

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業・報告

ラマン分光法による診断法の開発

田中裕之・沼田靖・小林 厚志 （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。これまでの研究で、アミノ酸¹⁾や脂質、糖のラマン強度比が濃度に比例することを見いだした。そこで、構造類似化合物の混合試料において、定量の精度を向上させるため、多変量解析による分析手段を取り入れた。

1. 不飽和脂肪酸の定量分析

1-1 序論

脂肪酸は食品中に含まれ、細胞膜の生成やエネルギー源に使われるなど、生命活動を行う上で重要な物質である。この脂肪酸には二重結合をもつ不飽和脂肪酸と単結合しかもたない飽和脂肪酸がある。さらに不飽和脂肪酸の構造にはシス体とトランス体が存在する。天然の脂肪酸はほとんどシス体であるが、ショートニングやマーガリンの製造の際、水素添加の過程でシス体からトランス体が生成されることがある。このトランス脂肪酸は動脈硬化等の疾病を引き起こす原因物質とされている。そのため、アメリカでは3年以内にトランス脂肪酸を全廃することが決められている。これまでの研究において、ラマン分光法による脂肪酸定量分析を行い、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、ラマン強度比が濃度に比例することが分かった。しかしながら、シス-トランス体の混合物には、スペクトルが似ているため、ピーク強度を使う方法では良い定量性が得られなかった。そこで、本研究ではスペクトルの解析方法として、多変量解析を用いて混合物における定量分析を多なした。

1-2 実験

今回の実験で用いた脂肪酸はシス体のオレイン酸とトランス体のエライジン酸である。ラマンスペクトルの測定は Renishaw 社 inVia Raman microscope を用いた。励起光には、532 nm のグリーンレーザーをサンプルに照射し、散乱光を検出部に導き、励起光をエッジフィルターで除去した後、分光器で分散した後、CCD で検出した。照射時間 1 s、積算回数を 50 回でスペクトルを得た。まず、濃度既

知のオレイン酸のラマンスペクトルを測定し、同時測定した基準物質であるアセトニトリルの 921 cm^{-1} のラマン強度に対する脂肪酸のラマン強度比を求めた。検量線はこのスペクトルを二階微分した後、多変量解析で解析して得た。混合物のラマンスペクトルを測定して、先ほど得た検量線で回帰することでシスおよびトランス体の濃度を求めた。

1-3 結果と考察

Fig. 1 にオレイン酸とエライジン酸由来のラマンスペクトルを示す。

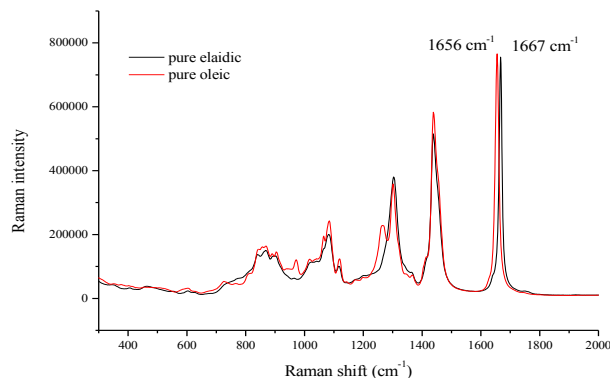


Fig. 1 Raman spectra of oleic and elaidic acids.

ふたつの脂肪酸のスペクトルは非常によく似ているのが分かる。しかし、 1660 cm^{-1} 付近に現れている C=C 二重結合の伸縮振動に帰属されるピークは 12 cm^{-1} 離れて観測される。このピークを使って定量分析を行うわけだが、図にみられるようにこれらのピークのテールは重なっていて、混合物になると定量するのは困難である。そこで、二階微分することで、スペクトルのピーク分離を行った。

Fig. 2 に二階微分をしたスペクトルを示す。Fig. 2 (a)は全体図で、(b)は 1660 cm^{-1} 付近を拡大した図である。Fig. 2b で見られるように、ふたつのピークはよく分離されているのが分かる。この二階微分したスペクトルを PLS 回帰を用いて解析した。実際仕込んだ濃度を横軸に、予測される濃度を縦軸に示した図を Fig. 3 に示す。この回帰モデルを用いて、混合試料の濃度既知試料のスペクトルから、シス体とトランス体の濃度を求めたところ、仕込み濃度と計算値が非常によく一致した。(図中の△、▲)

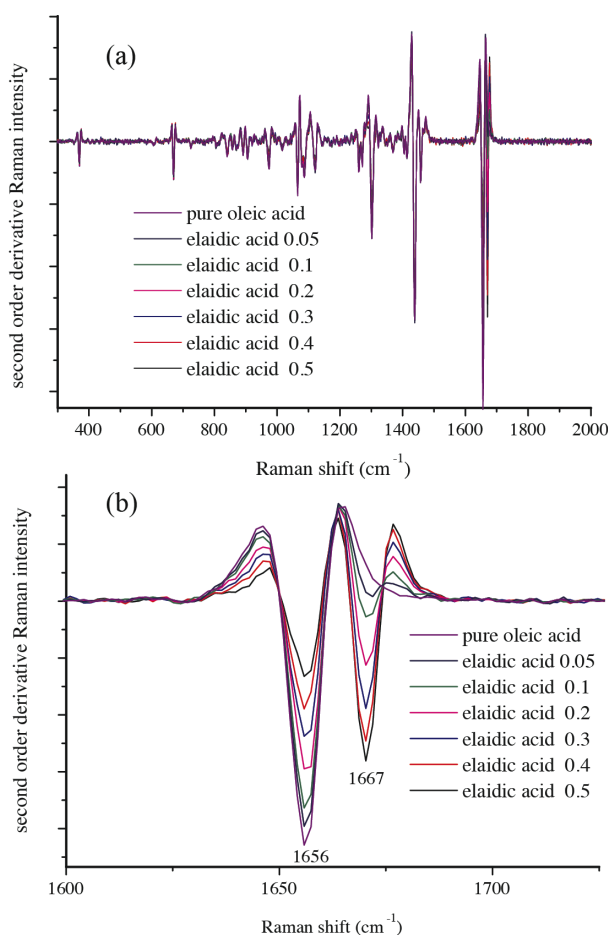


Fig. 2 Second derivative Raman spectra at several concentrations.

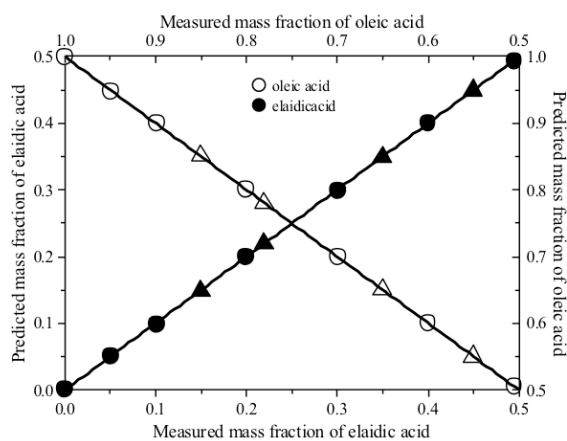


Fig. 3 PLS calibration curves of oleic and elaidic acids.

2. ビタミン C の定量分析

ビタミン C は、人間にとって欠かせない栄養素の一つとされている。ビタミン C は、還元型の L-アスコルビン酸と酸化型のデヒドロアスコルビン酸の 2 種類があり、人の体内ではビタミン C の 95 % は還元型で存在している。ビタミン C は、水溶性ビタミンであり強い抗酸化作用を有することから、動脈硬化やガンなどの予防に有効で

あると期待され、食品、飼料および医薬品などにも利用されている。そのため、生体内におけるビタミン C の定量は重要である。本研究では、純成分の L-アスコルビン酸とデヒドロアスコルビン酸の定量を検討した。次に L-アスコルビン酸とデヒドロアスコルビン酸から成る 2 成分系混合溶液の定量を行った。

結果と考察

Fig.4 に L-アスコルビン酸水溶液、デヒドロアスコルビン酸水溶液及びこれらの試料から成る 2 成分系混合溶液のラマンスペクトルを示す。L-アスコルビン酸は 1687 cm^{-1} に C=C 伸縮振動、デヒドロアスコルビン酸は 1793 cm^{-1} に C=O 伸縮振動のピークを確認した³⁾。これらのピークを用いて質量分率に対するラマン強度比をプロットすることで検量線を得た。

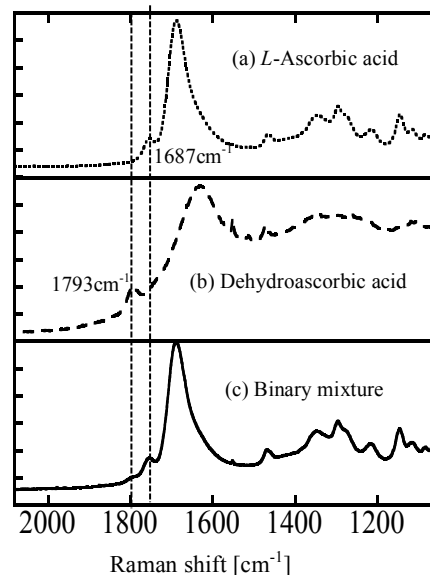


Fig. 4 Raman spectra of vitamin C.

純成分のラマン強度比は質量分率に対して、比例していることがわかった。一方、混合溶液は 1793 cm^{-1} のピークが純成分に比べて非常に小さくなっており、質量分率が 0.005 以下では検出できなかった。これは、混合溶液中では反応によって、還元型から酸化型に変化していると考えている。

【参考文献】

1) Numata, Otsuka and Tanaka, “Quantitative Determination of Glycine, Alanine, Aspartic acid, Glutamic acid Phenylalanine, and Tryptophan by Raman Spectroscopy”, *Analytical Letters*, 50(4), 651-662, (2017).

ラマン分光法による診断法の開発に向けた細胞外マトリックス模倣多糖ゲルの状態分析

小林厚志¹⁾, 伊藤博¹⁾, 星野優人¹⁾, 上沢七海¹⁾

1) 日大工・生命

【緒論】生物個体は細胞の集合体であるが、その細胞の内外の物質はゲル状態になっていると言われている。生命活動は物質が細胞内外の適切な場所で作用したり移動したりすることによって営まれており、物質はそのゲル空間を往来している。そのような生命活動に起因する物質の流れにより、生命体を構成するゲルは局所的に常に変化していると考えられる。しかし若齢の時はその変化を元に戻そうとする恒常性維持機構がはたらくため、変化の少ない定常的な状態にあると考えられる。多糖類やタンパク質で構成される細胞外マトリックスはその代表例である。その細胞外マトリックスは加齢に伴い、不可逆的に物理的または化学的に変化する(図1左)。本研究においては、老化の進行状態を評価するために、細胞外マトリックス中の多糖類の状態変化を観察する手法の開発を行っている。その手段としてラマン分光法の活用を考えたが、ラマン分光法が多糖類の構造変化を検出する手段として適切であるかどうか不明である。実際に存在する多糖類を用いて検証

することが望ましいが、複数の構成単糖からなる多糖類を用いた場合、その評価が困難になることが予想される。そのため、モデルケースとなる多糖類として澱粉を用いることとした。澱粉はグルコースのホモポリマーであり、化学的には単純な構造をとっているが、その分子中には分岐構造やらせん構造を有することから、微小構造の検出モデルとして適切である(図1右)。今回、様々な状態の澱粉ゲルの作製を行い、その性質を評価したので報告する。

【実験方法】

澱粉として、可溶性澱粉、トウモロコシ澱粉、バレイショ澱粉、コムギ澱粉を用いた。添加物として、水酸化ナトリウム、ホウ砂、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、リン酸一水素二ナトリウム、リン酸二水素一ナトリウム、リン酸三ナトリウムを用いた。澱粉のゲル化は、澱粉を水溶媒中に懸濁させた状態で76℃で20分間加温し糊化させた後、20℃の恒温槽で冷却を行うことによって行った。ゲル化の確認は、冷却したサンプル

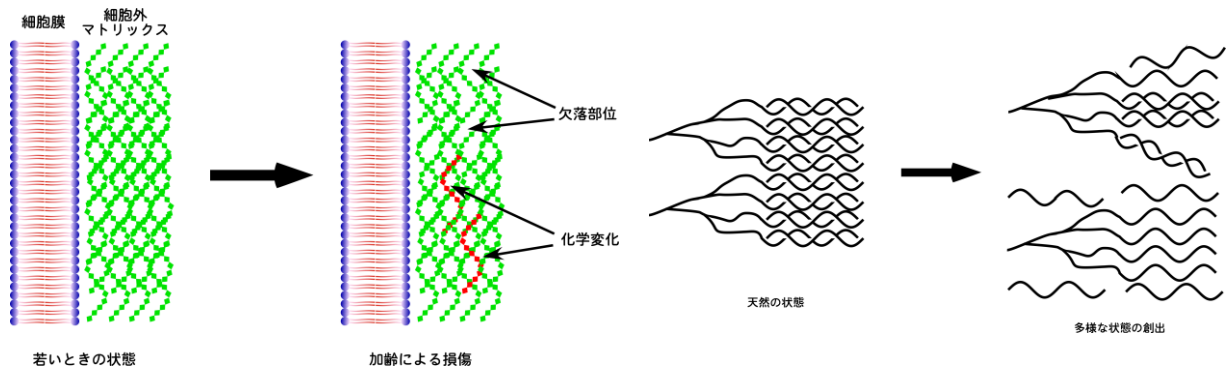


図1 細胞外マトリックスの状態変化(左)と澱粉の構造(右)のイメージ図。

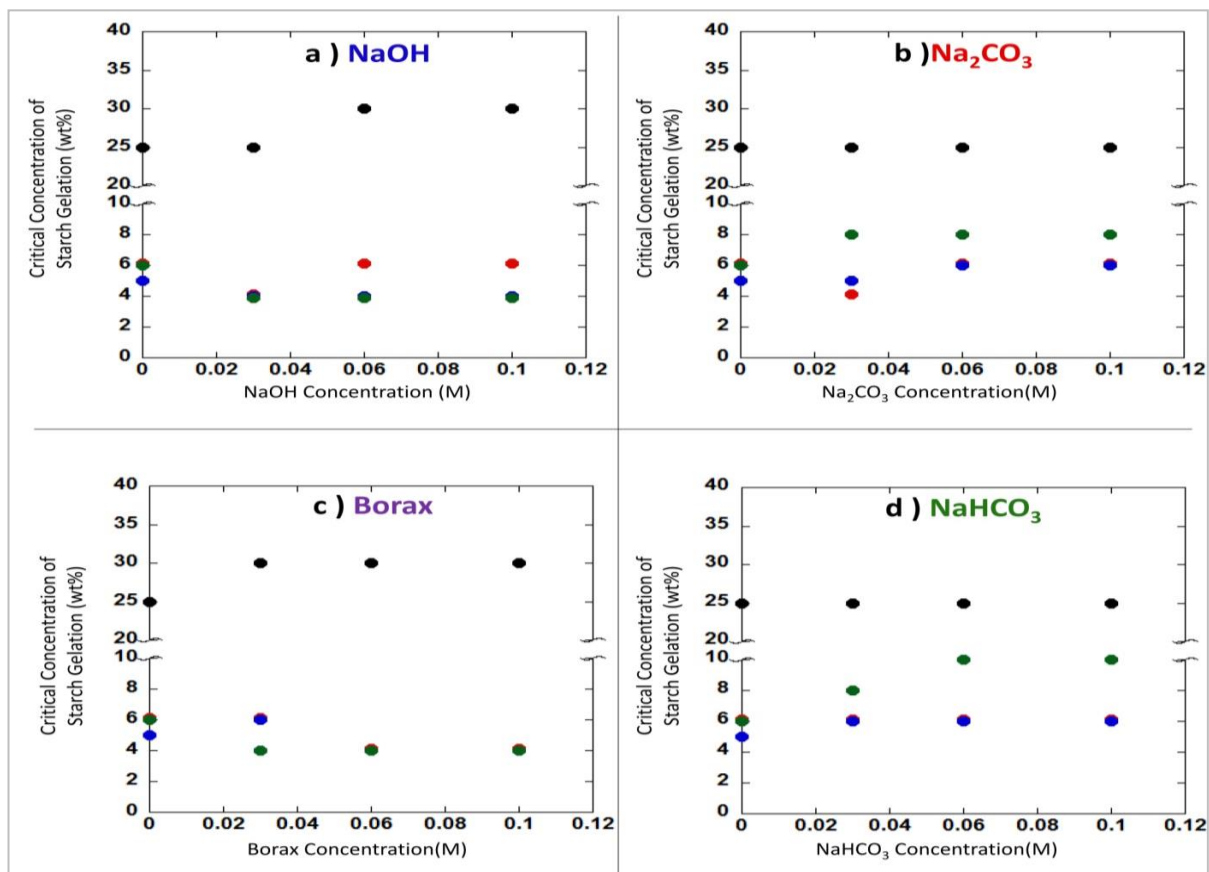


図2 Effects of various sodium salts on the starch gel formation (black: Soluble Starch, Red; Corn Starch, Blue; Potato Starch, Green; Wheat Starch). Concentration of all sodium salts were 0.1 M.

ルを容器ごと上下反転させ、その流動性を目視によって確認することによって行った。また、ゲルの保水能の確認は水分計を用いる蒸発速度の測定によって行った。

【結果と考察】

①澱粉のゲル形成に対するオキシ酸の効果

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に必要な最低濃度(臨界ゲル化濃度)が異なることを確認した(図2)。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臨界ゲル化濃度が低くなったが、可溶性澱粉のみ臨界ゲル化濃度が高くなるという結果が得られた(図2c)。その他のオキシ酸イオン存在下でも同様の実験を行ったところ、その変化の傾向は澱粉の由来によって異なることがわかった(図2、

a,c,d)。この現象は、澱粉の糊化からゲル化への状態変化に対してオキシ酸の構造や塩析/塩溶性の性質が影響しており、その影響の差異は澱粉の構造や粒径等に起因していると考えられる。局所現在、ラマン分光による局所構造の変化の検出可能性を検討すると同時に、DSC等の熱分析の実施も検討している。

②澱粉ゲルの乾燥耐性

次に、澱粉ゲルの乾燥耐性試験を行った。図3に、100℃で澱粉ゲルを保温したときの重量変化に基づく乾燥速度のプロファイルを示した。可溶性澱粉を用いた場合、乾燥速度はホウ砂添加濃霧にかかわらずほぼ同じであった。(図3上)。一方、と天然型澱粉の一つであるトウモロコシ澱粉を用いた場合は、ホウ砂無添加の場合は大きな乾燥速度が観測されたが、添加した場合は乾燥速度が

小さくなった。ゲル化の実験と合わせて考えると、天然型澱粉はホウ酸イオンを架橋剤とすることによりゲル構造を維持し、ゲル内の水分の保持力も大きくなっていると推測できる。現在、他の澱粉においてもその乾燥速度について検討を行っているところである。

今後の方針

状態の異なる澱粉ゲルが準備できたことから、これらをラマン測定することにより、その局所構造の検出可能性について検討する。また、各種オキソ酸イオンの添加効果が澱粉の由来によって大きく変化していることから、多糖構造に対するオキソ酸類の影響をより詳細に検討する。具体的には、澱粉とオキソ酸水溶液を混合加熱時に起こる糊化温度に対する影響等に関して DSC 等の機器分析を用いて検証する。さらには半固体 NMR などを用いて微視的な構造に関する基礎データを得る予定である。

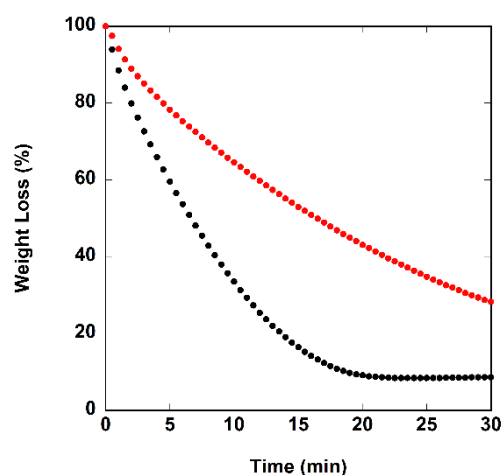
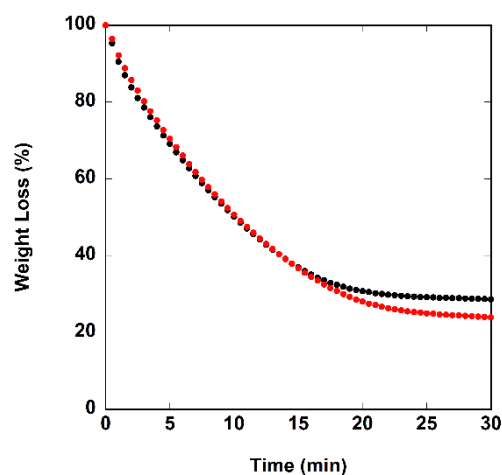


図3 Effects of borax on the Drying Tolerance of Starch Gels R at 100 °C. Top; soluble starch without borax (black) and with borax (red). Bottom; corn starch without borax (black) and with borax (red)

ピレンの蛍光消光を利用したチミン塩基識別プローブの開発

齋藤 義雄

日大工・生命

【緒論】

極性、粘性、pH などの周辺の環境変化に応じて蛍光強度や発光波長を劇的に変化させる蛍光ヌクレオシドを開発することが出来れば、標的 DNA や RNA の検出のみならず、遺伝子配列中の特定の位置の一塩基の違いなどの微細な構造変化を検出できるようになると考えられる。したがって、このような蛍光核酸塩基の開発は、核酸の微細構造解析や遺伝子診断のためのツールの開発にとって非常に重要であると考えられる。我々はこれまでに、周辺の環境変化に伴って蛍光強度や波長が変化する様々なデアザプリンヌクレオシドの開発に取り組んできたが、本研究では、新たに、蛍光消光を利用することで高感度で対面塩基（チミン塩基）を識別できる新規蛍光核酸塩基の開発を行った。^{1),2)}

本研究で開発した、非 π 共役系リンカーを有するピレン含有 3-デアザ-2'-デオキシアデノシン **Py^{3z}A (1)** は、オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) 鎖に導入して相補鎖とハイブリダイズさせた際に、**Py^{3z}A (1)** の対面塩基がミスマッチの時に強い

対して、対面塩基がマッチとなるチミン塩基の場合には、ピレンの蛍光発光が強く消光されることがわかった。この性質を利用することで、対面のチミン塩基を非常にクリアーに識別可能であることがわかった。

【実験方法および結果】

3-デアザアデニン塩基は、DNA を構成する 4 種類の天然の核酸塩基よりも酸化電位が低く、ピレンと隣接した際にピレンの蛍光を強く消光することができる考えた。そこで Fig. 1 に示したように、3-デアザアデニンとピレンを非 π 共役系リンカー（プロパルギルアミンリンカー）で連結した新規蛍光ヌクレオシドをデザイン・合成した。さらに、DNA/RNA 自動合成機を用いて **Py^{3z}A (1)** を ODN 鎖に導入することにより、新しい蛍光 ODN プローブを作成した (**Table 1**)。

Table 1 Oligonucleotides used in this study

ODNs	Sequences	
ODN1(X)	5'-d(CGCAACXCAACGC)-3'	X = Py ^{3z} A
cODN1(N)	5'-d(GCGTTGNGTTGCG)-3'	N = A, G, C, or T

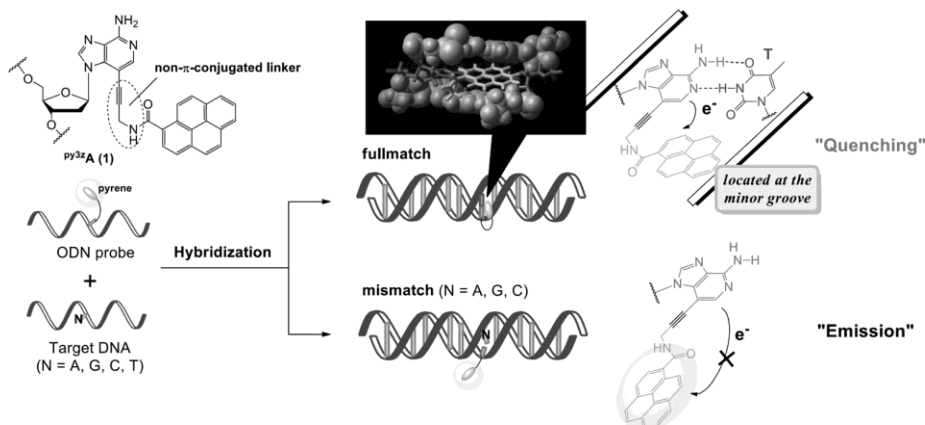


Fig. 1 Structure of pyrene-labeled 3-deaza-2'-deoxyadenosine **Py^{3z}A (1)** and schematic of the detection of a perfectly matched thymine in the target DNA through fluorescence quenching using an ODN probe containing **Py^{3z}A (1)**.

プローブ鎖を標的 DNA とハイブリダイズさせて二重鎖を形成させた際に、対面塩基がフルマッチ（チミン塩基）の時には、立体的に制限された狭い溝であるマイナーグループにピレンが入り込み、3-デアザアデニン塩基がピレンと隣接するようになるため、ピレンの蛍光が強く消光されると考えられた。それに対して、対面塩基がミスマッチの際には、ピレンが DNA の外側に移動し、ピレンと 3-デアザアデニンの距離が離れるためピレン本来の強い蛍光発光が見られると考えられた。実際にプローブ鎖を標的 DNA とハイブリダイズさせて蛍光スペクトルを測定したところ、プローブ鎖単独の場合、あるいは対面塩基がミスマッチ（A, G あるいは C）の場合には、ピレンの強い蛍光発光が観察されたのに対して、対面塩基がマッチとなるチミン塩基の場合には、強い蛍光消光が確認された (Fig. 2)。さらに、この蛍光消光は、Py^{3z}A (1) の前後の塩基配列に制限されないこともわかった。

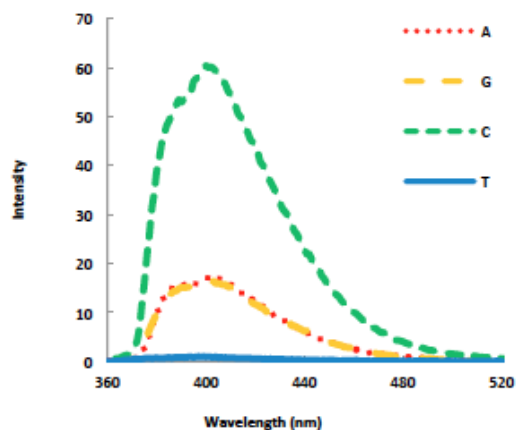


Figure 2. Fluorescence spectra of 2.5 μ M ODNI(Py^{3z}A) hybridized with 2.5 μ M cODNI (N = A, G, C, T) (50 mM sodium phosphate, 0.1M sodium chloride, pH 7.0, rt).

このように、新たに開発した Py^{3z}A (1) を用いたプローブを利用することで、標的 DNA 上の特定部位の位置にあるチミン塩基を、蛍光消光を利用して、蛍光の ON/OFF で識別できることがわかり、新たな蛍光 DNA プローブの開発に成功した。

このようなプローブは、核酸の微細構造解析や遺伝子診断のためのツールとしての利用が期待される。

【参考文献】

- 1) Y. Saito, Y. Miyauchi, A. Okamoto, I. Saito *Chem. Commun.* **2004**, 1704.
- 2) T. Aso, K. Saito, A. Suzuki, Y. Saito, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 10540.

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

【緒言】

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、ポリウレタンと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ポリシロキサンに導入することで、シリコー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、新規シリコーン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。これまでに我々は、ポリシロキサンの主鎖中に芳香環を導入し、主鎖の芳香環にスルホベタイン基を有するポリ(テトラメチルシルアリー

レンシロキサン) とポリ(ジメチルシロキサン-*ran*-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る当該シリコーンゴム創製を行ってきた¹⁾。その結果、架橋反応により材料の凝集が生じ、加工が困難となったことから、柔軟な架橋剤の選択ならびに新たな分子設計が必要である。

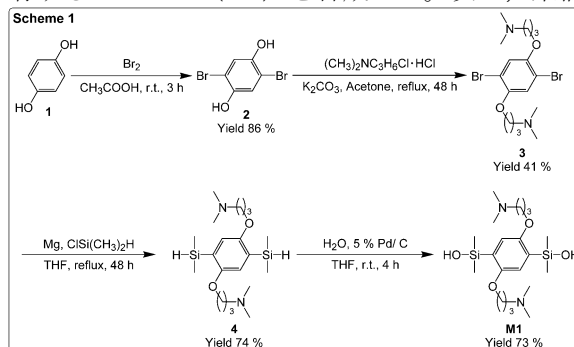
以上のような背景から、ポリシロキサンの主鎖中の芳香環上に架橋部位および双性イオン性基を有するポリ(テトラメチルシルアリーレンシロキサン) 誘導体、さらには、ポリシロキサンのペンダント部位に双性イオン性基を有するポリシロキサン誘導体を合成し、チオール-エンクリック反応を用いた新規シリコーンゴム材料の創製を行うことを本研究の目的とした。

【実験および結果】

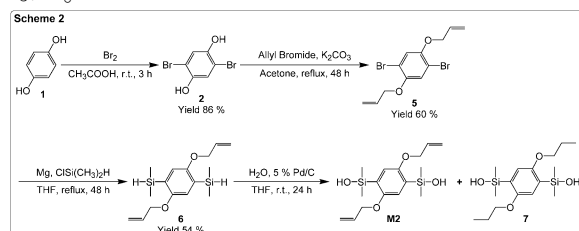
本研究課題では、ポリシロキサン誘導体に同種・異種材料との相互作用を付与し、接着性などの加工性を向上させるために、ポリ(テトラメチルシルアリーレンシロキサン) 誘導体の芳香環上あるいはポリシロキサンのペンダント部位に、双性イオン性基であるスルホベタイン基を導入することを計画した。また架橋点であるビニル基も同様に、芳香環部位あるいはペンダント部位への導入を検討した。

(1) 双性イオン性基導入部位および架橋部位を有するモノマーの合成

昨年に引き続き、Scheme 1 に示す合成経路に従い、双性イオン性基導入部位(三級アミン)を有するモノマー (M1) を合成した。次に、架橋

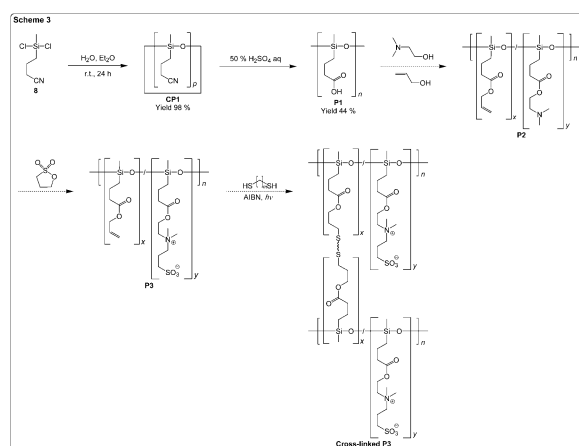


点であるビニル基を有するモノマーの合成 (Scheme 2) について検討した結果、加水分解反応の際に用いた Pd/C 触媒により、ビニル基が水素化された化合物 (7) が生成され、目的物であるモノマー (M2) の単離・精製が困難であった。そのため、芳香環部位にビニル基およびスルホベタイン基を有するポリ(テトラメチルシロキサン)誘導体の合成には至っていない。



(2) ペンダント部位にスルホベタイン基を有するポリシロキサン誘導体の合成

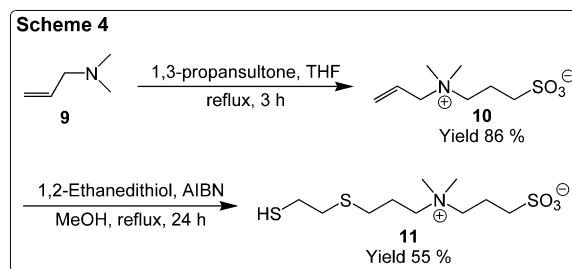
Scheme 3 に示す合成経路に従い、ペンダント部位にスルホベタイン基を有するポリシロキサン誘導体の合成について検討した。現在までにホモポリマー (P1) の合成を達成し、ポリシロキサン共重合体 (P2) の合成について検討している。一方で、出発原料であるシラン化合物 (8) の合成を試みたが、8 を得ることはできなかった。そこで、新たな分子設計を行い、スルホベタイン基を有するポリシロキサン誘導体を得るための原料の合成について以下に述べる。



(3) スルホベタイン基を有するチオール誘導体の合成

双性イオン性基を有するポリシロキサン誘導体の合成に必要なスルホベタイン基を有するチオール誘導体の合成経路を Scheme 4 に示す。*N,N*-ジメチルアリルアミン (9) に対し、1,3-プロパンスルトンを用いた四級化反応により、化合物 (10) を合成し、1,2-エタンジチオールを用

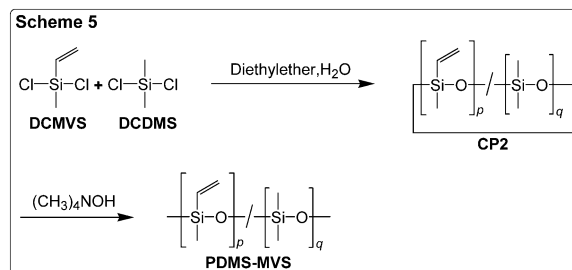
いたチオール-エンクリック反応により、スルホベタイン基を有するチオール誘導体 (11) を得た。



【今後の計画】

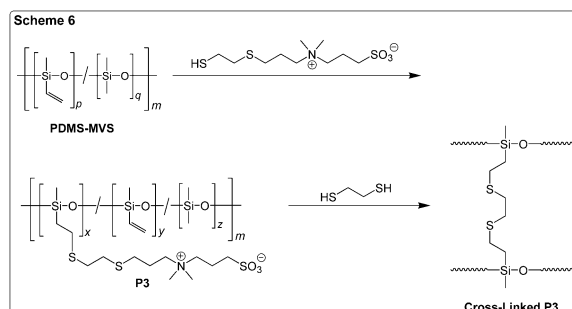
(1) ポリ(ジメチルシロキサン-*ran*-メチルビニルシロキサン)の合成

Scheme 5 に示すように、各種シランの加水分解および環化反応により得られる環状コオリゴマー (CP2) のアニオン開環重合を行うことにより、ポリ(ジメチルシロキサン-*ran*-メチルビニルシロキサン) (PDMS-MVS) を得ることができる。



(2) ポリシロキサンのペンダント部位へのスルホベタイン基導入およびシリコーンゴム創製

Scheme 6 に示すように、スルホベタイン基を有するチオール誘導体を用いて、ポリ(ジメチルシロキサン-*ran*-メチルビニルシロキサン)のチオール-エンクリック反応により、ペンダント部位にスルホベタイン基を有するポリシロキサン誘導体 (P3) の合成を行う。次に、得られたポリシロキサン誘導体の架橋反応により架橋体(シリコーンゴム) (Cross-Linked P3) を合成し、得られた架橋体の機械特性および生体適合性について検討し、組成比の最適化を行う予定である。



【参考文献】

- 市川 司, 春木 満, 根本 修克, 日本ゴム協会誌, 90 巻, 7 号, 2017 年, 7 月掲載予定.

DDS 医薬の創製

石原 務

日大工・生命

【緒論】

原発性肝臓がんは、主として肝炎ウイルス感染を起因に慢性肝炎・肝硬変を経て進行し、その死者数は国内だけで年3万人を超える。しかしながら、その一連の疾患に対する決定的な治療法はなく、特に肝臓がんにまで進展してしまうと生存率は劇的に低下する。平成23年度には厚労省が「肝炎研究10ヵ年戦略」を取りまとめており、これらの肝疾患を克服することの重要性・緊急性が窺い知れる。そこで、本研究では、独自のDDS技術を用いた創薬研究戦略に基づき、肝炎と肝硬変に対する非侵襲的な薬物療法を確立することを目指し、具体的には、二つの薬物キャリア(①ウイルス性慢性肝炎治療のため肝実質細胞を標的とするナノ粒子と②肝硬変治療のため肝星細胞を標的とするナノ粒子)の開発を試みた。

① 肝実質細胞を標的としたナノ粒子の開発

【背景】

現在のC型慢性肝炎治療では、様々な薬物が併用投与されている。その薬物の一つが抗ウイルス薬のリバビリンであるが、溶血性貧血の副作用を伴う。そこで、副作用低減と薬効の向上を目指し、リバビリンを内部に包埋し、かつ肝実質細胞のアシアロ糖タンパク質レセプターに結合するリガンド分子を表面に配した生分解性ポリマーからなるナノ粒子の開発を試みた。

【実験方法】

ナノ粒子は、アラビノガラクトサンとポリグルタミン酸のコンジュゲート(AG-PLG)、末端にアミノ基を導入したポリ乳酸(PLA-N)、リバビリン-リン酸(RMP)を溶解したDMSO溶液を水相に添加

するOil-in-water型溶媒拡散法により調製した。その際、各化合物の量や添加速度が、ナノ粒子の大きさ及びリバビリンの封入率に及ぼす影響を評価した。HepG2細胞(ヒト肝癌由来細胞株)へのナノ粒子の取り込みは、蛍光化合物をラベルしたナノ粒子を37°Cで細胞とインキュベートした後、細胞を蛍光顕微鏡で観察し評価した。また、ナノ粒子の細胞毒性はWST-8アッセイにより評価した。

【結果と考察】

以前の我々の研究では、肝実質細胞へリバビリンを選択的に運搬するため、ナノ粒子表面にガラクトースを主成分とした多糖のアラビノガラクトサンを配したナノ粒子を調製した。このナノ粒子をマウスの静脈内に投与したところ、肝臓に大量のリバビリンが運搬されかつ長期にわたりそこに残留していた¹⁾。しかしながら、このナノ粒子では、アラビノガラクトサンを粒子表面に固定する際にポリカチオンのポリリジンを用いているため細胞毒性が認められた。そこで、本研究では細胞毒性が低い新たなリバビリン封入高分子ナノ粒子の作製を試みた。

ポリリジンあるいはポリグルタミン酸とアラビノガラクトサンのコンジュゲート(AG-PLL, AG-PLG)、末端がカルボキシ基あるいはアミノ基のPLA(PLA-C, PLA-N)をそれぞれコーティング剤及びコア物質として用いナノ粒子を調製した(Table 1)。ゼータ電位測定からAG-PLLあるいはAG-PLGが粒子表面にコーティングされていることが明らかになった。ナノ粒子をリン酸緩衝液中(pH7.5)にて37°Cでインキュベートし、ナノ粒子からのリバビリン放出挙動を解析すると、リバ

ビリンはナノ粒子から約 20 日にわたり少しずつ徐放出されていることが明らかになった (Fig. 1)。

Table 1 Nanoparticle characteristics

Code	Coating polymer	Core polymer	ζ -potential (mV)	Diameter (nm)	RMP loading efficiency (wt.%)
None/C-NP	None	PLA-C	-43.4	107	N.D.
None/N1-NP	None	PLA-N1	-0.1	167	N.D.
None/N3-NP	None	PLA-N3	5.1	143	N.D.
PLG/N1-NP	AG-PLG	PLA-N1	-5.5	158	0.1
PLG/N3-NP	AG-PLG	PLA-N3	-4.1	88	0.6
PLL/C-NP	AG-PLL	PLA-C	0.0	77	0.8

The diameters and ζ -potentials were measured three times and the mean values were shown. N.D.: not determined

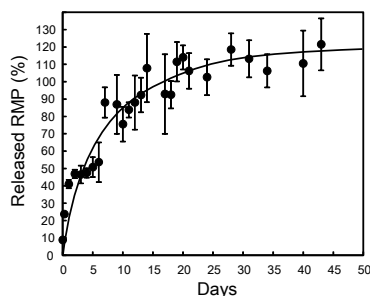


Figure 1. Release behavior of RMP from the nanoparticles.

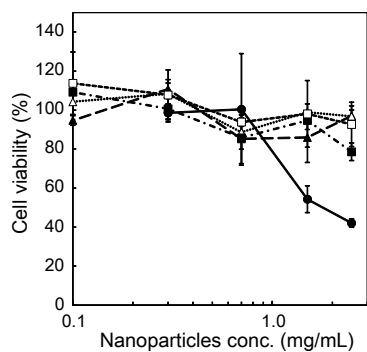


Figure 2. Cytotoxicity of various nanoparticles. HepG2 cells were incubated with PLG/N1-NP (open triangle), PLG/N3-NP (closed triangle), None/N1-NP (open square), None/N3-NP (closed square), or PLL/C-NP (closed circle) in Opti-MEM for 24 h.

ローダミンでラベルしたナノ粒子を用い細胞への取り込みを観察すると、AG-PLG を用いずに作製したナノ粒子に比べ、用いたナノ粒子では顕著な細胞への取り込みが観察された。これは、ナノ粒子表面の AG がリガンドとなりレセプター依存のエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれたためと考えられる。また、AG-PLL を用い作製したナノ粒子では顕著な細胞毒性を示したのに対し、AG-PLG を用い作製したナノ粒子はほとんど細胞毒性を示さなかった (Fig. 2)。さらに、

マウスでの実験から、AG-PLG を用いたナノ粒子は、肝臓に集積することが明らかになった。

以上より、このナノ粒子は次のような機能 ① リバビリンの赤血球への移行を回避し副作用を軽減できる、② リバビリンがナノ粒子から徐放出され薬効が長期持続できる、③ 肝実質細胞へ選択的に運搬できる、④ 粒子自体が細胞毒性を示さないを有する新たな慢性肝炎治療薬としての利用が期待される。

② 肝星細胞を標的としたナノ粒子の開発

【背景】

慢性肝炎が進行すると肝硬変にいたる。肝硬変は不可逆性の病態であり、非代償性期肝硬変では根治治療法がなく合併症の対症療法が基本治療方針である。一方、実験的動物モデルでは可逆的に肝硬変症状が緩和したとの多数の報告があり、特に肝線維化に中心的な役割を担う肝星細胞のコラーゲン産生を抑制することが有効な治療法につながると考えられている。しかし、現行の抗線維化薬は全身に分布し強い副作用を示すため、臨床で肝硬変治療に応用するのは難しい。そこで、本研究では、抗線維化薬を肝星細胞に選択的に運搬できるナノ粒子を開発することを目的とする。抗線維化薬としては、COX-2 選択的阻害薬であり主に関節リウマチや腰痛症などに対し消炎・鎮痛効果を有するセレコキシブを用いた。セレコキシブは近年肝星細胞のアポトーシス誘導やコラーゲン産生抑制効果が見出されている。しかし、セレコキシブは全身に分布してしまい代謝されやすい。そこで、肝星細胞へ選択的にセレコキシブを集積させるため、肝星細胞に特異的に結合するペプチドを修飾したナノ粒子の作製を試みた。

【実験方法】

肝星細胞に発現している血小板由来増殖因子

受容体(PDGFR)に特異的に結合する環状ペプチド(pPB, 配列: KGGCSRNLIDC)をリガンド分子として用いた。pPBを末端に導入したポリエチレングリコールとポリ乳酸からなるブロックポリマーを合成した。ナノ粒子は、このポリマーとポリ乳酸、セレコキシブを溶解したDMSOを水中に添加するOil-in-water型溶媒拡散法により調製した。細胞との相互作用は、PDGFRが発現しているTWNT-1細胞(ヒト不死化肝星細胞株)あるいはHeLa細胞(ヒト子宮頸がん由来細胞株)を用い評価した。また、蛍光物質を修飾した18merのオリゴDNAあるいはローダミンを内封したナノ粒子を調製し、細胞への取り込みを評価した。

【結果と考察】

蛍光ラベルしたpPB自体が顕著にTWNT-1細胞に取り込まれたことから、pPBがリガンドとして機能することが示唆された。pPBを導入したブロックポリマーの合成は、SECと¹H-NMR解析から確認した。このポリマーとポリ乳酸を用いナノ粒子を調製し、TWNT-1細胞あるいはHeLa細胞への取り込み評価を行った。その結果、pPB未修飾ナノ粒子に比べ修飾ナノ粒子の方が多く細胞に取り込まれていた。その取り込みは、pPBを大量に共添加することで抑制された。さらに、リソソーム染色試薬であるLysoTracker Redを共添加すると、細胞内の分布がほぼ一致していたことから、取り込まれたナノ粒子はリソソームに分布していることが示唆された。よって、pPBがリガンド分子としてPDGFRに特異的に結合し、エンドサイトーシスによってナノ粒子が細胞内に取り込まれたと考えられる。セレコキシブの細胞毒性試験をWST-8アッセイにより行ったところ、100 μ M以上で細胞死が確認できた。また、Hoechst33258で染色すると高濃度のセレコキシブで核内の強い青色蛍光が観察されたことからクロマチン凝縮に伴うアポトーシスであることが示唆された。

一方、肝硬変の遺伝子治療を目指しセレコキシブに代わり核酸分子を封入したナノ粒子の作製も試みた。末端アミノ化ポリ乳酸を用いることでオリゴDNAが粒子内に有意に包埋できることが分かった。

以上より、pPB修飾ナノ粒子は肝星細胞へ特異的に薬物を運搬するキャリアとしての利用が期待できる。

【参考文献】

- 1) Ishihara T, *et al*, J Pharm Sci. 103: 4005-4011 (2014)

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、一本鎖の核酸分子であり、標的分子に対して抗体と同等の高い親和性と特異性を持つ。一方で、抗原性を示さない点や、化学合成によって安価に製造できる点、乾燥状態で安定に保存できる点など、抗体にはない特性を有している。このことから、RNA アプタマーは、抗体医薬に続く次世代技術として、医薬品分野や診断薬分野など、Active aging を支援する新機能性分子として開発が進むものと期待されている。

RNA アプタマーを実用化するためには、塩基配列を決定するだけでなく、生体内での酵素耐性を得るために、各塩基に対して高度に化学修飾することが必須である。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。このプロセスの効率化が、新規 RNA アプタマーの開発における大きな課題となっている。本研究は、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が目的である。

平成 28 年度は、ヒト抗体(IgG)に対する RNA

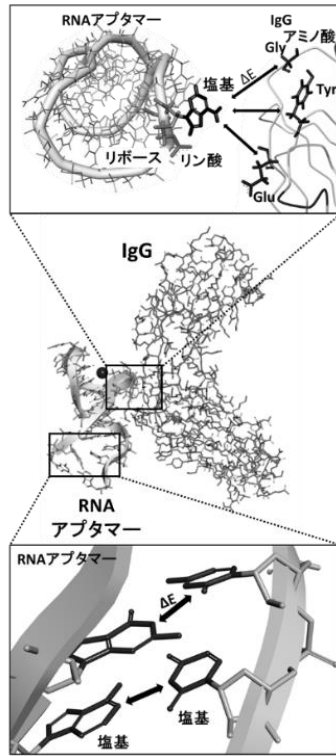


図 1. RNA アプタマーとヒト抗体 (IgG) との複合体の立体構造

アプタマーを解析対象とし、アプタマーと標的タンパク質との分子認識メカニズムの解析、およびアプタマーの立体構造について解析を行った。

【方法】

アプタマーの立体構造の解析には、分子動力学 (MD) シミュレーションを用いた。MD 法は、分子の運動を解析するための計算化学的手法である。原子間に働く力を単純なポテンシャル関数で表現し、ニュートンの運動方程式を解いて分子の運動を調べることができる。本研究では、配列の異なる複数のアプタマーに対して、100-300 ナノ秒[ns]間の動的な構造変化を解析し、塩基への化学修飾がアプタマーの構造に与える影響について解析した。MD 計算では、アプタマーの周囲に TIP3P モデルの水を配置し、カウンターイオンを付加することで、中性の溶媒モデルを作成した(図 2)。AMBER 力場 ff14SB を用い、計算プログラムには Amber14 の sander を用いて MD シミュレーションを実行した。

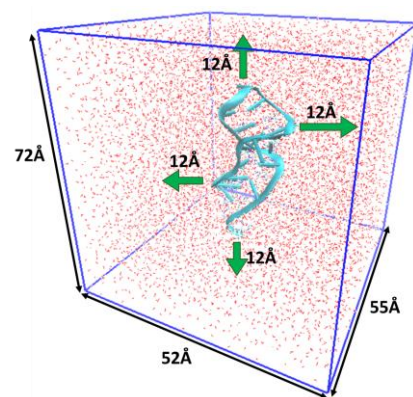


図 2. 溶媒モデル

【結果】

(i) 化学修飾がアプタマーの構造に与える影響

分子動力学(MD)シミュレーションを用い、ヒト抗体(IgG)に対する結合性の異なる複数のアプタマーに対して 300 ナノ秒[ns]間の経時的な動

S 期開始のメカニズムの解明

岸 努 日大工・生命

【緒論】

遺伝情報を安定に維持するためには、染色体の複製と分配の厳密な制御が不可欠である。染色体の複製は S 期に行われるが、通常 1 回の細胞周期で S 期は決められた時期に一度しか起きない。S 期開始の制御が正しく遂行されずに通常より早く S 期を開始する変異株は、染色体の欠損が高頻度で誘発する。また細胞の癌化の多くは、S 期開始の制御に関わる遺伝子機能の欠損が原因となっている。したがって、S 期開始のメカニズムの解明は、生物学的にも医学的にも重要である。

S 期開始を直接制御する因子として 3 つのタンパク質が明らかとなっている。まず S 期開始に必須のタンパク質で、標的タンパク質の分解をひき起こす Cdc4 (1)、S 期の進行を直接制御する S-Cdk (S 期サイクリン-サイクリン依存キナーゼ複合体で G1 後期に合成される) (2)、そして G1 期に発現し S-Cdk の活性を阻害する Sic1/p27 (3) である。しかしこれら 3 つのタンパク質による S 期開始制御機構は混沌としている。1994 年にモデル細胞である酵母において、*cdc4* 温度感受性変異株は制限温度において S 期を開始できずに致死性を示すが、*SIC1* を破壊した *cdc4 sic1* 二重変異株では S 期を開始できることが報告され (4)、Cdc4 による Sic1/p27 の分解が S 期開始に必須であることが提唱された (同様な結果はヒトにおいても示された)。しかしその後、Sic1/p27 の分解は必ずしも S 期開始には必須ではないことを示す結果も報告されている (5, 6)。Sic1/p27 の分解はリン酸化が必須であり、リン酸化部位であるセリン・スレオニン残基をアラニンに置換した Sic1/p27 は分解を受けずに安定化するが、こ

の安定化型 Sic1/p27 を発現する細胞は、ヒトにおいても酵母においても G1 期が長くなるものの S 期開始を遂行することができるという結果である。このように、S 期開始制御における Sic1/p27 の分解の重要性は相反する結果が報告されている。本研究は、このパラドックスの解決を目指して酵母を用いて研究を行った。

【方法】

Swi5 の安定性はパルス・チェース実験、および GFP との融合タンパク質を用いたタイムラプス・イメージングによって調べた。

SWI5 遺伝子への突然変異は、PrimeStar Max を用いた PCR 法により導入した。

【結果】

S 期開始制御における Cdc4 の標的タンパク質は Sic1/p27 以外に存在する可能性を検討した。すなわち、*cdc4* 温度感受性変異株が制限温度で致死性を示すのは、Sic1/p27 とタンパク質 X の分解ができないためと仮定した。すると X の機能としては、以下の二つのどちらかが考えられる。一つ目は、S 期サイクリンの合成を阻害する可能性である。すなわち、*cdc4* 温度感受性変異株では Sic1/p27 の分解ができないだけでなく、S-Cdk 自体ができないために S 期を開始できない可能性である。しかしこの可能性は否定できる。*cdc4* 温度感受性変異株でも S 期サイクリンは野生株と同様に発現するうえに、*cdc4 sic1* 二重変異株では S 期を開始できるという 1994 年に報告された結果を説明できない。

二つ目の可能性は、X が Sic1/p27 の発現を促

進する可能性である。この考えに従うと、*cdc4* 温度感受性変異株が致死性を示すのは、Sic1/p27 が安定化するだけでなく、発現量も著しく増大し、その結果 S-Cdk の発現が Sic1/p27 を超えられないためと説明できる。*cdc4 sic1* 二重変異株では S 期を開始できることと矛盾しないうえに、安定化型 Sic1/p27 を発現する細胞が生育可能であること、および G1 期が長くなることを説明できる。

すでに私は Cdc4 の標的タンパク質として Swi5 を明らかにしている (7) が、この Swi5 は Sic1/p27 の転写活性化因子であり、X の条件を満たしている。そこで S 期開始における Cdc4 の標的タンパク質は Sic1/p27 と Swi5 であるか検証した。

まず Cdc4 による分解を受けずに安定化する安定化型 Swi5 を作製した。Swi5 の分解はリン酸化に依存することをすでに報告している。したがって、そのリン酸化部位を同定し、その部位をアラニンに置換すれば、その変異型 Swi5 は安定化するはずである。フォスフォペプチドマッピングにより Swi5 は少なくとも 25 カ所のリン酸化部位が存在する。現時点で、これらのうちの数カ所は分解に必要であること、これらアラニンに置換すると Swi5 は安定化することを明らかにした。

次に安定化型 Swi5 と安定化型 Sic1/p27 を発現するプラスミドを作製し、酵母細胞を形質転換した。一方のみを発現する細胞は生育が可能であったが、両方を発現するプラスミドを用いた場合には形質転換体を得ることができなかった。

以上の結果は、S 期開始において Cdc4 は Sic1 の分解を制御するだけでなく、Swi5 の分解を介した Sic1 の発現も制御することを示す。Swi5 の分解は G1 初期に起こることから、Cdc4 は G1 初期における Swi5 の分解と G1 後期における Sic1 の分解の二段階で S 期開始を制御することを明らかにした。

【参考文献】

- (1) Hartwell et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 66, 352-359 (1970)
- (2) Schwob et al. Genes Dev. 1160-1175 (1993)
- (3) Mendenhall. Science 259: 216-219 (1993)
- (4) Schwob et al. Cell 79: 233-244 (1994)
- (5) Malek et al. Nature 417: 323-327 (2001)
- (6) Cross et al. Genetics 176: 1541-1555 (2007)
- (7) Kishi et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 105: 14497-14502 (2008)

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、従来のマルチプラスミド法では、各プラスミドのコピー数の違いによって酵素発現量に違いが生じるため、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用の際に問題が生じる場合がある。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、大腸菌ゲノムの計 5 ヲ所に生合成遺伝子を導入し、プラスミド上に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、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、合成量が2倍に増加し、プラスミド上に導入した場合と同等まで合成量が改善する結果を得た。

平成 28 年度は、この酵素複合体化による合成量の改善が、挿入ゲノム部位に因らないことを確認するため、計 3 ヲ所のゲノム上部位へ生合成遺伝子を導入し、合成量の確認を行った。その結果、いずれのゲノム上部位においても、酵素複合体化による合成量の改善効果が生じることを確認した。また、合成量の改善は、比色定量だけでなく、逆相 HPLC によっても確認した。

【今後の予定】

試験管内において、酵素複合体化の効果を解析する。また、抗腫瘍活性を持つクルクミン生合成系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。

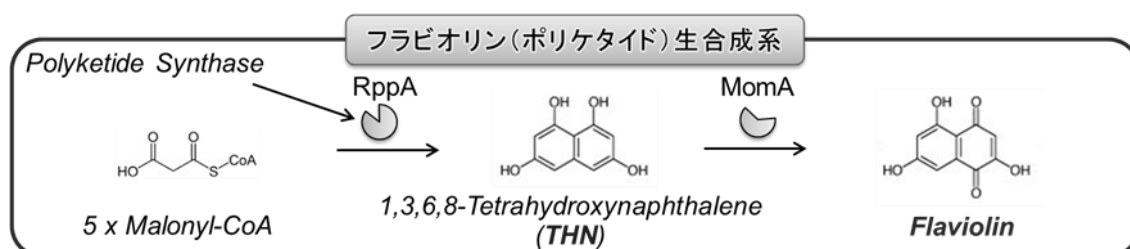


図 1. 放線菌の赤色色素化合物（フラビオリン）生合成系