

# ラマン分光法による疾患関連分子の検出法の開発

田中裕之, 沼田靖

日大工・生命

## 【序論】

我々のグループでは疾病関連物質の定量分析をラマン分光法で行うことを目標としている。今年度はアミノ酸、脂質、および糖についての実験を行った。アミノ酸では生理機能を有するいわゆる機能性アミノ酸の定量法を確立した。脂肪酸ではトランスとシスの異性体混合溶液における定量を行い、糖ではグルコースの構造異性体のスペクトルの違いからそれぞれの異性体の定量を行った。また、可視領域と近赤外の励起光で得たスペクトルを比較した。

## 1. なぜラマン分光法による定量法なのか？

今年度の結果を説明する前に、まずラマン分光を定量分析に利用する理由について述べたい。ラマン分光法は赤外線吸収スペクトル(IR)と同様、分子の振動準位を測定することが可能であり、定量分析というよりも分子構造の知見を得ることに主に使われてきた。もし、この分光法が定量分析に適応できればさまざまな利点がある。

図 1 にラマンスペクトルのエネルギーダイアグラムを示す。図中の  $S_0$ 、および  $S_1$  はそれぞれ、基底電子状態と励起電子状態を表している。また、 $S_0$  状態にはいくつかの振動準位があり、それを短い実線で表している。分子にレーザーのような強い光を照射すると分子は仮想的な状態(図中の破線まで)に励起さ

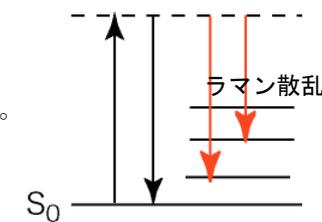


図 1 Energy diagram of Raman scattering.

れ、散乱が起こる。この散乱には二つのタイプの散乱光がある。一つは入射レーザー光と同じエネルギーをもつレイリー散乱であり、その低エネルギー側に現れる強度の弱い散乱光をラマン散乱という。これはちょうど分子の振動準位に相当するところにピークが現れる。図 2 にラマンスペクトルの模式図を示す。レイリー散乱からラマン散乱までのエネルギー差(一般的に波数、 $\text{cm}^{-1}$ の単

位で表すことが多い)が基底電子状態の振動準位となる。

$N$ 個の原子からなる分子の振動の自由度は  $3N-6$  (直線分子では  $3N-5$ ) となるので、ほとんどの分子でピークが現れる。

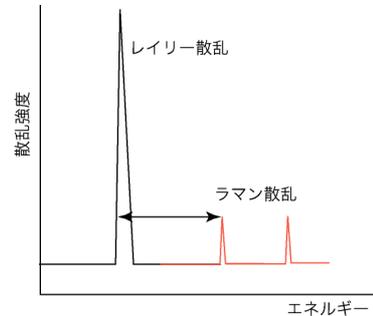


Fig. 2 Schematic Raman spectrum.

IR スペクトルも振動状態間の遷移であるので、同じエネルギー準位の情報が得られるが、スペクトルの選択則のため IR スペクトルには水素のような二原子分子は測定できない。しかし、ラマンスペクトルはそれら分子も測定可能である。

次の利点としては IR では水のピークが非常に大きく現れるがラマンスペクトルにはそのピークがあまり大きく現れないので、水溶液中の分子の定量も可能な点である。

また、分解能が良いので多成分系の定量にも利用可能である。

しかしながら、このような利点があるにも関わらず、ラマン分光法はこれまで定量分析にはあまり使われてこなかった。なぜなら、ラマン分光法は散乱現象を利用しているため、その散乱強度がレーザーパワーに大きく依存するからである。近年、レーザーパワーの影響を排除するために標準物質とのラマン強度比を用いる方法が行われるようになってきた。以前、我々の研究においても溶媒を内部標準に用いてフィトケミカルであるケルセチンの定量を行ったり<sup>1)</sup>、あらかじめ測定した物質を外部標準に用いて、発酵気体である水素、メタンおよび二酸化炭素の同時定量<sup>2)</sup>や水-アルコール混合溶液の定量分析を行ったりしてきた<sup>3)</sup>。

現在、これらの研究をもとに疾病関連物質の定量分析をラマン分光法で行っている。その研究の一環として、平成 26 年度は生体物質で重要なアミノ酸、脂質および糖について実験を行った。

## 2. 本年度の結果

### (1) アミノ酸

本年度は機能性アミノ酸の定量を行った。用いたアミノ酸は鎮静作用のあるキョートルフィン、動脈硬化防止に効果のあるシトルリンおよび疲労回復に効果のあるカルノシンをターゲットとした。図3にキョートルフィンおよびそれを構成するチロシンとアルギニンのラマンスペクトルを示す。

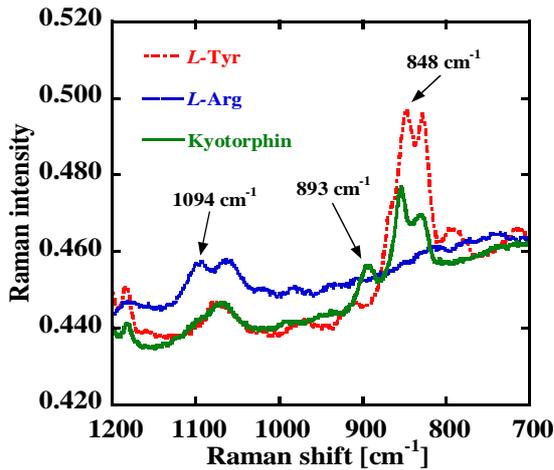


Fig. 3 Raman spectra of amino acids and peptides.

ジペプチドであるキョートルフィンは構成アミノ酸のピークが主に観測されるが、893 cm<sup>-1</sup>にキョートルフィンにのみ現れるピークが観測された。これはペプチド結合に由来するピークと考えられる。このピークの強度比を濃度に対してプロットすることにより検量線を得た。Fig. 4にキョートルフィンの検量線と比較のためにチロシンとアルギニンの検量線も示す。いずれのアミノ酸についても良い直線性を示しており、ジペプチドとその構成アミノ酸がラマン分光法によって定量できることを明らかにした。シトルリンやカルノシンも同様な実験を行い、検量線は濃度に

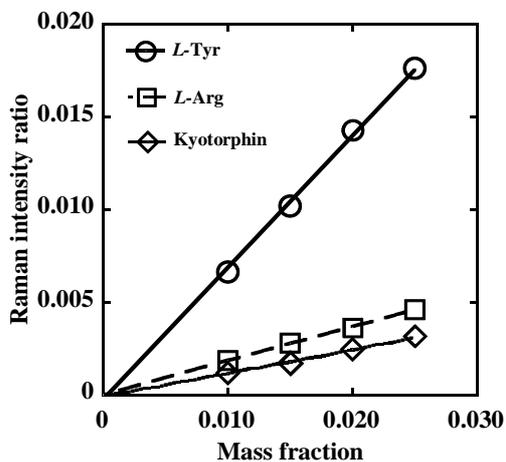


Fig. 4 Calibration curves of amino acids and peptides.

対して比例していることが分かった。

### (2) 脂肪酸

トランス脂肪酸は LDL コレステロールを増加させるといわれている。トランス脂肪酸は天然油にはほとんど含まれていないが硬化油を製造する過程や油の酸化時に生成される。本研究ではシス体であるオレイン酸とそのトランス体(エライジン酸)の定量分析を行った。図5にシス体とトランス体のラマンスペクトルを示す。

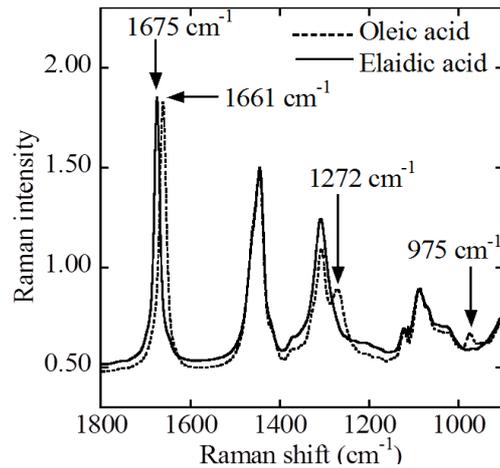


Fig. 5 Raman spectra of Oleic and Elaidic acids

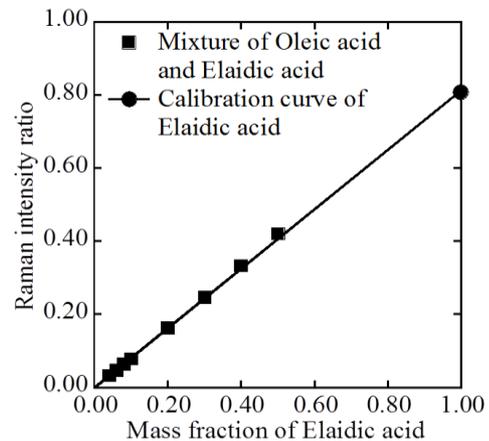


Fig. 6 Calibration curve of Elaidic acid.

1670 cm<sup>-1</sup> 付近のバンドが分離されて観測される。これは二重結合の構造異性によるものであり、1675、および 1661 cm<sup>-1</sup>のピークはそれぞれ、トランス体とシス体に帰属された。種々の濃度で測定し、図6にトランス体のラマン強度比を濃度に対してプロットした図を示す。濃度に対してラマン強度比は比例した。シス体も同様なグラフが得られた。この結果からラマン強度比から各脂肪酸の濃度が決定できることを明らかとした。

### (3) 糖

糖の構造を知るためにラマンスペクトルを測定した。図7にグルコース、ガラクトースおよびマンノースのラマンスペクトルを示す。

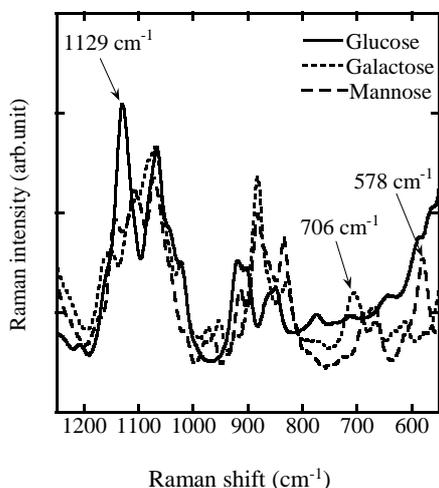


Fig. 7 Raman spectra of saccharides

ヒドロキシ基が異なるだけで大きなスペクトル変化が観測された。この理由については現在、分子軌道計算による振動数解析を行っているところである。各糖固有のピーク（グルコース、ガラクトースおよびマンノースはそれぞれ、1129, 578, 706 cm⁻¹）を用いて検量線を作成したところ濃度に対してラマン強度比は比例することが分かった。

### (4) 532 nm と 785 nm 励起のラマンスペクトル

現在、当研究室のラマン分光装置は励起光に488 nm または 532 nm のレーザーを用いている。しかし、このような短波長を励起光に用いた場合、蛍光物質が含まれていると蛍光が強く現れて、ラマンピークが観測されなくなることがある。特に生体物質を用いる場合、注意が必要となる。蛍光を押さえ、ラマンスペクトルを測定するひとつの方法として長波長のレーザーを励起光として用いる場合がある。図8(a)に鶏胸肉からアミノ酸を抽出した試料の532 nm 励起によるラマンスペクトルを示す。このスペクトルは蛍光が強く現れピークが観測できなかった。そこで、785 nm 励起 (Renishaw inVia) でラマンスペクトルを測定したところ、蛍光が消失し、ピークが観測された(図8bの黒線)。しかしこのピークはカルノシンとは一致せず、他のアミノ酸も多く抽出されたと考えられる。

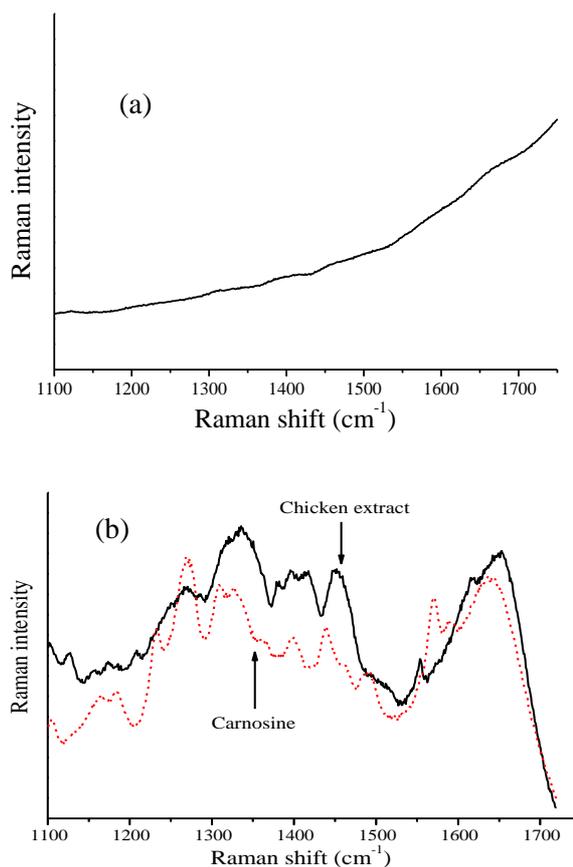


Fig. 8 Raman spectra with (a) 532 nm and (b) 785 nm excitation.

平成 27 年度

この結果をもとに、今年度ではより疾病診断に利用できる系での実験や疾病のメカニズムの解明に役立つ系での実験を行う予定である。

具体的には細胞の認識などで重要な役割を果たしているといわれているシアル酸である。種々のシアル酸とその誘導体のラマンスペクトルを測定することにより、それらの構造の知見や定量法の確立を目指す。また、今年度から分担者に糖質工学を専門としている小林先生に入っていたので、種々の糖鎖においてどんな糖がどのような順序で結合しているかという分析法の確立も行う予定である。

### 【参考文献】

1. Numata, Tanaka, *Food Chemistry*, **126**, 751-755, (2011).
2. Numata, Shinohara, Kitayama, Tanaka, *Process Biochemistry*, **48**, 569-574 (2013).
3. Numata, Iida, Tanaka, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, **112**, 1043-1049, (2011).

# 次世代高機能血管カテーテルシステムの開発

根本修克<sup>1)</sup>, 春木 満<sup>1)</sup>

1) 日大工・生命

## 【緒論】

Haptic 技術を血管カテーテルに応用することにより血管壁の硬さを計測することができ、安全なカテーテル操作が可能となる。また、脳血栓治療用 Ni-Ti ガイトドワイヤー (Chameleon Wirer) を使用することにより、血栓除去の可能性が認められた。本研究課題では、これらを組み合わせた次世代高機能血管カテーテルシステムを開発することを目的としている。また、脳血管疾患の治療に用いられるカテーテルでは、バルーンの膨張・収縮時に穿孔が生じたり、潤滑性コーティングが剥離するといったことが問題となっており、より高い耐穿刺性や潤滑性の保持能を有する材質が求められている。

一方、ポリジメチルシロキサン (PDMS) は、柔軟性、疎水性、耐熱性、ガス透過性、化学的・生理学的不活性といった特性を有するポリマーであり、周辺組織との癒着や炎症を起こさず、抗血栓性にも優れていることから、現在、ポリウレタン共に医療用カテーテルの代表的な素材として利用されている。しかし、柔軟性が高すぎることからハンドリングが難しくなること、さらには、同種・異種材料との相互作用が弱いため、材料表面にハイドロゲルなどの他材料をコーティングし加工することが困難である二つの問題点が存在する。

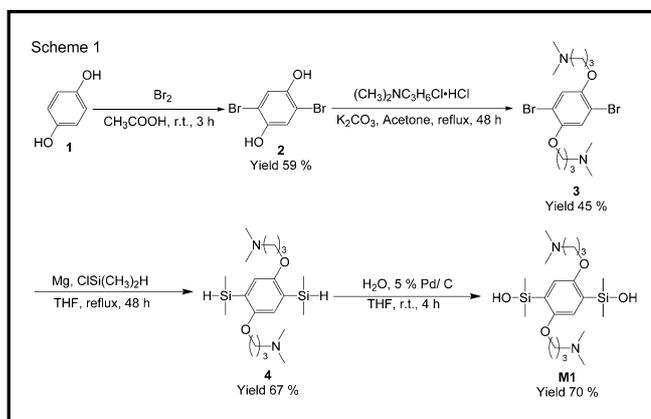
本研究課題では、極性の高いスルホベタイン基を側鎖部位に有する芳香環をポリジメチルシロキサンの主鎖中に導入することで、シリコンゴム材料に適度な柔軟性と材料間の強い相互作用を付与できるものと考え新規ゴム材料の創製を行うことを目的としている。スルホベタイン基は親水性を示す双性イオン性基で、水溶液中で周囲の水分子の構造を乱だしにくく、人体における幅広い pH 領域においても、そのイオン構造を保持することができることから生体材料に利用可能な置換基として研究されている。以上のような背景から、具体的には、双性イオン性基を導入したポリ(テトラメチルシリラーレンシロキサン)とポリジメチルシロキサンおよびポリメチルビニルシロキサンとの共重合体を合成し、チオール-エンクリック反

応を利用した架橋反応により当該シリコンゴム創製を行うことを本研究の目的とした。

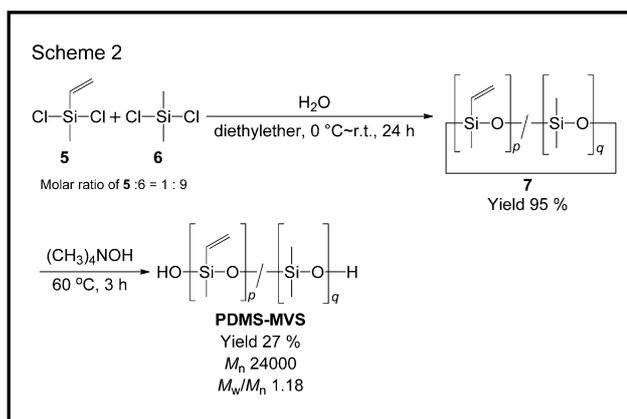
## 【実験および結果】

### (1) モノマー合成

本研究課題では、ポリシロキサン誘導体に同種あるいは異種高分子材料との相互作用を付与し、接着性などの加工性を向上させるために、ポリ(テトラメチルシリラーレンシロキサン)誘導体の芳香環部位に双性イオン性基を導入することを計画した。熱安定性に優れ、置換基の導入も比較的容易に行うことが可能な芳香環部位としてベンゼン骨格を有し、ベンゼン環上に双性イオン性基導入可能部位、すなわち三級アミン部位を有するポリ(テトラメチルシリラーレンシロキサン)誘導体を合成した。具体的な合成経路を Scheme 1 に示す。



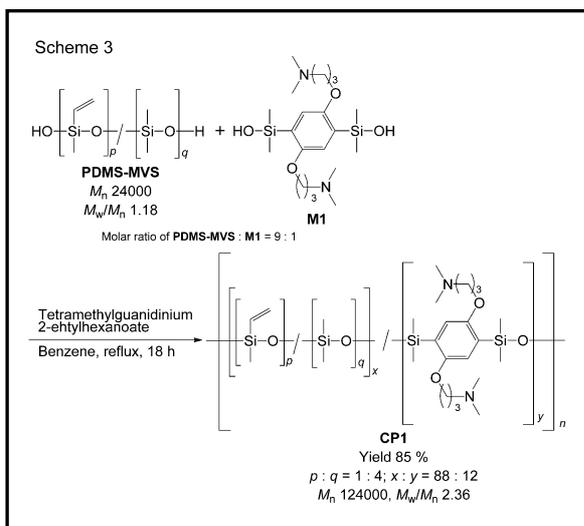
### (2) ポリ(ジメチルシロキサン-メチルビニルシロキサン) (PDMS-MVS) の合成



**M1** を用いたマルチブロック共重合体合成を行うためのもう一つの原料となるポリ(ジメチルシロキサン-メチルビニルシロキサン) (**PDMS-MVS**) を Scheme 2 にしたがって合成した。得られた **PDMS-MVS** の SEC クロマトグラムが単峰性を示したことから、ランダム共重合体 **PDMS-MVS** が得られたことを確認した。

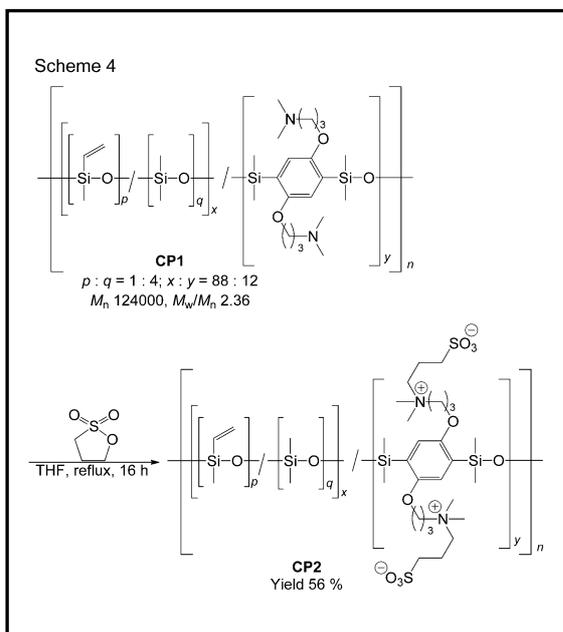
### (3) マルチブロック共重合体の合成

次に、**PDMS-MVS** および **M1** を用いたマルチブロック共重合体合成を Scheme 3 にしたがって行った。



得られたマルチブロック共重合体 **CP1** の SEC クロマトグラムが単峰性を示したことから、マルチブロック共重合体 **CP1** が得られたことを確認した。

さらに、得られた **CP1** を用いて、Scheme

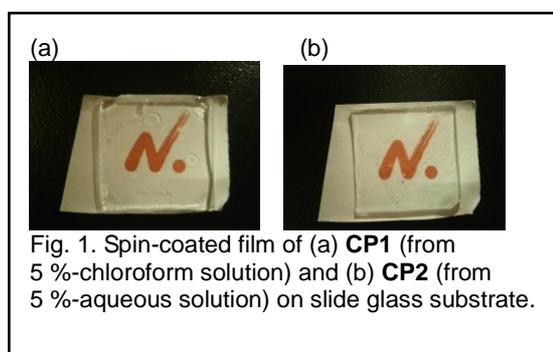


4 にしたがって、スルホベタイン基の導入を行った。マルチブロック共重合体 **CP1** は、酢酸エチル、ベンゼン、クロロホルム、ジクロロメタン、ジエチルエーテル、ヘキサン、THF、トルエンといった汎用有機溶媒に溶解したが、スルホベタイン基を導入した **CP4** は有機溶媒に溶解せずに水のみで溶解することが明らかとなった。

### (4) 薄膜形成

**CP1** はその 5%クロロホルム溶液から、また、**CP2** はその 5%水溶液をガラス基板上にスピコートすることにより成膜することが可能であった。

得られた薄膜を Fig. 1 に示す。いずれも透明

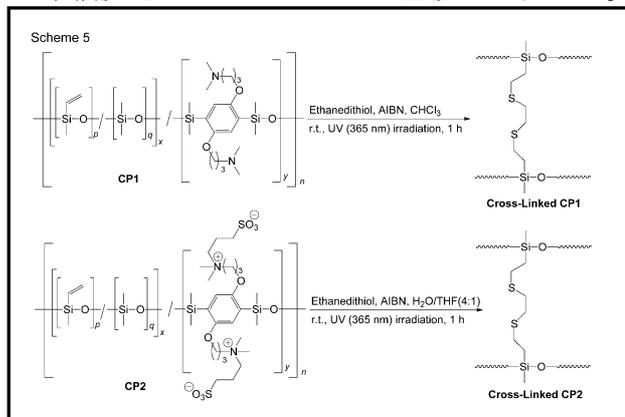


な薄膜が得られることが明らかとなった。

### (5) チオール-エンクリック反応による架橋体合成

さらに、得られたマルチブロック共重合体 **CP1** および **CP2** を用いて、Scheme 5 にしたがって、チオール-エンクリック反応による架橋体合成を行った。

架橋反応はスライドガラス基板上で行った。

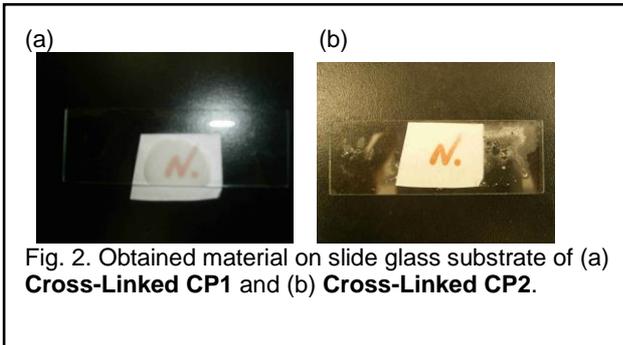


反応後、アセトン、エタノールで架橋体を洗浄し、減圧乾燥したところ、**Cross-Linked CP1** からはガラス基板上に薄膜を得ることができたが、**Cross-Linked CP2** はガラス基板上で吸着凝集した粉末状の架橋体を得る

にとどまった。得られた架橋体を Fig. 2 に示す。

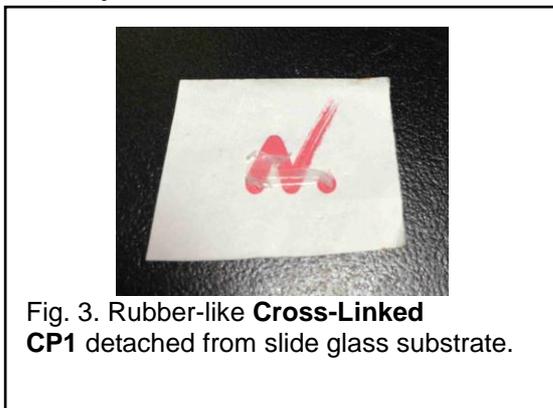
また、**Cross-Linked CP1** はガラス基板上から剥離することが可能であった。Fig. 3 に

うな状態となるが、放置すると元の形状に戻った。このシリコーンゴムは適度な堅さを有しているものと推察されるが、その力学的特性や表面特性および生体適合性を明らかにすることが今後の課題となる。



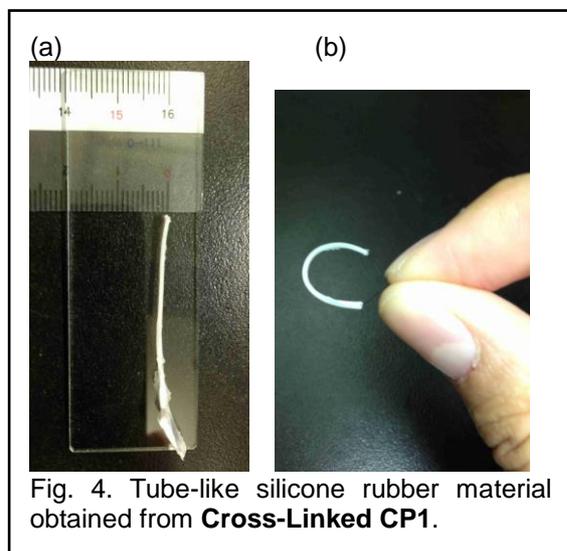
ガラス基板上から剥離した **Cross-Linked CP1** を示す。

**Cross-Linked CP1** からの自立膜形成が確認できた。



さらに、**Cross-Linked CP1** をエタノールで洗浄し続けるとガラス基板上から遊離し、Fig. 4 に示すようなチューブ状のゴム状物質が得られた。

太さは 1 mm 程度であり、髪の毛を通すことができる。これを折り曲げると Fig. 4(b)のよ



# 環境応答型蛍光性新規デオキシアデノシン誘導体の 合成と遺伝子診断プローブへの応用

齋藤義雄

日大工・生命

## 【序】

我々はこれまでに、溶媒極性の変化に伴い蛍光発光色が変化する種々の環境応答型蛍光核酸を報告している<sup>1),2),3)</sup>。最近では、粘度環境変化に伴って分子の平面-ねじれ構造が変化し、それに応じて波長の短い LE 発光と波長の長い ICT 発光の2種類の発光が切り替わる新しい環境応答型蛍光核酸塩基の開発に成功している<sup>2)</sup>。この修飾塩基を含むオリゴデオキシヌクレオチド鎖は、マッチであるチミンと水素結合を形成した際に、DNA メジャーグループに突き出された蛍光色素部位が、ねじれ構造になることで LE 発光を示すことが明らかになっている。従って、相補鎖側の相手塩基のマッチ-ミスマッチの違いによって、発光モードが切り替わることで、より鋭敏に発光波長を変化させて識別することができる遺伝子プローブとして有用である。しかしながら、この蛍光核酸は近傍の GC 塩基対などによって強い蛍光消光をうけてしまうために、塩基配列に制限されることなく、より塩基識別能に優れた新規な蛍光核酸プローブの開発が求められる。本研究では、LE 発光と ICT 発光の2種類の発光を示す新たな蛍光核酸のデザイン、および DNA 二重鎖

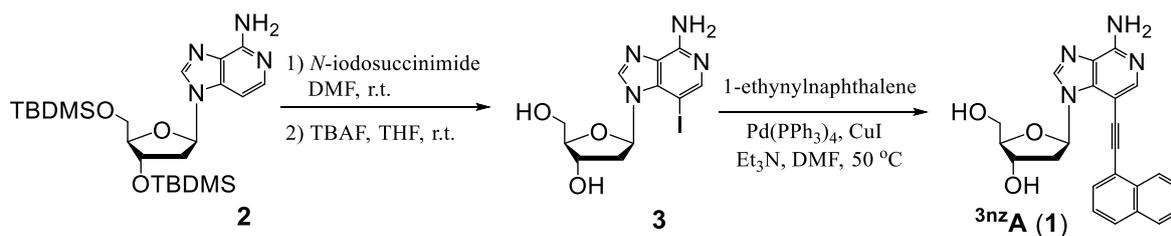
構造を形成した際に、溝の幅が狭いマイナーグループに、修飾基（蛍光色素部位）が位置することで、修飾塩基が共平面構造をとることが期待できる3位置換3-デアザプリンヌクレオシドの開発を目指した。

## 【実験】

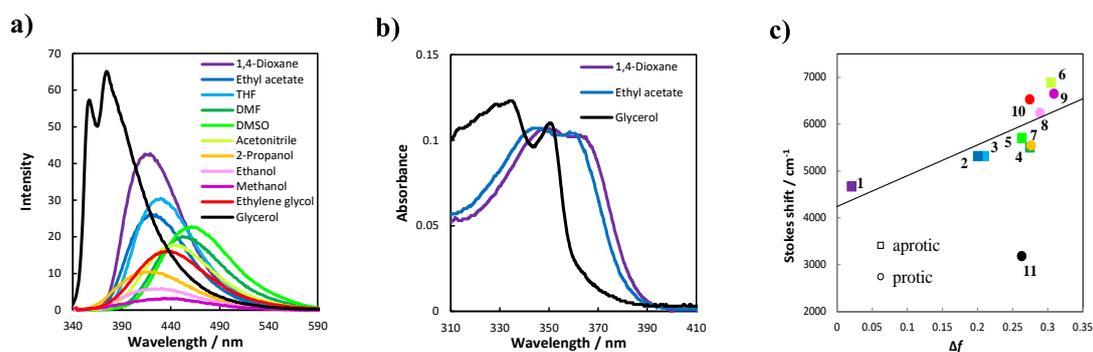
まず、既報により合成した3',5'-ビス-*O*-(*tert*-ブチルジメチルシリル)-3-デアザ-2'-デオキシアデノシン<sup>2)</sup>から、ヨウ素化、TBDMS 基の脱保護の二段階を経て3-ヨード-3-デアザ-2'-デオキシアデノシン<sup>3)</sup>を得た。続いて<sup>3)</sup>と1-エチルナフタレンとを菌頭反応により、カップリングすることで目的化合物である<sup>3nz</sup>A(1)を合成した(Scheme 1)。得られた<sup>3nz</sup>A(1)を様々な極性や粘性の異なる溶媒中での蛍光、吸収スペクトルの測定を行った(Figure 1(a)-(c))。

## 【結果と考察】

粘度の高いグリセロール中では、振動構造を伴った短波長領域での発光が観測された(Fig.1a)。<sup>3nz</sup>A(1)は、基底状態では、3-デアザアデニン-ナフタレン骨格間にかけて、ねじれ構造をとっており、グリセロール中で観測



Scheme 1. Synthesis of 3-deaza-2'-deoxyadenosine derivative <sup>3nz</sup>A (1)



**Figure 1.** (a) Fluorescence spectra of  $^{3nz}\mathbf{A}$  (**1**, 10  $\mu\text{M}$ ) in various solvents. (b) Absorption spectra of  $^{3nz}\mathbf{A}$  (**1**, 10  $\mu\text{M}$ ) in 1,4-dioxane, ethyl acetate and glycerol. (c) Lippert-Mataga plot showing the Stokes shift of  $^{3nz}\mathbf{A}$  (**1**) as a function of solvent orientation polarizability ( $\Delta f$ ): 1, 1,4-dioxane; 2, ethyl acetate; 3, THF; 4, DMF; 5, DMSO; 6, acetonitrile; 7, 2-propanol; 8, ethanol; 9, methanol; 10, ethylene glycol; 11, glycerol. Glycerol data spot was omitted in the linear model fitting.

された発光は、分子周辺の粘度環境が高いために、分子の回転が抑制されたことによって現れたナフタレン骨格由来の LE 発光であると考えられる。一方、低粘度溶媒中では、 $\pi$  共役の拡張を示すブロード化と長波長シフトを伴う蛍光スペクトルを示した。また、高粘度溶媒のグリセロール中に比べて極大吸収波長の長波長シフトが観測されたことから新たな共役系を形成していることが確認できた(**Fig.1b**)。すわなち、低粘度溶媒中では、3-デアザアデニン-ナフタレン骨格との間で、自由に分子回転が可能になるために、共平面構造を形成していると考えられる。また、非極性溶媒の 1,4-ジオキサン中では 417nm の発光を示したのに対して、極性の高い DMSO 中では 461nm の発光が観測された ( $\Delta\lambda = 44$  nm)。さらに、溶媒の極性のパラメータ  $\Delta f$  と各溶媒中で観測されたストークスシフト値をプロットすると、 $^{3nz}\mathbf{A}$ (**1**)の蛍光スペクトルは、溶媒の極性の増加に伴い、長波長シフトすることが確認できた(**Fig.1c**)。従って、この化合物は、分子構造がねじれている状態では、LE 発光を示す一方で、共平面構造をとると、溶媒極性に伴う ICT 発光を示すことが明らかとなった。

そこで、 $^{3nz}\mathbf{A}$ (**1**)をホスホロアミダイト化した後に、DNA 自動合成機により目的とする ODN 鎖へ導入した。合成した  $^{3nz}\mathbf{A}$ (**1**)を含む

オリゴデオキシヌクレオチドプローブは、相補鎖の相手塩基がマッチとなるチミンの場合にのみ、ICT 由来の発光が観測されたことから、発光波長変化で対面塩基の識別を行うことに成功した。また、修飾塩基の近傍に GC 塩基対が存在するような配列でも蛍光消光を受けないことが確認できた。本発表では、それらの詳細について報告する。

#### 【参考文献】

- 1) Suzuki, A. Takahashi, N. Okada, Y. Saito, I. Nemoto, N. Saito, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 886.
- 2) Saito, Y. Suzuki, A. Okada, Y. Yamasaka, Y. Nemoto, N. Satio, I. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 5684.
- 3) Suzuki, A. Nemoto, N. Saito, I. Saito, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 660.
- 4) Minakawa, N. Sasabuchi, Y. Kiyosue, A. Kojima, N. Matsuda, A. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, 44, 288.

# 翻訳後修飾による細胞機能制御機構の解明

岸 努, 日大工・生命

## 【緒論】

細胞内で合成されたタンパク質の活性や機能は、修飾を受けることにより調節される。翻訳後修飾は多くの場合可逆的であるため、細胞内の調節経路や情報伝達経路のスイッチのON・OFFの制御に重要な働きをしている。このような修飾系として、リン酸化やアセチル化などの他に、ユビキチンやスモ1というタンパク質が付加されるユビキチン化、スモ1化などが知られている。

遺伝学を用いた研究から、ユビキチン化やスモ1化が、細胞周期、細胞内情報伝達、DNA複製、DNA損傷修復、発生・分化など様々な生命現象の制御に必須であることがわかってきたが、そのメカニズムは多くの場合、未解明である。その理由の一つとして、ユビキチン化あるいはスモ1化されるタンパク質の多くが未解明であることによる。

これまで、ユビキチン化あるいはスモ1化されるタンパク質を系統的スクリーニングする遺伝手法 (conditional two-hybrid システム) を、酵母細胞を用いて開発し、ユビキチン化あるいはスモ1化される新規タンパク質の同定・機能解析を用いて行ってきた(1-4)。昨年度は、同定したタンパク質のユビキチン化あるいはスモ1化の生理的意味を解明することを目的として研究を行った。

## 【研究経過】

### 1. DNA 損傷修復に関与する Ssu4 タンパク質のスモ1化機構の解明

conditional two-hybrid システムを用いたスクリーニングにより、DNAの安定性の維持とDNA

損傷修復に機能する酵母 Ssu4 がスモ1化の基質であることを見いだした。

Ssu4のスモ1化は、DNA損傷とDNA複製フォークの停止による一本鎖DNAの露出を引き起こす薬剤であるMMSの濃度に依存して増加した。一方、DNA複製フォークの停止をもたらすHUでは、Ssu4のスモ1化は減少した。したがって、Ssu4のスモ1化はDNA損傷応答に機能していることが推測される。またスモ1部位を特定したので、このリジンをアルギニンに置換した変異型 Ssu4 を発現する細胞を用いて、DNA損傷応答を調べる予定である。

### 2. 転写因子 Swi5 の分解による細胞周期制御機構の解明

すでに、細胞周期 G1 初期に活性化される転写因子 Swi5 がユビキチンリガーゼ SCF<sup>Cdc4</sup> により G1 中期ユビキチン化・分解されること、このユビキチン化は Swi5 のリン酸化に依存すること、リン酸化部位をアラニンに置換した Swi5 はユビキチン化を受けずに安定化すること、この安定化型 Swi5 を発現する細胞は、S 期開始、染色体の分離、M 期終了のいずれもが阻害されることを明らかにした。

そこで、Swi5 の分解の時期がどのように決められているのか明らかにするために、Swi5 のユビキチン化に必要なキナーゼの同定を行った。その結果、サイクリン依存キナーゼ CDK5 のホモログである Pho85 が関与することを明らかにした(5)。Pho85 はサイクリンサブユニットと結合して活性化される。そのサイクリンは 10 種類存在し、それぞれが特異的な機能を果たすことが知ら

れている。これら 10 種類のサイクリンのうち、Pc12 と Pc19 は Swi5 に依存して転写される。そこで、Swi5 のユビキチン化が、Pc12/Pho85 あるいは Pc19/Pho85 によるフィードバック制御を受けるという作業仮説を立てて検証している。

また、安定化型 Swi5 の発現が染色体分離の阻害を引き起こす機構について調べた。ノコダゾールで M 期中期より同調培養を行いガラクトースで誘導可能な *GAL1* プロモーターより安定化型 Swi5 を発現すると染色体分離が阻害されるが、この阻害は Swi5 が転写する Sic1 の過剰発現による CDK 活性の低下に依存した。さらに、紡錘体チェックポイントを制御する *MAD2* を欠損すると染色体分離は回復した。以上のことから、CDK は紡錘体チェックポイントを制御すること、さらにこの制御に Swi5 の分解が関与することが示唆される (6)。

### 3. ユビキチン化を標的とした新しい薬剤スクリーニング系の開発

すでに、ユビキチンリガーゼ SCF の新規基質として、カルシウム情報伝達系の一つであるカルシニューリン・シグナリングのフィードバック阻害因子 Rcn1 を同定した。またそのヒトホモログである DSCR1 もユビキチン化されることを明らかにしている。

創薬上、DSCR1 は興味深い特性を持っている。DSCR1 は、がん細胞における血管新生の抑制や臓器移植による拒絶反応を引き起こすインターロイキン 2 の発現抑制を制御する。またダウン症の患者において DSCR1 は高発現化しており、ダウン症の患者に神経疾患をひき起こす。DSCR1 のユビキチン化は、DSCR1 が SCF ユビキチンリガーゼによって識別されることで引き起こされる。したがって、両者の結合を促進あるいは促進する薬剤は、新しい抗がん剤や免疫抑制剤あるいはダウン症

の治療薬となり得る。

このような薬剤のスクリーニングには、ユビキチンリガーゼとその基質の結合を検出・定量する系が不可欠である。そこで conditional two-hybrid を用いて DSCR1 と SCF ユビキチンリガーゼの結合を安定的に検出する系の作製を行っている。

#### 【参考文献】

1. T. Kishi et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 2007: 104, 17419-17423
2. T. Kishi et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 2008: 105, 14497-17502
3. S. Mimura et al. *EMBO J.* 2009: 28, 3693-3705
4. Y. Liu et al. *Mol. Biol. Cell* 2011: 222, 1575-1584
5. H. Hayashi et al. *Genes Genet. Syst.* 2014: 89, 332
6. N. Watanabe et al. *Genes Genet. Syst.* 2014: 89, 332

# 【癌や脳疾患等に有効な生理活性物質の合成と改良】 ポリケタイド合成酵素の蛋白質工学とゲノム工学

平野 展孝  
日大工・生命

## 【背景・目的】

植物由来ポリケタイドには、ウコンのクルクミンや、ブドウのレスベラトロールなど、抗腫瘍作用や抗酸化作用など様々な生理活性を持つものが存在する。これらの天然物は植物からの抽出によって生産されているが、近年のバイオテクノロジー分野において、有用生理活性を持つこれらの誘導体を、微生物や酵素によって生合成する手法が注目されている。しかし、従来のプラスミド上への遺伝子導入では、導入 DNA 鎖長に限界が有るため、多種類の生合成遺伝子が反応に関与する生合成系への適応が困難になっている。この問題を解決するため、本研究では、大腸菌ゲノム上へ導入した生合成系遺伝子群からのポリケタイド生合成を目標とした研究を行う。

## 【方法・結果】

平成 26 年度は、比色定量が容易な放線菌が生産する赤色色素化合物であるフラビオリン（図 1）をモデル化合物として、放線菌 TG1 インテグラーゼによる部位特異的遺伝子導入法を用いて大腸菌ゲノムへのフラビオリン生合成遺伝子（*rppA* & *momA*）の導入を行い、大腸菌によるフラビオリン生合成を行った。

TG1 インテグラーゼを用いて、大腸菌ゲノム上の 5 ヶ所にフラビオリン生合成遺伝子を導入し、プラスミド上に生合成遺伝子を導入した場合と、生合成産物量を比較した。その結果、いずれのゲノム上部位に導入しても、プラスミド上に生合成遺伝子を導入した場合と比較して、合成量が約 1/2 に減少する結果を得た。この結果は、プラスミド上と比較して、ゲノム上に遺伝子導入した場合、遺伝子のコピー数が減少するため、酵素の発現量も減少することに起因していると予想される。

## 【今後の予定】

生合成酵素を複合体化することで基質チャネリング効果の創出を試みる。基質チャネリング効果とは、生合成酵素が複合体化することで、各酵素間で代謝中間体の受け渡しが円滑に行われることにより、生合成反応が効率良く進行する効果を指す。細胞内に代謝中間体と酵素が拡散しないため、薄い酵素濃度や、基質親和性の弱い酵素を用いた際の反応効率が改善すると予想される。大腸菌ゲノム上に複合体遺伝子を導入した際に、フラビオリン合成量が改善するかを検討する。

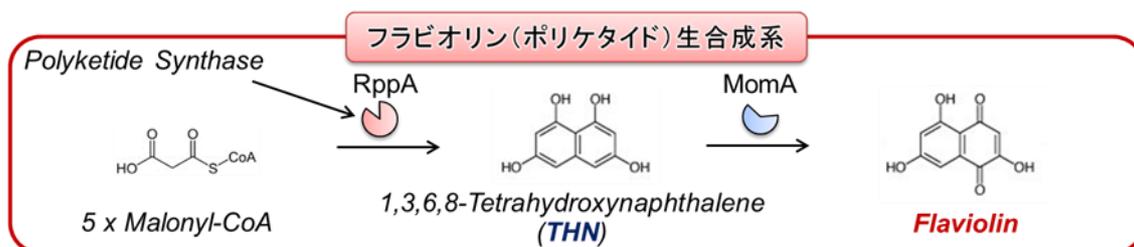


図 1. 放線菌の赤色色素化合物（フラビオリン）生合成系

# RNA-seq を用いた呼吸器疾患診断システムの開発

山岸賢司

日大工・生命

## 【緒論】

インフルエンザをはじめとする呼吸器疾患は、高齢者の死亡原因の上位に位置し、重症化する前に容易に診断できる手法の確立は Active ageing に大きく貢献する。本研究では、血液中のエクソソーム内の RNA の発現パターンを利用し、呼吸器疾患を早期に診断するシステムの開発を目指している。

今年度は、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq のデータ解析手法を構築し、4つの呼吸器疾患病態モデルマウス[肺炎, インフルエンザ感染, 慢性閉塞性肺疾患 (COPD), 気管支喘息]に対して応用した。

## 【方法】

呼吸器疾患病態モデルマウスの RNA 塩基配列は、気管支肺胞洗浄液中からエクソソームを単離し、そのエクソソームから抽出した RNA に対し、次世代シーケンサー (Ion PGM™, Life Technologies Inc.) を用いて解析した。病態モデルは、肺炎 4 個体 (Lungs1-4), インフルエンザ感染 5 個体 (Virus1-5), 慢性閉塞性肺疾患 3 個体 (COPD1-3), 気管支喘息 4 個体 (Asthma1-4), 正常 14 個体 (Mock1-14) を用いた。

## 【結果】

### 1. RNA-seq データ解析プロトコルの構築

#### i. 参照ゲノム配列へのマッピング手法の構築

次世代シーケンスにより解析されたエクソソーム中の RNA を、2つのマッピングソフトウェアを有機的に組み合わせることで、参照ゲノム配列に正しくマッピングする手法を構築した。現在、次世代シーケンサーから得られる RNA の配列データを染色体の参照ゲノム配列上に一義的にマッピングする手法は確立されていない。特に、イントロンを跨ぐエクソン由来の塩基配列を持つリード配列は、イントロン領域がスプライシングにより欠落するため、そのままでは参照ゲノム配列と一致しない。そのため、汎用的に用いられているマッピング方法では、このようなリード配列は、参照ゲノム配列にマッピングされないという問題があった。そこで、ゲノムマッピングソフト TopHat2 を用いて、まずスプライシングを予測し、マッピングされなかったリード配列を、再度別のマッピングソフトウェア Bowtie2 を用いてマッピングした。そして、双方のマッピング結果を組み合わせることで、イントロンを跨ぐエクソン由来の塩基配列を持つリード配列を正しくマッピングできるよう設計した (Figure 1)。

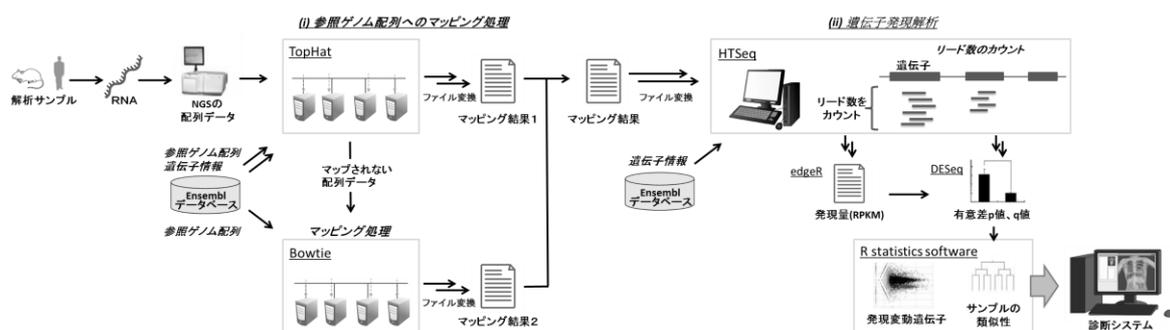


Figure 1. RNA-seq データ解析プロトコル

## ii. 遺伝子発現解析手法の構築

各遺伝子の発現量は、各遺伝子にマッピングされたリード配列の数とした。HTSeqを用いて、各遺伝子にマッピングされたリード配列をカウントした。次に、遺伝子ごとにマッピングされたリードの数を比較し、有意差  $p$  値および  $q$  値を、それぞれの病態モデルごとに分けて DESeq を用いて算出した。この  $q$  値が 0.1 未満の遺伝子を発現変動遺伝子と判断した(Figure 1)。以上の一連の解析において、参照ゲノム配列と遺伝子情報は、Ensembl の mm10 version78 を使用した。

## 2. マウス呼吸器疾患病態モデルへの応用

呼吸器疾患の病態モデルマウスに対して、次世代シーケンサーにより塩基配列を決定した。決定した塩基配列は、構築した RNA-seq データ解析プロトコルを用いて処理し、病態モデルごとに RNA の発現量が変動する遺伝子を特定した。その結果、肺炎モデルでは、約 30,000 個の遺伝子の中から 24 個の発現変動遺伝子を特定することができた。これらの遺伝子の中には、肺炎モデルに使用した LPS 刺激に応答する NF $\kappa$ B シグナル伝達経路の遺伝子の存在が確かめられた。他の呼吸器疾患病態モデルでは、インフルエンザ感染モデルは 13 個、気管支喘息モデルは 52 個の遺伝子を特定した。一方で、慢性閉塞性肺疾患モデルでは、 $q$  値が 0.1 未満となる遺伝子は存在せず、発現変動遺伝子を特定できなかった。

次に、発現変動遺伝子の発現量を入力因子としたクラスター解析を行い、各病態モデルマウスの発現パターンの類似性を解析した。発現変動遺伝子が特定できなかった慢性閉塞性肺疾患モデルについては、 $q$  値の上位 20 個の遺伝子を入力因子として採用した。その結果、解析に用いたすべてのサンプルで、病態モデルごとにクラスタリングすることができた(Figure 2)。また、上記解析に使用していない肺炎病態モデルと正常モデルの

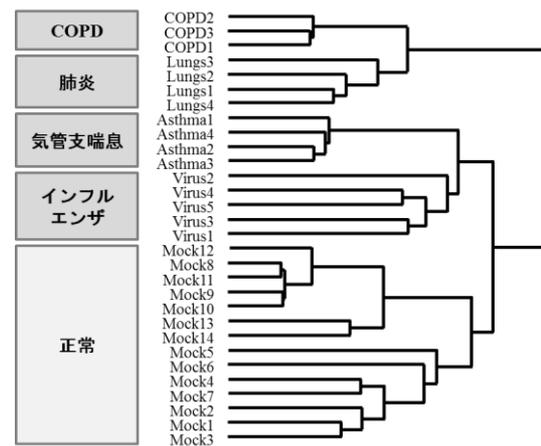


Figure 2. 遺伝子発現パターンを利用したクラスター解析による病態モデルの分類

合計 6 個体のマウスを病態未知のモデルマウスとし、RNA の発現パターンがどの疾患モデルと類似しているか解析した。その結果、肺炎モデルと正常モデルともに、同じ病態と近い階層にクラスタリングすることができた。

以上の結果から、RNA 発現パターンを利用することで、呼吸器疾患を診断するシステムに応用可能であることが示唆された。次年度は、バイオマーカー遺伝子の特定とヒトサンプルへの展開、新たな疾患関連遺伝子の探索手法の開発を行う。

### 【謝辞】

病態モデルマウスの作成、および次世代シーケンサーによる RNA 塩基配列の決定は、医学部内科学系呼吸器内科学分野 橋本修教授、権寧博准教授らの研究グループにより行われた。

### 【参考文献】

- [1]RNA-Sequence Analysis by Next-Generation Sequencer for the Early Diagnosis of Respiratory Disease. Y.Fukano, Y.Miyazawa, T.Mikoshi, T.Inoue, S.Maruoka, K.Kuroda, Y.Gon, S.Hashimoto, K. Yamagishi\*. J. Comput. Chem. Jpn, 13, 6 332, 2014 (DOI: 10.2477/jccj.2014-054)
- [2]RNA-seq に対する NGS データ解析プログラムの開発。見越大樹, 深野義人, 宮澤由妃, 山岸賢司\*. 日本コンピュータ化学会誌. 13 号 6 巻 299, 2014 (DOI: 10.2477/jccj.2014-0049)
- [3]次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析手法の確立と呼吸器疾患早期診断システムへの展開。深野義人, 宮澤由妃, 山岸賢司他, 生命医薬情報学連合大会, 2014. 10. (仙台) [Lightning Talk 選出発表]