

# 28T-pm08

脂質二分子膜内ナイルブルーのモノマー化を利用した蛍光プロテアーゼ定量法  
○東海林 敦<sup>1</sup>, 河野 智成<sup>1</sup>, 飯室 翔平<sup>1</sup>, 柳田 顕郎<sup>1</sup>, 渋澤 庸一<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京薬大薬)

**【目的】** バイオセンシングの高感度化を目的として、脂質二分子膜を利用する計測法は数多く報告されている。その多くは多量のマーカー分子を封入したリポソームやチャネル分子により、優れたシグナル増幅能を有している。一方、脂質二分子膜内を利用した計測法はほとんど見当たらない。しかしながら、脂質二分子膜は 4~5 nm のナノ薄膜であるため、マーカー分子をこのナノ薄膜に濃縮させることができれば、センシング法の高感度化を達成できるものと考えられる。本研究では、マーカー分子として古典的な pH 指示薬であるナイルブルーに着目し、プロテアーゼ定量法の構築を検討した。

**【方法】** リン酸緩衝液中 (pH 7.4) でゾル化した (45 °C) ゼラチンにリポソームを懸濁させ、96 穴マイクロプレートのウェル内でゲル化した。このゲル上にナイルブルーおよびトリプシンの混合溶液を添加後、蛍光強度の経時変化をプレートリーダーで測定した (ex. 635 nm, em. 664 nm)。

**【結果および考察】** リポソーム懸濁液にナイルブルー溶液を添加すると、6~8 割程度のナイルブルーが自発的に脂質二分子膜内に濃縮されることがわかった。また、脂質二分子膜内におけるナイルブルーの蛍光強度は、水溶液中と比較して 15 倍程度増強されることがわかった。リポソームの有無におけるナイルブルーの吸収および励起スペクトルから、水溶液中で消光性の H-会合体を形成するナイルブルーが、脂質二分子膜内ではモノマーとして存在していることが示唆された。脂質二分子膜内では、ナイルブルーの濃縮効果とモノマー化により蛍光強度が増大しているものと考えられる。リポソーム含有ゼラチンゲル上にナイルブルーおよびトリプシンを添加したところ、トリプシン濃度に依存して蛍光強度が増大した。