

研究助成 業績報告集

2017 年度

公益財団法人 小柳財団

創立者あいさつ

人間の健康と美を促進する研究活動を支援し、
より良い社会環境を実現するために

生命科学の健全な発展に寄与し、技術革新と人間重視の両面からより良い社会環境の実現に貢献したいと願っています。

昨今、日本の経済・社会・文化の持続的な発展のために、研究開発の重要性が再認識されています。研究開発のために様々な形の公的施策や、公益法人等により支援措置が取られ、また民間企業においても共同研究などの様々な改善や工夫が行われています。

既成の概念にとらわれず広い視野と新たな発想を持って、農林水産分野、食品分野、生物学分野において、既に存在する課題はもとより未来を見据えた潜在的な課題に取り組む基礎研究活動を応援することを目的として、公益財団法人小柳財団を設立いたしました。



公益財団法人 小柳財団
設立代表者 小柳 昌之

財団概要

財団名	公益財団法人 小柳財団
理事長	大倉一郎
設立	設立 平成 24 年 11 月 1 日
所在地	〒 101-0041 東京都千代田区神田須田町 1-24
TEL	03-5296-6299
FAX	03-5296-6259

役員一覧

評議員	小柳昌之
評議員	知野秀雄
評議員	石川和則
理事長	大倉一郎
理事	蟻川芳子
理事	小柳典子
監事	宮崎一成

2017 年度 研究助成選考委員名簿

財団役職	氏 名	経歴
選考委員長	小澤 俊彦	放射線医学総合研究所 名誉研究員 昭和薬科大学 酸化ストレス研究室 特任教授
選考委員	蟻川 芳子	日本女子大学 名誉教授 (前日本女子大学学長・理事長)
選考委員	大倉 一郎	東京工業大学 名誉教授 (前東京工業大学副学長)
選考委員	上村 みどり	帝人ファーマ株式会社 生物医学総合研究所創薬化学研究所 上席研究員
選考委員	畠中 研一	東京大学 生産技術研究所 教授
選考委員	三原 久和	東京工業大学 生命理工学院 教授

● 研究助成業績報告集 ●

2017年度

[2017年4月1日～2018年3月31日]

公益財団法人 小柳財団

目 次

1	ポリフェノール模倣高分子ポリビニルガロールの精密重合－ 共重合化を可能にするフェノール保護基の検討 研究者 > 東京大学 生産技術研究所：吉江 尚子	P.6-7
2	長寿遺伝子SIRT1による食嗜好制御機序の解明 研究者 > 群馬大学 生体調節研究所代謝シグナル解析分野：佐々木 努	P.8
3	茶葉の抗酸化物質エピガロカテキンガレートの生合成 研究者 > お茶の水女子大学 基幹研究院：加藤 美砂子	P.9
4	脂肪酸燃焼の亢進が腹部大動脈瘤の 進展・破裂に及ぼす影響の評価 研究者 > 近畿大学 農学部：財満 信宏	P.10-11
5	「健康と美」を高める抗酸化物質の機能と安全性の予測を 可能にする分子機能解析法の確立 研究者 > 東京工業大学 物質理工学院応用化学系：宮地 輝光	P.12-13
6	可視光応答型窒素添加チタニア光触媒の合理的設計 (チタニア光触媒反応の歯科口腔医療への応用を目指して) 研究者 > 大阪市立大学 複合先端研究機構：吉田 朋子	P.14-15
7	細胞外小胞(Extracellular Vesicle)を介した運動の 臓器相関メカニズムの解明 研究者 > 三重大学 保険管理センター：小林 由直	P.16
8	グアイアノライドセスキテルペノラクトンのコンビナトリアル生合成 研究者 > 大阪大学 大学院工学研究科生命先端工学専攻：關 光	P.17
9	エラグ酸のエピジェネティクス制御を介した 細胞がん化抑制に与える影響 研究者 > 名古屋市立大学 大学院薬学研究科：長田 茂宏	P.18

-
- 10 有害化学物質の効率的除去のための固体触媒開発 P.19-20
研究者 > 大阪市立大学 大学院工学研究科 化学生物系専攻：山田 裕介
-
- 11 バイオミメティクスによる新規な銅イオン選択的キレート剤の開発 P.21-22-23
研究者 > 第一薬科大学 薬学部：田畠 健治
-
- 12 軽度認知症早期発見のための体外臨床診断用酵素の開発 P.24-25
研究者 > 福島大学 理工学群共生システム理工学類：杉森 大助
-
- 13 pH感受性膜透過性ペプチドとリポソームの複合化による
新規薬物送達キャリアの開発 P.26-27
研究者 > 日本大学 生産工学部応用分子化学科：柏田 歩
-
- 14 マイクロ液滴培養技術による腸内細菌の
代謝活性シングルセルスクリーニング P.28-29
研究者 > 早稲田大学 理工学術院：竹山 春子
-
- 15 様々な含フッ素メチル基を有する新規五炭糖類の合成方法の開発 P.30-31
研究者 > 東京農工大学 大学院工学研究院応用化学部門：山崎 孝
-
- 16 生体内味覚受容体シグナリングの理解にむけた
ヒト受容体細胞外領域試料解析系の確立 P.32-33-34
研究者 > 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科薬学系：山下 敦子
-
- 17 女性ホルモン受容体に対する植物エストロゲンの
特異的作用の解明と評価手法の開発 P.35-36
研究者 > 星薬科大学 薬学部：福澤 薫
-
- 18 健康食品の機能性を発揮させるNrf2システムの
新規動物モデル開発とその活用 P.37
研究者 > 筑波大学 医学医療系：小林 麻己人
-
- 19 生活習慣病に伴う認知機能悪化に対する大豆食品の予防効果 P.38-39
研究者 > 大分大学 医学部 内分泌代謝・膠原病・腎臓内科学講座：後藤 孔郎
-
- 20 Lipid droplet形成におけるTORC2シグナル経路の機能解明 P.40-41
研究者 > 京都大学 農学研究科・応用生命科学専攻：井上 善晴
-

研究テーマ

ポリフェノール模倣高分子ポリビニルガロールの精密重合 -共重合化を可能にするフェノール保護基の検討

研究者 ▶ 東京大学 生産技術研究所：吉江 尚子（よしえ なおこ）

研究成果 ポリフェノールは植物の葉、茎、樹皮、果皮、種子などに多く含まれていいるバイオマス由来の化合物である。抗酸化作用、抗炎症性、抗菌作用といった優れた生理活性を持つものが多く、これまでに医薬品や食品添加物として利用してきた。代表的なものに緑茶に多く含まれる没食子酸エピガロカテキン、紅茶の赤色色素成分の一つであるテアフラビン、柑橘類やタマネギから多く検出される黄色色素ケルセチン、ベリーに多く含まれるミリセチン、収斂薬のひとつであるタンニン酸、カベルネ・ソーヴィニヨンの赤紫色の由来でもあるデルフィニジンなどがある。ところで、有機化学の分野で、ポリフェノールとは‘ポリ’（=たくさんの）フェノールという意味で、分子内に2つ以上のフェノール基を持つ植物成分を慣例的に指す。コーヒー豆に多く含まれるクロロゲン酸は2つのフェノール性水酸基しか持たないが、‘ポリ’フェノールである。一方で高分子化学の分野で用いられるポリマーの‘ポリ’は通常10量体以上を指し、ポリフェノールはいわゆるポリマーではない。例外もあり、成熟渋ガキに1%程度含まれる渋み物質であるポリフェノール（柿タンニン）はエピガロカテキンなどの単量体ポリフェノール12-13分子縮合した分子量1万5千程度に達する高分子化合物である（高分子化学的にも‘ポリ’フェノール）。

このように、天然には高分子量体のポリフェノールもわずかながら存在するが、その化学構造や高分子量化過程は極めて複雑であり、無作為である。私はこれまでにポリフェノールに多く含まれるガロールにビニル基を付与し、このモノマーをラジカル重合で高分子量化することで、構造が規定されたポリフェノール模倣高分子（ポリビニルガロール）を合成してきた。ポリビニルガロールは高い抗酸化活性と吸着特性を示したことから、バイオメディカル分野で応用が見込まれた。しかしながら、その際に障害となったのが最終ステップの三臭化ホウ素によるメキシ基の脱保護である。三臭化ホウ素は強いルイス酸なため、エーテル結合、エステル結合、アミド結合などを切断してしまった。そのため、エチレングリコール系、アクリル系、メタクリル系、アクリルアミド系を含む様々なモノマーとの共重合が不可能であった。

そこで本研究ではこの問題点を克服するために、メキシ基（R=Methyl）に代わる温和な条件で脱保護可能なフェノール性水酸基の保護基を探索した（図1）。具体的にはHClで脱保護可能な、シリル系保護基であるtert-Butyldimethylsilyl (TBDMS)基とアセタール系保護基であるMethoxymethyl (MOM)基を今回新たに検討した。TBDMS基で保護したモノマーは重合が進まなかった。これはTBDMS基が比較的嵩高いため、立体反発の効果によって反応性が落ちたことが原因と考えられる。一方で、MOM基で保護したモノマーは順調に重合が進み、高分子量体を与えた。

次に、MOM基で保護されたモノマーとアクリレート系モノマーであるブチラクリレート(BA)の共重合化を検討した（図2）。

図2aの合成方法は次の通りである。窒素雰囲気下、5.0 g (32.5 mmol) の3,4,5-trihydroxybenzaldehyde (THB) を、45.0 g (325 mmol) の炭酸カリウムを分散させた300 mLのアセトンに加えた。反応液を10 °Cに冷却し、クロロメチルメチルエーテル15.2 g (195 mmol) を加え、一晩還流した。



保護基 (R)	脱保護条件	結果	
Methyl	$R = \begin{array}{c} \\ H-C= \\ \\ O \end{array}$	BBr ₃	×
tert-Butyldimethylsilyl (TBDMS)	$R = \begin{array}{c} \\ H-C(=O)-C(CH3)3 \times 2 \end{array}$	HCl	×
Methoxymethyl (MOM)	$R = \begin{array}{c} \\ H-C(=O)-CH2OMe \end{array}$	HCl	○

図1. 各保護基の脱保護条件

固体物はろ過で除き、ロータリーエバポレーターで濃縮した。酢酸エチルで3回抽出を繰り返し、硫酸マグネシウム粉末を用いて有機層を乾燥した。シリカカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=2:1)で精製することで無色透明の液体、3,4,5-Tris(methoxymethoxy)benzaldehyde(TMMB)を得た。収率は65%であった。

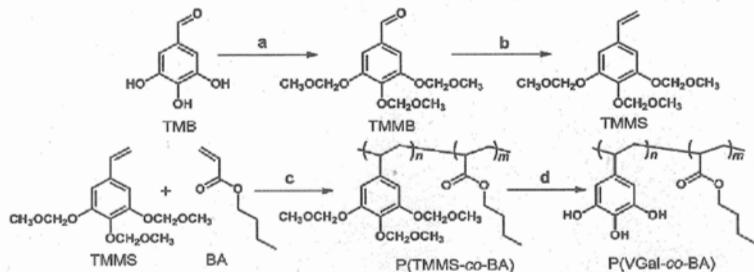


図2. ポリビニルガロール共重合体の合成経路

図2bのステップでは、TMMBのケトンをビニル基に変換した。100 mLテトラヒドロフラン中に7.0 g(19.2 mmol)のメチルトリフェニルホスホニウムプロミドを分散させ、ここに窒素雰囲気下0 °Cで12 mL(19.2 mmol) n-butyllithium(1.6 Mヘキサン溶液)を加えた。反応溶液を室温まで温めた後、4.0 g(14.2 mmol)のTMMBをフラスコに加えた後、45 °Cで一晩攪拌した。反応溶液を10 mLの蒸留水に注ぎ、ジエチルエーテルで抽出し、硫酸マグネシウム粉末を用いて乾燥した。シリカカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=2:1)で精製することで白色固体、3,4,5-Tris(methoxymethoxy)styrene(TMMS)を得た。収率は64%であった。

図2cのステップでは、TMMSとブチラクリレート(BA)を共重合化した。シュレンク管に1.0 g(3.5 mmol)のTMMS、1.8 g(14 mmol)のBA、28.7 mg(0.18 mmol)のアゾビスイソブチロニトリル、10 mLのテトラヒドロフランを入れた後、凍結脱気を繰り返し、最後に窒素を充填した。反応溶液を60 °Cに加温し、一晩攪拌した。反応溶液を0 °Cに冷却した後、ヘキサンを加えることで白色固体P(TMMS-co-BA)が沈殿した。減圧乾燥し、重量を計ったところ、収率は74%であった。

図2dのステップでMOM基を脱保護することで、P(VGal-co-BA)を得た。100 mLナスフラスコ中に1.0 gのP(TMMS-co-BA)と30 mLのn-ブタノールを入れ窒素雰囲気下、1時間攪拌した。ここに18vol% HClのn-ブタノール溶液を滴下し、一晩攪拌した。反応溶液を200 mLのヘキサンに注ぎ、生じた沈殿を遠心分離によって回収した。この沈殿をテトラヒドロフランに溶かし、再度ヘキサンへと注ぐことで再沈殿した。収率は60%であった。

温和な条件で脱保護可能な保護基を用いた合成経路を探索し、図2に示した合成経路を確立した。これによって、不可能であったアクリレート系モノマーとの共重合体化が可能になった。

論文発表: 本研究内容はアメリカ化学会が発行する査読付き学術論文誌Biomacromoleculesにて発表した。

Kan Zhan, Chaehoon Kim, Kyungmo Sung, Hirotaka Ejima, and Naoko Yoshie

"Tunicate-inspired gallo polymers for underwater adhesive: a comparative study of catechol and gallo"

Biomacromolecules, 2017, 18(9), 2959-2961

受賞: 本研究内容は下記の国際会議にて発表し、Silver Medal Award賞を受賞した。

Kan Zhan, Hirotaka Ejima, and Naoko Yoshie

Antioxidant and adhesive properties of polyphenol-inspired polymers: a comparative study of catechol and gallo

The 6th International Conference on Bio-based Polymers (ICBP2017), PD-119, Yuan Ze University, Taiwan,

May 15th, 2017

研究テーマ

長寿遺伝子 SIRT1 による食嗜好制御機序の解明

研究者 ▶ 群馬大学 生体調節研究所代謝シグナル解析分野：佐々木 努（ささき つとむ）

研究成果

まず初めに神経系特異的なSirt1増加マウスと欠損マウスの食行動を解析した。その結果、脳全体でSIRT1タンパク量が2倍に増加したSIRT1増加マウスでは、高脂肪食嗜好性は高まったが、高ショ糖食への嗜好性は減弱した。他方、脳全体でSIRT1を欠損させたマウスでは、高脂肪嗜好性は減弱し、高ショ糖食嗜好性は高まった。つまり、脳のSIRT1は脂質嗜好性を高め、炭水化物嗜好性を減弱させることがわかった。

次に、炭水化物嗜好性の制御機序の解明を先行させた。まず、炭水化物嗜好性の制御に関する因子を、脳特異的SIRT1増加マウスと欠損マウスでの遺伝子発現プロファイルの比較をもとに探索した。その結果、炭水化物嗜好性を抑える効果があることが報告されていたオキシトシン(Oxt)遺伝子の発現が、SIRT1により正に制御されていた。また、炭水化物嗜好性が抑制されている脳特異的SIRT1増加マウスへのOxt受容体拮抗薬投与は、炭水化物嗜好性の抑制を解除した。つまり、脳SIRT1による炭水化物嗜好性の抑制には、Oxtの受容体への作用が必要だとわかった。

次に、OxtニューロンのSIRT1が「炭水化物嗜好性の抑制」という表現型を引き起こすのに十分かを検証するために、Oxtニューロン特異的なSIRT1増加・欠損マウスを作成し、解析した。その結果、OxtニューロンのSIRT1の発現量の操作だけで、炭水化物嗜好性が変化することがわかった。

さらに、どんな炭水化物に反応するかを探索し、すべての炭水化物ではなく、単純糖質への嗜好性だけが、SIRT1により低下することが判明した。そして単純糖質の摂取を脳のOxtニューロンに伝えるシグナルを検討し、単純糖質を摂取した後に、肝臓から分泌されるFGF21がOxtニューロンに作用することを発見した。そしてFGF21は、Oxtニューロンの活性化と、Oxtの遺伝子発現の両方を促進することを明らかにした。また、SIRT1は、FGF21の感受性を促進し、単純糖質→FGF21→Oxtニューロンによるネガティブ・フィードバック制御を増強させ、炭水化物嗜好性を抑制していた。

FGF21によるOxt遺伝子の転写制御メカニズムも解明しました。FGF21シグナルの下流にあるAktの経路を介して、転写因子NRF2の活性化が、Oxt遺伝子発現を引き起こすことを発見した。またSIRT1はFGF21受容体の構成要素である β -Klothoの発現促進と、NRF2の活性化促進を介して、Oxt遺伝子発現を促進することを解明した。

脂質嗜好性の制御メカニズムに関しては、現在検討を続けている。少なくとも特定脂質に対してのみ嗜好性が高まっていることを見出した。現在、その脂質を摂取したという情報を脳に伝えるシグナル経路と、脳内で脂質嗜好性の促進を担う分子の両方を探索中である。

論文:Nature Communications, under review

受賞:私が指導している松居翔研究員が、本研究の成果を第38回日本肥満学会(2017/10/7-8)で発表し、若手研究奨励賞(YIA)を受賞した。

研究テーマ

茶葉の抗酸化物質エピガロカテキンガレートの生合成

研究者 ▶ お茶の水女子大学 基幹研究院：加藤 美砂子（かとう みさこ）

研究成果

チャ葉 (*Camellia sinensis*) には抗酸化物質であるカテキン類が多量に存在している。カテキン類はエピカテキン(EC)、エピガロカテキン(EGC)、エピカテキンガレート(ECG)、エピガロカテキンガレート(EGCG)の4種が含まれている。本研究では、最初にチャ葉のカテキン類を分析するHPLCによる分析系を構築した。カテキン類は凍結乾燥したチャ葉から65°Cの70%メタノールで抽出し、遠心分離して残渣を取り除いてメスアップした試料を分析に供した。HPLC分析では、固定相として Shim-pack VP-ODS (150 × 4.6 mm, Shimadzu)を、移動相としてアセトニトリルと0.5%ギ酸の濃度勾配を用いた。その結果、4種類のカテキン類の分離に成功した。さらに保持時間から推定したそれぞれのカテキン類の同定を確実なものとするために、LC-MS (QTRAP System2000)で質量スペクトルの解析を行って化合物を同定した。各ピークの化合物を同定した後に内部標準法によりカテキン類の存在量を求め、葉齢との関係を解析した。その結果、葉齢とカテキン量には明確な相関関係は見られなかった。

カテキン類の骨格はシキミ酸経路で合成されるが、EGCとEGCGにはガレート(没食子酸)が結合している。この結合には、ガロイルトランスフェラーゼが関与すると推定されているが、この酵素は同定されていない。ガロイルトランスフェラーゼは、 β -グルコガリンのガロイル基をカテキン類に転移すると思われる。過去にガロイルトランスフェラーゼの部分精製が行われ、MALDI-TOF-MSの分析により得られたアミノ酸部分配列が報告されている(Liu et al. 2012)。この論文で報告されたアミノ酸配列を元にデイジェネレートプライマーを作製し、ガロイルトランスフェラーゼのcDNAの単離を試みた。ガロイル化されたカテキン類の含有量は葉齢による大きな差異はなかったので、チャのRNAは第3葉からCTAB法で抽出した。cDNAは3'-Full RACE CoreSet (TaKaRa)により、dT-3sites Adaptor Primerを用いて合成した。このcDNAをテンプレートにPCRを行った結果、2種の約400bpのcDNA断片を得ることに成功した。

このcDNA断片は、既知の配列との相同性がなく、連続したアミノ酸をコードしていることから、ガロイルトランスフェラーゼ遺伝子の一部である可能性が高い。現在、RACE法を用いて、このcDNA断片の全長の単離を行っている。

Liu ,Y., Gao, L., Liu, L., Yang, Q., Lu, Z., Nie, Z., Wang, Y. and Xia, T. Purification and characterization of a novel galloyltransferase involved in catechin galloylation in the tea plants. (*Camellia sinensis*) (2012) *J. Biol. Chem.* 53: 44406-44417.

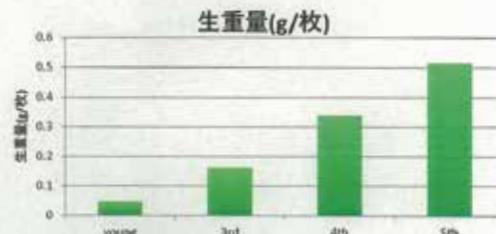
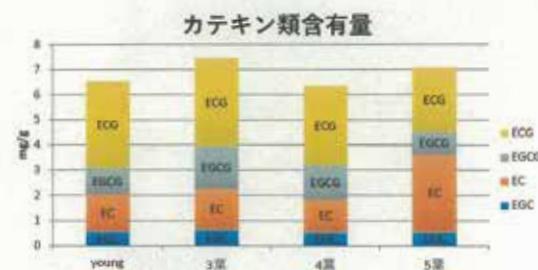


図 葉齢に伴うカテキン類の変化

研究テーマ

脂肪酸燃焼の亢進が腹部大動脈瘤の進展・破裂に及ぼす影響の評価

研究者 ▶ 近畿大学 農学部：財満 信宏（ざいま のぶひろ）

研究成果

大動脈瘤とは大動脈の進行的な拡張を主病変とする疾患であり、拡張した大動脈は最終的に破裂する。大動脈の破裂及び解離による死亡は、日本人の死因の10位前後に位置するにもかかわらず、有効な薬物療法や食事による予防法は確立されていない。本研究では、大動脈瘤のうちで最も発症頻度の高い腹部大動脈瘤に焦点を当てた研究を行った。

我々はこれまでにヒト腹部大動脈瘤組織の病理解析によって、腹部大動脈瘤血管壁では循環不全が生じていることを発見した（Plos One 2013）。この知見をもとに、ラットの腹部大動脈血管壁に人工的に循環不全を誘導した結果、ラット腹部大動脈に瘤が形成され、血管壁の循環不全が腹部大動脈瘤の発症原因であることがあきらかになった（Plos One 2015）。また、腹部大動脈瘤による死因のほとんどは瘤の破裂によるものであるが、これまで瘤がなぜ破裂するのかという点については不明であった。申請者はヒト病理組織解析と、モデル動物を統合的に解析し、腹部大動脈瘤の破裂の原因が血管壁における脂肪細胞の異常出現であることを明らかにした（J. Vasc Res. 2015, Sci Rep 2016）。これまでの研究により、中性脂肪合成抑制効果と抗炎症機能を併せ持つ高度不飽和脂肪酸を含む魚油の投与によって、モデル動物に形成される腹部大動脈瘤の破裂が抑制できることが分かった。腹部大動脈瘤の破裂が抑制された群では、血管壁の脂肪細胞の量と脂肪細胞から放出されるアディポサイトカインが抑制されおり、血管壁の脂肪細胞の量を制御することによって、腹部大動脈瘤の破裂を抑制できる可能性が示された。本研究では、脂肪の蓄積を抑制する作用を有する中鎖脂肪酸が腹部大動脈瘤の進展と破裂にどのような影響を及ぼすのかを評価することを目的とした。

平均体重に及ぼす影響

日常的に摂取可能な中鎖脂肪酸供給源としてココナッツオイルを選択した。高脂肪食に加えてココナッツオイルを40日間経口投与した群の平均体重は蒸留水を投与したコントロール群と比較して有意差はなかった。

血糖値、血清中性脂肪値、血清コレステロール値に及ぼす影響

ココナッツオイル投与群の血糖値、血清中性脂肪値、血清コレステロール値はコントロール群と比較して有意差はなかった。

臓器重量に及ぼす影響

ココナッツオイル投与群の肝臓、精巣周囲脂肪、心臓、腎臓重量（体重で補正）はコントロール群と比較して有意差はなかった。

腹部大動脈瘤の発症率、破裂率に及ぼす影響

ココナッツオイル群の腹部大動脈瘤発症率、破裂率はコントロール群と比較して有意差はなかった。

腹部大動脈瘤径に及ぼす影響

ココナッツオイル群の腹部大動脈瘤径はやや減少する傾向にあるものの、コントロール群と比較して有意差はなかった。

血管壁中の脂肪細胞の数と大きさに及ぼす影響

ココナッツオイル群の血管壁に出現する脂肪細胞数、面積ともにコントロール群と比較して有意差はなかった。

弾性線維と膠原線維に及ぼす影響

ココナッツオイル群と弾性線維の破壊程度はコントロール群と比較して有意差はなかった。膠原線維の面積にも有意差はなかった。

考察

本研究では、血管壁の破裂を誘導しやすくなる条件である高脂肪食負荷状態において、ココナッツオイルの追加投与が腹部大動脈瘤の発症率と破裂率、瘤径にどのような影響を及ぼすのかを評価した。ココナッツオイルの追加投与は脂肪分の追加投与であるにもかかわらず、腹部大動脈瘤の発症率、破裂率、瘤径に悪影響を及ぼさず、瘤径を低下させる傾向が観察された。しかしながら、いずれもコントロール群と比較して有意な差はなかった。血管壁の脂肪細胞の数と面積においても有意な差は観察されなかったことから、ココナッツオイルの投与は腹部大動脈瘤の形成に対して大きな影響を与えないことが示唆された。日常の食生活が腹部大動脈瘤に及ぼす影響はほとんど明らかになっていない。本研究の結果は、ココナッツオイルは腹部大動脈瘤患者にとってリスクの低い食品であることを示唆するものであり、食生活学的な観点からは意義のある知見であると考えられる。機能性食品の観点からは、ココナッツオイルの有効性が示されなかった原因の一つはココナッツオイルに含まれる中鎖脂肪酸含有量が考えられる。ココナッツオイルは食品成分としては中鎖脂肪酸を豊富に含むが、同時に飽和脂肪酸も多く含まれている。本研究で飽和脂肪酸を含むココナッツオイルが腹部大動脈瘤の進展に悪影響を及ぼさなかったのは、飽和脂肪酸の影響が中鎖脂肪酸の効果によって相殺された可能性が考えられる。今後は、中鎖脂肪酸の精製物を調製した試料を投与するなどの研究を計画することによって、本研究で明らかになった知見をさらに深めていきたい。

研究テーマ

「健康と美」を高める抗酸化物質の機能と安全性の予測を可能にする分子機能解析法の確立

研究者 ▶ 東京工業大学 物質理工学院応用化学系：宮地 輝光（みやじ あきみつ）

研究成果

健康と美の効用に加え、安全に且つ安心して利用してもらえるフェノール誘導体の効率的な開発を実現することを最終目的として、本研究では、フェノール誘導体が体内の酵素チロシナーゼで酸化されることで生成するハイドロキノン化合物について、その自動酸化反応における ROS 生成に寄与する化合物の電子状態を明らかにすることを目的とした。

ハイドロキノン化合物には、チロシンの水酸化によって生体内で生成するカテコール化合物である L-ドーパ、白斑疾患を惹起することで知られる 6-ヒドロキシドーパ、*tert*-ブチルカテコール、ロドデンドロールカテコール体、ベンゾキノール、ジュロキノールを選択した。

これら化合物について、空気雰囲気下、pH 7.4 のリン酸緩衝液における自動酸化反応速度を酸素電極を用いた酸素消費量の経時変化により測定した。本研究で用いた *o* および *p*-ハイドロキノン化合物はアルカリ条件下 (pH > 10) で自動酸化が進行することが知られている。この自動酸化速度に比べると、生理的条件である pH 7.4 での自動酸化速度は 100 分の 1 程度であるものの、生理的条件においても自動酸化反応が進行することを見出した。

この自動酸化反応において細胞毒性を示す ROS が生成する可能性は高い。本研究では、細胞毒性との間に相関性が見出されている ROS の一つであるヒドロキシラジカルについて、その生成量を調べた。自動酸化におけるヒドロキシラジカル生成量の測定には、DMPO (5,5-Dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide) をスピントラップ剤に用いた電子スピン共鳴 (ESR) 測定法を用いた。

DMPO 共存下、ハイドロキノン化合物の自動酸化反応を 15 分間行い、その反応液の ESR を測定した。その結果、Figure 1 に示すように、ヒドロキシラジカルを補足した DMPO (DMPO-OH) に起因する ESR シグナルが観測された。生成したヒドロキシラジカル生成量を、DMPO-OH のシグナル強度から求め

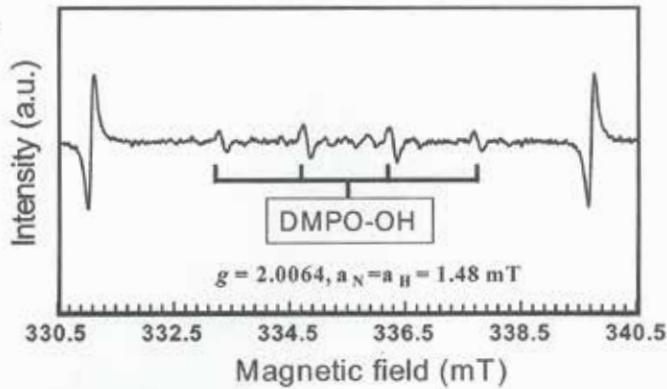


Figure 1 DMPO 共存下での L-ドーパ自動酸化反応における ESR シグナル

た。その結果、Figure 2 に示すようにヒドロキシラジカルの生成量は、自動酸化速度に比例した。すなわち、ハイドロキノン化合物の自動酸化反応に伴いヒドロキシラジカルが生成することがわかった。

カテコール化合物の自動酸化反応、すなわち酸素分子への電子の供与には、HOMOと呼ばれる分子軌道が寄与すると考えられる。そこでHOMOの軌道エネルギーを密度汎関数法による量子化学計算(DFT計算)により求め、その値と自動酸化速度との相関性を調べた。DFTにはωB97XD、基底関数には6-31++G(d, p)、水溶媒系を考慮した誘電体モデルCPCMを用いた。ハロゲン置換によって自動酸化反応速度が異なるポリクロロハイドロキノンでは、Figure 3 (A) に示すようにHOMOの軌道エネルギーが低くなるに従い自動酸化速度が高くなった。これに対して、白斑疾患を惹起するカテコール化合物においては、Figure 3 (B) に示すようにHOMOの軌道エネルギーが高くなるに従い自動酸化反応速度は高くなった。

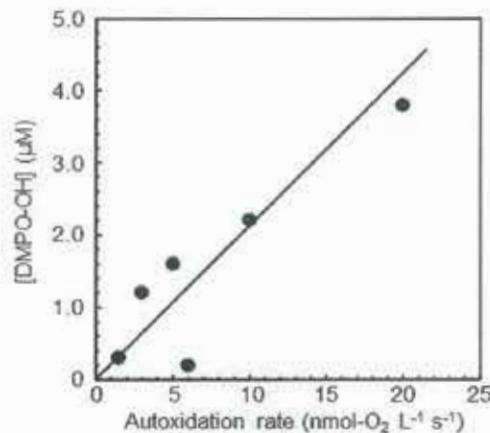


Figure 2 ハイドロキノン化合物の自動酸化速度と生成するヒドロキシラジカル生成量の相関性

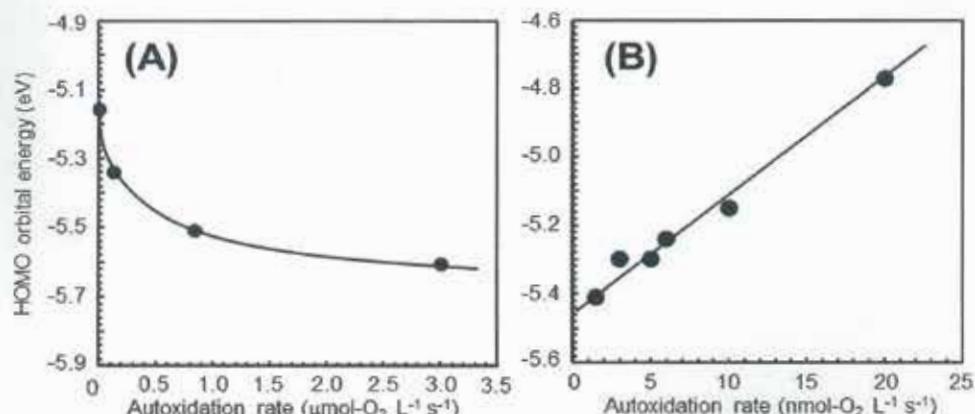


Figure 3 自動酸化反応速度とHOMO軌道エネルギーの相関性

この結果は、ポリクロロハイドロキノンと白斑を惹起するハイドロキノン化合物では、自動酸化反応機構が異なることを示唆している。今後、酸化体や環化体、二量化体を経た自動酸化反応の可能性について分析を進めることで、生体毒性を示すハイドロキノン類の自動酸化反応におけるROS生成に寄与する分子構造因子を明らかにする。

研究テーマ

可視光応答型窒素添加チタニア光触媒の合理的設計 (チタニア光触媒反応の歯科口腔医療への応用を目指して)

研究者 ▶ 大阪市立大学 複合先端研究機構：吉田 朋子（よしだ ともこ）

研究成果

チタニア(二酸化チタン)を利用した光触媒反応は、歯科人工材料の殺菌・防汚効果や、口腔癌治療に利用されており、人間の健康・美にとって欠かせない技術となりつつある。しかしこの反応が紫外光照射下でしか進行しないため、実用化の観点からチタニアの可視光応答化が重要な課題となっている。チタニアに窒素を添加すると可視光照射下でも光触媒反応が進行することが報告されているが、現在においても最適添加濃度や添加有効深さについては未だ明確な知見が得られていない。本研究では、窒素添加量・添加領域を制御できるイオン注入法を利用して、可視光応答を示す活性窒素種と不活性窒素種の化学状態の違いおよび活性窒素種を生成させるうえで有効な窒素添加量を明らかにすることを目的とした。

50 keVのN⁺イオンを室温でTiO₂(1 0 0)単結晶に照射した。イオン注入後、その一部を大気中573Kで2時間加熱処理した。SRIMコードによるモンテカルロシミュレーションから、注入された窒素濃度は深さ90nmまで単調に増加することが示唆された。これらの試料について0.01mmol/Lのメチレンブルー溶液0.5mLの光触媒分解実験を行った。光源には300W Xeランプを使用し、紫外光をカットするためのフィルター(λ > 430nm)を用いて光照射した。加熱処理前後の試料に対してUV-vis吸収スペクトル、X線光電子分光スペクトル(XPS)、全電子収量法によるX線吸収スペクトル(N K-edge XANES)を測定した。また断面TEM試料を作製し、電子エネルギー損失スペクトル(N K-edge ELNES)も測定した。

N⁺注入後のTiO₂試料は黄色を呈し、可視光領域(波長430–900nm)に吸収帯が認められた。430–550nmの吸収帯吸光度はN⁺注入量と共に単調に増加した。一方N⁺注入後に573 Kで熱処理すると550nm以上の波長領域の吸収帯が消失したことから550nmより長波長側の吸収は照射欠陥に由来するものと考えた。

N⁺注入量に対する、可視光照射MB分解量の変化を調べた結果、分解活性は注入量が3×10²¹ /m²の時に最大となり、それ以上注入すると活性は低下することが分かった。N⁺注入後に加熱処理した試料でも同様の傾向を示し、特にN⁺ 5×10²¹ /m²注入後熱処理した試料では可視光応答触媒活性は殆ど消失した。以上のように、可視光領域の吸光度の増加は必ずしも触媒活性の増加に対応していないことがわかった。

高活性試料(N⁺を3×10²¹ /m²注入した試料)と不活性試料(N⁺ 5×10²¹ /m²注入した試料)についてXPS測定をしたところ高活性試料ではTi-N結合に由来するN ls XPSピークが396 eVに確認された。このピークはTiNの397 eVのピークよりもわずかに低エネルギー側に位置しており、TiO₂の酸素サイトを置換した窒素によるものと推測される。不活性試料には、396 eVのピーク以外に、N-O結合を示すピークが401–403eVに見出された。

TiN参照試料、高活性試料、及び不活性試料各表面のN K-edge XANESスペクトルを測定した(Fig.1)。高活性試料とTiNのXANESは類似の構造を示すが、二つの主ピークの位置と相対強度が異なり、不活性試料のXANESには401eV付近に一つの鋭いピークが認められた。そこで可能な窒素の原子配置に対して、FEFFコードによるXANESのシミュレーションを行い、Fig.1に併せて示した。高活性試料のXANESはN原子が酸素原子を置換しているモデルで、不活性試料の鋭いピークはNO₂分子が酸素原子を置換しているモデルで良く再現された。

これら二つの窒素構造モデルの電子状態密度(DOS)において、前者では価電子帯上方にN 2p軌道準位が形成され、見かけ上バンドギャップが狭まることが示唆された。このため前者は可視光照射下で分解反応が進行したと考えられる。一方、後者ではバンドギャップ内の伝導帯に近い側にN 2p準位が形成される。この局在電子準位は、光照射により生成される電子—正孔再結合を促進する可能性があり、触媒活性を相殺すると推測された。

高活性試料について、位置敏感N K殻吸収端ELNES測定を行った(Fig. 2)。ELNESはXANESと同様の情報を与えるが、ナノレベルの空間分解能で深さ分析できる利点がある。試料表面近傍のELNESには、活性窒素種(置換型N)由来の398eVと401eVの2つのピークが観測されたが、試料内部のELNESほど不活性窒素種(置換型NO₂)由来の401eV付近の鋭いピークが成長した。このことから、窒素濃度の増加によって不活性窒素種(置換型NO₂)が生成されることがわかった。

SRIMコードによる計算結果から示唆されるように、本条件で調製した試料では、深さに対する窒素の濃度勾配があると予想される。そこで、高活性試料の各深さ領域についてN, O K-edgeとTi L_{2,3}-edgeを対象にELNESを測定し、吸収端の強度比から各深さ領域における局所的な窒素濃度を実際に計算した。結果をFig.3に示す。ELNESから求めた窒素濃度は表面から深さ85nmの領域まで深さに対して単調に増加した。Fig.2において、局所的な窒素濃度が高くなる試料内部ほど不活性窒素種の割合が多くなっていることから、添加した窒素の化学状態は局所的な窒素濃度に依存することが分かる。Fig. 2において、表面から25nmの深さ領域のELNESには不活性窒素種(置換型NO₂)に特有な401eVの鋭いピークが成長し始めていることに注目し、活性窒素種のみを生成させるための局所的な窒素濃度は1.8atom%未満と見積もった。

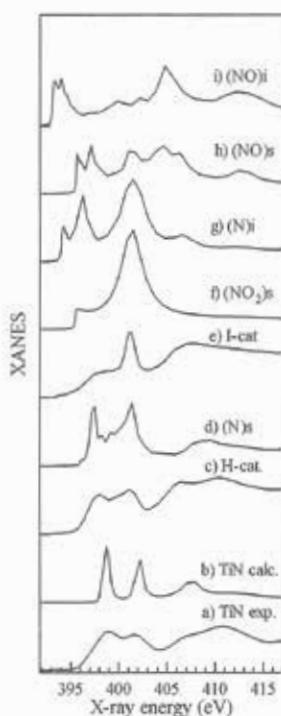


Fig. 1 N K-edge XANES spectra of (a) TiN crystal, (c) the sample N⁺-implanted with $3 \times 10^{21} \text{ m}^{-2}$, (e) that with $5 \times 10^{21} \text{ m}^{-2}$ followed by heating at 573 K for 2 h, and theoretical spectra of structure models for (b) TiN, (d) substitutional N-doping, (e) substitutional NO₂-doping, (g) interstitial N-doping, (h) substitutional NO-doping and (i) interstitial NO-doping.

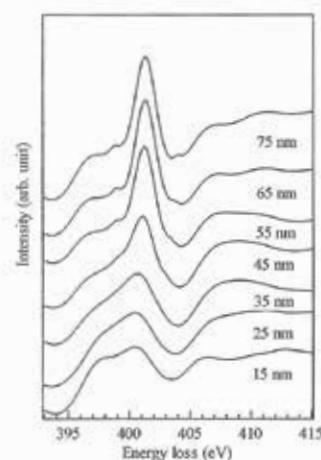


Fig. 2 Depth-resolved N K-edge ELNES of sample, N⁺ implanted with fluence of $3 \times 10^{21} \text{ m}^{-2}$.

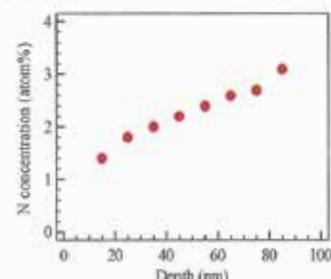


Fig. 3 Depth distribution of implanted nitrogen atoms.

研究テーマ

細胞外小胞 (Extracellular Vesicle) を介した運動の臓器相関メカニズムの解明

研究者 ▶ 三重大学 保険管理センター：小林 由直（こばやし よしなお）

研究成果

75gの経口糖負荷試験を行った203人（男性76人、女性127人、平均年齢54歳）を対象に、多機能インピーダンスを用いた身体測定データや血液データ測定を行い、ライフコードを用いた1週間の平均運動量や運動強度も測定した。血中EV数はカルセイン-AM (Invitrogen 社) で染色後、フローサイトメトリーにて測定した。

運動量は、低強度 (< 4 METS)、中強度(4~6 METS) および強強度 (7~9METS) に分けて解析したところ、1日平均歩数は全ての強度の運動量と強い正の相関を示し ($\rho : 0.75 \sim 0.80$ $P < 0.01$)、良く歩く人は良く運動する傾向にあることが示唆された。低強度運動量は、BMI、体脂肪率、収縮期及び拡張期血圧、中性脂肪と有意な負の相関を示し、HDL-コレステロールとは有意な正の相関を示したことより、強度の低い運動であっても肥満や脂質代謝の改善に寄与していることが示唆された。また中～強強度運動量(4~9 METS)はインスリン抵抗性の指標である HOMA-R と有意な負の相関を認め、比較的強い運動がインスリン抵抗性の改善に寄与していることが示唆された。

血中EV数は女性と比較して男性の方が有意に高いことが分かった ($p < 0.001$)。さらに、血中EV数はTGが上昇した人で有意に高いことが明らかとなった ($p < 0.001$)。

スペアマン解析の結果から、血中EV数は骨格筋量を含む様々なメタボリック因子と相関することが明らかになり、BMI、骨格筋量、ウエストヒップ比、収縮期及び拡張期血圧、ALT、 γ -GTP、総コレステロール、中性脂肪、空腹時血糖、HOMA-R とは正相関し、HDL-C とは逆相関が認められた。これらの中で最も強い相関を示したのは中性脂肪 ($\rho = 0.597$, $p < 0.001$) であり、HOMA-R ($p < 0.001$) と HDL-C ($p < 0.001$) とも強い相関を示した。

脂肪細胞がEVを放出している可能性を検討するため、血中EVをカラム精製してEVにおける perilipin (脂肪細胞由来)を定量したところ、メタボリック因子の異常を持つ人における血中EV中の perilipin の量は、中性脂肪と有意に相関した ($R=0.72$, $p < 0.05$)。

多変量解析により血中EV数と有意に相関する因子を解析したところ、203人全員では中性脂肪 ($t=8.55$, $p < 0.001$) 及び HOMA- β ($t=2.38$, $p < 0.05$)、男性76人では中性脂肪 ($t=4.14$, $p < 0.001$) のみ、女性127人では中性脂肪 ($t=6.95$, $p < 0.001$) 及び HOMA- β ($t=2.43$, $p < 0.05$) であった。健常者36人では中性脂肪 ($t=3.27$, $p < 0.01$) に加え骨格筋量 ($t=2.32$, $p < 0.05$) が検出された。

上記の結果から、運動によるメタボリック因子への良い影響を示すことができ、適切な運動が「人間の健康と美」のために重要な要素であることが示された。また、血中EV数は多様なメタボリック因子の上界を反映する非侵襲性バイオマーカーであることを明らかにすることことができた。健常者において骨格筋量とEV数が相関したことより、骨格筋由来のEVが存在するが、この相関は多くのメタボリック因子の異常によりマスクされている可能性が示唆された。

今後は骨格筋由来のEVの分離及びその内容分析、全身臓器に及ぼす影響(機能)を検索していく予定である。

これらの成果は国際雑誌に現在投稿中である。

研究テーマ

グアイアナライドセスキテルペンラクトンのコンビナトリアル生合成

研究者 ▶ 大阪大学 大学院工学研究科生命先端工学専攻：關 光（せき ひかる）

研究成果

セスキテルペノイドは炭素数15のファルネシルニリン酸(FPP)を共通前駆体とするテルペノイドの一群で、その構造多様性はテルペノイドの中で最大、かつ多くの有用化合物を含む。Guaianolide Sesquiterpene Lactones (GSLs) は植物セスキテルペノイドの一グループで、5員環-7員環-ラクトン環が縮合した基本構造を持つ。いくつかのGSLは骨髓性白血病幹細胞に対して選択的細胞毒性を発揮するため医薬品リード化合物として注目されている。抗がん剤として利用されるArglabinもGSLの一種である。しかしながらその構造は複雑するために製品としてのGSLは植物より抽出した前駆体からの半合成により供給されている。そのため生産効率は非効率的であり、新たな製法が求められている。そこで本研究では、生合成酵素遺伝子を利用した組換え酵母内におけるGSLのコンビナトリアル生合成を目的とした。

これまでの研究により、*Aquilaria crassna* 由来のセスキテルペン合成酵素の一種である δ -guaiene合成酵素 (AcC2)、レタス由来のシトクロムP450モノオキシゲナーゼ (CYP71AV3)、*Artemisia annua* 由来のアルコール脱水素酵素 (ADH1) とアルデヒド脱水素酵素 (ALDH1) を組み合わせてセスキテルペノイドの共通前駆物質であるFPPを高生産する代謝改変酵母株において発現させることにより、 δ -guaieneの13位の炭素が選択的にカルボキシル化されたGSLの前駆体となりうる13- δ -guaianoic acidをde novo生産することに成功している。したがって、さらに6位または8位の炭素に水酸基を導入することができれば、このカルボキシル基と脱水縮合しラクトン環を形成し酵母内でGSLの基本構造を生成できると考えた。

そこで、本研究では δ -guaieneの6位または8位を選択的に水酸化する酵素の候補遺伝子マイニングおよび酵素機能解析をおこなった。*Aquilaria* 属植物の一種である*Aquilaria sinensis*は、傷害に応答してguaieneおよびGSLを生産するとともに、他の研究者らにより行われたRNAシークエンスデータ（発現遺伝子の網羅的な部分配列情報）が公開されている。そこで、*Aquilaria sinensis* の公開RNAシークエンスデータをダウンロードした後アセンブルし、シトクロムP450モノオキシゲナーをコードする遺伝子を抽出した。さらに、候補となるP450を絞り込むため、 α -guaiene酸化活性が報告されているブドウのCYP71BE1に対して45%のアミノ酸配列同一性を示し、かつ傷害部位において発現量が顕著に上昇する計6種のP450を δ -guaiene水酸化酵素の候補として選抜した。これらのP450の酵素活性を解析するため、各P450の酵母発現ベクターを作成し、 δ -guaiene合成酵素遺伝子とともにFPP高生産酵母株に導入した。組換え酵母の培養液を酢酸エチルで抽出した後、ガスクロマトグラフィー質量分析計により分析し候補P450の δ -guaiene酸化活性を評価した。その結果、6種のうち3種の候補P450を導入した酵母培養液の抽出物からそれぞれ δ -guaiene水酸化物と推定される分子イオン[M]⁺をm/z 220にピークをもつ化合物が1種あるいは2種類検出された。

δ -guaiene酸化活性を示した3種の候補P450のうち2種から共通して検出された推定 δ -guaiene水酸化物については、13-hydroxy δ -guaieneの保持時間およびマスフラグメンテーションパターンと一致したため、13-hydroxy δ -guaieneと同定した。また、別の1種から検出された推定 δ -guaiene水酸化物については保持時間およびマスフラグメンテーションパターンが13-hydroxy δ -guaieneのものと一致しなかったことから、 δ -guaieneの13位以外の位置が水酸化されたmono-hydroxy δ -guaieneと推定され、目的としている δ -guaieneの6位または8位に水酸基が導入された化合物である可能性も考えられる。現在、本生成物について酵母培養液からの分離・精製をおこないNMRによる構造決定を行っている。また、本P450について、13- δ -guaianoic acidに対する活性を評価するための新たな酵母株を作成し、GSLが生産されるかを確認する予定である。

研究テーマ

エラグ酸のエピジェネティクス制御を介した細胞がん化抑制に与える影響

研究者 ▶ 名古屋市立大学 大学院薬学研究科：長田 茂宏（おさだ しげひろ）

研究成果

細胞のがん化は遺伝子の変異による影響に加えて、ヒストンタンパク質の化学修飾（メチル化、アセチル化など）など、エピジェネティクス制御による影響も考慮する必要がある。我々は肝化学発がん初期に発現上昇するエピジェネティクスを制御する因子を複数単離しており、そのうちのひとつがアルギニンメチル化酵素（coactivator associated arginine methyltransferase 1, CARM1）である。CARM1はヒストンタンパク質のひとつであるヒストンH3の17番目のアルギニン残基（H3R17）などをメチル化する酵素であり、様々な転写関連因子もメチル化する。エラグ酸はラズベリーなどの果物などの植物に含まれる化合物であり、化粧品の美白成分としても広く用いられている。エラグ酸がH3R17メチル化を抑制することが報告されたが、その詳細は不明である。

本研究においては、エラグ酸が細胞増殖とH3R17のメチル化に与える影響、他のエピジェネティクスを制御する酵素阻害剤との併用が細胞増殖に与える影響を検討した。さらに、がん細胞は足場非依存的に増殖可能であり、その環境を模倣した低接着状態におけるエラグ酸の効果についても検討した。

ヒトメラノーマ由来がん細胞、子宮頸がん由来細胞を含むいくつかのがん細胞に対し、エラグ酸が細胞増殖およびH3R17のメチル化に与える影響を解析した。いずれの細胞にもエラグ酸は細胞増殖阻害効果を示したが、その濃度において、細胞全体のH3R17のメチル化状態にはほとんど影響を与えたかった。また、細胞増殖に影響を与えない最高の濃度のエラグ酸存在下において一ヶ月程度培養後のH3R17のメチル化状態にも影響を与えたかった。これらのことから、細胞増殖阻害が検出され始める濃度のエラグ酸は、細胞全体のヒストンH3R17のメチル化状態に影響を与えないことが示された。今後は、細胞増殖に関わる遺伝子の発現制御領域におけるメチル化状態を検討する必要がある。

抗がん剤には様々な作用機構があり、異なる作用機構の薬剤の併用により、効果的な治療につながることがある。抗がん作用機構のひとつである核酸代謝拮抗作用を示す古典的抗がん剤として、フルオロウラシル（5-FU）がある。また、ヒストン修飾のひとつであるアセチル化は遺伝子発現の活性化を導き、脱アセチル化は不活性化につながる。トリコスタチンA（TSA）などのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は抗がん活性を示す。5-FU, TSAのがん細胞増殖阻害活性にエラグ酸が与える影響を検討した。その結果、エラグ酸添加はこれらの薬剤によるメラノーマ細胞の増殖抑制を促進したが、相乗的な抑制効果は観察されなかった。

がん細胞の特徴のひとつに足場非依存的増殖能があり、この性質はがんの浸潤・転移に関与する。通常プレートをpoly(2-hydroxyethyl methacrylate), poly-HEMAコーティングすることにより、低接着性になり、足場非依存的培養条件を模倣できる。そこで、ヒトメラノーマ由来A375-C6細胞（低転移性）、およびその株に由来する高転移性細胞株A375-SMの増殖にエラグ酸が与える影響を検討した。高転移性A375-SM細胞に比べ、エラグ酸はA375-C6細胞に感受性を示した。また、どちらの細胞においてもpoly-HEMAコーティングにより、感受性が低下した。poly-HEMAコーティングの方が、よりがん細胞の特徴を考慮した培養条件であることから、今後はpoly-HEMAコーティング条件において、エラグ酸がヒストン修飾に与える影響やエラグ酸と他剤との併用効果について検討する必要がある。

研究テーマ

有害化学物質の効率的除去のための固体触媒開発

研究者 ▶ 大阪市立大学 大学院工学研究科 化学生物系専攻：山田 裕介（やまだ ゆうすけ）

研究成果

本研究の目的は、農薬などで用いられており人体に有毒な有機リン酸エステルを効率よく低毒化・無害化するための加水分解触媒を開発することである。本目的を達するために、典型的な配位高分子であるシアノ架橋金属錯体の固体酸触媒としての活性向上を目指した研究を行った。

① シアノ架橋金属錯体の合成と構造評価

シアノ架橋金属錯体の組成式は一般に $M_x[M'(CN)_6]$ で表すことができる。まず、M'として Fe(III)、M1として Fe(III)、Ga(III)、Mn(II)、Zn(II)、Co(II)を用いた錯体を合成した。合成は、Mイオンを含む水溶液に $[M'(CN)_6]$ を含む水溶液を滴下し、得られた沈殿を水洗、乾燥する手順で行った。蛍光X線分析を用いて沈殿に含まれるMならびにM'イオンのモル比を調べたところ、MならびにM'の価数から予想されるモル比とほぼ一致していた。次に、これらの試料の粉末X線回折を測定したところ、図1に示したような立方晶の結晶構造に帰属できる回折パターンが得られた。ただし、MがZn(II)の場合には複雑

表1 蛍光X線分析により求めた種々のシアノ架橋金属錯体の化学組成

(M, M')	Formula (XRF)
(Mn ²⁺ , Fe ³⁺)	$[Mn^{II}(H_2O)_{4.2}]_{1.5}[Fe^{III}(CN)_6]$
(Fe ²⁺ ³⁺ , Fe ²⁺ ³⁺)	$[Fe^{II/III}(H_2O)_{3.9}]_{1.3}[Fe^{III/II}(CN)_6](K^+)_0.1$
(Co ²⁺ , Fe ³⁺)	$[Co^{II}(H_2O)_{4.0}]_{1.4}[Fe^{III}(CN)_6](K^+)_0.1$
(Ga ³⁺ , Fe ³⁺)	$[Ga^{III}(H_2O)_{4.2}]_{0.9}[Fe^{III}(CN)_6]$

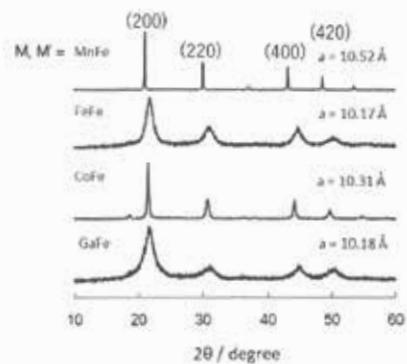


図1 種々のシアノ架橋金属錯体 $M_x[M'(CN)_6]$ から得られた粉末X線回折図形

な回折パターンを示した。これはZn(II)は八面体型の配位構造よりも正四面体の構造を取りやすいためと考えられる。次に、シアノ配位子の局所的な架橋配位構造を調べるために、赤外線吸収スペクトルの測定を行った。いずれの場合も2000-2300 cm^{-1} 付近に現れるCN伸縮振動に帰属されるピークが、C側のみに金属イオンが配位した原料錯体の場合と比べて高波数側にシフトしていた。図2aにブルシアンプルーの例を示す。これは、CN配位子のHOMOは反結合性軌道であるため、CN配位子がN側でも金属イオンと相互作用することで、より反結合性が下がりCN結合が強くなったためと考えられる。以上の結果より、目的とするシアノ架橋金属錯体が得られたことがわかった。また、固体触媒反応は表面化学反応であるのでその細孔構造を調べることも大変重要である。そこで液体窒素温度での窒素吸脱着等温線の測定を行った(図2b)。その結果、低圧部に急峻な立ち上がりが見られたことから、その細孔の大きさが1 nm以下のいわゆるミクロ孔を持つ多孔体であることがわかった。BET法を用いて求めた比表面積の大きさは384 $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ と大きいものであった。MP法を用いて細孔の細孔径を求めたところ、およそ5 Åであった。また、t-法を用いて求めた細孔内部を除く表面積の大きさ、いわゆる外表面積は、8.7 $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ であった。以下に述べる有機リン酸エステルの加水分解反応においては、基質は5 Å以上の大きさであるため、有効な触媒表面積は8.7 $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ であると考えられる。

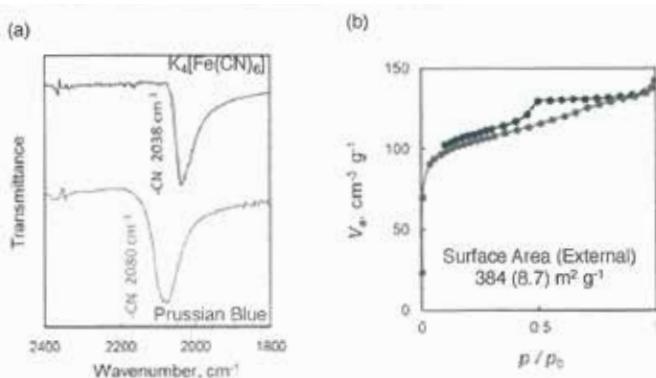


図2 ブルシアンブルー (M, M') = (Fe^{2+3+}, Fe^{2+3+})の
(a) 赤外線吸収スペクトルと(b) 液体窒素温度での窒素吸脱着等温线。

② シアノ架橋金属錯体の有機リン酸エステル加水分解に対する触媒活性評価

①で得られたシアノ架橋金属錯体を触媒として用いて、有機リン酸エステルであるパラニトロフェニルリン酸二ナトリウム塩 (p-NPP) の水溶液中での加水分解反応を行った。反応は、pH 8.3のHEPES緩衝溶液にp-NPP (25 mM) を溶解させ、60°Cでシアノ架橋金属錯体を懸濁させることで行った ($[M] = 0.25 \text{ mM}$)。一定時間経過後、反応溶液を一部取り出して一定の割合で希釈し、紫外可視吸収スペクトルの測定を測定した。反応の進行に伴い、反応基質であるp-NPPに由来する300 nm付近の吸収の吸光度は減少し、生成物であるp-ニトロフェノール(p-NP)に由来する410 nm付近の吸光度が増大した。また、340 nm付近には等吸収点が見られ、副反応が進行していないことがわかる。

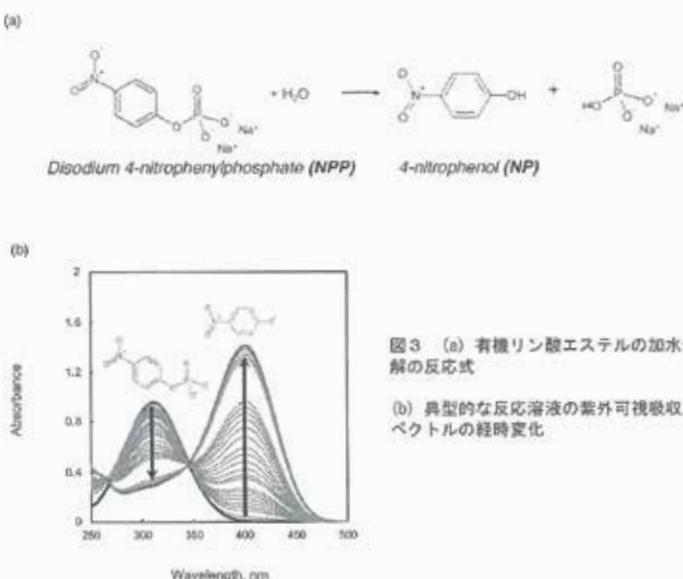


図3 (a) 有機リン酸エステルの加水分解の反応式
(b) 典型的な反応溶液の紫外可視吸収スペクトルの経時変化

それぞれの触媒を用いた反応系に対し、反応生成物であるp-NPの生成量の経時変化を調べることで反応の進行を確認した。その結果、 $Fe(III)[Co(III)(CN)_6]$ が触媒として用いた場合に最も高い活性が得られ、反応開始から24時間での基質転化率が95%に達した (触媒回転数TOF = 4.0 h^{-1})。この他にも、 $Fe(III)[Ir(III)(CN)_6]$ 、 $[Fe(III)(H_2O)1.5]4/3[Ru(II)(CN)_6]$ を触媒として用いた場合の添加率が、それぞれ90%, 81%と高い活性を示した。シアノ架橋金属錯体ではC側に結合した金属イオンは配位飽和であるため反応活性点とはならず、N側に結合した金属イオンが活性点となる。高い活性を示したこれらの錯体は、N側に結合した金属イオンが $Fe(III)$ であったことから、本反応に対しては $Fe(II)$ が活性点として適していることが分かった。

研究テーマ

バイオミメティクスによる新規な銅イオン選択性 キレート剤の開発

研究者 ▶ 第一薬科大学 薬学部：田畠 健治（たばた けんじ）

研究成果

研究背景と目的

人体には様々な重金属イオンが生体の維持に必要な必須微量元素として存在する。一方で、重金属イオンの過剰な摂取は人体に対して重篤な被害をもたらすことから、生体内における重金属の恒常性は厳密に制御されている。現在、金属イオンの過剰摂取に対する解毒薬としては、大きく分けて2つのタイプのキレート剤が用いられている。1つは、生体内で最も多く含まれる微量元素である鉄イオンに対するキレート剤であり、もう一つは、他の重金属に対するキレート剤である。鉄イオンに対するキレート剤の代表であるデスフェリオキサミンは微生物が生産する化合物であり、鉄イオンに対して高い選択性を示す。一方で、重金属に対するキレート剤としては、合成化合物であるペニシラミンが用いられる。ペニシラミンは様々な金属と結合することから、生体内に摂取した場合、有害な金属イオン以外の元素も生体外に排出する。この金属イオンに対する選択性の低さは、慢性的な金属過剰症の治療のようにキレート剤を飲み続ける必要があるような場合には、問題となる。例えば、銅イオンの過剰症として、ウィルソン病が知られているが、この病気は遺伝性の疾患であり、体内で銅イオンが蓄積するため、つねにキレート剤を摂取しなければならない。そのため、重金属に対して選択性の高い解毒剤の開発が望まれている。

メタノバクチン（図1）は、メタン資化細菌が生産する菌体外ペプチドであり、銅イオンの取り込みに関与していると考えられている。このメタノバクチンは微生物が分泌する鉄イオン以外の金属イオンの取り込みに関わるキレート化合物として、初めてその構造が明らかになった化合物であり、銅イオンと選択性に結合することが知られている。そのため、メタノバクチンは銅イオンに対する解毒剤としての利用が注目されている。しかし、メタノバクチンは生産条件が難しく大量生産に向かない。また、構造が複雑であるため、化学合成による合成も困難である。そこで、本研究では、メタノバクチンをベースとした新規なキレート化合物を作成し、その性質を明らかにすることにより、様々な重金属に選択性的なキレート剤の開発を目指すことを目的とした。

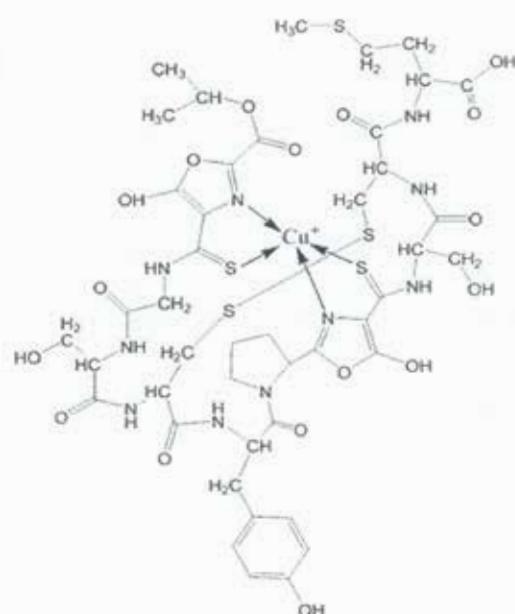


図1 銅結合メタノバクチンの構造

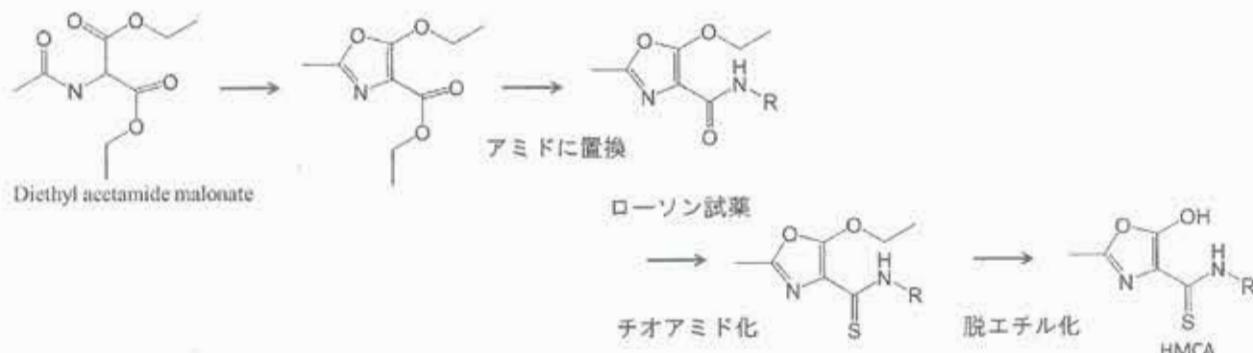
Kim HJ et al. *Science* 2004 305:1612-5.

メタノバクチンの重金属イオンに対する配位

最初に、重金属イオンとメタノバクチンの結合について調べた。本研究では、メタン資化細菌の一種である *M. trichosporium* OB3b 由来のメタノバクチンを用いた。0.4 μ M の銅イオンを含む培地で培養した *M. trichosporium* OB3b の培養上清中に亜鉛イオンを添加し、C18 を用いた固相抽出により、亜鉛結合型メタノバクチンを濃縮した。その後、過剰量の EDTA の転嫁により亜鉛イオンを脱離し、逆相クロマトグラフィーにより、金属遊離型メタノバクチンを精製した。この金属遊離型のメタノバクチンに対して、重金属イオンの結合の特異性を詳細に調べた。メタノバクチンは2価銅イオンとの結合により紫外可視吸収スペクトルに特徴的な変化を示す。すなわち、メタノバクチンは340 nm と 390 nm に2つの極大吸収を有しており、2価銅イオンを結合した直後、390 nm の極大吸収が減少する。これは2価銅イオンとメタノバクチンの会合体形成に由来する。その後、340 nm の極大吸収が緩やかに減少する。この340 nm 吸収極大の減少に伴って、2価銅イオン由来の ESP シグナルの消失が観測されることから、この2段階目の反応は2価銅イオンの還元反応に由来すると考えられる。このように紫外可視吸収スペクトルの時間変化を測定することにより、メタノバクチンの錯体形成反応を測定することができる。そこで、メタノバクチンと金属イオンの結合を吸収スペクトルの変化を観測することで調べた。その結果、 Cu^{2+} 、 Hg^{+} 、 Ag^{+} は金属遊離型メタノバクチンとの結合過程が Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} と異なることが明らかとなった。 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} は紫外可視吸収スペクトルで 394 nm の吸収のみが変化する。また、その反応速度は非常に速く、一段階で反応していると考えられた。一方で、 Ag^{+} は 394 nm の吸収スペクトルの低下に伴う変化に加え、343 nm の吸収極大波長が右シフトした。また、 Hg^{+} は 343 nm、394 nm の吸収スペクトルの低下に続き、新たに 360 nm 付近に吸収極大波長ができた。そのことより、メタノバクチンに Ag^{+} 、 Hg^{+} は結合以外にメタノバクチンの構造変化が起きていることが示唆された。さらに、 Hg^{+} のメタノバクチンとの結合の速度論的解析より 343 nm、394 nm ともに反応速度定数がほとんど同じ値を示した。そのことから、メタノバクチン中の硫黄原子と窒素原子による Hg^{+} への配位は、ほぼ同時に起きることが示唆された。

メタノバクチンの部分構造の合成

メタノバクチンは分子内に 5-hydroxy-4-methyloxazole-2-carbothioamide (HMCA) を 2 つ有しており、この 2 つの HMCA が銅イオンに配位する。これまでに HMCA をもつ化合物は他に知られておらず、この HMCA がメタノバクチンの持つ銅イオンに対する高い選択性の要因となっていると考えられる。そこで、HMCA と銅イオンとの反応機構を調べるために、HMCA を有する化合物の合成を試みた。HMCA は Diethyl acetamide malonate を原料として、以下のスキームで合成を試みた。



Diethyl acetamide malonate を五酸化二りんを用いて脱水縮合し、得られた化合物を 15% 水酸化カリウムにより加水分解を行うことにより、2-methyl-5-ethoxyoxazole-4-carboxylic acid (MECA)を得た。さらに、MECAを原料として、メチルアミドまたは、プロピルアミドによるアミド化を行い 2-Methyl-4-([N-methylamino] carbonyl]-5-ethoxyoxazole (MMCE)または、2-Methyl-4-([N-propylamino] carbonyl]-5-ethoxyoxazole (MPCE)を得た。アミド化反応は既報の方法により行った。さらに、これらの化合物について、ローソン試薬を用いたチオアミド化を行った。得られた試料の質量分析の結果、チオアミド化した化合物を合成できたことが確認できた。しかしながら、合成した MPCE は不安定であり、常温で NMR を測定中に構造変化することが観測された。今後は MMCE を用いて、脱エチル化反応について検討し、HMCA の合成を行うこととした。

まとめ

本研究では、メタン資化細菌 *M. trichosporium* OB3b が産生するメタノバクチンをモデルとした新奇なキレート化合物を合成するために、メタノバクチンの重金属結合機構の解明および、モデル化合物の合成を試みた。その結果、各種重金属に対するメタノバクチンの結合機構が明らかになった。一方で、モデル化合物の合成は、途中生成物が不安定なことから、最終的な化合物を得ることはできなかったが、今後は、目的とした HMCA を得るために、反応条件を検討する必要があることが分かった。

研究テーマ

軽度認知症早期発見のための体外臨床 診断用酵素の開発

研究者 ▶ 福島大学 理工学群共生システム理工学類：杉森 大助（すぎもり だいすけ）

研究成果

本申請研究では、認知症の早期発見に有効なバイオマーカーである「プラズマローゲン (Pls)」を特異的に加水分解し、エタノールアミン (Etn) を遊離する反応を触媒する酵素ホスホリバーゼ D (Pls-PLD) の精製法を確立し、精製酵素について酵素学的な諸特性解析を進め、当該酵素遺伝子をクローニングし、組換え発現法を確立することを目標とした。

目的酵素生産菌の培養上清から硫酸アンモニウム分画により、目的酵素を濃縮した後、疎水性相互作用クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアバタイトクロマトグラフィーに供することで目的酵素を精製した。培養上清から 187 倍まで精製し、比活性 7.4 U/mg-protein の部分精製サンプルを得ることができた。このサンプルを用いて、酵素の作用 pH と温度について調べた結果、目的酵素は pH 5.5、50°C 付近で最も良く作用することがわかった。本サンプルを電気泳動分析した結果、約 66、53、45、32 kDa の 4 つのバンドが確認された。同サンプルを用いて基質特異性試験を行った結果、Etn 型 Pls (PlsEtn) に最も良く作用し、ジアシル型基質であるホスファチジルエタノールアミンとアルキルエーテル型基質である 1-*o*-hexadecyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine に約 10% 作用したが、それ以外の類似リン脂質には活性を示さず、Pls に対する特異性が十分高いことが確認できた。また、PlsEtn の *sn*-1 位アルケニルエーテル鎖の炭素数が 18~22 のうち、二重結合を 6 つ持つ炭素数 22 の 1-(12-octadecenyl)-2-docosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine に対して高い選択性を示すことがわかった。この基質特異性は、認知症初期段階の検出に適しており、部分精製サンプル中には目的酵素が含まれていると結論づけた。各バンドを LC-MS/MS 解析した結果、53 kDa のバンドが既知ホスホリバーゼ D (PLD) と類似するアミノ酸配列が検出されたため、この 53 kDa のバンドが目的酵素を構成するポリペプチド鎖の可能性が高いと結論づけた。得られたアミノ酸配列に基づき PCR プライマーを設計・合成し、PCR 増幅を行った。得られた PCR 増幅断片の塩基配列を DNA シーケンサーで解読した結果、放線菌由来 PLD のアミノ酸配列と類似性が高いことがわかった。PCR 増幅断片の配列を元に、インバース PCR により、未解読領域の DNA 塩基配列を解析し、目的酵素遺伝子の全長塩基配列を解読した。その配列をアミノ酸配列に変換した結果、Sec 分泌シグナルと、503 アミノ酸残基の活性型タンパク質から構成されていることがわかった。

クローニングした PLD 遺伝子を大腸菌、放線菌、枯草菌を用いて異種組換え発現の検討を行った。その結果、大腸菌、枯草菌を宿主とした発現では目的酵素を生産させることができなかつたものの、放線菌を宿主とした発現では目的酵素を生産させることができた。しかしながら、活性が微弱であり、親株酵素とは異なる基質特異性を示した。そこで、さらに高度精製可能な疎水性相互作用クロマトグラフィーに供した。その結果、アイソザイムとして 3 種類のフラクションに分離し、そのうち 1 フラクションに目的酵素が回収できることができた。そこで、この活性フラクションを回収し、濃縮、電気泳動分析後に目的酵素と予想されるバンドを切り出し、トリプシン消化して LC/MS 解析することで酵素のアミノ酸配列を部分的に解析した。その結果、先に同定した酵素のアミノ酸配列とはやや異なる配列情報が得られた。そこで、このアミノ酸配列情報を元にして遺伝子クローニングを試みた。PCR 増幅を行った結果、GC 含量が高く、また高次構造

形成が原因で増幅が確認できなかった。今後、GC含量が高いDNAの増幅に対応した強力なDNA増幅酵素を用いてPCR増幅を行うなど、遺伝子クローニングを目指す予定である。

間接的成果

学術論文

- 1) Saki Yamaura, Shin-ichi Sakasegawa, Emisa Koguma, Shigeru Ueda, Yuzo Kayamori, Daisuke Sugimori, Ken Karasawa, Novel enzymatic method for assaying Lp-PLA2 in serum, *Clinica Chimica Acta*, 481, 184-188 (2018).

特許出願

- 1) 発明者：酒瀬川信一、山浦沙樹、杉森大助、出願人：旭化成ファーマ株式会社、国立大学法人福島大学、出願番号：PCT/JP2017/022051、出願日：2017.6.15

学会発表情報

- 1) コリン型リゾプラズマローゲン特異的ホスホリバーゼDの基質認識メカニズム解明を目指した部位特異的変異解析、小山貴之、酒瀬川信一、村山和隆、杉森大助、2017年酵素・補酵素研究会、2017.6.23（秋保温泉 秋保リゾートホテルクレセント、仙台市）
- 2) コリン型リゾプラズマローゲン特異的ホスホリバーゼDの基質特異性改変、小山貴之、成田悠理、酒瀬川信一、村山和隆、杉森大助、日本生物工学会 2017 年度北日本支部福島シンポジウム、2017.12.25（コラッセふくしま、福島市）
- 3) コリン型リゾプラズマローゲン特異的ホスホリバーゼDの基質特異性改変と基質認識機構の考察、小山貴之、成田悠理、酒瀬川信一、村山和³、杉森大助、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018.3.16（名城大学、名古屋）

依頼講演

- 1) 酵素はどこまで進化させられるか？：L-グルタミン酸オキシダーゼの耐熱性向上とリゾ型プラズマローゲン特異的ホスホリバーゼDの基質特異性改変を例に、日本生物工学会 2017 年度北日本支部福島シンポジウム、2017.12.25（コラッセふくしま、福島市）
- 2) 酵素の究極進化を目指して、バイオ関連セミナー、2018.2.23（北見工大、北見市）

研究テーマ

pH感受性膜透過性ペプチドとリポソームの複合化による新規薬物送達キャリアの開発

研究者 ▶ 日本大学 生産工学部応用分子化学科：柏田 歩（かしわだ あゆみ）

研究成果

これまで、われわれは細胞膜透過ペプチドとして広く研究が行われているメリチンをモチーフとした人工膜透過ペプチドの設計および合成を行ってきた。このペプチドは脂質膜相互作用セグメントとして、メリチンC末端側のアミノ酸配列を模倣したLys-Arg-Lys-Arg配列と脂質膜侵入部位として、疎水性ヘリックスセグメントLeu-Ala繰り返し配列を併せ持つ。さらに、弱酸性pH応答性を有するペプチドとして、疎水性ヘリックスセグメントの改変を行い、リポソームに対する膜透過活性評価の報告を行った(Org. Biomol. Chem. 2016, 14, 6281.)。

本研究課題ではリポソーム担体を用いた薬物送達を意識した系として、血中条件では安定に薬物担持しているリポソームがエンドサイトーシス後における弱酸性条件で自発的に薬物放出する系の構築を目指した。すなわち、弱酸性pH応答性ペプチドをコンジュゲートさせたリポソーム(pH応答型内封物放出担体)の設計と評価を行った。

報告済の弱酸性応答性ペプチドのリポソームに対する膜透過挙動が生理条件から弱酸性条件におけるpHの連続的変化への鋭敏な応答性を有するか評価を行った。蛍光消光濃度以上のカルセインを封入したEgg-PCリポソームに対し、所定濃度のペプチドを添加した後に系のpHを7.4から5.0とした際のカルセイン漏出挙動を蛍光強度測定から見積ったところ、弱酸性へのpH変化により、カルセイン漏出挙動が顕著に確認された。そこで、設計した弱酸性pH応答性ペプチドのC末端にPEG鎖(PEG5)を介し、アンカーとしての役割を果たす疎水性部位(ステアロイル基)を導入したペプチドコンジュゲートの合成を行った。得られたコンジュゲートはpH7.4の血中条件下でEggPCリポソームに安定に導入されていることが確認できたことから、弱酸性条件での挙動の評価を行った。本課題で構築する系はリポソームに導入されたpH応答性ペプチドが弱酸性条件下で自動的にリポソームに空孔を形成し、内容薬剤を徐放的に放出することが想定される。

pH応答型内封物放出担体の特性評価として、はじめに種々のpH条件下におけるリポソーム内封カルセイン漏出挙動を追跡した。その結果、予想通り、中性領域から塩基性領域において、ペプチドコンジュゲート導入リポソームはペプチドの透過活性に伴うカルセイン漏出挙動を示さなかった。一方、系のpHを5.0に変化させた際にはリポソーム中に封入された消光濃度のカルセインが外水相に放出され、希釀環境下となったことによる蛍光強度の増大が観測された。この結果は弱酸性条件下におけるペプチドコンジュゲートのリポソーム膜透過活性を示唆するものである。

リポソームに内封されたカルセインが外水相に放出された際には、同時に外水相成分の内水相への透過が並行して観測されることが予想される。そこで、本研究ではペプチドコンジュゲート導入リポソームにおける外水相成分の内水相への透過活性のpH依存性についても評価を行った。評価にあたって、リポソーム構成脂質としてEggPCに対して1 mol%の蛍光色素(NBD)標識脂質を含む混合脂質を用いた。常法に従い、直徑100 nmのペプチドコンジュゲート導入リポソームをpH7.0条件下において調製後、還元剤(亜ジチオノ酸ナトリウム)を添加することにより、脂質二重層の外水相側に存在するNBDを消光させた。そして、系のpHを5.0に

変化させたところ、さらなるNBDの消光を観測することができた。本系における蛍光消光は外水相に存在する亜ジチオニ酸が脂質二重層を透過して内水相側に移動した結果、脂質二重層内層に存在するNBDに作用したことを示しており、ペプチドコンジュゲートがリポソームに作用したことを示唆している。以上、カルセイン放出挙動と亜ジチオニ酸の内水相侵入挙動はペプチドコンジュゲート導入リポソームのpH応答型薬剤自己放出機能を支持するものである。

一方、上記のペプチドコンジュゲート導入リポソームの評価からはペプチドコンジュゲート自身が導入されたリポソームに作用しているのか、他のリポソームに作用しているのか判断することができない。本研究で目指す自己放出機能を有する系はペプチドコンジュゲート自身が導入されたリポソームに作用するものであり、その証明が必要となる。そこで、pHを中性から酸性に変化した際に観測されるリポソーム内外での物質透過過程におけるリポソームの粒径(流体力学的直径)変化を動的光散乱(DLS)法に基づいて評価した。その結果、リポソーム膜内外での物質透過が確認された系の中でリポソーム構成脂質に対し、2.0 mol%から5.0 mol%と比較的低濃度のペプチドコンジュゲートを含む系ではpH変化におけるリポソーム粒径の大きな変化は観測されなかった。したがって、低濃度のペプチドコンジュゲートを導入したリポソームにおいては本研究で目指したpH応答型自己放出機能を有していることがわかった。一方、5.0 mol%から7.5 mol%のコンジュゲートを含む系においては動的光散乱測定における粒径の増大が認められたことから、ペプチドコンジュゲートの膜透過能が他のリポソームにも及んでいることが確認された。以上の結果から、適切な濃度のペプチドコンジュゲートを導入したリポソームにおいて、pHに応答した非破壊的な自己放出機能を有していることが示された。

本研究ではリポソームと相互作用した際のペプチドの構造についても評価を行った。弱酸性pH応答性を有するペプチドコンジュゲートは中性環境下では全体的に水溶性を有する設計となっているが、酸性条件下において疎水性ヘリックス構造を形成する。そして、疎水性ヘリックス部位がリポソームの脂質二重層に侵入することにより、膜の秩序構造を乱し、内封物の放出につながる設計となっている。円偏光二色性分析によりリポソームに担持したペプチドコンジュゲートの二次構造に関して評価を行ったところ、pH7.0においてはほぼランダム構造であったのに対し、pH5.0ではヘリックス構造形成に由来するスペクトルパターンが観測された。この結果は予想通りであり、水系におけるペプチドコンジュゲートの構造変化と内封物放出活性との相関を得ることができた。

以上の成果は血中に相当する条件において薬物を担持したリポソームがエンドソーム環境下または腫瘍細胞環境下で内封薬物を自己放出するための基本系を提供しており、新規な薬物送達担体の開発において有意義なものと考えられる。本研究において得られた結果は継続研究において十分な再現性を検討することにより、7th EuCheMS Chemistry Congress での発表対象とともに、論文として公表する計画である。さらに、血中を意識した分子夾雜条件下での評価を通して、in vitro系からin vivo系へと継続的に発展させる計画である。

研究テーマ

マイクロ液滴培養技術による腸内細菌の代謝活性シングルセルスクリーニング

研究者 ▶ 早稲田大学 理工学術院：竹山 春子（たけやま はるこ）

研究成果

研究の背景と課題、目標

ヒトの腸管内には数百種類で100兆個もの腸内細菌が生息しており、これら腸内細菌叢は宿主腸管上皮細胞や粘膜免疫細胞らと複雑に相互作用することで、腸管内における複雑な共生環境「腸内エコシステム」を形成している。腸内エコシステムは通常は異種生物間クロストークのバランスによって恒常性を維持し、人々の健康維持に寄与している。しかし、そのバランスが破綻すると、腸管局所の疾患のみならず、アレルギーや代謝疾患といった様々な全身性疾患に繋がる。近年では、健康維持あるいは疾病発症への腸内細菌叢の関与に対する理解が進み、疾患と関連した内細菌叢の組成解析や腸内細菌叢が発酵代謝によって產生する有機酸（短鎖脂肪酸や胆汁酸等）の成分分析が進められている。一方で、現状の解析法は糞便中に存在する多様な微生物群集のDNA、脂肪酸をまとめて分析しているため、どの腸内細菌が特定物質の代謝・有機酸產生に関わっているのかを直接的に評価することが出来なかった。これを実現するには、腸内細菌を單一種レベルにまで分離し、個別に培養した上で代謝・有機酸產生能を評価する必要があるが、非常に操作が煩雑であり従来の分析法ではコストとスループットの両面からも実現が困難であった。

一方で、我々は、組織中の個々の細胞の超並列ゲノム解析を実現するために、マイクロ流体デバイスを基盤とした新しい1細胞解析技術の開発に取り組んでいる。これまでに、流体力学的效果を用いてマイクロ流路中の水溶液の定常流からピコリットル容量の液滴を連続形成し、これらを超微量な化学反応容器として用いる手法を提案している。この液滴に、核酸や細胞、薬剤を封入すれば、各液滴内で生化学反応を並列進行させることができる。本方式では、理論上では細胞や試薬を封入した数百万の反応環境を1時間以内に作ることが出来るため、有機酸產生に関わる腸内細菌のスクリーニングを従来法の限界を超えてハイスループットに実現できると考えた。本研究では、マイクロ液滴技術を用いた腸内細菌の代謝活性シングルセルスクリーニング技術の開発を目的とした。

【結果及び考察】

本研究では、マイクロ流体デバイスを用いた液滴形成技術を基礎とし、腸内細菌の培養技術を検討した。すでに確立しているマイクロ液滴によるシングルセルゲノム解析法などと合わせて、マイクロ液滴に閉じ込めた1種の腸内細菌から有機酸生産に加えて遺伝子配列情報なども合わせて多層な情報を取得することについて検討した。

1. 腸内細菌シングルセル封入液滴の形成と嫌気培養法の検討

乳酸菌(*Lactobacillus gasseri*)をGAM培地に懸濁した細胞懸濁液を、PDMS製のマイクロ流体デバイスに通液することで、*L. gasseri*を0.1 cell/deopで封入した粒径50 μ mの微小液滴を作成した。微小液滴を1.5 mLチューブ内に回収し、37°Cの嫌気条件下でインキュベートした。培養開始から5日後に微小液滴の顕微鏡観察

を行った結果、複数の *L. gasseri* を含む微小液滴の割合がインキュベート前より増加しており、微小液滴内での *L. gasseri* の培養が可能であることが確認された。また、腸内で重要な機能を有することが知られている嫌気性細菌 *Bifidobacterium longum* を用いて同様の実験を行った結果、*L. gasseri* と同様に微小液滴内での増殖が確認された。

2. 腸内細菌シングルセルゲノムの解析

雄のICRマウスの糞便を1.5 mLチューブに採取し、500 μ LのPBS中でMotorized Tissue Grinderを用いて固形物がなくなるまで寸断した。続いて遠心して上清を回収した後、マウス腸内微生物を集菌した。菌体のペレットをPBSで2回洗浄した後、PBS中に懸濁することでマウス腸内微生物の細胞懸濁液を得た。十字または丁字の流路形状を有するポリジメチルシロキサン製のマイクロ流体デバイスを用いて液滴内へのマウス腸内微生物1細胞の封入を行った。水相インレットから腸内微生物懸濁液を、油相インレットからオイルを導入することで0.1 cells/dropletの微小液滴を作成した。液滴内部で細胞を溶解させ、ゲノムDNAを得た。phi29ポリメラーゼなどの鎖置換合成酵素を含む全ゲノム增幅反応試薬(Repli-g Single Cell Kitなど)で、1時間から一晩の全ゲノム增幅反応を行った。その後、蛍光性DNAインターラーカレーターにて染色を行った。微小液滴をスライドガラスに滴下して顕微鏡観察の下で、マイクロビペットを用いて蛍光を示す単一の微小液滴をランダムにピックし個別にPCRチューブに回収した。回収した微小液滴に対してMDAによる二次増幅を行うことでマウス腸内微生物由来の1細胞増幅ゲノムライプラリーを獲得した。

次に、1細胞増幅ゲノムライプラリーからの全ゲノム解読を行った。ライプラリー中の各増幅ゲノムの一部を用いて16S rRNA遺伝子のV3V4領域に対するPCRおよびPCR産物のサンガーシークエンスを行った。PCR産物が取得できたサンプルについてNextera XT DNA sample prep kit (Illumina) によるライプラリ調製を行い、MiSeqを用いた全ゲノムシークエンスによって2 \times 300 bpのペアエンドリードを取得した。シークエンスデータのアセンブリを行った後、QUASTを用いてアセンブリの評価を行った。ゲノムコンプリート率およびコンタミネーションの評価にはCheckM (Parks et al. 2015) を用いた。この結果、解析した全45個のシングルセルゲノムでは、半数でゲノム解読率(コンプリート率)が50%を超えていた。またコンタミネーション率は5%以下である。このため、国際基準MISAGにおいて、Medium quality からHigh qualityとして評価される高品質のゲノム情報が得られた。

以上より、腸内細菌の培養や1細胞からのゲノム解析によって、微生物個々の代謝活性を評価するための基礎技術を確立することができた(論文準備中)。

本研究では、微生物をシングルセルレベルからハイスクールで培養するプラットフォームの構築を達成するだけでなく、その技術を用いてシングルセルレベルでの遺伝子情報解析を可能する技術の確立まで踏み込むことができた。現在、シングルセルゲノム解析は微生物の世界では大きな研究分野と発展しつつある。本研究は、この分野に大きく貢献するだけでなく、新しい産学連携への発展も期待されている。

【学会発表】

超並列シングルセルゲノム増幅産物の相互比較による高精度ゲノム解析法の開発

○小川雅人, 西川洋平, 森一樹, 細川正人, 竹山春子 日本農芸化学会2018年度大会

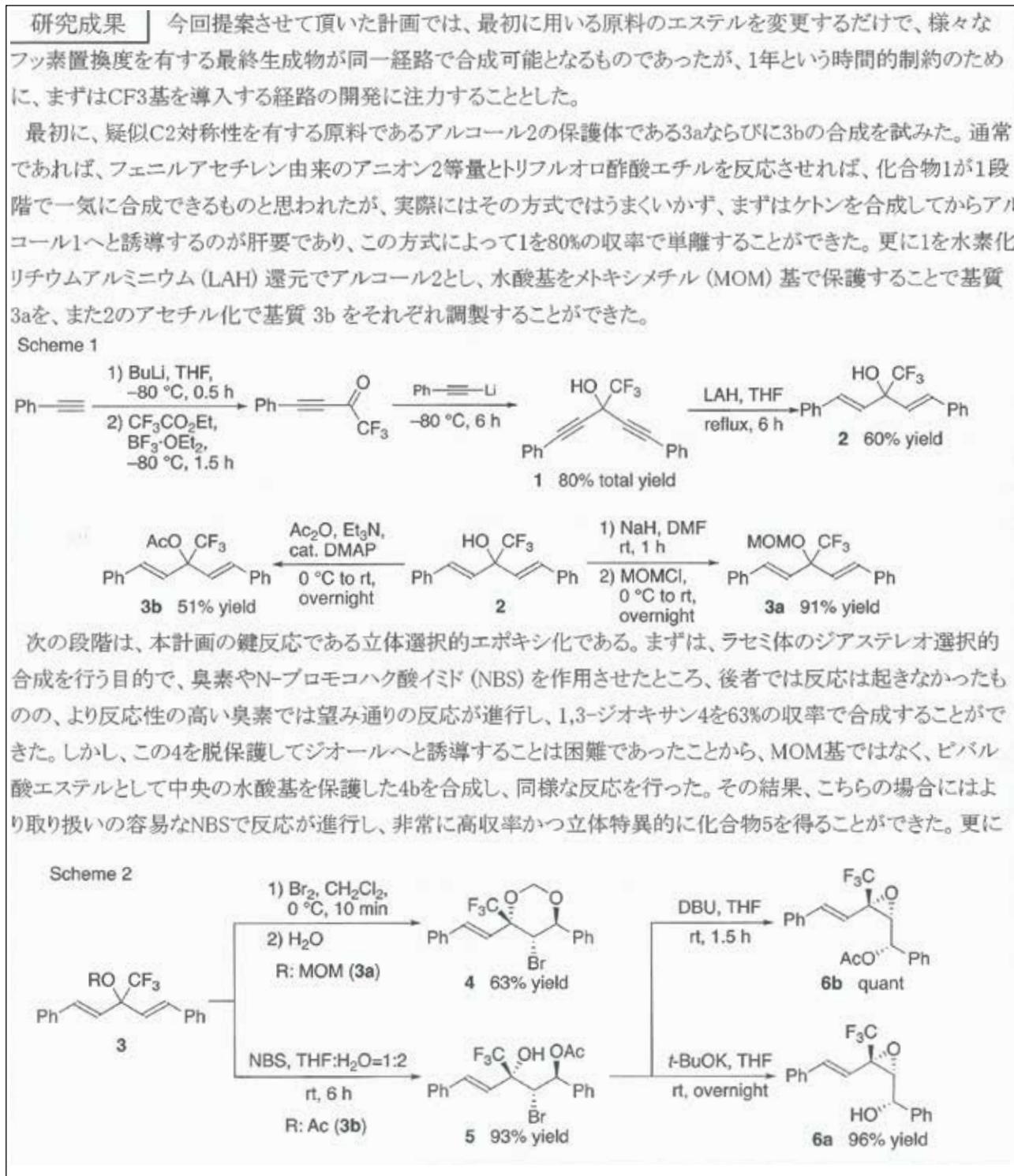
微小液滴を用いた1細胞ゲノムの並列取得と相互比較解析による高精度ゲノムの獲得

○小川 雅人, 西川 洋平, 森 一樹, 細川 正人, 竹山 春子 第7回CSJ化学フェスタ2017

研究テーマ

様々な含フッ素メチル基を有する新規五炭糖類の合成方法の開発

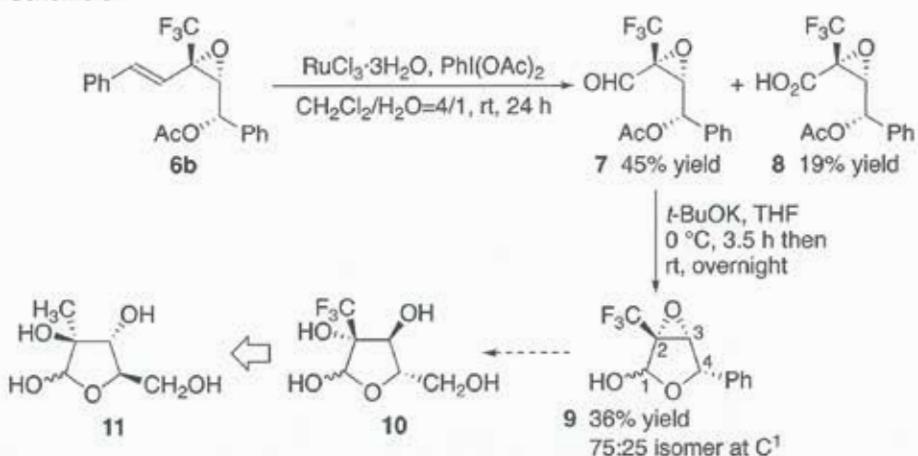
研究者 ▶ 東京農工大学 大学院工学研究院応用化学部門：山崎 孝（やまさき たかし）



をt-BuOKやDBUといった異なる塩基で処理することで、ほぼ定量的にエポキシアルコール6aや6bの立体選択的構築に成功した。

続いて、この6の各種官能基変換を検討した。まず、残存している二重結合を酸化的に開裂させて、その後の変換に有用なアルデヒドを生成させることを試みた。こうした反応にしばしば用いられる過マンガン酸カリウムや、当研究室で以前に利用経験のある塩化ルテニウム／過ヨウ素酸ナトリウムを作用させた場合には、望む開裂はほとんど進行しなかったが、塩化ルテニウムをヨウ化ベンゼンジアセタートと組み合わせると望む酸化開裂を起こすことが判明し、アルデヒド7とこれが更に酸化を受けたカルボン酸8の混合物を合成することができた。両者を分離して単離精製したアルデヒド7を用いて、更なる合成的利用の検討を行った。

Scheme 3



まず、化合物7の脱アセチル化を行うことで、ラクトール9への変換を試みることにした。様々な条件を検討した結果、t-BuOKを作用させることで望む反応が進行し、9を得ることができた。この化合物9は、 ^{13}C NMRを測定した結果、C1が五員環ラクトールに特徴的な94 ppm付近に観測されたことから、この構造を有していることが確認された。

こうして合成されたラクトール9は、1) ベンゼン環を塩化ルテニウム／過ヨウ素酸ナトリウムもしくは塩化ルテニウム／ヨウ化ベンゼンジアセタートで処理してアルデヒドへと変換後、2) 水素化ホウ素ナトリウムで還元し、3) エポキシドを酸性条件で開環させることでフラノース体10への誘導が可能になると考えられる。この10は、C型肝炎ウィルスに対して有効であることが明らかとなっているヌクレオシドを構成するフラノースである11のトリフルオロメチルアナログであり、フッ素を有する化合物の生理活性物質としての有用性を考慮に入れると、この化合物の合成を完成させることは極めて興味深い。

ここまで、今回得られた結果を示してきた。各段階について比較的簡単に既述してあるものの、それぞれの段階では、各種反応の条件を十分に検討してきていることから、残念ながら、今回はここでタイムアップとなってしまった。今後は、上記の1)から3)の変換反応を実現できる条件を見出すために更なる研究を行うと共に、CF₃基部分のフッ素置換度が異なる、ジフルオロならびにモノフルオロメチル体の合成も手がけ、最終的には光学活性体の調製の実現に向けて研究を進めていくことを予定している。もちろん、これらが揃った段階で、実際にどのような生理活性を示すかについて、試験を行っていきたいと考えている。

最後にはなったが、今回上記のような研究を自由に行うことができたのは、ひとえに貴財団からの助成を受けることができたからに他ならない。ここに深く感謝させて頂きたい。

研究テーマ

生体内味覚受容体シグナリングの理解にむけた ヒト受容体細胞外領域試料解析系の確立

研究者 ▶ 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科薬学系：山下 敦子（やました あつこ）

研究成果

【研究背景および目的】

味覚受容体は、糖やアミノ酸などによって味覚を惹起する栄養素のセンサータンパク質である。例えばヒトの口腔内には、T1rタンパク質で構成されている味覚受容体が存在し、T1r1/T1r3ヘテロ二量体がアミノ酸や核酸などのうま味物質の受容を、T1r2/T1r3ヘテロ二量体が糖など甘味物質の受容を担っている。一方近年、味覚受容体が、口腔内だけでなく全身の様々な組織に存在し、消化管におけるホルモン分泌や、精巣における精子鞭毛形成などをはじめ、生体内の様々な組織で利用されている知見が明らかになってきている。このような味覚受容体の多様なシグナリングは、食物に含まれる栄養素をはじめ、味覚受容体が応答する様々な化学物質により引き起こされていると考えられる。一方、細胞外からのどのような化学物質が、どのように味覚受容体を制御することで細胞内へのシグナリングを引き起こしているのかについての理解は、いまだほとんど進んでいない。

このような味覚受容体を介するシグナリングの詳細の理解にむけては、受容体と作用する化合物との相互作用の理解が必須であり、このためには味覚受容体タンパク質を安定して組換え発現・精製する条件の確立が必要である。一方、味覚受容体は、発現・精製が極めて困難なため、精製タンパク質を利用した解析がほとんど進んでいなかった。

申請者らは、T1r味覚受容体が脊椎動物に保存されていることを利用し、その主要な味物質の結合を担う細胞外リガンド結合ドメイン(LBD)の広範な発現・精製条件探索を行った結果、メダカ由来のアミノ酸応答性味覚受容体であるT1r2a/T1r3LBDヘテロ二量体について、安定に組換え発現・精製し、精製試料を用いた機能解析や結晶構造の決定に初めて成功した (Nango et al. Sci. Rep. 2016; Nuemket, Yasui et al. Nat. Commun. 2017)。一方で、ヒトの味覚受容体の発現・精製については、世界的にもいまだ成功例がない。そこで、すでに試料調製に成功しているメダカ受容体の発現条件を基盤に、種々の条件下でのヒト受容体発現解析を行い、ヒト受容体T1rLBDヘテロ二量体の発現・精製系を確立し、これをもとに生体内味覚受容体シグナリング理解に向けた解析系を構築することを目的に本研究を実施した。

【研究方法】

ヒト由来T1r1, T1r2, T1r3のLBD領域は、結晶構造解析に用いたメダカT1r2aLBDおよびT1r3LBDとの配列比較により決定した。これらのT1rLBD領域の遺伝子配列の下流に、発現確認に用いるためのGFP配列およびFLAGタグ配列を融合したものをpAc5.1/V5-His vector (Thermofisher Scientific)にサブクローニングし、発現ベクターを構築した。これらのベクターをリポフェクション法によりショウジョウバエS2細胞に導入し、各種の条件下での一過性発現を行った。得られた細胞培養上清画分はanti-FLAG M2 affinity gel (SIGMA)にて免疫沈降を行って濃縮、細胞画分はバッファーに懸濁後細胞溶解液を作製して、発現解析に供した。発現局在解析として、GFP蛍光検出によるFV1200 (OLYMPUS)を用いた発現細胞の共焦点顕微鏡観察を行い、発現量解析として、細胞培養上清または細胞溶解液について抗FLAG抗体 (MBL) を用いたウェスタンブロッティングを行った。また、発現産物の折りたたみ・会合状態解析として、細胞培養上清のGFP蛍光検出によるゲルろ過クロマトグラフィーを行った。

【研究結果】

(1) ヒトT1rLBDの発現解析

結晶構造解析に成功しているメダカT1r2a/T1r3LBDヘテロ二量体は、GFP融合体を用いた発現解析で良好な発現を示すことを見出し、さらにショウジョウバエS2細胞を用いた大量発現に成功している (Nango et al. Sci. Rep. 2016)。そこで、同じ条件をヒトT1rLBDに適用し、各種手法を用いた発現解析を実施した。

T1rLBDは受容体の細胞外領域に存在することから、生理的条件を再現した発現に成功した場合、小胞輸送によって輸送された発現産物が細胞外分泌画分に確認されるものと考えられる。実際、メダカT1r2a/T1r3LBDでは、S2細胞発現によって得られた細胞培養上清画分から精製することで、結晶化にも適した良質の試料が得られている。一方、ヒトT1rLBDの発現をウェスタンブロッティングで確認したところ、T1r1, 2, 3LBDの単独発現およびT1r1/T1r3またはT1r2/T1r3LBDの共発現など、実験したいずれの条件においても、ほとんどの発現産物が細胞画分に確認され、細胞培養上清画分にはほとんど分泌されないことが判明した。また、ヘテロ二量体を構成する両サブユニットの共発現による分泌発現量の向上はみられなかった。共焦点顕微鏡観察では、ごく一部に小胞輸送過程にある細胞内小器官に発現産物が局在しているとみられる細胞もあったものの、細胞全体に発現産物が留まっている細胞も多く確認された。

培養上清画分に得られた発現産物の蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィーを行ったところ、適切な折りたたみを示す鋭いピークは得られず、幅広いピークが観察された。また、T1r1/T1r3LBDやT1r2/T1r3LBDの共発現条件においても、機能単位である二量体に該当するピークが確認できず、単量体に該当するピークのみが確認された。

以上の結果から、S2細胞を用いたヒトT1rLBD発現では、適切な折りたたみや会合状態を獲得できている発現産物が極めて少なく、このことが原因となり、良好な小胞輸送と培養上清への分泌発現が行われていないことを明らかにした。

(2) メダカT1r2a/T1r3LBDの立体構造情報に基づく変異導入を行ったヒトT1rLBDの発現解析

メダカT1r2a/T1r3LBDでは、両サブユニットにアゴニストであるアミノ酸の結合が確認されている (Nuemket, Yasui et al. Nat. Commun. 2017)。このうちT1r3LBDの結合部位に、メダカT1r3とヒトT1r3とで性質が大きく異なるアミノ酸を持つ部位を見出し、ヒトT1r3での該当のアミノ酸をメダカ型に改変するE301S変異体を作製した。この変異体の発現確認を行った結果、T1r3のみの単独発現でも、T1r1またはT1r2との共発現でも、野生型と比較し発現量が低下することが判明した。また、メダカT1r2a/T1r3LBDでは、T1r2aのC344とT1r3のC132との間にサブユニット間ジスルフィド結合が形成されており、この結合がヘテロ二量体を安定化していると考えられる (Nuemket, Yasui et al. Nat. Commun. 2017)。そこで、ヒトT1rにおいてこれらに対応するCys残基や近傍に存在するCys残基をSerに置換する変異を導入したが、どの変異体でも顕著な分泌発現の向上はみられなかった。

(3) 発現制御によるヒトT1rLBD発現性向上への試み

細胞内でのタンパク質発現量の制御が分泌発現量に与える影響を調べるために、ヒトT1rLBDにタンパク質分解を誘導するデグロニン配列を付加し、発現解析を行った。発現細胞の共焦点顕微鏡観察では、野生型とくらべ顕著な細胞内局在の変化はみられなかった。一方で、ウェスタンブロッティングでの解析の結果、各サブユニット単独での発現においては、野生型と比較しデグロニン付加体では発現量が同等または低下する傾向がみられたのに対し、T1r1/T1r3LBDの共発現においては、デグロニン付加により分泌発現量が2.5~4倍程度向上することを見出した。この原因として、折りたたみ不全や局在不全にあるタンパク質を除去することで、これらが負荷となり生じていた細胞ストレスが軽減された可能性が考えられる。

【研究成果まとめ】

本研究より、ヒト味覚受容体解析系確立に重要な細胞外領域試料調製の妨げとなっているのが、組換え発現時におけるタンパク質折りたたみや会合などの構造形成不全とこれに伴う局在不全にあることを明らかにし、細胞内タンパク質を減少させるなどの発現調節によって、組換え発現効率を向上できる可能性を見出した。

【成果発表】

Kono, Y., Yasui, N., Moriya, H., Yamashita, A. "Attempt for recombinant expression of the extracellular domains of human T1R taste receptors" The 16th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, Fukuoka, November 3-4, 2017.

【謝辞】

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人小柳財団ならびに関係者のみなさまに、心から感謝申し上げます。また、本研究は、岡山大学薬学部・河野洋平氏、同医歯薬学総合研究科・安井典久博士、同異分野融合先端研究コア・守屋央朗博士のご協力を得て実施しました。また共焦点顕微鏡観察では、岡山大学自然生命科学研究支援センター、同教育学研究科・安藤元紀教授、株式会社大熊・竹下慎一氏のご協力を得ました。本研究にご協力いただいた方々に御礼申し上げます。

研究テーマ

女性ホルモン受容体に対する植物エストロゲンの特異的作用の解明と評価手法の開発

研究者 ▶ 星薬科大学 薬学部：福澤 薫（ふくざわ かおり）

研究成果

【はじめに】

女性ホルモンであるエストロゲンは、乳がんや骨粗しょう症に関わっており、そのバランスの維持に役立つと考えられるのが、大豆などに多く含まれている植物エストロゲンである。これらの物質のターゲットタンパク質であるエストロゲン受容体(ER)には2つのサブタイプ(α, β)があり、女性ホルモンである 17β -estradiolは双方に作用するが、植物エストロゲンはβサブタイプに特異性があることが知られている。本研究では、日本発の理論手法であるフラグメント分子軌道(FMO)法を用いて、ER βと様々な化合物との電子レベルの詳細な相互作用を評価し、またER αとの比較を行うことによって、サブタイプ特異性を明らかにすることを目標としている。

【方法】

計算対象は、Protein Data Bankから共結晶構造が公開されている、ER βと20個の化合物およびER αと2個の化合物との複合体構造とした。計算・解析のためのソフトウェアには、FMO計算プログラムABINIT-MPおよび可視化解析プログラムBioStation Viewerを用いた。FMO計算の理論レベルはFMO2-MP2/6-31G*とし、解析は主にフラグメント間相互作用エネルギー(IFIE)およびエネルギー成分分割法(PIEDA)を用いて行った。さらに、タンパク質との相互作用エネルギーに基づいたクラスタリング解析(VISCANA)を行って計算した化合物を分類し、実験値(文献値)との比較を行った。計算機は、福澤が代表を務めるFMO創薬コンソーシアムと連携して、スーパーコンピュータ「京」を利用した(課題番号hp170183)。尚、本助成金の一部はVISCANAの改良に用い、注目する領域からの距離に応じて結果の表示領域を変化させる機能を追加した(後述の図2を参照)。

【結果と考察】

まずサブタイプ間の違いを明らかにするために、ER αとER βに対して、 17β -estradiolと代表的な植物エストロゲンであるGenisteinが結合した複合体構造における比較を行った。リガンド結合サイトにおけるサブタイプ間の違いは、α Leu384/ β Met336、α Met421/ β Ile373の2つの疎水性残基だけであり、構造もほぼ一致している。図1に示すように、ER βにGenisteinが結合した際には、変異残基であるMet336とのCH/π

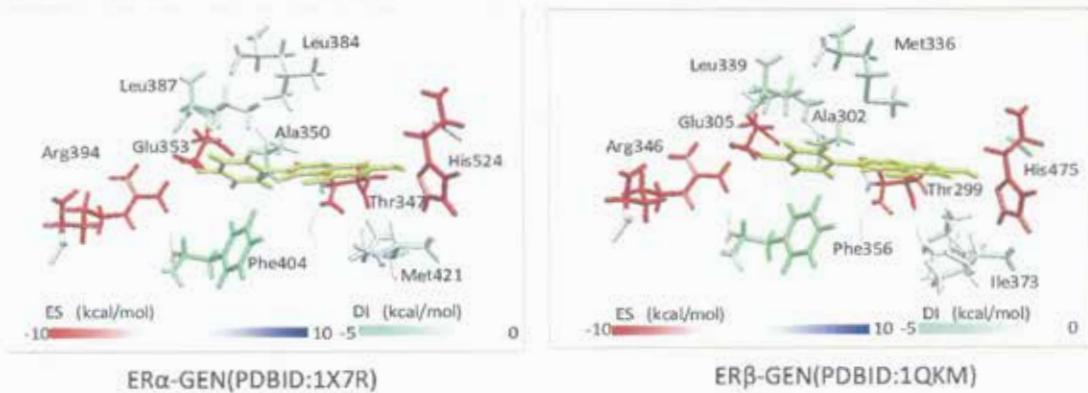


図1 (右)ER αとGenistein、(左)ER βとGenisteinとの相互作用

相互作用が強くなっていること、His475との水素結合が弱くなっていることが分かった。他方の変異残基であるIle373は、Genisteinよりもむしろ17 β -estradiolとのCH/ π 相互作用が安定であることがわかった。

次にER β と20種のリガンド化合物に対するVISCANA解析を行ったところ、4つのクラスタ(I～IV)ができ、 17β -estradiolはクラスタIに、GenisteinはクラスタIIIに分類された(図2)。全てのクラスタに共通しているのは、リガンドとGlu305の水素結合とPhe356のCH/ π 相互作用であり、これらがリガンド結合に必須の相互作用であることがわかった。クラスタ間の主な違いはHis475との水素結合、Met336およびIle373とのCH/ π 相互作用であり、クラスタIは比較的 β 選択性が高く、クラスタIIIは比較的 β 選択性の低いリガンドが属したことから、これらの残基が β 選択性に関わっていることが示唆された。

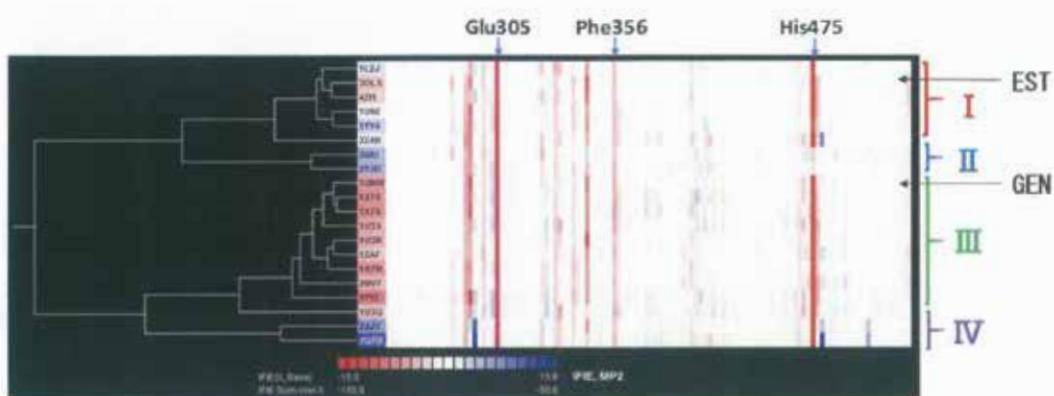


図2 ER β と20種のリガンドのVISCANA解析(リガンド周辺の20 Åを表示)

【おわりに】

本研究ではエストロゲン受容体を例にしたが、FMO量子化学計算に基づく本手法は汎用的であり、特定のターゲットに拘らず選択性の高い新薬の設計に繋がるものである。我々が「FMO創薬」と称する一連の研究開発は、従来までの古典力学的手法では解決することのできない、電子的な効果が重要となる場面に対する論理的創薬を可能にし、多くのターゲットに対する創薬を大きく効率化できると期待される。

本研究で得られた計算結果は、2018年度末に公開予定のFMOデータベースに格納する。また改良したBioStation Viewerは公開しており、今後のFMO創薬技術の開発成果と共に広く社会に還元するものである。

【研究成果の対外発表】

本研究に関する対外発表として学会発表4件を行い、また大学院講義3件において研究内容を紹介した。

- ・ 関祐哉ら「フラグメント分子軌道法によるエストロゲン受容体 β とリガンドとの相互作用解析」
第61回日本薬学会関東支部大会(2017年9月)
 - ・ Kaori Fukuzawa “In silico Drug Discovery Based on the Fragment Molecular Orbital method”
Joint symposium for Zhejiang University, Oct, 2017.
 - ・ 福澤薰「FMO創薬コンソーシアムにおける活動」FMODD・KBDD合同公開シンポジウム
CBI学会2017年大会(2017年10月)
 - ・ 福澤薰「フラグメント分子軌道法の創薬への応用」日本大学薬学部大学院講義(2018年2月)
 - ・ 福澤薰「フラグメント分子軌道法に基づくインシリコ創薬」東京医科歯科大学データ関連人材育成プログラム
(2018年2月)
 - ・ 福澤薰「フラグメント分子軌道法に基づくインシリコ創薬」城西大学薬学部大学院講義(2018年2月)
 - ・ 関祐哉ら「フラグメント分子軌道法によるエストロゲン受容体 β とリガンドとの相互作用解析」
第138回日本薬学会(2018年3月)

研究テーマ

健康食品の機能性を発揮させる Nrf2 システムの新規動物モデル開発とその活用

研究者 ▶ 筑波大学 医学医療系：小林 麻己人（こばやし まこと）

研究成果

ウコンやショウガ、ナツメグなどの食品は健康保持増進に役立つと言われているが、最近その機能発揮がNrf2システムの活性化を介している可能性が示されてきた。Nrf2システムとは、転写因子Nrf2を中心とするストレス応答型遺伝子発現誘導機構であり、酸化ストレスや親電子性物質に応答して、抗酸化ストレスタンパク質や解毒化酵素群などの生体防御遺伝子群を一斉に強力に発現誘導するシステムである。Nrf2システムは多種多様のストレスに応答して生体防御能を発揮するが、「ストレス応答能」は明快でも「ストレス防御能」は限定的にしか実証いないという課題がある。そこで研究代表者はNrf2を活性化する各種毒性ストレスに対し「ストレス応答」と「ストレス防御」の両方を同時に測定できる新規動物モデルを開発し、これを活用して各種健康食品成分の質的な比較評価を行うことを目的に本研究を行った。

研究代表者はまずモデル動物ゼブラフィッシュの5日幼魚を活用し、過酸化水素などの酸化ストレス、亜ヒ酸や水銀などの重金属、小胞体ストレスなどの細胞ストレス、に対して「ストレス応答」と「ストレス防御」の両方を同時に測定するシステムを構築した。Nrf2システムの依存性に関しては、Nrf2突然変異ゼブラフィッシュ系統を活用し、測定を行った。次にこの測定システムを活用し、ブロッコリースプラウトのスルフォラファン、ウコンのクルクミン、ショウガのジングロール、緑茶のエピガロカテキン、など十数種の健康食品の主要有効成分の「Nrf2活性化能」と「ストレス防御能」を測定した。一方、Nrf2システムと老化及び健康寿命との関連性を調べるために、Nrf2突然変異老魚の解析も開始した。同時に、Nrf2の常時活性化型系統の開発も行った。

その結果、Nrf2を強力に活性化するスルフォラファンが酸化ストレスだけでなく、小胞体ストレスに対してもNrf2依存的なストレス緩和活性を示すことを見いだした。このことはブロッコリースプラウトの摂取が小胞体ストレスを起因とする各種疾患に対する予防効果を示す可能性を示している。この研究の成果と研究代表者らの見解は、次の論文に報告した。

Mukaigasa, K., Tsujita, T., Nguyen, T.V., Li, L., Yagi, H., Fuse, Y., Nakajima-Takagi, Y., Kato, K., Yamamoto, M. and Kobayashi, M. (2018) Nrf2 activation attenuates genetic endoplasmic reticulum stress induced by a mutation in the phosphomannomutase 2 gene in zebrafish. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 115(11): 2758-2763.

一方、スルフォラファンは亜ヒ酸や水銀などの重金属毒性に対してはNrf2非依存的な共毒性を示すことを見出した。この結果は重金属汚染地域でのスルフォラファンの過剰摂取の危険性を示すものとなった。この成果は次の論文に報告した。Fuse, Y., Endo, Y., Araoi, S., Daitoku, H., Suzuki, H., Kato, M. and Kobayashi, M. (2018) The possible repositioning of an oral anti-arthritis drug, auranofin, for Nrf2-activating therapy: The demonstration of Nrf2-dependent anti-oxidative action using a zebrafish model. Free Rad. Biol. Med. 115 (2018): 405-411.

スルフォラファン以外の健康食品主要成分に関しては、重金属毒性に対して共毒性を発揮しないNrf2活性化有効成分を数種見出した。現在、その薬効と毒性を検証しているところである。Nrf2突然変異老魚解析に関しては、一歳齢成魚の段階では野生型との違いは見出せないことがわかった。現在、引き続き解析を行っている。Nrf2常時活性化型系統の開発に関しては、Nrf2の抑制分子であるKeap1の遺伝子破壊系統をCRISPR-Cas9法で作製した。この系統は少なくとも酸化ストレスに対しては高い抵抗性をもつことを明らかにできた。今後、この系統を活用してNrf2システムがもつ「ストレス防御能」の測定を行っていきたいと考えている。

研究テーマ

生活習慣病に伴う認知機能悪化に対する大豆食品の予防効果

研究者 ▶ 大分大学 医学部 内分泌代謝・
膠原病・腎臓内科学講座：後藤 孔郎（ごとう こうろう）

研究成果

①研究の背景と目標

近年、肥満を伴ったアルツハイマー型認知症(AD)の患者が増加し、ADの罹患率は脳血管性認知症を上回るようになり、ADの予防・治療法の確立が急がれている。ADの病因として最も注目されているのがアミロイド β の沈着であるが、その沈着のメカニズムの詳細は不明である。一方、脳由来神経栄養因子(Brain-derived neurotrophic factor; BDNF)は神経細胞の維持や修復に重要な働きをするタンパク質であるが、近年、このBDNF発現量がAD患限が有効であると報告されている。しかし、現代社会において肥満人口が増加する一方であることを考慮すると、運動や食事制限の実効性については疑問である。これまで我々は、小腸から合成されるglucagon-like peptide-1(GLP-1)の門脈内濃度が増加すると、脳内BDNFの発現が亢進することを明らかにしている。肥満患者では腸内環境は悪く、さらに血中GLP-1濃度が低下しているという事実を考慮すると、食物による腸内環境の改善が、ADの発症・進展を防ぐという可能性が示唆される。

以前から、大豆のなかの大豆イソフラボンには腸内環境改善作用があることが知られている。従って、大豆を積極的に取り入れれば、腸内環境がある程度維持され、脳内BDNF発現が減少することもなく、認知症の発症に至らないもしくは進行を遅らせるといった効果が期待できる。

②研究計画

雄ラットに通常食または高脂肪食を2ヶ月摂取させ、通常食群と高脂肪食群に分ける。また各群を大豆イソフラボン群(通常食および高脂肪食に1%大豆イソフラボン+0.001%エクオールを添加)とコントロール群に分ける。したがって、通常食+コントロール群、通常食+大豆イソフラボン群、高脂肪食コントロール群、高脂肪食+大豆イソフラボン群の4群を作成する。

[1]糖代謝および血圧に関する評価：

体重、空腹時血糖値、末梢血および門脈血インスリン、グルカゴン濃度および収縮期血圧を測定する。

[2]小腸に関する評価：

小腸内のGLP-1、DPP-4酵素活性、TMF- α 、IL-10などの抗炎症性サイトカイン、炎症性マクロファージ(M1)発現を検討する。

[3]腸内細菌叢に関する評価：

T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism)法を用いて、腸内細菌解析を検討する。腸内細菌の構成菌種は、16SrDNAの塩基配列が異なるため、制限酵素による切断部位は菌種固有のものとなる。これらの処理によって得られるDNA断片に対応したピークの位置(断片長)、面積(菌数)および数(菌種の多様性)を解析することで糞便中の構成菌種およびその割合を推定する方法である。

[4]脳に関する評価：

a) 認知症の発症には脳内の炎症性変化が大きく関与していることから、脳内の炎症性、抗炎症性サイトカインの測定、BDNF発現および炎症に関与しているミクログリア細胞の活性を評価する。

b) 脳内のアミロイド β (A β)、A β の前駆体であるamyloid precursor protein (APP) 含有量を定量する。

③研究の結果

1. 糖代謝および血圧に関する評価:

高脂肪食投与によって、体重および空腹時血糖値の高値がみられたが、大豆イソフラボンの投与による変化はみられなかった。また、高脂肪食によって門脈血グルカゴン濃度は増加したが、このような変化は大豆イソフラボン投与によって有意に抑制された。門脈血インスリン濃度や収縮期血圧に有意な変化はみられなかった。

2. 小腸に関する評価:

高脂肪食投与によって門脈血中のGLP-1濃度が低下した。このような変化は大豆イソフラボンの投与によってその低下が回復した(図2A)。また、DPP-4活性については高脂肪食によってDPP-4活性が増加したが、その増加は大豆イソフラボンによって抑制された。また、高脂肪食投与による小腸内の炎症性変化も大豆イソフラボンによって抑制された。

3. 腸内細菌叢に関する評価:

腸内細菌叢の検討では、高脂肪食群では悪玉菌とされているBacteroidetes門が増加したが、大豆イソフラボンにより分布が軽減された。

4. 脳に関する評価:

高脂肪食投与による脳内TNF-alpha発現の亢進が、大豆イソフラボンの投与によって抑制された。さらに、脳内IL-10発現についても同様の結果であったが、TNF-alpha/IL-10をみると、高脂肪食によるTNF-alpha/IL-10の高値が大豆イソフラボンの投与によって低下していた。したがって、大豆イソフラボンは炎症性変化を抑制させることが示唆される。ミクログリア活性についても、同様の変化であった。また、脳内BDNF発現については、高脂肪食により低下したが、大豆イソフラボンの投与により改善した。一方、脳内A β 沈着については、高脂肪食投与や大豆イソフラボンの投与による影響はみられなかった。

④研究の考察:

本研究で、高脂肪食負荷に伴う小腸内炎症性変化に対して、大豆イソフラボンは抑制的な作用をもたらすことを認めた。さらに高脂肪負荷による脳内BDNF発現の低下も、大豆イソフラボン摂取により改善していた。BDNFは脳内における神経回路網の形成やシナプスの可塑性にも関与し、記憶や学習の形成において重要な役割を果たすことが明らかになっている。BDNFは神経細胞の維持をもたらす因子であることから、大豆摂取には脳内のA β の沈着とは独立してBDNFによる神経保護作用が発揮されることが推測される。今回の研究によって、大豆の摂取は小腸の炎症性変化が改善することで小腸からのGLP-1分泌を促進させ、それに伴い脳内BDNF発現が増加することが推測された。したがって、本研究の結果は、大豆摂取は認知症の予防に有効であることを示唆させる。

本研究のように、腸内環境の改善という観点から、AD発症予防に重要な因子である脳内BDNF発現について検討するといった内容は、国内外を通じて皆無であり、極めて独創性に富んでいると考える。肥満によってADが発症するメカニズムを解明するうえでとても意義があり、今後、以上のような視点からさらなる解析が必要である。

研究テーマ

Lipid droplet 形成における TORC2 シグナル経路の機能解明

研究者 ▶ 京都大学 農学研究科・応用生命科学専攻：井上 善晴（いのうえ よしはる）

研究成果

TOR (target of rapamycin) は免疫抑制剤ラパマイシンの標的分子として酵母において初めて見いだされた Ser/Thr キナーゼで、酵母だけに限らず、真核生物において進化的に広く保存された栄養シグナル伝達に重要なタンパク質リン酸化酵素である。TOR は TORC1 と TORC2 という 2 つの TOR 複合体を形成し、それぞれ異なる機能を有している。

一方、脂肪滴 (lipid droplets, LD) は中心部にトリアシルグリセロールなどの中性脂肪を含む構造体で、オルガネラの一種と考えられている。動物細胞では、LD はエネルギー貯蔵としての機能があるが、酵母の LD は栄養が枯渇する定常期によく発達することから、酵母においても LD がエネルギーの貯蔵庫として機能しているのかどうかはよく分かっていない。そこで本研究では、TOR シグナル、とくに TORC2 シグナルと LD 形成との関係について検討を行った。

① TORC2 の機能欠損による LD 形成

TORC2 の必須コンポーネントのうち、Avo3 と Tor2 の温度感受性変異株 (avo3-30 株と tor2-21 株) を対数期まで許容温度で培養し、一旦集菌した後、フレッシュな培地に交換して、許容温度と非許容温度にシフトして LD の観察を行った。その結果、avo3-30 株でも、tor2-21 株でも、制限温度にシフトすると 4~6 時間で LD の形成が誘導された。Tor2 は TORC1 にも TORC2 にも、どちらにも含まれるが、tor2-21 変異は TORC2 の機能不全が起こるアレルであることが知られている。これらのことから、TORC2 の機能不全は LD 形成を誘導すると考えられた。

② TORC2 の機能不全を抑圧するマルチコピー・サプレッサーの単離と LD 形成

酵母の avo3-30 株の機能不全をマルチコピーで抑圧することのできる遺伝子 (MTD: Multicopy suppressor of TORC2-Deficiency) のスクリーニングを行い、2 つの MTD 遺伝子 (MTD1, MTD2) をクローニングした。MTD1 あるいは MTD2 をマルチコピーで導入すると、avo3-30 株の温度感受性を抑圧した。そこで、これらの遺伝子を導入した株の LD 形成を観察した。しかしながら、MTD1 ならびに MTD2 遺伝子はいずれも、非許容温度での avo3-30 株の LD 形成を抑圧できなかった。

③ TORC2 の下流因子の機能不全と LD 形成

TORC2 は AGC キナーゼのうち、Ypk1/2 と Pkc1 を基質にすることが知られている。そこでまず、YPK1 が温度感受性変異 (ypk1-ts) で、なおかつ YPK2 が欠失変異 (ypk2Δ) した株 (ypk1-ts ypk2Δ) を使って、制限温度に移してからの LD 形成を観察した。その結果、ypk1-ts ypk2Δ 株では、非許容温度にシフトすると LD が速やかに (シフト後 4~6 時間) 形成された。

一方、PKC1 遺伝子の欠失変異 (pkc1Δ) は致死となるが、培地にソルビトールを添加しておくと生育が可能

る。*pkc1*Δ株を、ソルビトールを含む培地で対数初期まで培養しても、その時点でLD形成は野生株でも*pkc1*Δ株でも差はなかった。そこで、ソルビトールを含む培地で対数初期まで培養した*pkc1*Δ株を一旦集菌し、ソルビトールを含まない培地に移してからのLD形成を観察した。しかしながら、調べた時間内においては、LD形成において野生株と*pkc1*Δ株で差は認められなかった。これらのことから、TORC2はYpk1/2を介してLD形成を負に制御していると考えられた。

そこで、このことを検証するため、*avo3*-30株でYpk2の構成的活性化変異体(YPK2-D239A)、あるいはPkc1の構成的活性化変異体(PKC1-R398P)をマルチコピーで導入して、非許容温度にシフトした際のLD形成を観察した。その結果、野生型YPK2遺伝子をマルチコピーで導入しても、*avo3*-30株の非許容温度でのLD形成は抑圧されなかったのに対し、YPK2-D239Aを導入した株ではAvo3の機能不全によるLD形成が抑圧された。一方、PKC1-R398Pを導入した株ではLD形成の抑圧は見られなかった。これらのことからも、LD形成はTORC2-Ypk1/2経路によって負に制御されていることが強く示唆された。

④窒素源枯渢によるLD形成におけるTORC2-Ypk1/2経路の役割

酵母のLDは栄養が枯渢する定常期によく発達するので、窒素源を枯渢させた状態でのLD形成を調べた。すなわち、必要なアミノ酸を含む最少培地で対数期まで培養し、集菌後、アミノ酸と硫酸アンモニウムを除いた最少培地に菌体を再懸濁したところ、4~6時間でLDが形成された。窒素源枯渢によるLD形成は、*avo3*-30株や $ypk1-ts\ ypk2\Delta$ 株を許容温度で培養した場合でも観察された。そこで、*avo3*-30株や野生株にYPK2-D239AやPKC1-R398Pを導入した株を窒素源枯渢条件下にシフトした際のLD形成を観察したところ、Ypk2やPkc1の構成的活性化変異体はLD形成を抑圧しなかった。

以上の一連の実験結果から、TORC2-Ypk1/2シグナル経路はLD形成を負に制御しており、窒素源枯渢によるLD形成は、本経路の不活性化に起因するものではないと考えられた。

公益財団法人 小柳財団
