



医学への展開：化学との融合研究

超分子を使った全く新しい代謝物の迅速定量法の開発

上野将也 Masaya UENO 平尾 敦 Atsushi HIRAO

患者の診断や治療効果の評価において、代謝物の測定は極めて有用である。中でも尿は低侵襲で、最も一般的に利用される検体の1つである。しかし一部を除き、多くの代謝物の定量は質量分析計に依存しており、スループットの低さや高額な機器の必要性から、臨床現場での迅速なフィードバックには必ずしも適していない。筆者らは、超分子化学との融合研究として、センサー分子にピラーアレーンを用いることで、尿中のビタミン代謝物を数分で100検体同時に定量できる新しい測定法を開発した。本稿では、その原理と将来の展望について紹介する。

代謝物測定の課題と超分子化学によるアプローチ

生命活動は、糖質、脂質、アミノ酸、ビタミンなどの栄養素が体内で多様な酵素反応を経て代謝されることによって維持されている。これらの代謝経路は生体の恒常性を支える一方で、異常が生じれば疾患の原因となる。がんやメタボリックシンドロームといった加齢関連疾患では、糖・脂質代謝やエネルギー代謝の異常が密接に関与することが知られており、患者の代謝状態を正確に把握することは診断や治療に直結する課題である。

従来、代謝物の測定には質量分析計が広く用いられてきた。質量分析は物質を高精度に同定できる強力な手法であるが、装置が高価であること、熟練を要する

操作が必要であること、測定に時間を要することが大きな制約となる。臨床現場における迅速診断や大規模スクリーニングへの応用は容易ではなく、簡便かつ低コストで特定代謝物を直接検出できる新しい測定技術の開発が望まれてきた。

近年、超分子化学を基盤としたバイオセンサーがこの課題に対する新しいアプローチとして注目されている。分子認識能を持つホスト分子を設計し、特定の代謝物との結合を蛍光などの光学的変化として検出する手法は、従来の分析機器を補完あるいは代替する可能性を持つ。筆者らは、生越友樹先生らと協働し、水溶性ピラー[6]アレーンセンサー分子を用いることで、尿中のビタミン代謝物を数分で100検体同時に定量できる新しい測定法を開発した。本稿では、その原理と将来の展望について紹介する。

ピラーアレーンを用いた1-MNA測定法の確立

ナイアシンの代謝物1-メチルニコチンアミド(1-MNA)は、肝臓でニコチンアミドN-メチルトランスフェラーゼ(NNMT)により生成され、尿中に排出される。1-MNAは体内のナイアシン代謝の指標となるとともに、NNMTが多くのがんで高発現することから、がんの進展や悪性化のバイオマーカーとして注目されている。しかし、従来の測定法は質量分析計に依存しており、大規模スクリーニングには適さなかった。

この課題に対し、筆者らはカルボキシレート基を有する水溶性ピラー[6]アレーン(P6A)¹⁾を用いた測定法を確立した(図1)。P6Aは電子豊富な空洞を持ち、サイズと電荷が適合した「ゲスト」分子を取り込むこと

うえの・まさや

金沢大学がん進展制御研究所 助教

〔経歴〕2006年金沢大学大学院医学研究科修了、博士(医学)。同大学助教、大阪大学助教、海外特別研究員などを経て、現職。〔専門〕分子細胞生物学、腫瘍生物学、バイオセンサー開発。〔趣味〕音楽・舞台芸術の鑑賞、造形写真。

E-mail: masayaueno@staff.kanazawa-u.ac.jp



ひらお・あつし

金沢大学がん進展制御研究所、WPIナノ生命科学研究所 教授

〔経歴〕自治医科大学卒業後、臨床医として地域医療に従事。医学博士。トロント大学オントリオがん研究所博士研究員、熊本大学発生医学研究センター助手、慶應義塾大学医学部助手、同特別研究助教授を経て、2005年より金沢大学がん進展制御研究所教授、17年よりWPIナノ生命科学研究所教授。〔専門〕腫瘍生物学。〔趣味〕ミツバチの飼育・花粉の観察。

E-mail: ahirao@staff.kanazawa-u.ac.jp



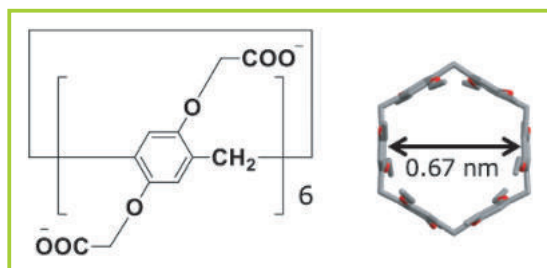


図1 ピラーアレーンの構造

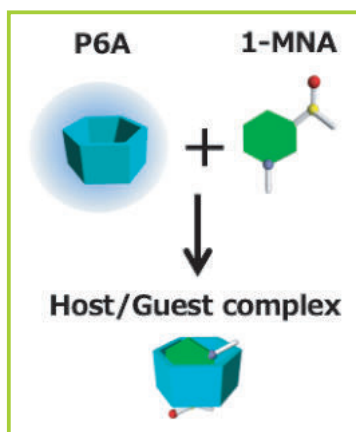


図2 1-MNAと結合するとP6Aの蛍光が消光する

ができる（ピラー[n]アレーンの構造や、空孔サイズによる会合定数の違いは本特集の生越先生の記事（本号 p. 858）を参考にされたい）。¹H NMR および等温滴定熱測定（ITC）解析により、P6A が 1-MNA と 1:1 の安定な錯体を形成することが明らかとなった。さらに、この結合に伴う蛍光消光を利用することで、検体に P6A を加えて蛍光を測定するだけでサンプル中の 1-MNA 濃度を定量できることも明らかになった（図 2）²⁾。

P6A は、ニコチンアミドや 1-MNA の酸化代謝産物である *N*-methyl-2-pyridone-5-carboxamide (2-py) とはほとんど結合せず、高い選択性を示した。加えて、NNMT 遺伝子を欠損したマウス（NNMT 酵素を全く作らないため尿中に 1-MNA を含まない）を用いた解析により、尿のように多様な代謝物が存在する条件下でも、P6A が 1-MNA を特異的に検出できることが実証され、質量分析法と同等の定量性を実現することが示された。

高感度化による迅速なナイアシン代謝物測定の実現

P6A による 1-MNA 測定法は簡便で高い選択性を示したが、検出感度の点では依然として限界があり、測定可能なサンプルは 1-MNA を高濃度を含むマウス尿

などに限定されていた。特にヒト由来試料や細胞培養液中に含まれる低濃度の 1-MNA を直接定量するには、さらなる改良が必要であった。

この課題に対して筆者らは、カルボキシレート基よりも酸性が強いスルホネート基を導入したピラー[6]アレーン（P6AS）を合成した。P6AS は 1-MNA との結合親和性が P6A の約 700 倍に達し、極めて強固なホスト-ゲスト複合体を形成することが明らかとなった³⁾。この結合強度の向上により、がん細胞が培養液中に産生する数 $\mu\text{mol/L}$ 程度の 1-MNA を直接定量することに成功した。

さらに、未精製のヒト尿試料を対象とした検討では、P6AS による蛍光測定値が質量分析計による定量値と高い相関を示し、複雑なサンプルに対しても前処理なしで適用可能であることが確認された。すなわち、P6AS の導入によって、従来法では困難であった低濃度域での 1-MNA 検出が可能となり、実用的な測定感度と汎用性が大幅に向上した。

臨床応用・今後の展望

NNMT は、 NAD^+ （ニコチンアミドアデニンジスクレオチド）代謝異常を来す疾病、特に、がん、老化、生活習慣病などの病態に関与するため、これらの疾病のバイオマーカー候補として期待されてきた。しかし、その臨床的意義はいまだ十分に明らかではなく、1-MNA 測定を用いた診断法は確立されていない。筆者らは、最近、1-MNA 測定を基盤とする NAD^+ 代謝可視化システムを開発し（特許出願済み）、アルコール摂取に伴う肝臓の代謝ストレスを非侵襲的に捉えられることを見だし、適正飲酒指標の開発へと展開している。さらに、肝疾患患者やサルコペニア患者を対象とした臨床試験も実施中である。1-MNA に対する超分子バイオセンサーの開発も併せて実施することで、医療現場で有用な診断ツールとしての応用を目指している。これらの技術開発は、 NAD^+ 代謝異常を指標とする臨床応用や老化研究に資するものであり、健康寿命の延伸に大きく貢献する可能性がある。

1) T. Ogoshi et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5022.

2) M. Ueno et al., *Commun. Chem.* **2020**, 3, 183.

3) M. Ueno et al., *Anal. Chem.* **2024**, 96, 14499.