

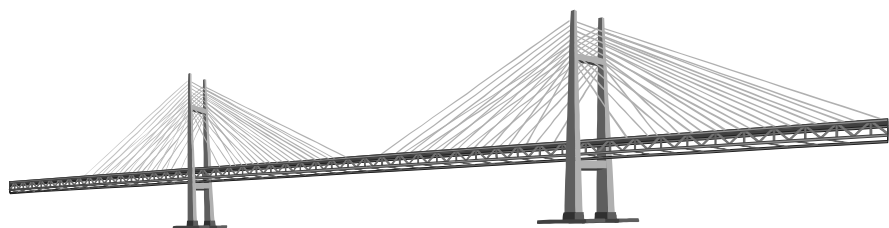
生命化学研究 レター

No. 14 (2004 年 2 月)

1. 巻頭言		
	生命化学研究会 将来への架け橋	2
	馬場嘉信 (徳島大学薬学部)	
2. 研究紹介		
	液相クラスター構造から生体反応を考える	3
	望月俊介 (産業技術総合研究所 環境管理研究部門)	
	ランダムライブラリーからの選択手法: 糖鎖関連タンパク質の創製に向けて	7
	松原 輝彦 (慶應義塾大学理工学部)	
	テーラーメイドな機能を有する半合成蛋白質の創成を目指して - P-PALM による蛋白質エンジニアリング -	11
	中田 栄司 (九州大学大学院工学府)	
3. 論文紹介 「気になった論文」		14
	加藤 正宏 (京都大学化学研究所)	
	廣瀬 徹哉 (大阪大学大学院工学研究科)	
4. 米国ノースカロライナ州立大学留学体験記		19
	富崎欣也 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)	
5. シンポジウム等会告		22
6. お知らせコーナー		
	受賞・会員異動のお知らせ	25
	編集後記	26

巻頭言

生命化学研究会 将来への架け橋



生命化学研究会会長
徳島大学薬学部
馬場嘉信

杉本初代会長から引き継いで3年、あっという間の3年間であった。目標としていた国際シンポジウムは盛会のうちに終了し、丸善からプロシーディングス[1]の出版も実現することができた。このように実り多い成果を残すことができたのは、ひとえに会員の皆さんのお陰である。特に、国際シンポジウムの組織委員・プログラム委員の方々にはたいへんお世話になり、心からお礼申し上げたいと思う。

国際シンポジウムのプロシーディングスを読み返しながら、研究会の将来のことを考えてみた。研究会の今後の進むべき方向については、すでに、これまでの巻頭言のなかで、それぞれの方々から提案されており、私自身もこれらの意見には深く賛同している。

研究会開始当初に比べると、みんな忙しくなり、学会、国際会議や種々のミーティングの数も飛躍的に増加してきた。このようななかで、生命化学研究会の求心力は何であろうか。これまでも何度も指摘されてきたことではあるが、やはりこの研究会の特徴であるヘテロな分野の研究者が集まり境界領域の研究を展開すること、新たな分野を切り開いていくこと、質の高い科学を目指すこと、ふところ深い会であることなどであろう。

しかし、これを実現していくには、これまでより効果的に境界領域の研究・教育が進められる場、人材育成、研究費、産業界との連携などが求められると思う。個人的な希望としては、将来、生命化学がより重要な学問領域として認められ、全国の大学・国研に“生命化学専攻”や“生命化学研究所”のようなものが数多くできて、これらが、生命化学の研究者のさらなる求心力になり、研究・教育がより進展し、日本から生命化学研究を世界的にリードする研究成果と人材が数多く輩出されていくことにつながるようになれば良いと思っている。さらに、基礎的研究成果を産業に結びつけるための手立ても重要となるであろう。

このような夢をかなえるには、生命化学研究会がこれまで同様、各会員の質の高い研究成果を追求するとともに、研究会としてその成果を日本・世界に発信していくことはもちろんのこと、その学問領域としての重要性を総合科学技術会議、文部科学省、学術会議、日本学術振興会などに訴えていくこと、特定領域、学術創成などの学問領域を形成するためのプロジェクトを立ち上げること、科研費の項目に生命化学関連の項目を増やすこと、産業界、経済産業省、NEDOなどにその重要性を訴えることなどが必要である。

近い将来、世界中の大学生が、生命化学研究をするなら、日本の 大学大学院生命化学専攻を目指したいと思えるような、生命化学研究を夢見て。

[1] Biomolecular Chemistry, ISBC2003 プログラム委員会編, 丸善 (2003) pp. 1-387.

液相クラスター構造から生体反応を考える

産業技術総合研究所 環境管理研究部門 環境分子科学研究グループ 望月俊介

この度、第1回生命化学国際シンポジウムでポスター賞を受賞することができ、大変な名誉であると感じています。組織委員会の皆様、聴講して下さった多くの皆様にお礼を申し上げます。本稿を執筆する機会をいただきましたので、拙文ながら研究についてご紹介させていただきたく思います。

1. はじめに

毎朝飲む一杯の紅茶は頭をスッキリさせてくれる。この紅茶は、紅茶の成分や砂糖を溶かし込んだ一つの溶液と見ることができる。見た目は均一だが、分子のレベルの目で見るとそこには巨視的な像とは違った様々な構造が見えてくる(図1)。砂糖の分子や色素、香料の成分

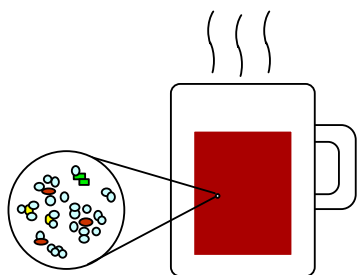


図1 紅茶をミクロの目で見てみると...

が周りの水と相互作用し、溶媒和構造を形成しているかもしれない。疎水性相互作用を通して分子同士の会合が起きているかもしれない。このように、均一に見える溶液中でも、溶媒-溶質、溶質-溶質、そして溶媒-溶媒間の相互作用を通して、不均一なミクロ構造の形成が起こる。

化学反応が分子間相互作用の密な凝集相である液相で進行しやすいことを考えると、このミクロな構造は単に溶質の化学的特性を表しているだけでなく、溶質同士の化学反応にも関わる重要な因子であると考えられる。したがって、このミクロ構造を考察することで溶媒の持つ役割や化学反応の選択性について新たな知見が得られるかもしれない。また、特異性の極めて高い生体反応も液相中で進行することから、ミクロ構造の解析から反応の特異性に繋がる手がかりが得られるかもしれない。このよう

な背景から、化学反応と液相の構造、生体反応の特異性との関連を調べることをテーマとすることになった。本稿では研究の概要と、そこから感じたことを記してみたい。

2. 液相の構造測定とは？

液相の構造を観測する手法には分光法、回折法、理論的計算法などがあるが、本研究では液滴を直接真空中に導入し、断熱膨張により得られた液滴断片を質量分析法で観測する手法を採用した。^{1,2)}この方法は液相そのものを測定するわけではないが、液相中の相互作用に関する情報を液滴断片という残像で捉えることはできる。測定手法の模式図を図2に示す。差動排気された真空チャンバーには、試料導入部のノズルと四重極質量分析計が取り付けられている。試料は電解質溶液のため、エレクトロスプレーによるイオン化法が用いられた。ノズルと各スキマーには高電圧が印加され、ノズルからイオンを含む試料が流れてくると、電荷の分離が起きて過剰のイオン(図では正電荷)を含む液滴が生成される。この液滴は真空中に導入され、断熱膨張と静電的な反発によって粉々に砕かれ、イオンを含む液滴断片、すなわちクラスターが残る。液相中の各相互作用が弱ければ破裂の際に分子やイオンは蒸発するが、相対的に強い相互作用は残存してクラスター構造として観測される。これを質量分析計で測定し、イオンと分子の相互作用を考察した。

3. 陽イオンと陰イオンの間柄

イオンの関わる反応ということ、まず錯形成反応が思い浮かぶ。陽イオンと配位子の相互作用

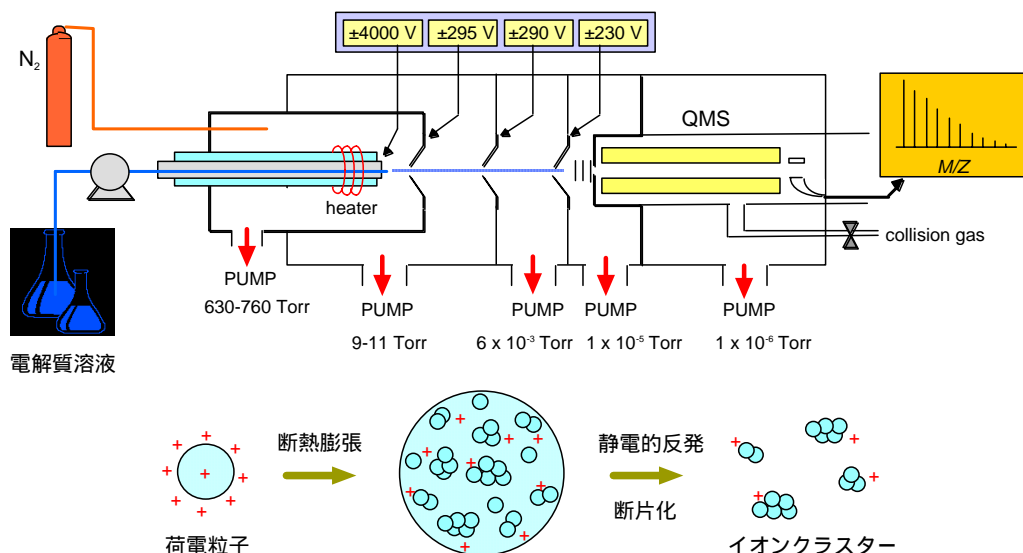


図2 液相クラスター質量分析計

は多数報告されており、化学の教科書にも基本事項として載っている内容である。しかし、陰イオンの状態の記述はあまり見られず、また論文も陽イオンほどは多くない。そこで、この錯形成反応の中で両イオンについてどのようなことが起きているかを調べてみた。ここでは塩化セシウムのメタノール溶液について陽イオンと陰イオンの状態を観測し、さらに陽イオンを取り込むことで知られるクラウンエーテルの有無による構造比較をしてみた。

結果を要約すると、陽イオンの錯形成が進むと、陰イオンの溶媒和が進行する様子が確認された。³⁾図3は結果を示す模式図である。溶液

中のイオンには溶媒との相互作用とともに対イオンとの静電相互作用も存在し、それらのバランスで溶媒和構造を形成する。ここにクラウンエーテルなどの配位子が存在し、錯形成反応によって陽イオンの周りの環境が変化すると、陰イオンとの静電相互作用が減少する。その結果、相対的に陰イオンと溶媒の相互作用が増加し、溶媒和クラスタの形成が促進されたと考えられる。このことから、溶液中のイオンの構造は互いの対イオンの構造変化にとっても敏感であるという像が見えてくる。イオンは溶液中で、相補的な関係に支配されながら化学反応に関わっていると考えられる。

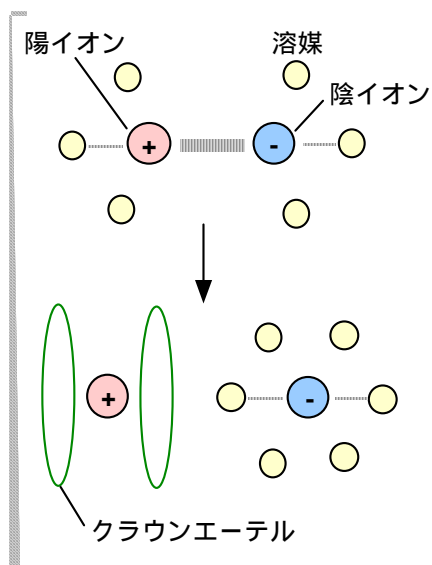


図3 陽イオンと陰イオンの溶媒和構造の変化

4. 生体反応をクラスター構造から考えてみたい...

次のステップとして、より複雑な系でクラスター構造がどのように関わるかを調べることになり、テーマとして挙げたのが「DNA複製反応における金属イオンの効果」であった。これまで生化学の研究はまったく経験していなかったが、特異性・選択性が極めて高く神業のように進んでいく生体反応と、その中で液相のクラスター構造がどのように関わるのかということは非常に興味深い。

しかし、本法の質量分析計は溶媒和構造などの分子量の小さな化学種を対象としており、夕

ンパク質などの分子量の大きな化合物の関わる反応を直接測定することができない。そこで、まずは分子量の小さなヌクレオシド(ここではシチジン)の水溶液をモデル系として使ってみようということになった。そして、PCRのような人工的なDNA複製反応で見られる金属イオンや有機溶媒の効果を、シチジンのクラスター構造から考察してみることにした。

PCRで見られる金属イオンの効果というと、 Mg^{2+} の有効性、 Mn^{2+} によるエラーの誘発などが挙げられる。これらのイオンを含むシチジン水溶液のクラスター構造観測を行うと、共存金属イオンの周りにシチジンが会合したシチジンクラスターの形成が示された。クラスターの質量スペクトルの分布から、 Mg^{2+} では静電的、 Mn^{2+} では配位的な相互作用でシチジンクラスターを形成すると考え(図4)、 Mg^{2+} が多数のシチジンを会合させている様子が推察された。⁴⁾これは2'-デオキシシチジンでも同様の傾向が見られた。静電的、配位的という相互作用の差は、各金属イオンの特性を考えるとごく普通の結果に見えるが、 Mg^{2+} の周りにシチジンが溶媒和するように取り囲む構造は分光法などでは見えづらいものであり、質量分析の力が発揮された結果ともいえる。

一方、PCRではDMSOなどの有機溶媒を添加することで複製効率が向上することがある。そのメカニズムは非常に複雑であると思われるが、水系の反応であるPCRの中で金属イオンと有機溶媒が共存するとき、それらは独立の化

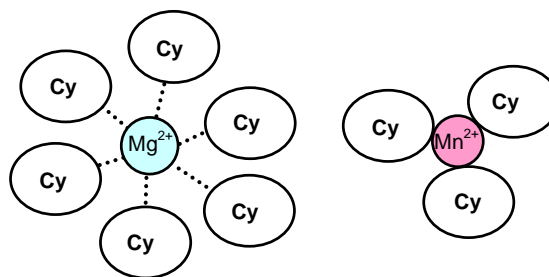


図4 水溶液中のシチジンクラスター形成における金属イオン効果の模式図 (Cyはシチジンを表す)

学種としてよりは、密な相互作用をした状態で存在していることも考えられる。そうなればPCRにおける有機溶媒の効果はDMSO単体の効果と考えるより、金属イオンや分子との会合状態の効果として考えた方が面白いかもしれない。論文を見回してみたところ、このような観点から調べた研究はあまり見かけなかったので、上述のモデル水溶液($MgCl_2$ を含む)を使って検討してみた。

5% (v/v) のメタノール、アセトニトリル、DMSOを含むシチジン水溶液から得られた質量スペクトルの結果は非常に特徴的で、メタノールではシチジンの会合は100%水系の結果とあまり変わらなかったが、アセトニトリルではシチジンの会合がかなり抑制された。DMSOでもかなり抑制されていたが、シチジンの会合数は依然として多いという特徴があった。しかしDMSOの濃度が10%まで上がると、シチジンクラスターの形成はアセトニトリルの結果と同程度となった。

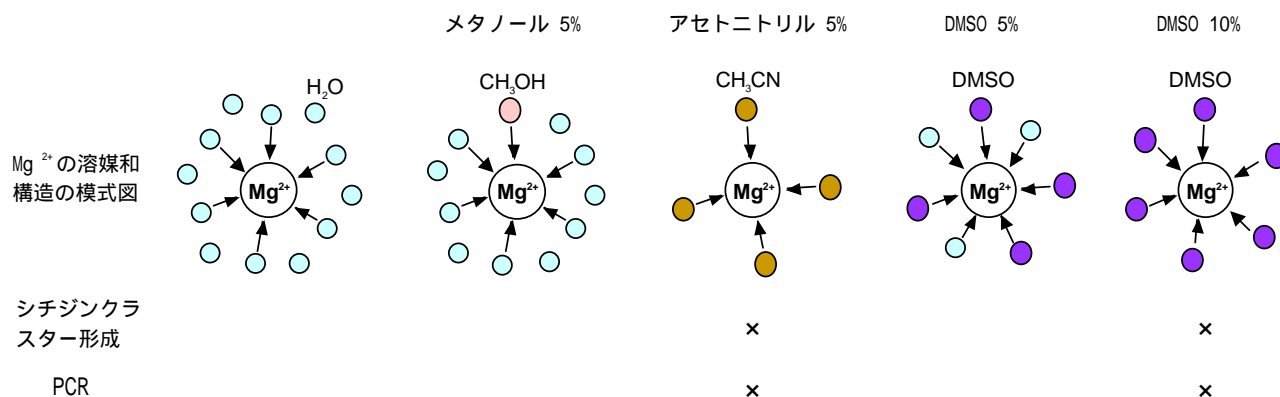


図5 水溶液中の Mg^{2+} の溶媒和構造に与える有機溶媒の効果の模式図

このような変化の要因には、各有機溶媒とシチジンの親和性の違いも考えられるが、本実験で目立ったのは、共存している Mg^{2+} の溶媒和構造が有機溶媒に依存してかなり変化していることだった。観測された溶媒和構造の様子を模式的に表すと、図5のようになる。シチジんクラスタ形成と PCR (ヒト β -グロビン遺伝子) の結果も定性的に、 \square 、 \triangle 、 \times で記してみた。 Mg^{2+} の溶媒和構造が変化すれば、シチジンと Mg^{2+} との相互作用も変化し、シチジんクラスタ構造も変化すると考えられる。実験結果からは、 Mg^{2+} の水和が有効な場合はシチジんクラスタ形成が起こり、PCR の結果も良いという関連が見られた。

実際の PCR は非常に多くの物質が関わるため、シチジンの会合状態だけでは DNA 複製プロセスにおける金属イオンや有機溶媒の効果を説明することはできないが、今回の方法は生体反応の特異性を解明する一つの可能性を示しているのではないかと考えている。金属イオンや有機溶媒が特徴的な微視的環境の中にあることは明らかであり、また、この環境は個々の化学的特性だけに支配されるのではなく、共存する他の物質との相互作用の結果で形成される。このような特徴的な構造を通して生体内の化学反応が進行し、その微妙な構造変化が生体反応における至適濃度の存在や反応の特異性に寄与している可能性も考えられる。

5. 終わりに

従来、バルクなイメージで捉えがちであった液相は、単なる連続体でなく、共存する物質に起因するユニークな構造の集合体であり、それらはお互いの構造変化に敏感に対応しながら化学反応に関わっている。このようなマイクロ構造から考察していくと、これまで簡単だと思っていた現象もまた違った見え方をしてくる。経験的な知見に基づいた溶媒の役割やイオンの効果が、マイクロな世界の中での絶妙な構造変化に基づいて決定されている可能性もある。今回の内容はまだ途上の段階であり、今後の検討でまた新しい発見があるかもしれない。

これからいろいろなテーマに取り組み、壁に突き当たったら、紅茶を一杯飲みながら「ミクロの視点」に立ち戻って、また様々な可能性を考えたいと思う。

参考文献

- 1) H. Kobara, A. Wakisaka, K. Takeuchi, T. Ibusuki, *J. Phys. Chem. A*, **106**, 4779-4783 (2002).
- 2) J. B. Fenn, J. Rosell, C. K. Meng, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **8**, 1147-1157 (1997).
- 3) S. Mochizuki, A. Wakisaka, *J. Phys. Chem. A*, **106**, 5095-5100 (2002).
- 4) S. Mochizuki, A. Wakisaka, *J. Phys. Chem. B*, **107**, 5612-5616 (2003).

望月 俊介 (もちづき しゅんすけ)



産業技術総合研究所環境管理研究部門環境分子科学研究グループ客員研究員 (NEDO フェロー)
平成7年茨城大学理学部化学科卒業、平成9年同大学院理工学研究科修士課程修了、平成13年東北大学大学院工学研究科博士課程修了、同年より現職。平成16年3月で任期終了予定。

E-mail: s-mochizuki@aist.go.jp (平成16年3月まで)
以降のアドレスは s-mochi48@mx35.tiki.ne.jp になります。



研究紹介

ランダムライブラリーからの選択手法：
糖鎖関連タンパク質の創製に向けて

慶應義塾大学理工学部 生命情報学科 松原 輝彦
(matsubara@bio.keio.ac.jp)

1. はじめに

第三の生命鎖=糖鎖 ゲノム解析から発現分子の機能解析へ研究の趨勢が移行しつつある現在、核酸およびタンパク質に加え、第三の主要な生体高分子である糖鎖の関わりを考えざるを得ない時期にある。しかしその存在は周知であるものの、糖鎖分子の供給や構造の複雑さ(構造異性体の数に加え、多くの場合タンパク質や脂質などと結合している)が機能解析を妨げている。さらに複合糖質が単独で存在するのではなく、他の分子と複合体を形成して機能発現している場合もある。したがって糖鎖と相互作用する分子を単純に試験管内で混ぜ合わせることだけでは本当の機能を見ていることにならない可能性もある。このように糖鎖を含む分子を網羅的に解析する技術の開発は困難を極めているのが現実である。

複合糖質の生物学的な機能は、細胞間相互作用、シグナル伝達、接着、細胞の分化・増殖など多岐にわたる。細胞は複合糖質によって覆われていることから、糖鎖は細胞間コミュニケーションに直接関わっており様々な分子と相互作用する(図1)。病原性微生物(大腸菌 etc.)、細菌毒素(コレラ、ペロ、破傷風、ボツリヌス etc.)、ウイルス(インフルエンザ、ポリオ、HIV etc.)などは糖鎖の末端構造を認識し、細胞内に侵入する。また細胞の腫瘍化に伴っても細胞表面に発現される糖鎖構造は変化し、細胞が異常であることを知らせる。このような外来性タンパク質は糖鎖全体を認識しているのではなく、末端のわずかな構造の違いを見分けている。例えば、インフルエンザウイルスが毎年亜型を変化させて流行するのも、糖鎖を認識する部位のアミノ酸置

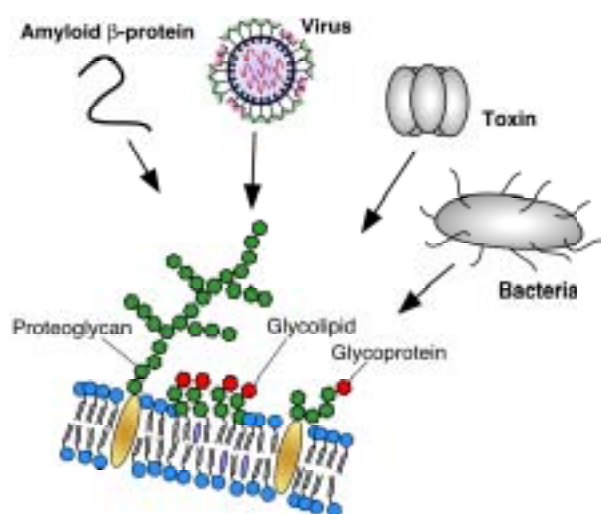


図1 細胞膜における糖鎖認識

換が直接の原因である。したがって糖鎖とタンパク質との相互作用を阻害する分子が設計できれば、病原体の侵入やガン細胞の転移の阻害分子として有用性が高い。しかし抗体では糖鎖結合ポケットのアミノ酸置換を区別することは難しく、低分子有機化合物やそれらを高分子化した研究が行われている。またコンビナトリアル化学の概念を用いて糖鎖構造を模倣する分子を設計する研究が行われている。

筆者は細胞膜面における糖鎖-タンパク質認識に関し、スフィンゴ糖脂質の糖鎖を特異的に認識するペプチドを選択する手法を開発した(2. ガングリオシド結合ペプチドの選択)。また認識特異性を強化するため、構造骨格を含む配列を選択する予備的な実験結果についても述べたい(3. 亜鉛に結合する構造モジュールの選択)。

2. ガングリオシド結合ペプチドの選択

ガングリオシド(ganglioside)はシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質の総称である。GM1(Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4GlcCer, 図 2)はセラミド脂質にシアル酸を含む五糖が結合しており、コレラ毒素の受容体としても知られている。コレラ毒素BサブユニットはGM1糖鎖の末端のガラクトース(Gal)およびシアル酸(NeuAc)を認識する。しかし糖鎖と相互作用しているアミノ酸残基はタンパク質の一次構造上に配置されているわけではなく、天然のタンパク質の一部を使って糖鎖認識させることはできない。

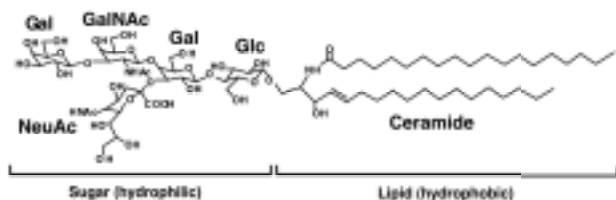


図 2 ガングリオシド GM1 の構造

単分子膜に対するセレクション¹⁾²⁾ ランダムペプチドライブラリーから GM1 糖鎖に結合する配列のセレクション方法を開発した。15 残基のランダムペプチド配列が外殻タンパク質 pIII の N 末端に発現されたファージライブラリーを用いた。生体膜に類似した状態を保つため、ラングミュアトラフを用いてガングリオシド単分子膜を調製した(図 3)。この状態では、ガングリオシド分子の糖鎖(親水部)は水相に、セラミド脂質(疎水部)は気相を向く。生体膜圧力(表面圧)に相当する 30 mN m⁻¹ で調製し、ガングリオシド分子を配向および凝集させた状態で固相基板に固定化させた(GM1 の占有面積は 0.67 nm²/分子)。このように配向固定することで、糖脂質の糖鎖部分とのみファージを相互作用させることが可能となる。セレクションでは重量センサーである水晶発振子(QCM, quartz-crystal microbalance)の金電極表面に水平付着法で物理吸着させた。ファージライブラリーとGM1単分子膜をバッファー中で反応させ、ファージ粒子の結合挙動を QCM でモニタリングしながら条件検討した。洗浄、溶出、増幅し、このサイクルを 5 回繰り返す。GM1 結合性フ

ァージプールを得た。ファージをクローン化し、DNA を抽出およびシーケンスしてランダム部分のペプチド配列を同定した。

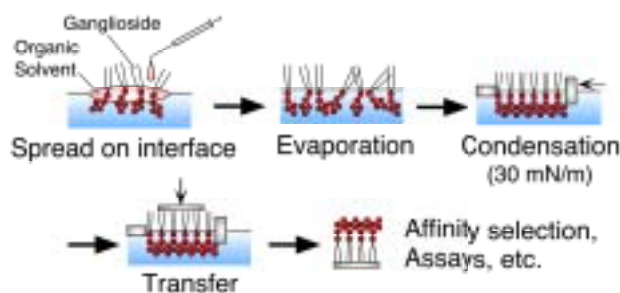


図 3 GM1 の単分子膜の調製

その結果、3つの配列が同定されたが、これらは天然の糖鎖結合性タンパク質と相同性がなかった。しかし2つのペプチド配列間で共通性が見いだされ、GM1 結合モチーフと名付けた (f/wRxL-Px-Fxx-Rx-P; f/w は Phe もしくは Trp, x はその他のアミノ酸, -はスペースもしくは x) (図 4)。これらの 15 アミノ酸残基のペプチドを化学合成し、結合アッセイを行った。No. 3 の配列(ペプチド 3)は GM1 に特異的に結合し、コレラ毒素 B サブユニットを IC₅₀ = 1 μ M で阻害することが示された。

peptide 1	D F R R L P G A F W Q L R Q P
peptide 3	V W R L L A P P F S N R L L P
consensus	f/w R x L - P x - F x x - R x - P

図 4 GM1 結合ペプチドおよび共通配列

GM1 結合モチーフ 次にモチーフ部分をアミノ酸置換した変異ペプチドのアッセイを行った。その結果、Arg および芳香族アミノ酸(Trp および Phe)が糖鎖認識に関与していることがわかった。また、様々な糖鎖構造を有するスフィンゴ糖脂質に対して行った結合アッセイから、このペプチドは GM1 糖鎖の末端 Gal およびシアル酸部分を認識している可能性が示された。これらはコレラ毒素に認識される糖残基と同じであった。その結合様式は Arg による糖水酸基およびシアル酸カルボキシル基の二価の水素結合および静電相互作用、芳香族アミノ酸

による Gal-B 面およびシアル酸アセトアミドメチル基との疎水性および van der Waals 相互作用と考えられる。また GM1 と同様の手法でガングリオ a-系列ガングリオシド(GD1a, GM2, GM3, and GM4)に対してセレクションを行ったところ、セレクションに用いた糖鎖構造に依存して共通モチーフが異なった。興味あることに、Arg および芳香族アミノ酸は高い適合度で現れ、Ala や Pro などは低い適合度ながらも頻出した。Arg および芳香族アミノ酸は直接糖鎖認識に関与し、他の頻出アミノ酸はペプチドの構造や疎水場の提供などに寄与している可能性がある。

集合化した GM1 を認識 実際の生体膜において、膜内の様々な分子は一様に分散しているわけではない。例えばスフィンゴ糖脂質は他の脂質(コレステロール、リン脂質など)や膜タンパク質などと凝集してマイクロドメインを形成している。今回セレクションで用いた GM1 単分子膜は凝集した糖鎖平面を形成しており、マイクロドメイン中の GM1 に近い構造をしている可能性がある。ペプチドが結合しない GlcCer をマトリックス脂質とし、GM1 濃度を变化させた GM1-GlcCer 混合単分子膜を作成した。ペプチド 3 は GM1 濃度が増加するに従って指数関数的に結合量が増加した。原子間力顕微鏡の画像より、20%の低い GM1 濃度では GM1 は GlcCer 膜面に分散しており、ドメイン形成していない。一方、80%GM1 では GM1 ドメインと GlcCer ドメインが相分離している。GM1 濃度とペプチドの結合量を Hill 解析したところ、ペプチドは約 2 分子の GM1 と結合することが示された(図 5)。つまり、ペプチドは GM1 が集合化した状態にのみ結合する。これはドメイン中で集合化している糖脂質のみ認識する分子として用いることができる可能性がある。一方、同じアッセイを天然のコレラ毒素 B サブユニットに対して行うと、GM1 が 1 分子あれば結合することがわかった。生物界では低い糖鎖濃度でも結合しやすいように設計されていると考えられる。

ペプチドライブラリーからの選択によって短いペプチドでスフィンゴ糖脂質の糖鎖に結合する配列を同定することができた。また集合化した GM1 を認識する天然にない機能を有することが示され

た。

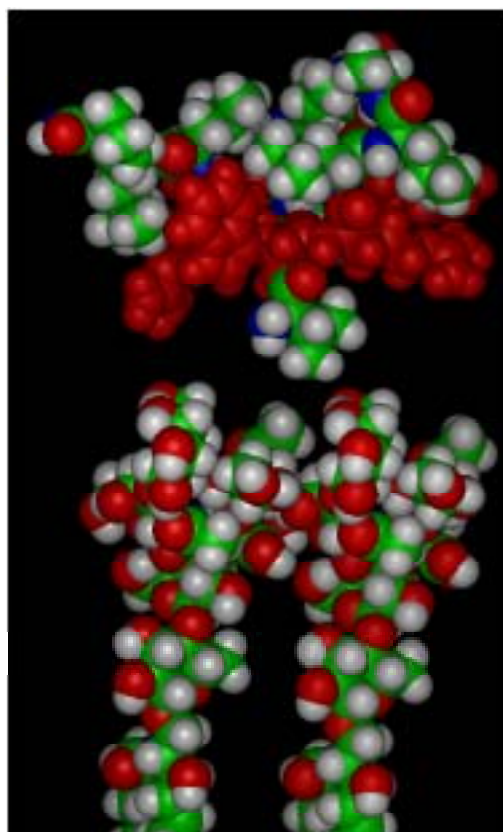


図5 ペプチド3(上)は2分子のGM1(下)と相互作用する

3. 亜鉛に結合する構造モジュールの選択

タンパク質(ペプチド)の *de novo* 設計において最も困難にしているものが高次構造である。2次構造としては α -ヘリックス、 β -シート構造、折り返し構造があるが、これらの配列はモジュールとして複数繰り返され、より高次の構造やドメイン形成に寄与している。これら高次構造の制御が容易になることは、より自由に分子の設計が可能になると考えられる。しかしながら、2次構造の選択がどのように自然界で行われているのかよくわかっていない。

上述の糖鎖を認識するペプチドにおいても、わずか 15 残基では剛直な構造を取り得ない。仮に糖鎖を認識する際に induced fit を行っているとしても、最適な構造に移行する際のエントロピー損失を免れない。そこで金属イオンを用いてペプチドの高次構造を形成させることを試みた。金属イオンは転写因子である zinc finger に代表されるように、短

いペプチドでも構造の保持が容易にできる補因子である。また天然レクチンでも金属イオンで直接、糖鎖認識に関わっている例が多い。金属イオンは histidine hexamer などの短いペプチドと組み合わせられて、発現タンパク質の精製で多用されている。

亜鉛結合部位の同定³⁾ タンパク質精製用アガロースカラムに亜鉛イオンを保持させ、12残基のランダムペプチドを提示しているファージライブラリーを用いて亜鉛に結合する配列群を濃縮した。クローニングおよびELISAによるスクリーニングを行って亜鉛に結合する配列を同定した。最も高い結合活性のあったc04配列(HYQHNTTHPSRW)はZn > Ni > Co > Cu > Feの順で結合し亜鉛への特異性を示した。このペプチドを化学合成したところ、亜鉛と1:1で相互作用することが円偏光二色性スペクトルよりわかった。このペプチドは亜鉛との相互作用する過程において構造変化を起こすことが示された。つまり亜鉛の有無によって構造変化を起こし、天然のタンパク質にあるような構造亜鉛部位に類似した機能を有しているといえる。

天然タンパク質との相同性³⁾ セレクションで得られた配列の類似性検索(FASTA アルゴリズム)をタンパク質データベースに対して行ったところ、亜鉛を含むタンパク質の一部と相同性があった。c20配列は亜鉛含有フェレドキシンの亜鉛結合部位の一部に対応した。また c03配列は Cu/Zn スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)のZn結合部位に相当した(図6)。興味深いことに、いずれもタンパク質中に他の金属イオン(Fe もしくは Cu)があるにも関わらず、亜鉛と結合している部位の配列がセレクションされた。わずか 12 残基で亜鉛に特異的な配列が得られ、それらはすべて構造亜鉛部位の半分、つまり亜鉛へ4配位するうちの2配位をしているアミノ酸を含んでいた。

また c20配列はフェレドキシン中では 構造の一部であった。亜鉛結合部位ではないが、c02配列ではマンガンに配位しているタンパク質のヘリックス構造の一部であった(unpublished)。ランダムペプチドライブラリーから、天然のタンパク質の構造に関する配列が選択されてきたことは、分子進化を考えるうえで興味深い。もしランダムライブラリーか

ら構造モジュールが選択できることになれば、突然変異(error prone や DNA shuffling など)、ドメインシャッフリングなどの技術を加えることで、人工のタンパク質が創製可能になると考えられる。現在、構造モジュールを加えたペプチドの設計を行っている。

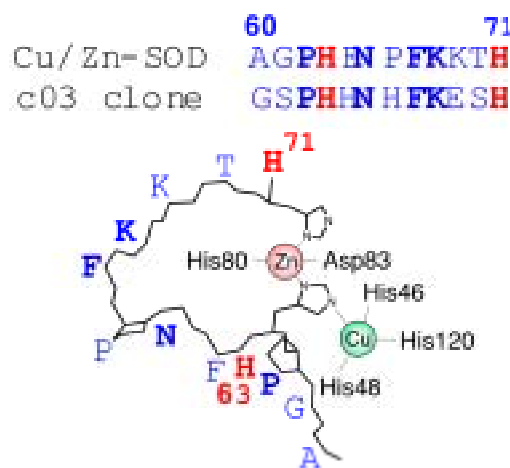


図6 c03配列とCu/Zn-SODの配列の比較(上). Cu/Zn-SODにおける触媒中心(下).

References

- 1) T. Matsubara et al., *FEBS Lett.*, **456**, 253-256(1999).
- 2a) 植田充美・近藤昭彦編、コンビナトリアル・バイオエンジニアリング, 化学同人, pp.127-131 (2003).
- 2b) T. Matsubara, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **13**, 557-560 (2001).
- 3) T. Matsubara et al., *FEBS Lett.*, **555**, 317-321(2003).

松原 輝彦(Teruhiko Matsubara)
慶應義塾大学工学部
生命情報学科(佐藤 智典 研究室)助手



テーラーメイドな機能を有する半合成蛋白質の創成を目指して - P-PALM による蛋白質エンジニアリング -

研究紹介



九州大学大学院工学府物質創造工学専攻
浜地研究室 博士後期課程 1年
中田 栄司
E-mail: eijitcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp

1. はじめに

核酸や糖鎖と並んで生体高分子の主役である蛋白質は、生命活動における機能のほとんどすべてを司っている。その機能は分子認識や触媒活性など多彩であり、生命の長い進化の過程において獲得されたものであるが、これを人為的に修飾・改変することにより、これまでにない新規な機能を有する人工蛋白質を創成できるかもしれない。これまで我々の研究室では、非天然分子の導入による蛋白質の人工機能化の例として、ヘム蛋白質の光機能化¹⁾や外部刺激応答性半人工酵素²⁾などを報告している。そのような一連の流れの中で、私は、当研究室で開発された光親和性ラベル化後修飾法(Post-PhotoAffinity Labeling Modification : P-PALM)によるレクチン(糖結合性蛋白質)の高機能化について研究を進めている。ここでは、それに関するこれまでの成果について紹介させていただきたい。

2. P-PALM によるレクチンの化学修飾³⁾

生体内重要物質である糖鎖は、ニュートラルな物性と多様・複雑な構造を有する。そのため、これらを精密に識別する合成人工分子をデザインすることは、高度に発展した現代の有機化学においても困難を極め、事実過去においても数例しか報告されていない⁴⁾。一方で、生体内においては、レクチンと呼ばれる一群の糖結合性蛋白質が、特定の糖鎖をその結合ポケットにおいて選択的に識別する機能をもつ。そこで、レクチンにトランスドューサーを組み込むことで、その高い認識能力を利用した糖質バイオセンサーの構築が可能であろうと考えた。問題は、トランスドューサーを組み込む方法である。我々は、プロテオミクスの分野において、相互作用部位の同定に用いられる光アフィニティラベル化修飾法を応用し、レクチンの活性部位近傍に修飾活性部位を導入する手法として、P-PALMを開発した。

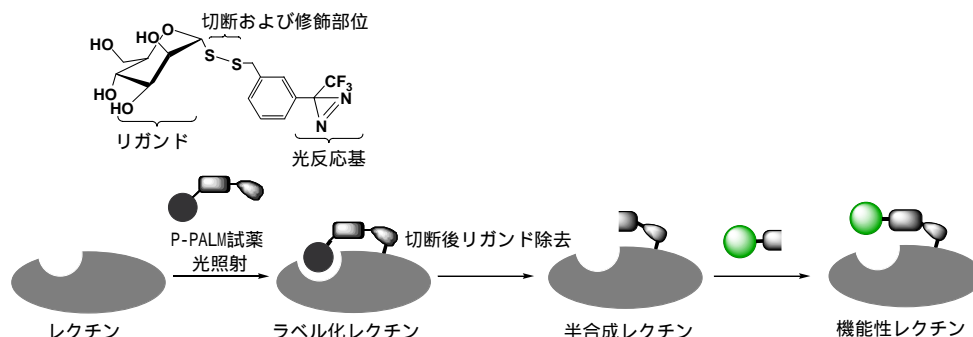


図1. P-PALMによるレクチンの特異的修飾

P-PALMでは、まず図1に示すようなレクチンポケットに認識される小分子をデザインし、光アフィニティラベル化をおこなう。我々が最初に試したコンカナバリンA(Concanavalin A : ConA)では、得られたラベル化ConAの解析をおこなったところ、糖結合部位近傍に存在するTyr100に極めて位置特異的にラベル化

反応が起こっていることが明らかとなった。次にラベル化部位のジスルフィド結合を還元すると、リガンド部位が切り出され、レクチン表面に反応性の高いチオール基が発生する。このチオール基に様々な人工分子を結合させることにより、レクチンの人工機能化が可能となるのである。

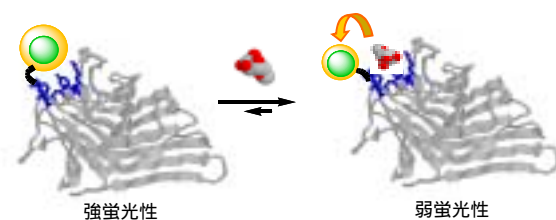


図2. 蛍光性糖質バイオセンサー

例えば、環境応答性の蛍光色素を導入することで、レクチンの本来有する糖選択性を保持したままで、糖の結合を蛍光強度と波長の変化で読み出すことの出来る蛍光性糖質バイオセンサーを構築することに成功している (図2)。

3. 人工レセプター導入レクチンによるオリゴ糖の高選択的センシング⁵⁾

我々は、レクチンの更なる高機能化を目指し、P-PALMにより調製された半合成レクチンに糖結合性人工分子を導入することで、これまでに例のない天然レセプターと人工レセプターの共同的認識によるオリゴ糖選択的な蛍光性バイオセンサーへの機能変換に成功している (図3)。

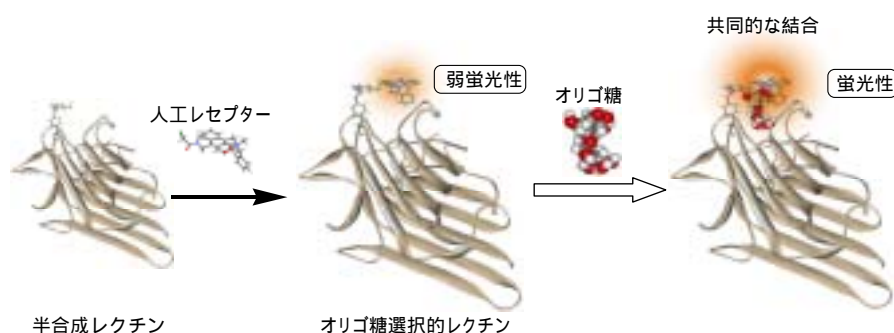


図3 副結合部導入レクチンによるオリゴ糖の認識概念

今回、副結合部として導入した人工レセプター (APET-Br) は、水中で糖認識が可能なフェニルホウ酸を有し、糖との結合を PET (Photoinduced Electron Transfer: 光誘起電子移動) 機構により蛍光強度の増加として読み出すことが出来る (図4)。P-PALMにより調製された APET-ConA において、様々な糖種添加に伴う蛍光スペクトル変化を評価した結果、APET-ConA では、ConA 本来の糖選択性がよりシャープになり、特定のオリゴ糖に対し、天然よりも数千倍もの高い結合定数で認識することが明らかとなった。このことは、レクチンの糖結合部位とフェニルホウ酸というヘテロな結合部位の共同的な作用を強く示唆している。さらにスペーサー長が異なる副結合部 (APET-ape-Br : 図4) を導入すると、APET-ConA とも異なり、糖選択性が極めて高いことが明らかとなった。これは、糖鎖の共同的な認識には人工レセプターとレクチンの糖結合部位の空間的配置が重要であることを示す結果である。

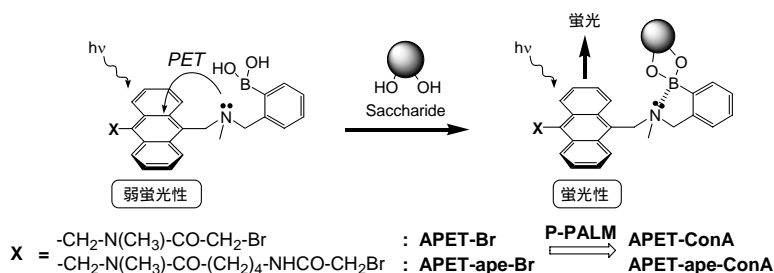


図4 PET型人工糖レセプターの分子構造と読み出し機構

以上のように、これまで我々が進めてきた P-PALM によるレクチンの高機能化について簡略に記した。P-PALM という手法は、用いる P-PALM 試薬や人工レセプターの構造を様々に変えることで、さらに多様化することが可能である。そうすることで、特異性や親和性をテーラーメイドに改変可能な半合成蛋白質も調製できると考える。もちろんその為には、現在までに確立した手法にとらわれず、P-PALM 自身が更なる進化を遂げる必要がある。そのためにも、現在類まれなる進化を遂げている様々な科学の成果を直視し、それらを取り込んでいく柔軟性を私自身がもって今後も研究を進めていきたい。

これらの研究は、浜地 格教授、また、修士課程途中までお世話になりました新海征治教授の指導の下、長瀬 剛氏(現 萬有製薬)の成果の上に積み重ねられたものです。ここに感謝の意を表します。

- 1) a) I. Hamachi, S. Tanaka, S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 10458 (1993). b) H. Takashima, S. Shinkai, I. Hamachi, *Chem. Commun.*, **1999**, 2345. c) I. Hamachi, S. Tsukiji, S. Shinkai, S. Oishi, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 5500 (1999). d) Y. Z. Hu, S. Tsukiji, S. Shinkai, S. Oishi, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 241 (2000). e) Y. Z. Hu, H. Takashima, S. Tsukiji, S. Shinkai, T. Nagamune, S. Oishi, I. Hamachi, *Chem. Eur. J.*, **6**, 1907 (2000). f) S. Tsukiji, I. Hamachi, *Supramolecular Chemistry*, **14**, 133 (2002).
- 2) a) I. Hamachi, T. Hiraoka, Y. Yamada, S. Shinkai, *Chem. Lett.*, **1998**, 537. b) I. Hamachi, Y. Yamada, T. Matsugi, S. Shinkai, *Chem. Eur. J.*, **5**, 1503 (1999). c) I. Hamachi, R. Eboshi, J. Watanabe, S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 4530 (2000). d) H. Hiraoka, I. Hamachi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 13 (2003).
- 3) a) I. Hamachi, T. Nagase, S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12065 (2000). b) T. Nagase, S. Shinkai, I. Hamachi, *Chem. Commun.*, **2001**, 229. c) T. Nagase, E. Nakata, S. Shinkai, I. Hamachi, *Chem. Eur. J.*, **9**, 3660 (2003).
- 4) 総説として T. D. James, K. R. A. S. Sadanayake, S. Shinkai, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **35**, 1910 (1996).
- 5) E. Nakata, T. Nagase, S. Shinkai, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 490 (2004).

最後に・・・

このたびは、ISBC ポスター賞という栄えある賞をいただき、非常に光栄に思っております。現在私は、博士後期課程1年在学中ですが、研究室に配属当初は、化学のいろはも楽しさもわからないそんな学生でした。そんな私が、今では、実験結果に悪戦苦闘しながらも、仲間と共に議論し、助け合い、化学の楽しさを噛み締めながら、日々の研究に取り組んでいます。今後も、今まで以上に精進し、研究に従事していきたいと思っていますので、皆様どうぞよろしくお願いたします。



気になった論文



加藤 正宏 (かとう まさひろ) 京都大学化学研究所生体分子機能研究部門 1 D2

kato@biofun.kuicr.kyoto-u.ac.jp

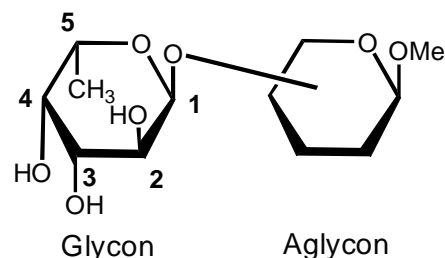
私は、グリコシダーゼという糖加水分解酵素をターゲットとして、その阻害剤の合成研究を行っています。そういう訳で、グリコシダーゼの阻害剤に関係する報告を紹介させていただきます。

Glycosidase-Substrate Interactions Analysis by STD-NMR Spectroscopy: Study of α -L-Fucosidase

Olivier Berteau, Corine Sandstrom, Julie Bielicki, Donald S. Anson, and Lennart Kenne, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 15296-15297.

この論文は、 α -L-フコシダーゼとその阻害剤、または α -L-フコシダーゼとその基質の相互作用を Saturation transfer difference-nuclear magnetic resonance (STD-NMR) という方法で解析したという報告です。STD-NMR は、高分子タンパクと低分子リガンドの相互作用を解析するための方法で、少量のタンパク量で水溶液中での相互作用を解析できるという優れたものです (*J. Am. Chem. Soc.*, 2001, *123*, 6108-6117.)。この STD-NMR を用い、阻害剤のどの部分が阻害活性に寄与しているか、また基質のどの部分が基質特異性・基質認識に関与しているかを示しています。

この報告で注目したのは、 α -L-フコシダーゼとその基質である α -L-フコシドとの相互作用解析です。すなわち、1. α -L-フコース部分の 5 位のメチル基が酵素と強い相互作用している、2. 基質のグリコン部 (Glycon) だけでなくアグリコン部 (Aglycon) も強く相互作用している、ということが判明したことです。 α -L-フコースの 5 位メチル基が酵素と強く相互作用し基質特異性に重要であることは、阻害剤を用



α -L-Fucoside

いた研究等からも示唆されていました。また、直感的にも、 α -L-フコースの 5 位メチル基が基質特異性に効いているだろうと想像できます。しかしながら、実際に相互作用していることが示されたのは初めてで、 α -L-フコシダーゼの基質認識に基質の 5 位メチル基が重要であることを直接示したすばらしい結果だと思います。また、基質のグリコン部だけでなくアグリコン部とも強い相互作用を示す STD-NMR シグナルが観察され、 α -L-フコシダーゼの基質認識にアグリコン部も関与していることが示されました。

さて、酵素がアグリコン部とも相互作用しているという結果は次のような考えを浮かばせます。すなわち、グリコシダーゼ阻害剤の設計には、基質のグリコン部のみならずアグリコン部の構造も考慮する必要がある、ということです。これまでのグリコシダーゼ阻害剤は、グリコン部のみを重視した設計がほとんどで、アグリコン部も考慮した設計はあまり例をみないです。そのためか、阻害活性は強いものの選択性が低い場合があります。

特定の酵素だけを狙い撃ちできる「スナイパー」阻害剤は、薬剤のような応用面で威力を発揮します。よって、グリコシダーゼのアグリコン部認識能をも考慮した阻害剤設計が今後重要になると思います。

Direct Observation of the Protonation State of an Imino Sugar Glycosidase Inhibitor upon Binding

Annabelle Varrot, Chris A. Tarling, James M. Macdonald, Robert V. Stick, David L. Zeche], Stephen G. Withers, and Gideon J. Davies, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 7496-7497.

この論文は、代表的なグリコシダーゼ阻害剤である isofagomine 誘導体 (Fig. 1) に関する報告です。阻害剤 isofagomine 誘導体とグリコシダーゼの一種であるエンドセルラーゼの複合体結晶を作成し、その X 線結晶構造解析 (1.0 resolution) から活性部位内での阻害剤の状態をみています。その結果、本阻害剤は、酵素の活性部位内において窒素がプロトン化された状態で存在することがはじめて直接的に示されました。

Isofagomine (Fig.1 n = 0) は糖をミミックした化合物で、糖の 1 位に相当する炭素が窒素で、環内酸素が炭素で置換されています。種々の類縁体を含め既に報告されている化合物です。基質を模

した化合物が阻害剤になることは言うまでもありませんが、isofagomine は基質が加水分解される際に経由すると考えられている遷移状態をも模した化合物です (Fig. 2)。つまり、isofagomine 誘導体のプロトン化された状態が、oxocarbenium-ion 様の遷移状態の正電荷をミミックしています。

グリコシダーゼの至適 pH が酸性側にあることと、piperidine の pKa をあわせて考えると、isofagomine 誘導体がプロトン化された状態で存在すると「常識的」に考えていいでしょう。実際、isofagomine 誘導体の pKa は 8.4 付近であり、結晶化を pH 5.0 下で行ったことから (ちなみに結晶化に用いた酵素の至適 pH は 6.0)、isofagomine 誘導体がプロトン化された状態で取り込まれていると考えるのはごく自然です。これまでの報告でも、当然プロトン化されたものとして扱われています。そこをきっちり示したという意味では偉いと思います。どれくらい意義があるのかは疑問ですが。

さて、私がかつとも興味を抱いたのは上記のプロトン化云々ではなく、実は isofagomine 誘導体の活性部位内でのコンフォメーションとその阻害活性の強さに関することです。Isofagomine (部位) は、その活性部位内ではほぼ完全な「イス形」コンフォメーションをとっており (イス形は基質が通常とっていると考えられている配座である)、Fig. 2 に示した遷移状態と考えられている「半イス形」をとっている (似ている) わけではありませんでした。にもかかわらず、これまでに報告されている中でほぼ最強の阻害活性を示したのです (Fig.1 の n = 2 の場合、 $K_i = 5$ nM)。一般に、酵素は遷移状態に対してもっとも親和性を示すと考えられています。しかも上記 isofagomine 誘導体は、グリコシダーゼの基質認識および遷移状態の安定化に寄与すると考えられている 2 位の水酸基を欠いております。確かに遷移状態に期待される正電荷は有するものの、しかしながらここまでの阻害活性を示すは正直驚きでした。なお、同じ研究グループの報告で、より詳細 (酵素キネティクス、阻害剤の結合の熱力学的解析など) な実験結果を示した論文 (*J. Am. Chem. Soc.*, 2003, *125*, 14313-14323.) もあります。興味がある方は参考にしてください。

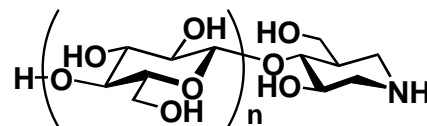


Fig. 1 (n = 0 - 3)

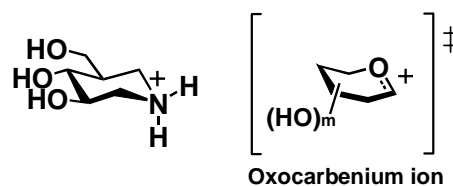


Fig. 2

Selection of a High-Energy Bioactive Conformation of a Sulfonium-Ion Glycosidase Inhibitor by the Enzyme Glucoamylase G2

Margaret A. Johnson, Morten T. Jensen, Birte Svensson, and B. Mario Pinto, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 5663-5670.

この論文は、硫黄を含む二環式のグリコシダーゼ阻害剤 1 に関する報告です。阻害剤 1 は酵素の活性部位内で、高エネルギー状態の「舟形」コンフォメーションで存在することが示されました。

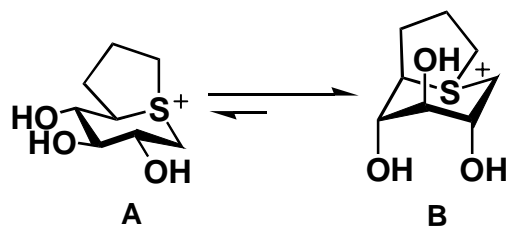
この化合物 1 はユニークな特徴を有しており、熱力学的に不利であると考えられているイス形 B のようなコンフォメーションに平衡が偏っていることがわかりました(結晶状態でも B で存在する)。その理由として、硫黄と酸素間の静電的相互作用を挙げています。また、計算による配座間のエネルギー比較でも B コンフォマーの方がエネルギー的に有利であることを示しています。

阻害活性はどうなのか。予想通り(という失礼かもしれませんが)、3種の α -グルコシダーゼに対して阻害活性を測定したところ、2種にはまったく阻害活性を示さず、タイトルにあるグルコアミラーゼ G2 にのみ弱い拮抗阻害活性を示しました(K_m と同程度)。これは、活性型と考えられるコンフォマー A の存在割合が少ないことや酵素の基質特異性に原因があると、個人的には思います。

では、酵素の活性部位内ではどうなっているのか。これを調べたのが彼らの偉いところで、NMR で化合物 1 のコンフォメーション解析したところ、活性部位内では高エネルギー状態の舟形で存在することが判明しました。これは、化合物 1 の船形コンフォマーは A コンフォマーよりもエネルギー的に安定である(計算結果)ことや、X線結晶構造解析の結果をもとにした酵素・阻害剤の結合モデリングからも支持されており、活性部位内のアミノ酸残基と船形の化合物 1 がいい相互作用をしていることが示されました。特に、化合物 1 の正電荷を有する硫黄原子と活性残基であるグルタミン酸が静電的相互作用をしていることがモデルで示され、従来の阻害剤と同様、正電荷が阻害活性に重要であることが示唆されました。

このように阻害活性の強弱に関係なくその結合の様子を解析することは、より高活性な阻害剤開発につながるだけでなく、酵素そのものの理解につながると思います。

以上、グリコシダーゼの阻害剤に関する論文でした。



Bicyclic sulfonium ion compound 1



廣瀬 徹哉 (ひろせ てつや) 大阪大学大学院工学研究科分子化学専攻井上研究室 博士前期課程
hiro.t@chem.eng.osaka-u.ac.jp

近年、DNA をテンプレートとした DNA や核酸モデル・人工核酸の配列特異的オリゴマー化学合成(ケミカル・ライゲーション)が盛んに行われており、酵素を用いない化学的手法を用いた複製反応や転写反応など様々な試みがなされています。そこで今回は、最近気になった DNA テンプレートケミカル・ライゲーションに関する論文を 3 報紹介させていただきます。

(1) DNA テンプレートを用いたペプチド核酸 (PNA) の合成

Efficient and Sequence-Specific DNA-Templated Polymerization of Peptide Nucleic Acid Aldehydes

Daniel M. Rosenbaum and David R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 46, 13924 – 13925.

この論文では、ペプチド核酸 (PNA) の C 末端アシル基を還元アミノ化することによって、DNA テンプレートに対して相補的な PNA オリゴマーを合成した成功例を示しています。過去に筆者らは、DNA テンプレートを利用したアミンのアシル化や Wittig 反応では、反応部位の十分な位置選択性が得られないことを明らかにしています (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *43*, 1370-1375)。これに対し、還元アミノ化は配列特異的に反応生成物が得られたため、今回この手法を応用した PNA オリゴマーの合成を行っています。具体的には、一部にミスマッチ単位を含み、主に 5'-ATGC-3' 単位からなるテンプレート DNA の 5' 末端にアミノ基を導入し、そこへ相補的な NH₂-GCAT-CHO を 1 単位とした PNA 鎖を還元アミノ化により導入し伸長しています。DNA にミスマッチ配列が含まれるとその手前で PNA の伸長は遮断され、その部分に相補的な PNA 鎖を用いると伸長は継続されます。今回はユニット当たりの塩基数や配列が一定ですが、これらを変化させたときでも配列特異性が得られれば、今まで PCR 法やインビトロ・セレクション法で用いられてきた生体高分子にとって代わる配列を有する人工高分子の合成方法としての展開が期待できます。

(2) DNA ポリメラーゼの基質に対する柔軟性

2',5'-Linked DNA Is a Template for Polymerase-Directed DNA Synthesis

Surajit Sinha, Paul H. Kim, and Christopher Switzer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 1, 40-41.

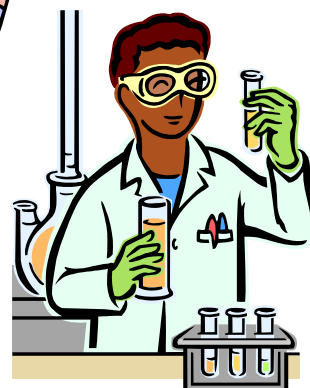
DNA ポリメラーゼ非存在下で 2',5'-linked DNA および RNA は、それぞれ二重鎖や三重鎖を形成し 3',5'-linked RNA とも錯形成しますが、天然の 3',5'-linked DNA はそれらと安定な錯体を形成することができません。本論文では 2',5'-linked DNA をテンプレートとし、Mg²⁺ や Mn²⁺ といった 2 価の金属イオン存在下で、ある種の DNA ポリメラーゼや逆転写酵素の作用により、塩基配列特異的な天然 DNA の酵素的合成が可能であることを報告しています。ポリメラーゼは、エキソヌクレアーゼの非存在下でもエラーは 10⁻³ 以下と低く、主として遺伝情報を完全な状態で保存する機能を担っています。しかし本論文の実験結果から、実際には基質に対する柔軟性をもつと考えられる酵素が存在し、構造的に 2 重鎖を形成しえないという場合でも転写が起こりうることは大変興味深く思いました。さらに今後、現存するポリメラーゼに隠れた機能を有効に利用できる方法論の発展が期待されます。

(3) DNA テンプレートを用いた加水分解反応

DNA-Templated Metal Catalysis

Jens Brunner, Andriy Mokhir, and Roland Kraemer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 41, 12410-12411.

ケミカルライゲーションではなく、位置特異的切断反応に DNA テンプレートを用いる新しい方法論です。具体的には、金属触媒によるエステルの加水分解反応を、DNA テンプレートを用いて行っています。10 量体以下の短いオリゴ PNA は比較的シングルミスマッチを認識しやすく高いターゲット親和性があることが知られているため、この短鎖 PNA を用い、2 種類の PNA オリゴマー、PNA1 ならびに PNA2 の N 末端および C 末端に Cu(II) ピリジルピラゾールキレート金属錯体触媒ならびにエステル残基を各々導入しています。PNA2-PNA1 に対して相補的なフルマッチ・テンプレート DNA の存在下では、反応基質エステル残基を有する PNA2 の加水分解反応の初期反応速度は著しく増大します。一方、ミスマッチを有するテンプレート DNA を用いた場合や金属触媒を有する PNA1 非存在下では加水分解速度が 150 倍程度低下することからテンプレート DNA を用いることに基づく反応の著しい加速が報告されています。また、PNA2/DNA(full match)の T_m (56.5 °C)より低い 40 °C で反応を行っても PNA2 濃度を増加させると初期反応速度が大きく増大することから、テンプレート DNA は触媒的に機能していることが報告されています。このような、金属触媒を導入した DNA テンプレート反応のさらなる応用が今後期待されます。



米国ノースカロライナ州立大学留学体験記



東京工業大学大学院生命理工学研究科
三原研究室 助手(COE21) 富崎欣也

2003年5月より東工大院生命理工三原研にてCOE助手として研究に従事しています。この度、海外留学体験記を執筆する機会を与えて頂きました編集委員の先生方に深く感謝すると共に、現在海外留学志願の若手研究者の皆様の参考になれば幸いに思います。

さて、私は2000年7月から2003年5月までの約3年間、米国ノースカロライナ州立大学化学科 Jonathan S. Lindsey 先生の研究室に博士研究員として留学して参りました。ノースカロライナ州はアメリカ東海岸の中南部に位置し、北はバージニア州、南はサウスカロライナ、ジョージア両州、西はテネシー州に隣接している横長い州です。市販のガイドブックにはあまり紹介されていない未知の州ですが、ライト兄弟が初めて飛行体験をした海岸があることで有名です。ノースカロライナ州立大学(以下NCSU)はノースカロライナ州の州都Raleigh(ラーレー)市に所在し、ノースカロライナ大学チャペルヒル校およびデューク大学とともにリサーチトライアングルを形成しています。車で数十分の距離にあるこれら3大学は研究、スポーツ等全てにおいて互いにライバル関係にあり、日常的に切磋琢磨しています。ここでは「全米で住みたい都市」の上位に常に選ばれるRaleigh市での研究成果および研究生活について報告します。



(図1) 2000~2001年頃のLindsey研メンバー。写真中央奥がLindsey先生。
2列目一番左が筆者。

NCSU は赤煉瓦造りの美しい大学で、その一角に 8 階建ての化学科の建物があります。化学科では他にも高分子化学の Bruce M. Novac 先生、有機合成化学の Daniel L. Comins 先生、材料化学の Christopher B. Goman 先生が活躍されていますし、学長は女性の Marye Anne Fox 先生です。Lindsey 先生の専門は「ポルフィリン類の合成と光機能性材料への応用」です。研究テーマは大きく分けると(1)ポルフィリン類の新規合成法の開発、(2)ポルフィリン類を用いた光捕集アレイの構築、(3)ポルフィリン類を用いたインフォメーションストレージ分子の開発の3つに分けられます。これらのテーマ毎にポスドクが4~5名配置され(ちなみにポスドクは常時十数名在籍していました)各人に独立した研究テーマが与えられます。Lindsey 研では合成が主で、詳細な電気化学および光化学的物性測定は共同研究先(カリフォルニア大、ワシントン大学)で行われます。

私の研究テーマは上述中2番目の「ポルフィリン類を用いた光捕集アレイの構築」で、ポルフィリンを用いていかに可視光を広く、効率よく吸収するかを追求するものでした。ポルフィリンには Soret 帯(400 nm 付近)と Q 帯(500-600 nm 付近)の2つの強い吸収帯がありますが、それらの間の波長域(400-550 nm 付近)を補う補助色素の利用が効果的であろうと考えました。そこでペリレンモノイミド色素(PMI)に着目しました。PMI は(1)蛍光量子収率がほぼ1(亜鉛ポルフィリンの蛍光量子収率は0.03程度)、(2)長い蛍光寿命、(3)高い安定性というように補助色素としては3拍子揃った性質を示します。まず PMI を修飾して有機溶媒に可溶化した後、亜鉛ポルフィリンに直接結合してペリレン-亜鉛ポルフィリン dyad を合成しました[1]。さらに可視領域の吸収を強めるため亜鉛ポルフィリンに PMI を多数結合した複合体も合成し、励起状態の PMI から亜鉛ポルフィリンへの効率的なエネルギー移動を確認しました[2]。将来的な色素分子の集積化を視野に入れ、PMI を多数結合した亜鉛ポルフィリンモノマーを用い、有機溶媒に可溶なロッド状のポルフィリンオリゴマー合成に成功しました[3]。また、PMI 色素調整法の改良を行うことで、量的調製への可能性を探りました[4]。他にもポルフィリン類による金属表面修飾のために、メルカプト基を有する環状ポルフィリン6量体の設計合成も行いました[5]。上述のように Lindsey 研在籍中は一貫してポルフィリンを機能単位とする材料化学へのアプローチを行ってきました。

研究室での失敗談も色々あります。闇実験を明るいうちに行っていて Lindsey 先生に見つかったこともありますし、ペリレンモノイミドを合成する際、ある朝来てみると反応容器が破裂してドラフト中が赤く染まっていた、それ以来私が使っていたドラフトはペリレンモノイミド合成専用になったこともありました。いずれにしても私の中ではどの論文も思い出深い「作品」となっています。

学会活動では Lindsey 先生は年2回のアメリカ化学会年会に3~4名のポスドクを参加させます。私は2001年と2002年の秋の年会に参加し、そこでビール片手のポスターセッションに感銘を受けたことを覚えています。あちらこちらで活発な討論が行われたのはアルコールの効果もあるのでしょうか?

さて、アメリカ生活も3年目を迎える頃、ようやく「英会話術らしいもの」が身に付いたように感じました。私の後から渡米してきた日本人ポスドク的生活セットアップを手伝ったりしたことも役に立っているのではないかと思います。NCSU ではアジア出身の大学院生(特に中国、インド、

台湾、韓国)を多く目にしました。これからは我々も海外での Ph.D.取得を選択肢の 1 つに加えてもいいかもしれません。

最後になりますが、約 3 年間私を雇用して下さった Lindsey 先生、お互いを助け合い、励まし合った Lindsey 研の皆様にご感謝致します。また、渡米前からの私のよき理解者である妻 由美とアメリカで生まれ、生後 3 ヶ月で日本に連れてこられた長男 広大(こうた)にご感謝致します。

[1] Loewe et al. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2002**, 6, 626–642. [2] Tomizaki et al. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 6519–6534. [3] Loewe et al. *J. Mater. Chem.* **2002**, 12, 3438–3451. [4] Tomizaki et al. *Tetrahedron* **2003**, 59, 1191–1207. [5] Tomizaki et al. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 8199–8207.

とみざき きんや (kytomiza@bio.titech.ac.jp)



(図 2) Lindsey 先生主催のホームパーティーにて。写真左から筆者、Lindsey 先生、妻の由美。Lindsey 先生が持っているのは日本酒の空き瓶。

シンポジウム等会告



大阪府立大学先端科学研究所 (第10回 先端科学シンポジウム) 生物分子科学の新しい潮流を探る

21世紀を迎え、「生物」と「化学」の境界領域で、従来の学問の枠組みを越えて研究が大きな進展をみせています。この20年間に大きく発展した分子生物学は、今や、化学的な物質観なしには研究を進めるのが難しいとまで言われており、生命現象を分子レベルで制御する化学的アプローチが、大きな威力を発揮すると期待されています。一方、化学の研究分野においても、生体分子の解析法やバイオチップなどの新しい技術が開発され、生体分子そのものを材料する研究が大々的に進展してきています。今まさに「生物」と「化学」が融合し、新しい研究の流れを作り始めようとしています。今回のシンポジウムでは、この境界領域で活躍されている研究者をお招きし最新の話題をお話しいたします。多くの方々のご参加をお願い申し上げます。

・日時:2004年3月3日(水)午後1時～5時40分

・会場:大阪府立大学 学术交流会館 多目的ホール

地下鉄御堂筋線 なかもず駅下車 徒歩15分、南海高野線 白鷺駅下車 徒歩10分

・参加費:無料(ただし、事前申込が必要です)

なお、懇親会参加の方は、当日、受付にて別途懇親会費をお支払い下さい。

・申込先:〒599-8570 堺市学園町1-2 大阪府立大学 先端科学研究所

事務課 仲野(TEL:072-254-9803、FAX:072-254-9935)または

広報委員長 原(E-mail:hara@riast.osakafu-u.ac.jp)

世話人 藤井(E-mail:fujii@riast.osakafu-u.ac.jp)

学校名または会社名、部署、参加者氏名、電話番号、
懇親会参加の有無をお知らせ下さい。

・ **申込締切:2004年2月27日(金)**

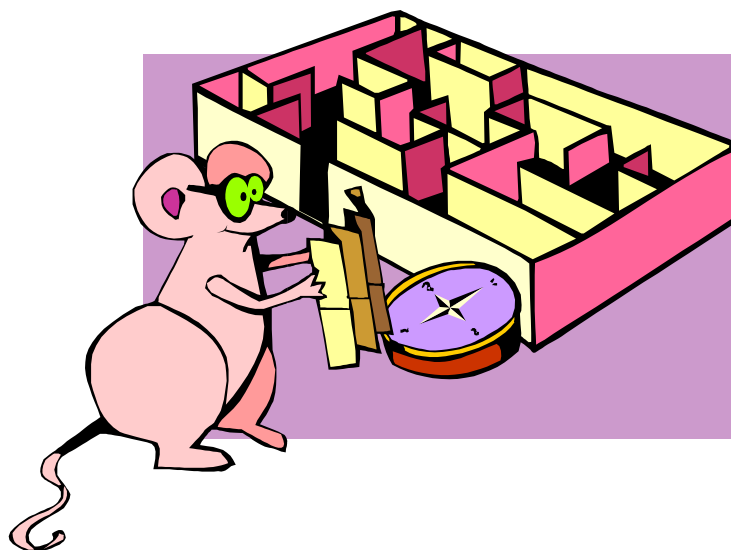


プログラム (敬称略)

13:00-13:10	開会挨拶	先端科学研究所所長	溝畑 朗
13:10-13:20	はじめに	大阪府立大先端研	藤井 郁雄
13:20-14:10	「次世代のアンチセンス分子の創製を目指して...」 - 刺激応答性核酸創製へのアプローチ -	大阪大工学部	和田 健彦
14:10-15:00	「デザインペプチドアレイを用いたプロテインチップ開発」	東工大生命理工学部	三原 久和
15:00-15:50	“Discovery of New Target RNA Using Chemical Genomics and RNA Specific Molecules.”	Korea Institute of Science & Technology	Jaehoon Yu
15:50-16:00	休憩		
16:00-16:50	「新しいNMR構造パラメーターを利用した蛋白質構造解析」	生物分子工学研究所	楯 真一
16:50-17:40	「酵素反応を重さで測る」	東工大生命理工学部	岡畑 恵雄
17:40-19:00	懇親会		

主催:大阪府立大学 先端科学研究所

<http://www.riast.osakafu-u.ac.jp>



FCCAセミナー「第11回グライコサイエンス若手の会」

本会は、糖関連の化学・工学・生化学・生物学等を研究対象とする若手研究者および学生の交流の会です。普段は交流のない様々な分野の研究者により、糖質を科学的かつ多角的に議論できればと思っております。以下の招待講演をお聞きした後、講師の先生方をお囲みした懇親会、参加者による口頭又はポスター発表(発表形式は事務局へ御一任下さい。;学会とは異なりますので、他分野の方にも理解できるようにお願い致します。)等、内容は豊富です。企業にお勤めの方でしたら商品の説明でも構いません。糖質をキーワードに新たな研究を展開し、新しい人脈を培うきっかけさらにはビジネスチャンスになれば幸いです。是非、お気軽に御参加下さい。

主催：FCCA

日時：平成15年8月20日(金)～21日(土)

場所：宮城県立泉が岳青年の家(宮城県仙台市泉区福岡字岳山9-6、

<http://www.pref.miyagi.jp/iz-seinen/>)

内容:

1. 招待講演:

清水弘樹氏(東北大院生命)

「化学合成法とNMR法によるたんぱく質接着糖鎖リガンドの溶液構造の解明」

今場司郎氏(食総研)

「糖鎖自動合成、並びに糖鎖ライブラリー合成を指向した次世代糖鎖合成法」

村島弘一郎氏(明治製菓ヘルスバイオ研)

「フラクトオリゴ糖を摂取したマウスにおける遺伝子発現解析」

2. 参加者による口頭発表およびポスター発表

3. 懇親会・レクリエーション

定員：40名

参加費(予定)：一般5,000円、学生2,000円(宿泊、食事代込み)

旅費申請：本FCCAセミナーへの参加者は川口基金(<http://www.gak.co.jp/AN/kkfundJ.html>)からの旅費の補助を受けることができます。

申込締切：平成16年7月17日(金)

口頭あるいはポスターの希望、発表題目を明記の上、下記の代表幹事へE-mailでお申し込み下さい。

申込先：東北大学大学院工学研究科 小林厚志(E-mail: kobayashi@poly.che.tohoku.ac.jp)



お知らせコーナー

受賞のお知らせ

大矢 裕一(関西大学工学部応用化学科)

受賞名:日本バイオマテリアル科学奨励賞(日本バイオマテリアル学会、
2003.12.16)

研究題目:「多様な物性を示す新規なポリ乳酸系生分解性高分子の合成とバイオマテリアルとしての応用」



会員異動

氏名:有賀克彦(前勤務先:科技団ナノ空間プロジェクト)

住所:〒305-0044 つくば市並木 1-1

物質・材料研究機構 物質研究所 超分子グループ

電話:029-851-3354 ex. 8115(居室、秘書経由)

029-860-4597(本人直通)

FAX:029-852-7449(並木業務室、平日 8:30-17:15)

E-mail: ARIGA.Katsuhiko@nims.go.jp

産業戦略工学専攻 山下啓司

466-8555 名古屋市昭和区御器所町

名古屋工業大学 おもひ領域

Tel&Fax 052-735-5243

E-mail yamakei@nitech.ac.jp



編集後記

生命化学研究会では、年3回のレターをお送りするようにしております。ここに2003年度最後の生命化学研究レターを無事お送りすることができ、編集担当一同、喜んでおります。

本号では、3年間、本会会長を務めてくださった、馬場嘉信氏に巻頭言を執筆いただき、今後の研究会へエールを送っていただきました。長い間、本当にありがとうございました。馬場会長の最も大きな功績は、第1回生命化学国際会議を成功に導いてくださったことでした。会議の記録は前号(No. 13)に掲載いたしました。本号には、国際会議でポスター賞を受賞された若手研究者の皆さんに、研究紹介あるいは論文紹介「気になった論文」を執筆いただきました。

生命化学国際会議の会場で行われました、本会総会で承認されましたように、次期会長には九州大学先端物質化学研究所 浜地 格氏が就任され、次の3年間の舵取りを御願いすることになりました。学会が数多く存在し、討論会・シンポジウムが過密スケジュールとなっている昨今、学会や研究会の存在意義が問われています。皆さんが貴重な研究時間を割いて参加いただく以上、できるだけサイエンティフィックに有意義な会であるように会員全員が心がけるべきだろうと思います。浜地新会長を盛りたてて、次の3年間も新たな展開を模索できればと、一会員として願っております。

会長交代に伴い、本レターの編集担当も新しいメンバーとして、大阪市立大学の長崎 健氏と、東京学芸大学の原田和雄氏に加わっていただくことになりました。本レターは当初、二木史朗氏が担当され、その後、和田健彦氏と石田が加わりました。個人的には、両氏に助けていただきながら、No. 8から編集させていただきました。作業は大変なこともありましたが、概ね楽しくやらせて頂きました。誰よりも早く原稿を拝見し、わからないことがあれば補足説明を御願いしたりすることによって、私自身、大変勉強をさせていただいた2年間でした。今後は、編集メンバーの一員として、協力させていただきたいと思っております。

本号のみならず、レター全般にご要望、ご指摘ございましたら、石田までご連絡いただければ幸いです。特に、本レターのメールによる配信の是非、解像度とファイルサイズの関連など、編集担当一同、苦慮しております。皆さんのご意見、アイデアがございましたらぜひお聞かせください。

次号(No. 15)は、長崎氏の担当により、2004年6月に発行を予定しております。新しい生命化学研究レターにご期待ください。



石田 斉
北里大学理学部
(ishida@sci.kitasato-u.ac.jp)