

Active aging を支援する診断治療のための新規機能分子・測定法の開発 —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)

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。昨年度(平成26年度)はアミノ酸、脂質、および糖についてラマン分光法を用いて定量分析が可能であることを示した。

そこで、本年度では、1. 機能性アミノ酸である「シトルリン」を実試料(スイカの果皮)から抽出し、その濃度を決定した。2. 不飽和脂肪酸にはシス体トランス体の幾何異性体があるが、光異性化反応によるそれぞれの量をラマン分光法で決定した。3. 糖ではアグリコンと配糖体のような構造類似化合物がラマン分光法によって定量可能かどうかの実験を行った。

1. スイカの果皮から抽出されたシトルリンの定量

シトルリンは生体内で一酸化窒素の合成に関与し、血管拡張を起こすので、動脈硬化や高血圧改善などの効果があることが知られている。この分子はスイカの果皮部に豊富に含まれている。そこで、本研究ではスイカからシトルリンを抽出して、定量分析を試みた。昨年度、シトルリンはラマン分光法による定量が可能であることを示した。そこで、本年度では実際のサンプルから抽出されたシトルリンの定量分析を行った。

ところがラマン測定に532 nmを励起光として用いたところ、非常にブロードなスペクトルが得られ、シトルリンのバンドは観測できなかった。これは抽出された試料中に532 nmの光を吸収し、蛍光を発する分子が存在するためと考えられる。そこで、本実験では励起光にもっと低エネルギーである785 nmのレーザーを用いることにした。

Fig. 1に785 nm励起のシトルリンのラマンスペクトルを示す。これは532 nm励起によって得られたスペクトルと一致していた。種々の濃度におけるスペクトルを測定して、検量線を作成したところ、濃度に対して良好な直線が得られた。

Fig. 2にスイカから抽出した試料のラマンスペクトルを示す。532 nm励起のスペクトルとは異なり、シャープなピークが観測されている。比較

のためにシトルリン分子のスペクトルもFig. 2に示す。ふたつのスペクトルを比較するとスイカから抽出した試料に現れているピークとシトルリンのピークは、ずれていることがわかる。

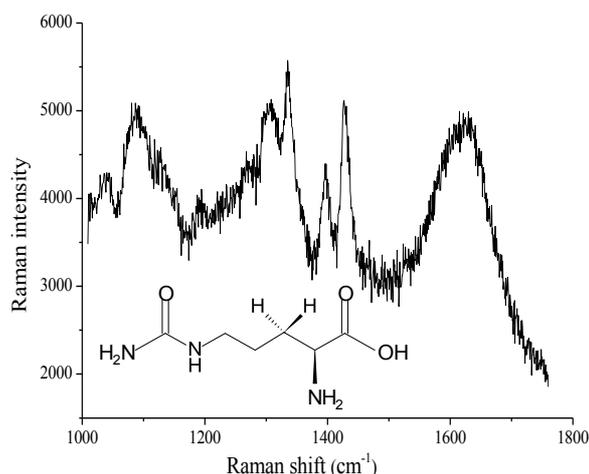


Fig. 1 Raman spectrum of citrulline obtained by excitation at 785 nm.

これは、抽出試料中にシトルリン以外の分子が含まれていることを示している。しかし、シトルリンのピーク位置にはピークやショルダーが観測されるので、この試料中にはシトルリンが入っていると考えられる。そこで、1437 cm⁻¹のピーク強度を用いて、定量を行ったところシトルリンの濃度が 2.85×10^{-2} mol/Lと求められた。

これが、正しいかどうかを確認するために先日納入されたアミノ酸分析装置を用いて定量を行った。その結果、 2.67×10^{-2} mol/Lと求められた。

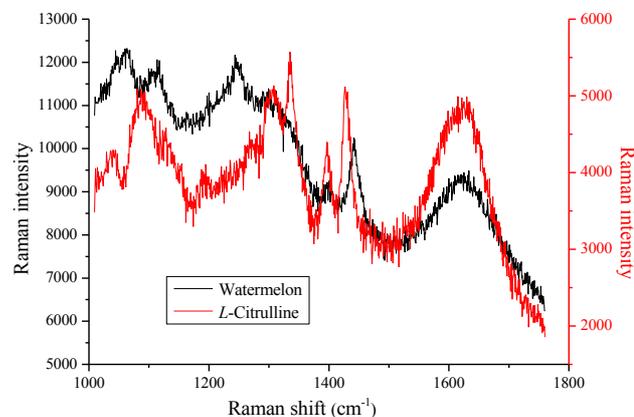


Fig. 2 Raman spectra of the extracted sample and citrulline.

2. 不飽和脂肪酸の光異性化反応

昨年の研究において、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）の定量分析を行い、ラマン強度比は濃度に比例することが分かった。そこで本研究では、オレイン酸に光照射してトランス体に変化する反応について追跡した。

Fig. 3 に光照射した時間（日にち）に対するオレイン酸とエライジン酸由来のラマン強度比を示す。オレイン酸由来の 1661 cm^{-1} のラマン強度比は減少するのに対して、エライジン由来の 1675 cm^{-1} のラマン強度比は増加していることが分かった。オレイン酸の減少量とエライジン酸の増加量の直線の傾きは絶対値でほぼ同じとなることから、光照射によりオレイン酸からエライジン酸が生成しているといえる。

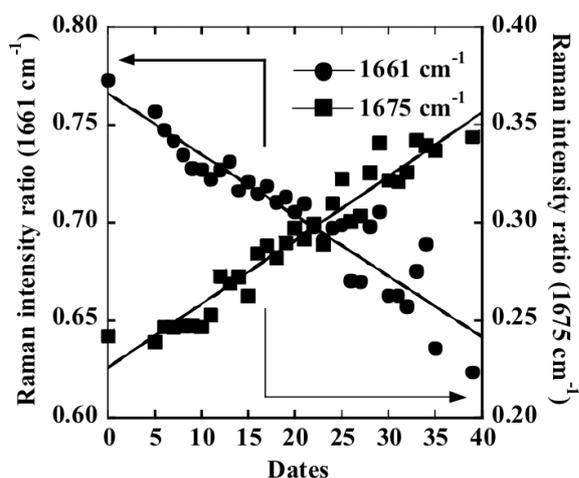


Fig. 3 Dependence of the Raman intensities at 1661 and 1675 cm^{-1} on the irradiation time.

また、エライジン酸の純成分の検量線（Fig. 4）から紫外線照射後のオレイン酸の強度比を求めたところ最大で約 15 %のエライジン酸が生成されていた。

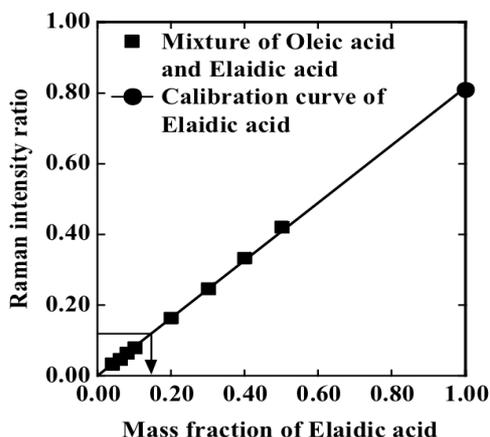


Fig. 4 Calibration curve of Elaidic acid.

3. アグリコンと配糖体の同時定量

生体系では配糖体として存在する分子も多く存在する。そこで、ラマン分光法を使って、配糖体と配糖体でないもの（アグリコン）の同時定量ができるかどうかを確認した。今回使った試料はポリフェノールであるケルセチンとその配糖体ルチンである。

ケルセチンとルチンのラマンスペクトルではピークの出現位置はほぼ同じであるが、 1500 cm^{-1} ~ 1700 cm^{-1} の間にあるピークの強度比が異なっている。Fig.5 にケルセチンとルチンの混合比を変えた混合溶液のラマンスペクトルを示す。混合比によって 1500 cm^{-1} ~ 1700 cm^{-1} のピーク強度比が変化していることが分かる。

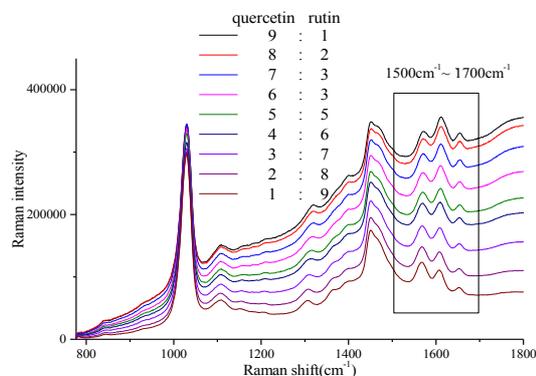


Fig. 5 Raman spectra of mixed solutions

このスペクトルを多変量解析（PLSR:部分最小二乗回帰）を用いて定量分析を行い、各成分の体積を求めた（Fig. 6）。その結果、仕込み体積と計算から求めた体積は非常によく一致していた。

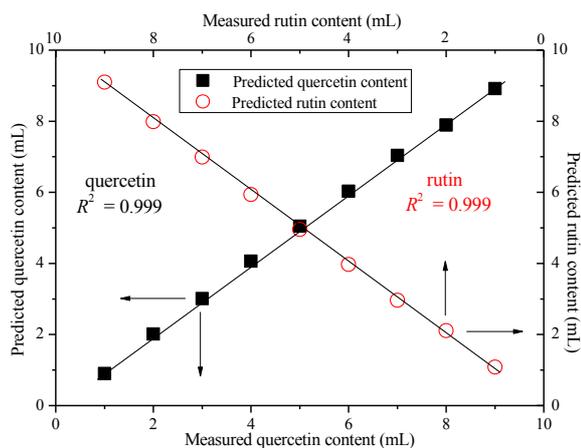


Fig. 6 Relation between the measured and the predicted values obtained by PLSR.

4. フェルラ酸と γ オリザノールの定量

最後に薬品に応用が期待されている分子の定量を行った。

本実験では、フェルラ酸とそれにステロールが縮合した γ オリザノールを選んだ。それらの分子は米ぬかに多く含まれることが知られており、更年期障害における心身症候の抑制および高脂血症の抑制、コレステロールの吸収・合成の阻害などの効能がある。

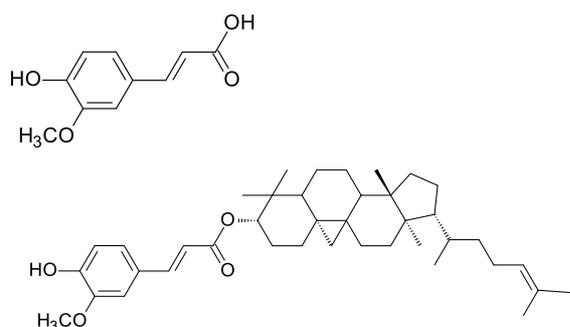


Fig. 7 にアセトンを経としたフェルラ酸および γ オリザノールのラマンスペクトルを示す。

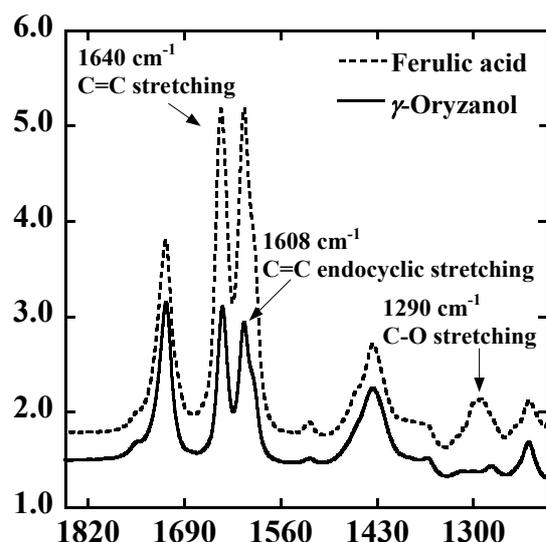


Fig. 7 Raman spectra of ferulic acid and oryzanol.

フェルラ酸における 1640 cm^{-1} のピークは C=C 伸縮振動、 1608 cm^{-1} のピークはベンゼン環の C=C 伸縮振動、 1290 cm^{-1} のピークはカルボキシ基上の C-O 伸縮振動と帰属される。その他の 1710 cm^{-1} 、 1440 cm^{-1} と 1230 cm^{-1} のピークは溶媒であるアセトンの振動と帰属される。 γ オリザノールのラマンスペクトルはフェルラ酸と非常に酷似している。しかし、 1290 cm^{-1} の C-O 伸縮振動ピークはフェルラ酸には現れているが、 γ オリザノールには現れていない。この振動はカルボキシ基の C-O 伸縮振動と帰属され、 γ オリザノールではステロールが縮合し、かなり重いものが振

動するようになるため、このピークは大きく低エネルギー側にシフトするため、 γ オリザノールのラマンスペクトルには現れなかったと考えられる。そこで、フェルラ酸ではこのピークが特有のピークとなるので、このピーク強度を用いて、検量線を作成した。また、 γ オリザノールでは強度が強く現れている二重結合による 1608 cm^{-1} のピークを用いて、検量線を作成した。

Fig. 8 にそれぞれの検量線を示す。どちらの分子の検量線共に良い直線関係が得られたおり、ラマン分光法による定量分析の可能性を伺わせる。

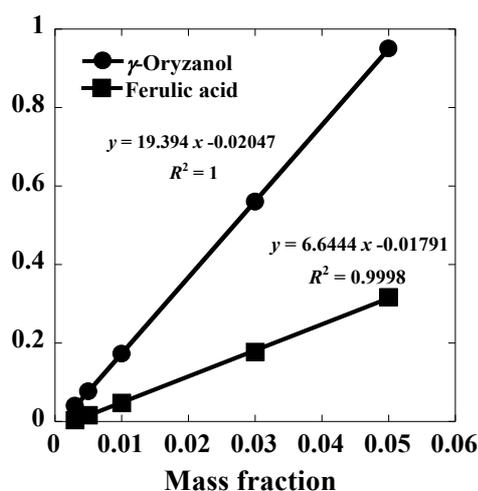


Fig. 8 Calibration curves

現在、この検量線をもちいてフェルラ酸とオリザノールの混合溶液中に含まれるそれぞれの成分の定量分析を行っているところである。

投稿中の論文

1. Yasushi Numata, Maria Otsuka, Kenji Yamagishi and Hiroyuki Tanaka, Quantitative Determination of Glycine, Alanine, Aspartic acid, Glutamic acid Phenylalanine, and Tryptophan by Raman Spectroscopy, *Analytical Letters*.

2. Yasushi Numata, Yuta Shinohara and Hiroyuki Tanaka, Quantitative analysis of ethanol-methanol-water ternary solutions using Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*.

今後の予定

この研究で開発した定量法を使って、より生体内の反応に関する分子の定量ができることを確認していきたい。現在、細胞認識で重要であるノイラミン酸のモノマー、ダイマー、トリマーの定量分析を行っている。

ラマン分光法による診断法の開発に向けた糖質化学的手法の新展開

小林厚志¹⁾, 伊藤博¹⁾, 星野優人¹⁾, 鈴木大樹¹⁾

1) 日大工・生命

【緒論】

糖質は生命活動に重要な分子であり、低分子の単糖から高分子の多糖まで多様な形態で存在している。生物はこれら糖質を必須の栄養素として要求する傍ら、糖質の化学的な影響を大きく受けながら加齢していく。若い間は糖質を起因とする化学反応に対して抵抗性を示し、元の分子に容易に戻すことが可能であるが、加齢とともに修復が困難になり、結果として老化関連物質が蓄積する。これら老化関連物質を容易に検出可能になれば、器官や組織レベルでの老化の程度の判断ができる。本研究においては、ラマン分光による老化関連物質の検出法の開発を行うために、事項に示す、二項目の基礎的な知見を得ることを目標とする。

【実験および結果】

①老化関連物質糖誘導体の環境調和型酵素反応による合成法

近年の糖鎖合成技術の発展はめざましい。しかし、その合成プロセスの環境調和型化の達成が課題として残されている。その解決手段の一つとして、環境調和型プロセスである酵素反応を組み込むことが多くなっている。しかしながら、単純に基質と酵素を混合するのみでは有機合成化学による糖鎖合成効率に劣るため、酵素反応条件の改善が必要不可欠である。本研究においては、糖質分解酵素からの糖脂質合成のための酵素反応シミュレーションおよび酵素合成反応の改善にむけた酵素化学的実験を行った。

澱粉分解酵素の代表例である α -アミラーゼによる反応のシミュレーションについて検証したところ、シミュレーション結果と実際の実験デ

ータ値とはおおよそ符合した。一方、シミュレーション結果と乖離している場合も存在したことから、現在、その詳細についての検討を行っている。

②ラマン分光による糖鎖ゲル中の微細構造の分析に向けた条件設定

生体の主成分は水であるが、その中には非常に高濃度の溶質から成り立っており、結果としてゲル様の振る舞いを示す。特に細胞と細胞の間、または、関節などには多糖を中心とするゲル状物質で覆われており、その状態を観察することは生命現象を理解する上で重要である。さらに、このようなゲル状物質中に老化が引き起こす変化を簡便に見出すことができれば、老化の診断に有用であると言える。本研究においては、多様な構造体を形成可能な澱粉ゲルをモデルケースとして、澱粉ゲルの微細構造の変化の検出の実現を目指す。まず、澱粉のゲル形成における澱粉の由来による影響を検討したところ、由来によってゲル化可能濃度が異なることを確認した。次に、ゲルの架橋剤としてホウ砂を添加したところ、ほとんどの由来の澱粉ではゲル化可能濃度が低くなったが、可溶性澱粉のみゲル化可能濃度が高くなるという結果が得られた。この現象は、局所的な構造が異なることに起因していると仮定して、現在、ラマン分光による局所構造の変化を確認すべく、ゲル形成条件についての詳細を検証しているところである。

遺伝子検出を目指した新規蛍光核酸塩基の開発

齋藤 義雄

日大工・生命

【緒論】

極性、粘性、pH などの環境変化に応じて発光波長が劇的に変化するような機能を有する蛍光核酸を開発することが出来れば、標的 DNA/RNA の検出のみならず、遺伝子配列中の特定の位置の塩基の違いといった構造変化の認識を蛍光発光色の変化で簡便に検出できるプローブとしての応用が期待される。そこで、我々はこれまでに、周辺の環境変化に伴って蛍光発光が変化する様々な7-デアザプリンヌクレオシドの開発に取り組んできた。それらのなかでも、8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン **cnaA** はチミンと塩基対を形成した際にのみ、エチルナフトニトリル由来の LE 発光を示すことで簡便にチミンを識別することに成功している。これは、メジャーグループに突き出されたナフトニトリル部位が核酸塩基間とで、ねじれ構造を形成しているためであると考えられる (**Figure 1**)。本研究では、「新規環境感応型蛍光核酸塩基の開発と遺伝子検出へ

の応用」を目指して、さらに高感度な蛍光核酸塩基のデザインを行った。デザインのコンセプトとして、核酸塩基部位に蛍光色素となる多環芳香族化合物を、エチニル基を介することなく直接導入すれば、環境の違いで分子内のねじれ/平面性がより変化しやすくなると考え、様々なナフチル基を有する 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体 **1** の開発を試みた。

【実験結果】

まずはじめに、各ナフチルボロン酸ピナコールエステル体 **3a-d** の合成を検討した。続いて、8-アザ-7-デアザ-7-ヨード-2'-デオキシアデノシンと得られた各ナフチルボロン酸ピナコールエステル体を鈴木-宮浦クロスカップリングにより反応させ、ナフチル基を連結させた新規蛍光性 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体 **1a-d** を合成した。また、それらの中で、特に優れた光学特性を示す誘導体を DNA 自動合成機によりオリゴデオキシヌクレオチド鎖 (ODN 鎖) へ導

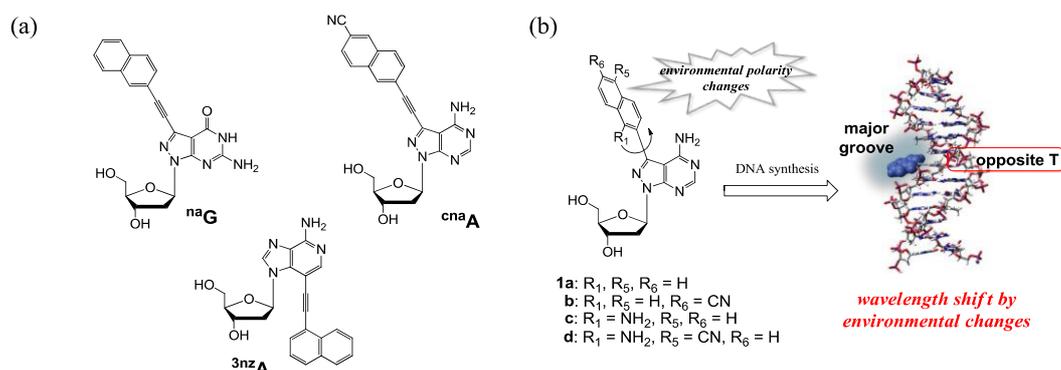


Figure 1. (a) Structure of previously reported ESF nucleoside. (b) Structure of newly designed 7-naphthylated 8-aza-7-deaza-2'-deoxyadenosine derivatives

Table 1. Photophysical properties of fluorescent 8-aza-7-deaza-2'-deoxyadenosine derivatives.

Solvents	η^a	1a		1b		1c		1d	
		$\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$ (nm)	$\Phi_{\text{fl}}^{\text{b}}$						
1,4-Dioxane	1.44	359	0.11	370	0.37	428	0.03	488	0.47
Ethyl acetate	0.45	358	0.08	382	0.28	433	0.01	494	0.29
DMF	0.92	361	0.13	415	0.22	452	0.02	524	0.21
DMSO	1.99	363	0.15	423	0.25	450	0.03	534	0.18
Acetonitrile	0.34	360	0.10	398	0.26	458	0.01	513	0.23
2-Propanol	2.04	363	0.16	389	0.26	480	0.01	514	0.19
Ethanol	1.20	364	0.14	394	0.27	489	0.01	520	0.13
Methanol	0.59	362	0.14	402	0.25	498	0.01	527	0.07
Ethylene glycol	19.9	365	0.21	400	0.25	493	0.01	529	0.08
Glycerol	1412	372	0.11	374	0.17	404	0.07	522	0.12

^a Viscosity (mPa s; 20°C)^b Fluorescence quantum yields

入し、熱融解温度および光学特性の観点から対面塩基識別能の評価を行った。

次に、合成により得られた蛍光ヌクレオシドモノマー **1a-d** を極性環境の異なる様々な溶媒中において蛍光スペクトルの測定を行った。ナフタレン部位に置換基を含まない化合物 **1a** では、溶媒の極性変化に伴う発光波長変化がそれほど見られないのに対して、置換基を導入した場合には、発光波長変化が大きくなることがわかった (**Figure 2**)。特に、2-ナフトニトリルを含む **1b** ($\Delta\lambda = 53$ nm) および 1-ナフチルアミン($\Delta\lambda = 94$ nm) を含む **1c** は、より優れたソルバトフルオロクロミックな光学特性を示すことがわかった (**Table 1**)。続いて、**1b** および **1c** のホスホロアミダイトユニットを合成し、DNA 自動合成機により ODN 鎖へ導入した。合成した ODN 鎖を相補鎖とハイブリダイズさせ、熱融解温度 (T_m) 測定を行った結果、修飾ヌクレオシド **1b** および **1c** の対面塩基がチミン以外の塩基では、 T_m 値の大きな低下がみられた。従って、今回開発した7位にナフチル基を有する 8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン誘導体は、チミン塩基とのみワトソン-クリック型の塩基対を形成することが確認できた。さらに蛍光スペクトルの測定を行ったところ、対面塩基が塩

基対を形成することが可能なチミンの場合にのみ、発光波長の短波長シフトがみられた(**Fig. 2**)。以上の結果から **1b** および **1c** を含む ODN プローブは対面塩基のチミンを発光波長変化で識別可能なことが明らかとなった。

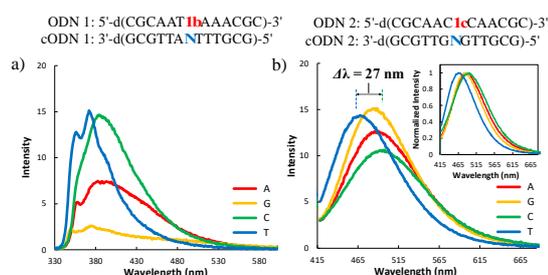


Figure 2. Fluorescence spectra of (a) 2.5 μM ODN 1 hybridized with 2.5 μM cODN 1 (N = A, G, C, or T) and (b) 2.5 μM ODN 2 hybridized with 2.5 μM cODN 2 (N = A, G, C, or T) (50 mM sodium phosphate, 0.1 M sodium chloride, pH 7.0, r.t.). Inset: Normalized fluorescence spectra.

【結論】

以上のように、目的とするチミン塩基を識別することが可能な蛍光 DNA プローブを得ることができた。現在、これらの蛍光 DNA プローブを搭載した DNA チップの開発に向けた検討を行っている。

【参考文献】

Y. Saito, A. Suzuki, T. Yamauchi, I. Saito, *Tetrahedron Lett., Memorial Symposium-in-Print for Harry Wasserman*, 2015, 56, 3034-3038.

次世代高機能血管カテーテルシステムの開発

根本修克¹⁾, 春木 満¹⁾, 市川 司¹⁾

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。

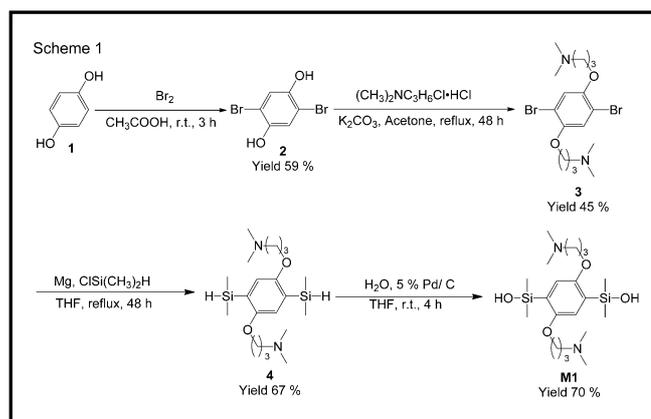
本研究課題では、極性の高いスルホベタイン基を側鎖部位に有する芳香環をポリジメチルシロキサンの主鎖中に導入することで、シリコンゴム材料に適度な柔軟性と材料間の強い相互作用を付与できるものと考え新規ゴム材料の創製を行うことを目的としている。スルホベタイン基は親水性を示す双性イオン性基で、水溶液中で周囲の水分子の構造を乱だしにくく、人体における幅広い pH 領域においても、そのイオン構造を保持することができることから生体材料に利用可能な置換基として研究されている。以上のような背景から、今年度は、双性イオン性基を導入したポリ(テトラメチルシリレンシロキサン)とポリメチルビニルシロキサンとの共重合体を合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

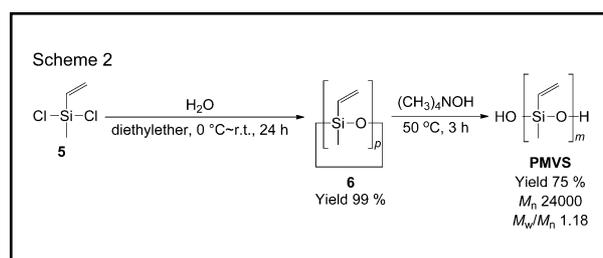
(1) モノマー合成

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。昨年度に引き続き、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。



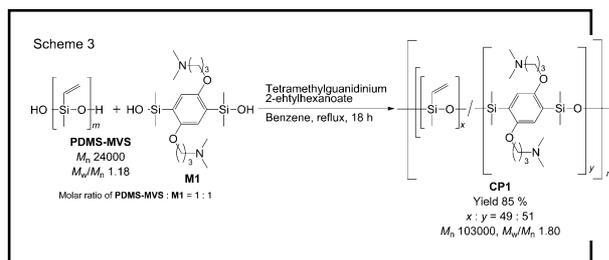
(2) ポリ(メチルビニルシロキサン) (PMVS) の合成

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(メチルビニルシロキサン) (PMVS) を Scheme 2 にしたがって合成した。



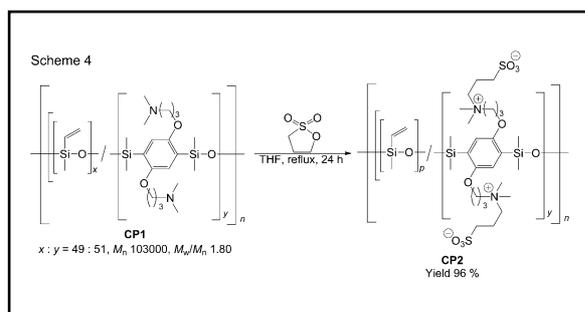
(3) マルチブロック共重合体の合成

次に、**PMVS** 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。

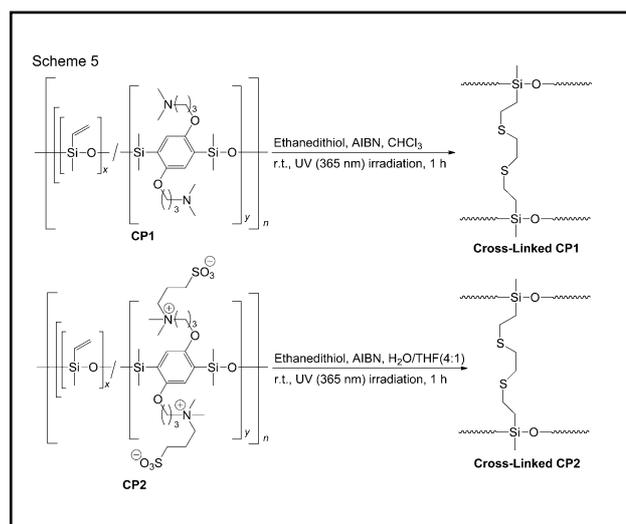
さらに、得られた **CP1** を用いて、Scheme 4 にしたがって、スルホベタイン基の導入を行った。



マルチブロック共重合体 **CP1** は、昨年度報告したポリジメチルシロキサンユニットを有するマルチブロック共重合体と同様な溶解性を示し、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 **CP2** 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) チオール-エンクリック反応による架橋体合成

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剥離可能な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。



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. 1 にガラス基板上から剥離した **Cross-Linked CP1** および **Cross-Linked CP2** の凝集状態を示す。

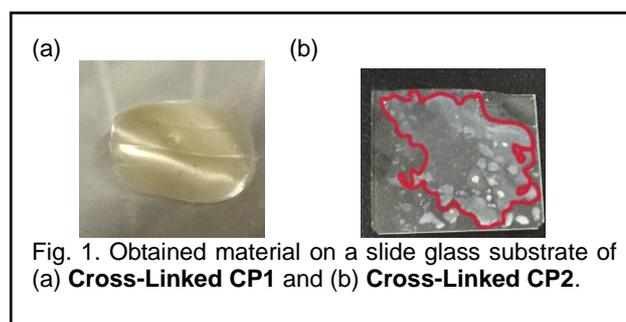


Fig. 1. Obtained material on a slide glass substrate of (a) **Cross-Linked CP1** and (b) **Cross-Linked CP2**.

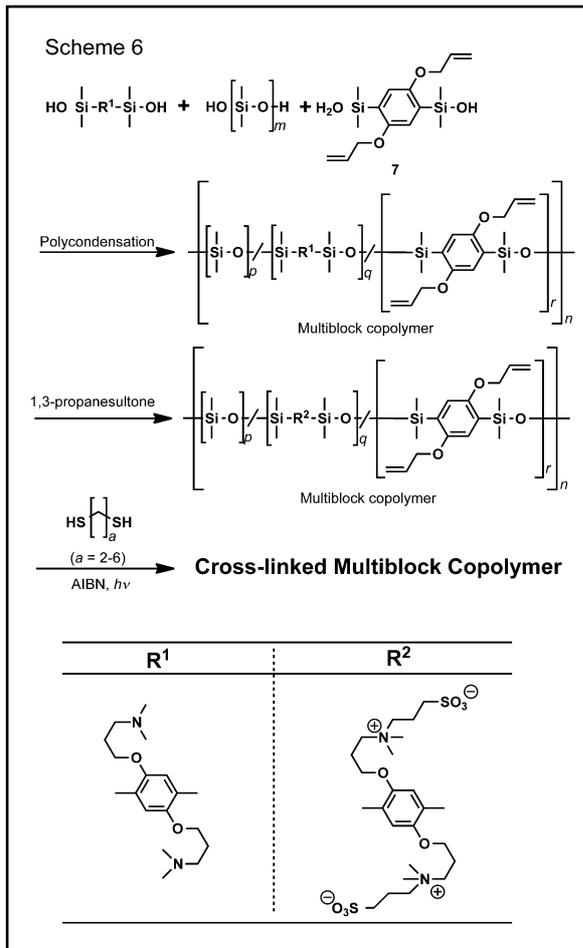
Cross-Linked CP1 からは独立したゴム状物質を得ることはできたが、**Cross-Linked CP2** からは独立したゴム状物質を得ることができないことが明らかとなった。これは、スルホベタイン基を導入することにより分子間相互作用が増大し、凝集性が高まった結果であるものと考えられる。したがって、架橋体合成の際に用いるリンカーの分子鎖長を伸長することにより、分子間の自由体積を増大させる、あるいは、スルホベタイン基含有量を低下させるといった条件の最適化を行うことや得られた架橋体の力学的特性や表面特性および生体適合性を明らかにすることが今後の課題となる。

【今後の計画】

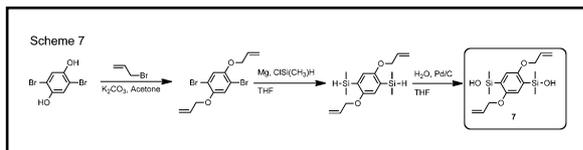
以上述べたように、これまでに十分な性能を有するシリコンゴム材料創製に至っていないため、新たな分子設計に基づき、シリコンゴム創製を行うことも計画しているので、以下に述べる。

(1) ベンゼン環上に架橋部位を有するポリ(テトラメチルシラリレーンシロキサン-ジメチルシロキサン)マルチブロック共重合体の合成

Scheme 6 に示すような合成経路に基づき、架橋部位をベンゼン環上に有するポリ(テトラメチルシラリレーンシロキサン-ジメチルシロキサン)マルチブロック共重合体の合成を行う。



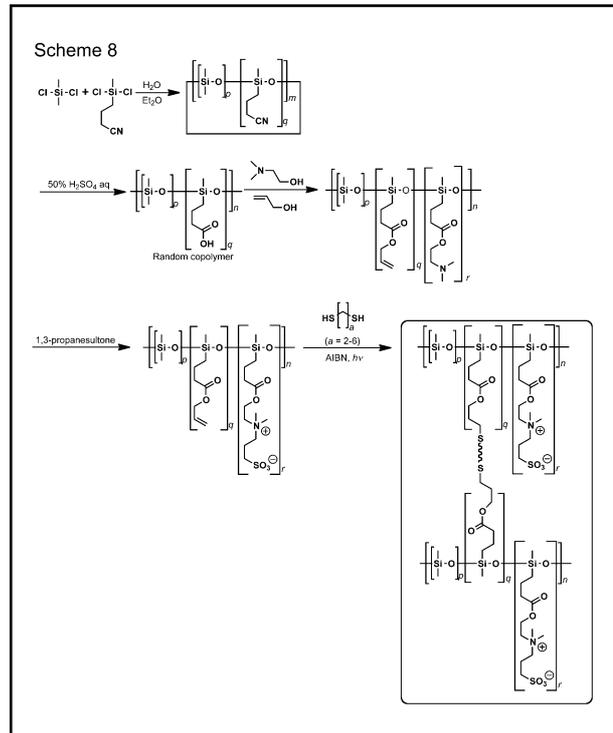
ベンゼン環上に架橋点を有する新規モノマー **7** については Scheme 7 に示す合成経路にしたがい、合成を行う。



また、マルチブロック共重合体合成においては、共重合体の組成比の最適化について検討する。さらに、メチレン鎖長の異なるジチオール誘導体を架橋反応時に用いることにより、最適な架橋剤の探索を行う予定である。

(2) ポリ[(3-カルボキシプロピル)メチルシロキサン-ジメチルシロキサン]ランダム共重合体からの新規シリコーンゴム創製

これまでは、ポリ(テトラメチルシラリレーンシロキサン-ジメチルシロキサン)マルチブロック共重合体を用いたシリコーンゴム創製を行ってきたが、得られた架橋体は柔軟性に欠け、凝集してしまう傾向があった。そこで、主鎖中にベンゼン環を持たない新規シリコーンゴム創製を行う。具体的な合成経路について Scheme 8 に示す。



ポリ[(3-カルボキシプロピル)メチルシロキサン-ジメチルシロキサン]ランダム共重合体^{1,2)}においては、共重合体の組成比の最適化について検討する。さらに、メチレン鎖長の異なるジチオール誘導体を架橋反応時に用いることにより、最適な架橋剤の探索を行う予定である。

【参考文献】

1. Y. Katayama, T. Kato, M. Ohyanagi, K. Ikeda, Y. Sekine, *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **7**, 465-470 (1986).
2. N. Nemoto, H. Ishii, M. Ihara, K. Ikeda, N. Takamiya, *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **32**, 2457-2467 (1994).

RNA アプタマーを用いた分子標的医薬の開発

山岸賢司

日大工・生命応用化学

【緒論】

RNA アプタマーは抗体に代わる次世代技術として、医薬品分野や診断薬分野などの Active aging を支援する新機能性分子として注目されている。しかし、RNA アプタマーを実用化するためには化学修飾が必須であるが、どのような修飾をどこに入れるかは経験と勘に頼っており、多くの時間と費用が必要である。本研究では、計算化学を用いてアプタマーとタンパク質との結合力を予測する手法を確立し、アプタマーの効率的な設計手法を開発することを目指している。

近年、ヒトの免疫グロブリン(IgG)の Fc ドメインに対して特異的に結合できる RNA アプタマーが開発され、その X 線結晶構造が初めて解析された(Nomura et al., Nucleic Acids Research, 2010, Figure 1)。これまで、マイナスの電荷を持つ RNA アプタマーは、表面電荷がプラスに帯電したタンパク質としか結合することができないと考えられてきたが、X 結晶構造解析の結果、この RNA アプタマーは、IgG の中性アミノ酸領域に結合していることが明らかとなった。これにより、RNA が電荷相互作用に依存せずに特異的な強い結合を達成でき、多種多様なタンパク質を標的とすることが可能であることが示されたものの、その結合メカニズムについては、明らかとなっていない点が多い。

平成 27 年度は、新規アプタマーの効率的な設計手法の開発に向けて、RNA アプタマーと IgG 複合体の電子状態を分子シミュレーションにより詳細に解析し、その結合メカニズムについて、原子レベルで明らかにすることを目指した。

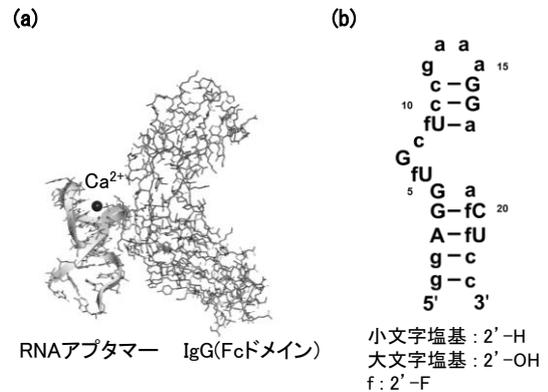


Figure 1. IgG に特異的に結合する RNA アプタマーの構造
(a) RNA アプタマーと IgG の複合体結晶構造
(b) RNA アプタマーの塩基配列

【計算方法】

i) アプタマーと IgG の立体構造作成

RNA アプタマーと IgG との複合体の立体構造は、X 線結晶構造(PDB:3AGV)を基に作成した。RNA アプタマーは 23 塩基から成る一本鎖構造をとっている(Figure 1b)。IgG は Fc ドメインを抽出した 208 残基(237-444)から成る構造である。

ii) アプタマーと IgG の結合メカニズムの解析

RNA アプタマー、IgG、および RNA アプタマーと IgG の複合体の系の全電子エネルギーは、フラグメント分子軌道(FMO)計算により算出した。FMO 計算では、RNA アプタマーはリボース-5-リン酸と塩基の 2 つの部位にフラグメント分割し、IgG はアミノ酸 1 残基ごとに分割した。計算レベルは、ファンデルワールス力を正確に評価することができる MP2/6-31G**レベルで実行し、計算プログラムには PAICS を用いた。

RNA アプタマー、および IgG の構造変化は、分子動力学(Molecular Dynamics : MD)計算により解析した。計算プログラムには、AMBER14 を用い、力場は ff14SB とした。

【結果】

FMO 計算に基づくフラグメント間相互作用エネルギー(IFIE)解析を用いることで、塩基-アミノ酸間の相互作用エネルギーを求めることができる。さらに、その相互作用を静電相互作用とファンデルワールス力に分けて解析することが可能である。そこで、この IFIE 解析を用いて、RNA アプタマーと IgG との結合に重要な部位を解析した。その結果、RNA アプタマーの G7 リボース-5-リン酸部位は Lys340 の側鎖(-NH₃⁺)部位と -134.3 kcal/mol の静電相互作用を、G7 塩基部位は Tyr373 の側鎖芳香環と π - π 相互作用により -6.6 kcal/mol の安定化相互作用を形成していることが明らかになった(Figure 2)。さらに、RNA アプタマーと IgG は、G20 塩基部位と GLN342、U21 リボース-5-リン酸部位と GLN342 など複数のファンデルワールス相互作用を形成していた。このファンデルワールス相互作用の総和は、-151.2 kcal/mol であった。以上の結果から、RNA アプタマーと IgG との結合は、1 つの強固な静電相互作用を複数のファンデルワールス力がサポートすることで、IgG の中性アミノ酸領域に結合していることが明らかになった。

次に、RNA アプタマー、および IgG の構造のゆらぎが結合性に与える影響を解析するため、分子動力学(MD)計算を行った。MD 計算では、1 ステップ 2.0 f sec.として、5,000,000 ステップ、10.0 n sec.間の構造変化を追跡した。その結果、IgG への結合親和性が低い RNA アプタマーは、初期構造から 1.0n sec.に向けて大きく構造が変化していることが明らかとなった。Figure 3 には、初期構造から 1.0 n sec.間の RNA アプタマーの構造変化を示した。この構造変化が、IgG に対する結合性の低下の原因であると考えられる。今後は、結合親和性の異なる種々の RNA アプタマーに対して同様の MD 計算を進め、結合性との関係について、構造活性相関の解析を進める予定である。

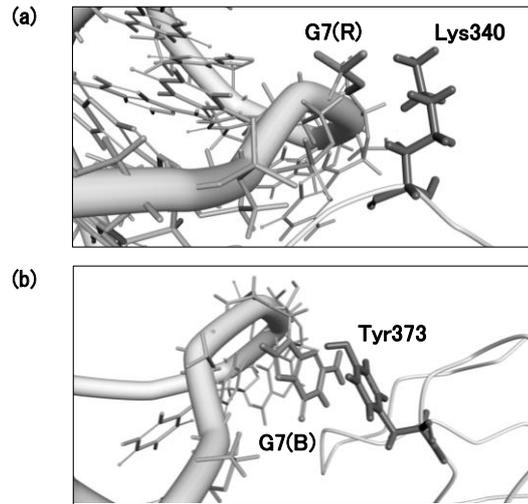


Figure 2. RNA アプタマーと IgG との結合に重要な部位
(a) 静電相互作用による結合が最も強い部位
(b) ファンデルワールス力による結合が最も強い部位

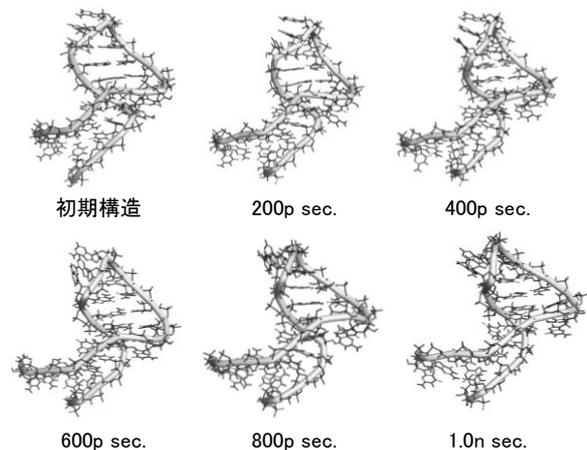


Figure 3. MD 計算による RNA アプタマーの構造変化

【参考文献・研究成果】

- [1] Y. Gon, S. Maruoka, T. Inoue, K. Muzumura, K. Kuroda, Y. Fukano, **K. Yamagishi**, E. Tsuboi, S. Hashimoto, "Gene expression analysis in airway-secreting extracellular vesicles upon house dust mite exposure", *Allergology international*, 2016 *in press*.
- [2] **山岸賢司**, 見越大樹, 権寧博, 橋本修, 「新規転写産物抽出装置、及び新規転写産物抽出プログラム」, 特願 2015-192288
- [3] 権寧博, 丸岡秀一郎, 黒田和道, **山岸賢司**, 橋本修, 「創薬を視野に入れた呼吸器疾患の病態解明 -細胞外顆粒内 RNA 情報の臨床応用-」, 呼吸と循環, 医学書院, 63/6, 541-546, 2015
- [4] 吉田尚恵, 関口真裕, 石川岳志, 宮川伸, 坂本泰一, **山岸賢司**, 「分子シミュレーションを利用した RNA アプタマーと標的タンパク質との結合メカニズムの解析」, 日本化学会第 96 春季年会, 要旨集 3PA-172, 2016 年 3 月 (京都)

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】

遺伝情報を正確に維持することはすべての生物に重要である。遺伝子の本体である DNA は様々な要因によって絶えず損傷を受けているため、細胞は損傷した DNA を修復するための DNA 修復経路を持っている。まず損傷部位を識別し、次にその周囲の DNA を切り出し、その後 DNA を再合成するという DNA 修復機構は 1980 年代に発見され、発見者は昨年ノーベル化学賞の榮譽に輝いたことは記憶に新しい。

しかし近年、S 期の細胞に損傷が入った場合、DNA 修復機構は機能しないことがわかってきた。DNA 複製中 DNA ポリメラーゼが損傷部位に直面すると、次にどの塩基を基質としてよいかわからなくなるため、複製フォークが停止する。すると一本鎖領域が露出する。一本鎖領域は構造上非常に不安定であるため、DNA 修復よりも損傷部位をなんとか乗り越えて複製する DNA 損傷トランス機構が機能すると解釈されている。

この DNA 損傷トランスには損傷部位の複製を正確性の低い DNA ポリメラーゼが行う TLS と、もう一方の新生鎖を鋳型に複製を行なう PRR という異なる二つの機構が存在する。これらは、複製型の DNA ポリメラーゼの伸長促進因子で DNA ポリメラーゼとともに DNA を移動する PCNA が、損傷部位でユビキチンというタンパク質による修飾を受けることで制御されることがわかってきた。すなわち、ユビキチンが一つ結合するモノユビキチン化が起きた場合には TLS が、複数ついたポリユビキチン化が起きた場合には PRR が活性化する(1-5)。PCNA のユビキチン化は、下流因子の集積の場を提示している

と予想されているが、その実体は全くわかっていない。

私たちは以下に示す実験結果から、PCNA のユビキチン化の機能の一つとして、DNA 損傷応答に関与している Ssu4(Substrate for SUMoylation 4) のスモ 1 化の場として機能するのではないかと考えており、その実証と生理的意味の解明を行っている。

【研究経過】

Ssu4 のスモ 1 化の細胞周期依存性

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。このような翻訳後修飾として、低分子量タンパク質であるユビキチンが用いられるユビキチン化やスモ 1 が用いられるスモ 1 化が知られている。ユビキチン化の基質やスモ 1 化の基質をスクリーニングするために開発した conditional two-hybrid システム(6,7)を用いて、DNA 損傷応答に関与している Ssu4 がスモ 1 化修飾を受けることを昨年の当研究会で報告した。今回、Ssu4 のスモ 1 化についてさらに詳しく調べた。

Ssu4 は DNA 損傷剤である MMS で細胞を処理すると M 期および G1 期に強くスモ 1 化された。対照的に S 期では Ssu4 のスモ 1 化は減少した。このことから、Ssu4 のスモ 1 化は主に M 期から G1 期における損傷に対して応答することがわかった。

Ssu4 のスモ 1 化が、S 期で抑制されることを見出したが、序論で記した PCNA のユビキチン化は逆に S 期における DNA 損傷に依存して引き起こされる。そこで、Ssu4 のスモ 1 化が PCNA のユビ

キチン化によって阻害される可能性を調べた。PCNA の 164 番のリジン残基がユビキチン化の標的的部位であることがわかっているため、この部位をアルギニンに置換した PCNA-K164R 株を用いて、MMS 存在下で Ssu4 のスモ 1 化を調べた。その結果、Ssu4 のスモ 1 化は亢進した。したがって、S 期において Ssu4 のスモ 1 化が抑制されるのは、ユビキチン化された PCNA がスモ 1 化を阻害するためであることが示唆される。

(USA) 2007: 104, 17419-17423

7. T. Kishi et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
(USA) 2008: 105, 14497-17502

DNA 損傷の種類と Ssu4 のスモ 1 化

MMS は塩基のアルキル化と二重鎖切断を引き起こす。Ssu4 のスモ 1 化が、そのような DNA 損傷に依存するのか調べるために、MMS とは作用機序の異なる DNA 損傷を誘発する 4NQO と主に二重鎖切断を誘発するゼオシンを用いて Ssu4 のスモ 1 化を調べた。4NQO あるいはゼオシンは、いずれも Ssu4 のスモ 1 化を誘導した。しかしその程度は MMS の場合より著しく低かった。Ssu4 のスモ 1 化が塩基のアルキル化によって引き起こされることが示唆される。ただし、4NQO またはゼオシンで処理した場合と MMS 処理を行なった場合で DNA 損傷の程度が同程度であるか検討する余地がある。

【参考文献】

1. Hoegge et al. *Nature* 419: 135-141 (2002)
2. Stellter and Ulrich. *Nature* 425: 188-191 (2003)
3. Haracska et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
(USA) 103: 6477-6482 (2006)
4. Karras and Jentsch. *Cell* 141: 255-267 (2010)
5. Daigaku et al. *Nature* 465: 951-955 (2010)
6. T. Kishi et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

ポリケタイド生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】

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。

そこで平成 27 年度は、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（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）の創出を試みた。その結果、生合成遺伝子と複合体骨格遺伝子をゲノム上に導入した場合、生合成遺伝子だけの場合と比較して、フラビオリン合成量が 2 倍に増加し、プラスミド上に生合成遺伝子を導入した場合と同等まで合成量が改善する結果を得た。

【今後の予定】

酵素濃度・基質濃度・反応速度・複合体形成の化学量論比が明確な試験管内で、酵素複合体化の効果を検討する。また、抗腫瘍活性を持つクルクミンの生合成遺伝子を大腸菌ゲノムへ導入し、酵素複合体化による生合成量の変化を検討する。

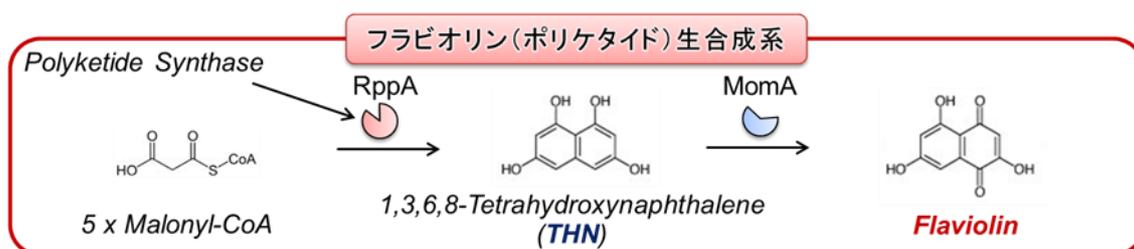


図 1. 放線菌の赤色色素化合物（フラビオリン）生合成系