

生命化学研究レター

(2009 年 6 月)

2. 巻頭言

生命化学研究との出会いそれから...

東北大学多元物質科学研究所 永次 史

4. 研究紹介

4. 人工核酸を用いたポリメラーゼ反応

～人工核酸アプタマー創出に向けて～

群馬大学大学院工学研究科 栗原 正靖

10. シャペロニンを利用した機能性物質の創製

東北大学多元物質科学研究所 金原 数

16. 光誘起電子移動に基づく蛍光プローブの精密開発

東京大学大学院薬学研究科 浦野 泰照

23. 論文紹介「気になった論文」

九州大学大学院システム生命科学府 戸井田 力

大阪大学大学院理学研究科 町田 慎之介

東京医科歯科大学学生体材料工学研究所 森谷 優貴

33. 生命化学研究法

IIS 型制限酵素を利用した全自動プラスミドコンストラクション

北海道大学電子科学研究所 小寺 一平

38. シンポジウム等会告

2nd Switzerland-Japan Biomolecular Chemistry Symposium (SJBCS2009)／国際バイオ EXPO 特別講演セッション／第 24 回生体機能関連化学シンポジウム・第 12 回バイオテクノロジー部会シンポジウム／FCCA セミナー FCCA グライコサイエンス若手フォーラム 2009

43. お知らせコーナー

受賞・会員異動のお知らせ

編集後記

巻頭言



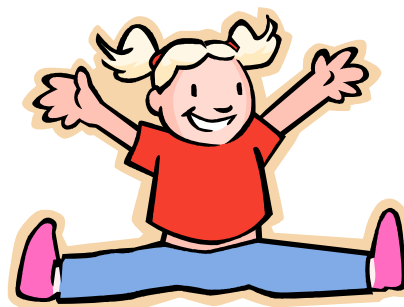
生命化学研究会との出会いそれから・・・

東北大・多元研 永次 史

東北大学・多元研の永次です。今回は生命化学研究レターの巻頭言の執筆の機会をいただき非常に光栄です。お話をいただけてまず、過去に書かれた巻頭言をもう一度読み直していくと、どの巻頭言からも、皆様の生命化学研究に関する夢、また本研究会の素晴らしさを感じられ、執筆に際し非常にプレッシャーを感じました。自分と生命化学研究とのかかわりについて考えた時に、この研究会に参加されている方々との出会いが大きかったことを改めて思い出し、私と生命化学研究会との出会いについて書かせていただくことにしました。(自分の回顧録のような内容で申し訳ありません) 記憶をひもといてみますと、1995年に、研究室の先輩である藤井さん(大阪府立大学)にくっついて、初めて米国での *Bioorganic Chemistry* のゴードンカンファレンスに参加した時に、現在、生命化学研究会の中心となられている先生方とお会いしたと思います。当時、核酸に関する研究を始めて3年が過ぎこのテーマで博士論文を書いていましたが、まだまだ中途半端で有機合成化学の領域を超える研究が自分にできるのかどうか、大変悩んでいました。ちょうどその時に、藤井さんから誘われ参加したカンファレンスでは若い研究者の方々が大変アクティブであり、その当時私が感じていた「領域の壁」のようなものはまったくなく、生命化学研究について活発に議論するのを聞いて、まさに眼からうろこ、でした。このカンファレンスに参加できたことは、後の私の研究人生を大きく変えることになったと思います。(余談ですが、夜、宿舎で飲みすぎて、次の朝、講演もきかずに、というよりも聞ける状態ではなく藤井さんとパームツリーの木の下で水をのみながら座っていたのもいい思い出です。)その後、無事、博士号を取得でき、カンファレンスで受けた刺激を胸に、遺伝子制御に向けた研究を展開していたころ、藤井さんから、本会が発足するきっかけとなった熊本での会議のお話をお聞きし、一も二もなく参加したいと申し出ました。ところが、当時は女性一人での参加禁止(宿泊料金が高くなる)という冷たいお言葉に、参加を断念した記憶があります。生命化学研究会が正式に発足して、第2回、大阪で行われた生命化学研究会に藤井さんに誘っていただき、女性二人で参加させていただきました。進行は遅いものの、5年前より少しは研究が進み、やっと遺伝子制御に使えるような道具(人工機能性核酸)の試験管内における機能を調べていた頃でしたが、この会でもいろいろな先生方とお話をさせていただいたことを記憶しています。その後、留学から戻り、2003年に生命化学研究会に呼んでいただき、発表させていただきました。この時もいつものように議論が沸騰し、最後の講演者だった新留さんの発表時間がほとんど残っていな

かったように記憶しています。生命化学研究会に参加されている方々は、生命化学に対して非常に熱い思いをお持ちなので、会に参加することでいつも元気をもらいます。2006年4月に九州大学から東北大学にうつり、最近やっと自分の研究室で合成した分子を使って、細胞系で調べるシステムを立ち上げつつあります。ここ数年、大学で境界領域の研究をやることの難しさを感じています。私の研究は遺伝子発現を制御できる新しい人工分子を合成し、それを用いて試験管内、細胞内での評価を行なうというのが主な研究の流れなのですが、学生さんは修士課程の2年間という短い時間でこのようなテーマに取り組みます。「ものづくり(合成)」にはある程度の技術と知識が必要であるために、なかなか目的のものが合成できず、卒業するころにやっと合成が終了するということが多々あります。かといって、新しく入ってきた学生さんに機能評価から行なってもらおうというのは難しく、結局合成からスタートするため、また1年かかります。教育の観点からいっても境界領域では勉強することも多く、学生さんの理解が追い付いていないところが多々あり、教育が中途半端になっているのではないかと思うこともよくあります。

自分の研究室を持って3年が経ち、日々悩みは尽きないところですが、生命化学研究会で皆様に興味を持っていただけるような、研究成果を目指してこれからも頑張りたいと思っています。巻頭言としてはふさわしくない内容になってしまいましたが、これからも生命化学研究会のますますの発展を祈念いたします。



研究紹介

人工核酸を用いたポリメラーゼ反応

～人工核酸アプタマー創出に向けて～

群馬大学大学院工学研究科

葉原正靖

(kuwahara@chem-bio.gunma-u.ac.jp)



1. はじめに

人工核酸を用いた転写および逆転写反応は、人工核酸をランダムスクリーニング法へ応用する上で重要な技術となる。核酸のランダムスクリーニング法には、SELEX 法 (Systematic Evolution of Ligand by Exponential Enrichment)^{1,2}や Non-SELEX セレクション法³、一段階セレクション法⁴などがあり、抗体と類似の機能をもつ核酸アプタマーを任意の標的分子 (ターゲット) に対して創製することができる (図 1)。核酸アプタマーは、生物を用いることなく創出することができる点や、化学合成によって mg～g スケールで安価に製造できる点、乾燥状態で常温保存できる点などの特長があるため、研究試薬や医薬・診断薬への応用が期待されている。しかし、核酸はヌクレアーゼ (核酸分解酵素) によって生体内で容易に分解されてしまうことが実用化の妨げになっている。そこで筆者らは、医薬・診断薬等への応用を目指して、核酸塩基部や糖部、リン酸部などを化学修飾することによってヌクレアーゼ耐性を向上させた人工核酸アプタマーを作製する技術の開発を行っている。

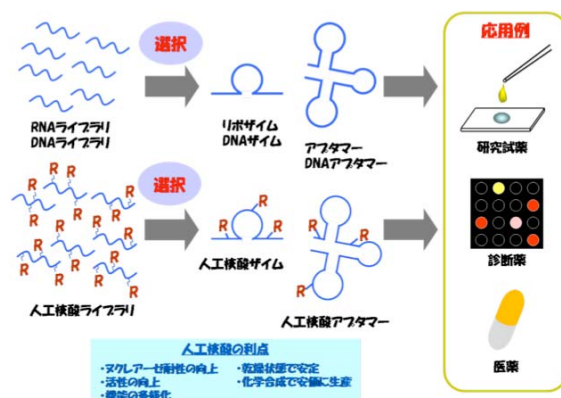


図 1 機能性核酸の創製

2. 人工核酸を用いたポリメラーゼ反応

ご存知のように核酸は、ヌクレオチドといわれる基本単位がリン酸ジエステル結合で直列に繋がった分子である (図 2)。ヌクレオチドは塩基部位、糖部位、リン酸部位から成り、アンチセンス医薬や核酸プローブなどへの応用や、二重鎖形成機構の解明などを目的として、これらの部位を化学的に修飾・改変した種々の人工核酸が報告されてきた。本研究では、特にこれらの部位への修飾がポリメラーゼ反応に及ぼす効果に着目し、ポリメラーゼによる人工核酸の転写および逆転写について精査した。

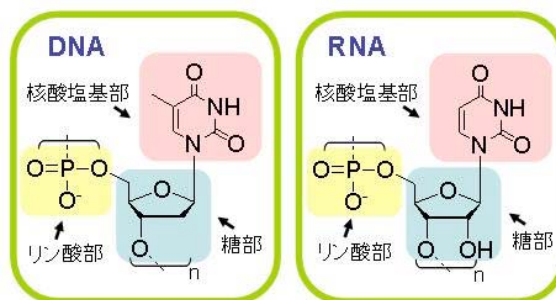


図 2 核酸 (DNA・RNA) の構造

2-1. 塩基部位の修飾⁵

塩基部位への修飾は古くから研究されており、チミンやシトシンなどのピリミジン塩基では 5 位、アデニンやグアニンなどのプリン塩基では 7 位への置換基導入に対して、ポリメラーゼは比較的寛容であることが知られている。従って、これらの部位に蛍光基を導入したヌクレオシド三リン酸誘導体は、核酸の蛍光標識化試薬として市販されている (図 3)。一般にこれらの試薬は、天然型の基質三リン酸 (dATP、dGTP、dCTP、TTP) の共存下で用いるため、蛍光基は DNA 鎖中の適当な箇所に挿入されることになる。例えば、蛍光標識した TTP の誘導体を用いた場合、T が挿入されるべきところには、天然型の T が入ったり修飾型の T が入ったりすることになる。蛍光標識化という点では、蛍光基の挿入箇所が定まっていなくても全く問題はないが、この技術を SELEX 法へ応用する場合には大変不都合である。従って SELEX 法へ応用する場合には、

用いる修飾型基質三リン酸に対応する天然型基質三リン酸は抜いてポリメラーゼ反応を行う。つまり、TTP の誘導体を使用するときは天然型の TTP を、dATP の誘導体を使用するときは、天然型の dATP を抜いて反応を行う。そうすれば、T が挿入されるべきところには全て修飾型の T が、A が挿入されるべきところには全て修飾型の A が挿入されることになる。しかしながら、この方法では、4 種類の天然型基質三リン酸に修飾型基質三リン酸を添加する前述の方法に比べて、ポリメラーゼ反応の効率が大きく低下する。

そこで筆者らは、修飾基の異なる種々の修飾型基質三リン酸を合成し、それらを用いたポリメラーゼ反応を系統的に検討することによって反応の最適化を試みた。その結果、修飾基の化学構造やポリメラーゼの種類、また、それらの組み合わせが、反応の収率や忠実度を大きく左右することが分かった。特に、ポリメラーゼの種類については、古細菌 (*Thermococcus kodakaraensis*) 由来の耐熱性 DNA ポリメラーゼ (KOD Dash) が、種々の修飾基質に対して、対応する人工核酸を高い忠実度で収率良く与えることが分かった。

さらに筆者らは、ポリメラーゼによる修飾 DNA 生成反応を速度論的に解析するこ

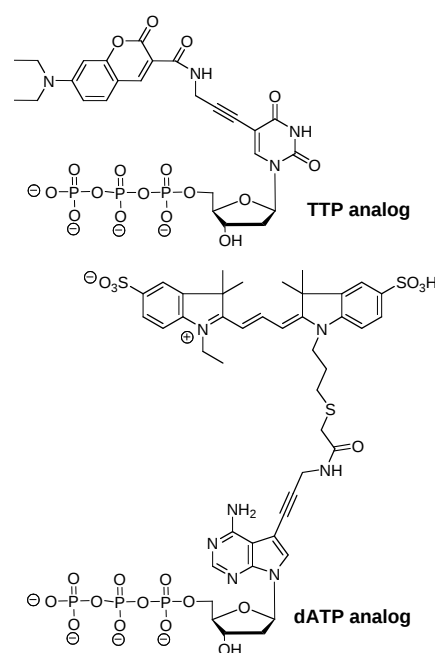


図3 市販の蛍光標識基質三リン酸の例

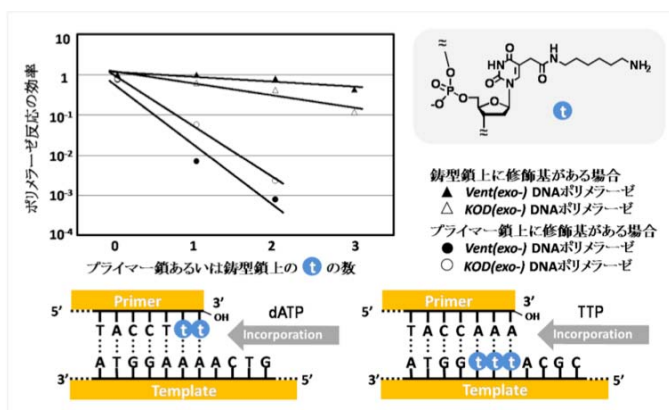


図4 修飾基がポリメラーゼ反応に及ぼす影響

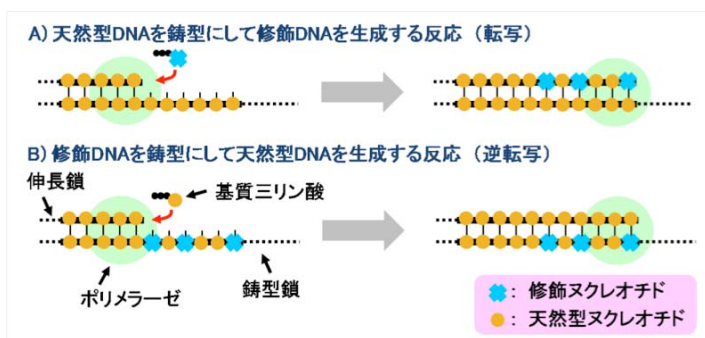


図5 修飾 DNA(人工核酸)を用いたポリメラーゼ反応

とによって、反応のどの過程が収率や忠実度に影響を及ぼしているかを精査した。その結果、修飾基が DNA の伸長鎖末端に位置するとき、ポリメラーゼの触媒効率が著しく低下するのに対し、修飾基が鋳型鎖側に位置するときは、触媒効率はあまり低下しないことが分かった (図 4)。この結果は、天然型 DNA を鋳型にして修飾 DNA を生成する反応 (転写) よりも修飾 DNA を鋳型にして天然型 DNA を生成する反応 (逆転写) の方がはるかに容易であることを示している (図 5)。

2-2. 糖部位の修飾⁶

糖部位を修飾した人工核酸を用いたポリメラーゼ反応は、今世紀に入り精力的に行われるようになった。ランダムスクリーニング法への応用や、転写 (ひいては翻訳) システムの拡張、ポリメラーゼ反応機構の解明などがその目的となっている。筆者らは、数ある糖部位修飾アナログのうち、特に核酸医薬への応用が有望視されている架橋型核酸 (BNA: Bridged Nucleic Acid)⁷を用いたポリメラーゼ反応を検証した。実験には架橋型ヌクレオシド三リン酸誘導体 (KTP, LTP, MTP) および架橋型ヌクレオチド (K, L, M, K_A) を含む鋳型鎖を用いた (図 6)。その結果、KTP を用いた場合は 3 残基、LTP では 2 残基、MTP ではわずか 1 残基の伸長しか見られなかった (図 7)。一方、架橋型ヌクレオチドを含む鋳型鎖で反応を行ったところ、架橋型ヌクレオチドが連続して存在する鋳型鎖では 5~9 残基程度で伸長が停止した。そこで 1 つおき、あるいは 2 つ、3 つおきに架橋型ヌクレオチドを挿入したものを鋳型鎖に用いたところ、*KOD Dash* DNA ポリメラーゼおよびその変異体を用いれば、タイプ L の架橋型ヌクレオチドを除き反応が最後まで進行した完全長の伸長鎖が確認された (図 8)。

同じ遺伝子進化ファミリー B に属する

Vent(exo-) DNA ポリメラーゼでも同様に伸長が確認されたが、速度解析より前述の酵素よりも誤取り込み (ミスインコーポレーション) を生じやすいことが示唆された。

尚、人工核酸を用いたこの類の研究では、しばしば通常の 50 倍を超える高い酵素濃度や 1 時間を超える長い反応時間など極端な条件が用いられていることがあるので注意を払う必要がある。因みに本実験は、反応時間は 5 分間、酵素濃度は推奨濃度かその 10 倍で行った。

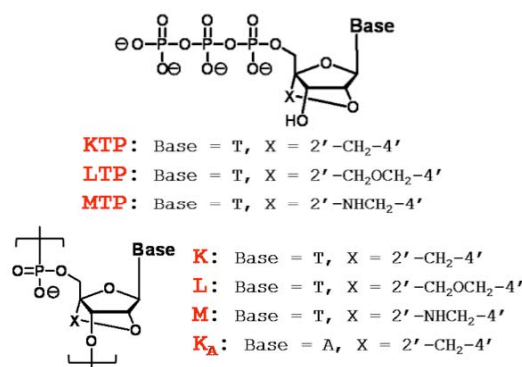


図6 実験に用いた架橋型ヌクレオチド

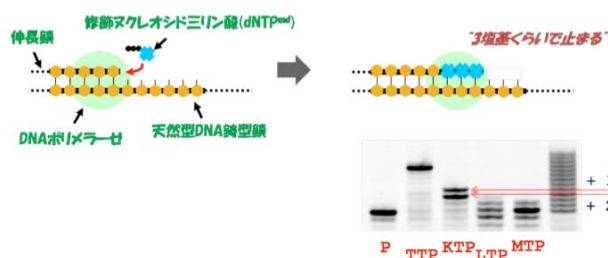


図7 架橋型ヌクレオチドの取り込み

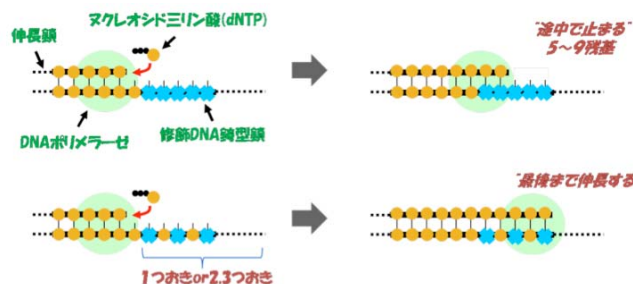


図8 BNA 鋳型鎖から DNA の生成

2-3. リン酸部位の修飾⁸

リン酸部位の修飾には、ホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド (PS-ODN) やボラノフォスフェート型オリゴヌクレオチド (BH_3 -ODN) などがある (図9)。対応するヌクレオシド三リン酸を用いれば、酵素的にこれらの人工核酸を調製することが可能である⁹。これらの人工核酸を用いてアンチセンスやアプタマーなどの機能性核酸を作製する場合、しばしば α -リン酸のキラリティーが問題となる。光学的に純粋なアナログも開発されているが大変高価である。ホスホロチオエートもボラノフォスフェートも

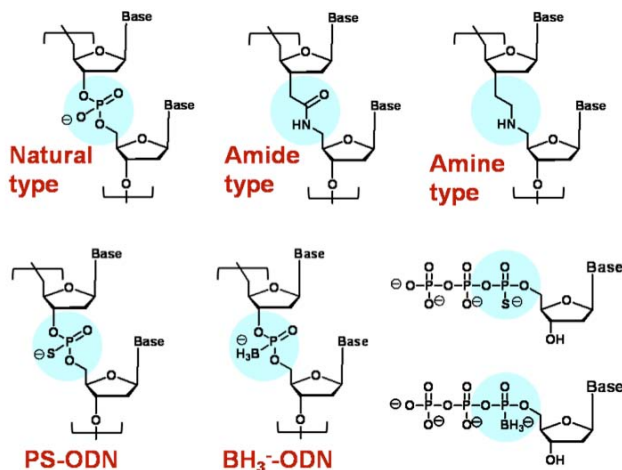


図9 さまざまなリン酸部位修飾核酸

リン酸ジエステル誘導体であるが、その他にも種々の結合でこの部位を置換した人工核酸が数多くある。特に比較的合成が容易なアミド結合やアミン結合などで置換したオリゴヌクレオチドは、相補核酸 (DNA、RNA) との熱安定性のみならずその二重鎖構造 (NMR) についても詳細にキャラクタライズされている。しかし、DNA 鎖中のそれらの結合が、ポリメラーゼ反応に及ぼす影響については殆ど報告例がなかった。そこで筆者らはプライマー鎖や鋳型鎖のリン酸ジエステル結合をアミド結合あるいはアミン結合に置換した ODN を合成し、それらを用いたポリメラーゼ反応を検証した (図9)。リン酸部位におけるこれらの置換基の挿入は、塩基部位修飾や糖部位修飾よりもずっと伸長反応を妨げたが、*KOD(exo-)*や *Vent(exo-)* DNA

ポリメラーゼは鋳型鎖上の挿入置換基を通過して伸長鎖を生成した。しかしながら、塩基部位修飾や糖部位修飾と大きく異なる点は、酵素が通過した後も鋳型鎖上の挿入置換基は下流の伸長反応を干渉した点である。図10 にその一例を示した。酵素に *KOD(exo-)*あるいは *Vent(exo-)*を用いた場合、アミド型リンカーを1つ含む鋳型鎖2 (○) および3 (△) では、置換基挿入箇所前後での伸長停止はほとんど見られないのに対し、アミド型リンカーを2つ含む鋳型鎖4 (◇) では、1番目の置換基挿入箇所前後ではほとんど伸長は停止しないが2番目の挿入箇所の手前で80~90%もの伸長停止が見られた。即ち、これはDNAポリメラーゼが2番目のアミド型リンカー上を通過する際、1番目のアミド型リンカーの存在が伸長反応を干渉していること示唆している。文献¹⁰によると本置換基を1残基挿入することによるDNA二重鎖の融点変化 (ΔT_M) は $-0.1 \sim +0.9^\circ\text{C}$ であるので、置換基挿入による二重鎖の不安定化はほとんどないと考えられる。一方、同様の実験を遺伝子進化ファミリーAの *Taq* DNAポリメラーゼを用いた場合では、

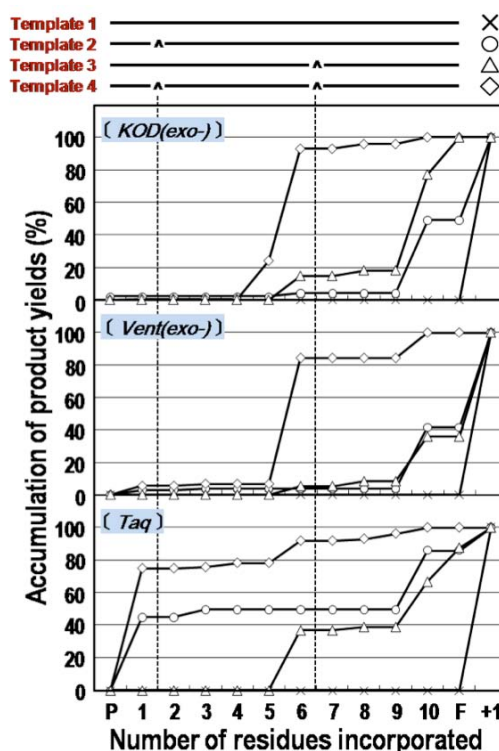


図10 アミド型リンカーを含む人工核酸を鋳型鎖に用いたポリメラーゼ反応

「△」はアミド結合の挿入箇所を示す。反応時間は5分間、酵素濃度は *KOD(exo-)*では推奨濃度、*Vent(exo-)*, *Taq*では推奨濃度の10倍で行った。

どの鋳型鎖 2、3、4 (○、△、◇) でも置換基挿入箇所の前で伸長停止が見られるという分かり易い結果となった。しかし、注目すべきは鋳型鎖 2、4 (○、◇) を比較したとき、1 番目の置換基挿入箇所の前で、前者では約 45%の伸長が停止したのに対して、後者では約 75%もの伸長停止が見られた。これは 2 番目の挿入置換基が上流の伸長反応を干渉していることを示唆している。しかし、X 線構造解析からは DNA ポリメラーゼが 5 残基も下流の置換基挿入部位を認識しているとは考え難い。恐らくこれは 2 番目の置換基挿入によって、鋳型鎖全体にもたらされる動的挙動の変化が伸長反応に不利に働くためか、或いは、プライマー鎖/鋳型鎖複合体から解離した DNA ポリメラーゼが再び複合体に会合する反応を挿入置換基が妨げるためと考えている。

鋳型鎖のホモシーケンス (T の連続配列) 中に本置換基を挿入すると、DNA ポリメラーゼのスリップが頻繁に見られたことから、プライマー鎖/鋳型鎖複合体—DNA ポリメラーゼ間の相互作用においてリン酸基は、歯車の歯のような役割を果たしているのかもしれない。現在、DNA ポリメラーゼの変異体を用いて構造と機能の相関について精査している。

3. ランダムスクリーニング法への展開

これまでに筆者らは、塩基部を修飾した人工核酸のライブラリを用いた SELEX 法によって、シアリルラクトースやサリドマイド誘導体、グルタミン酸などに特異的に結合する人工核酸アプタマーを創出した¹¹⁻¹³。これらの人工核酸アプタマーは、その物質の生体内や細胞内に於ける動態や役割などを研究するための有用な分子ツールとして期待される。

これまでの研究結果を考慮すると、ポリメラーゼ反応で糖部位やリン酸部位を修飾した人工核酸を酵素的に合成することは、今のところ難しいと判断される (図 5A)。これらの人工核酸を通常の SELEX 法に適用させて、核酸アプタマー創製を図るのはあまり現実的ではない (図 11A)。しかし、一方で、*KOD Dash* および *KOD* の変異体を用いれば、これらの人工核酸を鋳型として天然型 DNA の相補鎖を効率よく酵素的に合成することが分かった (図 5B)。近年、SELEX 法を用いない核酸アプタマーのスクリーニング法 (Non-SELEX セレクション法、一段階セレクション法など) が開発された。これらの方法では、セレクションの途中過程で核酸分子を増幅させる操作がないため、人工核酸を酵素的に合成する行程がない (図 11B)。現在、筆者らはこれらの方法によって、塩基部修飾よりさらにヌクレアーゼ耐性の高い人工核酸アプタマーの開発を進めている。

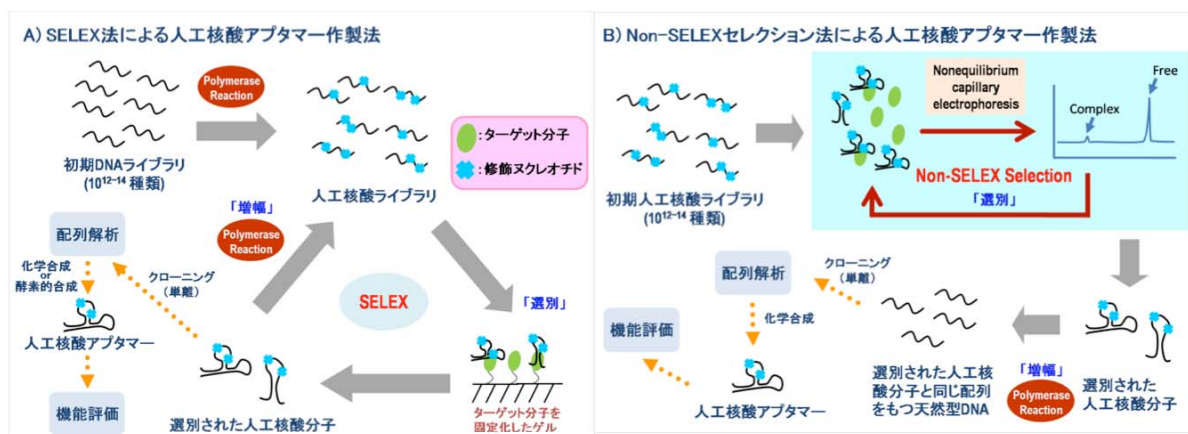


図11 人工核酸のランダムスクリーニング法への応用

4. おわりに

核酸アプタマーのヌクレアーゼ耐性の向上と機能拡張は今後も重要な検討課題である。多彩な分子認識能をもつ核酸アプタマーを実際に‘使える’機能性分子として実用化させる上で、高い拡張性をもつ人工核酸は大変魅力的である。ライブラリの新しいスクリーニング法の開発に加え、人工核酸の熱力学的安定化エネルギーや分子ダイナミクスに基づく構造と機能の相関データの集積によって、近い将来、自在に人工核酸アプタマーを設計・創製し、医療、食品衛生、環境、基礎研究など様々な分野へ展開応用されることが期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり、独立行政法人科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業個人型研究（PRESTO）「構造機能と計測分析」より多大なる御支援を受けました。また、有益なる御鞭撻ならびに御助力を賜りました群馬大学名誉教授 澤井 宏明 先生および同大学教授 尾崎 広明 先生、大阪大学名誉教授 今西 武 先生、同大学教授 小比賀 聡 先生に心より厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. A.D. Ellington, J.W. Szostak, *Nature*, **346**, 818 (1990).
2. C. Tuerk, L. Gold, *Science*, **249**, 505 (1990).
3. M. Berezovski, M. Musheev, A. Drabovich, S. N. Krylov, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 1410 (2006).
4. A. Nitsche, A. Kurth, A. Dunkhorst, O. Pänke, H. Sielaff, W. Junge, D. Muth, F. Scheller, W. Stöcklein, C. Dahmen, G. Pauli, A. Kage, *BMC Biotechnol.*, **7**, 48 (2007).
5. M. Kuwahara, J. Nagashima, M. Hasegawa, T. Tamura, R. Kitagata, K. Hanawa, S. Hososhima, T. Kasamatsu, H. Ozaki, H. Sawai, *Nucleic Acids Res.*, **34**, 5383 (2006).
6. M. Kuwahara, S. Obika, J. Nagashima, Y. Ohta, Y. Suto, H. Ozaki, H. Sawai, T. Imanishi, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 4257 (2008).
7. S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, K. Morio, Y. In, T. Ishida, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.* **38**, 8735 (1997).
8. M. Kuwahara, H. Takeshima, J. Nagashima, S. Minezaki, H. Ozaki, H. Sawai, *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 3782 (2009).
9. 澤井宏明, 栗原正靖, ゲノムケミストリー, 講談社, 関根光雄・齋藤烈 編, 157 (2003).
10. S. M. Freier, K. H. Altmann, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4429 (1997).
11. M.M. Masud, M. Kuwahara, H. Ozaki, H. Sawai, *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 1111 (2004).
12. A. Shoji, M. Kuwahara, H. Ozaki, H. Sawai, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 1456 (2007).
13. K. Ohsawa, T. Kasamatsu, J. Nagashima, K. Hanawa, M. Kuwahara, H. Ozaki, H. Sawai, *Anal. Sci.*, **24**, 167 (2008).

研究紹介

シャペロニンを利用した機能性物質の創製

東北大学多元物質科学研究所

金原 数

(kinbara@tagen.tohoku.ac.jp)



1. はじめに

タンパク質は様々な高次構造を有しており、それぞれが独自の立体構造に基づく機能を有している。このような洗練された構造と機能を上手く利用すると、人工物では作り得ないようなナノスケールの機能性構造物を作り出すことができる。我々は、シャペロニンと呼ばれる筒状タンパク質を利用した機能性物質の開発を行ってきた。本稿では、このチューブ状タンパク質を利用した機能性物質の開発について紹介する。

2. シャペロニン

シャペロニン(chaperonin)は、内部に筒状の空孔を有する円筒状あるいは球状の巨大タンパク質集合体であり、生体分子機械の一つとして知られている[1]。大腸菌由来のGroELの場合、7つのサブユニット(60 kDa)が会合してドーナツ状の環状集合体を作り、さらにそれらが二つ積み重なったダブルデッカー型の円筒構造を形成している。円筒の高さは約14 nm、外径も約14 nmで、中央には内径4.5 nmに達する巨大な空孔が広がっている(図1)。分子量は840 kDであり、

タンパク質の中ではかなり大きな部類に属する。細胞内でシャペロニンは、変性タンパク質のリフォールディングを手助けすることが知られている。シャペロニンの空孔入り口付近は疎水性が高く、変性によって疎水面が露出したタンパク質を容易に捕らえることができる。ここで、ふたの役割を果たすコシャペロンGroESの存在下ATPを添加すると、筒が構造変化を起こし、変性タンパク質のリフォールディング、ならびに空孔からのリリースが起こる。シャペロニンを材料として捉えたとき、他の材料には見られない魅力的な点は、1)直径4.5 nmという巨大なナノ空間にゲストを取り込むことができる、2) ATPを加えると空孔の形が変化して内包物を放出する、という2点である。このように機械的に動作する巨大ホスト分子を人工的に合成することは現時点では不可能であり、様々なゲストを運ぶためのキャリアの候補としてシャペロニンを利用しようと考えた。

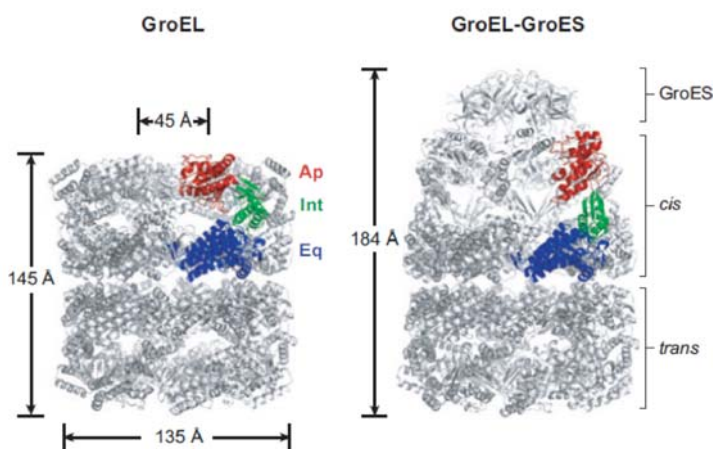


図1 シャペロニン GroEL および GroEL-GroES 複合体の結晶構造

3. 人工物のキャリアーとしての応用 [2]

シャペロニンを機能性材料として応用する上で重要な点は、シャペロニンの空孔内に変性タンパク質とは異なる人工物を導入し、それをATPによって放出できるかどうか、ということにある。そこで、まず手始めに、手頃な大きさの半導体ナノ粒子(CdS)を導入して、ナノ粒子の安定化を図るとともに、ATPに応じてナノ粒子を放出する、動的ナノ粒子複合体の調製を試みた。CdS等の半導体ナノ粒子は蛍光性を有するため、シャペロニンによる取り込み、放出を検出するのが容易である。特にCdS自身には水溶性がほとんどないため、シャペロニンから放出された場合には即座に沈殿として系外に除かれることが予想されるため、モニターとして適していると考えた。まず、水溶性溶媒であるジメチルホルムアミド中で調製したCdSナノ粒子(直径2.2 nm)を、Tris-HCl(pH 7.5)バッファー中の大腸菌由来並びに高度好熱菌由来シャペロニン(GroEL, T.th. cpn)と混合し、

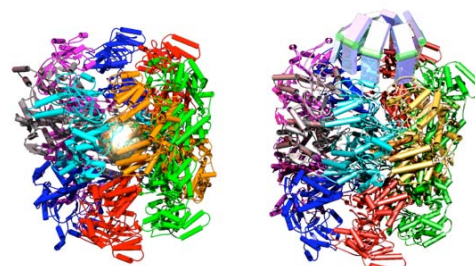


図2 シャペロニン／ナノ粒子複合体とアゾベンゼン修飾シャペロニンのイメージ図

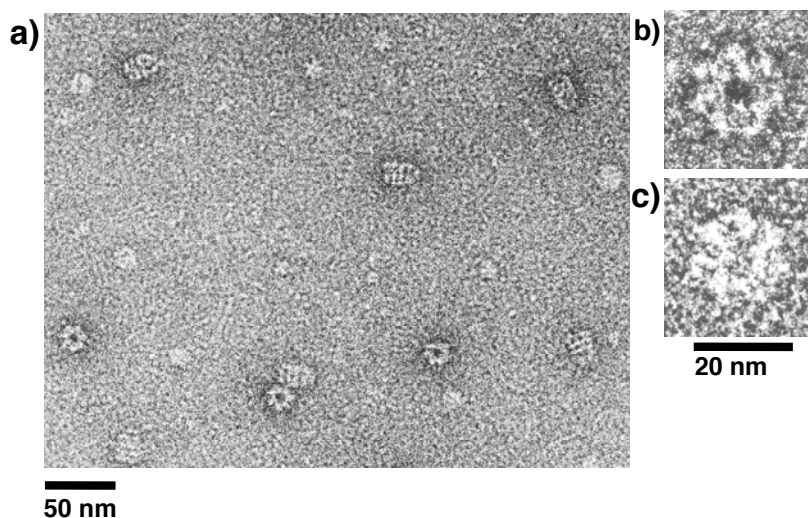


図3 T.th. cpn/CdS ナノ粒子複合体の TEM イメージ図
a)、b) 複合体。c) 同条件で撮影した T.th. cpn。

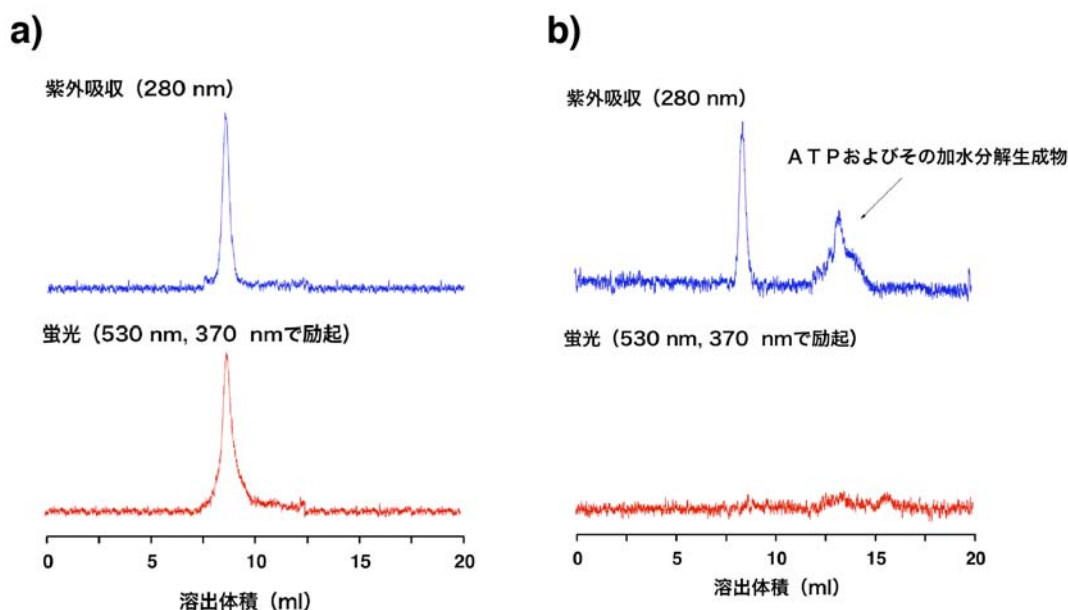


図4 紫外光吸収および蛍光でモニターした T.th. cpn/CdS ナノ粒子複合体のクロマトグラム。a) ATP 添加前。b) ATP 添加後。

ゲルろ過により精製した。その結果、TEM(図3)およびクロマトグラフィー(図4)により目的とするシャペロニン/ナノ粒子複合体が得られたことを確認した。ちなみに、シャペロニンの存在しない条件でCdSナノ粒子のジメチホルムアミド溶液をバッファーに滴下すると即座に沈殿が生じた。得られた複合体は熱的に安定であり、GroELとの複合体では50 °C、T.th. cpnとの複合体では80 °C付近まで、変性、分解やナノ粒子の放出は起こらなかった。これらの温度は、ホストのシャペロニンの耐熱温度と対応しており、複合体の安定性がシャペロニンそのものの安定性により決まっていることが分かった。さて、このように安定なシャペロニン/CdSナノ粒子複合体であるが、このTris-HCl(pH 7.5)バッファー水溶液にATP、 Mg^{2+} イオン、 K^+ イオンを添加したところ、内包されたCdSナノ粒子が即座に放出されることを見出した。この際、ホスト側のシャペロニンはその構造を保っていることが分かった。このような放出が起こる条件は、ATP、 Mg^{2+} イオン、 K^+ イオンの三者が存在するときのみであり、これは生体中でシャペロニンが変性タンパク質にリフォールディングを促進する条件と同様である。このように、シャペロニンが人工物に対しても変性タンパク質に対するのと同様の機構により、ゲストの取り込み、さらに放出をATPにより制御できることが分かった。

4. シャペロニンの化学修飾による機能制御 [3]

シャペロニンはATPにより、物質の取り込み、放出を制御できるが、機能性物質のキャリアーとしての利用を考えると、物理的刺激による制御ができるほうが好ましい。そこで、ATP応答性を有するシャペロニンにさらに光応答性を付与し、その機能の光制御について検討することにした(図5)。

GroELはもともと3つのシステイン残基を有しているが、まずこれらをすべてアラニンに置換した後、空孔入り口付近(231番)にシステイン残基を新たに一つ導入した変異体を作成した。この変異体に対し、マレイミド部位を有するアゾベンゼン誘導体を作用させることにより、入り口に光応答性ゲートとしてアゾベンゼンを導入した修飾シャペロニンを得ることに成功した。この修飾シャペロニンに変性GFPを加えたところ、野生型のシャペロニンと同様にこれを取り込むことができることを確認した。

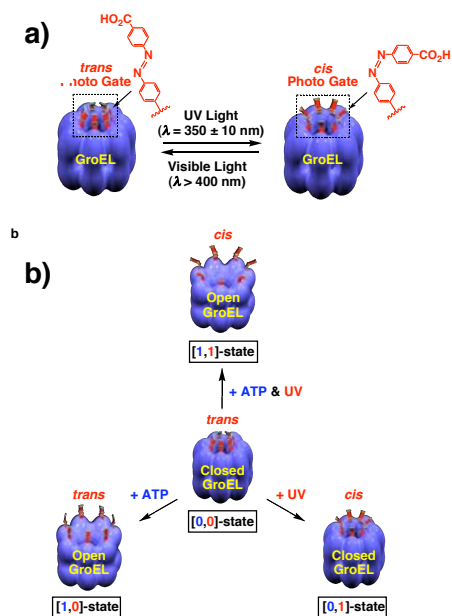


図5 a)アゾベンゼンの光異性化。b)アゾベンゼン修飾シャペロニンの外部刺激に応じた4状態のイメージ図。

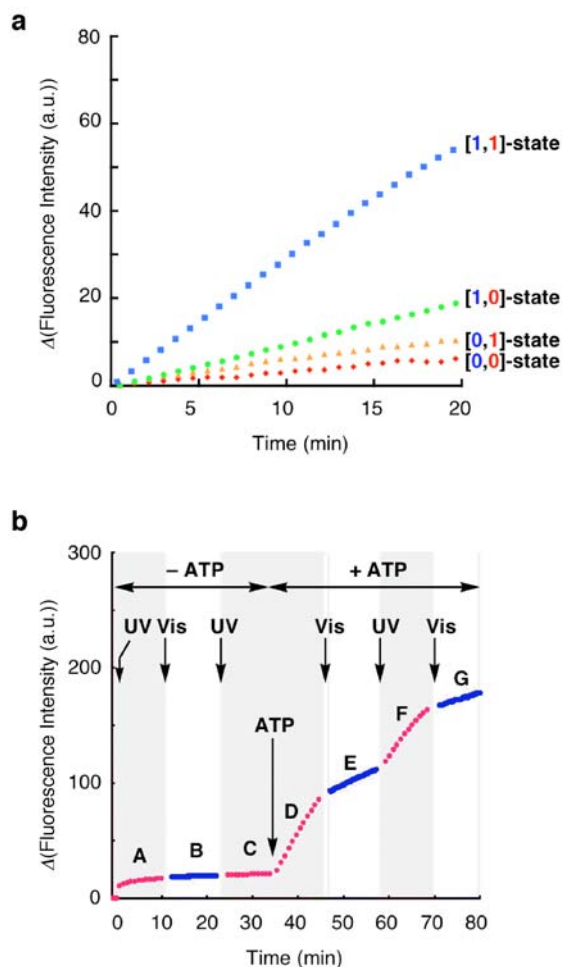


図6 変性 GFP の放出の様子。a)それぞれ4状態単独の場合。b)連続して刺激を与えた場合。

アゾベンゼンは紫外光照射により、トランス体からシス体へ、可視光照射によりシス体からトランス体へと、照射波長を選ぶことにより可逆的に異性化を制御できる。トランス体では分子長が比較的長く、シス体では比較的短くなるため、紫外可視光照射により、光ゲートの長さを可逆的にコントロールできることになる。興味深いことに、このアゾベンゼン修飾シャペロニンを用いることで、ゲストとして用いた変性GFPの放出速度を光照射により制御できることが分かった(図6)。まず、ATPの影響について検討したが、紫外光、可視光いずれを照射した場合にも、ATPの存在しない場合にはゲストの放出速度は極めて遅いことが分かった。これに対し、ATP存在下、紫外光を照射してアゾベンゼン部位をシス体に異性化すると速やかに変性GFPを放出した。ここで、可視光を照射してアゾベンゼン部位をトランス体に異性化すると、放出速度が著しく低下することが分かった。これらの結果は、ATPと紫外光を入力信号として見たとき、その2つが加えられたときにのみ出力(変性GFPの速やかな放出)が起こるAND論理回路のような応答とみなせる。本系は、分子機械の動作を論理回路によって制御できた初めての例になる。

5. シャペロニンナノチューブ [4]

偶然の発見であるが、4項に続くシャペロニン機能の光制御に関する研究の途中で、化学修飾した変異体シャペロニンが、金属イオンの添加により1次元的に整列したチューブ状の集合体を与えることを見いだした。以下、その結果について少し詳しく述べる。

前項において、光応答性部位としてアゾベンゼンを用いていた。これは光照射により、ゲート部の物理的な長さを大きく変化させるものであった。これに対し、光照射により極性が大きく変化するフォトクロミック分子としてスピロピランを導入することを考えた。まず、天然型シャペロニンGroELの各サブユニットのシステインをすべてアラニンに置換し、更に311番目のリジンと314番目のロイシンをシステインに置換したGroEL変異体(図7)を作製した。この変異体では、修飾可能なシステインが計28個両端の空孔の入り口に存在することになる。このシャペロニンGroEL変異体に対し、マレイミド部位を有するスピロピラン誘導体を添加することで(図8)、システイン残基にスピロピランを導入した。修飾後、紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、スピロピランは本実験系で使用しているバッファー中で一部が自発的にメロシアニン型に異性化し、系中では常にスピロピランとメロシアニンが共存した状態にあることがわかった。

修飾反応の確認はサイズ排除型超高压高速液体クロマトグラフィー(GPC)により行った。ここでタンパク質の吸収波長である280 nm、およびスピロピラン型分子の吸収波長である350 nm、更に、メロシアニン型分子の発光波長である654 nm (励起光 381 nm)でそれぞ

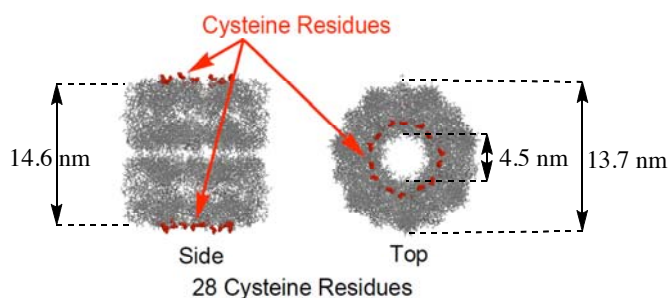


図7 新たに作製した GroEL 変異体。

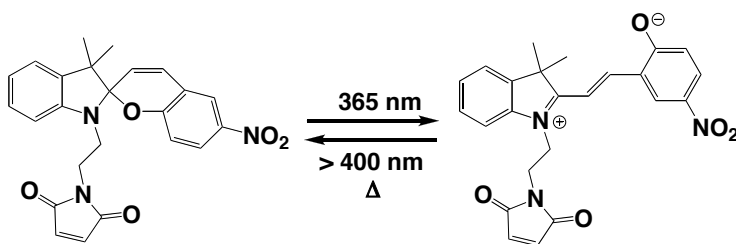


図8 修飾に用いたスピロピラン/メロシアニン誘導体の光異性化挙動。

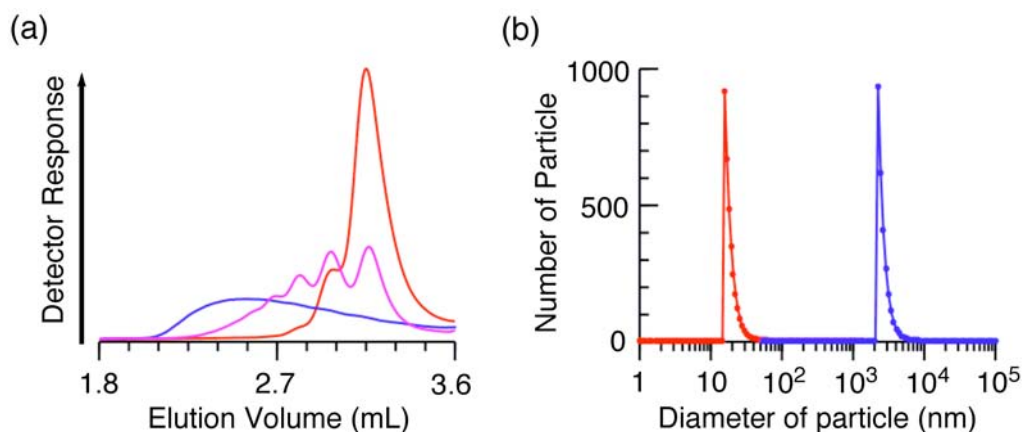


図9 a)スピロピラン／メロシアニン修飾シャペロニンに塩化マグネシウムを添加する前(赤)および後(青)のクロマトグラム。ピンク:さらに EDTA を加えた場合のクロマトグラム。b) 動的散乱により得られた粒径分布。塩化マグネシウムの添加前(赤)および後(青)

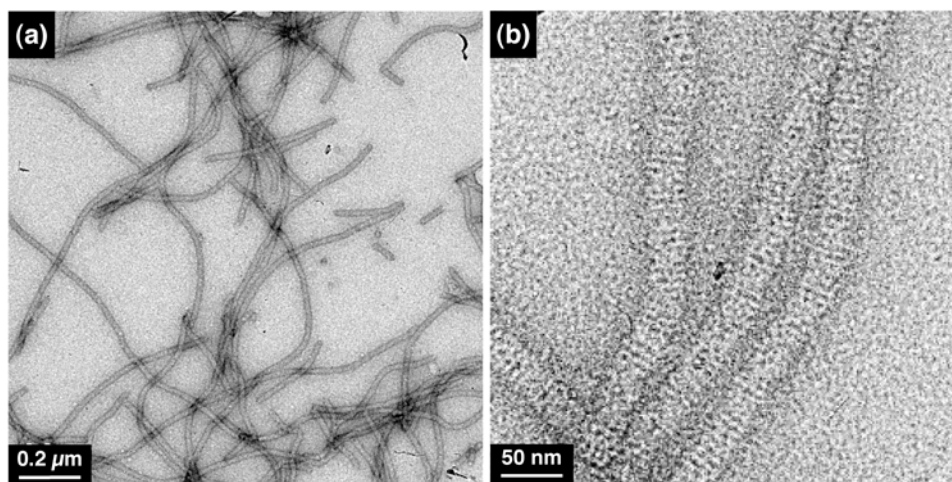


図10 シャペロニンナノチューブの TEM イメージ図

れクロマトグラムを測定し、修飾反応が十分に進行していることを確認した。修飾後の吸光度測定により、GroEL変異体のシステインのおよそ98%以上が修飾されていることが分かった。

修飾後のこの変異体GroELに塩化マグネシウムを添加したところ、GPCクロマトグラム上で高分子量成分の割合が著しく増加した(図9)。さらに透過型電子顕微鏡により、修飾GroELが自己集積し、長いチューブ状の会合体が形成していることを見出した(図10)。詳細に検討した結果、このようなチューブ状会合体の形成には、まずスピロピラン／メロシアニンによる化学修飾が必須であることが分かった。さらに添加する金属塩について検討を行った結果、塩化マグネシウムだけでなく、カルシウムや亜鉛などの2価の金属イオンの添加が効果的であることを見いだした。これらのことから、ナノチューブ形成には、スピロピラン／メロシアニン部位と金属イオンとの配位が関与していると考えられる。ここで、ナノチューブを形成した試料にEDTAを添加すると、ナノチューブが解離することが分かった(図9)。これは、EDTAとの配位によりマグネシウムイオンが取り除かれたためであると考えられ、ナノチューブの形成において配位が重要な役割を担っていることを裏付けている。

次に、シャペロニンが変性タンパク質を取り込むことを利用して、シャペロニンナノチューブ内にゲストを

導入することを試みた。
まず、ウシ由来の変性 α -lactalbumin を蛍光ラベル化し2価の金属イオンの存在しない条件で、スピロピラン/メロシアン修飾GroELに加えたところ、天然型GroELの場合と同様に取り込まれることが分かった。この状態に塩化マグネシウム添加したところ、変性 α -lactalbumin に由来す

る蛍光でモニターしたクロマトグラムが、紫外光吸収でモニターしたナノチューブのクロマトグラムと重なることが分かった。すなわち、変性 α -lactalbumin が取り込まれたまま、ナノチューブ形成が起こることが分かった。このようにシャペロニンの最大の特徴であるゲスト取り込み能を利用してナノチューブの中にゲスト分子を取り込ませることに成功した。

6. まとめ

シャペロニン、特にGroELは、結晶構造が既知であり、生体における役割が詳細に検討されているため、様々な情報を容易に得ることができる。さらに、安定性が高く取り扱いも比較的容易であり、大腸菌を使った大量発現も可能であるため、様々な変異体を大量に得ることができる。今回紹介した変異体作製／化学修飾という一連の流れにより、シャペロニンの構造的な特色、ATP応答性といった独自の動的な性質を活かした、新しい動的機能材料創製が可能であることを示すことができた。今後は、シャペロニンの生体親和性を活かした実用的な応用への展開を図っていきたいと考えている。

謝辞

本稿で紹介した内容は、東京大学大学院工学系研究科の相田卓三教授ともに行なった研究成果です。また、共同研究者の東京農工大学大学院工学研究科の養王田正文先生および東京大学大学院新領域創成科学研究科の田口英樹先生にこの場を借りて御礼申し上げます。

【参考文献】

- [1] Braig, K.; Otwinowski, Z.; Hegde, R.; Boisvert, D. C.; Joachimiak A.; Horwich A. L.; Sigler P. B. *Nature* **1994**, 371, 578-586.
- [2] Ishii D.; Kinbara K.; Ishida Y.; Ishii N.; Okochi M.; Yohda M.; Aida T. *Nature* **2003**, 423, 628-632.
- [3] Muramatsu S.; Kinbara K.; Taguchi H.; Ishii N.; Aida T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 3764-3769.
- [4] Shuvendu Biswas S.; Kinbara, K.; Oya N.; Ishii N.; Taguchi, H.; Aida T., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, in press.

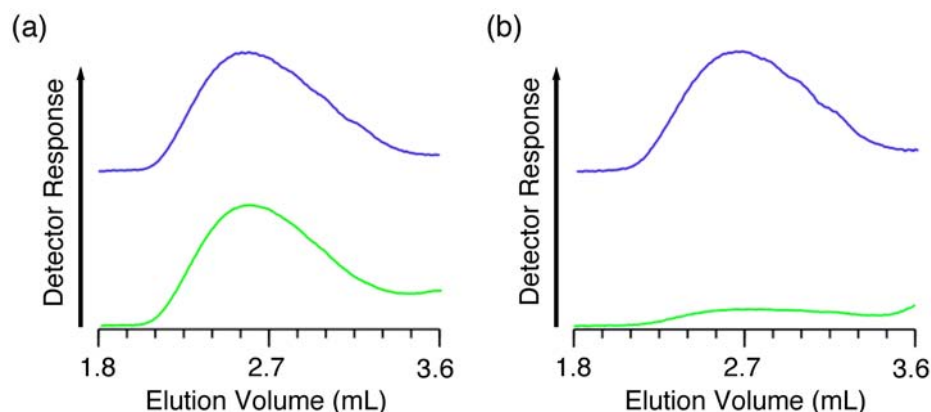


図11 a)あらかじめ α -lactalbumin を添加した後に塩化マグネシウムを加えた場合のクロマトグラム。b)あらかじめ塩化マグネシウムを加えた後に α -lactalbumin を添加した場合のクロマトグラム。青: 紫外光吸収でモニターした場合。緑: α -lactalbumin による蛍光でモニターした場合。

研究紹介

光誘起電子移動に基づく蛍光プローブの精密開発

東京大学大学院薬学系研究科

浦野 泰照

(urano@mol.f.u-tokyo.ac.jp)



1. はじめに

近年、生命現象の解析や病態要因の解明などにおいて、「生きている状態の生物試料」における種々の生理活性物質の動態をリアルタイムに観測することが極めて重要であることが、強く認識されるようになってきている。このような観測を実現する技法として現在、観測対象分子を高感度に可視化する蛍光プローブを用いて、蛍光顕微鏡下で生細胞応答を観測する技法が広く汎用されている。図1上に、蛍光プローブ、蛍光顕微鏡を用いて「生きている」細胞を「生きたまま」観測する手法の原理を簡潔にまとめた。観測対象とする生理活性分子(▽)の検出を考えると、ほとんどの生理活性物質は無色であるため、光学顕微鏡でただ観察してもその動きを知ることは出来ないが、本手法は、元々は無蛍光性であり、▽と反応・結合することで初めて蛍光を発する分子(蛍光プローブ)を細胞内に存在させることで、▽の動きを蛍光の変化として、高感度かつリアルタイムに追うことを可能とさせるものである。

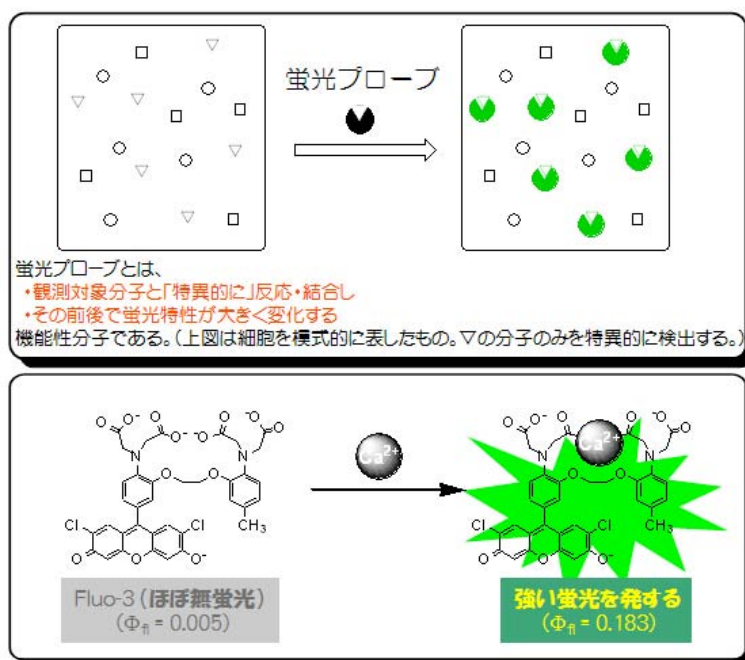


図1 蛍光プローブとはどのような機能性分子か？(上) 代表的な Ca^{2+} イオン検出蛍光プローブ fluo-3 の、 Ca^{2+} イオン結合前後における蛍光特性変化(下)

例えば、 Ca^{2+} イオンが細胞内の情報伝達を司る代表的なセカンドメッセンジャーとして働いていることは、既に疑いの無い事実であるが、これは Ca^{2+} イオンを選択的に蛍光検出可能な蛍光プローブの開発によるところが極めて大きい。代表的な Ca^{2+} イオン検出蛍光プローブである fluo-3 の構造と Ca^{2+} イオン検出の原理を図1下に示した。Fluo-3 はフルオレセイン骨格と Ca^{2+} イオンキレーターである BAPTA 部位とが融合した構造であるが、 Ca^{2+} フリーの状態ではほぼ無蛍光であり、これが Ca^{2+} イオンと結合することでその蛍光強度が 36-40 倍に上昇するため、 Ca^{2+} イオン検出蛍光プローブとして機能する¹。

2. 分子内光誘起電子移動に基づく蛍光プローブの論理的精密設計法の確立

上述のように生細胞観測に極めて重要な役割を果たす蛍光プローブであるが、これまでに開発されて

きた有機小分子蛍光プローブのほとんどは trial and error 方式で開発されてきており、望みの機能を実現する蛍光プローブを狙って開発することは極めて困難であった。この理由として、現代の最新の量子化学計算を駆使しても、新たな有機化合物の蛍光特性、中でもその明るさ（蛍光量子収率）を正確に予測することはほぼ不可能であり、それら新規物質を実際に合成し、蛍光特性を実測してみるまで、光るか光らないかはわからないことがあげられる。よってこれまで、元々は無蛍光性であり、 ∇ と反応・結合することで初めて蛍光を発する蛍光プローブを開発するには、試行錯誤に基づくことが一番の近道であったが、この方法では新たな検出対象分子を可視化する蛍光プローブを開発できる保証は全く無く、実際これまでに開発されてきた蛍光プローブのターゲットは、各種典型金属イオンなど非常に限られたものであった。

そこで筆者らはこのような状況を打破し、目的の機能を有する蛍光プローブを論理的に精密に設計することを目標とした研究を行ってきた結果、光誘起電子移動(Photoinduced Electron Transfer; PeT)を設計原理とする蛍光プローブの論理的なデザイン法を確立することに成功した。すなわち、例えば代表的な蛍光分子であるフルオレセインは、分子をベンゼン環部位と蛍光団であるキサンテン環部位の2部位に分けて考えることが可能であり、分子内 PeT によりその蛍光特性を精密に制御可能であることを見出した(図2左上)。具体的には、ベンゼン環部位の HOMO エネルギーレベルがある値よりも高いフルオレセイン誘導体は全てほぼ無蛍光であり、これが低い誘導体は全てフルオレセインと同等の強い蛍光を発することが明らかとなった(図2右)^{2,3}。なぜ一般に予測不可能であった蛍光特性を、我々の手法を用いた分子設計では予測可能となったかを簡単に述べるならば、我々の手法では蛍光団であるキサンテン環には全く修飾を加えておらず、蛍光団とは π 電子共役していないベンゼン環部位に修飾を加えているため、蛍光団自身の基本的な特性は損なわれていないことがあげられる。実際、この手法に基づく分子設計では、その吸収・蛍光スペクトルはほとんど変化せず、量子収率のみが変化するなど、蛍光団自身の基本的な特性は保たれていることが明らかとなっている。

以上の知見を発展させることで筆者らは、図2左下に示した蛍光プローブの論理的設計法の確立に成

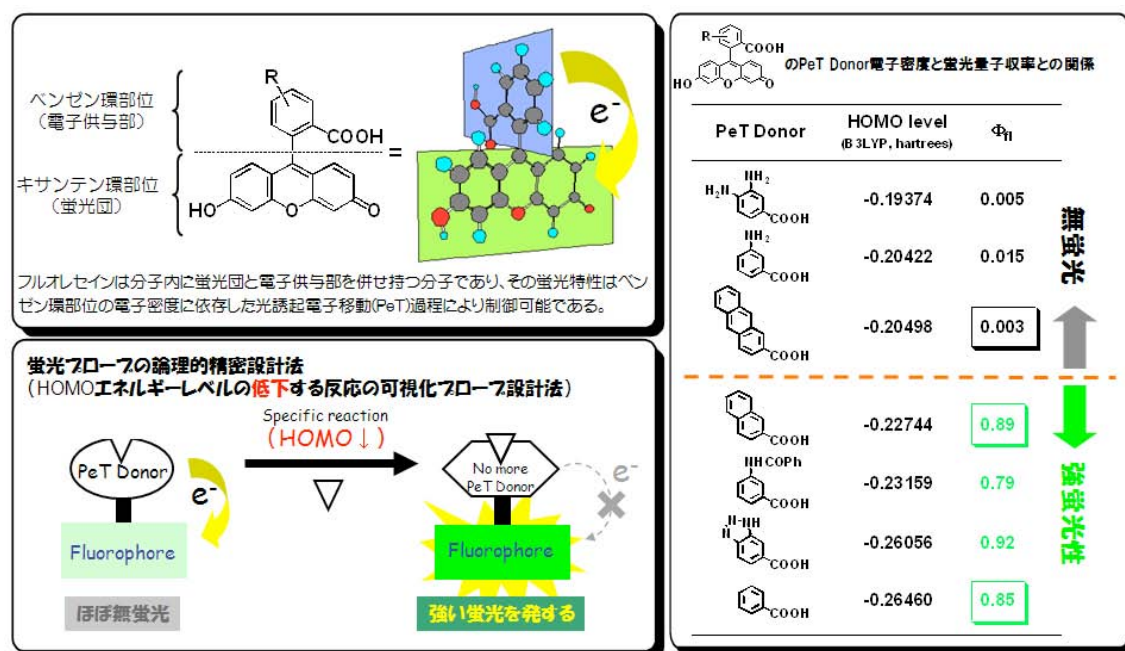


図2 代表的な長波長励起蛍光分子であるフルオレセインは2つの部位に分割して考えることができ(左上)、その蛍光量子収率はベンゼン環部位の HOMO エネルギーレベルに依存した光誘起電子移動の概念によって、精密に予測することが可能である(右)。筆者がこれまでに確立した、光誘起電子移動に基づく蛍光プローブの論理的精密設計法(左下)。

功した。すなわち、ある観測対象分子に対する蛍光プローブの開発を考える際、その観測対象分子と特異的に結合・反応し、かつその反応前後で基質の HOMO エネルギーレベルが大きく低下する化学反応（分光学的な変化は一切必要ない）さえ知っていれば、これを活用して反応前は PeT によりほぼ無蛍光であり、反応後に PeT が起こらなくなることで強い蛍光を発するプローブを論理的に開発することが可能となった。

3. 各種活性酸素種 (ROS)、及び関連酵素活性の選択的検出を可能とする蛍光プローブの論理的開発

活性酸素種 (ROS) は、炎症、ガンなど多くの疾患に関わるとされ、また近年では細胞内情報伝達物質としての役割も持つとの指摘もあり、ますます注目を集めている。一口に ROS と言っても、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、一重項酸素など多くの種が存在し、これらはそれぞれ特徴的な化学反応性を持つことから、生体内においても異なる役割を持つ可能性も高い。ROS 検出用蛍光プローブは、筆者らの研究以前にもいくつか開発され、中でもジクロロフルオレセインの 2 電子還元体である DCFH (Dichlorodihydrofluorescein) が広く用いられてきた。しかしながら DCFH には ROS 間の特異性は全くなく、また励起光を当てるだけで ROS の有無にかかわらず大きく蛍光が増大してしまう欠点を持っており、生物学的に意味あるデータを得ることは困難であった。

そこで筆者らは、上述の蛍光プローブデザイン法を活用し、ある特定の活性酸素種のみを検出可能な蛍光プローブの精密設計を試みた結果、多数の新規蛍光プローブの開発に成功した⁴⁻⁷。図 3 にいくつかの代表例を示したが、例えば一重項酸素とパーオキシナイトライトとをそれぞれ高選択的かつ高感度に検出可能な蛍光プローブは、前者はアントラセンからエンドパーオキシドを生成する化学反応^{3,4}を、

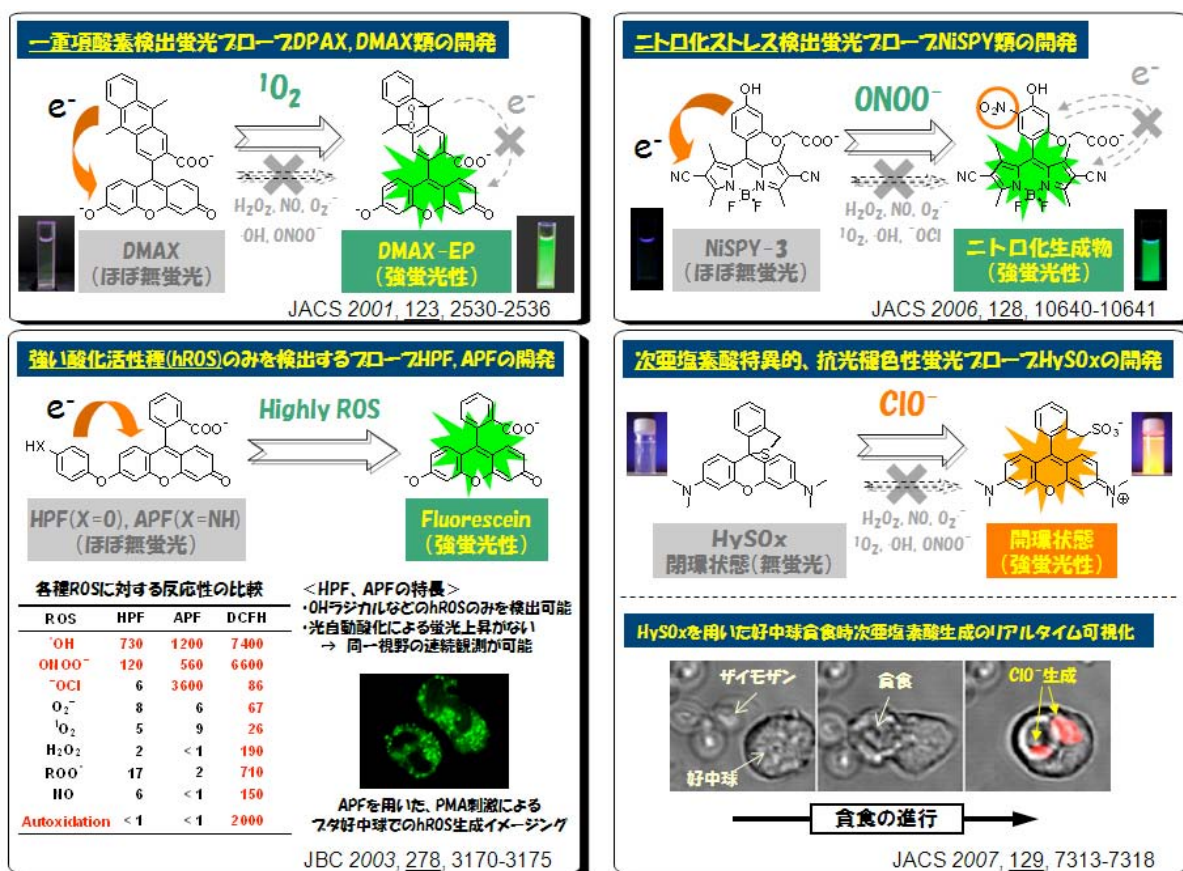


図3 確立した設計法に基づき開発に成功した、各種活性酸素種を種特異的に検出可能な蛍光プローブ群。各種 ROS に選択的な化学反応を蛍光制御部位に精密に組み込むことで、検出分子との反応によって特異的に蛍光強度が飛躍的に増大する、世界初の各種 ROS 蛍光プローブ群の開発に成功した。

後者はフェノールのニトロ化反応⁶をそれぞれ鍵化学反応として活用することで、論理的にそれぞれの蛍光プローブを開発することに成功した。

さらに、薬物代謝反応の第二相反応を司る酵素として知られ、また近年生細胞内で各種タンパク質と複合体を形成することで、それらの活性を制御していることも指摘されている、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) の酵素活性を可視化する蛍光プローブの開発を行った。GST はジニトロクロロベンゼンやペンタフルオロ安息香酸類など電子欠損有機化合物を良い基質とすることが知られており、特に 3,4-ジニトロ安息香酸アミドは GST の選択的な良い基質となり、酵素反応の結果 1 つのニトロ基がグルタチオンで置換された反応生成物を与えることが明らかとなったため、この特徴ある化学反応を活用して、生細胞内での活性検出を可能とする蛍光プローブの設計を行った。具体的には、上述した電子移動とは逆向きの、すなわちニトロ基の強い電子吸引性に基づく蛍光団からベンゼン環部位への分子内 PeT を活用し、図 4 に示す新規 GST 活性検出蛍光プローブ DNAT-Me をデザイン・開発した⁸。

開発に成功した DNAT-Me は、GST と反応する前は、LUMO エネルギーの十分に低いジニトロ安息香酸アミド部位が分子内に存在するため PeT によりほぼ無蛍光である。これが GST によってグルタチオン化されることにより PeT が起こらなくなり、蛍光強度が飛躍的に増大することが、精製 GST を用いた *in vitro* 実験から確かめられた。特に強調すべき点として、本プローブはグルタチオンのみとはほとんど反応せず、GST が存在して初めてグルタチオン化反応が進行する特長を有しており、真に GST 活性をとらえることが出来る世界初の蛍光プローブである点があげられる。そこで最後に DNAT-Me を生細胞に負荷し、生きている細胞中の GST 活性の検出を試みた。その結果、細胞の種類によって生きている状態での GST 活性は大きく異なること、また HuCCT-1 などがん細胞では、図 4 下に示したように、細胞質に比べて核内に強い GST 活性があることが明らかとなった。このような時空間分解能の高い情報は、生細胞内で機能する GST 活性検出蛍光プローブの存在があつて初めて得られるものであり、生物学研究における蛍光プローブの重要性を端的に示す結果である。

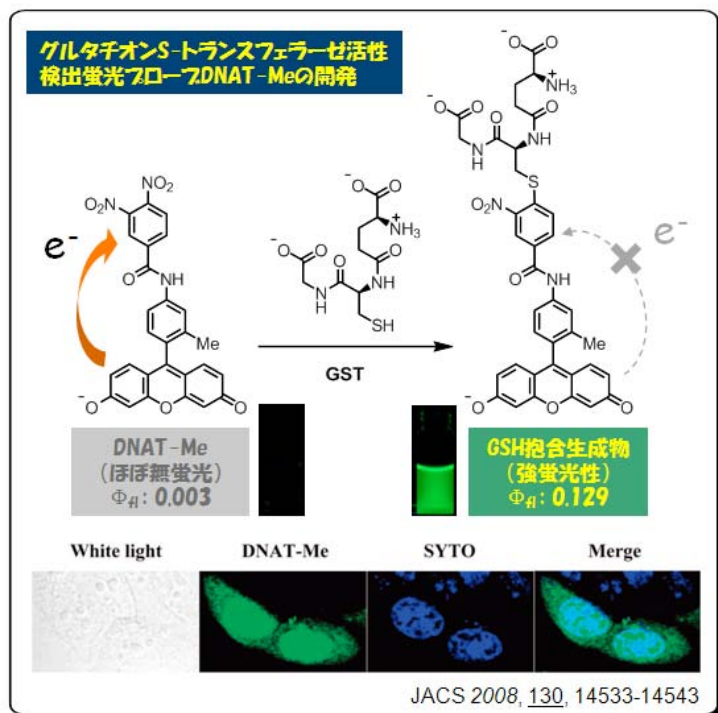


図4: 光誘起電子移動を原理とするグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 活性検出蛍光プローブ DNAT-Me の開発に成功し、生細胞内の GST 活性のリアルタイム観測に世界で初めて成功した。本プローブを数種のがん細胞に適用したところ、いくつかのがん細胞は核内の GST 活性が細胞質に比べ強いことなどが初めて明らかとなった。

4. TokyoGreen 骨格の創製に基づく、各種加水分解酵素・反応可視化蛍光プローブの開発

さらに最近、フルオレセインの骨格構造を大胆に見直すことで、新たな蛍光プローブデザイン法に繋がる誘導体群の創製に成功した。すなわち上記の PeT の考え方によれば、カルボキシ基は他の官能基に変換することが可能なはずであると考え、メチル基、メトキシ基など他の官能基に置換した誘導体の開発に成功した (図 5 左上)。驚いたことにこれらの単純なフルオレセイン誘導体は新規化合物であり、

また以下に詳述するようにこれらは極めて有用な蛍光プローブ母核となるものであったため、これらの新規蛍光骨格を TokyoGreen (以下 TG と略す) と命名した⁹。次にこれら TGs の蛍光特性を精査した結果、ベンゼン環 HOMO エネルギーレベルの上昇により蛍光量子収率が減少するという PeT の原理に一致した結果が得られたばかりでなく、蛍光 On/Off の境界はキサンテン環部位の水酸基がアニオン型である場合と、分子型である場合で大きく異なることも明らかとなった (図5右上)。本知見はプローブ設計の観点から非常に有用である。すなわち、図5右上のオレンジの枠で囲った m-メトキシトルエンをベンゼン環部位として持つ TG は、キサンテン部位がアニオン型の時は強蛍光性である一方、分子型になるとほぼ無蛍光であるという特異な性質を有するキサンテン系色素と言え、極めて有用な蛍光プローブ母核となり得ることを示している。以下、本特性を活用して開発に成功した各種加水分解酵素・反応可視化蛍光プローブを紹介する。

まず、 β -ガラクトシダーゼ活性検出蛍光プローブ TG- β Gal (図5左下) を紹介する。TG- β Gal は、m-

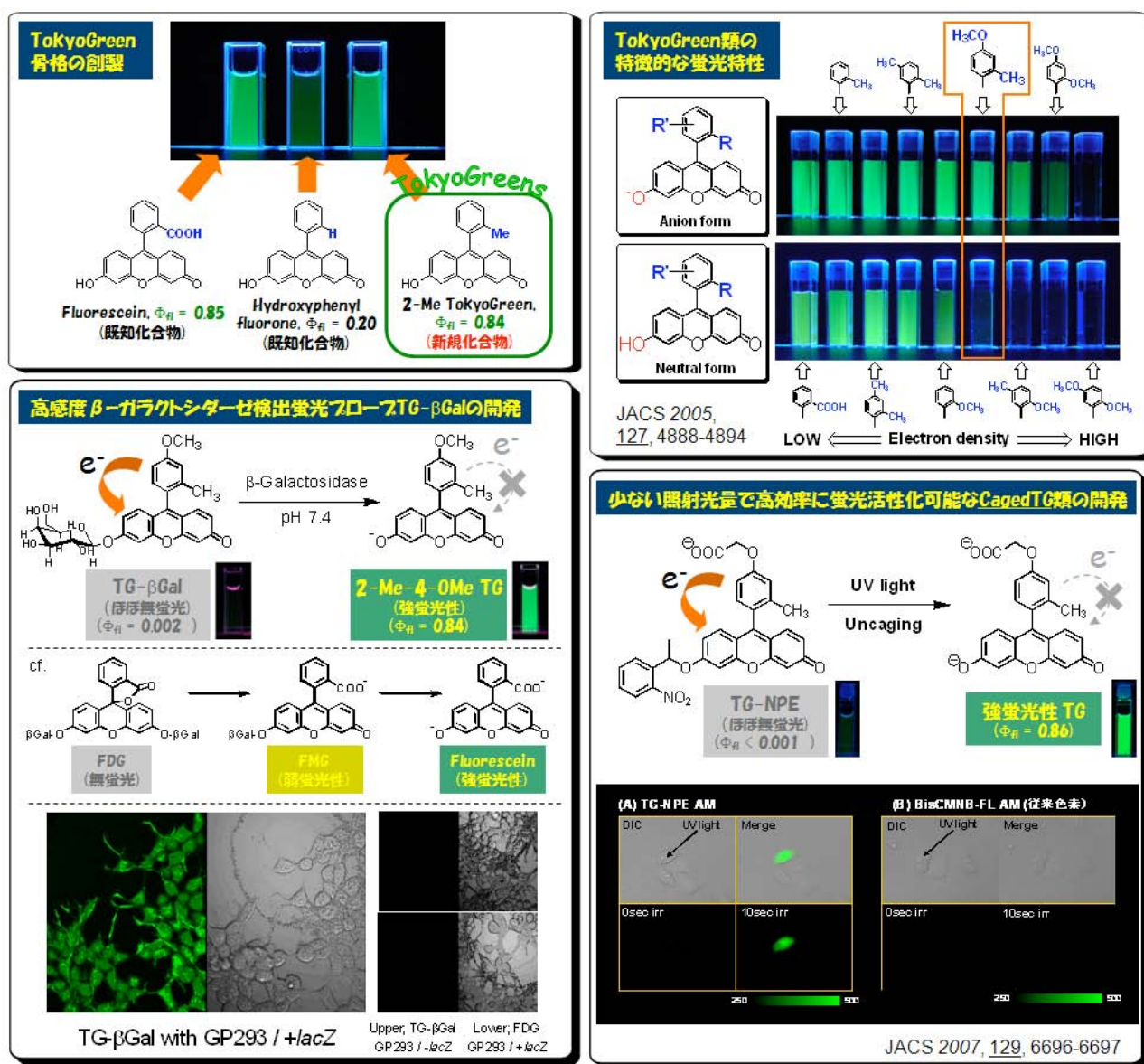


図5 新規フルオレセイン誘導体 TokyoGreens (左上) の構造とその特徴的な蛍光特性 (右上)。この特有の蛍光特性を活用した設計法に基づき、極めて高感度かつ生細胞系での使用が可能な世界初の β -ガラクトシダーゼ検出蛍光プローブ TG- β Gal の開発に成功した (左下)。また同設計法を活用し、極めて少ない紫外線照射光量によって、最大限の蛍光活性化を実現する新規 Caged 蛍光色素 (Caged TG 類) の開発に成功した。TG-NPE を負荷した細胞では、市販されている同目的の Caged 蛍光色素に比べて少ない照射光量で、高効率に単一生細胞の蛍光染色が可能であった。

メトキシトルエンをそのベンゼン環部位とする TG 類であり、このプローブ自身のキサンテン環部位の水酸基は、ガラクトースと結合しているエーテル構造となっており、よって pH 7.4 の水溶液中でも分子型をとる結果、ほぼ無蛍光性である。これが β -ガラクトシダーゼにより特異的に加水分解されることで、キサンテン環部位の水酸基はフリーとなるが、その pKa が約 6.2 であるため脱プロトン化してアニオン型となるため、生成物である 2-OMe-4-Me TG は強い蛍光を発する。すなわち本プローブは β -ガラクトシダーゼ活性検出蛍光プローブとして機能する。実際、本反応前後での蛍光増大率は約 800 倍にも達し、極めて鋭敏に β -ガラクトシダーゼ活性検出が可能である。

β -ガラクトシダーゼはレポーター酵素として最も汎用されているが、これまでの検出法は X-Gal 染色などの吸光法を原理とするものがほとんどであり、原理的に高感度であるはずの蛍光法が用いられることは非常に少なかった。今回開発に成功した TG- β Gal は分子内に糖部位を 1 つしか持たず、これが加水分解される 1 段階の反応で、従来から知られている蛍光プローブ (Fluorescein-di- β -galactoside; FDG、図 5 左下) の 2 段階分に相当する最大の蛍光強度変化を生じるように設計されているため、非常に感度良く β -ガラクトシダーゼ活性を検出することが可能となった。本プローブは生細胞系への適用が可能であり、実際図 5 左下に示したように、生細胞系における β -ガラクトシダーゼの高感度検出に世界で初めて成功した^{9,10}。

上述の設計法で用いるアルキル基部位は、もちろんガラクトースに限られるものではない。これを光解除性保護基であるニトロベンジル基とすれば、いわゆる caged 蛍光色素が誕生する。実際本設計法に基づいて開発された TG-NPE は、それ自身は分子内 PeT の結果ほぼ無蛍光であり、ここに 350 nm の解除光を照射することで大きな蛍光増大を示す Caged 蛍光色素として機能する。TG-NPE は上述の TG- β Gal と同様、1 段階の光解除性保護基の脱離により最大の蛍光強度変化を生じるため、従来色素に比べ極めて短時間の解除光照射で単一細胞の蛍光染色が可能であることも示された(図 5 右下)¹¹。

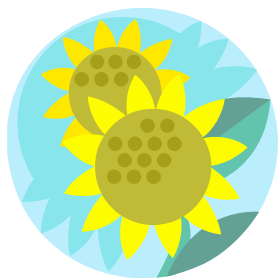
5. 今後の展望

筆者らが最近確立することに成功した有機小分子蛍光プローブの論理的な設計法により、開発可能な蛍光プローブの種類は飛躍的に増大し、生きている生物試料の中で起こる各種イベントを可視化する新規蛍光プローブ群の開発に成功した。開発した蛍光プローブ群は、細胞培養液に添加するだけで、容易に細胞膜を通過して生きている細胞に負荷することが可能であり、すぐにでも生物学領域研究に適用可能な実用性を持っている。このように、化学を基礎とした蛍光プローブ分子を精密に設計・開発することで、生物学領域研究が一気に進むことが大いに期待されることから、今後も多種多様な機能を持つ蛍光プローブの開発を鋭意行っていく予定である。

文献

1. Akwasi Minta et al., *J. Biol. Chem.*, **264**, 8171-8178 (1989).
2. Tetsuo Miura et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8666-8671 (2003).
3. Kumi Tanaka et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 2530-2536 (2001).
4. Naoki Umezawa et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 2899-2901 (1999).
5. Ken-ichi Setsukinai et al., *J. Biol. Chem.*, **278**, 3170-3175 (2003).
6. Tasuku Ueno et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 10640-10641 (2006).
7. Suguru Kenmoku et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 7313-7318 (2007).
8. Yuuta Fujikawa et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 14533-14543 (2008).

9. Yasuteru Urano et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4888-4894 (2005).
10. Mako Kamiya et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 3918-3929 (2007).
11. Tomonori Kobayashi et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 6696-6697 (2007).
12. 浦野泰照 他, *現代化学*, **381**, 44-50 (2002).
13. 浦野泰照 *細胞*, **37**, 370-374 (2005).
14. 浦野泰照 *化学工業*, **57**, 699-706 (2006).
15. 浦野泰照 *化学*, **61(9)**, 23-27 (2006).



気になった論文

戸井田 力 (といた りき)

九州大学大学院システム生命科学府 システム生命科学専攻 一貫性博士課程4年 片山研究室
riki0710@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

この度は、生命化学研究レターの「論文紹介」コーナーへの執筆機会を頂き、心より感謝致します。現在、私は九州大学大学院システム生命科学府の片山佳樹教授の指導の下、細胞内のリン酸化酵素（キナーゼ）に応答して機能発揮するシステムの開発を行っております。将来的には、臨床応用可能な遺伝子キャリアー、特定の酵素の蛍光イメージングシステムへの応用を行っていきたいと考えています。さて、今回は、「癌細胞マーカーの検出システム」、「抗癌剤の新たな知見」、「初代培養細胞を使用した薬物探索システム」の論文をそれぞれ紹介させていただきます。

Integrated Barcode Chips for Rapid, Multiplexed Analysis of Protein in Microliter Quantities of Blood

R. Fan, O. Vermesh, A. Srivastava, B. K. H. Yen, L. Qin, H. Ahmad, G. A. Kwong, C. C. Liu, J. Gould, L. Hood, J. R. Heath, *Nat. Biotechnol.*, **26**, 1373-1378 (2008).

本論文では、マイクロ流路を用いて、ハイスループット、低コスト、高感度な癌細胞マーカー分子の検出法を確立しています。癌患者の血中では特定のタンパク質（癌のマーカー分子）の分泌量が大幅に向上しており、この血中量を測定することで簡易的な癌の診断が行われています。例えば、前立腺癌患者では前立腺特異抗原 (Prostate Specific Antigen; PSA) の、卵巣・精巣腫瘍患者ではヒト絨毛性ゴナドトロピン (Human Chorionic Gonadotropin; hGC) の血中濃度が亢進しています。採取した血液中のタンパク質は不安定で短時間で処理することが求められます。また、このようなマーカー分子は多数あり、同時に多数の検体を処理できることも同様に重要であります。

図1(A)に著者らが開発したIBBC (Integrated Blood Barcode Chip)を示しました。血液中には、目的のマーカー分子以外に非常に多くの夾雑物が存在しています。まず、タンパク質と比較して非常に大きな赤血球や白血球は、Zweifach-Fung効果により目的のマーカー分子を含む血漿成分と分離することが可能です。これがマイクロ流路を使

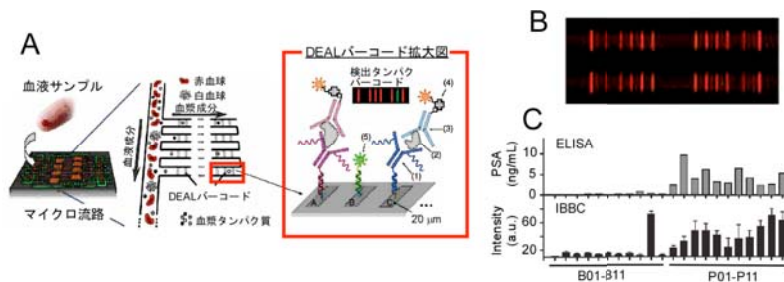


図1 (A)IBBC (Integrated Blood Barcode Chip)の概念図。(1)基板上的DNAとハイブリダイズするためのDNA修飾抗体、(2)検出したいマーカー分子、(3)ビオチン修飾抗体、(4)Cy5修飾アビジン、(5)Cy3修飾コントロールDNA、(B)前立腺癌患者の血液サンプルの11種のサイトカイン、PSA分泌レベルの測定結果。対応するタンパクが検出されると赤色蛍光が確認される。緑色蛍光はコントロール。(C)ELISAとIBBCの比較 (論文より一部改変)

う一つの利点であります。さらに、血漿成分中から目的のマーカー分子を検出する必要がありますが、マーカー分子に対する抗体を高密度に修飾した DEAL (DNA-Encoded Antibody Library) バーコード法によりこれを達成しています(図1A 赤枠)。DEAL 法は多種の抗体を一度に修飾できるため、多数のマーカー分子の分泌量を一度に測定することが可能です。図1(B)は前立腺癌患者から採取した血液サンプル中の PSA および 11 種のサイトカインの分泌レベルの測定結果です。12 種のマーカー分子が非常にきれいに分離・検出できていることが分かります。図1(C)は計 22 人の前立腺癌患者 (P01-P11) および乳癌患者 (B01-B11) の血液サンプル中の PSA の分泌レベルを測定した結果です。乳癌患者のサンプルではほとんど PSA が確認されないのに対し、前立腺癌患者のサンプルでは高分泌していることが分かります。さらに IBBC による測定結果とタンパク質の検出法として汎用されている ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 法と同様の検出プロファイルおよび感度が得られたことで本検出法の有用性が示されています。また、この測定に必要な血液サンプル量は数 μL オーダーと非常に微量です。将来的には簡便な癌診断法としての応用が期待される報告であります。

Stimulation of Tumor Growth and Angiogenesis by Low Concentrations of RGD-Mimetic Integrin Inhibitor

A. R. Reynolds, I. R. Hart, A. R. Watson, J. C. Welte, R. G. Silva, S. D. Robinson, G. D. Violante, M. Gurlaouen, M. Salih, M. C. Jones, D. T. Jones, G. Saunders, V. Kostourou, F. P. Sierra, J. C. Norman, G. C. Tucker, K. M. H. Dilke, *Nat. Med.*, **15**, 392-400 (2009).

多くの固形癌では、血管内皮細胞増殖因子(Vascular endothelial growth factor; VEGF) が過剰発現しており、癌の血管新生を誘導し、癌の転移を促進しています。また、細胞の接着因子であるインテグリンも血管新生に深く関与しており、インテグリンの阻害剤 (Cilengitide) は癌の治療薬として、臨床試験が行われている最中でありです。しかしながら、Cilengitide は脳腫瘍に対しては一定の治療効果を得ていますが、他の癌では良好な結果が得られていません。本論文では、高濃度では癌の治療効果が確認されている Cilengitide、および低分子阻害剤 S36578 が、低濃度では逆に癌の成長を促進させてしまうことを見出しました。さらに、それらに関与しているタンパク質として、VEGF のレセプタータンパク質 (VEGFR2)、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリン($\alpha_v\beta_3$)、タンパク質のリサイクリングを誘導する RabA4 を挙げています。図2(A)では低濃度 (2 nM) の S36578 処理による VEGFR2 および $\alpha_v\beta_3$ の細胞周辺への濃縮効果を確認しています。VEGF により細胞を刺激すると、未刺激のものと比較して VEGFR2 の細胞周辺の発現量が向上しています。さらに、これを低濃度の S36578 で処理すると、未処理の場合と比較して大きく向上していることが確認されました。次に、低濃度の S36578 の新生血管の構築に与える影響を確認しています (図2B)。まず、細胞を VEGF で刺激すると、血管の新生が確認されました。VEGF 刺激細胞を高濃度(50 μM)の S36578 で処理すると、血管の新生は VEGF 未刺激の細胞と同程度まで抑えることが可能でした。一方、低濃度の

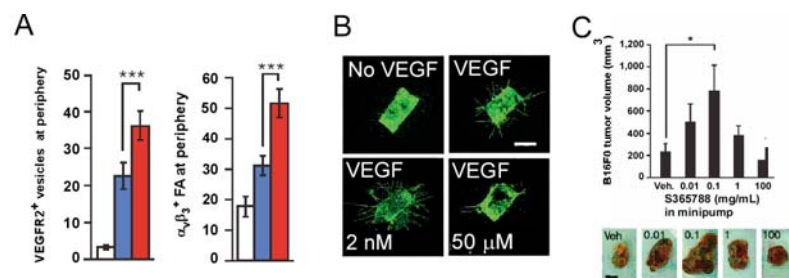


図2 (A)癌細胞周辺のVEGFR2、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの発現量(白:未処理、青:VEGFのみ、赤:VEGFおよび低濃度のS36578)、低濃度の阻害剤による(B)微細血管、(C)固形癌の成長(論文より一部改変)

S36578 で処理すると、VEGF 刺激細胞より活発に血管の新生が行われていることが分かります。最後に、モデルマウスを用いて癌の成長に与える効果を確認しています。癌組織に S36578 を様々な濃度で処理したところ、1 mg/mL 以上では癌の成長を抑制したのに対し、低濃度(0.1 mg/mL)で処理した場合、コントロールと比較して成長が大幅に促進されることが確認されました。これらの結果より、低濃度の阻害剤により、(1) Rab4A の活性化 (データ未掲載)、(2) RabA4 による VEGFR2 および $\alpha_v\beta_3$ の細胞周辺への濃縮 (図 2 A)、(3) VEGF による新生血管構築の促進 (図 2 B)、(4) 癌の成長が誘導 (図 2 C)されるという一連のメカニズムを提唱しています。実際の治療において、薬物の自由拡散により癌周辺の薬物濃度は次第に低濃度になっていき、癌が悪化することが懸念されます。将来的には、癌周辺の薬物濃度を固定化する技術、あるいは材料が必要になってくるのかもしれない。

High-Content Single-Cell Drug Screening with Phosphospecific Flow Cytometry

P. O. Krutzik, J. M. Crane, M. R. Clutter, G. P. Nolan, *Nat. Chem. Biol.*, **4**, 132-142 (2008).

特定の疾病細胞では、特定のタンパク質リン酸化酵素（キナーゼ）の活性が異常亢進していることが報告されています。そのため、これらの酵素の阻害剤は疾病の治療薬となることが期待できます。特に、特定の酵素および特定の細胞集団にのみ作用する阻害剤は副作用を回避する上で、非常に有用です。また、これらの酵素の阻害剤のスクリーニング系の開発も極めて重要です。

10^5 個に及ぶ候補薬物は精製酵素、細胞、個体での多岐にわたる評価が行われ、最終的に数個の薬物が臨床試験にまわされます。一次スクリーニングでは主に精製酵素による阻害能の評価が行われますが、精製酵素の評価で良好な結果が得られていた薬物が、必ずしも生体内で有効なわけではありません。また、精製酵素による評価は莫大な時間と資金が必要になります。そのため、より効率的な薬物探索を目的として、細胞を利用したハイスループットなスクリーニング系が切望されています。本論文では、フローサイトメトリー (FCM) の特性を利用することで、同時に多種の細胞、タンパク質活性を評価し、ハイスループットな細胞ベースのスクリーニング系を実現しています。図 3(A)が戦略を示した概念図 (Phosphoflow) であります。初めに薬剤により目的のタンパク質の活性を亢進させます。次に薬剤候補の化合物を処理し、目的のタンパク質に対応した蛍光修飾抗体 (複数のタンパク質がターゲットの場合は修飾する蛍光の蛍光波長を変える。最大で 15 種まで可能) を作用し、染色します。最後に FCM で検出を行います。前報にて、すでに抗体濃度、染色時間などのパラメーターを最適化しており、ウエスタンブロットの結果と非常に高い相関を得ています (Cytometry A, **55**, 61-70)。

まず、235 個の化合物の Phosphoflow による培養細胞内の Stat1、Stat5、p38 活性の阻害能の検討を行っています。図 3(B)には、その中の 12 個のヒット薬物の結果を示しています。例えば、HHT は p38 の有効な阻害剤、Striatin E は Stat1、Stat5、p38 全てに有効な阻害剤であることが分かります。このように、一度の測定で得られる候補薬物の情報量が多く、高スループット化には必要な技術であります。

さらに、著者らは前報で確立した FCB (Fluorescent Cell Barcode) 法 (図 3(C), *Nat. Methods*, **3**, 361-368) と Phosphoflow を融合した Phosphoflow/FCB 法を、初代培養細胞に応用しています。特定の組織から、単一の初代培養細胞を得るためには、煩雑な精製作業が必須です。一方、各々の細胞には、特定の受容体が発現しており、これらに対する蛍光修飾抗体を使用することで、精製するこ

となく、特定の細胞群を染め分けることが可能です。すなわち、Phosphoflowにより多種の酵素の阻害効果を、FCB法により多種の細胞に対する阻害効果を確認することができ、一回の測定で得られる情報は飛躍的に向上します。図3(D)に、Phosphoflow/FCB法にて、脾臓から採取した未精製の初代培養細胞（B細胞、T細胞、単球、樹状細胞などが含まれる）内のStat1に対するSTRPNの阻害効果を測定しております。B細胞内のStat1に対しては濃度依存的に阻害効果が增大していることが確認されます。一方、CD4⁺T細胞内のStat1に対しては全く阻害効果を与えませんでした。また、この結果はウェスタンブロットとの整合性も高く信頼できる結果といえます。最後に著者らは、STRPNの阻害効果を個体レベルで検証していますが、先の初代培養細胞系と類似した結果が得られています。

このように、Phosphoflow/FCB法を使用することで、候補薬物の多種のタンパク質および異種の細胞群を含む初代培養細胞に対する阻害効果を、煩雑な作業を行うことなしにハイスループットに測定することができした。また、本文では特に述べませんでしたが、本手法で(1)薬物のIC₅₀値を決定すること、(2)数千個の薬物を一日で測定することも可能です。新たな初代培養細胞を使用した薬物探索法として期待されます。

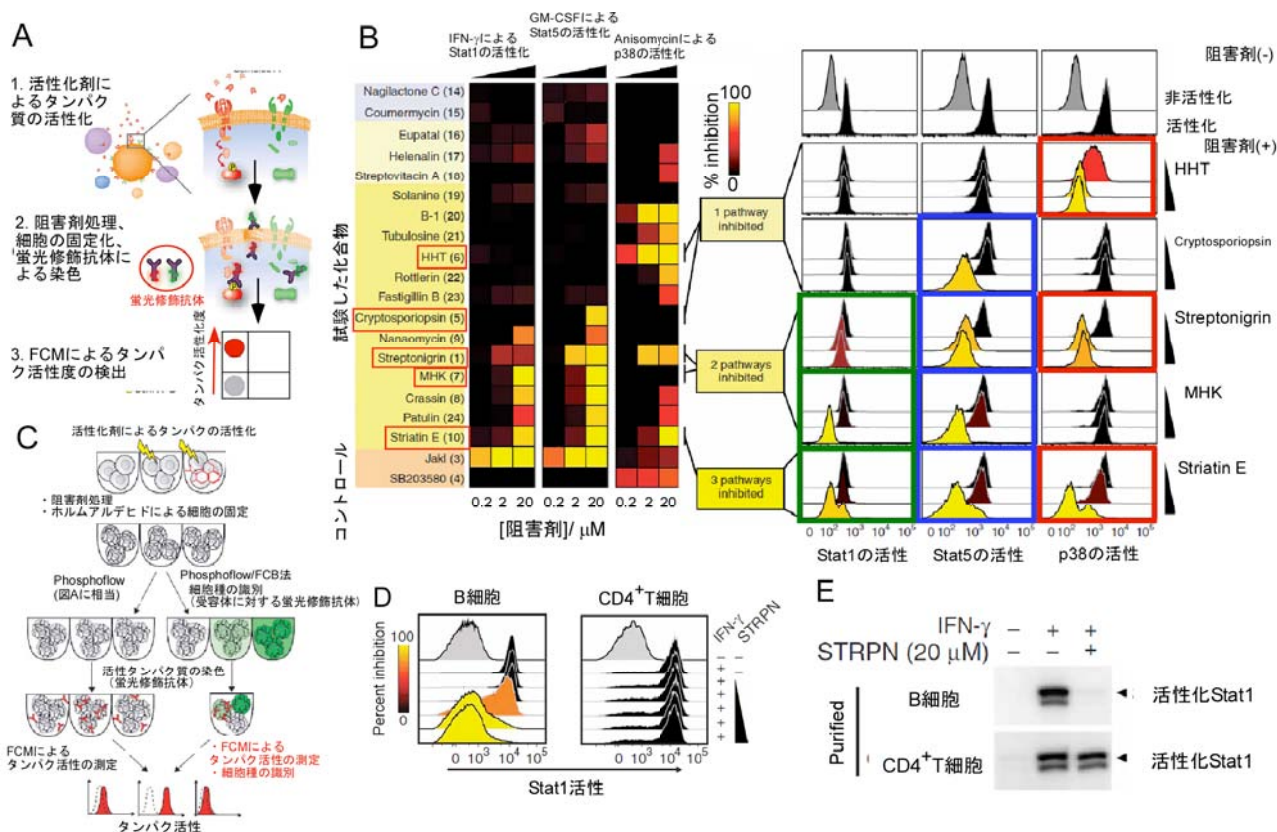


図3 (A)Phosphoflowの概念図、FCMにより単一細胞内のタンパク質活性を検出可能である。(Cytometry A, 55, 61より一部改変) (B)235個の化合物をPhosphoflowでスクリーニング、図にはヒットした18個の化合物を示した。一度の測定で化合物がどのタンパク質活性を阻害するか可能である。(C)Phosphoflow/FCB法の概念図、通常のPhosphoflow前に細胞種を識別するために細胞種特異的な蛍光修飾抗体を作用する。(D)脾臓から得た多種の初代培養細胞群で薬物のタンパク質阻害能を測定した。B細胞の特異的な受容体B220に対する蛍光修飾抗体、CD4⁺T細胞の受容体TCRβおよびCD4受容体に対する蛍光修飾抗体により各々の細胞群を識別可能である。STRPNで処理した初代培養群の内、B細胞内のStat1にのみ阻害効果を与える。(E)ウェスタンブロットとの整合性。(B),(D),(E)は紹介論文より、(C)はNat. Methods, 3,361より一部改変して転載。

気になった論文

町田 慎之介 (まちだ しんのすけ)

大阪大学大学院理学研究科 博士後期課程 3 年

shin-m33@sanken.osaka-u.ac.jp

この度は、生命化学研究レター「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。私は大阪大学産業科学研究所 医薬品化学研究分野にて加藤修雄教授、大神田淳子准教授の御指導のもと研究を行っております。低分子量 GTP 結合タンパク質は遺伝子発現、細胞周期から腫瘍形成・転移と幅広く関与し、これらの翻訳後修飾を担う prenyltransferase の farnesyltransferase と type-I geranylgeranyltransferase は抗がん剤の標的酵素として注目されています。私の研究はこれらの二つの酵素による翻訳後修飾を経由して機能化し、すい臓がんの 90% に変異体が見出されている K-Ras4B の翻訳後修飾のみを効果的に阻害する prenyltransferase dual 阻害剤の開発です。

今回は、タンパク質の構造変化に着目した新たなスクリーニング法開発、RNA 創出におけるリボヌクレオチドの新たな合成経路、分子認識によるシグナル伝達的作用機序の解明の三つをご紹介します。

A New Screening Assay for Allosteric Inhibitors of cSrc

J. R. Simard, S. Klüter, C. Grütter, M. Getlik, M. Rabiller, H. B. Rode, D. Rauh, *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 394-397 (2009)

kinase 阻害剤は i) ATP と競合でき、高く保存された kinase domain の hinge region に結合する type I と、ii) hinge region およびあまり保存されていない allosteric site に結合して kinase を不活性型にする type II と III に分類できます。いずれの場合も、大きな library からの化合物の評価にはハイスループットスクリーニング (HTS) が効果的ではありますが、化合物の標的タンパク質に対しての結合の分類には HTS は適していません。ここで紹介する論文は、kinase 阻害剤の type を分類できる新しいスクリーニングを開発したという論文です。

kinase の活性型は図の右端に示すように active loop が動いて type II/III が結合する allosteric site を占有し、ATP が結合できるポケットを作り出すのに対して (図 1 a 一番右)、不活性型では active loop が ATP の結合を阻害できるような配置を取る代わりに、allosteric site を提供する空間を生み出します (図 1 a 左)。

筆者らはこの active loop の構造変化に着目し、kinase の一つである cSrc に環境応答型の蛍光プローブの acrylodan を導入した cSrc を用いて、活性型の cSrc に結合する type I と不活性型に結合する type II/III を区別できるかを試みました。阻害剤のない条件での acrylodan-cSrc は二つの発光極大を示します (図 1 c 475 と 505 nm)。そこに、type II/III の阻害剤を作用させると二つの発光極大がほぼ等しく減

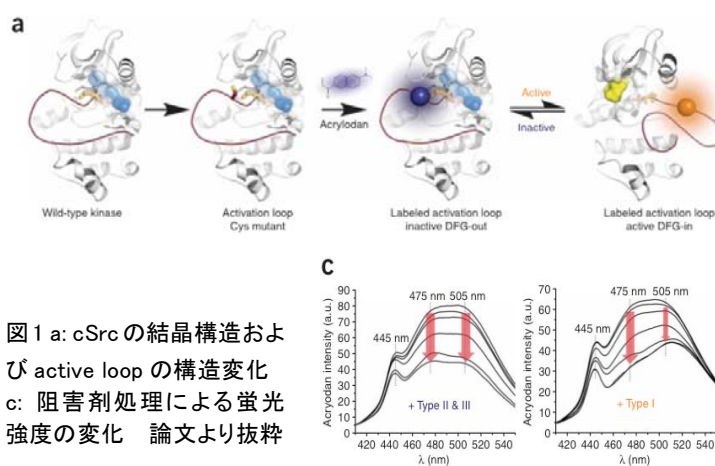


図 1 a: cSrc の結晶構造および active loop の構造変化
c: 阻害剤処理による蛍光強度の変化 論文より抜粋

少していくのに対して、type I の阻害剤を作用させた場合では、475 nm の発光極大のほうが著しく減少し、505 nm の発光極大が 510 nm へシフトします。このように active loop の構造変化に伴い蛍光プローブの環境および性質に変化が生じることを利用して、type I と type II/III を区別ができることを示しています。

また、筆者らが開発した今回の assay 系を利用して、p38 α kinase に低 nM と高い affinity を持つ type III 阻害剤の scaffold として取り入れられている pyrazolourea を核とする 4 つの化合物を合成し、cSrc に対して二つの化合物の IC₅₀ が約 30~65 μ M の活性を示し、type II/II と同じ binder として機能することを見出しています。さらに、それら化合物を用いて cSrc との共結晶を作成し、typIII 阻害剤と同じ結合様式であることも示しており、今回開発したスクリーニングが新しい tool として有効であることを示しています。

Synthesis of Activated Pyrimidine Ribonucleotides in Prebiotically Plausible Conditions

M. W. Powner, B. Gerland, J. D. Sutherland, *Nature*, **459**, 239-242 (2009)

リボヌクレオチドが重合して RNA が形成されることは実証されてきましたが、それを構成するための活性化されたピリミジンリボヌクレオチド **1** の形成は明らかにされていませんでした。この論文は、これまでに考えられてきた経路(青)と同じ低分子前駆体を用いて、他の中間体を経由して活性化されたピリミジンヌクレチドを短く、高効率なルート(緑)を発見したというものです。

1 はピリミジンヌクレオシド **2** のリン酸化によって、**2** はピリミジン **3** とリボース **4** の縮合によって生じることに違いはないと考えられていたのは、**3** と **4** が合成されるという事実によって支持されてきたためです(青の経路)。しかしながら、**2** を合成するにあたり、**3** の N-1 の非共有電子対の非局在化および水溶液中で反応が縮合よりも加水分解が好まれるといったことが、この経路の問題となっていました。そこで、筆者らは図の緑で示す新たな経路を提唱して、それぞれの鍵となる中間体 **11** から **12**、**13** についての反応条件の検討を行い、それらの中間体を経て活性化されたリボヌクレオチドを合成することに成功しました。**8** と **10** による **11** の合成は、強塩基下での縮合が伝統的な手法であったのに対して、中性条件下で得るために無機リン酸塩を用いることで>80%以上で **11** を得ることに成功しました。また、この反応で **8** を過剰にすることで **3** の原料となる urea **6** が得られることを見出しています。次に、**9** と **11** からは 4 つの異性体が形成されるが、lyxose、xylose 体は非常に収率が低く、さらにリン酸塩存在下で長時間放置しておくと糖が開環した形へと変換されてしまい arabinose 体 **12** と ribose 体が major で生成されますが、ribose 体はこのあとのリン酸化が生じないために、結果として鍵となる中間体 **12** が主生成物となります。その後、**12** から再び無機リン酸塩を用いて、反応の pH の上昇を抑えることで anhydrous nucleoside **13** を高収率で得ることができ、**13** から **1** へのリン酸化においては 5'位の 1 級アルコールに優先的に生じるのではなく、3'位の 2 級アルコールを優先して生じることを結晶構造から 5'位の水酸基が 3'位と比較して立体的な効果によるものとし、反応の溶液中でもその効果が影響していると述べています。そして、3'位のリン酸基の転位を経由して、活性化されたピリミジンヌクレオチドの合成を達成しました。実際にご覧になられた方が多いのでは・・・と思いますが、リン酸塩は最後のヌクレオチド形成に使われるだけでなく、鍵となる反応を制御する物質として活躍してい

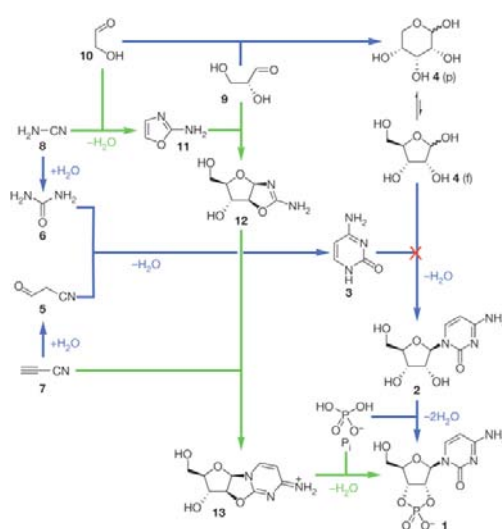


図2 pyrimidine nucleotide の合成経路
論文より抜粋

ます。また、出発物質は生物が登場する前に存在するようなものばかりであり、実際にこのような反応を通して RNA が合成されたのかなと思うような論文でした。

Sialylated Multivalent Antigens Engage CD22 *in trans* and Inhibit B Cell Activation

A. H. Courtney, E. B. Puffer, J. K. Pontrello, Z.-Q. Yang, L. L. Kiessling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 2500-2505 (2009)

B 細胞抗原レセプター (BCR; B cell antigen receptor) は B 細胞を活性化する BCR シグナルを細胞内へ伝える役割を持ち、sialic acid-binding Ig-lectin (Siglec) のファミリーの一つの CD22 は BCR シグナルを阻害する共受

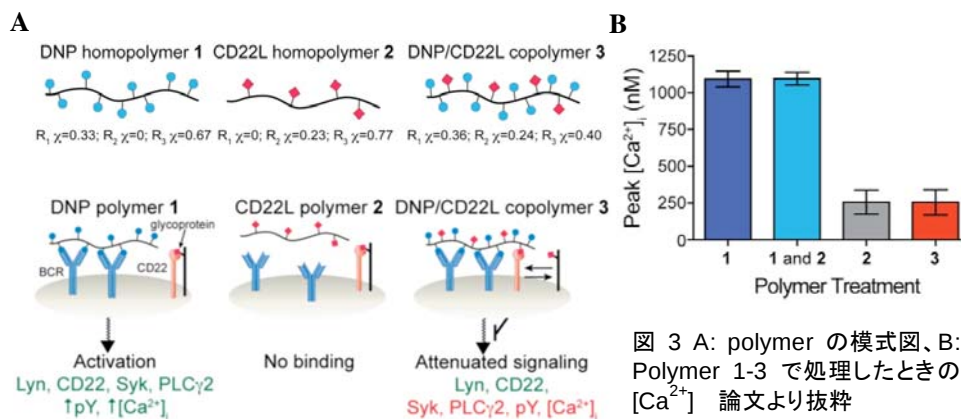


図 3 A: polymer の模式図、B: Polymer 1-3 で処理したときの [Ca²⁺] 論文より抜粋

容体と知られており、CD22とBCRの共局在によってBCRシグナルの活性化を抑えることが明らかとなっています。一方、CD22のligandを持つ糖タンパク質とCD22が同一細胞表面上での相互作用である *cis* interaction が働くとBCRとの共局在ができないために、B細胞の活性化が生じることが報告されています。しかし、それとは対照的にCD22と他のB細胞の表面上の糖タンパク質との相互作用である *trans* interaction と、そこから生じるシグナルの影響は今まで曖昧なままでした。ここで紹介する論文はB細胞の活性化の制御におけるCD22の *cis* と *trans* interaction の因果関係を明らかにした論文です。

図3Aに示すように、BCR antigenのDNPのみのpolymer 1、CD22 ligandのみのpolymer 2およびantigenとligandを組み合わせたpolymer 3の三つのpolymerを用いてB細胞の活性化の特徴である[Ca²⁺]の増加の観察を行いました。図3Bに示すように、BCRの抗原のみを持つ1はBCRと結合し、CD22はB細胞表面上の糖タンパク質と結合します。よって1を作用させたときは、CD22がBCRから隔離された形を取るためにB細胞活性化の抑制に重要である共局在が起こらずに活性化を促進します。次に2はBCRのantigenを持たないためにB細胞の活性化を促進しないという予想通りの結果を示しました。3については興味深いことに、antigenとligandの2つを持つために1と2の作用の中間の活性を示すかと考えられますが、B細胞の活性化を促進しないという結果を示します。これは2のBCRのantigenが無いためにB細胞の活性化が促進されないという結果に対して、3の結果はantigenおよびligandのそれぞれが認識されてCD22とBCRの共局在を促します。しかし、これは単に一つのpolymerにそれぞれのantigenとligandを有しているためであると考えられますが、1と2の併用はB細胞の活性化を促進するという結果から、3は *trans* interaction でBCRとCD22に作用して共局在化を引き起こし、B細胞の活性化を抑制することを示しました。また、1と3はBCRのantigenを持つためにB細胞活性化のBCR signalingの初期段階は促進されます。そこで、*trans* interaction のB細胞活性化の抑制を詳細にするため、BCRのリン酸化ドメインのkinaseであるLynと、さらにその下流のSyk、PLCγ2リン酸化のレベルを調べた結果、Lynから下流のSyk、PLCγ2の活性化を抑制することを明らかにしました。

気になった論文

森谷 優貴 (もりたに ゆうき)

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 医歯学総合研究科 博士課程3年

moritani.org@tmd.ac.jp

この度は、生命化学研究レターの論文紹介の機会を頂き誠に感謝致します。現在、私は東京医科歯科大学の秋吉一成教授の下で、無細胞タンパク質合成による膜タンパク質組込リポソームの調製と機能評価、特に膜タンパク質が機能する状態で効率良くリポソームに組み込む手法の研究に携わっております。

これまでは、膜タンパク質組込リポソームの調製法としては、主に細胞に目的の膜タンパク質を強発現させ、界面活性剤等を用いて抽出、単離したものをリポソームに再構成する手法が用いられてきましたが、近年無細胞タンパク質合成によって合成した膜タンパク質をリポソームに組み込む手法が開発され、様々な膜タンパク質組込リポソームを形成する試みがなされています。このような手法の発展により、これまで未知な部分の多い膜タンパク質の構造解析や、機能の解明に関する研究が進むことに加え、容易に膜タンパク質組込リポソームを調製できるため、産業応用も盛んに行われることが期待されます。

本稿では、無細胞タンパク質合成によって膜タンパク質を合成し、リポソームへの組み込みを実施している論文について3報紹介させていただきます。

A Synthetic Biology Approach to the Constitution of Membrane Proteins in Semi-Synthetic Minimal Cells

Y. Kuruma, P. Stano, T. Ueda, P.L. Luisi, *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 567-574 (2009).

リポソームはその形状、性質から人工細胞を形成する材料として有用視されており、細胞の持つ様々な機能、例えばタンパク質合成能等をリポソームに保持させる研究が実施されています。本論文では、リポソームに自己増殖能を持たせることを目指し、リポソーム膜の構成成分をリポソーム内部で合成するために、前駆体からホスファチジン酸を合成する膜タンパク質を、無細胞タンパク質合成によってリポソーム内部に組み込むことを試んでいます(図1)。これまでも無細胞タンパク質合成を用いて膜タンパク質組込リポソームを形成し、膜タンパク質を機能化させることに成功した報告は存在しますが、本論文では、グリセロール-3-リン酸とアシルCoAからリソホスファチジン酸を合成する膜タンパク質である GPAT (*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase) とリソホスファチジン酸とアシルCoAからホスファチジン酸を合成する膜タンパク質である LPAAT (lysophosphatidic acid acyltransferase) を組み込んだリポソームを別々のリポソーム上に組み込み、環境条件を途中で変更

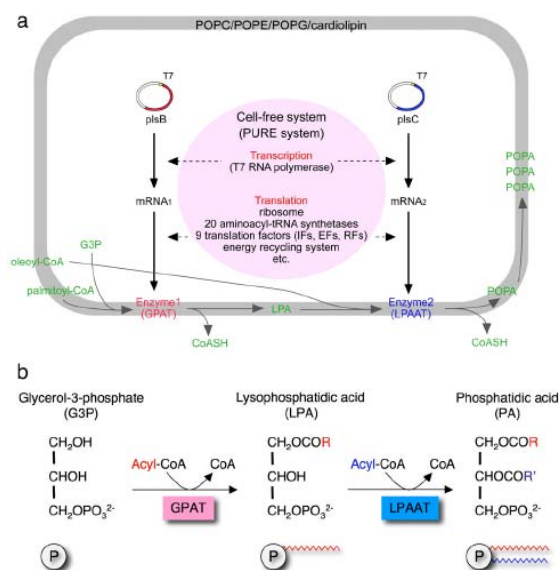


図1 脂質を合成するリポソームの概念図(論文中より抜粋)

してはいますが、2種類の膜タンパク質をシーケンシャルに作用させて、前駆体から最終生成物であるホスファチジン酸を合成することに成功しています。協調動作する複数の膜タンパク質をリポソームに組み込むことが可能になることで、より複雑な機能を保持したリポソームが作成できるため、様々な応用が期待されます。また、リポソームを構成する脂質の種類によって、膜タンパク質の合成量、合成した膜タンパク質のリポソームへの内包量、膜タンパク質の活性量が異なることや、合成時にリポソームが存在することで膜タンパク質の活性が高くなるといった点も示唆されており、非常に興味深い結果である。

Cell-free Synthesis of the Torque-Generating Membrane Proteins, PomA and PomB, of the Na⁺-driven Flagellar Motor in *Vibrio alginolyticus*

H. Terashima, R.A. Yoshizumi, S. Kojima, M. Homma, *J. Biochem.*, **144**, 635-642 (2008).

1報目に紹介した論文では、シーケンシャルに協調動作する2種類の膜タンパク質をリポソームに組み込んでいましたが、本論文では、相互作用して1つの機能を実現する2種類の膜タンパク質を無細胞タンパク質合成し、単一のリポソームに組み込むことを試みています。ターゲットとしている膜タンパク質は*Vibrio alginolyticus*由来のPomAとPomBであり、4分子のPomAと2分子のPomBが膜上で複合体を形成することで、鞭毛モーターを構成することが知られています。論文中では、リポソーム存在下で無細胞タンパク質発現によって2種類の膜タンパク質を同時に合成することで、両者を共に発現させると共に発現した膜タンパク質がリポソーム膜上に組み込まれ、両者が相互作用していることを示唆する実験データが示されています。具体的には、PomBにhis6タグを付与したものを発現し、Ni-NTAアガロースカラムを通すことで、タグを付与していないPomAがPomBと同じ画分で検出されることが示されています(図2)。残念ながらリポソーム膜上に組み込まれた膜タンパク質が機能することは確認できなかったとのことであり、その点については今後の発展が望まれますが、相互作用する複数の膜タンパク質を機能する形でリポソーム膜に組み込むことは、複合体の構造解析や機能評価等の有用なツールになると考えられます。また、論文中では、本稿で紹介した膜タンパク質のリポソームへの組み込み以外にも、界面活性剤存在下での無細胞タンパク質合成による膜タンパク質合成や、合成した膜タンパク質の可溶化、相互作用の検証も行われており、こちらも興味深い内容です。



図2 無細胞タンパク質合成した PomA と PomB の リポソーム膜上での相互作用結果(Ni-NTA アガロースカラムを通した各フラクションの免疫ブロッティング結果) Syn: 全量、FT: フロースルー、W: 洗浄、E1、E2: 溶出(論文中より抜粋)

Liposomes-Mediated Delivery of Pro-Apoptotic Therapeutic Membrane Proteins

L. Liguori, B. Marques, A.V. Mendez, R. Rothe, J. L. Lenormand, *J. Control. Release*, **126**, 217-227 (2008).

本論文は、無細胞タンパク質合成した膜タンパク質をリポソームに組み込み、細胞内にデリバリーして膜タンパク質を作用させることで、癌等の治療に利用することを目指した研究を実施しています。具体的には、ミトコンドリアの膜タンパク質の透過性向上がアポトーシスの開始点となることから、ミトコンドリアの外膜に存在する膜タンパク質であり、ミトコンドリア外膜からのシトクロムC放出に寄与する電位依存性陰イオンチャネ

ル (Voltage-dependent anionic channel: VDAC) とアポトーシス促進効果があり、同様にミトコンドリアの外膜に存在する膜タンパク質であるBakをリポソームに組み込み、癌細胞内にデリバリーしてアポトーシスを誘発することを試みています。

本論文では、最初は無細胞タンパク質合成によってVDACおよびBakを合成し、リポソーム存在下で合成することでどちらか一方のみを組み込んだリポソームおよび両者を共に組み込んだリポソームを調製することに成功したことが報告されています。更に、ショ糖密度勾配遠心を用いることで、反応後の溶液から膜タンパク質組込リポソームを精製することにも成功しています。

次に、精製後の膜タンパク質組込リポソームを培養細胞に添加して6時間以上インキュベートすると、細胞内部のミトコンドリアまで膜タンパク質組込リポソームをデリバリーできるという顕微鏡観察結果が示されています(図3)。また、膜タンパク質組込リポソームをミトコンドリアまでデリバリーすることにより、細胞のアポトーシスが誘発されるかを検証するために、細胞から抽出したミトコンドリアに対して膜タンパク質組込リポソームを作用させ、アポトーシスタンパク質であるシトクロムCの放出量、複数のカスパーゼの活性、アポトーシスが発生したことのシグナルであるホスファチジルセリンを生産している細胞量、細胞の生死判別といったアッセイを実施し、膜タンパク質組込リポソームのデリバリーによる効果を確認しています。一例としては、膜タンパク質組込リポソームを作用させることによりHCT116p53^{+/+}細胞においてカスパーゼ9 (46kDa) が分割されたものが観察されており、アポトーシスシグナルが伝達していることが確認できています。また、他の実験についても同様にアポトーシスシグナルが伝達しているという結果が得られています。

本論文は、無細胞タンパク質合成によって形成した膜タンパク質組込リポソームが癌細胞に膜タンパク質をデリバリーする材料として有益であることを初めて示したものであり、今後の発展が期待されます。

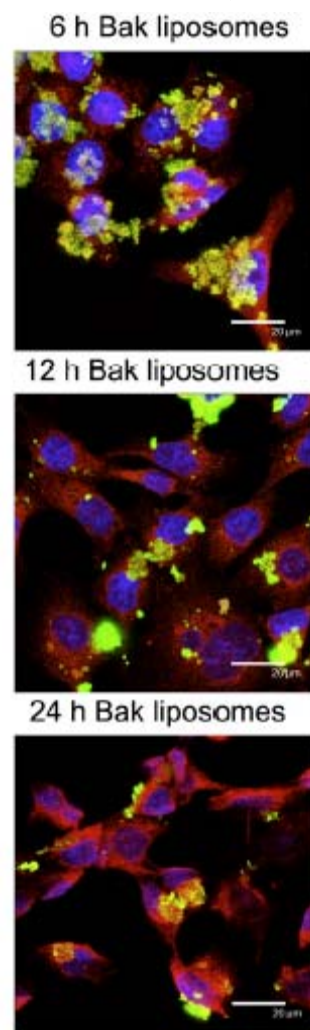


図3 Bak 組込リポソームを HCT116p53^{+/+}細胞に作用させた結果。Bak (緑)、ミトコンドリア (赤)、核(青)を染色 (論文中より抜粋)

生命化学研究法

IIS型制限酵素を利用した全自動プラスミドコンストラクション

北海道大学電子科学研究所ナノシステム生理学

小寺 一平

(kotera@es.hokudai.ac.jp)

1. はじめに

DNAを自在に組換える一連のDNA組換え技術は、新しい学問領域を創成するほどの強力な方法論であり、現在では、PCRやDNAシーケンシング等と並び分子生物学の基礎的手法となっている。DNA組換え技術の重要な要素である制限酵素は、1968年にハミルトン・スミスらによって報告された。制限酵素は特定のDNA配列を認識して切断する酵素であるが、当初報告された制限酵素の大部分はパリンドローム（回文）配列を認識して切断するIIP型制限酵素と呼ばれるサブタイプに属する。こうした歴史的背景もあり、IIP型制限酵素は世界中の研究室で広く用いられているが、現在主流のDNA組換え方法の効率が低い原因は、パリンドローム配列による方向性のないDNA連結によるところが大きい。本稿では、IIP型制限酵素の問題点と、それに替わるIIS型制限酵素の利点を解説し、IIS型制限酵素を利用することで効率を大幅に向上させた「混ぜるだけ」でDNAを組換えることの出来る新しい組換え手法 (FASTR法) の紹介を行う。

2. DNA組換え技術の現状と問題点

生物に関する幅広い学問領域において、DNA組換え技術は日常的に用いられる重要な手法である。しかし現在広く使われているDNA組換え法は、1970年代に開発されて以来、基本的には同等のプロトコルが現在も使われており、改善の余地は多く残されている。組換え効率の観点からだけであれば、Gateway®など、現在までに高い組換え効率を達成した技術は数多く開発されている。しかし、こうした組換え酵素を用いた技術では、組換えスキームの自由度が制限されてしまうため、従来のDNA組換え方法を置き換えるには至っていない。こうした理由から、複雑なDNAコンストラクションを行う研究者が多くの時間を組換え作業に費やしている現状

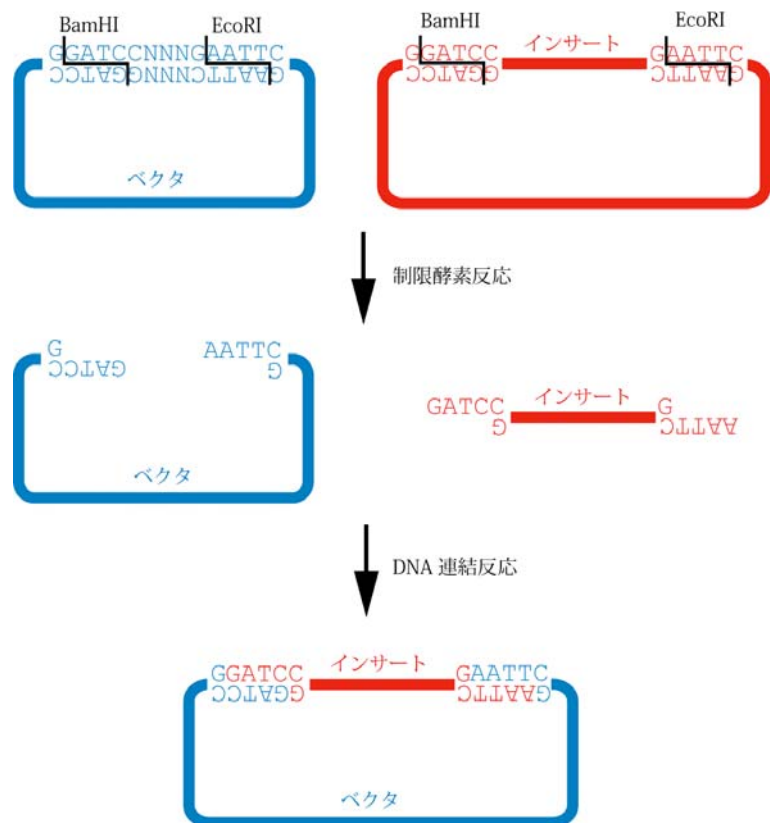


図1 従来のDNA組換え法

がある。さらに、煩雑な実験手技は他分野からの参入に対しても障壁となっている。

遺伝子のクローニングをはじめとするDNAの様々な操作には、ベクタと呼ばれる環状のプラスミドDNAが用いられる(図1、上段)。ベクタには、宿主細胞でセレクションを行うためのマーカーや、複製開始点、マルチクローニングサイト(MCS)などが含まれる。ベクタを制限酵素で処理することでMCS内の制限酵素サイトを切断し、環状DNAを開いて直鎖状のDNAを得る。同様に、クローニングする遺伝子配列(インサート)も制限酵素で処理し、必要な遺伝子断片を「切り出す」操作を行う(図1、中段)。こうして得られた直鎖状のベクタとインサートをDNA連結酵素で結合させることで、目的に応じた新たなプラスミドDNAを得ることができる(図1、下段)。一連の処理で用いる制限酵素を複数組合せることで、インサートを狙った方向に組み入れることも可能である。しかし、こうした通常のDNA組換え操作は組換え効率が低いため、確実に組換え体を得るためには様々な工夫を行う必要がある。例えば、制限酵素処理したDNA断片を電気泳動し、目的のサイズのDNA断片を回収して精製したり、DNA連結反応の際のベクタとインサートの反応条件を最適化したりすることが一般的に行われる。こうした手間の掛かる作業の原因について考察してみると、パンドロームなIIP型制限酵素の切り口が問題の根源であることが分かる。

広く普及しているIIP型制限酵素である*Bam*HIを例にパンドロームの問題点を考える(図2)。DNAを順鎖・逆鎖のどちらから読んでも同じ配列となるのがパンドロームである(図2、上段)。さらにIIP型制限酵素により切断された切り口もパンドロームとなるため、例えば*Bam*HIで切断したDNA断片を、*Bam*HI切断面を持つ別のDNAに結合させることが可能である。制限酵素のこうした特性を利用することで、DNA組換え技術は実現する。しかしパンドローム切断面を注意深く観察すると、*Bam*HI切断面を有するDNAは、同じ切断面を持つあらゆるDNAと結合可能であることが分かる。つまり、パンドローム切断面どうしの連結反応には方向性が存在しない。例えばインサートどうし(図3、上段)やベクタどうしの連結(図3、下段)も可能であり、実際にこうした連結断片が生成され問題となることがある。目的のプラスミド以外にもベクタとインサートの無数の組合せが存在するため、目的の組換え体の収率を最大化するために前述のような操作が必要になる。

こうしたパンドローム配列の欠点については以前から指摘されており、非パンドローム配列の切断面を有するIIS型制限酵素の利用も以前から行われている。ただし、分子生物学の方法論に関する保守的な姿勢もあり、IIP型制限酵素以外の制限酵素は現在殆ど利用されていない。一方で、IIS型制限酵素が作る切断面は任意にデザインすることが可能であり、連結に方向性を持たせてベクタやインサートどうしの連結を防ぐことが出来る(図2、下段)。また1種類の酵素で複数の切断面を作ることも可能であり、IIP型制限酵素のように、複数酵素の組合せに頭を悩ませる必要もない。

IIP 型制限酵素 (*Bam*HI)



IIS 型制限酵素 (*Bbs*I)



図2 IIPとIIS型制限酵素の代表例

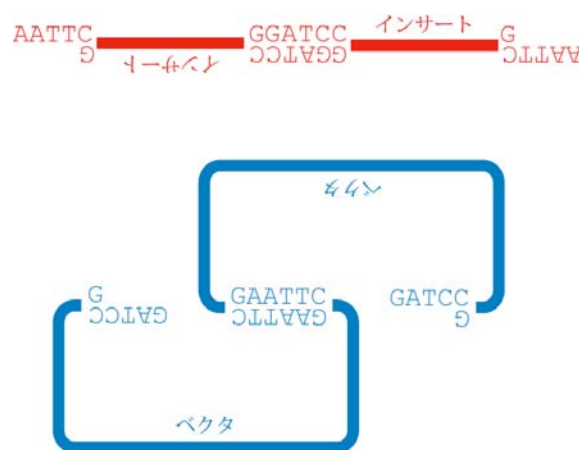


図3 非特異的な連結の例

3. FASTR法について

IIS型制限酵素の長所を利用して、さらに効率の良いDNA組換え反応を達成したのが、本稿で紹介するFASTR法(Fully automatic single-tube recombination)である(図4)。本手法ではDNAの断片と、IIS型制限酵素、DNA連結酵素を全て混ぜ合わせ、シングルステップで組換え反応を達成している。前述のようなDNAの後処理や精製が不必要であり、最短15分程度で全工程を終えることができる。また組換え効率や組換えスキームの自由度の観点からも、従来の方法を十分に置き換えることの出来る手法である。

FASTR法は、IIS型制限酵素の非パリンドローム性と、切断部位と認識部位の「ずれ」を利用して高組換え効率を達成している。PCR法でインサートとベクタの断片をそれぞれ増幅し、プライマにアダプタ配列を付加しておくことで、PCR産物にIIS型制限酵素の認識部位(図4、黄色四角)を設ける。IIS型制限酵素がDNAを認識する箇所と切断する箇所は異なる部位であるため、認識部位から一定の塩基数だけ離れた箇所の任意配列を切断することが出来る(図4、緑線)。この反応溶液にはDNA連結酵素も含まれるため、一旦切り離されたアダプタ配列が元のDNA断片に再結合する反応も起こる。このように、各DNA断片のアダプタ配列に関しては、切断と連結を繰り返す平衡反応となる。この状態で、インサート断片とベクタ断片が連結されると、このDNA断片にはもはやIIS型制限酵素の認識部位が存在しない。このため、インサートとベクタの連結産物は平衡反応から離脱し、最終産物の集積が起こる。こうした平衡反応から最終産物への一方向的な反応がFASTR法の最大の特徴であり、これによりシングルステップで高い組換え効率を達成することが出来るようになった。

実際にこうした反応を検討してみると、PCR粗産物を用いた場合にはDNAポリメラーゼの持ち込みによりDNA断片の平滑化が起り、DNA連結反応の特異性が低下するなどの問題が生じた。また、PCR粗精製産物にはPCRのテンプレートDNAも存在するため、FASTR産物で大腸菌を形質転換すると、テンプレートDNA由来のコロニが形成される問題もあった。前者の問題に関しては、真核細胞のDNAポリメラーゼ α の阻害剤であるアフジコリンが、古細菌由来のPCR用DNAポリメラーゼを効率よく阻害することを見

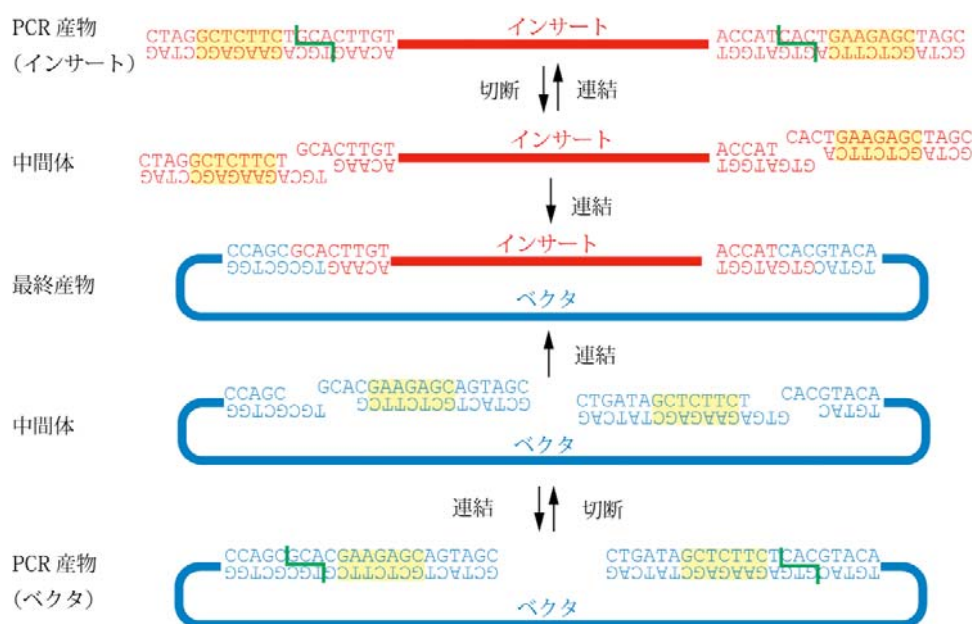


図4 FASTR法の原理

いだし、本反応に加えることでDNA平滑化の問題は解決をみた。また、テンプレートDNAに対しては、メチル化DNAの分解酵素である*DpnI*でPCR産物を処理することで、テンプレートDNAの影響を排除することが出来た。PCRのテンプレートに用いているプラスミドDNAは、大腸菌内で合成されたものであるためメチル化されているが、FASTRが組換えるのはPCRで増幅されたDNA断片であるためメチル化はされていない。こうしたDNAの修飾の差を利用して必要なDNA分子のみを選別することにより、FASTR法の効率は大きく向上した。

最終産物へ一方向的に反応が進む新しい組換え反応に、PCR粗産物を直接用いるための工夫を加えることで、「混ぜるだけ」でDNA組換えを行うFASTR法を開発することが出来た。酵素群を加えて15分ほどの静置を行うだけで80%程度の組換え効率を達成しており、本手法の高い自由度も考慮すると、従来の組換え方法を置き換える十分な性能を有すると考えている。

4. FASTRの^oプロトコル

ここまでの話をまとめて、実際にDNA組換えを行うためのプロトコルを以下に紹介する。「混ぜるだけ」のプロトコルなので作業手順としては短い、以下の点に留意する必要がある。冒頭でも述べたとおり、IIS制限酵素の切断部位がパリンドロームになると、インサートやベクタどうしのライゲーションが起こるため、これを回避する設計が必要である。また、ライゲーション温度を下げすぎたり、PEGなどのライゲーション補助剤を使ったりすると、ミスマッチ・ライゲーションが増えて目的産物の収量が下がってしまう。ライゲーション効率を多少犠牲にしても、ライゲーションの正確性を優先するべきである。

プライマの設計

プライマの基本構造として、5'末端に数塩基程度の予備配列とIIS型制限酵素の認識配列とを並べ、さらに切断配列を挟んで3'側にテンプレート配列へのハイブリダイゼーション配列を設ける(図5)。インサートとベクタに対してそれぞれプライマを設計し、IIS型制限酵素による切断面どうしが、うまく結合するように設計する。複数断片の同時ライゲーションを行う場合には、切断部位を複数種類用意し、それぞれがクロストークしないように留意する。

インサート用(GFP)フォワードプライマ

CTAGGCTCTTCAGCAATGGTGAGCAAGGGCGA

インサート用(GFP)リバープライマ

GCATGGACGAGCTGTACAAGCACA GAAGAGCTAGC
 C9TACCTCGCTCGATGATGLLCGTGLLCLLCGATCG

ベクタ用 (pRSET-b) フォワードプライマ

CTAGGCTCTTCACACGCTGGTACCATGGAATT

ベクタ用 (pRSET-b) リバープライマ

AAATGGGTCGGGATCTGTACGCAAGAAGAGCTAGC
LLTACCCAGCCCTAGTACATGCGTLLCTCTCTGATCG

図5 FASTR用プライマの配列

FASTR反応

1. 表1の条件でPCRを行う。
2. PCR産物を表2の条件で混ぜ合わせ、室温で15分～60分静置する。
3. FASTR反応産物5 μ lで50 μ lのコンピテント大腸菌をトランスフォームする。

表1 FASTR プロトコルで用いる PCR の条件。

	3 μ l
リバースプライマ (5pmol/ μ l)	3 μ l
テンプレート DNA (100ng/ μ l)	0.2 μ l
10x KOD plus バッファ	2 μ l
dNTPs (2mM)	2 μ l
MgSO ₄ (25mM)	0.8 μ l
KOD plus (Toyobo)	0.4 μ l
超純	8.6 μ l
合計	20 μ l

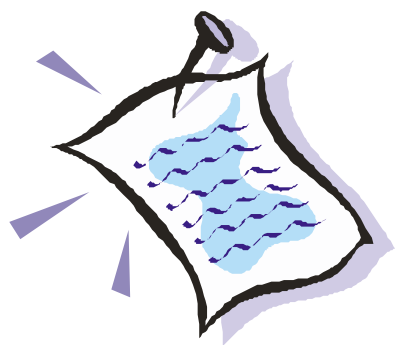
94°C	2 分	1 サイクル
94°C	15 秒	30～35 サイクル
65°C	30 秒	
68°C	1 分/1000bp	
68°C	5 分	1 サイクル

表2 FASTR 反応溶液の組成。

Tango バッファ (Fermentas)	0.5 μ l
T4 DNA Ligase バッファ (NEB)	0.5 μ l
PCR 産物 (インサート)	1 μ l
PCR 産物 (ベクタ)	1 μ l
アフィジコリン (10mM、和光 017-09813)	0.2 μ l
ATP (10mM)	1 μ l
LguI (Fermentas)	0.2 μ l
DpnI (NEB)	0.2 μ l
T4 DNA ligase, 2 million U/ml (NEB)	0.2 μ l
超純水	5.2 μ l
合計	10 μ l

引用文献

1. Kotera, I. et al., *J. Biotechnol.* (2008)137:1-7



シンポジウム等会告

第2回スイス日本生命化学シンポジウム

2nd Switzerland-Japan Biomolecular Chemistry Symposium (SJBCS2009)

<http://www.cbl.rcast.u-tokyo.ac.jp/FBC/SJBCS2009>

主催: 東京大学先端科学技術研究センター・日本化学会フロンティア生命化学研究会

会期: 2009年9月11日(金)~12日(土)

会場: 東京大学駒場リサーチキャンパス・コンベンションホール(An棟)

(東京都目黒区駒場4-6-1)

<http://www.cbl.rcast.u-tokyo.ac.jp/FBC/SJBCS2009MAP.html>

セッション:

1. Mechanisms and Engineering of Biomolecules
2. Biological Probes and Therapeutic Methods
3. Natural Product Synthesis and Engineering
4. Biological Sensors and Systems

主な講演者(敬称略)

スイス: Stefan Matile, Howard Riezman (U. Geneva), Hilal Lashuel, Karl Gademann, Kai Johnsson, Bart Deplancke, Christian Heinis, Horst Vogel, Ursula Röthlisberger (EPFL), Jean-Louis Reymond (U. Bern), Don Hilvert, Dario Neri, Karl-Hein Altmann (ETH), Nathan Ludtke (U. Zurich), Helma Wennemers, Marc Creus (U. Basel)

日本: Toshihiro Ihara (Kumamoto U.), Shinsuke Sando (Kyushu U.), Takashi Morii (Kyoto U.), Junko Ohkanda, Koichi Fukase, Tomoaki Matsuura (Osaka U.), Teruhiko Matsubara (Keio U.), Takeaki Ozawa, Hiroshi Murakami (U. Tokyo), Takayuki Doi (Tohoku U.), Takeharu Nagai (Hokkaido U.), Mikiko Sodeoka (RIKEN)

スイス、日本両国において、生命化学／ナノバイオロジー、ケミカルバイオロジー領域で最先端の研究を展開している気鋭の研究者が一同に介し、フロンティア研究を紹介するとともに今後の領域発展について議論することを目的としています。生命化学研究をリードする二国間の交流を深め、今後重要な方向性を与える内容になっています。一般発表としてポスター発表も募集しております。皆様ふるってご参加下さい。

ポスター発表申込・事前振込〆切:8月7日(金)

ポスター発表の募集:

一般講演としてポスター発表を受付けます。発表希望者は、A4 版用紙1ページ縦(上下左右に 2.5 cm の余白)に、題目・発表者(連名の場合は発表者に下線)・所属・同所在地(連絡先)、および要旨本文を記載し、電子メール(Microsoft word、できれば PDF ファイルで添付書類)で下記申込先までお送り下さい。

参加費(要旨集等込み):

(一般)事前振込 10,000 円、当日 11,000 円

(学生)事前振込 2,000 円、当日 3,000 円

振込先、事前登録方法は下記アドレスにてご確認ください。

アドレス:http://www.cbl.rcast.u-tokyo.ac.jp/FBC/SJBCS2009_registration

問合せ・申込先:

〒277-8562 千葉県柏市柏の葉5-1-5 生命棟 301

東京大学大学院新領域創成科学研究科 津本 浩平

電話:04-7136-5402 FAX:04-7136-3601

E-mail:sjbc2nd@gmail.com

詳細はホームページ:<http://www.cbl.rcast.u-tokyo.ac.jp/FBC/SJBCS2009>

世話人:菅 裕明(代表)、津本浩平(事務局)

セッションオーガナイザー:佐藤智典、浜地 格、深瀬浩一、三原久和

**第2回 スイスー日本
生命化学シンポジウム**
2ND SWITZERLAND-JAPAN
BIOMOLECULAR CHEMISTRY SYMPOSIUM
SJBCS 2009
URL: <http://www.cbl.rcast.u-tokyo.ac.jp/FBC/SJBCS2009>
主催 日本化学会フロンティア生命化学研究会 (FBC)
東京大学・先端科学技術研究センター (RCAST)
2009年9月11日(金)・12日(土)
9:30 AM ~ 5:00 PM
会場: 東京大学駒場リサーチキャンパス・コンベンションホール [A棟]
<http://www.cbl.rcast.u-tokyo.ac.jp/FBC/SJBCS2009MAP>
**Mechanisms and Engineering of Biomolecules
Biological Probes and Therapeutic Methods
Natural Product Synthesis and Engineering
Biological Sensors and Systems**
Speakers:
Stefan Matile, Howard Riezman (U. Geneva), Hilar Lashuel, Karl Gademann (EPFL)
Kai Johnsson, Bart Deplancke, Christian Helnis, Horst Vogel, Ursula Röthlisberger (EPFL)
Jean-Louis Reymond (U. Bern), Don Hilvert, Dario Neri, Karl-Helm Altmann (ETH)
Nathan Ludtke (U. Zurich), Helma Wennemers, Marc Creus (U. Basel)
Toshihiro Ihara (Kumamoto U.), Shinsuke Sando (Kyushu U.), Takashi Morii (Kyoto U.)
Junko Ohkanda, Koichi Fukase, Tomoaki Matsuura (Osaka U.)
Teruhiko Matsubara (Kelo U.), Takeaki Ozawa, Hiroshi Murakami (U. Tokyo)
Takayuki Doi (Tohoku U.), Takeharu Nagai (Hokkaido U.), Mikiko Sodeoka (RIKEN)
申し込みはこちら!

国際バイオ EXPO 特別講演セッション

https://apply.reedexpo.co.jp/IPBI/jp/form_con/step1.phtml?ex_code=TOKU

日時:2009 年 7 月 2 日 10:30~12:00

場所:東京ビッグサイト

詳細・申込: https://apply.reedexpo.co.jp/IPBI/jp/form_con/step1.phtml?ex_code=TOKU

セッション3 驚く再生医療とがん治療の進化 ~ナノバイオ研究が拓く未来医療~

座長:名古屋大学 総長補佐(研究担当)・工学研究科教授 馬場 嘉信

『がん細胞のイメージング及びがん治療に向けたナノバイオ研究』

東北大学大学院 医学系研究科 外科病態学講座 腫瘍外科学分野 教授 大内 憲明

『日本発 細胞シート ティッシュエンジニアリング ~再生医療産業創出への挑戦~』

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 所長・教授 岡野 光夫

第 24 回生体機能関連化学シンポジウム・第 12 回バイオテクノロジー部会シンポジウム

http://seitai.csj.jp/div_sympo/

主催:日本化学会生体機能関連化学部会、日本化学会バイオテクノロジー部会

共催:日本化学会、化学工学会バイオ部会、九州大学 G-COE 未来分子システム化学教育研究拠点

会期:9 月 13 日(日)(13 時)~15 日(火)

会場:九州大学医系キャンパス・百年記念講堂(〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1)[交通]福岡市営地下鉄馬出九大病院前徒歩 5 分

参加申込締切:予約締切 8 月 3 日

発表申込締切:6 月 22 日(月)

予稿原稿締切:7 月 21 日(火)

参加登録(予約)締切:8 月 3 日(月)

生体機能関連化学部会シンポジウム:

発表形式:口頭(15 分発表、5 分質疑、2 会場)およびポスター発表

*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。

部会講演賞:生体機能関連部会及びバイオテクノロジー部会の部会員になって 1 年以上が経過し、受賞時 40 歳以下の部会員が対象。賞応募申請は発表申込時点で登録。

バイオテクノロジー部会シンポジウム:

発表形式:依頼講演およびポスター発表

*9 月 13 日:午後 1 時より講演会(依頼講演のみ、一般の口頭発表は行わない)

参加登録は共通となっておりますので、両シンポジウムに参加可能です。

参加費 部会員:一般 5,000 円、学生 3,000 円、非部会員:一般 7,000 円、学生 5,000 円、8 月 3 日以降、各参加種別に 2,000 円プラス

懇親会:9 月 14 日(月)。費用 6,000 円(必ず事前に申込の事)。

参加申込方法:両シンポジウムとも、WEB サイト(http://seitai.csj.jp/div_sympo/)から発表申込、予稿原稿の提出、参加登録のすべての手続きを行う。

申込先:

812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1 九州大学先端物質化学研究所 成田 吉徳

電話:(092) 642-2731

FAX:(092) 642-2715

E-mail: naruta@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

http://seitai.csj.jp/div_sympo/

問合先:

819-0395 福岡市西区元岡 744 番地 九州大学工学研究院応用化学部門 片山佳樹

電話/FAX:(092)802-2850

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

http://seitai.csj.jp/div_sympo/

第24回生体機能関連化学シンポジウム
第12回バイオテクノロジー部会シンポジウム

日時: 2009年9月13日(日)~15日(火)
会場: 九州大学医系キャンパス・百年講堂
発表: 口頭・ポスター発表

申込締切 2009年6月22日(月)

詳しくは大会ホームページをご参照下さい。
http://seitai.csj.jp/div_sympo/

主催: 生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会
共催: 日本化学会、化学工学会バイオ部会
九州大学 G-COE 未来分子システム科学

実行委員長: 九州大学先端物質化学研究所 成田吉徳
事務局: 九州大学大学院工学研究院 後藤雅宏・片山佳樹

お問い合わせ先
〒819-0395 福岡市西区元岡744
九州大学 大学院工学研究院 応用化学部門
後藤雅宏: TEL: 092-802-2806; FAX: 092-802-2807
片山佳樹: TEL&FAX: 092-802-2850

第12回バイオテクノロジー部会シンポジウム

2009年9月13日(日) 13:00-17:30
九州大学医系キャンパス・百年講堂

特別講演
長棟 輝行
(東京大学 大学院工学研究科)
バイオ分子工学を活用した細胞機能の計測制御技術の開発

招待講演
跡見 晴幸
(京都大学 大学院工学研究科)
ゲノム情報を利用した微生物の新規機能酵素の探索

神谷 典穂
(九州大学 大学院工学研究院)
翻訳後修飾酵素の活用によるハイブリッドタンパク質工学

新留 琢郎
(九州大学 大学院工学研究院)
診断・治療を支えるハイブリッド金ナノ粒子の創製

清中 茂樹
(京都大学 大学院工学研究科)
新規Ca²⁺チャネル阻害剤の作用機構解明およびその応用

梅津 光央
(東北大学 大学院工学研究科)
ナノ材を抗原とするペプチド・抗体: 発見・創製・ナノバイオ展開

山東 信介
(九州大学 稲盛フロンティア研究センター)
分子レベルでの細胞・生体機能を探索するChemBio/ハイブリッドテクノロジー

主催: バイオテクノロジー部会、生体機能関連化学部会
共催: 日本化学会、化学工学会バイオ部会
九州大学 G-COE 未来分子システム科学

実行委員長: 九州大学先端物質化学研究所 成田吉徳
事務局: 九州大学大学院工学研究院 後藤雅宏・片山佳樹
ホームページ: http://seitai.csj.jp/div_sympo/

FCCAセミナー FCCAグライコサイエンス若手フォーラム2009

http://www.geocities.jp/y_glycosci/

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

日時:2009年8月28日(金)～29日(土)

会場:つるまいプラザ(愛知県勤労会館) 第2視聴覚室

愛知県名古屋市中区鶴舞1丁目2番32号(電話:(052)733-1141)

(<http://www.ailabor.or.jp/tmplaza/>)

内容:1. 招待講演

鈴木康夫 先生(中部大)「インフルエンザウイルスと糖鎖」

石田秀治 先生(岐阜大)「複雑な構造を有するガングリオシドの精密合成」

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

タイムテーブル: <1日目> 10:15～ 受付開始

午前 招待講演

午後 口頭発表

夕方 ポスター発表&懇親会

<2日目> 午前 招待講演, 口頭発表(12:00 終了予定)

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21年7月31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:中部大学 生命健康科学研究所 伊田みちる(E-mail: ida@isc.chubu.ac.jp)

詳細はホームページ(http://www.geocities.jp/y_glycosci/)でもご覧になることができます。

若手フォーラム代表 堤内 要(中部大)、グライコサイエンス若手の会 代表幹事 伊田みちる(中部大)

お知らせ



受賞

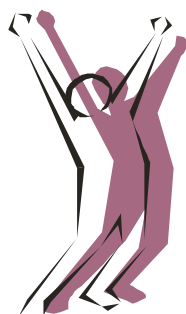
栗原正靖(群馬大学大学院工学研究科 助教)

文部科学大臣表彰若手科学者賞

「水溶液中で分子認識能を有する新規機能性人工核酸創製の研究」

(2009年4月14日、平成21年度科学技術分野の文部科学大臣表彰式において受賞)

異動



野島 高彦

北里大学 一般教育部 自然科学教育センター化学単位 講師

〒228-8555 神奈川県相模原市北里 1-15-1

E-mail: nojima@kitasato-u.ac.jp

村上 裕

東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系 准教授

〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1

Tel: 03-5454-4458

E-mail: murah@bio.c.u-tokyo.ac.jp

富崎 欣也

龍谷大学 理工学部 物質化学科 准教授

〒520-2194 滋賀県大津市瀬田大江町横谷 1-5

Tel: 077-543-7469

Fax: 077-543-7483

E-mail: tomizaki@rins.ryukoku.ac.jp



編集後記

大阪市大の長崎さんより編集委員を引継ぎ、今回 はじめてFBCレターの編集を担当させていただきました。いろいろと不慣れなために多くの方からのサポートをいただきましたが、ここに No. 30 をお届けできるようになり、編集委員一同 喜んでおります。執筆者の方々にはお忙しい中、それぞれたいへん興味深い内容の記事をご提供いただき重ねてお礼を申し上げます。

ここ、九州では梅雨入りしたにもかかわらず、これまでほとんど雨らしい雨も降らず、夏の水不足を心配しておりましたが、やっとこの数日、集中的に激しい雨が降りました。この数年の九州の夏の雨はこんな感じです。これも世界的な気候変動の影響でしょうか、九州はもはや亜熱帯になりつつあるようです。この季節が終わり、夏休み明けには学会シーズン。その口火を切るのが、本ニュースレターでもお知らせしておりますとおり、東大 菅さん、津本さんのお世話で本研究会が主催する第2回スイス日本生命化学シンポジウム(2nd Switzerland-Japan Biomolecular Chemistry Symposium (SJBCS2009))です。皆さん、奮ってご参加くださいますようお願い申し上げます。

次号(No. 31)は、円谷さんの担当により、2009年10月頃の発行を予定しております。ニュースレター改善のため、皆さんからのご要望、ご意見等をお待ちしております。下記編集担当までご連絡をいただければ幸いです。

平成21年6月24日

井原敏博
熊本大学大学院自然科学研究科
(toshi@chem.kumamoto-u.ac.jp)

編集担当
円谷 健(大阪府立大学)
大神田淳子(大阪大学)