



目 次

1.	巻頭言	2
	共に動くとき 三原久和 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)	
2.	関連シンポジウム報告	3
	日本化学会第 88 春季年会アドバンスドテクノロジープログラム バイオケミカルテクノロジーセッション	
3.	研究紹介	
	たんぱく質相互作用を標的とする阻害剤の創製 ～ペプチドミメティクスからモジュールアセンブリへ～ 大神田淳子 (大阪大学産業科学研究所)	4
	光応答性タンパク質・ペプチドの創製と構造制御 廣田 俊 (奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科)	10
4.	論文紹介「気になった論文」	16
	姜 貞勲 (九州大学大学院工学研究院) 川上隆史 (東京大学大学院工学系研究科) 中西 猛 (大阪市立大学大学院工学研究科)	
5.	生命化学研究法	24
	蛍光異方性測定 中田栄司 (徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス部) 浜地 格 (京都大学大学院工学研究科)	
6.	Max-Planck 研究所留学体験記	30
	吉田将人 (東北大学大学院薬学研究科)	
7.	シンポジウム等会告	34
8.	お知らせコーナー	40
	集会のお知らせ・受賞のお知らせ・会員異動のお知らせ 編集後記	

巻頭言

共に動くとき



東京工業大学大学院生命理工学研究科

三原 久和

今年 2008 年から、「生命化学研究会」改め、「フロンティア生命化学研究会」が発足しました。新規の研究会として新たに 3 年間会長を勤めさせていただきます。何卒よろしくお願いいたします。本会の趣旨は、・・「生命システムを理解し、応用するために、化学、農学、薬学、医学等広範囲の学際的研究を展開し、フロンティア生命化学と関連学問ならびに利用技術の一層の発展を計ること」を目的とします。従来の「生命化学研究会」の事業を発展させつつ、広範に学際化した生命化学領域に対応するために、日本化学会の「生体機能関連化学・バイオテクノロジー」、「医農薬化学」、「天然物化学・生命科学」、「高分子」、「ナノテク・材料化学」、「錯体化学・有機金属化学」、「光化学」、「分析化学」などの多数のディビジョンを横断する研究会レベルでのフロンティア事業を展開します。また、各ディビジョンに所属する若手研究者とも共同し、生命化学フロンティアでの学術、産学連携に関する次世代の育成にも寄与する・・としています。日本化学会からの要望もあり、ディビジョン横断的という意識しています。そのために種々の分野(ディビジョン)から 26 名の運営委員に参加いただき、色々な意見がいただけるようにしました。結構大上段的趣旨となっていることがこそばゆいところですが、実質は、従来どおりの学術はもちろんのこと、マルチな分野横断の熱の入った議論、そして産学連携などへの貢献の意識も取り入れた実りある、面白い研究会を継続できればと願っています。

ここから、同時期に依頼された生体機能関連化学部会のニュースレター巻頭言と意見が重複します。ご容赦下さい。研究会用にと解説を足しました。対比してご覧ください。

ところで大学では、大学院の高度化や法人化等を経て、大競争時代になっています。皆さんも過去には経験したことのない大学等での取り組みの渦に巻き込まれているでしょう。過去との経験的対比ができない(これがオリジナルな思考につながり良いのです)学生さんやポストドクの方もいつの間にかその変革の渦の中にいる筈です。このジレンマからどうにか脱却できないかなーというまったく困った社会状況です。そのせいか最近、いろいろな会でのお話で「現在と幕末時代との類似性」について論じられ、気になっています。当時の攘夷あるいは開明で諸藩が競い合い、結果として瞬間に外国の制度を日本人特有の技能をもって導入し、明治維新に繋がっていったわけです。しかし、現在の学問、教育、研究の国際レベルでのグローバルな競争に打ち勝つには、幕末とはまた違った相当な意識改革と犠牲が伴いそうです。失敗すれば当時のような負け組みになってしまうのでしょうか？先輩諸氏は、幕末時代のように決死の覚悟で取り組み、と発破をかけていただいているようにも取れます。研究会の役割も自分たち世代がためにもという狭い意識を越えて、若い研究者層および大学院学生の弛まない研究への熱意を継続的に発展させるべく仕組みを考えていくことが責務としてあるように思えて仕方ありません。某大先生が「小さな親切。大きなお世話だ」と約 20 年前に発言されたように言われるようになりたいものです。大学間競争も大事ですが、そろそろ色々な層(レベル)で協働する時が来ているように思えてなりません。攘夷＝開明の流れであったように、このようなフレキシブルな研究会のレベルでこそ時代の変化と継続性を議論し、努力する機会の設定ができ、これがますます重要になってきているように感じています。たくさんの議論・意見を交わらせることがやはり大事だと思います。国内・国際問わず面白くある研究会にしたいものです。当時のように、若い人が新しい考え方をだし、行動を起こし、名前が出る頃には命をとられていくのもたまりませんが、あの伊藤博文も最初は俊輔という足軽からでした。当時のように年齢の壁を取り払って、共に動き、開明へ一歩一歩進みませんか？

(みはら ひさかず hmihara@bio.titech.ac.jp)

関連シレポジウム報告



日本化学会第88春季年会（2008） アドバンスト・テクノロジー・プログラム（ATP） ～バイオケミカルテクノロジー～ 報告

東京工業大学大学院生命理工学研究科
三原 久和

平成20年3月26日(水)～30日(日)の異例の5日間で開催された、日本化学会第88春季年会(立教大学池袋キャンパス)にて、通常のアカデミックプログラム(AP)と平行して、アドバンスト・テクノロジー・プログラム(ATP)～バイオケミカルテクノロジー～が、3月28日～29日の2日間で開催されました。日本化学会ATPは、平成17年の第85春季年会から材料分野において、「化学の応用」、「実用化」、「事業化」を中心とする産学連携のための新しい企画 Advanced Technology Program(ATP)として実施されています。当該分野のトップランナーによるオーガナイズならびに基調・招待講演などにより、活発な討論が行われ会場は活気あふれたものになり、多くの参加者から好評をいただくことができ、春季年会の新機軸として成功を収めてきています。ATPバイオは、昨年に引き続き2回目の開催です。

今年度も、基調講演に加えて、T7 グリーンバイオとT8 フロンティア・バイオの2つのセッションで、それぞれ下記の2つのサブセッションを設けました。ご発表、ご参加の皆様には大変有難うございました。

特別基調講演 協和発酵におけるバイオイノベーション（協和発酵工業・相談役）平田 正

基調講演 試験管内でタンパク質を作る：技術開発とタンパク質生物学への応用に向けた
試み（愛媛大）遠藤弥重太

基調講演 科学技術政策と産学連携によるイノベーション
（京大院薬・客員教授）清水一治

グリーンバイオ：バイオマス・バイオポリマーとバイオコンバージョン

2会場：招待講演 9件（アカデミア）、依頼講演6件（企業）、ポスター 13件

フロンティアバイオ：ナノバイオ・バイオ計測とバイオマテリアル・先端医工学

1会場：招待講演 4件（アカデミア）、依頼講演 4件（企業）、ポスター 25件

来年も平成21年3月27日～30日に日本化学会第89春季年会(日本大学船橋キャンパス)において同様の企画でATPバイオを開催します。産学連携の重要な機会として、皆様の積極的なご参加、ご発表、ご討論を期待しております。よろしくお願いたします。来年度は、東京医科歯科大学秋吉先生、大阪大学深瀬先生が中心になってお世話くださいます。

たんぱく質間相互作用を標的とする阻害剤の創製 ～ペプチドミメティクスからモジュールアセンブリへ～

大阪大学産業科学研究所 医薬品化学研究分野

大神田 淳子

(johkanda@sanken.osaka-u.ac.jp)



1. はじめに

ヒトの場合、25万通り以上存在するともいわれるたんぱく質間相互作用ネットワークは、細胞増殖、分化、細胞死等を制御する様々な信号伝達系で重要な役割を果たしています。複雑なたんぱく質相互作用を解き明かしてゆく作業からは、生命の動作原理の解明だけでなく、新しい医療の発展に結びつく未知の標的が発見されることも期待できます[1]。もし、細胞内のたんぱく質相互作用を自在に制御できるような有機分子を創ることができれば、それらは情報伝達系の研究のための化学プローブ、あるいはたんぱく質表面指向型の創薬研究のリード化合物として、重要な役割を担うと考えられます。

ところが、多くのたんぱく質間相互作用では作用面が広くて浅く、かつバルクの水や電解質に晒されているために、細胞膜を透過してくれそうな、いわゆる"drug-like"な有機低分子による制御が極めて困難であることが知られています。これとは対照的に、規定された3次元空間を形成する酵素の活性ポケットのように外部の水から比較的遮断されているたんぱく質の内側表面に対しては、結合力の強く選択性の高い低分子阻害剤の開発が可能であるため、伝統的な創薬研究の対象とされてきました。

たんぱく質の外部表面が担う機能をプラクティカルに制御する有機分子には、おそらく1) 結合部位選択性、2) sub μM オーダー以上の親和性、3) 細胞膜透過性、が最低限の性質として要求されることでしょう。そしてこれら全ての要求を満たすためには、抗体の抗原結合サイトのように広い分子表面を確保しつつも、分子サイズを絞るという矛盾した条件を満たす新しい分子設計法を導入する必要があると、私たちは考えています。非常に難しい課題ですが、ひとつのやり方として比較的強力で選択的な結合が期待できる内部表面認識を足がかりとして使うことをまず考えました。

本稿では、酵素群 prenyltransferase 阻害剤の開発研究から、たんぱく質内部表面指向型（活性サイト結合型）ペプチドミメティクスの例と、この研究中に着想を得たアンカー型外部表面指向型阻害剤の例を紹介させていただきます (Figure 1)。

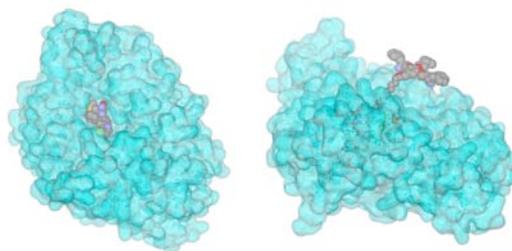


Figure 1. A set of representative models for enzyme inhibitor targeting interior protein surface (left) and both interior and exterior surfaces (right); inhibitors are shown in CPK; protein (mammalian GGTase-I) is shown in surface model (blue).

2. ペプチドミメティクス系 prenyltransferase 阻害剤と抗腫瘍活性

Prenyltransferase とはGTP結合たんぱく質の翻訳後修飾を担う亜鉛含有酵素群です。基質たんぱく質のC末端にC15 farnesyl または C20 geranylgeranyl 基を転移し、標的たんぱく質を膜組織に局在化させます。私が所属した研究グループでは、構造と酵素反応機構が類似するが、生理学的役割

は異なる farnesyltransferase (FTase) と Type-I geranylgeranyltransferase (GGTase-I) に焦点を当て、ペプチドミメティクスを基盤とした低分子阻害剤の論理的設計と生理活性を検討しました。

2-1: ペプチドミメティクスの合理的設計

MAPK シグナル伝達系の分子スイッチとして機能する Ras たんぱく質に点変異が起こると GTP 加水分解機能が損なわれ、細胞の無制御増殖を引き起こす。FTase は Ras の C 末端 4 アミノ酸配列 CAAX (C = cysteine; AA = aliphatic dipeptide; X = methionine or serine) を認識し、farnesyl 2 リン酸 (farnesyl pyrophosphate; FPP) から farnesyl 基を Cys の側鎖チオール基へ転移する反応を触媒する。この翻訳後修飾が Ras のスイッチ機能発現に必須であることから、FTase に対する選択的阻害剤はがん増殖抑制剤として機能すると期待された。

90% のすい臓がんに変異体が検出される K-Ras4B は CVIM (Cys-Val-Ile-Met) を CAAX 配列として持つ。FTase 複合体結晶構造から明らかのように、CVIM は活性ポケット内で *extended conformation* をとり、1) チオール基の亜鉛への配位結合、2) Val-Ile 部位の疎水性側鎖の疎水性ポケットへの結合、3) Met カルボキシルおよび Ile アミド基と Gln167 α , Arg202 β との水素結合、の主に 3 種の相互作用を介して活性ポケットに認識されている (Figure 2) [2]。従ってペプチドミメティクスの設計指針として *extended conformation* と水素結合受容体を保持しつつ、a) チオールに代わる亜鉛配位子の導入、b) Val-Ile ジペプチドに代わる疎水性土台の導入、c) Met の置換、が妥当と考えられた。それぞれの指針に沿って、a) 亜鉛イオンに親和性の高いイミダゾール基の導入、b) 4-アミノ安息香酸の導入、c) 種々のアミドまたは Val-Ile-Met トリペプチド部位を *terphenyl* コアで置換する、等を有機合成化学的に検討し、誘導体の [^3H] ラベル化 farnesyl 基の H-Ras への取り込み阻害効果の検証、構造活性相関研究を経た結果、FTase に対し IC₅₀ 値が pM~nM レベルの阻害剤を得ることができた (Figure 3. A) [3-5]。FTI-2148 と FTase の複合体の結晶構造解析から、FTI-2148 は上述 1)~3) の全ての相互作用を設計どおり保存し、活性ポケットに結合することが証明された [5] (Figure 4)。

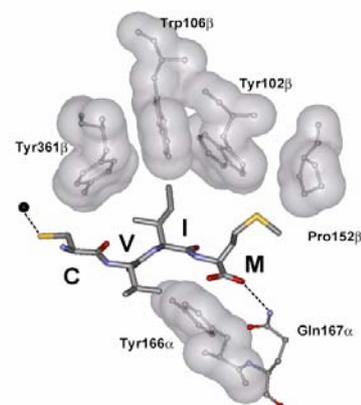


Figure 2. The view of active site in X-ray structure of mammalian FTase bound to CVIM tetrapeptide.

2-2: ペプチドミメティクスの FTase 阻害活性と抗腫瘍活性

イミダゾール含有誘導体の FTI-2148 は、第 1 世代のチオール含有 FTI-276 の活性を保ちつつも GGTase-I に対する高い選択性を示した (>1,000 倍)。また *terphenyl* 型の FTI-2297 は FTI-2148 に劣るものの sub μM レベルの活性を持つことから、Met 残基の除去による *achiral* な阻害剤設計が可能であることを明らかにした [3]。Ras 変異型 NIH-3T3 細胞を用いた実験では、*bis-imidazole* 誘導体 FTI-2287 が プロドラッグ化せずとも Ras の farnesyl 化を非常に強く阻害するという興味深い結果を得た (Figure 3. B; IC₅₀ = 5 nM) [5]。2 つ目のイミダゾールが膜透過性の向上に寄与した可能性が考えられる。

マウスゼノグラフトモデル (ヒト肺がん由来 A-549 を移植) に FTI-2148 を投与したところ、83 日後の腫瘍成長が 91% 抑制され、また体重減少等の副作用は全く認められなかった (Figure 3. C)。この場合、45 日目に薬剤投与を中断すると腫瘍サイズの増加が始まり、53 日目に薬剤投与を再開すると再び腫瘍成長は抑制されることから、FTI-2148 が細胞増殖抑制効果を持つことが分かる。この

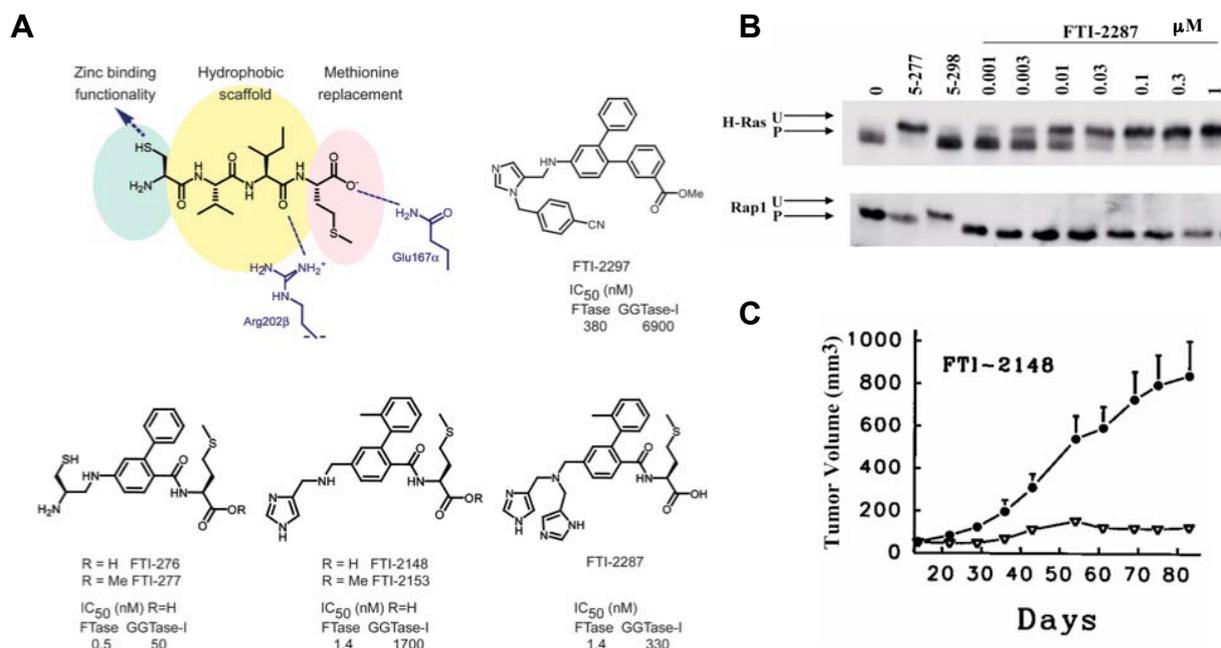


Figure 3. (A) Example of peptidomimetic FTase inhibitors. (B) Inhibition of H-Ras and Rap1A processing in H-Ras-transformed NIH-3T3 cells by FTI-2287. (C) Antitumor activity of peptidomimetics. Xenograft mice implanted with A-549 were treated i.p. with vehicle (●), or FTI-2148 (50 mg/kg/day; △).

ことは前述したように、FTase 阻害剤が腫瘍性 Ras に誘導される無制御増殖を抑制する作用機序に合致する結果であると考えられる。

3. モジュールアセンブリによるたんぱく質外部表面指向型阻害剤の開発

近年 Hamilton により提唱された proteomimetics[6]または Schepartz らの protein grafting[7]によって、ラショナルに設計された人工マクロ分子もしくは miniature-proteins を使うことで、たんぱく質間相互作用を阻害できることが分かってきました。しかし、結合部位選択性、分子量、細胞膜透過性、等の観点から、依然としてこれら基礎研究と実際の創薬研究との間に大きな隔りがあることは否めません。現在私たちは、たんぱく質間相互作用を正もしくは負に制御する道具をできるだけ小さい有機化合物で創ろうとする課題に挑戦しており、部品の集積化（モジュールアセンブリ）に基づく新しい手法を検討しています。次項では、私たちの最初の試みであるアンカー型 GGTase-I 阻害剤研究の例を紹介させていただきます。

3-1: アンカー型阻害剤の Structure-based Design

標的とする酵素（黄）が、活性ポケット（クサビ形の凹）と、その近傍表面に基質認識の際の transient-たんぱく質間相互作用に関わる特徴的な部分構造を持つとする（Figure 5; 上部の浅い凹み）。前者を内部表面、後者を外部表面として、この二つの表面構造を同時に認識するような化合物は、基質たんぱく-酵素のたんぱく質間相互作用を内側と外側表面の2箇所

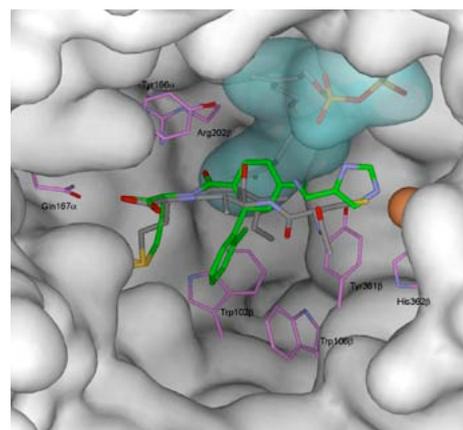


Figure 4. View of the active site of FTase ternary complex with FTI-2148 (green) and FPP (gray with blue surface). The structure of CVIM (gray) bound to the active site is superimposed.

れる。そこで、2箇所表面認識に適切なモジュール分子をそれぞれ設計する。活性ポケットすなわち内部表面認識モジュール（青）としては、既知の阻害剤もしくは基質ミメティクス適用が妥当と考えられ、外部表面認識モジュール（赤）には、その表面サイズと官能基に対して相補的な条件を満たす化合物を考える必要がある。この二つのモジュールを適切な長さのリンカー（緑）で共有結合的に連結した化合物は、内部表面認識モジュールによって活性ポケットにアンカーされ、外部認識モジュールを狙った表面部位に配置するであろう。その結果、ふたつのモジュールのそれぞれの標的部位への結合に伴う ΔG の加算性により、モジュール単独よりも強い親和性を示すと予想される。この方法により、たんぱく質外部表面のみを標的とする分子の潜在的な課題であった結合位置選択性と分子量の問題を改善できると考えた。

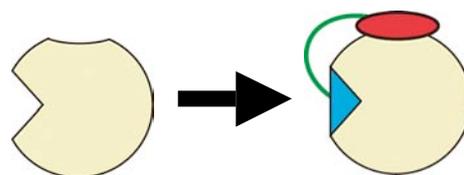


Figure 5. A schematic representation of bivalent enzyme inhibitors targeting interior (active site) and exterior surfaces. The exterior surface area that can be targeted by this strategy may be implicated in transient protein-protein interaction in recognition of the substrates.

3-2: 内部・外部表面同時認識するハイブリッド型 GGTase-I 阻害剤

この仮説を検証するための系として、GGTase-Iに着目した。GGTase-Iの機能はC20-geranylgeranyl基をCAAXに転移させる点ではFTaseと酷似しているが、CAAX配列のXがLeuまたはPheを持つ基質に対して選択性を持つ。GGTase-Iは α/β ヘテロダイマーで、サブユニット

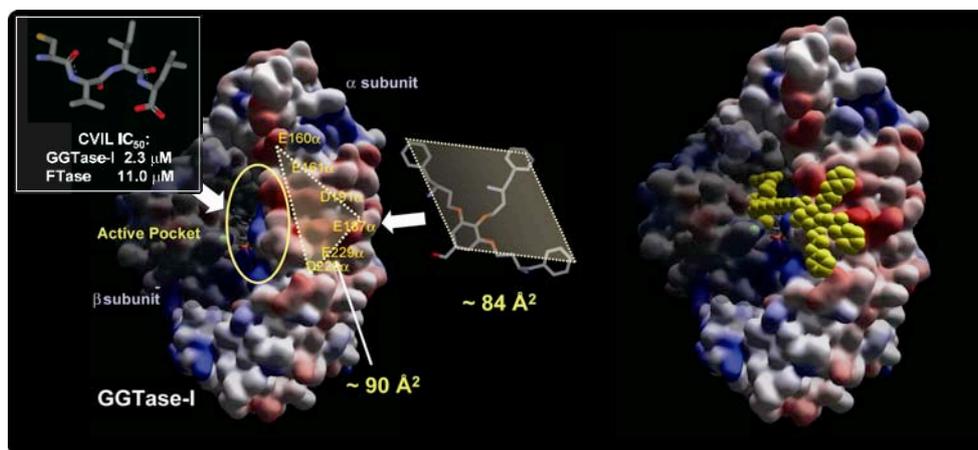


Figure 6. X-ray structure of GGTase-I and the structures of designed modules for binding to the active site and the negatively charged surface. Negatively charged and positively charged surfaces are shown in red and blue, respectively.

Figure 7. A superimposed model of bivalent compound 4 (yellow) and GGTase-I crystal structure.

の境界に活性ポケットを持つ (Figure 6)。活性ポケット近傍表面には Asp, Glu のクラスターが存在し、およそ 90\AA^2 程の酸性領域を形成している。この部分は、K-Ras4B のように CAAX 近傍に塩基性領域を持つ基質たんぱく質と静電的にたんぱく質間相互作用をされると考えられており、GGTase-I はたんぱく質の内部表面（活性ポケット）とその近傍の外部表面の双方を、基質認識に使う酵素とみなすことができる。そこでこのふたつの面に対してモジュールを設計し、ハイブリッド化 (Figure 7) に伴う加算性が実際に認められるかどうか、化合物の分子量の絞込みが可能かどうかの2点に主眼を置き検証した。

内部表面認識モジュールとして天然基質テトラペプチド CVIL を、酸性表面に対して同等な面積を有するアミノ含有安息香酸誘導体をモジュールとし、これらをアルキルスパーサーで連結したハイブリッド型化合物を合成した (Figure 8)。GGTase-I に対する阻害活性を評価した結果 (Figure 9)、ハイブリッド型化合物は GGTase-I の活性を nM レベルで阻害し ($K_i = 0.15\text{-}0.21\ \mu\text{M}$)、対応するモジュール類 ($\text{IC}_{50} = 1.4\text{-}>100\ \mu\text{M}$) と比較して 8 倍から 150 倍以上の活性を示した。

スパーサー長が $n=11$ でベンジル基を持つハイブリッド化合物は $n=3, 5$ の誘導体に比べて著しく

能していることが示された[8]。

以上の結果から、本化合物は非特異的な結合を伴うことなく GGTase-I の活性ポケットをその内部表面認識モジュールで識別して結合していることは明らかであり、その結果としてモジュールの加算性が観測されたことは、外部表面認識モジュールは標的の酸性領域に配置されることを強く支持している。従って、このモジュールアセンブリに基づくアンカー型阻害剤設計によって、標的たんぱく質外部表面に低分子量モジュールを位置選択的に配置させることが可能になり、選択的なたんぱく質相互作用阻害剤の開発につながることを期待される。

4. おわりに

たんぱく質表面は、生物有機化学的興味からも創薬の見地からも非常に魅力的な分子標的ですが、課題は山積していますが、たんぱく質の外側の特異的あるいは共通の表面構造を標的として視野に入れることで、isoform 選択的あるいは dual 阻害剤への可能性も広がると思います。将来 "drug-like" な小さいモジュールを使って細胞内のたんぱく質間相互作用を制御することを目標に、私たちはモジュールアセンブリの研究に取り組んでいます。

謝辞:

寄稿の機会を与えて頂きました編集委員の先生方に深く感謝申し上げます。前半の研究は Yale 大学化学科 Andrew Hamilton 教授と South Florida 大学 Moffitt ガン研究所 Said Sebti 教授の共同研究グループで、後半は、東京学芸大学および大阪大学産業科学研究所医薬品化学研究分野にて行われたものです。関係の諸先生方と学生の皆さんに感謝いたします。

文献:

- [1] Ruffner, H.; Bauer, A.; Bouwmeester, T. *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 709-716.
- [2] Long, S. B.; Casey, P. J.; Beese, L. S. *Structure* **2000**, *8*, 209-222.
- [3] Ohkanda, J.; Lockman, J. W.; Kothare, M. A.; Qian, Y.; Blaskovich, M. A.; Sebti, S. M.; Hamilton, A. D. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 177-188.
- [4] Ohkanda, J.; Buckner, F. S.; Lockman, J. W.; Yokoyama, K.; Carrico, D.; Eastman, R.; de Luca-Fradley, K.; Davies, W.; Croft, S. L.; Van Voorhis, W. C.; Gelb, M. H.; Sebti, S. M.; Hamilton, A. D. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 432-445.
- [5] Ohkanda, J.; Strickland, C. L.; Blaskovich, M. A.; Carrico, D.; Lockman, J. W.; Vogt, A.; Bucher, C. J.; Sun, J.; Qian, Y.; Knowles, D.; Pusateri, E. E.; Sebti, S. M.; Hamilton, A. D. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 482-492.
- [6] Orner, B. P.; Ernst, J. T.; Hamilton, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5382-5383.
- [7] Rutledge, S. E.; Vlokman, H. M.; Schepartz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14336-14347.
- [8] Machida, S.; Usuba, K.; Blaskovich, M. A.; Yano, A.; Harada, K.; Sebti, S. M.; Kato, N.; Ohkanda, J. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1392-1401.

光応答性タンパク質・ペプチドの創製と構造制御

奈良先端科学技術大学院大学
物質創成科学研究科廣田 俊
(hirota@ms.naist.jp)

1. はじめに

タンパク質やペプチドなどの生体分子の構造を高い空間分解能と時間分解能で制御できれば、様々な利用法がある。特に、生体内計測分析や医療への利用が期待されている。そこで筆者らは光応答性タンパク質やペプチドを作製し、これらの分子の構造を光制御するとともに、その光応答性を利用する手法の開発を行っている。本稿では、その研究例をいくつか挙げて解説する。

私たちの体内では、様々なタンパク質が複雑に機能しており、タンパク質が機能するためには特定の高次構造をもつ折れ畳んだ状態を形成することが必須である。実験と理論の両面からタンパク質の構造形成に関する研究が盛んになされており、ストップフロー法などにより比較的遅い時間領域でのタンパク質形成反応の理解が深まった。しかし、ストップフロー法では約 1 ms 程度の不感時間が生じ、タンパク質の構造形成にはいまだ不明な点も多い。このため、1 ms よりも早い初期段階での構造形成反応を追跡する良い手法が必要である。そこで、種々のタンパク質に広く応用できる方法として、光解離性修飾基をタンパク質の折れ畳み反応の追跡に利用する方法を提案している。

また、筆者らはタイプ 3 銅含有タンパク質への酸素結合挙動を調べている。フラッシュフォトリシス法により光照射後の酸素結合速度を観測する際、酸素結合後のタンパク質は光照射前の酸素結合型構造に戻るため、タンパク質への光再照射が可能となりデータの積算が比較的容易である。この研究により、タイプ 3 銅含有タンパク質における酸素結合速度定数や酸素解離速度定数などの詳細な情報を得ている。

最後に、光照射により可逆的に化合物のペプチド金属錯体の立体構造を制御し、その構造変化によって DNA 切断活性を制御する研究例について述べる。複核金属錯体が単核金属錯体よりも DNA の切断活性が高いことに着目し、2 つの金属サイト間の距離を光で制御することによって DNA 切断活性を光制御することを考えた。2 つの銅ペプチド錯体をシス-トランス構造異性化するアゾベンゼンで連結し、トランス体では金属間の距離が比較的大きくそれぞれの金属サイトが単核的に作用するのに対して、シス体では 2 つの金属が接近し複核錯体として DNA に作用する。その結果、シス体がトランス体よりも加水分解による DNA 切断活性が高くなり、DNA 切断活性を光制御することに成功した。

2. タンパク質の折れ畳み反応の追跡

筆者らは、タンパク質の折れ畳み反応を追跡するために、化学修飾により光解離性修飾基をタンパク質の特定の amino 酸残基の側鎖に導入し、得られた修飾タンパク質に光を照射することにより、タンパク質の折れ畳み反応を追跡する手法を提

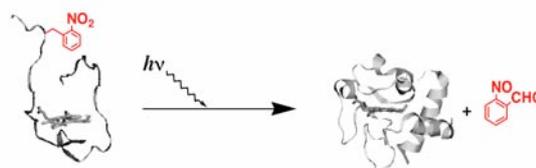


図1. 光解離性修飾基で修飾されたタンパク質の紫外光照射による折れ畳み反応。

案している。この手法では、不安定化した修飾タンパク質にパルス光を照射して、タンパク質から修飾基を瞬時に外すことにより、タンパク質のフォールディング反応を一斉に開始させ、タンパク質の構造形成反応の初期段階を観測する(図1)。

例として、まず発色団としてヘムを有するシクロムc (cyt c) の場合について述べる^(1,2)。cyt c は比較的長い α ヘリックス3本と1巻き半程度の短い α ヘリックス1本からなり、変性状態でもヘムはタンパク質に結合したままである。光解離性修飾基の位置選択的な導入のため、ウマ cyt c に2個存在するメチオニン残基のオルトニトロベンジル化を行った。cyt c のメチオニン 65 (Met65、ヘムに非配位) とメチオニン 80 (Met80、ヘムに配位) を修飾し、その後、Met65 のみが修飾された (NBz-Met65) タンパク質と Met80 のみが修飾されたタンパク質を分離した。

未修飾 cyt c と Met65 修飾 cyt c のグアニジウム塩酸塩による変性の中間濃度はそれぞれ 2.8、1.9 M であり、Met65 修飾 cyt c の立体構造が未修飾 cyt c の立体構造よりも不安定であることが解かった。2M グアニジウム塩酸塩存在下では、未修飾 cyt c 分子はほとんど変性しないが、Met65 修飾 cyt c 分子は約半分が変性した。そこで、2M グアニジウム塩酸塩存在下で Met65

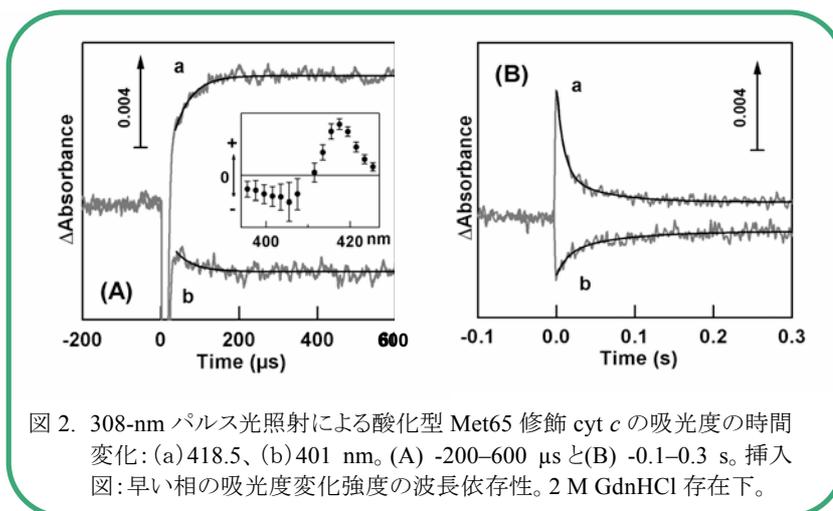
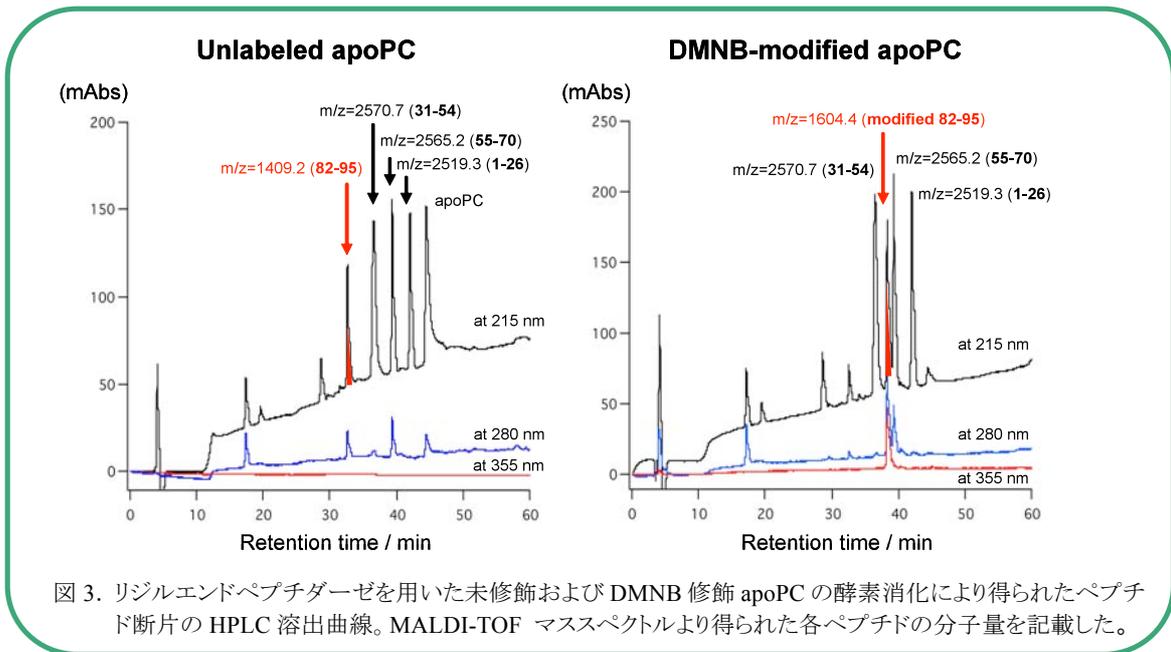


図2. 308-nm パルス光照射による酸化型 Met65 修飾 cyt c の吸光度の時間変化: (a) 418.5、(b) 401 nm。(A) -200–600 μ s と (B) -0.1–0.3 s。挿入図: 早い相の吸光度変化強度の波長依存性。2 M GdnHCl 存在下。

修飾 cyt c に光を照射すると、タンパク質の折れ畳み反応が観測できた。光照射後のヘムのソーレ帯 (401 及び 418.5 nm) の吸光度変化を追跡した結果、時定数、約 50 μ s、10 ms、100 ms の吸収変化の相が観測された(図2)。特に、時定数が小さい約 50 μ s の相の存在を明らかにすることは、タンパク質のフォールディングが如何にして起こるかを解き明かすのに大変重要である。約 50 μ s の吸収変化は構造が崩れた状態のタンパク質の疎水性残基が非特異的に凝集する反応に連動するヘムの環境変化に対応し、10 ms と 100 ms の吸収変化はヘムの軸配位子の変化に対応する。

次に、緑色植物などの葉緑体中に存在する可溶性の電子伝達銅タンパク質であるプラストシアニン (PC) から銅原子を取り除いたアポプラストシアニン (apoPC) を取りあげた⁽²⁻⁵⁾。PC は β シートタンパク質に分類され、8 本からなる 2 つの β シートと 1 回転の α ヘリックスを有し、タンパク質内の唯一のシステイン残基 (Cys84) は銅原子に配位している。Cys84 の硫黄原子は銅に配位しているため、PC から銅を外して得た apoPC の Cys の硫黄原子をオルトニトロベンジル基のジメトキシ誘導体 (DMNB) で修飾した。

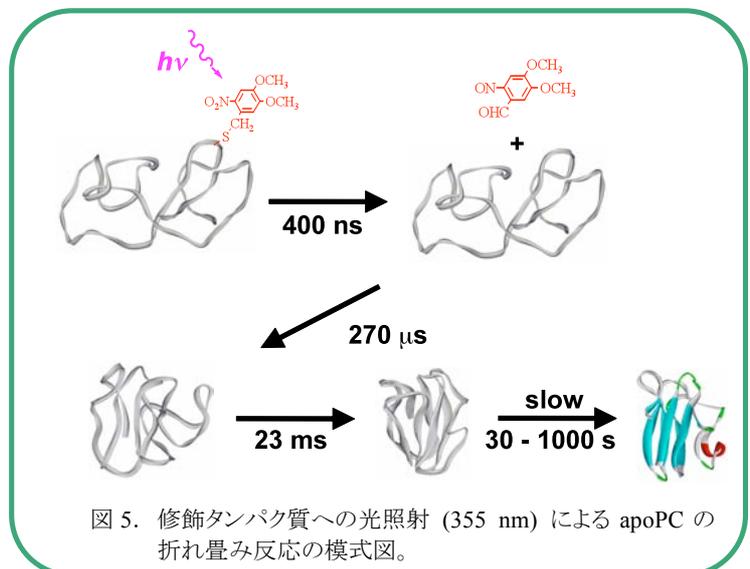
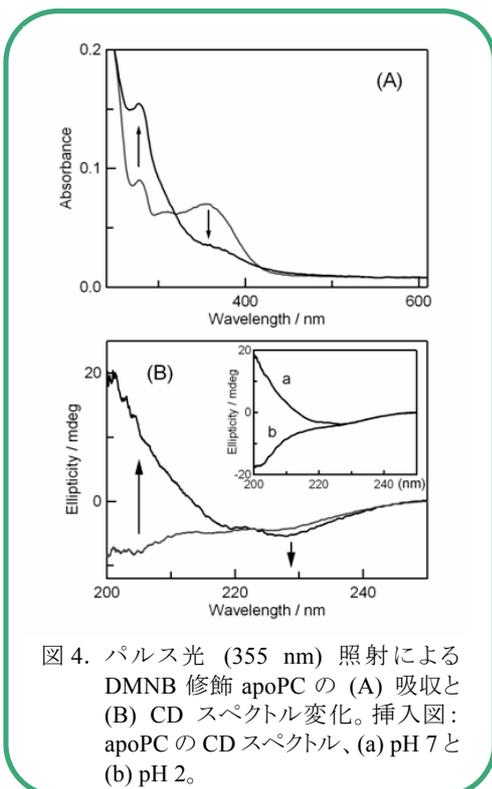
apoPC の修飾部位を特定するために、リシルエンドペプチダーゼにより未修飾および修飾タンパク質の酵素消化を行い、各タンパク質から得られたペプチド断片を HPLC で精製した(図3)。得られた各ペプチド断片の MALDI-TOF マスペクトルを測定し、分子量を決定した。未修飾 apoPC から得られたペプチド断片の溶出曲線で観測された分子量 1409.2 のペプチドに由来するピークは修飾 apoPC から得られたペプチド断片では観測されず、代わりに分子量 1604.4 のペプチドに由来する新しいピークが観測された。修飾により消失したペプチドおよび新しく生じたペプチドの分子量差は 294.8 で、修飾基の分子量に対応していた。また、新しく観測された分子量 1604.4 のペプチドは 355 nm に吸収帯を有していた。修飾タンパク質に特異的に観測されたこのペプチド断片のアミノ酸配列解析を行うとともに、エルマン試薬との反応性を未修飾と修飾タンパク質で比較したところ、apoPC の DMNB 修飾部位が Cys 84 であることが特定された。



修飾 apoPC に 355 nm のパルス光を照射すると、修飾基に由来する 355 nm の吸収帯が減少したことより、光照射により修飾基が apoPC から遊離したことが判明した(図 4A)。一方、未修飾と修飾 apoPC の酸変性状態の CD スペクトルを比較したところ、修飾 apoPC は変性状態であることが解った。また、修飾 apoPC への 355 nm の光照射により、変性状態を示していた CD スペクトルはネイティブ状態の CD スペクトルに戻った(図 4B)。さらに、光照射前後の修飾 apoPC の ¹⁵N-HSQC NMR スペクトルを測定したところ、光照射前の修飾 apoPC のスペクトルは酸変性のスペクトルと類似したスペクトルになり、光照射によりスペクトルはネイティブ状態のスペクトルに変化した。これらの結果より、光照射によりタンパク質が変性状態からネイティブの β シート構造の状態に戻ることが確かめられた。

次に、過渡回折格子法を用いて修飾タンパク質に光を照射したときの反応を追跡した。修飾タンパク質

への光照射により得られた回折シグナルは、まず、強度が急激に増大し、その後、ゆっくり増大するようになり、マイクロ秒の時間領域で減少した。この減衰成分は、熱グレーティング成分であった。ゆっくり増大した成分のタイムスケールは 400 ns であり、この信号の形がグレーティングの波数を変えても変わらなかった

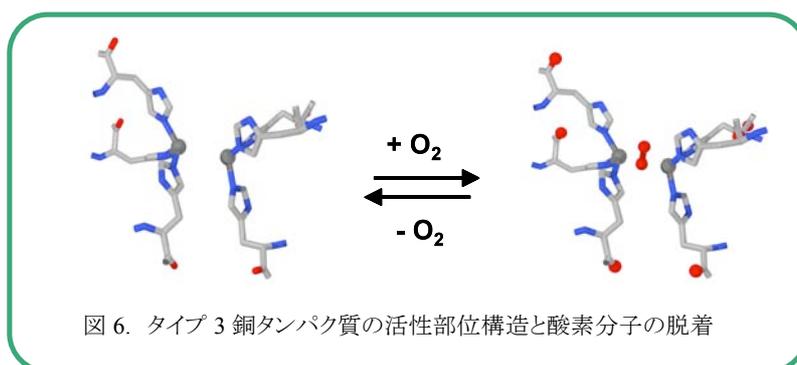


た。このことより、この成分は修飾基がタンパク質から解離するのに対応し、400 ns で修飾基がタンパク質から解離することが判明した(図 5)。照射後、約 270 μ s でタンパク質の体積減少が観測され、この体積変化は変性状態から初期段階での疎水基凝集への変化に帰属できた。さらに、23 ms のタイムスケールで拡散定数が増大することが解り、この変化はタンパク質と水分子の分子間水素結合がタンパク質内の分子内水素結合へと変化したことに対応すると解釈した。

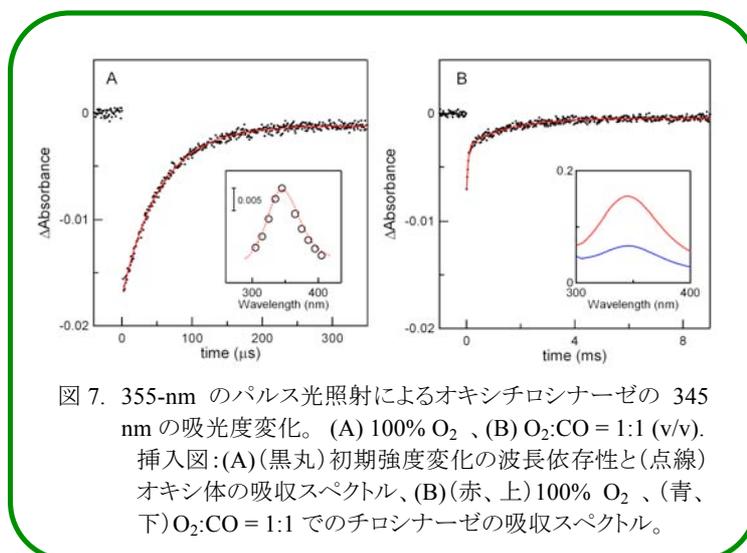
次に、タンパク質への光解離性修飾基導入の応用例として、アルツハイマー病アミロイド β ペプチド1-42 (A β 1-42) を照射によって再生するペプチド前駆体の開発について述べる⁽⁶⁾。A β 1-42 は強い凝集性を示すが、A β 1-42の26 位セリンをO-アシル化されたイソペプチドでは、主鎖の異性化によりA β 1-42 由来の望ましくない凝集性が制御される一方、pH 依存的にO-N 分子内アシル転位反応が起こりA β 1-42 が速やかに生成することが木曾らにより報告されている。このイソペプチドの26番目の Ser に光応答性修飾基を導入し、照射によりA β 1-42を生成することに成功した。このペプチド前駆体は照射前は安定で、照射後にはじめて生成することより、A β 1-42 の発症メカニズムの解明に利用できることが期待される。以上のように、光解離性修飾基を用いてタンパク質やペプチドの構造を制御する手法は多くの生体分子へ応用可能であり、生体分子の構造と機能の有効な研究手段になると期待される。

3. フラッシュフォトリシス法による銅タンパク質の酸素結合挙動の解明

ヘモシアニンやチロシナーゼは二核銅タンパク質であり、その活性部位はそれぞれ 3 つのヒスチジンが配位した銅イオンの対からなる(図 6)。酸素分子は 2 つの銅イオンが両方もとも還元状態(Cu⁺)のとき、銅イオン対の真ん中に 2 つの銅イオンに対して横向きに結合する。タイプ 3 銅タンパク質では、ミオグロビンやヘモグロビンと同様、酸素分子の結合は可逆的に起こる。つまり、高酸素濃度のとき酸素分子は結合し、低酸素濃度のとき解離する。ヘモシアニンは軟体動物や節足動物中に存在し、酸素分子の運搬と貯蔵を行うが、チロシナーゼは結合酸素を活性化し基質を酸化する。



筆者らは、これまでにタイプ 3 銅含有タンパク質であるチロシナーゼにおいて、フラッシュフォトリシス法を用いて、酸素分子が結合するときの吸光度の時間変化を観測することに初めて成功し、酸素結合定数を求めた(図 7A)⁽⁷⁾。酸素結合速度の温度依存性を調べることにより、酸素結合に伴う活性化エンタルピーなどの熱学的パラメーターを求めた。さらに、一酸化炭素がチロシナーゼへの酸素結合を阻害する様子をフラッシュフォトリシス法により観測した。CO 雰囲気下で、オ



キシチロシナーゼから酸素を光解離させると、いったん CO が結合して CO 結合型チロシナーゼが生成し、その後、結合していたCOが酸素と置き換わることによりオキシチロシナーゼが生成する様子が観測された (図 7B)。以上のように、リガンドがチロシナーゼの複核銅部位に結合する様子が観測された。一方、ヘモシアニンの酸素結合挙動を詳しく調べると、酸素親和性が高い R 状態と酸素親和性が低い T 状態に分けて酸素結合挙動を観測することができ、本タンパク質のアロステリック効果を調べるのに大変有効であることが解かった。

4. 光応答性金属錯体の創製と DNA 切断制御

金属錯体は様々な機能を有しており、その一つに DNA や RNA の切断能がある。金属錯体のこの性質は、遺伝子操作、生体構造プローブのデザイン、新しいがん療法の開発などに応用できる可能性が期待され、バイオテクノロジー、薬学などの分野で興味をもたれている。

様々な金属錯体による DNA 切断の研究成果は数多く報告されているが、可逆的に光応答性を示す DNA 切断金属錯体の報告例はあまりない。DNA が切断されると、DNA のコンフォメーションは超らせん型から損傷型 (1 箇所切断)、

直線型 (2 箇所切断) へと順に変化する。制限酵素のうち、タイプ II 制限酵素は DNA のパルンドロームを認識して、特定の位置で DNA を切断する。タイプ II 制限酵素である *Bgl* I などによるリン酸エステルの加水分解過程では、複数の金属イオンが関与していることが明らかになっており、2 つの金属サイトが同時に 1 つのリン酸エステルに作用して、加水分解的に DNA を切断すると考えられている (図 8、右図)。また、複核金属錯体の方が単核金属錯体よりも DNA 切断活性が高いことが解かってきた。以上のことより、2 の金属サイト間の距離が小さいときに DNA 切断活性が向上すると考えられる。

筆者らは 2 つの金属サイト間の距離を光制御することによって、DNA 切断活性を光制御できると考え (図 8)、2 つの CysGly ペプチド銅錯体をシス-トランス構造異性化するアゾベンゼンで連結した⁽⁸⁾。この化合物のトランス体では金属間の距離が比較的大きく、それぞれの金属サイトが単核的に作用するのに対して、シス体では 2 つの金属が接近し複核錯体として作用する。トランス体に 355 nm の光を照射するとシス体に、シス体に 430 nm の光を照射するとトランス体にそれぞれ可逆的に変換させることができた。また期待されたように、シス体はトランス体よりも加水分解による DNA 切断活性が高く、照射するレーザー光の波長を変えることにより DNA 切断活性を光制御することができた (図 9)。以上のように、金属間距離を光制御することにより DNA 切断活性を制御することが可能であるので、今後、さらに高活性な光応答性金属錯体の作製が期待される。

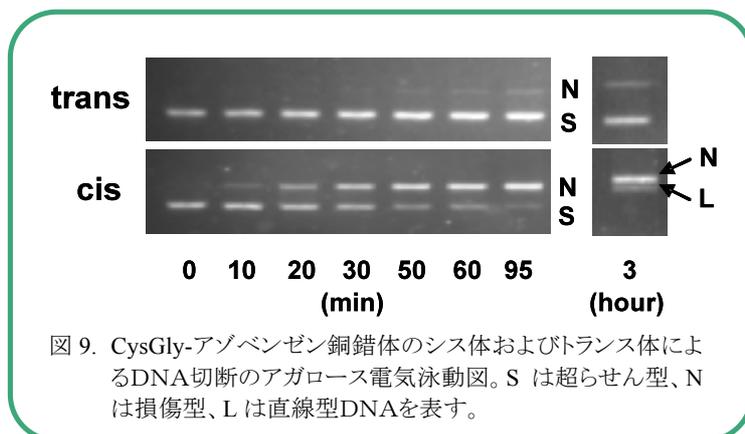
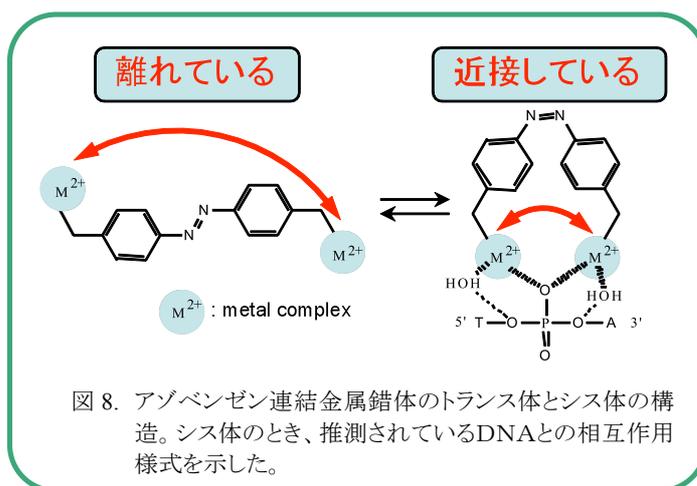


図 9. CysGly-アゾベンゼン銅錯体のシス体およびトランス体によるDNA切断のアガロース電気泳動図。S は超らせん型、N は損傷型、L は直線型DNAを表す。

5. おわりに

本稿で紹介したように、光応答性タンパク質やペプチドを様々な研究に用いることができる。例えば、タンパク質のフォールディング反応を初期段階から観測することができた。特に、apoPC では270 μs で初期の疎水基の凝集が起こり、23 ms で水素結合が分子間から分子内に変化する描像が得られた。タイプ3含有銅タンパク質の酸素結合挙動においては、フラッシュフォトリシス法が有効であることが解かり、アロステリック効果等、リガンド結合に関する新たな知見が得られることが期待される。錯体の機能制御では、銅錯体をアゾベンゼンで連結しその立体構造を光制御することにより DNA 切断活性を制御した。タンパク質やペプチドの構造や機能を光制御することにより、タンパク質やペプチドの構造に関する理解が深まり、様々な利用法が開発されることを期待する。

謝辞

過渡回折格子法の結果は京都大学大学院理学研究科の寺嶋正秀教授および寺嶋研の馬殿直樹博士、Jungkwon Choi 博士との共同研究による成果であり、これらの方々に感謝いたします。また、山内脩名古屋大学名誉教授、渡辺芳人教授(名古屋大学大学院理学研究科)、木曾良明教授(京都薬科大学)、桜井弘教授(京都薬科大学名誉教授、現鈴鹿医療大学薬学部)、安井裕之教授(京都薬科大学)、藤本ゆかり博士(現大阪大学大学院理学研究科)、奥野貴士博士(現京都薬科大学)をはじめとする多くの共同研究者の方々にも感謝いたします。

参考文献

- 1) T. Okuno, S. Hirota, and O. Yamauchi, *Biochemistry*, **39**, 7538-7545 (2000).
- 2) 廣田俊, *生物物理*, **45**, 207-210 (2005).
- 3) S. Hirota, Y. Fujimoto, J. Choi, N. Baden, N. Katagiri, M. Akiyama, T. Okajima, T. Takabe, Y. Funasaki, Y. Watanabe, and M. Terazima, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 7551-7558 (2006).
- 4) N. Baden, S. Hirota, T. Takabe, N. Funasaki, and M. Terazima, *J. Chem. Phys.*, **127**, 175103 (2007).
- 5) T. Yoshidome, M. Kinoshita, S. Hirota, N. Baden, and M. Terazima, *J. Chem. Phys.*, **128**, in press.
- 6) A. Taniguchi, Y. Sohma, M. Kimura, T. Okada, K. Ikeda, Y. Hayashi, T. Kimura, S. Hirota, K. Matsuzaki, and Y. Kiso, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 696-697 (2006).
- 7) S. Hirota, T. Kawahara, E. Lonardi, E. de Waal, N. Funasaki, and G. W. Canters, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 17966-17967 (2005).
- 8) H. Prakash, A. Shodai, H. Yasui, H. Sakurai, and S. Hirota, *Inorg. Chem.*, **47**, DOI: 10.1021/ic8007443 (2008).



気になった論文



姜 貞勲 (かん じょんぶん)

九州大学工学研究院応用化学部門 特任助教

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

この度は生命化学研究レターの執筆機会を頂き心より感謝致します。九州大学工学研究院応用化学部門片山研究室で特任助教をしております姜貞勲と申します。現在は、疾病細胞内情報システムに応答する材料を開発し、それを利用した疾病細胞ターゲティング遺伝子送達システムの創製、特定疾病診断法の確立および疾病細胞情報システム応答型イメージングへの適用に取り組んでいます。また、体液内に存在する疾病標的バイオマーカーの探索も行っています。細胞は外部からの情報を受理、伝達、処理する細胞内情報システムを構築しています。もし、細胞内情報システムの攪乱、あるいは特定のシグナルの制御に破綻が生じると、システムの崩壊に繋がり、その結果は疾病という形で現れます。疾病発症メカニズムを解明し、正確な診断や適切な治療を行うためには、疾病を誘発するシグナルの正体(シグナル変化、活性度、コントロールする上流や下流シグナルなど)を明らかにしなければならないと考えています。そこで今回は、これまでと全く異なるメカニズムによる遠隔臓器への癌転移を報告した論文1報と、癌の遠隔臓器への転移に関わる因子の探索に関する論文2報を紹介させていただきます。

Intercellular Transfer of the Oncogenic Receptor EGFRvIII by Microvesicles Derived from Tumour Cells

K. Al-Nedawi, B. Meehan, J. Micallef, V. Lhotak, L. May, A. Guha, and J. Rak, *Nat. Cell Biol.*, **10**, 619-624 (2008).

日本人の死因の第一位を占めている癌、その死亡原因の多くは遠隔臓器への転移・再発によるものです。一般的に転移とは、癌細胞が原発巣から離れ、血管やリンパ系を介して遠隔臓器に移動・拡散することを意味します。しかし、これと全く異なるメカニズムによる遠隔臓器への癌拡散が発見されました。癌細胞は発癌蛋白質を有する微小水疱(microvesicle)を遊離させ、その微小水疱が正常細胞と結合すると癌化に関連するシグナルを活性化させ、癌を拡散するメカニズムです(図1)。微小水疱は膜マイクロドメインの一種である脂質ラフト(lipid raft)から形成されたもので、著者らは発癌蛋白質含有微小水疱を *Oncosome* と命名しました。また、脳腫瘍細胞膜には上皮増殖因子受容体欠損変異体III(epidermal growth factor receptor variant III; EGFRvIII)が存在し、癌の悪性を誘導します。研究グループは、微小水疱中に大量のEGFRvIIIが存在していることと、そのEGFRvIIIが微小水疱の正常細胞膜近傍

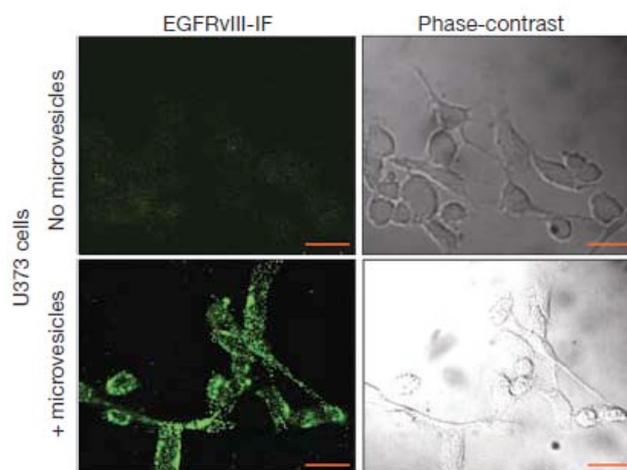


図1. EGFRvIII-GFP 単独または EGFRvIII-GFP 入り微小水疱の添加後、U373 細胞での GFP 発現(論文より抜粋)

は、膜マイクロドメインの一種である脂質ラフト(lipid raft)から形成されたもので、著者らは発癌蛋白質含有微小水疱を *Oncosome* と命名しました。また、脳腫瘍細胞膜には上皮増殖因子受容体欠損変異体III(epidermal growth factor receptor variant III; EGFRvIII)が存在し、癌の悪性を誘導します。研究グループは、微小水疱中に大量のEGFRvIIIが存在していることと、そのEGFRvIIIが微小水疱の正常細胞膜近傍

への遊走を促進することを見出しました。EGFRvIII入りの微小水疱は癌細胞と正常細胞、両方とも融合が可能です。癌拡散の流れとしては、先ず、血中に放出された微小水疱は細胞膜と融合できるまで血流に乗って全身を循環します。その後、細胞膜と融合できれば、EGFRvIIIが宿主細胞膜に入り込み、癌化に必要なシグナルである MAPK と Akt の細胞内シグナル伝達経路を活性化させると同時に、EGFRvIII 関連遺伝子 (VEGEG、Bcl-xL および p27) の発現誘導、細胞膜の変化や足場非依存性増殖能 (anchorage-independent growth capacity) の向上を促して癌拡散を助力します。本論文は、遠隔臓器への癌転移は癌細胞の接着・増殖だけによるのではなく、多重経路により起こることを明らかにしました。今後、血中 oncosome の存在を把握することで、迅速な転移癌診断ができると期待されます。

Endogenous Human MicroRNAs that Suppress Breast Cancer Metastasis

S. F. Tavazoie, C. Alarcon, T. Oskarsson, D. Padua, Q. Wang, P. D. Bos, W. L. Gerald, and J. Massague, *Nature*, **451**, 147-152 (2008).

乳癌の転移メカニズムの解明に向けた遺伝子レベルでの研究から、種々の転移誘導遺伝子が見つかりましたが、その遺伝子発現を制御するネットワーク情報はまだ明らかになっていません。従って、標的遺伝子の発現を転写後段階で抑制するマイクロ RNA (microRNA; miRNA) が癌化および転移の上位制御因子として注目されています。

本論文は、転移性固形癌では特定の miRNA のレベルが正常組織に比べて著しく減少するといった報告を基に、乳癌の転移に関与している miRNA の探索を行いました。転移性乳癌細胞の miRNA を分析すると、非転移性乳癌細胞に比べ特異的に発現がなくなる一群の miRNA (miR-335, miR-126, miR-206, miR-122a, miR-199a* および miR-489) が見つかりました。その内、三つの miRNA (miR-126, miR-206 および miR-335) の発現を回復させると、肺および骨への転移が抑えられました。また、転移性乳癌患者由来サンプルからもこれらの三つの miRNA がなくなっていました。三つの miRNA の転移における役割を調べると、miR-126 の減少は転移された乳癌細胞の成長と増殖を、miR-335 と miR-206 の抑制は乳癌細胞の遊走と浸潤を促進しました。特に、乳癌の転移と強い相関を持つ miR-335 の減少は一群の遺伝子 (COL1A1, SOX4, PTPRN2, TNC および MERTK) の活性化に繋がり、六つの遺伝子が発現している乳癌細胞は高い転移性を示しました。その内、細胞の遊走に関わっている遺伝子 SOX4 と TNC を shRNA または siRNA を用いてノックダウンすると、肺への転移が抑制されました。最後に、著者らは 368 人の乳癌再発患者由来の原発乳癌細胞を調べると、その大半で miR-126 と miR-335 がなくなっており、二つの miRNA の欠損は高い遠隔転移と低い生存率に深く関係していました (図2)。この結果から、miR-126 と miR-335 がヒト乳癌細胞の転移を抑制する miRNA であることが明らかになりました。今後、これらの miRNA は、乳癌の予後予測因子となり、乳癌細胞転移の抑制を目指した抗癌剤や治療法の開発に貢献できると期待されます。

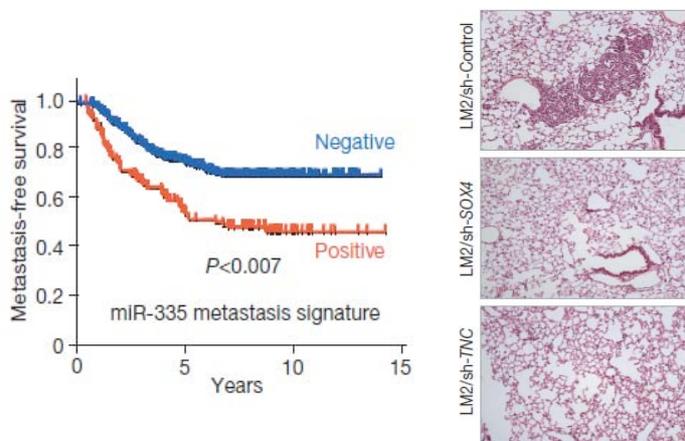


図2. miR-335 と転移なしの生存率との関係(左)、SOX4 と TNC のノックダウンによる肺への転移抑制(右) (論文より抜粋)

SATB1 Reprogrammes Gene Expression to Promote Breast Tumour Growth and Metastasis

H. J. Han, J. Russo, Y. Kohwi, and T. Kohwi-Shigematsu, *Nature*, **452**, 187-193 (2008).

癌の悪性化に伴い細胞内に変化が起り、転移に必要な浸潤や遊走といった性質を獲得するようになりますが、その転移性獲得のメカニズムに関しては殆ど分かっておりません。本論文は、special AT-rich sequence binding 1 (SATB1) 蛋白質が癌の悪性化や転移性獲得に決定的な役割を果たすことを明確にしました。SATB1 は核マトリクス付着領域結合蛋白質で、染色質の再構成やヒストン脱アセチラーゼ複合体の補充により多数の DNA

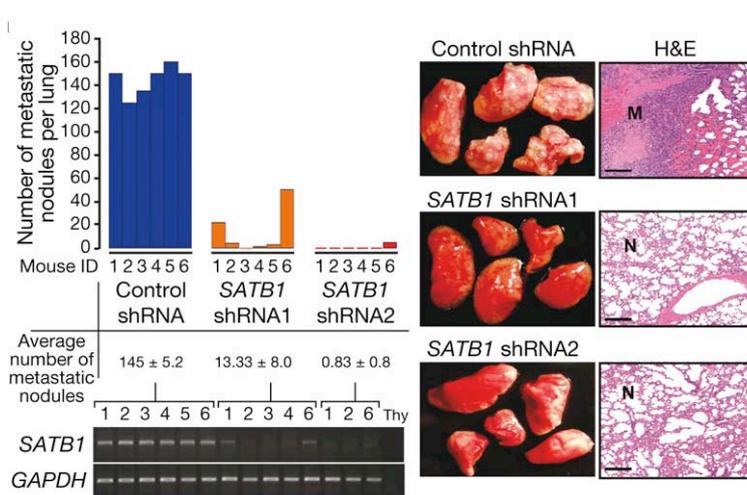


図 3. SATB1 欠損および発現乳癌細胞のマウス投与後、肺への転移 (論文より抜粋)

配列と結合し、幅広い範囲の遺伝子発現を調節するゲノムオーガナイザーです。SATB1 は転移性乳癌細胞でのみ確認され、SATB1 のレベルは患者の予後と密接な関連性がありました。強い転移性を持つ乳癌細胞 (MDA-MB-231) において、shRNA を用いて SATB1 をノックダウンすると、1000 以上の遺伝子活性に変化が起り、細胞の転移能と腫瘍形成能は消失しました。一方、悪性度が低い癌細胞 (SKBR3) に SATB1 を過剰発現させると、悪性度の高い癌の表現型と一致する遺伝子発現のパターンが現れ、癌の転移能は促進されました。SATB1 欠損乳癌細胞を六匹マウスへ尾静脈投与すると、9 週間後に 5 個以下の癌結節が確認されましたが、SATB1 発現乳癌細胞の投与からは、125-160 個の癌結節が確認されました (図 3)。マイクロアレイを用いた分析から、SATB1 は癌細胞転移に深く関連する遺伝子 (metastasin, VEGFB, MMPs, TGFβ1, CTGF など) の発現を促し、転移抑制遺伝子 (BRMS1, CD82, KISS1, NME1 など) の発現は抑制する事実が判明されました。今後、乳癌細胞内の SATB1 活性は、患者の転移リスクや予後の把握に主要な指標になると考えられます。



川上 隆史 (かわかみ たかし)

東京大学大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 博士課程3年

kawakami@cbl.rcast.u-tokyo.ac.jp

この度は、生命科学研究レター「気になった論文」を執筆する機会を与えて頂き、誠にありがとうございます。現在、私は、東京大学先端科学技術研究センターで菅裕明教授のご指導のもと研究を行っております。私の研究内容は、リボソーム翻訳ペプチド合成系に利用可能な新規あるいは有用な (細胞膜透過性、分解酵素耐性など) 非天然骨格基質を発見すること、そして、それを生細胞内の生体分子の機能を制御するための *in vivo* 指向型小分子リガンドの進化分子工学的スクリーニングに応用することになります。

今回、半合成法でタンパク質修飾タンパク質を調製し、その修飾の生物学的機能解析へと応用した論文について一報、内在代謝経路による直交性官能基導入とその選択的修飾反応を利用し、生物個

体の細胞表面糖鎖の時空間的 *in vivo* イメージングへと応用した論文について一報、そして、改良型の量子ドットを調製し、生細胞レセプタータンパク質の蛍光ラベリングへと応用した論文について一報、ご紹介させて頂きたいと思ひます。

Chemically Ubiquitylated Histone H2B Stimulates hDot1L-Mediated Intranucleosomal Methylation

R. K. McGinty, J. Kim, C. Chatterjee, R. G. Roeder, and T. W. Muir, *Nature*, Advanced online publication, (2008).

ヒストンは、真核細胞内においてDNAと共にクロマチンを構成する塩基性タンパク質であり、DNAを自身に巻き付けてコンパクトにする役目を持っています。そのヒストンのN末端は高度に翻訳後修飾(アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化)を受け、その位置および種類特異的に様々なタンパク質と相互作用し、それぞれ特異的な遺伝子発現、抑制を行うことが知られています。

今回紹介する論文は、半合成法を用いて位置選択的にユビキチン化されたヒストンH2Bを調製し、そのユビキチン化が、別のヒストンタンパク質H3の79番目のリシン選択的メチル化酵素(hDot1L)の活性化を介して、そのリシンメチル化を促進するという結果を報告したものです。まず、位置選択的ユビキチン化H3を調製するための方法として、筆者らによって開発された

Expressed protein ligation法(発現タンパク質のC末端チオエステルと化学合成ペプチドのN末端システインの化学選択的縮合反応)を利用しています(図1)。ここで、野生型のユビキチンおよびH2Bには共にシステインが存在しないため、ユビキチン化H2Bの調製には、H2BのC末端断片(1)、ユビキチン断片(2)、H2BのN末端断片(6)の3種類の断片を2種類の拡張型 ligation で連結する方法を利用しています。一つ目は、光分解性 ligation 補助基を用いて、化学合成したH2BのC末端断片(1)のリシン側鎖 ϵ -NH₂とユビキチン断片(2)のC末端をイソペプチド結合で連結するもので(3)、ユビキチンのC末端がGly-Glyであることが効率的かつ *traceless* な(野生型と同じ結合形態の)連結を実現しています。二つ目は、システインからアラニンへの選択的脱硫化を利用するもので、先ほどの化学合成したH2BのC末端断片(1)のN末端は、野生型のアラニンからシステインに変異をさせ、かつ、そのN末端システインを光分解性保護基で保護しているため、光分解性 ligation 補助基の照射による除去と共にそのN末端システインは脱保護されます(4)。そして、H2BのN末端断片(6)との ligation 後(5)、Raney ニッケルによる脱硫化を経ることによって、全長の位置選択的ユビキチン化H2B(7)の調製が達成されています。次に、調製したユビキチン化H2B(7)でヌクレオソーム(クロマチンの構成単位)へと *in vitro* で再構成したものを介してhDot1Lによるメチル化反応解析を行い、H2Bのユビキチン化依存的に、hDot1Lを介したH3のリシン79メチル化が促進されることを示しています。更に、ユビキチン化H2Bで再構成されたヌクレオソームと非ユビキチン化H2Bで再構成されたヌクレオソームを連結したジムクレオソームを用いて、そのメチル化促進がユビキチン化H2Bを持つ

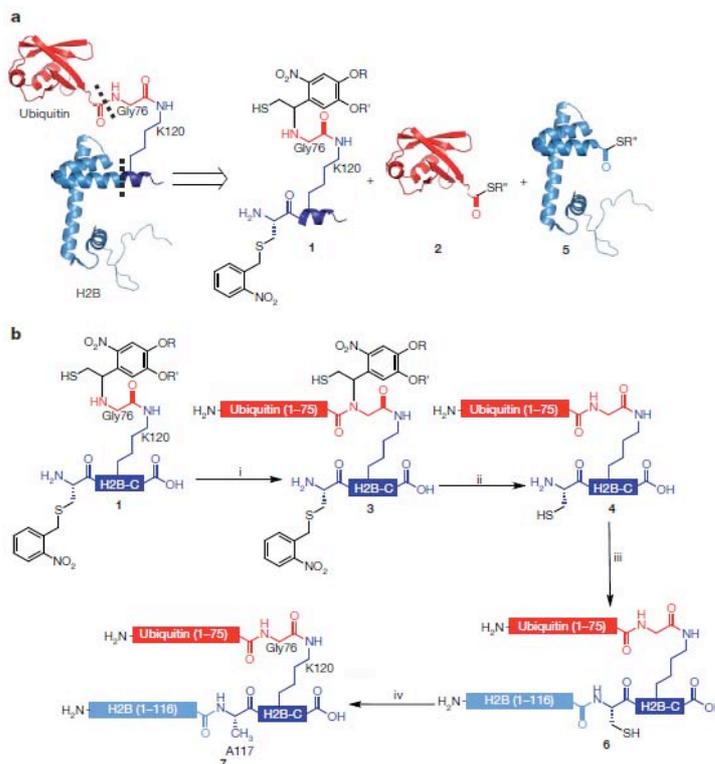


図1. 位置選択的ユビキチン化ヒストンタンパク質の半合成

ヌクレオソームのみに限られることを示しています。今後、その他のヒストンや非ヒストンタンパク質へのユビキチン(あるいはユビキチン様タンパク質)修飾への展開が期待されます。

In Vivo Imaging of Membrane-Associated Glycans in Developing Zebrafish

S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, and C. R. Bertozzi, *Science*, **320**, 664-667 (2008).

細胞表層の糖鎖は、生物個体の発生段階における遺伝子発現変化にともなってその構造がダイナミックに変化するように、生細胞内の生理状態を反映する重要な生体分子です。しかし、タンパク質とは異なり、標準的な遺伝子工学的手法では糖鎖を蛍光ラベル化などで可視化することはできません。

今回紹介する論文では、内在代謝経路を利用して直交性官能基であるアジド基をゼブラフィッシュの細胞表層糖鎖に導入し、また、以前に筆者らによって報告されたアジドとジフロロ化オクチン(DIFO)の Cu-free click chemistry との選択的化学反应を利用して、発生中の糖鎖の *in vivo* 蛍光ラベリングを報告しています(図2)。今回のアジドとの選択的化学反应は、これまでに筆者らなどによって用いられてきた Staudinger 反応や Cu触媒 click chemistry とは異なり、より反応速度が速く、かつ、細胞毒性のない反応である点が非侵襲の生物個体 *in vivo* イメージングの成功を実現しています。まず、アセチル修飾N-アジドアセチルガラクトサミン存在下でゼブラフィッシュ胚の培養を行ってアジド基を細胞表層糖鎖に導入します。そして、受精後の特定の時間ごとに、様々な蛍光波長を持つ蛍光基と DIFO のコンジュゲートを反応させることによって、ゼブラフィッシュ発生過程における糖鎖産生の時空間的な多重蛍光可視化解析を行なっています。その結果、受精後60~72時間において、下あご、胸びれ、嗅覚器における糖鎖産生の上昇、更に、受精後各時間における糖鎖産生レベルの変化とその組織特異性の差異の観察にも成功しています。今後、その他の糖鎖やその他の生体分子の *in vivo* イメージングへの展開などが期待されます。

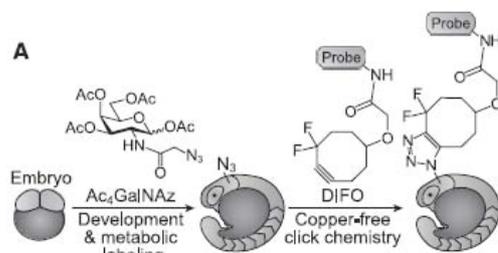


図2. アジドによる代謝ラベリングと DIFO との選択的反応による糖鎖イメージング

Monovalent, Reduced-Size Quantum Dots for Imaging Receptors on Living Cells

M. Howarth, W. Liu, S. Puthenveetil, Y. Zheng, L. F. Marshall, M. M. Schmidt, K. D. Wittrup, M. G. Bawendi, and A. Y. Ting, *Nat. Methods*, **5**, 397-399 (2008).

量子ドットは、可視から近赤外領域に渡ってシャープな蛍光スペクトルを持ち、その高い量子収率や低退色性などの利点のため、生細胞イメージングにおいて優れた性質を持つ蛍光色素の一つです。しかし、その大きなサイズや多価性のため、まだ改良すべき問題点が存在しています。

今回紹介する論文では、筆者らがこれまで報告してきた技術を組み合わせて、サイズがより小

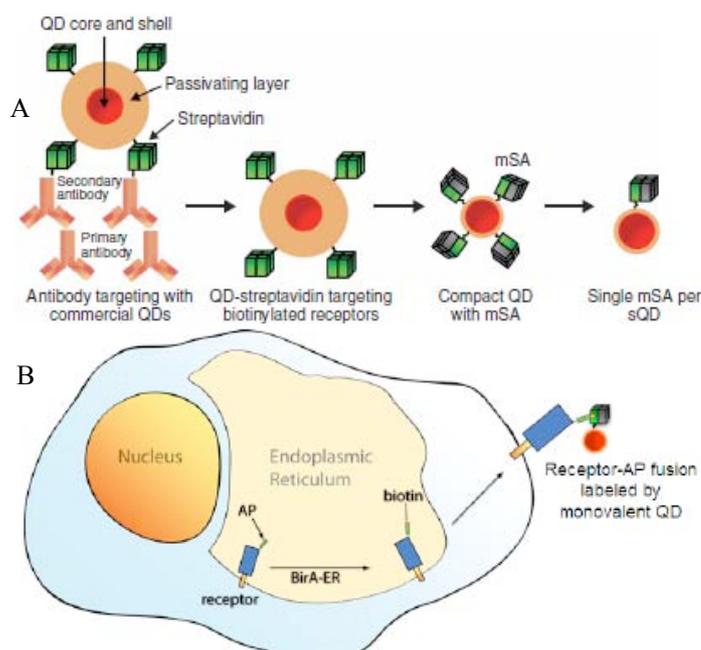


図3. 量子ドット-streptアビジンコンジュゲートを用いたピオチン修飾レセプタータンパク質の蛍光ラベル

さくかつ一価の量子ドットと改変ストレプトアビジンのコンジュゲートを作製し、そして、ビオチン修飾した生細胞レセプタータンパク質への蛍光イメージングへと応用したことを報告しています。まず、ジヒドロリポ酸をベースにした不動態膜を用いてサイズを小さくした量子ドットに、一箇所のビオチン結合部位を持つ改変ストレプトアビジン(mSA)を結合させ、アガロースゲル電気泳動精製により一対一で結合した(一価の)量子ドット-mSAコンジュゲートを作製しています(図3A)。そして、ビオチン化アクセプターペプチド配列と融合させた標的レセプタータンパク質とビオチンリガーゼを共発現させた細胞にその量子ドット-mSAを作用させ、そのレセプターの蛍光ラベルを行なっています(図3B)。このようにしてサイズを小さくした結果、小分子蛍光色素(Alexa Fluor 568)よりは少し劣りますが、市販の量子ドットより高い割合で標的レセプターのオーセンティックマーカールとの強いマージが観察されています。また、一価にした結果、多価の量子ドットと比較して、標的レセプタークラスター化に伴う活性化の影響を減少できたことも報告しています。今後の応用展開が期待されます。



中西 猛(なかにし たけし)

大阪市立大学大学院工学研究科 化学生物系専攻 特任講師

nakanishi@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

この度は、論文紹介コーナーへの執筆の機会を頂き感謝申し上げます。簡単な自己紹介をいたしますと、私は学位取得後、東北大学にて熊谷泉教授の下、抗原抗体相互作用の精密解析、ファージディスプレイ法を用いた抗体の高機能化などに携わってきました。この4月に大阪市立大学に赴任し、井上英夫教授の下で研究を開始いたしました。今後は抗体の洗練された分子認識機構に学びながら、相互作用界面のエンジニアリングによる新規なタンパク質機能の創製を目指して研究を進めていきたいと考えています。

さて、抗体を取得する場合、免疫(あるいは非免疫)ライブラリーなど天然に存在するレパートリーから単離する方法が主流ですが、現在では優れた合成ライブラリーが研究開発され、実績を上げています。それと同時に、欧米のバイオテック企業が主となって、機能性に優れた足場タンパク質(スキャホールド)の開発が盛んに行われており、ライブラリー技術を駆使して創り出される標的分子特異的な人工バインダーは、基礎科学分野だけでなく、医薬分野でも実用化されつつあります。通常、ライブラリー構築においては、多種多様な標的分子に対応できる「汎用性」の高いライブラリーが優秀であると考えられますが、今回は、ある特定の分子群を標的とした、まさしく「スペシャル」なライブラリー設計に関連する論文を紹介させていただきます。

Synthetic Antibody Libraries Focused Towards Peptide Ligands

C. W. Cobough, J. C. Almagro, M. Pogson, B. Iverson, and G. Georgiou, *J. Mol. Biol.*, **378**, 622-633 (2008).

フレキシビリティが高いペプチドに抗体が結合するとき生じるエントロピー損失のために、高い親和性を持つ抗ペプチド抗体の取得は困難であると考えられます。本論文では、ペプチドを標的とした高親和性抗体の獲得に最適化されたライブラリー設計について述べられています。一般的に、タンパ

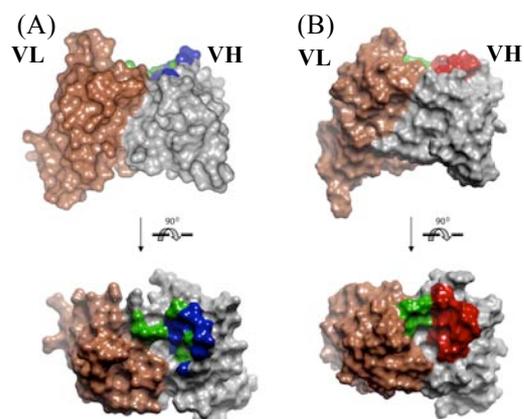


図1. (A) Hu:anti-pep 及び(B) M:anti-pep ライブラリーに関するモデリング構造 (論文より抜粋)

ク質抗原と抗体の相互作用界面は、平らな表面であるのに対して、ペプチドなど低分子に特異的な抗体の抗原結合領域は大きな溝を形成しています。これらの形状は、相補性決定領域 (CDR) のカノニカル構造とループの長さに依存すると考えられます。実際、抗ペプチド抗体の約5割は、同一のカノニカル構造のパターン1-2-4-1-1 (H1-H2-L1-L2-L3)を持ち、CDRの長さにも偏りがあるようです。そこで、著者らは、抗原結合領域の形状に着目し、2種のライブラリー (Hu:anti-pepとM:anti-pep、前者がヒト抗体で後者がマウス抗体です) をデザインしています(図1)。作製した2種のライブラリーでは、いずれも重鎖可変領域 (VH) のみに多様性を創出しています。次に、モデルとして、長さが異なる2種のペプチド、angiotensin (AT, 10アミノ酸残基) と neuropeptide Y (NPY, 36アミノ酸残基) を用いて、ファージディスプレイ法により抗体の選択を行っています。その結果、Hu:anti-pepライブラリーから取得した抗体の多くでは μM オーダーの低い親和性であったのに対し、M:anti-pepライブラリーからは、10-100 nMという高い親和性を持つ抗体 (最も親和性が高い抗AT抗体では14 nM) を取得することに成功しています。2つのライブラリー間で単純な比較はできないと思いますが、M:anti-pepライブラリーで使用した抗体スキャホールドの特徴として、前述のカノニカル構造のパターンに一致すること、ループの長さが抗ペプチド抗体と類似すること、などを挙げています。それでは、今回作製した合成ライブラリーがペプチド特異的な抗体を獲得するために効率的なライブラリーであると結論付けられるかについて、著者らは、対応する汎用的なライブラリーが存在しないために、評価は難しいとしながらも、VHのみに多様性を導入したライブラリーから nM オーダーの親和性を持つ抗体の取得に成功したことを強調しています。残念ながら、今のところ、親和性では免疫ライブラリーから取得した抗体に及ばないようですが、VLにも多様性を導入した次世代ライブラリーを作製中であるようなので、今後に期待したいと思います。

Designed Armadillo Repeat Proteins as General Peptide-Binding Scaffolds: Consensus Design and Computational Optimization of the Hydrophobic Core

F. Parmeggiani, R. Pellarin, A. P. Larsen, G. Varadamsetty, M. T. Stumpp, O. Zerbe, A. Caflisch, and A. Plückthun, *J. Mol. Biol.*, **376**, 1282-1304 (2008).

次にご紹介するのは、ペプチドに対するバインダーの創製を指向したスキャホールドのデザインに関する研究です。スキャホールドとして用いているのは、アルマジロリピートと呼ばれる約42アミノ酸残基から成る繰り返し配列で、一つのリピート配列は、3本の α -ヘリックスで構成されています (図2A)。基本設計については、同じグループが先行して開発しているアンキリンリピートを用いたものと類似しています (詳しくは*Nat. Biotechnol.*, **22**, 575-582 (2004)をご参照ください)。N末端とC末端には、疎水性コアが露出するのを防ぐために、キャップとなるような配列を用意し、その内側にライブラリー化したリピート配列を挿入します。アルマジロリピートタンパク質は、伸びた状態のペプチド鎖と相互作用することが知られているため、ペプチドに対するバインダーのスキャホールドに適しており、1つのリピート配列で2残基を認識します (図2B)。図2Cに示すように、選択操作により、特定の短いペプチド鎖を認識できるリピート配列を同定することができれば、それらを組み合わせることによって、新たに選択操作を行うことなく、長いペプチド鎖を認識させることができると考えられます。このような設計概念のもと、(1)

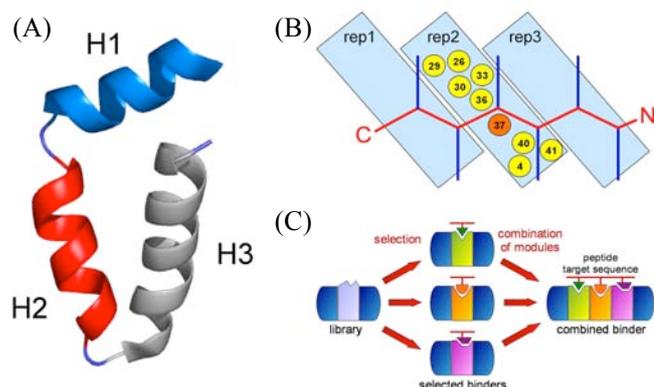


図 2. アルマジロリピートの構造と標的ペプチドに対する結合様式 (論文より抜粋)

大腸菌での生産性が高い、(2)単量体である、(3)熱安定性が高い、(4)システインを含まない、などの条件を満たす、アルマジロリピートタンパク質を創り出すために、コンセンサス配列に基づいて、設計しています。その結果、内部リピート配列として、3種類 (Type I or T or C) を作製しています。また、N末端、C末端のキャップ配列としては、同じくコンセンサス配列に基づいてNaとCa、酵母由来のNyとCyをそれぞれ作製しています。これらの配列を組み合わせて、大腸菌発現系により調製したところ、NyとCaを両端に持つリピート配列が可溶性タンパク質として大量発現することを確認しています。さらに、Type Cと組み合わせたものは単量体として存在し、期待される二次構造を検出できたのですが、変性過程において協同性を示さないことから、正しい三次構造を形成せず、モルテングロビュール様の状態であることを示しています。そこで、疎水性コアを最適化するために、コンセンサス配列に基づいて変異を導入し、それらの変異体群について、エネルギー最小化を行い、そのスコアを基に選択した変異体を調製しています。作製した変異体では、協同性を観察できたことから、正しく三次構造を形成していると結論付けており、前述の条件を満たすアルマジロリピートタンパク質の創製に成功したといえます。今後は分子表面に存在するアミノ酸残基への変異導入により、ペプチドに対する指向性を示すライブラリー構築が期待されます。

Two-Dimensional Surface Display of Functional Groups on a β -Helical Antifreeze Protein Scaffold

M. Bar, T. Scherf, and D. Fass, *Protein Eng. Des. Sel.*, **21**, 107-114 (2008).

最後に、材料表面を特異的に認識するバインダーを指向したスキャホールドの研究開発についてご紹介します。近年、半導体をはじめ非生体材料に結合するペプチドがコンビナトリアルケミストリー技術によって作製されていますが、単離されたペプチドにはコンセンサス領域は見出されず、その組成こそが重要であると考えられています。そこで、著者らは、氷の結晶面を認識し得る不凍タンパク質に着目し、材料表面など二次元的に配列化された標的に対するスキャホールドとして、適しているのではないかと考えています。本研究で用いている昆虫由来の不凍タンパク質 THP (Thermal Hysteresis Protein)は、 β -ヘリックス構造を有しており、 β -シートで構成される同一平面にトレオニン残基が存在し、それらの規則的な配置が氷結晶の認識に重要となっています (図3)。

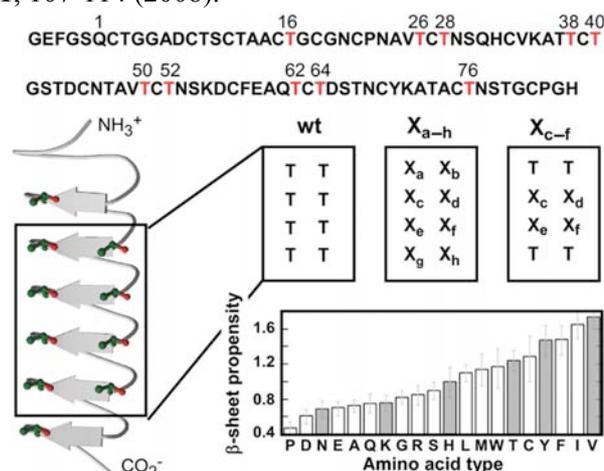


図3. THPのアミノ酸配列と立体構造(論文より抜粋)

不凍タンパク質 THP (Thermal Hysteresis Protein)は、 β -ヘリックス構造を有しており、 β -シートで構成される同一平面にトレオニン残基が存在し、それらの規則的な配置が氷結晶の認識に重要となっています (図3)。そこで、これらのトレオニン残基を他のアミノ酸残基に置換し、新たな相互作用界面を創り出すことで、材料表面特異的な認識素子を作製できるのではないかと考えられます。本論文では、その前段階として特定のアミノ酸に置換した変異体を作製し、それらの二次構造、熱安定性等の諸性質について検討しています。この THP は、84残基中16個のシステイン残基を含むジスルフィド結合に富むタンパク質であるにもかかわらず、大腸菌発現系で高い発現効率を示しています。さらに熱安定性も高く、アミノ酸置換に対しても寛容であることが、CD スペクトル、NMR などの解析結果から明らかになっています。今回の研究では、THP 変異体の材料認識能について評価していませんが、材料表面の認識素子としてどのような機能を発揮するのか、今後の展開に期待したいと思います。

後半にご紹介した2種のスキャホールドから生み出されるバインダーの機能は未知数ですが、それらの特徴的な相互作用界面において、どのような分子認識機構が実現するのか、大変興味深いと考えています。

生命化学研究法

蛍光異方性測定

徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部 中田 栄司
(nakata@bio.tokushima-u.ac.jp)

京都大学大学院工学研究科合成生物専攻 浜地 格
(ihamachi@sbchem.kyoto-u.ac.jp)

蛍光異方性について¹⁾

蛍光異方性測定は、生体物質間の相互作用解析（複合体形成・解離・分解・高次構造の変化）をリアルタイムかつ高感度に測定することができる測定法であり、検体の基板への固定化などの手間が必要なく、生体物質間の結合の強さを簡便に評価することができる手法として、種々の相互作用解析のみならず、医薬品のスクリーニングなど幅広い分野において活用されている。そこで、まず以下に、蛍光異方性測定の測定原理について概説する。

液体中の蛍光性分子は、偏光した励起光によって励起されると、同一の偏光方向の蛍光を放射することが知られている。しかし、励起された蛍光性分子が、励起状態中に回転などの運動を行った場合には、励起光とは異なった偏光方向に蛍光を放射することになるため、結果、蛍光の偏光は解消される。²⁾このような分子の運動は、蛍光性分子の大きさに依存する。すなわち、蛍光性分子が低分子の場合には、運動速度が速いため、放射した蛍光の偏光が解消され、蛍光異方性は小さい値を示す。一方、高分子である場合には、運動速度が遅いため、偏光が解消されにくくなり、蛍光異方性は大きな値を与えることになる(図1)。また、偏光解消の程度は、溶媒の粘性など蛍光分子が存在するマイクロ環境にも依存することが知られている。

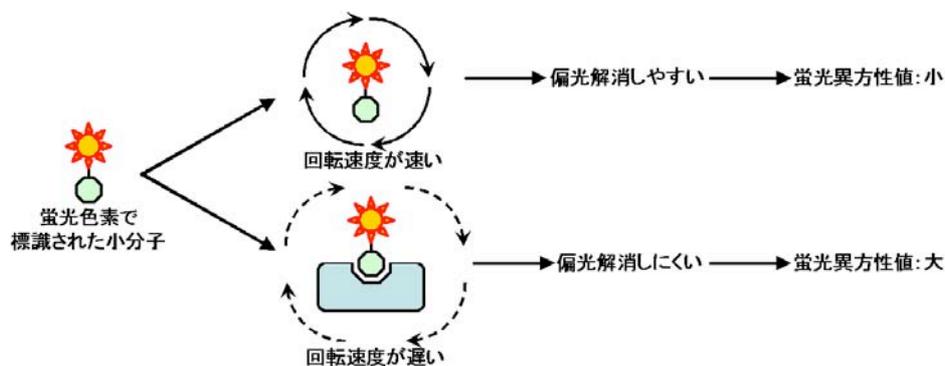


図1. 蛍光偏光解消の原理

このように蛍光異方性値 (r) は分子の回転緩和時間に比例するため(式1)、測定条件(温度・粘度)を一定にしておくことで、蛍光異方性の大小の測定によって分子サイズの大小を判別することが可能となる。

$$r \propto \rho = \frac{3 v \eta}{k_B T} \quad (\text{式1})$$

ρ : 回転緩和時間 η : 溶媒の粘度
 v : 分子の大きさ T : 絶対温度
 k_B : ボルツマン定数

次に、蛍光の異方性の測定の実際を図2に示す。励起光と発光の偏光測定のためには偏光板を用いた蛍光測定を行う。具体的には、垂直方向あるいは水平方向に偏光している励起光を試料に照射し、それぞれ垂直及び水平方向に偏光した発光を偏光板（モノクロメーター）を介して観測することで、 I_{VV} , I_{VH} , I_{HV} , I_{HH} の4種類の組み合わせの発光強度を得る。

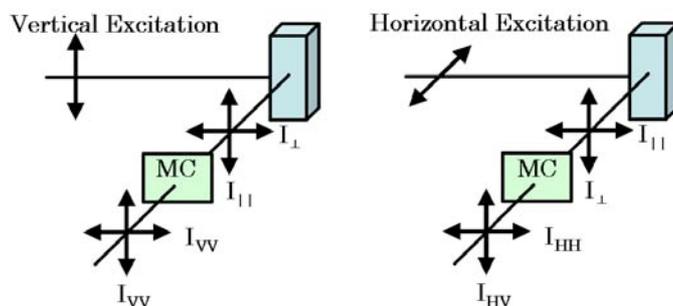


図2. 蛍光異方性測定の大略図 (MC: モノクロメーター)

これらの値を元に蛍光異方性 (r) は式2で算出される。

$$r = \frac{I_{VV} \cdot G I_{VH}}{I_{VV} + 2G I_{VH}} \quad (\text{式2})$$

I_{VV} ＝鉛直方向の偏光で励起したときに鉛直方向で観測される蛍光強度

I_{VH} ＝鉛直方向の偏光で励起したときに水平方向で観測される蛍光強度

ここで、 G 値は発光分光器の設定波長に依存する補正值であり、以下の式3によって求められる。実測値の G 値が1からずれている場合は補正をおこなうべきである。

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (\text{式3})$$

I_{HV} ＝水平方向の偏光で励起したときに鉛直方向で観測される蛍光強度

I_{HH} ＝水平方向の偏光で励起したときに水平方向で観測される蛍光強度

このようにして蛍光異方性値 (r) を算出することで、分子量の増減を伴うような生体物質間相互作用（例えば抗原-抗体、リガンド-レセプター、DNA-蛋白質や糖-レクチンなどの結合・解離過程の評価やプロテアーゼによる分解反応、フォールディングや変性過程など）を解析することが可能となる。

なお、文献でしばしば用いられる蛍光偏光度 (P) は、蛍光異方性値 (r) と以下の式4で表される関係にある。

$$P = \frac{3r}{2 + r} \quad (\text{式4})$$

蛍光異方性測定における留意点

実際に蛍光異方性測定をおこなうにあたっては、蛍光標識した分子をあらかじめ用意する必要がある。このとき、実験条件が許すならば、異方性の変化が評価しやすいように系を構築することをお勧めする。すなわち、分子量が小さい物質を蛍光標識し、それと高分子量の物質が相互作用をす

る系を構築することで、蛍光標識物質単独と複合体形成時の分子量の差が大きくなるため、蛍光異方性の変化幅が大きくなる。これを逆にしてしまうと、蛍光標識された物質を基準とした複合体形成時の見かけの分子量変化が小さくなるために、蛍光異方性値の変化も小さくなってしまい、精度の高いデータを得られないことがある。

蛍光異方性を測定する際には、まず蛍光標識分子単独の場合に、 I_{HV} と I_{HH} のそれぞれをある発光波長について測定し、式2により補正值 G を算出する。そして蛍光標識分子との親和性を評価したい分子（こちらは蛍光標識不要）を滴定しながら、適時鉛直方向の励起光で励起し、蛍光側の鉛直方向で観測される蛍光強度 (I_{VV}) および水平方向で観測される蛍光強度 (I_{VH}) を一定の波長に対して測定し、得られた値を式1に代入して、蛍光異方性値 (r) を算出することになる。ここで留意すべき点としては、蛍光異方性値の変化は、溶媒の粘性の変化や分子間の非特異な会合などの要因によっても変化しうることである。そのため、滴定においては、同一の溶媒組成で評価されるべきである。また、複合体形成後に蛍光非標識の分子を過剰に添加することで、蛍光異方性値が初期値に戻ることを確認することで、測定系と得られた滴定データの正当性を確認することが出来る。

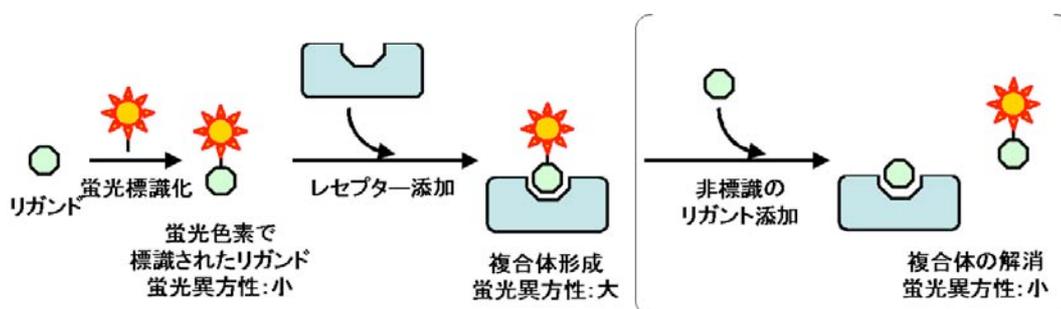


図3. 蛍光異方性測定の評価スキーム

なお、蛍光異方性測定は、普通の蛍光測定装置に偏光付属装置を取り付け、偏光フィルタを手動で動かしながら蛍光異方性スペクトルを測定することも可能だが、大変な作業である（以前はそうやっていましたが・・・）。現在では、偏光フィルタを搭載し、自動的に測定できるようにセットアップされた蛍光測定装置（一例として Perkin 社製 LS55 (図4)) やハイスループットな解析を可能とするプレートリーダー型も市販されており、これらを用いると大変便利である。



図4. Perkin 社製 LS55 蛍光測定装置

蛍光異方性測定の実際

ここでは、実際の蛍光異方性測定例として我々の実験系を紹介する。

(1) リン酸化蛋白質を認識する小分子レセプターによるリン酸化蛋白質-蛋白質間相互作用の阻害過程の解析³⁾

我々はこれまでに、2核の Dpa/Zn 錯体がスペーサーを介して連結された小分子レセプターが、蛋白質上に離れて位置する2つのリン酸基を架橋して強く相互作用することを見出している。そこで、適切なスペーサー骨格を有する小分子レセプターが、リン酸化蛋白質とアダプター蛋白質との蛋白質間相互作用を、阻害できるのではないかと期待し、この結合/解離過程を蛍光異方性測定により評価した。評価にあたって、リン酸化蛋白質-蛋白質間相互作用のモデル系として Pin1 蛋白質由来の WW domain (約 40 kDa) とその結合基質である RNA ポリメラーゼの C 末端ドメイン (CTD) の一部を構成するリン酸化ペプチド (pS6,9 peptide(約 12 kDa)) を採用し、図 5 に示すような実験系を構築した。

まず、蛍光色素としてテトラメチルローダミンを分子量の小さい方、すなわち pS6,9 peptide に修飾した。このローダミン修飾 pS6,9 peptide (Rho-pS6,9 peptide) に対して、WW domain を添加しリン酸化ペプチド-アダプター蛋白質複合体を形成させ、次いで小分子レセプター (3,3'-Zn(Dpa)-Biph) を添加し、各過程の蛍光異方性の変化を評価した。Rho-pS6,9 peptide に対して WW domain を添加すると、見かけの分子量増大による r 値の増加が確認され、良好に複合体が形成していることが示唆された。一方、この複合体に 3,3'-Zn(Dpa)-Biph を添加すると、r 値の顕著な減少が確認され、複合体が崩壊していることが明らかになった。すなわち、3,3'-Zn(Dpa)-Biph が WW domain と Rho-pS6,9 peptide 間の複合体形成を阻害していることが、蛍光異方性測定から、明確に示された。

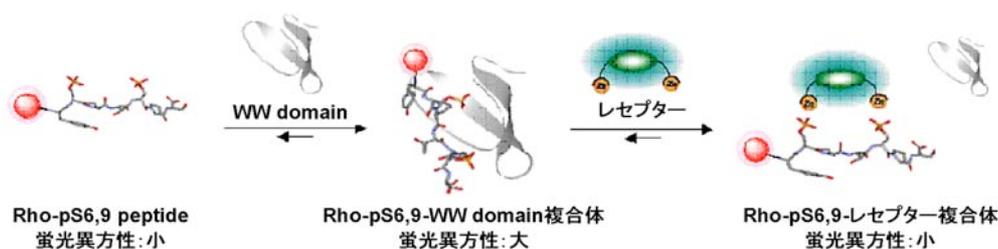


図 5. レセプターを用いたリン酸化蛋白質-蛋白質間相互作用の阻害スキーム

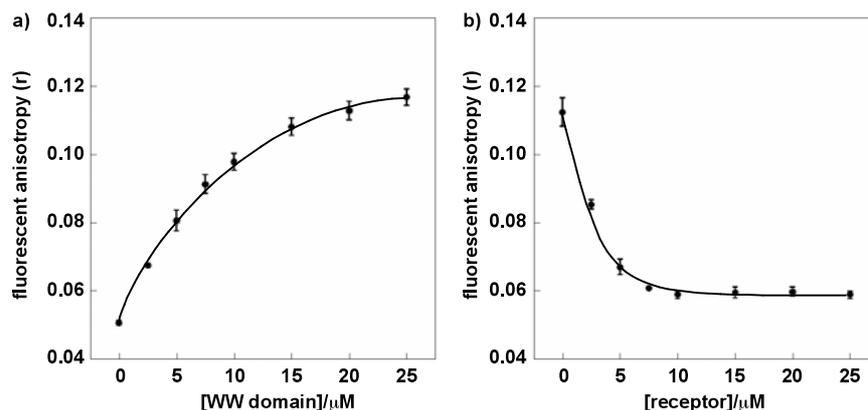


図 6. a) Rho-pS6,9 peptide (5 μM) に WW domain を添加した際の蛍光異方性変化 b) Rho-pS6,9 peptide (5 μM)-WW domain(25 μM)複合体にレセプター分子を添加した際の蛍光異方性変化

(2) 蛋白質の局所でのリガンド認識に伴う蛍光分子マイクロ環境/運動性変化の観測：(蛍光性バイオセンサーの応答機構解明)⁴⁾

我々はこれまでに、化学修飾法に基づく蛋白質の活性中心近傍への機能性分子の選択的な導入方法として、(光)アフィニティーラベル化法を基本としたユニークな手法である P-(P)ALM 法 ((光)

アフィニティーラベル化後修飾法: Post-(Photo) Affinity Labeling Modification) を開発している。本手法の特徴の一つとして基質の認識前後において最も構造変化を受けやすい活性中心近傍を活性を保持したまま選択的に加工することが可能な点が挙げられ、そのアプリケーションの一つとしてマイクロ環境変化に感受性の高い蛍光色素を修飾することで、リガンドの結合を蛍光強度変化によって読みだすことができる蛍光性バイオセンサーの構築に成功している (図7)。我々は、このリガンド結合に伴う蛍光応答機構を解明するために、リガンド添加に伴う蛍光異方性値の変化を評価した。P-PALM 法によりフルオレセインをレクチンの一種である Con A に導入した FI-Con A は、Con A の良好なリガンドとして知られる糖種である Man3 の添加に伴い、蛍光強度が飽和挙動をとりながら減少し、約 30% 程度の蛍光強度の減少が確認される (図 8a))。Con A に Man3 を添加していった際の蛍光異方性値の変化も同様に飽和挙動をとりながら減少し、 r 値が 0.21 (Man3 結合前) から 0.13 (Man3 結合後) まで減少した (図 8b))。この結果は、フルオレセインの微視的環境が、糖結合前においては運動性が抑制された状態にあり、Con A が Man3 を結合することによって自由な分子運動が可能な環境へと変化したことを示唆している。すなわち、フルオレセインが Con A の糖結合部位が形成する疎水的環境に存在した状態から、糖の結合に伴って親水的かつ自由な環境へ移動していることを示唆している。この結果は、糖添加に伴うフルオレセインの吸収スペクトル変化の評価からも支持されている。このように、蛍光異方性測定は、大きな分子量変化を伴わない場合でも、運動性の変化が顕著な場合などには有益な情報を与えてくれることがあるので、丁寧な実験でデータをとってみる価値はある。

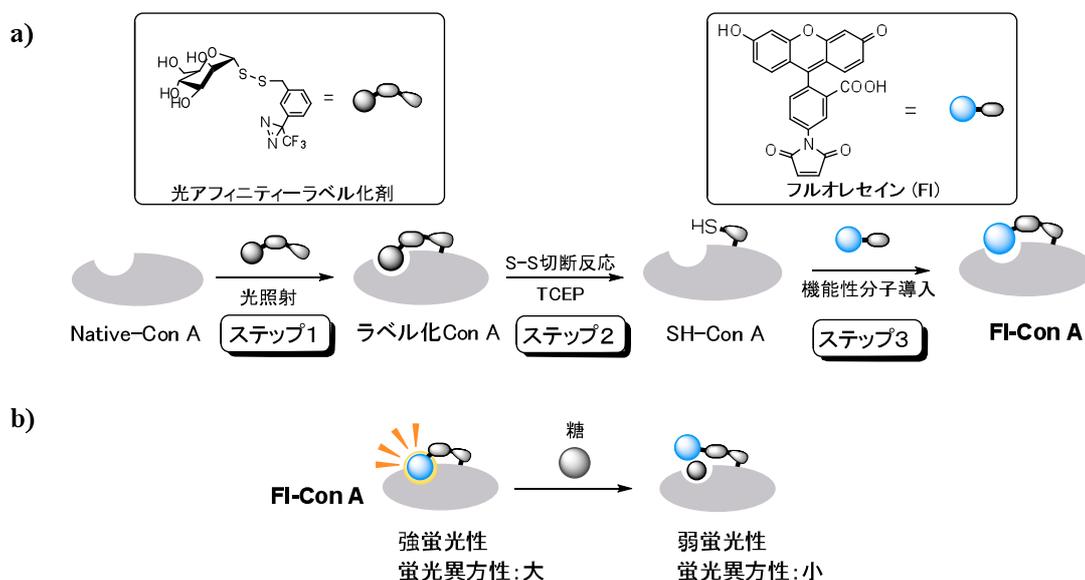


図7. a) 光アフィニティーラベル化後修飾法 (P-PALM 法)による FI-Con A の調製スキーム、
b) FI-Con A の糖認識に伴う蛍光変化および蛍光異方性変化のスキーム

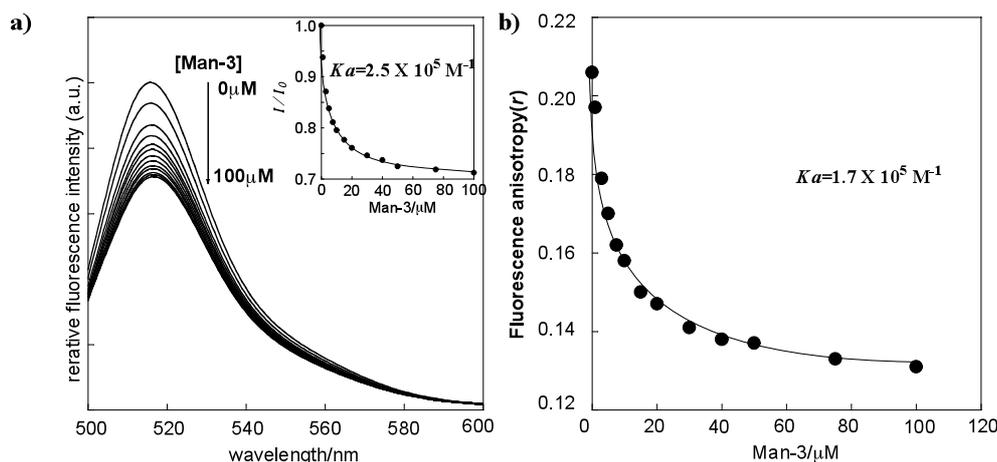


図8. a) Man3 添加に伴う Fl-Con A の蛍光変化 (挿入図) Man3 濃度に対する相対蛍光強度(I/I_0)プロット、 b) Man-3 濃度に対する蛍光異方性変化プロット (両滴定曲線から得られる結合定数の値はほぼ一致している。)

おわりに

以上、生体分子間相互作用測定法の一つとしての、蛍光異方性測定の概要を紹介した。前述したように蛍光異方性測定では、溶液中での測定であり基板への固定化や反応後の精製などの手間が必要ないため、迅速かつ簡便に、かつリアルタイムで分子間相互作用が解析できるというメリットが有る一方、蛍光色素による標識が必須であるため、蛍光標識位置の選定や導入方法などの工夫や検討が必要となる。また、系内に未標識分子が存在する場合、それ自身が阻害能を示すことになるため、標識後のサンプルの十分な精製も求められる。そのため、(これは蛍光異方性測定に限ったことではないが)異なる手法/原理による分子間相互作用解析法と組み合わせることで、より正確かつ相補的な実験データを得る慎重さが求められる。

参考文献

- 1) a) J. R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy Third Edition, Springer, (2006). b)木下一彦・御橋廣眞編, 蛍光測定 生物科学への応用, 学会出版センター, (1983)
- 2) 蛍光の偏光に影響を与える因子としては、①蛍光分子の回転運動の他にも、②分子の配向分布や③蛍光分子間の励起エネルギー移動が知られている。詳しくは参考文献1)を参照されたい。
- 3) a) Ojida, A.; Mito-oka, Y.; Inoue, M.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6256. b) Ojida, A.; Inoue, M.; Mito-oka, Y.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10184. c) Ojida, A.; Mito-oka, Y.; Sada, K.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2454. d) Ojida, A.; Inoue, M.; Mito-oka, Y.; Tsutsumi, H.; Sada, K.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2052.
- 4) a) Hamachi, I.; Nagase, T.; Shinkai, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12065. b) Nagase, T.; Shinkai, S.; Hamachi, I. *Chem. Comm.* **2001**, 229. c) Nagase, T.; Nakata, E.; Shinkai, S.; Hamachi, I. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3660. d) Nakata, E.; Nagase, T.; Shinkai, S.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 490. e) Koshi, Y.; Nakata, E.; Hamachi, I. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1349. f) Nakata, E.; Koshi, Y.; Koga, E.; Katayama, Y.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13253. g) Takaoka, Y.; Tsutsumi, H.; Kasagi, N.; Nakata, E.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3273. h) Nakata, E.; Wang, H.; Hamachi, I. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 25. i) Wakabayashi, H.; Miyagawa, M.; Koshi, Y.; Takaoka, Y.; Tsukiji, S.; Hamachi, I. *Chem. Asian J.*, **2008**, in press
- 5) 蛍光標識した分子が一つ構築できれば、それを用いた競合阻害滴定により、ライブラリーの簡便なスクリーニングが可能なのは大きなメリットとして挙げられる。



Max-Planck 研究所 (Max-Planck Institute of Molecular Physiology, Dortmund) 留学体験記

東北大学大学院 薬学研究科 創薬化学専攻 反応制御化学分野
COEフェロー 吉田 将人

私は2006年3月に東京工業大学大学院 理工学研究科 応用化学専攻 高橋孝志教授、土井隆行准教授(現東北大院薬 教授)のもとで学位を取得し、同年5月よりドイツ・ドルトムントの Max-Planck 研究所 Prof. Waldmann 研究室に約2年間博士研究員として留学していました。現在は東北大学大学院 薬学研究科において、COEフェローとして研究を行っております。この度、留学体験記の執筆の機会を頂きましたので、2年間の留学期間で感じたことやドイツでの生活などについてご紹介させて頂きたいと思います。

1. ドイツ・ドルトムントという街について

ドイツは日本より飛行機で12時間、ヨーロッパの中央部に位置します。国の面積は意外にもそれほど大きくなく、日本の面積とほぼ同じ面積であり、緯度的には北海道と同じもしくは北に位置します。北海道よりも北に位置すると言ってもそこまで寒くはなく(もちろん南部地方の山沿いは寒いですが)、稀にやってくる大嵐を除いては1年通して非常に穏やかな気候です。私の留学先であるドルトムントはルール川に面し、人口約75万の中堅都市です。ご存知の通り、ルール川一帯は以前から鉄工業が発達し、周辺には炭坑などが多く存在していました。しかし、第2次世界大戦の空爆によってルール川一帯、特に当時は周辺地域で大都市であったドルトムントは都市面積の90%が焼失するという被害にあいましたが、戦後の復興により現在ではビールとサッカーの街として発展しています。記憶に新しいところでは2006年にサッカーワールドカップが開催され、ドルトムントでも日本対ブラジル戦を始め、数多くの試合が行われました。私がドイツに留学した年が偶然にも開催年で、この4年に1度の祭典を観戦することができました。運が良ければ留学先でこのような幸運にも恵まれるみたいです。またご存知かと思いますがドイツは四季折々に様々なイベントが催され、特にクリスマスの時期はドイツ国内のどの都市も色とりどりに街中が飾られ、盛大にクリスマスを祝います。街の様子については、また後ほどもう少し書かせて頂こうかと思います。

2. Max-Planck 研究所とは

私の留学先は、冒頭にも書かせて頂きましたが Max-Planck 研究所でした。Max-Planck 研究所とは全体の総称であって母体となる団体の正式名称は Max-Planck Gesellschaft (以下MPG)と言います。この組織は80にも及ぶ研究所から成り立っており、研究内容も化学や生物のみならず様々な分野の研究が行われています。MPGのホームページによると12000人以上の職員と9000人以上の博士研究員や学生が所属しており、この人数は一つの研究機関としては非常に大きなものと言えます。私はその中の一つ、Max-Planck Institute of Molecular Physiologyというドルトムントに所在を置く研究所の Prof. Waldmann 先生の研究室に2年間お世話になりました。

先にも書きましたが Max-Planck 研究所では、博士研究員だけではなく数多くの博士課程の学生さんも研究を行っています。しかし、Max-Planck 研究所自体は彼ら学生に対して学位を与えることができません。そのため、Max-Planck 研究所内で研究室を主宰している先生方は、ほとんどの場合近隣の大学の教授

職を兼任しており、そのため多くの学生が大学側から研究所へ通っています。ほとんどの研究所では様々な最新鋭の機器類を常時利用することができるため、雇用されている研究員のみならず学生も非常に充実した環境で研究を行うことができます。



Max-Planck 研究所の外観



研究所前から見た大学の化学棟

3. Prof. Waldmann 研究室の研究、そして留学して感じたこと

Waldmann 研究室では天然有機化合物をモチーフとした小分子化合物のライブラリー合成やライブラリー合成から得られた高活性化合物をプローブ化し、生物現象を解明する化学生物学的な研究を中心に行っています。Waldmann 研は Waldmann 先生を筆頭とし、11名のグループリーダー、約30名の博士研究員、そして約40名の学生によって構成されています。秘書さんや技術補助の方などを含めると約100名強の大所帯です。各グループはライブラリー合成チーム、活性評価チームといった感じでお互い連携をとりながらそれぞれ研究を行っていきます。私は天然物の全合成、および化合物ライブラリーの構築を目的とした固相合成法の開発を中心に研究を行っていましたが、多数の研究者が所属していることもあり各個人の研究内容も様々で、有機化学のみならず生物学をメインとして研究をしている方もいます。冒頭に述べた研究だけではなく、生理活性化合物の固定化技術やそれに基づく活性化合物の高速評価法の開発、また化合物を合成していく上で基盤となる金属触媒を利用した合成反応の開発や天然物の全合成など様々な研究を行っています。

Waldmann 研は基本的にはドイツやヨーロッパ諸国からの人々が7割を占めるのですが、残り3割がアジアからの留学生および博士研究員でした。その中でもインド人と中国人の人数が多いことに驚かされました。彼らは「職に就く前に一度海外で経験を積むことは大事なことで、それは将来の糧になる」と言い、むしろ学位を取得してすぐに就職するのはもったいないとまで言われました。単純に日本と国の総人口を比べたら、インドや中国の方が圧倒的に多いのでその比率から留学生の数も多いのかと思いますが、彼ら自身がそういう意識、つまり積極的に外に出る意識を持っているからこそ留学生の総数が多いのだと感じました。これは私がいた研究所に日本人が私のみだったからそう感じたのかも知れませんが、現役の学生さんには海外に出るチャンスがきっとあるはずなので、そのチャンスを活かしてもっと外でいろんな経験をして良いのではと思います。

4. ドルトムントでの生活

ドルトムントは同じルール川地域に属するデュッセルドルフやエッセン、また近郊のミュンスターなどと比較すると、そこまで観光都市ではありません。しかし、ビールやサッカーにかける情熱は他の大都市にも負けない凄まじいものがあります。ドイツではほとんどの都市でその街特有のビール、つまり地ビールがあるの

ですが、ドルトムントは他の地域を遥かに凌ぐ種類と量を生産しています。そのため同じ市内に住んでいても好みのビールの銘柄は人それぞれ違い、住んでいた家の大家さんと飲んだときは好きなビールの銘柄について話すことがしばしばありました。

また、サッカーの応援も熱狂的です。ドルトムントにはボルシア・ドルトムントという地元サッカーチームがあります。拠点の Signal Iduna Stadion は8万人収容のスタジアムで、これはドイツで一番大きいと言われています。それゆえチームを応援する人の数も非常に多く、試合の日はチームのユニフォームを着た人々が街中に溢れ、そして街の印象も勝った日と負けた日で違います。熱狂的ゆえ、負けた日は苛立っている人が多い気がしました。「片手にはビール瓶を持って飲みながらスタジアムに行き、地元チームを応援して帰って来る」、日本ではあまり見られない光景ですがいかにもビールとサッカーを愛するドイツらしいスタイルでした。

クリスマスの時期はドルトムントの街が一変します(個人的な感想ですが)。街中は華やかに飾られ、クリスマスの装飾品やクリスマス限定の飲食物を売る屋台が建ち並びます。特に圧巻なのは街の広場に立てられるクリスマスツリーです。広場に立てられたクリスマスツリーを紹介する看板によると、高さは世界一でその高さは52メートルだそうです。普段のドルトムントは飾ることの無い、言い方を変えればドイツらしい質素な雰囲気をもつ街ですが、イベントの時期は一変して華やかに生まれ変わるといった様々な顔を持ち、私にとってドルトムントは研究だけではなく日常の生活も楽しむことができる非常に住みやすい街でした。



ボルシア側の応援スタンド
熱狂的なファンで埋め尽くされています



2007年のクリスマスツリー
頂上の飾りは毎年変わり、この年は天使でした

5. おわりに

2006年5月にドイツに留学してからあつという間に2年という月日が過ぎていきました。2年という期間は長い様に思いましたが、非常に短かったというのが今の感想です。この期間に得られた経験は今後の自分に活かしていかなければならないと思っています。



帰国前日、Waldmann 先生と



同部屋のメンバーと帰国前のお別れ会

赴任当初から暖かく接して頂き、非常にお忙しい身でありながら、いつも快く時間を割いてディスカッションをして下さった Waldmann 先生には非常に感謝しております。また、Max-Planck 財団および Alexander von Humboldt 財団より助成をして頂き、問題なく研究を行うことができました。ここにお礼申し上げます。さらに同部屋で夜遅くまで研究を行った仲間達がいたからこそ、研究のみならず日常生活においても楽しい2年間を送ることができました。最後になりましたが、ドイツでの生活を何不自由無く送ることができたのは妻の支え、そして様々な面で助けて頂いた大家さんの Stang 夫妻のお陰でした。ここに感謝するとともに、お礼を申し上げます。

よしだ まさひと masahito@mail.pharm.tohoku.ac.jp





シンポジウム等会告

第7回 国際バイオ EXPO・バイオフィォラム

会期:2008年7月2日から4日

会場:東京ビッグサイト

詳細・申し込みは、ホームページ(<http://www.bio-expo.jp/jp/>) をご参照ください。

代表的な特別講演セッション

1) iPS 細胞研究と応用の最前線

座長:京都大学 物質-細胞統合システム拠点 拠点長 中辻 憲夫

「iPS 細胞の可能性と課題」

京都大学 iPS 細胞研究センター センター長/再生医科学研究所 教授
山中 伸弥

「ヒト iPS 細胞技術の創薬への応用」

iZumi Bio, Inc., Chief Scientific Officer
桜田 一洋

2) ナノバイオ研究が拓く未来医療と次世代がん治療 ～医工連携が加速するナノテク臨床応用～

座長:名古屋大学 総長補佐 (研究推進担当) 工学研究科 教授 馬場 嘉信

「ナノ治療イノベーションを実現する超分子ナノデバイス設計」

東京大学 大学院工学系研究科 マテリアル工学専攻 教授
東京大学 ナノバイオ・インテグレーション研究拠点リーダー
片岡 一則

「癌治療に向けた NCI のナノテクノロジー研究

～ナノテクノロジーに基づいた次世代診断・治療ソリューションを目指して～」

National Cancer Institute, NCI Alliance for Nanotechnology in Cancer, Director
Piotr Grodzinski

高分子学会九州支部フォーラム

主題: 自己組織性高分子

<趣旨> ボトムアップ型ナノテクノロジーの発展のためには、「自己組織化による高分子の創製」、ならびに、「高分子を自己組織化させる技術の開拓」が必要不可欠です。本支部フォーラムでは、自己組織性高分子に関する研究において最前線でご活躍されている西日本の若手研究者をお招きし、ご講演と熱い討論をしていただきます。研究講演会後に懇親会を予定しておりますので、情報交換や交流の場としても是非ご活用ください。

主催 高分子学会九州支部

共催 九州大学 高分子機能創造リサーチコア

日時 平成 20 年 8 月 2 日 (土) 13:00~17:40

会場 九州大学 伊都キャンパス ウェスト 4 号館 3 階 4 番講義室(314 室)

<13:00~14:40>

1) メタル化ペプチドを用いる金属の精密集積制御

(京大化研・JST さきがけ) 高谷 光

2) 2次元平面上での鎖状高分子のコンホメーション・配向挙動

(奈良先端大物質創成) 内藤昌信

<14:50~15:50>

3) 小分子の自己組織化に基づく機能性ナノ粒子の創製

(九大院工) 西藪隆平

4) 塩橋形成を利用した相補的な二重らせん高分子の構築

(ERATO 超構造プロ・現九大先導研) 前田壮志

<16:00~17:40>

5) 分子集合体が切り拓く新たなナノサイエンス: 分子デザインと機能

(神戸大院理・JST さきがけ) 津田明彦

6) ロタキサン構造を組み込んだSAMおよびポリウレタンの設計とその特性評価

(長崎大院生産科学) 村上裕人

参加要領 1) 定員 60名 2) 参加費 無料 3) 懇親会費(2000円程度)は当日徴収します。 4) 申込方法 氏名・所属・学年(役職)・E-mail アドレス・懇親会参加希望の有無 を E-mail または Fax でお知らせください。

申込先 〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744 番地 九州大学大学院工学研究院 応用化学部門 松浦 和則 FAX 092-802-2839 E-mail: ma14tcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp



Japanese Society for Biomaterials

日本バイオマテリアル学会 第3回関西若手研究発表会のご案内と演題募集

以下の要領で第3回関西若手研究発表会を開催いたします。できるだけ多くの医・歯・工学系大学院生・若手研究者の方々に研究成果を発表していただきたく、積極的なご参加をお待ちしております。特に初めて学会発表される方のご参加を歓迎いたします。本会は関西地区の若手会員が主体となって運営しておりますが、他の地区からも積極的にご参加いただけたらと思います。

主催： 日本バイオマテリアル学会 関西ブロック
日時： 平成20年8月7日(木)10:00~18:00
場所： 関西大学 第4学舎(理工学府)3号館 3402,3403 室
交通アクセス：<http://www.kansai-u.ac.jp/Guide-j/access.html>
学内地図：<http://www.kansai-u.ac.jp/Guide-j/mapsenri.html>

参加費： 本学会の会員・非会員に関わらず無料。

発表申込： ①氏名・学年(または職位), ②所属(機関・部署・所属研究室名), ③連絡先(住所・電話・FAX・E-mail), ④発表演題(聴講のみで参加の場合, その旨記入⑤⑥不要), ⑤発表者全員の氏名(演者に○印), ⑥希望発表形式(口頭 or ポスター)⑦ミキサー参加の可否, を明記の上, を 6月27日(金)までに下記まで電子メールにてお申込みください。発表申込していただきました方に詳細をご連絡いたしますが, A4版1ページの抄録の締切が7月15日(火)となります。

申込先： 関西大学 化学生命工学部 化学・物質工学科
日本バイオマテリアル学会 第3回関西若手研究発表会事務局(担当:大矢裕一)
〒564-8680 大阪府吹田市山手町 3-3-35
E-mail: yohya@ipcku.kansai-u.ac.jp, Tel: 06-6368-0818, Fax: 06-6339-4026

備考： 発表形成は口頭(質疑込 15分程度)・ポスターを受け付けておりますが, 申込件数により調整させていただくことがございます。プログラムの詳細は7月初旬にお知らせします。研究発表会終了後, ミキサー(懇親会)の開催を予定しておりますので, こちらにも是非, ご参加いただきますようお願いいたします(参加費:お一人1000円程度)。

FORUM: CARBOHYDRATES COMING OF AGE「糖質の時代がやってきた」 FCCAグライコサイエンス若手フォーラム2008

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。以下の招待講演をお聞きした後、講師の先生方をお囲みした懇親会、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。また、企業にお勤めの方でしたら商品の説明でも構いません。経験のある研究者の聴衆としての参加も歓迎しております。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。

主催: FCCA

HP: <http://www.gak.co.jp/FCCA/indexj.html>

日時: 2008年8月21日(木)~22日(金)

会場: (財)筑波学都資金財団 筑波研修センター 第1研修室

茨城県つくば市天久保1-13-5(電話:029-851-5152(代))

内容:

1. 招待講演

笠井献一先生(帝京大薬)「糖はどのように発生し、どのように生命と共進化したのか?」

伏信進矢先生(東大院農)「糖質ホスホリラーゼとビフィズス菌のヒトミルクオリゴ糖代謝」

2. 若手研究者(学生も含む)による一般講演及びポスター発表

3. 交流会

定員: 50名

参加費: FCCA会員 無料、非会員 一般2,000円、学生1,000円

旅費申請: 本FCCAセミナーへの参加者は川口基金(<http://www.gak.co.jp/AN/kkfundJ.html>)からの旅費の補助申請が可能です。

申込締切: 平成20年7月25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: (独)農研機構 食品総合研究所 仁平高則(E-mail: tnihira@affrc.go.jp)

* 詳細および過去の開催記録はホームページでもご覧になることができます。

FCCAサイバースペース (<http://www.gak.co.jp/FCCA/indexj.html>)

グライコサイエンス若手の会 (http://www.geocities.jp/y_glycosci/)

若手フォーラム: 代表・東 伸昭(東大院薬)

グライコサイエンス若手の会: 代表幹事・仁平高則(食総研)

第5回 分子インプリンティングに関する国際ワークショップ

(MIP2008、神戸)

さて、2008年9月7-11日の5日間、第5回分子インプリンティングに関する国際ワークショップ (The Fifth International Workshop on Molecular Imprinting, MIP 2008, Kobe)が開催されます。過去4回は英国及び仏国にて開催されておりましたが、今回始めてアジアで開催される記念すべき会となります。つきまして、皆様からの講演申込み(口頭/ポスター)及びご参加をぜひともお願いしたくご案内を差し上げる次第です。大学院生のための若手のセッションもあり奨励賞を授与することになっていますので、大学院生の発表も歓迎いたします。なお、詳細はホームページにて公開しておりますのでご覧頂ければ幸いです。

(http://fmc.scitec.kobe-u.ac.jp/~mip2008/index_j2.htm)

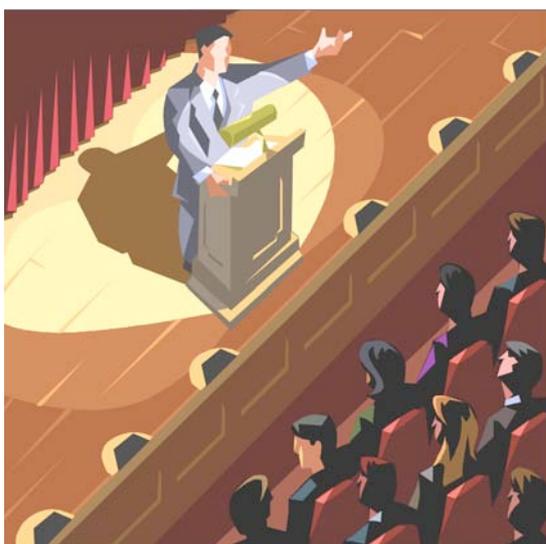
問い合わせ・連絡先: 松井 淳

甲南大学 理工学部

甲南大学 先端生命工学研究所 (FIBER)

(Phone) 078-435-2507

(Fax) 078-435-2766



第3回バイオ関連化学合同シンポジウム2008

(第23回生体機能関連化学シンポジウム、第11回バイオテクノロジー部会シンポジウム、
第11回生命化学研究会シンポジウム、第4回ホスト-ゲスト化学シンポジウム)

主 催: 生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、フロンティア生命化学研究会、ホスト-ゲスト・超分子化学研究会

共 催: 日本化学会、東京工業大学生命系G-COE教育研究拠点

会 期: 2008年9月18日(木)、19日(金)、20日(土)

会 場: 東京工業大学 すずかけ台キャンパス
(〒226-8501横浜市緑区長津田町4259)

発表申込締切: 6月23日(月)

予稿原稿締切: 7月22日(火)

参加登録(予約)締切: 8月4日(月)

内容: 生体機能、バイオテクノロジー、生命化学、超分子包接化学に関する日本化学会2部会・2研究会の合同シンポジウム。

発表形式: 口頭、ポスター

*1つの会場で各日の午後1時から3時をポスター、それ以外を口頭発表(15分発表、5分質疑、3会場)とする。

*口頭発表は原則として1研究室1件まで。但し、申込は2件まで可。この場合は発表優先順位をつけ、2件目の採否は実行委員会の判断による。

参加申込方法: 4月末から公開予定のWEBサイト(<http://www.joint-sympo.org/>)から発表申込、予稿原稿の提出、参加登録のすべての手続を行う。

部会講演賞: 生体機能関連化学部会あるいはバイオテクノロジー部会のいずれかの部会員になって1年以上が経過し、受賞時40才以下の部会員が対象。賞応募申請は発表申し込み時点で受付を行う。

参加登録費: 8月4日(参加登録(予約)締切)まで・・・部会員:一般5,000円、学生4,000円、
非部会員:一般7,000円、学生5,000円

8月5日以降・・・上記の各参加種別に2,000円プラス。

*いずれの価格にも予稿集代金が含まれています。

*予稿集の事前送本は予定していません。事前に予稿原稿の閲覧ができるよう、PDFでの限定公開を計画しています(9月8日以降)。

懇親会: 9月19日(金)。費用6,000円(必ず事前に申込のこと)。

連絡先: 実行委員長 岡畑 恵雄

(〒226-8501横浜市緑区長津田4259 B-53 東京工業大学 大学院生命理工学研究科 生体分子機能工学専攻) Tel: 045-924-5781, Fax: 045-924-5836, E-mail: yokahata@bio.titech.ac.jp

お知らせコーナー

受賞のお知らせ

松浦 和則(九州大学大学院工学研究院 応用化学部門)
平成20年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞
「生体分子の自己集合による新しいナノ分子集合体構築の研究」

松浦 和則(九州大学大学院工学研究院 応用化学部門)
第10回花王研究奨励賞(化学・物理学分野)
「生体分子のプログラム自己集合による新しいナノ構造体の構築」



会員異動

国嶋 崇隆
金沢大学医薬保健研究域薬学系 生物有機化学研究室 教授
〒920-1192 金沢市角間町
TEL and FAX: 076-264-6201
E-mail: kunisima@p.kanazawa-u.ac.jp

平野 義明
関西大学化学生命工学部化学・物質工学科 教授
〒654-8680 吹田市山手町3-3-35
TEL: 06-6368-0974
E-mail: yhirano@ipcku.kansai-u.ac.jp

編集後記

4年前に初めて15号の編集作業に携わり、はや4年計5回目の編集作業に携わることとなりました。編集委員の最大の特権はみなさんに先んじて原稿に目を通し勉強できることです。今回も大変興味深く、時には賛同しうなずき、時には関心し思わず声を上げながらの楽しい編集作業を経験させていただきました。実は今回が責任者としての編集作業は最後となります、多くの筆者の方々には勿論のこと前編集委員の石田さんや原田さん円谷さんをはじめ多くの方に支えられ毎回何とか発行に辿り着いた気がします、改めてお礼申し上げます。後任には熊本大学の井原敏博さんが当たってくれます。レターは読者のみなさんのサポート無しでは立ち行きません、今後とも積極的な支援をお願いいたします。みなさんからのニュースレターに対するご要望、ご指摘等の声をお待ちしています。レター改善のために、編集担当までご連絡を頂ければ幸いです。次号(No. 28)は、円谷氏の担当により、2008年10月頃に発行を予定しております。



長崎 健
大阪市立大学大学院工学研究科
(nagasaki@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp)

編集担当
原田 和雄(東京学芸大学)
円谷 健(大阪府立大学)

