

# 令和8年度特色入試問題

《薬学部》

## 論文試験

200点満点

(注意)

1. 問題冊子および解答冊子は係員の指示があるまで開かないこと。
2. 問題冊子は表紙のほかに16ページある。
3. 解答冊子は表紙のほかに、下書き用紙を含め11ページある。
4. 試験開始後、解答冊子の表紙所定欄に受験番号・氏名をはっきり記入すること。  
表紙には、これら以外のことを書いてはならない。
5. 解答はすべて解答冊子の指定された箇所に、日本語で記入すること。
6. 解答に関係のないことを書いた答案は無効にすることがある。
7. 解答冊子は、どのページも切り離してはならない。
8. 問題冊子は持ち帰ること。解答冊子は持ち帰ってはならない。

## 問題 I

資料 1 および資料 2 に関する問 1 ～問 5 に答えなさい。

問 1 以下の文章は、資料 1 下線①の具体的な内容の一例を述べたものである。文中の空欄に適切な数値を入れなさい。

200 アミノ酸からなる酵素に対応する DNA ライブラリの作製を考える。相当する長さの塩基配列は、その組み合わせを完全に網羅すると  通り存在する。DNA 1 塩基対の平均分子量を 660 とした場合、先の組み合わせを 1 分子ずつ含む 2 本鎖 DNA の合計質量は  g となり、実験室レベルでは取り扱いが困難である。

計算の際には、 $\log_{10}2 = 0.301$ 、 $\log_{10}3 = 0.477$ 、 $\log_{10}5 = 0.699$  を用いなさい。

問 2 下線①の課題を克服するために、Manfred Eigen は、directed evolution を提案した。この directed evolution はどのような方法か、自然界の進化過程と対応させて具体的に説明しなさい。

問 3 directed evolution の概念の実現に貢献した技術を本文中から 2 つ取り上げ、それぞれの特長について説明しなさい。

問 4 Figure 3 は、3 サイクルのライブラリの作製とスクリーニングの結果を示したものである。これに関する以下の (1) ～ (3) に答えなさい。

(1)  $S_NAr1.3$  の見かけの反応速度は、 $S_NAr1.0$  のそれに対して何倍向上したか。

(2) (1)の反応速度の変化に加えて、3 サイクルの変異導入によって酵素の触媒作用の特性はどのように変化したか。

(3) (2)の変化はどのような機序によって生じたと想像されるか。

問 5 現在の医薬品開発の課題を 2 つ挙げ、directed evolution によって、それらがどのように解決できるか、あなた自身の考えを述べなさい。

## 資料 1

次の文章は、Frances H. Arnold 博士、George P. Smith 博士、Gregory P. Winter 博士の 3 氏が 2018 年にノーベル化学賞を受賞した際の解説記事の一部である。

資料 1 は出典のみ公開する。

(出典)

Authors: The Royal Swedish Academy of Sciences

Source: Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2018 (一部改変)

(注釈)

\*<sup>1</sup>iterative: 反復の; \*<sup>2</sup>versatility: 多用途性; \*<sup>3</sup>subtilisin E: タンパク質分解酵素の一種; \*<sup>4</sup>seminal: 影響力の強い; \*<sup>5</sup>error-prone: エラーを起こしやすい; \*<sup>6</sup>halo: コロニー外周上に出現する円周状の透明な帯; \*<sup>7</sup>propagate: 伝播する; \*<sup>8</sup>immunoglobulin: 免疫グロブリン; \*<sup>9</sup>de novo: 新しい、最初からの; \*<sup>10</sup>enantio-selectivity: 鏡像異性体選択性; \*<sup>11</sup>chiral: 鏡像異性の; \*<sup>12</sup>*Pseudomonas aeruginosa*: 緑膿菌

## 資料 2

次の文章は、“directed evolution” を実践した 2025 年の学術研究論文「Engineered enzymes for enantioselective nucleophilic aromatic substitutions」の要旨であり、Figure 3 はその実験結果の一部である。

### 【要旨】

Nucleophilic<sup>\*1</sup> aromatic substitutions ( $S_NAr$ ) are among the most widely used processes in the pharmaceutical and agrochemical industries, allowing convergent assembly of complex molecules through C–C and C–X (X = O, N, S) bond formation.  $S_NAr$  reactions are typically carried out using forcing conditions, involving polar aprotic<sup>\*2</sup> solvents, stoichiometric<sup>\*3</sup> bases and elevated temperatures, which do not allow for control over reaction selectivity. Despite the importance of  $S_NAr$  chemistry, there are only a handful of selective catalytic methods reported that rely on small organic hydrogen-bonding or phase-transfer catalysts<sup>\*4</sup>. Here we establish a biocatalytic approach to stereoselective  $S_NAr$  chemistry by uncovering promiscuous<sup>\*5</sup>  $S_NAr$  activity in a designed enzyme featuring an activated arginine. This activity was optimized over successive rounds of directed evolution to afford an engineered biocatalyst,  $S_NAr1.3$ , that is 160-fold more efficient than the parent and promotes the coupling of electron-deficient arenes<sup>\*6</sup> with carbon nucleophiles with near-perfect stereocontrol (>99% e.e.).  $S_NAr1.3$  can operate at a rate of  $0.15\text{ s}^{-1}$ , perform more than 4,000 turnovers and can accept a broad range of electrophilic<sup>\*7</sup> and nucleophilic coupling partners, including those that allow construction of challenging 1,1-diaryl quaternary stereocentres. Biochemical, structural and computational studies provide insights into the catalytic mechanism of  $S_NAr1.3$ , including the emergence of a halide<sup>\*8</sup> binding pocket shaped by key catalytic residues R124 and D125. This study brings a landmark synthetic reaction into the realm of biocatalysis to provide an efficient and versatile platform for catalytic  $S_NAr$  chemistry.

【実験結果】

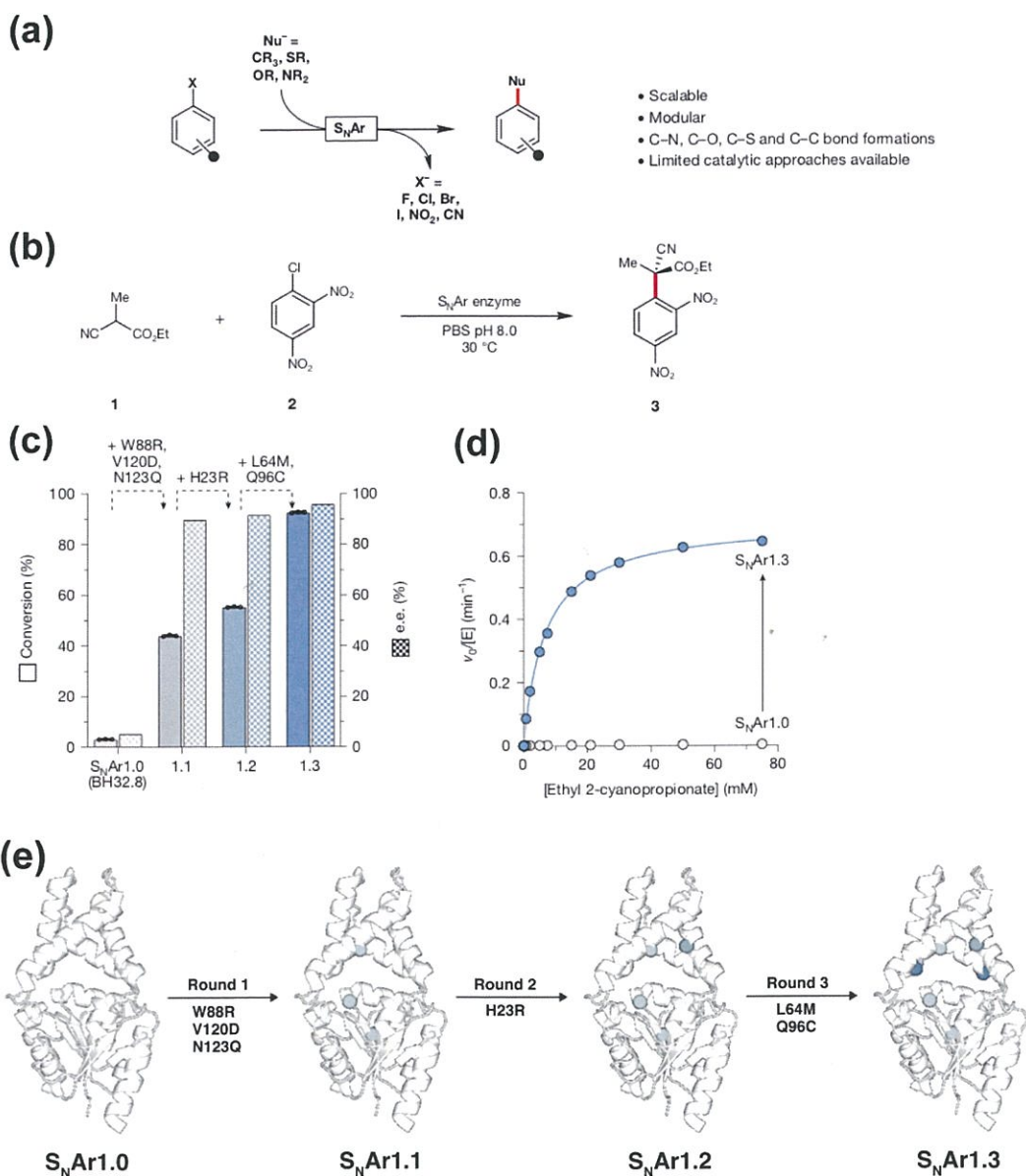


Figure 3. S<sub>N</sub>Ar reactions and directed evolution of an enantioselective S<sub>N</sub>Ar enzyme.

- (a) S<sub>N</sub>Ar reactions involve the coupling of aromatic electrophiles with diverse nucleophilic coupling partners.
- (b) Chemical scheme showing the target S<sub>N</sub>Ar reaction between ethyl 2-cyanopropionate (**1**) and 2,4-dinitrochlorobenzene (**2**), generating product **3** containing an all-carbon quaternary carbon centre. The S<sub>N</sub>Ar enzymes developed preferentially produce the *R*-isomer of **3**.
- (c) Bar chart showing reaction conversion (solid bars) and selectivity (patterned bars) achieved by S<sub>N</sub>Arase variants along the evolutionary trajectory. Reaction conditions: **1** (25 mM), **2** (2.5 mM),

S<sub>N</sub>Ar variant (75 μM) in phosphate buffered saline (PBS) pH 8.0 with 10% (v/v) dimethyl sulfoxide as a co-solvent, 16 h at 30 °C.

(d) Michaelis–Menten kinetic analysis of S<sub>N</sub>Ar1.0 to S<sub>N</sub>Ar 1.3 show a 160-fold improvement in  $k_{\text{obs}}$  following evolution ( $0.0040 \pm 0.0002 \text{ min}^{-1}$  and  $0.65 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$  for S<sub>N</sub>Ar1.0 and S<sub>N</sub>Ar1.3, respectively). Assays were performed at a fixed concentration of **2** (2.5 mM) and varying concentrations of **1** (3.5–75.0 mM).

(e) Schematic showing the trajectory from S<sub>N</sub>Ar1.0 to S<sub>N</sub>Ar1.3. Mutations introduced are represented as colored spheres. Three rounds of evolution afforded S<sub>N</sub>Ar1.3, which contains six mutations.

(注釈)

\*<sup>1</sup>nucleophilic: 求核性の; \*<sup>2</sup>aprotic: 非プロトン性の; \*<sup>3</sup>stoichiometric: 化学量論的な;

\*<sup>4</sup>phase-transfer catalysts: 相間移動触媒; \*<sup>5</sup>promiscuous: 無差別の; \*<sup>6</sup>arene: 芳香族炭化水素;

\*<sup>7</sup>electrophilic: 求電子性の; \*<sup>8</sup>halide: ハロゲン化合物

(出典)

Authors: Thomas M. Lister et al.

Source: Nature, Vol. 639, 375–381 (2025) (本文および補足資料を一部改変)

<白紙>

## 問題 II

資料 1 および資料 2 に関する問 1～問 6 に答えなさい。

### 【注記】

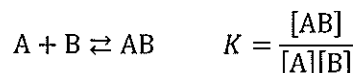
- ・ インスリンは、細胞表面のインスリン受容体に結合することで、下流のシグナルを活性化する。その結果、細胞内に存在するグルコース輸送体が細胞膜上に移行し、グルコースの細胞内への取り込みが促進される。
- ・ 特に明記されない限り、「グルコース」とは D-グルコースを指す。L-グルコースは、D-グルコースの鏡像異性体であり、自然界にはほとんど存在しない。
- ・ NNC2215 (図 1) のマクロサイクル構造に対する結合力は、D-グルコースと L-グルコースで同等とする。
- ・ 等温滴定型熱量測定における「熱の流れ (熱流)」とは、反応系が吸収または放出する熱を打ち消すために、装置が単位時間あたりに供給または除去する熱量を指す。この熱流の積分値は、複合体形成に伴うエンタルピー変化に相当する。

問 1 資料 1 に基づいて、以下の (1) および (2) について簡潔に説明しなさい。

- (1) インスリンを用いた糖尿病治療における課題
- (2) (1) の課題を解決するために開発された化合物 NNC2215 の設計コンセプト

問 2 次の文章は、実験 1 で用いた等温滴定型熱量測定法の原理について述べたものである。空欄にあてはまる数式を答えなさい。また、計算欄には計算の過程を残しなさい。

物質 A と物質 B が 1:1 で複合体 AB を形成するとき、次の平衡が成り立つ。



$K$  は結合定数を表す。

試料セル内に含まれる A の総濃度を  $C_{A(\text{total})}$ 、B の総濃度を  $C_{B(\text{total})}$  と定義する。

ここで、 $r$  と  $\alpha$  をそれぞれ

$$r = \frac{C_{B(\text{total})}}{C_{A(\text{total})}}, \quad \alpha = \frac{1}{KC_{A(\text{total})}}$$

と定義すると、A が複合体を形成する割合  $\frac{C_{AB}}{C_{A(\text{total})}}$  は、 $r$  と  $\alpha$  を用いて

$$\frac{C_{AB}}{C_{A(\text{total})}} = \boxed{\text{ア}}$$

と表される。 $C_{AB}$  は AB の濃度を表す。

いま、濃度  $C_{A(\text{total})}$  の A を含む試料セルに対し、B の溶液を一定時間ごとに少量ずつ滴下する。このとき、B の溶液の滴下による体積変化は無視できるものとし、試料セル内の溶液の体積は常に一定値  $V_0$  に保たれると仮定する。ごく少量の B (物質

量  $\Delta X_B$ ) を A に添加した時に生じる熱流の積分値を  $\Delta Q$  とすると、 $\Delta Q$  は AB の量的変化  $V_0 \Delta C_{AB}$  に比例する。すなわち、 $\Delta Q$  は複合体形成に対する標準エンタルピー変化  $\Delta H^\circ$  を用いて、

$$\Delta Q = \Delta H^\circ V_0 \Delta C_{AB}$$

と表される。よって、モルエンタルピー変化  $\frac{\Delta Q}{\Delta X_B}$  と  $r$  の間の関係式は、 $\Delta H^\circ$  と  $\alpha$  を用いて次の通りとなる。

$$\frac{\Delta Q}{\Delta X_B} = \boxed{\text{イ}}$$

この関係を表す理論曲線は結合等温線(例:図 2 b)と呼ばれ、その切片は  $\boxed{\text{ウ}}$ 、最も急峻な勾配は  $\boxed{\text{エ}}$  である。これらの値から  $\Delta H^\circ$  と  $K$  が決定できる。

- 問 3 実験 1 では、NNC2215 の合成原料であるマクロサイクルプロピルアジドを用い、グルコースとの複合体形成に関する等温滴定型熱量測定を行った。結合等温線を解析した結果、マクロサイクルプロピルアジドとグルコースの複合体形成に関する  $K$  は  $10,800 \text{ M}^{-1}$ 、 $\Delta H^\circ$  は  $-7.50 \text{ kcal/mol}$  と決定された。

マクロサイクルプロピルアジドとグルコースとの複合体形成が自発的に進行する主要な要因について、反応前後のエネルギー変化の観点から説明しなさい。なお、標準ギブス自由エネルギー変化  $\Delta G^\circ$  と  $K$  との間には、次の関係式が成り立つ。

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad R: \text{気体定数}, T: \text{絶対温度}, \ln K: \text{結合定数 } K \text{ の自然対数}$$

計算の際には、 $R = 1.99 \times 10^{-3} \text{ kcal/mol/K}$ 、 $\ln 2 = 0.693$ 、 $\ln 3 = 1.10$ 、 $\ln 5 = 1.61$  を用いなさい。

- 問 4 実験 2 では、図 3 に示すように、インスリン誘導体の添加濃度に依存した  $^{125}\text{I}$ -insulin 結合量の減少が観察された。このような曲線が得られる理由を説明しなさい。また、図 3 の b と c を比較し、ヒトインスリンとインスリンデグルデクでは、どちらのほうがインスリン受容体 hIR-A に対する結合力が高いと考えられるか、曲線の特徴に基づいて説明しなさい。
- 問 5 実験 2 において、NNC2215 の場合 (図 3 a) には共存するグルコース濃度を変化させたときの影響が観察された。この理由を説明しなさい。
- 問 6 実験 3 において、D-グルコースではなく L-グルコースを投与した理由を説明しなさい。このとき、L-グルコースの特性に基づいて、研究者がどのような効果を検証しようとしたのか、D-グルコースとの生理機能の違いにも注意して説明しなさい。

## 資料 1

次の文章は、インスリン誘導体 NNC2215 の設計・開発を行った 2024 年の学術研究論文「Glucose-sensitive insulin with attenuation of hypoglycaemia」の序論である。

Using insulin to control diabetes<sup>\*1</sup> comes with the risk of introducing hypoglycaemia, namely blood glucose values below 3.9 mM. This is due to the fact that blood glucose fluctuations are difficult to predict owing to many factors, such as the character and timing of meals, exercise, infections and changing individual insulin sensitivity. People with diabetes must therefore adjust their daily doses of insulin (both basal and meal insulin) to account for these factors. However, to avoid events of low blood glucose, which can be dangerous especially during the night, many opt for conservative insulin doses. Compromising insulin doses due to the fear of hypoglycaemia subsequently results in suboptimal glucose control, thereby increasing the risk of complications arising from long-term hyperglycaemia. To facilitate improved glycaemic control without the risk of hypoglycaemia, the idea of engineering an insulin that can modify its bioactivity in response to varying blood glucose levels has been pursued since the 1970s. Despite many publications and patents, to date, no mechanism has proven to solve the issue to the extent that it can be applied to treat diabetes. Most papers in the field describe polymer systems that can release insulin from subcutaneous<sup>\*2</sup> depots in response to glucose fluctuations, but such systems are limited by delayed glucose diffusion to the subcutis, as well as a delay in the released insulin entering the blood circulation. Moreover, such systems release insulin irreversibly, meaning that, once the insulin is released from the depot, it is no longer glucose sensitive. A better approach seems to be equipping insulin itself with glucose-responsive properties, so it can respond to glucose in a reversible manner. Notably, glucose values vary over a narrow range (from approximately 2 to 20–30 mM in people with diabetes), so a rather steep change in insulin bioactivity must be attained for the glucose-sensitive insulin to have an impact. To achieve such sensitivity to glucose, a chemical group able to bind to glucose with maximal sensitivity in this glucose range will be required. One system was based on oligofucose/mannose insulin conjugates that can be cleared from the circulation in an equilibrium between glucose-sensitive binding to the mannose receptor versus insulin binding to the insulin receptor, but this did not merit pursuing beyond phase I clinical trials. The glucose response was found to be shallow, and high clearance at the mannose receptor led to a very low in vivo potency, implicating the eventual need for prohibitively high insulin doses.

The concept of introducing a glucose-sensitive switch into the insulin molecule has been pursued over many years. A switch involves dual conjugation of a glucose-binding motif plus a binding partner onto insulin such that, at low glucose, the switch will induce a closed less-active state, equilibrating towards an open more-active state with higher glucose concentrations. The glucose-binding motif must therefore have an affinity for both glucose and the binding partner within the narrow glucose range that occurs in people with diabetes (approximately 2 to 20–30 mM). Furthermore, the two components

of the switch must be attached to insulin in a manner that ensures that, in the closed state, there is a lower insulin bioactivity by altering the insulin conformation and/or blocking the receptor binding surfaces of insulin. This switch idea has been pursued by using boronates<sup>\*3</sup> as glucose binders, but the glucose sensitivity of such designs has so far been too limited for pharmacological use. The best previous example of a carbohydrate-sensitive switch working with insulin showed sensitivity to fructose at high concentrations (50 mM), but the compound was insensitive to glucose. A recently identified macrocycle<sup>\*4</sup> offers another option for a glucose-binding element. The macrocycle was designed to provide a glucose-binding cavity that secures a relevant affinity for glucose as well as selectivity over other carbohydrates and potentially interfering small molecules. Here we describe the molecular design of NNC2215, an insulin with a glucose switch by incorporating the macrocycle at B29Lys and introducing a glucoside residue through a short linker at B1Phe. This combination of glucose binder, glucoside, linker and conjugation sites was found to impart glucose-sensitive bioactivity to NNC2215, which demonstrated a 12.5-fold increase in insulin receptor binding affinity when glucose was raised from 0 to 20 mM and a 3.2-fold increase when raised from 3 to 20 mM. Furthermore, NNC2215 was shown to be glucose sensitive in vivo, to attenuate hypoglycaemia in pigs and to reduce the glucose excursions during glucose tolerance tests in diabetic rats.

(注釈)

\*<sup>1</sup>diabetes: 糖尿病 ; \*<sup>2</sup>subcutaneous: 皮下の ; \*<sup>3</sup>boronates: ボロン酸化合物 ; \*<sup>4</sup>macrocycle: 大環状化合物

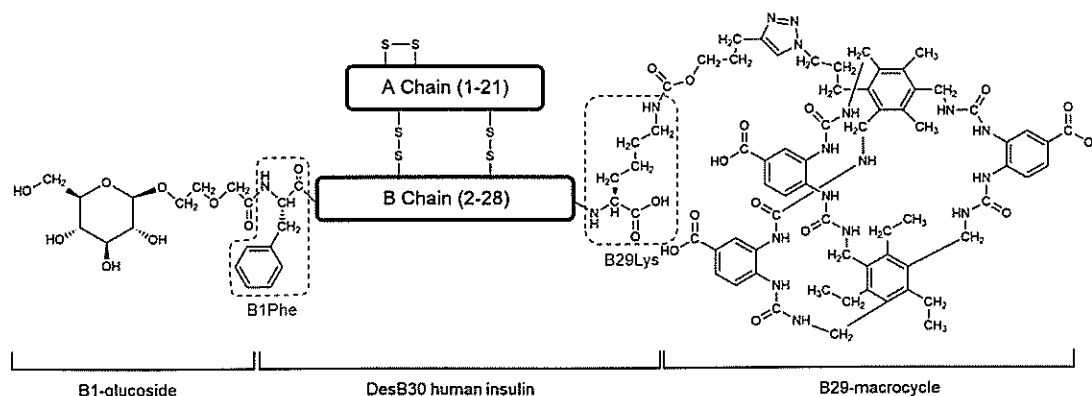


図1 NNC2215の化学構造

ヒトインスリンは、ジスルフィド結合によって架橋されたA鎖とB鎖からなり、それぞれ21個、30個のアミノ酸残基から構成されている。NNC2215は、ヒトインスリンの誘導体である。B鎖のN末端（B1位）にグルコース残基を付加する一方で、C末端側ではアミノ酸を1つ除去して、B29位のリシン残基にマクロサイクルを導入した構造をとっている。

(出典)

Authors: Thomas Hoeg-Jensen et al.

Source: Nature, Vol. 634, 944–951 (2024) (一部改変)

## 資料 2

次の実験 1～3 は、資料 1 の学術研究で行われた実験とその結果をまとめたものである。

### 【実験 1】

マクロサイクルプロピルアジドのグルコース親和性を、等温滴定型熱量測定法により評価した。

本測定法では、試料セルと、緩衝液で満たされた参照セルから構成される特殊な熱量計を用いる。既知の濃度に調製された試料溶液を、試料セルに少量ずつ滴下し、その際に生じる試料セルと参照セル間の温度差を検出する。温度差が生じた場合、装置は試料セルを加熱または冷却して、反応系の温度を一定に保つ。この温度制御に必要な熱量を測定することで、各滴下（スパイク）に伴う反応系のエンタルピー変化を定量的に知ることができる。

実験では、まず試料セルに濃度 50  $\mu\text{M}$  のマクロサイクルプロピルアジドを加え、温度を 25 $^{\circ}\text{C}$  に保持した。攪拌しながら、一定時間ごとに濃度 3 mM のグルコース溶液を 10  $\mu\text{L}$  ずつ試料セルに滴下した。得られた滴定データは時間軸上にプロットし、さらに熱流を積分することで結合等温線が作成された。図 2 には、装置からの熱流の時間プロファイルと、これに基づいて作成された結合等温線を示す。

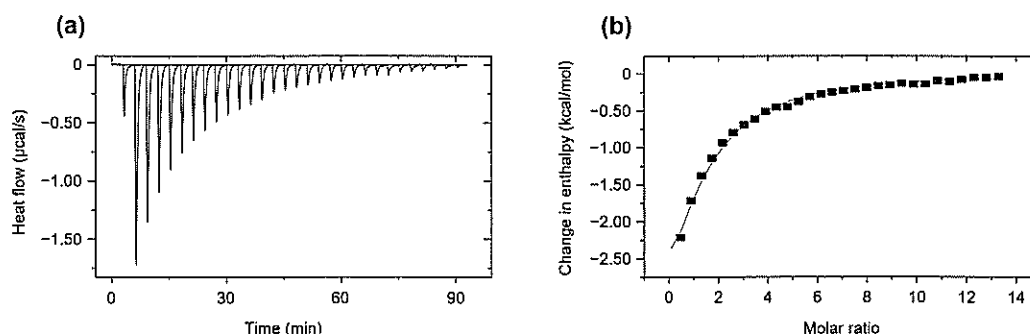


図 2 マクロサイクルプロピルアジドの等温滴定型熱量測定

### 【実験 2】

NNC2215 の存在下、 $^{125}\text{I}$ -insulin<sup>\*1</sup> のインスリン受容体 hIR-A に対する結合力を評価した。

本実験の実施にあたり、精製した hIR-A を SPA ビーズ<sup>\*2</sup> 上に結合して hIR-A 固定化ビーズを作製した。結合実験では、異なる濃度の NNC2215 を含む溶液中で、 $^{125}\text{I}$ -insulin と hIR-A 固定化ビーズを 22 $^{\circ}\text{C}$  でインキュベートした。22 時間後にビーズを取り出し、ビーズに結合した  $^{125}\text{I}$ -insulin の放射活性（単位：CPM）をシンチレーションカウンターで測定した。

図 3 は、NNC2215、対照として使用したヒトインスリンおよびインスリンデグルデク<sup>\*3</sup> の添加濃度と、ビーズに結合した  $^{125}\text{I}$ -insulin の放射活性との関係を示している。

(注釈)

\*1  $^{125}\text{I}$ -insulin: 放射性核種  $^{125}\text{I}$  で標識したインスリン

\*2 SPA ビーズ: 放射線で励起発光する物質が内部に搭載されたビーズ

\*3 インスリン デグルデク: 超長時間作用型のインスリン誘導体の一つ

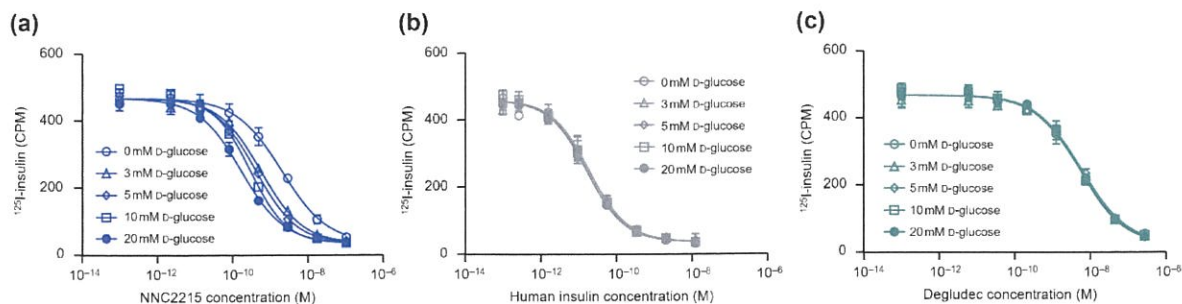


図3 NNC2215 (a)、ヒトインスリン (b)、インスリン デグルデク (c) が  $^{125}\text{I}$ -insulin と hIR-A との結合に与える影響

実験では、インスリンやインスリン誘導体に加えて、異なる濃度のグルコースを共存させ、 $^{125}\text{I}$ -insulin の hIR-A への結合を評価した。横軸は対数スケールで表されている。

### 【実験3】

健常のラットに通常通り餌を与えた状態で、NNC2215 またはインスリン デグルデクを体重 1 kg あたり 4.5 nmol の用量で静脈内注射 (i.v. injection) し、この時刻を 0 (ゼロ) とした。次に、30 分後に、異なる用量の L-グルコースを追加で注射した。図 4 は、時刻 0、25、35、45、60、90、120 分に採血し、血漿中 D-グルコース濃度を測定した結果を示している。

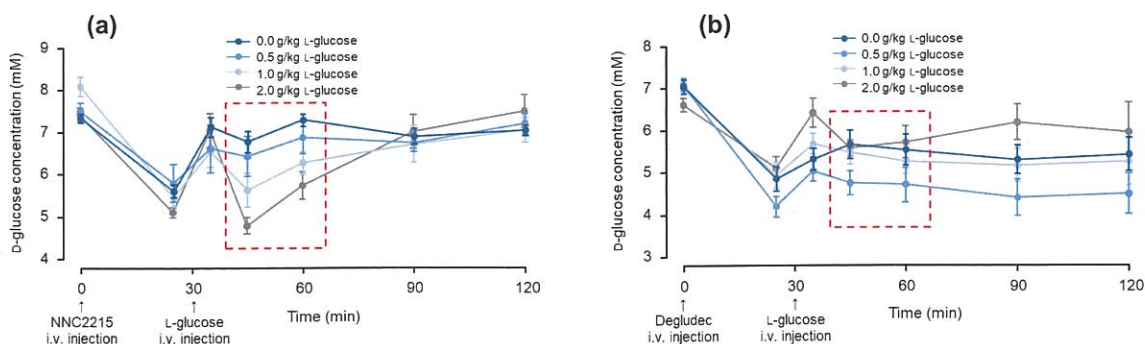


図4 NNC2215 (a) およびインスリン デグルデク (b) をラットに静脈内注射後の血漿中 D-グルコース濃度の時間推移

各インスリン誘導体を静脈内注射した後、30 分の時点で L-グルコースを投与した。NNC2215 投与の場合には、インスリン デグルデク投与の場合とは異なり、45~60 分の時点 (赤点線枠内) において、L-グルコースの投与量に依存して血漿中 D-グルコース濃度が低下する傾向が観察された。

(出典)

Authors: Thomas Hoeg-Jensen et al.

Source: Nature, Vol. 634, 944–951 (2024) (本文および補足資料を一部改変)