

# 生命化学研究レター

(2014年2月)

**2.** 巻頭言

時代おくれの科学者

甲南大学 FIBER 杉本 直己

**3.** Conversation

**4.** 主催研究会報告

第16回生命化学研究会 in 熱海

**9.** 研究紹介

**9.** 膜タンパク質膜挿入の鍵を握る糖脂質酵素 MPIase

サントリー生命科学財団・岩手大学農学部附属寒冷バイオフィロンティア研究センター

島本 啓子・西山 賢一

**15.** エピジェネティクスのケミカルコントロール

京都府立医科大学大学院医学研究科 鈴木 孝禎

**20.** 論文紹介「気になった論文」

Department of Chemistry, Dartmouth College 溝口 玄樹

Universität Erlangen-Nürnberg 橋本 知恵

**27.** 留学体験記

ブランダイス大学、及び、マサチューセッツ総合病院留学体験記

Department of Chemistry, Brandeis University 堀谷 学

**32.** シンポジウム等会告

京都大学化学研究所国際シンポジウム2014 (ICRIS'14)・日本化学会  
第94春季年会特別企画・日本化学会第94春季年会アドバンスト・テ  
クノロジー・プログラム(ATP)

**35.** お知らせ

異動

編集後記

# 巻頭言

連載「生命化学の明日はどっちだ」2回目:

## 時代おくれの科学者

甲南大学 FIBER 杉本直己

ベンター (J. Craig Venter) 博士と出会った。個人的に話す機会も得た。

云わずと知れたヒトゲノム解析の立役者である。2000年6月26日、ホワイトハウスで、クリントン米国大統領(当時)がヒトゲノムの概要解説終了を発表した。この報道はご記憶の方も多かろう。あのとき、クリントン氏や米国国立ヒトゲノム研究所所長(当時)のコリンズ (Francis S. Collins) 博士と並んで、フラッシュを浴びていたあの人。彼がベンター博士である。

出会った場所は、東京のパレスホテル。きっかけはビジネススクールの同窓会。話はこうである。米国ペンシルバニア大学にはWharton Schoolという名門のビジネススクールがある。この同窓会がWharton Global Forumを東京で開催し、講演会に彼を講師として招いたのである。J. Craig Venter研究所を運営する彼としては、資金の援助者として大切な聴衆の皆さんという関係なのだそうだ。勿論、聴衆の私はサイエンスが聞きたいだけだが。

彼の講演は軽妙なジョークで始まった。「また招いていただいてありがとうございます。3回目になりますね。1回目、2回目の話があまりにも分かりにくかったので、最後のチャンスを与えようということで、3回目の“interview (研究支援依頼の面接説明会)”になったのだと思います」。会場は爆笑に包まれた。講演内容は意外にも科学的な事実を基盤にした学問的なものであった。講演が終わった後、投資や援助を予定している方々から次々と質問がなされたが、彼はできるだけ丁寧に答えていた。最後の質問は難しいものであった。「あなたの研究から最終的には変な人間が生まれるのではないかと危惧します。スパイダーマンのような」。彼の答えはこうだ。「先週も映画を見ました。すでに、スパイダーマンは生み出されています。そしてあんなに活躍していますよ」。爆笑と拍手で講演は終わった。

実は、彼の講演のうまさではなく、私はその講演のもとになる彼の基盤的科学概念の凄さに驚嘆していた。マスコミの報道から、彼はサイエンスを金儲けの道具と考えている悪徳科学者のように思っていたが、私は間違っていたようだ。彼は、まさしくロマンを追い求めるサイエンティストであった。ある質問に答えて、彼はこういった。“私は時代おくれ (old-fashioned) なのかもしれない。基礎研究指向だから”。驚いた。基礎研究指向で民間(自分)の研究所をどうやって運営しているのだろうか。公的資金頼みの研究者としては、その秘訣が知りたい。

彼は自叙伝(「ヒトゲノムを解説した男」野中香方子氏訳、化学同人)でこのように述べている。

『わたしは幸いにも人生を通して、最も偉大で最も刺激的で、  
そしておそらく最も有益な科学的冒険に参加してきた。』

このように言ってみたいものである。さてヒトゲノムの次の、“最も素晴らしい科学的冒険”とは何なのだろうか。ジョー！とは叫ばないが、真のポストゲノムに向けて、生命化学の“明日はどっちだ”を考える時期なのかも知れない。

# Conversation

近年、我々は競争的資金獲得とその評価に追われ、つい「できそうなこと」を研究する傾向にある。科学（化学）の本質的な課題にチャレンジするのではなく、解決できる課題を自ら作り、それに答えを出す研究をしてしまう。つまり「目先の明日」を求めすぎている。ベンターは、常に「できそうにないこと」に挑戦しているのだろう。なかなかできることではないが、我々もその気概を忘れてはならない。私自身も、常にその葛藤に苦しんでいる。

菅 裕明、東京大学

知り合いの先生で私がおの立場だったら研究なんて到底できないような状況に居ても素晴らしい研究を行っている方がおられます。自分の研究が進まないのは周りのせいではなく自分に能力がないのだと思って頑張ってきました（きたつもり）。借金が税収入を超えた日本（個人だったら自己破産）において大学の教育や研究にお金がまわらないはずですよ。自分がなぜ研究をしているのかと問いただせば、好きだからです。私の研究に賛同してくる学生もいます。好きな研究のためには多少の雑務など気にせず研究しないといけないと思っています。好きな研究を独りよがりにならず、研究費を支援して頂いた方々（国民）のためにも世の中に役に立つように研究をするだけだと思います。元ケネディ大統領の演説で「国家が何をしてくれるかではなく、国民が国家に何が出来るか考えよ」と言われました。自分たちができるやり方で日本の科学を発展できるようにそれぞれのやり方で努力するしかないと思いました。

竹中 繁織、九州工業大学



# 主催研究会報告

2014年1月9、10日、第16回生命化学研究会が静岡県熱海市で開催されました。東大の村上・菅両氏のお世話により2年振りの開催となった今回の研究会では、7件の招待講演と30件のポスター発表が行われ、熱い研究討論が繰り広げられました。

## 第16回 生命化学研究会

主催：日本化学会フロンティア生命化学研究会

共催：日本化学会

会期：2014年1月9日（木）～10日（金）

会場：KKR ホテル熱海

幹事：村上 裕（東京大学大学院総合文化研究科）、菅 裕明（東京大学大学院理学系研究科）

### 【プログラム】

1月9日（木）

12:55 挨拶

13:00-13:45 Discussion Leader: 村上 裕

L1 「大腸菌をマイクロデバイスと融合する」

田端 和仁（東大工）

13:45-14:30 Discussion Leader: 津本 浩平

L2 「バキュロウイルスと抗体テクノロジー」

浜窪 隆雄（東大先端研）

14:30-14:50 休憩

14:50-15:35 Discussion Leader: 菅 裕明

L3 「Unstructured/Structured Interaction を標的にした創薬」

小路 弘行（株式会社 PRISM Pharma）

15:35-16:20 Discussion Leader: 桑原 正靖

L4 「RNA スイッチ：ナノ構造と人工回路設計の共通原理」

齊藤 博英（京大 CiRA）

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

17:30-18:00 幹事会

19:00-21:00 夕食 21:00-

フリーディスカッション

1月10日(金)

7:30-9:00 朝食、各自フロントにてチェックアウト

9:00-9:45 Discussion Leader: 円谷 健

L4「結晶構造に基づく低分子化合物およびペプチドによる創薬研究」

濡木 理 (東大理)

9:45-10:30 Discussion Leader: 井川 善也

L6「RNA エピジェネティクスと生命現象」

鈴木 勉 (東大工)

10:30-10:45 休憩

10:45-11:30 Discussion Leader: 金原 数

L7「天然物の骨格多様化合成プロセス開発」

大栗 博毅 (北大理)

11:30-11:45 総会 解散

### ポスターセッションプログラム

P01 グラフェン酸化ナノ界面における DNA の挙動を解明する

甲南大学フロンティアサイエンス学部 三好 大輔

P02 蛋白質針を分子ツールとする細胞制御

東京工業大学大学院生命理工研究科 上野 隆史

P03 One-hybrid screening を用いた TALE タンパク質の標的塩基変換

京都大学化学研究所 今西 未来

P04 ホロ酵素型抗体酵素はどのようにして反応を触媒するのか?

大阪府立大学大学院理学系研究科 円谷 健

P05 新規 NAD(P)<sup>+</sup>選択的検出プローブは cytochrome P450 の基質ハイスループットスクリーニングを可能とする

東北大学大学院薬学研究科 叶 直樹

P06 緑色硫黄光合成細菌の巨大アンテナ系で働く色素の C3 1 位を水酸化する 2 つの酵素は、その立体化学に大きく関与する。

久留米大学医学部医化学講座 原田 二郎

P07 自己組織化蛍光ナノプローブによる内在性蛋白質の in-cell イメージング

京都大学大学院工学研究科 吉井 達之

P08 生体機能分子の構造変化の高感度・高時間分解能解析を目指した CD 測定装置の開発

東北大学多元物質科学研究所 和田 健彦

P09 フシコクシン誘導体の分化誘導活性作用機序を解明する

京都大学化学研究所 大神田 淳子

P10 In vitro セレクションを用いて小分子結合性 small non-coding RNA を探索する

東京大学大学院理学系研究科化学専攻 寺坂 尚紘

P11 ウイルスタンパク質は相状態の違いを区別し、人工混合脂質膜ナノドメイン内のペプチド脂質を認識する

慶應義塾大学理工学部 松原 輝彦

P12 人工核酸アプタマー：適合性の向上による標的多様性の拡張

群馬大学理工学研究院 栞原 正靖

P13 架橋反応性核酸は細胞内遺伝子発現制御を効率化する

東北大学多元物質科学研究所 永次 史

P14 コウジ酸修飾カルボランでメラノーマ選択的ホウ素中性子捕捉療法を実現する

大阪市立大学大学院工学研究科 河崎 陸

P15 繊維状ウイルスからメゾスケール集合体を創製する

東京工業大学大学院生命理工学研究科 澤田 敏樹

P16 ペプチド配位子で新しい二酸化炭素還元錯体触媒を創る

北里大学大学院理学研究科 石田 斉

P17 電気化学的テロメラーゼアッセイを利用した口腔癌診断

九州工業大学大学院工学研究院 竹中 繁織

P18 PYP タグと発蛍光プローブを利用した細胞内蛋白質高速イメージング技術の開発

大阪大学大学院工学研究科 菊地 和也

P19 金属イオンとの錯生成により DNA 塩基配列を可逆的に編集する

熊本大学大学院自然科学研究科 井原 敏博

P20 人工環状ペプチドは核内増殖抗原 PCNA を細胞内で阻害する

東京大学大学院理学系研究科 後藤 佑樹



村上 裕 氏 (本会幹事)



菅 裕明 氏 (本会幹事)



田端 和仁 氏



浜窪 隆雄 氏





小路 弘行 氏



齊藤 博英 氏



濡木 理 氏



鈴木 勉 氏



大栗 博毅 氏



会場風景



平成 26 年 1 月 9 日出席者一同  
会場写真撮影：円谷 健





研究紹介

膜タンパク質膜挿入の鍵を握る

糖脂質酵素 MPIase

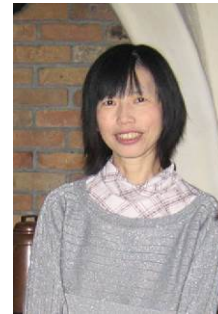
公益財団法人 サントリー生命科学財団<sup>1</sup>

岩手大学 農学部附属

寒冷バイオフィロンティア研究センター<sup>2</sup>

島本 啓子<sup>1</sup>、西山 賢一<sup>2</sup>

(shimamot@sunbor.or.jp)



島本



西山

1. はじめに

生命の基本となる細胞は、すべて細胞膜に包まれて自己と外界を区別している。細胞膜には多くの膜タンパク質が存在して、細胞内外の物質や情報のやりとりを担っている。膜タンパク質が正常な機能を発揮するには、細胞内のリボゾームにおいて生合成されたタンパク質が、正しい三次元構造と配向性をもって細胞膜へ挿入されることが必須である。このタンパク質の膜挿入機構の基本は全ての生物で共通であると考えられており、その分子機構解明は生命科学における重要な課題の一つである。

生体膜内は疎水的な環境にあるため、多くの膜タンパク質の膜貫通領域は疎水的である。一方、タンパク質の生合成は親水的な細胞質内で行われるため、疎水的なタンパク質を親水的な環境で生合成して膜に挿入するためには、特別なしくみ(分子装置)が必要である。これまで、膜タンパク質の膜挿入を手助けする多くのタンパク質が同定されてきた。最近、我々は大腸菌内膜における膜タンパク質挿入に必須の新たな因子として、MPIase (Membrane Protein Integrase) を発見した。このMPIaseについて構造解析を試みたところ、驚くべきことにMPIaseはタンパク質性の酵素ではなく、図1に示す糖脂質であるという結論に至ったので以下に紹介する。<sup>[1]</sup>

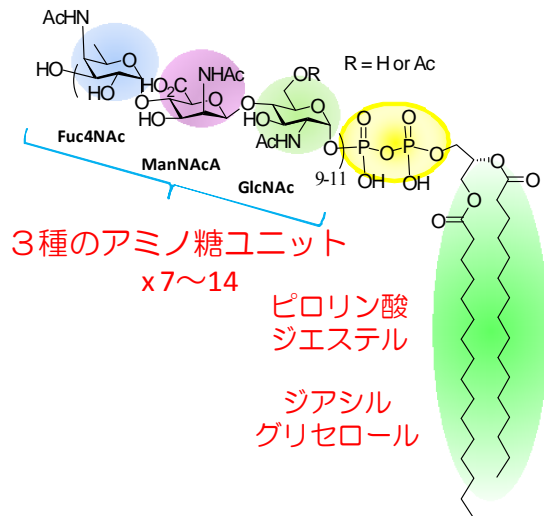


図1.新たに発見した膜タンパク質膜挿入因子 MPIase の構造

2. 新たな膜タンパク質膜挿入因子MPIaseの発見

膜タンパク質を膜に挿入したり、分泌タンパク質を膜透過させたりするための分子装置として、複数のタンパク質から形成されるトランスロコンと呼ばれる複合体チャンネルが知られている。細菌類においては、SecY、SecE、SecGから構成されるトランスロコンが関与する。トランスロコン依存性の膜タンパク質は、生合成が始まりリボゾームから出てきたところでシグナル認識粒子に認識されて膜上に輸送され、トランスロコンに受け渡された後、生合成が進行するのに合わせて膜挿入する(図2)。大腸菌にはトランスロコンが無くても内膜に挿入されるタンパク質もあり、このようなトランスロコン非依存性のタンパク質は、膜の疎水性による

膜タンパク質の挿入機構 (大腸菌)

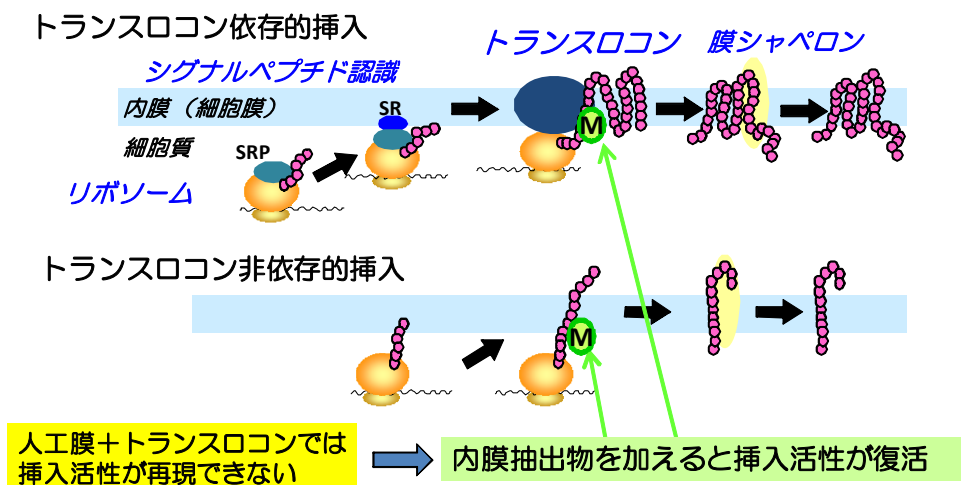


図2 大腸菌の膜タンパク質挿入機構: (上)トランスロコン依存性挿入 リボソームで合成されたタンパク質にSRP (signal recognition particle)が結合し、膜上のSRP受容体 (SR)に輸送され、トランスロコンを介して膜に挿入される。(下)トランスロコン非依存性挿入 Mplase (図中 Mで示す)はどちらの経路にも必須であった。

「自発的挿入」を起こしていると考えられていた。<sup>[2]</sup>しかし、西山は先行研究で、ジアシルグリセロール (DAG) が膜中に存在すると、「自発的挿入」が起こらないことを明らかにしていた。<sup>[3]</sup>大腸菌の膜脂質中のDAGの生理的濃度は1~2%である。人工的なリボソームにDAGをリン脂質の1%組み込むだけで自発的挿入は十分に抑制され、3~5%程度含有するリボソームでは完全に膜挿入は抑制される。しかも、この系にトランスロコンを組み込んでもトランスロコン依存性の膜挿入も起こらない。生理的濃度のDAGが「自発的挿入」も「トランスロコン依存挿入」も抑えてしまっているのであれば、実際の大腸菌の膜で膜挿入を引き起こしている要因は何なのだろうか？

さらに、DAGで自発的挿入を抑制したリボソームに大腸菌内膜の抽出物を加えると、膜挿入が復活することが分かった。<sup>[4]</sup>これらの結果は、大腸菌の内膜には、タンパク質膜挿入に関わる未知の因子が存在するという可能性を示している。そこで、我々はその機能からこの因子をMplase (Membrane Protein Integrase)と命名し、膜成分からの探索を行った。<sup>[5]</sup>Mplaseは大腸菌のタンパク質の膜挿入過程において、トランスロコン依存性・非依存性どちらの経路にも必須の因子であった。

### 3. Mplaseの構造解析

#### 3-1. Mplaseの正体: 非タンパク質性の糖脂質

大腸菌内膜の抽出物を分画したものをリボソームに組み込んで、放射性標識したタンパク質 (アッセイにはトランスロコン非依存性の Pf3 フェージコートタンパク質の変異体を用いた) の膜挿入能を指標に精製を進めた。Mplase は疎水性と親水性の両方を併せ持つ複雑な物性を示すため、精製にはかなり苦労したが、HPLC や液-液分配等の各種クロマトグラフィーを駆使して、ようやく純粋な化合物を単離することに成功した<sup>[5]</sup>。精製過程でトリクロ酢酸で抽出されるなどリポ多糖 (LPS) と似通った挙動を示したことから、当初、Mplase は LPS がタンパク質修飾されたものではないかと推定していた。しかし、純粋な Mplase のアミノ酸分析を行ったところ、意外にもアミノ酸成分は全く存在しないことが分かった。一方で、グルコサミンと大量のアモニアが検出されたことから、酸加水分解に不安定なアミノ糖の存在が推察された。

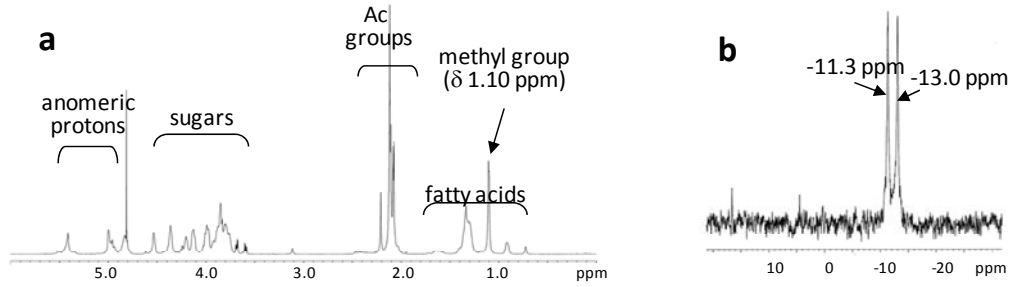


図3 MPIaseのNMR a)  $^1\text{H}$ -NMRは糖脂質構造をサポートする。b)  $^{31}\text{P}$ -NMRの化学シフトからピロリン酸ジエステルの存在が分かる。

さらに、加水分解物の GC-MS では大腸菌に一般的な脂肪酸やグリセロールが観測された。これらの結果から、MPIase は非タンパク質性の糖脂質であると推測された。MPIase の  $^1\text{H}$ -NMR や  $^{13}\text{C}$ -NMR で、アノマー位(糖の1位)、糖骨格、*N*-アセチル基、脂質等のピークが同定されたことから、糖脂質の構造が裏付けられた(図3a)。一方、 $^{31}\text{P}$ -NMR を測定したところ、-10 ppm 付近に2本の特徴的なピークを示し、ピロリン酸ジエステルの存在が示唆された(図3b)。二次元 NMR ( $^1\text{H}\{^{31}\text{P}\}$ -HMBC)で-13 ppm のリン原子と糖アノマープロトン、-11ppm のリン原子とグリセロールのメチレンプロトンとの間にそれぞれ相関が認められたため、このピロリン酸は糖鎖と脂質部位のリンカーになっていると考えた。

## 2-2. MPIaseのMS解析

続いて、MPIaseのMALDI-TOF-MSを測定したところ、分子量は7,000程度であることが分かった。また、図4aのように650または608という質量差をもつ特徴的な繰り返しパターンが見られた。各々のユニット中には、さらに42ずつ異なるピークが複数含まれていた。608を親イオンとしてMS/MSを行うと、187, 203, 217の3つの成分から構成されていた(図4b)。組成分析の結果を踏まえると、203は*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)に由来することが分かる。650を親イオンとするMS/MS解析では、203に代わって245の成分が観測され、42の質量差はGlcNAcの*O*-アセチル基の修飾の有無によるものと推測された。NMRの積分

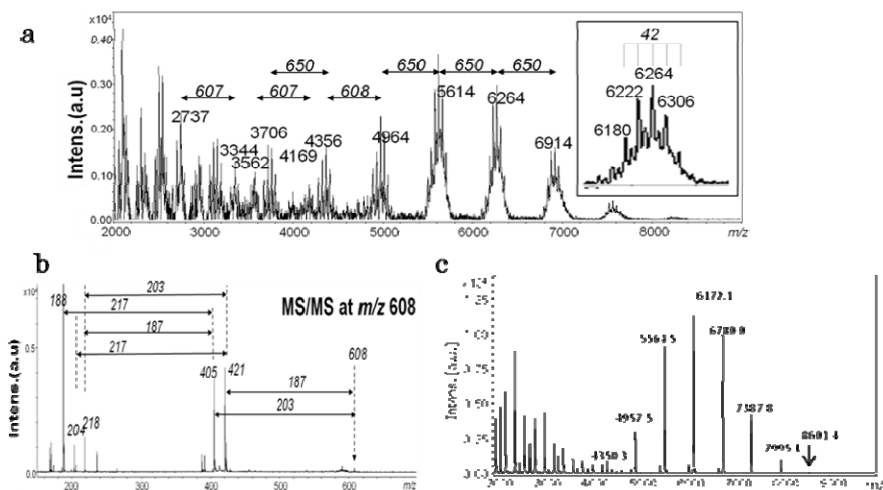


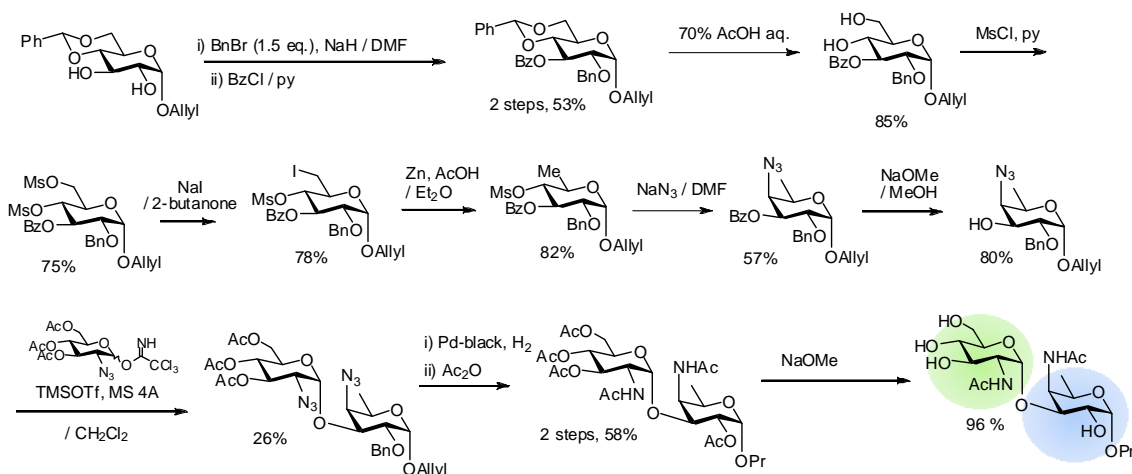
図4 MPIaseのMALDI-TOF-MS分析 a) MPIaseは特徴的な繰り返しパターンを示す。42の質量差はアセチル基の有無の多様性があることを示唆する。b)  $m/z$  608を親イオンとするMS/MS解析により3つの成分で構成されていることが分かる。c) アルカリ処理後のMPIaseのMALDI-TOF-MS。 *O*-アセチル基と脂肪酸が除去されて単純なパターンを示す。

比から約 1/3 が *O*-アセチル化されていると見積もっている。次いで、MPLase をベンジルジアゾメタンでベンジルエステル化してみると、繰返しの質量差が 90 増えて 740 となった。MS/MS 解析では、217 に代わって 307 の成分が観測され、この成分中にはエステル化されるようなアニオン性の官能基(カルボン酸またはリン酸)があると予想できた。*N*-アセチルアミノヘキソースとの質量数差から、6位の水酸基がカルボン酸となったウロン酸であると予測した。残り1つの成分は、*N*-アセチルアミノヘキソースよりも質量数が 16 小さいのでデオキシ糖になっていると考えられた。

図 4a で見られた不均一性は脂質部や糖の *O*-アセチル基の有無の多様性に由来するため、アルカリ処理や HF 処理をすると、より単純な 608 Da 間隔の繰返しパターンに変化し、繰返し数は7~14回程度であると明らかにすることができた(図 4c)。

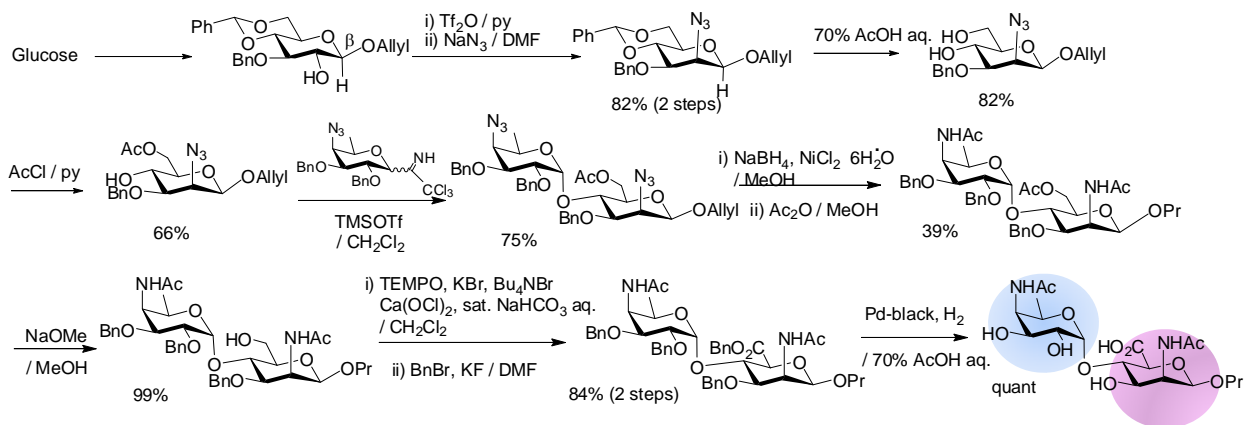
### 2-3. MPLaseの糖鎖部の解析

MPLase をメタノリシスして GC-MS で分析すると3種類の糖成分が検出できたことから、糖鎖が3糖(*N*-アセチルグルコサミン、*N*-アセチルヘキソサミンウロン酸、*N*-アセチル-デオキシヘキソサミン)の繰返し構造であることが支持された。図 3a の <sup>1</sup>H-NMR で δ1.1 ppm に観測されるピークはデオキシ糖の6位メチル基に由来すると考えられる。NOESY では、このメチル基と NOE を持つアミド基が存在することから、6位に近い位置にアミノ基を有するデオキシ糖として 4-アセトアミドフコース(Fuc4NAc)を想定した。標品を合成して GC-MS で確認したところ良い一致が見られた。ウロン酸についても、予測できる数種類の構造を合成して GC-MS を比較し、*N*-アセチルマンノサミンウロン酸(ManNAcA)と同定した。メタノールの代わりに光学活性アルコールを用いて加溶媒分解して標品と GC-MS の比較をすることで、構成糖は全て D 体であることが分かった。次いで、糖鎖の配列と結合位置を解析した。糖鎖成分を水素化ホウ素ナトリウムで還元処理してから加水分解し、GC-MS で標品との比較分析を行ったところ、GlcNAc の還元体が検出されたことから、還元末端の糖が GlcNAc であると決定した。二次元 NMR からは、Fuc4NAc と ManNAcA の間の結合は推定できたが、GlcNAc がどちらの糖に繋がっているのかを決めることができなかった。そこで、推定部分構造を合成した(Scheme 1)。また、ManNAcA のアノマー位の立体は結合定数からは決められないため、α、β 両アノマーを合成した。β 体の合成スキームを Scheme 2 に示す。これら合成品の <sup>13</sup>C-NMR のケミカルシフト値を天然物と比較した結果、糖鎖の配列をα-Fuc4NAc-(1→4)-β-ManNAcA-(1→4)-α-GlcNAc(1→3) であると決定することができた。以上の情報を総合し、MPLase の構造をを図1のように、3種のアミノ糖から成るユニットが10回程度繰返す糖鎖とジアシルグリセロールがピロリン酸を介して結合した糖脂質であると結論した。



Scheme 1





Scheme 2

### 3. MPIase の機能

MPIase を酵素や化学反応により誘導体化したのものについて、トランスロコン非依存性の膜挿入活性を調べたところ、意外にも脂質部分が無い糖鎖誘導体に天然物より強い挿入活性が見られた。また、GlcNAcのO-アセチル基を除去した誘導体には活性がなく、O-アセチル基が重要であることも分かった。ゲル濾過等の結果から、糖鎖が膜タンパク質を可溶化して凝集を防いでいる可能性が考えられた。MPIase 以外の細胞質内成分にも弱い凝集抑制作用が見られたが、膜挿入活性は全く観測されなかったことから、MPIase の作用は単なる可溶化だけでは説明できず、膜挿入能をもつシャペロン様の活性であると考えられる。我々は、図 5 のように、MPIase の糖鎖部が複合体を形成し、リボゾームから翻訳されてくる合成直後のタンパク質を捕捉し、膜に挿入できる構造に変換するという機構を推定している。水溶性の糖鎖誘導体の場合は、タンパク質の受け取り効率が上がったために高い活性を示したのであろう。

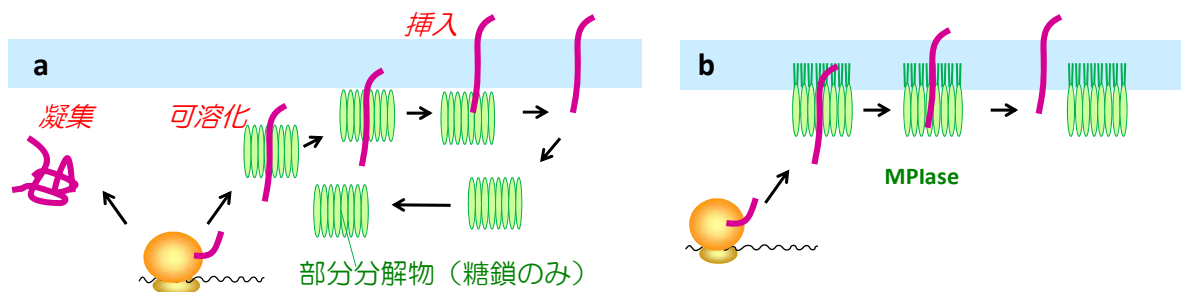


図 5 推定される挿入機構: a)糖鎖部は会合しており、リボゾームから翻訳されてくるタンパク質を捕捉して凝集を防ぎ、挿入可能な構造を維持する。膜にターゲットする過程は推定。b) 天然型 MPIase も同様に膜上で会合し、タンパク質を捕捉する機構が推定される。

### 4. おわりに

以上のように、我々は膜タンパク質が膜に挿入される際にはたらく新しい因子として、ユニークなアミノ糖を含む糖鎖ユニットから成る糖脂質 MPIase の構造を明らかにした。これまでタンパク質の膜挿入過程に非タンパク質性の有機分子が関与する知見はなく、膜挿入機構解明に大きな手掛かりを与えることができたと考えている。また、非タンパク質性の糖脂質が酵素(integrase)様の機能を示すことは極めて興味深く、我々は glycolipozyme(糖脂質酵素)という概念を提案した。糖鎖-タンパク質相互作用や糖鎖複合体から膜にタンパク質が受け渡される過程など、まだ詳細は解明できておらず、今後の課題であると考えている。

**【謝辞】**

本研究についてご指導いただきました楠本正一先生(サントリー生命科学財団前所長)、徳田元先生(盛岡大学学長)に厚く御礼申し上げます。単離構造決定、糖鎖部分合成に尽力いただいたサントリー生命科学財団 前田将秀博士、永瀬良平博士をはじめ、研究にご参画いただいた多くの皆様に深く感謝します。

**【引用文献】**

- 1) Nishiyama, K., Maeda, M., Nagase, R., Yanagisawa, K., Iwashita, T., Komura, H., Yamagaki, T., Kusumoto, S., Tokuda, H., Shimamoto, K., *Nature Commun.*, **2012**, 3, 1260, DOI: 10.1038/ncomms2267.
- 2) Geller, B. L., Wickner, W., *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260, 13281-13285.
- 3) Kawashima, Y., Miyazaki, E., Müller, M., Tokuda, H., Nishiyama, K., *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283, 24489-24496.
- 4) Nishiyama, K., Ikegami, A., Moser M., Schiltz E., Tokuda H., Müller M., *J Biol Chem.*, **2006**, 281, 35667-35676.
- 5) Nishiyama, K., Maeda, M., Abe, M., Kanamori, T., Shimamoto, K., Kusumoto, S., Ueda, T., Tokuda, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2010**, 394, 733-736.

研究紹介

エピジェネティクスのケミカルコントロール

～ヒストン脱メチル化酵素阻害薬の創製～

京都府立医科大学大学院医学研究科

鈴木 孝禎

(suzukit@koto.kpu-m.ac.jp)



1. はじめに

DNAの塩基配列に依存せず遺伝子の発現を制御する機構は、エピジェネティクスと呼ばれている。これまでに、シトシンのメチル化やヒストンリシン残基のアセチル化、メチル化などが重要なエピジェネティクス機構の一つであることが明らかにされてきた。また、エピジェネティックな異常は、がんなどの疾病に関与することも報告されている。したがって、エピジェネティクスをコントロールする化合物は、エピジェネティクス研究のためのツールとして利用することも出来るし、抗がん剤などの治療薬として応用することも期待できる。そこで、我々の研究グループでは、エピジェネティクスのケミカルコントロールを行う小分子化合物の創製研究を行っている。本稿では、エピジェネティクスを制御する重要な酵素の一つであるヒストン脱メチル化酵素に対する阻害薬の創製研究について、最近の研究成果を紹介する。

2. ヒストン脱メチル化酵素

ヒストンリシン残基のメチル化は、主に、ヒストン H3 及び H4 の 6 つのリシン残基 (H3K4、H3K9、H3K27、H3K36、H3K79、H4K20) で起こる。一般的に H3K4、H3K36、H3K79 のメチル化は転写活性に、H3K9、H3K27、H4K20 のメチル化は転写抑制の方向に働くと言われている<sup>1)</sup>。しかし、同じリシン残基においても、モノ(me1)、ジ(me2)、トリ(me3)メチル化状態をとることができ(図 1)、転写においてそれぞれ異なった影響を与えることが示唆されている<sup>2)</sup>。

以前は、ヒストンのメチル化はその C-N 結合の強さから、安定かつ不可逆的な修飾であると考えられていた。しかし、2004 年にハーバード大学の Shi らが、初のヒストン脱メチル化酵素として lysine-specific demethylase 1 (LSD1) (KDM1A) を発見したのを皮切りに<sup>3)</sup>、リシン脱メチル化酵素(KDM)が次々と発見され、ヒストンのメチル化修飾は、リシンメチル化酵素(KMT)と KDM による酵素可逆的な反応によって制御されることが明らかとなった(図 1)<sup>4)</sup>。

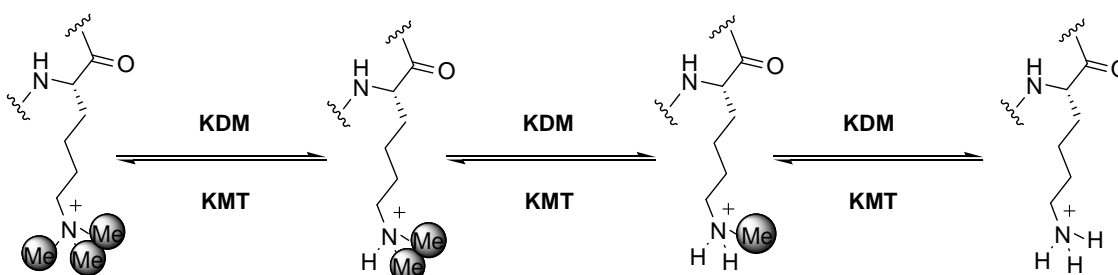


図 1 ヒストンリシン残基のメチル化修飾

KDM はフラビン依存性リシン脱メチル化酵素 (LSD) と Fe(II) 及び  $\alpha$ -ケトグルタル酸依存性の脱メチル化酵素 (JHDM) の 2 種類に分類することができる。これまでに同定されたリシン脱メチル化酵素を表 1 にまとめた。

表1 ヒストン脱メチル化酵素

Name	Alternative name	Substrate	Transcription
<b>Flavin-dependent KDMs</b>			
KDM1A	LSD1	H3K4me1/2, H3K9me1/2	repression, activation
KDM1B	LSD2	H3K4me1/2, H3K9me1/2	repression, activation
<b>Fe(II) and <math>\alpha</math>-ketoglutarate-dependent KDMs</b>			
KDM2A	JHDM1A, FBXL11	H3K36me1/2	repression
KDM2B	JHDM1B, FBXL10	H3K4me3, H3K36me1/2	repression
KDM3A	JMJD1A, JHDM2A, TSGA	H3K9me1/2	activation
KDM3B	JMJD1B, JHDM2B, 5qNCA	H3K9me1/2	activation
KDM3C	JMJD1C, JHDM2C, TRIP8	H3K9me1/2	activation
KDM4A	JMJD2A, JHDM3A	H1.4K26me3	unknown
		H3K9me2/3	activation
		H3K36me2/3	repression
KDM4B	JMJD2B, JHDM3B	H1.4K26me3	unknown
		H3K9me2/3	activation
		H3K36me2/3	repression
KDM4C	JMJD2C, JHDM3C, GASC1	H1.4K26me3	unknown
		H3K9me2/3	activation
		H3K36me2/3	repression
KDM4D	JMJD2D, KIAA0780	H1.4K26me2/3	unknown
		H3K9me1/2/3	unknown
		H3K36me2/3	repression
KDM5A	JARID1A, RBP2	H3K4me2/3	repression
KDM5B	JARID1B, PLU-1	H3K4me2/3	repression
KDM5C	JARID1C, SMCX	H3K4me2/3	repression
KDM5D	JARID1D, SMCY	H3K4me2/3	repression
KDM6A	UTX	H3K27me2/3	activation
KDM6B	JMJD3	H3K27me2/3	activation
KDM7A	JHDM1D, KIAA1718	H3K9me2, H3K27me2	activation
KDM7B	JHDM1F, PHF8, KIAA1111	H3K9me1/2, H3K27me2,	activation
		H4K20me1	
		H3K36me2	repression
KDM8	JMJD5	H3K36me2	activation
NO66	MAPJD	H3K4me1/2/3, H3K36me2/3	repression
Mina53	MDIG, NO52	H3K9me3	activation
PHF2	GRC5, JHDM1E, KIAA0062, MGC176680	H3K9me1/2	activation



表1に示すKDMの中でも、フラビン依存性脱メチル化酵素 LSD1、JHDMのアイソザイムであるJMJD2 (KDM4)、PHF8 (KDM7B) は、いくつかの疾病に関与することから<sup>5-11)</sup>、創薬のターゲットとしても注目を浴びている。以下に、我々が行ったLSD1阻害薬およびJMJD2阻害薬、PHF8阻害薬の創製研究について概説する。

### 3. LSD1阻害薬の創製<sup>12)</sup>

LSD1は、フラビン依存性のリシン脱メチル化酵素であり、遺伝子発現をエピジェネティックに制御している。LSD1は前立腺がん細胞、乳がん細胞、急性骨髄性白血病細胞など様々ながん細胞の増殖や $\alpha$ -ヘルペスウイルスの再活性化に関与することから、LSD1阻害薬は、LSD1の機能を調べるためのバイオプローブとしてだけでなく、新たな作用機序の抗がん剤、抗ウイルス剤として期待されている。しかし、既存のLSD1阻害薬はLSD1阻害活性、LSD1と相同性の高いモノアミノオキシダーゼ(MAO)に対する選択性、細胞活性において問題のあるものが多い。そこで我々は、それらの問題を克服したLSD1阻害薬の創製を目指した。

非選択的LSD1阻害薬であるPCPA (図2A) はLSD1活性中心中でFADと共有結合を形成し、LSD1を不可逆的に阻害する(図2A)。その際、PCPAの窒素原子はアンモニア分子としてLSD1活性中心中から放出される。この機構を基に、我々は「ドラッグデリバリー型標的酵素不活性化薬」という概念を提唱し、リシン部分およびPCPA部分を有するLSD1不活性化薬 $\mathbf{1}$ を設計した(図2B)。メチル化リシンはLSD1の基質であるため、 $\mathbf{1}$ のリシン部分はMAOには認識されず、LSD1により選択的かつ効率的に認識されると考えられる。続いてLSD1活性中心に運び込まれた $\mathbf{1}$ のPCPA部分はFADと付加体を形成しLSD1を阻害する。その際、 $\mathbf{1}$ のリシン部分はイミン中間体となり、続く加水分解を受けることでLSD1活性中心から放出されると予想される(図2B)。すなわち、 $\mathbf{1}$ のリシン部分はMAOおよびLSD1阻害薬であるPCPAをLSD1活性中心に選択的かつ効率的に運び込む「輸送体」として働くことが予想された。この機構により、 $\mathbf{1}$ はドラッグデリバリー型の強力なLSD1選択的不活性化薬となることが期待された。

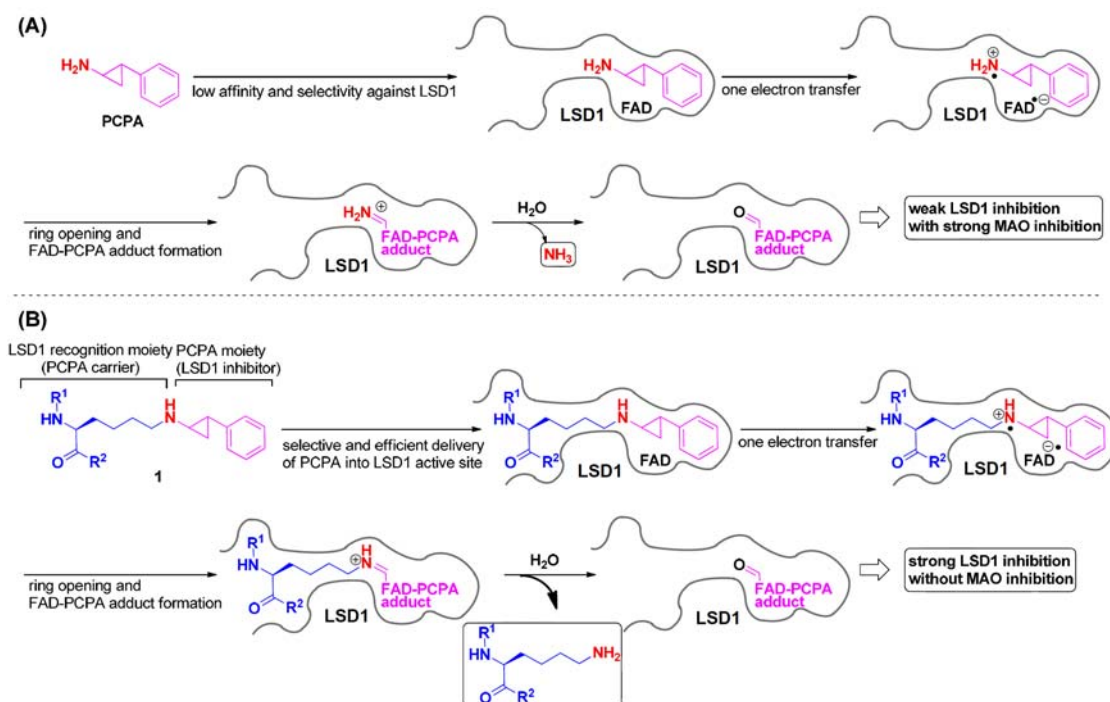


図2 (A) PCPAによるLSD1阻害、(B) 期待された $\mathbf{1}$ によるLSD1不活性化機構

LSD1のX線結晶構造を基に、**1**の誘導体を合成し、LSD1阻害活性およびがん細胞増殖阻害活性評価を行ったところ、 $IC_{50} = 0.41 \mu M$ の高いLSD1阻害活性を示すNCD33を見出した(図3)。また、NCD33は、ほとんどMAOを阻害せず( $IC_{50} > 100 \mu M$ )、高いLSD1選択性を示した。さらに、NCD-33は、HeLa細胞に対して $GI_{50}$ が $3.7 \mu M$ 、SH-SY5Y細胞に対して $GI_{50}$ が $1.7 \mu M$ とリード化合物であるPCPAと比べて高いがん細胞増殖阻害活性を示した。

酵素速度論解析を行った結果、NCD33によりLSD1の酵素活性は時間依存的に低下し、NCD33は不可逆的にLSD1を阻害していることが確認された。さらに、NCD33とLSD1の反応液をMALDI-TOF MSで解析したところ、FAD-PCPA付加体に相当する分子イオンピークが検出された。これらの解析結果から、NCD33は期待した通り、図2に示すように、リシン部分がLSD1に認識されることを利用してPCPAをLSD1活性中心へ効率的かつ選択的に運び込み、LSD1を強力かつ選択的に不活性化することが強く示唆された。

以上の結果から、ドラッグデリバリー型LSD1選択的不活性化薬の抗がん剤としての有用性が強く示された。

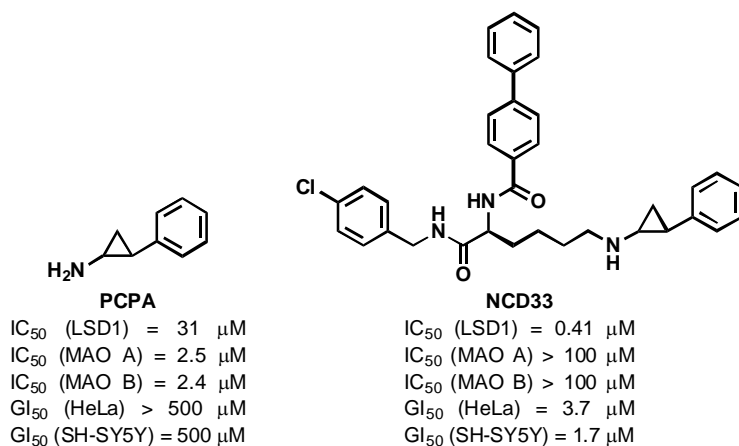


図3 NCD33の構造と生物活性

#### 4. JMJD2阻害薬とPHF8阻害薬の創製<sup>13,14)</sup>

JHDMには表1に示すアイソザイムが報告されているが、いくつかのアイソザイムは疾患に関与することが報告されている。JHDMのアイソザイムであるJMJD2とPHF8に関しては、siRNAによるそれらの酵素のノックダウンが、がん細胞の増殖を抑制するという報告がある。したがって、JMJD2阻害剤およびPHF8阻害剤は、新たな作用機序の抗がん剤として期待されている。そこで、我々は、それらの酵素の選択的阻害剤の創製研究を行った。

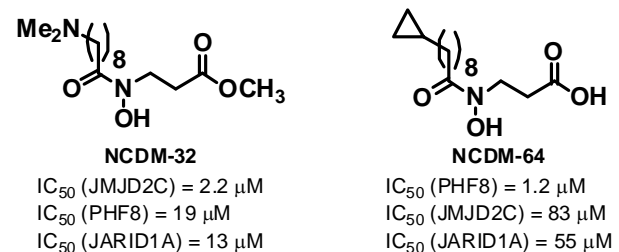


図4 NCDM-32, NCDM-64の構造とJHDM阻害活性

JMJD2とPHF8のX線結晶構造を基に、酵素の活性中心に作用し得る化合物群を設計、合成し、酵素阻害活性評価を行った結果、高い選択性および阻害活性を有するJMJD2選択的阻害剤NCDM-32およびPHF8選択的阻害剤NCDM-64を見出した(図4)。興味深いことに、JMJD2あるいはPHF8のsiRNAによるノックダウンはがん細胞の増殖抑制という表現型を示すのに対し、JMJD2選択的阻害剤はがん細胞に対して何の効果

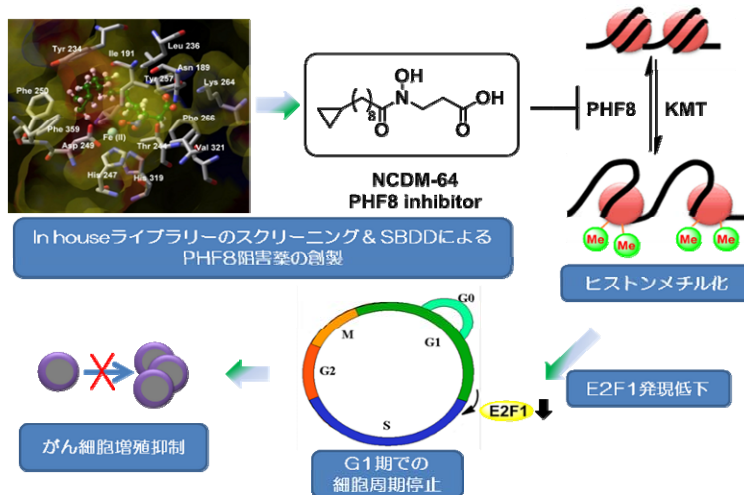


図5 PHF8阻害薬NCDM-64の創製とがん細胞増殖抑制機構

も示さず、PHF8選択的阻害剤はがん細胞細胞増殖抑制作用を示した。さらに、NCDM-64は、PHF8を阻害することによりH3K27をメチル化し、細胞周期調節因子E2F1の遺伝子発現を抑えることでG1期で細胞周期を停止させ、がん細胞増殖阻害活性を示すことも明らかにした(図5)。これらの実験結果から、PHF8阻害剤が抗がん剤として有効であると考えられた。

## 5. おわりに

本稿では、紙面の都合上、エピジェネティクスをコントロールする小分子化合物の例として、ヒストン脱メチル化酵素阻害薬のみを取り上げたが、他にもエピジェネティクスを制御するタンパク質は多数あり、それらのタンパク質の機能をコントロールする小分子化合物の開発が進んでいる。これらのエピジェネティクス関連タンパク質を分子標的とする小分子化合物の創製研究がさらに進み、それらを用いたケミカルバイオロジー研究により、さらに詳しいエピジェネティクス機構が解明されるとともに、エピジェネティクス制御を基盤とする新薬が誕生することを期待している。

最後に、本研究に携わった研究室の教員、研究員、学生および学外の多くの共同研究者に深くお礼を申し上げます。

## 参考文献

- 1) Li, B.; Carey, M.; Workman, J. L. *Cell* **2007**, *128*, 707–719.
- 2) Kubicek, S.; Jenuwein, T. *Cell* **2004**, *119*, 903–906.
- 3) Shi, Y.; Lan, F.; Matson, C.; Mulligan, P.; Whetstone, J. R.; Cole, P. A.; Casero, R. A.; Shi, Y. *Cell* **2004**, *119*, 941–953.
- 4) Suzuki, T.; Miyata, N. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8236–8250.
- 5) Liang, Y.; Vogel, J. L.; Narayanan, A.; Peng, H.; Kristie, T. M. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 1312–1317.
- 6) Schulte, J. H.; Lim, S.; Schramm, A.; Friedrichs, N.; Koster, J.; Versteeg, R.; Ora, I.; Pajtler, K.; Klein-Hitpass, L.; Kuhfittig-Kulle, S.; Metzger, E.; Schule, R.; Eggert, A.; Buettner, R.; Kirfel, J. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 2065–2071.
- 7) Schenk, T.; Chen, W. C.; Gellner, S.; Howell, L.; Jin, L.; Hebestreit, K.; Klein, H.-U.; Popescu, A. C.; Burnett, A.; Mills, K.; Casero, R. A. Jr.; Marton, L.; Woster, P.; Minden, M. D.; Dugas, M.; Wang, J. C. Y.; Dick, J. E.; Müller-Tidow, C.; Petrie, K.; Zelent, A. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 605–611.
- 8) Shi, L.; Cui, S.; Engel, J. D.; Tanabe, O. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 291–294.
- 9) Cloos, P. A.; Christensen, J.; Agger, K.; Maiolica, A.; Rappsilber, J.; Antal, T.; Hansen, K. H.; Helin, K. *Nature* **2006**, *442*, 307–311.
- 10) Björkman, M.; Östling, P.; Härmä, V.; Virtanen, J.; Mpindi, J. P.; Rantala, J.; Mirtti, T.; Vesterinen, T.; Lundin, M.; Sankila, A.; Rannikko, A.; Kaivanto, E.; Kohonen, P.; Kallioniemi, O.; Nees, M. *Oncogene* **2012**, *31*, 3444–3456.
- 11) Sun, X.; Qiu, J. J.; Zhu, S.; Cao, B.; Sun, L.; Li, S.; Li, P.; Zhang, S.; Dong, S. *PLoS One* **2013**, *8*, e77353.
- 12) Ogasawara, D.; Itoh, Y.; Tsumoto, H.; Kakizawa, T.; Mino, K.; Fukuhara, K.; Nakagawa, H.; Hasegawa, M.; Sasaki, R.; Mizukami, T.; Miyata, N.; Suzuki, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8620–8624.
- 13) Hamada, S.; Suzuki, T.; Mino, K.; Koseki, K.; Oehme, F.; Flamme, I.; Ozasa, H.; Itoh, Y.; Ogasawara, D.; Komaarashi, H.; Kato, A.; Tsumoto, H.; Nakagawa, H.; Hasegawa, M.; Sasaki, R.; Mizukami, T.; Miyata, N. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5629–5638.
- 14) Suzuki, T.; Ozasa, H.; Itoh, Y.; Zhan, P.; Sawada, H.; Mino, K.; Walport, L.; Ohkubo, R.; Kawamura, A.; Yonezawa, M.; Tsukada, Y.; Tumber, A.; Nakagawa, H.; Hasegawa, M.; Sasaki, R.; Mizukami, T.; Schofield, C. J.; Miyata, N. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7222–7231.

## 気になった論文

溝口 玄樹 (みぞぐち はるき)

Department of Chemistry, Dartmouth College, Postdoctoral fellow

Haruki.Mizoguchi@dartmouth.edu

この度は、生命化学研究レター“気になった論文”への執筆機会を頂きありがとうございます。私は 2013 年 3 月に及川英秋教授、大栗博毅准教授のご指導のもと北海道大学で学位を取得し、同研究室で研究を続けさせていただいた後、12 月より米国 Dartmouth 大学の Glenn C. Micalizio 教授の研究室で博士研究員としての研究をスタートしました。現在は、低原子価チタンを活用する炭素-炭素結合形成反応を鍵とした天然物合成に携わらせていただいています。本稿では合成化学の視点から“化合物ライブラリー構築のための新規合成戦略”について取り上げてみたいと思います。

新規性の高い機能・メカニズムやターゲット分子を持つ低分子化合物を見出すことができれば、創薬やケミカルバイオロジー研究は大きく進展します。多くの場合、化合物ライブラリーのスクリーニングによりリード化合物を探索するため、質および量に優れた“当たりが出やすい”化合物群が求められるのは当然のことかと思えます。この課題に対し、近年では化合物群の三次元的な構造多様性の創出により探索領域を拡張することが重要と考えられており、分子の多様さ・複雑さを迅速に生み出す合成プロセスに注目が集まっています。今回は、生理活性物質の宝庫である天然有機化合物に学んだ分子設計や合成戦略により、斬新な化合物ライブラリーを創製した三つの論文を紹介したいと思います。

**Biomimetic diversity-oriented synthesis of benzannulated medium rings via ring expansion**

Bauer, R. A.; Wenderski, T. A.; Tan, D. S. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 21-30.

8-11 原子で構成される中員環は、天然有機化合物においてしばしば見られる構造モチーフであり、ベンゼン環と縮環したアリアルエーテルやアリアルエステルを中心骨格とする生理活性物質が多数知られています。一方で、上市されている薬剤の中にはこれらの構造ほとんど見られません。そもそも、このような中員環分子は NIH の低分子リポジトリのような巨大な化合物ライブラリーにもごく少数しか含まれておらず、生理活性物質のスクリーニングにおいて未開拓の領域であると言えます。この背景として、環化反応による中員環構築がエントロピー(反応点の近づきやすさ)およびエンタルピー(環の歪みや渡環相互作用)的に不利であるため困難なことが挙げられます。そこで著者らは、環拡大によるアプローチにより簡便で一般性の高い中員環構築法を開発し、多様性指向型ライブラリーを構築しようと試みました。

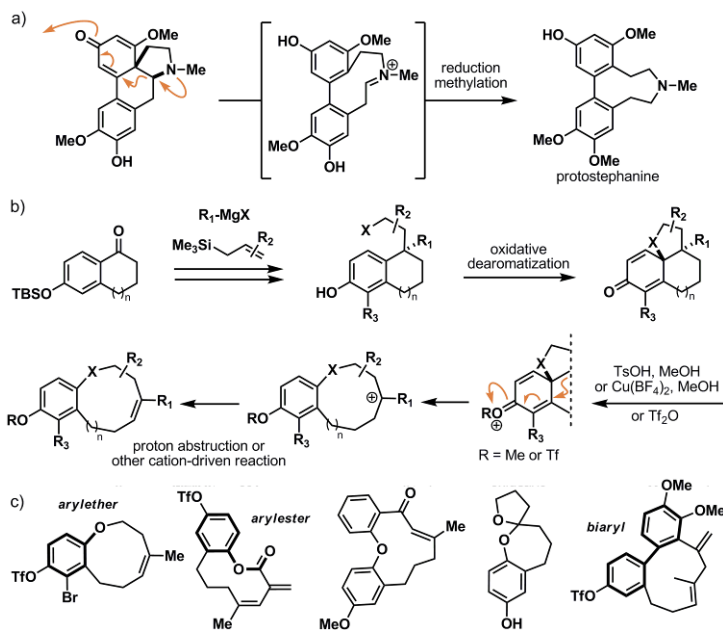
ここで著者らは天然のアルカロイド protostephanine の生合成に着目しました。このアルカロイドの 9 員環骨格は、スピロ縮環したシクロヘキサジエノンの芳香族化に駆動される環拡大反応によって形成されると推定されています(Figure 1a)。生合成では、アミンの電子供与が反応の進行に寄与していることが推測されますが、著者らは適切にジエノン部位を活性化することで、より一般的な環拡大反応へと展開できると考えました。実際に、三環性のジエノンを合成して条件を探索したところ、*p*-トルエンスルホン酸(TsOH)や銅塩 Cu(BF<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、トリフルオロメタンスルホン酸無水物(Tf<sub>2</sub>O)を用いることで副反応を抑えながら環拡大が効率的に進行し、8-12 員環化合物が収率よく得られることを見出しています(Figure 1b)。本反応は、様々な官能基や環の員数、縮環様式からなる基質を中員環へと変換可能であり、Figure 1c に示すようなアリアルエーテルやアリアルエステル、ビアリアルを含む骨格を簡便に構築できます。前駆体となるジエノンがモジュラ



一式の置換基・官能基導入により迅速かつ柔軟に合成できることや、得られる中員環群もまた種々の変換反応の基質として有用であることから、構造多様性に富んだライブラリー合成に適した手法と言えます。

さて、これら化合物群は本当に新規性が高いのでしょうか。近年では化合物群の性質を客観的に評価するための手法としてケモインフォマティクスによる解析が多用されるようになってきました。分子量や脂溶性、水素結合部位など多数の化学・物理学的性質をパラメータとした主成分分析 (PCA: Principal component analysis) により化合物群のケミカルスペース内での分布を可視化する手法が一般的に用いられます。著者らも実際に今回合成したライブラリーを解析しており、

これら分子群が冒頭にあげたような中員環天然物に近い領域を占める一方、既存の薬剤とは大きく異なった性質を示すことを明らかとしています。生合成に学ぶことでこれまで困難であった探索領域へのアクセスを可能とした本合成戦略、特異な生理活性分子の報告が期待できるのではないのでしょうか。



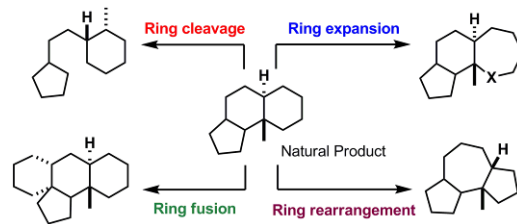
**Figure 1.** 生合成類似型環拡大反応を鍵とする中員環化合物ライブラリーの創製 a) Protostephanine の推定生合成機構 b) 三環性ジェノンの環拡大が芳香族化により駆動されて進行し、中員環を与える c) 代表的な中員環化合物群

## A ring-distortion strategy to construct stereochemically complex and structurally diverse compounds from natural products

Huigens III, R. W.; Morrison, K. C.; Hicklin, R. W.; Flood Jr, T. A.; Richter, M. F.; Hergenrother, P. J. *Nature Chem.* **2013**, *5*, 195-202.

多数の環が縮環した複雑な天然物は、強力な生理活性を持つ一方で微量成分のため量的供給が難しいといった印象が強いですが、植物や微生物から工業スケールで入手可能な化合物も少なくありません。これら天然物を出発物質として構造多様性を創出する一般的な手法があれば、多数の立体中心や置換基、骨格の複雑さに富んだ化合物群を合理的に得ることができると期待されます。従来の多様性指向型合成と異なり、構造の複雑化のための設計が不必要となり簡便である一方、保護されていない多数の官能基からなる縮環骨格の望む位置で反応を起こし、その三次元構造を多様化することは容易ではありません。

今回著者らは、母骨格に組み込まれた官能基の特異的変換により縮環様式を改変する“ring-distortion”戦略を提唱し、この課題に挑んでいます。本戦略では、①骨格を大幅に変化させると共に有用な官能基を生み出す環開裂や、②普遍的官能基であるケトンやエノンを足がかりとして環のサイズの改変と共にヘテロ元素を導入する環拡大、③構造の歪みや密集した官能基を起点とする転位反応やペリ環状反応による環構築、の組み合わせにより、天然物の複雑さを維持しながらまったく異なる環構造へと短工程で導きます。本論文では実際に、テルペノイドやステロイド、アルカロイドを出発物質として用いた構造多様化により戦略の有用性を実証しました。



**Figure 2.** Ring-distortion strategy の概略

一例として、ジベレリン酸(G)を原料とした合成プロセスを示します (Figure 3)。複雑な縮環骨格に多数の立体中心、酸素官能基を持つ分子ですが、工業的に応用されており容易に入手できます。これに対し、ラクトン環を開裂した後、B環部を酸化的に開裂することでジケトンG1が5工程で合成できます。

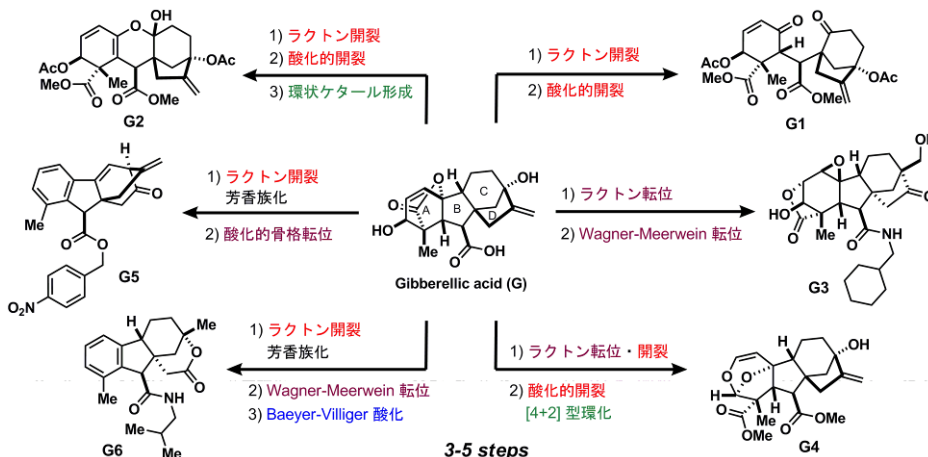


Figure 3. ジベレリン酸(G)に対する Ring-distortion strategy を用いる構造多様化。5 工程以内で 6 種類のまったく異なる多環性骨格を構築

一方で、塩基性条件でラクトン環を転位、開環させた後、A環を酸化的に開裂すると[4+2]型の環化反応が連続して起こりケタールG4へ導くことができます。他にも、環開裂・環拡大・転位を駆使することでジベレリン酸からそれぞれ5工程以内の変換でまったく異なる6種類の骨格群を構築することに成功しています。また、ここで示した生成物G1-G6に限らず、天然物からそれぞれに至る各合成中間体もまた複雑な構造を持つ魅力的なリード化合物候補であることも注目すべき所です。

今回報告された化合物に限らず、本戦略は様々な多環性天然物を骨格多様性創出の起点とできるポテンシャルを持ちます (最近の例: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 220-224.). 生合成マシナリー構築技術の進歩に伴い二次代謝産物の量的供給が可能となりつつあるこの時代、出発物質のバリエーションという問題が解消されれば、天然物類似分子群の合成における主要な手法の1つとなるのではないのでしょうか。

### A biomimetic polyketide-inspired approach to small-molecule ligand discovery

Aquino, C.; Sarkar, M.; Chalmers, M. J.; Mendes, K.; Kodadek, T.; Micalizio, G. C.

*Nature Chem.* **2012**, *4*, 99-104.

オリゴマー型分子、たとえば核酸、ペプチド、糖などは、多種多様な組み合わせでモノマーを連結することにより、限られた種類のビルディングブロックから構造、そして機能の多様性を生み出します。化合物ライブラリーの構築の際にも魅力的な分子群であり、高い信頼性を誇るペプチド結合形成反応と、固相合成やスプリット・プール法といったコンビナトリアルケミストリーの手法の組み合わせにより膨大な数の合成オリゴマー分子が創製されてきました。これに対し著者らは、これら鎖状ペプチド・ペプチドの三次元構造が非常にフレキシブルであり、その結果、生体高分子への親和性・選択性に制限がある可能性に着目しました。溶液中のコンホメーションが定まっていないことで、ターゲット分子との相互作用に最適な置換基、官能基の空間配置をとるためにエントロピー的なロスを乗り越えなければならず不利であると考えたのです。一方で、顕著な生理活性が知られるポリケチドやテルペノイドといった二次代謝産物もモノマー単位の繰り返し構造を持つオリゴマー型分子ですが、環構造や不飽和結合などにより三次元構造は明確に規定されています。そこで本論文では、従来のペプチド合成法(モジュラー式合成・固相合成やスプリット・プール法などの大規模ライブラリ

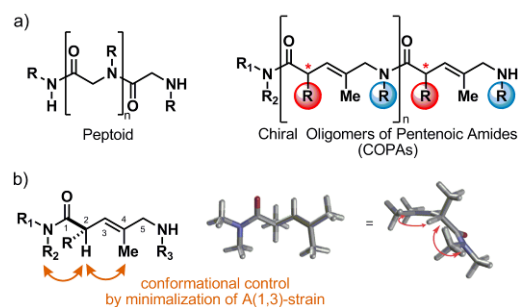
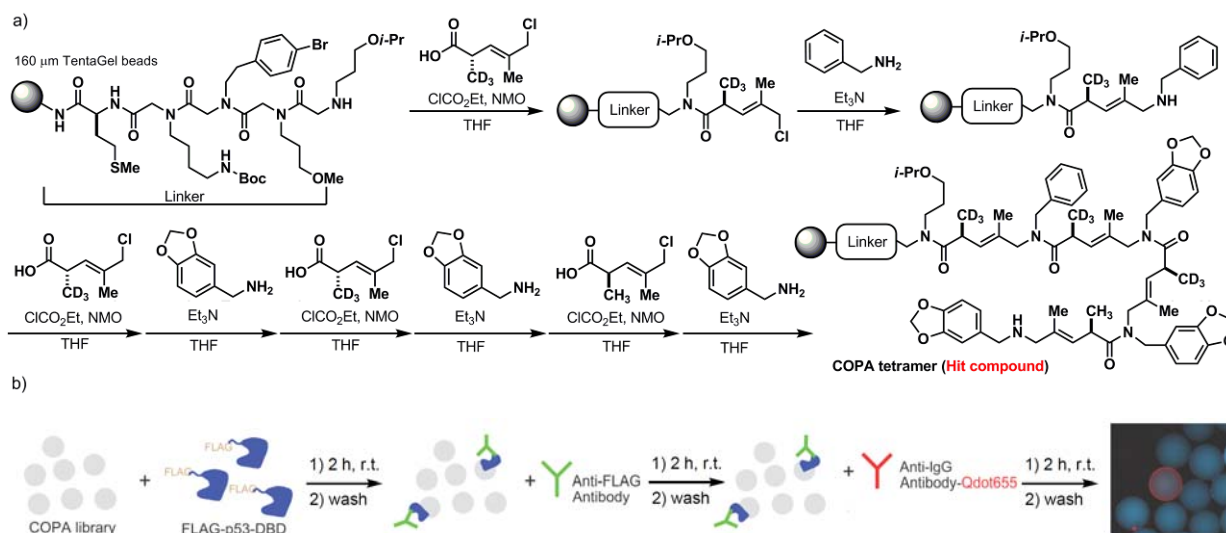


Figure 4. COPAs の設計 a) Peptoid オリゴマーと COPAs オリゴマー b) COPA 構成単位は A(1,3)-歪みを最小にするようなコンホメーションをとる (論文より一部改変)

その結果、生体高分子への親和性・選択性に制限がある可能性に着目しました。溶液中のコンホメーションが定まっていないことで、ターゲット分子との相互作用に最適な置換基、官能基の空間配置をとるためにエントロピー的なロスを乗り越えなければならず不利であると考えたのです。一方で、顕著な生理活性が知られるポリケチドやテルペノイドといった二次代謝産物もモノマー単位の繰り返し構造を持つオリゴマー型分子ですが、環構造や不飽和結合などにより三次元構造は明確に規定されています。そこで本論文では、従来のペプチド合成法(モジュラー式合成・固相合成やスプリット・プール法などの大規模ライブラリ

一構築技術)の強みを生かしながらも rigid な三次元構造を持つキラルなオリゴマー分子として、“chiral oligomers of pentenoic amides (COPAs)”を開発しました。COPAs は、その名の通り 5-amino-2,4-dialkyl-3-pentenoic amide (Figure 4b)を構成単位とする分子群であり、アミド置換基、不斉中心および三置換オレフィンを持つことが大きな特徴です。ここでは、ポリケチド天然物に見られるアリル歪みによるコンホメーション固定から着想を得た設計がされています。即ち、COPA モノマーにおいては、三置換オレフィンと不斉炭素に連結した置換基の間のアリル歪み、およびその置換基とアミド置換基との間に生じる立体反発を最小限とするようにコンホメーションが制限されます。このようなキラルなモノマーの形を反映してオリゴマー全体の三次元構造を制御しようという試みです。分子力場計算からも、COPA テトラマーがペプチドテトラマーと比較して特定のコンホメーションをとりやすい(最安定構造から 1.1 kcal/mol 以内のエネルギーを持つ構造が 2 個以下)ことが支持されており、ビルディングブロックと立体化学の組み合わせにより、三次元空間への置換基の配向を自在にデザインできるのではないかと期待されます。その合成は、キラルなクロロペンテン酸と様々な一級アミンをペプチド結合形成とアリル化により交互に縮合するという高収率かつ簡便な反応により達成されており、固相合成にも耐える実用的な手法です(Figure 5a)。実際に、ビーズに固定した基質に対し、スプリット・プール合成法を適用することで 10 種類のアミンとクロロペンテン酸の両エナンチオマーから 16 万種類のテトラマー化合物を合成しています。ここで、クロロペンテン酸のオレフィン置換基をエナンチオマー間でメチル基(CH<sub>3</sub>)と重水素化されたメチル基(CD<sub>3</sub>)で使い分けることで、各テトラマーの構造を質量解析(MS/MS)で同定できるようにしているところに工夫が光ります。得られたライブラリーからは癌抑制タンパク質である p53 の DNA 結合ドメインと選択的に相互作用する化合物(野生型 p53-DNA 結合ドメインへ非共有結合的に作用する初めての分子:K<sub>D</sub> ~10 μM)を見出しており、今回提唱したコンセプトの有用性を非常に明白に実証したと言えるでしょう。斬新なアイデアで、大規模ライブラリー構築技術と、これまで多環性骨格の多様性指向型合成を中心に研究されてきたスカフォールドの多様性を融合させた非常にクリエイティブな成果だと思えます。



**Figure 5. COPAs ライブラリーの合成と生理活性評価** a) ビーズに連結した二級アミンを起点として、ペプチド結合形成とアミンのアリル化により COPA テトラマーを固相合成 b) COPA ライブラリーを用いた p53 DNA binding domain 結合分子のスクリーニング。COPA と FLAG タグを連結した p53-DBD をインキュベートしたのち、Anti-FLAG 抗体と蛍光を発する Quantum dots と共役した二次抗体を順次作用させ検出(論文より一部改変。赤く光るビーズがヒット化合物。MS/MS で構造決定)。



## 気になった論文

橋本 知恵 (はしもと ちえ)

Universität Erlangen-Nürnberg 博士研究員

email address: chie.hashimoto@fau.de

この度は、生命科学研究レター「気になった論文」への執筆の機会を与えていただき、深く感謝申し上げます。私は東京医科歯科大学・玉村啓和教授のもとで学位を取得した後に博士研究員として在籍し、2013年12月よりドイツのエアランゲン・ニュルンベルグ大学、薬学部の Jutta Eichler 教授のもとに博士研究員として着任いたしました。宜しくお願ひ申し上げます。まず、現在の私の研究標的である HIV-1 第二受容体 CCR5 と臨床で利用されている抗 HIV-1 薬 maraviroc との共結晶構造を解いた論文をご紹介します。次に、これまで私はエイズワクチンおよび抗 HIV-1 薬開発を目指して HIV-1 タンパク質やもう一つの HIV-1 第二受容体 CXCR4 のタンパク質間相互作用部位を模倣した分子を合成してまいりましたが、タンパク質ミミックを合成するための 2 種類のアプローチを報告した論文をご紹介します。

### Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex

Tan, Q.; Zhu, Y.; Li, J.; Han, G. W.; Kufaveva, I.; Li, T.; Ma, L.; Fenalti, G.; Li, J.; Zhang, W.; Xie, X.; Yang, H.; Jiang, H.; Cherezov, V.; Liu, H.; Stevens, R. C.; Zhao, Q.; Wu, B. *Science* **2013**, *341*, 1387-1390.

HIV-1外被タンパク質gp120は宿主細胞上の第一受容体CD4に続き第二受容体CCR5あるいはCXCR4との結合を介してCD4陽性細胞に感染した後に免疫機構を破綻させるため、これら受容体は重要な創薬ターゲットです。Wuらは、2010年にCXCR4とリガンドとの共結晶構造解析に成功しており、主要なすべてのHIV-1第二受容体の構造を解析するという大きな成果をあげました。

CCR5/CXCR4は7回膜貫通構造を持つGタンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、細胞外にN末端 (NT) および3個のループ (ECL1-3) を有します。Maravirocはリガンド結合ポケットの奥に結合し、環状構造の官能基はCCR5と疎水性相互作用を形成しています (図1)。図1の青色で示したアミノ酸残基はmaravirocの結合に重要であることが変異原性試験により報告されており、共結晶構造の結果と一致しました。また、CCR5はケモカイン受容体であり、ケモカインのコア領域がNT/ECL2と結合し (site 1)、その後にケモカインのN末端がTyr<sup>37</sup>およびTrp<sup>248</sup>などを含む膜貫通ヘリックス領域 (site 2) に結合して受容体が活性化されます。Maravirocはインバーサゴニストと考えられていますが、今回maravirocはケモカイン認識部位のsite 1には結合せずsite 2を覆い隠すことでケモカインによる受容体の活性化を阻害することが分かり、インバーサゴニストとして働くメカニズムが解明され

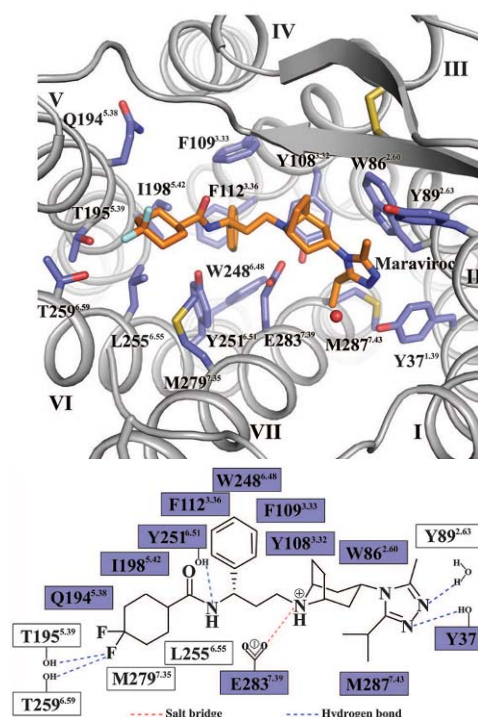


図 1. Maraviroc (橙色) 結合ポケット (下図の青色のアミノ酸残基: 変異原性試験により maraviroc の結合に重要とされる。)



ました。また、HIV-1はCCR5を利用するR5指向性株およびCXCR4を利用するX4指向性株に分類され、gp120上の第二受容体結合部位V3 loopの正電荷アミノ酸残基と第二受容体の負電荷アミノ酸残基のバランスの差が受容体指向性を生むと考えられてきました。今回新たに、CXCR4のリガンド結合ポケットはNT/ECL2により覆われているがCCR5ではポケットが開いているという違いも指向性を生む要因であることが示唆されました。HIV-1第二受容体CCR5/CXCR4の立体構造およびHIV-1の指向性を生む要因が解明されたことから、HIV-1感染予防および創薬研究におけるブレイクスルーが期待されます。

### A combinatorial approach toward smart libraries of discontinuous epitopes of HIV gp120 on a TAC synthetic scaffold

Mulder, G. E.; Kruijtzter, J. A. W.; Liskamp, R. M. J. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 10007-10009.

タンパク質の抗原決定部位 (エピトープ) の多くは、タンパク質の立体構造の中でそれぞれが近接している不連続なアミノ酸配列から成ります。この不連続なエピトープを模倣するためには、個々のペプチドが正しくフォールディングされているだけでなく、一つの分子内に複数のペプチドが正しく配置されなくてはなりません。これまでにLiskampらは、HIV-1外被タンパク質gp120上の不連続な3つのループから成るCD4結合部位に着目し、エイズワクチン開発のための合成抗原分子の開発を試みました。その方法は、段階的に脱保護可能な保護基で3個のアミノ基を保護したtriazacycrophane (TAC) scaffoldを樹脂に導入し、固相合成により3個の異なるペプチドをノンストップで縮合するというものでした。しかし、この方法で合成したミミックはHIV-1侵入阻害活性を示す一方で複製阻害活性は示しませんでした。そこで、環状ペプチドの配置は適切か、TAC scaffoldはテンプレートとして適切かを見直すこととしました。今回はアルキル基を有する4-ペンチン酸をアミノ基に縮合したTAC scaffoldに、アジド基を導入したloop 1-3の環状ペプチドをCu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) によってランダムに結合させ (図2A)、種々のペプチドを提示したエピトープミミックライブラリーを構築しました (図2B)。Loop 1-3の個々の環状ペプチドはCD4と結合しなかったのに対し、複数のループを提示するミミックはすべてCD4に結合することが分かりました。

中でも、loop 2とloop 3を連結したミミックは顕著なCD4結合活性を示しました。Loop 1-3すべてを提示したミミックが顕著なCD4結合活性を示さなかった理由は、環状ペプチドの大きさ・配置が適切でなかった可能性が考えられます。しかし、loop 1は構造が不安定な領域に存在し、CD4との結合に大きく関与しないことから、今後はloop 2, 3の組み合わせのミミックに関して環状ペプチドの大きさ・配置を最適化することでエイズワクチン開発を目指すそうです。CuAACを利用した今回の手法は、副生成物の得られない「クリーンな」ライブラリーが構築できるコンビナトリアル法であり、分子量による目的物の同定およびHPLCでの精製が可能なことからGPCRなどの他のタンパク質への応用が期待できます。

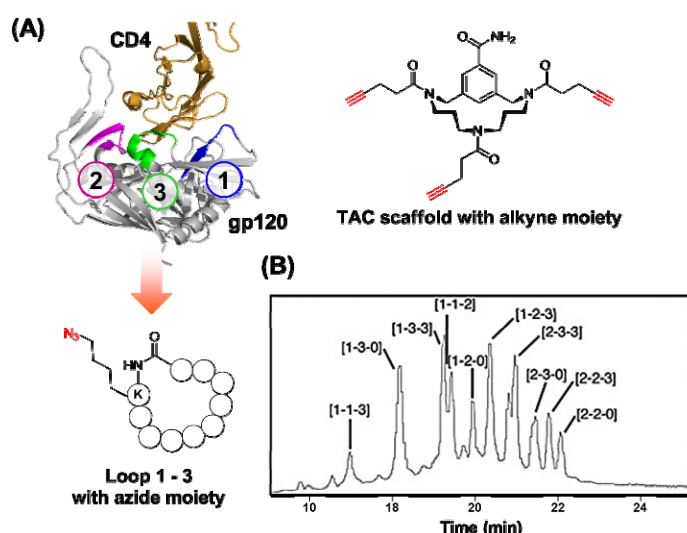


図2. (A) CD4-gp120 複合体の結晶構造と TAC scaffold 誘導体および環状ペプチドの構造。(B) ライゲーション混合物の LC-MS チャート (チャート上の数字は loop の番号を示す)。

## A functionally selective synthetic mimic of the HIV-1 co-receptor CXCR4

Möbius, K.; Dürr, R.; Haussner, C.; Dietrich, U.; Eichler, J. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 8292-8295.

Eichlerらは、HIV-1の受容体指向性を識別するツールを開発するために、CXCR4の3個の細胞外ループ(ECL1-3)を連結させたCXCR4ミミックを開発しました。分子設計を行うにおいて構造情報が必要ですが、CXCR4のリガンドフリーの構造は未知であることから、ECL1-3ペプチドの配置をテンプレートで固定しない方がいいと考えました。ECL1上のCys<sup>109</sup>とECL2上のCys<sup>186</sup>との間でジスルフィド結合によってECL2の揺らぎが抑えられていることから、著者らはフレキシブルなリンカー(β-アラニンおよび6-アミノヘキササン酸)でECL1-3を連結させた後に、ECL1-2間にジスルフィド結合を形成させることにしました。表面プラズモン共鳴(SPR)やELISAでペプチドの物性・活性を評価するためにLys側鎖のアミノ基にビオチンが縮合されたLys(biotin)をC末端に導入し、空気酸化によりジスルフィド結合を形成させて細胞外ミミックCX4-M1を合成しました(図3A)。CD4存在下でR5(JRFL, BaL)およびX4(IIIB, MN)指向性株のgp120に対する結合活性をSPRにより評価した結果、CX4-M1はX4指向性株のgp120のみに結合しました(図3B)。また、ジスルフィド結合を形成しないC109S/C186S変異体は約6割まで結合活性が減少し、ECL3を欠いた変異体やECL2ペプチド単体はgp120に結合しませんでした。さらに、ECL2上の酸性アミノ酸AspをAlaに置換した類縁体はgp120に結合することができない一方で、塩基性アミノ酸残基ArgをAlaに置換した類縁体はCX4-M1より約2倍高いgp120結合活性を示しました。以上より、gp120との結合にはECL1-3すべてが必要であり、ECL1-2間のジスルフィド結合が形成されていることと、負電荷アミノ酸がgp120との結合に重要であることが示されました。

X4およびR5指向性株を用いた感染阻害実験の結果、CX4-M1はX4指向性株に対して9.93 μMの侵入阻害活性を示し、ECL2上の塩基性アミノ酸残基をAlaに置換した類縁体はgp120結合活性と同様に約2倍高い活性を示しました。CX4-M1およびすべての類縁体はR5指向性株に対して侵入阻害活性を示さなかったことから、CX4-M1およびECL2上の塩基性アミノ酸残基をAlaに置換した類縁体はX4指向性株を識別する能力があることが明らかとなりました。今回開発した不連続なアミノ酸配列のペプチドをフレキシブルなリンカーで連結させて合成したCXCR4ミミックは、医薬品・医療ツールとしての応用が期待されます。現在著者らは、CD4上のgp120結合部位と第二受容体を一緒に提示したハイブリッド分子の設計・合成を目指しています。

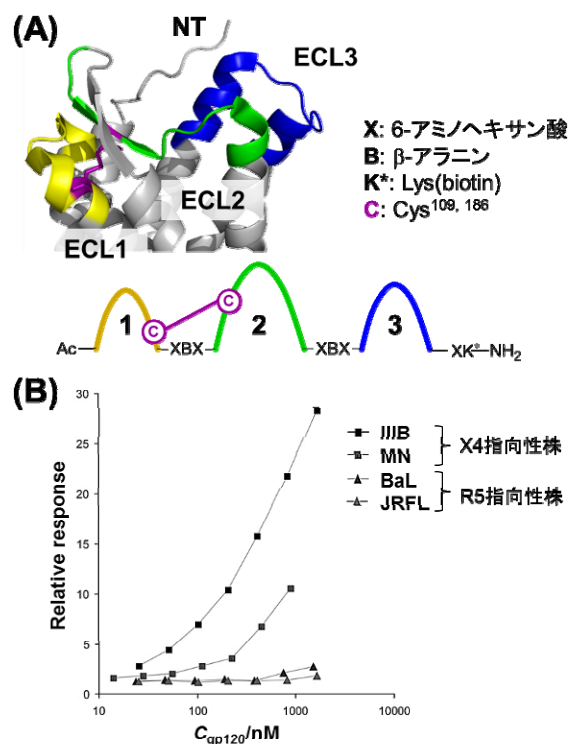


図3. CXCR4 ミミック CX4-M1 の構造 (A) および SPR による CX4-M1 の HIV-1 指向性評価 (B)

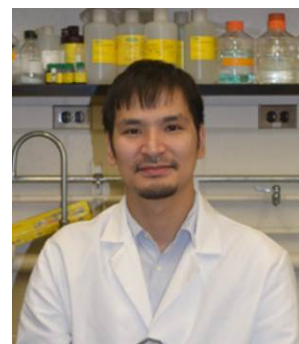
タンパク質の構造情報が得られていても、複数の不連続なアミノ酸配列のペプチドを正しく配置して活性のあるミミックを合成することはチャレンジングな研究です。ですが、近年ペプチドや抗体などの高分子を用いた創薬研究が注目されていることから、今回紹介した手法は合成抗原分子や抗体ミミックの開発に有用であり、より有効な分子設計方法および効率の良い合成法の開発が望まれています。最後になりましたが、本執筆の機会を与えてくださいました京都大学の大神田淳子先生に感謝申し上げます。

留学  
体験  
記ブランドイス大学、及び、  
マサチューセッツ総合病院留学体験記

Department of Chemistry, Brandeis University

堀谷 学

(shoriya@brandeis.edu)



米国ボストン近郊のウォルサムにあるブランドイス大学化学科Prof. Isaac Krauss研究室でポスドクをしている堀谷学(ほりやさとる)と申します。東京学芸大学の原田和雄先生のもとで学部三年から修士まで研究を行い、その後、東京慈恵会医科大学大学院博士課程に進学、生化学講座第二(松藤千弥教授、現、分子生物学講座)に所属し博士取得後、同ポスドクを経て現職に至ります。2010年11月の渡米時から2012年8月まで、共同研究のためボストン市内のマサチューセッツ総合病院(Massachusetts General Hospital, 略称MGH)のProf. Jack Szostak研究室にVisiting Researcherとして派遣され、現在は本来の所属先であるブランドイス大学に戻り研究を続けています。

私は公募中心に留学先を探しました。日本人でそのようなケースはあまり多くはないのではないかと思います。というのも、私自身インターネットや書籍などで、そういった情報を得ることができなかつたからです。アメリカでの研究環境や体験などは過去の留学体験記や他のリソースから得やすいと思いますので、ここでは留学先を決めるところから詳しく書いていきたいと思います。ちなみに、ボストンでの生活については生命化学研究レターNo. 40の留学体験記をボストン大学に留学された林剛介先生が執筆されているのでそれをご覧頂くのが良いと思います。

## 1. 留学先が決定するまで

私は大学に入学した頃は研究などにはまったく興味はなかつたが、何となく選んだ卒業研究の所属で原田和雄先生と出会ったことにより、徐々に研究に興味を持ち始め、ついつい大学院に進学してしまい、今ではポスドクとして研究をすることを生活の糧にしている。私は原田研の二期生である。原田先生は米国Salk研究所とUCSFで10年近くのポスドクを経て日本に帰国してまだ間もなかつた(原田先生は米国ポスドク時代の話をRNA Network Newsletter vol. 2 No. 2に寄稿されている。現在は下記のURLで公開されている。<http://ncrna.jp/nl/RNA2-2.pdf>)。その影響もあつてか、もし自分が研究を続けることがあつたら海外、特に米国で研究をしてみたいという漠然とした思いをいつしか持っていた。当時の原田研究室では、RNA-ペプチド相互作用、核酸の試験管内選択、リボザイムなどの研究を行っており、研究室内での雑誌会や研究報告会で、頻りに耳にしたJack Szostakの研究室にその後自分が所属することになるなどとは思つてもみながつたが…。そのような、米国留学への思いはありつつも、その後紆余曲折を経て、2009年末頃によく海外でのポスドク先を探し始めることとなった。留学先の探し方は色々あると思うが、私の場合は公募を中心として応募することにした。というのも、当時の所属先である慈恵医大分子生物学講座にも数人の米国留

学経験者がいたが、医局での斡旋や、たまたま日本人ポスドクを探しているPIと会ったり、はたまた、半ばスカウトに近い形であったりと、自分で積極的に留学先を探した経験のある人はいなかった。当然、論文で見知った研究室に応募する選択肢もあり、最初に一件応募書類を送ってみたがなしのつぶてであった。EMS (国際スピード郵便) で書類を送り、その後Eメールで問合せたが、返信はなかった。ちなみに、この研究室のウェブサイトではOpen Positionとしてポスドクを募集していたが、だからといってレスポンスが良いというわけではないという典型だと思う。以前、原田先生に相談した際には、NatureやScienceの巻末で募集広告を出しているところに応募するとレスポンスがよく、御自身もその方法でポスドク先を探されたとのことであった。少し研究分野を変えて新しいことを経験してみたいという気持ちもあり、私もその方法をとることにした。とはいえ、原田先生は英語のネイティブスピーカーであるので、英会話が苦手な私とは全く状況が異なるのだが…。私が主にチェックしたのはNaturejobsやScience Careerといったインターネットの求人情報である。この方法では、募集しているところに応募する形になるので原田先生から伺った様にレスポンスがよく、それについては後述したい。

まず最初に、公募中心に海外でのポスドク先を探すことについて、就職活動として以外の利点を述べたい。このような募集広告を見ているうちに、求められている具体的な専門技術に共通する場合があることに気がついた。つまり、募集広告を出している＝研究費がある、ということで、そのときにどのような研究がグラントをとり、どのような技術が求められているか、ということを知ることができ、論文や学会以外の場で、最先端の研究を垣間見ることができる。論文よりもずっと早いこともある。私が応募した研究室の一つでは、募集広告や研究室のホームページに未発表の研究が詳しく載っており(これは稀かもしれないが)、これはNatureやScience級の研究だと思ったものもある。残念ながらその募集先からオファーはなかったが、いつ論文になるのだろうと楽しみにしていたところ、その2年後によくScienceで発表されたという次第である。

話が脱線したが、兎にも角にも求人サイトでは、まず、興味のあるキーワードなどで検索し、応募したい(応募できそうな?)ところを探す。続いて応募である。応募の基本は、レターサイズ1枚のカバーレター、CV(英文履歴書)、3名程度からの推薦状、である。CVとカバーレターは、書籍やインターネットから得た情報を参考にした。カバーレターの最初の2段落程度は、自己紹介、これまでの研究の背景など、どの応募先でもほぼ共通の内容である。残りの数行に自分がどのように貢献できるかなどアピールするところを書く。ここはそれほど難しくないことも多い。というのも、募集している「最新の」研究内容が必ずしも出版されているとも限らず、広告に書かれている簡単な内容だけを把握すれば書ける、というよりそれだけをもとに書かなければならないことも少なくない。NIHグラントによる研究で、オンラインデータベース(NIH RePORT)において研究の要旨が見られる場合は、それも情報源になる。そして、ある程度まじめに書くと結構な確率で返事がくる。当時の記録を見ると、7件応募して4件は返事が来たようだ。(推薦者の先生方には申し訳ないが、返事がなかったものにはとりあえず応募しておくか、というものも含まれているので、体感としてはもっと確率が高い。)次の段階は、電話インタビューとなる。これは英会話の苦手な私にとっては鬼門であった。結果を先に言うと、4件中1件オファーをもらい、それが、現在のボスである。最初に返事を下さった教授からは、応募の翌日に連絡があり、翌々日に電話インタビューをすることになった。私の経歴には大変興味をもって頂いたが、英会話力が問題かもしれないということで(募集広告には筆記能力と会話能力が必須であった)、結局オファーを得ることはできなかった。非常に魅力的な研究を行っている研究室だったので、もし私の英語が流暢でオファーがあったならば当然それを受け、留学先は一ヶ月程で決まっていたかもしれない。

さて話を戻し、現在のボスとの電話インタビューの話をしたい。応募をしてからポジティブな返事が来るまでの期間は、公募の返信としては長く、1ヶ月以上経っており、既にあきらめていた。ポスドクに応募して連絡がない場合、有名なPIであれば応募書類を見ていない可能性もあるのかもしれないが、私の経験では、



却下の場合も公募であろうと連絡がない。実は私が応募した時には、既に別の有力な候補者のインタビューが済み、オファーを出していたとのことだったが、その候補者がオファーを受けるのか未確定だったこと、また、もしその候補者に決まったとしても、私が募集内容以外のプロジェクトでも貢献できそうなので、電話インタビューを行いたいということであった。さていざ電話をとると、サトルサンデスカ？と日本語が電話の向こうから聞こえた。名前からして日系人ではない、この人は日本で生活した経験があるのだろうか？などと思いつつ、とりあえず、日本語で返したが返事がない。どうやら日本語で普通に会話できるほどではないようだ。ここで、私は、以前読んだことのある「アットザヘルム」という新しくPIとなる研究者への指南書(著者は有名な研究指南書「アットザベンチ」のKathy Baker)で、外国籍の研究者に対してその国の言葉で話しかけるなどの工夫をすると良いというようなことを書かれていたことを思い出した。そこで、きっとこの人は私を雇いたいのに違いないと考え、というより、思い込むことで緊張をなくすようにつとめた。また、単に電話で話すだけではなく、あらかじめ研究内容についてのスライドファイルを送りあい、コンピュータでそれを見ながらお互いに説明するという型式で、また、ボスの英語も非常にわかりやすかったので、インタビューはスムーズに進行し、結局一週間後にオファーのEメールを貰うことができた。その頃は8月末だったが、11月1日には研究を始めてほしいということであったので、2ヶ月程度の短期間の中ばたばたと準備をし、予定を少し過ぎて11月11日になんとか渡米するに至った。ちなみに、ボスが日本語を話せた理由は勉強したことがあったため、特に日本で生活した経験はないとのことである。某メーカーの柿の種が好物なので、私は日本に帰る度にお土産として買うようにしている。尚、ボスの書棚にアットザヘルムがあるのを見かけたが、それを参考にしたかどうかについては尋ねていない。

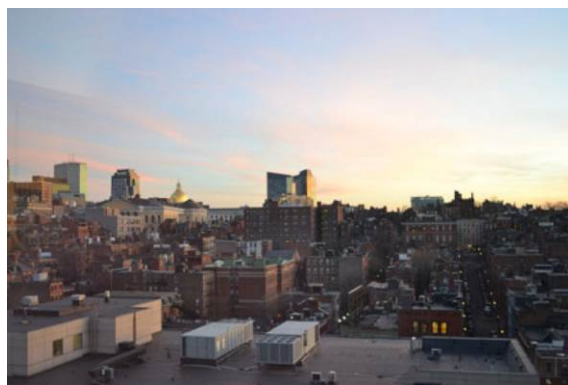
## 2. 渡米後

ボスのIsaacは、2008年に独立したassistant professorである。他のテニュアトラックのボスと変わらず押しが強く、とにかく、早く研究を始めてほしいということであった。私の場合、すぐにMGHのSzostak研に派遣され研究をすることになっていた。そのため、研究を始める前の事務手続きもブランダイスとMGHの2カ所ですることが必要があり、また、ブランダイスとMGHの両方に通勤の便が良く、かつ、家賃が高額なボストン周辺でポスドクの給料で賄える家賃でという、限られた条件でアパートを探すなど、研究以外のことに時間をとられた。その間にも、とにかく早く研究をスタートしてほしいと何度か連絡があり、渡米直後は非常に苦労した思い出がある。実験ノートを見ると最初の日付が11月24日になっているので、11月11日の渡米二週間以内にはなんとか実験を始めることができたらしい。同時期にSzostak研に来たポスドクなどは最初の1-2ヶ月くらいは殆ど実験をしている様子などはなく、何とも恨めしい気持ちになったのを覚えている。Isaacには、一日10時間以上、週末のどちらかは仕事をする(つまり週6日)、毎週のprogress reportなどが条件としてあげられた。それらは日本でも普通にやっていたことで特に厳しくはないが、慣れない外国の地でとなると中々のストレスになる。毎週のprogress reportには結構な時間がとられた。私は生化学的な実験をしていたのだが、Isaacは有機合成化学者なので、単にデータだけというわけにもいかず、詳しい説明文をつけてEメールで送るといような要領であり、提出が深夜になることもしばしばであった。たまには実験データ眺めてじっくり考えたいと思っても、なかなかそのような時間がなく、とにかく実験をしなければprogress reportを書けないという感じであった。とはいえ、研究を進めるための実験であり、progress reportを書くための実験になってはいけな。私のプロジェクトは以前担当した大学院生が1年間殆ど進められなかったもので、順調とはいかず最初の1年以上はほぼ休みなしで研究をしていたと思う。そんな中でもラッキーだったのは、Szostak研は研究費が豊富で、試薬類は個人の管理ですぐに購入できたため、少しの可能性を試すためでも、高価な試薬を躊躇せずに買いすぐに実験するということができ、研究のスピードを少しでも早めることに役立ったと思う。

私は、ここでお金を使って研究を進める方法を初めて覚えた。また、アメリカの設備は日本ほど充実していないという話をしばしば見聞きしたことがあったが、Szostak研が属するデパートメントでは機器類も豊富で、実験機器の取り合いになるということもあまりなかった様に思う。デパートメントでは色々なシステムが充実していたが、印象に残っているのはStock roomである。消耗品やバッファー、培地などが常備されており、コンピュータにログインしてボタンを押して記録し持ち出す、24時間オープンセルフサービスのシステムである。ティールームでは、コーヒー(一杯ずつドリップするタイプ)、紅茶、牛乳、オレンジジュース、コーラなどが飲み放題で、スナック菓子なども常備してある。Szostak研のある7Fから望むボストンの古い赤煉瓦の建物が立ち並ぶ町並みも美しい(右下写真。ただし、夜は明かりが少ないので夜景はあまりよくはない)。非常に恵まれた環境であった。一方で、昔見た、アメリカのメジャーリーガー育成に関するテレビ番組を思い出した。記憶が曖昧であるが、メジャーリーガーを目指す若手の選手に非常に充実した練習環境を与え選手を育成するという話であったと思う。そのような好環境で結果を残せなければその選手はメジャーリーガーになることを諦めざるを得ない。アメリカらしい合理的な方法だと思った。そのことを思い出し、このような研究環境で結果を出せなければ、アカデミックの研究者としてやっていくことに諦めざるを得ないだろうと実感した。私の場合は外部から派遣されていたので事情が異なるが、上記のような、物理的な好環境に加えて、研究スタイルにも特徴があると感じた。MGHの同じデパートメントのPIは大御所が多く、必ずしもすぐに結果を求められるというわけではないようで、大きなテーマにじっくり取り組む時間もある。他のラボの友人で、3年研究がうまくいかず、4年目にしてやっと成果が出て、それをScienceに掲載し、その後就職活動を経て、某大学でassistant professorになった人もいる。研究、発表、就職活動までの流れができていないかと思う。但し、これは私個人の意見なので、必ずしもそうとは言えないだろう。



Szostak 研のある MGH Simches Research Center。2004 年に出来たばかりでまだ新しい。MGH はボストンの中心地にあり、新旧の棟が通りを隔てて幾つもあ。都心の新橋にある慈恵医大キャンパスが思い出された。



Simches Research Center 7F のティールームからの景色。正面の赤煉瓦の建物群は Beacon Hill という高級住宅地。家賃は比較的高額だが、ここにアパートを借りている MGH ポスドクの友人も数名いた。

以上のようなMGHでの経験を経て、現在、ブランダイス大に移り1年が過ぎた。残念ながら、研究設備、システムはMGHには及ばない。とはいえ、ボスは私が異動するときにリクエストした一通りの実験器具を揃えてくれ、試薬が高価でもほぼ全て買ってくれるので特に問題なく実験ができる。しばしば隣にある別棟の生物系学科の実験機器を使いに行くこともあるが、アメリカでは実験機器をシェアするのが普通なので、特に気を遣うこともない。多少不便ではあるが慣れてきた。シンチレーションカウンターのある部屋はあまり人の出入りがないので、たまに、入って来た人が中にいる私に気付かず、物陰から私が姿を現した時にビクッと

させてしまうことがあるのが申し訳ないというくらいである。とは言え、やはり、ボスからは研究のスピードを求められるので、なかなかプレッシャーを感じる。ブランダイスでの楽しみは、夕方のセミナーであろうか。無料のビールとピザが用意される大学院生主催の会で、生物系では毎週、化学系は2週に1回である。内容に興味があっても、ビール飲みたさによく参加している。MGHではアルコールが出るセミナーはなかったが、デパートメントのビアタイムが毎週金曜日の夕方にあり、時々参加した。皆が参加するというわけではなく、週末の夕方に予定のない人が集まっていると考えると少し悲しい。そのような日々を過ごしつつ、早いもので米国に来て3年が過ぎた。時間は大分掛かってしまったがなんとか研究成果を出すことができた(ちなみに研究内容は糖ペプチドに関するケミカルバイオロジー的な研究)。昨年、12月初旬の日本分子生物学会年会の海外ポスドク招聘企画で学会から旅費の補助を頂き、日本に一時帰国するよいきっかけとなった。母国語でサイエンスの話ができるのはなんとよいことかと改めて感じた。このような企画がもっと増えてくれたら良いと思う。とはいえ、ポスドクの常として1年後は自分がどこで何をしているのかわからない。ボスがグラントを獲得できなければ、契約は更新されないのので今のラボは去らなければならない。また、ボス自身のテニュア審査も近いと思うので、ますます今後はどうなることかわからない。

この3年間のなかで、共同研究のため実際に米国内の二つの研究室を往来して研究を行うという非常に貴重な経験ができた。しかも、一方はビッグネームのPIのラボ、もう片方はテニュアトラックの若手PIのラボという両極端である。苦労話が少し多くなってしまったが、色々と楽しいこともあった。ボストンでは、日本人、外国人問わず、新しい友人もできた。色々と書くことは尽きないが、誌面に限りがあるので、この辺りで筆を置きたいと思う。今後アカデミアで研究を続けることがあれば、また、どこかでその他の話を執筆する機会もあるのかもしれない。この度の留学で得た様々な経験を今後に活かしたいと思う。



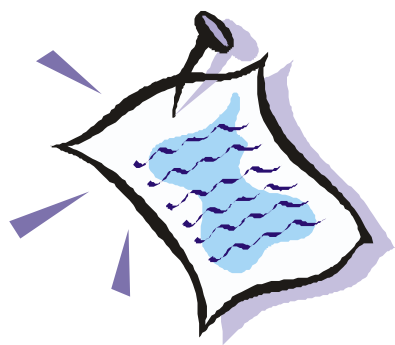
ブランダイス大学キャンパス。郊外の住宅地の中にある。いわゆるアメリカの大学の巨大なキャンパスではなく、比較的こじんまりとしている。少し高台になっていて、大学から望む自然の多い景色も美しい。



Krauss グループの写真(2012年)。後列左端がボスの Isaac。私は後列の左から2番目。中国人の大学院生1人と私を除いて、全て米国人。現在のメンバーは一部入れ替わっている。

### 謝辞

末筆ながら、Prof. Isaac KraussとKrauss研究室のメンバー、Prof. Jack SzostakとSzostak研究室のメンバー、及び、ブランダイス大学、MGHにてお世話になった方々に感謝します。また、執筆の機会を頂いた大神田淳子先生とそれをサポートして頂いた原田和雄先生に感謝致します。



# シンポジウム等会告

京都大学化学研究所 国際シンポジウム 2014 (ICRIS' 14) 「スマートマテリアルの科学と技術」 ”The Science and Technology of Smart Materials”

共催：化学研究所共同利用・共同研究拠点、京都大学エネルギー理工学研究所、生存圏研究所  
日時：平成 26 年 3 月 10 日 (月) ～12 日 (水)  
会場：おうぼくプラザ (宇治市五ヶ庄京都大学宇治キャンパス構内)

プログラム等は HP ( <http://www.kuicr.kyoto-u.ac.jp/icris14/> ) をご覧頂ければ幸いです。多くの皆様の御来聴をお待ちしております。

日本化学会第 94 春季年会特別企画

生命化学が拓く未来医療のフロンティア (生命化学基盤未来医療)

**Biomolecular Chemistry cultivates frontier of future medicine (Biomolecular Chemistry-based future medicine)**

日時： 3 月 27 日 (木) 午後

場所： S8 会場 (法経本館共用館 第 3 講義室教室)

【趣旨】本企画は、日本版 NIH が主導する研究課題である、がん診断・治療、iPS 細胞再生医療、ゲノム医療、医療技術・医療機器、創薬などの研究分野において、生命化学を基盤として、先導的・最先端研究を進めておられる産学官の研究者の講演を実施し、当該分野における最新情報を交換するとともに、本企画参加者との議論を通して、今後の医療・ライフサイエンス分野における、生命化学および化学研究の役割と方向性を明確化する。春季年会時に日本版 NIH の設立が検討されており、そのタイミングにおいて、生命化学・化学が、医療・ライフサイエンス分野において、産学官共同により研究を主導し、新たな研究分野を開拓していくための、意見交流と議論を深める。

プログラム

座長 青井 啓悟

13:30～13:35 日本版 NIH と本企画趣旨

(名大院工) 馬場 嘉信



13:35～14:10 ナノテクノロジーで創る「魔法の弾丸」：がんの標的治療への挑戦  
(東大院工・医) 片岡 一則

座長 杉本 直己

14:10～14:45 バイオマテリアル技術からみた先端医療 -再生医療を例として-  
(京大再生研) 田畑 泰彦

座長 三原 久和

14:45～15:20 PET 分子イメージングによる創薬支援 前臨床から臨床へ  
(浜松ホトニクス・中研) 塚田 秀夫

座長 浜地 格

15:20～15:55 新規蛍光プローブ群の論理的開発に基づく、微小がん・膝液漏などの術中迅速可視化の実現  
(東大院医・薬、JST) 浦野 泰照

座長 深瀬 浩一

15:55～16:25 ナノバイオ技術による次世代検査・診断技術の開発  
(東レ) 信正 均・米原 徹

16:25～16:30 総括  
(東レ)米原徹・(名大院農) 青井 啓悟

企画 責任者： 馬場 嘉信(名大院工)・米原 徹 (東レ)

## 日本化学会第 94 春季年会アドバンスト・テクノロジー・プログラム(ATP)

### T3. C. バイオベンチャーの新展開

日時： 3 月 27 日 (木) 午後

場所： 全学教育棟本館 1FS10

オーガナイザー： 菅 裕明 (東大院理・教授)

【趣旨】 バイオベンチャーは、オープンイノベーションの風を受け、まさに成長期に入ろうとしています。本サブセッションでは、産業界に大きなインパクトを与え、新たな産業創出と日本経済発展の原動力となる大学発ベンチャー、スピンオフベンチャーに焦点を当て、その技術戦略、ビジネス戦略等を中心に話題を提供します。

#### プログラム

13:00～13:10 趣意説明  
(東大院理) 菅 裕明

13:10～13:40 大学発ベンチャーに対するベンチャーキャピタルの役割  
(東京大学エッジキャピタル (UTEK)) 郷治 友孝

13:40～14:10 Unstructured/Structured Interaction を標的とした創薬  
(プリズムバイオラボ) 小路 弘行

- 14:10~15:00 アンメット医療ニーズへの挑戦 ―組換え HGF 蛋白質の医薬品開発―  
(クリングルファーマ) 岩谷 邦夫
- 15:00~15:30 糖鎖をベースとしたバイオナノテクノロジーとベンチャー  
(スティックスバイオテック) 隅田 泰生
- 15:30~16:00 再生医療の産業化  
(ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング経営管理部) 小澤 洋介
- 16:00~16:30 海外における研究成果から事業化への道 ―バイオ関連ベンチャーの動向―  
(Phoenix Venture Partners (PVP)) 神部 信幸

## 日本化学会第 94 春季年会アドバンスト・テクノロジー・プログラム(ATP)

### T3. B. 脳科学の新展開

日時： 3月29日(土) 午後

場所： 全学教育棟本館 1FS10

オーガナイザー：牛場 潤一 (慶大理工・准教授)

(担当委員：青井・上嶋)

【趣旨】脳は、約千億の神経細胞がつながった複雑なネットワークであり、「人類最後のフロンティア」とも言われています。本サブセッションでは、ポストゲノム時代の、残された未知の領域のひとつである脳機能に焦点を当て、ビジネス展開も念頭に、さまざまな切り口から化学がどこまで脳の不思議に迫れるかを中心に話題を提供します。

#### プログラム

- 13:00~13:10 趣意説明  
(慶大理工) 牛場 潤一
- 13:10~14:00 小型サル (マーモセット) を使った再生医療研究と疾患モデル作出について  
(東京慈恵会医科大再生医学研究部) 岡野 ジェイムス 洋尚
- 14:00~14:50 化合物を添加することによって神経活動を変調させ、神経機能と行動の解析をおこなう研究の新展開  
(名大環境医学研) 山中 章弘
- 14:50~15:30 神経伝達分子測定に向けて新電極材料やマイクロ流路デバイスの開発  
(産技研バイオメディカル研究部門) 丹羽 修
- 15:30~16:10 ダイヤモンドマイクロ電極の生体計測への応用  
(慶大理工) 栄長 泰明
- 16:10~16:30 (仮題) 脳卒中片麻痺上肢に対する神経リハビリテーションと薬理的介入への期待  
(慶大理工) 牛場 潤一





# お知らせ

## 【次期会長が選出されました】

第16回生命化学研究会において総会が開催され、藤井 郁雄 氏（阪府大理）が第6代会長として選出されました。任期は3年で、新体制は3月1日から始動致します。これまで会の発展にご尽力下さいました深瀬浩一会長、誠にありがとうございました。



藤井 郁雄 氏

## 【異動】

- ◆ 井川 善也  
富山大学 大学院理工学研究部 (理学系化学科) 教授  
〒930-8555  
富山県富山市五福3190  
Tel: 076-445-6599  
Fax: 076-445-6549  
E-mail: yikawa@sci.u-toyama.ac.jp

◆ 田中 克典

独立行政法人理化学研究所 基幹研究所 物質科学研究棟 田中生体機能合成化学研究室  
〒351-0198  
埼玉県和光市広沢2-1  
Tel: 048-467-9405  
Fax: 048-467-9379  
E-mail: kotzenori@riken.jp

◆ 山東 信介

東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 教授  
〒113-8656  
東京都文京区本郷7-3-1  
E-mail: [ssando@chembio.t.u-tokyo.ac.jp](mailto:ssando@chembio.t.u-tokyo.ac.jp)



【編集後記】

間もなくソチオリンピックが開幕します。今年はどんなドラマが展開されるのでしょうか。思えば初めて担当したレター編集がちょうどバンクーバー五輪の直前でした。あれからもう4年経ったのだと時が経つ速さを思い知らされています。今号も各方面でご活躍の皆様からお寄せ頂いた力作をお届けします。巻頭言には杉本氏に連載2回目をご寄稿頂き、今回は読者からの感想・意見をConversationとして併載しました。先週、STAP細胞のニュースが世界中を沸かせたところで、ちょうどよいタイミングで杉本氏の問題提起を皆様にお届けできそうです。溝口・橋本両氏にはご研究分野から最新の論文紹介を、島本、鈴木両氏には、新しい糖脂質酵素の発見に至るまでの経緯と脱メチル化酵素選択的阻害剤の合理設計について、それぞれ大変分かりやすく解説して頂きました。堀谷氏の体験記は、公募の博士研究員のポジションを獲得して海外修行への道を自ら切り拓こうとする方々にとって、大いに参考になるのではと思います。

次号 (No. 45) は、井原さんのご担当により、2014年6月頃の発行を予定しております。より充実した内容に向けて、皆様からの建設的なご意見、ご提案、フィードバックをお待ちしております。下記編集委員までご連絡をいただければ幸いです。

2014年（平成26年）2月1日

生命化学研究レター編集委員

第44号編集担当：大神田 淳子  
京都大学、[johkanda@scl.kyoto-u.ac.jp](mailto:johkanda@scl.kyoto-u.ac.jp)

井原 敏博  
熊本大学、[toshi@chem.kumamoto-u.ac.jp](mailto:toshi@chem.kumamoto-u.ac.jp)

松浦 和則

鳥取大学、[ma2ra-k@chem.tottori-u.ac.jp](mailto:ma2ra-k@chem.tottori-u.ac.jp)