

治療・予防・診断を目指した分子の開発

春木 満, 根本 修克, 市川 司

日大工・生命

1. 研究の目的

Active aging を達成するうえで、癌や脳疾患・高血圧など高齢化に伴って増加する疾患や、B型肝炎など完治の困難なウイルス性感染症の予防・治療は重要な課題である。そこで、このような疾患に対して、治療薬や予防・診断法の開発を目指している。

2. ポリシロキサン誘導体による DNA の細胞へのターゲティング

核酸医薬は従来治療が困難である疾患に有効な医薬品として期待されているが、体内での分解を防ぎ、標的細胞にのみに選択的に送達するための効率的なキャリアの開発が課題となっている。我々は、ポリシロキサンを基盤とし、アルキンを有するイミダゾール誘導体により四級化を行ったカチオン性両親媒性ポリマー (PI_m) を開発しており (図 1) ¹⁾、これにクリック反応によりターゲティング分子を付加し、目的細胞に特異的に核酸を送達することを目指している。

まず、肝細胞に特異的なガラクトースをクリックケミストリーにより付加した PI_m-lac を用いて DNA 複合体を作製し、ルシフェラーゼアッセイにより細胞への取り込みを調べた。その結果、PI_m-lac を用いた場合、肝細胞由来の HepG2 細胞へは PI_m を用いた場合に比べて約 30 倍多く取り

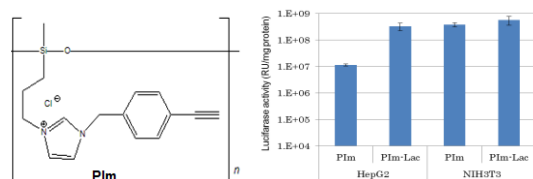


図 1 Lactose を付加した PI_m による DNA 導入効率の解析

込みがみられたが、NIH313 細胞ではこのような差は見られなかった (図 1)。したがって、PI_m-lac により HepG2 細胞へ特異的に核酸を送達できることが示された ²⁾。

次に、グリオーマ細胞への核酸送達を目指した。脳腫瘍のうちでも特に悪性度が高いグリオーマには効果的な治療法がなく、その開発が求められている。グリオーマに薬剤を特異的に送達することは、その手段のひとつとして期待されている。さらに、グリオーマ細胞 (U87-MG) 表面に発現している上皮成長因子受容体 (EGFR) を標的とし、EGFR に特異的に結合するペプチド (GE-11) を連結した PI_m を用いてグリオーマ細胞特異的遺伝子送達を行っている。しかしながら、PI_m は合成収率が悪く、再現性良く良好な品質の標品を得ることが困難であったため、新たな誘導体 (PI_m2) の合成を行った。GE-11 ペプチドを PI_m2 に付加してグリオーマ細胞への DNA の取り込みを調べたところ、PI_m に比べて約 10 倍多く取り込まれた (図 2)。しかしながら、PI_m2 は PI_m に比べて細胞への取り込み効率は 100 倍程度低くなっていた。その原因として、DNA との結合が弱いこと

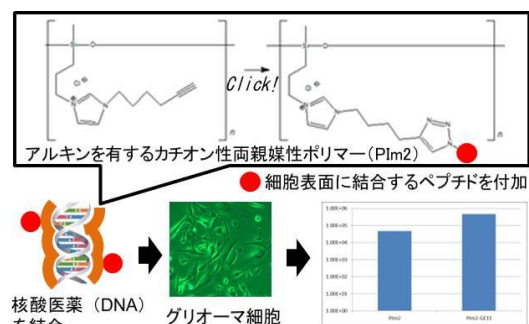


図 2 EGFR 結合ペプチドを付加した PI_m2 によるグリオーマ細胞への DNA の送達

や、細胞毒性が高いことが考えられる。このような性質を改善するためには、側鎖にフェニル基を導入するなどの方法が考えられる。また、細胞への取り込み効率を高めるために、連結するペプチドの数を多くすることも検討している。

3. 細胞内における RNase H 分解を利用したアクチベータブル蛍光プローブの開発

癌組織や動脈硬化プラークなどの病変部を可視化して識別することは、疾患の診断や外科的切除での取り残し防止のために重要である。蛍光分子を用いて検出する場合、患部以外に残存するバックグラウンドの蛍光が検出の妨害となる。そこで、遊離の状態では蛍光を生じず、患部に取り込まれた場合のみ蛍光を発するアクチベータブル蛍光プローブが有用と期待される。本研究では、細胞内の RNase H により分解されることで蛍光を発するアクチベータブル蛍光プローブの開発を目指した。5' -fluorescein ラベルした RNA と 3' -quencher (BHQ1) ラベルした DNA を用いて molecular beacon 型 DNA/RNA ヘテロ二重鎖を調製し、RAW264 マクロファージ細胞に導入したところ、細胞内に蛍光が検出された (図 3)。したがって、細胞内の RNase H により RNA 鎖が分解されたことにより fluorescein が遊離し、蛍光を発したと考えられる。DNA/DNA 二重鎖の場合にも同様に蛍光が見られたが、リソソーム酸性化阻害剤

Bafilomycin を加えると蛍光が見られなかった。リソソームの DNase による分解にはリソソーム酸性化が必要なことから、DNA/DNA 二重鎖はリソソームの DNase によって分解されると考えられる。これに対し、DNA/RNA ヘテロ二重鎖の場合は Bafilomycin 存在下においても蛍光がみられた。したがって、細胞内の RNase H によりヘテロ二重鎖の RNA 鎖が分解されたことにより fluorescein が遊離し、蛍光を発したと考えられる。次に、動脈硬化プラークに浸潤しているマクロファージに選択的にプローブを取り込ませることにより、動脈硬化を診断することを目指した。そのために、マクロファージに取り込まれるデキストランを付加した PIm2 (PIm2Dex) を作成した。ルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミドの RAW264 細胞への取り込みを測定したところ、PIm2Dex では PIm2 よりも取り込み効率が低下していた。その原因として、未修飾のポリマーでは食作用を介さない非特異的な取り込みが多くなっていることが考えられる。取り込み効率を向上させるため、付加するデキストランの分子量を検討している。

4. 金コロイドを用いたアミロイド・ペプチド検出法の開発

アルツハイマー病は脳内でアミロイド・ペプチド ($A\beta$) が凝集して老人斑 (アミロイド斑) として沈着し、やがて神経細胞が死滅することから、アルツハイマー病は $A\beta$ が原因というアミロイド仮説が有力となっている。現在アルツハイマー病の効果的な治療法はなく、進行を抑制する効果のある薬しかないことから、早期発見・早期診断が大切となっている。そのような診断法の開発を目指し、 $A\beta$ を付加した金コロイドの作成を行うために、アルキンおよびチオールを導入したカチオン性ポリシロキサン誘導体 PIm-SH の合成を行った (図 4)。アジド化した $A\beta$ を PIm-SH にアルキン

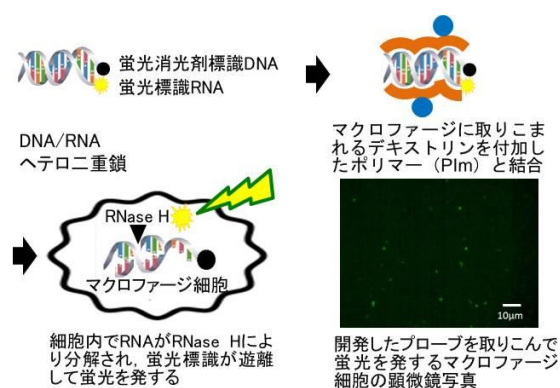


図3 DNA/RNA ヘテロ二重鎖蛍光プローブのRAW264 マクロファージ細胞への取り込み

えた後、 NaBH_4 で還元することにより金コロイドを作製した。作製した金コロイドおよび $\text{A}\beta$ を添加した金コロイドを図4に示す。15 μM になるよう $\text{A}\beta$ を加えた結果、凝集を確認した。これは、金コロイドに付加した $\text{A}\beta$ と添加した $\text{A}\beta$ が凝集することで生じたと考えられる。この結果から、金コロイドにより $\text{A}\beta$ を検出できるという可能性が示唆された。

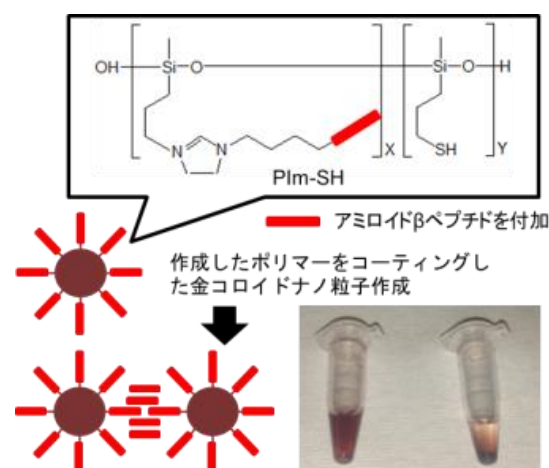


図4 PIm-SHを用いて作製した金コロイドによるアミロイド β ペプチドの検出

5. ポリフェノール類による上皮型ナトリウムチャンネルの発現抑制効果の解析

腎臓細胞に存在する上皮性ナトリウムトランスポートター (ENaC) の過剰発現は食塩感受性高血圧の原因となる。ENaC の mRNA の合成を抑えることが出来れば、食塩感受性高血圧の予防に効果があると期待される。ENaC は α , β , γ のサブユニットからなり、3つのサブユニットを全部抑制できるほうが高い効果を示すと期待される。フラボノイドの一種である Quercetin は、 α ENaC 発現抑制効果が報告されているが、 β ENaC および γ ENaC 発現も抑制されるかは興味深い。そこで、Gingerol 誘導体や他のポリフェノール類による α , β , γ ENaC 発現抑制効果を解析した。解析は、アフリカツメガエル腎臓由来 A6 細胞に浸透圧ショックを与えることにより ENaC を発現誘導し、リアルタイム PCR を用いて ENaC mRNA を定量

することにより行った。

その結果、S 体および R 体 Gingerol 誘導体、Curcumin, Piceatannol, Zingerone, Quercetin に β , γ ENaC 発現抑制効果がみられた (図5)。低浸透圧ショックにより p38 MAP キナーゼの活性化が引き起こされ β ENaC 遺伝子、 γ ENaC 遺伝子の転写が促進されることが報告されている³⁾。今回効果を示した化合物は Tyrosine と構造に類似性があるため、p38MAPK による Tyrosine のリン酸化を阻害し、 β , γ ENaC 遺伝子の転写が抑制されたと考えられる。

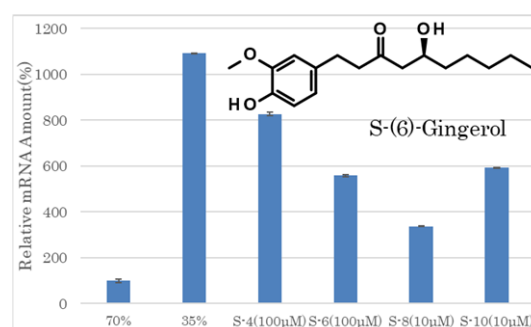


図5 S 体 Gingerol 誘導体による β ENaC 発現抑制効果

6. 既承認薬ライブラリーを用いた新規薬効探索

L T T バイオファーマ社との共同研究により 1241 種の既承認薬ライブラリー、富山大学和漢医薬学総合研究所の探索研究プロジェクトに生薬エキス (120 種)、生薬成分化合物ライブラリー (96 種)、および漢方方剤エキス (42 種) の提供を受けた。これらのライブラリーを用いて、酸化ヌクレオチド分解酵素 MTH1 および B 型肝炎ウイルス逆転写酵素 RNase H 阻害剤の探索を行った。

(1) MTH1 阻害剤の探索

癌細胞は酸化ストレスを多く受けるため、酸化されたヌクレオチドを分解する MTH1 の発現が上昇する。MTH1 の活性を阻害すると癌細胞を死滅させることができ、普遍的な抗癌剤となると期待されている。そこで、MTH1 の活性を阻害する化

化合物の探索を目的とした。MTH1の活性は、基質として dGTP を用い、その分解により生じるピロリン酸を発色させて検出した。化合物を 0.1 mM の濃度で加え、生薬由来化合物についてスクリーニングを行った。これまで既承認薬ライブラリーの化合物については 8 種について顕著な活性の阻害がみられた。そのうち 1 種については 1.3 μ M で 50%の活性を阻害した。生薬由来化合物についてはバイカリン、ベルベリン、カピラリシン、硝酸デヒドロコリダリン、塩化パルマチンに 50%以上の阻害がみられた (図 6)。次に、生薬エキスを 0.2 mg/mL の濃度になるように加えた場合の結果、オウバクにおいて 50%以上の阻害が見られた。ベルベリン、デヒドロコリダリン、パルマチンは構造式が類似しており、ともに阻害活性を有することは順当といえる。また、パルマチンを含むオウバクにも阻害活性がみられたこととも合致する。漢方方剤エキスについては 0.2 mg/mL の濃度で加えてスクリーニングを行い、黄蓮解毒湯、半夏白朮天麻湯について 50%以上の阻害がみられた。

(2) B型肝炎ウイルス逆転写酵素 RNase H 阻害剤の探索

B型肝炎ウイルス (HBV) の増殖に必須である逆転写酵素の RNase H 活性を阻害することにより、ウイルスの増殖を抑える薬剤の探索を目的とした。RNase H の活性は、基質として molecular beacon 型 DNA/RNA ヘテロ二重鎖を用い、その分解により生じる蛍光により検出した。既承認薬ライブラリーの化合物を 0.1 mM の濃度で加え、これまで 400 種類の化合物についてスクリーニングを行った。このうち 6 種について、顕著な活性の阻害がみられた。これらの化合物については、さらに詳しい解析を行う予定である。生薬由来化合物の化合物を 0.1 mM の濃度で加えた結果、Alisol A, Astragaloside IV, Ginsenoside-Rb1,

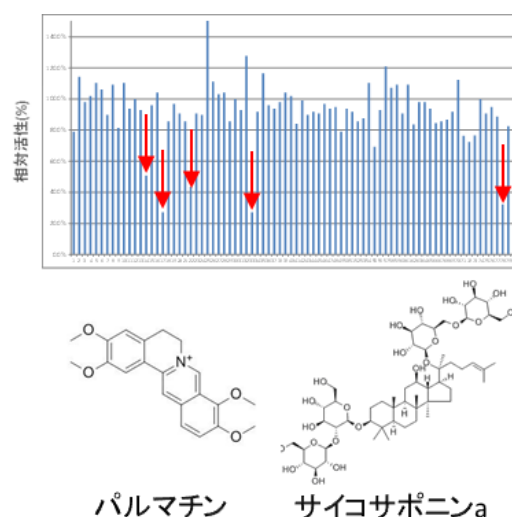


図 6 MTH1 を阻害する生薬由来化合物のスクリーニング結果 (上) と MTH1, HBV RNase H を阻害する生薬由来化合物の例 (下)

Ginsenoside-Rc, Ginsenoside-R, Icariin, Saikosaponin a, Saikosaponin b2, Saikosaponin c, Saikosaponin d, Timosaponin A-III に顕著な阻害がみられた。これらの化合物は Icariin を除きトリテルペノイドまたはステロイド骨格を有しており、このような構造が RNase H の活性阻害に必要と考えられる。また、Alisol A, Astragaloside IV, Saikosaponin には B型肝炎ウイルス増殖抑制効果が報告されており、本研究によりその阻害効果は逆転写酵素の RNase H 活性の阻害によることが示唆される。

【謝辞】

本研究は LTT バイオファーマ社との共同研究として、また平成 28 年度富山大学和漢医薬学総合研究所の共同利用・共同研究助成を受けて行われました。ここに感謝の意を表します。

【参考文献】

- 1) Kihara, Y., Ichikawa, T., Abe, S., Nemoto, N., Ishihara, T., Hirano, N., and Haruki, M., *Polym. J.*, 46, 175-183 (2014).
- 2) Kihara, Y., Maeda, R., Imaizumi, A., Ichikawa, T., Nemoto, N., Ishihara, T., Hirano, N., and Haruki, M., *J. Nanosci., Nanotech.*, 17, 5081-5089 (2017)
- 3) 新里直美, 丸中良典, 大豆たん白質研究, 9, 147-152 (2006).

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）

【序論】

ラマン分光法は赤外線吸収スペクトル（IR）と同様に、分子の振動準位の情報を得ることができる（Figure 1）。

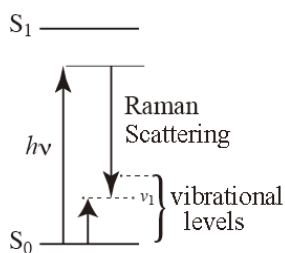


Fig. 1 Energy diagram of Raman scattering.

ラマン分光法の利点として、①分子の散乱現象を利用するため、どんな分子・相にも適応可能である。②水のピークが大きく現れないため、水溶液でも利用可能である。③励起光にレーザーを用いるため、高分解能である。そのため、分子の構造や定性分析によく用いられてきた。しかし、散乱現象を利用するため入射光の強度にラマン強度は依存する。そのため、定量分析にはあまり用いられてこなかった。これまでの研究において、入射光強度や基準試料のラマン強度に対する試料のラマン強度比が濃度に比例することを見だし、種々の系に応用してきた。

本プロジェクトにおいて、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た。この研究で、アミノ酸や脂質、糖のラマンスペクトルから強度比が濃度に比例することを見いだした。また、通常細胞とがん細胞のラマンスペクトルを比較し、がん特有のピークを見つけることについても研究を行なった。

(1) アミノ酸

アミノ酸の定量分析には高速液体クロマトグラフィ（HPLC）が広く用いられている。この方法は非常に高感度で再現性が良いという利点があるが、アミノ酸は発色団をもっていないものが多いので、カラムによる分離の前または後に誘導体化を行い、検出する必要がある。そのため、分離することなしに、アミノ酸混合溶液を同時定量できる方法を開発することが本研究の目的である。本研究ではラマン分光法をアミノ酸水溶液の定量分析に応用することを試みた。この研究におい

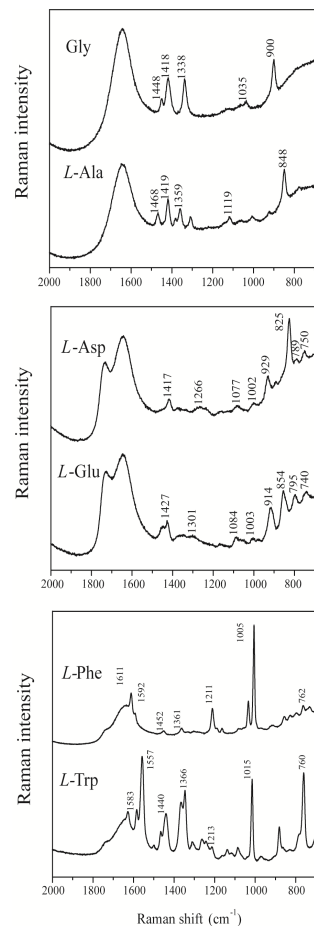


Fig. 2 Raman spectra of amino acids.

て、L-アラニン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-フェニルアラニンおよびL-トリプトファン の 6 種のアミノ酸およびそれらアミノ酸混合溶液における定量分析結果を報告する。

Figure 2 にアミノ酸のラマンスペクトルを示す。同じ振動モードであっても置換基の違いにより、ラマンピークが異なることがわかる。種々の濃度に対して各分子の特有のラマンピーク強度比をプロットすることにより検量線を得た。その検量線は良い直線性を示し、ラマン分光法により、定量分析が可能であることを示した。

(2) 脂肪酸

脂肪酸はカルボキシ基を持つ鎖状炭化水素である。食品中などに含まれ、細胞膜の生成や活動の際のエネルギー源に使われるなど、人間が生命活動を行う上で重要な成分である。脂肪酸は二重結合を持たない飽和脂肪酸と二重結合を持つ不

飽和脂肪酸に分類でき、さらに不飽和脂肪酸は二重結合を構成する炭素に結合する水素の向きによってシス脂肪酸とトランス脂肪酸に分類される。天然に存在する不飽和脂肪酸はほとんど *cis* 体であるが、マーガリンやショートニングなどの固形油を製造する際の水素添加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血中の悪玉コレステロール増加、善玉コレステロール減少を招き、動脈硬化をはじめとする心筋梗塞や脳梗塞などの様々な疾患を引き起こすといった人体への悪影響がある。このことから食品に含まれるトランス脂肪酸の量の表示が義務付けられたり、トランス脂肪酸が食品中に入らないようにしたりする試みが行われている。そのため、製造現場で使用できる定量分析法が必要となる。そこで、本研究では、*cis* 体のオレイン酸と *trans* 体のエライジン酸のラマン分光法による同時定量を行なった。

Figure 3 に (a)オレイン酸と(b) エライジン酸のラマンスペクトルを示す。エライジン酸の融点は 45°C なので、加熱して溶かしてすぐにスペクトルの測定を行なった。オレイン酸の目立ったピークは 1655 , 1438 , 1300 , 1265 , 1065 , and 972 cm^{-1} であった。このスペクトルはいくつかのピークを除いてエライジン酸 (Fig. 3b) のスペクトルとよく似ていた。

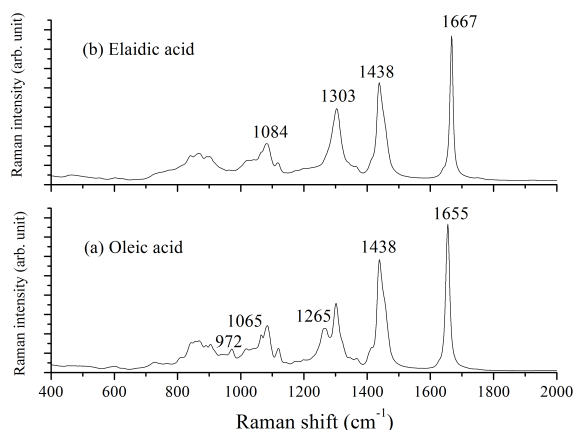


Fig. 3 Raman spectra of (a) oleic and (b) elaidic acids.

種々の既知濃度の試料のスペクトルを二階微分し、多変量解析の PLS 回帰を用いて、実際の濃度に対する予想値が一致するようなモデルを作った (Figure 4 の黒丸と白丸)。そのモデルを使って定量した結果は、実際の濃度とよく一致していることが示された。(Figure 4 の三角の記号)

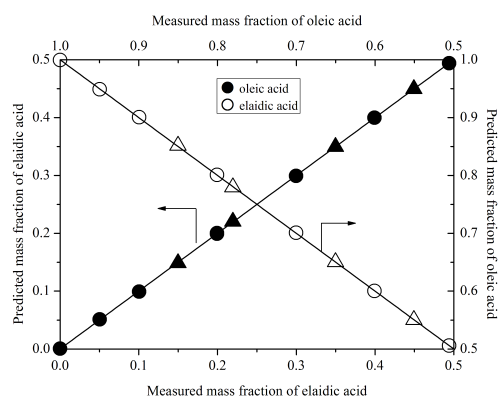


Fig. 4 PLS calibration curves.

(3) 糖

糖の構造による振動準位の違いを知るためにラマンスペクトルを測定した。Figure 5 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。

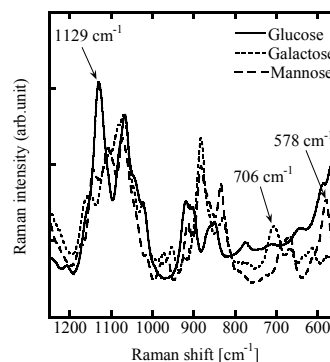


Fig. 5 Raman spectra of glucose, galactose, and Mannose.

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。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) スイカ中のシトルリンの定量

近年、食品廃棄物の量が増加し、大きな問題になってきている。リサイクルの方法として、堆肥化が最も行われているが、もっと付加価値のあるものにすることができれば、さらにリサイクルを進められると考えられる。そのため種々の有用成分を廃棄物から抽出する試みがなされてきた。本研究では、生命活動に有用なアミノ酸を抽出し、再利用しようと考えた。本実験で注目したアミノ酸は、スイカの果皮に含まれている *L*-シトルリンである。アミノ酸を廃棄物から抽出する際、抽出過程で連続的な濃度管理が必要なため、高含水

中で、その場測定が可能なラマン分光法を用いて定量分析を試みた。

Figure 6 にシトルリンのラマンスペクトルを示す。

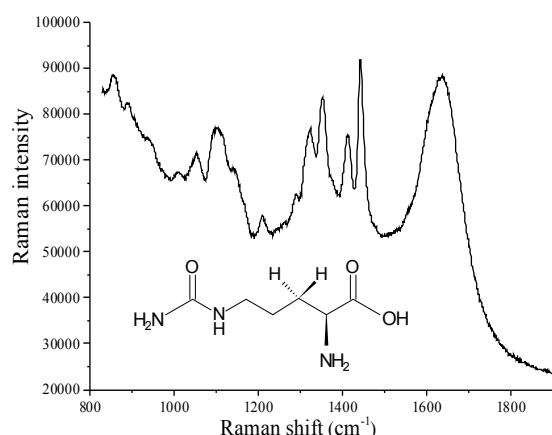


Fig. 6 Raman spectrum of *L*-citrulline.

いくつかのピークが現れているが、最も強度の大きなピーク (1443 cm^{-1}) を用いて、定量することにした。これはシトルリンの H-C-H の変角振動と帰属された。一方、 1640 cm^{-1} にブロードに現れているピークは水の変角振動と帰属された。希薄溶液では、水の濃度は一定と考えられるので、このピーク強度に対するシトルリンのピーク強度を求めて、定量を行った。濃度に対して、ラマン強度比をプロットしたところ、非常に良い直線関係が得られた。この検量線を用いて、スイカから抽出されたシトルリンの濃度を決定したところ $2.231 \times 10^{-2}\text{ mol/L}$ と求められた。同じ試料を高速液体クロマトグラフィで定量したところ $2.255 \times 10^{-2}\text{ mol/L}$ となり二つの方法で求めた濃度はよく一致した。このことから、ラマン分光法は食品から抽出される有用成分の定量に利用できることが示された。

(5) がんと通常細胞におけるラマンスペクトルの違い

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。

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。

Figure 7 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。

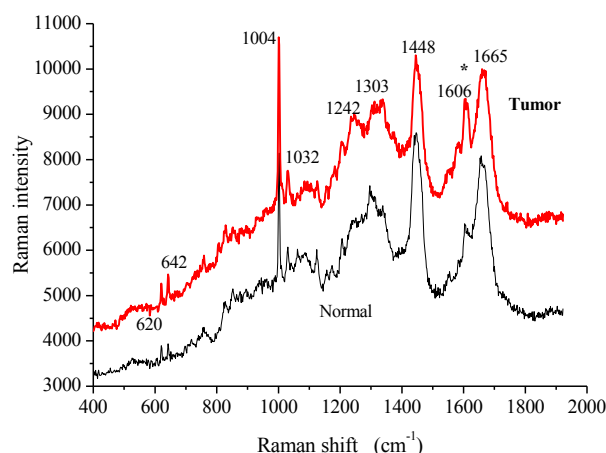


Fig. 7 Raman spectra of normal and tumor tissues.

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

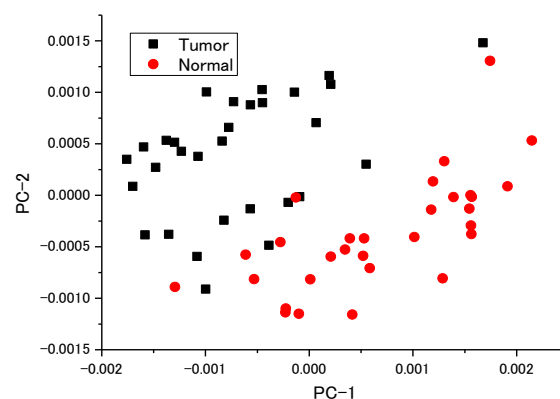


Figure 8 Score plot for PC1 vs PC2.

Figure 8 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 9 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 Fig. 7 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。

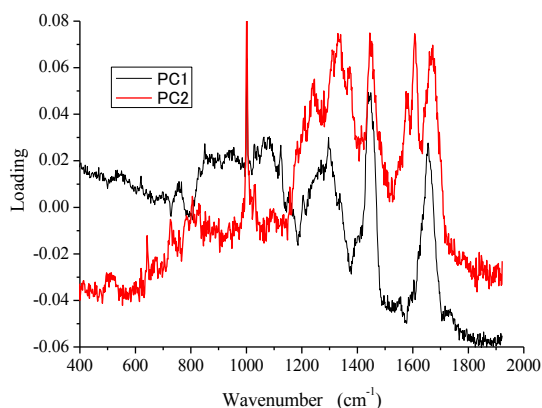


Fig.9 Loading spectra of PC1 and PC2.

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

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

1. 分析化学討論会（京都）

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」

2. 分析化学年会（東京）

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」

3. 食品科学工学会（日本大学生物資源）

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).

平成 30 年度

1. 分析化学討論会（山口）

赤間, 小林, 河野, 沼田, 田中 「ヒト組織片を用いた通常および腫瘍組織におけるラマンスペクトルの比較」

長鈴, 須田, 沼田, 田中 「金コロイド凝集による SERS ピーク強度変化の追跡」

2. European Congress on Molecular Spectroscopy, Coimbra, Portugal

Numata, *et al.*, “Simultaneous determination of elaidic and oleic acid in their mixed solution.”

3. 分析化学学会年会（仙台）

赤間, 沼田, 田中「胃の組織片を用いた通常および腫瘍組織におけるラマンスペクトルの比較」

長鈴, 沼田, 田中「金コロイドサイズがおよぼす SERS ピーク強度変化」

古澤, 沼田, 田中「ラマン分光法による還元型および酸化型ビタミン C の定量分析」

4. 化学系学協会東北大会（秋田）

赤間, 長鈴, 古澤, 発表 3 件

投稿中および準備中論文

(1) Numata, Shinohara, Tanaka, “Quantitative analysis of ethanol-methanol-water ternary solutions using Raman spectroscopy”, *Spectroscopy Letters*, submitted.

(2) Numata*, Kobayashi, Oonami, Kasai, Hiroyuki Tanaka, “Simultaneous determination of oleic and elaidic acids in their mixed solution by Raman spectroscopy” *J. Molecular Structure*, submitted.

(3) Numata, Tsukioka, Tanaka, “Quantitative analysis of citrulline in watermelon rind by Raman spectroscopy”, *Food Control*, 準備中

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
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
小林 厚志(日大工・生命)

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、個体毎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の観察は、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(ラマン分光法による多糖類の構造解析)および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(酵素反応産物の効率的検出法/新規酵素探索のための酵素活性測定法の開発)について検討したので報告する。

1. 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シ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 1)。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℃)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(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在形態を調べるために、ラマン分光法による解析を始めた。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 3)。

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)。Figure 5 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(青), 9(赤), 10(緑), 11(紫)に調製したものを用いた。パ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。

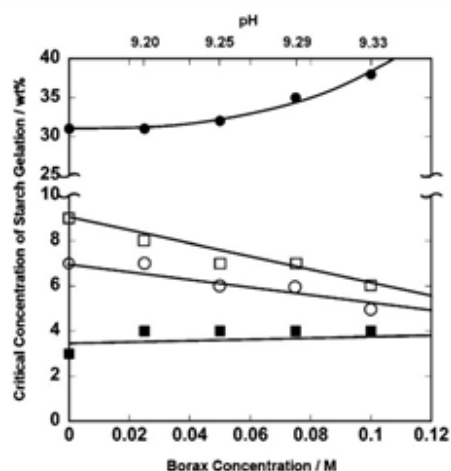


Figure 1 澱粉のゲル化に必要な最少濃度に対するホウ砂の添加効果

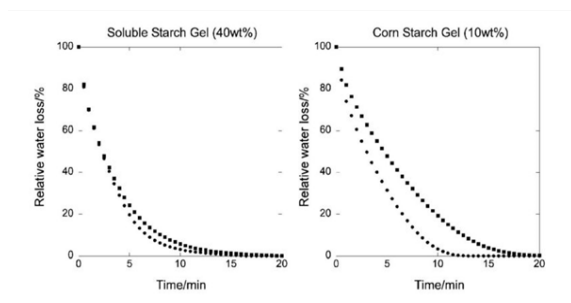


Figure 2 100 °C における澱粉ゲルの水分量変化

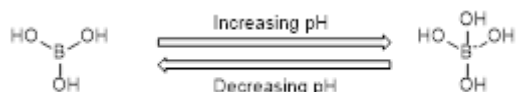


Figure 3 ホウ酸の水溶液中での平衡

2. 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合には、天然の構造体と同じものを用いるより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 に示すような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。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

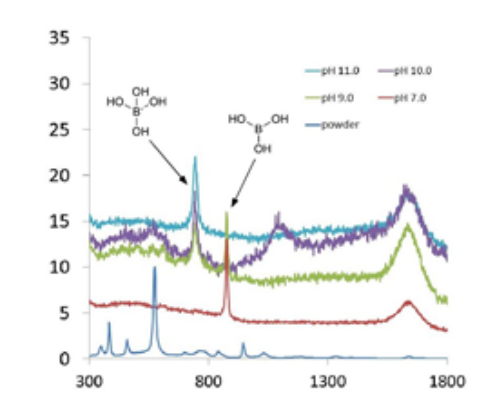


Figure 4 ホウ砂水溶液のラマンスペクトル

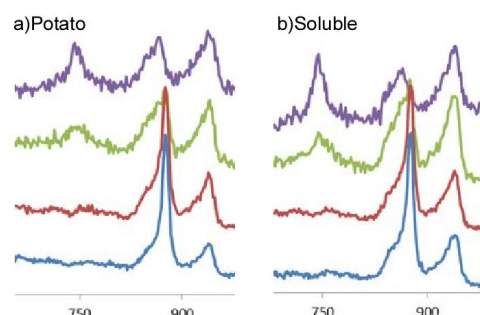


Figure 5 10wt%澱粉-ホウ砂溶液混合物のラマンスペクトル

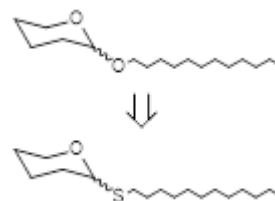


Figure 6 O-グリコシドとS-グリコシドの構造

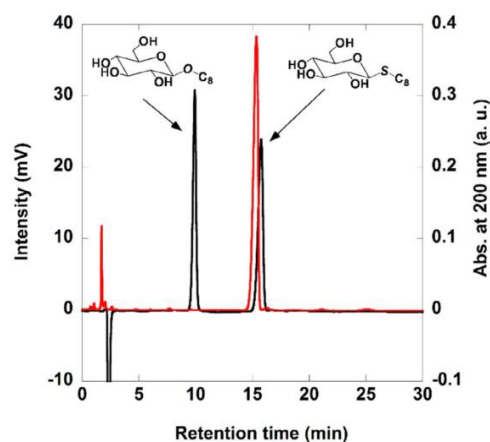


Figure 7 逆相 HPLC による O-グリコシドと S-グリコシドの分離と検出

クロマトグラフは RI 検出によるものであり、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。

3. 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 (Figure 8) に着目し、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 (ビスンコニン酸) 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

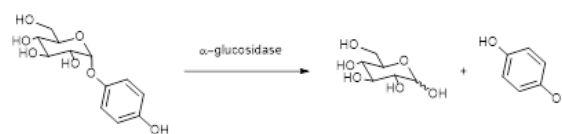


Figure 8 α -グルコシダーゼによるアルブチンの加水分解反応

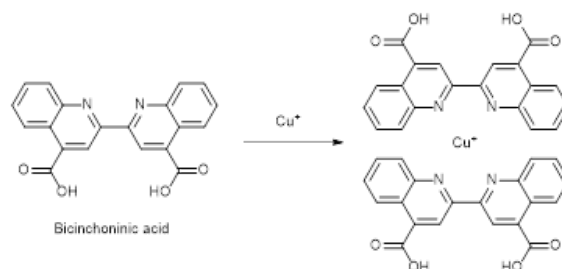


Figure 9 BCA 法の発色原理

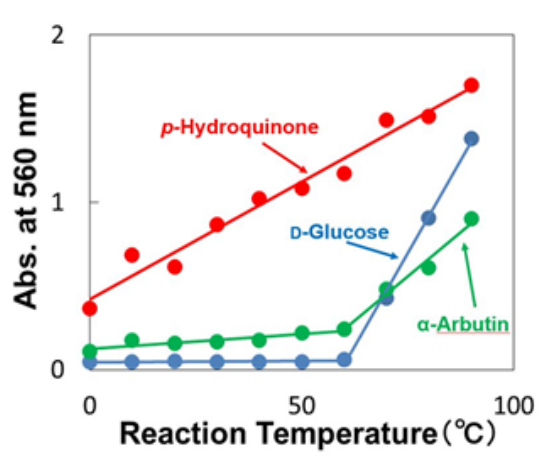


Figure 10 各種還元性物質の BCA 法による発色に対する反応温度の影響

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。

平成 29 年度の活動

投稿論文

- (1) UV Absorption of *n*-Alkyl 1-thio- β -D-glucopyranosides and its Utilization in Chromatographic Separation, Hiroshi Ito, Fabio Pichierri, Atsushi Kobayashi, *Tetrahedron Letters*, **58**, 3678-3680 (2017)

学会発表

日本農芸化学会 2018 年度大会 3 月 15 日-18 日 名城大

- (1) ホウ砂含有澱粉ゲルの乾燥耐性、上沢七海, 星野優人, 伊藤博, 小林厚志
- (2) アルキルチオグリコシドの紫外吸収特性におけるアルキル鎖長とグリコン部位の影響、伊藤博¹, 小林厚志¹, PICHIERI Fabio² (¹日大工, ²東北大院工)

第 8 回福島地区 CE セミナー 12 月 16 日 日本大学工学部

- (3) アルキル-β-D-チオグルコシドの単分散ポリマー粒子表面へのワンポット固定化、磯井友真¹, 荒川史弥¹, 尾形慎¹, 車田研一¹, 伊藤博², 小林厚志², 山内紀子¹ (¹福島高専, ²日大工)

第 60 回日本大学工学部学術講演会 12 月 9 日 日本大学工学部

- (4) チオグリコシドの UV 吸収特性を活かした酵素的配糖化産物の効率的な分析手法、伊藤博, 小林厚志
- (5) アルブチンを基質とする酵素活性測定法の開発、鈴木大樹, 伊藤博, 小林厚志
- (6) ホウ酸含有澱粉ゲルの保水能に対する pH の影響、星野優人, 伊藤博, 小林厚志
- (7) 双頭型ピリジニウム塩を用いるアルギン酸のゲル化、上沢七海, 伊藤博, 小林厚志

2017 高分子学会東北支部研究発表会 11 月 9 日-10 日 山形大学米沢キャンパス

- (8) 還元糖定量法を用いる糖加水分解酵素の簡便な活性測定法の開発、鈴木大樹, 伊藤博, 小林厚志
- (9) 双頭型ピリジニウム塩のアルギン酸ゲルの架橋剤としての評価、上沢七海, 伊藤博, 小林厚志

第 60 回高分子討論会 9 月 20 日-22 日 愛媛大学

- (10) Effect of oxoacids on the water-holding ability of starch gels、星野優人, 伊藤博, 小林厚志

平成 29 年度化学系学協会東北大会 9 月 16 日-17 日 岩手大学理工学部

- (11) Rational design of reaction condition for the formation of glycosidic linkage catalyzed by glycosyl hydrolase: A case of α-amylase、小林厚志 (依頼講演)

- (12) Optimization of α-amylase-catalyzed maltooligosyl transfer reaction to various *n*-alkyl β-thio-glucosides、伊藤博, 小林厚志

- (13) A novel method for the detection of activity of glycosyl hydrolases by using synthetic glycosides having reducing activity、鈴木大樹, 伊藤博, 小林厚志

- (14) Evaluation of water-holding ability to starch gels containing oxoacid、星野優人, 伊藤博, 小林厚志

- (15) Complex formation between sodium alginate and *n*-Alkanediyl α,ω-bis(*N*-pyridinium bromide)、上沢七海, 伊藤博, 小林厚志

2017 年度日本応用糖質科学会大会 9 月 6 日-8 日 日本大学湘南キャンパス

- (16) チオグリコシドを糖受容体とする α-アミラーゼによる効率的グリコシル化のための反応評価、伊藤博, 小林厚志

- (17) オキソ酸イオン添加澱粉ゲルの特性解析 星野優人, 伊藤博, 小林厚志

2017 年度日本応用糖質科学会東北支部講演会 7 月 15 日 東北大学青葉山キャンパス

- (18) アルキルチオグリコシドを糖受容体とする酵素的配糖化反応の最適化、伊藤博, 小林厚志

- (19) 還元糖の定量法に対するフェノール誘導体の影響、鈴木大樹, 伊藤博, 小林厚志

- (20) オキソ酸イオン添加による澱粉ゲルの物理特性への影響、星野優人, 伊藤博, 小林厚志

- (21) 酸性多糖における双頭型ピリジニウム塩の架橋剤としての効果、上沢七海, 伊藤博, 小林厚志

**平成 30 年度
投稿論文及び準備中論文**

- (1) 澱粉のゲルに対するホウ砂の添加効果およびゲルの乾燥耐性評価、小林厚志、星野優人、上沢七海、伊藤博、高分子論文集, **75**, 99-102 (2018)
- (2) Kinetic Analysis of Drying Process of Gelatinized Starch to Investigate the Effect of Boric Acid. Atsushi Kobayashi, Nanami Kamizawa, Yuto Hoshino, Hiroshi Itoh, and Yasushi Numata, *ECS Transactions, in press*
- (3) Effect of pH on the drying process of the gelatinized starch containing boric acid at 100 °C. Atsushi Kobayashi, Nanami Kamizawa, Yuto Hoshino, Hiroshi Itoh, and Yasushi Numata, *Journal of the Electrochemical Society, manuscript in preparation*
- (4) Effect of the structure of alkylthioglycosides on UV absorption property and elucidation of the UV absorption mechanism. Hiroshi Ito, Fabio Pichierri, Atsushi Kobayashi, *Tetrahedron Letters, manuscript in preparation*

学会発表

2018 高分子学会東北支部研究発表会 11 月 15 日-16 日 岩手大学理工学部

- (1) α 化澱粉の挙動解析, 上沢七海, 長崎 茜・松葉 豪・伊藤 博・沼田 靖・小林 厚志
第 67 回高分子討論会 9 月 12 日-14 日 北海道大学 札幌キャンパス
- (2) ホウ砂含有澱粉ゲルの乾燥耐性, 小林厚志, 上沢七海, 星野優人, 伊藤博, 沼田靖
日本応用糖質科学会平成 30 年度大会(第 67 回) 9 月 10 日-12 日 秋田県立大学生物資源学部
- (3) アルキルチオグリコシドの紫外吸収特性におけるアルキル鎖長とグリコン部位の影響, 伊藤博¹, 小林厚志¹, PICHIERRI Fabio² (1 日大工, 2 東北大院工)
- (4) ホウ砂含有澱粉ゲルの乾燥耐性, 上沢七海, 星野優人, 伊藤博, 小林厚志

First International Conference on 4D Materials and Systems 8 月 26 日-30 日 山形大学工学部

- (5) Effect of Starch on the Equilibrium of Boric Acid, Atsushi Kobayashi, Nanami Kamizawa, Yuto Hoshino, Hiroshi Itoh, and Yasushi Numata

平成 30 年度第 10 回日本応用糖質科学会東北支部講演会 7 月 7 日 山形大学工学部

- (6) ホウ砂含有澱粉ゲルの乾燥耐性, 上沢七海, 星野優人, 伊藤博, 小林厚志
第 46 回東北地区高分子若手研究会夏季ゼミナール 7 月 6 日-7 日 山形市黒沢温泉「悠湯の郷 ゆさ」
- (7) ホウ酸を活用する澱粉の状態変化解析, 小林厚志 (招待講演)

新規蛍光プローブ開発を目指した PNA モノマーの開発

日大工・生命 齋藤 義雄

【序】

ペプチド核酸 PNA (Peptide Nucleic Acid) は 1991 年にニールセンらによってはじめて報告された DNA アナログであり、DNA や RNA の主鎖に見られる電荷を有するリン酸ジエステル結合の代わりにアミド結合を有する非天然のポリマー分子である。DNA や RNA は、主鎖にそれぞれ 2'-デオキシリボースおよびデオキシリボースといった糖構造を有するのに対して、PNA ではそれらの糖に代わって、*N*-(2-アミノエチル)グリシンが用いられている。また、PNA は通常アデニン A、グアニン G、チミン T、シトシン C などの DNA と類似の塩基部位を有しており、DNA と同様に相補的な配列を有する PNA や DNA、RNA とハイブリダイズして二重鎖を形成することが可能である。

任意の配列を有する 20mer 程度の短い DNA や RNA は、DNA/RNA 自動合成機を用いることで数時間程度で合成することが可能である。一方、ペプチド構造を有する PNA の場合は、ペプチド合成機を用いることで、同様に短い配列であれば一晩程度で合成することが可能である（さらに、DNA などに比べて大きいスケールでの合成が可能である）。天然の DNA や RNA は生体内においてヌクレアーゼなどの酵素によって容易に分解されてしまうためプローブを作成する際には、酵素分解されないような工夫を施す必要があるが、もともと非天然の構造を有する PNA は、ヌクレアーゼやプロテアーゼといった酵素に耐性であるため、そのような心配は不要である。そのため細胞に対して用いるプローブとして応用しやす

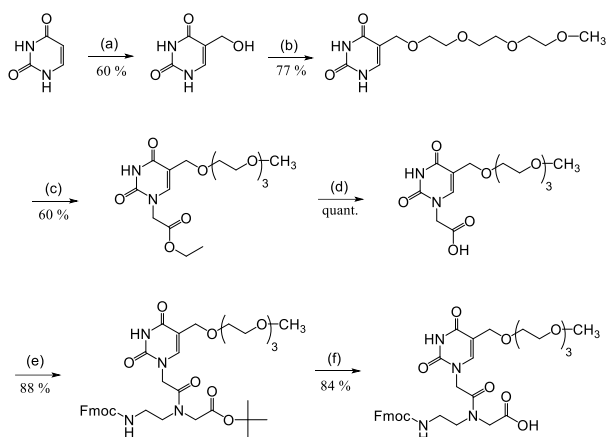
いといった利点がある。また、先ほど述べたように、PNA には DNA や RNA に存在するようなリン酸部位の電荷が存在しないため、相補鎖とハイブリダイズする際の安定性に対する塩濃度の影響が少ないということが知られている。さらには、リン酸部位の負電荷が存在しないために静電反発の影響が小さく、PNA/DNA の 2 重鎖は DNA/DNA の 2 重鎖よりも強い結合を形成することが知られている。このようなことから、修飾 PNA のオリゴマーは、プローブとして病気の診断やアンチセンス療法等への応用が期待されている。

このように、良い事ばかりに見える PNA であるが、実際にプローブとして利用しようと考えると、いくつかの問題点があることが知られている。その代表的なものの一つとして、溶解性の悪さが挙げられる。PNA は、その非イオン性の構造のために、水溶液中で凝集してしまい溶解性が低下してしまうことがしばしば見られる。また、それに伴って同様の理由により細胞膜透過性も低下し、細胞への導入が困難なケースもしばしば見受けられる。そのため、本研究では PNA に親水性置換基を導入した新規 PNA モノマーを合成し、それを導入した PNA 鎖を作成して、その特性、特に細胞膜透過性についての評価を行うこととした。また、これらと同時に開発を進めている蛍光核酸プローブに関する発表も行う予定である。

【結果と考察】

まずはじめに、親水性置換基を導入した PNA モノマーの合成についての検討を行った (Scheme 1)。ウラシルを出発物質として用い、

2段階の反応により、5位に親水性基を導入した。さらに3段階の反応を経て、ペプチド合成機に適応可能なPNAモノマー (**U_{peg}1**) を得ることに成功した。



Scheme 1. Reagents and conditions: a) Et₃N, H₂O, 60 °C, overnight; b) tri(ethylene glycol) monomethyl ester, conc.HCl, 130 °C, 2h; c) ethyl bromoacetate, Et₃N, CH₂Cl₂, 40 °C, overnight; d) Et₃N, H₂O, reflux, 1 h; e) tert-butyl-N-[2-(N⁹-fluorenylmethoxycarbonyl)-aminoethyl]-glycinate, HOBT, EDC.HCl, CH₂Cl₂, rt, overnight; f) TFA, Et₃SiH, rt, 1h.

また、同様の反応により、シトシン塩基の5位に親水性基を含むPNAモノマーの合成についての検討を行った。

続いて、ペプチド自動合成機を用いて、得られたPNAモノマー (**U_{peg}1**) のPNA鎖への導入についての検討を行った。

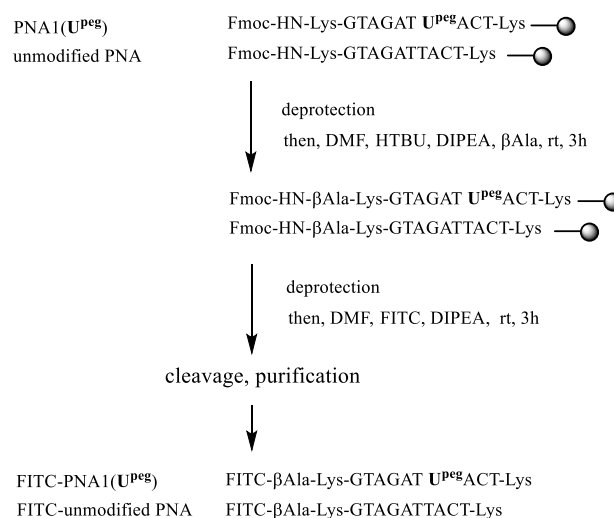
Table 1. PNA sequence used in this study

PNAs	Sequences
PNA1(U_{peg})	H ₂ N-Lys-GTAGAT U_{peg} ACT-Lys
PNA3(U_{peg})	H ₂ N-Lys-G U_{peg} AGAT U_{peg} AC U_{peg} -Lys
unmodified PNA	H ₂ N-Lys-GTAGAT TACT-Lys
target DNA	5'-AGTAATCTAC-3'
FITC-PNA1(U_{peg})	FITC-βAla-Lys-GTAGAT U_{peg} ACT-Lys
FITC-unmodified PNA	FITC-βAla-Lys-GTAGATTACT-Lys

Table 1 に示したように、未修飾のPNA鎖 (unmodified PNA) と、親水性基を含む **U_{peg}1** を1ユニット含む PNA1(**U_{peg}1**)、ならびに **U_{peg}1** を3ユニット導入された PNA3(**U_{peg}1**) を作成した。HPLCにより、精製を行った後、標的DNA鎖とハイブリダイズさせて融解温度を測定し、さらにCDスペクトルを測定した。その結果、ピリミジン塩基の5位にかさ

高い親水性ユニットを導入しても二重鎖形成能にほとんど影響を与えないことが分かった。また、HPLCの保持時間の比較により細胞膜透過性についての評価を行った結果、ユニット数を増やすことにより、細胞膜透過性が向上することが示唆された。さらに、実際の細胞を用いて、細胞膜透過性を評価するために、以下のScheme 2に示した方法により、PNA1(**U_{peg}1**)ならびに PNA3(**U_{peg}1**)を蛍光標識した FITC-PNA1(**U_{peg}1**)ならびに FITC-PNA3(**U_{peg}1**)を合成した。

Post-modification



Scheme 2. Post-modification of PNA1 and PNA3

これらを用いて、実際の細胞における細胞膜透過性の評価を行ったので、それらの結果についての報告を行う予定である。

また、これらの親水性基を導入したPNA鎖と組み合わせて使用することが可能な、新規蛍光PNAモノマーの合成についても検討を行っているので、その詳細についても報告を行う予定である。

【参考文献】

1) F. Wojciechowski, R. H. E. Hudson, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3807.

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、ポリシロキサンは主鎖がシロキサン結合 (Si-O 結合) からなるポリマーであり、代表的なポリマーがポリジメチルシロキサン (PDMS) である。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し、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、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することが困難であるといった問題がある。そこで我々は、高極性のスルホベタイン基に注目した。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。そこで、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られる。

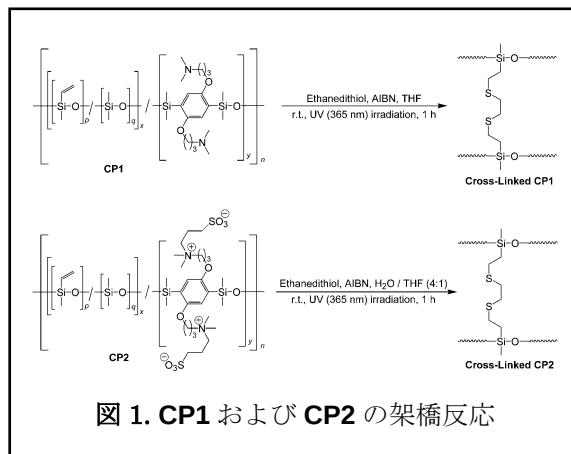
以上の背景から本研究では、同種あるいは異種高分子材料との相互作用を付与し、接着性などの加工性を向上させるために、双性イオン性基であるスルホベタイン基を有するシリコーンゴム創製について検討することを目的とした。

【実験および結果】

1. ポリ (シルアリーレンシロキサン) 誘導体を用いたシリコーンゴム創製

ポリシロキサンの主鎖に芳香環を導入したポリ (シルアリーレンシロキサン) 誘導体の代表的なポリマーが、ポリ (テトラメチル-1,4-シルフェニレンシロキサン) (PTMS) であり、PTMS のフェニレン基上に置換基や官能基を導入することにより、諸物性を変化させることが可能である。そこで、PTMS のフェニレン基上にスルホベタイン基を導入したポリ (テトラメチル-1,4-シルフェニレンシロキサン) 誘導体と、架橋点としてビニル基を有するポリ (ジメチルシロキサン-*ran*-メチルビニルシロキサン) (PDMS-MVS) を用いたマルチブロック共重合体を合成し、空気下で効率よく架橋可能なチオール-エンクリック反応を用いて、新規シリコーンゴム材料の創製について検討した。

図 1 に示すように、三級アミン部位を有するマルチブロック共重合体 **CP1** と、**CP1** の四級化反応により得られたスルホベタイン基を有するマルチブロック共重合体 **CP2** 合成した後に、**CP1** および **CP2** のチオール-エンクリック反応を行った。その結果、**Cross-Linked CP1** は、図 2 (a) に示すようなチューブ状のゴム状物質となり、折り曲げると破断することなく、図 2 (b) のような状態となった。その後、放置すると元の形状に戻ることから、得られた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。一方で、**Cross-Linked CP2** では、材料の凝集が起きてしまい、加工が困難となった。そこで、高分子反応



を用いて **CP1** の架橋体表面にスルホベタイン基を導入することで、物性の改善が可能であると考えられる。

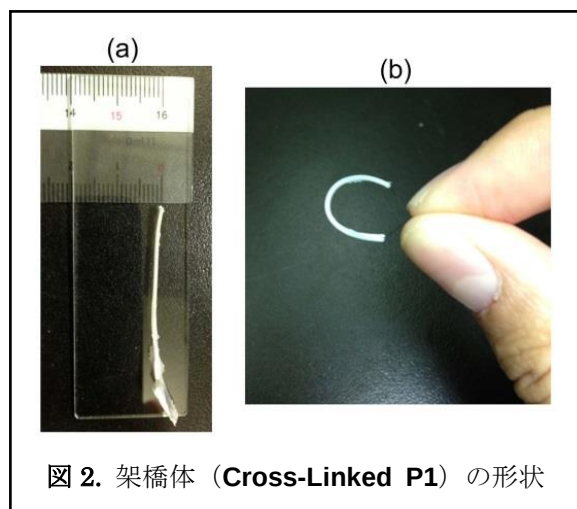


図 2. 架橋体 (Cross-Linked P1) の形状

2. 架橋点を有するポリシロキサン誘導体およびスルホベタイン誘導体を用いたシリコーンゴム創製

図 3 に示すように、スルホベタインメタクリレート (**SB1**)、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**) を用いて、**PDMS-MVS** のチオール-エンクリック反応を行い、新規シリコーンゴム材料の創製について検討した。

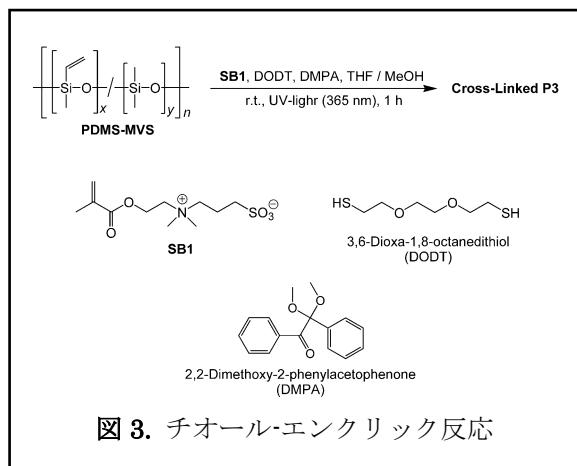


図 3. チオール-エンクリック反応

PDMS-MVS のチオール-エンクリック反応を行うことにより得られた **Cross-Linked P3** は、図 4 に示すような不均一な架橋体となった。これは **SB1** が汎用有機溶媒に対して溶解性が乏しいためと考えられる。そこで、薄膜状で均一な架橋体を得るためには、スルホベタイン化合物の溶解性を向上させる必要がある。

次に、架橋体表面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 5)。その結果、**PDMS-MVS** のみの架橋体 (**Cross-Linked PDMS-MVS**) では、水の接



図 4. 架橋体 (Cross-Linked P3) の形状

触角 θ が 100° であったことに対し、**SB1** を用いた **Cross-Linked P3** では、水の接触角 θ が 86.7° であったことから、**Cross-Linked P3** 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た。

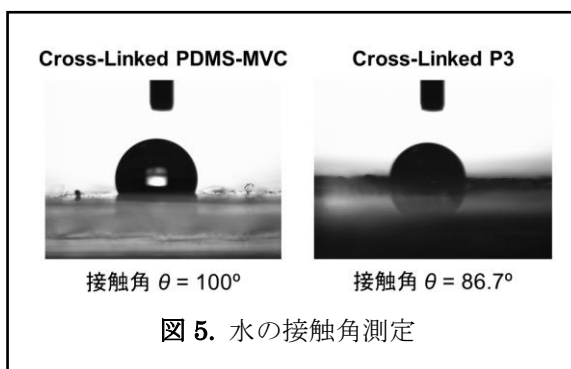


図 5. 水の接触角測定

【研究業績】

- 1) 市川 司, 根本 修克, アダマンタン骨格を有するポリシロキサン誘導体の合成と熱物性 (機能性モノマーの選び方・使い方 事例集), 株式会社 技術情報協会, 第 4 章, 7 節, 236-246 (2017).
- 2) 市川 司, 春木 満, 根本 修克, ポリ (シルアリーレンシロキサン) 誘導体を用いたシリコーンゴム創製, 日本ゴム協会誌, 90, 354-358 (2017).
- 3) T. Ichikawa, T. Wako, N. Nemoto, Synthesis of ionic liquid based on polysiloxane with quaternized imidazolium moiety, *Polym. Bull.* 73, 1361-1371 (2016).
- 4) T. Ichikawa, T. Wako, N. Nemoto, Synthesis of polysiloxane based quaternized imidazolium salts with a hydroxy group at the end of alkyl groups, *React. Funct. Polym.* 99, 1-8 (2016).
- 5) 市川 司, 根本 修克, 四級イミダゾリウム塩を有するポリシロキサンランダム共重合体の合成, 高分子論文集, 73, 116-123 (2016).

機能性骨修復材料の開発

内野智裕

日大工・生命

【緒論】

病気や怪我で骨が損傷し自然治癒が困難な場合、損傷部位の補填が行われる。補填の方法には、自身の骨を移植する自家骨移植、他者から骨を移植する他家骨移植および人工材料を移植する人工骨移植がある。それぞれの移植数は拒絶反応のリスクから自家骨移植が最多である一方、人工骨移植は供給量に制限が無い場合、症状、個体差に応じて機能を付与することなどが試みられている。生体骨の無機主成分は水酸アパタイト (HAp: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) に類似した結晶性の低い化合物である。化学量論の HAp において Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 、及び OH^- は様々なイオンで置換可能である。各イオンが骨修復および骨疾患に効果のあるイオンに置換できれば、この人工材料を埋入後、骨代謝に応答した有効成分放出制御可能な材料として期待できる。

非晶質リン酸カルシウム (ACP) は、生体骨の主成分である低結晶性 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 合成において有効成分を固溶できれば、結晶化の際アパタイト結晶構造中にも固溶し、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、Sr、Mg などを導入して金属イオン導入粉末を合成し評価してきた。このセメントは骨吸収環境において放

出し、通常および骨形成環境において Zn など骨形成に有効な金属イオン放出を抑制することを明らかにした。本研究では、ACP に体内において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】

$\text{Ca/P} = 1.00$ (モル比)となるように同濃度の $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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。一方 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 pH10.5 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)。 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を、 $(\text{Ca}+\text{Mg})/\text{P} = 1.00$ (モル比)、Ca に対して 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, 圧縮試験により評価した。骨形成および骨代謝環境を模倣した擬似体液 (SBF) または酢酸緩衝液 (AcBu) に試料セメント浸漬し Mg 放出挙動を調べ、骨修復材料埋入直後試料表面で起こるされるタンパク質吸着評価を、牛血清アルブミン (BSA) を用

いて行った。

【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。Mg 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. 1)。各ピークはブロードなピークで LHAp 構造であると推察される。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。LHAp 構造で、Mg および CO_3^{2-} を構造中に含有していたことから、作製した試料は Mg 含有骨類似組成セメントである。セメント試料は取扱いに十分な強度を有し Mg 導入によ

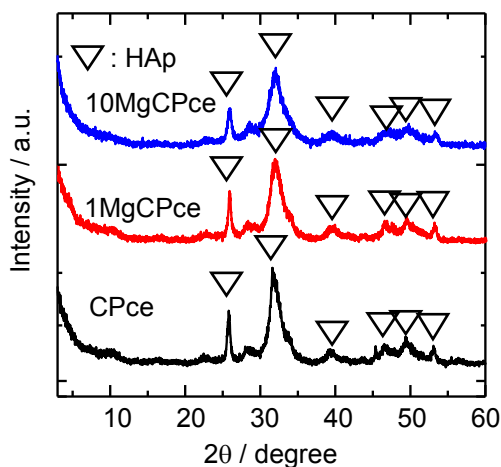


Fig. 1 セメント試料の XRD 図

り圧縮強度が増大し、生体内の海綿骨と同等の強度であった。Mg 導入セメントはその導入量によらず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. 2, 3)。Mg 導入により放出を制御することができ、Mg 放出の際、試料崩壊することなく溶出した (Fig. 4)。BSA 吸着試験において 24 時間以内で BSA 吸着挙動を示した。

作製したセメント試料は埋入初期にタンパク質吸着を抑制することなく、骨代謝サイクルに入り、要事に Mg を放出する機能性骨修復材料として期待される。

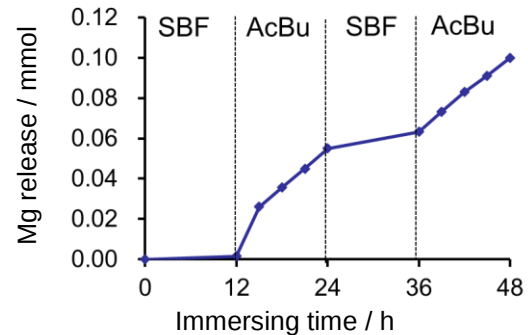


Fig. 2 10MgCPce の Mg 放出挙動

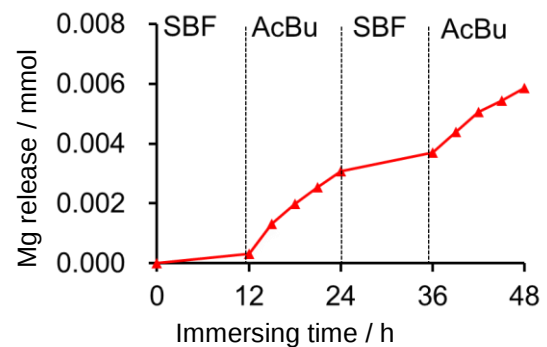


Fig. 3 1MgCPce の Mg 放出挙動

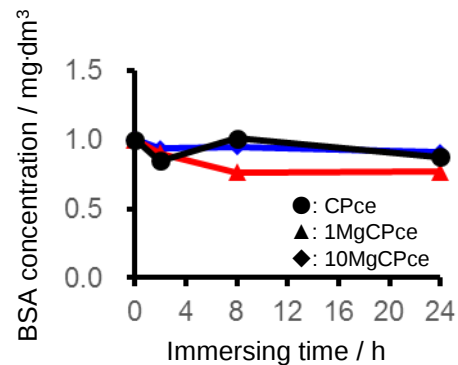


Fig. 4 セメント試料の BSA 吸着挙動

【まとめ】

本研究で合成した Mg 導入 ACP 粉末は、ACP 中への Mg 導入量を制御することができ、セメント試料は埋入後、タンパク質を吸着し骨代謝に応じて 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】

将来迎えるであろう超高齢化社会では、健康寿命を延伸することが重要な課題である。そのためには、健康管理/疾病予防はもちろん疾病発症後でも患者の生活の質を向上させる必要がある。薬物療法の一つであるドラッグデリバリーシステム(DDS)の技術を利用すると、体内の病変部位にのみ薬物を届け副作用を軽減させたり、一度の投与で薬効を長期間持続させ入院の回避や通院頻度の低下を可能にする。そこで我々は、工学的な見地から「患者にやさしい DDS 医薬品」の開発を試みた。本報告では、i)肝硬変治療のための薬物キャリア(ナノ粒子)、ii)ホスファチジルコリンを化学修飾したタンパク質製剤、iii)慢性動脈閉塞症治療のための脂質ナノ粒子製剤、iv)遺伝子治療のための機能性ポリ乳酸ナノ粒子の四つの創薬研究の成果を記した。

【肝硬変治療のためのナノ粒子製剤】

肝星細胞は、肝炎が慢性化すると活性化され過剰にコラーゲン線維を産生する。その結果、肝臓が線維化され肝硬変へと進行する。現在のところ肝硬変の根治療法はないが、動物試験ではコラーゲン産生を抑制すると肝硬変の病態が改善されたとの報告がある。抗線維化効果が示唆されている薬物としてセレコキシブなどがあげられるが、全身に分布してしまい肝星細胞にのみ集積させることはできない。そこで本研究では、肝星細胞へ特異的に薬物を運搬できるナノ粒子型 DDS 製剤の開発を目的とした。肝星細胞に発現している血小板由来増殖因子受容体(PDGF 受容体)のリ

ガンド分子である環状ペプチド(pPB)をナノ粒子の表面に修飾した。また、ナノ粒子のコア部に生分解性高分子を用い長期薬効持続のための薬物徐放機能を付与した(図1)。

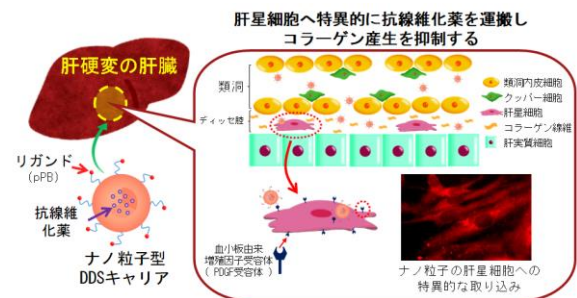


図1 肝星細胞への特異的薬物デリバリー

蛍光修飾ナノ粒子を作製しその TWNT-1 細胞(ヒト不死化肝星細胞株)への取り込み評価を行ったところ、pPB を修飾していないナノ粒子に比べ、pPB 修飾ナノ粒子では顕著に取り込まれた。また、その取り込みは過剰の pPB により抑制された。次に、セレコキシブにより誘導される TWNT-1 細胞の細胞死を評価したところ、pPB 未修飾ナノ粒子では細胞死がみられなかったが、pPB 修飾ナノ粒子では細胞死が確認できた。これは、ナノ粒子が pPB を介し選択的に細胞内に取り込まれセレコキシブを放出したためと考えられる。そこでさらに、TWNT-1 細胞のコラーゲン産生量を測定したところ、pPB 修飾ナノ粒子でのみコラーゲン産生が抑制された。よって、細胞内へ送達するセレコキシブ量を調整することで、細胞死を誘導せずコラーゲン産生を抑制できることがわかった。以上から、pPB 修飾ナノ粒子は肝星細胞へ特異的に抗線維化薬を運搬しコラーゲン産生を抑制できるキャリアとして期待できる。

【ホスファチジルコリンを化学修飾したタンパク質製剤】

近年、タンパク質を有効成分としたバイオ医薬品が数多く開発されている。その中には、遺伝子工学的あるいは化学的な修飾を施したものも存在する。現在、ホスファチジルコリン(PC)を修飾剤として用いたスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)製剤が研究されている。これまでに、PC化したSOD(PC-SOD)では、細胞親和性と血中滞留性が増大することや、活性酸素の過剰発現を起因とする様々な疾患モデル動物で薬理活性が高まることが報告されている。しかしながら、その詳細なメカニズムは未だ解明されていない。そこで、本研究ではPC-SODの生体成分との相互作用や *in vitro* での活性酸素消去能を検討した。

Cu, Zn-SOD に蛍光色素をラベル後、活性エステルを有するPC誘導体を反応させPC-SODをえた。電気泳動による解析の結果、PC-SODは血清中のアルブミンなどと複合体を形成することがわかった。また、PC-SODはSODより細胞に顕著に取り込まれ、阻害試験からその経路が脂質ラフトを介したエンドサイトーシスであることが示唆された。PC-SODの O_2^- 消去能を解析したところ、PC-SODはSODの約17%の消去能しかないことがわかった。さらに、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 O_2^- の定量を行った。培地中にSODあるいはPC-SODを添加し測定したところ、SODとPC-SODはほぼ同等の消去能を示した。一方、細胞とSODあるいはPC-SODをインキュベート後細胞を洗浄し測定したところ、SODはほとんど O_2^- を消去しなかったがPC-SODでは濃度依存的に顕著に消去できた。これは、細胞表面に結合したPC-SODが O_2^- を消去する役割を担ったためと考えられる。以上より、酵素活性が低下するにもかかわらずPC-SODがSODよりも高い薬理効果を示すのは、PC-SODが細

胞膜上に結合し細胞外に産生される O_2^- を効果的に消去したためと考えられる。

【慢性動脈閉塞症治療のための脂質ナノ粒子製剤】

リピッドエマルジョンとは、大豆油をレシチンで乳化した脂肪微粒子であり、血管拡張作用のあるプロスタグランジン E1(PGE1)のキャリアとして既に慢性動脈閉塞症治療で臨床利用されている。しかし、リピッドエマルジョンは薬物担持安定性が低く血中投与後すぐにPGE1が油相から遊離してしまう。一方、我々は既にポリ乳酸(PLA)からなるポリマーナノ粒子を開発してきた。このナノ粒子に封入した薬物は血中でほとんど遊離しないが、担持安定性が高すぎ疾患の種類によっては十分な薬効をえられないこともある。そこで本研究では、リピッドエマルジョンより安定に、かつポリマーナノ粒子より容易に薬物を放出できる新しい脂質ナノ粒子の開発を目指した(図2)。

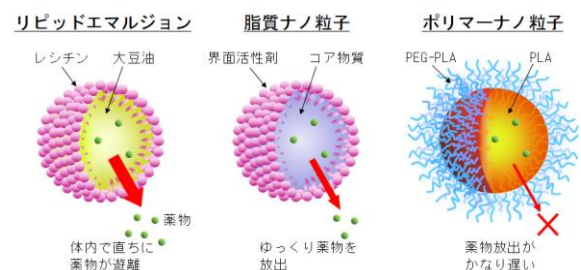


図2 様々な薬物放出速度の粒子製剤

ナノ粒子は、薬物としてPGE1のプロドラッグのAS013を、また界面活性剤として様々な両親媒性のブロック共重合体を用い溶媒留去法により調製した。しかしながら、50%血清中でのナノ粒子の薬物担持安定性は、ブロック共重合体の組成に依らずリピッドエマルジョンと大きな相違はみられなかった。そこで次に、トリラウリン、大豆油、PLAの3種のコア物質あるいはそれらを組み合わせる調製したナノ粒子の薬物担持安定性

を評価した。その結果、大豆油と PLA を混合した脂質ナノ粒子では、大豆油と PLA の混合比を変えることで薬物担持安定性を任意に制御できることがわかった。特に、約 20%重量の PLA を混合したナノ粒子は、リピッドエマルジョンとポリマーナノ粒子の中間の薬物担持安定性を示すことが明らかになった (図 3)。さらに、この脂質ナノ粒子をラットに静脈注射したところ、リピッドエマルジョンより高い血中滞留性を示した。

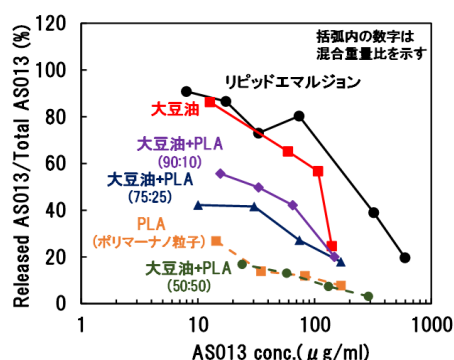


図 3 様々な粒子の AS013 担持安定性

【遺伝子治療のための機能性ポリ乳酸ナノ粒子】

遺伝子治療の実現には、核酸分子を標的組織に集積させ効率よく細胞内の核や細胞質に運搬するキャリアが必要とされる。ポリエチレングリコール (PEG) 鎖で表面を被覆したキャリアは、血中投与後 EPR 効果により腫瘍組織や炎症部位に集積することが知られる。しかしながら、集積後は却って PEG 鎖の存在が細胞内への移行の妨げになってしまう。一方、エンドサイトーシスで細胞に取り込まれたキャリアは、エンドソームから細胞質内に核酸を運搬し遊離しなければならない。本研究では、これら二つの課題つまり「PEG ジレンマ」と「エンドソーム脱出」を克服すべく、PLA からなる機能性ナノ粒子の調製を試みた (図 4)。

PLA と PEG のブロック共重合体 (PLA-b-PEG) から調製したナノ粒子の細胞への取り込みを観察したところ、PEG 含量が多いナノ粒子ほど取り込

みは減少した。また、あらかじめナノ粒子を PBS 中でインキュベートした後細胞への取り込みを観察すると、インキュベート時間に依存し取り込みが増大した。これは、インキュベーションに伴い PLA-b-PEG の PLA が加水分解され PEG 鎖が粒子表面から遊離したためと考えられる。この結果は、時間依存的にナノ粒子の細胞への親和性を制御できることを示唆している。一方、PEG とポリグルタミン酸のグラフト共重合体 (PLG-g-PEG) あるいはブロック共重合体 (PLG-b-PEG) を血液に添加すると溶血がみられたことから、これら共重合体は膜破壊能を有していることがわかった。これらを修飾したナノ粒子の細胞内挙動を蛍光顕微鏡で観察したところ、PLG-g-PEG を用いたグラフト型ナノ粒子では、ややぼやけた蛍光が観察できた (図 4)。これは、エンドソーム内での PLA の加水分解に伴い、PLG-g-PEG がナノ粒子から遊離しエンドソーム膜を破壊したためと考えられる。

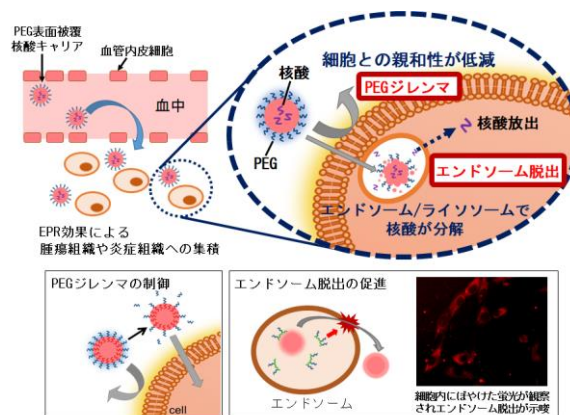


図 4 細胞質への核酸デリバリー

バイオインフォマティクスを基盤としたライフサイエンス研究

山岸賢司

日大工・生命応用化学

【緒論】

近年、急速に向上しているコンピュータの処理能力と、新たな理論やアルゴリズムの開発を背景に、生体高分子の構造やその機能を高精度にコンピュータ上でシミュレートすることが可能となってきた。さらに、ゲノム配列をはじめとする大量の実験データの解析においても、コンピュータを用いた解析は欠かせないものとなってきた。情報技術を基盤とするバイオインフォマティクスは、医学・薬学をはじめとする生命化学分野において、実用的な研究ツールの一つとして認識されつつある。本研究では、研究課題3「診断治療のための新機能分子・測定法の開発」に対して、バイオインフォマティクスを基盤として、以下の研究を行った。

テーマ1. 分子シミュレーション解析による新機能性分子の開発

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。

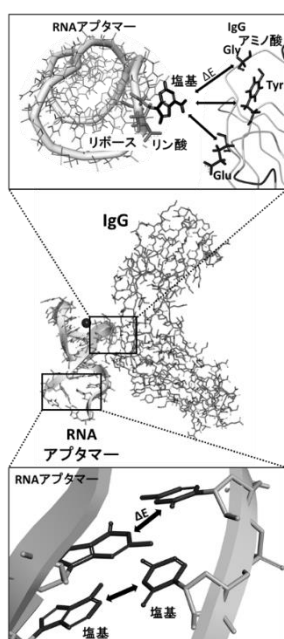


図1. アプタマーとヒト抗体との相互作用解析

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を目指した。

(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]間の経時的な動的挙動を解析した。アプタマーが平衡化構造に達した後、どれだけ構造の揺らぎがあるか解析するため、アプタマー構造全体の平均二乗偏差(RMSD)を算出し、その分散を用いた。図2には、フッ素修飾した塩基の数が異なる4つのアプタマーに対して解析した結果を示した。その結果、構造の揺らぎが小さいほど、ヒト抗体への結合活性が高いことが明らかとなった。

	apt. 1	apt. 2	apt. 3	apt. 4
N: 2'-OH (RNA), n: 2'-H (DNA), N: 2'-F	5' 3'	5' 3'	5' 3'	5' 3'
結合活性	+	+	-	-
2'-Fの個数	9	4	3	0
RMSDの分散	0.53	0.86	1.29	2.17

図2. アプタマーの配列とMD計算から解析した構造の揺らぎ

そこで、計算化学による分子設計に基づき、A18にLNAを修飾したアプタマーの化学合成を行い、ヒト抗体に対する結合活性(K_D 値)を表面プラズモン共鳴(SPR)法により測定した結果 apt. 2 の K_D 値が 26.0 [nM]であるのに対し、apt. 5 の K_D 値は 9.8 [nM]になり、結合性が向上した。以上より、計算化学を用いて、効率的なアプタマー設計を行うことに成功した(特許出願)。

テーマ2:次世代シーケンス解析を利用した呼吸器疾患の診断手法の開発

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。そこで、血液中のエクソソーム内の RNA の発現量の増減を利用し、呼吸器疾患を早期に診断するシステムの開発を行った。

(i) RNA-seq データ解析プロトコルの構築

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。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、遺伝子ごとにマッピングされたリードの数を比較、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するよう設計した。参照ゲノム配列と遺伝子情報は、Ensembl の mm10 version78 を使用した(図 6)。

(ii) 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。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。

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(図 7)。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

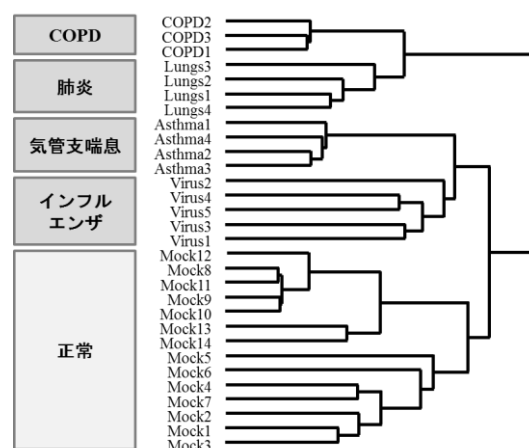


図 7. 遺伝子発現パターンを利用したクラスター解析による病態モデルの分類

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。

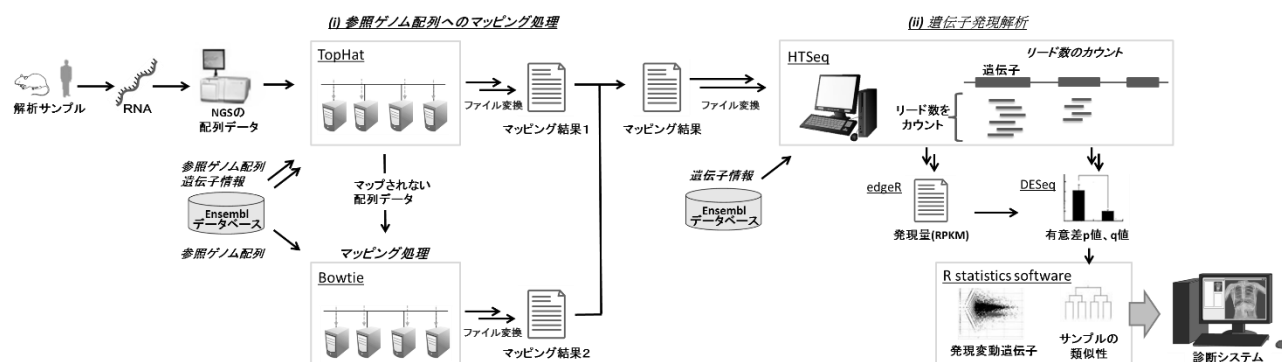


図 6. RNA-seq データ解析プロトコル

タンパク質分解系による細胞周期進行制御機構の解明

岸 努

日大工・生命

緒言

細胞の分裂は、細胞周期と呼ばれる精緻に制御された一連の過程を経て起こる。様々なタンパク質からなるネットワークによって支えられているため、その制御メカニズムは未解明な点が多い。多くのがん細胞は細胞周期制御が破綻した結果引き起こされることを鑑みると、細胞周期の未知の制御機構の解明は、生物学的にも医学的にも重要である。

細胞周期制御においてタンパク質のユビキチン化に依存した選択的分解が着目されている。特に S 期開始においては、ユビキチンリガーゼ SCF^{Cdc4} が必須の役割を果たす。このことは、何らかのタンパク質がユビキチン化・分解されることにより S 期開始が誘導されることを意味している。私たちはこれまでに、SCF^{Cdc4} によるユビキチン化・分解の標的タンパク質の一つとして G1 期に機能する遺伝子群の転写因子 Swi5 を明らかにしている。そこで本研究は S 期開始における Swi5 のユビキチン化・分解の役割を解明することを目的として開始した。その結果、Swi5 が適切にユビキチン化・分解されることが S 期開始だけでなく、G1 期の進行、染色体分離の制御にも重要であることを明らかにした (図 1)。

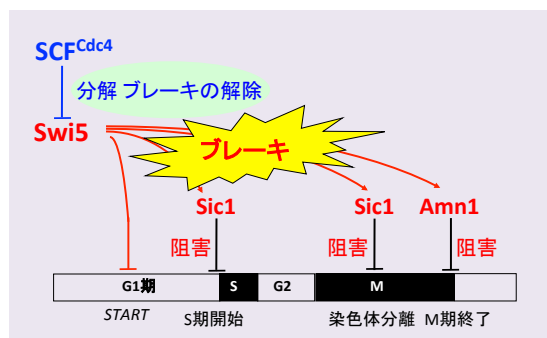


図1 Swi5の分解による細胞周期制御

(1) S 期開始の制御における SCF^{Cdc4} の標的タンパク質は Swi5 と Sic1 である

S 期の進行は S-CDK (S 期サイクリン-サイクリン依存キナーゼ複合体) が制御する。G1 期には S-CDK の阻害因子である Sic1 が発現している。これまで S 期開始には、Sic1 が SCF^{Cdc4} によってユビキチン化・分解されることが必須であると考えられてきた。しかし近年、酵母およびヒトの系において、Sic1 (ヒトでは p27) の分解は必ずしも必須ではないことが報告されている。すなわち、ユビキチン化に必須のリン酸化部位をアラニン置換することにより安定化した Sic1-9P0 を発現する細胞は、G1 期が長くなるものの S 期を開始することができる。私たちが同定した SCF^{Cdc4} の標的タンパク質である Swi5 は Sic1 の転写因子であるので、S 期開始の制御における SCF^{Cdc4} の標的タンパク質は Swi5 と Sic1 であるという作業仮説を立て検証した。

まず SCF^{Cdc4} によるユビキチン化・分解を受けずに安定化する安定化型 Swi5-ST12A を作製した。具体的には、Swi5 のリン酸化がユビキチン化に必須であるので、12 ヶ所のリン酸化部位をアラニンに置換した。実際にこの Swi5-ST12A が安定化することを確認した。染色体上の SWI5 を SWI5-ST12A に置き換えた SWI5-ST12A 株は S 期を開始することはできたが G1 期が著しく長くなった。さらに SWI5-ST12A と SIC1-9P0 を内在性プロモーターから発現する細胞は致死となった。以上の結果は、S 期開始を適切に行うには SCF^{Cdc4} による Swi5 と Sic1 の二つのタンパク質のユビキチン化・分解することが必須であ

ること、一方のみがユビキチン化・分解される場合には S 期を開始することはできるが著しく遅延することを示している。すなわち、S 期開始の制御において SCF^{Cdc4} による Sic1 の量的制御が必須であること、そしてこの制御は、まず第一に Swi5 の分解を介した Sic1 の発現調節と、第二に Sic1 の分解の二つで行なわれていることを明らかにした (図2)。

次に Swi5 のユビキチン化・分解がどのようにプログラムされているか検討した。Sic1 のユビキチン化・分解が G1 後期に行われるのに対して Swi5 の分解は G1 初期に行われるので、Swi5 と Sic1 のユビキチン化・分解を誘導するシグナルは別のはずである。実際 Sic1 ユビキチン化・分解に必要な G1/S サイクリンは、Swi5 のユビキチン化・分解に関与しないことを確認した。そこで Swi5 のユビキチン化・分解に必要なキナーゼのスクリーニングを行なった。Swi5 はリン酸化部位が多いため、リン酸化部位とキナーゼの対応関係を電気泳動における泳動度で見出すことは困難であった。そこで GFP を融合した Swi5 (Swi5-GFP) の安定性を野生株とキナーゼ欠損株を用いて比較した。

蛍光顕微鏡を用いて Swi5-GFP が核に移行してから分解消失するまでをタイムラプス観察した結果、野生株における半減期は約 5 分であった。次に酵母キナーゼの破壊株コレクションを用いて、それぞれの株における Swi5-GFP の半減期を測定した。その結果、3 種のキナーゼ破壊株において半減期が野生株と比べて長くなった。そのうちの 하나가 CDK の一つである *PHO85* であった。Pho85 のサイクリンサブユニットである Pcl2 と Pcl9 の破壊株でも Swi5-GFP は安定化した。したがって、核に移行した Swi5 をフィードバックにより分解するプログラムが存在する

ことがわかった。しかし *pho85* 欠損株における Swi5 の安定化は Swi5-ST12A に及ばなかった。したがって、Swi5 の分解は複数のシグナルによって調節されていることが示唆される (図2)。この点において、スクリーニングで同定した他の二つのキナーゼの関与とその生理的な意味の解明が重要である。

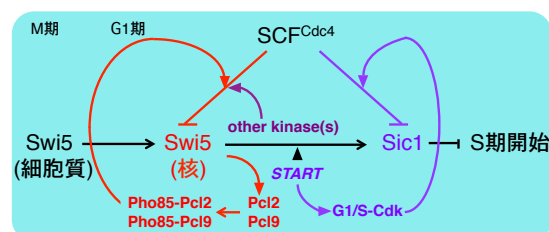


図2 S期開始を制御する2つの調節回路

(2) Swi5 の分解の S 期開始制御以外の役割

(2-1) Swi5 の分解による G1 期の進行制御

細胞分裂を終えた G1 期の細胞が新しい細胞周期に入るためには細胞の大きさが閾値に達しているかチェックする *START* と呼ばれる制御ポイントを通過しなければならない。*START* を通過すると新しい細胞周期に入り出芽を開始する。Swi5-ST12A-GFP を用いて細胞周期マーカー遺伝子の発現を調べたところ、Swi5 の分解が出芽開始の制御に関与することを見出した。

出芽酵母では、娘細胞は母細胞より出芽開始が遅れる。これは出芽酵母が不等分裂を行い、分裂により生じた娘細胞は母細胞より小さいためである。Swi5-ST12A を発現する細胞で出芽開始において以下の異常を観察した。出芽開始は母細胞と娘細胞ともに著しく遅延した。この時、娘細胞は母細胞とほぼ同時に出芽を開始し、いずれも Swi5-ST12A-GFP の消失に依存した。以上の結果は、出芽形成開始に Swi5 が適切に分解されることが重要であることを示している。Swi5 が

STARTの活性化を阻害する可能性と出芽形成を直接阻害する可能性の二つが考えられる。どちらの可能性が正しいかについては、STARTを直接活性化するG1サイクリンおよびG1/Sサイクリンの発現が*SWI5-ST12A*株において阻害されているか調べることによって判定できる。もしSwi5がSTART通過を阻害するのであれば、ヒトにおけるSwi5の分解は新しい抗がん剤の標的となり得る。

(2-2) Swi5 の分解による染色体分離の制御

染色体の分離を正確に遂行するためには全ての染色体が染色体分配装置である紡錘体と結合することが必須である。この結合を監視するのが紡錘体チェックポイントである。Swi5の活性を厳密にコントロールすることができない細胞は、紡錘体チェックポイントが活性化状態となり、染色体分離が阻害されることを見出した（図3）。

まずSwi5の細胞質局在に必要な3箇所のセリン・スレオニン残基をアラニンに置換することによって細胞周期に依らず安定化型Swi5を核に局在するSwi5-NLST8Aを作製した。

間接蛍光法を用いて核と紡錘体を構成するチューブリンを観察したところ、M期にSwi5-NLST8Aを強制発現すると染色体分離が阻害された。この阻害は紡錘体チェックポイントに依存した。*sic1*破壊株およびM期サイクリンを過剰発現する細胞では染色体分離の阻害は観察されなかった。これまでM期の進行にM-CDKが必須であることがわかっていたが、M-CDKの一つの機能として染色体分離を制御することを本研究で明らかにした。そして核移行とユビキチン化・分解によるSwi5の活性制御はM-CDKが適切に活性化するために重要であることを明らかにした。

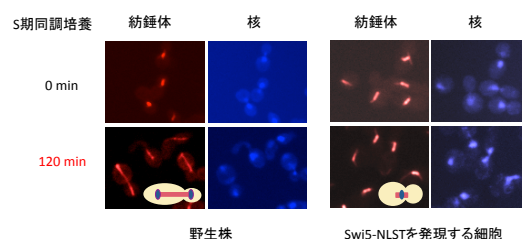


図3 Swi5の分解は染色体分離に重要である

M-CDKが紡錘体チェックポイントを介して染色体分離を制御する仕組みについては今後の課題である。染色体と紡錘体の結合が正常に起きるためにはM-CDK活性が必要であるか、あるいは一度活性化した紡錘体チェックポイントを解除することができないかの二つの可能性が考えられる。

考察

Swi5の分解が、G1期、S期開始、染色体分離を適切に遂行するために重要であることがわかった。また、すでにSwi5の分解が、M期終了を制御するMEN経路 (Mitotic Exit Network) の阻害因子でSwi5に依存して転写されるAmn1の発現抑制を介してM期終了を制御することを明らかにしている。したがってSwi5は、G1期に細胞周期の進行にブレーキをかけることによりG1期を安定に維持する役割を果たしていると考えられる（図1）。新しい細胞周期の進行のためにそのブレーキを解除するのがSCF^{Cdc4}に依存したSwi5の分解であると言える。

本研究を行う過程で、酵母で遺伝子破壊やエピトープタグングの際に用いる新しいリソースを開発した。これについては以下の論文で発表した。

K. Nihei and T. Kishi: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **64**, 99-102 (2018)

M. Nonaka and T. Kishi: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **63**, 199-202 (2017)

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。近年、バイオテクノロジー分野では、これらの生理活性物質の誘導体を、遺伝子工学が容易な大腸菌で生産する手法が注目されている。しかし、従来から用いられる大腸菌プラスミド DNA への遺伝子導入法では、導入鎖長に限界があるため、多種類の生合成遺伝子が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、長鎖 DNA が導入可能な大腸菌ゲノム DNA へ生合成経路を遺伝子導入することで、効率的なポリケタイド生産を可能にする手法の開発を行った。

【方法】

大腸菌ゲノムへの遺伝子導入には、放線菌ファージ TG1 由来部位特異的組換え酵素（TG1 ファージ・インテグラーゼ）を用いた^{1,2)}。ファージ・インテグラーゼは、ファージ感染時に、ファージゲノムの宿主細菌ゲノムへの組み込みを触媒する酵素である³⁾。しかし、遺伝子導入した生合成経路のゲノム発現時では、プラスミド発現時と比較して、遺伝子発現量が大きく低下し、生合成量も大きく低下する場合が多い。本研究では、放線菌のフラビオリン（赤色色素）とウコンのクルクミン（抗腫瘍作用）の生合成系（図 1）を対象に、生合成酵素を人工的に複合体化することで、生合成反応を効率良く進行させ、生合成量を向上させる手法の開発を試みた。

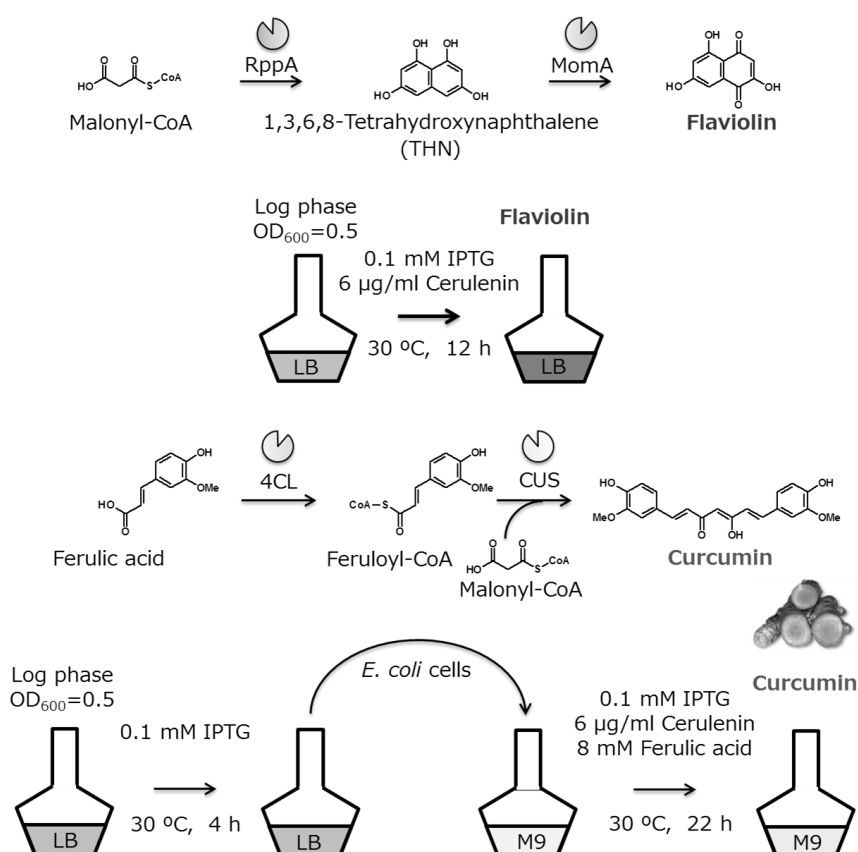


図 1. 大腸菌でのポリケタイド生合成（フラビオリン生合成系・クルクミン生合成系）

【結果】

生合成酵素の人工的な複合体化には、植物バイオマス分解酵素複合体（セルロソーム複合体）の形成機構を用いた^{4,7)}。フラビオリン生合成系で比較した場合、ゲノム発現時では、プラスミド発現時と比較して、酵素発現量は 1/5、生合成量は 1/2 に低下した。次に、生合成酵素を複合体化した場合、酵素発現量は 1/5 のままであるが、生合成量はプラスミド発現時と同等まで回復した（図 2）。また、クルクミン生合成系のゲノム発現時においても、生合成酵素の複合体化によって生合成量は改善したが、フラビオリン生合成系と比べて改善効果が弱い。同じポリケタイド生合成系であっても、複合体化した際の改善効果に違いが生じることが示唆された。酵素複合体化による生合成量の改善効果は、フラビオリン生合成系では顕著な効果が見られたが、クルクミン生合成系では顕著な効果は確認されなかった。

今後、ブドウのレスベラトロール（抗酸化作用）の生合成系を対象に、本手法の汎用性を検討する予定である。また今後は、ポリケタイド生合成系に限らず、更に多様な有用物質の生合成経路に対して、本手法の汎用性を検討してゆく予定である。

【引用文献】

1. Hirano, N. *et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2011) 89, 1877-1884.
2. Muroi, T. *et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2013) 97, 4039-4048.
3. Hirano, N. *et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2011) 92, 227-239.
4. Hirano, N. *et al. FEMS Microbiol. Lett.* (2013) 344, 25-30.
5. Hirano, K. *et al. Appl. Environ. Microbiol.* (2015) 81, 4756-4766.
6. Hirano, K. *et al. Sci. Rep.* (2016) 6, 35709.
7. Shinoda, S. *et al. Appl. Biochem. Biotechnol.* (2018) DOI: 10.1007/s12010-018-2864-6.

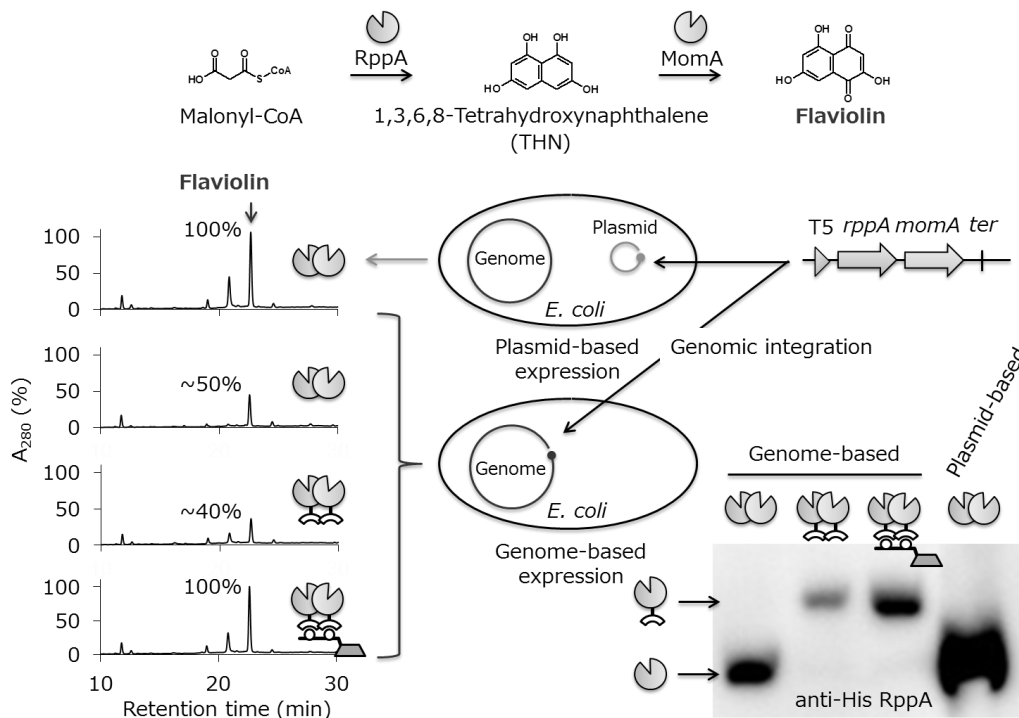


図 2. 生合成酵素の複合体化による生合成量改善効果（フラビオリン生合成系）

※大量発現プロモーター（T5）で構築した生合成経路を大腸菌ゲノムへ導入した場合、プラスミド発現時に比べて酵素発現量は~1/5、生合成量は<1/2 に減少する。一方、短鎖のセルロソーム骨格（酵素 2 個結合）で複合体化した場合、酵素発現量は~1/5 のままであるが、生合成量はプラスミド発現時と同等まで回復する。結果として、生合成酵素を人工的に複合体化することで、ゲノム発現時であっても生合成量は維持される。

過活動膀胱等の治療法の研究

山口 脩, 野宮正範, 池上憲太郎, 宮崎 希, 今井祐樹, 春木 満
日大工・生命

1. はじめに

前立腺肥大症は中高年男性の代表的な排尿障害である。本疾患では肥大前立腺が下部尿路を閉塞するため、排尿困難に加えて頻尿や尿意切迫感のような過活動膀胱(Overactive Bladder: OAB と略)の症状が出現し、生活の質(QOL)を著しく損ってしまう。そのため、過活動膀胱の治療・予防法の開発は重要である。本研究ではTAC-302 および水素水による過活動膀胱の改善効果について報告する。また、尿産生停止により膀胱が使用されなくなった場合に萎縮を起こすメカニズムの検討も行った。さらに、水素水による食塩感受性高血圧の改善効果についても報告する。

2. TAC-302 による OAB 改善効果

TAC-302 は熱帯地方で切り傷の治療に使われていた植物から抽出されたシクロヘキセノン長鎖アルコールで、神経突起伸長作用、神経修復作用および神経保護作用をもつ化合物である。過活動膀胱を有する患者の膀胱では部分的に神経脱落(partial denervation)が起こっていることから、OAB の発生と denervation の関連性が指摘されてきた。そこで、ラット慢性膀胱虚血(chronic bladder ischemia: CBI)モデルを用いて、TAC-302 がその神経保護および修復効果により膀胱過活動の発生を防止できるか検討した。また、TAC-302 の膀胱壁内神経に対する保護効果を形態学的および機能的側面から検証した。さらに、作用機序の解明を目指し、神経成長と修復に関与するとされている NGF および Ghrelin の発現についても検討した。

【対象と方法】

16 週齢雄性ラットを対照群 8 匹, CBI 群 12 匹, CBI+TAC-302 投与 (CBI-TAC) 群 11 匹に分けて検討した。対照群は、無処置普通食で飼育。CBI 群は、両側腸骨内皮傷害後、高コレステロール食で飼育。CBI-TAC 群は、両側腸骨動脈内皮傷害後、TAC-302 (0.1%) 混餌高コレステロール食で飼育した。8 週後、覚醒非拘束下に膀胱内圧測定を行った後、摘出膀胱の平滑筋条片を用いた等尺性

張力実験および膀胱と腸骨動脈の組織学的評価、PCP9.5 (非特異的神経マーカー) を用いた神経染色、ELISA 法による NGF の発現、定量的 RT-PCR による Ghrelin の発現を解析した。Ach の放出量は、膀胱切片をオルガンバス中に懸垂し、マイクロダイアリシス法によって測定した。また、胃における Ghrelin mRNA の発現も TAC-302 投与群で測定し、非投与群と比較した。

【結果】

体重・膀胱重量は群間に差を認めなかった。CBI と CBI-TAC 群の腸骨動脈は、血管壁肥厚を伴う動脈閉塞性変化を呈し、動脈壁の厚さは、CBI と CBI-TAC 群間で有意差を認めなかった。膀胱内圧測定では、対照群に比べ、CBI 群の排尿間隔は著明に短縮し、膀胱容量と一回排尿量の有意な減少を示した(図1)。一方、CBI-TAC 群では、この排尿間隔の短縮と膀胱容量の減少が有意に改善した(図1)。経壁神経電気刺激に対する収縮反応性は、対照群に比べて CBI 群で有意に低下し、CBI-TAC 群では、この収縮反応性の低下が有意に抑制された(図2)。膀胱の CGRP および

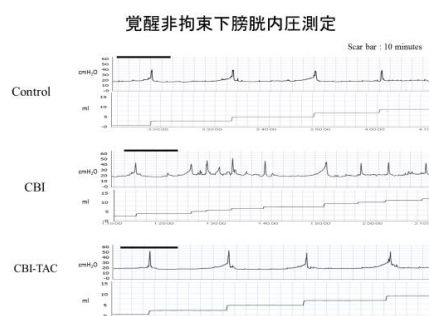


図1 膀胱内圧測定結果

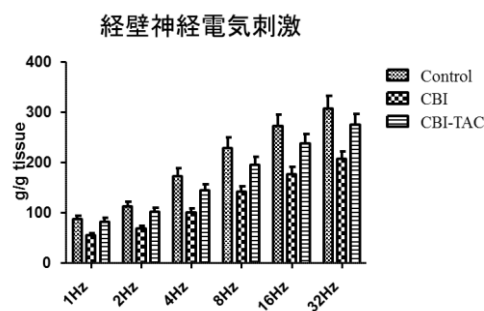


図2 経壁神経電気刺激に対する収縮反応性

Substance P (SP) 陽性神経は CBI 群で減少したが、これらの神経の減少は TAC-302 によって抑えられた (図 3)。Ach 放出量は CBI 群で有意に減少した。一方、TAC-302 投与は Ach の放出量をコントロールと同程度に維持した (図 4)。NGF の発現は、CBI 群と CBI+TAC-302 群では有意差がなかった (図 5)。膀胱および胃における Ghrelin mRNA の発現量は、TAC-302 投与の投与によっても変化を示さなかった (図 6)。

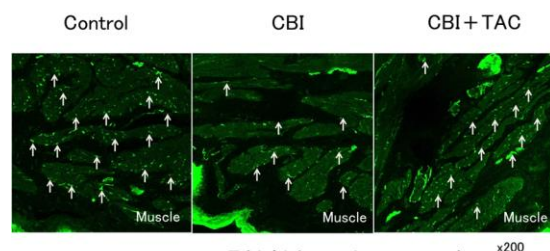


図 3 PGP9.5 陽性神経 (矢印で示す)

【考察】

TAC-302 の予防投与は、CBI ラットの膀胱過活動の発生を防止した。また、TAC-302 は CBI 群における求心性神経の減少、および経壁電気刺激による遠心性神経を介する縮反応の低下も抑えた。以上の所見は、遠心性および求心性神経を含めて膀胱支配神経の保護が、膀胱過活動の発生予防に繋がることを示唆している。

TAC-302 の投与が CBI における PGP9.5 陽性神経の減少を抑えると共に、Ach の放出量も正常レ

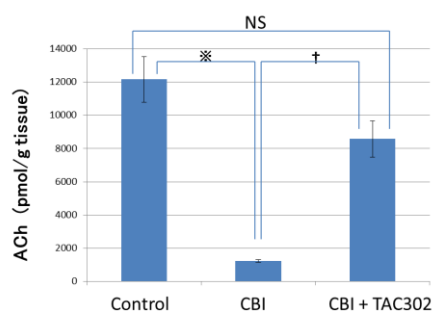


図 4 Ach の放出量

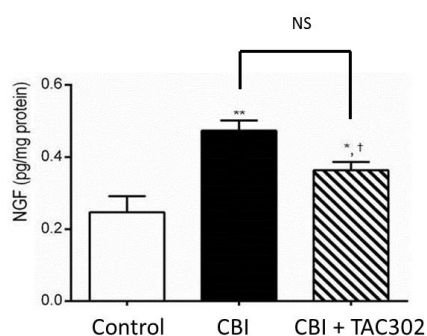


図 5 NGF の発現

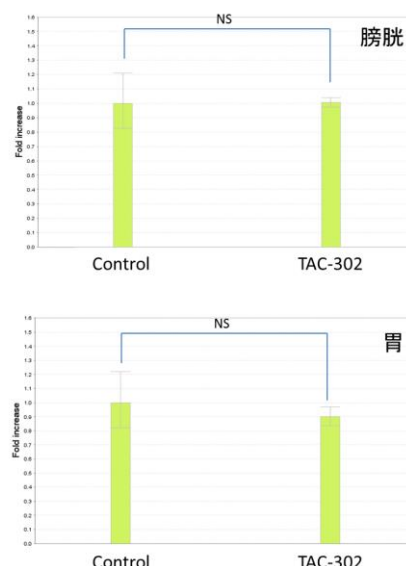


図 6 膀胱及び胃における Ghrelin mRNA の発現

ベル近くまで維持したことから、TAC-302 は遠心性および求心性神経を含めた膀胱壁内神経に対する保護効果を有することが明らかとなった。この作用機序として NGF や Ghrelin の関与を検討したが、TAC-302 の投与は膀胱および胃において両者の発現を促進しなかった。このように、TAC-302 には明らかに神経保護作用があるにもかかわらず、その作用機序には未知の部分が多く解明に向けた更なる研究が必要である。

3. 水素水による OAB の改善効果

下部尿路閉塞による OAB の発症には、膀胱の慢性虚血と酸化ストレスが関与すると考えられている。そこで、優れた抗酸化作用を有し、近年様々な疾患予防効果が報告されている水素水 (H_2 -Water) に着目し、水素水の摂取による OAB 改善効果および、その分子メカニズムを検討した。

下部尿路閉塞 (BOO) ラットに水素水 (HW) を 4 週間与え、通常水 (OW) を与えた群および Sham 群 (コントロール群) と比較した。通常水を与えた下部尿路閉塞ラット (BOO+OW) では、排尿間隔が短縮すると共に、残尿量の増加と排尿効率の低下が観察された (図 7)。一方、水素水を摂取させた群 (BOO+HW) では、排尿間隔がほぼ正常に戻り、排尿効率も残尿量の減少に伴い上昇した (図 7)。

膀胱組織中の酸化ストレスマーカー (8-OHdG と MDA) は、通常水を与えた群 (BOO+OW) で著しい上昇を示した (図 8)。また、膀胱求心性神経の感受性を高める NGF の発現も亢進していた。ところが、水素水を与えた群 (BOO+HW) では、8-OHdG および MDA の上昇が抑えられ NGF の発現も低下した (図 8)。

以上のように、下部尿路閉塞ラットにおいて、

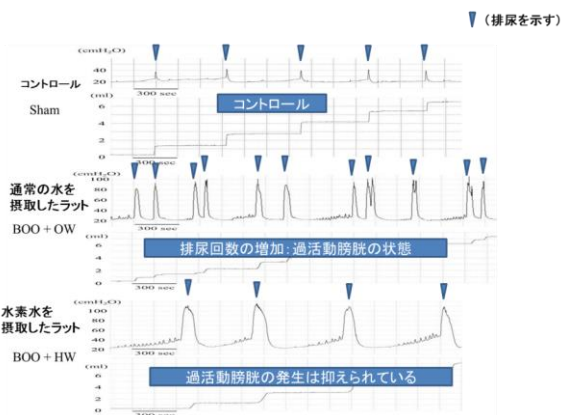


図7 水素水による過活動膀胱の症状の改善

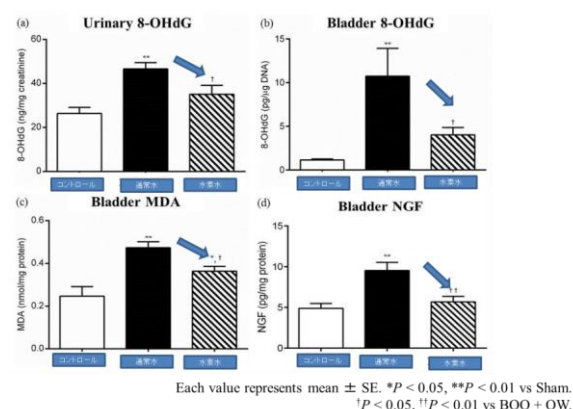


図8 水素水による酸化ストレスマーカーの減少

水素水の摂取はその抗酸化作用によって OAB の発生のみならず排出障害の悪化も抑えることが明らかとなり、今後臨床への応用が期待される。

4. 廃用性膀胱萎縮のメカニズム

腎不全などで尿産生が行われなくなり膀胱に尿が輸送されなくなると、膀胱は尿を貯め排出するという本来の活動を停止する。このように活動が停止した膀胱は廃用性萎縮を起こすことが知られている。ところが、腎移植によって尿産生が再開しても進行した膀胱萎縮は回復しないことが多く、移植医療における問題の一つになっている。本研究では、タンパク質を分解する機序の中で、ユビキチン・プロテアソーム径路に着目し、廃用性膀胱萎縮の機序を検討した。

【対象と方法】

雄 SD ラットに両側尿管を膀胱から遊離し背部に開口固定する尿路変更を行い、尿が膀胱に輸送されない廃用膀胱モデルを作成した。類似の sham 手術を行ったラットをコントロールとした。尿路変更後、1日目、2日目、3日目および7日目で膀胱を摘出し、膀胱重量測定後に凍結保存した。尿路変更後に萎縮を誘導する蛋白質を調べるため、蛋白分解系として MuRF-1 と Atrogin-1, アポトーシス系として Bcl-2 のそれ

ぞれの発現を定量的 RT-PCR により解析した。

【結果】

膀胱重量は、尿路変更後1日目から減少し始め、7日目で約30%の有意の減少を示した(図9)。MuRF-1 は、尿路変更後の1日目から有意に上昇し、2日目に最大となり、3日目まで有意の上昇を維持し、以後7日目まで徐々に減少した(図10)。Atrogin-1 も同様に、1日目から有意に上昇し、2日目に最大となり、3日目まで高値を維持し、7日目で sham と同レベルまで減少した(図10)。Bcl-2 については、2日目から上昇傾向を示したが、有意の変化は認められなかった。

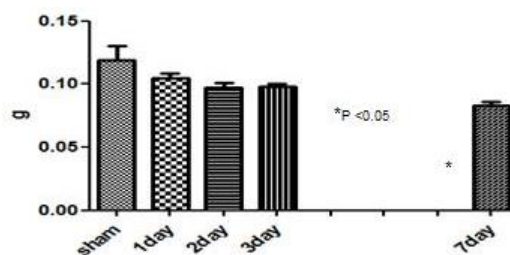


図9 尿路変更後の膀胱重量の推移

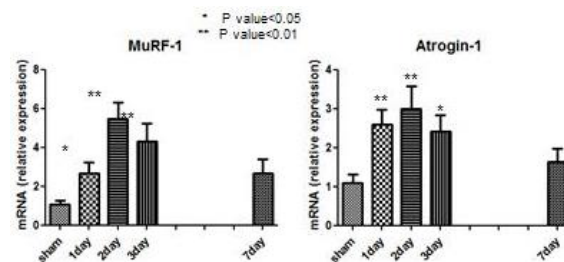


図10 尿路変更後のユビキチンリガーゼの発現

【考察】

運動不足や寝たきりの状態が続くと筋肉が萎縮することは良く知られている。平滑筋臓器である膀胱も使われなくなると廃用性萎縮を起こすが、今回の実験で膀胱重量が尿路変更後1週目で有意に減少(約3割の減少)したことは、膀胱の廃用性萎縮がかなり早い時期から始まることを示している。さらに、尿路変更後3日以内に、ユビキチン化を誘導する酵素である MuRF-1 と Atrogin-1 の発現(mRNA)が増大していることが明らかとなった。したがって、廃用性膀胱萎縮の機序として、MuRF も Atrogin も筋特異的なリガーゼであるから、両者が膀胱平滑筋を構成するタンパク質と結合、ユビキチン化を誘導し、ユビキチン・プロテアソーム径路による分解が進行しているものと思われる。今後、蛋白質のユビキチン化を防ぐ食品や薬剤の開発は、廃用性膀胱萎縮のみならず老化による筋萎

縮（サルコペニア）の予防に役立つことが期待される。

5. 水素水による食塩感受性高血圧の予防効果

食塩感受性高血圧は日本国内において、高血圧患者全体の4割を占める。血圧調節には Na^+ が重要な役割を果たしており、腎臓遠位尿細管細胞の上皮型ナトリウムチャネル（ENaC）を介して尿からの再吸収が行われることにより人体の電解質濃度を一定に保っている。食塩感受性高血圧では、ENaCによる Na^+ 再吸収が増進することによって血圧の上昇が引き起こされる。

本研究ではDahl salt sensitive rat (DSS ラット)を用いて H_2 水摂取による食塩感受性高血圧に対する抑制効果を検討した。また、水素水によるENaC遺伝子の転写抑制効果の解析を行った。また、血圧制御因子であるwith-no-lysine kinase 4 (WNK4)はENaCの発現を抑制することが報告されているので、WNK4の発現についても解析した。

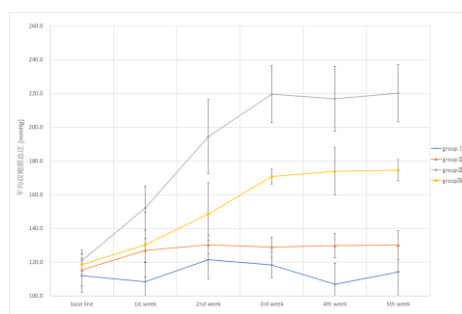


図 11 収縮期血圧の推移

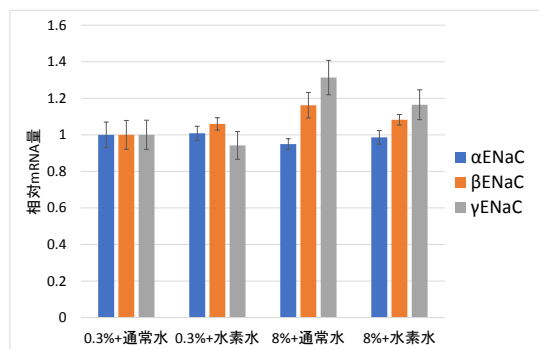


図 12 ENaC の発現

【方法】

8週令のDSSラットを4群に分けて、ベースライン(0週)、1週目、2週目、3週目、4週目および5週目に、収縮期血圧を測定した。血圧の測定は非観血的測定法であるTail-Cuff法を用いた。I群には0.3%の低食塩食と普通水(水道水)、II群には低食塩食と H_2 水、III群には8%の高食塩食と普通水、IV群には高食塩食と H_2 水をそれぞれ

与えた。III群では、2週間前より予防投与ということでの H_2 水の飲水を開始した。個体数はI群4頭、II群6頭、III群6頭およびIV群6頭である。各群のラットは5週目の血圧測定後に安楽死させ、腎臓を摘出した。腎臓の髄質からRNAを抽出し、逆転写反応により得られたcDNAを用いてリアルタイムPCRを行い、合成量が一定の β -ActinとENaC- α , β , γ サブユニットの増幅曲線を比較して相対的なmRNA量を求めた。また、WNK4の発現量についても同様の方法で解析した。

【結果】

低食塩食を与えたI群とII群は、普通水および水素水の摂取でも血圧の上昇が見られず、5週間を通じて安定した値を示した。高食塩食と普通水を与えたIII群では、血圧は1週目から上昇を開始し、3週以降は約220 mmHgの最大値を維持した。高食塩食と水素水を与えたIV群では、血圧上昇が著明に抑制され、1週目以降からIII群とIV群の間に有意差が生じた(図11)。ENaC mRNA量については、ENaC α の発現は各群で変化を示さなかった。ENaC β とENaC γ の発現は高食塩食と普通水を与えたIII群でそれぞれ増加した。一方、高食塩食と水素水を与えたIV群では、ENaC β とENaC γ の発現量の平均値はIII群のENaC β とENaC γ より減少したが、それぞれの発現量に両群間で有意差を認めなかった(図12)。WNK4のmRNA量は、低食塩食を与えた場合は普通水摂取と水素水摂取で差がみられなかった。高食塩食を与えた場合には、水素水を摂取したIV群の方が普通水を摂取したIII群よりも約1.3倍の増加を示し、III群の発現量との間には有意差がみられた。

【考察】

本研究から、高食塩食でDSSラットに発生する高血圧は、水素水の摂取により抑制されることが明らかとなった。また、水素水の食塩感受性高血圧に対する抑制効果の機序を探索するため、ENaCとWNK4発現量を解析した。水素水および普通水を摂取した群を比較すると、ENaCは減少傾向を示したが、両群間に有意差は認められなかった。一方、WNK4発現には有意差がみられた。

これらの遺伝子発現を解析した時期は、血圧上昇が頭打ちになる高食塩食摂取開始から5週目に限られていたので、水素水によるENaC発現抑制効果はもっと早い時期に現れていた可能性がある。ENaCやWNK4の発現については、高食塩食摂取から早期における解析も含め、今後の検討を要する。