

学 校 名	東 京 薬 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	酸性度評価を指針とする有機酸触媒の合理的な開発		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①有機化学 ②酸触媒 ③酸性度 ④軸不斉			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
松 本 隆 司	薬 学 部	教 授	研究総括・軸不斉ビフェニルの合成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
矢 内 光	薬 学 部	准 教 授	各種酸性化合物の合成と構造化学、触媒性能評価
袴 田 秀 樹	薬 学 部	教 授	各種触媒の酸性度測定
小 谷 明	薬 学 部	准 教 授	酸性度測定法の適用対象の拡張と測定条件の最適化

酸性度評価を指針とする有機酸触媒の合理的な開発

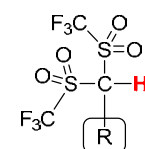
1. 研究の目的

ビス（トリフルオロメチルスルホニル）メタン Tf_2CH_2 **1a** ($\text{Tf} = \text{CF}_3\text{SO}_2$)は、1950年代に合成され、古くから硫酸に匹敵する強酸性炭素酸として知られている。しかしながら、こうした強酸性化合物を自在に合成することは依然として難しい。研究代表者の松本と矢内は、炭素酸合成手法の欠如が様々な分野への応用を阻んでいると考え、その効率的な合成手法の開発と触媒利用に関する研究を推進してきた。その中で、簡便な有機酸の酸性度測定を開発していた袴田、小谷らのグループと学内共同研究を進めてきた。本研究は、この共同研究を強力に支援していただいたものである。主たる目的は、強酸性炭素酸の化学構造と酸性度の相関を明らかにすると同時に、酸触媒としての性能評価を行い、新しい酸触媒を開発する際の設計指針を得ることにある。また、炭素酸に固有の触媒作用を発掘することや、各種有機溶媒中で簡便に酸性度を測定する手法の確立も期待した。

2. 研究の計画

(1) 新しい超強酸性炭素酸の合成試薬の開発

二つのトリフルリル基で*gem*-二置換された炭素酸 Tf_2CHR では、酸性C-H構造と酸に何らかの機能を付与する置換基Rとを同一構造中に配置することが可能である。このことは炭素酸構造が機能性強酸を開発する上で魅力的な構造単位となることを示唆している（右図）。ただし、硫酸並みの有機強酸を自在に合成することは長らく困難であった。この問題に対して、申請者らは「求電子性に富む1,1-ビス（トリフルリル）エチレン $\text{Tf}_2\text{C}=\text{CH}_2$ を反応系内で発生させ、これを共存する求核種で捕捉する」方法を開発してきた。しかし、既存の方法では、プロトン源となる化学種が反応系に共存するため、塩基性求核種への適用が出来なかった。また、種々のペルフルオロアルキル (R_f) 基をもつ炭素酸 $(\text{R}_f\text{SO}_2)_2\text{CHR}$ にも興味をもたれたが、これらの合成も叶わなかった。



↑
多彩な分子構造の導入

そこで、1,1-ビス（ペルフルオロアルキルスルホニル）エチレン $(\text{R}_f\text{SO}_2)_2\text{C}=\text{CH}_2$ の系内発生試薬を開発することで、新たな炭素酸を合成し、酸性度と利用法を検討することとした。

(2) $(\text{R}_f\text{SO}_2)_2\text{CHR}$ の溶液中における酸性度測定法の開発と触媒利用

一方で、袴田、小谷は電気化学検出に基づく酸性度評価法の改良を計画した。本手法は、ビタミンK3の還元電位が添加した酸の酸性度に応じて正側にシフトすることを応用したもので、これまで生体関連カルボン酸などの水中における酸性度測定に威力を発揮していた。本研究で得られる酸は、主として有機溶媒中で触媒作用を発揮することから、種々の有機溶媒中における酸性度測定へと改良する必要があった。さらに、改良測定法を用いて合成された炭素酸の酸性度を評価することとした。また、酸性度測定の結果を踏まえて、松本、矢内はその触媒利用を図ることとした。

3. 研究の成果

(1) 新しい超強酸性炭素酸の合成試薬の開発

炭素酸合成試薬として優れた反応剤を見いだすべく、 Tf_2CH **1a**₂、パラホルムアルデヒドおよび種々の置換ピリジンの三成分反応によって種々の双性イオンを合成した。NMRを用いた解析から、中でも2-フルオロピリジンから得た双性イオン**2a**が目的に適うことが示唆された。なお、同様の条件下、 Nf_2CH_2 **1b** ($\text{Nf} = \text{C}_4\text{F}_9\text{SO}_2$) や環状炭素酸**1c**からも対応する2-フルオロピリジニウム塩が得られた。これらの双性イオンにGrignard反応剤やDIBAL-Hといった有機金属反応剤を作用させると、対応する*C*-アルキル化炭素酸 **3, 4** が首尾よく得られた（図1）。また、広範囲に亘る求核剤の適用も可能であった。

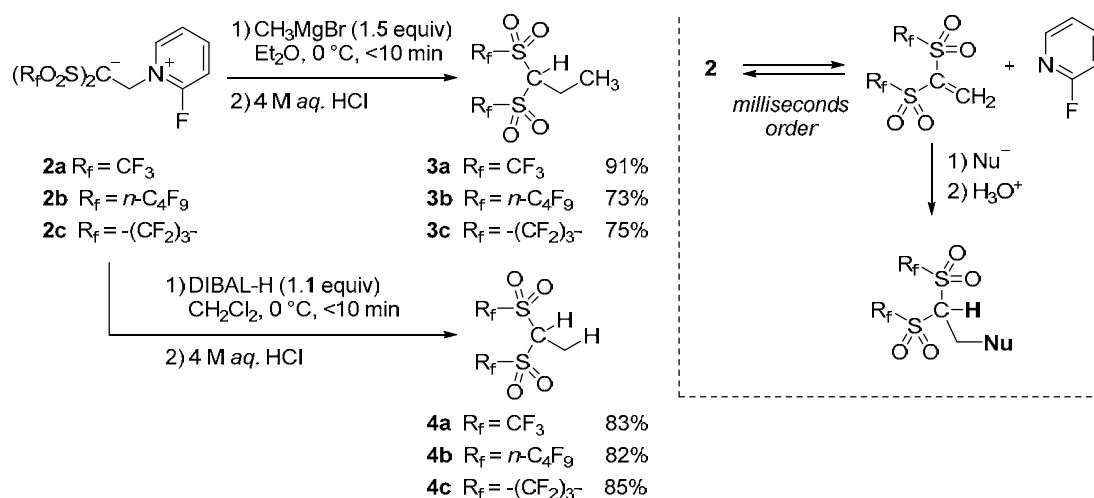


図1. Synthesis of strongly acidic carbon acids

(2) $(R_f\text{SO}_2)_2\text{CHR}$ の溶液中における酸性度測定法の開発と触媒利用

① 有機溶媒に適用可能な酸性度測定手法の開発

合成された酸の有機溶媒中での酸性度を明らかにするため、まずDMSO溶媒中での酸性度測定を検討した。その結果、袴田、小谷らの方法がDMSO溶液にも適用可能であることを明らかにしたが、炭素酸の pK_a 値は化学構造とは無関係に1-3の間の値であった。これは、測定対象となる酸の強酸性ゆえに、DMSOが塩基として振る舞うことで、酸分子の大部分が電離してしまうためと考えられた。そこで、検討を進め、アセトニトリル中での値が信頼できることを明らかにした(図2)。 Tf_2CHR 型炭素酸の置換基Rは酸性度に決定的な影響を及ぼし、Rがフェニル基、水素、メチル基となるに従って、およそ3 pK_a ユニットずつ酸性度が減弱した。また、 C_4F_9 基をもつ酸が CF_3 基や環状構造をもつものよりも100倍程度強酸であることを示した。

Chemical Structure	pK_a (AN)
$\text{F}_3\text{C}-\text{S}(=\text{O})_2-\text{C}(=\text{O})-\text{H}$ (R = Ph)	7.85
$\text{F}_3\text{C}-\text{S}(=\text{O})_2-\text{C}(=\text{O})-\text{H}$ (R = H)	10.8
$\text{F}_3\text{C}-\text{S}(=\text{O})_2-\text{C}(=\text{O})-\text{H}$ (R = Me)	14.0
$\text{R}_f-\text{S}(=\text{O})_2-\text{C}(=\text{O})-\text{H}$ (R = $n\text{-C}_4\text{F}_9$)	12.1
$\text{R}_f-\text{S}(=\text{O})_2-\text{C}(=\text{O})-\text{H}$ (R = CF_3)	14.0
$\text{R}_f-\text{S}(=\text{O})_2-\text{C}(=\text{O})-\text{H}$ (R = $\text{-(CF}_2\text{)}_3^-$)	14.2

図2. pK_a values of thus obtained carbon acids in acetonitrile

② 炭素酸誘導体を用いる触媒反応の開発

酸性度の精緻な評価から、我々が以前に開発した強酸性炭素酸触媒5 (pK_a in AN = 6.8) と、温和な酸触媒6 (pK_a in AN = 16.1) の触媒作用の違いを酸性度の観点から説明することもできた。さらに、5を用いると異なった2種のMichael受容体を用いる逐次的Mukaiyama-Michael反応が起こることを見いだした(図3)。こうした反応では、一般にオリゴマーやポリマーが主として得られるとされ、炭素酸の特異な触媒作用を示す好例である。さらに、酸ではない双性イオン**2a**も優れた触媒作用をもつことを明らかにした。面白いことに、ピリジン環上にフッ素をもたない**2d**は触媒作用を示さなかった。

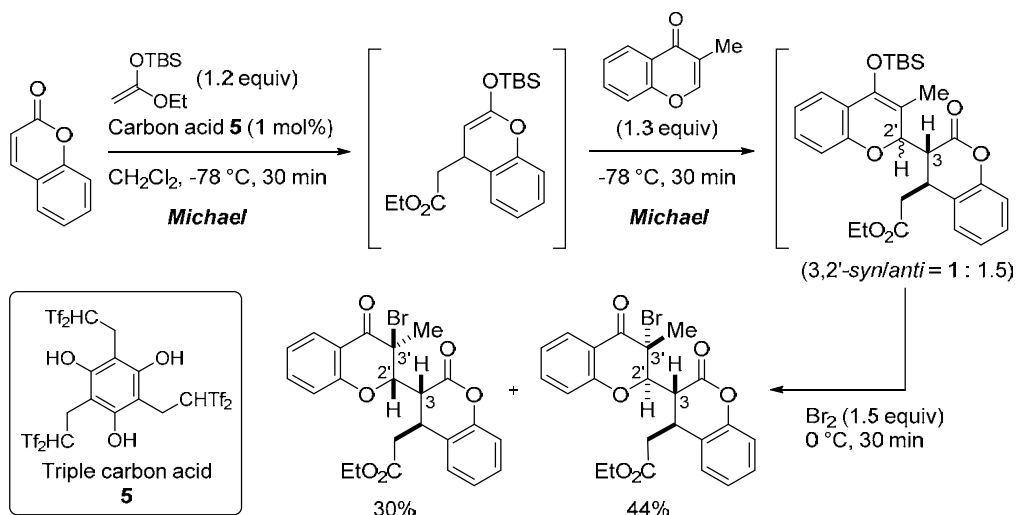


図3. Synthetic reactions catalyzed by carbon acid 5

(3) Push-pullアルケン ($(R_fSO_2)_2C=C(NHR)_2$) の化学

同時期に、松本、矢内は $(R_fSO_2)_2CH_2$ **1** とカルボジイミドの反応によって push-pull アルケン **7** が得られることを見いだした。さらに、NMR や X 線結晶構造解析などの結果から、これらが通常の「アルケン形」ではなく、電荷分離した「イリド形」として存在することを明らかにした (図 4)。こうした化合物は、尿素やチオ尿素といった強力な水素結合供与体のアナログと考えられる。 R_f 基の違いに基づく酸性度の差を評価したところ、 Tf_2CH_2 **1a** から合成したものよりも環状炭素酸 **1c** より合成した **7c** が強酸 (安息香酸と同程度) であることが明らかとなった。現在、この新しい酸の触媒利用に関する研究を進めている。

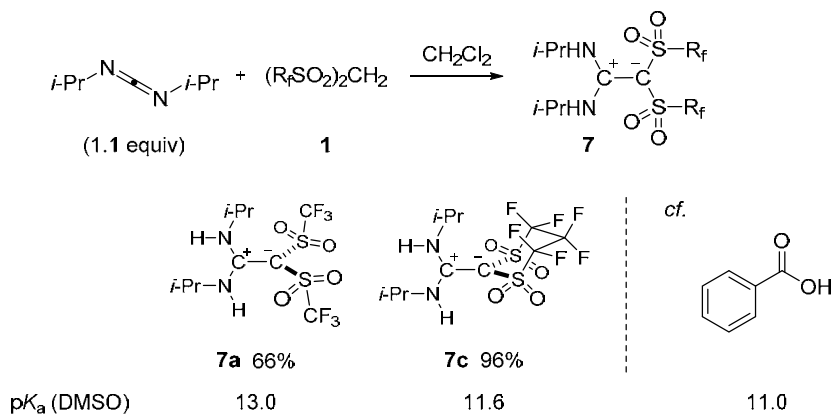


図4. Synthesis of compound **7** and pK_a values in DMSO

4. 研究の反省・考察

本研究では、当初想定した炭素酸の一般性ある合成手法の開発と、化学構造と酸性度の相関を明らかにするという大目標を達成することができた。また、push-pullアルケンの化学という想定外の成果を挙げることもできた。一方で、より穏やかな炭素酸についても研究を進めたが、酸性度測定が適用できないケースが多く、満足な触媒作用を見いだすことも出来なかった。この点については継続的な研究が必要だと考えている。また、軸不斉ビフェニルに対する炭素酸構造の導入は可能であったが、その不斉触媒としての利用には更なる検討を要する。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Hikaru Yanai, Yuichi Sasaki, Yuki Yamamoto, Takashi Matsumoto, Chemoselective two-directional reaction of bifunctionalized substrates: formal ketal-selective Mukaiyama aldol type reaction, *Synlett* **2015**, 26, 2457.
- ② Hikaru Yanai, Osamu Kobayashi, Kenji Takada, Takuya Isono, Toshifumi Satoh, Takashi Matsumoto, Sequential Mukaiyama–Michael reaction induced by carbon acids, *Chem. Commun.*, **2016**, 52, 3280. (掲載号の表表紙に採用)
- ③ Yuyama, Daisuke; Sugiyama, Nanami; Maeda, Takuya; Dobashi, Yasuo; Yokojima, Satoshi; Fujimoto, Yuuki; Yanai, Hikaru; Matsumoto, Takashi, A New Approach to Axially Chiral Biaryls via the Atrop-Diastereoselective Formation of Medium-Sized Lactone Bridge, *Synlett*, in press.
- ④ 中島美優, 小谷 明, 楠 文代, 袴田 秀樹, ボルタンメトリーによる油脂酸価の簡易計測, *分析化学*, **2015**, 64, 631.
- ⑤ Akira Kotani, Mizuki Watanabe, Kazuhiro Yamamoto, Fumiyo Kusu, Hideki Hakamata, Determination of eicosapentaenoic, docosahexaenoic, and arachidonic acids in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Anal. Sci.*, in press.

(2) 口頭発表

- ① 矢内 光、高橋流太、小野純平、松本隆司、フルオロピリジニウム型双性イオンを用いる触媒の分子変換、第8回 有機触媒シンポジウム、沖縄、2015年5月10日
- ② 高橋流太、矢内 光、小谷 明、袴田秀樹、松本隆司、ペルフルオロアルキルスルホニル基で安定化されたカルボアニオン含有双性イオンの合成と利用、第38回 フッ素化学討論会、東京、2015年9月17日
- ③ 矢内 光、小林 穰、高田健司、磯野拓也、佐藤敏文, Maurice Médebielle, 松本隆司、フッ素で置換された炭素酸触媒を用いる逐次反応の開発、第38回 フッ素化学討論会、東京、2015年9月17日
- ④ 前田拓哉、湯山大輔、鶴田英利奈、山口 悟、矢内 光、鈴木啓介、松本隆司、アトロプ選択的ラクトン架橋形成反応を利用した軸不斉ビフェニルの合成、日本化学会 第96回 春季年会、京都、2016年3月24日
- ⑤ 高橋流太、矢内 光、松本隆司、ビス (ペルフルオロアルキルスルホニル) メチル基をもつ強酸性炭素酸の新しい合成法の開発、日本薬学会 第136年会、横浜、2016年3月26日
- ⑥ 山本悠貴、佐々木優一、橋詰真緒、矢内 光、松本隆司、溶媒効果に基づくMukaiyamaアルドール型反応の化学選択性のスイッチング、日本薬学会 第136年会、横浜、2016年3月26日
- ⑦ 矢内 光、鈴木琢己、土橋保夫、阿久津裕士、中島康介、三浦 剛、松本隆司、高度に分極したpush-pullアルケンの構造化学、日本薬学会 第136年会、横浜、2016年3月26日
- ⑧ 阿久津裕士、山本智之、中島康介、矢内 光、高橋流太、小谷 明、平島真一、古石裕治、袴田秀樹、松本隆司、三浦 剛、新規水素結合供与型有機分子触媒の設計と不斉アルドール反応への適用、日本薬学会 第136年会、横浜、2016年3月26日
- ⑨ 鶴田英利奈、湯山大輔、杉山奈々美、山口 悟、矢内 光、鈴木啓介、松本隆司、ラクトン架橋の形成を利用した軸不斉ビフェニルの立体選択的合成法、日本薬学会 第136年会、横浜、2016年3月26日
- ⑩ 小谷 明、日本酒の酸度とアミノ酸度のセンサ開発、第87回化学センサ研究会、東京、2016年1月21日

(3) 出版物

なし

学 校 名	日 本 女 子 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ヒトの染色体DNAにおける複製開始点確立機構の解明 －複製開始因子ORCとグアニン配列との関係－		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①DNA複製 ②複製開始点 ③ORC ④グアニン四重鎖 ⑤Rループ			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
和 賀 祥	理 学 部	教 授	総括・実験・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
菅 野 靖 史	理 学 部	教 授	実験(主にタンパク質の結晶作成および解析)

ヒトの染色体DNAにおける複製開始点確立機構の解明 —複製開始因子ORCとグアニン配列との関係—

1. 研究の目的

複製開始点とは、DNA複製が開始する地点であり、ゲノム上の特定の位置に存在する。ヒトにおいては、多数の複製開始点が存在するが、未だに複製開始点を規定する共通配列は見つかっておらず、複製開始点がゲノムの特定の位置に確立するしくみは分かっていない。一方、DNA複製の開始の際、複製開始点に最初に結合して複製開始を引き起こすタンパク質として、ORCがすでに同定されている。ヒトORCはDNAに結合する活性をもち、細胞内でも複製開始点に結合していることが確かめられている。しかし、そのDNA結合には塩基配列特異性はなく、どのようなしくみでヒトORCが複製開始点に集積するかは未だ明らかではない。

私らは近年、ヒトORCはグアニン四重鎖 (G4) を形成し得るG-richな配列 (G4モチーフ配列) をもつ一本鎖DNAやRNAに選択的に結合するという新規の活性を見いだした。この知見と関連して、他のグループより、ヒト複製開始点の近傍にG4モチーフ配列が存在するという報告がなされた。そこで本研究では、ヒトORCのG4モチーフ一本鎖DNA (RNA) 結合が複製開始点の認識に関わるのではという仮説をたてて、その検証をすすめて、ヒト複製開始点の確立機構の解明を目指した。

2. 研究の計画

(1) G4モチーフに結合しない変異ORCの作製とその機能解析

G4モチーフ結合活性を失った変異ORC1サブユニットを作製する。その変異ORC1を内在性ORC1ノックダウン細胞へ導入し、変異ORC1の発現に伴って、細胞のDNA複製活性ならびにORCの複製開始点への結合がどう変化するかを調べる。

(2) Rループ形成がORCのDNA結合に及ぼす影響の解析

ORCが結合するターゲットはG4モチーフをもつ領域で形成されたRループであるという仮説をたて、その検証をin vitroとin vivoでの解析から進める。

3. 研究の成果

(1) G-rich RNA/ssDNA結合ドメインとG4モチーフをもつssDNAとの複合体の結晶構造解析へ向けて

ヒトORC1サブユニットのN末側半分の領域に2つのG-rich RNA/ssDNA結合ドメイン (AおよびB) が存在する。両ドメインを含むアミノ酸1-539の領域の構造決定を目指し、その組換えタンパク質の調製に着手した。N末側にヒスチジンタグを、さらにC末側にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を融合させた組換えタンパク質を発現するベクターを構築し、大腸菌を用いて発現させ、両方のタグを利用したアフィニティークロマトグラフィーにて精製、ならびに配列特異的なプロテアーゼによるタグの除去を試みた。その結果、HisタグおよびGSTがついた全長タンパクの精製は確認されたが、GSTを除去すると目的のタンパク質が可溶性画分に回収できなくなるトラブルに直面した。そこで、ドメインAおよびドメインBそれぞれを分けて、構造解析を行うことを並行して進めた。両ドメインともにGST融合タンパク質として大腸菌で発現させ、GSTを除去したものについて可溶性画分として調製することができた。現在は、結晶作成に着手する前に、NMRを用いた解析を進めている。

(2) G4モチーフに結合しない変異ORCの作製とその活性解析

ドメインAおよびドメインBのそれぞれについて、G4モチーフ結合の活性を低下させるアミノ酸置換変異は同定済みである。その置換変異を導入した全長ORC1の構築も完了し、現在その活性を解析中である。一方、ドメインAおよびBのほとんどを削除した変異ORC1も作製し、この変異ORC1は他のORCサブユニットと複合体を形成することを確認した。バキュロウイルス・昆虫

虫細胞発現系で変異ORC1を含む6量体複合体の精製にも成功し、現在その性状解析を進めている。

(3) 変異ORCのin vivo解析

全長ORC1のアミノ酸置換変異体で、G4モチーフ結合活性を失った変異ORC1の作出にはまだ至っていない。そこで、ドメインAとBを含むORC1のN末側領域だけを蛍光タンパク質融合タンパク質の形でヒト培養細胞で発現させ、その細胞内での局在について全長ORC1と比較解析を行った。さらに、G4モチーフ結合活性を低下させたアミノ酸置換変異体についても同様に解析を進めた。その結果、ORC1のN末側領域のポリペプチドの細胞内局在は、全長ORC1とよく一致した。特にヘテロクロマチン領域での局在で高い一致性が見られた。一方、変異を導入したN末側領域では細胞核内でのドット状の局在はみられたが、全長ORC1との局在の一致性はあまりみられなかった。この結果は、ORC1のN末側領域がORC1の核内局在に重要であること、そしてORC複合体の核内局在に重要である可能性を示唆する。

(4) Rループ形成がORCのDNA結合に及ぼす影響のin vitro解析

ヒトの複製開始点の多くがプロモーター領域にある。また、一般的にプロモーターからは双方向に転写が開始し、しばしば短鎖の非コードRNAがつくられる。さらに重要なことは、転写によってG-richなRNAがつくられる場合、安定なRループ（DNA-RNA三重鎖）が形成される点である。このRループでは、G4モチーフをもつ非鋳型鎖が1本鎖に解離してG4構造を形成する可能性があり、そして、この状態がORCの格好の結合ターゲットではないかと考えた。そこで、ヒトlamin B2遺伝子、ヒトmcm4遺伝子およびニワトリglobin遺伝子近傍に存在する複製開始点に着目した。そして、各複製開始点を含むDNAを組み込んだ環状プラスミドを固定化したビーズを鋳型として用い、T7プロモーターによる転写を行った時のORCのプラスミド固定化ビーズへの結合を調べた。その結果、調べたいいくつかのビーズにおいて、転写後にORCを加えた場合、転写をしない場合に比べてプラスミド固定化ビーズへの結合量が顕著に増加した。さらに、プラスミドの制限酵素に対する感受性を調べた結果、転写を行ったプラスミドでは、転写後にRNAを除くためにプラスミド固定化ビーズを洗浄したにもかかわらず、制限酵素に対し抵抗性を示した。この抵抗性はRループ構造の形成の可能性を暗示するものであることから、in vitroの条件下であるが、RループがORCの局所的な集積を引き起こしている可能性が考えられた。

4. 研究の反省・考察

(1) ヒトORC1のR-rich RNA/ssDNA結合ドメインの構造決定に向けて

上記のように組換えタンパク質の可溶性に関するトラブルに直面している。これを打開するために、GST融合の状態での構造決定も検討したい。さらに、ORC1のN末側領域の大腸菌での発現量は低く、また途中で翻訳が止まったために生じたと考えられる短鎖のポリペプチドの生成も目立った。そこで、コドンの最適化やバキュロウイルス/昆虫細胞発現系を利用して、発現量の増加を目指したい。一方、予備的な解析ではあるが、解析対象としているORC1の領域は元々決まった構造をとらない可能性も示唆されている。今後は、結晶作成だけでなく、NMR解析も勢力的に進めていく。

(2) 変異ORCを用いた解析

今後は、ヒトORC1のN末側領域の役割を解明することに集中的に取り組みたい。同領域には、ヒストンとの結合に関わるBAHドメインやヘテロクロマチン形成に関わるHP1との結合ドメインもある。これらの相互作用も含めながら、G-rich RNA/ssDNA結合活性のもつ生理的な役割を細胞を用いた解析を通じて追求する予定である。

(3) RループとORCとの関係

上記のように本研究でのin vitro解析からRループがORCを呼び込む可能性が示唆された。しかし、本解析条件下でのRループ形成を示す直接的な証拠はまだなく、さらに転写依存的なORC結合量の増加についてもその増加レベルのばらつきが大きい。そこで、解析対象をプロモ-

ターだけでなく、Rループが形成しやすいと示されている第1エクソンから第1イントロンにかけての領域に広げて解析をしていく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Magda Budzowska, Thomas G.W. Graham, Alexandra Sobeck, Shou Waga, and Johannes C. Walter. Regulation of the Rev1-Pol zeta complex during bypass of a DNA interstrand crosslink. *EMBO J.*, 34, 1971-1985 (2015)

(2) 口頭発表

第38回日本分子生物学会年会 (2015年12月1-4日、神戸ポートアイランド)

和賀 祥、山崎 翠、塚澤真衣、鈴木香菜、女部田寛子、寺西帆奈美、太田黒恵美、弓井絵利夏、由良 敬、保科祥子. 動物細胞のDNA複製開始点の確立機構の解明に向けて

(3) 出版物

なし

学 校 名	光産業創成大学院大学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	チャンネル創薬支援に向けた1分子センサーの開発		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①バイオセンサー ②チャンネルタンパク ③1分子計測 ④創薬支援			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
平野 美奈子	光産業創成研究科	講 師	総括・実験・データ処理・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
横 田 浩 章	光産業創成研究科	准 教 授	実験・データ処理・論文作成
井 出 徹	岡山大学 自然科学研究科	教 授	実験・論文作成

チャネル創薬支援に向けた1分子センサーの開発

1. 研究の目的

生体機能解析に用いられるバイオセンサーは、生体分子認識と信号変換を組み合わせたハイブリッド・デバイスであり、次代のバイオセンサー、特に臨床検査や創薬スクリーニングのためのセンサーに要求される条件は、高感度で選択性が高いことである。チャネルタンパクはこのような要件を満たしている理想的な分子である。チャネルタンパクを人工的な細胞膜（脂質二重層膜）に組み込み、さらに認識情報を電子デバイスで物理信号に変換できれば、理想的なバイオセンサーが実現する。本研究の目的は、これまでに開発したチャネル1分子計測装置を応用して、高感度・高効率のバイオ計測装置（センサー）を作ることである。そこで、以下の2点を目的とし、本年度は各項目に記載した事項について検討を行った。

- (1) チャネルの1分子計測を組み込んだ高感度・高効率センサーの開発、及びセンサーデバイスへの応用
 - ① 1分子計測系の改良－複数チャネル活性同時計測による測定の高効率化
 - ② 1分子計測系によるP2X₄チャネルの活性計測（薬剤評価、ATPセンサー）
- (2) チャネルタンパクの刺激感度や選択性に関わる「ゲーティング（チャネル開閉）」の分子メカニズムの解明
 - ① K⁺チャネル(KcsAチャネル)の新たな構造機能相関の解明

2. 研究の計画

- (1) チャネルの1分子計測を組み込んだ高感度・高効率センサーの開発、及びセンサーデバイスへの応用
 - ① 1分子計測系の改良－複数チャネル活性同時計測による測定の高効率化
平成26年度に改良した金探針を用いた高感度・高効率なチャネル活性計測系をさらに高効率化するため、親水層を保持した金探針を2本用いて脂質層をそれぞれ二重層化させ、脂質二重層膜を複数同時に作製する系を作る。さらに、K⁺チャネル（KcsAチャネル）を固定した2本の金探針で同時に脂質二重層膜を作製するとともにKcsAチャネルを脂質二重層膜にそれぞれ組み込む。各金探針からのKcsAチャネル電流を計測し、複数の活性計測が可能な系を確立する。
 - ② 1分子計測系によるP2X₄チャネルの活性計測（薬剤評価、ATPセンサー）
金探針を用いたチャネル1分子活性計測系を用いて、ヒトP2X₄チャネルの活性を測定する。P2X₄チャネルを精製する系を確立し、精製したP2X₄チャネルの活性を金探針を用いたチャネル活性測定系で計測する。ヒトP2X₄チャネルは神経障害性疼痛に関わっており、P2X₄チャネルの活性を抑制する薬剤は疼痛の治療薬となりうるため、この系は疼痛薬のスクリーニング系となりうる。また、P2X₄チャネルはATPによって活性が制御されるため、ATPセンサーとしての発展も考えられる。
- (2) チャネルタンパクの刺激感度や選択性に関わる「ゲーティング（チャネル開閉）」の分子メカニズムの解明
 - ① K⁺チャネル(KcsAチャネル)の新たな構造機能相関の解明
センサーとなるK⁺チャネルのモデルチャネルであるKcsAチャネルの細胞内領域による活性制御機構について知見を得るため、細胞内領域を刺激（プロトン）を感受した状態を模倣した変異体を数個作製し、その機能と構造の状態を調べる。機能についてはチャネル活性を測定し、活性特性（コンダクタンス、開確率）とイオン選択性への影響を調べる。構造については、それらの変異体の細胞内領域の膜方向への構造状態の変化を、環境依存的に蛍光強度が変化する蛍光色素を用いて調べる。

3. 研究の成果

(1) チャンネルの1分子計測を組み込んだ高感度・高効率センサーの開発、及びセンサーデバイスへの応用

① 1分子計測系の改良－複数チャンネル活性同時計測による測定の高効率化

平成26年度に改良した金探針を用いたチャンネル活性計測系を並列に複数同時に計測する系を作製し、チャンネル活性測定効率を上げることができた。具体的には、親水層を保持した2本の金探針の先端の高さを合わせ、水層上に重層した脂質層に上方から押し付けることで、脂質二重層膜を形成した。水層からグラミシジンチャンネルを脂質二重層膜に取り込ませると、2つの金探針から同時にグラミシジンチャンネルによるチャンネル電流を測定することができた。また、KcsAチャンネルを固定した2本の金探針を用いると、脂質二重層膜に組み込まれたKcsAチャンネルによる電流を測定することができた。これらのチャンネルのコンダクタンスは約20 pSと約60 pSであり、報告されているコンダクタンスに近い値であった。

② 1分子計測系によるP2X₄チャンネルの活性計測（薬剤評価、ATPセンサー）

金探針を用いたチャンネル1分子活性計測系を用いて、ヒトP2X₄チャンネルの活性測定に成功した。ヒトP2X₄チャンネルは昆虫細胞で発現させ、アフィニティタグを用いて高い純度で単離することができた。単離したP2X₄の活性を金探針を用いたチャンネル活性計測系で測定すると、約30 pSのコンダクタンスを持つチャンネル活性が捉えられた。

(2) チャンネルタンパクの刺激感度や選択性に関わる「ゲーティング（チャンネル開閉）」の分子メカニズムの解明

① K⁺チャンネル(KcsAチャンネル)の新たな構造機能相関の解明

センサーとなるチャンネルタンパクの分子実体を理解するため、KcsAチャンネルの刺激感受に重要な細胞内領域の荷電状態が活性（機能）に与える影響を調べた。その結果、細胞内領域の荷電状態が不活性化へ移行する速さとイオン選択性の両方に影響を与えることが明らかとなった。具体的には、KcsAチャンネルの細胞内領域の8つの負電荷のアミノ酸をすべて中性化した変異体と2つのアミノ酸を中性化した変異体は不活性化が起こらない上、K⁺選択性も低下した。一方、E146のみを中性化した変異体の特性は野生型と変わらなかった。これらのことから、D149の荷電状態は選択性フィルター部位の機能である不活性化とイオン選択性に大きな影響を与えていることがわかった。また、これらの変異体の細胞内領域の膜方向への構造状態を蛍光色素を用いて調べたところ、機能が野生型と異なる（不活性化が起こらずK⁺選択性が低下した）変異体でも膜方向への構造状態の変化は野生型とは同様であるものもあった。このことから、細胞内領域の膜方向以外への構造変化によって機能の変化が生じていると考えられる。

4. 研究の反省・考察

(1) チャンネルの1分子計測を組み込んだ高感度・高効率センサーの開発、及びセンサーデバイスへの応用

① 1分子計測系の改良－複数チャンネル活性同時計測による測定の高効率化

金探針を用いた計測系を用いて、2つのチャンネル活性測定を同時に測定することができた。しかしながら、この系ではそれぞれの金探針の高さを合わせる必要であるため、さらに多くの金探針を扱うのは難しいと思われる。今後は、剣山型で先端の長さが揃っている担体を検討することを考えている。

② 1分子計測系によるP2X₄チャンネルの活性計測（薬剤評価、ATPセンサー）

金探針を用いた計測系で、ヒトの神経障害性疼痛にも関わるP2X₄チャンネルの活性を効率よく測定することができた。さらに、計測された電流がこのチャンネルに由来するものであることを裏付けるため、ATPで活性化が制御されることを確かめる必要がある。

(2) チャンネルタンパクの刺激感度や選択性に関わる「ゲーティング（チャンネル開閉）」の分子

メカニズムの解明

① K⁺チャンネル(KcsAチャンネル)の新たな構造機能相関の解明

今回の結果から、KcsAチャンネルの細胞内領域の荷電状態がイオン選択性フィルター部位に影響を与え、機能に関与していることが明らかとなった。さらに、細胞内領域の膜方向への構造変化ではない変化によってイオン選択性フィルターの状態の変化が引き起こされているようだ。KcsAチャンネルの構造状態の情報は、蛍光色素を用いた細胞内領域の膜方向への変化の測定で得ることができるとこれまで考えていたが、膜方向以外への変化も捉える必要があることがわかった。今後は、FRET法などを用いて細胞内領域のねじれなどの変化も捉える必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

平野美奈子, チャンネルタンパクの構造機能相関研究 1 (巨視的計測), 公益財団法人新世代研究所2015年度第1回バイオ単分子研究会 (平成27年8月)

(3) 出版物

なし

学 校 名	名 城 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	先端的有機合成戦略を基盤とする海洋生物活性物質の合成研究 ーポリ環状エーテル海産毒ギムノシンの合成ー		研 究 分 野 理 学
キ ー ワ ー ド	①収束合成 ②オキシラニルアニオン ③ポリ環状エーテル ④海洋天然物 ⑤ギムノシン ⑥渦鞭毛藻 ⑦赤潮		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
森 裕 二	薬 学 部	教 授	総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
坂 井 健 男	薬 学 部	准 教 授	実験・論文作成

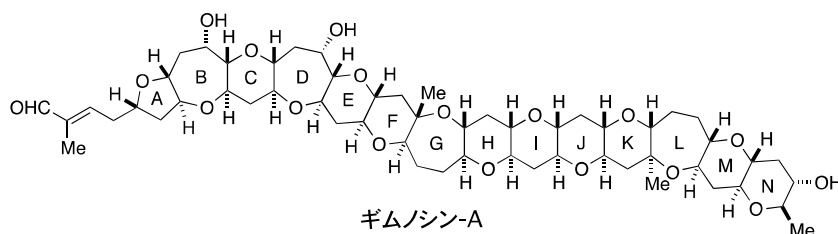
先端的有機合成戦略を基盤とする海洋生物活性物質の合成研究 —ポリ環状エーテル海産毒ギムノシンの合成—

1. 研究の目的

(1) 海洋生物から発見された巨大構造を有するポリ環状エーテル天然物は、神経イオンチャネルの活性化や腫瘍細胞に対する細胞毒性、抗菌性など多彩な活性を示す。これらは創薬シーズとして期待される活性を有しながらも天然からは極微量しか得られないため、さらなる研究の推進には合成化学による研究試料の供給が切望されている。

ギムノシン類は、瀬戸内海を中心として西日本で赤潮を形成し、魚介類の大量斃死を引き起こす代表的な有毒渦鞭毛藻 *Karenia mikimotoi* から単離されたポリ環状エーテルである。ギムノシンAはマウスリンパ腫細胞に対して細胞毒性 (IC₅₀ = 1.3 μg/mL) を示し、構造的には14個のエーテル環が連続的に縮環した巨大構造を持つことから合成化学的に興味を持たれている。

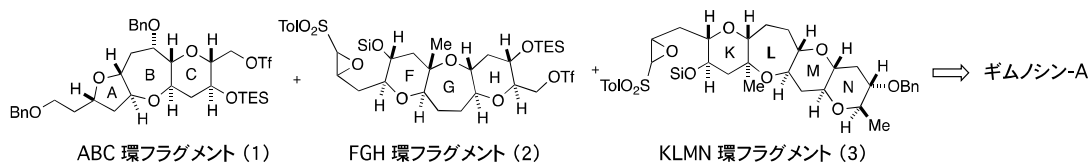
① 本研究では、14環性赤潮毒ギムノシン-Aの全合成研究を行う。



2. 研究の計画

(1) これまでに開発したオキシラニルアニオン戦略を基盤とする[X+2+Y]型新規収束合成法を繰り返し用いる合成戦略によって縮環システム構築の一元化を図り、ギムノシン-A効率的全合成を目指す。

- ① ギムノシン-Aのフラグメント合成：全合成に必要な3種類のABC環、FGH環、KLMN環フラグメントの大量合成を実施する。
- ② ギムノシン-A全合成：はじめにFGH環フラグメントとKLMN環フラグメントをオキシラニルアニオン法で連結して9環性のFGHIJKLMN環システムを構築し、ついでABC環フラグメントを結合してギムノシン-Aの全合成を達成する。

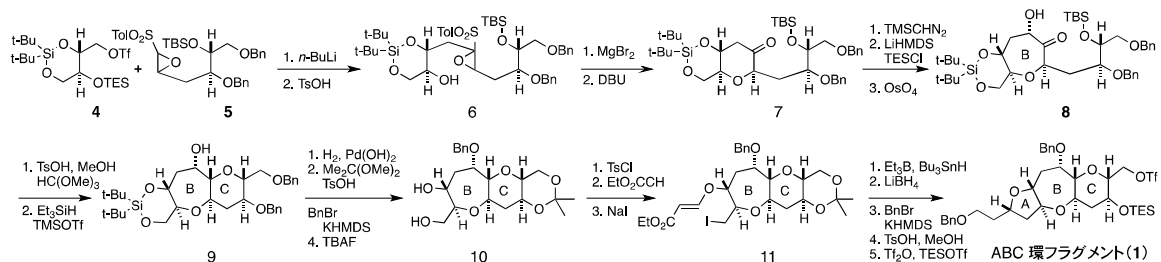


3. 研究の成果

(1) ギムノシン-Aのフラグメント合成

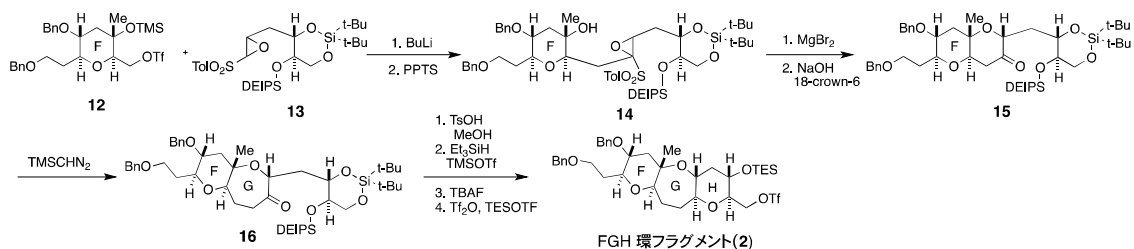
① ABCフラグメントの合成

トリフレート**4**とエポキシスルホン**5**をカップリングして**6**を合成し、MgBr₂との反応によって得られるプロモケトンを経由してDBUで環化して6員環ケトン**7**を得た。これを環拡大して7員環ケトンとし、シリルエノールエーテルに誘導後OsO₄で酸化してヒドロキシケトン**8**を合成した。アセタール環化と還元的エーテル化によりC環を構築して**9**とし、保護基を変換して**10**としたのち不飽和エステル-ヨウ素誘導体**11**に変換し、ラジカル環化反応、エステルの還元、ベンジル化、脱アセトニド化反応、トリフレート化してABC環フラグメント**(1)**を合成した。



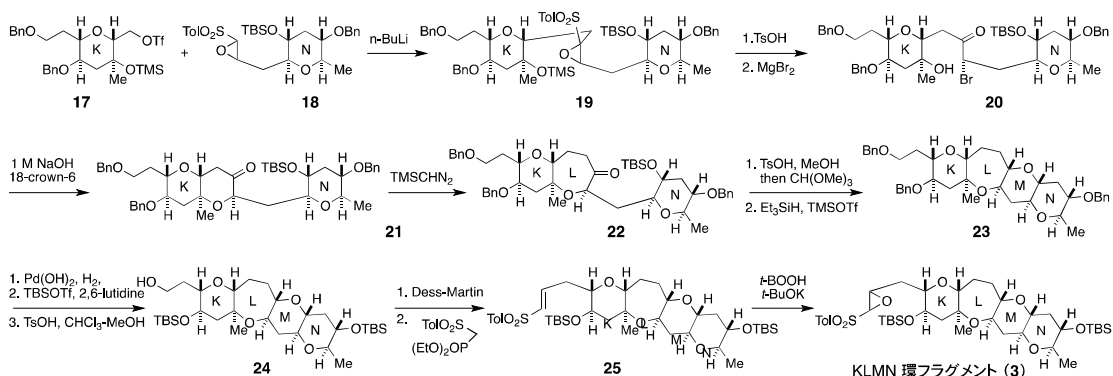
② FGH環フラグメントの合成

F環トリフラート**12**とエポキシスルホン**13**をオキシラニルアニオン法でカップリングして**14**を合成した。MgBr₂を作用させてブロモケトンとし、NaOHによるWilliamsonエーテル合成で6員環ケトン**15**を構築した。トリメチルシリルジアンズメタンで7員環に環拡大してG環ケトン**16**を合成した。ついで、環状アセタール化と還元的エーテル化、脱シリレン化、トリフラート化反応によりFGH環フラグメント(**2**)を合成した。



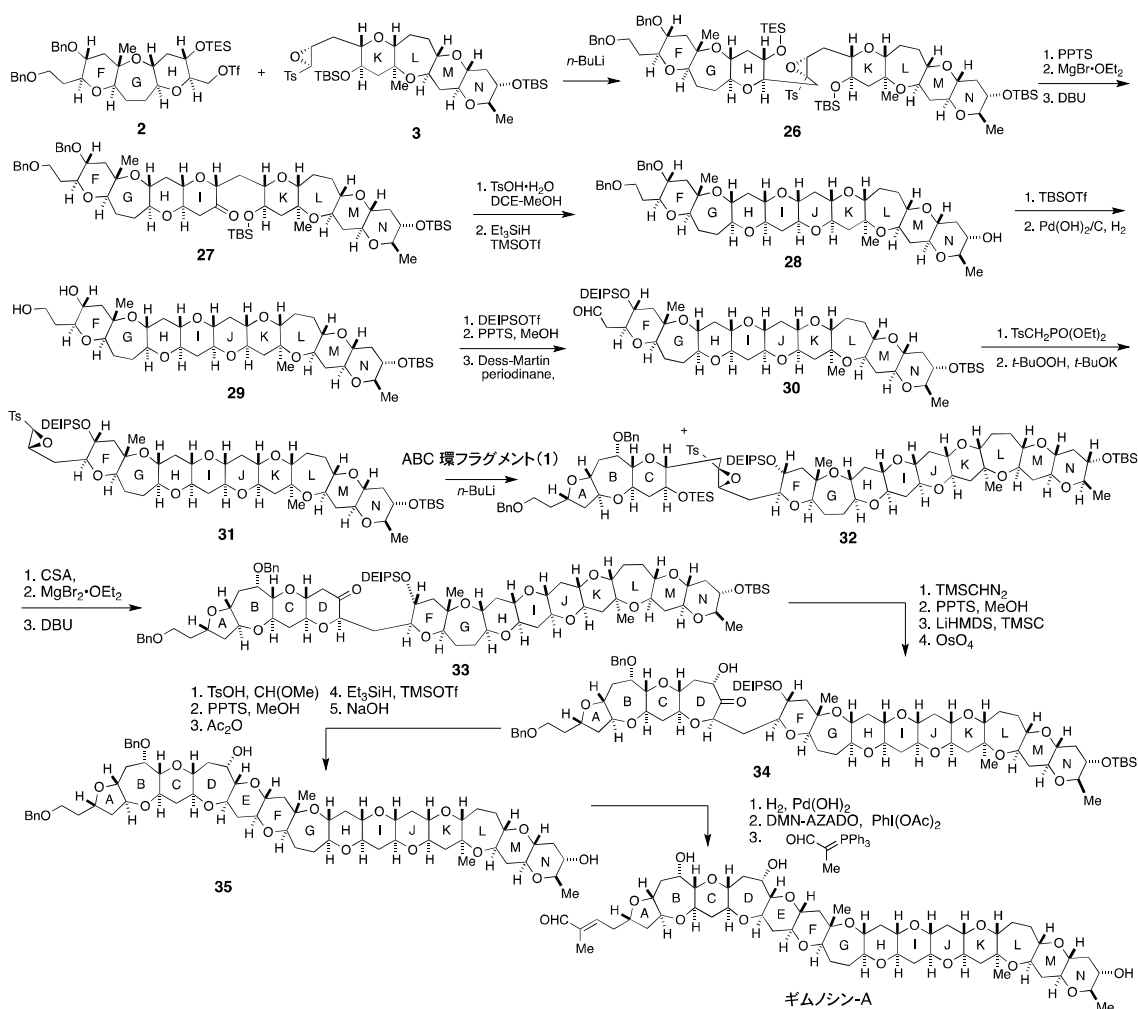
③ KLMN環フラグメントの合成

17と**18**をカップリングして**19**としたのち、ブロモケトン化して**20**とし、クラウンエーテル存在下aq. NaOHを用いて分子内環化反応を行って6員環ケトン**21**を合成した。ついで、トリメチルシリルジアンズメタンで環拡大して7員環エーテルケトン**22**に誘導した。脱TBS化と生成したヒドロキシケトンの分子内アセタール化を一挙に行い、さらに還元的エーテル化してKLMN骨格**23**を構築した。**23**の3つのベンジル基を除去したあとトリオールをTBS基で保護し、一級アルコールのTBS基のみを選択的に除去してアルコール**24**を得た。水酸基をアルデヒドに酸化後、HWE反応でビニルスルホン**25**を合成した。塩基性条件下*t*-ブチルヒドロペルオキシドでビニルスルホンをエポキシ化して、KLMN環フラグメント(**3**)の合成を達成した。



(2) ギムノシン-Aの全合成

FGH環トリフラート**2**とKLMN環エポキシスルホン**3**を連結して**26**とし、3工程でI環を構築した後、**27**のメチルアセタール化、還元により9環性エーテル**28**を合成した。N環水酸基のTBS化、脱ベンジル化してジオール**29**を得た。水酸基の保護、選択的脱保護により第1級アルコールを再生し、Dess-Martin酸化してアルデヒド**30**に変換した。HWE反応で合成したビニルスルホンに酸化して、9環性エポキシスルホン**31**を合成した。この**31**とABC環フラグメント**(1)**をカップリング後、3工程でD環を構築して**33**とし、環拡大、エノールシリル化、酸化によりD環に水酸基を導入して**34**を合成した。酸処理によるDEIPS基の脱保護とアセタール化を行い、水酸基のアセチル化、還元的エーテル化、脱アセチル化して**35**を得た。最後に、ベンジル基を接触還元で脱保護し、第1級アルコールのみを選択的に酸化してアルデヒドに変換後、Wittig反応で共役アルデヒド側鎖を構築し、ギムノシン-Aの全合成を達成した。



4. 研究の反省・考察

(1) 本研究ではオキシラニルアニオン法を基盤とする収束合成法を5回繰り返して、3種のフラグメントの合成とそれらの連結縮環を行い、極めて効率的な全合成を達成することに成功した。フラグメントの合成までは時間を要したが、カップリング反応以降の合成研究は順調に進行し、研究期間内に研究目的を達成することができた。この統一的合成戦略による巨大ポリ環状エーテル天然物の全合成は、優れた合成研究として最新の有機化学研究を紹介する国際誌SYNFACTSに紹介され、また本研究分担者が第57回天然有機化合物討論会奨励賞を受賞するなど、国内外より高い評価を受けた。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

T. Sakai, S. Matsushita, S. Arakawa, K. Mori, M. Tanimoto, A. Tokumasu, T. Yoshida, and Y. Mori:
Total Synthesis of Gymnocin-A. *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 14513–14516 (2015). 平成27年11月

(2) 口頭発表

① 坂井健男、松下真吾、荒川正悟、森 巧一、谷本美樹、徳升晃大、吉田達司、森 裕二：
オキシラニルアニオン法を基盤としたGymnocin-Aの全合成研究

第107回有機合成シンポジウム2015（東京）平成27年6月

② 石原 葵、青山佳代、坂井健男、森 裕二：

Gymnocin-AのFGH環およびKLMN環フラグメントのダイバジェント合成に向けて

第61回日本薬学会東海支部総会・大会（名古屋）平成27年7月

③ 坂井健男、松下真吾、荒川正悟、森 巧一、谷本美樹、徳升晃大、吉田達司、森 裕二：
Gymnocin-Aの収束的合成研究

第61回日本薬学会東海支部総会・大会（名古屋）平成27年7月

④ 坂井健男、松下真吾、荒川正悟、森 巧一、谷本美樹、徳升晃大、吉田達司、森 裕二：
Gymnocin-Aの収束的全合成

第57回天然有機化合物討論会（横浜）平成27年9月

⑤ 坂井健男、松下真吾、荒川正悟、森 巧一、谷本美樹、徳升晃大、吉田達司、森 裕二：
Gymnocin-A の全合成

第41回反応と合成の進歩シンポジウム（大阪）平成27年10月

(3) 出版物

なし

学 校 名	関 西 学 院 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	高度な機能が期待される化合物の有機合成による 存在実証 －大環状繰り返し構造化合物の化学合成－		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①有機合成化学 ②大環状化合物 ③繰り返し構造 ④存在実証			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
山 田 英 俊	理 工 学 部	教 授	研究代表者 統括、 および糖による大環状繰り返し構造化合物の 合成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
羽 村 季 之	理 工 学 部	教 授	芳香環による大環状繰り返し構造化合物の合成
山 口 宏	理 工 学 部	教 授	X線解析による合成中間体、最終合成物の構造 決定

高度な機能が期待される化合物の有機合成による存在実証 —大環状繰り返し構造化合物の化学合成—

1. 研究の目的

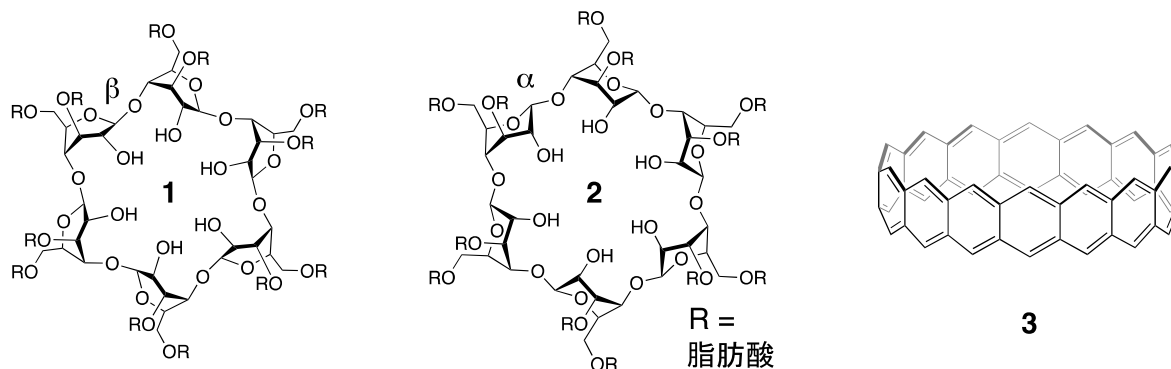
糖あるいは芳香環を繋いだ新規大環状繰り返し構造化合物の創製を目的とする。

繰り返し構造を有する大環状の有機化合物は、独特の機能をその分子に持たせることができる。例えば、D-グルコースが環状に連結した化合物シクロデキストリンは、分子内部が親油性、外部が親水性であり、分子内部に脂溶性化合物を包摂したまま水に溶ける。この機能を利用して、食品、医薬、化粧品などの成分として広く利用されている。一方、ベンゼン環がつながって筒を構成した化合物はカーボンナノチューブと呼ばれ、その長く丈夫な構造、制御可能な伝導性から、構造材料、電子材料としての革新的な応用が期待される。

本研究では、シクロデキストリンとは逆の性質、すなわち、内部が親水性で外部が疎水性となる反転シクロデキストリン（ β 型：**1**、 α 型：**2**）の合成を目指す。この性質を持たせるには、構成単糖をアキシアル・リッチな立体配座に固定する必要がある。また、カーボンナノチューブの最小環状単位であり、非平面性 π 共役構造に基づく興味深い化学的性質を秘めているシクラセン（**3**）の合成を標的とする。どちらの化合物も、多くの機能が期待されながらも未だ合成されていない。その最大の要因は、高ひずみ構造であるアキシアル・リッチ糖あるいは非平面性のベンゼン骨格を構築する合成方法が欠如しているためである。

本研究では、これらタイプの異なる大環状繰り返し構造化合物を合成できる方法を開拓し、これらの存在実証を目的とする。その過程で、「糖」「ベンゼン環」という全く異なった基本単位を大環状化させる研究を共有し、大環状繰り返し構造化合物の合成指針を得る。

存在が実証された場合、実際にその分子を用いた応用展開が可能になる。現存のシクロデキストリンやカーボンナノチューブの非常に幅広い応用性を考えると、本研究で合成された大環状繰り返し構造化合物は、新たな機能性分子として医薬品、化粧品、化学センサー、エレクトロニクス分野等に貢献できる。

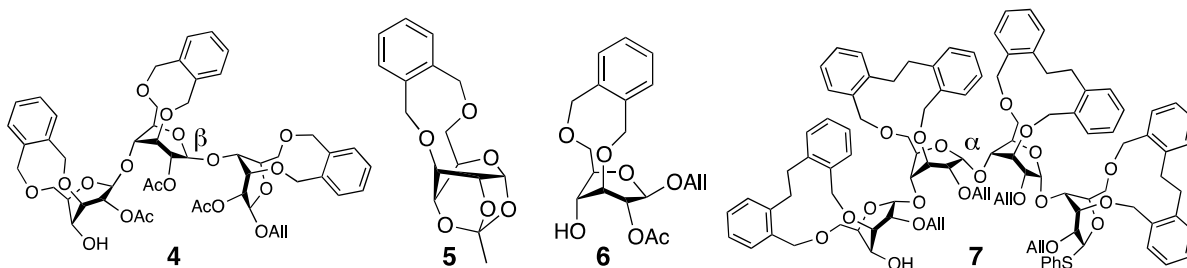


2. 研究の計画

本研究は、平成25年度からの継続である。従って、27年度の計画は、25、26年度に得た成果を踏まえ立案した。26年度の成果は、

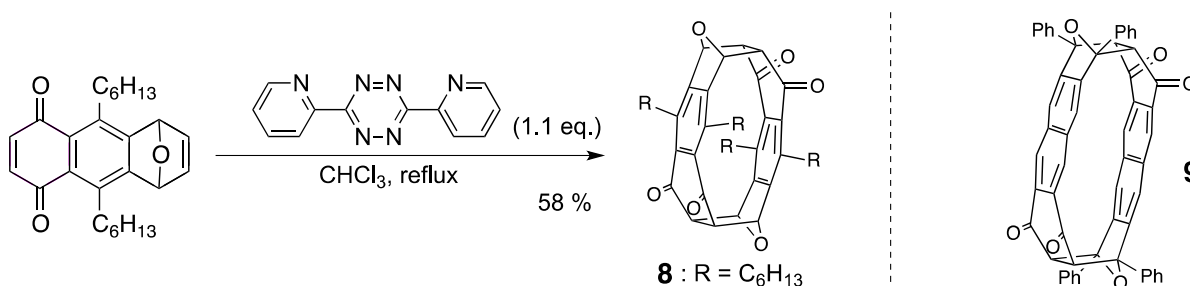
(1) 「反転シクロデキストリン」の合成

- ① β 型反転シクロデキストリン**1**の合成に関して、低収率であった三量体**4**の合成法を合理化する過程で、これまで**5**から**6**段階で合成していた原料単糖**6**の、短段階合成法を発見した。
- ② α 型反転シクロデキストリン**2**の合成に関して、三量体とする計画を変更し、二量体を結合させて四量体**7**とする経路を確立した。



(2) 「シクラセン」の合成

- ① ベンザインとイソベンゾフランの連続的な環付加反応による多環式芳香族化合物のワンポット合成法を開発した。また、環選択的にイソベンゾフランを発生させる手法の開発にも成功し、これらを利用した置換ペンタセンライブラリーの構築に成功した。
- ② 電子受容部位を持つイソベンゾフランの自己環形成反応を基盤として、幾つかのベルト状分子（例えば、**8**や**9**）を効率良く構築できることを明らかにした。これらの構造はX線結晶構造解析により明らかにした。



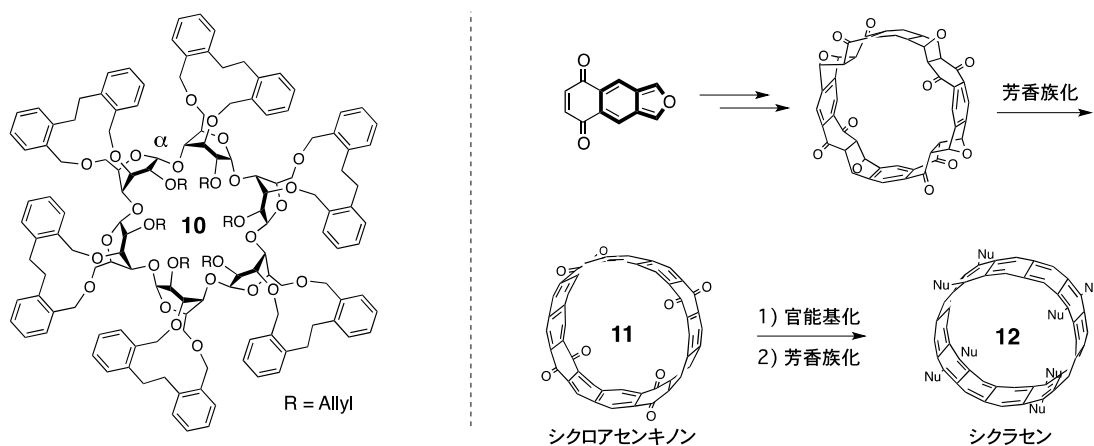
これらの成果を踏まえ、以下のように平成27年度の研究を計画した。

(1) 「反転シクロデキストリン」の合成

- ① β 型、及び α 型反転シクロデキストリンの合成に分けて研究を進行する。
- ② α 型、 β 型双方について、前年度に確立した反転糖四量体（ α 型）、三量体（ β 型）の合成法を合理化し、化合物**10**のような骨格合成を経て目的化合物への誘導を試みる。

(2) 「シクラセン」の合成

- ① 種々のリング状分子を網羅的に合成し、これらの分子の芳香族化によるシクラセンキノンへの誘導化を試みる。
- ② シクラセンキノン (**11**) のカルボニル基への求核付加を鍵とする適切な官能基の導入と芳香族化を経て、未だにその合成が達成されていないシクラセン (**12**) の世界初の合成を試みる。



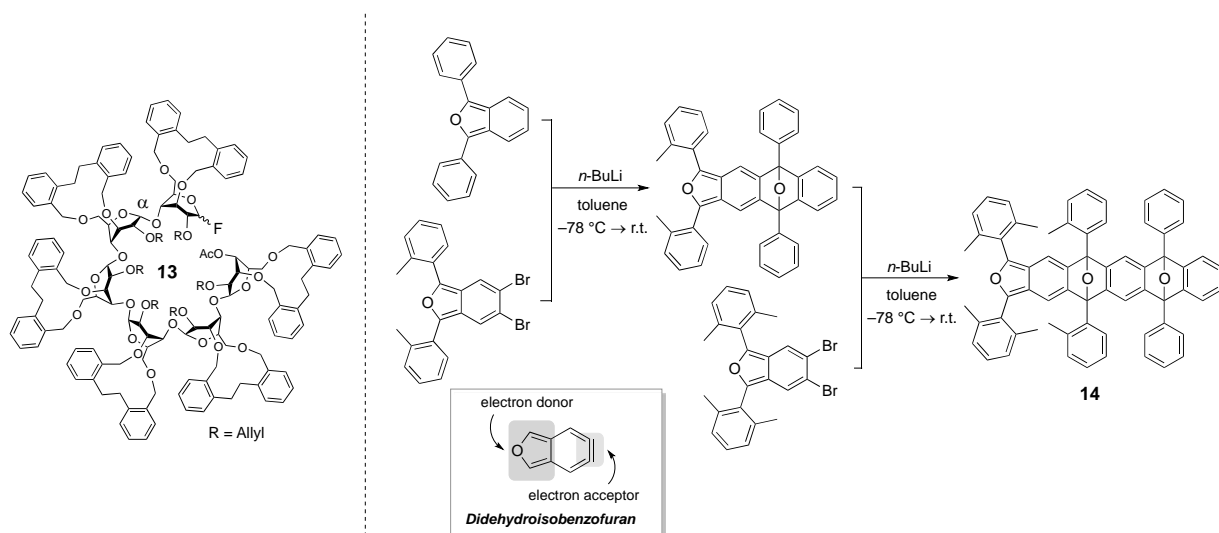
3. 研究の成果

(1) 「反転シクロデキストリン」の合成

- ① α 型反転シクロデキストリンの合成については、直鎖六量体**13**の合成を達成した。
- ② 上記の合成研究過程で、決定が難しい全アノマー位の立体化学を演繹的に決定した。すなわち、立体化学の不明位置が異なる様に工夫した二つの経路で直鎖六量体をそれぞれ合成し、両経路を経て合成した化合物が完全に一致することを確認した。そのため、両者のアノマー位立体化学の照合が可能となり、未決定であった全てのグリコシド結合が α 配置であると決定した。

(2) 「シクラセン」の合成

- ① エポキシアントラセンをコアとする連続的な環付加反応を駆使して、ベルト状分子**8**及び**9**よりも縮環数の大きな分子骨格を構築することができた。
- ② 縮環数の異なるベルト状構造を網羅的に合成するための新たなアプローチとして、新規高反応性分子であるジデヒドロイソベンゾフランの効率的発生法の開発に成功し、これを適切な捕捉剤の共存下で連続的に環を伸長することによって、対応する環付加体（例えば、**14**）をワンポットで合成することができた。



4. 研究の反省・考察

(1) 「反転シクロデキストリン」の合成

- ① β 型反転シクロデキストリンの合成では、反転糖三量体以降の合成が困難であった。 β 型の合成に用いたキシリレン架橋を施したグルコースは、多糖体合成の途中でグリコシド結合が切断する性質を有することが明らかになったためである。今後、 α 型の合成に用いたビベンジルビスメチレン架橋を施したグルコース誘導体を用いて、再挑戦する。
- ② α 型反転シクロデキストリンの合成において達成した直鎖六量体の環状化は、非常に低収率ながら進行した。しかし、単離できるほどの化合物量が無く、存在実証のため合成量を増やして現在再検討している。近い将来、目的化合物の合成に至ると考えている。

(2) 「シクラセン」の合成

- ① ベルト状分子**9**及び**10**の酸性条件での芳香族化によるシクラセンキノンへの変換は困難であることが分かった。これは、芳香族化に伴い、生成物が非常に大きな歪みエネルギーを蓄積することに起因している。今後、より縮環数の大きな前駆体を合成し、芳香族化を改めて検討する。
- ② イソベンゾフランの自己環形成反応に加えて、ジデヒドロイソベンゾフランの連続的環付

加反応によって高次構造の構築が可能であることが明らかとなった。今後、これらの反応を駆使して得られる多様なベルト状構造の変換を重層的に検討することによって、シクラセンの合成を達成できるものと期待している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Total Syntheses of Laevigatins A and E. Hirokane, T.; Ikeuchi, K.; Yamada, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 7352–7359.
- ② Direct thiophenylation accompanying orthoester-cleavage of 1,2,4-O-orthoacetyl-3,6-O-(*o*-xylylene)glucopyranose. Uchino, T.; Tomabechi, Y.; Fukumoto, A.; Yamada, H. *Carbohydr. Res.* **2015**, *402*, 118–123.
- ③ Selective Halogen–Lithium Exchange of 1,2-dihaloarenes for Successive [2+4] Cycloadditions of Arynes and Isobenzofurans. Eda, S.; Hamura, T. *Molecules*. **2015**, 19449–19462. (*Special Issue in Development and Application of Aryne Chemistry*).
- ④ Ring Selective Generation of Isobenzofuran for Divergent Access to Polycyclic Aromatic Compounds. Akita, R.; Kawanishi, K.; Hamura, T. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3094–3097.
- ⑤ New Synthetic Route to Substituted Tetracenes and Pentacenes via Stereoselective [4+2] Cycloadditions of 1,4-dihydro-1,4-epoxynaphthalene and Isobenzofuran. Eda, S.; Eguchi, F.; Haneda, H.; Hamura, T. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 5963.
- ⑥ Probing the Catalytic Mechanism of Copper Amine Oxidase from *Arthrobacter globiformis* with Halide Ions. Murakawa, T.; Hamaguchi, A.; Nakanishi, S.; Kataoka, M.; Nakai, T.; Kawano, Y.; Yamaguchi, H.; Hayashi, H.; Tanizawa, K.; Okajima, T. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 23094–23109.

(2) 口頭発表

- ① Yamada Hidetoshi, Glycosylation Using 3,6-O-(*o*-Xylylene)-Bridged Glucosyl Donor, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015年12月18日, Honolulu (招待講演) .
- ② 山田英俊, 立体配座反転糖：意外な遠隔立体制御とエラジタンニン合成, GlycoTOKYO 2015, 2015年10月24日, 慶応大学矢上キャンパス. (招待講演)
- ③ 新井智貴, 内野拓耶, 池内和忠, 山田英俊, 3,6位酸素を*o*-キシリレン架橋したグルコースの効率的誘導化, 日本化学会第96春季年会, 2016年3月25日, 同志社大学京田辺キャンパス.
- ④ 生田大喜, 苫米地裕輔, 池内和忠, 山田英俊, 3,6-O-[ビベンジルビス-2,2'-(メチレン)]架橋を持つシクロデキストリンの合成研究, 日本化学会第96春季年会, 2016年3月24日, 同志社大学京田辺キャンパス.
- ⑤ 羽村季之, 高反応性分子を駆使した高次縮環 π 電子系分子の創製、第31回若手化学者のための化学道場、兵庫県・淡路市、2015年8月27日 (招待講演) .
- ⑥ 羽村季之, イソベンゾフランを活用する新規 π 共役系分子の合成研究、日本化学会第96回春季年会、同志社大学(京田辺)、2016年3月25日 (招待講演) .

(3) 出版物

なし

学 校 名	神 戸 薬 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	次世代型チャンネルロドプシンモデルの開発 －発色団による長波長光応答モデルの構築－		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①チャンネルロドプシン ②発色団 ③長波長光応答 ④オプトジェネティクス			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
和 田 昭 盛	薬 学 部	教 授	研究代表者 研究計画・実施計画

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
七 田 芳 則	京 都 大 学 大 学 院 理 学 研 究 科	教 授	タンパク質オプシンの作成と結合実験
山 野 由 美 子	薬 学 部	准 教 授	発色団の合成・構造解析
沖 津 貴 志	薬 学 部	講 師	発色団の合成・モデリング解析

次世代型チャンネルロドプシンモデルの開発 —発色団による長波長光応答モデルの構築—

1. 研究の目的

- (1) レチナールを発色団とするチャンネルロドプシン (ChR) を脳のニューロンに発現させ、ニューロンを光で操作する技術が開発されてオプトジェネティクスと呼ばれている。この方法は、従来からある電極を用いた電気刺激による方法に対して、光を用いて神経細胞をコントロールするため、他の細胞への影響が極めて小さく、革命的な方法となっている。しかしながら、これまでのオプトジェネティクスには、Ch1とCh2が用いられ、励起波長として青色光および緑色光が使用されている。青色光や緑色光は、組織中の神経細胞に光が到達しにくく、光に対する応答が小さくなるという欠点がある。そこで、レチナールの共役系に更に二重結合を導入し、より長波長に吸収極大を持つ発色団を設計し、従来より長波長光で制御可能な新規ChRモデルを構築することを目的とする。

2. 研究の計画

- (1) 和田グループは、より長波長での吸収極大を有するレチナール部分の共役系に二重結合を導入した発色団を設計・合成する。また、タンパク質との結合についてコンピューターを用いたドッキングシュミレーションを行い、発色団とタンパク質アミノ酸残基との相互作用について解析し、この結果をもとに更なる発色団の設計・合成を行う。
 - ① レチナールそのものの共役系を伸ばす方法として、まず、A1アルデヒドのシクロヘキセン環の4位から二重結合を数個伸長させたアナログ化合物を作成する。
 - ② レチナールの3,4位に二重結合を入れたA2アルデヒドを用い、3位に二重結合を数個導入したアナログ化合物を合成する。
 - ③ タンパク質オプシンとのコンピューターによるドッキングシュミレーションを実施する。
- (2) 七田グループは、ChR のタンパク質オプシンを作成し、これまで合成したアナログ化合物の結合実験を試み、タンパク質オプシン中に取り込まれるかどうかを確認する。結合したアナログ化合物については、ChRとしての光挙動を検討し、イオンチャネルとしての機能を持つかどうかを確認する。

3. 研究の成果

- (1) 共役系の長い発色団の合成
 - ① α -ヨノンから4位に二重結合を2個伸長した β -ヨノン体へと誘導後、エチルトリメチルシリルアセテートとのPeterson反応後、エステルをアルデヒドへと変換、続いてC5ホスホネートとのHorner-Emmons反応で側鎖を延長した。最後にエステルをアルデヒドへ変換し、A1アルデヒドの4位へ二重結合を2個導入したアナログ化合物を合成することができた。この化合物のUV吸収スペクトルでは、A1アルデヒドより二重結合が2個伸びたものの吸収極大波長はほとんど変わらないことが判明した。
 - ② アクチノールより3,4位に二重結合と3位にビニル基を導入した β -シクロシトラールへと変換後、C5シアノホスホネートで側鎖を延長し、シアノ基をアルデヒドへと変換した。続いてC5シアノホスホネートで更に側鎖を延長し、最後にシアノ基をアルデヒドへと変換し、A2アルデヒドの3位から二重結合を1個伸ばしたアナログ化合物を合成することができた。この化合物のUV吸収スペクトルでは、A2アルデヒドより二重結合が1個伸びたものであり吸収極大波長は、A2アルデヒドより30 nm長波長シフトしていることが判明した。
 - ③ β -ヨノンを出発原料としてC5ホスホネートとC3ホスホネートによるHorner-Emmons反応の組み合わせ順序を変更することによりビタミンA1アルデヒドの側鎖部分のC12位およびC14位

の後に二重結合を一つ挿入した化合物 2 種類を合成した。

(2) オプシンの作成ならびに発色団との結合

① 前年度サフラナルより合成したビタミンA2アルデヒドの側鎖部分のC8位、C12位およびC14位の後に二重結合を一つ挿入した化合物 3 種類 (I, II, III) について、タンパク質オプシンとの結合実験をしたところ、いずれの発色団もタンパク質中に取り込まれ新たなChRアナログが生成した。

② 3 種の新規ChRの吸収極大は、天然のChRの吸収極大 (λ_{\max}) に比べてわずかに10~20 nm長波長シフトしているだけであったが、 $1/2 \lambda_{\max}$ の吸収波長を比較すると40~80 nmと大きく長波長シフトしていることが判明した。

(3) コンピューターを用いたドッキングシュミレーション

ビタミンA2アルデヒドの側鎖部分に二重結合を一つ挿入した化合物 3 種類 (I, II, III) について、X線結晶構造が明らかにされているC1C2を用いてドッキングシュミレーションを行い発色団のコンホメーション解析を行った。それぞれの最安定コンホメーションにおけるE値は、 $I=1.5138$ Kcal/mol, $II=-13.1696$ Kcal/mol, $III=-2.4567$ Kcal/mol となった。これらの値を比較するとより安定な発色団ほど $1/2 \lambda_{\max}$ の吸収波長のシフト値が大きく ($II > III > I$ の順) になっており、二重結合を導入する位置としては側鎖C12位の後に入れるのが最も効果的であることが明らかになった。

4. 研究の反省・考察

(1) A1アルデヒドの側鎖に二重結合を入れた発色団とCh1Ch2チャンネルロドプシンオプシンとの結合実験を実施するまでには至っていないので、早急に実施し新たなチャンネルロドプシンアナログを形成するかを検討する。また、アナログを与えた場合にはその吸収極大がA2アルデヒドの時と同様に、 $1/2 \lambda_{\max}$ の吸収波長のシフト値が大きくなるかどうかを確認する。

(2) コンピューターによるドッキングシュミレーションの安定コンホメーションが、実際の吸収極大特に、 $1/2 \lambda_{\max}$ のシフト状況とよく一致することが判明したので、今後の発色団の設計においてどのように活用していくかを検討する。

(3) 長波長での吸収極大を持たせる次の方法として、レチナールのシクロヘキセン環を複素環に変え、かつ共役系を長くしたアナログ化合物の効率のよい合成法を確立する。できたアナログでは、天然のオプシンと結合するかどうかを検討する。

(4) さらにコンピューターを用いた発色団のコンホメーション解析を実施するとともに、より長波長に吸収極大をもつ発色団の設計と合成を行なう。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① 和田昭盛

ビタミンA誘導体を用いたケミカルバイオロジー研究
ファルマシア **2015**, *51*, 193-195.

② Maoka, T.; Yamano, Y.; Wada, A.; Etho, T.; Terada, Y.; Tokuda, H.; Nishino, H.
Oxidative Metabolites of Lycopene and γ -Carotene in Gac (*Momordica cochinchinensis*)
J. Agric. Food Chem. **2015**, *63*(5), 1622-1630.

③ Yamano, Y.; Ematsu, K.; Kurimoto, H.; Maoka, T.; Wada, A.
Total synthesis of gobiusxanthin stereoisomers and their application to determination of absolute configurations of natural products: revision of reported absolute configuration of epigobiusxanthin
Mar. Drugs **2015**, *13*(1), 159-172.

- ④ Yamano, Y.; Eno, K.; Hikita, Y.; Kurimoto, H.; Wada, A.
Stereocontrolled First Total Syntheses of Salmoxanthin and Deepoxysalmoxanthin
Curr. Org. Synth. **2015**, *12*(2), 180–188.
- ⑤ Katayama, K.; Okitsu, T.; Imai, H.; Wada, A.; Kandori, H.
Identical Hydrogen-Bonding Strength of the Retinal Schiff Base between Primate Green- and Red-Sensitive Pigments: New Insight into Color Tuning Mechanism
J. Phys. Chem. Lett. **2015**, *6*(7), 1130–1133.
- ⑥ Oshima, K.; Shigeta, A.; Makino, Y.; Kawamura, I.; Okitsu, T.; Wada, A.; Tuzi, S.; Iwasa, T.; Naito, A.
Characterization of photo-intermediates in the photo-reaction pathways of a bacterio-rhodopsin Y185F mutant using *in situ* photo-irradiation solid-state NMR spectroscopy
Photochem. Photobiol. Sci. **2015**, *14*(9), 1694–1702
- ⑦ Yanagawa, M.; Kojima, K.; Yamashita, T.; Iwamoto, Y.; Matsuyama, T.; Nakanishi, K.; Yamano, Y.; Wada, A.; Sako, Y.; Shichida, Y.
Origin of the low thermal isomerization rate of rhodopsin chromophore
Sci. Rep. **2015**, *5*, 11081.
- ⑧ Imamoto, Y.; Kojima, K.; Oka, T.; Maeda, R.; Shichida, Y.
Helical rearrangement of photoactivated rhodopsin in monomeric and dimeric forms probed by high-angle X-ray scattering.
Photochem Photobiol Sci. **2015**, *14*, 1965.
- ⑨ Koyanagi, M.; Wada, S.; Kawano-Yamashita, E.; Hara, Y.; Kuraku, S.; Kosaka, S.; Kawakami, K.; Tamotsu, S.; Tsukamoto, H.; Shichida, Y.; Terakita, A.
Diversification of non-visual photopigment paraporinopsin in spectral sensitivity for diverse pineal functions.
BMC Biol. **2015**, *13*, 73.
- ⑩ Sakai, K.; Yamashita, T.; Imamoto, Y.; Shichida, Y.
Diversity of Active States in TMT Opsins.
PLoS One. **2015**, *10*, e0141238.
- (2) 口頭発表
- ① 山野由美子、西山裕也、青木敦志、和田昭盛、眞岡孝至
ガックより単離されたlycopene-5,6-diolおよび γ -carotene-5',6'-diolの立体異性体の合成とHPLC分離条件の確立
第29回カロテノイド研究談話会 (2015.09.04 八王子)
- ② 佐藤恵太、山下高廣、大内淑代、友成さゆり、酒井佳寿美、今元泰、和田昭盛、七田芳則
Opn5L1は光サイクル性の反応で制御されるGタンパク質共役型受容体である
第53回日本生物物理学会年会 (2015.9.13. 金沢)
- ③ 小島慧一、柳川正隆、山下高廣、松谷優樹、今元泰、松山オジョス武、中西香爾、山野由美子、和田昭盛、佐甲靖志、七田芳則
視物質の低い熱活性化頻度をもたらす分子メカニズム
日本生物物理学会第53回年会 (2015.9.13. 金沢)
- ④ 松谷優樹、小島慧一、柳川正隆、山下高廣、今元泰、山野由美子、和田昭盛、七田芳則
両生類の緑桿体に含まれる青色錐体視物質の熱活性化頻度
日本動物学会第86回大会 (2015.9.19. 新潟)
- ⑤ Wada, A.; Okitsu, T.; Yamano, Y.; Kobayashi, Y.; Ishizuka, T.; Yawo, H.; Matsuyama, T.; Yamashita, T.; Imamoto, Y.; Shichida, Y.
Preparation of New ChR with One Double Bond-elongated 3,4-Dehydroretinals

The 3rd International Conference on Retinoids (2015. 10. 21, Gifu/Japan)

⑥ 山野由美子、西山裕也、青木敦志、和田昭盛

Lycopeneの新規酸化代謝物、lycopene-5, 6-diol立体異性体の全合成
第41回反応と合成の進歩シンポジウム (2015. 10. 26 東大阪)

⑦ 沖津貴志、森澤祐介、本村映人、和田昭盛

イナミドの求電子性が促進する6-*endo-dig*環化：ピリダジン類の制御合成
第41回反応と合成の進歩シンポジウム (2015. 10. 26 東大阪)

⑧ Shichida, Y.

Molecular evolution of the low thermal isomerization rate of rhodopsin
chromophore 7th AOCF (2015. 11. 18. Taipei/Taiwan)

⑨ Okitsu, T.; Murai, C.; Wada, A.

Iodonium-mediated dearomative cyclization/Diels-Alder tandem of a chiral ynamide
toward diastereoselective construction of bridgehead-spiro system
Pacifichem 2015 (2015. 12. 19, Honolulu/USA)

⑩ Shichida, Y.

Thermal isomerization of chromophore in rod and cone visual pigments
Pacifichem 2015 (2015. 12. 19. Honolulu/USA)

(3) 出版物

山野由美子、都出千里、和田昭盛

カロテノイドの有機合成、「カロテノイドの化学と最新応用技術 普及版第1版」宮下 和夫
監修、pp27-37 (2015)、シーエムシー出版

学 校 名	東 洋 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	無細胞マイクロ生体モデルを用いたナノ薬剤の 血管透過性解析		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①マイクロ流体デバイス ②ナノ薬剤 ③血管			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
佐々木直樹	理 工 学 部	准 教 授	研究代表者 総括 実験・データ整理・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
佐藤香枝	日 本 女 子 大 学 部 理 学	准 教 授	実験・データ整理・論文作成

無細胞マイクロ生体モデルを用いたナノ薬剤の血管透過性解析

1. 研究の目的

厚生労働省の平成26年人口動態統計によれば、日本人の死因の第1位はがん（悪性新生物）であり、全体の28.9%を占める。かつては結核や脳卒中が第1位であったが、医療の発展に伴い、これらの病気で亡くなる人が減ったため、結果としてがんで亡くなる人が増えていると考えられている。従って、さらなる長寿健康社会を実現するには、従来法に比べて優れたがんの診断・治療法を開発し、超早期診断や低侵襲治療へと展開していく必要がある。

これまでのがんの診断・治療では、主に低分子の薬剤を血管に投与するため、これらが体内の腫瘍組織のみならず正常組織においても血管外に漏出する。このため、造影剤で患部を効果的に造影できない、或いは抗腫瘍剤が正常組織を攻撃し重篤な副作用が避けられない、などの問題が起こる。これを解決するために、ナノメートルサイズの粒子に薬物を封入した「ナノ薬剤」を血管に投与し、患部にピンポイントに送り届け薬効を発揮させる技術が盛んに研究されている。

ナノ薬剤を用いた患部選択的な薬物送達の原理は、Enhanced permeability and retention effect (EPR効果)として知られている。すなわち、癌周囲の腫瘍血管は正常血管に比べて血管壁の構造が疎であり物質透過性が高い。よって、ナノ薬剤は正常血管からは漏出せず、腫瘍血管からのみ効果的に漏出すると考えられている。従って、このような血管透過性を調べる技術は、有効なナノ薬剤の設計・開発に不可欠である。

これまでのナノ薬剤開発では、培養細胞や実験動物を用いてその効果を検証していた。しかし、培養皿などセンチメートルサイズの空間で静置培養される細胞は、マイクロメートルサイズの空間で血流にさらされている血管の細胞と大きく環境が異なる。また実験動物はブラックボックスであり、一般に体内の深部で起こるナノ薬剤の血管からの漏出を観察できず、薬剤が集積したか否かの結果でしか判断できない。加えて、ナノ薬剤が透過する血管壁の孔は形状・サイズが不均一であり、これらの物理的パラメータが透過性に与える影響を評価できない。すなわち、ナノ薬剤の血管透過性を精密評価する方法は現在のところ存在しない。

申請者は微細加工技術で作製したマイクロ流体デバイスを用い、細胞を組み込んだ新たな血管モデルを構築すると共に (Electrophoresis, 33, 1729 (2012); PLOS ONE, 10, e0137301 (2015))、細胞を用いずに構築した擬似血管構造からのナノ粒子の漏出を評価してきた (Proc. MicroTAS 2013, 1818 (2013); Anal. Biochem., 458, 72 (2014))。細胞を用いないことで、血管壁の孔のサイズを始めとする物理的パラメータが透過性に与える影響を評価可能となる。そこで、これらの研究を更に推し進めることで、現在は不明であるナノ薬剤の血管透過性を生体外で明らかにするための新たな実験系が構築できると考えた。

2. 研究の計画

本研究ではマイクロ流体デバイスを用い、ナノ薬剤の血管透過性を評価するための無細胞生体モデルを開発する。マイクロメートルサイズの流路内に腫瘍血管構造を再現し、血流を模擬する流れの存在下でナノ薬剤の透過性を評価する。具体的に以下の3点を検討する。

(1) 多孔膜を有するデバイスでの無細胞系ナノ薬剤透過試験

漏出性のある血管壁を模倣した多孔膜をデバイスに組み込み、ナノ薬剤に見立てた蛍光標識ナノ粒子の透過性を評価する。孔のサイズや粒子のサイズと透過性の関係を明らかにする。

(2) 小型ポンプを組み込んだデバイスでのナノ薬剤透過試験

小型ポンプをデバイスに組み込み、ナノ薬剤の透過性を評価している。本ポンプを用い、微量の溶液を循環させながら透過試験を行うことで、血管透過性に加えてナノ薬剤の血中滞在性も評価可能となる。このような血中滞在性の評価は、生体内でナノ薬剤を長期にわたって血中に存在させ、患部での薬剤濃度を維持する上で極めて重要である。項目1と同様に透過試験

を行い、血管透過のみを調べた結果と比較考察する。

(3) 血球や血清との共存系でのナノ薬剤透過試験

血球は血液の約半分を占めナノ薬剤の血管内分布に影響するほか、血清中に含まれる様々なタンパク質は吸着によりナノ薬剤の表面電荷に影響する。そこでこれらの共存下で上記の実験を行い、ナノ薬剤の透過性を評価し、生体内でナノ薬剤が効率的に血管を透過するための要素を明らかにする。

3. 研究の成果

(1) 多孔膜を有するデバイスの作製

申請者の過去の研究(Proc. MicroTAS 2013)では、マイクロ流路のパターンを有する基板で多孔膜を挟みこんでデバイスを作製していた。この場合、膜が顕微鏡の観察面に対して平行に位置するため、ナノ粒子が膜を透過する際には観察面に対して垂直に移動することとなる。よって、通常の蛍光顕微鏡では深さ方向の分解能が高くないため、ナノ粒子が膜を透過する様子を直接観察することは困難であった。そこで本研究では、膜を観察面に対して垂直に配置する新たな作製法を開発した。

具体的にはまず、民生用のレーザー加工機を用いてマイクロ流体デバイスの鋳型を作製した。厚みや素材の異なる数種のシート材を切断し、基板に貼りつけて鋳型とした。いずれのシート材を用いた場合も、おおよそ設計通りに鋳型を作製できた。流路パターンの幅は最小100 μm 程度まで加工できることがわかった。この鋳型をシリコンゴム的一种であるポリジメチルシロキサン(PDMS)でかたどりのち、別のシリコンゴム基板と貼り合わせた。貼り合わせ後の基板の一部に顕微鏡下で切り込みを入れ、デバイス上の流路を仕切るように多孔膜を挟み込んで接合して多孔膜を有するデバイスを作製した。デバイスの作製手順や実験条件を検討し、再現性良くデバイスを作製する手順を確立した。

(2) ナノ粒子透過試験

はじめに試料としてウラニンを用い、これを作製したデバイス上のマイクロ流路にシリンジポンプで導入して顕微鏡観察した。上記(1)で作製したいずれのデバイスにおいても、溶液の漏れがないこと、試料が膜を透過することを確認でき、透過試験に利用可能なデバイスの作製に成功した。次に蛍光標識デキストランを用いて同様の実験を行い、試料が膜を透過すること、および分子量に応じた膜透過が起こることを確認した。分子量の違いは粒子のサイズの違いに相当するため、粒子サイズが透過性に与える影響を評価できたと言える。これらの結果を細胞系の結果と比較するために、孔径1 μm の多孔膜を挟みこんだデバイスに細胞を培養し透過試験を行った。血管内皮細胞を膜の上部に培養し、ウラニン、ルシファーイエローおよび蛍光標識デキストランを血管内皮細胞が培養されている流路へ導入して透過試験を行った。ウラニンは細胞質に取り込まれてしまったため、細胞を用いた場合の透過試験に用いることはできなかったことがわかった。一方細胞膜不透過性色素であるルシファーイエローを用いた場合は、時間経過とともに多孔膜を抜け下部のチャンネルへの移行が観察された。蛍光標識デキストランはルシファーイエローと比較して透過量が少なく、細胞を用いた系での分子量に応じた膜透過を確認した。

4. 研究の反省・考察

(1) 多孔膜を有するデバイスの作製

本研究で開発したデバイスの作製法は、クリーンルームや半導体の微細加工装置など、高価で大掛かりな設備・装置を必要としない。加えて、フォトレジストなどの高価な試薬も用いないため、微細加工技術になじみのない生化学・医工学分野の研究者にも使いやすい手法を開発できたと考えている。

(2) ナノ粒子透過試験

上記(1)で作製したデバイスを用いた透過試験の原理を実証できたため、この成果を基に次年度以降の検討を進めていく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

① 演繹的及び構成的アプローチに基づくマイクロバイオ分析デバイスの開発、○佐々木直樹、日本分析化学会第64年会、福岡、平成27年9月

② “Cell-free microfluidic vascular models for nanoDDS”、○Naoki Sasaki、第2回アジア分析科学シンポジウム (2nd Asian Symposium for Analytical Sciences)、日本分析化学会第64年会、福岡、平成27年9月

(3) 出版物

なし

学 校 名	中 部 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	自己組織化グラフェン素子の糖鎖修飾による高感度センサーの開発 －新型鳥インフルエンザの選択的検出の研究－	研究分野	工 学
キ ー ワ ー ド	①鳥インフルエンザ ②ヒト適応性変異株の選択的検出 ③パンデミック監視 ④ナノカーボン素子 ⑤低次元系物性 ⑥超高感度センサー ⑦特異的結合分子設計 ⑧素子プロセス開発		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
河 原 敏 男	工 学 部	教 授	全体の統括、デバイスの創製

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
鈴 木 康 夫	生 命 健 康 科 学 部	客 員 教 授	インフルエンザおよびウイルス受容体糖鎖関連研究
玉 田 敦 子	人 文 学 部	准 教 授	データの統計学的解析
上 村 和 秀	生 命 健 康 科 学 部	准 教 授	糖鎖およびウイルス関連研究の遂行
Nongluk Sriwilajaroen	Thammasat University Faculty of Medicine	講 師	インフルエンザおよび糖鎖関連研究の遂行
中 北 慎 一	香 川 大 学 総合生命科学研究センター	准 教 授	シアロ糖鎖の化学合成および天然素材からの調製と応用

自己組織化グラフェン素子の糖鎖修飾による高感度センサーの開発 — 新型鳥インフルエンザの選択的検出の研究 —

1. 研究の目的

インフルエンザは世界で最も広く分布する人獣共通感染症であり、その病原体インフルエンザウイルスは完全制圧不可能な最強ウイルスの一つである。そして、ヒトへの感染性を獲得したヒト型インフルエンザの脅威がWHO（世界保健機関）より発信されている。次期パンデミックが危惧される高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1亜型、以下H5N1）は、既に世界63ヶ国以上に広がり、16ヶ国でヒトへ伝播している。ヒトにおける致死率は約60%で、極めて高い。しかも、そのウイルスは、極めて変異しやすく、且つ渡り鳥やブタなどの中間宿主を介して、飛沫感染などにより、速やかな地球規模の伝播能力を持つ。これが、ヒト世界で流行可能なヒト適応変異を遂げた場合、数千万人規模の死者が出る可能性がある。そこで、ヒト適応変異を十分な検出感度で検出可能な、感染防疫体制構築のための実用的監視技術の世界展開が切望されている。

ヒト適応性変異は、現行の遺伝子や抗原変異監視では決して検出できず、唯一、ヒト喉の受容体シアロ糖鎖結合性で検出出来ることを我々は明らかにしてきた。そこで、ウイルス受容体シアロ糖鎖を用いたセンサーを開発し、その感度向上により世界規模の迅速監視が可能な実用的監視体制を築くことを目的に研究を行う。特に、H5N1のヒトへの適応性獲得変異シグナルをウイルスヘマグルチニン分子とその受容体シアロ糖鎖との特異的分子間相互作用で検出する。

センサーとしては、ナノカーボン材料による電子デバイス構造を用いる。ナノカーボン材料の一つであるグラフェンでは、その2次元性に起因する特異な電子構造、及び、ナノカーボンの高電子移動度や巨大な表面積を活用することにより、従来の感度を凌駕する高感度で、非標識かつ簡便に標的を電気的に検出できるセンサー系の構築が可能である。我々は、グラフェンを用いた電界効果トランジスタのデバイスプロセスを研究開発してきたが、グラフェンをセンサー素子とすることでシアロ糖鎖の特異的相互作用を検出する。特に、電気的検出のため電場の遮蔽距離を考慮した短い糖鎖分子系を用いたセンサープロセスの研究開発を行う。

本研究では、原理的に超高感度化が可能であるナノカーボン材料（グラフェン）とウイルス受容体シアロ糖鎖疑似分子の研究開発を進展させることで、これらを組み合わせた電子デバイスを開発する。そして、ウイルス感染の際に反応しやすい糖鎖の構造や分布を明らかにすることで、鳥ウイルスのヒト適応性獲得を短時間に目視的に捉える世界初の高精度、高感度検出技術の開発とその国際的な実用化の達成を目指す。特に、鳥ウイルスのヒト適応性変異を事前に超高感度（ウイルス粒子数10個以下）、安価（開発途上国で使用可）、軽量（5グラム以下）、高速（5分以内）、高性能（鳥ウイルス、そのヒト適応変異株を分別可）に検出・監視出来る電子デバイス開発を行う。そして、超高感度センサーによる事前診断・検出で世界流行阻止の感染防疫基盤の創製を目的としている。

2. 研究の計画

本課題では、鳥、ヒト型インフルエンザウイルスを超高感度で識別出来る新しいグラフェン構造体を創製する。そのためには、自然界の鳥及びヒト型インフルエンザウイルス受容体を解明し、単離又は化学合成する。それをグラフェン上に化学的に結合させた世界初の鳥およびヒト型インフルエンザウイルス受容体担持グラフェンを創製することでデバイス化、超高感度センサーを開発する。さらに、世界規模の防疫体制を目指す。そこで、平成27年度は次の2つの課題を実施した。

(1) 温度変調プロセスによる数層グラフェンの電気伝導率向上

平成26年度の成長条件は、成長を抑える方向の制御であったため、成長速度や成長密度が

低下する。これらはデバイスプロセスを考える際に、プロセス時間や集積度に影響を与えるため不利となる。そこで、ナノカーボン系の成長モードが初期成長により規定され、その後の成長が優先成長方向に制限されることを利用することにした。つまり、初期成長を低温ないし低密度成長のグラフォエピタキシーで行い、その後、温度を変調させることで成長モードを変更し、成長速度を向上させプロセス最適化を図る。さらに、初期成長後は温度やガス比等の成長条件も自由に設定できるため、温度変調制御による多段成長をグラフェン素子プロセスとして開発する。また、透過電子顕微鏡による回折像から温度条件により結晶性が変化することもわかっており、単結晶でグレインサイズが拡大し、また、グレインが配列したグラフェン相を成長させることで、ひずみの効果を制御すること及び移動度の向上を目指すことにした。以上の結果、生産性と高電気伝導率を両立させたプロセスの開発に繋がる。

(2) 数層グラフェンFET用糖鎖分子の開発・デバイス化

平成26年度から継続して自己組織化数層グラフェンの成長プロセスを開発しているが、グラフェン電界効果トランジスタを用いて、選択的にウイルスを検出する為には、グラフェンを糖鎖アレイで修飾する必要がある。修飾のための結合にはアミド結合を用いる。結合による修飾分子の観察を、走査型プローブ顕微鏡で行うことで、センサーの反応系を電氣的に有効な距離内に構築できるかの可否、及び、反応系分子の結合強度等を評価する。同時に、糖鎖とウイルスの組み合わせの探索をクロマトグラフィーで行うことで、最適な反応系の探索を行う。さらに、実際に自然界で分離された鳥およびヒトインフルエンザウイルス天然および臨床分離株（日本国内分離株、実際に鳥からヒトへ伝播している国、エジプト、ベトナムなど、の分離株）の反応特異性を様々な視点（反応時間、感度、鳥およびヒト型受容体識別能力、利便性、反応コストなど）から評価し、改良を加える研究を行った。

3. 研究の成果

(1) 温度変調プロセスによる数層グラフェンの電気伝導率向上

電気抵抗の主要因が、配列化プロセスによるひずみでグレイン境界での散乱がエンハンスされるためなので、バッファ層を用いて基板との相互作用を弱めること、及び、電気特性の時間変化の解析を行った。400°C成長の数層グラフェンをバッファ層(LTバッファ層)にし、メインの成長温度を変化させてラマン測定により評価した。その結果、LTバッファ層の導入によるG/D比の向上が観測された。電気特性は比較的低温の500°C成長でもすべての素子が金属特性を示すようになりシート抵抗が45 k Ω 程度以下となった。また、ドレイン-ソース電流の時間変化をノイズスペクトルとして解析し、LTバッファ層の導入によるノイズ強度の減少、成長温度の向上によるノイズの減少(図1)を明らかにした。これは、グレイン界面での散乱過程がノイズの主要因であり、その散乱が減少したことによるため、ノイズ解析による品質評価にも成功した([T. Kawahara et al.; IEEE Conf. Proc.: 23rd ICNF, 108 \(2015\)](#))。

さらに、デバイスノイズの減少はセンサーとしての分解能向上にも有用である。

(2) 数層グラフェンFET用糖鎖分子の開発・デバイス化

平成26年度にシアロ糖鎖の大きさを評価したので、次に、クロマトグラフィーでウイルスとの反応性を評価した。その結果、ヒト型、鳥型ウイルスの選択性が確認できたので、デバイスを作製した。糖鎖分子修飾デバイスでの選択性を

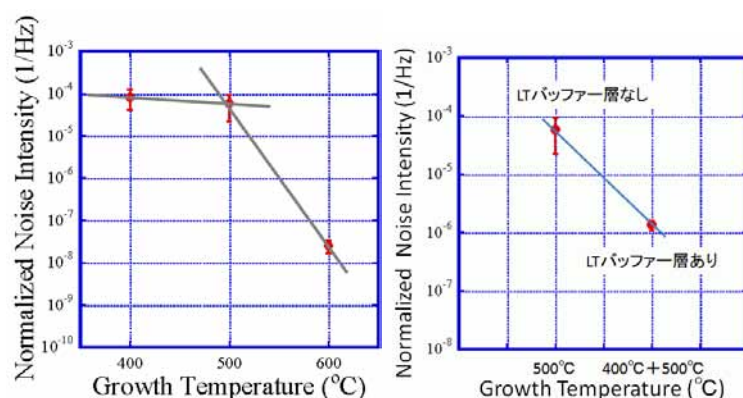


図1:成長温度によるノイズの変化(a) とLTバッファによるノイズの変化(b)

ソースドレイン電流の変化で調べ(図2)、濃縮技術を用いない検出技術として最高感度の 10^5 個/0.1mLのウイルス検出が可能であることが分かった。さらに糖鎖構造の最適化を継続する予定である。

次に、自然界で分離された鳥およびヒトインフルエンザウイルス天然および臨床分離株（日本国内分離株、及び、実際に鳥からヒトへ伝播している国での分離株）の反応特異性を評価した。その過程で、エジプトで分離された高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)の中に、ヒト型、鳥型レセプターシアロ糖鎖の両方へ結合性をもつ変異ウイルス株を世界で初めて見いだした(**T. Kawahara, Y. Suzuki, A. Tamada et al.**; 5th AASEF (招待講演), つくば, 2015)。最近2年間のエジプトでの鳥からヒトへのH5N1ウイルスの伝播例は世界最多であり、死者も急増している。高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト適応性変異がエジプトで進みつつある可能性を強く示唆する結果が得られた。

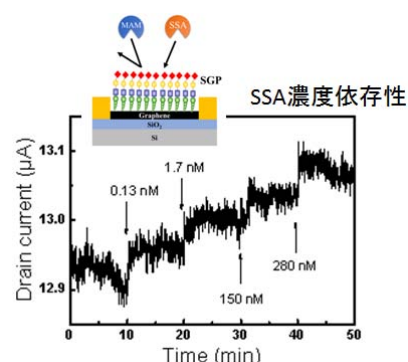


図2:ヒト型レクチンでの電流変化

4. 研究の反省・考察

(1) 温度変調プロセスによる数層グラフェンの電気伝導率向上

自己組織化プロセスに対して、バッファ層プロセス等の開発を行い、電気的特性の改善には成功した。しかし、まだ、グレインサイズが小さいため、デバイスサイズが大きくなると電気伝導特性が低下して感度が低下する。今後、劈開等のプロセスも併用してデバイス化を行うと共に、リーク電流の改善等のデバイスプロセスとしての完成を目指したプロセス開発を行っていく予定である。

(2) 数層グラフェンFET用糖鎖分子の開発・デバイス化

糖鎖分子のサイズ評価、及び、反応性の評価を行い、選択的にウイルスを検出できることを示した。また、ウイルスの変異等の検出も可能であった。しかし、高感度化のためには短い長さの糖鎖分子が必要であり、分散状態にまだ改良の余地があることが原子間力顕微鏡像から分かってきた。そこで、凝集などの効果を調べると共に、分布制御の方策を検討することで、糖鎖プローブの高性能化を進めていく予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① **河原敏男, 玉田敦子**, “直接成長グラフェンによる自己組織化デバイスプロセス開発-自己組織化プロセスのデバイス特性への影響-,” 総合工学, **27** (2015) 28-35.
- ② **Toshio Kawahara, Yasuhide Ohno, Kenzo Maehashi, Kazuhiko Matsumoto, Kazumasa Okamoto, Risa Utsunomiya, Teruaki Matsuba**, “Noise Spectroscopy of Self-aligned Carbon Nanowalls,” IEEE Conf. Proc.: 2015 23rd Int. Conf. Noise and Fluctuations (ICNF)(2015) 108-111.
- ③ Guohua Deng, Jianzhong Shi, Jing Wang, Huihui Kong, Pengfei Cui, Fang Zhang, Dan Tan, **Yasuo Suzuki**, Liling Liu, Yongping Jiang, Yuntao Guan, Hualan Chen, “Genetics, receptor binding, and virulence in mice of H10N8 influenza viruses isolated from ducks and chickens in live poultry markets in China,” Journal of Virology, **89** (2015) 6506-6510.
- ④ **鈴木康夫**, “インフルエンザウイルスのシアロ糖鎖生物学-鳥インフルエンザウイルスのヒト適応性変異の分子基盤-,” 生化学 (日本生化学会), **87** (2015) 348-361.
- ⑤ **Nongluk Sriwilajjaroen, Katsuhiko Suzuki, Emi Takashita, Hiroaki Hiramatsu, Osamu Kanie, Yasuo Suzuki**, “6SLN-lipo PGA specifically catches (coats) human influenza virus and synergizes neuraminidase-targeting drugs for human influenza therapeutic potential,” J. Antimicrobial Chemother, **70** (2015) 2797-2809.
- ⑥ **玉田敦子**, “18世紀フランスにおけるミソジニーとナショナリズム,” 一橋大学社会科学古典

資料センターStudy Series, **72** (2016) 1-44.

(2) 口頭発表

- ① **Toshio Kawahara, Yasuo Suzuki, Atsuko Tamada, Nongluk Sriwilaijaroen, Kazuhiko Matsumoto**, “Spreading of Influenza Virus in North Africa and Southeast Asia,” 30th Anniversary Hall, University of Tsukuba, Japan, 2015年5月10日～13日, 11p-S4-4 (2015年5月11日).(招待講演)
- ② **Toshio Kawahara, Yasuhide Ohno, Kenzo Maehashi, Kazuhiko Matsumoto, Kazumasa Okamoto, Risa Utsunomiya, Teruaki Matsuba**, “Noise Spectroscopy of Self-aligned Carbon Nanowalls,” 23rd International Conference on Noise and Fluctuations(ICNF), Xidian University, Xi’an, China, 2015年6月2日～5日, We-D-4 (2015年6月3日).
- ③ 林亮太, 小野堯生, 生田昂, 金井康, 大野恭秀, 前橋兼三, 井上恒一, 渡邊洋平, **河原敏男, 鈴木康夫, 中北慎一**, 松本和彦, “糖鎖機能化グラフェンFETを用いたインフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンの検出,” 第76回応用物理学会秋季学術講演会, 名古屋国際会議場, 2015年9月13日～16日, 15P-2B-6 (2015年9月15日).
- ④ **河原敏男**, 川際智聖, 中川幸紀, 大野泰秀, 前橋兼三, 松本和彦, 岡本一将, 宇都宮里佐, 松葉晃明, 吉村雅満, 松岡佑樹, “低温バッファ層を用いたCNW-FETのノイズ解析,” 第76回応用物理学会秋季学術講演会, 名古屋国際会議場, 2015年9月13日～16日, 16a-PA2-32 (2015年9月16日).
- ⑤ **河原敏男, 玉田敦子, 中北慎一**, “シアロ糖鎖修飾による数層グラフェンインフルエンザバイオセンサーの研究開発,” 平成27年度 総合工学研究所研究発表会, 中部大学 521講義室(2016年3月7日).
- ⑥ 林亮太, 小野堯生, 金井康, 大野恭秀, 前橋兼三, 井上恒一, 渡邊洋平, **河原敏男, 鈴木康夫, 中北慎一**, 松本和彦, “ウイルス検出のための糖鎖機能化グラフェンFET の修飾糖鎖の検討,” 第63回応用物理学会春季学術講演会, 東京工業大学大岡山キャンパス, 2016年3月19日～22日, 20p-P12-26 (2016年3月20日).
- ⑦ 鎌田果歩, 小野堯生, 金井康, 大野恭秀, 前橋兼三, 井上恒一, 渡邊洋平, **河原敏男, 鈴木康夫, 中北慎一**, 松本和彦, “糖鎖機能化グラフェンFETを用いたノイラミニダーゼ反応計測,” 第63回応用物理学会春季学術講演会, 東京工業大学大岡山キャンパス, 2016年3月19日～22日, 21p-S011-10 (2016年3月21日).
- ⑧ **鈴木康夫**, “鳥インフルエンザウイルスのヒト間伝播能獲得の仕組み,” 第29回日本医学会総会2015関西, 国立京都国際会館, 2015年4月11日～13日(2015年4月11日).
- ⑨ **玉田敦子**, “テキストデータベースを用いた研究の現状と課題,” 日本18世紀学会, 東京大学駒場キャンパス, 2015年6月20日～21日(2015年6月20日).
- ⑩ **Atsuko Tamada**, “L'éloge de la virilité au cours du renouvellement de la vertu civique,” 14th International Congress for Eighteenth-Century Studies, Erasmus University, Rotterdam, Netherlands, 2015年7月27日～31日(2015年7月28日).
- ⑪ **Atsuko Tamada**, “The Peculiar Promotion of French E-Data Resources and the New Research Possibility in the Research on Rhetoric,” The Workshop on the Promotion of Digital Humanities and the New Possibility of “Analogue” Humanities, National Institute of Informatics, Tokyo, 2016年2月10日.(招待講演)

(3) 出版物

- ① **鈴木康夫**, “インフルエンザウイルスヘマグルチニンの糖鎖ウイルス学,” 糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック—創薬・医療から食品開発まで, 監修: 秋吉一成, 編集: 津本浩平, 加藤晃一, 鷹羽武史, 深瀬浩一, 古川鋼一, 株式会社エヌ・ティー・エス, (2015) 総ページ数/678.
- ② 長島昭, **玉田敦子**, “中部高等学術研究所共同研究「寿命 — 無限か再生か」第3回研究会報告書 Studies Forum Series,” 中部高等学術研究所, **95** (2016) 総ページ数/28.

学 校 名	大 阪 成 蹊 短 期 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	廃棄羊毛屑のリサイクルによる高機能再生繊維の作成 ー再生羊毛のナノファイバーシート化ー		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①羊毛 ②ケラチンタンパク質 ③再生繊維 ④リサイクル ⑤ナノファイバー			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
澤 田 和 也	総 合 生 活 学 科	教 授	研究総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
藤 里 俊 哉	大 阪 工 業 大 学 大 学 院 部 工 学	教 授	実験(ケラチン再生繊維化)
吉 村 由 里 香	地 方 独 立 行 政 法 人 大 阪 市 立 工 業 研 究 所 生 物 ・ 生 活 材 料 研 究 部 機 能 性 色 材 研 究 室	室 長	実験(再生ケラチンの物性評価)

廃棄羊毛屑のリサイクルによる高機能再生繊維の作成 ー再生羊毛のナノファイバーシート化ー

1. 研究の目的

(1) <研究背景その1>

再生繊維の実用は、セルロースを材料として既に古くからおこなわれている。また、近年ではナノファイバー化に関する研究も進み、その応用分野も広範にわたっている。一方、セルロースと同じく天然由来素材である動物繊維のタンパク質については、一部で研究例があるものの再生繊維化は進んでいない。特に、我々にとって最も身近な羊毛については再生繊維化された例は見当たらない。

また、羊毛については、その紡績過程において繊維屑が大量に発生し、それらの多くは廃棄処分されている。もし、これらの繊維屑を利用してそれらから再生繊維を作成することが可能であれば、資源のリサイクルにも繋がる。

<研究背景その2>

近年注目されている組織再生による再生医療の発展には、細胞が増殖するための足場となるスキャフォールドの開発が不可欠である。また、スキャフォールドを含み生体内で使用することを前提としたバイオマテリアルに応用するための材料には、「適切な力学特性」および「生体親和性」という両面の特性が要求される。一般に、合成高分子は前者に優れ、天然高分子は後者に優れているが、両者を満足する材料は未だ開発されていない。現在のところ、最も一般的に用いられている材料は、コラーゲンである。コラーゲンは生体を構成している構造タンパク質であり、優れた特性を有しているが、牛海綿状脳症（BSE）の問題が浮上して以降、その安全性が危惧されている。そして、現在もその代替品の開発が待たれている。

(2) 以上のような背景をもとに、本研究では二つの観点から表題の研究テーマに着想した。

第一点目は、動物由来のタンパク質繊維の再生繊維化であり、上記の通り廃棄羊毛のリサイクルに繋げることを目的としている。更には、下記記述の第二点目とも関連するが、バイオマテリアルへの応用をターゲットとした場合、廃棄羊毛のみならずヒト毛髪に適用することも可能である。ヒト毛髪は、廃棄羊毛屑と比べ、毎日大量に産業廃棄物として処分されている。廃棄される羊毛屑だけでなく、従来まで全く利用価値の無かった廃棄毛髪を利用することが出来れば、究極のリサイクルにつながる。さらに、その資源はヒトが生存する限り永久的に、安定かつ大量に、そして安価に入手可能なバイオマスの活用と言える。

第二点目は、生体内に移植することを前提とした材料として、病原性因子を排除した非血管性由来の構造タンパク質を活用することを目的としている。この点において、毛や爪等の主成分を構成しているケラチンはその材料として適しており、さらに細胞接着性タンパク質として知られているフィブロネクチンと同様に、細胞の接着に関与するアミノ酸配列（RGD、LDV等）がケラチン分子内に存在することから、バイオマテリアルとして応用できる可能性を十分に有している。もし、羊毛由来ケラチンの基礎検討を終えた後、その原材料を同じ動物由来毛であるヒト毛髪に適用することが可能であれば、バイオマテリアルとして異種由来動物ではなく、同種由来が利用できることになり、さらに安全性は高まる。そして、究極には自分自身の毛髪を利用することが可能であれば、自家由来材料による移植組織の作成が可能となり、最も理想的な素材と成り得る可能性を有している。

以上の経緯と最終達成目標を総合的に勘案し、本申請課題では、研究実施計画期間内に、以下の4項目を達成することを到達目標とする。

- ① 紡糸原液組成と生成するナノファイバーとの関連性を評価する
- ② ナノファイバーシート内の孔径をコントロールするための操作パラメータの評価
- ③ 生成ナノファイバーシートの物性評価
- ④ 高機能化するためのコンポジット化評価

現段階で、羊毛繊維を単独でナノファイバー化した例は見当たらない。本研究は最終目的としてバイオマテリアルをターゲットとしているが、動物繊維の再生繊維化そのものが達成されていない。従って、本申請課題であるナノファイバーシート作成技術は、最終応用目的のバイオマテリアル応用のみならず、衣料用繊維はもちろん、化粧品関連や産業材料、医療材料等、セルロース再生繊維と比較して幅広い分野への応用化が可能である。

2. 研究の計画

研究期間2年目の当該年度においては、上記③に記載の“ナノファイバーの物性評価”に着手する。また、昨年度の継続申請時に記載した通り、将来のバイオマテリアル応用におけるケラチンナノファイバー上での細胞増殖性を考慮し、ナノファイバーの配向性制御を追加項目に挙げ、検討に着手する。尚、③のナノファイバーの物性評価については、(バイオマテリアル応用への観点から)以下の点を重要項目として挙げ、検討を実施する。(一部実施中)

- 1) 作成したナノファイバーシートの精製(不純物除去)度の評価
- 2) 親水性度の評価
- 3) 力学強度の評価(引張り試験)
- 4) In vitroにおける生分解性評価

3. 研究の成果

上記記載の1)については、紡糸時に増粘剤として添加したPEGの除去および残存について評価した。具体的に、ナノファイバーを塩素系有機溶媒とリン酸緩衝溶液中に浸漬することで、PEGの選択的溶解抽出を行い、抽出液およびナノファイバーの両者をFT-IRにより評価した。その結果、浸漬時間の経過と共にナノファイバー中のPEG量は減少し、機器分析における測定では最終的にPEGの残存は確認されなかった。2)においては接触角測定および吸水性試験を行い、表面が極めて高い疎水性であることが示された。これは、ケラチンそのものの性質由来ではなく、表面のナノ構造に起因する物理的構造と関連していることも判明し、細孔サイズを調整することで表面親水性をある程度任意にコントロールできることも明らかとなった。3)においては引張り試験による強度評価を実施し、紡糸時の各種パラメータを変化させた際のナノファイバーシートの破断限界強度、伸び率、ヤング率を系統的に調べた。そして、ナノファイバーの組成と強度に関する有益な知見を得ることが出来た。4)においては、プロテアーゼ(セリンプロテアーゼ)を用い、in vitroでのケラチンナノファイバーの生分解性評価を行った。架橋度の差により分解速度に差はあるものの、その速度を制御できることから、その詳細を現在検討中である。

次に、昨年度に追加項目としたナノファイバーの配向性については、現在予備検討を行っている。配向性制御には、コレクターの回転を工夫することが重要であると予測される。しかし、本年度は当初計画の研究予算に変更が生じたため、回転コレクターの導入を最終年度に延期し、一般的な攪拌装置を改良することで代用し、導入的な検討を始めた。その結果、コレクター面積や回転速度の調整により、配向性に変化が生じる傾向にある、という知見が得られた。現時点では、コレクター回転数や径の不足、および回転により生じる風圧等、装置的要因により明確なデータは得られていない。しかし、これらの予備検討データから、最終年度の装置導入により、任意の配向性制御が期待される。尚、前記③ナノファイバーの物性評価は、無配向状態の結果であるが、今後配向制御されたナノファイバーの評価も随時実施する予定である。

4. 研究の反省・考察

添加剤(PEG)を含む系においてのみ、ケラチンナノファイバーが形成されており、その残存についても評価を行った。本来、PEGは生体親和性が高く、残存があつたとしても生体への影響は無視できると考えられる。今回実施した分析の範囲では、その残存は確認されていないが、完全に除去されているかは判定できない。この点において、今後細胞や生体との親和性を評価する際に、PEGの優れた生体親和性の効果か、ケラチンの効果かを判断することが困難となる。現在、溶媒や

スピニング条件を変えて、ケラチン単独でのスピニングを試みており、その手段確立は今後の詳細な検討のために不可欠である。

生分解性の評価において、一部のプロテアーゼのみによる評価に止まっており、説得力のある議論とは言えない。少なくとも作用機構の異なるプロテアーゼそれぞれを用いて、至適条件での速度論的追跡を加えた評価が今後必要である。

また、配向性制御においては、細胞の分化誘導に極めて大きな影響を与えると考えられることから、今後その制御を着実にを行うことが課題である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Kazuya Sawada, Toshiya Fujisato, Preparation of Keratin Nanofibers for Biomedical Application, TISSUE ENGINEERING: Part A, 21, S-39, 2015

(2) 口頭発表

Kazuya Sawada, Toshiya Fujisato, Application of regenerated animal fibers for scaffold preparation, Asian Textile Conference -13 (Geelong, Australia), 2015. 11.3-6.

(3) 出版物

なし

学 校 名	東 京 電 機 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	物質生産誘導性ストレスに応答する新奇遺伝子の生理機能解析 －有用物質生産の新技术開発に向けた基盤構築－		研究分野 農 学
キ ー ワ ー ド	①コリネ型細菌 ②グルタミン酸発酵 ③ストレス応答 ④代謝制御 ⑤有用物質生産 ⑥機能未知遺伝子		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
川 崎 寿	工 学 部	教 授	研究総括、コリネ型細菌の遺伝子組換え実験、代謝産物解析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
夏 目 亮	工 学 部	教 授	遺伝子破壊株、相補株、増幅株の培養、代謝酵素の生化学的解析

物質生産誘導性ストレスに応答する新奇遺伝子の生理機能解析 —有用物質生産の新技术開発に向けた基盤構築—

1. 研究の目的

- (1) 工業的なアミノ酸生産に用いられている *Corynebacterium glutamicum* においてL-Glu過剰生成を誘導するストレスに応答して転写量が増大する新奇遺伝子（合計7種類、uk1～uk7と表記する）の生理的機能について、遺伝子破壊株および増幅株を用いた遺伝学的解析、代謝酵素の生化学的解析、代謝産物解析を通じて明らかにする。
- (2) (1)で得られた知見を基に、微生物の有用物質生産能力を利用あるいは強化する技術の基盤を確立する。

2. 研究の計画

(1) 遺伝子破壊株の構築

- ① 昨年度破壊効果が認められたuk1とuk2の2重遺伝子破壊株の構築

既に作製済みであるuk1遺伝子破壊株を親株に、既に作製済みであるuk2遺伝子破壊用プラスミドを導入し、uk1、uk2二重遺伝子破壊株を構築する。

(2) 遺伝子破壊株のグルタミン酸生産培養解析

- ① 昨年度破壊効果が認められたuk2遺伝子—遺伝子相補株、遺伝子増幅株の解析—

昨年度、uk2遺伝子破壊株は2つのグルタミン酸生産誘導条件、すなわち、ペニシリン添加条件とTween 40添加条件において、野生株と比較してグルタミン酸生産量および糖消費量に差異が認められた。そこで、本年度は、昨年度認められた差異がuk2遺伝子の破壊に由来することを確実にするために遺伝子相補株および遺伝子増幅株の培養評価を行う。尚、遺伝子相補株は、遺伝子破壊株にuk2遺伝子およびそのプロモーターを含むと推定されるuk2遺伝子上流域を搭載したプラスミドを導入した株であり、遺伝子増幅株は、野生株に前記プラスミドを導入した株である。

- ② 昨年度破壊効果が認められたuk4, 5, 6—破壊株の培養解析—

昨年度、uk4, 5, 6三重遺伝子破壊株はグルタミン酸生産誘導条件であるTween 40添加条件において、野生株と比較してグルタミン酸生産量および糖消費量に差異が認められたが、有意であるか確証が持てないレベルであった。そこで、本年度は、当該遺伝子破壊株の培養評価を繰り返し実施し、破壊効果について確証を得る。

尚、昨年度の報告書にも記した通り、uk4, 5, 6遺伝子については3つのORFが同じ向きで連続して隣接していることに加えコードするアミノ酸配列の相同性が高いため、遺伝子破壊・遺伝子増幅・遺伝子相補いずれの場合もこれら3つのORFをまとめて扱っている。

- ③ uk3遺伝子破壊株の培養解析

昨年度新たに構築したuk3遺伝子破壊株について、培養評価を実施する。

(3) 遺伝子破壊株の代謝解析

- ① uk2破壊株、遺伝子相補株、遺伝子増幅株の代謝解析

上記(2)①のuk2遺伝子破壊株、相補株、増幅株の培養評価を踏まえ、グルタミン酸以外の代謝産物の解析や酵素活性測定などの解析を行う。

3. 研究の成果

(1) 遺伝子破壊株の構築

- ① 昨年度破壊効果が認められたuk1とuk2の2重遺伝子破壊株の構築

既に作製済みであるuk1遺伝子破壊株を親株に、既に作製済みであるuk2遺伝子破壊用プラスミドを導入し、uk1、uk2二重遺伝子破壊株の構築を試みた。1回組換え株の取得には成功

したが、2回組換え株の取得には至らなかった。uk1, uk2二重遺伝子破壊は*C. glutamicum*の生育に悪影響を及ぼす可能性も考えられる。今後、今年度とは逆に、uk2遺伝子破壊株を親株に、既に作製済みであるuk1遺伝子破壊用プラスミドを導入し、uk1, uk2二重遺伝子破壊株の構築を試みる。

(2) 遺伝子破壊株のグルタミン酸生産培養解析

① 昨年度破壊効果が認められたuk2-遺伝子破壊株、遺伝子相補株、遺伝子増幅株の解析-

昨年度の培養評価では、2つのグルタミン酸生産誘導条件、すなわち、ペニシリン添加条件とTween 40添加条件において、野生株と比較してグルタミン酸生産量および糖消費量に差異が認められた。今年度の培養評価は、効果が大きかったペニシリン添加条件に絞って行った。研究の計画に記したように、遺伝子相補株は、遺伝子破壊株にuk2遺伝子およびそのプロモーターを含むと推定されるuk2遺伝子上流域を搭載したプラスミドを導入した株であり、遺伝子増幅株は、野生株に前記プラスミドを導入した株である。対照株として空ベクターを導入した株を用いた。

培養解析の結果、ペニシリン添加条件において、uk2遺伝子破壊株のグルタミン酸生産量は対照株と比べ減少する傾向がみられ、糖消費量は増加する傾向が見られた。従って、uk2遺伝子破壊株消費糖当たりのグルタミン酸生産量は対照株と比べ大きく低下した。遺伝子相補株においては野生株と類似した表現型を示す傾向が見られたことから、遺伝子破壊株で見られた表現型はuk2遺伝子破壊に由来するものであると考えられた。uk2遺伝子増幅株は、ペニシリン添加条件において、対照株に比べグルタミン酸生産量が増加する傾向、すなわち破壊株と逆の傾向が認められた。一方、糖消費量については、消費量が増加する傾向、すなわち破壊株と同様の傾向が認められたことから、uk2が糖消費に与える影響については今後更なる解析が必要と考えられた（下記(3)にて実施）。

興味深いことに、このuk2遺伝子破壊株および増幅株は、グルタミン酸生産誘導条件ではない通常の培養条件においても明確な表現型を示した。すなわち、通常の培養条件において、uk2遺伝子破壊株は野生株と比べて多くのグルタミン酸を培養液に蓄積した。このグルタミン酸蓄積量は、もちろん、グルタミン酸生産誘導時と比較すると非常に少なく1 g/L程度であるものの、野生株の約2倍と明確な違いが認められた。また、増幅株のグルタミン酸蓄積量は野生株と比較して低下する傾向が認められた。上記のペニシリン添加によるグルタミン酸生産誘導時とは逆の表現型であるが、非常に興味深い結果であり、今後さらに検討を進めることで、uk2遺伝子の興味深い機能が明らかとなれば、大変有意義な成果に繋がること期待される。

② 破壊効果が認められたuk2-当該ORFにコードされるタンパク質が機能しているかの解析-

前記①に示したように、ペニシリン添加条件において、uk2遺伝子破壊株のグルタミン酸生産量は対照株と比べ減少する傾向がみられ、糖消費量は増加する傾向が見られた。一方、uk2遺伝子は、ゲノム解析の結果、機能未知タンパク質をコードするORFと推定されているのみであり、機能解析の報告は無い。①に記した表現型が当該ORFのタンパク質による作用であるかどうかを調べるために、①で用いた遺伝子相補用プラスミドに搭載したuk2に変異を導入し、そのプラスミドによって相補できるかどうかを検討した。uk2の変異としては、N末端から2番目のアミノ酸に対応するコドン以降10番目のコドンまで、アミノ酸の置換を伴わないサイレント変異を導入した変異遺伝子を作製した。また、これとは別に開始コドンから1塩基フレームをシフトさせ、更に最初のコドンを終止コドンに変更した変異遺伝子を作製した。これら変異型uk2遺伝子をuk2遺伝子破壊株にプラスミドを用いて導入し、培養評価を行った。

その結果、消費糖当たりのグルタミン酸生産量を指標にした場合、サイレント変異遺伝子の導入は野生型遺伝子と同程度の相補が認められたが、フレームシフト変異遺伝子の導入は相補が認められなかった。従って、uk2は実際にタンパク質をコードし、そのタンパク質が機能しているものと推定された。

③ 昨年度破壊効果が認められたuk4, 5, 6—破壊株の培養解析—

昨年度、uk4, 5, 6三重遺伝子破壊株はグルタミン酸生産誘導条件であるTween 40添加条件において、野生株と比較してグルタミン酸生産量および糖消費量に差異が認められたが、有意であるか確証が持てないレベルであったため、当該遺伝子破壊株の培養評価を繰り返し実施した。グルタミン酸生産誘導条件としては、昨年度破壊の効果が認められたTween 40添加条件を用いた。

その結果、uk4, 5, 6三重遺伝子破壊株は野生株と比較して、生育にはほとんど差異が認められなかったが、グルタミン酸生産量と糖消費量は共に減少した。

④ uk3破壊株の培養解析

昨年度作製し直したuk3破壊株について、典型的な3種のグルタミン酸生産誘導条件、すなわち、ビオチン制限、Tween 40添加、ペニシリン添加にて培養を行った。

その結果、前記3種のグルタミン酸生産誘導条件全てにおいて、uk3遺伝子破壊株のグルタミン酸生産量は野生株よりも多かった。いずれの条件においても、uk3遺伝子破壊株の糖消費量は野生株よりも多い傾向がみられたが、グルタミン酸生産量の差異ほどは大きくなく、uk3遺伝子破壊株の消費糖当たりのグルタミン酸生産量は野生株よりも高かった。生育には大きな差異が認められなかったことから、uk3遺伝子破壊株においては、細胞当たりの糖消費の亢進とグルタミン酸生産方向への代謝フラックスの変換の両方が生じていると考えられた。

(3) 代謝解析

① uk2遺伝子増幅株の培養再解析と代謝解析

(2)①に記したように、uk2遺伝子増幅株は、ペニシリン添加でのグルタミン酸生産誘導条件で興味深い表現型を示したが、評価が定まらず、更なる評価が必要であった（上記(2)①参照）。更に、グルタミン酸生産誘導条件ではない通常の培養条件においても興味深い表現型を示した。そこで、uk2遺伝子増幅株について、ペニシリン添加条件とグルタミン酸生産誘導条件ではない通常の培養条件における更なる評価を行った。

その結果、ペニシリン添加によるグルタミン酸生産誘導条件において、uk2遺伝子増幅株は対照株と比較してグルタミン酸生産量が増加、糖消費量が増加する傾向が認められた。培養中期においては、uk2遺伝子増幅株は対照株と比較してより多くの酢酸を蓄積した。これは当該株の糖消費亢進と対応しており、グルタミン酸生産量の増大も糖消費亢進に起因するものと推定された。

また、グルタミン酸生産誘導条件ではない通常の培養条件においては、uk2遺伝子増幅株の培養液中のグルタミン酸蓄積量は対照株と比較して低いものであった。この時、糖消費量はuk2遺伝子増幅株と対照株で大きな違いは認められなかったが、酢酸蓄積量は、uk2遺伝子増幅株は対照株と比較して高い傾向が認められた。

以上より、uk2遺伝子は糖中枢代謝の制御に関与することが考えられた。

4. 研究の反省・考察

(1) 遺伝子破壊株の構築

① 目的の破壊株を構築するに至らなかった。uk1, uk2二重遺伝子破壊は*C. glutamicum*の生育に悪影響を及ぼす可能性も考えられる。

(2) 遺伝子破壊株のグルタミン酸生産培養解析および代謝解析

① uk2遺伝子破壊株に加え、相補株、増幅株について解析した結果、破壊株が示した興味深い表現型は目的遺伝子の破壊に起因するものであることが確定した。

② 機能未知ORFであるuk2は実際にタンパク質をコードし、そのタンパク質が機能しているものと推定された。

③ uk2遺伝子は糖中枢代謝の制御に関与することが考えられた。

- ④ uk3遺伝子破壊株においては、細胞当たりの糖消費の亢進とグルタミン酸生産方向への代謝フラックスの変換の両方が生じていると考えられた。
- ⑤ 培養解析を再現性よく実施するためには、実験者に精緻な実験技術と忍耐が必要であるため、当初の計画よりも多くの時間を費やした。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表（学会発表（ポスター発表））

竹内 孝志、山内 健太郎、夏目 亮、川崎 寿

*Corynebacterium glutamicum*機能未知短鎖ORF *NCg10917*はTCA回路鍵酵素の調節因子をコードしている。

2015年度日本放線菌学会大会（2015年9月8日、富山国際会議場）

(3) 出版物

なし