

論文の内容の要旨

論文題目 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)

氏 名 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、様々な生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たしているだけでなく、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、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の塩橋形成により、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。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、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。

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 1)。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。

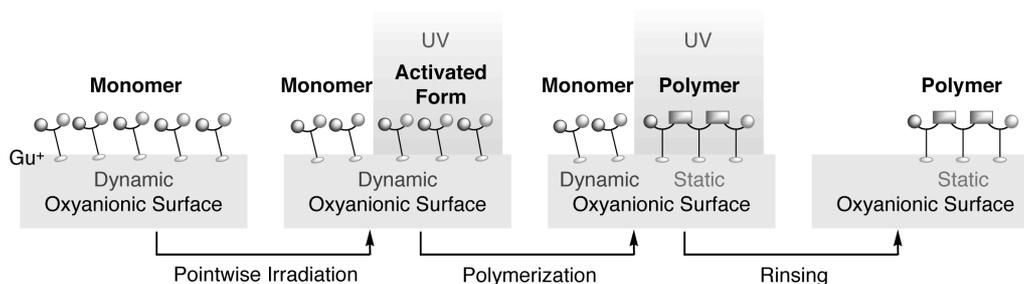


Figure 1. Schematic illustration of the mechanism of spatiotemporal generation of polymeric molecular glues.

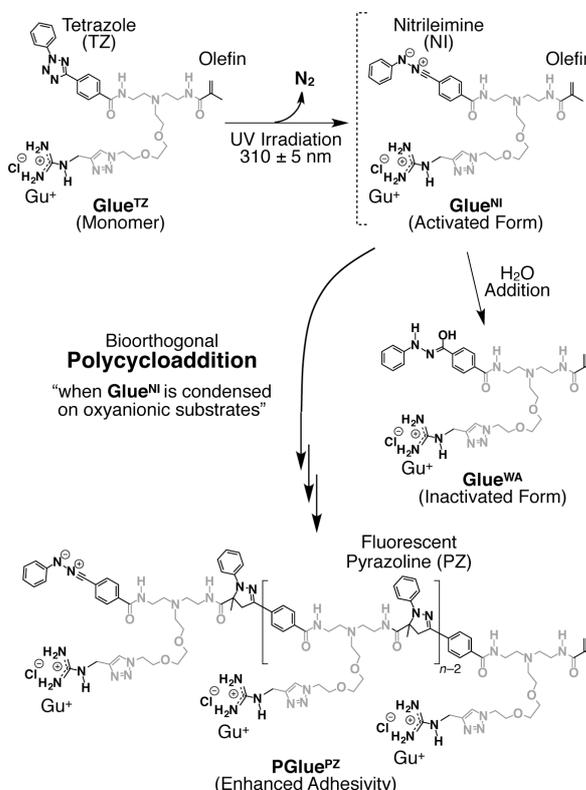
【2】オキシアニオン性表面での生体直交型光重合反応による分子糊の位置特異的な合成

光重合の素反応としては、生細胞内でも進行する生体直交型反応として知られているテトラゾール (TZ) とオレフィンの光誘起反応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が、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分間照射した後に、蛍光顕微鏡で観察したところ、紫外光を照射した場所のみから蛍光が見られた。この結果は、Scheme 1で示したように Glue^{TZ} への紫外光照射で生じた Glue^{NI} 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十分に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



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}), followed by bioorthogonal 1,3-dipolar polycycloaddition, affording a pyrazoline (PZ)-based fluorescent polymer (PGlue^{PZ}) carrying multiple Gu^+ pendants. Without oxyanionic substrates, Glue^{NI} preferentially reacts with water to be inactivated in the form of Glue^{WA} .

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、こ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 2, gray)と比較して高分子量の領域にピークが見られた (Figure 2, black solid)。またMALDI-TOF質量分析においては最大で六量体まで、Glue^{NI}の多量体に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}のTris-HCl緩衝溶液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 2, black dashed)。

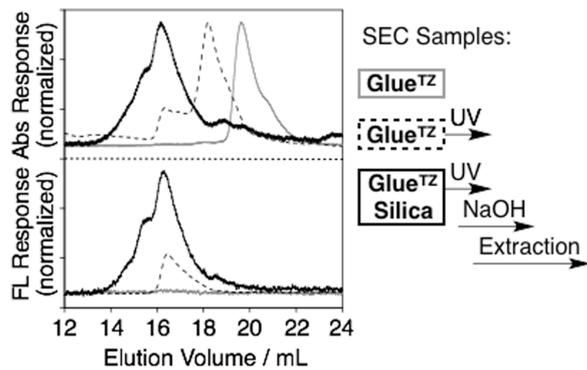


Figure 2. SEC traces of Glue^{TZ} (gray), UV-exposed Glue^{TZ} (black dashed), and PGlue^{PZ} (black solid) extracted from the UV-exposed silica plate. Normalized absorption (315 nm) and fluorescence (530 nm/ $\lambda_{ext} = 360$ nm) responses.

さらに、表面がカルボン酸イオンで修飾されたラテックス粒子や、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。これらの結果を踏まえ、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 3a)に固定化した。

次にその基板の上にモノマーGlue^{TZ} (10 μ M)のTris-HCl緩衝溶液をスポット[i]、[ii]、[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 3a)。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、PGlue^{PZ}に由来する発光が観測された (Figure 3b-d)。つまり、PGlue^{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。

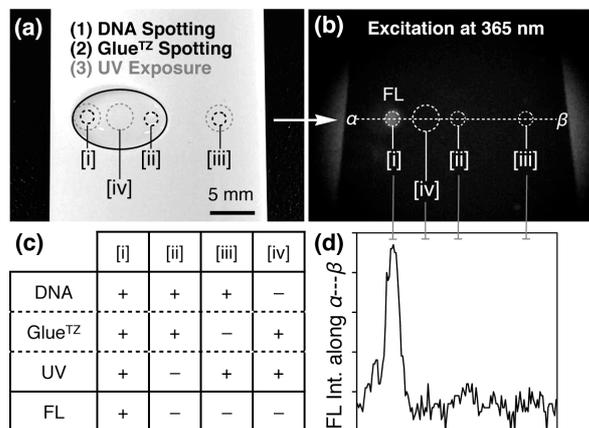


Figure 3. (a,b) Photopolymerization of Glue^{TZ} on a DNA-immobilized substrate. (c) The experimental conditions and fluorescence response of spots [i]-[iv]. (d) Fluorescence intensity along the white dashed line between α and β in (b).

【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

本章ではGlue^{TZ}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、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観察すると細胞からPGlue^{PZ}由来する蛍光が観測された (Figure 4a)。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 4a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 4b)。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 4c)。これらの対照的な結果はPGlue^{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PGlue^{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、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 4d (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、[Glue^{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 4d, 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 4d, 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 4d; [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。

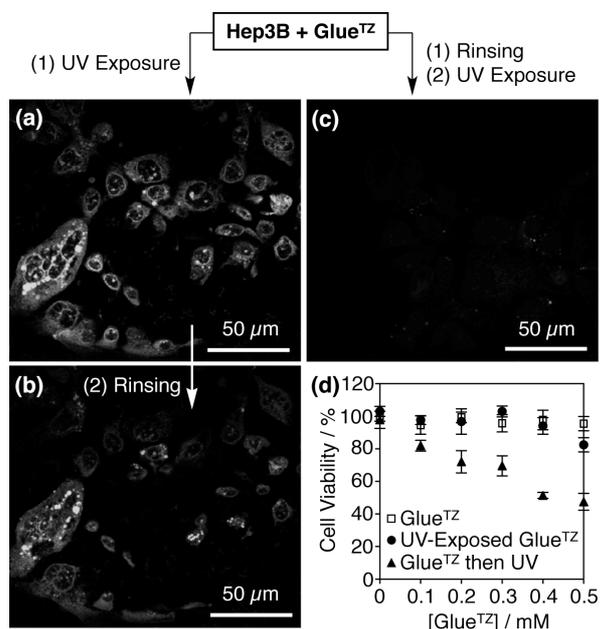


Figure 4. (a–c) Confocal laser scanning microscopy upon two-photon excitation at 720 nm of Hep3B cells (1.0×10^4 cells well⁻¹) after incubation at 37 °C for 24 h in EMEM (200 μL) containing Glue^{TZ} (0.5 mM). (d) Viability profiles of Hep3B cells (5.0×10^3 cells well⁻¹) using the CellTiter-Glo assay. 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). The results are expressed as means ± s.e.m. ($n = 3$).

【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。