



# 生命化学研究 レター

## 目次

1.	巻頭言	2
	さらなるジャンプを…	
	和田 健彦 (東北大学多元物質科学研究所)	
2.	関連シンポジウム紹介	4
	1 <sup>st</sup> Japanese-Swiss Symposium on Chemical Biology (JSCB07)に参加して	
	浦野 泰照 (東京大学大学院薬学系研究科)	
3.	研究紹介	
	プローブを協調させてシグナルをデザインする	6
	井原 敏博 (熊本大学大学院自然科学研究科)	
	天然物類似低分子ライブラリー構築の新戦略: 三次元構造多様性を如何にして創出するか?	11
	大栗 博毅 (北海道大学創成科学共同研究機構 流動部門未踏系)	
	無細胞蛋白質合成系を用いた分子、 システムの最適化を目指して	17
	松浦 友亮 (大阪大学大学院情報科学研究科)	
4.	論文紹介「気になった論文」	22
	兒島 孝明 (大阪府立大学大学院理学系研究科)	
	長門石 暁 (東京大学大学院新領域創造科学研究科)	
	今西 未来 (京都大学化学研究所)	
5.	生命化学研究法	30
	生体分子間相互作用の熱測定 ～等温滴定型カロリメトリー(Isothermal Titration Calorimetry:ITC)～	
	織田 昌幸 (京都府立大学大学院農学研究科)	
6.	レロアール研究所留学体験記	35
	原田 和雄 (東京学芸大学自然科学系)	
7.	シンポジウム等会告	39
8.	お知らせコーナー	41
	会員異動	
	編集後記	

# 巻頭言

## さらなるジャンプを・・・

東北大学多元物質科学研究所  
和田 健彦

2008年…日本化学会の研究会としての設置年限を迎える「生命化学研究会」にとって、まさに節目の年となる。その節目の年を目前とした今回の生命化学研究会ニュースレターの巻頭言のタイトルは、研究会の更なる発展への思いを込め「さらなるジャンプを…」とさせて頂いた。

前回、2004年に巻頭言を書かせて頂いた際のタイトルは「新しいステップに…」。

発足時の「ホップ」、ヒトゲノム配列が決定され、生命化学研究会としての初めて国際会議を開催し盛会に終わられ次なるステージに移行するべき2004年は新しい「ステップ」、そして1998年3月日本化学会の研究会として発足して10年の節目となる年に書かせて頂く今回の巻頭言タイトルは「ジャンプ」に。生命化学研究会の「ホップ」、「ステップ」、「ジャンプ」…

1995年生命化学研究会の前身、生体分子化学研究会を始めた頃多くのメンバーは30代前半から30代半ば…分子レベルで生命現象を理解し、解析・制御・応用することを目的とした仲間が日本化学会の枠を越え、薬学会や生化学会、高分子学会、分析化学会…他学会でも志を同じとする、同世代で独自の研究を進めようとがんばっている仲間と声を掛け合い集まり始まった(研究会後に温泉を楽しみたい…って、目的もあったのですが(笑))。研究会では、その研究に対する発案・結果・議論・結論・将来展望…いずれに関しても、自分自身の仕事として責任を持って話すことができ、議論できることのみを発表することを基本とし、研究目的、実験結果、結論、発展性、そしてコンセプトに対してさえも、忌憚なく途中質問し、他分野であってもお互いかなりのレベルで研究目的・内容を理解できるまで時間制限なしで議論し合っただけと記憶しています。メンバーも若く、意気盛んで、何かできる、なにか自分たちが遣らなければ…、欧米のトップレベルの研究者にも負けない日本発の新しい分野を切り開いていきたい…研究費獲得や新しいお仲間を作るためではなく、互いに切磋琢磨することにより、純粋に研究レベルの向上を目的に研究会が始まりました。研究会では当初質疑応答時間を含め、一人1時間程度のプログラムでしたが、先にも書きましたが、途中質問有り・時間制限ない約束ですから、質疑応答が盛り上がり一人の講演が2時間以上に及ぶことも稀ではなく、プログラム後半発表予定講演者が次回に…となることも珍しくないほど、議論を重視していたと思います。また10年後に自分はどんな研究を行っているか…など、各人の研究コンセプト・展望・各分野の将来予想を話し合うことにより、生命化学研究の方向性、そして研究会の今後…について、時には酒を酌み交わしながらも熱く語り合っただけと記憶しています。若さ故、深酒&締めラーメンを食べるためにみんなで明け方の街を徘徊したことも今では楽しい記憶です。実際、平日頃から研究内容・動向を知り尽くした研究会メンバーの前で発表する研究会は、他の学会などでの講演に比較して、厳しく、緊張したことを昨日のことのように覚えています。

そして3年間の準備期間を経て、1998年3月幾多の障害を乗り越え杉本先生を会長と仰ぎ、「生命および生体分子の関与する化学」を基礎から応用まで広く研究・展開し、関連学問ならびに利用技術の一層の発展を図ることを目的に日本化学会「生命化学研究会」を立ち上げられました。研究会の特長は 1.平均年齢が若い 2.ヘテロな集団であると杉本先生は指摘され、「脇は甘く、懐の広い」研究会に育てていきたい

と述べられています。

設立以来 10 年を経て、アメリカ・ヨーロッパの大学では、単なる Department of Chemistry が少なくなり、Chemical Biology が主流となり、また Nanotechnology の急速な発展に伴い、Nanobiology/Nanobiotechnology が政府主導で推進されています。またヒトゲノム配列決定計画完了を踏まえ、遺伝子診断・SNIPs 解析の実用化や細胞機能可視化などを目的とした蛍光イメージング、さらには人体レベル・臓器レベルでの正確な定量的診断を目指した Functional MRI やポジロン解析…生命化学を取り巻く環境は大きく変化しています。また、研究会運営委員の多くも年を重ね 40 代半ばに…

先述の研究会を重ねることにより、設立当初「ヘテロな集団」であった生命化学研究会メンバーも、「分子レベルでの話ができる仲間…」をキーワードに、互いの研究内容を理解し、ディスカッションの歯車も合うようになり、互いに居心地良い仲間になりつつあるのではと思います。つまり、いまでも研究分野は大きく異なるものの、大きな目を見た場合、また研究者としての視点からは「ヘテロ」ではなく、良い意味で「ホモ」な集団に進歩できてるのではと考えています。しかし、設置年限を迎え、新しい発展が求められる「生命化学研究会」にとって、この「ホモな集団」(ちょっとヤバイ表現ですよ、これは(笑))は相応しいのでしょうか…。

先日、初代生命化学研究会会長、甲南大学 FIBER 所長(HRC,FIBER に続き、2009 年度には新しい学部 FIRST を開設されます!)杉本直己先生から「これまで基本とし、こだわってきた「分子レベルでの話しができる仲間…」って前提を取っ払い、ブラックボックスでも、現象論としてでもいいから、最先端の興味深く、重要な研究を語れる方にもメンバーに加わっていただいたらどうだろうか…」とのお話を聞いたとき、目から鱗が落ちたような気がしました。現象論として発見された事象を、Chemistry を武器に、分子レベルで理解することこそが、我々が立ち向かうべき新しい目標ではないか…。もちろんテクニカルタームをはじめ、研究概念や思想、時間軸、空間軸とも全く背景の異なる研究者が、同じ土俵で話し合い、理解し合えるまでには多大な努力・時間が必要であることは想像に難くなく、また結果的に分かり合えない可能性も大きいことは十分承知しています。しかし、当初「ヘテロな集団」であった我々がこの 10 年を経て、互い分かり合い「ホモな集団」となるための時間・努力、そして異分野研究者と切磋琢磨することは、非常に有意義で、少なくとも私にとっては非常に刺激的で、研究の方向性を考える上で多大なメリットが有ったと思います。他の研究会メンバーも、同じような思いを頂いておられる方も少なくないのではないかと思います。このような経緯を考えると、杉本先生の仰るように、基礎医学や生理学、発生学など全く他分野・他学会で頑張っている一線の同世代若手研究者(我々もそろそろ若手と呼ぶのが憚れるが…)にも研究会に参加いただき、設立当初と同じ「ヘテロな集団」に立ち戻り、色々な考え方を受け入れる「脇は甘く、懐の広い」知的好奇心旺盛な研究者が集う研究会としての原点から、もう一度始めて見るのも悪くないのではと思います。

もちろん近年求められている、社会への説明責任・産学連携が非常に重要な目標であることは当然で、今後より一層関連企業サイドの研究者の方々にもご参加いただき、基礎研究と実際応用研究の接点を模索することも重要だと思います。ただ、応用サイドの研究に走りすぎ、魂を売ることにならないようにだけは…ですね。基礎と応用、研究の尖鋭化と一般化…いずれも重要で、結局は全てバランスが、大切なんですよ。

そして前回も書かせていただきましたが、今後どんどん知的好奇心と向上心に富んだ若い研究者にも研究会に参加頂き、研究者の年齢的にもヘテロな集団となっていければ有難いと思います。

「生命化学研究会」にとって節目となる 2008 年を目前とし、生命化学研究会を愛するメンバーの一人として、さらなる発展への思いを込め、研究会の「さらなるジャンプを…」

## 関連シンポジウム報告

1<sup>st</sup> Japanese–Swiss Symposium on Chemical Biology (JSCB07)に参加して

東京大学大学院薬学系研究科

浦野 泰照

本年6月24日～26日にかけて、スイス・ローザンヌで、日本・スイス両国の代表的な chemical biology 研究者が一堂に会して、第1回日本–スイスケミカルバイオロジーシンポジウム(JSCB)が開催された。第1回 JSCB は Prof. Kai Johnsson 主催で、レマン湖のほとりに立ち対岸にはフランスアルプスを望むことが出来るという、これ以上ない絶好の location にある EPFL (École Polytechnique Fédérale de Lausanne) で開催された。

会はず、Hôtel Mirabeau での welcome reception からスタートした。日本から参加された先生方は、当日着いた方、前日入りした方、少し余裕を持ってスイスに入国した方などなど、多様な旅程で日本各地から Lausanne に集結されたようで、久々に会うスイスの研究者の方々との再会を祝い、旧交を温めつつ、翌日からのシンポジウムに備えた。翌日の朝、(どのバスが迎えるバスかわからなかったものの)バスで EPFL に向かい、(バスがどこに着いたかわからず少し迷ったものの)シンポジウムの開かれる Génopode ビルに無事たどり着き、三原先生の講演を皮切りにシンポジウムがスタートした。スイス側からは ETH Zürich の Prof. Peter Seeberger、Prof. Donald Hilvert、Univ. Geneva の Prof. Stefan Matile、Univ. Neuchatel の Prof. Tom Wald、EPFL の Prof. Karl Gademann、Univ. Bern の Prof. Jean-Louis Reymond の各先生方が講演された。これだけ多くのスイスの研究者の仕事を一時に聞くチャンスは滅多になく、筆者も一聴衆として、各先生方の研究に対する思い入れ、将来展望などをたっぷりと聞かせていただき、存分に講演を楽しんだ。実は筆者は以前、Johnsson 先生とヨーロッパの chemical biology 研究について色々話す機会があったのだが、そのときの Kai の答えは、スイスとイギリスが最も活発な国であり、特にスイスは世界的な製薬企業が多いことも関係して、大学が高いレベルの chemical biology 研究を先導しているというものであった。実際今回多くのスイスの研究者の講演を聴き、その chemical biology 研究の幅の広さ、質の高さを目の当たりにし、Kai の言葉が正しいことを実感した次第である。講演は EPFL 内のレストランでのランチをはさんで午後も続き、その後夕方からは学生、ポスドク中心のポスターセッションが chemistry building の中で開かれた。ここでもスイスの若手研究者の熱い研究発表を、ビール、野菜をつまみながらじっくりと聞き、質疑応答を通じて彼らの様々な考えを楽しむことができた。

ポスターセッションが終わると、バスで Lausanne の東、Lutry の丘にあるワイナリーでの conference dinner へと向かった。Lutry から Montreux までの Lavaux 地区は、スイスの中でも有数のワイン生産地であり、今回 dinner party が開かれた Domaine du Daley はその中でも最古のワイナリーの1つで、非常においしいワインと料理、またワイナリー内部見学などを夜遅くまで楽しんだ。会が始まった頃はあいにく小雨がぱらつく天気であったため、眼下に広がるレマン湖や対岸のアルプスの山々を見ることは出来なかったが、会が終盤にさしかかった頃、突然沈みかけた夕日が雲間から表れ、Lausanne の町を幻想的に照らす風景を堪能することが出来た。その頃には皆ワインも良い感じで回っており、昭和の希望あふれる青年風の写真など、数々の名(迷)写真もしっかりとデジカメに収められるなど、生命化学研究会の楽しい雰囲気 Lausanne の地でもしっかりと爆発していたことが、とても印象的であった。

最終日の講演は午前中のみであったが、それらはやはりいずれも興味深いものであった。講演終了後、organizerであるProf. Johnssonによってposter award2件の表彰があり、賞品がwinnerに贈られたが、そのときの表彰の言葉がKaiらしいwitに富んだものであった。Kai曰く、“Chemical biology 研究には、multi disciplineの知識、発想の融合が重要である。スイスは昔からmulti disciplinaryな発想が豊かな国であり、それはこのスイス名産の土産物を見れば一目瞭然。なので、第1回のJSCB poster award winnerにはこのSwiss army knifeを贈る。”

Prof. Johnssonの閉会の挨拶のあと、有志で湖畔で昼食を取り、その後ホテルまで戻って解散となった。天気もだいぶ良くなったため、市内の観光や、対岸のEvianまで水を汲みに行くなど、参加者は出発までの半日を思い思いに過ごし、帰国の途についたようである。

一参加者としてまず、今回のすばらしい会のホストを務めていただいたEPFLのKai Johnsson先生に心から感謝したい。おかげで両国のchemical biology研究の学術的な面白さ、質の高さを感じられたことはもちろんのこと、Lausanneのすばらしい研究・生活環境を垣間見ることが出来、非常に有意義、濃密な3日間となった。次回の第2回JSCBは日本で開かれるとのことであるが、今度はスイスの方々がいろいろな意味でenjoyできる会になるように、日本側の研究者として是非また参加できればと思っている。最後に、このような有意義なJSCB2007に参加するチャンスをいただいた、生命化学研究会の各先生方に深く感謝して、私の学会報告を終えたいと思う。





研究紹介

プローブを協調させてシグナルをデザインする

熊本大学大学院自然科学研究科・JST さきがけ

井原 敏博

(toshi@chem.kumamoto-u.ac.jp)



はじめに

核酸、タンパク、多糖等の生体高分子はそれ自身が天然の超分子である。もちろん、多くの場合これらは単独でなく、分子間の協調したはたらきによって高度な仕事を行っている。この精緻な分子システムの一部、すなわち生命の部品に化学的に少しだけ手を加えてやる(コンジュゲーション)と、分子の自在なマニピュレーションが可能となる。コンジュゲート分子間の協同性(アロステリズム)を利用することで結合制御、信号変換、物質変換等の非天然の機能、さらには、分子マシン、制御されたナノ構造体等の多様な分子システムを作り上げることができる<sup>1)</sup>。

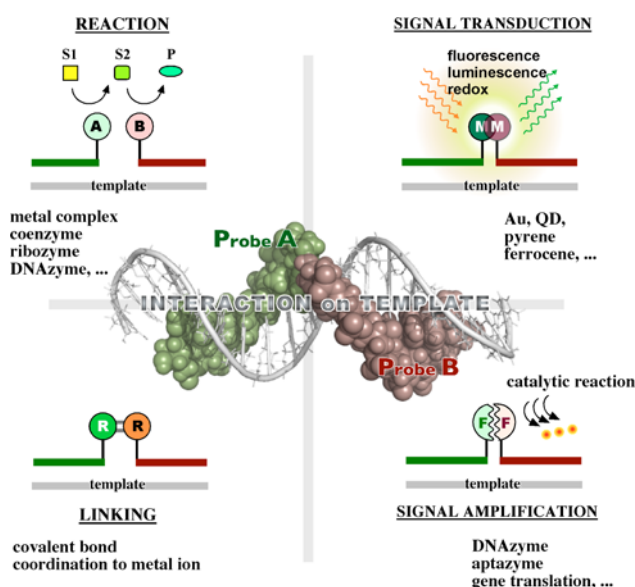


図1 コンジュゲートの協同作業による物質変換、信号変換・増幅

著者は分子間の協同性に焦点を当て、これを積極的に利用した新しい分子プロービング技術の開発を行っている。複数のプローブ(バイオコンジュゲート)が協調してはたらくと単一のプローブでは成し得ない高度で多彩な機能を発揮する。用いるコンジュゲートの分子設計の多様性に加えてそれらの組み合わせの自由度を考えると無限の展開が可能である(図1)。以下、蛍光性ナノスフェアの colocalization(選択的供凝集)を利用した SNP タイピングやイムノアッセイ、金属配位性 DNA コンジュゲートを利用する DNA の協同的蛍光ラベル化、および光化学反応性 DNA コンジュゲートの光化学ライゲーションなど著者らの最近の研究について紹介する。

金属配位性 DNA コンジュゲートを用いる協同的蛍光ラベル化

図2には一連の研究の発端となった、協同性を利用した分子間相互作用の制御の例を示す<sup>2)</sup>。核酸末端に金属配位基を導入したコンジュゲートは適当な金属イオン共存下でのみ金属を挟んだ2量体を形成し、ターゲットである C<sub>2</sub> 対称な結合サイトに協同的に結合した。ここで用いた銅イオンと配位子の安定度定数を考慮すると実験条件下、錯体はほとんど生成しないはずである。ここでは DNA(ターゲット)がテンプレートとなり、2つの配位子を接近させて銅イオンを収容する理想的なマイクロ環境を作ったと考えられる。このことは、用いる金属を発光性のものにするとそのままユニークな DNA プローブとなる。すなわち、テンプレート

があつて初めて錯体を形成するので、ターゲットが存在するときにしか光らない(B/F 分離不要の)均一溶液で使用できるプローブである。錯体化学で蓄積された膨大なデータを利用すると、金属と配位子の適当な組み合わせを種々選択することができる。

ここでは金属イオンとして発光性の希土類金属( $\text{Eu}^{3+}$ と $\text{Tb}^{3+}$ )を用いることにした。希土類金属の発光は寿命が非常に長いので、時間分解測定法を採用することで生体試料中に含まれる夾雑物由来の蛍光のバックグラウンドの影響を最小に抑えることができるために高感度検出が可能になる<sup>3)</sup>。ターゲット上でこれら金属を2つの DNA コンジュゲートで挟むが、片方のコンジュゲート(キャプチャープローブ)末端には、DTPA、EDTA、IDA 等の金属イオンを捕まえるコンプレキサン型の配位子を、もう片方(アンテナプローブ)には Phen、DPPZ、Terpy 等の芳香族性の非常に弱い配位子を導入した。すなわち、全体として、前者が強く金属イオンを捕捉し、ターゲットをテンプレートとして後者の増感剤(アンテナ分子)と隣り合わせに結合したタンデム二本鎖を形成することでターゲットに結合したときのみ希土類金属イオンが発光するというしくみである(図3)。様々な条件下、時間分解測定法により発光特性の検討を行った。その結果、ターゲット中の

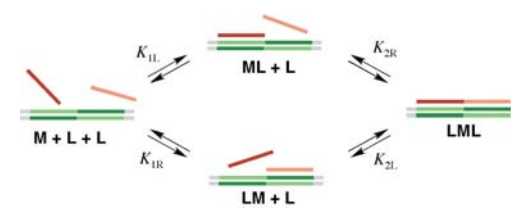
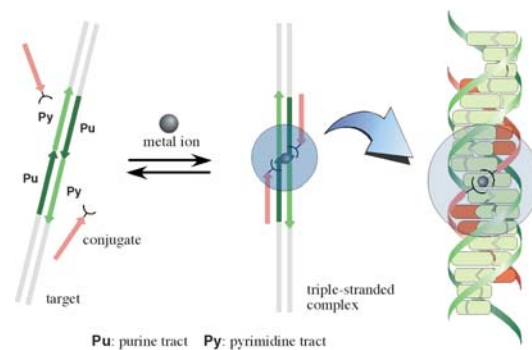


図2 DNAコンジュゲートの隣接するサイトへの協同的結合 銅イオン共存下、一つ目のコンジュゲートは隣接部位への第二のコンジュゲートの結合定数を165倍に増大させた<sup>2)</sup>。

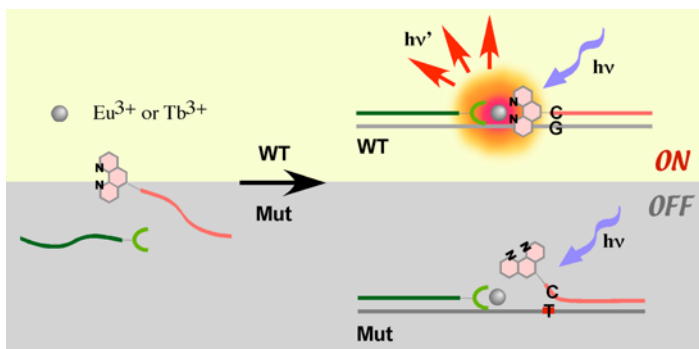
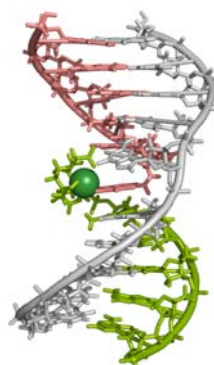


図3 協同的発光の原理 ターゲット上でキャプチャープローブとセンサイザープローブが希土類金属を挟むタンデム二本鎖を形成して発光する。ターゲットに変異があると発光を与える複合体が形成しない<sup>4,6)</sup>。



ミスマッチの有無により発光強度が20倍以上の劇的な変化をすることがわかった<sup>4)</sup>。さらに興味深いことに、本系では遺伝子混合物の同時検出(アレルタイプピン

グ)が可能であることもわかった<sup>5,6)</sup>。野生型と、変異型に相補的な2種のキャプチャープローブを準備して、それぞれ等量の $\text{Tb}^{3+}$ 、 $\text{Eu}^{3+}$ と混合する。これら2種のキャプチャープローブ溶液と共通のアンテナプローブをターゲットと混合して計測した結果、野生型ホモ接合体のサンプルで $\text{Tb}^{3+}$ の緑色、変異型ホモで $\text{Eu}^{3+}$ の赤色、両者の等量混合物、すなわちヘテロ接合体サ

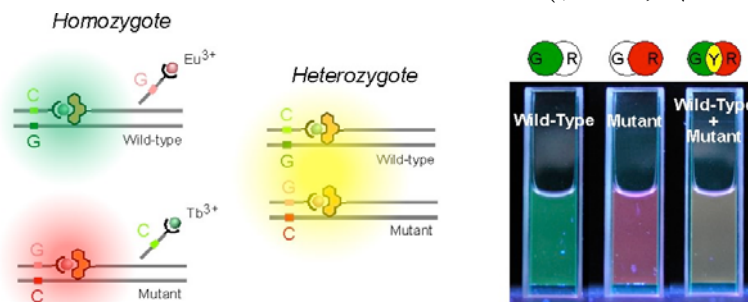


図4 鋳型上での発光性希土類錯体の協同的形成を利用した多色アレル解析 (左図) 検出原理の模式図 バイアレリックなサンプルに対し WT プローブは $\text{Tb}^{3+}$ (緑)で Mut プローブは $\text{Eu}^{3+}$ (赤)でラベル化し、検出実験に供した。(右図) WT/WT、Mut/Mut、WT/Mut サンプルはそれぞれのプローブで特異的にラベル化され、緑、赤、黄で明るく発色した<sup>5,6)</sup>。

ンプルでは黄色の発光色を肉眼で観察することができた(図4)。

### 繰返し配列探索プローブ

遺伝子中には非常に多くの繰返し領域が存在することがわかっており、トリプレットリピート病に代表されるように、その多くは生物学的に重要な意味を持つ。分子間の協同性をより強く意識してプローブを設計すると、このような繰返し配列に選択的に結合する分子をつくることができると考えた。

[Ru(phen)<sub>2</sub>dppz]<sup>2+</sup>錯体は二本鎖特異的にインターカレーションし、発光する“light switch”として良く知られた分子である<sup>7)</sup>。繰返し配列(ヒテロメア、(TTAGGG)<sub>n</sub>)の1ユニットに相補的な DNA 末端にこれを修飾する。このコンジュゲートのひとつがターゲットに結合すると、[Ru(phen)<sub>2</sub>dppz]<sup>2+</sup>錯体部分が二本鎖構造を好むために、隣接するユニットへの第二の結合を誘導するはずである(図5)。

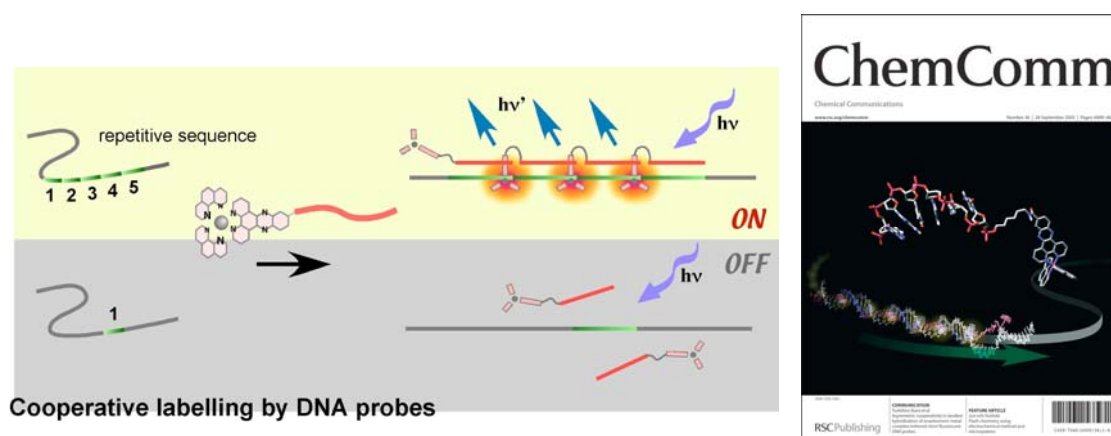


図5 [Ru(phen)<sub>2</sub>dppz]<sup>2+</sup>錯体を修飾した DNA コンジュゲートによる繰返し配列の協同的認識 この金属錯体は二本鎖特異的なインターカレータであるので繰返しユニットに最初のプローブが結合するとそれが隣接するユニットへの第二の結合を誘導する<sup>9)</sup>。

まず、金属錯体部分の光学活性に基づいて、コンジュゲートを $\Lambda$ 、 $\Delta$ 体に分割し、それぞれを種々の条件下、TTAGGG および(TTAGGG)<sub>2</sub>との融解実験を行い、コンジュゲートのハイブリダイゼーションにおける協同性 $\omega$ を算出した<sup>8)</sup>。その結果、 $\Delta$ 体については $\omega = 54$ 、 $\Lambda$ 体は1.6という結果になった。このことは、最初の $\Delta$ 体コンジュゲートがターゲットの繰返しユニットの一つに結合すると、その隣のサイトへの結合を結合定数にして約50倍に促進することを示している<sup>9)</sup>。すなわち、 $\Delta$ コンジュゲートは(TTAGGG)<sub>n</sub>配列を探索し、選択的にそこに結合する性質を持つ。 $\omega$ はコンジュゲート末端部分の塩基配列に依存しており、[Ru(phen)<sub>2</sub>dppz]<sup>2+</sup>錯体の $\Lambda$ 体、 $\Delta$ 体について観測された $\omega$ の非対称性は、それぞれの錯体に関して知られている塩基配列特異性<sup>10)</sup>によって説明することができた。この結果は、強い協同性を示す配位子のロジカルな分子設計の指針となる。

### ナノスフェアの選択的凝集およびバイオアッセイへの応用

金コロイド、半導体微粒子(Q dot)や高分子の超微粒子のバルク材料とは異なる様々な性質が注目されるようになり、そのサイズ(nmから $\mu\text{m}$ )、表面状態など様々に異なるものを調製、または容易に入手できるようになった<sup>1)</sup>。これらの超微粒子表面に核酸や特定のタンパクなどを固定化すると、固有のバイオアフィニティーにより、これら超微粒子の凝集を自在に制御できると考えられる。これをバイオアッセイやユニークなナノ構造体の構築に応用できる可能性がある。中でも有機高分子からなるナノスフェアは1)表面構造(官能基)に多様性があるために表面修飾法を選ばない、2)分散状態ではいわゆる通常の透明な『溶液』状態であり、可視光を散乱しないがある種の刺激により容易に $\mu\text{m}$ サイズの凝集体に成長し、光散乱、顕微鏡観



察など様々な手法でこれをモニターすることができる、などの優れた特長がある。

R (red)、G (green)、B (blue) 3色の異なる蛍光色を有するナノスフェアにそれぞれユニークな塩基配列の DNA を固定化した。これら DNA 固定化ナノスフェアの混合溶液に添加された一本鎖 DNA (ターゲット) は相補的な DNA の固定化されたスフェアのみを選択的に架橋し、対応する色で発色する凝集体を与えた (図6)<sup>11)</sup>。すなわち、WT-DNA は黄色、Mut-DNA はマゼンタで発光する凝集体を形成した。これは、それぞれ R と G、R と B スフェアが選択的に架橋された結果である。もちろん、両 DNA の等量混合サンプルは R、G、B 全てのスフェアを架橋するために白色の発光色をもつ凝集体を与え、本系により溶液中で非常に簡便にアレル解析を行えることがわかった<sup>12)</sup>。またこの系の検出原理には一般性があるので遺伝子に限らず同時多色免疫アッセイに応用することも可能であった<sup>13)</sup>。

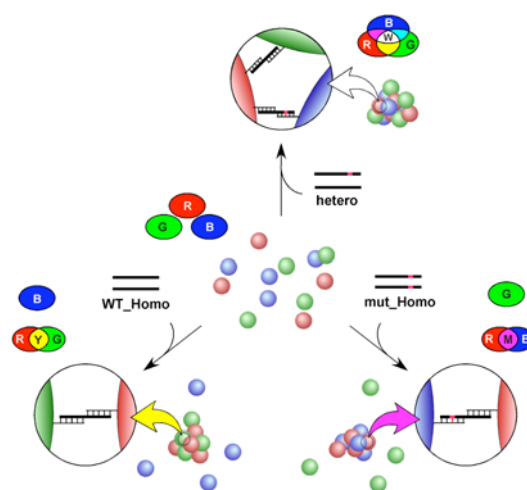


図6 発光性超微粒子の選択的凝集を利用した多色アレル解析の原理 R/G/B、3種の色 of 微粒子にそれぞれユニークな配列の DNA を固定化する。混合分散溶液に添加された DNA の組成、塩基配列に対応して微粒子が選択的に架橋され凝集する<sup>7)</sup>。

### DNA コンジュゲートの光化学ライゲーションおよびそれを利用した遺伝子検出

酵素を使わずに核酸を化学的に連結する化学的ライゲーションには、“酵素反応に適した”化学構造や反応条件という制限がなく、新しい遺伝子操作法、ナノ構造体の構築法等の観点から盛んに研究が行われている。中でも光を駆動力とする光化学ライゲーションは、第三の試薬の添加の必要がないこと、照射光の強度や波長により反応を容易に制御できる点が特長<sup>14)</sup>であるが、研究例はたいへん少ない。

著者らは末端に光反応性基であるアントラセンを導入した DNA コンジュゲートを合成した。それぞれ逆末端にアントラセンを導入した 2 種のコンジュゲートはターゲットに結合した際にその互いのアントラセン部位が対峙 (スタッキング) するように設計してある。複合体形成後、光を照射すると相補的な DNA が加えられたサンプルにおいてのみコンジュゲート同士が連結された二量化生成物が生じた (図7)<sup>15)</sup>。反応は数分で完結し、 $[4\pi-4\pi]$  型の光架橋反応であるので塩基とのクロスカップリングもない。これまでに SNP 解析への適用の可能性を示唆する結果を得ている (図8)。また、アントラセンまわりの部分構造を改良することでライゲーション効率を向上できることもわかってきた。

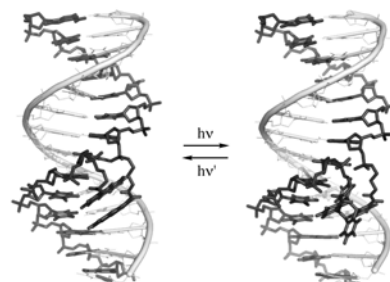


図7 アントラセン-DNA コンジュゲートの光化学ライゲーション 向かい合う2つのアントラセン同士は数分の光照射で  $[4\pi-4\pi]$  反応により二量体を形成する<sup>15)</sup>。

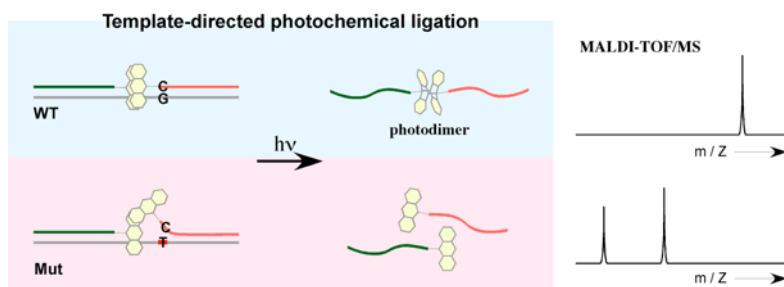


図8 アントラセン-DNA コンジュゲートの光化学ライゲーションを利用する SNP 解析 ターゲット上で理想的なタンデム二本鎖を形成した場合にのみ光照射により両コンジュゲートが共有結合により連結される。生成物は HPLC や質量分析により解析される<sup>15)</sup>。

## おわりに

生体関連分子の誘導体化に関する技術が発達し、最近では、有機化学あるいは遺伝子工学的手法を駆使して特定のターゲットに対する多様なリガンドを作製することが以前より容易になっている。それら分子をターゲットと結合させた後その情報をどうやって取り出すかが工夫のしどころである。本研究では複数の機能性リガンドを協調させることで単独での性能を上回る機能を期待した。核酸やタンパク等の生体高分子間の特異的な認識能はまさに協同性のはたらくナノ環境を設計するのに格好の場またはパーツを与えてくれる。協同性を意識し、これを積極的に利用することで、認識における特異性を向上させたり、信号を多彩に変化させることが可能である。

## 謝辞

熊本大学大学院自然科学研究科 城 昭典 教授、崇城大学工学部 田崎正人 准教授、および 故 近浦 靖 博士、岡田健治 博士、武田由香 君、藤井朋広 君、北村裕介 博士、田中正二郎 君、迎文都子 君、森 靖記 君をはじめとする城研究室の学生の皆さんに感謝します。また、研究助成をいただきました文部科学省、科学技術新興機構、熊本大学 VBL、ユニカ画像科学振興財団、上原記念生命科学財団、内藤記念科学振興財団に対し感謝します。

## 参考論文

1. 例えば、C. M. Niemeyer, C. A. Mirkin, Eds., "Nanobiotechnology, – Concepts, Applications and Perspectives", Wiley-VCH, Weinheim (2004).
2. T. Ihara, Y. Takeda, A. Jyo, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 1772 (2001).
3. I. Hemmiliä, V. Laitala, *J. Fluoresc.*, **15**, 529 (2005).
4. Y. Kitamura, T. Ihara, Y. Tsujimura, M. Tazaki, A. Jyo, *Chem. Lett.*, **34**, 1606 (2005).
5. Y. Kitamura, T. Ihara, Y. Tsujimura, Y. Osawa, M. Tazaki, A. Jyo, *Anal. Biochem.*, **100**, 1744 (2006).
6. Y. Kitamura, T. Ihara, Y. Tsujimura, Y. Osawa, D. Sasahara, M. Yamamoto, K. Okada, M. Tazaki, A. Jyo, submitted.
7. S. Delaney, J. Yoo, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10511 (2004).
8. S. G. Lokhov, A. A. Koshkin, I. V. Kutyavin, M. P. Mityakin, M. A. Podyminogin, A. V. Lebedev, *Russian J. Bioorg. Chem.*, **21**, 169 (1995).
9. Y. Kitamura, T. Ihara, K. Okada, Y. Tsujimura, Y. Shirasaka, M. Tazaki, A. Jyo, *Chem. Commun.*, 4523 (2005).
10. C. M. Dupureur, J. K. Barton, *Inorg. Chem.*, **36**, 33 (1997).
11. T. Ihara, Y. Chikaura, S. Tanaka, A. Jyo, *Chem. Commun.*, 2152 (2002).
12. T. Ihara, S. Tanaka, Y. Chikaura, *Nucleic Acids Res.*, **32**, e105 (2004).
13. T. Ihara, Y. Mori, T. Imamura, M. Mukae, S. Tanaka, A. Jyo, *Anal. Chim. Acta*, **578**, 11 (2006).
14. S. Ogasawara, K. Fujimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 4512 (2006).
15. T. Ihara, T. Fujii, M. Mukae, Y. Kitamura, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 8880 (2004).



研究紹介

天然物類似低分子ライブラリー構築の新戦略：  
三次元構造多様性を如何にして創出するか？

北海道大学 創成科学共同研究機構 流動部門未踏系  
大学院理学研究科 化学部門（兼任）

大栗博毅

(oguri@sci.hokudai.ac.jp)



1. はじめに

天然由来の有機低分子(天然物)は、医薬品開発のみならず、周辺基礎科学の発展に大きく貢献している。生体高分子と相互作用し、多彩な生理活性を発現する天然物の構造特性として、(1)リジットで複雑なトポロジーの分子骨格を持つこと、また同時に、(2)生体高分子表面と効果的に相互作用する複数の置換基(多様な立体化学を持つ)や官能基を有すること、が挙げられる。そこで、これら天然物の構造と機能の知見を踏まえて、有望な天然物類似低分子群を設計、系統的に合成し、目的の機能を持つ低分子を選別できないか？本稿では、多様性指向型合成 (Diversity-Oriented Synthesis) [1-5] を活用するアプローチに的を絞って、最近の展開を紹介したい。

2. 多様性指向型合成を活用した有用分子の探索

多様性指向型合成を利用した生理活性低分子探索のアプローチを図1で模式的に示した[2, 3]。まず、骨格と立体化学の多様性に富んだ低分子群を迅速に(3-5工程)構築する(多様性指向型合成)。次に、有望な構造特性を持つ低分子を選別し、続いて、多様性指向型合成の過程で骨格に組み込まれた官能基を足掛かりに、選別したリード化合物にビルディングブロック(BB)を連結する(メディシナルおよびコンビナトリアル合成)。そして、得られた低分子群から、機能発現に最適のものを選択する手順となる。このように多様性指向型合成では、ビルディングブロック連結に重点を置かず、後に修飾可能な官能基を骨格に組み込みつつ、複雑で多様性に富んだ構造の低分子群を如何に立体選択的かつ短工程で構築するかに主眼を置く。そのため、本アプローチでは、多様性指向型合成とコンビナトリアル合成の長所を協同的に活用できる。

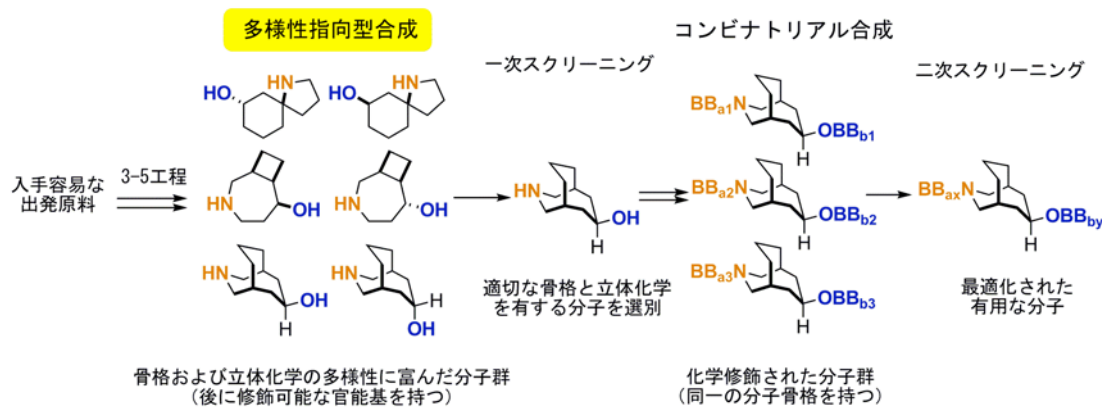


図1 多様性指向型合成による生理活性分子探索の模式図

3. 多様性指向型合成の立案

天然物の全合成研究に代表される標的指向型合成と多様性指向型合成の両者において、構築困難な

低分子の効率的合成という共通の要請がある。ここで前者では、複雑な標的分子をより単純な前駆体へ変換していく(複雑→単純)逆合成解析(Retrosynthetic Analysis)により合成計画を立案する。一方、後者では、単純で似かよった特性の分子群を複雑で多様な分子群へ変換するプロセス(単純かつ均質→複雑かつ多様)の考察が重要となる。すなわち、(1)複雑な骨格に多様な立体化学や官能基を組み込んだ低分子群を一挙に構築可能で、かつ(2)初めの工程の生成物群は、次の工程の基質群となりうる化学反応性を受け渡すことも可能、という要件を満たした短工程プロセスの実現が鍵である。図2に挙げた例では、Ugi—Diels-Alder のタンデム型反応と、開環—閉環連続オレフィンメタセシス反応を組み合わせたプロセスにより、縮環した4環性骨格の効率的構築に成功している[6]。

最近、Schreiber らは、多様性指向型合成のプロセスを立案する指針として、Forward-Synthetic Analysis を提唱した[2]。以下では、分子骨格の多様性獲得を目的とした2つの基本戦略(図3)について、それぞれ解説したい。

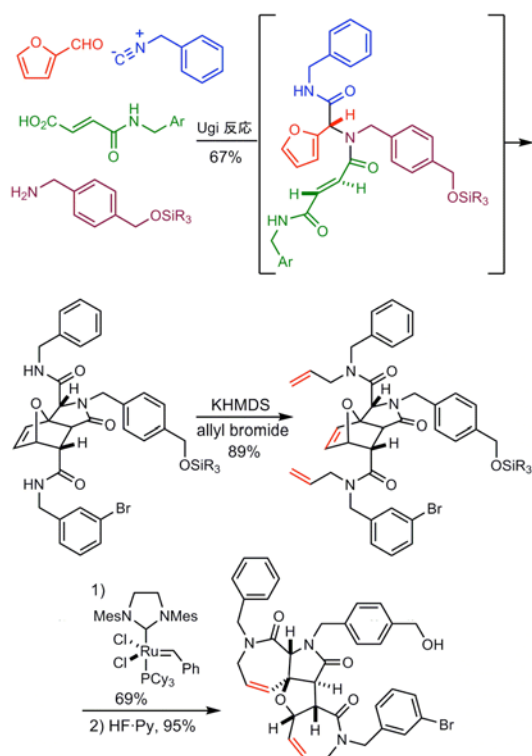


図2 四環性骨格の短段階合成

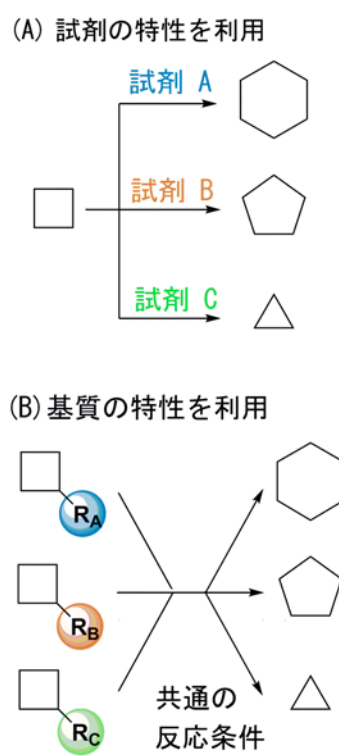


図3 骨格の多様性に富んだ分子群構築の戦略

### (A) 試剤の特性を利用するプロセス

図4のように、トリエン **1** に対し反応性の高いジェノフィル **2, 3** を作用させると、二連続の環状付加反応が進行し、4環性の **4, 5** がそれぞれ生成する[7]。ここでは試剤 **2, 3** の構造特性(オレフィ

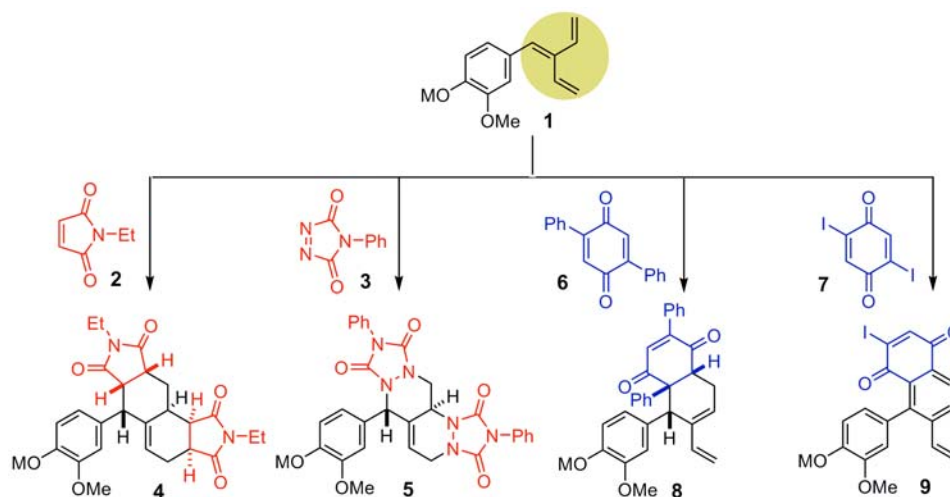


図4 ジェノフィルの反応特性を利用した分子間反応によるプロセス



ン、ジアブ)が反映され、生成物 **4, 5** の骨格は異なるトポロジーとなる。また、ジエノフィル **6, 7** との反応では、シクロヘキセン環やベンゼン環を形成した2環性の **8, 9** が生成する。この方法論を展開して、実際に、29,400 個の多環性低分子群(骨格10種)が合成された。このように試剤の化学反応性や構造特性を巧みに利用して、多様な分子骨格を持つ低分子群の効率的構築が可能となってきた。

### (B) 基質の特性を利用するプロセス

もう一つは、基質個々の構造および反応特性の違いを利用し、均質な基質群を共通条件下の分子内反応で、異なる骨格の低分子群へ変換するプロセスである[8]。図5の例では、フラン環の近傍に2, 1, 0 個の水酸基を導入した基質 **10-12** を同一の酸化条件で処理して、求電子反応性の高いエンジオン中間体を經由した分子内反応を進行させ、異なる骨格の生成物群 **13-15** を合成している。更に、より多彩な構造および反応特性を付与した基質群を用いると、1,000 個以上の低分子群(骨格6種)を系統的に構築できる。

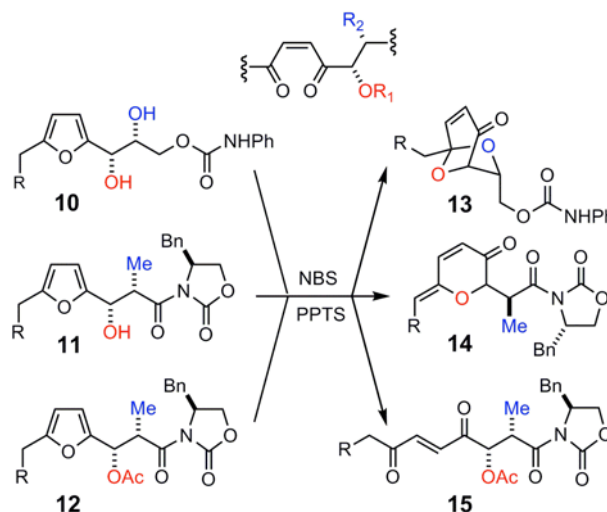


図5 分子内反応によるプロセス

### 4. 多環性インドールアルカロイドの多様性指向型合成[9]

種々の生体高分子と効果的に相互作用する低分子ライブラリーの構築を目指して、インドールアルカロイド天然物群に着眼した。ビンカアルカロイドやストリキニーネに代表される生理活性アルカロイドの構造特性として、インドール環とピペリジン環が連結した多環性縮環分子骨格を有することが挙げられる (図6a)。本研究では、インドールアルカロイド群の分子骨格を構造モチーフとした多様性指向型合成を創始すべく、新しい合成戦略を案出した。すなわち、(1)ロジウム触媒によりジアゾエステルからカルボニルイリドを生成させ[10]、これをインドール環の2重結合と分子内で環状付加させる**タンデム型反応で四級炭素を含む多環性分子骨格を一挙に構築**する(図6b)、(2)分子内にジアゾエステル、およびインドール環を簡便に導入可能な部位を3箇所 (**A-C**) 有するピペリジン様 Scaffold **16** を設計し(図6c)、ジアゾエステルとインドールの導入部位の組合せ(理論上6通り可能)を利用して、**分子内環化反応モードをプログラムできる多様性指向型合成戦略**を立案した。

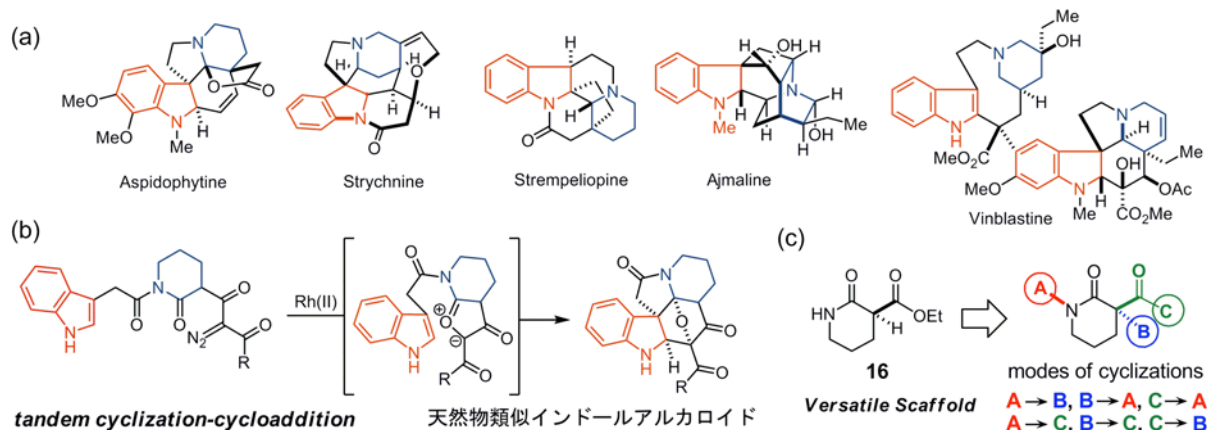


図6 インドールアルカロイドの構造と天然物類似低分子ライブラリーの合成戦略



まず、**16** のアルキル化で部位 **B** に末端シリルエーテルを有するリンカーを連結した(図7)。次に、エステルを利用してβ-ケトエステルを部位 **C** に導入後、ラクタムを足掛かりにインドール環を部位 **A** に連結した環化前駆体 **22** を合成した。これをロジウム触媒で連続環化させ[11]、6環性の **24** を単一の生成物として得ることに成功した。

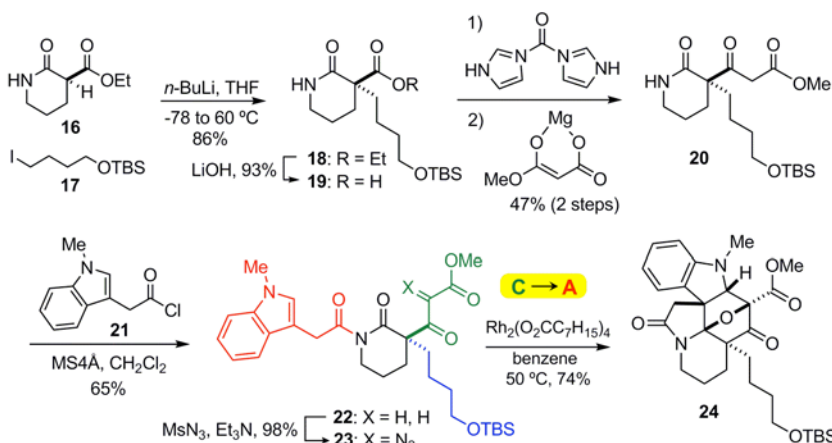


図7 環化モード(C→A)によるインドールアルカロイド類似6環性骨格の構築

尚、部位 **B** に導入済みの水酸基を利用すれば、**24** の分子骨格と種々のタンパク質との相互作用を低分子マイクロアレイで解析可能である。

次に、部位 **A** にジアゾエステルを導入、部位 **B** にインドール環を連結した環化前駆体 **29** を合成した(図8)。この基質でも

連続環化が高立体選択的に進行し、**30** を収率よく(73%)得ることができた。環化体 **30** の立体化学をビフェニルベンゾエート **31** へ変換後、X線結晶構造解析で確認した。

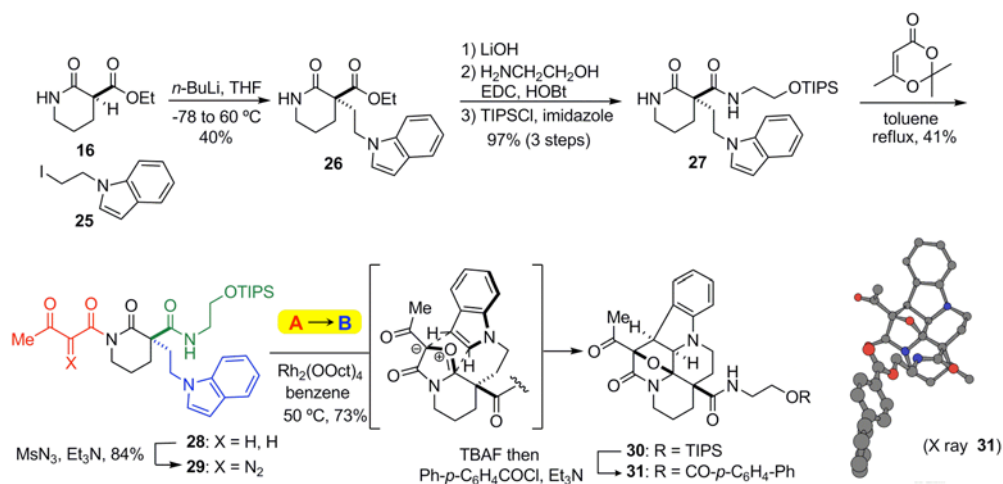


図8 環化モード(A→B)によるインドールアルカロイド類似6環性骨格の構築

更に、部位 **A** と **C** にジアゾエステルおよびインドール環をそれぞれ導入した前駆体 **37** の合成を検討した(図9)。ここではUgi反応[12]を活用し、4成分を一挙に連結して **35** を合成した。β-ジケトン部を導入後、ジアステレオマーを分離し、ジアゾエステル

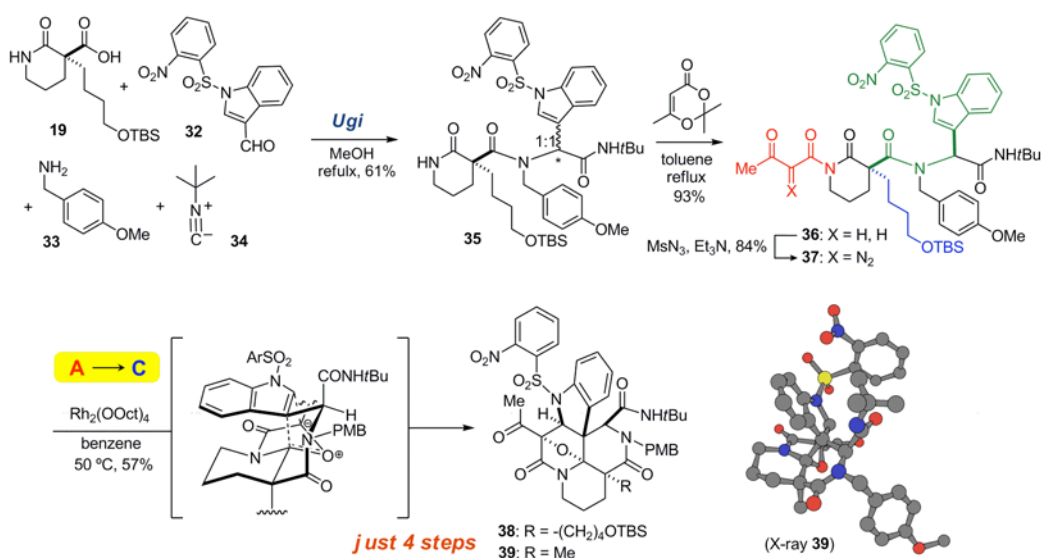


図9 環化モード(A→C)によるインドールアルカロイド類似6環性骨格の構築

**37** を得た。高度に官能化された **37** においてもロジウム触媒による連続環化は高立体選択的に進行し、

目的の6環性環化体 **38** を得ることに成功した。環化体 **38-39** の立体化学も X 線結晶構造解析で決定することができた。本経路 **A** → **C** では、僅か4工程でアミノアセチル構造を含み四級炭素が近接した複雑な6環性骨格を迅速に構築可能であり、かつ、任意の基質(カルボン酸、アルデヒド、アミン、イソシアニド)を利用することで、種々の側鎖を持つ低分子ライブラリーを簡便に作製できる点は特筆に値する。

## 5. まとめ

鎖状前駆体の分子内反応を自在に制御して、構造多様性に富んだ環状分子骨格群を構築する本プロセスは、天然物生合成(テルペノイド、ポリケチド等)の基本戦略と類似している(図10)。

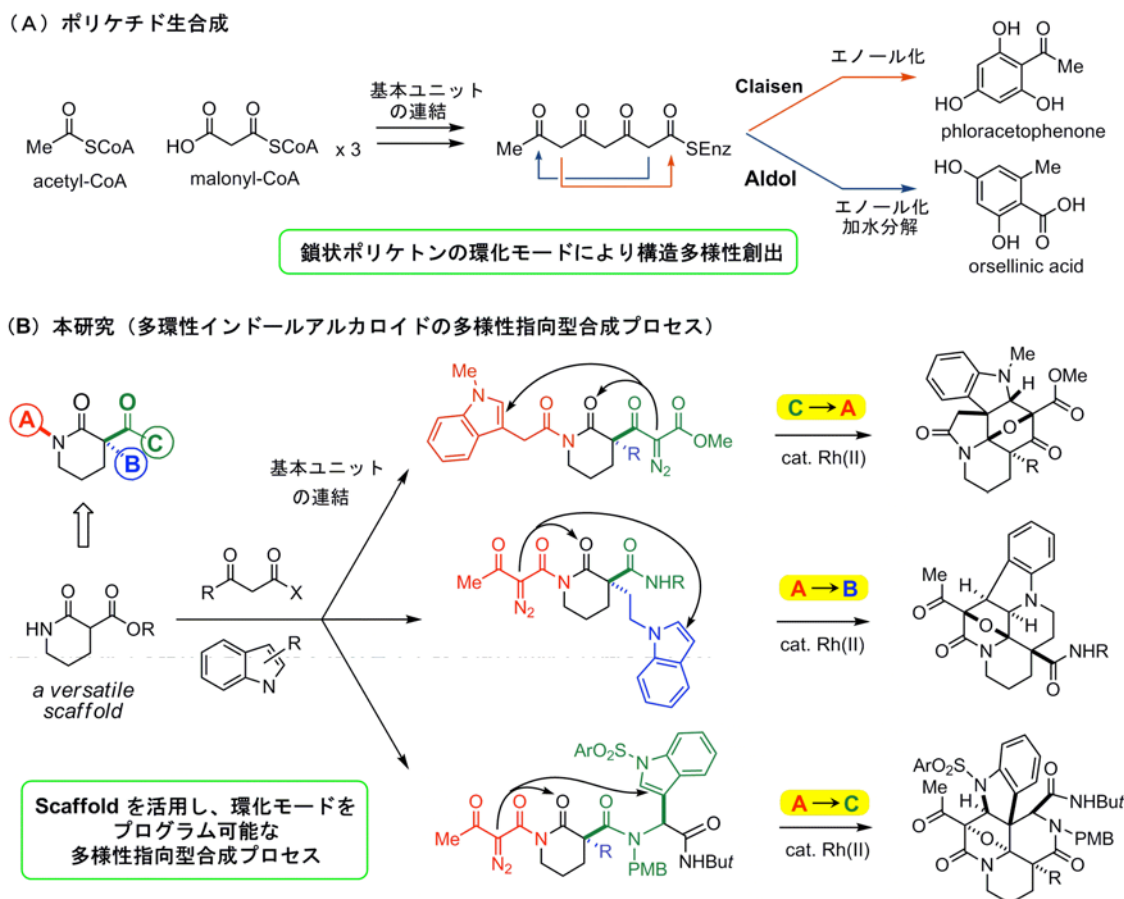


図10 ポリケチド生合成と本多様性指向型合成プロセスで採用した基本戦略の比較

ポリケチド天然物の生合成において、アセチル CoA (開始単位) にマロニル CoA (伸長単位) が脱炭酸を伴いながら縮合し、ポリケチド鎖が合成される。このテトラケチドが分子左端から右端へ Claisen 縮合するとフロロアセトフェノンが生合成される。一方、同一のテトラケチド中間体の分子右端から左端へ Aldol 縮合するとオルセリン酸が生成する。すなわち、活性メチレンとカルボニル基との分子内環化モードの違いにより、同一の鎖状前駆体から構造の異なる環状分子が合成されている。この天然物生合成の基本戦略を踏まえて、本研究では、ピペリジンを母骨格とした Scaffold **16** にインドール環やポリケチン等の基本ユニットを迅速に連結して、テトラケチドに類似した鎖状前駆体中間体を合成している。また、ジアゾ化-ロジウム触媒によるカルベノイド形成により、ポリケチン型鎖状前駆体の特定のメチレン炭素を選択的に活性化できるように設計した。さらに、インドールとジアザカルボニル基を連結可能な3つの部位を有する Scaffold を活用することで、分子内環化反応のモードをプログラム可能なプロセスを実現した。これらのインドール

アルカロイド類似低分子群は、迅速 (< 4 – 7 工程) に合成可能で、サンプル量(> 100 mg)の確保も容易である。

以上のように、生理活性天然物の構造特性と生合成戦略を模倣しつつ、骨格の多様性に富んだ天然物類似低分子ライブラリーを合理的かつ系統的に構築する新戦略を提供することができた。高度に官能化され、三次元構造多様性に富む天然物類似低分子群を活用する本アプローチでは、天然物やその部分構造を利用した従来の構造活性相関研究よりも、生体高分子の機能を変調する低分子が獲得すべき三次元構造要素をより高い精度で把握できるはずである。近い将来、有機合成化学を駆使してユニークな表現型を誘導する分子プローブを創製し、意外な新発見に遭遇したいところである。

## 6. 文献

- [1] S. L. Schreiber, *Science*, **287**, 1964-1969 (2000).
- [2] M. D. Burke and S. L. Schreiber, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 46-58 (2004).
- [3] 大栗博毅、化学と工業 **2004**, 57(10) 1054-1057.
- [4] P. Arya, R. Joseph, Z. Gan, and B. Rakic, *Chem. Biol.*, **12**, 163-180 (2005).
- [5] D. S. Tan, *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 74-84 (2005).
- [6] D. Lee, J. K. Sello, and S. L. Schreiber, *Org. Lett.*, **2**, 709-712 (2000).
- [7] O. Kwon, S. B. Park, and S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 13402-13404 (2002).
- [8] M. D. Burke, E. M. Berger, and S. L. Schreiber, *Science*, **302**, 613-618 (2003).
- [9] H. Oguri, and S. L. Schreiber, *Org. Lett.*, **7**, 47-50 (2005).
- [10] A. Padwa, and M. D. Weingarten, *Chem. Rev.*, **96**, 223-269 (1996).
- [11] A. Padwa, and A. T. Price, *J. Org. Chem.*, **63**, 556-565 (1998).
- [12] A. Döming, and I. Ugi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 3168-3210 (2000).



研究紹介

無細胞蛋白質合成系を用いた分子、  
システムの最適化を目指して

大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻

松浦友亮

(matsuura\_tomoaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp)



<はじめに>

無細胞翻訳系とは、菌体抽出液から調製される蛋白質合成に必要な成分を全て含んだ溶液を用いて、試験管内で蛋白質合成反応が行えるものである。生細胞を用いないため多種多様な蛋白質を合成できる、蛋白質修飾が容易であるなどの利点から、無細胞翻訳系は蛋白質生産に広く用いられている。現在では、大腸菌由来、小麦胚芽由来、ウサギ由来のものなどが市販されている。今回は、無細胞翻訳系を用いて行ってきた研究について紹介する。

<進化分子工学的手法への利用:蛋白質の機能最適化を目指して>

進化分子工学的手法とは、変異と選択のプロセスを繰り返すことにより生体分子の性質を改変する手法を言う[1]。例えば、天然酵素の配列にランダムに突然変異を導入することで変異型蛋白質ライブラリーを作成し、それぞれの物性を調べることで酵素活性や熱安定性が高い変異型酵素を取得することが可能である[2]。進化分子工学的手法により優れた蛋白質を創出するためには、膨大な数の変異型遺伝子の中から数少ない高機能蛋白質をコードする遺伝子を選択してくることが重要である。そのためには、それぞれの遺伝子から作られた蛋白質の機能をハイスループットに解析できる系を構築する必要がある。無細胞翻訳系を用いることで非常に多くの変異体を一度にスクリーニングすることが可能となる。ここでは、人工脂質二重膜であるリポソームを用いた *in vitro* compartmentalization [3]、リポソームディスプレイ法[4]の2つの進化分子工学的手法について紹介する。

我々は、生物膜を模した反応場を与えることができる細胞サイズのリポソームを遺伝子封入並びに蛋白質発現の器として用いることにした[5,6]。具体的には、図1のように個々のリポソームに無細胞翻訳系と共に約1分子の DNA(この場合、GFP遺伝子)を封入し、その後に蛋白質翻訳反応を行う。これを蛍光セルソーター (FACS) を用いて、分析した結果を図1右は示している。

余談になるが、このように脂質に囲まれた反応場での蛋白質合成反応を kinetic に解析することも可能である。ここで、蛍光をほとんど示さないリポソームがたくさん観測される(図1のプロットの左側に、多くのリポソームが存在していることを示す)ことが1分子の DNA から反応が進行していることの証拠の一つである。合成された蛋白質がそれ自体蛍光を有する(e.g. GFP or RFP)、もしくは酵素でありかつ蛍光基質を同時に封入すると、各リポソームが発する蛍光強度は内部で合成された蛋白質の機能を反映したものとなる(図1)。そこで、FACS を用い

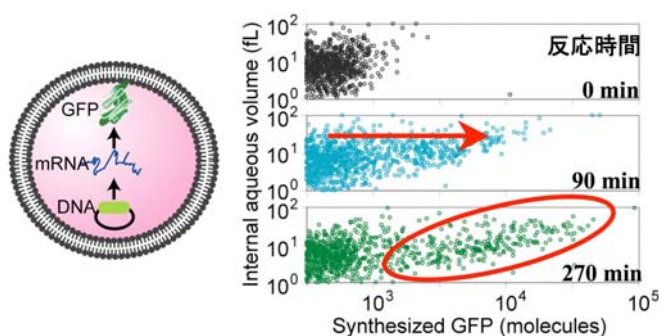


図1: リポソーム内 GFP 合成反応の FACS 解析

一つの点が一つのリポソームのデータを示す。



て、蛍光強度の強いリポソームを分取することで、高い機能を有する蛋白質をコードした遺伝子を取得できる。

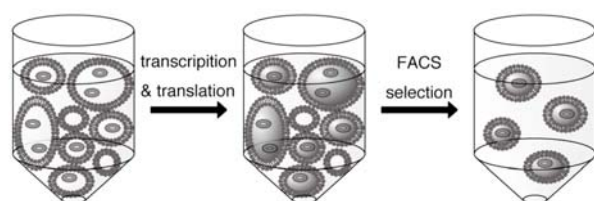


図2：リポソーム内遺伝子進化実験のスキーム

模倣した環境下で選択が行える点から、膜蛋白質の進化など、これまで進化分子工学的手法のターゲットとなりにくかった蛋白質への適用が期待される。さらに、ここで紹介したリポソーム内での生化学反応をトレースできる実験系は、細胞のような微小空間内での反応に対する膜分子の影響を調べられるという点からも有用である。

また、FACSは1秒間に20000個のリポソームを分析できるため、かなりの数の変異型遺伝子がコードする蛋白質の性質を調べることが可能となる。我々は上記の方法を用いて、高機能蛋白質をコードする遺伝子を選択することが可能であることを示した(図2) [3]。本実験系はリポソームという生細胞を模倣した環境下で選択が行える点から、膜蛋白質の進化など、これまで進化分子工学的手法のターゲットとなりにくかった蛋白質への適用が期待される。さらに、ここで紹介したリポソーム内での生化学反応をトレースできる実験系は、細胞のような微小空間内での反応に対する膜分子の影響を調べられるという点からも有用である。

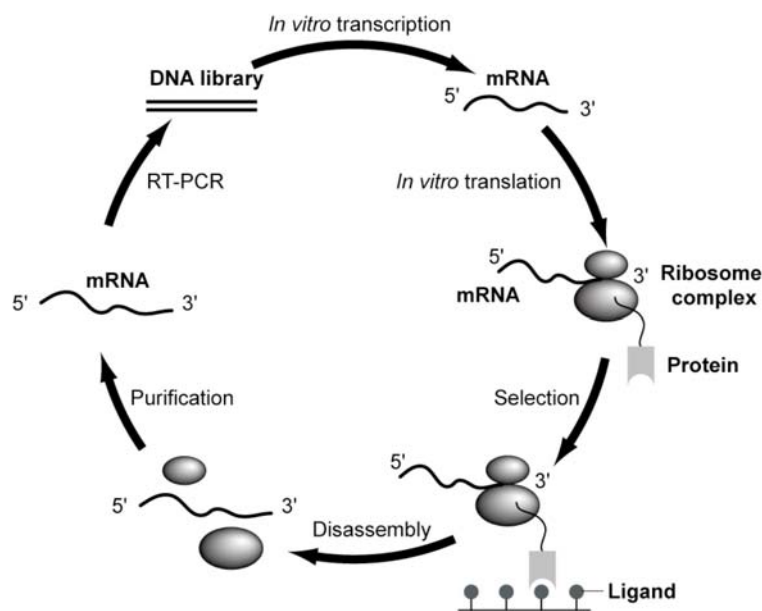


図3：リボソームディスプレイ法

的かつ非常に高い親和性で結合する抗体分子などが得られている。また、抗体以外への適用も可能である。リボソームディスプレイ法は、その他の進化分子工学的手法と比べても、かなり膨大な数の変異型遺伝子(〜10<sup>12</sup>)の中から数少ない高機能蛋白質をコードする遺伝子を選択してることが可能である[4,8]。

我々は最近、リボソームディスプレイ法を用いて WW domain の変異体の一つである W17F 変異体(17番目の Trp が Phe に置換されたもの)の機能進化に成功した。WW domain family は30-40残基からなる小さい蛋白質であり、数多くの蛋白質に存在し、プロリンリッチなペプチド配列(PY ligand)に結合する機能を有する(図4A)。ファミリー内で厳格に保存されている残基に導入された変異、W17F は WW domain の機能を低下させ、WW domain が有する three-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet 構造を破壊する(いわゆる natively unstructured protein になる)[9]。このような W17F 変異体を出発配列として、リボソームディスプレイ法を用いることで、厳格に保存された残基の置換により3次構造を失った蛋白質が機能進化できるのかを実験的に検証した。つまり、進化能を有するかを検証した。その結果、4-5アミノ酸置換により、W17F 変異体の低下した機能は野生型以上に回復させることができた(図4B)。また、機能復帰にとまなう、基質特異

リボソームディスプレイ法は図3のようにステップ1-3を繰り返すことにより、特定のリガンドに結合する蛋白質分子を取得する手法である[7]。1:ライブラリーをコードする mRNA から、無細胞翻訳系により、リボソーム、mRNA、翻訳された蛋白質の三者複合体(以後、リボソーム複合体と呼ぶ)を作り出す。2;提示された蛋白質のうちリガンドに対する親和性があるものは結合する。結合しないものを取り除く。3;結合した蛋白質をコードする mRNA を抽出し、RT-PCRにより増幅する。4;最初のステップに戻り1-3を繰り返す。リボソームディスプレイ法は抗体ライブラリーを用いた場合には、大きな成功を収めており、特異



性や構造特性の向上が同時に見られた。

今回我々が用いた W17F 変異体は、保存残基を置換した結果、立体構造が壊れ機能が低下している一方で、基質特異性が緩やかになっていることを観測した。このような構造可塑性をもつタンパク質が functional promiscuity を示す例として、これまで構造多様性をもつ抗体が multi-specificity を示すこと、また最近多く見つかっている Natively Unfolded タンパク質が多機能性を生み出していることが知られている [10,11]。このような構造可塑性が生み出す functional promiscuity は、新規機能を有するタンパク質を生み出す進化のソースとして、蛋白質の重要な性質であることが議論されている [12]。以上のことから、我々は W17F から新たな基質特異性をもった機能タンパク質を生み出すことができると考え、実験を進めているところである。

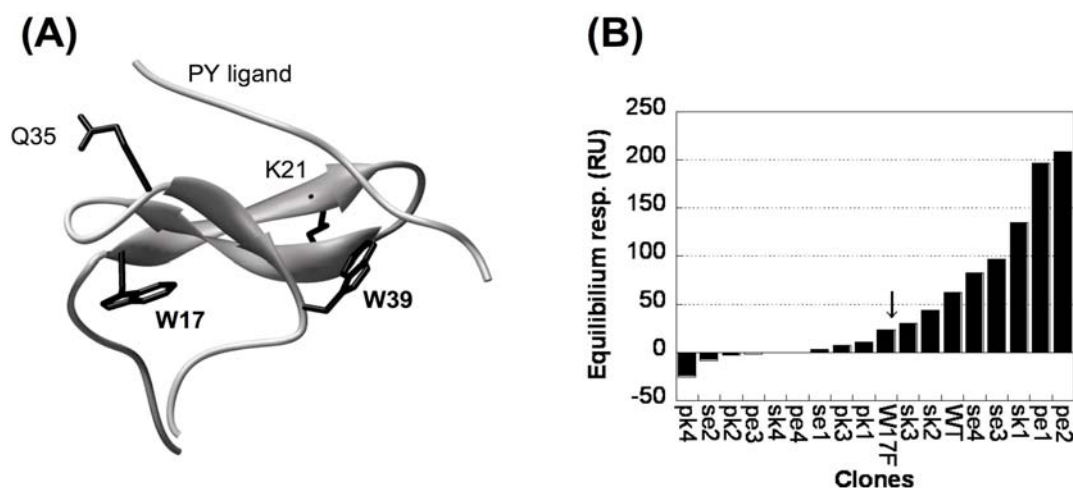


図4：リボソームディスプレイ法を用いた蛋白質機能進化

(A) ww domain の立体構造、(B) 進化実験により取得された変異体のリガンド結合能

### < 蛋白質合成システムの最適化 >

蛋白質合成システムは細胞にとって非常に重要な反応である。最近の研究から、翻訳反応を行うのに最低限必要な蛋白質因子は36種類の蛋白質とリボソームだけであることが実験的に示されている[13]。具体的には、Initiation, elongation, termination factors、さらには ARS、エネルギー再生に関わる蛋白質、並びに ribosomal proteins などである。これら基本因子は大腸菌では全遺伝子 4300 種類[14]のうちわずか 2.5% だけである。一方で、大腸菌ゲノムにコードされている要素は互いに相互作用して、大きなネットワークを構成している[15]。では、2.5%の基本因子で稼働する反応ネットワーク(蛋白質合成反応システム)とは、どれだけの蛋白質因子が相互作用するのであろうか？これらの疑問に答えることで、蛋白質合成システムの全容を明らかに出来るだけでなく、蛋白質合成システムの工学的最適化に関する知見を得ることができると考えられる。

先の基本因子のみから構成される無細胞翻訳系、PURE system は大腸菌由来の翻訳反応に関与する蛋白質分子を全て精製しこれを再構成することにより、試験管内で蛋白質合成反応が行えるものである [13]。我々は、大腸菌由来の ORF 蛋白質 4194 種類を無細胞翻訳系により合成し、それぞれが PURE system を用いた green fluorescent protein (GFP) 合成反応に与える影響を調べた(図5)。その結果、4194 種類のうち 8.2% が GFP 合成反応を促進し、3.8% が阻害させる効果があることを明らかにした。よって、あわせて少なくとも 12% の ORF が基本因子から構成される蛋白質合成システムと相互作用することが明らかになった。大腸菌ゲノム上にコードされている ORF のうち、約半数が(実験的に)機能未知である[14]。よって、上記のデータは、多数の機能未知蛋白質の機能を推定する上でも非常に有用である。

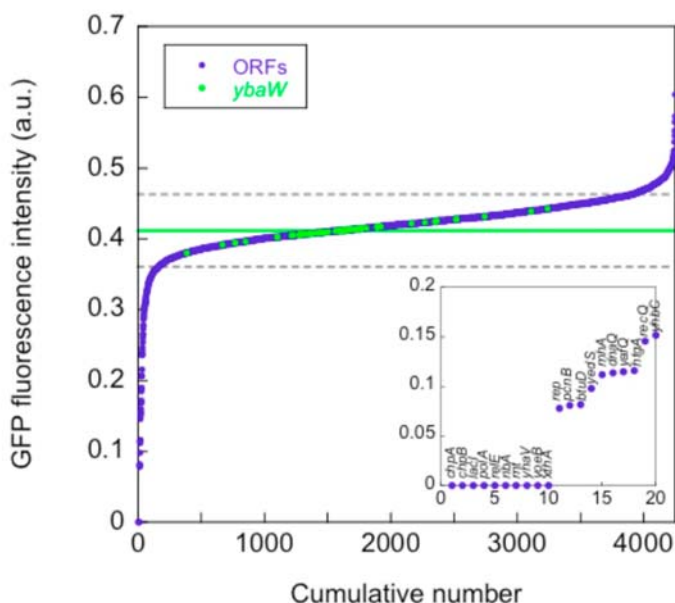


図5：大腸菌蛋白質が GFP 合成反応に与える影響

縦軸はそれぞれの蛋白質を加え合成反応を行ったときの3時間後の GFP 蛍光値、横軸は4194測定値の低いものから順に左から並んでいる。

は、図3の網羅解析の信憑性を示すものである。これら6つの蛋白質の効果は加法的であった。つまり、6つの蛋白質は GFP 合成反応に独立に作用していた。このことは、さらなる蛋白質合成システムの最適化には重要であり、より多種の因子の添加により、さらなる合成量の増加が期待されることを意味している。これらの結果については特許出願が終わり、現在論文投稿中である。

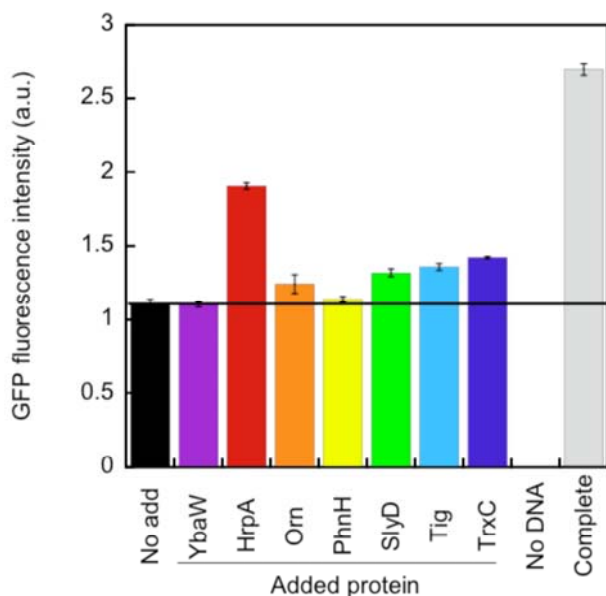


図6：GFP 合成反応

縦軸はそれぞれの蛋白質を加え合成反応を行ったときの3時間後の GFP 蛍光値。

<最後に>

以上述べたように、無細胞翻訳系を用いて、蛋白質の機能改変や蛋白質合成システムの理解を進めてきた。これらの研究で、共通していることは、より良いものを作り上げたいというビジョンである。作ることを通

翻訳反応に影響を与えた個々の蛋白質について調べた。図5で反応を阻害すると特定された蛋白質には、toxin として報告されている分子(ChpA, ChpB, RelE, YoeB, YafQ)が全て含まれていた。一方で、どのような機構で蛋白質合成反応を阻害しているのか見当がつかない分子も多数同定された(YhaV, PolA, RibA)。また、これらが蛋白質合成を阻害していることは SDS-PAGE により確認した。翻訳反応を促進すると特定された蛋白質は、それぞれを精製しその効果を調べた(図6)。その結果、調べた6つの蛋白質のいずれも、PURE system を用いたGFP合成反応を促進させる効果が確認できた。また、6つの精製蛋白質を同時に加えることでGFP蛍光値が2.44倍上昇した(complete)。これらの結果

我々は作用因子が大腸菌遺伝子の少なくとも12%であると結論づけた。ただし、12%は underestimate されており、それ以上に影響を与える因子が存在することが予想される。なぜならば、加えた大腸菌蛋白質が機能を発現しうる状態で加えられているとは限らないからである。例として、多数存在するヘテロオリゴマーとして機能する蛋白質や膜蛋白質の存在を考えれば容易に想像できる。こうした理由から12%は最小値であって、それ以上の作用因子が存在すると考えるのが適当である。このことは、生物の特性の多くが蛋白質によりコントロールされている事実から考えると、この結果は非常に妥当なものである。

して生物に学ぶという姿勢で今後も研究を進めてゆきたいと考えている。

<謝辞>

図の作成に関して、角南武志、柳田勇人、数田恭章氏にご協力頂きました。本研究の一部は、文部科学省科学技術振興調整費「先端融合領域イノベーション創出拠点の形成:ゆらぎプロジェクト」の研究助成によるものであり、ここに記して謝意を表します。

<参考文献>

1. Matsuura T, Yomo T (2006) In vitro evolution of proteins. *J Biosci Bioeng* **101**: 449-456.
2. Matsuura T, Miyai K, Trakulnaleamsai S, Yomo T, Shima Y, et al. (1999) Evolutionary molecular engineering by random elongation mutagenesis. *Nat Biotechnol* **17**: 58-61.
3. Sunami T, Sato K, Matsuura T, Tsukada K, Urabe I, et al. (2006) Femtoliter compartment in liposomes for in vitro selection of proteins. *Anal Biochem* **357**: 128-136.
4. Matsuura T, Yanagida H, Ushioda J, Urabe I, Yomo T (2007) Nascent chain, mRNA, and ribosome complexes generated by a pure translation system. *Biochem Biophys Res Commun* **352**: 372-377.
5. Yu W, Sato K, Wakabayashi M, Nakaishi T, Ko-Mitamura EP, et al. (2001) Synthesis of functional protein in liposome. *J Biosci Bioeng* **92**: 590-593.
6. Ishikawa K, Sato K, Shima Y, Urabe I, Yomo T (2004) Expression of a cascading genetic network within liposomes. *FEBS Lett* **576**: 387-390.
7. Hanes J, Plückthun A (1997) In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4937-4942.
8. Matsuura T, Plückthun A (2003) Selection based on the folding properties of proteins with ribosome display. *FEBS Lett* **539**: 24-28.
9. Koepf EK, Petrassi HM, Ratnaswamy G, Huff ME, Sudol M, et al. (1999) Characterization of the structure and function of W --> F WW domain variants: identification of a natively unfolded protein that folds upon ligand binding. *Biochemistry* **38**: 14338-14351.
10. Tompa P, Szasz C, Buday L (2005) Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends Biochem Sci* **30**: 484-489.
11. James LC, Roversi P, Tawfik DS (2003) Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. *Science* **299**: 1362-1367.
12. James LC, Tawfik DS (2003) Conformational diversity and protein evolution--a 60-year-old hypothesis revisited. *Trends Biochem Sci* **28**: 361-368.
13. Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, Suzuki T, Yokogawa T, et al. (2001) Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat Biotechnol* **19**: 751-755.
14. Riley M, Abe T, Arnaud MB, Berlyn MK, Blattner FR, et al. (2006) Escherichia coli K-12: a cooperatively developed annotation snapshot--2005. *Nucleic Acids Res* **34**: 1-9.
15. Butland G, Peregrin-Alvarez JM, Li J, Yang W, Yang X, et al. (2005) Interaction network containing conserved and essential protein complexes in Escherichia coli. *Nature* **433**: 531-537.

## 気になった論文



児島 孝明 (こじま たかあき)  
 大阪府立大学院理学系研究科 博士研究員  
 kojimat@b.s.osakafu-u.ac.jp

この度は生命化学研究レターへの執筆機会を頂き、感謝致します。簡単に自己紹介させていただきますと、私は、名古屋大学院生命農学研究科中野秀雄教授のもとで博士号を取得した後、2006年4月より現在に至るまで、大阪府立大学院理学系研究科藤井郁雄教授のもとで博士研究員として研究させて頂いております。現在、触媒抗体の高機能化を目指した新たな手法の確立をメインテーマに取り組んでおります。

抗体タンパク質は生体内免疫システムにおける中枢を担っており、現在、この抗体タンパク質の機能改変に関する研究が様々な角度より行われております。その際、生体内免疫系の働きを模した、「多様性の発生(ライブラリー構築)」、「提示(遺伝子型と表現型の関連付け)」、「選別(セレクション)」のステップを踏む定向進化(directed evolution)といった手法がよく取られます。上に挙げたこれらステップの二番目、「提示」はファージディスプレイ法を初めとして、酵母ディスプレイ法、リボソームディスプレイ法等、これまでに多種多様なディスプレイ技術が報告されております。今回は我々生命科学者にとって最も身近な生物の一つ、大腸菌を用いたディスプレイ法による新規抗体探索技術、という観点から論文を3報紹介させていただきます。

### **Binding and enrichment of *Escherichia coli* spheroplasts expressing inner membrane tethered scFv antibodies on surface immobilized antigens.**

Jung ST, Jeong KJ, Iverson BL, Georgiou G.

*Biotechnol. Bioeng.*, **98**, 39-47 (2007).

### **APEX 2-hybrid, a quantitative protein-protein interaction assay for antibody discovery and engineering.**

Jeong KJ, Seo MJ, Iverson BL, Georgiou G.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **104**, 8247-52 (2007).

### **Isolation of engineered, full-length antibodies from libraries expressed in *Escherichia coli*.**

Mazor Y, Van Blarcom T, Mabry R, Iverson BL, Georgiou G.

*Nat. Biotechnol.*, **25**, 563-5 (2007).

2004年、テキサス大学 George Georgiou らのグループは、新たな大腸菌ディスプレイシステム、anchored periplasmic expression (APEX)をPNASに報告しました。この手法は従来の手法とは異なり、目的タンパク質を大腸菌の内膜表層、ペリプラズム空間側にアンカーリングさせます。その後、EDTA-リゾチームを用いて外膜を除去する事で、目的タンパク質を提示したスフェロプラストを得ることが出来ます。この手法を用いることで、従来のバクテリアのディスプレイ系に比べ、外膜に起因する分子間相互作用阻害の低減により、分子量の大きいタンパク質等の抗原も用いる事が出来る、という大きなメリットが見込まれるそうです。今回の3報は、このAPEXを用いた応用編、です。

まず、*Biotechnol. Bioeng.*の論文においてビーズに固定化した抗原に対するスクリーニング法の検討を



行っています。従来のスクリーニング法では、水層に分散させた蛍光標識抗原に対して抗体を提示させた細胞を加え、FACS で抗原が結合した細胞を分取するといった手順でしたが、本論文では細胞内で一本鎖抗体 scFv と GFP を共発現させ、このスフェロプラストが結合した抗原標識ビーズを FACS で分取するスクリーニングを行っています (図 1)。その結果、APEx システムは固定化抗原や細胞表層に発現させた抗原に対する抗体スクリーニングも原則可能、ということが示されました。

この論文の面白いところはアンカーリングに用いるペプチドやタンパク質を 3 種類も検討していることです。その理由は、蛍光標識抗原を用いた表層提示 scFv の抗原結合能は 3 種すべてのケースで問題なく確認出来たのですが、抗原が固定化されたビーズに対する有意な結合が確認出来たのは scFv の C 末端にフュージョンさせた gp3 を用いた場合のみだった為です。この結果に対し、著者らは N 末端と C 末端フュージョンの違い、アンカーリングされる場所の違い、等が要因ではないか、と述べておりました。が、現時点での断定は難しいようです。著者らはこの gp3 の系を用いて目的の抗原に結合する scFv 遺伝子の 950 倍の濃縮に成功しています。

つづいて、PNAS の論文です。この論文では、APEx システムを酵母 Two-hybrid システムのような形に応用しています。ペリプラズム空間側にアンカーリングされるように、N 末端側に NlpA のリーダーペプチドと最初の 6 残基(CDQSSS)を付加した scFv を bait、FLAG タグを付加した抗原を prey とし、大腸菌内で共発現させます。もしこの scFv と抗原が相互作用するならば、bait-prey (scFv-抗原)複合体が提示されたスフェロプラストとなり、蛍光標識した抗 FLAG タグ抗体でこれを検出します (図 2)。著者らは、この系を用いて炭疽菌の防御抗原ドメイン (PA-D4) に対する scFv14B7( $K_D=3.3nM$ )を元にしたライブラリーより pmol オーダーの  $K_D$  を保持する scFv の獲得に成功しています。

さらに、著者らは bait と prey をそれぞれ抗体の L 鎖、H 鎖( $V_H-C_H1$ )として発現させ、scFv ではなく Fab (IgG をタンパク質分解酵素パパイニンで処理することによって得られる抗原結合部位を含む領域)の形で提示させる技術を確認しました。通常、大腸菌での Fab の発現は効率が悪いと言われており、培養温度を 25°C に下げることにより、その発現量が改善されることがあるそうです。著者らは、今回のこの新規 Fab 提示手法を用いて、培養温度 37°C においても発現及び活性が高レベルに保持される抗 PA Fab を獲得しています。

さて、最後は Nat. Biotechnol. の論文です。順に scFv, Fab と来ました。となると次は完全長の IgG です。この論文は完全長の IgG の表層提示技術の確立に関する報告をしています。勿論、これまでに述べ

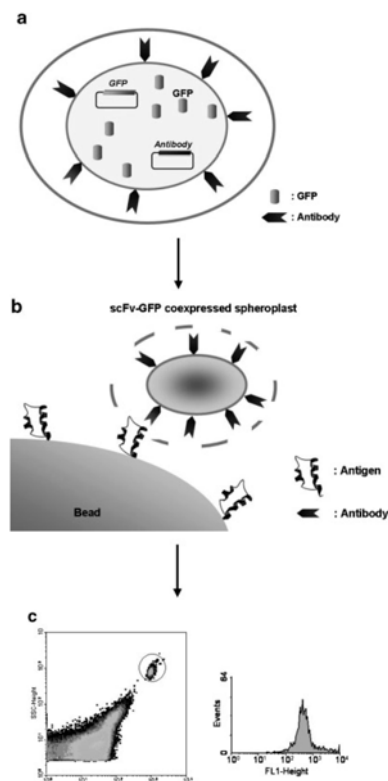


図1 APExシステムを用いた固定化抗原結合 scFvスクリーニング 論文より一部抜粋改変

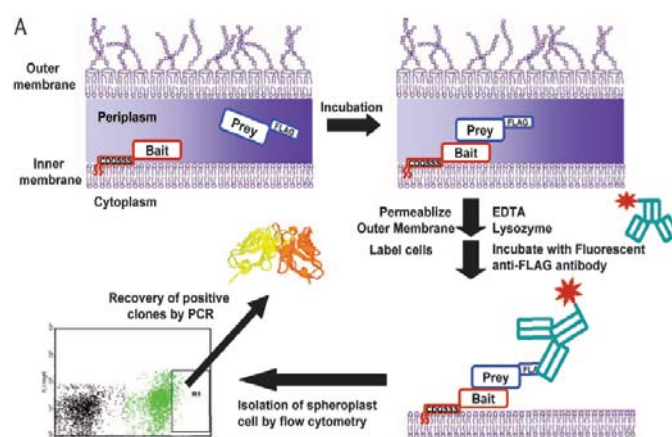


図2 APEx Two-hybrid システム 論文より一部抜粋改変



てきました、APE<sub>x</sub> システムを用いて、です。

大腸菌内でL鎖 (V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>)、H鎖 (V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>-C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>) をそれぞれ分泌シグナル pelB が付加された状態で NlpA(1-6)-ZZ と共発現させます。ZZ ドメインは Fc に特異的に結合する為、ペリプラズム空間側にアンカーリングされた ZZ が、シグナル配列によって輸送されてきた IgG をトラップし、結果的に IgG が提示されたスフェロプラストとなります (図 3)。この手法では、提示に必要なポリペプチド鎖を IgG に付加することなく FACS スクリーニングを行う事が出来、得られたクローンをそのまま IgG 産生に利用することが可能となります。

著者らは、この系を用いて戦略通りに抗 PA 抗体 (M18.1 Hum IgG)、抗 digoxin 抗体 (26-10 IgG) がその活性を保持した状態でスフェロプラスト表層に提示されることを確認した後、抗 PA 抗体: 抗 digoxin 抗体=1:100,000 の模擬ライブラリーで FACS スクリーニングを行い、2 サイクルで目的 IgG の 100,000 倍濃縮、という結果を得ています。また、PA を免疫したマウスより得られた V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub> ライブラリーを IgG 発現用ベクターに組み込み、この IgG ライブラリーを用いてスクリーニングを行い、数十 nM の K<sub>D</sub> を保持する IgG の獲得に成功しています。

今回検討した IgG は二種類ですが、他の IgG でも安定に発現、提示が可能ならば、このシステムは抗体の解析技術に革命をもたらすかもしれません。得られた抗体の機能改変、スクリーニング、そして機能解析の為、発現しやすい scFv, Fab の形状にわざわざ移す手間が省ける訳ですから。この APE<sub>x</sub> システム、今後とも注目していきたいと思っております。

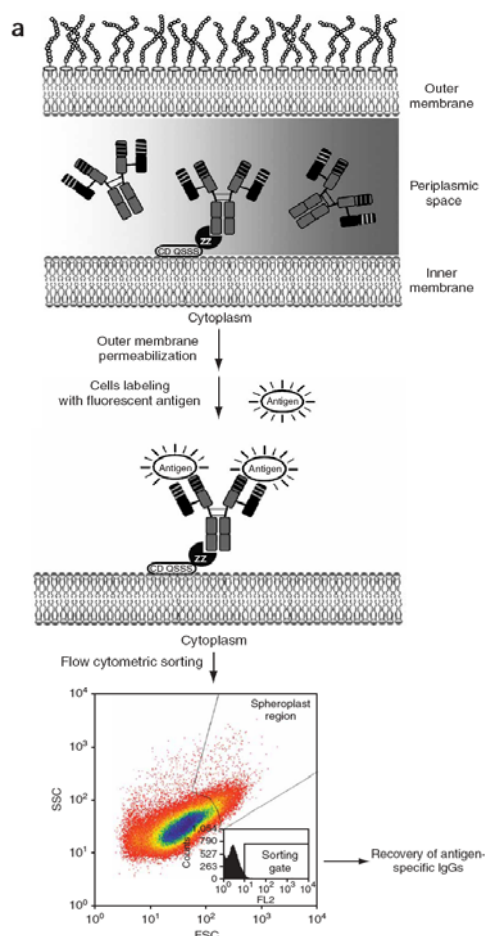


図3 APE<sub>x</sub>システムを用いたIgGスクリーニングシステム 論文より一部抜粋改変



長門石 暁 (ながといし さとる)

東京大学大学院新領域創造科学研究科 メディカルゲノム専攻 博士課程二年

kk67620@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

この度は、このようなコーナーの執筆ができる機会を頂き心から感謝申し上げます。現在私は、東京大学大学院の津本浩平准教授の下で、蛋白質-DNA 間相互作用の熱力学的解析を行いながら、特に“構造変化と水和”に注目した研究を行っております。

さて皆さま、蛋白質の“分子認識”に対してどのようなイメージをお持ちでしょうか？私は正直なところ、学部時代に授業で学びました、いわゆる“鍵と鍵穴”モードが頭にしっかり染み込んでいます(いました)。互いに相補的な構造を用意してドッキングし、複合体が安定化する。私は今まで蛋白質を“ブロック”のようにイメージしていました。ここでは、そんなイメージがぶち壊された、蛋白質のまるで“生き物”のような認識・作用をご紹介します。

### Hot-spot Mimicry of a Cytokine Receptor by a Small Molecule

C. D. Thanos, W. L. DeLano, and J. A. Wells

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15422-15427 (2006)

生体内では、物質間の相互作用(蛋白質間相互作用)によって機能が誘発されるため、この相互作用を遮断する阻害剤を用いてその機能を抑制するという方法が創薬などの世界では盛んに行われています。その阻害剤の設計にあたり重要な情報となるのが、相互作用している“結合界面の構造”です。この構造を参考に分子設計を行い阻害剤が出来上がります。と、これで多様な薬がどんどん作れそうな気がしますが、本論文では蛋白質表面はそんなに単純ではない例が示されています。免疫系のシグナル伝達において重要な役割を果たしている蛋白質 IL-2 は、その受容体である IL-2R $\alpha$  と相互作用するのですが、この相互作用を阻害する小分子(SP4206)がテザリング法(結合界面に小分子ライブラリーを設置し阻害効果のある分子を選別していく)という手法により開発されました。さて IL-2 はどのような様式で SP4206 と結合しているのか、複合体の結晶構造を解いてみたところ、なんと IL-2R $\alpha$  とはまったく異なる結合界面が IL-2 には形成されていたのです(図 1)。IL-2R $\alpha$  に対して IL-2 は平らな結合界面を用意している一方で、SP4206 に対してはループ部位をヘリックス誘起させて溝をつくり、はめ込むようにして結合界面を形成していました(図 1)。共通するのは、電荷の分布と結合特異性に大きな影響を与える“Hot-spot 残基”でした。蛋白質-蛋白質間相互作用を阻害する小分子などの開発は大きな市場が期待されている中、このように立体構造の模倣では対応できない蛋白質の柔軟性が明らかとなってきています。蛋白質の相互作用は、まるで“人の手”みたいですね。

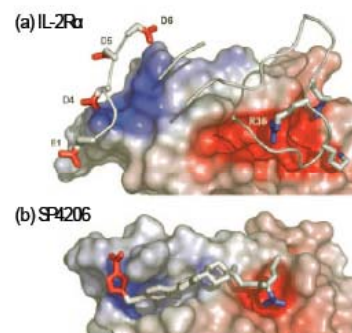


図 1. 各リガンドに対する IL-2 の結合界面の様式 (a) IL-2R $\alpha$  結合の場合、(b) SP4206 結合の場合 (論文より抜粋)

### Structural Basis for Cooperative Transcription Factor Binding to the CBP Coactivator

R. N. De Guzman, N. K. Goto, H. Jane Dyson, and P. E. Wright

*J. Mol. Biol.*, **355**, 1005-1013 (2006)

近年、“天然変性蛋白質(不規則性蛋白質)”という言葉をよく耳にします。蛋白質単独では全体的に、もしくは部分的に全くのランダムな構造で存在し、結合相手と出会うことにより構造を形成する、というものです。本論文では、活性化補助因子 CBP という蛋白質の KIX ドメインが、転写因子 MLL また c-Myb と三者複合体を形成する際、その結合サイトにおいて KIX はランダムな構造を用意し相互作用していることを、多次元 NMR スペクトル測定により解析しています。ここでは単独の KIX に対して MLL が結合する際の親和性よりも、c-Myb が KIX と結合した二者複合体に対して MLL が結合する際の親和性の方が高いことが示されました。逆の c-Myb においても、KIX:MLL 複合体の方がより親和性の高い結果が得られています。

NMR スペクトルの化学シフトにおいて、KIX 単独と二者複合体とでは MLL の結合サイトにおいて相違

が見られ、c-Myb は KIX と結合することにより MLL 結合部位の構造変化を誘起していることが示唆されました。もちろん c-Myb と MLL は互いに相互作用しません。さらに面白いことは、c-Myb:KIX 二者複合体と比べて MLL が結合した三者複合体では、loop L<sub>12</sub> が MLL に近接しより密接なパッキングをしており、helix α<sub>3</sub> は MLL の結合によってヘリックス構造を形成し、逆に c-Myb 側へ近接し静電的な相互作用をしていることが明らかとなりました(図 2)。つまり、これら複合体は“アロステリック効果”を有する分子認識を行っ

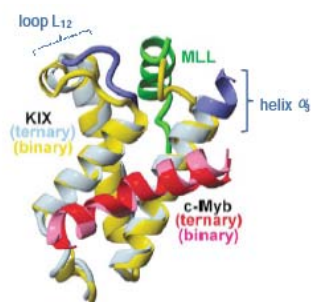


図 2. KIX:MLL:c-Myb 三複合体(ternary)と KIX:c-Myb 二複合体(binary)の比較(論文より抜粋)

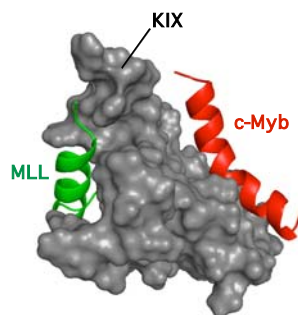


図 3. KIX:MLL:c-Myb 三複合体における結合位置(PDB より)

ているのです。MLL と c-Myb は KIX ドメインを間に挟んでほとんど真向いに位置しているにも関わらず(図 3)、一方の結合によってもう一方の結合様式を促進させるという、情報伝達を KIX ドメインは見事に成し遂げている

のです。シグナル伝達の一部を担っていると言われている KIXドメイン有する CBP 蛋白質にとって、このアロステリック効果という巧みな認識構造は必要不可欠な相互作用手段なのかもしれません。

### The Role of Protein Dynamics in Increasing Binding Affinity for an Engineered Protein-Protein Interaction Established by H/D Exchange Mass Spectrometry

J. R. Horn, B. Kraybill, E. J. Petro, S. J. Coales, J. A. Morrow, Y. Hamuro, and A. A. Kossiakoff

*Biochemistry*, **45**, 8488-8498 (2006).

前述にもありました蛋白質相互作用において特異性に大きな影響を与える“Hot-spot 残基”，この探索には部位特異的変異導入による相互作用解析が用いられ、特にアラニン残基に置換して探索する“Ala-scanning (アラニンスキャニング)”と呼ばれる方法によって同定されています。最後に紹介致します論文は、そんな Ala-scanning では解明できない蛋白質の巧妙な認識メカニズムが論じられています。

ヒト成長ホルモン hGH とその受容体の細胞外ドメイン hGHbp との相互作用は、ヒトの成長や発達の調節において重要な役割を果たしており、それに関連した多くの研究が報告されています。その中で、hGHbp に対しより高い親和性を示す hGH 変異体 hGHv がファージディスプレイ法により作製されました。ところがこの hGHv の結合様式を詳細に調べてみたところ、hGH と基本骨格(主要な三次構造)は全く同じであるにも関わらず、Hot-spot 残基が hGH とは全く異なっていました。熱力学的な解析からも、hGH はエンタルピー、エントロピー有利であったのが、hGHv ではエンタルピー有利、エントロピー不利でした。相互作用に関与している残基のタイプや複合体の立体構造からでは、この hGH と hGHv の結合様式の違いが説明できないのです。そこで著者らは、近年注目されている H/D 交換質量分析法(詳細な内容は割愛致します)を使って、蛋白質の動的な情報(揺らぎ)から謎を解き明かしています。要は、hGH と比べて変異体 hGHv は自身の結合サイトにおいて“大きな揺らぎ”を持たせていました。つまり自身のエネルギー準位を高くし、複合体との結合自由エネルギー差を大きくしていたのです。このため hGHv は大きな負のエンタルピーを獲得できました。このように残基レベルで親和性を向上させるのではなく、結合部位を“揺らがせる”という動的な相互作用戦略を蛋白質は持っていることが分かってきています。

蛋白質の“構造と機能”を関連づける取り組みが生命現象の解明に重要であることは明確ですが、X線結晶構造解析などによる“静的な構造”では限界があり、ダイナミクスな観点を取り入れた“動的な構造”解明の重要性が必須だと感じます。その時、もしかしたら“何が特異性・親和性に必要なのか？”の答えに新たな光が見えてくるかもしれません。



今西 未来 (いまにし みき)  
 京都大学化学研究所 助教  
 imiki@scl.kyoto-u.ac.jp

この度は生命化学研究レターへの執筆機会を頂き感謝致します。京都大学化学研究所二木研究室で助教をしております今西未来と申します。現在は、タンパク質化学、特に、代表的なDNA結合タンパク質である亜鉛フィンガータンパク質の改変および遺伝子制御への適用に取り組んでいます。

DNA配列選択的なDNA結合タンパク質のDNAへの結合様式が、様々な生化学的アッセイや構造解析から明らかになっています。その一方、膨大なゲノムを含む細胞内で、DNA結合タンパク質がどのようにその標的配列を見つけ出しているのかという、安定な結合に至る過程に関しては、まだ未解明な点がたくさんあります。転写因子をデザインし、それを生体システムの中で使いたいと考えたときに、分子のダイナミクスに関する知見は非常に重要であると考えています。そこで今回は、転写因子の細胞内でのダイナミクスに関して、理論および実験から考察を行っている論文2報と、人工遺伝子制御系の構築に必要であると考えられる、遺伝子スイッチに関する最近の論文1報を紹介させていただきます。

### How Gene Order Is Influenced by the Biophysics of Transcription Regulation

G. Kolesov, Z. Wunderlich, O. N. Laikova, M. S. Gelfand, and L. A. Mirny

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 13948-13953 (2007).

はるか30年以上も昔に、リプレッサーとオペレーターとの反応速度定数が算出され、その結合が単純な拡散(3D diffusion)のみによってではなく、結合を促進する要因の存在が指摘されています。また、“転写因子がどのようにして標的DNA配列を見つけるのか？”という問いに対して、これまでにたくさんの理論的研究がなされており、一般論として、3D diffusion (Jump)と1D sliding (Slide)を繰り返しながら標的にたどり着くというモデルが提唱されています。著者らは、これらに同じウエイトを置いて評

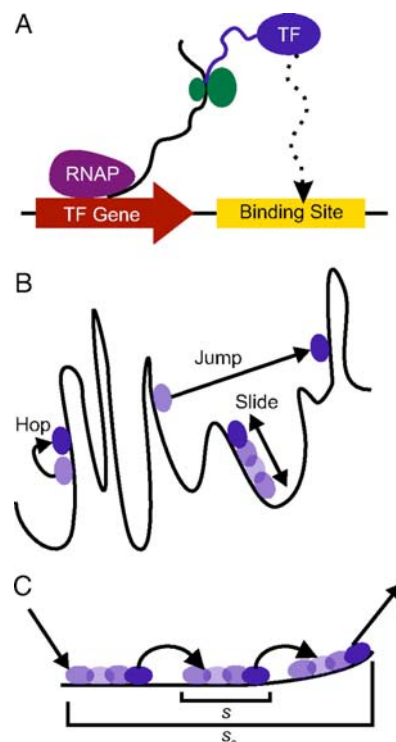


図1 原核細胞における、転写因子(TF)の標的結合サイトの探し方モデル(論文中より抜粋)。



価するだけでは、コピー数の少ない転写因子が標的にたどり着くまでにかかなりの時間がかかってしまうことをシミュレーションによって示しています。そして新たに、原核生物のゲノムにおいて、「転写因子遺伝子と、その転写因子自身の標的 DNA 配列とのゲノム上での距離(図 1A)」という、遺伝子の“並び”、特に近距離からの制御に着目しています。この距離の要素に加え、非特異 DNA への親和性および、非特異結合分子の近傍 DNA への再結合(Hop)というステップを考慮することによって、発現量の少ない転写因子の速やかな DNA 結合を理論的に解釈しようと試みています。直感的に考えて、当たり前の議論をしているような気はするのですが、逆に、どのようなパラメーター(例えば、速度論的観点、タンパク質の構造的側面などから)が実験から必要とされるのか? など考えさせられる点もたくさんありました。また、転写因子の核移行を要する真核細胞では、この論文の議論は当てはまらないものの、速やかな DNA 結合をサポートする分子が存在するのではないか? など、まだまだ、“転写因子がどのようにして標的 DNA 配列を見つけるのか?” という昔からの問いに対しては、実証していくべきことがたくさんあると感じた論文です。

### Probing Transcription Factor Dynamics at the Single-Molecule Level in a Living Cell

J. Elf, G-W. Li, and X. S. Xie

*Science* **316**, 1191-1194 (2007).

転写因子の結合サイトの見つけ方に関しては、上に紹介した論文をはじめとして、1Dと3D diffusionの組合せであることが示唆されていますが、そのDNAへの特異的結合と拡散とを細胞内で検出した例は、この論文がはじめてだと思います。この論文では、ラクトースリプレッサー(LacI)とVenus(迅速に発光する黄色蛍光タンパク質)との融合タンパク質、LacI-Venusの発現量が極めて少なく(2-4分子)なるようにした大腸菌株を作製し、LacI-Venusの大腸菌内の動きを一分子レベルでダイレクトに検出しています。著者らがLacI-Venusの“特異的DNA結合”の指標としているのは、“拡散しにくい”という特徴から得られる蛍光像です。すなわち、長時間(1 sec)露光像に、蛍光スポットが見られるかということ、あるいは、1 msecのレーザーパルス照射によって検出された蛍光が一定時間後の観察において同じ位置に検出されるか、という点です。図2では、LacIに結合

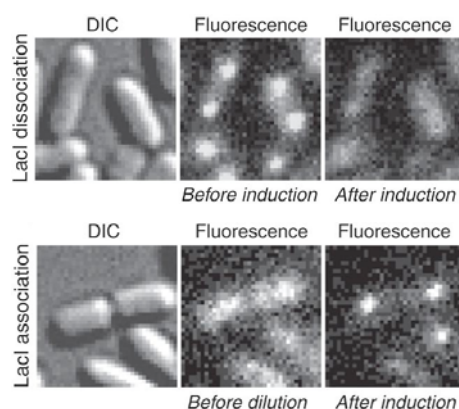


図2 大腸菌内でのLacI-Venusの結合と解離の検出(論文中より抜粋)。上図はIPTG添加前(中央)と添加40秒後(右)。添加前にはクリアなスポットが見られるが、添加後にはオペレーターから解離した分子が露光中に拡散するため、蛍光が全体に広がっている。下図はIPTG競合剤によるIPTGの希釈前(中央)と希釈1分後(右)。再結合が見られる。

し、そのオペレーターDNAからの解離を誘発する物質であるIPTG(イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド)を利用しています。すなわち、IPTG添加によってLacI-VenusがDNAから解離する様子を、蛍光スポットの消失によって観察し(図2上)、引き続いて、IPTG競合剤の添加によるスポット出現(図2下)のキネティクスから、特異的結合に要する時間を算出しています。一方、露光時間依存的なスポットサイズの広がり、あるいは、一定時間間隔のレーザーパルス照射による蛍光スポット位置の移動距離から、非特異DNAへの結合時間や、拡散定数も算出しています。分解能の限界などから、vivoでは算出できないパラメーターもあるものの、生きて大腸菌内でのタンパク質(ほぼ)一分子のダイナミクスを、発現量を減らし、また、露光時間を調節するという工夫によって、見事に検出・定量できているのは、非常に興味深く感じました。



## A Tunable Genetic Switch Based on RNAi and Repressor Proteins for Regulating Gene Expression in Mammalian Cells

T. L. Deans, C. R. Cantor, and J. J. Collins

*Cell* **130**, 363-372 (2007).

著者らは synthetic biology の分野で精力的な研究をしており、これまでに数々の人工的な遺伝子制御システムを構築しています。システム構築にあたっては、関与する分子の性質が明らかになっていることが重要であり、遺伝子の on と off を自在に操ることのできる効果的なスイッチが必要となります。この論文では、既存のスイッチを巧妙に組み合わせることによって、発現のリークを効果的に抑制しています。具体的には、Lac-Tet-RNAi の制御系をタンデムに並べた

ベクターを使っています。図3Aのように、強力なサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターによるラクトースリプレッサー(LacI)強制発現下において、テトラサイクリンリプレッサー(TetR)と標的タンパク質(図3ではEGFP)の発現が lac オペレーター(lacO)への LacI の結合によって抑制されるようになっています。さらに、この TetR 非存在時には、EGFP の 3'UTR 中に意図的に導入した配列に対するショートヘアピン RNA (shRNA) が、U6/tetO 制御系で発現するようになっており、リークして産生されてしまった GFPmRNA を分解し、GFP の発現を完全にブロックしています。一方、図3Bのように、誘導剤 IPTG の添加に伴う LacI のオペレーターからの解離によって、標的 EGFP 遺伝子のスイッチが on になる(と同時に shRNA の転写は TetR により抑制される)という仕組みです。論文では、IPTG の有無により、スイッチ on、off の繰り返しが可能で、IPTG 濃度依存的な調節ができることを示しています。この方法は、基本的には内在遺伝子の調節には不向きですが、目的遺伝子発現量変化の影響を調べたい場合には、個々に shRNA を設計する必要もなく、ほぼ完全に発現の on と off が IPTG によって調節できる点が魅力的だと思います。ただ、lac または tet オペロンによる単独制御の場合よりも抑制効果が高い反面、二重の制御をすることによって、スイッチが効くまでのタイムスケールがどう変化しているのだろうかという点は、論文中では述べられていませんが気になるところです。Synthetic biology の進展に伴い、導入遺伝子の発現調節をいかに行うかに関して、tet 制御系とビオチン-アビジン相互作用を組み合わせた例(Fussenegger のグループ、Nucleic Acid Res. 35, e116 (2007))など、様々な制御系の組み合わせが報告されています。これらに応用することによって、面白い人工的な遺伝子制御システムができあがっていくのではないかと、今後の発展が楽しみです。

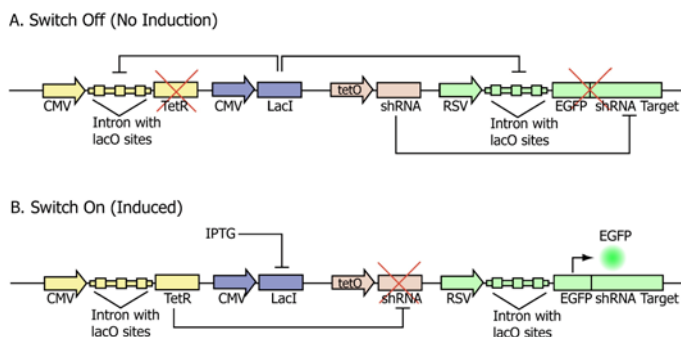


図3 Lac-Tet-RNAi (LTRi)スイッチを導入した Synthetic Gene Network (論文中より抜粋)。



# 生命化学研究法

## 生体分子間相互作用の熱測定

### ～等温滴定型カロリメトリー (Isothermal Titration Calorimetry: ITC)～

京都府立大学大学院農学研究科 織田 昌幸

oda@kpu.ac.jp

#### 等温滴定型カロリメトリーとは

等温滴定型カロリメトリー (ITC) は、一定温度下で滴定に伴う熱量変化を検出する装置で、主に分子間相互作用解析に用いられる。<sup>1)</sup> 言うまでもなく、物質同士が結合する時には、熱の発生や吸収を伴うわけで、生体分子間相互作用の場合にも、微小ながら熱量の増減を伴う。ITC はこの熱量変化を計測することで、その滴定曲線から、結合のエンタルピー変化 ( $\Delta H$ )、結合定数 ( $K_a$ )、結合比 ( $n$ ) を求めることができる。さらに[1]式から結合の自由エネルギー変化 ( $\Delta G$ ) が求まり、[2]式から結合のエントロピー変化 ( $\Delta S$ ) を算出できる。

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad [1]$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad [2]$$

特筆すべき点として、 $\Delta H$  を実験的に決定できることから、分子間相互作用の熱力学量を、他の測定手法に比べて精度よく決定できることがあげられる。図1は MicroCal 社の ITC 装置の概略で、滴定シリンジとサンプルセルに、それぞれ相互作用を観測したい試料溶液を入れておく。滴定シリンジの先端はスクリュー状になっており、測定中はこの滴定シリンジが一定速度で回転し、試料が一定量サンプルセル内に滴下されると直ちに試料同士が混合され、平衡に達する。図1に示す通り、サンプルセルとリファレンスセルは断熱シールド内にあり、両セル間の温度差  $\Delta T$  が常に 0 になるように、セルフィードバックネットワーク (CFB) システムが、両セルに適宜

熱を加えている。装置としては、この CFB の電力量を検出しており、これを時間に対して積分すると、系の熱量が得られることになる。すなわちある分子間相互作用で発熱を伴う場合、サンプルセルに対する電力量を小さくすることになり、その結果、図2に示すような負の熱量ピークデータを与えることになる。一方、吸熱反応の場合、測定データとしては正の熱量ピークデータを与える。

#### ITC 測定データ例

図2には、抗原・抗体間相互作用を ITC で測定した生データと、その滴定曲線の例を示す。いずれも測定は 25°C で行い、同じ抗原 (滴定シリンジ内) を各抗体 (サンプルセル内) に対して、1 滴目のみ 3  $\mu$ l、2 滴

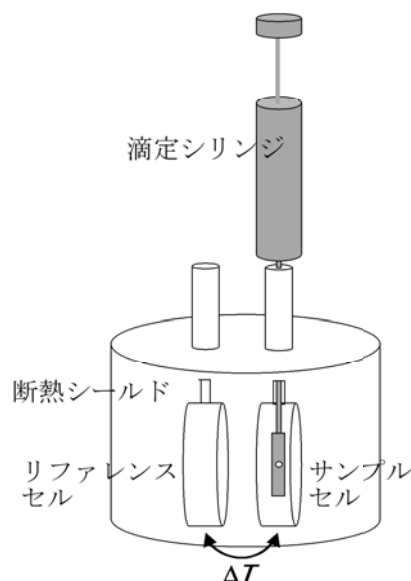


図1. ITC 装置の概略

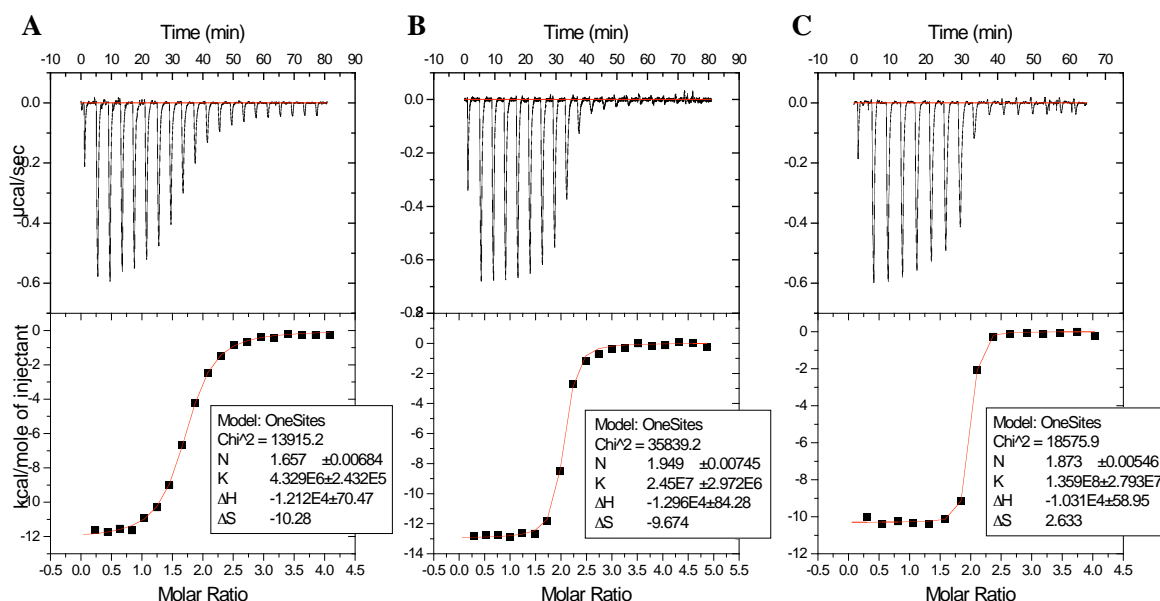


図2. ITC 測定データ

(上図)生データ (下図)生データから Origin ソフトにより滴定曲線を作成し、フィッティングにより各熱力学量を算出した。

目以降は 13 μl を滴下したものである。図2上図が生データになるが、時間軸左側から順に抗原の各滴下により、抗体との結合に伴う発熱が観測される。各滴定の一定時間経過後(図2の場合は4分)、CFB 値がゼロに戻ってから、次の滴定を行うよう、測定条件を検討する。また後で詳しく述べるが、測定に必要な試料量は、結合のΔH に大きく依存し、CFB 値として 0.2 μcal/sec 程度は必要となる。最初から数回の滴定時は、サンプルセル中の抗体量が滴下された抗原量に比べて十分量存在するので、滴下された分だけ発熱が観測される。滴定が進むにつれて、サンプルセル内で結合した複合体の割合が増加する(フリーの抗体量が減少する)ため、滴下後の発熱量が小さくなっていく。最終的には、滴下試料の希釈熱のみが観測されることになる。図2下図に示す滴定曲線を得るために、滴定最終段階までに加えられる抗原量が、サンプルセル中の抗体量×結合比(n)× 2.5 倍程度になるようにする。図2下図の各データ点(■)は、上図の各発熱ピークを積分し、滴下抗原量 1 mol あたりの熱量を y 軸に、滴下された抗原量のサンプルセル内にある抗体量に対する割合を x 軸にとったものである。このデータ点に対して、1:1 結合を想定し、カーブフィッティングして得られたベストフィットが、図2下図の赤線になる。このベストフィットの y 軸上の外挿値が結合のΔH を与え、さらにベストフィットの形状から、結合定数(K<sub>a</sub>)と結合比(n)が求められる。図3は、結合の強さや試料濃度が異なる場合のいくつかの滴定曲線の形状を表している。ここで K<sub>a</sub>M<sub>tot</sub>n(M<sub>tot</sub>は滴定前のセル中の試料濃度)で定義される c 値として、各熱力学量の決定には、1 以上 1000 以下である必要があり、結合定数にすると 10<sup>2</sup> < K<sub>a</sub> < 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup> 程度に相当する。特に強い結合については、ΔH や n は正確に決定できるものの、K<sub>a</sub> は別の方法で決定する必要がある。その場合、示

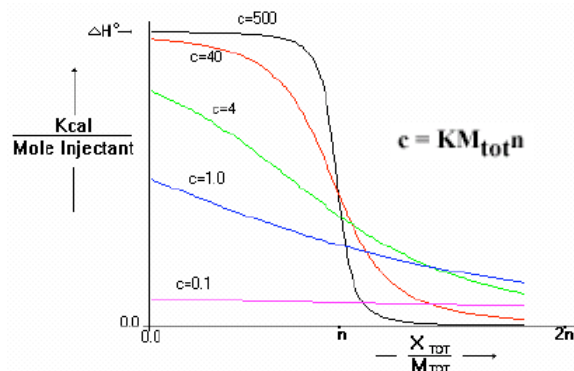


図3. 各 c 値での ITC 滴定曲線

M<sub>tot</sub>: 滴定前のセル中の試料濃度, X<sub>tot</sub>: シリンジ中の試料濃度 (MicroCal ITC ユーザーマニュアルより、同社の許可を得て転載)

図2下図の各データ点(■)は、上図の各発熱ピークを積分し、滴下抗原量 1 mol あたりの熱量を y 軸に、滴下された抗原量のサンプルセル内にある抗体量に対する割合を x 軸にとったものである。このデータ点に対して、1:1 結合を想定し、カーブフィッティングして得られたベストフィットが、図2下図の赤線になる。このベストフィットの y 軸上の外挿値が結合のΔH を与え、さらにベストフィットの形状から、結合定数(K<sub>a</sub>)と結合比(n)が求められる。図3は、結合の強さや試料濃度が異なる場合のいくつかの滴定曲線の形状を表している。ここで K<sub>a</sub>M<sub>tot</sub>n(M<sub>tot</sub>は滴定前のセル中の試料濃度)で定義される c 値として、各熱力学量の決定には、1 以上 1000 以下である必要があり、結合定数にすると 10<sup>2</sup> < K<sub>a</sub> < 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup> 程度に相当する。特に強い結合については、ΔH や n は正確に決定できるものの、K<sub>a</sub> は別の方法で決定する必要がある。その場合、示

差走査型カロリメトリー (Differential Scanning Calorimetry: DSC) を用いて、対象分子の結合前と結合後の熱安定性の差を利用して  $K_a$  を決定する方法や、ITC を用いて、競合分子存在下で測定する方法などが報告されている。前者の実例として、major histocompatibility complex class II (MHC II) とペプチドとの結合のように、ペプチド結合が MHC タンパク質そのものの立体構造形成に大きく寄与し、MHC 単独での精製が困難な場合などには特に有効で、種々のペプチドを MHC に結合させた状態で DSC 測定を行い、各ペプチドとの結合の強さを評価することができる。<sup>2)</sup> また後者の競合分子存在下での ITC 測定法は「displacement ITC」とも呼ばれ、HIV-I プロテアーゼに対する阻害剤のキャラクタリゼーションなどの実例が数多く報告されている。<sup>3)</sup>

### ITC 測定条件の検討

前述のように、測定試料の物質あたりあたりの熱量変化が小さい場合、相対的に多くの試料量を必要とする。一例として、同じ抗原を2種類の抗体に滴下した ITC データを図4に示す。<sup>4)</sup> このデータを得るために用いた抗体濃度は、図4A で  $3 \mu\text{M}$  であるのに対し、図4B ではその10倍を要して、同データを得ている。後者のように熱量変化の小さい相互作用においては、低濃度(例えば  $3 \mu\text{M}$  で測定を行った場合)では熱量変化が極めて小さく、それだけの実験結果からは「結合しない」とする間違っただ結論を導く恐れがあるので、注意を要する。

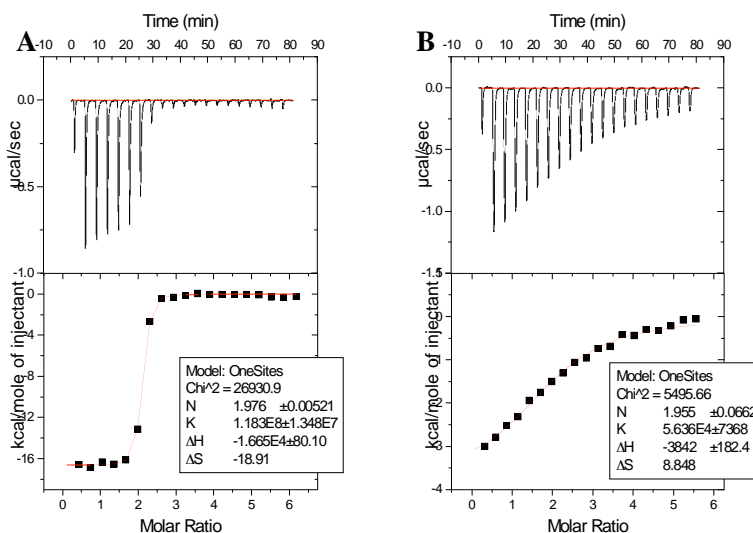


図4.  $\Delta H$  が異なる ITC 測定データ例

A:  $\Delta H = -16.7 \text{ kcal/mol}$ , B:  $\Delta H = -3.8 \text{ kcal/mol}$

また観測したい試料同士の分子間相互作用に伴う熱量に、別の要因による熱量が重なり、間違っただ結論を導く恐れもある。例えば試料中に  $\text{Ca}^{2+}$  と EDTA が含まれる場合などは、当然このキレート反応に伴う熱量変化が観測される。また滴定する側とされる側の溶媒も、試料を透析するなどして、組成を出来るだけ同じ条件にすべきである。特に DMSO などの有機溶媒を少量でも使う場合には、細心の注意が必要である。生体分子間相互作用に伴う熱量変化は極めて小さいため、溶媒の混合熱や希釈熱などにより、観測すべき熱量変化が見えなくなる恐れもある。

溶媒に緩衝液を用いる場合には、緩衝液と試料間でのプロトン交換に伴う熱量変化が、分子間相互作用に伴う熱量変化に付加される可能性があり、これを念頭におく必要がある。詳細は Fukada & Takahashi の論文<sup>5)</sup>に記載されているが、緩衝液の種類によっても、このプロトン解離に伴う熱量変化は異なる。観測したい分子間相互作用の熱力学量を出来るだけ正確に求めたい場合には、プロトン解離に伴う熱量変化が小さい緩衝液を選ぶことや、2種類以上の緩衝液中での ITC 測定を行うなどの対応が必要となる。

その他、分子間相互作用に付加される恐れのある熱量変化として、生体分子の変性熱や、酵素などの場合には触媒反応に伴う熱量変化が考えられる。前者に関しては、特に温度や pH を変えて測定を行う場合、その条件下で、少なくとも測定時間内(通常2時間程度)に試料の変性などが起こらないことを、DSC や分光測定などを用いて確認しておく必要がある。<sup>6)</sup> また後者についても、ITC 測定時間内に起こる触媒反応に伴う熱量変化が、結合に伴う熱量変化に対して無視できる程度となる条件(pH など)を検討する必要



がある。<sup>4)</sup>

### ITC データから得られる熱力学量とその解釈

相互作用する分子に着目すると、通常の系では、結合に伴い水素結合やイオン結合が分子間に形成され、その結果、結合の $\Delta H$  は負の値となる。一方、分子の自由度に着目すると、結合に伴い、多くの系では自由度が抑制されるため、結合の $\Delta S$  も負の値となる。[2]式からも明らかなように、通常の生体分子間相互作用においては、 $\Delta H$ と $\Delta S$ が相互に compensate する向きに働き、トータルでは負の $\Delta G$ を与えることになる。例えば抗原・抗体間相互作用の多くは、負の $\Delta H$ と $\Delta S$ を示す。しかし図4Bに示した系では、負の $\Delta H$ であるものの、 $\Delta S$ が正の値となる。また系によっては正の $\Delta H$ を示す分子間相互作用も報告されている。ここで考えなければならないことは、ITC で得られる熱力学量が、反応系全体の熱量変化を観測するものであり、着目する分子間相互作用以外にも、例えば水や緩衝液の寄与も付加された熱力学量を与えるという点である。すなわち、例えば生体分子の疎水性表面にある結合水が、生体分子間相互作用に伴い脱水和すると、この水の寄与は正の $\Delta H$ 、 $\Delta S$ に反映されることとなる。

昨今のポストゲノム研究分野では、タンパク質の構造から機能を理解するうえで、タンパク質の自由度の問題解明が重要課題であり、ITC で得られる結合エントロピーの解釈も重要な位置づけにある。Frederickらは、ごく最近、主に ITC 測定と NMR による緩和時間測定結果に基づき、系全体のエントロピー変化と、結合に伴うタンパク質の構造エントロピー変化が、良く相関することを報告している。<sup>7)</sup>

ITC 測定を、異なる温度で行うことで、結合の各熱力学量の温度依存性を明らかにできる。図5には、ある抗原・抗体間相互作用の温度依存性を示すが、通常の生体分子間相互作用の系では、このように $\Delta H$ 、 $\Delta S$ ともに温度依存性を示す一方、両者はお互いに compensate して、 $\Delta G$  はほぼ一定の値を示す。また重要な情報として、 $\Delta H$ の温度依存性から、結合の比熱変化量( $\Delta C_p$ )を決定することができる。この $\Delta C_p$ は、生体分子の露出表面積(accessible surface area; 分子表面に水分子を接触させて、表面をくまなく転がしたとき、水分子の中心が描く面の面積)の結合前後での変化量と相関することが、複数のグループから報告されている。DNA 結合タンパク質の系では、結合に伴う結合部位以外での立体構造変化を予測し、これが実際の立体構造解析結果とも良く一致することが示されている。<sup>8)</sup> 一方でこれらの相関式との不一致も、特に低分子との結合で多く報告されているが、試料溶液に含まれるイオンの水和の寄与<sup>9)</sup>や、結合分子間に水が関与する場合などに $\Delta C_p$ の値が加算される可能性<sup>9)</sup>などが報告されている。

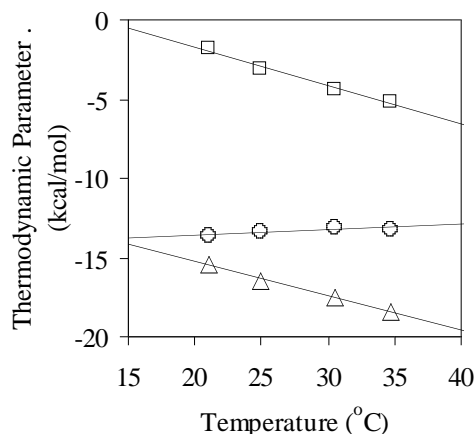


図5. 各熱力学量の温度依存性

○:  $\Delta G$ , △:  $\Delta H$ , □:  $T\Delta S$

ITC 測定で得られる結合比( $n$ )も重要な情報を与える。例えば1分子のタンパク質に何分子のリガンドが結合するかを決定することができる。また抗体のように複数の抗原結合部位をもつ場合(IgG 抗体で2箇所)、抗原の大きさにより、立体障害の影響を受けるか否かで、1または2の結合比(抗原/抗体)を示すことになるが、その識別にも利用できる。さらに例えば品質管理の観点からすると、低分子の抗原に対して本来2の結合比を示す IgG 抗体も、変性した抗体の割合が増えると、この結合比が2より小さい値を示すようになる。図2Aに示す抗体などはその好例で、全体の20%程度が変性し、抗原と結合する能力を失っていることが示唆される。

## おわりに

以上、生体分子間相互作用の熱測定について、ITC による生命化学研究法の概要を紹介した。分子間相互作用解析の重要性は近年ますます重要になりつつあるが、ITC では結合の熱力学量を精度よく決定できる点で特徴的である。応用面でも、例えばドラッグデザインには ITC が広く活用されており、リード化合物の候補決定にあたっては、対象分子に対する結合の強さが同じ場合、よりエンタルピー的に有利な化合物が好ましいとされている。その理由としては、リード化合物からの最適化の過程で、化合物の自由度や疎水性を変えるなど、エントロピー的に有利にする改変は比較的容易であることに基づいている。また ITC 測定にあたっては、必要試料量が比較的多いことが研究の障害になっているようであるが、今夏には、より高感度の ITC 装置がメーカーから紹介されており、その性能が注目される。なお本稿では、ITC の分子間相互作用解析への適用を中心に紹介したが、セル内で起こる熱量変化を観測することから、例えば酵素反応のモニタリングにも適用できる。<sup>10)</sup>

最後に本稿執筆の機会を与えていただいた大阪府立大学大学院理学系研究科、藤井郁雄、円谷健、両博士に感謝の意を表します。

## 参考文献

- 1) Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J. F.; Lin, L., *Anal. Biochem.*, **1989**, 179, 131.
- 2) Saito, K.; Sarai, A.; Oda, M.; Azuma, T.; Kozono, H., *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 14732.
- 3) Velazquez-Campoy, A.; Freire, E., *Nature Protoc.*, **2006**, 1, 186.
- 4) Oda, M.; Ito, N.; Tsumuraya, T.; Suzuki, K.; Sakakura, M.; Fujii, I., *J. Mol. Biol.*, **2007**, 369, 198.
- 5) Fukada, H.; Takahashi, K., *Proteins*, **1998**, 33, 159.
- 6) Oda, M.; Furukawa, K.; Ogata, K.; Sarai, A.; Nakamura, H., *J. Mol. Biol.*, **1998**, 276, 571.
- 7) Frederick, K. K.; Marlow, M. S.; Valentine, K. G.; Wand, A. J., *Nature*, **2007**, 448, 325.
- 8) Spolar, R. S.; Record, M. T., Jr., *Science*, **1994**, 263, 777.
- 9) Ababou, A.; Ladbury, J. E., *J. Mol. Recognit.*, **2007**, 20, 4.
- 10) Todd, M. J.; Gomez, J., *Anal. Biochem.*, **2001**, 296, 179.





## レロアール研究所留学体験記

東京学芸大学 自然科学系 生命科学分野  
原田和雄

現在所属している東京学芸大学の研究専念制度を利用して、2007年6月から6ヶ月の滞在予定でアルゼンチンのブエノスアイレスにあるレロアール研究所(Fundacion Instituto Leloir)で研究を行っています。本来は、生命化学研究レターの編集委員として若い研究者に留学体験記の執筆をお願いする立場ですが、今回は多少趣向を変えて、本欄では初めて(?)のサバティカル・リーブ体験記となります。サバティカル・リーブとは、大学教員などに研究のために一定期間与えられる長期有給休暇の通称である。欧米以外の国への留学について取り上げられることは少ないと思いますので、以前のアメリカでの留学体験との比較も含めてアルゼンチンでの研究の様子についてご紹介したいと思います。

### アルゼンチン、そしてブエノスアイレスについて

アルゼンチンというとサッカーとタンゴの国、広大なパンパを利用した小麦と牛肉の生産国(これは、高校地理で勉強した)、「母を訪ねて3千里」の舞台の国であること以外には殆ど何も知らないままアルゼンチンの首都・ブエノスアイレスにやって来ました。アルゼンチンはイタリア系を中心とした移民により構成されており、インディオ(中南米の先住民族の総称)が少ないことから、中南米の中では最もヨーロッパ的な国であると言われています。そして、ブエノスアイレスは、20世紀初頭に繁栄した「南米のパリ」とも言われた街並みがそのまま残っている美しい大都市です。

ブエノスアイレスは東京とは地球の真反対、緯度は東京とほぼ同じで時差もちょうど12時間です。日本からは最も遠くに位置しているだけあって、こちらまでの飛行時間は実質24時間程度でした。季節も北半球とは逆ですので、私がこちらにやってきた6月は日本では言えばちょうど12月です。冬が到来していました。ただし、東京ほど寒くはなく、ブエノスアイレスでは雪は降らないということでした。ところが、今年の冬は例年に無く寒かったようで、7月上旬に降雪がありました。これは、日本でもニュースになったようですが、なんと89年ぶりのことだったそうです。

### レロアール研究所について

レロアール研究所は1947年に創設された私立の非営利目的の研究所です。創設時の研究所の名称はデルカンポ研究所でしたが、2年前に創設者の1人でノーベル化学賞受賞者 Luis Leloir にちなんで名称が変更されました。主に民間からの寄付などにより運営されていますが、ブエノスアイレス大学やCONICET(アルゼンチンの科学技術省)と連携しながら生化学・細胞生物学に関する研究が行われているアルゼンチン有数の研究所のひとつです。研究活動は23名のPI(Principle Investigator)を中心として、ポスドクと大学院生が主力となって進められています。また、Leloir 研究所では女性の活躍が目立っており、学生やポスドクは女性の数が男性を上回っている他、PIの内6名が女性です。

ほとんどのPIが欧米での研究経験を持っているためか、研究体制は私がアメリカ留学中に経験したものとよく似ています。実験機器は各研究室で保有しているものも含めてすべて共用で使用できるようになって



Leloir 研究所の外観。



研究室のメンバー。右端がアンドレアさん。

おり、学生やポスドクがそれぞれの機器の責任者となって取り扱いの説明や維持・管理を行うシステムが整っています。また、ガラス器具の洗浄／滅菌や DNA シーケンシング、文献の検索や複写、パソコンのメンテナンス(ソフトウェアの更新や修理)に至るまでサービスが充実している他、一般的な試薬や消耗品は研究所内の「ドラッグストア」に買い物に行けば手に入るなど、効率よく実験ができるようになっています。

## 研究室について

現在お世話になっている分子ウイルス学研究室では、デングウイルスに関する研究が行われています。PIの Andrea Gamarnik 博士(以下、アンドレアさんと呼びます)は、ポスドク時代をカリフォルニア大学サンフランシスコ校(UCSF)で共に過ごした友人です。アンドレアさんは、当時、ポリオ・ウイルスに関する研究を行っていましたが、5年ほど前に現在のポジションに就くに当たり、母国アルゼンチンでもしばしば問題となっているデングウイルスに関する研究に着手しました。アルゼンチンは正直なところ欧米や日本と比較して研究環境が整っているとは言えませんが、アンドレアさんは少ない研究リソースを利用して如何にアルゼンチンのためになる研究を行うか考えた結果、敢えて研究材料として取扱いにくいデングウイルスを用いて研究を行っています。

現在の研究室の構成はポスドク2名(男性1、女性1)、大学院生4名(男性3、女性1)です。こちらの教育システムでは学位を取得する年齢が日本よりも高く、研究室のメンバーは大学院生が多いものの、30歳前後です。また、こちらの大学院生はアメリカの場合と同様に何らかの形で給料(アメリカでは Stipend と呼ばれる)をもらうので、経済的に独立していて、結婚をして子供がいる人が数多くいます。デイケア施設も充実していて、赤ちゃんが6ヶ月になると預けることができます。

研究室のメンバーは大変陽気で、実験中にみんなで突然歌いだしたりすることがあるなど、ラテン民族の国ということを実感しています。そして、皆とても気さくで面倒見が良く、実験面から生活面までとてもお世話になっています。大学院生は、英語のチューターによる個人レッスンを研究所の負担で安く受けられるようになっているので、英語は上手です。そして、私がスペイン語を喋れないので、英語で喋る時間を設けて(英語の練習も兼ねているのだと思います)、スペイン語を喋ると罰として *Factura* と呼ばれるアルゼンチン特有のペーストリーを皆のために買うゲームを行っています。

## 研究について

デングウイルスは、デング熱、及びより重篤なデング出血熱の原因ウイルスです。デング(出血)熱はアジアやアメリカ大陸の熱帯・亜熱帯地域では最も重要な感染症と言われていますが、基礎研究が進んでいな



いため、有効なワクチンや抗ウイルス薬がありません。デングウイルスは、フラビウイルス科に属する(+)鎖の一本鎖 RNA ウイルスであり、ウイルス RNA の複製は感染後に合成されるウイルス由来 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ(RdRp)により行われます。アンドレアさんの研究室では、RdRp がウイルス RNA の 5'-非翻訳領域中の stem-loop A (SLA)と結合することにより複製を開始することを見だし、フラビウイルス属のウイルスとしては初めて(-)鎖を合成するためのプロモーターを同定しました。<sup>1)</sup>また、複製が起こるためには、5'-と 3'-非翻訳領域(UTR)が相互作用をすることにより、ゲノム RNA が環化することが既に知られています。アンドレアさんの研究室では環化反応において 5'-非翻訳領域中の stem-loop B (SLB)が重要な役割を果たしていることを見だしています。<sup>2)</sup>そこで、私は SLA、SLB に強く結合するペプチドをスクリーニングし、これらのペプチドによるウイルス複製への影響について検討することを目的として実験を行っています。スクリーニングには、私の研究室で開発した KAN システム(Kanamycin ANtitermination system)と呼ばれる大腸菌を用いた RNA-ペプチド相互作用検出系を用いています。<sup>3,4)</sup>現在はペプチドをスクリーニングしている段階ですが、SLA 及び SLB 結合ペプチドは、ウイルス複製のメカニズムを解析する上で有用であるばかりではなく、その抗ウイルス薬のリード化合物としての応用が期待されます。

### ブエノスアイレスの生活

これまでにラテンアメリカの国は旅行で訪れた経験はありましたが、スペイン語もわからないので、こちらに来るまでは多少不安はありました。そして、こちらに来てからも想像していた以上に生活や文化の違いを感じて戸惑うことがよくあります。こちらの人達の生活で特に印象的なのは、家族や友人と過ごす時間をとても大切にしている、仕事が終わった後も夜な夜な街に繰り出して楽しんでいるところです。仕事においても、私生活においても一生懸命でバイタリティーを感じます。ブエノスアイレスっ子の一日はとても長く、レストランでの夕食は夜10時頃からが一般的で、店を出る時には真夜中をどうに過ぎていることがしばしばありました。一方、物価についてですが、5年程前に対外債務が累積したことにより経済が破綻し、それまでの1 USドル/1 ペソの固定相場制から自由相場制になり、一時は1 USドルが5 ペソまで下がりました。その後、経済も次第に回復に向かっていくようで、現在は1 USドルが3 ペソ程度となり、物価の上昇が続いています。そのような訳で、物価は日本の半分以下、食料品はさらに安く感じられます。肉類の中では牛肉が最も安く、最上級のヒレ肉が1キロ当たり500円程度です。日本人好みの霜降りとは違って赤身の脂肪分の少ない肉ですが、ビックリするくらい美味しいです。残念ながら、日本ではアルゼンチン牛の輸入は口蹄疫に対する恐れから禁止されています。レオアール研究所では農場を幾つか保有していて(農場の利益は研究所を維



研究所の Asado のために牛肉、ソーセージなどを炭火で焼いている様子。



研究所の Asado。研究所のスタッフ、PI、ポスドク、大学院生が歓談している様子。

持する費用として利用されているそうです)、年に2回、秋分の日と春分の日には農場の牛を一頭さばいて、研究所でバーベキュー(こちらでは *Asado* という)が行われます。炭火でじっくりと焼いた肉やソーセージは *Parrilla* と呼ばれるレストランでも食べることができますので、アルゼンチンに来られることがありましたら是非召し上がってみてください。ところで、アルゼンチンは長い海岸線を持っていて海産物は豊富だと思われませんが、ほとんどが輸出用で高価なため一般庶民の口にはあまり入りません。日本の食材は手に入りにくいいため、日本食は最初から諦めて食べていませんが、日系人が経営するレストランはあるようです。また、寿司が流行っているようで、種類は限られますが食べることができます(こちらのシャケはとてもおいしいです)。

一方、サッカー好きはご存知だと思いますが、今年は *Copa America* が開催されました。*Copa America* はワールド・カップのアメリカ大陸版であり、ワールドカップと同様に4年に一度行われますが、私がこちらに来た頃ちょうど始まったところで大変盛り上がっていました。特にサッカー・ファンではなかった私も連日試合を見ているうちにすっかりアルゼンチン・チームのファンになりましたが、応援の甲斐なく今回の *Copa Americana* は前回と同様にアルゼンチンは決勝でブラジルに負けてしまいました。

### 最後に

今回、サバティカル・リープを取得して、実験を中心とした研究に専念しながら充実した研究生活を過ごしています。以前からデングウイルスの研究をしているアンドレアさんの研究室と共同研究をしたいと思っていましたので、それがようやく実現してうれしく思っています。この経験を今後の研究に生かし、さらに共同研究を進めていきたいと思っています。レロアール研究所で研究を行う機会を与えてくださったアンドレアさん、そして暖かく受け入れてくださった研究室のメンバーに感謝します。また、半年間、インターネット会議とメールのやりとりで研究を続けた学芸大の私の研究室の学生達には改めて感謝の気持ちを伝えたいと思います。今回のデングウイルスに関する研究をサポートしていただいた内藤記念財団にも感謝いたします。



研究室のメンバーとの記念撮影。

### 参考文献

- 1) Filomatori, C. V., Lodeiro, M. F., Alvarez, D. E., Samsa, M. M., Pietrasanta, L., and Gamarnik, A. V. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev.* **20**:2238-49 (2006).
- 2) Alvarez, D. E., Lodeiro, M. F., Luduena, S. J., Pietrasanta, L. I., and Gamarnik, A. V. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J. Virol.* **79**:6631-43 (2005).
- 3) Harada, K., Martin, S. S., and Frankel, A. D. Selection of RNA-binding peptides *in vivo*. *Nature*, **380**:175-179 (1996).
- 4) Peled-Zehavi, H., Horiya, S., Das, C., Harada, K., and Frankel, A. D. Selection of RRE RNA binding peptides using a kanamycin antitermination assay. *RNA*, **9**:252-261 (2003).



## シンポジウム等会告

### 第10回生命化学研究会シンポジウム・熊本（2008） つくる生命化学 -未来への展望-

主催 日本化学会生命化学研究会

共催 高分子学会、日本薬学会、日本分析化学会

会期 2008年1月11日(金)9:00~17:00

会場 熊本大学 工学部百周年記念館

(熊本市黒髪2-39-1 熊本大学黒髪南キャンパス)

#### ○プログラム

09.00-09.05 開会挨拶 三原久和(生命化学研究会会長)

09.05-09.45 『遺伝子人工転写調節システムとがん診断・治療への応用』

片山佳樹(九大院工)

09.45-10.25 『ユビキチン様蛋白質スモによる分子架橋と新規バイオポリマーのデザインと合成』

斉藤寿仁(熊本大院自)

10.25-10.40 休憩

10.40-11.20 『架橋型人工核酸BNAの開発とその応用』

小比賀聡(阪大院薬・さきがけ)

11.20-12.00 『蛋白質相互作用解析:材料・医療への展開』

津本浩平(東大新領域)

12.00-13.00 昼食

13.00-14.30 ポスター発表 50件程度(先着順)

14.30-14.40 休憩

14.40-15.20 『生命分子の自己集合をデザインしてナノ構造を作る』

松浦和則(九大院工・さきがけ)

15.20-16.00 『細胞内と試験管内の人工遺伝子回路』

木賀大介(東工大院総理)

16.00-16.40 『ペプチド折り紙:金属錯体をコアとする人工蛋白質の構築』

石田 斉(北里大院理)

16.40-16.55 総会

16.55-17.00 閉会挨拶

17.00-18.10 ミキサー

●ポスター発表申込〆切 2007年11月30日(金)

一般発表としてポスター発表50件(定員なり次第締切)を受付けます。希望者はA4版用紙1ページ縦(上下左右に2.5 cmの余白)に、題目、発表者(連名の場合は発表者に下線)、所属、同所在地(連絡先)、および要旨本文を記載し、電子メール(PDF書類を添付、上限1MB程度)でお送りください。講演要旨の提出をもって発表申込みとします。

●参加登録費事前振込〆切 2007年11月30日(金)

日本化学会会員5000円、非会員6000円、学生2000円(当日それぞれ1000円増)(要旨集、ミキサー代込み)

上記期日までに下記口座に振込後、すぐにお振込内容(氏名、所属、振込金額、会員・非会員・学生の別、連絡先、振込日)を電子メールでお知らせください。研究室等で一括してご送金、またはご連絡いただいで結構です。

振込口座:郵便局 01760-9-65937

口座名:生命化学研究会シンポジウム2008熊本

お問い合わせ、および申込・連絡先

〒860-8555 熊本市黒髪2-39-1

熊本大学工学部物質生命化学科 井原敏博

Tel & Fax: 096-342-3873

E-mail: fbc10@chem.kumamoto-u.ac.jp

第10回生命化学研究会シンポジウム・熊本(2008)世話人

井原敏博(熊本大)・中島敏博(化血研)・石田 斉(北里大)

## 第10回生命化学研究会 in 阿蘇 2008

主催 日本化学会生命化学研究会

会期 2008年1月12日(土)9:00~15:00

会場 日赤温泉 アソシエート(Tel: 0967-63-4511)

(熊本県阿蘇郡南阿蘇村河陽4369-19)

URL: <http://www-ku.magma.ne.jp/~asociate/>

参加費 15,000円(11日の宿泊費を含む)、当日徴収

●参加申込〆切 2007年11月30日(金)

参加および話題提供の募集 参加希望、発表(30分程度)希望の有無(有の場合は発表タイトルも)を氏名、所属、連絡先とともに下記担当者まで電子メールでご連絡ください。発表希望者が多い場合、選定は世話人にお任せ願います。

参加者は11日に熊大(シンポジウム会場)よりバスで会場まで移動。一泊して翌日、研究会を開催致します。終了後、熊本空港、および最寄りのJR駅までバスでお送りします。



お問い合わせ、および申込・連絡先  
〒860-8555 熊本市黒髪2-39-1  
熊本大学工学部物質生命化学科 井原敏博  
Tel & Fax: 096-342-3873  
E-mail: fbc10@chem.kumamoto-u.ac.jp

第10回生命化学研究会シンポジウム・熊本(2008)世話人  
井原敏博(熊本大)・中島敏博(化血研)・石田 斉(北里大)

## お知らせコーナー

### 会員異動

富崎 欣也  
(財)地球環境産業技術研究機構  
〒619-0292 京都府木津川市木津川台9-2  
TEL: 0774-75-2305 FAX: 0774-75-2305  
E-mail: tomizaki@rite.or.jp

### 編集後記

大変遅くなってしまいましたが、ここに生命化学研究レターNo.25 をお送りします。今回から、私、円谷が石田 斉氏(北里大学)に変わり編集委員として参加することになりました。不慣れなこともあり、執筆者の皆様には大変ご迷惑をおかけしましたが、皆様のご協力もあり、何とか編集作業を終えることができました。重ねてお礼申し上げます。

本年度は、関連シンポジウム報告にもありますように、スイス・ローザンヌで日本—スイスケミカルバイオロジーシンポジウム(JSCB)が開催され、日本からも多くの生命化学研究会メンバーが参加しました。第2回JSCBは日本で開催されることになると思いますので、その際には是非ご参加ください。

次号(No.26)は原田 和雄氏(東京学芸大学)の担当により、2008年2月に発行を予定しております。読者の皆様からのニュースレターに対するご要望、ご指摘の声をお待ちしておりますので、編集担当(円谷、原田、長崎)までご連絡をいただけたら幸いです。今後も、生命化学研究レターをよろしく願いいたします。

円谷 健  
大阪府立大学大学院理学系研究科  
(tsumu@b.s.osakafu-u.ac.jp)

編集担当  
原田 和雄(東京学芸大学)  
長崎 健(大阪市立大学)