

生命化学研究レター

(2014年10月)

2. 巻頭言

教育と研究：ある地方大学教授のつぶやき

九州工業大学工学研究院 **竹中 繁織**

4. 研究紹介

4. 人工生合成系による化合物生産 ～複雑な化合物を簡単に作る～

東京大学大学院理学系研究科 **後藤 佑樹**

10. PCDR 法と CLIP-RNAi 法

岡山大学大学院自然科学研究科 **大槻 高史**

14. 生体内合成化学治療を実現する ～動物内で生理活性分子を全合成～

理化学研究所・田中生体機能合成化学研究室 **田中 克典**

21. 論文紹介「気になった論文」

東北大学多元物質科学研究所 **村岡 貴博**

東京工業大学大学院生命理工学研究科 **安部 聡**

27. シンポジウム等会告

29. お知らせ

受賞

異動

編集後記

巻頭言

教育と研究：ある地方大学教授のつぶやき

九州工業大学工学研究院物質工学研究系応用化学部門 教授
バイオマイクロセンシング技術研究センター長
竹中繁織

フロンティア生命化学研究会、生命化学研究会の仲間に入れて頂いてからこの分野も大きく変わってきたようです。化学者は、最初の頃、生体内の反応を化学反応の組み合わせであると考え、生体内のモデル反応に関する研究に注目していました。生命科学の理解が深まり、バイオテクノロジーの発展によって化学者は生命科学に化学的な手法を用いて深く迫れるようになってきました。このような手法による研究分野であるケミカルバイオロジーといった領域も生まれてきました。今や化学者が医師と組んで臨床研究を進めることが特殊なケースではなくなってきました。

一方、大学も大きく変わってきました。これまでの教授、准教授、助教の体制で研究室を運営するのではなく各自独立して自分の研究を行うようになりました。研究予算を獲得できる大学では、博士課程へ学生たちが進学し、博士研究員を雇用でき、助教の立場でも世界と戦える研究を行うことができます。これに対して地方大学ではどうでしょう。研究予算を確保するチャンスは低く、博士課程進学率は低く、大学の業務負担が多い状況で日々大学業務に追われ、いつの間にか時間だけが過ぎているように思えます。助教は独立して研究をできるという立場ではありますが、その分責任も生じ学生の生活指導、学生実験や授業に追われ、責任のあいまいなスーパーバイザーからはきちんとした指導を受けられず、そのまま時間だけが過ぎ、教員評価の時になって頑張らなかったのは自己責任だと言われ、そのまま放置され、大学にとっても貴重な教員ポストが無駄に使われることとなります。このような状況では、学生達の大学に対する魅力は失われ、博士課程進学率の低下も当然でしょう。

文部科学省も各大学は各大学の強みを活かした大学運営を行うことを期待しています。この流れに沿って文部科学省は各大学にミッション再定義を提案させることによって研究大学と教育大学に差別化しています。地方大学に対しては、教育改革に関する教育改革のための競争的資金によって教育改革を促しています。今後加速化する少子高齢化社会においては現在の国立大学法人の十分の一しか必要でなくなると言われています。以前の大学統合に加え、二年後の第三期中期目標の頃には教員の給与に手を付けないと存続が危うい大学も出てくるということです。

文科省はこれまで幾度も大学改革を行ってきました。しかし、文科省の改革毎に大学教員の論文数と論文のインパクトファクターが下がってきています。これに加え文科省はグローバル化を推進しています。学部学生から海外へ派遣することが行われています。某雑誌では、アームチェア留学と批判しています。私は工学部に属していますが、工学部の基礎から応用まで訓練された学生でないと旅行気分でも海外に出しても効果は低いように思われます。文部科学省は、教育のグローバル化として日本技術者教育認定機構(JABEE)認定を推進し、PDCA(Plan→ Do→ Check→ Act)サイクルによるエンジニアリング・デザイン教育、

チームワーク教育の推進が期待されています。これら全て以前から研究室で行っていた事柄の焼き直しだけのような気もします。逆にこれらの言葉だけの改革によって研究が学生実験のようになり、実践的な研究教育ができなくなっている気もします。修士一年の後半から就職活動が始まり、学生たちは、研究の合間に活動するのではなくそれだけにかかりきりとなっています。研究室で鍛えることもできず学生を就職に送り出さざるを得ない状況です。

このような大学の現状を考えると大学はどうなってしまうのか、大学で研究ができるのか、研究室で鍛えた学生を輩出できるのかと悩んでしまいます。最近の大学の状況を見るにつけて大学のマイナスの面を強調してしまいました。しかし、まだ大学教員は好きな研究をやろうと思えばできる状況が残されています。できないと言っているのは逃げている自分のように思います。大学に入学してきた学生たちも学問や研究の面白さをわからないわけではないと信じています。現に4年生の研究室配属では学生たちは真剣に研究のことを考えているように思われます。

最終的な結論は、どんな状況にあっても良い研究を頑張っていれば道は拓けるということです。嫌なことだとなかなかできない、好きなことだと寝食忘れてのめり込むことができます。好きなことをするための困難なんてたいしたことないと思い、頑張ろうということです。生命化学は、生命といった分子機構を化学で解明する素晴らしい学問です。言い換えると有機、無機、物理化学、分析化学を基本として薬学、医学に挑める学問だと思います。年寄りもまだまだ頑張りますが、どんな状況であっても生命化学を志す若手の研究者には、あなたの素晴らしい個性で好きな研究を行い、世界に挑んで頂きたいと思います。

2014年10月



2014年1月研究室で学問の神様、菅原神社へ初もうで

研究紹介

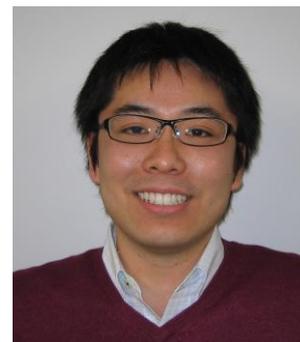
人工合成系による化合物生産

～複雑な化合物を簡単に作る～

東京大学 大学院理学系研究科 化学専攻

後藤 佑樹

(y-goto@chem.s.u-tokyo.ac.jp)



1. はじめに:私の研究のモチベーション

私が学部生として配属されたのは、京大工学部の齋藤烈先生が主宰する、有機合成を駆使して核酸の生物有機化学を行う研究室だった。齋藤研では、当時の中谷和彦助教授のご指導の下、核酸中のミスマッチ塩基対やテロメアDNAに結合する人工分子の合成と、それを応用したSNP検出法の開発などに携わった¹⁻³。研究室のメンバー達と男子校ノリで色んなことに盛り上がりながら、夜遅くまで実験を続けた日々はなかなか楽しいものだった。ご指導頂いた先生や先輩方のお陰で、修士課程までの三年間でそれなりに有機合成の技術を覚えることができたし、なにより自分の手でオリジナル化合物を作り出す喜びを知ることができた。4回生の夏に、初めて自分の化合物を合成し、それが予想通りにDNAに結合した時の感動は今でも覚えている。しかしその一方で、有機合成は一筋縄ではいかない職人芸の側面を持つことを痛感したのも事実である。先輩がやっていた反応を自分がやるとなぜかうまくいかなかったり、時間をかけてカラムをしたのにまったく精製できていなかったりと、合成で行き詰まった経験は数え切れない。私の研究は合成した化合物の評価や応用展開が主題だったので、目的の化合物がとれないと研究が全く進んでいない感覚にとらわれ、合成の失敗が続くことで積み重なる「がっかり感」はかなりのものであった(もちろんこれらの失敗は貴重な経験となるのだが、学生であった当時の私にはそんな精神的余裕はなかった)。その結果、「複雑な化合物を自分の経験と腕で美しく合成する」といった合成化学の美学からはかけ離れ、収率やエレガンスは度外視で、いかに合成ステップが短いかという観点で標的の化合物デザインを行っていた(中谷先生、ごめんなさい)。

こんな修士課程までの経験から、オリジナル化合物を作りたい!でも、難しい合成は嫌だ!というわがままな気持ちが芽生えた。それ以降、『オリジナルな有用化合物を、簡単に、自在に、合成する技術を確認したい』ということが、私の研究における一貫したモチベーションになっている。本稿では、このモチベーションに沿って実施してきた、博士課程以降の研究について簡単に紹介させて頂く。

2. 一連の研究の背景

齋藤先生のご退官もあり、博士課程で別の研究室に移る道を模索していた私は、中谷先生のお薦めでもあった、東大先端研の菅研への進学を決めた。菅研は当時アメリカから移ってきたばかりで、メンバーは少なかったが、幅広いバックグラウンドを持つ研究員・学生が集まりつつあるところであった。そんな発展途上かつ自由な空気の中、ユニークな面々と一緒に研究室の文化や研究を新たに作り上げる一助となれたのは、かけがえのない経験だったと思っている。

研究の面では、タンパク質の生合成系である、「翻訳反応」の人工改変研究に携わった。翻訳反応では、

①20種類ものビルディングブロック(アミノ酸)が、②配列制御を伴ってつながってゆき、③非常に高分子量の生成物であっても、④選択的かつ高純度に合成される。このような特長を併せ持った化合物生産系は、人工の有機合成や高分子重合では到底達成できず、翻訳系は超精密なアミド結合形成システムと言えよう。その一方で翻訳系には、利用可能なビルディングブロックが、一般的に20種類の天然アミノ酸に限られるという制限が存在する。90年代以降、この制約を克服するべく、翻訳反応におけるコドンとアミノ酸の対応関係-いわゆる遺伝暗号-を人工的に改変する試みが広く開発されてきた。アメリカではSchultzらの一連の研究がよく知られ⁴、国内でも宍戸・芳坂研や横山研にて多彩な方法論が数多く報告されている^{5,6}。私が加入した頃の菅研でも、助手の村上裕さんにより人工アミノアシル化リボザイム(フレキシザイム)を活用した遺伝暗号のリプログラミング技術が完成されつつあった⁷。

この遺伝暗号のリプログラミング技術を用いて、非天然アミノ酸含有タンパク質の生産に参入したとしても、著名な先駆者達の研究の中では埋もれてしまうのではないか。そのような考えから、研究の対象を小/中分子と呼べるサイズの短いペプチドへと絞るのが、当時の菅研の戦略であった。強い生理活性を示すペプチド性の天然物の中には、D-アミノ酸やN-メチルアミノ酸といった翻訳合成では利用できない特殊なアミノ酸からなる

大環状ペプチドが多く存在する(例えばサイクロスポリンA、図1A)。もしも、このような特殊骨格を含むペプチド(特殊環状ペプチドと我々は呼んでいる)を翻訳系で合成することができれば、生理活性分子を簡便に生産する有用なツールとなるはずである。こういった背景をうけ当時の菅研では、用いるアプローチはそれぞれ違っていたものの、メンバーみんなが「遺伝暗号をリプログラミングして特殊環状ペプチドの翻訳合成を達成する」という方向性で研究を進めていた。

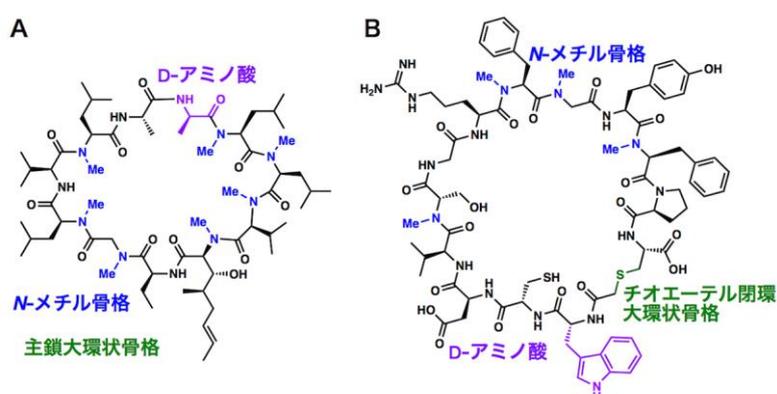


図1 特殊環状ペプチドの例。(A) サイクロスポリンA (天然物)。(B) E6AP阻害性ペプチドMCP-1 (人工ペプチド)。

3. 翻訳開始反応のリプログラミング法とその応用

そんな中、私は翻訳の開始反応のステップに注目して遺伝暗号のリプログラミングに取り組んだ。原核生物の翻訳開始反応は、AUGコドンがホルミルメチオン(fMet)をコードして進行することから、翻訳産物のN末端構造がfMetに制限されてしまう。この制限は、多様な特殊ペプチドを自在に合成する上で、大きな問題となっていた。

私が確立した開始反応のリプログラミング法⁸では、再構成無細胞翻訳系⁹から天然の開始残基であるMetを除いた反応液を用意する。この系では天然の翻訳開始経路が完全に阻害されるが、フレキシザイム技術で用意した非天然アミノアシル開始tRNAを添加することで、加えた非天然アミノ酸が人工の開始残基として機能する。つまり、開始AUGコドンに相当するアミノ酸をfMetから任意の人工開始残基に書き換えることとなり、(翻訳開始反応に許容されれば)N末端に人工の構造をもったペプチドを翻訳することができる(図2A)。実際に様々な人工開始残基を試したところ、翻訳開始反応の基質許容性は驚くほど高いことが分かった。20種類全てのアミノ酸側鎖骨格や様々なN-アシルアミノ酸だけでなく、D-アミノ酸や短鎖のペプチドであっても開始残基となりえ、多彩なN末端骨格を翻訳合成できるようになった¹⁰⁻¹²。

この手法は、翻訳産物のN末端のバリエーションを単純に増やしただけでなく、N末端に導入するアシル

基を工夫することで、大環状ペプチドの翻訳合成も可能にした^{8,13}。図2Bには、Grb7のSH2ドメインに結合する抗ガン活性ペプチドG7-18NATE¹⁴の翻訳合成の例を示した。この実験では、人工開始残基としてN-クロロアセチルトリプトファン(CIAcTrp)を用いて翻訳開始反応のリプログラミングを行う。翻訳産物としては、N末端にCIAcTrpが導入された直鎖ペプチドの生成が予想されるが、実際にはクロロアセチル基が下流のシステイン上のチオール部位と自発的に反応し、チオエーテル結合で閉環した大環状ペプチドが得られる。この反応には特別に試薬を加える必要はなく、適切に配列をデザインしたDNA二本鎖を加え、37°Cで30分インキュベーションするだけで、翻訳反応と翻訳後化学反応がカップルして進行し、大環状ペプチドが純度良く合成される。同じペプチドを化学合成する場合には、熟練者でも精製操作を含めて数日かかるのと比べ、混ぜるだけ・短時間で純度の高い化合物が得られる本手法の優位性を強調したい。

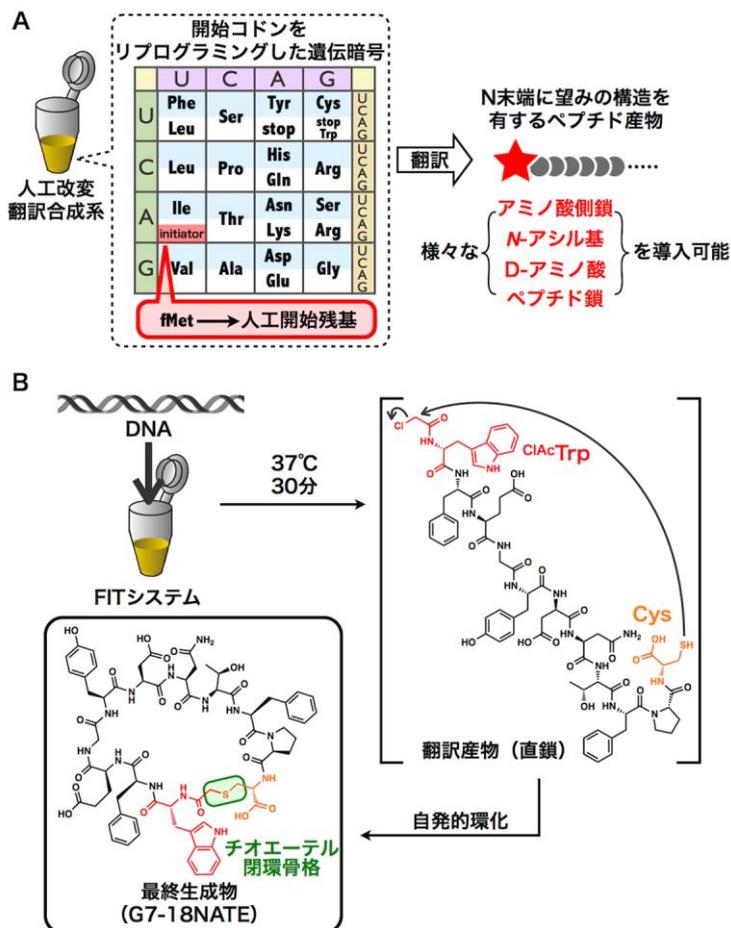


図2 (A) 翻訳開始反応のリプログラミングによるN末端修飾ペプチドの合成。(B) 大環状骨格を有するペプチドの翻訳合成。

この手法の最大のメリットは、mRNA display^{15,16}と呼ばれる試験管内分子進化法と組み合わせることで、大規模な大環状ペプチドライブラリーを作成し、その中から望みの生理活性を有するペプチドを迅速に探索できることである。Random Peptide Integrated Discovery (RaPID)システムと名付けられたこの技術では、1兆種類以上の異なる配列の大環状ペプチドの集団を、それぞれの鋳型mRNAでラベル化しながら構築する。このライブラリーの中から特定の標的タンパク質に結合するペプチドを「選択」し、その活性種にラベル化されたmRNAのみをRT-PCRで「増幅」させる。この選択-増幅のサイクルを繰り返すことで、目的の活性を示す大環状ペプチドを簡便に(通常2週間以内に)同定できる。例えば、後輩の山岸君の成果として、子宮頸がんの発症に関わるユビキチン転移酵素E6APを標的としたRaPIDシステムにより、図1Bで例示した大環状N-メチル化ペプチドが開発された(サイクロスポリンとの構造モチーフの類似性に注目されたい)¹⁷。このペプチドはE6APに対して $K_D = 600 \text{ pM}$ という非常に強い結合親和性を示し、E6APとE2タンパクとのタンパク-タンパク相互作用を阻害することで、ユビキチン化反応自体も抑えることが明らかとなった。これは翻訳系を用いた生理活性ペプチドの探索戦略の有用性を端的に示す結果である。実際、菅研ではその後様々な標的についてRaPIDシステムを適用し、多くの人工特殊環状ペプチドの開発に成功している¹⁸。

4. 新規クラス翻訳後修飾酵素の発見

特殊な骨格を有するペプチドは天然物として広く生産されているが、それらは翻訳系の関与しない生合成経路(nonribosomal peptide synthetases, NRPS)で産生されていると私は信じていた(単に不勉強なだけ

だったのだが)。そのため、天然特殊ペプチドの中の相当数が、翻訳合成されたペプチドを前駆体とし、翻訳後修飾酵素による骨格変換を経て生合成されていることを知った時、大きな衝撃を受けた¹⁹。そこでポストドク先は、ランチビオティクスの生合成に関わる翻訳後修飾酵素の試験管内再構成の分野で興味深い研究を展開している、イリノイ大のvan der Donk研にお世話になった。ランチビオティクスとは、チオエーテル閉環構造を複数有する多環式の天然抗菌ペプチドの総称である²⁰。その生合成経路は、①翻訳系による前駆体ペプチドの合成、②脱水酵素によるSer/Thr残基の脱水(α, β -不飽和アミノ酸の形成)、③環化酵素によるCysと脱水アミノ酸間のマイケル付加(チオエーテル閉環構造の形成)の三ステップから成る(図3A)。翻訳後修飾反応のうち、③の環化反応については関連酵素の結晶構造も解かれ、分子メカニズムも分かっていたのだが、②の脱水ステップの反応機構については未知の部分が多かった。

私が取り組んだのは、ゲノムマインニングにより見つかった、未知のランチビオティクス生合成酵素の候補タンパク質(後にVenLと命名)の機能解明である。この新しいタンパク質VenLは、C末端部分に既知の環化酵素に相同性を持つドメインを有するが、N末端部分は他の脱水酵素と相同性がなく、VenLが本当にランチビオティクス生合成酵素なのかどうかを含め、謎に包まれていた(図3B)。全長VenLおよびドメイン欠損体を複数発現し、その酵素活性を試験管内で評価した結果、この酵素が新しいクラスのランチビオティクス生合成酵素であることが分かった²¹。おもしろいことに、N末端の未知の脱水酵素部分には、Ser/Thrキナーゼ様ドメインとリン酸化Thrリアーゼ様ドメインが隠れていた(図3C)。つまり、本酵素反応による脱水反応では、Ser/Thrが一旦リン酸化されることでpSer/pThrとなり、その後リン酸の β 脱離を伴って脱水アミノ酸が形成される分子メカニズムが示唆された。リアーゼドメインに対する点変異実験からこの仮説はさらに支持され、ランチビオティクス生合成における脱水反応の詳細な分子機構を初めて提案した²²。本酵素は現在、「クラスIV」ランチビオティクス合成酵素として認知されている。

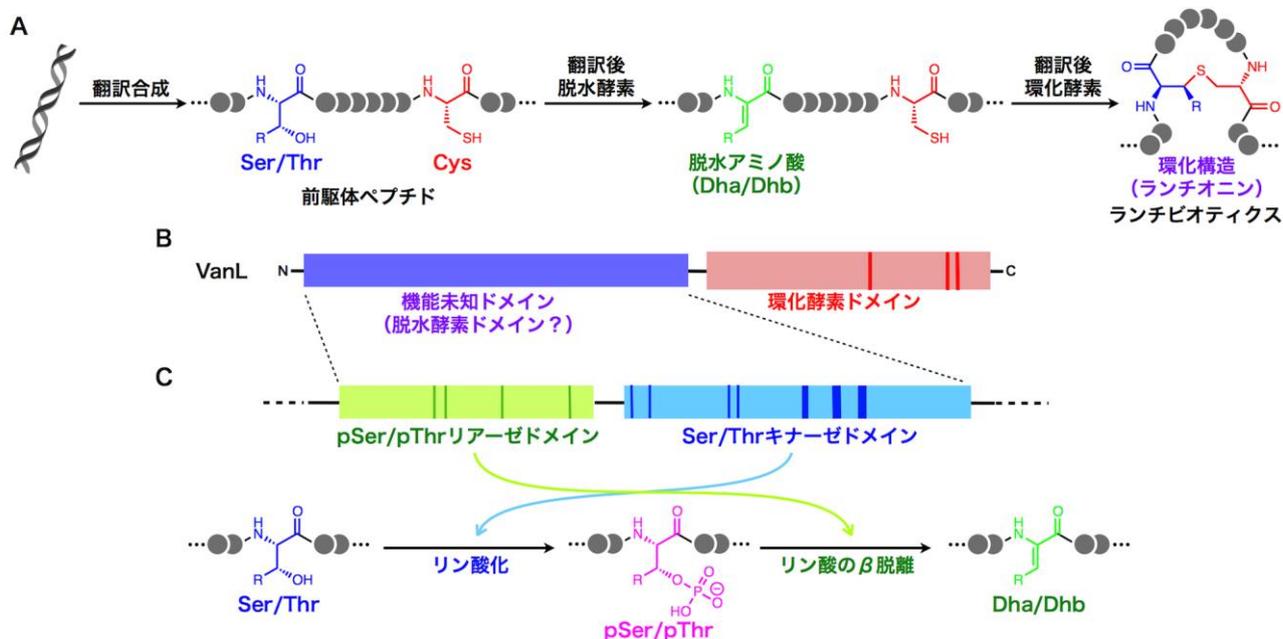


図3 (A) ランチビオティクスの生合成経路。(B) 未知のランチビオティクス生合成酵素の候補であるVenLタンパクのドメイン構造。(C) クラスIVランチビオティクス生合成酵素による脱水アミノ酸合成のメカニズム。

5. 特殊ペプチドの翻訳合成とその応用

一年半のポストドク研究の後、菅さんから声を掛けてもらった私は、翻訳合成系の改変技術と翻訳後修飾酵素とを組み合わせることで、より幅広いペプチドを試験管内生合成するプロジェクトを立ち上げた。博士課程とポストドク時代の経験の掛け合わせで一見単純ではあるのだが、色んな化合物を簡単に作りたい、と

いう私のモチベーションにうまく合致していることがこの研究を始めた一番の理由である。帰国後の研究では、ランチビオティクスの生合成酵素からは離れ、ペプチドの主鎖骨格にユニークなヘテロ環骨格を導入する酵素を扱うこととした。

主鎖骨格にヘテロ環を有する天然物は広く見られるが(図4A)、その強い生理活性を發揮する上で、主鎖ヘテロ環骨格は重要なモチーフとなっている²³。我々は、翻訳後修飾反応として、Cys/Ser/Thr残基部分のアミド結合を脱水ヘテロ環化し、アゾリン環骨格へと変換する酵素群に注目した(図4B)。具体的には、翻訳後ヘテロ環化酵素の一種であるPatD²⁴を無細胞翻訳系に組み込むことで、基質DNAの転写・翻訳・アゾリン環修飾の三ステップの反応が一つのチューブ内で進行する人工生合成系(FIT-PatDシステム)を確立した²⁵。研究を始めて分かったことだが、PatD酵素の基質許容性は予想外に高く、人工のアゾリン含有ペプチドを多数生産することに成功している。また、異なる配列のDNAを用意するだけで基質変異体の酵素反応を試せる簡便性から、PatDの基質認識機構についても新たな知見を見出すことができた。さらにFIT-PatDシステムでは、遺伝暗号のリプログラミングによるビルディングブロックの多様化や翻訳産物の大環状化手法をそのまま活用することも可能だ。これにより、図4Cに例示した大環状アゾリンペプチドの合成も達成している。今後、RaPIDシステムと組み合わせることで、天然物の構造モチーフを有する人工生理活性分子(擬天然物)の創成を目指して、さらに研究を展開していく所存である。

6. おわりに

以上、誰がやっても合成失敗の「がっかり感」を経験することなく、望みの化合物を得ることができる、汎用生合成ツールの確立を目指した研究を紹介させて頂いた。今後も自分の研究モチベーションに素直に従い、化学・バイオテクノロジーの観点から技術革新を進めていきたいと考えている。将来的には、分子生物学者の方々にも気軽に使ってもらえるような合成システムを作り、誰もがオリジナル化合物を使って研究を進められる、ケミカルバイオロジーの新技术を提供できればと夢描いている。

謝辞

このように自分の研究を振り返る度に感じるのが、私が周りの人に恵まれてきたということである。学生・ポスドク時代は、温かく支えてくれるボスや切磋琢磨できる研究室メンバーがいたからこそ、思う存分楽しく研究することができた。また助教になってからも、優秀な学生さん達が研究を盛り上げてくれていることに大いに感謝している。特に本稿に記載の研究では、菅さん、村上さん、Wilfredの三人の先生方と、FIT-PatDシステムの研究に携わってくれた伊藤悠美さん、加藤保治君、角田翔太郎君に深くお礼申し上げる。

参考文献

- Goto, Y.; Hagihara, S.; Hagihara, M.; Nakatani, K. *ChemBiochem* **2007**, *8*, 723.
- Goto, Y.; Suda, H.; Kobori, A.; Nakatani, K. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *388*, 1165.

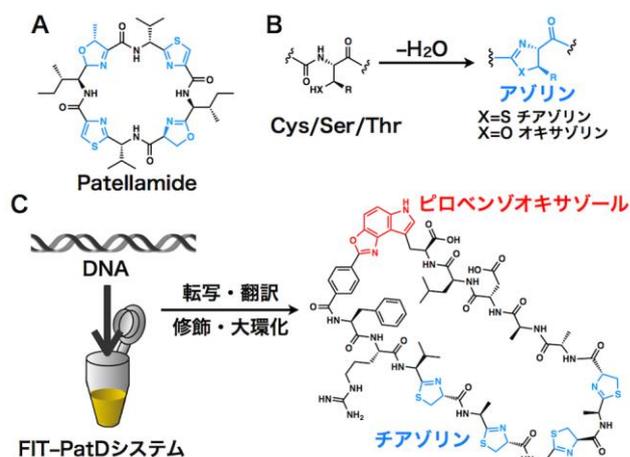


図4 (A) アゾリン骨格含有天然物の例。(B) 翻訳後脱水ヘテロ環化酵素によるアゾリン形成反応。(C) FIT-PatDシステムを用いた大環状アゾリンペプチド合成の一例。

3. Nakatani, K.; Hagihara, S.; Goto, Y.; Kobori, A.; Hagihara, M.; Hayashi, G.; Kyo, M.; Nomura, M.; Mishima, M.; Kojima, C. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 39.
4. Xie, J.; Schultz, P. G. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 548.
5. Hohsaka, T.; Sisido, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 809.
6. Sakamoto, K.; Yokoyama, S. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **2009**, *54*, 1454.
7. Murakami, H.; Ohta, A.; Ashigai, H.; Suga, H. *Nat. Methods* **2006**, *3*, 357.
8. Goto, Y.; Ohta, A.; Sako, Y.; Yamagishi, Y.; Murakami, H.; Suga, H. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 120.
9. Shimizu, Y.; Inoue, A.; Tomari, Y.; Suzuki, T.; Yokogawa, T.; Nishikawa, K.; Ueda, T. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 751.
10. Goto, Y.; Murakami, H.; Suga, H. *RNA* **2008**, *14*, 1390.
11. Goto, Y.; Suga, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5040.
12. Ohshiro, Y.; Nakajima, E.; Goto, Y.; Fuse, S.; Takahashi, T.; Doi, T.; Suga, H. *Chembiochem* **2011**, *12*, 1183.
13. Goto, Y.; Katoh, T.; Suga, H. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 779.
14. Pero, S. C.; Oligino, L.; Daly, R. J.; Soden, A. L.; Liu, C.; Roller, P. P.; Li, P.; Krag, D. N. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 11918.
15. Roberts, R. W.; Szostak, J. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12297.
16. Nemoto, N.; Miyamoto-Sato, E.; Husimi, Y.; Yanagawa, H. *FEBS Lett.* **1997**, *414*, 405.
17. Yamagishi, Y.; Shoji, I.; Miyagawa, S.; Kawakami, T.; Katoh, T.; Goto, Y.; Suga, H. *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1562.
18. Passioura, T.; Katoh, T.; Goto, Y.; Suga, H. *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 727.
19. Yarnell, A. *Chem. Eng. News* **2006**, *84*, 9.
20. Chatterjee, C.; Paul, M.; Xie, L.; van der Donk, W. A. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 633.
21. Goto, Y.; Li, B.; Claesen, J.; Shi, Y.; Bibb, M. J.; van der Donk, W. A. *PLoS Biol.* **2010**, *8*, e1000339.
22. Goto, Y.; Okesli, A.; van der Donk, W. A. *Biochemistry* **2011**, *50*, 891.
23. McIntosh, J. A.; Donia, M. S.; Schmidt, E. W. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 537.
24. Schmidt, E. W.; Nelson, J. T.; Rasko, D. A.; Sudek, S.; Eisen, J. A.; Haygood, M. G.; Ravel, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 7315.
25. Goto, Y.; Ito, Y.; Kato, Y.; Tsunoda, S.; Suga, H. *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 766.



研究紹介

PCDR 法と CLIP-RNAi 法

岡山大学大学院自然科学研究科

大槻 高史

(ohtsuk@okayama-u.ac.jp)



1. はじめに

最近取り組んでいる「光をあてた細胞のみで細胞質内にRNAを導入する方法」の開発について、紹介したい。ここでは、この方法をPhotoinduced Cytosolic Dispersion of RNA (PCDR) 法と呼ぶことにする。また、PCDR法でshort hairpin RNA (shRNA)等を細胞内導入する方法については、特にRNAiを光誘導する方法であることを伝える意図でCPP-Linked RBP-mediated RNA Internalization and Photoinduced (CLIP)-RNAi法という別名を使う。これらの方法を可能にするのは光応答性のRNAキャリアである。すなわち、PCDR法やCLIP-RNAi法の開発は、RNAキャリアの開発に基づいている。

RNAキャリアの開発をしていると話すと、RNA創薬への応用を目指して研究を始めたのだろうと思われる方が多い。現在は当然その方向も目指しているが、当初はそうではなかった。当時、私は岡山大学宍戸昌彦教授研究室で「蛋白質への非天然アミノ酸の位置特異的な導入法」に関する研究を始めており、¹⁻³⁾細胞外で作ったアミノアシルtRNAを細胞内に効率よく運ぼうと考えたのがきっかけであった。細胞内で作り得る“非天然”アミノアシルtRNAの種類は限られていたが、細胞外ではより多種類の非天然アミノ酸を担持したtRNAを作製可能である。これを用いて細胞内翻訳に結び付けたかった。アミノアシルtRNAはアミノ酸部分が外れやすいため、例えばリポフェクション法で細胞内導入するとアミノアシルtRNAは細胞内に入る前に分解してしまう割合が大きい。そこでアミノ酸とtRNAの結合部分を保護するEF-Tu蛋白質と、細胞内侵入能をもつTatペプチドを融合させることで、アミノアシルtRNAを保護しながら細胞内に運ぶキャリア蛋白質(TatEFTu)を作れないかと考えた。結果として、作製したTatEFTuにより細胞内にわずかにアミノアシルtRNAを導入することができた。⁴⁾ただし、わずかに導入されたアミノアシルtRNAによる細胞内での翻訳(非天然アミノ酸を含む蛋白質の合成)がほとんど検出できず、残念ながらTatEFTuはあまり日の目を見ていない。

さて、話が逸れたが、つまり、かなりマニアックな用途でRNAキャリアを作り始めたわけである。自分でもマニアックすぎると思い、TatEFTuと同様な設計に基づく、より一般的なRNAキャリアを作り始めた。その1つがTatU1Aである。⁵⁾TatU1Aは上述のTat(11aa)とヒト由来U1 small nuclear ribonucleoprotein A (U1A)のRNA結合ドメイン(98aa)との融合蛋白質である(図1)。この蛋白質はループ構造の12塩基のRNA配列を認識する。従って、TatU1Aは認識配列を末端に付加したRNAや図1のように認識配列をループ中に組み込んだRNAと結合する。

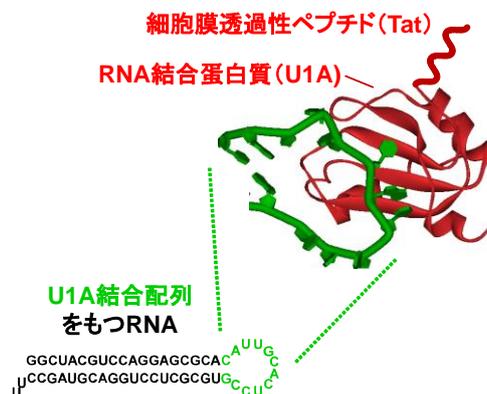


図1. キャリア蛋白質TatU1Aと、結合するRNA

このTatU1Aは結合したRNAを細胞内に運びこむことが分かったが、困ったことに、エンドソーム内にトラップされて細胞質に出てこないことも分かった。そこで、RNAおよびキャリアをエンドソームから脱出させる方策の1つとして、光増感剤をキャリアに付加して用いることを試した。すると、RNAとキャリアを混ぜて細胞に投与して2-3時間後に光照射すると、RNAおよびキャリアがエンドソームから脱出し、細胞質に移行することが分かった(図2)。こんなことがなぜ起こるのかとよく聞かれるが、現在では、励起光照射時に光増感剤から生じる活性酸素の一種がエンドソーム膜の破壊に関わっていると考えている。ただし、このことに関しては少し疑いの余地があり、現在調べているところである。詳細な機構はともかく、このような方法で光依存的にRNAを細胞質に運べることは確かである。光増感剤を付加したTatU1Aを光応答性RNAキャリアと呼ぶ。そして、図2の機構でRNAを細胞質内に運ぶ方法が、冒頭で述べたPCDR法である。

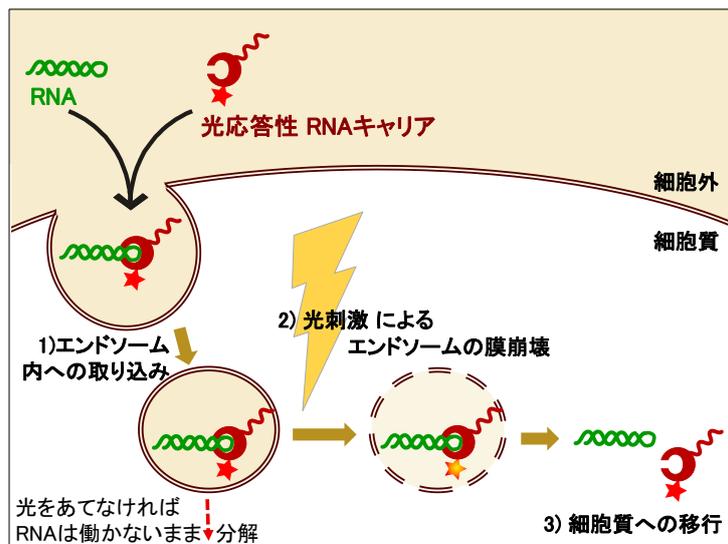


図2. 光でRNAを細胞質内に運ぶキャリア分子、および方法(PCDR法)

2. CPP-RBP型のRNAキャリア

光応答性RNAキャリアの蛋白質部分は、上述の通り、細胞膜透過性ペプチド(CPP)と、RNA結合蛋白質(RBP)の融合蛋白質となっている。TatU1Aの組み合わせよりも良いものが見つかるかもしれないということで、いくつかCPPとRBPの組み合わせを試してみた(図3)。⁶⁾ CPP部分としては、Tatおよびflock house virus coat peptide (FHV) ⁷⁾、cytoplasmic transduction peptide 512 (CTP512) ⁸⁾を試した。当時でもCPPは既に多くの種類が報告されており何を用いるかは迷った覚えがある。ただし、新規CPPについての論文の多くはCPP単独の細胞内侵入効率に関する報告であり、それらのCPPを蛋白質に融合しても効率よく細胞内侵入するという報告は少なかった。蛋白質に融合しても効率よく細胞内に侵入するCPPという観点で論文や噂を頼りにFHVやCTP512を選んだ。他にもポリアルギニンR9なども試そうとしたがR9-U1Aの大腸菌での発現・精製は困難であった。FHV-U1AおよびCTP512-U1Aは作ることができ、これらのキャリア蛋白質に同一の光増感剤(Alexa Fluor 546: 蛍光色素であるが光増感剤的役割も持つ)をC末端に付加し、PCDR法に基づいて細胞質内RNA導入を試みた。その後、蛍光顕微鏡で観察すると、双方ともRNA導入能力をもつことが認められた。FHV-U1AはTatU1Aと同等、CTP512-U1AはTatU1Aの半分くらいのRNA導入効率であった。

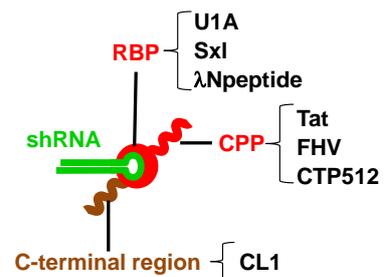


図3. CPP-RBP型キャリアのバリエーション

RBP部分については、*Drosophila* Sex lethal protein (Sxl)およびλNペプチド(λN)の利用を試みた。Sxlは1本鎖RNA配列を認識し、λNはヘアピンRNA構造を必要とする。λNの特徴はU1AやSxlと比べてそれ自体が小さいことである(ここでは36aaの部分を用いた)。そのため細胞内に入りやすいかもしれないと考えた。Sxlの特徴は*Kd*が小さいことである(~5 pM)。この値は、報告されているU1A/RNA複合体およびλN/RNA複合体の*Kd*より、それぞれ1桁および3桁小さい値である。すなわち、強くRNAに結合することが、効率よいRNA導入に結び付くかもしれないと考えた。これらのRBPに対してTatをN末につけたTatSxlやTatλNを作製し、そのRNA運搬能を比較した。このとき、これらのキャリア蛋白質のC末に同じ光増感剤を付け、同じsiRNAのsense鎖5'端に各RBPによる認識RNA配列を付けたものを用いて、PCDR法によるRNA導入を比較した。結果として、TatλNによる細胞内へのRNA導入はほとんど観測できなかったが、TatSxlによるRNA導入はTatU1Aを少し上回るくらいのものであった。“RNA導入能”も、報告されている*Kd*から考えられる“RNAとの結合の強さ”も、TatSxl>TatU1A>>TatλNであった。このことから、CPP-RBP型キャリアによるRNAの細胞内導入は、キャリア-RNA間の結合の強さと関係していることが示唆された。この結果から、TatSxlはキャリアとしての能力が高いという結論になりそうだが、そうではなかった。細胞内導入したsiRNAによるRNAi作用の面では、TatSxlを用いた場合はTatU1Aと比べて劣っており、RNAi効率は12%低かった。このことから、結合が強すぎると細胞内に入ってからでもキャリアとRNAが解離せず、RNAの働きを邪魔してしまう可能性が示唆された。

では、解離を促す仕組みを付加したら、どうなるだろう。そう考えて、TatU1AのC末側に分解促進ペプチドCL1を付加したもの(TatU1A-CL1)を作製した。これを用いた場合には、TatU1Aの場合と比べてRNAi効率が10%上昇した(図4)。すなわち、キャリア/RNA複合体が細胞質内に入ってから、キャリア側が分解されやすくなることにより、RNAがキャリアから離れやすく、働きやすくなったのだと思われる。

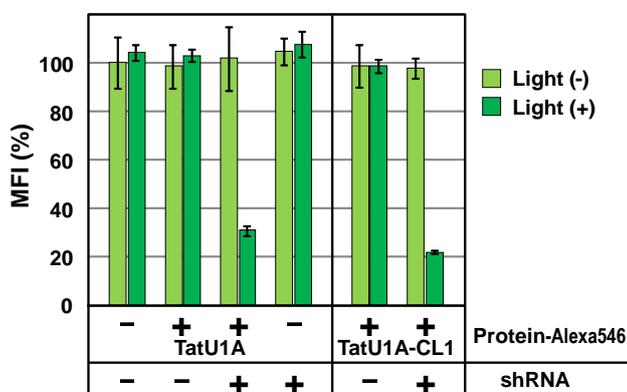


図4. Anti-EGFP shRNAの導入によるEGFPノックダウン。EGFPを安定発現するCHO細胞を用いて実験した。

縦軸は、未処理細胞のEGFP蛍光を100%としたときの、細胞あたりの平均蛍光強度(MFI)の相対値を示す。

3. 様々な波長の光

PCDR法は、光でRNAの細胞質内導入を誘導する方法である。この方法に使える光の波長域を広げるために、光増感剤部分に様々な色素を採用して、この方法を試した。図5は、各種の光増感剤候補物質(色素)をC末に付加したTatU1A-dyeを用い、PCDR法による蛍光標識RNAの細胞内導入を行ったときの様子を示している。RNAの蛍光標識は、光増感剤の励起波長と重ならないように、FAMまたはTAMRAのどちらかを採用した。このような実験の結果、まず、550 nm付近の緑色光、および630 nm付近の赤色光でPCDR法の実施が可能になった。⁹⁾ 350 nm付近の紫外光によるRNAの細胞質内導入も可能であったが、細胞へのダメージが大きく、実用的ではなかった。緑色光、赤色光でのRNA導入を行った場合は、LDH

アッセイ法では細胞毒性はほとんど見られなかった。続いて、最近、750 nm付近の近赤外光で励起できる色素群を試し、6種類の中から1つだけRNA導入に使えるものが見つかった。¹⁰⁾ 波長700-900 nm付近の近赤外光は生体組織透過性が高いため、動物個体への適用を考えた場合には、この波長域の光が使えることは大きなメリットである。

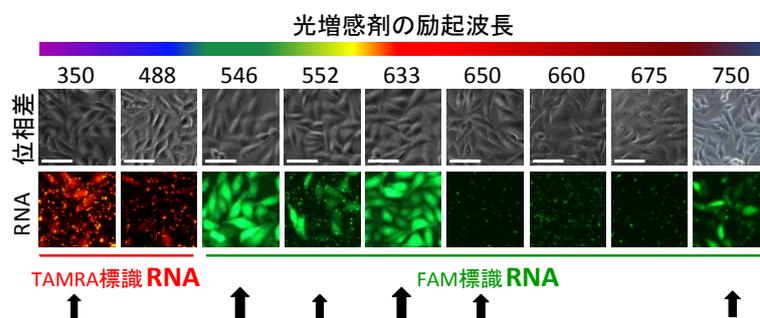


図5. 本手法に使える光の「波長」

4. CLIP-RNAi法

PCDR法でsiRNAやshRNAの細胞質内送達を行うとRNAiを誘導することができる。これを、RNAiの光誘導法としてとらえる場合はCLIP-RNAi法と呼んでいる。CLIP-RNAi法によりEGFPやルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子に加え、EGF receptorやPARやEphB4などある種の腫瘍で高発現する遺伝子のノックダウンができることも確認している。

光誘導が可能ということは、位置特異的なRNAiの誘導が可能ということである。この点が、通常のRNAキャリアを用いたRNAi誘導法とは異なる。他に、光照射強度によりRNAiの度合を調節することもできるし、光照射によりRNAiを引き起こすタイミングをコントロールすることもできる。CLIP-RNAi法により位置特異的にRNAiを誘導した例を図6に示す。このときは、培養プレートの底にフォトマスクシール(透明フィルムに黒地に透明のCLIPという文字を印刷したもの)を貼っておき、培地にキャリア/RNA複合体を加えて3h培養後に、フォトマスクを通して光照射した。細胞は哺乳動物(CHO)由来であり、shRNAはAnti-EGFP配列のものを用いている。照射24h後、光照射領域特異的にEGFPのノックダウンが見られた。これは1mm四方くらいの大きさの文字の中で起きたことである。それに加え、レーザー光を用いることで1細胞特異的に起こすこともできた。⁹⁾ このとき光照射部位でEGFP蛍光が見えなくなったのは、細胞が死滅したせいではなくRNAiによるものだというのを、染色による細胞の生死判定法により確認した。今後は、このような局所的RNAiを3次元的な細胞集団および動物個体の中で示していかなければならないと思っており、現在取り組んでいるところである。

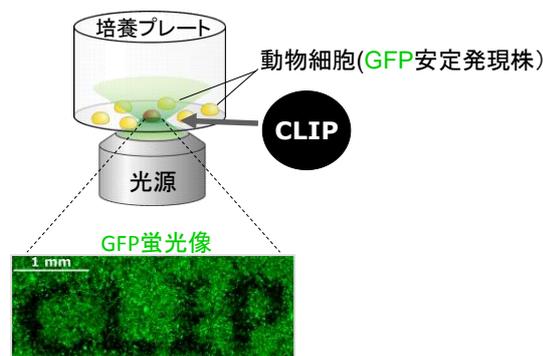


図6. CLIP-RNAi法による位置特異的なRNAi誘導

5. おわりに

CLIP-RNAi法では、狙った遺伝子の発現を抑えることができる。また、PCDR法で、siRNAやshRNA以外にも、tRNAやmiRNA (pre-miRNA)くらいの小さなRNAは細胞質内導入できることは確認済みである。従って、動物個体あるいは細胞群の中の局所において、様々な遺伝子を狙って発現抑制でき、様々な低分子RNAの導入が可能である。このことにより、広範な細胞機能を制御できるはずであり、なおかつ、その時間的・空間的制御ができるわけなので、非常に大きな可能性が広がっている。従って、私達のグループとしては今後、生命科学・合成生物学・医療などの研究などに向けたPCDR法とCLIP-RNAi法の応用例をぜひ示して行きたいと思っている。ただし、分子研究から一歩踏み出して各種応用を進めるとなると自力では限界がある。本技術を生かせそうな良い実験系をお持ちの方と協力関係を結べると幸いである。

最後に、本研究を軌道に乗せた遠藤玉樹博士とその後を継ぐ石躍由佳博士、そして、研究開始当初の上司である宍戸昌彦先生、現在の研究室を支える渡邊和則博士、および関係諸氏に深くお礼を申し上げます。

【引用文献】

- 1) Ohtsuki, T., Manabe, T. and Sisido, M. Multiple incorporation of non-natural amino acids into a single protein using tRNAs with non-standard structures. *FEBS letters*, 579, 6769-6774 (2005)
- 2) Nakata, H., Ohtsuki, T., Abe, R., Hohsaka, T. and Sisido, M. Binding efficiency of EF-Tu to tRNAs charged with nonnatural fluorescent amino acids. *Analytical Biochemistry*, 348, 321-323 (2006)
- 3) Doi, Y., Ohtsuki, T., Shimizu, Y., Ueda, T. and Sisido, M., EF-Tu mutants expand amino acid tolerance of protein biosynthesis system, *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 14458-14462 (2007)
- 4) Neki, S., Ohtsuki, T. and Sisido, M. Position specific incorporation of nonnatural amino acids into proteins *in vivo*. *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (Eds by Kamihira, M., Katakura, Y., Ito, A., JAACT2008 proceeding), Vol. 16, 435-440 (2010)
- 5) Endoh, T., Sisido M. and Ohtsuki, T., Cellular siRNA delivery mediated by a cell-permeant RNA-binding protein and photoinduced RNA interference. *Bioconjug. Chem.*, 19, 1017-1024 (2008)
- 6) Matsushita-Ishiodori, Y., Kuwabara, R., Sakakoshi, H., Endoh, T., Ohtsuki, T., Photosensitizing carrier proteins for photoinducible RNA interference. *Bioconjug. Chem.* 22, 2222-2226 (2011)
- 7) Nakase, I., Hirose, H., Tanaka, G., Tadokoro, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., and Futaki, S. (2009) Cell-surface accumulation of flock house virus-derived peptide leads to efficient internalization via macropinocytosis. *Mol. Ther.* 17, 1868-1876.
- 8) Kim, D., Jeon, C., Kim, J. H., Kim, M. S., Yoon, C. H., Choi, I. S., Kim, S. H., and Bae, Y. S. (2006) Cytoplasmic transduction peptide (CTP): new approach for the delivery of biomolecules into cytoplasm *in vitro* and *in vivo*. *Exp. Cell Res.* 312, 1277-1288.
- 9) Endoh, T., Sisido M. and Ohtsuki, T., Spatial regulation of specific gene expression through photoactivation of RNAi. *Journal of Controlled Release*, 137, 241-245 (2009)
- 10) Matsushita-Ishiodori, Y., Morinaga, M., Watanabe, K., Ohtsuki, T., Near-infrared light-directed RNAi using a photosensitive carrier molecule. *Bioconjug. Chem.* 24, 1669-1673 (2013)

研究紹介

生体内合成化学治療を実現する

～動物内で生理活性分子を全合成～

理化学研究所・田中生体機能合成化学研究室

ロシアカザン大学 A. Butlerov 化学研究所

田中 克典

(kotzenori@riken.jp)



今回、私共の研究を紹介させていただく機会を頂戴し、誠に有り難うございます。大阪大学大学院理学研究科の深瀬浩一先生の研究室から独立して理研に移り、「田中生体機能合成化学研究室」という研究室名を頂いて2年間半が経ちました。私達の研究室では、生きている動物内での生理活性分子の多段階

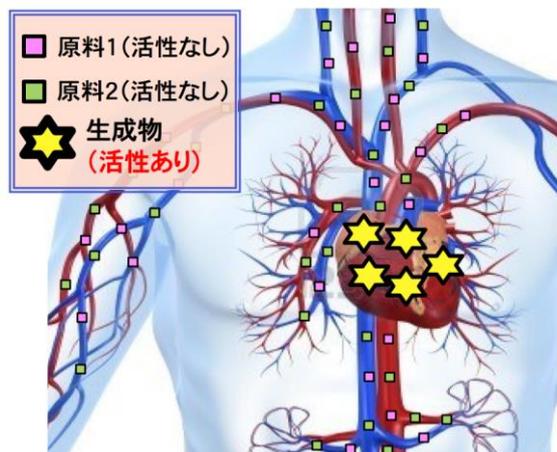


図1 例えば、心臓での生体内合成化学治療

合成にチャレンジしています。従来のように、薬理活性や生理活性を持つ分子を体内に導入して、治療を行うのではなく、「生体内合成化学治療」と呼ぶ方法で、血中内や標的臓器上での反応や試薬開発を行い、ある時間枠にピンポイントで生理活性分子を直接動物内で合成して治療の実現を目指しています。活性や毒性のない原料や試薬を体内に導入して、体内の特定の場所で時空間的に生理活性分子を創製し、治療する試みです(図1)。チャレンジングなテーマではありますが、(1)生体内で起こっている新奇な有機合成反応を発見・開発し、

そして(2)ある特定の時間に試薬や原料を、体内の標的の臓器や細胞に運ぶ、この2つの点を解決すれば、動物内でも「生理活性分子の合成」が実現できると真剣に考えています。本研究紹介では、これら2つの点に対する私達の取り組みの一端を紹介し、「生体内合成化学治療」へ向けた夢を語らせていただきます。

1. 生体内で起こっている新奇な有機合成反応を発見・開発する

私達は、特に窒素上にアルキル基を持つ共役イミン(N-アルキル共役イミンと称します)の反応性に焦点

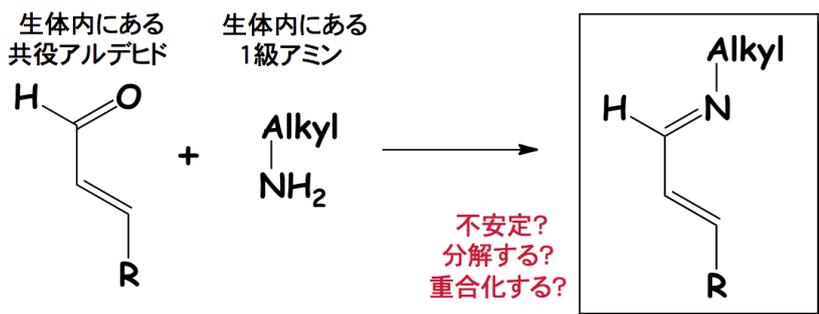


図2 意外と研究されていない共役イミン

N-アルキル共役イミン

を当てて研究を進めています。窒素上に「電子を引く」置換基を持つイミンの反応性については、これまで多くの有機合成化学者が研究を行ってきました。一方、窒素上にアルキル基を持つ共役イミンに関しては、ほとんど例がありません(図2)。アルキル基を持つイミンは、加

水分解や酸、あるいは熱に対して非常に不安定であり、重合を起こしたり分解すると信じられてきたために、その反応性については詳細には調べられておらず、有機合成にほとんど利用されてこなかったのです。しかし、*N*-アルキル共役イミンは、生体内に沢山存在する共役アルデヒド(例えば脂質代謝産物)と、これもまた生体内に存在するリジンなどの1級アミンから容易に得られますので、生体内に沢山存在すると考えられます(図2)。私達は、ひょっとして、*N*-アルキル共役イミンは、有機合成化学者がこれまでに見落としていた新奇な反応性を秘めており、この反応性が生体内での重要な機能を担っているのではないかと、もし、この新しい反応性をその機能と含めて見つめ直したならば、その反応性を逆に利用して、生体内で有効に合成研究ができ、生体機能を操ることができるのではないかと考えたのです。実際に私達は、*N*-アルキル共役イミンがこれまで予想されていなかった「見過ごされてきた」反応性を示すことを幾つか明らかにしてみました。

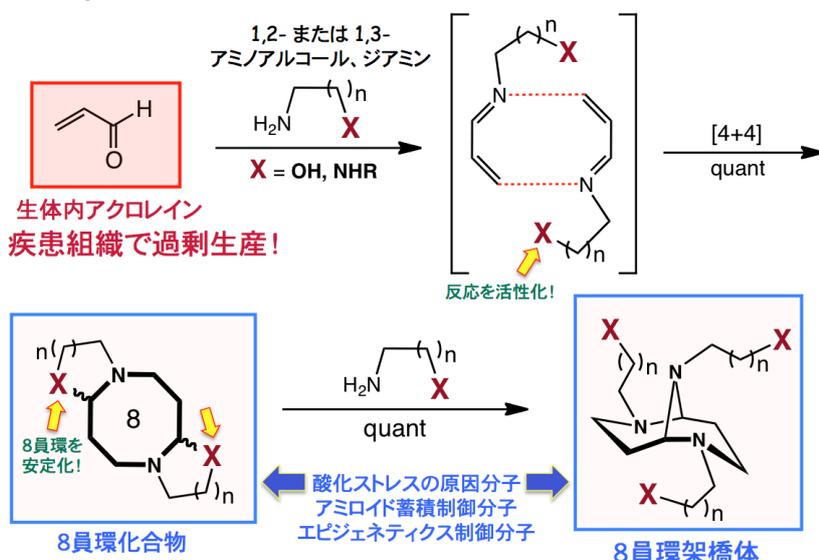


図3 アクロレインとアミノアルコール、ジアミンとの反応による8員環形成

例えば、これまでに共役アルデヒドに対して1,2-あるいは1,3-アミノアルコールやジアミンを作用させると、対応する共役イミンやアミノアセタールが得られると信じられてきました。しかし私達は、中間に生じる共役イミンが速やかに[4+4]環化反応を起こし、実は8員環化合物である1,5-ジアザシクロオクタンが15分程度で定量的に生成していることを突き止めました(図3)^{1,2}。アミンが過剰に存在すると、さらに安定化合物として8員環架橋体構造

に変化することも明らかにしました。8員環化合物は共役イミンと平衡下に存在すると考えられますが、アミンの隣接位にある水酸基やアミノ基(図3でXと示した原子)がアミノアセタールを形成することにより環状生成物を安定化させるためであると考えています。さらにイミンが[4+4]環化反応を起こす遷移状態を解析したところ、水酸基やアミノ基は二重結合と相互作用して、反応基質のイミン同士を近づけるとともに、二重結合の電荷をより分極させて、反応自体も促進させていることが明らかとなりました(図3)。長い有機合成化学の歴史の中で、図3のような共役イミンが汎用されてきたにも拘らず、8員環化合物が報告されていなかったという事実は驚きでした。

ここで私達は、1,3-ジアミンが、スペルミンやスペルミジンなどの天然ポリアミンの部分構造であることに注目しました(下の図5参照)。ポリアミンも共役アルデヒドと速やかに反応して、同様な8員環化合物を与えるのではないかと考えたのです。そこで、アクロレインに対してスペルミンを代表とする様々なポリアミンを有機溶媒中、または水中で反応させたところ、予想したように共役イミンから[4+4]環化反応が速やかに進行しました(図5)³。さらにスペルミンに対してアクロレインを過剰量作用させると、時間経過とともに8員環が連なったポリマーが得られ、このポリマーは最終的にシート状のヒドロゲルを与えたのです。このヒドロゲルの化学構造については、様々な1,3-ジアミンとのモデル反応の結果から、一部の単位構造に8員環架橋体構造が含まれることによって、非可逆な架橋ポリマー構造が形成されていると考えています(図5)。

さて、動脈硬化やアルツハイマー、あるいは癌などの酸化ストレスを要因とする疾患の原因物質として、これまでにポリアミンなどから酵素酸化により生じる毒性物質、アクロレインがその候補として議論されていま

す。アクロレインはタンパク質のリジン残基やポリアミンなどのアルキルアミンと反応して、FDP (3-formyl-3,4-dehydropiperidine)と呼ばれるテトラヒドロピリジン構造を持つアミノ基付加構造を与えることが報告されています(図4)。

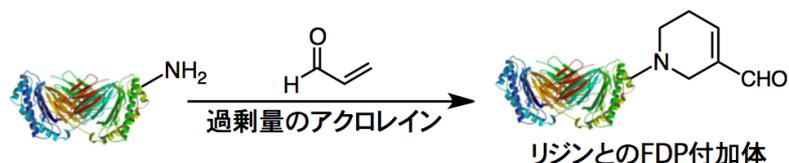


図4 リジンとアクロレインとの反応によるFDP形成

実際に FDP の抗体が作成され、様々な疾患の酸化ストレスマーカーとして、組織レベルでの検出に用いられています⁴。一方、私達は上記の結果から、アクロレインがポリアミンと反応して、対応する8員環化合物が速やかに得られることを発見しました。この反応は、これまでに知られている FDP 誘導体が生成するよりも格段に速く進行するのです。共役アルデヒドであるアクロレインが生体内でポリアミン自身から生産されることを考えると、私達が見出したアクロレインとポリアミンから速やかに生じる環状化合物は実際に生体内でも生成しており、疾患の原因や生体内での様々な機能制御を担っていることを確信しました。

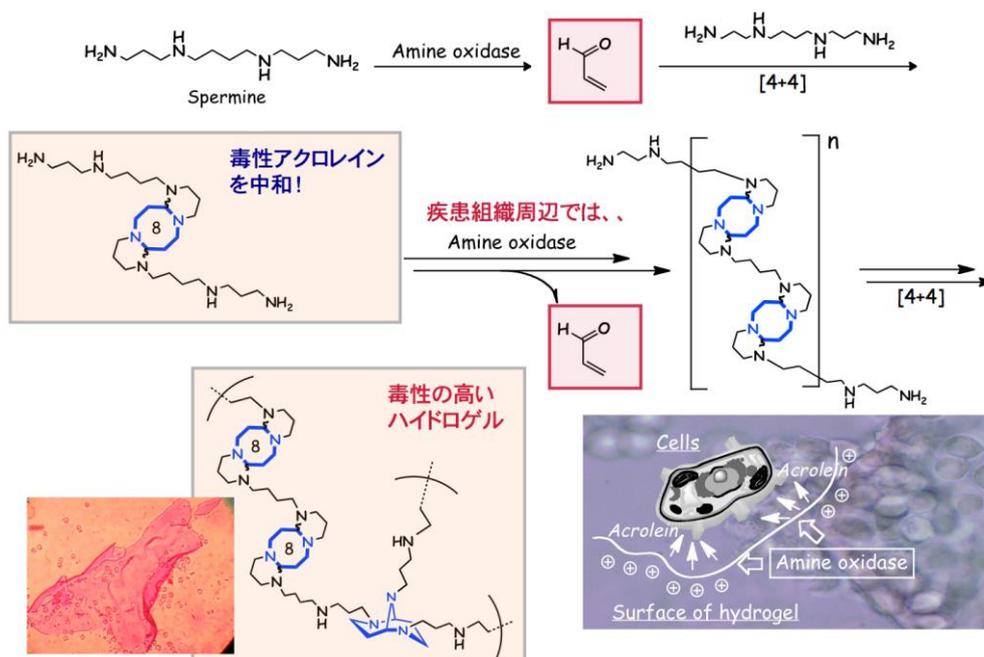


図5 ポリアミンとアクロレインによる[4+4]反応とその生物活性

そこで、様々なポリアミンから得られる8員環化合物の細胞毒性の評価と酸化ストレスへの影響を検討した結果、8員環化合物の単量体自体は、アクロレインと比較してほとんど細胞毒性を示さないのに対して、アクロレインを過剰量作用させたとき、最終的に生じるシート状のヒドロゲルは、細胞に強力に接着し、即時に細胞を死滅させることが分かりました(図5)³。すなわち、生体内では(特に細胞内からポリアミンが放出され血液中に漏れだすと)アミン酸化酵素によってポリアミンからアクロレインが代謝されて生じますが、これは近傍に大量に存在するポリアミンと速やかに反応し、環状化合物を与えることでアクロレインの毒性が中和されていると考えられます(図5)。一方、生体内での制御機構が破綻すると、ポリアミンから大量のアクロレインが生産され、8員環のポリマーを与え、酸化ストレスの亢進に繋がること示唆されました。8員環のポリマーや最終産物として生成するヒドロゲルは、そのカチオン特性から細胞に強力に接着し、細胞機能にダメージを与えていることが予測されます。さらに生体内でのアミン酸化酵素がポリマー構造を酸化し、近傍の接着細胞に対して大量にアクロレインを放出することにより、著しい細胞毒性を示している可能性が示唆

されました。

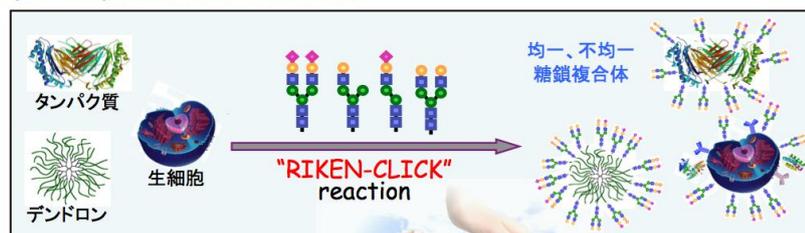
さて、私達が見出した[4+4]環化反応は、ポリアミンから生体内で生成する毒性のアクロレインを中和するためだけに、進行しているのでしょうか。私達は現在、8員環やその低分子ポリマーが生体内で何らかの機能発現に寄与している可能性を追求しています。大変興味深いことに、最近の結果では、[4+4]反応によるポリアミンと8員環化合物は、生体内で平衡条件下にあり、実はこの化学平衡がクロマチンの凝集活性やエピジェネティクス制御、さらに、アルツハイマーのペプチド凝集の制御に携っている証拠を掴んでいます(図3参照)。ポリアミンが核内に nM 程度も存在し、さらに脳内で過剰に発現していることを考えれば、生体内ではポリアミンが自身でアクロレインを生産し、自身の構造をダイナミックに変化させることによって、様々な生体内機能を制御しているのではないかと、夢はどんどん広がってきます。

このように、これまで見過ごされてきた*N*-アルキル共役イミンの反応性として、[4+4]反応による8員環化合物の生成を明らかにするとともに、ポリアミンから生成する8員環ポリマーは酸化ストレス原因物質の1つである可能性を提唱しました。さらに、本反応が生体内での重要な機能を制御する鍵として存在する可能性を提起いたしました。これらは「有機合成化学」を以て初めて明らかにできた現象であることを強調させていただきたく思います。単に化合物を合成して生物学的な研究に供与するだけでなく、本稿でお示したアプローチもケミカルバイオロジー研究に非常に有効であることを強調させていただきたいと思います。一方、現在これらの知見から、アクロレインの過剰生成している癌などの疾患組織において、「生体内で起こっている」[4+4]反応を積極的に動物内で実施することにより、エピジェネティクス等を制御し、疾患を治療する「生体内合成化学治療」を展開しています。

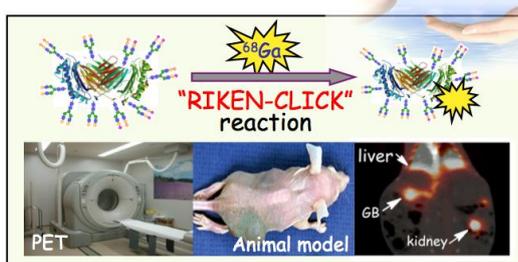
2. ある特定の時間に試薬や原料を、体内の標的の臓器や細胞に運ぶ

上記の反応を含め、動物内での標的の臓器や細胞で生理活性分子の合成を行うためには、必要な時間帯にできるだけ早く、試薬や原料を体内の標的の臓器や細胞に運ぶことが最も重要となってきます。まだ未発表ですが、生体内糖鎖の相互作用を有効に利用することにより、生きている動物内の肝臓や脾臓、あるいは特定の癌標的に対して、たった数分で有機合成の試薬や原料を精度良く運搬することに成功しています。臓器の中でも特定の細胞を選択的にターゲティングすることも可能となっています。また、この方法

(テーマ1) 糖鎖複合体の化学合成



(テーマ2) 標識化、イメージング 診断、治療戦略



(テーマ3) 組織、細胞 分子相互作用解析

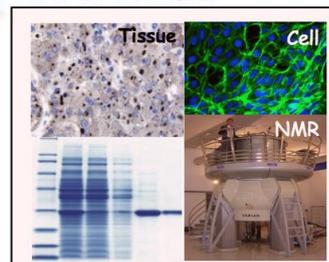


図6 理研/カザン大ジョイントプロジェクトによる糖鎖診断と治療の研究拠点

により、特定の時間帯で必要のない化合物を膀胱、あるいは胆嚢から自在に排出することにも成功しています。

これらの糖鎖を活用したデリバリーシステムは、本稿でテーマとしております「生体内合成化学治療」にとどまらず、PET、MRを始めとする診断、さらには放射線療法にも適応できる方法です(図6)。これらの研究は、私達が10数年かけて開発した共役イミンの「速やかな6 π -アザ電子環状反応」を基盤として実施していますが(現在、RIKEN-CLICK反応と呼ばれています)⁵、標的臓器や細胞への選択性の向上とヒトへの診断と治療を押し進めるため、最近、ロシアのカザン大学で新しく「生体機能化学研究室」と名付けた共同研究室を開設いたしました(理研の研究室から「合成」という言葉を削りました)⁶。理研・カザン大学化学科・物理科・基礎医学部と共同で基礎から応用研究までを開始しています(図6)。

化学の分野では、カザン大学はブトレロフ、マルコフニコフ、アルブゾフなど、多くの著名な化学者を生み出した有機化学の発祥地として知られていますが、残念ながら現状では、世界の化学(化学生物学)情勢から立ち後れています。そこで本年度、ロシア政府の指令により国際研究拠点プログラムが開始され、私達の研究室はその1つです。アメリカやヨーロッパ、あるいはアジアしか目を向けていなかった私には、彼らの勤勉さ、研究に対する情熱、また驚くほど素直で温かい人柄に、大変驚き、そして大いに反省いたしました。昨年ユニバーシアードがあり、そして4年後にはサッカーのワールドカップが開催されるカザンの都市、文化、食事、そして人をご覧になれば、皆様間違いなく驚かれることと思います。数年後には、理研-カザンジョイントプログラムによる、「糖鎖診断と治療の研究拠点」として確立したいと意を決しております。先日テレビで日本人が滅多に行かない都市として紹介されておりましたが、どうぞ、機会のある際にお立ち寄りいただければと思います。

最後になりましたが、理研、およびカザン大学の研究員の皆様(図7)、そして常日頃からお世話になっております共同研究者の先生方にこの場をお借りして心よりお礼申し上げます。

生体機能合成化学研究室



生体機能化学研究室



図7 理研/カザン大の化学研究室メンバー

参考文献

- [1] A. Tsutsui, K. Tanaka, 2,6,9-Triazabicyclo[3.3.1]nonanes as overlooked amino-modification products by acrolein, *Org. Biomol. Chem.*, **11** (2013) 7208-7211.
- [2] K. Tanaka, R. Matsumoto, A. R. Pradipta, Y. Kitagawa, M. Okumura, Y. Manabe, K. Fukase, Facile preparation of 1,5-diazacyclooctanes from unsaturated imines: Effects of the hydroxyl groups on [4+4] dimerization, *Synlett*, (2014) 1026-1030.
- [3] A. Tsutsui, R. Imamaki, S. Kitazume, S. Hanashima, Y. Yamaguchi, M. Kaneda, S. Oishi, N. Fujii, A. Kurbangalieva, N. Taniguchi, K. Tanaka, Polyamine modification by acrolein exclusively produces 1,5-diazacyclooctanes: A previously unrecognized mechanism for acrolein-mediated oxidative stress, *Org. Biomol. Chem.*, **12** (2014) 5151-5157.
- [4] K. Uchida, M. Kanematsu, K. Sakai, T. Matsuda, N. Hattori, Y. Mizuno, D. Suzuki, T. Miyata, N. Noguchi, E. Niki, T. Osawa, Protein-bound acrolein: potential markers for oxidative stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95** (1998) 4882-4887.
- [5] K. Tanaka, Y. Watanabe, S. Nozaki, K. Fukase, New ^{68}Ga -DOTA labeling, *PCT/JP2013/161407*, Aug 2, 2013.
- [6] 研究室HP: <http://www.riken.jp/nori-tanaka-lab/>



気になった論文

村岡 貴博 (むらおか たかひろ)

東北大学多元物質科学研究所 生命類似機能化学研究分野 金原研究室 助教

muraoka@tagen.tohoku.ac.jp

このたびは、生命化学研究レター「気になった論文」への執筆の機会を頂き、心より感謝申し上げます。私は2007年3月に東京大学大学院にて学位を取得し、日本学術振興会特別研究員(PD)として、米国イリノイ州ノースウェスタン大学Stupp研究室にて研究を行い、2008年5月から、東北大学金原数教授の下で、助教として勤めております。現在は、膜タンパク質と同様のフォールディング構造を形成する合成分子の開発・機能化と、ポリエチレングリコールの構造化による機能開拓、という2つのテーマを軸に、それらから派生した研究も含め幅広い興味を持って研究に取り組んでおります。

最近の高分子化学、超分子化学において、メカノケミストリーという領域が注目を集めています。機械的な刺激によってポリマー鎖内の化学構造を変化させ、色や蛍光特性を変化させることでストレスセンシングを可能にする、などの応用が展開されています。一方タンパク質化学において、最近、メカニカルな応答性を持たせたタンパク質を分子材料として利用した研究が報告されています。その中で、最近気になった論文を紹介させていただきます。

Forced Protein Unfolding Leads to Highly Elastic and Tough Protein Hydrogels

J. Fang, A. Mehlich, N. Koga, J. Huang, R. Koga, X. Gao, C. Hu, C. Jin, M. Rief, J. Kast, D. Baker, and H. Li, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2974.

プロテインベースのヒドロゲルは、再生医療などの応用可能性から注目を集めている。通常、タンパク質を用いたヒドロゲルは、立体構造が崩れた非球状のタンパク質から作られているため伸縮性や強靭性を持たず、応用の幅が制限されている。ここで著者らは、力で引き起こされるタンパク質のアンフォールディングに着目した。これによるポリペプチド鎖の大きな伸長の結果、伸縮性を有し、効果的にエネルギーを分散させ、壊れにくいヒドロゲルを開発することができるのではないかと考えた。しかし、ここで一つ問題となるのが、ヒドロゲル中で、いかにかなりの割合のタンパク質を力で変性させるか、という点である。理論上、ヒドロゲル中のポリマー鎖一本がゲルの変形によって受ける力は2-3 pNである。それに対し、通常の弾性を有するタンパク質をアンフォールドさせるのに必要な力は数十から数百 pNであるため、それらを用いてゲルを構築したとしても、力に応答する分子はごく少数に限られてしまう。

そこで著者らは、力学的に極めて不安定なタンパク質をデ

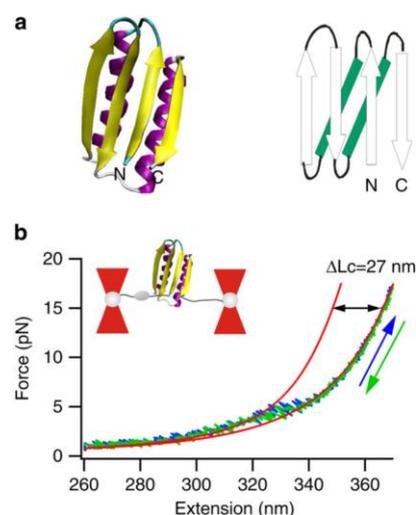


図1 (a) FL ドメインの予想立体構造 (左)とその模式図(右)。FLドメインは、 $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ の二次構造から成る。(b)シングル FL ドメインの代表的な Force-Extension カーブ。論文より許可を得て転載(一部改変)。

ザインし、ゲルのビルディングブロックとして用いた。探索の結果、フェレドキシンと似た折りたたみ構造を形成するFLドメインを設計した(図1a)。Force-Extensionカーブ測定から、FLドメインは約5 pNでアンフォールドし、それにより長さも約27 nm伸びることが分かった(図1b)。著者らは、このFLドメインを8つ連結した(FL)₈を合成し、さらに[Ru(bpy)₃]²⁺を用いたチロシンの光二量化反応により、(FL)₈のPBS溶液からヒドロゲルを得た。得られたヒドロゲルは不透明であり、ゲル中にタンパク質が凝集した部分があることが示唆された(図2a)。さらに興味深いことに、このヒドロゲルは水に浸すことで収縮した。多くのタンパク質ヒドロゲルは、水に浸すことで膨潤するため、この性質は特異なものである。これは、ゲル中への水の浸透により生じた張力によりFLドメインの立体構造が崩れ、疎水性表面が露出したことにより生じたものと考えられる。

得られたゲルは、水を70%含むにも関わらず弾性を有し、元々の長さの5倍の大きさにまで、破損すること無く伸長した。また、伸長過程と収縮過程とで応力応答に大きなヒステリシスが見られ、顕著なエネルギー分散が起きていることも示唆された。グアニジン塩酸塩を添加すると透明なゲルに変化した(図2a)。円偏光二色性スペクトルからFLドメインが変性していることが示され、変性ポリペプチドがクロスリンクしたネットワーク構造から成るゲルであることが示唆された。FLドメインを変性させることで柔軟性が増す、などヒドロゲルの力学的応答は大きく変化し、エネルギー分散がほとんど起こらないことも明らかとなった。従って上記のような特異なゲルの性質は、フォールドしたFLドメインのフォールド→アンフォールド立体構造変化の効果であることが強く示唆される。FLドメインを変性させたヒドロゲルを再度PBS中に浸すと、不透明なゲルに戻り、力学的特性も変性前とほぼ同じものに回復した(図2a,b)。

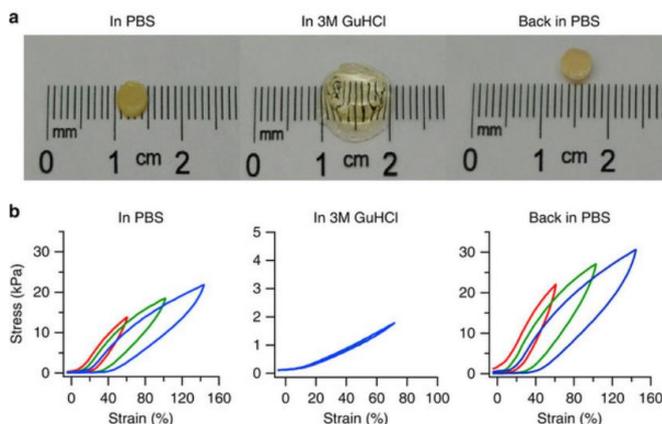


図2 変性前後、リフォールディング後の(FL)₈ヒドロゲルの(a)写真と(b)力学応答。論文より許可を得て転載。

Mechanically Modulating the Photophysical Properties of Fluorescent Protein Biocomposites for Ratio- and Intensiometric Sensors

J. N. Brantley, C. B. Bailey, J. R. Cannon, K. A. Clark, D. A. V. Bout, J. S. Brodbelt, A. T. Keatinge-Clay, and C. W. Bielawski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5088.

蛍光性タンパク質であるYFP, GFPの立体構造を、ポリマー中で力学的に変化させることにより、力に応じて蛍光波長や蛍光強度を変えるポリマー材料を開発した。

YFPは、色素ユニットとTyr203間の弱いアレーン相互作用で黄色く発光する。enhanced YFP (eYFP)を用い、メチルメタクリレート、AIBN、可塑剤としてのBMIM-PF6を混ぜ、重合し、eYFPを含むPMMAコンポジットを作成した。得られたポリマー材料は、540 nmの蛍光を示した(励起波長485 nm)。ここに圧力をかけると、その強さに応じて蛍光波長は短波長シフトし、360 MPa下において534 nmにシフトした。従って、ポリマー材料への圧力印加により、eYFP中の色素、Tyr203部分のわずかな構造変化が引き起こされたことが示唆される(図3A)。

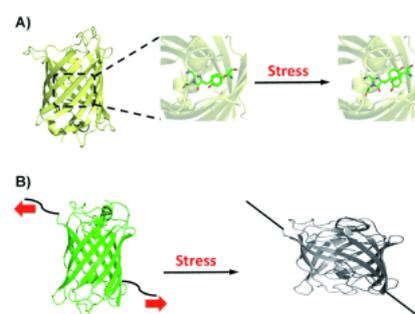


図3 力による(A) YFPのアレーン相互作用部分、(B)GFPの立体構造変化。論文より許可を得て転載。

GFPはアンフォールドすることで消光することが知られる。そこで著者らは、GFPに対しポリマー鎖を共有結合で導入することで、力学的にGFPを変性させ、消光する材料開発を行った。GFPのN末端と、その反対側にシステインを導入した二点変異型GFPを用い、メチルメタクリレートとAIBNを混ぜ、重合することで、変異型GFPを含むPMMAコンポジットを作成した。このポリマー材料は420 nm励起光に対し、507 nmの蛍光を発した。ここに圧力をかけると連続的に蛍光強度は減少した。ここで、一点にだけ変異を加えたGFPで作成したPMMAコンポジットの場合、蛍光の圧力応答性はほとんど見られなかったことから、二点変異型GFPを用いたPMMAコンポジットでは、受けた力によってGFPの立体構造が崩れ、消光したものと考えられる(図3B)。

Direct Observation of Disulfide Isomerization in a Single Protein

J. Alegre-Cebollada, P. Kosuri, J. A. Rivas-Pardo, and J. M. Fernández, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 882.

最後に、AFMを利用してタンパク質一分子を引っ張り、アンフォールディングによる1分子鎖長の変化からジスルフィド異性化の部位特異性を定量的に調べた研究を紹介する。

著者らは、I27という分子内に2つのジスルフィド結合32-75, 24-55を有するタンパク質を4つ連結した分子の両端をAFMの探針と基盤に固定し、システインを含むバッファー中で引っ張ることでアンフォールドさせ、分子鎖長の変化をforce-clampスペクトルとして観測した(図4a)。すると、32-75, 24-55の開裂に伴う分子鎖長の増加以外の変化も観測され、分子内でのジスルフィド異性化が起きていることが示唆された。得られたforce-clampスペクトルにおいて、4 nmの伸長がもっとも頻繁に、かつ他の変化よりも先に見られた。これは12個のアミノ酸が開放され、伸びた分に相当するため、ジスルフィド32-75の開裂に由来する。その結果生じたフリーのCys32は、ジスルフィド24-55の近くに存在するため分子内ジスルフィド異性化が起きると考えられ、force-clampスペクトルにおいても異性化に依る分子鎖長の増加に対応する伸長が

観測された。つまり、このAFMを用いる方法により、タンパク質中のジスルフィド結合の開裂と異性化をリアルタイムに観測することができた。従って、各分子鎖長変化の頻度を解析することにより、開裂と異性化の頻度を算出することができる。その結果、システインによるジスルフィド32-75の開裂において、Cys75がCys32よりも2.2倍の頻度で攻撃されることが分かった。さらに、ここで生じたフリーのCys32が、Cys55をCys24に比べ3.8倍高い頻度で分子内攻撃し、ジスルフィド異性化が進行することも明らかにすることができた(図4b)。通常のタンパク質をバルクで扱う場合、ジスルフィド異性化で生じる複数の異性体は酸化状態が同じであるため、分離し定量評価するのが困難であった。一分子アッセイではそれらを明確に分離し、評価することが可能であり、この論文で初めてジスルフィド異性化を定量的に観察・評価することに成功した。

以上のように、タンパク質の「力」に対する応答性をうまく利用することで、機能性材料開発からタンパク質の一分子精密評価まで展開されており、今後も更なる応用展開が期待される。最後になりましたが、今回執筆機会を与えてくださいました鳥取大学の松浦和則先生に厚く御礼申し上げます。

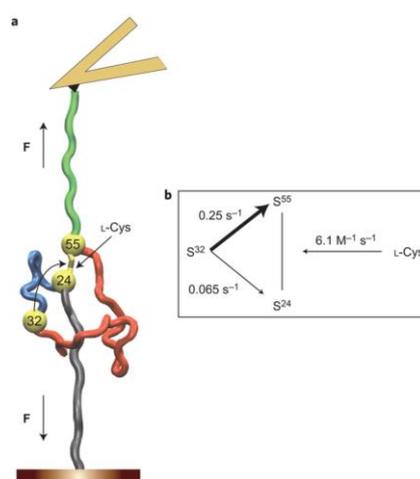


図4 (a)I27中のジスルフィド32-75の開裂により生じたCys32がジスルフィド24-55を分子内で攻撃する。(b)分子鎖長変化とその頻度を解析することによりCys32がCys24とCys55を攻撃する頻度を算出することができる。論文より許可を得て転載。

気になった論文

氏名 安部 聡

所属 東京工業大学大学院生命理工学研究科 助教

saabe@bio.titech.ac.jp

この度は、生命化学研究レターの“気になった論文”への執筆機会を与えて頂き、ありがとうございます。私は、2008年に名古屋大学にて学位を取得、京都大学での博士研究員を経て、2012年5月より東京工業大学大学院生命理工学研究科・上野隆史研究室の助教として勤めております。宜しくお願ひ申し上げます。現在は、タンパク質の自己集合体を用いたバイオマテリアルの創製に取り組んでおります。天然では、タンパク質がかごやチューブ状など高い規則性を有する集合体を形成することにより、集合体内部空間を利用した多様な機能を発現しております。しかし、天然のように規則正しい構造を持つタンパク質集合体を試験管内で構築することは、未だ難しく、バイオナノテクノロジー分野のチャレンジングなテーマの一つとなっています。今回は、タンパク質集合体の新規構築手法からその機能化についての論文を紹介させていただきます。

Highly Ordered Protein Nanorings Designed by Accurate Control of Glutathione S-Transferase Self-Assembly

Y. Bai, Q. Luo, W. Zhang, L. Miao, J. Xu, H. Li, and J. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 10966-10969.

本論文では、タンパク質間に金属配位サイトを導入し、さらにタンパク質-タンパク質相互作用の設計によるナノリングの構築を行いました。著者らは、タンパク質超分子ナノ構造体のビルディングブロックとして、ホモダイマーとして存在するglutathione S-transferase (GST)を用い、ナノリング構築のため、2カ所の金属結合部位を設計しました。(1)結合サイトをGSTの表面に突き出るように設計すること、(2)リング構造を形成するために、金属結合サイトをV字型に設計すること、(3)金属配位可能な距離に二つのヒスチジンを配置することをポイントとして設計しています(図1)。さらに、ZDOCKプログラムを用いて、GST間の非共有結合によるドッキングを検討しました。あらゆるドッキングモデルの中で、金属配位サイトを導入することにより、その構造が優先的に構築されることがわかりました。さらに、そのGSTの境界面では、静電相互作用や水素結合により、そのドッキングが安定されることがわかりました。

Hisと高い親和性を持つ Ni^{2+} とGST変異体を水中で反応させ、複合体を作成し、原子間力顕微鏡により集合体を観察したところ、高い規則性をもつナノリングやリングが形成される途中の構造が観測されました。曲率から予測されるリングの直径(367 ± 10 nm)や高さ(3.6 nm)から均一なリングが形成していることがわかります(図2)。次に、GST間の非共有結合の強弱を溶液の塩濃

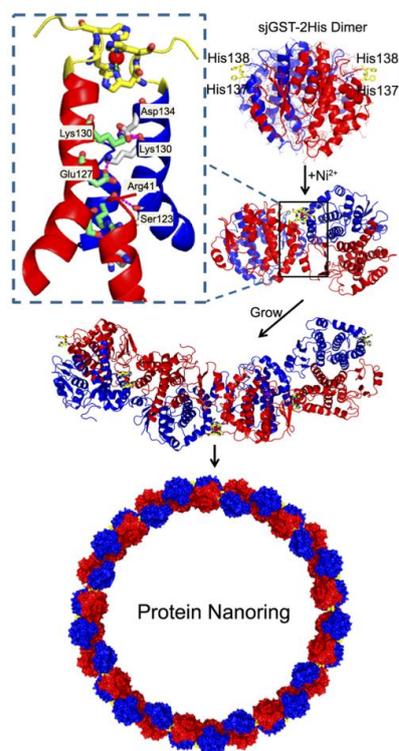


図1. Ni^{2+} -His 形成によるナノリング構造体の構築 (文献より引用)

度で調整することにより、リング直径のコントロールを行いました。20 mM Tris, 30 mM NaCl溶液条件の場合、タンパク質間の相互作用が弱まり、曲率半径が小さくなるため、小さいリングが形成されることをAFMで確認しています。以上のように、金属配位と静電相互作用を設計することにより、タンパク質リング構造の大きさを制御することに成功しました。複数の相互作用を利用したタンパク質集合体の構築方法であり、今後の機能化が注目されます。

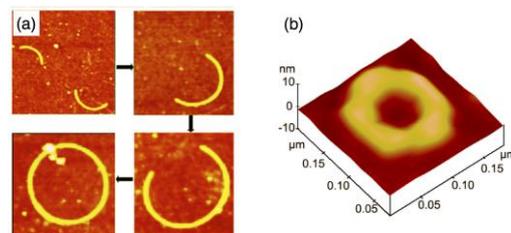


図 2. ナノリング構造の AFM イメージ (文献より一部改変して引用)

Exceptionally Stable, Redox-Active Supramolecular Protein Assemblies with Emergent Properties

Jeffrey D. Brodin, Jessica R. Carr, Pamela A. Sontz, and F. A. Tezcan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, 111, 2897-2902.

次に、タンパク質表面に導入した金属結合部位と金属イオンによるタンパク質集合体の構築とその物性評価、集合体を利用した金属ナノ粒子合成の論文を紹介します。筆者らは、これまでに4本のバンドル構造をもつ電子伝達タンパク質であるシトクロム cb_{562} に金属結合サイトを導入した変異体(RIDC3)と亜鉛イオンを混合すると1Dナノチューブや2Dアレイ構造が形成されることを示してきました(図3)。本論文では、その集合体の有機溶媒や温度に対する安定性評価と金属ナノ粒子のテンプレート合成について検討を行っています。

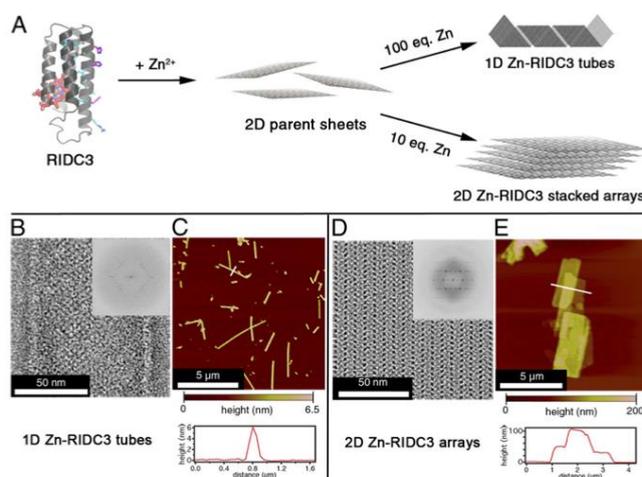


図 3. RIDC3 からの 1D ナノチューブ、2D アレイ構造体の構築と TEM、AFM による構造観察 (文献より引用)

自己集合体の安定性を評価するため、RIDC3のヘムの吸収帯であるソーレーバンドをモニターしながら有機溶媒や温度に対する安定性を評価したところ、モノマーでは、30% THFや50% iPrOHでアンフォールドするのに対し、1Dナノチューブや2Dアレイは、90%以上までフォールド状態を維持していることがわかり、亜鉛イオン結合を介したRIDC3の集合化による安定性の向上が確認されました。さらに、この集合体は70°C (1Dナノチューブ)、90°C (2Dアレイ)まで超分子構造やその結晶性を維持していることも確認されています。次に、2Dアレイ表面上で白金粒子の合成を行いました(図4)。

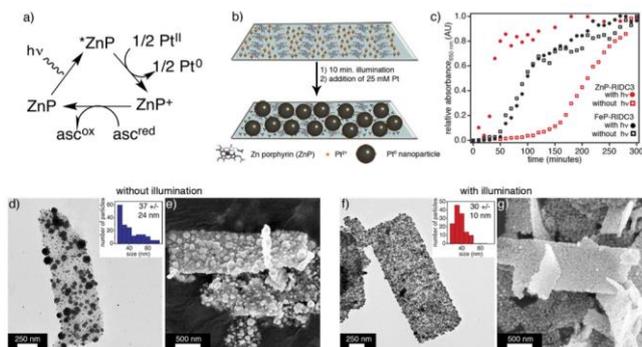


図 4. ZnP-RIDC3 2Darray をテンプレートとした白金粒子の合成。(a, b) 照射による白金粒子の生成スキームとイメージ図。(c) FeP-RIDC3, ZnP-RIDC3 の照射による白金粒子生成速度の比較。(d-g) 2DZnP-RIDC3 を用いた白金粒子の TEM (d, f)、SEM 像 (e, g). 照射なし (d, e)、照射有り (f, g) (文献より引用)

次に、2Dアレイ表面上で白金粒子の合成を行いました(図4)。ヘムを亜鉛ポルフィリン(ZnP)に置換したZnP-RIDC3を作成し、亜鉛イオンと混合すると、ヘムRIDC3と同様に亜鉛イオン配位による2次元の結晶性アレイが構築されます。2DZnP-RIDC3アレイを5mM Pt^{2+} イオンに浸漬し、アスコルビン酸存在下、照射により2Dアレイ表面上に白金ナノ粒子を生成することができます。照射しない場合と比較し、照射により白金粒子の生成が速く、粒子の大きさが均一、

かつ規則正しく配列していることがTEMやSEM観察から確認できます。一方、2DFeP-RIDC3アレイを用いた場合は、光照射の有無により白金粒子の生成速度に変化がありませんでした。ZnPは2Dアレイ中に規則正しく配列しているため、光励起されたZnPにより還元された白金粒子は、生成が促進され、均一な粒子が規則正しく配列されたと考えられます。以上のように、金属イオン配位によるタンパク質集合体は、高い安定性や金属による機能化も可能なため、今後のさらなる機能開発が期待されます。

Accurate Design of Co-assembling Multi-component Protein nNanomaterials

N. P. King, J. B. Bale, W. Sheffler, D. E. McNamara, S. Gonen, T. Gonen, T. O. Yeates, and D. Baker, *Nature* **2014**, *510*, 103-108.

最後に多成分のタンパク質の自己集積によるタンパク質集合体の構築について紹介します。天然のタンパク質では、単一種類のタンパク質による集合体だけではなく、複数種類のタンパク質が自己集合して精密な機能を発現しています。しかし、これまで紹介してきたような単一タンパク質の自己集合は報告されつつありますが、多成分のタンパク質を精密に設計し、集合体を構築することは困難でした。そこで、筆者らは、計算を利用し、タンパク質-タンパク質相互作用を設計することにより、多成分タンパク質の自己集合によるタンパク質ナノマテリアルの構築を試みました(図5)。

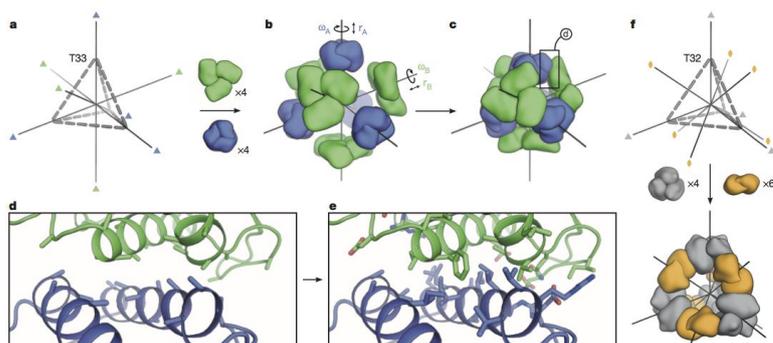


図5. 計算によるタンパク質集合体の設計方法 (a, b, c) T33 集合体概念図、(d, e) タンパク質界面のアミノ酸設計、(f) T32 集合体の概念図 (文献より引用)

タンパク質-タンパク質相互作用を設計することにより、多成分タンパク質の自己集合によるタンパク質ナノマテリアルの構築を試みました(図5)。Rosetta Designを改良した方法を用いて、2種類のタンパク質3量体の組み合わせ(T33)と、3量体と2量体の組み合わせ(T32)の境界面を設計しました。30個のT32と27個のT33を用いて、電気泳動やカラムクロマトグラフィーにより、最終的に5種類の24個のサブユニットで構成されるかご型タンパク質を構築しました。中には2種類の成分を別々に単離精製後、混合するだけで構造体を形成するものも存在し、タンパク質間の境界面を設計すれば、単純に混合するだけで様々な構造体を形成する可能性もあります。TEM像よりそれぞれの集合体

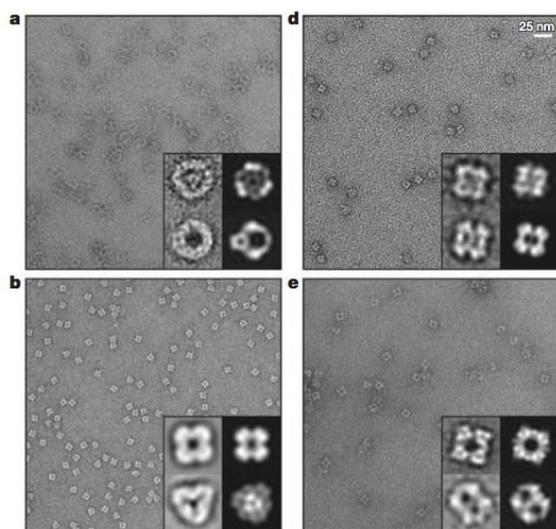


図6. 合成したタンパク質集合体のTEM像 (文献より引用)

で単分散構造体が観測され、その構造もコンピュータによるモデルと近い構造が得られました(図6)。また、結晶構造においても設計した構造とのRMSDが0.5~1.2Åと近い構造であることがわかりました。以上の結果は、タンパク質境界面を設計することにより、複数成分のタンパク質が自己集合する複雑なタンパク質集合体の構築に成功しています。今後、特定の目的にあったタンパク質ナノ構造体を設計、構築することが期待されます。

最後になりましたが、本執筆の機会を与えて下さいました鳥取大学松浦和則先生に感謝申し上げます。



シンポジウム等会告

第 17 回 生命化学研究会 ～生命化学の大海原を探る～

主催 日本化学会フロンティア生命化学研究会

会期 2015 年 1 月 8 日(木)13時 ～ 9 日(金)12時

会場 三翠園(〒780-0862 高知市鷹匠町 1-3-35・TEL: 088-822-0131)

<http://www.sansuien.co.jp/>

アクセス: 1. 高知龍馬空港から 連絡バス(高知駅行き)に乘車、はりまや橋観光バスターミナル下車【約 40 分、¥720】 2. はりまや橋から路面電車を利用、はりまや橋→県庁前停留所下車後徒歩3分程【約 15 分、¥200】 3. JR 高知駅から 路面電車を利用し、はりまや橋乗換【約 20 分、¥200】

講師【敬称略】: 杉山雄一(理研)、大塚英幸(東工大理工)、武政誠(早大理工)、清中茂樹(京大工)、佐々木善浩(京大工)、高島義徳(阪大理)、松浦和則(鳥取大工)

会費: 参加登録費 13,000 円、宿泊費 10,000 円、食事代 7,000 円(当日徴収)

参加申込方法: 氏名・所属・役職(学年)・性別・E-mail アドレス・ポスター発表の希望の有無を明記の上、11 月 18 日(火)までに下記の連絡先へ申し込みください。

定員: 80 名

ポスター発表募集(件数は 40 件迄)

要旨締切: 11 月 18 日(火)ポスター発表希望者は A4 白黒半ページ、テンプレートを使用して作製し、申し込み時に添付ファイルとして下記連絡先迄送付してください。テンプレートは生命化学研究会ホームページ(<http://res.tagen.tohoku.ac.jp/FBC/>)よりダウンロードできます。なお、ポスター題目は出来るだけ能動態で動的なタイトルをつけて下さい。(例: __は__である。__は__する。)

問い合わせ・連絡先: 〒558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138

大阪市立大学大学院工学研究科化学生物系専攻 長崎 健

E-mail: nagasaki@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

Tel: 06-6605-2696 Fax: 06-6605-2785

第3回 エキゾチック自己組織化材料シンポジウム

主催： 日本化学会新領域研究グループ「エキゾチック自己組織化材料」

共催： 日本化学会中国四国支部

会期： 2014年12月18日（木） 13:00～17:30

会場： 鳥取大学工学部大講義室

依頼講演

- 1) ナノ相分離型液晶性半導体の開環重合による薄膜化
(香川大院工) 舟橋正浩
- 2) 特異な分子認識により制御される超分子構造
(広島大院理) 灰野岳晴
- 3) 赤色蛍光を示すアゾベンゼンナノ構造体
(名大 MBT センター) 韓 旻娥
- 4) 細胞内分子環境でも機能する分子の合理設計指針
(甲南大 FIRST) 三好大輔
- 5) 生体分子モーターが作り出す散逸構造とその外場応答特性
(北大院理) 角五 彰
- 6) 焼結フリー金属ナノインクで印刷するフレキシブルデバイス
(岡山大 RCIS) 金原正幸

参加費：無料

参加申込方法：メールまたは当日受付

問合先：〒680-8552 鳥取市湖山町南 4-101 鳥取大学大学院工学研究科 松浦和則

電話 0857-31-5262

E-mail: ma2ra-k@chem.tottori-u.ac.jp

<http://exotic.chemistry.or.jp/activity/>

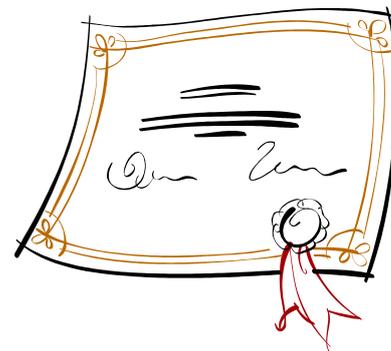
お知らせ

受賞

浜地格 (京大院工)
第20回名古屋メダルセミナー Silver Medal
Protein organic chemistry under live cell conditions
2014年10月受賞

杉本直己 (甲南大 FIBER)
錯体化学会貢献賞
核酸の熱力学的挙動解析と核酸ナノマテリアルの創製
2014年9月受賞

三浦佳子 (九大院工)
高分子学会旭化成賞
タンパク質の機能制御を指向した硫酸化糖鎖高分子の創製
2014年9月受賞



異動

高岡洋輔
東北大学理学研究科化学専攻 講師
2014年7月1日付け
〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3
E-mail: ytakaoka@m.tohoku.ac.jp

編集後記

9月中は連続学会出張などでバタバタしまい編集作業が遅れてしまいましたが、発光ダイオードに関するノーベル物理学賞のニュースが流れる中、ようやく編集作業完了しました。先日、初めてスイスに行きましたが、マッターホルンの近くまで行くことができ、絶景を見ることができました。しかし、出張から帰る際に、台風の影響で搭乗予定の飛行機が欠航に・・・、結局、待ち時間含め30時間くらいかけて帰宅しました。良いこともあれば、悪いこともありますね。

さて、次号の生命化学研究レター(No.47)は、大神田さんの担当により、2015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に、みなさんからのご要望・ご意見をお待ちしております。下記の編集担当まで、ご連絡をいただければ幸いです。



平成 26 年 10 月 11 日

松浦和則
鳥取大学大学院工学研究科
ma2ra-k@chem.tottori-u.ac.jp

編集担当
井原敏博(熊本大学)
大神田淳子(京都大学)