

分子システム融合チーム

(チームリーダー：前田 瑞夫)

DNA二重鎖末端構造の揺らぎ制御に基づく メゾスコピック論理ゲートの開発

金山直樹, 前田瑞夫

理研・前田バイオ工学

生物の遺伝情報媒体であるDNAは、 π 電子に富んだ核酸塩基を有する半剛直性の高分子電解質である。水溶液中におけるDNA二重鎖は、親水性の置換基（例えば、リン酸基、リボース部の水酸基、核酸塩基部のイミノ基・ケト基など）が水分子と溶媒和し、隣接する核酸塩基同士の疎水性相互作用（スタッキング）、および相補鎖間での核酸塩基の水素結合を介した塩基対形成が二重らせん構造を安定化している。しかし、この構造は静的なものではなく、塩基対内への水分子の侵入などにより、二重鎖構造が部分的に開閉する揺らぎ（ブリージング）を伴った動的なものである[1]。特にDNA二重鎖の末端部のブリージング（fraying motionと呼ばれる）は、近傍の水分子の影響により同一鎖内の他の箇所と比べて頻度が高い。このようなDNA二重鎖末端の動的な構造特性は、DNAの複製や転写などの生命プロセスにおいて重要な役割を担っていると考えられている。

これまでに我々のグループでは、比較的短い (< 50 bp) DNA二重鎖がブラシ状に集積して形成される“DNAブラシ界面”において、DNA二重鎖末端の塩基対構造に依存した界面特性が発現することを報告してきた[2]。その背景には、DNAブラシ界面における末端構造の揺らぎが強く関与していることが示唆されている。例えば、DNAブラシで覆われたナノ粒子（DNAナノ粒子）の分散挙動が最表層の塩基対構造に強く依存するというコロイド界面現象が挙げられる[3]。興味深いことに、DNAブラシ末端が相補的塩基対であるDNAナノ粒子は高イオン強度溶液中において凝集・沈殿するのに対し、DNAブラシ末端の僅か一組の塩基対がミスマッチ構造であるものは高イオン強度溶液中においても安定に分散状態を保持するのである（図1）。これは、DNAブラシ末端におけるミスマッチ塩基対が、相補的塩基対に比べて末端構造の大きな揺らぎを与え、DNAナノ粒子

間の反発力を高めることに起因していると考えられる。また最近、末端にT-Tミスマッチ構造を導入したDNA金ナノ粒子が、分散媒に添加した水銀(II)イオン (Hg(II)) をとりこんで T-Hg(II)-T 錯体を形成すると、高イオン強度環境下における分散安定性が著しく低下し、凝集することを明らかにした[4]。これは、T-Tミスマッチ部位での錯体形成を介した擬似的な塩基対合がDNA二重鎖末端の揺らぎを抑制し、粒子間の反発力を弱めたためと考えられる。これらは、① DNA二重鎖末端構造の揺らぎはナノ粒子の分散挙動などのメゾスコピックな現象へ変換・増幅させられる、② DNA二重鎖末端の構造の揺らぎを外部刺激によって制御できる、ことを意味している。さらに強調すべきは、このような現象はDNAと金ナノ粒子を単に混和しただけでは惹起されず、両者を適切にレイアウトした階層構造の形成（システム化）によりはじめて達成される点である。

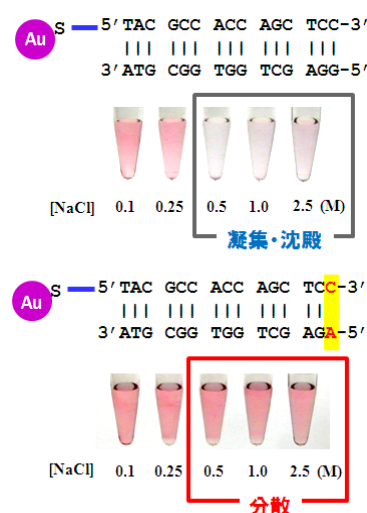


図 1. DNA ブラシ末端構造に依存した DNA ナノ粒子の分散挙動

以上の知見をもとに今年度は、核酸塩基と金属イオンの選択的錯体形成によるDNAブラシ末端の揺らぎ制御に基づき、複数の入力に対し論理的な応答を与える論理ゲートシステムの開発に取り組んだ。概要を右に示す。ベースとなるのは、鎖長が16 bpのDNAブラシで覆われた粒径が40 nm の金ナノ粒子である。この粒子は、分散状態では金ナノ粒子の表面プラズモン吸収に起因する鮮やかな赤色を示すが、凝集すると無色（薄紫）へ変化する。DNAブラシ末端には、水銀イオン (Hg(II)) や銀イオン (Ag(I)) と X-M-X 錯体 (X = T, M = Hg(II); X = C, M = Ag(I)) の形成が知られるT-TおよびC-Cミスマッチを導入し、錯体形成をトリガーとするDNAブラシ末端構造の揺らぎの制御を可能とした。また、本システムではDNA金ナノ粒子分散液へのHg(II), Ag(I)の添加を input, 分散液の色を output と定義した（赤: 0, 無色（薄紫）: 1）。

3つの連続したT-T, C-CミスマッチをDNAブラシ末端に導入したNP-A（図3(a)）は、Hg(II)とAg(I)の両方が系中に存在する場合のみ凝集するAND型の応答性を示した（図3(b)）。また、末端から2, 3番目の位置にT-T, C-Cミスマッチ、最末端にG-C塩基対を導入したdsDNAブラシを有するNP-O（図4(a)）は、Hg(II)とAg(I)のいずれかが系中に存在すれば凝集するOR型の応答性を示した（図4(b)）。注目すべきは、NP-AとNP-Oはコアの金ナノ粒子のサイズや表層のDNAブラシ密度などの基本構造はほぼ同一であるにも関わらず、DNAブラシ末端の構造が僅かに異なるだけでinputに対する応答性が全く異なっている点である。このことは、DNAブラシ末端構造の揺らぎが本システムの応答性を左右する主要な因子となっていることを強く示唆している。

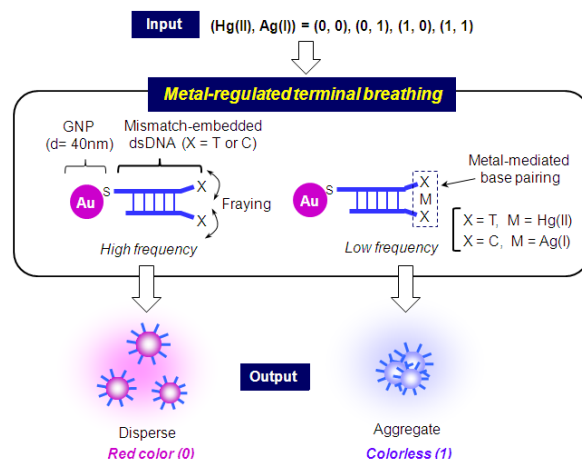


図 2. 検討を行った論理ゲートシステムの概略図

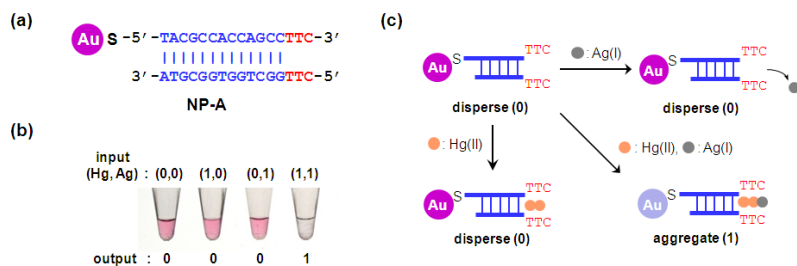


図 3. 2 つの入力シグナル (Hg(II) および Ag(I)) に対し AND 型の論理応答を示す DNA 金ナノ粒子 (NP-A)

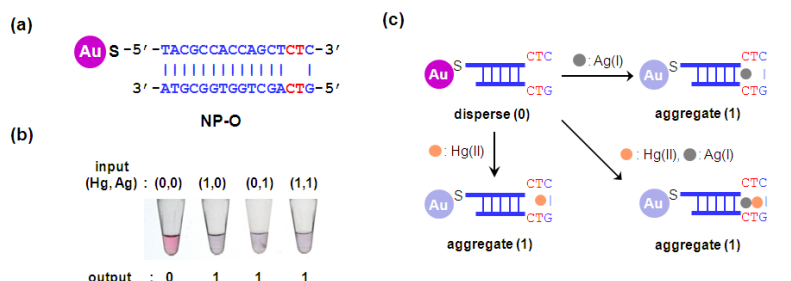


図 4. 2 つの入力シグナル (Hg(II) および Ag(I)) に対し OR 型の論理応答を示す DNA 金ナノ粒子 (NP-O)

【参考文献】 [1] Ambjornsson, T.; Banik, S. K.; Krichinsky, O.; Metzler, R. *Biophys. J.* **2007**, 92, 2674. [2] 例えば, 金山直樹・前田瑞夫, CSJ カレントレビュー 09 金属および半導体ナノ粒子の科学 (日本化学会編), 第 13 章, 化学同人, 2012 年. [3] Sato, K.; Hosokawa, K.; Maeda, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8102. [4] Kanayama, N.; Takarada, T.; Maeda, M. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2077.

DNA担持金コロイドを1次元アレイ化したナノ構造体の作製

秋山好嗣¹, 鹿川裕翔^{1,2}, 宝田徹¹, 前田瑞夫^{1,2}

理研・前田バイオ工学¹, 東大院・新領域²

一本鎖DNAで密に覆われたDNA担持金コロイド(DNA-GNP)は、塩を含む生理的環境下において安定に分散する。凝集すると表面プラズモン共鳴に起因した鋭敏な色調変化が生じるが、この現象とDNAが有する高度な分子認識能を複合化すれば、遺伝子診断をはじめとする高感度バイオアッセイに応用することができる[1]。一方、最近ではDNA origamiに代表される規則的なナノ構造体にDNA-GNPを位置を厳密に制御して固定する試みが数多く報告されている[2]。これまでに成しえなかった高度に秩序だったナノ材料を創製する目的においても、DNA-GNPは魅力的な素材となっている。

本研究では、DNA-GNPからなる規則構造体を外部刺激で新たな別の規則構造体へと動的に変換し、可逆的に制御可能な新しい高機能性ナノ材料の構築を目的としている。動的な変換を誘起させるシグナルとしては、本研究室で独自に見出されたDNA-GNPの非架橋的な凝集現象の利用が挙げられる[3]。すなわち、DNA-GNPに担持された二重鎖DNAが完全相補鎖のとき、粒子間の非架橋的な凝集が誘起される一方で、DNA-GNP末端がわずかに一塩基だけ異なるミスマッチ鎖の添加では粒子は分散状態を示す。特筆すべきは、この非架橋型の凝集現象は、イオン強度や温度変化に伴い鋭敏かつ可逆的に粒子の凝集・再分散が可能な興味深い物性を示す点にある。しかし、一般的な非架橋型の凝集構造は、規則性を示さない。そこで、本研究では一本鎖DNAの鋳型にDNA-GNPを等間隔に配置した糸ビーズ状の1次元アレイ化した規則的なナノ構造体をつくり、イオン強度の変化からロッド状構造への可逆的な変換システムの構築をめざす(図1)。

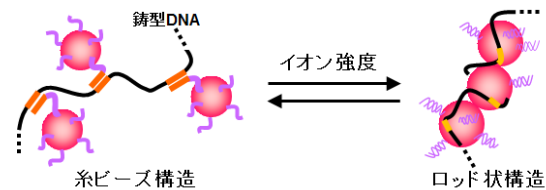


図1. DNA-GNP と鋳型 DNA からなる糸ビーズ構造体のロッド状構造体への動的な構造制御

本年度は、これら着想のもと鋳型DNAに粒径5 nmの金コロイドを3つ配置した3GNP糸ビーズ構造体を設計した(図2)。具体的には、まず、金と特異的に結合できるチオール誘導体(ジチオール基)を末端に有する一本鎖DNA(35塩基)を粒子表面に1つ固定したところへ非架橋現象が誘起できる16塩基からなるチオール化DNAを高密度で修飾した異種DNA-GNPとした。そして、200塩基の鋳型DNAに粒子が結合可能な配列を3ヵ所導入することによって3GNPからなる糸ビーズ

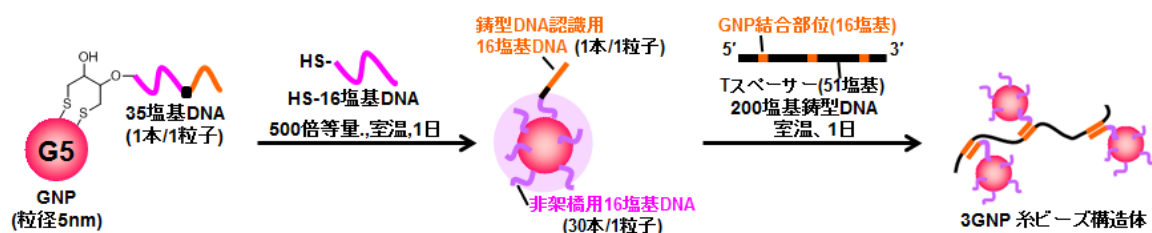


図2. 3GNP と鋳型 DNA からなる糸ビーズ構造体の調製

構造体の調製を試みた。実際にDNA-GNP分散液に鋳型DNAの添加量を変えて混ぜたときのアガロースゲル電気泳動の結果を図3に示す。DNA-GNPのみ(Lane 2)と鋳型DNAに担持されたDNA-GNP(Lane 3-5)との比較から、鋳型DNAの添加量に応じて3種類の新たなバンドが確認された。そして、Lane 4と5のように鋳型DNAに対して粒子が相対的に過剰な条件としても、これら3種類以外のバンドは観察されなかったこと

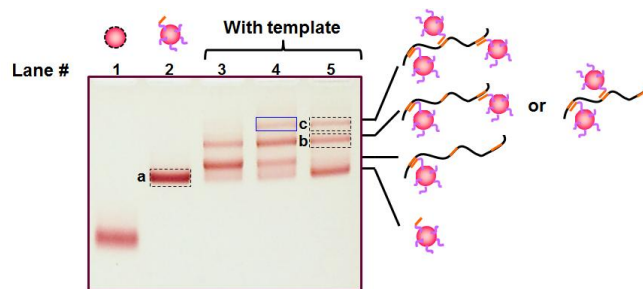


図 3. 糸ビーズ構造体の 3%アガロースゲル電気泳動(30 分、100V)。Lane 1; 1.5 μ M GNP のみ, Lane 2; 1.5 μ M DNA-GNP のみ, Lane 3; 1.5 μ M DNA-GNP + 0.5 μ M 鋳型 DNA, Lane 4; 1.5 μ M DNA-GNP + 0.25 μ M 鋳型 DNA, Lane 5; 1.5 μ M DNA-GNP + 0.125 μ M 鋳型 DNA。

から、移動度が一番高い(DNA-GNPのみに一番近い)バンドから順にそれぞれ鋳型DNAへ担持された1、2、3GNPからなる糸ビーズ構造体であると考えられる。ここで、Lane 4で一番移動度が低いバンド(青枠)をゲルから単離してDLS測定を行ったところ平均粒径は32.8 nmとなった。DNA-GNPのみの平均粒径が同一条件で18.1 nmであったことから、鋳型DNAの存在下で高次構造体の形成が示唆された(data not shown)。更に、図3のゲル電気泳動で検出されたバンドのうち点線で囲われたバンド(a, b, and c)を切り出して単離・精製した溶液を透過型電子顕微鏡(TEM)にて直接観察したところ、予想された通り鋳型DNAに2GNPと3GNPがそれぞれ担持された糸ビーズ構造体が観察された(図4-b, c)。図4-c中の拡大図から粒子間距離を見積もると、10 nm前後の値となった。今回、使用している鋳型DNAのTスペーサー(51塩基)の長さは約20 nmで設計しており、TEM測定用のサンプル調製時の乾燥工程によって若干、粒子同士が近づいているもののロッド状構造体への変換をTEMで観察することが十分可能な距離であることが示された。

以上のことから、目的とする糸ビーズ状のナノ構造体が自発的かつ効率的に生成することがゲル電気泳動、DLS解析、およびTEM観察にて確認された。今後は、相補的な16塩基の一本鎖DNAと塩を添加してロッド状構造へ変換することを試みる予定である。

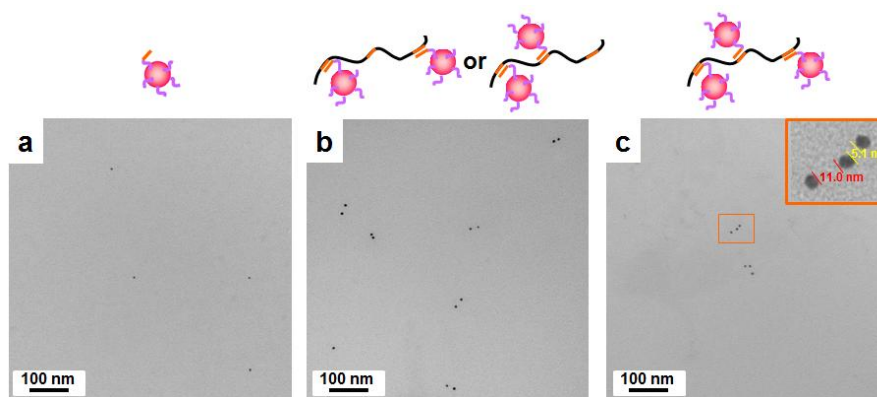


図 4. アガロースゲルから単離した DNA-GNP および糸ビーズ構造体の TEM 観察 ; a) DNA-GNP のみ、b) 2GNP 糸ビーズ構造体、c) 3GNP 糸ビーズ構造体

【参考文献】

- [1] Hu, R.; Zhang, X.-B.; Kong, R.-M.; Zhao, X.-H.; Jiang, J.; Tan, W. *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 16323 [2] たとえば、Kuzyk, A.; Schreiber, R.; Fan, Z.; Pardatscher, G.; Roller, E.-M.; Hogle, A.; Simmel, F. C.; Govorov, A. O.; Liedl, T. *Nature* **2012**, 483,311 [3] Sato, K.; Hosokawa, K.; Maeda, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 2025.

DNA担持ナノ粒子の構造解析

藤田雅弘¹, 平峯勇人^{1,2}, 前田瑞夫^{1,2}

理研・前田バイオ工学¹, 東大院・新領域²

本研究では、構造科学的な観点を中心にして、オリゴ DNA が表面に密生した金ナノ粒子の非架橋凝集のメカニズムを解明することを試みている。DNA 担持ナノ粒子は、表面に固定化された DNA 二重鎖末端の塩基対構造に明敏に応答して分散・凝集の違いが出る。末端塩基対が相補的な場合粒子は凝集しやすいが、変異があると分散したままである。DNA 鎖長、疎水核粒子の大きさおよびイオン強度が粒子全体の分散安定性や凝集体構造に及ぼす影響を調べてみた。分散安定性は紫外・可視吸収 (UV-Vis) スペクトル測定、凝集体構造は小角 X 線散乱法 (SAXS) を主に用いて評価した。また、DNA 層間に働く相互作用をより直接的に評価するために、原子間距離顕微鏡 (AFM) を用いた表面間力測定を試みた。

DNA 鎖長が凝集構造に与える影響を先ず調べた。粒子表面に固定化された二重鎖 DNA の鎖長に応じて近接粒子間距離は変わるものの、DNA 層が互いにある程度オーバーラップしながら粒子は凝集していた (図 1)。DNA 鎖長が疎水核径に対し相対的に長くなると、末端塩基対が相補的でも粒子は熱により分散性を向上することを明らかにした。(図 2)

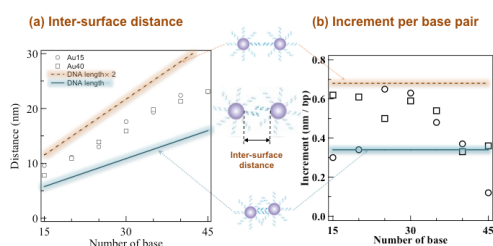


図 1. DNA 鎖長に対する粒子間距離 (疎水核表面間距離) との変化 (a) と増分 (b). 図中の点線と実線は、二つの DNA 鎖同士の間隔を仮定した場合のプロット。

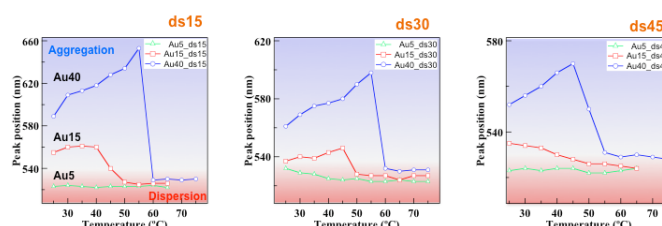


図 2. プラズモンピーク波長の温度変化. 粒径 5、15、40 nm (Au5、Au15、Au45) の金ナノ粒子表面上に、(左から) 15、30、45 塩基対の DNA 鎖 (ds15、ds30、ds45) が固定化された場合の結果を示す。

次に、異なる長さの二種類の DNA (15 塩基と 45 塩基) を担持した金ナノ粒子 (混合系) の非架橋凝集の解析を行った。45 塩基と完全に相補的な DNA を添加した場合、その近接粒子間距離は、45 塩基のみの金ナノ粒子 (単一系) 同士の距離と比較しても明らかに短かった (図 3)。混合系の場合、二重鎖 DNA のグラフト密度は低く、粒子凝集時には互いにオーバーラップしやすいために表面間距離は短くなる。しかしながら混合系は凝集しにくい。低グラフト密度のため DNA が揺らぎやすく立体反発力が增大していると考えられる。

DNA 二重鎖末端塩基の組み合わせが非相補的でも非架橋凝集する場合があることが分かった。これは非相補的な組合せでも不安定

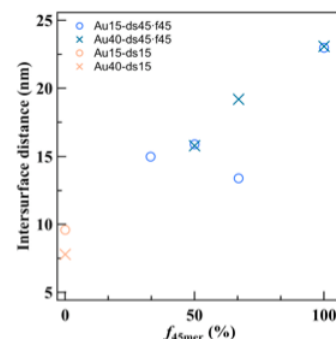


図 3. 粒子表面間距離と二重鎖形成率との関係. 鎖長の異なる DNA (15 塩基と 45 塩基) の固定化比率を変えて担持した粒子に長鎖側の相補鎖を添加したときの結果。

ながら塩基対を形成するためと考えられる。粒子の分散安定性はこの塩基対の安定性と強い相関があり、その安定性の順に応じて加熱により粒子は分散しやすかった。(図 4)

構造科学的観点に加え、実際に DNA 層間に働く相互作用を直接的に評価することを試みた。金コートされたコロイドプローブに DNA を固定化させ、液中にてフォースカーブ測定を行った結果の一例を図 5 に示す。金同士の場合は、互いに接触する際に引力が作用するが、DNA で覆われていると斥力のみが観測された。ただし、その大きさには差異が見られ、DNA 二重鎖末端に一塩基ミスマッチがあるときは、一本鎖や完全に相補的な二重鎖と比較して大きな斥力が観測された。今後はこの斥力の詳細を明らかにしていく予定である。

以上の結果より、DNA 担持ナノ粒子で生ずる非架橋凝集は当初予測された二重鎖 DNA 間の end-to-end stacking の差異による現象ではなく、むしろ DNA 鎖あるいは密生層としての揺らぎに起因する立体反発力の変動が粒子の分散安定性を決定づける重要な因子であると結論づけた。その立体反発力には幾つかのモードがあると考えられるが、末端に一塩基ミスマッチがある場合、遠距離から作用する斥力が存在することが示唆された。

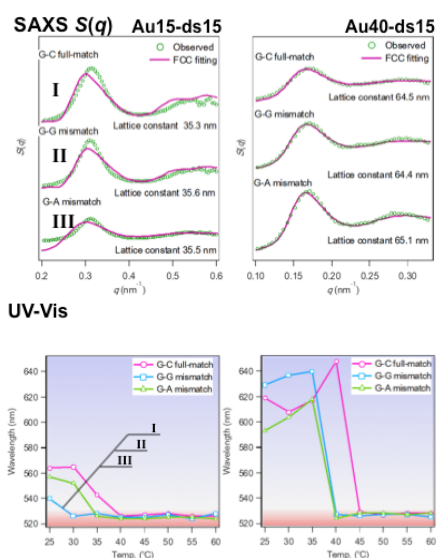


図 4. 非相補的末端塩基対の場合の凝集体構造の SAXS 解析 (上) とプラズモンピーク波長の温度依存性 (下)。

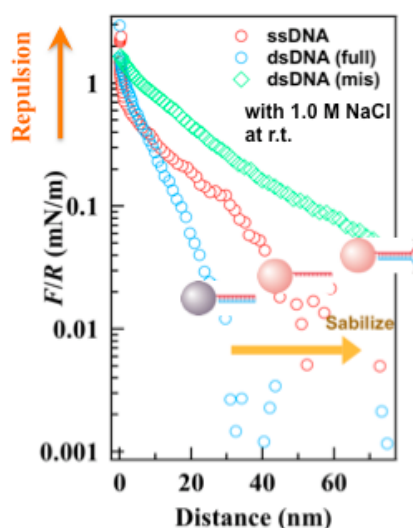


図 5. AFM コロイドプローブを用いた表面間力測定の結果。

【参考文献】

- [1] Fujita, M.; Katafuchi, Y.; Ito, K.; Kanayama, N.; Takarada, T.; Maeda, M. *J. Colloid Int. Sci.* **2012**, 368, 629-635.

分子シャペロンタンパク質によるアミロイド β 凝集の構造および細胞毒性制御

座古保¹, Karin Sorgjerd¹, 吉田知識^{1,2}, 前田瑞夫^{1,2}

理研・前田バイオ工学¹, 東大院・新領域²

タンパク質はポリペプチドとして合成された後、折れたたむことにより配列特異的な立体構造を形成して初めて生理活性を有する。一方、折れたたみに失敗したポリペプチド鎖や変性したタンパク質が細胞内で凝集体として蓄積し、細胞の障害をもたらすことが近年分かってきた。アルツハイマー病や狂牛病はその例である。これらの病気では共通してアミロイド線維と呼ばれるタンパク質凝集体が疾病の原因とされている。近年アルツハイマー病の原因物質とされているアミロイドベータ(A β)のアミロイド線維形成において、分子シャペロンタンパク質の1種であるsHsp(small heat shock protein)の関与が示唆されている。sHspは通常は16量体構造をとっており、熱ストレスにより2量体などに解離し非天然状態のタンパク質と結合することでタンパク質の変性凝集を抑制すると考えられている。一方、sHspの構造状態によるアミロイド凝集化への影響は明らかになっていない。そこで、本研究では解離温度が40℃と明らかになっている分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 由来 SpHsp16.0を用いて、sHspがA β 42の線維形成に与える影響について検討を行った。

PBSバッファーにA β 42モノマー及びSpHsp16.0を30 μ Mとなるように溶解した。50℃もしくは30℃で24時間インキュベートを行い、得られたアミロイド線維の解析を行った(図1)。TEM観察およびアミロイド線維に特徴的な積層 β シート構造に結合する蛍光色素ThioflavinT(ThT)アッセイにより、SpHsp16.0非存在下での β シートを含むアミロイド線維形成が確認された(図2A)。一方、SpHsp16.0添加のサンプルでは、30℃ではアミロイド線維が観測されなかったのに

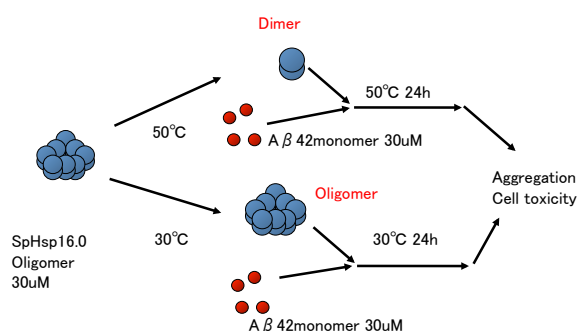


図1. 構造の異なる SpHsp16.0 による A β 凝集への影響

対して、50℃では線維構造が観察された。これは予想に反して、SpHsp16.0が会合状態ではアミロイド線維形成を阻害したが解離状態では線維形成を阻害しなかったことを示唆する。SpHsp16.0存在下で形成した線維は積層 β シートをほとんど含有していないことがわかった(図2B)。また、免疫沈降実験により、この線維はSpHsp16.0を含んでいることが示された。

得られたA β 線維をラット副腎細胞PC12に対する細胞毒性をMTTアッセイにより評価した。SpHsp16.0非存在下で形成したアミロイド線維はインキュベート温度に依らず高い細胞毒性が観測されたが、SpHsp16.0存在下(50℃)で形成した線維の細胞毒性は著しく低減していた(図2C)。細胞との相互作用を免疫染色により評価したところ、SpHsp16.0存在下(50℃)で形成した線維は細胞表面との相互作用が著しく抑制されていた(図2D)。一方で、予め作成したA β 線維と50℃で2量体に解離させたSpHsp16.0の複合体について評価したところ、ThT蛍光は高く、細胞毒性も有したままであることが分かった。これらの結果はSpHsp16.0存在下(50℃)で形成した線維はA β 線維とSpHsp16.0の単なる複合体ではないことを示唆している。

本研究では、SpHSP16.0は会合体構造でA β の線維化を抑制し、解離構造の存在下では通常のアミ

ロイドとは異なるA β 線維が形成されることが明らかになった。この線維は積層 β シートを含まず、細胞毒性は非常に低減されていた。また、この線維は細胞表面との相互作用を抑制することで細胞毒性を低減していることが示唆された[1,2]。我々はこれまでにインスリンのアミロイドについても、細胞毒性と細胞との相互作用に相関があることを見いだしており[3]、今回の結果と一致する。

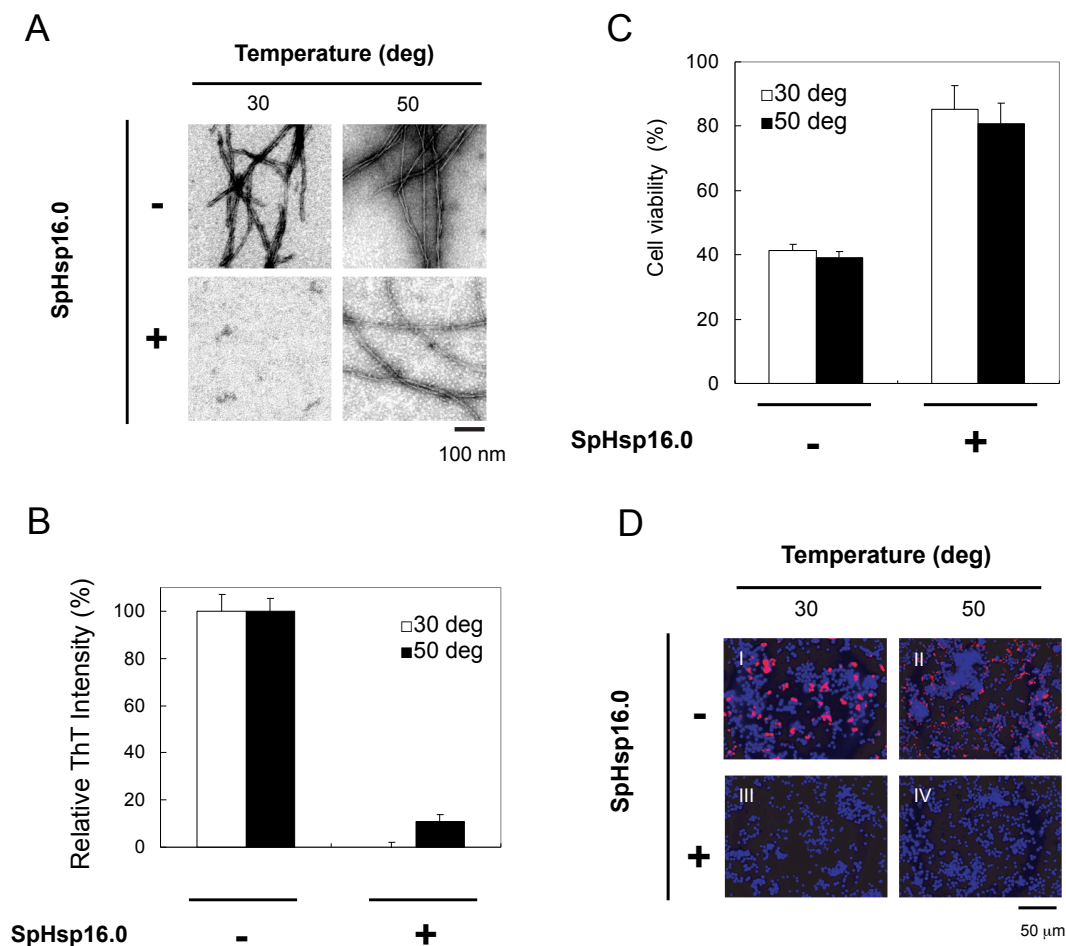


図2. 多量体 (30°C)・2量体(50°C)のSpHsp16.0の存在下、非存在下におけるA β 凝集評価。A)透過型電子顕微鏡像、B)ThT蛍光、450nmの励起光による482nmの蛍光を測定、C)細胞毒性、PC12細胞にサンプルを加えた際の細胞生存率をMTT法により評価、D)細胞への結合評価、抗A β 抗体、Alexa555標識二次抗体を用いた蛍光免疫染色像

【参考文献】

- [1] M. Sakono, A. Utsumi, T. Zako, T. Abe, M. Yohda and M. Maeda, *Biochem Biophys Res Commun.* 430, 1259 (2013) [2] T. Zako, M. Sakono, T. Kobayashi, K. Sorgjerd, K. P. R. Nilsson, P. Hammarstrom, M. Lindgren and M. Maeda, *ChemBioChem* 13, 358 (2012) [3] 吉田 知識・座古 保・カリン ソルヤード・前田 瑞夫、第85回日本生化学会年会、2012

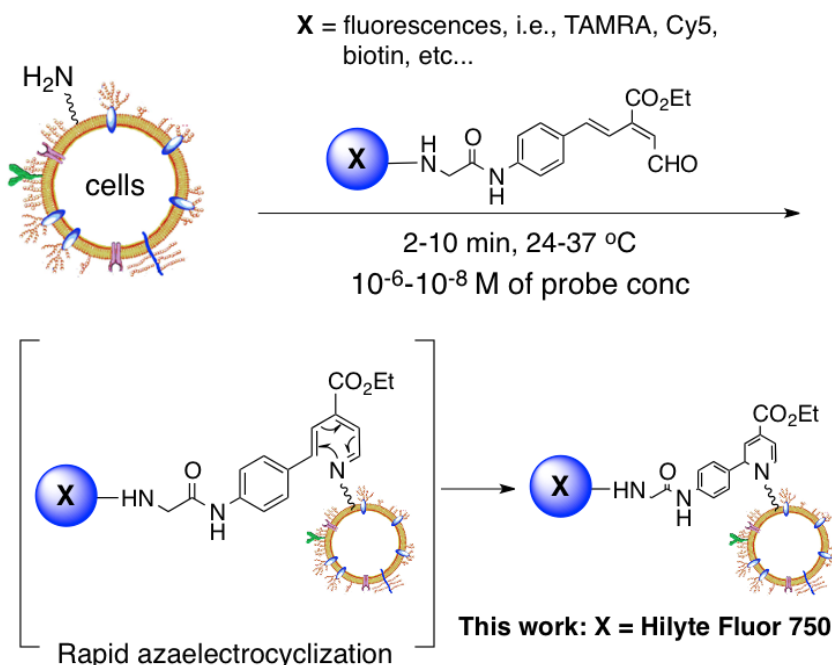
アザ電子環状反応による細胞表面標識法を活用した 癌転移の早期検出

田中克典¹, 森脇健太², 三善英知², 深瀬浩一³

理研・田中生体機能合成化学¹, 阪大・院医², 阪大・院理³

これまでに報告者らは、「高速 6 π -アザ電子環状反応」を開発し、室温・数分という温和な条件下、生細胞表層上のアミノ基に対して、その機能に影響を与えることなく標識基を導入することに成功している（下図）[1]。そこで本研究では、開発した「高速 6 π -アザ電子環状反応」を用いて癌細胞を蛍光標識化し、ヌードマウス内での初期癌転移を非侵襲的に可視化することを試みた。特に、転移の鍵となる糖鎖遺伝子を欠損・回復させた癌転移を可視化して、糖鎖構造が癌転移に及ぼす効果を生きた動物レベルで実証することを目的とした[2]。

まず、既に確立した電子環状反応のプロトコルに従って、癌細胞に対して近赤外線領域に吸収を持つ蛍光色素（Hilyte Fluor 750）を導入した結果、癌細胞を殺傷することなく効率的に表面を蛍光標識することができた。そこで、癌細胞のアスパラギン結合型糖鎖（*N*-結合型糖鎖）が癌の転移に与える影響を蛍光イメージングにより検討した。始めに、ヒト胃癌株細胞 MKN-45、および *N*-acetylglucosaminyl

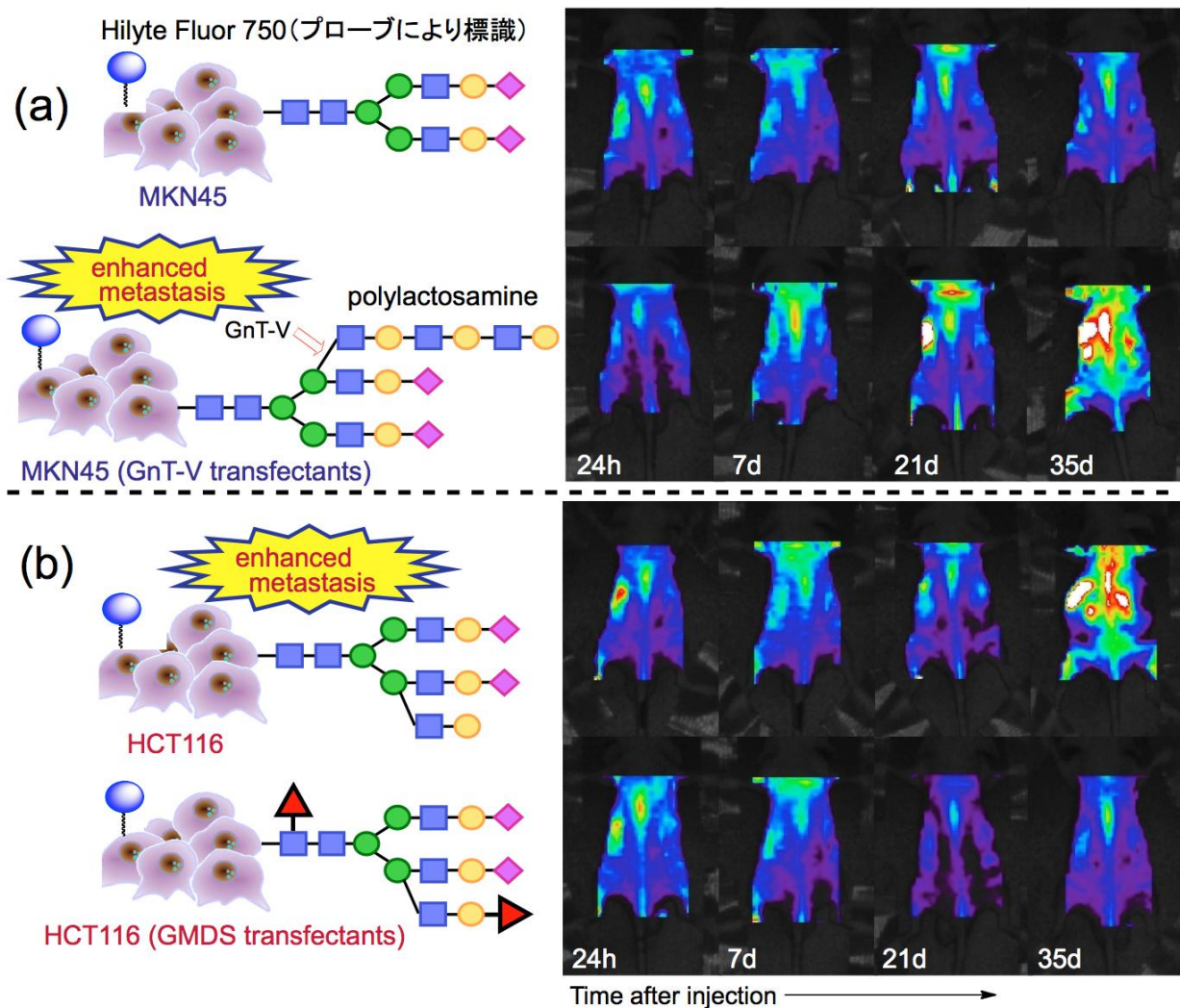


transferase (GnT-V) を強制発現させた MKN-45 糖鎖改変癌細胞について転移イメージングを実施した。GnT-V を強制発現させることによって、癌細胞表層におけるマトリプターゼの耐性獲得や $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンのガレクチンを介した癌細胞の遊走と浸潤の亢進により、転移が促進されることが既に知られている[3]。報告者の方法により標識した両者の癌細胞を、BALB/c ヌードマウスの腹腔内に投与して蛍光イメージングを行った結果、既に 7 日後に MKN-45 糖鎖改変癌細胞がより顕著な転移を示すことを、明確に可視化することができた（下記図(a)）。

一方、*N*-結合型糖鎖におけるコアフコースが欠如したヒト結腸癌株細胞HCT116、およびフコースの合成に必要なGDP-mannose-4, 6-dehydratase (GMDS) を遺伝子導入してフコシル化を回復させたHCT116糖鎖改変癌細胞についてもイメージングを行った。HCT116糖鎖改変癌細胞では、NK細胞によるTRAILを介したアポトーシスにより転移が抑制されることが既に分かっており[4]、報告者らはこの効果についてもイメージングにより、1ヶ月後に明確に可視化することができた（下記図(b)）。このように、糖鎖構造に起因する癌転移の促進や制御効果を生きた動物レベルで非侵

襲的に検証することに成功した。

本研究成果で示したいいずれの系の場合にも、従来の剖検を基盤とする実験では、これら転移を可視化するために2、3ヶ月の時間が必要とされてきた。報告者らの「アザ電子環状反応」による細胞表面の効率的な標識法と生体内イメージングの手法を併用することによって、短時間で転移を可視化することができた。癌転移の可視化と検出を目的とした研究分野において、画期的な方法論を示す成果である。



【参考文献】

- [1] Tanaka, K.; Moriwaki, K.; Yokoi, S.; Koyama, K.; Miyoshi, E.; Fukase, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1074.
[2] Tanaka, K.; Minami, K.; Tahara, T.; Fujii, Y.; Siwu, E. R. O.; Nozaki, S.; Onoe, H.; Yokoi, S.; Koyama, K.; Watanabe, Y.; Fukase, K. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 841. [3] Ihara, S.; Miyoshi, E.; Ko, J. H.; Murata, K.; Nakahara, S.; Honke, K.; Dickson, R. B.; Lin, C.-Y.; Taniguchi, N. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 16960. [4] Moriwaki, K.; Shinzaki, S.; Miyoshi, E. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 43123.

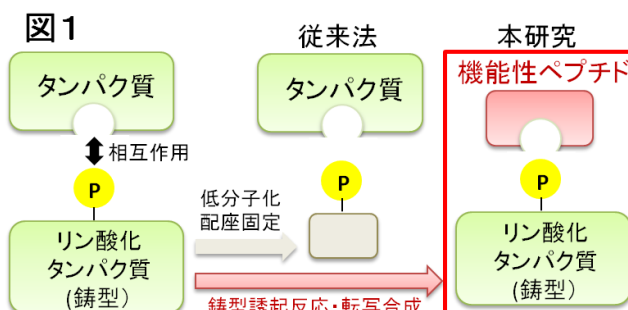
鋳型誘起反応の開発に基づく

リン酸化タンパク質認識ペプチドの化学転写合成

田中克典¹, 岩田隆幸¹, 白坪早苗², 景山知佳², 田原強³, 野崎聡³, Eric R. O. Siwu², 田村理⁴, 道家駿祐⁴, 村上啓寿⁴, 尾上浩隆³, 渡辺恭良³, 深瀬浩一²

理研・田中生物機能合成化学¹, 阪大・院理², 理研・分子イメージングセンター³, 阪大・院薬⁴

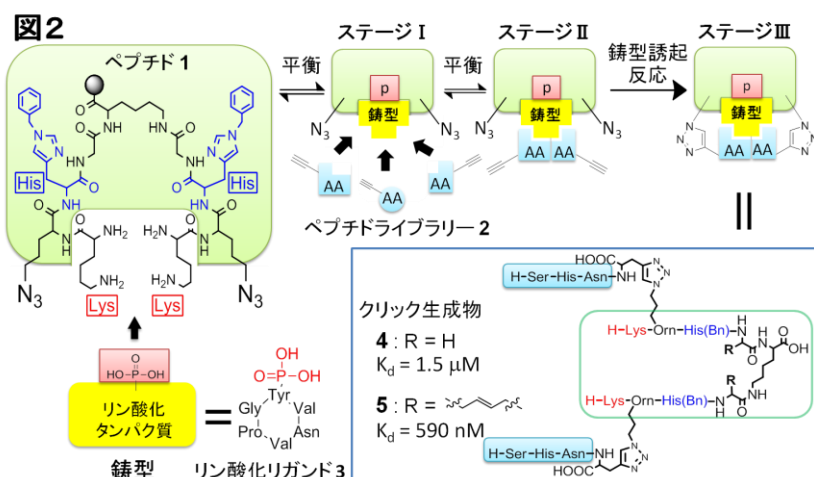
リン酸化シグナル伝達を代表例として、多くの細胞内シグナル伝達機構はタンパク質／タンパク質相互作用によって厳密に制御されており、この相互作用を低分子化合物で選択的に制御することは、現在最も盛んに検討されているトピックの一つである。従来、標的のリン酸化タンパク質相互作用を選択的に阻害する分子を見出す方法として、専らリン酸基を含むタンパク質の部分構造に注目し、これを疑似化する分子の探索や配座固定などの誘導化が行われてきた（図1）。これに対して報告者らは、分子設計の新戦略として、リン酸化タンパク質（鋳型）に相互作用する天然類似機能性ペプチドを、独自の鋳型誘起反応により鋳型から転写合成することを検討した。その結果、EGFRを高発現する癌細胞内において、特定のリン酸化タンパク質を選択的に認識する Grb2/SR2 ドメイン（Growth-factor Receptor-Bound protein 2/ Src Homology 2）の疑似ペプチドを創製することに成功した[1]。



<鋳型誘起合成の戦略と Grb2/SR2 ドメイン疑似ペプチドの創製>

報告者らは、アジド基のような反応活性基を備えたリン酸基結合ペプチド1 に対して、鋳型となる標的リン酸化タンパク質を結合させた後（図2、ステージⅠ）、さらに幾つかのペプチドライブラリーを作用させることにより、最終的にこのライブラリーの中から鋳型に最もフィットするペプチドが平衡条件下で選択されると考えた（ステージⅡ）。この段階で、非可逆的な結合形成反応（鋳型誘起反応、ステージⅢ）を実施することにより、鋳型のリン酸化タンパク質に最も選択的なペプチドが得られると予測した。この際、非可逆的な結合形成反応として、Huisgen[3+2] 環化反応の活性化基であるヒスチジンをペプチドに導入することによって（図2、ペプチド1の構造参照）、「自己活性化型反応」を実現し、これまで難しいとされてきた複雑なペプチド同士の反応を良好に進行させることに成功した。

実際の検討では、Grb2/SR2 が認識するリン酸化部分配列に選択的な分子を効率良く得るために、既知のモデルリン酸化環状ペプチド3 を鋳型として用いた（図2下図）。すなわ

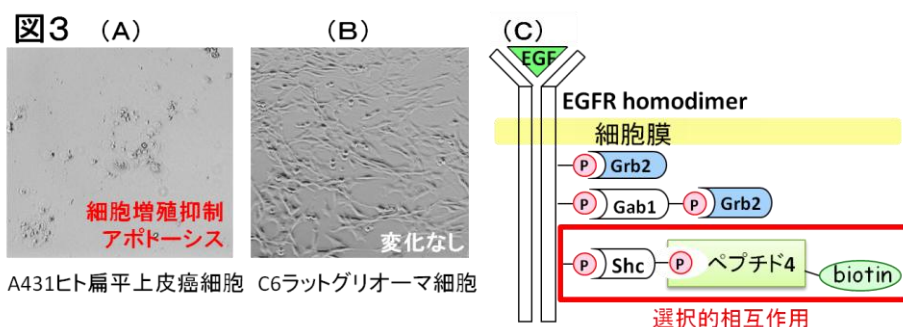


ち、ヒスチジン残基を導入したペプチド 1 に対して、リン酸化ペプチド 3（鋳型）の存在下、アセチレンペプチドライブラリー 2 との Huisgen 反応を行った。3 の非存在下でのクリック生成物と HPLC を比較検討した結果、4 を含む数種類のペプチドがリン酸化ペプチド 3 の存在下で顕著に生成することが判明した。

そこでこれらペプチドを再合成し、3 に対する解離定数を求めた結果、化合物 4 は、1.5 μM の結合活性を示すことが判明した（図 2）。このように、我々が提起した鋳型誘起合成を以て、Grb2/SH2 ドメインの疑似低分子となり得るペプチドを創製することができた。さらに、化合物 4 の配座を分子内メタセシス反応により固定化することにより、より強い相互作用を示すペプチド 5（590 nM）を得ることに成功した。

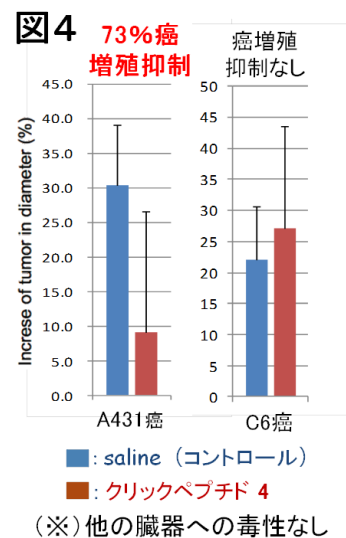
<Grb2/SH2 ドメイン疑似ペプチドの細胞および動物レベルでの癌選択的増殖抑制効果>

EGFR を高発現する A431 ヒト扁平上皮癌細胞（Grb2/SH2 を介したシグナル伝達が細胞増殖に寄与する）に対して、得られたペプチド 4 作用させたところ、効率的に癌細胞に導入され



るとともに、顕著な細胞増殖抑制活性やアポトーシス活性を示した（図 3 A）。一方、EGFR を高発現しない C6 ラットグリオーマ細胞に対してもペプチド 4 は細胞内に取り込まれたが、これらの効果は全く認められなかった（図 3 B）。さらに、Huisgen 反応前駆体である分岐リジンペプチド 1（図 2 参照）を用いた場合にも、両者の細胞に増殖抑制効果は見られなかった。そこで、ビオチン標識体を用いて A431 細胞ライセートから標的のリン酸化タンパク質を探索したところ、4 は A431 細胞内でリン酸化 Shc タンパク質に選択的に結合して、A431 細胞選択的に増殖抑制活性を示すことが明らかとなった（図 3 C）。

さらに、標的の A431 細胞または C6 細胞を移植したそれぞれの癌モデルマウスに対して、1 週間継続してペプチド 4 を尾静脈注射したところ（図 4）、コントロールに比較して、C6 癌の増殖には全く影響を及ぼさなかったのに対して、A431 癌の体積増加を選択的に抑制することが判明した。以上のように、報告者が開発した鋳型誘起反応を適応することによって、動物内でも選択的に望む癌の増殖を抑制するペプチドを創製することに成功した。



【参考文献】

- [1] Tanaka, K.; Shiotsuki, S.; Iwata, T.; Kageyama, C.; Tahara, T.; Nozaki, S.; Siwu, E. R. O.; Tamura, S.; Douke, S.; Murakami, N.; Onoe, H.; Watanabe, Y.; Fukase, K. *ACS Chem. Biol.* **2012**, 7, 637. [2] Iwata, T.; Tanaka, K.; Tahara, T.; Nozaki, S.; Onoe, H.; Watanabe, Y.; Fukase, K. *Mol. BioSyst.* **2013**, 9, 1019.

共役イミンの「見過ごされてきた反応性」の開拓による 有機合成化学への展開と生体機能制御の解明

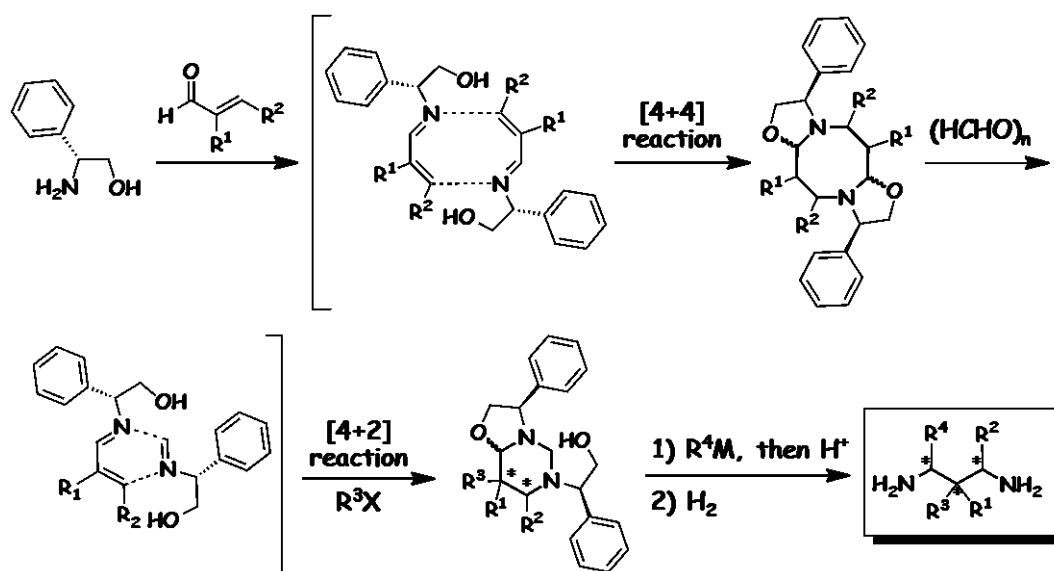
田中克典, Ambara R. Pradipta, 筒井歩

理研・田中生体機能合成化学

報告者らは、共役アルデヒドとアミンから得られる共役イミン誘導体の「新奇な反応性」を発見するとともに、これを効率的な有機合成に展開した。さらに、本反応がこれまでに見過ごされてきた重要な生物活性に関する可能性を見出した。

共役イミンの[4+4]環化反応、および[4+2]環化反応の発見とその合成的展開

一般的に、『共役アルデヒドに対して一級アルキルアミンを反応させると、対応する共役イミン（共役 Schiff 塩基）が得られる』ことは常識である。このようにして得られる窒素上にアルキル基を持つ共役イミンは、加水分解や熱に対して非常に不安定であることが知られており、分解や重合するために有機合成化学にはほとんど用いられて来なかった。同様に、共役アルデヒドに対してフェニルグリシノールに代表される 1,2-エタノールアミン誘導体を作用させると、対応する共役イミンやアミノアセタールが得られると信じられて来た。しかし、報告者らは、この場合、中間に生じる共役イミンが速やかに[4+4]環化反応を起こし、1,5-ジアザビシクロオクタン誘導体を与えることを見出した。計算化学を用いて、この原因を詳細に調べたところ、アミンの隣接位にある水酸基が反応促進に大きく関わっていることを見出した。この反応は様々な置換基を持つ共役アルデヒドに対して一般的であり、多置換を持つ 1,5-ジアザビシクロオクタン誘導体の新規合成法として開拓した（下図上欄）。



一方、[4+4]環化生成物に対して、さらにホルムアルデヒドを作用させることにより、新規なイミンの[4+2]反応が進行することも発見した（上図下欄）。原料として用いた共役アルデヒドの置換基を選択することにより、あるいは得られた[4+2]環化生成物に対してさらに置換基を導入

することにより、様々な置換パターンを有するジアミノプロパン化合物を簡便かつ立体選択的に得ることができた。すなわち、報告者らが見出した一連のイミノ[4+4]/[4+2]環化カスケード反応により、アクロレインなどの共役アルデヒドから誘導される不安定な *N*-アルキルイミンの反応性を制御して、新たに C3 ユニットとして有機合成化学的に利用することを可能とした。

ポリアミン由来の共役イミン [4+4]環化反応の発見とその生体制御の可能性

上記のように、1,2-アミノアルコールとアクロレインなどの共役アルデヒドから得られる共役イミンが速やかに[4+4]環化反応を起こすことを見出したが、さらにポリアミンとアクロレインから得られる共役イミンの場合にも、同様に[4+4]環化反応が進行することを発見した。興味深いことに、ポリアミンの種類や反応条件によって、1,5-ジアザビシクロオクタンやさらに1分子のポリアミンで架橋された2,6,9-トリアザビシクロ[3.3.1]ノナンが高収率で得られる。一般的にアクロレイン自体がアミン塩基の存在下で速やかに重合反応を起こすことはよく知られているが、ポリアミンとアクロレインの付加体として1,5-ジアザビシクロオクタンを示したのは今回が初めての例あり、天然物生理活性分子から得られる共役イミンの『見過ごされていた新奇反応性』である。

一方、動脈硬化やアルツハイマー、あるいは癌関連疾患に代表される酸化ストレスを要因とする疾患の原因物質として、これまでスペルミンやスペルミジンから生合成されるアクロレインがその候補として議論されてきた。このように、共役アルデヒドであるアクロレインが生体内でポリアミンから代謝されて生産されることを考慮に入れると、報告者が見出したポリアミンとアクロレインとの[4+4]環化反応は、この新奇反応が疾患の原因や様々な生体内での機能制御を担っている可能性を示す結果である。そこで報告者らは、スペルミンやスペルミジンを代表とするポリアミンとアクロレインから誘導される環化付加生成物について、その類縁体の合成や生理活性評価の結果に基づき、生体機能制御の可能性についてさらに検討した。その結果、これらの環化生成物が酸化ストレスの原因物質の1つであるとともに、エピジェネティクスの制御にも厳密に関与する可能性を見出した。

