



生命化学研究 レター

No. 23 (2007年2月)

1. 巻頭言		
	10年目を迎えて	2
	三原 久和 (東京工業大学生命理工学部)	
2. 研究紹介		
	単分子膜→糖→DNA→ペプチド	4
	松浦 和則 (九州大学大学院工学研究院 応用化学部門)	
	糖鎖を用いた生理活性材料の設計と利用	9
	三浦 佳子 (北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科)	
	翻訳系を用いた特殊ペプチドの合成	14
	村上 裕 (東京大学先端科学技術研究センター)	
3. 論文紹介「気になった論文」		
	井本 修平 (東北大学多元物質科学研究所)	20
	瀧 真清 (岡山大学大学院自然科学研究科)	22
	田丸 俊一 (京都大学大学院工学研究科)	26
	堤 浩 (東京医科歯科大学 生体材料工学研究所)	28
4. 生命化学研究法		
	ペプチド固相合成法	34
	富崎 欣也・高橋 剛 (東京工業大学大学院 生命理工学研究科)	
5. 米国 Northwestern 大学留学体験記		42
	多喜 正泰 (京都大学大学院人間・環境学研究科)	
6. シンポジウム等会告		45
7. お知らせコーナー		49
	受賞・会員異動のお知らせ 編集後記	

巻頭言

10年目を迎えて



東京工業大学生命理工学研究科

三原久和

(みはら ひさかず: hmihara@bio.titech.ac.jp)

日本化学会生命化学研究会は、2007年で発足して10年を迎えます。1998年に30歳台を中心として発足した若い世代の新しい研究会のメンバーも40代後半が中心になってきました。2007年3月から4期目に入り、4期目の会長を務めることになりました。9年間事務局を務め、内部の詳細は理解しているつもりですが、会員の皆様の総意を反映できるよう努力いたします。よろしくお願いいたします。

今期は、まず大きな分岐点として、10年間の間に日本化学会の施策の変更などが起こり、生命化学研究会も2007年度(2008年2月)で日本化学会の冠(かんむり)がとれる期限が来ます。これに伴い、研究会の体制をどうするか決めていかなければなりません。ここで、10年前(前身の生物分子化学研究会(熊本、箱根、徳島)から13年)の研究会をふりかえって見ます。約10年程度前、生物有機化学の分野は、成熟の段階にあり、化学の分野でもタンパク質のクローニングやフェージライブラリ、核酸のSELEXなど分子生物学手法を取り入れた研究が普通に展開・理解されるようになってきていました。米国でのBioorganic Chemistryのゴードンカンファレンスの若さと活発さがよく議論の話題になっていました。そこで「化学の力で生命現象解明から利用の分野まで含めて、生体分子をコアに真摯に議論する会を作ろう。」「化学会のみならず薬学会、高分子学会、農芸化学などの分野にもまたがる研究者層で議論しよう。」「手弁当で集まり自由にたっぷり議論しよう。」という趣旨で有志20-30人が集まった“生物分子化学研究会”が発足しました。今でいう、広義のケミカルバイオロジーを議論する会にあたると思っています。幹事15名も若く、まだ講師や助教授になりたての世間を知らない、元気が旗印である会のスタートでした。最初の2年の研究会は、「現在の自身の研究をベースに10年後(20xx年)の研究は？」について、20-30名の参加者全員が、発表する義務があり、最後の数人は時間がなくなって、ドタバタやっていたことが懐かしく思います。その頃からの参加者の方々は、10年後の今、研究は予想通りに出来ているのでしょうか？おそらくもっと組織的にも内容的にも発展されているのではないのでしょうか。熊本の地から発足した前身の生物分子化学研究会から3年目に日本化学会の正式な研究会として申請することになった際、名称をどうするか議論し、先の趣旨(心意

気)を鑑み、“生命化学研究会”ということになりました。初代の会長は、杉本直己さん(生命化学研究会では、先生とは呼ばない決まりです)であり、グループの中の一番の年配者であったことよりも、暫く日本化学会の先輩・委員会へも一番通じていたこと、全体への目配りや将来へのコンセプト作りに最も熱心であること(=声がかいという意見も)ことが会長就任依頼のメジャーな思考でもあったと思っています。1997年の年会で杉本さんに会長案をお願いした際、即決で「やりましょう!」とっていただいたのを今でも鮮明に記憶しています。その会長の3年間の杉本さんの頑張りはこの場では言い尽くせないもので、皆の感謝の未だ尽くせないところでもあります(杉本さん、有難うございます)。

10年間のあいだに、正会員は160名に膨らみ、毎年の生命化学研究会シンポジウムも多くの参加者・発表者を得て盛会かつ目的どおりに行ってきています。計2度の国際会議(ISBC2004 淡路(馬場)、ISBC2006 神戸(杉本・浜地))も大正解(盛会)で、国際連携にも積極的でしっかりと評価されています。日本化学会を中心に、産学連携BICSシンポジウム(JCIIと連携、計3回)を開催し、今年3月の日本化学会アドバンス・テクノロジー・プログラム(ATP)のバイオ版へと発展させています。このように日本化学会研究会としては、前例が無いほど?活発な活動を通じた貢献を実施してきています。今後、さらに若手を中心とした日本化学会のディビジョンを跨るような“サイエンティフィック”活動への広がりも期待されています。

こういう回顧録を書くと、年配者からの思い出のように若い方には捉えられるかもしれません(書いている自分がそう思っています)。が、今までの Society での先輩たちがそうであったように、これは次への引き金であり、初期の趣旨、今までの活動が、参考になれ反省になれ、新しい段階へのステップであることが今改めてよく理解できます。今年度は最初に述べたとおり、10周年、日本化学会との関係など研究会にとって大きなポイントの年になりそうです。皆様とアカデミアとしての議論を重ねていける会が継続的に行われれば一番と思っています。今後の引き続きのご協力をよろしくお願いいたします。

最後になりますが、今年6月24-26日の日程でスイス・ローザンヌにおいて、第1回日本・スイスケミカルバイオロジーシンポジウム(JSCB2007)を開催します。2008年1月には、発足の記念の地、熊本にてシンポジウムと研究会を開きます。初心に帰り、また次を真剣に議論するにはよい機会だと思っています。皆様との出会い、面白く活発な議論を楽しめればと思っています。





単分子膜 糖 DNA ペプチド

松浦和則

九州大学大学院工学研究院 応用化学部門
(JST さきがけ「構造制御と機能」研究者 兼任)
E-mail: ma14tcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp



はじめに

私の研究紹介を一言で表現する良いタイトルが思い浮かばなかったため、これまで主に扱ってきた物質でタイトルを書いてみました。

東工大の大学院時代に自己集合単分子膜 (Self-assembled monolayer) 上での**気相系分子認識**を、水晶発振子マイクロバラン (QCM) を用いて解析するという研究をさせていただいていた私は、バイオっぽい研究を常に意識しながらも、実際には緩衝液さえ作ったことが無いほど、生命科学研究から離れていた¹⁾。そんな私が、幸運にも博士号取得後すぐに、名古屋大学大学院工学研究科の小林一清教授のもとで助手として働かせていただいたからは、糖や DNA を化学的にいじる研究をするようになったのである。当初、小林先生からは、「松浦さん、糖を使ってなんか面白いことをやってくれんかいのう〜」とだけ言われ、「『なんか面白いこと』と言われても・・・」と思いつつも、色々考えることになった。一貫したテーマで研究を行ってきたわけではない(飽きっぽい)ので、纏めるときに苦労するのだが、助手以降に私が行ってきた研究を以下にかいつまんで紹介します。

螺旋(らせん)状糖鎖高分子

小林先生は、ラクトースなどの糖を側鎖にもった合成高分子(ポリスチレンなど)の合成および生体材料への応用のご研究でよく知られていた。そこで最初に行ったのが、糖を側鎖に有するポリフェニルアセチレンやポリイソシアニドなどの螺旋状高分子の合成である。螺旋状に糖をきれいに並べたら、きっとレクチンや細胞に効果的に認識される材料になるのでは? という(糖だけに)甘〜い考えで、研究をスタートした。合成したのは良いものの、(今思えば当然なのだが)螺旋状に糖を並べることで糖側鎖間が密になってしまい、しかも主鎖が比較的剛直なので、ポリスチレンの糖鎖高分子と比べ、レクチン認識能はかなり低下するという結果となってしまった^{2,3)}。しかし、レクチンには認識され難かったものの、糖を有するポリイソシアニドはなぜか親水性表面に多層吸着することがわかった⁴⁾。その時に、「クラスター化したら糖同士でも水中で相互作用する」ということに気づき、次の糖鎖間相互作用を研究するきっかけとなった。

糖鎖高分子を用いた糖鎖間相互作用

糖の分子認識と言えば、天然ではレクチンや糖転移酵素・糖加水分解酵素で、人工系ではフェニルボロン酸などを思い浮かべるだろう。しかし、例は少ないが、細胞間の接着などに糖鎖-糖鎖間の相互作用が関与していることが、ワシントン大学の箱守先生らにより提唱されている⁵⁾。例えば、B16 メラノーマ細胞とマウスのリンパ球細胞が接着する際に GM3 と Gg3 という糖脂質間の相互作用が関与していることが示されている。しかしながら、単独の糖同士の水中での相互作用は極めて弱いため、研究方法の困難さから構造と認識性の関係などは十分にわかっていなかった。それで、上述の「クラスター化したら糖同士でも水中で相互作用する」という考えに基づき、糖脂質の水面単分子膜と、糖を側鎖に有するポリスチレンとの間の相互作用を表面圧-面積(π -A)等温線⁶⁾および表面プラズモン共鳴 (SPR)^{7,8)}を用いて解析する研究を行った。この

方法により、これまで難しかった GM3-Gg3 の糖鎖間相互作用を高感度かつ定量的に解析することに初めて成功した(図 1)。また、岐阜大農学部の木曾先生から合成糖脂質(GM4 や Gg3 など)や名大農学部(当時)の北島先生からのニジマス由来 KDN-GM3 のご提供のおかげで、様々な糖鎖構造を用いて糖鎖間相互作用を調べることができ、この相互作用における GalNAc (*N*-アセチルガラクトサミン)と NeuNAc (*N*-アセチルノイラミン酸)構造の重要性を示すことができた。

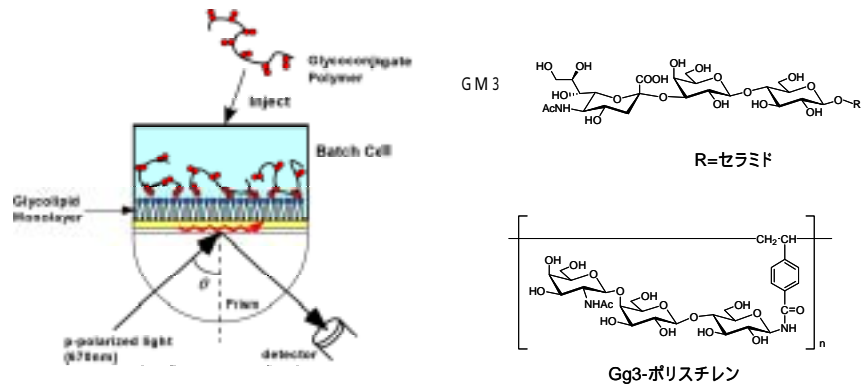


図 1. SPR による糖脂質単分子膜と糖鎖高分子との間の糖鎖間相互作用の実験セットアップ、GM3 および Gg3-ポリスチレンの構造。

DNA-糖鎖コンジュゲート

そんなある意味マニアックな糖鎖間相互作用を研究しながらも、もう一つ糖関連でマニアックなものが気になっていた。それは、「ワトソン 遺伝子の分子生物学」という教科書で偶然見つけた糖で修飾された DNA である。T2, T4, T6 の T 偶数系ファージ(なぜ偶数だけなのか知りませんが)のシトシン(C)塩基の 6 位には、グルコースなどが修飾されており、宿主に感染した際のヌクレアーゼ耐性を獲得しているようである。それで、「もし人工的に DNA のある特定塩基を任意の糖鎖で修飾できたら面白い材料になるかも」という期待と、「単に人の作っていないモノを作りたい」というマニアックな発想から、人工の DNA-糖鎖コンジュゲートを創製する研究をスタートした。どうやって DNA としての機能を損なわずに、簡便かつ選択的に DNA を修飾するかは、かなり考えたが、これまた偶然にもある会社の試薬カタログに載っていた「ジアゾカップリング法でタンパク質をピオチンラベルする試薬」からヒントを得て、DNA のグアニン塩基の 8 位(二重螺旋の主溝側)をジアゾカップリングにより糖鎖修飾する方法を開発した(図 2)^{9,10}。サケ精巢 DNA をラクトースで修飾したコンジュゲート(修飾率:全塩基の 10%程度)は、B 型二重螺旋構造を保持し、ヌクレアーゼ耐性を有し、レクチンにより特異的かつ強く($K_d \approx 10^5 \text{ M}^{-1}$)認識されるものであった⁹。通常、DNA を化学修飾すると mRNA への転写は抑制されると考えられるが、興味深いことに、プラスミド DNA をラクトースで修飾したものは、T7 RNA ポリメラーゼによる mRNA への転写活性を保持していることがわかった¹⁰。それで、ついでに転写制御できないかと思い(正直言ってお遊びですが)、ラクトース修飾プラスミドにレクチンを加えて転写 OFF、これにラクトースを加えて転写 ON という糖による転写制御ができることを示した(図 3)¹¹。

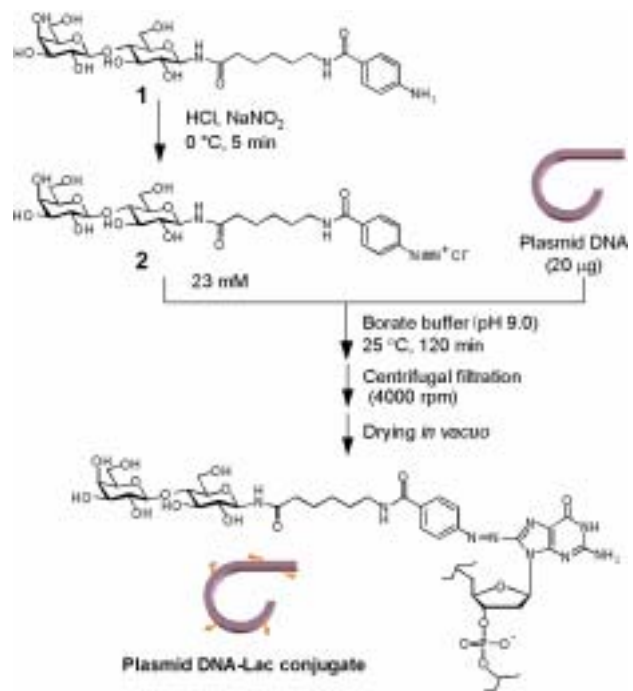


図 2. ジアゾカップリング法によるプラスミド DNA の糖鎖修飾

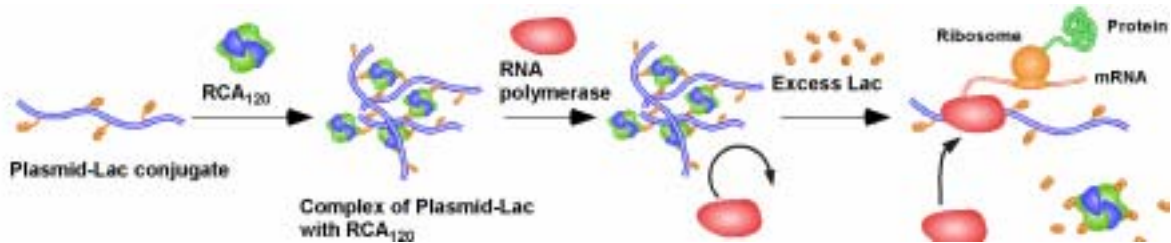


図 3. ラクトース修飾 DNA とレクチンによる遺伝子発現制御の模式図 .

半分ずらし相補鎖による DNA に沿った糖の配列化

ジアゾカップリング法というのは、4年生でもできる簡便な方法なのだが、高分子反応なので修飾位置の厳密な制御は困難である。それで、やはり精密に糖を並べてみたいという欲求があった。そんな時、関西大の大矢先生が「DNA をテンプレートにしてクロモフォアを配列化する」研究¹²⁾を発表されているのを高分子学会で聞き、「クロモフォア→糖にしたら面白いやろなあ」と漠然と思った。しかし、ただ真似するのもなんなので、「半分ずらし相補鎖(Half-sliding complementary DNA)」という考え方を導入してオリジナルな DNA 組織化方法を提案した^{13,14)}。図 4 に示すように、糖側鎖としてガラクトースを有する 20-mer DNA を合成し、その配列に半分ずらして相補的となるような 20-mer DNA を等量混合することで、DNA を一次元組織化し、ガラクトースを 20bp おき (6.8 nm 間隔) に配列することに成功した。この DNA に沿ったガラクトースクラスターは、RCA₁₂₀ レクチンに協同効果を伴って認識された。また、ガラクトースの間隔を 18bp, 20bp, 22bp おきと変え、糖鎖の相対配置を厳密に変えることで、RCA₁₂₀ レクチンによる認識挙動が大きく変化することを示すことができた。

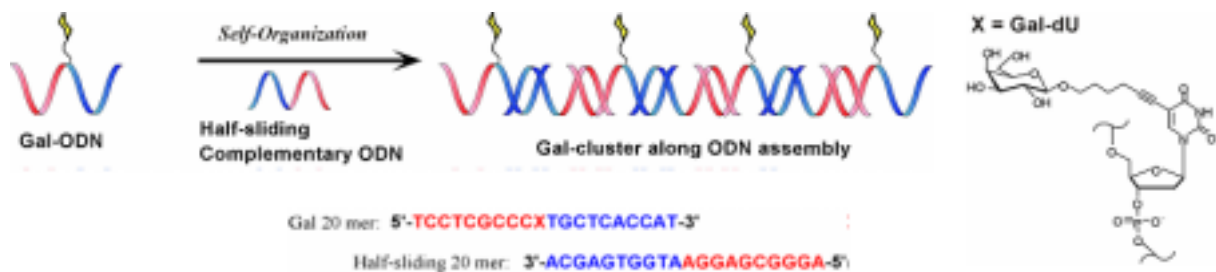


図 4. ガラクトース修飾 ODN の半分ずらし相補鎖とのハイブリダイゼーションによる DNA に沿ったガラクトースクラスターの構築 . 同じ色で示したシーケンスはそれぞれ相補的である .

DNA の自己集合による Nucleo-cages

そんなこんなで研究しているうちに、幸運にも九州大学の君塚研究室の助教授として採用していただくことになった。君塚先生には、「助手の時にやっていた研究は忘れてね」と最初に言われ、新しいことをせねばならないことになった。最初は糖を引きずって、カーボンナノチューブに糖をつけるなどの研究¹⁵⁾を行っていたのだが、様々な事情によりそれもやめてしまった。それであれこれ考えたあげく、2002 年当時はあまり例がなかった(今では Seeman 一派などがものすごい勢いで論文出していますが...) DNA の自己集合による面白いナノ構造体でも作ってみようかということになった。図 5 に示すように、DNA の三叉路構造をモチーフにして、それらの 3'末端に自己相補性 Sticky-end A₅T₅ を有する 3 本の 30-mer DNA を分子設計した。これらの DNA 三叉路構造が Sticky-end を全てハイブリダイゼーションに使うように自己集合すると、閉じた球状構造となることが予想される。実際、これら 3 本の DNA の混合水溶液 (全 DNA 濃度: 1 μM) を 70 から 10 にゆっくり冷却すると、粒径約 40 nm の DNA 球状集合体

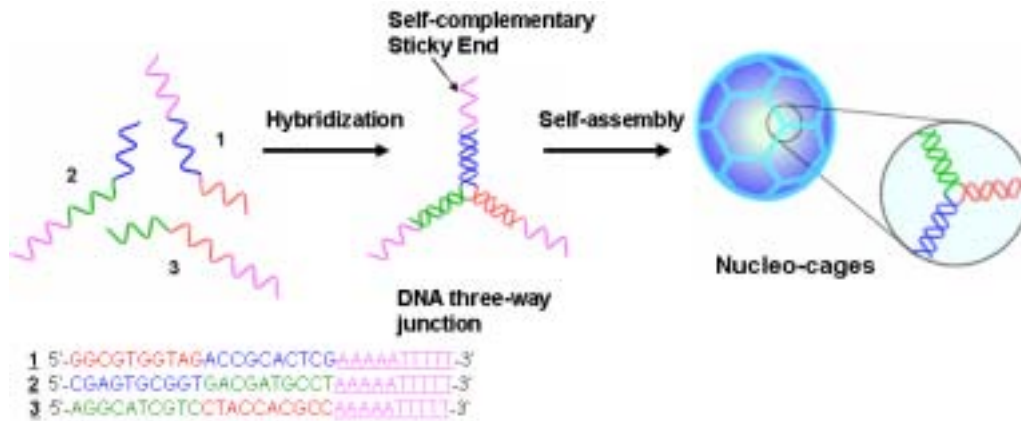


図5. オリゴDNAの自己集合による Nucleo-cageの構築およびオリゴヌクレオチドの塩基配列. 同じ色で示したシーケンスはそれぞれ相補的である.

(”Nucleosome“という用語はすでにあるので、”Nucleo-cage”と勝手に命名した)が自発的に構築されることが動的散乱(DLS)測定および透過型電子顕微鏡(TEM)観察により明らかになった¹⁶⁾。この Nucleo-cages は、ヌクレアーゼ切断実験より、一本鎖および二本鎖末端を有しない閉じた構造であり、内部はDNAで満たされた構造であることが共焦点レーザー蛍光顕微鏡(CLSM)観察よりわかっている^{17,18)}。Seemanらの有名な DNA-cube¹⁹⁾や DNA-sheet²⁰⁾と Nucleo-cage で、何が違うかと言うと、「作り方や構成要素のシンプルさがかなり違う」ということになるかと思う。しかし、その辺がなかなかわかってもらえず、最初の論文¹⁶⁾を通すにはかなり苦労したのだが・・・。

三回対称ペプチドコンジュゲートの自己集合

DNAの三叉路構造から Nucleo-cages を作っている時に、何気なく「タンパク質の構造入門」および「ストライヤー 生化学」といった教科書をパラパラと眺めていると、偶然にも三叉路構造をユニットとして自己集合する生体超分子があることに気がついた。例えば、トマトブッシュスタントウイルスは、三回対称性のシート構造が自己集合して、正十二面体の内部骨格を形成している。また、クラスリンという細胞内のタンパク質集合体も、三回対称性のペプチドユニットが自己集合して C₆₀のような幾何構造を構築しているのである。自然が織りなす幾何学的美しさに感銘を覚えるとともに、「こりゃ使える」と思った私は、それらを単純化して、人工的に「ウイルスのようなもの」を作ってみたくなった。それで、あれこれ考えたあげく、図6のような三回対称性シートペプチドコンジュゲートを設計するに至った。このコンジュゲートは、酸性水溶液中で逆平行シート構造を形成し、直径約 19 nm のカプセル状集合体を形成することが、動的散乱(DLS)測定および原子間力顕微鏡(AFM)測定からわかった²¹⁾。この直径は、三回対称ペプチドコンジュゲート分

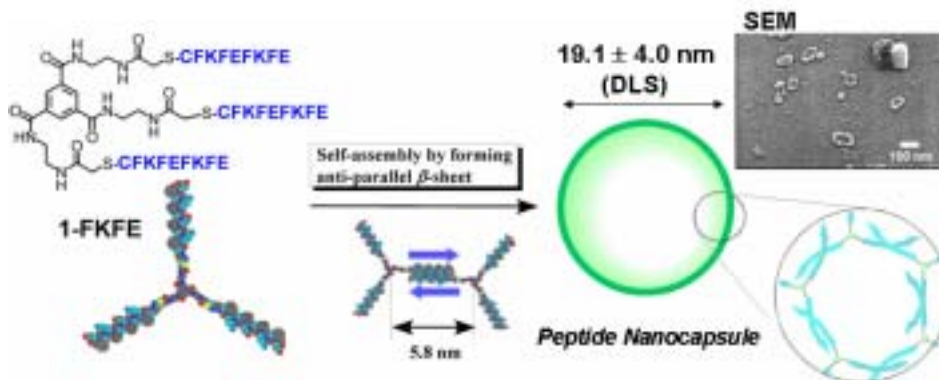


図6. 三回対称シートペプチドコンジュゲートの自己集合によるペプチドナノカプセルの構築の模式図

子が逆平行シート形成により正十二面体構造を形成したときの大きさ(16 nm)に近い値であり、狙い通りにウイルスの外殻様のペプチド集合体が形成していることを示唆している。

現在は、様々な対称性(5回対称性など)コアや様々な自己集合性ペプチドを用いて、ナノ構造体構築を行っており、その内部にDNAなどを内包して、人工ウイルスの構築を目指しています。そんな感じのプロポーザルで、今年度JST さきがけ「構造制御と機能」領域に採択していただきました。

おわりに

以上、松浦が博士号取得後に行ってきた研究をガラガラと述べてきました。名古屋大学名誉教授の小林一清先生および九州大学 君塚信夫先生には、色々ご助言いただき、大変お世話になりました。また、学生時代の師匠の岡畑先生には、「人にアツと言わせる研究をせい！」などと学会で会うたびに叱咤激励されています。そんなわけで、今後とも人のやらない変な研究をしていくかも知れませんが、どうぞよろしく願いいたします。

参考文献

- 1) 松浦和則, *高分子*, **2001**, 50 巻, 10 号, p.732.
- 2) Matsuura, K.; Furuno, S.; Kobayashi, K. *Chem. Lett.* **1998**, 847.
- 3) Hasegawa, T.; Kondoh, S.; Matsuura, K.; Kobayashi, K. *Macromolecules* **1999**, 32, 6595.
- 4) Hasegawa, T.; Matsuura, K.; Ariga, K.; Kobayashi, K. *Macromolecules* **2000**, 33, 2772.
- 5) Hakomori, S. *Pure Appl. Chem.* **1991**, 63, 473.
- 6) Matsuura, K.; Kitakouji, H.; Oda, R.; Morimoto, Y.; Asano, H.; Ishida, H.; Kiso, M.; Kitajima, K.; Kobayashi, K. *Langmuir* **2002**, 18, 6940.
- 7) Matsuura, K.; Kitakouji, H.; Sawada, N.; Ishida, H.; Kiso, M.; Kitajima, K.; Kobayashi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 7406.
- 8) Matsuura, K.; Oda, R.; Kitakouji, H.; Kiso, M.; Kitajima, K.; Kobayashi, K. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 937.
- 9) Matsuura, K.; Akasaka, T.; Hibino, M.; Kobayashi, K. *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 202.
- 10) Akasaka, T.; Matsuura, K.; Emi, N.; Kobayashi, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 260, 323.
- 11) Matsuura, K.; Hayashi, K.; Kobayashi, K. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2533.
- 12) 大矢裕一, *生命化学研究レター*, No.15 (2004 June), p.12.
- 13) Matsuura, K.; Hibino, M.; Yamada, Y.; Kobayashi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 357.
- 14) Matsuura, K.; Hibino, M.; Ikeda, T.; Yamada, Y.; Kobayashi, K. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 352.
- 15) Matsuura, K.; Hayashi, K.; Kimizuka, N. *Chem. Lett.* **2003**, 32, 212.
- 16) Matsuura, K.; Yamashita, T.; Igami, Y.; Kimizuka, N. *Chem. Commun.* **2003**, 376.
- 17) Kim, K.; Masumoto, K.; Matsuura, K.; Kimizuka, N. *Chem. Lett.* **2006**, 35, 486.
- 18) Kim, K.; Matsuura, K.; Kimizuka, N. *Bioorg. Med. Chem.*, in press..
- 19) Chen, J.; Seeman, N.C. *Nature* **1991**, 350, 631.
- 20) Winfree, E.; Liu, F.; Wenzler, L. A.; Seeman, N. C. *Nature* **1998**, 394, 539.
- 21) Matsuura, K.; Murasato, K.; Kimizuka, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10148.

研究紹介

糖鎖を用いた生理活性材料の設計と利用

三浦 佳子

北陸先端科学技術大学院大学
マテリアルサイエンス研究科

E-mail: miuray@jaist.ac.jp



1. はじめに

細胞表層の糖鎖が大きな関心を集めている。古くは、糖は単なる生体のエネルギー物質や天然高分子としてしか認識されていなかったが、糖鎖が生体認識シグナルとして生命現象で重要な役割を果たしていることがわかってきたためである。そして、ゲノムプロジェクトによって生命現象の中心となる遺伝子の発現やタンパク質合成の機構が明らかになるにつれ、生命現象のセントラルドグマだけではなく、遺伝子に直接コードされていない糖鎖が生命現象の鍵を握っているとも考えられるようになったためである。

生理活性糖鎖は、細胞表層に糖脂質、生理活性多糖、糖タンパク質などとして存在して、糖鎖を提示して、細胞間の情報交換を行っている。そして、細胞の接着、インフルエンザウイルスの感染、癌の転移、認知症の発症など、重要な生命現象や疾患、感染症に深くかかわっている。

筆者はこうした生理活性糖鎖の機能を活用する材料の研究を進めている。糖鎖機能材料の魅力は、糖鎖の機能を活用することによって、具体的な生体機能や疾患を操作できることである。また、糖鎖の機能を材料として再構築することで、複雑な天然の生理活性糖鎖だけではわからない、糖鎖機能を明らかにすることも可能であろう。

糖鎖の機能材料を構築する上では、糖鎖とタンパク質の相互作用の理解が重要である。糖鎖とタンパク質の相互作用は弱いものの、糖鎖を密集することで強くなることが知られており、天然では糖タンパク質や糖脂質が集合構造を形成している。糖タンパク質では、樹状の密集した糖鎖の塊を提示している他、糖脂質はコレステロールと共に糖脂質が局在構造をとるラフト領域や、細胞膜が窪んだカベオラという糖鎖の集合構造を提示している。人工的に糖鎖が密集した糖クラスター化合物を合成すれば、糖鎖の認識機能を効率的に発現する分子となり、細胞やタンパク質、ウイルスなどに結合し、薬剤や材料として有用な機能を発揮する。これまでに、糖鎖を側鎖に結合させた高分子材料などが、細胞培養材料として応用された例はあるが、糖鎖機能の活用は十分とはいえない。

筆者の研究では、特に、糖鎖機能材料として高分子素材やバイオインターフェースの研究を行っている。これらを 2. グリーンケミストリーとの融合、3. 糖鎖高分子の設計、4. 糖鎖バイオインターフェースの順に記す。

2. 糖鎖高分子のグリーン合成と機能

糖は生体認識を司る生体シグナル分子であると同時に、豊富に存在する生物資源の側面も持っている。それ故、天然資源である糖を効率的なプロセスで機能材料化することは、バイオマスの有効利用や高機能化の点からも重要である。しかしながら、糖は多価アルコールである上に、アミノ基、硫酸基、リン酸基などの官能基も有しているため、保護基の化学による煩雑な有機合成プロセスが

必須と考えられており、バイオマスの有効利用の観点から再考が必要である。

糖鎖の機能を利用し、且つ環境調和性に優れた糖鎖機能材料を作成するためには、生理活性糖鎖の入手と、糖鎖の機能を有効に活用できる材料の仕組みが必要である。我々は糖鎖高分子の合成プロセスの簡素化、糖クラスター化合物の効果的な利用を通じて、優れた生体機能を有し、環境負荷の低い糖鎖材料の創製を目指した。糖鎖材料合成において、選択的な化学反応を有効に活用することで、合成を簡素化させ、環境負荷を低減することができる。

そこで、環境負荷を低減するために、生体触媒である、酵素による糖鎖高分子合成法を検討した(図 1)。酵素は高い触媒活性、化学選択性、温和な反応条件で化学反応が進行するため、糖鎖高分子の環境負荷を軽減させるのに適している。更に、加水分解酵素の逆反応を利用して合成した材料は酵素の正反応によって自ら、生分解性となるため、生体分解性を要求される生体機能材料の合成方法としても望ましい。

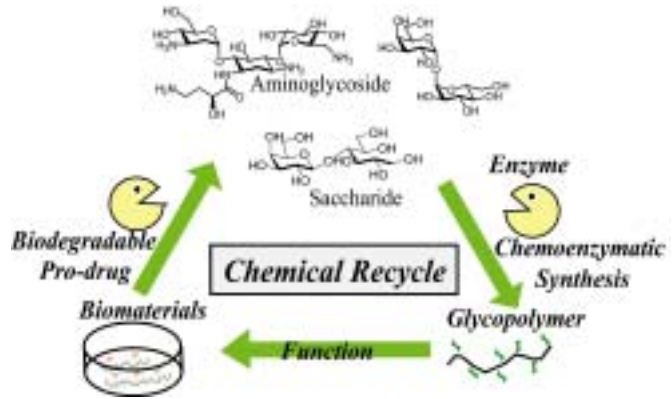


図 1 酵素合成による機能性糖鎖高分子。

糖アルコール¹⁾、オリゴ糖類²⁾、アミノグリコシド³⁾といった糖鎖を有機溶媒に溶解させ、エステラーゼを用いた、酵素エステル化反応を行った。数多くの水酸基、多様な官能基にも関わらず、各々の場合に選択的なエステル化反応が進行した。ジカルボン酸ジビニルエステルをアシルドナーとして用いた酵素反応では、一方のカルボン酸のみが反応して糖鎖と結合し、もう一方のカルボン酸ビニルエステルは、反応せずにビニルエステルのままであった。このビニルエステルを過酸化水素水による、温和なラジカル開始剤を用いて重合し、糖鎖高分子を合成した(図 2)。

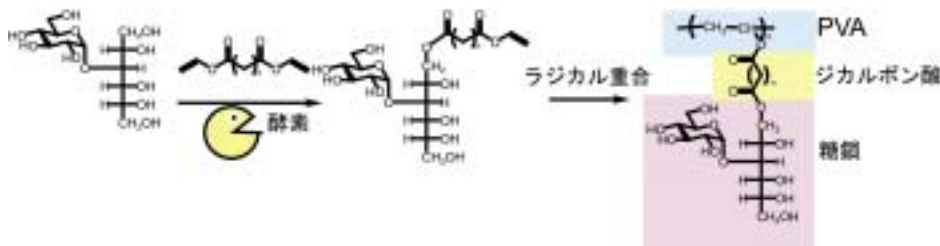


図 2 PVA 型糖鎖高分子の合成と構造。全て生分解する要素から成り立つ。

この糖鎖高分子では、主鎖はラジカル重合による C-C 結合を有しているものの、生分解性のポリビニルアルコールを主鎖としたユニークな構造となる。側鎖のカルボン酸、糖鎖はエステル結合で連結しており、全て生分解する要素から成り立った高分子となった¹⁾。実際に、生化学的酸素要求性 (BOD) を測定すると、30 日間で 30% 程度分解し、緩やかな分解性を有することがわかった。生分解性を利用することで生体認識性と生体分解性を併せ持つ材料として、細胞培養材料や診断材料への応用が期待できる。抗生物質であるアミノグリコシドを担持させた糖鎖高分子を同様の手法で合成したところ、高分子が分解性を有するため、薬品を徐放するプロドラッグとして機能した³⁾。

これらの糖鎖高分子では、糖の化学構造は極めて単純化されているが、糖鎖が集積化された構造

を有しており、糖クラスター効果を発揮し、糖認識タンパク質や細胞に対して強く結合する。グルコースやガラクトースを有する糖鎖高分子は対応するレクチンである、ConA や RCA₁₂₀ に対して、 $10^4 \sim 10^5$ (M⁻¹)オーダーの結合定数が観測され、単独の糖よりも 10 倍以上強い親和性を示した。また、簡易な糖鎖構造を糖クラスター効果によって集積化することにより、複雑な生理活性糖鎖の模倣機能を発揮させることもできた。大腸菌 O157 の産生する志賀毒素の天然リガンドは Gb₃ (Gal α (1-4)Gal β (1-4)Glc β Cer)であるが、構造に類似性を含むガラクトース型トレハロース (Gal α (1-1) α Glc)を糖鎖高分子として集積すると、十分な志賀毒素阻害効果を発揮することがわかった²⁾。

3. 糖鎖高分子の設計と利用

糖鎖を集合化させた糖クラスター化合物はタンパク質と強く相互作用する。特に、高分子の側鎖に糖鎖を結合させた糖鎖高分子は強いクラスター効果と、医用高分子材料への応用性から、注目されている。2 で示したようなポリビニルアルコールを主鎖とする糖鎖高分子をはじめとし、ポリスチレンやポリアクリルアミドの糖鎖高分子が合成されている。

天然の糖脂質や糖タンパク質糖鎖は、複雑な立体構造を有しているのに対し、糖鎖高分子では特定の糖鎖が密集した構造で、簡易な構造を提示している。こうした人工的な糖鎖の提示の仕方によっても、設計の如何によっては、天然の糖鎖タンパク質の相互作用よりも強い生体反応を引き起こす。それゆえ、糖鎖タンパク質の相互作用における、多価効果の解析、鍵となる糖鎖の構造の解析に対して、人工的な糖鎖高分子は有用なツールとなる。

筆者らは、ラクトースを側鎖に有する糖鎖高分子を、リビングラジカル重合によって、重合度を制御して合成し、レクチンとの相互作用を調べた。すると、重合度が高くなるにつれて、同じ糖鎖濃度でも、タンパク質との相互作用は、強くなることがわかった。また、糖鎖高分子の含有量を変えて、タンパク質との相互作用を測定すると、糖鎖が中程度に含まれている場合 (20 %程度の糖鎖含有量) に最も優れたタンパク質認識性を発揮した。また、糖鎖高分子の認識性は高分子の主鎖構造にも影響を受け、主鎖構造の適度な剛直性と柔軟性を持つポリスチレン主鎖の糖鎖高分子が高い生体認識性を示した。また、特定の糖鎖構造を取り出して、その作用を詳細に調べることで、薬理活性を詳細に検証することもできる。筆者らは、生理活性多糖の一部となる、硫酸化糖鎖を抽出した上で、高分子化した材料を合成して、この高分子のタンパク質アミロイド化抑制活性を調べた。すると、硫酸化糖鎖を担持させた高分子はアミロイドの凝集抑制活性を示すことがわかった (図 3)。

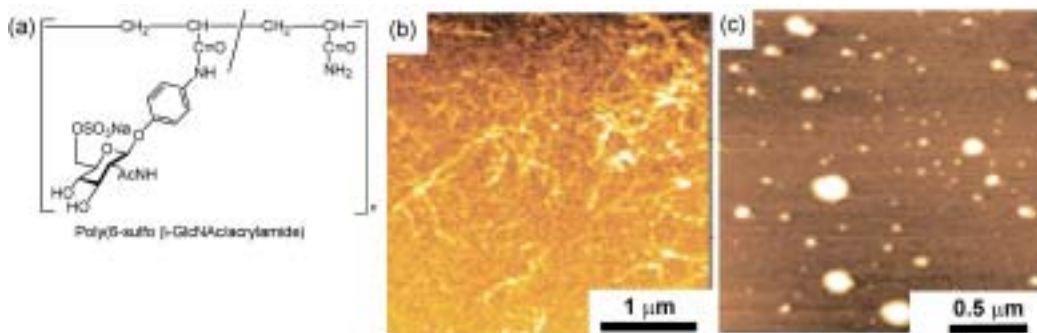


図 3 硫酸化糖鎖高分子の設計と生体機能 . (a)硫酸化糖鎖高分子の構造、(b) A β (42)のモルホロジー、(c)糖鎖高分子を加えた場合の A β (42)のモルホロジー .

4. 糖鎖インターフェースの設計と利用

糖鎖の材料としては、高分子を利用した材料化が可能であると共に、金属や半導体、ガラスなどの基板に固定化した基材も重要である。天然の糖脂質は細胞膜表層でカベオラやラフトといった糖鎖の集合構造を形成していることが知られている。基板の上に天然の糖脂質を模した、集合構造を形成させれば、糖鎖クラスター材料として有用であるばかりでなく、基材の光学特性、電気化学特性を利用する複合材料として用いることができる。基板への糖鎖の集積化は、自己組織化膜(SAM)、糖鎖結合高分子のコーティング、LB膜形成などによって行うことができる。

SAM形成では基板を直接修飾できることから、電極の修飾やナノ微粒子への展開も可能である。筆者らは Au-S 結合を利用した SAM 形成に加えて、Si-C 結合を利用した糖鎖 SAM 形成を報告している⁴⁾。糖鎖固定化基板では、細胞膜に類似した生体機能が期待でき、糖認識タンパク質(レクチン)に対して、特異的な相互作用を示すが、それ以外のタンパク質や細胞には忌避活性があり、バイオセンシングやバイオアレイに適している。

筆者らは生理活性糖であるシアル酸(*N*-アセチルノイラミン酸)を固定化した自己組織化膜について検討を行っている。シアル酸固定化基材は、レクチンやアミロイドなどと強い相互作用を有する。シアル酸修飾電極を用いることで、この糖を認識する病原体との親和性が向上し、鋭敏なセンシングが可能になる。筆者らはアルツハイマー病の原因タンパク質である、アミロイドをシアル酸 SAM 上でインキュベートして、電気化学的測定を行った。アミロイド形成に伴うインピーダンスの変化などのアミロイドに起因する電気化学反応が観察された。他のタンパク質では糖修飾基板のタンパク質忌避活性に伴い、そのような変化は観察されなかった。電極を微小化することで、0.01 μM 程度の濃度で 1 μl から計測が可能であった。

また、グロボ系オリゴ糖鎖 Gb3 (Gb3: Gal(α 1-4)Gal(β 1-4))は腸管出血性大腸菌産生毒素(志賀毒素)の細胞感染に関与している。筆者らは Gb3-SAM を水晶発振子上に形成させ、QCM による志賀毒素の検出、解析を行った⁵⁾。志賀毒素を検出溶液に加えると、即座に QCM の振動数が変化し、10 分から 1 時間程度で検出されることがわかった。検出は毒素 nM レベルから可能であった。また、Gb3-SAM のアルキル鎖長を変化させて、糖鎖分子の配向を変化させると、志賀毒素の吸着量が変化し、SAM の配向性、糖質の密度が毒素検出に大きな役割を果たすことが示唆された(図 4)。

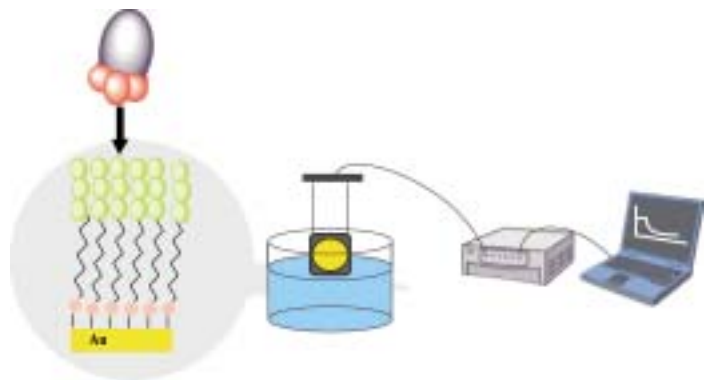


図 4 Gb3 糖鎖薄膜と水晶発振子を組み合わせた糖鎖バイオセンサー。

さらに、糖鎖高分子の自己組織化能を利用して、糖鎖の界面修飾を行うこともできる。2、3 で述べた糖鎖高分子は、疎水性の主鎖と親水性の側鎖を持つ両親媒性構造である。そのため、アルキルシランによって疎水化した基材に対して、糖鎖高分子を作用させると、疎水性相互作用によって自己組織化して、10 Å 程度の超薄膜を形成した。この薄膜は糖認識タンパク質である、レクチンに対して強い結合を示すが、糖鎖認識性が対応しないレクチンやその他のタンパク質に対しては殆ど結合性を示さなかった。この性質を利用して、疎水性基板の表面を光リソグラフィーによって微細

加工し、局所的に疎水場を持つテンプレートを作成し、糖鎖高分子を自己組織化させると、テンプレートにそって糖鎖を自己組織化させることに成功した^{6, 7)}(図5)。更に、糖鎖の微細構造を制御することで、レクチンや細胞を微細提示することもできた。また、疎水性だけでなく、カチオン性の官能基をも共固定化して微細加工した後にテンプレートとして用いると、合成した糖鎖高分子とヘパリンなどの天然高分子を界面での自己組織化によって共微細固定化することができ、細胞の共培養への応用が可能であった。

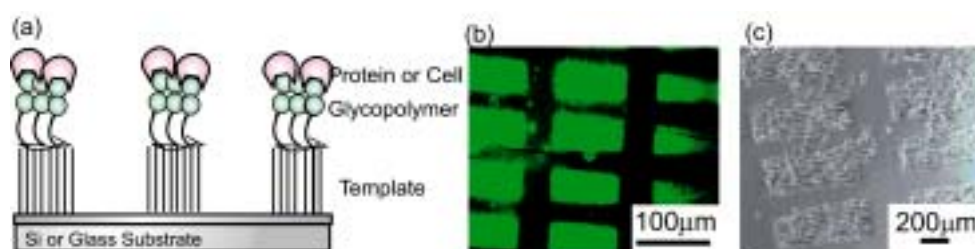


図5 糖鎖高分子の自己組織性を利用した生体高分子微細提示。(a) 模式図、(b) タンパク質(FITC-RCA₁₂₀)微細提示、(c) NIH 3T3 繊維芽細胞微細培養。

5. まとめ

以上のように、筆者は糖鎖を高分子や界面と融合させることで、材料化させることにより様々な機能性素材の開発を行ってきた。今後は、こうした生体シグナル分子のナノ構造を制御することによって、生体の機能を精妙に制御し、生命現象を操るような糖鎖材料の開発を目指していきたい。

参考文献

1. Y. Miura, T. Ikeda, K. Kobayashi, *Biomacromolecules*, **4**, 410(2003); Y. Miura, T. Ikeda, N. Wada, K. Kobayashi, *Green Chem.*, **5**, 610 (2003).
2. Y. Miura, N. Wada, Y. Nishida, H. Mori, K. Kobayashi, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **42**, 4598 (2004).
3. Y. Miura, T. Ikeda, N. Wada, K. Kobayashi, *Macromol. Biosci.*, **3**, 662 (2003).
4. N. Shirahata, T. Yonezawa, Y. Miura, K. Kobayashi, K. Komoto, *Langmuir*, **19**, 9107 (2003).
5. Y. Miura, Y. Sasao, H. Dohi, Y. Nishida, K. Kobayashi, *Anal. Biochem*, **310**, 27 (2002).
6. Y. Miura, H. Sato, T. Ikada, H. Sugimura, O. Takai, K. Kobayashi, *Biomacromolecules*, **5**, 1708 (2004).
7. H. Sato, Y. Miura, N. Saito, K. Kobayashi, O. Takai, *Biomacromolecules*, *in press*.



翻訳系を用いた特殊ペプチドの合成

村上 裕

東京大学先端科学技術研究センター

E-mail: hmura@rcast.u-tokyo.ac.jp



1. はじめに

あなたの専門分野は化学ですか、生物学ですか？と聞かれることがある。化学者に聞かれたときには化学、生物学者に聞かれたときには生物学と答えることにしているが、本当のところは化学的な思考を基礎に様々な系を理解し構築できればいいと考えている。現在の研究は、翻訳による特殊ペプチドの合成である。本稿では、化学を用いて翻訳系を何処まで改変できるか、それにより何が可能になるかについて紹介したい。

2. 翻訳と特殊ペプチド

翻訳は、mRNAを鋳型とし蛋白質を合成する過程である。ここでは、mRNA上の3塩基からなるコドンと呼ばれる暗号単位が、普遍遺伝暗号表に従ってアミノ酸へと翻訳され蛋白質が合成される。このように翻訳系そのものは、整然とした非の打ち所のない系であるが、工学的な視点からこれを見ると、そこには幾つかの制限が見えてくる。その最たるものは、使用できるアミノ酸の種類制限であろう。それは翻訳系が、20種類のアミノ酸（通常アミノ酸）のみを使用し、その他の特殊な構造を持つアミノ酸（特殊アミノ酸）を使用できないことである。

一方で、多くの薬剤候補となるペプチドは、様々な特殊な構造をその骨格や側鎖に持つものが多い。図1にはその代表例であるサイクロスポリンを載せる。これは、免疫抑制剤として使用されていた化合物で、Nメチル化されたアミノ酸、側鎖に特殊な構造を持つアミノ酸、D体のアミノ酸な

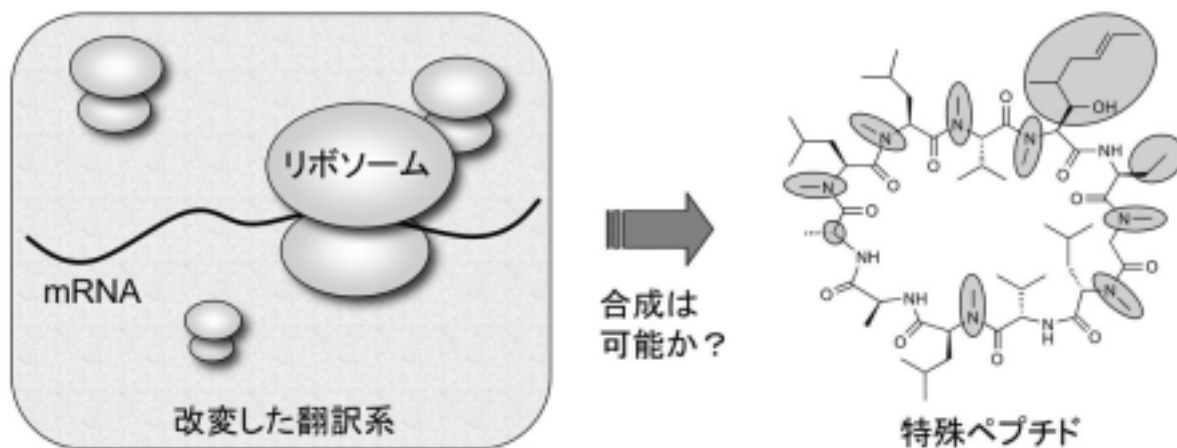


図1 改変した翻訳系を用いた特殊ペプチドの合成。通常の翻訳系ではこのような特殊な構造をもつペプチドを合成できない。特殊ペプチドには、Nメチル化されたアミノ酸、側鎖に特殊な構造を持つアミノ酸などが含まれている。翻訳系を用いて合成するため、DNA配列と特殊ペプチドを対応づけることができ、大きなライブラリーが調製できると考えられる。

どが含まれている。多くの特殊ペプチドにおいて、このような特殊な構造は、ペプチドの安定性を向上したり、膜透過性を付与するために重要であると考えられている。そこで筆者らは、化学の力を借りて翻訳系を改変することで、特殊アミノ酸を含むペプチド(特殊ペプチド)を自在に合成できないか考えた。これにより、薬剤候補となる特殊ペプチドを合成するための、新しい技術が生まれると期待できる。

3. 遺伝暗号のリプログラミング

特殊アミノ酸を含むペプチドの合成には、なにが必要であろうか？それは遺伝暗号のリプログラミングである(図2)^{1,2}。これは、通常アミノ酸の代わりに、特殊アミノ酸を指定した遺伝暗号表を作成する技術である。

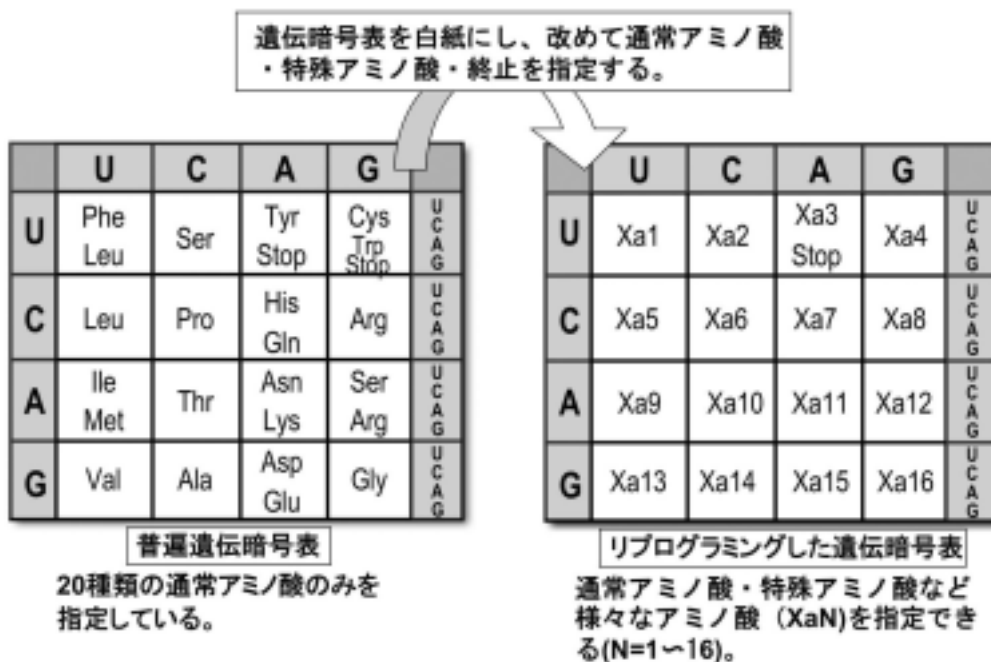


図2 遺伝暗号のリプログラミング。普遍遺伝暗号表では20種類の通常アミノ酸のみが指定されているが、遺伝暗号のリプログラミングにより特殊アミノ酸を指定した遺伝暗号表が構築できる。

鍵となる分子はアシルtRNAである。アシルtRNAはL字型3次構造をしており、その片側の先に位置するループに、コドンに相補的な塩基からなるアンチコドンを持ち、もう一方の先の3'末端にはアミノ酸が連結している(図3)。これが伸長因子と結合してリボソームのAサイトに取り込まれ、コドン・アンチコドン対が形成された際に伸長反応が起こる。ここで重要なことは、リボソームは、コドン・アンチコドン対に対しては極めて厳密な認識を行う一方で、そのアンチコドンとアミノ酸の対応関係に対しては無関心なことである。すなわち、アシルtRNAが合成された時点で、コドンとアミノ酸の関係は決定しているのである。このことは、通常アミノ酸に代わって特殊アミノ酸を任意のtRNAに人工的にアシル化することで、遺伝暗号のリプログラミングができることを意味している。

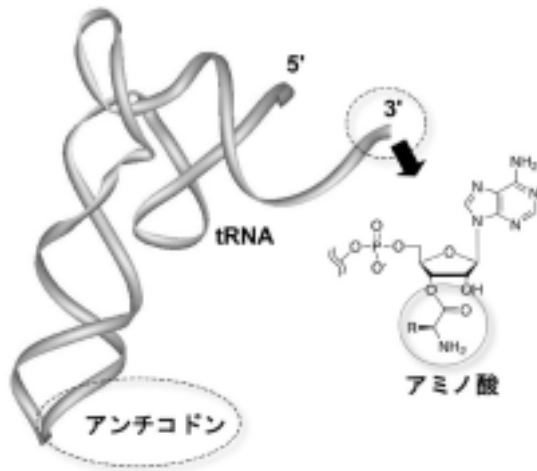


図3 アシルtRNAの三次構造。コドンと対を形成するアンチコドンを持ち、3'末端にはアミノ酸が連結されている。これが、コドン-アミノ酸の仲介役として働き、コドン-アミノ酸の対応関係ができる。通常アミノ酸の代わりに特殊アミノ酸をtRNAに連結させることで、コドン-アミノ酸の対応関係を変化させ、自由に遺伝暗号表を書き換えることができる。

4. アシルtRNA合成リボザイムの創製

前項のように遺伝暗号のリプログラミングには、特殊アミノ酸でアシル化したtRNAの合成が必要である。これまで特殊アミノ酸でアシル化したtRNAは、化学的手法と酵素を組み合わせた方法

により合成されてきた³。しかしながらこれには多くのノウハウが必要で、現在のところ一般的に使用される方法にはなっていない。そこで、我々はリボザイム(RNA触媒)を人工的に進化させて、この反応を触媒しようと考えた。リボザイムの進化法については、図4を参照して頂きたい。これによりランダムなRNAの配列から、基質であるフェニルアラニン誘導体をtRNAの3'末端にアシル化するリボザイムを得た^{4,5}。さらに、このリボザイムを用いて合成したアシルtRNAは、翻訳系において活性であることも確認した⁶。

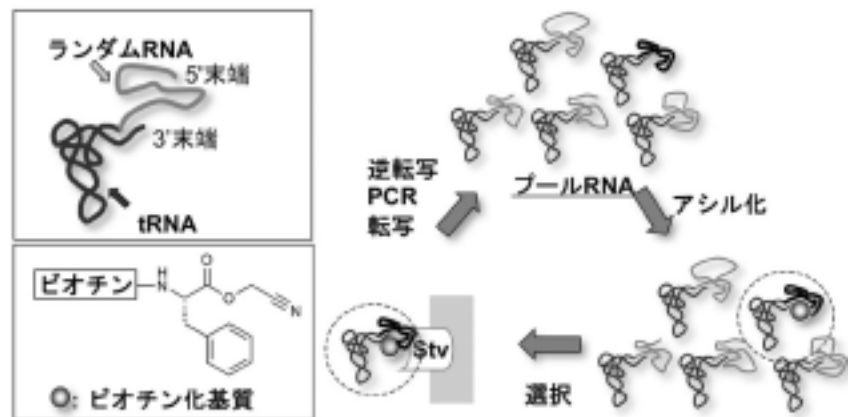


図4 アミノアシルtRNA合成リボザイムの創製。まず、ランダム配列をtRNAと直接連結したRNAプールを調製し、基質として弱く活性化されたアミノ酸を加える。これにより様々な配列を持つRNAプールの中で、触媒活性をもつRNAのみが自身に付加したtRNAをアミノアシル化する。このときビオチンで標識したアミノ酸を用いることで、アシル化されたRNA、すなわち活性をもつRNAを、ストレプトアビジン固定化担体上に集める。回収したRNAは逆転写によりDNAに変換し、それをPCRで増幅し、さらに増幅したDNAを鋳型として転写を行う。生成したRNAは次の反応・選択へと使用し、これを繰り返すことで活性種を濃縮する。活性種を濃縮した後は、そのDNAをクローニングし配列決定を行う。

5. 新しい基質設計によるリボザイムの普遍化

実は、前述のリボザイムには、一つ大きな欠点がある。それは、このリボザイムが、芳香族系のアミノ酸のみを基質とし、それ以外の様々なアミノ酸を基質とできないことである。この問題を克服することが、次の課題であったが、当初、研究は遅々として進まなかった。その理由は、特殊ア

ミノ酸には様々な種類のものがあり、これら多種多様なアミノ酸に対し、個々にリボザイムを創製することは、骨の折れる作業だったからである。

そこで視点を変え、リボザイムの進化ではなく、基質の構造を工夫することで、この問題を解決しようと考えた。過去の研究から、リボザイムはアミノ酸の側鎖の芳香族を認識することが分かっている。そこで脱離基に芳香族を導入することで、リボザイムの認識部位を側鎖から脱離基に移そうと考えた(図5)。こうして設計した新しい基質は反転させると、認識部位である芳香族基と反応点であるカルボニル基の炭素が、元の基質とぴったりと重なる。従って、この新しい基質は、4で得たりボザイムの基質となる可能性が高い。重要なことは、新しい基質設計では、側鎖はリボザイムに認識されていないことである。従ってこの新しい基質設計により、リボザイムは、様々なアミノ酸を基質とする能力を獲得することになる。

このアイデアを試すため、非芳香族アミノ酸を用いて新しい基質を合成したところ、わずかながら活性が観測された。さらに、リボザイムをこの基質に対して最適化し、図6に示す最新のリボザイムを得た。

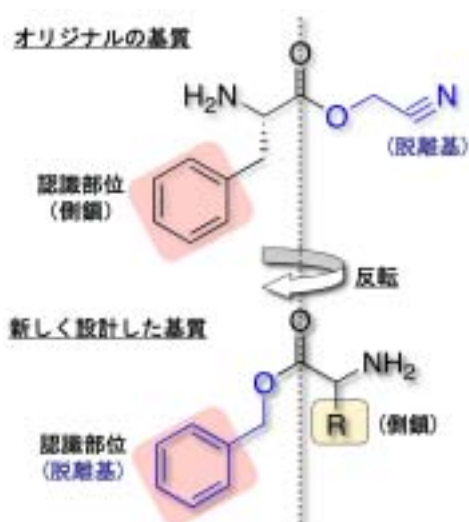


図5 オリジナルの基質と、新しく設計した基質。新しい設計では、ベンジルエステル化したアミノ酸を使用する。実際には、エステルを活性化するために、ベンジル基にニトロ基を導入している。

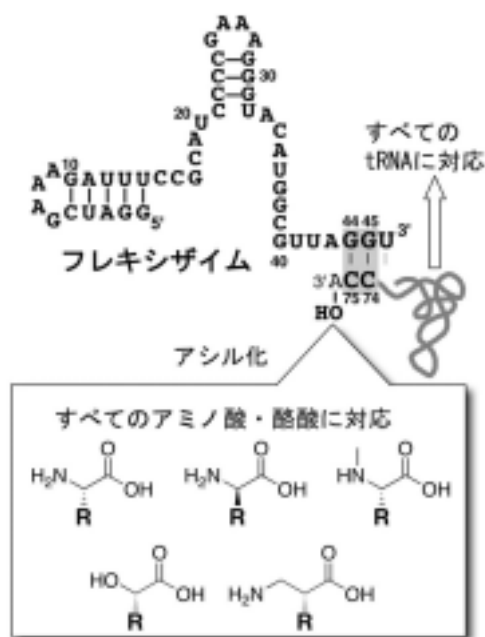


図6 フレキシザイム。

これは46塩基からなる小さなリボザイムであり、その末端の⁴⁴G⁴⁵G⁴⁶U-3'が、tRNA末端の⁷⁴C⁷⁵C⁷⁶A-3'と相互作用することでリボザイム tRNA複合体を形成する。tRNA上の⁷⁴C⁷⁵Cは、すべてのtRNAにおいて保存された配列であるため、このリボザイムは、どのようなtRNAでもアミノアシル化できる。また、このリボザイムはアミノ酸基質の側鎖と -アミノ基を認識しないことから、様々な -アミノ酸やβ-アミノ酸、さらには酪酸をtRNAにアシル化することができる(図6)。この性質から我々は、このリボザイムをフレキシザイム(tRNAやアミノ酸基質に対してフレキシブルな認識を持つリボザイム)と命名した⁷。

6. 特殊ペプチドの合成

上記の研究により、リボザイムの進化は一応の目的を達した。次にフレキシザイムを用いて、特殊アミノ酸であるアセチルリシン、シトルリン、*p*-ヨウ化-フェニルアラニンを含む特殊ペプチドの合成を行った例を紹介する。

特殊ペプチドの合成には遺伝暗号のリプログラミングが必要である。我々はまず、再構成無細胞翻訳系⁸から通常アミノ酸をすべて除くことで遺伝暗号表を白紙にできることを確認した。これに精製のために付加したFLAGタグと、そのスペーサーに必要な通常アミノ酸（メチオニン、チロシン、リシン、スレオニン、アスパラギン酸）を加え、対応するコドンが再指定されることを確認した。次に、フレキシザイムを用いて、特殊アミノ酸でアシル化したtRNAを合成し、AGU, AAC, CAGの3種のコドンに、それぞれアセチルリシン、シトルリン、*p*-ヨウ化-フェニルアラニンを指定した。反応後のサンプルをSDS-PAGEで分析したところ、対応する特殊ペプチドのバンドが見られた（図7）。またこれは、3種類のtRNAの内の1種類をアミノアシル化していないtRNAに置き換えることで消失することから、mRNAの鋳型依存的に合成されていることが分かる。さらに、特殊ペプチドの合成を直接的に確認するため、FLAGタグ抗体を用いてペプチドを精製し質量分析を行った。これにより、予想した分子量にペプチドが観測され、目的の特殊ペプチドが合成されていることが確認できた（図7）。

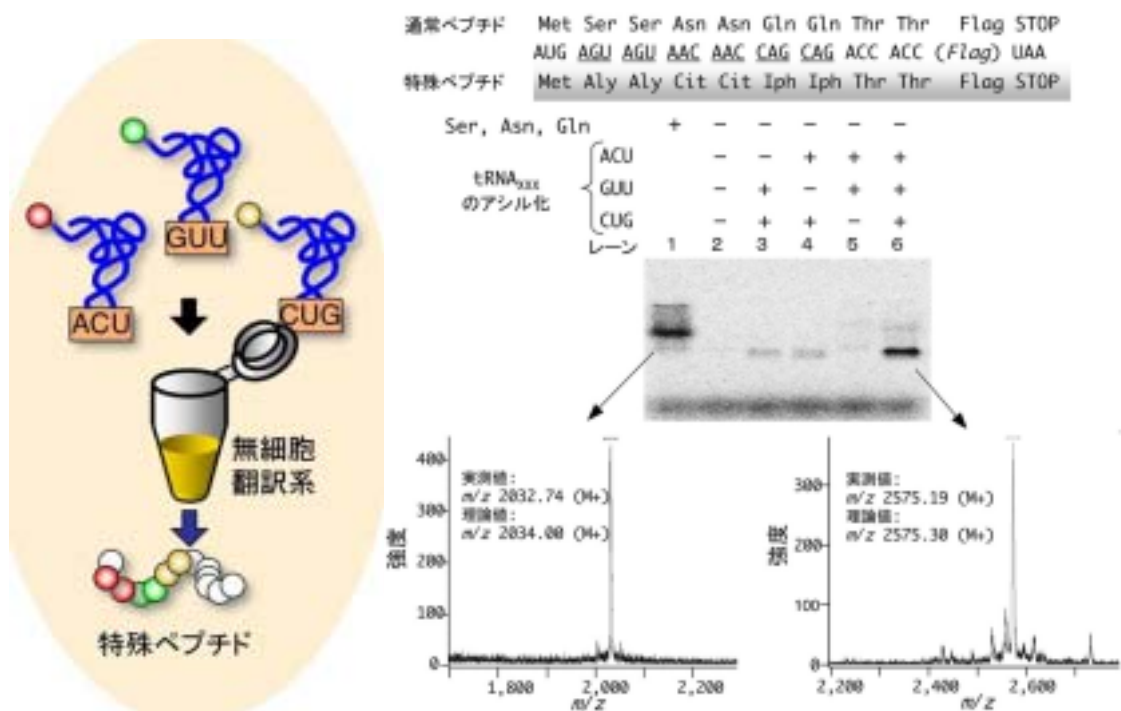


図7 遺伝暗号のリプログラミングによる特殊ペプチドの合成。フレキシザイムを用いて、特殊アミノ酸でアシル化したtRNAを合成し、再構成無細胞翻訳系に加えた。レーン1：通常のペプチドの合成。レーン2-5:アシル化していないtRNAを加えたコントロール実験。レーン6：特殊ペプチドの合成。ペプチドは¹⁴C]-Aspで標識されている。

特筆すべき点は、これが鋳型依存的に合成されていることである。この技術を発展させれば、特殊ペプチドのライブラリーがmRNAのライブラリーから簡便に合成できるようになる⁹。今後は、側

鎖だけでなく主鎖に特殊な構造を含むペプチドの合成と、それをを用いた特殊ペプチドのライブラリー合成を行い、創薬に向けた応用研究を遂行する予定である。本研究を基礎として、様々な疾患に対する薬剤の開発に寄与できれば幸いである。

謝辞

本研究は東京大学 菅 裕明教授の研究室で行った研究であり、菅教授に深謝します。

参考文献

- (1) Forster, A. C.; Tan, Z.; Nalam, M. N.; Lin, H.; Qu, H.; Cornish, V. W.; Blacklow, S. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6353-6357.
- (2) Josephson, K.; Hartman, M. C.; Szostak, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11727-11735.
- (3) Heckler, T. G.; Chang, L. H.; Zama, Y.; Naka, T.; Chorghade, M. S.; Hecht, S. M. *Biochemistry* **1984**, *23*, 1468-1473.
- (4) Saito, H.; Kourouklis, D.; Suga, H. *EMBO J.* **2001**, *20*, 1797-1806.
- (5) Murakami, H.; Saito, H.; Suga, H. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 655-662.
- (6) Murakami, H.; Kourouklis, D.; Suga, H. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1077-1084.
- (7) Murakami, H.; Ohta, A.; Ashigai, H.; Suga, H. *Nat. Methods* **2006**, *3*, 357-359.
- (8) Shimizu, Y.; Inoue, A.; Tomari, Y.; Suzuki, T.; Yokogawa, T.; Nishikawa, K.; Ueda, T. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 751-755.
- (9) Leemhuis, H.; Stein, V.; Griffiths, A. D.; Hollfelder, F. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 472-478.

余談

最近、酒を飲んで酔っぱらった際に「(自然)科学の定義は何ですか?」と質問しているらしい。広辞苑では、「自然に属する諸対象を取り扱い、その法則性を明らかにする学問」とある。以前に上野で開催された南方熊楠展では「森羅万象の探求」とあった。分かったようで分からない説明である。私にじっくりときた答えは、Prof. Rajbhandaryから聞いた「何でも新しいことをやればそれが科学だ」という答えである。新しいことをすることで、これまで見えなかった何かが見えてくる。そういう意味で言ったのだろうと思う。現在はこれを実践しようと、一生懸命努力をしている毎日である。また飲む機会があれば、「(自然)科学の定義は何ですか?」質問をすることもかもしれません。その際は酔っぱらいの戯言と思って答えてあげてください。



気になった論文



井本 修平(いもと しゅうへい)

東北大学 多元物質科学研究所 機能分子制御研究分野 助手

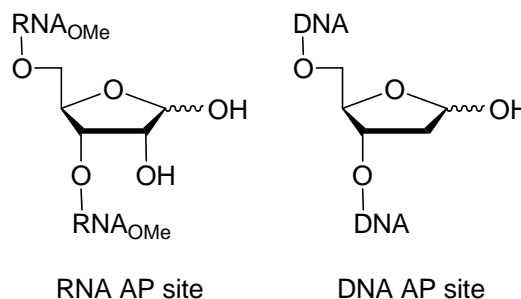
simoto@tagen.tohoku.ac.jp

この度は、生命化学研究レター「気になった論文」への投稿機会を与えて頂き、感謝致しております。私は2006年9月より東北大学多元物質科学研究所・分子機能制御研究分野にて永次史先生ご指導の元で研究を行っております井本修平と申します。私たちの研究室では遺伝子発現をコントロールできる機能性分子を独自に設計・合成し、さらに細胞内での機能及びその分子の動態を調べ、新たな機能を持つ人工分子を開発することを目標に研究を行っています。当研究室は新設されてからまだ日が浅いのですが、オリジナルな発見を一日も早く世界に発信できるように努力致しております。さて、今回は"損傷を受けた核酸"をキーワードに数報ご紹介させていただきます。

The chemical stability of abasic RNA compared to abasic DNA

P. A. Küpfer, C. J. Leumann, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 58-68 (2007).

薬物や紫外線照射によって引き起こされるDNA損傷は、塩基の酸化やDNA鎖の切断など多数の例が報告されていますが、その中でもN-グリコシド結合の加水分解により生じる脱塩基損傷(AP site)は代表的DNA損傷の1つです。DNAのAP部位は不安定であることが知られており、37°C 生体条件下のイオン強度で核酸鎖の切断が進行します。DNA鎖のAP部位に関する研究は盛んに行われていますが、RNAの



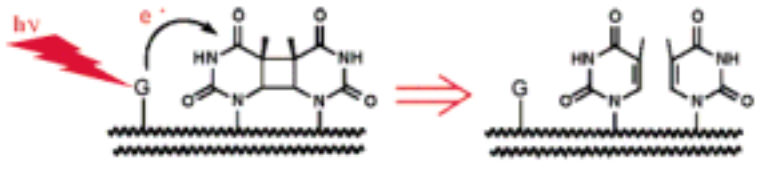
AP部位についての研究はほとんど行われていませんでした。本論文でLeumannらは特定の位置にRNA AP部位を持つオリゴ核酸を合成して、その安定性をDNAのAP部位と比較しています。意外なことに、塩基性条件下(0.1 M NaOH)でRNA AP部位の鎖切断速度定数はDNAのAP部位と比べて約1/17であり、RNAのAP部位の方がより塩基性条件下で安定であることが明らかとなりました。このRNA AP部位の意外な安定性は生体内で何か重要な意味を持つものなのか、また生体内にはRNA AP部位を修復する特別な機構は存在するかなど、今後の研究の進展に興味を持たれます。

Self-repair of thymine dimer in duplex DNA

M. R. Holman, T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 6-7 (2007).

DNAに紫外線を照射するとDNA中の隣り合ったチミン(TT)がシクロブタンチミンダイマー(T<>T)となり、この損傷が引き金となって細胞死や変異の誘発が起こり発癌等を惹起することが知られています。この反応は可逆反応ですが、RokitaらはTT周辺の塩基配列がT<>T形成に及ぼす影響を調べてい

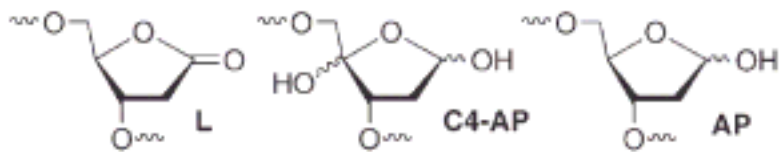
ます。その結果、TT の 5'側の塩基が T<>T の生成レベルに大きく影響しており、特に 5'側が G の場合に T<>T の生成が抑えられています。これは UV 照射によって G から T<>T へ電荷移動が起こり T<>T の修復が起こっているためであると Rokita らは考えています。今後さらに研究を進めることで、同じ TT を持つ配列でも特にチミンダイマーになりやすい配列などが解明されれば紫外線照射により特に損傷を受けやすい遺伝子の特定などが出来るのではないかと思います。



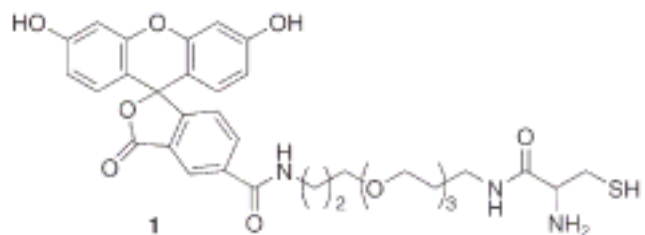
Use of fluorescence sensors to determine that 2-deoxyribonolactone is the major alkali-labile deoxyribose lesion produced in oxidatively damaged DNA

L. Xue, M. M. Greenberg, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 561-564 (2007).

最後に、私の留学先であった米国 Johns Hopkins 大学の Marc Greenberg 研究室の研究から紹介させて頂きたいと思います。2-デオキシリボノラクトン(L)は酸化的な脱塩基部位の一つであり、ネオカルシノスタチンやガンマ線照射によってデオキシリボース C1 水素の引き抜きが起こることで生成すると考えられています。L は塩基除去修復酵素と共有結合を形成するなどの面白い特徴を持ち、変異の原因と考えられているためその検出プローブは L の生物学的な機能評価に有用であると考えられます。



すでに 2005 年に佐藤と Greenberg はシステインとビオチンを基本骨格とした L の検出プローブを報告していますが、本研究ではシステインとフルオレセインを適度なリンカーで連結した 1 を合成し、蛍光による L の直接的な検出を試みています。筆者らはまず、1 が AP や C4-AP とは反応せず、L を含む 30-mer の DNA と選択的に反応することをポリアクリルアミド



ゲル電気泳動(PAGE)で確認しました(直接 1 と L が反応するのではなく、L を含む DNA をジメチルエチレンジアミン(DMEDA)で前処理することによって生じる butenolide 構造をシステイン部位がトラップする)。続いて 1 の蛍光を指標として、ウシ胸腺 DNA にガンマ線を照射することで生じ

る L の定量を行ったところ、L は他の脱塩基部位(AP や C4-AP)よりも約3倍も多く生成していました。これは以前考えられていたよりもかなり多くの L がガンマ線照射によって DNA 中に生成していることを示すものです。DNA 中で L が生成する反応機構では、L が生成する際に L の 3'側の塩基部位も損傷を受けていると筆者らは考えています。すなわち L は単独で存在するのではなく、L とチングリコール(Tg)のように損傷塩基が連続した部位の一部として存在するケースが多いと考えられます。実は私が Greenberg 研に留学していた際に携わっていた仕事のひとつが、塩基損傷部位が連続した部位が DNA 修復機構に関する研究であり、近いうちにこの成果について論文で発表する予定にしています。

瀧 真清(たき ますみ)

岡山大学大学院自然科学研究科 助手

taki@biotech.okayama-u.ac.jp

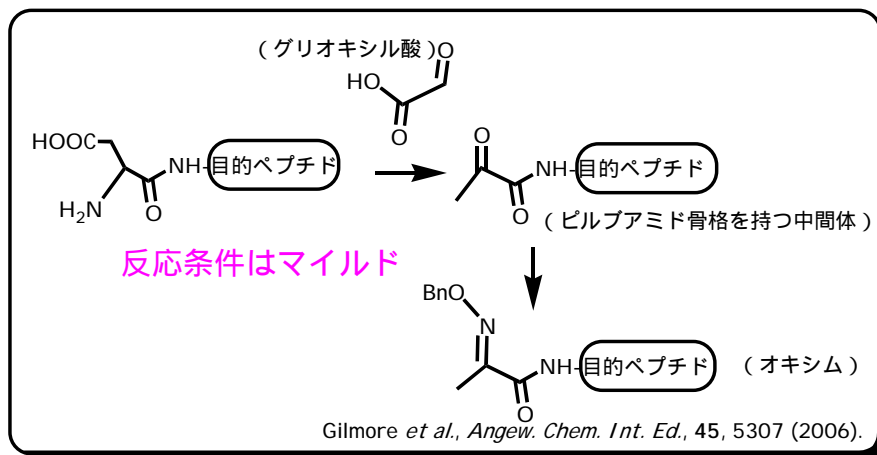
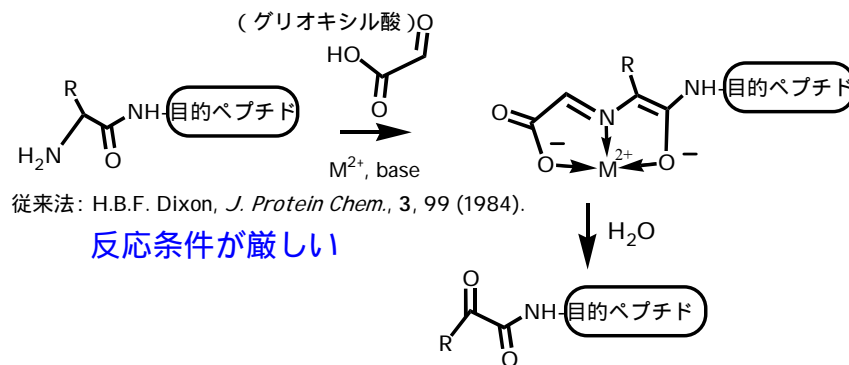
この度は、論文紹介の機会を与えていただき、ありがとうございました。私は学生時代、構造有機化学分野におり、卒業後に生命化学に興味を持ちました。新規蛍光性非天然アミノ酸などの有機合成にも興味があります。これまでに、[60]フラーレンやダンベル型 DNA、蛋白質やペプチドなど様々な macromolecules に対し、位置特異的な修飾を行う研究を主にやってきました。蛋白質の N 末端修飾に関する論文を 2 報、構造有機化学の論文を 1 報報告させていただきます。

N-terminal protein modification through a biomimetic transamination reaction

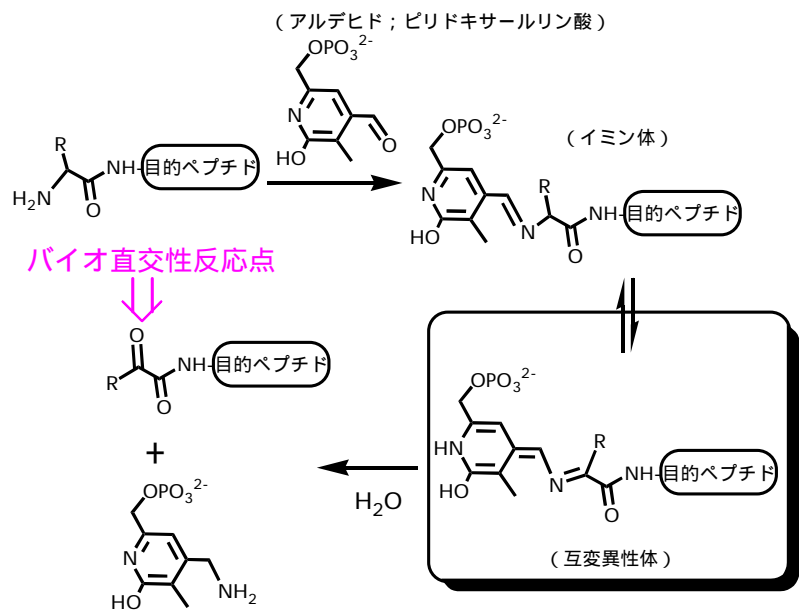
J. M. Gilmore, R. A. Scheck, A. P. Esser-Kahn, N. S. Joshi, and M. B. Francis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 5307–5311 (2006).

蛋白質本来の活性を保ったまま別の機能を付与する試みは、近年注目を浴びています。筆者らは、蛋白質とピリドキサルリン酸(ビタミン B6)とを混合するだけで、簡便に蛋白質の N 末端を反応点(ケトンやアルデヒド)に変換させました。これらのバイオ直交性(bioorthogonal 性)反応点を使って、オキシムやヒドラゾン形成させる反応を利用することで N 末端特異的な修飾ができます。

筆者らはペプチド(アンジオテンシン)とグリオキシル酸とを混ぜたとき、2 価金属イオンや塩基の非存在下でも、10%の収率で N 末端のアスパラギン酸から脱カルボキシル反応が起きることを見つけました。この時できる中間体と O-ベンジルヒドロキシアミンとを混合し、クルードのまま ESI-LCMS で分析したところオキシムが形成されていました(下図)。それを手がかりに中間体の正体はピルブアミド骨格を持つものだと決定したようです。



この反応は、蛋白質 N 末端のアミノ基とアルデヒドとが反応してイミン体(Schiff塩基)を形成したとき、互変異性体ができる点がミソです。イミン体と平衡状態にある互変異性体が加水分解する結果、N 末端特異的にピルブアミド骨格を残すことができます。様々なアルデヒドを用いてこの反応を行ったところ、概してイミン体で反応が止まってしまう場合が多かったようですが、ピリドキサルリン酸(ビタミン B6)を用いた時に右図のように 65%の高収率で有用なケトン体(バイオ直交性反応点)へと変換可能でした。なお、ペプチドの N 末端は特にアスパラギン酸である必要はなく、メチオニンやグリシンでも良いようです。



応用例として、ペプチドの代わりに蛋白質を用い、各種アルコキシルアミンと反応させることで蛋白質の N 末端特異的蛍光修飾を行うことができます。また、この反応を利用して蛋白質のポリエチレングリコール修飾を行って、蛋白質の免疫原性を低下させたり安定性を向上させたりするのに使えるようです。弱点として、蛋白質の N 末端がセリン、スレオニン、システイン、あるいはトリプトファンの場合アルデヒドと副反応をしてしまうこと、およびプロリンの場合反応しないであろうことが予想できます。反応条件は 37 で、温度を下げてしまうと反応が進行しづらいため、熱に不安定な蛋白質の修飾には向かないかもしれません。それでもなお、マイルドな化学反応で大量の蛋白質を安価に標識するのに適した方法であると思いました。糖(蛋白質)の還元末端を標識するための試薬として、様々なヒドラジン誘導体がすでに市販されていることも強みでしょう。これらを用いると、論文で述べられているアルコキシルアミン誘導体に比べると多少反応性は落ちることが予想されるものの、バイオ直交性反応点への修飾が可能と思われます。非常に簡単なので、化学者だけでなく分子生物学者にも受けが良い気がします。

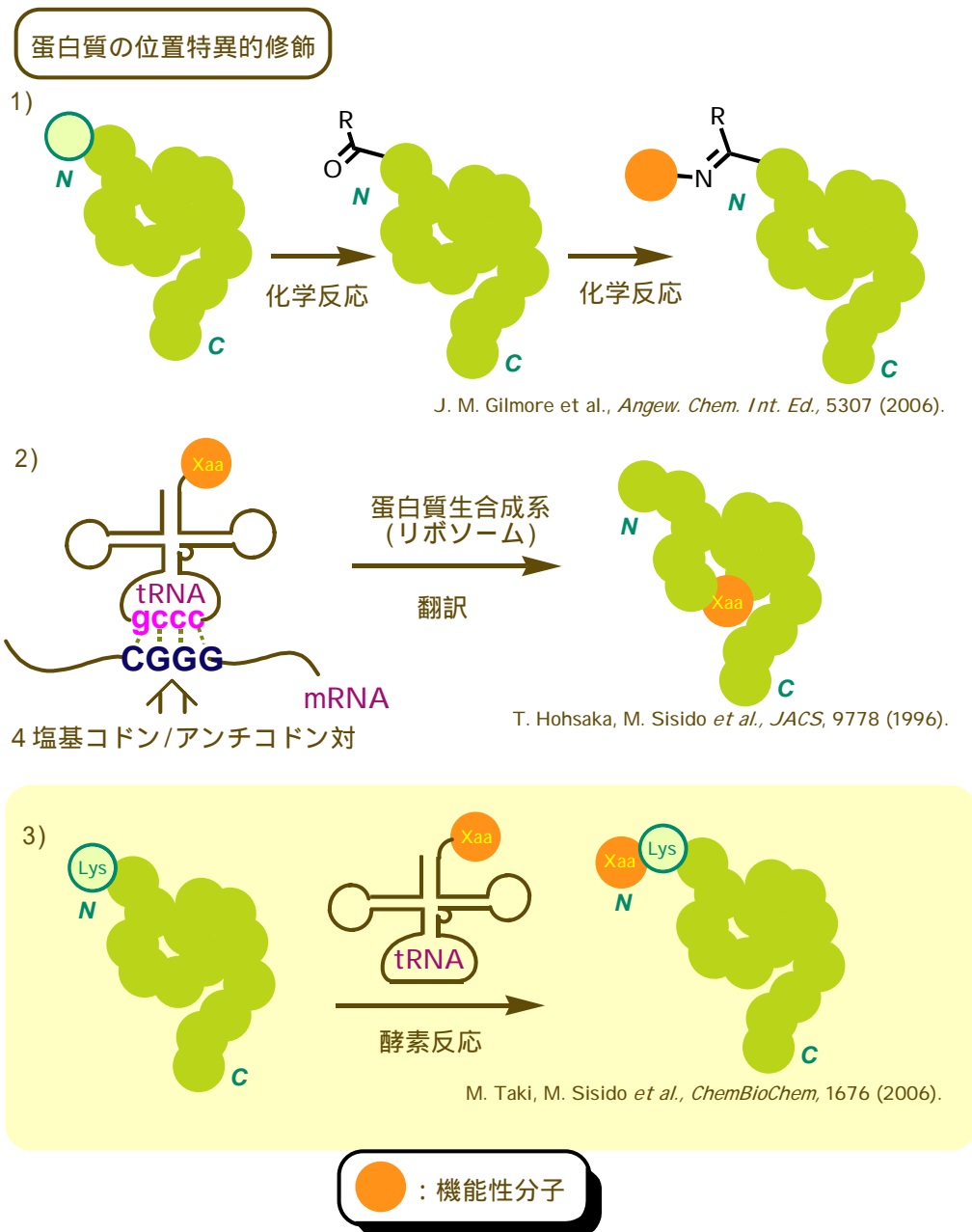
Leucyl/phenylalanyl-tRNA-protein transferase-mediated chemoenzymatic coupling of N-terminal Arg/Lys units in post-translationally processed proteins with nonnatural amino acids

M. Taki, A. Kuno, S. Matoba, Y. Kobayashi, J. Futami, H. Murakami, H. Suga, K. Taira, T. Hasegawa, and M. Sisido, *ChemBioChem*, 7, 1676–1679 (2006).

非天然アミノ酸を蛋白質に導入する場合、通常はアミノ酸を特定 tRNA の 3'末端に共有結合させたものを作成し、これを蛋白質生合成系に混合することで行います。我々は、蛋白質生合成系を使わずに、非天然アミノ酸を蛋白質に導入する手法を開発しました。具体的には、非天然アミノ酸でアミノアシル化された tRNA と酵素とを用いて、コドン・アンチコドン対やリボソームなどを使わずに非天然アミノ酸を蛋白質の N 末端に導入を行いました。この手法では、標識したい目的蛋白質やペプチドの N 末端に塩基性アミノ酸(リジンもしくはアルギニン)を持たせることがポイントです。我々は、N 末端にリジンやアルギニンを持つ目的蛋白質を作成し、目的蛋白質 N 末端と非天然アミノ酸とを酵素(L/F-tRNA-protein-transferase)を用いて結

合させました。非天然アミノ酸でアミノアシル化された tRNA は、L/F-transferase によってある程度曖昧に認識を受けます。この酵素の曖昧さを利用して、蛍光プローブのほか、バイオ直交性を持つアセチルフェニルアラニンやアジドフェニルアラニンのような機能性アミノ酸を蛋白質の N 末端に導入することができます。バイオ直交性を持つ非天然アミノ酸を N 末端に導入した蛋白質やペプチドは、前述した論文と同じように N 末端特異的に更なる化学修飾が可能です。具体例として、アジド基を N 末端に持つキシラン結合蛋白質と、ビオチンまたは蛍光基を持つアルキン誘導体とを混ぜ、Huisgen-Sharpless[3+2]環化付加反応を利用して、ビオチン化および蛍光修飾されたキシラン結合蛋白質を得ることができました(Taki & Sisido, *Biopolymers*, *in press.*)。前述したシッフ塩基を形成させる反応も有効でした。

リボソームを使う生合成系で非天然アミノ酸を蛋白質に定量的に導入することは困難ですが、本手法にて幾つかの基質を用いた場合、定量的に導入できた点が強調されます。酵素反応であるため副反応がお



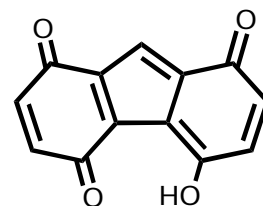
こらず、非常に素早く(数分~20分程度)導入できる点も長所です。本手法の弱点は前述した論文ほど大量の修飾蛋白質を作成できないこと、および非天然アミノ酸の構造によっては導入できない場合があります。また、前述した論文と共通した欠点として、蛋白質の N 末端が蛋白質の内部に埋もれていると反応が進行しづらいことや、蛋白質やペプチドの内部への修飾はできない点あげられます。一方、細胞抽出液存在下などの汚い環境下でも目的蛋白質やペプチドへの特異的標識が可能である点や、低温(4℃)でも効率よく反応が進行する点などは、本酵素反応の強みでしょう。

L/F-transferase は 40 年以上も前に見つかった酵素ですが、X 線結晶構造解析が難しく、反応機構が良く分かりませんでした。しかし最近、産総研の富田耕造先生らのグループなどが X 線解析に成功しており (Suto *et al.*, *EMBO J.*, **25**, 5942 (2006))、酵素の活性中心のアミノ酸を変異させることでいろいろな非天然アミノ酸を導入することができるのでは、と私は考えています。このことは、リボソームを改変するよりもずっと簡単そうに思います。

Chemical studies on the red sweat of the hippopotamus (カバの赤い汗に関する化学)

K. Hashimoto, Y. Saikawa, and M. Nakata, *J. Syn. Org. Chem.* (有機合成化学協会誌), **64**, 1251-1259 (2006).

新聞等で一時期話題になった原著論文 (Nature 誌) の発見物語です。原著に増して面白い! 日本語の総合論文ですが、有機化学の真髄を追求する姿勢を読み取ることができ、感動しましたのでここで敢えて紹介させていただきます。この論文の要点は、カバの赤い汗の正体は、右図に示した構造式の化合物であったこと、天然物は採取の時期に限られる上に微量しか得られず不安定であるため、この化合物を全合成して性質を調べたことです。結論にいたるまでに、実験をしている最中に筆者らが遭遇した、へこんでしまいそうな厄介な問題と、そこで行った試行錯誤の数々が書かれています。



具体的には、

1. カバの赤い汗に含まれる化合物は濃縮や凍結保存しようとするとう重合してしまう不安定なものだったが、分子同士が近づかないように工夫して凍結保存した話。
2. 最初 ^1H NMR と UV スペクトルだけしか情報が得られなかったが、より安定な化合物へ化学変換してさらなる構造決定を試みたら、幸運なことに結晶化して X 線構造解析ができたこと。
3. サンプル量が少なくても測定できるはずの MS のデータがなかなか得られず、不活性ガス雰囲気下で LC-ESI-MS を使って測定したこと・・・などなどです。この論文の内容の 90% くらいは、学部の教科書に書いてある基礎的なことばかりだし、奇をてらった反応ではなく教科書的な反応ばかりを使って有機合成を行っています。特に学生会員の方には有機化学の基礎力が付いて勉強になる上に内容が深遠なので、是非とも時間をかけて読むことをオススメします。

論文の結びで著者らは、「なぜカバの汗は赤くなるのかという疑問から研究が始まった...(中略)...このあたりが研究の原動力であり、研究とは非常に個人的な事柄であるが、願わくば成果が役に立って欲しい。ただし、この“役に立つ”は誰かが論文を読んで“ああそうか”と納得することである。」と述べています。私は大学に身をおく一人の研究者・教育者として、この考えに深い共感を覚えました。産業や医療への実用化を目指した応用研究も大事ですが、人が生来もっている好奇心をくすぐるこのような基礎研究は、教育的内容をとても多く含んでいるので、これからも重要であると改めて感じました。

田丸 俊一(たまる しゅんいち)

京都大学工学研究科 合成・生物化学専攻 博士研究員

s.tamaru@z05.mbox.media.kyoto-u.ac.jp

京都大学工学研究科合成・生物化学専攻にて本会長(2007年1月現在)のもと、日々研究にいそしんでおります田丸俊一と申します。この度は本コーナーの執筆機会を頂き、大変嬉しく思っております。

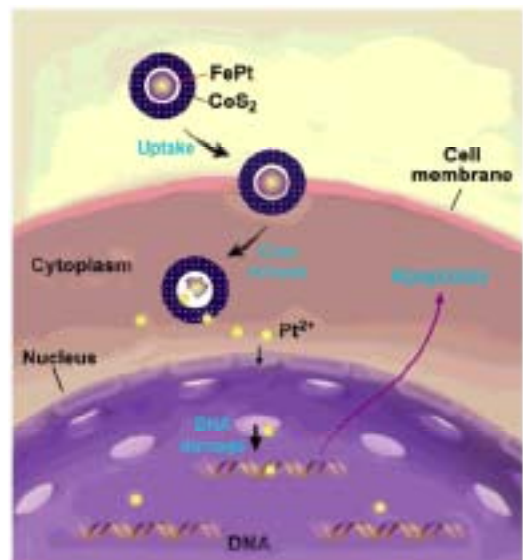
周知のように、近年生物・生化学研究は飛躍的に進歩しております。その一方で、ナノ~マイクロメートルサイズの機能性材料・デバイスの開発もまた劇的な成長を遂げております。このような流れの当然の帰結として、完全人工ナノ~マイクロ材料の生体内での活用や、生体分子とナノ~マイクロ材料が融合した新たなデバイスの開発、ナノテクノロジー研究技術の生物学への応用は現在最も活発な研究分野となっております。私の担当するパートでは、こうした研究の中から、気になった3報について概説致します。

FePt@CoS₂ yolk-shell nanocrystals as a potent agent to kill HeLa cells

J. Gao, G. Liang, B. Zhang, Y. Kuang, X. Zhang, and B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, ASAP (2007).

シスプラチンは純然な無機小分子でありながら抗ガン特性を有する興味深い分子です。しかしながら、その発見以来 30 年間シスプラチンを越える白金型抗ガン剤は発見されておられません。本論文では FePt ナノ粒子を「黄身」として包含する FePt@CoS₂ 卵状ナノ結晶が HeLa 細胞に対して高い毒性を示すことを報告しています。

彼らは、Pt(acac)₂ と Fe(CO)₅ との熱分解反応により調製した FePt ナノ粒子と Co₂(CO)₈ をオレイン酸・trioctylphosphine oxide 共存下、1,2-dichlorobenzene 中で加熱還流した後、硫黄を加えて加熱することで、FePt@CoS₂ 卵状ナノ結晶を調製しました。この卵状ナノ結晶共存下で HeLa 細胞を培養したところ、卵状ナノ結晶非存在下に比べて劇的な HeLa 細胞のアポトーシスが確認されました。MTT アッセイ(生細胞中のミトコンドリア内脱水素酵素活性を測定し、相対的な細胞量を測定する方法)より、IC₅₀ は 35.5 ± 4.5 ng (Pt/mL)と算出され、この卵状ナノ結晶がシスプラチン(IC₅₀ = 230 ng of Pt/mL)よりも高い細胞毒性を有することが確認されました。1) 卵状ナノ結晶はイオン交換水中で安定であり、形状変化などは観測されない事、2) 卵状ナノ結晶存在下で HeLa 細胞を培養すると、細胞内に取り込まれたナノ結晶が多数観測される事、3) 細胞内で観測されるナノ結晶は、「黄身」部分である FePt を喪失した中空粒子として観測される事、4) 卵状ナノ結晶は 2 次リソソームを模した条件 (phosphate-buffered saline; pH = 4.98, 37°C, 5% CO₂) 下で、同様に、FePt を喪失して中空粒子となる事、5) CoS₂ 殻はイオンが透過できる細孔を有することが知られている事などから、著者らは右の図に示すような作用機構を提案しています。卵状ナノ結晶内の FePt は、CoS₂ 殻に囲まれてはいるが、その表面は化学的には未修飾であり反応活性であるため、エンドサイトーシスによって取り込まれた卵状ナノ結晶内の FePt は、酸性条件である 2 次リソソーム内で徐々に酸化・分解されます。その結果、Pt²⁺ が卵状ナノ結晶内から溶出し、その Pt²⁺ がシスプラチンの作用機構と同様に DNA と錯化する事で細胞



毒性が発揮されと考えられます。

この卵状ナノ結晶は、シスプラチンと同様に様々な副作用も誘発すると考えられるので、ガン細胞を標的とする抗体と組み合わせる事で、強力な抗ガン剤へと変換できるだろうと著者らは締めくくっています。

***In vivo* biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice**

Z. Liu, W. Cai, L. He, N. Nakayama, K. Chen, X. Sun, X. Chen, and H. Dai, *Nature Nanotech.*, **2**, 47–52 (2007).

以前のこのコーナーでカーボンナノチューブの細胞取り込み機構の解明に関する興味深い論文が紹介されておりました。今回はインテグリンとの特異的結合により細胞接着に関わる事が知られるアルギニン-グリシン-アスパラギン酸連続配列 (RGD 配列) を利用したカーボンナノチューブの腫瘍に対するターゲティングについて紹介致します。

カーボンナノチューブはその物理・化学特性から、ナノテクノロジーにおいて中心的役割を担っています。その特性は、例えばガンの温熱治療など医療などにおいてもカーボンナノチューブが有望な材料である事を示唆しています。しかしながら、本来水に対して不溶であるため、カーボンナノチューブを利用した特に *in vivo* での生化学的研究は、十分には行われていません。この論文では、高分子鎖の片末端にリン脂質部位を、逆末端にマイクロサイズでのポジトロン断層撮影 (Micro Positron Emission Tomography; MicroPET) によるイメージングのための ^{64}Cu 錯化部位と RGD 配列とを導入した PEG を用いて非共有結合的に修飾することで水へ可溶化された単層型カーボンナノチューブ (SWNT-PEG) を用いて、マウスの腫瘍細胞へのターゲティングを試みています。

インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 活性の U87MG 腫瘍を皮下に持つマウスに対して、RGD 配列を有しない SWNT-PEG を静脈注射により投与したところ、これらの血中循環性は PEG 鎖長が長いほど良好であり (SWNT-PEG₅₄₀₀: $t_{1/2} \sim 2$ h, SWNT-PEG₂₀₀₀: $t_{1/2} \sim 0.5$ h)、肝臓と脾臓以外の臓器および U87MG 腫瘍にはほとんど取り込まれない事が確認されました。さらに、投与後 24 h のマウスの体中にも SWNT-PEG が十分量存在していた事から、SWNT-PEG が細網内皮系から逃れられる事が確認されました。これは、1) 使用している SWNT のサイズ (直径: $\sim 1 - 5$ nm, 長さ: $\sim 100 - 300$ nm) が比較的小さい事、2) PEG 被覆によりタンパク質の非特異吸着と凝集が抑制されている事、に起因していると考えられています。以上を踏まえて、次に、RGD 配列を導入した SWNT-PEG-RGD の U87MG 腫瘍へのターゲティングを試みています。その結果、期待通り SWNT-PEG-RGD の腫瘍への取り込み向上が確認されました。腫瘍への取り込み量は筋肉への取り込み量の 15 倍程度であり、物理的に柔軟で容易にたわむ事が出来る SWNT 表層に数多くの RGD 配列を並べる事で、RGD-インテグリン相互作用に対して多価効果を発現でき、結果として選択性が向上したと考察しています。

本論文では、「カーボンナノチューブを用いたからこそ」という結果を得るには至っておりませんが、先に紹介されていた論文の内容も踏まえて、カーボンナノチューブを利用したこれまでのガン治療とはまた違った形の治療法が提案される日も近いのかもしれない。

Using polarization-shaped optical vortex traps for single-cell nanosurgery

G. D. M. Jeffries, J. S. Edgar, Y. Zhao, J. P. Shelby, C. Fong, and D. T. Chiu, *Nano Lett.*, **7**, ASAP (2007).

光ピンセットは水中にある数十 nm ~ 数十 μm サイズの微小体を捕捉・操作できるため、細胞手術などへの応用が期待されています。しかしながら、一般的に用いられているいわゆる Hermit-Gaussian (HG) beam

を利用して物体を捉える場合、対象物は光強度が最も強いレーザー光焦点に捉えられるため、捕捉対象が光損壊する危険性ははらんでおり、特に脆弱なオルガネラには適用しづらいという難点があります。この点を克服するために、水や生体内物質に吸収されにくい800~1100 nmのレーザー光が利用されていますが、極めて高濃度条件である細胞内で特定の物体を捉えるためには強いレーザー強度が必要となるため、多光子過程に基づく対象の光損壊が無視できないというのが現状です。そこで彼らは、光損壊の軽減を期待して、リング状のエネルギー分布を持つ Laguerre-Gaussian (LG) beam を利用した「光渦ピンセット」の細胞手術への応用を試みています(場にそぐわないので、上記の光ピンセット・光渦ピンセットの原理については割愛致します。ウェブサイトなどでも勉強できますので検索してみてください)。

Nd:YAG レーザー光(1064 nm)をフォーク型のフォログラフィーに入射する事で、リング状のエネルギー分布を持つ LG beam(円偏光渦)を発生させる事が出来ます。様々なサイズの蛍光ビーズを用いて、標的物質の捕捉位置を測定したところ、リングサイズよりも小さい蛍光ビーズは光のリング上に、リングサイズと同等以上のサイズのビーズはリングの中心に捕捉される事が確認されました。リング中心は光強度が極めて低いので、LG beam を用いた光渦ピンセットでは、光損壊を軽減する事が出来ると期待できます。また、光焦点を絞り込む事で、光エネルギー分布をリング状から対称的な2つのエネルギーの点(直線偏光渦)に変換出来ます。この直線偏光渦は従来型の光ピンセットよりも低いレーザー強度で発生させる事が出来るので、彼らはリングサイズよりも小さい物体を穏和に捉えるために利用しています。

多光子過程による光損壊率を、2光子励起により形成した励起種の分布から評価したところ、従来の HG beam による光ピンセットに比べて、LG beam による光渦ピンセットでは円偏光渦・直線偏光渦のいずれにおいても捕捉点における励起種の形成を極端に軽減出来る事が確認されました。そこで、ミトコンドリアを選択的に染色できる色素(Mitotracker Green dye)により染色したミトコンドリアを HG beam 光ピンセット、LG beam 光渦ピンセット(直線偏光渦)の双方で捕捉し、蛍光強度の変化から光損壊の程度を比較したところ、従来法である HG beam 光ピンセットによる捕捉では数分間で劇的に蛍光強度が減少したのに対して、LG beam 光渦ピンセットでは若干の蛍光減退が観測されたのみでした。最後に彼らは、直線偏光渦を利用して人工的に膜をゆるめた細胞内から蛍光染色されたリソソームを光損壊させることなく(蛍光退色がほとんど見られない事から)取り出す事に成功しています。

この技術は細胞手術において対象となる物体の光損壊を低減させる事が出来るだけでなく、レーザー強度を調節する事で光渦ピンセットのサイズを制御でき、従来の光ピンセットよりもさらに小さいオルガネラをも対象とする事が可能となるので、細胞手術の新たな技術として貢献するものと期待されます。



堤 浩(つつみ ひろし)

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 分子認識分野 特任助手

tsutsumi.mr@tmd.ac.jp

この度は生命化学研究レターの「気になった論文」に投稿機会を与えたいいただき、編集員の先生方に感謝申し上げます。実は2004年にも投稿させていただきましたが、当時は浜地 格教授のもとでポスドクとして在籍しておりました。現在は、東京医科歯科大学生体材料工学研究所の玉村啓和教授のもとで特任助手として研究に励んでおります。玉村研究室では、ケモカイン受容体 CXCR4 およびプロテインキナーゼ C

(PK-C)をターゲットとしたアンタゴニスト等の機能分子の開発を行っています。私は CXCR4 と PK-C に特異的な蛍光プローブ分子の開発研究に携わる他、ペプチド - ペプチド間相互作用を利用した新たなタンパク質の蛍光イメージングツールの開発に向けて試行錯誤している毎日です。

本論文紹介では、新規蛍光タンパク質に関して 1 報、糖タンパク質のラベル化とイメージングに関して 1 報ずつ、タンパク質の修飾反応に関して 1 報を紹介させていただきます。

A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy

T. Kogure, S. Karasawa, T. Araki, K. Saito, M. Kinjo, A. Miyawaki, *Nat. Biotechnol.*, **2006**, *24*, 577-581.

細胞内でタンパク質の機能や発現動態を解析するとき、標的タンパク質を蛍光標識して可視化する方法が多用されています。特に、タンパク質 - タンパク質間相互作用の解析にはFRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)がよく用いられていますが、観測対象とするタンパク質のサイズが大きいとドナーとアクセプターが近接しにくいと、FRETのシグナルが得られにくくなる場合があります。そのため、FRETに変わる技術として蛍光相関分光法(Fluorescence correlation spectroscopy: FCS)を発展させた蛍光相互相関分光法(Fluorescence cross-correlation spectroscopy: FCCS)が注目されています。FCSは、特定の微小領域に出入りする蛍光分子のブラウン運動に由来する蛍光シグナルのゆらぎを観測することにより、観測対象の大きさや濃度などを測定する方法です。FCCSでは観測対象である2つのタンパク質にそれぞれ異なる発光波長を有する蛍光色素を標識し、これらを同時に励起して2波長での蛍光のゆらぎを観測することにより、分子間相互作用に関する情報を引き出すことができます。従来のFCCSでは、2つの蛍光色素を同時に励起するために異なる波長のレーザーを用いていますが、微小領域に2つのレーザー光を同時にあてることは技術的な困難を伴います(図1a)。2つの蛍光色素が同じ波長で励起可能かつ異なる発光波長を有していれば、より簡便にFCCSによる測定が可能になります(図1b)。

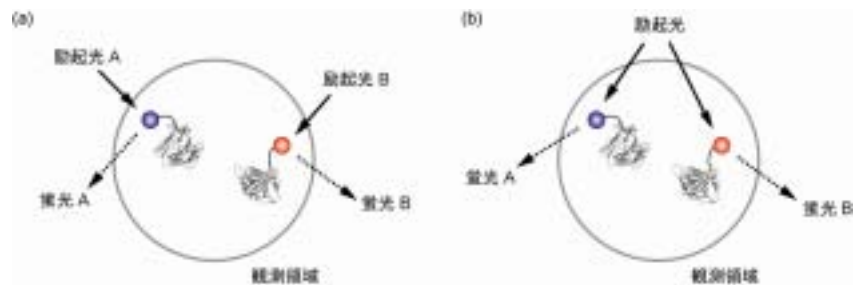


図1 (a) 従来の FCCS (b) 1 波長で同時励起可能な 2 つの蛍光色素を用いた FCCS .

そこでこの論文では、CFP (Cyan Fluorescence Protein)と同じ波長で励起可能で CFP とは異なる発光波長を有する蛍光タンパク質の開発について報告しています。著者らは、コモンサンゴからクローニングしてきた新規の色素タンパク質を遺伝子工学的に改変し、非常に大きなストークスシフトを示す蛍光タンパク質”Keima”の開発に成功しました。Keima は 440 nm に励起最大波長、620 nm に発光最大波長を有し、実に 180 nm ものストークスシフトを示します。KeimaとCFPの発光波長はほとんど重ならないため、これらを容易に区別することが可能です。著者らは、KeimaとCFPの組み合わせを用いてカスパーゼ活性を FCCS で定量的に解析しています。また、458 nm で励起可能で異なる発光波長を有する 6 つの蛍光タンパク質 CFP、mMiCy、EGFP、YFP、dKeima(二量体の Keima)、mKeima(単量体の

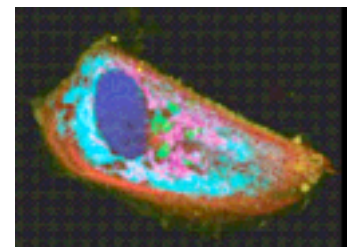


図2 1 波長で同時励起可能な蛍光タンパク質を用いたマルチカラーイメージング(論文より抜粋) .

Keima)を用いて、1細胞の6つの領域を同時励起観察することにも成功しています(図2)。私はケミカルバイオロジーの視点からタンパク質のイメージング方法について考えがちなので、蛍光タンパク質はやっぱり大きいなぁとってしまうのですが、本論文は細胞内の多数のタンパク質を同時に可視化して解析できる有用な手法を提供していると感じました。

Glycoproteomic probes for fluorescent imaging of fucosylated glycans *in vivo*

M. Sawa, T.-L. Hsu, T. Itoh, M. Sugiyama, S. R. Hanson, P. K. Vogt, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2006**, *103*, 12371-12376.

タンパク質が翻訳後に多数の修飾を受けるのは周知のことだと思います。翻訳後修飾の中でも糖鎖修飾は真核生物のタンパク質の50%以上に起こっているといわれており、グリコミクス研究が精力的に展開されています。例えば、本論文と次の論文で標的としているタンパク質のフコシル化は、細胞間の相互作用やタンパク質の機能調節などの重要な生理機能に関与することが知られています。しかしながら、蛍光タンパク質のように遺伝子工学的に糖鎖を蛍光ラベル化する方法がないので、細胞内での糖タンパク質の局在や機能、糖鎖のプロセッシングなどについての情報を直接得るためには、タンパク質上の糖鎖を選択的にラベル化する方法が必要となります。近年、糖鎖のサルベージ経路(再利用経路)を利用して糖タンパク質上に特異な反応性を有する官能基を有する糖鎖誘導体を組み込む方法が提唱され、糖タンパク質上に提示された官能基に対して選択的な反応を用いることにより、糖タンパク質のラベル化が達成されています。これまでに、ketone-aminoxy あるいは hydrazide の選択的かつ安定なイミン形成反応、アジドとホスフィン誘導体間で起こる Staudinger 反応などが利用されていますが、本論文では Cu(I)を触媒とするアジドとアルキンの[3+2]付加環化反応(いわゆる Click 反応)を用いて細胞内でのフコシル化タンパク質の蛍光ラベル化にチャレンジしています。Click 反応の利点として、反応が速いことに加えて、形成されるトリアゾール環の電子供与的な特徴から反応前後での蛍光の OFF/ON が可能であると期待されます。著者らは、無蛍光性の 4-ethynyl-*N*-ethyl-1,8-naphthalimide(図1 1a)が6位にアジドを有するフコース誘導体 2a と反応することにより 462 nm に発光極大を有する蛍光性の生成物 3a を与えることを見出しました。同様に、4-azido-*N*-ethyl-1,8-naphthalimide(図1 1b)は6位にアルキン(alkyne)を有するフコース誘導体 2b と反応して、422 nm に蛍光を示す 3b を与えます。発光波長や量子収率、安定性の面から、以降は 1a を用いて糖タンパク質のイメージングを行いました。アセチル化した 6-azido-L-fucose 存在下で Jurkat 細胞を3日間培養し、1a を用いて蛍光ラベル化を行ってフローサイトメトリーにより解析した結果、細胞表面の糖タンパク質が蛍光ラベル化されていることが示唆されました。*N* 結合の糖タンパク質合成の初期段階を阻害するツニカマイシン存在下で培養した後にラベル化を行った場合には、コントロール(アジドをもたないフコース存在下で培養したもの)とほとんど差がないことから、糖タンパク質が選択的に蛍光ラベル化されたことが支持されます。Hep3B 細胞を用いて細胞内の糖タンパク質ラベル化を行った結果、粒状の蛍光イメージングパターンを得ることに成功しています。水溶性トリフェニルホ

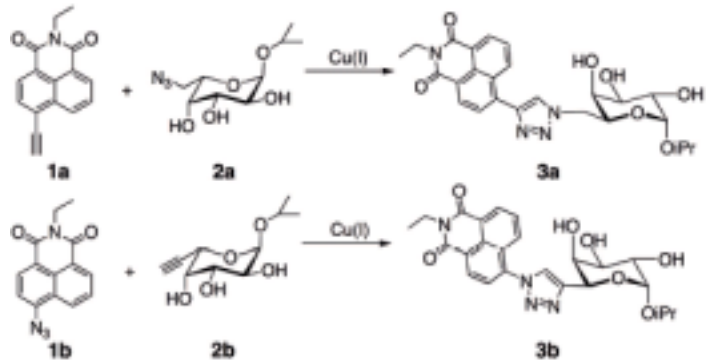


図1 アジドおよびアルキンを有するナフタルイミドとフコース誘導体、およびそれらの click 反応生成物(本文より抜粋)。

スフィンでアジドを還元した後でラベル化を行っても蛍光パターンが得られないこと、Alexa Fluor 594 修飾 WGA レクチンを用いて二重染色した結果、ほぼ重なったマージ画像が得られたことから、細胞内で選択的に糖タンパク質の蛍光イメージングが達成されたと考えられます。

以上のように、Click 反応でアジド糖の選択的ラベル化と蛍光スイッチングを達成できている点で、本論文は糖タンパク質の蛍光イメージングにおいて有用な方法論を提案しているものと思われます。しかし、サルベージ経路を利用した糖鎖ラベル化にはまだ問題があるようです。本論文では特に触れられてはいませんが、同様にタンパク質のフコシル化をターゲットとした際の問題点に触れた Bertozzi らの論文を次に紹介します。

A chemical reporter strategy to probe glycoprotein fucosylation

D. Rabuka, S. C. Hubbard, S. T. Laughlin, S. P. Argade, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 12078-12079.

生合成経路を利用して非天然の官能基を有する糖鎖をタンパク質などに組み込む手法は Bertozzi らの先駆的な研究によるものであり、彼らは chemical reporter strategy と呼んでいます。彼らは特にアジドを有する糖誘導体を用いていますが、修飾反応として Cu(I) 触媒を必要としない strain-promoted [3+2] 付加環化反応も開発しており、ケミカルバイオロジーからのグライコミクス研究に精力的に取り組んでいます。本論文では、Wong らと同様にフコシル化タンパク質をターゲットとしています。フコースのサルベージ経路では、フコースは fucose kinase によってリン酸化された後、GDP-fucose pyrophosphorylase によって GDP-フコースに変換されます。フコース転移酵素は少なくとも 2 種類は 6 位置換のフコース誘導体を基質として受け入れ可能であることが *in vitro* で明らかにされていますが、サルベージ経路の第一段階の fucose kinase については非天然基質に対する寛容性は明らかにされていません。そこで、2 位(1)、4 位(2)および 6 位(3)にアジドを有するフコース誘導体を合成し、タンパク質中への組み込みについて検討しています(図 1)。アセチル化したアジドフコース誘導体存在下で Jurkat 細胞を 3 日間培養し、Staudinger 反応でタグとなる FLAG ペプチドを反応させた後、FITC (Fluorescein isothiocyanate) 標識した抗 FLAG 抗体で染色してフローサイトメトリーによる解析を行いました。その結果、1 および 2 ではほとんど細胞表面のラベル化が起こっていないのに対し、3 では顕著な蛍光シグナルが観測され、3 はフコースサルベージ経路の第一段階の基質としても容認されていることが示唆されました。ただし、3 には細胞障害性があるようで、100 μM 以上の濃度では同様に FITC-FLAG 抗体でラベル化された死細胞も検出されています。一方、1 と 2 では 200 μM の濃度でも死細胞は検出されていません。著者らは、細胞表面の糖タンパク質に 3 が組み込まれていることの確証を得るために、細胞破碎液を温和な条件下で酸加水分解処理し、高 pH でのアニオン交換クロマトグラフィーによる分析を行いました。その結果 6-azido fucose が検出され、3 が確かに組み込まれていることが示唆されました。しかし、同時に天然のフコースも検出され、6-azido fucose が代謝過程でフコースへと変換されていることも示唆されました。著者らは 3 の毒性との関連から、酵素阻害あるいはタンパク質の機能異常が起こっているのではないかと考察しています。

また、6-azido fucose が糖脂質中に組み込まれている可能性も否定できないため、より詳細な検討が必要であると述べています。

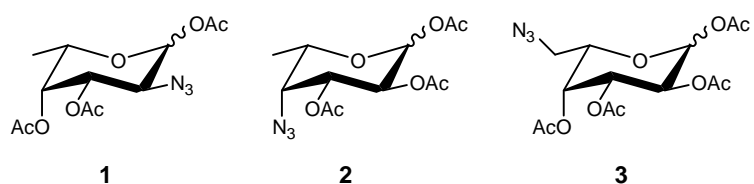


図 1 2 位、4 位および 6 位にアジドを有するフコース誘導体。

Chemical reporter strategy による糖タンパク質のラベル化は、いかに細胞をだまして非天然の糖誘導体を望みのタンパク質に組み込ませるか、という点が難しくまたおもしろいのではないかと感じました。今後、新たな Bioorthogonality を有する非天然の官能基が見出されることによって、より生合成経路に受け入れやすい糖鎖誘導体の開発が可能になるかもしれません。また近年、複合糖質の生合成において欠かせない存在である糖転移酵素について多くの知見が得られるようになってきていることから、chemical reporter strategy にも新たな展開が現れるのではないかと期待されます。

Modification of aniline containing proteins using an oxidative coupling strategy

J. M. Hooker, A. P. Esser-Kahn, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 15558-15559.

タンパク質表面には種々の官能基が存在しますが、これらを区別して特定の残基に選択的に修飾反応を施すことは困難です。そのため、遺伝子工学的に Bioorthogonal な反応性を有する官能基をタンパク質に組み込み、その官能基に選択的な反応を用いることにより、部位特異的に人工の機能単位を導入する方法が開発されています。糖タンパク質のイメージング・ラベル化でも紹介しました Staudinger 反応や click 反応が有名なところかと思えます。近年、クロスカップリング反応を用いて 4-iodophenylalanine のような非天然アミノ酸に対して蛍光色素やビオチン誘導体を選択的に導入可能であることが実証されています。私は浜地研に在籍時に鈴木カップリングを利用した修飾反応の開発を行うことができました (A. Ojida, et. al., *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 3301-3305.). また、横山先生のグループでも Heck 反応を利用したタンパク質修飾反応を報告されておられます (K. Kodama, et. al., *ChemBioChem*, **2006**, *7*, 134 – 139). 拡張コドン法により非天然アミノ酸のタンパク質への組み込みが比較的容易にできるようになりましたが、細胞内で効率的に非天然アミノ酸を組み込むためにはまだクリアすべき課題がいくつかあると思われま。Schultz らは、細胞内でアミノフェニルアラニンの生合成およびタンパク質への組み込みが可能であることを報告しています。しかしながら、アミノフェニルアラニンに選択的な修飾反応はこれまでのところ開発されていません。そこで、Francis らはアニリン誘導体の酸化的カップリング反応に着目し、アミノフェニルアラニンを標的として chemoselective かつ高収率な反応の開発を行いました。

基盤となる反応では、水溶液中、酸化条件下で、*N*-アシルフェニレンジアミン **1** が数分のうちに三量化し、安定な色素 **2** を形成します (図 1)。

この反応を 2 成分系にするために、**1** のアミノ基をアルキル化しました。**3** は NaIO_4 のような酸化剤を添加しても、単独ではほとんど反応しませんが、一級アニリン **4** とは迅速に反応して安定な生成物 **5** を与えます (図 1)。著者らが提案している反応メカニズムでは 2 つめのアニリンが反応することは無く、水が求核付加することにより、**3** と **4** の 2 成分酸化カップリング生成物 **5** を与えます。このことは H_2^{18}O 中で反応を行うと、 H_2^{16}O

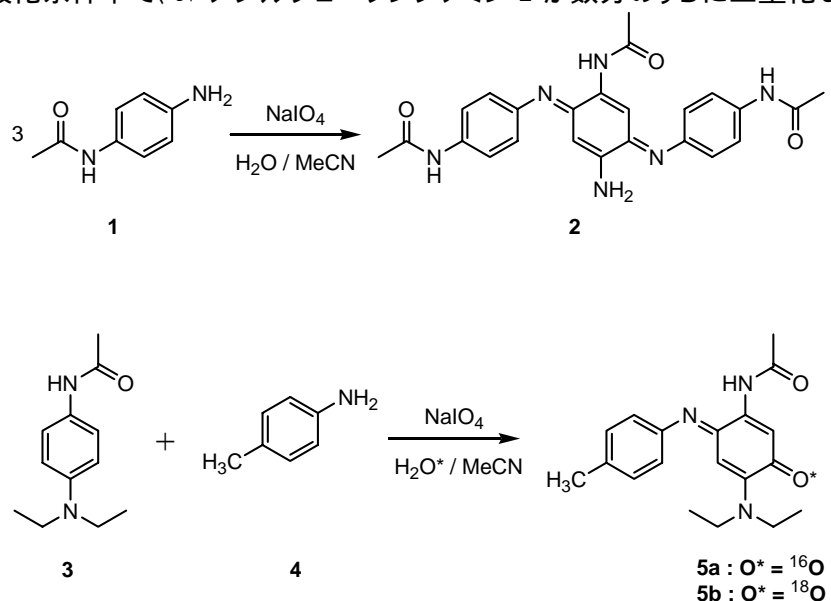


図 1 フェニレンジアミン誘導体とアニリン誘導体の酸化カップリング反応。

中で反応したときより2マスだけ増加した生成物が確認されていることから支持されます。5は2と同様に安定で、pH 2~11の間で12時間以上分解物の生成は認められませんでした。興味深いことに、5bのカルボニル酸素(図中の*)は H_2^{16}O 中でも24時間以上 ^{18}O のまま同位体交換は起こりません。この点からも、加水分解に対して高い安定性を有していることが明らかになりました。次に、この酸化カップリング反応のタンパク質上での選択性を検討するために、アニリン4のアナログをリゾチームのリジン側鎖に修飾し、 NaIO_4 存在下でフェニレンジアミン誘導体3を反応させたところ、高効率で1分子の3が反応した生成物を与えました。逆に、フェニレンジアミン誘導体をリゾチームに修飾して、アニリン誘導体を選択的に反応させられることも確認しています。一方、未修飾のリゾチームは、酸化剤とフェニレンジアミン誘導体存在下では反応生成物を与えないことから、通常のアミノ酸の側鎖は反応しないと考えられましたが、この反応はメチオニン等の硫黄を含む側鎖の酸化を伴ってしまうことがわかりました。N末端セリンの NaIO_4 による酸化反応では、メチオニン含有緩衝液中で行うことにより硫黄の酸化を最小限に抑えられるようですが、アニリンの酸化カップリング反応では効果があまりないため何らかの防止策が必要と考えられます。本実験では用いていないようですが、 $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ を酸化剤として用いると改善されるようです。さらに、アシル基の先に蛍光色素を有する3の誘導体を用いることによりタンパク質の蛍光ラベル化も可能です。反応条件にもよりますが、50 μM のアニリン修飾タンパク質に対し、250 μM のフェニレンジアミン誘導体、1 mMの NaIO_4 で2時間反応させた場合では、平均85%とかなり高い収率で目的物が生成されます。副反応が気になりますが、反応が比較的速く高収率であり、新たなタンパク質修飾反応として有用ではないかと思います。個人的には、生成する色素が蛍光性を有するように設計できればラベル化と蛍光スイッチングを同時に達成できてしまうのになあ、と考え込んでしまいました。



生命化学研究法

ペプチド固相合成法

東京工業大学大学院 生命理工学研究科 生物プロセス専攻 三原研究室

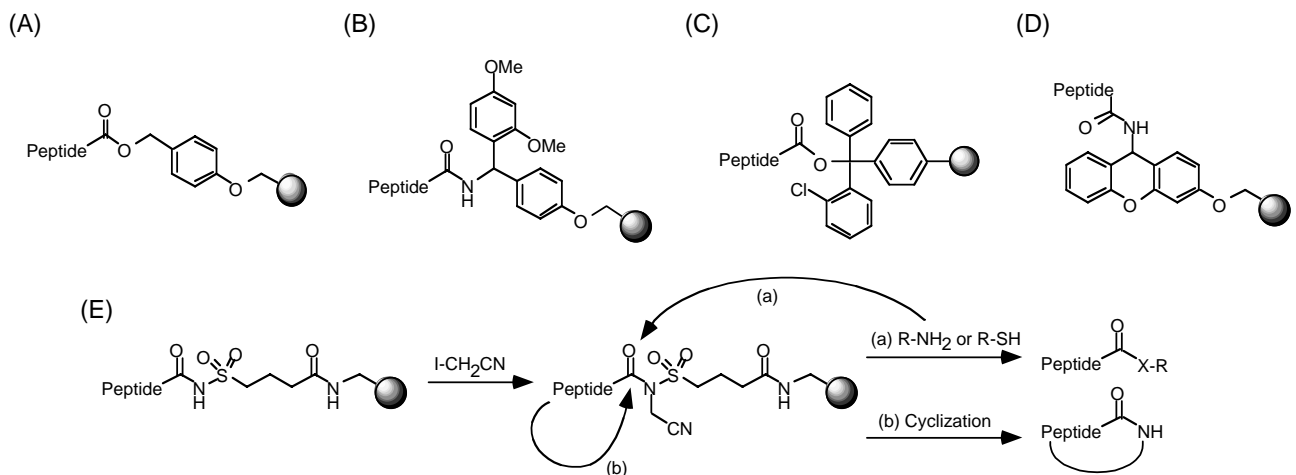
富崎欣也 (助手(COE21))・高橋 剛 (助手)

(1) はじめに

ペプチドは高選択的・高活性な生理活性物質である。近年のヒト遺伝子配列解読を期に遺伝子にコードされている全タンパク質(プロテオーム)機能解析の機運が高まるにつれて、研究ターゲットとして拍車がかかるとともにペプチドのバイオツールとしての利便性・重要性も認識されつつある。また、ペプチドは自己組織化によりナノファイバー等の興味ある構造体を形成することが知られており、生体適合性材料あるいはナノ有機材料としての応用が期待されている。ここでは、まずペプチド固相合成用樹脂やアミノ酸保護基の選択についての考え方について述べる。さらに、東工大三原研で一般的に利用されているペプチド固相合成法プロトコル(章末参照)および常法で調製した粗ペプチドの純度に不満がある、あるいは10~20種程度のペプチドを量的に並列して調製したい場合等に適用可能なペプチド合成法について述べる。最後に、蛍光色素等の非天然単位をアミノ酸側鎖に樹脂上で導入する方法や、より長鎖のペプチドを合成する方法について述べる。

(2) ペプチド固相合成用樹脂の種類

まず、合成したいペプチドのC末端構造を確認する。カルボン酸、アミド、アルコール、エステルおよびヒドラジドであれば固相合成可能である。図1にFmoc固相ペプチド合成用樹脂を示す。



(図1) ペプチド固相合成に用いられる代表的な合成用樹脂。(A) Wang 樹脂。ペプチドC末端はカルボン酸型で得られる。(B) Rink Amide 樹脂。ペプチドC末端はアミド型で得られる。(C) 2-クロロトリチル樹脂。カルボン酸、アルコール、アミン等種々の官能基を固定できる。ペプチド保護基を残してC末端カルボン酸型で得られる。(D) Sieber 樹脂。ペプチド保護基を残してC末端アミド型で得られる。(E) 4-Sulfamylbutyryl AM 樹脂。スルホンアミド型でペプチドを担持する。ヨードアセトニトリルにより活性化され、求核剤との反応でペプチドの樹脂からの切断とC末端修飾を同時に行う。

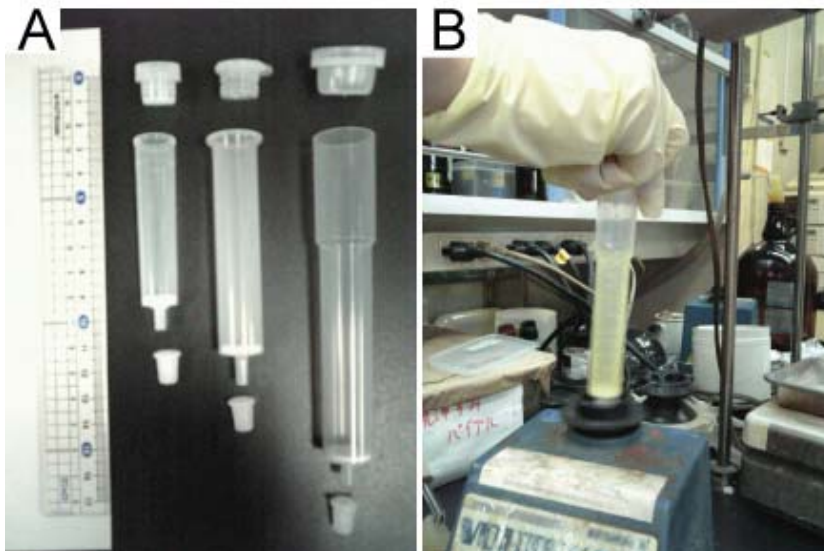
ペプチドのC末端をカルボン酸で得る場合には Wang 樹脂、またアミドで得る場合には Rink Amide 樹脂が一般的に用いられる。これらは 95% TFA 処理によりペプチドの樹脂からの脱離および保護基の除去を行うことができる。2-クロロトリチルクロライド樹脂はカルボン酸のみならず、アルコール、フェノール、アミンおよびヒドロキシルアミンを固定化することができ、5%の TIS を含む 1-50% TFA の DCM 溶液により樹脂から切断可能である。特に、側鎖保護基を残したまま C 末端カルボン酸を得るときに有効である。一方、Sieber Amide 樹脂を用いると穏和な酸処理 (1% TFA) により C 末端アミドを得ることができる。また、スルファミル基を用いる固相合成法は、ペプチド C 末端を様々修飾したい場合に有効である。アミノ酸をスルホンアミド型で樹脂へ導入しペプチド鎖を伸長した後、ヨードアセトニトリルで活性化することができる。これにより一級および二級アミン、チオール、アミノ酸エステル、アルコールおよびヒドロキサイド等の求核剤処理により相当する修飾 C 末端を得ることができる。また、分子内求核攻撃により環状物が得られる。現在では多種多様な有機合成用樹脂が販売されているので、必要に応じた樹脂の選択が必要である。

(3) ペプチドマニュアル固相合成法

ペプチドの種類によっては、保護基の組合せが複雑であったり、保護基除去の条件が異なったり、あるいは量的に必要なだったりしてペプチド自動合成機では対応できない場合がある。その場合、ペプチドマニュアル合成を行う必要がある。しかし、10 種程度のペプチドを並列にマニュアル合成するのは思いの外、骨の折れる作業である。そこで、当研究室にてペプチド配列中の側鎖保護基の部位特異的除去、次いで蛍光色素の導入等すべての操作を樹脂上にて行う際に汎用している秘密兵器 (?) を紹介する。

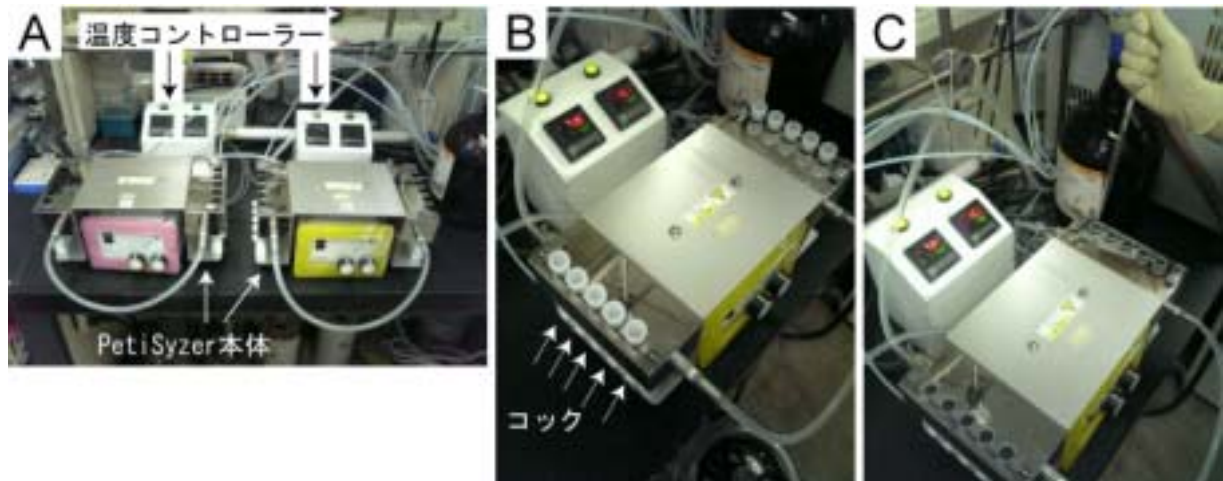
まず、マニュアル合成する際に重要なことは、合成スケールおよび反応容器の選択である。図 2A に示すように、我々は通常 3 種類のプラスチック製反応容器を使い分けている。利用可能な樹脂量は小さい方から順に (小) ~100 mg、(中) ~250 mg および (大) ~1 g である。従って、用いる樹脂の置換率を 0.40 mmol/g とすると、得られるペプチドの理論量はそれぞれ 40 μ mol、0.10 mmol および 0.40 mmol となる。これらを図 2B に示すように、ボルテックス攪拌することで Fmoc 基の除去と Fmoc アミノ酸の縮合を行う。減圧ろ過は使用済みのガロン瓶上で十分である。

合成するペプチドの種類が少ない場合には上述のボルテックス攪拌で十分であるが、種類が多い



(図 2) ペプチド固相合成用反応容器。(A) 常時 3 種類のサイズが用意されている。左から順に (小) ~100 mg、(中) ~250 mg、(大) ~1 g 樹脂の取り扱いができる。(B) NMP 等の溶媒で膨潤させた樹脂をボルテックス攪拌しているところ。攪拌しすぎると樹脂が砕けてフィルターが目詰まりを起こす場合がある。

場合、例えば 10 ~ 20 種を並列マニュアル合成する場合には (株) ハイペップ研究所から購入した PetiSyzer が威力を発揮する。PetiSyzer は本体と温度コントローラーにより構成されている (図 3A)。本体には最大で 10 本の反応容器 (小) を装着可能である (図 3B)。コックを開けてアスピレーターで減圧することで、10 本同時に溶媒を除去することができる。さらに、温度コントローラーを接続することで、反応進行に合わせたチャンバー内の昇温および冷却が可能である。PetiSyzer を用いて 20 種程度のペプチドを並列合成する場合は、用いる Fmoc アミノ酸をあらかじめ NMP 等の溶媒に溶解し、必要量を粉末ではなく溶液で反応容器に加えると大幅な時間の短縮になる (図 3C)。我々はこのシステムを用いて、Fmoc 基の除去には 25% ピペリジンを含む NMP 溶液処理を室温で 1 分 (×1 回)、5 分 (×2 回)、また縮合反応には Fmoc アミノ酸 10 等量、HBTU-HOBt 法、40 °C、20 分の条件でペプチド鎖を伸長することで、N 末端に TAMRA 色素を有する (通常難配列といわれている) 16 残基の α -ヘリックス性ペプチドを HPLC 上ほぼ単一ピークとして得ることができた。ペプチド鎖伸長後の TFA による脱保護も PetiSyzer 上で可能であるが、脱保護・脱樹脂後の粗ペプチドを含む TFA 溶液のろ過、濃縮、エーテル沈殿および乾燥等は 1 本ずつ手作業で行う (図 4、詳細は章末プロトコール参照)。



(図 3) 固相合成用自動攪拌機 PetiSyzer。(A) PetiSyzer は本体と温度コントローラーにより構成されている。(B) 本体には最大で 10 本の反応容器 (小) を装着可能。コックを開けてアスピレーターで減圧すると、10 本同時に溶媒を除去できる。また、温度コントローラーを接続することで、反応進行に合わせたチャンバー内の昇温および冷却が可能である。(C) Fmoc アミノ酸等の試薬類はあらかじめ高濃度溶液を調製し、粉末ではなく溶液で反応容器に加えると大幅な時間短縮になる。

(4) アミノ酸側鎖の樹脂上での修飾

ペプチド固相合成法の応用として、ペプチド中のアミノ酸側鎖上に蛍光色素や糖鎖等の非天然単位を導入することもできる。N 末端に導入する場合は、導入する化合物にカルボン酸があれば、通常のアミノ酸と同様にカップリングすることで容易に導入できるが、側鎖に導入する場合には少し工夫が必要である。一つの方法として、最初から非天然単位を導入した人工アミノ酸を合成し、そのアミノ酸のアミノ基を Fmoc 基等で保護しておけば、通常通りの固相合成により合成することができる。しかしこの方法では、非天然部位を導入した人工アミノ酸を溶液中で合成する必要があり、高価な蛍光色素や糖鎖等を大量に使わなければならない。また糖鎖のように、水酸基といった反応性の高い官能基を多数含んでいたりすると、その後のアミノ酸伸長反応の際に容易に副反応が生じ

る。そこで、リシン等のアミノ酸側鎖のアミノ基や、グルタミン酸等のカルボキシル基を利用して、非天然単位の導入を樹脂上で行うことで、それらの問題を回避することができる。具体的には、TFA等の最終脱保護・脱樹脂に使う試薬と orthogonal な保護基で保護したアミノ酸を用い、ペプチドをN末端まで伸長させ、その後、特定のアミノ酸上の保護基を選択的に除去し、そこに非天然単体を樹脂上でカップリング試薬を用いて導入する。またこの際に、導入する試薬の等量数を下げれば(樹脂上の官能基に対して、1~2倍等量)、高価な試薬の使用量をかなり減らすことができる。以下に4-methyltrityl (Mtt)基で側鎖のアミノ基を保護した Fmoc-Lys(Mtt)-OH を用いた系について簡単に紹介する。

まず、通常の Fmoc 固相合成法にてペプチド合成を行う(章末プロトコル参照)。この際に、使用する樹脂として、Rink Amide リンカーと樹脂との間にリンカーを導入してある Rink Amide MBHA 樹脂等が酸に安定なので適している。N末端まで合成終了後、樹脂をDCMで洗浄し、NMPから置換する。直前に調製した脱 Mtt 溶液(1% TFA, 5% TIS in DCM)を樹脂に加え、よく混合する。2分後、溶液をろ過により除去し、これを5~10回程ろ液の色が黄色から透明に変化するまで行う。DCM、NMP等で順次洗浄した後、DIEA等の塩基を少量加え攪拌し、TFAを除去する。さらにNMP等で洗浄した後、目的の非天然部位を含む試薬をカップリングする。反応終了後、樹脂を洗浄、乾燥後、TFAで通常通りに脱保護・脱樹脂を行う(図4、詳細は章末プロトコル参照)。



(図4) TFAで脱保護した後、樹脂をろ過により除去しているところ。ここでは、先に使用したペプチド合成チューブをそのまま利用して樹脂を除いている。樹脂をTFAで十分洗浄した後、エバポレーターにより溶媒を留去、ジエチルエーテルを加えてペプチドを沈殿化させる。

(5) ネイティブケミカルリゲーションによる長鎖ペプチドの合成

これまで紹介してきた通常のペプチド合成により、40残基程度までは合成可能であるが、40残基を超えてくると純度および収率が大きく減少する。特に、副生成物である1残基欠損したペプチド等の分離が非常に困難になってくる。そのような問題を解決する一つの方法として、複数のフラグメントペプチドを溶液中で縮合させて長鎖ペプチドを合成する方法がある。ここではStephan B. Kentらにより開発されたネイティブケミカルリゲーション法について紹介する。ネイティブケミカルリゲーション法は、N末端側のフラグメントペプチドのC末端に配置したチオエステルと、C末端側のフラグメントペプチドのN末端に配置したCys残基のチオール基がエステル交換反応を起こした後にチオエステルからアミド結合への再結合を生じる反応であり、最終的に得られるペプチドは通常のアミド結合で繋がったものとなる。特にこの反応は、チオフェノール等を溶液中に数%入れておくことでエステル交換反応が促進され、効率よく反応を行うことができ、また副反応も少ないため、目的のペプチドを高純度・高収率で得ることができる。もちろん、この反応を繰り返し行うことで、非常に長いペプチド・タンパク質を合成することも可能である。以下に概略を紹介する。

通常のFmoc法での固相合成では、ピペリジン等の塩基によりFmoc基を除去するため、塩基性条件下で不安定なチオエステル結合を直接樹脂上から伸長することは困難である。我々は、穏和な

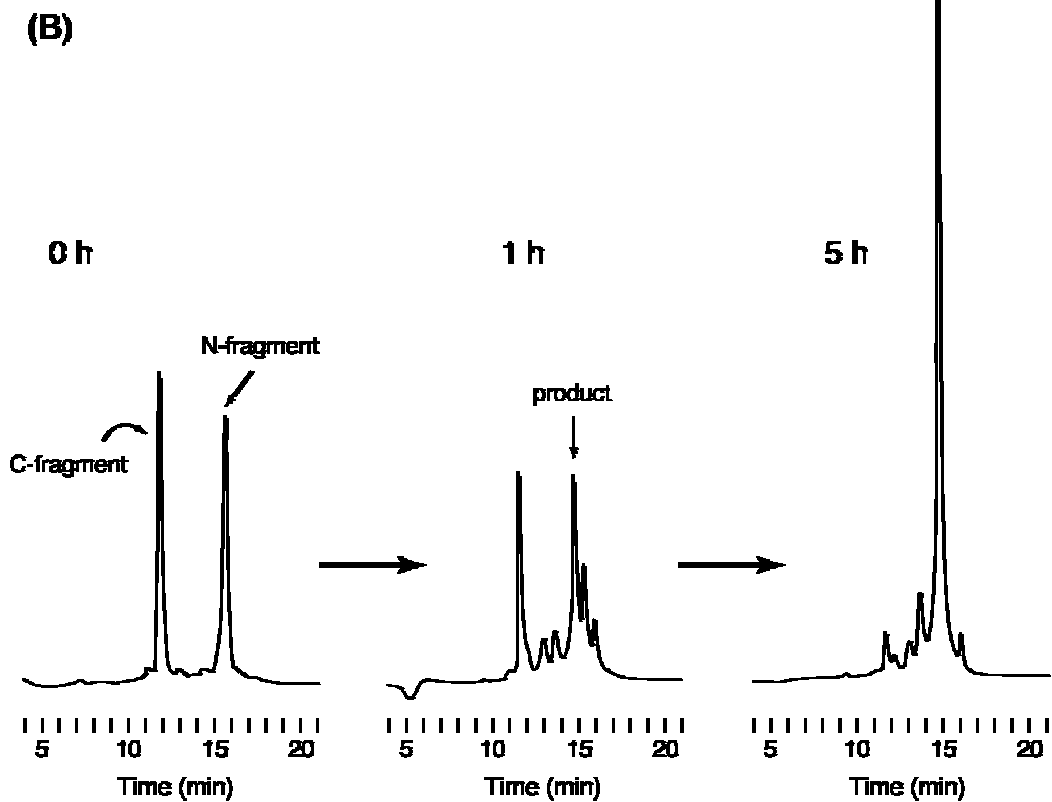
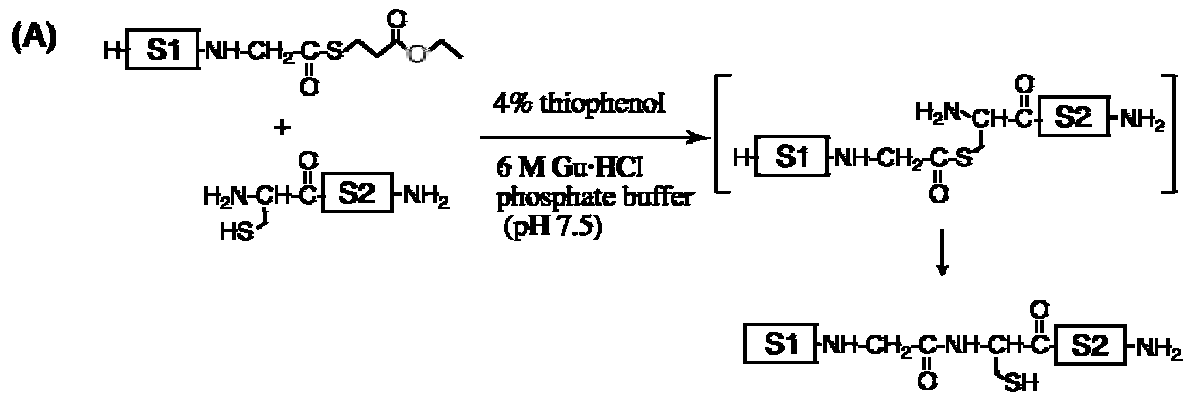
条件で脱樹脂を行える 2-クロロトリチルクロライド樹脂等を用いることで、一度保護ペプチドを回収し、その保護ペプチドの C 末端を EDC・HOBt 等のカップリング試薬と EtOCOCH₂CH₂SH 等のチオール基を有する化合物を用いてチオエステル化を行っている。この際注意することとして、C 末端のアミノ酸のラセミ化が起こる可能性があるので、できれば、C 末端にはグリシンを配置するのが望ましい。チオエステル化した保護ペプチドを TFA を用いて脱保護後、HPLC にて精製し、チオエステル化した N 末端フラグメントペプチドを得る。

合成した N 末端フラグメントと N 末端にシステインを配置した C 末端側ペプチドを混合し、ネイティブケミカルリゲーションを行う。多くの場合、合成するペプチドは長鎖なので溶解度が低い。ため、通常変性剤として 6 M グアニジンを含む中性の緩衝液中で反応を行う。またシステインが S-S 結合を形成するのを防ぐため、緩衝液はあらかじめ十分脱気しておく。両フラグメントペプチドを緩衝液に溶かした後、直ちにチオフェノールを加える。注意点として、チオフェノールの臭いはきついで反応は必ずドラフト内で行う。各フラグメントペプチドを mM 程度の濃度で反応させれば、3 ~ 5 時間くらいたつと、HPLC 上でだいたい生成物がメインとして得られる (図 5)。最後に細かい点として、反応に使う各フラグメントペプチドは十分に精製しておかないと、最終物の純度・収量に強く影響する。

以上、我々が常用しているペプチド合成法を解説した。ペプチド固相合成を行う場合、アミノ酸保護基の選択・組合せも最重要事項であるので、いずれ改めて紹介したい。

略号表

DCM:	dichloromethane
DIC:	diisopropylcarbodiimide
DIEA:	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMAP:	<i>N,N</i> -dimethylaminopyridine
DMF:	<i>N,N</i> -dimethylformamide
EDC・HCl:	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
Fmoc:	9-fluorenylmethoxycarbonyl
HBTU:	2-(1 <i>H</i> -benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HOBt・H ₂ O:	1-hydroxybenzotriazole monohydrate
NMP:	<i>N</i> -methylpyrrolidone
TAMRA:	<i>N,N,N',N'</i> -carboxytetramethylrhodamine
TFA:	trifluoroacetic acid
TIS:	triisopropylsilane
PPD:	piperidine



(図5) (A) ネイティブケミカルリグーションの反応スキーム。(B) 実際に合成したときの HPLC チャート。ここでは、35 残基の N フラグメントと 20 残基の C フラグメントを用いて反応を行った。約 5 時間後にはほぼ反応が終了していることが分かる。

東工大三原研究室における一般的なペプチド固相合成プロトコール

(A) ペプチド C 末端アミド合成法

Fmoc-NH-Rink Amide Resin (1 eq)を使用

1 . 脱 Fmoc 操作

NMP wash x 5

20% PPD/NMP 1 min x 1

20% PPD/NMP 15 min x 1

NMP wash x 5

2 . Fmoc アミノ酸カップリング操作

Fmoc-AA-OH 3 eq

HBTU 3 eq

HOBt · H₂O 3 eq

DIEA 6 eq

NMP

30 min x 1 (2-3 分に 1 回程度ボルテックス攪拌)

NMP wash x 5

3 . Kaiser test

微量の樹脂を小試験管に入れる

(i), (ii) および (iii) を 1-2 滴ずつ小試験管に入れる

(i) ニンヒドリン (0.5 g)/エタノール (10 mL)

(ii) フェノール (8 g)/エタノール (2 mL)

(iii) 10 mM KCN (0.2 mL)/ピリジン (10 mL)

沸騰水中で 2 分加熱する

陰性であれば脱 Fmoc 操作に移る

陽性であればカップリング操作に戻る

4 . 脱 Fmoc 操作および Fmoc アミノ酸カップリング操作を繰り返す

第一アミノ酸導入後、脱 Fmoc 操作時に Fmoc 基の定量を行う。

(i) 20% PPD/NMP 1 min x 1

(ii) 20% PPD/NMP 15 min x 1

(iii) NMP wash x 5

(i)-(iii) 溶液をメスフラスコに受ける DMF で 50-100 倍に希釈する

301 nm における吸収強度を測定する (リファレンスは DMF)

Fmoc のモル吸光定数 $\epsilon_{301} = 7800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて Fmoc 基濃度を計算する

5 . カップリング終了

6 . 脱 Fmoc 操作

7 . 必要に応じてアセチル化

Ac₂O 10 eq

NMP

8 . CHCl₃ wash

9 . 真空乾燥

(B) ペプチド C 末端カルボン酸合成法

Wang Resin (1 eq)を使用

(B-1) DCC-HOBt 法

1. 第一アミノ酸の導入

Fmoc-AA-OH 3 eq

DIC 3 eq

DMAP 0.3 eq

Wang Resin 1 eq

DMF

室温で攪拌 60 min

2. 樹脂を合成用カラムに移す

3. DMF wash x 3

4. キャッピング

無水安息香酸 5 eq

20% ピリジン/DMF

室温で攪拌 60 min

5. DMF wash x 4

以下は Rink Amide Resin の操作と同様

(B-2) DCC-HOBt 法

1. 第一アミノ酸の導入

Fmoc-AA-OH 4 eq

DIC 4 eq

HOBt 4 eq

DMF

室温で 10 min 攪拌

Wang Resin 1 eq

室温で 20 h 攪拌

2. 樹脂を合成用カラムに移す

以下は (B-1) 操作と同様



(C) 樹脂からの切断および保護基の除去

(C-1) ペプチドが Cys, Met, Trp を含まない場合

1. 乾燥した樹脂(250-500 mg)を 50 mL ナスフラスコに入れる

m-cresol 0.25 mL

thioanisole 0.75 mL

TFA 10 mL

室温で 1 h 攪拌

2. 合成カラムを通してろ過

3. TFA wash x 4

4. TFA を水温で留去

5. 冷エーテルを加えペプチドを沈殿させる

6. 遠心(3000 rpm, 5 min)の後デカンテーション x4

7. 真空乾燥

8. HPLC で分析、精製

(C-2) ペプチドが Cys, Met, Trp を含む場合

1. 乾燥した樹脂(250-500 mg)を 50 mL ナスフラスコに入れる

m-cresol 0.25 mL

ethanedithiol 0.75 mL

thioanisole 0.75 mL

TFA 10 mL

室温で 1 h 攪拌

2. 合成カラムを通してろ過

3. TFA wash x 4

以下はペプチドが Cys, Met, Trp を含まない場合の操作と同様



米国 Northwestern 大学留学体験記

京都大学大学院人間・環境学研究科
分子・生命環境論講座
助手 多喜 正泰

現在、京都大学大学院人間・環境学研究科にて助手として勤務しております。2002年4月から2003年9月までの一年半の間、Northwestern大学のThomas V. O'Halloran教授のもとで博士研究員として研究活動に従事してきました。昨年11月、実験のため約3年ぶりにNorthwestern大学を訪れていたところ、タイミングよく(?)留学体験記を執筆する機会を頂きました。編集委員の先生方に感謝するとともに、Northwestern大学での研究とエバンストンでの生活を3年前と現在の状況を交えながらご紹介したいと思います。

『O'Halloran先生 (Tom)との出会い』

私はそれまでに、大阪大学大学院工学研究科・福住俊一教授の御指導のもとで、「低分子量銅錯体による分子状酸素の活性化制御」に関する研究を中心に行っていました。そろそろ進路を決定しなければと考えていた博士課程3年の夏、Florenceで開催された国際会議で大阪大学大学院工学研究科の林高史教授にTomを紹介していただきました。その学会では、Tomのplenary lectureがあったのですが・・・タンパク質、ましてや細胞など触ったことのなかった私は、その時のmetal traffickingに関する講演内容をほとんど理解できませんでした。しかし、なんとなく興味があり、あまり深く考えることなく帰国後すぐにCVを送りました。待つこと約2ヶ月・・・Tomから連絡があり、11月中頃に留学先が決定しました。そこから、公聴会、博士論文提出、学会、私事ではありますが結婚式などが相次ぎ、あっという間に4月を迎えてしまいました。今にして思えばかなり留学(勉強も含めて)準備不足だったかもしれません。

『エバンストンでの生活とシカゴについて』

エバンストンはシカゴ中心部から北へ約25キロ離れたところに位置する落ち着いた閑静な学生街です。シカゴと聞いて連想されることは、ジャズ、ピザ、White Sox (MLB)、アル・カポネなど多数ありますが、日本人にとってはあまりなじみ深い街ではありません。特に「シカゴピザ」に関しては勘違いが多く(実際、私もその一人でしたが)、写真の通りdeep dish pizzaと呼ばれる非常に厚みのあるピザのことを意味します。また、シカゴは別名Windy Cityと呼ばれるくらい常に風が吹いています。そのため夏は快適に過ごせるのですが、冬の寒さは半端ではなく、ラボから家路につくときにはダイヤモンドダストがきらきらと輝く様子を見ながら歩いていたのを思い出します。さらに、シカゴはアメリカの4大プロスポーツチームを有しているため、年中スポーツ観戦を楽しむことができます。ただ残念ながら、私はタイミングが悪かったのか、White Sox (MLB)のWorld Series Champion (2005)とChicago Bears (NFL)のSuperBowl進出(2007)の歓喜の瞬間を味わうことができませんでした。



これがシカゴ名物 deep dish pizza
中に入っているチーズの量は半端
じゃありません

話をエバンストンに戻しまして・・・エバンストンから北の一角は全米屈指の高級住宅街としても知られています。少し北にあるハイランドパーク市には、なんとあのマイケルジョーダンの自宅もあったそうです。治安も極めてよく、実験で遅くなった夜中の帰り道も一人で安心して歩けます。また、電車・バスなどの公共交通機関も非常に充実しており、アメリカに留学された多くの方がな

された車の購入はエバンストンでは必ずしも必要ではありません。事実、私も車を買いませんでしたし、必要なとき（遊びに行くとき）はレンタカーで済ませていました。ただ、日本食材を求める場合には少し遠出しなければなりません。私の場合は、大変でしたが往復3時間かけてバスを乗り継いで行っていました。

『Northwestern 大学と現在の O'Halloran lab の様子』

Northwestern 大学はシカゴ市内にもキャンパスがありますが、メインキャンパスはエバンストンにあります。南北 1.6 キロに広がるミシガン湖に面した長細いキャンパスで、160 近い建物が学内に建ち並んでいます。office の一つ一つが普通の一軒家と同じ作りになっているため、看板がなければ大学とは気づきません。大学にある建物の中でもとりわけ大きな建物が Tech building で、かつての O'Halloran lab はその 2 階にありました。2005 年に引っ越しし、現在は biology&life science 系の建物である Pancoe-Evanston Northwestern Healthcare (ENH) Life Sciences Pavilion に研究室があります。建物は新築で非常に洗練されているのですが、液体窒素、高圧ポンペ、有機溶媒等の保管庫は Tech building 内にあるため、真冬の厳しい寒さの中で取りに行くのはかなり憂鬱のようです。現在の O'Halloran lab の中とは言いますと、非常にゆったりとしているはずですが・・・引っ越し後の片付けがまだ済んでいないのでしょうか？ちなみに、有機合成班は 1 人につき 1 ドラフトが使用でき、快適な実験環境です。また、酸・塩基それぞれに対応した全自動ガラス器具洗浄機があったのには非常に驚かされました。



筆者が研究を行っていた Tech building。写真ではわかりにくいですが、かなり広い建物です。



現在 O'Halloran lab が入っている Pancoe-ENH Life Science Pavilion。この一階にあり、外から研究室の様子が丸見えです。



あるポストドクのベンチ。引っ越しの片付けが済んでいないのでしょうか？それとも本人が使いやすいようにアレンジされているのでしょうか？

『研究について』

ここで、私の留学していた当時のラボの様子と研究内容についてご紹介したいと思います。留学当時の O'Halloran lab は、私を含めてポストドク 5 名、大学院生 5 名、テクニシャン 3 名、秘書 1 名で構成されており、規模としてはそれほど大きくありませんでした。時を同じくして、同期の古川良明君（現：理化学研究所）もポストドクとして加わっています。彼は非常に優秀な研究者で、彼と知り合えたことが留学して良かったことの一つと言えます。各個人の研究テーマは多様性に富んでおり、「金属の関与する Chemical Biology」です。非常にアバウトな表現になってしまいましたが、それくらい幅広いテーマの研究が行われていました（現在はさらに広がっているようです）。ラボ内のグループミーティングは基本的には週一回で、これに加えて同じ Department の Godwin lab、Meade lab、Hoffman lab との合同ミーティングが週一回行われました。ピザ、クッキー、チーズ、時にはビールを飲み食べながらの discussion には始めは戸惑いましたが、分野の異なる先生方や学生との意見交換は非常に有意義な時間でした。

さて、Tom の代表的な研究には、転写活性因子による金属イオンの高感受性に関するものがあり

まず、MerR, CueR, ZntR はそれぞれ *E. coil* 中に存在する水銀、銅一価、および亜鉛の濃度調整タンパク質の転写制御因子であり、それぞれ金属選択的に機能します。特に、必須金属である銅 (+1) と亜鉛に関しては、それぞれ 10^{-21} M および 10^{-15} M という極めて低濃度の金属イオンを感受していることを明らかにしており、その結果 "フリー" な状態のこれらの金属イオンは *E. coil* に存在しないことを明らかにしました。^{1,2} これに対して私の携わったプロジェクトですが、細胞内亜鉛イオンのレシオイメージング用ツール、すなわち亜鉛蛍光プローブの開発でした。特に、二光子励起型蛍光顕微鏡を用いてレシオイメージングできるプローブが必要とされていたことから、その分子設計・合成に着手しました。蛍光に関する知識は最低限度しか持ち合わせておらず、プローブに関しては基本中の基本からの勉強でしたが、私のバックグラウンドは錯体化学ということもあり、配位子設計から合成、測定に至る一連の流れは比較的スムーズにいったと思います。私の第1号亜鉛プローブ Zinbo-1 からいろいろと改良を加え、ついに第5号である Zinbo-5 が完成し、その成果を論文で報告することができました。³ 私はこの Zinbo シリーズの開発を続け、私が帰国するころには Zinbo-13 にまで達しました。その後も Zinbo シリーズは続いているようで、先日の訪問時には Zinbo-23 にまでなっており、非常に驚いたのと同時に嬉しくもありました。これらのシリーズをまとめた結果については現在執筆中でありますので、今しばらくお待ちください。



O'Halloran lab の OB 会 (現役も含めて)
2003 年に開催された国際会議にて、左から二番目にいるのが筆者で、その下が Tom です。

このように書くと研究がすべて順調に進んだかのように見えるのですが、実を申し上げますと、最初 Tom から提示されたテーマは「シリコンを使った蛍光ナノラベル剤」の開発でした。右も左もわからないナノ粒子の世界で数ヶ月の間、四苦八苦していましたが、Tom の出張中に気分転換がてらに合成したのが上述の Zinbo-1 でした。出張後の報告では Tom は驚いていましたが、勝手なテーマ変更に関しては何のおとがめもなく、次の瞬間には笑顔となりプローブに関する Discussion へと展開されていきました。そんな訳でひょんなことから始めたプローブ合成が実を結んだこととなり、研究とはどう転ぶかわからないもので、それがあから研究が面白いんだなあと改めて感じる今日です。

『最後に』

留学体験記を執筆された他の先生方もおっしゃられているように、海外留学は自分の視野や世界観を広めることのできる非常によい機会だと思います。様々な国のいろいろな研究者の考え方や情熱は、人から聞いても本を読んでも理解できるものではありません。実際に肌で感じるからこそ得られるものであり、研究のみならず、人生においても何事にも代え難い貴重な財産となることは間違いないと私は断言することができます。

最後になりましたが、私にこのような研究の機会を与えていただいた O'Halloran 教授、ならびに私のつたない英会話に付き合いながら discussion し、実験を教えてくれたラボのメンバー、さらに一緒に渡米してくれた妻 千穂に感謝いたします。また、経済的な支援をいただいた日本学術振興会もこの場を借りてお礼申し上げます。

1. Outten, C. E., O'Halloran, T. V., *Science*, **292**, 2488-2492 (2001).
2. Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C. E., O'Halloran, T. V., *Science*, **301**, 1383-1387 (2003).
3. Taki, M., Wolford, J. L., O'Halloran, T. V., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 712-713 (2004).

シンポジウム等会誌

ナノバイオ EXPO 2007 および nano tech 2007 開催のご案内

日時 2007年2月21日～23日

会場 東京ビッグサイト 東4・5・6ホールと会議棟

ホームページ nano tech 2007 (<http://www.ics-inc.co.jp/nanotech/>)

ホームページ ナノバイオ EXPO 2007 (<http://www.ics-inc.co.jp/nanobio/>)

世界最大のナノテク国際展示会・国際会議である、nano tech 2007 (実行委員長 川合知二 大阪大学教授)およびナノバイオ EXPO 2007(実行委員長 馬場嘉信 名古屋大学教授)を上記日程・会場で開催します。今年は、史上最高の5万人の来場が予定されています。

詳細は、上記ホームページをご参照ください。

また、ナノバイオ EXPO 2007 に併設して、第3回ナノバイオ国際シンポジウムを下記の通り開催します。ご参加をお待ちしております。

第3回ナノバイオ国際シンポジウム

日時 : 2007年2月21日(水) - 22日(木)

会場 : 東京ビッグサイト 東4ホール ナノバイオ Expo2007 会場内

主催 : ナノバイオ Expo 実行委員会

参加定員 : 各150名

参加費 : 1日参加 10,000円(税込) 2日参加 15,000円(税込)

テーマ : 「ナノバイオ技術によるイノベーション創出」

ホームページ: http://www.ics-inc.co.jp/nanobio/nanobio_3rd.html

参加申し込み: 上記ホームページをご参照ください。

プログラム

[第1日目] 2月21日(水) 「創薬・医療におけるイノベーション創出」

基調講演

13:15-14:00 : 「New Technology and Clinical Applications of Nanomedicine」

Dr. Chiming Wei, MD, PhD, FACC, FAHA

Cardiothoracic-Renal Molecular Research Program Department of Surgery, Johns Hopkins University

School of Medicine, USA

President of American Academy of Nanomedicine

招待講演 1

14:00-14:35 : 「アプタマーRNA 医薬の開発」
東京大学 医科学研究所基礎医科学部門 部門長 中村 義一

招待講演 2

14:35-15:05 : 「がん治療へ、siRNA 医薬への期待」
株式会社ジーンケア研究所 取締役会長 古市 泰宏

招待講演 3

15:05-15:35 : 「RNAi 医薬開発の現状と期待」
日本新薬株式会社 取締役 矢野 純一

招待講演 4

15:35-16:10 : 「疾病メカニズムの解明と薬剤設計を目指した疾患関連タンパクの構造解析」
国立循環器病センター研究所 心臓生理部長 盛 英三

招待講演 5

16:10-16:45 : 「生理活性物質から見た蛋白質機能解明：創薬と chemical genetics」
アステラス製薬株式会社 分子医学研究所 主席研究員 田中 明人

[第2日目] 2月22日(木) 「食品・健康・化粧品におけるイノベーション創出」

基調講演

13:15-14:00 : 「健康産業におけるバイオマーカーの重要性」
名古屋大学大学院生命農学研究科 食品機能化学研究室 教授 大澤 俊彦

招待講演 1

14:00-14:35 : 「メタボリック症候群に対する機能性食品の開発」
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 臨床栄養学分野 教授 武田 英二

招待講演 2

14:35-15:10 : 「美容を目的とした食品素材の機能」
株式会社資生堂 H&BC 開発センター 特別研究員 渡部 一夫

招待講演 3

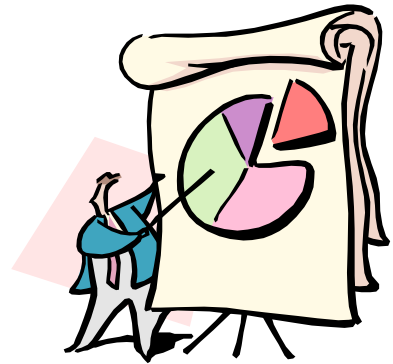
15:10-15:45 : 「アラキドン酸は高齢者の脳機能を改善する」
サントリー株式会社 健康科学研究所 所長 木曾 良信

招待講演 4

15:45-16:20 : 「酸化ストレス障害のバイオマーカー開発」
産業技術総合研究所 ヒューマンストレスシグナル研究センター センター長 二木 鋭雄

招待講演 5

16:20-16:50 : 「フラレンを使用した新規化粧品有効成分の開発」
ビタミン C60 バイオリサーチ株式会社 取締役 松林 賢司



第 27 回日本医学会総会 シンポジウムのご案内

第 27 回日本医学会総会(会頭 岸本忠三 大阪大学前総長)は、4 年に 1 回開催され、3 万人の医療関係者が参加する学会です。本学会で、下記のシンポジウムを開催します。ご参加をお待ちしております。

シンポジウム 夢 02 ナノテクと医療 現代版ミクロの決死圏

日時 2007 年 4 月 8 日 9:30 ~ 11:30

場所 大阪国際会議場 10 階 1008

ホームページ <http://www.isoukai.jp>

参加申し込み： 上記ホームページをご参照ください。

座長 川合知二 大阪大学産業科学研究所

馬場 嘉信 名古屋大学大学院工学研究科・予防早期医療創成センター

『ミクロの決死圏』は、1966 年に公開された SF 映画である。しかし、ナノテクノロジーの出現により、『ミクロの決死圏』はもはや夢物語ではなくなった。ナノテクノロジーは、ナノメートルスケール(10^{-9} m)で原子・分子を自在に制御し、望みの構造と機能をもった物質・材料・デバイスを創出する技術であり、最近、医療応用を目指した研究が急速に進展している。本シンポジウムでは、ナノテクノロジーの医療応用について、最先端の研究状況について情報提供するとともに、ナノテクノロジーによる未来医療について展望したい。

基調講演

川合 知二 大阪大学産業科学研究所・所長
ナノテクノロジーと医療

招待講演

菅 弘之 国立循環器病センター研究所・所長
ナノメディシン最前線

江刺 正喜 東北大学大学院工学研究科
バイオ MEMS による医療創成

片岡 一則 東京大学大学院工学系研究科・医学系研究科
ナノバイオ融合によるセルセラピー

馬場 嘉信 名古屋大学大学院工学研究科
ナノバイオデバイスによる予防早期医療創成

第2回ホスト・ゲスト化学シンポジウム

主催 ホスト - ゲスト・超分子化学研究会

会期 2007年5月24日(木) ~ 25日(金)

会場 大阪市立大学 学術情報総合センター(大阪市住吉区杉本 3-3-138)

発表申込締切 2月28日(水)

予稿原稿締切 4月13日(金)

事前参加登録締切 4月20日(金)



討論主題 「分子認識」と「超分子」を中心とする有機化学, 無機化学, 高分子化学, 生化学, 生体関連化学, 材料科学, 超分子化学, バイオテクノロジー化学 など

招待講演者 中島直敏 教授(九州大学)・Prof. Kenneth Raymond(カリフォルニア大学、USA)

発表形式 口頭発表(質疑応答を含め20分を予定)・ポスター発表

HGCS Japan Award of Excellence 2007 およびポスター賞の選考を行います。

発表・参加登録申込方法 シンポジウム HP をご覧下さい。

参加登録費 予約:一般 7,000 円, 学生 4,000 円(当日受付:各 1,000 円増, いずれも講演要旨集代を含む)

懇親会 5月24日(木), 会場:天王寺都ホテル「吉野の間」, 懇親会費:一般 6,000 円, 学生 4,000 円(当日受付:各 1,000 円増)

問合せ先 558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138

大阪市立大学理学研究科 築部 浩 電話 (06)6605-2560

E-mail: tsukube@sci.osaka-cu.ac.jp

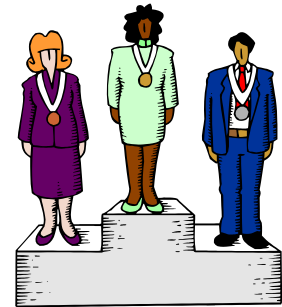
シンポジウム HP: <http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/chem/hg2007>

お知らせコーナー

受賞のお知らせ

田中 健太郎 (東京大学大学院理学系研究科)
平成 18 年度文部科学大臣表彰若手科学者賞 平成 18 年 4 月 18 日
「超分子化学分野における錯体型人工 DNA 分子システムの研究」

塩谷 光彦 (東京大学大学院理学系研究科)
井上科学振興財団 井上學術賞 平成 19 年 2 月 5 日
「金属錯体の精密配列制御と動的機能創成」
日本化学会 學術賞 平成 19 年 3 月 26 日
「精密分子設計による金属錯体型超分子の構築と機能化」



国嶋 崇隆 (神戸学院大学薬学部)
日本薬学会 學術振興賞 平成 19 年 3 月 27 日
「反応場の特性を基盤とする反応制御と実用的試薬の開発研究」

編集後記

私事ですが、今号をもちまして、編集委員を卒業させていただきます。長い間、また今回も、たくさんの方から面白い原稿を寄稿いただき、本当にありがとうございました。No. 8 (2002 年 2 月号) から担当させていただき、誰よりも早く原稿が読めることを楽しんでやらせて頂きましたが、もう 5 年も経ってもしまいました。月日が流れるのは早いものだと思います。

本号の村上氏の研究紹介の余談の中で、お酒の席で「科学の定義は？」と尋ねる話がでています。三原氏の巻頭言ではないですが、研究会初期の頃は、村上氏のように酒を飲んでサイエンスの話をするのはごく自然でした (ワイン飲みながらエントロピー談義?)。しかし、私がまだ駆け出しの助手の頃は、偉い先生方とご一緒させていただくと、必ず病気が健康の話になり、サイエンスの話にはなかなかならず、これは何だろう? こんなことでいいのか? などと不遜にも思ったりしていましたが、今となってはメタボリックな話題に終始しているにもかかわらず恥じることさえしない我が身に気づき、愕然とするような次第です。

この原稿を書いている 2 月 3 日は、実は私の誕生日です。年を重ねることで経験も豊富となりますので、化学のように発想だけではなく様々な技術、経験も必要な学問分野では、年をとることが必ずしも不利になるとは思っていません。しかし、着実に残り時間は少なくなります。人生の残り時間で、何ができ、何が残せるのか。それを意識しながら研究するようになるのは、年齢を重ねた者にとって避けられないことなのかもしれません。

ニュースレターの編集は、ここ数年、長崎 健氏 (大阪市大)、原田和雄氏 (東京学芸大) と私の 3 人で行い、毎号、編集委員全員で査読の上、皆さんにお送りしています。私の後任には、円谷 健氏 (大阪府大) を御願いし、3 人で引き続き、年 3 回の発行を目指していただきます。私も陰ながら、お手伝いしていきたいと思っています。今後とも、ニュースレターのご愛読、宜しく御願いたします。

石田 齊 (北里大学理学部)