

「私の自慢」サイドストーリー

(日本化学会「化学と工業」2015年4月号に掲載された拙稿のもととなった拡大版であり、紙数の都合で取り上げられなかったエピソードを多数含むサイドストーリーです。本編と併せてご覧いただければ幸いです。前田瑞夫)

二重鎖 DNA 担持ナノ粒子

-----既存概念の単純和を超えた飛躍的進歩を求めて-----

前田 瑞夫 MAEDA, Mizuo (独立行政法人理化学研究所・主任研究員)

1983年東京大学大学院工学系研究科博士課程修了(工学博士)。同年東京大学工学部助手、88年九州大学工学部助教授、95年同教授、2002年から現職、06年から東京大学大学院新領域創成科学研究科連携教授(兼務)。08年発足文科省科研費・新学術領域研究「ソフト界面」領域代表者。05年高分子学会賞、07年文部科学大臣表彰科学技術賞(研究部門)、09年日本化学会学術賞、11年日本バイオマテリアル学会賞、14年日本分析化学会賞などを受賞。最近の趣味は舞台やミュージカルの鑑賞。

(概要)

高分子化学から分析化学に専門を変え、新テーマを模索していた頃、たまたま見つけた一編の論文にヒントを得て高分子と分析を結びつけた。この研究が意外な形で花開いたのはそれから10年後のことであった。

はじめに

自慢は得手ではない。家内からはハッターリが利かないとよく言われる。そもそも世界一とかオンリーワンとかのネタがない。本欄は自分には無縁と思っていた。しかし執筆依頼には、読者に研究の面白さやドラマが伝わるような、研究のきっかけや後日談・失敗談を盛り込んだ解説記事を、とある。それなら私も今年で還暦、多少は面白い経験もして来た。「親離れ」後約30年の自分史を振り返ってみる良い機会かもしれない。ひょっとして若い方々に何かのご参考になればと思い筆をとることにした。

高分子講座から分析講座へ

筆者のもともとの専門は高分子化学である。東京大学工学部合成化学科の井上祥平教授のもとで博士課程大学院生ならびに助手として過ごした数年間は、ビニルポリマーとポリペプチドの二成分からなるグラフト共重合体を合成し、ポリペプチドのコンホメーション変化を利用した刺激応答性分離膜あるいは生体膜モデルに関する研究を展開していた。そ

れ以前、卒業研究から修士課程までは、先代の鶴田禎二教授にご指導をいただき、前駆体となる反応性アミノ基をもったビニルポリマーの合成と医療応用について研究していた。このあわせて10年ほどの間、いくつか分岐点はあったし、パラレルに複数のテーマも経験したが、基本的には一本道であって、途上に量子論的な遷移はなかった。

ところが1988年2月に九州大学工学部に助教授として異動し、研究分野を大きくシフトさせることになった。「親離れ」の機会を下さったのは合成化学科有機分析学講座の高木誠教授である。高木教授は色素化クラウンエーテル「高木試薬」の発明で一世を風靡したのち、有機化学を基礎に核酸分析の新手法開拓を進めていた。当時、P. Dervan や J. Barton らが DNA の配列特異的切断を可能にする小分子化合物の研究で注目を集めており、私も東大助手時代からそれなりに勉強を始めていたが、私が何らかの形で高木研の遺伝子分離・分析に貢献するとすれば、それは高分子のバックグラウンドを活かすことだと感じていた。新学期のテーマを考えるために図書館にこもって文献調査をするうちに、“Polyfunctional DNA intercalating agents”という65頁に及ぶ大部の総説に出会った。その中に、ほんの数行であったが DNA 二重鎖結合性のビニルモノマーに関する記述を見つけることができた。これを使えば DNA に水溶性ビニルポリマーをグラフトできるはずであると考え、ビニルポリマーと DNA 二重鎖から成るグラフト共重合体の研究を始めた。学位研究でのポリペプチドが DNA に変わっただけで、いずれも生体由来の高分子電解質であるため不安はなかった。だが得られる新物質が何の役に立つかは全く考えていなかった。新しいから挑戦の価値があると考え、五里霧中のなかで取り組んだ。

この研究は高木教授から概ね隔年、指導を一任される新学生のテーマとして、数年間にわたり細々とながら脈々と続けられた。平井輝君、西村千寿君、稲永章子さん、梅野太輔君（現・千葉大准教授）ら歴代の担当者は皆、学年でトップクラスの優秀な意欲にあふれた学生さん達で、彼らとの交流は毎日がエキサイティングであった。最初は図書館で見つけた文献記載の化合物で始めたので、人の褌で相撲を取っているような違和感があったが、3年目からは光で DNA 2重鎖に共有結合するソラレン誘導体型ビニルモノマーを新たに考案し、さらに展開を広げた。この間、高木教授の研究テーマもお手伝いしながら、電気化学センサやクロマトグラフィー、大気環境分析など、多角的に分析化学の on-job training を受けることが出来たのは幸運であった。ソラレン化合物を DNA 二重鎖の機能化に用いるアイデアも、もとは高木教授からいただいたアフィニティークロマトグラフィーに関するテーマから生まれたものである。このテーマに取り組んだ柏木正太郎君は私が九大で指導を担当した最初の学生の一人であるが、その後の20年間、私が研究テーマに困ることがないほどの本質的意義を含む修士論文を残してくれた。

生体関連化学のメッカ

余談であるが、当時の九大合成化学科はかつてのジャイアンツと同じで「助っ人」に頼らない純血主義をつらぬいていた。外部からいきなり助教授を採るのは私が初めてだった

そうである。「東京モン」の私には、お手並み拝見という好奇の目が注がれていたように思う。私も焦りやプレッシャーがなかったとは言わない。しかし私はこの環境を大いに楽しんだ。同学科には国武豊喜教授を初めそうそうたる教授陣が揃っており、自他ともに認める生体関連化学のメッカだった。また総合試験や資格試験など米国流の教育システムを取り入れ、早くから大学院教育に重きを置いていた。これら口頭試験や卒論・修論の審査には全教員が出席し、そこでの質疑応答に加わるだけで大変勉強になった。国武教授や梶山千里教授の行きつけの小料理屋さんに、先生方のご威光をお借りして出入りするようになり、そのご縁で博多祇園山笠にも九大着任の年から15年連続で参加することになった。

それにしても世間は狭いもので、高木研助手の中野幸二さん（現・九大准教授）は東北出身の家内と同郷で、家内と中野さんのお姉さんは幼なじみであった。電気化学が専門の中野さんとは、ポリペプチド膜を用いたバイオミメティックセンサやDNA二重鎖固定化センサで先駆的な成果を上げることが出来た。これらはユニークな研究として米国化学会年会から招待を受けるなど、内外で注目を集めた。

その後、1995年秋には同じ学科に新設された生体高分子講座の教授に昇任する幸運に恵まれた。自分の研究室を構えてDNAとビニルポリマーからなる複合体（DNAコンジュゲート）に関する研究をさらに本格的に進めるようになった。当初はDNA二重鎖に合成高分子をグラフトしていたが、主鎖が合成高分子で側鎖にDNAをもつグラフト共重合体の合成も始めた。同プロジェクトは学会では一風変わった研究と見なされていて、それなりに聴衆は集まるものの、「何に使えるのか」というしごく尤もな質問には相変わらず夢を語るのが精一杯であった。この地道な基礎研究が意外な形で実を結んだのは、九大に移って10年近くたった頃であった。

偶然の発見

当時、同じ九大の別キャンパスで高分子講座を担当していた入江正浩教授が、分子認識部位（ホスト）を持つ温度応答性高分子を合成し、ゲストの濃度に依存してその応答温度（曇点）がシフトすることを報告していた。これにインスパイアされ、DNA二重鎖形成の曇点への影響を調べてみたくなり、温度応答性高分子として知られるポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）を主鎖とし側鎖に複数の1本鎖DNAをもつグラフト共重合体を合成した。ところが私の期待に反し、このグラフト共重合体の水溶液を加熱しても、白濁は起こらず系は透明のままであった。研究を進めていた森健君（現・九大准教授）が様々な計測法を駆使して詳細に調べたところ、粒径50nm程度のナノ粒子が自己組織的に生成していることが明らかとなった。これは生理温度付近の36°Cで脱水和し疎水化した主鎖の集合体を、親水性で負電荷を持つDNA鎖が取り囲む、いわゆる高分子ミセルに分類される構造であり、DNAを密に担持したナノ粒子の製法としても意義のある発見であった。

さらに面白かったのは、このナノ粒子を含むコロイド分散液の性質である。ここに側鎖DNAと相補的なDNA鎖を加えると、透明であったコロイド分散液がみるみる白濁してく

るのである。この現象は最初、DNAの簡単なモデルである(dT)₁₂を約240本、表面に固定化した粒径50nmの高分子ナノ粒子について、その透明なコロイド分散液に0.5M NaCl濃度条件下で(dA)₁₂を加えたときに見いだされた。最初この白濁は、抗体固定ラテックス粒子を用いた抗原による免疫凝集反応と同様に、粒子間で架橋が起きたためであろうと考えた。その頃、金ナノ粒子を用いた架橋原理に基づく遺伝子診断法が米国で発表されていることもあった。ところが森君は想定外の実験結果を持って来た。(dA)₁₆や(dA)₂₄を加えた場合には、全く変化が起きないというのである。

もし添加した(dA)オリゴマーによる粒子間架橋が白濁の原因であるなら、より長いものを用いた方が水素結合部位が増えるため、架橋反応はより迅速に進行するはずである。ところがさらに丁寧に実験を進めると、白濁するのはぴったり長さが合った時だけであることがわかった。一塩基はみ出したとき、あるいは一塩基短いときには、つまり(dA)₁₃や(dA)₁₁を加えた時には白濁は観察されないのである。博士課程に進学した森君は、完全相補の時にのみこの「非架橋」凝集現象が見られることを、がん遺伝子等の様々な塩基配列に対して明らかにした(前田瑞夫, 化学 **2008**, *63*, 4)。同研究は宝田徹博士(現・理研専任研究員)や唐中嵐君(現・東京女子医大助教)に引き継がれ、長鎖DNAへの展開などさらに検討が進められた。

その後の展開

同テーマは、私が2002年に九州大学から理化学研究所へ移籍した後も続けられ、大きな進展を見せることとなった(宝田徹, 前田瑞夫, 分析化学 **2015**, *64*, 15)。まず上記の末端依存的「非架橋」凝集現象は、DNA担持「金」ナノ粒子を用いた場合についても実証することが出来た。細川和生博士(現・理研専任研究員)・佐藤香枝博士(現・日本女子大准教授)は二重鎖DNA担持金ナノ粒子の示すこの特異なコロイド挙動が遺伝子の一塩基変異を誤りなく見分ける信頼性の高い精密診断法となることを示した。特別な温度制御を必要とせず一塩基識別を室温で行えるという点も重要な特徴である。また座古保博士(現・愛媛大教授)とTong BUさん(東大・理研連携講座・前田研・博士課程)は一分子計測の手法でDNA担持ナノ粒子の凝集を追跡し、fMレベルの遺伝子診断が可能であることを示した。

宝田博士と秋山好嗣博士(現・東京理科大専任講師)らは、末端が一塩基伸長したDNAでは二重鎖担持ナノ粒子が必ず安定分散することに着目して、より信頼性の高い遺伝子診断法を開発し、ヒト試料にも適用してその有用性を明らかにしている。藤田雅弘博士(現・理研専任研究員)らは大型放射光施設Spring-8を駆使し、ナノ粒子の凝集構造や動的過程を詳細に研究している。

小川敦司博士(現・愛媛大准教授)は標的物質に応答して自己切断するアプタザイムRNAに着目し、これとDNA担持金ナノ粒子の凝集現象を組み合わせ、分子センサを実現した。小川博士はこれをさらに分子論理回路へと展開し、注目された。

一方、粒子から離れた末端がミスマッチであれば二重鎖担持ナノ粒子は凝集せず、安定

に分散している。神奈川大学の小野晶教授は T/T ミスマッチと Hg(II)が、C/C ミスマッチと Ag(I)がそれぞれ安定な錯体をつくることで非ワトソン・クリック型の塩基対が形成されることを発見し、これらの金属イオンは末端ミスマッチ二重鎖担持ナノ粒子の凝集を誘起するのではないかと助言して下さった。金山直樹博士（現・理研研究員）らは末端付近の塩基配列設計に工夫を行ない、これを実現した。また水銀イオンと銀イオンを入力信号とする論理回路の構築にも成功している。

最近、宝田博士・秋山博士らは、ナノ粒子が規則的に配列したナノ構造体の構築に力を入れている。また加入したばかりの王国慶特別研究員は、金ナノロッドの頭部と側面に別配列の二重鎖 DNA を固定化し、それぞれの末端構造を外部刺激（具体的にはイオン添加）で独立に制御することによって、ロッドが横に並んだ構造と縦に連なった構造の、二重鎖 DNA 担持ナノ粒子が示す末端構造依存性の発見から次々と面白い研究が生まれている。

後日談

一連の研究の発端が図書館で見つけた 1986 年の総説の、数行の記述であることは既に述べた。そこで引用された 1979 年の *Biochemistry* 誌論文は、DNA の GC 塩基対と AT 塩基対にそれぞれ特異的に結合する 2 種類のビニルモノマーと 1 種類のカチオン性モノマーを特定の DNA 上で重合させると、得られるポリマーはその DNA からの転写を阻害するという驚くべき内容のものであった。私はその論文から、DNA 結合性モノマーの合成法を知ろうとしたが、それは他の研究者から供与されたもので **unpublished experiments** とあるのみなので、今度はこの 1979 年の論文を引用している「未来の」(1979 年以降の)論文を調べた。昔はコンピュータ検索などなく、図書館で自分が探さなくてはならない。Citation Index という書物を繰って、ドイツの研究者達が合成法を報告している 2 年後(1981 年)の論文にたどりついたときは宝物を探し当てた気分であった。

今回、本稿の執筆にあたり、あらためて文献検索を行なった。もちろん現在はネット検索で一瞬に答えが出る。興味は 1979 年 *Biochemistry* 誌論文をその後、誰が引用しているか、である。テンプレート重合の先駆的な研究であり、また目的と結果が極めて現代的な課題であるにもかかわらず、引用数はわずか 16 にとどまっている。しかし最新の引用は 2010 年の、共重合体の配列制御に関する総説である。素晴らしい着想の研究は 30 年経っても色あせないということだろう。ちなみに同論文を初期に引用したのは上記の 1986 年総説と 1981 年 *Biochemistry* 誌論文の他には、鋳型重合のご本尊・G. Wulff 教授、精密重合の京大・澤本教授グループ、それと筆者らのグループだけである。異なる視点からの筆者の 25 年前の「先見」は、ちょっと自慢しても良いかもしれない、ささやかながら。

私の自慢

さて何を自慢したものか。表面的には、分野が異なる 4 つの学会から賞を頂いたことが

挙げられようか。しかしこれは言うまでもなく、ここに名前を挙げた同僚や部下そして学生諸氏のおかげである。敢えて自慢するとすれば、彼らが自由に研究する場を用意した、ということだろう。理研に移籍し、「バイオ工学研究室」を一から立ち上げて新たな境界領域を開拓することが出来たのはひとえに幸運であったと思う。新学術領域研究「ソフト界面」の立ち上げに盟友・長崎幸夫さん（筑波大教授）と一緒に汗を流したのも同じ思いからであった。

それにしても、DNA と合成高分子をくっつける研究を始めてから、当初想定したのとまったく異なる意外な発見に出会うまでに約 10 年の歳月が必要であった。そしてそれを分析化学として意味のある形に展開するのにさらに 10 年がかかっている。

息の長い研究を可能にしたのは、一つには恩師の鶴田・井上両教授から叩き込まれたオリジナリティーに対するこだわりがあるが、それに加えて、既存概念の単純和を超えた飛躍的進歩の重要性を常に語っておられた故・高木教授の存在が大きい。合理的な分子設計と称して「2」をつくるために 2 つの「1」を足し合わせ、和が 2 となった（あるいは限りなく 2 に近い）ことを単に喜ぶのではなく、意外な組み合わせについてそれぞれの要素の本質を十分に理解したうえで両者を融合させれば、全く新しい機能が生まれる、それが進歩である、とのご指導である。「高木試薬」開発者ならでは、の説得力があった。

ここでは「親離れ」直後の 30 代のエピソードに主に紙数を割いた。九大から理研への移籍の経緯については別の機会に書いたので、ご興味のある方にはご参照いただければ幸いです（前田瑞夫, 高分子 **2011**, *60*, 21）。