

生命化学研究



No. 9 (2002年6月)



巻頭言

夢

九州大学有機化学基礎研究センター 教授

浜地 格

いきなり私事で恐縮だが、大学で教育 / 研究者の端くれとして職を得て十数年が経過した。学生さん達に大学院で授業をはじめただけでも10年以上となる。毎学期の大学院授業の最初には必ず言うのは「大学院では好きな授業を取ったらいい。単位だけのためにここにいる人はさっさとラボに帰ってフラスコを覗きましょう」。また最後に必ず出題する問題は「科学・化学に対するあなたの夢はなんですか?」。これに対する答えは千差万別で読んでみると大変面白い。それぞれの学生さんのこれまでと、今が反映されている記述が多いからだ。極めて近視眼的に、今のテーマがうまく進むことです、と言った答えが最も多いが、人に役に立つ化学製品を作りたいとか、環境や地球に優しい化学技術を開発したい、といったどこかのコマーシャルのような答えもある。およそ、夢のない人生ほどつまらないものはない、と僕は思っているので、日々実験や研究に追われて多忙に見える(あるいは厳しい現実に打ちひしがれて目的を見失って放浪しているように見える)大学院生諸君に、たまには自分の夢を思い出してもらいたいという意味を込めての僕からのプレゼントのつもりである。中には、自分が化学を志した(学科を選んだ)動機に遡って、夢を語る子もいたりする。夢はその人の個性やセンス、あるいは未来の豊かさをもっとも端的に現している。先人達の画期的な発見や発明は、それぞれの天才の夢(空想 / 構想力)みる能力に負うところが大きいことはよく言われることでもある。

さて、生命化学研究会の夢は何だろうか? 日々の日常に流され、多忙を極める中でちょっと立ち止まって思い出してみる時間も必要であろう。学生さん達の答案のように、近視眼的な夢もあるし、大きな将来の展望もあったように思う。夢はできるだけ个性的で、それぞれオリジナルな方が素敵だ。他人の夢を自分のもののように語るほど貧しいことはない。日本の生命化学の源流がこの研究会にあった、将来そう言われるような研究会ができないか。厳しくしがらみの多い現実をしなやかに乗り越えながら夢に向かって進んでいけると素晴らしい。我々の夢が、この分野の将来展望を決めるのかもしれないという自負を持って、

One is as big as one's dream.

以上、学生時代は授業を受けることが嫌いで、今は授業をすることが苦手な一人(注)からの言い訳でした。

(注) 授業は苦手ですが、研究室での寺子屋教育は得意です。新生「浜地研」では大学院生を大募集中です。
(はまち いたる: itarutcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp)

新規蛍光プローブの創製による機能分子の細胞内可視化

東京大学大学院薬学系研究科
菊地和也



生細胞において生体内分子は、その生理機能が発揮される特殊な生体組織や個体発生上の特殊な時間に発現している。現在、ポストゲノム時代における重要な研究課題として細胞内外に作用する分子の働きを、機能しているその場で解明することが挙げられるようになった。この機能を解析するためには、細胞が生きたまま機能を調べることができれば有効である。この目的のため、細胞内分子と特異的に反応して不活化あるいは可視化することができる機能性分子をデザイン・合成し直接細胞に応用することを試みた。この結果、生体内分子の空間的・時間的な変化を解析する手法を創り出すことが可能となる。本稿では成功例として、生理機能可視化プローブとレーザー分子機能不活化(CALI)プローブを創製し、細胞系へ応用した研究内容を紹介する。

1. 亜鉛イオン(Zn^{2+})検出用蛍光プローブの開発

生体内において、遊離の Zn^{2+} は細胞死や神経伝達に関与していることが報告され、近年着目されるようになった。しかし、 Zn^{2+} の作用機序に関しては不明な点が多い。そこで、細胞内での Zn^{2+} の濃度を生きた状態で可視化することが有効であると考え、蛍光プローブの開発を行った。

Zn^{2+} のホストとしてTPEN 類縁体を用い蛍光団に Fluorescein 骨格を用い、ZnAF 類をデザイン・合成した。このうち、ZnAF-2 は nM オーダーでの濃度変化を測定でき、現存する Zn^{2+} プローブの中で最高感度かつ選択的である事が示された。さらに、ZnAF-2 を細胞膜透過性に修飾した ZnAF-2 DA を合成し、正常時及び虚血時におけるラット脳海馬における Zn^{2+} 濃度変化を可視化することに成功した。正常時、 Zn^{2+} は CA3 及び歯状回において高濃度で存在するが、虚血や脱分極刺激によってCA1 において濃度上昇することが明らかになった(図1.)。近年 Zn^{2+} 蛍光プローブは数多く報告されているが、実際に生細胞イメージングへの応用に耐えるものはこのプローブのみである。

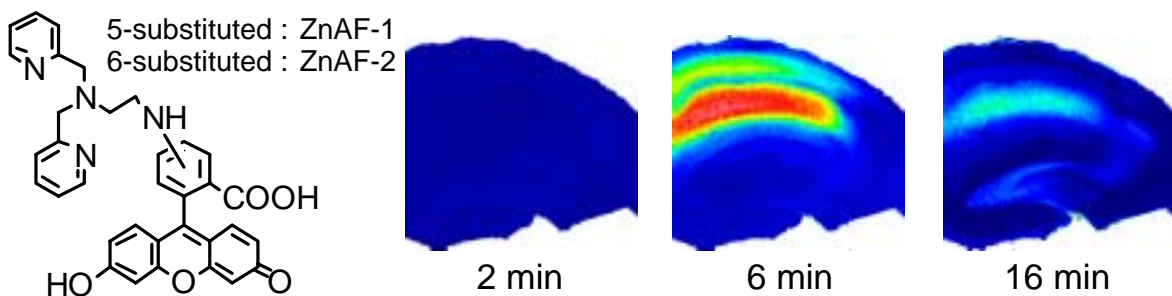


図1. ZnAF 類の構造式と虚血時におけるラット脳海馬の Zn^{2+} 放出

2. 蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)型蛍光プローブの開発

FRETとはドナー化合物とアクセプター化合物が近い位置(通常 50-100Å 以内)にある場合、ドナーを励起したにもかかわらずアクセプターからの蛍光が観測される現象である。化学結合が切断され、両化合物が離れた場合にはドナー自身の蛍光に変化することになる。すなわち、ドナーとアクセプターの間のリンカーを切断することで蛍光波長が変化することになり、比の測定が可能である。しかし、既に2つの蛍光団を単純に化学結合した小分子では、色素同士が水溶液中では会合し消光が起きることを観測していた。そこで、非会合性の蛍光プローブをデザイン・合成し、Phospho-diesterase 活性を測定可能なプローブ CPF4 の作製に成功した(図2.)。

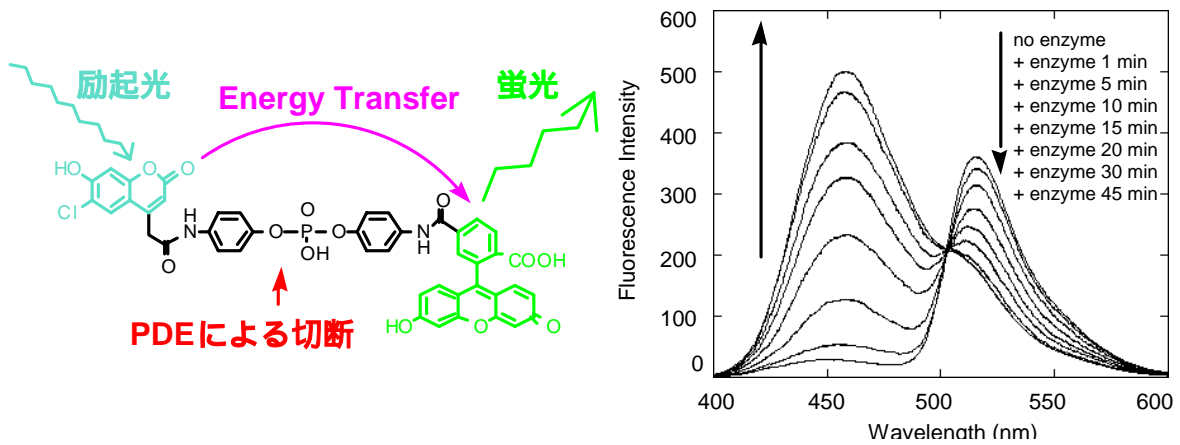


図2. CPF4 の構造及び PDE によるスペクトル変化

3. イノシトール3リン酸受容体のレーザー分子不活化(CALI)

生体内分子の機能解明には時間と場所を特定できる不活性化法が望まれる。この目的に適う手法の一つがレーザー分子機能不活性化法(Chromophore-Assisted Laser Inactivation, CALI)である。CALIでは色素標識した抗体を細胞に導入し、レーザー光を照射する。この結果、色素は光増感剤として働き、近傍の標的分子のみを特異的かつリアルタイムに不活性化する。しかし、従来の CALI では抗体をプローブとするため、不活性化部位を制御できない事、細胞への導入が困難な事等問題点があった。これら問題点を解決するため、抗体の代わりに合成小分子プローブを用いることを計画した。

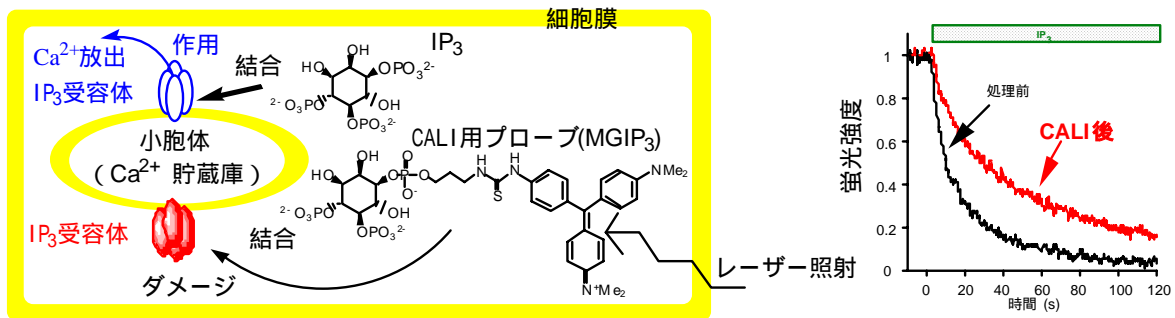


図3. IP₃ 受容体の CALI による不活化の概念図及び Ca²⁺放出抑制

イノシトール三リン酸 (IP₃) 受容体を標的分子として選択し, IP₃ の1位のリン酸に色素を結合させた CALI 用プローブ(MGIP₃)を合成した. MGIP₃ は K_d 値がサブ nM と現存する IP₃ リガンドで最強の親和性を持つことが示された. 続いて, モルモットの平滑筋組織に MGIP₃ を添加しレーザー照射すると, IP₃ 受容体からの Ca²⁺ 放出が抑制され, 合成小分子プローブを用いた CALI により, IP₃ 受容体を生きた状態で特異的に不活性化できることに成功した(図3.). さらに, シングルセルレベルでの不活化にも成功した.

4. アニオン応答性蛍光プローブ

生体内には数多くのアニオンが存在し, 生理的に重要な機能を司っている. 生理活性物質の細胞内における機能を探索するためには蛍光プローブが有用であるが, Ca²⁺ 検出プローブに代表されるカチオン検出蛍光プローブと比較するとアニオン検出蛍光プローブの数は圧倒的に少ない. これは水中においてアニオン種特異的に結合するホスト分子が報告されていないためである. この状況下, d¹⁰ 金属イオンへのアニオンの配位能に着目して蛍光プローブ作製に着手した. これまでにサイクレン金属錯体にアニオンが配位すると, あらかじめ配位させていたクマリン誘導体の配位がはずれ励起光波長が変化するという検出メカニズムに基づいて, 中性の緩衝液中で機能する蛍光アニオンセンサーを開発した. さらに, 環状ヌクレオチド特異的ホスホジエステラーゼの活性測定に使用できることが示された.

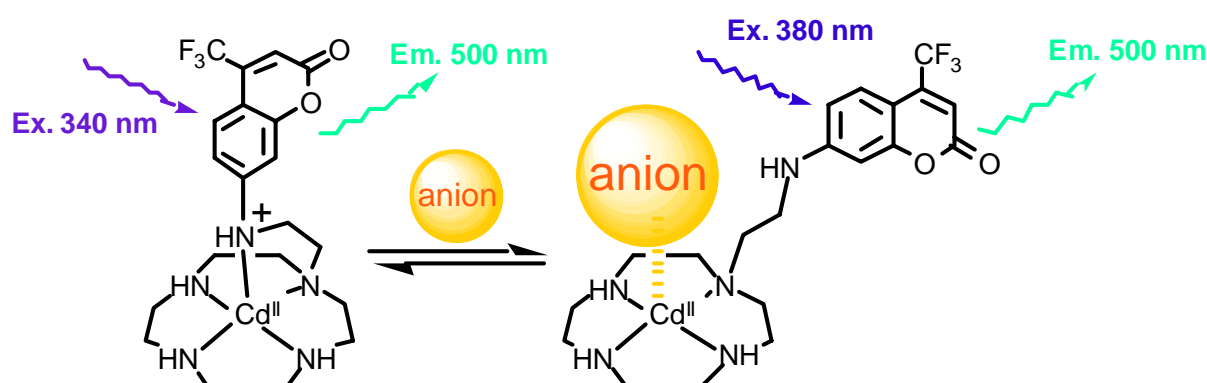


図4. アニオン検出蛍光プローブ分子の励起光変化メカニズム

主要論文

- 1) Zn²⁺ Probes: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, ASAP article (2002). *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12399-12400 (2000). *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 1052-1054 (2000).
- 2) FRET Probes: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 1653-1657 (2002). *Anal. Chem.*, **73**, 939-942 (2001). *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 3438-3440 (2000). *FEBS Lett.* **453**, 356-360 (1999).
- 3) CALI: *Chem. Biol.*, **8**, 9-15 (2001). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 1697-1702 (1999).
- 4) Anion Probe: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 3920-3925 (2002).

(きくち かずや: kkikuchi@mol.f.u-tokyo.ac.jp)

研究紹介 Suga Laboratory

<http://www.chem.buffalo.edu/Suga>

Suga 研の研究紹介と アメリカの研究費申請システムにみる研究者、 研究内容の切磋琢磨



菅 裕明

私の研究を紹介しろということであるが、まず簡単に研究室の仕事を紹介し、その後、アメリカの研究費申請のシステムについて少し考察をしてみたいと思って書き始めている。

リボザイムの試験管内分子進化

リボザイムは触媒活性を持つ RNA 分子のことである。生体内で発見されたタンパクに依存しないリボザイムの活性は、現在までのところ RNA の切断、splicing に限られている。しかしながら、90年代初頭の Szostak, Joyce, Gold らが示した研究により、人工的に進化させた RNA 分子には様々な活性が見い出されることがわかった。私の研究室でも、この5年あまり、試験管内人工進化の技術を用いて新規リボザイムを創製することを試みている。

私の研究の紹介をする前に、まず、この領域の仕事を批判的にみてみたい。過去に単離されたりボザイムのほとんどは自己修飾触媒である。これは、その進化手法が自己修飾触媒といった形でしかセレクションできないことに由来する。また、その反応は、酵素モデルの域から出ていない。さらに、進化されたりボザイムの構造、動力学的研究が薄弱である。これでは、過去に研究された他のタイプの人工触媒と少しも変わりが無い。したがって、これらの批判的材料をできるだけ克服すべく私自身の研究計画を推進していく必要があると、5年前、そして今でも感じている。

私のこの仕事における興味は、RNA とアミノ酸が進化上でどのように関わり、進化に寄与してきたかである。これは、翻訳システムがいかに進化したか、また、遺伝子暗号はいかに進化(凍結)したか、などの疑問を軸としている。現在の翻訳システムにおいて、RNA とアミノ酸が会う最初のステップは、トランスファー RNA (tRNA) のアミノアシル化反応である。この反応は、アミノアシル tRNA 合成酵素、すなわちタンパク酵素が担っている。この酵素は、アミノ酸を特異的に認識、活性化し、さらに特定の tRNA に選択的にチャージする機能を持っている。天然には20種類のアミノ酸があるため、それぞれに特異的な酵素が20種類あるわけである。

このタンパク酵素は非常に精巧であり、また複雑な機能を持っている。このようなタンパクが、生物進化上に突然現れるわけではなく、また、複雑かつ正確な翻訳システムが進化、完成する前に合成されることも考えにくい。したがって、原始翻訳システムが進化するにはタンパク以外の分子、おそらく RNA が類似の活性を持っていたと考えられる。私の仕事は、このアミノアシル tRNA 合成酵素リボザイムを単離するところから出発している。

我々は現在までに3つのアミノアシル tRNA 合成酵素リボザイムを発表している(詳しい内容は文献を参考にして頂きたい)。それぞれのリボザイムは、異なる戦略で進化され、また異なる特徴を持つ。しかし、いずれにも共通していることは、(1)自己触媒ではなく、tRNA をトランスアミノアシル化できる(リボザイムは触媒として働く)、(2)アミノ酸、もしくは、tRNA に対する選択性がある。また、現在までに、それらの構造、動力学的解析、さらに活性の金属イオン依存性などが研究され、その一部がすでに発表されている。特に我々のグルタミン酸特異的リボザイムは、詳細に研究された数少ない人工リボザイムのひとつといえる。また、エンジニアリング、たとえば tRNA 選択性の改変、の容易さというのも、リボザイムの特徴と言える。

残念ながら、我々のアミノアシル tRNA 合成酵素リボザイムはまだ完全とは言えず、いくつかの課題を残している。しかし、現在進行しているリボザイムの進化とエンジニアリングを組み合わせる試みも成功しつつあり、実用性の兆しが見えてきた。現在、我々のリボザイムを用いて、非天然アミノ酸を人工的にエンジニアリングした tRNA にチャージし、翻訳に用いる手法の開発を試みている。このステップを触媒化できれば、芳坂氏らの研究(生物化学研究会レターNo.8 参考)も、もっと一般的にタンパクエンジニアリングに用いられる手法となるであろう。リボザイムを実用的に翻訳に用いることができるのも、そう遠くはないかもしれない。

また最近、コファクターを利用するレドックスリボザイムの単離に成功した。このリボザイムは、アルコールをアルデヒドに酸化できる触媒機能を持つ。この酸化反応はアミノ酸の新陳代謝には不可欠の機能である。将来、アミノ酸の新陳代謝の過程を全てリボザイムで触媒できれば、RNA ワールドの仮説も、夢物語とは言えなくなるのではないかと思っている。

参考文献

- Y. Bessho, D.R.W. Hodgson, H. Suga, *Nature Biotech.* **2002** in press.
H. Murakami, N.J. Bonzagni, H. Suga, *J. Am. Chem. Soc.* **2002** in press.
K. Ramaswamy, K. Wei, H. Suga, *Nucleic Acid Res.* **2002** *30*, 2162-2171.
H. Saito, K. Watanabe, H. Suga, *RNA* **2001** *7*, 1867-1878.
A. Flynn-Charlebois, N. Lee, H. Suga, *Biochemistry* **2001** *40*, 13623-13632.
N. Lee, H. Suga, *Biochemistry* **2001** *40*, 13633-13643.
H. Saito, H. Suga, *J. Am. Chem. Soc.* **2001** *123*, 7178-7179.
A. Vaidya, H. Suga, *Biochemistry* **2001** *40*, 7200-7210.
N. Lee, H. Suga, *RNA* **2001** *7*, 1043-1051.
H. Saito, D. Kourouklis, H. Suga, *EMBO J.* **2001** *20*, 1979-1806.
N. Lee, Y. Bessho, K. Wei, J.W. Szostak, H. Suga, *Nature Structural Biology*, **2000** *7*, 28-34.

上記の論文は、下記の隠れホームページにて、pdf でダウンロードできます。

http://www.chem.buffalo.edu/Suga_publications_download.html

その他の研究

私の研究室では、リボザイム関係の研究以外に、2つのプロジェクトが動いている。一つは、グラム陰性菌に関する細胞間のシグナルに関する仕事である。これは、有機合成と Microbiology を組み合わせた研究で、3年に及ぶ研究の末、ようやく興味深い結果が得られたところである。もう一つは、ナノテクノロジーに関する仕事で、これは大学内の物理学、電子工学など、様々なサイエンティストとの共同研究で成り立っている。

アメリカの研究費申請システムについての考察

私が、この考察をこの場を借りて行いたいのは、最近の日本の研究費の巨大さに驚き、かつ、日本の政府がノーベル賞受賞者を計画的に増やすなどということを真顔で発表しているのをインターネットや新聞上で読み、アメリカの科学の底力がどこから由来するのか、その研究費申請システムを考察することで少しでもメンバーの皆さんと考えることができればと思っている。この考察はあくまでこのレター上での、私の個人的意見と考えて頂きたい。

私は、97年より現職について自分の研究室を運営している。この5年間何をしてきたかといえば、グラント(研究申請書)を書き続けていた(いる)と言っても過言ではない。そのかいあって、終身在職権、いわゆる tenure の審査も通常より一年早く終え、私のアメリカに来て以来の目標はとりあえず達成されたという感じである。ここで最初に話題にしたいのは、この終身在職権を取るのになぜグラント(研究費)を取得した事実が必要なのかである。それには二つの理由があると私は思う。

第一に、研究室を運営するためには研究費が必要である。これは研究を運営する側(研究者自身)としては当然のことであるが、これを大学側からみてみたい。大学は、この研究者に助教授の職を与えるにあたり、研究室を立ち上げるスタートアップの費用を提供する。これは、大学により、研究者の研究内容により、また雇用時期により様々であるが、通常2千万円から4千万円程度である。この大学の出資はその研究者が外部より研究費を取得することにより、オーバーヘッドとして大学へ還元される。オーバーヘッドの利率は大学によって違うが、研究費総額の30%から50%というところである。したがって、研究者がより多くの研究費を取ってくれば、最初の出資をはるかに超えるお金が大学に入る。このシステムは、アメリカの私立大学のみならず、州立大学も法人として独立しうるシステムの一つと言って良いであろう。したがって、大学側にとっては、研究費を取得できない研究者を雇用しておく理由は全くないと言って良い。(上のことは、Ph.D.を出す大規模の大学にあてはまるが、いわゆるカレッジといわれる小規模の大学では教育が優先される。)

第二は、研究費を取得したということは、研究費申請システムに適応し、生き残ったという証であり、また、これからも生き残る可能性を示したことになる。それは、科学者としてアメリカで切磋琢磨していくことを体得したことになる。これがどういうことか、それはアメリカの研究費申請システムについての説明が必要であろう。

アメリカの研究費出資機関はいくつかある。生命科学に関する分野において出資する機関を大きく分類すると、NIH、NSF、DOD(defense)、DOE(energy)、NASA、そして、個人財団法人である。個人財団法人のほとんどは、継続申請のできないものが多く、アメリカの科学全体を支えている種類のものではない。DOD以下、3つの機関は個人研究費に対する出資もあるが、主にすでにエスタブリッシュした研究者を中心とし

たチームに出す場合が多く(コネクションが必要となる)、また、どちらかと言うとフィジカルサイエンスをサポートする場合が多い。したがって、NIHとNSFの二つの機関の出す研究費がアメリカの生命科学(化学も含む)を支えていると言って良いと思う。この二つの機関は、その研究費申請書の審査方法には多少の違いがあるが、どちらもかなりフェアと私は思う。紙面上、両方の機関について述べるができないので、財力の大きいNIHを取り上げて、その審査過程を説明したい。

申請書は、25ページにわたる予備実験結果、研究計画と、その他の書類、論文リスト、予算などから成り、通常全体で35ページあまりの研究費申請書となる。現在のNIHの1人の研究者に対する予算は年間25万ドル(約3千万円)以下で、それ以上請求する場合は明確な理由を必要とする。助教授に全額与えられることは珍しく、審査員の判断でその半分から25万ドル以下の年予算がつけられる。補助期間は5年以下である。申請書類は各分野の研究者で組織されたスタディーセクションで審査され、そのセクションはパーマナントに120セクション、それに加えて30ほどのスペシャルセクションが設けられている。各セクションは、その予算配分により5人から30人程度のその分野の研究者で組織される。セクションは申請者で選択することもできるが、NIHが選択してくることもある。

では、申請書の審査のクライテリアは何であろうか。まず、申請者が予備実験をきちっとやっていること、継続申請の場合、過去に発表された実績も重要となる。私の経験から言って、予備実験結果の弱い申請書はまず通らない。次に、研究の新規性、フィールドに与えるインパクトの大きさが評価を大きく左右する。さらには、実験計画が論理立っており、しかも、計画の失敗をできるだけ少なくした考慮がされているかも重要な点である。申請書は各研究者がベストを尽くして(もちろんそうでないものもあるが)書いたもので、いずれも素晴らしい点を持っている。したがって、審査員はその弱点を見つけて批評するわけであるから、弱点は少ないほど良いのは当然であろう。申請者は自分が持っているベストのアイデアをこの申請書に書いていることも、重要であろう。(このあたりに、日本にありがちな秘密主義でなく、アメリカの科学が切磋琢磨していく源が明らかに見えると感じている。)したがって、NIHでは大風呂敷の研究申請を書いたグラントは評価されない。

審査では、ひとつの申請書に対しスタディーセクションのメンバーから適切な3人の研究者がセクションチェアによって選ばれ、彼らによって審査が行われる。各メンバーは、各申請書に対し、2ページ弱の批評をセクション会議前に書き上げ、提出する。私は去年パイオケミストリーのスタディーセクションに参加したが、その時は10の申請書にアサインされ、その批評を書く義務を負った。送られた来た段ボールにはセクションで審査される100余りの申請書が入っており、アサインされた以外の申請書にも目を通すことができる。セクション会議では、各申請書にアサインされたメンバーがそれぞれ申請書のサイエンティフィックメリットを批評を加えて10分程口頭で述べ、3人の審査員が論議をする。3人の意見が一致することもあれば、分かれることもある。最終的には、その論議の後、セクションのメンバー全員がその評価を投票する。したがって、1人の意見だけで評価が決定されることは決してあり得ない。最終的に予算が与えられるのは、全体の20~25%ほどである。

正直言って、私がバイオケミストリーのスタディーセクションで申請書を読み(勉強し)批評を書くのに使った時間は、自分の申請書を書く時間(通常1ヶ月あまり)と同じ、もしくは、それ以上であった。他人の仕事の批評の難しさを身にしみて感じる経験であった。書いた批評は、申請者に送られる。申請者は、審査員のり

ストを知らされているので、ある意味で容易に審査員を予測することができる。したがって、審査員は的外れたことは書けるわけもなく、申請者が納得できる批評を書く必要がある。また、審査員にとっては、批評を書くことは自己教育でもあり、どのような申請書が採用されるのかを学ぶ絶好の機会でもある。採用されなかった申請者は、批評を読み、その批評に答えるべく実験を行い、また、再申請書を書かなくてはならない。再審査の申請書には、前回の批評が添えられており、いかに申請者が批評を克服すべく申請書を作り直したか、次の審査員にわかるようになっている。審査は年に3回行われる。と言っても、申請して審査結果が帰ってくるのは約8ヶ月後、したがって1年に1回しか申請書は出すことができない(急げば、2年に3回出すことができるが、再申請は2回しかできないので、申請者は批評に対する十分の予備実験を行ってから申請書を作成する必要がある)。

読者の皆さんもすでお分かりになったと思うが、アメリカの研究者は、実際の研究を進める以前に計画が綿密に立てられている。もちろん、これらは計画であり、計画通りに実験が進むことは少ないかもしれないが、少なくとも私の経験では、綿密な計画を論理立てて書くことにより、研究の方向性が非常にはっきりしてくる。また、申請書を審査され、また審査することにより、研究内容と研究者自身が切磋琢磨されている。

予算に関しても、年間25万ドル以下であり、そのうちの70%近くは人件費に使われる。例えば、私の大学の場合、学生1人に年間約3万ドル、ポスドクに4万ドル以上かかる。また、夏休み中の申請者の給料もここから捻出しなくてはならない(逆に言えば、研究費がなければ研究者の夏休み期間中の給料はない!)。したがって、アメリカの研究費は見た目の金額より、実際に研究に使える金額は低い。まして、新しい高価な機械を手に入れるには、個人的には無理なことが多い(通常大学内のチームで、ひとつの機械購入だけを目的とした申請書を作成し申請する)。したがって、大きな研究室を運営するには、複数のグラントが必要となってくる。

こうしてみると、はたして日本の研究費の審査は公正に行われているか、そして最も重要なことはその審査で日本の研究者が切磋琢磨される機会があるか、考える必要があるのではないかと思う。正直言うと、私の英語力ではNIHやNSFの申請書を数週間で仕上げることはできず、年中申請書を書いている次第である(この原稿を書いている現在もひとつ書いており、そのフラストレーションをこれを書くことではらしているのかもしれない)。しかし、私がこの5年間で研究費申請、審査を通して学んだことは、実際にベンチで実験していた時以上に多かったかもしれない(多少次元が違うことではあるが)。政府がベンチャービジネスを後押しするのも、また、巨額の研究費を数人の研究者に出すのも、日本の科学の将来を明るくするひとつの方法かもしれない。だが、それ以上に研究者が切磋琢磨し、研究内容を自己向上させるような研究費申請システムと審査、評価システムを作ることが重要ではないかと思う。まして、大学を法人化し、そして、ノーベル賞受賞者を増やしたいなら、なおさらであろう。

最後に、上記のアメリカの研究費申請システム、ならびに、それに基づく終身在職権の決定について悪いと思われる点を挙げておこう。まず、研究の種類にはお金の取れやすい研究とそうでない研究がある。あきらかに基礎研究よりアプリケーション型の研究の方がお金は取りやすい。また、研究費取得の容易さは、研究のトレンドに左右されることも多い。手元に自分自身の研究が確立していないスタートしたばかりの助教授にとっては、自己の研究がトレンドにあるかどうか研究費取得の一つの要因となる。時には、このトレンドが先行し、たいした研究でもないのに研究費が集まる場合もある(もちろん、実績がなければ、継続申

請は困難になるであろうが)。したがって、ある意味で独自の研究を腰を落ち着けてできる環境とは言えにくい。また、素晴らしい研究者でありながら、研究がトレンドでない研究者の場合、研究費が取れず終身在職権が取れないことも可能性としてあろう。また、最近の傾向としていわゆるセンターマネーと言うのがある(おそらく、日本では重点戦略みたいな研究費に近いのではないかと思う)。これは、その分野に一気にお金を投入しその分野を活性化し競争を促すなど、良い点も多数あるが、その影響でその分野の個人型研究費割り当てが減少し、センターに入れなかった、または入らなかった研究者にとっては研究費が取れにくくなる。(このセンターマネーはもともと、DOD などのエージェンシーに多かったのであるが、最近では NIH や NSF にもこのタイプの研究費が増えている。)このようなセンターマネーを取るために、研究者が研究を軌道修正する傾向が強くなる可能性があるかと思う。また、研究そのものの実力ではなく、ポリティックに力を持った人が、センターマネーを手に入れる傾向もあろうかと思う。

えらそうなことを、とりとめもなく書いてしまったが、私は日本人として、日本の科学が発展することを心から希望している。この私の戯れ言が、将来の日本の科学を背負うこの会のメンバーの皆さんの論議の一つになって頂ければと思っている。

最後に。私の研究室に生命科学研究会の(長老?)メンバーのもとから巣立った研究者が現在2人ポスドクで来ています。2人とも素晴らしく、私の研究室から出る次世代の仕事の多くは、彼らのした仕事になると思います。私の研究室では、ポスドクの人にはできるだけ自由に実験をしてもらい、私は予算の管理とディスカッションの相手としての役割を果たしています。幸運なことに彼らからでてくるアイデアは、私の考えることを超えたものが多く、また、それを実現してくれる素晴らしい才能の持ち主達です。このような人達がまた私の研究室に来てもらえたらと希望する一方で、学生をこのように素晴らしい研究者に育てたあげた生命化学会メンバーの方々に感服するばかりです。

私のもとでポスドクをしてみたい方、私に電子メールを送って下さい(hsuga@buffalo.edu)。まずは、ディスカッションしましょう。

平成 14年5月 17 日、やっと春らしくなってきたバッファローにて(今年はちょっと春が遅いぞ!)。

(すが ひろあき: hsuga@buffalo.edu)



研究の風景

触媒抗体が出来るまで

生物分子工学研究所・機能制御部門 藤井グループ

テーラーメイド人工酵素（触媒抗体）をつくる過程を追いながら，私たちの研究室をご紹介します．



一応，遷移状態アナログの設計に使っているつもりです



ハプテン合成



MALDI-TOF-MS



NMR (600MHz)

免疫



私たちの大事な仲間です



果報は寝て待て！談話室です．



ハイブリドーマの作製
(クリーンベンチ)



抗体の精製
(FPLC)



触媒活性の測定
古くて安いHPLC! でもこれが一番使い易い



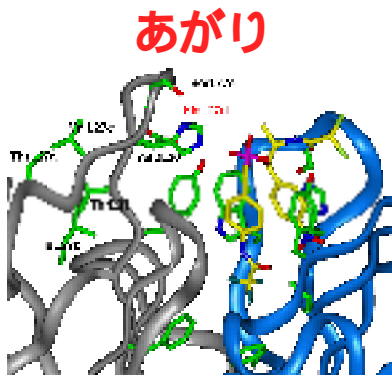
抗体のクローニング



PCR



シーケンス



X線構造解析



結合活性の試験 (SPR)



安全衛生のため実験室と居室がべつべつ



+



ご質問はこちらへ
fujii@beri.or.jp



気になった論文

高木 昌宏 (たかぎ まさひろ) 北陸先端科学技術大学院大学・材料科学研究科 教授
takagi@jaist.ac.jp

タンパク質の構造プロセスに関する研究を行っていると、目の当たりにしている現象が原因、結果、それとプロセスなのか、解らなくなる事が多くあります。そして、従来の考え方にそぐわない、例外的な現象の中から極めて重要な発見が有る場合も多くあります。ここでは、例外的な発見から重要な知見に繋がった論文を紹介したい。

(1) Unfolded conformation of α -lytic protease are more stable than its native state

J. L. Sohl, S. S. Jaswal, D. A. Agard, *Nature*, **1998**, 395, 817-819.

α -Lytic protease(α LP)はグラム陰性の土壌細菌 *Lysobacter enzymogenes* から分泌される 198 アミノ酸残基から成るセリンプロテアーゼである。 α LP は、N 末端に 166 残基からなる大きなプロ配列を持ち、in vivo および in vitro において α LPの正しいフォールディングにはプロ配列が必要である。プロ領域を欠くと、このプロテアーゼは部分的に折りたたまれた不活性状態 I となる。プロ配列は、I と N(ネイティブ状態)とを分ける障壁(遷移状態)を直接安定化することにより α LP のフォールディングを触媒していると考えられた。一般にタンパク質の折りたたみでは、N 状態のタンパク質の自由エネルギーが最小となるが、I と U がともに、N よりも低い自由エネルギー状態にあることが示された。したがって α LP の N 状態は準安定状態であり、N 状態は I 状態との間に大きな速度論的な障壁($t_{1/2}=1.2$ 年)あるために、見かけの安定性が現れていた。

(2) Energetic landscape of α -lytic protease optimizes longevity through kinetic stability

S. S. Jaswal, J. L. Sohl, J. H. Davis, D. A. Agard, *Nature*, **2002**, 415, 342-346.

(1)の続報として、さらに筆者らは、 α LP の N 状態が速度論的な安定性を通して、高いタンパク質分解耐性を獲得している可能性について調べた。タンパク質がプロテアーゼの攻撃から守り、寿命を長く保つには、N 状態をタンパク質分解から守るだけでなく、アンフォールディングを抑えること(アンフォールディング構造は分解を受けやすい)やプロテアーゼが接触しやすい Open 構造(揺らいだ構造、局所的にアンフォールドした構造)も抑えられなければならない。重水素交換反応と NMR 測定により、N 構造のタンパク質の揺らぎを解析し、さらに実際にプロテアーゼ耐性実験、変異酵素も用いたフォールディング実験を行うことで、 α LP が高いタンパク質分解耐性を獲得した理由について、(1)非常に遅いアンフォールディング速度(アンフォールディング構造はタンパク質分解を受ける)、(2)局所的なアンフォールディングの抑制、の2点が関与していると筆者らは考察している。「進化のプロセスは、生物物理の常識をも覆す。」という鮮烈な印象を持った。

(3) Persistence of native-like topology in a denatured protein in 8 M urea.

D. Shortle, M. S. Ackerman, *Science*, **2001**, 293, 487-489.

同じく、常識を覆した論文と言える。一般には、タンパク質を尿素や塩酸グアニジン等の化学的変性剤に晒すと、その濃度に応じてネイティブ構造が徐々に崩れ、最後には完全にランダムコイル状態になると言われている。しかしながら、筆者らは *Staphylococcus* 由来のヌクレアーゼを材料に、変性環境下における構造について調べたところ、ネイティブ状態に近い構造が8M尿素存在下でも存在していることを報告している。

(4) Long range interactions within a nonnative protein

J. Klein-Seetharaman et al., *Science*, **2002**, 295, 1719-1722.

(3)で紹介したような、タンパク質フォールディングの現象における非ネイティブ状態は、生体内においては、種々の疾患の原因、特にアルツハイマー病などにおける神経毒性との関連が指摘されている。筆者らは、NMR と部位特異的変異操作を組み合わせ、リゾチームの非ネイティブ状態の解析を行い、非常に強固な疎水クラスターが高濃度の変性剤に晒した状態でも存在することを明らかにしており、またその構造が、わずか1アミノ酸の置換(Trp62Gly)によって、完全に消失することを示している。

タンパク質は、ネイティブ構造(N)とアンフォールドした構造(U)の二つの構造が分光的に安定に存在しうると考えられてきた(Anfinsen のドグマ)。このような階層的なフォールディング過程は全てアミノ酸配列によって決定されると考えられてきたが、今回紹介したように、これとは別の経路とその構造が注目されている。常識を疑う事から、新しい発見がまだまだ見つかりそうである。



松浦和則(まつうらかずのり) 九州大学大学院工学研究院応用化学部門 助教授

ma14tcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp

名古屋から九大に移って早一年、九大有機センターのI.H先生に「もう糖はやめろ」などの叱咤激励をいただきながら頑張っております。まだまだ若輩者ですが、宜しくお願いいたします。

Ultrafast Holographic Nanopatterning of Biocatalytically formed Silica

L. L. Brott, R. R. Naik, D. J. Pikas, S. M. Kirkpatrick, D. W. Tomlin, P. W. Whitlock, S. J. Clarson, and M. O. Stone, *Nature*, **2001**, 413, 291-293.

珪藻類は、非常に複雑で入り組んだシリカを生理的条件下で作り出す能力をもっているため、材料の研究者から注目されています。この論文では、珪藻類の *Cylindrotheca fusiformis* 由来のカチオン性ペプチドを、二光子励起光重合でパターン化した高分子表面に固定し、そのペプチド触媒による穏和な条件でのシリカのナノパターンを作成することに成功しています。この有機/無機ハイブリッド材料はホログラフィーなどの光

学材料として興味深いと思われます。

Spontaneous in Vitro Formation of Supramolecular β -Amyloid Structures, “ β amy Balls”, by β -Amyloid 1-40 Peptide

A. Westlind-Danielsson and G. Arnerup, *Biochemistry* **2001**, *40*, 14736-14743.

アルツハイマー病にかかわっているA β ペプチドで、 μm オーダーのアミロイドのボール “ β amy Balls”を作ったという話。通常のアミロイドフィブリル化の濃度よりも高濃度(600 μM 程度)にすると、20-200 μm の β amy Balls ができるらしいです。 β -ペプチドによる超分子構築は今後面白そうな気がします。

Template-Directed Assembly of a *de Novo* Designed Protein

C. L. Brown, I. A. Aksay, D. A. Saville, and M. H. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, in press. (web 公開)

彼らが*de Novo*デザインした β -シートペプチドを高配向グラファイト(HOPG)上に吸着させると、三回対称の配向軸に沿ってアミロイド様のペプチド集合体得られることがわかったらしい。HOPG上で合成高分子がきれいに並ぶ話はすでに知られているので、それをアミロイドでやっただけのような気もしますが…。

A Robust DNA Mechanical Device Controlled by Hybridization Topology

H. Yan, X. Zhang, Z. Shen and N. C. Seeman, *Nature*, **2002**, *415*, 62-65.

この論文では、DNA のハイブリダイゼーショントポロジーの変化を利用して、DNAを燃料とした力学デバイスを報告しています。文章だけで説明するのは難しいので原報を見ていただきたいのですが、DNA ハイブリダイゼーション様式の違いによって、DNA鎖が180°回転するような設計になっています。AFM像はきれいだったなあ。

DNA-Directed Assembly of Biotinylated Complexes from In Vivo Biotinylated NAD(P)H:FMN Oxidoreductase and Luciferase

C. M. Niemeyer, J. Koehler, C. Wuerdemann, *ChemBioChem*, **2002**, *3*, 242-245.

この論文では、DNA 上にカスケード反応する酵素を並べることで、反応効率が向上することを述べています。アビジン固定化したプレート上にビオチン化したテンプレートDNAを固定化し、そこにビオチン-アビジンを介して酵素(NADH-FMN oxidoreductase と luciferase)がくっついたDNAをハイブリすることで、DNA鎖にそって酵素を並べることができたらしい。一本のDNAテンプレート上に酵素を並べた方が、2倍ほど効率がよかったです。べつにDNAじゃなくてもいいんじゃないか？と言われそうですが…。

Photoswitchable Multivalent Sugar Ligands: Synthesis, Isomerization, and Lectin Binding Studies of Azobenzene-Glycopyranoside Derivatives

O. Srinivas, N. Mitra, A. Surolia, and N. Jayaraman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 2124-2125.

アゾベンゼンの光異性化を利用して、糖のレクチン認識性をスイッチングするというもの。cis と trans で結合定数が4倍くらい違うという結果だった。まあ、誰でも思いつきそうな研究と言えるだろう。著者らは、

“Although a number of multivalent glycosides have been tested previously, no report concerning the existence of cooperativity is reported so far” と言っているが、そんなことはない。

A Model System Mimicking Glycosphingolipid Clusters to Quantify Carbohydrate Self-Interactions by Surface Plasmon Resonance

M. J. Hernaiz, J. M. de la Fuente, A. G. Barrientos, and S. Penades, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 1554-1557.

糖はレクチンだけでなく、糖鎖間で分子認識することが知られています。この論文は、 Le^x 間の自己糖鎖間相互作用を表面プラズモン共鳴(SPR)で解析している。金基板上の Le^x 単分子膜に対し、 Le^x を固定した金微粒子を吸着させるという工夫をしています。金微粒子を使うことで表面プラズモン効果が増強され、感度良く観察できるようです。でも、糖鎖間相互作用を SPR で見るというのは、我々の方が先に報告している(*J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 7406)。

Artificial Regulation of Transcription Applying Carbohydrate-Lectin Interaction

K. Matsuura, K. Hayashi, and K. Kobayashi, *Chem. Commun.*, **2002**, 1140-1141.

これはおまけですが、プラスミドにラクトースをくっつけてレクチンと糖クラスターで mRNA への転写を on-off 制御できることを示しました。「でも結局 *in vivo* じゃ使えないじゃん」「はぁ、よく言われます…」



小野 慎(おの しん) 富山大学工学部物質生命システム工学科助教授

shinono@eng.toyama-u.ac.jp

普段はあまり論文を読みませんが、4年ほど前から Biochemistry だけは目を通すようにしています。ペプチドを利用して役に立つ面白いものを創りたいと考えているので、面白そうな蛋白質や機能が載っていれば一応 check しておくためです。いつの日かこの情報の中からアイデアが生まれると信じてページをめくっています。

個人的な興味で選んでいますので、会員の方に参考になるかはわかりませんが、4つほど簡単にご紹介します。

現在 アミラーゼ阻害剤の研究を行なっているところに、ヒト膵臓 アミラーゼについて 2 報見つけました。

1. Probing the Role of the Chloride Ion in the Mechanism of Human Pancreatic α -Amylase

Shin Numao, Robert Maurus, Gary Sidhu, Yili Wang, Christopher M. Overall, Gary D. Brayer, and Stephan G. Withers, *Biochemistry*, **41**(1), 215-225 (2002).

アミラーゼは塩化物イオン依存性 & 非依存性に分けられます。ヒト膵臓 アミラーゼは塩化物イオン依存性

です。その塩化物イオンの結合サイト周辺の部位特異的変異体を用いて、X線結晶解析と酵素活性の変化を丁寧に調べています。塩化物イオン結合サイトの Arg 残基の影響を特に調べており、変異導入によって立体構造に大きな変化がないこと、塩化物イオン結合能の消失に伴ってアミラーゼ活性が低下したり最適 pH が変化したりすることなどを報告しています。

2. Mechanistic Analyses of Catalysis in Human Pancreatic α -Amylase: Detailed Kinetic and Structural Studies of Mutants of Three Conserved Carboxylic Acid

Edwin H. Rydberg, Chunmin Li, Robert Maurus, Christopher M. Overall, Gary D. Brayer, and Stephan G. Withers, *Biochemistry*, **41**(13), 4492-4502 (2002).

論文1と同じグループが、今度はアミラーゼ活性の活性カルボキシ基の効果を調べています。手法は前報と同様に、活性残基といわれる Asp、Glu の部位特異的変異体を作り、X線での構造解析と酵素活性の変化を検討しています。構造解析から変異導入によって立体構造に大きな変化がないことを確認し、Asp197、Glu233、Asp300 の活性への影響を調べています。結論として、ヒト膵臓 アミラーゼのグリコシド結合の加水分解では、Asp197 が nucleophile として、Glu233 は一般酸塩基触媒基として機能していることが示唆され、Asp300 は加水分解を受けもつ水分子との相互作用に関係している可能性があるとのことでした。

3. The α A-Crystallin R116C Mutant Has a Higher Affinity for Forming Heteroaggregates with α B-Crystallin

Sibes Bera and Edathara C. Abraham, *Biochemistry*, **41**(1), 297-305 (2002).

歳をとるにつれて視力の低下が気になるため、視力に関する話に関心を持つようになりました。水晶体は目のレンズの働きをしており、その中にはクリスタリンという水溶性蛋白質が多く含まれて透明性を保っています。この水晶体が混濁すると白内障になるわけです。クリスタリンには少なくとも 3 種類(, ,)があり、本題の クリスタリンは A、B2 つのサブユニットを成分とする不均一の集合体として存在しています。先天性白内障はこの クリスタリンの A サブユニット中にある 161 位 Arg が Cys へ変異することと関連があります。

そこで A サブユニットの変異体 R161C を作り、B サブユニットとの会合様式や性質を調べています。結果としては確かに、R161C 変異 A サブユニットは B サブユニットと会合して、天然型とは異なる会合体を形成することが示されました。さらに、 クリスタリンにはシャペロン作用があることが見つかったのですが、このシャペロン作用も変異 A サブユニットから作られる クリスタリンでは低下していました。著者らとしては、しかしながら、今回見られた会合様式の変化は先天性白内障の主要因としては考えられないとの結論です。(このようなクリスタリンの研究から、白内障の予防法でも早く見つかるとうれしいのですが)

4. PA₆₃ Channel of Anthrax Toxin: An Extended β -Barrel

Shilla Nassi, R. John Collier, and Alan Finkelstein, *Biochemistry*, **41**(5), 1445-1450 (2002).

ポリペプチドの構造の中でも、 構造に多少の興味を持っているので、 バレルというタイトルに惹かれました。論文にも7量体を作ったタンパクがその一部を提供し合って膜を貫通した バレルを形成している絵が載っています。釣られて読んでみると、炭疽菌の毒素の話でした。

炭疽菌の毒素は防御因子 PA、浮腫因子 EF、致死因子 LF で構成されています。PA は細胞に結合して穴

をあけて EF と LF を細胞内に入れる役割をするため、毒性発現には必須です。この PA が膜中で作る穴がバレル構造らしいのです。プロテアーゼ作用によって活性化された PA(PA₆₃)は細胞膜上で7量体を形成し、エンドソーム内に取り込まれて低pH環境に置かれると、PA1分子が2本ずつのストランドを提供して14本のストランドでできたバレルを作り、カチオン選択性のチャネルが形成されます。この論文では膜中での構造解析は難しいためか、この膜貫通ドメインのほとんどすべての残基(前報を含めて, *Biochemistry*, **37**, 3941-3948 (1998))を Cys に変換した変異体を作り、チオールに特異的な試薬を使ってそれら変異体を作るチャネルへの影響を精査しています。結果としては、チオール試薬による影響のパターンから膜中でのバレル構造の構築を証明し、バレルを形成している部位が特定されています。この論文では変異体だけでも50以上作られています。頭が下がる思いがしました。



中村 史(なかむら ちかし) 産業技術総合研究所ティッシュエンジニアリング研究センター 主任研究員 chikashi-nakamura@aist.go.jp

最近気になった論文を研究室のメンバーから1つずつ、計4つ紹介します。各自のテーマ、「趣味」が反映されています。

1. 中村 史

Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity

Benjamin T. Houseman, Joon H. Huh, Stephen J. Kron, and Milan Mrksich, *Nature Biotechnology*, **20**, 270-274 (2002).

ペプチドチップ作製に関する論文である。まず、金基板上にヒドロキノン-PEO-アルカンチオールコンジュゲートとペンタエチレングリコール-アルカンチオールコンジュゲートの混合自己集合膜(SAM)を形成する。ヒドロキシンの酸化を行った後に、ペンタジエン修飾ペプチドを Diels-Alder 反応により固定化し、ペプチドマイクロアレイを作製した。単純なスポットティングによる方法で、0.2~1 mm 程度のアレイが作製できる。また、標識抗体による結合試験の結果から蛍光検出に十分な量のペプチドが固定化できており、バックグラウンドも小さくタンパク質の相互作用解析などに優れたマイクロアレイであると筆者らは主張している。

このような「後のせ」方式が、ペプチドでも可能ならば、ピコリットルインジェクションの技術などと組み合わせることで、さらなる高密度化が可能と考えられる。ソフトばかりを追いかけているうちに、メディア開発がかなり進んできたようだ。

2. 長谷川みき(産総研非常勤職員)

A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells

May C. Morris, Julien Depollier, Jean Mery, Frederic Heitz, and Gilles Divita, *Nature Biotechnology*, **19**,

1173-1176 (2001).

HIV-1 の転写調節タンパク質である Tat タンパク質のうち、PTD(protein transduction domain)と呼ばれる 11 アミノ酸残基のペプチドにタンパク質を結合させると、そのタンパク質が細胞内へ導入されることがこれまで多く報告されている。これを利用することで体全体のあらゆる組織へ外来タンパク質、遺伝子を導入することが可能となり、医療の分野でも注目されているペプチド配列である。しかし PTD と目的タンパク質を結合させるには化学結合やクローニングといった手間がかかる。そこで著者らは短い両親媒性ペプチドを用いて細胞内への導入を行っている。Pep-1 と名付けられた 21 残基の両親媒性ペプチドは、目的のタンパク質やペプチドと混合するだけで疎水結合により複合体を形成し、細胞内へ導入されることが確認されている。また、 β -ガラクトシダーゼと pep-1 の複合体を細胞へ添加したところ 80%以上の効率で細胞内へと導入され、 β -ガラクトシダーゼの正常な活性を示すことが確認された。さらに抗体といった大きなタンパク質の細胞内導入にも成功している。

3. 武田晴治(産総研特別研究員)

Detection of Single PSS Polymers on Rough Surface by Pulsed Force Mode Scanning Force Microscopy

Min Zhu, Sabri Akari, and Helmuth Mohwald, *Nano Letters*, **10**, 569-573 (2001).

基板上に吸着または固定化された分子を原子間力顕微鏡(AFM)により観察する際に、基板が平坦であることが要求される。このため、通常、吸着させる基板には、mica や Au(111)などの基板が用いられる。この報告では、通常の Tapping mode で得られたイメージ像と AFM 探針と試料間に作用した力のイメージ像を同時に測定して比較することにより今までは困難であった、約 6nm 程度の凸凹のある基板にあるポリマーの認識に成功している。ここで用いられている測定方法は AFM 探針と試料に作用した力を、新たに開発した Pulsed Force Mode により、試料表面上を走査しながら測定するものである。Pulsed Force Mode では、探針を 700 ~ 800Hz で Tapping させ、探針がたわむ最大の力から探針と試料に作用する力を、また、通常の Tapping 測定と同様に探針の振幅を利用して高さ情報を得ている。

複数の情報 (摩擦力、位相等)を同時に得ることにより、基板上的分子を認識する方法は既に報告されている。相互作用の力と高さ情報の同時比較することにより、既存の方法では認識できなかった凸凹のある基板上的分子を認識する方法が開発された。

4. 小幡谷育夫(NEDO フェロー)

Directly observed covalent coupling of quantum dots to single-wall carbon nanotubes

B. R. Azamian, K. S. Coleman, J. J. Davis, N. Hanson, M. L. H. Green, *Chem. Commun.*, 366-367 (2002).

最後にカーボンナノチューブ(CNT)の論文を紹介したい。畑違いと思われるかもしれないが、その特異なナノ構造と生体分子(タンパク質や核酸)を利用し、デバイスや機能材料の創製を目指す研究が勃興しつつあるからである。CNT の機能化や新たな材料への応用を目指す場合には、生体分子を含めた化学修飾技術が必要となってくる。Smally らが CNT を強酸で処理することによって酸化できることを報告して以来、CNT を共有結合的に化学修飾する様々な研究が行われており、この論文のその中の一つである。著者らは市販の Single-wall nanotube を用い、硝酸処理を施すことによってカルボン酸に酸化させている。この CNT に金コ

ロイド溶液を加えたものを原子間力顕微鏡(AFM)で観察しても CNT 表面への金コロイドの結合は観測されない。しかし、カルボン酸に2-アミノエタンチオールのアミンをアミド結合させた CNT について AFM で観察したところ、CNT の表面に金コロイドが結合していた。これは、CNT にアミド結合を介してチオールを修飾できたことを示唆する。このことから、CNT の先端だけでなく、表面にもカルボン酸を出すことができ、さらに化学修飾を施すことができることが示された。(生体分子を用いている研究としては、*Nature* 394, 52-55, (1998) 等も参照されたい。)



大庭 亨(おおば とおる) 分子科学研究所 分子スケールナノサイエンスセンター 助手
tob@ims.ac.jp

4月に宇都宮大学から分子研に異動しました。古巣から一緒にやって来た学生さんと新しい研究室を立ち上げつつ、これまでの不勉強を解消するために論文をむさぼり読んでおります。私のグループでは分子間会合、特に蛋白質が関わるそれをキーワードに、新しい材料やデバイスの基礎作りを目指しています。ここでは蛋白質の分子認識と会合を中心に、最近の論文を紹介したいと思います。

情報伝達系は蛋白質-蛋白質相互作用の宝庫です。とりわけ、チロシンキナーゼ「Src」は最もユニークな例でしょう。Src は3つのドメイン(SH2、SH3、キナーゼ)から成る AND 型分子スイッチで、OFF の状態では各ドメインがそれぞれ体の別の部分と結合した(右手は左膝に、左手は右肩にといった感じ)、言わば「ひとり円固め」状態にあります。2つのドメイン(SH2、SH3)が外来のシグナル分子と結合してこの「ひとり円固め」状態がほどけると、それに伴ってキナーゼドメインにある活性部位のコンフォメーションも変化し、スイッチは ON になります。このスイッチング機構を文章だけで表現するのはなかなか骨ですが、分かりやすい絵が最近の review(下記2報)に出ていますので詳しくはそちらをご覧ください。

The conformational plasticity of protein kinases.

M. Huse, J. Kuriyan, *Cell* **2002**, 109, 275-282.

The modular logic of signaling proteins: building allosteric switches from simple binding domains.

W. A. Lim, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 12, 61-68.

さて、次の論文はこの Src を OFF にする分子スイッチ「Csk」の結晶構造についての報告です。Csk は Src と比較的好く似た分子(450 残基、51 kDa)で、ドメイン構成も同じ(SH2、SH3、キナーゼ)ですが、末端に SH2 結合部位をもっていないので「ひとり円固め」はできません。また、Src の活性部位には活性状態のコンフォメーション維持に必須とされるチロシンがありますが、Csk の相当する位置にはチロシンが存在しません。つまり、Csk のスイッチング機構は Src とは異なるはずで

1) Structure of carboxyl-terminal Src kinase, Csk.

A. Ogawa, Y. Takayama, H. Sakai, K. T. Chong, S. Takeuchi, A. Nakagawa, S. Nada, M. Okada, T. Tsukihara, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 14351-14354.

この結晶には、活性部位の構造が異なる2種類の Csk 分子が含まれていました。一方は問題のチロシンがないにも関わらず、ループやヘリックス、塩橋の位置などが活性型 Src の活性部位によく似ています。もう一方では活性部位内の塩橋が切れていて、全体的に緩んだコンフォメーションになっていました。活性部位の上にはちょうど各ドメインを結ぶリンカーが載っていますが、リンカーと活性部位との接触の仕方がこれら2種類の分子では異なっています。このことから著者らは、この接触の仕方が変化することによって活性部位のコンフォメーションが変化し、分子スイッチとしての ON と OFF が切り替わるのではないかと推測しています。

上出の SH3 ドメインは実はアミロイド繊維を形成する蛋白質の一つですが、そうしたアミロイド繊維化を抑制する分子の報告がありましたので(本会会員は既にご存知かと思いつつも)簡単に記します。これも蛋白質の会合(蛋白質と低分子の会合)が重要な役割を果たしている例です。

2) Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis.

M. B. Pepys *et al.* *Nature* **2002**, *417*, 254-259.

著者らの戦略は serum amyloid P component (SAP; PDB に構造があります 1SAC) と呼ばれる蛋白質がアミロイド繊維の中に必ず含まれていることに着目したもので、SAP のアミロイドへの供給を断れば繊維化を食い止められるのではないかと考えています。彼らは SAP に強く結合する化合物(両端に D-プロリンをもつ直線状分子)をランダムケミストリー的手法で見出しています。結晶構造から、この化合物のプロリン部分が SAP 表面の疎水的ポケットと非共有結合的に相互作用すること、両端のプロリンがそれぞれ別の SAP 分子と相互作用するために、ちょうどこの化合物がリンカーとなって SAP を会合させることが分かります。このプロリン誘導体にはマウスおよびヒトの体内から速やかに SAP を排出させるはたらきがあり、マウスではアミロイド繊維の形成も抑制されたとの由。著者らはプロリン誘導体による SAP 会合体の形成が SAP の排出と体内濃度の減少を促し、アミロイド繊維の形成を抑制したのではないかと考えています。

次の論文は、疎水的なヘリックスに結合する人工分子をラショナルケミストリー的に見出した例です。

3) Design of a protein surface antagonist based on α -helix mimicry: Inhibition of gp41 assembly and viral fusion.

J. T. Ernst, O. Kutzki, A. K. Debnath, S. Jiang, H. Lu, A. D. Hamilton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 278-281.

HIV ウイルスが標的細胞に融合・侵入する際の手助けをする蛋白質を、ベンゼン環が3つつながったターフェニルという簡単な化合物で認識するものです。この蛋白質が機能するには6ヘリックスバンドル構造が形成される必要があるので、そうしたヘリックスの疎水的な面に特異的に結合する分子を作って、構造形成を阻害してやろうというわけです。ターフェニルに導入した置換基の効果が CD スペクトルと ELISA から評価されています。この分子の設計思想についてはむしろ前報(B. P. Orner *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5382-5383)の方が詳しいのですが、3つのベンゼン環の位置がヘリックスのピッチにうまく適合すること、どの環も環-環結合を軸として回転し得ること、各ベンゼン環に疎水性置換基(イソブチル基、イソプロピル基、ベンジル基)を導入していることが、目的のヘリックスに対する induced fit を促していると考えられます。

疎水的な面に結合する例といえば、相手は蛋白質ではありませんが1年前に出た次の報告を興味深く思い出します。

4) Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization.

R. J. Chen, Y. Zhang, D. Wang, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3838-3839.

カーボンナノチューブとピレン誘導体とを DMF に溶解し、これを蛋白質水溶液に加えると、ピレン環がナノチューブの外壁に疎水性相互作用で貼り付く。更にピレン側鎖のヒドロキシスクシンイミドエステルが蛋白質表面のアミノ基と反応して、蛋白質とカーボンナノチューブとがピレン誘導体を介して結び付いた複合体が形成される。鉄結合蛋白質フェリチンと導電性をもつカーボンナノチューブのバンドルは、ナノテク的に意味深長です。

アポ蛋白質への補因子の結合やフォールディングは、蛋白質の「内側」で起こる会合現象と考えることができます。補因子とその周囲とはどのような関係にあるのか。次の論文はミオグロビンのヘムとヘムポケットの関係を MD 計算からシミュレートしたものです。

5) Heme distortions in sperm-whale carbonmonoxy myoglobin: correlations between rotational strengths and heme distortions in MD-generated structures.

C. Kiefl, N. Sreerama, R. Haddad, L. Sun, W. Jentzen, Y. Lu, Y. Qiu, J. A. Shelnut, R. W. Woody, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3385-3394.

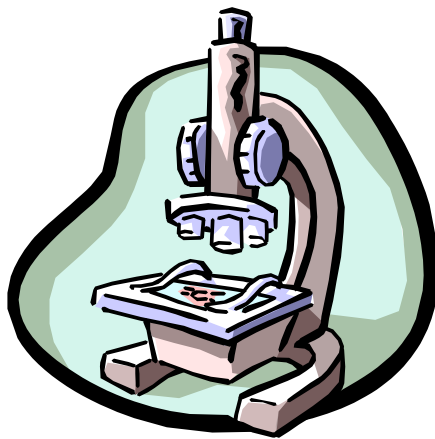
ヘム分子(Fe-protoporphyrin IX)にはよく見ると「表と裏」(面不斉)があります。そこで、コンピューター上で本来の向きとは面を逆さにヘムを入れたミオグロビンを作り、これと本来の向きにヘムが入っているミオグロビンとを MD にかけて、600 ps 間の振動の仕方からヘムの歪み方の特徴を抽出、比較しています(各瞬間の構造に、サドル型、ドーム型、プロペラ型などの6つの構造的要素がどれだけ含まれているかが調べられている)。その結果、例えばポルフィリン環がドーム型の構造をとるような振動モードが現れる場合には、どちらの面を「表」にして入れてみても近位 His の方向に膨らんだドームができるといった具合に、「表」か「裏」かに関わら

ずヘムはヘムポケットの構造的特徴を反映した歪み方をとると結論されています。計算の初期条件と 600 ps という観測時間にまだ検討の余地があることは著者らも認めています。解析手法とその結果がもつ意味合いには興味深いものがあります。

アポ蛋白質への補因子の結合とフォールディングは、例えば光合成蛋白質中のクロロフィルのように補因子が蛋白質内に閉じ込められている場合には同一の問題となります。この問題はヘム蛋白質についてはよく調べられていますが、クロロフィル蛋白質についてはほとんどありません。これはクロロフィル蛋白質の構造が一般に複雑なためですが、紅色光合成細菌の光捕集蛋白質「LH」は非常に簡単な構造をとっており、クロロフィル蛋白質のフォールディングを考える上での良いモデルとなると考えられます。次の論文は必ずしもそのことを意識しているわけではありませんが、重水素や ^{13}C でラベルしたサンプルを用い、溶媒や測定方法を工夫して、LH中のバクテリオクロロフィルのNMRシグナルをフルアサインメントした力作で、LHのフォールディング過程を調べるための基礎を提供してくれるように思われます。

6) Selective detection and assignment of the solution NMR signals of bacteriochlorophyll *a* in a reconstituted subunit of a light-harvesting complex.

Z.-Y. Wang, Y. Muraoka, M. Shimonaga, M. Kobayashi, T. Nozawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1072-1078.





お知らせコーナー

会員異動

佐藤 智典 氏 (2002年4月より)

慶應義塾大学 理工学部 生命情報学科 教授

〒223-8522 横浜市港北区日吉3-14-1

電話:045-566-1771

FAX:045-566-1447

E-mail : sato@bio.keio.ac.jp

(2002年4月より電子メールアドレスが変更になっています。旧アドレスは10月以降使用できなくなります。)

横山 憲二 氏 (2002年4月より)

独立行政法人 産業技術総合研究所 先端バイオエレクトロニクス研究ラボ 副研究ラボ長

〒305-8562 つくば市東 1-1-1 つくば中央第4事業所

TEL&FAX:0298-61-2987

E-mail: ke-yokoyama@aist.go.jp



受賞のお知らせ

多比良 和誠氏(東京大学大学院工学系研究科;産総研ジーンディスク
バリーセンター併任)

(1) 日経 BP 技術賞(2002 年)

「高効率リボザイムの開発」

(2) 第二回バイオビジネスコンペ JAPAN 優秀賞(2002 年)

「世界初のプールポピュレーションを減らさず新規機能性タンパク質を選
択する手法 の開発とそのポテンシャル」



関連シンポジウム

第4回 RNA ミーティング(第4回日本 RNA 学会年会)および
文部科学省特定領域研究「RNA 情報網」第1回国際シンポジウムのお知らせ

会 場: つくば国際会議場(つくば市竹園 2-20-3)

会 期: 「RNA 情報網」第1回国際シンポジウム 2002年7月15日(月)~16日(火)

第4回 RNA ミーティング 2002年7月16日(火)~18日(木)

スケジュール

7月15日(月) 午後 特定領域国際シンポジウム(公開)

7月16日(火) 午前 特定領域国際シンポジウム(公開)

午後 第4回 RNA ミーティング

7月17日(水) 終日 第4回 RNA ミーティング / (夕方 懇親会)

7月18日(木) 終日 第4回 RNA ミーティング(15:00 頃終了予定)

発表申込締切日:平成14年5月31日(金)

参加登録申込締切日:平成14年7月5日(金)

参加費:当日受付にてお支払い下さい

<会 員> 一般:13,000円, 学生:5,000円

<非会員> 一般:18,000円, 学生:7,000円

詳細は年会ホームページをご参照下さい。

ホームページアドレス:

<http://www.chem.t.u-tokyo.ac.jp/chembio/labs/taira/rna2002/>[年会専用メールアドレス:rna2002@chembio.t.u-tokyo.ac.jp](mailto:rna2002@chembio.t.u-tokyo.ac.jp)

連絡先: 世話人 多比良 和誠

〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1

東京大学大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 多比良 研究室内

第4回 RNA ミーティング(第4回日本 RNA 学会年会)事務局

TEL & FAX: 03-5841-7340

担当 東



Buffalo International Symposium**Bioorganic Reaction Mechanisms: From Determination to Practical Applications****August 15 - 17, 2002****University at Buffalo, NY****Theme:**

Much of what is known about the chemical transformations that occur in living systems has been discovered by application of the principles of organic chemistry. This symposium will highlight recent chemical studies on the mechanism of organic reactions which occur in biological systems or the mechanisms of reactions which serve as models for complex biological processes. The talks will revolve around themes of contemporary importance.

The Chemical Mechanism for Obtaining Rate Accelerations for Enzymatic Reactions.

Talks in this subject area will highlight what has been learned about enzyme catalysis from the study simple enzyme mimics which are designed to model the interactions believed to be responsible for stabilization of enzyme-bound transition states. Talks in this area will focus on studies of model systems and of enzymatic reactions which emphasize the chemical mechanisms for enzymatic catalysis.

The Chemical Mechanisms for Biological Reactions.

We will invite speakers who exemplify the best work in modern mechanistic chemistry directed towards solving problems of biological relevance. Talks in this area will focus on the de novo synthesis of small molecules and polymers which are mimics of biological molecules such as peptides and proteins.

Practical Applications of Knowledge of Bioorganic Reaction Mechanisms.

An understanding of the mechanism of biological reactions is essential to the design of therapeutic reagents to inhibit these reactions. Many such practical applications have been the direct outcomes of a better understanding of Bioorganic Reaction Mechanisms.

More detailed program please see the web site:
http://www.chem.buffalo.edu/Bioorganic_conference.html

Please note that this conference is a post-conference of the IUPAC International Symposium on Bioorganic Chemistry 2002 (ISBOC6), in Toronto. See the web site:
<http://www.chem.utoronto.ca/symposium/isboc6/about.html>