2023 年度

氏 名 所 属	研究テーマ	役職
岡 弘樹 大阪大学 大学院工学研究科	疎水性ナノ空間を有する全有機の多孔質材料を用い た革新的プロトン伝導材料の創製	助教
豊竹 洋佑 立命館大学 生命科学部	脂質の機能から紐解く有用酢酸菌の抗ストレス応答メ カニズム	助教
山田 駿介 東北大学 大学院工学研究科	植物由来の乳酸を用いた生分解性電池の作製とその 農業 DX 応用	助教

2023年度「杉山報公会研究助成」報告書

研究題目:疎水性ナノ空間を有する全有機の多孔質材料を用いた革新的プロトン伝導 材料の創製

東北大学 多元物質科学研究所 岡弘樹

【1. 緒言】

疎水性ナノ空間中の水分子は、バルクの水と異なる特異な挙動を示す^[1]ことから、優れたプロトン伝導性を発現することが報告されている。^[2] 我々は、これまでに、スルホン酸とアミンが簡便な再結晶を通して構築する多孔質有機塩 (**POS**) において、アミンへの官能基修飾により空孔表面環境を調整できることを見出している (**図 1**)。^[3]

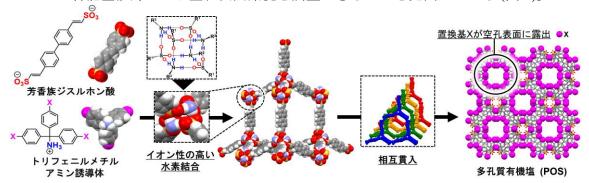


図 1. 多孔質有機塩の構造構築と表面環境の制御

本研究では、POS のこの性質に着目し、高フッ素化アミンを用いることで表面がフッ素に覆われた疎水ナノ空間を有する POS を作製した。POS の均一な構造を利用して、水環境における疎水性の高フッ素化ナノ空間の特性を明らかにすることで、室温で実用基準の 10^2 S/cm を示すプロトン伝導体の創製を目指した。

[参考文献]

- [1] P. K. Maiti, et al., Acc. Chem. Res., 50, 2139, 2017.
- [2] H. Kitagawa et al., Nat. Commun., 11, 843, 2020.
- [3] T. Ami, K. Oka, N. Tohnai, et al., Angew. Chem. Int. Ed. 61, e202202597, 2022.

【2. 研究方法】

図 2 左に示すように、**TPMA** の芳香環のパラ位およびにフッ素を導入したフッ素化アミン (**TPMA-3F**) を合成し、四面体骨格のテトラスルホン酸である 4',4"',4""'-,4""'-methanetetrayltetrakis (([1,1'-biphenyl]-4-sulfonic acid)) (**MTBPS**) と組み合わせた有機塩を再結晶することで **TPMA-3F/MTBPS** を作製した。**TPMA-3F/MTBPS** の多孔質構造を X線構造解析により決定した後、材料の水に対する特性 (耐水性、吸着特性) を調べ、交流インピーダンス測定により高湿条件下でのプロトン伝導性を測定した。

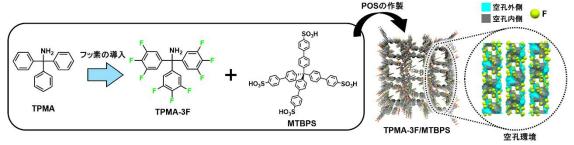


図 2. 高フッ素化ナノ空間を有する POS の構築

【3. 結果と考察】

3.1. X 線構造解析による TPMA-3F/MTBPS の構造決定

図2右に示すように、単結晶 X 線構造解析により、TPMA-3F/MTBPS は表面にフッ 素が露出した疎水性の高フッ素化ナノ空間を形成していた。この多孔質空間は、 1000Å3あたり 9.2 個のフッ素原子を含み、極めて高いフッ素密度を示した。

3.2. TPMA-3F/MTBPS の耐水性および水に対する吸着特性の決定

図 3a に示すように、TPMA-3F/MTBPS の耐水性を調べるために、結晶を水中に1週 間浸漬させ、前後の粉末 X 線回折測定の結果を比較した。浸漬前後の構造に変化は見 られず、フッ素の高い疎水性に起因した水に安定な構造であることが明らかになった。

図3bに示すように、水 蒸気吸着測定では、最大 で 160 mL/g を吸着し、孔の 表面が疎水性のフッ素で覆 われているにも拘わらず、 孔内に水分子が侵入可能 であることから、水環境での 応用の可能性を示した。

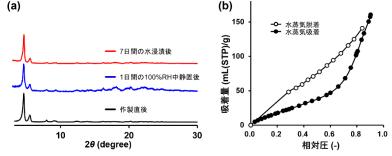


図 3. (a) 水環境下での XRD パターンおよび (b) 水蒸気吸着測定

3.3. TPMA-3F/MTBPS のプロトン伝導測定

最後に、作製した TPMA-3F/MTBPS を ペレット状にし、電気化学インピーダンス分 光法によりプロトン伝導度を測定した。図 4 に示すように、TPMA-3F/MTBPS は 95%RH の高湿条件下で典型的な誘電緩 和が見られ、90℃で1.34×10⁻² S/cmの優れ たプロトン伝導度を示した。 さらに、TPMA-3F/MTBPS のプロトン伝導の活性化エネル

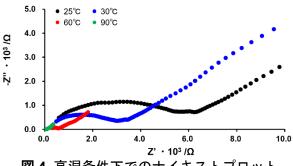


図 4. 高湿条件下でのナイキストプロット

ギーは 1.01 eV であり、空孔表面に露出した疎水性のフッ素原子が、水分子間の水素結合を 制限することで、プロトンがヒドロニウムイオンとしてナノ空間中を移動することが明らかになっ た。本研究により、疎水性の全有機多孔質材料の優れたプロトン伝導性を初めて実証した。

現在は、より発展的な構造設計として、アミン中のフッ素原子の数を調整することによるフッ 素密度が異なる疎水性空間の形成やプロトン源となる酸性置換基の導入に取り組んでいる。 今後は、フッ素密度や疎水性とプロトン伝導度の相関をより詳細に解明し、室温で実用基準 の 10² S/cm を示すプロトン伝導体の創製へ向け、さらなるプロトン伝導度の向上を目指す。

【4. 成果】

T. Ami, K. Oka, * S. Kitajima, N. Tohnai, * Angew. Chem. Int. Ed. 2024, 63, e202407484.

【5.謝辞】

本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援を頂いた貴財団に心より御礼を申し上 げます。

2023年度「一般財団法人杉山報公会研究助成」成果報告書

脂質の機能から紐解く有用酢酸菌の抗ストレス応答メカニズム

立命館大学 生命科学部 生物工学科 豊竹洋佑

【諸言】

酢酸菌は、異なる基質特異性を持つ複数の膜結合型酸化還元酵素を有しており、細胞膜の表面で様々な基質を位置特異的に酸化し、その後放出する。このユニークな能力は、基質を選択することで、医薬品やその他有用な化合物の生産に応用できる可能性を秘めている。一方その過程で、生成物の細胞毒性や pH の変動、環境温度の変化といった様々な膜ストレスに晒されることから、酢酸菌の持つ巧みな抗ストレス応答戦略を理解し向上させることが重要である。以上の背景から、本研究では、独自に作製した本菌の膜脂質関連遺伝子欠損株における表現型を解析し、酢酸菌細胞膜を構成する多様な脂質分子がそれぞれどのような抗ストレス応答機構に関与するのかを調べた。

【方法・結果・考察】

先行研究で確立された相同組換えを利用した方法により [Appl. Microbiol. Biotechnol. (2018) 102, 4549]、Acetobacter pasteurianus SKU1108 における種々の脂質合成関連遺伝子 を欠損させた。これまでに得られた欠損株とその表現型を以下に解説する。(1) グリセ ロリン脂質の一種であり、酢酸菌細胞膜おいて最も豊富に存在するホスファチジルコリ ン (PC) は、ホスファチジルエタノール (PE) の極性頭部をメチル化することで得られる。 この反応を触媒する PE N-メチル基転移酵素を欠損させ、PC が欠失し PE が著量蓄積し た変異株を得た (ΔpmtA)。ΔpmtA 株は親株と比較して著しい酢酸感受性・低 pH 感受 性・高温感受性を示した。さらに、中性環境での酢酸塩に対しても感受性を示したこと から、PmtA によって合成される PC は、本菌の極めて多様なストレス応答機構に重要 であることが示唆された。② ステロール様化合物ホパノイドは、スクアレンが環化し た五環性トリテルペノイドの一種である。酢酸菌はスクアレン環化酵素のホモログ遺伝 子を二つ持っているが、単一細胞内でどのように機能を分担しているのかは分かってい ない。そこで、これら二種類のホモログ遺伝子をそれぞれ欠損させた変異株を作製した $(\Delta hpnF \& \Delta shc)$ 。 Δshc 株は親株を比較して著しい酢酸感受性を示した。一方、低 pH や 酢酸を中和して得えられた酢酸塩に対して感受性を示さなかったことから、Shc によっ て合成されるホパノイド分子は本菌の酢酸分子依存的なストレス応答機構に関与するこ とが示唆された。③ リゾリン脂質アシル基転移酵素 (LPAAT) は、細胞膜脂肪酸組成の

調節に関与し、環境ストレスの変化に応じて、不飽和度や炭素鎖長の異なる脂肪酸を膜リン脂質に導入する。興味深いことに、酢酸菌は LPAAT ファミリーに属する機能未知ホモログ遺伝子を三種類持つ (Locus tag: APT_RS03600, APT_RS05100, APT_RS11025)。これらの生理的意義を明らかにするため、それぞれの遺伝子を欠損させた変異株の作製を試みた。結果として、APT_RS05100 欠損株と APT_RS11025 欠損株の作製に成功した。APT_RS03600 遺伝子を欠損させた株が生存できなかったことから、この遺伝子は生存に必須であることが示唆された。表現型解析の結果、APT_RS11025 欠損株は酢酸ではなく塩酸に対して特異的に感受性を示した。このことから、APT_RS11025 は本菌の低pHストレスへの応答機構に関与することが示唆された。続いて、大腸菌 LPAAT ホモログの温度感受性変異株を用いて、非許容温度条件下での上記ホモログ酵素の in vivo 活性を調べた。その結果、APT_RS03600 が唯一 LPAAT 活性を示し、特に cis-バクセン酸をリン脂質 sn-2 位に導入する活性が高いことが分かった。一方、APT_RS05100 やAPT_RS11025 を発現させた株は、非許容温度下で生育しなかったことから、これらは細胞内で LPAAT 活性とは異なる活性を持つことが示唆された。

【口頭発表】

- 1. 豊竹洋佑、Md Riad Hossain Khan、山川和奏、山口百萌花、松井大亮、若山守「酢酸菌をモデルとした多様な細胞膜脂質の生理機能解析」第 11 回酢酸菌研究会 (2023 年 11 月)
- 2. 山口百萌花、松井大亮、若山守、豊竹洋佑「酢酸菌由来リゾリン脂質アシル基転 移酵素ホモログ群の生理機能解析」第24回極限環境生物学会年会(2023年8月)
- 3. 山川和奏、辻茜、松井大亮、若山守、豊竹洋佑「酢酸菌スクアレン環化酵素ホモログの欠損変異株構築とその表現型解析」第24回極限環境生物学会年会(2023年8月)
- 4. 豊竹洋佑、Md Riad Hossain Khan、松井大亮、若山守「酢酸菌に特徴的な発酵生理を支える細胞膜脂質の構造多様性とその生理的意義」第 24 回極限環境生物学会年会(2023 年 8 月)
- 5. 豊竹洋佑、原悠一朗、Md Riad Hossain Khan、松井大亮、若山守「ホスファチジルコリン生産性細菌に見いだされた分子種特異的な膜リン脂質の新規生理機能」第65回日本脂質生化学会(2023年6月)

2023 年度研究助成 一般財団法人 杉山報公会

植物由来の乳酸を用いた生分解性電池の作製と その農業 DX 応用

山田駿介

所属 東北大学 大学院工学研究科

要旨

本研究では、電池の電極、電解質、ポリマーの生分解性に注目して、使用後に環境中で分解し、回収不要な電池の創製を実現した。作製した Mg-Mo は出力電圧 0.6 V を示した。電池の分解性を評価したところ、リン酸緩衝液中で緩やかに分解することを確認できた。

背 景

ロシアのウクライナ進行など海外の政局の急変により、海外 産の食料品の価格が高くなるなど、食料の大部分を輸入に 頼る我が国において食料の安定供給は重要である。一方 で、少子高齢化にともない農業第一次産業の人口が減少 すると考えられ、人手不足に対応するため AI 技術・センシ ングシステムの農業への応用、いわゆるスマート農業(農業 DX)の普及が今後想定される。それにともない数多くのセ ンサが消費され、電子部品のごみ (e-waste) は年間 7400 万 トンと試算されている。環境中に放出されるセンサ端末は最 終的に有害物質に分解され、農作物を含めた環境を汚染 する可能性がある。近年、生分解性材料を用いた、使用後 に分解される半導体デバイス・センサが注目を集めており [1-4]、環境センシングや生体埋め込みデバイスが提案され ている。エレクトロニクスを駆動するために必要な電池は有 害な電解質をふくむため、端末の経年劣化により、有害物 質が漏洩して深刻な環境汚染を引き起こす恐れがあり解 決すべき技術的な課題である。本研究では、植物由来の 乳酸に注目して生分解性と水溶性を示す金属・電解質を 用いて、使用後に環境中に吸収される電池実現を目指す。

【生分解性電解液の作製と評価】

コリンと乳酸を反応させ乳酸コリンを合成したのち、酢 酸エチルを用いた抽出と蒸留作業により、図1に示 すようなイオン液体を合成した。イオン液体に水を混 合することで、生分解性電解液を作製した。その電 気 化 学 特 性 を Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) により評価したところ、図 2a、b に 示すようにイオン液体の濃度が 40wt%において、イ オン伝導度とpH は 15 mS cm⁻¹ と 8.4 であることが判 明した。このイオン液体を用いて、図 2c に示すように、 Mg-Mo 電池のプロトタイプを作製した。この電池のイ オン液体に Ag/AgCl 電極を挿入して、Mg アノードと Mo カソードでの電気化学反応を評価した。図 2d に Mg-Mo 間の出力電圧を示す。水の濃度が高い場合 は出力電圧が低く、放電とともに電圧が大きく減少す ることが判明した。イオン液体の濃度が 40wt%または 60wt%の場合は、安定した出力電圧 0.6~0.7 V が得 られた。図 2eに示すように、Ag/AgCIに対するMgの



図1合成したイオン液体の写真

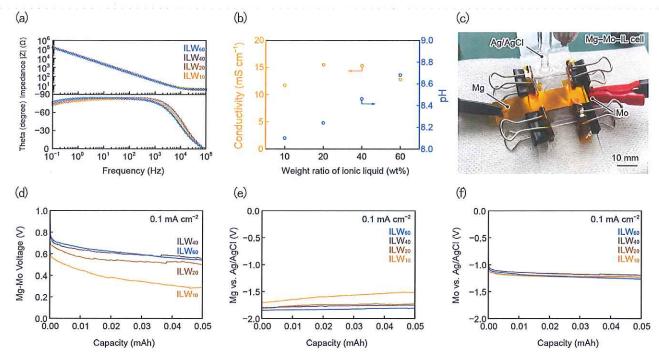


図 1 イオン液体の電気化学特性。(a) インピーダンスと位相特性 (b) イオン伝導度と pH の濃度依存性 (c) Mg-Mo 電池の実験写真 (d) Mg-Mo 電池の出力電圧-電流特性 (e) Mg アノードと(f) Mo カソードの出力電圧 (vs. Ag/AgCl)

電位を測定したところ、水が Mg の電位を大きくすることが判明した。これは、水により Mg が Mg(OH)2 に変化し、その結果 Mg の酸化(-2.3 V)よりも小さくなると考えられる。Ag/AgCI に対する Mo の電位に関しては、図 2f に示すように、水の濃度に関係なくほぼ一定であり、Mg-Mo 電池の出力を最大化するためには、イオン液体の濃度を 40wt%または 60wt%が最適であることが判明した。本研究では、イオン伝導度が大きいイオン液体濃度 40wt%を使用した。

【Mg-Mo 電池の作製・その生分解性評価】

上記生分解性電解質をPVAに分散してゲル化して、Mo電極上に塗布して、全固体Mg-Mo電池を作製した。リン酸緩衝液 PBS への溶解性を評価したところ、Mg、Moはそれぞれ、30日、90日で PBS に溶解することが判明した。基板としてしようした生分解性ポリマーは、光重合で合成したため安定性が高く、分解は 20%程度であることが判明した。このため、より分解性の高い熱重合ポリマーを合成して、その分解性を検討することを考えている。今後の方針としては、

生分解性試験 OECD 301C を用いて、体内や汚泥環境を再現して、その生分解性を評価することを検討している。さらに、無線センサ端末を、生分解性電池を用いて駆動してその農業 DX への応用を検討する。

参考文献

- [1] C. M. Boutty et al., "A stretchable and biodegradable strain and pressure sensor for orthopaedic application," (in English), Nature Electronics, vol. 1, no. 5, pp. 314-321, May 2018, doi: 10.1038/s41928-018-0071-7.
- [2] S. K. Kang et al., "Bioresorbable silicon electronic sensors for the brain," (in English), Nature, vol. 530, no. 7588, pp. 71-+, Feb 4 2016, doi: 10.1038/nature16492.
- [3] S. W. Hwang et al., "A Physically Transient Form of Silicon Electronics," (in English), Science, vol. 337, no. 6102, pp. 1640-1644, Sep 28 2012, doi: 10.1126/science.1226325.
- [4] H. Tran et al., "Stretchable and Fully Degradable Semiconductors for Transient Electronics," (in English), Acs Central Sci, vol. 5, no. 11, pp. 1884-1891, Nov 27 2019, doi: 10.1021/acscentsci.9b00850.

2022 年度

氏 名 所 属	研究テーマ	役職
田中 孝明 新潟大学 工学部	高分子多孔質材料の孔構造の制御ならびにそれを用いた複合材料の生体分子分離への応用	教授
上田 賢志 日本大学 生物資源科学部	共生細菌から微好気性の本質を探る ※ページ数の関係で研究テーマ及び目次のみ	教授

一般財団法人杉山報公会 研究助成成果報告書

研究課題:

高分子多孔質材料の孔構造の制御ならびにそれを用いた複合材料の生体分子分離への応用

研究者名: 田中 孝明(2022年度研究助成者)

現在,医療用タンパク質,特に免疫抗体などのバイオ医薬品などの需要の高まりとともに,効率的な分離材料の開発が望まれるようになってきている。モノリス (monolith,一枚岩)型の高分子多孔質材料は従来の粒子充填型材料と比べて,容易な分離が可能なため,注目されている。本研究課題では高分子多孔質材料ならびにそれを用いた複合材料の生体分子の分離への応用研究を行った。

まず、多糖類の一種であるキトサンにグリシジルトリメチルアンモニウムを反応させて調製した第4級アンモニウム塩を導入したカチオン性高分子(QCS)を用いて、多孔質モノリスを作製し、これを用いたタンパク質の分離を行った。

モノリスは高分子を架橋するためにグルタル アルデヒドを用い、多孔質にするために凍結によ り氷晶を形成させるクライオゲル法を用い、強度 を高めるために珪藻土(商標名 Celite)を添加し た (QCS-Celite モノリス)。作製したモノリスを 用いて種々のタンパク質の吸着実験を行った。単 独タンパク質の定量には, 主としてビシンコニン 酸法と紫外可視分光光度計を用い, 混合タンパク 質の個別定量には SDS-ポリアクリルアミドゲル 電気泳動とイメージスキャナ, ならびに画像処理 ソフトウエア ImageJ を用いた。QCS-Celite モノ リスは pH 5.5 において、ヒト血清アルブミンお よび牛血清アルブミンなどの酸性タンパク質を 吸着し、免疫抗体を含む牛γ-グロブリンは吸着 しなかった。そこで、牛血清アルブミンと牛γ-グ ロブリンの混合溶液を QCS-Celite モノリスに通 液したところ, 牛血清アルブミンを吸着除去し, 牛γ-グロブリンを回収できることが示された。 このモノリスは少なくとも5回の繰り返し使用 ができた。

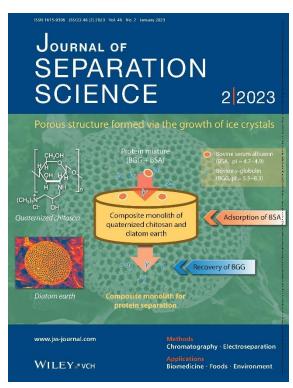


図1 高分子多孔質材料を用いたタンパク質の分離(キトサン誘導体 QCS と珪藻 土の複合モノリスの例)

Journal of Separation Science の掲載号の表 紙図に採用された(2023 年)。

この研究成果を Journal of Separation Science 誌に投稿したところ, 2023 年の第 46 巻第 2 号に掲載され, 同号の表紙図(図 1)にも選ばれた(T. Tanaka *et al.*, Preparation of composite monoliths of quaternized chitosan and diatom earth for protein separation, J. Sep. Sci. 46 (2023) 2200638)。

次にアニオン性高分子である κ-カラギーナンを用いた多孔質モノリスの作製と応用について

研究した。 κ -カラギーナンは硫酸基を有する多糖類であり,塩基性タンパク質の吸着材料を目指した。高分子多糖の架橋にはエピクロロヒドリンを,多孔質にするためにはクライオゲル法を,強度を高めるために珪藻土を用いた。当初,QCS-Celite モノリスと同様なクライオゲル法を用いたところ,多孔質モノリスの通液性が低かったが,冷却条件を検討することにより,通液性の高い κ -カラギーナン多孔質モノリスを作製することに成功した。このモノリスを用いて酸性タンパク質の卵白アルブミンと塩基性タンパク質の卵白リゾチームを分離することができた。この研究成果は日本膜学会「第 45 年会」・「膜シンポジウム 2023」合同大会(萩野,田中ら, κ -カラギーナンを用いたモノリス型分離材料の開発,東京,2023 年 11 月,P-378)にて発表を行った。現在, κ -カラギーナン(単糖ユニット当り,0.5 個の硫酸基)よりも荷電性が高く,より高い吸着容量が期待される λ -カラギーナン(単糖ユニット当り,1.5 個の硫酸基)のタンパク質吸着材料への応用も目指している。 λ -カラギーナンモノリスは通液性が極端に低く,エピクロロヒドリン濃度や氷晶作製のための冷却条件を多数検討したが,現在のところ,通液可能なモノリスが作製できていない。そこで,通液性のなかったモノリスを乾燥後に粉砕して粒子状の多孔質 λ -カラギーナン-Celite 複合体を調製したところ,タンパク質吸着材料として利用できることが示された。

上記の研究と並行して、ポリメチルメタクリレート多孔質体とヒドロキシアパタイトとの複合 モノリス(PMMA-HA モノリス)を作製して、免疫抗体のパパイン消化物(分子認識能を維持し た状態で、分子の大きさを小さくできる)の分離研究も行った。ヒドロキシアパタイトは骨にも 含まれる無機化合物の一種でタンパク質の吸着能力を有する。PMMA-HA モノリスは, ポリメチ ルメタクリレート多孔質体を熱誘起相分離法にて作製し、当研究室で合成したヒドロキシアパタ イト粒子をポリメチルメタクリレート溶液に懸濁後に多孔質化することにより作製した。こちら の研究は進行中であるが、その成果の一部を日本膜学会「第45年会」・「膜シンポジウム2023」合 同大会(設楽,田中ら,免疫抗体のパパイン消化物のPMMA-HA複合モノリスに対する吸脱着特 性, 東京, 2023 年 11 月, P-39S) にて発表した。また, PMMA-HA モノリスを用いてポリエチレ ングリコール修飾タンパク質と未修飾タンパク質の分離を行った。ポリエチレングリコール修飾 タンパク質は血中寿命の延長や抗原性の低下など機能性タンパク質の医療への応用時に用いられ ている。本研究ではリゾチームをモデルタンパク質とした。リゾチームはポリエチレングリコー ル化剤(スクシンイミジルカーボネート活性化ポリエチレングリコール,分子量5000)によって 修飾されるアミノ基を多数有するため、修飾反応条件を調節し、リゾチーム1分子当り、約1分 子のポリエチレングリコールが結合するようにした(モノポリエチレングリコール化リゾチーム)。 このとき, 修飾リゾチームと未修飾リゾチームの比率は約 1:1 となった。この反応溶液を PMMA-HA モノリスに通液したところ, 未修飾リゾチームが吸着され, モノポリエチレングリコール化リ ゾチームが回収された。 回収画分がポリエチレングリコールで修飾されていることは SDS-ポリア クリルアミドゲル電気泳動後のヨウ素-塩化バリウム溶液による染色, ならびに質量分析 (MALDI-TOF-MS) によって確認した。

開発した多孔質モノリスを用いて免疫抗体や酵素などを効率良く分離・精製できるようになれば、貴財団の助成対象分野である、医薬産業や食品産業のような健康な暮らしを支える産業分野の技術の発展に貢献することが期待できる。今後もこの研究課題を発展させていく予定である。

研究助成成果報告書

共生細菌から微好気性の本質を探る

令和6年3月30日

日本大学 生物資源科学部 教授 上田賢志

目次

第1章 経緯と目的	4
第1項【経緯】	4
第2項【目的】	4
第2章 Caldinitratiruptor microaerophilus JCM16183のCOX 活性	5
第1節 C. microaerophilusのグリセロールストックの復元	5
第1項【目的】	5
第2項【研究材料】	5
第3項【手順】	8
第4項【結果】	9
第5項【考察】	9
第2節 C. microaerophilus (G3)の16S rRNA解析	10
第1項【目的】	10
第2項 【研究材料】	10
第3項【手順】	11
第4項【結果】	13
第5項【考察】	14
第3節 酸素電極を用いた C. microaerophilus の COX 活性の測定	14
第1項【目的】	14
第2項【研究材料】	15
第3項【手順】	17
第4項【結果】	19
第5項【考察】	21
第3章 シトクロムオキシダーゼの分布に着目した未知細菌門の探索	21
第1節 ボレー粉から微好気条件でのみ生える Anoxybacillus の再分離	雅21
第1項【目的】	21
第2項【研究材料】	22
第3項【手順】	24
第4項【結果】	26
第5項【考察】	34
第2節 ボレー粉から得られた菌の16S rRNA解析	34
第1項【目的】	34
第2項【研究材料】	34
第3項【手順】	35
第4項【結果】	37
笠 5項【老窓】	40

第3節 未知分類群の菌に共通する COX 遺伝子から設計したプライマーのプログラム	5
の検討	41
第1項【目的】	41
第2項【研究材料】	41
第3項【手順】	44
第4項【結果】	44
第5項【考察】	46
第4節 微好気性細菌の探索と酸素濃度の違いによる菌の生育への影響	47
第1項【目的】	47
第2項【研究材料】	47
第3項【手順】	49
第4項【結果】	51
第5項【考察】	60
第5節 培養液の濁度に見る酸素濃度の違いによる菌の生育への影響	61
第1項【目的】	61
第2項【研究材料】	61
第3項【手順】	63
第4項【結果】	64
第5項【考察】	64
第 4 章 総括	64
第1節【主とめ】	64

第1章 経緯と目的

第1項【経緯】

バクテリア・アーケア・ユーカリアの3つの超界から構成される生物界において、酸素のない環境を好む嫌気性バクテリアが所属する分類群(Clostridia 綱と Bacilli 綱の Lactobacillales 目)は、グラム陽性かつ低 G+C 含量グループである Bacillota 門のみに包含されている。しかし、筆者らが研究対象としてきた共生細菌 Symbiobacterium は、Bacillota から独立した 16S rRNA 系統に位置することが、その後に発見された 4 属 (Thermaerobacter、Sulfobacillus、Caldinitratiruptor および Limnochorda)を含めた系統解析から浮かび上がってきた(渡邊ら. IJSEM 65:2378, 2015)。加えて、これらの菌群は、ゲノム DNA 中の G+C 含量が高いこと、酸素に対する感受性が低く、シトクロムオキシダーゼ(COX)複合体を有している点で Bacillota 門の嫌気性グループと異なる。

シトクロムオキシターゼ(COX)は、酸素分子を電子受容体とする好気呼吸の末端酸化酵素であり、好気呼吸の過程の一つである電子伝達系においてクエン酸回路から生じるプロトンを引き渡す役割を持つ。しかし、その起源についての情報は乏しい。そのため予想される分類群の遺伝的特性を明らかにすることは、未知探索菌門の存在を強く示唆することに加えて、生物進化の劇的なイベントである光合成による地球大気の酸素濃度の増加に伴って生物が好気呼吸能を獲得した歴史に重要な情報をもたらす可能性が高いと考えられる。また、本菌群の分離のための技術的な基礎が確立すればこれまで分離培養がされてこなかった微生物群集にアクセスする手段となり、それを利用したバイオテクノロジーの発展にも大きく寄与することが期待される。

本研究でモデルとした用いた Caldinitratiruptor microaerophilus は、フランスの温泉から分離された上記で示した未知分類群に属する菌であると考えられており、Symbiobacterium 属に近縁であると分かっている。また、通性微好気性嫌気性好熱菌であり硝酸塩還元細菌でもある。そして、非運動性であり、ゲノム DNA の G+C 含量は 70.3%と高い値を示している。(Marie-Laure Fardeau, Extremophiles. 2010)

第2項【目的】

微生物はその酸素要求性に基づいて、好気性と嫌気性に分けて理解されてきた。一方、 微好気性と呼ばれる、酸素と二酸化炭素をそれぞれ5%程度含むガスを好む細菌が存在 することも知られるが、それは一部の病原菌などの限定的な特性と捉えられてきた。し かし、上記のシトクロムオキシダーゼを有する、未知分類群に位置するであろう菌群が 微好気に近い条件で増殖し、系統的にクロストリジアなどの嫌気性菌に近いことから、 これらの菌群は地球進化の過程で成立していた微好気大気に適応をはじめ、現在も他生 物と共存することで存続している微生物群である可能性を想起させる。

そこで、本研究では、Symbiobacterium に近縁で培養が比較的容易な C. microaerophilus を主要なモデルとして、その酸素消費活性を中心とする性状解明を行

った。また、Symbiobacteriumが牡蠣殻から単離されるという以前の知見に基づき、牡蠣殻を粉砕した飼料であるボレー粉から微好気性を示す菌を改めて探索した。これらを通じて、現在のグラム陽性細菌の系統分類群に、嫌気性と好気性の間にまたがる新たな分類群が存在し、地球進化の過程で成立した微好気条件に適応し、現在も特に他の生物との共存下において成立する同ガス条件環境で生存を続ける菌群があることを実証する。

第2章 Caldinitratiruptor microaerophilus JCM16183のCOX 活性

第1節 C. microaerophilusのグリセロールストックの復元

第1項【目的】

前任者(馬場)は、*C. microaerophilus* のグリセロールストックから植菌しても菌の増殖が見られないという問題を抱えていた。そのため、本現象を確認するために、前任者(馬場)の卒業論文中の第2章第3項【手順】を引き継ぎ、以下の第3項【手順】の条件で実験を行った。

本実験で用いた *C. microaerophilus* は、前任者の馬場と向山が保存したものである。 GO、G3 (G は generation、数字は継代した順番) は向山が継代培養し、グリセロールストックしたものである。しかし、どの段階で作成したかは明確には分からない。 *C. microaerophilus* 培養液のみ、DMSO+ *C. microaerophilus* 培養液、滅菌水+ *C. microaerophilus* 培養液、グリセロール+ *C. microaerophilus* 培養液は、馬場が *C. microaerophilus* の保存方法の確立(卒業論文 第2章 第7節)を行った際に作成したものである。

第2項【研究材料】

【使用サンプル】

C. microaerophilus JCM16183

C. microaerophilus の冷凍保存液(G0、G3、C. microaerophilus 培養液のみ DMS0+C. microaerophilus 培養液、滅菌水+C. microaerophilus 培養液、グリセロール+C. microaerophilus 培養液)

【使用器具】

- 嫌気性菌培養装置(三紳工業、神奈川)
- (卓上焼却炉、温調機、石英反応管。ステンレス製クーラーパイプ、綿濾管、分岐 管支持台、分岐管、還元銅)
- 電動ピペット (FALCON、愛知)
- メスピペット (FALCON、愛知)
- 還元銅カラム(三紳工業、神奈川)

第4項【結果】

好気、微好気、嫌気条件で培養した UT83、UT88 に関して 0D600 で Cary 60 UV-Vis に供した。濁度測定の結果は表 3-6 となっており、UT83 は好気条件で最も増殖していることが分かった。UT88 に関しても好気条件で最も増殖していることが分かった。

	UT83	UT88
好気	0. 155	0.305
微好気	0. 028	0. 127
嫌気	0.013	0. 193

表 3-6 それぞれの条件における UT83 と UT88 の濁度 (0D600)

第5項【考察】

第3章 第4節での結果では、UT83は図3-33、UT88は図3-35のように微好気条件で最も生育が良いとなっていたが、本実験では両方の菌で好気条件が最も増殖した。そのため、固体培地と液体培地での酸素濃度の違いによる生育の影響は異なる結果となった。本実験は、現在一度しか測定を行っていないため、何度か同様の条件で実験を行い、再現性があるかを確かめる必要があると考えられる。また、次回同様の実験を行う際は、液体培地と体培地で同時に培養をして比較することも行う予定である。

第4章 総括

第1節【まとめ】

C. microaerophilus のグリセロールストックからの復元は、本来の培養期間から長めに培養日数を設定する必要があった。また、16S rRNA 解析の結果より、グリセロールストックにコンタミネーションは無いと判断した。一方、C. microaerophilus の COX 活性については、活性がないという結果になったが、培養条件や試薬のコンタミネーションが COX に影響がある可能性があるため、様々な条件を探りつつ酸素電極を行う必要があると考えた。また、ネガティブコントロールとして菌体無しの条件とポジティブコントロールとして大腸菌を用いての評価も行う必要があると考えている。

ボレー粉からのスクリーニングでは、好気条件と比較して微好気条件で生育が良い物を選別し、酸素電極に供し、16S rRNA 解析を行ったところ、UT44、UT45、UT47, UT53 が *Anoxybacillus* 属とその近縁の菌と考えられるとわかった。また、UT45 と UT53 は相同率が低く、それぞれの検索結果で出た菌群の近縁であると考えられる。

未知分類群の菌に共通する COX 遺伝子から設計したプライマーのプログラムの検討 については、目的の長さのバンドが得られなかったため、アニーリング温度を変更して 目的のバンドが得られるかデータをとる。アニーリング温度を変更しても目的のバンドが得られなかった場合、Tm値の差が5℃以内になるようなプライマーの設計を行う必要がある。

微好気性細菌の探索と酸素濃度の違いによる菌の生育への影響についてでは、微好気 条件のみで増殖する菌は得られなかったが、微好気条件でより生育が良い菌を2株獲得 した。ボレー粉内部の菌を獲得するために、ボレー粉の懸濁液を作成する際にボレー粉 をより細かく砕いて作成する必要があると考えられる。

濁度測定の結果では、好気条件で最も増殖が良いという結果になり、固体培地での結果とは異なる結果になった。しかし、濁度測定は一度しか行えていないため、再現性があるかの確認と液体・固体培地で同時に培養した際の比較を行う予定である。

2021 年度

氏 名 所 属	研究テーマ	役職
兒島 憲二 姫路獨協大学 薬学部	カイコガの前胸腺刺激ホルモン PTTH の大量調製法の確立および受容体 Torso との相互作用の解析	准教授
植田 浩明 京都大学 大学院理学研究科	元素置換 M 型フェライト磁石の原料コストの低減および磁気異方性の起源の解明	准教授
藤谷 美菜 愛媛大学 大学院農学研究科	大豆イソフラボン腸内細菌代謝物エコール抱合体による消化管-脳視床下部ネットワークを介した食欲抑制機構の解明	特任講師

<研究課題> カイコガの前胸腺刺激ホルモン PTTH の大量調製法の確立および受容体 Torso との相互作用の解析

代表研究者 姫路獨協大学薬学部 准教授 兒島 憲二

1. 研究の目的

昆虫の前胸腺刺激ホルモン(PTTH)は、脳内で産生され、昆虫の脱皮ホルモンであるエクジソンを産生・分泌する器官・前胸腺の細胞膜上に発現しているチロシンキナーゼ型受容体の Torso に作用することで、昆虫の脱皮や変態を厳格に制御するペプチドホルモンである。昆虫などの外骨格動物にとって脱皮・変態は自身の体をより大きく成長させるための重要な発育過程であることから、ホルモン PTTH とその受容体 Torso との間の特異的な相互作用は、昆虫種選択的な殺虫剤開発の有力なターゲットであると考えられている。しかし、PTTH と Torso との間の相互作用については十分な解析が進んでいない。その原因のひとつとして、天然からはもとよりリコンビナントの PTTH すらも非常に調製しにくいということがある。本研究では、カイコガ PTTH と Torso との間の特異的相互作用の分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、まず、カイコガ PTTH の大量調製を試みた。また、Torso を誘導発現させた培養細胞をそのまま流路に注入する生細胞ベースの表面プラズモン共鳴測定法を開発し、阻害薬スクリーニングの技術基盤を構築した。

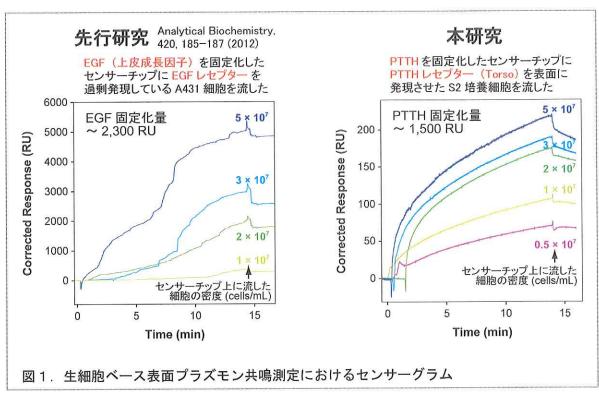
2. 研究の成果

2-1. ブレビバチルス菌の分泌発現により得られるカイコガ PTTH の 2種類の分子種の解析 カイコガ PTTH の組換えタンパク質は、先行研究(Biochemistry, 33, 5912-5919 (1994))では大腸 菌に発現させ、菌体内の沈殿画分からリフォールディングによって調製されたものについて、鎖 内3本と鎖間1本のジスルフィド架橋様式が決定され、ホモ二量体であることが明らかにされた。 本研究で、カイコガ PTTH を大量調製するためにブレビバチルス菌に分泌発現させたところ、2 種類の全長の分子種(B-1、B-2)が回収され、両分子種は質量分析で同様の質量を示したが、非 還元 SDS-PAGE では B-1 より B-2 の方が低分子量を示すことが明らかになった。カイコガ PTTH の大量調製に先立って、両分子種の違いの解明を試みたところ、40~97℃で似通った CD スペク トルを与えたが、サーモライシン消化に対する抵抗性は B-2 の方が高かったことから、二次構造 に影響を与えない程度の差異の範囲で、分子内ジスルフィド架橋の架かり方が異なっているので はないかと考えられた。本成果は第 94 回日本生化学会大会(2021 年 11 月 3-5 日) にてポスタ 一発表を行った。その後、非還元条件下でのサーモライシン消化物を質量分析に供したところ、 B-1 と B-2 では質量スペクトルが全く異なったことからジスルフィド架橋構造がやはり異なるこ とが示された。また、ブレビバチルス菌の培養を低温で行うと B-1 よりも B-2 の割合が増えたこ とから、B-2の方がコンパクトで安定なネイティブ構造をとっているのではないかと考えられた。 本成果は、第95回日本生化学会大会(2022年11月9日)にてポスター発表を行った。

2-2. PTTH と Torso との間の相互作用を解析するための"生細胞ベース表面プラズモン共鳴測 定法"の開発

ホルモン PTTH とレセプターTorso との間の相互作用(親和性)の評価には、Biacore を測定機器とする表面プラズモン共鳴測定法が有用である。問題点として、Torso のような細胞膜タンパク質は、膜から取り出すと不安定になってしまうため、天然の立体構造を維持したまま単離・精製するのに膨大な労力と時間がかかってしまう。これは Torso に限らず、すでに上市されている医薬品の約半数が標的とする "細胞膜タンパク質"についても言えることであり、このことが阻害薬探索を遅らせる要因のひとつになっている。本研究では、細胞膜タンパク質を単離・精製することなく、リガンドとの親和性を評価する "生細胞ベース表面プラズモン共鳴測定法"の開発を目指した。

Biacore T100 を用い、ブレビバチルス菌を用いて調製したリコンビナント PTTH (C 端に Hise タグを付加)をアミンカップリング法により固定化した Sensor Chip NTA 表面に、遺伝子導入により "細胞表面"にカイコガ Torsoを発現させたショウジョウバエ胚由来 S2 培養細胞をアナライトとして流した。接着性の弱さに着目して採用した S2 培養細胞は、予想通り、測定中に細胞塊を形成することなく、得られたセンサーグラムは、先行研究に比べて乱れが格段に小さくなった(図 1)。また、流した細胞の密度の増大に伴い、応答値も増大したことから、PTTH と Torso との間の相互作用を検出できていると考えられた。今後、細胞膜タンパク質を表面に発現させた細胞とともに阻害剤候補化合物を同時に流し、センサーグラムの応答値の減少を指標とすれば、阻害剤をスクリーニングすることができると考え、現在、測定条件を検討している。本成果は、日本薬学会第142年会(2022年3月27日)にてポスター発表を行った。本測定法は、マラリアなどの感染症を媒介する蚊の PTTH と Torso との間の相互作用を遮断する薬剤の探索や、そのほかの細胞膜タンパク質を標的とする創薬に向けた阻害剤探索に幅広く応用できると考えられる。



杉山報公会 2021 年度 助成成果報告書

研究者: 京都大学 理学部 准教授 植田浩明 2022 年 11 月 28 日 研究題目: 元素置換 M 型フェライト磁石の原料コストの低減および磁気異方性の起源の解明

モーターの需要の高まりとともに、高性能な永久磁石の開発が強く求められている。それには、 永久磁石の性能がどのような要因によって決まっているのかを明らかにすることが重要である。本 研究では、重量ベースで工業的に最も使われているフェライト磁石について、その性能の一つであ る保磁力に対して、二価の鉄イオンの役割を明らかにすることを目的としている。

永久磁石の磁化の方向を維持するための保磁力の起源となっているのは、磁性材料のもつ磁気異方性である。さらにその磁気異方性の主な要因は単一イオン磁気異方性である。単一イオン磁気異方性は、一つの磁性イオンのエネルギーがそのスピンの方向に依存することであり、スピン角運動量と軌道角運動量の相互作用つまりスピン軌道相互作用によって生じる。これらをまとめると、永久磁石の保磁力は、元を正せばスピン軌道相互作用によると言える。

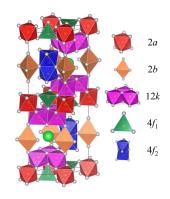


図 1 M 型フェライト の結晶構造

像では無視されていた電子配置が配置間相互作用によって混成するためであると考えられている.

 $SrFe_{12}O_{19}$ にランタンとコバルトを置換すると保磁力が増加することが知られており,実用材料としても応用されている.この保磁力の増加は,二価のコバルトイオンのもつ軌道角運動量によって磁気異方性が増加するためであることが示された.ここで,さらにランタンの置換量を増加させると二価の鉄イオンが生じるが,それによってもさらに磁気異方性が増加することが,我々の以前の研究によって明らかになり,二価の鉄イオンを積極的に活用することによるフェライト磁石の性能の向上の可能性が示された.

本課題では, $SrFe_{12}O_{19}$ に二価の鉄イオンを導入するために高価数の陽イオンとなる元素で置換した材料について理論的および実験的な研究を行った.理論計算としては,五種類の鉄サイトまわりの結晶場を点電荷モデルに基づいて求め,原子内の電子間反発は経験的に得られたSlator-Condon 係数を用い,それらのサイトに Fe^{2+} を置いた場合の磁化過程の計算を行った.実験としては, $SrFe_{12}O_{19}$ において, Fe^{3+} をより高価数の Ge^{4+} , Ti^{4+} , Nb^{5+} で置換した物質の単結晶を浮遊帯域溶融法によって育成し,磁化困難軸方向に磁場を印加して磁化過程から異方性磁界

 $H_{\rm A}$ を算出し、以前の研究で行った ${\rm La}^{3+}$ 置換の結果と比較して、永久磁石の材料としての性能を検証する.

図 2 に、結晶場と配置間相互作用を考慮した量子化学計算から求めた磁化困難軸方向に磁場を印加したときの二価の鉄イオンのサイトごとの磁化過程を示す.磁気異方性が無い場合には、わずかな磁場の印加によって、磁化が誘起されて、すぐに飽和する.一方、得られた磁化過程では、いずれのサイトに Fe^{2+} を置いた場合にも、磁化はゆっくりと増加してなかなか飽和しない.これは、一軸性の磁気異方性を持っていることを示している.特に、2b サイトにおいては、非常に強い磁気異方性を生み出す可能性が示された.

磁化曲線の低磁場部分を延長して飽和の値に達する磁場を異方性磁界と呼び,これは理論的な保磁力の最大値と一致する.様々な元素置換を行った単結晶を育成して磁化測定から求めた異方性磁界 H_A の組成依存性を図 3 に示す.SrM は $SrFe_{12}O_{19}$ に M を置換した物質を表し,La は Sr サイトを,それ以外は Fe サイトを置換している.このとき, Fe^{2+} の濃度 x は Nb では置換量の二倍,それ以外は置換量と等しくなる.La 以外の置換では、300 K と 5 K のいずれにおいても異方

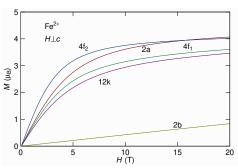


図2 磁化困難軸方向のサイトごとの磁化過程

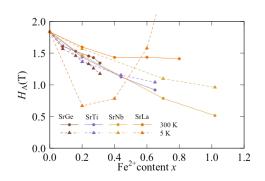


図3 異方性磁界 HA の組成依存性

性磁界は置換量と共に減少している。これは,磁性を担う鉄が減少することによって,磁気相互作用が分断され,その結果として磁気異方性が低下しているためであると考えられる。La においても, $300\,\mathrm{K}$ では減少するが, $5\,\mathrm{K}$ では一旦減少してから増加する。この温度依存性は,鉄イオン間で電子を授受することによって $\mathrm{Fe^{2+}}$ の位置が移動することによると考えられる。鉄サイトが置換される系では,このような移動が抑制されるために,温度変化が小さいとすれば,矛盾は無い。しかし,理論計算は $\mathrm{Fe^{2+}}$ はどのサイトにあっても磁気異方性を増大させることを示唆しており,La 置換の低温での異方性磁界の低下を説明できない。上記の理論計算は,結晶場を点電荷で近似し,イオン間の磁気相互作用を無視しており,さらに詳細に検討するためには,これらの影響を考慮する必要がある。

今回の研究により、理論的には M 型フェライト中のいずれの Fe サイトが Fe²⁺ となっても磁気 異方性が増大し、特に 2b サイトが非常に大きな寄与を与えることが明らかになった。しかし、Fe サイトの元素が非磁性元素で置換されて磁気相互作用が分断されたり、電子の授受によって Fe²⁺ が移動すると、磁気異方性が抑制されることが、単結晶を用いた実験によって示された。これらの 結果が、Fe²⁺ を用いて室温で高い磁気異方性を実現するための指針を与えると期待している.

大豆イソフラボン腸内細菌代謝物エコール抱合体による消化管-脳視床下部ネットワークを 介した食欲抑制機構の解明

> 愛媛大学 大学院農学研究科 藤谷 美菜

【目的】大豆イソフラボン摂取がエストロゲン欠乏による肥満を予防・改善する可能性が 指摘されているが、その作用機構は未だ解明されていない。大豆イソフラボンはその構造 類似性からエストロゲン様作用または抗エストロゲン作用を持ち、エストロゲン欠乏状態 ではエストロゲン様作用を、エストロゲン充足状態では抗エストロゲン作用を示すことに より様々な健康効果をもたらすと考えられている。エストロゲンが食欲を抑制することか ら、我々は大豆イソフラボンもエストロゲン様作用により食欲を抑制するのではないかと 考え、内因性エストロゲン量の異なる雄、雌、卵巣摘出ラットを用いて検討したが、大豆 イソフラボンの摂取はラットにおいて卵巣の有無にかかわらず雌特異的に食欲を低下させ たが、エストラジオールによる食欲低下作用は雌では見られず雄や卵巣摘出ラットでは顕 著に見られたことから、大豆イソフラボン摂取は食欲の低下を引き起こすが、エストロゲ ン様作用によるものではないことが示唆された。この機構解明を目指す中で、食欲抑制作 用に関与するのはゲニステインではなくダイゼインであること、ダイゼインを摂取したラ ットの血液中ではダイゼインよりその腸内細菌代謝物エコールの方がはるかに高濃度であ ること、エコールの混餌投与でも雌特異的に食欲が抑制されることが明らかとなり、本作 用にはエコールが関与すると推測された。雌ラットにエコールを混餌投与した場合、投与 開始後数日間は有意な食欲低下が見られなかったことから、この期間に起こる何らかの変 化が本効果の発現に重要であると推測し、エコールの体内分布の変化を摂取開始から 5 日 目まで調べたところ、エコールは体循環中に比べてはるかに多く腸肝循環中に存在し、エ コールの胆汁中濃度は数日の摂取によって次第に上昇していくことが明らかとなった。さ らに、ダイゼインを投与された雌ラットから採取したエコール抱合体を含む胆汁を、ダイ ゼインを投与されていない雌ラットの十二指腸に注入し飼料摂取量への影響を検討したと ころ、注入 11 時間後以降で飼料摂取量が有意に低下した。ダイゼイン/エコールの継続 的な摂取によりエコール抱合体が腸肝循環しながら経日的に蓄積されることで食欲抑制作 用を引き起こすと推測される。また、ラットの胆汁中にはエコール4'位グルクロン酸抱 合体および7位硫酸抱合体が存在しており、エコール4'位グルクロン酸抱合体は雌では メジャーな抱合体であるが雄ではほとんど存在しないのに対し、エコール7位硫酸抱合体 では雌雄差は見られなかった。ラットの胆汁中に雌特異的に存在するエコール 4'位グル クロン酸抱合体が雌特異的な作用に関与している可能性が考えられる。雌ラットではダイ ゼインの継続的な摂取により約1 mM と非常に高濃度のエコール 4' 位グルクロン酸抱合 体を含む胆汁が十二指腸に分泌されることから、我々はエコール抱合体が小腸で作用する

のではと推測している。さらに、卵巣摘出ラットを用いた研究でダイゼイン摂取により胃排出が遅延することが明らかとなり、2食制(各1時間、食間2時間)で飼育したラットでは、胃内容物が残留していない状態で飼料を摂取させた場合(1食目)ではダイゼイン摂取による飼料摂取量の減少は見られなかったが、胃に内容物が残留している状態で飼料を摂取させた場合(2食目)ではダイゼイン摂取により有意な飼料摂取量の減少が見られた。この際、2食目食中において食欲抑制および胃排出遅延作用を持つ視床下部ウロコルチンの遺伝子発現がダイゼイン摂取により有意に増加していた。さらに、スリーブ状胃摘出により胃内容物貯留能を失ったラットではエコール摂取による飼料摂取量の減少は見られなかった。これらのことから、エコールによる食欲抑制作用は、視床下部ウロコルチン遺伝子発現増加を介した胃排出の遅延に起因することが示唆された。しかし、視床下部ウロコルチン遺伝子発現増加を介した胃排出の遅延に起因することが示唆された。しかし、視床下部ウロコルチン遺伝子発現増加を介した胃排出の遅延に起因することが示唆された。しかし、視床下部ウロコルチン遺伝子発現増加させる機構は不明であったため、本研究では、ダイゼイン摂取が小腸から分泌される食欲抑制性ホルモンの遺伝子発現に与える影響について検討した。

【実験方法】6 週齢雌性 Sprague-Dawley ラットにイソフルラン麻酔下で両側卵巣摘出術 (OVX) を施した。OVX後3日間回復させた後、2 食制の給餌パターン(1 食目、暗期開始30分後~1 時間30分後まで;2食目、暗期開始3時間30分後~4 時間30分後まで)に慣れさせた。その8日後、AIN-76組成に準拠したコントロール飼料を摂取させる群(C群、n=10)、コントロール飼料にダイゼインを添加した飼料を摂取させる群(D300:300 mg/kg 飼料、n=10)の2群に分け、2食制で飼育した。本飼育8日目の2食目摂食開始11分後から1分間隔で断頭採血し、視床下部および回腸上部20 cmの粘膜を採取した。

【結果および考察】総飼料摂取量、総体重増加量、最終体重は、C群と比較して D300 群で有意に減少した。2 食目の飼料摂取量は、C群と比較して D300 群で3、5、6、7 日目に有意な減少が見られたが、1 食目の飼料摂取量は実験期間を通して C 群と D300 群の間に有意差は見られなかった。視床下部ウロコルチン遺伝子発現は、C 群と比較して D300 群で増加傾向が見られた。その他の食欲促進因子 NPY、AgRP、orexin および MCH の遺伝子発現、食欲抑制因子 POMC、CART および CRH の遺伝子発現では、C 群と D300 群の間に有意差はなかった。小腸粘膜では、C 群と比較して D300 群でグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP) の遺伝子発現に増加傾向が見られた。GIP は胃排出促進させること、食欲には影響を与えないことが報告されているが、一方で小腸の運動性を抑制することも報告されている。ダイゼイン摂取による胃排出遅延に GIP 分泌増加による小腸運動抑制が関与している可能性も考えられる。しかし、末梢の GIP により視床下部ウロコルチン発現が増加するといった報告はない。ダイゼイン摂取により視床下部ウロコルチン発現が増加する機構は不明であり、今後さらなる検討が必要である。

【謝辞】本研究を支援して頂きました一般財団法人杉山報公会ならびに関係者の皆様に深 く感謝申し上げます。

2020 年度

氏 名 所 属	研究テーマ	役職
木岡 紀幸 京都大学 大学院農学研究科	細胞外基質の硬さに対する細胞応答に与える コラーゲンペプチドの効果に関する研究	教授
小林 高範 石川県立大学 生物資源工学研究所	イネの鉄吸収を制御する因子の機能解析	教授
增田 裕一 三重大学 大学院生物資源学研究科	アミロイド β の凝集を阻害する β -ストランド配 座固定ペプチドの創製	准教授

2020年度 一般財団法人杉山報公会 研究助成

成果報告書

2021年5月13日

研究者: 増田 裕一

所属機関・役職:三重大学大学院生物資源学研究科・准教授 所属機関所在地:〒514-8507 三重県津市栗真町屋町1577

連絡先: TEL: 059-231-9620 FAX: 059-231-9634 E-mail: masuda@bio.mie-u.ac.jp

研究題目:アミロイドβの凝集を阻害するβ-ストランド配座固定ペプチドの創製

【背景・目的】

アルツハイマー病因ペプチドである 42 残基のアミロイド β (A β 42) は、分子間 β -シートを形成 することにより凝集し、神経細胞毒性を示す。A β 42 の分子間 β -シートに結合し、その伸長を阻 害する短鎖ペプチドは β -シートブレーカーペプチド (BSBp) と呼ばれ、アルツハイマー病治療薬 の候補として期待されている。本研究では、BSBp の立体配座を β -ストランドに固定することにより、A β 42 の分子間 β -シートへの結合能および凝集阻害活性を向上させた新規 BSBp を設計・合成 することを目的とした。

【方法・結果】

Aβ42 凝集体の 17~21 番目のアミノ酸残基 (LVFFA) は、分子間β-シートを形成しており、凝集において重要な役割を果たしている。そこで、本部位のアミノ酸配列と β -ストランド配座を模倣して、同じ方向を向いている側鎖どうしを適切な長さで連結することにより、 β -ストランド配座に固定した BSFp-A1 を設計した (Fig. 1a)。加えて、Pro および Asp の導入は BSFp の Aβ42 の凝集に対する活性を向上させる可能性が考えられたため、末端にこれらの残基を導入した BSFp-A2-4 を設計した (Fig. 1a)。 BSFp-A1-4 の合成は、2,4 番目にアリル基を持つ 5 残基ペプチドを、オレフィンメタセシス反応で環化することにより行った。BSFp-A1-4 が β -strand 配座を形成していることは、溶液 NMR で得られた構造情報に基づく分子力学計算により確認した。チオフラビンT法を用いた Aβ42 凝集阻害活性試験を行ったところ、BSFp-A1 は Aβ42 の凝集を強く阻害することが明らかとなった (Fig. 1b)。一方、BSFp-A2-4 は Aβ42 の凝集を阻害していないことから、Pro および Asp の導入は BSFp の活性の向上に繋がらないことが示唆された (Fig. 1b)。

続いて、連結するアミノ酸の位置を検討する目的で、1,3 番目の側鎖で環化させた BSFp-B1、2,4 番目で環化させた BSFp-B2、および 3,5 番目で環化させた BSFp-B3 の 3 種のペプチドを設計・合成した (Fig. 2a)。1,3 番目、3,5 番目の側鎖で環化を行った BSFp-B1,3 は A β 42 の凝集を阻害せず、BSFp-A1 と同様に 2,4 番目の側鎖で環化を行った BSFp-B2 のみが A β 42 の凝集を阻害した (Fig. 2b)。このことから、環化位置は 2,4 番目が最適であることが示唆された。

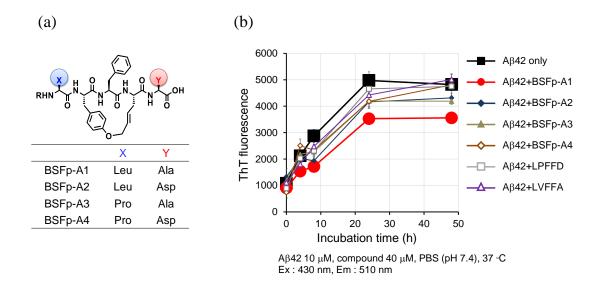


Fig. 1 (a) BSFp-A の設計 (b) BSFp-A の Aβ42 の凝集に対する効果

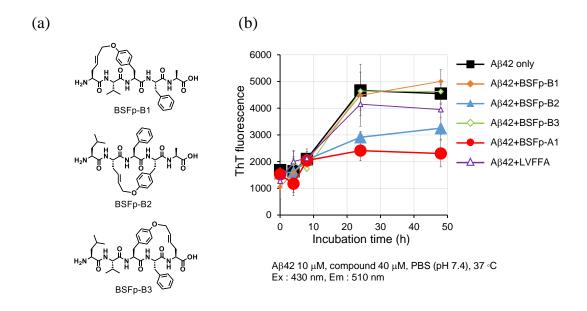


Fig. 2 (a) BSFp-B の設計 (b) BSFp-B の Aβ42 の凝集に対する効果

[本助成による研究成果の発表論文(1件)]

Tanaka, F., Shibata, K., Monobe, Y., Akagi, K., Masuda, Y.*: Design and synthesis of β-strand-fixed peptides inhibiting aggregation of amyloid β-protein. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28*, 115676.

(杉山報公会に対する謝辞の記載あり)