

生命化学研究 レター

No. 8 (2002年 2月)



第4回生命化学研究会シンポジウム（慶応大 2001年12月13日）参加者集合写真と
講演される杉本直己氏（甲南大）



生命化学研究会（ラフォーレ修善寺 2001年12月14・15日）参加者集合写真と
講演されるJeffery Kelly氏（Scripps Research Institute, USA）



巻頭言

雑 感

東京大学大学院理学系研究科

塩 谷 光 彦

宇宙に満ちているあらゆる複雑なものは、究極的には幾つかの力と粒子（つぶつぶ）によって説明できるらしい。このような自然界の複雑さには両極端がある。一方には、素粒子とその相互作用を支配する、美しく普遍的な法則。そして、もう一方の端には、想像もできないほどの豊かさをもつ複雑適応系がある。科学者が何かを眺めるとき、あるときはその内部へ果敢なアプローチを試み、またあるときは、視野を大きく広げて、時間を遡り、大きな距離を越えて無限大の世界で飛び込んでいく。どちらも同じくらい豊かでエキサイティングな冒険である。

生命化学研究では、どちらかと言うと、小さなスケールで起こる現象へアプローチすることが多い。それが未知のものであるとき、アイデアや物質を記述するための新しい“絵”が必要になる。先を予測し進むためには、イメージをもつことが大事だからだ。しかしながら、ターゲットにできるだけ接近してその姿や立ち振る舞いを眺めようとするとき、必ずと言ってよいほど、ものを検出する能力の限界と向き合わなければならない。これは、生物に対していわゆる還元的なアプローチをする場合だけでなく、ボトムアップ型の分子（システム）作りを行うときにも同じことが言える。作る行為自体は還元的アプローチとは逆方向かもしれないが、結局は手間をかけて作ったものの構造や動的機能を探るために、還元的アプローチが必要となるからである。さらに、これから作るべきものは、熱力学的に安定で美しく見えるものではなく、対称性が低く、分子間でコミュニケーションをとることができるより複雑なものであるはずだから、問題はいつそう厄介になる。複雑であればあるほど、我々の前に立ちはだかる壁は強靱なものになるであろう。いずれのアプローチにおいても、時空間的に日常からかけ離れたスケールのシグナルを拾うためには、途方もない装置の鎖を組み上げなければならない。生命化学が次の段階に大きく飛躍するための一つの鍵は、間違いなく、動的機能を見ること、時間依存性の機能を作ることであろう。これはとりたてて新しいこと

ではない。アイデアは昔からあった。問題は何をどうやって見つけるか。今の時代に可能な装置を使って、ターゲットを手の届く所にもってこるための方法を発明することが鍵となる。

現代分子生物学は、遺伝子の物理化学的性質やゲノムの構造を解明することに成功し、また、ある遺伝子がオンになったり、オフになったりする仕組みを明らかにすることもできた。しかしながら、たくさんの破片や断片の間で起こっているとてつもなく複雑で時々刻々と変わる相互作用を相手にしたとき、分子生物学は、そういうあらゆるものを文脈に取り込んで説明するという構造をもっていない。それを補うのが生命化学の重要な役割だとしたら、本研究会は余りにも重大で手に負えないものを背負い込んでしまったような気がする。

昨年のことだったか、小学生の息子たちに、水が沸騰したり凍ったりするのを、“つぶつぶ”で説明したことがあった。何かイメージをもってもらうためには“絵”が必要であった。彼らは最近“つぶつぶ”という言葉を使って会話をし、時折“つぶつぶ”で質問を投げつけてくるようになった。難問奇問がくると、悪戦苦闘すれど、ついにギブアップすることもある。先日、幼稚園に通う一番下の娘が、アゲハチョウが幼虫からさなぎになり、そして成虫へ育っていく様子を描いた図鑑をもってきて見せてくれた。例えば、アゲハチョウは、幼虫のときには触覚が口の両脇にあり、口自体も葉っぱを食べるのに適したがっちりした形をしている。そしてさなぎになり、何だか急に静かになったなあと思った途端、艶やかな蝶へと変身する。そして、2本の触覚は頭の方に移動し、口はいつでも伸ばせるような渦巻きストローの形に変わる。新鮮な驚きを与えてくれた娘に感謝するとともに、彼女にはまだ“つぶつぶ”を教えておかなくてよかったと、ホッとしている。尋ねられても困るからである。

(しおのや みつひこ : shionoya@chem.s.u-tokyo.ac.jp)



遺伝コードの拡張による非天然アミノ酸のタンパク質への導入

岡山大学工学部生物機能工学科 芳坂貴弘
(hohsaka@biotech.okayama-u.ac.jp)

遺伝子工学の発展によりタンパク質中のアミノ酸を自由に変換することが可能になった。しかし、ここで使用できるのは通常のタンパク質を構成している 20 種類のアミノ酸に限られる。もし 20 種類以外のアミノ酸「非天然アミノ酸」をタンパク質の特定部位へ組み込むことができれば、全く新しい人工タンパク質の合成が可能になるとともに、タンパク質の構造機能解析のための新たな方法論を生み出すこととなるだろう。

このようなタンパク質の合成法としてまず考えられるのは化学合成法である。近年のペプチド自動合成技術ならびにフラグメント連結技術の発展は、高分子量タンパク質の化学合成を可能にしつつあるが、一般的にはこの方法は低分子量のペプチドに限られてしまう。その点、生物の持つタンパク質合成系では、合成されるタンパク質の分子量には基本的に制限は無い。そこで我々は、タンパク質合成系を改変することで、非天然アミノ酸をタンパク質へ導入することを試みた。

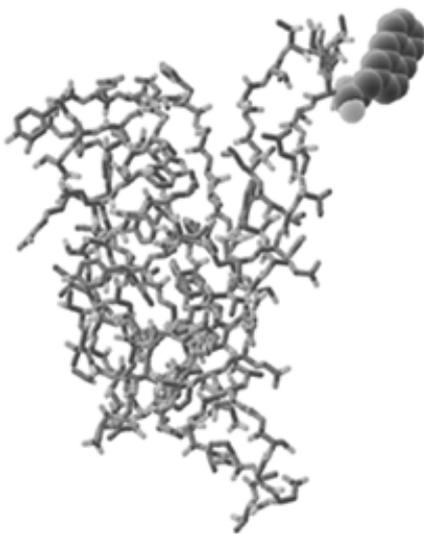


図 1 . 非天然アミノ酸を導入したタンパク質の例

(アントラセンを導入したストレプトアビジン)
タンパク質合成の仕組み：非天然アミノ酸導入のための抜け道

タンパク質合成においてアミノ酸はまずトランスファーRNA (tRNA) の 2'あるいは 3'末端に結合し、次にタンパク質合成の場であるリボソームへ運ばれる。リボソームでは3つ並びの塩基配列(コドン)からアミノ酸への翻訳が行われる。これは実際にはメッセンジャーRNA (mRNA) のコドンと、アミノ酸を運んできた tRNA のアンチコドンとを照らし合わせて、それが正しければ(アミノ酸の照合は行わずに)、アミノ酸を伸長中のペプチド鎖に組み込んでいる。したがって非天然アミノ酸を結合させた tRNA であっても、コドン・アンチコドンペアが正しく形成されてしまえば、その非天然アミノ酸はタンパク質へ組み込まれることになる。

しかし、コドンは A,C,G,U の 4 種類の文字を 3つ並べたものであるから $4 \times 4 \times 4 = 64$ 個しか存在しない。そしてそれらは天然のアミノ酸を指定する(61 個)、あるいは、タンパク質合成の終了を指定する(3 個)のためにすでに使用されている。そのため、非天然アミノ酸を導入するためには何らかの「人工コドン」が必要となる(杉本直己編、「生命化学のニューセントラルドグマ」、第9章「人工コドン」(化学同人より近日出版予定)もご参照下さい)。P.G.SchultzらおよびA.R.Chamberlinらは、終止コドンの1つUAGを非天然アミノ酸に割り当てる方法を報告しているが、この系では終結因子との競争により、非天然アミノ酸の導入効率は低くなってしまう。そこで我々は、「人工コドン」として拡張遺伝コード「4塩基コドン」を用いることを試みた。

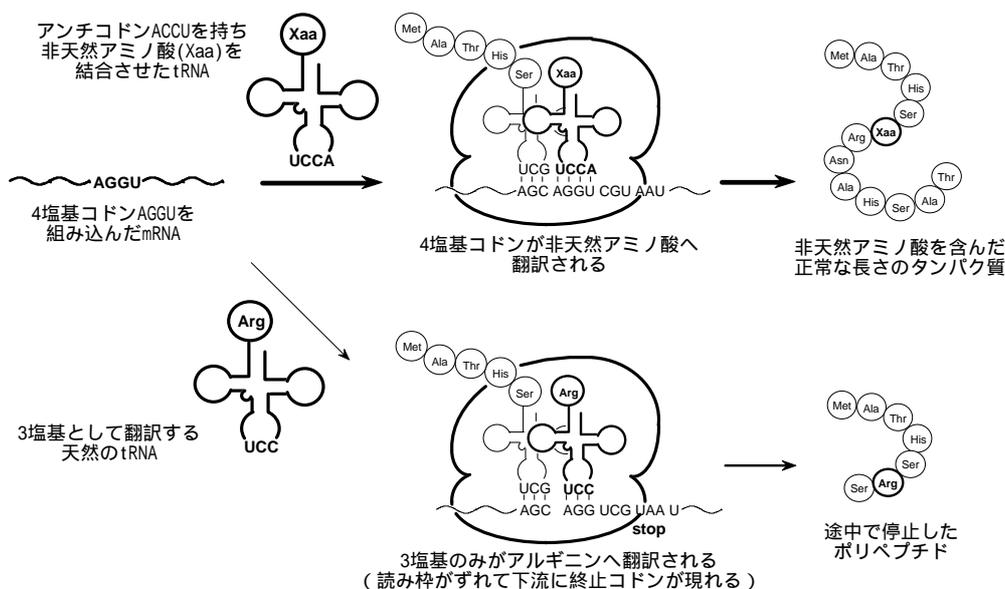


図2 . 4塩基コドンを用いた非天然アミノ酸のタンパク質への導入法の原理

4塩基コドンを用いた非天然アミノ酸のタンパク質への導入

図2には4塩基コドンAGGUを例にしてこの方法の原理を示している。まず、mRNAの非天然アミノ酸を導入したい部位のコドンを4塩基コドンAGGUへ置換する。一方、tRNAのアンチコドン部位を対応する4塩基ACCUに置換し、さらに非天然アミノ酸を結合させておく。これらが無細胞タンパク質合成系へ加えると、4塩基コドンに置換した部分が4塩基のアンチコドンを持ったtRNAによって認識され、その結果、tRNAに結合させた非天然アミノ酸は伸長中のペプチド鎖に組み込まれる。その前後のコドンは通常通り3塩基ずつ翻訳されるので、最終的に得られるタンパク質には、4塩基コドンで指定した部分にのみ非天然アミノ酸が導入されていることになる。ただし4塩基コドンに置換した部分でも最初の3塩基のみが天然のtRNA(この場合はArg-tRNA)によって読み取られる可能性がある(図2下)。しかしこの場合は下流の読み枠にずれが生じ、その結果現れる終止コドンによりタンパク質合成は途中で終了してしまう。ここで、AGGは大腸菌においては使用頻度が低いコドン(マイナーコドン)であり、それに対応してアンチコドンにCCUを持つtRNA量も非常に少ないことが知

られている。したがって、そのようなマイナーコドンを拡張した4塩基コドンでは、3塩基による翻訳が極力抑えられることになる。

実際の実験は図3に示すようにして行われた(1)。まず、ビオチン結合タンパク質であるストレプトアビジンの合成遺伝子を持ったプラスミド(pGSH)から、その83番目のチロシンに対応するコドンTATを4塩

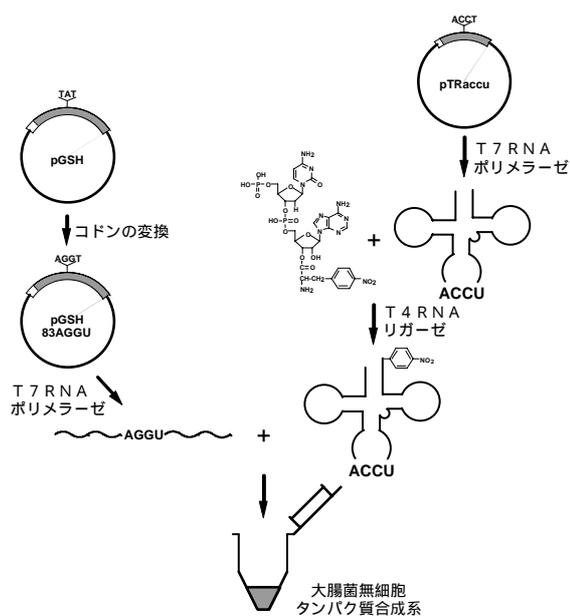


図3 . 非天然アミノ酸を導入するための実験スキーム

基コドン AGGT に組み換えたプラスミド (pGSH83AGGU) を作製した。次にこれを鋳型として T7 RNA ポリメラーゼにより mRNA を合成した。一方、酵母のフェニルアラニン tRNA の骨格を持ちそのアンチコドン部分を ACCU とした tRNA の遺伝子 (pTRaccu) を作製し、mRNA と同様にして T7 RNA ポリメラーゼを用いて tRNA を合成した。ただし 3' 末端のジヌクレオチドはあらかじめ欠損するようにしておいた。これにニトロフェニルアラニンを結合させたジヌクレオチドを T4 RNA リガーゼにより連結させた。最後に、tRNA と mRNA とを大腸菌抽出液へ加えタンパク質の合成を行った。合成されたタンパク質の検出は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動の後、抗体を用いたウエスタンブロッティングにより行った。

その結果 (図 4) tRNA を加えない場合やアミノ酸を結合させていない tRNA を加えた場合には途中で停止した短いペプチドのみが合成されたが、非天然アミノ酸を結合させた tRNA を加えた場合には野生型と同じ長さのストレプトアビジンが合成された。このことは 4 塩基コドン AGGU が 4 塩基アンチコドン ACCU を持った tRNA により非天然アミノ酸へ翻訳されたことを示している。また、蛍光性非天然アミノ酸の導入とそのトリプシン分解ペプチドの分析から、非天

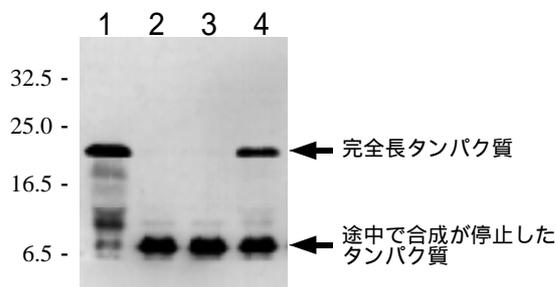


図 4 . ウエスタンブロット分析

1 : 野生型ストレプトアビジン , 2 : tRNA なし ,
 3 : アミノ酸を付加していない tRNA を添加 ,
 4 : ニトロフェニルアラニンを結合させた tRNA を添加

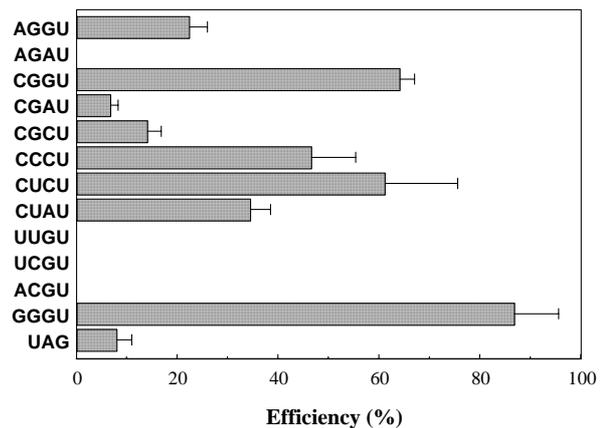


図 5 . 種々の 4 塩基コドンによるニトロフェニルアラニンの導入効率 (野生型タンパク質の発現量に対する相対値)

然アミノ酸がタンパク質中に確かに取り込まれていることが確認されている。

このようなコドンの拡張は、他の様々なコドンについても可能であった (2, 3)。図 5 には、大腸菌において比較的使用頻度の低いコドンに 1 塩基 U を付加した 4 塩基コドンの翻訳効率をまとめている。この結果、実に様々な 4 塩基コドンが使用可能であり、中でも CGGU や GGGU により非常に効率良く非天然アミノ酸の導入が可能であることがわかった。さらに付加する塩基は U に限らず、A、C、G のいずれでも良いことも確認されている。

ちなみに、終止コドン UAG を同じ系を用いた場合は 10% 程度であったことから、4 塩基コドンが従来の終止コドンよりも格段に高効率であることがわかる。

また、このように複数の 4 塩基コドンが得られたことは、複数の非天然アミノ酸をタンパク質へ同時に導入することを可能にしてくれる。実際に、CGGG と AGGU、あるいは CGGG と GGGU を同時に使用することにより、2 種類の非天然アミノ酸をタンパク質へ導入できることを確認しており (3, 4)、電子移動・エネルギー移動などへの応用を現在検討している。

遺伝コードのさらなる拡張

4塩基コドンが効率良く翻訳されたことから、さらに1塩基付加した5塩基についても検討を行なっている(5)。その結果、驚くべきことに5塩基コドンも5塩基アンチコドンを持つ tRNA によって正しく翻訳されることがわかった。コドンの拡張がどこまでリボソームに許容されるのか、興味深い問題である。

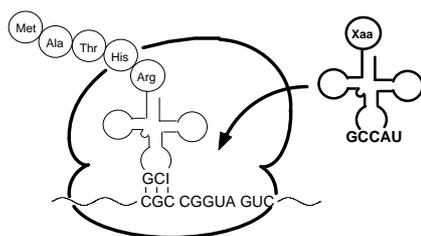


図6 . 5塩基コドンによる翻訳
5塩基コドン CGGUA が5塩基アンチコドン UACCG を持った tRNA によって読み取られる。

おわりに

4塩基コドンを用いた非天然アミノ酸のタンパク質への導入法は、タンパク質を自由自在に改変することを可能にしてくれる。しかし、実際にはいくつかの問題点が存在する。特に、非天然アミノ酸の導入部位によっては、タンパク質の活性が極端に低下あるいは完全に消失してしまう。これに対して我々は、遺伝子中のランダムな部位の3塩基コドン(あるいは4塩基コドン)へ置換できる新たな手法の開発に成功している(6)。この手法とリボソームディスプレイなどの手法を組み合わせることで、適切な導入位置を迅速に決定することが可能になる。また、非天然アミノ酸を導入したタンパク質は、現在のところ実験室レベルで数十 μ g程度しか合成できないことも大きな欠点である。この問題に対しては、細胞内でタンパク質合成を行なうための人工アミノアシル tRNA 合成酵素の開発が必要不可欠となるだろう。

なお本研究は、岡山大学工学部宍戸昌彦教授のご指導のもと、研究室の多くの方々のご協力により行われました。この場をお借りして深く感謝いたします。

参考文献

- (1) T. Hohsaka, Y. Ashizuka, H. Murakami, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 9778-9, (1996).
- (2) T. Hohsaka, D. Kajihara, Y. Ashizuka, H. Murakami, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 34-40, (1999).
- (3) T. Hohsaka, Y. Ashizuka, H. Taira, H. Murakami, M. Sisido, *Biochemistry*, **40**, 11060-4 (2001).
- (4) T. Hohsaka, Y. Ashizuka, H. Sasaki, H. Murakami, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 12194-5, (1999).
- (5) T. Hohsaka, Y. Ashizuka, H. Murakami, M. Sisido, *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3646-51 (2001).
- (6) H. Murakami, T. Hohsaka, M. Sisido, *Nature Biotechnology*, **20**, 76-81 (2002).



芳坂貴弘(岡山大学工学部生物機能工学科助手)。平成4年東京工業大学工学部生体分子工学科卒業。平成6年同大学院総合理工学研究科修士課程修了。同年岡山大学工学部生体機能応用工学科助手。平成8年学科改組により現職。新規人工タンパク質の合成や、*in vitro* タンパク質合成系と人工 tRNA を用いる新規手法の開発を進めています。

新企画!

研究の風景

北里大学理学部編

石田 斉

北里大学理学部化学科

E-mail: ishida@sci.kitasato-u.ac.jp

百聞は一見に如かず・・・というわけで、デジカメファン待望の?新企画 「研究の風景」を始めてみました(1回きりかも)。ご自身の研究室周辺の写真を元に、ご研究されている環境の雰囲気をご紹介ください。研究内容・利用している機器の紹介に利用すれば、共同研究のきっかけなどにもなるかもしれません。

ということで、一例として私が勤務している北里大学理学部をご紹介します。昨年9月に赴任したばかりで、私自身の研究はこれからですし、機器類も自分のものはほとんどありません。しかし、ここでは理学部内の機器は他研究室のものもオープンにすることで、主なものはあり、特に不自由はしないようです。建物は新しくきれいで、デザインがカッコいいです。中央に吹き抜けの学生が集まれるスペースがあり、そこにはインターネット端末が多数並んでいます。

研究室のHPはまだ出来ていない状態ですが、学部のサイトを覗いていただければ幸いです。

<http://web.kitasato-u.ac.jp/sci/>



この「研究の風景」を紹介いただける方を募集します。デジカメを使って、ご自分のお持ちの適当なソフト(WordやChemDrawでも可能)で編集していただき、お送りください。pdf fileをお送り頂いても結構です。個性的なご紹介をお待ちしています。



ワークステーション（左：CHARMM/QUANTAなど分子設計や分子動力学計算に利用）と、レーザー分光システム（右：研究室では過渡吸収スペクトルや時間分解IRが測定できます）



ナノ秒蛍光寿命測定装置（左）とX線構造解析装置（右）



NMR（左）とESR（右） 主に使用するNMRにはBrukerの300 MHzと、JEOLの400 MHzがあります



気になった論文

青木 伸 (あおき しん) 広島大学医学部助教授 (総合薬学科)

sinaoki@pharm.hiroshima-u.ac.jp (2002年4月から shinaoki@hiroshima-u.ac.jp)

石田斉先生にこのような機会をいただきましたので、構造生物学に関して、2001年に私の目についた3つのトピックスを紹介いたします。

1 K⁺ channel の構造と機能

1-1 Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter

J. H. Morais-Cabral, Y. Zhou, and R. MacKinnon, *Nature*, **2001**, *414*, 37-42.

1-2 Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution

Y. Zhou, J. H. Morais-Cabral, A. Kaufman, and R. MacKinnon, *Nature*, **2001**, *414*, 43-48.

K⁺ チャンネルは、細胞膜に存在する電位作動性イオンチャンネルの一つであり、K⁺を選択的 (Na⁺の 10000 倍) に細胞内から細胞外で輸送する6回膜貫通 (Shaker) 型蛋白である。MacKinnonらは *Streptomyces lividans* (放線菌) の K⁺ チャンネル (K_{CSA} K⁺ チャンネル) の結晶構造を 1998 年に報告した (D. A. Doyle et al. *Science*, **1998**, *280*, 69-77)。それにより、K_{CSA} K⁺ チャンネルの四量体構造とその中央に存在するチャンネル部、K⁺ 選択性を制御する K⁺ フィルターの存在などが明らかにされた (ここでは K_{CSA} K⁺ チャンネルは C 末端を切断し、結晶化に最適なサイズにした)。しかしその時の分解能が 3.2Å であったため、K⁺ フィルター内の K⁺ や水分子の詳しい挙動を議論するには不十分であった。

そこで同グループは、K⁺ チャンネルに対するモノクローナル抗体を作成し、K⁺ チャンネル-抗 K⁺ チャンネル抗体 (F_{ab}) の複合体を結晶化することによって、分解能 2.0Å の X 線結晶構造解析に成功した。また、様々な K⁺ 濃度において結晶化を行い、異なる K⁺ 濃度の存在下におけるチャンネルの構造、チャンネル内とチャンネル近傍に存在する K⁺ (7 ケ所) と水分子の位置を精密に決定した。その結果、K⁺ 濃度が低い (<5 mM) 条件下 (細胞外の K⁺ 濃度に相当する) と K⁺ 濃度が高い (>100 mM) 条件下 (細胞内の K⁺ 濃度に相当する) では、K⁺ フィルターの構造が変化すること、

それに伴って K^+ の位置も変化することが明らかになった。これらは、チャンネルが閉じて細胞外液 ($[K^+] \sim 5\text{mM}$) に接触している時と、電位変化によってチャンネルが開き細胞内液 ($[K^+] \sim 140\text{mM}$) に接触した時の構造変化に対応すると考えられる。さらに、チャンネル内で K^+ と水分子が交互に存在し、消化バケツリレー (玉突き) 式 (C. Miller, *Nature*, **2001**, 414, 23-24) に K^+ イオンが非常に速く (約 10^8 ions / sec) 輸送されるメカニズムを提唱した。

妥協を許さない厳しい姿勢、イオンチャンネルの構造解析を通じて生命の神秘に迫ろうとする研究哲学は賞賛すべきであると思う (MacKinnon らは、ごく最近 Cl^- イオンチャンネルの構造解析にも成功した。 *Nature*, **2002**, 415, 287-294 参照)。今後、電位変化による K^+ チャンネルゲート制御などの研究と結びつくことにより、 K^+ チャンネルの全体像が明らかになる日が近いに違いない。

2 I型アルドラーゼ-基質複合体の構造と反応機構

2-1 Covalent intermediate trapped in 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate (KDPG) aldolase structure at 1.95-Å resolution.

J. Allard, P. Grochulski, and J. Sygusch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2001**, 98, 3679-3684.

2-2 Observation of covalent intermediates in an enzyme mechanism at atomic resolution.

A. Heine, G. DeSantis, J. G. Luz, M. Mitchell, C.-H. Wong, and I. A. Wilson, *Science*, **2001**, 294, 369-374 (corrections, **2001**, 294, 2096).

生体内でアルドールおよび逆アルドール反応を触媒する酵素、アルドラーゼは、反応機構によってI型とII型に分類される。I型アルドラーゼの反応機構は、活性部位の Lys_{229} のアミノ基が、基質であるカルボニル基質 (例えば FDP (D-fructose-1,6-diphosphate) aldolase は dihydroxyacetone monophosphate (DHAP) を基質とする) と縮合してエナミンを生成、オレフィン部がアクセプター (求電子試薬) のアルデヒド基に 1,2-付加した後、エナミンの加水分解によって生成物が遊離するものと推定されている。しかしこれまでは、間接的な証明しかなかった。

最近、基質と共有結合した2つのI型アルドラーゼ (KDPG (2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate) aldolase (論文 3-1) と DERA (D-2-deoxyribose-5-phosphate aldolase) (論文 3-2)) の結晶構造解析結果が報告された。3-1 は、pyruvate 存在下、pH4.8 で Lys_{133} のアミノ基が pyruvate に 1,2-付加した carbinolamine をもつ KDPG aldolase の構造を明らかにした。一方 3-2 は、DERA の wild type と D-2-deoxyribose-5-phosphate (DER) から carbinolamine 型、DERA の活性に重要であると考えられる Lys_{201} を Leu に変異させた K201L mutant と DER からは Schiff base 型 の中間体の構造を報告した。これらの論文によって、I型アルドラーゼの反応中間体が証明され、反応機構がより詳しく議論できるようになった。Schiff base の脱プロトン化機構に若干議論の余地があると思う

が(脱プロトンを行いうるアミノ酸残基が必ずしも Schiff base の α -水素の近傍に存在しない)、非常に重要な論文である。

3 炭疽菌毒素の構造

Crystal structure of the anthrax lethal factor.

D. Pannifer, T. Y. Wung, R. Schwarzenbacher, M. Renatus, C. Petosa, J. Bienkowska, D. B. Lacy, R. J. Collier, S. Park, S. H. Leppla, P. Hanner, and R. C. Liddington, *Nature*, **2001**, *414*, 229-233.

炭疽病の病原体である炭素菌(*Bacillus anthracis*)は、1877年コッホによって発見された好気性のグラム陽性桿菌である。この病原菌が分泌する毒素は3種類の成分、浮腫因子(Oedema Factor:OF)、致死因子(Lethal Factor:LF)、防御抗原(Protective Antigen:PA)からなり、菌が免疫系から逃れるのを助け、感染した宿主の生命を奪うこともある。上記3成分のうち致死因子(LF)は炭疽病の発症に不可欠な蛋白であり、MAPKK(Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase)を特異的に切断するプロテアーゼであることが報告されている。LFおよびLFとMAPKK-2のN末端残基の複合体の結晶構造を報告したのが本論文である。LFは4つのドメインから成り、その内ドメインIVが亜鉛メタロプロテアーゼであることが明らかになった。活性中心に存在する亜鉛イオンにはHis686、His690、Glu735、1分子の水分子が配位している。これはカルボキシペプチダーゼ型の配位構造である。今後、従来カルボキシペプチダーゼ阻害剤やカーボニックアンヒドラーゼ(炭酸脱水酵素)阻害剤(例えばアセタゾラミド)などの亜鉛酵素の阻害剤が、抗炭疽菌剤として再度注目されるであろう。



王子田 彰夫(おうじた あきお) 九州大学大学院・工学研究院・応用化学部門助手
ojidatcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp

企業からの出戻りでこの分野に入って参りました。生命化学研究会に入会したばかりの若輩者でございますが、今後ともどうぞよろしくお願い致します。

今回は'亜鉛イオン'にテーマを絞って最近の文献を紹介したいと思います。生体内の亜鉛は、亜鉛酵素などの触媒活性を担う'catalytic zinc'、ジンクフィンガーなどの代表される高次構造の保持に働く'structural zinc'として周知されております。その一方で神経伝達に関わる'chemical mediator'として、また β -アミロイドの形成、アポトーシスなど、亜鉛イオンの生体内でのさらなる

役割が注目されています。その機能解明には細胞内亜鉛イオンの動的かつ経時的な挙動の可視化が重要になります。亜鉛イオンにも過去のカルシウム物語と同じように生体内での重要な役割が未知のまま残されているのかもしれませんが……

Conversion of a maltose receptor into a zinc biosensor by computational design

Jonathan S. Marvin, and Homme W. Hellinga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, 98, 4955.

糖結合たんぱく質 maltose binding protein (MBP)をコンピューターデザインに基づいた rational かつ radical な改変により亜鉛イオン蛍光バイオセンサーへと変換しています。MBP は open-closed form 間のコンフォメーション変化を伴いヒンジ領域で結ばれた二つのドメイン間の接触面でマルトースを認識しますが、選択的な亜鉛イオンセンサーとしての機能化を目指して 1) ドメイン間接触面での亜鉛認識サイトの位置、2) 亜鉛結合アミノ酸残基 (coordination sphere) の選択、3) ヒンジ領域のアミノ酸の変換による open-closed form 間のコンフォメーション制御、などをコンピューターによる rational なデザインに基づいて押し進めています。亜鉛認識部位近傍には環境応答性蛍光色素を導入しコンフォメーション変化に連動した亜鉛イオンセンサーとして機能させているわけですが、これらのデザインによる MBP の機能変換により亜鉛 イオンに対してサブマイクロモルレベルの親和性を有する蛍光亜鉛センサーを得ています。

Derivatives of 8-Hydroxy-2-methylquinoline Are Powerful Prototypes for Zinc Sensors in Biological Systems

Dierdre A. Pearce, Nathalie Jotterand, Isaac S. Carrico, and Barbara Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 5160.

従来の Zinquin および TSQ などのスルフォンアミドキノリン型の蛍光亜鉛イオンセンサーよりも量子収率などの点で改良を加えた 8-ヒドロキシキノリン型の亜鉛蛍光センサーについて報告しています。いくつかの類縁体を合成し、それらの亜鉛イオン存在時の蛍光特性などについて評価しています。繊維芽細胞を用いて細胞内亜鉛イオンの蛍光センシング(高濃度の亜鉛を含む細胞内ベシクルの可視化)を行っています。

Fluorescent Sensors for Zn^{2+} Based on a Fluorescein Platform: Synthesis, Properties and Intracellular Distribution

Shawn C. Burdette, Grant K. Walkup, Bernhard Spingler, Roger Y. Tsien, and Stephen J. Lippard, *J. Am Chem. Soc.*, **2001**, 123, 7831.

Lippard 氏と Tsien 氏の共著です。フルオロセインをフルオロフォアとして、ジピコリルアミンを亜鉛イオンのキレート部位として組み込んだ蛍光亜鉛イオンセンサー Zinpyr-1, 2 について報告しています。Zinpyr-1, 2 は高い蛍光量子収率(0.87 ~ 0.92)、センシングに適した長波長領域での応用性($\lambda_{\max} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = \sim 520 \text{ nm}$)、亜鉛イオンとの高い親和性($K_d = 0.5 \sim 0.7 \text{ nM}$)など、生体内蛍光センサーとして必要な特性を有しています。COS-7 細胞での細胞内亜鉛イオンの可視化を試みているが、細胞内のフリーの亜鉛イオンは非常に低濃度であるため生体内亜鉛イオンの局在性の可視化は不可能でした(最近、細胞内のフリーの亜鉛は極めて厳密かつ低濃度($10^{-16} \sim 10^{-15} \text{ M}$)にコントロールされており、亜鉛イオンはシャペロンを介して金属酵素などに運搬されているのではないかと報告があります。詳しく知りたい方は O'Halloran et al., *Science*, 2001, 292, 2488 をご覧下さい)。ただし細胞外部からの亜鉛イオンの添加には細胞内で応答します。この Zinpyr-1, 2 のデメリットとして、ジピコリルアミンの三級アミン部位のプロトン化によるバックグラウンドの蛍光の存在、また細胞内酸性部位への局在性などの問題があります。これらのデメリットを解消したものが同じくフルオロセイン型の亜鉛イオンセンサーについて書かれた次の論文になるでしょうか。

Detection and Imaging of Zinc Secretion from Pancreatic β -Cells Using a New Fluorescent Zinc Indicator

Kyle R. Gee, Zhang-Lin Zhou, Wei-Jun Qian, and Robert Kennedy, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, ASAP.

これもまたフルオロセイン型の蛍光センサー。Molecular Probes 社とフロリダ大学 Kennedy 氏との共同研究です。カルシウムイオン蛍光センサーとして開発された fluo-3, 4 の酢酸ユニットを一つ減らしトリカルボキシレートとすることだけでカルシウムイオンに対する親和性を大きく低下させた亜鉛イオン特異的な蛍光プローブ FluoZin-3 (K_d for $\text{Zn}^{2+} = 15 \text{ nM}$)について報告しています。他の生体内金属イオンとの親和性は弱く、高い亜鉛選択性を有します。彼らは、この蛍光プローブを用いてグルコース刺激による膵臓 β 細胞からの亜鉛イオン遊離の動的および経時的変化の可視化に成功しています。従来の亜鉛イオン蛍光プローブである Zinquin に比して抜群に高い感度と S/N 比での生体亜鉛イオンの検出が可能です。一昨年に報告された東大 長野先生らのフルオロセイン型の蛍光性亜鉛イオンセンサー(*J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 12399)および前記の Lippard, Tsien 両氏の論文を含めてフルオロセイン型蛍光亜鉛イオンセンサーが多く報告されています。



菅本 和寛 (すがもと かずひろ) 宮崎大学工学部助手
sugamoto@cc.miyazaki-u.ac.jp

私が所属する学科は平成 11 年度に学科改組があり物質環境化学科という名前になりました。(環境化学という名前がついたので?)最近では環境に優しい有機合成を目指した研究をしています。主な仕事としては有害物質を使用しないグリーン合成反応の実現のために新規な酸素酸化反応,無溶媒反応,酵素反応を開発し,自分達で開発した反応をキーステップとして生理活性物質の全合成等を行っています。今回は,私の専門とは異なりますが,最近かなり話題になっている狂牛病についておもしろい論文がありましたので紹介します。

1996年英国政府より,牛海綿状脳症(Bovine Spongiform Encephalopathy:以下 BSEと略す)いわゆる狂牛病は人間に感染し,新異型クロイツフェルト・ヤコブ病を引き起こす可能性があると発表された。日本でも2001年9月に第一例の BSE に感染した牛がみつかりたいへんな騒ぎになっている。通常,感染症はウイルスや細菌により引き起こされる。BSE に代表されるプリオン病も最初はウイルス感染症の一つと考えられていた。しかし,プリオン病の感染本体はプリオンと呼ばれるタンパク質であることが明らかになってきた。正常なプリオンタンパク質(以下 PrP^Cと略す)の多くは動物の脳に存在する。プリオン病は,この正常な PrP^C が異常プリオンタンパク質(PrP^{Sc}と略す)に感染することで引き起こされると推定されている。PrP^Cは PrP^{Sc}に感染するとタンパク質の構造が変化し PrP^{Sc}が増殖し海綿状脳症になると考えられている。現在,プリオン病の治療法はないが,以下に示す3報の論文が治療法になりうる?

Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease

Carsten Korth, Barnaby C. H. May, Fred E. Cohen, and Stanley B. Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, 98, 9836-9841.

アクリジン誘導体とフェノチアジン誘導体が異常プリオン持続感染細胞の増殖を抑制した。特にアクリジン誘導体であるキナクリン(抗マラリア剤として使用されている)の PrP^{Sc}形成阻害の半数影響濃度(EC₅₀)は0.3 μM,フェノチアジン誘導体であるクロルクロマジン(精神安定剤として使用されている)のEC₅₀は3 μMと低濃度で PrP^{Sc}形成を阻害することを明らかにしている。両化合物ともに血液脳関門を通過する事がわかっており,プリオン病治療薬の候補になると考えられている。現在イギリスとアメリカで臨床実験が行われている。

Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies

Frank L. Heppner, Christine Musahl, Isabelle Arrighi, Michael A. Klein, Thomas Rüllicke, Bruno

Oesch, Rolf M. Zinkernagel, Ulrich Kalinke, and Adriano Aguzzi, *Science*, **2001**, 294, 178-182.

PrP^C に対する抗 PrP 遺伝子を導入したマウスは、抗 PrP 抗体を生産する。このマウスに PrP^{Sc} を導入しても、脾臓と脳の PrP^{Sc} 感染は防止される。これはプリオン病が免疫により予防できる可能性を示している。

Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity

David Peretz, R. Anthony Williamson, Kiotoshi Kaneko, Julie Vergara, Estelle Leclerc, Gerold Schmitt-Ulms, Ingrid R. Mehlhorn, Giuseppe Legname, Mark R. Wormald, Pauline M. Rudd, Raymond A. Dwek, Dennis R. Burton, and Stanley B. Prusiner, *Nature*, **2001**, 412, 739-742.

PrP^{Sc} と PrP^C の相互作用により PrP^{Sc} が増殖すると考えられているので、どちらかのタンパク質と特異的に結合する薬剤は、この相互作用を妨げ PrP^{Sc} 形成を阻害すると考えられる。PrP^C に対する抗体が異常プリオン持続感染細胞の増殖を抑制し、しかもそれまで存在した PrP^{Sc} も消滅させた。つまりこの抗体は感染後でも、プリオン病を治療できる可能性がある？



高橋 剛 (たかはし つよし)

東京工業大学生命理工学研究科生物プロセス専攻 日本学術振興会特別研究員

ttakahas@bio.titech.ac.jp

私は現在、東工大生命理工の上野・三原研究室でポスドクをしています。12月の終わりころに石田先生からメールをいただき、色々迷いましたが、結局手元にあった中から自分が興味をもった論文4報ほど簡単に紹介させていただきます。

In vitro selection of nucleoprotein enzymes

Michael P. Robertson and Andrew D. Ellington, *Nature Biotechnology*, **2001**, 19, 650-655.

近年、DNA や RNA を用いた in vitro selection 法により、触媒活性を有するリボザイムや特定の化合物に結合するアプタマーが多数開発されています。この論文では、タイトルにあるように、"nucleoprotein"、すなわちタンパク質と RNA が複合体を形成することによって機能を発現する酵素をセレクションすることを目的としています。今までにも有機小分子 (ATP や theophylline) などにより活性制御が可能なりボザイムが開発されています。ここでは、エフェクタ

ーとしてタンパク質を用いたセレクションを行うことにより、nucleoprotein として機能する酵素をスクリーニングしています。実際のセレクションの方法として、エフェクターであるタンパク質がないときに活性がある RNA を系外に除き、タンパク質があるときにのみ活性(ligase)があるものを増幅することにより、目的物を獲得しています。結果的には、タンパク質存在下、非存在下での活性の差が数万倍になったものが得られています。著者らは、セレクション法で得られた RNA を用いることにより、特定のタンパク質の検出に利用できるのではないかと結論づけています。また、このような手法を用いることにより、RNA や DNA 単独では得ることが難しい機能を有する分子をセレクション的に得ることができるのではないかと思います。

Kinetic parameters for small-molecule drug delivery by covalent cell surface targeting

David A. Nauman and Carolyn R. Bertozzi, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2001**, 1568, 147-154.

細胞表層に存在する糖鎖は、細胞間の認識等において重要な役割を果たしています。著者らはこれまでに細胞表層上に存在する糖鎖を人工的に改変する試みを色々行っており、ケトン基を有する *N*-levulinoylmannosamine (ManLev)を代謝経路に取り込ませることで、細胞膜上にケトン基を持つ *N*-levulinoyl sialic acid (SiaLev) を発現させることに成功しています。これを利用して薬剤等の有機分子をシアル酸を呈示する細胞上に化学的に導入し、エンドサイトーシスによって薬剤等を細胞内に取り込ませることができるとしています。この論文では、ピオチンヒドラジドとケトン基との反応性を解析し、実際薬剤等をこの方法で導入することが、今までのレクチンや抗体を用いた系と比較して有効であるかどうかを考察しています。細胞上に呈示されるピオチンの量は、最初に取り込ませる ManNAc の量やその後反応させるピオチンヒドラジドの量に顕著に依存しており、また細胞上に呈示されたピオチンは一度エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた後加水分解されて、ケトン基をもつ SiaLev が再生されることを示しています。著者らは、これらの方法が実際にドラッグデリバリーとして有効であると結論づけています。

Metabolic selection of glycoprotein defects in human cells

Kevin J. Yarema, Scarlett Goon, and Carolyn R. Bertozzi, *Nature Biotechnology*, **2001**, 19, 553-557.

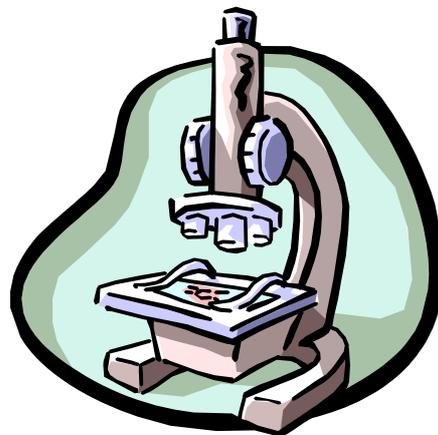
この論文も同じグループの人たちのものですが、この論文では、先に紹介した ManLev の取り込みにより実際に発現される SiaLev の量が多い細胞と少ない細胞をセレクションし、両者の性質を wild type の細胞と比較しています。セレクションは発現した SiaLev とピオチンヒドラジドを結合させた後 FITC-アビジンと反応させ、細胞を蛍光強度により簡便に選別しています。SiaLev の量が大きく減少している細胞を調べたところ、糖の代謝経路の最初のステップを行う酵素

(UDP-GlcNAc 2-epimerase)に異常があり、実際にこの酵素を調べたところ、sialuria という病気において見られるアミノ酸変異と同じ部位に変異が起こっていることが明らかとなりました。一方、SiaLevの発現量が増加している細胞を調べると、一般的な細胞には見られない、polysialic acid (PSA)の発現が顕著に示されていて、これは、このPSAの足場となるNCAMなるものの発現量が顕著に増加している結果であることと結論づけています。著者らは、このような手法により、細胞表面に発現する糖鎖を簡便に評価することができ、結果的に糖鎖合成に関する知見を獲得することができるかと結論しています。

De novo design of fibrils made of short α -helical coiled coil peptides

S.A. Potekhin, T.N. Melnik, V. Popov, N.F. Lanina, A.A. Vazina, P. Rigler, A.S. Verdini, G. Corradin, and A.V. Kajava, *Chemistry & Biology*, **2001**, 8, 1025-1032.

この論文では、両親媒性コイルドコイル構造をとるべく設計した34残基のヘリックスペプチドが繊維状に集合化することについて報告しています。ペプチドはQLARELQを繰り返した配列となっており、Ala, Leu, Leuの疎水性残基間の相互作用と、Arg, Glu残基の静電的相互作用でうまく4から5量体程度のコイルドコイルになるだろうと予測して設計しています。円二色性、電子顕微鏡、X線回折等の実験から、合成したペプチドが弱酸性条件下で5量体程度の大きさでコイルドコイル構造を形成して集合化し、それがヘリックスの鎖方向に伸張して繊維を形成していると推察しています。中性条件では、繊維にはならずアグリゲーションしてしまうようです。アミロイドのようにシート構造に基づく繊維ではなく、このようにヘリックス構造での繊維は非常に面白く、今後の展開が期待されます。





お知らせコーナー

会員異動

秋吉一成 氏（2月から）

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所素材研究部門 有機材料分野 教授

〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台 2-3-10

Tel: 03-5280-8020, Fax: 03-5280-8027

E-mail: akiyoshi.org@tmd.ac.jp



受賞のお知らせ

青木 伸氏（広島大学医学部）

平成 14 年度日本薬学会奨励賞

「水溶液中における多核亜鉛錯体の超分子化学」

菊地 和也氏（東京大学大学院薬学系研究科）

(1) 第 16 回生体機能関連化学シンポジウム 第 2 回講演賞

「新規亜鉛イオン蛍光センサー分子のデザイン・合成と生細胞可視化解析」

(2) 平成 14 年度日本薬学会奨励賞

「生細胞蛍光プローブのデザイン・合成とその応用による可視化解析」



佐々木 茂貴氏（九州大学大学院薬学研究院）

薬学会学術振興賞

「遺伝子発現の化学的制御を目指した機能性認識分子の創製」

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カバリーセンター併任）

(1) 第一回 バイオビジネスコンペ JAPAN 最優秀賞（H13）

「新規 RNA-プロテインハイブリッド型高機能リボザイムライブラリーを用いた新規機能遺伝子探索法（ジーンディスカバリーシステム）の開発」

(2) 第 33 回市村学術賞功績賞（H13）

「ポストゲノム時代の新 RNA 工学の開拓」

中島敏博氏 ((財)化学及血清療法研究所)

第7回 日本生物工学会論文賞

Construction and Characterization of Phage Libraries Displaying Artificial Proteins with Random Sequences
J. Bioscience and Bioengineering (2000), 90: 253-259.

[共著者：中島敏博 1) 2)、石黒直樹 1)、山口宗義 1)、山内朝夫 1)、島 康文 1)、野崎周英 2)、
ト部 格 1)、四方哲也 1) 3) 4) 1) 大阪大院・工・応用生物、2) (財)化学及血清療法研究
所、3) JST、4) 東京大]

新留琢郎氏 (長崎大学工学部)

日本ペプチド学会奨励賞

「ペプチド性化合物を用いた細胞内遺伝子導入法に関する研究」

林 高史氏 (九州大学大学院工学研究院)

第16回生体機能関連化学シンポジウム部会講演賞 第2回講演賞

「ヘムプロピオン酸側鎖修飾によるミオグロビン機能変換」

和田健彦氏 (大阪大学大学院工学研究科)

第16回生体機能関連化学シンポジウム部会講演賞 第2回講演賞

「ガン細胞特異的にアンチセンス機能を発現するペプチドリボ核酸の創成」



関連シンポジウム

遺伝子・デリバリー研究会 第2回シンポジウム

本シンポジウムでは、急速に進歩しております遺伝子治療について、臨床応用可能な遺伝子の設計から、そのデリバリーに関する幅広い領域の研究者が一同に集まり討論することを目的としております。分子設計や物理化学的な構造解析などの基礎的な研究から、治療に使える遺伝子の設計、細胞や個体レベルでの遺伝子発現の評価、臨床を含めてそれらを製剤として確立するまでの幅広い領域の研究者が一同に集まること重要と思われれます。本シンポジウムでは、各領域の第一線の研究者による招待講演、依頼講演、およびポスター発表が行われますので奮ってご参加下さい。

日時： 平成14年5月17日(金) 10時30分~18時00分

場所： 京都テルサ

(〒601-8047 京都市南区東九条下殿田町70、(Tel : 075-692-3400)、JR 京都駅より徒歩10分)

招待講演： 橋田 充 (京都大学・薬)・吉川研一 (京都大学・理)・谷 憲三朗 (東京大学・医科研)
森下竜一 (大阪大学・医)・多比良和誠 (東京大学・工)

依頼講演： 西川元也 (京都大学・薬)・恵美宣彦 (名古屋大学・医)・丸山一雄 (帝京大学・薬)
松田 修 (京都府立医科大学)

パネルディスカッション： 非ウイルスキャリアーの現状と問題点

ポスター発表演題募集： [1]演題、[2]氏名(発表者に) [3]所属、[4]連絡先(住所・TEL・FAX・E-mail アドレス)を明記の上、山岡宛に E-mail (gened2@ipc.kit.ac.jp) にてお申し込み下さい。ポスター発表演題申込締切りは2002年3月29日(金)必着とさせていただきます。

予稿集： A4用紙1頁で作製してください。上下左右25mmのマージンを取り、タイトル・所属はボールド字体で12ポイント程度、本文は11ポイント程度の文字を使用して作製して下さい。予稿集のテンプレートは、シンポジウムのホームページからダウンロードできます。予稿集提出締切りは2002年4月15日(月)必着とさせていただきます。

参加事前登録： 2002年4月30日(火)までに事前登録をお願いします。[1]氏名、[2]所属、[3]連絡先(住所・TEL・FAX・E-mailアドレス)、[4]研究会会員・非会員の別、[5]懇親会参加の有無を明記の上、E-mailにて gened2@ipc.kit.ac.jp (山岡哲二)宛にお願いいたします。

シンポジウムのホームページ： <http://www.bfc.bioa.eng.osaka-cu.ac.jp/gd2002/gdsympo2002.html>

研究会参加費(要旨代を含む)： 正会員および正会員の研究室に所属する学生：無料
会員外：一般：5,000円、学生：1,000円(当日徴収致します)

懇親会費： 5,000円(当日徴収致します)

連絡先： 〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町
京都工芸繊維大学高分子学科 山岡 哲二
(シンポジウム実行委員長)
TEL&FAX：075-724-7823
E-mail：gened2@ipc.kit.ac.jp



μTAS 2002
Sixth International Conference on
Miniaturized Chemical and Biochemical
Analysis Systems
November 3-7, 2002
Nara New Public Hall, Nara, Japan

The Sixth International Symposium on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (μTAS) will be held in Nara, Japan on November 3-7, 2002. The μTAS 2002 meeting will include topics that relate to research, development and application of micro fabricated devices and systems for chemical and biochemical measurements. Authors are invited to contribute original presentations on advances in, application of and technologies for miniaturized components and systems for chemical and biochemical analysis.

TOPICS

1. Microfluidics

- 1.1 Fluid Dispensing
- 1.2 Fluid Mechanics and Modeling Tools
- 1.3 World-to-chip Interfacing
- 1.4 Others

2. MEMS Technology

- 2.1 Micromachining Methods
- 2.2 Plastic Machining
- 2.3 Micropumps and Valves
- 2.4 Microfluidic Components
- 2.5 Others

3. Nanotechnology

- 3.1 Nanofluidics Components
- 3.2 Nanoengineered Materials
- 3.3 Others

4. Materials

- 4.1 Surface Modification
- 4.2 Chemical and Biochemical Arrays
- 4.3 Interfacial Characterization
- 4.4 Others

5. Application

- 5.1 Clinical Diagnostics
- 5.2 Genomics and Proteomics
- 5.3 Environmental Assays
- 5.4 Separation Science
- 5.5 Cellular Analysis
- 5.6 Drug Discovery
- 5.7 Others

6. Detection Technologies

- 6.1 Micro-Optical Systems
- 6.2 Electrochemical Detection
- 6.3 Mass Spectrometry
- 6.4 Novel Quantification Strategies
- 6.5 Others

7. Other Categories

SYMPOSIUM CO-CHAIR

Yoshinobu Baba, The University of Tokushima, Japan
Shuichi Shoji, Waseda University, Japan

FOR FURTHER INFORMATION:

Micro TAS 2002
Honcho 2-41-16-103, Nakano-ku,
Tokyo, 164-0012, Japan
fax 81-3-3299-1361
phone 81-3-3299-1371
e-mail microtas@twics.com
Website: <http://www.twics.com/~microtas/>

Important Date

Abstract Submission Deadline May 17, 2002

Steering/Program Committee

Yoshinobu Baba	University of Tokushima
David Beebe	University of Wisconsin-Madison
Albert van den Berg	MESA ⁺ Research Institute, University of Twente
D. Jed Harrison	University of Alberta
Klavs F. Jensen	Massachusetts Institute of Technology
Thomas Laurell	Lund Institute of Technology, Lund University
Andreas Manz	Imperial College of London
M. Allen Northrup	Microfluidic Systems Inc.
J. Michael Ramsey	Oak Ridge National Laboratory
Shuichi Shoji	Waseda University
Sabeth Verpoorte	University of Neuchâtel