

1.3 イオン結合固定化

DNA マイクロアレイが生物学研究に用いられる大きなきっかけとなったのが、スタンフォード大学の Brown らが報告したカチオン性にした基材表面に、負に帯電した核酸をイオン相互作用で吸着させる方法である²⁰⁾。この方法はその簡便さから多くの研究者に用いられ、カスタムメイドや in-house 調製で広く用いられている²¹⁻²⁶⁾。そして核酸ばかりでなくタンパク質マイクロアレイでも用いられている²⁷⁾。カチオン性のポリマーにはポリアニリンやポリリシンが用いられている。イオン結合固定化は物理吸着固定化と同様、簡便な方法であるが、固定化の不安定性、バックグラウンドの高さなどの問題がある。

1.4 包埋固定化法

ヒドロゲル中に包埋する方法で、第4章第2節に述べられているような自己集合分子のほか、古くからは、ポリアクリルアミド・ゲルやアガロース・ゲルへの包埋が報告されている^{28,29)}。この方法は、生体分子を3次元の架橋体の中に入れるため、多くの場合セミウェット状態が保たれており、生体分子が水中に近い状態でトラップされている利点があるが、一方で、アッセイの際、ゲルがバリアーとなり、アナライトとの相互作用を減じる可能性が高い。このような問題点を解決する方法として、ナノレベルで高分子イオン錯体を積層して生体分子を固定化する方法が報告されている³⁰⁾。

1.5 共有結合固定化法

共有結合法は3つに分類される。第1は、生体分子に修飾を加えずに、固有の官能基を用いて基板の官能基へ反応させる場合、第2は、ヌクレオチドやペプチド、およびそれらの誘導体だけに適応できる On chip 合成法、第3は、生体分子に修飾を加えて新たな官能基を導入し、基板の官能基と反応させる方法である。

1.5.1 生体分子固有の官能基を用いて固定化する方法

マイクロアレイの歴史は On chip 合成で始まったが、固相法で合成可能なオリゴ核酸やオリゴペプチドに限られ、高分子量の生体分子をマイクロアレイ固定化するためには、他の方法が必要となる。核酸以外の生体分子にはいくつかの官能基があるため、それらを利用して固定化が行われる。核酸の場合は官能基が限られるため固相合成の際に導入されて用いられる場合が多い。表2には生体分子内の固定化用の官能基と基板表面の官能基を示す。通常生体分子の固定化反応は、水溶液中で進行することが必要になるが、低分子化合物のマイクロアレイでは、この制約はない。

表2 生体分子をそのまま共有結合固定化する方法

生体分子内官能基	基板上の官能基
アミノ基	カルボキシル基 活性エステル基 エポキシ基 アルデヒド基 イソシアナート基 イソチオシアナート基
チオール基	マレイミド基 ピリジリジスルフィド基 ビニルスルホン基 ブromoアセチル基
カルボキシル基	アミノ基
水酸基	エポキシ基 シリルクロライド基
糖鎖	ヒドラジド基 アミノオキシアセチル基
芳香族	ジアゾ基
—	光反応性基 (アリルアジド, ジアジリン, ベンゾフェノン, ニトロベンジル基など)

(1) アミノ基利用¹¹⁾

オリゴヌクレオチドの固定化では固相法での合成の際に末端に導入され使われている。その場合、基板には、活性エステル基、イソチオシアナート基、アルデヒド基が表面に被覆されたものがよく用いられている。タンパク質固定化の場合は、リシン残基を利用することになる。もしいくつものリシン残基がタンパク質の表面に存在すると、多点結合となり、タンパク質のコンフォメーションに影響して柔軟性も損なうことも考えられる。糖では、元来アミノ基を含むものはそのまま、含まないものはアミノ基を導入して固定化が行われている^{31,32)}。

N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) はアミド結合を形成するための最も一般的な試薬である。生体分子を低イオン強度の溶液に溶解し、活性化した基板表面に反応させる。NHS エステルが生体分子の求核基を攻撃して強固なアミド結合ができる。固定化効率は、様々な反応パラメーター (pH, 濃度, イオン強度, 反応時間) に依存し、生体分子ごとに最適化する必要がある。

る。

アミンとアルデヒドで Schiff 塩基を形成し、還元により安定な二級アミノ結合として固定化することは非常に一般的に行われている。McBeath と Schreiber³³⁾による最初のタンパク質マイクロアレイは、アルデヒド基導入ガラス基板を用い、この反応を利用した。リン酸緩衝液に溶かしたタンパク質をマイクロアレイ固定化し、その後、ガラス基板をウシ血清アルブミン (BSA) 溶液に浸漬し、目的タンパク質の固定化領域以外への非特異的吸着を抑制する操作が行われた。BSA が、固定化する生体分子より大きいと、固定化された生体分子が被覆されてしまう心配もある。

(2) チオール基利用¹¹⁾

チオール基は、金属と親和性が高いため、末端修飾オリゴ核酸をそのまま金属基板に固定化し、表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定や電気化学測定に広く用いられる。またマレイミド基がコーティングされている基板もある。タンパク質固定化では、システイン残基のチオール基が利用される。通常、システインはリシンほど豊富には存在しないので多点結合による失活の心配はないが、すべての生体分子が固定化できるわけではない。

マレイミド二重結合はチオール基と付加反応により安定なチオエーテル結合を形成する。反応は pH 6.5 から 7.5 で特異的に起こり、高 pH ではアミノ基との副反応が起こることが知られている。マレイミドの反応は速く、水溶液中ではゆっくり加水分解反応も生じるため、生体分子の取り扱いに注意を要する。ホモ二官能性のビス (マレイミドヘキサン) やヘテロ二官能性の *N*-(ϵ -マレイミドカプロイル) スクシンイミドやスルホスクシンイミジル 4 (*p*-マレイミドフェニル) プチレートなどのリンカー分子が開発されている。

ジスルフィド試薬は、新しいジスルフィド結合形成のための交換反応を伴う。結合は還元剤により可逆的に切断されるため、安定な固定化には不向きである。そこで、ピリジルジスルフィドが一般的に使われる。これは脱離基が非反応性の化合物に変換されるためである。ただ通常これらの反応は水溶液中では進行しにくく、水/有機溶媒の混合溶媒系が必要となる。しかし最近では、ジスルフィド結合の可逆性の特徴を生かして書き換え可能な DNA マイクロアレイの報告が行われている³⁴⁾。

ビニルスルホン基は、Michael 付加でチオール基と反応する。この反応は温和な生理条件下で進行するため、タンパク質の選択的修飾に向いている。反応は 7 から 9.5 の pH 領域が最適で pH 9 以上ではゆっくりではあるが、アミノ基とも反応する。反応はほぼ定量的に起こる。チオール選択的であることと水中安定性が、この固定化法の利点であるため、ポリエチレングリコール (PEG) 化反応のために、ビニルスルホン-PEG 誘導体は広く利用されている。この他に基材表面にプロモアセチル基を導入し、チオール基と反応させペプチドを固定化を行った例が三原らに

よって報告されている³⁵⁾。

(3) カルボキシル基利用¹¹⁾

タンパク質の場合は、アスパラギン酸、グルタミン酸が分子表面に多く存在する。したがって、アミノ化ガラスなどへは多点で結合し、固定化法として多用される。

最も一般的に使用される試薬が、カルボジイミドである。ただしカルボジイミドは、タンパク質内部に存在するアミノ基とカルボキシル基同士の反応も誘発するため、生物活性を保持したままの固定化には慎重を要する。

(4) エポキシ基利用¹¹⁾

エポキシ基を使う反応は、中性 pH で、湿潤状態で、強固な結合を形成できることから生体分子固定化には適している。タンパク質とエポキシ表面との共有結合形成反応は非常に遅いが、吸着したタンパク質と基板上的エポキシ基は速く反応する。そのため、市販のエポキシ基材はいくつかの制限がある。エポキシ-アガロースはイオン強度が高すぎたり低すぎたりすると、ほとんど固定化反応が進行しない。これは、基材に疎水性部分がなくタンパク質が吸着しにくいとめと考えられている。エポキシ-セファビーズとエポキシオイパーギット C は高イオン強度でのみ固定化できるため、固定化できるタンパク質の種類は限られる。そのため、物理吸着を促進する領域と、固定化のために充分量のエポキシ基をもつ領域を兼ね備えた基材が開発されている。エポキシ-アミノ基材は、エチレンジアミンでタンパク質を吸着促進し、エポキシ基で固定化するものである。チオール修飾エポキシ基材は、チオール-ジスルフィド交換反応でタンパク質を固定化してからエポキシ基で共有結合するものである。

(5) 糖鎖利用¹¹⁾

還元糖とアミノ基修飾物との反応が報告されていたが³⁶⁾、より反応性の高いヒドラジド化やアミノオキシ化したガラス基板や、ヒドラジン基修飾金表面に糖鎖をマイクロアレイ固定化する例が多く報告されている³⁷⁻⁴⁰⁾。これらの場合は、糖は全く修飾せずに固定化される。オキシム結合で固定化された糖が、開環状態と閉環状態との平衡か、開環状態でしか存在しないのか議論があったが、最近、閉環状態で存在し、生来の分子認識が起こることが証明されている⁵⁰⁾。

(6) ジアゾカップリング法⁴¹⁾

抗体、ホルモン、酵素の多くは糖タンパク質で、通常の生物（分子認識）機能はタンパク質領域が担っており、もし糖鎖領域だけで固定化ができれば機能に影響を与えず固定化を行うことができる。実際、抗体では、Fc 部分の糖鎖で結合すると分子認識能が高くなることが報告されている。抗体の糖鎖を介してヒドラジド修飾表面に固定化することは、1990年代から通常の方法として行われてきており、産業上もバイオリアクター構築上重要な方法となっている。

基材にアミノ基を導入し、亜硝酸によりジアゾ基に変換し、生体分子の芳香族とカップリング

させる方法が核酸やタンパク質の固定化に応用されている。タンパク質ではヒスチジン・タグを導入することによりさらに固定化効率が增加することが報告されている。

その他の糖鎖固定化方法としては、ジチオ脂肪酸やアミノフェニルボロン酸が使われる。ジオールとの環状エステル化合物の形成により固定化が起こる。ボロネート-糖鎖相互作用の不安定性を解決するために、ヘテロ機能化エポキシ-ボロネート自己集積性分子が考案されている。

(7) 光固定化^{5, 11, 42~45)}

光固定化では光反応性試薬を用い、光照射により活性中間体が形成され生体分子と反応して共有結合固定化が起こる。光反応は単一過程で、効率がよく、pHや温度にも影響されず、しかも生体分子に特別な官能基を要求しない点が大きな特徴となる。すなわち、どのような生体分子も同じ方法で同一基板上に固定化できる。細胞の固定化も可能であることが報告されている⁴²⁾。通常の生体分子が吸収しない350 nm以上の光で励起されるアリールアジド、ジアジリン、ベンゾフェノン、ニトロベンジルが一般的に使われる(図2)。アリールアジドは光照射により光分解を受け、反応性のナイトレンが生じ、これがC-H結合への挿入反応を起こす。ナイトレン中間体は素早く分子内反応で環拡張して非常に求電子的な環状化合物となると挿入反応速度は遅くなる。そのため、芳香族の環拡張を最小にするためにフルオロ基で置換したパーフルオロフェニルアジド(PFTA)を使うこともできる。ジアジレンは反応性のカルベンを生じる。ニトロベンジル基を用いる方法はケージング化学とも言われ、UV照射によりケトン、二酸化炭素や遊離した反応性基を生み出すことにも利用される。ベンゾフェノンは共有結合物と容易に反応するケチ

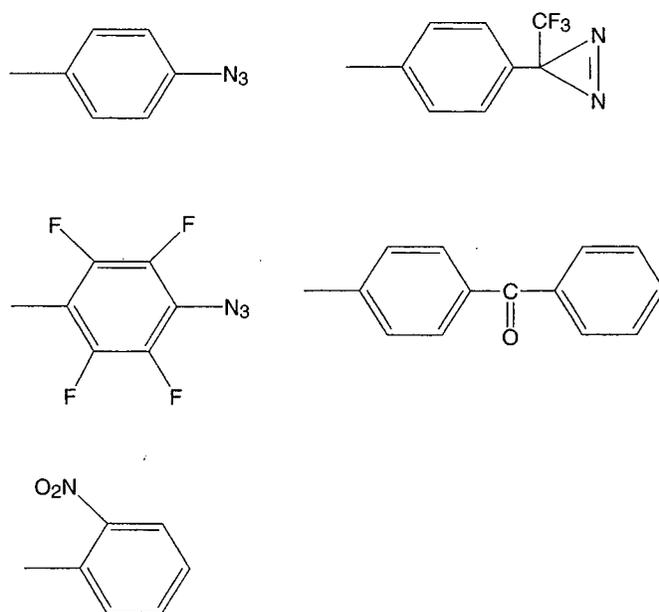


図2 光固定化に用いられる官能基の例

ル・ラジカルの前駆体である。

光反応性リンカーは様々開発されてきている。NHS エステルを含む PFTA は、光反応性表面を提供できる。N-[m-[3-(トリフルオロメチル)-ジアジリン-3-イル]フェニル]-4-マレイミドブチルアミドは、チオール表面への結合と生体分子との光反応ができる。1-フルオロ-2-ニトロ-4-アゾベンゼンはポリスチレン表面の活性化に使われる。アミノ基に反応性のフルオロ化表面を作り出すことができる。

光固定化法の特徴は、固定化する生体分子に特別な官能基が必要でないことに加え、アナライトとの相互作用が未知の場合、様々な配向性で固定化ができる点である。アナライトがポリクローナル抗体の場合の検出や、薬剤としての活性を探索するには、ランダム配向で固定化した方が検出効率を高め、網羅性を高める上で有効である（図3）。

1.5.2 On chip 合成

最初の本格的なマイクロアレイは、チップ表面上に直接様々なシーケンスの生体分子（ペプチド、核酸）を固相法（Merrifield 法）で合成することから始まった。コンビナトリアル化学が提唱されるようになった90年代、Fodorらは、光リソグラフィ法と光分解性の保護基を用いた高密度パラレル合成を開発したと論文発表した（1991年⁴⁶⁾。その後、Southernらにより、4つの配列のオリゴヌクレオチドをガラス上にパラレル合成し、ハイブリダイズにより核酸配列を解析する方法が1992年に論文として報告された⁴⁷⁾。同年、FrankによってペプチドのSPOT合成が発表され、エピトープ分析への利用が強調された⁴⁸⁾。光リソグラフィ法は、現在 Affymetrix 社のジーンチップの製造法になっている。光保護基を用いる方法については、その後、光マスク

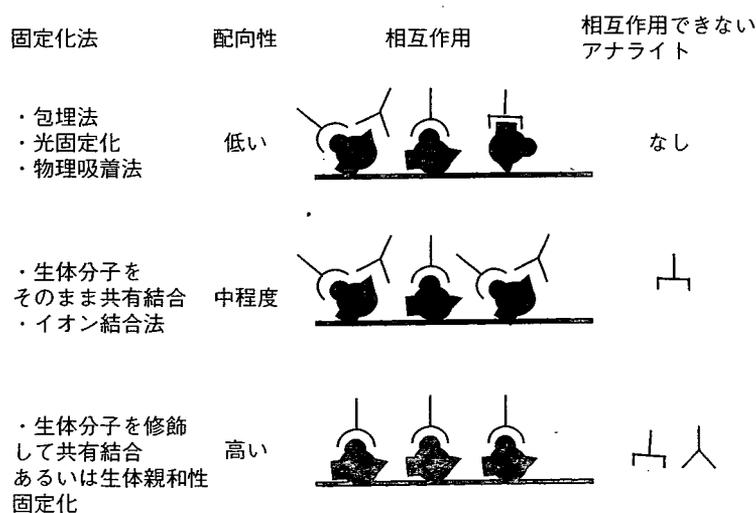


図3 固定化生体分子の配向性

配向性が高いほど、特定の分子との相互作用は強くなるが、様々な相互作用を探索する解析目的、ポリクローナル抗体を検出する機能性目的には、配向性はない方が適している。

を用いずに、光照射を特定領域に絞るための装置を用いた方法も考案されている^{49~53)}。

一方、Agilent Technologies 社からはインクジェットプリントを用いて特定の領域で固相合成を行う方法が開発された^{3,54)}。光マスクでなく、ポリマーマスクを使用する方法が山武(株)で開発されている⁷⁾。これは、反応させたくない領域をポリマーで覆い、反応させたい領域はポリマーを溶解させ、固相合成を行うという方法である。それ以外にも、電極による微小領域の酸化還元を制御して脱保護、縮合を行う方法が報告されている⁵⁵⁾。On chip 合成法を簡単に図4にまとめた。

最近、第2章第3節で紹介するようなプローブオンキャリア法が長澤らによって考案されている。これは、オンチップ合成した担体をそのままチップ上に固定化する方法で、様々な特長もっている。

1.5.3 生体分子修飾による固定化

生体分子の一部に新たな官能基を導入して固定化する試みも広く行われている(図5)。この方法の特徴は、一定に配向した固定化ができることである。配向固定化は、相互作用する部位が明らかな場合には非常に有効な方法で、高効率でのアナライトとの相互作用が期待できる。

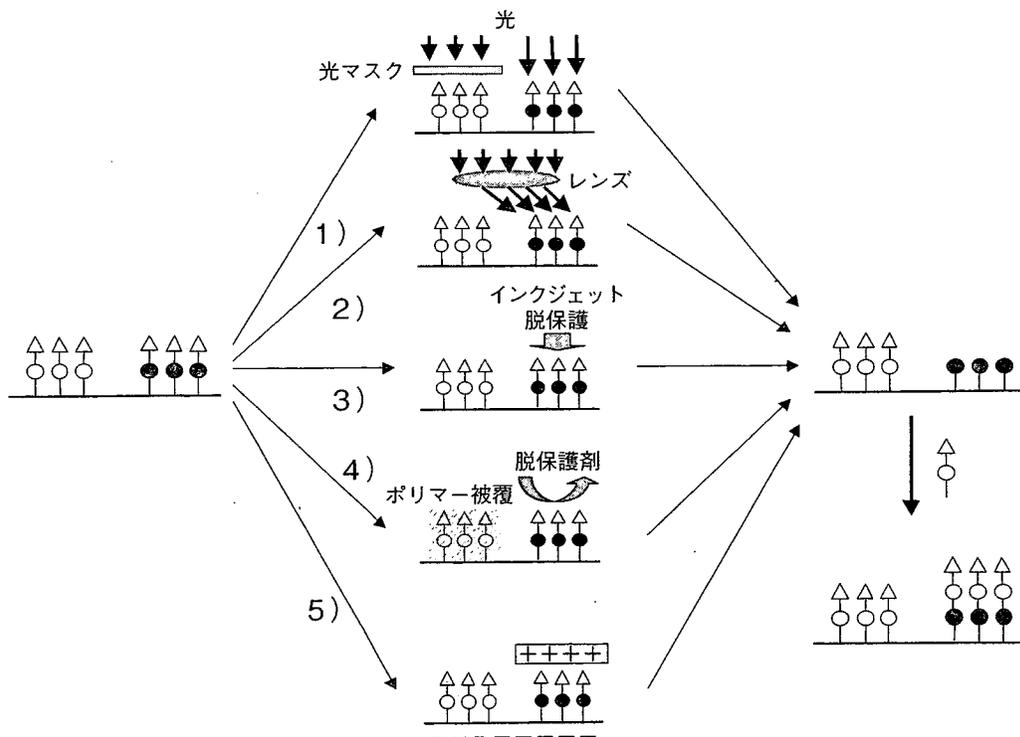


図4 様々な On chip 合成法

1) 光マスク法, 2) マスクなし光照射, 3) インクジェット逐次合成, 4) ポリマーマスク法, 5) 酸化還元法。

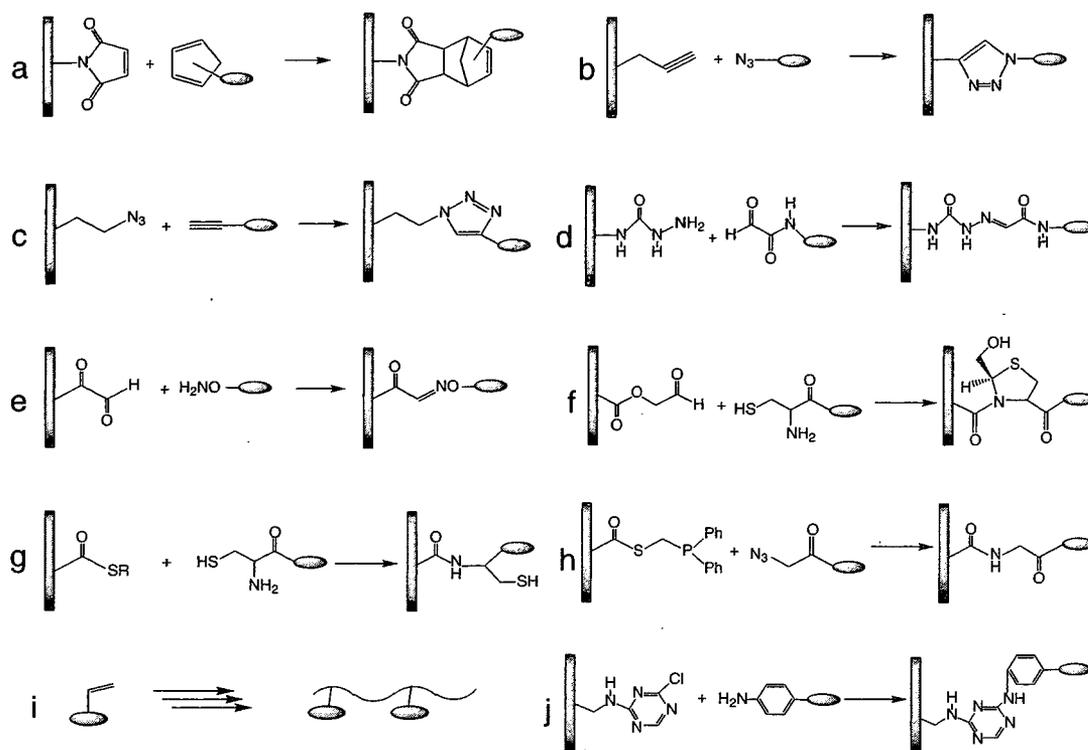


図5 生体分子に新たに官能基を導入し基板にマイクロアレイ固定化する反応例

a) Diels-Alder 反応, b) クリック化学, c) クリック化学, d) α -オキシセミカルバゾン結合, e) オキシム形成, f) チアゾリジン形成, g) ペプチド形成, h) Staudinger 結合, i) ビニル基重合, j) パラアミノフェニル基とシアノクロライドとの反応。

(1) Diels-Alder 環状付加

Diels-Alder 反応は、ジエノフィルとジエンの反応で不飽和の六員環を形成する反応である。図 5 a に示すように、ジエノフィルはマレイミド修飾表面でジエンが生体分子に結合している。この方法は、ペプチド・チップや糖鎖チップの作成で用いられた^{56,57)}。ペプチドの場合、固相法で合成する際に、シクロペンタジエン・リンカーを導入し、ベンゾキノン修飾表面に固定化された。Diels-Alder 反応は水中で室温で高速に進行するため、生体分子の固定化に有効であると考えられる。

(2) クリック化学 (1,3-双極子環状付加反応)

アジド基とアルキン基が 1,3-双極子環状付加して 1,2,3-トリアゾールを形成する反応を簡単に素早いことから、「クリック」化学と呼ぶ。アジド修飾生体分子をアルキン修飾表面へ、アルキン修飾酵素をアジド修飾表面へ各々固定化した例が報告されている (図 5 b, c)^{11,58)}。また、Diels-Alder 反応と 1,3-双極子環状付加を組み合わせた例も報告されている⁵⁹⁾。N-(ϵ -マレイミドカプロイル) 誘導体ガラス基板を調製し、アルキン基とシクロジエン基を各々末端にもつ二官能性 PEG リンカーを反応させ、生体分子の固定化が行われた。

(3) α -オキソセミカルバゾン結合

α -オキソセミカルバゾン結合による固定化は、Melnykらによって報告されている(図5 d)⁶⁰⁾。セミカルバジドガラス基板は、シラン化処理と Fmoc-NHNH₂ との反応、あるいは直接セミカルバジドシランによるシラン化処理によって行われた。セミカルバジドはアルデヒド基と反応し、安定なセミカルバゾン結合を形成した。

(4) オキシム/チアゾリジン形成

ガラス基板を(3-アミノプロピル)トリエトキシシランで処理しアミノ化する。ここに① Fmoc-Ser を反応させてから脱保護、あるいは②保護グリオキシリク酸を反応させ、塩酸で脱保護することによりグリオキシリ誘導体を形成する。ここに、4,7,10-トリオキサ-1,13-トリデカンジアミンスクシニミック酸リンカーを反応させ、最後にアミノ-オキシ基修飾糖を反応させて固定化を行う(図5 e)⁶¹⁾。システインを含むペプチドを反応させると、N末端システインとエステルグリコアルデヒドの反応により、チアゾリジン環が形成されアシル転移によりプロリンに似た官能基が形成される(図5 f)。

(5) ペプチド結合¹¹⁾

近年、生合成できないペプチドを native chemical ligation で合成する方法が盛んになってきた⁶²⁾。これは、C末端の α カルボキシル基をチオエステルとしたペプチドセグメントと、N末端にシステインをもつペプチドを縮合する方法で、これが固定化反応にも利用されている。例えば、N末端システインを含むタンパク質を調製し、チオエステル修飾表面に固定化を行われた(図5 g)。また逆に、C末端に α -チオエステルを導入し、ガラス表面に形成したPEGシステインのアミノ基へ固定化することも行われている。

さらに、タンパク質工学による expressed protein ligation (ECL) による固定化も報告されている。タンパク質の一部で、自動的に切除され、残った部分がペプチド結合で再結合されるタンパク質スプライシングのような反応をするインテイン構造が利用される。C-インテイン断片をガラス表面にペプチド・リンカーを介して固定化し、N-インテイン断片を固定化するタンパク質のC末端と融合させておく。この二つの断片が結合すると、活性なインテイン領域が形成され、表面への固定化が起こる。

(6) Staudinger 結合^{11,63)}

Staudinger 結合はアジド基とフォスフィン含有(チオ)エステルの反応でアミド結合を形成するものである(図5 h)。アミノ処理ガラス基板にスクシンイミジルエステル(NHS-C(O)-PEG-C(O)-NHS)とジフェニルフォスフィノメタンチオールを反応させ、表面にフォスフィノチオエステルを形成し、アジド修飾生体分子を反応させる例が報告されている。Staudinger 反応は水溶液中で温和な条件でほとんど副反応なしで定量的に進行することが知られている。

(7) ビニル基導入^{8,64)}

三菱レイヨン(株)で開発されたジェノパールは、オリゴDNAの5'末端に重合性官能基を結合させ、中空糸内で共重合して得られたもの(図5i)である。中空糸は束ねられ、垂直に切断してDNAチップとして利用されている。

(8) パラアミノフェニル基+トリアジンクロライド⁶⁵⁾

Glycominds社のGlycoChipTMが、採用している糖鎖固定化法である。トリアジンクロライドに1,8-ジアミノ-3,6-ジオキサオクタンのオリゴマーをスペーサーとして固体基板上に固定化する。そして糖鎖をパラニトルフェニル基で修飾してからジチオナイト・ナトリウムで還元してパラアミノフェニル基として、シアノクロライドで活性化したリンカーに反応させる(図5j)。

1.6 生体親和性結合による固定化

生体親和性結合は生体分子の配向固定化に適しており、均一な固定化表面を形成できるだけでなく可逆的に脱離させることも可能という利点もある。

1.6.1 アビジン-ビオチン系^{10,11)}

アビジン-ビオチン結合は、非共有結合の中では最も強固な結合の中の一つである($K_d=10^{15} \text{ M}^{-1}$)。アビジンは4量体糖タンパク質で、水溶性で広い範囲のpH、温度域で安定で、4分子のビオチンと結合できる。反応は非常に速く、pH、温度、有機溶媒、酵素分解、変性剤の影響を受けない。ストレプトアビジンもアビジンに似ているが、分子量、アミノ酸組成、pIが異なる。アビジンもストレプトアビジンも化学的あるいは遺伝子工学的に改良されてきている。例えば、NeutrAvidinはビオチンと非常に特異性が高いビオチンへの親和性を持ち、NitrAvidinは、pH依存性をもつ(酸性条件でビオチンと結合し、高pHでは解離する)。

一方のビオチンあるいはビタミンHは、あらゆる生物種で見られる天然ビタミンの一つである。アビジンへの結合には二環構造が要求されるだけなので、バレリック酸のカルボキシル基部位を修飾することにより様々なビオチン化試薬が合成されている。ビオチンのNHSエステルは、アミノ基修飾用に、ビオチンヒドラジドは炭水化物あるいはカルボキシル修飾用によく利用される。ビオチンによる表面修飾、アビジン/ストレプトアビジンによる表面修飾も行われている。アビジンの吸着あるいは共有結合による直接固定化が行われる一方、ビオチン/アビジン/ビオチン層では、直接ビオチンを固定化し、アビジンを第二層としてビオチン化生体分子を固定化しようとするものもある。ビオチンやビオチン化分子の結合のためには表面が活性化される必要があり、ガラス基板をアミノシラン処理した後、ビオチン-NHSを反応させることが一般的に行われる。

生体分子へのビオチン基の導入は、有機合成で行う場合のほかに、共有結合固定化の1.5.3項

(5)で紹介したような ECL 法でタンパク質の C 末端を化学タグで修飾して固定化する方法がある。タンパク質アレイのために用いられた最初の例は、3つのモデルタンパク質、マルトース結合タンパク質、増強グリーン蛍光タンパク質、とグルタチオン S-トランスフェラーゼを用いて行われた。ECL 法でビオチン化されたこれらタンパク質はアビジン化スライド基板へ固定化され、各々の抗体を使って固定化が確認された。その他に、システイン-ビオチン複合体を反応させてビオチン化タンパク質を調製する方法、*in vitro* タンパク質合成の際に、ピューロマイシン-ビオチンを反応させてリボソームによるタンパク質合成の際にビオチン化タンパク質を調製する方法なども報告されている⁹⁾。

光化学との組み合わせも行われている。一端は、金基板にチオールで結合し、その上にアビジンを介してフォトビオチン（光反応性ビオチン）を結合し、UV 照射により分解が起こりアビジンと結合できるようになるというものである。ケージド化合物としてよく用いられるのが、ニトロベラトリロキシカルボニル基である。最近、電気化学的に酸化によって分解されるヒドロキノンと結合したビオチンも合成されている。

1.6.2 His-Tag 系^{9,11)}

Tag（荷札）は、できるだけ生物活性に関与する部位から離れた箇所に遺伝子工学的に導入される。ポリヒスチジンは、最も一般的な tag で、サイズが小さく、有機溶媒にも耐性で、免疫原性が低く、容易に精製できる利点がある。ヒスチジン 6 量体を C 末端あるいは N 末端に結合し、ニッケル-ニトロ酢酸（NTA）のようなニッケルキレート錯体に固定化する。NTA はカルボキシデキストラン上へ EDC-NHS を介して、あるいはシラン化ガラス基板へマレイミドを介して共有結合固定化される。高密度な金属キレートを可能にするために多価キレーター・ヘッドを介する試みも行われている。

この結合の利点は、競争的なりガンドであるヒスチジンやイミダゾール、あるいはキレート剤 EDTA を流すことで金属を除去し、固定化された生体分子を回収できることである。このような再利用の可能性は、固定化物の高い配向性ととも重要である。そして His-tag は市販もされており、多くのタンパク質に適用可能である。しかし、His-tag の Ni^{2+} -NTA への親和性はそれほど高いわけではない ($K_d=10\mu\text{M}$) ので、欠点として金属依存性の非特異的タンパク質吸着を無視することができないことが挙げられる。

1.6.3 DNA を介した固定化^{9~11,66)}

DNA マイクロアレイは既にルーチンで作られるようになっていて、生体分子に単鎖 (ss) DNA を結合し、それをマイクロアレイ・チップ上へハイブリダイゼーションすることで特異的に固定化する方法である。ssDNA のタンパク質への結合に関しては、直接の共有結合、二官能性リンカー使用、ストレプトアビジン・ブリッジ、そして発現タンパク質ライゲーションなどが

提案されている。

直接結合は、チオピリジル・スルフィド基を導入したオリゴヌクレオチドとタンパク質の反応性システインとの反応で行われた。この方法により単一の ssDNA タグを特異的にもつ均一なタンパク質は得られたが、ジスルフィド結合は不安定なため、高効率で安定性の高いカップリング法としてタンパク質をヒドラジドで処理し、5'-オリゴヌクレオチドのアルデヒド基と反応させることも提案されている。生成されるヒドラゾン結合は広い pH 領域で安定である。

二官能性リンカーにはヘテロ型とホモ型がある。両方のタイプのリンカーが5'末端に一級アミノ基をもつオリゴヌクレオチドで検討されている。ホモ型リンカーであるビス（スルホスクシンイミジル）スベレートを用い、リシンのアミノ基への反応を行わせたり、ヘテロ型であるスルホスクシンイミジル 4-[*N*-マレイミドメチル]-シクロヘキサン-1-カルボキシレートと反応させてチオール基と反応させることが行われた。*N*-[χ -マレイミドブチリロキシ]スクシンイミドエステルやスルホスクシンイミジル 4[*p*-マレイミドフェニル]-ブチレートなども使われている。

ssDNA-ストレプトアビジン錯体は、ビオチン化タンパク質の部位選択的な固定化に適している。5'チオレート化したオリゴヌクレオチドと組み換えストレプトアビジンを反応させ、DNA ハイブリダイゼーションにより固定化が行われている。

発現タンパク質ライゲーションも融合タンパク質を DNA へ結合するために用いられたが、タンパク質スプライシングと DNA 結合過程は効率が悪く時間を要した。そこで、システインを結合したオリゴヌクレオチドを調製し、ケミカルライゲーションによりタンパク質を結合する方法も考案されている。

DNA ハイブリダイゼーションを利用して固定化する方法は、固定化効率が高く、部位特異性にも優れている。固定化物はアルカリ変性によって取り除くこともできるため、チップの再利用には好都合ではある。また、様々な生体分子を DNA タグをもとに一度に固定化できる利点がある。しかし問題もある。それは、分析対象物に核酸分解酵素が含まれていた場合に DNA が分解される恐れがあることである。ssDNA 以外にも PNA でコードした生体分子を DNA マイクロアレイ上に固定化した例も報告されている⁶⁷⁾。

1.6.4 プロテイン A/プロテイン G 仲介系¹¹⁾

免疫グロブリン IgG の Fc 不変領域を利用してプロテイン A/プロテイン G を仲介させて固定化する方法が抗体の固定化で行われている。抗体 IgG 分子中の抗原と結合する Fab 可変領域を表面に露出させたまま固定化できる特徴がある。ただ欠点としてはプロテイン A そのものの配向性をどこまで制御できるかによる。そこで、プロテイン A を短くして C 末端にヘキサヒスチジンタグを導入した方法が報告されている。また、自己集積化できる *N*-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ) プロピオネートとプロテイン A の一級アミノ基とを反応させ固定化を行

うことでプロテイン A 層を形成させ、その上に IgG を固定化することも報告されている。ジチオビススクシンイミドプロピオネート修飾ガラスへの抗体固定化がプロテイン A を使って行われている。

プロテイン A を使った固定化は、それが認識できる特定の抗体にしか通用しない。ストレプトコッカス・プロテイン G は広い範囲の免疫グロブリンを認識できる。そこでプロテイン G の結合領域と疎水性表面への結合を高めるためにエラスチンの結合ペプチドなどを繰り返し配列で導入したタンパク質の調製が行われている。

1.6.5 その他の生体親和性捕捉リガンド系¹¹⁾

クチナーゼとスーサイド（自殺）基質との共有結合を用いる方法がある。クチナーゼはセリン・プロテアーゼで部位特異的に加水分解の遷移状態類似体であるホスホネート・リガンドと共有結合を形成する。4-フェニルホスホネートを阻害剤としてこれを自己集積化単分子層に固定化し、ここにクチナーゼを融合した抗体を固定化する方法が報告されている。この方法で固定化した抗体は、物理的に吸着した抗体が 20 % の活性しか保持しなかったのに対し、そのまま生物活性を保持していた。しかし、この方法の欠点としてはホスホネート阻害剤が、クチナーゼに限らず広く加水分解酵素に作用するため、選択性に難があることが挙げられる。

DNA 修復タンパク質である O⁶-アルキルグアニン-DNA アルキルトランスフェラーゼ (AGT) を遺伝子組換え法で導入し、タンパク質固定化に利用した報告がある。AGT 融合タンパク質は、選択的にベンジルグアニン (BG) 誘導体に共有結合し、不可逆固定化となる。BG は市販の SPR 用チップのデキストランに結合させて調製された。C 末端にポリ (ヒドロキシアルカノエート) 分解酵素の基質結合領域を遺伝子組み換え法で導入して固定化した例も報告されている。しかし、このような方法は、固定化処理を行った後も捕捉分子が表面に残留する問題がある。

最近、温度応答性のエラスチンと遺伝子組み換え法で融合したタンパク質のマイクロアレイが報告されている^{68,69)}。これは、可逆的に水溶性 (低温) から疎水性凝集 (常温) まで相転移する繰り返しペプチド配列をもつエラスチンを基にしたポリペプチドを利用するものである。マイクロアレイ固定化は常温で行うことができる。このエラスチン誘導体とプロテイン A などとを融合して抗体マイクロアレイを作成したり、カルシウム依存性のカルモデュリンと融合して細胞破砕液からのタンパク質の捕捉・脱離が可能であることを報告している。

1.7 おわりに

生体分子の固体材料上への固定化法は、固定化酵素の開発として、新しい医薬の開発として、また新しいバイオ複合材料の研究として発展してきた。マイクロアレイは、様々な生体分子や細胞を同一の方法で固定化する必要があり、さらに困難を極めるものであるが、それぞれの特徴を

生かした固定化を行うことでより高性能のマイクロアレイ・バイオチップが開発されるものと期待される。

本章は部分的に引用論文 11), *Biomacromolecules*, 2007, 8, 1775-1789, Copyright 2007 American Chemical Society から許可を得て和訳転載した。

文 献

- 1) 伊藤嘉浩, 「コンビナトリアル・バイオエンジニアリングの最前線」, 植田充美編, シーエムシー出版, p. 251-272 (2004)
- 2) 今野博之, 「コンビナトリアル・バイオエンジニアリングの最前線」, 植田充美編, シーエムシー出版, p. 273-280 (2004)
- 3) 関根光雄, 「ナノバイオ計測の実際」, 三原久和, 小島英理, 馬場嘉信編, 講談社, p. 5-18 (2007)
- 4) 佐藤智典, 「ナノバイオ計測の実際」, 三原久和, 小島英理, 馬場嘉信編, 講談社, p. 42-51 (2007)
- 5) 叶直樹, 「ナノバイオ計測の実際」, 三原久和, 小島英理, 馬場嘉信編, 講談社, p. 52-62 (2007)
- 6) 黒岩孝朗, 「新しい DNA チップの科学と応用」, 関根光雄編, 講談社, p. 17-29 (2007)
- 7) 小松康雄, 「新しい DNA チップの科学と応用」, 関根光雄編, 講談社, p. 41-55 (2007)
- 8) 秋田隆, 「新しい DNA チップの科学と応用」 関根光雄編集, 講談社, p. 56-68 (2007)
- 9) D. S. Y. Yeo, R. C. Panicker, L.-P. Tan, S. Q. Yao, *Comb. Chem. High Throughput Screening*, 7, 213-221 (2004)
- 10) M. Cretich, F. Damin, G. Pirri, M. Chiari, *Biomol. Eng.*, 23, 77-88 (2006)
- 11) F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen, *Biomacromolecules*, 8, 1775-1789 (2007)
- 12) B. Guilleaume, A. Buness, C. Schmidt, F. Klimek, G. Moldenhauer, W. Huber, D. Arlt, U. Korf, S. Wiemann, A. Poustka, *Proteomics*, 5, 4705-4712 (2005)
- 13) K. Bussow, D. Cahill, W. Nietfeld, D. Bancroft, E. Scherzinger, H. Lehrach, G. Walter, *Nucleic Acids Res.*, 26, 5007-5008 (1998)
- 14) D. Wang, S. Liu, B. J. Trummer, C. Deng, A. Wang, *Nat. Biotechnol.*, 20, 275-281 (2002)
- 15) W. G. T. Willats, S. E. Rasmussen, T. Kristensen, J. D. Mikkelsen, J. P. Knox, *Protomics*, 2, 1666-1671 (2002)
- 16) S. Fukui, T. Feizei, C. Galstian, A. M. Lawson, W. Chai, *Nat. Biotechnol.*, 20, 1011-1017 (2002)
- 17) F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 14397-14402 (2002)

- 18) M. C. Bryan, O. Plettenburg, P. Sears, D. Rabuka, S. Wacowich-Sgarbi, C. H. Wong, *Chem. Biol.*, **9**, 713-720 (2002)
- 19) K.-S. Ko, F. A. Jaipuri, N. L. Pohl, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 13162-13163 (2005)
- 20) M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown, *Science*, **270**, 467-470 (1995)
- 21) M. Schena, D. Shalon, R. Heller, A. Chai, P. O. Brown, R. W. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **93**, 10614-10619 (1996)
- 22) 「必ずデータが出る DNA マイクロアレイ実践マニュアル—基本原理, チップ作製技術からバイオインフォマティクスまで」, 林崎良英監修, 岡崎康司編, 羊土社 (2000)
- 23) 「DNA マイクロアレイ」, M. Schena 著, 加藤郁之進監訳, 宝酒造 (2000)
- 24) 「わかる! 使える! DNA マイクロアレイデータ解析入門」, S. Knudsen 著, 塩見聡, 松本治, 辻本豪三監訳, 羊土社 (2001)
- 25) 「DNA チップ実験まるわかり」, 佐々木博己, 青木一彦編, 羊土社 (2004)
- 26) 田代康介, 久原哲, 「バイオ解析・診断技術のテーラーメイド医療への応用」, 山本重夫監修, シーエムシー出版, p. 31-42 (2006)
- 27) B. B. Haab, M. J. Dunham, P. O. Brown, *Genome Biol.*, **2**, 4 (2001)
- 28) V. Afanassiev, V. Hanemann, S. Wolf, *Nucleic Acid Res.*, **28**, 1-5 (2000)
- 29) P. Arenkov, A. Kukhtin, A. Gemmell, S. Voloshchuk, V. Chupeeva, A. Mirzabekov, *Anal. Biochem.*, **278**, 123-131 (2000)
- 30) X. Zhou, J. Zhou, *Proteomics*, **6**, 1415-1426 (2006)
- 31) O. Blix, S. Head, T. Mondala, C. Scanlan, M. E. Huflejt, R. Alvarez, M. C. Bryan, F. Fazio, D. Calarese, J. Stevens, N. Razi, D. J. Stevens, J. J. Skehel, I. van Die, D. R. Burton, I. A. Wilson, R. Cummings, N. Bovin, C.-H. Wong, J. C. Paulson, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **101**, 17033-17038 (2004)
- 32) O. Bohorov, H. Andersson-Sand, J. Hoffmann, O. Blix, *Glycobiology*, **16**, 21 C-27 C (2006)
- 33) G. MacBeath, S. L. Schreiber, *Science*, **289**, 176-1763 (2000)
- 34) W. C. E. Schofield, J. McGettrick, T. J. Bradley, J. P. S. Badyal, S. Przyborski, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2280-2281 (2006)
- 35) M. Takahashi, K. Nokihara, H. Mihara, *Chem. Biol.*, **10**, 53-60 (2003)
- 36) E. A. Yates, M. O. Jones, C. E. Clarke, A. K. Powell, S. R. Johnson, A. Porch, P. P. Edwards, J. E. Turnbull, *J. Mater. Chem.*, **13**, 2061-2063 (2003)
- 37) M. Lee, I. Shin, *Org. Lett.*, **7**, 4269-4272 (2005)
- 38) X. Zhou, J. Zhou, *Biosens. Bioelectorn*, **21**, 1451-1458 (2006)
- 39) Z. L. Zhi, A. K. Powell, J. E. Turnbull, *Anal. Chem.*, **78**, 4786-4793 (2006)
- 40) Y. Liu, T. Feizi, M. A. Campanero-Rhodes, R. A. Childs, Y. Zhang, B. Mulloy, P. G. Evans, H. M. I. Osborn, D. Otto, P. R. Crocker, W. Chai, *Chem. Biol.*, **14**, 847-859 (2007)
- 41) Y. Wu, T. Buranda, R. L. Metznerberg, L. A. Sklar, G. P. Lopez, *Bioconjugate Chem.*, **17**, 359-365 (2006)
- 42) Y. Ito, *Biotechnol. Prog.*, **22**, 924-932 (2006)
- 43) Y. Pei, H. Yu, Z. Pei, M. Theurer, C. Ammer, S., Andre, H.-J. Gabius, M. Yan, O. Ramstrom, *Anal. Chem.*, **79**, 6897-6902 (2007)
- 44) Z. Pei, H. Yu, M. Theuer, A. Walden, P. Nilsson, M. Yan, O. Ramstrom, *ChemBioChem*, **8**, 166-

- 188 (2007)
- 45) M. A. Lodhi, G. W. Opperman, ZJ. V. Wall, A. B. Anderson, *NSTI-Nanotech*, **1**, 389-392 (2005)
 - 46) S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science*, **251**, 767-773 (1991)
 - 47) U. Maskos, E. M. Southern, *Nucleic Acid Res.*, **20**, 1675-1678 (1992)
 - 48) R. Frank, *Tetrahedron*, **48**, 9217-9232 (1992)
 - 49) S. Singh-Gasson, R. D. Green, Y. Yue, C. Nelson, F. Blattner, M. R. Sussmann, F. Cerrina, *Nat. Biotechnol.*, **17**, 974-978 (1999)
 - 50) K. R. Bhushan, *Org. Biomol. Chem.*, **4**, 1857-1859 (2006)
 - 51) E. F. Nuwaysir, W. Huang, T. J. Albert, J. Singh, K. Nuwaysir, A. Pitas, T. Richmond, T. Gorski, J. P. Berg, M. McCormick, J. Norton, T. Pollack, T. Sumwalt, L. Butcher, D. Porter, M. Molla, C. Hall, F. Blattner, M. R. Sussman, R. L. Wallace, F. Cerrina, R. D. Green, *Genome Res.*, **12**, 1749-1755 (2002)
 - 52) J. P. Pellois, X. Zhou, O. Srivannavit, T. Zhou, E. Gulari, X. Gao, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 922-926 (2002)
 - 53) X. Gao, X. Zhou, E. Gulari, *Proteomics*, **3**, 2135-2141 (2003)
 - 54) T. R. Hughes, M. Mao, A. R. Jones, J. Burchard, M. J. Marton, K. W. Shannon, S. M. Lefkowitz, M. Ziman, J. M. Schelter, M. R. Meyer, S. Kobayashi, C. Davis, H. Dai, Y. D. He, S. B. Stephaniants, G. Cavet, W. L. Walker, A. West, E. Coffey, D. d. Shoemaker, R. Stoughto, A. P. Blanchard, S. H. Friend, P. S. Linsley, *Nat. Biotechnol.*, **19**, 342-347 (2001)
 - 55) R. D. Egeland, E. M. Southern, *Nucleic Acid Res.*, **33**, e 125 (2005)
 - 56) B. T. Houseman, J. H. Huh, S. J. Kron, M. Mrksich, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 270-274 (2002)
 - 57) B. T. Houseman, M. Mrksich, *Chem. Biol.*, **9**, 443 (2002)
 - 58) M. C. Bryan, F. Fazio, H.-K. Lee, C.-Y. Huang, A. Chang, M. D. Best, D. A. Calarese, O. Blixt, J. C. Paulson, D. Burton, I. A. Wilson, C. -H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 8640-8641 (2004)
 - 59) X. Sun, C. L. Stabler, C. S. Cazalis, E. L. Chaikof, *Bioconjugate Chem.*, **17**, 52-57 (2007)
 - 60) O. Melnyk, X. Duburcq, C. Olivier, F. Urbes, C. Auriault, H. Gras-Masse, *Bioconjugate Chem.*, **13**, 713-720 (2002)
 - 61) J. R. Falsey, M. Renil, S. Park, S. Li, K. S. Lam, *Bioconjugate Chem.*, **12**, 346-353 (2001)
 - 62) 大石真也, 藤井信孝, *化学*, **62**, 68-69 (2007)
 - 63) J. Kalia, N. L. Abbott, R. T. Raines, *Bioconjugate Chem.*, **18**, 1064-1069 (2007)
 - 64) 秋田隆, 「DNA チップ活用テクノロジーと応用」, 久原哲監修, シーエムシー出版, p. 41-58 (2006)
 - 65) M. Schwarz, L. Spector, A. Gargir, A. Shtevi, M. Gortler, R. T. Altstock, A. A. Dukler, N. Dotan, *Glycobiology*, **13**, 749-754 (2003)
 - 66) Y. Chevotot, C. Bouillon, S. Vidal, F. Morvan, A. Meyer, J.-P. Cloarec, A. Jochum, J.-P. Praly, J.-J. Vasseur, E. Souteyrand, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 2398-2402 (2007)
 - 67) N. Winssinger, R. Damoiseaux, D. C. Tully, B. H. Geierstanger, K. Burdick, J. L. Harris, *Chem. Biol.*, **11**, 1328-1330 (2004)
 - 68) D. Gao, N. McBean, J. S. Schultz, Y. Yan, A. Mulchandani, W. Chen, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**,

676-677 (2006)

69) G. Jenikova, U. L. Lao, D. Gao, A. Mulachandani, W. Chen, *Langmuir*, 23, 2277-2279 (2007)

第6章 マイクロアレイ・バイオチップの応用

伊藤嘉浩*

今日マイクロアレイ・バイオチップは先端生命科学における必修の技術になってきており、その応用範囲はますます広がっている¹⁻⁸⁾。ポストゲノム科学として様々なオミクス研究が広がる(表1)⁹⁾とともに、信頼性のある診断方法としても着実に展開されている。本章では、それらについて出来るだけ網羅的にまとめた(表2)。

1 DNA マイクロアレイ (第7章)

最も開発の進んでいる DNA マイクロアレイは学術的利用方法が拡大すると同時に臨床診断に用いられ、近年急速に発展している¹⁰⁾。

1.1 遺伝子配列解析

一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) を調べ、患者一人一人にあわせた個人 (テイラーメイドあるいはオーダーメイド) 医療や疾患の分子レベルでの診断、薬物の効果や毒性に

表1 オミクス研究のいろいろ

用語	定義
バイオミクス	生物学的オミクス研究の総称
セロミクス	生体触媒共存下での細胞機能の研究
デグラドミクス	プロテアーゼ活性の研究
ゲノミクス	遺伝子マッピング, 配列解析, 機能解析を含むゲノムの研究
ペプチドミクス	ペプチドの研究
ファーマコゲノミクス	遺伝子発現への薬剤の効果の研究
ケミカルゲノミクス	遺伝子発現への化合物の効果の研究
ファーマコプロテオミクス	プロテオームへの薬剤の効果の研究
プロテオゲノミクス	ゲノミクスとプロテオミクスの研究
プロテオミクス	細胞タンパク質の研究
トランスクリプトーミクス	mRNA 発現の研究

* Yoshihiro Ito (独)理化学研究所 伊藤ナノ医工学研究室 主任研究員

表2 研究されているマイクロアレイ

マイクロアレイ固定化物	対象物	対象物の詳細	応用編の該当章と引用文献番号
DNA	生体分子	DNA	第7章, 1~10
		RNA	第7章, 11
RNA		RNA	6
タンパク質		タンパク質	第8章, 1~9, 12~20
タンパク質ドメイン		タンパク質	21~26
細胞抽出物		タンパク質 (リバースプロテインアレイ)	27
抗体		タンパク質	第9章, 28~34
低分子化合物		タンパク質, 酵素, 細胞抽出物	第10章, 41, 42
抗原 (含アレルギー, 自己抗原, ハプテン)		抗体	43~72
ペプチド		タンパク質	第11章, 73~76
糖鎖		抗体, レクチン	第12章, 77~81
レクチン		糖鎖	第13章, 82
細胞		抗体	83, 84
組織		抗体	85~89
DNA, RNA	細胞	細胞 (リバーストランスフェクション)	第14章第1節 90~94
抗体		細胞	第14章第2節 95~97
タンパク質			98~100, 105
ペプチド			第14章第3節 101, 102
糖鎖			103, 104
生分解性高分子			106, 107

についての個人差の予想を行おうとするファーマコゲノミクスは、すでに実用化が始まっている。例えば、「ハーセプチン」投与とセットになった検査が実施されており、2004年になってがん治療薬の「イレッサ」の効き目と上皮細胞成長因子受容体 (EGFR) 変異の多型との相関が明らかになってきた。そして、DNAチップとして最初に欧米で認可されたのは、Roche社のAmpliChip CYP450である。これは、酵素として多くの薬剤を代謝することで知られているチトクロームP450の遺伝子の多型を調べるものである。多型は遺伝的差異によるもので、薬剤代謝能力の個人差の素因となるため、個人ごとの薬物の治療効果や副作用の発現の可能性を調べることができ

る。日本では、24テスト分が1,423,800円で販売されている。現在、SNP解析用には様々な研究機関や企業からDNAマイクロアレイが開発されている。

1.2 遺伝子発現解析

遺伝子の発現解析は、DNAではなく細胞内で発現されるRNAを検出するものである。DNAマイクロアレイで解析され、各種疾患との相関が研究され、予後予測に用いる試みが、DNAチップの発展とともに広く行われるようになり、DNAマイクロアレイ発展の牽引役となってきた。

しかし、一方では遺伝子とタンパク質の発現と分解に“時差”があることや、最近では、non-coding RNAが見出されてきている状況もあり、さらにプロテオーム解析によって得られたデータをマイニングする際に、DNAチップ解析のデータを参照することは難しいとする報告もあった。そのような中、オランダのベンチャー企業 Agendia 社が、70余りの遺伝子で乳がんの予後を診断するDNAマイクロアレイ「Mammaprint」を上市することに成功した。切除された腫瘍における遺伝子発現を一度に調べ、遠隔転移リスクを数値化するものである。発現解析用マイクロアレイ研究は、マイクロアレイの中核となるもので、様々な研究機関や企業が、様々な遺伝子をターゲットとして研究開発が進められている。

1.3 CpGメチル化検出

近年、ゲノムの塩基配列に依存しない遺伝子発現制御機構を研究するエピジェネティクスが急速に進展している。そしてその主要な制御機構として、シトシンのメチル化、ヒストンの修飾が知られてきた。シトシンがメチル化をうけると遺伝子発現は抑制（サイレンシング）され、脱メチル化されると発現が起こる。真核生物の遺伝子プロモーター領域にはCpG塩基配列が多く含まれる領域がありCpGアイランドと呼ばれ、この領域のメチル化が発がんに関係していることが明らかにされている。そこで、DNAマイクロアレイを用いた解析法が研究されている⁶⁾。

1.4 ChIP-chip法

転写、複製といった染色体機能（遺伝情報の制御）はDNA-タンパク質相互作用である。この研究方法として、DNAチップ上でのクロマチン免疫沈澱法（Chromatin Immuno-precipitate）であるChIP-chip法が開発された。これは、細胞を化学固定化した後、破碎し、抗体を用いて免疫沈澱させ、その後DNAを増幅し、そのDNAをDNAマイクロアレイ（ゲノム配列網羅的なタイピングアレイが必須）で分析する手法である。これによりDNAのどの部分とタンパク質が相互作用しているかを知ることができるため、その有用性から多くの研究が行われている⁵⁾。