

(第 39 回)

公益財団法人 篷庵社

研究助成発表会

講演要旨集

令和 2 年 7 月 3 日 (金)

於 ヒルトン大阪

# プログラム

日 時 : 令和 2 年 7 月 3 日 (金) 10 時 30 分から 15 時 35 分まで

場 所 : ヒルトン大阪 4階 真珠の間

\* 所属は講演当時のもの

10:00-10:35 ご挨拶 公益財団法人 蓬庵社 理事長 武田 禮二

演題および演者(講演 25 分、討論 10 分)

座 長

10:35- 1. 肝障害を有する医薬品の代謝活性化機構の解明と  
それを基盤にした低毒性医薬品の創製  
**大江 知之 先生**  
(慶應義塾大学薬学部)

(蓬庵社名誉理事)  
廣部 雅昭 先生  
代理  
(蓬庵社理事)  
長野 哲雄 先生

11:15- 2. ブドウ球菌毒素が誘導するスーパー抗原活性に対する  
植物由来成分および生薬による制御機構の網羅的解析  
**増田 修一 先生**  
(静岡県立大学食品栄養科学部)

(蓬庵社元評議員)  
伊勢村 護 先生

11:55-12:40 昼 食 休 憩

12:40- 3. ストレスによる薬物欲求増大の神経メカニズム  
**金田 勝幸 先生**  
(金沢大学医薬保健研究域薬学系 薬理学研究室)

(蓬庵社理事)  
佐藤 公道 先生

13:20- 4. 超高感度蛍光共鳴エネルギー移動による定量的  
バイオセンシングを可能とする新しい糖鎖高分子の創出  
**松岡 浩司 先生**  
(埼玉大学大学院理工学研究科)

(蓬庵社評議員)  
西村 紳一郎 先生

14:00-14:15 休 憩

14:15- 5. 生活習慣病に対する新しい診断治療法の開発  
**西山 成 先生**  
(香川大学医学部薬理学)

(蓬庵社評議員)  
岩尾 洋 先生

《特別研究助成》

14:55- 6. 小児脳難病の病態解析によって発見された  
若年脳遺伝子の機能解明  
**森 雅樹 先生**  
(滋賀医科大学 神経難病研究センター)

(塩野義製薬(株)  
創薬疾患研究所)  
塚本 輔 氏

## 目 次

1. **大江 知之**  
「肝障害を有する医薬品の代謝活性化機構の解明と  
それを基盤にした低毒性医薬品の創製」  
1
2. **増田 修一**  
「ブドウ球菌毒素が誘導するスーパー抗原活性に対する  
植物由来成分および生薬による制御機構の網羅的解析」  
12
3. **金田 勝幸**  
「ストレスによる薬物欲求増大の神経メカニズム」  
22
4. **松岡 浩司**  
「超高感度蛍光共鳴エネルギー移動による定量的バイオセンシングを  
可能とする新しい糖鎖高分子の創出」  
32
5. **西山 成**  
「生活習慣病に対する新しい診断治療法の開発」  
42
6. **森 雅樹**  
「小児脳難病の病態解析によって発見された若年脳遺伝子の機能解明」  
51

# 肝障害を有する医薬品の代謝活性化機構の解明とそれを基盤にした

## 低毒性医薬品の創製

慶應義塾大学薬学部

大江知之

### 1. はじめに

医薬品は生体内に入ると主に肝臓で代謝を受け、水溶性が高い代謝物に変換され安全に排泄される。しかし、代謝されることで求電子性やラジカル性を有する反応性の高い代謝物が生成し毒性が発現することがある。この過程を「代謝活性化」といい、生成する代謝物は「反応性代謝物 (Reactive Metabolite; RM)」と呼ばれる。RM はタンパク質や核酸などの生体高分子と不可逆的に結合し、アレルギー、肝毒性、組織壊死、変異原性やがん原性の原因になることが知られている<sup>1</sup>。

医薬品やその候補品の毒性が臨床段階または上市後に認められた場合、最悪その後の開発中止や医薬品市場からの撤退という結果となることも多い。医薬品の毒性については、上市される前に非臨床安全性試験や臨床試験で十分評価が行われるものの、上市後初めて毒性が報告される例は後を絶たない。特に、特異体質性薬物反応は、極めて発生件数が少なく、個人の体質や遺伝的要因に依存するが、症状が現れた場合重篤化することが知られている<sup>2</sup>。現在、特異体質性薬物反応の機序については様々な仮説が提唱されているが、多くの場合その最初のトリガーはRMの生成が関係していると考えられている。従って、創薬研究におけるRMの有無の評価は、安全性の高い医薬品の創製という観点から極めて重要で、最近では製薬企業において薬物動態評価項目の1つとして行われていることが多い<sup>3,4,5</sup>。しかしながら、RMの生成には、種差、性差、臓器特異性もしくは個人差などが見られ、また、生体内にはRMを不活性化するシステムも存在するため、ヒトにおける化合物の代謝活性化による毒性発現を正確かつ定量的に予測することは容易ではない。現時点では、創薬初期段階で化合物のRMリスクを評価し化合物を誘導化しておくことが、こうしたリスクを軽減する手段の一つと考えられる。RMの評価法として最も信頼性が高いものに共有結合試験がある。肝ミクロソームあるいは肝細胞中インキュベーションでRMに変換されどの程度生体内タンパク質と共有結合するかを定量する試験である。しかし、共有結合量の測定には、医薬品の放射性標識体を合成する必要がある。ある程度医薬品の候補品数が絞られた段階では可能であるが、構造最適化の段階において多くの放射性標識体を合成することは現実的ではないため、創薬の初期ではトラッピング剤 (Trapping Reagent; TR) を用いて付加体を検出する方法が主に用いられている。ただし、既存のTRは後述するように問題点も多く、RMを定量的に評価し化合物の毒性リスクを決める上

で十分と言えず、実際に新規の RM の評価法が製薬企業の現場でも求められている。こうした背景から、まず我々は、代謝活性化研究を円滑に進めるために、創薬現場でも利用可能でかつ広範な RM を捕捉できる新規 TR の創製に取り組んだ。

一方、上述のように、既存薬の中にも RM を生成し、副作用として肝毒性を示すものが知られており、それが原因で市場から撤退した薬がたくさんある。我々は、こうした肝毒性を持つものの薬効の面で他の薬では代替が利かない医薬品に着目し、その代謝活性化機構を明らかにするとともに、その知見に基づき最小限の構造変換により安全性の高い医薬品を創製することを目指してきた。現在までに、ベンズブロマロン、ネビラピン、ジクロフェナク、アミオダロン、ラベタロール、リモナバンなどに取り組んできた。

本要旨では、前半では新規 TR の創製について、後半では肝毒性を示す既存薬の代謝活性化機構に基づいた低毒性医薬品の創製研究の一部について記す。

## 2. 反応性代謝物検出用の新規 TR の創製

### 2-1. 既存の TR

RM は生成量が少ない上に反応性が高いため、生体試料を用いる代謝実験の系中で生体成分と共有結合をし、回収が困難になることが多い。そこでグルタチオン (GSH) などの求核剤をトラッピング剤として系中に添加することで、求電子性を持つ反応性代謝物をトラップし安定な付加体として得ることができ LC/MS などにより解析できるようになる<sup>3,4,5</sup>。TR はその反応性の違いからソフト及びハードな求核的試薬に分けられる<sup>6</sup>。キノンなどのマイケル受容体やエポキシドなどのソフトな求電子化合物に対しては、ソフトな求核能を持つ GSH や *N*-アセチルシステインなどが TR として用いられ、それらのチオール基が反応する。一方で、ハードな求電子化合物のイミンやイミニウムイオンに対してはハードな求核能を持つシアニドイオンが、別のハードな求電子化合物のアルデヒドにはアミノ基を持つセミカルバジド、メトキシアミンが用いられる。

前述の TR では多くの代謝物や生成物の中から捕捉されたものを特異的に検出するのは難しい。また、生じた RM の構造情報は得られたとしても定量性に乏しい。最も汎用されている TR は GSH であるが、RM とのアダクトの LC/MS での検出感度は低く、その解析には精密質量分析器など高価な装置や特殊なプログラムが必要となる。

近年、簡便かつ半定量的にアダクトを検出する手法として化学的に標識化した TR を用いた手法が報告されている。この中には、放射標識されたものなどがあるが<sup>7</sup>、最も使われているものは蛍光標識 TR であり、中でもダンシル基で標識した dansyl glutathione (dGSH) は製薬企業において探

索段階から用いられている TR である<sup>8</sup>。dGSH を用いたトラッピング試験では、各被験化合物を dGSH 存在下で肝ミクロソームにより代謝させ、蛍光検出器と LC/MS で解析を行う。

## 2.2. 新規蛍光標識 TR のデザインと合成

dGSH はソフトな求電子性を持つキノンなどの RM を捕捉できる一方で、アルデヒドなどのハードな RM を捕捉できない。また、アルデヒド用 TR としてアミノ基を有するものが知られているが、そのアダクトは

不安定なイミンであり、効率的にアルデヒドをトラップできない。そこで、アルデヒドを安定な環状構造で捕捉し、ソフト及びハードな RM を一挙に検出できる TR の創製を

目指し、CysGlu-Dan、Cys-DanH、CysGlu-Dan 及び DapCys-Dan (図1) をデザインした。これらはいずれもソフトな求核能を有するチオール基とハードな求核能を有するアミノ基を同一分子内に持ち、アルデヒドを安定な環状構造でトラップできるデザインとした (図2)。また、アダクトを簡便に検出できるよう dGSH と同様に蛍光団としてダンシル基を導入した。

新規蛍光標識 TR は保護基付きの様々なアミノ酸あるいはジペプチドに、エチレンジアミンリンカーを介してダンシル基を結合後、脱保護をして得た。一例として、CysGlu-Dan の合成経路を図3に示す。

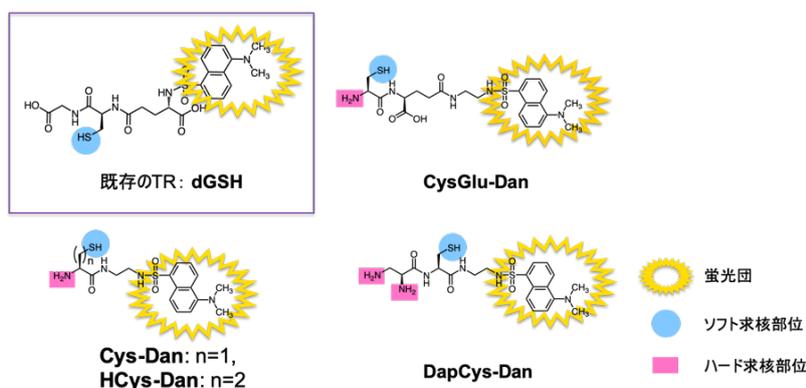


図1 新規蛍光標識トラッピング剤 (TR) の構造

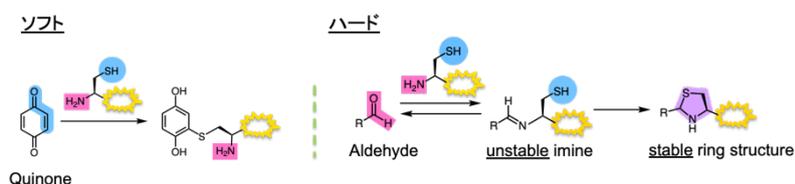


図2 ソフト及びハードな求電子の反応性代謝物に対する新規蛍光標識トラッピング剤の捕捉機構

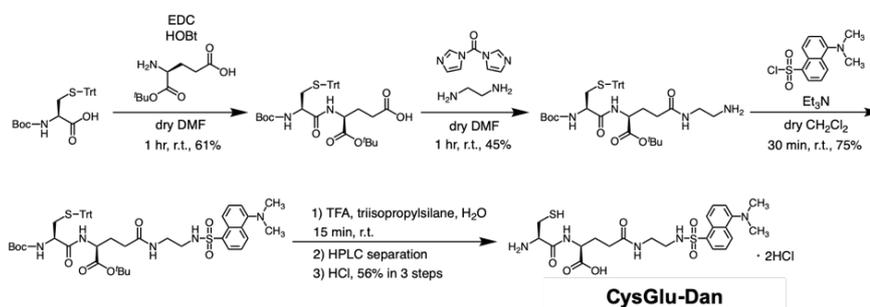


図3 CysGlu-Danの合成経路

### 2-3. 新規蛍光標識 TR のトラッピング能

新規蛍光標識 TR 及び **dGSH** のトラッピング能を評価するために、RM を生成する化合物 (ソフトな RM を生じる *p*-cresol、troglitazone、ハードな RM を生じる benzyl alcohol、pargyline など) をトラッピング剤存在下肝ミクロソームにより代謝させた後に、蛍光検出器付きの HPLC あるいは LC/MS にて分析した。まず、新規蛍光標識 TR がハードな RM であるアルデヒドをトラップできるかを調べるために、モデル基質である benzyl alcohol を基質として評価した。その結果、**CysGlu-Dan**、**Cys-Dan** 及び **HCysGlu-Dan** は生成する benzaldehyde をトラップできたが、**DapCys-Dan** 及び **dGSH** はできなかった。これより、アルデヒドを安定に環構造でトラップするには、アミノ基とチオール基が近傍に存在する必要があることが示唆された。一方、ソフトな RM であるキノンメチドを生成するモデル基質 *p*-cresol を使って評価したところ、全ての TR はその RM を捕捉することができた。従って、新規蛍光標識 TR はソフトな RM に対する反応性は **dGSH** と同様であることが示された。

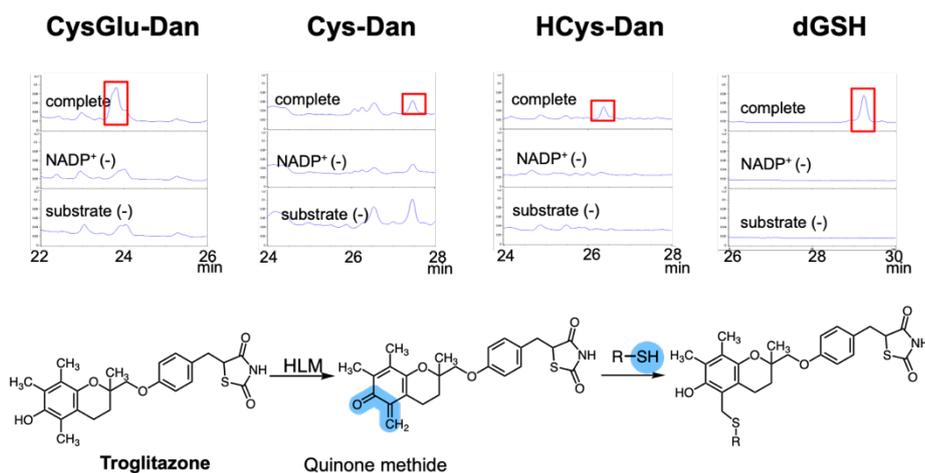


図4 CysGlu-Dan, Cys-Dan, Hcys-Dan及びdGSHによるtroglitazone代謝物のトラッピング

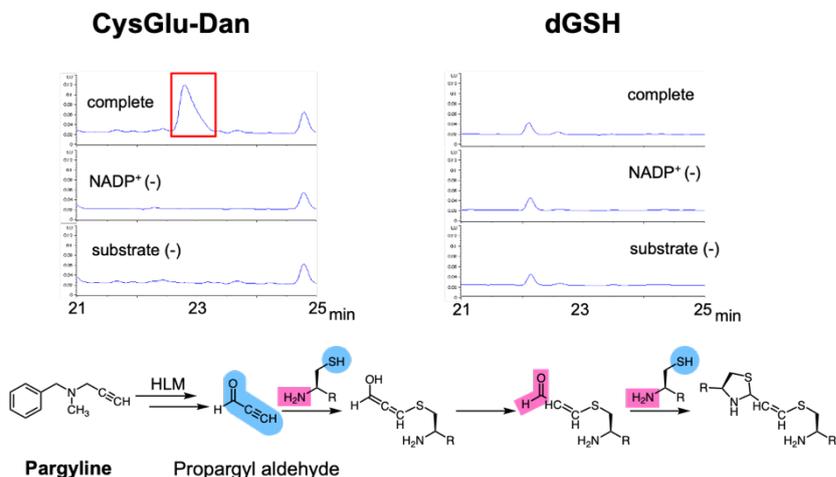
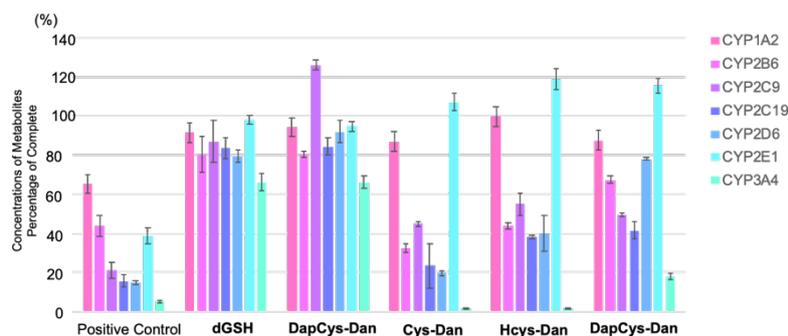


図5 CysGlu-Dan及びdGSHによるpargyline代謝物のトラッピング

次に、実際の医薬品に応用するために、毒性で市場から撤退した糖尿病治療薬 troglitazone 及び抗うつ薬 pargyline の評価を行った (図 4、図 5)。Troglitazone は様々な RM の生成が報告されているが、主要なものとしてキノンメチド体がある。キノンメチドはソフトな RM であり、期待通り **CysGlu-Dan**、**Cys-Dan**、**HCysGlu-Dan** 及び **dGSH** において、蛍光クロマトグラム上 complete サンプルにおいてのみに存在するピークが確認できた。LC/MS を用いた構造解析より、これらのピークは各 TR のアダクト由来であることが明らかになった。Pargyline については、プロパルギル基が酸化されて生じる  $\alpha, \beta$ -不飽和アルデヒドはソフトな性質を持つマイケル受容体であることに加えハードなアルデヒド基も有する。つまり、ソフトな求核性しか有さない TR では効率的にこの RM を捕捉できないと考えられるが、実際に **dGSH** では特異的なピークは見られなかった。一方、ソフトとハードの性質を併せ持つ **CysGlu-Dan** は、この不安定な RM を捕捉することができた。LC/MS を用いた構造解析の結果、1 分子の **CysGlu-Dan** のチオール基が 1,4-付加した後、もう一分子の **CysGlu-Dan** のアミノ基とチオール基でアルデヒドをトラップしたと考えられた。

#### 2-4. 新規蛍光標識 TR の CYP 阻害活性

トラッピング試験では、インキュベーションの際、高濃度の TR を反応液に加える。そのため、RM の生成に関わる主な代謝酵素であるシトクロム P450 (CYP) を TR が強く阻害するのは好ましくない。新規蛍光標識 TR 及び **dGSH** の CYP1A2、2B6、2C9、2C19、2D6、2E1、3A4 に対する阻害能を評価した結果、**dGSH** と **CysGlu-Dan** についてはすべての CYP に対してほとんど阻害活性はなかったが、それ以外の TR は阻害活性を示し、特に多くの医薬品代謝に関係する CYP である CYP3A4 に対して極めて強い阻害能を示した。



CYP	Substrate	Inhibitor	CYP	Substrate	Inhibitor
1A2	Phenacetin (100 mM)	Furafylline (10 mM)	2D6	Dextromethorphan (10 mM)	Quinidine (1.0 mM)
2B6	Efavirenz (20 mM)	Sertraline (50 mM)	2E1	4-Nitrophenol (5.0 mM)	Clomethiazole (20 mM)
2C9	Diclofenac (10 mM)	Sulfaphenazole (5.0 mM)	3A4	Midazolam (5.0 mM)	Ketoconazole (1.0 mM)
2C19	S-Mephenytoin (50 mM)	Ticlopidine (10 mM)			

図6 新規蛍光標識Tトラッピング剤のCYP阻害

#### 2-5. 小括

トラッピング試験の結果、新規蛍光標識 TR の中で **CysGlu-Dan** はソフトな RM のキノン (キノンメチド)、ハードな RM のアルデヒドを最も効率良くトラップし、また CYP 阻害試験でほとんど

阻害能を示さなかった。以上より、**CysGlu-Dan** は広範な RM を捕捉する有用性の高い新規 TR になり得ると言える。一方、構造最適化研究においてしばしば直面するカルボン酸の代謝活性化としてアシルグルクロニド (AG) 生成がある。AG 代謝物は活性化されたエステルでありそれ自体に求電子的な反応性があるだけでなく、グルクロン酸が転位し生成するアルデヒド (糖の 1 位) も毒性に関与すると言われているが、現時点で AG を効率的に評価できる有用な TR は存在しない。我々は、開発した新規蛍光標識 TR が AG 捕捉用にも使えると考え、カルボキシ基を含む様々な医薬品を使って AG のトラッピング試験を行っている。その結果、**DapCys-Dan** が最も効率的に AG を捕捉することが示され、現在、トラッピング試験における蛍光クロマトグラムのピーク面積と各医薬品の毒性リスクとの関係について精査している。

### 3. 肝毒性を示す既存薬の代謝活性化機構に基づいた低毒性医薬品の創製

#### 3-1. ベンズブロマロン (BBR)

BBR は尿酸トランスポーター (URAT1) 阻害薬であり、尿酸の再吸収を抑えることで尿酸排泄を促進し、血中尿酸値を低下させる薬として使われている。特に、日本人は尿酸排泄低下型の高尿酸血症が比較的多いため、本邦ではキサンチンオキシダーゼ阻害剤のアロプリノールが有効でない患者に使われることも多い。一方で、副作用として肝障害や劇症肝炎が発症し死亡者も出ていることが報告されており、投与開始後定期的な肝機能検査が義務づけられている薬である。そのため、米国では承認されておらず、欧州でも市場から撤退している<sup>9</sup>。

##### 3-1-1. BBR の代謝活性化機構

BBR は、その名前から分かるとおり分子内に臭素を持つユニークな構造をしている。また、フェノール性ヒドロキシ基を有することも特徴である。BBR の肝毒性には代謝活性化が関与しているという数々の報告があったが、最近まで詳細な機構は明らかにされていなかった。筆者らは、以前よりフェノール性ヒドロキシ基の薬物代謝研究を行っていた。フェノール性ヒドロキシ基は化学的に見れば非常に酸化されやすい構造であり、フェノールを持つ化合物の一般的な代謝物は、このフェノール環が酸化されたものであることが多い。例えば、ヒドロキシ基のオルト位やパラ位が水酸化されることでカテコール体やヒドロキノン体、さらに酸化された *o*-キノン体や *p*-キノン体が生成する。しかし、BBR の場合、ヒドロキシ基のオルト位やパラ位に臭素やカルボニルといった置換基がついており一般にはここが水酸化されるということはないと考えられていた。実際に BBR のフェノール環が酸化されて生成する代謝物の報告は全くなかった。しかし、我々はこれまでのフェノールに関する薬物代謝研究に基づいて<sup>10,11,12</sup>、たとえ置換基が付いていてもその *ipso* 位 (置換

基の根元)で代謝が起きると考えた (*ipso* 置換代謝)。実際にその代謝物標品を化学合成し肝ミクロソームによる代謝反応を追跡したところ、予想通り CYP により *ipso* 置換代謝物が生成することが確認された。すなわち、BBR 中のフェノール性ヒドロキシ基のパラ位に置換しているカルボニルが、置換代謝を受け脱離すると同時に、ヒドロキノン体 (DBH) あるいはその酸化体 (DBBQ) が生成することを明らかにした (図 7)。これらは新規代謝物であったが、それに加え、肝細胞に対する毒性試験やミトコンドリアに対する障害を調べたところ、BBR そのもののを凌駕する高い毒性を持っていることが示された。これら DBH や DBBQ は反応性が高いヒドロキノン体やベンゾキノン体である上に、脂溶性の高い臭素原子がベンゼン環に結合したものであり、類縁体でもあるブロモベンゼンやブロモフェノールは古くから肝毒性の強い化合物として有名なものである。それ故に、これらの代謝物が BBR による毒性の本体であると結論づけた<sup>13</sup>。

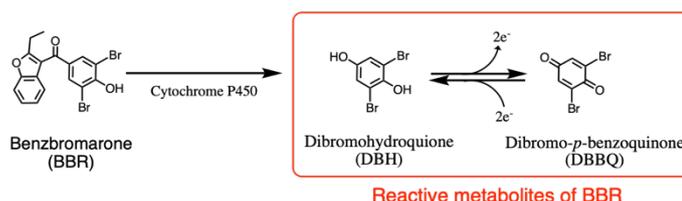


図7 ベンズプロマロン (BBR) の代謝活性化機構

### 3-1-2. 低毒性 BBR 誘導体の創製

上述のように、BBR が引き起こす肝毒性はその反応性代謝物である DBH や DBBQ が原因であることが示された。そこで、BBR の毒性を回避することを目指し、反応性代謝物が生成しないような誘導体をデザインし合成してみることにした。本代謝反応機構を考えた場合、フェノール性ヒドロキシ基のパラ位にカルボニル結合があることが、この結合が代謝的に切断される原因になっている。従って、この2つの置換基の位置関係を変えることにより代謝活性化を抑えられると考えた。具体的には、図8のようにカルボニル結合をヒドロキシ基から見てメタ位にずらした **B-1**~**B-6** の化合物を合成した。マウスの遊離肝細胞において、これらの誘導体の毒性を検討した結果、全ての誘導体は BBR に比べて毒性が軽減した。また、それらのミトコンドリアに対する毒性を検討した結果、代謝酵素を含む系において誘導体は母化合物 BBR よりも低毒性であり、期待通り代謝活性化が抑制されることが示された。次に、薬効である URAT1 阻害活性を検討したところ、BBR に比べて阻害能は若干弱くなったものの活性はある程度維持された。以上のように、BBR の毒性を回避した改良型誘導体の創製に成功した<sup>14</sup>。

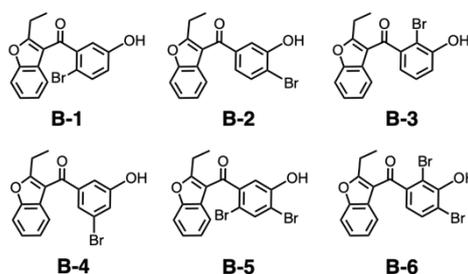


図8 ベンズプロマロンの代謝活性化を回避した誘導体

### 3-2. ジクロフェナク (DCF)

DCF はシクロオキシゲナーゼ (COX) を阻害することによりプロスタグランジン合成を抑制し、抗炎症作用、解熱・鎮痛作用を示す代表的な非ステロイド性抗炎症薬の一つである。DCF は COX-1 と COX-2 を阻害する非選択性の COX 阻害剤であり、関節リウマチ、変形性関節症などの慢性疾患や急性上気道炎などの急性疾患などに使われる。副作用としては COX-1 阻害由来の胃腸障害のほか、発疹、皮膚障害、そして肝臓に対する毒性が挙げられる。DCF を服用した 15-20% の患者に血漿中の ALT の上昇を認め、稀ではあるが劇症肝炎の発症が報告されている。DCF の肝毒性に関してはこれまで多くの研究がなされ、詳細は不明なところも多いが、代謝活性化によって生じる反応性代謝物の関与が疑われている。

#### 3-2-1. DCF の代謝活性化機構

DCF の代謝活性化機構としてこれまでに 2 種類提唱されてきた<sup>15,16</sup>。まず、1 つ目は、CYP により代謝されて生成する 2 種類のフェノール性代謝物 (4'-OH metabolite 及び 5-OH metabolite) が、さらに酸化され *p*-キノンイミンを生じ、これが毒性を示すとするものである (図 9)。2 つ目の機構としては、DCF のカルボキシ基が UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) によりグルクロン酸抱合されて生成するアシルグルクロニド

(DCF-AG) が毒性に関与するというものである (図 9)。アシルグルクロニドは反応性が高い代謝物として知られており、実際に DCF の代謝物として検出されている。両機構ともに肝毒性に関与している十分な実験事実があり、総じて考えれば両機構ともに DCF の肝毒性に寄与していると考えられる。

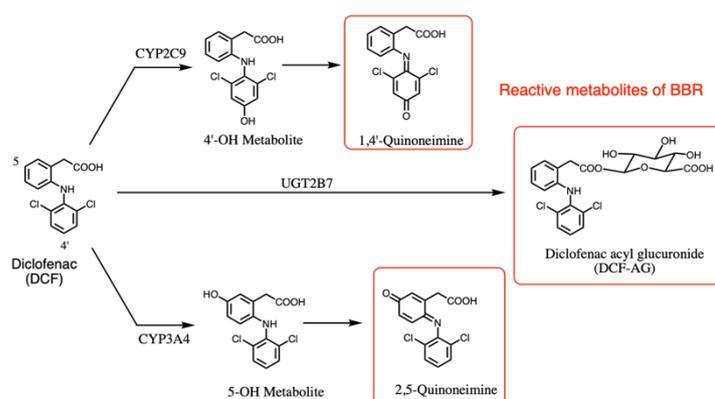


図9 ジクロフェナク (DCF) の代謝活性化機構

#### 3-2-2. 低毒性 DCF 誘導体の創製

そこで、*p*-キノンイミンの生成を抑えるために 4'位あるいは 5 位もしくはその両方にフッ素を導入するデザインを考えた。また、もう一つの代謝活性化経路であるアシルグルクロニド生成を抑えるためにカルボキシ基をその生物等価体であるテトラゾール、スルホン酸、スルホンアミドへの変換、カルボキシ基の  $\alpha$  位にフッ素の導入も考え、合計 13 化合物 (D1b~D5d) を合成した (図 10)。まず、フッ素をベンゼン環に導入した D1b~D1d については、COX 阻害活性はほぼ維持された。

一方で、代謝活性化に関しては、*p*-キノンイミンの生成は抑えたが予想通りアシルグルクロニドの生成は変わらなかった。従って毒性については多少の軽減は期待できるが、完全なものではないと言える。テトラゾールを導入した **D-2** シリーズでは COX-1 阻害活性は激減したが COX-2 阻害活性はある程度維持した。代謝活性化に関しては、ベンゼン環にフッ素を導入したものは **D-1** シリーズと同様 *p*-キノンイミンの生成は抑えられ、さらにテトラゾールへの変換によってアシルグルクロニドの生成も抑えられた。しかし、残念ながらヒト肝細胞に対する毒性は総じて DCF に比べ高くなってしまった。現在までのところその理由については分かっていない。 **D-3a** や **D-4a** では COX 阻害活性はほぼ消失した。注目すべきは **D-5** シリーズである。カルボキシ基の  $\alpha$  位にフッ素を導入したこのシリーズでは、**D-2** シリーズと同様 COX-1 阻害活性が消失した一方、COX-2 阻害活性はある程度維持した。特に、**D-5c** は DCF とほぼ同等の COX-2 阻害活性を示した。また、代謝活性化に関しては、**D-5b**, **D-5c**, **D-5d** は *p*-キノンイミンの生成が抑え、さらにアシルグルクロニドの生成も抑えられた。これは  $\alpha$  位へのフッ素の導入で酸性度が変化しアシルグルクロニドの生成が抑えられた可能性が考えられる。ヒト肝細胞に対する毒性は DCF に比べ低いことも明らかになった。以上より **D-5** シリーズは肝毒性を回避し、薬効を維持する新規 DCF 誘導体として期待できる。しかも、COX-1 は消化管毒性の原因となるので、これらの化合物の COX-2 選択的阻害特性は興味深く、DCF が持つ 2 つの重篤な副作用である肝毒性と消化管毒性を同時に回避できる可能性が示された。

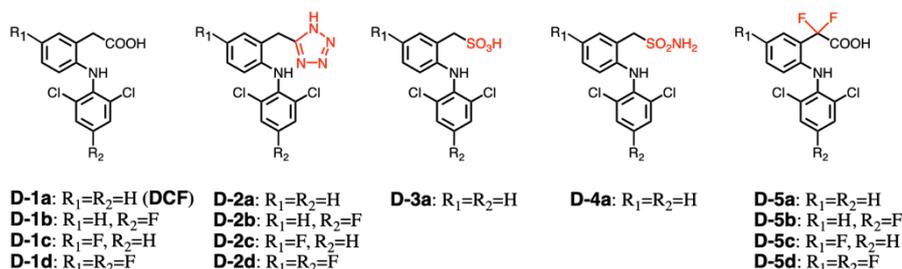


図10 ジクロフェナクの代謝活性化を回避した誘導体

### 3-3. 小括

本研究では、肝毒性を示す既存薬 BBR に関して、その代謝活性化機構を解明し、それを回避した新規の誘導体を合成し、明らかに毒性が軽減し安全性が向上する誘導体を見出すことができた。また、DCF に関しても既知の代謝活性化機構を参考に、その代謝部位をブロックあるいは改変した誘導体を合成し、代謝活性化を回避できることを示した。そして、薬効においても COX-2 選択的阻害を達成するなど、創製した誘導体は非常に興味深い性質を持つ。今回紹介した全ての誘導体は改良型医薬品としてとても魅力的なものである。なぜなら、安全性の向上は *in vivo* で大幅に投与量を引き上げることができるので、*in vitro* における多少の薬効の減弱くらいであれば十分に補完できるからである。今回は紙面の都合上割愛したが、BBR や DCF で紹介した方法論を肝毒性を示す他

の複数の既存薬にも応用し着実な成果が得られている<sup>17</sup>。こうした試みを続け代謝活性化回避のためのノウハウが蓄積することで、今後安全性の高い医薬品を創製するための一助になればと考えている。

#### 4. おわりに

以上紹介したように、我々は有機化学や合成化学の知識や技術を武器に、毒性と構造、毒性と反応の関係を明らかにし、最終的に安全な医薬品を創製すること、またそのための戦略の構築を目指してきた。また、有機化学を基盤にした薬物動態研究を進めるアカデミア研究者として、代謝活性化を評価できる TR の創製など、創薬現場で実際に使用可能なツール化合物の開発を行っており、最近では既存薬を利用した臓器標的型プロドラッグの創製などにも挑戦している。こうした分野の研究は日本では比較的珍しいが、海外の大学では盛んに行われ、薬物動態に精通したメディシナルケミストや有機化学を熟知した薬物動態研究者が多数輩出され、製薬企業やベンチャー企業で活躍している。将来的に創薬を担う人材を育成する教育機関としての役割を考えると、継続的にこうした研究を学生とともに進めていくことの意義を日々感じている。こうした研究結果の蓄積や人材の育成により、将来における日本の創薬研究のレベルアップに微力ながら貢献したいと思っている。

#### 謝辞

以上の研究成果は、当研究室の増野匡彦教授、高橋恭子専任講師、安田大輔特任助教、柴崎智香子学士、立石泰寛修士、梅沢隆太郎修士、小川真依学士並びに多くの学生の協力により得られたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。最後に、本研究の遂行にあたりご支援を賜りました公益財団法人 蓬庵社に心より感謝申し上げます。

#### 文献

- 1) Guengerich FP, MacDonald JS. Applying Mechanisms of Chemical Toxicity to Predict Drug Safety. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 344–369 (2007).
- 2) Ulrich RG. Idiosyncratic toxicity: a convergence of risk factors. *Annu Rev Med.* **58**, 17–34 (2007).
- 3) Kalgutkar AS, Dalvie D, Obach RS, Smith DA. *Methods and Principles in Medicinal Chemistry: Reactive Drug Metabolite*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2017).
- 4) Evans DC, Watt AP, Nicoll-Griffith, DA, Baillie TA. Drug-Protein Adducts: An Industry Perspective on Minimizing the Potential for Drug Bioactivation in Drug Discovery and Development. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 3–16 (2004).

- 5) 大江知之. 反応性代謝物とその評価. 日本薬理学雑誌 134, 338-341 (2009).
- 6) LoPachin RM, Geohagen BC, Nordstroem LU. Mechanisms of Soft and Hard Electrophile Toxicities. *Toxicology*, **418**, 62–69 (2019).
- 7) Inoue K, Shibata Y, Takahashi H, Ohe T, Chiba M, Ishii Y. A Trapping Method for Semi-Quantitative Assessment of Reactive Metabolite Formation Using <sup>35</sup>S Cysteine and <sup>14</sup>C Cyanide. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **24**, 245–254 (2009).
- 8) Gan J, Harper TW, Hsueh, MM, Qu Q, Humphreys WG. Dansyl Glutathione as a Trapping Agent for the Quantitative Estimation and Identification of Reactive Metabolites. *Chem. Res. Toxicol.* **18**, 896–903 (2005).
- 9) Lee MH, Graham GG, Williams KM, Day RO. A benefit-risk assessment of benzbromarone in the treatment of gout. Was its withdrawal from the market in the best interest of patients? *Drug Saf.* **31**, 643-665 (2008).
- 10) Ohe T, Mashino T, Hirobe M. Novel metabolic pathway of aryloethers by cytochrome P450: cleavage of the oxygen-aromatic ring bond accompanying *ipso*-substitution by the oxygen atom of the active species in cytochrome P450 models and cytochrome P450. *Arch Biochem Biophys.* **310**, 402-409 (1994).
- 11) Ohe T, Mashino T, Hirobe M. Substituent elimination from p-substituted phenols by cytochrome P450. *ipso*-Substitution by the oxygen atom of the active species. *Drug Metab Dispos.* **25**, 116-122 (1997).
- 12) Ohe T, Hirobe M, Mashino T. Novel metabolic pathway of estrone and 17β-estradiol catalyzed by cytochrome P-450. *Drug Metab Dispos.* **28**, 110-112 (2000).
- 13) Kitagawara Y, Ohe T, Tachibana K, Takahashi K, Nakamura S, Mashino T. Novel Bioactivation Pathway of Benzbromarone Mediated by Cytochrome P450. *Drug Metab Dispos.* **43**, 1303-1306. (2015).
- 14) Ohe T, Umezawa R, Kitagawara Y, Yasuda D, Takahashi K, Nakamura S, Abe A, Sekine S, Ito K, Okunushi K, Morio H, Furihata T, Anzai N, Mashino T. Synthesis of novel benzbromarone derivatives designed to avoid metabolic activation. *Bioorg Med Chem Lett.* **28**, 3708-3711 (2018).
- 15) Tang W. The metabolism of diclofenac--enzymology and toxicology perspectives. *Curr Drug Metab.* **4**, 319-329 (2003).
- 16) Grillo MP, Hua F, Knutson CG, Ware JA, Li C. Mechanistic studies on the bioactivation of diclofenac: identification of diclofenac-S-acyl-glutathione in vitro in incubations with rat and human hepatocytes. *Chem Res Toxicol.* **16**, 1410-1417 (2003).
- 17) Tateishi Y, Ohe T, Yasuda D, Takahashi K, Nakamura S, Kazuki Y, Mashino T., Synthesis and evaluation of nevirapine analogs to study the metabolic activation of nevirapine. *Drug Metab Pharmacokinet.* **35**, 238-243 (2020).

# ブドウ球菌毒素が誘導するスーパー抗原活性に対する植物由来成分および生薬による 制御機構の網羅的解析

静岡県立大学 食品栄養科学部 増田 修一

## 1. はじめに

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、ヒトおよび動物の常在菌であるが、時としてヒトや動物に病原性を示す。本菌は、様々な毒素を産生するが、その中でも staphylococcal enterotoxin A (SEA) は、そのスーパー抗原活性により、多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬、アトピー性皮膚炎、慢性鼻副鼻腔炎の発症もしくは難治化に関与することが報告されている<sup>1,2)</sup>。スーパー抗原は、抗原提示細胞上の主要組織適合抗原 (MHC) クラス II 分子に結合し、T 細胞レセプター (TCR) を介して膨大な T 細胞を活性化させ、それに伴う大量のサイトカイン (TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  など) の産生により、各種疾病が惹起される。したがって、SEA のスーパー抗原活性を抑制することにより、これらの疾病を軽減できることが期待される。さらに、近年、SEA は、肥満や II 型糖尿病等の脂肪組織の炎症に関与する gp130 と結合し、脂肪細胞において、インスリンシグナル伝達を抑制することが報告されている<sup>3)</sup>。SEA は、gp130 受容体に結合し、STAT3 シグナル伝達を活性化させることにより、インスリン感受性を低下させ、インスリン誘導性およびトリグリセリド合成におけるグルコースの取り込み、また protein kinase B の活性を抑制することが報告されていることから、II 型糖尿病に見られるインスリン抵抗性の寄与因子のひとつである可能性が指摘されている。gp130 は、炎症性サイトカインであるインターロイキン-6 (IL-6) をはじめとする IL-6 サイトカインファミリー共通の受容体であることから、SEA の gp130 への結合を抑制することができれば、炎症性サイトカイン IL-6 等が関与する種々の自己免疫疾患および慢性炎症性疾患を軽減できることが期待される。

我々は、これまでに植物由来のポリフェノール類が SEA と結合することを明らかにしている<sup>4)</sup> ことから、植物由来ポリフェノール類は、本来スーパー抗原である SEA が結合する MHC クラス II や IL-6/IL-6 レセプターである gp130 分子への結合阻害能を有する可能性がある。そこで、本研究では、SEA に起因する各種疾患に対する新たな治療法の開発を目的に、SEA と結合し、SEA のスーパー抗原活性もしくは gp130 分子への結合を阻害する成分を植物由来ポリフェノールおよび生薬からスクリーニングし、その作用機序について検討した。

## 2. ポリフェノールおよび生薬の SEA スーパー抗原発現部位への結合親和性

28 種のポリフェノール類および 2 種類の生薬 (キンギンカ、ショウキョウ) から SEA と相互作用して毒素活性を阻害する成分を探索するために、ポリフェノール類 (終濃度: 6.25~100

$\mu\text{g/mL}$ ) を SEA ( $5 \mu\text{g/mL}$ ) と混合し、 $37^\circ\text{C}$  で 24 時間インキュベートした後、その上清について抗-SEA 抗体を用いた Western blot 解析を行った。その結果、緑茶に含まれるカテキン類である(-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) において、特に SEA のバンドが減弱し、EGCG は、SEA と強く相互作用することが示唆された。次に、SEA の毒素活性部位のアミノ酸配列をもとに、4 種の合成ペプチド (A-2、A-3、A-6 および A-10) を合成し、これらに対する抗ペプチド抗体 (抗-SEA ペプチド抗体) を作製して、EGCG を含む 4 種のカテキン類 (図 1) が SEA の毒素活性部位と相互作用するか調べた。等モル濃度 ( $3 \text{ mM}$ ) で比較したところ、構造内にガロイル基を有する EGCG および ECG は、いずれの毒素活性発現部位とも相互作用した (図 2)。SEA の 3 つのアミノ酸残基 (H187、H225、D227) は、ヒトでは、亜鉛イオンを介して、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) クラス II 分子の HLA-DR 領域 ( $V\beta$  鎖) と結合するが、SEA のアミノ酸残基 F47 と HLA-DR 領域の結合は、亜鉛イオンを介さないことが報告されている (5)。A-3 は、SEA のアミノ酸配列中に F47 を含んでおり、EGCG は、SEA の MHC クラス II 分子結合サイトとの結合を阻害している可能性が示唆された。茶葉中に含まれる茶ポリフェノールの約 15% は、4 種のカテキンから構成され、その組成は、EGCG が約 60%、EGC が約 20%、ECG が約 14%、EC が約 6% であることが報告されている<sup>5)</sup>。また、本研究で使用した  $3 \text{ mM}$  のカテキン類を緑茶  $100 \text{ mL}$  あたりに換算すると、EGCG で  $138 \text{ mg}$  であり、市販のペットボトルの飲料と同程度である。これらの結果より、EGCG は SEA と相互作用することが可能であると考

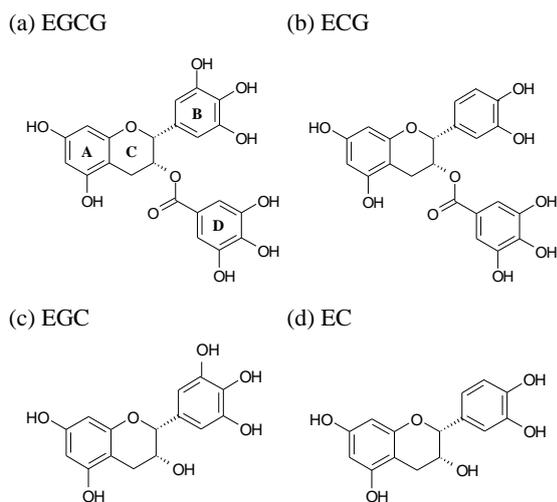


図 1: カテキン類の構造

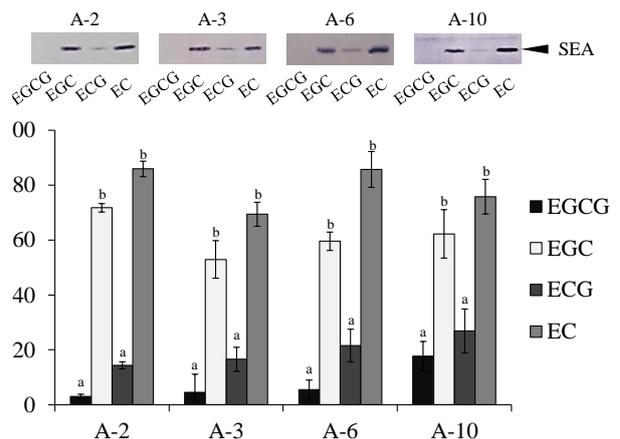


図 2: カテキン類の毒素活性発現部位に対する結合親和性

グラフは Western blot 解析の結果を数値化したものを示す。Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$  (異なるアルファベット間で有意差あり)。

### 3. 生体内モデル反応系における SEA と EGCG の結合親和性

創薬研究への応用を考慮した場合、結合親和性を示した EGCG と SEA が生体内でもその結合を維持していることが求められる。そこで、消化管内等を考慮して、Mcilvaine Buffer により pH 2.4、4.0、6.0、6.8 および 8.0 の緩衝液を調製した。SEA (終濃度 5  $\mu\text{g/mL}$ ) に各 pH の Mcilvaine Buffer を 9 倍容の割合で混合した。また、SEA との結合に対するタンパク質の影響を調べるために、SEA (終濃度 5  $\mu\text{g/mL}$ ) に、ウシ血清アルブミン (BSA) を終濃度 50、500、5000  $\mu\text{g/mL}$  となるように混合した。各混合液に、EGCG を終濃度が 3.0 mM となるように加え、37°C で 24 時間インキュベートした後、反応液中の SEA 量を抗-SEA ポリクローナル抗体を用いた Western blot 法にて定量した。その結果、EGCG は、すべての pH 条件下で SEA との相互作用を維持していた (図 3 (a))。カテキン類は、酸性溶媒中では安定であるが、中性から弱アルカリ性では酸化的分解を受けることから、EGCG は、構造が変化しても SEA との相互作用を維持できる可能性が示唆された。また、BSA 共存下における EGCG と SEA の相互作用について調べたところ、SEA と BSA の質量濃度比が 1 : 100 までは SEA のバンドが検出されず、EGCG と SEA の相互作用は維持されていた (図 3 (b))。これらの結果より、SEA と EGCG は、腸管から吸収された後、血清アルブミンとの共存下においてもその相互作用を維持できる可能性が示唆された。

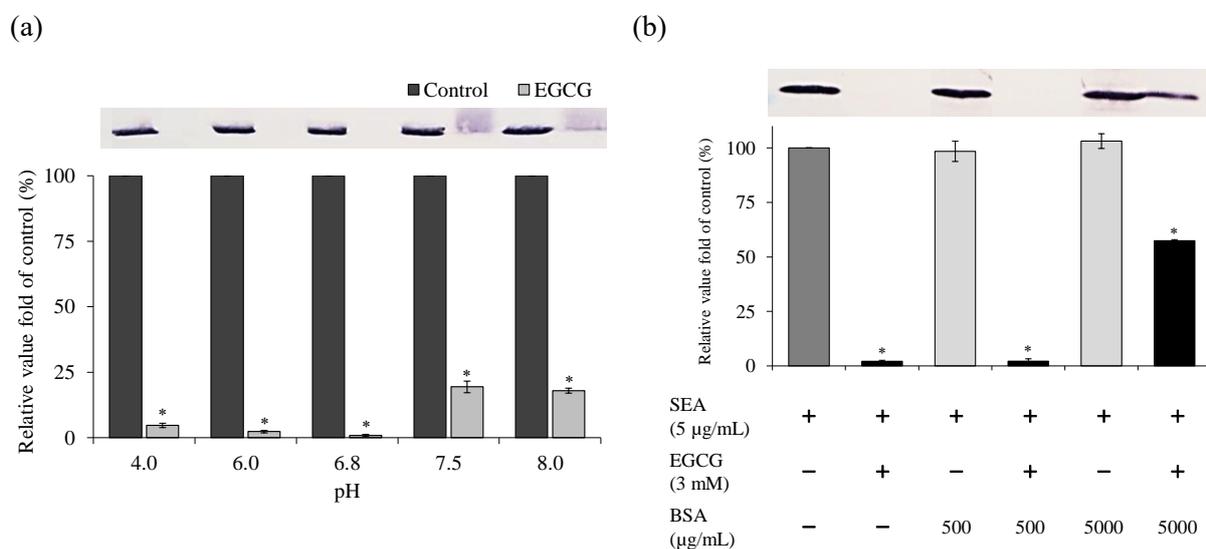


図 3: SEA と EGCG との相互作用に及ぼす pH およびタンパク質の影響

(a) SEA および EGCG を Mcilvaine 緩衝液 (pH4.0~8.0) に溶解し、37°C で 24 時間インキュベートした後、上清の SEA の濃度を Western blot で検出した。 (b) SEA、EGCG およびウシ血清アルブミン (BSA) 溶液を 37°C で 24 時間インキュベートした後、上清の SEA の濃度を Western blot で検出した。 \* represents  $p < 0.01$  compared to the control.

#### 4. SEA と EGCG の分子間相互作用解析

EGCG と SEA との相互作用について、さらに詳細に調べるために、表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance; SPR) および等温滴定型カロリメトリー (isothermal titration calorimetry; ITC) を用いて分子間相互作用解析を行った<sup>6)</sup>。Biacore を用いた SEA と EGCG との分子間相互作用解析の結果、構造にガロイル基を持たない EC は、いずれの濃度においても Blank と差が認められなかった (図 4 (a)) が、EGCG は、50  $\mu\text{M}$  以上で濃度依存的に SEA と相互作用した (図 4 (b))。さらに、ITC を用いて SEA と EGCG の相互作用を検討したところ、 $\Delta H$  と  $-T\Delta S$  のパターンから、相互作用様式はエントロピー駆動型であり、サーモグラムにおいて負の方向 (発熱反応) のピークが確認された (図 4 (c, d))。また、EGCG を滴下するに従い、発熱量が増大し、その後、減少したことから、EGCG と SEA の相互作用は、複数の結合サイトにおける疎水的相互作用であることが示唆された。一方、滴定プロットの結果より、EC の滴下前後で発熱反応が生じていないことから、EC と SEA は相互作用していないことが示唆された。

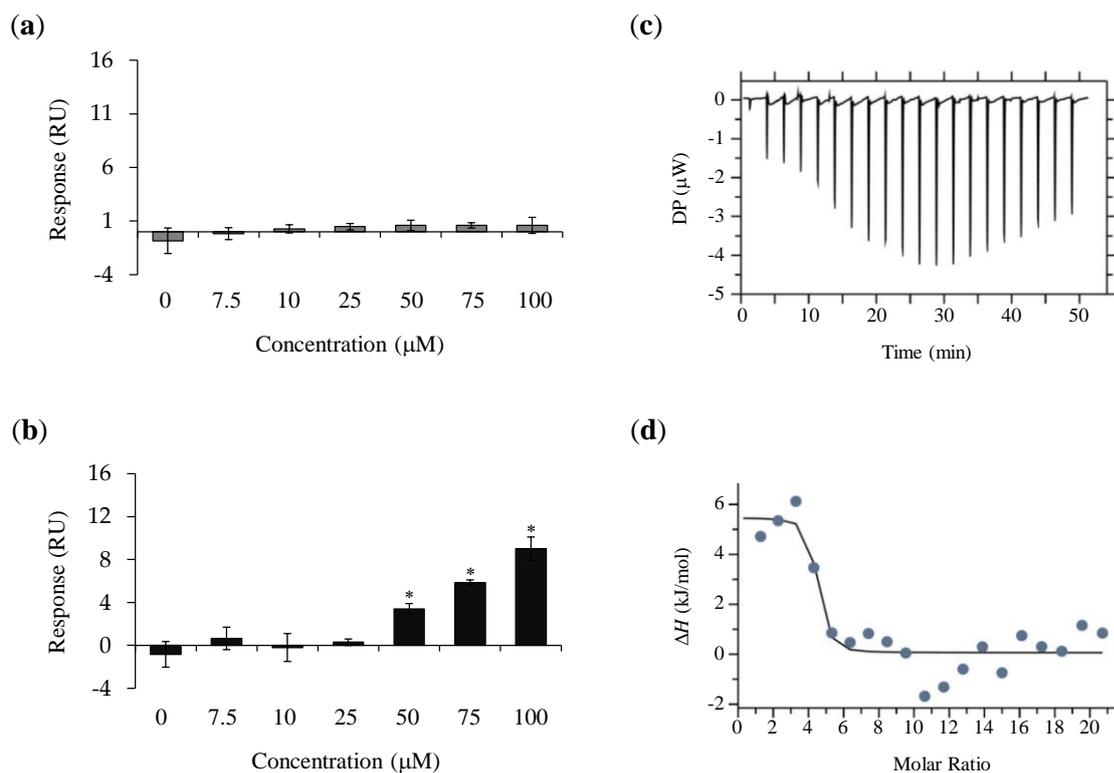


図 4: SEA と EGCG の分子間相互作用解析

(a) SEA と EC との相互作用, (b) SEA と EGCG との相互作用. リガンド (SEA) を Sensor Chip CM5 に固定化し, アナライト (カテキン) の分子間相互作用を測定した. \* represents  $p < 0.05$  compared to the control. (c) SEA に EGCG を滴定したときのサーモグラム, (d) 各滴定の発生熱量をセル中のリガンド (EGCG) と標的分子 (SEA) のモル比に対してプロットすることにより得られた結合等温線.

さらに、ドッキングシミュレーションによる EGCG と SEA のドッキング解析を行った<sup>6)</sup>。その結果、SEA の毒素活性部位である A-2～A-3 および A-6 領域のアミノ酸が EGCG と相互作用しており、特に、Y91 と EGCG の 3"位の水酸基が水素結合を形成する結果が得られた (図 5)。これらの結果より、構造にガロイル基と A 環が共に存在する場合は、ガロイル基が選択的に SEA と相互作用すると推察された。

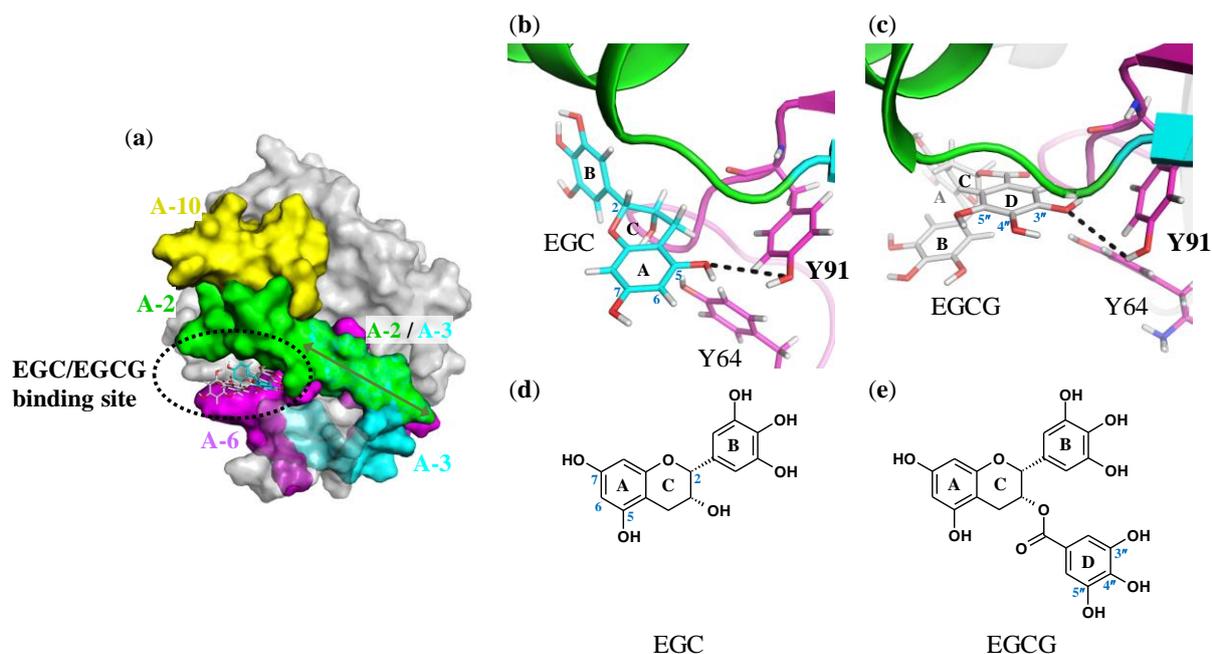


図 5: SEA と EGCG および EGC とのドッキングシミュレーション解析

(a) SEA 上の EGC または EGCG の結合部位. A-2 (アミノ酸残基 21～40), A-3 (アミノ酸残基 35～50), A-6 (アミノ酸残基 81～100), A-10 (アミノ酸残基 161～180). (b) SEA の毒素活性部位 (A-6) と EGC のドッキングシミュレーション. (c) SEA の毒素活性部位 (A-6) と EGCG のドッキングシミュレーション. (d) EGC の構造. (e) EGCG の構造.

## 5. EGCG のスーパー抗原活性阻害メカニズムの解明

Rasooly ら (2010) は、マウス脾臓細胞を用いることで SEA のスーパー抗原活性が評価できることを報告している<sup>7)</sup>。そこで、C57BL/6J マウスより、脾臓細胞 ( $1 \times 10^6$  cell/mL) を調製し、SEA (終濃度 50 ng/mL) または SEA+EGCG (終濃度 3 mM) を加えて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 16 時間インキュベートし、T 細胞の異常増殖および IFN- $\gamma$  産生に対する抑制効果を測定することにより、*in vitro* 試験で効果が認められた EGCG が *ex vivo* における SEA のスーパー抗原活性を不活化できるか検討した。なお、本実験は、静岡県公立大学法人静岡県立大学における動物実験の指針 (承認番号 175160, 185185 および 195220) に従い実施した。その結果、EGCG は、SEA が誘導する T 細胞の異常増殖 (図 6 (a)) および IFN- $\gamma$  産生 (図 6 (b)) を有意に抑制した。



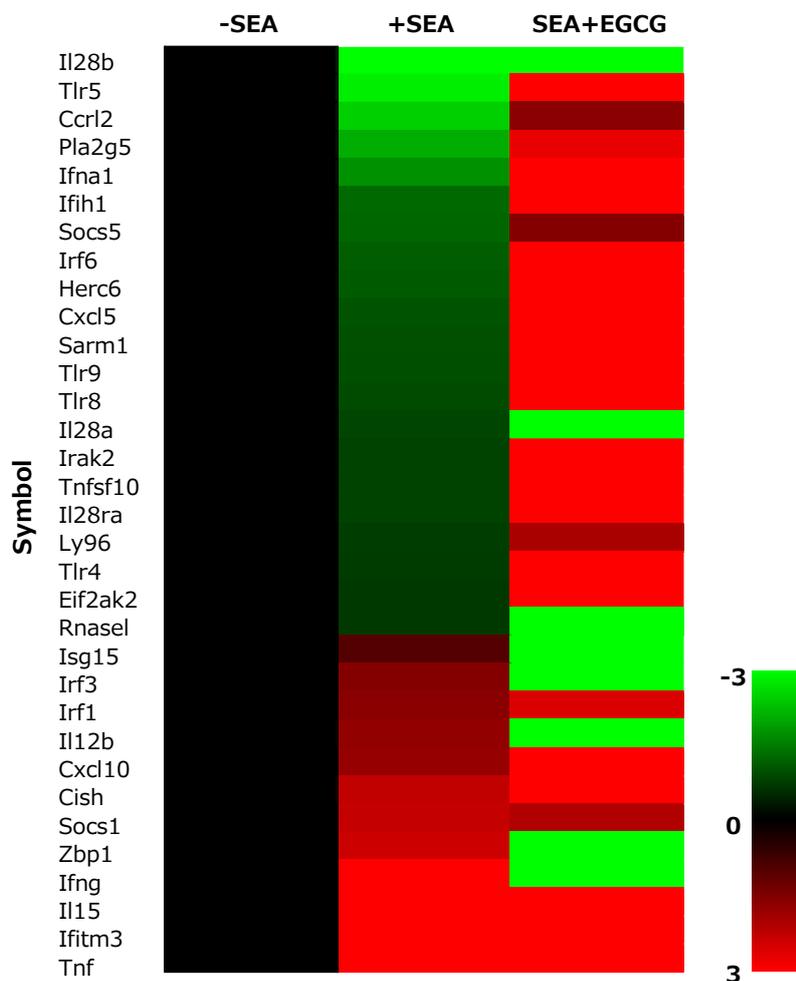
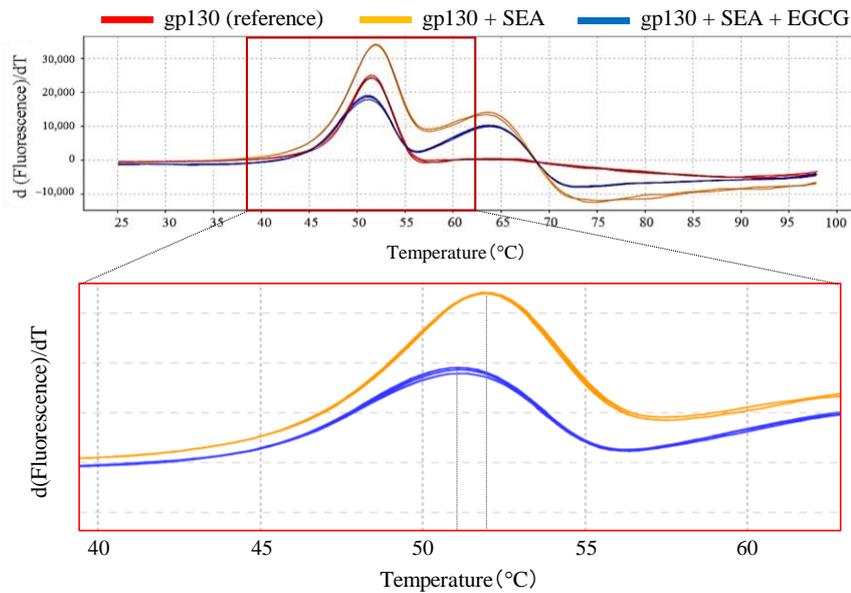


図 7: マイクロアレイによる遺伝子発現プロフィール解析

SEA によって変動した遺伝子および SEA 誘導性遺伝子に対する EGCG の効果について、発現比をヒートマップで表した。緑は発現比が小さいことを、赤は発現比が大きいことを示す。

#### 6. EGCG と反応させた SEA と STAT3 を活性化する gp130 受容体との相互作用解析

近年、SEA は、脂肪細胞において gp130 に結合し、その下流因子である STAT3 のリン酸化反応を誘発することが報告されている<sup>3)</sup>。しかし、SEA と gp130 の結合やそれに伴う STAT3 のリン酸化反応を抑制する成分やそのメカニズムについては報告がない。そこで、protein thermal shift assay を用いて、EGCG と反応させた SEA と STAT3 を活性化する gp130 受容体との相互作用を解析した。その結果、SEA のみを添加した gp130 の melting temperature (Tm) (51.96°C) は、EGCG と反応させた SEA を添加した gp130 の Tm (51.09°C) と比較して、高温側にシフトしていた (図 8)。このことから、SEA と EGCG の相互作用により、SEA と gp130 との結合が阻害されていると考えられた。



**図 8: EGCG と反応させた SEA と gp130 受容体との相互作用解析**

タンパク質にリガンドが結合すると構造安定性が増大し、 $T_m$  値は高温側にシフトする。  
 gp130+[SEA] は、gp130+[SEA+EGCG] と比較して  $T_m$  値が高いことから、SEA と EGCG の相互作用により、SEA と gp130 との結合が阻害されていると考えられた。

## 7. EGCG による STAT3 のリン酸化抑制能

5.と同様の方法で、マウス脾臓細胞に SEA および EGCG を加えてインキュベートした後、細胞からタンパク質を抽出し、細胞中のリン酸化 STAT3 の発現量を抗-pSTAT3 抗体を用いた Western blotting で定量的に検定した。マウス脾臓細胞に SEA を 6 時間暴露した際のリン酸化 STAT3 の発現について検討したところ、リン酸化 STAT3 (Tyr705) は、SEA の濃度依存的に有意に増加したが、リン酸化 STAT3 (Ser727) では、SEA の暴露による変化は認められなかった。そこで、マウス脾臓細胞における SEA 誘導性リン酸化 STAT3 (Tyr705) に対する EGCG の抑制能について検討した。その結果、SEA によって誘導されたリン酸化 STAT3 (Tyr705) は、EGCG によって有意に抑制された。

そこで、SEA が誘導するリン酸化 STAT3 の抑制に、EGCG の構造内のいずれの水酸基が関与しているかを明らかにするために、EGCG のガロイル基の 3''および 4''位の水酸基をメチル基で置換した 3''-メチル化カテキン((-)-EGC-3-(3''-*Q*-methyl)gallate; EGCG3''Me) および 4''-メチル化カテキン((-)-EGC-3-(4''-*Q*-methyl)gallate; EGCG4''Me) を用いて検討した。その結果、SEA によって誘導されたリン酸化 STAT3 は、EGCG および EGCG4''Me によって抑制された(図 8)。一方、EGCG3''Me は、STAT3 のリン酸化を抑制しなかったことから、EGCG のガロイル基の 3''位の水酸基が SEA 誘導性のリン酸化 STAT3 を抑制していることが明らかとなった。

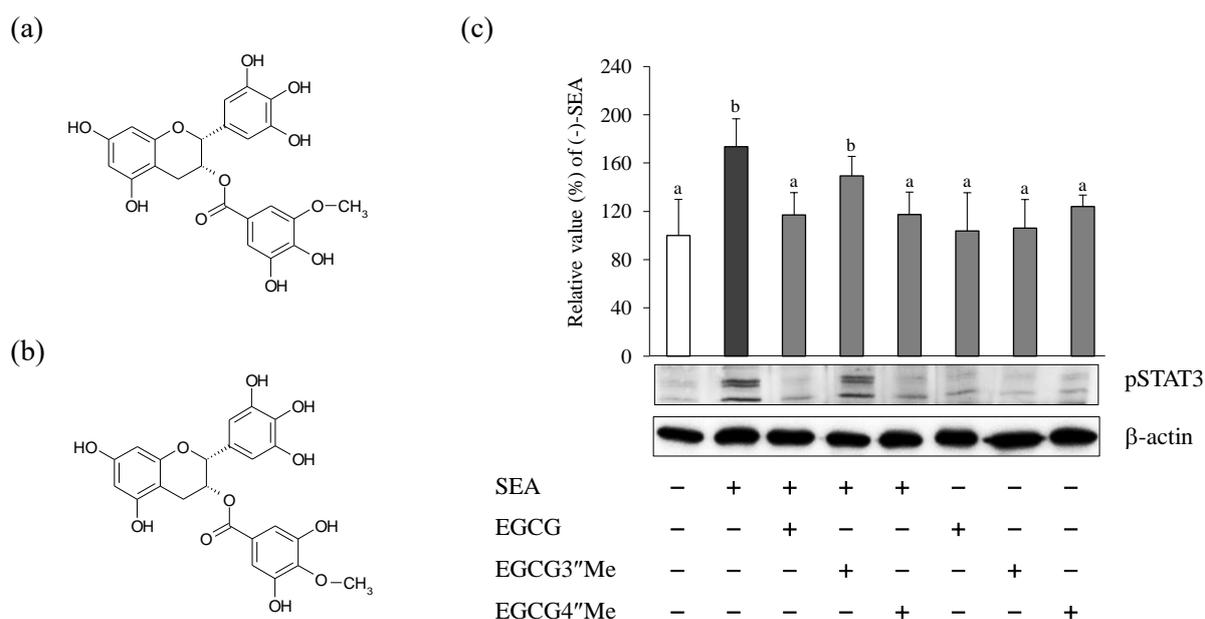


図 9: SEA 誘導 p-STAT3 に対する EGCG およびメチル化 EGCG の効果

(a) EGCG 3''Me の構造, (b) EGCG 4''Me の構造, (c) SEA 誘導 p-STAT3 (Tyrosin705) に対する EGCG およびメチル化 EGCG の抑制効果. グラフは Western blot 解析の結果を数値化したものを示す. Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$  (異なるアルファベット間で有意差あり).

## 8. おわりに

本研究では、ブドウ球菌毒素である SEA が誘導するスーパー抗原活性に対して抑制効果を示す植物由来成分および生薬を探索し、特にカテキン類について、SEA 上の結合部位と毒素活性阻害能との関連、またその作用メカニズムの解明を目的に研究を行った。その結果、いずれのカテキン類も SEA の毒素活性発現部位と結合していることが推察され、特に、EGCG は、SEA で刺激したマウス脾臓細胞の増殖能および誘導される IFN- $\gamma$  産生に対する抑制効果を示したことから、SEA の毒素活性を抑制できる可能性が示唆された。EGCG は、生体内を考慮した pH 条件下やタンパク質共存下においても SEA との相互作用を維持でき、我々が普段飲用している緑茶の濃度においても SEA と相互作用することが可能であると考えられた。また、SEA による STAT3 活性化に対する EGCG の影響について検討したところ、EGCG が SEA と相互作用することにより、gp130 受容体と SEA の結合が阻害され、STAT3 のリン酸化を抑制することが示唆された。今後、相互作用の時間的評価やポリフェノールの腸管内存在状態などを考慮した上で更なる研究を行う予定である。また、現在、申請時の計画にあった糖尿病モデルマウスにおける SEA の毒性変動とそれに対する EGCG の抑制効果について検討しており、将来的には、植物由来成分および生薬によるスーパー抗原活性が誘導する疾病の予防・改善を目指した研究を展開していきたいと考えている。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご援助を賜りました公益財団法人蓬庵社および関係者の皆様、ご推薦を賜りました静岡県立大学名誉教授の伊勢村護先生に厚く御礼申し上げます。また、研究試料として EGCG3"Me および EGCG4"Me をご供与いただいた、静岡県立大学薬学部薬学科医薬品製造化学分野の菅敏幸先生に心より御礼申し上げます。

最後に、本研究は、静岡県立大学食品栄養科学部食品衛生学研究室で行われたものです。共同研究者である静岡県立大学の島村裕子先生、伊藤創平先生、中野祥吾先生、東洋大学の細谷孝博先生をはじめ、当研究室に在籍した大学院生・学生の諸氏に深く感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) Torres, B. A., and Johnson, H. M.: Modulation of disease by superantigens. *Curr. Opin. Immunol.*, **10(4)**: 465–470 (1998).
- 2) Kobayashi, T., Glatz, M., Horiuchi, K., Kawasaki, H., Akiyama, H., Kaplan, D. H., Kong, H. H., Amagai, M., and Nagao, K.: Dysbiosis and *Staphylococcus aureus* colonization drives inflammation in atopic dermatitis. *Immunity*, **42(4)**: 756–766 (2015).
- 3) Banke, E., Rödström, K., Ekelund, M., Dalla-Riva, J., Lagerstedt, J. O., Nilsson, S., Degerman, E., Lindkvist-Petersson, K. and Nilson, B.: Superantigen activates the gp130 receptor on adipocytes resulting in altered adipocyte metabolism. *Metabolism*, **63(6)**: 831–840 (2014).
- 4) Shimamura, Y., Aoki, N., Sugiyama, Y., Nakayama, T., Masuda, S.: Screening of tea extract and theaflavins for inhibitory effects on the biological activity and production of staphylococcal enterotoxin A. *J. Food Sci.*, **79(11)**: M2294–M2300 (2014).
- 5) Reygaert, W. C.: Green tea catechins: Their use in treating and preventing infectious diseases, *BioMed Res. Int.*, **2018**: 1–9 (2018).
- 6) Shimamura, Y., Utsumi, M., Hirai, C., Nakano, S., Ito, S., Tsuji, A., Ishii, T., Hosoya, T., Kan, T., Ohashi, N., and Masuda, S.: Binding of catechins to staphylococcal enterotoxin A. *Molecules*, **23(5)**: 1125 (2018).
- 7) Rasooly, R., Do, P. M., and Friedman, M.: Inhibition of biological activity of staphylococcal enterotoxin A (SEA) by apple juice and apple polyphenols. *J. Agric. Food Chem.*, **58(9)**: 5421–5426 (2010).

## ストレスによる薬物欲求増大の神経メカニズム

金沢大学医薬保健研究域薬学系 薬理学研究室

金田勝幸

# 超高感度蛍光共鳴エネルギー移動による定量的バイオセンシングを可能とする 新しい糖鎖高分子の創出

埼玉大学大学院  
理工学研究科 物質科学部門  
松岡浩司

## 1. はじめに

複合糖質を模倣した糖鎖高分子は、糖鎖-タンパク質相互作用における親和性の向上が期待されるため、生化学および生物医学研究分野において大きな関心が寄せられています<sup>1)</sup>。単糖、オリゴ糖、生理活性物質、蛍光官能基など、高度に機能化された糖鎖高分子の開発に多くの努力が払われてきました。これらの糖鎖高分子は多価の糖鎖構造を持ち、細胞表面を模倣しているようにふるまうため、天然の複合糖質と類似の役割を果たします。細胞上の複合糖質中の糖鎖は、ヘマグルチニン(hemagglutinin)としても知られているレクチン(lectin)と相互作用します。レクチンはタンパク質であり、糖結合タンパク質(carbohydrate-binding protein; CBP)の1種として知られています。CBPは一般に、糖鎖構造に対する適切な結合部位を1つだけ持ち<sup>2)</sup>、レクチンは、糖鎖認識ドメインとして2つ以上の結合部位を持っています<sup>3)</sup>。これまでに、レクチンに対する適切な糖鎖構造の結合親和性を評価するための様々な方法が開発されてきました<sup>4,5)</sup>。蛍光分光分析は、糖鎖とタンパク質との間の相互作用を評価するための分析方法として知られています。蛍光基質として糖鎖誘導体を使用される場合、レクチンに起因する蛍光発光は相互作用解析に不要です<sup>6)</sup>。しかしながら、蛍光性糖鎖誘導体は、安定性と品質管理の点でその取扱いが容易ですが、蛍光性糖鎖基質の調製には、時間、および労力とコストがかかります。一方、蛍光基を持たない通常の糖鎖とその誘導体を基質として糖鎖-レクチン相互作用解析に使用する場合は、レクチンに起因する蛍光発光が必要となります。タンパク質中のトリプトファン(Trp)残基に由来する蛍光発光は、タンパク質中の便利な自己蛍光プローブとして生物学的評価によく使用されています。タンパク質中の Trp 残基の環境の変化は、UV スペクトルと蛍光スペクトルの双方において非常に敏感です<sup>7,8)</sup>。タンパク質内の Trp 残基に由来するスペクトル変化を使用した糖鎖-レクチン相互作用の生物学的評価が報告されています<sup>9-11)</sup>。アミノ糖である *N*-アセチル-D-グルコサミン(GlcNAc)との強い結合が知られているレクチンである小麦胚芽凝集素(WGA)の Trp 残基は、GlcNAc の結合による環境変化に敏感であることが知られています。その環境変化を効率よく利用するために、糖鎖クラスター効果を発現する GlcNAc を含む糖鎖高分子の調製に取り組んできました<sup>12-14)</sup>。しかし、D-マンノース(Man)と Man と結合することが知られているレクチンであるタチナタマメ由来のコンカナバリン A(ConA)との結合活性評価に対して、糖鎖との結合による Trp の環境変化を利用する手法を適用しましたが、Trp の蛍光スペクトル

ル変化は起こらず、適用ができませんでした<sup>15)</sup>。ConAには、Manの結合部位またはその近傍にTrp残基が存在していないため、糖鎖の結合による環境の変化が起こらなかったことに起因していました。蛍光分光法を利用した高感度測定の実用として、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が知られています。FRETは、蛍光供与基の蛍光スペクトルと蛍光受容基のUVスペクトルの各波長の重なり、および蛍光供与基と蛍光受容基間の距離がおおよそ10~100 Åの際に観測される現象になります<sup>16,17)</sup>。この手法を糖鎖-タンパク質相互作用の評価のため利用できないかと検討しました。我々は、これまでにFRET効果を発現する蛍光基質を報告しており、ユニークな高分子基質においてもFRETが観測できることを見出しております。加水分解酵素として知られているアミラーゼを標的とする低分子型FRET基質を図1に例示します<sup>18)</sup>。

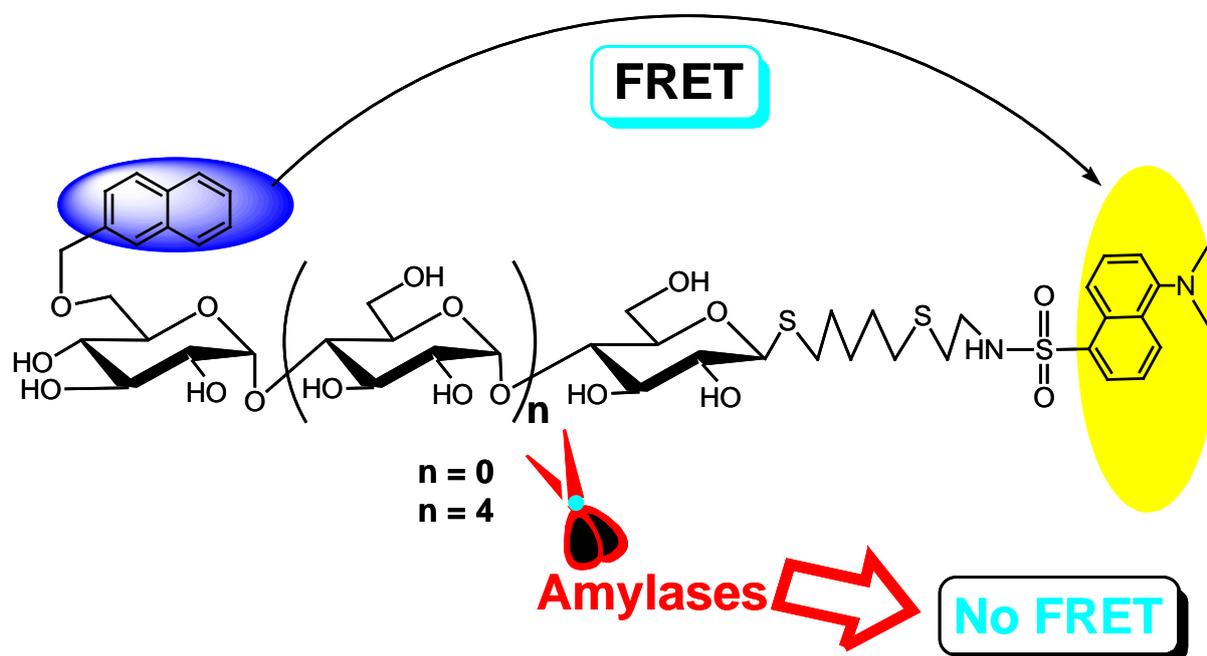


図 1. ナフチル基を蛍光供与基、ダンシル基を蛍光受容基とするアミロオリゴ糖からなる低分子型基質<sup>18)</sup>

非還元末端に2-ナフチル基( $\lambda_{ex}$  290 nm,  $\lambda_{em}$  333 nm)、還元末端にダンシル基( $\lambda_{ex}$  340 nm,  $\lambda_{em}$  520 nm)が導入された糖鎖個数の異なるアミロオリゴ糖誘導体を系統的に合成した。図1には、二糖と六糖由来の誘導体が見られています。オリゴ糖鎖の個数の違いにより、アミラーゼの加水分解速度が異なることから、種々のアミラーゼの検出応用が可能となりました。

低分子型基質のFRET検出が首尾よく達成できたので、より簡便に且つ普遍的に利用可能な高分子型基質へ本蛍光プローブの組み合わせを使って展開を図りました。この高分子型基質のコンセプトは、蛍光基を導入したモノマーを調製しておくことにより、要事、重合により調製ができることとなります。実施例を図2に示します。これは、上記の低分子基質を高分子基質に展開した例となります<sup>19)</sup>。標的酵素として、同様に

アミラーゼを選定しております。

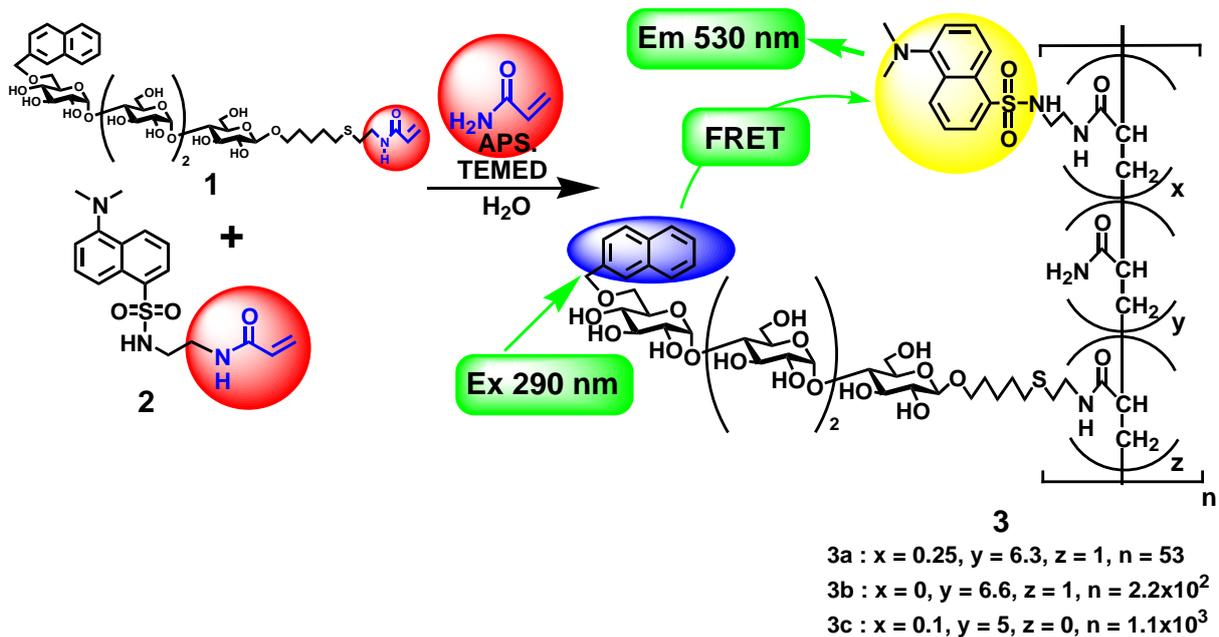


図 2. ナフチル基を蛍光供与基として含む糖鎖モノマー、およびダンシル基を蛍光受容基とするアクリルアミドモノマーをアクリルアミドとともにラジカル重合し、一分子中に蛍光供与基と蛍光受容基の双方を含む高分子基質の合成<sup>19)</sup>

この図においては、四糖からなるアミロオリゴ糖由来の蛍光供与体モノマーとダンシル化された蛍光受容体モノマーを一挙に高分子化させ、FRET 感受性糖鎖高分子の構築を行いました。さらに、酵素による加水分解の継続的なモニターにこの基質を用いた際の蛍光スペクトルのプロファイルを図 3 に示します。

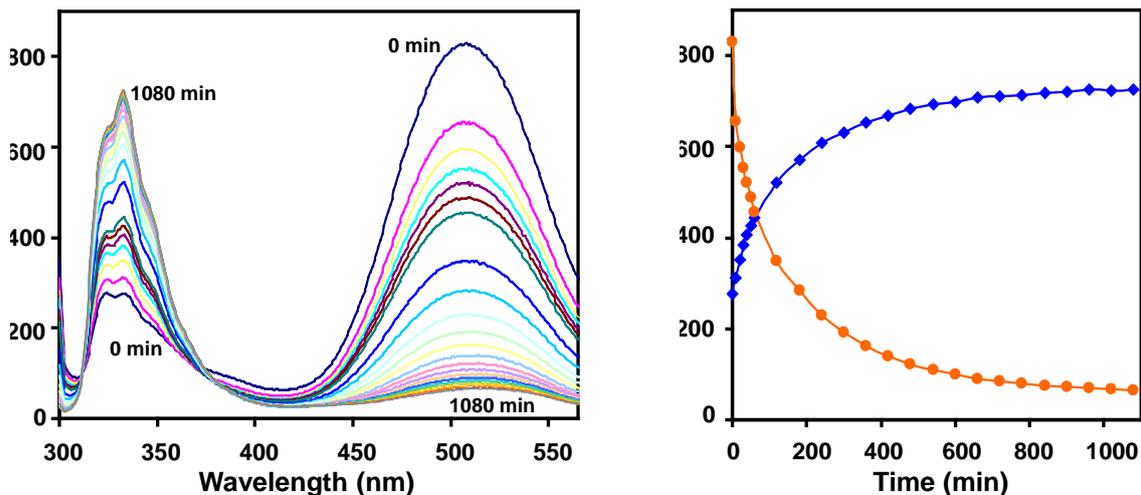


図 3. FRET 感受性糖鎖高分子による酵素反応の蛍光モニターリング 左図: 励起光 290nm による発光スペクトルの時間変化 右図: 290 nm(青)530 nm(橙色)における蛍光強度変化の時間依存性<sup>19)</sup>

図の3においては、530 nm 付近のダンシル基に由来する発光の減少、および 330 nm 付近のナフチル基に由来する発光の回復が顕著に観測され、酵素の速度論解析により、 $K_m$  および  $V_{max}$  を求めることができ、本手法の有効性が確認できました。そこで、本研究では、高感度な FRET 機能を分子間において機能する高分子型蛍光基質の有効性について、糖鎖モノマーとダンシル化モノマーを調製し、種々の比で重合させることによりワンステップアセンブリーを行い、蛍光性糖鎖高分子を調製し、分子間 FRET 技術を利用して生物学的評価を行ったので、その結果について、以下に説明します。

## 2. 糖鎖高分子の合成

合成の開始にあたり、蛍光供与基と蛍光受容基の検討を行いました。蛍光供与基と受容基の組み合わせは、FRET を効率よく発現するために極めて重要な事項です<sup>20)</sup>。タンパク質中のトリプトファン(Trp)に由来する蛍光共鳴エネルギーを励起エネルギーとして利用可能な蛍光プローブとして、ダンシル基を選定しました。レクチンとしてこれまで実績のある WGA をモデルレクチンとし、その認識糖鎖である GlcNAc をモデル糖鎖としました。糖鎖モノマーと蛍光モノマーの合成について図 4 に示します。

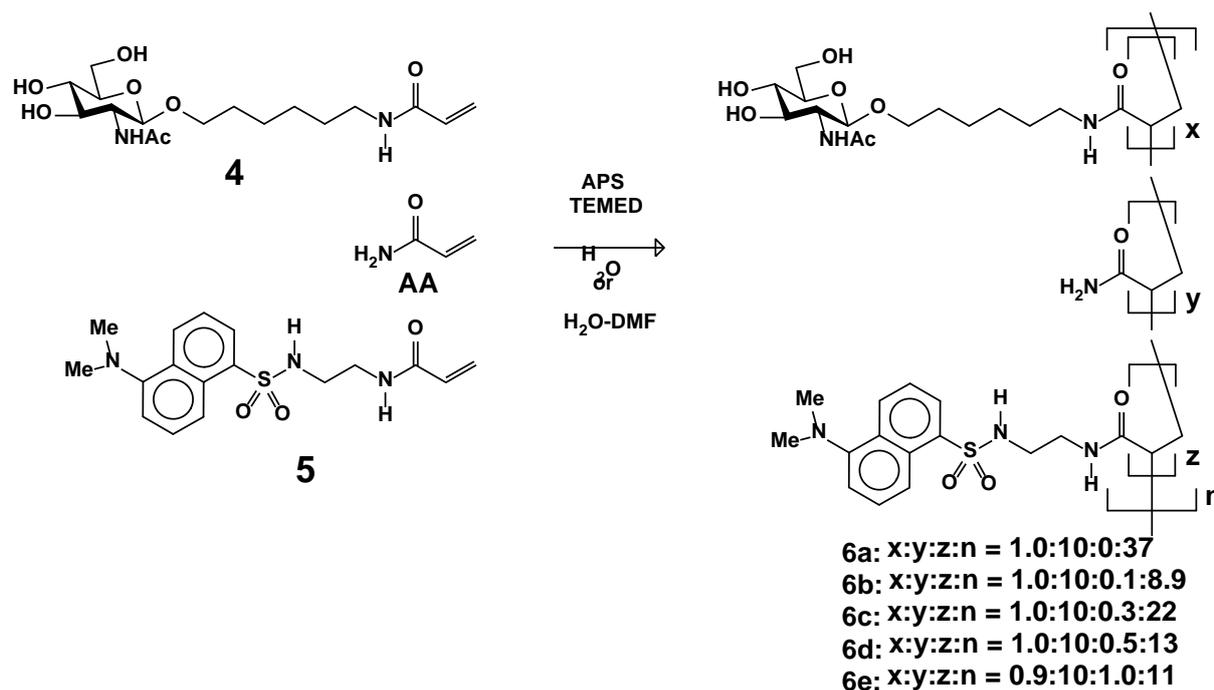


図 4. 糖鎖モノマー、ダンシル基を蛍光受容基とするアクリルアミドモノマー、およびアクリルアミドとのラジカル重合による高分子化<sup>21)</sup>

糖鎖モノマー<sup>4</sup><sup>22)</sup>は、GlcNAc 由来のオキサゾリン誘導体<sup>23)</sup>と 6-アクリルアミドヘキサン-1-オールとのグリコシル化後、エステル交換反応<sup>24)</sup>により調製しました。一方、ダンシルモノマー<sup>5</sup><sup>25)</sup>は、エチレンジアミンのダンシル化後、アクリロイル化する

ことにより、調製しました。モノマーとアクリルアミド(AA)の重合は典型的なラジカル重合条件下<sup>26)</sup>において行われ、良好な収率で目的とする糖鎖高分子 **6a~6e** を与えました。その結果について、表1に示します。

表 1. 重合反応の結果

polymer	monomer ratio			total yield <sup>a</sup> %	polymer composition <sup>b</sup>				sugar content wt%	$\overline{M}_w^c$ kDa	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
	1	2	AA		x	y	z	n			
<b>6a</b>	1.0	0	10	100	1.0	10.0	0.0	37	35	40	1.6
<b>6b</b>	1.0	0.1	10	98	1.0	10.0	0.1	8.9	33	10	1.2
<b>6c</b>	1.0	0.3	10	98	1.0	10.0	0.3	22	31	25	1.5
<b>6d</b>	1.0	0.5	10	88	1.0	10.0	0.5	13	30	16	1.5
<b>6e</b>	1.0	1.0	10	100	0.9	10.0	1.0	11	24	16	1.4

<sup>a</sup>Total yields were calculated on the basis of quantities of monomers used. <sup>b</sup>Polymer compositions of x : y : z : n were estimated on the basis of the results of <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. <sup>c</sup>The weight-average molecular weights ( $\overline{M}_w$ s) were estimated by size-exclusion chromatography in an aqueous solution using a Shodex Asahipak GF-510HQ column. Calibration curves were obtained using pullulan standards (5.9, 11.8, 22.8, 47.3, 112, 212, 404, and 788 kDa; Shodex P-82).

### 3. WGA に起因する蛍光変化による糖鎖高分子の生物学的評価

GlcNAc 残基を含む種々の糖鎖高分子の調製が完了したので、次に、レクチンモデルとした WGA との親和性について蛍光分光法による評価を行いました。まず、WGA に対して、蛍光基を含まない糖鎖高分子 **6a** との相互作用解析を行ったので、その結果を図5に示します。

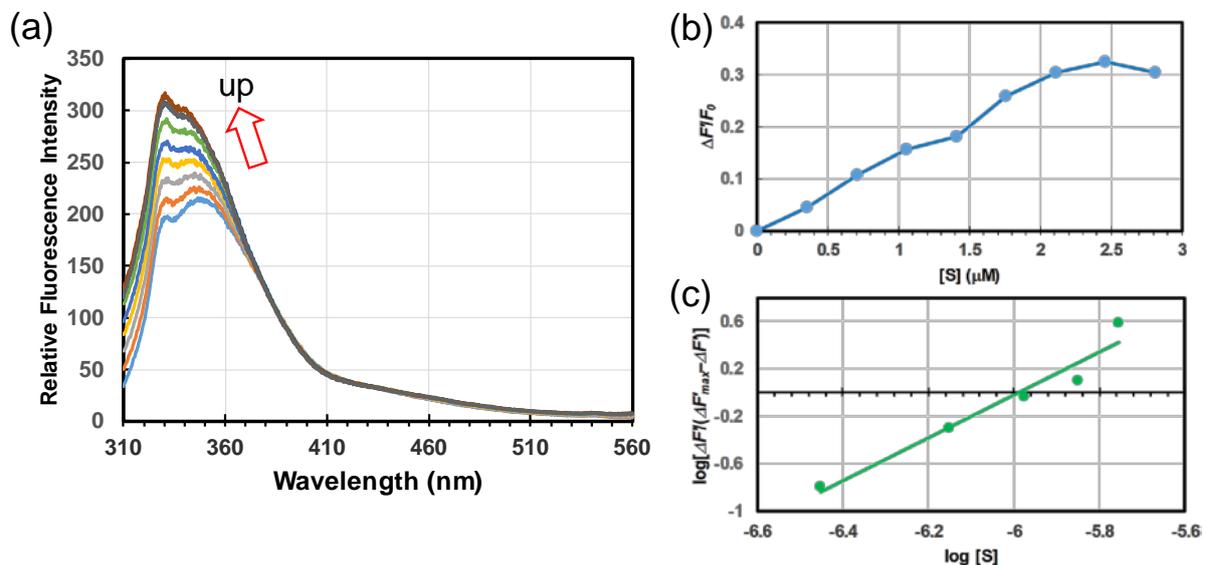


図 5. WGA と糖鎖高分子 **6a** との生物学的評価 (a) WGA 水溶液に少量の **6a** 溶液を加え続けた時の蛍光強度変化 (b) 糖残基濃度に対する蛍光強度比 (c) Hill プロット

WGA に含まれる Trp を選択的に励起する<sup>27)</sup>ため、295 nm の励起光を照射し、得られた蛍光スペクトルが図 5(a)になります。WGA 溶液に少量の **6a** 溶液を加えると GlcNAc 結合部位近傍の Trp の環境変化を引き起こし、Trp に起因する蛍光強度変化が

生じます。348 nm の蛍光強度比を糖鎖高分子の糖鎖残基濃度に対してプロットすると(b)のようになります。さらに、(c)の Hill プロットによる解析を実施することにより、親和定数  $K_a$   $9.75 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  と算出することができます。同様にして、モノマー**1**、及び他の糖鎖高分子に対する WGA との親和定数を算出いたしました。その結果を表 2 に示します。

表 2. 蛍光測定を基盤とした WGA に対する結合定数

substrates	isoemissive point (nm)	$ \Delta F'/F_0 $ (%)	$\Delta F_a^0$ (kJ/mol)	$K_a$ @ 348 nm ( $\text{M}^{-1}$ )	$K_a$ @ 520 nm ( $\text{M}^{-1}$ )	Hill coefficient *	relative potency **
<b>4</b>	398	30.3	21.1	$9.33 \times 10^3$	-	1.5	1
<b>6a</b>	382	30.4	31.8	$9.75 \times 10^5$	-	1.8	104
<b>6b</b>	442	10.9	29.9	$4.34 \times 10^5$	$8.70 \times 10^5$	3.3	46
<b>6c</b>	441	51.8	31.1	$7.30 \times 10^5$	$11.0 \times 10^5$	2.3	78
<b>6d</b>	436	61.2	31.3	$7.91 \times 10^5$	$9.52 \times 10^5$	2.2	85
<b>6e</b>	433	69.2	30.8	$6.46 \times 10^5$	$6.21 \times 10^5$	2.6	69

\*Hill coefficients were calculated from corresponding Hill plots using fluorescence intensities at 348 nm. \*\*Relative potencies were calculated on the basis of  $K_a$  at 348 nm of monomer **4**.

全ての測定において等発光点が観測されていることから、WGA と糖鎖との相互作用が起きていると考えられます。Hill 係数が 1 より大きいことから、協同的な結合が起きている<sup>28)</sup>ことが考えられます。また、モノマー**1**と比較して、糖鎖高分子は何れも数十から 100 倍程度結合定数が大きくなっていることから、正の糖鎖クラスター効果<sup>29)</sup>が発現していることが確認できました。

#### 4. 分子間 FRET による糖鎖高分子の生物学的評価

WGA に起因する蛍光強度変化による糖鎖高分子の生物学的評価が完了したので、次に WGA と蛍光標識糖鎖高分子との間の分子間 FRET の評価について検討しました。WGA と **6b** および **6e** の結果を図 6 に示します。

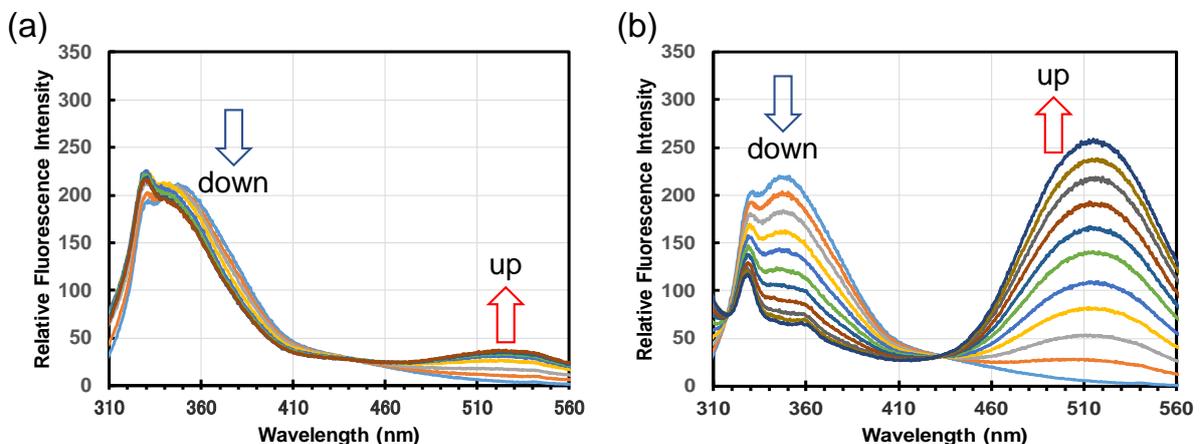


図 6. WGA と蛍光標識糖鎖高分子との生物学的評価 (a) WGA 水溶液に少量の **6b** 溶液を加え続けた時の蛍光強度変化 (b) 同様に少量の **6e** 溶液を加え続けた時の蛍光強度変化

ダンシル基を含まない糖鎖高分子 **6a** を用いた時のプロファイル (図 5) とは大きく異なり、348 nm における WGA の Trp 由来の蛍光発光の減少とダンシル基の蛍光発光に起因する 520 nm 付近の蛍光強度の増大が観測され、分子間における FRET が起きていることが見て取れます。我々のこれまでの研究において、蛍光供与基を含む高分子とその蛍光受容基ブレンドした場合、分子間 FRET は観測されませんでした<sup>19)</sup>ので、WGA と GlcNAc が結合することにより、ダンシル基が WGA 中の Trp 近傍に配置され、その結果、FRET が観測されたと考えています。295 nm の励起波長はダンシル基を弱く励起するので、その差分を考慮して、Hill プロットによる解析を行ったところ、それぞれの糖鎖高分子について、結合定数  $K_a$  を算出することができたので、@ 520 nm として、表 2 に記載しました。本来、348 nm と 520 nm において得られた蛍光強度による解析において、同様の結合定数が得られるべきですが、この結果から、ダンシル基の存在量が GlcNAc の量と比較して少ない場合 (ダンシル基のユニット比が低い糖鎖高分子)、結合定数値が高く出る傾向がありました。糖鎖とダンシル基の比がほぼ等しくなると、結合定数の値も同じくらいになりました。以上のことより、分子間 FRET を利用することにより、糖とレクチンとの相互作用解析ができそうであることが示唆されました。今後、レクチンに起因する蛍光強度変化が利用できる系は限られているので、そのような系へ本手法を展開しようと考えております。

今回報告した手法は、蛍光モノマーと糖鎖モノマーを種々準備しておけば、要事に簡便に蛍光性糖鎖高分子へ誘導でき、且つ分子間 FRET の発現が期待できる興味深い解析手法となりました。

## 5. 関連する糖鎖高分子による生物学的評価

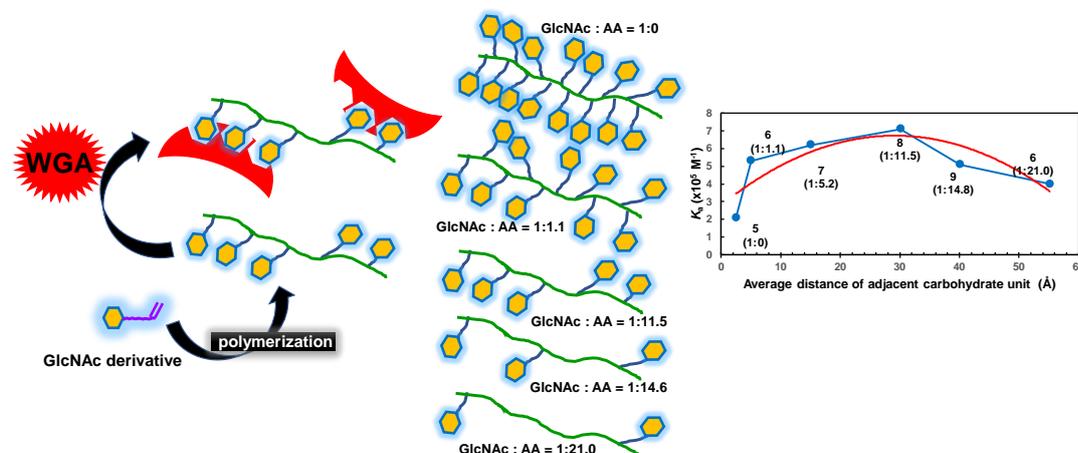


図 7. 糖鎖高分子中の糖鎖密度と親和定数の関係

糖鎖高分子中の糖鎖密度を変化させることにより、WGA との親和定数に与える影響について検討しました。この研究では、糖とアクリルアミドユニットの比が 1:11.5 の時に最も高い親和定数を示しました<sup>30)</sup>。この結果は、レクチン中の糖鎖結合部位に適した糖鎖間距離があることを示唆していると考えています。現在、さらに詳しく、糖鎖密度と主鎖から糖鎖までのスペーサー長の関係について検討しています。結果が出ましたら、改めて報告したいと思っております。

## 謝辞

本研究を推進するにあたり、貴重な御援助を賜りました公益財団法人蓬庵社ならびに関係者の方々に厚く御礼申し上げます。また、本研究助成申請において御推薦を賜りました北海道大学西村紳一郎先生に心より感謝申し上げます。共同研究者として本研究に関わっていただいた研究者及び学生らに深謝申し上げます。

## 参考文献

1. Spaltenstein A, Whitesides GM. Polyacrylamides bearing pendant alpha-sialoside groups strongly inhibit agglutination of erythrocytes by influenza-virus. *J. Am. Chem. Soc.* 1991; 113: 686–687.
2. Drickamer K. Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. *Nature* 1992; 360: 183–186.
3. Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N. What should be called a lectin. *Nature* 1980; 285: 66–66.
4. Lis H, Sharon N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* 1998; 98: 637–674.
5. Sharon N, Lis H. Lectins. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2003.
6. Yan HB, Yalagala RS, Yan FY. Fluorescently labelled glycans and their applications. *Glycoconj. J.* 2015; 32: 559–574.
7. Edelhoch H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 1967; 6: 1948–1954.
8. Vivian JT, Callis PR. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys. J.* 2001; 80: 2093–2109.
9. Lotan R, Sharon N. Fluorescence of wheat-germ agglutinin and of its complexes with saccharides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1973; 55: 1340–1346.
10. Privat J-P, Delmotte F, Mialonier G, Bouchard P, Monsigny M. Fluorescence studies of saccharide binding to wheat-germ agglutinin (lectin). *Eur. J. Biochem.* 1974; 47: 5–14.
11. Jimbo A, Seno N, Matsumoto I. Tryptophan residues and the sugar binding-site of potato lectin. *J. Biochem.* 1984; 95: 267–275.

12. Matsuoka K, Yamaguchi H, Koyama T, Hatano K, Terunuma D. Synthetic construction of a fucosyl chitobiose as an allergen-associated carbohydrate epitope and the glycopolymer involving highly clustered trisaccharidic sequences. *Tetrahedron Lett.* 2010; 51: 2529–2532.
13. Kumari A, Koyama T, Hatano K, Matsuoka K. Synthetic assembly of novel avidin-biotin-GlcNAc (ABG) complex as an attractive bio-probe and its interaction with wheat germ agglutinin (WGA). *Bioorg. Chem.* 2016; 68: 219–225.
14. Hayama R, Koyama T, Matsushita T, Hatano K, Matsuoka K. Preparation of functional monomers as precursors of bioprobes from a common styrene derivative and polymer synthesis. *Molecules* 2018; 23: 2875.
15. Diwan D, Shinkai K, Tetsuka T, *et al.* Synthetic assembly of mannose moieties using polymer chemistry and the biological evaluation of its interaction towards concanavalin A. *Molecules* 2017; 22: 157.
16. Jares-Erijman EA, Jovin TM. FRET imaging. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21: 1387–1395.
17. Sapsford KE, Berti L, Medintz IL. Materials for fluorescence resonance energy transfer analysis: beyond traditional donor-acceptor combinations. *Angew. Chem.-Int. Ed.* 2006; 45: 4562–4588.
18. Oka H, Koyama T, Hatano K, Matsuoka K. Synthetic studies of bi-fluorescence-labeled maltooligosaccharides as substrates for alpha-amylase on the basis of fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Bioorg. Med. Chem.* 2012; 20: 435–445.
19. Matsuoka K, Arai H, Oka H, Koyama T, Hatano K. Synthetic assembly of bifluorescence-labeled glycopolymers as substrates for assaying alpha-amylase by resonance energy transfer. *ACS Macro Lett.* 2012; 1: 266–269.
20. Wu PG, Brand L. Resonance energy-transfer – methods and applications. *Anal. Biochem.* 1994; 218: 1–13.
21. Matsuoka, K, Suzuki, Y, Koyama, T, Matsushita, T, Hatano, K. Fluorogenic glycopolymers available for determining the affinity of lectins by intermolecular FRET. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2020; 30: 127024.
22. Nishimura S-I, Furuike T, Matsuoka K, *et al.* Synthetic glycoconjugates .4. Use of  $\omega$ -(acrylamido)alkyl glycosides for the preparation of cluster glycopolymers. *Macromolecules* 1994; 27: 4876–4880.
23. Nakabayashi S, Warren CD, Jeanloz RW. A new procedure for the preparation of oligosaccharide oxazolines. *Carbohydr. Res.* 1986; 150: C7–C10.
24. Zemplén G, Pascu E. Über die Verseifung acetylierter Zucker und verwandter Substanzen. *Berichte* 1929; 62: 1613–1614.
25. Shea KJ, Stoddard GJ, Shavelle DM, Wakui F, Choate RM. Synthesis and characterization of highly cross-linked polyacrylamides and polymethacrylamides – a

- new class of macroporous polyamides. *Macromolecules*. 1990; 23: 4497–4507.
26. Nishimura S-I, Matsuoka K, Kurita K. Synthetic glycoconjugates – simple and potential glycoprotein models containing pendant *n*-acetyl-D-glucosamine and *N,N'*-diacetylchitobiose. *Macromolecules*. 1990; 23: 4182–4184.
  27. Wetlaufer DB. Ultraviolet spectra of proteins and amino acids. *Adv. Protein Chem.* 1963; 17: 303–390.
  28. Weiss JN. The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J.* 1997; 11: 835–841.
  29. Lee YC, Lee RT. Carbohydrate-protein interactions - basis of glycobiology. *Acc. Chem. Res.* 1995; 28: 321–327.
  30. Matsuoka, K, Yamashita, S, Koyama, T, Matsushita, T, Hatano, K. Verification of suitable ratio of carbohydrate residues in a glycopolymer having GlcNAc moieties for determining the affinity for wheat germ agglutinin. *J. Mol. Struct.* 2020; 1217: 128404.

## 生活習慣病に対する新しい診断治療法の開発

香川大学医学部薬理学・教授 西山 成

## 小児脳難病の病態解析によって発見された若年脳遺伝子の機能解明

森 雅樹

滋賀医科大学 神経難病研究センター

### 【① 若年特性の研究】

小児の脳難病の治療戦略を新規に確立する目的で、子どもが生来もつ、大人にはない強みに着眼した。子どもが、大人と違い、成長し、学習し、柔軟に環境に適応しつつ、自らの体や機能を作り上げることができる特性を「若年特性 (juvenility)」と位置づけた (図 1)。若年特性を実現している分子機構を同定するために、マウスモデルにおいて週齢別に網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq) を行い、若年期の臓器に高発現している遺伝子群として「若年性遺伝子 (juvenility-associated genes, JAGs, ジャグ)」を同定した (文献 1. Jam et al., Scientific Reports, 2018)。

若年性遺伝子には、細胞増殖に関連する遺伝子のほか、スプライシングや代謝に関わる遺伝子など多彩な機能をもつ遺伝子が含まれた (機能解析による成果について③以下に詳述)。

図1. 若年特性は、若年期に特有の生理的性質である  
**若年特性 (Juvenility)**  
…若年期特有の生理的性質

★成長      ★創傷治癒  
★再生      ★可塑性  
★学習      ★適応性 etc...



若年特性の分子基盤の解明  
**若年性遺伝子 (JAGs)**  
**若年性リンクRNA (JALNC)**

### 【② 若年性遺伝子・細胞若年性の同定】

遺伝子解析を、機能未知な部分が大きいロング・ノンコーディング RNA (long noncoding RNA, lncRNA) に拡張し、若年期に高発現している lncRNA として、「若年性 lncRNA (juvenility-associated lncRNA, JALNC, ジャリンク)」を同定した (2. Tano et al., Journal of Cell Science, 2019)。

JALNC のうち、機能未知であった Gm14230 はヒトでも保存され、細胞老化を抑止する機能があることを解明した。分子メカニズムとしては、Gm14230 はクロマチン制御因子である Ezh2 蛋白分子と結合し、Tgif2 遺伝子の転写を調節する。Tgif2 遺伝子は、全前脳胞症の原因遺伝子としても知られ、脳発達に関わる重要な因子である。

さらに、若年特性の実体を細胞レベルで検証し、若年期特有の細胞の性質を、「細胞若年性 (cellular juvenescence)」として報告した (文献 2)。細胞若年性は、細胞の増殖性、同化優位の代謝動態、老化抵抗性などの性質によって構成され、子どもと大人の細胞レベルでの違いに他ならない。

### 【③ 年齢依存性オルタナティブ・スプライシング (ADAS) の説明】

オルタナティブ・スプライシング (AS) はゲノムDNAから転写されたmRNAから異なるパターンでイントロンを除去し、多彩なタンパク質を生産する分子機構である。臓器の発達過程で、ASが起き、異なるバリエーションが発現するかどうかは知られていなかった。

若年期の遺伝子発現解析の結果、AS がトランスクリプトームの年齢変化に大きく寄与することを発見した。年齢依存的に実行される AS を網羅同定し、**年齢依存性オルタナティブ・スプライシング (age-dependent alternative splicing, ADAS, エイダス)** として報告した (図 2A)。さらに ADAS の責任分子として、若年性遺伝子であるスプライシング因子 **Srsf7** を同定した。Srsf7 の変異は、トランスクリプトーム・ワイドなスプライシング異常を引き起こす(図 2B)。Srsf7 は標的とするスプライシングの年齢依存的な制御を行っており、1 例として、EIF4A2 遺伝子のスプライシングにおいては、若年期にのみ含まれるエクソンの選択を担っている (図 2C)。

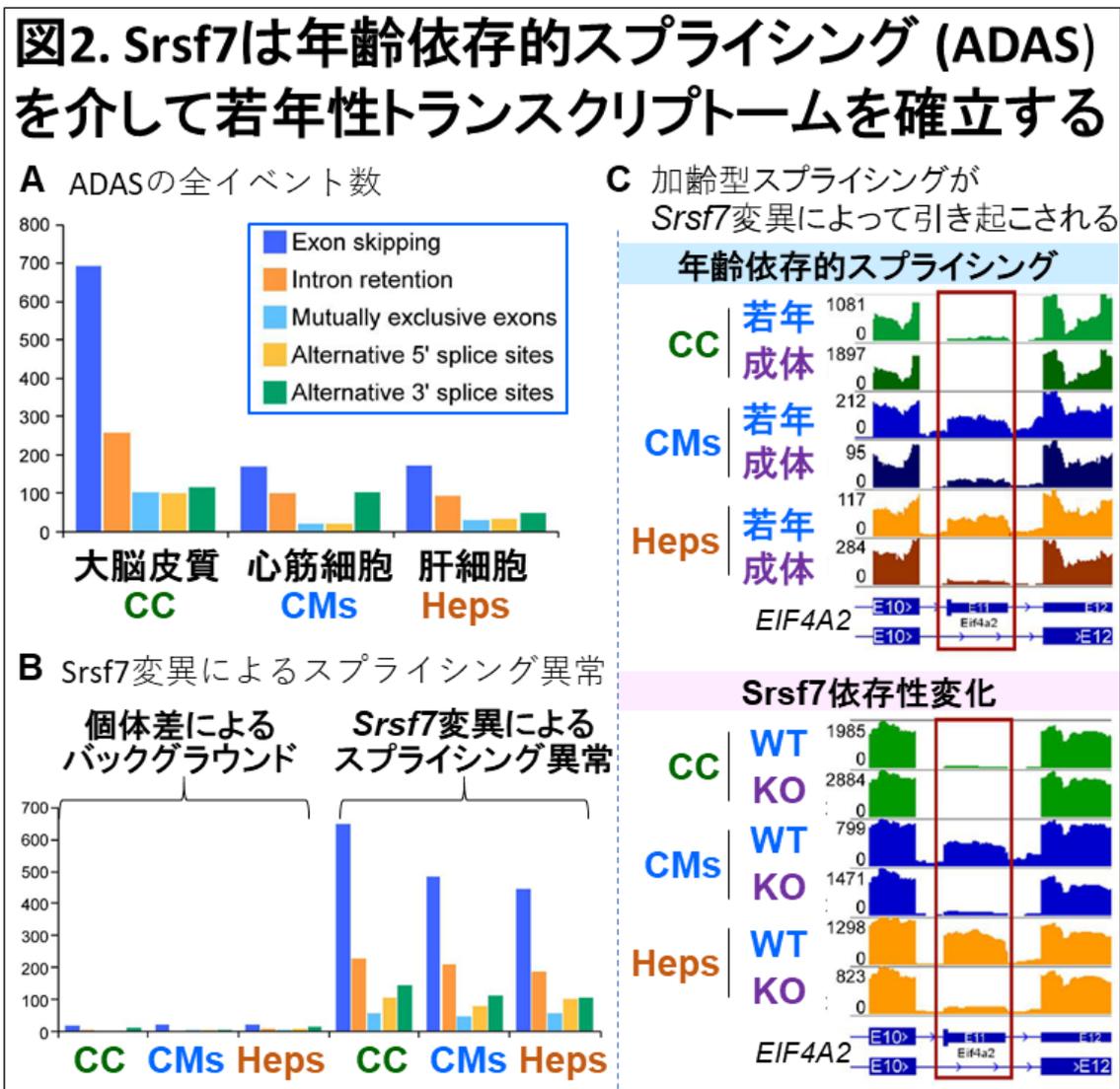
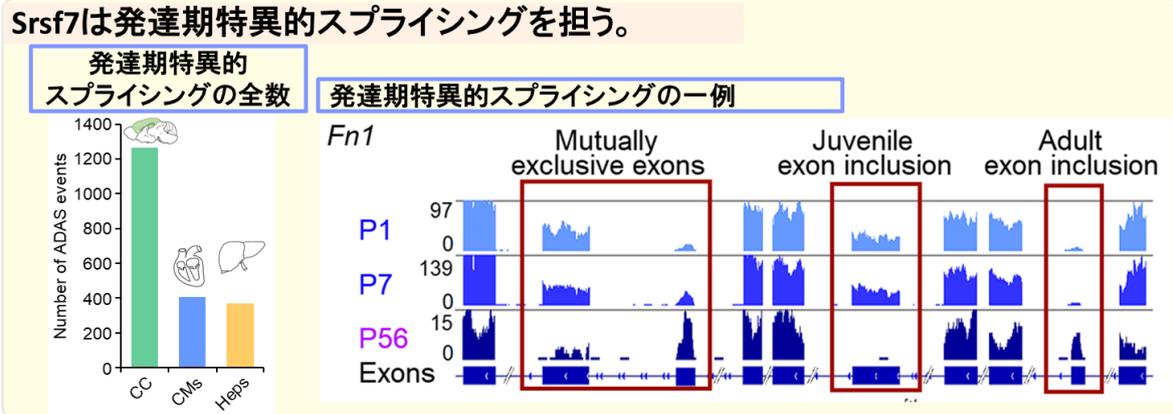


図3に示すように、発達期特異的なASは大脳皮質、心筋細胞、肝細胞において頻繁に認められる。一例として Fn1 遺伝子では、複数のタイプの年齢依存的ASが生じ、スプライシングパターンの変化がプロテオームの多様性に与える影響は多彩である。

図3



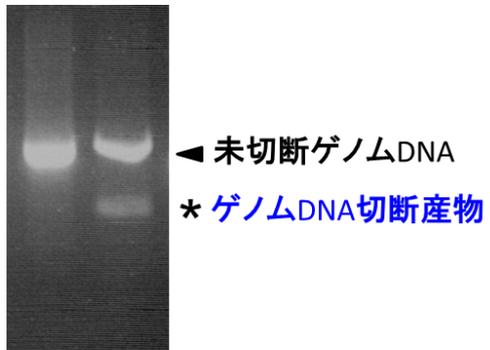
若年性遺伝子である Srsf7 は、発達期の脳皮質、心筋細胞、肝細胞で発現し、成熟後は発現が低下する。ゲノム編集技術である CRISPR-Cas9 法を用い、Srsf7 のノックアウトマウスを初めて創出した (図4)。Srsf7 ノックアウトマウスについての詳細なスプライシング解析の結果、Srsf7 が年齢依存的スプライシングに与える寄与は非常に大きいことが分かった。発達期の細胞で Srsf7 が発現すると、標的となる mRNA の AS が起こる。その結果、異なるバリエントの蛋白分子が発現する。この機序により、発達段階によって、同じゲノムから異なるプロテオームが形成される。

Srsf7 は多くの代謝遺伝子を作用標的とする。Srsf7 は若年期には代謝酵素である RBM7 および EIF4A2 の同化型バリエントを発現する。一例として EIF4A2 では、Srsf7 の存在下では、若年期特異的な AS により、若年期特異的なエキソンを含むバリエントが発現する。そのエキソンにはストップコドンが含まれているため、若年期バリエントはタンパク質としては短縮し、下流の機能ドメインを欠く。その下流の機能ドメインは microRNA 依存性に蛋白翻訳を抑制する機能があるため、

図4 ゲノム編集による若年性遺伝子の変異マウスの作製

T7エンドヌクレアーゼ・アッセイ

- + T7 endonuclease I



CRISPR法によるKOマウス創出のため、標的遺伝子座にゲノム切断を導入するガイドRNAを作製した。

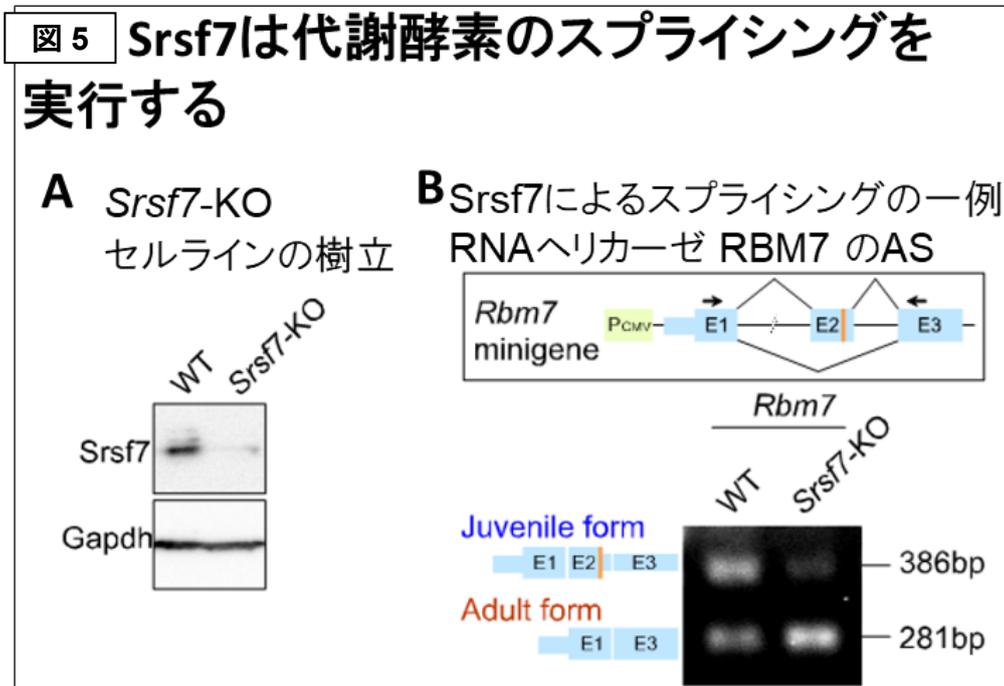
受精卵へのインジェクション



若年性遺伝子の変異マウス系統の樹立

若年期バリエントでは翻訳抑制がおこらなくなる。

このように、成人期には *Srsf7* が存在せず両酵素は異化型バリエントとして発現する。*Srsf7* ノックアウト(KO)マウスでは、RBM7 やEIF4A2 は異化型バリエントとなり、トランスクリプトームの加齢性変化が生じる (図 5)。



実際に、*Srsf7* の KO マウスは若年期には体サイズの小型化と成長の早期停止を示し、成熟期には早期老化徴候を示した。以上のことから、若年性遺伝子である *Srsf7* は ADAS を通じて若年型のトランスクリプトームを実現し、*Srsf7* が失われると、トランスクリプトームの加齢型への進行を導くことがわかった (文献 3. Kadota et al., *iScience*, 2020)。

#### 【④ 若年期の応答性を担う天然変性タンパク質の新規発見】

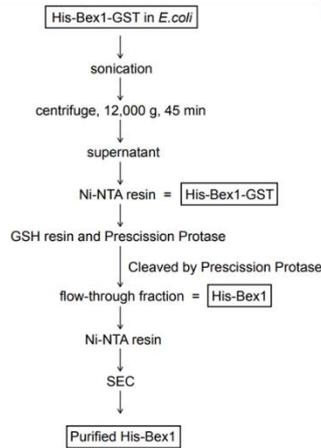
さらに、別の若年性遺伝子である **BEX1** に着眼した。BEX1 ファミリーは機能未知の遺伝子群であるが、若年期に著明な発現を示し、成熟個体では発現が極めて小さくなる。

BEX1 は細胞増殖に必須であり、アミノ酸配列として天然変性領域を含み、**天然変性蛋白** (intrinsically disordered protein, IDP) であることが予測された。BEX1 のリコンビナント蛋白を大腸菌に発現させ、精製した。一般に、IDP は凝集や分解の傾向を示すことが多く、精製に難渋することが多い。BEX1についても同様であり、精製過程で容易に凝集体を作ったり、低温でも速やかに分解が進んだりし、保存が困難であるなどの課題が生じた。結果として得られた BEX1 リコンビナント蛋白は円二光性スペクトル解析で安定した二次構造を取らないことが示され、IDP としての物性をもつことがわかった (図 6)。

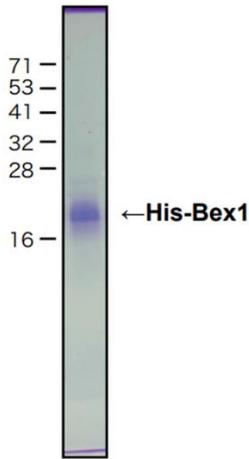
図 6

## Bexは天然変性タンパク質であり、液-液相分離を起こす

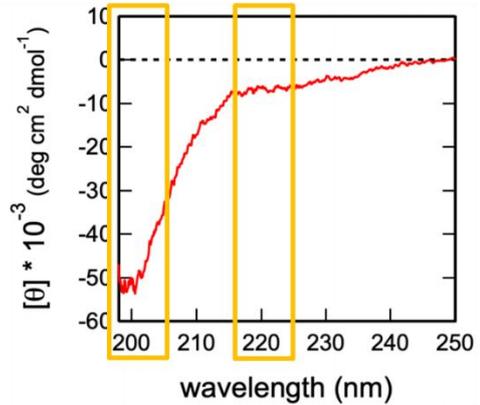
天然変性タンパク質,  
Intrinsically disordered  
protein, IDP



12% SDS-PAGE / CBB染色



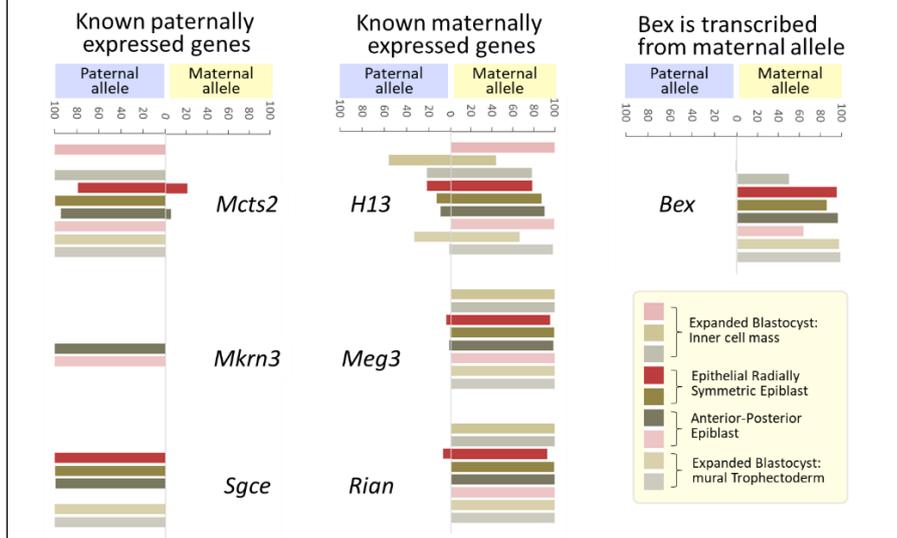
円二色性 (CD) スペクトル



BEX1 の生体機能は未知であったが、BEX1 の KO マウスを初めて作製したところ、以下のようなことが判明した。まず、BEX1 はインプリンティングによる制御を受け、BEX1 遺伝子の変異の影響は、その変異が母親から継承されたときにより強いことがわかった。母親から継承された場合、ヘテロ変異であっても表現型はホモ変異に相当した。このことは、父由来アレルからの BEX1 の発現が強く抑制されていることを示唆した (図 7)。

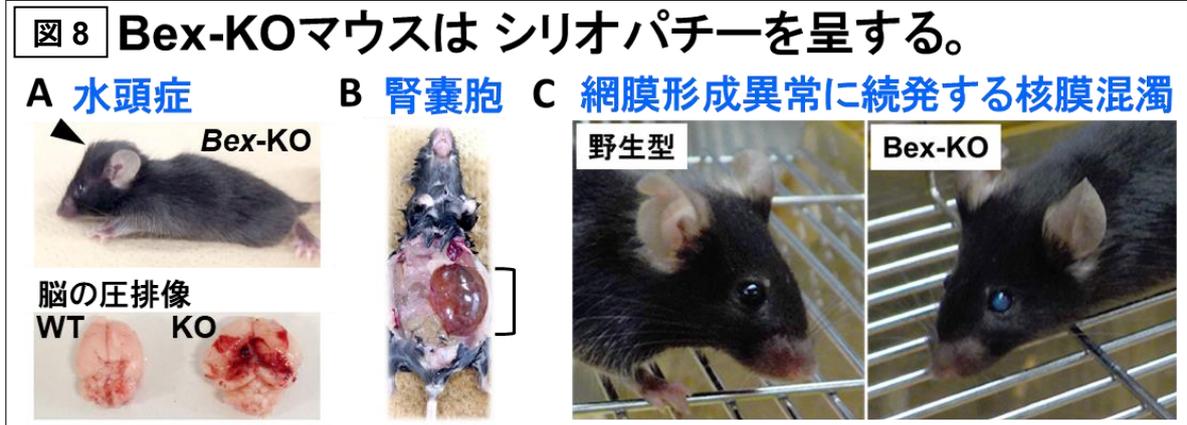
図 7

## Bexはインプリンティング制御を受ける

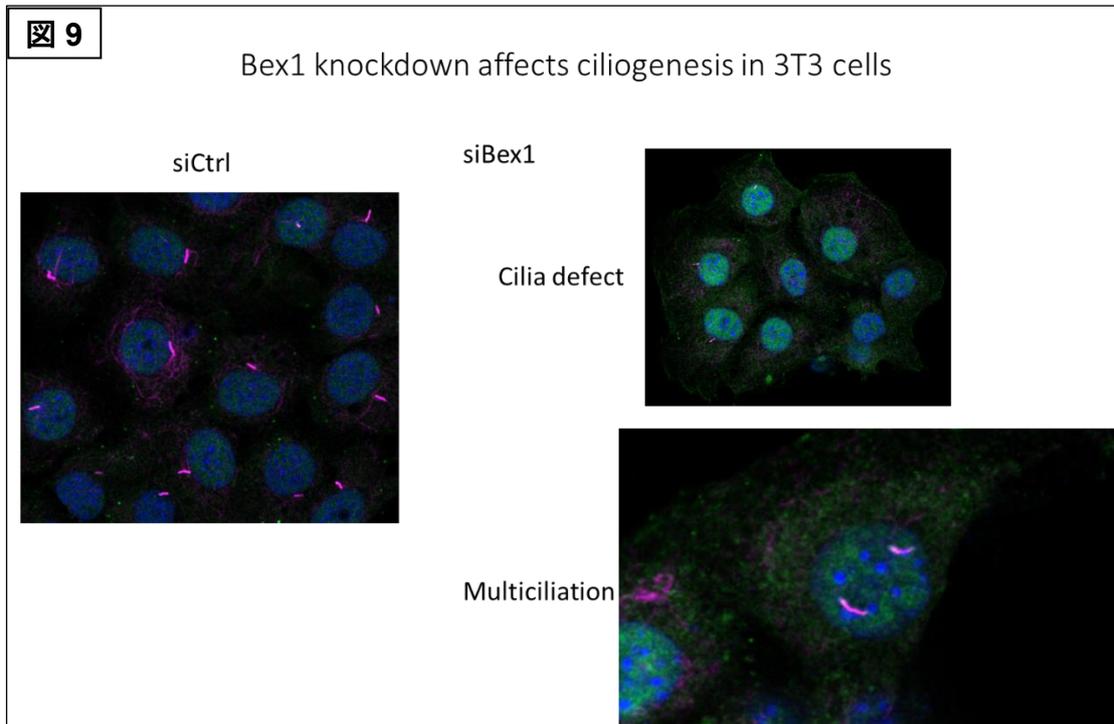


さらに、BEX1 変異の表現型には性差があり、メス個体で表現型が強い傾向が明確であった。この原因については不明であり、性差に関わる分子機構を検討するために有用な知見の 1 つと考えている。

BEX1 の変異マウスは、①網膜の形成異常や②多発性嚢胞腎および③小脳虫部の低形成を発症することがわかった (図 8)。これらは線毛病 (ciliopathy) の主要徴候である。



一次線毛(primary cilia)は細胞には一般的に存在するアンテナ様構造で、細胞外環境の栄養や固さの検出を行っていると考えられている。培養細胞では、BEX1 の発現抑制により、一次線毛の形成が強く阻害されることがわかった (図 9)。一次線毛は原則として 1 つの細胞に 1 本認められるが、その本数が複数となる異数性も認められた。このことから、BEX1 は一次線毛の正しい数を規定するはたらきもあると考えられた。

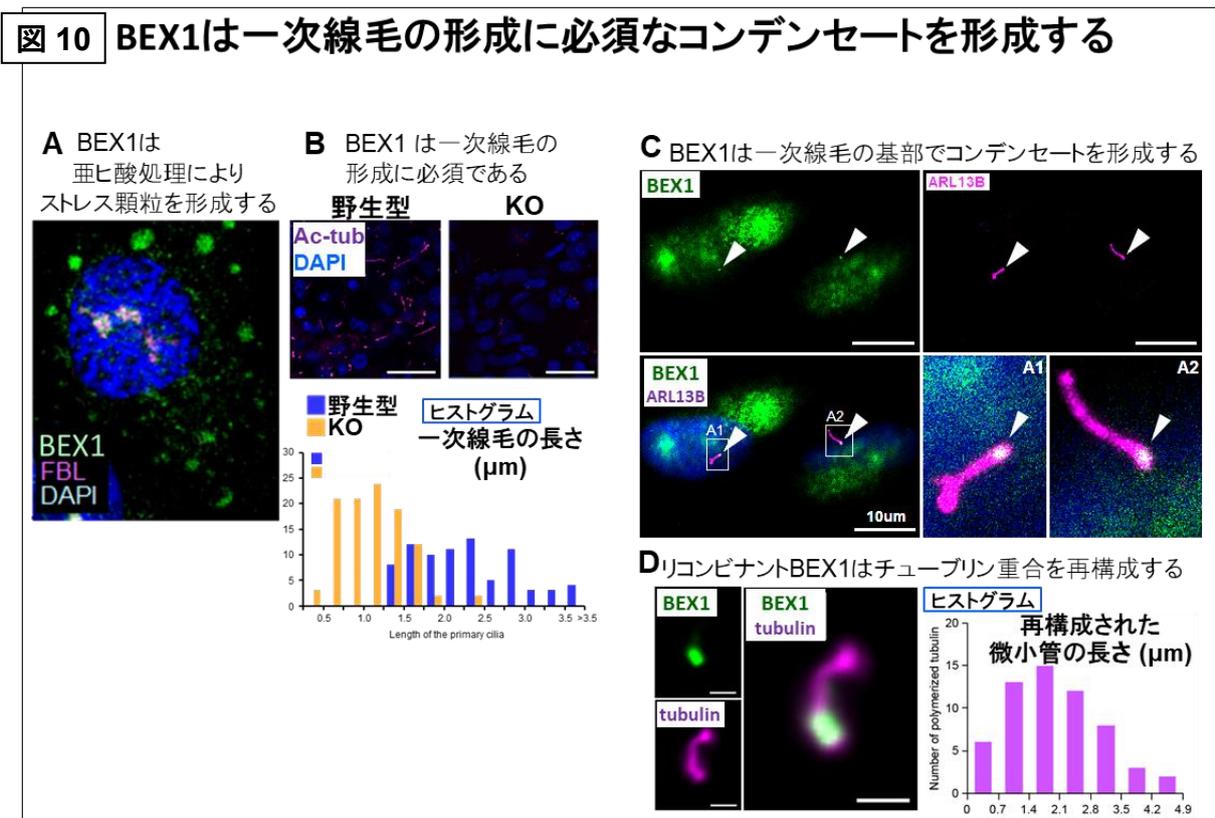


次にBEX1の生物学的機能を検討するために、免疫染色を行って細胞内局在を調べたところ、定常状態では核小体に局在し、亜ヒ酸 (arsenite) による酸化ストレスによってストレス顆粒 (stress granule)を形成することがわかった (図 10A)。ストレス顆粒への局在は、IDP について比較的良好に認められる挙動である。

さらに BEX1 マウスでも一次線毛の形成が著明に抑制されていることがわかった (図 10B)。一次線毛の減少は、網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium) および脳の線条体 (striatum) で認められた。以上のことから、Bex1 は一次線毛の形成に必須であることがわかった。

この知見に基づき、BEX1 と一次線毛の共局在を高解像度顕微鏡で検証した結果、BEX1 蛋白質は、一次線毛の起始部に“condensate”を作ることがわかった (図 10C)。一次線毛の起始部には基底小体 (basal body) と呼ばれる分子複合体が形成される。基底小体の構成分子は、線毛病の原因遺伝子として広く同定されている。

蛍光標識した BEX1 リコンビナント蛋白質はポリエチレングリコール (PEG)による molecular crowding 効果の存在下で、細胞内で認められたのに酷似した condensate を形成した。さらに、リコンビナント・チューブリン蛋白質の存在下でチューブリンの重合を誘起できることがわかった (図 10D)。



以上から、BEX1 は IDP として一次線毛の起始部にチューブリン重合に必須なコンパートメントを作ることがわかった (論文投稿中)。

若年特性の重要な役割の 1 つは、外部環境への「適応」であり、細胞のアンテナである一次線毛の形成に若年性遺伝子が寄与することは理にかなっていると考えている。

### 【⑤細胞若年性に着眼した細胞競合研究】

細胞競合は、同種の細胞間に生じる生存競争である。がん遺伝子 (Ras や Src など) を発現する細胞は、前癌細胞として周囲の細胞に感知され、apical exclusion や細胞死の誘導によって積極的に除去される。

細胞競合は発達期の脳でも生じている可能性があるが、十分に検討されていない。

脳発達における細胞競合の役割を明らかにするため、上皮性の配置を示す神経幹細胞をモデルとして、マウス胎児期の神経前駆細胞を用いて細胞競合の検証を行った。

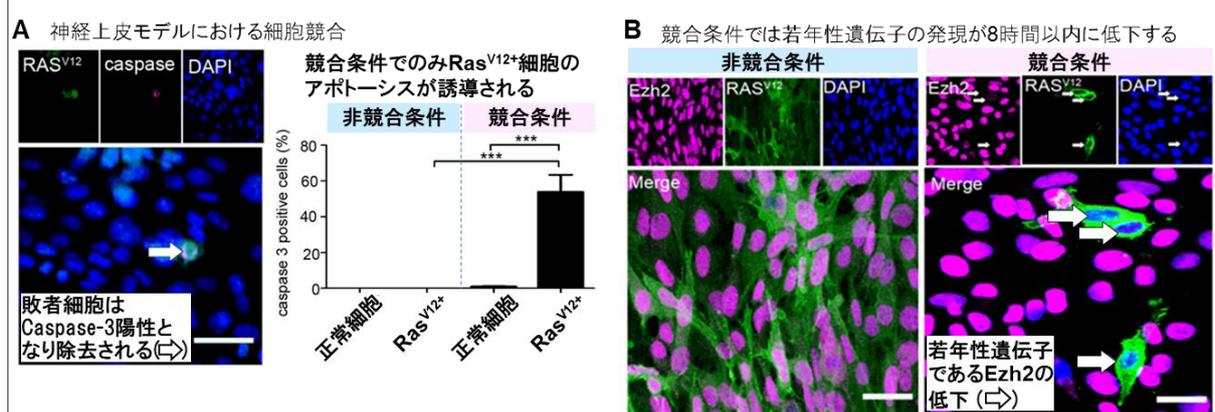
前がん遺伝子である Ras<sup>V12</sup> を薬剤誘導性に発現する神経前駆細胞は、アポトーシスによって細胞死が誘導されることがわかった (図 11A)。

さらに、細胞死が誘導された細胞 (敗者細胞) は、周囲の正常細胞によってファゴサイトーシス (食作用) によって除去されることがわかった。

競合条件でのみ細胞死が誘導されるメカニズムとして、若年性遺伝子である Srsf7 および Ezh2 の発現が、敗者細胞で非細胞自律性に抑制されることがわかった (図 11B)。さらに、Srsf7 を過剰発現させた Ras<sup>V12</sup> 細胞では細胞競合による除去が抑制された。

これらの知見から、細胞競合が敗者細胞を除去するメカニズムの 1 つとして、細胞若年性の喪失が寄与していると考えられた (投稿中)。

図 11 細胞競合により細胞若年性の喪失が惹起され、敗者細胞は除去される

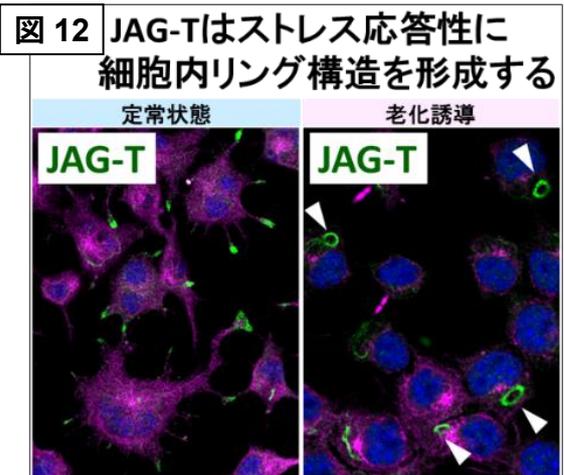


### 【⑥ 老化ストレス応答における細胞内リングの役割】

神経細胞における若年性遺伝子のはたらきを解明するため、小児の神経難病である「てんかん性脳症」に関連する JAG-T 遺伝子 (呼称) に着眼した。JAG-T は Rab-GTPase として定常状態では細胞膜周囲に局在する。JALNC である Gm14230 をノックダウンすることで細胞若年性を喪失させると、JAG-T は細胞質においてリング構造を作ることがわかった (図 12)。

JAG-T がこのような細胞内構造を取ることは報告されていない。さらに、「てんかん性脳症」の遺伝子変異を導入した JAG-T 蛋白分子は、凝集体を作る傾向が著明であった。これらの知見は、JAG-T のリング形成による老化ストレス応答が正常な神経機能に必要であることを示唆した。

生体ストレスへの応答不全が「難治性てんかん」の原因になるとともに、新規の神経難病の治療標的となる可能性を示唆しており、分子機構の解明を進めている（投稿準備中）。



### 【⑦バイオインフォマティクス解析】

高速シーケンシング技術やプロテオミクス・メタボロミクスなどのオミクス解析の発展により、生体を構成する多数の因子を取り扱うことが可能となった。網羅的遺伝子発現解析である RNA-seq 技術に加え、現在ではオルタナティブ・スプライシング、RNA 編集、シングル・セル RNA-seq、アレル特異的 RNA-seq、メチローム解析など多様なバイオインフォマティクス解析が可能になっており、生命現象の理解に用いられている。AI の進歩も著しく、コンピュータ技術を用いたアプローチを抵抗なく利用していくことは重要であると考えられる。

ロング・ノンコーディング RNA (lncRNA) は種間保存性が低く、ヒト—マウス間で 10%程度と見積もられた。多くの lncRNA 配列が、LINE1 などのトランスポゾン配列を含むことがわかった。この知見は、トランスポゾンの挿入によって種特有の lncRNA の転写単位が生成する可能性を示唆した。生物種に特有の lncRNA は多く、lncRNA の進化への寄与が示唆された（投稿準備中）。

### 謝辞

一連の研究は、公益財団法人 蓬庵社による研究助成により可能となりました。この場をお借りしまして、心より感謝申し上げます。

### 参考文献（いずれも本助成による成果です。）

1. Yosuke Kadota#, Faidruz Azura Jam#, Haruka Yukiue#, Ichiro Terakado, Takao Morimune, Ayami Tano, Yuya Tanaka, Sayumi Akahane, Mayu Fukumura, Ikuo Tooyama, Masaki Mori\*  
 (#, equally contributing authors; \*, corresponding author)  
 Srsf7 establishes the juvenile transcriptome through age-dependent alternative splicing in mice.  
**iScience**, doi.org/10.1016/j.isci.2020.100929, 2020.
2. Ayami Tano#, Yosuke Kadota#, Takao Morimune#, Faidruz Azura Jam, Haruka Yukiue,

Jean-Pierre Bellier, Tatsuyuki Sokoda, Yoshihiro Maruo, Ikuo Tooyama, Masaki Mori\*  
(#, equally contributing authors; \*, corresponding author)

Juvenility-associated lncRNA Gm14230 maintains cellular juvenescence.

**Journal of Cell Science**, doi: 10.1242/jcs.227801, 2019

3. Faidruz Azura Jam#, Yosuke Kadota#, Anarmaa Mendsaikhan#, Ikuo Tooyama, Masaki Mori\*

(#, equally contributing authors; \*, corresponding author)

Identification of juvenility-associated genes in the mouse hepatocytes and cardiomyocytes.

**Scientific Reports**, 8, 3132, doi:10.1038/s41598-018-21445-3, 2018

公益財団法人 篷庵社

Hoansha Foundation

大阪市中央区道修町3丁目1番8号

電話：06-6231-9180