



# 生命化学研究 レター

No. 29 (2009年2月)

1.	巻頭言	2
	研究と教育のカップリング 栗原正靖 (群馬大学大学院工学研究科)	
2.	主催研究会報告	4
3.	研究紹介	9
	分子メタモルフォーゼ -環境に応答する DNA- 三好大輔 (甲南大学先端生命工学研究所 FIBER) 巨大蛋白質複合体機能化への化学的アプローチ 上野隆史 (京都大学物質-細胞統合システム拠点) デザインされたペプチドによる 細胞膜内スフィンゴ糖脂質ナノドメインの特異的検出 松原輝彦 (慶應義塾大学理工学部)	
4.	論文紹介「気になった論文」	28
	林 剛介 (大阪大学大学院理学研究科) 中木戸 誠 (東京大学新領域創成科学研究科)	
5.	生命化学研究法	35
	ノックアウトマウスの作製のコツと 復帰可能なノックアウトマウス作製法について 原田彰宏 (群馬大学生体調節研究所)	
6.	米国スタンフォード大学留学体験記	41
	(Department of Chemistry, Stanford University) 臼井一晃	
7.	シンポジウム等会告	45
8.	お知らせコーナー	
	受賞・会員異動のお知らせ／編集後記	52

# 巻頭言

## 研究と教育のカップリング

群馬大学大学院工学研究科

栞原正靖

昨年11月28-29日、第11回生命化学研究会(2008)を群馬県水上町にて開催致しました。当日は天候にも恵まれ、ホテル7階の会場からは美しく雪化粧した谷川岳を間近に眺望することができました。研究会では初日に招待/依頼講演4件とポスター発表20件が、二日目に若手講演14件が行われ、とてもリラックスした自由な雰囲気の中で、全国から集まった七十余名の参加者が熱い討論を交しました。世話人をするのは初めての経験でいろいろと至らぬ点もあったと存じますが、私にとって大変良い勉強になりました。このような機会を与えて下さいました三原会長をはじめとする運営委員の先生方、また、お忙しいところ参加して下さいました皆様に改めて厚くお礼申し上げます。

この度は巻頭言をお任せ下さるとのことですので、不肖ながら自己紹介を兼ねて日頃感じていることを書いてみたいと思います。私は岡山大(宍戸研)出身で、学生時代はペプチド核酸の研究をやっておりました。その縁もあって、特に、杉本先生や和田先生、三原先生には学生の頃から学会活動等を通していろいろとご示唆を頂き、大変お世話になってきました。2年間ポスドクを経験した後、今の仕事(助手)に就きました。月日が流れるのは速いもので、群馬大に来て8年が経とうとしています。その間、現場の仕事を通して大学で研究を行うことの社会的意義や難しさを考えさせられる場面が多くありました。

一般に、個々の教員が競争的に獲得できる研究費の主目的は、研究の推進であり人材(学生)の育成ではありません。従って、必ずしも学生をその研究に参加させなければならないという縛りはありません。しかし、今や大学から配分される運営費はほとんど当てにできず、研究助成金が無くては我々が卒研や大学院で享受した素晴らしい(と信じている)教育環境を維持できない状況にあります。従って、かつてと同じように教育課程で学生が研究の現場に本格的に参加できる環境が今も確保されているならば、それは本当に有り難いことだと思います。しかし、そんな思いとは裏腹に、修学に対する学生の意識低下は深刻になっていると感じています(「下流大学が日本を滅ぼす!」 三浦展 著)。何かと特別扱いを要求してくる学生が増えたために、まともな学生たちのやる気を挫くような光景が日常化しつつあります。放っておけばその負のスパイラルは日に日に増大し、ラボの研究カルチャーは浸食され、やがて消滅し、そしてラボはサークルの部室のようになっていきます。これはラボ自体が消滅するより残念な事態です。ラボの研究カルチャーは高度な専門教育を実施し、アカデミック・インパクトやソーシャル・インパクトの高い研究を目指すための土壌のようなものだと思います。今までこの無形の財産を維持・発展させるために随分と悩んできたように思います。いろいろな対処法があると思いますが、いずれにせよ、学生がゼロでは研究活動において教育とのカップリングを果たすことはできません。

大学における研究・教育には教職員の給与も含め巨額の費用が税金で賄われています。そのインプットに見合うアウトプットとは一体何でしょうか？そんな議論をかつて澤井先生と交したことがあります。先生には自らの研究成果を実用化させ、得られた数千万円の特許実施料を長年にわたり研究・教育に充ててきた実績があります。先生は昨年退職されましたが、目標として頑張りたいと思います。無理かもしれませんが……。ところで、最近、年齢のお陰か企業の人事担当者とは話す機会が増えました。製造業が中心ですが、興味深いことに、企業の大小や採用分野、業種を問わず、「オリジナルの研究課題に従事し、根気強く試行錯誤を経験した人材が欲しい」という要望が多く寄せられています。このような社会的要請に応え続けることも大切な使命だと思います。

幸い生命化学研究会は異なる分野・世代で構成される個性豊かでアクティビティーの高い研究者の集まりなので、そこにはさまざまな研究カルチャーや教育フィロソフィーがあると思います。交流を通じてより高い研究目標を見出すと共に、教育とのカップリングによって多様な研究カルチャーが世代を越えて引継がれていけばいいなと思います。そして、研究会が20代30代の我々若い世代においても、自由闊達な雰囲気の中で、お互いの意識を高め合える場であり続けることを願っています。

(くわはら まさやす [kuwahara@chem-bio.gunma-u.ac.jp](mailto:kuwahara@chem-bio.gunma-u.ac.jp))



第11回生命化学研究会・群馬（2008）

「～生命化学をシステムで捉えたら～」

（平成20年11月28日（金）群馬県利根郡みなかみ町 水上館）

# 主催研究会報告

## 第11回生命化学研究会 「～生命化学をシステムで捉えたら～」

平成20年11月28日(金)～29日(土)に群馬県の水戸館において第11回生命化学研究会研究会「～生命化学をシステムで捉えたら～」が栗原正靖氏(群馬大学)、三原久和氏(東京工業大学)のお世話により開催され、活発な討議が行われました。研究会の様子については、栗原氏の巻頭言、下記のプログラム・写真などから感じ取って頂ければ幸いです。

### 第11回生命化学研究会

主催 日本化学会フロンティア生命化学研究会

会期 2008年11月28日(金)～29日(土)

会場 水戸館 大会議室「谷川」

(群馬県利根郡みなかみ町小日向)

#### プログラム :

#### 28日 (金)

13:30～13:40 開会挨拶 三原久和(フロンティア生命化学研究会会長)

座長: 栗原 正靖

13:40～14:25 細胞の極性を制御する遺伝子の個体での機能の解明  
原田 彰宏(群馬大学生体調節研究所)

座長: 石田 齊

14:25～15:10 核酸上での分子間相互作用を利用したシグナル変換  
井原 敏博(熊本大学大学院自然科学研究科)

休憩 (20分)

座長: 三原 久和

15:30～16:15 タンパク質配列に隠された内因性機能ペプチド、「クリプタイド(Cryptide)」  
向井 秀仁(京都薬科大学)

座長: 和田 健彦

16:15～17:00 ヘムオキシゲナーゼの反応機構  
齋藤 正男(東北大学多元物質科学研究所)

#### ポスター発表

17:10～18:10 前半(奇数番号), 後半(偶数番号)

#### 29日 (土)

若手講演会 (発表・討議時間: 15分・5分)

ディスカッション・リーダー： 叶 直樹 ①～③, 坂本 清志 ④⑤, 浦野 泰照 ⑥～⑧,  
小澤 岳昌 ⑨⑩, 松浦 和則 ⑪⑫, 大神田 淳子 ⑬⑭

- ① 8:00～8:20 特殊ペプチドの翻訳合成 ～創薬を目指した新技術の創成～  
村上 裕 (東京大学先端科学技術研究センター)
- ② 8:20～8:40 グアニン酸化損傷の効果の予測  
喜納 克仁 (徳島文理大学香川薬学部分子生物学講座)
- ③ 8:40～9:00 二重鎖 DNA 中の 8-オキシグアニン塩基を選択的に認識する人工核酸プローブ  
兒玉 哲也 (大阪大学大学院薬学研究科)
- ④ 9:00～9:20 電気化学的な遺伝子検出および酵素活性検出  
佐藤 しのぶ (九州工業大学バイオマイクロセンシング技術研究センター)
- ⑤ 9:20～9:40 がらくた RNA を通して、遺伝子とヒトゲノムを考える  
相澤 康則 (東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター)
- 休憩 (10分)
- ⑥ 9:50～10:10 *In Vivo Chemistry*: 化学システムとして機能する細胞の理解/制御/応用を目指す  
生命化学基盤へのチャレンジ  
山東 信介 (京都大学大学院工学研究科)
- ⑦ 10:10～10:30 糖鎖が示す厳密で曖昧な分子認識能を評価するために  
岡田 朋子 (東京工科大学応用生物学部)
- ⑧ 10:30～10:50 科学と技術のあいだ: ライブラリー選択システムによる糖鎖関連ペプチドの同定  
松原 輝彦 (慶應義塾大学理工学部)
- ⑨ 10:50～11:10 L/F 転移酵素を用いた蛋白質 N 末端特異的標識  
瀧 真清 (岡山大学大学院自然科学研究科)
- ⑩ 11:10～11:30 蛋白質集合体のメゾスケール化学に向けて  
上野 隆史 (京都大学物質-細胞統合システム拠点)
- 昼休み・総会 (120分)
- ⑪ 13:30～13:50 アルツハイマー病アミロイドβの集合化をモニターする蛍光タンパク質の構築  
高橋 剛 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)
- ⑫ 13:50～14:10 DNA 連鎖削除反応による DNA 配列の解読と組換え  
小寺 一平 (科学技術振興機構さきがけ)
- ⑬ 14:10～14:30 多機能性エンベロープ型ナノ構造体を用いた細胞内動態制御への試み  
秋田 英万 (北海道大学大学院薬学研究院)
- ⑭ 14:30～14:50 人工核酸アプタマー ～生命計測や医薬・診断薬への応用を目指して～  
栗原 正靖 (群馬大学大学院工学研究科)
- 14:50～15:00 閉会挨拶 栗原 正靖 (群馬大学大学院工学研究科)

#### ポスター発表 (11月28日)

- P1 コレステロール異常酸化物により修飾されたアミロイドβペプチドは低濃度 (nM) で凝集する  
臼井 健二 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)
- P2 2本鎖 DNA の構造制御を目指した分子モーターの合成

- 永次 史 (東北大学多元物質科学研究所)
- P3 メンブレンマイクロアレイによる生体高分子のラベルフリー分析法  
及川 雅人、小川 雄一 (東北大学大学院生命科学研究科)
- P4 希土類金属錯体によるポリシアル酸認識  
松浦 和則・田尾 周一・菓子野 翼・君塚 信夫 (九州大学大学院工学研究院)
- P5 細胞内在性タンパク質を標的とした<sup>19</sup>F-バイオセンサーの構築  
高岡 洋輔、築地 真也、田村 朋則、浜地 格 (京都大学大学院工学研究科)
- P6 時計遺伝子を標的とした人工転写因子の創製  
今西 未来 (京都大学化学研究所生体機能設計化学研究領域)
- P7 細胞内の分子過程を可視化する分子プローブ  
佐藤 守俊 (東京大学大学院総合文化研究科)
- P8 外部刺激による緑色蛍光タンパク質の機能制御  
坂本 清志 (東北大学多元物質科学研究所)
- P9 長寿命蛍光プローブの論理的開発とその応用  
寺井 琢也 (東京大学大学院薬学系研究科)
- P10 **Fluorescent green logic**  
野島 高彦, 山本 貴富喜, 木村 啓志, 藤井 輝夫 (東京大学生産技術研究所)
- P11 細胞内導入したルテニウム-ペプチド錯体からのりん光発光を観測する  
石田 斉 (北里大学大学院理学研究科)
- P12 5本鎖コイルドコイル蛋白質のデザインとリガンド結合評価  
水野 稔久 (名古屋工業大学大学院工学研究科)
- P13 電気化学的ヌクレアーゼアッセイ  
竹中 繁織 (九州工業大学)
- P14 蛍光タンパク質断片の再構成を利用した Arf GAP タンパク質ファミリーの機能解析  
服部 直史, 竹内 雅宜, 小澤 岳昌 (東京大学大学院理学系研究科)
- P15 分子シャペロンによる金属ナノコロイドの包摂  
迫野 昌文 (科学技術振興機構さきがけ/理研)
- P16 シャペロンナノチューブの構築とその性質  
金原 数、ビスワスシュベンドゥ、相田 卓三、田口 英樹、石井 則行 (東北大学多元物質科学研究所)
- P17 ペプチドナノファイバーの微細構造を認識するペプチドを獲得する  
澤田 敏樹・高橋 剛・三原 久和 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)
- P18 蛋白質凝集を抑制する小分子添加剤の開発と応用  
山口 哲志 (東京大学工学系研究科・ナノバイオ拠点)
- P19 ホロ抗体酵素：人工補酵素の導入による化学反応性の制御

円谷 健・石川 文洋・藤井 郁雄 (大阪府立大学大学院理学系研究科)

P20 *in vivo* イメージングによる体内薬物の定量的解析にむけて

三輪 佳宏 (筑波大学大学院人間総合科学研究科)









## 分子メタモルフォーゼ —環境に应答する DNA—

甲南大学 先端生命工学研究所 (FIBER)

三好大輔

miyoshi@center.konan-u.ac.jp



### 1. はじめに

この度は研究紹介の機会をいただきましてありがとうございます。2009年4月には、私が甲南大学先端生命工学研究所 (FIBER) の杉本所長のもとで職を得てからちょうど5年になります。また、4月には甲南大学の新キャンパス (ポートアイランド) に設立されるフロンティアサイエンス学部 (FIRST) 生命化学科が開設されます。ニュースレターの編集委員からは、気軽に何でも書いてもいいとのお言葉をいただきましたので、これを機会に、5年間の研究内容と今後チャレンジしてみたいことについて記したいと思います。

### 2. 疑似細胞内環境下での DNA の標準構造と非標準構造

DNA の標準構造の B 型二重らせんは、シンプルでかつ美しく、さらに遺伝情報の保持と複製に非常に適した形であるように思われる。二重らせん構造が報告されてからというもの、「DNA の構造」= 「二重らせん構造」と一般的に考えられている。もし、DNA が形成する標準構造 (二重らせん構造) が、その他の非標準構造よりも常に安定であれば、この考え方に間違いはない。一方、非標準構造が二重らせん構造よりも安定であれば、DNA は非標準構造を形成するはずである。そのため、細胞内で刻々と変化する環境因子によって標準構造と非標準構造の安定性が変化するのであれば、細胞内において DNA が多様でダイナミックな非標準構造を形成する可能性がある (図 1)。

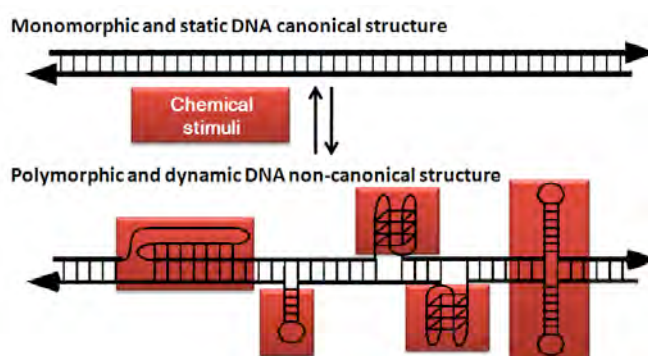


Figure 1. Schematic illustration for the DNA switch between the canonical and non-canonical structures regulated by chemical stimuli.

DNA が必要な機能に応じて高次構造を劇的に変化させるのであれば、これは DNA のメタモルフォーゼ (変態) とも言える。メタモルフォーゼを行う種の幼虫は、成体と全く異なった形態をとる。個体レベルでのメタモルフォーゼは、栄養摂取に最適化された形態 (幼生) から生殖に有利な形態 (成虫) へと機能を変化するためや、生育環境に順応するために必要であると考えられている。DNA などの分子レベルでも、要求される機能や環境に应答するために形態 (構造) を変化することがあるのではないだろうか。このように考えて、細胞内を模倣した環境を試験管内で化学的に再現し、DNA の構造とその熱力学的安定性を検討することにした。

DNA が必要な機能に応じて高次構造を劇的に変化させるのであれば、これは DNA のメタモルフォーゼ (変態) とも言える。メタモルフォーゼを行う種の幼虫は、成体と全く異なった形態をとる。個体レベルでのメタモルフォーゼは、栄養摂取に最適化された形態 (幼生) から生殖に有利な形態 (成虫) へと機能を変化するためや、生育環境に順応するために必要であると考えられている。DNA などの分子レベルでも、要求される機能や環境に应答するために形態 (構造) を変化することがあるのではないだろうか。このように考えて、細胞内を模倣した環境を試験管内で化学的に再現し、DNA の構造とその熱力学的安定性を検討することにした。

#### 2-1. 細胞内の分子環境

核酸やタンパク質などの生命分子は、生体内・細胞内でその機能を最大限に発揮するために、

生命の誕生以来進化を続けている。また、タンパク質や長鎖の核酸の構造や機能活性が、溶解させる溶液の成分、温度、pH などによって全く異なることもよく知られている。これらの事例は、生命分子が周辺環境に非常に敏感であることを示している。そのため、生命体内における生命分子の構造や機能を知るためには、その周辺の分子環境を考慮することが必須である。核酸が存在する細胞内には非常に高濃度の生命分子などが存在する。大腸菌の場合では、細胞内のタンパク質と RNA の総量は 400 g/L にも達する。これらの生命分子は細胞内の全空間の 20~40 % を占有する。このような分子が非常に混み合った状態を分子クラウディングと呼ぶ(1)。一方、試験管内実験で使用する生命分子の量は一般的に少なく、生命分子の濃度が 1 g/L 以下という希薄溶液中で種々の測定を行う場合が多い。これでは細胞内環境を反映しているとは言い難い。そこで我々の研究グループでは、分子クラウディング環境を種々の共存溶質を用いて再現し、DNA の高次構造とその熱力学的安定性に及ぼす影響を検討してきた。以下では、得られつつある結果の一部を述べる。

## 2-2. テロメア DNA の構造多様性

分子クラウディングが及ぼす DNA への効果を検討するにあたり、我々が注目したのが染色体の末端に位置するテロメアである (図 2)。テロメア DNA は、細胞の加齢やガン化に関与すると考えられている。さらに近年では、幹細胞の増殖においても注目されていることから、その構造や安定性を細胞内環境因子で制御できれば、生物学的に興味深い知見となると考えた。

テロメア DNA は、二重らせん構造を形成すると考えられている領域と一本鎖状態の突出領域からなる。前者は、グアニンに富んだ鎖 (G 鎖) とその相補鎖であるシトシンに富んだ鎖 (C 鎖) から形成される。後者は、数十から数百塩基の G 鎖で構成されている。この突出領域は、四重らせん構造を形成する。四重らせん構造では、四つのグアニン塩基が環状となりフーグスティーン塩基対を形成し G-カルテットと呼ばれる平面構造を形成する。この G-カルテット同士がスタッキング相互作用を形成し、四重らせん構造が形成される。G 鎖が形成する四重らせん構造は、希薄溶液中においてコンパクトであることが示されている。これらの試験管内での結果に対して、核酸と直接相互作用しないポリエチレングリコール (PEG) を共存溶質として誘起した分子クラウディング環境下での G 鎖 (*Tetrahymena* とヒト由来のテロメア DNA) の構造を検討した (図 3a)。*Tetrahymena* とヒト由

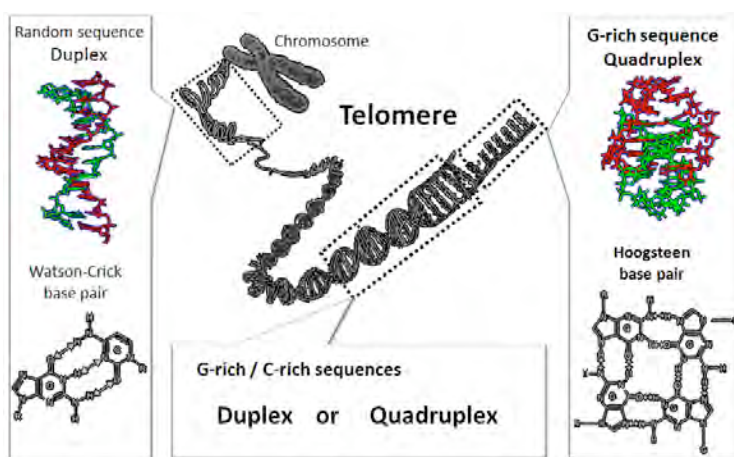


Figure 2. Telomere DNA at the ends of chromosome.

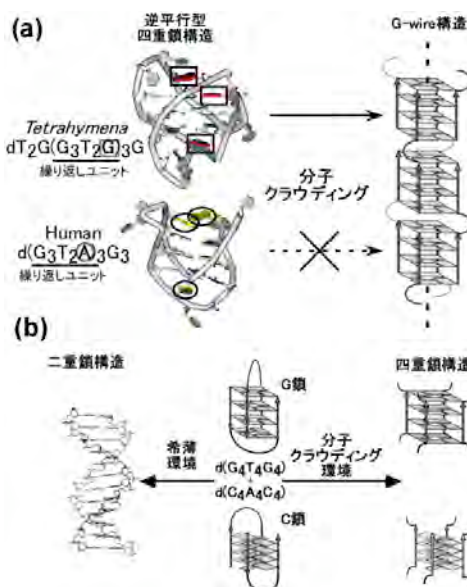


Figure 3. Structural switch of telomere DNAs induced by molecular crowding.

来のテロメア DNA の塩基配列を比較すると、一つの繰り返しユニットにたった一塩基の違いしかない。また、希薄得溶液中 ( $\text{Na}^+$ イオン存在下) における両者の構造は、逆平行型四重らせんである。このように非常に似た配列と構造がもつ両者であるが、分子クラウディング環境では、全く異なる構造を形成することが示された。*Tetrahymena* テロメア DNA は、分子クラウディングによって、多数の鎖が平行に自己組織化した高次構造 (G-wire) へと構造が遷移する。しかし、ヒトテロメア DNA は、分子クラウディング環境下においても、希薄得溶液中と同様の逆平行型四重らせん構造を保持することが見出された(2)。これらの結果から、テロメア DNA のたった一塩基の違いにより、分子クラウディング環境下における構造が劇的に変化することが示された。

同時に、G 鎖とその相補鎖である C 鎖が形成する構造に及ぼす分子クラウディングについても検討した。その結果、希薄溶液中では G 鎖と C 鎖は二重らせん構造を形成するが、分子クラウディング環境下では、それぞれが四重らせん構造を形成することが示された (図 3b) (3)。これらの結果から、ワトソン-クリック塩基対によって強固な二重らせん構造を形成すると考えられてきた DNA が、細胞内環境因子である分子クラウディングに応答して多様な構造を形成することが明らかとなった。

### 2-3. 分子クラウディング環境下における DNA 構造の熱力学的安定性

分子クラウディングが DNA の構造多様性を誘起するメカニズムを検討するためには、DNA 構造の熱力学的安定性に及ぼす分子クラウディングの効果を検討する必要がある。そこで、希薄溶液環境及び分子クラウディング環境における四重らせん構造と二重らせん構造の安定性を定量化した (図 4)。その結果、DNA 四重らせん構造は分子クラウディングによって安定化することが示された。これとは逆に、DNA の標準構造である B 型二重らせん構造が不安定化することも明らかになった(4)。さらに、この要因を

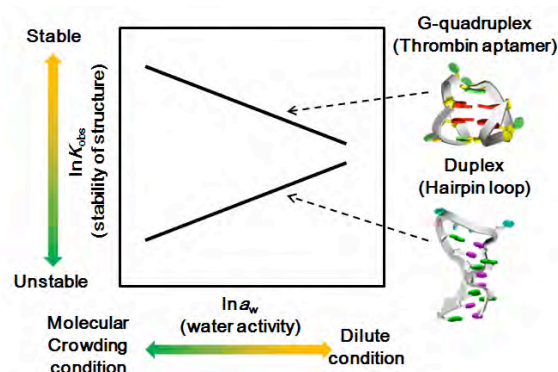


Figure 4. Thermodynamic stability of DNA structures depending on molecular crowding (water activity).

水の活量と構造安定性の相関関係から検討した。その結果、四重らせん構造は、構造形成に伴い水分子を放出するのに対し、二重らせん構造は構造形成に伴い水分子を取り込むことが見出された。このような分子クラウディングに対する安定性変化における差異は、DNA の全体構造によるものではなく、構造を形成する塩基対様式によって引き起こされることも明らかになりつつある(5)。これらの結果から、自由水が非常に少ない (水のモル濃度と活量が低い) 細胞内環境下においても、ワトソン-クリック塩基対から形成される標準構造が不安定化し、非ワトソン-クリック塩基対から形成される非標準構造が安定化することで、図 1 に示したような多様な DNA の構造が形成されている可能性が示された。

### 3. 環境に応答する核酸によるナノ・バイオテクノロジーへの展開

分子の自己組織化能を利用したナノスケールの機能性マテリアルや機能性デバイスの開発 (ボトムアップテクノロジー) が注目されている。その中の一つに、情報処理技術への展開を指向した機能性分子を開発する試みがある。筆者らも、分子クラウディングをはじめとして、一価金属イオ

ン、二価金属イオン、水素イオン (pH) などに対応する DNA を用いて、ナノマテリアル・デバイスの開発に取り組んでいる。また、環境に対応する DNA や RNA の構造や熱力学的安定性を用いて酵素機能を制御することも試みている。以下では、環境応答性核酸を用いたナノテク、バイオテクへの取り組みを紹介する。

### 3-1. 環境応答性核酸を用いたナノテクノロジーへの取り組み

論理素子は、数種類の入力に対し、論理的に対応し、出力するデバイスである。DNA を用いて論理素子を開発するには、DNA の高次構造を複数の外部環境因子によって合理的に制御する必要がある。そこで、G 鎖とその相補鎖である C 鎖からなるテロメア DNA の高次構造と熱力学的安定性に及ぼす一価カチオン ( $M^+$ ) と pH ( $H^+$ ) の効果を

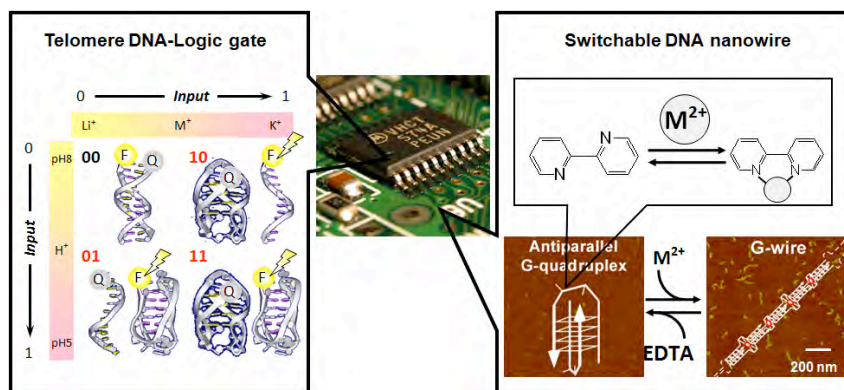


Figure 5. Development of nanobiodevice and nanobiomaterial using DNA metamorphose.

検討した結果、テロメア DNA の構造を  $M^+$  と  $H^+$  で四種類に制御できた (図 5 左)。このテロメア DNA に蛍光団を導入することで論理素子として機能させることができる。例えば、G 鎖の 3' 末端に蛍光消光基を導入し、C 鎖の 5' 末端に蛍光発光基を導入すると、G 鎖と C 鎖で二重らせん構造を形成した場合にのみ蛍光が消光され、他の三つの構造状態では目視が可能なほどの蛍光が観測された。すなわち、このテロメア DNA が OR 論理素子として機能することが示された。さらに、蛍光色素の種類とその導入位置を変えることで、情報処理技術で多用される基本的論理素子のすべてを構築することも明らかになった(6)。

四重らせん構造を用いた DNA ナノワイヤーの構築にも取り組んでいる。G 鎖に共存溶質や金属イオンを添加すると G-wire 構造 (図 3) を形成するが、その構造形成を可逆的に制御することは困難であった。そこで、四重らせん構造のループ部位にピピリジンを経理的に導入し、金属イオン応答性 G-wire を構築することを試みた (図 5 右)。その結果、金属イオン非存在下におけるピピリジンを導入した人工 G 鎖の構造は天然型の G 鎖と同様のコンパクトな四重らせん構造であることが示された。一方、 $Ni^{2+}$  などの金属イオンを添加すると人工 G 鎖のみが G-wire 構造を形成することが示された。さらに、EDTA などのキレーターを用いることでこの構造スイッチを繰り返して可逆的に制御できた(7)。

四重らせん以外にも、我々の研究グループでは、pH に対応する平行型二重らせん構造を用いた細胞内 pH のモニタリングシステム(8)、代謝物質に対応する人工リボスイッチ(9)、低分子化合物に対応するアデニン二重らせん構造によるドラッグスクリーニングシステム(10)などを構築している。このように環境応答性核酸は、新しい機能性ナノデバイス・ナノマテリアルの開発に有用であると考えられる。

### 3-2. 環境応答性核酸を用いたバイオテクノロジーへの取り組み

核酸の高次構造や熱力学的安定性を環境因子によって制御できれば、核酸を基質とする酵素の

機能も制御できるはずである。我々は、テロメア DNA を伸長する機能をもつテロメラーゼに着目した。テロメラーゼは、がん細胞や幹細胞などの不死細胞において活性化されている。そのため、テロメラーゼの活性を阻害するだけでなく、活性を上昇させることができれば、診断や検査技術への展開、さらには細胞機能の制御にも有用な知見が得られると考えた。テロメラーゼの反応機構においては、テロメラーゼ内に含まれる RNA が鋳型となり基質であるテロメア DNA の繰り返し配列を伸長することが知られている。そこで、様々な共存溶質存在下において、鋳型 RNA/基質 DNA 二重らせん構造の安定性を検討したところ、低分子量の共存溶質によって二重らせん構造が不安定化し、高分子量の共存溶質によって二重らせん構造が安定化することが見出された。さらに、テロメラーゼ活性に及ぼす、これらの共存溶質の効果を検討した。その結果、二重らせん構造を不安定化する共存溶質はテロメラーゼ活性を上昇させるのに対し、安定化する共存溶質は活性を減少させることが示された(11)。この結果は、テロメラーゼ活性を合目的的に上昇させたはじめての成果として注目されている。また、我々の研究グループでは、ポリメラーゼやヌクレアーゼの活性を分子クラウディングで制御できることも報告している。このように環境応答性核酸は、バイオテクノロジーの改良にも有用であることが示された(12)。

#### 4. おわりに

以上のように「分子メタモルフォーゼ」と、不明瞭なまとめ方で 5 年間の研究をまとめさせていただきました。正直に言いますと、私は物理化学が苦手であり、その深淵に到達するにはかなりの労力と時間が必要なように思っています(到達できないかもしれませんが)。そのせいもあって、核酸の構造や機能を変える、可能であれば完全にメタモルフォーゼさせることを一つの目的にしてみました。また、個体レベルでのメタモルフォーゼとは、目的や環境に応じて形を劇的に変化させることですので、「メタモルフォーゼならでは」の機能を分子に付与することも研究目標としています。

これからは、①細胞核内の分子環境をより精密に再現する、②より多様な DNA と RNA の高次構造を化学的に見直してみる、③動的で多様な高次構造と生物学的機能の相関を見出す、④メタモルフォーゼならではのナノバイオテクノロジーを作り出す、などに取り組んでみたいと考えております。雲をつかむような内容も含まれているかもしれませんが、2009 年 4 月に開設される新学部、甲南大学 FIRST (下図) の一員として一つでもうまくいくように研究に励みたいと思っております。

**謝辞** 本研究は、甲南大学先端生命工学研究所において研究所所長の杉本直己教授が代表を務める文部科学省学術フロンティア推進事業の一環として行われました。また、研究遂行にご助力を頂きました、共同研究者、博士研究員、大学院生、学部生、技術補佐員、研究所職員の方々に深く感謝いたします。



甲南大学 FIRST

<http://www.konan-first.jp/>

## 参考論文

- (1) D. Miyoshi and N. Sugimoto, *Biochimie*, **90**, 1040 (2008).
- (2) D. Miyoshi, H. Karimata, and N. Sugimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 3740 (2005).
- (3) D. Miyoshi, S. Matsumura, S. Nakano, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 165 (2004).
- (4) D. Miyoshi, H. Karimata, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 7957 (2006).
- (5) D. Miyoshi, K. Nakamura, H. Karimata, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, *in press* (2009).
- (6) D. Miyoshi, M. Inoue, and N. Sugimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 7716 (2006).
- (7) D. Miyoshi, H. Karimata, Z.-M. Wang, K. Koumoto, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 5919 (2007).
- (8) T. Ohmichi, Y. Kawamoto, P. Wu, D. Miyoshi, H. Karimata, and N. Sugimoto, *Biochemistry*, **44**, 7125 (2005).
- (9) T. Yamauchi, D. Miyoshi, T. Kubodera, M. Ban, A. Nishimura, and N. Sugimoto, *ChemBioChem*, **9**, 1040 (2008).
- (10) G. Song, C. Chen, X. Qu, D. Miyoshi, J. Ren, and N. Sugimoto, *Adv. Mater.*, **20**, 706 (2008).
- (11) H. Yu, D. Zhang, X. Gu, D. Miyoshi, and N. Sugimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 9034 (2008).
- (12) Y. Sasaki, D. Miyoshi, and N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 4086 (2007).

## 巨大蛋白質複合体機能化への化学的アプローチ

京都大学物質-細胞統合システム拠点

上野隆史

taka@sbchem.kyoto-u.ac.jp



## 1. はじめに

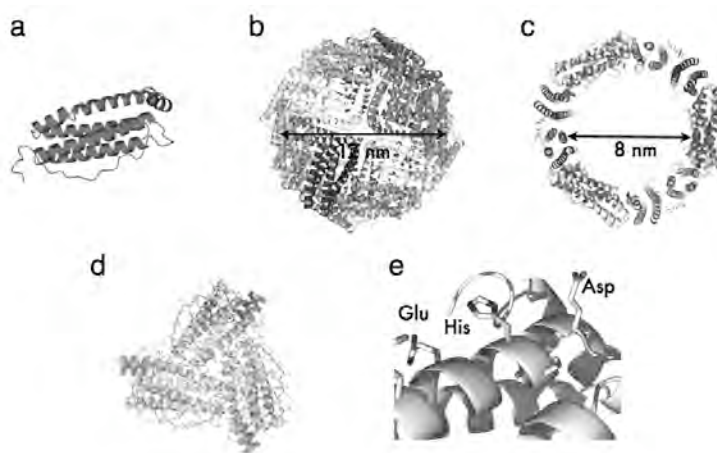
金属の関与する生体機能設計は非常に長い歴史を有しており、古くは赤堀四郎らによる絹へのパラジウム触媒担持触媒や<sup>1</sup>、70年代の Whitesides らによるロジウム錯体の蛋白質結合による不斉水素化反応が報告されてきた<sup>2</sup>。当時は、金属錯体/蛋白質複合体のキャラクタリゼーションや分子生物学的手法が乏しく、反応機構の解析や性能向上への分子設計は困難であったが、近年では様々な蛋白質を利用して、精密な材料合成や化学反応制御に適した分子テンプレートの設計が可能となっている。本稿では、巨大蛋白質複合体の反応空間を利用した機能化について著者等の最近の研究成果について報告する。

## 2.1. フェリチンナノケージ構造の利用

従来の人工蛋白質の分子設計は、熱的に安定な分子量数万の小さな蛋白質へ単一の機能分子を化学修飾や非共有結合により固定化する手法が主流であった<sup>3-10</sup>。もし、蛋白質複合体によって形成される空間を数ナノの化学反応場として利用したり、数十以上の蛋白質から構成される複合体へ、一度に複数の機能を導入できれば、これまでにない分子機能の創成が可能となる。

そこで、モデル化合物では再現が困難な蛋白質表面への金属イオン集積反応に着目した。天然では磁性微粒子や骨、歯、貝殻は、特定の蛋白質集合

体の表面に無機イオンや金属イオンが集積して合成される。これらの反応はバイオミネラル化とよばれ、再生医療はもとより、最近ではエレクトロニクス分野でも注目されている無機合成反応である<sup>11</sup>。また、窒素固定や光合成をつかさどる金属酵素の活性中心には人工的には合成困難な金属クラスターが存在し、生体触媒サイクルにおいて重要な役割を担っている<sup>12</sup>。従って、これらの金属イオン集積機構を理解すれば、無機材料の合成ばかりではなく触媒設計も可能となる。そこで、我々はフェリチン(Fr)に着目した。Frは外径12 nm、内径8 nmの24量体から成り、pH 2-11、<80 °Cの広い範囲で安定な球状複合体である(Fig. 1a-1c)<sup>13</sup>。鉄イオン貯蔵の機能を有しており、鉄



**Fig. 1** Crystal structure of apo-Fr (PDB ID:1DAT): monomer (a), whole structure (b), cross section view (c), three-fold axis channel (d), and internal surface (e).

イオンを3つの単量体によって形成されるFr表面の三回対称軸チャンネルより取り込み(Fig. 1d)、内部表面に存在するグルタミン酸、ヒスチジン、アスパラギン酸等といった配位性アミノ酸残基によって集積していくと推定されている(Fig. 1e)<sup>14</sup>。我々は、鉄イオンの代わりに空のFr(apo-Fr)を $K_2PdCl_4$ と反応させ、Fig. 2に示す手順でapo-Fr内部にPd(II)イオンを集積させた後、 $NaBH_4$ による還元でapo-Fr内にPd<sup>0</sup>微粒子を「その場合合成」した<sup>15</sup>。こうして作成されたフェリチン内部のPd<sup>0</sup>微粒子は2.0 nmの平均粒子径を持つことを電子顕微鏡により確認した(Fig. 2b)。次に、精製したPd<sup>0</sup>•apo-Frを用いてオレフィンの水素化反応を検討した。アクリルアミド水素化反応のPd原子当たりのTOF(72)は、apo-Fr 1分子当たりに換算すると約3万となる。また、基質のサイズが大きくなるにつれてTOFが減少していることと、Tb(III)を用いて三回対称軸チャンネルをブロックするとTOFがもとの10%にまで低下することから、基質が三回対称軸チャンネルを通過する際にサイズ選択が occurring していると考えられる。

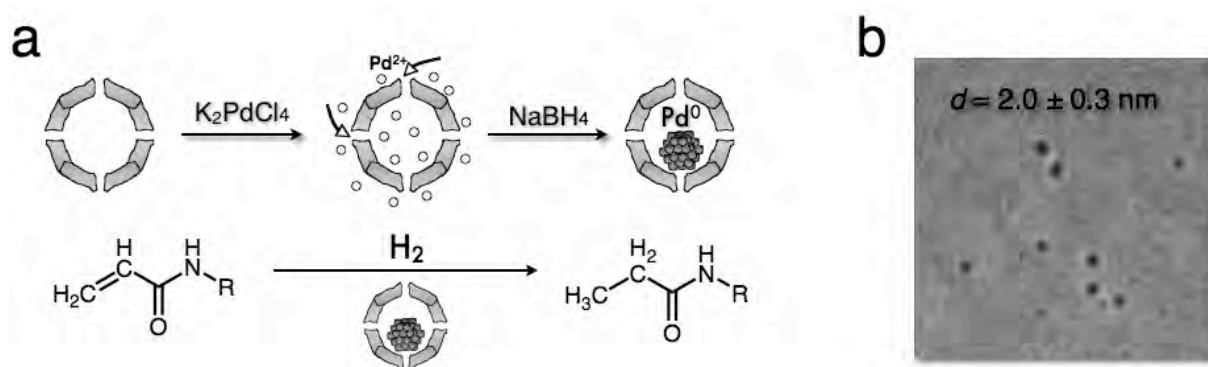


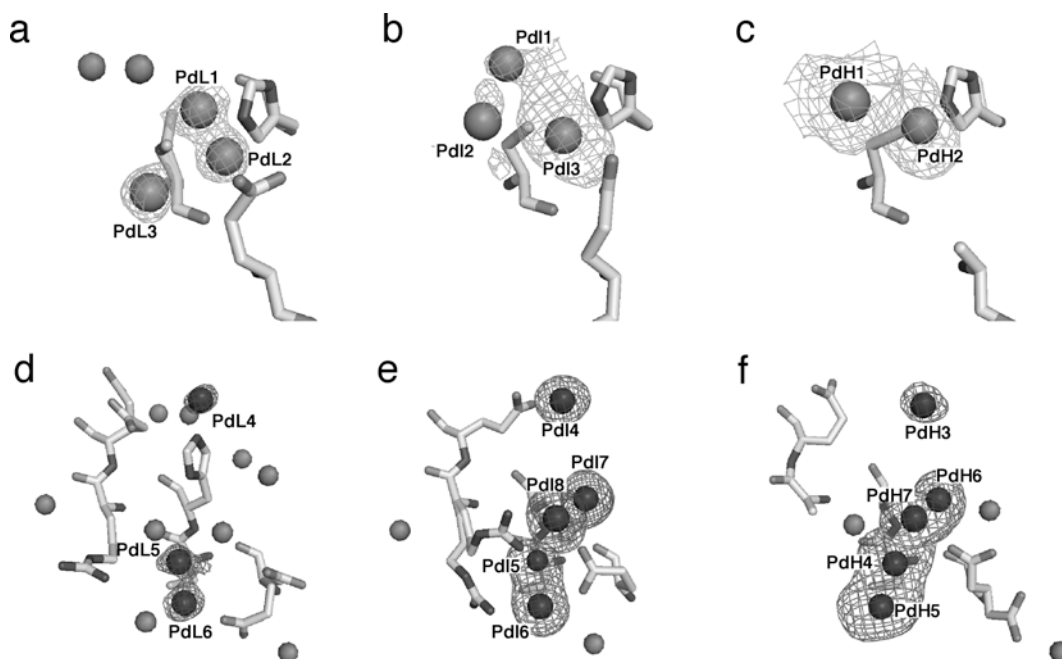
Fig. 2 Schematic drawings of preparation of Pd<sup>0</sup>•apo-Fr and olefin hydrogenation catalyzed by Pd<sup>0</sup>•apo-Fr (a) and a TEM image of ice-embedded unstained sample of Pd<sup>0</sup>•apo-Fr (b).

## 2.2. フェリチン内金属イオン集積過程の精密観察<sup>16</sup>

先に示した合成法で得られたPd<sup>0</sup>微粒子は、TEM像より均一に揃ったサイズを持つ事がわかった(Fig. 2b)。従って、この微粒子サイズ制御機構を明らかにすれば、様々な金属微粒子の合成につながると考えられる。Pd(II)イオンとapo-Frを反応させると、取り込まれたPd(II)イオンが内部表面に結合する。この場合、金属イオンが集積した構造は反応中間体と考えられ、全ての結合サイトに金属イオンが充填された状態で $NaBH_4$ 還元されるために、内部で生成するPd<sup>0</sup>微粒子の径が揃うと推定できる。そこで、金属イオンが集積していく中間状態の構造決定を試みた。具体的には、異なる個数のPd(II)イオンが集積したapo-Frを単離精製後、X線結晶構造解析を行った。まず、50等量の $K_2PdCl_4$ と反応させたapo-Fr(L-Pd<sup>II</sup>•apo-Fr)を単離精製、結晶化し、結晶構造解析を行ったところ、Pd(II)イオンが内部表面に結合している事が明らかとなった。24量体を構成する蛋白質単量体の構造は、Pd(II)イオンが単量体当たり3回対称軸チャンネルとイオン集積サイトの2ヶ所に集積していることを示している(Fig. 3)。Pd(II)イオンの集積サイトはこれまで鉄イオンが集積すると考えられていた部分から少しだけ離れており、金属の種類によって集積構造に違いがあることを示している。さらに、100等量、200等量の $K_2PdCl_4$ と反応させた複合体(I-Pd<sup>II</sup>•apo-FrとH-Pd<sup>II</sup>•apo-Fr)との構造比較から、三回対称軸チャンネルではパラジウムの電子密度が多少変わるものの、その個数と周辺アミノ酸残基のコンホメーションに劇的な変化は観測されなかった。一方、Pd(II)イオン集積サイト



では Pd(II)イオンの増加に伴い、Pd(II)イオン周りのアミノ酸残基のコンホメーションも劇的に変化することが明らかとなった。つまり、Fr 内部への Pd(II)イオンの集積は主に金属イオン集積サイトで生じており、アミノ酸残基の大きなコンホメーション変化によって多数の Pd(II)イオンが保持さ



**Fig. 3** Binding site structures of Pd•apo-Frs. **a-c**, the three-fold channel structures of L-, I-, and H-Pd<sup>II</sup>•apo-Fr, respectively. **d-f**, the accumulation center structures of L-, I-, and H-Pd<sup>II</sup>•apo-Fr, respectively.

れていることが明らかとなった。

### 3.1. バクテリオファージ T4 の部品蛋白質 gene product 27-gene product 5 複合体

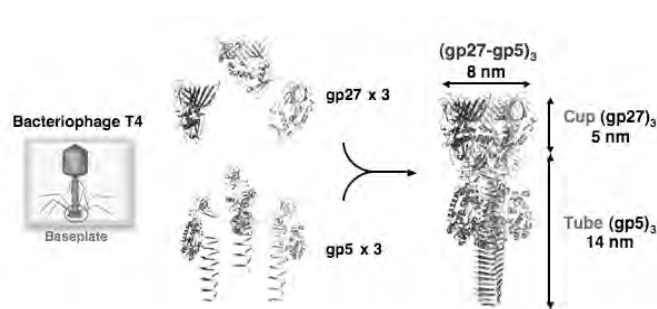
近年、新規なナノ材料創成において、分子レベルで制御された集積構造体が必要不可欠となっている。そのため、規則正しい三次元構造を有する DNA、蛋白質などの生体分子は、機能集積の有用な基盤分子であると考えられる。例えば、球状や棒状ウイルス上へ金属微粒子や蛍光分子、金属錯体などを集積させることで、分子ワイヤーやセンサー等のバイオナノ材料の構築が行われている。しかし、導入する分子の数、種類、および配列の制御、さらに修飾した蛋白質パーツ材料を自在に高次集積化させることは未だに困難である。つまり、これらの問題解決のためには、精密な化学合成のビルディングブロックとして利用できる新たな蛋白質の選択、および蛋白質の三次元構造を分子レベルで考慮した機能分子導入法の確立が必須である。そこで我々は、これまで報告してきた蛋白質単量体と金属錯体の複合化や apo-Fr を用いた金属微粒子の触媒反応をもとに、バクテリオファージ T4 の部品蛋白質の一つであるヘテロ蛋白質複合体(gp27-gp5)<sub>3</sub> への分子機能集積を進めている。この複合体は、全く機能と構造が異なる蛋白質 gene product 27 と gene product 5 がそれぞれ三量体を形成し、さらにヘテロな複合化によってチューブ構造とカップ構造を形成する(Fig. 4)<sup>17</sup>。従って、機能を導入可能な異なる反応サイトが多数存在することになる。そこで、蛋白質の高次集積制御、および蛋白質上での機能分子の集積制御を行った。

### 3.2. 金微粒子形成によるチューブ蛋白質のテトラポッド構造体への集積制御

蛋白質複合体上に化学修飾を用いて様々な機能分子を配置する研究は多数報告されているが、蛋白質複合体の集積を三次元的に制御する研究はほとんど行われていない。そこで、特定のアミノ酸配列が持つ金属イオンや微粒子への親和性を利用して、(gp5)<sub>3</sub> チューブの三次元集積体の作成を試みた<sup>18</sup>。着目したのはイミダゾール基を側鎖に持つヒスチジン(His)を6個含む短い配列(His-Tag)である。本来は Ni イオンとの高い親和性を利用して Ni キレートカラムによる蛋白質精製に用いられる配列だが、三量体から構成されるチューブ蛋白質(gp5)<sub>3</sub>のC末端に導入することによって、合計18個のヒスチジンが集積し、高い金属イオンへの集積能が発現される(Fig. 5)。この(gp5-His)<sub>6</sub>に300等量のKAuCl<sub>4</sub>を加え、NaBH<sub>4</sub>で還元後、単離精製したサンプルのTEM像からは、金微粒子に4つの(gp5-His)<sub>6</sub>が結合したテトラポッド状の構造体が観測された(Fig. 6)。このTEM像から得られた金微粒子の平均粒子径(Fig. 6b)と(gp5-His)<sub>6</sub>の結晶構造解析より得られた(gp5-His)<sub>6</sub>のチューブ径から算出される表面積もこの構造を支持する(Fig. 6c)。さらに、His-Tagを持たない(gp5)<sub>3</sub>とKAuCl<sub>4</sub>の反応では、このようなテトラポッド構造が形成されない事から、His-Tagが3つ集まったC末端領域が金微粒子形成の土台となって(gp5-His)<sub>6</sub>の三次元的な集積を制御していると考えられる。

### 3.3. カップ状空間への鉄ポルフィリン錯体集積による触媒反応場の構築

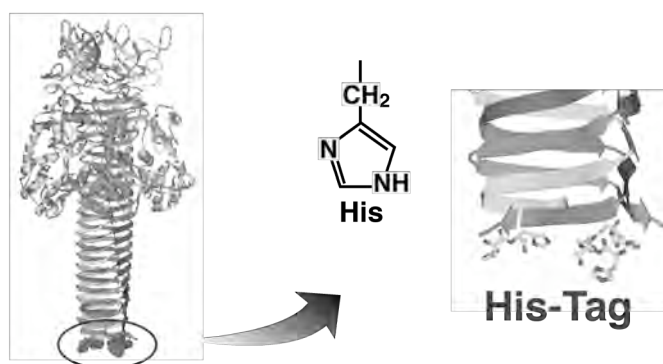
先に述べた Fr の内部空間の反応では、



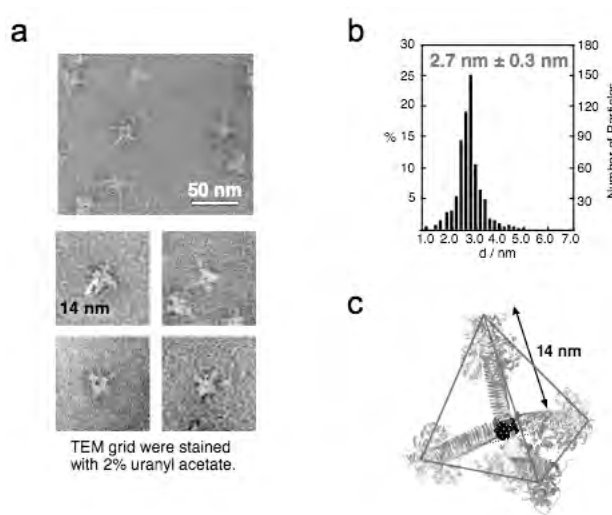
**Fig. 4** The crystal structure of (gp27-gp5)<sub>3</sub> from bacteriophage T4 (PDB ID: 1K28).

#### Bio-nanotube, (gp5)<sub>3</sub>

#### Histidine Fragment



**Fig. 5** Structures of the membrane-puncturing bionanotube complexes of (gp27-gp5-His)<sub>6</sub> from bacteriophage T4 with a close-up view of the His<sub>6</sub> fragment region showing the histidine residues.



**Fig. 6** TEM image of Au<sup>0</sup>/((gp5-His)<sub>6</sub>)<sub>4</sub> and the close-up views (Scale bar: 50 nm) (a), Au<sup>0</sup> nanocluster size distribution (b), and the proposed structure of the composite (c).

金属イオンや基質の取り込みに三回対称軸チャネルのみを使うため、取り込む分子のサイズに制約を受ける場合が多い。しかしながら、チューブ蛋白質(gp5)<sub>3</sub>の上部に gp27 が3つ自己集積することで、内径 3 nm のカップ状空間が形成される(gp27-gp5)<sub>3</sub>では(Fig. 7)、数 nm までの分子を取り込み、固定化できる利点を持つ。そこで、カップ内部へ鉄ポルフィリン(FePP)を集積させ、金属錯体反応場としての利用を試みた。鉄ポルフィリンは、システインチオールとマレイミドの反応を使って(gp5)<sub>3</sub>チューブ上に固定化した<sup>19</sup>。まず、gp5 と gp27 との複合化に影響せず、修飾反応に対し自由度が高い N 末端付近の残基をシステインに置換した(gp27-gp5\_M3C)<sub>3</sub> と(gp27-gp5\_N7C)<sub>3</sub>を作成し、それらの変異体とマレイミド基をもつ鉄ポルフィリン錯体を反応させその固定化を行った。(gp27-gp5\_M3C)<sub>3</sub> とカップ構造をもたない(gp5-M3C)<sub>3</sub> への FePP 修飾反応の比較では、カップ構造を持つ(gp27-gp5\_M3C)<sub>3</sub> のほうが、修飾後の複合体収率が 7 倍程度高かったことから、カップ内部に鉄ポルフィリンを固定化させることで、水溶性の低いポルフィリンの非特異的な分子間会合を抑制し、安定な複合体が形成されたと考えられる。さらに、FePP•(gp27-gp5\_N7C)<sub>3</sub> の結晶構造解析よりシステインチオールに結合したマレイミドまでの電子密度が観測され、カップ内では、FePP がいくつかの異なる構造をとっていると考えられる。この複合体を触媒としてチオアニソールの酸化反応をおこなったところ、固定化していない FePP に比べて 6-10 倍程度の触媒活性を示したことから、カップ構造による疎水空間形成と複合体の安定化による触媒活性の向上が示された。

#### 4. まとめと展望

以上のように、金属イオンを駆使した様々な高次構造を持つ蛋白質への機能化法を報告してきた。ここ数年で、蛋白質の集積制御に錯体化学を取り入れた研究や<sup>20,21</sup>、金属錯体と蛋白質の相互作用を X 線結晶構造解析から精密に分子設計していく試みが活発に報告されるようになってきた<sup>22</sup>。我々の進めている研究においても、Pd<sup>0</sup>•apo-Fr や、FePP•(gp27-gp5\_N7C)<sub>3</sub> の反応は環境調和型触媒の基礎研究やナノバイオ材料の新しい可能性を示すものとして興味を持たれている<sup>23,24</sup>。このように、複雑かつ巨大な蛋白質分子を配位化学のテンプレートとすることによって、これまでシンプルなモデル研究では困難であった蛋白質表面でおこる金属イオンの挙動観察や、生体センサーへの応用、有害物質分解を行うハイブリッド分子の構築が可能となりつつある。今後は、これまでの研究成果をもとに、従来の枠を越えた生体分子集合体を分子基盤とする新しい生体関連化学の領域を確立していきたい。

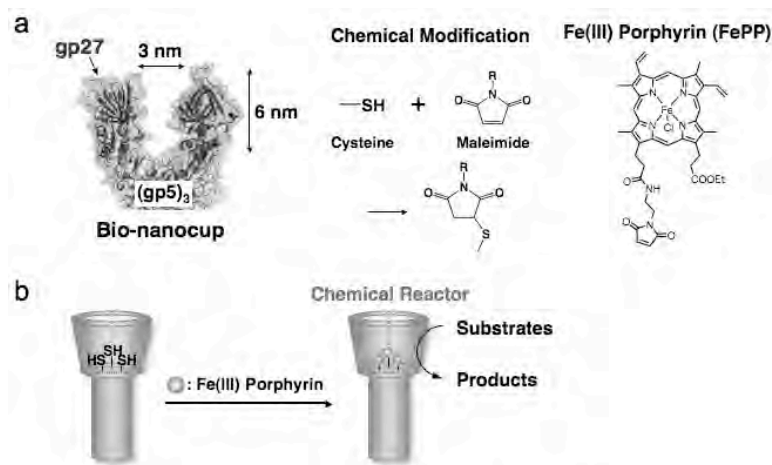


Fig. 7 Section view of the bionanocup (a). A schematic drawing of the conjugation reactions of FePP maleimides and (gp27-gp5)<sub>3</sub> cysteine mutants (b).

謝辞 本研究を遂行するにあたり、全面的にサポートして頂いた名古屋大学物質科学国際研究センター 渡辺芳人教授、共に研究を進めてくれた渡辺研究室のメンバーに深謝致します。特に、鈴木

理子博士 (現東ソー株式会社)、越山友美博士 (現京都大学)、安部 聡博士 (現京都大学)、横井紀彦氏 (名古屋大学)、安部瑞恵氏 (名古屋大学)、三浦友紀氏 (名古屋大学) の不断の努力なくしては、このような成果を生み出す事はできませんでした。さらに、協同研究者の皆様による、最新の蛋白質結晶構造解析や透過型電子顕微鏡測定をはじめとする様々な支援に対し、この場をお借りして心より感謝申し上げます。

## 文献

- (1) Akabori, S.; Sakurai, S.; Izumi, Y.; Fujii, Y. *Nature* **1956**, *178*, 323-324.
- (2) Nuzzo, R. G.; Feitler, D.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3683-3685.
- (3) Lu, Y.; Berry, S. M.; Pfister, T. D. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3047-3080.
- (4) Qi, D. F.; Tann, C. M.; Haring, D.; Distefano, M. D. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3081-3111.
- (5) Abe, S.; Ueno, T.; Reddy, P. A. N.; Okazaki, S.; Hikage, T.; Suzuki, A.; Yamane, T.; Nakajima, H.; Watanabe, Y. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 5137-5139.
- (6) Ohashi, M.; Koshiyama, T.; Ueno, T.; Yanase, M.; Fujii, H.; Watanabe, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1005-1008.
- (7) Ueno, T.; Abe, S.; Yokoi, N.; Watanabe, Y. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 2717-2731.
- (8) Ueno, T.; Koshiyama, T.; Abe, S.; Yokoi, N.; Ohashi, M.; Nakajima, H.; Watanabe, Y. *J. Organomet. Chem.* **2007**, *692*, 142-147.
- (9) Ueno, T.; Koshiyama, T.; Ohashi, M.; Kondo, K.; Kono, M.; Suzuki, A.; Yamane, T.; Watanabe, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6556-6562.
- (10) Ueno, T.; Ohashi, M.; Kono, M.; Kondo, K.; Suzuki, A.; Yamane, T.; Watanabe, Y. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 2852-2858.
- (11) *Handbook of Biomineralization*; Behrens, P.; baeuerlein, E., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2007; Vol. 2.
- (12) Messerschmidt, A.; Huber, R.; Poulos, T.; Wieghardt, K. *Handbook of Metalloproteins, Vol. 2*; WILEY: New York, 2001.
- (13) Granier, T.; Gallois, B.; Dautant, A.; DEstaintot, B. L.; Precigoux, G. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1997**, *53*, 580-587.
- (14) Hempstead, P. D.; Yewdall, S. J.; Fernie, A. R.; Lawson, D. M.; Artymiuk, P. J.; Rice, D. W.; Ford, G. C.; Harrison, P. M. *J. Mol. Biol.* **1997**, *268*, 424-448.
- (15) Ueno, T.; Suzuki, M.; Goto, T.; Matsumoto, T.; Nagayama, K.; Watanabe, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2527-2530.
- (16) Ueno, T. et al. in submission.
- (17) Kanamaru, S.; Leiman, P. G.; Kostyuchenko, V. A.; Chipman, P. R.; Mesyanzhinov, V. V.; Arisaka, F.; Rossmann, M. G. *Nature* **2002**, *415*, 553-557.
- (18) Ueno, T.; Koshiyama, T.; Tsuruga, T.; Goto, T.; Kanamaru, S.; Arisaka, F.; Watanabe, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4508-4512.
- (19) Koshiyama, T.; Yokoi, N.; Ueno, T.; Kanamaru, S.; Nagano, S.; Shiro, Y.; Arisaka, F.; Watanabe, Y. *Small* **2008**, *4*, 50-54.
- (20) Burazerovic, S.; Gradinaru, J.; Pierron, J.; Ward, T. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5510-5514.
- (21) Kitagishi, H.; Oohora, K.; Yamaguchi, H.; Sato, H.; Matsuo, T.; Harada, A.; Hayashi, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10326-10327.
- (22) Ueno, T.; Yokoi, N.; Abe, S.; Watanabe, Y. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 1667-1675.
- (23) Highlight *Green Chem.* **2004**, *6*, G57.
- (24) materialsviews *Materials views* **2008**, February, A1.

## デザインされたペプチドによる細胞膜内 スフィンゴ糖脂質ナノドメインの特異的検出

慶應義塾大学理工学部生命情報学科

松原輝彦

matsubara@bio.keio.ac.jp



研究紹介

生体分子の構造や機能を解析する技術は進展が著しいが、新しい分子をデザインする手法はいまだ模索の状態にある。我々のグループは以前にランダム選択法によって得られたガングリオシド GM1 結合性ペプチドを同定したが、最近になってこのペプチドが神経細胞膜のアミロイドβペプチドの重合に関わる GM1 領域と相互作用する可能性が示された。背景およびこれまでの経緯を含め紹介したい。

### 細胞膜の膜マイクロドメイン「脂質ラフト」

生体膜の脂質は二重層を形成しているが、脂質膜に存在する分子は必ずしも無秩序に分散しているわけではないことが明らかになってきた [1]。ある種の脂質分子は互いに相互作用して膜マイクロドメイン（微小領域）を形成する。この領域は「脂質ラフト (lipid raft)」と命名され、最小構成成分はコレステロールとスフィンゴ脂質である (図 1)。この脂質ラフトによるモデルは古典的な Singer-Nicolson による流動モザイクモデルをベースに、より詳細に脂質分子の挙動を説明したモデルといえる。この脂質ラフトは水面に浮かぶ筏 (ラフト) のように、脂質二重層中で自由に作成および崩壊し、動き回るイメージを与える。脂質ラフトは周囲の脂質より高い相転移温度を持った約 20-100 nm のドメインであり、受容体やシグナル伝達を担うタンパク質を内包する。

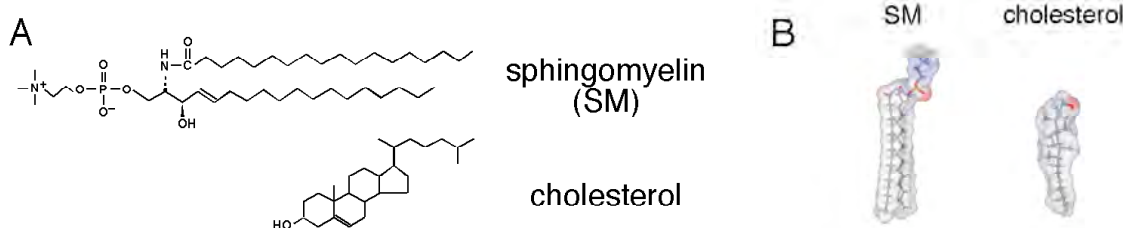


図1 脂質ラフトを構成するスフィンゴミエリン (SM) およびコレステロール。

(A) 化学構造, (B) 分子モデル

この脂質ラフトと関連する病原性分子およびウイルスにヒト免疫不全ウイルス (HIV-1)、インフルエンザウイルス、プリオンタンパク質 (PrP)、アミロイドβペプチド (Aβ) などがあり、これらはスフィンゴ脂質を介した細胞膜との結合や膜融合などに関わっている。例えば、HIV-1 の gp120 はスフィンゴ脂質で誘導されるコンホメーション変化が膜融合に必要であり [2]、インフルエンザウイルスはヘマグルチニンによる膜融合で脂質ラフトが関与する [3]。HIV-1 の gp120 の V3 ループ 2-34 残基、PrP の 179-211 残基、Aβ の 1-25 残基はいずれもヘリックス-ターン-ヘリックス骨格で

脂質ラフト中のスフィンゴ脂質と相互作用する [4]。このように脂質ラフトのスフィンゴ脂質の挙動を追うことは、分子レベルの解明に加え、診断や治療へ応用できる可能性がある。Steinert らはペプチドで脂質ラフト中のスフィンゴ糖脂質を追跡している [5]。

### GM1 結合性ペプチドの同定と立体構造解析

松原らは以前にフェージ提示法によるランダムライブラリーからスフィンゴ糖脂質の 1 つである Gal  $\beta$  1-3GalNAc  $\beta$  1-4(Neu5Ac  $\alpha$  2-3)Gal  $\beta$  1-4Glc  $\beta$  1-1'Cer (GM1) (図 2) に結合する 15 残基のペプチドを同定した [6]。ペプチドによる GM1 への結合活性はタンパク質の場合と比較すると低くなることが予想されたため、GM1 のクラスター状態を模倣した糖脂質単分子膜を利用した。GM1 単分子膜を固定化して親和性選択 (バイオパニング) を行ったところ、同定されたペプチド p3 は GM1 に特異的に結合し (解離定数  $K_d=1.2 \mu\text{M}$ )、コレラ毒素 B サブユニット (CTB) による GM1 の結合を  $\text{IC}_{50}=1.0 \mu\text{M}$  で阻害した [7,8]。

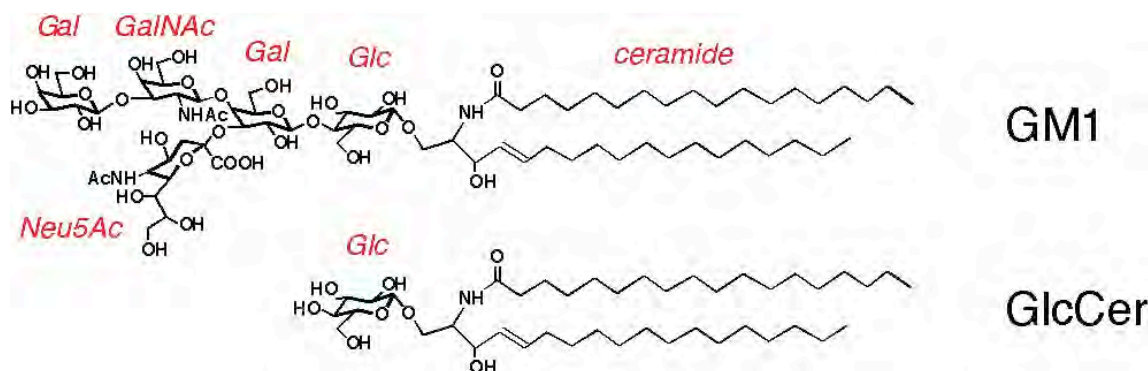


図 2 スフィンゴ糖脂質 GM1 および GlcCer の化学構造

また NMR 解析によって、p3 は糖鎖認識の際にペプチドのコンホメーション変化を伴っていることが明らかになった (図 3) [9]。溶液中では緩やかに中央で折れ曲がり、主鎖および側鎖の自由度が大きい、GM1 と相互作用する際には剛直な主鎖となり、側鎖の自由度がかなり制限されることがわかった。短いながらも N 末端側に  $\beta$  ターン構造、さらに C 末端側に  $3_{10}$ -ヘリックスを形成し

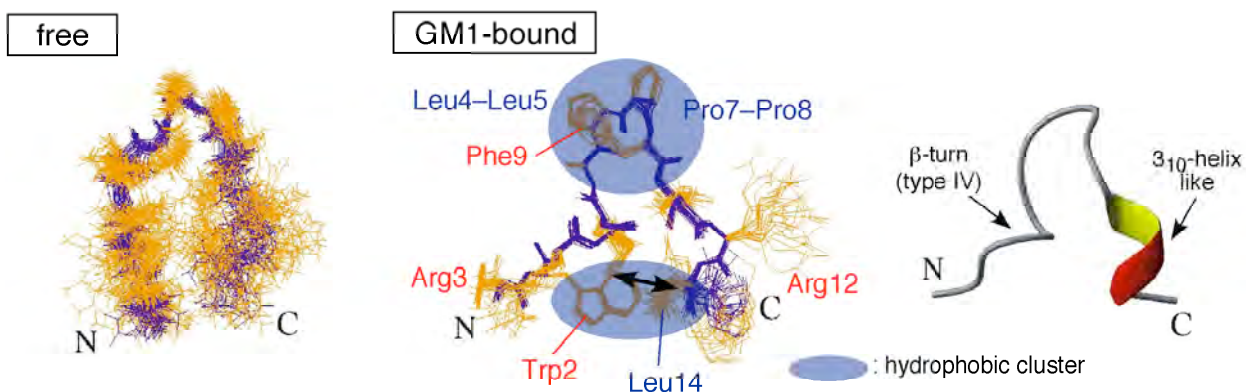


図 3 NMR 解析によって同定された p3 のコンホメーション. 溶液中 (free) および GM1 との相互作用時 (GM1-bound、右は主鎖構造のみ) の可能な構造の 25 の重ね合わせ. 青色は疎水性アミノ酸が集まっている部位を示した。結合モチーフ中のアミノ酸は赤色で示した (Trp2, Arg3, Phe9 および Arg12). p3, VWRLAPPFSNRLLP.

ていることがわかった。人工的に得られたペプチドで、このようなユニークな立体構造を形成できる例はあまり知られていない。特に Trp2 と Leu14 は近い位置にあることで環状のコンホメーションを形成し、折れ曲がり部分および Trp2-Leu14 は疎水性アミノ酸が集まることがわかった。またこの形成により結合モチーフの Arg (3位および12位) および疎水性アミノ酸 (Trp2 および Phe9) が配置される。ここで Arg のグアニジウム基は水素結合が可能であり、疎水性アミノ酸との組み合わせにより協同的に糖鎖認識に関与していると考えられる。タンパク質による糖鎖認識は水素結合と疎水性相互作用であり、これまでの糖鎖認識の知見と矛盾しない。

ペプチドの立体構造の形成は、標的分子を認識する際にエントロピー的に有利に働く。p3 の例でも induced-fit でペプチドの立体構造が形成された。そこでヘリックス-ループ-ヘリックス構造骨格を持つペプチドライブラリーを用いて同様に GM1 に対して親和性選択を行った [10]。このペプチド (35 残基) は中央にループを配置し、N 末端および C 末端の配列が互いに相互作用して 2 本のヘリックスを形成する。ライブラリーは C 末端のヘリックスに 5 つのランダム残基を配置させた。親和性選択で得られたクローンのうち、5 つの残基に Lys、2 つの Arg、Phe および Ala を有するペプチド B72 が同定された (図 4)。B72 はヘリックス構造を形成して GM1 を特異的に認識し、結合親和性は p3 より 5 倍向上した ( $K_d = 0.24 \mu\text{M}$ )。アラニンスキャニングの結果、Arg および Phe が最も結合に寄与し、これらのアミノ酸は p3 での結合モチーフのアミノ酸と同じであった。またヘリックス形成をしない C 末端ペプチドのみでは親和性も特異性も失っていたことから、ヘリックス構造が GM1 糖鎖の特異的な相互作用に必要であることがわかった。

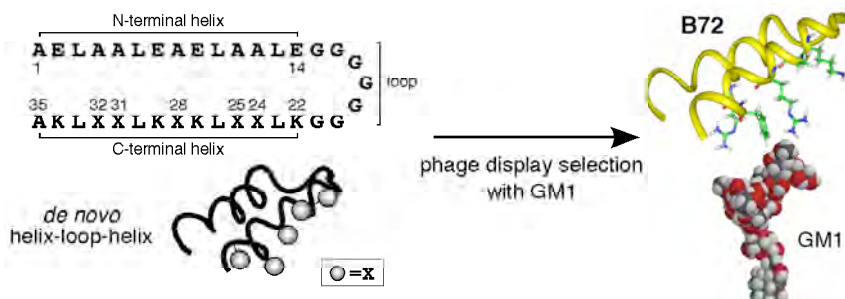


図 4 ヘリックス-ループ-ヘリックスペプチド B72 による GM1 糖鎖認識

完全なランダムライブラリーから得られた p3、立体構造を形成するペプチドから得られた B72 がいずれも標的オリゴ糖鎖に特異的に結合した。どちらのペプチドも立体構造を形成し、直接の相互作用が可能なアミノ酸を配置すれば、目的の結合活性を持つペプチドをデザインできることがわかった。つまり、物理化学的な要素を加味した分子設計を行えば、分子の設計は天然タンパク質の配列に頼る必要はない。これらの結果は、ボトムアップでペプチド (およびタンパク質) がデザインできる可能性を示唆している。

#### GM1 結合性ペプチド p3 は二次元面の集合状態の違いを認識する

生体膜でのスフィンゴ糖脂質含量は数%程度であり、他の脂質が圧倒的に多い。p3 は GM1 単独膜を認識したが、他の脂質が混在した場合にどのような結合挙動を示すだろうか？またどのような

分布の GM1 を認識できるだろうか？脂質単分子膜では 1 種類の脂質だけでなく、他の脂質を加えて混合膜を作製することができる。他の脂質を混合させた脂質単分子膜は、GM1 を二次元に分散させることができる。ここで共存させる脂質は GlcCer (Glc  $\beta$  1-1' Cer) を選んだ。このスフィンゴ糖脂質は GM1 から 4 つの末端糖鎖を除いた構造であり、脂質部分の構造は同じであるので GM1 とほぼ均質に混合すると考えられる。また p3 は GlcCer に結合しないため、GM1 のみに結合した量を検出することができる。

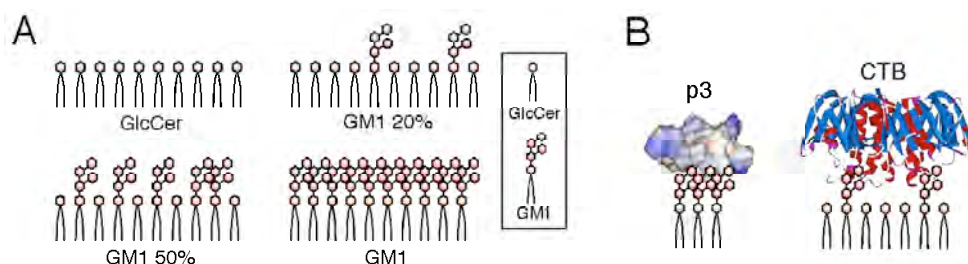


図5 GM1/GlcCer 混合膜での GM1 の分散状態のモデル (A) および予想される糖鎖認識 (B).

異なる比率で混合した GM1/GlcCer 混合単分子膜を準備し(図 5A)、p3 の結合を追跡したところ、GM1 含有量が増加するに従って結合量が急激に増加し、p3 が高い密度の GM1 (> 60 mol%) を認識することがわかった [7]。Hill プロットの結果は  $n=1.8$  となり、2 つの GM1 分子が隣接した状態、もしくは協同的に相互作用してペプチドが GM1 を認識することが示唆された(図 5B 左)。これらの結果は最初の予想通り、ペプチドは高い密度の GM1 しか認識できず、多価効果が必要であることを意味する。

GM1/GlcCer 混合単分子膜に対する同じ実験を CTB に対して行くと、p3 とは異なり GM1 含量が 20 mol% あれば結合することがわかった(図 5B 右)。CTB は GM1 に結合するサブユニットが 5 つあり、1 分子でも多価の効果で高い親和性を有する ( $K_d$  は  $10^{-8}$ - $10^{-12}$ )。つまり、GM1 側の密度に依存せずに結合することができる。

これらの GM1 密度に依存した認識の違いは、ペプチドは GM1 との親和性は低く、CTB は親和性が高いことを意味し、合理的な結果であった。単純な結合親和性の大きさは CTB が優れているが、この結果は p3 を「密度の高い GM1 領域のみを認識するプローブ」として使えるのではないかと、という着想を与える事になった。

### 脂質ラフト中のスフィンゴ糖脂質の集合・分散状態

図 2 に示したように、GM1 は SM と同じスフィンゴ脂質を有していることから、脂質ラフトに濃縮されて存在する。古典的には、脂質ラフトの細胞内の挙動は、GM1 に結合する CTB によって追跡されてきた。まずモデル膜で脂質ラフトの組成の膜を調製する準備を行った。

GM1 の脂質ラフトの脂質成分をモデル化した組成の単分子膜からモデル二分子膜を作製し、水中における原子間力顕微鏡 (AFM) 観察を行った [11]。脂質ラフトの成分である SM およびコレステロール (chol) に加え、マトリックス脂質として不飽和脂肪酸を有する 1-パルミトイル-2-オレオ



イル-ホスファチジルコリン (POPC) を用いた。SM/chol/POPC (10:35:50) (モル比) における表面トポロジーは、高さが約 0.8 nm 異なる二相状態を示し、脂質ラフト様構造を形成することがわかった (図 6A)。大きさは数十 nm の大きさであり、脂質ラフトのこれまでの知見と一致する。ここに GM1 を 5 mol% 加えると、脂質ラフト内にさらに 1.0 nm 高いドメインが見いだされ、「GM1 ナノドメイン」と名付けた (図 6A)。GM1 ナノドメインは脂質ラフト内もしくは隣接して存在し、その大きさは約 65 nm であった。

この脂質膜に p3 を相互作用させたところ、GM1 ナノドメインのみに結合する様子が見られた (図 6B)。周囲の膜から 1.8 nm 高いことから、ペプチドが 1 層結合していることがわかった (NMR の結果より、GM1 相互作用時のペプチドの大きさは 1.1 nm×1.7 nm×1.8 nm 程度)。この p3 の結合により、GM1 ドメインは高い密度で存在していることが示唆された。一方、CTB を相互作用させると、GM1 以外の脂質ラフト領域に結合することがわかった。確かに CTB は脂質ラフトに結合し、マーカーとして機能することが確認された。しかしこの結果は、GM1 ナノドメイン以外の脂質ラフト領域にも GM1 が存在していることを示唆する。これらの観察結果により、AFM で観察された GM1 ドメインは濃度が高いが、脂質ラフトにも低い濃度で GM1 が存在する、と考えた。

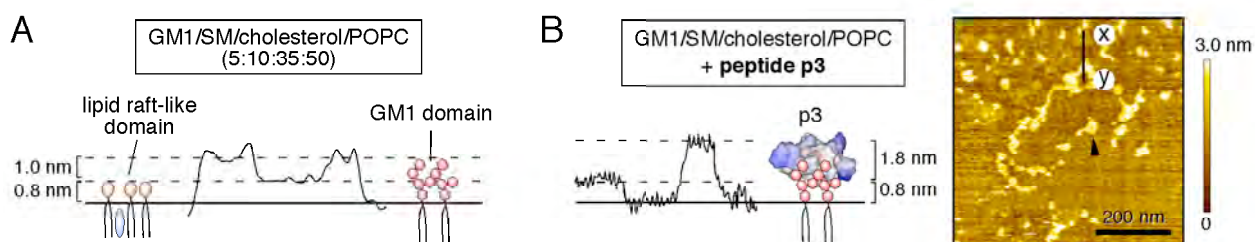


図 6 GM1 含有脂質ラフト組成膜の AFM 観察. (A) GM1/SM/chol/POPC (5:10:35:50) のセクション分析およびモデル. (B) GM1/SM/chol/POPC (5:10:35:50) に p3 ペプチド相互作用させた後のセクション分析 (左) および AFM 画像 (右). 矢印の明るい領域が p3 が結合していることを示す.

### マウス脳海馬シナプトソームの GM1 認識

アルツハイマー病の病理学的な所見の 1 つに、アミロイドβペプチド (Aβ) の沈着による老人斑形成がある (図 7 左)。これは病状の進行とともに海馬と呼ばれる領域から、大脳へ広がること

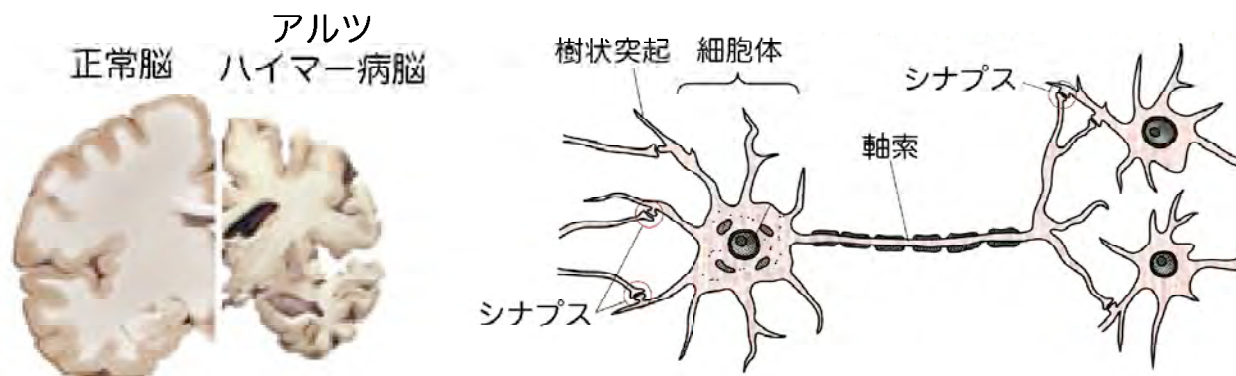


図 7 アルツハイマー病脳 (左) [12] および神経細胞の模式図 (右) [13]

が知られている。A $\beta$ のオリゴマーの細胞毒性が最も高いことや、他の所見（細胞内の $\tau$ タンパク質のリン酸化による神経原繊維変化）などが明らかになってきたが、互いの関連はいまだ不明である。詳細なメカニズム解析は今後の研究を待たねばならないが、早期発見や予防、さらに治療のための薬剤開発が望まれている。現在では抗体や薬物による治療方法が臨床段階にあるが、多方面のアプローチによる解明および治療は今後ますます必要とされるだろう。

柳澤および松崎らは、細胞膜におけるGM1がアミロイド $\beta$ ペプチドの蓄積に関与していることを示し、GM1-bound A $\beta$  (GA $\beta$ )説を提唱した [14]。GM1にA $\beta$ のモノマーが結合すると、「seed」として可溶性A $\beta$ の重合を促進する、という仮説である (図8A)。ここでこのGA $\beta$ 形成に関わるGM1はコレステロール依存的なGM1クラスター (高密度のGM1領域) である必要がある。しかし、CTBは密度に関係なくGM1を認識してしまうため、特異的にGM1クラスターをラベル化することができない (柳澤、私信)。

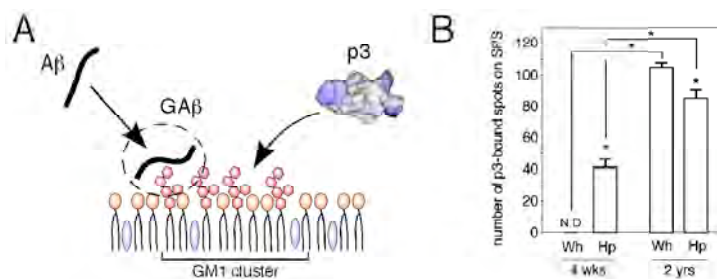


図8 GA $\beta$ 仮説およびp3によるGM1クラスター認識。(A) GA $\beta$ 仮説の模式図。

(B) p3のシナプトソームへの結合 (Wh, 全脳; Hp, 海馬)

若齢および老齢のマウス脳の海馬を単離し、シナプトソーム (シナプス末端の機能を維持した画分、図7右) とp3との相互作用を測定した (図8B) [15]。ここでシナプス膜はGM1が豊富に含まれ、アルツハイマー病脳における最初のA $\beta$ 沈着部位であるという報告がある。測定の結果、p3は若齢よりも老齢で、さらに全脳 (海馬を除く) より海馬で高い結合能力があることがわかった。また神経細胞モデルであるPC12細胞においても、p3がシナプス末端に結合することがわかった。これらの結果は、p3がGA $\beta$ 形成に関わるGM1領域を特異的に認識する可能性を示唆する。

## 最後に

脂質の物性に基づき、物理化学的な研究手法として利用されている脂質モデル膜を親和性選択の条件として利用することでペプチドをデザインした。得られたペプチドは標的糖鎖に特異的な認識を示し、さらに細胞や生体サンプルに対する特異性が示された。物理化学的および有機化学的な知見をもとにデザインすることで、生体内で機能を発揮する可能性のあるペプチドを得る事ができた。

天然物を資源として生理活性物質を探索する手法はいまだ価値のある手法ではあるが、これまで得られてきた知見に基づいて分子をデザインすることも可能になりつつある。最近では計算機支援によってデザインされた分子も市場に出ている (抗インフルエンザ薬「ザナミビル」) [16]。現在は短いペプチドによる結合活性のみであるが、将来的にはタンパク質でより複雑な機能を設計できる

ような手法を開発していきたいと考えている。

## 謝辞

本研究は慶應義塾大学工学部佐藤智典研究室で行われた。共同研究をしていただいた先生方、学生ならびに関係諸氏に感謝する。

## References

- [1] L.J. Pike, *J. Lipid Res.*, **47**, 1597 (2006); H.Lodish ら著、石浦章一ら訳、分子細胞生物学 (第 5 版)、第 5 章、東京化学同人 (2005) などを参照.
- [2] N. Yahi, J. M. Sabatier, S. Baghdiguian, F. Gonzalez-Scarano, J. Fantini, *J. Virol.*, **69**, 320 (1995).
- [3] M. Takeda, G. P. Leser, C. J. Russell, R. A. Lamb, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **100**, 14610 (2003).
- [4] R. Mahfoud, N. Garmy, M. Maresca, N. Yahi, A. Puigserver, J. Fantini, *J. Biol. Chem.*, **277**, 11292 (2002).
- [5] S. Steinert, E. Lee, G. Tresset, D. Zhang, R. Hortsch, R. Wetzal, S. Hebbar, J. R. Sundram, S. Kesavapany, E. Boschke, R. Kraut, *PLoS ONE*, **3**, e2933 (2008).
- [6] T. Matsubara, D. Ishikawa, T. Taki, Y. Okahata, T. Sato, *FEBS Lett.* **456**, 253 (1999).
- [7] T. Matsubara, K. Iijima, M. Nakamura, T. Taki, Y. Okahata, and T. Sato, *Langmuir*, **23**, 708 (2007).
- [8] 松原輝彦, ランダムライブラリーからの選択手法: 糖鎖関連タンパク質の創製に向けて, 生命化学研究レター, **14**, 7 (2004).
- [9] N. Fujitani, H. Shimizu, T. Matsubara, T. Ohta, Y. Komata, N. Muira, T. Sato, and S.-I. Nishimura, *Carbohydr. Res.*, **342**, 1895 (2007).
- [10] T. Matsubara, M. Iida, T. Tsumuraya, I. Fujii, and T. Sato, *Biochemistry*, **47**, 6745 (2008).
- [11] manuscript in preparation.
- [12] Alzheimer's Disease: Unraveling the Mystery, <http://www.nia.nih.gov/Alzheimers>.
- [13] 森 寿ら編集、神経科学イラストレイテッド (改訂第 2 版)、羊土社 (2006).
- [14] 松崎勝巳, 柳澤勝彦, 蛋白質核酸酵素, **49**, 2463 (2004); 柳澤勝彦, 蛋白質核酸酵素, **47**, 344 (2002); 松崎勝巳, 蛋白質核酸酵素, **47**, 351 (2002).
- [15] N. Yamamoto, T. Matsubara, T. Sato, and K. Yanagisawa, *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 2717 (2008).
- [16] M. von Itzstein *et al.*, *Nature*, **363**, 418 (1993).

## 気になった論文



林 剛介 (はやし ごうすけ)

大阪大学大学院理学研究科 化学専攻 博士後期課程3年

大阪大学産業科学研究所

[gosuke26@sanken.osaka-u.ac.jp](mailto:gosuke26@sanken.osaka-u.ac.jp)

この度は、生命化学研究レターでの論文紹介の機会をいただき、嬉しく思うと同時に関係者の皆様にはお礼申し上げます。現在私は、大阪大学産業科学研究所の中谷和彦教授の下、光でスイッチング可能な人工リボスイッチを開発することを目指した研究と、タンパク質合成過程である翻訳反応をアンチセンス核酸によって活性化する研究に取り組んでおります。

昨今、生命科学に対する新しいアプローチとして「Synthetic Biology (合成生物学)」や「一分子生物学」というものがあります。「Synthetic Biology」は、既存の生命体あるいは地球上に存在しないような生命体を、有機化合物や高分子化合物を材料として創り出すことを究極の目標としており、その過程で、これまで発見されてきた数々の生命現象を確認・実証するとともに、「創る」ことで初めて明らかになる新しい生命メカニズムの発見、生命の進化に対する考察を行っていく新しい学問分野です。また、「一分子生物学」は、生体分子の挙動を単一の分子レベルで観察、測定、操作することで、全ての生体分子が同様に振る舞うのではなく、確率論的に個々で異なった挙動を示すという事を明らかにし、生体分子の本質を理解する学問領域です。今回私は、「Synthetic Biology」に関する論文を2報、「一分子生物学」に関する論文を1報紹介させていただきます。

### Template-directed Synthesis of a Genetic Polymer in a Model Protocell

S. S. Mansy, J. P. Schrum, M. Krishnamurthy, S. Tobe, D. A. Treco & J. W. Szostak, *Nature* **454**, 122-125 (2008).

この論文では、著者らが単純な脂肪酸と RNA に似た遺伝物質を用いて、約 40 億年前に誕生したと考えられている原始細胞 (protocell) の一つの候補を創り出した、ということが報告されています。Szostak は、in vitro selection 法や mRNA display 法などの試験管内分子進化法を開発しながら、進化とは化学的にどういうことか?、化学物質だけの世界からどのようにして細胞のような構造体が形成されて行っ

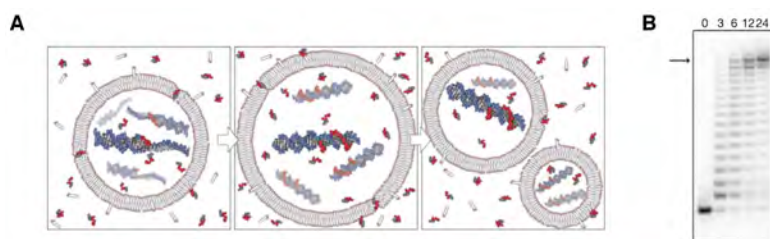


図 1. (A) モデル原始細胞の概念図。 (B) ベシクル内での鋳型伸長反応 (論文より抜粋)

たのか?、という大きな問題に取り組んできており、今回その答えの一つとして、化学的根拠を持った原始細胞を創成するに至りました。この原始細胞は、脂肪酸からなるベシクル（細胞膜）を通して化学的に活性化されたヌクレオチドを取り込み、内側で鋳型 DNA を用いて遺伝的ポリマーを合成することができます。また、将来的には、さらなる脂肪酸を外から加える事で、ベシクルが大きくなり、何らかの物理的な力が働く事で、分裂することが可能だと筆者らは言っています(図 1A)。現在の細胞は強固で動的な性質を持たないリン脂質を基盤とした細胞膜を持っており、外部から栄養素を細胞内部に取り込むことは難しいと考えられます。そこで筆者らは原始細胞の細胞膜候補となる物質を探す事からスタートしました。数種類の脂肪酸とそれに対応するアルコールおよびグリセロールモノエステルを用いてベシクルを作製し、リボースやヌクレオチド誘導体の細胞膜透過性を調べたところ、myristoleic acid (MA) と glycerol monoester of myristoleate (GMM) のペアと decanoic acid (DA)、decanol (DOH)、glycerol monoester of decanoic acid (GMD) の組み合わせがヌクレオチドを透過する膜を形成することを発見しました。最終的に筆者らは、これらのベシクルに鋳型となる DNA を封入しておき、外から活性型ヌクレオチドを加え、ベシクル内でヌクレオチドの重合反応を起こす事に成功しています(図 1B)。このように、生物出現以前に存在してもおかしくない膜に透過性がある事は、太古の原始細胞がチャンネルやポンプ等のタンパク質がなくても周囲の環境から栄養素を取り込む事ができた事を示唆していると考えられます。

### Complete Chemical Synthesis, Assembly, and Cloning of a *Mycoplasma genitalium* Genome

D. G. Gibson, G. A. Benders, C. Andrews-Pfannkoch, E. A. Denisova, H. Baden-Tillson, J. Zaveri, T. B. Stockwell, A. Brownley, D. W. Thomas, M. A. Algire, C. Merryman, L. Young, V. N. Noskov, J. I. Glass, J. C. Venter, C. A. Hutchison III & H. O. Smith, *Science* **319**, 1215-1220 (2008).

1 報目の論文が、化学物質からいかにして原始生物を創るかというボトムアップのアプローチをとっているのに対し、この論文の著者である Venter や Smith らは現存する生物の遺伝子に変異を導入したり欠損させたりして生物が生物であるためには最低何が必要なのかということトップダウンのアプローチを用いて「Synthetic Biology」を行っています。本論文で彼らは最も小さいゲノムを持つ生物であるマイコプラズマに着目し、そのゲノム DNA (583 kb) を化学合成されたオリゴヌクレオチドのみを出発原料として全合成する事に成功しています。彼らの実験結果は、ある生体のゲノム DNA を初めて合成した、という意義を持つだけでなく、583 kb という今まででは考えられない大きさの DNA を作り出した(この論文以前の合成 DNA の最

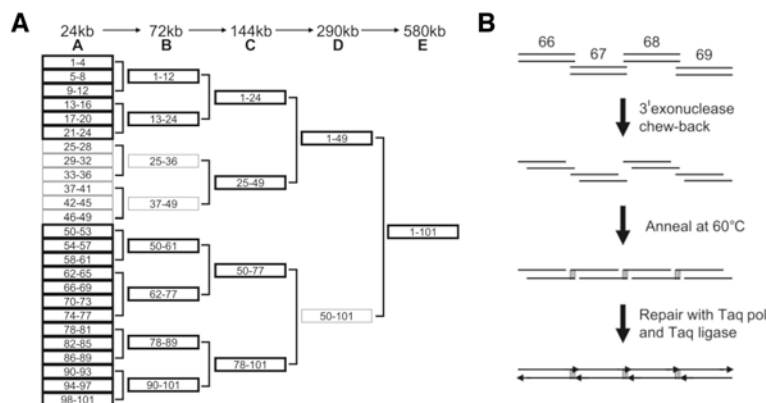


図 2. (A) 101 の断片からゲノムを作製する計画図。(B) 個々の DNA フラグメントを結合させる手法 (論文より抜粋)

大サイズは 32 kb) という事、またその方法論も非常に注目に値するものだと考えられます。今回のマイコプラズマゲノムの全合成では、まずゲノム配列を 101 個の断片に分け、それぞれを DNA 合成によって合成した後、そのフラグメントを 4 つずつ繋ぎ合わせ、さらにそれらを繋ぎ合わせて、繋ぎ合わせる操作を 5 回行う事で、最終的に 583 kb の DNA を合成しています (図 2A)。この繋ぎ合わせる作業で鍵となるのが T4 ポリメラーゼの 3' エキソヌクレアーゼ活性を用いた「chew-back」という技術で、DNA のフラグメントの末端に 5' 粘着末端を作る事でスムーズに各フラグメントを繋げています (図 2B)。また各ステップで毎回 DNA の配列解析を行って、正しい配列が合成されているかどうかを確認しています。このようにして筆者らはマイコプラズマのゲノム DNA をオリゴヌクレオチドレベルから合成したわけですが、ゲノム DNA の合成が可能だということは、任意の位置に変異を加えたり、ある遺伝配列を抜き去ってみたり、遺伝子の配置をかえたりする事が可能になり、様々な新しい知見を得ることができるようになります。また、彼らは「genome transplantation」というゲノム DNA の移植技術 (細胞の中の DNA を抜き出して他の DNA を注入する手法) もすでに開発しており、将来的には合成したゲノム DNA をマイコプラズマに移植して実験を進めて行くと考えられ、非常に楽しみな研究でもあります。

### Following Translation by Single Ribosomes One Codon at a Time

J.-D. Wen, L. Lancaster, C. Hodges, A.-C. Zeri, S. H. Yoshimura, H. F. Noller, C. Bustamante & I. Tinoco Jr., *Nature* **452**, 598-603 (2008).

最後の論文は、一分子測定技術を活用してタンパク質合成反応である翻訳反応を世界で初めて単分子レベルでリアルタイムに計測した、という論文です。リボソームが mRNA の上を 1 コドンずつ停止と転座を繰り返しながら進んで行く様子が観察されています。Bustamante は光ピンセットを用いた一分子生物学の先駆者であり、これまでに DNA や RNA の構造と機能を光ピンセットを用いて研究してきました。そこで今回著者らはヘアピン構造をとる 1 本の mRNA の両端を光ピンセットで捉えて一定の力をかけ続け、その上を 1 個のリボソームが進む事でヘアピン構造がほどけて光ピンセットの両端の距離が変化するところを観察しました。具体的な実験としては、まず、5' 末端が Biotin あるいは Digoxigenin で標識された DNA を mRNA の 5' 側と 3' 側にそれぞれハイブリさせます。そこに Streptavidin、あるいは Digoxigenin 抗体で覆われたポリスチレンビーズを結合させ、そのビーズに光を照射してビーズをトラップして、その後リボソームによる翻訳反応を行い、ビーズ間の距離の変化を観察しています (図 3)。この実験からリボソームは一定の速さで mRNA の上を動くのではなく、停止と転座を繰り返しながら進む、それも RNA の 2 次構造や他のファクターによって停止の時間が異なってくる (転座の時間は常に一定だった) ことが明らかになりました。また、統計的な解析から、リボソームの停止は 2 つの律速段階に支配された過程であり、転座にも 3 つ

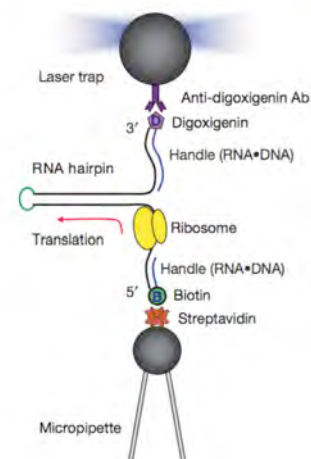


図 3. 実験デザイン (論文より抜粋)

のサブステップが存在する事が判明しました。このように単分子計測技術をうまく利用する事で、これまで得る事ができなかった知見を得る事ができたという一分子測定技術の力強い一面を見せつけた研究です。



中木戸 誠 (なかきど まこと)

東京大学新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 博士課程1年

kk087341@mgs.k.u-tokyo.ac.jp

この度は生命化学研究レターへの執筆機会を頂き、心よりお礼申し上げます。現在、私は東京大学大学院新領域創成科学研究科の津本浩平准教授の下で、病原性微生物の膜表面に存在する機能未知蛋白質の機能および性質の解明を目指した研究を行っております。将来的には、これらの解析結果を基に、能動的に標的蛋白質の機能を制御する、あるいは蛋白質自体を工学的に応用するという事を目指していく事を考えています。そこで、今回は、低分子化合物を用いて蛋白質の機能に影響を与え、その結果、細胞の分化や再生に影響を与えることに成功したという論文を2報、また、ジンクフィンガーを基に作成したヌクレアーゼによってゲノムを改変することに成功したという論文を1報紹介させていただきます。

### Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2

D. Huangfu, K. Osafune, R. Maehr, W. Guo, A. Eijkelenboom, S. Chen, W. Muhlestein, and D. A. Melton, *Nat. Biotechnol.*, **26**, 1269-1275 (2008).

まずは流行の iPS 細胞関連の論文をご紹介します。再生医療や研究試料への応用等、非常に期待の大きな iPS 細胞ですが、作製する際に、リプログラミングの効率の低さやリプログラミングに必要なだとされていた遺伝子に癌関連遺伝子(C-Myc, Klf4)を含むといった点が挙げられています。本論文は、C-Myc, Klf4 遺伝子が細胞のリプログラミング自体に必須ではなく、リプログラミング効率を高めるために必要であるという

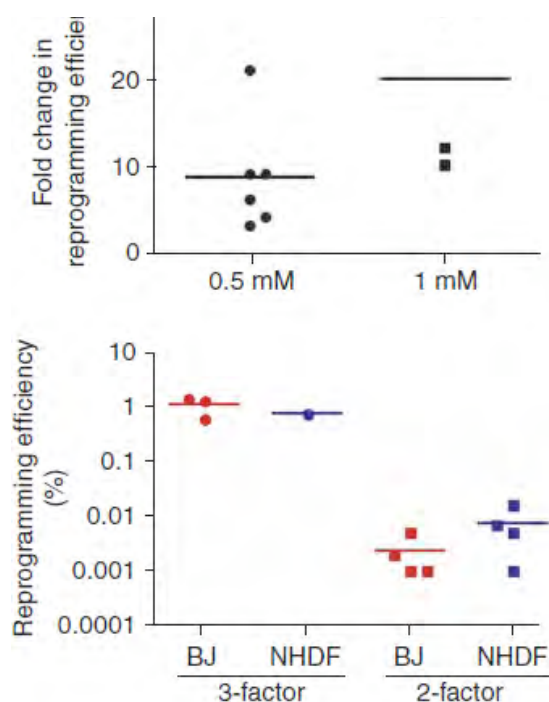


図1. (上) VPAの添加による細胞のリプログラミング効率の上昇度合い (下) VPA存在下における C-Myc, Klf4 を除いた因子によるリプログラミング効率 (論文中より抜粋)

報告や、ヒストン脱アセチル酵素や DNA メチル基転移酵素が細胞のリプログラミングを阻害している、といった報告を基に、ヒストン脱アセチル酵素阻害剤である valproic acid (VPA)を用いてリプログラミング効率を高めることにより、C-Myc, Klf4 という癌関連遺伝子を用いることなく iPS 細胞を作製することに成功しています (図 1)。この方法によって作製した iPS 細胞は、4 つの因子によって作製した iPS 細胞同様、3 つの胚葉への分化能を有し、さらに DNA のメチル化パターンや遺伝子の発現パターンも ES 細胞と酷似しているという結果が得られています。

この研究により、癌関連遺伝子を導入することなく iPS 細胞を作製することに成功した、ということだけでなく、複数の因子を導入することによってどのようなメカニズムによって細胞のリプログラミングが起こっているか、という機構の解明へも一歩前進したのではないかと思います。近い将来、蛋白質を用いることなく低分子化合物のみによって高効率に、かつ副作用を起こすことなく細胞のリプログラミングを行うことができるようになるのかもしれない。

### Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer

B. Chen, M. E. Dodge, W. Tang, J. Lu, Z. Ma, C-W. Fan, S. Wei, W. Hao, J. Kilgore, N. S. Williams, M. G. Roth, J. F. Amatruda, C. Chen, and L. Lum, *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 100-107 (2009).

Wnt ファミリーに属する蛋白質群によるシグナル伝達は、胚の発生から骨の再生、毛髪の伸長におけるまで、非常に幅広い機能に関連しており、また、癌の発生にも関与していると考えられています。この Wnt 蛋白質群によるシグナル経路を自在に制御できることが可能になれば、癌の治療薬や、器官の再生といった治療にも大きく貢献することが期待されます。

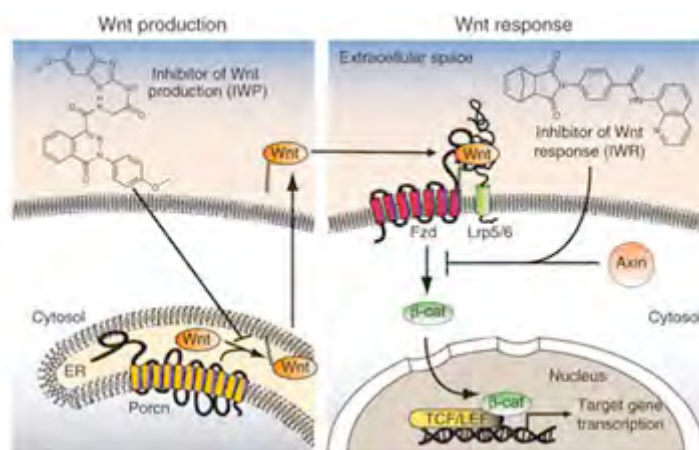


図2 IWP, IWRによるWntシグナル阻害の模式図

本論文は、およそ 20 万種の低分子化合物のライブラリの中から、多段階のスクリーニング過程を経て、Wnt シグナルを阻害する低分子化合物を 9 種獲得し、その作用機構によって Inhibitor of Wnt production (IWP) 4 種と Inhibitor of Wnt response (IWR) 5 種に分類し、これらの化合物による Wnt シグナルの阻害機構に関して生化学的解析を行っています。まず、IWP に関して、Wnt が分泌されるために必須であるパルミトイル化を行う酵素である Porcupine を過剰発現することによって IWP による Wnt シグナルの阻害を軽減することができる、IWP を加えることによって実際に Wnt のパルミトイル化が阻害されている、といった結果から、IWP は Porcupine に作用することによって Wnt のパルミトイル化を阻害し、分泌されなくなることによってシグナル伝達を阻害していること、さらにはその阻害メカニズムは IWP が直接 Porcupine と結合することによるものであることを明らかにしています。次に、IWR に関し



て、IWR で処理した細胞では蓄積する  $\beta$ -カテニンの量が減少することから、 $\beta$ -カテニンを破壊し、その蓄積量を調節する複合体に着目して生化学的な解析を行っています。その結果、IWR で処理することにより、その複合体の構成蛋白質である Axin2 の細胞内濃度が増加するが他の構成蛋白質の量は変化せず、また IWR によって  $\beta$ -カテニンのリン酸化が促進されている、といった結果から、IWR は  $\beta$ -カテニンの破壊複合体の構成蛋白質である Axin2 に直接結合し、安定化することによって  $\beta$ -カテニンのリン酸化、さらにはそれに続くプロテアソームによる分解経路を促進することによって  $\beta$ -カテニンの蓄積を阻害し、Wnt /  $\beta$ -カテニンシグナル伝達を阻害していることを明らかにしています。

続いて、*in vivo* での効果を確認するため、水槽の水中に IWP あるいは IWR を加えて飼育したゼブラフィッシュを用いて、その効果を解析しています。その結果、IWP に関しては効果がなかったものの、IWR に関しては、水中に添加することで、ゼブラフィッシュの尾びれを切断した後の回復が阻害される、胃腸の細胞の恒常的な再生が抑制されるといった効果が確認されています。また、IWR を除くことによってこれらの機能は正常に回復することも確かめられました。

上述のように、Wnt 蛋白質群は、癌や様々な疾患、あるいは器官の発生や再生に関連していると考えられているため、このようにして得られた、Wnt シグナルを特異的に、かつ可逆的に阻害することのできる低分子化合物は、これらの疾患の治療や発生メカニズムの解析、さらには再生医療といった分野への貢献が期待されます。

### Establishment of HIV-1 resistance in CD4<sup>+</sup> T cells by genome editing using zinc-finger nucleases

E. E. Perez, J. Wang, J. C. Miller, Y. Jouvenot, K. A. Kim, O. Liu, N. Wang, G. Lee, V. Bartsevich, Y-L. Lee, D. Y. Guschin, I. Rupniewski, A. J. Waite, C. Carpenito, R. G. Carroll, J. S. Orange, F. D. Urnov, E. J. Rebar, D. Ando, P. D. Gregory, J. L. Riley, M. C. Holmes, and C. H. June, *Nat. Biotechnol.*, **26**, 808-816 (2008).

最後に、上の2つの論文とは異なり、蛋白質を道具として用いた論文をご紹介します。後天性免疫不全症候群(AIDS)は世界中で発症が拡大しており、また、未だに完治することのできない疾患です。そのため、AIDS の原因となるヒト免疫不全ウイルス(HIV)の感染を防ぐことは非常に重要な課題であるといえます。

本論文は、HIV は感染の際、T 細胞上の CCR5 というケモカインレセプターを介して感染するという報告や、また、CCR5 の遺伝子中に 32 塩基の欠損を持ち、正常に機能しない CCR5 遺伝子を保有している人々でも特に障害はなく、それらの人々は HIV の感染に抵抗性を有しているという報告を基に、特定の塩基配列を認識するジ

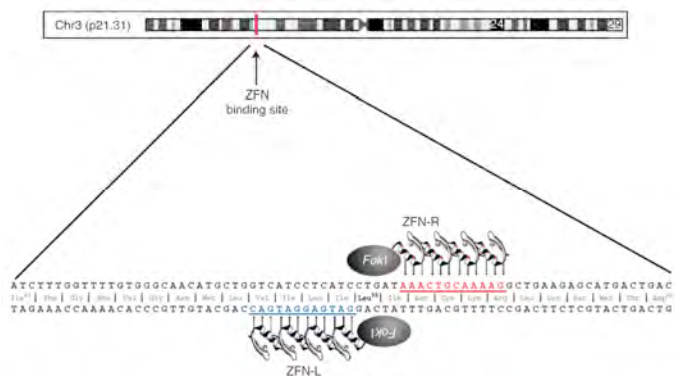


図3 Zinc-finger nucleaseによるCCR5遺伝子の破壊の模式図

ンクフィンガーモチーフ数個と非特異的に塩基配列を切断するヌクレアーゼを組み合わせることである程度特異性を持って遺伝子を切断することを可能にした人工ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) を用いてゲノム上の CCR5 遺伝子をホモ接合型に破壊し、HIV の感染に対する影響を解析しています。ZFN による CCR5 遺伝子の破壊は、株化された細胞および健常人から採取した細胞双方に対して有効であり、この破壊効果は遺伝子修復機構の存在下でも長期に持続すること、そして実際にこの処理によって細胞への HIV の感染が抑制されていることが示されています。また、ZFN 処理を行った CD4<sup>+</sup>T 細胞と HIV に感染している抹消血細胞をマウスに接種したところ、正常細胞のみが HIV によって破壊され、マウス内に存在する CCR5 遺伝子破壊細胞の割合が徐々に増加することにより、マウスの血中 HIV 濃度が低下し、T 細胞全体の量は減少しないという結果から、HIV 感染の予防だけでなく、HIV 感染後の治療への可能性も示しています。一方、ジンクフィンガーに非特異的に塩基配列を切断する制限酵素をリンカーでつなぐという仕組みのため、破壊する箇所にある程度ばらつきが出てしまい、自己抗原性を得てしまう可能性がある、標的の配列に似た塩基配列を持つ遺伝子も破壊してしまう、といった問題点があり、実用化にはまだまだ仕組みの改良および安全性の検証が必要であると考えられます。しかし、こういった研究が発展すれば、近い将来、AIDS は不知の病でなくなるのかもしれない。



# 生命化学研究法

## ノックアウトマウスの作製のコツと 復帰可能なノックアウトマウス作製法について

群馬大学生体調節研究所細胞構造分野 原田彰宏

(平成 21 年 4 月より大阪大学医学系研究科細胞生物学教室に異動予定)

私は 1990 年から 2001 年まで東京大学医学部細胞生物学教室に在籍して微小管関連蛋白や微小管依存性モーター蛋白（キネシン、ダイニン等）のノックアウトマウス作製の立ち上げと解析に従事し、また 2001 年から現在まで群馬大学生体調節研究所でそのノウハウを活かして細胞の形（極性）、分泌に重要と考えられる分子のノックアウトマウスを作製している。群馬に移ってからは 25 種類のノックアウトマウスを作製したが、その相同組換え効率やマウス作製の成功率は他の研究室に比べてかなり高いと考えている。

今回はその方法、特に復帰可能なノックアウトマウス（revertible knockout）の作成法について記したいと思う。

まず最初に効率の良いノックアウトマウスの作成法について書きたいと思う。

一般にはノックアウトマウスの作製において、人為的にはどうしようもないと考えられている以下の 2 つの技術的な壁がある。

- 1) homologous recombination を起こした ES 細胞がとれるかどうか
- 2) germline にいくかどうか

しかしこれらはかなりの確率で乗り越えることが可能である。

そしてそれは作製を始める段階で大体決まってしまう。

今回はその方法について記したい。まず、

- 1) homologous recombination を起こした ES 細胞がとれるかどうか  
についてであるが、巷で言われる 2 つの秘訣がある。

A) long arm の長さ と B) negative selection (tk ないしは DT-A) を行うかどうか である。

我々は A については 6kb 以上、B については通常 DT-A を用いているが、それで特に問題はないようである。

しかしそれ以上に重要なのは positive selection marker に何をを使うか？

ということであり、我々は positive selection marker の選択がよいため、homologous recombinant を得ていると考えている。しかしこの事実に関しては殆ど解説書や文献には触れられていない。そのため、ここで紹介する意義に足りるものと我々は考えている。

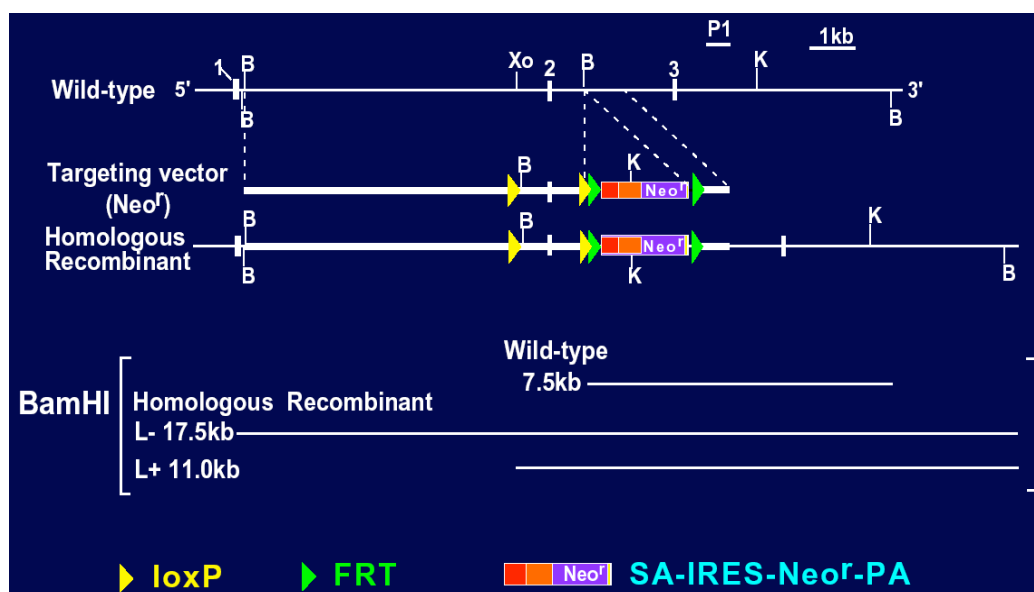
我々が positive selection marker を選ぶ際の protocol を以下に記す。

我々は、まず knockout する遺伝子が ES 細胞で発現しているかどうかを RT-PCR 法で調べることにしており、ES 細胞で発現している分子、発現していない分子に分けて方法を変えている。

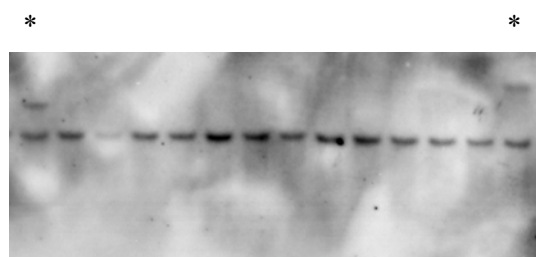
1) ES で発現している遺伝子の knockout では promoter trap 法を用いる

つまり、SA (splice acceptor)-IRES (internal ribosomal entry site)の後ろに promoter なしの beta-geo (LacZ と neo の融合遺伝子)+poly A signal を付けている

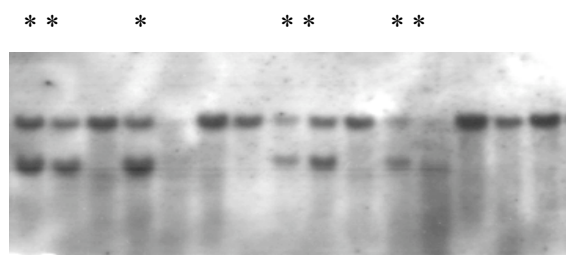
SA-IRES の後ろに beta-geo を付けた時は、以下の例では neo を付けた時よりも homologous recombination の効率が4倍程上がる。



Neo 遺伝子を positive selection marker に用いた場合 (下記の\*が homologous recombinant) の genomic southern blot: Homologous recombination の確率 : 28/168=1/6 (16.8%)



beta-geo 遺伝子を positive selection marker に用いた場合 (下記の\*が homologous recombinant) : Homologous recombination の確率 : 138/212=約 2/3 (65.2%)

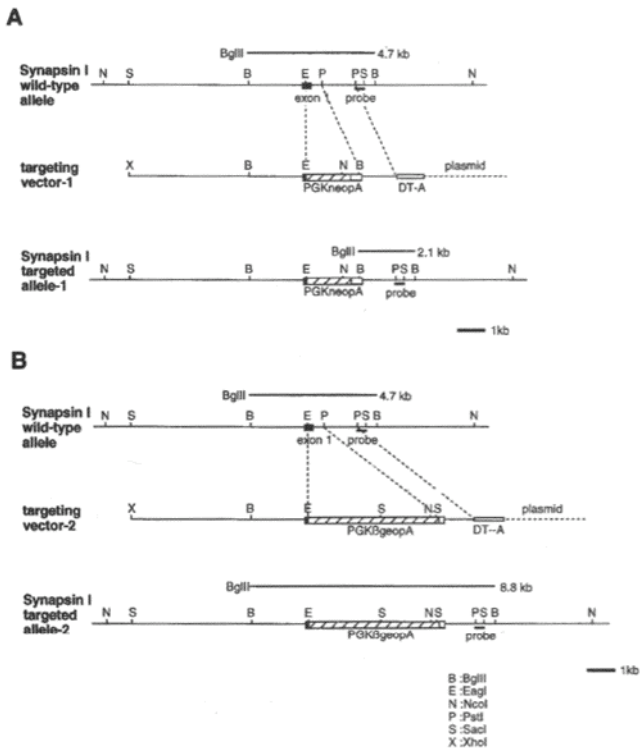


2) ES で発現していない遺伝子ではどうするか？

通常の promoter 付きの beta-geo を用いるが、その際、beta-geo の coding region に mutation が入って、G418 耐性が低下しているものを選ぶ(最近使われているものは殆ど mutation が直されているので、古くから使われているものをもらう：当方からも譲渡可能)

\* neo (mutation+) と beta-geo (mutation+) の比較をすると beta-geo の方が homologous recombination の効率は高い

例として下に synapsin I knockout (Journal of Cell Biology 131, 1789 1995) で我々が観察した例を挙げる。



相同組換えの効率

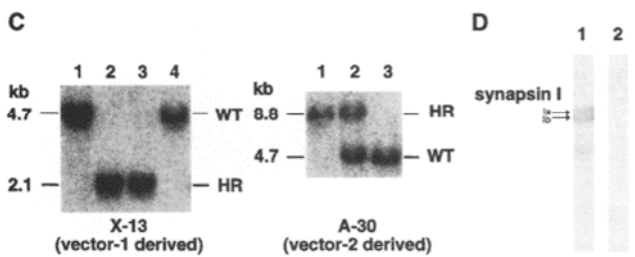
- Neo を用いた場合：2/310 (0.645%)
- beta-geo を用いた場合：11/121 (9.1%)

homologous recombination の効率は

$$9.1 / 0.645 = 14 \text{ 倍!}$$

\* 理由としては beta-geo の方が G418 に対する耐性が弱いため、転写活性の高い染色体上の部位にうまく入らない (random integration の多くがこれに相当すると思われる) と G418 sensitive になるからではないかと思われる

beta-geo (mutation+) の homologous recombination 効率は非常に高く、SA を用いた場合に匹敵することもある



**図の説明** A) neomycin 耐性遺伝子を用いた synapsin I のノックアウト (上：synapsin I の野生型遺伝子、中：targeting vector、下：相同組み換えを起こした遺伝子)； B) beta-geo (beta-gal 遺伝子と neomycin 耐性遺伝子の融合遺伝子) 遺伝子を用いた synapsin I のノックアウト (上：

synapsin I の野生型遺伝子、中：targeting vector、下：相同組み換えを起こした遺伝子)； C) (左) A のベクターを用いた時のゲノム DNA のサザンブロット レーン 1, 4 が野生型遺伝子のみを持つ ES 細胞、レーン 2, 3 が相同組み換え体の遺伝子のみをもつ ES 細胞。(右) B のベクターを用いた時のゲノム DNA のサザンブロット レーン 1 が相同組み換え体の遺伝子のみを持つ ES 細胞、レーン 2 が野生型遺伝子と相同組み換え体の遺伝子を持つ ES 細胞、レーン 3 が野生型遺伝子のみを持つ ES 細胞； D) 野生型マウスとシナプシン 1 欠損マウスの脳の免疫染色 (レーン 1 が野生型、レーン 2 がシナプシン 1 欠損マウス)。

\* 相同組み換えの効率が高いことは非常に重要である。特に最近良く行われている時期・組織特異的ノックアウト法 (conditional knockout) を用いる際には、1つの loxP 配列を薬剤耐性遺伝子と離しておかざるを得ず、両方の loxP が入った construct が得られる確率は全部の相同組換え体の中の 1/5-1/2 に過ぎないからである。

## 2) germline にいくかどうか

これは、ES 細胞の種類を問わず、質の良い ES 細胞を用いることに尽きる。

ただ、我々が特に注意しているのは、

「germline transmission が確認されている」とされる ES 細胞でも culture の protocol が譲渡先と自分達の間で微妙に違ったりする場合もあるため、

targeting vector を導入する前の普通に培養している ES 細胞が germline に通るか、必ず事前に確認している。何も遺伝子導入していない ES 細胞が germline に行かない場合は、細胞を買い直すかもらい直して germline transmission 効率の高い ES 細胞を選ぶことが何よりも重要である。

特に homologous recombinant が 1、2 個しかない場合、その ES 細胞の germline transmission 効率の高さが実験全体の成否を握ることになりかねないため、慎重に選んだ方がよい。

次に我々が開発した復帰可能なノックアウトマウス作成法 (revertible knockout) について記したいと思う。

概念図を p39 に記す。

図 A はこの作成法の際に用いる targeting vector の模式図を示す。

この vector の要は

- 1) 薬剤耐性遺伝子 (neo、または beta-geo) の前に強力な splice acceptor シグナルとその後に internal ribosomal entry site (IRES) を置くこと
  - 2) その「SA+IRES+薬剤耐性遺伝子」を FRT という Flp recombinase で認識される配列で挟み、そのすぐ上流 (またはすぐ下流) に loxP という Cre recombinase によって認識される配列をおく
  - 3) 2 と標的遺伝子のエクソンを挟むイントロンにもう 1 つの loxP 配列を入れる
- ということになる。

もしこの targeting vector を ES 細胞に導入し、homologous recombination をおこさせた遺伝子座 ('Targeted allele') では挿入された薬剤耐性遺伝子の前のエクソンからの転写が薬剤耐性遺伝子の前の splice acceptor によってトラップされ、薬剤耐性遺伝子が転写されるものの、その転写産物が polyA シグナルによって切られるため、その後の標的遺伝子のエクソンは転写されず、遺伝子産物が出来なくなってしまう。

そのような ES 細胞からマウスを作製し、そのマウスを用いて概念図 B のような作業を行う。

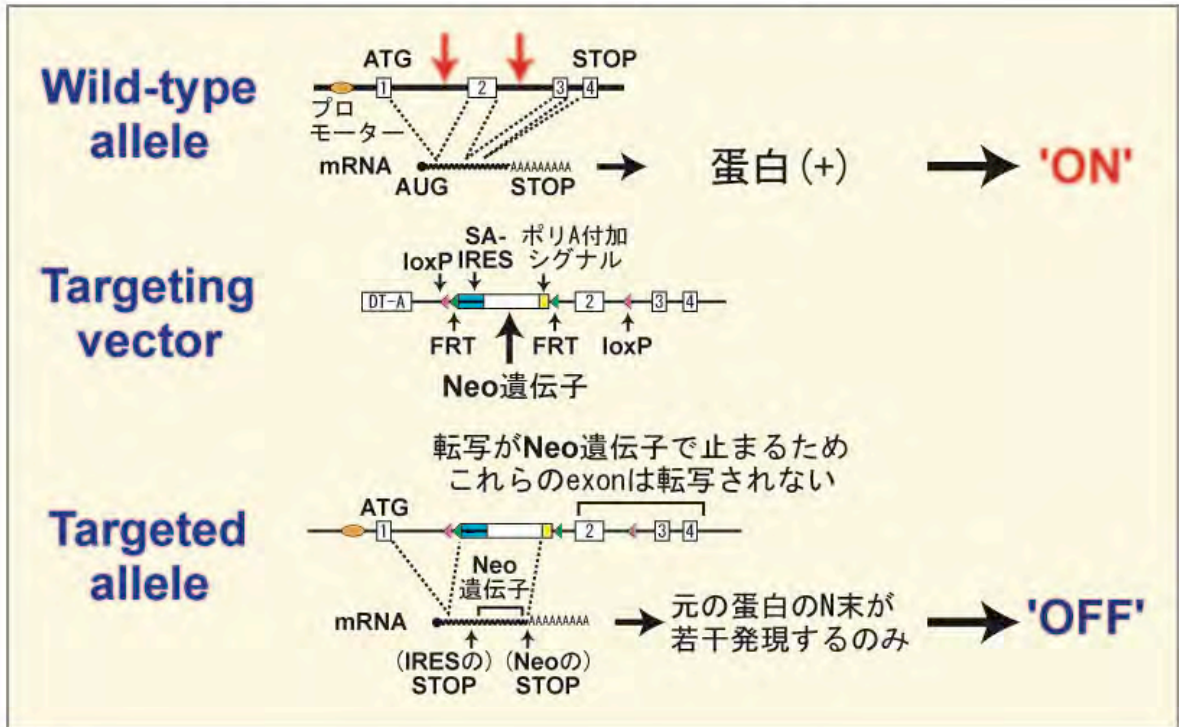
図 B では、そのような遺伝子座を持つマウスを Flp recombinase を全身で発現するマウスを交配すると、2つの FRT 配列の間で組み換えがおきてその間の DNA が削除される。すると図 B の左下図に

あるように、splice acceptor が削除されるため、標的遺伝子の発現が復活する。つまり復帰変異体を得ることが出来る。この手法の利点はこの時点でまだ2つの loxP が残るため、このマウスを用いて時期・組織特異的ノックアウトマウスの作製が出来ることである (図 B の右下図)。

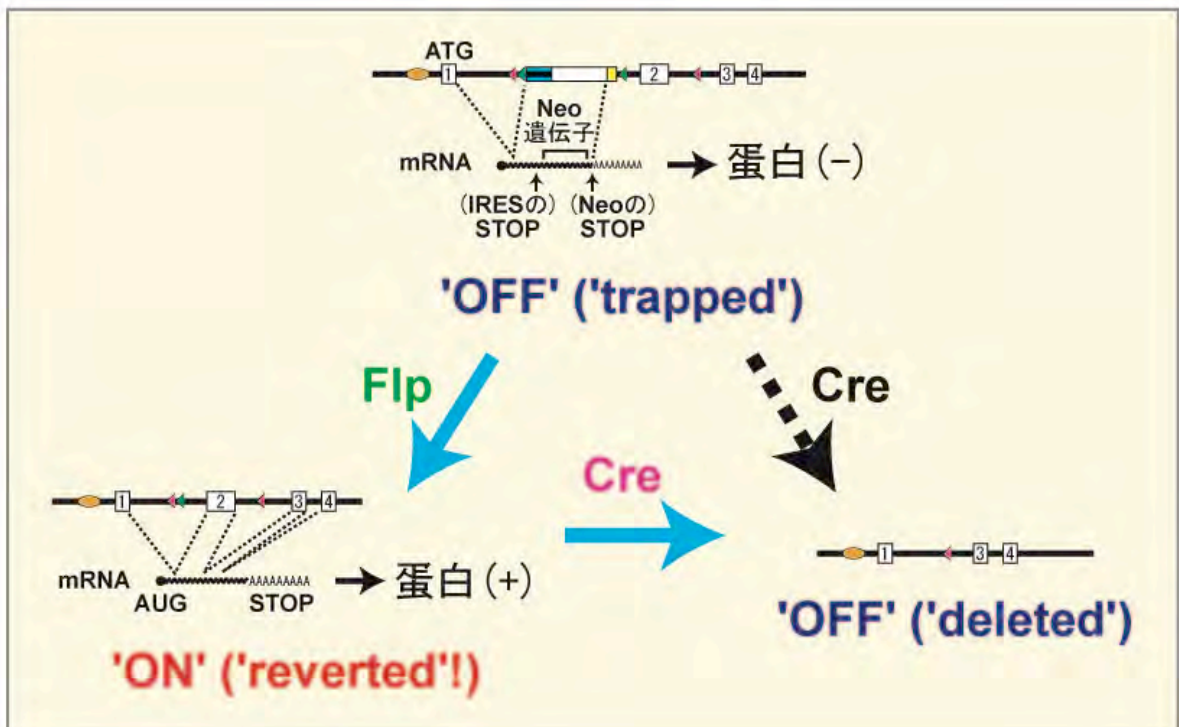
既にこの方法を用いた例 (Rab8 knockout) を p36 に掲載した。

## Reversible knockout の概念図

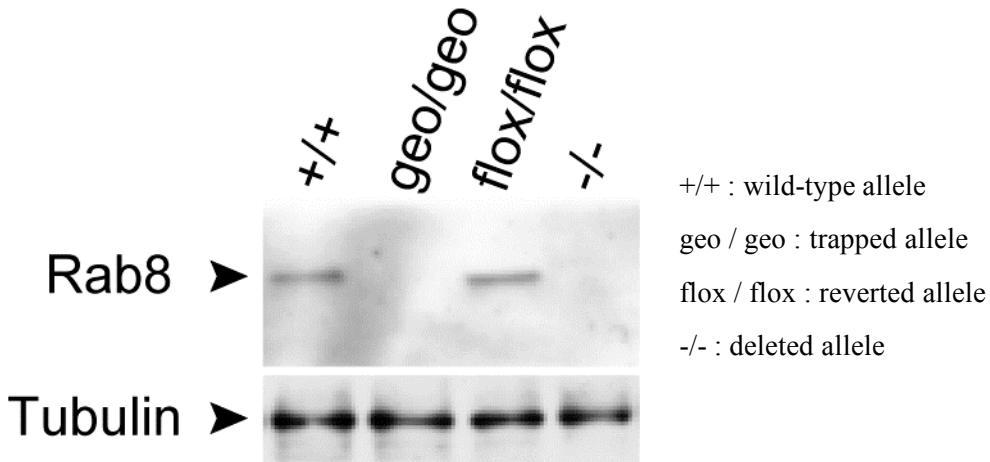
概念図 A



概念図 B



我々は本当にこの Rab8 の ‘trapped allele’ で遺伝子産物の発現が無いか、また ‘reverted allele’ で遺伝子産物の発現が回復するかについて、western blot を用いて確認しており、理論どおりに産物が ‘trapped allele’ で消失していること、また ‘reverted allele’ で再発現していることを確認している (下図)。



このベクターを用いて、現在我々は細胞の極性に重要といわれる遺伝子の殆どについて復帰可能なノックアウトマウスを作製し、現在は細胞極性に関与する新規遺伝子を線虫の系で発見し、それらの新規遺伝子についてもノックアウトマウスを作成中である。

我々の研究について興味のある方、また今回御紹介した positive selection marker (無償で譲渡可能) について興味のある方は、原田 彰宏 (harada-a@umin.ac.jp) にお問い合わせ頂きたい。



## 米国スタンフォード大学留学体験記



臼井一晃

Stanford University

Department of Chemistry

Kool 研、 博士研究員

うすい かずてる usui5633@stanford.edu

私は 2008 年 3 月に九州大学大学院薬学研究院の末宗洋教授のもと、博士号を取得し、同年 4 月より米国スタンフォード大学の Eric T. Kool 教授(以下 Eric と呼称)のもとで、博士研究員として研究させていただいております。この度、海外留学体験記を執筆する機会を得ましたので、カリフォルニアでの研究留学の醍醐味や Kool ラボのことなどを紹介させていただきます。

### いざアメリカ

去る 2008 年 4 月 8 日は、カリフォルニアに向け日本から出国する日で、関東地方が暴風雨で大荒れの天候でした。実家のある北海道の新千歳空港から成田へと向かう機はダッチロールを繰り返しながら飛行し、機内では生命の危機すら感じました。どこの空港でも良いから、とにかく無事に着陸してほしいと祈りながら機はタッチアンドゴーの再トライで無事に着陸したまでは良いが、到着時間の大幅な遅れで、着いて即チェックインする羽目になってしまいました。実は、一人で海外に行くのが初めてで、手際が悪く、成田空港のチェックインから出国審査まで時間がかかり、かなり冷や汗ものでした。無事に搭乗したが、さらに機上の人となる事に、一抹の不安を感じながら、アメリカへ飛び立った事が懐かしく思います。

### カリフォルニアでの生活

スタンフォードを中心とするシリコンバレーの晴天率は非常に高く、4 月から 11 月までの期間、雨が一日中続いた日はありません。そのため、乾燥が酷く、頻繁に大規模な山火事が発生します。シリコンバレーの南側で山火事が起こった際には、スタンフォード一帯に灰が降り、黒色の車はまるでゴマ塩を降り掛けたようでした。この辺りの豊かな緑は人工でつくられた自然であり、300 km 先のロッキー山脈からパイプを使い、引いてきた水によって保たれています。そのパイプを引くための工事費用はマンハッタン計画の原爆開発に匹敵する額と相当します。

また、シリコンバレーには数多くの日本人が暮らしているため、日系のスーパーやレストラン及び旅行会社が大変充実しています。

こちらでの生活のセットアップには大変苦労しました。渡米直後のアパート探し、その後のガス、水道、電気、テレビ等の生活面では、苦労の連続で失敗談には枚挙にいとまがありません。スタンフォード近辺は治安が良く抜群の環境なのですが、アパートは日本と比べ物にならないほど家賃が高く、一番安いステュディオ(ワンルーム)でも 1000 \$ 以上もします。ケーブルテレビの契約では、つたない英語で何とか工事まで漕ぎつけても、エンジニアの人から「道がわからないので案内しろ」という始末。入居したばかりの右も左もわからない人間に案内など出来るはずもなく、私はすぐ本社に電話で「そちらからドライバーに道を伝えろ」と少し興奮気味で電話したのを覚えています。

このような経験をつんだ人間は逞しくなるものですが、私の場合は電話恐怖症になってしまいました。当時から見ると、最近では電話の呼び音にも少しずつ慣れ、その恐怖症から解消されてきています。

## スタンフォード大学

スタンフォード大学は 1891 年に設立された全米屈指の専門校で、サンフランシスコとシリコンバレーの中心都市の間にキャンパスがあります。過去に 17 名のノーベル賞受賞者を擁しており、多くの研究分野において世界をリードしています。アメリカ最大の総敷地面積(約 33.1 km<sup>2</sup>)を誇るそのキャンパスは学生達から「The Farm(農場)」と呼ばれて親しまれています。



私の足元に寄ってきたキャンパス内に生息しているリス

私はこの Farm と呼ばれている事の意味を知らず、初日に大変な思いをしました。その最寄りのホテルから徒歩で大学に向かう際、入り口から Kool ラボに辿り着くのに 40 分ほどかかり、ほとんど歩き疲れました。ただ、大学全体が美術館と見間違ふ様な美しい景観には、歩き疲れた体を心地よく和ませてくれました。

この地には、リスやアライグマも非常に多く生息しており、スタンフォード周辺に生息しているリスは野生的で警戒感が強いですが、UC バークレーに生息しているリスはこれと違い大変人慣れし、とても愛嬌があります。

キャンパス内には無料シャトルバス(Marguerite shuttle)が巡回しており、大学関係者以外の人でも利用でき、大変便利な交通システムがあります。大学内の交通が発達していることもあり、余計なパトカーも巡回しています。こちらに来て間もない時、自転車で構内を走行中、一時停止の標識を見落としてしまった私に対し、近くにいた警官が停止を求め罰金の紙を渡そうとしたので、慌てた私はその場を取り繕い、なんとか罰金から逃れることができました。



スタンフォード正面前にあるオーバルからの眺め。無料シャトルバスが巡回しています。

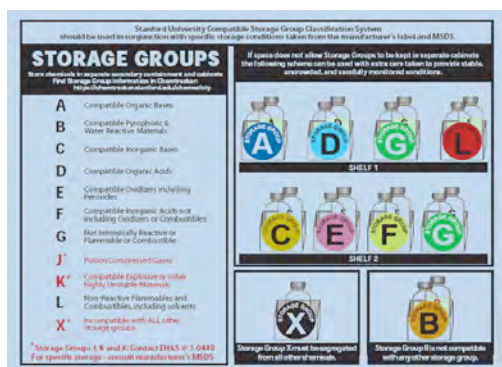


化学科の本部 Mudd Chemistry building (この前でよく BBQ パーティーが開かれています)

また、スタンフォード大学には数多くの優秀な日本人の方がたくさん留学されており、スタンフォード日本人会(SJA)という助け合いネットワークが発達しており、ここで生活する上での必要な情報を入手することができます。私も生活の立ち上げ時には色々と参考にさせていただきました。

私の所属している化学科に関しては、2008 年の US news で主要研究課程ランキングの全米トップと高く評価されており、院生や博士研究員らに対するきめ細かい配慮は圧巻で、毎週水曜日

にはフリーのドーナツとコーヒーが振舞われ、さらに夏季になると週末に BBQ パーティーが開かれるなど、数多くのコミュニケーションの場を提供してくれます。



試薬の保管方法が明記された資料。これに従って、試薬を保管しなければ危機管理担当者から注意を受けます。

日本の大学と大きく違うシステムは、徹底された安全管理の指導かと思います。かなり細かく系統的にマニュアル化されており、セーフティトレーニングにパスしなければ実験できないようになっています。例えば、試薬の保管方法が記された左図にあるようなマニュアルを覚えなくてはなりません。私は生物有機化学が専門ですので、これに加え核磁気共鳴(NMR)装置や放射線同位元素(RI)の扱いに関するテストも受けなくてはなりませんので、一ヶ月はそれらの試験に時間を費やしました。面倒な作業ですが、皆に共通した安全意識が定着し、快適な研究環境で過ごすことができるので素晴らしいシステムではないかと思いました。

## Kool ラボについて

Kool ラボでは<sup>1)</sup>、合成生物学の手法を用いて、DNA 中に人工塩基対を組み込むことにより遺伝暗号の拡張、および新規機能性核酸の創製を目指しています。人工塩基対の基礎研究から細胞適合型の遺伝子配列診断・検出への応用<sup>2)</sup>、セントラルドグマに関わる生体分子のメカニズムの解明といった幅広い研究を行っています。特に、地球上のどの生体システムにもない新規な遺伝システムである拡張 DNA (xDNA)の研究成果は核酸化学の分野に大きなインパクトを与えました<sup>3)</sup>。xDNA は天然の DNA に比べて熱力学的に安定であり、拡張させた人工塩基が対になる塩基と結合すると大きく蛍光の色調が変わるため、遺伝子診断への応用が期待されています。

私は DNA 複製時に機能する蛋白質の活性部位の詳細なメカニズム研究を手掛けています。既に、Eric は非天然型の非水素結合型塩基(Nonpolar nucleoside isosteres)を用いた革新的な研究により、DNA 複製工程における酵素のヌクレオチド取り込みに、対合塩基間の水素結合は絶対的に必要なものではなく、その代わり、酵素の活性部位にフィットするような塩基間の形状の相補性が複製において重要な役割を果たすことを証明しています<sup>4)</sup>。



グループランチ (Eric は右端から 2 番目に座っています)



Kool 研のラボの様子。奥行きがかなりあり、実験スペースはかなりあります。

現在のラボは、私を含めポスドク 4 名、大学院生 9 名、学部生 1 名、秘書 1 名で構成されており、

出身国はアメリカ、フランス、オランダ、スイス、スペイン、インド、シンガポール、中国と国際色豊かです。多国籍で構成されているラボですから、それぞれ英語の発音がかなり異なり、渡米直後は英語での会話が成立せず家で落ち込む日が続きました。兎に角、はじめのうちは、試薬の保管場所や購入方法、機器の使い方などを英語で聞くのは一苦勞でした。Eric とは2週に一度は実験について話し合う機会を持つようにしています。彼からは、非常に理解しやすい英語での確な指示やアドバイスをもらえるので良い軌道修正ができます。

研究室の雰囲気はとてもよく、いかにもカリフォルニアらしい明るく陽気な時間が流れており、快適に過ごすことができます。ポップミュージックをかけながらリズムカルに実験をこなす学生も多いのですが、インド人の方の独特な音楽はどうも私には苦手です。

合同ミーティングは週一回開かれ、ほぼ月に一度、順番が回ってきます。アメリカスタイルとでも言うのでしょうか、ピザを食べながら、進行していく形式は食べる事が大好きな私の肌に良く合っているため、ミーティングの時間が大いに楽しみです。しかしながら、自分の発表となると話は別です。Eric からの信頼や契約更新に繋げるための大事な機会でもあるので、非常にストレスのかかるものです。そのため、はじめての発表の時は、緊張していた私に氣遣って同僚からビールが差し出されました。日本では発表前にアルコールを飲む事は考えられないので、一瞬躊躇しましたが、「郷に入れば郷に従え」で結局ビールに手をつけてしまい、その結果、酔いが回り過ぎて、ハイテンションで発表してしまったのを赤裸々に覚えています。

こちらは安全管理が徹底している事を先に書きましたが、それを軽視していたために、消防車と警察を出動させてしまったことがありました。硫酸を含む発色試薬を塗布した薄層クロマトグラフィー(TLC)を加熱していた際に、検知器が発生した微量のガスを探知したため、警報機が作動し、研究棟にいた人全員を非難させてしまったのです。研究室の皆は笑っていましたが、どうもその日は気分が滅入ってしまいました。こんな失敗をしながらも楽しい研究生活を送ることができています。

## 終わりに

この一年間は光陰矢のごとで、ポスドク生活はあっという間に過ぎ去ろうとしています。このたった一年の経験では、「少年老い易く学成り難し」の如く、英語の語学力は延びた気がしていませんが、私の人生の中でも非常に価値ある経験が積めたのではないかと思います。特に、私の下手な英語に嫌な顔一つせず、つき合ってくださいました Eric T. Kool 教授をはじめとするラボのメンバー、さらには渡航の際の準備に協力して下さった谷口陽介 先生(九州大学大学院薬学府、佐々木研)および現地で何処に行くにも車に乗せていただいた中澤順 氏 (スタンフォード大学化学科、Stack 研) に深く感謝いたします。また、経済的な支援を頂いた日本学術振興会に対し、この場を借りてお礼申し上げます。

- 1) <http://www.stanford.edu/group/kool>
- 2) S. Sando, H. Abe, E. T. Kool. "Quenched Autoligating DNAs: Multicolor Identification of Nucleic Acids at Single Nucleotide Resolution" *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1081-1087.
- 3) H. Liu, J. Gao, S. Lynch, L. Maynard, D. Saito, E. T. Kool. "A Four-base Paired Genetic Helix with Expanded Size" *Science*, **2003**, *302*, 868-871.
- 4) T. J. Matray, E. T. Kool. "A Specific Partner for Abasic Damage in DNA" *Nature*, **1999**, *399*, 704-708.



# シンポジウム等会告

## 主催シンポジウム

日本化学会 第89春季年会 特別企画

ナノバイオとデバイスの融合を目指したバイオメカノケミストリー最前線

2009年3月30日(月)午前 日本大学

### 趣旨

バイオケミストリーやケミカルバイオの優れた知見を、ナノバイオ、特にナノバイオツール・ナノバイオデバイスとして展開するには、化学工学やメカトロニクス技術など異分野との融合が必要不可欠である。このような背景を踏まえ、ここ数年、ナノとバイオ、そしてメカトロニクスを「化学」の力を介して融合した“バイオメカノケミストリー”が、新しい境界領域として注目されている。

本特別企画では、ハイブリッドナノバイオマシン、タンパク質チップ、ナノバイオデバイス、DDS用ナノ構造体などの最先端研究を実際に推進しておられる世界第一線研究者に、新しい潮流について講演いただき、日本独自の研究展開と産学連携の可能性などに関しても議論したい。

座長 浜地 格

09:30-09:40

趣旨説明(東北大学多元研)和田 健彦

09:40-10:10

MEMS デバイスを用いたナノバイオテクノロジー(東大生産研)竹内 昌治

座長 杉本 直己

10:10-10:40

次世代ナノバイオデバイスの創成とゲノム医療への応用(名大院工・産総研健康工学研セ)馬場 嘉信

10:40-11:10

多機能性エンベロープ型ナノ構造体の創製とナノメディシンへの展開(北大院薬)原島 秀吉

座長 佐藤 智典

11:20-11:50

抗体を用いた高感度微量検出系の開発 (阪府大理) 円谷 健

11:50-12:20

バイオトランジスタによる生体分子認識の検出 (物材機構/東大院工) 宮原 裕二

12:20-12:30

総括 (化血研) 中島 敏博



## 主催シンポジウム

日本化学会 第 89 春季年会  
**Asian International Symposium**  
**Biofunctional Chemistry and Biotechnology**  
March 29, PM  
Room: H4

13:30 - 13:40 3H4-28

Opening remark ( Tokyo Inst. Tech. ) MIHARA, Hisakazu

Chair: MIHARA, Hisakazu (13:40 - 14:20)

13:40 - 14:20 3H4-29 Plenary Lecture

Carbon nanotubes electronics: Challenges and opportunities of chemists ( Peking Univ. ) LIU,  
Zhongfan

Chair: SHIONOYA, Mitsuhiko (14:20 - 15:00)

14:20 - 15:00 3H4-33 Keynote Lecture

Molecular electronic devices potentially for biosensing and DNA detecting ( Peking Univ. )  
GUO, Xuefeng

Chair: MIHARA, Hisakazu (15:00 - 15:40)

15:00 - 15:40 3H4-37 Keynote Lecture

Micro-patterning of transparent carbon nanotube (CNT) electrode and its application to bioanalysis ( Hanyang Univ. ) SEONG, Gi Hun

Chair: HAMACHI, Itaru (15:40 - 16:10)

15:40 - 16:10 3H4-41 Invited Lecture

Single-cell analysis based on scanning probe technique and electrochemical microdevice ( Tohoku Univ. ) SHIKU, Hitoshi

Chair: SUGIMOTO, Naoki (16:10 - 16:40)

16:10 - 16:40 3H4-44 Invited Lecture

Morphological control of magnetic nanoparticles using mms6 protein of magnetotactic bacteria ( Tokyo Univ. Agric. Tech. ) ARAKAKI, Atsushi

Chair: HISAEDA, Yoshio (16:40 - 17:10)

16:40 - 17:10 3H4-47 Invited Lecture

Nano-assemblies from C3-symmetric peptide conjugates ( Kyushu Univ. ) MATSUURA, Kazunori

Chair: HAYASHI, Takashi (17:10 - 17:40)

17:10 - 17:40 3H4-50 Invited Lecture

Nucleic acid interaction revisited: Cation and water binding to nucleotides ( Konan Univ. ) NAKANO, Shu-ichi



# 主催シンポジウム

日本化学会 第 89 春季年会 特別企画  
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  
2008 年 3 月 29 日～30 日 日本大学

## 特別基調講演

日本の科学技術政策と iPS 細胞および高温超伝導における新発見が占める位置(科学技術振興機構)  
北澤宏一

## T8. グリーンバイオ

### A. バイオコンバージョン

### B. バイオマスの新活用

セッションオーガナイザー：鴻池敏郎（塩野義製薬）須貝 威（慶應大薬）

大橋武久（奈良先端大バイオサイエンス）

跡見晴幸（京大院工）

グリーンケミストリーは自然との共存共栄で実現する経済発展と質的に豊かな生活を構築していく上で重要、不可欠の技術である。本技術は 21 世紀の課題の重要なポイントと認識されている。グリーンバイオケミストリーはグリーンケミストリーの重要技術をバイオテクノロジーで構築していくことが期待されている。

本セッションでは A. バイオコンバージョン、B. バイオマスの新利用などの各重要技術の現状や展開につき基調講演、招待講演、依頼講演やポスター発表で紹介、討論する。これら技術はいずれも、カーボンニュートラル、省エネルギー、地球温暖化防止、廃棄物削減、環境汚染防止、健康、安全、QOL 向上、創薬などに寄与するものであり産官学での技術構築が望まれる。

基調講演 新規農薬の研究と開発（日本農薬）浜口 洋

## バイオコンバージョン

招待講演 新規ペプチド合成酵素の発見と応用（早大理工）木野 邦器

招待講演 ジペプチド合成酵素の発見とそれを用いたジペプチド生産（協和発酵バイオ生産技術研究所）橋本 信一

招待講演 抗体酵素の新展開（阪府大院理）藤井 郁雄

招待講演 加水分解酵素を用いる生理活性天然物の合成（東邦大薬）秋田 弘幸



依頼講演 加水分解酵素を活用する不斉合成の新展開 (静岡県大薬) 赤井 周司

依頼講演 三菱化学のバイオプロセス開発事例と将来技術について (三菱化学科学技術研究センターバイオ技術研究所) 上田 誠

依頼講演 2段階醗酵によるプラバスタチンナトリウム生産 (第一三共) 細渕 雅彦

依頼講演 化学-酵素法を相乗的に活用する有用物質合成 (慶應大薬) 須貝 威

#### バイオマスの新活用

招待講演 海洋藻類の燃料生産への応用 (東農工大院生命機能科学) 松永 是

招待講演 グリーンプラスチックのバイオケミカルリサイクル (慶應大理工) 松村 秀一

招待講演 バイオマスからの効率的なバイオ燃料の生産技術 (神戸大自然科学系先端融合研究環)

福田 秀樹

招待講演 植物バイオ研究は遺伝子機能実用時代へ (奈良先端大バイオサイエンス) 横田 明穂

依頼講演 政策動向にみるバイオ燃料の現状と未来 (三菱総合研究所) 井上 貴至

依頼講演 微生物産生ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) の実用化に向けて (カネカイノベーション企画部・カネカフロンティアバイオ・メディカル研究所) ○藤木 哲也・大窪 雄二・上田 恭義

依頼講演 循環型機能性素材としてのグルコースポリマーの開発 (江崎グリコ) 栗木隆

依頼講演 遺伝子組換え酵母による高光学純度乳酸生産(仮題) (トヨタ自動車・豊田中研) ○多田 宣紀・大西 徹・松下 響・石田 亘広・嶋村 隆

#### T9.フロンティアバイオ

##### A.ナノバイオ・バイオ計測

##### B.バイオマテリアル・先端医工学

セッションオーガナイザー：秋吉一成 (東医歯大生材研)

渡邊英一 (東大院工)

磯部直彦 (住友化学)

高柳輝夫 (第一三共)

深瀬浩一 (阪大院理)

ナノテクノロジーとバイオテクノロジーの融合領域である、ナノバイオテクノロジーの研究開発が盛んになってきた。事業化に関しても本分野はかなり有望なターゲットである。この分野における我が国の基礎研究は世界的にも高いレベルにあり、その応用や産業化を考える時期が到来したといえる。

本セッションでは、この研究分野の第一線でご活躍の方々の基調講演、招待講演および依頼講演(企業)をもとに、ナノバイオの研究開発と産業化について、その現状と将来を議論できる場を提供する。また、一般講演(ポスター発表のみ)では、企業や大学等からの多くの発表を期待している。

基調講演 超好熱菌による高速連続水素生産 (立命館大生命科学) 今中 忠行

ナノバイオ・バイオ計測

招待講演 バイオミネラリゼーションと自己組織化による機能性ナノ構造の作製 (奈良先端大物質創成) 山下 一郎

招待講演 ヒト個体システムの科学に向けて (ソニーコンピュータサイエンス研究所) 桜田一洋

依頼講演 吸入曝露試験による有害性評価-ナノ粒子・ミクロン粒子・繊維状粒子について- (産業医科大産業生態科学研究所) 田中 勇武

依頼講演 高分子材料技術のバイオ産業への応用 (住友ベークライト) 中西 久雄

バイオマテリアル・先端医工学

招待講演 バイオマテリアルのナノ構造制御と実用化への展開 (阪大院工) 明石 満

招待講演 産学連携による大学のシーズの実用化 (阪大院医) 森下 竜一

依頼講演 アテロコラーゲンをを用いた核酸デリバリー技術に基づく新規治療薬の開発 (高研新事業戦略室) 井岡 亮一

依頼講演 バイオマテリアルへの印刷技術の展開 (大日本印刷研究開発センターバイオマテリアル研究所) 高橋 洋一



## 遺伝子・デリバリー研究会第9回シンポジウム会告

日時：2009年7月9日（木）～11日（土）

場所：大阪大学コンベンションセンター

（〒565-0871 吹田市山田丘 1-1）

特別講演：Ernst Wagner（ドイツ：ミュンヘン大学）

合同シンポジウム：秋吉一成（東京医科歯科大学）

片山佳樹（九州大学）

佐々木茂貴（九州大学）

江頭健輔（九州大学）

依頼講演：前田瑞夫（理研）

落谷孝広（国立がんセンター）

小比賀聡（大阪大学）

一般演題（口頭発表、ポスター発表 [ポスター賞選考有り]）、参加登録申し込みは4月末日締め切りです。詳細は遺伝子・デリバリー研究会のホームページ <http://www.gene-delivery.org/> をご参照ください。今回は第15回日本遺伝子治療学会との合同開催となります。

---

事務局・問い合わせ先：

遺伝子・デリバリー研究会第9回シンポジウム

運営委員長：斯波 真理子 事務局：合田

国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部

〒565-8565 吹田市藤白台 5-7-1

Email: [entry2009@gene-delivery.org](mailto:entry2009@gene-delivery.org)

TEL 06-6833-5012 (内線 2909)

FAX 06-6872-8415

# お知らせコーナー



## 受賞のお知らせ

叶 直樹 (東北大学大学院薬学研究科 准教授)

2008 年度有機合成化学協会奨励賞

タイトル「有機合成化学を基盤とした天然有機化合物のケミカルバイオロジー」



## 編集後記

ここに 2009 年最初の生命化学研究レターを無事お送りすることができ、編集担当一同、喜んでおります。今回も執筆者の皆様、および編集委員の皆様のご協力のもと、何とか編集作業を終えることが出来ました。お陰様で、内容、ボリュームともに充実した号になったのではないかと考えております。執筆者には重ねてお礼申し上げます。

東京では冬の寒さがそれほど厳しくなかったせいか、既に梅が満開となりました。そして、桜のつぼみ (右写真) も大きく膨らみつつあり、日本化学会年会が開催される頃には開花しているのではないかと思います。今回の日本化学会年会ではフロンティア生命化学研究会関連のシンポジウムとして、特別企画「ナノバイオとデバイスの融合を目指したバイオメカノケミストリー最前線」、



Asian International Symposium “Biofunctional Chemistry and Biotechnology”、そしてアドバンスト・テクノロジー・プログラム(ATP) バイオケミカルが開催されます (本ニュースレターのシンポジウム等会告コーナーにプログラム等を掲載しております)。皆様、ふるってご参加くださいますようお願い申し上げます。

ところで、私事ですが、今回のニュースレターが私にとって最後の編集作業となります。この5年間は、前編集委員の石田さん、長崎さん、現編集委員の円谷さんをはじめとして数多くの方に支

えられて何とか毎回発行にたどり着くことができました。改めてお礼申し上げます。後任には大阪大学産業科学研究所の大神田淳子さんが当たってくださいます。今後とも、ニュースレターへの皆様の支援をお願い致します。次号(No. 30)は、井原敏博(熊本大学)の担当により、2009年6月に発行を予定しております。

原田和雄

東京学芸大学教育学部

(harada@u-gakugei.ac.jp)

編集担当:

円谷 健(大阪府立大学)

井原敏博(熊本大学)