



目次

1.	巻頭言	
	「超分子化学」と「生命化学」: 一個人の歴史	2
	渡邊 英一 (東京大学総合研究機構ナノマテリアセンター)	
2.	関連シンポジウム紹介	
	第2回産学連携 BICS シンポジウム	4
3.	研究紹介	
	分子シャペロン機能工学とバイオマテリアル創製	6
	秋吉 一成 (東京医科歯科大学学生体材料工学研究所)	
	糖鎖を迅速に合成する	14
	眞鍋 史乃 (理化学研究所)	
4.	論文紹介「気になった論文」	22
	中野 修一 (甲南大学先端生命工学研究所)	
	穴田 貴久 (東北大学大学院歯学研究科)	
	濱田 勉 (京都大学大学院理学研究科)	
5.	私の Caltech 体験	28
	梅野 大輔 (千葉大学工学部)	
6.	研究所紹介	
	甲南大学先端生命工学研究所の紹介	33
	甲元 一也 (甲南大学先端生命工学研究所)	
7.	シンポジウム等会告	35
8.	お知らせコーナー	37
	受賞・会員異動のお知らせ	
	編集後記	

巻頭言

「超分子化学」と「生命化学」： 一個人の歴史



東京大学総合研究機構ナノマテリアセンター

渡邊 英一

28年前のある休日、研究室の廊下からみかけた光景を今でも思い出す。セミナー室の中で男が床に向かい一心不乱に図を描いては消した描く。そしてそれはいつ果てるとも無く続けられる。背後の窓から差し込む西日で顔がよく見えない。けれども分子模型を横に飽かず眺めるその姿から研究室のボスだとすぐに気がついた。ボスの名前は Jean-Marie Lehn、後に「超分子化学」の概念を提唱し、ペデルセン、クラム両名とともにノーベル化学賞を受けた若き日の姿である。

当時私は日本からはじめてのレーン研の研究者としてクリプタンドの合成とその金属錯体の研究に従事していた。正直に言えば、私にはクリプタンドを中心とする一連の研究室の仕事が、クラウンエーテルを発見したペデルセンや、それを米国流の鮮やかな手口で展開したクラムの仕事にくらべてそれほど特徴があるものとは思えなかった。ボスとのディスカッションは刺激に富み、厳しいけれども楽しさがあつたが、私自身はテーマとしていたヘモシアニンモデルを追及すればするほど、人間が扱う既存の化学体系から外れたところで機能する自然の造化の妙に打たれ、モデルの構築ははるかに遠いと感じていた。とても人智のおよぶものではないと。後年その若きボスが「化学」の視点で生命現象のメカニズムから純粹に人工系まで幅広い領域を包含した「超分子化学」(supramolecular chemistry)の概念を創生して化学の世界に大きな影響を及ぼすとはそのときは知る由も無かつたのである。

今思うと教授は私が出会った内外の「化学者」のいずれのタイプとも異なっていた。冒頭のエピソードが示すように、ある概念を表す分子集合体を記述するスキームの考案に関して、そのこだわり方と集中力は尋常ではない。それは「化学」というよりは「数理」的な美の追求であり、美しい建造物を求める設計者ともいえる。突き詰めて考えた先が「超分子」でありその「化学」的視点の重要性であつたのではないか。帰国後燎原の火のごとく「超分子化学」の概念が人工物から生命現象にわたる全研究分野に広まるのを見るにつれ、考え抜いた末の「概念」の威力を思い知った。

時は経て私は企業の触媒の開発の現場から研究管理部門にうつり、4年前よりナノテクノロジー分野で「材料技術の知識の構造化」という名の国家プロジェクトに従事している。プロジェクトを始めるにあたって各国のナノテクノロジー国家戦略をまとめる必要があり、統一欧州の科学技術政策報告書を調べていたところ、文書中に「supranational」という文字が様々な文脈の中で使われていることに気がついた。分子集合体の振

る舞いを示す「supramolecular chemistry」のアナロジーであることは明らかだが、それにしても欧州各国の統一のため人々を行動に駆り立てるのに、米国発ではなく、欧州独自の言葉を用いるという心憎い政治感覚、ここまで適切な言葉の使い方が他にあるだろうか。これこそ戦略的思考の見本であり、米国発の言葉があつて始めて“戦略？”的に物事が前に進むことが当たり前の我が国の状況に比して欧州おそるべしと感じた所以である。

そして今現在、私は何に導かれたのか日本発の概念である「生命化学」とその産業への橋渡しにいつのまにかかわっている。話の源は3年前、神田神保町にある化学技術戦略推進機構(JCII)の一室での面談にさかのぼる。そこで甲南大学の杉本直己教授にお会いして、先生の「生命化学」に関する熱のこもったお話と、社会への橋渡しの真摯な思いに心打たれたことが、「生命化学」の社会への橋渡しを決意させた理由の一つである。しかしそれは私自身が心底から「生命化学」が目指すところを理解したことを意味しない。「生命化学」の概念は現在でも私の中で定まってははいない。けれども杉本教授の「分子環境(モレキュラー・エコロジー)を変化させる」という一言で、理由も無く「生命化学」には「超分子化学」という概念の可能性に匹敵するものがあると感じたのである。それは生体だけでなく、「触媒」という人工物の、とても人の手によると思われぬ不可思議な働きに対してもこれまでいつも抱いていたもやもやした気持ちを打ち破る一言であった。さらにいえば、かつて私が造化の妙として尻尾をまいて逃げ出した生命領域に対し、「化学」の視点で切り込めば決して手が届かない領域ではないとする、チャレンジングだが冷静な取り組み姿勢に心打たれたのかもしれない。すでに「生化学」や「バイオメテック」など既存の関連学問領域があるにもかかわらず、なぜこれだけの新進気鋭の研究者が「生命化学」に惹きつけられるのか理解できた気がした。

今後の私自身の使命を「概念化」とすると、アカデミアと産業界を結ぶ「知の編集人」でありまた同時に「萌芽事業のプロデューサー兼仕事請負人」でありたいと考えている。「生命化学」の場合でいえば、現状は産と学を結ぶための「知の編集」段階に過ぎない。しかし遠からず「生命化学技術」として産業の活性化のための新たな技術基盤を提供することは間違いがない。現在の私は生命化学にかかわる研究者の皆様の熱意に導かれて橋渡しのお手伝いをしている。「生命化学」をどうにかして将来社会に役立たせたいという情熱を持つ若き研究者の皆さん、是非未来の社会を一緒に作ろうではありませんか。

(わたなべ えいいち wataei@sogo.t.u-tokyo.ac.jp)

関連シンポジウム報告

**第2回産学連携 BICS シンポジウムを開催しました。
—生命化学による次世代技術の創成—**

慶應義塾大学理工学部 佐藤 智典

第2回産学連携 BICS シンポジウムは、神奈川大学横浜キャンパスで開催された日本化学会第85春期年会の特別企画として、平成17年3月26日に行われました。日本化学会(産学交流委員会・生命化学研究会)、化学技術戦略推進機構(BICS 研究会)、科学技術振興機構(JST)が主催となり、生命化学研究会に属する大学研究員と化学技術戦略推進機構に属する企業研究者が「生命化学」をベースとする産学連携活動の内容を紹介し、産業技術化を目指した実質的な産学交流を発展させることを目的として行われた。本 BICS(Bio-chemicals Informatics & Chemo Systems)研究会は、「生命化学を事業化し、化学産業の活性化につなげることを目指して、化学技術戦略推進機構(JCII)・研究推進委員会と日本化学会・生命化学研究会が連携して一昨年に設立された。生命化学研究会から 浜地会長、馬場前会長、杉本元会長、塩谷委員、二木委員、三原委員と私が参加し、渡邊英一 研究会主査(化学工学会、三菱化学)の指導のもと、BICS 研究会参加企業約 10 社と「生命化学」における産学連携のあり方について、中長期的な展望を見据えた議論が行われていた。その成果のひとつとして、平成16年11月22日には第1回 BICS シンポジウムが行われた。第1回が企業を中心としたシンポジウムであったのに対して、第2回シンポジウムは日本化学会会員に対して広く紹介するために、日本化学会の特別企画として開催された。

第2回シンポジウムでは、浜地 格会長による基調講演においてはバイオ関連産業の未来と若い研究者を引きつけるための生命化学の研究のあり方についての提案がなされ、渡邊 英一研究会主査からは BICS 研究会の活動報告が行われた。学からの提案では研究会メンバー5名に加えて、バイオベンチャーを設立されている東京大学の多比良 和誠先生と慶應義塾大学の曾我 朋義先生の講演が行われた。次に産業界の取り組みとして4名の講師による講演が行われた。

第3期目の生命化学研究会においては、浜地会長が主要な目標の一つとして、「産にも学にもうれしい有意義な産学連携」を挙げている。既に2度の公開シンポジウムで産学連携に関して熱心な議論が行われたが、生命化学の産業としての取り組みはまだ始まったばかりであり、どのような産業に成熟するのかを見極めようとしているのが現状なのかもしれない。そのような時代においては、バイオベンチャーの役割も産学連携の橋渡しとして重要であるように感じられた。生命化学研究会が、学問分野および産業界で果たすべき役割について継続して議論していくことの重要性を再認識できたシンポジウムであった。

産学連携 BICS シンポジウム(シリーズ 第2回)
—生命化学による次世代技術の創成—

日時:3月26日(土) 9:00-17:30

場所:神奈川大学

共同主催:日本化学会(産学交流委員会・生命化学研究会)・化学技術戦略推進機構(BICS 研究会)・
科学技術推進機構

- (1) 企画趣旨説明 (化学工学会) 渡邊 英一
- (2) 基調講演 「生命化学と新たな産業創生について」
(九大先導研) 浜地 格
- (3) 活動紹介 「BICS 活動および第1回シンポジウム」
(化学工学会) 渡邊 英一
- (4) 第1部:学からの提案
(生命化学による革新技术創成および応用の可能性提案と大学発ベンチャーへの取り組みなど)
 1. 人工生体高分子を用いた金属配列技術の創成
(東大院理) 塩谷光彦
 2. 細胞の運命を決める小さな RNA の発見から応用まで
(東大院工) 多比良和誠
 3. 次世代のタンパク質改変技術—非天然型アミノ酸導入技術の開発と応用
(北陸先端大材料科学研) 芳坂 貴弘
 4. 新しい生体情報のセンシングおよび利用技術の開発と新しいコンセプトの創製
(九大院工) 片山佳樹
 5. CE-MS による生体成分の網羅的な解析
(慶大先端生命研) 曾我朋義
 6. シャペロン工学によるタンパク質の機能・集積制御
(東京医歯大生体材料研) 秋吉一成
 7. フェージライブラリー法を用いたインフルエンザ感染阻害の開発
(慶大理工) 佐藤 智典
- (5) 第2部:産界の取り組み、今後の展望
 - 1) 講演 生命化学によるビジネス創成への期待
(日経バイオビジネス) 横山 勇生
 - 2) 企業からの話題提供:産業技術化、事業化、産学連携の立場
 - 1) DDS 用素材の開発とその展開
(日本油脂) 山村 廣行
 - 2) 膜型人工肺 Platinum Cube NCVC の開発と製品化
(大日本インキ化学工業) 松田 智昌
 - 3) 熱応答性磁性ナノ粒子の開発と応用
(チッソ石化) 大西 徳幸
- (6) まとめ



分子シャペロン機能工学とバイオマテリアル創製

東京医科歯科大学生体材料工学研究所

秋吉 一成

(akiyoshi.org@tmd.ac.jp)



1. はじめに

遺伝子工学の進展により、細胞内合成装置を利用して様々なタンパク質が自在に設計できる時代となった。一方で、細胞内で多量に発現させた新規タンパク質は正しくフォールディングされずに凝集してしまい、その再生・集積技術が大きな課題となっている。細胞内では、タンパク質のフォールディング、会合、凝集抑制、膜透過、活性制御そして分解に至るまでその一生を制御している分子シャペロンタンパク質が存在している。膜タンパク質の場合は生体膜がこの役割を一部担っている。また、クロマチン形成など核酸の高次構造制御に関わるタンパク質(核酸シャペロン)も見いだされている。分子シャペロンは、現在「他のタンパク質と一時的に相互作用して、その不安定なコンフォーマーを安定化させ、フォールディング(タンパク質の合成、膜通過、ストレス誘起の変性の後)、オリゴマーアセンブリー、他の細胞構成要素との相互作用、細胞内輸送、タンパク質の分解を促進するタンパク質」と定義されている。

最近我々は、この概念を広く高分子の会合、高次構造形成過程へと一般化して、「分子シャペロン機能工学」なるものを唱えている。高分子の立体構造形成、高分子間のコミュニケーションを助けるナノ環境場(シャペロン場)の設計と利用である。分子の結合と切断などに溶媒が重要な効果(マイクロ環境効果)を果たしているように、細胞内では分子シャペロンは会合・凝集しやすいタンパク質や核酸などの生体高分子を可溶化し、立体構造形成や会合を助けるような選択的溶媒として働く(シャペロン効果)。また、ある種の生体分子シャペロンは、単なる選択溶媒ではなくタンパク質の機能制御のためのスイッチング機能を有した機能性システムへと進化している。例えば、転写因子と結合して翻訳を制御しているものや酵素と結合して安定化するとともにコシャペロンによる外部刺激で酵素活性を制御している例が報告されている。

ポストゲノム研究やナノバイオ計測システム開発、さらに DDS 分野においても、タンパク質や核酸などの生体高分子の機能、連携を積極的に補助するナノ環境場の制御やそのシステム設計(分子シャペロン機能工学)は益々重要となると思われる。我々は、分子シャペロン機能を有する人工分子システムの創出とその応用展開を図っている。ここでは、ナノゲルおよびリポソームシステムの設計と応用について紹介したい。¹⁾

2. タンパク質の一生に関わる分子シャペロンの特性

タンパク質は、疎水性と親水性のアミノ酸から構成されている。その比率は通常の水溶性タンパク質ではほぼ等量であり、比較的疎水性の高い両親媒性高分子である。ポリペプチド中の疎水性残基は水中では“のり”の役割を果たし、この作用により疎水面を内殻としてコンパクトな球状の形態をとりえる。しかし、生まれたてのタンパク質や熱などで変性した状態では、この疎水性の“のり”の部分が露出して分子間で会合して凝集してしまう場合が多い。つまり、タンパク質は潜在的に凝集しやすい高分子といえる。特に、高

分子濃度の非常に高い細胞内(例えば、大腸菌では 300—400g/l)では分子間凝集は、なおさらおこりやすい。タンパク質が無秩序に凝集することは細胞にとっては死にもつながる困った問題である。そこで、分子シャペロンは、非天然状態の会合しやすいタンパク質を捕まえて、その凝集を防ぎ、タンパク質を可溶化した状態に保つ役割を果たしている。さらに、この機能はその後、タンパク質の一生をも管理する役目になうように進化していったのであろう(図 1)。²⁾

タンパク質の認識といえば、通常は酵素の活性部位のように鍵と鍵穴的な厳密な分子認識にもとづくものが一般的である。分子シャペロンは、天然状態と非天然状態のタンパク質という高分子の状態を認識するような比較的ファジーな認識を行っているのが特徴である。例えば、大腸菌の分子シャペロンである GroEL は、大腸菌内の可溶性タンパク質約 2500 個のうちの約 10%のタンパク質を基質として作用している。もちろん、あやふやとはいえ、天然状態と非天然状態のタンパク質の認識は厳密におこなわれている。この認識の分子論的な仕組みは、十分明らかではないが、ポリペプチドの二次構造などの特殊なモチーフを認識するのではなく、変性タンパク質の部分的にほどこけたヒモ状の疎水的な領域を認識しているらしい。これはすべてのタンパク質にも通じる共通の性質である。

3. ナノゲルシャペロン

分子シャペロンは、非天然状態のタンパク質(ゲスト)を認識して捕捉する高分子ホストとみなせるものである。人工系では、そのようなホストはほとんど知られていなかった。我々は、ナノサイズの物理架橋ゲル(ナノゲル)を開発し、³⁾特に疎水化多糖からなるナノゲル(図2)は、そのナノマトリックス内にタンパク質を捕まえる高分子ホストとして機能することを見いだした。⁴⁾実際、天然の分子シャペロンと同様に熱変性タンパク質や巻き戻り中間体を選択的に捕まえ、その凝集を阻害した。さらに、ナノゲル中では機能を失っているものの、外部刺激やシクロデキストリンを添加してナノゲルを崩壊させると、自然にタンパク質機能が再生した(図3)。⁵⁾

このように、凝集しやすい非天然状態のタンパク質を捕捉、安定化し、外部刺激により活性のある形でタンパク質を放出する機能は、まさに生体系に存在する分子シャペロンシステムが行っていることである。天然の分子シャペロンは変性したタンパク質の疎水面と相互作用しえる疎水的アミノ酸領域と、タンパク質を取り込めるナノ空間を有している。また、捕捉したタンパク質の巻き戻りと放出は、ATP の結合によるコンフォメーション変化とその加水分解反応による解離という巧妙な仕掛けにより制御されている。一方、ナノゲ

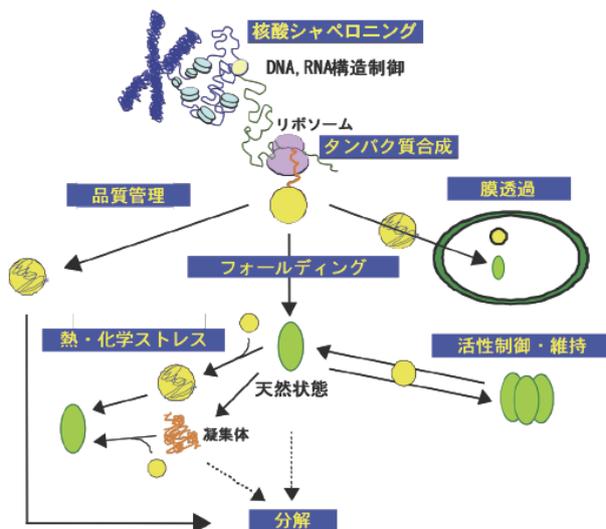


図 1 タンパク質の一生と分子シャペロン

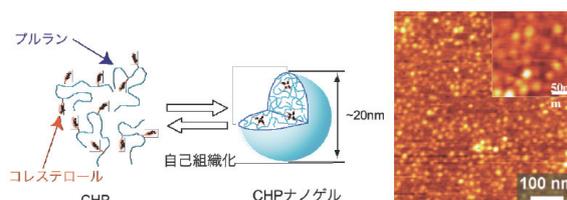


図 2 疎水化多糖ナノゲルの構造

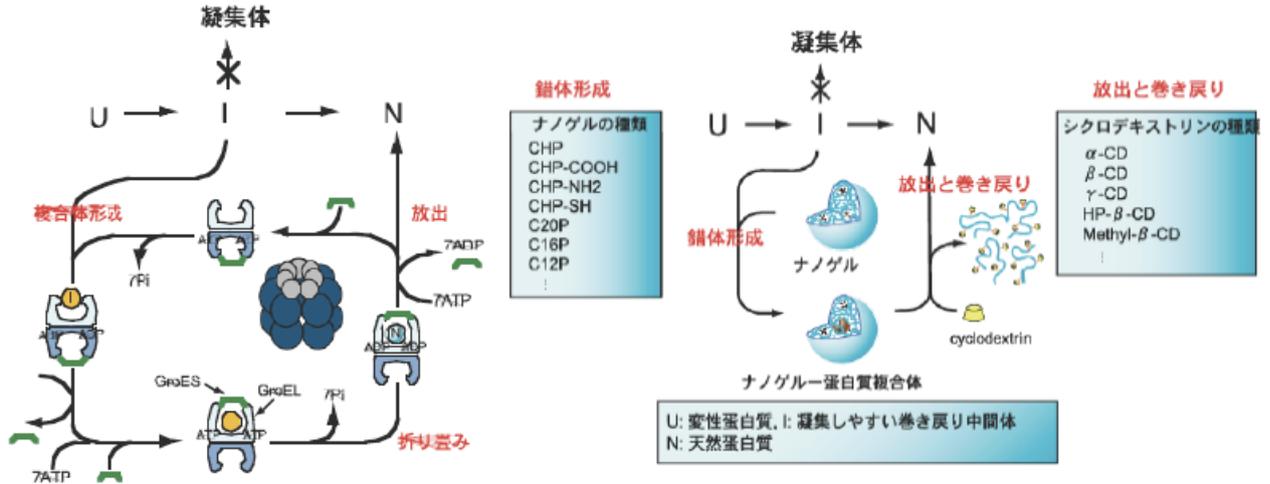


図3 天然シャペロン(GroEL-ES)と人工分子シャペロンの作用機構

ル中の水含量は 80～90%程度で、通常のマクロゲルを切り刻んでナノサイズにしたようなゲルであり、タンパク質を取り込める、疎水的な物理架橋点に囲まれたナノ空間を有している。ナノゲルシステムでは、例えばシクロデキストリンにより、ゲルの架橋点を壊すことでタンパク質の巻き戻りと放出を制御できた。

このように第一世代のシャペロンは、1)ゲルをナノサイズにすることで、タンパク質一分子を凝集する前にゲル内にトラップしえる空間を作りえたこと、および2)ナノゲル内の物理架橋点を形成している疎水基とシクロデキストリンとのホスト-ゲスト相互作用を利用して、タンパク質の取り出しとその巻き戻りを制御しえたことが重要な点である。天然の分子シャペロン機能のエッセンスを再構築したものである。通常マクロなゲルのネットワーク構造をナノレベルで制御するのは困難なため、タンパク質のトラップされる環境の制御も難しく、ヒドロゲル内でのタンパク質の凝集などが生じ、タンパク質の本来の機能を損なう場合が多い。

現在、第二世代のシャペロンとして光や酸化・還元などの外部刺激に応答する人工分子シャペロンの開発を行っている(図4)。光で分子の極性を制御することができるスピロピラン基を架橋点とするナノゲルの合成に成功し、シャペロン活性が発現することも最近報告した。⁶⁾ナノゲル系ではないが、アミロース酵素合成反応と共役した酵素応答性人工分子シャペロンも開発している。また、ナノゲルのシャペロン機能を損なうことなくヒドロゲルへ固定化する方法を確立し、実際の応用へ一歩前進した。⁷⁾“なんでも巻き戻しシャペ

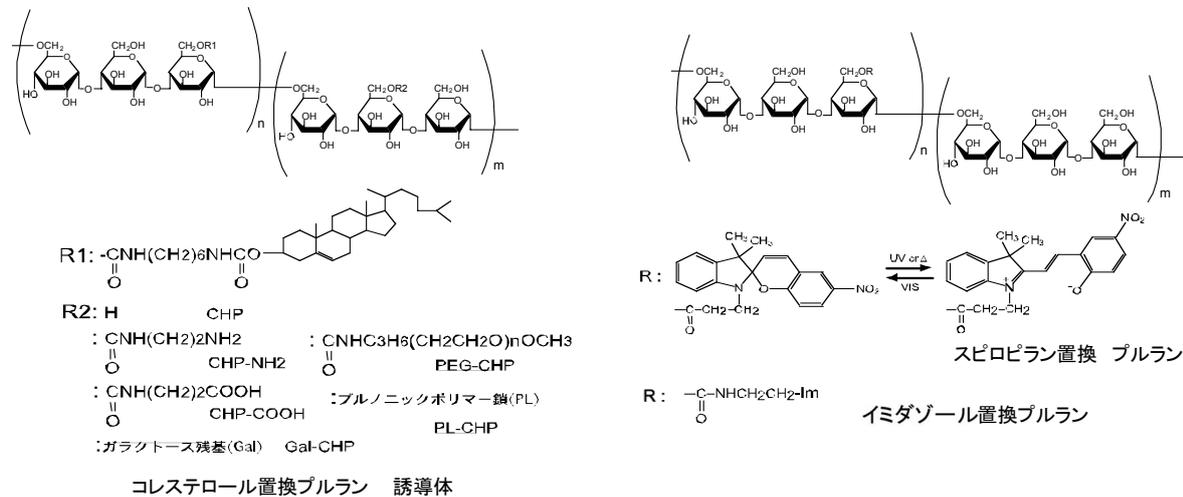


図4 ナノゲルを形成する機能性多糖の構造

ロンカラム”としての研究を進めている。ポストゲノム研究におけるタンパク質の機能解析にはタンパク質のフォールディング・凝集の問題は避けて通れない重要な課題である。ナノゲルの核酸シャペロンとしての機能も九州大学丸山教授との共同プロジェクト(CREST、分子シャペロン工学に基づく遺伝子解析)で進行中である。

4. シャペロン機能とアミロイド・免疫・DDS

アルツハイマー病に代表されるように、タンパク質のフォールディング異常によって引き起こされる病気は数多く知られている。タンパク質の疎水的な会合力を駆動力として繊維状会合体(アミロイド様線維)形成がその原因であるといわれている。アミロイド様線維体は分子間の β -シートでつながった比較的規則正しい構造をしており、プロテアーゼでは簡単には分解されない。そのために、細胞内もしくは細胞外で蓄積され細胞に障害を与えることになる。ハンチントン病の患者の脳には核内封入体とよばれる凝集物が形成されている。ショウジョウバエやマウスのモデル系において分子シャペロン(HSP70 と HSP40 のファミリー)を過剰発現することで、アミロイド様凝集体量の減少や毒性の軽減が認められている。これらの病態の治療として分子シャペロンの利用が注目されている。⁸⁾疎水化多糖ナノゲルが、アルツハイマー病の原因タンパク質である $A\beta$ ペプチドのアミロイド形成を抑制することを最近見いだした。

免疫系において、ウイルスや感染細胞およびがん細胞を排除する機構は細胞性免疫といわれている。細胞性免疫は、抗原提示細胞や標的細胞に提示されるペプチド抗原を T 細胞表面上の抗原受容体(T 細胞受容体)が認識することからはじまる。この際、細胞表層への抗原の提示には主要組織適合遺伝子複合体(MHC complex)と呼ばれる膜結合型タンパク質が必要である。細胞内の分子シャペロンはペプチド抗原をこの MHC 分子に受け渡すキャリアとして機能し、特に細胞性免疫(抗腫瘍性のキラーT 細胞)を効率よく誘導することが見いだされた。さらに、ネクローシスにより細胞が壊死した場合には、細胞内の抗原ペプチドを結合した分子シャペロンが細胞外に大量に放出され、この分子シャペロンが細胞外でも抗原ペプチドのキャリアとなり免疫系を活性化することも明らかになった。このような、分子シャペロンのペプチド抗原キャリアとしての機能を利用した癌免疫療法の臨床応用に向けた研究が活発に検討されている。⁹⁾

面白いことにこれとよく似た現象が、疎水化多糖ナノゲルを抗原タンパク質のキャリアとして用いた時に見いだされた。癌遺伝子産物である *erbB2* 抗原タンパク質はナノゲルと効率よく結合した。この複合ナノゲルを用いて免疫を行うと抗体産生のみならず、抗腫瘍性のキラーT 細胞が効率よく誘導され、癌免疫療法として有効に作用することがわかった。¹⁰⁾抗原タンパク質だけでは、キラーT 細胞は誘導されないので、ナノゲルの複合化は細胞内動態に大きな変化をもたらしていることが示唆された。またこの際、癌抗原タンパク質を凝集させることなくナノゲルと複合体を形成させることができるシャペロン機能が生かされている。三重大学医学部珠玖教授のグループにより現在、ヒトへの臨床試験が始まったところである。

タンパク質製剤系はもとより水に難溶性の抗癌剤であるアドリアマイシン、シスプラチン誘導體あるいは抗ステロイド薬をナノゲル内に担持することも可能で、癌治療や再生医療を含めた研究を展開している。また、カチオン性ナノゲルは、プラスミドや RNAi などの核酸キャリアとしても有用である。その他にも、ナノゲルへの細胞親和性付与など様々な機能性ナノゲルの設計を行っている。

5. ナノゲル工学へ

ポリマーゲルは、薬学・医療分野から分離テクノロジーや化粧品、食品の分野まで幅広く利用されている。また、ゲルの相転移を利用したアクチュエーターなどのゲルマシンの開発も進んでいる。一般にゲルは、三次元網目構造を有する構造体で溶媒をその内部に保持できる組織体である。架橋法として、架橋が共有結合の化学架橋ゲルまた分子間力による物理架橋ゲルが知られている。最近では、架橋点が移動する新しい架橋構造を有するゲルも報告されている。しかし、ゲルの内部構造はいまだに混沌としている。ゲル網目やゲル架橋点の制御はなかなか難しい課題である。通常ゲルは手に取れるマクロな物質として認識されてきたが、先に述べたように我々は、ナノ粒子の特性を合わせ持つナノゲルを調製する一般的手法を開発した。つまり、会合性分子を高分子鎖に部分的に導入することで高分子の会合を動的に制御しえる物理架橋ナノゲルをえる手法と一般化される。ナノゲルは導入する疎水基の構造や置換度を変えることで、その粒径や粒子内部の疎水領域の分布(ゲルのポアサイズ)などを制御可能である。また、様々な水溶性多糖類、ポリアミノ酸、および合成高分子においても同様なナノゲルが形成し、光や酸化・還元応答性ナノゲルの作成も可能となった。¹¹⁾ 詳細は他の総説を参照してほしい。^{1c,1d)}

一方、微粒子としてのナノゲルの特性をさらにマテリアルとして応用するために、ナノゲルをビルディングブロックや架橋点としたマクロなヒドロゲルの開発へと展開している(図5)。ナノゲルの特性を保持したナノマトリックスゲルは、薬物の徐放担体として従来にない性能を発揮することが明らかになった。再生医療に不可欠な細胞の足場としての新規細胞外マトリクスなどの創出が期待される。ナノ構造が制御された新規ヒドロゲルは、その物性の面でも興味がある。また、ナノゲル-アパタイト複合体やナノゲル-量子ドット複合体など新規有機-無機ハイブリッド組織体の設計が可能となりその利用を図っている。¹²⁾

このようにナノゲルを基盤としたさまざまな組織体の創製とその応用は、ナノゲル工学と呼べるもので、新しい研究領域として期待される(図5)。

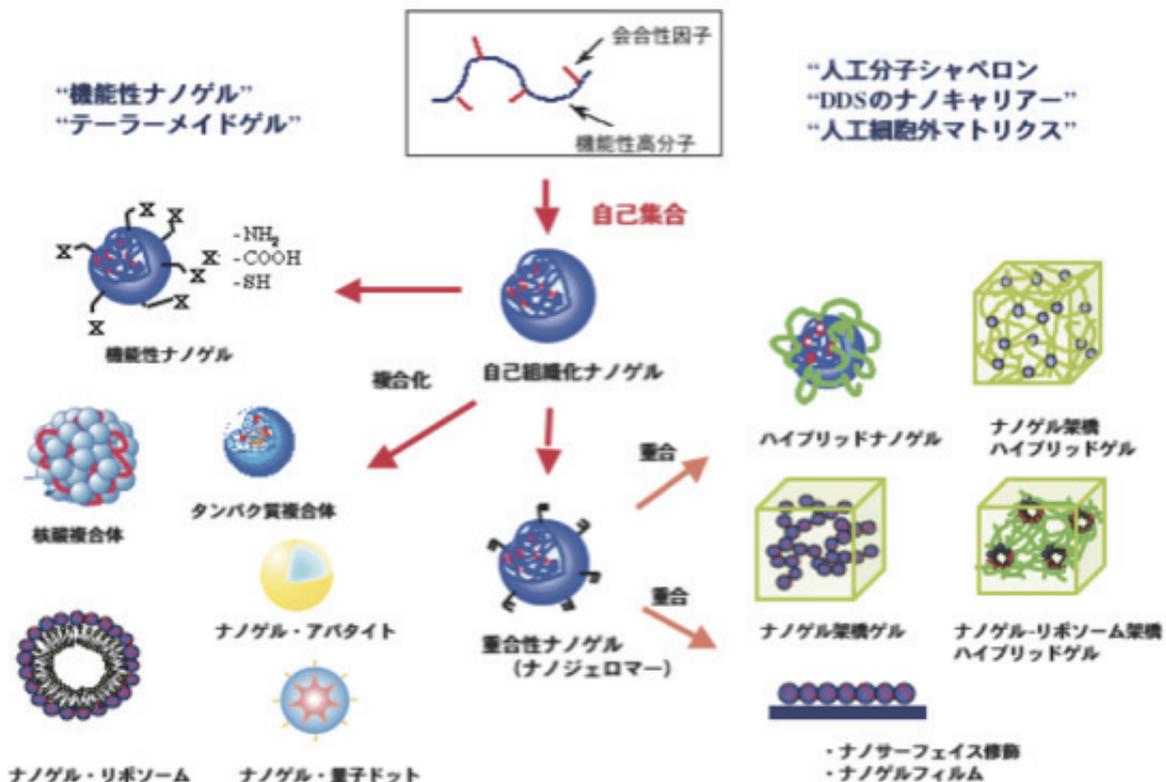


図5 自己組織化高分子を用いたナノゲル工学

6. リポソームシャペロン

これまで、細胞内での水溶性タンパク質に対する分子シャペロンの機能について主に検討してきた。東京に研究室を移してから、膜タンパク質のフォールディングを補助するシステムやその機能解析を進展させるシステムについて検討を始めた。よく知られているように細胞膜表面で物質の認識、透過、情報伝達に関わる膜タンパク質の分子レベルでの機能解析は、水溶性タンパク質ほど進んではない。その最大の理由は、正しいフォールディングや単離精製が困難な点にある。通常、膜タンパク質を大腸菌などで大量発現し、界面活性剤で可溶化しカラムにより精製を行った後に、リポソームに再構成してその機能を調べるというやり方が一般的である。しかし、操作が煩雑で途中でタンパク質の凝集や活性を失う場合も多い。

生体系では、合成と同時に生体膜に膜タンパク質が組み込まれることで凝集の抑制とフォールディング制御が行われている。無細胞タンパク合成系で膜タンパク質を発現させ、同時にリポソームに直接組み込む手法に取り組んだ。リポソーム存在下無細胞タンパク合成系で表在性膜タンパク質(アンカー型膜タンパク質)であるチトクローム b5 (b5) を合成させる実験から始めた。この際、リポソームとして1 μ m以上の大きさをもつ巨大リポソーム(細胞サイズリポソーム)を用い、蛍光タンパク質(EGFP)をつけた b5 を発現させるとリポソーム膜上に GFP の蛍光がリング上に観察された。巨大リポソームは細胞実験と同じように光学顕微鏡や蛍光顕微鏡で直接実時間観察が行える利点がある。^{13,14}ウェスタンブロットによってもタンパク質合成の確認ができた。簡易型密度勾配遠心法によりリポソーム画分を分取してゲル電気泳動により調べたところ、膜タンパク質がほぼワンバンドで検出された。一回膜貫通型膜タンパク質である P450 リダクターゼについても同様な手法により発現後にリポソームへの組み込みも確認された。本手法は膜タンパク質の構造・機能解析の新しい手法を提供するものといえる。

次に、リポソーム表層へタンパク質をリクルートする疎水性タグを利用したシステムを考案した。例えば、ジヒドロ葉酸リダクターゼ (DHFR)- b5 融合タンパク質を発現させると b5 が疎水性タグとなりリポソーム上に酵素を提示しえることが明らかになった。b5 との連結部分を工夫すれば疎水性タグをプロテアーゼ処理により取り出すことも可能である。本手法は疎水性タグ法を用いたリポソーム表層工学といえるもので、様々な応用が期待される。

この研究を進めているころ、ギャップジャンクション(GJ)を形成する膜タンパク質コネキシン(Cx43)を研究している東京医科歯科大学歯学部の森田教授と知り合いとなった。Cx43 は4回膜貫通型の膜タンパク質であり、6量化によりチャネルを形成し、さらに細胞間同士で結合することで GJ を形成する(図6)。その孔は1.5kDa以下のサイズの分子を輸送することができ、細胞間の情報伝達に重要な役割を担っている。早速共

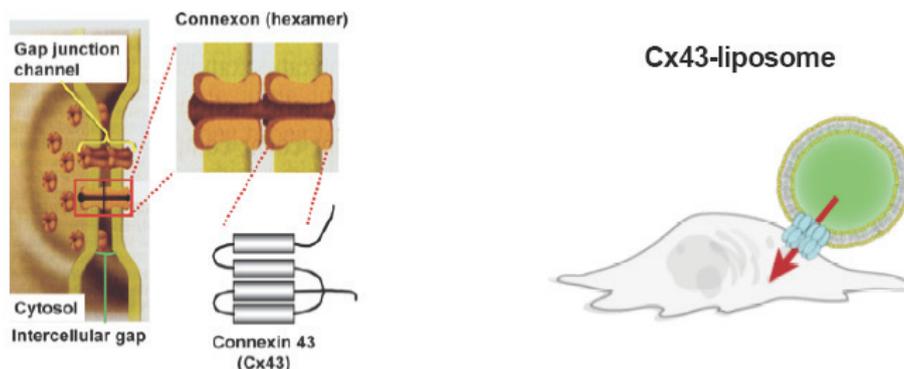


図6ギャップジャンクションの構造とコネキシンリポソームと細胞との相互作用

同研究がはじまった。しかし、最初の1年間はなかなかうまくいかず、2年目を迎えてようやく無細胞タンパク質合成系において、リポソームシャペロン法によりコネクシン(Cx43)をリポソームに直接組み込むことに成功した。遠心によりリポソームを分取して調べたところ、発現した Cx43 のほとんどがリポソームに組み込まれていた。また、興味深いことにリポソームに組み込まれた Cx43 が細胞と GJ を形成することが、Cx43 を発現する動物細胞との間での蛍光色素 (Calcein) の双方向輸送を直接共焦点顕微鏡により観察することで確認された。無細胞合成系で膜貫通型チャンネルタンパク質をリポソームに機能を保持したまま直接組み込める手法およびリポソーム-細胞間を GJ を通じて相互に物質輸送しえる初めての例となった。生体系では小胞体やゴルジ体を経由して糖鎖などの翻訳後修飾が行われて初めて機能を発現するものも多い。無細胞合成系での限界と本手法の適用範囲を今後検討する必要がある。

Cx43 リポソームは、ドラッグデリバリーシステム(DDS)としても有用である。これまでのリポソームデリバリーシステムでは、細胞内への物質搬入経路としてはエンドサイトーシスと融合が知られていた。GJ を介した物質輸送は従来にない全く新しい搬入経路である。実際、細胞内シグナル(NFκB)を阻害する因子であるペプチドをリポソーム中に封入して細胞と共培養することにより、細胞内における NFκB 経路が効率よく阻害されることが確認された。水溶性ペプチドを細胞質内にエンドサイトーシスを介することなく、直接輸送する新しいリポソーム DDS として機能することが明らかになった。

我々は、リン脂質からなる細胞サイズリポソームにガングリオシドと呼ばれる糖脂質を添加すると、チューブ構造が誘起され、チューブで連結されたリポソームネットワークが形成することを見出している(図7)¹⁵⁾また、最近コレステロールを用いることでもリポソームネットワークが形成することがわかった。¹⁶⁾また、この脂質チューブやネットワーク構造はアガロースゲル内で安定化されることも見いだしている。このリポソーム工学技術とリポソームシャペロン技術を用いて、膜タンパク質アレイ構築に向けて研究を進展させている。

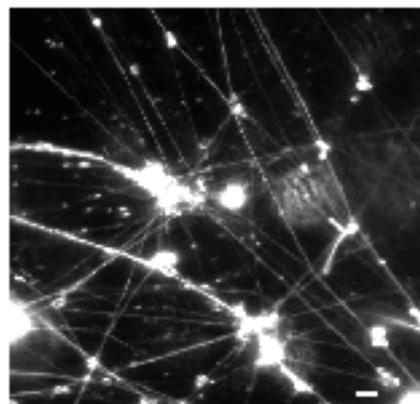


図7 脂質チューブ-リポソームネットワーク構造*

7. おわりに

東京医科歯科大学生体材料工学研究所に赴任してから3年間に過ぎた。1年目に東京医科歯科大学21世紀 COE「歯と骨の分子破壊と再構築のフロンティア」のコアメンバーに参画させて頂いたこともあり、医歯学者や分子生物学者との交流もふえ、共同研究もいくつか立ち上がっている。その内のいくつかは成果もあがってきた。先にも述べた癌免疫療法については実用化を目指した研究が本格的にはじまった。また、ナノゲルは化粧品の新素材として大手化粧品会社数社ですでに使われている。手塩にかけて育ててきた材料が、実際の社会で活躍して世の中に少しでもお役にたっていることはうれしいことである。一方で、これら応用研究、共同研究を通じて、サイエンスとして解明すべき大変興味深い現象が見つかっている。また、生命現象の神秘さをあらためて感じている。まだまだ分子レベルでわかっていないことだらけである。なんとか、化学の力でその本質にせまり、生体と自在にコミュニケーションを図れる分子システムを構築したいと思っている。

参考文献

- 1) a) 秋吉一成: 化学フロンティア 5 生命化学のニューセントラルドグマ、杉本直己編、化学同人、160 (2002), b) 秋吉一成, 野村雄太, 日本 DDS 学会誌, **17**, 486 (2002), c) 秋吉一成, 未来材料, 2月号, 36 (2004), d) 秋吉一成, 化学, Vol.60 No.1(2005).
- 2) 永田和宏、森 正敬、吉田賢右 共編: 分子シャペロンによる細胞機能制御, シュプリンガー・フェアラーク東京(2001).
- 3) a) K.Akiyoshi, et al, *Macromolecules*, **26**, 3062 (1993), b) K.Akiyoshi, et al, *Macromolecules*, **30**, 857 (1997), c) K. Kuroda, et al., *Langmuir* , **18**, 3780 (2002), d) I. Lee, et al, *Biomaterials*, **25**, 2911 (2004).
- 4) a) T. Nishikawa, et al, *Macromolecules*, **27**, 7654 (1994), b) T. Nishikawa, et al, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6110 (1996).
- 5) a) K. Akiyoshi, et al, *Bioconjugate Chem.*, **10**, 321 (1999), b) Y. Nomura, et al, *FEBS Lett.*, **553**, 271 (2003), c) Y. Nomura, et al, *Biomacromolecules*, **6**, 447 (2005).
- 6) T. Hirakura, et al, *Biomacromolecules*, **5**, 1804 (2004).
- 7) N. Morimoto, et al, *Biomacromolecules*, in press.
- 8) P. J. Muchowski , *Neuron* **35**, 9 (2002).
- 9) Z. Li, et al, *Current Opinion in Immunology*, **14**, 45 (2002).
- 10) a) X-G. Gu, et al, *Cancer Res.*, **58**, 3385 (1998), b) Y. Ikuta, et al, *Blood*, **99**, 3717 (2002).
- 11) a) K. Akiyoshi, et al, *Macromolecules*, **33**, 3244 (2000), b) K. Akiyoshi, et al, *Macromolecules*, **33**, 6752 (2000).
- 12) U. Hasegawa, et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **331**, 917(2005).
- 13) ナノテクノロジーハンドブック IV 編 バイオ・化学へ使う、人工細胞システムを創る、野村慎一郎、秋吉一成、オーム社、30 (2003).
- 14) リポソーム応用の新展開—人工細胞の開発にむけて—、秋吉一成、辻井 薫監修、エヌ・ティー・エス社(2005).
- 15) K. Akiyoshi, et al, *FEBS Lett*, **534**, 33 (2003).
- 16) S. Nomura, et al, *BBA*, in press.



糖鎖を迅速に合成する

理化学研究所

眞鍋 史乃

(smanabe@riken.jp)



1. はじめに

タンパク質は DNA に保存されている遺伝情報をもとに RNA を経て生合成されている。しかしながら翻訳後そのままのかたちではその機能を発揮することは少なく、なんらかの翻訳後修飾を経て初めてその機能を発揮するものが多い。タンパク質を構成するアミノ酸は通常20種類しか存在しないが、翻訳後修飾により、よりタンパク質の多様性を広げていると考えられている。翻訳後修飾にはジスルフィド結合の形成、リン酸化など多くの翻訳後修飾の形が知られているが、糖鎖付加は最も普遍的、かつ構造的に大きな修飾形である。¹⁾

生化学的にも重要であり、造血ホルモンであるエリスロポイエチンの N-結合型糖鎖の数を増やすと効果が持続することや、抗体医薬であるハーセプチンのフコースを除去すると活性が増大するなどの例が知られている。一方、低分子化合物においても抗生物質バンコマイシンの糖鎖部を改変することにより耐性菌に対しても活性をもつようにしたり、²⁾細胞のガン化と細胞表面糖鎖の認識の重要性は糖鎖-BSA コンジュゲートを用いてガンに対するワクチンを開発しようとする試みが行われているに至っている。³⁾

糖鎖付加が実際にどのような寄与を及ぼすかについての研究には純粋な糖鎖、および糖タンパクの調製が必須である。しかし、糖鎖は生合成の過程でさまざまなトリミングを受ける。そのため、少しずつ構造の違った化合物群として存在する糖鎖から、均一な糖鎖構造を持つ糖鎖あるいは純粋なものを天然から単離することは困難がつきまとう。他の生体内高分子である核酸やタンパク質は分子生物学の力を借りて PCR 法により増幅や合成することができるが、糖鎖付加はセントラルドグマの外にあるためである。

そのような観点から糖鎖を眺めると、生体内高分子であると同時に、低分子化合物のような2次代謝産物であるといえる。有機合成化学では主に2次代謝産物について自然界から供給が難しい化合物を合成し、供給してきたが、糖鎖についても同様のことが行えるはずである。

さて、糖鎖合成を眺めてみると、糖ユニットの合成の問題は別として、いくつかの反応の繰り返しであることがわかる。すなわち、ルイス酸性条件におけるグリコシル化反応と、そこでの未反応保護水酸基を不活性化するためのキャッピング反応、そして次のグリコシル化反応のポイントとなる水酸基をつくるための通常塩基性条件下での一時的保護基の脱保護反応である。これらの反応を繰り返していけば、理論的には合成の簡単な糖鎖については合成できる(図1)。

ペプチド固相合成は Merrifield が 1963 年にペプチド固相合成を発表し⁴⁾、数年後にはペプチド自動合成機が登場している。Merrifield は固相合成の論文の中ですでに自動合成機の可能性について言及し、提出していたが、審査員から削除を求められ、従ったそうであるが、数年後には彼自身により開発された自動ペプチド合成機が登場している。

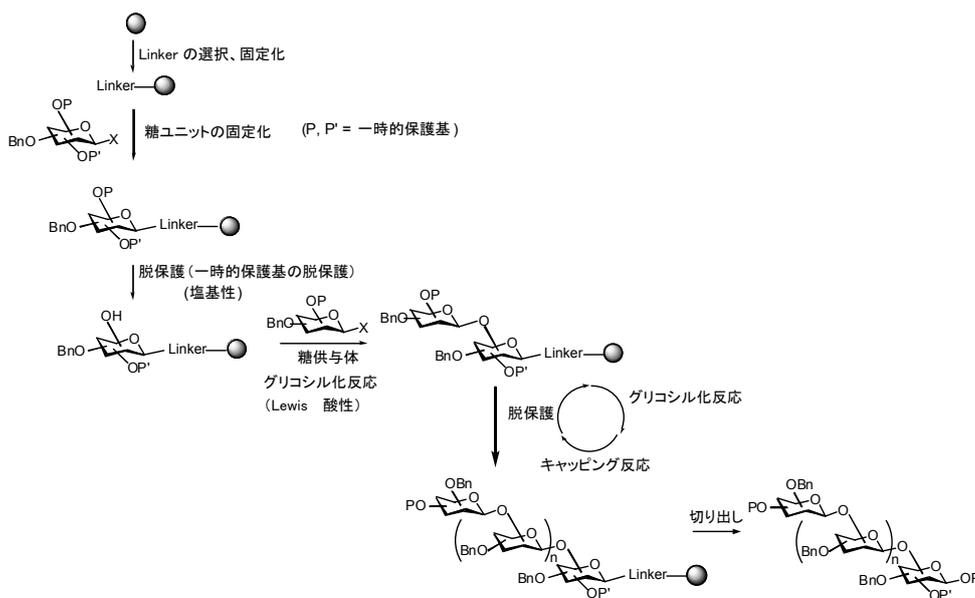


図1 糖鎖固相反応の概略

当然、当時の糖合成化学者も糖鎖合成に応用しようと考えた。しかしながら、当時はグリコシル化反応の試薬として固体試薬を使うことが多かったため(固相反応において固体試薬は固相樹脂と分けられない)に反応条件の選択に限界があり、特殊な系を除いてはうまくいっていない。⁵⁾また、当時は高分解能 NMR が存在しなかったために生成物の同定も旋光度により行っている。

しかし、Danishefsky が彼等のグリカル法を固相反応に適用したことにより、再び注目を集めるようになり、精力的に研究されるようになった。⁶⁾糖鎖迅速合成はペプチド固相合成をそのまま応用すればできるわけではなく、いくつかの問題点を解決しなければならない(表1)。

表1 ペプチド合成と糖鎖合成

	ペプチド合成	糖鎖合成
基本となる反応	アミド結合形成反応、キャッピング反応、アミノ基の脱保護反応	グリコシル化反応、キャッピング反応、水酸基の脱保護反応
ユニットを結合させる反応条件	中性に近い 高収率	酸性条件、あるいは親硫黄条件 中程度の収率が多い
一時的保護基の脱保護反応条件	酸性条件 (Boc 法) 塩基性条件(Fmoc 法)	塩基性条件
最終脱保護	強酸性条件	接触水素添加
反応の追跡	ニンヒドリン反応など	開発必要
自動合成機	実現、市販	検討開発中

2. 可溶性高分子担体上で糖鎖を合成する

さて、固相反応では反応系が固-液反応と不均一系となるために、反応性が著しく低下する。ここで、可溶性ポリマーである低分子量のポリエチレングリコール(以下 MPEG)を固相のかわりに用いることとした。MPEG は可溶性であるために均一反応系を与えるので反応性を高いままに保つことができる。また、極性が非常に高いために MPEG に結合した基質も非常に高い極性を持つことになる。そこで非常に短いシリカゲルカラムクロマトグラフィーに反応液をアプライした後、酢酸エチルで溶出すると糖供与体由来の副生

成物、試薬は溶出されるが、MPEG に担持された化合物は高極性ゆえに原点にとどまっている。さらにメタノール:酢酸エチル混合溶媒で極性を上げると MPEG に結合した化合物のみが回収される。この操作は固相反応における濾過操作に相当する。すなわち、固相合成においては固相であるポリスチレン樹脂に基質を結合させることにより、基質の物理化学的性質がどんなものであるにしろ、固相に結合している限りは濾過可能であるという共通の物理化学的性質を持ち、しかもその性質により、他試薬からの分離が簡便に行えるというメリットを持つが、極性の高い MPEG をポリスチレン樹脂のかわりに用いることにより、MPEG に結合している基質は共通に非常に高い極性を持つことになり、他試薬との分離もルーチン化できることとなる。また結合している基質についての構造、純度については最も基本的な通常の ¹H-NMR により決定できる利点も持つ(図2、表2)。また、分子量も固相樹脂に比べて小さいので、大量合成も可能である。液相の利点を持ちつつ、固相合成法の最大の利点である試薬の分離が簡単である利点を持つ、反応場である。

図2 PEG を高分子担体として用いた反応の精製法

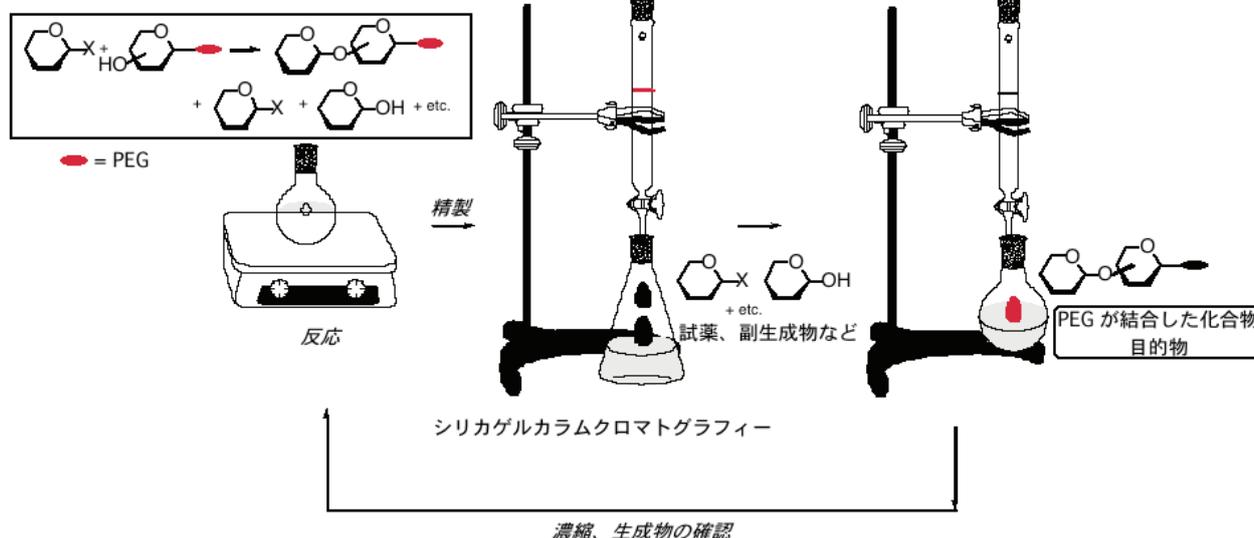


表2 固相合成と液相合成

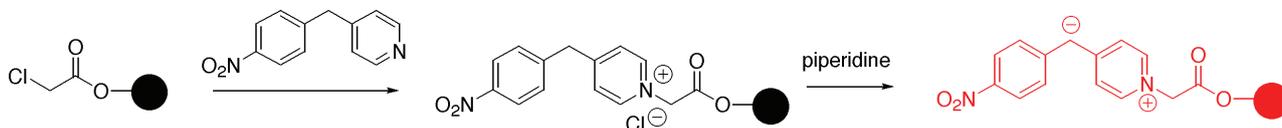
	液相合成	固相合成
反応追跡	TLC, HPLC 容易	困難
化合物の単離	カラムクロマトグラフィーなどによる	ろ過、洗浄
合成できる量	少量から大量まで	大量は困難
化合物の構造・純度確認	NMR などいくつかの方法で可能	難しい。MS, NMR など
ルーチン化	できる	向いている
機械化	ある程度可能	可能、実現例あり

3. 反応追跡法を開発する

反応の進行状況については液相合成においては反応液の一部をキャピラリーで取り出して TLC にて解析を行い、反応条件にフィードバックさせる手法が一般的であるが、固相樹脂上、あるいは MPEG 上においてはそれらの手法は適用できない。反応条件最適化については多くの時間と労力を要することになり

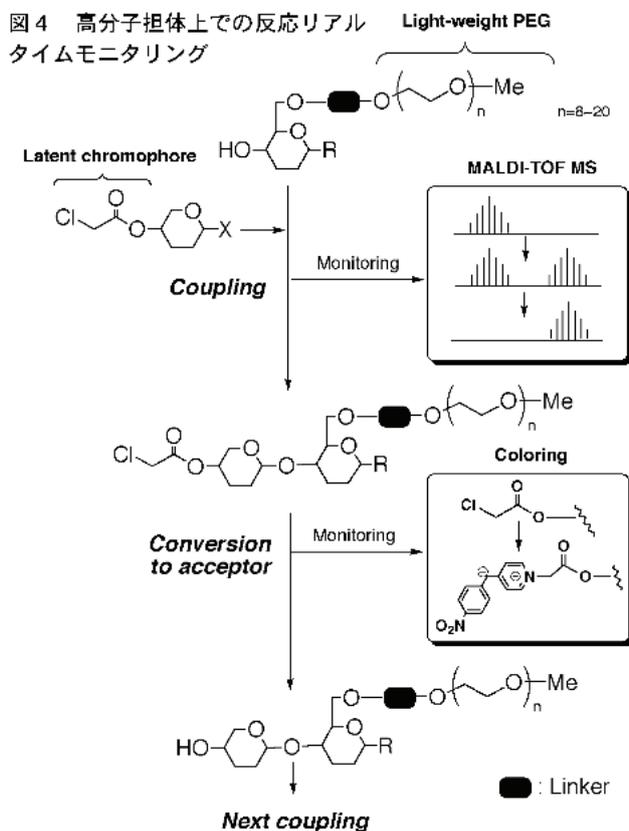
かねない。そこで、糖鎖合成において有用性が確立しているクロロアセチル基(以下、CAc 基)に着目し、反応を呈色反応により追跡する手法を開発した。CAc 基は *p*-(nitrobenzyl)pyridine と反応し、塩基性条件下、双極性イオンを生成し、赤色を呈することを発見した(図3)。

図3 クロロアセチル基の(*p*-nitrobenzyl)pyridine による発色



この反応を利用すると CAc 基の脱保護反応を固相あるいは高分子担体から切り出すことなく、モニターすることができる。実際に、MPEG を担体として CAc 基の脱保護をリアルタイムでモニターしながら行った。すなわち、一定量反応液を取り出し、TLC にスポットし、*p*-(nitrobenzyl)pyridine 溶液をスプレーして熱した後ピペリジン溶液に浸した。呈色反応は時間が経過するごとに薄くなり、CAc 基の脱保護反応が進んでいることが示唆された。この TLC をスキャナーでコンピュータに画像として取り込み、濃度定量ソフトである NIH-Image⁷⁾ で定量化することも可能であった。事実、¹H-NMR の積分値からの CAc 体と脱保護体の比と NIH-Image による積分値は比例関係があった。CAc 基は特に塩基性条件で外れやすい保護基であり、固相や高分子担体から切り出す条件で脱保護されてしまうこともあり、切り出しての反応進行の確認は難しいので、高分子担体上、固相上で直接迅速、鋭敏にモニターする手法は非常に役に立つこととなる。保護基が潜在的クロモフォアとしてもはたらいていることとなる。一方、グリコシル化反応の追跡は短鎖 PEG の性質を生かすことにした。すなわち、MPEG は炭素鎖長が正規分布している一群の化合物として販売されているので MALDI TOF MS (matrix assisted laser desorption ionization time of flight MS) のシグナルは正規分布の山のような特徴的な形状を示すことから他の化合物由来のシグナルと容易に区別ができる(図4)。反応が進行するにつれてシグナルが高分子量の側に動く。

これらの反応モニタリング法を組み合わせ、MPEG (平均分子量550) に糖鎖合成を指向して新たに開発した、ルイス酸性条件において安定であるリンカー^{8,9)}を介して糖受容体を結合した。通常のペプチド合成において使用されるリンカーはグリコシル化反応において必要とされるルイス酸性条件において、不安定であるが、このリンカーは酸性条件、一時的保護基の脱保護条件に安定であり、かつ他の保護基を損なわずに切り出しができる。糖ユニットを固定化後、CAc 基を呈色反応によりモニタリングしながら除去した。その後、MS によりモニタリングしながらフッ化糖を用



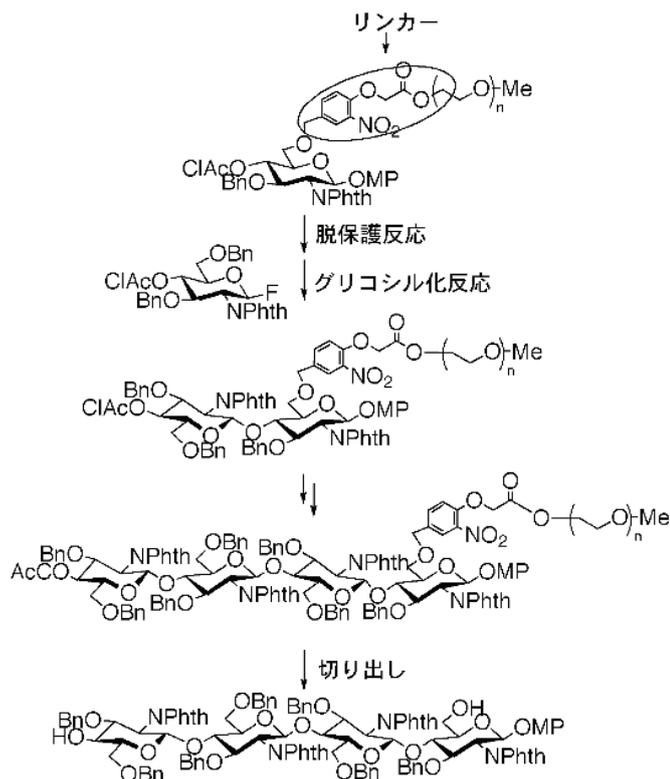


図5 糖鎖合成

いてグリコシル化反応を行った。呈色反応、グリコシル化反応を繰り返し、リンカーのニトロ基を還元することにより、MPEG から切り出しを行った。リンカー由来のヒドロキサム酸を含むベンジルエーテルは酸性条件にて除去した(図5)。¹⁰⁾ このように迅速に精製を行いながら、高い収率で糖鎖合成が行うことができることを示すことができた。

固相樹脂における呈色反応による反応追跡によって、免疫増強活性を持つ多糖シブフィランの基本構造である4糖の合成を迅速に行うことにも成功している。¹¹⁾

4. 固相樹脂と可溶性高分子担体を組み合わせた精製法

糖鎖合成の基本反応であるグリコシル化反応は液相中においても収率は 50%–90% にとどまっているので、反応性の低下する高分子担体上や固相樹脂上ではさらに収率が低下する。過剰の基質、試薬を用いても反応を完結させることは難しい。したがって何回かのグリコシル化反応を高分子上で行うと長さの違う糖鎖、およびそれに由来する副生成物が生成してしまい、切り出し後の目的物の単離は困難を極めることとなる。これは液相での反応と違って基質が高分子に結合したままの状態での反応終了後の精製ができないことに起因する。一方で収率を高めるために多大な条件検討を行うことは迅速合成の目的から外れることになる。そこで CAc 基の反応性を利用し、高分子担体に基質を結合させたまま精製を行う手法を開発することとした。すなわち、CAc 基を持つ糖ユニットを糖供与体として用いて PEG 上の糖受容体と反応させると反応が完結しない場合、原料である糖受容体と CAc 基を持つ 2糖 が PEG 上に存在することになるが、PEG が非常に高い極性を持つためにこのふたつの化合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーでは分離することができない。そこで PEG 成分のみをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離した後、固相樹脂に担持されたシステイン誘導体を加えた。すると固相樹脂に担持されたシステインのイオウ原子と CAc 基の塩素原子は置換反応をおこし、CAc 基を持つもののみが固相樹脂上へつりあげ(Capture)られる。つりあげ反応は CAc 基を検出する *p*-(nitrobenzyl)pyridine 法で追跡し、終了を知ることができる。一方、ヒドロキシル基である未反応の糖受容体は反応しないので、固相樹脂をろ過、洗浄することにより洗い流すことができる。すなわち、この段階でシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離できない高分子上の複数の化合物の分離が固相樹脂を用いることにより可能になった。次にアミノ基の保護基を脱保護するとすみやかに環化反応により2糖は高分子担体ごと液相へと放出(Release)される(図6)。

この方法を利用して精製を行いながら、自然界に広く存在するポリラクトサミン4糖 を合成することに成

功した。¹²⁾また、ガン化やアルツハイマーに関与しているとされている糖転移酵素の2基質型阻害剤の合成の迅速化にも役立った(図7)。¹³⁾

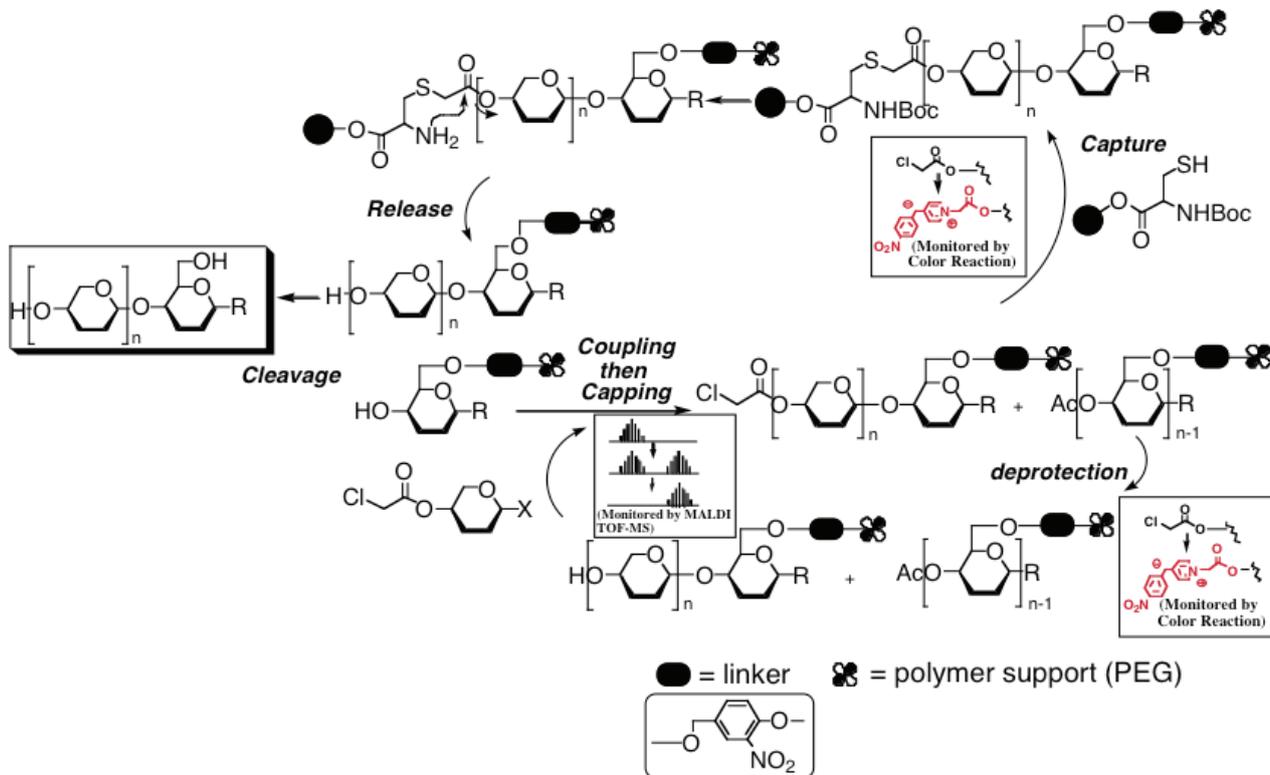


図6 Capture-release 法による精製

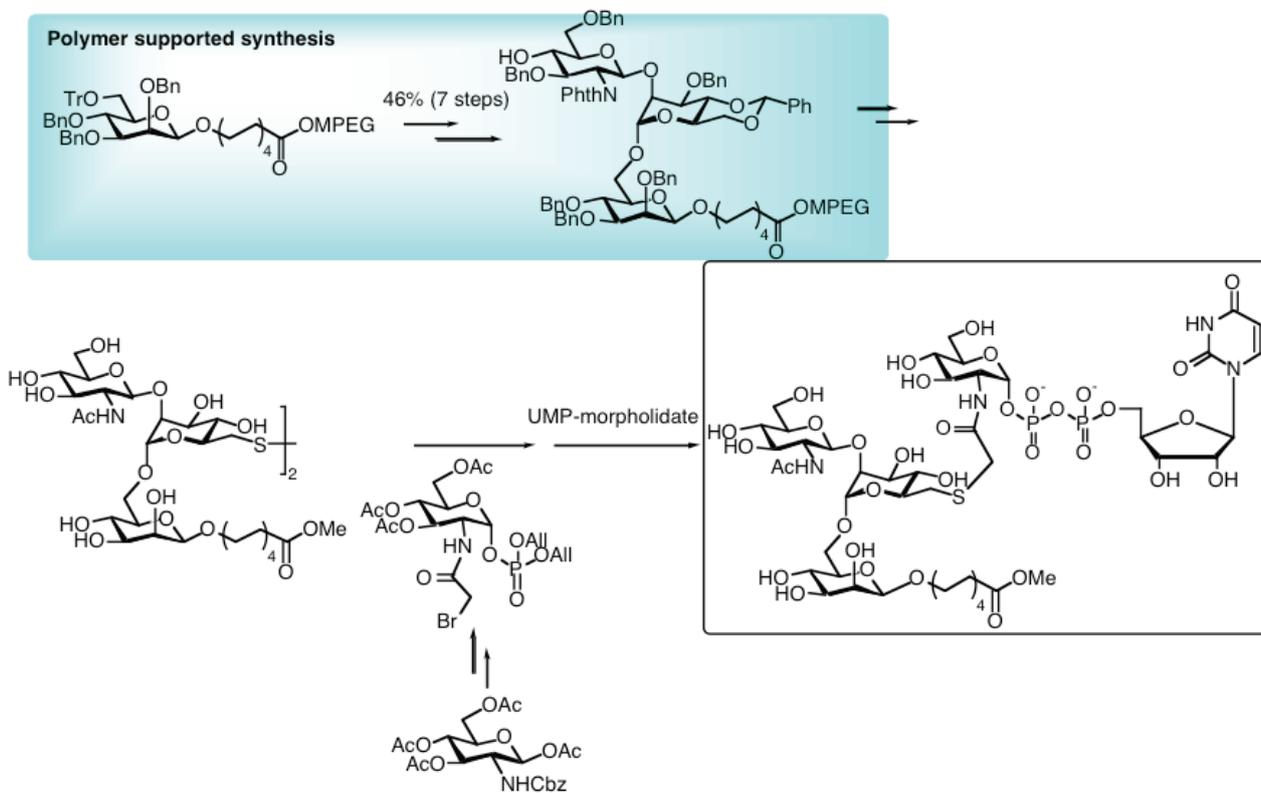
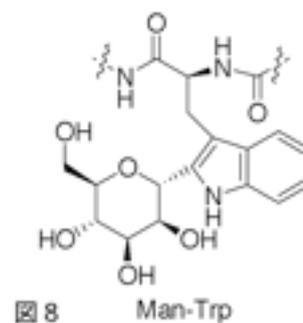


図7 糖鎖迅速合成を生かした2基質型糖転移酵素阻害剤の合成

5. 新規タンパク質修飾型 C-Man-Trp の合成と生物学的意義の解明へのアプローチ

また、もうひとつのトピックとして新規タンパク質修飾型である C-マンノシルトリプトファン (C-Man-Trp) についても触れておきたい。糖タンパク質糖鎖はその構造上の特徴からアスパラギン側鎖のアミド基を介して糖鎖とタンパク質が結合している N-結合型糖鎖と、セリンまたはスレオニンの側鎖水酸基を介して結合している O-結合型糖鎖に分類されてきた。しかしながら、新たにマンノースとトリプトファンが炭素-炭素結合を介して結合した C-結合型糖修飾型が見出された(図8)。¹⁴⁾本構造は最近、サイトカインや免疫系のタンパク質からも見出されており、その機能が注目されている。生合成前駆体がドリコールリン酸エステルであることや、¹⁵⁾ ガン、妊娠中毒などにより、体液において C-Man-Trp の存在量が増加していることが示されているが、¹⁶⁾いまだ生体内における役割については未解明である。我々はマンノシルトリプトファンの合成にいち早く成功したが、¹⁷⁾ここではその詳細は述べないこととする。共同研究において、合成した C-Man-Trp をもとに抗体を作成し、いろいろな病変モデル動物の組織の C-Man-Trp の分布を調べたところ、糖尿病モデルラットの大血管において C-マンノシル化されたトロンボスポンディンの量が増加していることが明らかになった。¹⁸⁾今後も C-Man-Trp の生体内における役割の解明に向けて研究を行う予定である。



6. おわりに

有機化学は生命現象の解明と密接に関連して発展してきた。今後、生命現象解明のために有機合成化学者が行うべき仕事のひとつは、生体内分子の構造を損なわず、水中でも適用できる温和な反応条件の開発や、タンパク質などの巨大分子のなかの特定の官能基変換を行うような高反応性、かつ選択的な反応の開発であろう。

低分子化合物における有機合成化学の歴史をみても、官能基選択性や位置選択性の解決に続いて立体選択性の解決(ジアステレオ選択性、エナンチオ選択性)などの方法論の開拓を行い、この数十年の間に著しい展開を遂げた。一方で、現在の分子生物学を支えている有機化学は60年代、70年代に行われたものが現在においても使用されている。

固相反応の難しさは液相での合成において当たり前になっていること、例えば TLC での反応追跡や NMR での生成物の確認など、日常有機合成で当たり前として使っている手段が使えない不便さに起因する。しかし、つい数十年前の有機化学者はそのような分析手段の背景を持たずして、様々な問題を解決してきており、敬服する。

タンパク質は翻訳後修飾を受けて初めてその機能を発揮するものが多いが、糖鎖付加による修飾は典型的なもののひとつであり、ポストゲノム時代といわれる現在、ますますその糖鎖および複合糖質の需要は高まると思われる。糖鎖のみならず、複合糖質をいかに合成するかも興味深い点である。

Merrifield の考案したペプチド合成機は現在のペプチド自動合成機の原形であり、固相合成がその後、核酸合成にも応用されたことや現在のコンビナトリアル・ケミストリーの基盤技術となっていることからその波及効果ははかりしれない。核酸やペプチドの受託合成についても一般化してきた。「だれでもが」望む構造のペプチドを手にいれることができる。一方で、ペプチド自動合成機の普及はペプチド合成化学の進歩

もさることながら、精製を容易にする逆相、イオン交換 HPLC の登場、目的物の同定を可能にする MS の測定技術の進歩を背景にしている。有機合成化学の手法を用いた糖鎖自動合成機が普及するには、糖鎖を合成するための保護糖の供給、MS などの技術による構造確認の手法の発達、精製法の発達なども必要である。合成化学の面から糖鎖合成を自動化でき、糖鎖生物学の発展に貢献できる日が近いと確信している。

参考文献

- 1) Varki A., *Glycobiology*, **3**, 97-130 (1993); Dwek, R. A., *Chem. Rev.*, **96**, 683-720 (1996).
- 2) Ge M., Chen Z., Onishi H. R., Kohler J., Silver L. L., Kerns R., Fukuzawa S., Thompson C., Kahne D., *Science*, **284**, 507-511 (1999)
- 3) Kudryashov V., Glunz P. W., Williams L. J., Hintermann S., Danishefsky S. J., Lloyd K. O., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **98**, 3264-3269 (2001); Gilewski T., Ragupathi G., Bhuta S., Williams, L. J., Musselli C., Zhang X-F., Bencsath K. P., Panageas K. S., Chin J., Hudis C. A., Norton L., Houghton A. N., Livingston P. O., Danishefsky S. J., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **98**, 3270-3275 (2001).
- 4) Merrifield B., *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149-2152 (1963).
- 5) Frechet J. M. J., Schuerch C., *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 492-496 (1971).
- 6) Danishefsky S. J., McClure K. F., Randolph J. T., Ruggeri R. B., *Science*, **260**, 1307-1309 (1993).
- 7) <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>
- 8) Manabe S., Nakahara Y., Ito Y., *Synlett*, **2000**, 1241-1244 ; Manabe S., Ito Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 1234-1235 (2001).
- 9) このリンカーは東京化成工業株式会社より市販されている。
- 10) Ando H., Manabe S., Nakahara Y., Ito Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3848-3849 (2001).
- 11) Manabe S., Ito Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 12638-12637 (2002).
- 12) Ando H., Manabe S., Nakahara Y., Ito Y., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 4725-4728 (2001).
- 13) Hanashima S., Manabe S., Inamori K-i., Taniguchi N., Ito, Y., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 5674-5677 (2004).
- 14) Hofsteenge J., Müller D. R., de Beer T., Löffler A., Richter W. J., Vliegthart J. F. G., *Biochemistry*, **33**, 13524-13530 (1994).
- 15) Doucey M.-A., Hess D., Cacan R., Hofsteenge J., **9**, 291-300(1998).
- 16) Fujise, H., Horiuchi, K., Adachi, K., Sano, H., Suzuki, K., Patent, WO99/09411. (Chem. Abstr. 1999, 130).
- 17) Manabe S., Ito Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9754-9755 (1999).
- 18) Ihara Y., Manabe S., Kanda M., Kawano H., Nakayama T., Sekine I., Kindo T., Ito Y., *Glyobiology*, **15**, 383-392 (2005).



気になった論文



中野 修一(なかの しゅういち) 甲南大学先端生命工学研究所講師
shuichi@center.konan-u.ac.jp

甲南大学先端生命工学研究所(通称 FIBER = Frontier Institute of Biomolecular Engineering Research) は、生命分子工学に関する種々の研究活動(生命・健康・環境・材料)を‘束ねる’組織として平成 15 年 11 月に設立されました。現在、杉本直己所長のもとで活発な研究活動を行っています。私の現在の主な研究内容は、核酸構造とその形成エネルギーの定量的解析、及び機能性核酸に関する研究です。今後ともよろしく願います。

General acid catalysis by the hepatitis delta virus ribozyme

S. R. Das and J. A. Piccirilli, *Nature Chemical Biology*, **1**, in press (2005).

まず、*Nature Chemical Biology* 誌の記念すべき第一号の表紙を飾った論文を紹介します。論文の内容は、ヒトデルタ型肝炎ウイルス(HDV)リボザイムの反応機構についてです。リボザイムは金属イオン酵素と一般に考えられていましたが、HDV リボザイムでは核酸塩基が反応を触媒するという内容の論文です。この可能性は数年前から指摘されていましたが、活性部位に位置するシトシン塩基が、RNA の切断反応に対して塩基触媒として作用するという報告と、酸触媒であるという両方の報告がありました。(現在では、HDV リボザイム以外のリボザイムや、リボソームでも核酸塩基が触媒反応に直接関わっていることが報告されています。)

筆者らは、切断反応において脱離基となるヌクレオチドの 5'位の酸素原子を硫黄原子に置換したものと、活性部位のシトシンをウラシル、あるいは 6-アザシトシンに置換した変異型リボザイムを設計しました。これらの変異を組み合わせたリボザイムの活性に対する pH 依存性、金属イオン効果、マグネシウムイオン濃度の依存性、ヘキサアンミンコバルトイオンによる阻害効率、イミダゾール添加の影響を比較した結果、筆者らは活性部位のシトシンは酸触媒として作用していると結論づけました。生化学的な手法を駆使することで、結晶構造からでは明確にされなかったリボザイムの活性構造と反応機構を解明した点で非常に優れた論文といえます。

RNA SHAPE chemistry reveals nonhierarchical interactions dominate equilibrium structural transitions in tRNA^{Asp} transcripts

K. A. Wilkinson, E. J. Merino, and K. M. Weeks, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4659-4667 (2005).

この論文では、SHAPE (selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension)という方法を用いて、tRNA^{Asp} の三次構造に対する熱変性の過程を調べています。筆者らが用いた *N*-methylisatoic anhydride (NMIA)は、リボヌクレオチドの 2'水酸基、特に一本鎖状態のリボヌクレオチドに効率良く反応します。このことを利用すると、NMIA への反応性が高いリボヌクレオチドは一本鎖状態であり、修飾されない

場合は構造体を形成していると判断できます。また、反応したリボヌクレオチドの同定は、プライマー伸長反応が停止した位置から決定することが可能です。従来、このような化学修飾法は RNA の高次構造の決定に用いられてきました。しかし、修飾試薬の反応性が温度の影響を大きく受けてしまうために、温度変性に伴う構造変化を追跡するのは困難でした。これに対して、本論文で用いられた NMIA は、その反応効率が温度によってほとんど影響を受けないという性質があり、このことによって高次構造の熱変性過程を調べるのが可能になりました。

温度変化に伴う修飾パターンの変化を解析することで、tRNA^{Asp}の三次構造の熱変性過程を追跡した結果、次のような事実が判明しました。35 °C では、tRNA^{Asp}は L 字型の高次構造を形成し、アンチコドンループのヌクレオチドは比較的柔軟な状態でした。51 °C になると、D-ループと T-ループの間の相互作用がなくなります。このときに、D-ステムを構成していた複数のワトソン-クリック塩基対が解離します。そして、53 °C で D-ステム構造が完全に融解し、これに伴って tRNA^{Asp}の三次構造が全て消失します。従来、RNA の熱変性は三次構造が崩れた後に、二次構造が融解するとみなされてきました。しかし、tRNA という比較的単純な RNA でも、二次構造と三次構造はお互いに影響し合うことが示されました。さらに、58 °C になるとアンチコドンループとアクセプターステムが融解しますが、興味深いことに、この融解と同時に、アンチコドンループと 3'ダングリグ末端のヌクレオチドに対する NMIA の反応性が顕著に低下することが見出されました。これは、熱変性によって、tRNA^{Asp}の構造ドメインとは異なる構造が新たに形成されたことを意味します。この多段階の変性過程が UV 融解曲線の形状とよく一致したことから、NMIA は RNA 構造の変性過程の解明に有効であることが示されました。

Effects of fluorescent dyes, quenchers, and dangling ends on DNA duplex stability

B. G. Moreira, Y. You, M. A. Behlke, and R. Owczarzy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **327**, 473-484 (2005).

DNA の末端に蛍光色素や蛍光消光色素が導入された修飾 DNA は、DNA 鎖の可視化や、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)や蛍光消光を利用した DNA 構造の検出、あるいはハイブリダイゼーション実験のプロブとして頻繁に用いられています。この論文では、DNA 末端に連結された蛍光色素や蛍光消光色素が、DNA 二重鎖構造の熱安定性に与える影響について系統的に調べられています。これまでであるようななかった論文です。

DNA の修飾に用いられる代表的な色素 (BHQ1, BHQ2, Iowa Black RQ, Iowa Black FQ, FAM, HEX, TAMRA, TET, Cy3, Cy5, Texas Red, QSY7, Dabcyl) が調べられました。その結果、用いられた全ての色素は DNA 二重鎖構造の安定性を低下させないことが示されました。その中でも、Cy3 と Cy5 は二重鎖の T_m を約 1.5 °C 上昇させることが見出されました。熱力学的パラメータを比較した結果、この安定化効果はエンタルピーエネルギーの寄与であることが明らかにされました。また、DNA と Cy3 をつなぐメチレンリンカーの鎖長が長いほど、Cy3 による T_m の増加は小さくなりました。一方、DNA の両末端に蛍光色素と消光色素を付加させた場合の安定化は、それぞれの色素単独で得られる安定化の和にはならない色素の組み合わせがあり、5'-Cy5 と 3'-Iowa Black RQ の組み合わせでは最大 4.3 °C の T_m の上昇が観測されました。このことから、両末端を修飾すると色素同士が分子内で相互作用する可能性が指摘されました。この相互作用の存在は、可視吸収スペクトルの測定結果からも示唆されました。このように、蛍光標識化 DNA が形成する二重鎖構造の熱安定性に対して、色素の影響が無視できる場合とそうではない場合があることが示されました。

この論文が掲載されたすぐ後に、ヌクレオチドのダングリグ末端に関する 2 報の論文が相次いで報告さ

れました(*Biochemistry*, **44**, 5390-5401, *RNA*, **11**, 512-516)。どちらの論文も、ダングリング末端の安定化効果に関する新たな知見を報告しており、ワトソン-クリック塩基対以外の部分の重要性が明らかにされています。



穴田貴久(あなだ たかひさ)
東北大学大学院歯学研究科 顎口腔創建学講座 助手
anada@mail.tains.tohoku.ac.jp

私は本年度4月より東北大学大学院歯学研究科にお世話になることになった穴田貴久と申します。このたび、このレターへ寄稿の機会を頂き大変光栄に思っております。さて、当研究室(鈴木治教授)は発足2年目の新しい研究室ですが、骨の再生医療を中心に研究を行っています。これまでに骨や歯のような硬組織を代替する材料としてリン酸カルシウム化合物、特にヒドロキシアパタイト(HA)やβ型の第三リン酸カルシウム(β-TCP)などが用いられ、臨床応用もされています。当研究室においては医学系研究科創生応用医学研究センター 鎌倉慎治先生と共同で生体アパタイトの前駆物質として考えられている第8リン酸カルシウム[Ca₈H₂(PO₄)₆·5H₂O; OCP]がHAやβ-TCPと比肩し得る性質を持つことを見出し、研究を進めております。しかしながら、OCPはHAなどに比べると骨置換材料としての知名度が低いのが実情です。そこで、生命化学を研究されている皆様にもOCPの興味深い性質を知って頂きたいと考え、この場をお借りしてOCP関連の論文を紹介させて頂きたいと存じます。これを機に以下の論文、さらには今後の論文が皆様の「気になった論文」となれば幸いです。

Implanted octacalcium phosphate is more resorbable than β-tricalcium phosphate and hydroxyapatite

S. Kamakura, Y. Sasano, T. Shimizu, K. Hatori, O. Suzuki, M. Kagayama, and K. Motegi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **59**, 29-34 (2002).

骨修復の三要素として①細胞、②成長因子、③担体が挙げられます。しかしながら、現在のところ①の骨芽細胞やより未分化な幹細胞だけでは骨再生は不十分であり、②の成長因子は生体内において不安定ですぐに分解し、単独では拡散してしまふ。そのため細胞や成長因子を保持し、再生の基盤となり得る③担体の開発に注目が集まっています。本論文では新規骨再生担体としてのOCPを人工的に合成し、HAやβ-TCPとの比較を行うことでその評価を行っています。実験方法はラットの頭蓋冠に自然治癒が望めないサイズの骨欠損を作製し(頭蓋冠規格化骨欠損モデル)、そこへOCP、HA、β-TCPを埋め込み、6ヶ月後に骨再生を観察しています。その結果、OCP埋入による新生骨の割合がHA、β-TCPに比べ有意に高く(OCP; 63%、β-TCP; 43%、HA; 24%)、残存移植体量が少ない(OCP; 6.6%、β-TCP; 23%、HA; 39%)ことが示されました。つまり、OCPは他の物質に比べて吸収されやすく、骨再生を促進する能力を持つことがわかりました。

New scaffold for recombinant human bone morphogenetic protein-2

S. Kamakura, S. Nakajo, O. Suzuki, and Y. Sasano, *J. Biomed. Mater. Res.*, **71A**, 299-307 (2004).

本論文ではOCPが骨形成に関与する成長因子の一種であるbone morphogenetic protein-2(BMP)(リコンビナント)の担体となるかについて検討を行っています。上記論文と同様に規格化された骨欠損をラット頭蓋冠に作製し、そこへOCP/BMP混合物あるいはOCPのみをそれぞれ埋入し、術後4、8週に標本を採取

してX線学的、組織学的な解析を行っています。その結果、BMPを複合化させることで有意に新生骨が増加し、残存移植体量も少なくなっていることがわかりました。従って、OCPはBMPをはじめ成長因子を保持する優れた担体として機能し、複合化によって骨再生と移植体吸収が同時に促進されることが示されています。

OCP は生体内においてアパタイトへと転換していくことが示されており(O. Suzuki et al., *Bone and Mineral*, (1993) **20**, 151-166 及び O. Suzuki et al. *Tohoku J. Exp. Med.*, (1991) **164**, 37-50)、このような性質が骨再生を促進している可能性があります、そのメカニズムは不明な点が多く残されており、その解明と硬組織代替用生体材料としての実用化が今後の課題です。さらに OCP の薬物担体としての機能を検討することで、新たなドラッグデリバリー法の開発にもつながると期待できます。



濱田勉(はまだ つとむ)

京都大学大学院理学研究科 物理学宇宙物理学専攻 博士課程三年

hamada@chem.scphys.kyoto-u.ac.jp

現在、京都大学理学研究科物理学第一教室吉川研一教授のもとで研究を行っています。研究内容は、細胞サイズの脂質二分子膜小胞(リポソーム)を主な対象にして、膜面の形態変化のダイナミクスやその内部での生化学反応に関する物理化学的解析を進めています。リポソームの研究はドラッグデリバリーや細胞膜のモデル実験系として生物・化学分野で多くの研究が行われていますが、その物性に関しても近年ソフトマター物理学分野からの研究が盛んになってきています。今回は、細胞サイズリポソームをモデル膜として用いた実験的研究を3つ紹介させていただきます。

Miscibility Phase Diagrams of Giant Vesicles Containing Sphingomyelin

S. V. Veatch and S. L. Keller, *Phys. Rev. Lett.*, **94**, 148101 (2005).

生体膜中では脂質分子等が一樣に分布しているのではなく、ある種の分子が多く含まれたドメイン(ラフト構造)を形成している事が近年報告され、生理的機能との関連から非常に注目を集めています。この脂質二分子膜でのドメイン形成は、物理学的には一種の相分離現象であると考えられます。相分離とは、結合エネルギーの異なる二種類以上の分子が存在するときに起こる現象であり、一般的に高温では混合のエントロピーが支配的となり一樣状態が安定で、低温では結合エネルギーが支配的となり分離してドメインが形成されます。生体膜を形成する脂質分子も同様の性質を示し、二種類以上の脂質分子で形成されたリポソーム膜上で相分離を観察する事が可能です。この論文では、不飽和脂質(DOPC: dioleoyl-phosphatidylcholine)とスフィンゴ脂質(Sphogomyelin)とコレステロールの三成分混合系リポソームでのドメイン形成を蛍光顕微鏡を用いて観察し、混合比を変化させることで相図(図1)を決定しています。この結果は、相図の全貌を実験的に明らかにした点で非常に重要であり、脂質二分子膜を場とした相

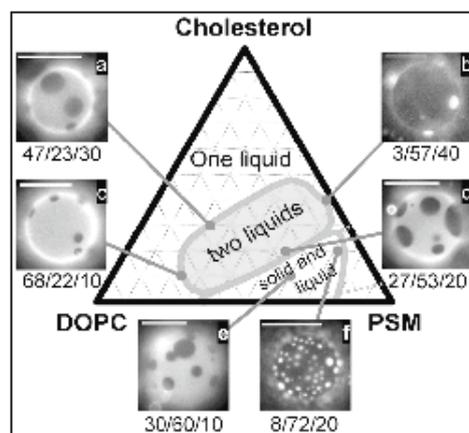


図1. 相図

分離現象を考える上で大きな意味を持つと思います。しかし、この論文でも指摘されていますが、このようなモデル膜上で観察されている相分離構造と実際のラフト構造との間にはまだまだ大きなギャップが存在しています。そのひとつは、ドメインサイズの問題です。生体膜中でのラフトはある有限のサイズを持って安定に存在していますが、モデル膜でのドメインは融合を繰り返してどんどんと大きくなってしまいます。また、実際のラフトは形成・分裂等を繰り返す動的構造体であるという報告もなされています。ラフトの形成メカニズム解明のためには、相図等の静的構造の観察・解析だけではなく、ドメイン成長過程に関する速度論的な研究なども今後必要になってくると思います。

"A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly"

V. Noireaux and A. Libchaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17669-17674 (2004).

ここ数年の間に、数十マイクロメートル程度の細胞と同程度の大きさのリポソーム内部に *in vitro* 転写翻訳系を封入し、その内部でタンパク質を合成可能な細胞モデル実験系の構築が進められてきています。これらの流れを受け、この論文ではリポソーム内部で α -hemolysin という膜タンパク質の合成が試みられています。実験条件としては、転写翻訳反応に必要な *E. coli extract* 等の物質と目的のタンパク質をコードした DNA をリポソーム内部に包み込み、外部バルク溶液には ribonucleotides, amino acids, magnesium salt, potassium salt 等の分子のみが含まれています。反応が進むと、膜小胞内で発現された α -hemolysin の monomer が自己集合して脂質二分子膜に直径 1.4 nm の穴を作り、3kDa 以下の低分子のみを透過可能な膜境界が形成されます。その結果、膜小胞外部からの穴を通じた物質供給が可能となり、通常ではリポソーム内部空間に存在する栄養・エネルギー源となる分子を使い果たし数時間で反応が止まってしまうのに対して、この系では数日間タンパク質合成が継続しています。この様に、生命が生きていくうえで必要となるエネルギーと物質の選択的透過を単純なモデル膜系にて実現している点を非常に興味深く感じました。また、今回リポソームを形成する方法にも工夫がなされています。著者らは、水/油エマルジョンを利用することで、通常難しい高塩濃度環境での安定な細胞サイズリポソームの形成に成功しています(図2)。このような細胞サイズリポソームを利用した人工的にコントロール可能な細胞模擬空間は、人工細胞の作成やマイクロリアクターとしての研究など多くの発展性が今後期待されます。

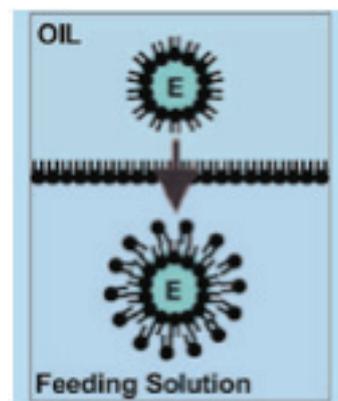


図2. リポソーム形成法

Active membrane fluctuation studied by micropipet aspiration

J.-B. Manneville, P. Bassereau, S. Ramaswamy, and J. Prost, *Phys. Rev. E.*, **64**, 21908 (2001).

最後は、膜タンパク質を再構成した脂質二分子膜の物性に関する報告を紹介させていただきます。この論文では、光感受性のプロトン輸送膜タンパク質である bacteriorhodopsin (BR) を細胞サイズリポソームに埋め込み、BR がプロトン輸送を行っているとき (active) と、輸送を行っていないとき (passive) とで二分子膜の物性が異なることを報告しています。実験は、図3に示した micropipet のテクニックを用いて行われています。この装置を使えば、任意の圧力でリポソームを吸引し固定する事が可能です。吸引される長さ L は膜面の曲がりやすさを表す弾性係数等と関係しているため、この長さ L と吸引圧 ΔP を測ることで二分子膜の性質を評価する事が出来ます。そして、黄緑色/赤色の光を照

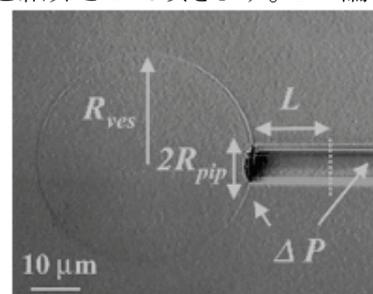


図3. Micropipet 法

射した active/passive それぞれの状態でのリポソームの測定結果から、BR が働いている状態 (active) の方が膜面が柔らかくなっている事が分かりました。また理論的考察から、二分子膜と BR の相互作用を考慮に入れた自由エネルギーを用いることで、この違いを定性的に説明できることを示しています。このグループは、ATP 依存のカルシウムポンプである Ca^{2+} -ATPase をリポソームに埋め込んだ実験系についても最近新たな報告 (*Phys. Rev. Lett.* 2005) を出していて、今回の理論的考察を更に発展させています。この様に、膜タンパク質の働きが脂質二分子膜の物性(柔らかさ)に与える影響がこのグループにより初めて実験的に示されました。この実験で用いられた micropipet 法などの二分子膜の物性を評価する手法が近年確立されつつあり、アイデアしだいでこのような興味深い実験系が色々構築できるのではないのでしょうか。





私の Caltech 体験

千葉大学工学部 共生応用化学科
梅野 太輔

はじめに

昨年7月、「米国漂流記(Lost in the Pacific)」¹⁾を書いた頃、自分がどこに漂着するのか見当もつかなかった。ところが一年も経ぬ今、なぜか自分は千葉に居て、「体験記」などを書かせていただいている。私の人生は、こんなに美しいものだったでしょうか？

私は1999年よりカリフォルニア工科大学(Caltech)に4年半、ワシントン大学(UW)に2年、計6年余アメリカで研究しました。この間も知人には、さんざん愚痴や(せこい)自慢話を聞かせてきました。その上まだ云い足りないの？と自嘲せぬでもないですが、今自分に書けるのはせいぜいアメリカのことくらいですし、また、寝食わすれて働いたあげく、遂に「研究紹介」ではなく「留学レポート」を依頼されるにとどまった自分のことは、一度きっちり反省したいと思っていました。反省文を書くのは高校卒業以来です。

アメリカいきやあ何かが変わる？

「そうですねえ、今日本には、別段アメリカ帰りに期待するものなどありませんねえ。優秀な人材→米留の図式はとうに終わってますし」。これは Caltech 日本人セミナーに現れたJETROのお役人の言葉である。「期待されぬ者」の集まりに押しかけてきておいて云う台詞かどうかは別として、言ってることはよくわかる。よく考えれば(否、考えずとも)、欧米帰りなぞ今どき珍しくもないし、優秀な人の多くは、卒業と同時にポストを得て、ビジターとして米留している。欧州でも似た状況のようだ。アメリカのポスドクの多くは(もちろん全部じゃありません)、わけありか、順番待ちか、おかしな個人的嗜好に導かれてやって来た輩である。私は100%、後者でした。



こいつは俺の斗いだ！(梅野)

ジャズ、ハリウッド映画、X-game、ベイウォッチ...アメリカは自分にとってまぶしい憧れの地、そこに「住み」「働く」ことは、その華やかさの一部になる第一歩でした。学生時代からアメリカが好きでよく旅行もしました。旅先で見知らぬ人達の家にあがりこみ何日も居候し、あげくの果てには彼らの単車で草レースに出ちゃうほど厚かましい自分。そういう自分が意外なほど受け入れられた記憶は、私をアメリカ党にするのに十分でした。そのうえ、心ない知人らが「梅野はきっとアメリカのほうに合うよ」などと全く無責任で無根拠なことばでそそのかす。結局、「せめて英語くらいはうまくなるかしら」(←嘘です。努力しなければ、ただ英語ができない自分に慣れてゆくだけです)、と安易な気持ちで渡米。思えば入口でつまづいていました。この留学が、自分のキャリアパスの上でどう位置づけられ、この間何を達成するのか、明確に考えたことなどありません。「何かが変わるんじゃないか。」竹中平蔵氏のいう「思考の放棄」とは、こういう態度を指す言葉でしょう。

私の「ボス毒」道

さて私は、米国の研究室に潜り込んだだけで達成感に酔いしれていましたが、同僚はポスドクであること自体に苦しみ、そして学生たちは彼らに同情しているようでした。米国のエンジニアスクールでは、優秀な学生は博士号を取ると同時に教授職を得ます。化学工学科のポスドクは、いわばシード権を持たない「事情アリ」の外人部隊の位置づけで、部隊員の誰もが憂鬱を抱えていました(私もすぐその一員となりました)。「もう一個 PhD とるつもりで腰落ち着けてやりたい」と無邪気に放言する私に、ボスは迷惑そうな顔で、「そうじゃない。一日でも早く PI (Principal



ほぼ毎日行われるカルテクポスドク(ルーザー)会議のひとつ。このうち彼らは再び現実世界(ベンチ)へと、重い足取りで帰ってゆく。

Investigator) になりたいと願いなさい。その道筋を急いで渡りきるのがポスドクの仕事と心得よ」と強く諷めました。今振り返ると、なんともかけがえない忠告をしてくれていたものです。しかし自分といえば、採ってくれた Arnold に感謝するあまり、「ドブサライでもなんでもやりますぜ」、と忠犬モードで高速運行。主人の迷惑も知らず、全くざまあ有りません。

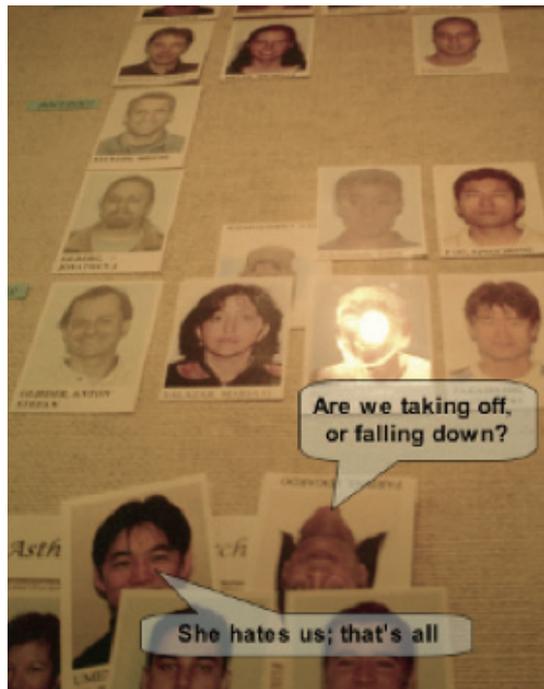
Caltech時代のボス、Frances H. Arnold教授は、酵素の分子進化学(Directed Evolution)のパイオニアの一人です。私が入ったころ、既に多くの研究室で蛋白質進化学が始まっていた。Arnold教授は、代謝経路や遺伝子回路など、蛋白質機能のネットワークを対象とする進化学の可能性を訴えていましたが、蛋白質ひとつの「進化」さえ「ポスドクキラー」と呼ばれていた当時、複数の酵素を同時に進化させねばならないテーマに応じるポスドクなど、おいそれとは現れません。Arnoldは誰にも相手にされず口をとんがらせていました。結局、ドイツから来たビジター(Claudia Schmidt-Dannert 現ミネソタ大教授)が独り、カロテノイド生合成系の進化学を始めたところでした。誰もが私に「あれはやっちゃダメだ」と耳打ちしましたが、何やら新しく面白そうだったし、そして、一これがいちばん反省していることですが、「ボスがやりたがっているのに誰も手を挙げぬとはけしからん。それならば拙者が。」と要らぬ忠義心に燃え、この研究に加わることにしました。ここでも思慮らしい思慮などありませんでした。

当初の目標は、大腸菌に構成した普通のカロテノイド生合成経路を、その経路上の酵素に対する進化学によって変換し、新規カロテノイドを生物生産してみせる、というものでした。反対する仲間の論拠は「アブナすぎる」ことでしたが、私は逆に、その志の低さにがっかりしていました。私はとても賢かったので、ランダムな遺伝子変異を導入したとき、それが何らかの出力変化に結びつく(⇒進化してみえる)可能性は、独立した調節子が多いシステム(代謝系)のほうが、パーツひとつ(蛋白質分子)よりずっと高いこと、つまり定義によっては「進化」は簡単に起こせる²⁾ことを看破していましたし、「本当に新規な」分子への合成経路を「自在に」に進化させるというのならば、話は全く違ってくることも知っていました。私は正義感が強く、感心で盲目的な青年でしたから、「いい加減な気持ちでアドバルーンを揚げた Arnold はいずれ批判に晒される。今こそ真のサムライ(吾輩)が身を挺してお守りせねば」と力んでいました。「2匹目の泥鰌は居ない」と翻意を促す友人の声には耳を貸さず(ああ、再び...)、このプロジェクトに深入りしてゆきました。ちなみに、ここの経緯やそこから学んだことなどについては、最近の総説³⁾や文献¹⁾に詳述しています。

黄金時代

私は Arnold 教授のためにひとつだけ NSF (National Science Foundation) のプロポザルを書きました。その採択がきまったとき、彼女は私に「Congratulations on your PERFECT freedom」と云いました。それを額面通り受け、以後 PI のように振る舞うことにしました。後の3つの論文で私は corresponding author ですし、そのうちのひとつがアメリカ微生物学会誌から feature されたときも、インタビューには私自身が答えています。それにしてもポストドクにこれだけの待遇を与えるのは異例であり、最初は私も固辞したのですが、「オマエは発案から研究費獲得、教育、論文まで全てワタシ抜きでプロデュースしたのだから、代表者となって当然だ」と云ってくれました(もともと、これには、私の独善的なやり方への皮肉も込められていました)。そうはいっても、ポストドクにスターマークを与えてしまうなんて…。Arnold 教授の明快な信条と度量の深さにはいつも感じ入ります。この効果で、私自身に対して講演や査読依頼、ポストドク希望の手紙(ポストドクのワタシにです:笑)などがしばしば寄せられるようになりました。私を雇いたいというすてきな人さえいました。些細なことと笑われるかもしれませんが、渡米後ようやくきた春に、「サムライズム遂に結実セリ!」と私はますます絶好調で、Caltech のキャンパスを風を肩で切って歩きました。喉元すぎればなんとやら、ちょっとぼたん掛け違えばクビになっていたのに、愚かしいことです。無論、本当にプロの自覚のある人なら、そんな PI ごっこに夢中になるよりは、本当の PI になる努力を積んだでしょう。Arnold 教授も「どんなに実験をさぼってもいいから Teaching に足る英語力をつけなさい」とまでいって下さっていましたが、私はこの厚意に応えることはなく、ますますマニアックな実験にふけるだけで、英会話学習は Bar で済ませて満足していました。

居心地の良さに任せて長居をし、この日々が永遠につづきますように、とはかない願いを念じてるうちに、気がつけば4年と4ヶ月経っていました。私の滞在日数は、この時点で化学工学科では前人未踏の最長記録でした(学部の規定で senior(=3年を超える研究者)は雇えないことになっています)。



掲示板はポスの心の鏡。ポスが興味を失うと、その人の写真は速やかに壁からはがれ落下する。この法則の最初の発見者は私である。

New Carotenoid Has Implications for Evolution, Bioengineering

Nature makes hundreds, and possibly thousands, of different carotenoids, using two main routes. One starts with a 30-carbon backbone, the other with a 40-carbon backbone. Daisuke Umeno and Frances H. Arnold of the California Institute of Technology, Pasadena, show that a synthase for the C_{30} pathway can also assemble a 35-carbon backbone when fed certain C_{15} and C_{20} precursors. "Thus a whole new pathway, never reported in nature, became possible in the laboratory," says Umeno. "I believe our work shows how easily secondary metabolic pathways can evolve," says Umeno. "With a combination of metabolic engineering and directed evolution, we can make use of this potential to generate large numbers of new compounds, some



Arnold and Umeno

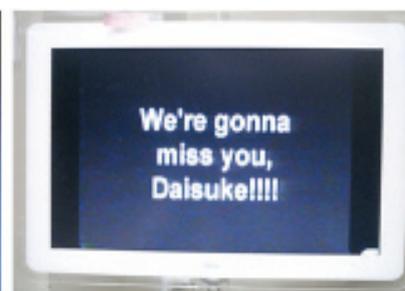
サヨナラ Caltech

Arnold 教授は、私色に染まりすぎ想定外の(地味な?)方向に進展してしまった代謝工学研究への関心を次第に薄めてゆきました。かわりに Scripps から移ってきた横林洋平氏(現 U.C. Davis 助教授)が始めた遺伝子(情報)回路の進化工学(今の Arnold 研のメインテーマです)に入れ込んでいました。ちなみに横林氏は私と同期で、めちゃくちゃ優秀な上に人格的にも全く非の打ち所がなく、誰からも一目おかれる存在でした。現在、氏は Davis に研究室を持ち、遺伝子ネットワークの設計や進化について、おもしろい研究を精力的に展開しています。

そういうわけで、私のグループの結果がだいたい出そろった頃、ついに露骨な肩たたきが始まりました。知らぬ間に会社に私の就職話をすすめていたこともあり、横林君に愚痴ったこともありましたが、ボスの気持ちも汲んでやれ、という趣旨のことを云われて納得したりなどしていました。もちろん私とて、よくここまで忍耐してくれた、はやく出て他の人に椅子を空けてあげたい、と焦っていました。しかしアカデミアへのあこがれは捨てきれないし、さりとてアメリカで教職を得るには力不足、行くところがないのです。悩み抜いた末、ワシントン大学医学部の LA Loeb 先生の研究室でもう一度研究員をすることにしました。この頃、外に出られず Arnold に迷惑かけている仲間は他にも何人かいました。彼らもまた、行き過ぎた浪漫主義や空想的遊技に足をすくわれた、かよわき心の友です(最近になってようやく彼らも居場所を確保したようです)。

そして、長く居座った Caltech にも、遂にさよならを云う日が来ました。さすがに私を知る人は多く、沢山の人が別れを惜しんでくれました。

出発の前日、最後の論文を Nature に投稿しました。私はさほど熱心な Nature 教信者ではありませんが、出たとこ勝負でアメリカに渡った田舎者の自分が、その4年後に主著者として Nature に論文投稿するなど想像外さえしてませんでしたから、やはり痛快でした。実際はこれが



大学院生 Alex Tobias 氏制作・総指揮による Daisuke サヨナラ映画。Miss You ということだが...そりゃそうでしょ!?

Editor で止められる見込みは高いと感じていました。そうならば、カリフォルニアの記憶はよいオチのまま凍結保存しよう、リジェクトの知らせが入る前にせめてカリフォルニアの外に出てしまおう。そう決めて、シアトルにむけおんぼろ車をひた走らせました。残念なことに、予期した知らせはオレゴン州境直前で届いてしまいました...(彼らにあと一日遅れて知らせしてくれる慈悲はなかったのでしょうか)。すっかりむくれた私は、その後牛歩運転に転じて遊びまわり、2週間もかけてシアトル入りしました。

UW もまた、ボス(Loeb 先生)・同僚ともにすばらしい研究室でした。しかし、人間関係の濃さにおいても、研究の厳しさにおいても、Caltech ほどの感慨をもって思い起こすことはありません。いまや私にとって、アメリカとは、ビーチを往来する美しい señorita でも、アクション決めるスーパークロスライダーでもありません。背中をまるめて過ごした Caltech のキャンパスと、同じく背中をまるめてむこうからぶつぶつ歩いてくる研究者たちの姿。それが私のアメリカです。

なんとなくアメリカに渡り、行き当たりばったり、汗を流す以外能をしめさなかった私の6年間は、無駄ばか

りで苦労が多かったです。周囲に迷惑ばかりかけました。それでも帰国がかなったのは、ひとえに周囲の慈愛と強運のおかげです。仲間、ボス、そして私を心配して下さった日本の友人や先生たち。どれが欠けてもアカデミアには残れなかった。感謝の気持ちでいっぱいです。最後に、燃費の悪い私の研究生活に呆れながらも、最後まで見捨てず支えてくれた家族と両親に、改めて感謝を捧げたいと思います。

今年の4月から私は、千葉大学工学部共生応用化学科の斎藤恭一先生の研究室の助教授として、小さなGroupをもたせてもらうことになりました。まだ研究室は建設中ですが、素晴らしい人々に囲まれて幸福な毎日です。研究のテーマは、特にDNA複製や修復まわりの酵素やパスウェイの実験室内進化です。生物の「もの作り」=分子進化の源泉である遺伝子変異をより自由にコントロールすること、遺伝子工学や遺伝子治療に役立つ新酵素を創りだすことを目指しています。Chemical Biology, Synthetic Biology に強い関心があり、是非とも生命化学研究会の仲間に入れていただきたいと思っています。これからどうぞ宜しくお願いいたします。

- [1] 梅野太輔, 米国漂流記, *高分子*, **53**: 507 (2004)
- [2] Schmidt-Dannert, C; Umeno, D; Arnold, FH, Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. *Nature Biotechnol.*, **18**, 750-753 (2000)
- [3] Umeno, D; Tobias, AV; Arnold FH Diversifying biosynthetic pathways by laboratory evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Review*, **69**, 59-78 (2005).

うめのだいすけ(umeno@faculty.chiba-u.jp)



研究所紹介

甲南大学先端生命工学研究所の紹介



甲南大学先端生命工学研究所

甲元 一也

甲南大学先端生命工学研究所 (FIBER) は、生命分子工学分野において世界最高水準の研究・教育を実施する研究所として 2003 年 11 月に発足いたしました。この春、その研究拠点となります新研究棟 (FIBER 棟) が完成し、本格的な研究が始動しております。

FIBER 棟は、地下1階、地上4階の総5階から構成されておりまして、地下1階には正面玄関、図書館、会議室などがあります。また、1階から3階が研究・実験ゾーンとなっており、4階には学会・講演会が行えるレクチャールームがあります。

研究・実験ゾーンの1階には吸収、蛍光、円二色性などの各種分光分析装置、DNA、ペプチド合成装置、LC-MS、AFM、SPR、ITC、DSC などが設置されており、種々の測定を円滑に行えるように設計されております。2階は、バイオ実験を行うフロアとなっております。すべての部屋にクリーンベンチが設置されており、DNA、RNA の取り扱いから大腸菌、酵母、動物細胞の培養まで行うことができます。また、4°C、37°C での実験が行える低温室、恒温室も完備されております。3階は、有機合成実験を行うフロアとなっております。各実験室はドラフトチャンバーが備え付けられ、広い実験スペースを確保してあります。

また、実験・研究ゾーンはフロア間で効率的な研究が推進できるよう設計されております。



FIBER 棟の外観



1 階測定実験室



2階バイオ実験室



3階合成実験室

4階には130人を収容できるレクチャールームがあります。このレクチャールームは可動式の間仕切りを備えており、レクチャールームを大小2つの部屋を分割することもでき、30人から130人までの様々なシンポジウム・学会・セミナー・講演会を対応できるよう設計されております。

このレクチャールームは、今年度におきましても4月23日に行われた FIBER 記念シンポジウムをはじめ、FIBER Lectures in NanoBioNow Series、FIBER FORUM 2005 などの学会、セミナー、シンポジウム等を開催することを予定しております。



レクチャールーム

また、この研究棟のエレベーターホール横には、研究所のシンボルとなる DNA の二重螺旋モニュメントがあります。地下1階から4階へと続く二重螺旋は、甲南大を支点とした地球を支える形で存在しており、甲南大学発

の新しいナノバイオテクノロジー研究の発展を願う意味が込められております。螺旋に沿うエレベーターの側面には、地下1階からDNAの発見からの歴史が記されております。



二重螺旋モニュメント



二重螺旋モニュメント最上部

このように甲南大学 FIBER では、最新鋭の設備のもと日々研究・教育に精進しております。今後とも皆様の温かい御支援、御協力をお願い申し上げます。

シンポジウム等会告



第 11 回機能性ホスト・ゲスト化学研究会サマーセミナー

主催 機能性ホスト・ゲスト化学研究会 共催 日本薬学会、日本化学会、高分子学会、日本分析化学会
協賛 有機合成化学協会

会期 2005 年 7 月 28 日(木)13 時から 29 日(金)13 時(予定)まで

会場 立山国際ホテル(富山県上新川郡大山町原45)

参加申込締切 6 月 30 日(木)必着

ポスター要旨締切 6 月 30 日(木)必着

1. 招待講演

(阪大院基礎工)戸部義人、(富医薬大薬)畑中保丸、(東大院薬)菊地和也、(静大理)小林健二、(東農工大院工)尾池秀章、(阪大院工)森 直、(京大院工)山東信介

2. 参加者によるポスターセッション

参加費 学生 15,000 円、大学関係 25,000 円、企業関係 28,000 円(宿泊費、食費、懇親会費、講演要旨集代を含む) 参加費は当日会場にて頂きます。

参加申込方法 氏名、性別、所属、連絡先(住所、電話、FAX、E-mail)、学生(学年)／大学関係(職名)／企業関係の別を E-mail、FAX または郵送にて下記のいずれかへお申し込み下さい。ポスター発表希望者は発表希望の旨を明記して下さい。

詳細についてはホームページ

<http://www.toyama-mpu.ac.jp/ph/yakka/summer/index.html>

をご覧ください。

申込先 〒930-0194 富山市杉谷 2630 富山医科薬科大学薬学部 薬化学研究室

世話人 井上将彦

連絡先 FAX(076)434-5049

阿部 肇 電話(076)434-7527, E-mail: abeh@ms.toyama-mpu.ac.jp

藤本和久 電話(076)434-7526, E-mail: fujimoto@ms.toyama-mpu.ac.jp



FCCAセミナー「第12回グライコサイエンス若手の会」

本会は、糖関連の化学・工学・生化学・生物学等を研究対象とする若手研究者および学生の交流の会です。普段は交流のない様々な分野の研究者により、糖質を科学的かつ多角的に議論できればと思っております。以下の招待講演を聴講し、講師の先生方を囲んだ懇親会、参加者による口頭又はポスター発表（発表形式は事務局へ御一任下さい。学会とは異なりますので、他分野の方にも理解できるようにお願い致します。）等、内容は豊富です。企業にお勤めの方でしたら商品の説明でも構いません。糖質をキーワードに新たな研究を展開し、新しい人脈を培うきっかけになれば幸いです。是非、お気軽に御参加下さい。

会期:平成17年8月26日(金)～27日(土)

場所:昭和女子大学 望秀海浜学寮

〒294-0055 千葉県館山市那古 1672-30

TEL:0470-27-5110 FAX:0470-27-5483

<http://homepage3.nifty.com/swu-boshu/>

内容:

1. 招待講演;

入村 達郎 氏(東京大学大学院薬学系研究科)

「レクチンについて考える」

蟹江 治 氏(三菱生命科学研究所)

「糖鎖構造解析における新手法:構造情報源としての糖鎖ライブラリーと質量分析装置による情報解析」

2. 参加者による口頭発表およびポスター発表

3. 懇親会・レクリエーション

その他詳細については <http://www.che.tohoku.ac.jp/~poly/glyco/glyco.html> をご覧ください。

定員:40-50名程度

参加費:一般5,000円、学生3,000円(宿泊、食事代込み)

旅費申請:本FCCAセミナーへの遠方からの参加者は川口基金(<http://www.gak.co.jp/AN/kkfundJ.html>)からの旅費の補助を受けることができます。

申込締切:平成17年7月22日(金)

※口頭あるいはポスターの希望、発表題目を明記の上、下記の代表幹事へE-mailでお申し込み下さい。

申込先:慶應義塾大学理工学部生命情報学科 松原 輝彦

(E-mail: matsubara@bio.keio.ac.jp)



お知らせコーナー

受賞のお知らせ

小澤岳昌(自然科学研究機構分子科学研究所)
文部科学大臣表彰若手科学者賞
「化学・生物分野における生細胞内分子動態解析法の研究」
平成17年4月20日



野島 高彦(九州大学大学院工学研究院応用化学部門)
日本化学会生体機能関連化学部会講演賞
「ペプチド-DNAコンジュゲートを利用したペプチド-蛋白質相互作用検出」
2004年10月8-9日



会員異動

濱地 格 (順不同)
京都大学大学院工学研究科 教授
〒615-8530 京都市京都大学桂
TEL: 075-383-2754 FAX: 075-383-2715 E-mail: ihamachi@sbchem.kyoto-u.ac.jp

小澤 岳昌
自然科学研究機構分子科学研究所
分子構造研究系 分子動力学部門 助教授
〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中38
TEL: 0564-55-7330 FAX: 0564-55-4639 E-mail: ozawa@ims.ac.jp

佐賀 佳央
近畿大学 理工学部理学科化学コース 講師
〒577-8502 大阪府東大阪市小若江3-4-1
TEL: 06-6730-5880(内線4365) FAX: 06-6723-2721 E-mail: saga@chem.kindai.ac.jp

林 高史
大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻 教授
〒562-0871 吹田市山田丘2-1 TEL & FAX: 06-6879-7928 E-mail: thayashi@chem.eng.osaka-u.ac.jp

青井 啓悟

名古屋大学大学院 生命農学研究科応用分子生命科学専攻 教授

〒464-8601 名古屋市千種区不老町 TEL & FAX: 052-789-4140 E-mail: aoi@agr.nagoya-u.ac.jp

平野 智也

東京医科歯科大学大学院・疾患生命科学研究部ケミカルバイオロジー分野・薬化学教室 助手

〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台2-3-10

TEL: 03-5280-8034 FAX: 03-5280-8127 E-mail: hiraomc@tmd.ac.jp

大神田 淳子

大阪大学 産業科学研究所機能分子科学大部門 医薬品化学分野 助教授

〒567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘8-1

TEL: 06-6879-8472 FAX: 06-6879-8474 Email: johkanda@sanken.osaka-u.ac.jp

二木 史朗

京都大学化学研究所生体機能化学研究系 生体機能設計化学研究領域 教授

〒611-0011 宇治市五ヶ庄

TEL: 0774-38-3211 FAX: 0774-32-3038 Email: futaki@scl.kyoto-u.ac.jp

津本 浩平

東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻・生命分子解析学分野 助教授

〒277-8562 千葉県柏市柏の葉5-1-5 東大・新領域・生命棟301

TEL: 04-7136-5402 or 3600 FAX: 04-7136-3601 E-mail: tsumoto@k.u-tokyo.ac.jp

編集後記

ここに 2005 年度最初の生命化学研究レターを無事お送りすることができ、編集担当一同、喜んでおります。本号は長崎が2回目の編集を担当させていただきましたが、編集時期が海外出張と重なり現地 St.Louis で血相をかえ執筆者の皆様のご協力はもとより石田・原田両編集委員のご尽力でなんとか発行にこぎ着けることができました。

次号(No. 19)は、原田氏の担当により、2005 年 10 月に発行を予定しております。乞うご期待ください。

長崎 健

大阪市立大学大学院工学研究科

(nagasaki@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp)

