

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）

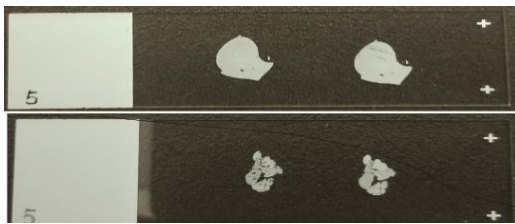
我々のグループでは疾病関連物質の定量分析をラマン分光法で行うことを目標としている。これまでの研究で、アミノ酸¹⁾や脂質、糖のラマン強度比が濃度に比例することを見いだした。そこで、通常細胞とガン細胞のラマンスペクトルを比較し、ガン特有のピークを見つけることを目的として実験を行った。

【序論】

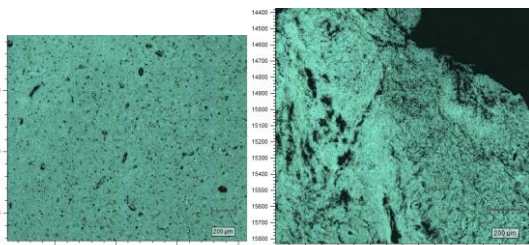
がんは 通常の細胞から発生した増殖を制御できない異常な細胞である。そこで、通常細胞と異常細胞の間で、どのような構造変化が起こるか興味をもった。この情報はがんの早期発見や治療に大いに役に立つと考えられる。本研究では通常細胞とがん細胞の組織片のラマンスペクトルを測定し、ピーク位置の違いや強度の違いについて調べた。

【実験】

通常細胞とがん細胞は Bio-Chain 社製のヒト成人正常組織切片スライドおよびヒト成人腫瘍組織のパラフィン組織切片スライドを用いた。パラフィンをキシレンで除去したのち、ラマンスペクトルを測定した。



組織片 上：通常細胞，下：がん細胞



組織片拡大写真 左：通常細胞，右：がん細胞

ラマンスペクトルの測定には Renishaw 社製 in via Raman microscope を用いた。532 nm の励起光を 50 倍の対物レンズで試料の表面に集光し、1s 間照射した。励起光をフィルターで除去したのち、

ラマン散乱光のみを分光器で分光し、CCD で検出した。これを 30 回繰り返して、スペクトルを得た。次に各組織 30 点で測定したスペクトルを多変量解析（主成分分析）を用いて解析した。

【結果と考察】

Fig. 1 に通常細胞とがん細胞のラマンスペクトルを示す。通常細胞 (Normal) は黒線で、がん細胞 (Tumor) は赤線で表している。一見すると、これら二つのスペクトルの差はあまりないように見える。特にがんになると新たに現れてくるピークは観測されなかった。しかしながら、1606 cm^{-1} のバンドの強度ががん細胞の方が通常細胞よりかなり大きくなっていることが見てとれる。

これらのスペクトルは組織の 1 点で測定したスペクトルであるので、たまたま強度に差が出た可能性もある。そこで次に各組織の 30 点の箇所を測定を行い、主成分分析で解析した。

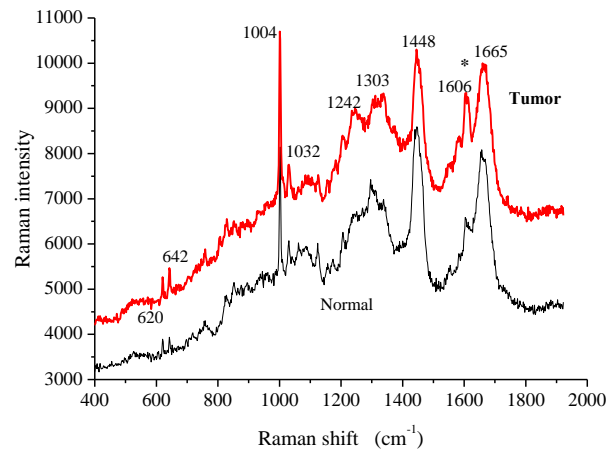


Figure 1 Raman spectra of normal and tumor tissues.

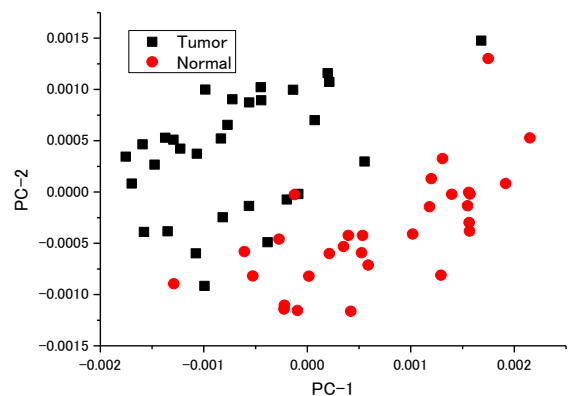


Figure 2 Score plot for PC1 vs PC2.

Figure 2 に主成分 1 に対する主成分 2 をプロットしたスコアプロットを示す。赤丸で表した通常細胞とがん細胞（黒四角）を比べると、主成分 1 (PC1) の大きい方が赤丸が多く、PC2 の大きい方に黒四角が多いのが見てとれる。これは通常細胞は主成分 1 に、がん細胞は主成分 2 に関係しているといえる。そこで、Figure 3 に主成分 1 および 2 のローディングプロットを示す。

主成分 1 のローディングプロットは、主成分 1 に関連するスペクトルを示している。主成分 2 のローディングプロットと主成分 1 を比較すると Figure 1 のラマンスペクトルで予想した通り、 1606 cm^{-1} のバンドの強度が大きく異なることがわかる。これはがん細胞ではこの 1606 cm^{-1} のバンドが増加していることを示している。また、他に、 1582 cm^{-1} , 1340 cm^{-1} , 1000 cm^{-1} のバンドが増加し、 1050 cm^{-1} , 950 cm^{-1} の領域の強度が下がっていることもわかる。これらの振動の帰属を行い、表 1 に示す。

Table 1 Assignments of Raman peaks.

Raman shift (cm ⁻¹)	Assignments
1000	Symmetric CC aromatic ring breathing
1340	CH ₂ Deformation of Adenine
1582	C—C stretching, C—H bending
1606	CO stretching, C=C bending of Phenylalanine or Tryptophan

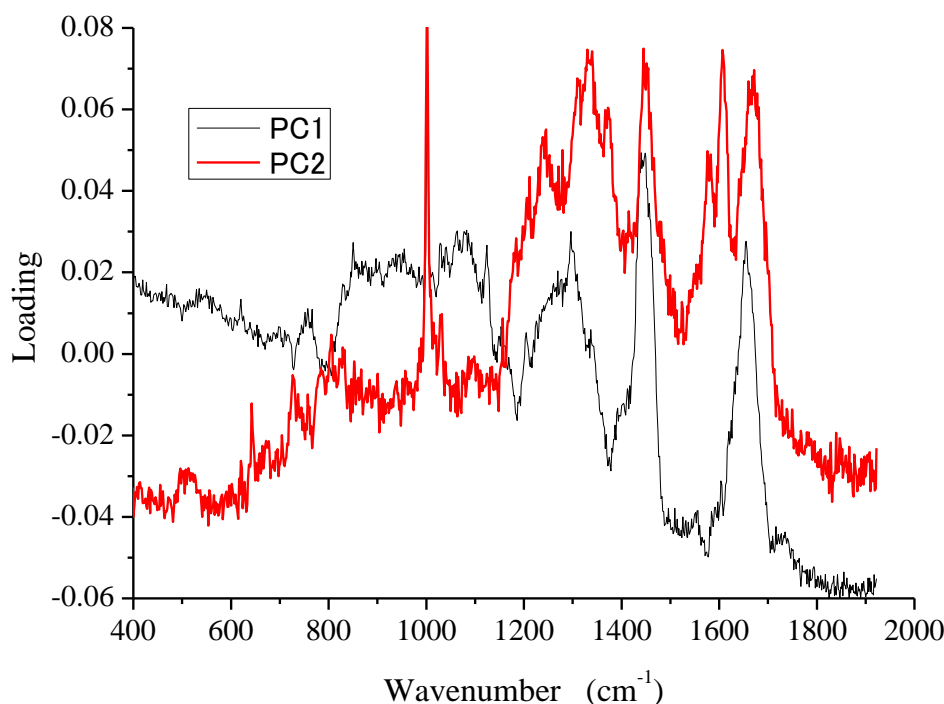


Figure 3 Loading spectra of PC1 and PC2.

まだなぜこれらのピークが増大するかはわからないが、主に芳香族化合物のピークが顕著に現れてくるという傾向があることがわかった。

平成 29 年度の活動

学会発表

分析化学討論会

小林, 沼田, 田中「ラマン分光法によるリン酸会合体の定量分析」

長鈴, 沼田, 田中「表面増強ラマン散乱を用いた定量分析法の開発」

沼田, 赤間, 田中他「ラマン分光法によるオレイン酸-エライジン酸混合溶液の定量分析」
分析化学年会

小林, 沼田, 田中「多変量解析を用いた微量分析に向けたラマンスペクトル解析法の開発」

長鈴, 沼田, 田中「表面増強ラマン散乱による増強ピークの時間変化と安定性の追跡」

佐々木, 沼田, 田中「顕微ラマン分光装置を用いたアルコール水溶液の簡易定量分析」

食品科学工学会

沼田, 月岡, 小林, 田中食品廃棄物中に含まれる有用アミノ酸のラマン分光法による定量分析

投稿論文

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

糖質化学的手法を活用するラマン分光法による診断法の開発

日本大学工学部 生命応用化学科 小林厚志

1 緒言

生物は時間の経過とともに老化する。これは、生物は誕生してから分子レベルでの不可逆的な変化を重ねていくためである。その分子レベルでの変化が視認可能、または、生化学検査などにより顕在化する前に、個体ごとにその老化のレベルを知ることは健康寿命を延ばす上で必要なことである。分子レベルでの変化は、個体への影響を考えると非破壊的な方法であることが望ましい。そこで本研究では、非破壊的な手段で分子の変化を追跡可能なラマン分光法に焦点を当て、生体内分子の変化を観察する方法の開発を目指した。そのモデル系として細胞外に豊富に存在する糖質を採用し、①多糖類である澱粉の状態変化の観察 ②糖脂質の酵素合成に適した酵素のハイスループットな検出法について検討したので報告する。

2 ラマン分光法による多糖類の構造解析

当グループではこれまでに、澱粉のゲル化に対するオキソ酸イオンの影響について検討してきた。特に影響の大きかったホウ酸イオン（ホウ酸イオン源として四ホウ酸ナトリウムを用いた）の影響について詳細に検討したところ、添加効果が澱粉の構成成分によって異なることが分かった。直鎖状のアミロースを主成分とする可溶性澱粉ではゲル形成能の低下が、分岐構造を有するアミロペクチンを主成分とする天然型澱粉ではゲル形成能の向上が見られた(Figure 2)。さらにこれら澱粉ゲルの保水能に対するホウ酸イオンの添加効果を調べるために、加温条件下(100 °C)での重量減少を測定したところ、可溶性澱粉ではその影響が見られなかったが、トウモロコシ澱粉では重量減少速度が小さくなった¹⁾(Figure 2)。以上のことにより、澱粉の種類によりホウ酸イオンの存在形態が異なることを予想した。

最近、これらゲル中におけるホウ酸イオンの存

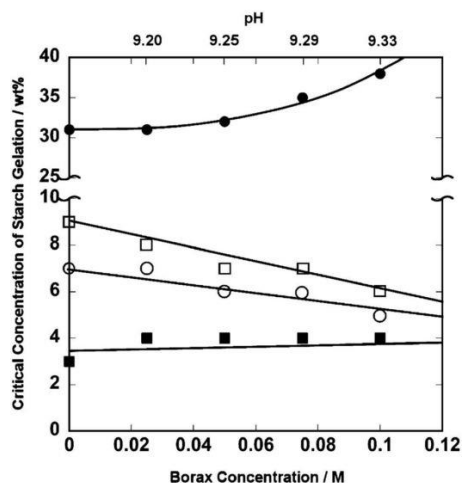


Figure 1 澱粉のゲル化に必要な最少濃度に対するホウ砂の添加効果。●可溶性澱粉、○トウモロコシ澱粉 ■バレイショ澱粉、□コムギ澱粉

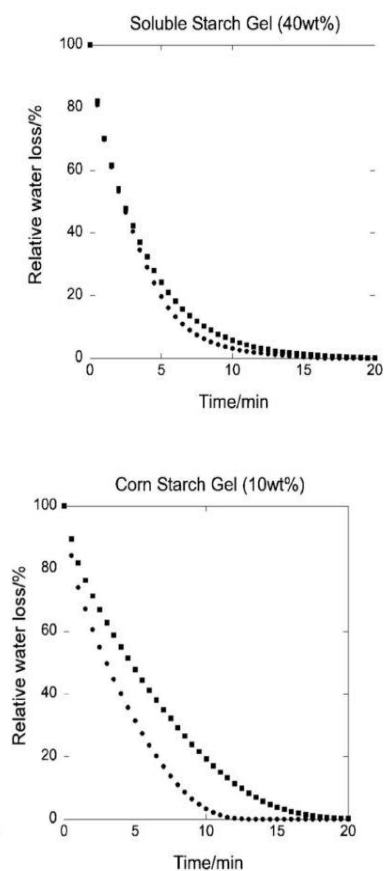


Figure 2 100 °Cにおける澱粉ゲルの水分量変化 ●ホウ砂無し。■ホウ砂あり

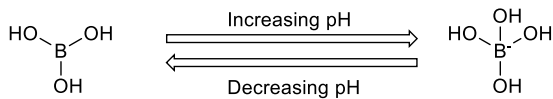


Figure 7 ホウ酸の水溶液中での平衡

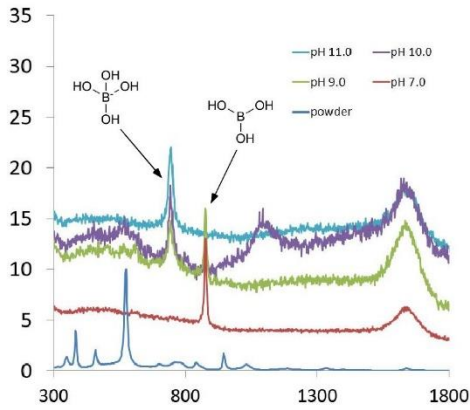


Figure 3 ホウ砂水溶液のラマンスペクトル

在形態を調べるために、ラマン分光法による解析を行った。ホウ酸イオンは中性付近では三配位が優勢であり、高塩基性条件下では四配位のホウ酸イオンになる(Figure 4)。

まず、0.10 M ホウ砂水溶液のラマンスペクトルを測定した。870-880 cm^{-1} が三配位ホウ酸で、740-750 cm^{-1} が四配位ホウ酸イオンである(Figure 4)。pH 値が大きくなるにつれて四配位ホウ酸イオンが優勢になることが分かる。エラー! 参照元が見つかりません。に 10 wt%の澱粉-ホウ砂溶液混合物のラマンスペクトルを示す。ホウ砂水溶液の pH は 7, 9, 10, 11 に調製したものを用いた。バレイショ澱粉と可溶性澱粉を比較してみたが、スペクトルに大きな違いは見られなかった。今後は引き続き、様々な澱粉とホウ砂の混合物に対してラマンスペクトルを測定することにより、澱粉構造の微細な構造の変化を捉える事を目標とする。

3 酵素反応産物の効率的検出法

生理活性を示す生体分子の一つに糖脂質がある。これまでに、糖脂質の合成研究は多くなされており、多種多様な糖脂質の合成が達成されている。糖脂質等が薬剤などに用いられる場

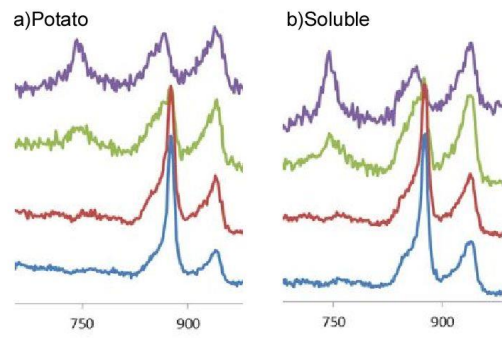


Figure 4 10wt%澱粉-ホウ砂溶液混合物のラマンスペクトル (下から pH7,9,10,11の順)

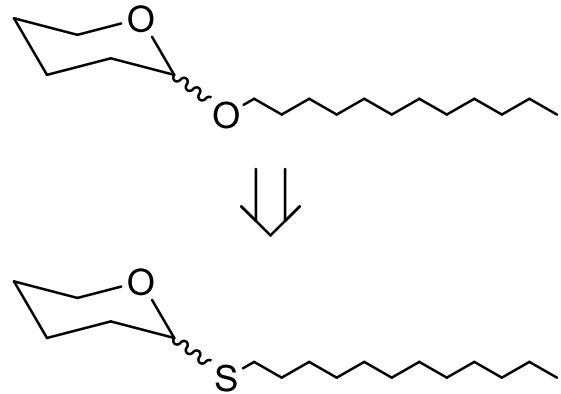
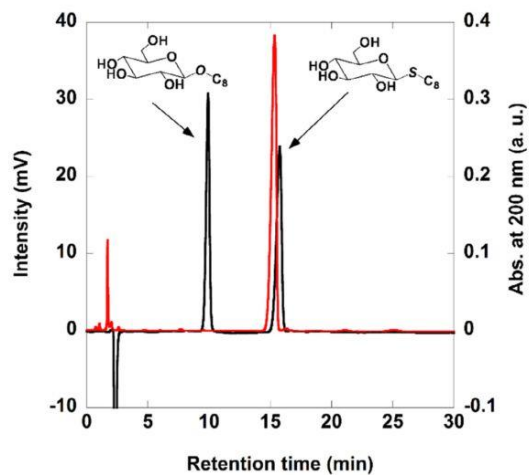


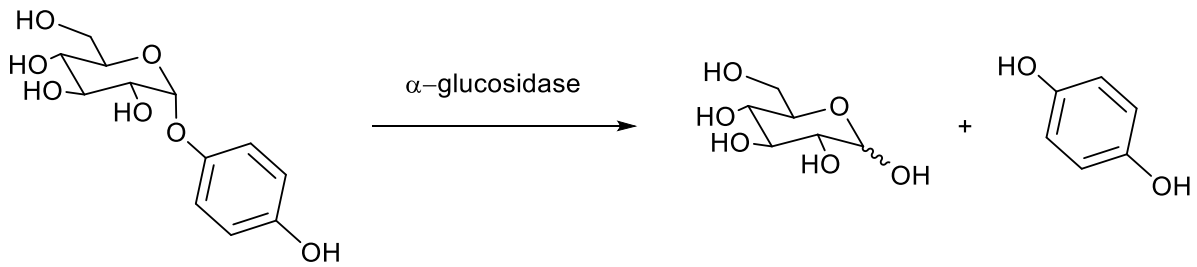
Figure 5 O-グリコシドとS-グリコシド



合には、天然の構造体と同じものを用いるより

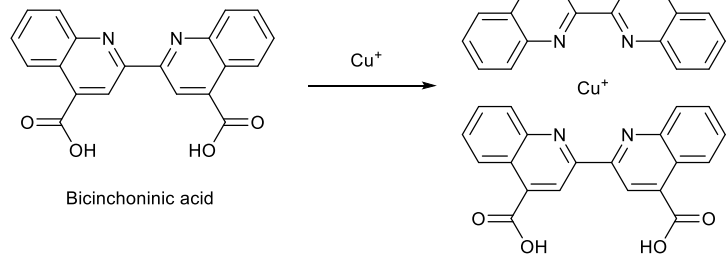
Figure 6 O-グリコシドとS-グリコシドのクロマトグラム

も部分的に構造を変えていることが多く、特に安定性向上のために Figure 6 に示すように、本来酸素原子が存在する部位を硫黄原子に置換したアナログ体を用いることがある。例えば酵



素的に分解されるのを防ぐためである。

このような化合物は安定性に優れているために利用価値は高いが、定量を行うための紫外可視領域に吸収が見られないため、各種解析のための吸光光度計の活用は難しいとされてきた。最近、我々のグループでは、このようなチオグリコシドが UV 領域において吸収を示すことを明らかにした²⁾。



し、これを活用するアッセイ系の構築を計画した。遊離したヒドロキノンの還元力の測定法の

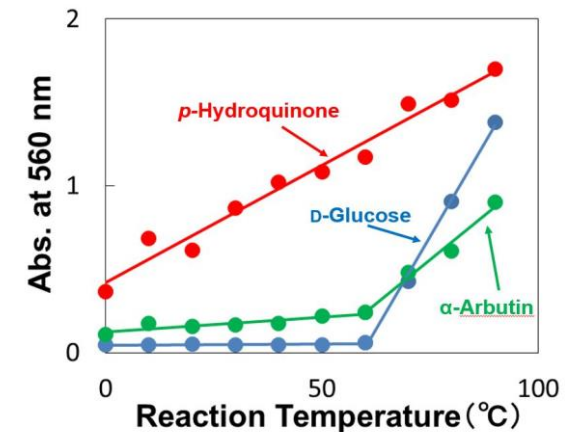
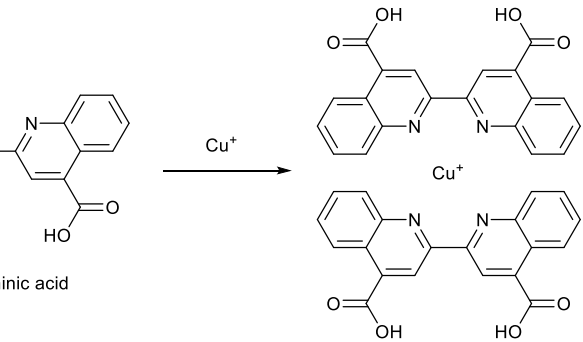
Figure 9 α -グルコシダーゼによるアルブチンの加水分解反応

この事実を活用して、HPLC においてチオグリコシドの選択的検出可能性について確認したところ、Figure 7 に示すような結果を得た。赤線で示すクロマトグラムは UV 検出によるものであり、チオグリコシドの吸収のみ確認され、黒線で示すクロマトグラフは RI 検出によるもので Figure 8 BCA 法の発色原理

あり、両グリコシドが検出された。現在、この現象の普遍性を検証するために、グルコース以外の糖のチオグリコシド体の UV 吸収について検証しているところである。

4 新規酵素探索のための酵素活性測定法の開発

糖鎖の化学合成においては、常に立体及び位置選択性の問題が生じる。従って、合理的な反応経路の選択は非常に重要である。その反応経路を合理化するために、しばしば酵素触媒の選抜の必要性が生じることがある。従って、酵素の性能評価をするアッセイ系の構築は重要である。我々のグループでは、合成が簡単で水溶性の高い人工基質であるアルブチン（エラー！参照元が見つかりません、化合物 1）に着目



活用が有力であるものの、同時に生成するグルコースの還元力も検出される。従って、ヒドロ

Figure 10 各種還元性物質の BCA 法による発色に対する反応温度の影響

キノンのみ選択的に検出可能な方法を用いる必要がある。

まず、還元糖の代表的な検出法の一つである、BCA（ビシンコニン酸）法（Figure 9）を用いることとした。通常は反応温度 90 °C で行うが、より低い温度にすることによりグルコースとヒドロキノンの還元力に差が生じると仮定し

て温度の効果の検証を行った。

Figure 10 に還元性物質による BCA 試薬の発色に対する温度の影響に関するグラフを示す。グルコースにおいては、約 60 °C を境目として、それより低い温度ではほとんど発色を示さなかった。一方、*p*-hydroquinone においては、発色の度合いは温度の影響を受けるものの、0 °C 付近においても発色を確認することができた。 α -アルブチンは 90 °C を境目として発色の度合いは低下したものの、若干の発色を示した。従って、温度を下げるだけでは基質による還元力の影響を受けるため、他の要因を変更することにより発色の選択性を向上させる必要がある。

発表論文

- 1) デンプンのゲルに対するホウ砂の添加効果およびゲルの保水能評価、高分子論文集、**75**, 99-102 (2018) DOI:10.1295/koron.2017-0055
- 2) UV Absorption of *n*-Alkyl 1-thio- β -D-glucopyranosides and its Utilization in Chromatographic Separation, *Tetrahedron Letters*, **58**, 3678-3680 (2017) DOI:10.1016/j.tetlet.2017.08.022

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 ガイドドワイヤー (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ることや、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。しかしながら、PDMS を原料とするシリコーン製カテーテルは、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や、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といった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 (テトラメチルシリ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り。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。

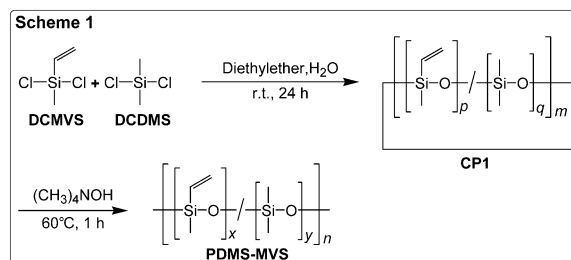
以上のような背景から、架橋点を有するポリシロキサン誘導体 (PDMS-MVS) およびスルホベタイン誘導体 (SB1) を合成し、チオール-エンクリック反応による新規シリコーンゴム材料の創製を行い、得られたシリコーンゴム材料の物性 (機械特性および生体適合性) について検討することを目的とした。

【実験および結果】

本研究課題では、シリコーンゴムに同種・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、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、ポリシロキサン誘導体のペンダント部位に架橋点であるビニル基の導入について検討した。

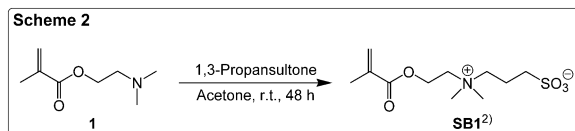
(1) 架橋部位を有するポリシロキサン誘導体の合成

架橋体合成のためのビニル基を有するポリシロキサン誘導体の合成経路を Scheme 1 に示す。各種シラン (DCMVS および DCDMS) の加水分解および環化反応により環状コオリゴマー (CP1) を合成した。さらに、CP1 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) を得た。



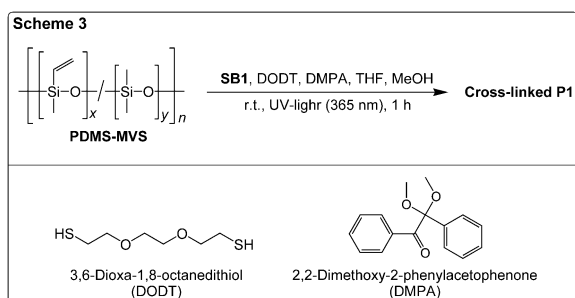
(2) スルホベタイン誘導体の合成

スルホベタイン誘導体の合成経路を Scheme 2 に示す。2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート (1) 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、スルホベタイン誘導体 (SB1) を得た²⁾。



(3) チオール-エンクリック反応を用いた架橋体の合成

スルホベタイン基を有するポリシロキサン系架橋高分子の合成経路を Scheme 3 に示す。得られた PDMS-MVS および SB1 に対し、架橋剤である 3,6-ジオキサ-1,8-オクタンジチオール (DODT) および開始剤である 2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノン (DMPA) を用いたチオール-エンクリック反応を、スライドガラス基板で行うことにより、ポリシロキサン系架橋高分子 (Cross-linked P1) を得た。



(4) 架橋体の形状および水の接触角測定

得られた Cross-linked P1 の形状を図 1 に示す。SB1 は汎用有機溶媒に対する溶解性が乏しいため、図 1 に示すような不均一な架橋として得られた。次に、得られた架橋体にスルホベタイン基が存在していることを確認するために、水の接触角測定を行った (図 2)。その結果、PDMS-MVS の架橋体 (Cross-linked PDMS-MVS) では、水の接触角 θ が 100° であったことに対し、Cross-linked P1 では水の接触角 θ が 86.7° であ

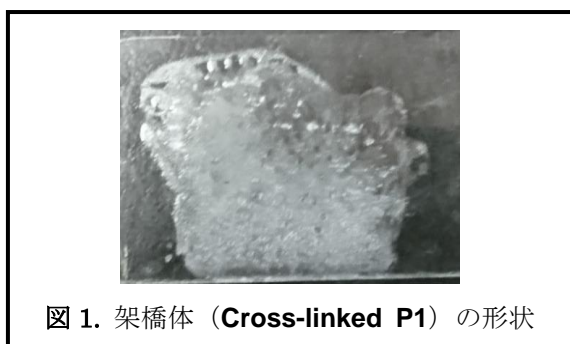
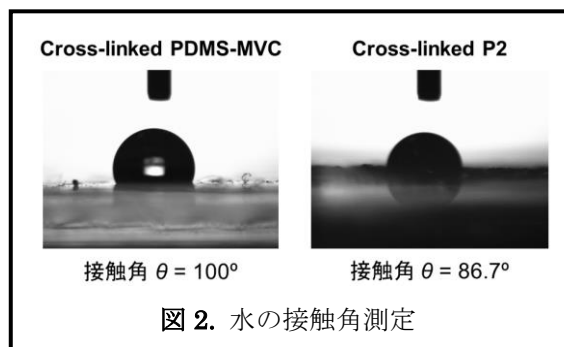


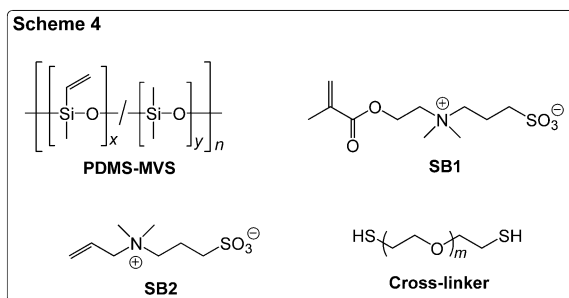
図 1. 架橋体 (Cross-linked P1) の形状

ったことから、Cross-linked P1 の表面には、親水性基であるスルホベタイン基の存在が示唆される。



【今後の計画】

架橋点を有するポリシロキサン誘導体 (PDMS-MVS)、スルホベタイン誘導体 (SB1) および SB2) および架橋剤を用いて架橋反応を行い、架橋反応により得られた架橋体の物性について検討する。具体例として、各種誘導体 (Scheme 4) を合成し、架橋反応 (チオール-エンクリック反応) を行う。また、得られた架橋体の機械特性および生体適合性 (血液適合性) について検討する予定である。



【参考文献】

- 1) 市川 司, 春木 満, 根本 修克, 日本ゴム協会誌, **90**, 354-358 (2017).
- 2) Y. Terayama, M. Kikuchi, M. Kobayashi, A. Takahara, *Macromolecules* **44**, 104-111 (2011).

RNA アプタマーを用いた新機能分子の開発

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、論理的根拠に基づいたアプタマー設計指針を確立することが目的である。平成 29 年度は、ヒト抗体(IgG)に対する RNA アプタマー (IgG ア

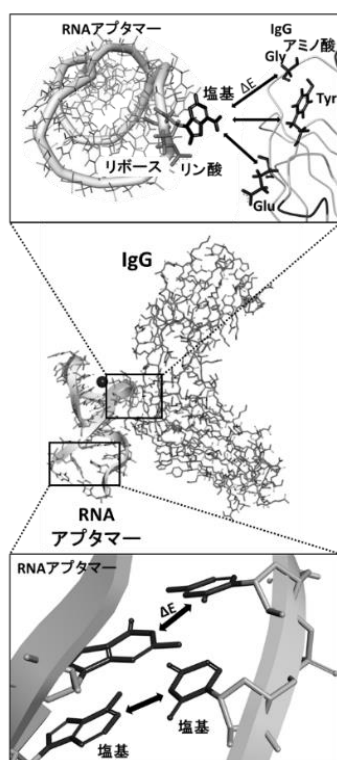


図1. RNA アプタマーとヒト抗体 (IgG) の複合体の立体構造

プタマー) を解析対象とし、以下の研究を進めた。

(1) IgG アプタマーの立体構造形成におけるカルシウムイオンの役割

IgG アプタマーとその標的分子であるヒト抗体(IgG)との複合体の結晶構造が明らかとされた。その結果、カルシウムイオンが、アプタマーの7番目の塩基と16番目の塩基の間に架橋するように存在し、アプタマーの立体構造を保持していることが示唆された(図2)。さらに、このカルシウムイオンを取り除くと、アプタマーと標的分子との結合が解離することも示された。このことから、このカルシウムイオンは、標的分子との結合性をも変化させてしまうほど、IgG アプタマーの立体構造の形成に影響を与えていることが示唆されるものの、その詳細な分子メカニズムは明らかとされていない。そこで、IgG アプタマーの立体構造形成におけるカルシウムイオンの役割の解明を目指し、分子動力学(MD)シミュレーションを用いて IgG アプタマーの動的構造の解析を行った。

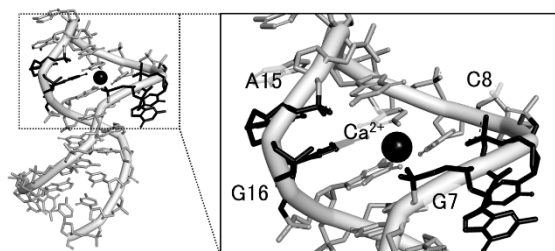


図2. ヒト IgG に対して特異的に結合する核酸分子の構造

MD 計算において、カルシウムイオンがある場合のモデル(sys. 1)とカルシウムイオンがない場合のモデル(sys. 2)を作成した。MD 計算における力場は、ff14SB、水分子の力場には TIP3P を用いた。SHAKE アルゴリズムにより水素原子の運動を拘束し、周期境界条件を課した。van der

Waals 力のカットオフ距離は 10\AA とし、時間刻みは 1 ステップあたり 2.0 フェムト秒[fs]とした。計算プログラムは、Amber16 の PMEMD を用いて、MD 計算を実行した。

まず、カルシウムイオンがアプタマーの構造に与える影響を解析するため、カルシウムイオンが存在する系(sys. 1)とカルシウムイオンを取り除いた系(sys. 2)に対して、100 ナノ秒[ns]間の MD 計算を実行した。図 3 には、100 ナノ秒[ns]間にわたるアプタマーの立体構造の時間変化を、RMSD を用いて示した。RMSD (Root Mean Square Deviation)は、基準とした構造からのズレを表す指標であり、その値が大きいほど、構造の変化があることを意味する。その結果、カルシウムイオンが存在しない系(sys. 2)では、RMSD が 10\AA 程度まで変化しており、基準とした構造から大きく構造が変化したことがわかる。一方、カルシウムイオンの存在下(sys. 1)では、RMSD は 3\AA 程度であり、基準とした構造から大きな構造変化は見られなかった。さらに、RMSD の振れ幅も小さい。以上より、カルシウムイオンは、アプタマーの立体構造を安定化させ、アプタマーの特異的な立体構造を保持していることが示唆された。

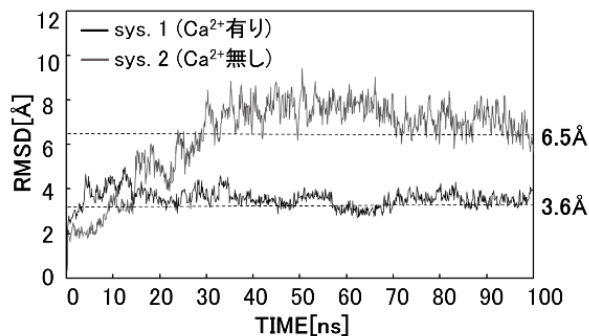


図 3. ヒト IgG に対して特異的に結合する RNA アプタマーの構造全体の RMSD 変化

(2) IgG アプタマーの構造変化とその結合性

IgG アプタマーは、G7 の塩基がフリップアウトした特徴的な立体構造を形成している (図 4)。そして、このフリップアウトした塩基は、標的分子であるヒト抗体(IgG)の Tyr373 とスタッキング

相互作用を形成する。そこで、このフリップアウト構造に着目し、IgG アプタマーの動的な構造変化を MD シミュレーションにより解析した。

解析の対象としたアプタマーは、ヒト抗体 (IgG) に対して結合性を示す RNA アプタマー (apt. a, b, c) と結合性を示さない RNA アプタマー (apt. d, e) とし、これら 5 つのアプタマーに対して、100 ナノ秒[ns]間の MD 計算を実行した。

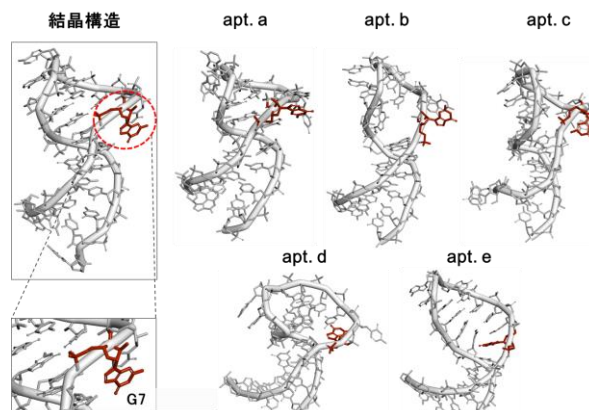


図 4. MD 計算における 100ns 後の構造のスナップショット

フリップアウト構造が維持できているか、G7 塩基の構造変化を 100 ナノ秒[ns]にわたり追跡したところ、結合性を示すアプタマーは、いずれもフリップアウト構造が維持されていた。一方で、結合性を示さないアプタマーは、G7 塩基部位がアプタマー内部方向に向くような構造変化がおき、フリップアウト構造が維持されていないことが明らかとなった。このことから、フリップアウト構造を維持できることが、IgG アプタマーの結合性に重要であることが示唆された。

参考文献

- [1] Shin Miyakawa, Taiichi Sakamoto, Yoshikazu Nakamura, et al., RNA, 14, 1154 (2008).
- [2] Yusuke Nomura, Taiichi Sakamoto, et al., Nucleic Acids Research, 38, 7822 (2010).
- [3] Hisae Yoshida, Takeshi Ishikawa, Taiichi Sakamoto, Kenji Yamagishi, et al., EFMC-ASMC'17, 2017.08, Vienna.

選択マーカを用いない新しい染色体改変法の作製

岸 努 日大工・生命

【緒言】 染色体の改変は相同組み換えを用いて行われる。この時、相同組換え部位、改変部位および選択マーカを持つ DNA 断片を作製し細胞を形質転換する。しかし選択マーカは、その種類が限られているので、一つの細胞に複数の遺伝子改変を導入することは技術的に困難である。そこで本研究では、選択マーカを染色体に残さない改変法の作製した。C-末端にトリプル HA (3×HA) エピトープを挿入する 3×HA タギングをモデルケースとした。作成した方法の特徴は以下の通りである。

【作製した方法の特徴】 (1) 相同組み換えで用いる DNA 断片を PCR で調製することができる。新たに作製した pMN-12 (図 1 上: PCR で増幅するカセットのみ記載) を鋳型とする。この時、フォ

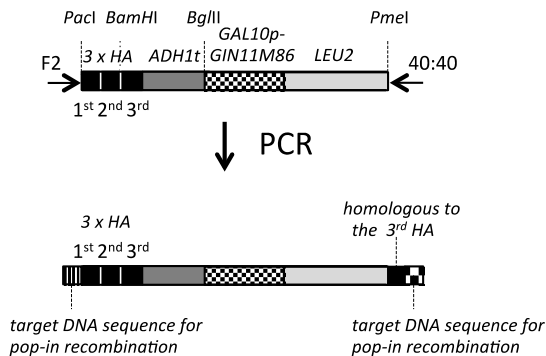


図1 pMN-12にクローン化されたPCRモジュールとPCRにより増幅する相同組換え用DNA断片

TAC CCA TAC GAT GTT CCT GAC TAT GCG GGC
1st HA
TAT CCC TAT GAC GTC CCG GAC TAT GCA GGA TTC
2nd HA
TAT CCA TAT GAC GTT CCA GAT TAC GCT GCT CAG TGC TGA
3rd HA

図2 3×HA 配列
3番目のHA配列を太字で示す。

ワードプライマーとして、終止コドン直前の DNA 配列 40 塩基と pMN-12 に特異的な配列 20 塩基を含む 60 塩基のプライマー (図 1-F2) を用いる。またリバースプライマーとして、終止コドン直後の DNA 配列 40 塩基、3×HA の 3 番目の HA 配列 40 塩基 (図 2) および pMN-12 に特異的な配列 40 塩基を含む 100 塩基のプライマー (図 1-40:40) を用いる。これにより、組換え部位である目的遺伝子の終止コドン直前の DNA 配列と直後の DNA 配列の間に、3×HA、*ADH1* ターミネーター、*GAL10p-GIN11M86*、選択マーカである *LEU2*、1×HA (3×HA の 3 番目の HA 配列と同一配列: 図 2) を含む DNA 断片を調製することができる。

(2) 作製した 3×HA タギング法は pop-in recombination と pop-out recombination を組み合わせた 2 段階からなる (図 3)。

まず第一段階では、相同組換え (pop-in recombination) を用いて、(1)の方法で調製した DNA 断片を用いて酵母を形質転換する (図 3 上)。pop-in 組換え体は、ロイシン非要求性クローンを選択することにより分離することができる (図 3 : pop-in)。第二段階では、挿入した 3×HA の 3 番目の HA 配列と 1×HA 配列の間での相同組換え (pop-out recombination) により、*ADH1* ターミネーター、*GAL10p-GIN11M86* および *LEU2* を欠失する (図 3 : pop-out)。欠失したクローンの選択は、*GIN11M86* 配列を用いる。*GIN11M86* はガラクトースで誘導可能な *GAL10* プロモーターから過剰発現すると酵母の増殖を阻害する遺伝子である。このため、pop-out 組換え体は、ガラクトースを含む培地で生育するクローンを選択することにより分離できる。

(3) この 2 段階法により、3×HA 以外に外来性

の DNA を全く含まない遺伝子改変が可能となる。実際、この方法で作製した 16 クローンの *SWI5-3 × HA* 株のゲノムシーケンシングを行った結果、全てのクローンで意図した *HA* 配列部位で pop-out recombination が起こっており、第一段階で挿入した *ADHI* ターミネーター、*GAL10p-GIN11M86*、選択マーカーである *LEU2* を完全に染色体上から消去することができた。

【結論】 *3 × HA* 配列のみを目的遺伝子に挿入する効率の良い新しい遺伝子改変法を構築した。1 回の PCR、1 回の pop-in recombination と 1 回の pop-out recombination のみが必要な簡便な系である。同様な方法により、他のエピトープの挿入や突然変異の導入も可能であり、応用性が高い。

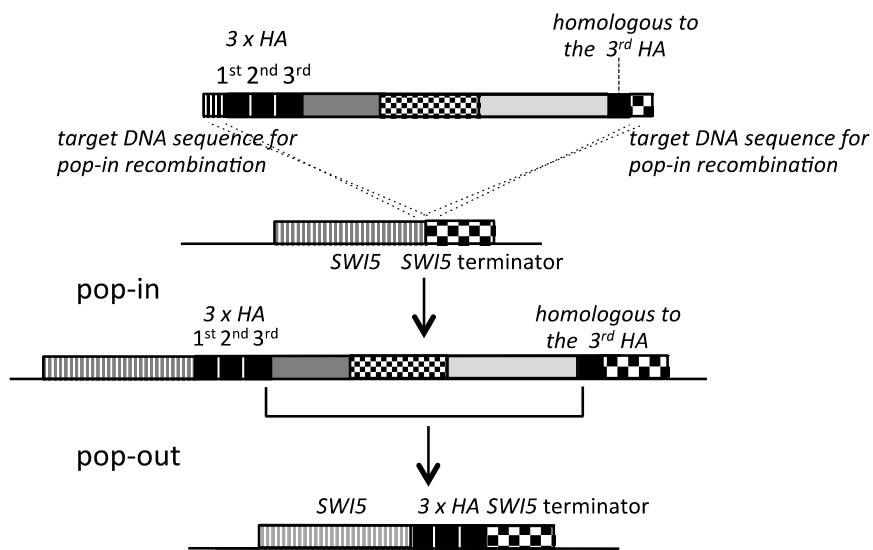


図3 ***3 × HA***配列のみを目的遺伝子に挿入する新しい二段階遺伝子改変法
 第一段階: 図1で作製した相同組換え用DNA断片を用いて酵母を形質転換することによりpop-in 組換え体を選択する。
 第二段階: カウンターセッレクションマーカー*GAL101p-GIN11M86*を用いることによりpop-out 組換え体を選択する。

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である。そこで、本研究では、大腸菌ゲノム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った。

【方法・結果】

インテグララーゼを用いて、ゲノム DNA に遺伝子導入した場合、強力な転写プロモーターを用いても、酵素発現量が減少し、生合成量が減少することが分かっている。そこで、生合成酵素の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。植物バイオマス分解酵素複合体（セルロソーム）骨格を用いて、放線菌のフラビオリン（赤色素化合物）の生合成系酵素（RppA & MomA）を複合体化したところ、プラスミド DNA から酵素を大量発現している時と同等まで合成量が改善されることを確認した。

平成 29 年度は、本手法の汎用性を検討するため植物ポリフェノールの一種である、ウコンのクルクミン（抗腫瘍活性物質）の生合成酵素（4CL & CUS）（図 1）を対象に同様の実験を行った。ゲノム DNA にクルクミン生合成酵素を遺伝子導入した場合、プラスミド DNA に遺伝子導入した場合と比較して、クルクミンの生合成量も低下した。次に、クルクミン生合成酵素にセルロソーム骨格結合ドメインを融合した結果、更に生合成量が低下したが、セルロソーム骨格を導入した場合、生合成量は増加した。しかし、セルロソーム結合部位の融合による生合成量の低下が大きかったため、プラスミド DNA に遺伝子導入した際の生合成量までは回復しなかった。クルクミン生合成系では、骨格結合ドメインの融合が酵素活性に悪影響を与えている可能性があるため、他の植物ポリフェノール（レスベラトロール）生合成系（4CL & STS）についても検討する予定である。

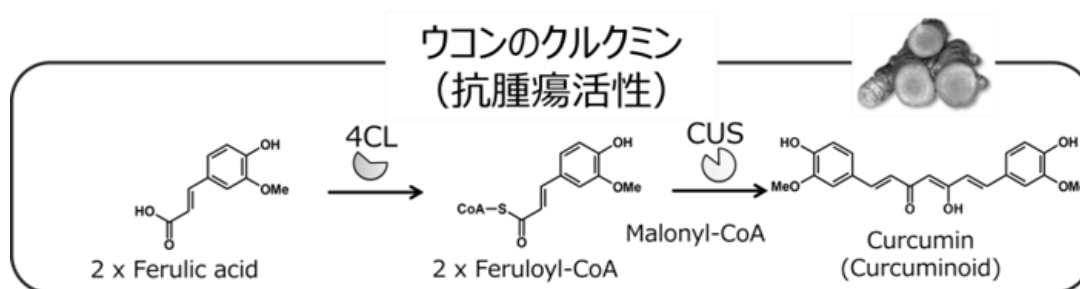


図 1.ウコンのクルクミン生合成系

機能的骨修復材料の開発

内野智裕

日大工・生命

【緒論】

骨の無機主成分である水酸アパタイト (HAp: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) は Ca^{2+} , PO_4^{3-} , 及び OH^- 各サイトを様々なイオンで置換可能である。各サイトに骨疾患に効果のある成分を導入できれば、骨代謝に応答した有効成分放出制御可能な材料が得られると期待できる。非晶質リン酸カルシウム (ACP) は骨の主成分である低結晶性の水酸アパタイト (HAp) 前駆物質として知られ、体温付近で徐々に低結晶性アパタイト (LHAp) へ結晶化する。ACP に、骨形成を促進し骨粗しょう症等骨疾患に効果のある成分を導入できれば、骨代謝に応答した有効成分放出制御可能な材料が得られると期待される。特に ACP は 4°C 付近の低温での合成に適し、薬剤を含む有効成分の導入に効果的である。これら有効成分を導入した ACP を出発物質として粉末を合成できれば、骨類似 LHAp 組成で、骨と結合し、体内で代謝される。分担者らは ACP 合成の際、Zn を導入して Zn 固溶 ACP 粉末を合成し、Zn 含有 LHAp セメントを作製した[1]。このセメントは骨吸収環境において Zn を放出し、通常および骨形成環境において Zn 放出を抑制することを明らかにした[2]。本研究では、ACP に骨形成のみならず酵素活性および機能維持に必須の Mg の導入を試みセメントを作製し評価した。

【実験方法】

同濃度の $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 水溶液および NaH_2PO_4 水溶液を $\text{Ca/P} = 1.00$ (モル比)となるように混合し、 4°C に冷却したリン酸/カルシウム水溶液を調製した。 4°C に保持した NaOH 水溶液を攪拌しな

がら、冷却したリン酸/カルシウム水溶液を $\text{pH}10.5$ になるまで滴下した。析出物をろ別、凍結乾燥し試料粉末を得た (CP)。一方、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を、 $(\text{Ca}+\text{Mg})/\text{P} = 1.00$ (モル比)、Ca に対しての Mg の導入量が 1, 10 mol% となるように $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 水溶液に混合し、この混合水溶液を NaH_2PO_4 水溶液と $\text{Ca/P} = 1.00$ となるよう混合した。CP 合成と同様に滴下、析出物ろ別、凍結乾燥し試料粉末を得た (1MgCP, 10MgCP)。得られたそれぞれの粉体に H_3PO_4 水溶液を加えて練合し、ペーストを調製した。それぞれのペーストを円柱状の型に流し込んで成形し、 40°C に保持してセメント試料を得た (CPce, 1gCPce, 10MgCPce)。得られた粉末およびセメントの結晶相を調べ、元素分析を行った。硬化前後の試料の特性を XRD, FT-IR, 圧縮試験により調べた。セメント試料を骨代謝環境に浸漬し Mg 放出挙動を調べた。

【結果と考察】

合成した試料粉末はいずれも XRD 図においてピークを検出せず、非晶質であった (Fig. 1)。Mg

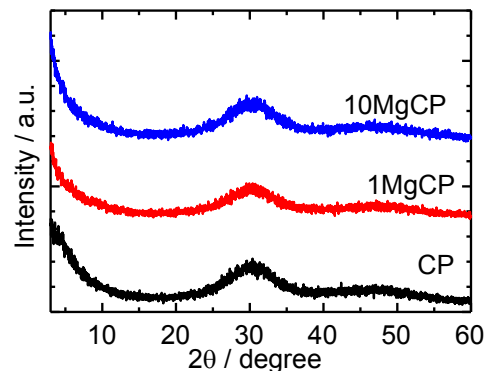


Fig. 1 粉末試料の XRD 図

を導入した MgCP, および 10MgCP の Mg 含有量は、導入と同程度であった。XRD 図において結

晶性のピークを検出しなかったことから、Mgを導入した試料は ACP 構造に固溶していると推察される。セメント試料の XRD 図はいずれも HAp に帰属された (Fig. 2)。各ピークはブロードなピークであったことから低結晶性のアパタイト構造を持つと推察される。FT-IR より、粉末、セメントいずれの試料も CO_3^{2-} に帰属される吸収を検出した (Fig. 3)。低結晶性アパタイト構造で、Mg および CO_3^{2-} を構造中に含有していると推察されることから、作製した試料は Mg 含有骨類似組成セメントである。セメント試料は Mg 導入により

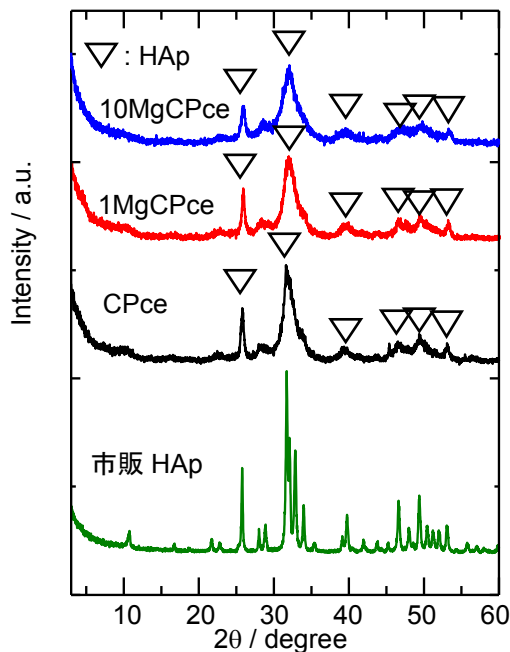


Fig. 2 セメント試料の XRD 図

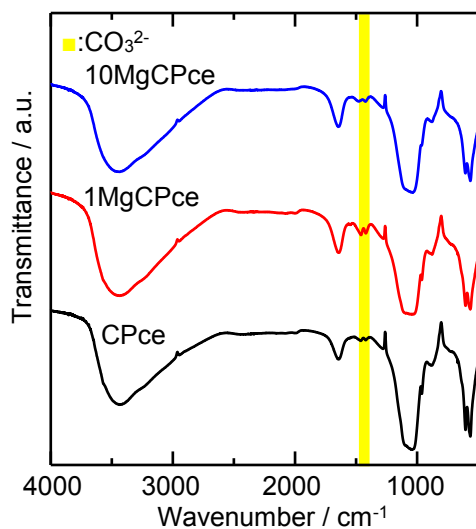


Fig. 3 セメント試料の FT-IR 図

圧縮強度が増大した (Fig. 4)。セメント試料は骨代謝環境に交互に浸漬することにより、骨吸収環境 (酢酸緩衝液 AcBu 中) で Mg を放出し、骨形成環境 (擬似体液 SBF 中) において Mg 放出が抑制された (Fig. 5, 6)。Mg 導入量により放出を

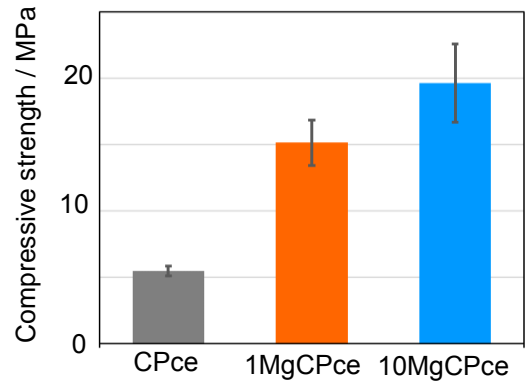


Fig. 4 セメント試料の FT-IR 図

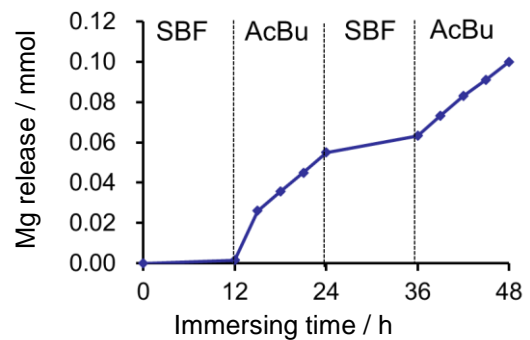


Fig. 5 10MgCPce の Mg 放出挙動

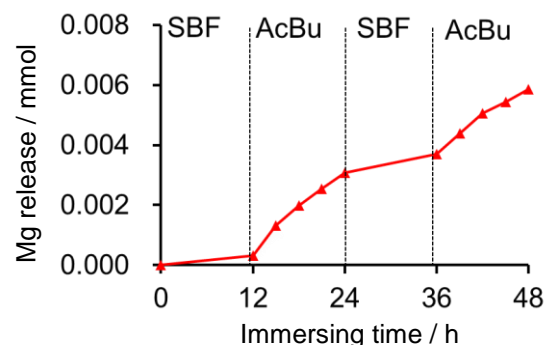


Fig. 6 1MgCPce の Mg 放出挙動

制御することができた。

【まとめ】

本研究で合成した Mg 導入 ACP は、ACP 中への Mg 導入量を制御することができ、セメント試料は骨代謝に応じて Mg を放出する新規骨修復材料として期待される。

DDS 医薬の創製

石原 務
日大工・生命

【緒論】

平成 29 年度は、主として、i) 化学修飾を施したタンパク質医薬、ii) 遺伝子治療のための核酸キャリア、iii) 肝疾患治療のための薬物キャリア (ナノ粒子) の三つの創薬研究を実施した。ここでは特にタンパク質医薬と肝疾患に対するナノ粒子に関する研究成果について報告する。

【レシチン化タンパク質の腸管吸収性評価】

我々はこれまでに、タンパク質にレシチンを化学修飾したレシチン化タンパク質を開発してきた。タンパク質としては、生体内で生じる活性酸素のスーパーオキシドアニオン (O_2^-) を消去するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を主に用いた。レシチン化したスーパーオキシドジスムターゼ (PC-SOD) は、SOD に比べ約 17% のスーパーオキシドアニオン消去能しかなかった。しかしながら、HL-60 細胞 (ヒト前骨髄性白血病由来細胞株) が細胞外に産生するスーパーオキシドアニオンは、SOD より PC-SOD の方が顕著に消去した。これは、レシチンを修飾することで SOD が細胞膜上や細胞内に取り込まれたためと考えられた。

多くのタンパク質が医薬品として臨床利用されているが、通常これらの投与経路は皮下や筋肉内、静脈への注射に限られる。一方、経口による腸管吸収経路は簡便で負荷が少ないが、タンパク質は消化管からほとんど吸収されない。そこで、前述したようにレシチン化によりタンパク質の細胞親和性が向上することから、腸管吸収性も向上するのではないかと考え PC-SOD の腸管吸収性を評価した。

細胞はヒト結腸癌由来細胞株である Caco-2 細胞を用いた。Caco-2 細胞を種々の濃度で播種し、2 日間 37°C でインキュベートした。FITC ラベルした SOD あるいは PC-SOD を添加し、3 時間 37°C でインキュベートした後、蛍光顕微鏡を用い細胞への取り込みを評価した。

細胞層透過性は次のように試験した。Caco-2 細胞をトランスウェルインサート上に播種し、21 日間培養した (図 1)。培地交換は 3~4 日おきに行なった。トランスウェルインサートは、ポリカーボネート (PC) 製とポリエチレンテレフタレート (PET) 製の 2 種類を使用した。培養した Caco-2 細胞の Apical 側の培地中に FITC ラベルした SOD あるいは PC-SOD を添加し、4 時間あるいは 12 時間 37°C でインキュベートした。その後、細胞層を透過し Basal 側の培地中に移行した SOD あるいは PC-SOD を蛍光光度計を用い定量した。また、使用した細胞層が損壊していないかは細胞層を透過しないルシファーイエローを用い確認した。さらに、対照として、ケトプロフェンあるいは FITC ラベルしたインシュリンと細胞膜透過ペプチドのペネトラチンの混合物を用い同様に試験した。

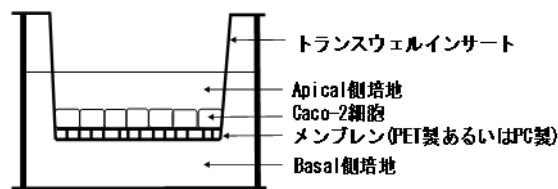


図 1. トランスウェルによる Caco-2 細胞層の透過試験

初めに、Caco-2 細胞への PC-SOD の取り込みを評価した。SOD では取り込みが全くみられなかったのに対し、PC-SOD では細胞間隙に局在してい

た。一方、HeLa 細胞(ヒト子宮頸がん由来細胞株)では PC-SOD は細胞内に取り込まれた。

次に、PET 製トランスウェルインサートを用い、PC-SOD の Caco-2 細胞層透過試験を行なった。インキュベーション時間が長いほど透過率が高まり、時間に依らず PC-SOD が SOD より 2 倍ほど高い透過率を示した。一方、腸管吸収性が高い低分子化合物のケトプロフェンの透過率は、PC-SOD の透過率よりはるかに高かった。また、PC 製トランスウェルインサートを用い 12 時間インキュベートを行なったところ、透過率は PC-SOD、SOD 共に PET 製よりも高く、PC-SOD の透過率は SOD より 3 倍程度高かった(図 2)。

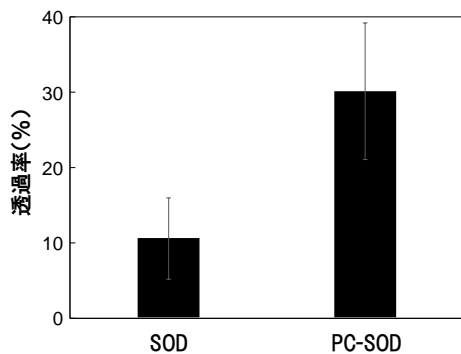


図 2. タンパク質の Caco-2 細胞層透過

一方、森下らはタンパク質に細胞膜透過ペプチドを混合することで、タンパク質の腸管吸収性が増大することを報告している。そこで、対照としてインシュリンとペネトラチンの混合物の評価も行った。その結果、既報のとおりインシュリン単独よりもペネトラチンを混合することでインシュリンの透過率は約 3 倍増加した。また、その透過率は PC-SOD の約 2 倍であった。

以上より、レシチンを修飾することで SOD の細胞層透過性が向上することが明らかになった。また、その透過経路は細胞内ではなく細胞間であることが示唆された。さらに、タンパク質の種類が異なるので単純に比較するのは難しいが、レシチン修飾は、細胞膜透過ペプチドを混合する手法と同程度の透過性の向上をもたらすことが

示唆された。

【レシチン化抗体の開発】

前述したレシチン修飾技術を SOD 以外のタンパク質にも応用し、改良型バイオ医薬品いわゆるバイオベターの開発を試みた。タンパク質としては抗体に着目した。現在多数の抗体医薬が開発されているが、抗体は細胞膜上あるいは細胞外の抗原に特異的に結合し高い治療効果を示す。しかし、抗体は組織/細胞親和性に乏しいため全身に存在する抗原に作用してしまい、場合によっては強い副作用を伴う。また、抗体医薬は細胞内に侵入することが難しいため細胞内抗原を標的にはできない。そこで本研究では、レシチン修飾により抗体の体内動態を変え抗体医薬の有用性を高めようと考えた。

モデル抗体として牛血清由来の γ グロブリンを用いた。サイズ排除クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーによる解析により、グロブリンはレシチンの仕込み量に応じ修飾されることがわかった。また、電気泳動解析からレシチン修飾グロブリンと血漿タンパク質が相互作用(結合)していることがわかり、血中に長く滞留できることが示唆された。さらに、HeLa 細胞や HL60 細胞への取り込みを評価したところ、グロブリンは全く取り込まれなかったが、レシチン修飾グロブリンは細胞内に多く移行していた。特に、グロブリンに対するレシチンの仕込み重量比 0.3 で作製した修飾体で最大の取り込みを示したことから、細胞親和性を高めるための最適なレシチン修飾率が存在することが明らかになった。

これらのことから、レシチン修飾グロブリンは白血球などの細胞膜上に局在あるいは細胞内に取り込まれ標的となる分子と結合できると考えられる。よって、新しいタイプの抗体医薬としての利用が期待できる。

【肝疾患治療のためのナノ粒子の開発】

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・肝硬変を経て進行する。しかしながら、肝臓がんや肝硬変に対する決定的な治療法はない。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標とした。

これまでの我々の研究にて、肝実質細胞選択的に抗ウイルス剤であるリバビリンを運搬するナノ粒子を作製してきた。しかしながら、このナノ粒子にはポリカチオンが含有されているため、強い細胞毒性が認められた。そこで、次に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てきた。ポリカチオンの代わりにポリアニオンを用いナノ粒子を調製したところ、ほとんど細胞毒性を示さなかった。さらに、マウスでの実験から、このナノ粒子が肝臓に集積することが明らかになった。よって、このナノ粒子は、肝実質細胞へ選択的にリバビリンを運搬可能で、かつ副作用も低い新たな肝炎治療薬として利用できる¹⁾。

一方、肝硬変の治療を目指し抗線維薬を封入した高分子ナノ粒子の開発もおこなってきた。肝硬変治療には、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であると考えられている。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した。抗線維化薬としては、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セレコキシブを用いた。また、肝星細胞へ選択的に薬物を集積させるため、肝星細胞に特異的に結合するペプチド(pPB)を修飾したナノ粒子を作製した。このナノ粒子の肝星細胞由来培養細胞(TWNT-1細胞)への取り込みを評価すると、pPBに依存し取

り込まれることが明らかになった。また、ナノ粒子を細胞に取り込ませた後、細胞のコラーゲン産生量を測定した。その結果、pPBを修飾していないナノ粒子に比べpPBを修飾したナノ粒子では顕著なコラーゲン産生抑制効果を示した(図3)。よって、pPB修飾ナノ粒子は肝星細胞特異的にセレコキシブを運搬可能な抗線維化薬としての利用が期待できる。

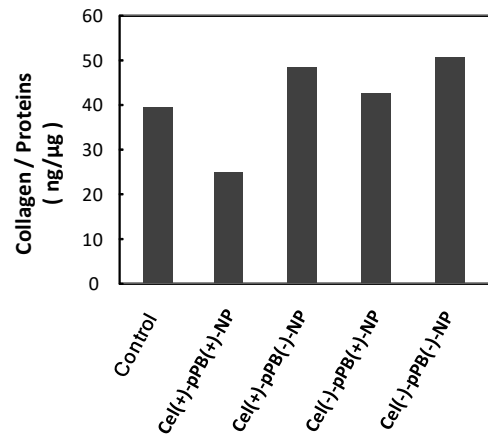


図3. セレコキシブ封入ナノ粒子によるコラーゲン産生抑制

- 1) Kaneko K, and Ishihara T. Development of liver-specific ribavirin-loaded nanoparticles with reduced cytotoxicity, Cogent Medicine 4(1), 1418133, 2017