

平成22年5月7日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20760544
 研究課題名（和文） 合成的アプローチによる適合溶質の機能解明とその生物学的応用
 研究課題名（英文） Understanding of cellular function of compatible solutes utilizing a synthetic approach

研究代表者

甲元 一也（KOURIMOTO KAZUYA）
 甲南大学・フロンティアサイエンス学部生命化学科・准教授
 研究者番号：60388759

研究成果の概要（和文）：

細胞内では老廃物である代謝産物の一部が重要な生命機能を担っていることが明らかとなりつつある。申請者はそれらの細胞内での機能を明らかにするため、代謝産物の構造を真似た物質群を合成し、生体高分子と混合することでそれらの果たす役割を評価した。その結果、代謝産物群の中でもある構造をした代謝産物が、生体高分子の安定性や活性に強く影響することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

It is becoming clear that certain metabolites play significant roles in participating in important cellular functions. In order to clarify their cellular function, applicant synthesized metabolite mimics and investigated the functions by mixing them with various biomolecules. As a result, synthetic metabolites possessing certain chemical structures showed profound effect on the stabilization and activation of cellular biomolecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：プロセス工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：生物機能工学

1. 研究開始当初の背景

細胞内において複雑な反応系は整然と制御されていることは周知の事実である。しかし、複雑な細胞機能を細胞外で実現することは困難を窮める。申請者の所属する研究所で

は、生命現象を分子レベルで解明すべく、擬似的に作り出した細胞環境中での生体分子、特に核酸の特性を探究する“分子クラウディング”に関する研究を行っている。分子クラウディング研究は、クラウディング剤と呼ばれる分子を、細胞中の生体分子濃度と同等の

50~400 g/L という高濃度で共存させ、その疑似細胞環境下における生体分子を含む生体分子の安定性、構造、活性を調べるものである。我々はこれまでに、分子クラウディング環境下における核酸の安定性、コンフォメーションが、多くの研究者が研究の対象としている希薄溶液中と異なることを明らかとしてきた。最近では、分子クラウディング環境下における核酸の水和因子が、安定性やコンフォメーション変化に影響を及ぼすことを明らかとしつつある。

分子クラウディングの研究では、核酸、タンパク質といった“生体分子”に焦点が当てられがちで、その周りを取り囲む周辺環境についてはあまり研究が為されてこなかった。それ故、ポリエチレングリコールのような細胞内には存在しない分子がクラウディング剤として用いられてきた。申請者は、生体分子を取り囲む環境の重要性を鑑み、細胞内に高濃度で発現することが知られる“適合溶質”と呼ばれる糖質、アミノ酸、脂質の代謝産物群に着目し、分子クラウディング研究を行ってきた。適合溶質は、細胞が環境の変化に応じて産生するものであり、コファクターのように特異的に生体分子に作用しない。その役割は、主に浸透圧の制御、細胞膜の安定化等に関与していると考えられているが、時に1Mにも達するその細胞内濃度は、生体分子にクラウディング効果をもたらす可能性は高い。そこで、報告されているいくつかのクラウディング剤を用いて三重鎖核酸の構造安定性を調査したところ、適合溶質によって核酸の安定性に大きな違いが現れることを見出した。

しかしながら、適合溶質は多種多様であり、細胞や器官によっても産生される分子が異なることから、その機能に関して未だ不明な部分も多い。申請者は、適合溶質の性質を解明すべく、多様な構造を持つ適合溶質ライブラリーを構築し、生体分子に与える影響の系統的に調査するに至った。

2. 研究の目的

適合溶質は、糖質、アミノ酸、脂質を基体しているため、構造的類似性に乏しく、構造と機能の相関を掴むことはこれまで困難であった。本研究では、(I)多様な構造を有する適合溶質ライブラリーを構築し、(II)生体分子に対する影響と構造の相関を明らかにすることを目的としている。さらに、得られた知見をもとにして(III)種々の酵素反応に応用を図る。

申請者は、適合溶質の基本骨格である対イオン型構造に着目し、その類縁体を大量、かつ、簡便に合成・精製する方法を開発することに成功した。同時にそれらを使ってDNA二

重鎖に対する不安定化効果を調べたところ、適合溶質の化学構造によってDNA二重鎖の安定性に差異が現れ、難増幅性のゲノム配列に対するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を促進することを見出した。本研究では、この初期成果を基にして以下の研究を計画し、遂行する予定である。

(I) 適合溶質ライブラリーの構築

細胞内で産生される対イオン型の適合溶質に多様性をもたせるため、カチオン性及びアニオン性官能基の種類、イオン間距離、嵩高さ、親水性・疎水性などの構造因子を異にする適合溶質ライブラリーを有機合成法によって構築する。

(II) 適合溶質が生体分子に与える影響

構築されたライブラリーを基に、どのような化学構造を持つ適合溶質がどのような生体分子にどのような影響を及ぼすか、系統的に調査する。また、その作用機構も明らかとする。

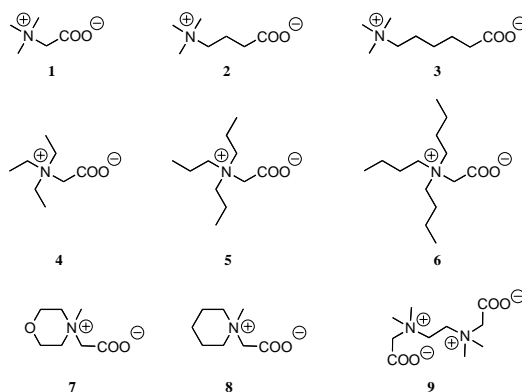
(III) 酵素反応への応用

(II)で得られた知見を基にして *in vitro* で行われる種々の酵素反応への応用を図る。

3. 研究の方法

(I) 適合溶質ライブラリーの構築

現在、対イオン型分子の簡便な合成法の確立を目指すためにグリシンベタイン (*N,N*-トリメチルグリシン、下図に示す化合物1)を基体とし、以下に示す4つの特徴を異にする8つの適合溶質を設計、合成した。



- (1) カチオンアニオンのリンカー長
- (2) カチオン性官能基の嵩高さ
- (3) 官能基の親水性、疎水性
- (4) 1分子内の対イオン数

これに加えて、以下の4つの特徴を有するライブラリーを新たに設計・合成する。

- (5) 芳香族置換基の導入

(6) アニオン性官能基をスルホン酸、リン酸に置換 (天然に存在するスルホベタイン、ホスホベタインモデル)

(7) カチオン性官能基を窒素から三価のリン、ヒ素等に置換 (非天然型ベタイン分子)

(8) 非対イオン型分子の設計・合成 (例えば、テトラアルキルアンモニウムカチオン等)

(II) DNA、蛋白質、脂質膜に及ぼす影響を調査・検討

得られたライブラリーを利用して、DNA 二重鎖のみならず、三重鎖、四重鎖に対する影響を検討する。主には分光学的手法による安定性の変化とゲル電気泳動、円二色性分光法による構造解析により評価する。細胞内で産生された適合溶質は小分子であるが故に、原核生物では核様体、真核生物でも細胞核内にも拡散移動することが予想され、それらが核酸の構造や安定性に及ぼす影響を調べる。また、 α ヘリックス、 β シート含量の異なる典型的な蛋白質を使い、蛋白質の高次構造に与える効果を評価する。評価法は、円二色性分光法と分子プローブ法を用いる。細胞内で産生される種々の適合溶質が蛋白質に与える影響、特にどのような構造を有する適合溶質が蛋白質構造を制御しているかの糸口を探る。さらに、リン脂質を用いたリポソームを使って脂質二重膜に及ぼす影響も調べる。乾燥環境で生きる生物は適合溶質の産生によって脂質膜の崩壊から逃れていることも指摘されており、適合溶質の安定性評価 (DSC 測定) は適合溶質の脂質膜に与える影響を可能にすると考えられる。

以上の DNA、蛋白質、脂質膜の構造・安定性に及ぼす影響を適合溶質の化学構造という観点から系統的に評価する。

(III) 種々の酵素反応に応用

蛋白質や核酸の構造や安定性に影響を及ぼす場合、当然のことながら酵素自体の活性にも影響を及ぼすと考えられる。そこで、種々の酵素反応に対する影響を調査する。調査する対象は以下の 3 つの点である。

- (1) 酵素の熱安定性の向上
- (2) 反応活性、基質結合性、基質選択性
- (3) 正反応活性と逆反応活性 (加水分解反応と縮合反応)

4. 研究成果

申請当初に目的として掲げた 3 つの計画について、成果をそれぞれ記載する。

(I) 適合溶質ライブラリーの構築

申請時には、グリシンベタインを基体として、すでに 8 つの化合物 (2、3、4、5、6、7、8、9) を合成していた。この 2 年間をかけて、適合溶質ライブラリーの充足を図るべく、カ

ルボキシベタインに関しては、N-メチルイミダゾールなどの芳香族官能基をカチオン部位に導入したものを合成した。また、タウリン (2-アミノエタンスルホン酸) を基体としたスルホベタインライブラリー、3 価リンをカチオン部位に持つベタインライブラリーについてもそれぞれ合成することに成功した。これらは当初の研究計画に挙げられていた (1) ~ (8) の要件を満たすものであり、ライブラリーの充実に関しては当初目的を達成することができた。

(II) 適合溶質が生体分子に与える影響

申請時には、フルマッチ DNA 二重鎖の熱安定性に関して、適合溶質が与える効果について評価していた。その結果では、天然に存在する適合溶質のグリシンベタイン (1) と比較して、メチル基をブチル基に置換した化合物 6 (N,N,N-トリブチルグリシネート) は、11 倍もの不安定化効果を示した。分子量は 2 倍程度に過ぎないにも関わらず、10 倍を超える効果が発現したことは、単に大きさの因子だけに左右されず、ベタインの化学構造自体が何らかの効果を発現するためと考えることができる。

このような前提結果をもとにして、まず行ったのが、種々の DNA 構造に対する効果を網羅的に観察することであった。構造に対する効果を調べるために以下の条件を中心に検討を行った。

- (1) DNA の鎖長の影響
- (2) DNA の GC 含量の影響
- (3) ミスマッチの影響 (インターナル、ターミナル)
- (4) ヘアピン構造の影響

(1) ~ (4) のすべての系においてベタイン誘導体を加えると、フルマッチの DNA 二重鎖と同様の不安定化が確認された。不安定化は、DNA 鎖長にも、GC 含量にも、ミスマッチ配列やヘアピンのような分子内構造にも依存せず、すべての DNA 構造に普遍的に働くことが明らかとなった。一例として鎖長に対する不安定化効果を示す。

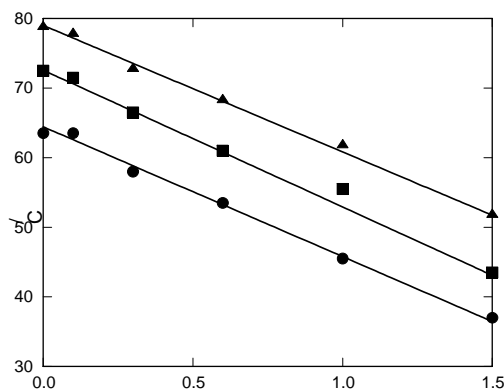


図1 GC含量を50%に固定し、DNAの鎖長を20bp(●)から40bp(■)、60bp(▲)へと変化した場合に観測される化合物6によるDNA二重鎖の不安定化挙動の比較

(●: 5'-GAAACCACAACGGTTACCTG-3' / 5'-CAGGTAACCGTTGTGGTTTC-3', ■: 5'-GAAACCACAACGGTTACTGACCATGTCTTGATACGATCG-3' / 5'-CGATCGTATCAAGACATGGTCAGGTAACCGTTGTGGTTTC-3', ▲: 5'-GAAACCACAACGGTTACTGACCATGTCTTGATACGATCGACCAAGCTTGTGACTGATGC-3' / 5'-GCATCAGTCACAAGCTTGGTCGATCGTATCAAGACATGGTCAGGTAACCGTTGTGGTTTC-3', [DNA]=10 μM, [Tris (pH 8.0)]=10 mM, [NaCl]=100 mM, [Solute] = 0 - 1.5 M)

DNA二重鎖の不安定化は鎖長に非依存的であり、加えたベタインの濃度に依存して決定された。鎖長と同様にGC含量にも、ミスマッチ配列、ヘアピン構造のような分子内構造に対してもそれぞれ依存せず、不安定化は添加剤の濃度によってのみ決定されることが示された。また、蒸気圧測定から不安定化挙動が大きいものほどヘンリープロットが直線からずれる挙動が強く、これらベタイン誘導体のDNAに対する働きは、水を介した間接的な相互作用に起因することが示唆されている。これらの結果は現在、投稿準備中である。

(III) 酵素反応への応用

本研究の成果として最も大きな発展を遂げたのが酵素反応への添加効果である。2件の特許として出願し(うち1件はさらに有用なデータが出たことによる優先権出願)、すでに1社と共同研究に発展している。

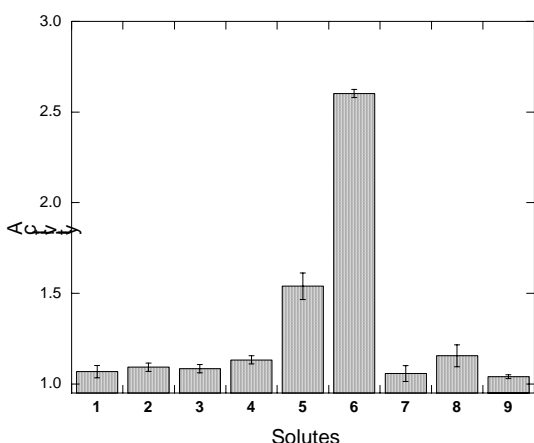


図2 50 mMの合成ライブラリー存在下におけるα-グルコシダーゼの加水分解速度の比較

([α-グルコシダーゼ]= 2.5×10^{-5} mg/mL, [p-ニトロフェニル-α-D-グルコピラノシド]=2.0 mM, [リン酸緩衝溶液 (pH 7.0)]=100 mM, [Solute] = 50 mM), 37°C)

これまでに報告されてきた適合溶質に関する研究では、ベタインのような適合溶質は、酵素の熱安定性を向上し、凍結変性や尿素変性などを緩和することは報告されていたものの、添加することによって活性を向上する効果については全く報告されていなかった。

申請者が開発した非天然型のベタインライブラリーは添加することで酵素の活性(主に反応速度)を向上した。一例として、α-グルコシダーゼ(Batillus Stearothermophilus由来)へベタインライブラリーを50 mMの濃度で添加した際に確認された反応速度の上昇比(Activity)を図2に示す。

酵素の活性化効果は、アンモニウム基に高い疎水性のアルキル基が導入された場合に強く発現した。速度論パラメータ解析によって、基質と酵素の結合を示す K_m に強く関与していることも明らかとなった。

このような活性化効果は、糖加水分解以外でもリン酸エステルの加水分解酵素であるアルカリフォスファターゼ、NADH依存型の酸化還元酵素である乳酸脱水素酵素、転移酵素であるDNAポリメラーゼなどにも広く発現することが明らかとなった(特許にて出願済)。

特許出願と共同研究の関係上、(III)の成果については論文投稿が遅れているが、申請課題に関して概ね課題の目標を達していると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

①K. Koumoto, H. Ochiai, N. Sugimoto
Enhanced amplification of polymerase chain reaction by addition of cosolutes derived from a cellular compatible solute, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 査読無、52巻、2008、257-258

[学会発表] (計10件)

①甲元一也、細胞内代謝産物を基体とする酵素活性化剤、口頭発表、関西6私大新技術説明会、2010年2月26日、東京

②甲元一也、出口瑛介、合成ライブラリーを用いた細胞内代謝産物群が酵素活性に及ぼす影響の解明、ポスター発表、第12回生命化学研究会、2010年1月8日、福井

③出口瑛介、甲元一也、対イオン構造を有する合成代謝産物ライブラリーの創製、ポスター発表、第29回有機合成若手セミナー、2009年11月24日、神戸

④ Kazuya Koumoto、Function of cellular metabolites for enzymatic reactions、招待講演、Special Seminar 2 (BK21) in Gyoengsang National University、2009年11月20日、Jinju, S. Korea

⑤ Kazuya Koumoto、Function of cellular metabolites for enzymatic reactions、招待講演、Special Seminar 1 (BK21) in Gyoengsang National University、2009年11月19日、Jinju, S. Korea

⑥ 甲元一也、細胞内代謝産物がポリメラーゼ連鎖反応を補助、促進する、口頭発表、知財ビジネスマッチングフェア2009、2009年10月21日、大阪

⑦ 出口瑛介、甲元一也、有機合成的手法を用いた代謝産物群の α -グルコシダーゼ活性化メカニズムの解明、ポスター発表、生体機能関連化学若手の会第21回サマースクール、2009年7月13、14日、京都

⑧ 出口瑛介、甲元一也、杉本直己、NanoBioNow(22) 適合溶質の α -グルコシダーゼ活性に及ぼす影響、口頭発表、日本化学会第89春季年会、2009年3月27日、船橋

⑨ K. Koumoto、H. Ochiai、N. Sugimoto、Enhanced amplification of polymerase chain reaction by addition of cosolutes derived from a cellular compatible solute、ポスター発表、Joint Symposium of 18th International Roundtable on Nucleosides, nucleotides and Nucleic Acids and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry、2008年9月9日、京都

⑩ K. Koumoto、Design of functional additives for the facilitation of polymerase chain reaction、招待講演、FIBER International Symposium on Nucleic Acid Chemistry、2008年9月7日、神戸

[産業財産権]

○出願状況(計2件)

①名称：酵素活性を向上させるための組成物およびその利用
発明者：甲元一也、出口瑛介
権利者：学校法人甲南学園
種類：特許(優先権出願)
番号：特願2010-001986
出願年月日：2010年1月7日

国内外の別：国内

②名称：酵素活性を向上させるための組成物およびその利用

発明者：甲元一也、出口瑛介

権利者：学校法人甲南学園

種類：特許

番号：特願2009-46946

出願年月日：2009年2月27日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

甲元 一也 (KOUmoto KAZUYA)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・
生命化学科・准教授

研究者番号：60388759