

生命化学研究レター

発行: 日本化学会フロンティア生命化学研究会

(<http://www.chem.eng.osaka-u.ac.jp/FBC/>)

目次

1.	巻頭言	2
	The power of the dream	
	中島敏博((財)化学及血清療法研究所)	
2.	関連シンポジウム報告	3
	第3回バイオ関連化学合同シンポジウム	
3.	研究紹介	
	低分子化合物と蛋白質に関わる化学反応	4
	田中富士枝 (The Scripps Research Institute)	
	タンパク質修飾試薬としてのトランスグルタミナーゼの可能性	10
	神谷典穂 (九州大学大学院工学研究院)	
4.	論文紹介「気になった論文」	18
	石川文洋 (大阪府立大学大学院理学系研究科)	
	宇井美穂子 (東京大学大学院新領域創成科学研究科)	
	三成寿作 (北九州市立大学大学院国際環境工学研究科)	
5.	生命化学研究法	27
	巨大リポソームの顕微鏡直接観察	
	濱田 勉(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)	
6.	スクリプス研究所留学体験記	32
	臼井 健二 (東京工業大学生命理工学研究科)	
7.	シンポジウム等会告	36
	編集後記	40

巻頭言

The power of the dream

(財)化学及血清療法研究所

中島 敏博

「フロンティア生命化学研究会」となって二回目のレターの巻頭言に執筆機会を頂き、感謝いたします。13年前の最初の熊本での研究会(生物分子化学研究会、第23号レター参照)から関わってきたメンバーとして、また数少ない「産」のメンバーとしてご指名を頂いたものと思います。

まず最初に26号のレターでも井原先生(熊大)から紹介がありましたように今年の1月に節目の第10回の研究会を熊本で開催することができ、また多くの方々に参加頂き、盛会であったことに世話人の一人として感謝いたします。「つくる生命化学」をテーマとして設定した背景には、自らが創薬という分野に身を置くとともに構成論的アプローチに関わってきたことのこだわりもありました。

ここ10年余りは「ヒトゲノムプロジェクト」や「蛋白質3000プロジェクト」に代表とされる生命系を構成する分子情報を網羅的に解析する要素還元論に基づく研究が(多くの予算を注ぎ込んで)進展してきました。その結果、確かにそこにある要素は少し分かるようになってきました。しかし、相互作用やシステムの理解はどこまでできたのでしょうか。

一方で、構成論的アプローチを通じた生命システムの理解の試みからも多くの成果が生まれてきています。分子や物質から生命システムの理解や制御を目指すにはこれらの研究成果が上手く橋渡しされていくことが必要であろうと考えています。丁度本年7月号の「化学と工業」に郷先生が「生命科学と物質科学をつなぐ化学と物理」という巻頭言を書かれておられましたが、「フロンティア生命化学研究会」はその重要な役割を果たす会であろうと思います。

振り返って見ますと13年前の最初の熊本での研究会(生物分子化学研究会)は当時熊大の石田先生(現北里大)のお世話で三原先生始め、30台半ばを中心に活力あふれるメンバーが勢ぞろいしたスタートでした。少し雪が積もった阿蘇の温泉に入りながら熱く夢を語られる先生方に、自分の道がどうなるのか私自身混沌としていた時代に、パワーを貰い、また叱咤激励を頂いてきたと思います。

そういうパワーを若い世代に引き継ぎ、さらに発展させていくことが大事であることに前号の三原会長の巻頭言通り疑いはありません。研究環境が大きく変化し、グローバルな競争に曝されている現代社会においてそれは容易なことではないかもしれません。

この夏の北京オリンピックで日本の女子ソフトボールチームは悲願の金メダルを手に入れました。夢に向かって必死に立ち向かう姿は多くの感動を与えてくれました。「The power of the dream」。これは熊本での研究会の翌年のアトランタオリンピックの開会式で歌われた曲ですが、夢を力に進んでいく姿は科学者にも共通のものでしょう。

新たなステップに踏み出したフロンティア生命化学研究会では引き続き、年齢を問わず、夢を語り合っていく環境であり続けて欲しいと思います。一つの分子、一つの現象を丁寧に観察する、観測する、理解するという真摯な姿勢で科学に向き合い、探求し、自らの夢を語る。その結果として新たなイノベーションが生まれる。決して産業界、企業研究では生み出せないものを育成できる環境であること。研究会は特定の領域に拘ることなく研究者が時代を超えて、そういう姿勢を失うことなく発展していく場であり続けることを祈念しています。

(なかじま としひろ nakashima-to@kaketsuken.or.jp)

関連シンポジウム報告

第3回バイオ関連化学合同シンポジウム
(第23回生体機能関連化学シンポジウム)
(第11回バイオテクノロジー部会シンポジウム)
(第11回生命化学研究会シンポジウム)
(第4回ホスト・ゲスト化学シンポジウム)

大阪府立大学大学院理学系研究科
円谷 健

2008年9月18日(木)から20日(土)の3日間にわたって、東京工業大学すずかけ台キャンパスにて第3回バイオ関連化学合同シンポジウム(実行委員長:東京工業大学岡畑恵雄教授)が開催された。本会は、日本化学会生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、フロンティア生命化学研究会、およびホスト・ゲスト・超分子化学研究会が主催するシンポジウムであり、参加者は3日間で合計610名におよんだ。当日は、台風が関東地方へ接近する予報であったため天候の崩れが懸念されたが、幸いにもそれほど大きく天候が崩れることもなく、口頭発表138件、ポスター発表256件の発表が行われ、活発に討論された。今回は、アドバンステクノロジープログラム(ATP)として12件の企業等からの発表も行われた。また、以下に示す4名の若手発表者に講演賞が贈られ、4名の部会長・研究会会長より懇親会にて賞状および副賞が贈呈された。

長門石 暁(東大院・新領域)「超好熱性蛋白質に対する温度に対応したDNAの相互作用特性」

瀧 真清(岡大院・自然)「L/F-蛋白質転移酵素と新規蛍光基質とを用いた蛋白質N末端特異的標識」

水上 進(阪大院・工)「酵素活性を検出するMRIプローブの開発」

人見 穰(同志社大・理工)「カテコールジオキシングナーゼの反応機構に対するモデル研究」

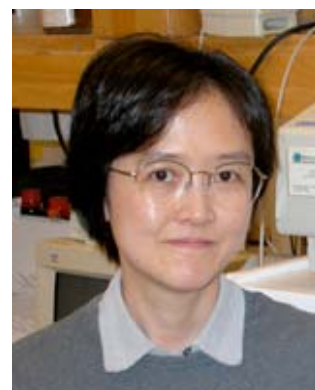
次回の合同シンポジウムは2010年度に大阪にて開催される予定である。



低分子化合物と蛋白質に関わる化学反応

Department of Molecular Biology,
The Scripps Research Institute

田中富士枝
(ftanaka@scripps.edu)



1. はじめに

天然に存在する酵素のように、水性緩衝液中穏和な条件下、目的とする反応を加速できる触媒分子を創製できるようになると、これらの触媒分子を用いて、生体内あるいは生きた細胞内で、天然に存在する酵素とは異なる基質特異性により、目的の化学反応を行なうことができるようになると期待される。例えば、ある機能に関わる蛋白質について、細胞内での動き、あるいは他の蛋白質との相互作用を調べる時に、生きた細胞内で目的蛋白質のみを選択的に修飾する反応を行なう触媒が利用できれば非常に都合良いと考えられる。また、生体内で有毒化合物を分解し無毒化する触媒、生理活性物質を細胞内に取り込ませるために修飾し、細胞内でその修飾を脱保護する反応を行なう触媒などは、基礎研究から病気の治療までの幅広い領域において役立つと考えられる。特に、DNA でコードできるアミノ酸を素材とする蛋白質性およびペプチド性触媒は、対応する DNA から生きた細胞内で産生することができるので、生体内あるいは生きた細胞内での反応を行うために有用であると考えられる。

一方、多くの薬や生理活性物質、酵素やレセプターと相互作用する物質は低分子有機化合物であるので、低分子有機化合物を、簡単、安全、効率的、かつ高選択的に合成する方法の開発が望まれる。生体中で産生され、生体機能の制御に関わる低分子有機化合物の多くは、酵素反応により合成される。酵素を手本にした触媒設計等により、高分子の酵素を用いなくても酵素触媒反応に匹敵する反応選択性等を得ることができれば、有機合成上、優れた方法であると考えられる。低分子有機化合物の合成、低分子有機化合物と蛋白質との反応、蛋白質（酵素）の反応は、有機化学を軸にお互いに関連し合っているといえる。

本稿では、酵素による触媒反応から低分子有機化合物の合成反応にまで共通するエナミン機構に基づき反応を触媒する、蛋白質性触媒、ペプチド性触媒、および低分子有機触媒の創製とそれらの利用について、特に、いかにして望みの機能を持つ触媒を創製していくかという点に重点をおき、私たちの研究を紹介する。

2. エナミンを生成するアミノ基と 1,3-ジケトン化合物との反応

エナミン中間体は、有機合成化学においても酵素反応においても、炭素-炭素結合形成反応をはじめとする反応に用いられる重要なカルバニオン等価体である。通常、リジン残基の側鎖アミノ基やN末端のアミノ基は中性緩衝液中ではプロトン化されていて、求核的に反応することはできない。ところが、アルドラーゼ酵素の活性部位のエナミンを形成するリジンのアミノ基は、特別に低い pKa 値を持ち、中性緩衝液中、アルデヒドやケトンのカルボニル基に求核的に反応することができる。そして、生成したエナミンがもう一分子のアルデヒドと反応し、アルドール成績体を生成する (図 1a)。蛋白質性触媒の求核的に反応できるアミノ基は、アミノ基が疎水性環境下に存在する場合、あるいは、アミノ基が近傍にある正に荷電した残基 (リジンあるいはアルギニン) と静電的相互作用する場合に認められる。アルドラーゼ酵素だけでなく、デカルボキ

シラーゼなどの酵素も求核的に反応するリジン側鎖アミノ基を持ち、イミンおよびイミニウム塩を生成する。1,3-ジケトン化合物はこれらの酵素の求核的に反応するアミノ基の機能の研究に用いられてきた。通常のエナミンの生成と分解が平衡にあるのに対し、1,3-ジケトンを用いると、安定なエナミノンを生成する (図 1b)。このエナミノンは特徴的なUV吸収を有するので、UV測定によりエナミノンの生成を検出することができる。すなわち、1,3-ジケトンとのエナミノン生成を指標に、エナミンやイミン、イミニウム塩を生成することのできる求核性のアミノ基の存在を確認できる。また、固相上に1,3-ジケトン誘導体を固定化しておくことで、エナミノン生成に基づいて、求核性のアミノ基を持つ蛋白質性触媒を、その固相上にトラップすることができる。また、私たちは、1,3-ジケトンとの反応によって得られた一連のアルドラーゼ抗体 (アルドール反応およびレトロアルドール反応を触媒する抗体) において、ジケトンとの反応性と触媒活性との間に正の相関が認められることを確認している¹⁾。

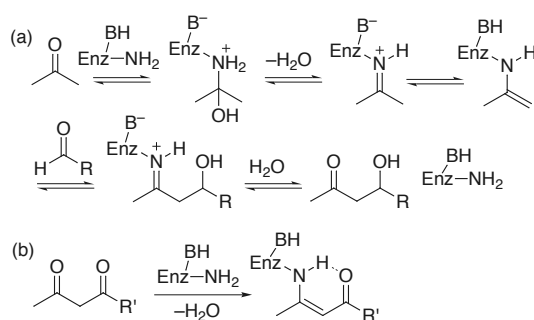


図 1. エナミン機構によるアルドール反応とエナミノン生成

3. 反応性に基づく選択戦略を利用する低分子ペプチド性触媒の高活性化

近年、一定の構造を持つ低分子のペプチドが設計されてきているが、高い触媒機能の設計となるとまだまだ困難である。ライブラリーの中から触媒活性に基づいて触媒を選択することができれば、高活性化のためのペプチドの構造を設計することなく、より高活性のペプチド性触媒に到達することができる。そこで、私たちは、アルドール反応およびレトロアルドール反応をより高い活性で触媒するペプチドを得るために、触媒候補のペプチドのファージライブラリーを用い、1,3-ジケトン化合物との結合 (望ましくはエナミノン生成) を指標に選択を行なった²⁾。この選択方法では、より反応性の高いペプチドは、限られた反応時間内にエナミノンを生成し固相上にトラップされるのに対し、ジケトンと反応しなかったペプチドは洗い流される。固相上にトラップされたファージペプチドを回収し、増殖後、さらにジケトンとの反応による選択を繰り返すことにより、ライブラリー中の高活性触媒の含有率を上昇させることができる。

すなわち、リジン残基を含むアミノ酸 18 残基から成る α -ヘリックスペプチドの C 末端に、アミノ酸 6 残基の、天然 20 種のアミノ酸から構成されるライブラリーを付加し、ファージディスプレイシステムにより、ジケトン誘導体との結合を指標に選択を行なった。得られたペプチド (24 残基) を化学的に合成し、もとの 18 残基のペプチドと比較すると、エナミノンの生成速度が向上し、また、アルドール反応活性およびレトロアルドール反応活性が向上していた。CD スペクトル測定から、得られたペプチドではヘリックス含量が向上していることがわかり、ライブラリーから選択された C 末端 6 残基中にリジンが含まれていないことから、活性向上はヘリックス構造形成能の向上に由来すると考えられた。一定の構造をとらない場合には触媒活性

を示さないのに対し、ヘリックス構造形成により、静電的な相互作用の生成や疎水性環境の構築が可能となり、アミノ基が求核的に反応できるようになり、触媒活性を獲得すると考えられる。

4. 低分子ペプチド性触媒の基質特異性の向上

上述の 24 残基のペプチドは触媒活性が向上しているものの、レトロアルドール反応ではもとの 18 残基のペプチドと同程度の mM 領域の K_m 値を与え、基質の認識能力には乏しかった。そこで、ペプチド性触媒の低分子基質に対する特異性向上のために、modular assembly strategy という戦略を考案した³⁾。この戦略では、基質の認識に関わるドメインを触媒ドメインと共有結合的につないで基質特異性を示すペプチドを作製する(図2)。基質認識ドメインが基質に対して平衡で結合と解離を繰り返すと、その近傍では部分的に基質濃度が高くなり、触媒活性ドメインはこの部分的に高い基質濃度の恩恵によって、全体では基質濃度は低くても、高い基質濃度を用いた場合に匹敵する反応速度を得ることができると考えられる。この方法によると、触媒ペプチドの活性部位を個々の基質に応じて作りかえることなく、基質認識ドメインを取り換えることにより種々の基質特異性を示すペプチドを簡単に作製できると考えられる。

基質認識ドメインとして、ファージディスプレイによって選択されたフルオレセインに結合するペプチド、触媒ドメインとして上述の 24 残基のペプチドを用い、これらを結合した 35 残基のペプチドを化学的に合成した。この 35 残基のペプチドは、フルオレセインの部分構造を含まない基質の反応では、約 1 mM の K_m 値を示したのに対し、フルオレセインの部分構造を含むアルドール体を基質とするレトロアルドール反応においては 8 μ M の K_m 値を示し、基質特異性の向上が確認された。いずれの基質の場合にも k_{cat} は同等であったことから、基質認識ドメインの付加は、触媒活性にほとんど影響せずに基質特異性の向上に寄与したと判断できた。この 35 残基のペプチドのアミノ酸一残基あたりの catalytic proficiency ($(k_{cat}/K_m)/k_{uncat}/\text{residue}$) は、天然の酵素の場合の下限值に匹敵する値であった²⁾。

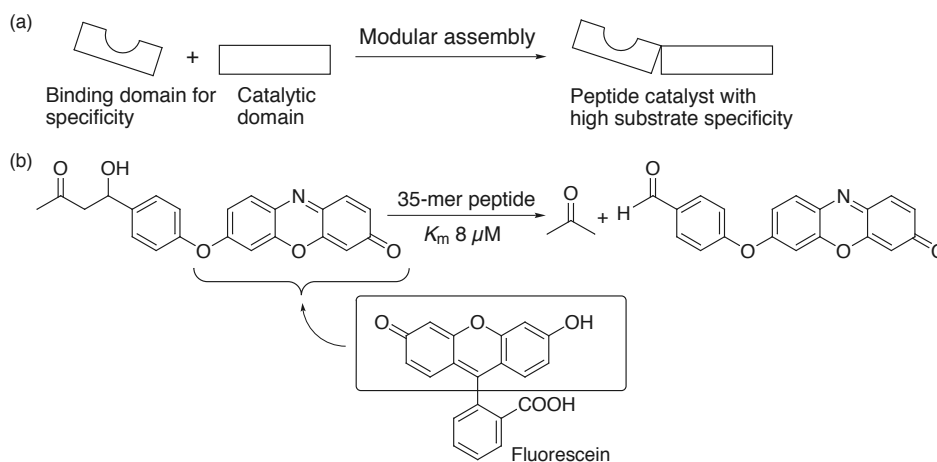


図2. (a) Modular assembly strategy の概略 (b) 基質特異性の向上したペプチドの触媒反応

5. 蛋白質に低分子化合物等のラベル分子を導入するための低分子ペプチド性タグの開発

ジケトンとエナミノンを生成するペプチドは、蛋白質にタグとして付加しておく、タグ部分のジケトン誘導体との反応により、ビオチンや蛍光化合物等の分子を蛋白質に導入できるはずである。しかし、上述のエ

ナミノン生成を指標に創製したアルドール反応やレトロアルドール反応を触媒するペプチドは、オリゴマーとして機能し、蛋白質のタグとして利用するには不向きであった。ラベル分子導入に利用するためには、モノマーとして機能するペプチドが望ましい。7 残基および 12 残基のライブラリーを出発点とし、エナミノン生成を指標とする選択と、N末端あるいはC末端へのライブラリーの追加を繰り返し、21 残基の、ジケトンとエナミノンを生成する機能を持つペプチド rpf1368 (図3) を創製した。このペプチドはモノマーとして機能し、蛋白質にタグとして付加し、ジケトン誘導体との反応により、ラベル分子を蛋白質に導入するのに用いることができた⁴⁾ (図4)。このペプチドは通常の反応触媒のように turn over し反応を加速するわけではないが、通常とは異なる反応性を示す点から、広義の触媒であると言える。

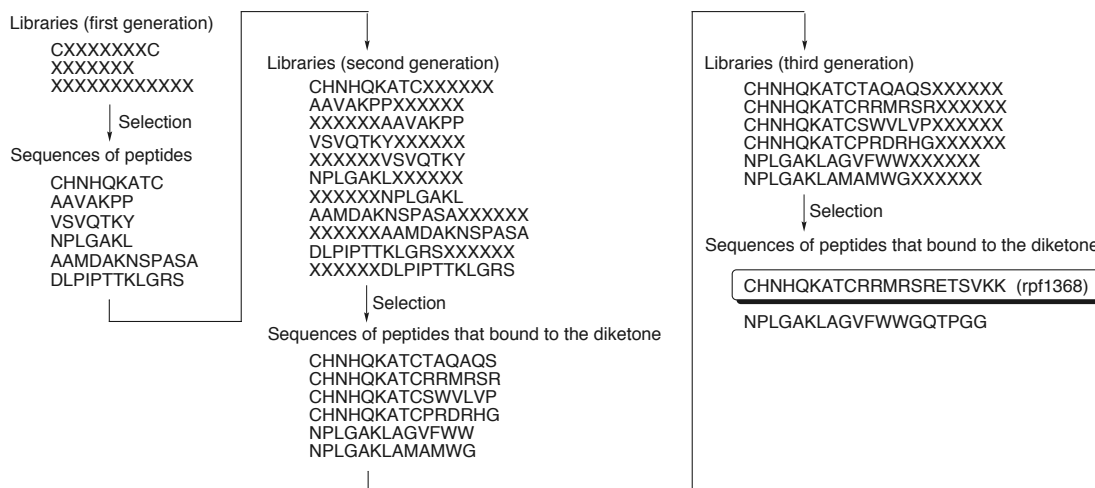


図3. ジケトンとエナミノンを生成するペプチドを得るのに使用したペプチドライブラリー

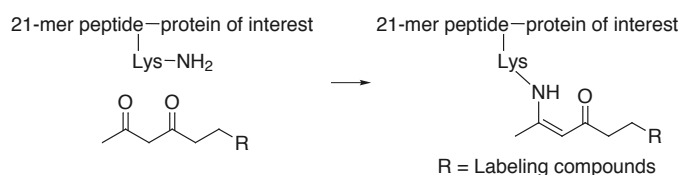


図4. エナミノンを生成するペプチドをタグとして用い蛋白質にラベルを導入する方法

6. 反応簡易検出法の開発とそれを利用する触媒の探索

化学反応の進行を迅速簡単に検出する方法は、ライブラリーからの高活性触媒の効率的検索、触媒間の活性の比較等に有用である。そこで、反応すると蛍光強度が増加するマレイミド誘導体を用いて、エナミン機構による炭素-炭素結合形成反応の進行を蛍光の増加により検出する方法を開発した⁵⁾ (図5)。この方法を利用することにより、触媒のエナミン生成能を迅速に評価できた⁶⁾。この方法は、抗体触媒およびペプチド性触媒による水性緩衝液中での反応の進行の検出、低分子有機アミンを触媒とする有機溶媒中での合成反応に有効な触媒および反応条件の探索等に有効であった。例えば、これらの蛍光測定による反応進行の評価法を用い、通常困難である、立体的にかさ高い α,α -二置換アルデヒドのエナミンを経るアルドール反応、マイケル反応等を、穏和な条件下、効率的に行なう方法を開発した⁷⁾。反応の進行に伴う蛍光強度の変化の測定からは生成

物の立体化学についての情報を得ることはできないが、触媒のエナミン生成能や反応条件を迅速に評価することにより、効率的かつ省エネルギー的に目的とする触媒反応を開発することに成功した。

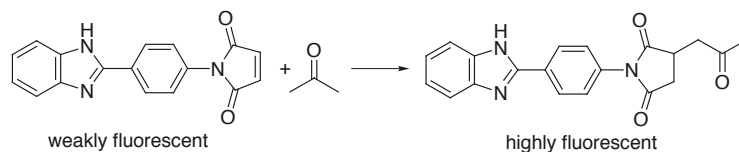


図5. 蛍光の増加により炭素-炭素結合形成反応の進行を蛍光の増加により検出する方法の例

さらに、反応すると蛍光強度が増加するアルデヒドを開発し、このアルデヒドを反応に用い、アルドール反応の進行を蛍光の増加により検出する方法を開発した⁸⁾ (図6)。従来、アルドール反応の進行を蛍光強度の増加等により簡便に検出する方法は知られておらず、アルドール触媒であっても、簡便な検出法のあるレトロアルドール反応により触媒活性の評価や触媒の同定が行われてきた。私たちが開発した方法により、アルドール触媒をアルドール反応に基づいて評価できるようになった。この方法は、今後の触媒の開発や活性の評価に役立つと考えられる。

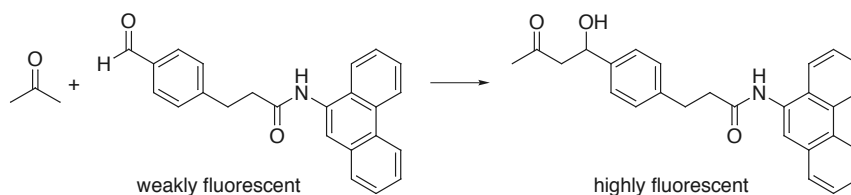


図6. 蛍光の増加によりアルドール反応の進行を検出する方法の反応例

7. エナミン機構に基づく合成反応法の開発

多くの薬や生理活性物質は低分子有機化合物であるので、低分子有機化合物を、簡単、安全、効率的、かつ高選択的に合成する方法の開発が望まれる。酵素のエナミン機構による触媒機能に習い、低分子有機化合物でありながら、望みの生成物を選択的に与える反応を触媒できる分子を設計、創製し、光学活性アミノ酸誘導体や高度に官能基化された化合物等の構築に寄与する有機合成反応法を開発した。例えば、望みの立体化学を持つアミノ酸誘導体を簡便に合成するためのマンニッヒ反応触媒を開発し、アンチ体とシン体を創り分けることができるエナンチオ選択的マンニッヒ反応法を実施することに成功した⁹⁾ (図7)。

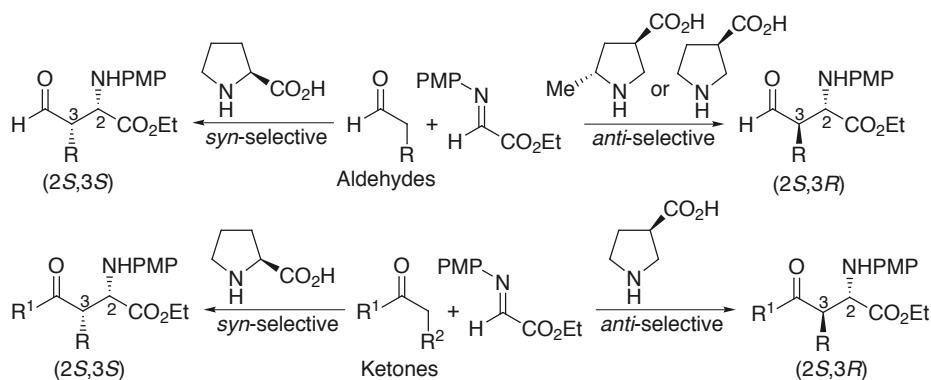


図7. ジアステレオおよびエナンチオ選択的マンニッヒ反応

8. おわりに

触媒設計の工夫、反応性に基づいて触媒を選択する戦略、および、実際の触媒活性に基づいて触媒を同定する戦略により、触媒を創り、利用する、私たちの試みを紹介した。さらなる工夫により、実用性の高いペプチド性および蛋白質性触媒の創製が可能になると考える¹⁰⁾。また、酵素の機能を低分子有機化合物で行なう方法を開発する上で得られる情報と、酵素の行なう反応の機構に関わる情報の両方を組み合わせることにより、さらに優れた有機合成法、蛋白質の選択的修飾反応、蛋白質性およびペプチド性触媒等の開発が進むと考える。

9. 文献

- 1) Tanaka, F.; Fuller, R.; Shim, H.; Lemer, R. A.; Barbas, C. F., III. *J. Mol. Biol.* **2004**, 335, 1007-1018.
- 2) Tanaka, F.; Fuller, R.; Barbas, C. F., III. *Biochemistry* **2005**, 44, 7583-7592.
- 3) Tanaka, F.; Barbas, C. F., III. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3510-3511.
- 4) Tanaka, F.; Fuller, R.; Asawapornmongkol, L.; Warsinke, A.; Gobuty, S.; Barbas, C. F., III. *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 1318-1324.
- 5) Tanaka, F.; Thayumanavan, R.; Barbas, C. F., III. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8523-8528.
- 6) Tanaka, F.; Thayumanavan, R.; Mase, N.; Barbas, C. F., III. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 325-328.
- 7) (a) Mase, N.; Tanaka, F.; Barbas, C. F., III. *Org. Lett.* **2003**, 5, 4369-4372. (b) Mase, N.; Tanaka, F.; Barbas, C. F., III. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 2420-2423. (c) Mase, N.; Thayumanavan, R.; Tanaka, F.; Barbas, C. F., III. *Org. Lett.* **2004**, 6, 2527-2530.
- 8) Tanaka, F.; Mase, N.; Barbas, C. F., III. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 3692-3693.
- 9) (a) Mitsumori, S.; Zhang, H.; Cheong, P. H.-C.; Houk, K. N.; Tanaka, F.; Barbas, C. F., III. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 1040-1041. (b) Zhang, H.; Mifsud, M.; Tanaka, F.; Barbas, C. F., III. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 9630-9631. (c) Zhang, H.; Mitsumori, S.; Utsumi, N.; Imai, M.; Garcia-Delgado, N.; Mifsud, M.; Albertshofer, K.; Cheong, P. H.-Y.; Houk, K. N.; Tanaka, F.; Barbas, C. F., III. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 875-886.
- 10) Tanaka, F. *The Chemical Record* **2005**, 5, 276-285.

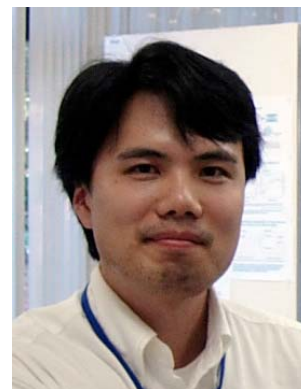


研究紹介

タンパク質修飾試薬としての
トランスグルタミナーゼの可能性九州大学 大学院工学研究院 応用化学部門
九州大学 未来化学創造センター

神谷 典穂

(noritcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp)



1. はじめに

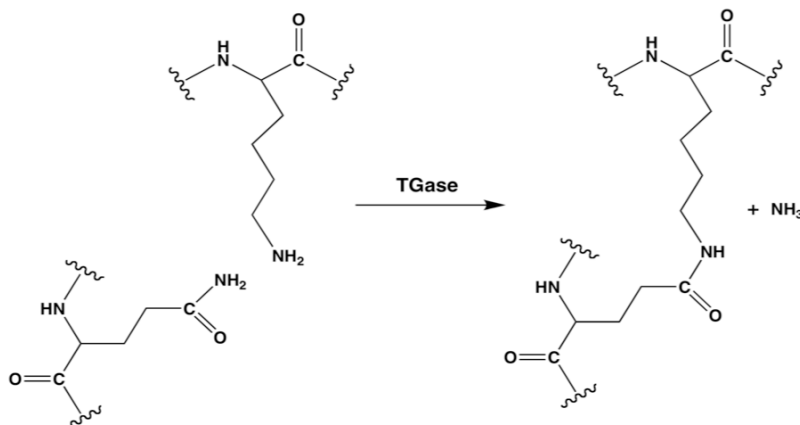
この度は歴史ある生命化学研究会のニュースレターに研究紹介をさせて頂く機会を与えて頂きありがとうございます。正直なところ、私が本会の研究紹介を書かさせて頂けることになろうとは夢にも思っておりませんでした。本会会員の皆様にとって、やや「大雑把な仕事」に映るかと思いますが、ご容赦願えればと思います。少し自己紹介をさせて頂きますと、学位論文は、東工大の岡畑先生らの開発された脂質修飾酵素を工学的観点からアレンジした「界面活性剤-酵素複合体」を用いた有機溶媒系酵素反応に関する仕事を行いました。こちらの研究については、現所属ラボのボスである後藤雅宏先生と共同で、Drug Delivery System 分野へと展開を図っています [1]。卒業は九大の合成化学科ですが、反応工学がベースの研究室の出身です。以下、現在の私の研究を紹介させていただきます。

2. トランスグルタミナーゼとの出会い

学位取得後、(幸運にも)東大・化学生命工学専攻の長棟輝行先生の研究室に助手として採用頂いた。当時、長棟研では、遺伝子工学を駆使して様々なキメラタンパク質を作り、それらを生体内・外で利用する仕事が大きく展開されていた。それまで市販の酵素しか使ったことがなかった私は、酵素も自前で作ってしまう学生さんがゴロゴロいる研究室にカルチャーショックを受けつつも、漠然と「何か新しいことをやらなければ！」と思っていた頃に出会ったのがトランスグルタミナーゼ(TGase)である。有機溶媒系酵素反応の利点の1つに、系中の水分量制御による加水

分解反応から合成反応への平衡のシフトがある。それまで低水分系で酵素活性を出すことに四苦八苦していた私は、水中でいとも簡単に共有結合形成を触媒するこの酵素に畏敬の念を抱くと共に、「これは使えそうだな」と感じた。TGase は、基質となるタンパク質の Gln 残基と Lys 残基の側鎖間を選択的に連結可能な酵素である(スキーム1)。すなわち、GlnドナーあるいはLysアクセ

スキーム1 TGase の触媒する Gln-Lys 側鎖間の連結反応



プターとして働く基質ペプチドを異なるタンパク質にタグとして導入できれば、TGase はペプチドタグ部位を選択的に認識して、異種タンパク質を架橋化することができるだろうと考えた。極めて単純で、誰も考えそうなことであったが、これを実験的にきちんと確かめた例は当時見当たらなかった。

3. ペプチドタグ選択的なタンパク質の連結

3-1. ヘテロ二量体の調製

異なる機能を有するタンパク質を、各々の機能を損なうことなく連結できれば、得られる融合タンパク質(ヘテロ二量体)を二機能性タンパク質として利用することができる。融合タンパク質を得るためには、一般的に二官能性架橋試薬が用いられるが、各々のタンパク質をコードする遺伝子を遺伝子組換え技術で連結して適当な宿主で発現させる手法がとられるが、それぞれ反応選択性と宿主内でのfoldingが問題となる。一方、TGaseを利用する場合は、対象タンパク質へのタグ付けさえできれば良いので、汎用性の広い手法になり得る。味の素(株)と天野製薬(株)により見出された微生物由来TGase(以下、MTG) [2] は、基質特異性が比較的広く、明確な基質配列に関する報告はなかったが、ほ乳類由来のTGaseと違い、反応にCa²⁺を必要とせず、安定で扱い易いことからMTGを研究対象として用いることにした。反応選択性の観点から、基質特異性の広さが問題になるかもしれないな、と思いつつも、まずはやってみようということで研究を開始した。

当時(おそらく今も)長棟研には沢山の組換えタンパク質が転がっていた。そこで、市販の酵素・タンパク質に加え、当時の学生さんに少しずつサンプルを分けてもらい、まずはMTGと混ぜて、しばらく放置して、覚えてのSDS-PAGEを流す、という作業を繰り返していたところ、Ribonuclease A由来のS-peptideをタグ配列として有する緑色蛍光タンパク質(S-tag EGFP)が自己架橋されることが分かった(図1)。架橋化反応は4°Cで十分に進行し、反応後もEGFP由来の蛍光活性に変化は見られなかった。質量分析による架橋化部位の同定に関して、同化学生命工学専攻の鈴木 勉先生と共同研究をさせて頂き、S-peptide中に存在する2つのLys残基および1つのGln残基がMTGの認識サイトとなり架橋化反応に寄与していること、EGFP本体の表面に存在する複数のGln/Lys残基は架橋化に関与していないこと、を明らかにできた [3]。すなわち、適当なペプチドタグを付加するだけで、ペプチドタグ選択的・共有結合的なタンパク質架橋化を簡単に達成可能なことが分かった。

S-peptide上にはMTGに認識されるGln残基とLys残基が共存するため、異なるタンパク質の連結にそのまま用いるとホモ二量体が50%の確率で生じる。従って、ヘテロ二量体を効率良く得るためには、Glnのみ、Lysのみを有するタグをそれぞれ設計する必要がある。別の実験から、MTGがミオグロビンからヘムを取り除いたアポミオグロビンを基質として認識すること、架橋化サイトがミオグロビンのF-helix上に存在することを明らかにしていたため、F-helixの1部(PLAQSHならびにTKHKIP)をタグのコア配列として、それぞれ一本鎖型抗体Fvドメイン(scFv)ならびに大腸菌由来アル

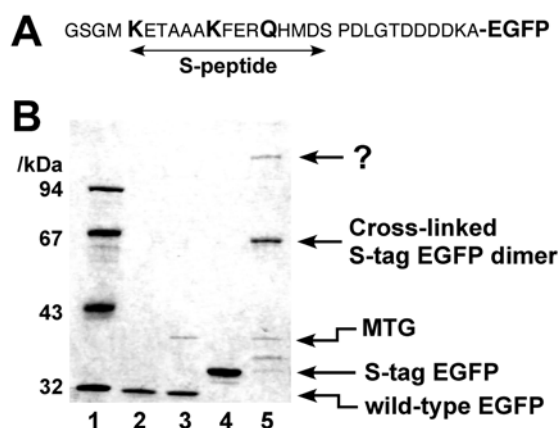


図1 N末端にS-peptideが付加したGFPのMTGによる架橋化反応。(A) N末端付加ペプチド配列。(B) 1:分子量マーカー; 2 & 3: 野生型GFP ±MTG; 4 & 5: S-tag GFP ±MTG (奇数レーンがMTG共存下)

カリホスファターゼ (AP) の N 末端に導入した。これらを精製後、MTG による架橋化反応に供したところ、望みの scFv-AP コンジュゲートを得ることができた。得られたコンジュゲートの scFv 部位由来抗原結合活性、AP 部位由来酵素活性は共にほぼ保持されており、本コンジュゲートを用いた酵素免疫測定法においては、scFv 部位の抗原結合活性の理論値に匹敵する検出感度を達成した [4]。

3-2. N 末端選択的なタンパク質の連結・修飾

TGase の利用価値を上げる触媒特性の1つに、Lys 残基の ϵ -アミノ基に加え、様々な1級アミン誘導体も基質とし

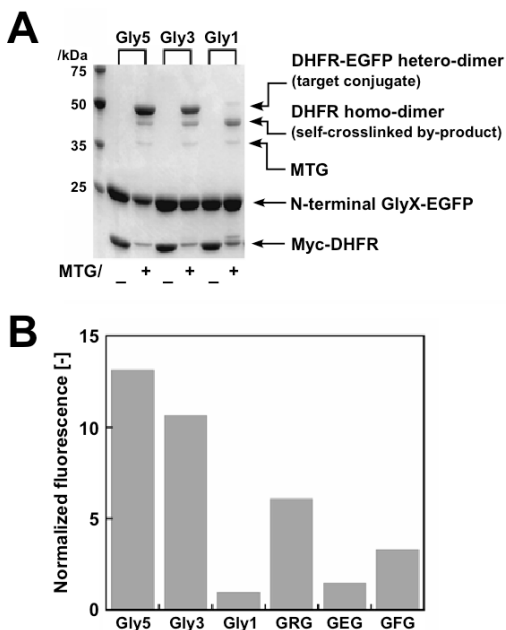


図2 N末端 Gly タグ配列が MTG によるタンパク質架橋化に与える影響. (A) SDS-PAGE による架橋化反応の追跡. (B) Gly を1残基伸長した GFP の反応性を1としたときの相対架橋化活性.

て認識可能な点が挙げられる。ここで、「タンパク質の α -アミノ基は TGase に基質として認識されないのだろうか？」という素朴な疑問が湧いた。そこで、N 末端に Gly を数残基伸張した EGFP を調製し、これが MTG により基質として認識されるかどうかを確かめることにした。ここでは、架橋化のパートナーを、自己架橋性ペプチドタグとして働く myc ペプチド配列 (EQKLISEEDL) を N 末端に付加したジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) とし、DHFR-EGFP ヘテロダイマー (目的タンパク質) と組換え DHFR の自己架橋産物であるホモダイマー (副産物) を SDS-PAGE で見分けられるように工夫し、目的タンパク質の収率から N 末端付加配列の反応性を評価する系を構築した。その結果、N 末端に Gly 残基を3つだけ伸張した EGFP が MTG の基質として認識されることが明らかとなった (図 2)。さらに、myc ペプチドそのものを用いて、myc ペプチド-(Gly)₃-EGFP コンジュゲートの調製も可能であった。このことから、基質として認識される Gln 残基の付加は必要であるが、TGase を用いて機能性ペプチドをタンパク質 N 末端 Gly の α -アミノ基選択的に導入可能なことが示唆された [5]。

3-3. ペプチドリンカー選択的なタンパク質の連結

遺伝子工学的手法では、N 末端から C 末端方向へタンパク質がタンデムに連結された融合タンパク質しか調製できない。一方、アミノ酸配列の途中に TGase 認識サイトを導入することができれば、分岐型的人工タンパク質が得られる可能性がある。最近、タンパク質 C 末端の基質配列 (LPXTG モチーフ) と N 末端 Gly-Gly 配列間のアミド転移反応を触媒する可溶性 Sortase が注目されている [6]。両者は、主鎖連結型 (Sortase) か、側鎖連結型 (TGase) か、に大きな相違がある。側鎖連結型酵素である利点を生かした MTG の応用例を紹介する。

Pseudomonas putida 由来 P450cam システムは、Putidaredoxin reductase (PdR)、Putidaredoxin (Pdx)、P450cam の3つのタンパク質成分からなり、 $\text{NADH} \rightarrow \text{PdR} \rightarrow \text{Pdx} \rightarrow \text{P450cam}$ という電子伝達によりヘム酵素である P450cam が還元され、分子状酸素の活性化を介して基質酸化が進行する。これまでに遺伝子組換えにより PdR、Pdx、P450cam をタンデムに連結した直鎖型融合タンパク質が調製されていたが、立体構造上の制約により十分な活性が得られていなかった。そこで、MTG の架橋化反応を利用して分岐型 P450cam 融合タンパク質(図3)を調製する試みがなされた。まず、野生型 P450cam には、MTG の基質となる Gln/Lys 残基が複数存在していることが明らかとなった。これに際して、当時長棟研の博士課程に在学していた

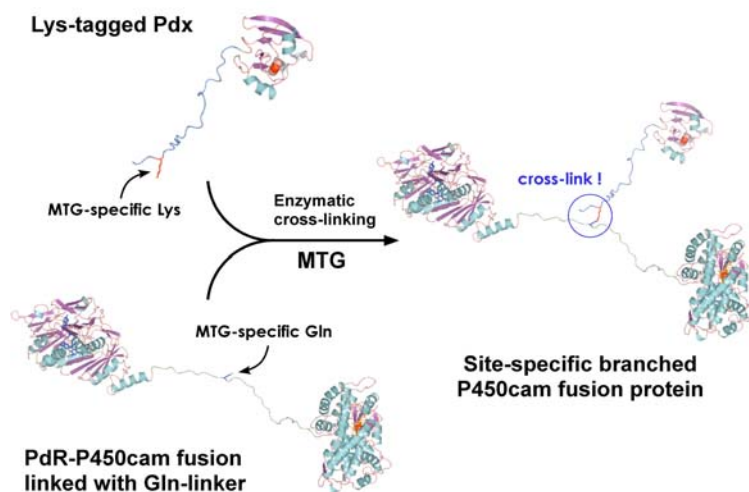


図3 MTG を用いた分岐型 P450cam システムの構築

平川秀彦君は、P450cam の X 線結晶構造を基に、電子伝達に関わっている可能性のあるヘム近位側の Gln/Lys 残基は保存し、それ以外の Gln7、Gln211、Gln214、Lys215、Gln273、Gln312、Lys314、Lys315、Gln344、Lys345、Gln389、Gln391、Lys413 の計 13 残基を、それぞれ Asn 残基、Arg 残基に置換するという大仕事をやってのけた。(この仕事の開始時に私は渡米していたので彼と長棟先生との間でどのようなやりとりがあったのか詳細は分からないが、もし私が彼のそばに居たら、おそらく止めたと思う。)ともかくにも、この P450cam 変異体は、もはや MTG の基質とはならず、驚くべきことに野生型と遜色のない機能を示し、図3の様な分子操作(と平川君の学位取得)が可能になったのである。

このようにして得られた分岐型 P450cam 融合タンパク質は、直鎖型融合タンパク質に比べ極めて効率良く基質酸化反応を触媒することが明らかとなった [7]。PdR、Pdx、P450cam を等量含む再構成系に比べ、分岐型融合タンパク質の触媒活性は極めて高く、酵素活性はタンパク質濃度に 1 次の依存性を示したことから、分子内で電子伝達が起きていることが示された。本成果は、MTG のタンパク質工学分野への応用の有用性を示す貴重な成果であると考えている。

4. ペプチドタグ選択的なタンパク質の固定化

タンパク質の固定化は、生物機能を有効に利用するための基盤技術の1つである [8]。最近、プロテインアレイや高活性な固定化酵素・タンパク質の創製を目標として、部位特異的なタンパク質固定化法の開発が再注目されている。そこで、MTG を利用する部位特異的なタンパク質固定化について検討した。基本戦略としては、部位特異的なタンパク質架橋化法と同様、まず目的タンパク質へ MTG 基質ペプチドを導入する。タンパク質固定化の場合、固相基板上に MTG が認識可能な反応性表面を構築することが次の課題となる。

まず、分子内に MTG が基質として認識する Gln/Lys 残基を複数有するカゼインを、ポリスチレン製の 96 穴型マイクロプレートに物理吸着により固定化し、目的タンパク質固定化のための足場とした。モデルタンパク質として、Lys 残基を含む基質ペプチド(MKHKGS)を N 末端に付加した大腸菌由来 AP を調製し、固定化反応温度は 4°C として MTG

による固定化反応に供したところ、ペプチドタグ選択的な AP の固定化が可能なが確認された [9]。本系では、酵素反応は固液界面で進行することを考慮し、立体障害の緩和を目的として基質ペプチドタグと目的タンパク質の間に比較的長いペプチドリンカーを導入すると、固定化効率の向上が可能であった。

次に、Gln 残基を含む基質ペプチドタグ(LLQG)を C 末端に付加した EGFP ならびにグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)を調製した。GST の分子設計においては、野生型に存在する Gln 残基の何れかが MTG に認識されることが実験的に明らかとなった。そこで、各 Gln 残基の溶媒露出率を調べたところ、GST の 5 つの Gln 残基のうち Gln207 が残りの 4 残基に比べ圧倒的に高い値(69.6%)を示した。そこで、これを Ala に置換したところ、MTG の非基質となることが確認された。

このようにして得た組換え EGFP と GST は、後者について非特異吸着によるバックグラウンドの増加は見られたものの、MTG によるペプチドタグ選択的なタンパク質固定化が可能なが確認された。興味深いことに、タンパク質の固定化は低 pH でより効率よく進行し、反応の至適 pH は溶液系でのタンパク質架橋のそれである 7 から 5 付近にシフトした [10]。そこで、固定化時の塩濃度(イオン強度)が固定化効率に与える影響について検討したところ、塩濃度が上がると固定化率が低くなる傾向が見られた(図 4)。Gln 残基を含むペプチドタグは中性ペプチドであるため、これらの組換えタンパク質の等電点は、それぞれの野生型タンパク質の等電点(約 5)と同様であると考えられる。一方、カゼインの等電点は約 5、MTG の等電点は約 9 である。固定化反応は、対象タンパク質に導入された LLQG 配列部位と MTG がアシル酵素中間体を形成し、これが固相表面に固定化されたカゼイン中の Lys 残基と架橋することにより進行する。従って、pH 5 付近においてアシル酵素中間体と基板表面の静電的反発が緩和され、基質タンパク質の有効濃度が高まる結果、固定化効率が高くなったのではないかと推察している。現在、ガラス基板表面を有機化学的に処理することで MTG 認識サイトを構築し、プロテインアレイへの展開を試みている。

5. 核酸-酵素ハイブリッド：相方を核酸へ

前述の通り、TGase が種々の一級アミン誘導体を部位特異的にタンパク質に導入できることはこの酵素の利用価値を高めている。実際、薬理活性タンパク質の機能保持と血中滞留安定性の向上を目的として、モノアミン型ポリエチレングリコールや分岐型糖鎖による部位特異的修飾が報告されている [11]。そこで、少し変わった分子を作ろうと思い、取り組んだのが核酸-酵素ハイブリッドの調製である。核酸-酵素ハイブリッドそのものは新しいものでは

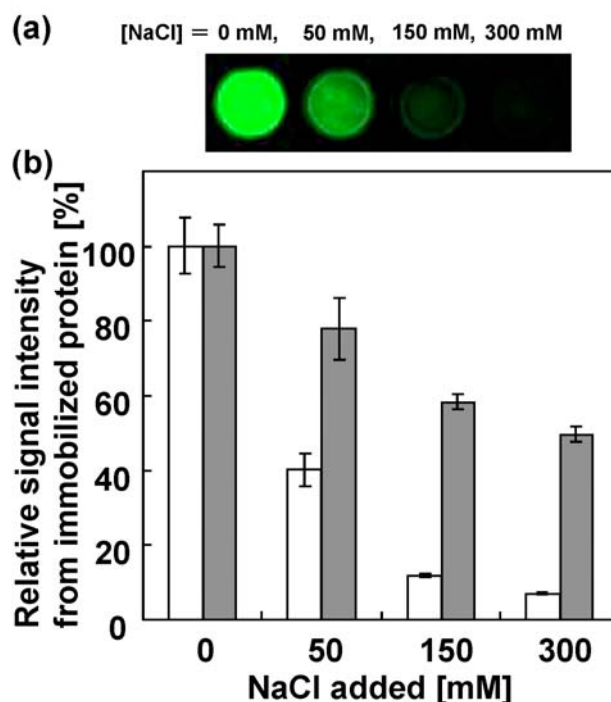


図4 EGFP-LLQG(□)ならびに GST-LLQG(■)のカゼイン被覆プレート固定化に及ぼす固定化時の塩濃度の影響 [(a) EGFP-LLQG 固定化の蛍光イメージ (b) 固定化EGFP-LLQG の相対蛍光強度ならびに固定化 GST-LLQG の相対酵素活性]

なく、その調製には既に多くの方法論が提案されているが、酵素を使った修飾例はなかった(最近、protein farnesyltransferase と click chemistry を組み合わせたハイブリッド化が報告されている [12])。5' 末端が1級アミン誘導化された DNA は、受託合成で容易に手に入れることができることから、ラベル化したいタンパク質側に Gln を含む基質ペプチドタグを導入しておけば、TGase 反応により容易に核酸-酵素ハイブリッドが得られるものと考えたが、実際には非常に効率が悪いことが分かった。その理由については、現在検討中である。そこで発想を転換して、MTG のモデル基質であるジペプチド(Z-QG)の C 末端を活性エステル化し、アミノ化 DNA と連結することで DNA を Gln ドナーとすることにした。この場合、組換えタンパク質側に Lys を含む基質ペプチドタグを導入することになるが、これらの高分子基質を組み合わせることで、MTG により比較的効率よくペプチドタグ選択的に DNA をラベル化できることが分かった [13]。また、核酸ハイブリダイゼーションを利用した固定化も可能であった(図5)。現在、ハイブリッド化の対象を DNA から RNA へと拡張し、新規な核酸プローブの創製に取り組んでいる。

このように、適当な化学修飾により合成高分子も基質に変換できることから、高分子-タンパク質コンジュゲートの調製や、高分子-ペプチドコンジュゲートの水ゲル化剤として TGase が利用されている [14]。

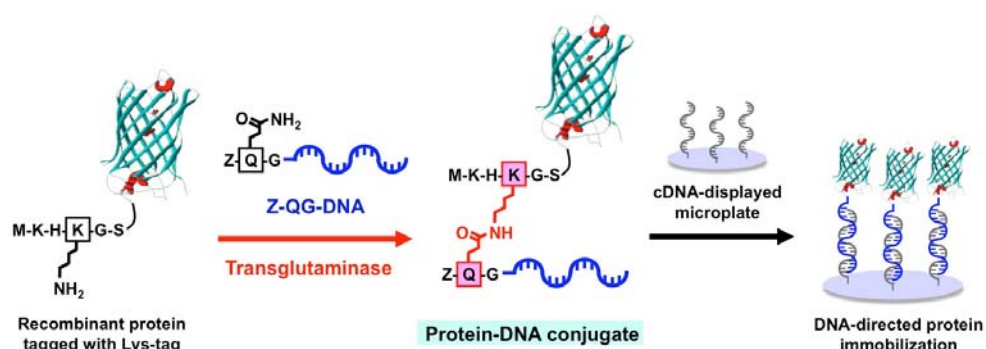


図5 MTGによるタンパク質のペプチドタグ選択的DNAラベル化法の概要

6. おわりに

タンパク質を対象とした研究は、ゲノム情報・構造情報の増加に伴い、基礎から応用に至る様々な研究分野でますます活発化している。タンパク質の機能はその高次構造に厳密に依存するため、いかにして高次構造を保持するかが、産業や医療分野への応用を考える上でクリアすべき重要なポイントとなることは言うまでもない。天然タンパク質をそのまま実用レベルで利用できることは少ないため、有機化学・遺伝子工学・タンパク質工学的手法を駆使して目的の用途に応じた(人工)タンパク質が創られてきた。タンパク質の翻訳後修飾に関わる酵素を用いる酵素工学的手法は、これらの既存の手法に比肩し始めている [15]。TGase について言えば、特に MTG は基質特異性が比較的広いと、上述の P450cam の場合の様に、全てのタンパク質にそのまま適用可能な手法にはなり得ていない。しかし、あらゆるタンパク質を無差別に架橋化する訳でもない。基本的には、タンパク質構造上の揺らぎの大きい部分に Gln/Lys が存在すると、基質になる確率が高いようである [11]。この点については、基質ペプチド配列の最適化により、速度論的にどこまで改善できるか検討してみたいと考えている。また、TGase の利用は、今のところ *in vitro* での利用に限られている [16] が、*in vitro* でもまだやれそうなこと、やるべきことも多々あり、もう少し詰めてみたいと考えている。

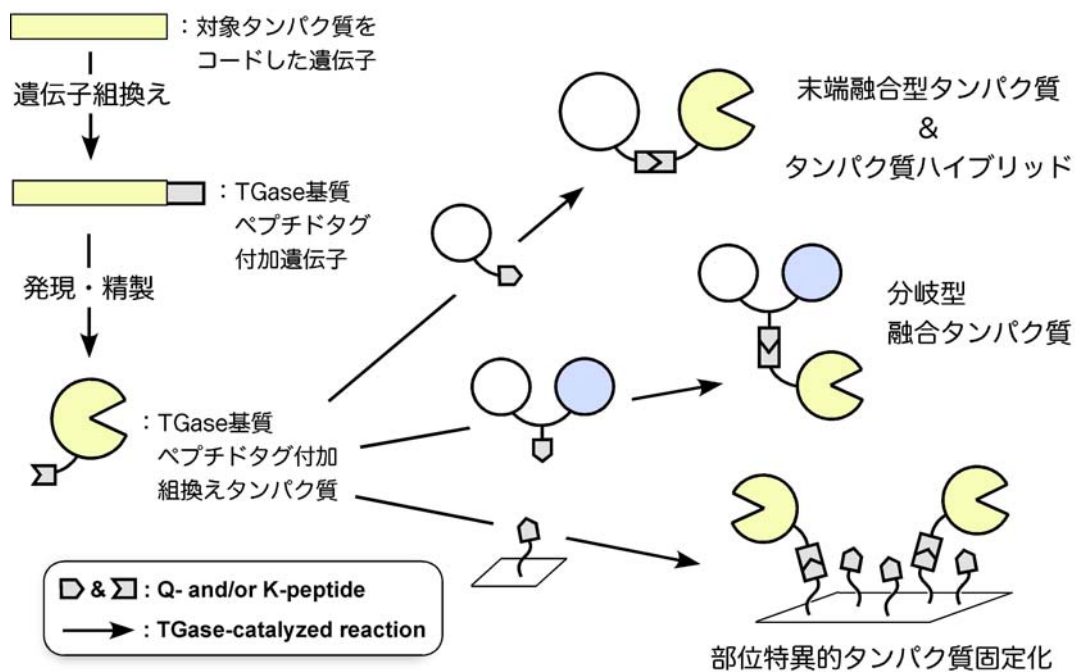


図6 TGase を利用するタンパク質の分子操作の概要

上図はこれまでの研究の概要をまとめたものですが、本会に参加する度に、「もっと掘り下げないといかんなー」と痛感させられます。そうすることで、「翻訳後修飾酵素によるタンパク質工学」をもう一步踏み込んで楽しめるだろうと思っています。その一步になるか分かりませんが、最近、TGase によるタンパク質ラベルのための小分子プローブの合成に取り組み始めました。次回、本会に出席させて頂く機会に、皆様からご批判を頂けることを願いながら、本稿を締めさせていただきます。

謝辞

本研究開発のきっかけを与えて下さった東京大学 長棟輝行先生、味の素(株)・京都大学 横関健三先生、九州大学 後藤雅宏先生、共同研究者として苦楽を共にしてくれた平川秀彦博士、田中 勉博士、富永 譲博士ならびに本研究にご協力を賜りました全ての皆様に心より御礼申し上げます。

参考文献

1. Tahara, Y. et al., *J. Control. Release*, doi:10.1016/j.jconrel.2008.07.015 (2008).
2. Yokoyama, K., Nio, N., Kikuchi, Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 447-454 (2004).
3. Kamiya, N., Tanaka, T., Suzuki, T., Takazawa, T., Takeda, S., Watanabe, K., Nagamune, T. *Bioconjugate Chem.*, **14**, 351-357 (2003).
4. Takazawa, T., Kamiya, N., Ueda, H., Nagamune T. *Biotechnol. Bioeng.*, **86**, 399-404 (2004).
5. Tanaka, T., Kamiya N., Nagamune T. *FEBS Lett.*, **579**, 2092-2096 (2005).

6. Mao, H., Hart, S. A., Schink, A., Pollok, B. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 2670-2671 (2004).
7. Hirakawa, H., Kamiya N., Tanaka, T., Nagamune T. *Protein Eng. Des. Sel.*, **20**, 453-459 (2007).
8. 神谷典穂, 酵素工学ニュース, 第 53 号, p.21-26 (2005).
9. Kamiya, N., Doi, S., Tominaga, J., Ichinose, H., Goto, M. *Biomacromolecules*, **6**, 35-38 (2005).
10. Y. Tanaka, Y. Tsuruda, M. Nishi, N. Kamiya, M. Goto. *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 1764-1770 (2007).
11. Fontana, A., Spolaore, B., Mero, A., Veronese, F. M. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **60**, 13-28 (2008).
12. Duckworth, B. P., Chen, Y., Wollack, J. W., Sham, Y., Mueller, J. D., Taton, T. A., Distefano, M. D. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 8819-8822 (2007).
13. Tominaga, J., Kemori, Y., Tanaka, Y., Maruyama, T., Kamiya, N., Goto, M. *Chem. Commun.*, 401-403 (2007).
14. Hu, B.-H., Messersmith, P. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 14298-14299 (2003).
15. Gronemeyer, T., Godin, G., Johnsson, K. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16**, 453-458 (2005); O'Hare, H. M., Johnsson, K., Gautier, A. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **17**, 488-494 (2007).
16. Lin, C.-W., Ting, A. Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 4542-4543 (2006).



気になった論文



石川 文洋 (いしかわ ふみひろ)

大阪府立大学大学院理学系研究科 生物科学専攻 博士課程3年

ishikawa06@b.s.osakafu-u.ac.jp

この度は生命化学研究レターへの執筆機会を頂き、感謝致します。現在私は、大阪府立大学大学院の藤井郁雄教授の下で、ホロ酵素型触媒抗体の創出を目指し研究を行っています。すなわち、抗体の抗原結合部位に種々のコファクター分子結合部位を構築するための方法論を確立し、種々の非天然の合成コファクター分子を抗原結合部位に導入するという試みです。

自然界は何億年という長い年月をかけて、突然変異を蓄積し、選別を繰り返すことによって、多くの化学反応を非常に効率良く触媒する酵素のような生体機能分子を獲得してきました。そのため、自由自在に酵素を設計し、また望むようにその機能を改変することは容易ではありません。また、天然酵素あるいは触媒抗体のように抗体を足場として利用するに関わらず、天然にはない基質特異性や新しい機能を持ち、望む反応を高効率かつ立体選択的に触媒する生体機能分子を設計および合成することは有機化学者のみならず生物学者にとっても最終目標の一つです。今回は酵素機能の改変および酵素機能の創出という観点から論文を3報紹介させていただきます。

Enhancing Activity and Controlling Stereoselectivity in a Designed PLP-Dependent Aldolase

M. D. Toscano, M. M. Müller, and D. Hilvert, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 4468-4470 (2007).

Hilvert らは *Geobacillus stearothermophilus* 由来の PLP-dependent alanine racemase の触媒残基である 265 番目の Tyr 残基を Ala 残基に置換することのみによって、racemase から aldolase への機能改変に成功しています(図 1a)。この部位特異的変異導入により、基質(2R,3S)- β -フェニルセリンに適する活性部位空間を生み出すことによって、本来のラセマーゼ活性は 10^3 倍減少し、基質のベンズアルデヒドとグリシンへの逆アルドール反応は 10^5 倍加速されることが示されました(図 1b, 図 2)。また、彼らは 265 番目の Tyr 残基を Ala 残基のみならず、Ser, Val, Glu, Arg, Lys 残基に置換することによってさらに最適化を行っています。その結果、Tyr265Lys 変異体は Tyr265Ala に対し 9 倍の k_{cat} を示しました。これは Lys 残基により基質結合部位の相補性が増大し、アミンの正電荷により基質のベンゼン環とのカチオン- π 相互作用の形成あるいは、遷移状態で生じる負電荷を安定化することが要因であると示唆しています(図 1c)。最後に、(2R,3S)-, (2R,3R)-フェニルセリンを用いジアステレオ選択性の検討を行っています。Tyr265Ala

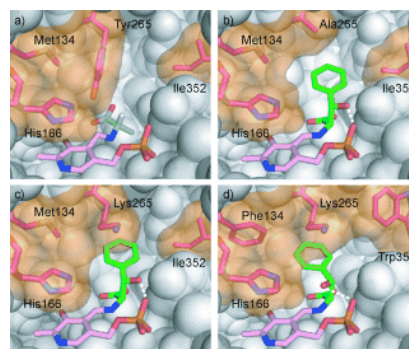


図 1 *G. stearothermophilus* alanine racemase 変異体の活性部位モデル a) 野生型 b) Tyr265Ala 変異体と(2R,3S)- β -phenylserine-PLP aldimine 複合体 c) Tyr265Lys 変異体と(2R,3S)- β -phenylserine-PLP aldimine 複合体 d) Met134Phe/Tyr265Lys/Ile352Trp 変異体と(2R,3R)- β -phenylserine-PLP aldimine 複合体 論文より一部抜粋

変異体は $[k_{cat}/K_m(2R,3S)]/[k_{cat}/K_m(2R,3R)] = 9.2$ を示します。ここで、彼らはこの選択性を逆転させる試みを行っています。すなわち、Met134Phe にすることによって相互作用様式を変換し、Ile352Trp とより嵩高いア

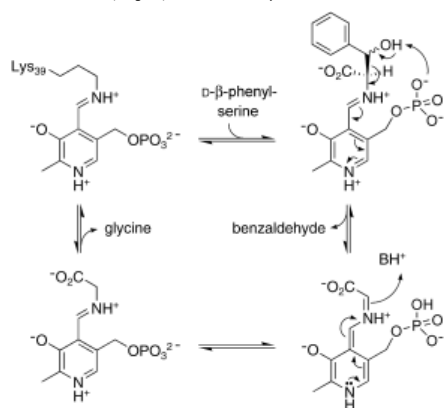


図2 逆アルドール反応触媒機構 論文より

一部抜粋

ミノ酸残基に置換することによって、(2R,3R)-フェニルセリンのβ-ヒドロキシル基と触媒として重要な働きをする補酵素のリン酸基の酸素原子を水素結合形成距離に制御します(図1d)。その結果、Met134Phe/Tyr265Lys/Ile352Trp 変異体は $[k_{cat}/K_m(2R,3S)]/[k_{cat}/K_m(2R,3R)] = 0.6$ と選択性の改善が見られます。本論文のおもしろいところは、活性部位の一残基に変異を導入するだけで、racemase から aldolase へと機能を改変することができ、さらに二残基に変異を導入すると逆アルドール反応のジアステレオ選択性も制御できるということです。

The Putative Diels-Alderase Macrophomate Synthase is an Efficient Aldolase

J. M. Serafimov, D. Gillingham, S. Kuster, and D. Hilvert

J. Am. Chem. Soc., **130**, 7798-7799 (2008).

ツユクサの病原菌 *Macrophoma commelinae* 由来の

Macrophomate synthase (MPS) は図3に示す2-ピロン(1)からマクロフォミン酸(2)への複雑な変換反応を触媒することがわかっています。その触媒反応は三段階に分けることができます。

1) 脱炭酸反応によるオキサロ酢酸からエノラートの生成。この段階は Mg^{2+} が必須です。2) エノラートと2-ピロン(1)との2個の炭素-炭素結合形成反応。3) 脱炭酸-脱水反応によるマクロフォミン酸(2)の形成です。この炭素-炭素結合形成段階は協奏的な Diels-Alder 反応により進行すると考えられています。しかしながら、QM/MM 計算の結果、図3に示す2段階マイケル-アルドール連続反応機構の方が[4+2]ペリ環状反応よりエネルギー的に有利であることが示されています。さらに、

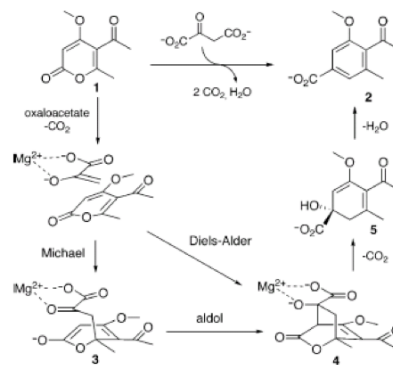


図3 MPS が触媒する2-ピロン(1)からマクロフォミン酸(2)への変換機構

MPS は 2-dehydro-3-deoxygalactarate (DGG) aldolase とアミノ酸配列および活性部位の構造も相同性が高く、また、どちらもコファクターとして Mg^{2+} を必須としていることから、本論文で、Hilvert らはアルドール受容体として種々のアルデヒドを用い、MPS の aldolase としての可能性を検討しています(図4)。その結果、脂肪族、芳香族および複素環アルデヒドを用いた場合、オキサロ酢酸とのアルドール反応を触媒することが示されました(表1)。さらに、MPS が触媒する 7a の逆アルドール反応は非触媒反応に対し、 10^5 倍以上の速度加速を示すことが示されています。本論文の興味深いところは、酵素を改変することなく、MPS の本来もつ触媒機構を最大限に生かしているところです。今後は、生成物の立体選択の向上が課題です。最後に、MPS がアルドール反応を触媒したことにより、2-ピロン(1)からマクロフォミン酸(2)への変換反応の触媒機構に一石を投じています。

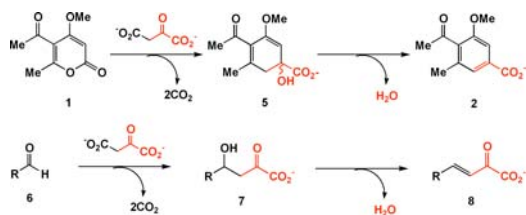


図4 MPS の本来の触媒反応およびアルドール反応 論文より一部抜粋改変

表1 MPS が触媒するアルドール反応の基質特異性 論文より一部抜粋改変

Substrate	Aldehyde	Yield (%)	7:8	ee(%)
6a	PhCHO	70	>20:1	44
6b	4-F-C ₆ H ₄ CHO	52	9:1	nd
6c	4-MeO-C ₆ H ₄ CHO	30	1:3	nd
6d		49	3:1	nd
6e	R-CHO	35	>20:1	nd
6f		95	>20:1	36
6g	C ₇ H ₁₃ CHO	96	9:1	nd
6h	Et ₂ CHCHO	45	>20:1	nd

Biomimetic Catalysis of intermodular Aminoacyl Transfer

K. M. Wilcoxon, L. J. Leman, D. A. Weinberger, Z.-Z. Huang, and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 748-749 (2007).

ペプチド抗生物質などの骨格形成におけるモジュール間アミノアシル転移反応は、非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)によるポリペプチド生合成の基本的な結合形成反応です。また、NRPS は基質の選択と活性化、基質の受け渡し、結合の形成といった特定の役割を担う活性部位(ドメイン)から構成されています。Ghadiri らは NRPS の 2 つの基本的な反応段階であるアミノアシル基質の活性部位への導入とモジュール間アミノアシル転移段階を模倣した触媒を設計しました。効率的なアシル転移反応を達成するために、彼らは、酵素触媒の重要な触媒因子の一つである近接効果を利用

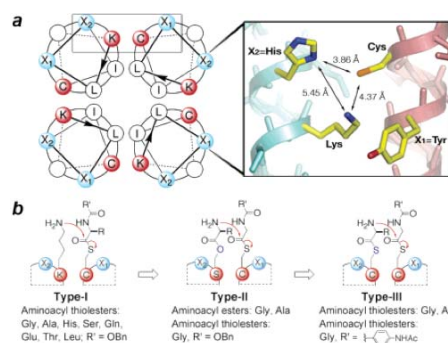


図5 a)(左図) herical wheel diagram (右図) X線結晶解析 b) 3種類の活性部位の設計 論文より一部抜粋改変

しています。本論文の興味深いところは、近接効果を設計するために 26 残基からなる coiled-coil ペプチドを土台分子として利用し、非共有結合的にアミノアシル供与体と受容体を近接させていることです(図 6a)。図 5a に示すように平行な coiled-coil ホモ四量体は 4 つの活性部位からなり、その活性部位は共有結合で基質を反応場に導入するための Cys 残基およびアシル受容体である Lys 残基から構成され、X₁, X₂ 部位は一般酸塩基触媒などの付加的な触媒残基を導入するための部位として設計されています。さらに、筆者らは Type- II および Type- III と活性部位を設計し、比較検討も行っています(図 5b)。Type- I 活性部位を用い、基質として Cbz-protected N-acetylcysteamine glycyl thioester を添加すると、Cys 残基により基質が反応場へ導入され、近接効果により Lys 残基とのヘリックス間アミノアシル転移反応が起こり、結合形成が起こります。このアミノアシル転移反応は、5400 倍 (k_{cat}/k_{uncat}) 加速されることが示されました。Type- II および Type- III を用いた場合もほぼ同様の結果が得られています。



宇井 美穂子 (うい みほこ)

東京大学大学院新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 博士課程 3年

kk67606@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

この度は、生命化学研究レターへのこのような執筆機会をいただき、心よりお礼申し上げます。現在、私は東京大学新領域創成科学研究科の津本浩平准教授のご指導の下、蛋白質工学の中でも特に抗体に焦点を当てた分子認識、特異的相互作用に関する研究に携わっております。抗体の新規抗原に対する高い親和性・選択性の創出機構を明らかにし、分子認識様式の情報基盤に基づいた抗体の更なる機能性の向上、安定性の獲得、あるいは機能改変等を目指して研究を行っております。抗体が持つ、いわゆる分子認識素子としてのある種の万能性と高度に洗練された抗原認識機構、また、抗体に限らず生体内蛋白質の見事なまでの巧みな機能発現システムを垣間見る度、生命への畏敬の念を持たざるを得ません。

天然蛋白質が持つ機能メカニズムを理解することで、それらを用途に応じて利用し、さらには、改良を加えた機能性人工蛋白質を自在に操る、そのような夢は多くの研究者が持ち続けているものだと思います。

今回は、自然界に存在する蛋白質を一つの部品として捉え、遺伝子工学的手法を用いて切ったり繋げたり人工的なアレンジを加えることで創製された機能性人工蛋白質についての論文を2報、また、コンピュータ上で設計した人工酵素についての論文を1報ご紹介させていただきます。

Design of Protein Function Leaps by Directed Domain Interface Evolution

J. Huang, A. Koide, K. Makabe, and S. Koide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 6578-6583 (2008).

天然蛋白質の多くは、組織化された複数のドメインによる協同的作用によって機能を発現しており、また、その活性部位はドメイン接触界面に位置している例が多くあります。複数のドメインが関与することによって大きな接触界面の獲得と厳密な活性部位の構造制御が可能となり、より高度な分子認識を実現していると考えられます。本論文では、そのような蛋白質ドメイン同士の協同的な分子認識を人工的に創り出し、単独ドメインよりも遥かに優れた機能獲得

を実現した例が報告されています。図1に示した機能性人工蛋白質“affinity clamp”は、標的ペプチドに対して弱い親和性を持った primary ドメイン(Erbin-PDZ)と親和性を全く持たない enhancer ドメイン(FN3)を連結させた人工蛋白質です。FN3表面に存在する3つのループに変異を加えることで 10^9 程度のライブラリーを構築し、ファージディスプレイ法によってペプチド結合部位表面の最適化を行いました。最終的に得られた affinity clamp ePDZ-b2 は、Erbin-PDZ ドメイン単独と比較すると親和性が500倍以上、特異性が2000倍以上という大幅な機能性の向上を達成しています。論文中では、2つのドメインにより標的分子を挟み込むことで接触界面の面積が増し、その結果、エンタルピー的寄与による親和性の向上と、より厳密な分子認識が可能になったことが述べられていました。本文中には、明確には示されておりませんが、ドメイン表面配列の成熟に伴う水和構造の変化、あるいは複合体形成前後での安定性の変化等が親和性・特異性に大きく影響している可能性も考えられます。

また、この affinity clamp の特筆すべき点の一つに、分析・検出試薬としての汎用性が挙げられます。今回得られた affinity clamp は標的ペプチドに対して数 nM の解離定数を示し、種々の免疫化学法で一般

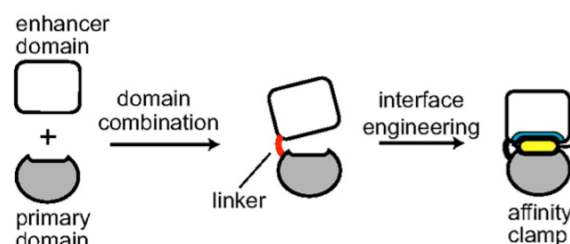


図1 “affinity clamp”の概念図および基本構造 (論文中より抜粋)

的に使われているモノクローナル抗体を凌ぐほどの感度を有する認識素子として評価されています。論文
 中では、alkaline phosphatase を融合したウエスタンブロッティング用検出試薬や Pull-down 用試薬としての
 有用性、また熱安定性などの評価も行っており、いずれも優秀な成績を修めています。primary ドメインと
 enhancer ドメインの組み合わせを変えることで、免疫学的手法を経ることなく、多様な標的に対応して
 affinity clamp を創製できるというこの新たな蛋白質工学の手法は、分析化学をはじめ多くの分野での応用
 が期待されます。

Novel Genetically Encoded Biosensors Using Firefly Luciferase

F. Fan, B. F. Binkowski, B. L. Butler, P. F. Stecha, M. K. Lewis, and K. V. Wood, *ACS Chem. Biol.*, **3**,
 346-351 (2008).

次は、発光基質ルシフェリンの酸化反応を触媒する酵素ルシフェラーゼを母体とした発光試薬の例をご紹介します。
 この化学発光系は、細胞内で機能する極めて感度の高い検出法として、これまでに ATP の高感度定量や、レポーター遺伝子
 としても広く用いられてきました。本論文では、このルシフェラーゼの優れた特性を生かして、細胞内の多様な標的分子に対
 応できる汎用性の高いバイオセンサーの創製を目指し、3 つの異なるモデルを提唱しています。

ルシフェラーゼは 2 つのドメインから構成され、そのドメイン
 同士はヒンジ部位を介して連結した二枚貝のような構造を取
 っています。基質不在下では Open 構造、基質存在下では
 Closed 構造の 2 つの異なる構造を取ることが可能です。本来、
 N末端、C 末端として存在している領域に、遺伝子工学的手法
 を用いて、標的分子に対して特異的に応答するペプチド配列、
 あるいはドメインを導入し、ルシフェラーゼの酵素活性を指標と
 した発光型バイオセンサーを創ることができました。

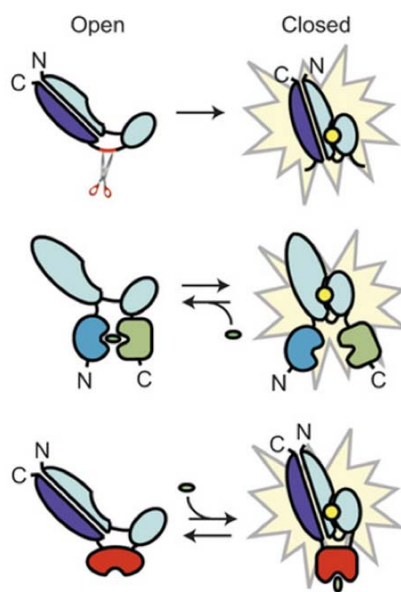


図2 ルシフェラーゼバイオセンサーの模式図
 (上) 共有結合モデル
 (中) 非共有結合モデル
 (下) アロステリックモデル

図 2(上)に示したモデルは、プロテアーゼ検出用バイオセン
 サーです。赤く示された本来のルシフェラーゼ末端部位にプロテアーゼ認識配列を導入しておく
 と、対象となるプロテアーゼ存在下では導入配列が切断され、野生型に近い酵素活性を示し
 ます。しかし、標的プロテアーゼ不在下では、ドメイン間が連結されているために運動が抑制
 されて Closed 構造を取ることができず、発光強度は数千分の一以下に減少します。7 種
 のプロテアーゼのいずれの場合も十分な検出感度を得ることができました。

図 2(中)は、ルシフェラーゼ末端の架橋を蛋白質ドメイン間相互作用によって制御する設計とな
 っています。FRB と FKBP12 はラパマイシンという化学物質存在下でヘテロ二量体を形成する
 ことが知られており、これを利用してラパマイシン応答性のバイオセンサーが構築されていま
 す。ラパマイシン不在下では、FRB と FKBP12 間の相互作用は形成されず、強い発光を伴
 う酵素活性が維持されます。一方、標的分子存在下では、FRB と FKBP12 間の相互作用
 がラパマイシンにより促進されることでルシフェラーゼの架橋が起これ、発光強度が著しく
 減少します。試験管レベル、細胞内レベルのいずれもラパマイシン濃度依存的な発光強度
 の変化が確認され、ほぼ同程度の検出感度を示しました。標的分子により蛋白質間相互作
 用が特異的に制御されるような種々の系を応用することで、さらに多様な検出様式が構築
 されることと期待されま

す。

さらに、図 2(下)には、アロステリックな制御機構を持ったモデルが示されています。ルシフェラーゼのヒンジ部位近傍に連結されたドメインに標的分子が結合するとドメインの立体構造が変化し、その構造変化の情報を酵素活性シグナルへ変換するという巧妙な機能を持ったアロステリック型センサーです。本文中では、細胞内環境を忠実に反映し、ある程度の十分な感度で cAMP の検出に成功した実験例が示されています。

標的分子を使って蛋白質の構造変化を制御するというこれらのデザインは、蛋白質の機能メカニズムの観点からも非常に興味深く、アイデア次第で多様な検出素子が作り出せる可能性を示唆しています。今後、さらに多様な機能性分子の登場が期待できます。

Kemp Elimination Catalysts by Computational Enzyme Design

D. Röthlisberger, O. Khersonsky, A. M. Wollacott, L. Jiang, J. DeChancie, J. Betker, J. L. Gallaher, E. A. Althoff, A. Zanghellini, O. Dym, S. Albeck, K. N. Houk, D. S. Tawfik and D. Baker, *Nature*, **453**, 190-195 (2008).

最後にご紹介するのは、コンピュータによる人工酵素の設計に関する論文です。自然界から得られる酵素が触媒する反応は、生命を支える生体内反応に限られています。天然には存在しない全く新しい人工酵素を作り出すことで、反応レパートリーが広がり、食品産業のほか、化学、医薬産業など広範な分野での応用が期待されます。

本文で、反応モデルとして実際に行ったのは、図 3 に示した、Kemp 脱離反応という開環反応です。Kemp 脱離反応のカギとなる反応段階は、一般塩基による炭素からの脱プロトン反応であることが知られています。まず、初めに、酵素のデザインは活性中心となる一般塩基から決定していました。一般塩基には、アスパラギン酸残基またはグルタミン酸残基のカルボキシル基、あるいは、分極されたヒスチジン残基が候補として選ばれました。続いて、反応の遷移状態を安定化するような活性部位のアミノ酸配置が設計された後、それらの活性部位を安定に再現することが可能な骨格として TIM バレルが選択されました。

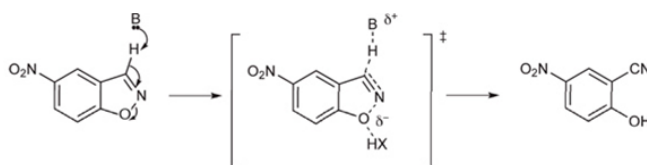


図3 Kemp 脱離反応の反応機構

このようにして 17 種類の異なった骨格をもつ 59 個の酵素デザインの中から、実際に酵素活性を示した 8 種類の酵素を作り出すことに成功しています。そのうちのひとつ、KE07 という酵素に関しては、結晶構造解析によって実際の立体構造を決定しました。コンピュータ上で作成したモデル構造と実際の立体構造とを比較したところ、活性部位の構造は非常によく一致していました。さらに、彼らは定向進化と呼ばれる試験管レベルでのアミノ酸配列の最適化を行うことで、触媒効率を 200 倍以上も向上させることに成功しています。

今後、さらに、蛋白質骨格の分子運動、柔軟性の因子をコンピュータでの計算に上手く反映することができれば、より実際の構造に近い形でシミュレーションが可能となり、目的機能を効率良く兼ね備えた正確な分子設計が期待できます。コンピュータによる計算手法と実験手法を上手く融合させたこのような蛋白質設計は、蛋白質工学においても重要な一歩となるのではないのでしょうか。

三成 寿作(みなり じゅさく)

北九州市立大学大学院国際環境工学研究科 環境工学専攻 博士課程 2年

d7610401@hibikino.ne.jp

この度は論文紹介の機会を頂き誠にありがとうございます。私は北九州市立大学の櫻井研究室において多糖の一種である β -1,3-グルカン(β-1,3-glucan)を核酸医薬のキャリアーに用いることを目指した研究に従事しております。アンチセンス核酸や siRNA が核酸医薬として研究されていますが、免疫活性作用を示す CpG DNA と呼ばれる 1 本鎖のオリゴ DNA に注目して、 β -1,3-グルカンを DDS 材料として用い、標的である抗原提示細胞にこの核酸医薬を効果的に送達する技術を編み出したいと考えています。この CpG DNA という名は非メチル化 CG ジヌクレオチドの配列が脊椎動物の免疫を活性化することに由来しています。本稿では、キャリアーとして使用する β -1,3-グルカンの受容体(Dectin-1)に関して一報と、核酸医薬としての CpG DNA に関して一報、さらに CpG DNA の受容体(TLR9)に関して一報をそれぞれご紹介させていただきます。

Differential High-Affinity Interaction of Dectin-1 with Natural or Synthetic Glucans is Dependent upon Primary Structure and is Influenced by Polymer Chain Length and Side-Chain Branching

E. L. Adams, P. J. Rice, B. Graves, H. E. Ensley, H. Yu, G. D. Brown, S. Gordon, M. A. Monteiro, E. Papp-Szabo, D. W. Lowman, T. D. Power, M. F. Wempe, and D. L. Williams, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **325**, 115-123 (2008).

2001 年の nature 誌で Gordon 先生らはマウス・マクロファージ様細胞株(RAW264.7)に β -1,3-グルカンのレセプターとして Dectin-1 が発現していると報告しました。この研究が発端となって、認識部位や陽性細胞の特定、またタンパクの異性体の探索、免疫活性における Dectin-1 の役割等について活発な研究が押し進められています。本論文では、 β -1,3-グルカンの鎖長や側鎖が Dectin-1 への認識にどのような影響を与えるかを明らかにしています。

7 残基からなる直鎖状のグルカンを用意し、加えて 8、9、10 残基のグルカン、さらには 7、8、9 残基のグルカンに 1 つのグルコース側鎖を持つ誘導体の合成を行いました。 β -1,3-グルカン長鎖の合成は現在注目される分野の 1 つで、中部大の堤内 要先生らも試みられております。各糖鎖の Dectin-1(マウス・組換え型)への結合能は表面プラズモン法で調べられ、糖鎖濃度 IC_{50} として比較されています。直鎖状のグルカンの IC_{50} は 7 残基の >1 mM から 10 残基の 0.7 mM へ、分岐型のグルカンでは 7 残基の 0.13 mM から 9 残基の 29 μ M へと、どちらも糖鎖数が増加するにつれ IC_{50} は減少し、すなわち結合能が増加します。側鎖の有無を比較すると、興味深いことに、7 残基のグルカンでは 1 つの側鎖の付与により IC_{50} が約 0.1 倍に減少し、また 9 残基では 2.6 mM から 29 μ M へと 0.01 倍程度にまで減少しており、1 つのグルコース側鎖の付与が Dectin-1 への認識能を極めて大きく高めることを示しています。図 1 は、直鎖グルカン(10 残基)と分岐グルカン(9 残基+側鎖 1 残基)の分子モデルを作製したものです。ここで、6 残基のグルコースが 1 ターンの螺旋を形成することを示した後に、側鎖があることでモル体積が減少しており、その結果生じた螺旋構造の差が Dectin-1 への認識に影響を与えると彼らは提案しています。我々のグループでは、分子動力学法を用い

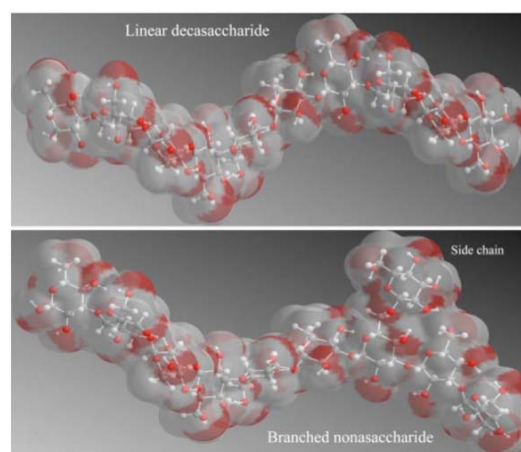


図 1 側鎖が与える主鎖構造への影響

てグルコース側鎖の存在が β -1,3-グルカンの 3 重螺旋の主鎖の立体配座に与える影響を調べ、側鎖が付加すると螺旋周囲の水の環境が変わり、螺旋のピッチが短くなることを示しています。糖の立体配座と被認識能との相関は今後解明されるべき課題と考えられます。

Properties Regulating the Nature of the Plasmacytoid Dendritic Cell Response to Toll-Like Receptor 9 Activation

C. Guiducci, G. Ott, J. H. Chan, E. Damon, C. Calacsan, T. Matray, K. D. Lee, R. L. Coffman, and F. J. Barrat, *J. Exp. Med.*, **203**, 1999-2008 (2006).

CpG DNA の発見は 1984 年の BCG の DNA 分画に強力なインターフェロン誘導能があるという徳永 徹先生らの報告に遡ります。その後、1992 年に DNA 中の CG ジヌクレオチドに免疫刺激能があることを明らかにしました。1995 年には、Krieg 先生らが大腸菌由来の DNA に B 細胞の活性化能があり、さらに CG の非メチル化が活性に必須であることを突き止めます。この CG 配列を含む合成オリゴ核酸(CpG DNA)が同様の免疫活性を示すことから、現在、CpG DNA を用いた癌免疫治療やワクチン療法の開発に注目が集まっています。

本論文では、形質細胞様樹状細胞(PDC)における CpG DNA の作用に関して紹介されています。PDC は体内で極めて少ない細胞ですが抗ウイルス免疫反応にお

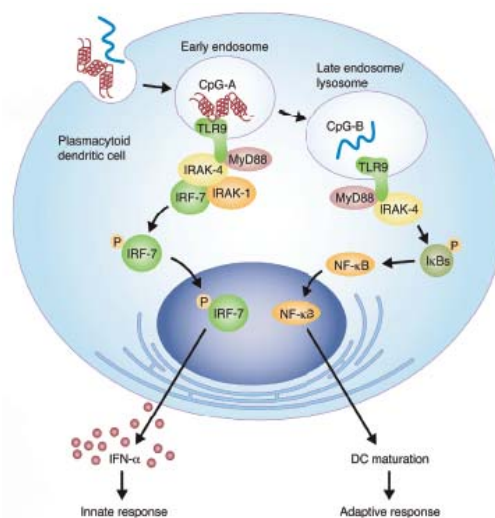


図 2 CpG DNA の免疫活性化機構

いて重要な役割を担っています。PDC を活性化する CpG DNA は、骨格修飾、配列、機能の差により A、B、C という 3 つの型に大別されます。A 型は IFN- α の産出、B 型は樹状細胞の成熟化、C 型は A と B の両機能(程度は下がりますが)を持っています。これまで、活性の差が何に由来するかは不明瞭だったのですが、彼らは CpG DNA の持つ高次構造にその謎を解く鍵があると結論付けています。実は、A 型は B、C 型とは異なり、配列末端にオリゴ G 配列を必要とするため、G の 4 量体形成を介した分子間会合体を生じます。そこで、高次構造の違いが細胞内の局在箇所によどのような影響を与えるかを、初期と後期エンドソームの染色剤として、抗トランスフェリンレセプター抗体と抗 Lamp-1 抗体を用いて顕微鏡で観察しています。結果は、従来エンドソーム内で差はないものとされてきたのですが、A 型であれば初期エンドソーム、B 型であれば後期エンドソーム、C 型は両方でそれぞれ認識されるというものでした(図 2)。つまり、この会合体の有無が認識場所の差、さらには活性の差を生じさせるということです。この主な根拠として、末端配列に、G4 量体を形成不能な 7-デアザ G 体を持つ A 型が B 型様に、複数の B 型を持つナノ粒子体が A 型様に、また pH 応答性の脂質膜(後期エンドソームで放出可能)に封入した C 型が B 型様に、それぞれ局在箇所を変え、さらに活性を示したことが挙げられます。このように分子の高次構造が受容体に与える影響を検討することは立証し難いことかも知れませんが、非常に興味深く今後の進展が気になるところです。

Ligand-Induced Conformational Changes Allosterically Activate Toll- Like Receptor 9

E. Latz, A. Verma, A. Visintin, M. Gong, C. M. Sirois, D. C. G. Klein, B. G. Monks, C. J. McKnight, M. S. Lamphier, W. P. Duprex, T. Espevik, and D. T. Golenbock, *Nat. Immunol.*, **8**, 772-779 (2007).

CpG DNA の受容体である Toll 様受容体 9 (TLR9)は、2000 年に審良 静男先生らによって発見されました。その後、次第に TLR9 活性化により誘導されるシグナルカスケード、免疫応答(Th1 型)に関しては解明されてきたのですが、TLR9-CpG DNA 間の認識機構に関してはベールに包まれたままでした。

本論文では、まず免疫活性を示す CpG ODN とそのコントロール配列である GpC ODN(CpG の逆配列)が TLR9-Fc(IgG の Fc 断片との組換え融合型)に同等の親和性を持つことが示されます。しかしながら、TLR9 の構造は、CpG 配列の添加時にのみ、変化することが円偏光二色性(CD)法により明らかにされました(図 3a 左)。つまり、TLR9 の活性化には CpG 配列の結合により生じる構造変化が重要であることがわかります。また同様の結果は、TLR9-Fc 二量体の N-C 末端間距離が、CpG 配列の場合にのみ短縮することからも得られています(図 3a 右)。ここでは、FRET 現象を利用し電子供与体-受容体間の距離を測定できる FLIM-FRET が適用されています。最終的に、TLR9 は ER 中で二量体として保持されており、CpG ODN の進入を受けエンドソームへ移動し、CpG 配列認識後の構造変化が MyD88(アダプター分子)依存的なカスケードを進行させると彼らは述べています(図 3b)。現在、CpG ODN の進入後に、TLR9 が ER からエンドソームへ移動する機構に焦点が当てられているところです。

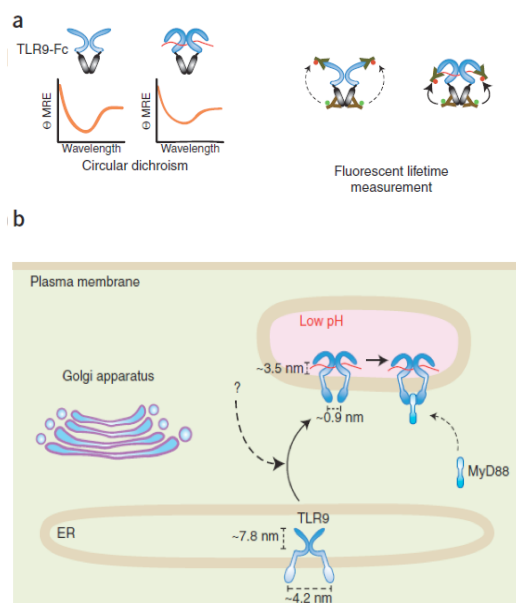


図 3 TLR9 の構造変化



生命化学研究法

巨大リポソームの顕微鏡直接観察

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 濱田勉

(t-hamada@jaist.ac.jp)

1. 巨大リポソームについて

細胞膜の基本構造を備えたリポソーム(脂質2分子膜小胞)は、モデル膜の基礎研究に用いられている。また、生体に対する馴染みが良いために、ドラッグデリバリーのキャリアや化粧品などの医薬・産業分野への応用にも利用される。これらの研究の多くは、数十から数百ナノメートルサイズのリポソームを対象にしており、光散乱によるサイズ変化や蛍光分光による物質保持効率等のアンサンブル平均の測定が行われている。近年、細胞と同程度の数十マイクロメートルスケールの巨大リポソームによるモデル膜の研究が盛んである[1]。細胞と同スケールの巨大リポソームは、組成・構造・サイズにわたり理想的な細胞モデル空間を提供する。またその大きさから、光学顕微鏡により一集合体の振る舞いをリアルタイムで測定することが可能である。今回、巨大リポソームの作製および顕微鏡観察の実験手法について解説し、実際の研究例を紹介したい。

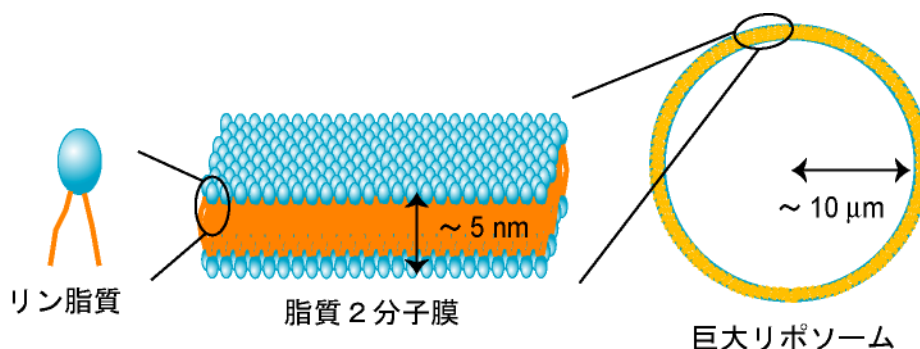


図1: 巨大リポソームの模式図

2. 巨大リポソームの作製

2-1. 積層膜水合法

脂質のかたまりを水と混合させると、脂質分子が自発的に集合しミセルやリポソームの膜構造体が形成される。この自己組織化現象は、脂質分子が両親媒性分子であることに起因し、疎水性相互作用がその駆動力である。しかし、この単純な混合法では、数10マイクロメートルサイズの巨大リポソームを得ることは困難である。そこで、巨大リポソームを効率的に得るために、脂質積層膜を水和する方法が一般的に用いられている(図2)。脂質分子を溶かした有機溶媒(クロロホルム)を乾燥させ、試験管の底に脂質の積層膜を作る。この積層膜に水溶液を加えると、積層していた2分子膜が離れて小胞化し、巨大リポソームが得られる。有機溶媒を乾燥させて得られる脂質積層膜は、数十マイクロメートルの平面膜構造を形成しており、この前駆膜構造が巨大リポソーム形成に重要となる。そして、加える水溶液にも注意が必要である。純水中では巨大リポソームが形成されやすいが、バッファーや塩を含んだ溶液中では形成率が悪くなる。また、リポソーム形成率は脂質分子の種類にも依存し、多種類の脂質混合系や相転移点の高い飽和脂質では作

製が難しい。これらは、積層膜がうまく剥がれないことが原因であり、膜を強制的に剥がす改善法が用いられている。交流電場を発生させ膜を強制振動させる「電場法」[2]、積層膜間に糖や塩などの低分子を混合し浸透圧を発生させる「浸透圧法」[3,4]、PEG 等の高分子結合脂質を少量混合させて高分子の広がり力を利用する方法[5]、荷電脂質を混合して膜間の静電斥力を高める方法[6]などがある。

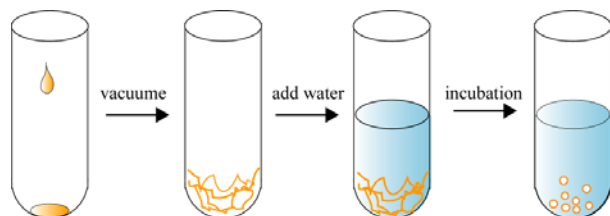


図2: 積層膜水和法

2-2. 液滴法

積層膜水和法以外に巨大リポソームを形成する手法として、「液滴法」がある。液滴法とは、油水2相系を用意し、油中液滴を水中に移行させてリポソームを作製する手法である[7]。液滴が移行する際に、液滴を覆う単層膜と油水界面単層膜が結合し、2分子膜リポソームが形成される(図3A)。積層膜水和法と同様に試験管の底に脂質積層膜を形成し、油(ミネラルオイル)を加えて超音波で混合させる。その後、少量の水溶液を加えタッピングにより分散させて液滴を作る。液滴法は積層膜水和法に比べて幾つかの利点がある。液滴がリポソームに移行する過程で小胞内水相が保存するため、リポソーム内部に物質を封入することが容易である。また、液滴と油水界面で異なる単層膜を用意すれば、任意の単層膜どうしを結合させた非対称2分子膜リポソームが形成される[8]。

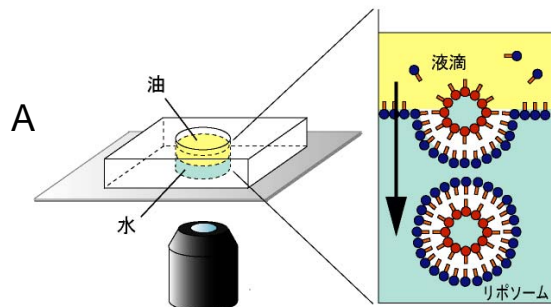
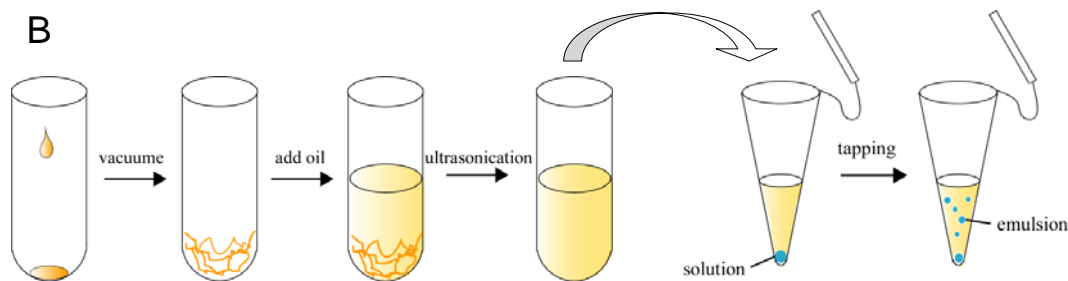


図3: (A) 液滴法の模式図。(B) 液滴の作成プロセス。



3. 顕微鏡直接観察

3-1. 位相差・微分干渉・蛍光像

脂質2分子膜の膜厚はわずか5ナノメートル程度の微細構造であるため、光の吸収量がコントラストに変換される通常の明視野観察では観察することが出来ない。そこで、物質の屈折率の違いをコントラストに変

換する「位相差」および「微分干渉」が用いられる。媒質と屈折率の異なるサンプル物体を光が透過すると、位相が変化する。この位相差を明暗コントラストに変換したのが位相差像であり、位相差の変化量(傾斜)を立体的な明暗コントラストに変換したのが微分干渉像である。図4に、巨大リポソームの位相差および微分干渉像を示した。位相差像では球状の脂質2分子膜部分が暗コントラスト像となり、微分干渉像では膜部分が立体像となっていることが分かる。また、脂溶性の蛍光プローブを混合し膜面を光らせる蛍光観察も、高コントラスト像を得ることが出来る方法として利用される。

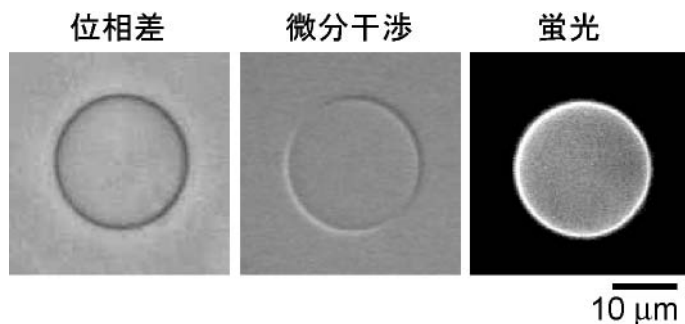


図4: 巨大リポソームの顕微鏡観察像。

3-2. 顕微鏡下マイクロ操作

リアルタイム観察の利点のひとつは、顕微鏡下で単一のリポソームを操作できることである。図5に、微小キャピラリーによるリポソームの吸引実験を示した。吸引圧を制御して膜の変形度合いを測定することで、膜の弾性率が求められる[9]。また、選択したリポソームをつかんで目的の場所に運んだり、リポソームに刺激物質を吹きかけたり等の操作も可能である。このようなマイクロ操作を行う場合は、ステージ上の空きスペースの多い、倒立型の顕微鏡が便利である。また、顕微鏡に固定したキャピラリーは実験台の振動に非常に敏感であり、振動の少ない環境または除振台上で実験することが必要である。

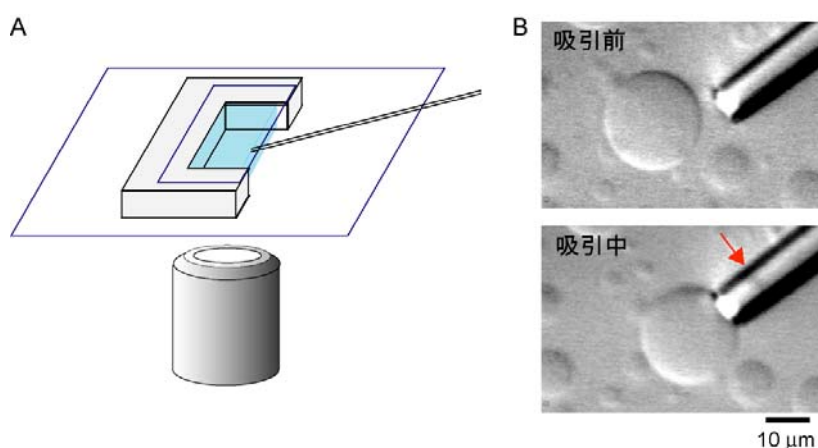


図5: 巨大リポソームのマイクロ操作。(A) 実験装置の模式図。(B) 微小ガラスキャピラリーによるリポソームの吸引。キャピラリー内部の赤矢印部分まで、膜面が吸引されている。

4. 巨大リポソーム研究の実際

4-1. 形態ダイナミクス(3次元膜構造)

細胞膜は外部環境や内部状態の変化に応じて様々な形状を取りうるが、このような多様な膜構造体を巨大リポソームで観察する事が出来る。図6は、浸透圧によるリポソームの形態変化プロセスの一例である。脂質2分子膜は半透膜の性質を有しているため、膜を介した物質の濃度勾配により浸透圧が生じる。この浸透圧差を解消するため、リポソームは水を出し入れして内水相体積を変化させる。内水相体積が変化することで、それに対応する安定形態が移り変わり、リポソームが多様な形態間を転移する。

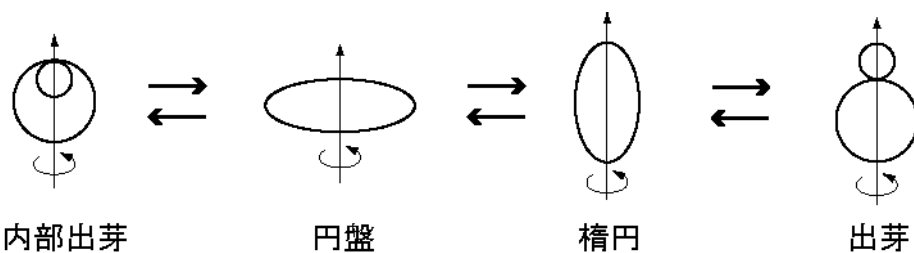


図6: 浸透圧によるリポソーム形態変化プロセスの一例。Z 軸に対して回転対称。

4-2. 膜マイクロドメイン(2次元膜構造)

細胞膜内には、スフィンゴ脂質(主に飽和アシル基を持つ)とコレステロールが多く含まれるマイクロドメイン構造「脂質ラフト」が存在すると考えられている(図7A)。マイクロドメインは受容体タンパク質等を選択的に局在させる性質を持つことから、シグナル伝達や小胞輸送などの場として機能する。マイクロドメイン内の脂質分子はアシル基の運動性が抑えられた「秩序」状態にあり、周囲は「無秩序」な流動膜である。この膜マイクロドメインを巨大リポソーム上で再構成して観察することができる。図7Bは、飽和脂質と不飽和脂質とコレステロールの3成分から成る巨大リポソームの蛍光顕微鏡像である。マイクロドメインと流動膜それぞれに局在する2種の蛍光色素を混合することで、リポソーム表面上での2次元膜構造を可視化している。なお、位相差・微分干渉等の透過像だけでは、膜面上のドメイン構造を観察することは出来ない。また、この2次元膜面上ドメイン構造は3次元膜形状と密にカップルしており、ドメイン誘起のエンドサイトーシス現象が巨大リポソームにて観察されている(図7C) [10]。

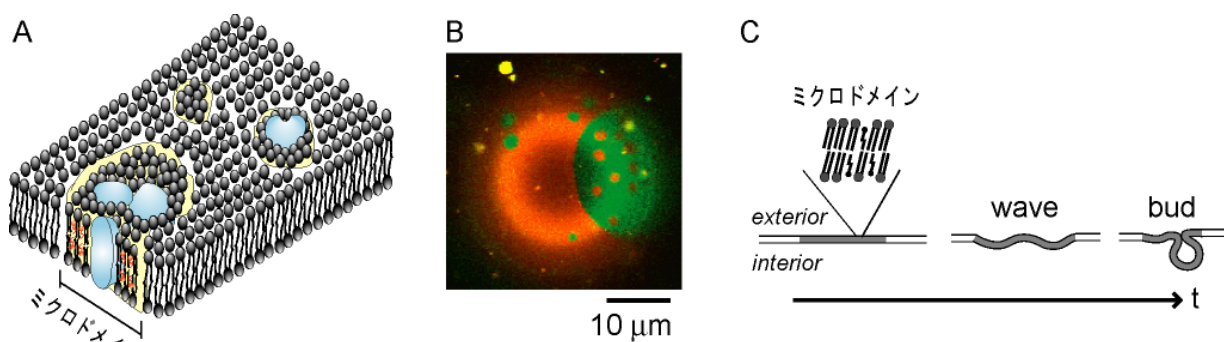


図7: (A) 細胞膜マイクロドメイン構造の模式図。(B) 巨大リポソーム上で再現したマイクロドメイン構造のレーザー共焦点顕微鏡像。緑色領域がマイクロドメイン、赤色領域が流動膜に対応する。(C) ドメイン誘起エンドサイトーシスの模式図。

4-3. リポソーム内部での化学反応モニター

生命は、内部物質の流出を防ぎ、有害物質や物理的浸食に対する境界として、脂質膜を形成している。このようなモデル実験として、巨大リポソーム内部へ生体物質や化学反応を封入するマイクロカプセル実験が試みられている。例えば、*in vitro* 転写翻訳系と GFP コードのプラスミド DNA の混合溶液を用いてリポソームを低温下で作製後、37度インキュベーションにより巨大リポソーム内でのタンパク質合成反応プロセスが観察されている[11]。また、リポソームに内封された反応物質が外部溶液中の分解酵素から保護されることも確認されており、巨大リポソームが外物質からの防御機構として有効であることがわかる。

参考文献

- [1] Luisi, P.L., Walde, P. *Giant Vesicles*; John Wiley & Sons Ltd: Chichester (2000).
- [2] Angelova, M.I., Soléau, S., Méléard, Ph., Faucon, J.F., Bothorel, P. *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **89**, 127-131 (1992).
- [3] Magome, N., Takemura, T., Yoshikawa, K. *Chem. Lett.*, **26**, 205-206 (1997).
- [4] Yamada, N.L., Hishida, M., Seto, H., Tsumoto, K., Yoshimura T. *Europhys. Lett.*, **80**, 48002 (2007).
- [5] Yamashita, Y., Oka, M., Tanaka, T., Yamazaki, M. *Biochim. Biophys. Acta*, **1561**, 129-134 (2002).
- [6] Akashi, K., Miyata, H., Itoh, H., Kinoshita, K.Jr. *Biophys. J.*, **74**, 2973-2982 (1998).
- [7] Yamada, A., Yamanaka, T., Hamada, T., Hase, M., Yoshikawa, K., Baigl, D. *Langmuir*, **22**, 9824-9828 (2006).
- [8] Pautot, S., Frisken, B.J., Weitz, D.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 10718-10721 (2003).
- [9] Evans, E., Rawicz, W. *Phys. Rev. Lett.*, **64**, 2094-2097 (1990).
- [10] Hamada, T., Miura, Y., Ishii, K., Araki, S., Yoshikawa, K., Vestergaard, M., Takagi, M. *J. Phys. Chem. B*, **111**, 10853-10857 (2007).
- [11] Nomura, S.M., Tsumoto, K., Hamada, T., Akiyoshi, K., Nakatani, Y., Yoshikawa, K. *ChemBioChem*, **4**, 1172-1175 (2003).





スクリプス研究所

留学体験記

東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情報専攻
臼井 健二

私は現在、東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情報専攻の小島英理准教授の研究室で、特別研究員をしております、臼井健二と申します。2006年3月に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の三原久和教授のもとで学位を取得し、同年4月よりアメリカ合衆国カリフォルニア州サンディエゴ近郊のスクリプス研究所のProf. Jeffery W. Kelly 研究室に2年間博士研究員として留学していました。このたび、留学体験記の執筆の機会をいただきましたので、サンディエゴやスクリプス研究所、Kelly 研究室などの紹介をしたいと思います。

1. アメリカ合衆国カリフォルニア州サンディエゴ

サンディエゴはロサンゼルス以南約 200 キロ、アメリカ最南西端にある、全米で第 7 位、カリフォルニア州ではサンフランシスコを抜いて第 2 位の人口規模である都市です。太平洋沿岸部は、年間を通して過ごしやすい気候で暑すぎもせず寒すぎもせず、常夏ならぬ常春といった感覚です。一方、内陸側は山や高原があって冬は雪が降ってスキーが楽しめますし、砂漠や荒地もあって夏は 40℃前後といった過酷な場所もあります。非常に自然が豊かで様々なレジャーが楽しめ、栄えた大都市でもあるため、America's Finest City とうたわれています。

もともとサンディエゴは、基地の街として栄えてきたのですが、近年では、ハイテク産業都市、研究学術都市といった側面が強くなってきています。カリフォルニア大学サンディエゴ校(UCSD)を筆頭に、サンディエゴ州立大学(SDSU)、ソーク研究所、そしてスクリプス研究所といった教育・研究機関が中心となり、情報通信関連企業や、バイオ、製薬、医療機器の企業などが集結し始めています。生命化学分野で言えば、ファイザー、メルク、ノバルティスなどの大企業をはじめ、数多くのベンチャー企業がスクリプス研究所周辺に集まっています。



サンディエゴ湾とサンディエゴのダウンタウン



スクリプス研究所ベックマン棟正面玄関



スクリプス研究所ベックマン棟内部

2. スクリプス研究所

スクリプス研究所は、サンディエゴの北のラホヤという街にあり、アメリカ最大の私立研究機関の一つで、300人近い教員と、800人ほどのポスドクと100人程度の学生、1500人の職員で構成されています。最近では、2001年にシャープレス教授、2002年にビュートリッヒ教授がノーベル化学賞を受賞し、化学の研究において最も影響力がある研究所といわれています。

他の海外の大学や国内外の研究機関がどうなのかはよく分かりませんが、私が日本の大学とは違うと感じた大きな点は、研究所のポスドクの割合が非常に多いことと、共同研究が非常に多いということが挙げられるかと思います。まず一つ目に関しては、研究所の主戦力がポスドクであるということもあり、研究所におけるポスドクの位置づけがしっかりしており、生活や研究の環境が整備されている印象を受けました。例えば、ポスドクのためにサークルやパーティー、就職相談やキャリアアップのための就職に関するセミナー、税金や保険などの生活に関するセミナーなどがありました。これらや研究を通して、ポスドク同士のつながりも強くなり、そのお陰かどうかは分かりませんが、メーリングリスト(ML)も非常に盛んでした。授業やセミナー、行事などの通知をする一般情報のMLのほか、車や家具などの中古品を個人売買するML、機器や試薬の貸し借りや実験のやり方などを聞ける研究に関するMLなどがあり、一週間メーラーの受信箱を放っておくとメールが百件、二百件と溜まり全部見切れなくなるほどでした。また、研究室の掃除、ゴミ捨て、廃液処理、さらに戸締りまでも、職員に任せることができ、学生やポスドクは研究に専念できることも驚きでした。このように、ポスドクや学生が生活や研究を円滑に行えるよう研究所全体で盛り上げている印象を受けました。

続いて共同研究の多さについてですが、研究に関するMLに象徴されるように非常に研究室間の垣根が低いことが、その理由として挙げられるかと思います。ポスドクだけでなく学生でも、研究遂行上必要な知識や技術をもつ他の研究者と話し合ったり、互いの研究室のセミナーで発表しあったりします。そして、互いの研究室を行き来して実験するようになり、さらに共同研究先の部屋にもベンチや机をもらうようになり、最終的には論文などに共著で発表するということとなります。この流れは研究所内だけではなく、研究学術都市の地の利を生かし、歩いてすぐ行けるソーク研究所や車で10分のUCSD、企業などとの共同研究も盛んに行われています。実際自分が携わった3つのテーマでも、1つは研究所内での共同研究、もう1つはソーク研究所と共同研究になっていました。

以上のように、最近のスクリプス研究所の発展と成功は、単にビッグネームの教授陣の寄与というだけではなく、ポスドクをうまく使い、研究室間の垣根を低くすることで、新しいテーマや発想が比較的自由な雰囲気で見み出されることや一研究室では遂行困難な研究を共同で気軽に行えるということも理由ではないかと思います。

3. Prof. Jeffery W. Kelly 研究室

Kelly研究室では、タンパク質のフォールディングやミスフォールディングに関する研究¹⁾を行っています。アンチパラレルβシート構造を安定にとるペプチドの開発に始まり、オレフィン、エステル結合を主鎖に導入したβシートペプチドのフォールディングを解析する研究、輸送タンパク質Transthyretinのアミロイド形成のメカニズム解明とそのアミロイド形成を阻害する小分子であるケミカルシャペロンの開発に関する研究、Gaucher病などにおけるケミカルシャペロンの研究などが挙げられます。近年では、Alzheimer病 amyloid β-peptide (Aβ)のアミロイド線維化に関する研究や、α-synucleinを中心としたParkinson病に関する研究も行い、化学分野から細胞やマウス、線虫を使った生物分野まで幅広い手法を用いて毒性や線維化メカニズムの解明などを目指しています。特に、最近では生物分野に力をいれているせいか、学生を含めラボのメンバーの半数以上は、化学科でありながら細胞生物学や遺伝子工学などをバックグラウンドに持つ人で占

められています。残りは有機化学で、糖やペプチドなどの生体高分子を扱っていたメンバーは私を含めて一握りしかいない状況でした。ラボの構成は助教 1人、ポスドク9人、学生5人、技術補佐員2人、秘書1人で、アメリカ人以外の外国人が多いスクリプスではめずらしく、アメリカ人が9人と過半数を占め、中国人4人、インド人、シンガポール人、スウェーデン人、韓国人、日本人(私)が各1人でした。

私が担当したテーマは3つありますが、どれも A β に関する研究でした。今回は、そのうちのメインで遂行していたテーマに関して紹介いたします。アルツハイマー病の原因物質と考えられている A β のアミロイド線維化において A β の生体内濃度は nM レベルとされています。一方、A β の凝集しうる最低濃度(限界濃度)は数 μ M 前後と言われており、生体内のような比較的low濃度における A β の凝集形成メカニズムは未だ解明されておりません。Kelly 研究室では以前より、生体内異常代謝酸化物質が A β の凝集を促進させるという知見を見出してきました²⁾。そこで本研究では、アルツハイマー病に関連し、生体内異常代謝物であると考えられているコレステロール酸化物を部位特異的に修飾した A β を設計・合成し、生体内のような A β 低濃度環境での凝集形成についてより詳細な解析を試みました。光散乱による凝集形成の速度測定や、凝集形成の限界濃度の算出を試みた結果、修飾 A β では数 nM~数十 nM レベルでの凝集形成が見られ、限界濃度が数 μ M 前後であった未修飾の A β よりも、かなり低い濃度で凝集することが分かりました。さらに、コレステロール異常酸化物の修飾位置の違いによって、凝集形成速度や凝集形成限界濃度に変化が見られました。本研究で得られた知見は生体内における A β の nM レベルでのアミロイド形成メカニズムの解明につながると考えられます。

研究テーマはボスと相談して決まりますが、進め方などは個人に任されています。機器の使い方や実験の手法などはラボのメンバー、特に学生がしっかりしていてよく教えてもらいました。ラボのミーティングが週に 1 回、3 ヶ月に一回ほどの割合で自分の発表がまわってきて成果を報告するほか、個別にボスや助教と進行状況や実験の詳細について議論する機会もあります。当初は、似たようなテーマを行うメンバーがラボには残っておらず、実験を軌道に乗せるのにも、英語で色々尋ね教わるのにも苦労しました。何とか実験を軌道に乗せ、英語での実験の議論もようやく慣れ始めた頃には、2 年間滞在の終わりに近づいてしまいました。帰国までに論文発表は間に合いませんでしたが、投稿までは漕ぎ着けたので、近いうちに発行されればと思っております。



Prof. Jeffery W. Kelly



Kelly 研究室のメンバー



クリスマスパーティーで日本人研究者の方々と

4. サンディエゴでの生活

サンディエゴでの生活において一番留意しておかなければならないことは、2 点あるかと思います。一つ目は、家賃が高いことです。America's Finest City ということで、住むことに憧れをもつアメリカ人が多く人気が高いことが要因です。1 ベッドルームやスタジオでも月\$1000 以上するので、下手をすると月給の半分以上が家賃となる人もいます。また、ルームシェアも盛んに行われています。二つ目は、自家用車が必要とい

うことです。Finest Cityと言われているにも関わらず、電車・バスなどの交通機関は貧弱です。車があるのとないのでは生活もかなり違ったものになります。以上をクリアすれば、生活は非常にしやすい街です。まず、比較的治安が良く人々もおおらかです。日系のスーパー、百元ショップ(一品\$1.5)などもあり、日本料理、日本の雑貨もほとんど手に入ります。また、近年、銀行や病院、電気会社・電話会社などでも日本語が通じる機会が多くなり、何かトラブルがあってもたいていは容易に解決できるようになってきました。(但し、英語はまったく上達しなくなりますが。)

さらに、特に化学科においては、日本人研究者とのつながりも強く、分野は違っても研究・生活などの面で助け合っているほか、パーティーや旅行などにも行く機会がありました。留学当初からスムーズに生活、研究を始めることができたのもこのスクリプス日本人研究者の諸先輩方のおかげです。なお、日本に帰国した後もつながりがあり、日本スクリプス会を通じて1年に1回以上は同窓会・研究会が開かれております。ホームページ³⁾もあり、こちらの留学情報や留学体験記は、留学前の自分にとっても大変参考になりました。この場を借りまして、日本スクリプス会の諸先生方にお礼を申し上げます。

5. おわりに

2年間の留学は長いように思いましたが、あっという間に過ぎてしまった印象です。しかし、この短いように感じる期間に得られた経験は、非常に貴重なものでした。今後の研究生活に生かしていければと思います。最後になりましたが、拙い英語でも親切に接して下さった Kelly 教授とラボのメンバーに感謝いたします。また、留学体験記の執筆の機会を与えて下さいました、編集委員の先生方にお礼申し上げます。

1)最近の代表的な論文として、Johnson, S.M., *et al.*, *J. Med. Chem.*, **48**, 1576-1587 (2005); Fu, Y., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 15948-15949 (2006); Cohen, E., *et al.*, *Science*, **313**, 1604-1610 (2006); Bosco, D.A., *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 249-253 (2006); Fowler, D.M., *et al.*, *PLoS Biol.*, **4**, e6, (2006)など。

2) Zhang, Q. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 4752-4757 (2004); Bieschke, J., *et al.*, *Acc. Chem. Res.*, **39**, 611-619 (2006) など。

3) http://www.geocities.jp/japan_scripps/

うすい けんじ kusui@bio.titech.ac.jp





シンポジウム等会告

第 11 回生命化学研究会

～生命化学をシステムで捉えたら～

主催 日本化学会フロンティア生命化学研究会

会期 2008年11月28日(金)～29日(土)

会場 水上館 (群馬県利根郡みなかみ町小日向, TEL.0278-72-3221)

<http://www.minakamikan.com/index.html>

○タイムスケジュール:

11月28日(金)

13:30～17:00 招待/依頼講演(4件)

・細胞の極性を制御する遺伝子の個体での機能の解明

原田彰宏(群馬大学生体調節研究所)

・ヘムオキシゲナーゼの反応機構

齋藤正男(東北大学多元物質科学研究所)

・タンパク質配列に隠された内因性機能ペプチド、「クリプタイド(Cryptide)」

向井秀仁(京都薬科大学)

・核酸上での分子間相互作用を利用したシグナル変換

井原敏博(熊本大学大学院自然科学研究科)

17:00～18:00 ポスター発表(20件程度)

19:30～ 夕食(懇親会)

11月29日(土)

8:00～15:00 若手講演(14件)

●会費:参加登録費 8,000円, 宿泊費(食事代込) 12,000円 (当日徴収)

●交通情報:

・チャーターバスを利用する場合

行き 28日12:30発 [上毛高原駅(上越新幹線)→水上館]

帰り 29日15:10発 [水上館→上毛高原駅(上越新幹線)]

※乗車時間は約30分です。

・チャーターバスを利用しない場合

1. 路線バス〔運賃 600 円, 上毛高原駅(上越新幹線)ーJR 水上駅〕

時刻表 (<http://www.kan-etsu.net/>)

2. タクシー〔運賃 約 4,000 円, 上毛高原駅(上越新幹線)ー水上館〕

3. JR 上越線 (JR 水上駅発着)

時刻表 (<http://eki.joy.ne.jp/newdata/station/10446011.htm>)

※ JR 水上駅ー水上館は約 0.8km です。水上館に連絡すれば送迎車がでます。

参照 (<http://www.minakamikan.com/access/index.html>)

問い合わせ、連絡先：

〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1 群馬大学応用化学科棟 6F

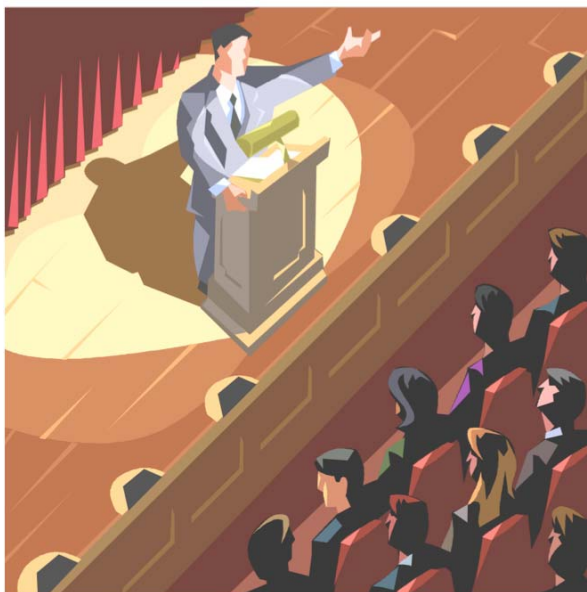
群馬大学大学院工学研究科 桑原正靖

Tel/Fax: 0277-30-1222

E-mail: kuwahara@chem-bio.gunma-u.ac.jp

第 11 回生命化学研究会・みなかみ 世話人

桑原正靖 (群馬大)・三原久和 (東工大)



第 10 回ペプチドフォーラム

“協奏分子としてのアルギニン:細胞・分子機能における普遍性・必然性とその応用“

主催：日本ペプチド学会

共催：日本薬学会、日本化学会

日時：平成20年11月7日（金）

会場：京都薬科大学（京都市山科区御陵中内町5）

塩基性ポリアミノ酸誘導体による核酸構造の動的制御と核酸ナノバイオへの応用（九大先導物質化研）丸山 厚

RNA結合ペプチドの合理的デザインとその生体機能制御への応用（東京学芸大教育）原田和雄

NMR法による構造及びダイナミクスの解析に基づいたアルギニンの標的認識機構の解明（横浜市大国際総合化学）片平正人

ソフトマター・生体系の粗視化シミュレーションと、ポリペプチドへの応用の可能性（金沢大理工学研究域）高須昌子

アルギニン修飾酵素の構造生物学的研究（横浜市大国際総合化学）清水敏之

アルギニンの蛋白質研究における役割：作用機序から応用まで（東大院新領域創成科学）津本浩平

アルギニンペプチドの細胞との相互作用のダイナミクス（京大化研）二木史朗

粒子界面におけるアルギニン素子のトポロジー制御に基づいた革新的送達システムの創製（京都薬大）小暮健太郎

詳細はHP（<http://www.kyoto-phu.ac.jp/labo/bukka/bukka-j.html>）をご覧ください。

問合せ先：〒607-8414 京都市山科区御陵中内町5

京都薬科大学 薬品物理化学分野 小暮健太郎

TEL 075-595-4663

E-mail: kogure@mb.kyoto-phu.ac.jp

酵素工学会 30 周年記念シンポジウム

主 催: 酵素工学会

酵素工学会は本年、創立 30 周年を迎えることができました。これもひとえに会員各位ならびに関係各位様のご支援の賜物と深く感謝いたしております。この区切りの年を記念し、「酵素工学会 30 周年記念シンポジウム」を本年 11 月 13 日(木)～14 日(金)、千葉県木更津市かずさアカデミアホールにおいて開催することとなりました。

本シンポジウムでは、中国・韓国から2名の先生方をお招きするほか、7題の講演を予定しております。また、このシンポジウムでは例年秋の講演会で開催しておりますポスターセッションに加え、若手のアピールのためのショートトーク等も企画しております。多くの方々のご参加を心待ちにいたしております。

シンポジウムの詳細に関しましては、下記をご参照下さい。

酵素工学会
会長 長棟輝行

日 時: 平成20年11月13日(木)13:00～14日(金)17:10

会 場: かずさアカデミアホール 202B 会議室(千葉県木更津市)

参加費(懇親会費込み): 15,000 円(本会会員)、18,000 円(非会員)、8,000 円(学生)

参加申込方法: シンポジウム参加ご希望の方は、参加申込書(酵素工学会 HP よりダウンロードできます。<http://wwwsoc.nii.ac.jp/enzyme/30th/30th.html>)に必要事項をご記入の上、郵送・FAX・E-mail(何れも可)にてお申し込み下さい。

会場アクセス: <http://wwwsoc.nii.ac.jp/enzyme/30th/access.html> をご覧下さい

プログラム

11 月 13 日 (木)

13:00	開会の辞
13:15～14:00	基調講演 土佐哲也(酵素工学会 名誉会員) 「酵素工学会の昔話」
14:00～14:30	記念講演 長棟輝行(東大院工) 「酵素を利用した蛋白質の部位特異的修飾技術の新展開」
14:30～14:40	コーヒーブレイク
14:40～15:40	ショートトーク(若手プレゼンテーション 5 名程)
15:40～17:25	ポスター内容フラッシュトーク(各 2 分程)
17:25～17:45	展示・企業内容プレゼンテーション
17:45～18:45	ポスターセッション、ミキサー
19:00～21:00	懇親会(於 オークラアカデミア宴会場)

11 月 14 日 (金)

9:00～9:45	記念講演(I) 浅野泰久(富山県立大工) 「有用酵素の新機能開拓と産業利用」
9:45～10:30	記念講演(II) 横関健三(味の素アミノサイエンス研/京大院農) 「企業からみた酵素工学の未来と展望」

- 10:30～10:45 コーヒーブレイク
- 10:45～11:30 招待講演 Hak-Sung Kim (KAIST, Korea)
「Activity-based Assay of Protease using Energy Transfer between Nanoparticles」
- 11:30～13:00 昼食 (委員・幹事総会)
- 13:00～13:45 招待講演 Cheng Jin (Institute of Microbiology, China)
「Glycosidase and glycosyltransferase in fungus *Aspergillus fumigatus*」
- 13:45～14:30 記念講演(III) 黒木良太(日本原子力機構)
「X線と中性子を用いて解析したヒト免疫不全ウイルスプロテアーゼ
ー阻害剤複合体の立体構造」
- 14:30～14:45 コーヒーブレイク
- 14:45～15:30 記念講演(IV) 橋本信一(協和発酵工業)
「in silico スクリーニングによるジペプチド合成酵素の発見とその応用」
- 15:30～16:15 記念講演(V) 近藤昭彦(神戸大院工)
「細胞表層工学の応用ー植物系バイオマスからのバイオエタノール生産」
- 16:15～16:25 平成20年度酵素工学奨励賞 授賞式
- 16:25～17:00 受賞講演 松浦友亮(阪大院情報科学)
「無細胞翻訳系を利用したタンパク質の機能改変に関する研究」
- 17:00～17:10 閉会の辞

申込み・問合せ先: 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町
京都大学大学院 農学研究科 応用生命科学専攻 発酵生理学研究室内
酵素工学研究会事務局
Tel・Fax 075-753-6462 E-mail enzyme@adm.kais.kyoto-u.ac.jp

編集後記

ここに生命化学研究レターNo.28をお送りします。私が編集委員として担当する研究レターは今回が2回目となりますが、今回も執筆者の皆様、そして編集委員の皆様のご協力もあり、何とか編集作業を終えることができました。重ねてお礼申し上げます。9月に第11回生命化学研究会シンポジウムとしてバイオ関連化学合同シンポジウムが開催されました。当日は、台風直撃で悪天候が予想されましたが、幸い、それほど天候も崩れず、無事終了しました。来年度の生命化学研究会シンポジウムは、昨年スイス・ローザンヌで開催されました日本-スイスケミカルバイオロジーシンポジウム(JSCB)の第2回会議として東京で開催されます(時期未定)のでふるってご参加ください。次号(No.29)は原田和雄さん(東京学芸大学)のご担当により2009年2月に発行を予定しております。読者の皆様からのニュースレターに対するご希望、ご指摘の声をお待ちしておりますので、編集担当(円谷、原田、井原)までご連絡をいただけたら幸いです。今後も、生命化学研究レターをよろしく願いいたします。

円谷 健
大阪府立大学大学院理学系研究科
(tsumu@b.s.osakafu-u.ac.jp)

編集担当
原田 和雄(東京学芸大学)
井原 敏博(熊本大学)