

生命化学研究レター

(2011年11月)

2. 巻頭言

日本のケミカルバイオロジーの今後を考える時期かもしれない

東京大学大学院理学系研究科 菅 裕明

4. 関連シンポジウム報告

第5回バイオ関連化学シンポジウム

大阪府立大学大学院理学系研究科 円谷 健

5. 研究紹介

5. 感染症の克服を目指した化学のアプローチ

東北大学大学院生命化学研究科 有本 博一

12. 小分子プローブを用いた In Cell 生体機能解析

九州大学大学院薬学研究院 王子田 彰夫

20. アルツハイマー病アミロイド β ペプチドを標的とした
人工タンパク質の構築

群馬大学先端科学指導者育成ユニット 高橋 剛

27. 論文紹介「気になった論文」

鹿児島大学大学院理工学研究科 畠中 孝彰

名古屋大学大学院生命農学研究科 児島 孝明

30. 留学体験記

カリフォルニア大学サンディエゴ校留学体験記

Michael D. Burkart Research Group, Department of Chemistry and
Biochemistry, University of California, San Diego 石川 文洋

39. シンポジウム等会告

第14回生命化学研究会～In-Cell Interaction を調べる・動かす・組み上げる～

編集後記

巻頭言

日本のケミカルバイオロジーの今後を考える時期かもしれない

東京大学大学院理学系研究科 菅 裕明

ケミカルバイオロジーは、今やひとつの大きな研究領域となった。1990年代初頭にスタートしたこの分野は、当時まだ確固たる領域名がないまま、化学と分子生物学の境界領域の研究として、化学側の研究者が「化学を武器(ツール)に分子生物学に切り込んだ」研究であった。そういった研究者たちからすると、自分たちがイニシャティブを取った研究は、いわゆる Biochemistry(生化学)とは異なる研究だという強い認識があった。当時、一般的な Biochemistry とは、あくまで分子生物学や生物物理学的手法を用いて酵素や核酸を研究する分野であったが、彼らの新研究は化学を武器に生物学に切り込むことで、生物学にパラダイムシフトを起こしたいという気概が多分にあった。

その主導的存在であった Schreiber らは、自らの研究を発表する場を求め、「Chemistry&Biology (C&B)」という研究誌を1994年(なんと17年前!)に開版する。その後、関連研究に対しケミカルバイオロジーという分野タームが付けられるが、実際にこの言葉が研究領域として認知され定着したのは、NIH がケミカルバイオロジーという名を NIH ロードマップに記載し、コンソーションとして組織的な取り組みが始まってからかもしれない(事実、それまでは NIH Study Section も関連研究を Medicinal Chemistry の一部として分類していた)。

一旦、ケミカルバイオロジーが研究領域として認知されると、分子生物学者や細胞生物学者が次々と参入、同時に生物物理学者・構造生物学者も参入することで、研究領域は大きな広がりもっていく。今や、研究論文中に化学式さえ出してくれば、ケミカルバイオロジーと呼ぶことさえもできる。さらには、老舗 C&B 誌に加え、ACS Chemical Biology、Nature Chemical Biology、ChemBioChem 誌等が加わることで研究者間の切磋琢磨が活発になり、研究者人口も増えて、ケミカルバイオロジー関連研究は量も質も年々高まっている。

日本のケミカルバイオロジーはどうだろう。生命化学研究会は、そもそも日本の古い「生体関連化学」とは一線を画した新進気鋭の研究者が集まることで、1998年に志をひとつに発足した(私は、まだ米国バッファローで研究室を持ったばかりで、最初のコアメンバーではないが)。しかし、日本のケミカルバイオロジーのイニシャティブは、その中心的役割を果たすはずだった生命化学研究会からではなく、むしろ古典的な天然物化学分野の研究者がとり、「ケミカルバイオロジー」研究会が発足、2008年に学会へと発展した。もちろん、政治力、その他の様々な要因があるので、誰があるいはどの団体がイニシャティブをもったか、それ自体は大して重要ではない。しかし、日本のケミカルバイオロジー研究のクオリティーが、世界のそれから水をあけられていると感じるのは私だけだろうか。実際、上記の研究誌に発表される論文の質がどんどん上がっている中、日本から発信される論文数は、多いとは言い難い。さらに、ケミカルバイオロジー領域で

一流の研究と認知(評価)されるためのハードルは年々高くなってきている。例えば、プローブ開発では、細胞を使った実験はもちろんのこと、個体を使った動物実験までもが必要になっている。化合物を用いた研究であれば、上記に加え、X線解析等でその機能メカニズムまでに迫ることを要求されるようになっている。これを研究予算が少ない、といったありきたりの言い訳で済ましてよいのだろうか。もう、化学をバックグラウンドとした従来の生命化学者だけでは、ケミカルバイオロジー研究をリードしていくことができない時期が来ているのだ。我々は、もっとアグレッシブに構造生物学や生物医学分野の研究者たちと交流し、その人々を取り込み(あるいはその人たちの研究に入り込み)、研究を進めなければならない時期に来ていると、私はひしひしと感じている。そしてまた、何よりも重要なことは、欧米研究者がした研究の追随やものまねではない、独自のアイデアで筋の通った(哲学のみえる)研究を着々と進めることである。今後のフロンティア生命化学研究会のメンバーにいつその奮起を期待すると同時に、切磋琢磨できる研究会であり続けて欲しいと切望する。

関連シンポジウム報告

第5回バイオ関連化学シンポジウム 第26回生体機能関連化学シンポジウム 第14回バイオテクノロジー部会シンポジウム 第14回生命化学研究会シンポジウム 第8回ホスト-ゲスト超分子化学シンポジウム

大阪府立大学大学院理学系研究科 円谷 健

2011年9月12日(月)から14日(日)の3日間にわたって、つくば国際会議場「エポカルつくば」(実行委員長:筑波大学大学院数理物質科学研究科 鍋島達弥教授)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日間で約560名におよんだ。本会では、特別講演1件、招待講演6件、口頭発表134件、ポスター発表267件の発表が行われ、いずれの会場でも、活発に討議された。また、以下に示す4名の若手発表者には講演賞が贈られ、懇親会にて賞状および副賞が贈呈された。次回の第5回バイオ関連化学シンポジウムは2012年9月6日~8日の日程で北海道大学にて開催される予定である。

高橋俊太郎 (東工大生命GCOE) 「mRNA配列情報で制御されたタンパク質合成のシングルターンオーバー解析」

荘司 長三 (名大院理) 「細菌由来シトクロム P450 の基質誤認識を利用するバイオ触媒系の開発」

檜田 啓 (名大院工) 「カチオン性色素会合を利用した光機能性DNAグルーの開発」

夜久 英信 (パナソニック先端研) 「擬似細胞核内環境下におけるアニオン性 G-quadruplex リガンドのテロメラーゼ阻害効果」



感染症の克服を目指した化学のアプローチ

東北大学大学院生命科学研究科 分子情報化学分野

有本 博一

(arimoto@biochem.tohoku.ac.jp)



1. はじめに

現在、私達の研究室は3つの領域について研究を進めている。内因性ニトロ化ヌクレオチドのケミカルバイオロジー^{1,2}、天然物合成、そして、多剤耐性菌に有効な抗菌剤の開発と作用解析である。本稿では感染症との闘いに絞って紹介したい。

バンコマイシンは、グリコペプチド系抗生物質の代表格である。多剤耐性グラム陽性菌感染症、とくに MRSA による院内感染症治療に欠くことのできない存在となっている。バンコマイシンの特徴は耐性菌が生じにくい点にもあるが、臨床応用が始まって50年が経過した最近では、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) や耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA) が問題となっている。私達は、過去14年間にわたり、バンコマイシン耐性菌に有効な化合物創製に取り組んできた。

バンコマイシンは、グラム陽性菌の細胞壁合成を阻害する。バンコマイシンが細胞壁合成中間体に D-Ala-D-Ala 末端を介して結合すると、中間体が細胞壁重合反応に充分供給されなくなる。これが、分子レベルの作用機序である。バンコマイシンファミリーを特定する呼称として Dalbaheptides があるが、これも結合様式に関係しており D-Ala-D-Ala Binding Antibiotic Heptapeptides が由来である。ファミリーには、100以上の天然化合物が含まれる。

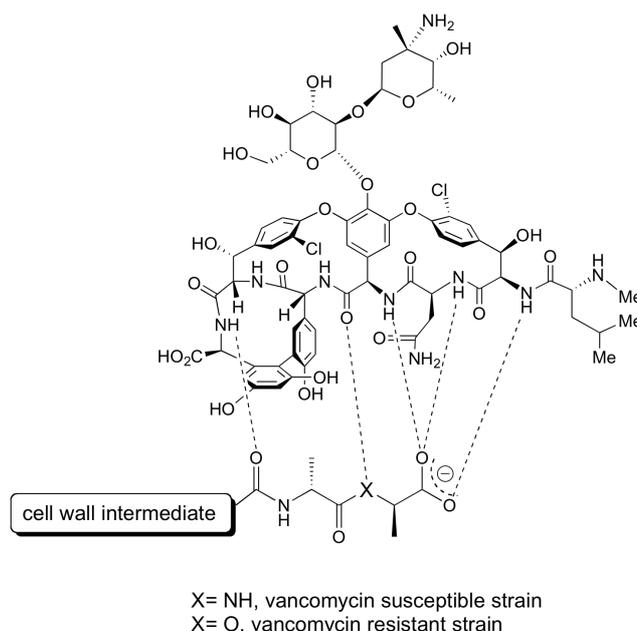


図1：バンコマイシンの化学構造、ならびに、細胞壁合成中間体との結合様式

バンコマイシン耐性には、主として二種類のタイプがあるが、本稿では VRE や VRSA に共通して見られ

る耐性様式に言及する。これらは、耐性の機構や程度によって、さらに数種のサブタイプに分類されており、臨床上問題となるのは VanA や VanB のサブタイプである。これらサブタイプの VRE や VRSA では、細胞壁の構成成分であるペプチドグリカン合成中間体の末端が、D-アラニル-D-アラニン(D-Ala-D-Ala)からD-アラニル-D-乳酸(D-Ala-D-Lac)に変化する(図1)。D-Ala と D-Lac の化学構造は似通っているが、バンコマイシンとの間で形成される水素結合数が減少するため、バンコマイシンと耐性菌ペプチドグリカン中間体とのアフィニティーは 1000 分の1程度に低下する。アフィニティー低下の結果として抗菌活性が失われる。細胞壁構造がこのような変異を起こす為には複数の酵素が必要であって、最初のバンコマイシン耐性菌出現まで30年間がかかった原因のひとつと考えられる。

バンコマイシン耐性克服を目指した基礎化学分野の取り組みは、「耐性菌の D-Ala-D-Lac 型中間体にも結合する化合物」の探索に集中しており、多くがアメリカ化学会誌を通じて発表されている。一方で、製薬企業の取り組みは異なっており、主として2種に大別される。一つはバンコマイシン(細胞壁合成に作用)と全く違う作用機序(タンパク質合成阻害)をもつ抗生物質を探ることであり、もう一つはバンコマイシンに脂溶性の置換基を導入するというアプローチである。前者はリネゾリドやチゲサイクリンが成功例であり、後者はテラバンシン(図2:2009年 cSSSI に対して米国, カナダで承認;2011年 欧州で MRSA に起因する肺炎に対して承認)などのリポグリコペプチドにあたる。テラバンシンは、*in vitro* においては VRE に抗菌活性を示すものの、薬剤としては VRE 感染症を主対象としていない。効果に不十分な点があると予想される。いずれにしても、基礎化学分野と、実際の創薬の方向性はかなり解離した状態にある。

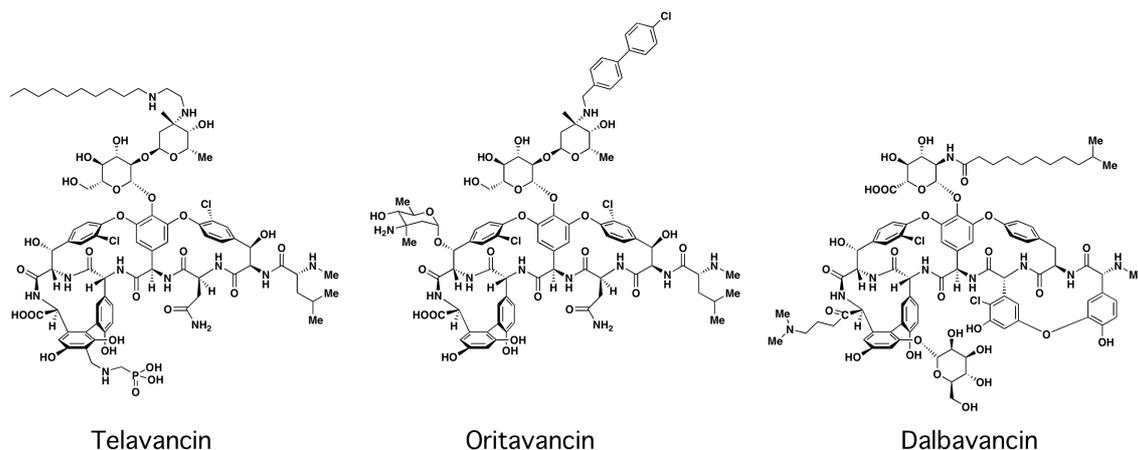


図2：バンコマイシン骨格に脂溶性置換基を導入したリポグリコペプチド

私達の研究も、当初はバンコマイシン耐性菌の D-Ala-D-Lac モチーフに結合する分子という発想でスタートしたが、最近では両者のアプローチを比較しながら研究を進めている。次項では、私達がこの分野に参入した経緯を説明したい。

2. 若いころ本当に困って考えたこと：バンコマイシンを重合しよう！

私は、1994年秋、慶大院を中退して静岡大学理学部化学科助手に採用された(奥村保明研究室)。静大は大講座制で、奥村先生が退官されるまでの1年半を自由にさせていただいたが、私はどうやって研究で暮らしを立てていくか思い悩む日が続いた。学位は天然物全合成で取得したけれども、出身研究室の環境と静大の状況は大きく異なり、同じような研究のアプローチが適さないことは明らかであった。これでは、やがて干上がってしまう。お金がかからず、時間がかからず、学生さんにも同業の先生方にも喜んでもらえ

るテーマが是非とも必要だった。

そんなとき、諸先生にお骨折りいただいてペンシルバニア大学化学科の Amos Smith, III 研究室に留学することになった。Smith 教授は、尊敬する天然物合成分野の大家であるが、私の問題意識は日本での新規テーマ企画立案に集中していた。幸いなことにペンシルバニア大学では、頻繁にセミナーが開催され刺激を受けることができた。米国の研究室は境界領域との交流が盛んで、発想に自由度が感じられた。ある日、ウィスコンシン大学の Laura L. Kiessling 教授のセミナーがあり、メタセシス反応を用いた糖多価ポリマーの合成に触れて大変な衝撃を受けた。Kiessling 教授は、糖のポリマーが「マルチバレント効果」によってレクチンと相互作用することを述べられた。私はとても単純に、帰国したらバンコマイシンのポリマーを合成しよう！とその場で思った。バンコマイシンに重合性官能基を導入し、重合すれば良い。最短で2段階の合成ですむ。バンコマイシンは市販されていて、頑張れば買うこともできる。まさに私にぴったりである。

バンコマイシンは、バクテリアの細胞壁原料(リピド中間体)に結合する。マルチバレント効果で相互作用を強化したらバンコマイシン耐性菌にも効くかもしれない(=D-Ala-D-Lac にも結合するかも知れない)。また、運悪く「効かない」としても、論文化できる成算はあった。当時は、Grubbs メタセシス反応が出始めたところで、複雑な官能基をもつ化合物への応用例に興味が集まっていた。メタセシスを使ってバンコマイシンを重合できれば、それだけで OK だろうとも思った。そこで、効くか効かぬかの博打にでることにした。

ペンシルバニア大学化学科の図書館には、バイルシュタイン Crossfire などオンライン検索の環境が整っており、深夜まで自由に利用できた。1997 年当時、静大には気軽に使えるオンライン検索の環境は整っておらず、冊子体のケミカルアブストラクトさえ、近所の静岡県立大学図書館へ出向かないと利用できなかった。米国の環境に感謝しながら、ポスドクとしての研究の傍らで、過去のバンコマイシン研究を調べ上げて帰国した。

1年間の留学期間中、静大の先生方には色々とお世話になった。特に、教養部から改組で移動してこられた上村大輔先生(現 神奈川大)には留守中の研究室を預かっていただき強力な支援をいただいた。私が帰国する前に上村先生は名大へ異動されたが、帰国後のバンコマイシンプロジェクトにも黙って援助して下さいました。企画した通り2工程でバンコマイシンのポリマーは合成できたが、2名の学生の努力と1年半の時間が必要であった。

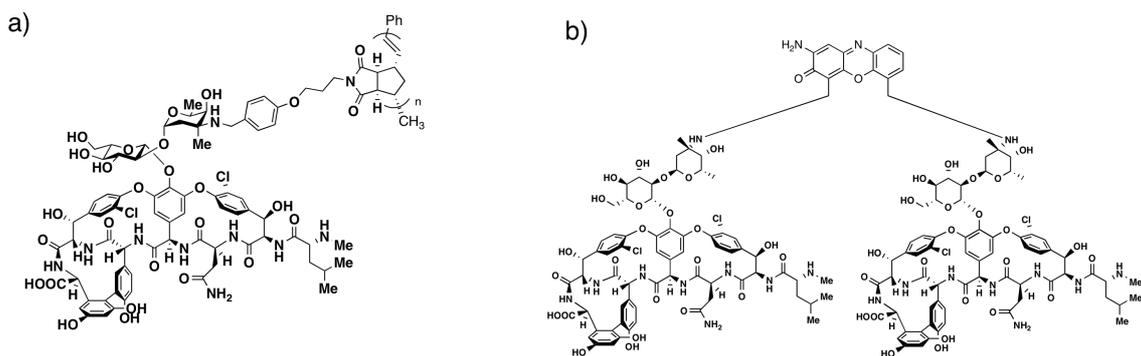


図3：バンコマイシンポリマー (a) とバンコマイシンダイマー(b: Van-D-08)

合成が終わってから困ったことは、抗菌活性を評価していただける場所がなかなか見つからなかったことである。当時、幾つか製薬会社にも相談したが、バンコマイシン耐性菌を保有していて評価が可能という答はなかった。友人のつてをたどって、面識もなかった荒川宜親先生(国立感染症研)に無理を申し上げ評価して頂いた。そして、第一回目に持参したサンプルのなかにバンコマイシン耐性菌に効果を示す化合物が

含まれていたのである³。感染研のお仕事を、そう何度もお邪魔するわけにもいかなかった。効かない場合を覚悟していたとはいえ、もし本当に抗菌活性がなければ今どうしていただろうか。私は本当にラッキーだったと思う。

バンコマイシン耐性菌の克服は、文字通り重要な課題であり、私のまぐれ当たりの成果も暖かく評価して頂いた。自前で研究費もいただけるようになり、自立して研究室が運営できる基盤ができた。

3. デッドエンドを回避できるか？

世に創薬を目指すと標榜する大学の研究室は多い。万に一つとも言われる医薬の成功確率だから、威勢良く研究費がとれても尻すぼみになるのが大勢だ。しかし、私もバンコマイシン耐性菌に有効な薬を作りたいと標榜した以上は、覚悟して取り組まなくては詐欺になると感じていた。

私達のビギナーズラックの産物である「バンコマイシンポリマー」は、重合分布をもつ混合物である(図3)。今後、薬効をどんなに上げても、組成が確定していない混合物が薬として認可される可能性は著しく低いだろう。また、ポリマーが何故効くのかを説明せず、当てずっぽうに化合物を合成しても、抗菌活性を測るだけになる。長い目で見て、これではサイエンスにならない。苦渋の選択であったが、愛着のある自らの成果に見切りを付けることにした。

この頃(2001年頃)、Griffinら(1996年)によって先導されたバンコマイシンダイマーの研究が耐性菌に効くかもしれないと注目を集めていた。大教授が主宰する複数の研究室も後を追った。ポリマー研究を断念した私は大変悩んだ末、最後尾になるのを覚悟の上でダイマー研究に参入することにした。その一番の動機は、作用機序研究にあった。先行論文はダイマーと D-Ala-D-Lac への結合をほのめかすが、細菌において起こっているのか、誰も検討していなかった。どの論文も VRE に対して、*in vitro* でほどほどの抗菌活性を示して終わっている。実際の動物モデルにおいて治療効果が出るのか否かという一番重要な点についても全く論文が発表されていなかった。ポリマーと違って純物質が入手できるダイマーを使い、誰も手を付けられない作用機序研究を進めていけば、いつか再びポリマーが理解できる日がくるかもしれないという気持ちもあった。

私達は参入に当たって、抗生物質アクチノマイシンとバンコマイシンのハイブリッドという発想で、新規バンコマイシンダイマーの合成を行なった(図3b)。天然物屋らしいデザインと、合成工程の短縮化を念頭においた結果である。合成は保護基を必要としない2工程で達成できた。得られたダイマーは、*in vitro* で VanA 型 VRE に抗菌活性を示した。さらに、肺炎球菌肺感染マウスに対しても顕著な治療効果を示し、動物実験で細菌感染症に治療効果を示す最初のバンコマイシンダイマーとなった⁴。また、ダイマーの合成中間体として調製したモノマー Van-M-02(図4)が思いがけぬ優れた作用を示した⁵。本化合物周辺で特許が得られたこともあって、研究の幅は大きく広がった。

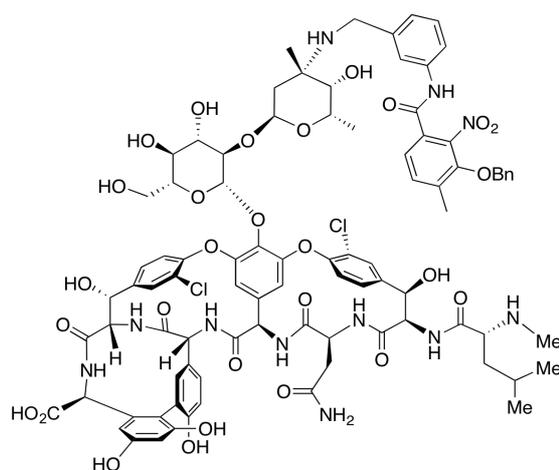


図4：耐性菌に有効なモノマー誘導体 Van-M-02

4. モノマー誘導体とダイマー誘導体：作用機序を研究するには

研究室オリジナルの活性物質が多種合成できるようになったので、次に分子レベルでの作用機序解析を行なって、より合理的な薬剤設計指針につなげたいと考えた。かねてから脂溶性置換基をもつモノマー誘導体 (Van-M-02) とダイマーは、全く異なる機構で抗菌作用を示していると考えており、それを証明したかった。

抗菌活性は、複数の現象の総体であるから、問題を詳しく分割するの必要を感じていた。実験的根拠がない中で、モノマー、バンコマイシンダイマー共に耐性菌の細胞壁合成に作用すると考える化学研究者が多かったので、この点から確認を始めることにした。作用機序解析には、主に以下の課題がある。新規の評価系を作りながら、これらを順に解いていく必要があることがわかった。

- 0) バンコマイシン耐性菌の細胞壁合成が私達の化合物によって阻害されているとしても、それが細菌の死に直接つながっているかどうか？ (現在も不明)
- 1) バンコマイシン耐性菌の細胞壁合成に影響を与えるか？
- 2) 多段階からなる細胞壁合成反応の、どの段階に薬剤が影響を与えるか？ (in vitro 評価系必要)
- 3) 抗生物質の主要ターゲットであるペプチドグリカン重合反応に与える影響は？

このうち、最も本質的な問題は0)である。細菌の細胞死に関わるシグナル経路の完全解明が必要と思われるので、当面、私達の手に負えない。そこで、項目1)から順に解析を始めた。モノマー (Van-M-02) とダイマーを用いて、放射性同位体標識した化合物を使う確立された手法で調べたところ、モノマー、ダイマーともに VRE の細胞壁合成を阻害することが確認できた^{5,6}。

細胞壁合成は、非常に多段階の過程であるから、薬剤が作用する過程を特定するためには適切にデザインされた評価系が必要となる。細胞壁合成の最後段にあたるペプチドグリカン重合過程は細菌細胞膜上で進行し、細胞膜画分を使った試験管内での再現が可能であることに着目した。黄色ブドウ球菌細胞膜画分を調製し、ここに細胞壁の前駆体となる UDP-MurNAc-ペンタペプチドを加えると高分子量のペプチドグリカンが生成する。さらに工夫を加えるとバンコマイシン耐性菌の細胞壁合成を再現することもできる。バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA) と VRE は、同一の前駆体 UDP-MurNAc-デプシペンタペプチドを利用するので、VRE から前駆体を単離して本評価系に用いると VRSA の細胞壁合成が再現できる (図5)⁵。

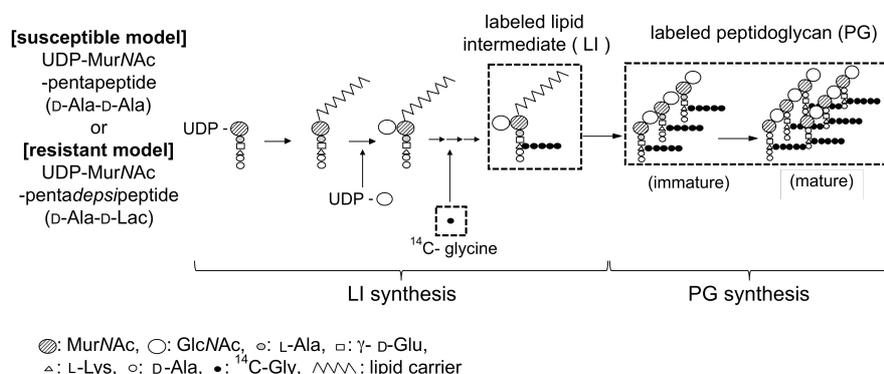


図5：黄色ブドウ球菌細胞膜を粗酵素とする *in vitro* ペプチドグリカン合成^{5,6}

モノマー誘導体 Van-M-02 は、図5の LI synthesis と PG synthesis の両方を同程度の濃度で阻害したが⁵、ダイマーは PG synthesis をより選択的に阻害することが分かった⁶。モノマー、ダイマー誘導体は共通してバンコサミン部位に修飾が入っているため実は同じ作用機序ではと疑う声も存在したが、作用機序に違いがあることを実験的に示すことができた。

図5の PG synthesis は重合過程である。黄色ブドウ球菌においては PBP2 と呼ばれる酵素が主要な役割を果たすと考えられている。PBP2 にはトランスグリコシラーゼ、トランスペプチダーゼという2つのドメインがあり、2つの反応によって網目状のペプチドグリカンが合成される。今後はダイマー誘導体が、これらの過程を阻害する機構を明らかにしたいと考えている。

PBP2 に絞って薬剤作用の解析を行なうには、上記の細胞膜画分を用いた評価系では限界がある。精製された PBP2 と酵素基質とを用いたシンプルな系での解析が望ましい。黄色ブドウ球菌由来 PBP2 の発現精製法が、2005 年に報告されたので、早速それに倣って調製した。一方、酵素基質の Lipid II 中間体は、細菌培養液からの精製が難しいので、全合成によって供給する必要がある。私達は、すでにバンコマイシン感受性菌の Lipid II (D-Ala-D-Ala 末端)、バンコマイシン耐性菌の Lipid II (DAla-D-Lac 末端)ともに全合成を達成し(未発表)、評価系の構築を進めている。今後、分子レベルでの詳細な知見が得られるものと期待している。

5. 合成化学の進歩を取り入れたバンコマイシンの新規化学修飾

利潤を追求する気のないアカデミアであっても、創薬を目指すにあたり特許の取得は避けて通れない。最初に知財を保護しないと、仮に研究が成功しても実用化に取り組んでもらえる企業を探すことが難しいからである。バンコマイシン類縁体は、すでに多くの特許出願がされており、権利が複雑に入り組んでいる。私達は20世紀には合成できなかった新規骨格に誘導することによって、この問題を回避しようと考えた。1998 年、Ar-Cl に対する鈴木カップリング反応が報告されたのを契機に検討を重ね、バンコマイシン骨格の修飾を行なった⁸。一部の化合物は良好な抗菌活性を示しており、今後さらに合成を進めてゆく予定である。

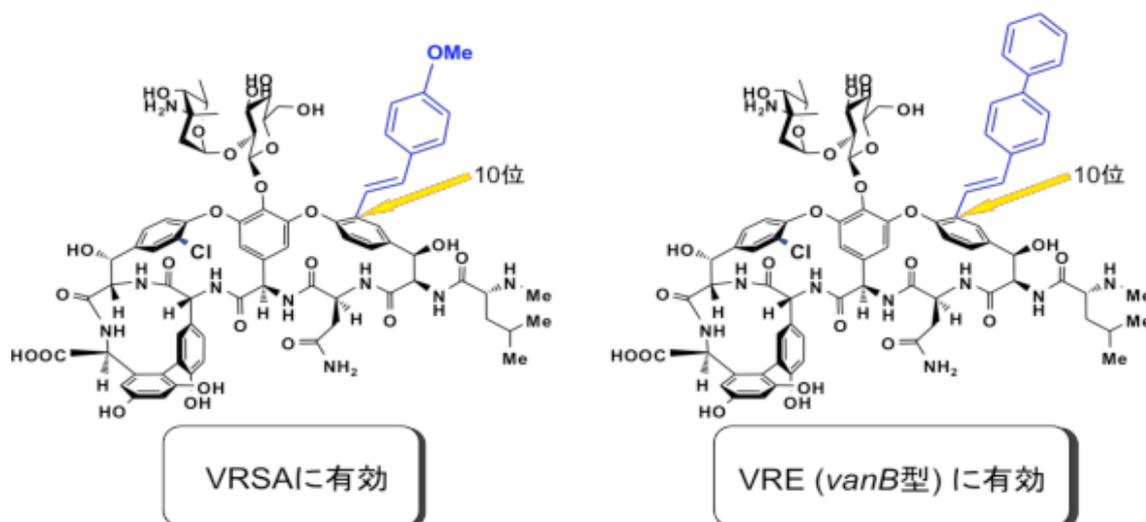


図6：Ar-Cl部のクロスカップリング反応を用いた新規モノマー誘導体合成

6. まとめ：現在の到達点

本稿ではバンコマイシン耐性の克服に向けた当研究室の取り組みについて述べた。耐性度の高い VanA 型のバンコマイシン耐性菌に対して治療効果を示すモノマー、ダイマー誘導体の創出に成功するとともに、

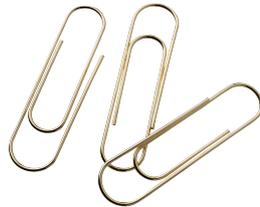
バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA) の細胞壁合成に対する阻害効果を評価できる *In vitro* の実験系を立ち上げた。当面の目標は、モノマーとダイマーの作用機序の違いを解明することにある。

バンコマイシンダイマーは、モノマー誘導体と異なってペプチドグリカンの重合過程を選択的に阻害している可能性が高い。重合過程を構成するトランスグリコシレーション (TG)、トランスペプチダーション (TP) 過程のうち、TG 過程阻害を主作用としている医薬品はないので、ダイマーの作用機序を解明すれば新しい創薬のヒントが得られると考えている。

以上の研究は、静岡大学、名古屋大学、東北大学の学生諸氏、ならびに、塩野義製薬株式会社創薬・疾患研究所の共同研究者によってなされたものであり、紙面を借りて深く感謝したい。

参考文献

1. Sawa, T. et al., *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 727-735.
2. Saito, Y. et al., *Chem. Commun.* **2008**, *45*, 5984-5986.
3. Arimoto, H. et al., *Chem. Commun.* **1999**, 1361-1364.
4. Lu, J. et al., *Chem. Commun.* **2007**, *44*, 251-253.
5. Miura, K. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 960-962.
6. Yoshida, O. et al., *MedChemComm* **2011**, *2*, 278-282.
7. Barrett, D. et al., *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 2215-2217.
8. Nakama, Y. et al., *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2528-2533.



小分子プローブを用いた
In Cell 生体機能解析

九州大学大学院薬学研究院

王子田 彰夫

(ojida@phar.kyushu-u.ac.jp)



はじめに

生体分子の機能を生きた細胞内において解析する蛍光バイオイメージングをはじめとする様々な in cell 解析技術は、これまでに分子レベルでの生命機能の解明に大きく貢献してきた。これらの解析技術を駆使して、未知の生命現象の解明を実現するためには、ハードとしての蛍光顕微鏡などの光学分析機器の発達と共に、ソフトとしての分子プローブの開発が重要である。例えば、これまでに細胞内のカルシウムイオンや活性酸素種 (ROS), NO, 水素イオン (pH) などの生理的に重要な分子種を細胞内で検出可能な蛍光プローブ開発が精力的に行われ、細胞機能を解明するツールとして、すでに実用化されている。これらのプローブは、現代の優秀な化学者が生み出した珠玉のケミカルツールの数々である。しかしながら、これらのプローブ開発は、(検出し易くかつ重要な)ほんの一部の生体成分を対象とした成功例にすぎない。すなわち、各々の生命現象に関わる多様な生体分子に目を向け、生体機能解析のための小分子プローブのレパートリーは現状において大きく不足していると考えれば、プローブ開発研究の潜在的な可能性と必要性は大きく広がる。一方、生命現象の主役といえるタンパク質の機能解析を行う上においても、小分子プローブは有用なケミカルツールである。近年、タンパク質の機能解析技術は大きな発展をみせており、蛍光によるバイオイメージングのみならず、ESR, ^{19}F -NMR などの多様なモダリティの応用が可能となっており、生きた細胞そのままでのタンパク質機能を探る術(すべ)はますます拡大しつつある。この技術の発展に適切に対応するためには、研究対象としうる細胞内の特定のタンパク質に対して、高いラベル化の特異性を発揮する小分子プローブおよびラベル化技術の開発が重要となる。本小論では、これまでに著者らが展開してきた生体機能解析のための新しい機能性小分子プローブの開発とその In Cell 機能解析について紹介する。

蛍光プローブによる細胞内 ATP の可視化

アデノシン三リン酸 (ATP) は、細胞内に最も豊富に存在するヌクレオシドポリリン酸の一つである。その機能は多岐にわたり、生命共通のエネルギー源や酵素基質としてのリン酸供給源としての役割のみならず、プリン受容体に作用するシグナル伝達物質としても重要である。細胞内 ATP の蛍光による検出は、これまでにタンパク質をベースとしたバイオセンサーがいくつか報告されている。例えば、今村、野地らは、2009 年に ATP 合成酵素由来の ATP 結合部位と二種類の蛍光タンパク質を融合させて FRET 機構で ATP を検出するバイオセンサー ATeam を報告している¹。一方で、小分子プローブを用いた細胞内 ATP の検出は、著者らが研究報告を行った 2008 年の時点において全く報告されていない状況にあった。著者らは、2000 年前半より翻訳後修飾により生じるリン酸化タンパク質を検出する蛍光プローブの開発を進め、ジピコ

リルアミン (Dpa) をリガンド部位として有するアントラセン型の二核亜鉛錯体がリン酸化タンパク質やリン酸化ペプチド上のリン酸基に結合し蛍光を増強させる蛍光センサー分子として機能する事を報告した²。著者らは、この研究を発展させていく過程において、キサンテンを蛍光団として有する二核の亜鉛錯体 **1** が、ATP などのヌクレオチドポリリン酸に対する優れた蛍光センサー分子であることを見出した。プローブ **1** は、中性の水溶液中ではほとんど無蛍光であるが、ATP と相互作用することにより蛍光強度を 30 倍以上大きく増加させる OFF/ON 型の蛍光センサーである(図1)。また、**1** は、ATP や ADP などに対しては蛍光応答するが、単純なモノリン酸である AMP や無機リン酸、あるいはリン酸化ペプチドなどの他のリン酸アニオン種に対して蛍光応答を示さず、ヌクレオチドポリリン酸種を選択的に検出可能な蛍光センサー分子である。

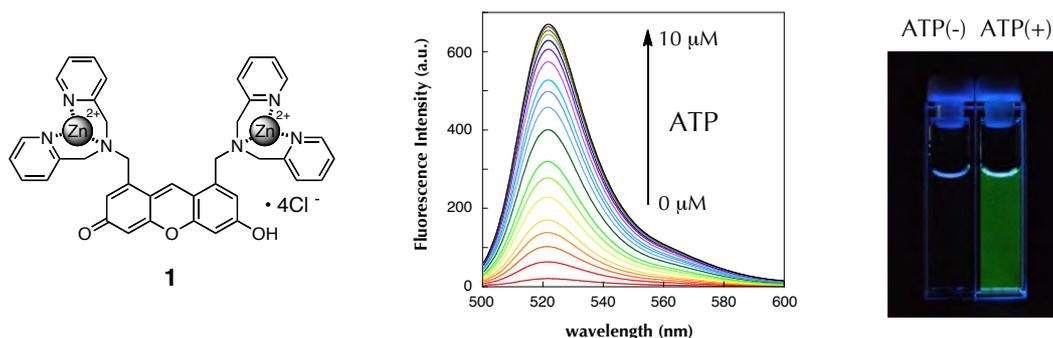


図1. ATPを検出する蛍光プローブ**1**の構造とセンシング機能

プローブ **1** の蛍光センシングのメカニズムについては、X 線結晶解析や様々な分光学的測定によって、図2に示すキサンテン環共役構造の再形成であることを明らかとした³。すなわち、**1** は初期状態では二つ

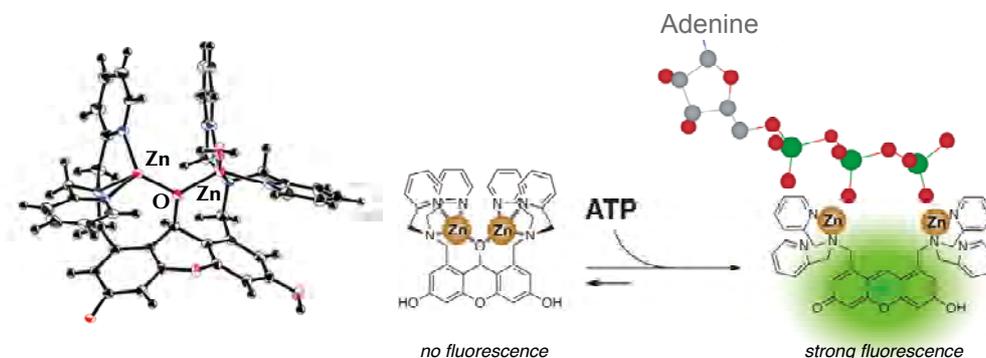


図2. 蛍光プローブ**1**のATP センシング機構

の亜鉛イオンに架橋配位した水分子がキサンテン環 9 位と形成しているために共役構造が切断され無蛍光状態にあるが、ATP と結合することにより配位水の結合が切断され、本来の共役構造を再形成して蛍光を回復するという、これまでに先例のない興味ある蛍光センシングメカニズムを有している。細胞膜透過性を有する **1** のジアセチル体 **4** を Jurkat 細胞内へと導入すると、キサンテン由来の蛍光を強く発する顆粒状の構造体の存在が観察された(図3)。この構造体は、ATP を非常に高濃度で含む ATP 顆粒(数百 mM に達すると言われている)であることが、弱酸性の ATP 顆粒に蓄積し発光することが知られているキナクリンとの同時染色実験などにより明らかとなった。この結果について著者らは、**1** が顆粒内の高濃度 ATP と相互作用することで、顆粒内に蓄積、蛍光 ON 状態となり、ATP 顆粒の蛍光可視化を可能にしたと考えている。

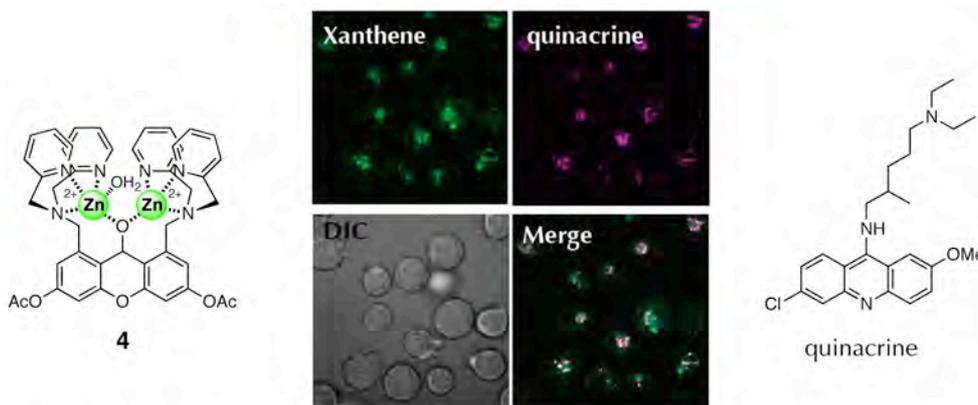


図3. 蛍光プローブ4を用いたJurkat細胞内ATP顆粒の検出

著者らは最近、**1** の機能をさらに改良し、定量的検出に優れた二波長型のレシオ蛍光変化により ATP を可視化可能な **5** の開発に成功した(図4)⁴。**5** は、キサントンおよびクマリンの二つの蛍光団を有しており、ATP などのヌクレオシドポリリン酸との結合に伴って、FRET 機構に基づいてクマリン由来の蛍光を減少させ、キサントン蛍光を上昇させる二波長レシオ型のセンシング機能を持つ。細胞イメージング実験に先だて、**5** が細胞内疑似環境下において ATP 濃度の変動をレシオ変化により検出できるか否かについて検討を行った。

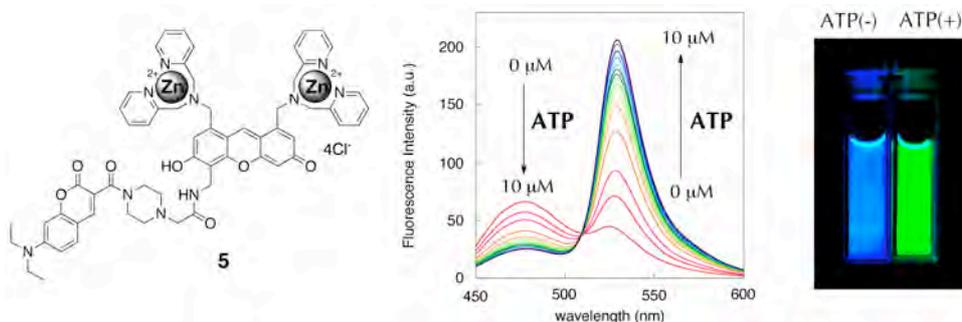


図4. 蛍光プローブ5によるATPの二波長レシオ検出

細胞内の平均的な ATP 濃度は 2~3 mM と報告されている。この濃度領域において、ATP と ADP の存在比を変化させると **5** の蛍光レシオ値が直線的に変化することが明らかとなった(図5)。

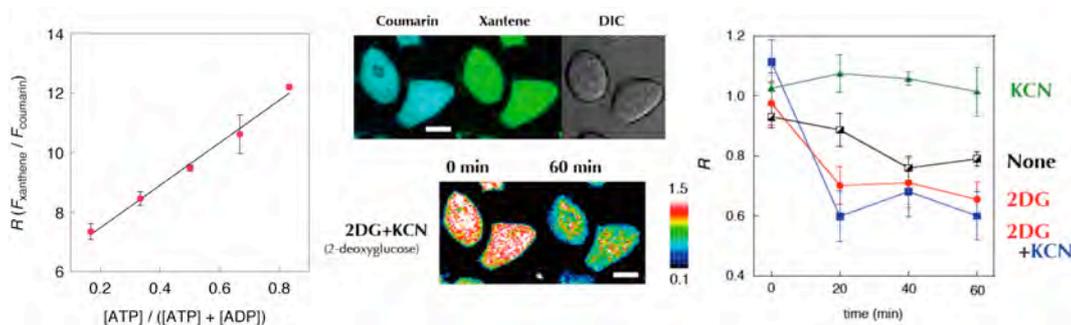


図5. 蛍光プローブ5による細胞内ATPの検出

このレシオ値の変化は、**5** が ATP および ADP に対して異なる感度でレシオ応答することによって由来する。**5** を細胞膜透過性を有するジアセチル体へと誘導後、HeLa 細胞(この場合には ATP 顆粒を有していない)に

導入すると、細胞質全体に **5** 由来の蛍光が観察された(図5)。この状態から ATP の産生を阻害する KCN (酸化的リン酸化阻害)や 2-デオキシグルコース(2-DG、解糖系阻害)を添加すると、**5** の蛍光レシオ減少により、細胞内 ATP 量の減少を捉えることに成功した。本研究は、細胞質内の ATP 濃度の変化を小分子プローブにより捉えた初めての例である。また著者らは、細胞の種類に応じて KCN と 2-DG による阻害効果に違いが表れることを明らかとしている。例えば HeLa 細胞では、2-DG を添加して解糖系を阻害することにより細胞内 ATP 濃度が有意に減少するが、KCN による酸化的リン酸化阻害に対してはほとんど応答しない。一方、HEK293 細胞や NIH3T3 細胞では、2-DG および KCN 添加に対して共に ATP 濃度減少の応答を示す。すなわち **5** を用いることで、細胞が酸化的リン酸化と解糖系のどちらに主に依存してエネルギー産生を行っているかを評価でき、細胞それぞれのエネルギー産生や代謝に関する知見を蛍光イメージングにより簡便に得ることが可能である。ドイツの生理学者でありノーベル賞受賞者でもあるオットー ワールブルグ (Otto Heinrich Warburg, 1883-1970) は、80 年以上も前に、「がん細胞では酸化的リン酸化によるエネルギー産生が低下し、細胞質における嫌気性解糖系を介したエネルギー産生が増加している」という説を提唱した。このワールブルグの説は、今日においても支持され続けており、近年では特にこのがん細胞での特異的なエネルギー代謝経路を標的とした抗腫瘍薬の開発が進められるなど、再び脚光を浴びつつある⁵。今後、著者らの開発した蛍光プローブが細胞代謝の状態を可視化するための分子ツールとして広く用いられることを期待したい。

小分子プローブによるタンパク質ラベル化法の開発

いうまでもなくタンパク質は、多くの生体機能に関わる最も重要な生体分子である。本小論の冒頭に述べた様に、小分子プローブによるラベル化は、蛍光、ESR、¹⁹F-NMR など多彩なモダリティでのタンパク質機能解析を可能とする優れた解析アプローチである。一方、小分子プローブによるラベル化により光応答性を有する小分子をタンパク質へと導入すれば光刺激によるタンパク質機能の人工制御なども可能となる。このように小分子プローブを活用してタンパク質の機能解析あるいは機能改変(エンジニアリング)を行うためには、プローブを標的タンパク質に対して選択的に、そして、より好ましくはタンパク質上の特定部位に選択的に導入できるラベル化技術が必要となる。これまでに著者らは、このような特異的ラベル化を可能にする手法として、タンパク質に導入する短い特殊なペプチドタグ配列と、これと特異的に相互作用する小分子プローブの組み合わせによるラベル化の開発を行ってきた(図6)。タグ・プローブのペアによるタンパク質のラベル化は、

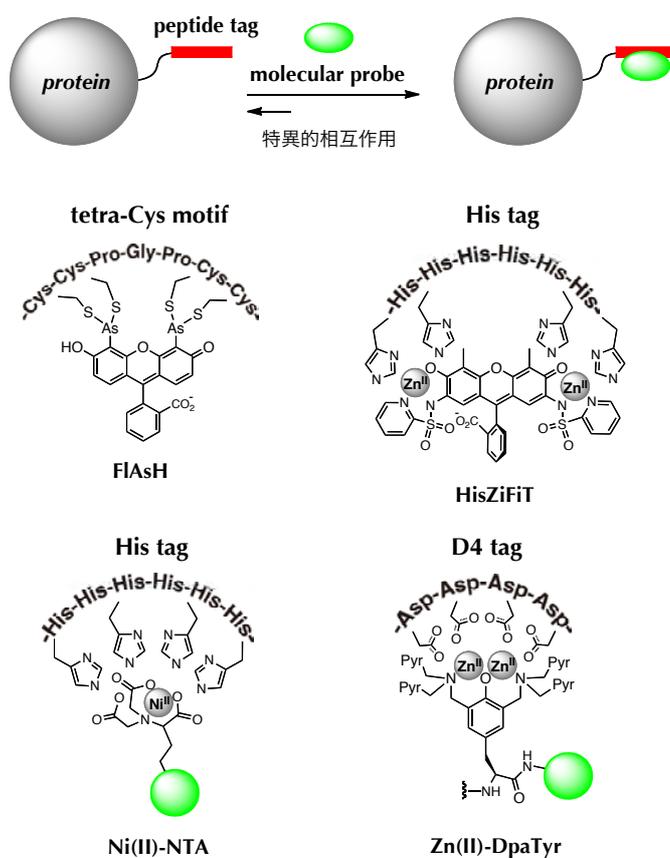


図6 タグ・プローブペアを用いたタンパク質の特異的ラベル化法

1) 様々な機能と特性を有するようにデザインしたプローブ分子をタンパク質に自在に導入できる、2) タグおよびプローブの分子サイズが GFP などのタンパク質ベースのラベル分子に比して小さく、ラベル化によるタンパク質機能の阻害を最小限に抑えることができ

る、3) 時間的(任意のタイミング、回数)あるいは空間的(細胞内外あるいはオルガネラ選択的など)に制御した形でのラベル化が可能であるなど優れた特性を有する。しかし、特異的に強く相互作用できる一対のタグ・プローブのペアを新たに見出すことは容易ではなく、その開発はこれまでにわずか数例に限られている。タグ・プローブペアをタンパク質の蛍光バイオイメージングへ応用した先駆的な報告は、Roger Tsien らによるテトラシステインループ(Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys)と呼ばれるタグと FIAsh と呼ばれる有機ヒ素系の蛍光プローブの組み合わせである(図6)⁶。両者相互作用は極めて強く(K_d にしてピコモラーレベル)、これまでに細胞内外におけるタンパク質の蛍光イメージングへの応用が報告されている。しかしながら、このペアは FIAsh プローブの細胞内チオール分子との非特異相互作用に基づくバックグラウンド蛍光などがあることなどから、使いこなすことが実際に難しいと言われている。一方、ヒスチジン連続配列である His タグ(His6 または His10)は、発現タンパク質のアフィニティー精製のタグとして、従来より広く用いられているが、このヒスタグを応用したタンパク質ラベル化法も報告されている。例えば、Vogel⁷や Piehler⁸らは、それぞれ独立にヒスタグに対して特異的な親和性を持つ Ni(II)-NTA 錯体との組み合わせを利用した膜受容体の蛍光バイオイメージングを報告している。また Tsien らは、Ni(II)-NTA 錯体の持つ蛍光消光能と細胞毒性を回避するために、ヒスタグに対して高い親和性を持つ新しい亜鉛錯体 HisZiFiT の開発を報告している⁹。

著者らは、新しい「ペプチドタグ・小分子プローブペア」の一つとして、連続アスパラギン酸配列からなる D4 タグ (DDDD)と二核亜鉛錯体プローブ Zn^{II}-DpaTyr のペアを見出している(図7)¹⁰。

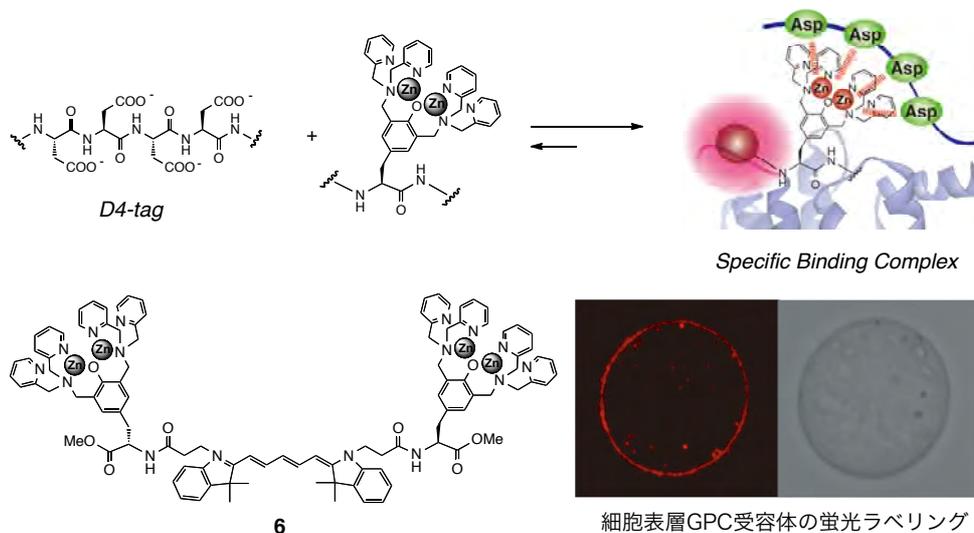


図7 D4タグ・Zn(II)-DpaTyrプローブペアによる細胞表面タンパク質のラベリング

初期のモデルペプチドを用いた研究から、D4 タグペプチド(DDDD)と Zn^{II}-DpaTyr プローブとの相互作用は K_d にして 1 ~10 μ M 程度であることを明らかとした。このペアの親和性をさらに向上させるため、D4 配列を連続させた D4x2 タグ配列(DDDDGDDDD)と二つの Zn^{II}-DpaTyr を連結させたダイマープローブのペアをデザインしたところ、両者の相互作用は K_d にして数十 nM という非常に強い親和性を有することが明らかとなった。著者らは、この強い相互作用を利用して、蛍光プローブ 6 を用いて細胞表面での G タンパク質共役型受容体(GPCR)の蛍光可視化に成功した¹⁰。しかしながら、D4 タグと Zn^{II}-DpaTyr を用いたタンパク質のラベル化法は、タグとプローブ間との可逆的な金属-配位子相互作用を利用しているため、蛍光標識は時間の経過に伴って徐々に減弱し、また、ウェスタンブロットティングなどのラベル化後解析など

を行うことも困難であり、解析ツールとしての応用には限界がある。この問題を克服するために著者らは、ペプチドタグと小分子プローブとが共有結合により連結される新しいラベル化手法(リアクティブタグシステム)の開発を行った(図8)¹¹。

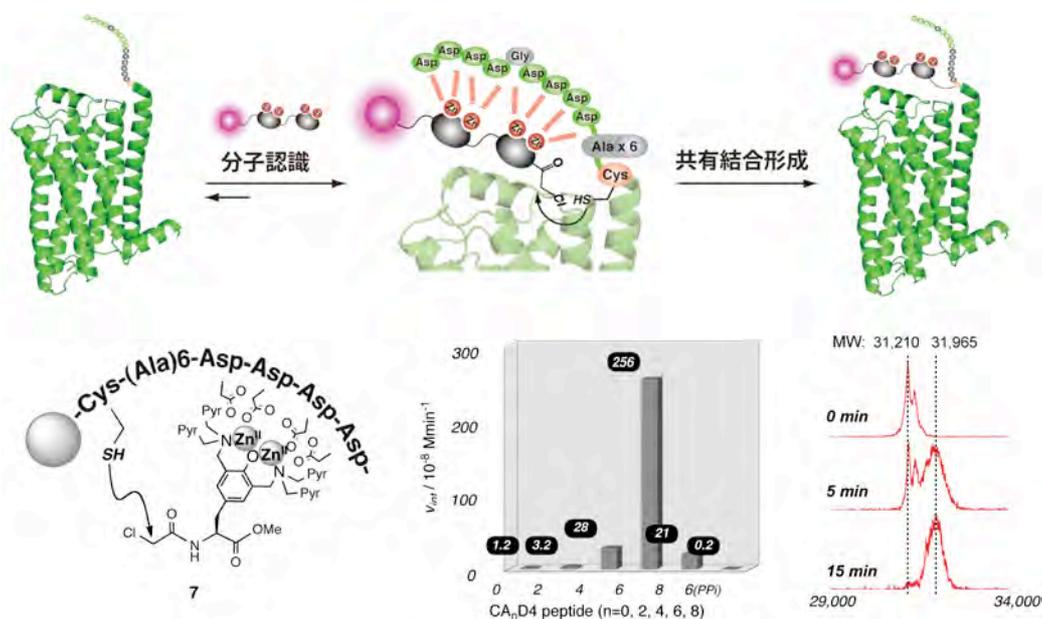


図8 リアクティブタグシステムによるタグ導入タンパク質の共有結合ラベル化

リアクティブタグシステムは、タグとプローブとが分子間相互作用により複合体を形成した状態から、両者の持つ反応性基の近接により共有結合形成反応が誘起されるしくみとなっている。この反応型のラベル化法に用いるタグ・プローブペアとして、タグ側にはシステインを有するアスパラギン酸4連続配列、プローブ側には、 α -クロロアセチル基を有する Zn^{II} -DpaTyr プローブを採用した。アスパラギン酸4連続配列とシステインとの間に複数個のアラニンを含むタグペプチドとプローブ **7** と反応を検討したところ、アラニンの数が6個のタグ配列(CAAAAAADDDDD:CA6D4 タグ)の場合に、非常に早く反応が進行する事が明らかとなった。その反応の初速度は、タグとプローブ間の分子間相互作用がない場合と比較すると、約 1,500 倍も加速された(図8下中)。実際に、CA6D4 タグを導入したタンパク質を用いてラベル化を行ったところ、反応は迅速に進行し、約 15 分でほぼ定量的に共有結合形成が起こる事が明らかとなった(図8下右)。次にリアクティブタグシステムを細胞表層に発現させた GPCR の共有結合ラベル化へ応用した(図9)¹²。GPCR としてブラジキン受容体(B2R)を選択し、細胞外領域に 16 残基のタグ配列(CAAAAAADDDDDGDDDD; CA6Dx2 タグ)を有する状態で HEK293 細胞膜上に発現させた。小分子プローブとしては、 α -クロロアセチル基(反応部位)とローダミン(蛍光色素)を有するダイマー型プローブ **8** をデザインした。両者の反応は、細胞表層においても容易に進行し、B2R 受容体へラベル化されたプローブ **8** に由来する蛍光を細胞表層上に明瞭に確認することができた(図9)。もちろんタグのない B2R 受容体や α -クロロアセチル基を持たないプローブを用いた場合、ラベル化反応は進行しない。ラベル化反応がタグを導入した B2R 受容体に対して特異的に進行していることは、ビオチン型プローブ **9** を用いてラベル化を行った後のウェスタンブロッティングにより確認された。また、ラベル化後のアゴニスト刺激による B2R 受容体のインターナライゼーションの蛍光可視化も可能であり、GPCR 受容体の細胞内動態解析にも応用できた。これらの結果は、リアクティ

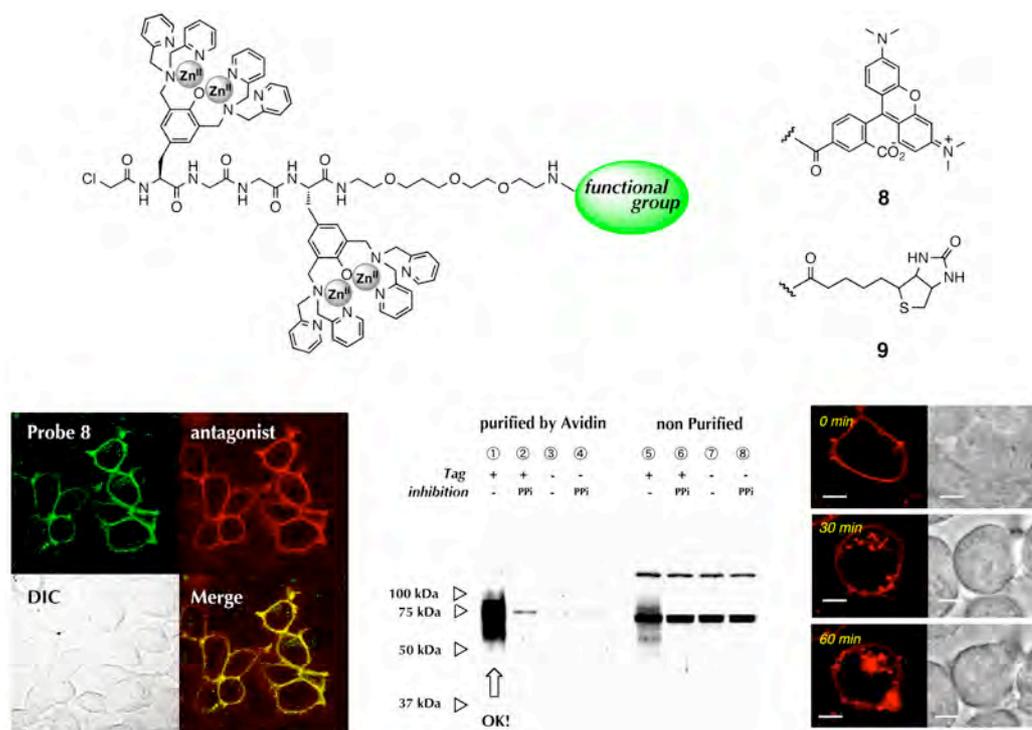


図9 リアクティブタグシステムによる細胞表面GPCR (ブラジキン受容体) の共有結合ラベル化

ブタグシステムが、細胞におけるタンパク質機能解析に有用なケミカルツールであることを示している。著者らが開発を行ったリアクティブタグシステムは、SNAP タグシステムや Halo タグシステムなどのいわゆる酵素反応を利用した共有結合形成によるラベル化を小さなタグ上で人工的に実現できる、他のラベル化法には無い優れた特徴を持っている。すなわち、共有結合によるラベルの持続性と安定性、分子サイズの小さいタグ・プローブペアを用いることによるタンパク質機能阻害の軽減、というラベル化ツールとしての二つの好ましい特徴を同時に兼ね備えている。細胞内タンパク質の 80%以上は、何らかのタンパク質複合体を形成して機能を発揮していることを考えると、分子サイズが小さくタンパク質機能への影響を最小限にしながらラベル化を行うことのできるタグ・プローブペアの潜在的な有用性は高いと言える。今後、本手法をさらに改良することにより、細胞内でのタンパク質間相互作用解析などへの応用が期待される。

小分子プローブ開発と応用の今後

以上、著者らがこれまでに進めてきた小分子プローブを応用した In Cell 生体機能解析について紹介した。機能設計の柔軟性、センシングシステムやモダリティのバラエティの豊富さ、試薬さえあれば誰でも使うことのできる簡便性は、小分子プローブの持つ分子ツールとしての魅力であり、絶対的な強みでもある。本小論の冒頭にも述べたように、現時点で小分子プローブにより解析が可能となっている生体分子は、まだまだ少なく多様な生体成分の中のほんの一部にすぎない。すなわち、多くの生体成分の機能解析を可能にする小分子プローブ開発が挑戦すべき大きな課題として残されている。小分子プローブの応用は、基礎研究のみに限定されるものではない。医療に応用できるヒト生体イメージングを可能とするプローブ開発も大きなニーズを持つ極めて重要な今後の課題である。もちろん細胞、生体などの複雑系で機能する小分子プローブの開発は決して容易ではない。これを実現するためには、物理、化学、生物学のあらゆる分野の知識を源泉とした斬新かつ革新的なアイデアが強く求められる。近年、バイオイメージングの分野では多光子励起顕微鏡観察や超解像顕微鏡など解析ハードの面で新たな次元での展開が次々と繰り広げられて

いる。解析のためのソフトである小分子プローブ開発においても、これまでに不可能と思われていたことを可能する新たなパラダイムを切り開いていきたいと考えている。

なお、今回紹介した研究は、主に著者が京都大学大学院工学研究院に在籍中に行った研究をまとめさせていただきました。浜地教授をはじめ、昼夜を問わず研究に没頭してくれた多くの学生諸氏に深く感謝いたします。

参考論文

1. Imamura, H.; Nhat, K. P. H.; Togawa, H.; Saito, K.; Iino, R.; Kato-Yamada, Y.; Nagai, T.; Noji, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 15651.
2. (a) Ojida, A.; Mito-oka, Y.; Sada, K.; Hamachi, I., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6256. (b) Ojida, A.; Mito-oka, Y.; Sada, K.; Hamachi, I., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2454.
3. Ojida, A.; Takashima, I.; Kohira, T.; Nonaka, H.; Hamachi, I., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12095.
4. Kurishita, Y.; Kohira, T.; Ojida, A.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13290.
5. *Chemical & Engineering News* **2010**, Feb, 15, 46.
6. O. Tour, S. R. Adams, R. A. Kerr, R. M. Meijer, T. J. Sejnowski, R. W. Tsien, R. Y. Tsien, *Nature Chem. Biol.* **2007**, *3*, 423.
7. E. G. Guignet, R. Hovius, H. Vogel, *Nature Biotechnol.* **2004**, *22*, 440.
8. S. Lata, M. Gavutis, R. Tanpé, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2365.
9. C. T. Hauser, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **2007**, *104*, 3693.
10. A. Ojida, K. Honda, D. Shinmi, S. Kiyonaka, Y. Mori, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10452.
11. H. Nonaka, S. Tsukiji, A. Ojida, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15777.
12. H. Nonaka, S. Fujishima, S. Uchinomiya, A. Ojida, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9301.



研究紹介

アルツハイマー病アミロイド β ペプチドを
標的とした人工タンパク質の構築

群馬大学先端科学研究指導者育成ユニット

高橋 剛

(ttakahas@gunma-u.ac.jp)



1. はじめに

通常の生体システムでは、構造が崩れて異常凝集したタンパク質は、速やかに種々のタンパク質分解系で処理される。しかしながら、ストレスなどの何らかの因子により、きちんと処理されなかった特定のタンパク質がさらに凝集し、それが引き金となって種々の神経変性疾患の発症を引き起こしている¹⁾。神経変性疾患の一つであるアルツハイマー病では、アミロイド β ペプチド ($A\beta$) の凝集体形成と Tau タンパク質の異常リン酸化が病気の発症に深く関与している²⁾。 $A\beta$ が線維状凝集体を形成し不溶化したアミロイド線維がアルツハイマー病患者の老人斑の主成分として沈着していることから、90年代まではこのアミロイド線維がアルツハイマー病を引き起こしているとする「アミロイド仮説」が有力であった。しかしその後の研究の進展で、 $A\beta$ の凝集体形成過程で生成する可溶性オリゴマーが成熟したアミロイド線維よりも高い細胞死誘導活性をもっていることなどから、現在では可溶性オリゴマー集合体が原因とする「オリゴマー仮説」が有力となっている³⁾。一般に $A\beta$ の可溶性オリゴマーとよばれているものには、5量体程度のものから100量体以上のものまでが含まれており (disc-shaped pentamers, ADDLs, globulomers, $A\beta^*56$, amylospheroids, annular protofibrils など)⁴⁾、真にアルツハイマー病発症に繋がる細胞死誘導活性を示しているオリゴマーの本体・立体構造は未だ謎である。また、細胞膜の GM1 ガングリオシド上で形成する $A\beta$ 重合体 ($GA\beta$) が核となって $A\beta$ 単量体の凝集を促進することも知られており、これも病気との関連が指摘されている⁵⁾。このようにアルツハイマー病発症における $A\beta$ の作用機序は、不明な点が数多く残されており、アルツハイマー病発症メカニズムを探る研究は現在でも活発に行われている。一方で、 $A\beta$ を標的としたアルツハイマー病治療薬開発に関する研究は増え続けているが、現状では十分な成果が挙げられているとはいえない⁶⁾。

著者らは、人工的に設計したタンパク質分子を使って、 $A\beta$ の凝集化の抑制や可溶性オリゴマーの特異的検出法の構築に取り組んでいる。今回はその研究例についていくつかを紹介する。

2. 緑色蛍光タンパク質 (GFP) をスキャフォールドとした $A\beta$ 結合人工タンパク質の創製2-1 $A\beta$ 様アミロイド提示 GFP 変異体の設計

生体内において $A\beta$ は、通常 40 残基からなる $A\beta_{1-40}$ が主に生成するが、加齢と共に 42 残基からなる $A\beta_{1-42}$ や 43 残基からなる $A\beta_{1-43}$ の割合が増加し、病気の発症との関連が指摘されている⁷⁾。 $A\beta_{1-40}$ と比べて $A\beta_{1-42}$ は非常に凝集しやすく、細胞毒性も高い。試験管内で $A\beta_{1-42}$ をインキュベーションすると速やかに凝集し、種々の大きさの可溶性オリゴマーを形成する。単量体の $A\beta$ は特定の構造をもたないランダムコイルであるが、その会合体は β シート構造を形成している。 $A\beta$ 凝集体の最終物であるアミロイド線

維の構造はいくつかのグループから報告されているが⁸⁾、どれも Aβ のアミノ酸配列中央付近と C 末端付近の疎水性アミノ酸に富んだ領域が β シート構造を形成しており、自己認識による会合体形成のときには、その領域のアミノ酸側鎖間の相互作用が強くとらわれていると考えられる。そこで著者らは、この Aβ アミロイドの β シート構造を参考に、β バレル構造をもつタンパク質表面にアミロイド β シート構造を提示した分子設計を試みた(図 1)⁹⁻¹²⁾。具体的には、β バレル構造をもつ緑色蛍光タンパク質(GFP)をスキュフォールドとして選択し、その表面アミノ酸のいくつかを Aβ 由来のアミノ酸に置換し、GFP 表面上に Aβ 様アミロイド構造を提示した擬 Aβ 提示 GFP 分子を設計した(図 2)^{9,10)}。GFP の β バレルは 11 本の β ストランドで構成され、1 対の平行 β シートと 10 対の逆平行 β シートからなる。そこで平行 β シート部位を改変した P13H 変異体と 3 箇所逆平行 β シート部位を使って改変を施した変異体(AP13Q, AP93Q, AP93H, AP200Q, AP200H)を構築した。この際に、GFP 構造に与える影響を最小にするために、バレルの表面側のアミノ酸のみを Aβ 由来のアミノ酸に置換し、内側のアミノ酸はそのままにした。これにより、各タンパク質とも大腸菌を用いた発現系で十分量得ることが可能であり、蛍光特性も保持していた。

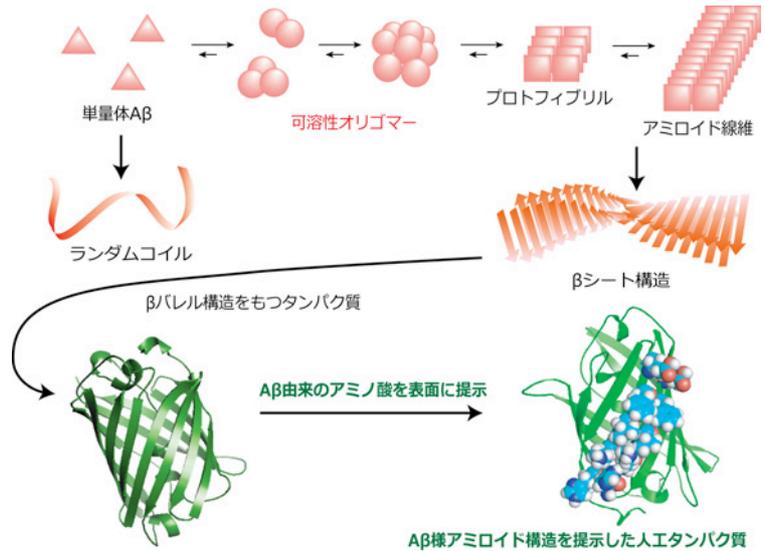


図 1. Aβ 凝集体形成とそれに基づく β バレルタンパク質をスキュフォールドとして Aβ 様アミロイド構造を提示したタンパク質設計の模式図。

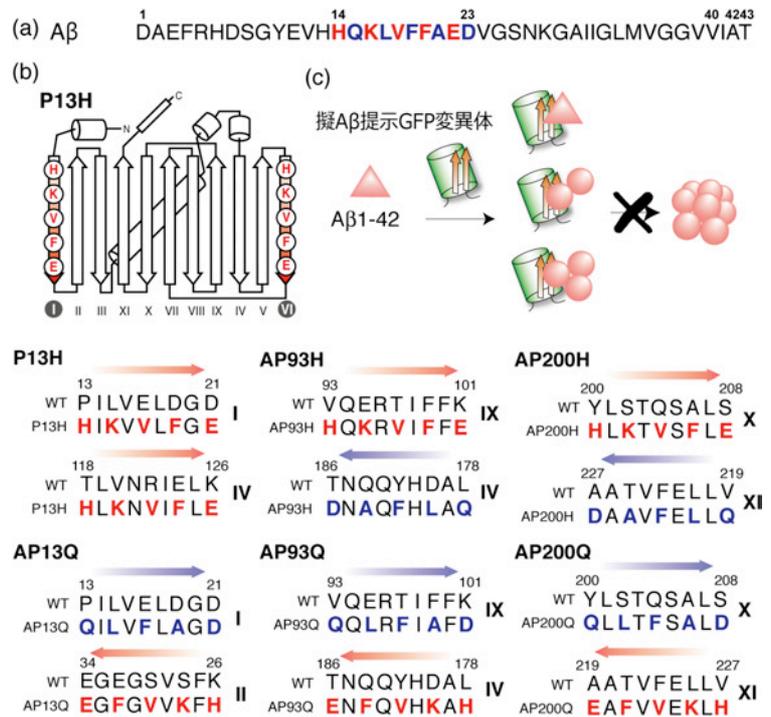


図 2. (a) Aβ のアミノ酸配列。GFP 表面に提示したアミノ酸を赤または青字で表記。(b) 設計した GFP 変異体。変異を入れた部位の各ストランドと変異箇所を表記。(c) GFP 変異体による Aβ1-42 の凝集体形成阻害の模式図。

2-2 擬 Aβ 提示 GFP 変異体による Aβ1-42 のオリゴマー形成の阻害

構築した GFP 変異体存在下における Aβ1-42 の凝集体形成について、Aβ オリゴマー特異的 ELISA により評価した¹⁰⁾。ELISA の結果から、AP200H 以外のどの変異体もある程度 Aβ オリゴマーの生成を抑制することが分かったが、その中でも P13H 変異体と AP93Q 変異体の阻害能が優れていた(図 3a)。また

ELISA だけでなく、培養細胞を使った細胞毒性実験からも P13H と AP93Q が効果的に Aβ1-42 のオリゴマー化を抑制していることが確認された(図 3b, c)。ELISA、培養細胞を使った実験共に、Aβ 単量体の濃度よりも低濃度の GFP 変異体で十分にオリゴマー形成を阻害する結果が示されたことから、おそらく Aβ をインキュベーションしたときに最初に生成する 2 量体や 3 量体に GFP 変異体が相互作用し、さらなる会合体形成を止めていることが考えられた。表面プラズモン共鳴(SPR)による Aβ と GFP 変異体との相互作用解析の結果から P13H と AP93Q がそれぞれ 260 nM と 420 nM の解離定数で Aβ と結合することが分かった。SPR 実験では、ビオチン化した Aβ を 4 量体タンパク質であるstreプトアビジンを介してセンサーチップに固定化しており、この基板表面上では Aβ 同士が相互作用して β シート構造を形成していると予想される。おそらく各 GFP 変異体はこのセンサーチップ上で会合した Aβ を認識して相互作用したものと結論づけている。

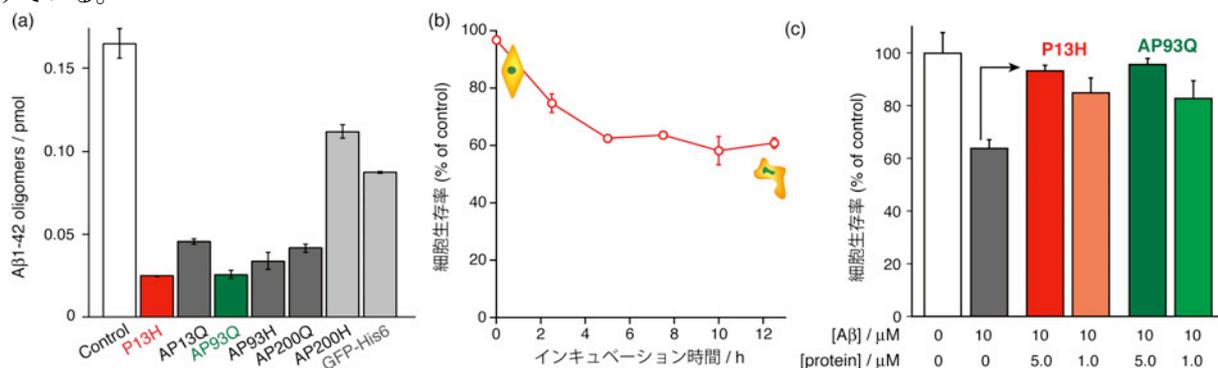


図 3. (a) Aβ オリゴマー特異的 ELISA による擬 Aβ 提示 GFP 変異体存在下での Aβ1-42 凝集体形成の評価。インキュベーション条件: [Aβ1-42] = 10 μM, [protein] = 2.5 μM in PBS at 20°C for 24 h. (b) Aβ1-42 を PC12 細胞 (3 × 10⁴) に播種したときの細胞生存率。横軸は細胞に播種する前に Aβ1-42 をインキュベーションした時間。インキュベーション条件: [Aβ1-42] = 10 μM in PBS at 20°C. (c) P13H または AP93Q 存在下で Aβ1-42 を 20°C で 10 時間インキュベーションした溶液を播種したときの PC12 細胞の生存率。

2-3 擬 Aβ 提示 GFP 変異体の Aβ1-42 会合体認識特性の評価

ここでは構築した擬 Aβ 提示 GFP 変異体 Aβ の会合体選択性について検討した。方法として、あらかじめ用意した Aβ1-42 のインキュベーション溶液を、GFP 変異体を固定した 96 ウェルプレートに加えて相互作用させ、吸着した Aβ を抗 Aβ 抗体で検出した(図 4a)。このとき、構築した GFP 変異体の中で優れていた P13H, AP93Q 変異体とも単独では Aβ との結合力が十分とはいえず、そこで両タンパク質の擬 Aβ 表面を 1 つのタンパク質に提示した変異

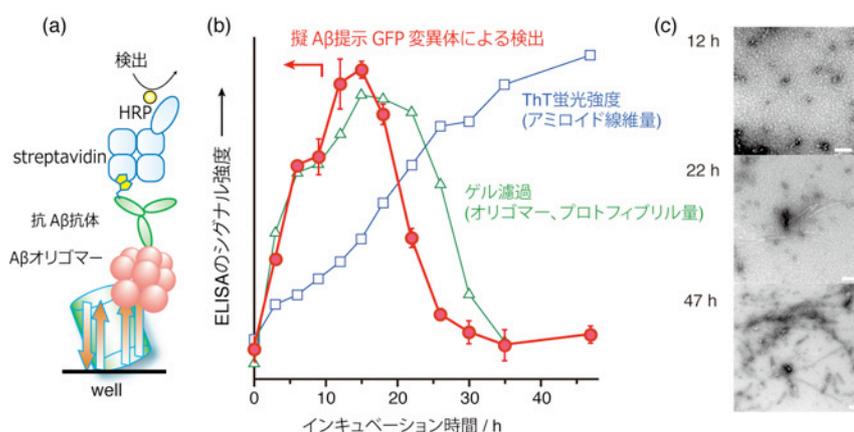


図 4. (a) SFAB4 による Aβ オリゴマー検出の模式図。(b) Aβ1-42 インキュベーション溶液を用いた SFAB4 による Aβ オリゴマー特異性の評価。インキュベーション条件: [Aβ1-42] = 40 μM in PBS at 25°C. (c) インキュベーション 12, 22, 47 時間後の Aβ1-42 溶液の透過型電子顕微鏡画像。Scale bar = 100 nm。

体(SFAB4)を新たに構築した。この SFAB4 は SPR 実験から A β と 100 nM の解離定数で結合した。SFAB4 を固定化したプレートに A β インキュベーション溶液を加えて結合特性をみたところ、結合を示すシグナル強度は、A β のインキュベーション時間が進むほど増大し、さらに進むと減少した(図 4b)。一方で成熟したアミロイド線維に強く結合する蛍光分子である Thioflavin T(ThT)を用いた評価では A β のインキュベーション時間に依存して単純に蛍光強度が増大する結果となった。A β のインキュベーションサンプルでゲル濾過分析を行い、オリゴマー画分のピーク面積をインキュベーション時間に対しプロットした結果は、SFAB4 変異体による ELISA アッセイの傾向と同様であったことから、SFAB4 は A β オリゴマーを特異的に認識していることが示唆された。このように、GFP を改変して A β 様の β シート構造を人工的にタンパク質表面に提示することで、A β オリゴマー特異的認識分子を構築できることが示された。

2-4 擬 A β 提示蛍光タンパク質を用いた蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)型 A β オリゴマー認識プローブの構築

GFP をスキヤフォールドとして構築した擬 A β 提示 GFP 変異体は、A β オリゴマーを特異的に認識するものの、そのままでは A β との相互作用による蛍光変化などがほとんどみられなかった。そこで蛍光変化で A β オリゴマーを簡便に検出できる系の構築を目的として、擬 A β 提示 GFP 変異体の改良を試みた¹²⁾。具体的には、擬 A β 提示 GFP 変異体の蛍光色をシアン色と黄色に変えた蛍光タンパク質(CFP, YFP)をそれぞれ構築し、両者をフレキシブルなリンカーで連結したセンサー(CPCYAB4)を設計した(図 5)。CPCYAB4 と A β オリゴマーとの相互作用で CFP 部位から YFP 部位への蛍光共鳴エネルギー移動効率が変化することを期待した。YFP 部位は円順列変異により N 末端の部位を変更したものをを用いた¹³⁾。

構築したセンサータンパク質と A β オリゴマーとの相互作用を調べるため、比較的安定な状態で単離可能なオリゴマーである Globulomer を調製し、種々の Globulomer 濃度における CPCYAB4 の蛍光スペクトルを測定した(図 6a)。CFP の吸収波長である 435 nm を励起して FRET 変化を観測したところ、Globulomer 濃度の増加に伴い FRET 効率が顕著に増大した。この変化をプロットして解離定数を算出したところ約 8 nM と求められた(図 6b)。一方、この構築したセンサータンパク質に単量体の A β を添加した場合には、Globulomer 添加時ほどは FRET 変化が生じず、CPCYAB4 が A β オリゴマー特異的センサーとして利用可能であることが示唆された。コントロールとして構築した A β 様アミロイド表面をもたない FRET センサー(CPCYwt)では、このような FRET 効率の変化は全くみられず、このことから CPCYAB4 の表面の擬 A β 部位が A β オリゴマーと相互作用し、オリゴマーを CFP 部と YFP 部が挟み込む形で相互作用した結果、FRET 効率が増大する変化を示したと考えられる。

この構築した CPCYAB4 センサーを用いて、2-3 の実験と同様に A β のインキュベーションサンプルを用意し、それを使って蛍光測定を行った(図 6c)。ここでも A β サンプルのインキュベーション時間に対するパターンは、ゲル濾過分析における A β オリゴマー量ときれいな相関を示し(図 6d)、A β の単量体や、アミロ

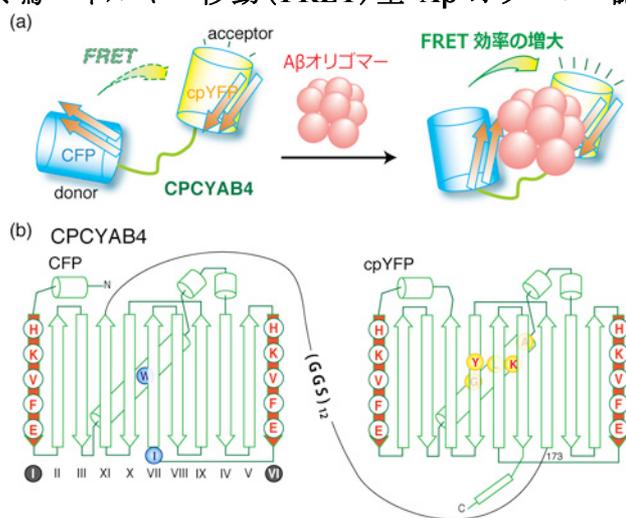


図 5. (a) FRET 型蛍光センサーCPCYAB4 による A β 1-42 オリゴマー検出の模式図。(b) CPCYAB4 構造の簡略図。

イド線維などが混在しているサンプルでも、相対的なオリゴマーの割合を FRET により読み出せることが分かった。このように擬 Aβ 提示 GFP を改良することで簡便に Aβ オリゴマーを検出できるセンサータンパク質の構築に成功した。まだ現状のセンサーでは、FRET の変化率が低いなどの改善点が残されており、今後はさらなる改良を進め、より有用なオリゴマー検出センサーを構築したいと考えている。

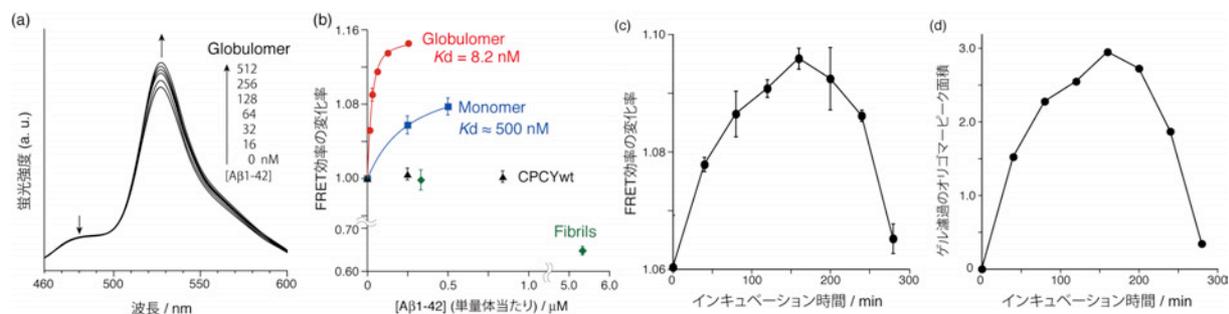


図 6. (a) Globulomer 存在下における CPCYAB4 蛍光スペクトル。励起波長 = 435 nm, [CPCYAB4] = 18 nM at 25°C. (b) 各種 Aβ1-42 サンプルによる CPCYAB4 または CPCYwt の FRET 効率の変化。赤, Globulomer; 青, Monomer; 緑, Fibrils; 黒, Globulomer with CPCYwt. (c) Aβ1-42 インキュベーション溶液を用いた時の CPCYAB4 の FRET 変化。蛍光測定条件: [CPCYAB4] = 18 nM, [Aβ1-42] = 200 nM at 25°C. (d) Aβ1-42 インキュベーション溶液のゲル濾過分析。インキュベーション条件: [Aβ1-42] = 40 μM in PBS at 25°C.

3. インスリン様成長因子 2 受容体 (IGF2R) のドメイン構造をスキヤフォールドとした Aβ 結合人工タンパク質の創製

3.1 IGF2R 改変タンパク質の設計

先に紹介した擬 Aβ 提示 GFP の設計戦略を他の β バレルタンパク質をスキヤフォールドとした系に拡張することを試みた。具体的な材料として、IGF2R のドメイン構造を選択した。IGF2R は、15 個の細胞外ドメインからなる細胞表面受容体であり、人の組織に偏在する多機能性タンパク質である。いくつかのドメインが単独または複数のドメインの状態では立体構造解析されているが、その中で IGF2R のリガンドの一つであるインスリン成長因子 2 (IGF-II) 結合部位であるドメイン 11 (IGF2R-d11) を利用した (図 7)。このタンパク質のドメイン構造を選択した理由として、1) GFP と比較して小型 (17 kDa) であること、2) 平行 β シートと逆平行 β シートの両者をタンパク質表面に有していること、3) 4 本のジスルフィド結合により安定な立体構造を保持していることが挙げられる。この IGF2R-d11 の平行 β シート部位に Aβ 様アミロイド構造を提示した IG11-KK および逆平行部位に提示した IG11-KA の 2 種類のタンパク質変異体を設計した。

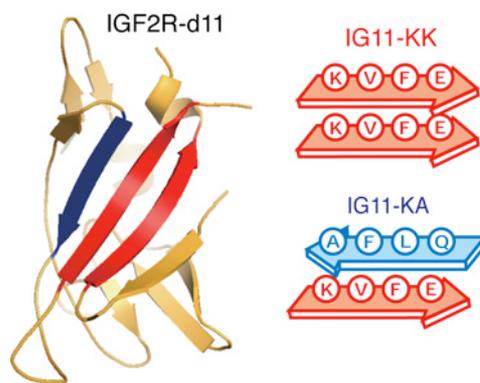


図 7. IGF2R ドメイン 11 をスキヤフォールドとした擬 Aβ 提示タンパク質の設計。

3.2 設計タンパク質による A β 凝集阻害能の評価

構築した IG11-KK、IG11-KA と野生型 IGF2R-d11 (IG11-wt) を用いて、A β 1-42 の凝集体形成阻害能について、ThT を用いた蛍光アッセイにより評価した (図 8)。A β 1-42 単独でインキュベーションした場合と比較して各タンパク質存在下において A β の凝集体形成が抑制された。特に IG11-KK が高い抑制能を示し、また IG11-wt や IG11-KA とは幾分異なる傾向を示した (図 8c, d)。IG-11KK 存在下におけるインキュベーション時間に対する ThT の蛍光強度の変化に着目すると、インキュベーション後に ThT 蛍光があるところまで増大する第 1 相と、そこから蛍光強度変化が強く抑制される第 2 相、さらに緩やかに蛍光強度が増大する第 3 相に分かれた蛍光変化を示した。また IG11-

KK の濃度を高くすると、第 2 相の時間が長くなり、また第 3 相における蛍光変化の傾きがより緩やかになることが分かった。この結果からの推察として、IG11-KK は第 1 相の段階で生成したオリゴマー A β に強く結合することで、それらがさらに凝集するステップ (第 2 相~第 3 相) を強く抑制していると考えられる。また第 3 相にみられる蛍光変化の傾きが小さいことから、ある程度の大きさの A β の凝集体 (プロトフィブリル) にも相互作用することで、アミロイド線維の伸長過程を抑制していることも示唆された。他の実験からも、IG11-KK は A β 単量体よりもオリゴマーに強く結合することが示唆されており、この阻害実験の結果を裏付けている。このように、IGF2R のドメイン構造上の平行 β シート部位に A β 由来のアミノ酸を配置してアミロイド様構造を提示した人工タンパク質により、A β のオリゴマー構造と相互作用することで A β の凝集体形成を抑制できることが分かった。GFP を用いた場合とは、若干凝集阻害特性が異なる傾向を示したが、 β バレル構造をスキヤフォールドとして用いる分子設計の有用性の一端が明らかとなった。今後は、IG11-KK の A β 模倣分子としての特性を活かした研究もあわせて展開していきたいと考えている。

4. おわりに

以上、著者らがこれまでに行ってきた β バレルタンパク質表面にアミロイド模倣構造を提示する分子設計によるアルツハイマー病 A β ペプチドの凝集体形成の阻害や検出について紹介した。ここ数年最も期待されているアルツハイマー治療薬の候補の一つは、A β を標的とした抗体医薬であるが、認知症患者に長期に抗体を投与することはあまり現実的ではない。抗体以外で A β の細胞死誘導を抑制する分子を創製・探索する研究は基礎と臨床の両面から必要であると思われる。著者らが考案した分子設計戦略もその候補の一つとして、モデルマウスなどを使った実験でアルツハイマー病に対する有効性を今後検討していきたい。また、著者らが開発した A β オリゴマーを特異的に検出するセンサータンパク質は、蛍光変化率が低い点やオリゴマー選択性が十分でない点などまだまだ改良の余地は残されているが、さらなる性能向上をはかり、オリゴマー形成阻害剤のスクリーニングに使えるようなセンサーへと発展させたいと考えている。今回

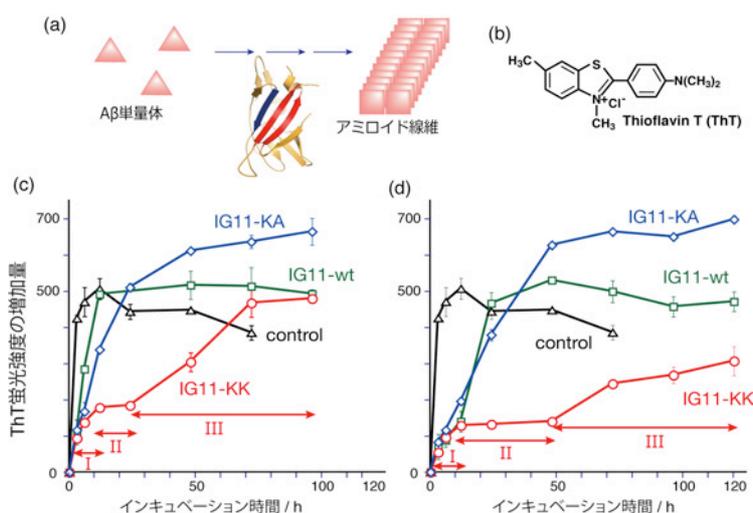


図 8. (a) 擬 A β 提示 IGF2R-d11 変異体による A β 1-42 凝集体形成阻害の模式図。(b) ThT の構造。(c), (d) 擬 A β 提示 IGF2R-d11 変異体存在下における A β 1-42 凝集体形成過程の ThT 蛍光の変化。インキュベーション条件: [A β 1-42] = 40 μ M, [protein] = 2.0 μ M (c), 4.0 μ M (d) in PBS at 37°C。

はアルツハイマー病 A β を標的とした研究を紹介させて頂いたが、他にも神経変性疾患に関与しているミスフォールディングタンパク質が存在する。現在ハンチントン病に関与しているポリグルタミンタンパク質を標的にした研究も行っており、A β 以外のミスフォールディングタンパク質にも β バレルタンパク質表面を分子認識場として利用する分子設計の有用性を示していきたい。

5. 謝辞

私は 2011 年 1 月より群馬大学に赴任しましたが、ここで紹介した研究のほとんどは、前所属の東京工業大学大学院生命理工学研究科で行われたものです。三原久和教授、三原研究室卒業生の太田健一君、村越祐子さんに感謝申し上げます。

参考文献

1. Soto, C. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 49-60 (2003).
2. Jellinger, K. A. *J. Neural. Transm.* **113**, 1603-1623 (2006).
3. Haass, C., Selkoe, D. J. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 101-112 (2007).
4. (a) Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., Elliott, J. I., Van Nostrand, W. E., Smith, S. O. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 561-567 (2010). (b) Uversky, V. N. *FEBS J.* **277**, 2940-2953 (2010).
5. Yanagisawa, K. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 1943-1951 (2007).
6. Abbott, A. *Nature* **475**, S2-S4 (2011).
7. Saito, T., et al. *Nat. Neurosci.* **14**, 1023-1032 (2011).
8. (a) Bertini, I., Gonnelli, L., Luchinat, C., Mao, J., Nesi, A. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 16013-16022 (2011). (b) Lühns, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Döbeli, H., Schubert, D., and Riek, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 17342-17347 (2005).
9. Takahashi, T., Ohta, K., Mihara, H. *ChemBioChem* **8** 985-988 (2007).
10. Takahashi, T., Ohta, K., Mihara, H. *Proteins* **78** 336-347 (2010).
11. Takahashi, T., Mihara, H. *Acc. Chem. Res.* **41** 1309-1318 (2008).
12. Takahashi, T., Mihara, H. *Chem. Commun.* DOI:10.1039/C1CC14552E.
13. Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M., Miyawaki, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 10554-10559 (2004).



気になった論文

畠中 孝彰(はたなか たかあき)

鹿児島大学大学院 理工学研究科 システム情報科学専攻 博士課程 3年

k7808291@kadai.jp

現在私の所属している研究室では、(理学部生命化学科有機生化学、伊東祐二教授、有馬一成准教授)、医薬品や新規バイオマテリアルの創製を最終目的とし、ライブラリ技術を用いた標的特異的な機能性ペプチドや単鎖 Fv 抗体(scFv)、VHH 抗体の単離・デザインについて、日々研究を行っています。私は機能性ペプチドデザインの一環として、ランダムペプチドファージライブラリより単離・デザインしたヒト抗体結合性特異ペプチドによる抗体の精製、検出システムの構築に関する研究を行っており、今回はこのペプチドのデザインに関連する最近の論文について気になった 3 報をご紹介します。

Evolution of cyclic peptide protease inhibitors.

T. S. Young, D. D. Young, I. Ahmad, J. M. Louis, S. J. Benkovic, and P. G. Schultz. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **108** 11052–11056 (2011).

従来、生合成システムを利用したタンパク質・ペプチドのライブラリ技術は、20 種類の必須アミノ酸を組み合わせて作製されてきました。しかし近年、D 体や非天然アミノ酸をも組み込んだライブラリの作製技術が飛躍的に発展し、より大きな多様性を持つライブラリの設計が可能となっています。そこでまず、その中の一つの例として、改良型アミノアシル tRNA シンターゼ(aaRS)を利用した、非天然アミノ酸を含むペプチドライブラリの設計と、HIV プロテアーゼ(HIVp)に対するユニークなインヒビターペプチド (Ipep)の単離について報告している論文について紹介します。

HIVは宿主細胞に感染後、integrationにより自身のDNAを宿主ゲノムに組み込みます。その後、転写された HIV 由来の mRNA は、宿主のタンパク合成系により翻訳され、一本の長いタンパク鎖として合成されます。その一部に存在する HIVp が自身を切り出した後、その他の増殖に必要なウイルスタンパク質を切り出すことで、最終的にウイルス粒子が形成されます。このことから、HIV の複製阻害には HIVp の機能を阻害することが有効であるといえます。今回筆者等は、3 種類のプラスミド、1) 環状ランダムペプチドライブラリ(図 1A)を発現するプラスミド、2) HIVp による切断部位を有するテトラサイクリン (Tet) 耐性タンパク遺伝子と HIVp 遺伝子を組み込んだプラスミド、さらに、3)ライブラリ遺伝子内の TAG コドン選択的に *p*-benzoylphenylalanine (*p*BzF)を導入するための改良 aaRS(図 1B)を発現するプラスミドを大腸菌に形質導入し、two hybrid システムを用いて HIVp 特異的 Ipep の単離を試みました(図 1C)。結果、筆者らは、*p*BzF を含む Ipep を 2 種類単離することに成功しています。また筆者等は、*p*BzF を含む Ipep が HIVp を阻害す

る機構として、*pBzF* が HIVp の 14 番目の Lys と特異的に共有結合を形成することで HIVp 自身の安定性に影響を及ぼし、凝集や unfolding を引き起こしているのではないかと考察していました。今後の結晶構造解析による更なる阻害メカニズムの解明、さらには医薬品としての応用が期待されます。

このように、非天然アミノ酸の導入はライブラリの多様性が広がるだけでなく、ユニークな性質を有するペプチドの単離を可能にする画期的な手法であります。

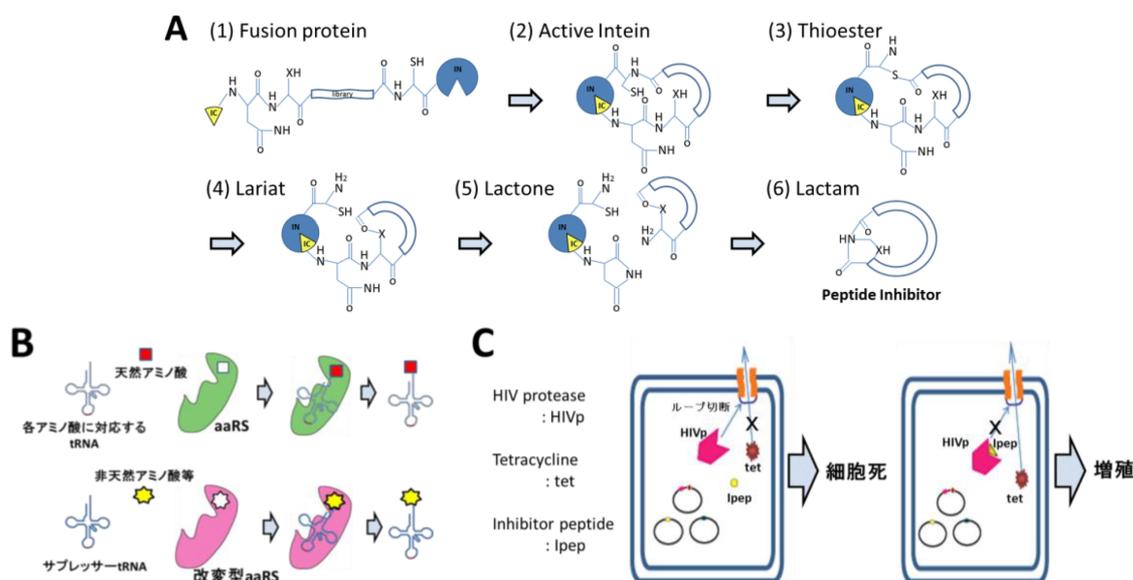


図 1. A) termed split intein catalyzed ligation of proteins and peptides (SICLOPPS) システムによるペプチドの環状化。B) スクリーニングの概要; HIVp により Tet 耐性タンパク質が分解されると、Tet 存在下では大腸菌は増殖することができない(左)。ペプチドライブラリより HIVp のインヒビターとなるペプチドが発現した場合は、大腸菌が増殖する(右)。C) 改変型 aaRS によるサプレッサー tRNA への非天然アミノ酸の修飾。

Hydrocarbon double-stapling remedies the proteolytic instability of a lengthy peptide therapeutic.

G. H. Birda, N. Madani, A. F. Perry, A. M. Princiotta, J. G. Supko, X. He, E. Gavathiotis, J. G. Sodroski, and L.. D. Walensky. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **107**, 14093–14098 (2010).

前項のように、ライブラリ技術を用いることで、これまで多くの機能性ペプチドが単離・発見されてきました。しかしながらそれらの多くについて、そのフレキシビリティの高さに由来する生理活性構造体の割合の少なさや、体内における速い分解速度が医薬品化における問題点となっています。そこで本項では、HIV 感染阻害ペプチドである Enfuvirtide とその変異体に stapling 技術を適用し改良することで、それらの問題点に解決の糸口を見出した論文を紹介したいと思います。

Enfuvirtide やその変異体はヘリカルな gp41 ミミックペプチドであり、HIV が細胞に感染する際の gp41 のアセンブリを阻害することで HIV の感染を阻害します (図 2A)。筆者らはペプチドの *i, i+4* の位置に (*S*)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)-2-methyl-hept-6-enoic acid を導入し、olefin metathesis によりペプチド内に 1 つ (Singly stapled) もしくは 2 つ (Doubly stapled) の架橋を形成させたペプチド (stapled peptide) を合成して (図 2B)、それらのキモトリプシン耐性、*in vitro* におけるウイルス中和活性、マウス血中における

半減期について評価しました。結果、架橋数の上昇に従いキモトリプシン分解耐性、ウイルス中和活性、血中半減期の上昇が確認されています。さらに筆者らは、Doubly Stapledペプチドにおいて酸性条件下(pH 2.0)でのペプシン耐性と、経口投与によるマウス血中への取り込み量が、飛躍的に上昇することを示し、ペプチド医薬の経口投与についても可能性を見出しています。

以上のように、stapling技術はペプチドの機能・性質を向上させる有用な手法の一つであり、今後のペプチド医薬の発展に貢献することが期待されています。

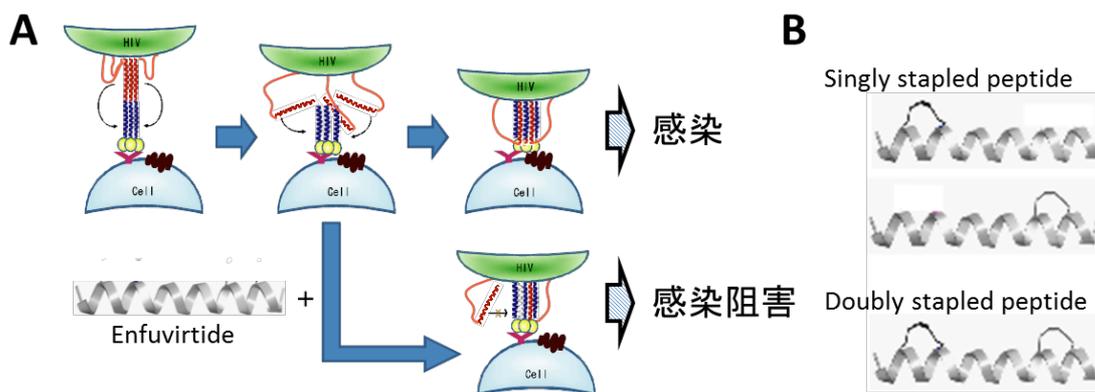


図2 HIVの感染機構とEnfuvirtideによる阻害機構(A)、stapled peptides (B)

Novel immunogenic peptides elicit systemic anaphylaxis in mice: implications for peptide vaccines.

C. M. Smith, P. Bradding, D. R. Neill, H. Baxendale, F. Felici, and P. W. Andrewm. *J Immunol.*, **187**, 1201-1206 (2011).

ペプチド性の医薬品候補はその分子量の低さから免疫原性は低いと考えられがちですが、中には非常に強い免疫原性を持つものも存在します。そこで最後に、機能性ペプチドの免疫原性について検討している論文を紹介させていただきます。

ペプチドは抗原分子のエピトープ構造をミミックすることができるため、ワクチンのターゲットとしても注目を集め、すでに幾つかガンなどに対するペプチドワクチンが報告されています。本論文の筆者らも以前、ファージディスプレイ法を用いることで、肺炎球菌の糖鎖構造を模倣するミミックペプチド(MP)の単離に成功し、さらに、マウスにおけるMPワクチン免疫が、抗肺炎球菌IgGの誘導と肺炎球菌感染マウスの生存率を上昇させることを報告しています。しかしながら、幾つかのMPワクチン(特にMP2)免疫後、マウス血中において抗ペプチドIgG以外にも多量の抗ペプチドIgEとヒスタミンが確認され、さらに、アナフィラキシー性の激しいアレルギー反応が観察されました。このように、ペプチド性のワクチンが過剰な免疫反応を引き起こすことは珍しく、筆者等はこのメカニズムについて本論文で議論しています。

筆者らが以前単離した7種のMPのうち、アレルギー誘発性の4種のMP(MP2, 14, 17, 18)には、Pro残基から4つ離れた位置に酸性アミノ酸(E, D)がクラスターを形成する形で存在しています(図3左)。これを受け筆者らは、MP2を例にその酸性アミノ酸を置換した(EはQ, DはN)MP2変異体(MP2m)を合成し、投与後の免疫応答の変化について検討しました。結果、抗ペプチドIgE、ヒスタミンはほとんど確認されず、しかしながら、MP2、MP2mに対するIgGはしっかりと誘導されることが示されました。また筆者らは、MP2の

免疫後に T 細胞の増殖が確認されたことから、MP2 は T cell エピトープであり、W と P が隣接し、P から 4 つ離れた位置に酸性アミノ酸のクラスターが存在するような配列が MHC クラス II の認識を受けてしまったのではないかと考察していました(図 3 右)。

このように、ペプチド自身の免疫原性を低下させるようなデザインも、今後ペプチド医薬開発が発展するにつれ重要な課題となってくると考えられます。

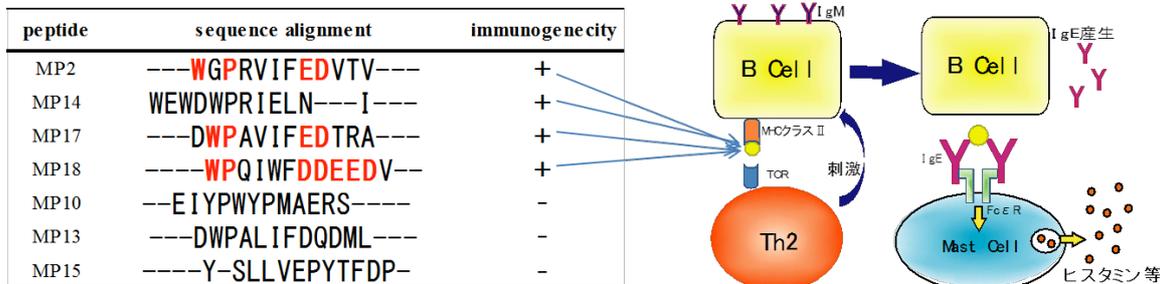


図 3 MP 配列のアラインメントとアレルギー誘導機構の考察

以上のように、機能性ペプチドのデザインに関連する多くの知見・手法が近年急速に発展してきています。今後ますます注目されてくる分野であるとともに、これらの技術が応用されたペプチド性のバイオマテリアルや医薬品が近い将来出現することでしょう。

最後になりましたが、本稿への執筆の機会をいただきました大阪府立大学、円谷先生に心より感謝申し上げます。

兒島 孝明(こじま たかあき)

名古屋大学大学院 生命農学研究科 生命技術科学専攻 助教

kojimat@nuagr1.agr.nagoya-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、私は名古屋大学院生命農学研究科中野秀雄教授のもと、分子ディスプレイ法を用いた分子間相互作用ハイスループットスクリーニング手法の確立と応用をメインテーマに取り組んでおります。

任意の生体高分子に目的とする構造、機能を自在に付与することは我々生命化学者にとって、“人工酵素創製”という夢でもあります。そのブレイクスルーの一手として、リボザイムを用いた手法が挙げられます。リボザイムはRNA酵素というその名の通り“酵素活性を保持するRNA”で、これまでに数十から数百塩基のランダムな配列から様々な生体機能を保持するリボザイムが獲得されております。リボザイムは遺伝子型と表現型を共に保持するその特性から、生命の起源時には主役を担っていたとも言われております(RNAワールド仮説)。今回はこのリボザイム研究の最前線、という観点から論文を3報紹介させていただきます。と、言う訳で皆様、「RNAの世界」へようこそ。

Coordinated control of a designed trans-acting ligase ribozyme by a loop-receptor interaction.

S. Matsumura, R. Ohmori, H. Saito, Y. Ikawa, T. Inoue, *FEBS Lett.*, **583**, 2819-2826 (2009).

自然界に存在するリボザイムの大半は自己修飾を行い、通常の酵素のようなターンオーバー機能を保持しておりません (*cis-acting* リボザイム)。そこで、リガーゼ機能を有するリボザイムにこのターンオーバー機能を付与させたリボザイム (*trans-acting* リボザイム) がこれまでにいくつか報告されております。例えば、*cis-acting* リボザイムである DSL (designed and selected ligase) に対してターンオーバー機能が付与された DSL (proto-*t*DSL-1) (図1) が取得されております (Ikawa, Y. et al., 2004)。これら *trans-acting* リボザイムの基質ユニットと触媒ユニットを相互作用させる為にはそれぞれのユニットに相互作用モチーフを導入する必要があります。上記 proto-*t*DSL-1 ではこのモチーフとして GAAA ループ/11-nt レセプターをそれぞれに組み込んだ戦略をとっておりましたが、その構造的特徴からホモ二量体を形成してしまうという欠点がありました。そこでこの論文では基質 RNA ユニットと触媒 RNA ユニットの相互作用モチーフを GAAA ループ/11-nt レセプターと GUAA ループ/B7.8 レセプターの二種類組み合わせることで改変型 *trans-acting* DSL、*t*DSL-1/GUAA の構築を行っております。この改変 DSL は 180 分間で約 70 回ものターンオーバーが観察されました。さらに著者らは上記 GUAA ループ/B7.8 レセプターモチーフの代わりにワトソン・クリック

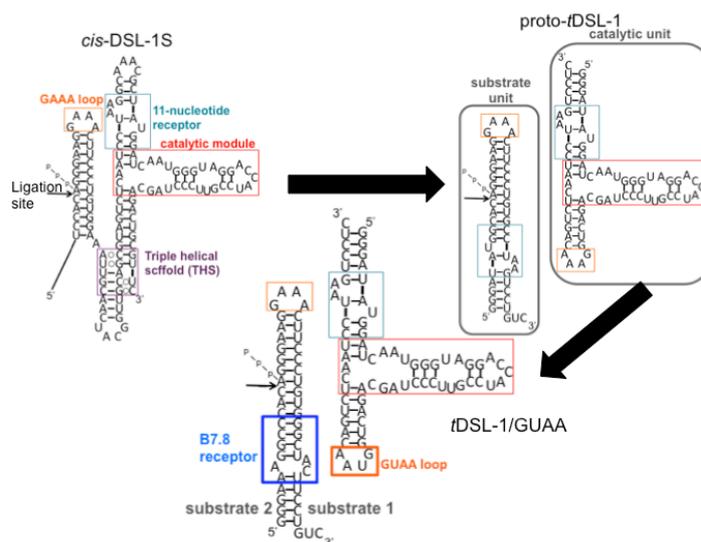


図 1. *trans-acting* DSL の作製

を導入する必要があります。上記 proto-*t*DSL-1 ではこのモチーフとして GAAA ループ/11-nt レセプターをそれぞれに組み込んだ戦略をとっておりましたが、その構造的特徴からホモ二量体を形成してしまうという欠点がありました。そこでこの論文では基質 RNA ユニットと触媒 RNA ユニットの相互作用モチーフを GAAA ループ/11-nt レセプターと GUAA ループ/B7.8 レセプターの二種類組み合わせることで改変型 *trans-acting* DSL、*t*DSL-1/GUAA の構築を行っております。この改変 DSL は 180 分間で約 70 回ものターンオーバーが観察されました。さらに著者らは上記 GUAA ループ/B7.8 レセプターモチーフの代わりにワトソン・クリック

塩基対モチーフを用いて検討を行っているのですが、この場合リガーゼ活性及びターンオーバー機能の劇的な低下がみられてしまったのが興味深いところです。基質と触媒の相互作用が強すぎるとその触媒活性に悪影響が出てしまうことは周知の通りですが、今回のケースではそこまで話が単純ではなさそうです。と、申しますのも、基質ユニットと触媒ユニットの親和性、 K_d を測定したところ、先の *tDSL-1/GUAA* の場合 273 nM だったのに対し、5 塩基のワトソン・クリック対の *tDSL* では 311 nM とほとんど変わらなかったからです。この結果に対して著者らは柔軟性のあるワトソン・クリック塩基対よりも構造が制約されたループ/レセプター相互作用の場合、ライゲーション反応により有利で安定な基質-触媒複合体構造をとりやすいのではないかと述べております。もしこの複合体の詳細な構造が分かれば、今回の知見は今後リボザイム触媒ドメイン構築を行う上でのヒントになりそうです。

Assembly and activation of a kinase ribozyme.

D. H. Burke, S. S. Rhee, *RNA*, **16**, 2349-2359 (2010).

次に紹介するリボザイムはキナーゼ活性を保持する RNA です。1994 年 Lorsch らによって報告されたり

ボザイム Kin.46 は ATP γ S から基質 RNA の 5' 末端にリン酸基を転移させるリボザイムで (図 2a)、3' 末端に“エフェクターオリゴ”と呼ばれるオリゴヌクレオチドが結合することによってその活性が向上する性質を持ちます。この論文において著者らは、リボザイムの配列及び二次構造が触媒活性とエ

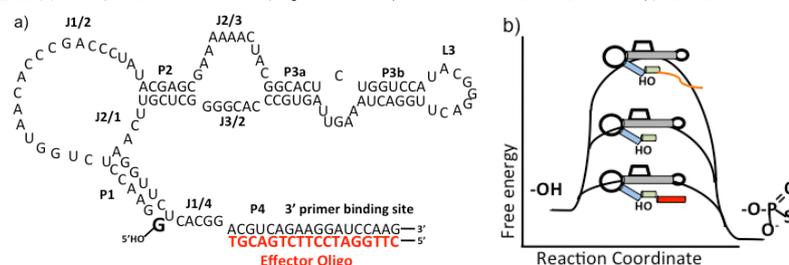


図 2. リボザイム Kin.46. a) 二次構造 b) エフェクターオリゴによる遷移状態安定化

フェクターオリゴを介した制御にどのような影響を及ぼすか、種々の Kin.46 変異体を作製して検討を行っております。これらの解析によってリン酸化反応に必要な不可欠な部位を特定しましたが、同時にその活性にほとんど影響を与えない領域の特定にも成功しております。一見するとこのリボザイムを特徴付けているように見えた J1/2 や L3 といったループ部分が活性にあまり関与していなかったところが面白いところです。さらに著者らは上記エフェクターオリゴの長さ及び結合部位の長さ、配列の変更など様々な検討を行いました。その結果、エフェクター非存在下の条件ではその結合部位が短い程高いリン酸化活性が確認されました。そこで各変異体における詳細な熱力学計算を行ったところ、この結合部位の長さやエフェクターオリゴの結合が、 ΔH^\ddagger 及び ΔS^\ddagger に大きな影響を与えていた事が分かりました。これらの結果より、エフェクターオリゴが結合することによって形成されるヘリックス、P4 がリボザイム活性部位周辺の安定化に寄与しているのではないかと推察し、この P4 における遷移状態安定化モデルを提起しております (図 2b)。

Ribozyme-catalyzed transcription of an active ribozyme.

A. Wochner, J. Attwater, A. Coulson, P. Holliger, *Science*, **332**, 209-212 (2011).

これまでに、リガーゼ、キナーゼと生体内で行われる重要な反応に関連したリボザイムの論文についてお話して来ました。最後は RNA ポリメラーゼ活性を有するリボザイムに関する論文について説明させて頂きたいと思っております。RNA ワールド仮説において、RNA の複製及び RNA 遺伝子の発現にはこの RNA ポリメラーゼ活性が必要不可欠とされています。この活性を有するリボザイムは自然界においてははまだ報告

されておりません(あるいは進化の過程で消失してしまった?)が、リガーゼリボザイムを土台とした *in vitro* 選択によって R18 という RNA ポリメラーゼ活性を有するリボザイムがこれまでに取得されております。そこで今回著者らは water-in-oil エマルジョンと

セルソーターを用いた新たなリボザイム選択法、compartmentalized bead-tagging (CBT)を用いてこの R18 の *in vitro* 進化を試みました(図 3)。まずプライマー/鋳型複合体と相互作用する R18 の 5'末端領域をランダム化したライブラリー($\sim 5 \times 10^7$)を作製し、CBT セレクションを行った結果、5'末端にヘアピンドメインとポリメラーゼ活性に影響を与える P2 領域に点変異を保持する優良クローン C19 を獲得しました。しかしながら、このクローンは鋳型が長いと伸張活性が著しく低下してしまった為、この C19 に対してさらに鋳型結合サイト部位周辺の改良を施し、より伸張活性が強化された tC19 の獲得に成功しました。この tC19、今回用いた鋳型では最高 95 nt もの伸張活性が確認されました(もとの R18 では 8 nt 程度)。ここまでの結果だけでも十分に凄いのですが、さらに著者らは R18 の別路線の *in vitro* 進化を試みております。これまでに述べて来た R18、C19 及び tC19 はすべて鋳型の配列依存的で、このままでは汎用性に欠けます。そこで著者らは R18 のランダムライブラリーを構築 (5×10^7) し、CBT セレクションによって 4 カ所の変異 C60U、G93A、G95A、A159C を保持する鋳型配列の特異性が低減されたクローン Z を獲得しました。そして仕上げに先の tC19 に上記 4 カ所の変異を導入し、高い伸張活性と鋳型の汎用性を兼ね備えた tC19Z を構築しました。このクローンは R18 の約 20 倍もの忠実性をも保持しており、研究、臨床現場、様々な用途での応用が期待できます。実際、その一例として著者らはこの tC19Z を用いて医療用にデザインされたハンマーヘッドリボザイムの全長合成の結果を示しておりますが、もう圧倒されるだけです。ここまで自由自在にリボザイムの *in vitro* 進化を行えるとは...。人工的に創製したとは言え、これだけ凄い RNA ポリメラーゼ・リボザイムの存在が実証されました。“RNA ワールド仮説”が“仮説”でなくなるまで、目が離せなさそうです。

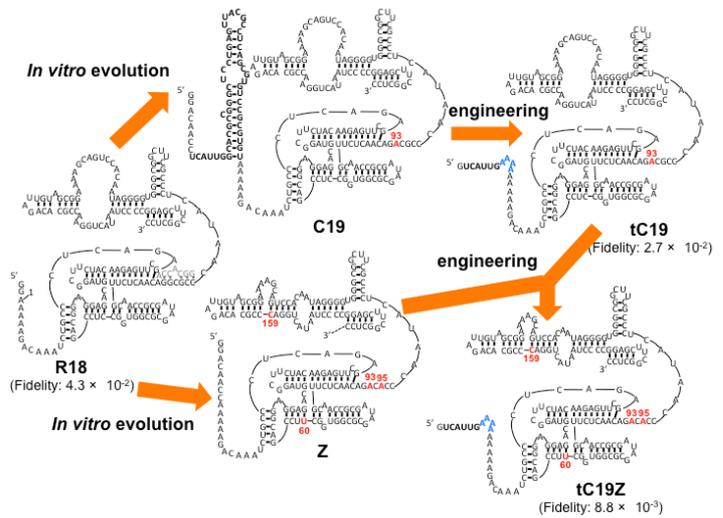


図 3. リボザイム R18 の *in vitro* 進化の概略

留
学
体
験
記

カリフォルニア大学サンディエゴ校留学体験記

Michael D. Burkart Research Group, Department of Chemistry and Biochemistry,
University of California, San Diego

石川 文洋 (fishikawa@ucsd.edu)

私は現在、カリフォルニア大学サンディエゴ校 (University of California, San Diego) の Michael D. Burkart 教授の下、博士研究員として研究を行っています。2009年3月に博士号を大阪府立大学大学院理学系研究科 藤井郁雄教授の下で取得し、その後1年間の同研究室での博士研究員を経て2010年4月からこれまでの間、Burkart 教授の下でポスドクとして研究に従事する機会を頂き現在に至っています。今回、この様に留学体験記を執筆するチャンスを頂きましたので、編集委員の円谷健先生に感謝すると共に、今後海外での研究留学を計画している学生の皆さんのお役に少しでも立てればと思い、ポスドクポジションの獲得、カリフォルニア大学サンディエゴ校での研究生活等について紹介させていただきます。

ポスドクポジションの獲得

私が Mike に初めて連絡を取ったのは、2009年8月のことでした。当時は新規触媒抗体の創出について研究を行っていましたが、ポスドクでは触媒抗体のような人工酵素ではなく天然酵素特に脂肪酸合成酵素 (FAS)、ポリケチド合成酵素 (PKS) および非リボソーム性ペプチド合成酵素 (NRPS) に代表される生合成酵素について研究を行いたいと考えていました。そこで、上記生合成酵素に関して興味深い研究を行っていた Burkart 研究室に問い合わせを行いました。Mike の研究に大変興味を持っているということに加えて、私自身の強みなどに言及し、ポスドクとして受け入れてくれるか伺う email を送付しました。それからわずか3日後に”You have an outstanding background in chemical biology that fits in very well with our own research”という旨のメールが届きあまりにもあっさり決定してしまったことに大変驚いたことを覚えています。当時指導教官であった藤井先生の強い推薦と Mike のご厚意のおかげで、アメリカでのポスドクポジションを決めることができました。最も重要なことはタイミング (自分の力ではどうにもなりません...行ってからわかったことですがちょうど一人ポスドクが出て行くことが決まった時に私からの応募を受けたそうです) と感じています。断られても、次に向けて動くのが大切だと思っています。その瞬間から2010年4月から期待に答えられるよう頂いたテーマに関する論文を読み、綿密に研究計画を立てて過ごしていました。

カリフォルニア州サンディエゴ (ラホヤ)

私が留学しているカリフォルニア州ラホヤはカリフォルニア州の南端に位置するサンディエゴ市の北郊に

あり、全米でもっとも気候が良いところと言われています。年中温暖で、雨が少なく4月から10月にかけては毎日晴天が続きます。夏は、暑いわりには湿気が少ないため蒸し暑くはなく、夜になればとても涼しく、外出には上着がいる時もあります。温暖な気候とはいえ、やはり冬はそれなりに寒くなります。といっても凍りつくような寒さではなく、長いコートやオーバーはまず不要です。1月～2月は、雨が降りますが雨量は東京の10分の1程度です。

ラホヤの人口は4万人ほどで有名人や資産家の邸宅が多く、海岸と丘陵のあるリゾート地としてとして有名です。中心部にはホテル、高級レストラン、宝飾店などがあります。海岸では海水浴、またサーフィンやダイビングなどのマリンスポーツも盛んです。治安は良く、女性が夜一人でジョギングをしたりすることも可能です。サンディエゴは車社会のアメリカにおいてバス網が比較的発達していて、しかもカリフォルニア大学サンディエゴ校の学生・職員はIDを提示すれば無料で乗ることができます。また大学がシャトルバスを運行しており、早朝7時から深夜12時まで最終バスを気にせず実験をすることができるという点でありがたいシステムです。

また、学術都市としても有名であり、数多くの著名な研究者が在籍するスクリプス研究所、DNA二重螺旋のCrick教授が在籍していたSalk研究所、Burnham研究所、ラホヤ免疫アレルギー研究所などの国際的研究機関が集まっています。私の留学しているカリフォルニア大学サンディエゴ校もその一端を担っています。サンディエゴ地区のバイテク企業の発展はこれら研究所、カリフォルニア大学サンディエゴ校(UCSD)の相乗効果によるといわれています。このようにサンディエゴには、技術と優秀な人材が溢れているため、ジョンソンアンドジョンソン、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所狭しとこの地域に集まっています。またスクリプス研究所、Salk研究所、UCSDからの技術移転を受けて設立されたベンチャー企業も多く、教授が経営に携わることは珍しくないと聞きます。

一方で最大の欠点といえるのが、物価特に家賃が高いということです。私が住んでいるアパートは70^m²の1LDK、駐車場着きの1275ドル/月です。どこのアパートも大体このぐらいの値段だと思います。1年に一度賃貸契約を更新するときに1250ドル/月から1300ドル/月にしたいと言われて、激しく抵抗してなんとかこの値段で落ち着いています。ただこの家賃が高い点を除けば数多くの日本食のレストラン、日本のスーパーマーケットだけでなく、日本人の研究者も多く、日本人にとっては大変過ごしやすい環境かもしれません。また日本とは全く違う環境の中に身をおいて、悪戦苦闘しながら生活することは大切な経験のひとつだと感じています。

カリフォルニア大学サンディエゴ校 化学・生化学科 Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, San Diego

カリフォルニア大学はカリフォルニア州オークランド市に本部を置くアメリカ合衆国の州立大学です。カリフォルニア大学群はアメリカ合衆国で最大規模の州立大学群です。10あるカリフォルニア大学のキャンパスの1つであるカリフォルニア大学サンディエゴ校は研究型大学と言う事で、大学院での研究が特に重要視されており各分野での世界的評価は著しいものがあります。化学・生化学科の研究環境も申し分のないものです。

Burkart研究室での研究生活

ここで私が所属している研究室について紹介します。Burkart研の研究課題は非常に多岐に渡っています。大まかに言うと、行われている実験は天然物全合成を含む有機合成、分子生物学、構造生物学、タン

パクタータンパク相互作用解析、プロテオーム解析、阻害剤探索、微生物を用いた化合物の活性評価まで非常に幅広いものであり、ケミカルバイオロジーの研究室です。研究室のメンバーはPIであるMike、ポスドク5人、大学院生14人の構成 (2011年9月時点) でアメリカでは中規模の研究室です。Burkart研には organic chemistry、biochemistry、molecular biology、chemical biology、microbiologyのスキルを持った大学院生が集まって来ており、同様にポスドクのメンバーのバックグラウンドも非常に多様です。私は日本では触媒抗体の開発研究に従事しており、有機合成化学、免疫化学、酵素化学、分子生物学等幅広く学んでいたため、違和感なく仕事を始めることができましたがそれでも、プロテオミクス研究の経験は全くありませんでしたので、Burkart研のメンバーに教えてもらいながら行なっています。研究テーマとしては、私は大きく分けて三つのプロジェクトを行なっています。一つ目は、脂肪酸およびポリケチド合成酵素の脱水酵素 (DH) ドメイン特異的標識プローブの開発。二つ目は、生合成酵素におけるタンパク質-タンパク質相互作用を解析するためのクロスリンクプローブの開発。三つ目は、OASIS 法による新規生合成酵素の同定および遺伝子クラスター解析研究、に従事しています。幸い仕事も順調に進み、一つ目の仕事は既に論文にまとめ、二つ目の仕事を論文にまとめているところです。研究が順調に進んでいることもあり多くのグループと共同研究をさせていただいており、ディスカッションを行い共同研究先に出向したり非常に貴重な経験をさせていただいています。研究は基本的にポスドクも学生も独立して行います。学生の自主性の高さには驚かされました。一週間に一度グループミーティングがあり、二人が各自の研究進行を報告し、議論する機会があります。発表者の二人がビールを40-50本ほど用意し、発表者も含めお酒を飲みながら行います。これはMikeの考えで、”お酒を飲みながらの方が質問がよく出ようになり議論が活発になる” ということに基づいています。私の拙い英語でディスカッションを行うのは当初は難しかったですが、寛容に見守って頂き、そのおかげで有意義な議論を行うことができています。

最後に

カリフォルニア大学サンディエゴ校での生活は1年半過ぎましたが、時間が流れるのは本当に早いと感じています。それだけ充実した時間を過ごせているのだと感じています。私は英語が堪能ではなかったため、最初の生活のセットアップ、研究生活では本当に苦労しました。英語で議論し、文化の異なる国で生活し、仕事をしてみなければ分からなかったことも多くあります。またそのような環境で結果を出してきたことは、やはり大きな自信になっています。今後博士課程やポスドクへ進もうとしている学生の皆さんも、思い切って国外に出て、レベルの高い環境に身を置いて自分を磨いてほしいと思います。

最後になりましたが、研究室に受け入れてくださり、研究に関して本当に多くのサポートをしてくださる Michael D. Burkart 教授、研究・生活の両面で力になってもらった Burkart 研のメンバー、良き理解者であり私の希望による渡米にも同伴してくれた妻、息子にこの場をお借りして深く感謝致します。



La Jolla の海岸



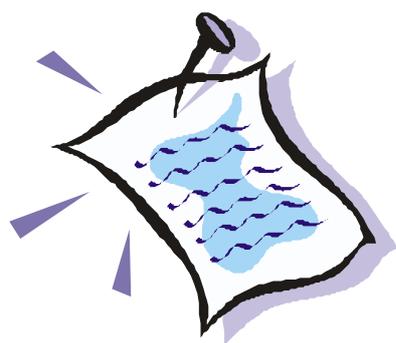
UCSD 構内



ラボのメンバーと日本食レストランにて
(左から二番目が筆者)



Mike (右)と筆者(左)



シンポジウム等会告

第14回 生命化学研究会

～In-Cell Interactions を調べる・動かす・組み上げる～

主催 日本化学会フロンティア生命化学研究会

会期 2011年12月2日（金）～3日（土）

会場 ラフォーレ南紀白浜（〒649-2211和歌山県西牟婁郡白浜町2428, TEL0739-43-8000）

<http://www.laforet.co.jp/lfhotels/shm/>

□プログラム

12月2日（金）

- 12:55 会長挨拶
- 13:00-13:45 「固定化・プローブ化を基軸とした生物活性小分子のケミカルバイオロジー」
叶 直樹（東北大薬）
- 13:45-14:30 「大腸菌膜タンパク質挿入に関わる新しい因子：機能と構造」
島本啓子（サントリー生物有機科学研）
- 14:30-14:50 休憩
- 14:50-15:35 「細胞構造生物学：in-cell NMRを用いたアプローチ」
伊藤 隆（首都大学東京）
- 15:35-16:20 「高難度タンパク質生産と解析を加速するタギング技術開発」
高木淳一（阪大たんぱく研）
- 16:20-16:30 写真撮影
- 16:30-17:30 ポスターセッション
- 17:30-19:00 チェックイン、入浴、自由
- 17:00-17:30 幹事会
- 19:00-21:00 夕食
- 22:00- フリーディスカッション

12月3日（土）

- 7:30-9:00 朝食、各自チェックアウト
- 9:00-9:45 「ナノとバイオを繋ぐ分子設計」
水上 進（阪大工）

9:45-10:30	「細菌由来の複合糖質；合成法開発と自然免疫機構制御のためのアプローチ」 藤本ゆかり（阪大理）
10:30-10:45	休憩
10:45-11:30	「高分子の超分子化学と機能物質設計」 金原 数（東北大多元研）
11:30-11:45	総会
解散	

● 交通：JR白浜駅から、市内循環バス15分白良浜下車バス停から徒歩7~10分（上り坂）、またはタクシー10分。南紀白浜空港からタクシー10分。白良浜バス停からホテルへの登り、やや勾配がきついです。できればタクシーを乗り合わせてお越し下さい。

● 会費：参加登録費 7,000円，宿泊費（食事代込）13,000円（当日徴収）

● 問い合わせ・連絡先：

〒819-0395 大阪府茨木市美穂ヶ丘8-1

大阪大学産業科学研究所 大神田淳子

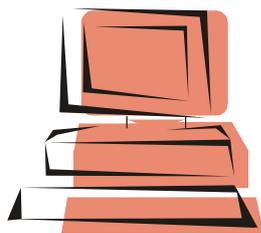
Phone : 06-6879-8472 Fax : 06-6879-8474

E-mail: johkanda【atmark】sanken.osaka-u.ac.jp

【atmark】は半角の@を入力してください。

第14回生命化学研究会 in 白浜温泉 幹事

菊地和也（阪大工）・大神田淳子（阪大産研）・円谷 健（阪府大）



編集後記

ここに生命化学研究レターNo.37 をお送りします。今回も、執筆者の皆様および編集委員のご協力により何とか編集作業を終えることができました。生命化学ニュースレター編集委員となってから5年になりますが、今号をもちまして、編集委員を交代させていただきます。長い間、たくさんの方々から大変面白い原稿をお寄せいただき、本当にありがとうございました。いつも10月の編集作業は科研費の申請と重なって大変な時もありましたが、皆様のご協力もあり、楽しんでやることができました。ここに、御礼申し上げます。私の後任には九州大学の松浦和則さんをお願いしています。私も陰ながら、生命化学ニュースレターの編集のお手伝いをしていきたいと思っていますので、今後ご協力お願いいたします。生命化学研究レターNo. 38 は、大神田さん(大阪大学)の担当により、2012年2月頃の発行を予定しております。ニュースレター改善のため、皆さんからのご要望、ご意見等をお待ちしております。編集担当(大阪大学・大神田, 熊本大学・井原, 九州大学・松浦)までご連絡をいただければ幸いです。

平成23年11月11日

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

大神田淳子(大阪大学)

井原敏博(熊本大学)