ以上のアルカリ領域ではアルドール縮合が起こり、 $\alpha\beta$ -不飽和アルデヒド構造を含む GA ポリマーが生成する(図 1 の構造 6)。この縮合が起こると、 $\alpha\beta$ -不飽和アルデヒドの C=C の $\pi-\pi^*$ 遷移による 235 nm の吸収極大がみられるようになる。したがって、GA モノマーの C=O の $n-\pi^*$ 遷移に基づく 280 nm の吸光度と 235 nm の吸光度の比 (A_{235}/A_{280}) をアルドール縮合物の存在量の指標として用いることができる⁽⁸⁾。アルドール縮合は pH がアルカリ側になるにつれ、また温度や GA 濃度の増加に伴い急速に起こる。pH が 12~13 以上になるとカニツァーロ反応が起こり、アルデヒド基はアルコールとカルボキシル基に不均化していく(図 1 の構造 7)⁽⁹⁾。平均分子量から考えて、市販の GA 溶液中にはアルドール縮合物はほとんど存在していないと考えられる(せいぜい 0.05% 以下)。アルドール縮合は不可逆反応であるため、いったん起こると 1 の構造には戻れない。そこで、市販の GA 溶液はアルドール縮合が起こりにくい酸性 pH 領域 (pH 3.5~4.0) にある。GA ポリマーの沈殿物の生成は、GA 由来の不純物の影響を強く受ける。pH 7.5~8.5 の弱アルカリ性の 2% GA 溶液中ではトリオキサソオリゴマー(図 1 の構造 8)⁽¹⁰⁾ が生成する。この物質は 280 nm に極大吸収を有するため、紫外吸収スペクトルの測定からは GA モノマーと区別できない。このオリゴマーが微量存在すると、沈殿物の生成が加速されることから、長期間の保存の際には大きな影響が出る。

グルタルアルデヒドの反応性

GA と類似のジアルデヒド構造を有する物質としては、グリオキザール、マロンジアルデヒドなどがある。またホルムアルデヒドなどのアルデヒド類も本来、高い反応性を有しているわけだが、それらと比べて GA が広い分野で用いられているのはどうしてなのだろうか。ここでは、特にこの点を考えながら GA の反応特性を見ていくことにする。

GA は一級アミノ基に対してきわめて高い反応性を示す⁽¹¹⁾。そのため、タンパク質の主に ϵ -アミノ基と反応することで、タンパク質を分子内あるいは分子間で架橋する。後述する GA の多くの利用は、このタンパク質との高い反応性を利用したものである。

アルデヒド基とアミノ基の典型的な反応はシッフ塩基

* 水和のうち特にその結合が化合物の形をとる場合を水化といい、生成物を水化物という。

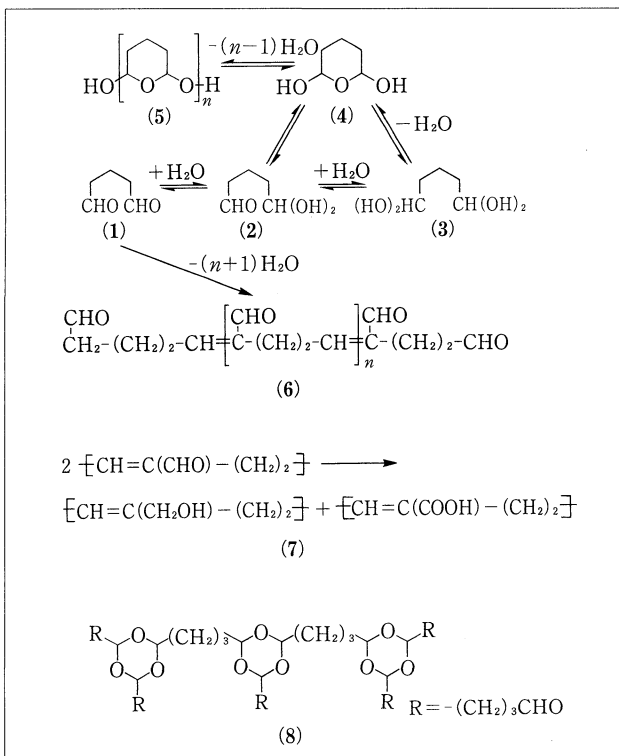


図 1 ■ グルタルアルデヒドの溶液中での化学形態^(7,9,10)

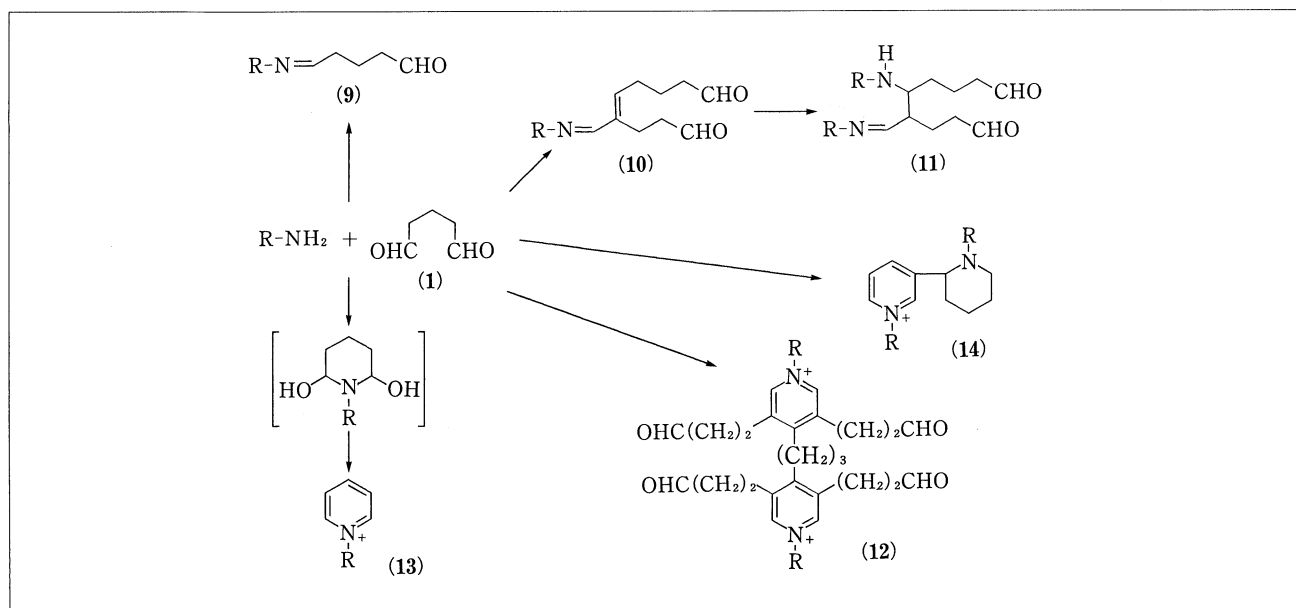


図 2 ■ グルタルアルデヒドとタンパク質の ϵ -アミノ基 ($R-NH_2$) との反応^(16,17,42)

の生成である (図 2 の構造式 9)。 Schiff 塩基は通常、酸加水分解に対して不安定である。ところが GA とアミノ基との間の反応物は酸加水分解に対しても安定である。また、ホルムアルデヒドや他のアルデヒド化合物と比較して、GA をアルブミン、コラーゲン、ムコ多糖などのタンパク質に反応させた修飾物は、高い安定性を示す。

GA とアミノ化合物が反応する場合、反応に関与するアルデヒド基に対するアミノ基の割合は、アミノ基が過剰の条件で 0.3、逆にアルデヒド基が過剰の場合 0.2 となる⁽¹²⁾。このことは、1つのアミノ基と結合するのに GA のアルデヒド基は 3~5 個必要であることを意味する。特に、アミノ基過剰の条件でさえ複数のアルデヒド基が関与している点は、GA の反応を理解する上で重要である。

実は、GA とアミノ基の反応物の安定性は、前に述べた GA のアルドール縮合によることが実験的に明らかにされている⁽¹³⁾。重合に伴い $\alpha\beta$ -不飽和アルデヒドが生成するが、このアルデヒドにアミノ基が Schiff 塩基を形成して結合すると、二重結合の共役により、酸加水分解に対しても高い抵抗性を示すようになる (図 2 の構造 10)。この共役構造が Schiff 塩基安定化の原動力であることから、さらにアミノ基が 10 と反応する場合に、マイクタイプ付加反応 (図 2 の構造 11) は起こりにくいと思われる。この安定化機構から考えると、アルドール縮合物の濃度が高いほどアミノ基との反応には有利になると考えられるが、多くの実験で、アミノ基との反応速度は初期アルドール縮合物の濃度に依存していないことが示されている⁽¹²⁾。これは一見、GA 反応物の安定化機構と矛盾

しているように思えるが、GA モノマーの溶液に微量のアミノ化合物を添加すると、アルドール縮合物と考えられる GA ポリマーが急速に生成することも明らかにされた。したがって、アミノ基が共存して生成したアルドール縮合物だけが反応に関与している可能性もある⁽⁷⁾。

一方、GA をタンパク質、アミノ酸などのアミノ基含有化合物と反応させると、反応溶液中の溶存酸素が急速に消費される^(14,15)。アマドリ転移物を生成しうる糖とアミノ基の組合せならば、酸素消費を伴う反応も考えられるが、アマドリ転移物を生成しない GA ではこの急速な酸素消費は説明できない。すなわちこの現象は、通常の Schiff 塩基の生成機構だけでは説明できない他の反応機構の存在を意味しているのである。Hardy らは、 N^{α} -アセチルリジンと GA の反応物に、ピリジニウム塩 (図 2 の構造式 12) が存在していることを明らかにした⁽¹⁶⁾。また、オボアルブミンの GA 反応物を加水分解して、その部分構造にやはりピリジニウム骨格を有する物質が存在していることを示した (図 2 の構造式 13, 14)⁽¹⁷⁾。この部分構造から考えて、前述の酸素消費は、中間物質として生成するジヒドロピリジンのピリジニウム塩への酸化反応に起因するものと考えられる。残念ながら、ピリジニウム塩の生成に関して、定量的な知見は得られていないために、どのような条件で、どの程度の割合のアルデヒド基がピリジニウム生成に関与するのかは不明である。

GA とアミノ化合物との反応はすべてが不可逆的に進行するわけではない。たとえば、pH 7 においてグリシン、エチルアミンなどと GA が反応する場合、可逆的な

反応も 10%程度関与している。この可逆的な反応はアルカリ領域になるとさらに高まるようである⁽¹²⁾。

GA はアミノ基との反応性が際立って高いが、システインの SH 基とも反応する。しかし、その反応の機構も単純ではなく、反応系の中にアミノ基が存在することが必要である。したがって、アミノ基のない SH 化合物は GA と反応しない⁽¹²⁾。

以上の反応特性から考えて、GA とタンパク質の反応ではリジン残基の ϵ -アミノ基が主要な反応部位となる。反応は多段階反応で、シッフ塩基の形成がきっかけとなり、アルドール縮合、酸素酸化反応を経由したピリジニウム塩の形成を経て、高分子化していくものと考えられる。さらに途中、可逆的な反応も介在していることから、その全貌の解明にはまだ多くの知見が必要とされる。

これまでの検討から、アミノ基との反応において、GA に匹敵する急速な酸素消費を示すアルデヒドは他には認められていない。したがって、GA がアミノ基との反応で示す酸素消費反応は、この試薬の反応特性を示す重要な特徴と位置づけられる。この酸素消費反応はピリジニウム塩の形成に関わっているものと推定されるため、架橋能力の高い 12 のような構造体が形成されることが、他のアルデヒド化合物にない GA のユニークな反応特性の源になっているのではないかと考えられる。

グルタルアルデヒドの利用分野

GA の化学的な性質、ならびに反応性について簡単に紹介したところで、次に実際の利用例を分野毎に概説していく。

1. 酵素工学への利用

活性を維持させたまま酵素を水不溶性の担体に保持させる酵素の固定化技術は、物質生産から分析技術まで幅広い用途をもつ。

GA を利用する最も典型的な酵素固定化法では、末端にアミノ基を有する多孔性の担体が用いられる。ここに GA を作用させ(活性化と呼ぶ)、一定時間反応させた後、未反応の GA を洗浄で除去し、酵素を添加する。操作は至って簡単で、何ら特殊な器具も必要としない。この固定化法の原理として、「担体のアミノ基と、後に加えられる酵素分子のアミノ基をシッフ塩基を介して結合するのが GA の役割である」と従来から説明されてきた⁽¹⁸⁾。しかし、反応機構はこの説明ほど単純ではない。

GA とアミノ基との反応で酸素消費が認められることをすでに述べたが、アミノ基を有する各種担体でも、GA

との反応で酸素の消費がみられる⁽¹⁹⁾。特に興味深いのは、同じ表面アミノ基濃度をもっていても、アミノ基周辺の構造、たとえば水酸基の有無などにより、酸素の消費速度が大きく異なる点である。この酸素消費が直接ピリジニウムの生成量を反映しているとすれば、その塩基性から考えて、生成量に依存して担体上の表面電荷が変化することになる。担体のアミノ基が GA の重合を促進させることも明らかになっており⁽²⁰⁾、GA の活性化条件は固定化担体の性質に少なからず影響を及ぼすものと予想される。

そこで筆者らは、パルスインジェクション法を用いて、GA による酵素固定化法の理論的解析を試みた^(21,22)。この方法では、様々な条件で GA 活性化を行なった担体をカラムに充填しておき、そこにタンパク質溶液をパルス状に繰り返し注入していく。当然、最初のうちは注入されたタンパク質は GA で活性化されたカラムに結合するため溶出してこないが、繰り返し注入していくと注入したタンパク質の一部が溶出してくる。その溶出パターンを解析する理論式を作成し、その式の中の未知のパラメータを実際の溶出曲線とのカーブフィッティングで決定していった。

ウシ血清アルブミン(BSA)をモデルタンパク質として、GA で活性化した 2 種類の担体で解析を行なったところ、BSA は比較的速い反応速度を有する結合で担体表面に捕捉された後、それよりも遅い別の様式の反応で、二次的に担体と共有結合していくことが明らかとなった。速いほうの反応はイオン強度の影響から、イオニックな相互作用に基づくものと推定され、担体上の電荷は BSA の等電点から考えて陽電荷であると考えられた。その陽電荷の性質は元々担体に存在していたアミノ基とは異なっており、筆者らはその電荷こそが、GA とアミノ基の間で生成したピリジニウムではないかと考えている。遅い反応はアルデヒド基の存在に依存していることから、この反応がタンパク質のアミノ基とのシッフ塩基形成に相当するものであろう。

一方、GA による活性化条件、特に反応の pH が担体の内部構造にどのような影響を与えているかを、本法による解析結果から推定してみた。GA の反応 pH をアルカリ側にすると、タンパク質の拡散が徐々に制約を受けるようになり、さらにイオニック相互作用で担体に結合するタンパク質の割合が減少した。この結果はどのような内部構造の変化を意味するのであろうか。

GA の活性化反応を考えていくには、アミノ基との反応性と、孔の内部への拡散という 2 つの因子を考慮しなければならぬ。GA のアミノ基との反応はアルカリ領

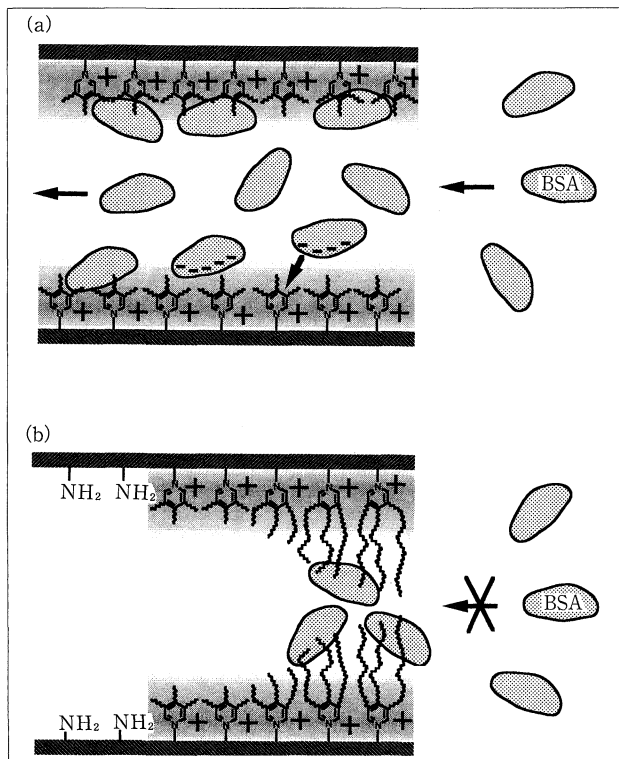


図 3 ■ グルタルアルデヒド活性化担体へのタンパク質の結合

グルタルアルデヒド活性化担体表面には、ピリジニウム塩由来の正電荷が分布している。(a) 活性化反応が低いグルタルアルデヒド濃度、もしくは低い反応 pH で行なわれた場合、グルタルアルデヒド重合物の形成は少なく、タンパク質分子の孔入口(右側)から内部(左側)への拡散は制約を受けていない。また、タンパク質は担体表面の正電荷と相互作用しうるほど接近できる。(b) アルドール縮合が起こるアルカリ pH で活性化を行なった担体では、孔入口付近からグルタルアルデヒド重合物が形成され、最初に結合したタンパク質分子により、その後のタンパク質分子の拡散が制約を受ける。またグルタルアルデヒド重合物が担体表面に密集して存在しているため、タンパク質分子は表面の正電荷に接近できない。

域のほうが速く、かつ GA はアルカリ領域ではアルドール縮合により高分子化しやすい⁽²³⁾。したがって、アルカリ領域になるほど、GA 分子は担体の孔の入口付近に集中して高分子のアルドール縮合物を形成しているものと予想される。そのような状態の GA 活性化担体に添加されたタンパク質分子は、孔の入口付近から結合していき、最初に結合したタンパク質が、その後孔内に入っていくタンパク質分子の拡散をさらに制約するものと考えられる。一方、担体上に形成されるピリジニウム塩は担体表面上のアミノ基を起点とする。アルドール縮合が起こりやすい条件では、GA ポリマーはその表面上に堆積し、一定の GA ポリマーが担体表面に生成すると、もはやタンパク質分子はその内部に埋没したピリジニウムの陽電荷とは相互作用できなくなる(図 3)。結果的に、その相互作用に依存していたタンパク質の結合割合が減少してい

くのではないかと推定される。

このように考えると、アルカリ領域での GA による活性化は、担体の内部構造を不均一にする効果をもつと言える。均一な内部構造を保持するためには、pH を下げ、縮合や反応性を抑えることで、GA 分子の孔内部への拡散を促進させることが必要である。

このようにパルスインジェクション法を用いて、GA 活性化反応の理論的な解析を行なってきたが、これまでに得られた結果は、担体内部構造のごく一部分の情報を与えているにすぎない。酵素と補酵素(NAD)の同時固定化においては、GA の重合度を含めた微妙な活性化反応の違いが、固定化担体の性能に大きな影響を与えることも明らかにされており^(24,25)、より高性能な固定化酵素の設計には、この研究を出発点として、さらに詳細な解析が行なわれる必要がある。

2. 分析化学への利用

ここでは分析試薬そのものとして GA を利用する技術、ならびに酵素免疫測定法(ELISA)などのマイクロプレートを利用した分析法への GA の利用について述べる。

GA をアミノ基含有の化合物と混合すると溶液中の溶存酸素が消費されるが、ここに 2-メチル-1,4-ナフトキノンと共存させると、酸素消費速度が増大する⁽¹⁴⁾。GA とアミノ化合物を反応させはじめてから一定時間経過後、たとえば 3 分後の溶存酸素消費量をクラーク型酸素電極で測定すると、酸素消費量とアミノ基濃度との間に直線関係が成立する。筆者らはこの関係に着目して、食品中の遊離アミノ基やタンパク質濃度を測定する方法を開発した⁽¹⁴⁾。この分析法は、食品の分析でしばしば問題となる試料の着色、あるいは濁りの影響をまったく受けない。さらに 1 検体の分析に要する時間が数分であることから、本法はたとえばエキス製造の工程管理法⁽²⁶⁾や乳製品の品質管理法⁽²⁷⁾として有用な方法である。

ELISA は抗体の有する高い分子認識能を利用した分析技術であり、様々な分野でその有用性が示されている。GA のこの分野での主な用途は、抗体の酵素標識、ならびにマイクロプレート表面への抗体やハプテンの固定である。酵素標識の場合、酵素と抗体の共存溶液に GA を添加して、両者をアミノ基間で架橋させる一段階 GA 法と、過剰の GA で反応させた酵素を抗体と結合させる二段階 GA 法が知られている⁽²⁸⁾。GA の反応条件はあくまで経験的に設定されているものであり、重合物の生成の割合や、GA の修飾に伴う酵素活性の低下をどのように制御するかについての理論的研究はなされていない。

さらに GA の標品による変動も大きいことから、高い簡便性をもちながらも、利用頻度は高くないようである。

一方、マイクロプレート表面への物理的な吸着による不溶化が難しい抗体やハプテン性の低分子を固定する場合に、GA による処理が有効である^(29,30)。たとえば、HBV の表面抗原に対する抗体をプレートに物理的に吸着させて不溶化し、そこに血清試料を添加すると、その不溶化した抗体の一部が、血清中のアルブミンの作用により脱離する。これに対して、2% GA (pH 5.0) でプレートを処理し、洗浄した後、抗体を添加・固定させると、抗体の脱離を有意に抑えられる⁽³⁰⁾。しかし、標品中に一定量のアルドール縮合物が存在していない場合には、脱離防止効果はあまり期待できないことも明らかにされている。このことは GA のアルドール縮合物とプレート表面との間の疎水的相互作用が、抗体の強固な結合に必要であることを示唆している。

筆者らは、マイクロプレートの表面に GA を用いて酵素を固定してみた⁽³¹⁾。GA を使うので、当然表面にアミノ基を有するプレートでなければ酵素の結合は起こらないと予想したが、結果はプレート上のアミノ基の存在には依存しなかった。これは GA がプレート表面と共有的に結合しているのではないことを示す。さらにアルドール縮合が起こりやすい条件で固定化した場合は、高い酵素活性が認められたことから、GA はプレート表面に疎水的な相互作用で結合しているものと考えられた。また pH 12 以上で GA を反応させると、酵素活性が低下する現象も認められ、アルデヒド基の不均化による極性基の形成が両者の相互作用を弱める働きがあることも判明した。GA ポリマーとマイクロプレート表面との疎水性相互作用を様々な生体分子の結合に積極的に利用することで、今後マイクロプレートを用いた新しい分析技術の開発も可能になると考えられる。

3. 組織化学への利用

1963 年に Sabatini は、GA、グリオキサール、ホルムアルデヒドなどの 8 種類の反応性の高いアルデヒドを比較して、GA が細胞化学の前固定剤として最も有効なアルデヒドであると位置づけた⁽³⁾。現在では、その微細構造の固定のよさから純形態学的研究一般の前固定剤として用いられ、その後四酸化オスミウムで後固定を行なうのが、生物材料の電顕観察において最も一般化した固定法となっている。GA の固定は組織のタンパク質のアミノ基間を架橋することによるものと考えられているが、その化学的な裏づけはまったくなく、固定の条件はあくまで経験的結果に基づいて選ばれている。

GA 固定液としては、2~3% 溶液を使用することが多いが、組織内への浸透性は四酸化オスミウム同様遅く、1 時間に組織表面より約 0.4 mm しか浸透しない。したがって、浸漬固定を行なう場合には組織を細切しなければならない。GA の浸透性が低い理由は、GA が表層組織から順次反応していくため、後で浸透してくる GA 分子の拡散が抑制されることに起因すると考えられる。GA の拡散が制約を受けた条件で固定された組織は、当然不均一なものとなる。したがって、均一な架橋が起こることが望ましい組織の固定では、GA の拡散が起こりやすい条件を選ぶ必要がある。言い換えれば、GA の拡散が十分に保証されるまで、GA の反応性を極力抑える工夫が必要である。

具体的にどのようにするかというと、まず低温、たとえば 0°C で組織を GA 溶液に浸漬させる。GA の反応は強く温度に依存するので反応速度は大きく低下し、本来ならば架橋が生じる表層付近でも GA 分子の内部への自由な拡散が起こる。3 時間程度経過して GA が十分に内部へ拡散した後、組織試料を高周波加熱装置を使って処理することで、GA をその周辺部分を中心に架橋させる。この方法で、きわめて均一な固定の可能なことがモデル組織を使って確かめられている⁽³²⁾。

拡散と反応性とのバランスが GA を使用する場合の一つのポイントであることを明示している点で、この研究は重要である。酵素の固定化など、他の GA 利用分野においても当然応用する価値のある技術であると考えられる。

4. 医療現場での利用

1) 殺菌・消毒剤としての利用

医療の現場では、殺菌や滅菌に熱が使えない場合がしばしばある。GA はそのような非加熱状態での殺菌・滅菌剤として高い有用性をもっている⁽³³⁾。

重炭酸塩で pH 8 付近に調整された GA 溶液が化学的殺菌・滅菌消毒剤として市販されている（商品名：ステリハイド、サイデックスなど）。この条件下において GA は、芽胞を含むあらゆる微生物に対して殺菌効果を示し、HBV やエイズウイルスのほか、各種ウイルスの不活化効果を有する。さらに耐性菌ができない上、他の薬剤に耐性のある微生物も殺菌できる。用いられる GA 濃度は 2%、もしくは 0.5% であるが、芽胞を対象としない一般の殺菌には 0.2~0.5% で十分である。2% 溶液は 3 時間で細菌芽胞を、30 分間で結核菌を、10~30 分間で HBV を、また 2 分間でエイズウイルスや一般細菌を殺滅できる。GA 溶液のもう一つの大きな特徴は、次亜塩素

酸ナトリウムや消毒用エタノールなどと異なり、種々の材質を劣化させにくいことである。したがって、GA 溶液は、滅菌や高度な消毒が必要で、しかも耐熱性のない器具類の消毒に汎用されている。主な消毒対象は、内視鏡や手術器具である。

GA の殺菌作用は pH に大きく依存している。酸性では活性は低く、アルカリ側で高くなる。この pH 依存性は GA のアルドール縮合が殺菌作用に深く関与していることを示唆する。しかし、pH が高くなりすぎるとアルドール縮合物が沈殿し、溶液の活性が急速に低下してしまうことから実用的ではない。その点を考慮して弱アルカリ領域が選ばれているようだが、同じ弱アルカリ pH でも、用いる塩の種類によって活性が変化する。重炭酸塩とリン酸塩を比較すると、明らかに重炭酸塩のほうが高い活性を示す。これは、重炭酸塩が微生物の膜構造に変化を与えて、GA の拡散を促進することに起因するものと考えられている。

GA の殺菌機構としては、GA が微生物の表層にあるタンパク質を架橋することによると推定されている。表層が架橋されると、当然、細胞内への物質の取り込みが阻害されるが、この取り込みの阻害は GA 処理によって、50%程度しか低下しない。したがって、この作用だけでは GA が示す急速な殺菌作用を説明し得ない。もう一つの殺菌機構として考えられているのは、GA の酵素に対する作用である。GA は酵素表面にあるリジン残基の ϵ -アミノ基に反応することで、多くの酵素を *in vitro* で失活させる。したがって、微生物の表層にある酵素分子にも同様に作用し、酵素活性を下げることで、その作用が発現するのではないかと考えられる。実用的に幅広く利用されているにもかかわらず、やはりこの分野でも GA の理解は不足している。

2) 人工弁への適用

心臓弁膜症や先天性の心臓病で、病変のひどい心臓弁を切除した後に入れるのが人工弁である⁽⁸⁴⁾。人工弁には機械弁と生物弁の2種類がある。機械弁はパイロライトカーボンなどを材質とするもので、耐久性に優れており、我が国での人工弁置換術において95%を占める。しかし、機械弁は一般に、血栓の形成を防止するために抗血液凝固剤を続けて服用しなければならないことが欠点である。これに対して生物弁は、ブタなどの大動脈弁やウシの心外膜を用いるもので、元来が生体の材料であることから血栓ができにくい。しかし、異種の動物組織に対する免疫反応が起こることと、耐久性が低いことが欠点である。そこで異種の動物の弁を GA で処理する技術が開発された⁽⁸⁵⁾。GA で処理すると、生体組織の主成分で

あるコラーゲンが架橋されて安定化し、コラーゲナーゼの作用を受けにくくなる。しかも抗原性も失われて、人体に移植されても免疫反応を起こさない。さらに、その処理によって殺菌効果も期待される。まったく理想的な処理方法である。通常、0.2~0.6%の GA 濃度が用いられるが、低い濃度では特に殺菌効果が十分でなく、高濃度を用いると組織が硬くなりすぎるという問題が生じる。GA 標品の純度や反応条件により、生物弁の性能が大きく左右されることから、この分野でも GA の反応に関しての基礎的な研究が求められている。

GA 処理により製造された生物弁は弁尖部の石灰化が泣き所である。この石灰化は血液中の様々な物質やカルシウムなどが沈着する現象を言う。石灰沈着が起こると弁は硬くなり、血栓がつきやすくなる。そのために生物弁は移植後6~7年以降になると、新しい弁と再置換することが多い。この石灰化に、生物弁中に残存している GA が関与しているという研究結果も報告されており、GA と石灰化の関連も早急に解明しなければならない重要な問題である。

5. 生化学での利用

生化学の分野では、GA を Ca^{2+} -ATPase などの酵素の構造を解明するために用いた利用法⁽⁸⁶⁾ や、タンパク質の生体内における翻訳後修飾反応の解明に用いた研究がある。ここではヒト血清アルブミン (HSA) およびニューロフィラメントの生体内修飾反応の解明に対して、GA が重要な役割を演じている例を紹介したい。

HSA は肝臓で生合成された後、体内を循環し、約2週間の半減期で異化される。体内を循環している時は、様々な物質による物理的・化学的修飾を受ける。肝疾患患者の血清中には、GA 処理した HSA 修飾物 (pHSA) を認識する抗体が存在する^(8,37)。これまでの知見から、GA が生体内に存在するとは考えにくいので、この抗体の出現は、生体内で HSA が過度に修飾されることでできる構造体と、GA 修飾構造との間に免疫学的な共通性があることを強く示唆するものである。一方、pHSA は HBV に対して結合性を示す⁽³⁸⁻⁴⁰⁾。HBV のレセプターは、その表面抗原の55アミノ酸残基からなる pre-S2 領域である。ヒトと同様に HBV に感染するチンパンジーの血清アルブミンも GA で処理すると HBV 結合性を示すが、他の HBV 非感染性の動物由来の血清アルブミンでは、GA 処理を行っても HBV 結合性は示さない。したがって、HBV の結合性から考えても、生体内に pHSA と類似の構造をもつ HSA 修飾物が存在している可能性がきわめて強いと考えられる。

そこで筆者らは、pHSA に対する抗体をマウスを使って作製し、その抗体認識能に基づき、生体内で pHSA と類似の構造を形成し得る物質の検索を試みた⁽⁴¹⁾。作製した抗 pHSA 抗体は、HBV の結合性に類似して pHSA のみに親和性を示し、ネイティブ HSA、他の動物起源の血清アルブミンおよびその GA 修飾物には結合しなかった。この抗体の親和性を尺度に、手始めに GA と同様にカルボニル基をもち、かつ生体内に存在する物質として、グルコース、フルクトースなどの還元糖の反応を調べてみた。その結果、これらの糖と HSA との反応物に対して、抗 pHSA 抗体は親和性を示し、さらにその親和性は分子間架橋物に対して強いことが明らかとなった。GA、ならびにこれらの糖は、HSA の主にリジン残基の ϵ -アミノ基と高い反応性を有していることから、分子間を ϵ -アミノ基で架橋しているものと考えられる。カルボジイミドやトランスグルタミナーゼで分子間架橋した HSA に対しては、抗体親和性はほとんど認められなかったことから、親和性はリシン残基の ϵ -アミノ基間を分子間架橋させることに基づくものと推定される。現在、同様の架橋機構を有する生体内物質で、さらにその活性が高い物質の検索を行なっているところである。

最近、GA の反応を生体内における修飾反応のモデルとして利用できるものが、HSA 以外にも報告された。それはアルツハイマー病の神経原繊維中のニューロフィラメントである⁽⁶⁾。アルツハイマー病には 2 つの特徴的所見、すなわち神経原繊維変化と老人斑があげられるが、このうち神経原繊維変化を特異的に認識するモノクローナル抗体の親和性に、GA との興味深い関わりが見いだされている。この抗体は通常ニューロフィラメント L 鎖には結合性を示さないが、GA で処理すると結合性を示すようになる。抗体親和性は GA 濃度、GA 処理時間に依存していることから、生体内において GA 様の物質がニューロフィラメントを修飾することが、アルツハイマー病の神経原繊維変化の出現に深く関与しているものと推察される。

これらの研究はまだ緒についたばかりであるが、HSA やニューロフィラメント以外の様々な疾病に関わっている他のタンパク質の翻訳後修飾に対しても、GA 類似反応が関与している可能性もあり、今後の展開に注目したい。

*

誌面の都合上、皮のなめし⁽⁴¹⁾、皮膚病の治療⁽⁴²⁾、ならびにドラッグデリバリー⁽³⁵⁾などの GA 利用については説明できなかったが、GA が多くの分野で利用され、その化

学的な性質がきわめて複雑であることがご理解いただけたものと期待する。この多様な科学の世界は、基本的に GA の有する高いタンパク質との反応性に基づくものであり、タンパク質が関与しているあらゆる分野で、GA は今後も利用されていくであろう。最後に述べたタンパク質の生体内修飾反応との関わりは、特に社会問題となっている疾病の病因とも絡んでおり、GA の化学的性質、ならびにそのタンパク質との反応を積極的に解明していくことが、その問題の解決に対して大きな寄与をするものと信じる。そのためには有機化学、生化学、分析化学、医学、微生物学にわたる幅広い領域での研究者の協力体制が必要とされる。

図の作成をお手伝いいただきました高知大学農学部・石井利直氏に深くお礼申し上げます。

文献

- 1) M.L. Fein & E.M. Filachione : *J. Am. Leather Chem. Assoc.*, **52**, 17 (1957).
- 2) R.E. Pepper & V.L. Chandler : *J. Appl. Microbiol.*, **11**, 384 (1963).
- 3) D.D. Sabatini, K. Bensch & R. Barnett : *J. Cell Biol.*, **17**, 19 (1963).
- 4) A.F.S.A. Habeeb : *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**, 264 (1967).
- 5) D. Onica, R. Lenkei & V. Ghetie : *Immunochemistry*, **15**, 687 (1978).
- 6) M.A. Smith, M. Rudnicka-Nawrot, P.L. Rickey, D. Praprotnik, P. Mulvihill, C.A. Miller, L.M. Sayre & G. Perry : *J. Neurochem.*, **64**, 2660 (1995).
- 7) J. Kawahara, T. Ohmori, T. Ohkubo, S. Hattori & M. Kawamura : *Anal. Biochem.*, **201**, 94 (1992).
- 8) K.-E. Rasmussen & J. Albrechtsen : *Histochemistry*, **38**, 19 (1974).
- 9) S. Margel & A. Rembaum : *Macromolecules*, **13**, 19 (1980).
- 10) T. Tashima, U. Kawakami, M. Harada, M. Imai, N. Satoh, T. Nakagawa & H. Tanaka : *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 377 (1989).
- 11) F.M. Richards & J.R. Knowles : *J. Mol. Biol.*, **37**, 231 (1968).
- 12) K. Okuda, I. Urabe, Y. Yamada & H. Okada : *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 100 (1991).
- 13) P. Monsan, G. Puzo & H. Mazarguil : *Biochimie*, **57**, 1281 (1975).
- 14) H. Ukeda, E. Miyazaki, K. Matsumoto & Y. Osajima : *Anal. Chem.*, **58**, 2975 (1986).
- 15) J.T.A. Johnson : *Eur. J. Cell Biol.*, **45**, 160 (1987).
- 16) P.M. Hardy, A.C. Nicholls & H.N. Rydon : *J. Chem. Soc. Perkin I*, 958 (1976).
- 17) P.M. Hardy, G.J. Hughes & H.N. Rydon : *J. Chem. Soc. Perkin I*, 2282 (1979).
- 18) K. Peters & F.M. Richards : *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 523 (1977).
- 19) H. Ukeda, Y. Nakazono, K. Matsumoto & Y. Osajima : *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 948 (1991).
- 20) K. Makino, S. Maruo, Y. Morita & T. Takeuchi : *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 617 (1988).

- 21) H. Ukeda, T. Ishii, M. Sawamura & H. Kusunose : *Anal. Sci.*, **9**, 617 (1993).
- 22) H. Ukeda, T. Ishii, M. Sawamura & H. Kusunose : *Anal. Chim. Acta*, **308**, 261 (1995).
- 23) T. Ishii, A. Sorita, M. Sawamura, H. Kusunose & H. Ukeda : *Anal. Sci.*, **13**, 5 (1997).
- 24) H. Ukeda, M. Imabayashi, K. Matsumoto & Y. Osajima : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2909 (1989).
- 25) H. Ukeda, H. Kamikado, K. Matsumoto & Y. Osajima : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 25 (1989).
- 26) 受田浩之, 松本 清, 甲木 功, 箴島 豊 : 農化誌, **65**, 1229 (1991).
- 27) H. Ukeda, S. Tanaka, K. Matsumoto & Y. Osajima : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2835 (1987).
- 28) S. Avrameas & T. Ternynck : *Immunochemistry*, **8**, 1175 (1971).
- 29) M. Suter : *J. Immunol. Methods*, **53**, 103 (1982).
- 30) J. Dobbins Place & H.R. Schroder : *J. Immunol. Methods*, **48**, 251 (1982).
- 31) H. Ukeda, Y. Fujita, M. Ohira & M. Sawamura : *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3858 (1996).
- 32) J.M. Ruijgrok, J.R. de Wijn & M.E. Boon : *Scanning*, **15**, 110 (1993).
- 33) S.P. Gorman & E.M. Scott : *J. Appl. Bacteriol.*, **48**, 161 (1980).
- 34) 渥美和彦 : “人工臓器「生と死をみつめる新技術の周辺」”, 日本放送出版協会, 1996.
- 35) A. Jayakrishnan & S.R. Jameela : *Biomaterials*, **17**, 471 (1996).
- 36) D.C. Ross & D.B. McIntosh : *J. Biol. Chem.*, **262**, 2042 (1987).
- 37) R. Lenkei : *Rev. Roum. Med.-Med. Int.*, **2**, 129 (1980).
- 38) M.W. Yu, J.S. Finlayson & J.W.-K. Shih : *J. Virol.*, **55**, 736 (1985).
- 39) A. Machida, S. Kishimoto, H. Ohnuma, H. Miyamoto, K. Baba, K. Oda, T. Nakamura, Y. Miyakawa & M. Mayumi : *Gastroenterology*, **85**, 268 (1983).
- 40) M. Takami, I. Kasuya & H. Tsunoo : *J. Biochem.*, **111**, 714 (1992).
- 41) H. Ukeda, T. Ishii, Y. Shimizu, M. Sawamura & H. Kusunose : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 341 (1997).
- 42) R.O. Beauchamp, Jr., M.B.G. St. Clair, T.R. Fennell, D. O. Clarke & K.T. Morgan : *Crit. Rev. Toxicol.*, **22**, 143 (1992).

お知らせ

文部省科学研究費補助金基盤研究(A) 第2回公開シンポジウム “天然物を素材とした薬剤耐性克服薬の探索と創製”

日 時 : 平成9年7月11日(金) 9:55~18:30
場 所 : 日本薬学会長井記念ホール
(東京都渋谷区渋谷2-12-15) 渋谷駅下車徒歩8分
協 賛 : 日本薬学会, 日本化学会, 日本生化学会, 有機合成化学協会
後 援 : 日本癌学会
プログラム :

アポトーシス耐性と抗癌剤耐性・鶴尾 隆(東大分生研) / 微生物由来生理活性物質の探索と活性・石塚雅章(微化研) / 環状ヘキサペプチド RA 系化合物の抗腫瘍活性・糸川秀治(東薬大薬) / 微生物由来物質の薬剤耐性癌細胞に対する作用・小宮山寛機(北里研) / 新規タキソイドの構造と生物活性・小林淳一(北大薬) / 海洋産の細胞毒性・抗腫瘍性物質の構造と活性・山田静之(名大) / バンコマイシンおよびハパロシンに関する合成と

生物機能・山村庄亮(慶大理工) / トポイソメラーゼ阻害活性を持つリグナン系含窒素類縁体の分子設計・富岡 清(京大薬) / 制癌性プロスタグランジン耐性分子機構と耐性抑制法・鈴木正昭(岐阜大工)

Nocardia 由来の抗癌剤耐性克服物質の探索・三上 襄(千葉大真核微研) / MRP の関与する抗癌剤耐性とその克服・秋山伸一(鹿児島大医) / 薬物耐性マラリアとその克服・綿矢有佑(岡山大薬) / 抗 AIDS 薬に対する耐性と併用療法による克服・馬場昌範(鹿児島大医)

特別講演 : 特異的阻害物質を活用しての情報メカニズムへのアプローチ・宇井理生(東京都臨床研)

参加費 : 無料

懇親会 : 一般 5,000 円, 学生 2,000 円(当日受付)

連絡先 : 〒060 札幌市北区北 12 条西 6 丁目

北海道大学薬学部 小林淳一 Fax. 011-706-4989