

生命化学研究



No. 12 (2003年9月)

1	巻頭言	
	出会い	2
	青井 啓悟 (名古屋大学大学院生命農学研究科)	
2	研究紹介	
	高分子ナノアーキテクチャーから医療への発信	3
	中山 泰秀 (国立循環器病センター研究所生体工学部)	
	ガス状小分子をセンシングするヘムタンパク質の構造・機能相関を解明する	9
	中島 洋 (名古屋大学大学院理学研究科)	
3	論文紹介「気になった論文」	
	加地 範匡 徳島大学大学院薬学研究科	14
	長田 英也 徳島大学大学院薬学研究科	15
	野島 高彦 九州大学大学院工学研究院	17
	藤本 ゆかり 大阪大学大学院理学研究科	19
	松原 輝彦 慶應義塾大学理工学部	21
4	グラビアページ	
	第6回 生命化学研究会 in 福岡(2003年6月27日)	23
5	お知らせコーナー	
	第1回生命化学国際シンポジウムへのお誘い	24
	受賞のお知らせ	26
	会員異動のお知らせ	26
	編集後記	27



巻頭言

出会い

名古屋大学大学院生命農学研究科
青井啓悟

生命化学研究会・・・実に懐の広い研究会だ。

生命、生物は、少々無案内であったとしても、いや無案内ならなおさら生命化学研究会で研究を見つめる価値があるだろう。このことを、体験として聞いていただきたいので、恥ずかしながら小生のことを正直に話したい。

私は、「生命」には縁遠い高分子合成を専門として育った。学生の時の研究には、生物色はまったく無かった。オキサゾリンの開環重合という研究に取り組んでいたが、強いて言えば後になって、その重合体を疑似ペプチドと呼んだことぐらいである。

名古屋大学の農学部の岡田鉦彦教授のもとで助手として探索をはじめ、生物あるいは生命と、合成高分子との接点を求めた。必要に迫られた。糖鎖デンドリマー「シュガーボール」は、そんな環境の中ではじめて生まれた。合成法がシンプルで、合成を専門としていた自分にとっては、自己満足からはほど遠い分子設計だったのだが。

生命化学研究会では、生物学的な言葉があまりわからなかったとしても、何も臆することはない。化学、物理、材料、分析、計算科学など広い分野の研究者間で、新たな研究の接点が芽生えることを願っている。

発見。量子的な飛躍。ブレイクスルー。

研究の魅力であり、また醍醐味でもあったりする、そのような体験にたどりつくには、もちろん己の研究をつきつめて突破口を開くのも正攻法であるのだが、異分野との交点には秘宝がいくらでも眠っている。

別世界とも思えるロケーション：淡路島の夢舞台で、第1回生命化学国際シンポジウムが開かれる。大きな期待が寄せられている。またとない「出会い」の機会だ。

(あおい けいご: aoi@agr.nagoya-u.ac.jp)

高分子ナノアーキテクチャーから医療への発信

国立循環器病センター研究所生体工学部 中山泰秀
(nakayama@ri.ncvc.go.jp)

1. はじめに

ゲノム解読に代表されるように生化学分野における輝かしい発展にともなって、対象とする精緻な生体高分子を精密に構造解析する手法が種々確立され、さらに、それらの一部は人工的に自動で再現でき、加えて新たな機能性分子を創生できることが既に現実のものとなって久しい。他方、人工合成高分子の分野においては、生成物が複雑系であることも影響して、統計学的処理を超えるユニット分子レベルでの精密な解析は未だ達成されておらず、合成面においては未だクラシカルな重合法が高分子化学工業の中心を支え続けている。しかし、ナノテクノロジーを始めとする超微細精密構造化の波はナノメディシンとして高分子材料を主構成成分とする医療デバイスのマイクロ化・多機能化にまで波及しつつある。

現在、医療の現場において、例えば循環器系疾患の領域では、従来の開頭や開腹を伴う一般的な標準的外科手術からX線透視下で行う血管内手術へと、侵襲を低減させた経皮的手術が先端医療の一つとして開発され、患者のQuality of Life (QOL) を高く保つ治療が提供されている。血管内治療では口径が僅か数 mm 以下の細い血管内を皮膚に開けた針穴を通して体外から自由に操作しなければならないため、治療デバイスの小型化や表面の精密化が設計されている。今後、血管内手術のさらなる推進のためには治療デバイスのより高集積化・多機能化が必須であり、将来的にはマイクロマシン化が期待されている。そのためにはナノレベルでその材料となる高分子の構造を厳密に制御できる分子設計法の開発が要求されている。我々はその一つのアプローチとして大津らによって開発されたイニファタ (Iniferter: initiator-transfer agent-terminator の機能を合わせ持

つ分子を意味する) 重合法を選択して高分子ナノアーキテクチャー技術として確立させ、その医療分野への適用を精力的に拡大させている。

2. 表面高分子ナノアーキテクチャー

イニファタの一種であるベンジルジチオカルバメート (Ph-CH₂-SCSNEt₂) に光を照射すると、ベンジル炭素と硫黄間の結合を可逆的に解離させ、ベンジルラジカル (Ph-CH₂·) とジチオカルバミルラジカル (·SCSNEt₂) を生成させることができる。ここで、ベンジルラジカルのみがビニルモノマーの重合開始剤として機能し、重合末端では常にジチオカルバミルラジカルによるキャッピングが起こる。従って、光照射時にのみにモノマーを重合させることができ、照射条件 (強度、時間) や溶液条件 (モノマー濃度、モノマー/開始剤比) を選択すれば多くのモノマーに対してリビング的にラジカル重合を進行させることができる。つまり、重合鎖長は照射時間によって、鎖の成分はモノマーの組成によって、また重合領域は照射領域によってほぼ厳密に規定することが可能である。

このナノレベルで構造を自由に設計できる高分子ナノアーキテクチャー技術を用いると、高分子の多彩な表面設計が可能となる (図1)。例えば、一定時間毎に照射領域を段階的にずらしていくことで数十 nm の段差を有する階段が作製でき (図2)、照射領域を連続的に拡大させていくことで高低差数百 nm のスロープを作製できた (図3)。その他、グラフト鎖の長さや密度の制御、グラフト重合領域の制御、加えて領域別での異種モノマーの重合によるマイクロパターン化、ならびにブロック化が容易に実現できた。

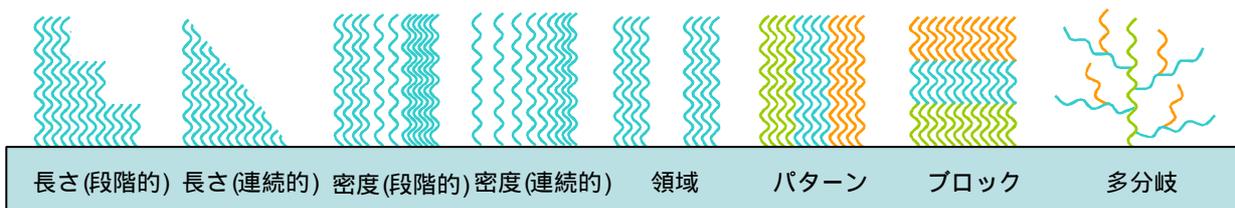


図1. 表面高分子ナノアーキテクチャー技術によって可能となった高分子表面の精密構造設計の例

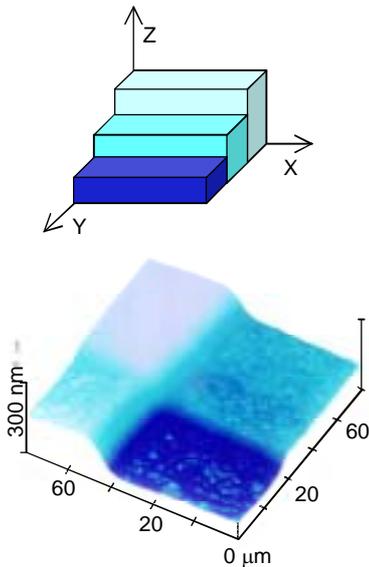


図 2. グラフト鎖長の段階的变化表面の原子間力顕微鏡 (AFM) 観察像。領域毎に照射時間を变化させることで数十～数百 nm の範囲で任意に高さを制御することが可能。

マイクロパターン化表面では微細領域毎に化学組成を任意に変化させることが可能である。蛋白質や細胞との相互作用の表面化学依存性を一度に同じ土俵で評価することができるため、生命化学研究における基材として有用である。現在、パターン化表面を提供した Anderson らによって、医療デバイス表面の最適化設計をめざしてマクロフェージとの相互作用等の詳細な検討が進められている。

また、ブロック化を利用すると表面の階層性構造をナノメートルレベルの厚みで厳密に制御することが可能である。これを医療デバイスの表面設計に応用すれば以下のような機能化・生体適合化が獲得される。1) 内層のブロック鎖としてヘパリン(強力な抗血液凝固剤)をイオン結合により固定したポリ *N,N*-ジメチルアミノプロピルアクリルアミド(カチオン性親水性高分子)鎖を、外層鎖としてポリ *N,N*-ジメチルアクリルアミド(非イオン性親水性高分子)鎖を形成させることで、ヘパリン徐放後においても引き続いて血液凝固を抑制できる蛋白質・細胞の非吸着・非接着性表面。2) 内層に緩衝層として機能するポリ *N,N*-ジメチルアクリルアミド鎖を、外層に IgG を固定化したポリアクリル酸(アニオン性親水性高分子)鎖を有する、生理活性を低減させない蛋白質固定化表面。また、3) 内層にモデル薬物としたプロプラノロール塩酸塩(高血圧・狭心症治療薬)を含浸させたポリ *N,N*-ジメチルアクリルアミド鎖を、外層に薬物放出制御膜となるポリ *n*-ブチルアクリレート鎖で皮膜化させた薬物貯蔵型表面、などが

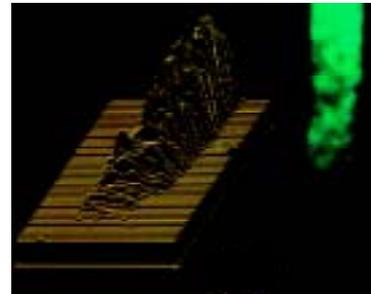
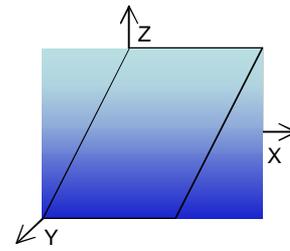


図 3. グラフト鎖長の連続的变化表面の共焦点レーザー顕微鏡観察像。照射領域を連続的に拡大させることで数百 nm の高低差を有するスロープが得られた。

例示できる。

一方、イニファタのマルチ化とグラフト鎖長の制御能を組み合わせることによってグラフト鎖の分岐度と鎖長を自由に設計することが可能となり、ナノレベルの木(多分岐型グラフト鎖)が作製できる。すなわち、大地と見なせる高分子の基材表面に種となるイニファタであるジチオカルバミル基を植える。そこに養分や水と見なせるモノマーと光を与えると、グラフト重合による幹が育つ。モノマーとして水溶性の *N,N*-ジメチルアクリルアミドを用いれば親水性の幹となる。この際、幹の一部として花とみなせるクロロメチルスチレンを共重合させておく。クロライド基は容易にジチオカルバミル基に置換できるため花が新たな種を生む。この後、幹を育てた時と同じ環境におくと、幹についた種から枝が育つ。さらに先と同様の方法を繰り返すことで枝に花を咲かせると小枝をつけることができる。すなわち、親水性高分子鎖の幹、枝、小枝を有する木が得られたことになる。この方法を用いてデバイス表面を加工すれば、グラフト鎖の空間密度を自在に設計できることから、血液や体液中の蛋白質等の吸着を大幅に抑制させ、細胞非接着性を長期間維持させることができると考えられる。

3. バイオチューブ人工血管の開発

ヒトの冠動脈に相当する口径 3mm 以下の人工血管(小口径人工血管と呼ばれる)は、これまで医用材料研究者の多大な努力にもかかわらず臨床に耐え

保が図られ、様々な組織工学的アプローチによって *in vitro* においてハイブリッド人工血管のプロトタイプが考案されている。しかし、免疫拒絶などの問題を考慮すれば移植物は全て自家組織から構成されることが最も望ましいと考える。

一方、生体内に人工物を埋入すると周囲にカプセル状の組織体の形成が起こることは古くから知られており、既存の人工血管を Scaffold として生体内において血管壁構造の再構築の促進化が試みられている。我々は、このカプセル化を利用して自己組織のみからなる血管様管状組織体を作製し、人工血管への応用をめざしている。直径 3mm 長さ 2cm の高分子（アクリル、シリコン、ポリウレタン、ポリエチレンなど）製の丸棒を鋳型として用いて、これらを兔の背部の皮下に埋入した（図 4）、2 週間ほどで鋳型の周囲にコラーゲンと繊維芽細胞を主成分とするカプセル化が起こり、管状組織体を得られた（図 5）。埋入 1 月後の組織体の壁厚は数十～数百 μm であり、いずれも 200mmHg の内圧に耐え得た。管状組織体は内腔面への加除圧に応じて拡張収縮を繰り返し、血管様の力学的性質を有していることが分かった（図 6）。ここで、壁厚や拡張径は埋入した鋳型の材質に大きく依存し、シリコンでは比較的硬く伸びにくく、アクリルでは柔軟な組織が形成されることが分かった。この差を生む原因として鋳型材の力学的物性、あるいは表面化学、表面構造の違いなどが考えられた。

そこで、鋳型の基材をポリメチルメタクリレート製の丸棒に統一し、表面修飾によって異なる化学を付与し、組織体形成に及ぼす表面化学のみの影響を調べてみた。表面化学を変化させる手段として先の表面高分子ナノアーキテクチャー技術を用いた。



図 4. 兔背部の皮下内に埋入させたポリメチルメタクリレート製の丸棒の周囲に形成されたカプセル状組織体。



図 5. 鋳型を除去して得られた管状組織体。

得るものは存在しない。単純な人工材料の改変やその表面の改質のみでは、移植した際、フェーズ毎に複雑に変化する生体防衛機構からの攻撃をしのぎきれないからである。現在は単機能の人工材料のみでの対応はほぼ絶望視され、細胞の援助（ある意味主役）を得るために人工材料（Scaffold 材や人工細胞外マトリックス材など）と細胞とのハイブリッド化に望みが託され、再生医療の一つの柱として開花が期待されている。その中で、血管内皮前駆細胞を含む幹細胞や ES 細胞が利用されて細胞の供給源の確

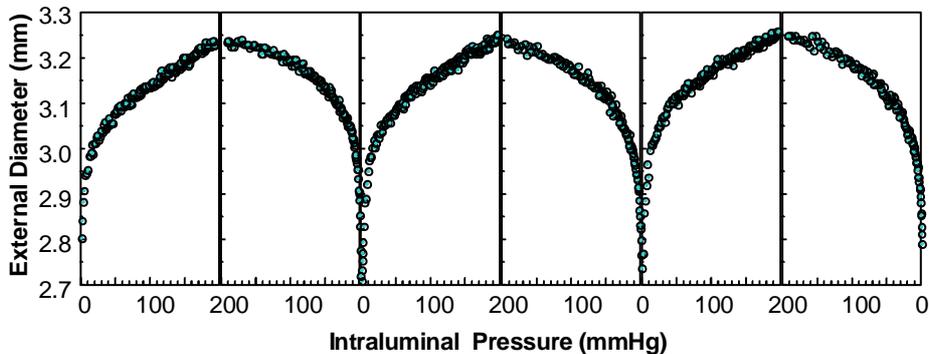


図 6. 管状組織体の内腔面への水圧の繰り返し付加による管径応答挙動。

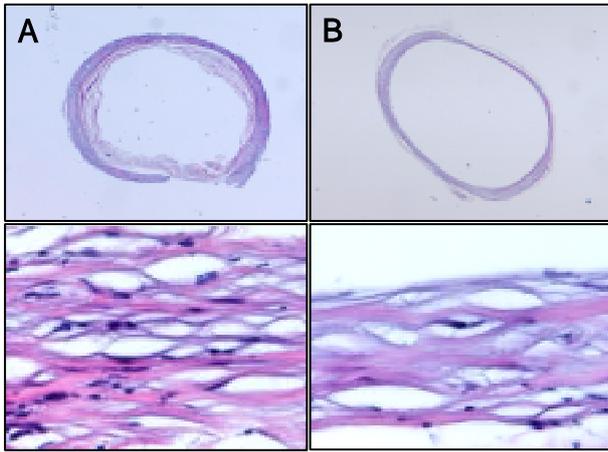


図7. アニオン性親水性表面 (A) と非イオン性親水性表面 (B) から形成された管状組織体の断面の組織観察像 (上段) と各拡大像 (下段)。



図8. 分岐型鋳型を用いた分岐型カプセル状組織体の形成。

これによって使用するモノマーを変化させるだけで、非イオン性親水性 (ポリジメチルアクリルアミド)、アニオン性親水性 (ポリアクリル酸)、カチオン性親水性 (ポリジメチルアミノプロピルアクリルアミド)、疎水性 (ポリスチレン)、撥水性 (ポリトリフルオロエチルメタクリレート) などを僅か百 nm の厚さで基材に損傷を与えることなく表面に付与することができた。いずれも1月間兔の背部皮下内に埋入させると安定したカプセル化が起こり、管状組織体が得られた。疎水性表面から得られた組織体は比較的伸びにくかったが、イオン性表面からの組織体は伸縮性に富んでいた。生理的血压範囲内での力学的性質はアニオン性表面のものではヒト管状動脈に、またカチオン性表面のものではヒト大腿動脈に相当した。壁構造を組織学的に観察すると、いずれも基材との接触面から外周方向にほぼ均一なコラーゲンの網目構造が形成されており、その密度はアニオン性で比較的密、非イオン性で疎であった (図7)。基材上のほぼ2次元のナノ表面化学を設

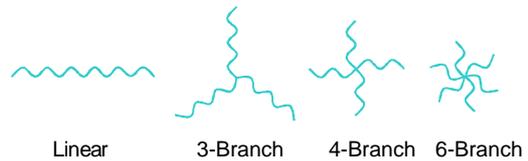
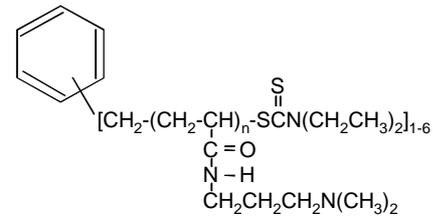


図9. スター型ベクターの化学構造と構造モデル。

計図としてコラーゲンの3次元網目構造と厚さがある程度規定できることがわかった。現在は、血管内皮増殖因子 (VEGF) や繊維芽細胞増殖因子 (bFGF)、インスリン様増殖因子 (IGF) の表面固定によって組織体の内皮化促進化、壁成長促進化、ならびに筋細胞誘導化などに加えて、鋳型の形状設計によるバイオチューブの分岐化、分枝化を併せて検討を行っている (図8)。移植を目的とする部位に応じた力学的性質や形状を自由に設計できるオーダーメイド移植医療が具体化しつつある。

4. スター型ベクターの開発

遺伝子導入の安全性と利便性から導入ベクターの脱ウイルス化が検討されており、ウイルス系ベクターの危険性回避から合成高分子ベクターの開発は現実味を帯びてその速度を加速しつつある。非ウイルス系ベクターの代表選手としてカチオン性高分子が良く知られているが、その導入効率の低さが広く臨床応用される障害となっている。導入効率を高めるための合成化学的なアプローチとして、主として高分子鎖のモノマーユニット組成や鎖長の影響が調べられてきた。また、最近では体積を操作しやすい dendrimer を用いて構造工学的見地からも検討が加えられつつある。しかし、これまで合成高分子の鎖長や分岐度を容易に制御する方法論がほとんど存在しなかったため、高分子の立体構造と遺伝子導入効率との相関関係はほとんど系統的に調べられていなかった。

高分子構造を厳密に制御できる高分子ナノアーキテクチャー技術を利用すると、表面系以外の溶液系においても高分子ナノ立体構造を比較的容易に設計することができる。そこで我々は分岐数を厳密に

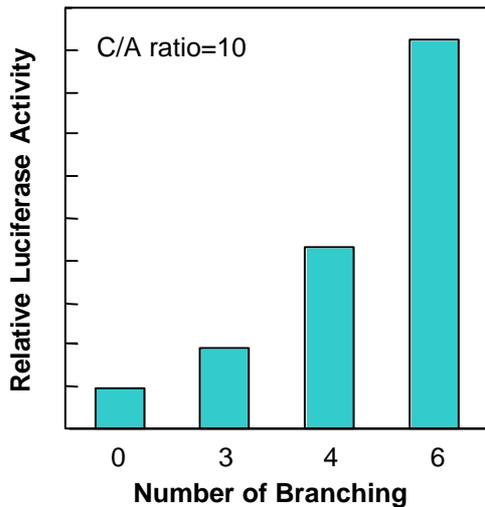


図 10. スター型ベクターを用いたトランスフェクション効率の分岐度依存性。

調節したスター型のカチオン性高分子を分子設計し、遺伝子発現効率との相関関係を調べ、ベクターの基本骨格構造の最適化を追求している。合成は、ベンゼン環をコアとしてジチオカルバミル基を 1 または 3, 4, 6 個導入したマルチニオファタを得、これらをカチオン性モノマー（ジメチルアミノプロピルアクリルアミド）中で置換基数に応じて所定時間紫外光を照射することにより行った。分岐数はベンゼン環に導入されたジチオカルバミル基数によって、鎖長は照射時間によって制御することができ、分子量を約 2 万に揃えて、直鎖状に加えて 3, 4, 6 分岐型のスター型カチオン性高分子を得た（図 9）。

これらをルシフェラーゼをコードする pGL3-control プラスミドと共存させると、すみやかにポリオンコンプレックスを形成し、いずれも約 250nm のナノ粒子を生成した。COS-1 細胞へトランスフェクションを行うと、ルシフェラーゼ活性は分岐数が増加するのに伴って大幅な増加を認め、6 分岐において最も高い活性を示した（図 10）。多分岐化による活性の増加の原因に関しては、電荷の凝集性の影響を含めて現在検討中である。使用するモノマー種によって高分子の鎖の組成が、また照射時間によって分子量が調節可能であるため、基本骨格構造に加えて高分子鎖の組成と長さの最適化が容易に獲得できることになる（図 11）。また、先の表面ブロック化で例示したようにモノマー種を変化させて重合を継続させることで、高分子鎖の成分を段階的、あるいは連続的に変化させることが可能である。

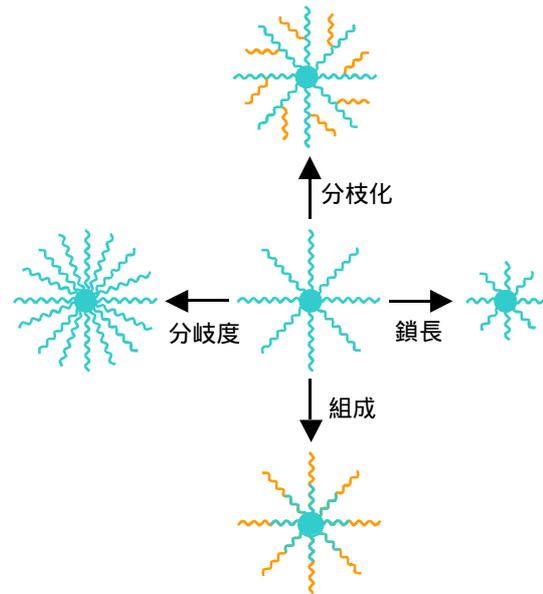


図 11. 高分子ナノアーキテクチャー技術を用いたスター型ベクターの基本骨格設計

コアに近い部分には 4 級アミンを外層には非イオン性など既存の合成法では困難である断面組成の調節も容易である。また、さらに分岐数を増加させるため、コア分子をベンゼン環からナフタレン環へ変更する、あるいはベンゼン環を複合化させることを検討すると同時に、先に示したナノレベルの高分子の骨を溶液系で作製することによってパースト構造を有するスター型高分子の合成や光機能性材料との複合化を含めて、さらなる基本骨格の最適化と機能化を追求している。

5. おわりに

本稿では高分子ナノアーキテクチャー技術を共通項として人工血管やベクターの開発研究への展開について概説させていただいた。現在、これらに加えて機能性ステントを含む血管内治療デバイスの開発に関しても主要テーマとして取り組んでいる。今後、高分子ナノアーキテクチャー技術は、高集積化・多機能化が要求される先端医療デバイスの表面ならびに骨格の高精密・微細設計の基盤ツールの一つとして有望であると考えられる。我々の研究グループでは、高分子材料工学から医学・医療に貢献することに使命感を持って発信しつづけていきたいと願っている。なお高分子ナノアーキテクチャー技術の開発は、現九州大学大学院医学研究院松田武久教授の指導のもと行われました。この場をお借りして深く感謝いたします。最後に研究紹介を書く機会を与えていただきましたことにお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Otsu, T., and Matsumoto, A. *Adv. Polym. Sci.*, **75**, 136 (1998).
- 2) Nakayama, Y., and Matsuda, T. *Macromolecules*, **32**, 5405-5410 (1999).
- 3) Nakayama, Y., and Matsuda, T. *Langmuir*, **15**, 5560-5566 (1999).
- 4) Higashi, J., Nakayama, Y., Marchant, R.E., and Matsuda, T. *Langmuir*, **15**, 2080-2088 (1999).
- 5) Lee, H.J., Nakayama, Y., and Matsuda, T. *Macromolecules*, **32**, 6989-6995 (1999).
- 6) Nakayama, Y., Anderson, J.M., and Matsuda, T. *J. Biomed. Mater. Res.*, **53**, 584-591 (2000).
- 7) Kidoaki, S., Nakayama, Y., and Matsuda, T. *Langmuir*, **17**, 1080-1087 (2001).
- 8) Nakayama, Y., Sudo, M., Uchida, K., and Matsuda, T. *Langmuir*, **18**, 2601-2606 (2002).
- 9) Brodbeck, W.G., Shive, M.S., Colton, E., Nakayama, Y., Matsuda, T., and Anderson, J.M. *J. Biomed. Mater. Res.*, **55**, 661-668 (2001).
- 10) Brodbeck, W.G., Patel, J., Voskerician, G., Christenson, E., Shive, M.S., Nakayama, Y., Matsuda, T., Ziats, N.P., Anderson, J.M. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 10287-10292 (2002).

- 11) Nakayama, Y., Ueda, H., Takamizawa, K., *J. Art. Org.*, **25**, 717 (2002).
- 12) Nakayama, Y., and Matsuda, T. *J. Control. Release*, **89**, 213-224 (2003).



中山泰秀 (Yasuhide Nakayama)

1986年大阪大学工学部応用精密化学科卒業。1991年大阪大学大学院工学研究科博士課程修了。ヒューマンサイエンス振興財団研究員を経て、1992年より国立循環器病センター研究所生体工学部研究員。1997年より研究室長。



研究紹介

ガス状小分子をセンシングするヘムタンパク質の
構造・機能相関を解明する名古屋大学大学院 理学研究科
中島 洋

はじめに

近年、一酸化窒素に代表されるようなガス状小分子がシグナル分子として認識され、生体内で生理機能の制御に寄与していることが、広く知られるようになってきた。ガス状小分子がシグナルとして機能するには、それと反応、感知するタンパクの存在が必要不可欠である。但し、生理的条件下におけるガス状小分子と単純タンパクとの反応は、酸素によるシステイン側鎖間のチオール・ジスルフィド変換および一酸化窒素とシステイン側鎖によるニトロソチオールの生成に限られる。このためタンパクは、ガス状小分子感知のための分子機構として、センサー部分に金属原子を含有する補欠分子族を利用している。これまでに、明らかとなったガス状小分子のセンサー部位では、いずれもヘムが中心的な役割を果たしており、既知のヘムタンパクの機能(酸素輸送・貯蔵、電子伝達、酵素反応)に続く新規な機能として注目されている。我々は、ヘムタンパクのこの新たな機能が、どのような分子構造、機構で実現され、従来のヘムタンパクとはどのような違いがあるのか、構造・機能相関の観点から研究を行っている。以下にこれまで我々が研究対象としている一酸化炭素(CO)センサータンパク CooA(CO 酸化酵素遺伝子群、*coo* operon の転写調節因子であることからこう呼ばれている)と酸素センサータンパク HemAT(Heme-based Aerotactic Transducer)について述べる。

一酸化炭素(CO)センサータンパク CooA による CO 選択的感知の分子機構

CooA 中ヘムのユニークな配位構造 CooA は紅色非硫黄光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* 中に見出された転写調節因子であり、生育環境に存在する CO を感知して CO 代謝に必要な酵素群の生合成を転写レベルで制御する。CooA は、分子量約 24000 のサブユニット 2 つが会合したホモダイマー構造を有しており、各サブユニットに 1 つのプロトヘム IX が包含されている。このヘムが CO センサーの本体であるが、その配位構造は、これまでのヘムタンパクにない極めてユニークなものであり、CO 感知に対する自然の巧妙さを感じる。その特徴を挙げると

1. ヘムは常に 2 つの軸配位子を有する 6 配位構造であり、そのうちの 1 つは N 末端 Pro²(Met¹ は翻訳後修飾により切除されている)のイミノ基である。この際、一方のサブユニットの Pro² は、他方のサブユニット中のヘムに配位しており、Pro² の配位を介して二つのサブユニットがたすきがけされている。しかも Pro² 残基を含む N 末端近傍の主鎖骨格は極めて柔軟である。後述のように Pro² のトランス位では、中心鉄の酸化還元に伴う軸配位子の交換反応が生じるが、Pro² は配位子交換に伴うヘムの動きに追随し、ヘム鉄に配位し続ける。
2. Pro² 配位子のトランス位では、軸配位子の交換反応が生じる。すなわち、中心鉄が 3 価の酸化型では

Cys⁷⁵ が、また 2 価の還元型では His⁷⁷ が軸配位子として機能する。また EPR スペクトルの結果より Cys⁷⁵ はチオレートアニオンとして配位している事が分かった。このため CooA の酸化還元電位は-300 mV (vs. SHE)に近い極めて低い値を示す。ただし、この軸配位子の交換反応がどのような生理的意義を有するのかは、未だ明らかではない。

3. CO とヘムとの反応は、配位飽和の還元型 CooA との間で生じる。CO のヘムへの配位に伴なって Pro² は脱離し、His⁷⁷ をトランス位に有するカルボニルヘム錯体が生成する。この CO 配位子を有する CooA (CO 付加型) が転写活性化能を示す活性型 CooA である。

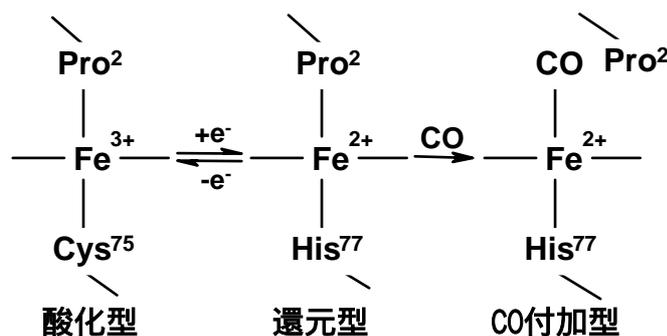


図1. CooA の配位構造変化

以上のことをまとめると図1のようになる。これらの配位構造変化を解明した当初、我々は CO による CooA の活性化機構について次のように考えた。すなわち、CO 配位に伴なう Pro² の脱離が N 末端近傍での主鎖構造変化を誘起し、それが活性型 CooA への高次構造変化のトリガーとなる。しかしこのアイデアは、その後に行った XAFS による軸配位子の立体構造解析ならびにいくつかの変異体の転写活性化能

の測定により、正確な描写ではない事が明らかになった。

Pro² 配位、脱離は CooA 機能の本質ではない?! XAFS による配位子の立体構造解析の結果、CooA の N 末端主鎖部分は極めて柔軟性が高いことが示唆された。このため Pro² の脱離に伴なう移動で、N 末端主鎖部分からタンパクの高次構造変化を誘起できるのかという疑問が生じた。実際、Pro² を含む N 末端のアミノ酸残基を 4 (N5) ないし 9 残基削除した CooA 変異体中のヘムは、野生型と同様に 6 配位構造を有し、CO 選択的な転写調節因子として機能する事が明らかとなった(表 1)。また、一酸化窒素(NO)と野生型

表 1. CooA 転写活性化能の比較

	β-gal activity Miller units/ mg of protein	
	+CO	-CO
Wild type	16.0	0.2
ΔN5	13.0	0.3
H77A	0.3	0.3

+CO: CO 存在下 -CO: CO 非存在下

CooA を反応させた場合、CO の時と同様 Pro² の脱離が生じるにも拘わらず、転写活性化能を示さない事が分かった。これらの結果から Pro² の配位や、外部配位子の存在に伴なうその脱離という極めてユニークな配位構造が意外にも CooA の機能にとって本質ではないことが示された。それでは、CooA 活性化機構の鍵はどこにあるのであろうか。

His⁷⁷ 配位の重要性。CooA の機能はこの配位子に集約される His⁷⁷ を Ala に置換した変異体(H77A)中のヘムは、還元型においても 6 配位構造を示す。この際、置換された His⁷⁷ の代わりに Cys⁷⁵ が酸化型と同様に配位している。野生型と同じく、この変異体の還元型も CO と反応し、カルボニルヘムの生成、Pro² の脱離を生じるが、転写活性化能は全く示さない(表 1)。His⁷⁷ の変異体は、H77A 限らず、配位性残基への置換も含めて転写調節能が消失する。また先ほど NO と野生型 CooA との反応で Pro² の脱離が生じると述べたが、この際、同時に His⁷⁷ の解離反応も進行し、CooA 中には 5 配位型ニトロシルヘムが生成する。これらの事実から言えることは、CooA が CO との反応によって転写活性化能を発現するには、ヘムへの His⁷⁷ の軸配位が必要不可欠であるということである。以上のことより我々は現在、CooA の活性化機構について

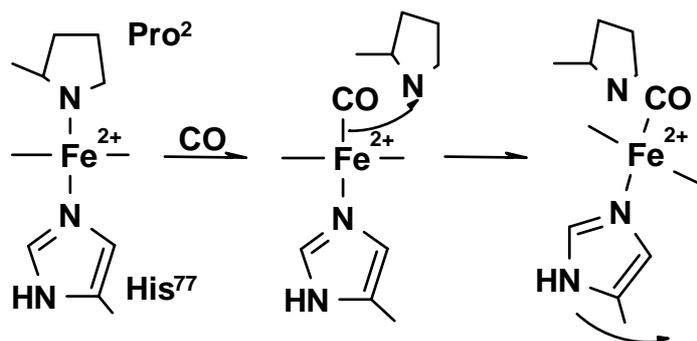


図2. COによるCooAの活性化機構

図2のような機構を予想している。Pro²はヘムの配向を活性型とは異なる方向に固定するためのフックの役割を果たしている。COのヘムへの配位によって、このフックがはずれるとヘムはHis⁷⁷を基点としてその配向を変化させる。その結果、ヘムとタンパク主鎖との直接的な相互作用に変化が生じ、この変化が、タンパク主鎖の高次構造を活性型CooAへと誘導する。この機構

は、変異体G117Aの転写活性化能の測定結果からも支持されている。Gly¹¹⁷はヘムから5Åの位置にあるアミノ酸残基であり、CooAのダイマー形成に關与する疎水性残基の近傍に位置する。このGly残基をAlaに置換したG117Aでは、ヘムの配位構造に変化がないにもかかわらず、転写活性化能に著しい低下が見られる。これは、Ala¹¹⁷のメチル基の立体障害によって、ヘムとタンパク主鎖との直接的な相互作用に変化が生じ、活性型CooAへの正常な構造変化が妨げられたためと考えられる。このように、COの結合したCooAが活性化するには、Pro²の支持を失ったカルボニルヘムがタンパク主鎖と「正しく」相互作用する必要があり、His⁷⁷の配位は、ヘムの「正しく」配向するためのアンカーの役割を果たすものと考えられる。

CO選択性の分子機構、NO選択性の分子機構 NOとCooAとの反応では、His⁷⁷のヘムからの解離反応が進行し、CooAが活性化されない。一方COとの反応ではHis⁷⁷の配位した6配位型カルボニルヘムが生成し、CooAが活性化する。CooAは、立体的には区別が困難なNOとCOを、化学者なら誰もが知っている両分子の反応性の差異を利用して明確に区別している。同様のことはNO選択性に関しても報告されている。哺乳類の細胞に存在する可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)は、NOを選択的に認識し、グアニル酸の環化反応を触媒するシグナル伝達タンパク質である。sGCのNOセンサーもHisの配位した5配位型ヘムであり、NOがヘムに配位するとHis配位子が解離し、これが環化反応活性化のトリガーとなる。一方COがsGCのヘムと反応するとHisが配位したままの6配位型カルボニルヘムが生成する。このためsGCが活性化されず、結果、NOの選択性が実現されている。このようにCooAとsGCでは、NO、COの選択性に全く同じ化学反応を用いており、生成してくる5配位型ヘムを利用するのか6配位型ヘムを利用するのかによって、選択性が切り替わっている。タンパクの存在する種やその目的、機能が異なるにもかかわらず、NOとCOの認識において同じ分子機構を採用していることは、極めて興味深い事実である。今後、様々な種や機能が異なるCOセンサータンパクやNOセンサータンパクが発見され、そのセンサー機構が解明されれば、タンパクにおけるNO、COセンサーの汎用機構の存在が示されるかもしれない。

酸素センサータンパク HemAT

HemATとは HemATは枯草菌 *Bacillus subtilis* に見出されたシグナル伝達タンパクの一種で、酸素走化性制御系における酸素センサーの役割を担っている。サブユニットの分子量は約48000で酸素の存在を感知するセンサー部位と内部シグナル物質を産生するシグナル生成部位から構成される。HemATが酸素の存在を感知するとシグナル生成部位でのキナーゼ活性が上昇し、走化性制御系の次のタンパクのり

ン酸化が進行する。最終的に菌の鞭毛モーターの回転方向の制御に至り、酸素濃度の高いほうに向かって菌体を駆動する。

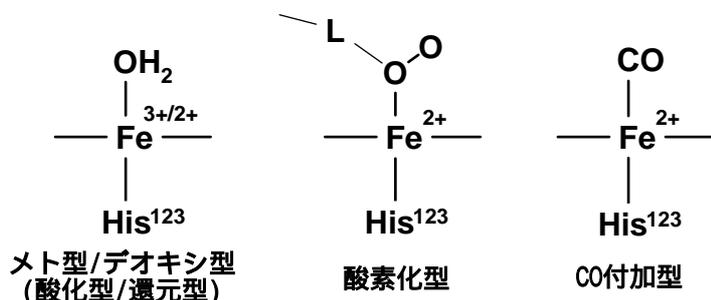


図3. HemATの予想配位構造

HemAT の酸素センサー HemAT の酸素センサー部位はミオグロビンと一次構造のレベルにおいて相同性を示す。実際、組換え体として大腸菌より発現させた HemAT は、プロトヘム IX を補欠分子族として有する事が明らかとなり、その電子吸収スペクトルは、ミオグロビンの各状態(メト型、酸素化型、デオキシ型、CO 付加型)と比較して吸収帯のピーク波長、吸光係数

とも高い類似性を示した。また、変異体を用いた実験並びに CO 付加型に対するラマンスペクトルの結果より、His¹²³ がヘムの配位子である事が分かった。His¹²³ は、ミオグロビンにおけるヘムの軸配位子 His⁹³ に相当する位置のアミノ酸残基である。これまでの知見から予想される HemAT 中のヘム配位構造を図3に示す。ミオグロビンと同様に HemAT も安定な酸素化型を生成し、自動酸化の速度定数 0.055 (h⁻¹) は、ミオグロビンと同程度であった。このことから、HemAT のヘムポケット内にもミオグロビンの His⁶⁴ に対応する残基が存在し、配位酸素との水素結合によって酸素の配位を安定化しているものと考えられる。ただ、HemAT には、ミオグロビンの His⁶⁴ に当たる位置に His 残基が保存されていない。また、水素結合可能な残基に対する変異導入においても著しく酸素配位が不安定化な変異体は得られておらず、酸素配位に關与する残基の特定には至っていない。いまのところ、未同定の水素結合アミノ酸残基(L)と配位酸素との水素結合は、鉄に直接結合した酸素原子との間で形成されていることがラマンスペクトルによる(Fe-O₂)伸縮の解析より示唆するに留まっている。

HemAT のこれから HemAT の酸素センサー部位はミオグロビンと一次構造レベルで相同性を示し、同じ配位構造のヘムを有しており、機能発現のための構造上のユニークさは一見感じられない。しかし HemAT には、酸素を安定に配位すると共に酸素が配位したという情報を生体内シグナル発生部位に伝達する分子機構が存在するはずである。今後、酸素を貯蔵と目的とする構造にどのような修飾がなされ、シグナル伝達の機構が付与されているのか、明らかにしてゆく必要があると考える。

ここで紹介した研究は、2002年12月まで、青野重利先生(現 国立共同研究機構 統合バイオ研究センター教授)のもとで主に北陸先端科技大にて行ったものです。現在は名古屋大学の理学部に異動し、新たに研究を開始しております。

文献

CooA に関して:

Ligand-switching Intermediates for the CO-sensing transcriptional activator CooA measured by pulse radiolysis.

Nakajima, H.; Nakagawa, E.; Kobayashi, K.; Tagawa, S.; Aono, S.

J. Biol. Chem., 276, 37895 (2001)

Redox properties and coordination structure of the heme in the CO-sensing transcriptional activator CoxA.

Nakajima, H.; Honma, Y.; Tawara, T.; Kato, T.; Park, S.; Miyatake, H.; Shiro, Y.; Aono, S.

J. Biol. Chem., 276, 7055 (2001).

HemAT に関して:

Resonance Raman and ligand binding studies of the oxygen-sensing signal transducer protein HemAT from *Bacillus subtilis*.

Aono S, Kato T, Matsuki M, Nakajima H, Ohta T, Uchida T, Kitagawa T.

J. Biol. Chem., 277, 13528 (2002)

(なかじま ひろし hnakajima@mbox.chem.nagoya-u.ac.jp)





気になった論文

加地 範匡 (かじ のりただ) 徳島大学大学院薬学研究科 博士後期課程

c400241002@stud.tokushima-u.ac.jp

現在、マイクロチャネルやナノチャネルのような微小な空間場を、いかにDNAなどの生体高分子解析に応用できるかをテーマに研究を進めております。ナノサイズの微小な空間場は、生体高分子を1分子レベルで観察・ハンドリングするのに非常に適した空間サイズであることから、この微小空間を利用した1分子解析がすすめられつつあります。そこで、今回は、最近気になった1分子解析に関する論文を2報、紹介させていただきます。

(1) Zero-Mode Waveguides for Single-Molecule Analysis at High Concentrations

M. J. Levene, J. Korfach, S. W. Turner, M. Foquet, H. G. Craighead, W. W. Webb, *Science*, 2003, 299, 682-686.

1分子レベルでの分子ダイナミクス観察のための新しい光学的手法である、ゼロモード導波路*を1分子解析に応用した論文で、1月31日号の *Science* 誌の表紙をかざったのでご存知の方も多いかと思えます。光学的手法(主に蛍光)を利用した1分子観察においては、観察対象分子自身が十分な蛍光強度をもつと同時に、バックグラウンドノイズに埋もれない(高 SN 比である)ことが要求されます。このためには、励起光照射部位に観察対象分子が1分子だけ存在する状態で観察することが理想ですが、光を用いた観察ゆえに、共焦点顕微鏡を用いても光の解像限界(可視光の場合 ~ 250 nm)以下の体積、約 0.2 fl (1 fl = 10^{-15} l)以下の空間を照射することは不可能です。全反射顕微鏡や近接場光顕微鏡でも、1 al (1 al = 10^{-18} l)が限界です。そこで、サンプルを pM から nM オーダーにまで希釈して1分子観察が行われてきました。しかし、実際の生理的条件下での酵素反応などは、 μ M から mM オーダーで進行しており、1分子レベルでのキネティックを解析するには、このオーダーの系で1分子観察を行う必要があります。

本論文では、スライドガラス上のアルミ薄膜に直径 50 nm 程度の穴のゼロモード導波路を作成し、これに励起光を照射することにより、スライドガラスから 20 nm 程度の空間のみ、励起することに成功しました。この結果、20 zl (1 zl = 10^{-21} l)程度の空間のみを照射することが可能となり、この空間では、たとえ 250 μ M のサンプルでも、実質1分子しか存在しないので、シグナルの弱い観察対象でも十分に検出が可能です。このゼロモード導波路に DNA ポリメラーゼを固定し、蛍光標識した dCTP が DNA 合成時にポリメラーゼに取り込まれる際の蛍光を、連続的に検出することに成功しています。1分子レベルで解析した DNA ポリメラーゼの DNA 合成速度と、バルク中での合成速度が同じであったことから、このゼロモード導波路を用いると、高濃度溶液中にも関わらず、1分子解析が可能であることが示唆されました。この論文は、1分子解析のための新しいプラッ

トフォーム技術を提示している点で、非常に重要なものではないでしょうか。

* 光導波路には、マルチモード、シングルモードがあり、より低次モードのほうが光の閉じ込めが強くなります。ここでは、光の波長よりも短い空間を有する光導波路を用いているので、これを著者らはゼロモード導波路と呼んでいます

(2) Sequence Information Can Be Obtained from Single DNA Molecules

I. Braslavsky, B. Hebert, E. Kartalov, S. R. Quake, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100, 3960-3964.

DNA を1分子レベルでシーケンシングするというアイデアそのものは、以前からも提唱されていましたが、それを実験的に実証した論文です。ガラス基板上に固定した ssDNA の鋳型鎖がポリメラーゼにより合成されていく際に取り込まれる Cy3 と Cy5 で蛍光標識した dNTP を、FRET 法と全反射顕微鏡を用いることにより連続的に検出し、シーケンシングを行っています。ただ、ここで問題になっているのは、ポリメラーゼが鋳型鎖を合成する際に、連続して蛍光標識 dNTP が取り込まれるシーケンスの場合、伸長が進まないということです。より精度の低いポリメラーゼ変異体を使用したり、蛍光標識した核酸アナログにより鋳型鎖が合成された後、化学的に蛍光分子を分解するなどの方法により、この障壁は乗り越えられると著者らは考えております。

ポリメラーゼを用いた1分子解析という点では、(1)の論文と、基本的に全く同じ考え方で解析を進めています。(1)のグループも、ゼロモード導波路を DNA1分子のシーケンシングへ応用することを考え、蛍光色素の検討を進めていますので、これからの展開が楽しみです。DNA1分子のシーケンシングが実現されることで、従来、研究レベルにとどまっていた1分子研究が、一気に産業レベルにまでその裾野を広げられることが期待されます。



長田 英也 (ながた ひでや) 徳島大学大学院薬学研究科 博士後期課程

c400241009@stud.tokushima-u.ac.jp

近年、活発に行われている自己集合化 / 組織化に関する研究は興味深いものがあります。単にボトムアップの一手法としてではなく、そこに特殊な現象が見られることが多いからですが、今回はそのような論文を2つ紹介させていただきます。

(1) A Discrete Self-Assembled Metal Array in Artificial DNA

K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, and M. Shionoya, *Science*, **2003**, 299, 1212-1213.

この論文に関しては、もう紹介する必要はないかと存じますが、御紹介させていただくことをご了承お願い致します。内容について少し触れますと、筆者らは、DNA の一つの性質、機能性ユニットを(分子レベルで)配列化する構造基盤を有していることに着目し、この機能を利用した人工 DNA を用いて、溶液中で金属イオンを一行に並べる挑戦をしています。その結果、平面状の二座金属配位子であるヒドロキシピリドン核酸塩

基(H)を導入した一連の人工オリゴヌクレオチド($d(5'-GHnC-3')$ ($n = 1$ から 5))を合成して、銅イオン(Cu^{2+})を介して交互に人工塩基対 ($H-Cu^{2+}-H$) を形成させ、右巻き二重らせんのオリゴヌクレオチド ($nCu^{2+} \cdot d(5'-GHnC-3')_2$ ($n = 1$ から 5))を定量的に構築することに成功しています。それぞれの錯体型塩基対にとり込まれた Cu^{2+} イオンは、 $Cu^{2+}-Cu^{2+}$ 間距離 3.7 ± 0.1 と見積られる間隔で、人工 DNA 二本鎖内で、らせん軸に沿って配列しており、 Cu^{2+} イオンは d 不対電子を介して、お互いに強磁性的な相互作用を示し、磁性鎖を形成したと述べられています。

Cu^{2+} イオンを溶液中において、これほど近い間隔で、多少のフレキシビリティはあるにしても一列に固定しただけでも興味深いのですが、もっと興味深いことに、この技術で合成したメタルアレイ人工 DNA 配列は、天然の DNA の任意の配列に導入可能ということで、その応用の可能性は大変大きなものであると言えるでしょう。例えば、磁性ビーズを用いていたソーティングもこの人工 DNA を用いれば楽になる可能性もあるだろうし、このメタルアレイ人工 DNA 配列の熱的安定性を利用して、一箇所だけ変成しない DNA 等が作れると、何か面白い応用が出来そうな気がします。そんなインスピレーションが沸いてくるような、大変面白い論文ですので、まだ読まれていない方がございましたら、ぜひご一読を。それにしても、この読者を畳み掛けるような論理展開とデータの挙げ方の上手さは、大変勉強になりました。

(2) DNA-templated Assembly And Electrode Attachment of A Conducting Silver Wire

E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, and G. Ben-Yoseph, *Nature*, **1998**, 391, 775 - 778

こちらは多少古いのですが、同じく自己集合化に関するところで選んでみました。短く御紹介させていただきますと、幅 $12 \sim 16 \mu m$ の金電極間に DNA をトラップし、その DNA 鎖骨格をテンプレートにして、DNA の周りに金属銀を析出させて銀ワイヤーを配線しています。

実際には、両方の金電極にその電極間を橋渡する DNA の末端の相補的配列を持ったオリゴヌクレオチドを付けておき、その電極間に橋渡する DNA 鎖を流すことでハイブリダイズさせて橋渡しを行っています。その後、銀イオンをこの DNA の周りに吸着させて、この銀イオンを還元することで金属銀として析出させています。その結果、電極間を橋渡しした $100 nm$ 幅の伝導性の銀ワイヤーを配線しています。

その結果、出来た銀ワイヤーは他には見られない電気特性を示したと述べられていますが、流れている電流値を見ると測定装置の誤差なのではと思ってしまいましたのは、私だけでしょうか。

当然既存の技術より細かい配線が出来るということで、将来的にますます集積化する電子回路の配線技術として期待が出来ますし、DNA の特異的結合を利用していますので、好きな所に配線できることも意味しています。これはこれで、大変面白いのですが、もう一つ私の感じたこの論文の面白さは、二重の意味で自己集積化が行われているところです。一つは、DNA を相補的にハイブリさせるところで、もう一つは、橋渡しされた DNA を陽イオン交換体と見立て、銀イオンを溶液中で、DNA の近傍に集めているところです。こんなの自己集合化とは言わないとお叱りを受けるかもしれませんが、この DNA を陽イオン交換体と見立てた、大胆なほどの発想の転換に面白さがありました。(1)で御紹介した論文でも、機能性ユニットを(分子レベルで)配列化する構造基盤を有していることから、DNA を金属イオンを並べる道具として、そのアーキテクチャを大胆なほど抽象化して捉える、この発想の転換に感嘆を覚えました。

二つの論文を並べてみると、両方の技術を組み合わせたら、一分子電池などが出来るのではないかとか、

いろいろインスピレーションが湧いてくる論文でした。



野島 高彦 (のじま たかひこ) 九州大学大学院工学研究院応用化学部門助手

<http://www.takenaka.cstm.kyushu-u.ac.jp/takahiko/nojimtcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp>

昨年春より九州大学大学院工学研究院の竹中繁織助教授のグループに加わり、生体分子アレイ技術をはじめとする種々のバイオ分析研究に携わっています。よろしくお願ひします。

生体分子アレイは、生命現象を包括的に理解するために必要な技術です。最初に実用化された DNA アレイに続き、現在は蛋白質や糖鎖、それに細胞をアレイ化したシステムも開発されています。今回はこのような生体分子アレイ技術に関する報告で目にとまったものを紹介します。

(1) Synthesis of Protein-Nucleic Acid Conjugates by Expressed Protein Ligation

Marina Lovrinovic, Ralf Seidel, Ron Wacker, Hendrik Schroeder, Oliver Seitz, Martin Engelhard, Roger S. Goody & Christof M. Niemeyer, *Chem. Commun.* **2003**, 822-823.

蛋白質アレイを作製するためには、固相表面に蛋白質分子を配列・固定しなければなりません。しかし固定化に伴って蛋白質分子の立体構造に影響が生じることがあり、これを回避する技術が求められています。このための一つの方法は、蛋白質を直接固体表面に固定せず、適切なリンカーを介して固定するというものです。この報告では遺伝子工学的に調製した蛋白質に一本鎖ペプチド核酸(PNA)を共有結合させたコンジュゲートを調製し、これを DNA アレイにハイブリダイゼーションさせることによって、蛋白質アレイを構築する手法が紹介されています。アレイ化された蛋白質が機能を失うことなく固定化されたことも確認しています。

(2) Self-Assembling Protein Arrays Using Electronic Semiconductor Microchips and in Vitro Translation

Andrew V. Oleinikov, Matthew D Gray, Jun Zhao, Donald D. Montgomery, Andrey L. Ghindilis, and Kilian Dill, *J. Proteome Research*, **2003**, ASAP article 10.1021/pr0300011.

同じく核酸を介して蛋白質分子をアレイ化する手法が報告されています。アレイ化される蛋白質は無細胞翻訳反応で調製され、この際にリジン残基の アミノ基にピオチンを導入しています。これを利用してストレプトアビジンを経由してピオチン化オリゴ DNA が連結されることにより、蛋白質と DNA とのコンジュゲートが構築されます。このオリゴ DNA と相補的配列が固定化された DNA アレイにコンジュゲートが与えられることにより、蛋白質アレイが構築されます。無細胞蛋白質合成系は、遺伝情報を実際の物質に変換することのできる非常に有用な手法です。以前は反応効率が非常に低く、ライジオアイソトープレベルでの検出感度が一般的な分析手法でしたが、この数年間で技術が大幅に進歩した結果、一般的なバイオ実験の一つになりつつあります。ここで述べられている一連の実験には生細胞を用いるステップは含まれておらず、遺伝子組換

え施設では無い通常の化学実験室で行えるという点でも注目に値します。

(3) Prediction of Feature Spread for Microarray Printing Using Protein and DNA Solutions

Jason T. Smith and Monty Reichert, *Langmuir*, **19**, 3078-3080 (2003).

生体分子アレイを自前で作製する際、もっともシンプルな手法は、ピンで試料溶液をガラス板に打ち付けるものです。アレイ上の液滴の直径は 100 マイクロメートルから 200 マイクロメートルの微小スケールなので、この直径はガラス表面の状態や溶液の組成に大きく影響されます。生体分子アレイを用いた実験において信頼性を高めるためには、できるかぎり液滴の大きさにばらつきが無いことが求められます。この報告では、種々の組成の生体分子試料溶液を、種々の市販アレイ用ガラス板にスポットした際の、液滴のサイズとばらつきに関して詳細に検討しています。経験的に液の組成からスポット径をある程度は予測できることが示されていますが、各種パラメータと液滴との関連性に関しては未知の部分が多く残されています。

(4) Arrays of Mobile Tethered Vesicles on Supported Lipid Bilayers

Chiaki Yoshina-Ishii and Steven G. Boxer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, ASAP article 10.1021/ja029783+

ベシクルを固定化したアレイも報告されています。ベシクルから 24 残基のオリゴヌクレオチドが外部に伸びており、これと相補的配列のオリゴヌクレオチドが基板上の脂質二重膜から伸びています。両者をオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションで結合させることにより、固体表面上にベシクルをアレイ化させることに成功しています。膜蛋白のアレイ化などへの応用が考えられる興味深い手法です。

(5) Direct Detection of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) with Genomic DNA by the Ferrocenylnaphthalene Diimide-based Electrochemical Hybridization Assay (FND-EHA)

Takahiko Nojima, Kenichi Yamashita, Makoto Takagi, Atsuko Takagi, Yasuyuki Ikeda, Hiroki Kondo, and Shigeori Takenaka, *Analytical Sciences*, **19**, 79-83 (2003).

最後に筆者の所属する講座からの報告を。生体分子アレイ技術では、アレイ作製技術に加えて、アレイ上の生体分子計測技術も鍵となります。電気化学的な検出法には様々なメリットがあり、微量サンプルの検出に適しています。ここでは染色体 DNA 上の一塩基多型の検出に電気化学的手法を用いています。血液から染色体 DNA を精製し、PCR もラベル化も施すことなく、そのまま金電極上に固定されたプローブオリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションさせることによって、一塩基多型の違いを確実に判別可能であることを示しました。



藤本 ゆかり (ふじもと ゆかり) 大阪大学大学院理学研究科化学専攻助手
yukarif@chem.sci.osaka-u.ac.jp

今年3月に阪大に戻って来て仕事を始めたところですが、現在の研究に関連する論文2報(自然免疫における受容体である NOD2 に関するもの)と、少し仕事から離れて興味のある、タンパク質の knot(結び目)構造関連の論文を紹介したいと思います。

Host Recognition of Bacterial Muramyl Dipeptide Mediated through NOD2. Implications for Crohn's Disease. Naohiro Inohara, Yasunori Ogura, Ana Fontalba, Olga Gutierrez, Fernando Pons, Javier Crespo, Koichi Fukase, Seiichi Inamura, Shoichi Kusumoto, Masahito Hashimoto, Simon J. Foster, Anthony P. Moran, Jose L. Fernandez-Luna, and Gabriel Nuñez. *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 5509-5512.

抗原抗体反応による防御である“獲得免疫”が脊椎動物のみに備わっているのに対し、“自然免疫”と呼ばれる生体防御機構は多細胞生物全般に共通に存在するシステムであり、細菌由来物質を受容体が認識することによってサイトカインの誘導が起こり免疫系が活性化される。マクロファージなどの細胞膜に発現し細菌の細胞壁成分等を認識する受容体として Toll-like receptor (TLR)が知られているが、最近になって細胞質に存在している NOD ファミリー (NODs)と呼ばれるタンパク質群も、細菌の細胞壁成分を認識して自然免疫を誘導することがわかってきた。NODs は、共通の構造としてヌクレオチド結合性多量化ドメイン (Nucleotide-binding oligomerization domain, NOD)を中央部に持つタンパク質群であり、現在のところヒトの NOD1、NOD2、Apaf-1 (アポトーシス誘導カスパーゼ活性化因子)、線虫の Ced-4、植物の病原抵抗性 (R) 因子等が発見されている

この論文では、最近発見された NOD2 (その遺伝子変異が、難治性の炎症性腸疾患である Crohn 病の原因の一つと言われている)が、細菌の細胞壁を構成しているペプチドグリカン (PGN) の免疫活性を発現する最小構造であるムラミルジペプチド (MDP) を認識し、核内転写因子である nuclear factor- κ B (NF- κ B) を誘導して自然免疫を引き起こすことを示した。一方、PGN を認識する TLR2 は MDP を認識しなかった。また、Crohn 病患者の変異型 NOD2 については、MDP による NF- κ B 誘導が弱いかほとんど観察されず、NOD2 による細菌由来成分の認識が Crohn 病の発病機構に関わっていることが示された。

Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection.

Stephen E. Girardin, Ivo G. Boneca, Jérôme Viala, Mathias Chamailard, Agnès Labigne, Gilles Thomas, Dana J. Philpott, and Philippe J. Sansonetti. *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 8869-8872.

上記の論文の直後に発表された非常に似た内容の報告。数種類の細菌のペプチドグリカンおよびムラミルジペプチドが NOD2 により認識されて NF- κ B 誘導が起こるのに対し、Crohn 病患者の変異型 NOD2 の場合には NF- κ B 誘導が起こらないことが示されている。

A Knot or Not a Knot? SETting the Record 'Straight' on Proteins

William R. Taylor, Bing Xiao, Steven J. Gamblin, Kuang Lin. *Comp. Biol. Chem.* **2003**, 27, 11- 15

著者らは、彼らの開発したアルゴリズムを用いて Protein Data Bank (PDB) を検索することにより、タンパク質が knot (結び目) 構造を持つものを 10 種発見しているが (*Nature*, **2000**, 406, 916-919)、その構造は主鎖自体が knot (結び目) を作った構造であり、彼らは (true) ‘topological knot’ と呼んでいる。一方、最近出されたこの論文では、昨年ほぼ同時期に 5 つの独立したグループから報告のあった histone lysyl methyltransferase の catalytic domain (SET domain) に存在する knot 様構造について議論している。これは水素結合により生成したループが C 末端のペプチド鎖をトラップした構造であり、厳密には著者らの定義する ‘knot’ ではないが、著者曰く、数学的な knot の定義とは異なり単にロジックの問題だけではなく、こうした hydrogen-bonded knot については ‘pseudo-knot’ と呼ぶのはどうかと言った提案をしている。また cystine knot と呼ばれるジスルフィド結合による knot 構造が知られているが、こうした構造については ‘covalent-knot’ と呼ぶのが良いのではないかと述べている (*Nature*, **2003**, 421, 25)。また、‘topological knot’ と、水素結合やジスルフィド結合によってできる knot 様構造は、単に呼び名の問題だけではなく、フォールディングの際に knot 構造がいつか生成するかを考えた場合でも本質的に違ったものになる。すなわち ‘pseudo-knot’ や ‘covalent-knot’ はタンパク質分子内の crosslink により比較的容易に生成しうると考えられるが、‘topological knot’ の場合は、ポリペプチド鎖がまずループを作り、その部分に末端のアミノ酸残基が十分な長さ通り抜けなければならず、低い頻度でしか起こらない現象である、と述べている。タンパク質の knot という言葉が幾つかの場面で使われていることに、数学的な knot の定義に基づいた著者の困惑(?) が窺える気がする。

The Cystine Knot Promotes Folding and Not Thermodynamic Stability in Vascular Endothelial Growth Factor.
Yves A. Muller, Christoph Heiring, Rolf Misselwitz, Karin Welfle, and Heinz Welfle. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277(45), 43410-43416.

これは cystine knot、すなわち Taylor の言う ‘covalent-knots’ を持つタンパク質の話である。それはさておき、ここでは血管内皮増殖因子 (VEGF) の 3 つの絡み合ったジスルフィド結合 - cystine knot の存在が、熱力学的安定性にはほとんど寄与しておらず、むしろフォールディングが正しく起こるために必要であると述べている。ジスルフィド結合生成を妨げるため Cys を Ala に置換した 3 種の変異体を作り、その熱力学的安定性、結晶構造を示した。変異の導入によってもフォールド状態の熱力学的安定性は低下せず、逆に 2 kcal/mol 程度上昇するのに対し、wild type の場合の 108 °C という高い熱安定性は 40 °C 程度低下し、エントロピックな安定化が失われた。また、最近 cystine knot を持つ growth factor glycoprotein hormone α -subunit のフォールディングにおけるジスルフィド結合の生成順を考察した結果が報告されている (*Biochemistry* **2001**, 40, 577) が、著者らはその結果と比較し、最後にジスルフィド結合が生成すると推測される部位の変異体の構造は、フォールディングの中間体の構造と近いと考えられるが、その構造は native の構造と比較してより compact な構造であると述べている。



松原 輝彦 (まつばらてるひこ) 慶應義塾大学理工学部生命情報学科 助手
matsubara@bio.keio.ac.jp

博士課程修了後しばらく徳島にいましたが、本年4月より再び佐藤研に所属させていただくことになりました。宜しくお願いたします。

Structure of A Protein Determined by Solid-State Magic-Angle-Spinning NMR Spectroscopy

Castellani F, van Rossum B, Diehl A, Schubert M, Rehbein K, Oschkinat H. *Nature*, **420**, 98-102 (2002).

Molecular Conformation of A Peptide Fragment of Transthyretin in An Amyloid Fibril

Jaroniec CP, MacPhee CE, Astrof NS, Dobson CM, Griffin RG, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16748-53 (2002)

SH3 (Src-homology 3)ドメイン、およびアミロイド繊維のアミノ酸レベルでの高次構造の固体 NMR 解析の論文。昨年溶液 NMR によるタンパク質の構造決定法がノーベル賞を受賞したが、いわゆる CP/MAS (cross-polarization/magic angle spinning)固体 NMR によるタンパク質の構造決定法が近年進歩しつつある。この方法の利点は、溶液に溶けず結晶化もできない固体粉末の生体試料(例えばアモルファス状態など)を測定できることである。また膜タンパク質や分子量の大きいタンパク質にも有用であるらしい(たまたま固体 NMR を使っていて見つけた論文ですが、「現代化学」2003年6月号に固体 NMR の有用性を説いた総説中でも紹介されています)。

Natural Killer Cells Attack Tumor Cells Expressing High Levels of Sialyl Lewis x Oligosaccharides

C. Ohyama, S. Kanto, K. Kato, O. Nakano, Y. Arai, T. Kato, S. Chen, M. N. Fukuda, and M. Fukuda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13789-13794 (2002).

sialyl Lewis x がNK細胞に認識されることを示した論文。ガン化された細胞には特殊な構造をもった糖鎖抗原が発現され、sialyl Lewis x (NeuAc 2-3Gal 1-4(Fuc 1-3)GlcNAc-)もその一つである。ヒト黒色種細胞 MeWo 細胞に sialyl Lewis x を発現できるように 1,3-fucosyltransferase III (FTIII)を遺伝子導入し、sialyl Lewis x の発現量の異なる細胞を3種(high, moderate, negative)得た。ベージュマウス(NK活性が低い)にそれぞれの細胞を投与して肺腫瘍を起こさせたところ、sialyl Lewis x の発現量に依存してマウスでの転移量が増えていた。以前の研究でヌードマウス(T細胞がないがNK活性はある)では sialyl Lewis x を高発現している細胞よりも中程度の細胞の方が転移能が高かったことから、NK細胞が sialyl Lewis x を認識して攻撃していることが示された。

Creation of A Zymogen

Plainkum P, Fuchs SM, Wiyakrutta S, Raines RT., *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 115-9 (2003).

プロテアーゼなどの酵素は細胞中で不活性な前駆体(zymogen)として発現され、限定分解を受けて活性状態に移行する。この研究では ribonuclease A (RNase A) にプロテアーゼ(plasmeprin II)の基質配列(GAKLELFEIPKGS)を活性部位付近に挿入させ、不活性化させた RNase A 前駆体を設計した。この前駆

体に plasmepsin II を作用させると基質配列部位が切断され、RNase A 活性を示した。特に特別なアイデアや技術を使っている訳ではないが、この類の研究は DDS で有用であろう。例えば前駆体の状態で標的部位に輸送させたあと、活性化状態にすることで特異的な治療効果が得られると考えられる。

The complete folding pathway of a protein from nanoseconds to microseconds

U. Mayor, N. R. Guydosh, C. M. Johnson, J. G. Grossmann, S. Sato, G. S. Jas, S. M. Freund, D. O. Alonso, V. Daggett, A. R. Fersht, *Nature*, **421**, 863-867 (2003).

3つのヘリックスバンドル構造を持つ Engrailed ホモドメイン (61aa のヘリックス) および変異体のナノ~マイクロ秒単位の折れたたみ過程を解析した論文。NMR、CD および蛍光の kinetics 解析を行い、動力学計算を行って分子モデルを組んでいる。(モデリングがどれほど正しいのかよくわからないが)タンパク質が部分的に少しずつほどけていく(折れたたまれていく)様の図は直感的に理解しやすく、美しい。

Targeting Therapeutics to An Exposed and Conserved Binding Element of the HIV-1 Fusion Protein

Root M.J. and Hamer D.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5016-21 (2003).

HIV ウィルスは変異の割合が高く、感染阻害を行うには亜型間でも共通な部位を標的にしなくてはならない。しかし HIV-1 外被糖タンパク質(Env) の亜型間に共通な部位は複合糖質で覆い隠されており、膜融合過程以外は露出することがない。そこでウィルスが膜融合過程で露出する Env の gp41 の C 末端領域と相互作用する 5-helix を作成した。Env はウィルス表面に提示されているが、感染細胞の表面にも存在する。5-helix はウィルスの感染阻害を起こすとともに、毒素との融合タンパク質として発現させると感染した細胞を選択的に死滅させることができた。HIV ウィルスの表面糖鎖のように、糖鎖はさりげなく(?)さまざまな生理活性に関与している。我々は微生物で発現されたタンパク質ではなく、きちんと翻訳後修飾されたタンパク質を用いて研究を行わなくてはならないのだが、技術的にまだ確立されていないのが現状である。



グラビアページ

第6回生命化学研究会

2003年6月27日(金)
九州大学国際交流プラザ

世話人



竹中繁織氏 浜地 格氏
九州大学



芳坂貴弘(北陸先端科学技術大学)
「遺伝暗号の拡張による非天然アミノ酸のタンパク質への導入」



芹澤 武(鹿児島大学)
「高分子超薄膜のナノ構造制御と機能発現」

宇都義浩(徳島大学工学部)
「イソプレノミクスを基盤としたフェノール性抗酸化剤の分子設計とミトコンドリア機能修飾」

末田慎二(九州工業大学情報工学部)
「タンパク質工学的手法を利用したピオチン依存カルボキシラーゼの解析」





お知らせコーナー

第1回生命化学国際シンポジウムへのお誘い

組織委員会・プログラム委員会

会員の方々は、既にご存知のことと思いますが、今年の12月2日～5日に兵庫県立淡路夢舞台国際会議場で第1回生命化学国際シンポジウムを開催いたします。組織委員会・プログラム委員会として、この国際シンポジウムの特徴や見所をご紹介させていただきたいと思っております。大変エキサイティングな国際シンポジウムになることは間違いありませんので、是非ご出席いただきたいと思います。

- 1) 世界最先端の研究者が20名以上招待講演者としてエキサイティングな講演を行います。
- 2) ポスター発表は、予想を大幅に超えて116件もの申込がありました。特に、新進気鋭の研究者のポスターが多く、ポスター会場では、熱気あふれるホットな議論が展開されます。当初、予定していたポスター会場は、80件しか発表できませんでしたので、急遽、ポスター会場を増やし、全てのポスターが、会期中ずっと掲示できるようにしました。また、これからの予算次第ではありますが、ポスター賞を設ける予定です。皆さん、張り切って発表準備してください。
- 3) 国際シンポジウムを記念して丸善から発行するプロシーディングス(ハードカバー)は、各自2-4ページの論文形式で、トータル400-600ページになる予定です。この本を読めば、生命化学の現在の最先端の研究動向が手に取るように分かるとともに、将来が見えてきます。このプロシーディングスは、学会当日お渡しいたします。
- 4) 参加登録は、advanced registrationが10月1日締め切りです。お早めに登録をお願いします。
- 5) 学会会場は、2000年に安藤忠雄氏の設計によりできた会場です。講演・ポスターともに素晴らしい環境の中で満喫していただけるものと思っております。
- 6) 国際シンポジウムのオフィシャルホテルは、ウェスティンホテル淡路です。ワールドカップの時に、ベッカムが宿泊して一躍有名になったホテルです。当初、これだけのポスター発表を申し込んでいただけるとは予想していなかったため、あまり部屋数を確保しておりませんでした。お早めにご予約ください。
- 7) 本国際シンポジウムは、文部科学省ナノテクノロジー総合支援プロジェクト、大阪大学大学院化学系21世紀COEプログラム拠点、日本化学会生体機能関連化学部会、コンビケム研究会などから支援をいただく予定になっております。さらに、他のいくつかの財団等からも支援をいただく準備をしております。また、組織委員会で手分けして支援していただける企業を募っております。これらの援助は、国際シンポジウムの成功のために活用することはもちろんのこと、特に、若手研究者(学生、院生、ポスドク)を支援するために、できるだけ活用したいと思っております。

以下に国際シンポジウムの会告を掲載します。

第1回生命化学国際シンポジウム

First International Symposium on Biomolecular Chemistry (ISBC2003)

<http://www.chem.eng.osaka-u.ac.jp/~ISBC2003/>

主催 日本化学会生命化学研究会 **共催** ナノテクノロジー総合支援プロジェクトセンター・大阪大学大学院化学系 21世紀 COE プログラム拠点・日本化学会生体機能関連化学部会・コンビケム研究会 **協賛** 日本化学会・日本薬学会・日本生化学会・高分子学会ほか

会期 平成15年12月2日(火)~5日(金)

会場 兵庫県立淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県津名郡東浦町夢舞台 1番地〔ホームページ〕
<http://www.yumebutai.org/>)

討論主題 生命化学に関する世界第一線の研究者が会し、最新の研究成果および今後の展開について発表・意見交換を行い、国際交流と発展を促進することを目的として、第1回生命化学国際会議 (ISBC2003) を開催する。世界的レベルの研究者による招待講演およびポスター発表により下記に示す5つのセッションを設け、生命化学の現状と展望について討論を行うとともに、生命化学分野の意義と重要性を追求し、当該分野における基礎研究および応用への発展に寄与することを目的とする。

主要テーマ (セッション名)

- I Functional DNA/RNA
- II Cell Function of Macromolecules
- III Metals in Chemical Biology
- IV Protein-Protein Interaction
- V Technology Innovation in Biomolecular Chemistry

主な招待講演者 : S. AONO (Japan), H. ARIKUNI (Japan), Y. BABA (Japan), C. F. BARBAS (USA), Y. CHANG (USA), D. P. FAIRLIE (Australia), D. P. GIEDROC (USA), D. HILVERT (Switzerland), S. HIROTA (Japan), S. ITOH (Japan), R. KANNAGI (Japan), K. H. KHOO (Taiwan), B. H. KIM (Korea), Y. S. LEE (Korea), C. H. LIN (Taiwan), T. W. MUIR (USA), P. E. NIELSEN (Denmark), P. SEEBERGER (USA), K. M. SHOKAT (USA), H. SUGA (USA), S. TAKENAKA (Japan), S. Q. YAO (Singapore), Y. YONEDA (Japan) 他

参加登録費 : 10月1日まで一般 50,000 円、官公庁・大学 30,000 円 ; 10月1日以降各 1万円増 (含講演要旨代) 学生 : 10月1日まで 5,000 円、以降 6,000 円 (講演要旨代 5,000 円別途)

申込先 〒770-8505 徳島市庄町 1 - 78 徳島大学薬学部 馬場嘉信

Tel: 088-633 - 7285 Fax: 088-633 - 9507 E-mail: isbc2003@chem.eng.osaka-u.ac.jp



受賞のお知らせ

坂本 寛氏 (久留米大学医学部医化学講座)

受賞名: 平成15年度(第1回)日本生化学会九州支部学術奨励賞 (2003年6月1日)

「結晶構造に基づくヘムオキシゲナーゼによるヘム分解機構の解明」

芳坂 貴弘氏 (北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科)

平成14年度日本化学会進歩賞 (2003年3月20日)

「遺伝暗号の拡張による非天然アミノ酸のタンパク質への導入」

平成15年度東京テクノフォーラム 21・ゴールドメダル賞 (2003年4月16日)

「遺伝暗号を拡張した人工蛋白質合成システムの開発と応用」



会員異動のお知らせ

片山 佳樹氏 (2003年4月より)

九州大学工学研究院 応用化学部門 応化分子教室 教授

〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

TEL: 092-642-3608

FAX: 092-642-3611

e-mail: ykatatcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp

坂口 和靖氏 (2003年4月より)

北海道大学大学院理学研究科化学専攻 生命分子化学講座 生物化学研究室

〒060-0810 札幌市北区北 10 条西 8 丁目

TEL: 011-706-2698

FAX: 011-736-2074

e-mail: kazuyasu@sci.hokudai.ac.jp

篠原 寛明氏 (2003年4月より)

富山大学工学部物質生命システム工学科 生命工学講座 教授

〒930-8555 富山市五福 3190

TEL/FAX: 076-445-6832

e-mail: hshinoha@eng.toyama-u.ac.jp

新留 琢郎氏 (2003年4月より)

長崎大学 大学院生産科学研究科 物質科学専攻 助手

〒852-8521 長崎市文教町 1-14

Tel&Fax: 095-819-2687

E-mail: tanido@net.nagasaki-u.ac.jp

芳坂 貴弘氏 (2003年4月より)

北陸先端科学技術大学院大学 材料科学研究科 機能科学専攻 助教授

〒923-1292 石川県能美郡辰口町旭台 1-1

TEL: 0761-51-1681

FAX: 0761-51-1149

E-mail: hohsaka@jaist.ac.jp



編集後記

誠に申し訳ないのですが、都合により、今号の発行が大変遅くなりました。早くから原稿をいただいた執筆者の方々、会告原稿が間に合わなくなってしまった方々に、この場をお借りして、深くお詫び申し上げます。今後、このようなことのないよう、注意して取り組んでいきたいと思っておりますので、今後とも宜しく御願い申し上げます。

石田 斉 (北里大学理学部)

