

博士論文

Spatiotemporal Generation of Molecular Glues
and their Medicinal Application

(分子糊の位置特異的な合成とその医学的応用)

波多野 淳一

【1】緒言

多数の非共有結合を複合的に利用した多点相互作用は、抗体による抗原の選択的な認識や、ウイルスや細菌の宿主細胞への接着等で見られるように、生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たしている。水素結合や静電相互作用といった弱い相互作用を用いた場合も、その数を増やすことで容易に相互作用を強めることができるため、多点相互作用の概念は標的に強く結合する薬剤の開発といった生医学分野においても注目を集めている。しかしながら、実際に生体での応用を考える場合には、いかにして多点相互作用を対象組織に位置特異的に働かせるかということが大きな課題となっている。例えば、大黒、相田らは2009年にアルギニンの側鎖官能基であるグアニジニウムイオン (Gu^+) を多数有する高分子が、生体高分子のオキシアニオン性表面に対する多価的塩橋形成 (Figure 1) により、生理学的条件下でもそれらに強く接着する「分子糊」として働くことを見出した^[1]。またこの分子糊が生体高分子の会合状態を安定化し、その機能を制御することを報告している。この分子糊には様々なオキシアニオン種に対して汎用的に接着できるという利点があるが、一方で生体内には無数のオキシアニオンが存在するため接着が無作為に生じ、標的の組織のみで分子糊を作用させることは不可能であった。

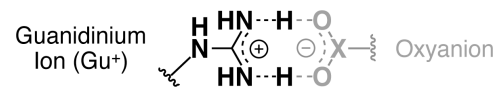


Figure 1. Salt-bridge interaction between Guanidinium ion (Gu^+) and oxyanion.

本研究では、光重合性部位と Gu^+ を一つだけ有する接着力の弱い分子糊モノマーを、接着対象となるオキシアニオン表面に動的に濃縮させておき、望みの位置に光照射して重合させることで、in situ で接着力の強い多価性分子糊ポリマーを構築するという、これまでに例の無い手法で分子糊の位置特異的な接着を達成した (Figure 2)。さらに、この分子糊を用いて生細胞の蛍光修飾及び細胞死誘導が可能であることを見出した。

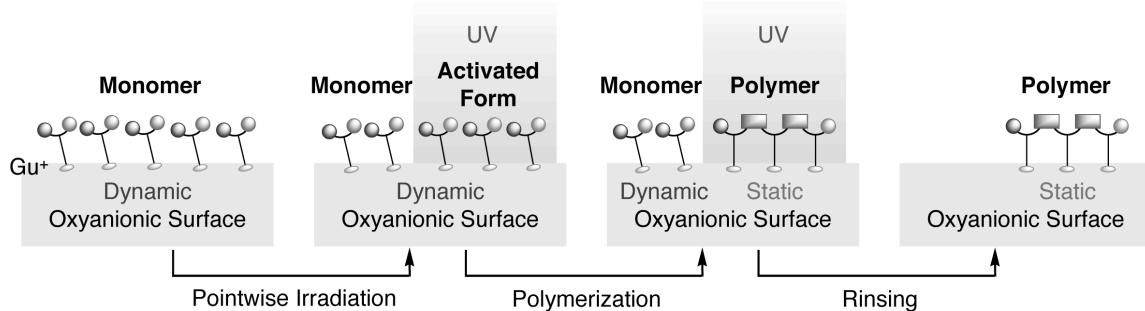


Figure 2. Schematic illustration of the mechanism of spatiotemporal generation of polymeric molecular glues.

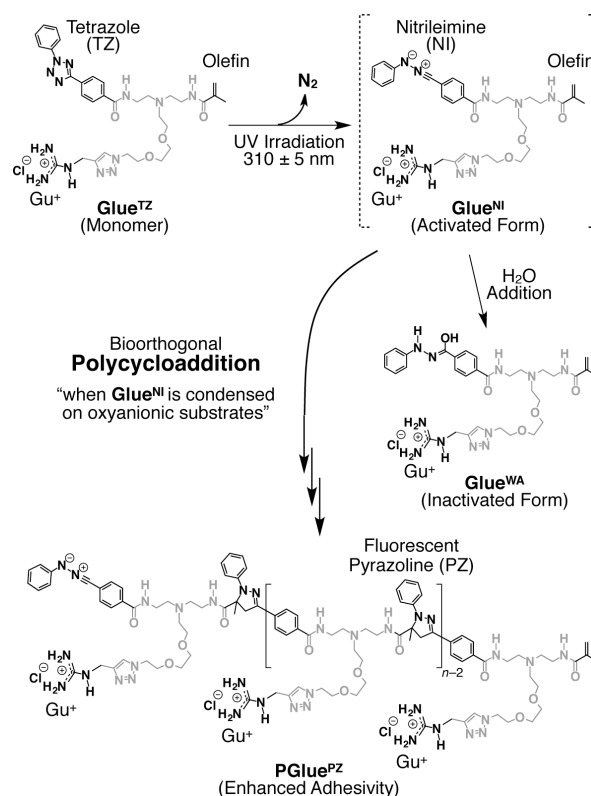
【2】オキシアニオン性表面での生体直交型光重合反応による分子糊の位置特異的な合成^[1]

生体内で位置特異的に重合を起こすためには、光照射等の外部刺激をトリガーとして生体適合条件下でも進行する生体直交型反応を素反応として用いる必要があると考えられる。ここでは生細胞内でも進行することが報告されている、テトラゾール (TZ) とオレフィンの光誘起反応^[2]を用いることを検討した。この反応では、紫外光照射によって TZ が脱窒素を伴ってニトリルイミン (NI) 中間体に変換され、これがオレフィンと 1,3-双極子環化付加を起こすことでピラゾリン (PZ) を形成する。PZ は蛍光性であるため反応の追跡も可能である。また最近、TZ とオレフィンを有する二官能性モノマーが、有機溶媒中で光重合することが報告

された^[3]。しかしながら、水溶液中では NI 中間体に対する水付加が競争的に起こるため、モノマーが高度に濃縮されない限り重合の進行は困難であった。

本研究では、まず TZ、オレフィン、Gu⁺を有する水溶性モノマー-Glue^{TZ}の合成を行った。そして、このモノマーが 1 mM (0.07 wt%) 以下に希釈された水溶液中でも、接着対象となるオキシアニオン種の存在下では、一価の弱い塩橋を介してその表面に動的に濃縮され、光照射をトリガーとして分子糊ポリマー-PGlue^{PZ}へと重合されることを見出した (Scheme 1)。PGlue^{PZ}は多数の Gu⁺を有するため、生じると同時にオキシアニオン性表面に強く接着する。表面近傍以外では NI 中間体 (Glue^{NI}) は水付加によって Glue^{WA}となり失活するため、PGlue^{PZ}の生成及び接着はオキシアニオン性表面上で高度に位置選択的に起こすことができる。

モノマー-Glue^{TZ}の合成及び同定を行った後、まず Figure 2 のコンセプトを検証するため、オキシアニオン表面のモデルとしてシリカ基板上での Glue^{TZ}の光重合を試みた。シリカ基板を Glue^{TZ} (1 mM) の Tris-HCl 緩衝溶液 (20 mM, pH 8.5) に浸し、310 ± 5 nm の紫外光を 2 分間照射した (Figure 3a) 後に、蛍光顕微鏡で観測したところ、紫外光を照射した場所のみから蛍光が見られた (Figure 3b)。またシリカナノ粒子 (φ



Scheme 1. A Gu⁺-appended water-soluble monomer (Glue^{TZ}) carrying tetrazole (TZ) and olefinic termini and its photochemical transformation into a nitrileimine (NI)-based reactive intermediate (Glue^{NI}) with elimination of N₂, followed by bioorthogonal 1,3-dipolar polycycloaddition, affording a pyrazoline (PZ)-based fluorescent polymer (PGlue^{PZ}) carrying multiple Gu⁺ pendants for enhanced adhesion toward oxyanionic substrates. Without oxyanionic substrates, Glue^{NI} preferentially reacts with water to be inactivated in the form of Glue^{WA}.

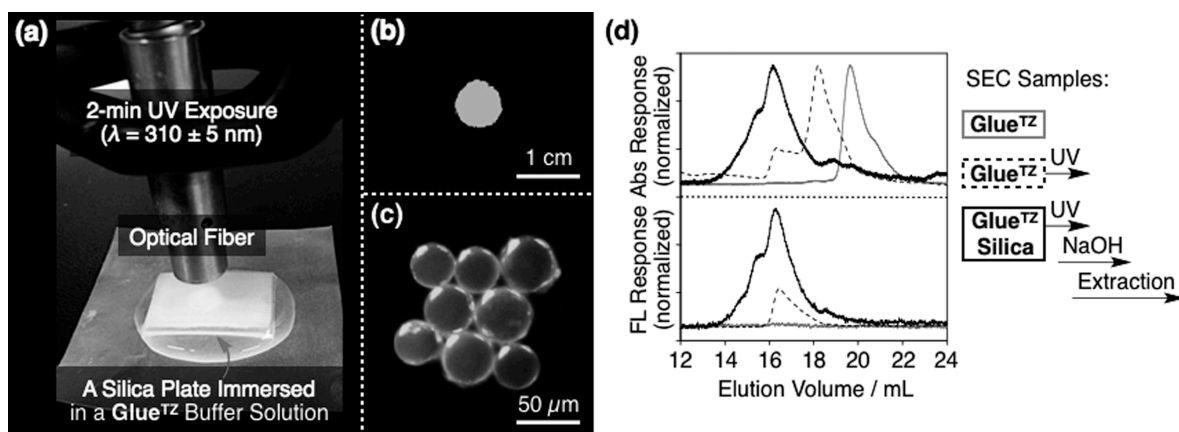


Figure 3. Photopolymerization of Glue^{TZ} (1 mM) in Tris-HCl (20 mM, pH 8.5) buffer on silica upon 2-min exposure of UV light ($\lambda = 310 \pm 5$ nm, 100 W). (a) An experimental setup for the photopolymerization of Glue^{TZ} on a silica plate. (b) A fluorescence micrograph of the silica plate pointwisely exposed to UV light for 2 min in the solution of Glue^{TZ} using the experimental setup shown in (a). (c) A fluorescence micrograph of silica particles after 2-min UV exposure in the solution of Glue^{TZ}. (d) SEC traces of Glue^{TZ} (gray), UV-exposed Glue^{TZ} (black dashed), and PGlue^{PZ} (black solid) extracted from the UV-exposed silica plate. Normalized absorption (315 nm) and fluorescence (530 nm/ $\lambda_{\text{ext}} = 360$ nm) responses.

= 40–50 μm , 25 mg mL^{-1}) を含んだ Glue^{TZ} (1 mM) の Tris-HCl 緩衝溶液 (20 mM , pH 8.5) に紫外光を照射した場合も、シリカ粒子の表面のみから蛍光が観測された (Figure 3c)。これらの結果は、Scheme 1 で示したように Glue^{TZ} への紫外光照射で生じた Glue^{N} が、バルクの水溶液中ではほとんどが水付加によって Glue^{WA} となる一方で、オキシアニオン表面の近傍では Glue^{TZ} が濃縮されるために光重合が進行し、生成した多価のポリマー PGlue^{PZ} がその表面にそのまま接着することを示唆している。事実、Figure 3b のシリカ基板を水酸化ナトリウムで処理した後、メタノールを用いて抽出し、回収物をゲルろ過クロマトグラフィーで分析したところ、モノマーである Glue^{TZ} (Figure 3d, gray) と比較して高分子量の領域にピークが見られた (Figure 3d, black solid)。また MALDI-TOF 質量分析においては最大で六量体まで、 Glue^{N} の多量体由来するピークが観測され、重合の進行が確認された。一方、シリカの非存在下で Glue^{TZ} (1 mM) の Tris-HCl 緩衝溶液 (20 mM , pH 8.5) に光照射をした場合には二量体と Glue^{WA} に由来するピークのみが観測された (Figure 3d, black dashed)。また Glue^{TZ} (1 mM) の Tris-HCl 緩衝溶液 (20 mM , pH 8.5) に浸したシリカ基板を用いて Figure 2 に示したそれぞれのステップを蛍光顕微鏡及び X 線光電子分光法によって分析し、 Glue^{TZ} が洗浄操作によって洗い流せる一方で、接着力の強い PGlue^{PZ} は洗浄後でも基板に残ることを確認した。

次に、この光重合を分光学的に分析するため、表面がカルボキシアニオン (CO_2^-) で修飾されたラテックス粒子 (LTX^- ; $\phi \approx 100 \text{ nm}$) を用いて実験を行った。なお、 LTX^- に対するモノマー Glue^{TZ} の会合定数は、 LTX^- に対して Glue^{TZ} を滴定した時のゼータ電位の変化をヒルの方程式にフィッティングすることで、 $K_{\text{assoc}} = 1.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ と算出している。これはこれまでに報告されている多数の Gu^+ を持つ分子糊のタンパク質に対する会合定数 ($K_{\text{assoc}} = 10^5\text{--}10^8 \text{ M}^{-1}$) と比較して非常に小さいが、 LTX^- と Glue^{TZ} の間に弱く動的な相互作用があることを示唆している。この LTX^- (1.25 mg mL^{-1} ; $[\text{CO}_2^-] = 5 \mu\text{M}$) を含む Glue^{TZ} (10 μM) の Tris-HCl 緩衝溶液 (20 mM , pH 8.5) に紫外光を 2 分間照射すると、光重合によって生成する PGlue^{PZ} の PZ 部位に由来する蛍光 ($\lambda_{\text{ext}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$) が見られるようになった (Figure 4a, black solid)。一方、 LTX^- の代わりにアルキルアンモニウムカチオンで修飾されたラテックス粒子 (LTX^+ ; $\phi \approx 100 \text{ nm}$, 1.25 mg mL^{-1})

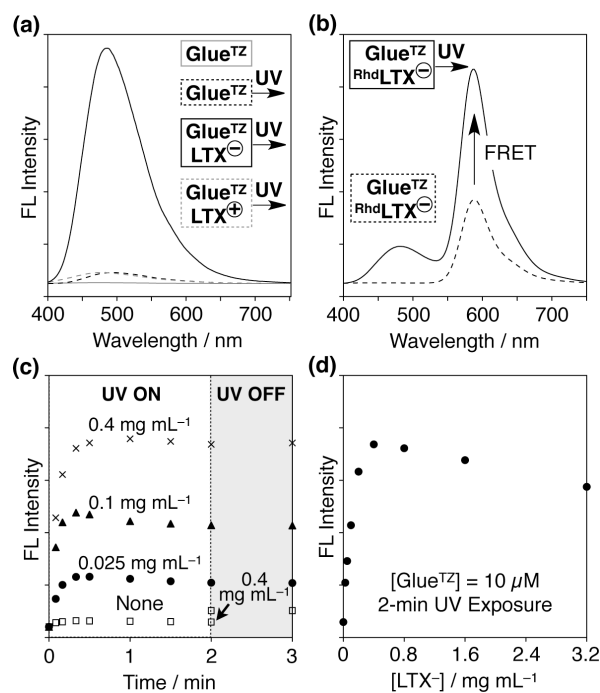


Figure 4. Photopolymerization of Glue^{TZ} (10 μM) in the presence of latex nanoparticles in Tris-HCl (20 mM , pH 8.5) buffer upon exposure to UV light ($\lambda = 310 \pm 5 \text{ nm}$, 100 W). (a) Fluorescence spectra ($\lambda_{\text{ext}} = 360 \text{ nm}$) before (gray solid) and after 2-min UV exposure in the absence (black dashed) and presence of oxyanionic (LTX^- ; 1.25 mg mL^{-1} , black solid) and cationic (LTX^+ ; 1.25 mg mL^{-1} , gray dashed) latex nanoparticles. (b) Fluorescence spectra ($\lambda_{\text{ext}} = 360 \text{ nm}$) of rhodamine-containing LTX^- ($^{\text{Rhod}}\text{LTX}^-$) before (dashed) and after 2-min UV exposure (solid). (c) Time profiles of the fluorescence intensity changes ($\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$) upon UV exposure (0–2 min) in the absence (square) and presence (circle, triangle, and cross) of LTX^- (0.025, 0.1, and 0.4 mg mL^{-1} , respectively). LTX^- (0.4 mg mL^{-1}) was added after 2-min UV exposure (square). (d) Fluorescence intensity ($\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$) after 2-min UV exposure in the presence of LTX^- (0–3.2 mg mL^{-1}).

mL⁻¹, [NR₃⁺] = 5 μM) を用いた場合には、Glue^{TZ}の濃縮が起きないため重合がほとんど進行せず、紫外光照射後の蛍光強度は無視できるほど弱かった (Figure 4a, gray dashed)。また赤色蛍光色素であるローダミンを含有する LTX⁻ (Rh^dLTX⁻) を用いた場合には、ローダミンと生成した PGlue^{PZ}の間に蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が観測され (Figure 4b)、PGlue^{PZ}が Rh^dLTX⁻の非常に近傍に存在すること、すなわち接着していることが示された。LTX⁻の非存在下で紫外光照射を行った場合には蛍光強度はほとんど増大せず (Figure 4a, black dashed)、光照射後に LTX⁻を加えても増大は見られなかったが、これは水溶液中での Glue^{Nl}の寿命が短く、重合しなかった場合には、すぐに水付加によって Glue^{WA}となり失活するためである (Figure 4c, square)。0.025 mg mL⁻¹の LTX⁻を用いて紫外光照射時間に対する蛍光強度の変化を観測すると、約 30 秒で飽和しており、LTX⁻が共存する場合には光重合反応が迅速に進行することが確認されている (Figure 4c, circle)。LTX⁻の濃度を増やして紫外光を 2 分間照射した後の蛍光強度を比較すると、0.4 mg mL⁻¹までは蛍光強度は増大するが、それ以上では用いている Glue^{TZ}に対して LTX⁻が過剰となり、重合を促進する効果が減少する (Figure 4d)。

さらに、多数のリン酸イオンを有する生体高分子である DNA もこの光重合を促進することを見出した。Figure 5a ([Gu⁺]/[PO₄⁻] = 0) は直線状 DNA (pUC19; 2686 塩基対; [PO₄⁻] = 9 μM) のアガロースゲル電気泳動プロファイルである。pUC19 にモノマー Glue^{TZ}を混合して紫外光を 2 分間照射すると、[Gu⁺]/[PO₄⁻] > 5 の場合では pUC19 の泳動が見られなくなる (Figure 5b)。これは pUC19 上での Glue^{TZ}の光重合で生じた PGlue^{PZ}が pUC19 に強く接着し、その負電荷を中和するためであると考えられる。一方、Glue^{TZ}の接着性は弱い ($K_{\text{assoc}} = 5.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) ため、紫外光照射無しでは、[Gu⁺]/[PO₄⁻] = 25 まで Glue^{TZ}の濃度を上げても pUC19 の泳動には影響を与えなかった (Figure 5a)。また、pUC19 との混合前に Glue^{TZ}に紫外光を照射した場合には、大部分が Glue^{WA}となり重合が進行しないため、これを pUC19 と混合しても泳動はほとんど妨げられなかった (Figure 5c)。

以上の結果を踏まえ、紫外光の照射位置を指定することで、生体高分子の表面で PGlue^{PZ}を位置特異的に合成し、接着させられるかどうかを検討した。この目的のため、まず末端アミノ基修飾された DNA (100 塩基対) を、活性エステル基で被覆されたプラスチック基板のスポット [i]–[iii] (Figure 6a) に固定化した。次にその基板の上にモノマー Glue^{TZ} (10 μM) の Tris-HCl 緩衝溶液 (20 mM, pH 8.5) をスポット [i]、[ii]、

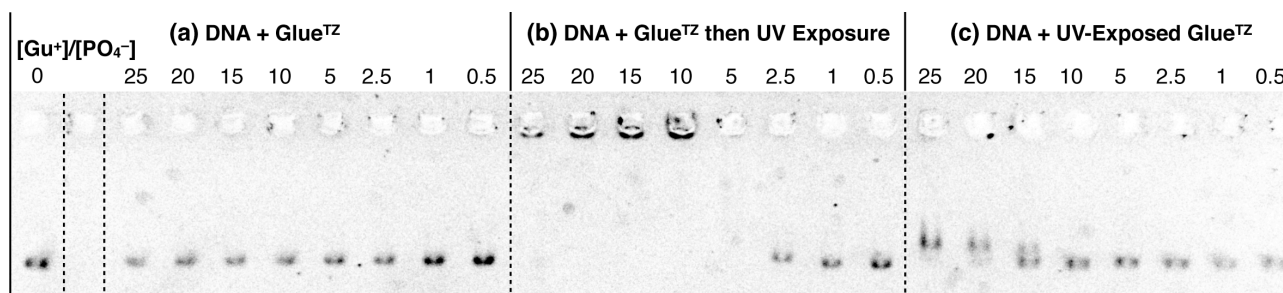


Figure 5. Agarose gel electrophoresis profiles of linearized plasmid DNA (pUC19) (a,b) with Glue^{TZ} (a) before and (b) after 2-min UV exposure ($\lambda = 310 \pm 5 \text{ nm}$), and (c) with UV-exposed Glue^{TZ}. Samples were prepared at [Gu⁺]/[PO₄⁻] = 0–25 and placed on an agarose gel that was subsequently stained with SYBR Green I for fluorescently visualizing the electrophoresis profiles upon excitation at 470 nm.

[iv]を覆うように乗せた後、スポット [i]、[iii]、[iv]に対して紫外光ビームを照射した (Figure 6a)。この基板に 365 nm の励起光を当てると、スポット [i]のみから、P Glue^{PZ} に由来する発光が観測された

(Figure 6b-d)。P Glue^{PZ} は多数の Gu^+ を有するため、一度 DNA 表面に接着すると、その後剥がれて溶液中に拡散し、他のスポットに固定化された DNA に接着するということは起こらない。一方スポット [iv] で生成した Glue^{NI} は潜在的には DNA の固定化されているスポット [ii] まで拡散し、そこで重合する可能性があるが、スポット [ii] から発光は見られない。これは Glue^{NI} が [ii] に到達する前に [iv] で生成してすぐに水付加によって失活するためである。つまり、P Glue^{PZ} はオキシアニオン表面、 Glue^{TZ} 、紫外光が全て揃ったところでのみ構築され、不可逆的にオキシアニオン表面に接着するため、紫外光照射の場所を指定することで高度に位置特異的な修飾が達成された。

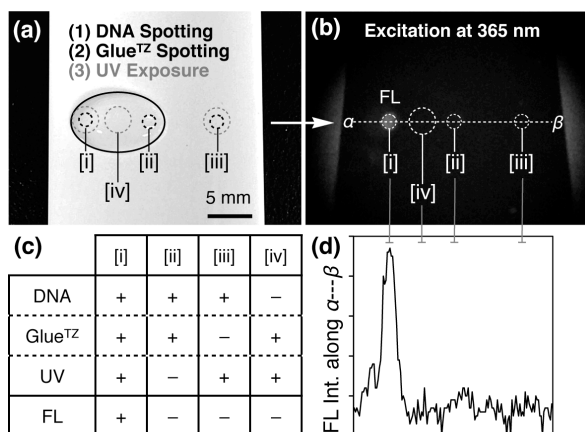


Figure 6. Photopolymerization of Glue^{TZ} on a DNA-immobilized substrate. (a) Immobilization of DNA bearing an NH_2 terminus (100 bp) onto an active ester-functionalized plastic substrate at spots [i]–[iii]. After rinse with 0.5 M NaOH and water, the substrate was immersed in a Tris-HCl (20 mM, pH 8.5) buffer solution of Glue^{TZ} (10 μM , inside black solid circle). Then, the substrate was exposed to focused UV light ($\lambda = 310 \pm 5$ nm) for 2 min (inside gray dashed circles), followed by rinse with water. (b) An image of the resultant substrate under 365 nm UV illumination. (c) The experimental conditions and fluorescence response of spots [i]–[iv]. (d) Fluorescence intensity along the white dashed line between α and β in (b).

[3] 生細胞で位置特異的に合成した分子糊による蛍光修飾と細胞死誘導⁽¹⁾

前章において生体高分子を含む種々のオキシアニオン表面を、その表面上での Glue^{TZ} の光重合によって生じる P Glue^{PZ} で位置特異的に修飾できることを見出した。ここではこの光重合が実際に生体直交的に進行するかどうかを検討するため、生細胞における Glue^{TZ} の光重合を試みた。まずヒト肝臓がん細胞である Hep3B 細胞を、 Glue^{TZ} を含んだイーグル最少必須培地 (EMEM) 中で、5%二酸化炭素雰囲気下で 37°C で 24 時間培養した。この細胞に紫外光を 2 分間照射した後、共焦点レーザー走査顕微鏡で 2 光子励起 (720 nm) すると細胞から P Glue^{PZ} に由来する蛍光が観測された (Figure 7a)。すなわち、生理学的条件下でも細胞の有するオキシアニオン性基質によって Glue^{TZ} の光重合が促進されることが示された。また Figure 7a の細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (D-PBS) で数回すすいだ後も、蛍光が維持された (Figure 7b)。一方で、 Glue^{TZ} を含む EMEM 中で培養した細胞を、D-PBS ですすいしてから紫外光を照射した場合は、細胞からの蛍光強度は無視できるほど弱かった (Figure 7c)。これらの対照的な結果は P Glue^{PZ} が細胞の構成要素に強く接着する一方、接着力の弱い Glue^{TZ} は洗浄操作によって取り除かれるということを示している。

さらに、この P Glue^{PZ} が細胞死を引き起こすことも見出した。 Glue^{TZ} を含む EMEM を培養中の Hep3B 細胞に加え、2 分間の紫外光照射を行った。その後培地を、 Glue^{TZ} を含まない EMEM に交換し、37 °C で 24 時間培養した後、細胞生存率を測定するために CellTiter-Glo 試験を行った。Figure 7d (triangle) に示したように細胞生存率は投与した Glue^{TZ} の濃度が上がるほど減少し、 $[\text{Glue}^{\text{TZ}}] = 0.5$ mM では 50% を下回った。

一方、Glue^{TZ}に紫外光照射をしなかった場合 (Figure 7d, square)、または Glue^{TZ}に紫外光照射を行ってから Hep3B 細胞に加えた場合 (Figure 7d, circle) には生存率の減少はほとんど見られなかった。また Glue^{TZ}無しでの 2 分間の紫外光照射自体も細胞生存率には影響しなかった (Figure 7d; [Glue^{TZ}] = 0 mM)。つまりここでは、接着性の高い PGlue^{PZ}の生成が Hep3B 細胞の生物学的機能に影響を与え、生存率を低下させたと考えられる。

【4】 結言

生体直交型の光重合性部位と一価の Gu⁺を有する水溶性モノマーGlue^{TZ}を開発し、その光重合で生じる蛍光性ポリマーPGlue^{PZ}でシリカや被修飾ラテックス粒子、更には DNA や生細胞といったオキシアニオン表面を修飾することに成功した。光照射位置を指定することで、接着対象上で選択的に PGlue^{PZ}を構築することができるため、対象組織の蛍光ラベリングや生物学的機能のコントロール等、本システムを用いた分子糊の生体内応用への展開が期待される。

【5】 参考論文

- [1] K. Okuro, K. Kinbara, K. Tsumoto, N. Ishii, T. Aida, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1626–1627.
 [2] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 828–839.
 [3] J. O. Mueller, D. Voll, F. G. Schmidt, G. Delaittre, C. Barner-Kowollik, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 15681–15684.

【6】 発表論文

- (1) J. Hatano, K. Okuro, T. Aida, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 193–198.

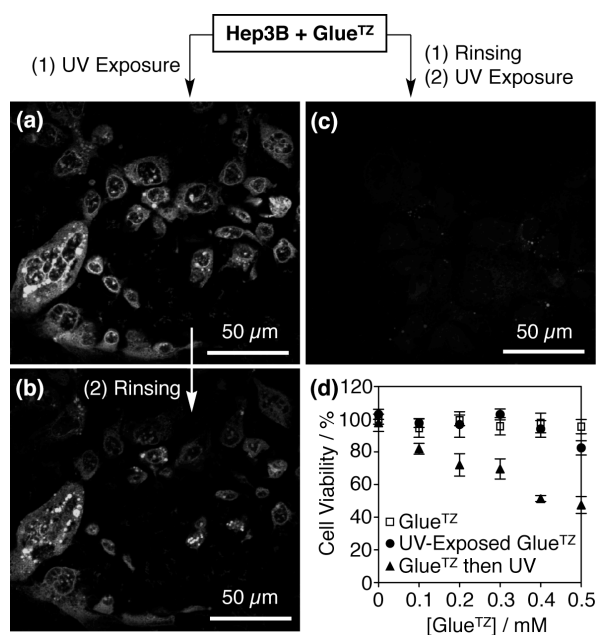


Figure 7. (a–c) Confocal laser scanning microscopy upon two-photon excitation at 720 nm of Hep3B cells (1.0×10^4 cells well⁻¹) after incubation at 37 °C for 24 h in EMEM (200 μL) containing Glue^{TZ} (0.5 mM). Fluorescence micrographs taken (a) after 2-min UV exposure ($\lambda = 310 \pm 5$ nm, 100 W) (b) followed by rinsing with D-PBS (200 μL \times 2) and subsequent incubation at 37 °C for 24 h in EMEM (200 μL) or (c) after rinsing with D-PBS (200 μL \times 2) and subsequent incubation at 37 °C for 24 h in EMEM (200 μL) followed by 2-min UV exposure. (d) Viability profiles of Hep3B cells (5.0×10^3 cells well⁻¹) using the CellTiter-Glo assay. Hep3B cells were incubated for 2 min in EMEM (100 μL) containing Glue^{TZ} (0–0.5 mM) without (square) and with (triangle) UV exposure or likewise incubated in EMEM (100 μL) containing UV-exposed Glue^{TZ} (0–0.5 mM) (circle). Prior to the viability assay, all samples thus obtained were further incubated at 37 °C for 24 h in EMEM (100 μL). The results are expressed as means \pm s.e.m. ($n = 3$).