

《様式B》

研究テーマ 「昆虫の異物代謝能力に着目した機能性ナノカーボン材料の開発」

研究責任者 所属機関名: 東海国立大学機構名古屋大学

官職又は役職: 特任助教

氏名: 宇佐見 享嗣

メールアドレス: usami.atsushi.y5@f.mail.nagoya-u.ac.jp

共同研究者 所属機関名

官職又は役職

氏 名

(令和5年度募集) 第36回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1,000字程度)

本研究の目的は「昆虫の異物代謝能力に着目した機能性ナノカーボン材料の開発」である。ナノカーボン材料は、我が国が世界をリードしている研究領域であり、興味深い物性を有した次世代マテリアルである。これらは位置選択的に官能基を付与することで新物性や機能が見出され、近年では生物医学用途への応用も期待されている。しかし、多くのナノカーボン分子は同程度の反応性を有する反応点が存在するため、位置選択的に直接官能基化が可能な分子が限られており、依然として反応開発が強く求められている。

研究代表者は、位置選択的な誘導体生産が可能な生体触媒が有効と考え、特異的な生物機能を有するハスモンヨトウ幼虫による生物変換を実施してきた。ごく最近、ナノカーボン材料の部分構造にあたるベルト状ナノカーボン分子([6]MCPP)を生物変換し、位置選択的に一酸素原子が挿入した新規化合物[6]MCPP-oxylene を得ることに世界で初めて成功した。また、ハスモンヨトウ幼虫による[6]MCPPの生物変換には、異物代謝酵素シトクロム P450 (CYP) の関与を見出し、ドッキングシミュレーションにより[6]MCPP が CYP の結合ポケットに安定的に収まることを確認した。これら背景から、申請者は生物変換の対象をナノカーボン材料にまで拡張できると考えた。

本研究では、[6]MCPP と同程度の直径を有し位置選択的な機能化が困難な球状ナノカーボン材料フラーレンをハスモンヨトウ幼虫により生物変換し、新奇機能性ナノカーボン材料創製を試みた。その結果、C₆₀ フラーレンは反応が進行せず、C₇₀ フラーレンは微量ではあるがいくつか誘導体の存在を確認した。単離精製が困難だったため、標的分子をリング状ナノカーボン ([n]CPP; n = 5-12) に変更し同実験を試みた。その結果、面白いことに[6]CPP のみ誘導体として [6]CPP-oxylene が得られた。また、反応に関与する酵素が[6]MCPPの時とは異なることも見出した。これら新規化合物は現状の有機合成では生産困難であることも実証した。

本研究にて創出された革新的なナノカーボン材料により、触媒・材料開発の自由度が広がり、更なるナノカーボン材料の飛躍・展開が期待される。

2. 実施内容および成果の説明

研究の方法と実施内容

これまでの研究から、ハスモンヨトウ幼虫による[6]MCPP から [6]MCPP-oxylyene への生物変換反応 (図 1) にはシトクロム P450 (CYP) の関与を明らかにしている (図 2)。また、ドッキングシミュレーションにより CYP の結合ポケットには十分な空間が存在し、[6]MCPP が安定的に収まることを確認している (図 3)。本研究では、[6]MCPP と同程度の直径を有し、対称性が高いことから位置選択的な機能化が困難な球状ナノカーボン材料のフラーレン 2 種類 (C₆₀ および C₇₀, 図 4) をハスモンヨトウ幼虫により生物変換することで新奇ナノカーボン材料を創製し、その機能性を明らかにすることを旨とする。目的達成のため研究を以下の 2 段階にて遂行した。

1. ハスモンヨトウ幼虫を用いた生物変換によるフラーレン誘導体の生産

基質である 2 種のフラーレン (0.1 mg/匹) は溶解せずに煮豆と寒天を組成とする人工飼料 (2.0 g/匹) へそれぞれ直接混合する。人工飼料は、図 5 に示すように発育後期のハスモンヨトウ幼虫へ経口投与し生物変換

を 1 から 2 日間実施する。代謝物は 12 時間おきに回収する。回収した代謝物はトルエンにて抽出し、フラーレン誘導体生産の有無を確認する。評価には TLC や NMR、MALDI-TOF MS を使用する。誘導体が確認できた抽出物は、サイズ排除クロマトグラフィーや分取 TLC で単離精製し X 線結晶構造解析により構造決定する。また、[6]MCPP の生物変換で進行した代謝反応の第 I 相反応である一酸素付加反応だけでなく、第 II 相反応であるグルクロン酸やアミノ酸、グルタチオンとの抱合反応が進行する可能性がある。その場合は、誘導体の構造決定だけでなく、代謝関連酵素遺伝子の推

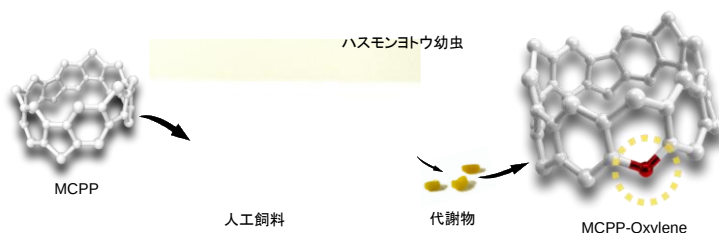


図1. ハスモンヨトウ幼虫による MCPP の生物変換反応

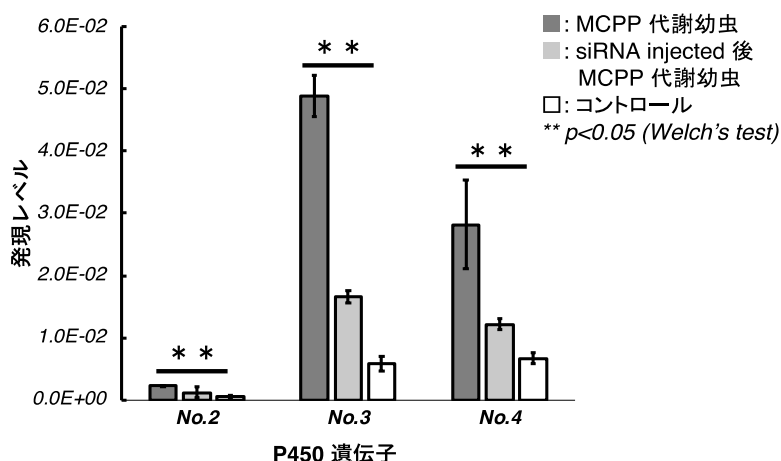


図2. MCPP 生物変換の関与が示唆される P450 遺伝子の発現量比較

siRNA injection により遺伝子発現量が減り MCPP-Oxylyene 生産能が低下した

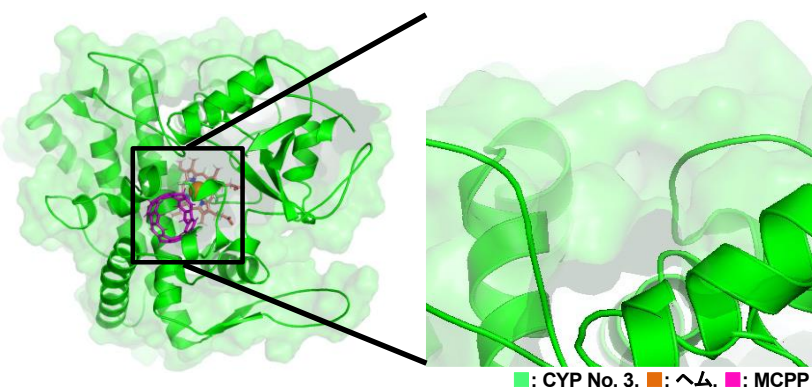


図3. CYP No.3 と MCPP とのドッキングシミュレーション

定を実施する。推定には、フラーレン混入人工飼料を摂取した発育後期のハスモンヨトウ幼虫から total RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行う。コントロールには、フラーレンを含有しない人工飼料を摂取したハスモンヨトウ幼虫の total RNA を使用する。第 II 相反応への関与が示唆される酵素群の発現量を比較し、フラーレンの抱合反応に関与する遺伝子を探査する (図 6)。候補遺伝子を標的とする siRNA を用いた RNAi 法を発育後期のハスモンヨトウ幼虫へ実施することでノックダウン個体を作成する (図 7)。作成したノックダウン個体を生体触媒に使用し、フラーレンに対する生物変換能の欠失を確認することで反応に関与する遺伝子を同定する。この研究過程では、**ハスモンヨトウ幼虫におけるフラーレンの生体内動態を詳細に理解したい。**

2. フラーレン誘導体の機能性評価

フラーレンは従来の有機化合物とは骨格から異なる構造なため様々な物理的・科学的特徴を有する。また、縮合芳香環化合物としての毒性がないことから、その誘導体は有機材料としてだけでなく生物活性などの点においても機能性が注目される。有機材料としては蛍光特性や溶解性を評価し、生物活性評価には抗酸化試験や抗炎症試験、抗菌試験を実施することでフラーレン誘導体の新奇な機能性を見出す。これら検討を通じて、**ナノカーボン科学と昆虫科学の独創的・先駆的な融合を強力に推進し学術的な知見を蓄積する。**

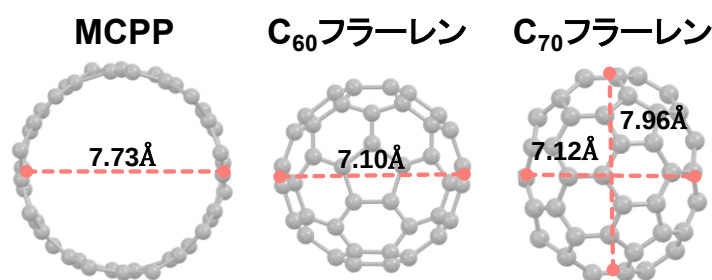


図4. MCPP とフラーレンのサイズ比較

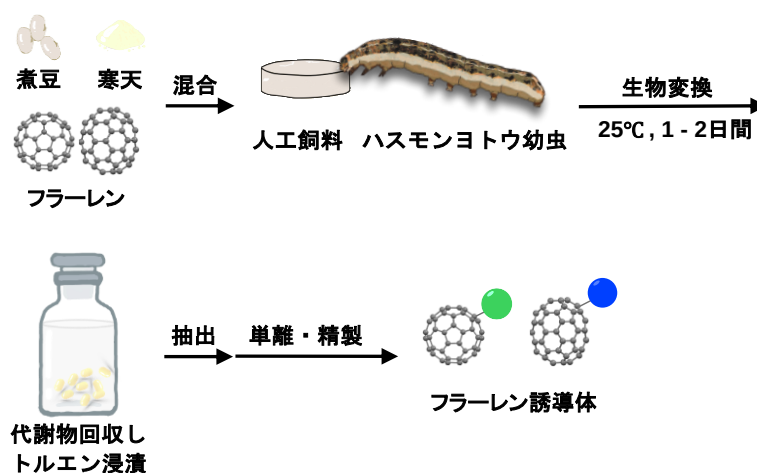


図5. フラーレンのハスモンヨトウ幼虫による生物変換反応

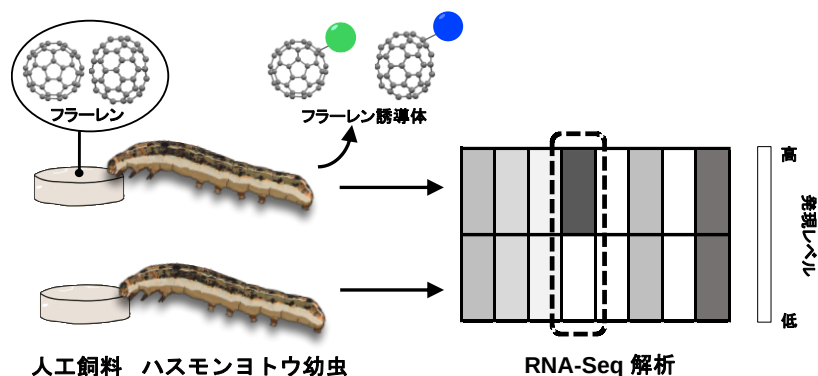


図6. フラーレンの生物変換反応に関わる酵素遺伝子の探索



図7. RNAi 法によるノックダウン個体の作成

3. 研究を進めるうえで発生した困難な点、新たな課題

2 種のフラーレンを経口投与させることに成功したが、誘導体は C₇₀ フラーレンからのみ数種が得られた。C₆₀ フラーレン由来の誘導体を得られなかった理由として分子サイ

ズが[6]MCPPよりも小さいことが挙げられた。そのため、基質のサイズ依存性を明らかにする必要がある。また、[6]MCPPの環サイズが異なる分子の市販化は達成されていない。そこで、[6]MCPPと類似の環サイズおよび異なる環サイズが容易に入手可能なカーボンナノリング ([*n*]CPP; *n* = 5~12) を基質に使用した。その結果、面白いことに[6]CPPのみ誘導体として [6]CPP-oxylene が得られ、他の CPP は反応が進行しなかった。また、反応に関与する酵素が[6]MCPPの時とは異なることを実験的に見出した。これら新規化合物は現状の有機合成では生産困難であることも実証した。

また、反応機構を明らかにすべく、計算科学者らと連携し、量子化学計算を実施した。その結果、一酸素原子挿入のメカニズムとして、分子に直接挿入されるという通常とは異なる反応形態であることも見出した。

5. この研究が社会経済の発展にどのように役に立つのか。

本研究は、**これまで有機合成的手法や物理的手法による合成・変換が「常識」であった分子ナノカーボン分野に「生体触媒を用いた機能分子生産」という新たなオプションを提示する大きな第一歩**である。本研究遂行にて蓄積する基盤確立に向けた知見は、分子ナノカーボンだけでなくあらゆる分子が対象となる。このことから、分子ナノカーボンを始めとした分子の新たな方向性として化学・物理・生物関連の幅広い分野に対し更なる応用が容易に考えられ、大きなブレイクスルーをもたらすことが期待できる。故に近い将来、従来法とは一線を画す生産方法として新産業の創出・イノベーションの促進に大きく貢献することが見込まれる。したがって、本研究にてバイオ生産プロセスが確立された暁には、自然環境との調和・共存を目指す持続可能社会を実現しうるツールの一つになるとともに、機能性物質はホスト・ゲスト化学やバイオイメージングといった生物医学用途への応用など分野を越えた人間活動の一助となる重要な学術的知見および社会の重要課題解決への貢献が期待される。