

生命化学研究レター

(2013年2月)

2. 巻頭言

沖縄での研究会と世界

京都大学工学研究科合成・生物化学専攻 **浜地 格**

3. 研究紹介

3. 非選択的有機反応を小分子の標的タンパク質探索に利用する
～カルベン化学の利用と展開～

東北大学大学院薬学研究科 **叶 直樹**

9. フォトアフィニティープローブシステムを用いた生物活性分子ー
タンパク質相互作用解析へのアプローチ

東京農工大学大学院工学研究院生命工学専攻 **櫻井 香里**

14. 人工光合成への大挑戦：Episode

北里大学大学院理学研究科・JST さきがけ **石田 斉**

21. 論文紹介「気になった論文」

理化学研究所基幹研究所 **Ambara Rachmat Pradipta**

東京大学大学院工学系研究科 **山平 真也**

東京大学大学院新領域創成科学研究科 **松長 遼**

30. 留学体験記

UCSF 留学体験記

University of California, San Francisco **岩佐 江梨子**

34. シンポジウム等会告

日本薬学会 133 年会内「天然物ケミカルバイオロジー：分子標的と活性制御」シンポジウム

日本化学会第 93 春季年会特別企画・生命化学研究の挑戦：バイオ医薬創出の新たな潮流・光機能化学展望～デバイスからバイオまで～

36. お知らせ

異動

編集後記

巻頭言

沖縄での研究会と世界

京都大学工学研究科合成・生物化学専攻 浜地 格

とある領域の日米セミナーに参加するために西海岸サンタバーバラにやって来た後に訪れたCaltechでのDepartment Seminarが終わって、ちょっとほっとした気分を書いているため、散文的になることをご容赦願いたい。この領域は50代中盤から後半の方々の活躍もあり、日米交互の発表を少し門外漢として客観的に聞いていても、発表内容はアメリカに負けていないし、むしろ優れていると感じて、日本勢やるな、と嬉しい気分になった。しかし、それは、Caltechで吹っ飛んだ。現役のノーベル化学賞受賞者が複数いるのだし、来る前から分かっていたけれども、Organic/Chemical Biology領域のfacultyがやってくれたInformal seminar/discussionは、どれも素晴らしく、かつ挑戦的である。私のセミナーには94歳になるらしいJohn Roberts (G. Whitesidesの先生、Dynamic NMRやbenzynes研究の巨匠) 名誉教授もやって来て、質問もしてくれる。その下に、年齢的にも成熟期の大御所が複数いて、若手や中堅どころが、大御所の背中を見ながら必死でその姿勢を受け継ごうとしているように感じられる。またさらに印象的だったのは、Department Seminarが終わって全体質問のあとにも、Macを片付けている自分のところへ大学院生がやって来て、色々な質問や研究提案をしてきたことであった。90代から20代までこの層の厚さはなんだろう。どの世代にも、その目の前に世界標準の手本がいるわけだ。私自身のpositionはせいぜい中堅どころであろうが、世界第一線と戦い挑戦する姿勢を持ち続けられているだろうか、我が身を振り返って思ってしまった。我々の先達が必死で世界を追ったように、そして日本のプレゼンスを獲得したようなレベルで。その姿勢なしにはこの国の研究レベルは維持できないし、次の世代に何も伝えられないのではないかな。

2012年はまた、生命化学研究会が主催し、深瀬会長を中心に運営された第二回アジアChemical Biology会議が沖縄で開催された年でもあった。2年後のシンガポール開催も決まったし、2nd ACBCが大成功であったことは疑いの余地はないが、私が率直に感じたことは、韓国やシンガポールの研究・発表レベルの高さに対する驚きであった。これにmain Chinaが加わると想像すると……。沖縄は、この研究会にとって発足当時の印象的な集まりを提供してくれた場所であり、この研究会の中心メンバーが若さにまかせて夢を語った場所である。あの頃からすると全員のstatusが大きく変わり、色々な責任が背中に乗っかっている。しかしそれだからこそ、もう一度初心に帰って、瑞々しい気持ちと夢と野心をこめて、(決してアメリカと同じスタンスでなくて良いので) 挑戦的でオリジナルな研究に取り組まないと……。2つの全く異なる国際会議のことを振り返りながら、沖縄とは反対側から太平洋を眺めた。



研究紹介

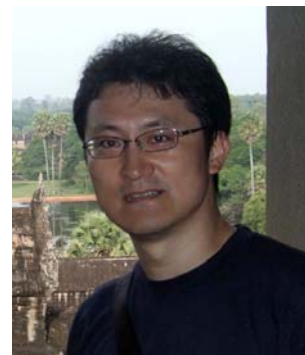
非選択的有機反応を小分子の
標的タンパク質探索に利用する

～カルベン化学の利用と展開～

東北大学大学院薬学研究科

叶 直樹

(nkanoh@m.tohoku.ac.jp)



はじめに

生物活性小分子の細胞内標的分子の同定は、基礎生物学や創薬科学の領域において大変重要な課題である。生物活性を有する有機小分子(天然由来であるか合成品かを問わず)の標的分子の発見と同定が、新しい細胞内プロセスの発見や理解に繋がった例はこれまでに数多く報告されている。また、現代の創薬の過程において、薬物が生体内に入った後に作用するターゲット(それらが有益な作用を示すか、有害かを問わず)を正しく評価することは必要不可欠である。これまでに、国内外の研究者により、生物学、化学、情報科学の領域を横断する様々な標的分子探索・同定の手法が考案され、利用されてきたが、21世紀の現在においても、「必ずこれで標的分子が同定できる」という決定的な手法は存在しない。そこで、標的分子の同定には、むしろ、一つの突出した決定的な手法を追求するというよりも、多くの相補的な手法のリスト(ツールボックス)を手にし、うまくこれらを組み合わせて個々の事例を解決することが最善だと考えられる。我々はこのような現状を認識した上で、有機合成化学というバックグラウンドを生かしながら「標的分子探索ツールボックス」に納めるに値する一手法の開発に取り組んでいる。本稿ではこれまで数年間に渡り行ってきた我々の取り組みを紹介したい。

化学者による標的分子探索

小分子、高分子を問わず、生物活性を有する分子が生体内で機能するためには、分子間相互作用の存在が必要不可欠である。そこで、分子Aが生体内で分子Bと相互作用している現場を直接おさえるか、もしくは相互作用の証拠を間接的に得れば、分子Bは分子Aの標的ということになる。間接的な証拠を得ようとする手法には、分子Aを生体(細胞や個体)に投与した時の表現型解析やプロファイリング解析などが含まれる。一方、相互作用の現場を押えようとするのが分子間結合を直接検出しようとする試みで、我々のアプローチはこの範疇に入る。

さて、生物活性小分子の細胞内標的分子の取得に関して、古典的かつ最もよく知られている例は、Harvard大学のS. L. Schreiber教授らが1989年に報告した免疫抑制剤FK506の標的蛋白質FKBP (FK506 binding protein)の発見であろう。彼らはFK506を固定化したアフィニティー樹脂を作成し利用することで、標的タンパク質FKBPを同定した¹。彼らは更にこの発見を契機として、FK506の免疫抑制メカニズムの全容を解明した。この一連の発見、解明のプロセスの中で重要だと考えられるのは、まず、彼らが複雑な天然物であるFK506の化学合成を達成しており、その途上でFK506分子の性質に関する情報と(多分詳細な)構

造活性相関情報を得ていたということであろう。

非選択的反応を化合物固定化に利用する

今から約10年前、それまで天然物合成を中心とした精密有機合成化学に取り組んでいた筆者は、理化学研究所にて研究員の職を得たことを契機に、自身の研究領域をケミカルバイオロジーに展開することを計画していた。当時、筆者の所属した抗生物質研究室(長田裕之先生主宰)では既に多くの生物活性天然物が単離され、これらの標的分子と作用機作の解明が課題となっており、筆者もまずは合成化学者としてこれらの研究に参画した²⁻⁵。その間、地道にプローブ分子を合成し、天然物の誘導化を行いながら、研究室内で初めて目にする生物学の手法と合成化学の違いにカルチャーショックを受けていた。例えば、生物活性小分子の標的タンパク質を探索する場合、有機化学的なアプローチではSchreiber教授らが行ったように固相担持型プローブ、もしくはバイオチン化プローブを作成し、利用するのが常法である。しかしそのためにはまず構造活性相関を行わなければならない、もとの分子の官能基変換を行ってその生物活性を確認し、その結果を受けてまた変換を行い...という作業を繰り返す必要があった。一方、分子生物学や酵母を使った遺伝学的手法では、遺伝子(やその産物である蛋白質)に確率論的な変異を一度に導入し、スクリーニングにより得られた耐性(もしくは感受性)変異体の変異遺伝子とその産物を解析することで標的タンパク質の同定を行うことができる⁶。これは筆者にとって大変魅力的な手法であった。そこで、当初は遺伝学的手法や技術をマスターし、合成化学的アプローチと併用することを考えたが、それでは成果が出るまでに長い時間がかかると思い直した。本研究領域における自身のアイデンティティーを数年のうちに確立し成果を出すために、有機合成化学のバックグラウンドと、新しく目にした遺伝学的手法の良い部分をミックスして何か新しい手法が創出できないかと考えた。

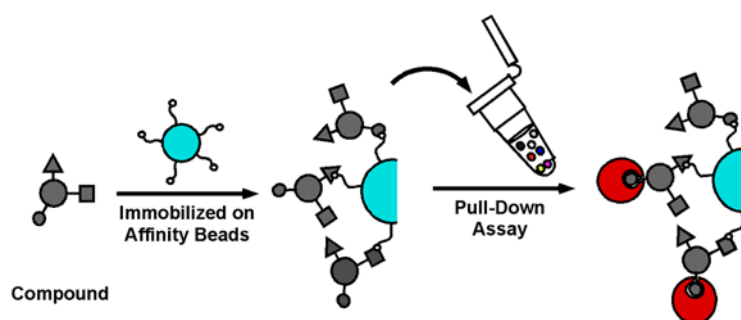


図1 官能基に依存しない小分子固定化の概念図
(文献 10 より許可を得て抜粋、改変)

そこで思いついたのが、確率論的(ランダム)な小分子の固相化手法であった⁷。すなわち、固相担体上に高反応性の反応種を発生させ、生物活性小分子と反応させることができれば、小分子は分子上の特定の官能基に依存することなくランダムに固相担体上に導入され、これを標的分子探索ツールとして利用できるのではないかとアイデアである。この手法が有効に働けば、小分子固定化アフィニティー樹脂を作成する時に行われる「化合物の誘導化→構造活性相関→誘導化→...」というボトルネックサイクルを取払うことができる。また、小分子上の固相担体との結合部位の選択は、望ましい小分子-生体高分子相互作用を検出するためには大変重要であるが、極めてランダムに小分子上の官能基と反応して出来た「固相-小分子コンジュゲート群」の中には、潜在的標的分子と正しく相互作用するものも含まれているに違なく、網羅的に結合分子を取得することも可能だと思われた。この相当荒っぽいアイデアは、必要なものを選択的かつ高収率に合成することが至上命題の精密有機合成化学者としては禁断の発想であったが、有機合成化学の常識を離れて考えてみると、ランダムな反応を用いることで、それまでの手法では出来なかったことがむしろ可能になると思われた。

当時、富山医科薬科大学の畑中先生らにより開発されたフォトアフィニティーラベリング(光親和性標識)用試薬⁸を他の目的で合成していたこともヒントになった。フォトアフィニティーラベリングとは、生物活性小分

子上の生物活性に影響を与えない部位に光反応性官能基(光照射下で分解し、高反応性活性種を発生する官能基)を導入したラベル化小分子を合成し、これを細胞、細胞抽出液、もしくは精製蛋白質と混合し光照射することでラベル化小分子と標的分子の間に共有結合を形成(クロスリンク)させる方法である⁹。小分子と標的分子の間の相互作用が弱い場合、相互作用を検出しようとしてもその前に解離してしまうが、両者の間に強固な共有結合を形成させておけば解離の可能性は低くなる。この手法では光反応性基を小分子上に導入し、生体高分子と光反応性基をクロスリンクさせるが、逆に高分子(固相担体)に光反応性基を導入しておいて小分子とクロスリンクさせれば上述の発想が可能になると考えられた。

フォトアフィニティーラベリングで用いられていたのはアリールアジドやアリールジアジリン由来のナイトレン(電氣的に中性の一配位窒素中間体)やカルベン(同様に中性の二配位炭素中間体)であったため、まずはこれらの利用を考えた。様々なナイトレンおよびカルベン前駆体を固相担体に導入し、固相担体と小分子(蛍光色素や標的タンパク質が既知の小分子)の溶液を混合・乾燥させ、小分子が固相担体上に密着した半固相状態で紫外線照射することで小分子を固相上に固定化させた。小分子が蛍光色素の場合は固相上の蛍光量で、生物活性小分子の場合は蛍光ラベル化した既知の結合蛋白質と処理した後にその結合量(蛍光量)で固定化した小分子が結合タンパク質と結合できるかを評価した。その結果、トリフルオロメチルアリールジアジリン基由来のカルベンが我々の目的に最も適していることが分かった^{7,10}。そこで我々は、図2dに示すフォトクロスリンカー**1**をアガロース樹脂に導入した小分子固定化用樹脂を作成し、これを第一世代の光親和型アフィニティー樹脂と名付けた。

カルベンの反応はどの程度非選択的か？

さて、ジアジリン基由来のカルベン種が高い反応性を持つことは、以前から物理有機化学的手法により示されていたが¹¹、この分子種が我々の用いている化合物固定化の条件下でどの位の効率性で化合物を捕捉し、どの位多様な生成物を与えるか調べておく必要があった。そこで、最初に単純な低級アルコール類との反応を解析した¹²。まず、フォトクロスリンカー**1**をエタノールに溶解させ、365 nmの紫外光照射を行った後、生成物のLC/MS解析を行った(図2: 図2aは光照射前の**1**、図2b,cは光照射後のクロマトグラムを示す。図2dは反応生成物の構造)。室温下、溶液状態で光照射を行った場合、ジアジリンから異性化したジアゾ体**2**、カルベンの酸化生成物であるケトンの水和体**10**、形式的還元体**4**などが副生成物として得られ、エタノールのメチル基やメチレンC-H結合へのカルベン挿入物(**5**, **6**, **8**)も微量ながら得られたが、最も多く生成したのはカルベンのO-H挿入生成物**3**であり、エタノール付加体全体の約90%を占めた(図2b)。次に、半固相状態での反応を模倣するために、液体窒素で**1**のエタノール溶液を冷却して凍らせ、その状態で光照射を行った。すると、生成物の分配比はドラスティックに変化し、エタノール付加体が反応生成物の殆どを占める結果となった(図2c)。ま

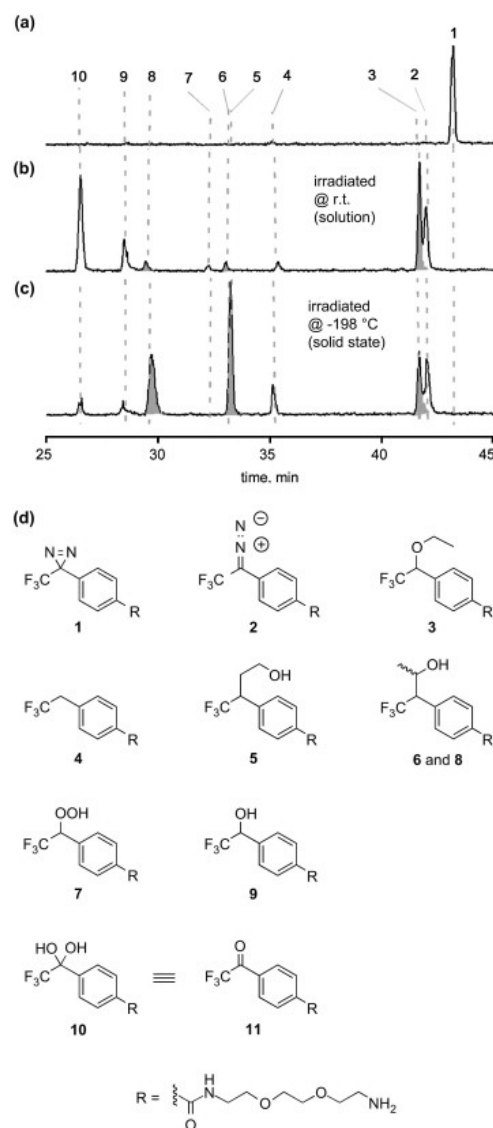


図2 フォトクロスリンカー**1**とエタノールの反応生成物(文献12より許可を得て転載)

た、この場合のメチル基C-H挿入生成物**5**、メチレンC-H挿入生成物**6**および**8**、O-H挿入生成物**3**の比は13:66:21で、C-H挿入生成物の割合が全体の約80%となった(図3a)。同様な傾向は他の低級アルコールでも見られ、溶液中反応ではO-H挿入生成物はアルコール付加体の75~87%を占めたが、固体状態ではO-H挿入生成物の比はわずか9~21%となり、C-H挿入生成物が大部分を占める結果となった(図3b-e)。

これらの解析により、低級アルコール中に存在する全てのC-H結合とのC-H挿入生成物が確認され、半固相状態におけるカルベンの高い非選択性が示唆された。

光親和型アフィニティー樹脂を起点とした生物活性小分子の標的タンパク質の解明とその展開

さて、新規なツールの開発は非常に大切であるが、最も大切なのはそのツールによりどんな新しい知見が得られたかであろう。我々もコンセプトの証明のみに留まらず、作用機作が分かっていない生物活性物質の標的分子探索に光親和型アフィニティー樹脂を積極的に利用した。その代表的な成功例は破骨細胞分化阻害物質methyl gerfelin (M-GFN)の標的タンパク質同定である¹³。M-GFNは真菌より単離された天然物gerfelinの合成メチルエステルであり(図4A)、マウスの破骨細胞前駆細胞(マクロファージ)の分化を阻害することが分かっていた。破骨細胞は生体内で骨を破壊(吸収)する役割を担っており、新しい骨を作る骨芽細胞と共に、骨のリモデリング(再構築)において重要な働きを担っているが、破骨細胞の過剰な活性化や骨芽細胞とのバランスの崩れは、骨粗鬆症などの骨疾患の原因とされている。そのため、その活性調節は現在でも重要な課題である。そこで我々は光親和型アフィニティー樹脂を利用してM-GFN固定化アフィニティー樹脂を調製し(図4B)、標的タンパク質の取得を試みた。M-GFNを固定化したアフィニティー樹脂にのみ結合した3種の蛋白質バンドを電気泳動用ゲルから切り出し解析した結果、これらはそれぞれ、機能未知タンパク質であるsmall glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein A (SGTA)、細胞内解毒代謝酵素 glyoxalase I (GLO1)、脂質輸送タンパク質 sterol carrier protein 2 (SCP2) と呼ばれるタンパク質であることが分かった(図4C)。共同研究者によりそれぞれのタンパク質について分子生物学的および生化学的評価が行われ、細胞内解毒代謝

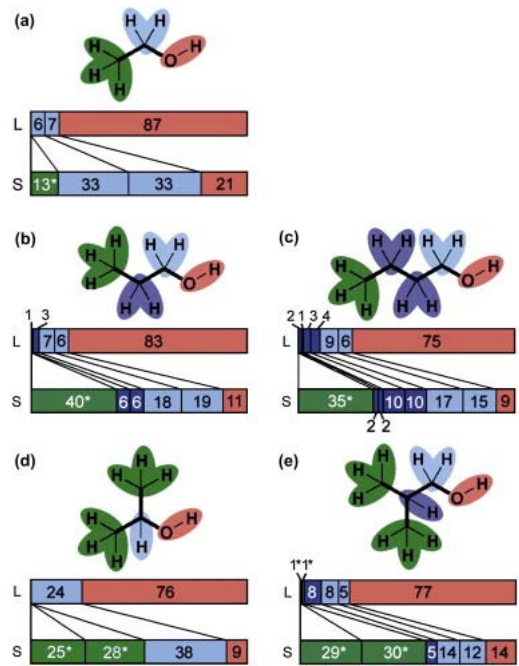


図3 低級アルコール類とジアジリン由来カルベンの反応生成物分布:L は液相での反応、S は固相での反応を示す。文献 12 より許可を得て転載)

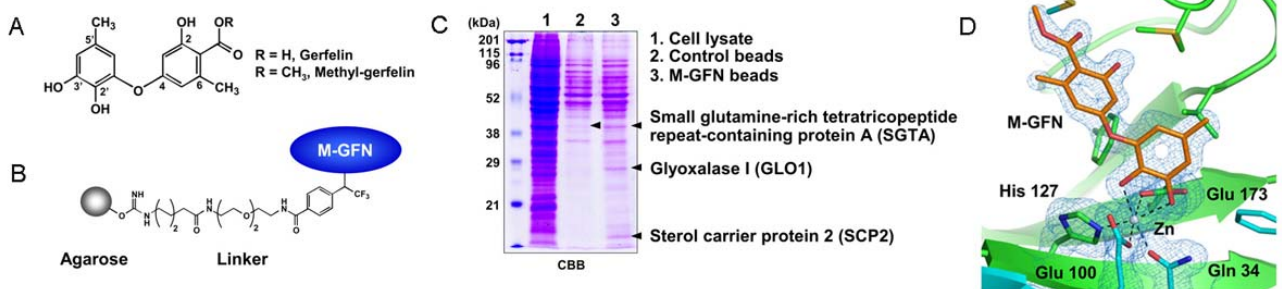


図4 Methyl gerfelin(M-GFN)の標的分子探索:(A)M-GFNの構造、(B)M-GFN固定化アフィニティー樹脂の模式図、(C)アフィニティー樹脂を用いたプルダウン実験の結果、(D)M-GFNとGLO1の共結晶構造(論文13より抜粋、改変)

酵素GLO1がM-GFNの一次標的であることが明らかにされた。更に、M-GFNとGLO1の共結晶解析も行われ(図4D)、これらの結果から以下の機構が明らかとなった。即ち、(1)M-GFNはGLO1の触媒活性部位に存在する亜鉛イオンに基質競合的に結合することでその酵素活性を阻害し、(2)GLO1の基質であるmethyl glyoxalが細胞内に蓄積することで、(3)破骨細胞への分化が抑制される、というメカニズムである。(2)と(3)を繋ぐ、蓄積したmethyl glyoxalが破骨細胞分化を阻害する機構については不明であるが、RANKL(Receptor Activator of NF- κ B Ligand: 破骨細胞分化因子)シグナルへの関与が考えられている。

さて、GLO1がM-GFNの破骨細胞分化阻害に関わる一次標的分子であることは分かったが、M-GFNと他の結合タンパク質との相互作用はM-GFNの生物活性にどのように影響しているのであろうか？最近の世界の流れでは、生物活性小分子は特定の一つの標的のみを狙い撃ちできるmagic bullet(魔法の弾丸)ではなく、むしろ、複数の標的分子の活性を同時に制御するmagic shotgunであり、その複数の生物活性をうまく調節することが重要であるという考え方(polypharmacology)が主流となっている¹⁴。我々もごく最近、M-GFNの構造活性相関や網羅的プルダウンプローブ化を通して、三種の結合タンパク質に対する多次元的構造活性相関を行い、GLO1に選択的に結合するプローブの創製と共に、SCP2やSGTAとM-GFNとの結合様式の解析結果を報告している¹⁵。

光親和型アフィニティー樹脂は、現在でも生物活性小分子の標的タンパク質探索に用いられ、最近ではオートファジー制御活性を有するプレニル化カルコンxanthohumolの標的タンパク質同定¹⁶や、HIV-1の感染に関わるウイルスタンパク質Vprの阻害剤vipirininとVprとの結合部位同定¹⁷に用いられている。

第二世代型の光親和型アフィニティー樹脂

さて、第一世代の光親和型アフィニティー樹脂は、小分子が365 nm付近の紫外光で分解しない限り適用可能で、利用価値の高い手法であるが、半面、幾つかの決定的な問題を内包していた。我々は光親和型アフィニティー樹脂の開発と同時期に、放線菌由来のphospectomycin類(PLMs: 図4BはPLM-D)が、細胞内でタンパク質脱リン酸化酵素2A(PP2A)の触媒サブユニット(PP2A/c)の269番目のシステインに共有結合してフォスファターゼ活性を阻害することを見いだしており³、このPLM-PP2A/c相互作用が第一世代のアフィニティー樹脂で検出できるかどうかを検証した。その結果、検出されたのはPP2A/cではなく、なんとPP2A/cと非共有結合性の会合体を形成している足場サブユニット(PP2A/a)であった(図5C中央)。これは、PLMが共有結合でPP2A/cと結合するため、非共有結合的にPP2A/cと会合するPP2A/aのみが樹脂から解離して検出されたと考えられた。この結果は、小分子が結合タンパク質と共有結合性複合体を形成する場合、本手法では最も重要な一次標的タンパク質が検出できないことを示唆している。

一方、本手法を用いて結合タンパク質の取得がうまく行かなかった場合に、それが化合物の固定化に問題があるのかどうかの解析が出

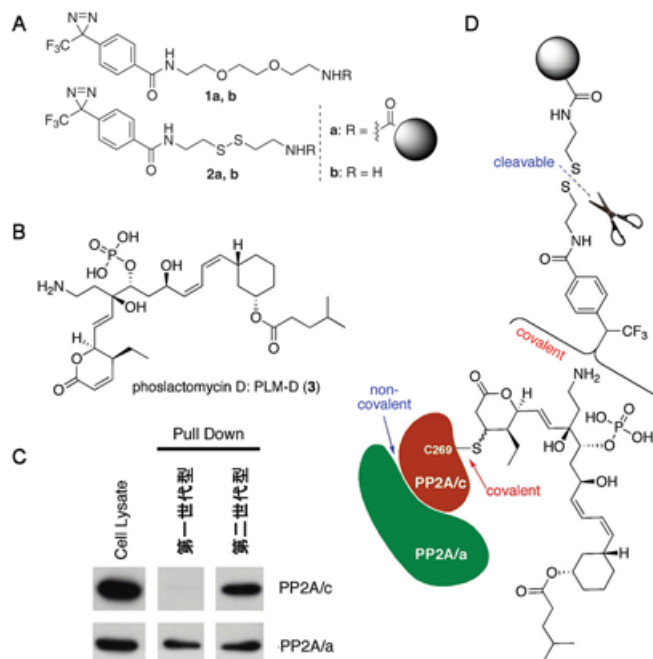


図5 第二世代型の解裂型光親和型アフィニティー樹脂と PLM-PP2A/c 相互作用検出(文献 より許可を得て抜粋、改変)

来ないという問題点も他の研究者に指摘されていた¹⁸。そこで我々は、光反応性基であるジアジリン部分と樹脂を繋ぐリンカー部分に選択的切断サイトとしてジスルフィド結合を導入した第二世代型アフィニティー樹脂をデザインし、作成した(図5A)¹⁹。詳細は割愛するが、本アフィニティー樹脂を用いることで、前述したPLMのターゲットであるPP2Acの検出も可能となった(図5C右)。また、小分子を固定化後にそのままジスルフィド結合を切断してLC/MS解析を行うことで、固定化された小分子の検出と解析が可能である。現在までのところ、固定化された小分子の量と配向性を定量的に検出し解析するところまで至っていないが、現在、そのような解析を可能とする第三世代型樹脂の開発を行っている。

終わりに

以上、非選択的有機反応であるカルベンのクロスリンク反応を生物活性小分子の標的分子探索に利用した経緯と展開についてまとめた。ここに示した全ての成果は、論文の共著者である共同研究者の協力と密なディスカッションが無ければ為し得なかった。生物学的な解析のほぼ全ては理研の川谷 誠博士をはじめとする共同研究者の成果である。学際的な研究を共に進めた共同研究者に深謝すると共に、科研費(No. 17510187, 19681023)および有機合成化学協会研究企画賞の支援に心から御礼申し上げます。

参考文献

1. Harding, M. W. *et al. Nature* **1989**, *341*, 758-760.
2. Usui, T. *et al. Chem. Biol.* **2004**, *11*, 799-806.
3. Teruya, T. *et al. FEBS Lett.* **2005**, *579*, 2463-2468.
4. Woo, J. T. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 4729-4734.
5. Shimizu, T. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3756-3760.
6. Miyamoto, Y. *et al. J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 28810.
7. Kanoh, N. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5584-5587.
8. Hatanaka, Y. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 453-454.
9. Kotzybahibert, F. *et al. Angew. Chem. Int. Ed., Engl.* **1995**, *34*, 1296-1312.
10. Kanoh, N. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3559-3562.
11. 富岡秀雄 著 最新のカルベン化学; 名古屋大学出版, 2009.
12. Kanoh, N. *et al. Tetrahedron* **2008**, *64*, 5692-5698.
13. Kawatani, M. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 11691-11696.
14. Arnaud, C. H. In *Chem. Eng. News* **2011**, *89* (4), pp. 32-33.
15. Kanoh, N. *et al. Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 44-52.
16. Sasazawa, Y. *et al. ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 892-900.
17. Ong, E. B. B. *et al. J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 14049-14056.
18. Peddibhotla, S. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12222-12231.
19. Kanoh, N. *et al. Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 182-186.

研究紹介

フォトアフィニティープローブシステムを用いた生物活性分子-タンパク質相互作用

解析へのアプローチ

東京農工大学大学院工学研究院生命工学専攻

櫻井香里

(sakuraik@cc.tuat.ac.jp)

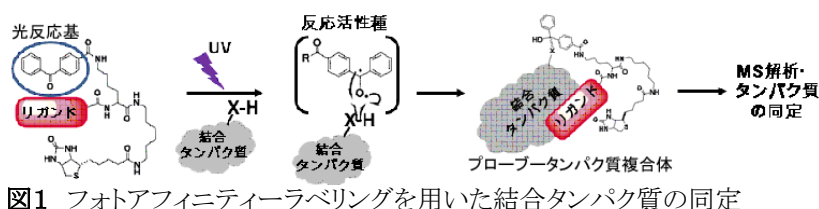


はじめに

天然物などの生物活性低分子が示す活性発現メカニズムの解明への化学的なアプローチは、これまでに生物学の手法ではとらえきれなかった生命現象の分子レベルでの理解や医薬品の開発に大きな貢献をもたらした。生物活性分子の作用点となっている結合タンパク質の検出は、その機能解明研究において、不可欠な第一ステップである。現在までに多様な様式の天然物及び低分子ライブラリーのハイスループットアッセイやRNAiライブラリーの網羅的スクリーンの開発によって、新たなpharmacoreを有する活性分子や望みの生物機構を制御するchemical toolとして有用な活性分子が次々と発見されている。一方で、活性分子それぞれの結合タンパク質の同定については、依然としてケースバイケースの試みが必要であり、活性分子の機能解明におけるボトルネックとなっている。様々な構造の生物活性分子の結合タンパク質を発見するプロセスを迅速化するためには、結合タンパク質の特異的かつ効率的な捕捉と分離を簡便にすることが重要である。これを可能とするような活性分子を基盤としたプローブの開発に向けて、近年様々な進展が見出されている。本稿においては、生物活性分子とタンパク質の相互作用解析に向けて、フォトアフィニティーラベリング法を用いた低分子結合タンパク質探索の利点と課題とともに、筆者らが近年取り組んでいるactive/inactive二種プローブシステムを用いたフォトアフィニティーラベリング法の開発について紹介する。

フォトアフィニティーラベリング法を用いた低分子結合タンパク質の検出

フォトアフィニティーラベリング法は、生物活性分子に対して光反応基と、反応生成物を解析するための検出基を修飾したプローブ分子を用いて、親和性依存的に形成した低分子リガンド-タンパク質複合体を、非化学選択的にフォトクロスリンクし、化学的に安定化して検出する方法である(図1)。光反応により溶液中で結合タンパク質を捕捉するタイミングを制御できる本方法は、Westheimerらによって初めて報告されて以来[1]、生物活性低分子とタンパク質間の相互作用解析のための有力な方法として利用されてきた。これまでに主に使用される光反応基としては、arylazide基、benzophenone基、diazirine基があり、UV照射下でそれぞれnitrene、ketylbiradical、carbeneを含む反応活性種を生じ、タンパク質主鎖及び様々な側鎖官能基との反応性を示す。フォトアフィニティーラベリング法は原理的には、構造情報が皆無の結合タンパク質の捕捉には最適なアプローチである。しかし反応収率が一般的に低いため(<30%)、反応生成物を高感度に検出するためには、以前は放射性同位体ラベルを含むプローブが多くの場合に使用された。近年におけるタンパク質解析技術の革新に伴い[2]、フォトアフィニティーラベリング法は結合タンパク質の同定研究において需要が高まっている[3-5]。またchemical biology研究の発展と



共に、質量分析や蛍光解析など、様々なモードの高感度な検出法をフォトアフィニティー法と一体的に組み合わせて活用する合成プローブの設計が考案されるようになった[6-11]。フォトアフィニティーラベリング法の課題としては、検出感度の他にも、親和性非依存的な反応性の制御が挙げられる。細胞中や細胞由来のタンパク質溶液には、様々な発現量で不特定多数のタンパク質が含まれるため、フォトアフィニティーラベリングを用いた結合タンパク質探索において、高発現量・多結合価のタンパク質がしばしば擬陽性検出される(図2a)。この問題は、低親和性のタンパク質や、低発現量のタンパク質が標的である場合に顕著となる。どの非特異的結合タンパク質がどの程度偽陽性検出されるかは、リガンドやタンパク質及び細胞の種類など対象とする実験系に強く依存するため、これまで統一的な解決への試みは少ない。

活性型不活性型二種プローブを用いたフォトアフィニティーラベリング法

多発現量・非特異的タンパク質を擬陽性検出する原因として、高親和性に基づいた低分子-タンパク質複合体と、低親和性・高濃度に基づいて複合体との区別が困難であることが挙げられる。偽陽性検出の原因となる、非特異的なタンパク質複合体を区別するために、不活性型リガンドを外部標準系として活用した方法論が報告された。Parkらは、活性低分子及び任意の不活性型分子に基づくプローブを別々にタンパク質とフォトクロスリンクし、2次元電気泳動解析を通して、非特異的タンパク質の検出の低減が可能であることを示した[11]。また、Ueda及びKawamuraらの研究グループでは、活性型リガンドのプローブ及びその不活性型エナンチオマーとタンパク質混合液との反応結果を比較し、その差異から特異的な結合タンパク質を特定する手法をそれぞれ開発した[12,13]。いずれも検出の真偽を判別し、結合タンパク質を効率的に発見するために不活性型リガンドを効果的に利用した非常に優れた解析法である。

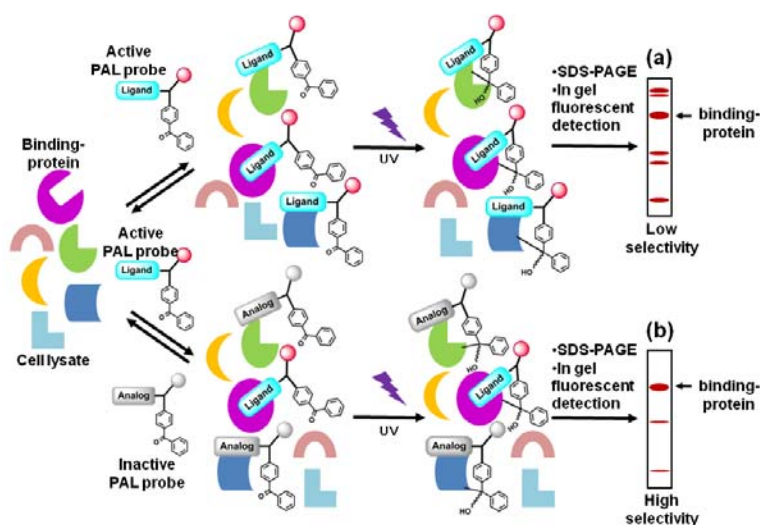


図2 従来型及び2種プローブフォトアフィニティーラベリング法

筆者の研究室では、フォトアフィニティーラベリング反応における選択性の向上に着目した新たな試みとして、活性型のプローブと不活性型プローブをワンポットで用いるdual-probe photoaffinity labeling systemの開発に着手し、その原理証明について最近報告した[14]。活性分子に光反応基と検出基としてビオチンを導入したactive probeに対して不活性のアナログに光反応基のみを修飾したinactive probe(図3a)を過剰量混合して照射下タンパク質と反応させ、プローブと選択的にクロスリンクした結合タンパク質を

SDS-PAGE/蛍光イメージング解析により特定するというものである。inactive probeは、多発現量の非特異的タンパク質と反応するブロッキング剤のような

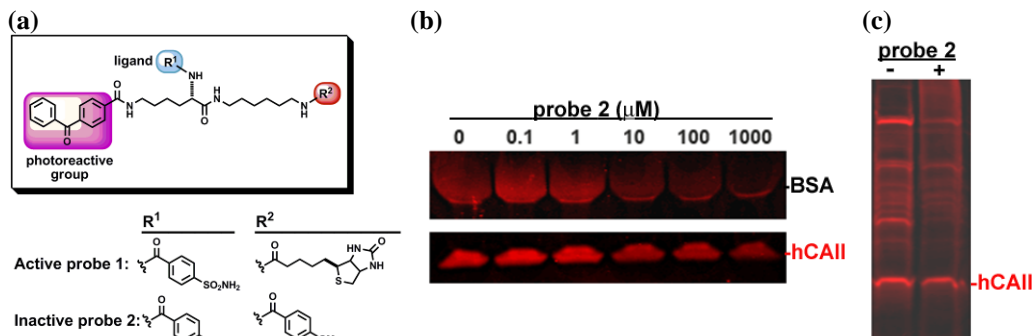


図3 2種プローブフォトアフィニティーラベリング法によるhCAIIの検出

役割を果たし、非特異的タンパク質と活性型プローブが結合することによって起こるプローブの濃度の低下や反応を抑制する(図3b)。モデル系による方法の確立のため、ヒト脱炭酸酵素hCAIIの阻害剤benzenesulfonamideと類似構造を有する不活性のアナログ4-methoxybenzeneを提示したactive probe (1)及びinactive probe (2)を用い、hCAIIを非特異的タンパク質として牛血清アルブミンBSAの1:100混合溶液と光反応を行い、1とクロスリンクしたタンパク質のみを蛍光ラベル化streptavidinにより検出し解析した。その結果、2に対して濃度依存的にBSAとの反応を抑制し、hCAIIを選択的にクロスリンクできた。inactive probeはactive probeに対して100倍量以上の濃度で用いると効果が最大となった。同様にhCAIIをタンパク質量比にして1%添加したHeLa細胞溶解液中で2種プローブを反応させ、active probeのみを用いた従来法に比べて、1とhCAIIとをより選択的にクロスリンクすることに成功した(図3c)。本法では、非特異的タンパク質との非特異的結合を競合させるために、不活性リガンドが活性分子と類似構造をもつことが鍵となる。2の部分構造をinactive probeとして用い、必要部位を評価したところ、やはり1と2の構造類似性は重要であるが、リガンドを除いたプローブの骨格構造部位のみの分子でも

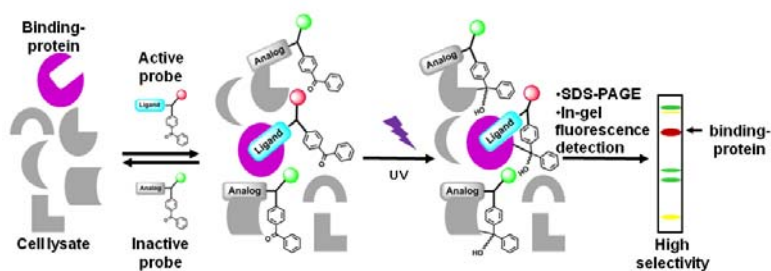


図4 Dual-photoaffinity labeling 法

inactive probeとしてある程度有効であることが明らかとなった。これより、活性分子に類似した不活性分子が容易に得られない場合には、活性分子の部分構造をinactive probeとして利用可能であることが示唆された。一方、本法の課題点として、inactive probeの効果は結合タンパク質の特異的な検出という観点からは十分ではないことが挙げられる。

そこで筆者らは、上述の方法を応用し、2重蛍光イメージングを用いた反応生成物の同時解析により、結合タンパク質の迅速な特定が可能となるdual-photoaffinity labelingを開発した(図4)[15]。本方法におけるactive/inactive probeは、それぞれフォトアフィニティー反応後に蛍光検出によって同一系中で識別できるように、2種の蛍光ラベルを有している(図5a)。これにより、同一の反応系でactive/inactive probeそれぞれとクロスリンクしたタンパク質をSDS-PAGEで分離後、異なる蛍光波長によって区別でき、inactive probeと比べてactive probeとより選択的に反応したタンパク質を結合タンパク質として判別できる。系の確立のため、活性分子として上述のhCAII阻害剤とそのアナログを提示したactive probe(3)とinactive probe(4)を1:10の混合比で用い、hCAIIを0.1%を含む成分既知のタンパク質溶液中で反応を行い、active probeとの反応生成物

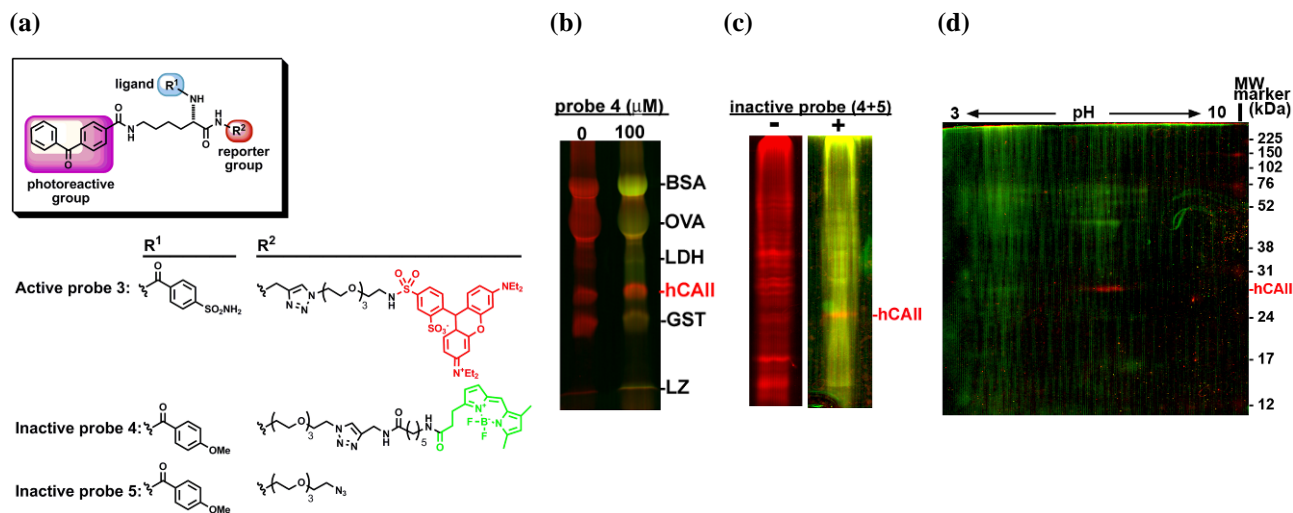


図5 Dual-photoaffinity labeling 法を用いた hCAII の検出

とinactive probeとの反応生成物をそれぞれ異なる蛍光波長で検出したところ、明確にactive probeと選択的に反応したhCAIIを判別できた(図5b)。本稿では詳細を割愛したが、蛍光ラベルはプローブにあらかじめ修飾した設計の他にも、acetyleneやazideを検出基とし、反応後にclick chemistryを介して蛍光ラベルを導入するものなども検討した結果、意外にも予め蛍光ラベル化したactive/inactive probeにおいて、最も選択的にhCAIIが検出されることが明らかになった。active probeは予め蛍光ラベルを導入すると、従来法でのフォトアフィニティー反応においては蛍光ラベル由来と考えられる非特異的な反応が増加するが、蛍光ラベル化したinactive probeを併用する本法においては非特異的な反応性は抑制され、結果的には結合タンパク質の選択的な検出には影響しないことを示唆している。蛍光ラベル化したinactive probe(4)は疎水性が高く、大過剰量を使用する際に溶解性の問題が生じたため、蛍光ラベル誘導体と水溶性が高いPEG基誘導体(5)の2種を1:10で混合したものをinactive probeとした3成分系のactive/inactive probeシステムを考案した。HeLa細胞溶解液にhCAIIを0.1%添加した系におけるactive/inactive probe(3:4:5 = 1:10:90)のフォトアフィニティー反応では、結合タンパク質のみがactive probe由来の蛍光波長で選択的に検出できた(図5c)。より分離能が高い2次元電気泳動法を用いて反応生成物を分離し、蛍光イメージング解析を行うことで、hCAIIのさらに簡便な検出に成功した(図5d)。本方法においては、active/inactive probeを適切に組み合わせさせてフォトアフィニティー反応を行うことで、多発現量の非特異的なタンパク質の検出を抑制し、かつ抑制が不十分で検出されたものについては、どのタンパク質が偽陽性検出されているかを2重蛍光イメージングにより識別することができるため、望みの結合タンパク質の特定を迅速に行えることが示された。本方法では、従来法では困難であった、結合タンパク質が低発現量の場合、または活性分子の結合活性が比較的低い場合にも適用可能であることから、今後様々なタイプの生物活性分子における、フォトアフィニティーラベリングを用いた結合タンパク質探索への応用が期待される。

おわりに

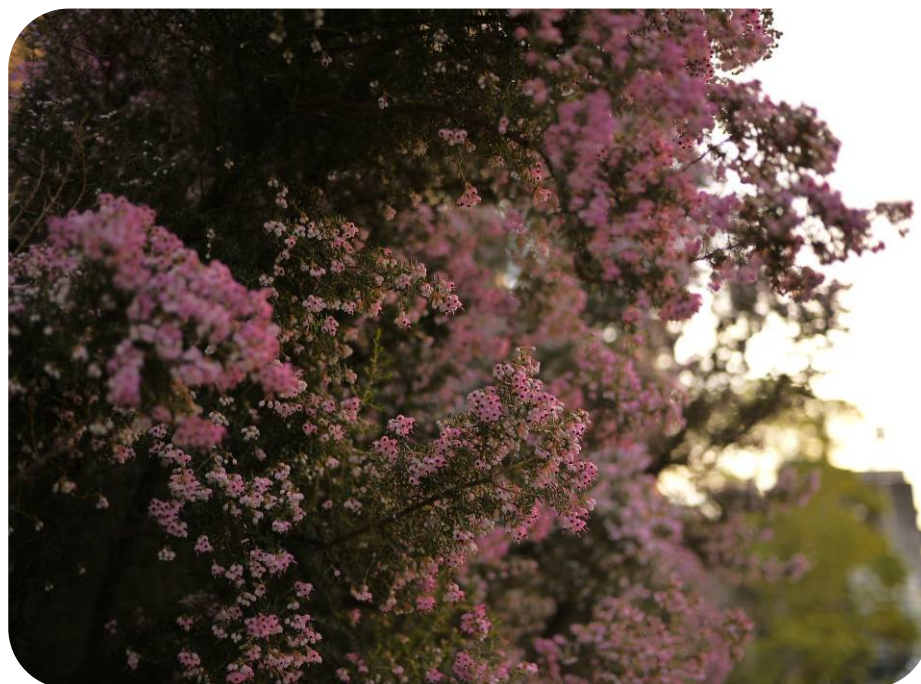
以上に筆者の研究室において近年着手したactive/inactive probe二種を用いたフォトアフィニティーラベリング法の開発と結合タンパク質の探索法への応用性について紹介した。本方法の利点は、多様な分子構造に一般的に応用可能であり、既存のタンパク質解析法と組み合わせることで結合タンパク質を簡便に検出することができることである。また、適当なinactive probeを内部標準分子として利用し、ターゲットとする結合タンパク質の特異性や結合強度を設定することが可能である。フォトアフィニティーラベリング法の最大の強みは、生細胞中における活性分子-タンパク質の動的な複合体形成を捕捉できる点である。2種プローブ法においては、大過剰のinactive probeを併用する現在の反応条件をそのまま細胞中で適用することは困難であると予想されるため、新たな方法論の開発が今後の課題である。筆者らは今後、本方法を天然物へ応用し、結合タンパク質の同定を起点とした機能解析研究へと展開したいと考えている。

最後に、本稿で紹介した研究は、筆者が東京農工大学大学院工学府生命工学専攻におけるテニュアトラック研究として行ったプロジェクトであり、研究と一緒に参加してくれた研究室の学生や様々な形でサポートをいただいた所属専攻の諸先生方に深く御礼申し上げます。

参考文献

1. Singh, A., Thorton, E. R., Wetheimer, F. H. *J. Biol. Chem.* 1962, 237, 3006-3008.
2. Cheng, K.-W., Wong, C.-C., Wang, M., He, Q.-Y., Chen, F. *Mass Spectrom. Rev.*, 2010, 29, 126-155.
3. Ueda, M. *Chem. Lett.* 2012, 41, 658-666.
4. Hatanaka, Y., Sadakane, Y. *Curr. Top. Med. Chem.* 2002, 2, 271-288.

5. Böttcher, T., Pitscheider, M., Sieber, S. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 2680–2698.
6. Tanaka, Y., Bond, M. R., Kohler, J. *Mol. BioSys.* 2008, 4, 473-480.
7. Hiramatsu, T., Guo, Y., Hosoya, T. *Org. Biomol Chem.* 2007, 5, 2916-9.
8. Ban, H. S., Shimizu, K., Minegishi, H., Nakamura, H. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 11870-11871.
9. Das, J. *Chem. Rev.* 2011, 111, 4405–4417.
10. Sadaghiani, A. M., Verhelst, S. H. L., Bogoy, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2007, 11, 20-28.
11. Park, J., Oh, S., Park, S. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 5447–5451.
12. Nakamura, Y., Miyatake, R., Ueda, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47, 7289–7292.
13. Kawamura, A., Hindi, S., Mihai, D. M., James, L., Aminova, O. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 8824–8829.
14. Sakurai, K., Tawa, M., Okada, A., Yamada, R., Sato, N., Inahara, M., Inoue, M. *Chem. Asian J.* 2012, 7, 1567–1571.
15. Sakurai, K., Yamada, R., Okada, A., Tawa, M., Inoue, M. *ChemBioChem* accepted.



研究紹介

人工光合成への大挑戦：

Episode

北里大学大学院理学研究科・JST さきがけ

石田 斉

(ishida@sci.kitasato-u.ac.jp)



はじめに

私はこれまでに、フロンティア生命化学研究会から多くのことを教えていただいた。今回、生命化学研究レターの研究紹介を書く機会をいただき、大変嬉しく、編集委員の大神田氏、松浦氏には特にお礼申し上げる。ところが、ほとんど同じメ切で生体機能関連化学ニュースレターの研究紹介執筆を引き受けてしまい、その上、「生命化学研究レターとはちょっと変えてね」と言われてしまったので、書く内容について逡巡してしまっ

た。私は生体機能関連化学(生命化学)、錯体化学、光化学分野の境界領域で研究をしてきた。最終的な目標は、「人工光合成の構築」である。今回は生命化学研究会の皆さんに、人工光合成研究の現状や私の研究を知っていただくよい機会でもあるので、通常の研究紹介とは少し異なるが、人工光合成とはどういうもので何を狙っているのか、生命化学研究とどう関連づけているのかなどについて、現在行っている「ペプチド折り紙で創る新規な二酸化炭素還元触媒」に関する研究に至るまでのエピソードを少し気楽に書かせていただきたいと思います。

人工光合成とは？

光合成は太陽エネルギーを利用して水から酸素を発生し、二酸化炭素を糖類へと固定する化学システムであり、石油・石炭などの化石燃料が太古の光合成産物であることを考えると、地球上のエネルギー全ての根源になっていることからその重要性は容易に理解できる。光合成は、植物ではチラコイド膜などに精緻に配列されたタンパク質群によって行われており、それを化学の力で人工的に再現しようとする「人工光合成」は多くの化学者が描く夢の一つである。¹⁾しかし、天然の光合成系の複雑さゆえに、当然、人工光合成は容易には実現できない。そのため研究者によって人工光合成の捉え方が異なり、その定義は曖昧なものになっている。そのことが「人工光合成」に対するある種の誤解を生んでいる面もあるようなので、ここではそのことについても触れてみたい。

私は人工光合成には、光合成を理解するためのモデル研究の側面と、アウトプットを再現する問題解決型研究の2つの側面があると考え(図1)。

アウトプットを再現する問題解決型研究の成功例として、現在、本多-藤嶋効果と呼ばれる研究成果が挙げられる。酸化チタンが光触媒となって水を分解し水素と酸素を発生するこの現象は、光エネルギーにより水から酸素を出し、得られた電子を水素エネルギーとして蓄える、というアウトプットから、光合成との類似性が指摘され、今日では人工光合成として認識されている。この系はもちろん天然の光合成とは全く異なるシステムであるが、この研究が広く知られたことによって、人工光合成は「光合成と内容が異なっても、太陽

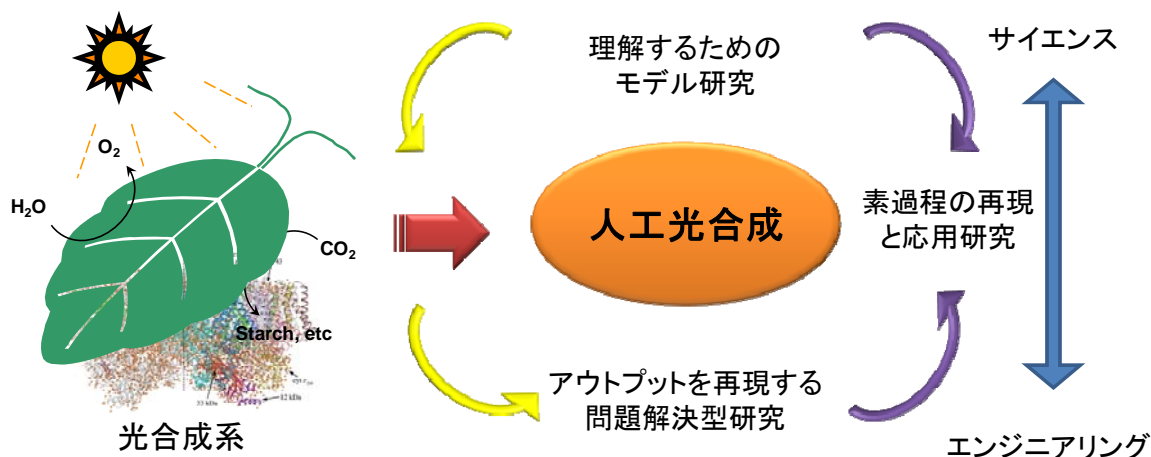


図1. 人工光合成とは？

エネルギーを有効利用できるシステムであればよい」という、現在の研究者の間の精神的支柱ともなっている。実際には、「光エネルギー」を利用しているが、「太陽エネルギー」と書くには抵抗がある。酸化チタン触媒による水の光分解は紫外光照射が必要であり、地表に届く太陽エネルギーの大部分は使われないからだ。そのため現在では、可視光エネルギーによる水の光分解に関する研究が行われており、近年、大きな成果を収めている。「人工光合成」が実用化されるアウトプットとしては、水の光分解による水素エネルギーの利用だと考えられている。

「研究者によっては」と但し書きされることが多いが、もう一つ、アウトプット再現型の人工光合成とされているのが太陽電池研究である。太陽電池と光合成がどうして、と考える方も多いと思われるが、太陽エネルギーを電気エネルギーという人間が利用しやすい形に変換している点が「光合成と同じ」という考えに基づいており、上記の考え方の延長線上にある。研究分野としては、Grätzelセルに用いられる増感色素として利用可能なルテニウムポリピリジル錯体の開発などがあるが、我が国では今堀らによるフラーレンを用いた逆電子移動を抑えた電荷分離系の基礎研究成果が、色素増感太陽電池へ応用されるなどしている。

視覚や人間の脳に関する研究が進んで、そのメカニズムが理解されても、それらを人工的に創造して人工眼球や人工頭脳を創ることは容易ではないことは明らかである。しかし、CCDカメラやコンピューターのように人工の眼や脳に代わるシステムは、我々の生活をより豊かにしてくれており、これらの進歩やさらなる研究が不要だという人はいないだろう。人工光合成も同様で、明瞭なアウトプットが設定されていないことから定義が曖昧になってしまっているわけだが、逆に言えば、どういう形で社会の役に立つシステムが開発されるかも自由に設定可能な魅力ある分野だと言える。

「人工光合成」に関してよくある誤解は、光合成そのものを人工的に行うことと、野菜を育てることとの違いがよくわからない、というようなもので、人工光合成のアウトプットを上手く伝えることができていない研究者サイドの問題のように思われる。実際、2011年3月11日の東日本大震災以降、我が国のエネルギー政策は転換を余儀なくされているが、再生可能エネルギーとして名前が挙がる太陽エネルギーは太陽電池による発電が中心である。²⁾ 現状では、「太陽電池の高効率化も人工光合成研究の一環」と主張する研究者もいるが、その次に来る技術として光触媒による水素発生とそれをベースとする水素社会の構築が実現可能な候補として挙げられている。これは、移送が難しい電気(送電中のロスが大きい)に対して、砂漠など天候が安定している地域で水の光分解により水素を発生し、それをパイプラインなどで輸送しようという提案である。実際、高効率な光触媒系が開発されるに従い、産学協同でのプラント開発など様々な動きが始まっている。

人工光合成のもう一つの側面として挙げられるのが、光合成を理解するためのモデル研究である。光合成系は極めて複雑なシステムから構成されているため、研究はその構成要素を一つひとつ解明していくところから始まっている。先に述べたフラーレンを利用した系は、天然の光合成系が光電子移動反応により生じた電荷分離状態を高寿命で保っていることから、その人工的再現を目的に開発されたものであった。もちろん天然の光合成系にはフラーレンは存在しないが、部分的に人工的化合物を用いてもその目的を達しようというところが、アウトプット再現型と共通している。このようなモデル研究は、光合成系という複雑なシステムをモデル化することで理解しようとするサイエンスの一環であったが、少しずつ天然の光合成系から離れ、光合成系を再現することで太陽エネルギーを利用するシステムを手に入れようとするエンジニアリング的研究へと進展していく。ただ、このようなモデル研究は一般的に光合成系全体を模倣しようとしているのではなく、一部の素過程を模倣しており、将来的にそれらの知見を積み重ねて人工光合成系を構築していく研究の流れを創ろうというものである。

これとは逆に、光合成系の作用機序などはわからなくても、人工的なシステムではなかなか再現できない部分は天然系をそのまま利用しようとする試みが、バイオテクノロジーを中心に行われている。例えば、光合成系を用いて光化学的にNADHの還元を行い、ギ酸デヒドロゲナーゼなどを用いて二酸化炭素をギ酸へと変換しようとする試みである。効率には課題があるが、金属錯体などを用いた光触媒反応と組み合わせた系などが研究されている。

人工光合成は生命化学研究か？

ここまで人工光合成の概略、現状について簡単にご紹介した。「人工光合成は生命化学研究か？」という問いにはもちろん、その通り、と答えたいところであるが、人工光合成の研究者が生体機能関連化学や生命化学研究会に所属する割合などを考えると、明瞭にそう言っていないものかどうか躊躇される。しかし、私は人工光合成研究が電気化学や光化学の一部の研究者だけが、天然の光合成系と離れたところで研究を進めているだけの状態は不自然だと考えており、人工光合成は生命化学研究の一分野として重要だという立場だ。

このことは生命化学研究とは何かということに帰着するように思う。そんな折、生命化学研究レターNo. 37巻頭言に、菅氏が書かれた「日本のケミカルバイオロジーの今後を考える時期かもしれない」を興味深く読ませていただいた。ケミカルバイオロジーは、生命化学研究の中心課題の一つであることは間違いないが、菅氏の巻頭言を読んで、ケミカルバイオロジーという分野が進展し、ある段階に移行しつつあることを感じ、生体機能関連化学部会、生命化学研究会が歩んできた道のりについて少し考えてみた。

学問には、創成と進展、そして成熟期がある。

創成期には何らかの理由でその分野を作り出す必要があり、その目指す方向や目標を共にする人達がある程度の人数が集まるか、その中に強力なオピニオンリーダーが現れて、研究分野(あるいは学会)が作られる。生体機能関連化学部会は1985年(昭和60年)に発足しており、その背景にはBreslowが提唱したバイオメティックケミストリー(生体模倣化学)があった。「生命現象を化学の言葉で語りたい」という目標は、現在のケミカルバイオロジーと変わるものではないが、アプローチとしては生命現象を担う酵素、特に補酵素のモデル化合物を研究することによって生命現象に切り込もうというものであった。この分野は、それまでの化学に生命現象を研究する目標と手段を与え、生物有機化学、生物無機化学分野に新しい流れが生まれた。しかし、バイオメティックケミストリーは元々、生物は化学の研究対象としては複雑すぎるのでモデル化することによって簡略化しようという前提があり、その後の遺伝子組み換え技術の発展によって研究対象である酵素などを大量に得ることができ、その構造機能が直接調べられるようになってくると、徐々にその役

割を終えることになったと思っていた。

しかしながら、バイオミメティックケミストリーは、当初の役割は終わったものの生物機能の人工的再現という形に変えて、今もなお存在意義を維持しているように思える。バイオインスパイアードケミストリーという名前を充てる場合もあるかもしれないが、先に述べた人工光合成研究のように、機能のモデル化により新規な機能性分子開発につながる例がそれに当てはまるだろう。我々はまだ十分に生物機能を理解しているわけではない。したがって、ケミカルバイオロジー研究が生命化学の中心テーマであることに疑う余地はない。しかし、生物機能を司る個々の生体分子がわかっても、元の機能を果たす物質を創れるわけではない。我々は人工酵素も人工抗体も、まだ十分には創ることが出来ない状態である。生命活動の中心で重要な働きを行うATPについても多くのことがわかっているにもかかわらず、我々はその機能を再現するどころか、その加水分解さえ容易に行えないでいる。生体機能を完全に理解することよりも、人工的に生体機能を再現することは格段と困難なのである。

ルテニウム錯体触媒による二酸化炭素還元反応

私は錯体化学分野から研究をスタートした。ここでは、田中晃二先生(当時は大阪大学工学部。昨年、分子研教授を退職され、現在は京都大学 物質—細胞統合システム拠点で研究を続けておられる)のご指導のもと見出した、ルテニウムビス(ビピリジン) (ダイカルボニル) 錯体を触媒とする光化学的CO₂還元反応について紹介する。³⁾

我々は[Ru(bpy)₂(CO)₂]²⁺ (bpy: 2,2'-ビピリジン)がCO₂を電気化学的に効率よく還元して一酸化炭素あるいはギ酸を与えることを見出し、その反応機構として図2左のようなスキームを提案した。[Ru(bpy)₂(CO)₂]²⁺の還元により一酸化炭素を放出してルテニウム(0価)五配位錯体が得られる。得られたルテニウム錯体は低原子価のためCO₂の炭素原子を求核攻撃し、Ru-C結合をもつη¹-CO₂付加錯体を与える。また、[Ru(bpy)₂(CO)₂]²⁺とカルボン酸錯体、η¹-CO₂付加錯体は水溶液中、酸塩基平衡にあり、弱いプロトン源存在下ではカルボン酸錯体が生成し、その還元によりギ酸が、強いプロトン源存在下では[Ru(bpy)₂(CO)₂]²⁺が再生し、その還元により一酸化炭素が生成する。この反応機構は現在では、Ru(0)五配位錯体を除くすべての中間体が単離され証明されているが、それ以上に金属触媒によるCO₂還元反応機構として広く受け入れられている。

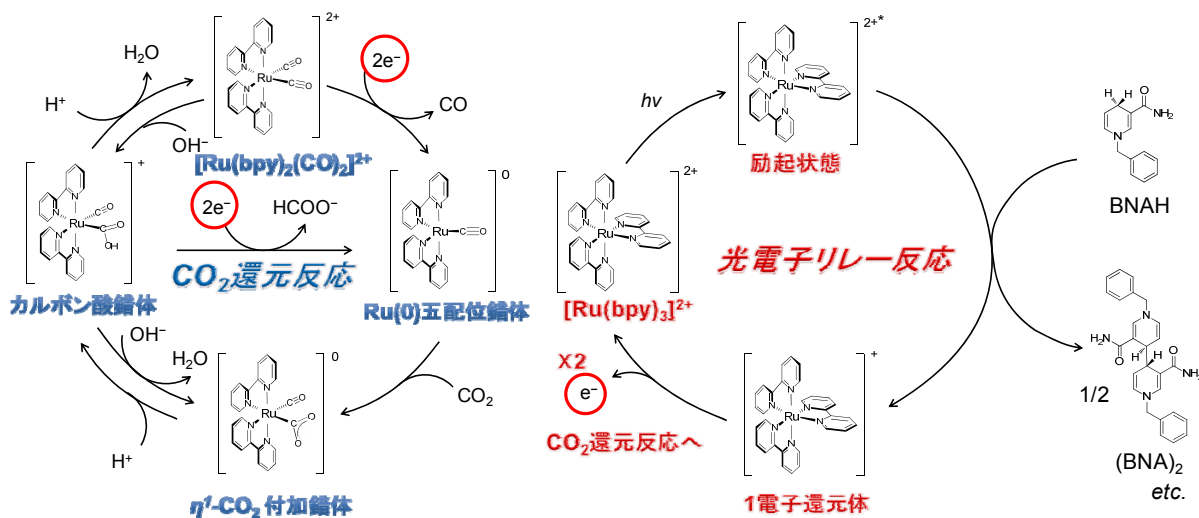


図2. [Ru(bpy)₃]²⁺を光増感剤、[Ru(bpy)₂(CO)₂]²⁺を触媒、BNAHを電子源とする光化学的CO₂還元反応 (bpy: 2,2'-ビピリジン)。

ここで還元に必要な電子を電気化学的ではなく、光反応を利用して供給するため光電子リレー反応と組み合わせて光化学的CO₂還元反応系を構築した(図2右)。光増感剤として[Ru(bpy)₃]²⁺、電子源としてNADHモデル化合物である1-ベンジル-1,4-ジヒドロニコチンアミド(BNAH)を用いると、ルテニウム錯体の励起状態へBNAHから電子移動が起こり、ルテニウム錯体の1電子還元体が生成する。[Ru(bpy)₂(CO)₂]²⁺と共存させると、1電子還元体が電子源となってCO₂還元反応が進行する。ここで、BNAHは生体内とは異なり、1電子ドナーとして作用しており、酸化生成物として二量体(複数の異性体が存在)が生成する。

この反応は光合成系で起こっている炭酸ガス固定とは全く異なる機構で進行しているし、生体系はルテニウム金属は利用していない。それでも光反応によってCO₂を還元するというアウトプットは、光合成系を人間が利用しやすい形に再現するという観点から人工光合成の一つの形とみなすことが出来る。今後の目標は、BNAHのような電子源ではなく、水の酸化触媒系などからの電子供給と共役した反応系を構築することである。

非天然アミノ酸を用いた機能性ペプチドの合成

次に私が取り組んだのが、非天然アミノ酸を利用した機能性ペプチドの分子設計・合成だった。光触媒を用いる「人工光合成」から離れて、なんとか光合成系により近い人工光合成を創りたいと考えた私は、究極的には酵素を人工的に創る必要があるという考えに至った。当時の(そして今でも)人工酵素は、モデル化合物から出発しており、タンパク質のもつ主要なアミノ酸側鎖はモデル化により省略されていた。私は、ペプチドを素材として用いることでタンパク質の基本骨格をできるだけそのまま使えないかと考えた。特に、酵素の機能発現には高次構造が重要であり、タンパク質を構成するアミノ酸残基のうちかなりの部分が高次構造構築に関わっていて、酵素活性に直接関係するアミノ酸残基はごく少数だという考えから、構造制御のために比較的構造自由度の少ない非天然アミノ酸の利用を思いついた。⁴⁾

非天然アミノ酸として3-アミノ安息香酸を用い、非天然アミノ酸と天然アミノ酸を交互に配列した環状ペプチドを合成した(図3)。様々な機能性ペプチドを得ることができたが、図には代表的な例として、リン酸エステルバインダー、

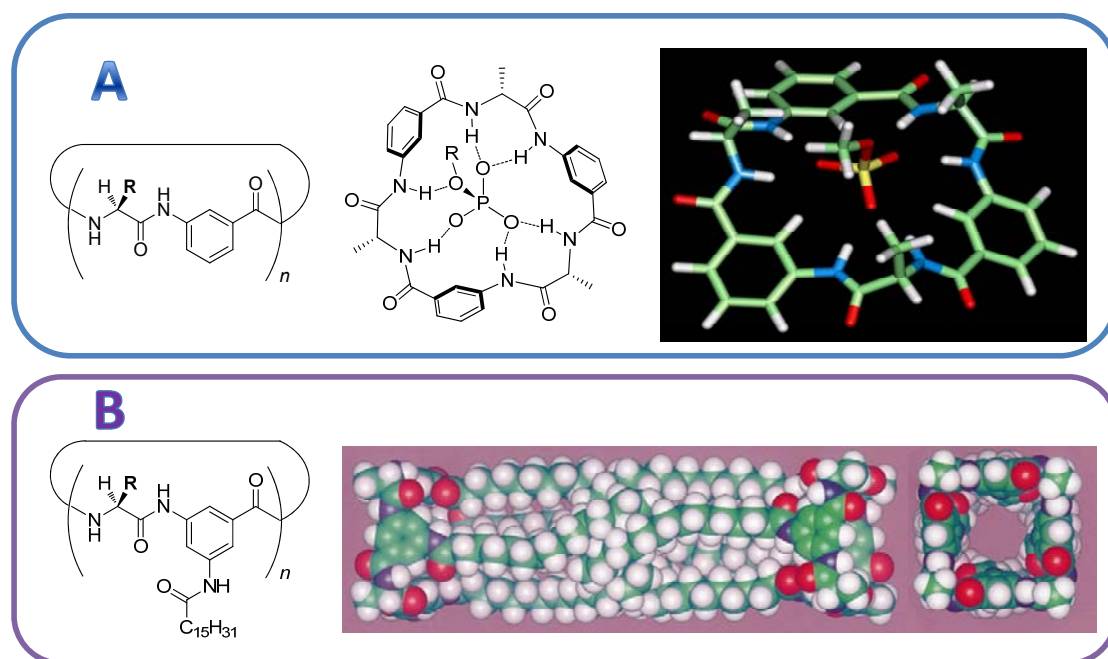


図3. 非天然アミノ酸(3-アミノ安息香酸)を用いた機能性環状ペプチド:
A. リン酸エステルバインダー、B. 人工イオンチャネル。

テルバインダーと人工イオンチャネルを示している。環状ヘキサペプチドは C_3 対称性を有する環状化合物であり、リン酸エステル誘導体と強く結合することが見出された。現在では例は多いが、当時は中性分子がアミド基との水素結合を利用してアニオン性分子と結合する珍しい例であった。また、この環状ペプチドは堅い構造の非天然アミノ酸を用いているために、環構造の中央に穴があいた構造を保っている。このことを利用して、二分子膜に導入しやすいよう長鎖アルキル基を接続することにより人工イオンチャネルを設計した。このイオンチャネル活性は曾我部正博先生(名古屋大医)に評価いただき、単一イオンチャネルとして機能していることが明らかとなった。

そしてペプチド折り紙へ

その後、私は、金属イオンに配位することにより人工的に折り畳んで始めてペプチドとして機能をもつことが出来るよう、ビピリジン型非天然アミノ酸 5'-アミノ-2,2'-ビピリジン-5-カルボン酸(5Bpy)を導入した機能性ペプチドを考案した(図4)。⁵⁾ 非天然アミノ酸を利用した構造制御を通してペプチドを機能化するという概念は、先のアミノ安息香酸を用いた環状ペプチドと同様だが、この手法は金属錯体に様々な官能基を導入する良い方法でもある。私はそれまで、不斉光触媒反応に用いるためキラル部位を導入した光増感剤として、様々な官能基を導入したビピリジン配位子のルテニウムトリス(ビピリジン)錯体を合成していたが、異なる置換基を複数導入すると異性体が生じることから、その合成と分離に苦労していた。⁶⁾ 図4に示したペプチド配位子を用いることにより、金属錯体の機能化の合成上の問題はかなり軽減された。

ただ、最初に報告したのはプロトタイプで、金属錯体化することにより折り畳めることを示しただけで、アミノ酸残基にはグリシン、アラニン、フェニルアラニンとプロリンなどしか用いておらず、ペプチドとして機能を発揮する要素はなかった。ルテニウム錯体化することにより発光性を示すなどの機能発現が観測されたので、「ルテニウムトリス(ビピリジン)錯体をコアとする人工金属タンパク質」というタイトルで論文を投稿した。^{5c)} 驚いたのは、掲載が決まってからゲラ刷りのTable of Contentsのタイトルが“*Peptide Origami*”となっていたことを見たときだった。それまでRunning Titleなどを勝手に変えられたことはなかったのでかなり驚いたが、良いタイトルなのでその後も、使わせていただいている。

この「ペプチド折り紙」の手法をより積極的に機能性金属錯体の設計に利用しようと、今度は金属錯体触媒の活性部位近傍にアミノ酸側鎖を配置させた、新しいタイプの錯体触媒の開発を提案した。随分昔では

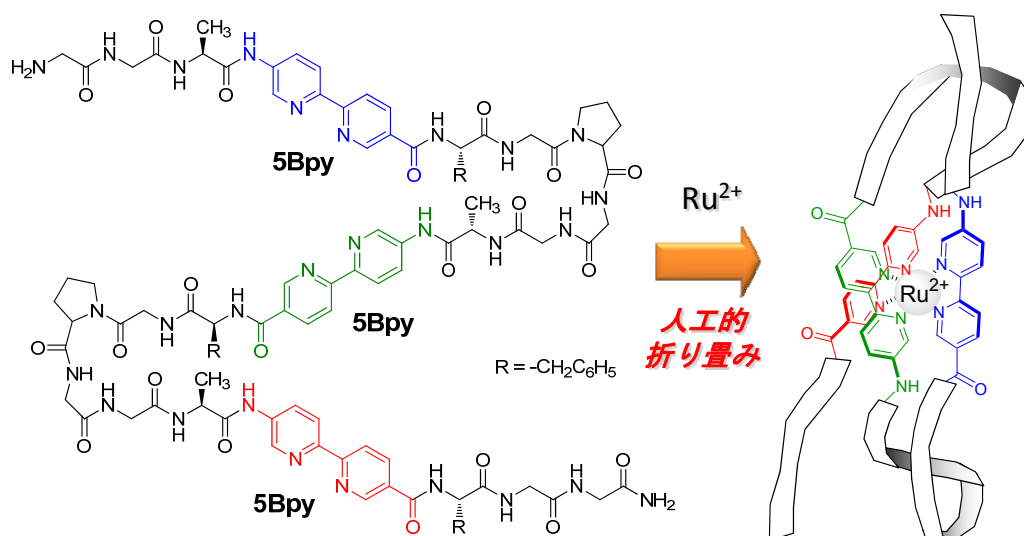


図4. ペプチド折り紙: 非天然アミノ酸(5Bpy)を用いた機能性金属-ペプチド錯体.

あるが、人工金属酵素を創りたいと思った際、配位子を変えることにより金属錯体の電子状態を制御するのではなく、酵素の活性中心のように第2配位圏にアミノ酸側鎖を配置することを考えたが、当時は合成技術が未熟なため実現することができなかった。ペプチド折り紙の手法は金属錯体への官能基導入が比較的容易に行えることから、実現可能ではないかと考えた。標的は「二酸化炭素還元触媒」とし、配位子をペプチド化することにより二酸化炭素還元能の高機能化を期待して分子設計を行い、さきがけ研究へ提案した。採択いただき、研究がスタートしたのは2009年10月のことである。

おわりに

研究紹介の機会を与えていただいたのに、人工光合成の現状や、生命化学研究との関連など最近、考えていることをかなり自由に書かせていただいた。このようにフランクに考えを披露し、皆さんと議論をできることが本研究会の最も良い点であろうと思う。本稿のタイトルである「人工光合成への大挑戦」の大挑戦は、戦略的創造研究推進事業 さきがけ研究領域「光エネルギーと物質変換」で私が採択いただいている「大挑戦型研究」に由来している。大挑戦は今も続いていて、その成果を発表する機会はこれからもあるだろうが、今回のようにそこに至るまでのエピソードを書かせていただくことはあまりないだろうと思う。改めてこのような機会を与えてくださった本レター 編集委員の皆様へ感謝したい。また、これまでの私の研究を支えてくださった方々、研究会の活動などを通じていろいろなことを教えてくださった皆さん、そして現在、さきがけ研究に共に取り組んでもらっている特任助教の倉持悠輔博士に感謝して、筆を置きたい。

参考文献

1. CSJ カレントレビューNo. 2 “人工光合成と有機系太陽電池”、日本化学会編、化学同人(京都)、2010.
2. “日本は再生可能エネルギー大国になりうるか”、北澤宏一、ディスカヴァー・トゥエンティワン(東京)、2012.
3. (a) Ishida, H.; Tanaka, K.; Tanaka, T. *Chem. Lett.* **1985**, 405-6; (b) Ishida, H.; Tanaka, K.; Morimoto, M.; Tanaka, T. *Organometallics* **1986**, 5, 724-30; (c) Ishida, H.; Tanaka, H.; Tanaka, K.; Tanaka, T. *Chem. Lett.* **1987**, 597-600; (d) Ishida, H.; Tanaka, H.; Tanaka, K.; Tanaka, T. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1987**, 131-2; (e) Ishida, H.; Tanaka, K.; Tanaka, T. *Chem. Lett.* **1987**, 1035-8; (f) Ishida, H.; Tanaka, K.; Tanaka, T. *Organometallics* **1987**, 6, 181-6; (g) Ishida, H.; Tanaka, K.; Tanaka, T. *Chem. Lett.* **1988**, 339-42; (h) Ishida, H.; Fujiki, K.; Ohba, T.; Ohkubo, K.; Tanaka, K.; Terada, T.; Tanaka, T. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1990**, 2155-60; (i) Ishida, H.; Terada, T.; Tanaka, K.; Tanaka, T. *Inorg. Chem.* **1990**, 29, 905-11.
4. (a) Ishida, H.; Donowaki, K.; Suga, M.; Shimose, K.; Ohkubo, K. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 8987-90; (b) Ishida, H.; Suga, M.; Donowaki, K.; Ohkubo, K. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 5374-5; (c) Ishida, H.; Inoue, Y. *Biopolymers* **2001**, 55, 469-478; (d) Ishida, H.; Qi, Z.; Sokabe, M.; Donowaki, K.; Inoue, Y. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2978-2989.
5. (a) Kyakuno, M.; Oishi, S.; Ishida, H. *Chem. Lett.* **2005**, 34, 1554-1555; (b) Ishida, H.; Kyakuno, M.; Oishi, S. *Biopolymers* **2004**, 76, 69-82; (c) Ishida, H.; Maruyama, Y.; Kyakuno, M.; Kodera, Y.; Maeda, T.; Oishi, S. *ChemBioChem* **2006**, 7, 1567-1570; (d) Kyakuno, M.; Oishi, S.; Ishida, H. *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 3756-3765; (e) Shiina, Y.; Oishi, S.; Ishida, H. *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 1249-1252; (f) Rama, G.; Arda, A.; Marechal, J.-D.; Gamba, I.; Ishida, H.; Jimenez-Barbero, J.; Vazquez, M. E.; Vazquez, L. M. *Chem.-Eur. J.* **2012**, 18, 7030-7035.
6. (a) Heseck, D.; Inoue, Y.; Ishida, H.; Everitt, S. R. L.; Drew, M. G. B. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 2617-2620; (b) Heseck, D.; Inoue, Y.; Everitt, S. R. L.; Ishida, H.; Kunieda, M.; Drew, M. G. B. *Inorg. Chem.* **2000**, 39, 317-324; (c) Heseck, D.; Inoue, Y.; Everitt, S. R. L.; Ishida, H.; Kunieda, M.; Drew, M. G. B. *Inorg. Chem.* **2000**, 39, 308-316.

気になった論文

Ambara Rachmat Pradipta (あんばら らくまっと ふらでいふた)

理化学研究所 基幹研究所 特別研究員

arpradipta@riken.jp

I currently work as a postdoctoral researcher at RIKEN Advanced Science Institute, under the guidance of Associate Chief Scientist Katsunori Tanaka. My current research focuses on synthetically exploring the overlooked and unique reactivity of the imines, which may lead to the discovery of novel post-translational modification.

I would like to express my gratitude to the editor for the kind invitation conveyed to me to write an article in this edition. I take this opportunity to introduce three journals about utilization of organic synthesis to reveal problems in the investigation of protein post-translational modification.

Exploring Post-translational Arginine Modification Using Chemically Synthesized Methylglyoxal Hydroimidazolones

Wang, T.; Kartika, R.; Spiegel, D.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8958-8967.

Under physiological condition, arginine side chain in proteins may spontaneously undergo a non-enzymatic post-translational modification with methylglyoxal (MGO), a highly reactive α -dicarbonyl metabolite generated by all living cells, to produce the so-called advanced glycation end products (AGEs). Methylglyoxal-derived hydroimidazolones (MG-Hs) is one of the most abundant AGEs in human plasma, and play important roles in both healthy and disease physiology in humans. However, the detail chemical and biological studies of the MG-Hs have been hindered by the unavailability of general method for the preparation of pure form and high yield synthesis of these poorly understood molecules.

In this report, Spiegel et al. developed a preparative-scale synthetic routes that for the first time afford access to the entire class of methylglyoxal-derived hydroimidazolones, as both amino acids and peptide conjugates. The routes to protected MG-H building blocks are concise (2-3) steps starting from readily accessible material and high yielding. Moreover, the MG-H monomers can readily be

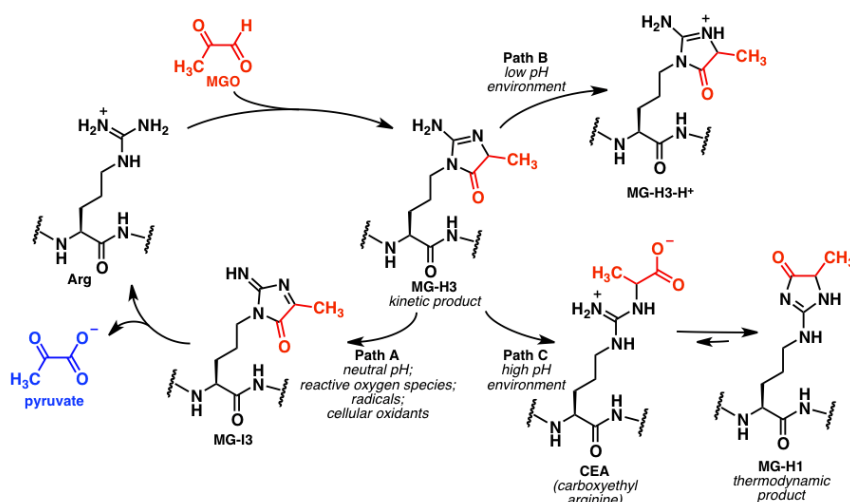


Fig 1. Proposed pathway for regulation of non-enzymatic post-translational modification of protein arginine residue. (Figure is originally published in JACS and have been partly modified)

incorporated site-specifically into synthetic oligopeptides using automated Fmoc solid-phase peptide synthesis.

These results have enabled them to perform biochemical and cellular evaluations, which have revealed a series of notable findings. As depicted in Fig 1, Spiegel et al. proposed a pathway for the regulation of arginine glycation, which may occur *in vivo*. One of the three MG-H isomers, MG-H3, was found to possess potent, pH-dependent antioxidant properties in biochemical and cellular assays intended to replicate redox processes that occur *in vivo*. Once formed, MG-H3 adducts are greatly influenced by their local environment. Notably, the product of MG-H3 oxidation at neutral pH, i.e. MG-I3, spontaneously disassembles to regenerate the native arginine side chain and pyruvate in aqueous solution.

These significant findings enhance our understanding on the role of MG-Hs in normal physiology and various diseases process in a much broader range.

Modification of N-Terminal α -Amino Groups of Peptides and Proteins Using Ketenes

Chan, A. O. Y.; Ho, C. M.; Chong, H. C.; Leung, Y. C.; Huang, J. S.; Wong, M. K.; Che, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2589-2598.

As an approach for the elucidation of protein function, mechanism, and interaction networks, the site-specific labeling of protein with small molecule(s) of unique function(s) is of paramount importance in chemical biology. Despite the advancements in bioconjugation reactions, the development of a relatively simple and general method for N-terminal modification with high site-selectivity remains a challenging task.

Previously, Che et al. have developed a highly selective approach for N-terminal α -amino group ligation of peptides by using a [Mn(2,6-Cl₂TPP)Cl/alkyne/H₂O₂] protocol through oxidative amide bond formation, with *in-situ* generated ketenes as the key intermediates (*JACS.* **2006**, *128*, 14796). However, oxidation of other amino acid residues (cysteine, methionine, and tryptophan side chains) was found to be a problem when using this protocol.

This time, Che et al. have designed a relatively stable alkyne-linked ketene with functional diversity for modification of peptides and proteins. The designed ketene has a terminal aliphatic alkyne group installed for further modification with different biophysical probes through bio-orthogonal click chemistry, and an aryl ring installed for enhancing the stability of ketene for vacuum distillation that make it possible for the ketene to be isolated.

By utilizing the isolated

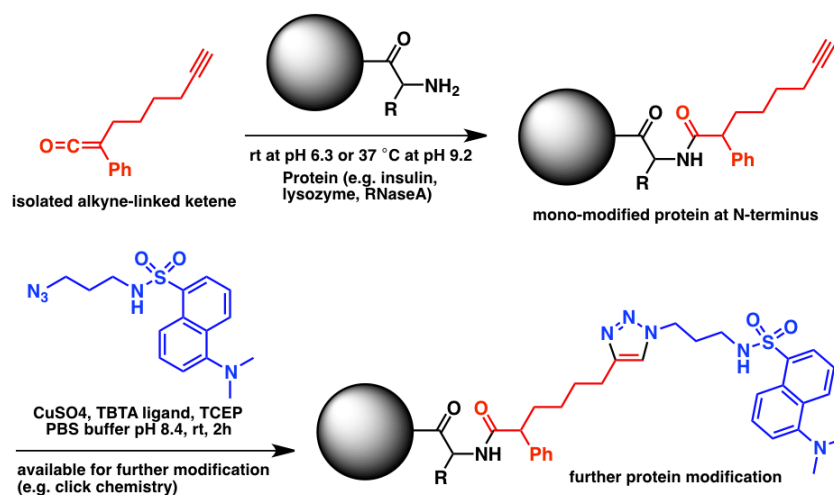


Fig 2. Selective N-terminal modification of proteins, and its availability for further modification in one pot reaction.

alkyne-functionalized ketene, Che et al. have observed excellent selective N-terminal modification of peptides and proteins, including insulin, lysozyme, RNaseA, and therapeutic protein BCArg under mild condition (Fig 2). Moreover, this highly selective N-terminal modification can circumvent the oxidation problem encountered using the previously found $[\text{Mn}(2,6\text{-Cl}_2\text{TPP})\text{Cl}]/\text{alkyne}/\text{H}_2\text{O}_2$ protocol for peptide modification. In the present work, Che et al. lend credence to practical application of ketenes as a highly site-selective acylation reagent for N-terminal modification of peptides and proteins.

Conversion of Cystein into Dehydroalanine Enables Access to Synthetic Histones Bearing Diverse Post-Translational Modifications

Chalker, J. M.; Lercher, L.; Rose, N. R.; Schofield, C. J.; Davis, B. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1835-1839.

Histones, the main protein components of chromatin, are known to undergo many post-translational modifications at multiple sites and residue. Access to histone bearing post-translational modifications is required to biologically and biochemically understand how they dynamically regulate chromatin structure, transcription and DNA replication and repair.

Dehydroalanine (Dha) is an amino acid residue, which synthetically useful as chemical precursor to a range of post-translational modification. Previously, Davis et al. found that 2,5-dibromohexanediamide is the most efficient reagent in forming dehydroalanine (Dha) through a bis-alkylation elimination of cysteine. In this report, the authors

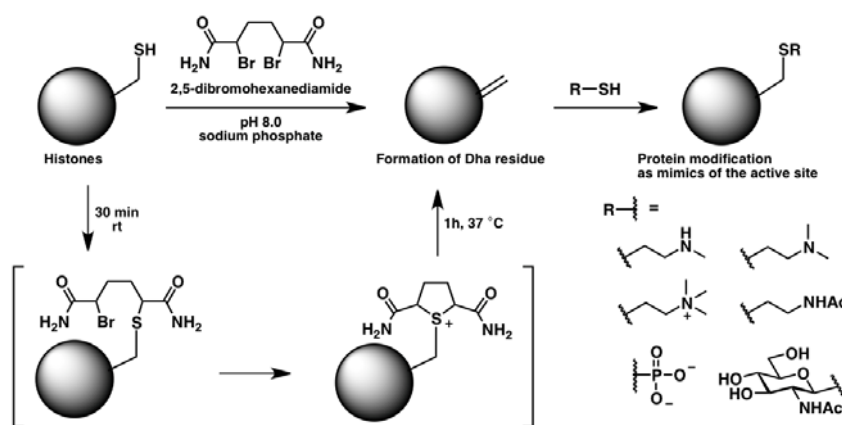


Fig 3. Dha is readily installed in histones by the reaction of 2,5-dibromohexanediamide. Dha, in turn, function as chemical precursor to mimics six distinct post-translational modifications.

extend the generality of the method by applying it to the post-translational modification of histones with simple and scalable protocols. The authors successfully showed that from single Dha precursor sites, six chemically diverse histones post-translational modifications can be installed site-selectively (Fig 3). Histones modification at more than one site, which separated by more than 50 amino acid residues, were also done in preparative scale by this simple procedure.

This report is undoubtedly important as one of the many efforts to synthesize modified histones and studies their complex roles of post-translational modifications in chromatin biology.

気になった論文

山平 真也 (やまひら しんや)

東京大学大学院 工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 長棟研究室、博士課程2年

yamahira@bio.t.u-tokyo.ac.jp

この度は、生命化学研究レターの”気になった論文”への執筆の機会を与えて下さり、誠に有難うございます。私は現在、東京大学大学院工学系研究科の長棟輝行先生のもとで、光応答性材料を用いた非接着性細胞のパターニング及びソーティング方法の開発を行っております。

これまで温度や pH、光、また特定の分子に対して応答する官能基や高分子等を用いて、様々な刺激応答性材料が開発されてきました。それらの刺激応答性材料は、様々な研究分野においてその他の機能性分子や制御技術と組み合わせる事により、課題解決の為にツールとなっております。時には、予想を超える方法で刺激や応答の表現型、スケールサイズを制御し、機能を拡張させる事も可能となっております。そこで今回、刺激応答性ハイドロゲル材料の使い方が興味深い、”分子認識”や”徐放”をテーマとした三報の論文を紹介させていただきます。

Photoswitchable gel assembly based on molecular recognition

H. Yamaguchi, Y. Kobayashi, R. Kobayashi, Y. Takashima, A. Hashidzume, A. Harada, *Nat Commun.* **2012**, *3*, 603.

生体内では、タンパク質間相互作用など様々な分子認識が行われており、分子認識の on / off や認識対象の変更は、シグナル伝達等の複雑な生命現象を制御するのに重要です。このような分子認識のスイッチングは、新たな機能性材料を生み出すために研究され、模倣されてきました。しかし、これまでの分子認識のスイッチングは、タンパク質や高分子等の $\sim \mu\text{m}$ サイズの構造体同士でしか観察されておりました。本論文では、 mm サイズのゲル間で光刺激によりマクロな分子認識の on / off、さらには認識対象の変更を可能としております。

アゾベンゼンは α -シクロデキストリン (α -CD) のゲスト分子であり、*cis* 型よりも *trans* 型のアゾベンゼンの方が強く結合します。アゾベンゼンは 365 nm の紫外光で *cis* 型、430 nm の可視光で *trans* 型に光異性化する為、照射光の波長によって、 α -CD との結合力を変化させる事が可能です。本論文ではまず、この光による分子間の結合力の変化を、マクロな構造体同士の分子認識の on / off に用いております。手法は至って簡潔で、ポリアクリルアミドをベースとして α -CD モノマー、またはアゾベンゼンを含むコポリマーゲルを作製し、これらのゲル切片(直径 3 ~ 4 mm)を水に浮かべて攪拌します。すると *trans* 型のアゾベンゼンゲルと α -CD ゲルが接触した時、界面における分子認識により結合します。そこへ 365 nm の紫外光を照射するとアゾベンゼンが *cis* 型

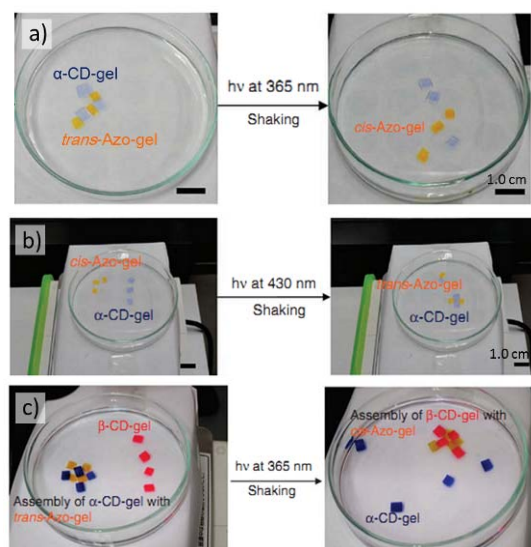


Fig. 1 アゾベンゼンゲルとシクロデキストリンゲル間における分子認識のスイッチング(論文より一部改変)

になる為、結合力が低下してゲルが解離します(Fig. 1 a)。この結合力の変化は可逆的であり、430 nm の光を照射する事で回復し、再び結合が可能となります(Fig. 1 b)。また、筆者らは認識対象の変更も行っております。β-シクロデキストリン(β-CD)はα-CD よりも少し環が大きく、同様にアゾベンゼンのホスト分子となります。この環の大きさの違いは、アゾベンゼンとの結合力に影響を及ぼします。β-CD はα-CD よりも *trans* 型のアゾベンゼンとの結合力は弱いのですが、*cis* 型とはα-CD よりも強く結合します。つまり、光異性化によって、アゾベンゼンとより強く結合するシクロデキストリンが変更されるのです。実際に光による認識対象の変更を試みた結果、α-CD と結合していたアゾベンゼンゲルへの紫外光照射で、β-CD ゲルに結合相手を変更させる事に成功しています(Fig. 1 c)。本論文の重要な点は、ミクロな分子挙動を、我々が触れたり直接観察する事の出来るサイズに拡張した点だと思われれます。このような手法で、逆に観察の困難なミクロな事象を、測定可能なサイズに拡張して分析する事も出来るのではないのでしょうか。

Programmable release of multiple protein drugs from aptamer-functionalized hydrogels via nucleic acid hybridization

M. R. Battig, B. Soontornworajit, Y. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12410 – 12413.

DDS (Drug Delivery System)の研究では、余計な副作用を起こさずに効果的に、適切な場所やタイミングで薬物を徐放する研究が行われております。例えば、刺激応答性のゲルやリポソームに薬剤を入れておく事で、外部からの刺激で薬剤の徐放を制御する事に成功しています。しかし、これまでの技術で徐放可能な薬剤はただ一種類です。実際の疾病の治療では、病気や治癒の進行に合わせて、複数の薬剤をそれぞれ適したタイミングで徐放する事が必要となる場合があります。今回紹介します論文では、近年多くの研究がなされている核酸アプタマーを用いて、複数のタンパク質の中から望みのタンパク質を、望みのタイミングで徐放する試みを行っております。アプタマーとして、anti-PDGF アプタマーと既に加齢性黄斑変性症の治療薬として認可されている anti-VEGF アプタマーを用いています。

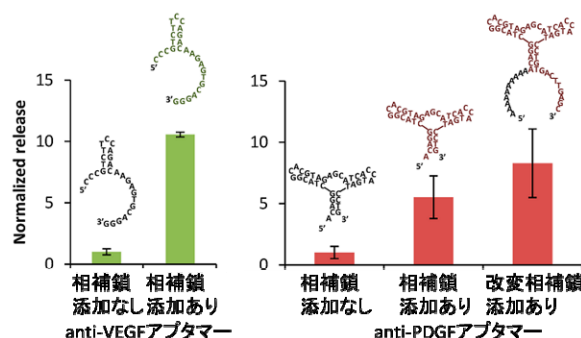


Fig. 2 相補鎖の添加によるタンパク質の徐放 (配列色文字部位: 相補鎖結合配列) (論文より一部改変)

まず、タンパク質の担持体としてアプタマー含有ゲルを作製しております。タンパク質担持アプタマー含有ゲルは、まずビオチン化アプタマーをstreptavidinコートビーズに結合させ、さらに対応するタンパク質を結合させた後に、アガロースゲル内に包埋する事で作製しています。タンパク質の徐放は、このゲルに対してアプタマーの相補鎖を添加する事で行っています (Fig. 2)。この徐放は、アプタマーがタンパク質と高い特異性と結合性を持つ他に、相補配列の核酸とも結合する性質を利用しています。つまり、タンパク質結合アプタマーに相補鎖が結合する事で、アプタマーのタンパク質との結合ドメインの構造が変形し、タンパク質がアプタマーから遊離する仕組みとなっています。筆者らは、徐放量の少なかった anti-PDGF アプタマー配列の改変を行っております。アプタマーの stem-loop 構造を壊さない様に、3'末端と5'末端に10塩基の追加を行いました。その結果、改変前よりも徐放量の大幅な改善がなされました。アプタマー内で組まれる塩基対

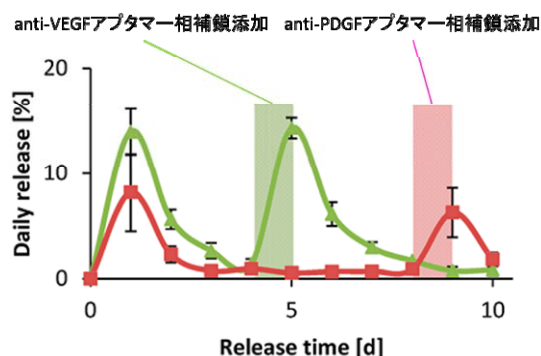


Fig. 3 タンパク質徐放のタイミング制御 (緑線: VEGF 徐放量, 赤線: PDGF 徐放量) (論文より一部改変)

数が多いと、二次構造が強固で相補鎖が結合し難くなり、逆に塩基対を組まない領域が出来ると、そこから相補鎖の結合が進行しやすくなるのだらうと筆者らは考察しています。このように、抗体等と比較して容易に改変が可能な点は、アプタマーの大きな優位点と言えるでしょう。最後に、それらのタンパク質-アプタマー結合ビーズを二種類とも含有させたゲルに、それぞれのアプタマーに対応する相補鎖を添加する事によって、タンパク質徐放のタイミングを制御しています。anti-VEGF アプタマーの相補鎖を添加した所、VEGFが徐放され、anti-PDGFアプタマーの相補鎖を添加した所、PDGFの徐放が確認されました(Fig. 3)。これらの結果は、一つの系内にアプタマー-タンパク質-相補鎖のセットを複数種使っても、それぞれのセットを独立して制御可能である事を示しております。複数の事象を制御出来る刺激応答性材料として、アプタマーは強力なツールとなることが期待されます。

Controlled origami folding of hydrogel bilayers with sustained reversibility for robust microcarriers

T. S. Shim, S-H. Kim, C-J. Heo, H. C. Jeon, S-M. Yang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1420–1423.

刺激に応答して形や体積を変化させる材料は、矩形や球など比較的単純な形でマイクロバルブ等のマイクロ流体デバイスの材料としてしばしば用いられます。この論文では、そのような材料をフォトリソグラフィで機能的な形に微細加工する事で、刺激前後で開閉して粒子を徐放可能な微小なカプセルを作製しております。

このカプセルは、pH に可逆的に応答する poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-acrylic acid) (p(HEMA-co-AA))と、応答しない poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (p(HEMA))の二層構造で出来ています。pH を 4 から 9 に変化させると p(HEMA-co-AA)の層だけが膨張し、p(HEMA)の層が内側になるように湾曲します。その際、内側に空洞を形成して変形する様に加工しておくことで、刺激応答性のカプセルが作成されます。筆者らは、この論文で二つの形のカプセルを作成しています。一つは円が二つ連なった雪だるまのような形であり、pH が上昇すると貝が閉じるようにカプセル化します(Fig. 4 a)。もう一つは、放射状の花びらの形をしており、これも pH が上昇するとカプセル化するように設計されています(Fig. 4 b)。加工方法としてまず、雪だるまや花びらの形に光を通すフォトマスク上に、p(HEMA-co-AA)のモノマーや光重合開始剤を乗せ、フォトマスクを通して光重合させます。未反応物を洗浄除去した後、同様に p(HEMA)のモノマーを光重合させて未反応物を洗浄除去すると、それぞれの形の p(HEMA-co-AA) - p(HEMA)二層構造 (各厚さ 25 μm) が作成されます。これを pH 9 のバッファーに漬ける事によって、カプセル化とフォトマスクからの遊離を行っております。まず、pH を 4 から 7, 9 と上昇させる事によって、開いていたカプセルがしっかりと閉じる様子が観察されました(Fig. 4 a, b)。また、pH 9 にすることでポリスチレンビーズを内包させ、pH 4 にする事でビーズを放出可能である事も確認されました(Fig. 4 c)。DDS やマイクロキャリアと聞くと、リポソームの大きさや組成、電荷等の工夫を思いつきますが、このように徐放と言うにはダイナミック過ぎる発想も、ブレイクスルーには必要かもしれません。

最後になりましたが、本稿への執筆の機会を頂きました大阪大学の大神田先生に、心より感謝申し上げます。

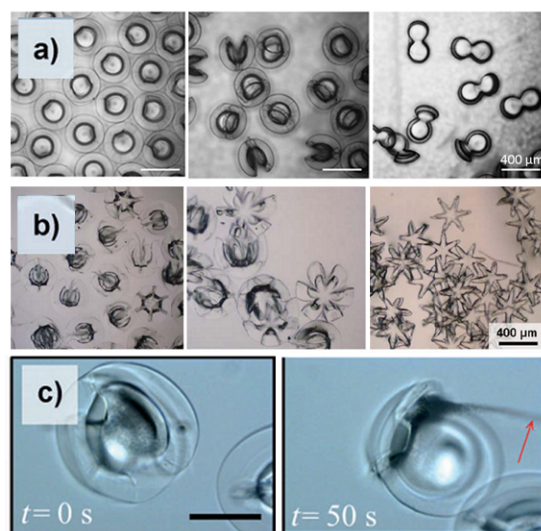


Fig. 4 a) 雪だるま型カプセル (左から pH 9, 7, 4)
b) 花びら型カプセル (左から pH 9, 7, 4)
c) カプセル形態の変化によるビーズの放出
(論文より一部改変)

気になった論文

松長 遼 (まつなが りょう)

東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻疾患蛋白質工学分野 博士課程1年

kk106407@mgs.k.u-tokyo.ac.jp

この度は、生命化学研究レター「気になった論文」への執筆の機会を与您にいただき、誠にありがとうございます。私は現在、東京大学医科学研究所、津本浩平教授の研究室に在籍しています。津本研究室では、医薬品や材料への応用を指向した蛋白質が関与する相互作用の解析とデザインを軸に幅広い研究テーマを扱っていますが、その中で私は自発的に重合する蛋白質の設計に取り組んでいます。

1本のポリペプチド鎖から蛋白質を形づくる原動力というと、多数の非共有結合の織り成す相互作用ネットワークを思い浮かべますが、なかには共有結合で架橋されるものも存在します。一番有名なものはシステイン側鎖のSH基どうしが反応して生じるジスルフィド結合ですが、近年グラム陽性菌の細胞表層蛋白質内に「イソペプチド結合」とよばれる側鎖どうしを架橋するペプチド結合が発見され(Kang, 2007)、盛んに研究されています。今回は分子内イソペプチド結合の、反応機構に関する論文を1報、次いで機能に関する論文を1報、最後に蛋白質工学への応用に関する論文を1報紹介させていただきます。

Autocatalytic intramolecular isopeptide bond formation in gram-positive bacterial pili: A QM/MM simulation

X. Hu, H. Hu, J. A. Melvin, K. W. Clancy, D. G. McCafferty, W. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 478–485.

分子内イソペプチド結合は補因子や酵素を必要とせず、折りたたみの過程で自発的に形成されます。酸性の側鎖を有する触媒残基と芳香環に囲まれた疎水的環境が結合形成に必須であることが既に知られていましたが、詳細な反応機構については明らかにされていませんでした。この論文では、実験的には解析の難しいこの反応機構に、コンピュータシミュレーションのアプローチ(QM/MM法)から迫っています。

解析対象としたのは、化膿レンサ球菌の線毛を構成するサブユニットであるSpy0128です。Spy0128はNDメインとCDメインという2つのドメインから成る蛋白質で、各ドメインに1つずつイソペプチド結合を有します。ともに、Gluを触媒としてLysとAsnがイソペプチド結合を形成します。

はじめに各残基のプロトン化状態について調べました。溶液中ではGluは脱プロトン化、Lysはプロトン化された状態(Normal protonation state)ですが、疎水的な環境下においては反対にGluはプロトン化、Lysは脱プロトン化された状態(Inverse protonated state)になると考えられます。実際にシミュレーションを行ったところ、気相条件(疎水環境)ではInverse protonated stateが安定に存在し、Normal protonation state、Inverse protonated state間は容易に往来できることが明らかになりました。さらに、Inverse protonated stateではLysのεアミノ基の窒素原子の負電荷が大きくなり、より求核性が増すことがわかりました。以上より、反応の初期状態はInverse protonated stateであると結論されます。

次にイソペプチド結合反応機構の推測を行いました。著者は2種類の機構を考えそれぞれシミュレーションを行ったところ、より活性化障壁の小さい図1に示す反応機構が確からしいと結論されました。すなわち、

第1段階でLysのεアミノ基中の窒素原子がAsnのC γ 原子を求核攻撃し、第2段階で2つのプロトン移動によりアンモニアが脱離するという機構です。しかしながら、CDメインでの反応に比べNDメインでの反応の活性化障壁は著しく高い値になりました。そこで、ドメイン間相互作用の影響を除くためにNDメインだけで改めて

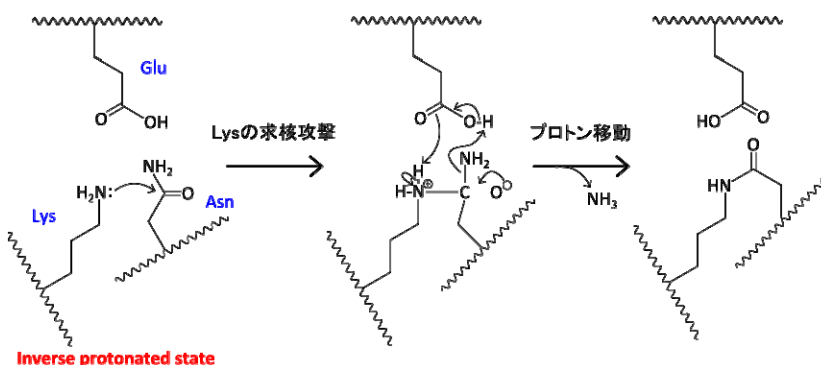


図1 提案されたイソペプチド結合反応機構

シミュレーションを行ったところ、CDメインを含めた全長で行ったときに比べて有意に反応の活性化障壁が低下することが明らかになりました。この結果より著者は、NDメインのイソペプチド結合はCDメインのイソペプチド結合より先に形成されるだろうと考察しています。

酵素反応と同様に、反応残基、触媒残基の精確な配置と適切な反応環境の提供により可能になるこの反応は、シンプルながらも洗練された蛋白質ならではの機構であると感じます。

Isopeptide bonds of the major pilin protein BcpA influence pilus structure and bundle formation on the surface of *Bacillus cereus*

A. P. Hendrickx, C. B. Poor, J. E. Jureller, J. M. Budzik, C. He, O. Schneewind, *Mol. Microbiol.* **2012**, *85*, 152-163.

BcpAはセレウス菌の線毛構成サブユニットです。線毛は、あるサブユニットのN末端ドメインと別のサブユニットのC末端ドメインが酵素により連結される反応を繰り返すことで形成されます。BcpAは、Spy0128とは異なり4つのドメイン(N末端より、CNA₁、CNA₂、XNA、CNA₃)から構成され、それぞれのドメインに1つずつ分子内イソペプチド結合が形成されることが明らかになっています。分子内イソペプチド結合を欠損するとサブユニットの熱安定性やプロテアーゼ耐性が大きく低下することは、他の線毛構成サブユニットの研究により示唆されています。この論文では、BcpAが重合して形成される線毛の形態に対する、BcpA中のイソペプチド結合の影響について、TEMとAFMを用いて解析を行っています。

はじめに、野生型のBcpAからなる線毛を解析したところ、BcpAが直列に重合して生じる線毛が2本より合わさってバンドル構造を形成することが明らかになりました。次に、各ドメインのイソペプチド結合を形成できないようにした変異型BcpAからなる線毛の解析を行いました。その結果、CNA₂、CNA₃ドメインのイソペプチド結合を欠損しても形態に変化は見られないものの、CNA₁、XNAドメインのイソペプチド結合を欠損するとバンドル構造を組めなくなり、単独の線毛としてのみ存在することが明らかになりました。さらに、これらの線毛を詳細に解析すると、CNA₁ドメインのイソペプチド結合を欠損した線毛は比較的直線的であるものの“こぶ”状の突起が

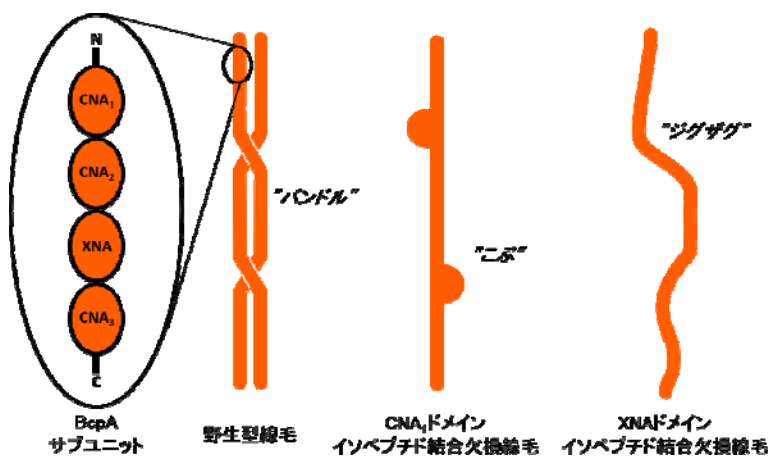


図2 分子内イソペプチド結合の有無による線毛形態の変化

点在し、XNAドメインのイソペプチド結合を欠損した線維は“ジグザグ”な形態をとることがわかりました(図2)。しかしながら、XNAドメインのイソペプチド結合を欠損した変異体の結晶構造を野生型と比較したところ、イソペプチド結合の有無を除いてはほぼ同一の構造を有していることが示されました。

局所的な結合の有無が、三次構造にはほとんど影響しないにもかかわらず四次構造を変化させているという点は興味深く、天然蛋白質構造体形成システムの奥深さが感じられます。

Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin

B. Zakeri, J. O. Fierer, E. Celik, E. C. Chittock, U. Schwarz-Linek, V. T. Moy, M. Howarth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2012**, *109*, E690-E697.

特異的な共有結合が自発的かつ不可逆的に形成されるという性質に着目し、イソペプチド結合を「ペプチドタグ」に応用することを目指したのがこの論文です。著者のグループは以前にも同じ方法論に基づく報告を行っていますが(Zakeri, 2010)、この論文では土台となる蛋白質の種類を変えることで、あらゆる面で以前より機能が向上したシステム(低分子量、高反応性、高安定性)を構築することに成功しています。

この論文では、化膿レンサ球菌のフィブロネクチン結合蛋白質FbaBに含まれるドメインであるCnaB2を利用しました。CnaB2は1つの分子内イソペプチド結合を有する非常に安定な約16 kDaの蛋白質です。この蛋白質をイソペプチド結合するところで、13残基(SpyTag)と138残基(SpyCatcher)の2つの部分に分割しました。これらをそれぞれ別々に合成してから混合すると、野生型の構造を再生するようにして2つの分子間に不可逆な共有結合が形成されることが明らかになりました。少なくとも4 °C~37 °C、pH 5~8の範囲で反応が確認され、25 °C、pH 7の条件下で等濃度(10 μM)のSpyTagとSpyCatcherを混合すると最初の1分間で40 %以上が共有結合するという、高い反応性を有することが示されています。

さらに、大腸菌ライセートやHeLa細胞表層という高濃度の夾雑分子が存在する環境下において2分子が特異的に結合するということが明らかになりました。また、AFMを用いたDFS(Dynamic Force Spectroscopy: 動的分子間力分光法)とよばれる手法により、結合したSpyTag-SpyCatcher複合体を両端から引っ張って結合が破壊される力を測定しました。結合が破壊される力の間値は1.9 nNと測定され、強力な結合力を有するとされるstreptavidin-biotin間、抗体-抗原間の相互作用よりも20倍以上強力であることが示されました(しかも、切断された結合は蛋白質を基板に固定していたC-S結合である可能性が高いとのこと)。

他の因子を必要とせず、天然アミノ酸だけで構成され、一度結合を形成したら解離することがないという性質は、現状では他の系にはないユニークな特長であり、1分子イメージングや蛋白質構造体構築への応用が強く期待できます。

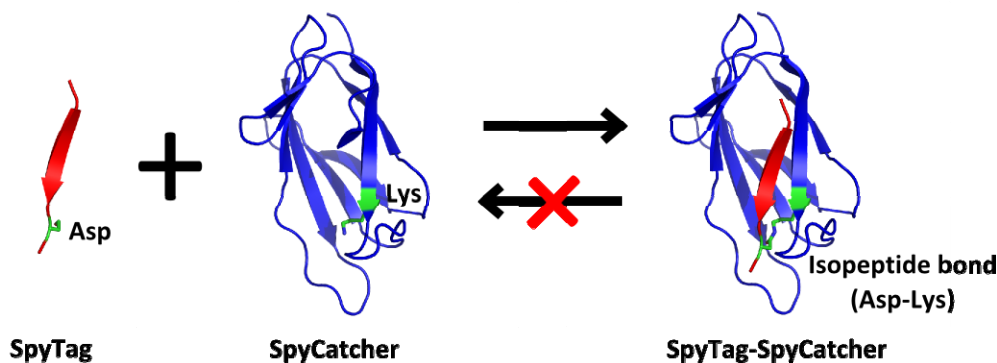


図3 SpyTagとSpyCatcherの構造と反応 (PDB 2X5PをもとにPyMOLにより作成)

留学体験記

UCSF 留学体験記

医学系研究科、細胞分子薬理学科

岩佐 江梨子

(eriko.iwasa@ucsf.edu)

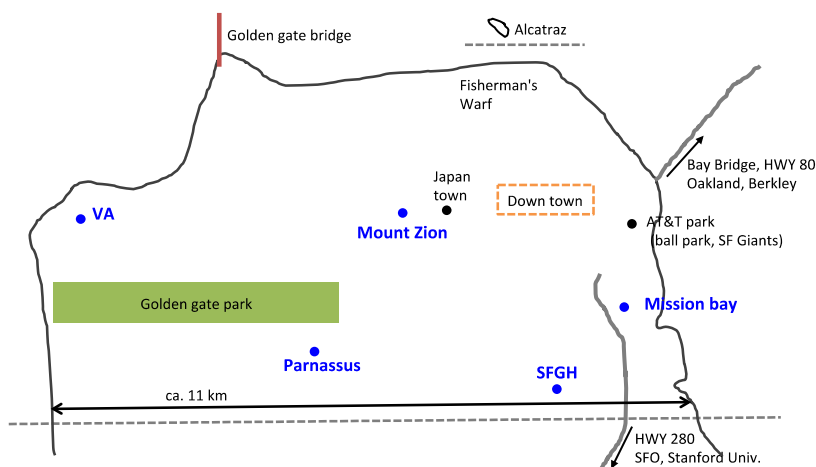


海外留学体験記の執筆の機会を与えてくださった生命化学研究レターの編集委員の皆様にお礼申し上げます。2011年8月より、University of California, San Francisco (UCSF、カリフォルニア大学サンフランシスコ校)のFujimori Lab (PI: Danica G. Fujimori, Ph.D)で博士研究員として勤務しております。UCSF留学体験記は、私の他に生命科学研究レターNo. 19に東京医科歯科大学大学院の平野智也先生が、No. 22に京都大学化学研究所の今西未来先生が書かれていらっしゃいます。この記事の読者の皆様の中には、UCSFに興味がある方や既に留学が決まっている方がいらっしゃるかと思います。そのような皆様にとっての最新情報となれば幸いです。

1. UCSFに留学が決定するまで

私はパスポートこそPacifichemに参加する為に作ったので持っていたものの、それまでに留学に対する強い興味はもちろんのこと海外旅行にも全く興味がありませんでした。日本にて博士号を取得後、ポスドクをしながら次の仕事を探していた矢先、「ポスドクを探している人がいる」という情報を同じ研究室の先輩から教えていただきました。仕事の内容について聞いてみれば私が興味を持っている内容そのもので、そのポスドク先がたまたまUCSFだったというのが留学に至ったきっかけです。「海外経験という箔も付いてラッキー」という軽い気持ちで応募を決意したのですが、恥ずかしながら応募当時はUCSFがどんな大学かも知らないような状態でした。従って、UCSFにポスドクとして入ることができて実に幸せ者だという事には後から気づく事になりました。念のため

UCSFの概要について簡単に説明しますと、UCSFは4つのデパートメント (School of medicine, pharmacy, nursing, dentistry) からなる医歯薬看護系大学院大学です。アメリカのみならず世界中からPh.DまたはMDを取得の為に学生が、そしてポスドクが集まります。UCSFはサンフランシスコ市内各地に24もの機関が分散していますが、恐らく全てのポスドクは3つのキャンパス (Parnassus, Mount



サンフランシスコ市の概略図: UCSF関連施設の間は無料シャトルバスでつながれていますが、行き先によっては本数が少ないので注意が必要です。市内は坂が多く、自転車での移動もルートによっては大変困難です。

Zion, Mission Bay)または2つの提携病院(San Francisco General Hospital, San Francisco Veterans Affairs Medical Center)のいずれかにある研究室で日々研究に励むこととなります。Mission BayにはGladstone研究所もあります。ParnassusにはUCSF medical centerがあるのですが、2015年にMission Bayに移動してくる予定で、現在その建設が進められています。

ポストクポジションへの応募についてですが、履歴書(英語でCVあるいはResumeと言いますが、日本の様式とは全く違うので注意)とカバーレターをFujimori先生にe-mailで送付したところ、Fujimori先生との面接にこぎ着ける事ができました。この面接についてですが、Fujimori先生が日本に居る私に配慮下さってSkypeでの面接となりました。そして面接の結果、本当に幸運なことにFujimori先生から正式なoffer letterをいただく事が出来ました。UCSFに来てから他のポストクに面接について聞いてみたところ、Skype面接はめずらしいようでした。直接先方の研究室に出向いた上で、これまでの仕事についてのプレゼンテーションをした後、ラボメンバーとのディスカッションとラボメンバーとの食事などを経た上で、ラボ内での審議によって採否を決定するという経過を辿ることが多いようです。

2. サンフランシスコ生活の準備

私の場合、UCSFはもちろんのことサンフランシスコにボス以外に知人が居る訳でもなく、さらには初めての海外(旅行)生活だったので不安だらけでした。インターネットで何でも調べられる時代かと思いますが、以下に私の経験談を書かせていただきます。

1) 持ち物

UCSFでの生活は单身という事もあり、家が決まるまでの2-3週間ホテル暮らしに必要となる身の回りのものをトランク1つに詰めて日本から出てきただけで特に不自由は感じませんでした。サンフランシスコにはJapan townがあるので、日本にしかないと考えられている物も大抵揃える事ができます。また、送料はかかりますが、アメリカをはじめとする海外に配送を請け負っている会社が日本にいくつか有り、早ければ一週間程でサンフランシスコまで配送可能なので余り深刻にならなくても大丈夫だと思います。日本からの引っ越しの荷物を船便や航空便を利用して荷物を配送する方もいらっしゃるかもしれませんが、その際には必ず荷物の中にも配送先が分かるものを入れておいた方が良いでしょう。というのは、荷物の長旅の道中で配送ラベルがはがれてラベルだけが届くという事故が多々あるからです。

現地で生活を始めるにあたっての軍資金についてですが、どこでもクレジットカードが使える(ただし日系のカード会社はほぼ使えません)ので、旅行ガイドに書いてある通り現金はそれほど必要ありませんでした。バス乗車やチップの支払いで必要となる1ドル札、普段使いでよく使われる20ドル札で用意しておくと思えばいいと思います(50/100ドル札は使えない事が多いので不便です)。家を借りるあるいは車を買うといった高額な買い物の際には現金でやり取りする事はほぼ無く、小切手でのやり取りになると思います。ただ、到着してすぐには現地銀行の預金口座も通常持っていない方がほとんどなので、口座開設の資金や大きな買い物での支払いはトラベラーズチェックで済ませることになると思います。家を借りる際には、日本で言うところの敷金に相当するdeposit(家賃の1ヶ月程度)が必要になることを忘れないようにしてください。

2) 生活のセットアップ

ソーシャルセキュリティーナンバーの取得、銀行口座の開設、カリフォルニアID(または運転免許証)の取得、電気ガスの開始手続きは一般的なアメリカ生活本やインターネットに出ている情報の通りでした。健康保険やその他の給与絡みの手続きについては、UCSFの人事課の方がとても親切丁寧に対応してくださいました。以下には、苦労した部屋探し、生活用品の購入、そして移動手段についてまとめました。

• 部屋探し

これが最大の難関でした。単身で住む部屋の種類としては、Studio、1 Bed room、あるいは複数人の人とシェアの3パターンが考えられます。UCSFにはMission bayとParnassusの近くに学校が運営するHousingがあります。ここに入居するのが一番安心でかつ安く、そしてキャンパス間を連絡するシャトルバスで楽に通勤が出来ます。しかし、いわゆる普通のポスドクや学生はOKですがUCSFにおける身分によっては入居出来ない場合がありますのでご注意ください。また、大人気のため入居まで数十人待ちということは当然で、斯く言う私もUCSFに来た時には



Mission bay campus: 右手に見えるのがByers hallとGenentech hall、左奥に見えるのが建設中のMedical center

Housingの空きが無く、他に部屋を探す事になりました。日本から代理店経由でサンフランシスコにある部屋を契約することも可能ですが、私には料金が高く断念しました。日本と異なる気候、そして物を長く大事にする人が多い事、そして様々な法律の事情で新築や改築が難しいといった事から基本的に古い家ばかりです。サンフランシスコは1906年にあったサンフランシスコ地震という大地震とそれに伴う大火事で壊滅的な被害を受けましたが、これらの被害を免れた築100年以上の家も沢山あります。従って、「日本で住んでいたアパートやマンションのような物件=新しくきれい」を希望すれば、一番安いStudioでも\$2000以上はするでしょう。キッチン/バス専有の部屋でほしい\$1200くらいからでしょうか。もっと安い物件も有るかもしれませんが、治安が悪い等の側面があることを覚悟してください。サンフランシスコは市内のあちこちに来米当初に日本人が住むのにはちょっと治安が良くない場所が多々有るので、Crime mappingなどを参考に場所決めをすると良いと思います。どうやって部屋を探すかについてですが、Craglist等の掲示板で探します。日本だと部屋の大家さんが不動産屋さんを仲介して部屋を貸す事が多いですが、サンフランシスコでは基本的にCraigslistを通して大家さんと直接契約です。女の一人暮らしと言う事も有り、「この大家さんを信じて大丈夫かな」という心配が強かったのですが、貸す方にも「ちゃんと家賃を払ってくれるのかな」という心配が有りますからどっこいどっこいなのでしょう。サンフランシスコ市内の部屋の需要と供給のミスマッチにより、一つの物件に対して何人もの人が応募するのが通常です。大家さんにe-mailをしてその返事を待っていてもその前に部屋が決まってしまうことが多々有るので電話でコンタクトをとることを強くお勧めします。

• 生活用品の購入

冷蔵庫は基本的に部屋についており、洗濯機は住むアパート内でのシェア、あるいは近所のコインランドリーが通常です。新生活で必要となるものはAmazon.com(何でも揃います)とIKEA(日本と違って安く、サンフランシスコ市内からBartと無料シャトルバスでお店まで行けます)で全て揃えることができ、これらの通販または配送サービスで間に合いました。購入費用は日本で新生活を始めるのと同じくらいを見積もっておけば良いと思います。ラボメンバーに不要になった家具が無いか聞いてみたり、Craglist等の掲示板をチェックしたりすることで安く入手できるかもしれません。

• サンフランシスコ市内の移動手段について

サンフランシスコ市内は公共の交通機関(muni/muni metro, Bart, Cal train)が発達しており、車が無くても一人暮らしであれば生活に困る事はありません。最初はバス路線図を見てもたくさんの路線があり、どれに乗って良いか迷うし、決死の覚悟で乗ってみればどこを走っているのか分からなくなるという事が多々有りました。これは乗って学ぶしか無いように思います。治安が悪い為に行かない方が良いと言われる地域に行ってしまうと、昼間であれば特に問題が無いように思います。一人暮らしでも、どうしても車が必要な場

合が出てくるかもしれません。そんな時の為にカーシェアリングに加入しておくと思いいます。カーシェア会社によってはUCSF割引もありますが、加入の際には日本での運転履歴証明書等が必要になることがあるので渡米前に何が必要かチェックしておくと思いいます。

3. UCSF

私が所属するFujimori Labは、Fujimori先生を中心に、ポスドクが2人、大学院生が7人から構成されます。2008年にスタートした比較的新しい研究室ですが、共通で使える機器も充実していますし、隣近所のラボにちょっと何かを借りるだとか何かを教わるといった際の垣根がとても低いので、研究遂行する上での大きなラボとの差を実感した事が有りません。研究室はMission BayのGenentech Hallにあり、同じフロアにはケミカルバイオロジーを研究対象とするラボが集結しています。使い慣れたガラス器具が無かったり、溶媒がやたら高かったり、さらには注文した試薬の配送に時間がかかるといった不便はありますが、一人に一台のドラフトがあるのでケミストにとってとても恵まれた環境だと思いいます。研究という仕事は時に夜遅くなったりしますが、夜9時から翌朝6時まででは自動的に防火扉が閉まって電気が消え、ラボをきれいにしてくれるクリーニングスタッフの仕事の邪魔をすることになるのでそれまでに帰れるように仕事をした方が良さそうです。

Fujimori Labでは、生命現象や疾病に関与する酵素の作用メカニズムの解明や疾病治療法への応用を最終目標に化学と生物学にまたがる学際領域研究に取り組んでいます。私の現在の研究テーマはヒストン修飾酵素阻害剤の開発で、UCSF内外の研究室とのコラボレーションで研究を進めています。UCSFに来るまでの研究でケミカルバイオロジーに片足をつっこんだものの、分子生物学の実験に至ってはほぼ初心者でした。初めてのクローニングや電気泳動を全て英語で習った事は、理解に苦労はしましたが貴重な体験だったと思いいます。私の英語につきあって根気よく教えてくれるラボメンバーに日々感謝の気持ちでいっぱいです。

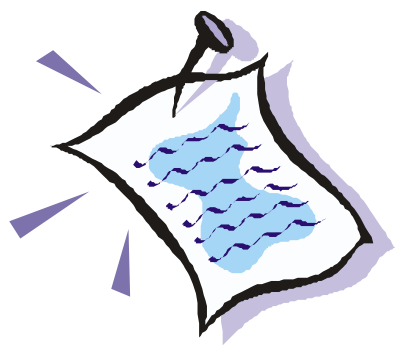
4. 留学

お決まりのまとめになるのですが、私は留学を強くお勧めします。UCSFでの留學生活を通して、世の中には日本人だからこそ出来る仕事があると思うようになりました。それが何なのか気付く為には、一度外国に出て一人の外国人としていろいろな人と仕事を市内と分からないと思いいます。

こうして一年半の間海外で暮らしてみると、日本に居る間に用意しておけば良かったなと思いいものがいくつかあります。留学を考えていらっしゃる方の参考になれば幸いです。

- 英語力： ジョン万次郎状態で来たことは、時間がもったいなかったと思いいます。日本人にとって英語を「読む事」と「話す事」は全く別の科目なのでその練習をお忘れなく。1年も居ると聞き取れてそれを復唱もできるようになりますが、まだまだ分からない単語だらけで日々修行です。
- フレンドリーな性格： UCSF内外、みんなおしゃべり大好きです。「黙っている美学」なんてものは無くて、「シャイな奴」で片付けられてしまいます。
- 奨学金： いろいろな日本の公益財団法人が海外に研究留学に行く人を対象に奨学金助成を行っていますが、海外に出てから応募出来る奨学金は多く有りません。ですから、アメリカにくる前に応募して受かった上で研究留学を始めた方が自分はもちろんのこと研究室もハッピーだと思いいます。

最後に、私の海外留学を応援して下さった皆様、Fujimori先生をはじめとするFujimori Labの皆様、そしてUCSFでいろいろお世話になった日本人研究者とそのご家族の皆様に深く感謝致します。



シンポジウム等会告

日本薬学会 133 年会内「天然物ケミカルバイオロジー：分子標的と活性制御」シンポジウム

主催：公益社団法人日本薬学会

日時：平成 25 年 3 月 30 日 (土) 午前 9 時～11 時

会場：パシフィコ横浜 (<http://www.pacifico.co.jp/index.html>)

プログラム等は新学術領域 HP (<http://chembiochem.jp/blog/2013/01/07/sympo133/>)をご確認頂ければ幸いです。

産官学を問わず、薬学会春期年会に参加される多くの皆様の御来聴をお待ちしております。どうぞ宜しくお願い申し上げます。

(情報提供：叶 直樹)

日本化学会第 93 春季年会特別企画

生命化学研究の挑戦：バイオ医薬創出の新たな潮流

【趣旨】 革新的な医薬品として抗体医薬を中心とするバイオ医薬品が注目を集めている。これらバイオ医薬品の創薬は、遺伝子組み換え技術、様々な分析技術の高度化、あるいは分離精製技術の先端化を受けて、新たな挑戦の段階に入っている。一方、生命化学領域における最近の研究成果が、これらバイオ医薬品の開発に新たな時代をもたらそうとしている。このような状況のもと、創薬領域における化学者の役割は今後ますます高まっていくものと考えられる。そこで、本企画では、バイオ医薬品研究とその周辺領域で中心的役割を果たしている研究者に、最先端の研究成果を紹介いただき、生命化学の新たな挑戦について議論する。

プログラム

3 月 22 日(金) 午前

9:30-9:35 趣旨説明 (大阪府立大) 藤井郁雄

座長 津本浩平

9:35-10:15 抗体医薬創製技術の現状と展望 (中外製薬) 服部有宏

座長 三原久和

10:15-10:55 バイオ医薬品と発現プラットフォーム (化学及血清療法研究所) 中島敏博

座長 円谷 健

11:05-11:45 抗体医薬精製用充填剤の開発 (ダイソー) 大高誠治

座長 深瀬浩一

11:45-12:25 低分子量抗体：ラクダ科動物 VHH 抗体の蛋白質科学 (産総研) 萩原義久

12:25-12:30 総括 (ダイソー) 鈴木利雄

企画 責任者：藤井 郁雄 (大阪府立大学) fujii@b.s.osakafu-u.ac.jp

鈴木 利雄 (ダイソー (株)) tsuzuki@daiso.co.jp

(情報提供：藤井 郁雄・円谷 健)

光機能化学展望～デバイスからバイオまで～

The Prospects of Photofunctional Chemistry –from Devices to Biology-

【趣旨】近年、有機 EL、有機太陽電池、光磁石などの様々な光機能性デバイスが開発されている。一方、生命科学においても、様々な蛍光プローブが開発されており、“光”の有効利用は強く望まれている。これらの分野は独自に目覚ましい発展を遂げているが、分野融合による“新概念”、“新技術”の創製は、喫緊の課題である。全ての分野に共通するのは、「鍵技術」が“光で働く材料開発”ということである。そこで、この特別企画では、①生体用蛍光プローブ、②光機能性デバイス、③光機能性分子の理論計算などに関する第一線の研究者が集い、講演を行うことで、デバイス⇔バイオ、応用⇔サイエンスを俯瞰し、光機能化学の将来を探ることを目的とする。

プログラム

3月22日 午後

13:30-13:35 趣旨説明 (北大院理) 加藤昌子

座長 (北大院理) 加藤昌子

13:35-13:55 ポルフィリンを用いた光機能性材料の開発 (東大生研) 石井和之

13:55-14:25 光相転移材料の開発 (東大院理) 大越慎一

座長 (北大院工) 長谷川靖哉

14:25-14:55 高効率熱活性化遅延蛍光による有機 EL 発光材料の新展開 (九大院工) 安達千波矢

14:55-15:25 光機能性材料の理論計算 (富山大院理工) 野崎浩一

座長 (北里大理) 石田 斉

15:25-15:55 イリジウム錯体を用いた生体用りん光プローブの開発 (群馬大院工) 飛田成史

15:55-16:25 生体ダイナミクスを観測する蛍光プローブの開発 (東大院医) 廣瀬謙造

16:25-16:30 おわりに (片山化学工業) 大谷敬亨・安達昌城、(北里大理) 石田 斉

企画責任者：

加藤昌子 (北大院理)・石井和之 (東大生研)・安達昌城 (片山化学工業(株)R&D センター)

(情報提供：石田 斉)





お知らせ

【異動】

◆ 新留 琢郎

〒860-8555 熊本市中央区黒髪2-39-1

熊本大学大学院自然科学研究科

産業創造工学専攻 物質生命化学講座 教授

E-mail: niidome@kumamoto-u.ac.jp

Tel: 096-342-3667

Fax: 096-342-3668



【編集後記】

1月下旬、産研近くの1本の白梅が咲き始めます。液体窒素のタンクの陰に隠れてしまい、普段は全く目立たぬ梅の木なのですが、南からの日差しを受けようと、タンクの後ろから懸命に細い枝を伸ばしています。その姿が健気で、毎年の開花日を待つのが密かな楽しみでした。今年は1月30日。昨日一輪、今日も一輪。春の訪れを教えてください。きっとこれからもこの場所で淡々と、季節の移り変わりを告げてゆくのだらうと思います。

今号もChemical BiologyからBioinorganic Chemistryまで盛り沢山の内容となりました。叶、櫻井両氏には、光親和性反応基を応用した標的探索の手法開発に向け、それぞれの新しいアプローチをご紹介頂いたほか、石田氏にはペプチド折り紙のご研究の経緯を、本研究会との関わりを踏まえて振り返って頂きました。力作をお寄せ下さったすべての執筆者の皆様にご心よりお礼を申し上げます。

次号 (No. 42) は、井原さんのご担当により、2013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。



2013年（平成25年）2月4日 立春

生命化学研究レター編集委員

第41号編集担当：大神田 淳子

大阪大学産業科学研究所、johkanda@sanken.osaka-u.ac.jp

井原 敏博

熊本大学、toshi@chem.kumamoto-u.ac.jp

松浦 和則

鳥取大学、ma2ra-k@chem.tottori-u.ac.jp