Dp-12

キトサンナノファイバーヒドロゲルの創製とバイオマテリアルへの応用

福山大・生命工

新田祥子, 小松礼佳, 石井泰生, ○岩本博行

【目的】キトサンは、生体適合性や抗菌性を備えた高機能生体材料であり、化粧品や医療分野など幅広い用途に利用されている。キトサンを water-jet 技術により微粉碎したキトサンナノファイバー (CNF) は、高い強度と高い比表面積を持ち、水中で優れた分散安定性を持つことから、再生医工学分野での利用が期待されている。そこで本研究では、生理活性物質輸送担体や骨代替材料としての応用を目指して CNF 含有ヒドロゲルを作製し、その性状や特性について調べた。

【方法】CNF (スギノマシン社製) 懸濁液中で、PEG diacrylate (PEGDA) の化学架橋により CNF-PEG ゲルを作製し、その構造を SEM により観察した。PEGDA/CNF 比や外部 pH がゲルの膨潤性、破断応力および含有物の放出特性に与える影響を評価した。更に CNF-PEG ゲルを CaCl_2 溶液および Na_2HPO_4 溶液に交互浸漬して、CNF ゲル内部および表層に hydroxyapatite (HAp) 結晶を集積した複合材料 CNF-PEG-HAp ゲルを作製した。

【結果】SEM 観察より、CNF-PEG ゲルは束状の CNF に沿って PEGDA がゲル化することにより、数十 μL の空孔を多く含む網目構造を持つことを見出した。また CNF-PEG ゲルは、CNF 仕込み比や外部 pH に依存した膨潤性を示した。さらに CNF 量の増加に従って破断応力が増大したことから、CNF 添加がゲルの高強度化をもたらすことが示唆された。次にゲルのリン酸化を試みたところ、FT-IR、XRD の結果から CNF-PEG ゲル内部および表層に HAp 結晶が生成していることを確認した。

Dp-13*

小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の開発：活性部位とは異なる部位を標的とした阻害剤

日大院生資料・生物資源利用¹、日大生資料・生命化²○荒井詩織¹、袴田航^{1,2}、平野貴子²、西尾俊幸^{1,2}

【目的】現在、新興・再興ウイルス感染症が大きな社会問題となっており、新規抗ウイルス剤が強く求められている。そこで原因ウイルスの感染・増殖に必須である N-結合型糖鎖に注目し、なかでもウイルス表面糖鎖を未成熟とし、ウイルスの感染力を低下させることが知られている小胞体グルコシダーゼ II (GII) 阻害剤に注目した。ヒトの GII はヘテロサブユニットの構造を有しており、現在報告されている GII 阻害剤は酵素の活性部位に結合する拮抗型阻害剤である。そこで、活性部位とは異なる部位に作用する GII 阻害剤を開発し、抗ウイルス剤に展開することを本研究の目的とした。

【方法・結果】仮想および天然化合物ライブラリー (NPDepo) から GII 阻害剤スクリーニングを行ない、仮想スクリーニングからは 3 母核、天然化合物からのスクリーニングからは 2 母核の化合物を見出した。次に 1 次選抜として細胞毒性評価し、抗ウイルス剤として必要な細胞毒性が低い (CC_{50} 165 μM 以上) 化合物を選抜し、1 母核が脱落した。2 次選抜として阻害剤濃度 100 μM で GII 阻害活性評価し、GII 阻害率が 30% 以上である阻害活性の強い化合物を選抜し、さらに 1 母核が脱落した。最後に 3 次選抜として EC_{50} を評価し、 EC_{50} が 150 μM 以上である 2 母核を選抜し、1 母核が脱落した。その結果、仮想および天然物からの探索それぞれから 1 母核、計 2 母核が選抜された。現在は、これらの有用な母核を有する化合物について、阻害剤の GII への作用部位の特定を試みている。

Dp-14*

天然化合物ライブラリからのゴルジ体マンノシダーゼ I 阻害剤の探索：抗ガン剤への応用を目指して

日大院生資料・生物資源利用¹、日大生資料・生命化²○小山亮祐¹、額田知実²、田村沙緒里¹、袴田航^{1,2}、平野貴子²、西尾俊幸^{1,2}

【目的】ガンの克服は重要な課題であり、そのためには多様な作用機序を持つ抗ガン剤の開発が必要となっている。これまでに、N-結合型糖鎖合成に関わるゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤が細胞表面の糖鎖構造を変化させることにより抗ガン作用を示す事が報告されている。しかしながら、既知阻害剤は糖ミミックな構造を有し、化合物の高い親水性による低い膜透過性や構造展開の難しさから、疎水性が高く構造展開の容易な非糖ミミックな阻害剤の開発が重要となっている。そこで、天然化合物ライブラリから、ゴルジ体マンノシダーゼ I (GMI) 特異的蛍光基質とヒト培養細胞 (HeLa) を用いて新規非糖ミミックな GMI 阻害剤を見出し、新規な抗ガン剤として応用することを本研究の目的とした。

【方法および結果】当研究室で確立した阻害剤のセルベーススクリーニング系を用いて、理化学研究所天然化合物ライブラリ (NPDepo) から GMI 阻害剤探索を行った。まず、候補化合物を 5 $\mu\text{g}/\text{well}$ となるように加え、一次スクリーニングを行い 14 種類のヒット化合物を得た。次に得られたヒット化合物を 5, 2.5, 1, 25 $\mu\text{g}/\text{well}$ と濃度を下げ阻害活性を評価した。その結果、高い GMI 阻害活性を示した化合物を 3 種類見出した。これらの化合物はそれぞれ異なる母核を有していた。現在、見出した化合物とその構造類縁体に対して抗ガン活性および GMI 阻害活性評価を行い、3 つの母核の中から最適な母核の選定を行っている。

Dp-15

Chitosan-enzyme-ferrocene-carbon nanotube electrode coatings for advanced glucose biosensing Waraporn Rernglit^{1,3}, Wipa Suginta^{2,3}, **Albert Schulte**^{1,3*}

¹School Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand; ²School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand; ³Biochemistry-Electrochemistry Research Unit, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand; E-mail: schulte@sut.ac.th

Thin platinum working electrode deposits of chitosan-soaked carbon nanotubes (CHIT-CNT) that were additionally charged with ferrocene (Fc) and glucose oxidase (GOx) as functional sensing elements have been explored as quantitative recognition layer for glucose biosensors. Demonstrated will be that the sophisticated layout of the established enzyme immobilization matrix allowed not only molecular O_2 and Fc as native and synthetic redox-active co-factors but also direct protein-to-electrode electron transfer to repeatedly work for oxidized GOx recovery after enzymatic glucose conversion and tune the protein's catalytically active site for non-stop interaction with continuously arriving sugar targets. Motivation behind the use of the marine biopolymer chitosan as part of the functional biosensor layer was the predictable gain of a matrix biocompatibility supportive of GOx long-term survival on the sensor surface and hence analytical response stability. The stable and consistent manifestation of CHIT-CNT-Fc-GOx biosensor signals in a flow-based electrochemical cell for the duration of day-long continuous exposures to adjusted glucose levels and success with on-line glucose calibration trials during uninterrupted flow cell operation will be reported as clear signs that the immobilized enzyme entities felt well enough in their polymeric chitosugar/CNT environment to maintain biocatalytic activity for long.