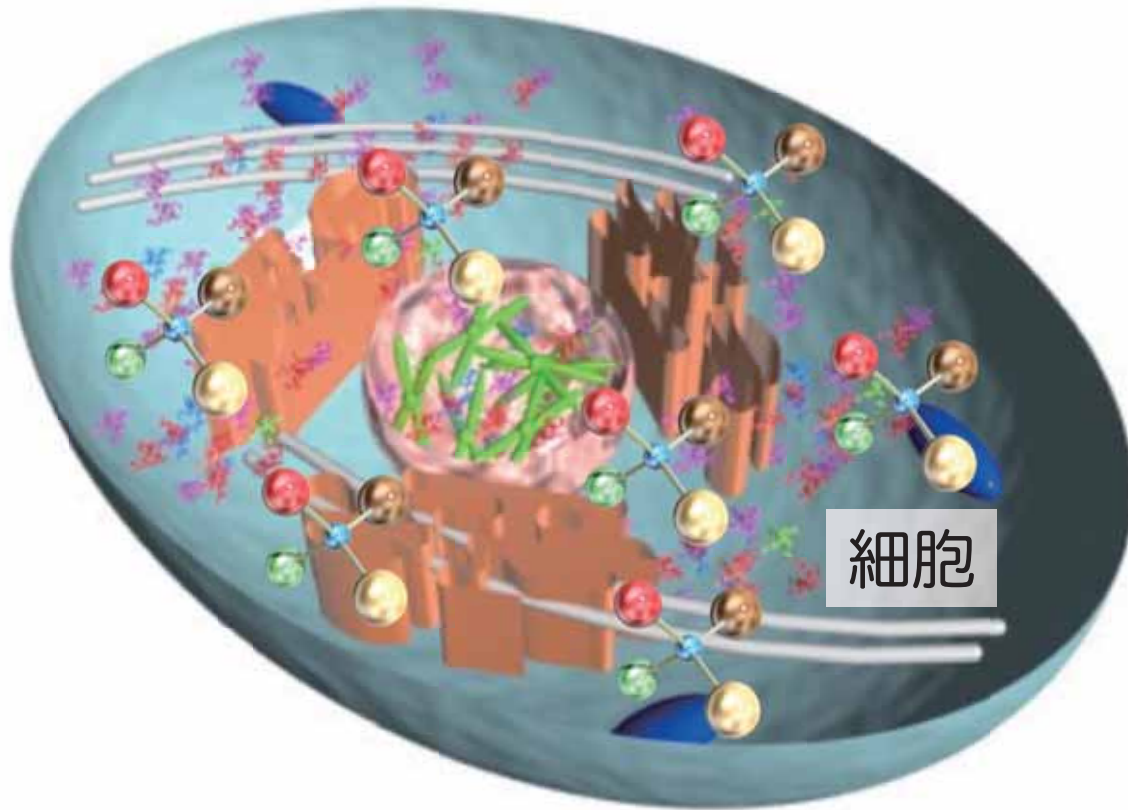


細胞内代謝産物を基体とする 酵素活性化剤

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 甲元 一也

研究背景1：細胞内に蓄積する代謝物質



代謝産物

塩水や高温、高塩、高压など極限環境に生息する生物は、無機イオンだけで補いきれない浸透圧変化をある種の代謝産物によって保っている。

また、平穏な環境に住む生物でも急激な細胞外環境の変化に抗して同様の代謝産物を産生する

研究背景2: 代謝物質の機能



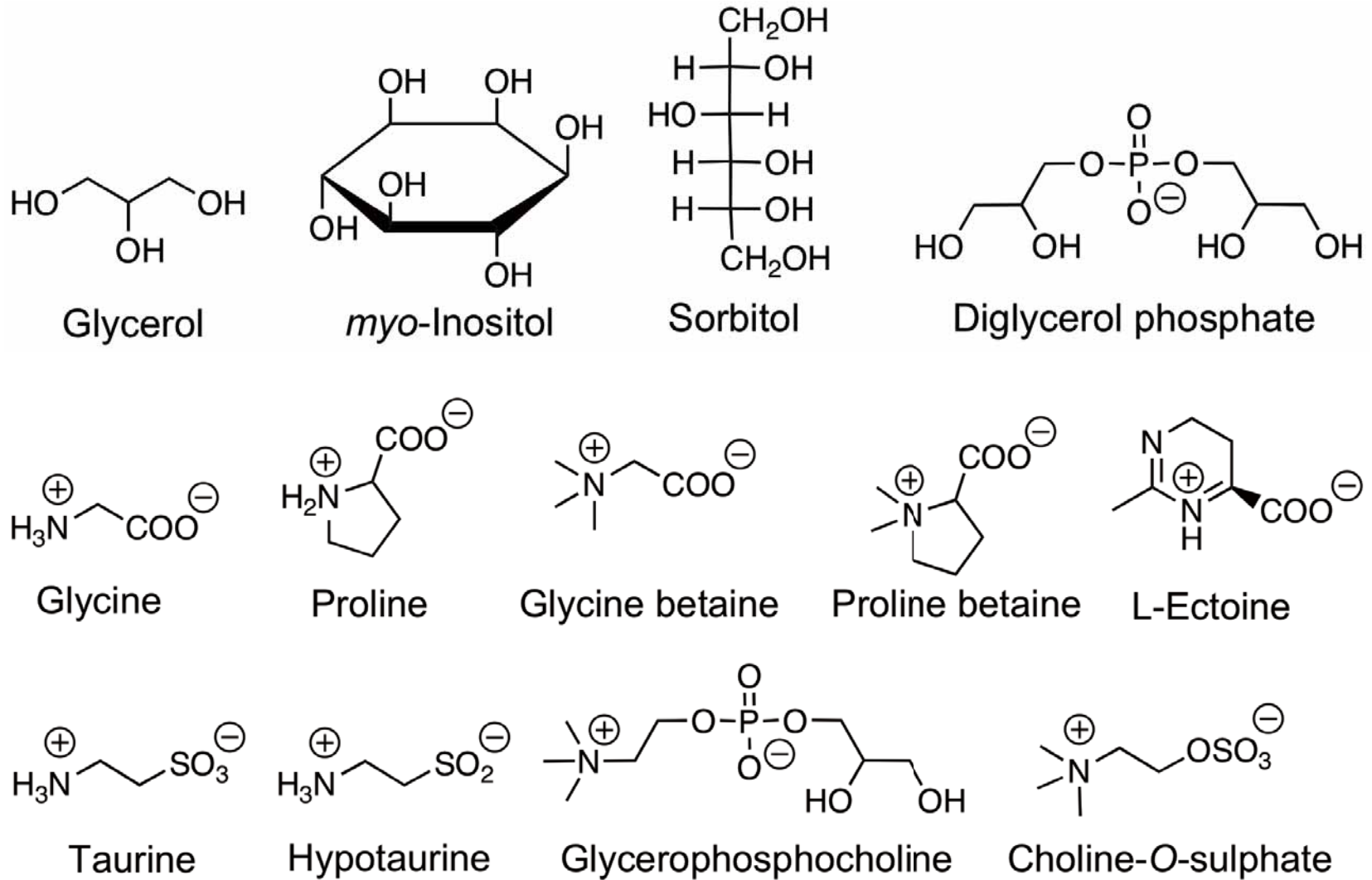
代謝産物

- ◆ 浸透圧の上昇
- ◆ 細胞膜の安定化
- ◆ レドックスバランスの調整
- ◆ 硫黄の解毒
- ◆ 活性酸素の除去
- ◆ 尿素変性の緩和

⋮

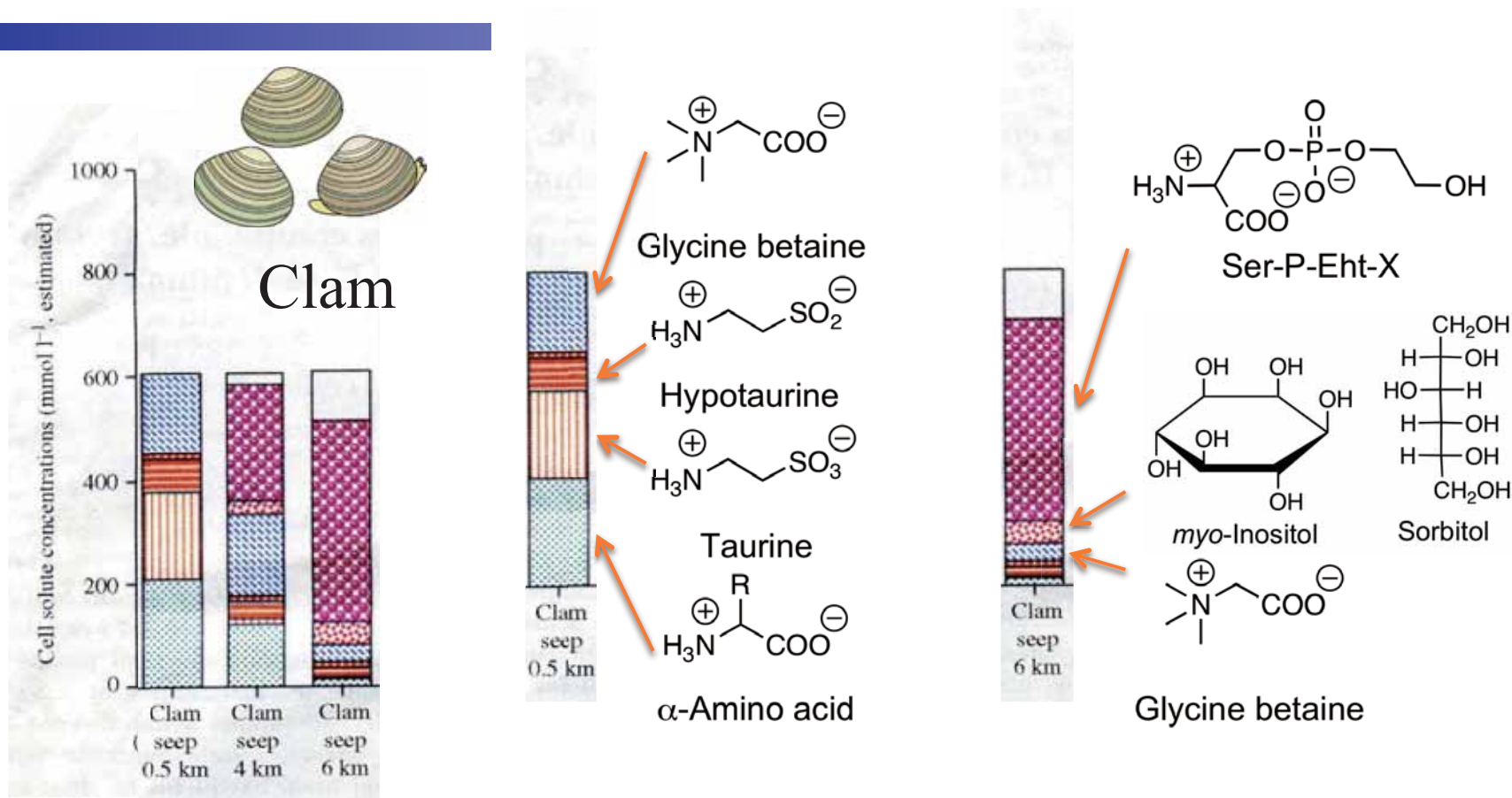
浸透圧の上昇以外にも多くの機能を担っている

研究背景3: 機能性代謝産物の化学構造



多くは分子内に対イオンを持っている

研究背景4： 代謝産物の構造と機能



種々の代謝産物を組み合わせて利用しているが、
生息環境によって産生される代謝産物に違いがある

なぜこのような構造の分子を、なぜ組み合わせて使うかは不明

これまでの研究

個々の機能性代謝産物の細胞内機能を詳細に解明してきた

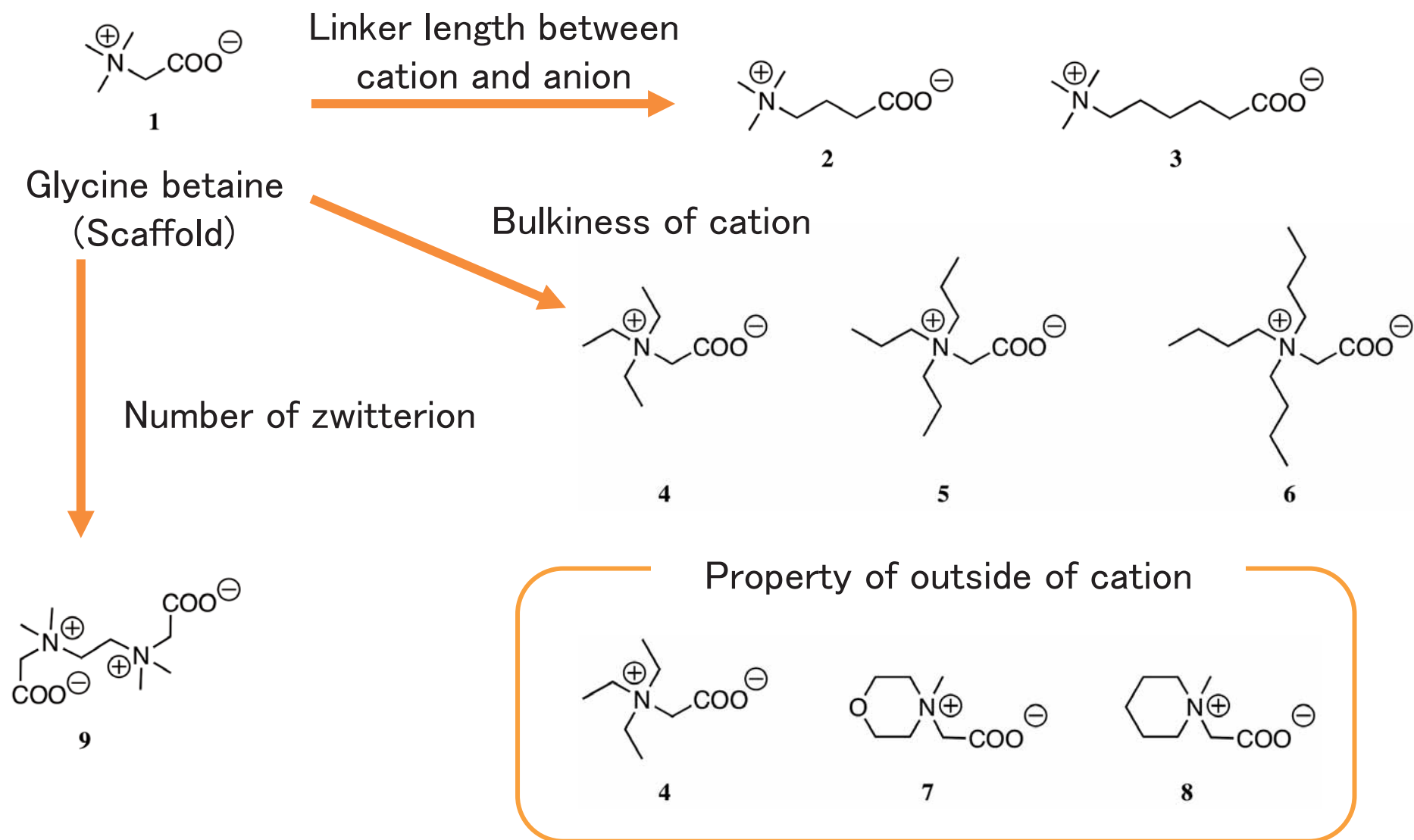
我々の研究

機能性代謝産物の化学構造と機能の相関をつかみ、代謝産物群が細胞内で行っている機能全体を解明



細胞機能や細胞内に含まれる生体高分子の機能を制御できる新規分子の開発にフィードバック

人工代謝産物ライブラリーの分子設計



発明の名称

核酸合成を促進する化合物を含む組成物およびその利用、並びに当該化合物の製造方法

- DNA二重鎖の構造を一切乱さずに、安定性のみを低下させる
- わずかに添加することでGC-richなゲノム配列のPCRを可能とする
- 塩のような夾雑物の混入の影響を受けない

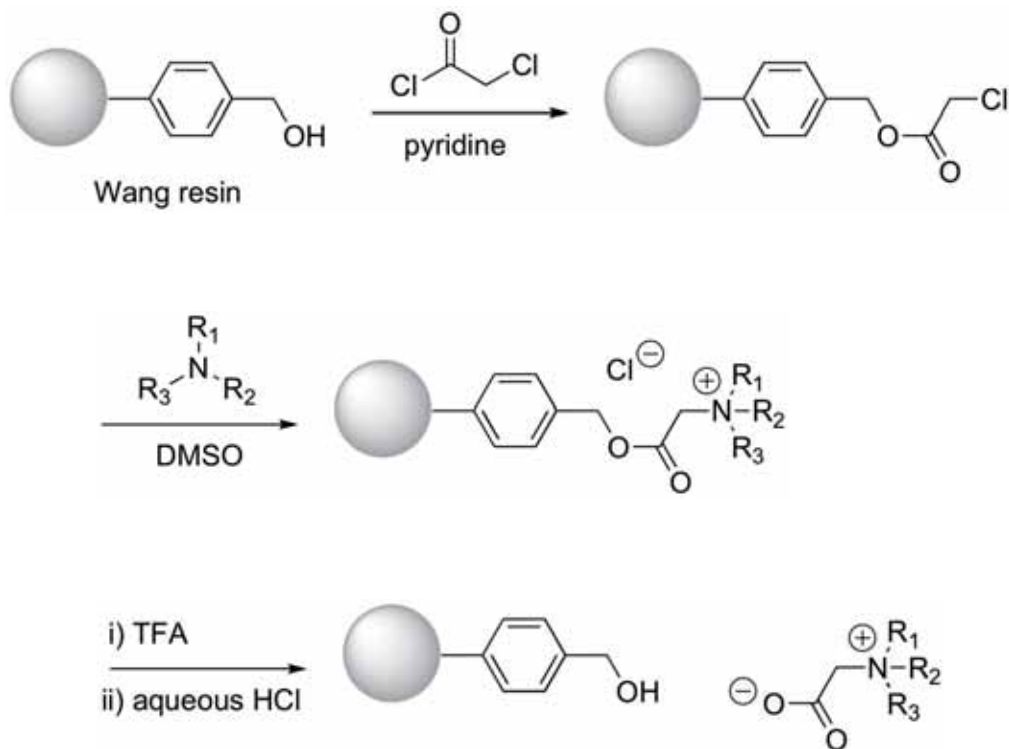
発明の名称

酵素活性を向上させるための組成物およびその利用

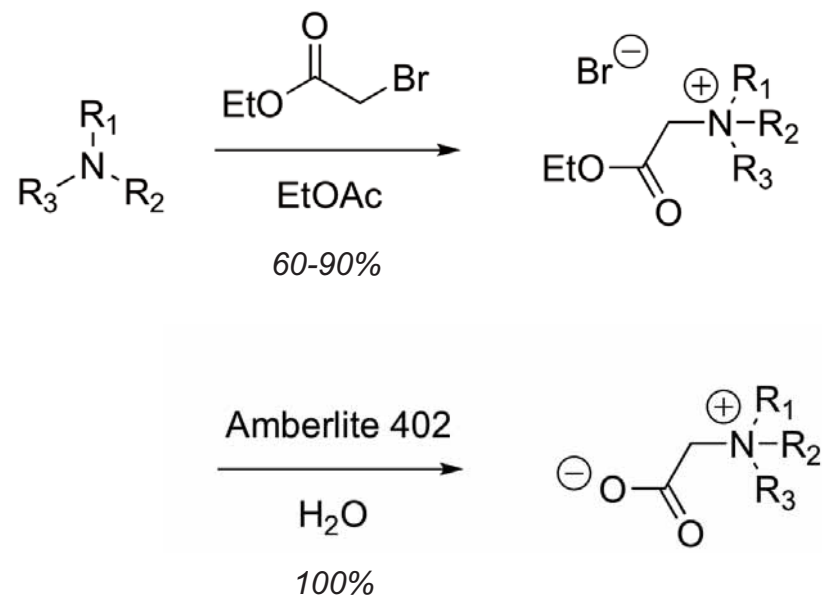
- 種々の酵素の反応速度を上昇
- 酵素の熱安定性を向上
- 酵素の基質結合性を向上
- 酵素の基質選択性を向上

未公開特許のため、実験データは発表でのみ紹介します。

既存の合成法 (固相合成)



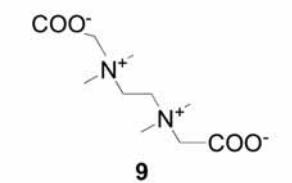
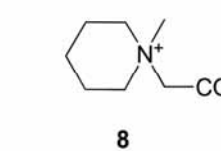
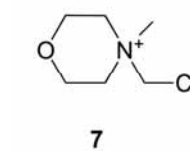
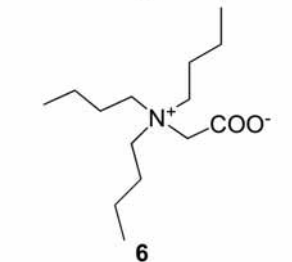
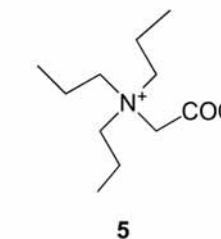
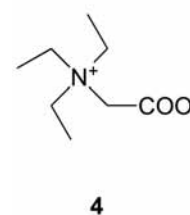
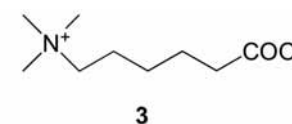
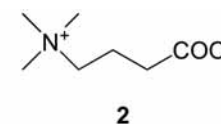
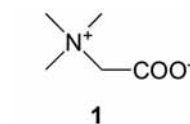
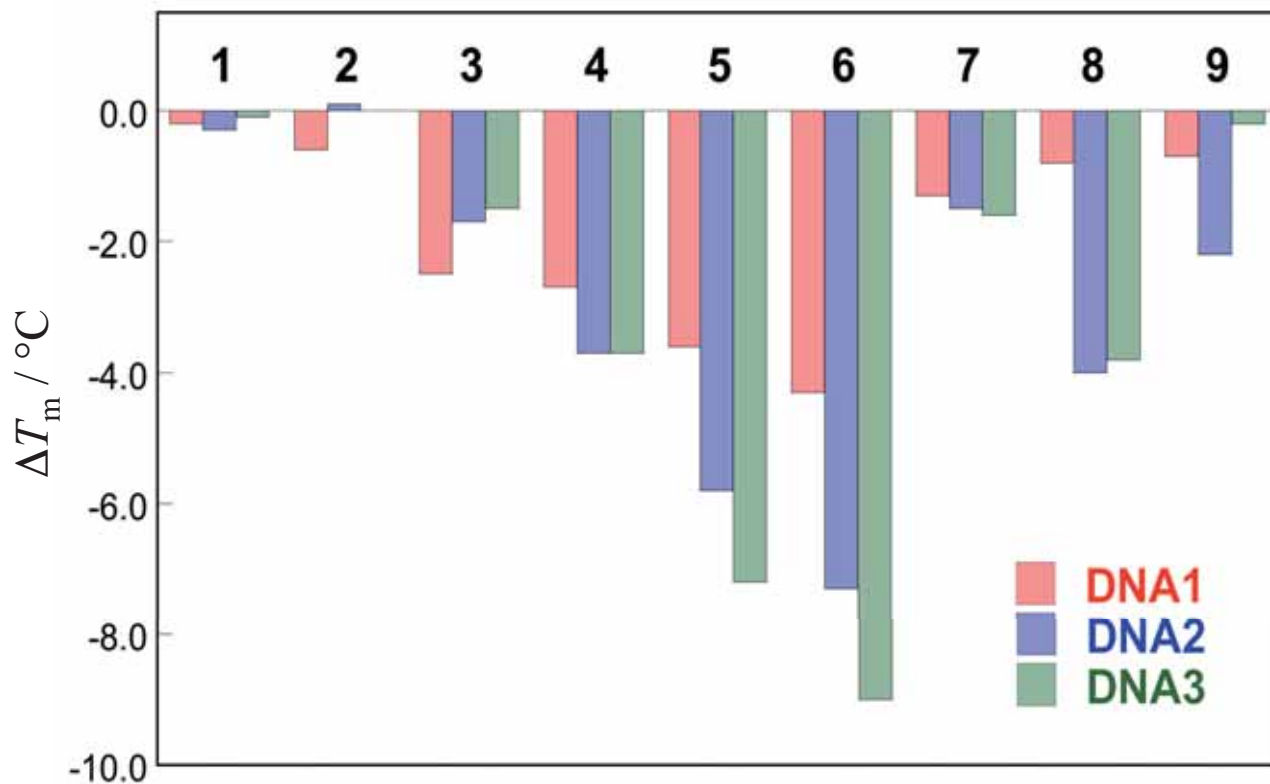
新規合成法 (液相、沈殿法)



高収率、簡便な大量合成法を確立

代謝物質の構造要件1 (生体分子の安定性)

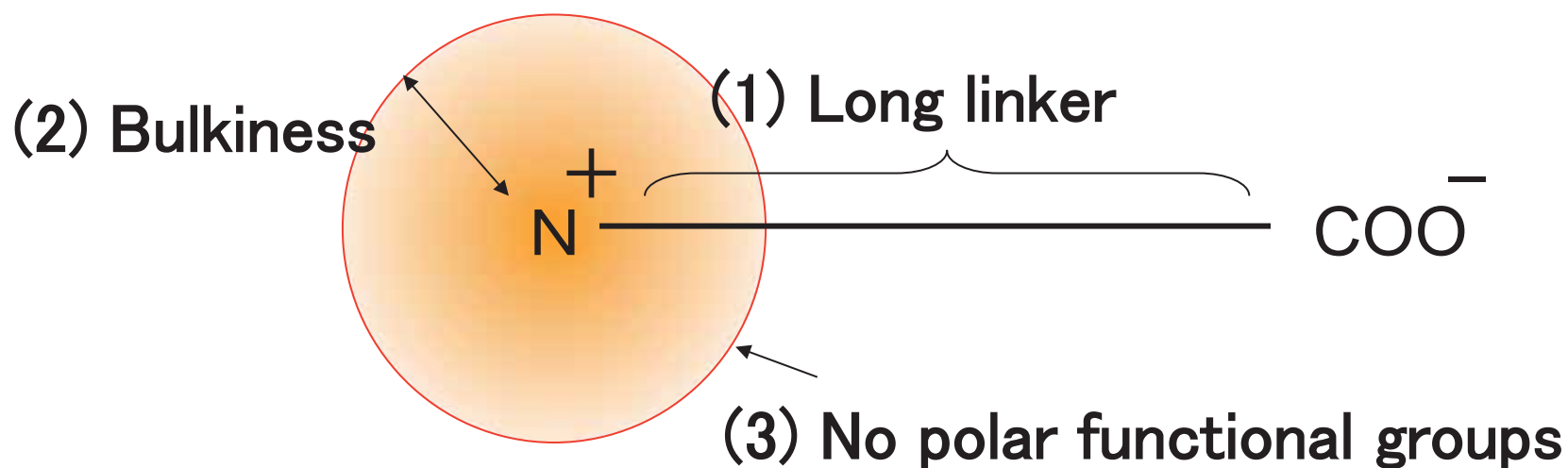
非存在下と0.5 Mの代謝物質存在下における融解温度差



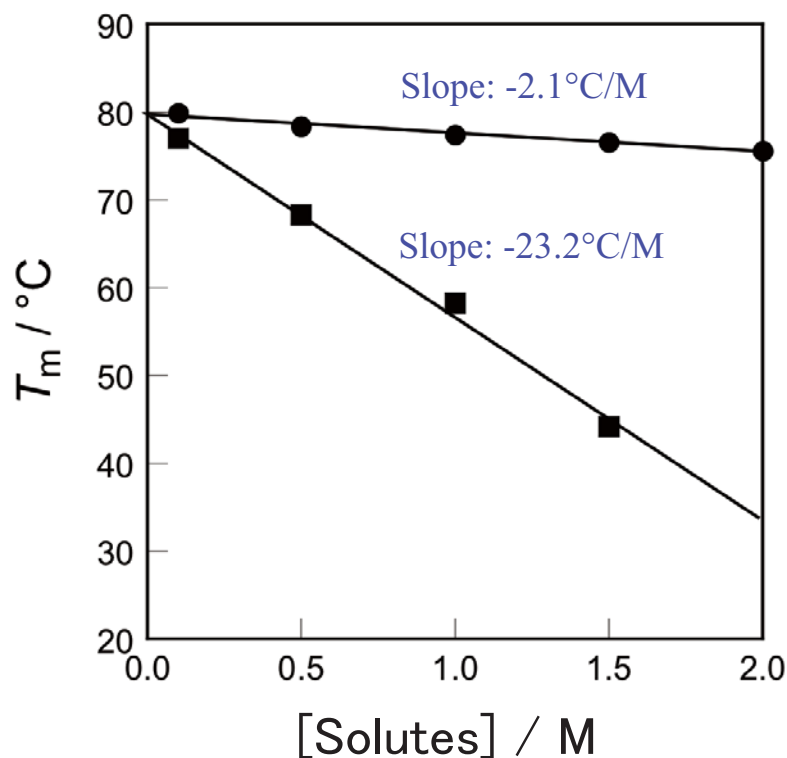
代謝産物の化学構造で安定性を制御可能

効果的な人工代謝産物のデザイン

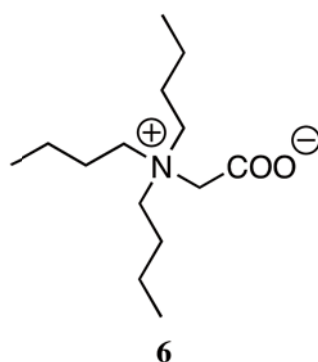
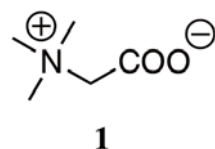
- カチオンとアニオンを連結するスペーサーが長いこと
- カチオンは嵩高い置換基で覆われていること
- カチオンを覆う置換基の外殻には極性の置換基がないこと



代謝物質濃度とDNA融解温度の低下の関係

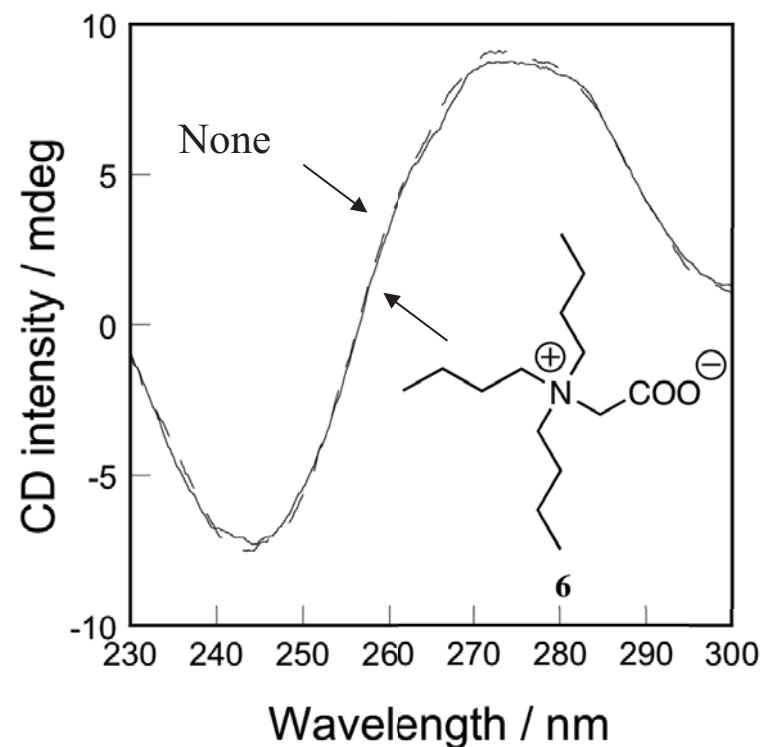


$M_w = 117.15$



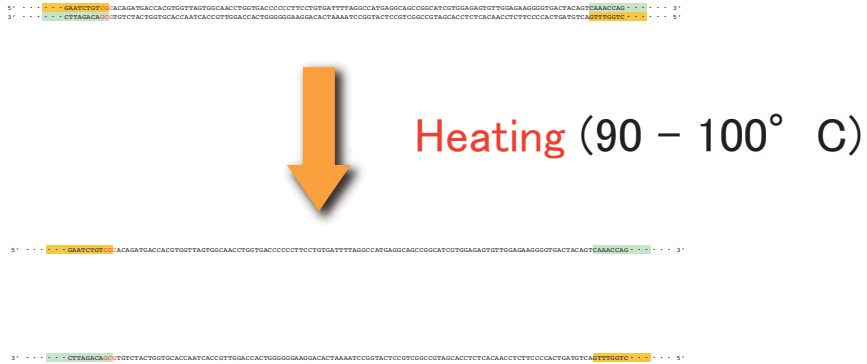
$M_w = 243.39$

代謝物質の添加に伴うDNA構造変化

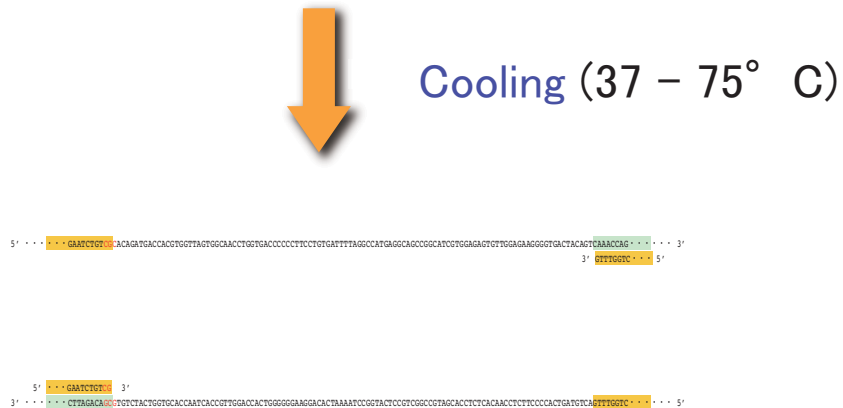


DNA二重鎖の不安定化は11倍向上するが、高次構造は変わらない

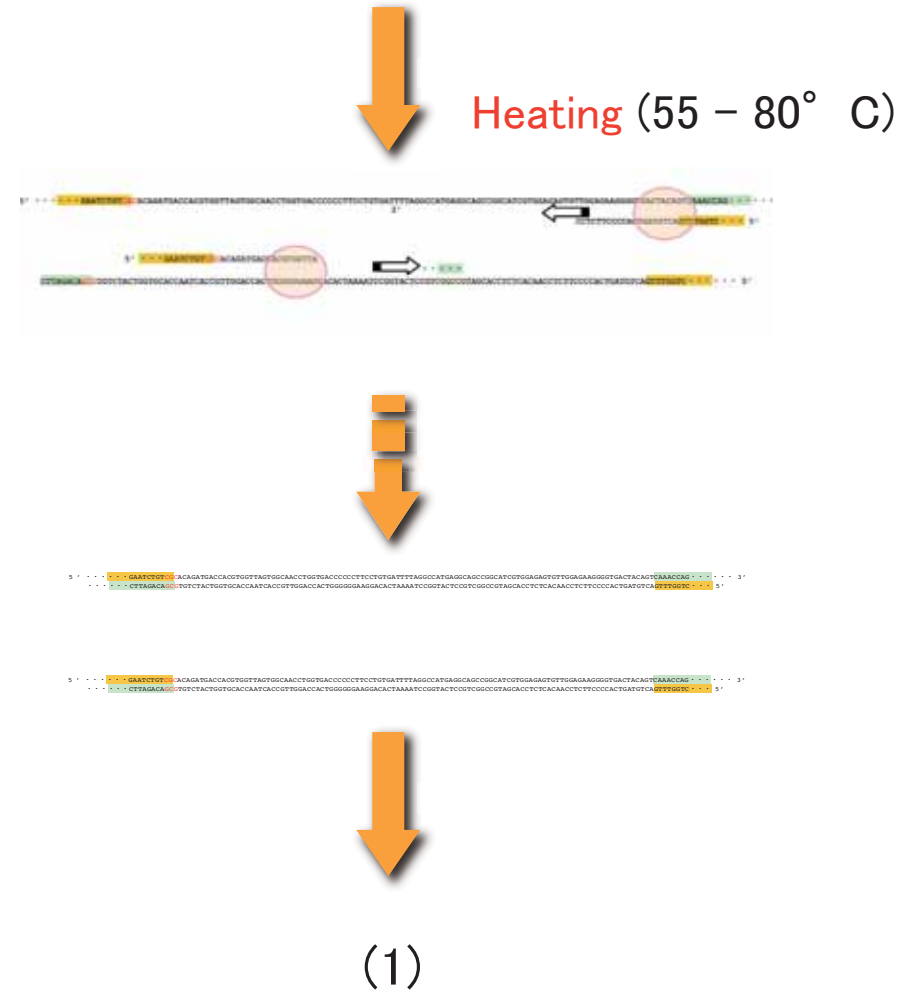
(1) Thermal denaturation



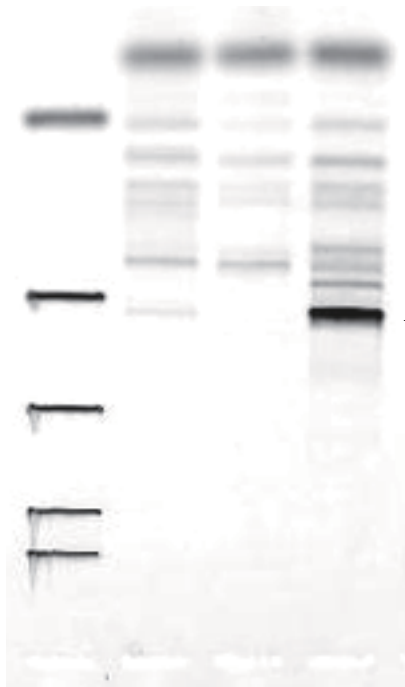
(2) Primer binding



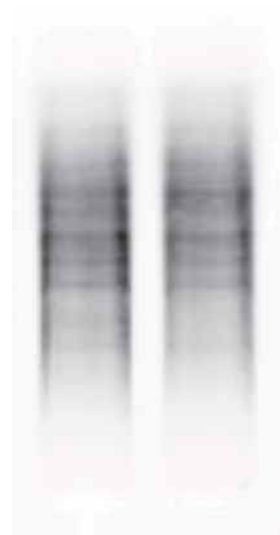
(3) Polymerase extension



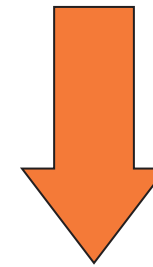
Undesired band



Smear band

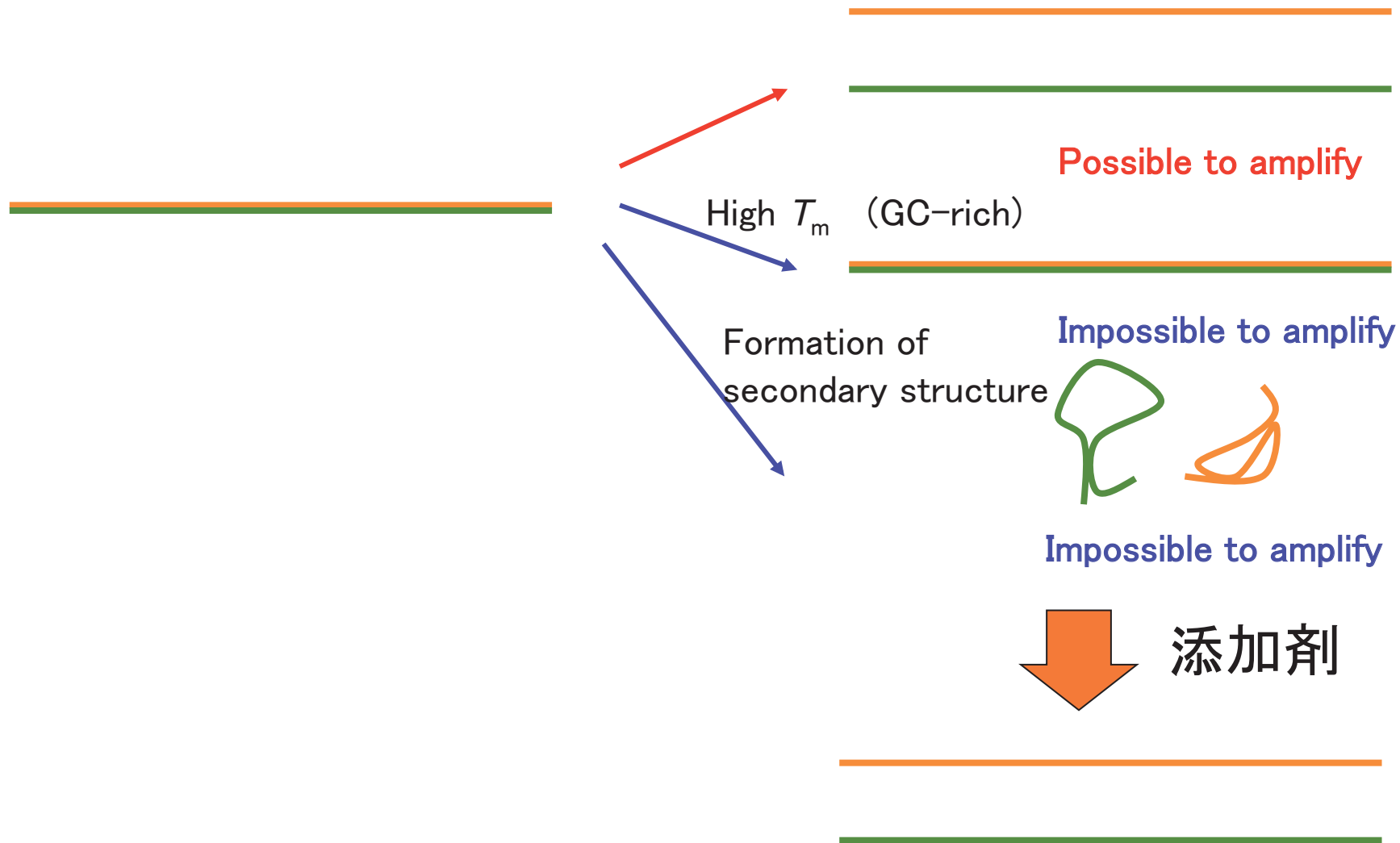


ラボレベルでの条件設定が必要

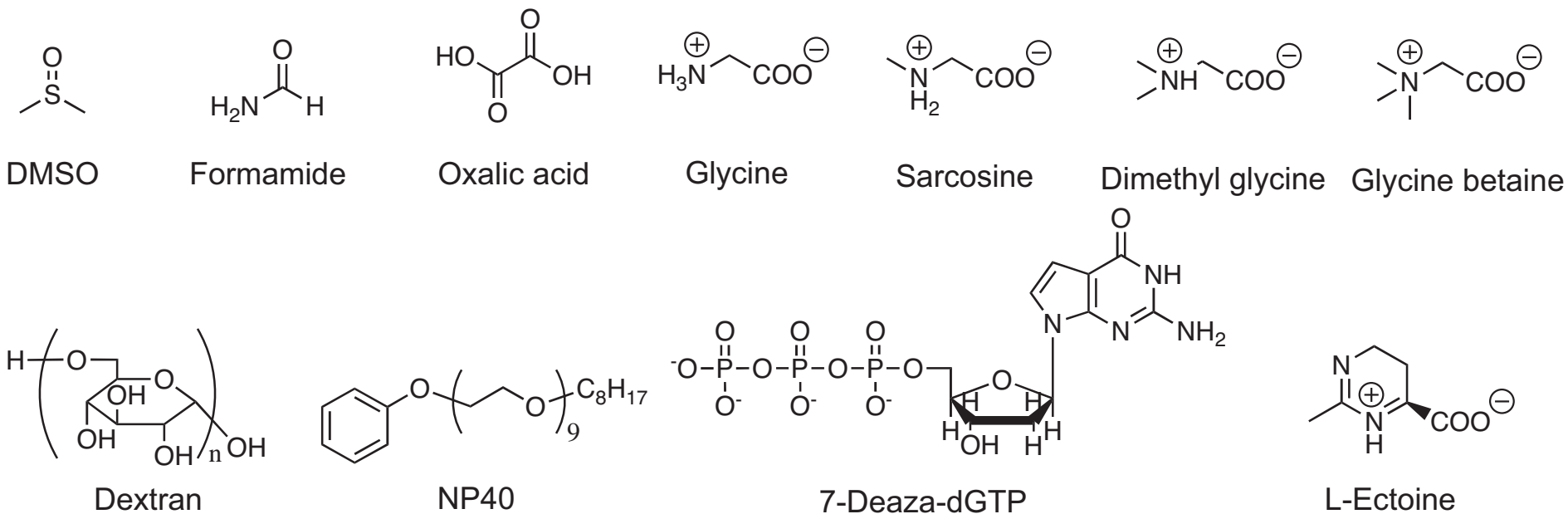


Annealing time and temperature
Primer concentration
DNA polymerase

PCRへの応用(高い融点領域と特殊な二次構造形成)

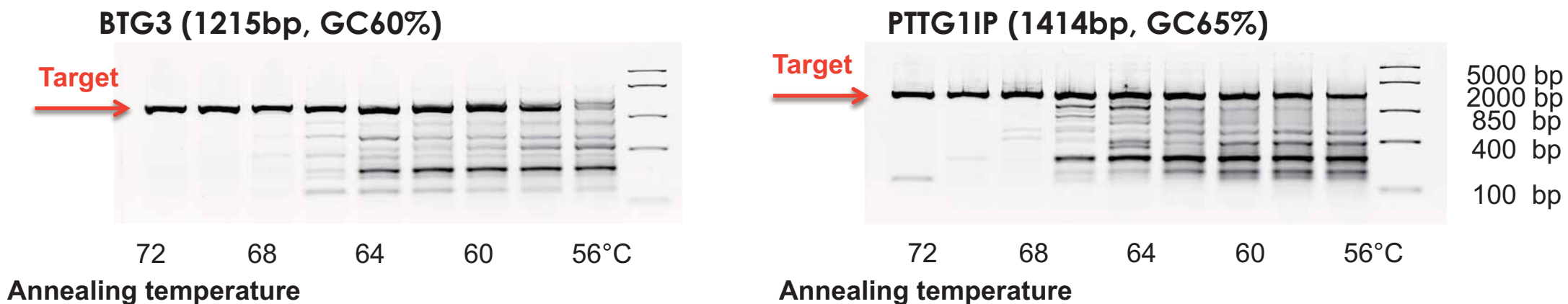


PCRへの応用(添付バッファーへ補助分子の添加)



合成代謝産物を添加剤として利用

PCRにおける増幅効果(ゲノム高GC領域の増幅)

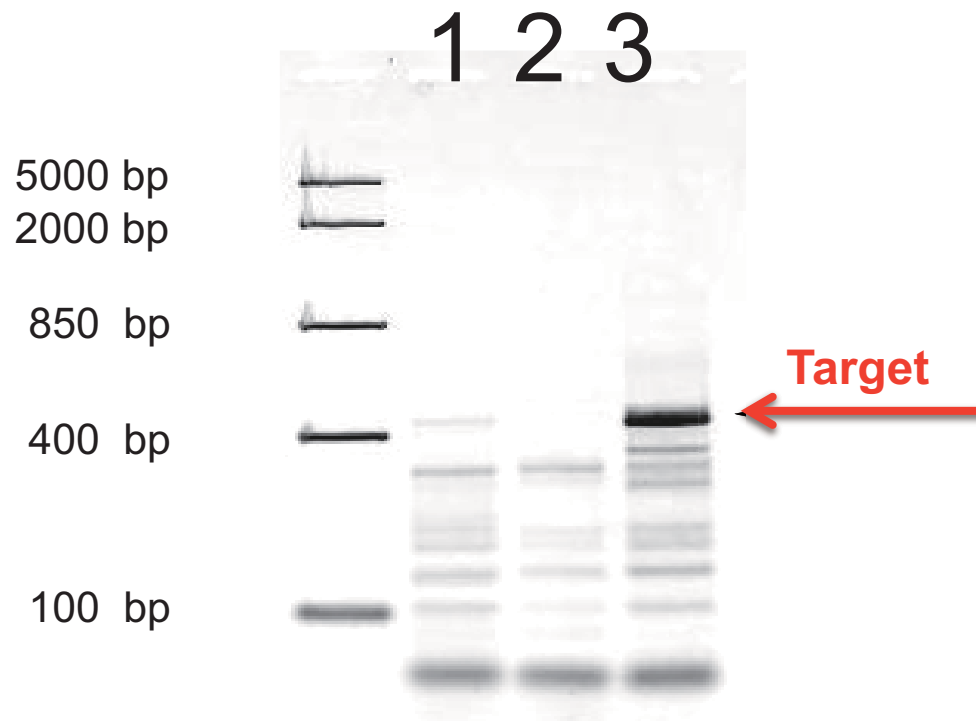


Conditions: [genomeDNA]=10 ng, [primerDNA]=0.2 μM each, [dNTP]=0.2 μM, [MgSO₄]=1.5 mM, [solute 6]=20 mM, [KOD polymerase]=1unit
 PCR cycle: 1 cycle; 95°C: 5 min, 40 cycle; 98°C: 15 s, annealing temperature: 30 s, 72°C: 30 s, 1 cycle; 72°C: 5 min.

高GC含量の領域でも増幅が確認

PCRにおける増幅効果(夾雑物の影響)

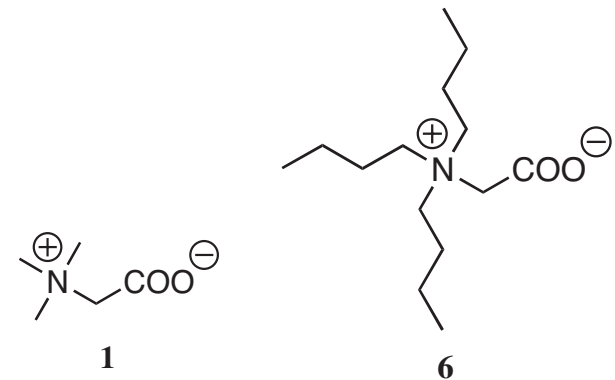
70 mMのNaCl共存下



Lane 1: None

Lane 2: Solute **1** (5 mM)

Lane 3: Solute **6** (5 mM)



Conditions: [genomeDNA]=10 ng, [primerDNA]=0.2 μ M each, [dNTP]=0.2 μ M, [MgSO₄]=1.5 mM, [KOD polymerase]=1unit
 PCR cycle: 1 cycle; 95°C: 5 min, 40 cycle; 98°C: 15 s, annealing temperature: 30 s, 72°C: 30 s, 1 cycle; 72°C: 5 min.

	新規酵素の探索	部位特異的変異法	添加剤、溶媒
利点	希望する化学反応を触媒できる酵素を探索可能	有益な酵素の安定性や活性を制御できる	既存のあらゆる酵素系に応用可能
欠点	酵素の安定性や活性、生産性に難がある場合がある	酵素ごとに個別の最適化を図る必要がある	添加剤の組み合わせや構造と効果の指針がない

特徴

新技術

- DNA二重鎖の熱安定性を低下
- PCRにおける難増幅配列の増幅促進
- 酵素の反応速度を上昇
- 酵素の熱安定性を上昇
- 酵素の基質結合性を上昇
- 酵素の基質選択性を上昇

- 添加剤には、最適構造がある
- 大量かつ、簡便に合成可能

- 夾雑物の影響を受けにくい

- 本技術の特徴は溶液に添加することで発揮される。
- 添加効果としては、熱安定性の上昇や低下、反応速度の上昇、基質選択性の向上などが挙げられる。
- 酵素を利用するものであれば基本的に適用することは可能と考えられる。

- **利用者・対象**

バイオ系酵素キットのメーカー
食品・化成品製造所など

- **市場規模**

利用用途に依存するが、安価で大量合成が可能であることと、添加することで効果を望めることから、用途が広がれば大きくなると考えられる。

- 他の酵素への効果を検討する必要有り。
- 最適な添加剤構造のスクリーニング

- 酵素を利用した化成品・食品製造プロセス、
酵素を使った分析キット開発に関連する企業
との共同研究を希望。

発明の名称 核酸合成を促進する化合物を含む組成物およびその利用、並びに当該化合物の製造方法

出願番号 特願2007-270700（特許公開2009-96766）

出願人 甲南学園

発明者 甲元一也、杉本直己

発明の名称 酵素活性を向上させるための組成物およびその利用

出願番号 特願2010-001986（出願日2010年1月7日）

出願人 甲南学園

発明者 甲元一也、出口瑛介

お問い合わせ先

甲南大学フロンティア研究推進機構 藤本 佳和

TEL 078-435-2463 FAX 078-435-2324

e-mail fujimoto@adm.konan-u.ac.jp