# 分子システム融合チーム

(チームリーダー:前田 瑞夫)

### DNA鎖の局所構造揺らぎを誘起する光スイッチ機構に基づく ナノ粒子自己集合制御システム

金山直樹,岸里美,宝田徹,前田瑞夫

理研・前田バイオ工学研究室

生物の遺伝情報媒体である DNA は、アデニン(A)、チミン(T)、グアニン(G)、およびシトシン(C)の4 種類の核酸塩基のいずれかが結合したデオキシリボースとリン酸が交互に連結した高分子電解質、ポリ アニオンである. AとT、GとCの核酸塩基の組み合わせは相補的、それ以外は非相補的(ミスマッチ)と 表現され、相補的な塩基配列の DNA 鎖は Watson-Crick 塩基対(A-T、G-C)形成を介して自発的に二 重鎖を形成する. タンパク質や糖鎖などと同様、水中における DNA の二重らせん構造は、DNA 鎖のミク ロブラウン運動や DNA 二重鎖内部へ侵入する水分子による塩基対の局所的な開閉(ブリージング)によ って動的に揺らいでいる. このような DNA 二重らせん構造の揺らぎは、遺伝情報の転写や複製などの生 命プロセスをスムーズに進行させる重要な因子と考えられている[1]. 本プロジェクトにおいて我々は、生 体システムの特徴である「しなやかさ」や「柔軟性」に学び、その構成要素の一つである DNA 鎖の"構造 の揺らぎ"を積極的に取り入れた、動的な機能特性をもつ分子システムの構築を目指している.

固体表面に DNA 二重鎖がブラシ状に集積して形成され る層を DNA ブラシ界面とよぶ.我々はこれまでに, DNA ブラ シ界面で覆われたナノ粒子(以下, DNA ナノ粒子)が, 表層 の二重鎖構造の僅かな差を反映して水溶液中で異なるふ るまいを示すことを報告してきた[2]. 例えば Fig.1 に示すよう に, 相補的塩基対(A-T あるいは G-C)を表層に提示した DNA ナノ粒子は, 一定のイオン強度以上の水溶液中では 自発的に集合し, 粗大な凝集体を形成する. 一方, 表層が 非相補的な構造(A-C, T-T など)の DNA ナノ粒子では, 同 じイオン強度の水溶液中でも粒子の集合は誘起されず, 安



Fig.1 DNA ナノ粒子分散液における,表 層塩基対に依存した特異な分散挙動.

定に分散状態を保持する.この現象は, DNA ナノ粒子間に, 表層の DNA 二重鎖構造に対応した引力 的・斥力的な相互作用が存在することを示唆している.この現象を手掛かりに我々は, DNA ブラシ表層 で外部刺激による位置選択的な構造変化を惹起させ, DNA ナノ粒子の集合・解離挙動を制御する分子 システムの構築を検討してきた[3]. 昨年度より, 外部刺激として光の採用を提案している.本年度は, 昨 年度に考案した光刺激によって DNA 二重鎖の局所構造変化を誘起する光スイッチシステムに関して, より詳細な検討を行った.

Azobenzene は、照射波長に応じて可逆的な *trans-cis* 光異性化挙動を示すフォトクロミック化合物として知られている. オリゴ DNA 二重鎖内に, Azobenzene 部位を含む人工ヌクレオチド(Azobenzene threoninol,以下 Azo-TN(Fig.2))を導入すると、Azo-TN が平面構造の *trans* 体の場合は Azo 部位が塩 基対間にインターカレートし二重鎖構造を安定化させ、一方、Azo-TN が屈曲構造の *cis* 体の場合には 立体障害により二重鎖構造を不安定化させることが Asanuma らにより報告されている[4]. 我々は、この Azo-TN をオリゴ DNA 二重鎖末端近傍に 1 箇所導入することによって、全体の二重鎖構造を保持しつ つ末端部位のみを局所的に不安定化させ,構造揺らぎ を生起できるのではないかと考えた.予備検討として, Azo-TN を末端部に導入した DNA 二重鎖(16 bp)に, 紫外光(350 nm)・可視光(450 nm)照射を行い, Azo 部 位の *trans-cis*, *cis-trans* 光異性化の進行に伴う, DNA 二重鎖の光融解の有無を RP-HPLC で分析したところ, 末端における Azo 部位の光異性化に関わらず DNA 二 重鎖構造が保持されることがわかった.

これと同じ配列をもつ DNA 二重鎖を, 既報に従い金 ナノ粒子表面に固定化し Azo-DNA-GNP を調製した. Fig.3 に示すとおり, Azo-DNA-GNP の表層は相補的な 塩基対構造が提示されている. Azo-DNA-GNP は, 低イ オン強度水溶液中では, 単分散状態の金ナノ粒子に特 有の 520 nm 付近に吸収極大を示すシャープなプラズ モンピークが確認され, 溶液は赤色を呈した. 一方, 0.5 M 以上の NaCl 共存下では, 580 nm 付近に極大を示 すブロードなプラズモンピークが確認され, 溶液は薄紫 色を呈した(Fig.4(a), 左). これは, DNA ナノ粒子が自 己集合し, 凝集構造を形成したことを意味している. これ らの結果は, 従来, 我々が報告してきた DNA ナノ粒子 の分散挙動とよく一致する[2].

高イオン強度溶液中で形成された DNA ナノ粒子集 合体に, Azo 部位の *trans-cis* 光異性化を誘起する 350 nm の光を照射したところ, 溶液の色が徐々に赤色へ変 化し(Fig.4(a), 中央), 600 秒後には 520 nm にピークト ップを有するシャープなプラズモンピークが確認された (Fig.4(b), 赤線). このことは, 紫外光照射によって Azo-DNA-GNP が凝集状態から分散状態へ転移したこ とを意味する. さらに, 分散状態の Azo-DNA-GNP に



Fig.2 Azo-TN の構造と光異性化挙動



**Fig.4** (a) Azo-DNA-GNP 分散液の光照射によ る色の変化. (b) Az-DNA-GNP 分散液の UV スペクトル(赤:紫外光照射後,青:可視 光照射後).

450 nm の可視光を照射し Azo 部位の *cis-trans* 異性化を誘起したところ, 徐々に溶液の色が薄紫色へ変化し(Fig.4(a), 右), 600 秒後には表面プラズモンピークは 580 nm 付近へブルーシフトした(Fig.4(b), 青線). このことは, Az-DNA-GNP が再び凝集状態へ戻ったことを意味する. 上記の光照射による可逆的な Azo-DNA-GNP の集合—解離プロセスは, 動的光散乱(DLS)測定による, DNA ナノ粒子集合体のサイズ変化測定からも確認することができた. また, この集合 – 解離プロセスは, 5 サイクル以上繰り返し誘起することが可能であり, 光刺激に応答し動的な特性変化を示す分子システムとして有望であることが示された.

【引用文献】[1] Ambjornsson, T.; Banik, S. K.; Krichevsky, O.; Metzler, R. *Biophysical J.* 2007, 92, 2674. [2] (a) 金山直樹・前田瑞夫, バイオマテリアル<sub>-生体材材</sub>, 2014, 32, 95. (b) Kanayama, N.; Takarada, T.; Maeda, M. *Chem. Commun.* 2011, 47, 2077. [3] Kanayama, N.; Takarada, T.; Fujita, M.; Maeda, M. *Chem. Eur. J.* 2013, 9, 10794. [4] Asanuma H.; Liang X.; Nishioka H.; Matsunaga D.; Liu M.; Komiyama, M. *Nat. Protoc.* 2007, 2, 203.

### 末端塩基対合で誘起されるDNA修飾金ナノ粒子オリゴマーの 粒子間距離変化

秋山好嗣<sup>1</sup>, 白石翔大<sup>1,2</sup>, 宝田徹<sup>1</sup>, 前田瑞夫<sup>1,2</sup>

理研・前田バイオ工学研究室<sup>1</sup>,東京理科大・理<sup>2</sup>

金属ナノ粒子の線形集合体は、孤立した粒子やバルク状態と大きく異なる物理特性を示すため、 基礎と応用の両面から関心が持たれている[1]。線形集合体の簡便な作製方法の1つとして、一本 鎖(ss) DNAを表面に担持した金ナノ粒子(DNA-GNP)を、鋳型となるssDNAと二重鎖形成さ せる方法がある[2]。この線形集合体の粒子間距離は鋳型DNAの塩基配列であらかじめ規定され るが、これを外部刺激によって自在に拡張・短縮することができれば、ナノ粒子集合体の特異物 性の動的制御につながる。本研究では、鋳型DNAにDNA-GNPを等間隔に配置した糸ビーズ状の 線形構造体を作製し、当研究室で見いだされた非架橋凝集[3]を利用して粒子間距離を可逆的に短 縮することを試みた[4]。

鋳型DNA (200塩基) に粒径5 nmのGNPを等間隔に3つ配置して線形集合体を作製した (Scheme 1)。まず、鋳型DNAに結合するための一本鎖 (ss) DNA (アンカーDNA、35塩基) をGNP 1 つあたり1分子だけ固定した[5]。次に、構造変換用のssDNA (16塩基) をGNP 1 つあたり複数分子 (平均5分子) 固定して[3]、ssDNA-GNPモノマーを得た。つづいて、0.5×TBEバッファー (75 mM NaCl, pH 8.3) 中で鋳型DNAとssDNA-GNPモノマーを混合し、室温で1日静置した。生成物をアガロースゲル電気泳動 (3%アガロース, 100 V, 45分, 4℃) で分離精製して、目的とするssDNA-GNPトリマーを得た。構造体内で粒子の非架橋凝集を誘起させるために、ssDNA-GNPトリマーに16塩基の相補鎖 (あるいは末端ミスマッチ鎖) をハイブリダイズさせて粒子表面の構造変換用DNA を二重鎖 (ds) とし、10 mM MgCl<sub>2</sub>を加えて室温で10分間静置した。構造体内の粒子間距離は、凍結試料を用いたcryoEM (JEM 2100F HC-STEM) 観察で得られた画像をもとに算出した。



Scheme 1. Preparation of dsDNA-GNP trimers and their structural changes.

ssDNA-GNP モノマーは、鋳型 ssDNA に結合できるアンカーDNA を1粒子あたり1分子しか 持たないので、多点結合による架橋体(4粒子以上からなる構造体)が副成しえない。さらに、 粒子と鋳型 DNA の間で生じる立体障害を排除するために、ssDNA-GNP のアンカーDNA(35 塩 基)は構造変換用 DNA(16 塩基)より長くなるように配列設計されている。これらの利点を実 証するために、鋳型 DNA との結合配列を突出させ ない、短縮型のアンカーDNA(16 塩基)をもつ ssDNA-GNP モノマーを比較のために新たに作製 した。結合効率の違いをアガロースゲル電気泳動か ら評価した結果を Figure 1 に示す。突出構造を持た ない ssDNA-GNP を使用した場合は、鋳型 DNA に 1 粒子だけが結合した構造体に由来するバンド

(Monomer + Template) は認められたものの、トリ マーのバンドは全く見られなかった。それに対し て、突出構造を有する ssDNA-GNP (従来型) では、 期待通りにトリマーに由来するバンドが検出され た。また、このバンドの上流に出現すると考えられ る、4 粒子以上からなる架橋体に由来するバンドは 全く認められなかった。以上の結果から、突出構造 を有するアンカーDNA を 1 分子だけ固定する設計 が有効であることが確認された。

次に、ssDNA-GNPトリマーの隣接粒子間で非架 橋凝集を誘起させ、粒子間距離を cryoEM 画像から 評価した。ssDNA-GNPトリマーに相補鎖あるいは 末端一塩基ミスマッチ鎖を添加して得られた dsDNA-GNPトリマーを 10 mM MgCl<sub>2</sub>存在下で静 置した後にサンプルを瞬間凍結させて cryoEM 観察 を行なった。相補鎖を加えて作製した dsDNA-GNP トリマーの平均粒子間距離は 22.5 ± 9.4 nm (Figure 2a)、末端ミスマッチ鎖は 26.1 ± 8.2 nm (Figure 2b) となり、末端ミスマッチをもつ構造体 の方が完全相補の場合よりも粒子間距離が長くな ることが明らかになった。最末端で塩基対合してい ないモノヌクレオチドがミクロブラウン運動する ことによって、粒子間のエントロピー反発が増大し たためと考えられる。同様の結果は、試料作製時に



**Figure 1.** Agarose gel electrophoresis of the ssDNA–GNP trimer constructed from the ssDNA–GNP monomers having the truncated 16-nt anchor DNA and the 200-nt template DNA.



Figure 2. Interparticle distance distributions of the ssDNA–GNP trimer constructed using 200-nt template DNA. (a) With the complementary DNA in the presence of 10 mM MgCl<sub>2</sub>. (b) With the single-base-substituted DNA in the presence of 10 mM MgCl<sub>2</sub>.

乾燥工程が必要となる TEM 観察からも得られている(データ省略)。したがって今回の cryoEM 観察の結果は、DNA-GNP トリマーの構造変化が少なくとも乾燥工程だけによるのではなく、溶液中においても生じていることを強く示唆している。

参考文献

- [1] H. Kitching, M. J. Shiers, A. J. Kenyon, and I. P. Parkin, AJ. Mater. Chem. A 2013, 1, 6985.
- [2] A. Kumar, J.-H. Hwang, S. Kumar, and J.-M. Nam, Chem. Commun. 2013, 49, 2597.
- [3] K. Sato, K. Hosokawa, and M. Maeda, J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 8102.

[4] Y. Akiyama, H. Shikagawa, N. Kanayama, T. Takarada, and M. Maeda, submitted.

[5] A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, Jr., and P. G. Schultz, *Nature* **1996**, *382*, 609.

### DNA修飾金ナノ粒子の塩基数識別能を利用した遺伝子診断法の開発

秋山好嗣, 宝田徹, 前田瑞夫

理研・前田バイオ工学

遺伝子の一塩基多型(SNP)を簡便、迅速、正確に識別する分析法の開発は、テーラーメード医療 を実現する上で重要である。その理由は、SNP部位の塩基の種類がわかれば、副作用のない薬剤の 選択や病気の発症リスクの予測が可能になるからである[1]。先行技術としてリアルタイム PCR 法 やマイクロアレイ法などが開発されているが、高価な検出装置や特殊な解析法を必要とすることか ら、臨床現場での実用性に課題を残している[2]。当研究室はこれまでに、一本鎖 DNA で修飾され た金ナノ粒子(ssDNA-GNP)の凝集分散を利用した SNP 目視識別法を開発した[3,4]。ssDNA-GNP の分散液に相補鎖を添加して粒子表面で二重鎖(ds) DNA を形成させると、高塩濃度下で自発的な 粒子凝集が誘起され、GNP の表面プラズモン共鳴シフトにより溶液の色は赤から青紫へ変化する。

一方、dsDNA-GNPの最末端が一塩基ミス マッチの場合は分散状態を保ち、溶液は赤 色を呈する。これにより、一塩基の種類の 違いを目視で識別することができる。しか し、末端ミスマッチ部位が比較的安定な擬 似塩基対(たとえばG-A)を形成する場合 は粒子が凝集してしまうため、完全相補

(G-C)と誤診する懸念があった[5]。昨年 度までに我々は、この分析法の信頼性を高 めることを目的として、塩基の種類ではな く数の違いに基づいた識別法を考案した (図1)[6]。本研究では、報告者のひとり の毛根細胞から抽出した遺伝子サンプル を使用して、実際に遺伝子診断ができるこ とを実証した。



図1.一塩基突出構造を導入した dsDNA-AuNP の分散安定性。

SNP 識別のターゲットとして、薬剤の副作用に関連するシトクロム P450 遺伝子(CYP2C19\*2) を選択した。この 681 番目の塩基は、野生型が G、変異型が A であることが明らかになっている。 市販の遺伝子抽出キット(ISOHAIR EASY)を使って毛根細胞からゲノム DNA を抽出し、PCR 法 を用いてシトクロム P450 遺伝子を増幅した[7]。これを鋳型としてジデオキシヌクレオシド三リン 酸(ddNTP: N = A、G、C、T)を1種類ずつ別々に使ったジデオキシ鎖終結法により、プライマ ー (16 塩基)の一塩基伸長反応を行った。次に、この反応溶液と ssDNA-GNP 分散液(ssDNA の 塩基配列は未反応のプライマーと完全相補)を混合して室温で 10 分静置し、さらに NaCl を添加し た(最終濃度: 0.5 M)。反応溶液中での dsDNA-GNP の凝集と分散を、プラズモン共鳴シフトに基 づく色調変化で判定した。

まず、化学合成した完全相補鎖(16 塩基)または一塩基伸長鎖(17 塩基)を任意の割合で混和 した溶液を ssDNA-GNPの分散液に添加して、一塩基突出の割合が異なる dsDNA-GNP を作製した。 一塩基突出の割合が 40%以下の場合は、0.5 M NaCl 共存下で迅速な凝集が生じて、数分で溶液の色 が赤から青紫に変化した(図 2)。それに対して、一塩基突出の割合が 60%以上になると、粒子は 分散状態を保ち溶液は赤色を示した。これは、一 塩基伸長反応の反応率が 60%以上であれば、反応 進行を目視で判断できることを示している。

次に、実際の遺伝子サンプルを使った SNP 識 別を行なった。SNP 部位の 3'側隣接領域と相補 するオリゴヌクレオチド(16 塩基)を化学合成 し、これを診断用プライマーとした。毛根細胞か ら調製した遺伝子産物を鋳型として、診断用プラ イマー、ddNTP、および DNA ポリメラーゼを用 いて一塩基伸長反応を行なった。上述の結果に基 づいて、一塩基伸長反応の反応率が 60%以上に なるように反応条件を設定した。反応終了後の溶 液に ssDNA-GNP (ssDNA は未反応の診断用プラ イマーと完全相補)と NaCl を添加して、溶液の 色調変化を目視判定した(図3)。その結果、 ddATP、ddGTP、ddTTP を使用した場合は青紫色 を示したことから、これらの反応溶液では一塩基 伸長反応は進行していないことがわかった。一方、 ddCTP を使用した反応液は赤色を示した。これは、 診断用プライマーが 3'末端側に一塩基(C)伸長 されて17塩基となり、一塩基突出構造のために dsDNA-GNP が安定に分散していることを意味 している。以上の結果から、SNP 部位の塩基の種 類はCと相補のGであり、この被検者のシトク ロム P450 遺伝子は、野生型(ホモ接合体)であ ると判定された。



図2.様々な一塩基の突出割合を有する dsDNA-AuNP の分散安定性。



図 3. ヒト毛髪を使用したシトクロム P450 遺伝子の 目視 SNP 識別。

結論として、ssDNA-GNP の塩基数識別能を利用することにより、遺伝子におけるわずか一塩基 の違いを溶液の色調変化で目視判定することに成功した。本法は、簡便で迅速な SNP 識別法とし て、医療のみならず環境や食品などさまざまな分野で応用されることが期待できる。

#### 【参考文献】

- [1] McCarthy, J. J.; Hilfiker, R. Nat. Biotechnol. 2000, 18, 505.
- [2] Syvänen, A. C. Nat. Rev. Genet. 2001, 2, 930.
- [3] Sato, K.; Hosokawa, K.; Maeda, M. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 8102.
- [4] Sato, K.; Hosokawa, K.; Maeda, M. Nucleic Acids Res. 2005, 33, e4.
- [5] Sato, Y.; Hosokawa, K.; Maeda, M. Colloids Surf. B 2008, 62, 71.
- [6] Akiyama, Y.; Shikagawa, H.; Kanayama, N.; Takarada, T.; Maeda, M. Chem. Eur. J. 2014, 20, 17420.
- [7] de Morais, S. M. F.; Wilkinson, G. R.; Blaisdell, J.; Nakamura, K.; Meyer, U. A.; Goldstein, J. A. J. Biol. Chem. **1994**, 269, 15419.

# Spontaneous Shrinkage of DNA-Functionalized Gold Nanoparticle Oligomers with Surface Plasmon Resonance Shifts

Guoqing Wang, Yoshitsugu Akiyama, Tohru Takarada, and Mizuo Maeda

Bioengineering Laboratory, RIKEN

Gold nanoparticles (GNPs) have widely been used as stimuli-responsive colorimetric reporters based upon their localized surface plasmon resonance.<sup>1</sup> Polyvalent single-stranded DNA–GNP conjugates (ssDNA–GNPs) further afford fast and selective recognition, with additional benefits of reliability and chemical stability in solution. Double-stranded (ds) DNA–GNPs obtained by hybridizing complementary ssDNA strands to ssDNA–GNPs undergo a dramatic reduction in their colloidal stability against ionic strength to aggregate in a non-crosslinking manner. In sharp contrast, dsDNA–GNPs obtained by hybridizing terminal-mismatch ssDNA strands to the ssDNA–GNPs can keep dispersed even at high salt concentration.<sup>2</sup> To date, the finding of non-crosslinking aggregation has enabled a number of applications in fields ranging from gene diagnostics<sup>3</sup> to logic gates.<sup>4</sup> However, precise control of the spontaneous aggregation of dsDNA–GNPs has remained to be challenged. In the present study, we prepared dsDNA–GNP oligomers with a different particle size using ssDNA–GNPs and an ssDNA template to show that the oligomers underwent a decrease in interparticle distance with regard to structural shrinkage at increased ionic strength. This work could lead to controllable structural change of GNP assemblies for developing various nano-devices, including switch, motor, and sensor.



**Figure 1.** a) Schematic illustration of ssDNA-templated formation of ssDNA–GNP dimers and trimers. Representative TEM images of ssDNA–GNP (15 nm) dimer and trimer are also shown. b) Hydrodynamic diameter distribution of the ssDNA–GNP (15 nm) monomer, dimer, and trimer.

In our experiments, GNPs of 5 nm, 10 nm, 15 nm, and 20 nm in diameter were used to construct dsDNA–GNP oligomers. A 35-nucleotide (nt) ssDNA was firstly mono-conjugated to the surface of GNPs (Figure 1a). A number of 16-nt ssDNAs were then attached to the GNP surface to give a high-density coverage. After hybridization with an ssDNA template containing three binding sites, trimers (and dimers as by-products) were produced and purified by agarose gel electrophoresis. Transmission electron microscopy (TEM) was used to confirm the formation of dimer and trimer structures (Figure 1a). Dynamic light scattering (DLS) measurements revealed that a hydrodynamic diameter of the ssDNA–GNP monomer, dimer, and trimer increased monotonously (Figure 1b).

To demonstrate the non-crosslinking shrinkage of discrete dsDNA–GNP assemblies, a dsDNA–GNP (15 nm) dimer with a long ssDNA spacer (184 nt) was newly prepared and used as the model (Figure 2a). The dimer structure was confirmed with TEM observation. We found that the dimer in solution exhibited a plasmon resonance band centered at 522 nm. After hybridization with a full-match sequence, the plasmonic peak was red-shifted to 526 nm in the presence of 350 mM NaCl (Figure 2b, left). In contrast, no plasmonic peak shift was induced by hybridization with a terminal-mismatch sequence under the same conditions (Figure 2b, right). This result agreed well with their high colloidal stability.<sup>2</sup> Since DLS measurements revealed that no aggregation took place among the different full-match dsDNA–GNP dimers, we concluded that the observed red shift was due to the spontaneous shrinkage of the discrete dsDNA–GNP dimer.



**Figure 2.** a) Diagram of the spontaneous shrinkage of dsDNA–GNP dimer that is accompanied with plasmonic shift. Insert numbers indicate the corresponding plasmonic peak positions. b) Salt-induced (left) and terminal base paring-induced (right) red shift of the plasmonic peak for the dsDNA–GNP dimer.

In conclusion, ssDNA–GNP dimers and trimers with different particle sizes ranging from 5 nm to 20 nm were successfully produced through hybridization between ssDNA–GNPs and ssDNA templates. With a dimer having a 184-nt ssDNA spacer, we demonstrated the non-crosslinking shrinkage of the discrete dsDNA–GNP dimer in solution by monitoring a plasmon resonance peak shift. Simulations will be carried out in the near future to compare with the present experimental results.

#### [References]

- 1) G. Wang, Y. Wang, L. Chen, and J. Choo, Biosens. Bioelectron. 2010, 25, 1859.
- 2) K. Sato, K. Hosokawa, and M. Maeda, J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 8102.
- K. Sato, K. Hosokawa, and M. Maeda, *Nucleic Acids Res.* 2005, 33, e4; Y. Akiyama, H. Shikagawa, N. Kanayama, T. Takarada, and M. Maeda, *Chem. Eur. J.* 2014, 20, 17420.
- 4) N. Kanayama, T. Takarada, and M. Maeda, *Chem. Commun.* 2011, 47, 2077; N. Kanayama, T. Takarada, M. Fujita, and M. Maeda, *Chem. Eur. J.* 2013, 19, 10794.

### 架橋型DNA担持ポリマーミセルの創製

藤田雅弘, 森田雄耶, 前田瑞夫

理研・前田バイオ工学研究室

ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm) は温度応答性高分子として知られ、その水 溶液は32 ℃付近に下限臨界溶液温度(LCST)を有し、その温度以上で白濁する。PNIPAAmに一 本鎖DNA(ssDNA)が少量グラフトされた共重合体(PNIPAAm-g-DNA)もLCSTを有する。DNA の比率に依存するが、LCST以上で疎水性のPNIPAAmセグメントどうしが会合し、その表層に親 水性のssDNA鎖が密生したようなコア・シェル型のナノミセル(DNA担持ナノ粒子)が形成され る。そのナノ粒子は安定的に水中で分散するため、LCST以上でも系は無色透明のままである。

そのようなナノ粒子表層のDNAに対し、完全に相補 的なDNAで二重鎖形成させると、ある塩濃度以上で ナノ粒子は速やかに凝集(非架橋凝集)し、系はた ちまち白濁する。一方、末端に一塩基だけ変異が導 入された相補鎖と二重鎖形成させた場合には、高塩 濃度でさえもナノ粒子は安定に分散状態を保ち、無 色透明のままである(図1)。DNAの末端塩基対構造 に鋭敏に応答して粒子のコロイド分散安定性を変化 させることから、遺伝子診断材料への応用が期待さ



図1 末端塩基対形成に応答する DNA 担持ナノ 粒子の分散安定性.

れている。しかしながら、PNIPAAmセグメントの疎水性相互作用による会合で形成されたミセ ルは、LCST以下では崩壊してしまう。そこで本研究では、一次構造の明確なPNIPAAm-DNA共 重合体[1,2]からなるミセルを化学架橋で安定化させることを試み、その架橋型DNA担持ポリマ ーミセルの構造や界面物性について評価した。

NIPAAmと2-aminoethyl methacrylate hydrochloride (AEMA)から成り、片末端にアジド基を有 する共重合体(P(NIPAAm-co-AEMA))を原子移動ラジカル重合法(ATRP)により合成した。ア ルキンを有する一本鎖オリゴDNA(9塩基)とクリック反応によりカップリングさせ、 P(NIPAAm-co-AEMA)-ssDNAを得た (スキーム 1)。得られた共重合体を0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9) に溶解させた。50°Cに加温してナノ粒子を形成させた後に、disuccinimidyl glutarate (DSG)を添 加し、そのまま一定時間保持すること

(DSC)、紫外可視分光光度計 (UV-Vis) や動的光散乱法 (DLS) な どを用いて、得られた試料の物性評価 を行った。ミセル形成や粒子内部の構 造などに関する詳細は、大型放射光施 散乱 (SAXS) 法により解析した。



設SPring-8 (BL-45XU)での小角X線 スキーム 1 ATRP とクリック反応による DNA コンジュゲートの 合成.

図2(a) に示すように、加熱によりPNIPAAm水溶液は30~35 ℃付近で白濁する。一方で、 [NIPAAm]:

[AEMA] = 400 : 50 の仕込比で得られた PNIPAAm-co-AEMAは、40°C以上でも大きな濁度変化を 示すことはなかった。LCST以上で粒径およそ80 nmほど の粒子を形成していることが確認された。DNAをカップ リングさせた共重合体も同様の挙動を示すが、このミセ ルは塩に対して非常に安定であった。LCST以上では、 会合したPNIPAAmセグメントを核とし、表層がDNAで 覆われたナノ粒子(未架橋)を形成していると考えられ る。DSGによる3時間ほどの架橋反応で得られた架橋型 ミセルも昇温による濁度変化を示さず、粒子は安定的に 分散していると考えられる。DSCにより(図2(b))、 PNIPAAmの相転移が認められることから、架橋型ミセ ルもLCST以上で脱水和を起こしている。一方、DLS測 定からは、このLCSTを境に粒子サイズが可逆的に変化 することが認められた。架橋型DNA担持ナノ粒子のサイ ズの可逆的な熱応答性はPNIPAAmの水和・脱水和によ って促進されていると示唆された。

さらに、昇温過程における構造の変化をSAXS法によ り詳細に調べた。未架橋のP(NIPAAm-co-AEMA)-DNA は、LCST以上でゼロ散乱強度の急激な増大が認められ た(図3a、3c)。これは見かけの分子量が増大している ことを意味している。それと同時に慣性半径も増大して いることから(図3c)、分子鎖の会合によりミセルが形 成されたことがわかる。一方、架橋型担持ナノ粒子の SAXS解析の結果では、慣性半径が昇温と共に収縮する ものの、ゼロ散乱強度は温度に依らずほぼ一定であった (図3b、3d)。LCST以下でも架橋型ミセルの崩壊は起こ らず、構造が保持されたままであることを強く支持して いる。LCST以上での分子鎖の会合やミセルどうしの凝 集は生じず、ミセル内での脱水和によりサイズ変化を起 こしていることが明らかになった。



**図 2** 透過率の温度依存性(a)と DSC プロファイ ル(b). 赤色が DNA 担持ナノ粒子のデータを示 す. 試料濃度 0.5 mg/mL で、1°C/min で昇温した.



**図 3** 昇温過程における SAXS プロファイル、慣性 半径 (*R<sub>g</sub>*) とゼロ散乱強度 (*I*(0))の温度依存性: (a, c) 架橋前、(b, d) 架橋後.

#### 【参考文献】

[1] Pan, P.; Fujita, M.; Ooi, W. Y.; Sudesh K.; Takarada, T.; Goto, A; Maeda, M. *Polymer* 2011, **52**, 895–900.
 [2] Pan, P.; Fujita M.; Ooi, W. Y.; Sudesh K.; Takarada, T.; Goto, A; Maeda, M. *Langmuir* 2012, **28**, 14347-14356.

# Ultrasensitive dark field microscopic detection of amyloid aggregates using antibody-modified gold nanoparticles

Tong Bu, Tamotsu Zako, Mizuo Maeda

Bioengineering Laboratory, RIKEN

Protein aggregation, and amyloid formation in particular, has recently attracted considerable interest, because the associated processes are likely to be the key issues in the pathology of more than 50 types of diseases, including Alzheimer's disease (AD). These amyloids are cytotoxic, and their physiological presence and tissue deposition are associated with neurodegenerative diseases, such as AD and other types of amyloidosis. The extracellular and intracellular aggregates of Amyloid- $\beta$  peptides (A $\beta$ ), including soluble oligomers, protofibrils, and mature amyloid fibrils, are considered to be the main cause for AD. Thus, the detection of these aggregates is of great importance for the early recognition of AD.

Previously we developed a rapid and simple method for detecting A $\beta$  aggregates using A $\beta$  antibody-conjugated gold nanoparticles (AuNPs) (Fig. 1a) [1]. AuNPs have attracted great attention due to their advantageous properties, including stability, activity, and surface chemistry. For example, the aggregation of AuNPs accompanied by a surface plasmon shift can be recognized by a pronounced colour change (from red to purple or to transparent), enabling their potential applications as sensors for DNA, heavy metal ions and protein. For the detection of A $\beta$ , A $\beta$  antibody was conjugated onto the surface of AuNPs. The formation of AuNP precipitates by A $\beta$  aggregates could be confirmed by the naked eye within 1 h with LOD of about 5  $\mu$ M.

We also previously demonstrated that 100 fM of DNA could be detected by analyzing DNA-induced AuNP aggregates at the single particle level using dark field microscopy (DFM), which can detect scattered light from individual single metal nanostructures [2]. The sensitivity was much better than that obtained with conventional methods such as colour change, UV-VIS spectroscopy and DLS. In this work, in aim to achieve higher sensitivity of A $\beta$  aggregates detection, DFM was also employed to detect the A $\beta$  aggregates-induced AuNPs assembly.

For the detection of A $\beta$ , A $\beta$  antibody was conjugated onto the surface of AuNPs (Ab-AuNP). Different concentration (from 0 to 5  $\mu$ M) of A $\beta$  monomer and fibrils were incubated with Ab-AuNP for 1 h. 6  $\mu$ L of the incubated samples were deposited onto glass slides and covered with cover glass. Ab-AuNPs were identified as bright orange-colored spots in DFM images and the scattered light intensity of each spot was quantified. The ratio of aggregates at each A $\beta$  aggregates concentration was estimated to calculate the LOD. The LOD was evaluated by the 3 $\sigma$  criterion method, where  $\sigma$  denotes the standard deviation of zero-concentration background data (n=6).

DFM images of Ab-AuNP with addition of 5  $\mu$ M A $\beta$  monomer and fibril were shown in Figure 1b. AuNP sample incubated with A $\beta$  fibrils showed much brighter spots, while AuNP sample with the monomer does not show significant difference with AuNP only sample. The Size of AuNP aggregates was estimated by the intensity of each spots in DFM images. Figure 1c shows intensity histograms of dispersed and aggregated AuNPs induced by addition of various amount of A $\beta$  fibrils. Larger aggregates were observed when an increased amount of A $\beta$  fibrils was added. As shown in Figure 1d, the ratio of aggregates increased at higher concentrations of the A $\beta$  fibrils, and LOD was determined to be as low as 40 pM, which was much better than the previous sensitivity with naked eye observation (5  $\mu$ M).

In conclusion, we demonstrated that DFM could be utilized to detect the  $A\beta$  aggregates at the single-particle level. The detection sensitivity reached as low as pM level [3]. This study further proved the potential application of DFM in the analytical methods based on AuNP aggregations.



**Fig.1** (a), Amyloid aggregates detection system using antibody-conjugated gold nanoparticles (AuNPs). In the presence of Aß aggregates such as fibrils, AuNPs could produce precipitates via the interactions between Aß aggregates and Aß antibody on the surface of AuNPs, while no change in the color of AuNPs solution was observed in the presence of Aß monomers (b), DFM images of AuNPs incubated with Aß monomer (left), Aß fibrils (middle). DFM image of AuNPs only sample was shown as a control (right). The scale bar=20  $\mu$ m. (c), Intensity histogram of AuNPs aggregates observed by DFM caused by adding different concentration of Aß fibrils. (d), Ratio of aggregated AuNPs at various Aß fibrils concentrations.

#### References

[1] Sakono, M.; Zako, T.; Maeda, M. Anal. Sci. 2012, 28, 73. [2] Bu, T.; Zako, T.; Fujita, M.; Maeda, M. *Chem. Commun.* 2013, 49, 7531. [3] Bu, T.; Zako, T.; Maeda, M. 第 66 回日本生物工学会年会, 2014, 1P258

# Adsorption and separation of amyloid beta aggregates using nanomagnets coated with charged polymer brushes

Tamotsu Zako<sup>1</sup>, Bu Tong<sup>1</sup>, Martin Zeltner<sup>2</sup>, Wendelin Stark<sup>2</sup>, Mizuo Maeda<sup>1</sup>

Bioengineering Laboratory, RIKEN<sup>1</sup>, Institute for Chemical and Bioengineering, ETH Zurich<sup>2</sup>

Amyloid beta (A $\beta$ ) protein is a 39- to 43-amino acid polypeptide that is the primary constituent of senile plaques and cerebrovascular deposits in Alzheimer's disease (AD). This amphiphilic peptide spontaneously forms fibrillar aggregates in aqueous solutions at or below the physiological pH. These A $\beta$  fibrils are cytotoxic, and their physiological presence and tissue deposition are associated with AD. Recent studies also indicated that soluble oligomeric A $\beta$  aggregates are more toxic and cause AD.

By virtue of their unique physical and structural properties, nanoparticles (NPs) are increasingly suggested for the adsorption and extraction of complex compounds in biomedicine, though there is limited understanding of the relationship between the physicochemical properties of nanomaterial and its interaction with target biological molecules. Magnetic NPs have attracted much attention for application as rapid separation agents to purify or remove target compounds [1]. However, not much attention has been paid to the application of NPs for the removal of toxic proteins such as  $A\beta$  aggregates, including oligomers and fibrils.

In this study, strongly magnetic NPs were functionalized with poly [3-(methacryloyl amino) propyl] trimethylammonium chloride (polyMAPTAC) and employed for adsorption and separation of A $\beta$  aggregates. C/Co@polyMAPTAC particles are ferromagnetic carbon-coated cobalt NPs functionalized with a highly charged polymer that is prepared via surface-initiated atom-transfer radical polymerization [2]. Since these particles show unprecedented stability in buffer solutions because of the positively charged polymer immobilized on the surface, we anticipated that they could capture negatively charged A $\beta$  aggregates.

The adsorption and separation of the A $\beta$  fibrils by C/Co@polyMAPTAC was examined by detecting the amount of A $\beta$  sample in the supernatant by dot blot assay using anti-A $\beta$  (Fig. 1a) after magnetic separation of the particles. The A $\beta$  sample solutions (monomers or fibrils) were incubated with 50 µg/mL particles. After collecting the NPs using the magnet, the supernatant was applied to the nitrocellulose membranes for dot blot assay. As shown in Fig. 1b, no fibrils were left in the supernatant, indicating that the particles could successfully adsorb and separate A $\beta$  fibrils. Interestingly, the amount of A $\beta$  monomers did not decrease after they were mixed with the particles, suggesting selective binding of C/Co@polyMAPTAC to the fibrils.

Recent studies revealed that  $A\beta$  oligomers are considered to cause AD, and hence it is important to remove  $A\beta$  oligomers. Characterization of  $A\beta$  oligomer adsorption was carried out by native-PAGE/Western blot method because the prepared soluble oligomer was actually a mixture of monomers, oligomers and a small amount of fibrils. As shown in Fig. 2a, soluble oligomers were clearly removed by incubation with C/Co@polyMAPTAC, while the monomer was left in the supernatant. It is notable that fibrils, which were observed at the well of the gel, were also removed, supporting the previous result (Fig. 1). These results indicate that oligomer and fibril could be selectively extracted by the particles. TEM observation also supported the association of particles with the Aß oligomers (Fig. 2b).

In this study, strongly magnetic carbon-coated cobalt NPs that were functionalized with positively charged polymers were employed to capture A $\beta$  aggregates. We anticipated that the charge interaction between the particles and the negatively charged A $\beta$  aggregates is important. To confirm this idea, fibril adsorption in the presence of salt was examined. Various amounts of NaCl (200, 500 and 750 mM) were added to the reaction buffer, and the amount of unbound A $\beta$  fibrils in the supernatant was estimated (Fig. 3). As shown in the figure, the binding of C/Co@polyMAPTAC to the A $\beta$  fibrils decreased in the presence of higher concentrations of salt, confirming that electrostatic interaction is important for adsorption.

In conclusion, we demonstrated the use of strongly magnetic few-layer graphene-coated cobalt NPs functionalized with a charged polymer, polyMAPTAC, for the adsorption and extraction of toxic A $\beta$  aggregates, including fibrils and oligomers. Interestingly, the A $\beta$  monomer was not captured by C/Co@polyMAPTAC, suggesting that binding of the particles to the A $\beta$  molecules is toxic species-selective. We also showed that the particles reduce the cytotoxicity of the A $\beta$  aggregate solutions. This study should be useful the further exploring the application of NP adsorption in mediating A $\beta$  toxicity.



Fig.1 (a) Adsorption and separation of Aß aggregates with C/Co@polyMAPTAC. (b) Dot blot assay to estimate the selective separation of the Aß fibrils by C/Co@polyMAPTAC (Left). The relative intensity indicates the amount of fibrils and monomers left in the supernatant after magnetic separation (right). The intensities of the samples without particles were normalized to 100%.



Fig.2 (a) Native PAGE/Western blot analysis of adsorption and separation of Aβ oligomers by C/Co@polyMAPTAC. (b) Transmission electron micrograph of Aβ oligomers incubated with particles (black dots). The scale bar = 200 nm. (c) Adsorption of C/Co@polyMAPTAC onto Aβ fibrils at different salt concentrations. The relative intensities were shown as a bar graph (right). The intensities of the samples without particles were normalized to 100%.

#### References

[1] Rotzetter, A.C.C.; Schumacher, C.M.; Zako, T.; Stark, W.J.; Maeda, M. *Langmuir* 2013, 29, 14117. [2]
Zeltner, M.; Grass, R.N.; Schaetz, A.; Bubenhofer, S.B.; Luechinger, N.A.; Stark, W.J. *J. Mat. Chem.*, 2012, 22, 12064

## マイクロ流路中に閉じ込めたミドリムシの 外部化学刺激の効果の計測

尾笹一成<sup>1</sup>, Jeesoo Lee<sup>2</sup>, Simon Song<sup>2</sup>, 前田瑞夫<sup>1</sup> 理研・前田バイオ工学<sup>1</sup>, Hanyang University・Mechanical Eng.<sup>2</sup>

ミドリムシは光合成を行う水棲の単細胞微生物(図1) で、鞭毛によって遊泳し、光合成に適当な光強度の場所 に留まる光走性と環境化学物質に反応する化学走性を示 す。生物の有する諸性質を化学反応の「階層構造を持つ 分子システム複雑系」と見た場合、ミドリムシの走性は 階層の最上層の複雑系レスポンスに位置する。具体的に は、光や化学物質に反応するレセプタータンパクが刺激 を受け、細胞内メタボリック信号伝達系を通じて鞭毛の 運動が制御される。これまでの他グループの研究によ って刺激レセプター分子は特定されつつあるが、中間 信号伝達系や鞭毛運動の制御系に関与しているタン



図1. 遊泳性光合成微生物ミドリムシ。

パク分子システムなどは、系の複雑さゆえにまったくわかっていない。

我々は分子システム階層の最上層の走性を利用して環境センシングマイクロデバイスなどを 構築するマイクロエージェント化戦略と、酵素タンパクのノックダウンの走性への影響を調べて 信号伝達系や鞭毛運動制御系に迫る走性因子解明戦略を立てて研究を行っている[1]。前者のマ イクロエージェント化戦略のひとつとして、ミドリムシをマイクロスケールのセンサーおよびイ ンジケーターとして用いる研究を進めた。マイクロ流路中の完全閉空間にミドリムシ細胞群を閉 じ込め、その運動をリアルタイムで計測数値化する技術を開発した。それによって計測したミド リムシのCO2に対する化学走性を計測し、環境センターとしての有効性を実証してきた[2]。

化学走性計測のために作製したマイクロデバイスの流路構造を図2に示す。マイクロ流路は多 孔質で透明なシリコン樹脂であるPDMSで作製しており、下面はスライドグラスとなっている。16 の扇形部分と中央の円形部分がミドリムシ細胞群を閉じ込めるエリアで、その周囲を2本のバイ

パス流路が取り囲む構造となっている。2本のバイパス にそれぞれテスト流体と比較流体を流すと流体分子は PDMSの壁を透過拡散し、中央の閉空間(マイクロアクア リウム)に濃度勾配となって現れる。その化学濃度勾配 をミドリムシが感知し、テスト流体側(正の化学走性の 場合)あるいは比較流体側(負の化学走性の場合)に集 まる。ミドリムシの行動を定量的に捉えるために、顕微 鏡に取り付けたビデオカメラからの画像をフレーム毎 に差分をとり、閾値による2値化と積算を行い1.6秒お きにピクセル数として計数する(Trace Momentum, TM)。この処理によって細胞の個体識別を行わずに、



図2.作製したマイクロデバイスの流路構造。 スケールバーは 1mm。

遊泳している細胞のみを区画ごとにリアルタイムで定量計測できる。テスト流体に近い7区画の TM (s-TM) と比較流体に近い7区画のTM (r-TM) よりChemotactic reaction ratioを (s-TM - r-TM) /(s-TM + r-TM)で算出する。

1.5%-H202に対するミドリムシの反応は単純な負の化学走性[2]ではなく、図3に示したように 時間とともに複雑な振る舞いを示した。H202導入後にミドリムシは負の走性によって反対側に偏 るが、10分程度で分布が逆転する。図4はミドリムシの運動形態の変化で、分布が逆転した状態 ではミドリムシは直線的な遊泳ではなく、回転し続けている。このことより、H202の強い酸化作 用によって、ミドリムシの細胞内のredox状態が撹乱され、運動の制御ができなくなっているこ とが推定される。多くのセルがH202サイドにトラップされ、やがて運動しなくなっていくことが わかった。



図4. (a) タイミングA、ミドリムシは H202 の濃度の低い所に集まっている。(b) タイミングB、ミ ドリムシは H202 の濃度の高いところに分布しており、その運動が回転になっている。(c) タイミング C、ミドリムシの運動が低下し、観察される数が減少している。

### 【参考文献】

[1] K.Ozasa, J.Lee, S.Song, M.Hara, M.Maeda, LabChip, 11 (2011) 1933-1940. "Two-dimensional optical feedback control of Euglena confined in closed-type microfluidic channels". [2] K.Ozasa, J.Lee, S.Song, M.Hara, M.Maeda, LabChip, 13 (2013) 4033-4039. "Gas/liquid sensing via chemotaxis of Euglena cells confined in an isolated micro-aquarium".

### ルイス酸触媒によるアミノ基の水中での直接的グアニジン化反応

 「坪倉一輝<sup>1,2</sup>,岩田隆幸<sup>1,3</sup>,泰地美沙子<sup>1</sup>, Almira Kurbangalieva<sup>4</sup>,深瀬浩一<sup>3</sup>, 中尾洋一<sup>2</sup>,田中克典<sup>1,4,5</sup>
 理研・田中生体機能合成化学<sup>1</sup>,早大先進理工<sup>2</sup>,阪大・院理<sup>3</sup>, カザン大学アレクサンドルブトレーロフ研究所<sup>4</sup>,JST さきがけ<sup>5</sup>

グアニジン官能基はアミノ酸のアルギニンに見られる骨格であり、リレンザをはじめとする多 くの医薬品や生理活性を持つ天然物に見られ、これまで多くの合成法や試薬が開発されてきた。 グアニジン官能基は、アミンから調製されることが最も直接的ではあるが、カルボジイミドとい った反応試薬を予め調製する必要があり、アミンからの直接的なグアニジン化法は少ない。また、 これまでに用いられてきたグアニジン化反応は、有機溶媒でのみ使用可能といった方法が多く、 水溶性の高い原料となるアミンや生成物のグアニジンに対して、その汎用性は低いといえる。

今回我々は水中でも使用可能な土類金属の Sc(OTf)<sub>3</sub>をシアナミドと作用させることで、カルボ ジイミド中間体が反応系内に生成することを見出し、これに対してアミンを作用させることで、 グアニジンを合成する方法を開発した(Scheme 1)。その詳細について、以下に記述する。



Scheme 1 Sc(OTf)3を用いた新規グアニジン化反応

まず、我々は水中で利用可能な数種類のルイス酸を用いて、アニリンのグアニジン化反応を検 討した(Figure 1)。その結果、Yb(OTf)<sub>3</sub>, In(OTf)<sub>3</sub>, Sc(OTf)<sub>3</sub>を用いた場合に、高い収率でグアニ ジン化合物が得られた。また Sc(OTf)<sub>3</sub>についてさらに触媒量の検討を行った結果、10 mol%の触 媒を用いることで最も良い成果を得た。このように、水中グアニジン化反応において、10 mol% の Sc(OTf)<sub>3</sub>触媒を用いる条件を見出した。

NH₂ ↓ +	H <sub>2</sub> N−C≡N (1.2 eq)	$\frac{10 \text{ mol\% Lewis acid}}{\text{H}_2\text{O}, 100 ^{\circ}\text{C}}$	<b>F</b> N	₩ NH <sub>2</sub>
Lewis acid	yield %	Lewis acid	yield %	
Nd(OTf) <sub>3</sub>	5	Y(OTf) <sub>3</sub>	43	
Zn(OTf) <sub>2</sub>	9	Yb(OTf) <sub>3</sub>	81	
Cu(OTf) <sub>2</sub>	10	In(OTf) <sub>3</sub>	82	
AgOTf	12	Sc(OTf) <sub>3</sub>	95	
InCl <sub>3</sub>	16	Sc(OTf) <sub>3</sub> (5 mol%)	66	
La(OTf) <sub>3</sub>	19	Sc(OTf) <sub>3</sub> (2 mol%)	34	
Tm(OTf) <sub>3</sub>	24			

Figure 1 グアニジン化反応における触媒検討

本反応の中間体、反応機構を考察するために、シアナミドに対して1当量の Sc(OTf)<sub>3</sub>を作用させ、<sup>13</sup>CNMR 測定を行った(Scheme 2)。その結果、シアナミド炭素に由良する 118 ppm のシグ ナルが、カルボジイミドの炭素に相当する 162 ppm のシグナルへとシフトした。以上の結果か ら、本反応は、まず Sc(OTf)<sub>3</sub>がシアナミドとカルボジイミド中間体を形成することでシアナミド として活性化し、これに対してアミンが作用することでグアニジン化が進行するという反応機構 が明らかとなった。



Scheme 2 Sc(OTf)3 共存下におけるシアナミドの <sup>13</sup>CNMR シグナルの変化

この結果を基に、様々なアミン(Figure 2: 青色部分)を用いて、グアニジン化合物を以下の収 率で合成した。本法は様々な置換基を持った芳香族アミン、複素環上のアミン、通常のアルキル アミン、二級アミン、さらにアミノ酸に対しても適用が可能であり、さらには5つのアミノ酸か ら構成されるペプチドについてもグアニジン化が可能であることが判明した。



Figure 2 新規グアニジン化法の基質一般性

以上のように、我々は Sc(OTf)<sub>3</sub> 触媒を用いて、シアナミドを系内で効率的に活性化することに 成功し、これまでの方法のように予め試薬を調製することなく、水中でアミンをグアニジン化で いる新規な手法を開発した。

【参考文献】

(1) Tsubokura, K.; Iwata, T.; Taichi, T.; Kurbangalieva A.; Fukase, K.; Nakao, Y.; Tanaka, K. Synlett 2014, 1302-1306.

# アクロレインによる生体内での8員環化合物の生成と その酸化ストレスマーカーへの変換反応の発見

高松正之<sup>1,2</sup>,深瀬浩一<sup>2</sup>, Almira Kurbangalieva<sup>3</sup>,田中克典<sup>1,3,4</sup>

理研・田中生体機能合成化学<sup>1</sup>, 阪大・院理<sup>2</sup>, カザン大学アレクサンドルブトレーロフ研究所<sup>3</sup>, JST さきがけ<sup>4</sup>

これまでに我々は、酸化ストレス(活性酸素生成下など)条件下で、細胞内のポリアミンや脂 質より産生するアクロレイン(不飽和アルデヒド)がアミン類と速やかに反応し、イミノ[4+4]環 化反応を引き起こすことを明らかにしてきた(図1左)<sup>1,2,3</sup>。すなわち、アクロレインとベンジル アミンが反応した際には架橋型の8員環化合物であるトリアザビシクロノナンを与え(図1右 (a))、一方、ポリアミンなどの分子内にアミノ基を有する分子と反応した場合には、8員環を含 む縮環構造を有するジアザシクオクタンを与えることを見出してきた(図1右(b))。



今回我々は、図1のイミノ [4+4] 環化反応におい て、分子内に水酸基を含む場合でも8員環を含む縮 環構造が導かれるのではないかと予想し、生体に存 在しているアミノアルコールとアクロレインとの 反応性を検証した(図1右(c))。生体由来のアミ ノアルコールとしてスフィンゴシンおよびノルア ドレナリン誘導体を選び、アクロレインと反応させ た後に詳細な構造解析を行った(図2)。その結果、 いずれの場合にも8員環を含む縮環化合物を定量 的に与えることが明らかとなった。

さらに、生成した8員環化合物自体に関して、大変興味深い知見を得ることができた。図3上段に示



す、水酸基でアセタールとして安定化された8員環化合物を室温で有機溶媒や緩衝溶液に溶解し、 室温で放置しても変化はほとんどなかったが、図3中段のアミノアセタールを含む8員環化合物 は、わずかながら酸化ストレスマーカーとして知られている3-ホルミル-3,4-デヒドロピペリジン

(FDP) へと次第に変換されることが判明し た。さらに、図3下段の架橋型である8員 環化合物は、2日間、室温で放置すること によって、定量的にFDPのアルデヒド型およ びそのイミンへと変換されることが明らか となった。以上の結果から、8員環化合物 のアミナール部位の安定化効果に従って、 アクロレインとの反応によってまず得られ るこれら8員環化合物が次第に酸化ストレ スマーカーへと変換されることが分かっ た。すなわち、アセタールの8員環構造の 安定性への寄与が少ない場合には、一旦、 速やかに生成する8員環構造がより安定な デヒドロピペリジン構造へと変換される。



以上の結果は、我々が見出したイミノ [4+4] 環化反応によって生じる8員環化合物がアクロレインとの最初の生成物であり、これは一般的に知られている酸化ストレスマーカーの生成中間体であることを示す。これまでに酸化ストレスマーカーのFDPは、二段階のマイケル付加/アルドール反応による経路によって生成することが提案されていたが(図4、Route A)<sup>4</sup>、8員環を経由した本経路(Route B)もFDPの形成に寄与していることが示唆される。一方、最終生成物であるFDPには特筆すべき生理活性が報告されていないが、我々の8員環化合物が真のアミンとの一次反応生成物であり、我々の成果を基に新たな活性が見出されることが期待される<sup>5</sup>。



【参考文献】

Tsutsui, A.; Tanaka, K. Org. Biomol. Chem. 2013, 11, 7208. [2] Tanaka, K.; Matsumoto, R.; Pradipta, A. R.; Kitagawa, Y.; Okumura, M.; Manabe, Y.; Fukase, K. Synlett 2014, 7, 1026. [3] Tsutsui, A.; Pradipta, A. R.; Saigitbatalova, E.; Kurbangalieva, A.; Tanaka, K. Med. Chem. Commun., 2014, in press. [4] Uchida, K.; Kanematsu, M.; Morimitsu, Y.; Osawa, T.; Noguchi, N.; Niki, E. J. Biol. Chem. 1998, 273, 16058. [5] Takamatsu, M.; Fukase, K.; Kurbangalieva, A.; Tanaka, K. Bioorg. Med. Chem. 2014, 22, 6380.

# アルギニンの翻訳後修飾に学ぶageladine A天然物の ワンポット全合成と活性リモデリング分子の創製

岩田隆幸<sup>1,2</sup>、大塚悟史<sup>3</sup>、坪倉一輝<sup>1,3</sup>、新井大祐<sup>3</sup>、深瀬浩一<sup>2</sup>、中尾洋一<sup>3</sup>、田中克典<sup>1,4,5</sup>

理研・田中生体機能合成化学<sup>1</sup>, 阪大・院理<sup>2</sup>, 早大先進理工<sup>3</sup>, カザン大学アレクサンドルブトレーロフ研究所<sup>4</sup>. IST さきがけ<sup>5</sup>

共役アルデヒドと各種アミンから得られる共役イミンは、分子内に求核部位と求電子部位の両者 を有しており、多種多様な反応性を示す。これら共役イミンは、生体内でもリジンやアルギニン を代表とする生体内アミンと脂質代謝産物から生成し、様々な機能を担っていると考えられる。 従って、生体内での共役イミンの反応性を理解することは、アルカロイド天然物の新しい合成法 開発のヒントとなるとともに、生体機能を制御する分子の創製に繋がる可能性を有する。我々は、 アルギニン残基に対する翻訳後修飾反応を鍵として、置換2-アミノイミダゾール合成法を開発し た。本法を用いて、顕著な血管新生阻害活性を持つ ageladine A の「ワンポット全合成」に成功 するとともに、ageladine A を神経分化促進活性を持つ分子へと進化させ、天然物の活性をリモ デリングすることに成功した。

2-アミノイミダゾール構造は多くの生理活性分子に見られるが、シンプルな構造にも関わら ず、置換基導入に耐えうる一般的合成法は非常に限られている。一方で、ごく稀ではあるが、タ ンパク質のアルギニンが脂質代謝物である共役アルデヒドにより翻訳後修飾を受け、イミン形成 と分子内共役付加を経て、2-アミノイミダゾールが生成することが報告されている(図1a)。そこ で、この翻訳後修飾をヒントにして、4-置換2-アミノイミダゾール誘導体の合成法を検討した。

様々な置換基を持つグ アニジンに対して、フマ ルアルデヒド酸メチル1 をメタノール中で24時間 作用させたところ(図1b)、 保護アルギニンとの反応 では加水分解の後、65% の収率で2-アミノイミダ ゾールを与えた。一方、 アルギニンのモデルとし て、*N*-フェニルグアニジ ンを用いた場合では、



86%の収率で反応が進行したが、直鎖アルキル基やベンジル基で置換されたグアニジンの場合に は多くの複雑な生成物を与えた。さらに、電子求引基であるアセチル基を持つグアニジンを用い た場合には、反応は全く進行しなかった。以上の結果から、天然のアルギニンはそのアミノ酸側 鎖により、うまく共役アルデヒドとの反応性を制御して翻訳後修飾を実現していることが判明し た。また、我々はこれをフェニル基で模倣できることを見出した。

そこで、以上の結果を基に、置換2-アミノイミダゾール誘導体のワンポット合成を検討した(図 1c)。様々な置換基を持つアニリン誘導体に対して、まずシアナミドと反応させることで対応す るN-フェニルグアニジンへと変換した後、続けて鍵反応であるイミダゾール環の形成、さらに加 水分解を一つのフラスコ内で一挙に行うことで、液相ライブラリー合成を実現した。

次いで我々は、上記に確立したワンポット置換2-アミノイミダゾール合成法を利用することに より、海産天然物であり、様々な活性を示す可能性を秘めるageladine A天然物やその類縁体を 「ワンポット」で合成できるのではないかと考えた。すなわち、図2に示したように、まず置換 フェニル基を持つグアニジン誘導体を原料として、共役ジアルデヒドと反応させることにより、 (1) イミン形成の後、(2) 分子内共役付加によりイミダゾール環を構築する。次いで、(3) アンモニアを作用させることにより、イミンを形成し、さらにエナミンへと異性化させた後、(4) 別のアルデヒドとイミン形成させた後、続けて(5) アザ電子環化反応を進行させる。生成する ジヒドロピリジンは、(6) 速やかに自然酸化を受け、ピリジン環が形成された後に、最後に(7) アリール基の切断を行う。このように、適当な時間間隔でフラスコ内に試薬を導入することによ り、全ての行程をワンポットで実現できると考えた。



種々反応条件を検討した結果、イミダゾール形成反応の活性化基として働くと同時に、チオリ シスによって脱保護が可能なジニトロフェニル基を持つグアニジン2を原料として、共役ジアル デヒド3をDMF中で10分間、室温で作用させ、まず鍵反応であるイミダゾール環形成を行った。 次いで、反応溶液中にアンモニウム塩とアルデヒド、および共溶媒としてメタノールを作用させ、 75 °Cでさらに2時間撹拌した。最後に、チオエタノール、炭酸水素ナトリウム、および水を導 入し、室温で1時間撹拌した。生成する混合物の中からHPLCによって分離操作を行うことによ り、天然物であるageladine Aを総収率5~13%、さらにより高い活性と選択性を持つピリジン類 縁体については22%という高収率でワンポットで合成することに成功した。

上記で確立した「ワンポット全合成」を用いれば、原料や反応試薬を変更するだけで様々な ageladine Aの類縁体4を簡単に合成することが可能となる。種々置換基を持つアニリン誘導体や アルデヒドを用いて、同様のワンポット反応を実施することによって、20種類以上の類縁体を迅 速に合成することに成功した。これら類縁体の活性を検討したところ、顕著な神経分化促進活性 をもつ数種の類縁体を見出した。血管新生阻害活性を持つageladine Aを初期構造として、その 活性を「ワンポット全合成」によりリモデリングすることに成功した。

以上のように、アルギニンの翻訳後修飾から共役イミンの新規な反応性を学び、2-アミノイミ ダゾール合成法へと展開した。さらに天然物であるageladine Aおよびその類縁体のワンポット 全合成へと展開するとともに、天然物の血管新生阻害活性を神経分化促進活性へと進化させるこ とに成功した。