

生命化学研究レター

(2010 年 2 月)

3. 巻頭言

自分の世界

九州大学大学院工学研究院 松浦 和則

4. 主催研究会報告

第 12 回生命化学研究会

9. 研究紹介

9. 薬剤の細胞内トラフィッキング制御システムを目指して

大阪市立大学大学院工学研究科 長崎 健

15. 生体に学ぶ水溶液中の超分子化学

～生物有機化学・不斉合成・錯体化学・光化学の接点～

東京理科大学薬学部 青木 伸

21. 起電芳香族アミドの立体特性と動的立体制御

～機能性芳香族化合物構築の鍵構造として～

お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科 棚谷 綾

27. 論文紹介「気になった論文」

東京工科大学応用生物学部 岡田 朋子

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 佐藤 しのぶ

京都大学工学研究科 高岡 洋輔

大阪府立大学大学院理学系研究科 藤原 大佑

39. 生命化学研究法

ケージドプライマーの活用による非天然粘着末端を付加した PCR 産物の直接合成とその応用

東京大学先端科学技術研究センター 葛谷 明紀

44. 留学体験記

ベルリン自由大学留学体験記

～充実のベルリン研究（&私）生活～

日本大学生産工学部 柏田 歩

48. シンポジウム等会告

第 6 回ナノバイオ国際シンポジウム / 日本化学会第 90 春季年会
「特別企画」 / 日本化学会第 90 春季年会「アドバンスト・テクノロジー・プログラム(ATP)グリーンバイオ・フロンティアバイオ未来産業を支えるバイオケミカルズ」 / Pacifichem 2010 /

53. お知らせ

会員異動のお知らせ

編集後記



巻頭言

自分の世界



九州大学大学院工学研究院 松浦 和則

昨年9月のSJBCS2009の時の会話:

大神田さん「松浦さん逃げられませんよ。断っちゃダメですからね。」

松浦「え、何？」

大神田さん「巻頭言書いてください」

松浦「はぁ・・・」

私の最も苦手とするもの・・・それは、「巻頭言とパネル討論会」なのですが、「断っちゃダメ」と最初に言われたしなぁ・・・ということで、今回巻頭言を書かせていただいています。

今年の1月8~9日、福井県の芦原温泉にて「第12回生命化学研究会～化学者だからできる生命科学～」をJAISTの三浦さんとともにお世話させていただきました。研究会としては過去最高の68名の方にご参加いただき、7名の方々からの講演(詳細は4ページに記載)、29名の方々のポスター発表を通じて、熱い討論をしていただきました。事前に大袈裟な「雪情報」をメールしていましたが、当日は殆ど雪がなく、がっかりされた方も多かったかと思います。私も普段は九州におりますので、福井県の気象情報を正確に把握できていませんでした、お許してください。夕食の際には、深瀬さんの黒田節、石田さん・津本さん・松浦・三浦さんのカラオケなどで盛り上がりました。その後も「未来の生命化学」について(アルコールで喉を潤しながらの)熱い討論が深夜まで続いたかと思います。

さて、カラオケと言えば、松浦のカラオケレパートリーの中に「ルパン三世のテーマ(作詞: 鷗田一枝・千家 和也)」があります(最近の学生には、「ルパンの曲って歌詞があつたんですね～」と言われますが)。その一節に以下の歌詞があります。

お～そこには自分の～世界がある

例えるなら～空をかける一筋の流れ星～

「自分の世界」・・・アカデミックの研究者にとって、自分の世界(独創性)を持つことは大変重要です。学生のころに、漠然と「松浦反応」とか「松浦の法則」とか発見したいなぁという夢を持っていました。その夢は未だ叶っていませんが、分子設計を見れば「これは松浦さんの仕事だよ」と認知してもらえるレベルにはしたいと思っています。アカデミックでやるからには、当然、世界で誰もやっていないことを目指さねばならないと思います。政治家に「二番じゃダメなんですか?」と問いかけられたら、自信を持って「一番じゃなきゃ、オリジナルじゃなきゃ、ダメなんです! 音楽・絵画などの芸術作品でも、素晴らしいものはオリジナルだから価値がある。コピーじゃダメなんです!」と答えたいものですね。本研究会(特に若い世代)から、「自分の世界」が色濃く表れた研究が多く発信されることを祈念して、筆を置きたいと思います。

PS: 上の歌詞で、「男には・・・」とありますが、女性にも自分の世界があると思います。松浦は男女共同参画に賛成です。

主催研究会報告

第12回 生命化学研究会 ～ 化学者だからできる生命科学 ～

主催: 日本化学会フロンティア生命化学研究会

会期: 2010 年 1 月 8 日 (金) ～ 9 日 (土)

会場: 芦原温泉清風荘 清風本陣 7 階 紫雲殿

2010 年 1 月 8 日より 1 泊 2 日の日程で、本年も生命化学研究会が開催されました。今回は、松浦和則氏 (九州大学)、三浦佳子氏 (北陸先端科学技術大学院大学) のお世話により、福井県の芦原温泉にて活発な討議が行われました。冒頭の松浦氏による巻頭言、下記のプログラム、スナップ写真等により、研究会の活気をお伝えできれば幸いです。

プログラム

1 月 8 日 (金)

会場: 清風本陣 7 階 紫雲殿

13:00-13:05 あいさつ

フロンティア生命化学研究会会長 三原久和

座長 松浦和則

13:05-13:50 L1 「非天然アミノ酸導入技術のタンパク質の構造機能解析への応用」

芳坂貴弘 (北陸先端科学技術大学院大学)

座長 三浦佳子

13:50-14:35 L2 「アルツハイマー病関連ペプチド凝集の解析と制御」

今野 卓 (福井大学・医)

14:35-15:00 休憩

座長 井川善也

15:00-15:45 L3 「Garage Chiba における Evolutionary Synthetic Biology」

梅野太輔 (千葉大学・工)

15:45-16:00 写真撮影

16:00-17:30 ポスターセッション (P01～P29)

17:30-18:00 運営委員会

19:00-21:00 夕食

21:00～ 未来の生命化学に関するフリーディスカッション

1 月 9 日 (土)

会場: 清風本陣 7 階 紫雲殿

9:00-9:30 総会

座長 石田 斉

9:30-10:15 **L4** 「生命現象解明ツールとしてのジンクフィンガー型人工転写因子の創製」

今西未来(京都大学・化研)

座長 藤本健造

10:15-11:00 **L5** 「励起子相互作用:新しい光化学制御法による核酸イメージング」

岡本晃充(理化学研究所)

11:00-11:15 休憩

座長 津本浩平

11:15-12:00 **L6** 「階層的な組織化による化学ナノ空間の創製」

田中健太郎(名古屋大学・理)

12:00-13:00 昼食

座長 和田健彦

13:00-13:40 **L7** 「イメージングを活用した糖鎖の in vivo 生体分子科学」

深瀬浩一(大阪大学・理)

13:40-14:30 フリーディスカッション

14:30 解散

~~~~~

ポスターセッション プログラム (1月8日 17:00-18:00)

**P1** 「スクレオチドの化学修飾とポリメラーゼ反応」

桑原正靖(群馬大学・工)

**P2** 「合成ライブラリーを用いた細胞内代謝産物群が酵素活性に及ぼす影響の解明」

甲元一也(甲南大学 フロンティア)

**P3** 「D4 リアクティブタグシステムによる細胞表面受容体の機能解」

野中洋(京都大学・工)

**P4** 「ペプチド折り紙で機能性分子を創る」

石田斉(北里大学・理)

**P5** 「ペプチド結合型分子モーターを用いた DNA 結合能の評価」

永次史(東北大多元研)

**P6** 「細胞内 pH 計測により適合した新規 SNARF 誘導体の設計」

中田栄司(徳島大・工)

**P7** 「ジアリールエテンを利用したヘリカルペプチド/DNA 相互作用の光制御」

藤本和久(富山大学・医学薬学)

**P8** 「生細胞内における内在性  $\beta$  アクチン mRNA の可視化と輸送機構の解明」

稲熊あすみ(総研大)

**P9** 「フシコクシン誘導体を基盤とする 14-3-3 たんぱく質の基質特異的蛍光標識化」

河村明恵(大阪大学産)

**P10** 「リガンド反応性分子標的を検出・同定する新規光親和型小分子アフィニティービーズ」

高山浩(東北大学・薬)

- P11**「DNA コンジュゲートによる蛍光性小分子の塩基選択性制御」  
井原敏博(熊本大学・工)
- P12**「簡単なシグナル伝達経路をもった巨大プロテオリポソーム構築の試み」  
湊元幹太(三重大・工)
- P13**「 $\gamma$ -アミノ酸を含む環状ペプチドの翻訳合成」  
後藤佑樹(東京大学・先端研)
- P14**「蛍光タンパク質表面を分子認識場としたアミロイド  $\beta$  ペプチド認識 FRET 型センサー」  
高橋 剛(東京工業大学・生命理工)
- P15**「ペプチドナノファイバーを認識するペプチドの創製と応用」  
澤田敏樹(東京工業大学・生命理工)
- P16**「刺激応答性ポリペプチドがタンパク質のフォールディングに 与える効果」  
花村遼(東京大学・工)
- P17**「腫瘍特異的酵素を利用した集合制御型 MRI 造影剤の作製」  
松村幸子(癌研究会癌研究所)
- P18**「精密糖鎖高分子を用いたハイブリッド材料の創製と生体認識」  
豊島雅幸(北陸先端大院マテリアル)
- P19**「トロンビン結合アプタマーとペプチドのコンジュゲーションによるカリウムイオン蛍光イメージング試薬の開発」  
竹中繁織(九州工業大学・工)
- P20**「3D-RNA を鋳型としたペプチド連結反応」  
井川善也(九州大学・工)
- P21**「細胞膜に存在するスフィンゴ糖脂質の二次元分布解析」  
松原輝彦(慶應義塾大学・理工)
- P22**「カスパーゼ活性の検出を指向した分割型 GFP の設計」  
坂本清志(東北大学多元研)
- P23**「二次元表面プラズモン共鳴測定法による酵素反応観察」  
藤井杏美(富山大学・理工)
- P24**「siRNA のアゾベンゼン修飾による RNA 干渉への影響」  
伊藤 浩(名古屋大学・工)
- P25**「配列選択的光クロスリンク反応を用いたノンコーディング RNA の選別法」  
吉村嘉永(北陸先端大)
- P26**「ジチオレンを有するナフタレンジイミドを利用した DNA の金基盤への固定化と応用」  
佐藤しのぶ(九州工業大学)
- P27**「亜鉛フィンガータンパク質をフレームワークとする人工ヌクレアーゼの創製」  
根木滋(同志社女子大学・薬)
- P28**「アンテナ系モデルタンパク質を用いた色素複合体の再構成」  
酒井俊亮(名古屋工業大学・工)
- P29**「ヒトゲノム内にあるレトロトランスポゾン L1 多型部位の検出法の開発」  
相澤康則(東京工業大学)





## 研究紹介

## 薬剤の細胞内トラフィック制御システムを目指して

大阪市立大学大学院工学研究科 化学生物系専攻

長崎 健

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



## 1. はじめに

薬剤は、個体内の組織、そして組織における標的細胞内の特定のオルガネラ(核, 細胞質, エンドソーム, ミトコンドリアなど)に到達することにより、最大限に機能を発揮する。そのためには細胞内トラフィックを制御可能な薬剤のデリバリーシステムが必要である。例えば、Intrabody(Intracellular Antibody)は細胞内に留まり、細胞内環境で機能する抗体のことであり、標的タンパク質に特異的に結合して機能を阻害する。標的タンパク質は、細胞質、小胞、ミトコンドリア、核、ゴルジ体など様々なオルガネラに存在

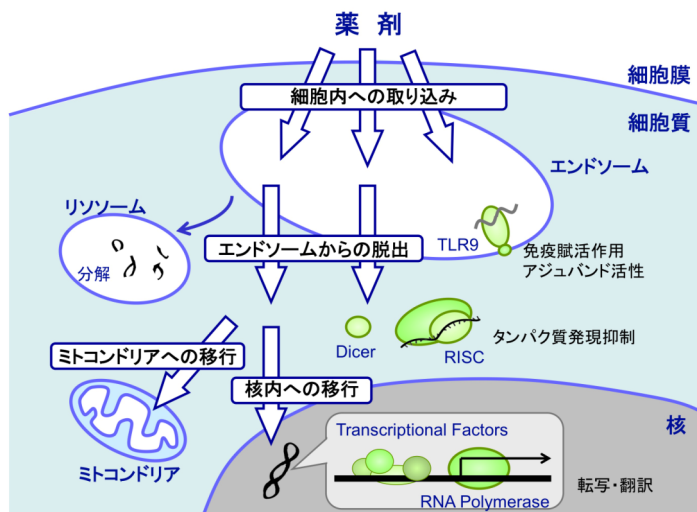


図1 細胞内トラフィック制御

し、それに結合する Intrabody もそのオルガネラに効率的にデリバリーされる必要がある。これら Intrabody は、各オルガネラ局在シグナルを利用することによってデリバリーされ、効率的に機能することが確かめられている[1]。また核酸医薬においては作用機序、適応疾患によってデリバリーされるべきオルガネラが異なる。図1に示すように核内に存在している転写因子やRNAポリメラーゼを利用するプラスミドDNAであれば核内へデリバリーされなければならない。siRNAは21~23塩基の短い2本鎖RNAであり、DicerやRISCの働きによって、標的遺伝子のmRNAを切断し特定のタンパク質の発現を抑制する。またアンチセンス核酸は、13~25塩基の1本鎖オリゴ核酸からなり、標的遺伝子のmRNAと特異的に結合しリボソームによる翻訳過程での立体的な障害、RNase HによるmRNAの切断を介することによって、そのタンパク質の発現を抑制する。siRNA・アンチセンス核酸は共に細胞質に存在するDicer、RISCやRNase Hを利用し、同じく細胞質に存在するmRNAの翻訳を阻害するため、これらsiRNA・アンチセンス核酸は細胞質に効率的にデリバリーされる必要がある。CpGオリゴ核酸は非メチル化CpGモチーフを含む約30塩基程度の1本鎖DNAであり、強い免疫賦活作用、アジュバント活性を有し、単独でのガン免疫療法・ガンワクチンのアジュバントとしての利用が期待されている。このCpGオリゴ核酸は樹状細胞、マクロファージ、B細胞に発現するTLR-9 (Toll-Like Receptor-9)に結合することで様々な免疫細胞を活性化する。TLR-9は後期エンドソーム内膜に発現、局在しているため、CpGオリゴ核酸を医薬品として機能させるためには後期エンドソームに効率的にデリバリーする必要がある。

本稿では、プラスミドDNA(pDNA)のデリバリーシステムを構築する過程において[2]、細胞膜・エンドソーム膜・核膜の障壁を突破する試みについて紹介し、核酸医薬に代表される薬剤の細胞内トラフィック制御システムの重要性について述べる。

## 2. エンドソーム脱出

一般的に、核酸医薬とキャリアーの複合体のような高分子薬剤は、エンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれる。細胞外液と共に取り込まれる飲作用 (Fluid-phase Endocytosis) と比較して、レセプター媒介型エンドサイトーシスでは、効率的に細胞内に取り込まれることから、キャリアーにレセプター結合因子を導入することによって高分子薬剤の細胞内への取り込み効率を向上することが可能である[3]。

エンドサイトーシスによって取り込まれた薬剤は、細胞質や核、ミトコンドリアで機能するためにはエンドソームから正常機能を保持したまま脱出する必要がある。核酸医薬などは、リソソームで分解されるため、いち早いエンドソーム脱出が必要不可欠である。

### 2-1: ジフテリア毒素機能ドメインの利用

ジフテリア毒素は、本来の毒性を有する A フラグメントと、それを細胞質まで輸送するための B フラグメントに分かれている。この B フラグメントには、細胞膜表面に存在するレセプター (proHB-EGF) に結合し効率的に取り込まれるための R ドメインとエンドソーム内で膜孔形成能を有する T ドメインがあり、A フラグメントの細胞質への輸送を助けている[4]。これら輸送ドメインを利用することにより、非ウイルスベクターの細胞内への取り込みおよびエンドソーム脱出効率を改善することが可能である。まず、ジフテリア毒素 T ドメインの利用により非ウイルスベクターとして広く用いられているポリエチレンジアミン (PEI) のプロトンスポンジ効果を上回るエンドソーム脱出効率を得られることを明らかにした[5]。ジフテリア毒素 T ドメインとストレプトアビジンの融合タンパク (DTS) を組換えタンパクとして調製した。一方、化学修飾によりビオチン基を導入した PEI (bPEI) を合成し、pDNA とポリプレックス形成後に、DTS と混合することでジフテリア毒素 T ドメインの複合化を行った。遺伝子発現効率はルシフェラーゼアッセイにより、細胞内への取り込み量はフローサイトメトリーにより、細胞内動態は共焦点蛍光顕微鏡により評価した。図 2 は、蛍光ラベル化ポリプレックスの細胞内局在を示している。pDNA/PEI 複合体では小胞状の蛍光像が見られる (図 2(A,C))。一方、pDNA/bPEI/DTS 複合体は細胞質に拡散した蛍光像が見られる (図 2(B,D))。また最適条件では DTS の効果により pDNA/PEI 複合体と比較し 10 倍高いタンパク発現効率を得ることが出来た。フローサイトメトリーの結果より細胞内への導入 pDNA 量に差は無いことを確認しており、ジフテリア毒素 T ドメインによりエンドソーム脱出が促進されたことがトランスフェクション効率の向上に寄与したものと考えられる。

さらに、細胞膜レセプターに対するリガンドであるジフテリア毒素 R ドメインの機能を併せ持つ多機能型ベクターの開発を行った[6]。組換えタンパクとしてジフテリア毒素 T として R ドメインとストレプトアビジンの融合タンパク (DTRS) を得た後、bPEI ポリプレックスと複合化した。DTS と比較して、DTRS は約 2 倍高い細胞内取り込み効率を確認された。タンパク発現効率を比較した結果、pDNA/bPEI/DTRS 複合体では、pDNA/bPEI/DTS 複合体と比較して、2 倍の効率向上が確認された。DTS、DTRS 複合体のエンドソーム脱出効率が同等であると仮定すれば、R ドメインによる細胞内導入効率の向上がタンパク発現に直接反映したことが解る。

以上ジフテリア毒素の輸送ドメインを利用することにより、pDNA/PEI 複合体の細胞内への取り込みとエンドソーム脱出過程を効率化できることを見いだした。ジフテリア毒素のレセ

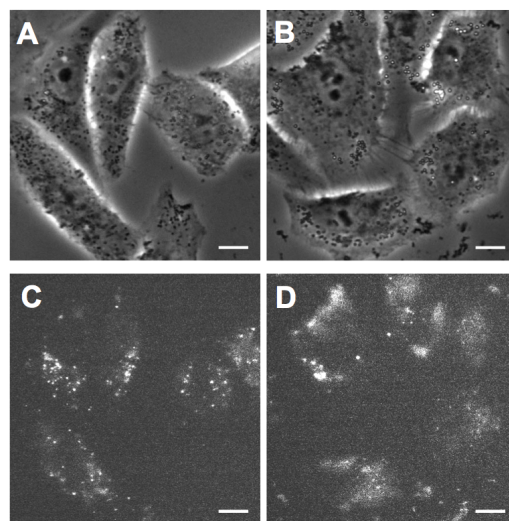


図2 A549細胞(ヒト肺がん細胞)に導入したPEIポリプレックスのエンドソーム脱出におけるジフテリア毒素 T ドメインの促進効果(A, B: 位相差図; C, D: 蛍光図)

プターである proHB-EGF は、ある種のガン細胞で過剰発現していることがすでに報告されており、ガンに対する遺伝子治療への応用が期待される。

## 2-2: 光応答性システムの利用

薬剤に付与したターゲティング能にプラスし、外部刺激によるダブルターゲティング機能を付与できれば、より副作用が少なく効率的な DDS が可能となり、細胞内トラフィック制御の精度も高まると期待される[7]。刺激の中でも光は強度、照射範囲、照射時間などを容易にコントロールでき光線力学療法に代表されるように実際に臨床利用されている。そこで、我々は光応答性脂質を利用することによって、エンドソーム膜の不安定化を誘起し、核酸医薬のエンドソーム脱出を促進させることを目指した。

親水部に塩基性アミノ酸であるリジンを二残基、疎水部にはジドデシルアミド基、そしてそれらのスパーサーとしてフォトクロミック構造であるアゾベンゼン骨格を有するカチオン性アゾ脂質 **KAON12** を合成した(図3-A)[8]。光応答性脂質が形成する分子集合状態の光制御を行うために、ジオレイルホスファチジルコリン/**KAON12** = 5/3 の混合薄膜から静置水和法によりジャイアントベシクル (GUV) を調製した。GUV は細胞サイズの大きさを有し、光学顕微鏡にて直接観察可能である[9]。GUV 溶液を遮光下室温で 24 時間放置したサンプルをトランス溶液とし、365 nm の UV 光 ( $3.5 \text{ mWcm}^{-2}$ ) を 5 分間照射した溶液をシス溶液 (trans/cis = 20/80) とした。GUV 溶液を位相差顕微鏡により直接観察し、UV 光照射、可視光照射時の構造変化を 30 frames/s でビデオ撮影した。GUV は直径 10-20  $\mu\text{m}$  のサイズで得られ、トランス溶液はほぼ球形の歪みのない小胞が観察された。一方、シス溶液では小胞は平均的に凸凹が観察され、揺らぎが見られた(図3-B)。アゾベンゼン部位のパッキング状態や分子占有面積の違い(図3-C)が膜構造の安定性を変化させたものと考えられる[10]。

次にエンドサイトーシスに適した大きさを有し、分子集合体自体は比較的不安定であるが大きな構造変化が期待される **KAON12** のみからなる小さな一枚膜リポソーム(SUV)を用いトランスフェクションを行った。SUV 溶液を遮光下室温で 24 時間放置したサンプルをトランス溶液とした。この溶液に 365 nm の UV 光 ( $3.5 \text{ mWcm}^{-2}$ ) を 5 分間照射した溶液をシス溶液 (trans/cis = 43/57) とした。SUV は動的光散乱測定より、トランス溶液では平均粒径 29 nm であるのに対し、シス溶液では 290 nm となり、平均粒径の増大が観察された。この時の構造変化を透過型電子顕微鏡にて観察した結果、UV 光照射後は膜融合することで、より大きなベシクルや繊維状構造を形成することが明らかとなった。屈曲率が大きく不安定な SUV においては、予想通りトランス体からシス体へのアゾベンゼンの光異性化に伴い、分子集合形態に大きな変化が

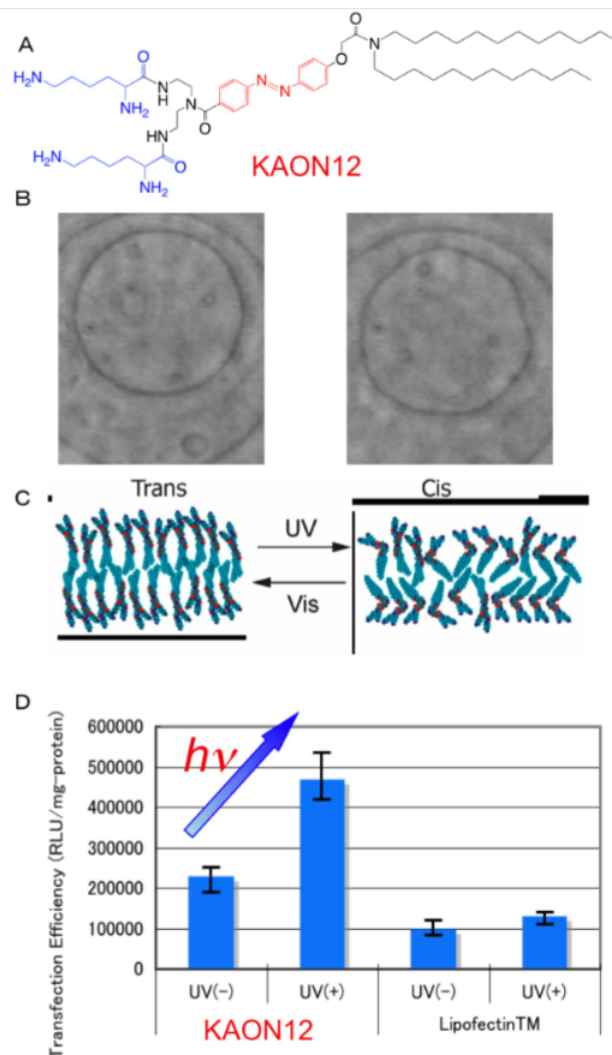


図3 カチオン性アゾ脂質の構造(A)、ジャイアントリポソームの膜揺らぎに対する光照射効果(B)、光異性化による膜構造変化の模式図(C)、光応答性カチオン脂質を用いたトランスフェクション効率の光照射効果(D)

誘起されることが明らかとなった。膜構造の揺らぎが増大することで不安定化し膜融合につながっていることが予想される。SUV 溶液と pDNA 溶液を混合し、複合体を形成後、細胞培地に添加し遺伝子導入を行った。市販のカチオン脂質ベクターを光非感受性比較物質として用いた。培地添加3時間後、複合体がエンドソームに最も集積しているタイミングでトランス体からシス体への構造変化を UV 照射により誘起し、エンドソーム脱出促進を試みた。最終的な発現タンパク量で評価した場合、光感受性脂質である **KAON12** を用い、照射を行うと、照射なしの場合と比較し2倍以上の発現効率の向上が見られた(図3-D)。一方、光非感受性のリポフェクチンでは UV 照射を行っても有意差は観察されなかった。光感受性カチオン脂質による分子集合形態変化がエンドソーム膜との膜融合などによりエンドソーム膜の不安定化を誘起し、pDNA のエンドソーム脱出を促進し、その結果タンパク発現量が増大したと思われる。

フォトクロミック構造と比較し光開裂性構造は分子特性や集合体特性に対して直接的かつ大きな変動をもたらすことが出来る。そこで、脂質分子の中に光開裂性構造である  $\alpha$ -ニトロベンジル構造を導入したカチオン脂質 (**KNBN12**) を合成し、**KNBN12** からなるリポソームの膜融合能の光制御にも成功した[11]。**KNBN12** からなるリポプレックスを細胞にトランスフェクションし、エンドソームに存在するタイミングで紫外光(365 nm)を照射すると、pDNA のエンドソーム脱出が増強することを見出している(図4-B)。**KNBN12** のリジン残基が遊離することで pDNA との解離が促進するのみならず、膜分子の親水性-疎水性バランスが崩れ、膜構造が不安定化することにより輸送小胞膜の安定性も低下し物質透過性が向上するためと考えられる(図4-C)。この光応答性リポソームによるデリバリーはエンドソーム脱出を必要とする他の薬剤へも応用可能である。

*In vivo* での検討を考慮した場合現在用いている照射光の波長(紫外光)では組織透過性が低く、また細胞障害性の危惧も残されている。今後、より長波長の光を利用した光応答性デリバリーシステムの開発が望まれる。

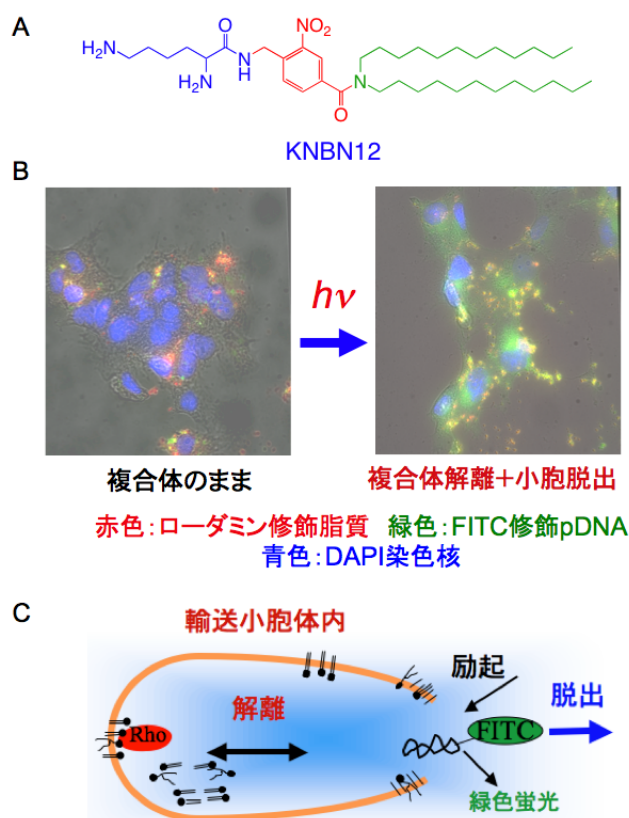


図4 光開裂性カチオン脂質の構造(A)、COS-1 細胞(アフリカ緑ザル腎細胞)に導入した **KNBN12** ポリプレックスへの UV 照射によるエンドソーム脱出促進効果(B)、光開裂によるエンドソーム脱出機構の模式図(C)

### 3. 核内移行促進システム

非ウイルスベクターを用いる場合、なかでも特に非分裂細胞へ導入する場合には核膜が大きな障壁となる。これまで、核タンパク質の核内移行機構を利用した遺伝子デリバリーシステムとして核局在化シグナル(NLS) ペプチドの利用が多く研究者により報告されている。しかし NLS ペプチドを利用した pDNA の核内移行および発現促進システムは未だ確立されていない[12]。我々は輸送体そのものである核内移行因子(インポーチン  $\beta$  ファミリー)を直接利用するシステムを新規に構築し、核膜透過能を付与した非ウイルスベクターの開発を目指した。

#### 3-1: 核内移行因子の利用

プラスミド DNA とインポートイン  $\beta$  の複合化にはビオチン-ストレプトアビジン相互作用を利用した。ストレプトアビジンとインポートイン  $\beta$  の融合タンパク質 ( $\beta$  S) を作製した (図5-A)。融合タンパクの *in vitro* 核内移行活性は NIH3T3 (マウス胎児繊維芽) 細胞を用いたマイクロインジェクション実験により評価した。核膜孔複合体 (NPC) のブロッキング剤と知られている小麦胚芽凝集素 (WGA) が存在しない場合、融合タンパクは細胞質へのインジェクション 1 時間後において核内への集積が認められた (図5-B, WGA(-))。しかし、WGA 存在下では核内移行が阻害され核膜周辺領域に融合タンパクが局在しており (図5-B, WGA(+))、融合タンパクの核内移行は NPC を経由していることが解った。そして、bPEI のポリイオンコンプレックスを調製後、 $\beta$  S を添加し複合化を行った。インポートイン  $\beta$  複合 PEI ポリプレックスはインポートイン  $\beta$  によって核膜孔を経る pDNA の核内移行が促進され、トランスフェクション効率が向上することが明らかとなった[13]。

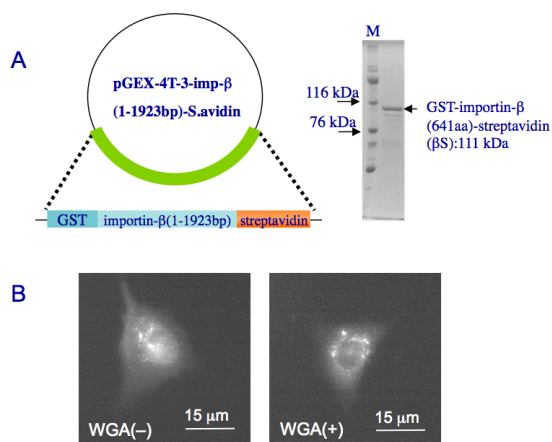


図5 マイクロインジェクション法によるストレプトアビジンとインポートイン  $\beta$  の融合タンパク質 ( $\beta$  S) の調製 (A) と核内移行能評価 (B)

### 3-2: センダイウイルスエンベロープとのハイブリッド化

細胞膜との融合により薬剤を細胞質に直接かつ効率的に送達可能なセンダイウイルスエンベロープ (HVJ-E) ベクターとのハイブリッド化により、細胞膜と核膜両方の透過能を有する非ウイルスベクターの作製を行った。

*In vitro* トランスフェクション活性は pDNA として pGL3 を NIH3T3 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイにより測定した (図6)。積極的な核内移行システムをもたない pGL3/bPEI 複合体と比較し、pGL3/bPEI/ $\beta$  S 三元複合体はトランスフェクション効率が約 500 倍向上した。PEI 本来のエンドソーム脱出能に核内移行能が付与することで、非常に大きな発現向上が達成されたと考えられる。さらに、HVJ-E を利用し、核内移行性 pGL3/b-PEI/ $\beta$  S 三元複合体とのハイブリッド化を試みた。核内移行性を有さない pGL3/bPEI 複合体を HVJ-E に封入した場合は、HVJ-E を使用していない核内移行性 pGL3/bPEI/ $\beta$  S 三元複合体よりも低く、PEI/pDNA 複合体にとって核内移行段階がタンパク発現までの大きな障壁となっていることが明らかとなった。一方、pGL3/bPEI/ $\beta$  S 三元複合体を HVJ-E に封入した場合は封入しない場合の 4 倍、また、 $\beta$  S 非存在下の 110 倍もの高い発現効率を示した。

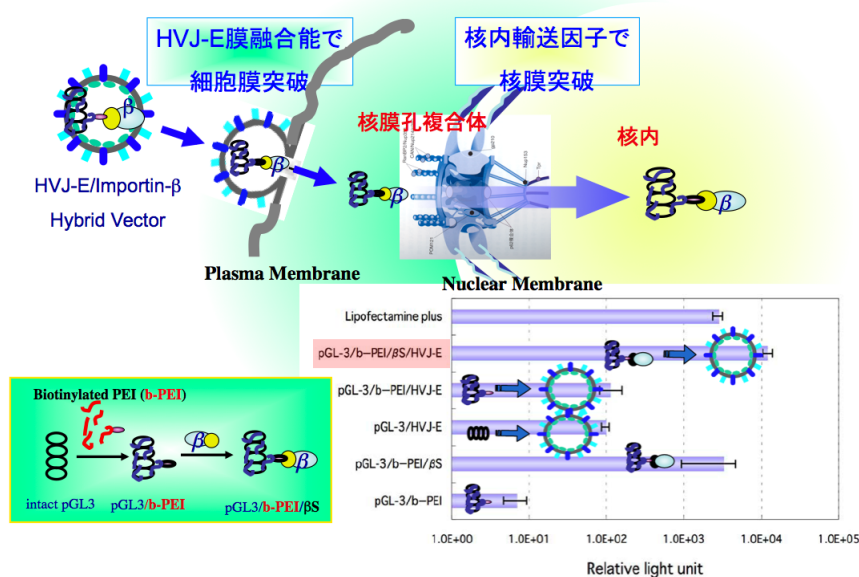


図6 核内移行因子/HVJ-E ハイブリッドベクターによる効率的トランスフェクション

以上のように、核内移行因子の直接的利用およびセンダイウイルスエンベロープベクターとのハイブリッド化により非ウイルスベクターの効率を大幅に向上することに成功した。本システムは分子生物学や細胞生物学の基礎学術分野ばかりでなく細胞工学や遺伝子治療などの医学応用分野にも大きく貢献可能であると考えている。

#### 4. おわりに

我々はこの十数年プラスミド DNA の効率的デリバリーシステムの構築を目指して研究を行ってきた。遺伝子医療における非ウイルスベクターの使用状況を見ても明らかなように、非ウイルスベクターの性能はとも満足できる状況ではない、しかしその研究過程において細胞内ナビゲーションのためのツールをいくつか見出すことが出来た。これらのツールを活かし今後核酸医薬のみならずその他の薬剤に対する細胞内トラフィッキング制御も進めていきたい。

謝辞: エンドソーム脱出促進システム開発において、ジャイアントリポソームを用いた膜安定性評価の研究は濱田勉博士(北陸先端科学技術大学院大学)との共同研究による成果でありこの場を借りてお礼申し上げます。また、共同研究者として貢献した柿本真司博士ならびに本研究に多大なご協力を賜りました恩師新海征治先生をはじめ皆様に深謝致します。

#### 参考文献

- [1] R. E. Kontermann, *Methods*, **34**, 163 (2004).
- [2] a) T. Nagasaki, M. Hojo, A. Uno, T. Satoh, K. Koumoto, M. Mizu, K. Sakurai, S. Shinkai, *Bioconjug. Chem.*, **15**, 249 (2004), b) T. Satoh, H. Kano, M. Nakatani, N. Sakairi, S. Shinkai, T. Nagasaki, *Carbohydr. Res.* **341**, 2406 (2006), c) T. Satoh, S. Kakimoto, H. Kano, M. Nakatani, S. Shinkai, T. Nagasaki, *Carbohydr. Res.* **342**, 1427 (2007), d) S. Kakimoto, T. Moriyama, T. Tanabe, S. Shinkai, T. Nagasaki, *J. Control. Release*, **120**, 242 (2007).
- [3] S. D. Conner, S. L. Schmid, *Nature*, **422**, 37 (2003).
- [4] E. London, *Mol. Microbiol.*, **6**, 3277 (1992).
- [5] S. Kakimoto, T. Hamada, Y. Komatsu, M. Takagi, T. Tanabe, H. Azuma, S. Shinkai, T. Nagasaki, *Biomaterials*, **30**, 402 (2009).
- [6] S. Kakimoto, T. Tanabe, H. Azuma, T. Nagasaki, *Biomed. Biopharmacother.*, in press.
- [7] T. Nagasaki, S. Shinkai, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **58**, 1091 (2007).
- [8] T. Nagasaki, K. Wada, S. Tamagaki, *Chem. Lett.*, **32**, 88 (2003).
- [9] 濱田 勉、生命化学研究レター、**28**、27 (2008).
- [10] a) T. Hamada, Y. T. Sato, K. Yoshikawa, T. Nagasaki, *Langmuir*, **21**, 7626 (2005), b) K. Ishii, T. Hamada, M. Hatakeyama, R. Sugimoto, T. Nagasaki, M. Takagi, *ChemBioChem*, **10**, 215 (2009).
- [11] T. Nagasaki, A. Taniguchi, S. Tamagaki, *Bioconjug. Chem.*, **14**, 513 (2003).
- [12] T. Nagasaki, T. Myohoji, T. Tachibana, S. Futaki, S. Tamagaki, *Bioconjug. Chem.*, **14**, 282 (2003).
- [13] T. Nagasaki, T. Kawazu, T. Tachibana, S. Tamagaki, S. Shinkai, *J. Control. Release*, **103**, 119 (2005).

## 研究紹介

## 生体に学ぶ水溶液中の超分子化学

～生物有機化学・不斉合成・錯体化学・

光化学の接点～

東京理科大学薬学部生命創薬科学科・  
東京理科大学がん医療基盤科学技術研究センター

青木 伸

(shinaoki@rs.noda.tus.ac.jp)



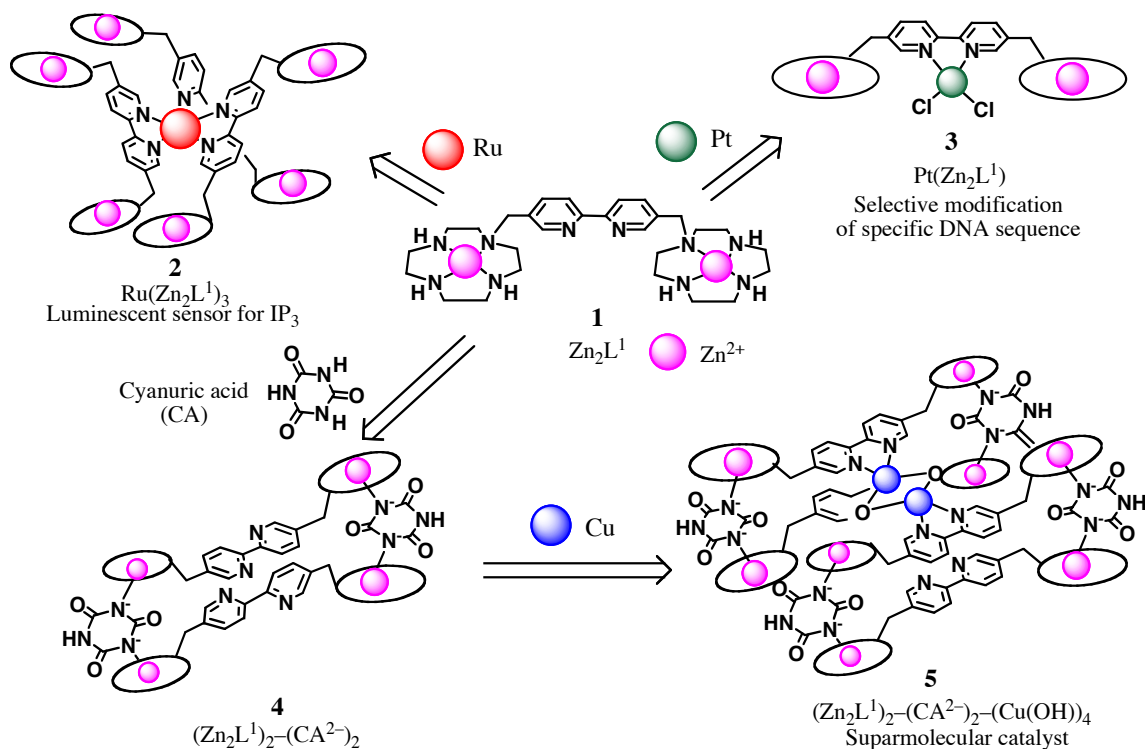
生体は、目的とする構造と機能を獲得するために、その場に必要と元素とその性質を利用して生きている。しかも、生体分子同士の分子認識、酵素反応は水を含む極性の高い環境で行われている。私達は、生命科学や創薬科学に密接に関わるテーマにおいて、周期表上の様々な元素を用いて水溶液中での新しい化学現象、化学反応を見つけ、それらを生命科学や創薬科学へ展開したいと考えている。本稿では、多核金属錯体モジュールの分子集積による超分子化学、酵素に学ぶ触媒的不斉合成反応、光分解反応を利用するバイオケミカルツールに関する内容を紹介する。

# 1. 同一の亜鉛錯体をビルディングモジュールとして用いる分子集積による発光センサー、DNA結合超分子、および超分子触媒

亜鉛( $\text{Zn}^{2+}$ )は生体内において鉄に次いで2番目に多く存在する必須微量元素であり、亜鉛酵素の触媒活性因子(catalytic factor)や、酵素や蛋白の構造安定化に寄与する構造因子(structural factor)などとして機能している。<sup>1)</sup> 木村らによって、亜鉛酵素活性中心のモデル化合物として開発された $\text{Zn}^{2+}$ -1,4,7,10-tetraazacyclododecane( $\text{Zn}^{2+}$ -cyclen)錯体は、溶液中でリン酸モノエステル、イミドアニオン、チオラートなどのアニオンと1対1複合体を生成するため、水溶液中での分子認識や自己集積体の構築に有効な分子ユニットである。<sup>2,3)</sup>

我々はこれまで、多核( $\text{Zn}^{2+}$ -cyclen)錯体をビルディングブロックとする水溶液中での超分子の構築を行ってきた。例えば、三核亜鉛錯体とシアヌル酸(CA)あるいはチオシアヌル酸(TCA)は中性水溶液中で自己集積し、いくつかの超分子を生成する。<sup>4,5)</sup> 最近では、直列四核亜鉛錯体がTCAと3対4複合体を生成し、これがDNAと複合体を生成することを報告した。<sup>6)</sup>

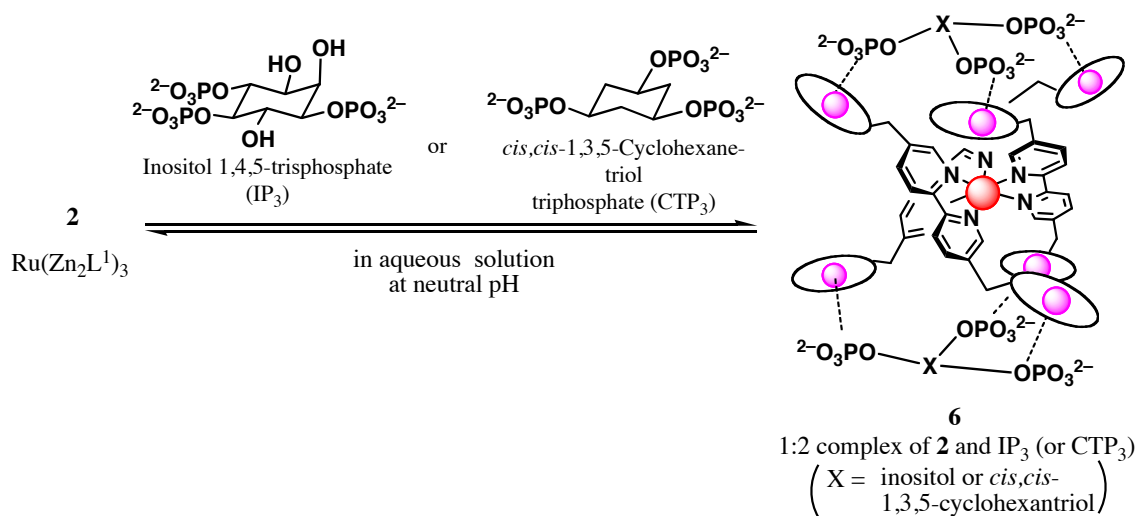
このように、超分子化学の大きな特徴の一つは、複数の分子を溶液に溶かすことによって新しい機能をもつ分子が得られること、分子モジュールの組み合わせを変えることによって、全く異なる構造と機能を有する分子を構築できることであろう。そこで我々は、2,2'-bipyridine(bpy)リンカーを有する二核亜鉛錯体**1**( $\text{Zn}_2\text{L}^1$ )を合成し、bpy部分で別の金属イオンと錯体を生成したり、 $\text{Zn}^{2+}$ -cyclenの部分で有機アニオンと複合体を生成させることにより、様々な構造と機能をもつ分子集積体を生み出すことができるのではないかと考えた。以下に、このような発想で合成したイノシトール三リン酸( $\text{IP}_3$ )に対する発光センサー**2**( $\text{Ru}(\text{Zn}_2\text{L}^1)_3$ )、DNAバインダー**3**( $\text{PtZn}_2\text{L}^1$ )、超分子加水分解触媒**5**( $(\text{Zn}_2\text{L}^1)_4\text{-(CA}^{2-})_4\text{-(Cu(OH))}_4$ )について述べる(Scheme 1)。



Scheme 1

### 1.1 イノシトール三リン酸 ( $\text{IP}_3$ ) に対する発光センサー

$\text{IP}_3$  は、細胞内シグナル伝達機構における重要なセカンドメッセンジャーの一つであり、その分布や濃度変化の検出には、選択的な発光センサーが必要である。そこで、**1** と Ru イオンの 3 対 1 集積体 ( $\text{Ru}-\text{N}$  配位結合に基づく) **2** ( $\text{Ru}(\text{Zn}_2\text{L}^1)_3$ ) を合成した (Scheme 2)。<sup>7)</sup> **2** は  $\text{IP}_3$  や、 $\text{IP}_3$  のモデル化合物である *cis,cis*-1,3,5-cyclohexanetriol triphosphate (CTP<sub>3</sub>) と 1 対 2 複合体 **6** を生成し、その発光強度が増大した。**2** は、三リン酸である  $\text{IP}_3$  や CTP<sub>3</sub> に対して直接かつ選択的に発光応答する初めての化学センサーである。



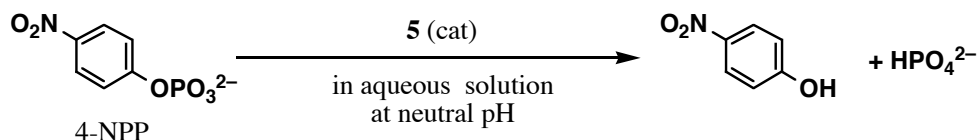
Scheme 2

## 1.2 白金—亜鉛複核錯体によるDNAの塩基配列特異的認識

次に、**1** ( $\text{Zn}_2\text{L}^1$ ) と  $\text{Pt}^{2+}$  のヘテロ錯体 **3** ( $\text{Pt}(\text{Zn}_2\text{L}^1)$ ) を合成した。cisplatinやcarboplatinに代表されるPt錯体は、抗がん剤として臨床で使用されており、DNA中の隣接する二つのグアノシン (G-G) を架橋してDNAの構造を変化させてその薬理作用を発揮すると考えられる。<sup>8)</sup> ただし、G-Gの前後のDNA塩基配列は全く認識しない。そこで、**3**のPt(bpy)がG-Gを、 $\text{Zn}^{2+}$ -cyclenの部分がTを認識することにより、cisplatinやcarboplatinとは異なる塩基配列認識能をもつことを期待した。エチジウムブロミド置換実験や環状プラスミドの巻き戻し実験などにより、**3**がcisplatinよりも低濃度 (1/10〜1/100) でDNAに結合することがわかった。また、ポリメラーゼを用いたDNA伸長阻害実験を行ったところ、GGGGやTGGT、TGAGAなどの塩基配列に選択的に結合することが示唆された。<sup>9)</sup>

## 1.3 超分子触媒によるリン酸エステルの加水分解

**1** ( $\text{Zn}_2\text{L}^1$ ) の  $\text{Zn}^{2+}$ -cyclen部はイミデートアニオンと配位結合を生成するので、**1**とCAを混合すると、CAジアニオン ( $\text{CA}^{2-}$ ) とのサンドウィッチ型 2対2錯体 **4** ( $(\text{Zn}_2\text{L}^1)_2(\text{CA}^{2-})_2$ ) が生成した。さらにCuIを加えたところ、**4**とCuが2対4の比で、即ち**1**と $\text{CA}^{2-}$ とCuが4対4対4の比で集積した超分子 **5** ( $(\text{Zn}_2\text{L}^1)_4(\text{CA}^{2-})_4(\text{Cu}(\text{OH})_4)$ ) が生成した。X線結晶構造解析の結果、**5**の上下2ヶ所には、 $\mu$ - $\text{Cu}_2(\text{HO})_2$ 錯体構造が存在することがわかった。そこで、4-nitrophenyl phosphate (4-NPP)の加水分解を検討したところ、**8**が4-NPPを触媒的に加水分解することを見出した (Scheme 3)。**4**単独、2対2錯体 **8** ( $(\text{Zn}_2\text{L}^1)_2(\text{CA}^{2-})_2$ )、 $\text{Cu}(\text{bpy})_2$ 錯体による加水分解は非常に遅く、またBis(4-nitrophenyl)phosphate (BNPP)の加水分解が殆ど進行しないことから、**5**の $\mu$ - $\text{Cu}_2(\text{HO})_2$ 錯体部分が4-NPPを捕捉し、加水分解を触媒しているものと推定される。<sup>10)</sup>



Scheme 3

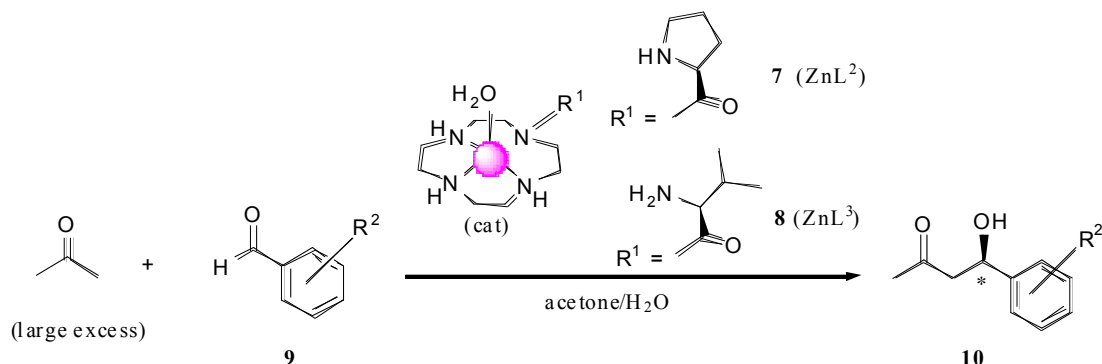
## 2. キラル亜鉛錯体を触媒とする立体選択的アルドール反応とその反応機構の解析

生体内には、炭素—炭素結合の生成及び開裂を触媒するaldolaseが存在する。例えば、D-fructose 1,6-bisphosphate (FBP) aldolaseは、FBPをdihydroxyacetone phosphate (DHAP)とD-glyceraldehyde 3-phosphate (G3P)に分解するretroaldol反応と、その逆反応に相当するDHAPとG3P間のaldol反応を触媒する。aldolaseは、反応機構によって、Class IとClass IIに分類され、Class IIは、活性中心に存在するリジンが基質とエナミン中間体を経由して、Class IIは $\text{Zn}^{2+}$ -エノラートを經由してaldol反応およびretroaldol反応を触媒する。<sup>11)</sup>

我々は、Class IとClass IIの特徴を有する不斉触媒として、アミノ酸を結合した $\text{Zn}^{2+}$ 錯体 **7** ( $\text{ZnL}^2$ )、**8** ( $\text{ZnL}^3$ )などを合成した (Scheme 4)。水溶液中における $\text{Zn}^{2+}$ 錯体生成平衡を解析した結果、 $\text{L}^2$ や $\text{L}^3$ の環内に存在する3つの2級アミンが $\text{Zn}^{2+}$ に配位すること、それぞれの側鎖のアミノ基は弱く $\text{Zn}^{2+}$ に配位していること、などが示唆された。

上記 $\text{Zn}^{2+}$ 錯体を触媒として用いて、acetoneとbenzaldehyde誘導体 **9**のaldol反応を行い、アルドール付加体 **10**を最大89%ee(R)で得た。種々の検討の結果、錯体中の $\text{Zn}^{2+}$ はLewis酸、側鎖のアミノ基は基質の脱プロトン化のための塩基として機能していることが示唆された。また、acetylacetone

(acac)と  $\text{Zn}^{2+}$  錯体およびプロリンの UV 滴定の結果、 $\text{Zn}^{2+}$  錯体によるアルドール反応が  $\text{Zn}^{2+}$ -エノラートを經由して進行していることが示唆された。 $\text{Zn}^{2+}$ -エノラートの方が、エナミン体よりも速度論的にも熱力学的にも生成しやすいことが要因であると考えられる。<sup>12)</sup>



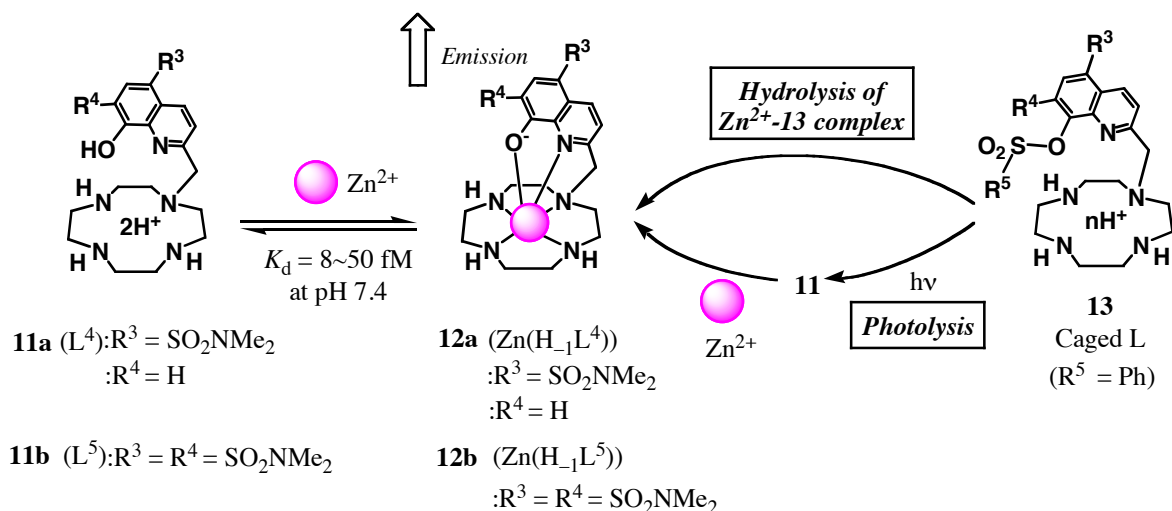
**Scheme 4**

### 3. スルホン酸 8-キノリニルエステルの分解反応（加水分解と光分解）とバイオケミカルツールへの応用

#### 3.1 $\text{Zn}^{2+}$ との錯体生成によって活性化される $\text{Zn}^{2+}$ プローブ

$\text{Zn}^{2+}$  は、 $\text{Ca}^{2+}$  に次ぐ細胞内シグナル伝達イオンとしても注目されている。私達は、Cyclen型  $\text{Zn}^{2+}$  蛍光プローブを合成し、アポトーシス初期過程で細胞内  $\text{Zn}^{2+}$  濃度が上昇することを報告した。<sup>13)</sup> **11a** ( $\text{L}^4$ ) は、 $\text{Zn}^{2+}$  錯体 **12a** ( $\text{Zn}(\text{H}_1\text{L}^4)$ ) を生成すると、その蛍光 (512 nm) が 17 倍増大した (励起波長 328 nm) (Scheme 5)。<sup>13f)</sup> 8-quinolinol 基に二つの 5-dimethylsulfonyl 基を導入した **11b** ( $\text{L}^5$ ) は、 $\text{Zn}^{2+}$  錯体 **12b** ( $\text{Zn}(\text{H}_1\text{L}^5)$ ) 生成に伴い蛍光 (478 nm) が 32 倍になった。<sup>14)</sup> **12a, b** は非常に安定 ( $K_d$  が fM オーダー)、広い pH 範囲 (pH 5~8) で  $\text{Zn}^{2+}$  検出が可能、錯体が瞬時に生成する、という特徴をもつ。

**11** の細胞内導入率と発光応答の  $\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$  選択性改善のため、8-quinolinol の水酸基を  $\text{PhSO}_2$  (Benzenesulfonyl, BS) 基で保護した **13** (BS-caged-L) を合成した。<sup>14,15)</sup> **13** の細胞内導入率は **11** のそれと比較して向上し、 $\text{Zn}^{2+}$  錯体中、 $\text{Zn}^{2+}$  に配位した  $\text{HO}^-$  が  $\text{PhSO}_2$  基に対して求核攻撃し、加水分解的に Uncage 反応が進行した。



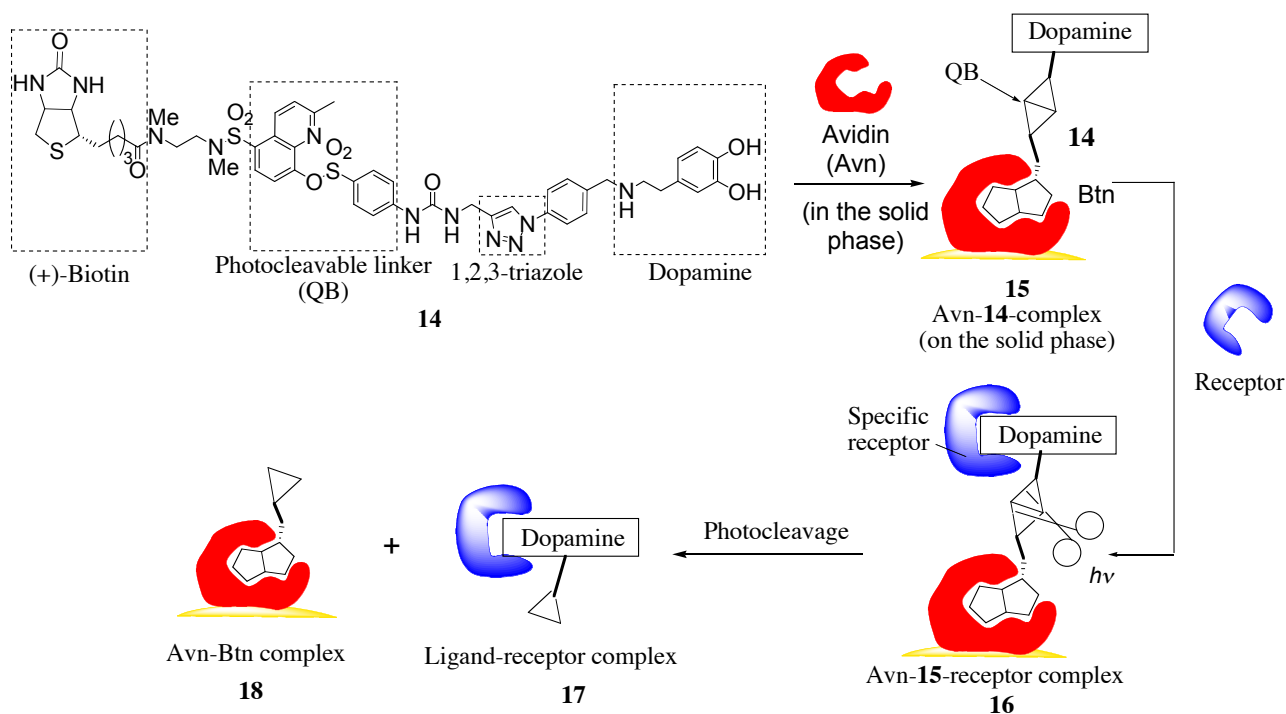
**Scheme 5**

さらに、**13**のBS基は光照射でもUncageされることを見出したのに加え、<sup>14,15)</sup> 上記の光分解反応はcyclenがなくても進行することが明らかになった。本反応のメカニズムを解析したところ、光三重項励起状態におけるS-O結合のホモリティックな開裂を経由することが示唆された。<sup>16)</sup>

### 3.2 スルホン酸キノリニルエステルの光分解反応の光分解性ビオチンリンカーへの応用

卵黄中に存在するビオチン (Btn) が、アビジン (Avn) と非常に安定な複合体を生成することが広く知られており、分子生物学など様々な分野で利用されている。この現象を利用したリガンド選択的レセプターを分離する手法の一つとして、アフィニティーカラムクロマトグラフィーがある。しかし、Avn-Btn複合体の解離には過酷な条件が要求され、リガンド-ターゲット複合体が安定であればあるほど、温和な条件下で、無傷のままそれを分離、回収するのは困難である。<sup>17)</sup>

我々は、Scheme 5で示した8-quinolinol誘導体の光分解反応を利用し、光分解性Btn標識リンカーを開発した。光分解性リンカーを介してリガンドをBtn標識した**14** (Scheme 5中ではDopamineがリガンドである) 合成し、リガンド-レセプター複合体をintactな状態で分離、精製する新しい手法である。Scheme 6にその概要を示す。Avn-Btn相互作用を利用して**14**を固相上に担持し (**15**)、リガンドに対する選択的レセプターとの複合体**16**とする。**16**に紫外光 (> 310 nm) を照射してリンカーを切断し、リガンド-レセプター複合体**17**を分離、精製して構造解析を行う、というものである。我々は、リガンドとしてドーパミンを導入した**14**を合成し、抗Dopamine抗体を用いて本法の有用性を実証した。<sup>18)</sup> 現在、共有結合したリガンド-レセプター複合体などの回収法の検討を行っている。



Scheme 6

## 6. 終わりに

以上、現在私達の研究室で行っている3つのテーマについて概説した。平成21年度から東京理科大学総合研究機構「がん医療基盤科学技術研究センター」にも参画し、分子集積体や配位化合物の概念に基づく抗がん分子標的薬の設計と合成などにも着手している。今後も、一つ一つの化合物の化学的性質や反応性を大切にしながら、生命科学、創薬科学に貢献したいと考えている。

謝辞：本研究にあたり御指導、御鞭撻をいただきました木村榮一先生（広島大学名誉教授、静岡大学理学部）、武田敬先生（広島大学大学院医歯薬学総合研究科）、城始勇博士（リガクX線研究所）、岡畑恵雄先生、古澤宏幸先生、（東京工業大学大学院理学研究科）、中村幹彦博士、鈴木友紀子博士（イニシヤム）、谷本能文先生、藤原好恒先生、灰野岳晴先生（広島大学大学院理学研究科）、池北雅彦先生、森田明典先生（東京理科大学理工学部）、田沼靖一先生、高澤涼子博士（東京理科大学薬学部）、安部良先生（東京理科大学生命科学研究所）に心から感謝申し上げます。

## Reference

1. (a) Auld, D. S. *BioMetals* **2001**, 14, 271–313. (b) Aoki, S.; Kimura, E. *In Comprehensive Coordination Chemistry II, Vol. 8*; eds. by Que, L. Jr.; Tolman, W. B. Elsevier Ltd.: 2004, p 601–640. (c) Kimura, E.; *J. Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 171–179. (d) Kimura, E.; Kikuta, E. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, 5, 139–155.
2. (a) Kimura, E.; Shiota, T.; Koike, M.; Shiro, M.; Kodama, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5805–5811. (b) Shionoya, M.; Kimura, E.; Shiro, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 6730–6737.
3. (a) Aoki, S.; Jikiba, A.; Takeda, K.; Kimura, E. *J. Phys. Org. Chem.* **2004**, 17, 489–497. (b) Aoki, S.; Iwaida, K.; Shiro, M.; Kimura, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 5256–5257. (c) Aoki, S.; Kimura, E. *Rev. Mol. Biotech.* **2002**, 90, 129–155. (d) Aoki, S.; Kimura, E. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 769–787. (e) Yamada, Y.; Aoki, S. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, 11, 1007–1023. (f) Aoki, S.; Tomiyama, Y.; Yamada, Y.; Shiro, M.; Kimura, E. *Chem. Asian J.* **2009**, 4, 9567–9578.
4. (a) Aoki, S.; Shiro, M.; Koike, T.; Kimura, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 576–584. (b) Aoki, S.; Shiro, M.; Kimura, E. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 929–939. (c) Aoki, S.; Zulkefeli, M.; Shiro, M.; Kimura, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 4894–4899. (d) 青木, 有機合成化学協会誌 **2006**, 64, 608–616.
5. 水溶液中の超分子化学に関する総説：(a) Oshovsky, G. V.; Reinhoudt, D. N.; Verboom, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 127, 9129–9139. (b) Fujita, M.; Umemoto, K.; Yoshizawa, M.; Fujita, N.; Kusakawa, T.; Biradha, K. *Chem. Commun.* **2001**, 509–518.
6. Zulkefeli, M.; Sogon, T.; Takeda, K.; Aoki, S. *Inorg. Chem.* **2009**, 48, 9567–6578.
7. Aoki, S.; Zulkefeli, M.; Kohsako, M.; Shiro, M.; Takeda, K.; Kimura, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9129–9139.
8. Lippert, B. *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*; Wiley-VCH: Zürich, 1999.
9. Aoki, S.; Okatani, R.; Yamada, Y.; Mano, Y.; Shiro, M.; Kimura, E. Manuscript in preparation.
10. Zulkefeli, M.; Shiro, M.; Aoki, S. Manuscript in preparation.
11. Wong, C.-H.; Whitesides, G. M. *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*; Pergamon: Oxford, 1994.
12. (a) Itoh, S.; Kitamura, M.; Yamada, Y.; Aoki, S. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 10570–10584. (b) Aoki, S.; Itakura, T.; Itoh, S.; Kitamura, M. Manuscript in preparation.
13. (a) Koike, T.; Kimura, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 12696–12703. (b) Aoki, S.; Kaido, S.; Fujioka, H.; Kimura, E. *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 1023–1030. (c) Aoki, S.; Kagata, D.; Shiro, M.; Takeda, K.; Kimura, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13377–13390. (d) Kimura, E.; Aoki, S.; Kikuta, E.; Koike, T. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **2003**, 100, 3731–3736. (e) Kimura, E.; Takasawa, R.; Tanuma, S.; Aoki, S. *Science STKE*, **2004**, pl 7. (f) Aoki, S.; Sakurama, K.; Matsuo, N.; Yamada, Y.; Takasawa, R.; Tanuma, S.; Shiro, M.; Takeda, K.; Kimura, E. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 9066–9080.
14. Ohshima, R.; Kitamura, M.; Shiro, M.; Morita, A.; Ikekita, M.; Kimura, E.; Aoki, S. *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 888–899.
15. Aoki, S.; Sakurama, K.; Matsuo, N.; Yamada, Y.; Takasawa, R.; Tanuma, S.; Shiro, M.; Takeda, K.; Kimura, E. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 3405–3413.
16. Kageyama, Y.; Ohshima, R.; Sakurama, K.; Fujiwara, Y.; Tanimoto, Y.; Yamada, Y.; Aoki, S. *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, 57, 1257–1266.
17. Meier, T.; Fahrenholz, F. A. *Laboratory Guide to Biotin-Labeling in Biomolecule Analysis*; Birkhauser: Boston, 1996.
18. Aoki, S.; Matsuo, N.; Hanaya, K.; Yamada, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 3405–3413.

## 研究紹介

## 芳香族アミドの立体特性と動的立体制御

～機能性芳香族化合物構築の鍵構造として～

お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科、

JST・さがけ

棚谷 綾

(tanatani.aya@ocha.ac.jp)



## 1. はじめに

生命機能を担う生体高分子は、核酸の二重らせんやヘアピン構造、タンパク質の  $\alpha$ -ヘリックスや  $\beta$ -シート構造といった特徴的な立体構造をもち、その機能発現に密接に関わっている。このような生体高分子と同様の構造や機能をもつ分子を構築しようという試みがなされ、最近では、全く人工的な骨格によって、秩序だった立体構造をもつオリゴマーや高分子が創製されてきた。なかでも、フォルダマー (Foldamer) と総称される化合物は、弱い相互作用によって特定の立体構造が安定化 (制御) されている鎖状オリゴマーの総称であり、ランダムな状態と秩序だった構造との間の動的な変換が可能なものが多く、その立体構造や動的立体挙動を基盤とした機能発現、例えば、バイオミメティックな受容体、触媒作用、光やエネルギーの捕獲、集積デバイス、薬物輸送や放出などへの応用性が期待されている<sup>1,2)</sup>。筆者らはアミド結合の立体特性を活かした芳香族フォルダマーの構築を行ってきた。本研究は基礎研究の範疇ではあるが、生命科学や材料化学での機能性芳香族分子開発に有用であると考えており、これまでの研究から興味深い例を紹介したい。

## 2. 芳香族アミドの立体特性

アミド結合はタンパク質の基本構造単位として、その立体構造や機能発現に関わっているばかりでなく、多くの生理活性物質の鍵構造としてみいだせるなど、生体になじみの深い官能基である。これらの機能性分子設計においては、アミド結合の多水素結合性などの電子的効果に着目することが多いが、その部分二重結合性に基づいた立体化学が化合物の化学的性質や機能発現に関わることも多い。例えば、発癌プロモーター活性をもつテレオシジン類の基本骨格であるインドラクタム V は、溶液中で *trans*、*cis* 型アミド結合に由来する2種類のコンフォマーの平衡で存在している (図1)。各コンフォマーを優先する誘導体の合

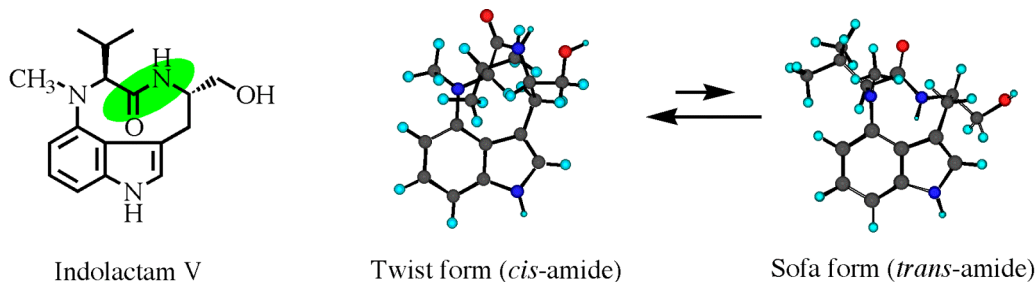


Fig. 1. Structure and two conformers of Indolactam V

成により、活性型は *cis* 型アミドをもつ Twist 型であることが示されている<sup>3)</sup>。また、合成レチノイド(活性型ビタミン A 誘導体)である Am80 は非常に強いレチノイド活性を有するが、その *N*-メチル体は全く活性を示さない(図2)<sup>4)</sup>。この活性の差は、それぞれアミド結合がトランス型およびシス型であることに起因している。

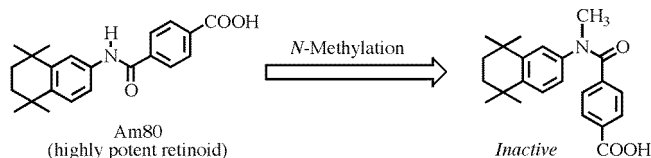


Fig. 2. Loss of biological activity by *N*-methylation of highly potent retinoid, Am80

筆者らは、レチノイドの構造活性相関研究を発端として芳香族アミドの立体化学に興味を持ち、ベンズアニリドなどの芳香族二級アミドが *trans* 型アミドで存在するのに対して、アミド結合の窒素原子上にメチル基を導入して得られる三級アミドが結晶中及び溶液中において *cis* 型アミドを優先することを見いだした(図3)<sup>5)</sup>。*N*-メチル化(より一般的には *N*-アルキル化)に伴う *cis* 型優先性は、アミド結合だけでなく、類縁官能基であるチオアミド、アミジン、ウレア、グアニジン類にも適応可能な立体特性である。アミジンやグアニジンでは、その塩も同様の性質を持ち、水溶性であるため、有機溶媒中ばかりでなく、水溶液中でも *cis* 型をとる。*N*-メチル化による *cis* 型優先性の根源については解決していないが<sup>6)</sup>、立体を制御した芳香族化合物の分子設計に有用な立体的性質である<sup>5)</sup>。

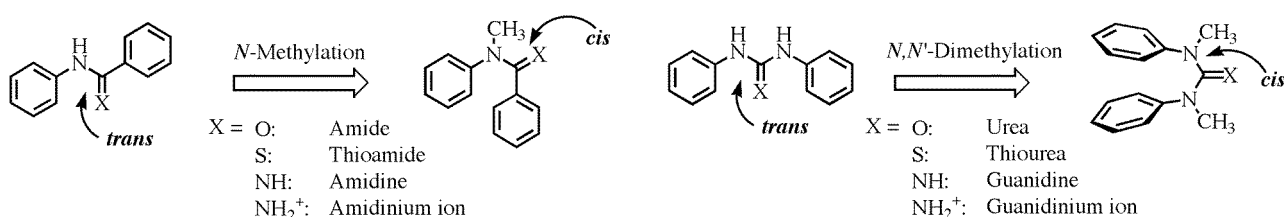


Fig. 3. *Cis* conformational preference of *N*-methylated amide and related compounds

### 3. 芳香族アミドのらせん構造

らせん構造は、自然界において様々なところでみられる構造であり、銀河や竜巻、巻き貝やアサガオのツルなど多種多彩である。いうまでもなく、DNA、タンパク質、多糖類などの天然高分子類にも、らせん構造が存在し、これらの機能発現と密接に関わっている。これまで、多くの化学者は、らせん構造の秩序だった美しさ、そして、そこに仕組まれた巧妙な機能特性に心を引かれ、人工的ならせん構造を作る試みが種々なされてきた。図3に示すように、*cis* 型アミド構造は折れ曲がった立体構造を構築するため、その構造をモノマー単位とするオリゴマーやポリマーはらせん構造を形成すると考えられる。

Yokozawa らが開発した連鎖重縮合反応によるポリアミドの合成法を用いると、望みの分子量の *N*-アルキ

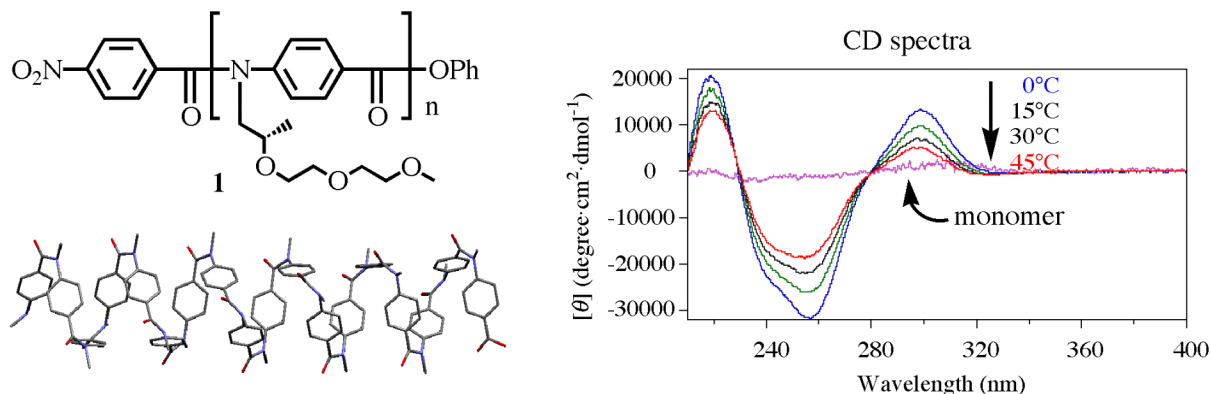


Fig. 4. Structure and CD spectra of polyamide **1** with chiral *N*-substituent

ルポリベンズアミドを狭い分子量分布 ( $M_w/M_n < 1.1$ ) で得ることができる。そこで、本合成法により、アミド結合窒素原子上に光学活性な側鎖を導入したポリアミド **1** を合成したところ、その CD スペクトルでは、非常に強いコットン効果が観測された(図4)<sup>7)</sup>。その強度は鎖長や温度に依存し、動的ならせん構造の性質を示した。CD スペクトルの実験値と理論的解析から化合物 **1** のらせん構造が右巻きであることが同定された。一般に、らせんの絶対構造を決める手段として CD スペクトルの形が用いられているが、実は、理論的解析を実験系に当てはめる際にはそう簡単ではない<sup>8)</sup>。本化合物の場合、部分構造の結晶構造を基にした理論的解析によってらせんの方向性を明確に証明することができた。

#### 4. 芳香族多層ウレアのらせん構造

アミド結合とウレア結合の *cis* 型構造を比較すると、*N,N'*-ジメチル-*N,N'*-ジフェニルウレアの方が、*N*-メチルベンズアニリドと比べて芳香環がより平行に近い構造(二面角は約 30°)をとっている(図3)。従って、*cis* 型ウレア構造をモノマー単位に持つオリゴマー**2**、**3** は分子内で芳香環多層構造となる(図5)<sup>9)</sup>。同様に、シス型グアニジン **4**、**5** では水溶性の芳香環多層分子となる。興味深いことに、芳香環多層グアニジン **4** は DNA のマイナーグループに高い親和性を持っていた<sup>10)</sup>。自由度の高いウレアやグアニジン誘導体 **2**~**5** が多層構造を形成することは、従来の分子内芳香環層状構造がシクロファン等の固定された骨格を用いてのみ構築されてきた点を考えると、単純で有用な構造単位といえよう。

多層構造において、メタ置換体 **3**、**5** の場合には、すべての軸不斉がそろった、らせん構造をとる(図5)。

結晶中では右巻き、左巻きの分子が1:1で存在するラセミ結晶であり、また、溶液中では互いに速い平衡下にあるため、両エナンチオマーを区別できない。そこで、化合物 **3** のウレア結合窒素原子2カ所に光学活性な置換基を導入した化合物 **6** を合成したところ、強い CD シグナルが観測された。化合物 **6** の UV・CD シグナルの理論計算値との比較から、化合物 **6a**、**6b** がそれぞれ *all-R*、*all-S* の軸不斉をもつ構造を優先していることが同定できた(図6)<sup>11)</sup>。

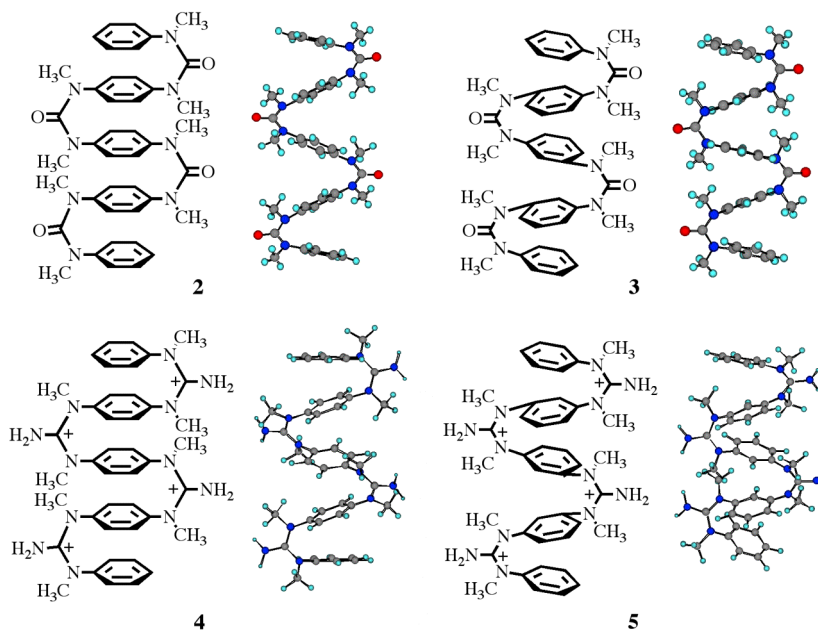


Fig. 5. Crystal structures of aromatic *N*-methylated oligoureas and guanidines

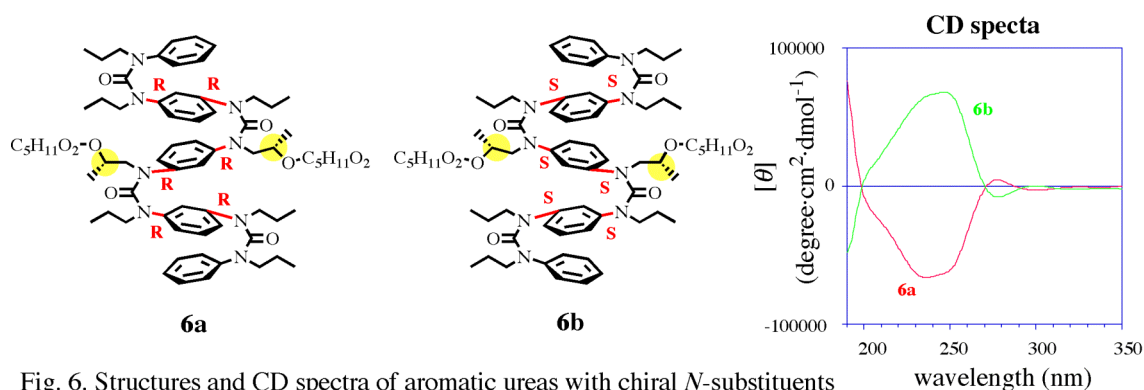


Fig. 6. Structures and CD spectra of aromatic ureas with chiral *N*-substituents

## 5. 環境応答型芳香族アミドの創製

近年、外的環境の変化に伴って構造変化を引き起こす分子が、分子マシーン、分子スイッチなどと呼ばれ、機能性分子への応用を目的に、様々な化合物が創製されている<sup>12)</sup>。筆者らは、芳香族アミドの立体特性の解析から、酸の添加や酸化還元反応などによりアミド結合の *trans*/*cis* 構造が転換する化合物を見いだした(図7a, b)<sup>13)</sup>。これらは、いずれも芳香環の電子密度の変化による。すなわち、より電子密度の高い芳香環がアミド結合カルボニルに対して *trans* 側に位置する性質を利用している。化合物 **7** の  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  溶液 (77% *cis*, 233 K) に、TFA-*d* (大過剰) を添加すると、*trans* 型が主コンフォーマー (85%) となった<sup>14)</sup>。この立体転換は **7** の  $\text{CD}_3\text{OD}$  溶液 (73% *cis*, 233 K) に DCl を添加しても起こる (84% *trans*)。化合物 **8** も  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  溶液中では、ほぼ *cis* 型 (>99.9%, 233 K) しか観測されず、TFA を添加すると、*trans* 型 (76%) へと立体転換した。一方、無置換の *N*-メチルアセトアニリドでは酸を添加しても *cis* 型の存在比はほとんど変わらない。また、化合物 **8** の場合、 $\text{CD}_3\text{OD}$  溶液 (>99.9% *cis*, 233 K) に DCl を添加しても *cis* 型 (72%) のままである。この結果は、適当な置換基とアウトプットを導入することで、酸度に応じた環境応答型アミド化合物へと展開できることを示唆している。

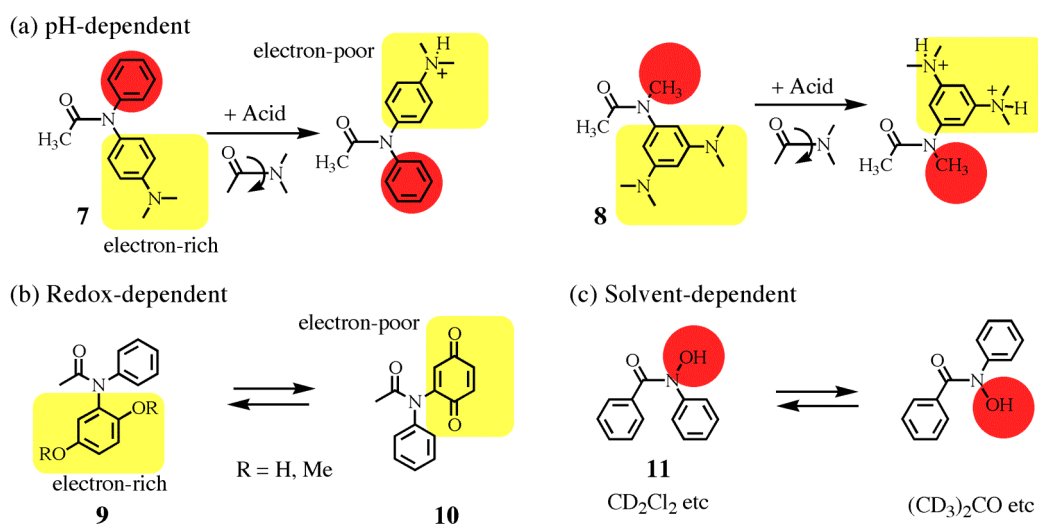


Fig. 7. Conformational alteration induced by environmental conditions

芳香環の性質を酸化還元反応によって変換する例として化合物 **9** と **10** を創製した(図7b)<sup>15)</sup>。この系では、電子密度の高いヒドロキノン環を酸化して得られる *p*-キノン環がフェニル基よりも相対的に電子密度が低くなり、立体転換が起こると考えた。化合物 **9** および **10** の結晶構造では、フェニル基がアミド結合カルボニルに対して、それぞれ *cis*, *trans* 側に位置した構造を有し、溶液中でもこの構造を優先していた。ヒドロキノン体 **9** とキノン体 **10** とは、電気化学的方法で相互変換可能であり、酸化還元反応を利用して構造の反復的な相互変換ができる。

もう一つ、興味深い例としてヒドロキサム酸の立体転換を紹介する。ヒドロキサム酸はアミド結合上に水酸基を持つ化合物と捉えることができる。 $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  溶液中では、化合物 **11** は、ほぼ *cis* 型構造で存在しているが、 $\text{CD}_3\text{OD}$  中では *cis* 型の存在比が 49% まで減少し、アセトン- $d_6$  中では *trans* 型が主 (77%) となる(図7c)<sup>16)</sup>。*N*-メチルベンズアミドでは、このような溶媒依存性はみられない。さらに、化合物 **11** を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  およびアセトンから再結晶すると、それぞれ *cis*, *trans* 型アミド構造を持つ結晶が得られる。つまり、化合物 **11** は溶媒依存的に立体構造を変化させ、それぞれの溶液からアミド結合の立体が異なる結晶を与えることが示された。様々な化合物が結晶多形を与えることが知られているが、コンフォーマー間の変換のエネルギー障壁が小さいものが多く、化合物 **11** は、両コンフォーマーが溶液中で比較的遅い平衡にあり、その平衡が溶媒に

よって制御できる例として興味深い。

以上のようなアミド結合の立体転換を蛍光の変化によって可視化することができれば、環境応答能を蛍光センサーの認識部位として利用することも可能である。パイレンを導入した化合物 **12** は無置換のパイレンと同様の蛍光(350 – 400 nm)を示すが、*N*-メチル化した化合物 **13** は、より長波長領域(450 – 550 nm)の蛍光を示した(図8)<sup>17)</sup>。後者の蛍光はパイレンエキシマーによるものと考えられ、本化合物においてはアミド結合の立体化学を直接反映していることを示した。

従来、分子スイッチとして開発されてきた化合物は比較的分子量の小さい分子としては、1,2-ジアリールエテンの環化反応やアゾベンゼンの異性化反応を利用したものであり、これらの分子の場合は、構造変化に要するエネルギー障壁が高く、外からの刺激を受けることによって初めてその構造を変換する。上述したアミド結合の立体転換のように比較的エネルギー障壁の低い平衡反応を分子スイッチ機能へ応用できるのかは今後の研究課題である。一方で、アミド結合の立体の差異の可視化は環境応答型分子構造と組み合わせることにより、蛍光センサーのスイッチとして応用可能である。

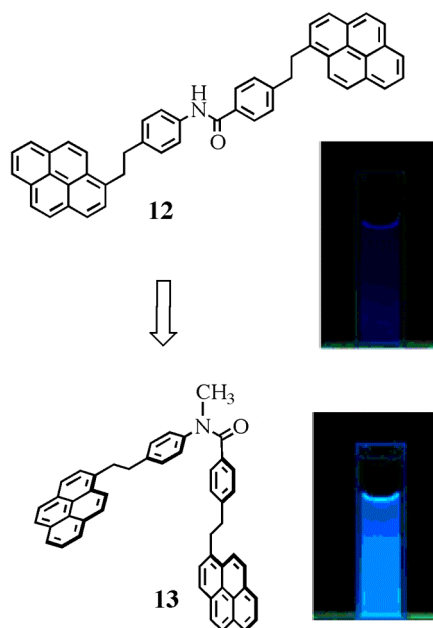


Fig. 8. Fluorescent properties of *trans*- and *cis*-amides

## 6. おわりに

今回紹介したアミド結合の立体特性は単純で一般性があり、また、水素結合や金属配位結合などの比較的強い相互作用に基づかないため、目的に応じて様々な分子設計が可能である。最初にも述べたように、本研究は基礎研究の段階ではあるが、生命科学や材料化学における応用をにらんで、研究を進めている。立体特性に基づく精密な分子設計により、その動的な立体挙動制御により、有用な化合物が創製できると考えている。

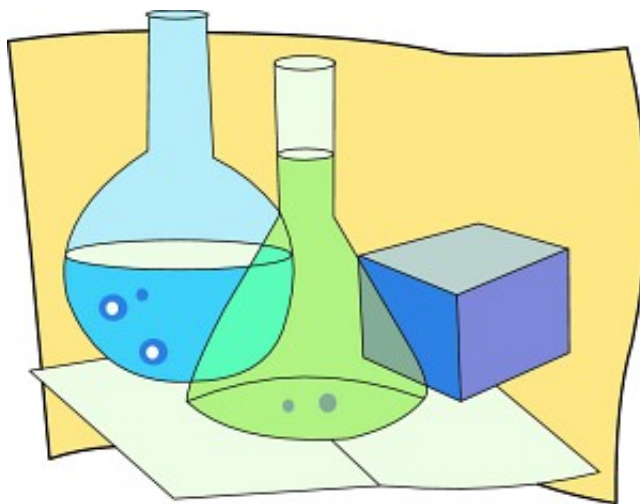
## 謝辞

本研究は、神奈川大学工学部横澤勉教授、東京医科歯科大学影近弘之教授、徳島文理大学香川薬学部東屋功教授、昭和薬科大学岡本巖准教授、理化学研究所内山真伸准主任研究員との共同研究として行われたものであり、ここに深く感謝いたします。

## 参考文献

- 1) S. Hecht, I. Huc, eds, *Foldamers*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- 2) 棚谷綾、影近弘之 「超分子サイエンス&テクノロジー」(監修:国武豊喜)第3章 1-1 節、467-476, **2009**.
- 3) Endo, Y.; Shudo, K.; Itai, A.; Hasegawa, M.; Sakai, S. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 5905-5924.
- 4) Kagechika, H. et al. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2292-2296.
- 5) 棚谷綾;東屋功;影近弘之. *有機合成化学協会誌* **2000**, *58*, 556-567.
- 6) Saito, S.; Toriumi, Y.; Tomioka, N.; Itai, A. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4715-4720.
- 7) Tanatani, A.; Yokoyama, A.; Azumaya, I.; Takakura, Y.; Mitsui, C.; Shiro, M.; Uchiyama, M.; Muranaka,

- A.: Kobayashi, N.; Yokozawa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8553-8561.
- 8) 小林長夫; 村中厚哉. *有機合成化学協会誌* **2006**, *64*, 735-743.
- 9) Tanatani, A.; Yamaguchi, K.; Azumaya, I.; Fukutomi, R.; Shudo, K.; Kagechika, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6433-6442.
- 10) Fukutomi, R.; Tanatani, A.; Kakuta, H.; Tomioka, N.; Itai, A.; Hashimoto, Y.; Shudo, K.; Kagechika, H. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6475-6478.
- 11) Kudo, M.; Hanashima, T.; Muranaka, A.; Sato, H.; Uchiyama, M.; Azumaya, I.; Hirano, T.; Kagechika, H.; Tanatani, A. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8154-8163.
- 12) B. L. Feringa Ed. *Molecular Switch*, Wiley-VCH, **2001**.
- 13) 岡本巖; 影近弘之; 棚谷綾. *有機合成化学協会誌* **2009**, *67*, 556-567.
- 14) Yamasaki, R.; Tanatani, A.; Azumaya, I.; Saito, S.; Yamaguchi, K.; Kagechika, H. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1265-1267.
- 15) Okamoto, I.; Yamasaki, R.; Sawamura, M.; Kato, T.; Nagayama, N.; Takeya, T.; Tamura, O.; Masu, H.; Azumaya, I.; Yamaguchi, K.; Kagechika, H.; Tanatani, A. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5545-5547.
- 16) Yamasaki, R.; Tanatani, A.; Azumaya, I.; Masu, H.; Yamaguchi, K.; Kagechika, H. *Crystal Growth Des.* **2006**, *6*, 2007-2010.
- 17) Hirano, T.; Osaki, T.; Fujii, S.; Komatsu, D.; Azumaya, I.; Tanatani, A.; Kagechika, H. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 488-491.



# 気になった論文

岡田 朋子 (おかだ ともこ)  
東京工科大学応用生物学部 助教  
tomoko@bs.teu.ac.jp

こちらに執筆する機会をくださり、ありがとうございました。現在私は、生命活動を解明するためのプローブ分子の創製に興味を持って研究を行っています。プローブ分子は、本来の目的を達成するために生命活動を阻害するものであってはならず、生命活動にうまく融け込めるものでなければなりません。また、目的とする細胞や生体由来の分子(核酸・タンパク・糖鎖など)と、プローブ分子との間にはたらく相互作用は、特異的であることが望まれます。これらの要求を満たすために、化学修飾で一分子内に複数種類の機能を付与する(武装化する?)わけですが、新しいプローブ分子の設計には、過去の報告例が非常に参考になります。そこで今回は、私が最近読んだ論文で、癌研究への展開を目的として人工的に構築したプローブに関するものを紹介します。

## Reversible Cell-Specific Drug Delivery with Aptamer-Functionalized Liposomes

Z. Cao, R. Tong, A. Mishra, W. Xu, G. C. L. Wong, J. Cheng, Y. Lu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 6494 – 6498 (2009).

強力な抗ガン剤は、有効な化学療法薬剤であると同時に、深刻な副作用をもたらす物質ですが、この副作用は、抗ガン剤を癌細胞に特異的に作用させれば軽減することが可能です。本論文で著者らは、アプタマー(ある物質に特異的に結合する配列を持った一本鎖オリゴヌクレオチド)を利用して、強力な抗ガン剤であるシスプラチンを癌細胞に特異的に作用させるとともに、アプタマーの相補鎖を解毒剤として利用する方法を報告しています。アプタマーおよびその相補鎖を用いて抗ガン剤の送達を制御した報告は初めてであり、これまでに報告されている抗体を利用した方法とは異なります。具体的な分子設計は、図1(a)に示すように、乳ガン細胞の表面に過剰発現するNCL(細胞増殖に関わるタンパク)に特異的に結合する

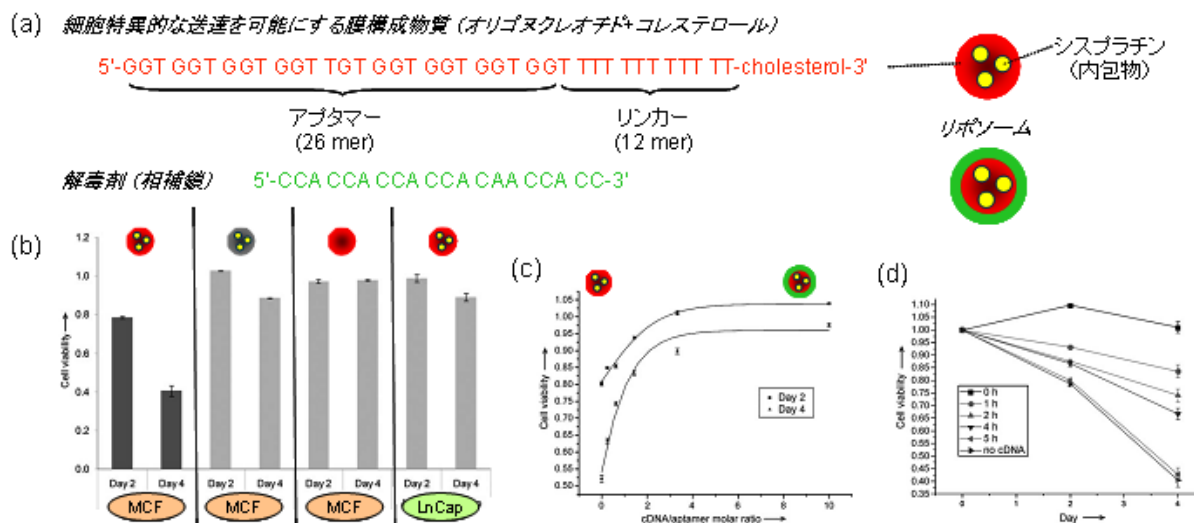


図1 (a) アプタマーと相補鎖の設計およびリポソームの概略図、(b) 送達方法と細胞生存率、(c) 細胞生存率 vs. 相補鎖の濃度依存性、(d) 細胞生存率 vs. 相補鎖の反応時間 (論文より抜粋、一部改変)

26-merのアプタマー(AS1411由来)に、リンカーとコレステロールを連結しています。この分子を用いてシステインを内包したアプタマー修飾リボソームを作製し、細胞に反応させると、MCF-7(NCLを過剰に発現している)の細胞生存率は、LnCap(NCLを過剰発現していない)のそれよりも低くなります(図1(b))。また、コントロールの配列を持ったオリゴヌクレオチドを含むリボソームや、シスプラチンを内包させないリボソームの場合と比較しても細胞生存率が低いことが分かりました。これらの結果は、アプタマーがNCLと特異的に結合したことによってエンドサイトーシスが起り、リボソーム内部のシスプラチンが作用して細胞死が引き起こされたことを示しています。つづいて著者らは、相補鎖(cDNA)による解毒作用を確認するため、cDNAの濃度や作用させるタイミングが細胞生存率に及ぼす影響(図1(c), (d))について評価しています。cDNAの濃度が高い方がMCF-7の生存率が高く、cDNAを加えない場合は4日後の生存率は約50 %であるので、cDNAによるシスプラチンの解毒作用を確認することができました。また、cDNAをリボソームと同時(0 時間)に作用させた場合の細胞生存率はほぼ100 %であり、作用させるタイミングが遅いほど、生存率が低いことが分かります。以上の結果から、アプタマーを用いてシスプラチンを癌細胞へ特異的に作用させることが可能であると確認できました。タイトルにはreversibleとありますが、cDNAを除去してシスプラチンの毒性が復活するか否かのコメントはありませんでした。しかし、アプタマーは、ヌクレアーゼで分解される物質であり毒性が低く、また、抗体に比べて合成や修飾が容易なので、特異的な相互作用を狙うターゲティングのための分子として非常に魅力的だと思います。

## A Two-Photon Tracer for Glucose Uptake

Y. S. Tian, H. Y. Lee, C. S. Lim, J. Park, H. M. Kim, Y. N. Shin, E. S. Kim, H. J. Jeon, S. B. Park, B. R. Cho, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 8027 – 8031 (2009).

癌細胞のグルコース(Glc)の細胞内取込み速度は速いことが知られています。本論文は、このことを利用し、癌細胞の可視化を目的とした新たなプローブ分子(図2(a))に示すAG1とAG2)を創製し、two-photon microscopy (TPM)を用いてグルコースの細胞内取込みを可視化した初めての報告です。TPMは、one-photon microscopyと比べて細胞のより深部まで観察することが可能であり、また励起光を局在化させて長時間観察することが可能です。まず著者らはAG1とAG2がA549とHeLa細胞(癌細胞)に特異的に取り込まれることを示し、さらにAG2の方がAG1よりもTPM画像で明るく可視化に適しており、50  $\mu$ M以下では無毒であることを確認しました。続いて、AG2を反応させたA549をTPMで観察し(図2(b))、AG2が2つの異なる極性環境下におかれていることを明らかにしています。AG2は極性環境によってその色を変化させるので、著者らはこれらを、より疎水的である細胞膜と、より親水的である細胞質の2種類であると推察しました。細

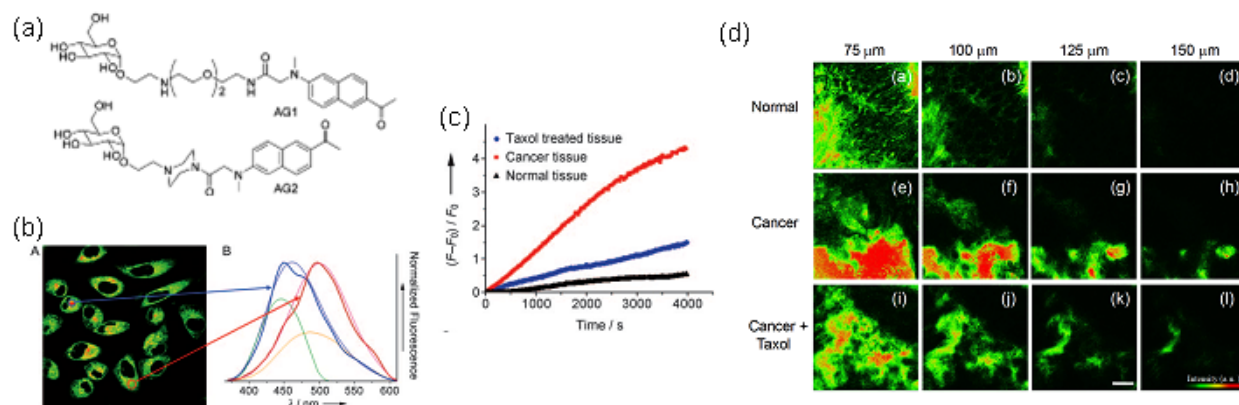


図2 (a) プローブ分子(AG1 と AG2)、(b) A549 (incubated with 50  $\mu$ M AG2) の TPM 画像と蛍光スペクトル(赤:親水的、青:疎水的)、(c) AG2 取込み量の時間変化、(d) AG2 を 4 h 反応させた後の TPM 画像 (論文より抜粋、一部改変)

胞内に取り込まれたGlcの量を評価するには、膜表面に結合しているだけのAG2由来のシグナルを省くことが効果的であり、そのためには520 - 620 nmで観察することが適していると分かります。また、D-GlcはAG2の取込みを阻害するが、L-GlcやD, L-Alanineが阻害しないことは、AG2のGlc部分が取込みに関与していることを示します。次に、図2(c)は抗ガン剤であるtaxolが細胞代謝を抑制する様子を、TPMで確認した結果です。大腸癌細胞のAG2の取込み量に比べて、taxolを作用させた癌細胞では取込み量が少なく、正常細胞に近い値を示すことが分かります。また、3000 s以上退色無く観察できることが確認できました。細胞の深さごとにTPM画像を記録した図2(d)からは、取込みが細胞の表面で行われており、4000 s後では、より深部である150  $\mu\text{m}$ までAG2が浸透していないことが分かります。以上から、著者らはAG2とTPMを用いた手法は、抗ガン剤のスクリーニングに有効であることを示しました。また、near-infrared (NIR) imaging 方法の観察対象がネズミなどのように大きいのに対し、TPMは細胞などマイクロメートルサイズを観察対象としており、数百ナノメートルの深さ方向の解像度を得るために有効な手法であると述べています。

### Synthesis and Evaluation of a Stable Bacteriochlorophyll-Analog and Its Incorporation into High-Density Lipoprotein Nanoparticles for Tumor Imaging

W. Cao, K. K. Ng, I. Corbin, Z. Zhang, L. Ding, J. Chen, G. Zheng, *Bioconjugate Chem.*, **20**, 2023 – 2031 (2009).

この論文は、NIR法で癌細胞を特異的に可視化するように設計した新しいプローブについて報告しています。このプローブは複数の分子で形成されており、図3(a)に示すように、染色剤(Bchl-BOA)、ターゲッティングのための分子(ApoA-1)を含んだ high-density lipoprotein nanoparticle (HDL-NP) です。Bacteriochlorophyll *a* (Bchl)にオレイル基を導入することによって、コレステロールエステル、リン脂質と混合してHDL-NPを作製したときにBchl-BOAを内包できます。さらに、癌細胞に特異的に過剰発現してる受容体(SR-BI)に親和性が高いApoA-1を用いることで、癌細胞へのターゲッティングを可能にしています。著者らが確立した手法で作製した粒子HDL-BchlBOAのサイズは、直径約10 nmであり、天然のHDLとほぼ一致します(TEM, DLSで確認)。このHDL-BchlBOAを、右腹部に腫瘍を持つマウスに静脈注射すると、図3(b)のように、時間経過と共に腫瘍付近にBchl-BOAが集まってくるのが分かります。組織検査の結果とあわせると、Bchl-BOAの蓄積量は、肝臓、副腎に次いで腫瘍と脾臓で高いことが分かりました。これは、SR-BIの発現量と一致した順であるため、ApoA-1がターゲッティングに寄与していることを示しています。癌細胞特異性はより高める必要がありますが、ApoA-1の代わりに、HDL-NPの表面にアプタマーやペプチドなどターゲットにあわせた物質を組み込めば、本論文と同様の手法で様々な目的の細胞を特異的に可視化できるため、汎用な手法であると思います。

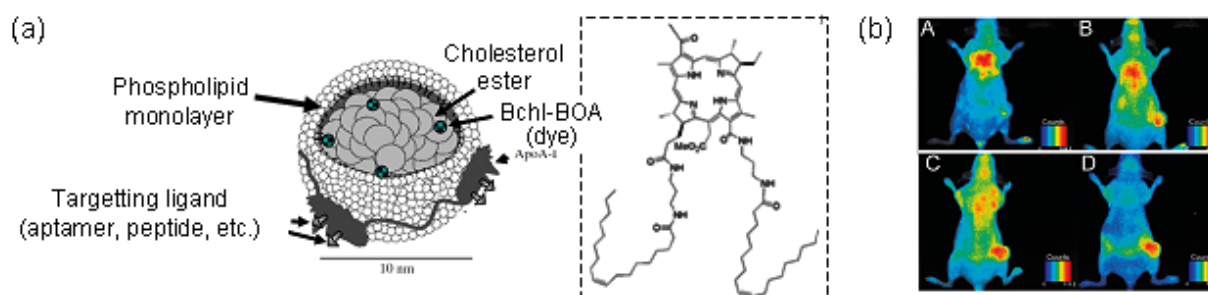


図3 (a) HDL-NPの概略図、(b) HDL-BchlBOA投与から(A) 1 h, (B) 3 h, (C) 6 h, (D) 48 h後のマウスのNIR fluorescence画像 (論文(本編および *J. Biomed. Nanotechnol.* 2007, 367 - 376)より抜粋、一部改変)

# 気になった論文

佐藤 しのぶ (さとう しのだ)

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 助教

shinobu@che.kyutech.ac.jp

この度は、生命化学研究レターの論文紹介への執筆機会を頂き、心より感謝致します。現在、私は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のセンター長である竹中繁織教授(工学研究院物質工学研究系応用化学部門 教授)の下、核酸に結合するインターカレータを利用した電気化学的遺伝子検出やインターカレータと核酸との相互作用に関する研究を行っております。最近、テロメア4本鎖DNAと当研究室で開発した化合物との相互作用解析や、テロメラーゼの電気化学的検出方法の確立を目指しています。このような研究を行っていく中で、気になった論文を3報紹介させていただきます。

## Tandem Application of Virtual Screening and NMR Experiments in the Discovery of Brand New DNA Quadruplex Groove Binders

S., Cosconati, L. Marinelli, R. Trotta, A. Virno, L. Mayol, E. Novellino, A. J. Oison, A. Randazzo, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 16336-16334 (2009).

4本鎖DNAに結合する分子は、テロメラーゼ阻害剤としての抗癌剤としての可能性があるため、現在多くの研究者により新規化合物が報告されています。その多くは、4本鎖DNAのグアニンカルテットにスタッキング相互作用するものが多いのですが、今回は、4本鎖DNA構造の溝に結合するグループバインダーについて興味深い論文があったので紹介します。

本論文はコンピュータシミュレーションとNMR測定により4本鎖DNAに結合するグループバインダーを探索したものです。2本鎖DNAに結合するグループバインダーは、マイナーグループに結合するものが多く報告されています。これらが、4本鎖DNAのグループに結合するかというと、それはかなり難しいといえます。4本鎖DNAの構造は、2本鎖DNAのマイナーグループとは化学的、構造的に大きく異なるためです。そこで、筆者らは、フリーのドッキングソフトウェアであるAutoock4 (AD4)を用いて、Life Chemicals databaseに掲載されている6000の化合物について4本鎖DNAとの相互作用を検討しました。用いた4本鎖DNAは、[d(TGGGGT)]<sub>4</sub> (PDB code 1S45, 図1参照)です。今回、筆者らが利用したDNAは、パラレル4本鎖構造を形成することが知られており、さらに4つの同一の幅の溝を形成しています。AD4によるシミュレーションで算出された $\Delta G_{AD4}$ は、-0.95 から -9.55 kcal/molの間となり、そのうち-6.0 kcal/mol以上の値の化合物は、相互作用が弱いものとして候補化合物として除去しています。残った候補化合物のうち、グアニン塩基と水素結合することが出来ないもの、核酸塩基のリン酸と静電的に相互作用できないものも除かれ、最終的に30の化合物についてNMR測定を行いました。筆者らは、6.8 mM d(TGGGGGT), 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 70 mM

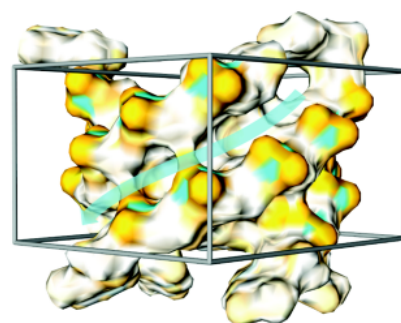


図 1. [d(TGGGGGT)]<sub>4</sub> による 4 本鎖 DNA.

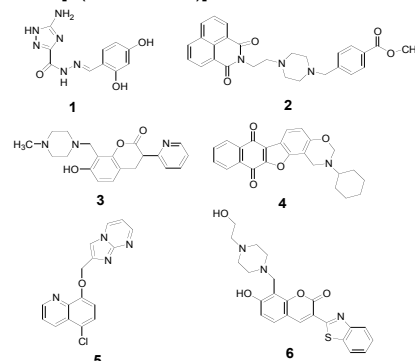


図 2. 4 本鎖 DNA にグループバインドする化合物.

KCl, 0.2 mM KCl, pH 7.0 水溶液(H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1) 2 mLに化合物を添加したときのNMR測定を行いました。化合物の添加に伴い、G3, G4のシグナルがドリフトしたのについては、グルーブバインドしていることが示唆されます。30の化合物のうち、図2に示す6つの化合物では、それらの添加に伴いG3, G4, G5, T6のピークがシフトしていました。これらの結果はAD4によるシミュレーションで得られた結合モデルとほぼ同じでした。

現在、4本鎖DNAに結合する化合物は、抗癌剤の候補化合物として様々なものが報告されています。その中でも、4本鎖DNAのGカルテット上にスタッキング相互作用するような分子の報告がほとんどで、同様の結合様式を持つ化合物であれば、設計は平面構造を持ち、Gカルテットに構造に適合するよう設計すれば、強く相互作用することが予想されます。しかし、今後は本論文と同様の手法を利用して4本鎖DNA、特にヒトテロメアDNAにグループバインドする新規化合物の報告が増えていくのではないかと思います。

# On the Nature of DNA Self-Assembled Monolayers on Au: Measuring Surface Heterogeneity with Electrochemical in Situ Fluorescence Microscopy

J. N. Murphy, A. K. H. Cheng, H. Z. Yu, D. Bizzotto, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 4042-4050 (2009).

現在考案されているDNAセンサの多くは、5'末端にアルキルチオールを持つDNAを固定化し、メルカプトヘキサノール(MCH)処理により自己組織化膜 (SAM) を形成することで調製されています。これまでに、DNA固定化基板の表面状態は、IRやXPS、AFMなどにより解析されてきていますが、その状態はほとんどが平均的な評価でしかありません。そのため、DNAの表面密度は明ら

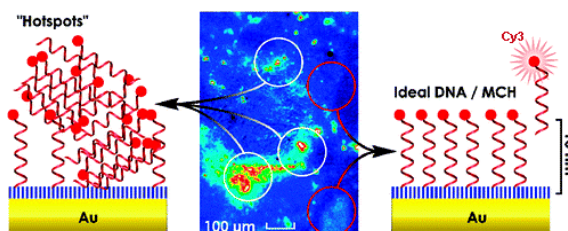


図 3. DNA 固定化電極の蛍光イメージング.  
(論文より一部改変)

かとなっても、表面の不均一性は不明なままでした。本論文では、5'末端はチオール化、3'末端はCy色素で修飾した30 merの蛍光ラベル化オリゴヌクレオチドを金電極に固定化し、電気化学的に蛍光イメージングすることにより、電極表面の不均一性について評価しています。

蛍光色素は、金基板の表面に近づくと消光されます。また、電極の表面電位が正電位側では、DNAは電極表面に引きつけられ、負電位側では電極表面と反発します。Cy色素修飾DNA固定化電極を調製し、その表面を蛍光イメージングしたところ、蛍光強度の強い箇所がありました。Cy色素修飾DNAは、電極表面から離れていなければ蛍光は強くないため、固定化されているDNAはクラスター状態でホットスポットを形成している箇所が存在していることが明らかとなりました。しかし均一なDNA固定化表面であるかどうかの評価は、蛍光強度だけでは強度が小さく評価することが難しいため、DNAを還元脱離させたときの蛍光強度変化から表面状態の評価を行っています。まず、一般的な手順（まずDNAを固定化し、MCH処理）で調製されたDNA固定化電極を用いました。電極の表面電位を0 mVから-1.5 mVまで変化させたときの蛍光強度をモニタリングします。蛍光の強度は -700 mVから強くなり始め、-725 mVで最大となり、さらに電位を負側に振ることで蛍光は確認されなくなりました。これは、725 mVでDNAが電極表面から脱離したことを示しています。このとき、脱離ピークには、-800 mV付近に小さなショルダーがあり、これはクラスターの脱離を示唆しています。この様子は、リアルタイム計測でも確認されており、-700 mV付近で蛍光が動き出す様子が動画として報告されています。筆者らは、均一な表面を作成するために、まずMCH処理した電極にDNA溶液を作用させることでCy色素修飾DNA固定化電極を調製し、この電極でも還元脱離の様子を確認しました。その結果、DNAの還元脱離は-625 mVから開始され、クラスターの脱離に伴うショルダーは確

認めませんでした。蛍光イメージングでも均一な表面状態が得られています。これより、まずMCHによるSAMを形成し、その後チオール化DNAを処理する手法を用いることで、均一な表面を調製出来ることが提案されました。

DNA固定化電極によるバイオセンサは、蛍光色素や電気化学活性な色素を3'末端にラベル化したプローブを用いて、アナライトとの相互作用に伴うDNAの形態変化による応答の変化をモニタリングするものが多く報告されています。この場合、電極の均一性は非常に重要なファクターとなります。DNAだけでなく、ペプチドや蛋白質チップの開発でも、今後、表面の均一性は議論されるものと思われます。

### Label-free Biomarker Detection from Whole Blood

E. Stern, A. Vacic, N. K. Rajan, J. M. Criscione, J. Park, B. R. Ilic, D. J. Mooney, M. A. Reed, T. M. Fahmy, *Nat. Nanotech.*, Published online 13 December 2009.

最後は、バイオセンサに関する論文を紹介します。様々なDNAや蛋白質をターゲットとしたバイオセンサに関する研究は数多く報告されていますが、全血サンプルの検出例はまだ多くはありません。それは、血液中の様々な物質が、センサ表面に吸着するといった問題があるからだと思います。多くのセンサでは、まずサンプルを別のチャンバーで精製し、そのサンプルをアッセイに用いるという手法が用いられていますが、これには多くの時間と手間が必要となります。今回紹介する論文ではわずか20分で、血液中の腫瘍マーカーであるPSAとCA15.3の精製と分析を一つのチップで行っています。

筆者らが開発したチップは、ターゲットであるPSAとCA15.3をキャプチャーするチャンバーと分析するチャンバーに分かれています。キャプチャー抗体は、光切断活性物質を介してチャンバーに固定化されています。血液サンプルを10  $\mu\text{L}/\text{min}$ の速度で1分泳動しキャプチャー抗体に血液サンプル中のアナライト(PSAやCA15.3)を結合させます。その後1xPBS bufferで3分洗浄します。分析用のbufferであるbicarbonate bufferで1分洗浄後、10分間UVランプで光照射するとキャプチャー抗体が基板上から遊離します。その後溶液を、分析チャンバーへと移し、分析チャンバー内のナノワイヤに固定化された2次抗体と反応させます。分析は、電界効果トランジスタ(FET)により行います。FETは、電極表面の電荷密度の変化をモニタリングします。キャプチャー抗体-抗原コンジュゲートが2次抗体に結合すると、電極表面の電荷密度が大きく異なるため、これを測定することでラベルフリー分析を達成することが出来ます。実際に、血液中の2.0 ng/mLのPSAや15 U/mLのIC15.3が検出できています。

臨床サンプルを取り扱う場合、それらに含まれているターゲット以外の蛋白質などの影響は非常に大きな問題です。今回の報告では、光照射で一次抗体を簡単に基板上から遊離させることが可能であり、ターゲットとなる抗原をキャプチャーする反応場と検出する反応場を分離したことで、短時間で血液サンプルでもノンラベルで検出可能だったのだと思います。より短時間で、簡便な操作で検出可能なバイオセンサは、今後、検出デバイスの開発や発展により飛躍的に発展していくと思われます。

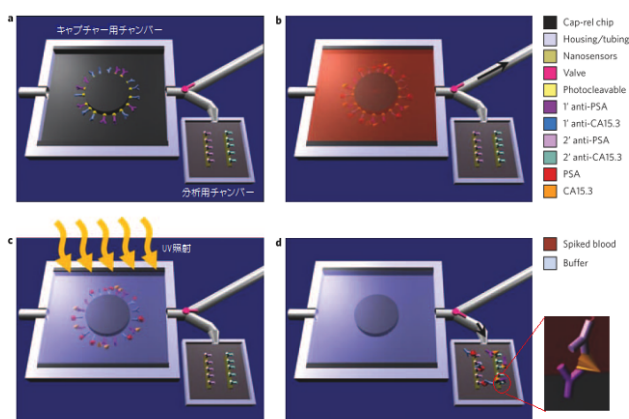


図4. (a)サンプル導入前, (b)血液サンプル導入中. 抗原が一次抗体と反応, (c)UV照射により一次抗体を基板上から遊離させる, (d)分析チャンバーで二次抗体と反応. (論文より一部改変)

# 気になった論文

高岡 洋輔 (たかおか ようすけ)

京都大学工学研究科 合成・生物化学専攻 博士後期課程3年 浜地研究室

ytakaoka@0601.mbox.media.kyoto-u.ac.jp

この度は、生命化学研究レター「論文紹介」の機会を与えていただき誠に感謝致します。現在私は、京都大学工学研究科の浜地格教授のご指導の下、細胞内在性蛋白質の化学修飾法の開発や、蛋白質の活性を細胞内で検出する MRI プローブの開発などを行なっています。蛋白質の機能を変換・利用する化学的手法を細胞内で適用することが出来れば、生命現象の可視化や薬剤開発など様々な分野での応用が期待されます。蛋白質の機能変換においては、ケミカルプローブとともに蛋白質を遺伝子レベルで改変する方法も強力であり、様々なアプローチが試みられております。今回はその両者に関して紹介させていただきます。まずケミカルプローブを用いた論文として「酵素前駆体の活性化を引き起こす小分子」、「神経伝達物質の放出過程を単一シナプスレベルで可視化する蛍光分子」について、また蛋白質を遺伝子的に改変したセンサーの例として「個体内での  $\text{Ca}^{2+}$  の可視化」について紹介させていただきます。いずれの場合も実際に可視化して意義のある物質を対象としており、生命科学における強力なツールとして期待されます。

## 1. Small-Molecule Activators of a Proenzyme

D. W. Wolan, J. A. Zon, D. C. Gray, J. A. Wells, *Science*, **326**, 853-858 (2009).

彼らはこれまでに、ユニークな化学的アプローチによって酵素阻害剤を効率的に探索する Tethering という方法を開発してきたグループです(一例として *Nat. Biotechnol.*, **21**, 308 (2001))。このような阻害剤の効率的なスクリーニング法は近年いくつか報告されつつありますが、今回彼らが新たに報告したのは、阻害剤ではなく「活性化剤」でした。

多くの酵素は、体内で前駆体として保存されており、しかるべき時に切断を受けるなどして活性化され、その機能を発揮することが知られています。特に Caspase は、Caspase 前駆体 (procaspase) から自己加水分解を起こし成熟型 caspase になることで、アポトーシスを誘導したり幹細胞からの表現形を決定付けたりする非常に重要な酵素です。これを人為的に制御出来れば、例えばガン細胞のみの細胞死を誘発したり、アポトーシスに関わるシグナル伝達機構の解明にも役立ちます。そのような背景のもと彼らは、Procaspase-3, -6,

-7 に作用させて Caspase を活性化する化合物を、ランダム化合物ライブラリーの中から選別することを試みました。その中で、1541 と呼ばれる化合物(クマリン誘導体、図 1A) が、 $\text{EC}_{50}$  にして 2.4  $\mu\text{M}$  (Procaspase-3) で作用する事を見出しました。試験管内でこのメカニズムを考察したところ、1541 は Procaspase に結合すると同時に構造を規定し、それに伴って自己加水分解を誘発することが示唆

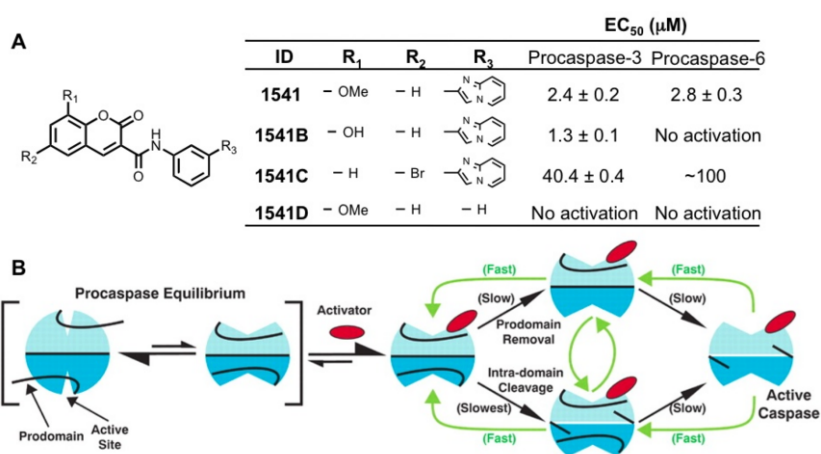


図1(a) 化合物1541類縁体の構造式と、Procaspase-3, -6に対する $\text{EC}_{50}$ 。(b) Wellsらによって提唱された活性化剤によるProcaspaseの活性化メカニズム。

されました(図1B)。このようなメカニズムで働く化合物はこれが最初の例となるため、今後さらなる構造の最適化も期待できると思われます。さらに実際に、この化合物 1541 がガン細胞のアポトーシスを誘導する事

や、1541 の標的が細胞内でも Procaspase-3 であることなどを、その他のアポトーシス誘導剤との比較などから証明しています。彼らの報告は、既存のアポトーシス誘導剤と異なり、直接的に Caspase を標的とする点で新規性の高いものであり、Proenzyme 標的薬剤の開発は、今後活発に研究がなされる新分野として注目されます。

## 2. Fluorescent False Neurotransmitters Visualize Dopamine Release from Individual Presynaptic Terminals

N. G. Gubernator, H. Zhang, R. G. W. Staal, E. V. Mosharov, D. B. Pereira, M. Yue, V. Balsanek, P. A. Vadola, B. Mukherjee, R. H. Edwards, D. Sulzer, D. Sames, *Science*, **324**, 1441-1444 (2009).

神経細胞間での情報伝達は、神経伝達物質が内包されたシナプス小胞の、シナプス前細胞からの放出と後細胞への融合によって起こり、両過程が厳密に制御されています。このシナプス小胞の動きを直接可視化することが出来れば、記憶や学習の複雑なメカニズムを知る鍵になります。これまでにシナプス小胞膜を蛍光色素で染色する試み(一例として、Q. Zhang *et al*, *Science*, **323**, 1448 (2009))などが報告されつつありますが、神経伝達物質の放出を「単一シナプスレベルで可視化」した例はありませんでした。彼らは今回これを達成する手法として、神経伝達物質の擬似蛍光分子(Fluorescent False Neurotransmitters, FFNs)を用いた方法を報告しています。

彼らが標的としたのは、代表的な神経伝達物質の一つであるドーパミンです。ドーパミンは生物行動の動機に深く関わっており、日常のあらゆる場面で必要とされます。このドーパミンを含むモノアミンは、VMAT2 (vesicular monoamine transporter 2) と呼ばれる膜タンパク質を介してシナプス小胞から放出されており、彼らはこの VMAT2 の基質類似体在设计することにしました。もともと VMAT2 は、ドーパミン以外にもセロトニン、ノルエピネフリンなど、モノアミン系の伝達物質だけでなく、合成分子をも輸送するなど、緩い基質選択性が知られていました。これら基質の共通点が、一級アミンと芳香属化合物が連結したものであることに着目して、彼らは蛍光色素であるクマリンとモノアミンを単純につないだだけの偽性神経伝達物質 (FFNs) として、FFN511 (図2A)を設計しました。

実際にクロム親和性細胞をモデル系として、FFN511 を添加して、細胞内で形成される小胞の観察を二光子励起の蛍光顕微鏡で行なったところ、細胞内部で顆粒状の蛍光が観察されました(図2B)。この顆粒は、刺激に応じて exocytosis 経路で細胞外に放出される挙動を確認しています。さらに実際に、マウスの脳切片を染色したところ、神経組織でもドーパミンの局在を可視化する事にも成功しました。これは、ドーパミンを作り出すチロシン水酸化酵素をプロモーターとする GFP を発現するトランスジェニックマウスを用いて、この GFP と FFN511 とが

ほぼ共局在する(GFPが発現する細胞では、同時にドーパミンが生成している)ことや、既存のシナプス小胞を染色する FM1-43 と一部が共局在する事などから

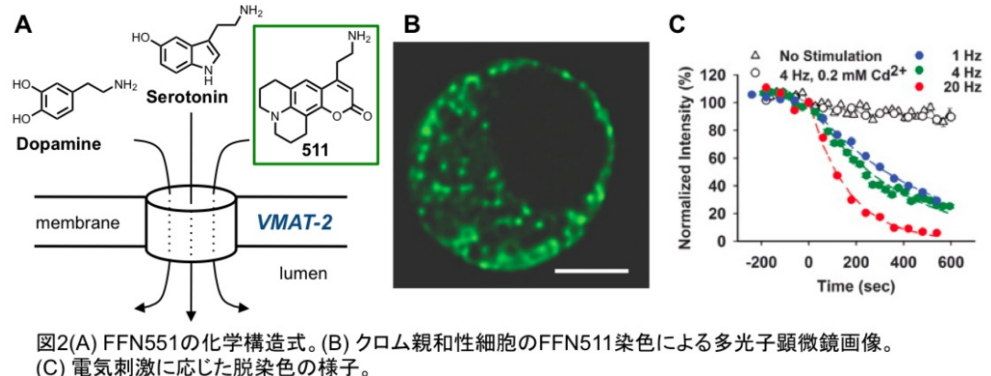


図2(A) FFN511の化学構造式。(B) クロム親和性細胞のFFN511染色による多光子顕微鏡画像。(C) 電気刺激に応じた脱染色の様子。

から確かめています。さらに、この FFN511 で染色した神経細胞に電気刺激を与えると、シナプス内部の FFN511 蛍光が減少する挙動を確認しました((図2C)。これは、FFN511 と同時に「ドーパミンが VMAT2 を介して細胞外に放出された」ことを示唆しており、実際に神経伝達物質の可視化に成功したことになります。

この FFN511 を用いて単一のシナプス小胞の動きを可視化する事で、その空間不均一性などの観察を直接観察することにも成功しました。この FFN511 は、既存のシナプス小胞染色剤や GFP マーカーなどと併用する事ができるため、今後様々な新知見が得られると考えられます。このような単純な構造でも、アイデア次第で便利な分子を作り出す事が出来る、非常に明快な例であると思われます。

### 3. Imaging Neural Activity in Worms, Flies and Mice with Improved GCaMP Calcium Indicators

L. Tian *et al.*, *Nat. Methods*, **6**, 875-881 (2009).

### 4. A Genetically Encoded Reporter of Synaptic Activity *in vivo*

E. Derosti, B. Odermatt, M.M. Dorostkar, L. Lagnado *et al.*, *Nat. Methods*, **6**, 883-889 (2009).

$\text{Ca}^{2+}$  イオンは、細胞内で働くセカンドメッセンジャーとして最も重要なイオンであり、これを可視化するプローブの開発は現在までに様々な方法で行なわれてきました。特に動物個体内において特定の細胞での  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行なうには、蛋白質性の  $\text{Ca}^{2+}$  センサーが非常に強力なツールとなり、様々な発展が遂げられてきました。その蛍光検出のメカニズムは似通っており、蛍光蛋白質に  $\text{Ca}^{2+}$  結合ドメインとしてカルモジュリン(CaM)と M13 ペプチドを導入し、その結合前後での構造変化を利用したものが主であります。ただし、いずれの場合も (1) Signal-to-noise 比(SNR)の低さ、(2) 光耐性・プロテアーゼ耐性、(3)  $\text{Ca}^{2+}$  への結合親和性などいくつかの問題をはらんでおり、個体内での観察は未だ困難でありました。

今回2グループが同時期に、別々のアプローチでこれらの問題の解決に挑んでいます。ベースにしたのは、一波長蛍光変化型の蛍光センサーである GCaMP (GFP-CaM probe)であり、最初の報告から現在までに様々な改変がなされてきました。Tian らは、この GCaMP の変異体である GCaMP2 を元に、直接一次配列を改変して性能を向上させました (図 3A)。<sup>3</sup> まずは N 末端残基の改変により細胞内での安定性を 40% 向上させ、さらに CaM と M13 の部分に変異をかけることで Ca 結合前後での変化率をこれまでの3倍に、 $\text{Ca}^{2+}$  との結合を 1.3 倍に向上させる事に成功しました。実際に開発した GCaMP3 を、線虫やショウジョウバエ、マウスなどのモデル動物に対して適用し、その性能を確かめています。また Derosti らのグループでは、SNR の向上をセンサーの局在によって達成するアプローチを取りました (図 3B)。<sup>4</sup> 具体的には既存の GCaMP2 に、シナプス小胞に局在させるシグナル配列として、Synaptophysin を連結 (Syn-GCaMP2) し、シナプス小胞レベルでの局所観察を行なう事に成功しました。彼らも個体モデルとしてゼブラフィッシュの体内に Syn-GCaMP2 を発現させ、*in vivo*  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングに成功しています。いずれの方法も合理的な設計に基づくものでありますが、未だ発展の余地が残されていることも感じます。これらの報告はいずれも一波長の蛍光変化ですが、例えば内部標準の蛍光蛋白質を融合するだけでレシオ検出型のセンサーも構築できる事や、いずれは蛍光小分子プローブに匹敵する量子収率と蛍光変化を起こすものも開発できると述べられていました。今回紹介した高精度な蛋白質性センサーと蛍光プローブとの併用は、生命現象の理解に直接つながるものと考えられます。

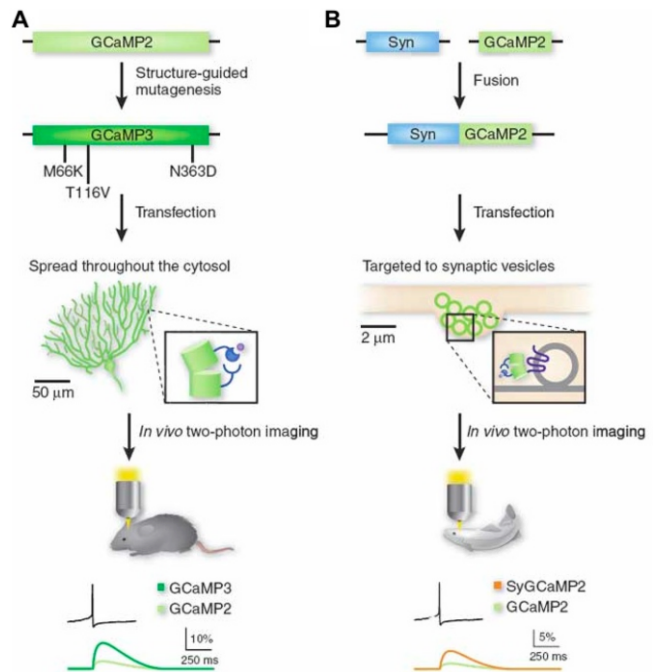


図3(A) TianらのGCaMP3, (B) DreostiらのSynGCaMP.

## 気になった論文

藤原 大佑 (ふじわら だいすけ)

大阪府立大学大学院理学系研究科 生物科学専攻 博士後期課程 3 年

fujiiwara04@b.s.osakafu-u.ac.jp

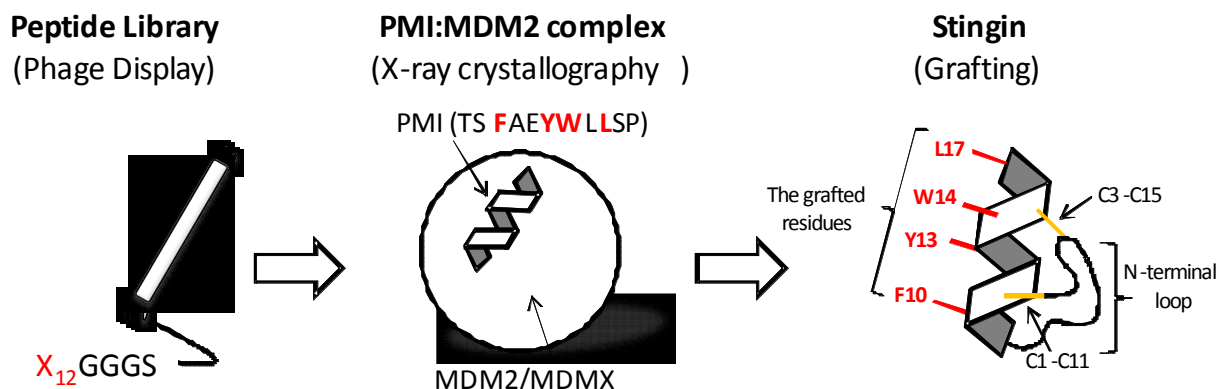
この度は生命化学研究レターへの執筆機会を頂き心から感謝申し上げます。現在私は、大阪府立大学大学院の藤井郁雄教授のもとで、ファージ表層提示ペプチド・ライブラリーを用いてプロテイン・キナーゼを選択的に制御するリガンド獲得を目指し研究を行っています。私は、プロテイン-プロテイン相互作用を制御する分子の設計と、選択的プロテインキナーゼ阻害剤の分子設計に興味を有しています。まず最初に前者に関連した論文を 2 報紹介致します。最後に、後者に関連した論文を 1 報ご紹介致します。

### Apamin as a Template for Structure-Based Rational Design of Potent Peptide Activator p53

C. Li, M. Pazgier, M. Liu, W-Y. Lu, W. Lu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 8712-7815 (2009).

最初にご紹介するのは、p53-MDM2/MDMX 相互作用を阻害する小さなタンパク質(Miniprotein)の合理的設計法に関する論文です。癌抑制因子である p53 は Oncogenic タンパク質の MDM2 或いは MDMX によって負に制御されています。MDM2/MDMX の p53 結合ポケットをブロックするアンタゴニストは、細胞周期停止やアポトーシスを制御する p53 経路を活性化し腫瘍細胞を殺すことから、抗癌剤として期待されています。

まず、今回の論文に先立ち著者らは、ファージ表層提示ペプチド・ライブラリーからMDM2/MDMX 結合性 12-mer ペプチド PMI (p53-MDM/MDMX inhibitor)を獲得し、PMI-MDM2/MDMX の複合体の立体構造を X 線結晶構造解析により明らかにしました(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4665 (2009))。大変興味深いことに、PMI (TSFAEYWLLSP)は結合時に両親媒性の $\alpha$ -ヘリックス構造を形成していました。結合に重要なアミノ酸残基(Phe19, Tyr22, Trp23, Leu26)の立体配座が、相当する p53 のヘリックス部位アミノ酸残基と酷似していました。この PMI の 4 残基をハチ毒 Apamin ヘグラフティングして Stingin と名付けました(Fig. 1)。Apamin とは、18 アミノ酸からなるタンパク質で N 末端側のループと C 末端側の $\alpha$ -ヘリックスから構成され、2 つのジスルフィド結合(C1-C11, C3-C15)により安定化された可溶性タンパク質です。stingin 5



**Fig. 1** MDM2 結合性ペプチドの分子設計. まず、ファージ表層提示ペプチドライブラリーを用いて MDM2/MDMX 結合性 12-mer のペプチド(PMI)を得た(左図)。次に、と MDM2(MDMX)の X 線結晶構造解析を行い、結合に重要なアミノ酸残基を決定した(中図)。最後に、それらアミノ酸を土台分子 Apamin ヘグラフティングし Stingin と名付けた(右図)。

は X 線結晶構造解析の結果、土台分子 Apamin の立体構造を保持していました。また、stingin 1・MDM2 の複合体の X 線結晶構造解析結果の結果、Apamin 構造を維持し、グラフトした 4 残基は PMI・MDM2 複合体と同様の立体配座をとることが分かりました。stingin 1 と stingin 5 の MDM2 に対する解離定数 ( $K_d$ ) はそれぞれ  $25.1 \pm 4.0$  nM、 $17.7 \pm 4.0$  nM でした。ファージ・ディスプレイ法、X 線結晶構造解析、さらに天然タンパク質 (apamin) へのグラフティングを組み合わせた合理的設計法を用い、p53-MDM2/MDMX 相互作用を阻害する Miniprotein を獲得した大変興味深い研究です。

### In Silico Improvement of $\beta^3$ -Peptide Inhibitors of p53-hDM2 and p53-hDMX

J. Michel, E. A. Harker, J. Tirado-Rivas, W. L. Jorgensen, A. Shepartz, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 6356-6357 (2009).

本研究は 1 報目と同様 p53-hDM2/hDMX 相互作用の阻害剤の分子設計に関するもので、ペプチドミメティクスに関する研究例です。 $\beta$ -ペプチドを用いたペプチドミメティクスは、天然のペプチドと比較してプロテアーゼに対する耐性があることから、短鎖は経口摂取可能な医薬品として、長鎖は薬物動態の点で半減期がより長い静脈注射の投与薬として注目を浴び活発な研究が行われています。中でも、Shepartz 博士らは $\beta^3$  ペプチド(Fig.

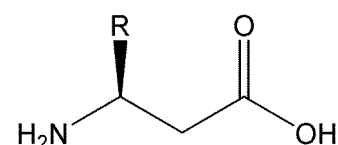


Fig. 2  $\beta^3$  アミノ酸

2)を用い、単量体でヘリックスを形成する $\beta^3$ -ペプチド 14-ヘリックス(以下  $3_{14}$ -helical scaffold; ヘリックス 1 回転が 14 原子で構成される)を *De Novo* 設計しました (*J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4022 (2003)). その一方で、p53 由来ペプチド p53AD<sub>15-29</sub> と MDM2 の複合体の X 線結晶構造解析が報告されていました。p53AD<sub>15-29</sub> 中にあり MDM2 の疎水的な溝に結合するアミノ酸側鎖 L, W, F に相当する $\beta^3$ L,  $\beta^3$ W,  $\beta^3$ F をもつ  $3_{14}$ -ヘリックスペプチド $\beta$ 53-1 の設計に成功しました (*J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 9468 (2004)). また溶液中で 14-ヘリックス構造をとることを確認しました (*J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4118 (2005)). さらに $\beta^3$ アミノ酸の誘導体を用い結合親和力を 10 倍改善した $\beta$ 53-13 を獲得しました(*Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 2038 (2009)). 今回紹介する論文では、 $\beta$ 53-8 を土台分子として *in silico* で非天然アミノ酸を導入した $\beta$ 53-8 誘導体を作成しました。 $\beta$ 53-8-hDM2/hDMX 相互作用と $\beta$ 53-8 誘導体-hDM2/hDMX の自由エネルギー差  $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$  をそれぞれ予測し、*in vitro* で実際の結合親和力を測定して予測結果を検証しました。p53AD<sub>15-29</sub>,  $\beta$ 53-8, および  $\beta$ 53-16 の hDM2 に対する結合親和力は蛍光ラベルしたペプチドを用いて蛍光偏光解消測定により求めま

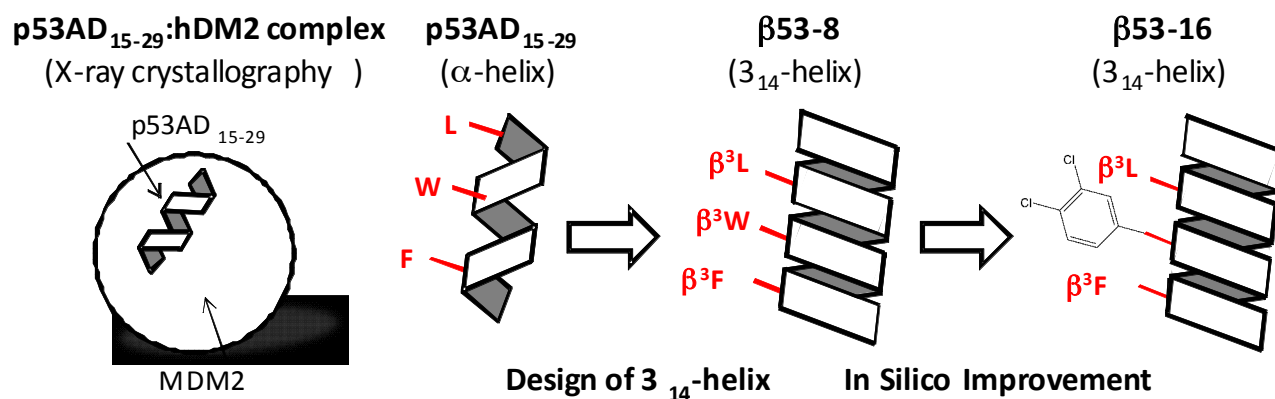


Fig. 2 hDM2 結合性ペプチドの分子設計。p53 由来ペプチド p53AD<sub>15-29</sub> と MDM2 の複合体の X 線結晶構造解析をもとに、Shepartz 博士らが設計した  $3_{14}$ -ヘリックスへ、結合に重要なアミノ酸残基を移植した(ペプチド $\beta$ 53-8)。さらに *in silico* improvement を実施し、結合親和力を向上させた(ペプチド $\beta$ 53-16)。

した。結果、 $K_d$  値はそれぞれ 72.5 nM, 204 nM, 27.6 nM で、 $\beta 53-16$  の結合親和力は  $\beta 53-8$  と比較して 7.3 倍向上しました。X 線結晶構造解析と  $\beta^3$  ペプチドの 14-ヘリックスの設計、さらに *in silico* improvement を組み合わせて p53-hDM2/hDMX 相互作用の阻害剤設計を行った大変興味深い研究です。

## A Chemical Genetic Method for Generating Bivalent Inhibitors of Protein Kinases

Z. B. Hill, B. G. K. Perera, D. J. Maly, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 6686-6688 (2009).

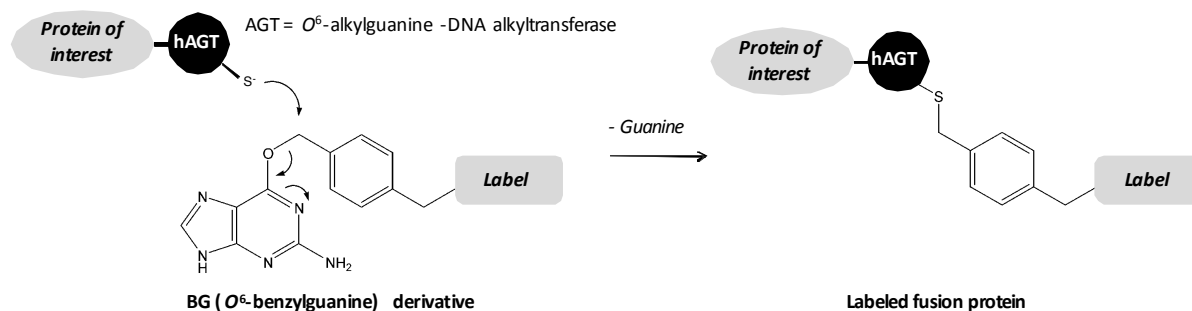


Fig. 3  $O^6$ -アルキルグアニン-DNA 転位酵素 (AGT)と  $O^6$ -ベンジルグアニン誘導体(BG)を利用した融合タンパク質ラベル法

最後にご紹介するのは、Fig. 3 で示した Johnsson 博士らによる融合タンパク質ラベル法(*Methods* **2004**, 32, 437-444)を利用したプロテインキナーゼ選択的 2 価阻害剤の設計に関する論文です。今回標的としたプロテインキナーゼは Src および Abl キナーゼです。両キナーゼは、高度に保存された相同性触媒ドメイン(SH1)を有しており、SH2 ならびに SH3 ドメインにより制御されています。SH1 は基質結合部位(ATP とタンパク質の結合部位)を有しており、その全アミノ酸残基はリン酸基転位反応に必須です。Src および Abl キナーゼは互いに類似することから選択的阻害剤の設計は大変困難でした。Maly 博士らは Src ファミリー選択的および Abl 選択的な 2 価阻害剤を Fig. 3 の融合タンパク質ラベル化法を用いて設計しました(Fig. 4)。

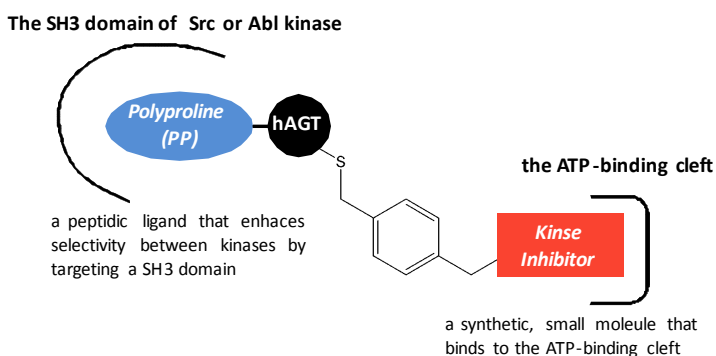


Fig. 4 プロテインキナーゼ 2 価阻害剤の設計。融合タンパク質として AGT に SH3 結合性ポリプロリン(PP)配列を、さらにラベルとして低分子阻害剤を用いた。

を作製しました。BG 誘導体のラベル部位には ATP-競合性低分子阻害剤を用いました。Src 選択的阻害剤として設計した AGT(PP1)-4 は Src キナーゼを特異的に阻害しました( $IC_{50} = 13 \pm 3$  nM)。Abl 選択的阻害剤として設計した AGT(PP7)-4 は Abl キナーゼを特異的に阻害しました( $IC_{50} = 18 \pm 7$  nM)。選択的プロテインキナーゼ阻害剤の分子設計に関する大変興味深い研究です。

# 生命化学研究法

## ケージドプライマーの活用による非天然粘着末端を付加したPCR産物の直接合成とその応用

東京大学先端科学技術研究センター

葛谷 明紀

(kuzu@mkomi.rcast.u-tokyo.ac.jp)

### 1. DNA二重鎖の末端形状と遺伝子組み換え

近年の生物に関連する研究分野ではほぼ例外なく、DNAの切り貼りによる遺伝子操作技術が不可欠となっている。特に遺伝子組み換えに使用する組換えベクターの作成には、DNAの連結反応が重要な役割を果たしている。単純な組換えベクターの作成には、平滑末端を持つDNA断片がそのまま用いられ、Taqポリメラーゼの影響でdAが一塩基突出した断片をそのまま利用したTAクローニングが行われることがある。一方で、プロモーターとの位置関係など、ベクターに挿入する断片の向きが重要になる場合には、それぞれの断片を制限酵素で処理し、4〜6塩基の粘着末端を付加した断片同士をライゲーションする方法が専ら用いられる。しかしながら、制限酵素はそれぞれ特定の認識配列を必要とするため、断片同士の連結部の配列は必然的に限られてしまう。また融合タンパクを作成する場合などは、コドンの読み枠を保ったままDNA断片を連結する必要があるため、適切な配列を選択することはさらに困難になる。

このような理由から、これまでも人工的にDNAの両端に非天然の粘着末端を作成する方法が、盛んに研究されてきた(参考文献1)。様々な方法が提案されているが、それらはほぼ例外なく、酵素処理を利用してDNAの末端形状を変化させる。このような非天然粘着末端の最も重要な活用法の一つが、Ligation-Independent Cloning (LIC) と呼ばれるライゲーション不要の組換えベクター作成法である(参考文献2)。10塩基程度の十分長い粘着末端をもつDNA断片同士は、大腸菌の形質転換を行う条件下でも十分に安定な複合体を作るため、あらかじめライゲーションによる共有結合形成を行わなくてもコンピテントセル内に導入される。断片間のニックは大腸菌が本来持つDNA修復系により修復され、組換えベクターが完成する。

### 2. ケージドプライマーを用いたPCRによる非天然粘着末端の直接的形成法 (LACE-PCR法)

当研究室では最近、光照射で除去できる保護基(ケージング基)を導入した核酸(ケージド核酸)を利用して、酵素処理さえも必要としない、非常に簡便な非天然の粘着末端を有するPCR断片を作成する方法を開発した(図1)。これは、DNAの複製を行う際に、テンプレートとなる鎖に核酸塩基の水素結合を阻害するようなケージング基を一分子導入しておく、DNAポリメラーゼによる鎖伸長反応がその塩基の正面で配列選択的に停止する、という我々の知見に基づく(参考文献3)。PCRプライマーにケージド核酸を一塩基用いた場合、ケージド核酸の正面でポリメラーゼ反応が停止し、プライマーの5'側はPCRが終了するまで常に一本鎖のままずっととどまり続ける。ケージドプライマーの合成は完全に化学的に行うため、一本鎖として残る部分の長さや配列は、自由に決めることができる。最後にPCR産物の溶液にUVAを短時間照射してケージング基を除去するだけで、両側に5'突出末端が付加した産物を得ることができる。当研究室ではこのPCR

法を、Light-Assisted Cohesive Ending (LACE)-PCR法と呼んでいる。

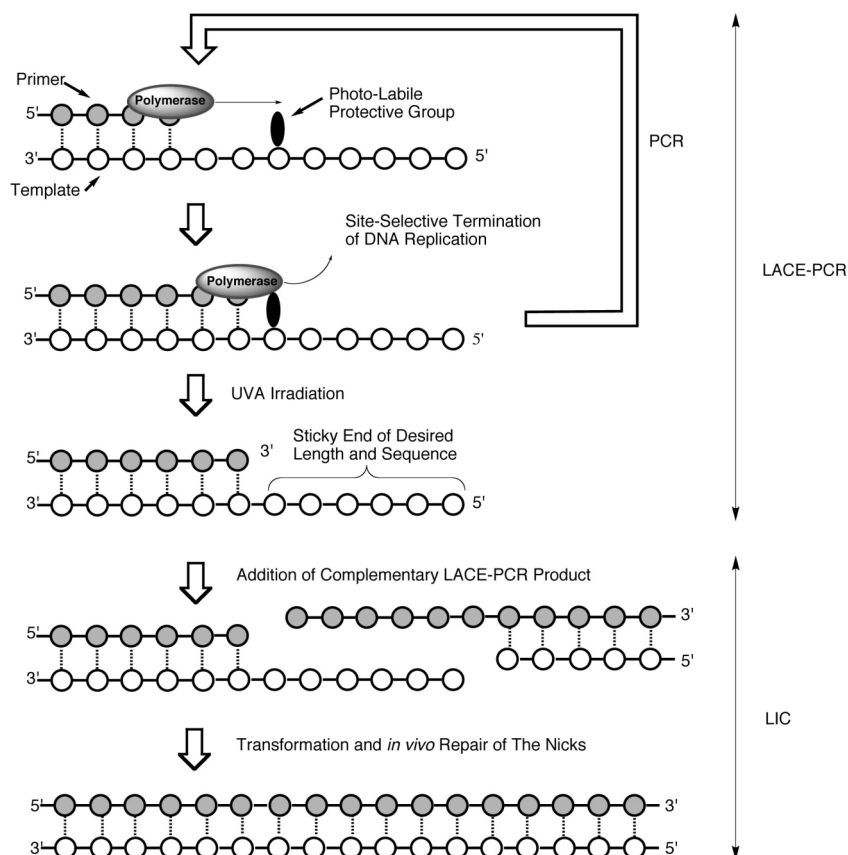


図1 LACE-PCR および LICの概略図

LACE-PCRに利用できるケージド核酸としては、これまでに図2に示す3通りのTの誘導体が検討されている(参考文献5)。既に $T^{NPOM}$  (参考文献6)は市販が開始されているが、ポリメラーゼの停止効果は $T^{NPPOM}$  (参考文献5)の方が優れていることがわかっている。 $T^{NPP}$  (参考文献7)は合成が容易だが、ポリメラーゼの停止効果は $T^{NPOM}$ とほぼ同等で、 $T^{NPPOM}$ には若干劣る。

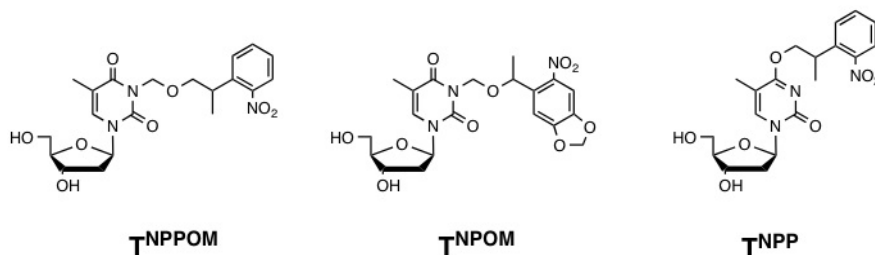


図2 LACE-PCRで利用できるケージド核酸

### 3. LACE-PCRにより作成したPCR産物を用いたライゲーション不要な形質転換

次に、LACE-PCR法を用いて作成した非天然粘着末端付きのPCR産物を用いて、実際に大腸菌を形質転換した例を紹介する。もちろん4塩基の制限酵素末端と相補的な粘着末端を有するLACE-PCR産物を作成し、通常通り天然の制限酵素を利用して調製したベクターとライゲーションして大腸菌の形質転換を行うことも可能であるが(参考文献4, 5)、本稿では、10塩基程度の長い粘着末端を有するPCR産物をベクター側とインサクション側の双方に関して用意し、ライゲーション不要の形質転換(LIC-PCR)によりBFP-GFP

融合タンパクの作成を行った例を示す(参考文献8)。系の概略を図3に示す。まず、T7プロモーター下にGFPをコードする5.1 kbpのプラスミドpQBI-T7GFPについて、ORF内のストップコドンの位置を境にしてLACE-PCRで全長を増幅し、ベクター側の断片として利用する。その際、PCR産物の両末端に10(または11)塩基の粘着末端が付加するよう、プライマー中にT<sup>NPP</sup>を一塩基ずつ導入しておく。また、上流側プライマー中のストップコドンに対応する部分の配列は、グリシンリンカーをコードする配列に換えておく。一方、ベクターに挿入する断片として、BFPをコードする6.4 kbpのプラスミドpQBI67から、BFPのORFである713塩基対をLACE-PCRで増幅する。両端に付加する粘着末端の配列は、ベクター側の断片と相補的にする。両断片を結合することにより、GFPのORFの下流に5残基のグリシンリンカーを介して連続してBFPのORFが挿入され、GFP-BFP融合タンパクがコードされる。

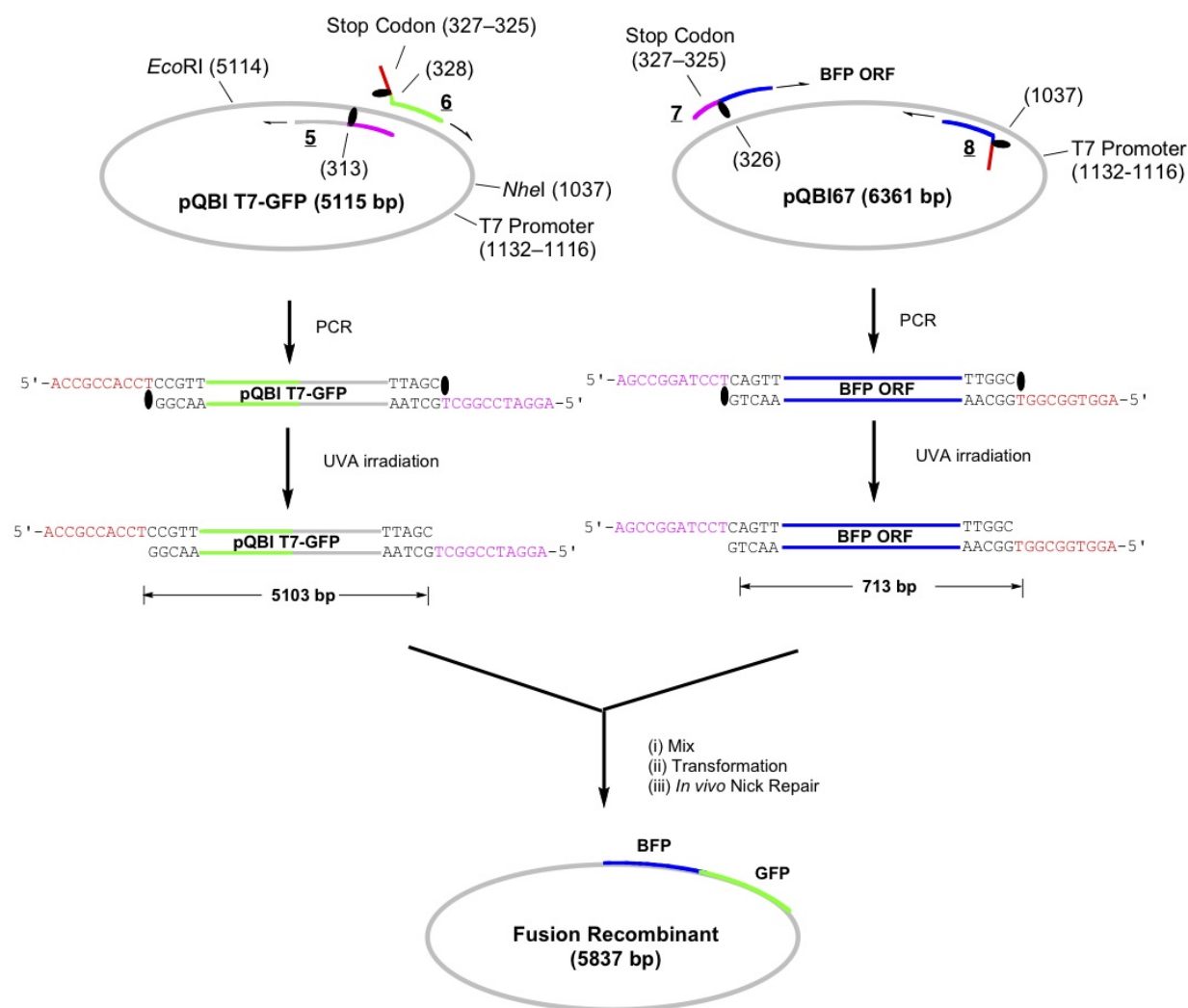


図3 LACE-PCR および LICを利用したGFP-BFP融合タンパクベクターの作成

### プライマーの合成

プライマーに使用するT<sup>NPP</sup>は、対応するアミダイトモノマーを既報文(参考文献7)に従って有機合成し、ホスホロアミダイト法でケージドプライマーを化学合成した。その際、DNAの化学合成で通常用いられる脱保護条件(濃アンモニア水、55℃、8時間以上)ではT<sup>NPP</sup>が加水分解されるため、dGおよびdAのモノマーに関しては、より穏和な条件(濃アンモニア水、25℃、24時間以上)で脱保護できる特殊モノマーを使用する必要がある(ケージド塩基としてT<sup>NPPOM</sup> もしくはT<sup>NPOM</sup>を利用する場合は、この必要はない)。CPGからの切

り出し、脱保護後、変性ポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)および逆層HPLCで精製を行った。

### LACE-PCR

ポリメラーゼとして、*Pfu* Ultra (pQBI-T7 GFP) または*Pfu* Turbo (BFP断片)を用い、製品推奨の条件にて、95°C (30 sec) → 55°C (30 sec) → 72°C (1 min x n kb) のサイクルを30回行った。サイクル終了後、テンプレートベクターを分解するため、Dpn Iを用いて37°Cで一晩行い、市販のキットでPCR産物を回収した。光照射によるケーシング基の除去は、室温、Tris-EDTA緩衝液(pH 8.5)中、300-400 nmを透過する光学フィルター(極大波長360 nm)を通した水銀キセノンランプからの紫外光を、2.5 mW/cm<sup>2</sup>で15分間照射することで行った。

### 形質転換

ベクター側PCR産物 50 ng および BFPのORF断片 24 ng(モル換算でベクター側に対して約3当量)を混合し(全量2 μL)、37°Cにて1 時間保温してから、ライゲーションを行うことなく直ちにJM109株に導入した。Carbenicillin 50 ugを含むLBプレートで一晩培養後、6個のコロニーが生じた。コロニーダイレクトPCRの結果、その内5個のコロニーに目的の融合ベクターが含まれていることが確認された。コロニー数が通常の形質転換に比較してかなり少ない理由としては、(1)今回の配列ではケーシング基の除去効率が40〜60%程度しかない、(2)本条件でDNAにUVAを照射した場合、計算上11%(1 kbpあたり2%)のPCR産物にピリミジンダイマーなどの損傷が起きるが、*recA*のコンピテントセルではこれらの損傷が修復されないため、その分形質転換効率が下がる、ことなどが考えられる。これらの組換え体の液体培養を行い、少量抽出により回収したプラスミドのシーケンシングするとともに、制限酵素処理により各断片の長さを確認することで、組替えが狙い通り行われていることを確認した。

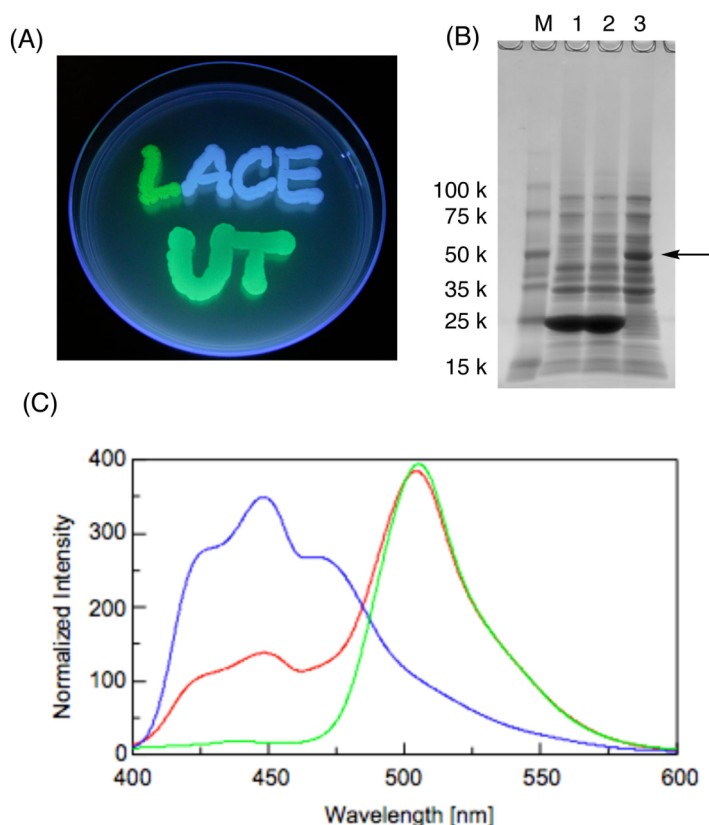


図4 発現したGFP-BFP融合タンパクの機能確認

### 融合タンパクの確認

さらにこの融合ベクターをT7 RNAポリメラーゼを恒常発現しているBL21-Gold (DE3)株に導入し、LBプレート上で一晚培養したところ、生じたコロニーは緑色の蛍光を発した(図4(a))。この蛍光(UTの字)は、元のGFP由来の蛍光(Lの字)とも、BFP由来の蛍光(ACEの字)とも、明白に異なる色調である。発現した融合タンパクは、さらに組換え体の溶菌液のSDS-PAGE(図4(b))および蛍光スペクトル解析(図4(c))でも確認を行った。図4(b)は、BugBusterにより溶菌した組換え体のSDS-PAGE結果である。元のGFP(レーン1)あるいはBFP(レーン2、分子量はいずれも28 kDa)を発現している株の溶菌液では、25 kDaのマーカー近傍に非常に濃いバンドが観察される。一方、融合ベクターを導入した組換え体の溶菌液(レーン3)では、このバンドが消え、代わりに約二倍の分子量に相当する50 kDaのマーカー近傍に新たな濃いバンドが観察された。図4(c)には、組換え体の溶菌液の蛍光スペクトルを示す。BFPの蛍光極大波長は450 nm (青いスペクトル)、GFPの蛍光極大波長は509 nm(緑のスペクトル)であるのに対し、融合タンパクを発現させた組換え体の溶菌液のスペクトル(赤いスペクトル)にはその両者が観測された。以上より、挿入された下流のBFPに関しても、正しく翻訳されていることが確認された。

### 4. おわりに

以上に示したように、通常のPCRで使用するプライマーにケージド核酸を一塩基導入するだけで、容易に非天然粘着末端を有するPCR産物を作成することができる。またこれを用いて、非常に簡便な遺伝子組み換えも可能である。制限酵素を使用しないため、PCRで増幅さえできれば、取り扱うDNAの配列には一切制限はない。本稿では一つの断片をベクターに挿入する例を紹介したが、原理的には二つ以上の断片を望みの順番、望みの向きで連結していくことも可能である。もちろんそのためには、現状の高いポリメラーゼ停止能を保ちながら、より高収率で除去が可能なケージド核酸が望ましい。またTのみならずdGなど他のケージド核酸も重要であり、我々も鋭意開発を進めているところである。

なお本法の開発は、科研費(18001001および20750126)の助成のもと、東京大学先端科学技術研究センター小宮山眞研究室にて行われた。

### 参考文献

1. Lu, Q. *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 199-207.
2. Aslanidis, C.; Dejong, P. J. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 6069-6074.
3. Tanaka, K.; Kuzuya, A.; Komiyama, M. *Chem. Lett.* **2008**, *37*, 584-585.
4. Tanaka, K.; Katada, H.; Shigi, N.; Kuzuya, A.; Komiyama, M. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2120-2126.
5. Kuzuya, A.; Okada, F.; Komiyama, M. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *10*, 1924-1929.
6. Lusic, H.; Young, D. D.; Lively, M.; Deiters, O.A. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1903-1906.
7. Kröck, L.; Heckel, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 471-473.
8. Kuzuya, A.; Tanaka, K.; Katada, H.; Komiyama, M. *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* **2009**, *53*, 75-76.

留学  
体験  
記

## ベルリン自由大学留学体験記

## ～充実のベルリン研究(&amp;私)生活～

日本大学 生産工学部 応用分子化学科

柏田 歩 (かしわだあゆみ)

(kashiwada.ayumi@nihon-u.ac.jp)



私は2000年に名古屋工業大学の南後守教授のもとで学位を修得いたしました。そして、現在は日本大学生産工学部応用分子化学科に勤務しております。このたび、日本大学中期研究員派遣制度を利用し、2009年3月から9月までの約半年間、ベルリン自由大学のProf. Beate Kokschoのもとで研究活動に従事する機会を得ることができました。ベルリン生活がスタートした際に、日頃から共同研究等でお世話になっている大阪市立大学の長崎健教授に挨拶メールを送ったところ、「帰国した際には留学体験記の執筆をよろしくね。」といったやりとりがきっかけでこのような機会をいただきました。そんな私ですが、恥ずかしながらフロンティア生命化学研究会未入会でした。そこで、帰国後に慌てて入会手続きを行った次第であります。本体験記では短期間ながら非常にインパクトがあったベルリン自由大学での研究生活を充実したベルリンでの私生活の状況を交えて紹介いたします。

## ベルリンというところ

ベルリン市は人口約350万、ご存知の通り、ドイツ連邦共和国の首都です。1989年11月に東西ベルリンを分断していた壁の崩落後の建築・建設ラッシュ(現在も旧東地区中心に進行中)を経て、現在では名実ともにドイツの中心都市です。旧東地区はブランデンブルク門からアレキサンダー広場までの約2キロ、ウンターデンリンデンという菩提樹並木の大通り沿いにフンボルト大学、オペラ、大聖堂、そして世界遺産に登録されている博物館島と言った歴史的に名高い観光資源が建ち並んでおり、休日の散歩にはもってこいのルートです。また、アレキサンダー広場にそびえるテレビ塔からはベルリンの街を一望できます。一方、旧西地区はヴィッテンベルク広場からヴィルヘルム大王記念教会を経て、クーダムという大通り沿いにデパートや高級ブランドショップといった様相です。壁崩壊から20年ですが、いまだに旧東と西の雰囲気の違いを肌で感じることができます。また、ベルリンは世界五大管弦楽団として名高い「ベルリンフィルハーモニー管弦楽団」の本拠地です。そして、イタリアやオランダの巨匠の絵画を堪能できる「絵画館」もあります。私はクラシック音楽鑑賞と絵画鑑賞を趣味としており、休日には何度も足を運びました。私にとってアメニティーの非常に高い街であることを実感しました。



## 私がお世話になったベルリン自由大学

ベルリンで最も古く、そしてベルリンを代表する総合大学といえば、旧東地区に位置するフンボルト大学であると言えます。フンボルト大学は創立200年、アインシュタインやファント・ホッフも教鞭をとったことで知られています。一方、私がお世話になったベルリン自由大学は第二次世界大戦後の1948年に旧西占領区のダーレム地区に設立された比較的新しい大学です。旧ソ連の社会主義的大学運営に反対した立場での設立ならびに運用が「自由大学」の由来です。歴史は浅いながらも、現在ではドイツ最大規模の総合大学で、特に化学・生化学分野を含めた自然科学領域の研究科はトップレベルの水準を維持しています。



## Koksch研究室での研究テーマ

私がお世話になったProf. Beate Koksch(以下, Beate)は化学・生化学専攻科の有機化学分野に所属しています。非常に若く(私よりわずか4歳年上)、活発な、頼れるお姉さんの存在です。専門はペプチド・タンパク質工学ですが比較的古典的なde novo設計からフッ素置換アミノ酸の合成と利用に関する流行の研究まで幅広く扱っています。まず、研究室における主要テーマを簡単に紹介します。



### ・ フッ素含有アミノ酸を含むポリペプチド集合体の構造形成特性評価<sup>1)</sup>

研究室ではバリンやグルタミン酸など天然アミノ酸側鎖の一部をフルオロアルキル基に置換した種々の誘導体合成に取り組んでいます。そして、これら置換アミノ酸をポリペプチド配列中に導入することに起因する構造形成特性をペプチド工学的見地から評価しています。in vitroでの評価を通じて、天然のフォールディングモチーフに対するフッ素含有アミノ酸の影響やフッ素間相互作用に基づく新規フォールディング形成要因について研究を行っています。現在ではファージディスプレイシステムの利用で広範なシーケンスモデルの中から特異な相互作用モデルをスクリーニングすることが実践されており、新規ペプチドドラッグやフッ素含有ペプチドマテリアル創出への発展が期待されています。

### ・ de novo設計ポリペプチドを用いたタンパク質のフォールディングや会合制御に関する研究<sup>2)</sup>

タンパク質の特徴として、唯一の最安定構造以外に外部環境などに依存した準安定構造形成を有することが挙げられます。この環境依存型構造変化はプリオン病やアルツハイマー病などに関連していることが知られています。そこで、Koksch研究室ではde novo設計ポリペプチドを用い、 $\alpha$ -helical構造から $\beta$ -sheetそしてアミロイド様繊維形成に至るフォールディング機構の解明について生化学・生物物理的観点から検討しています。このような検討を通じて、タンパク質のフォールディング機構の内在型要因について知見を得られるとともに、環境応答型バイオマテリアル創製への期待が持たれます。

### ・ $\alpha$ -helical coiled coilポリペプチドを凝集駆動力としたナノ微粒子の集積化<sup>3)</sup>

金コロイドなどのナノ微粒子はサイズ依存的な磁性、光学、そして導電特性を有しています。Koksch研究室では外部環境(pH)によって $\alpha$ -helical coiled coil構造に変化するポリペプチドを利用して、pH選択的な微粒子の会合制御について検討しています。すなわち、pH応答した $\alpha$ -helical coiled coilポリペプチドが親水面に正電荷を有することで、金コロイド界面の負電荷との静電相互作用が働きpH選択的な会合制御が実現できることになります。このような研究を通じてde novo設計のポリペプチドのデバイスへの展開が期待されます。

私は約半年という短い期間の滞在ということもあり、研究テーマ設定には以下の点を重視しました。

- ① 日本での研究テーマに直結できること
- ② 半年ながら、ある程度の成果を出し、自分の存在感を示せること

これまで、私は名古屋工業大学在学中に田中俊樹教授(当時:生物分子工学研究所主席研究員)のもとで、 $\alpha$ -helical coiled coilペプチドのde novo設計に関する研究に携わった経緯があります。そして、現在は日本大学において新規非ウイルス型ベクター構築を目指した標的選択的脂質膜融合系の設計に関する研究に取り組んでおります<sup>4)</sup>。そこで、半年の滞在期間で実現可能な、そして帰国後も継続可能な仕事として「エンドソームpH応答型膜融合パイロット分子の設計」というテーマに決定しました。われわれがこれまで設計してきた標的選択膜融合パイロット分子にエンドソームpH応答性 $\alpha$ -helical coiled coilポリペプチドを付与することで、インフルエンザウイルス中でのヘマグルチニンタンパク質の役割を担う人工パイロット分子の創製に至ることが期待されます。比較的、簡単そうなポリペプチド設計に見えますが、エンドソームpHに鋭敏に応答するためのシーケンス設計は試行錯誤の連続でした。そんな中、Beateやドクター連中との度重なるディスカッションのおかげで、約4ヶ月経過後に概ね、目的に合うポリペプチドに巡り会うことができました。帰国後の現在はこのポリペプチドをもとにした人工パイロット分子を用いた膜融合挙動を検討中です。

## Kochsch研究室にて

研究室はBeateのもと、PD2名、DC12名、MC1名、そして秘書2名とテクニシャン1名から構成されています。MC学生は研究室在籍となりますが、ほとんど講義でわずか6ヶ月しか研究期間を与えられません。研究と言っても再現性確認程度です。日本のように「戦力」として扱われておらず、完全な見習い生扱いです。なお、日本で言う「卒研生」は存在しません。正確に言えば、学部5年生(大学5年制でした)が6週間のみ研究室に配属され、PDあるいはDC学生の下で実験スキルを学び、発表会を経てレポート(卒論)を提出するシステムは存在しますが「卒研生」として年間通じて研究室に在籍することではないと言うことです。

研究室構成員ですが、その国籍はドイツ人半分、その他半分(イタリア、ポーランド、イラン、レバノン、中国、ガーナ、アメリカ)と言ったところで、研究室内の共通語は英語です。ドイツ語はもとより、英語(英会話)も得意といえない私は多少苦勞することもありましたが、周囲の気遣いのおかげで研究室の輪に入ることができました。研究室所有の部屋は有機合成室、ペプチド合成室、分析室、コンピューター室、そしてミーティング室です。各実験室とも日本における研究室と大差ありません(部屋自体は広いですが)。その他、分光光度計や蛍光光度計、そして円二色性分光計などは共同機器室のようなところに配置され、複数の研究室で共同利用しています。日本では、「分光光度計や蛍光光度計は研究室に最低1台当たり前」みたいな状況で、研究室内でも機器使用の順番待ちが発生していますが、向こうはのんびりしたものです。私も当初は「必要なときに必要な機器が使えないのでは」と心配でしたが、午前中(10時以前)と18時以降はほぼ誰もこれら機器を使用することは無く、自分の研究に支障をきたすことはありませんでした。

研究室では全員参加のゼミナールが毎週月曜10時から開催されま



す。ゼミナールは研究の進捗状況のプレゼンならびに雑誌会を兼ねており、毎週2ないし3名がパワーポイントでプレゼンします。ピザやケーキを食べ、コーヒーやビールを飲みながらのゼミナールでしたが、内容は日本でのゼミナール同様に活発な議論の場となっております。私も6月、8月、そして帰国前にプレゼンしました。研究室内のゼミナールですがペプチドエンジニアのストレートな意見・コメントに少々圧倒されました。今はいい思い出のひとつですが。

プライベートでも研究室の一員は仲良しです。多国籍軍の研究室ゆえ、バーベキューやイタリアンディナー、そしてSushiパーティーなど異国のグルメを満喫できるイベントも楽しむことができました。ドイツ人は日本人と同様に外国人を特別視する風潮があります。普段はドイツ人同士、外国人同士が固まる感じでしたが、このようなイベントを通じて研究室の結束を実感できました。本来は研究室旅行みたいなものもあるそうですが、滞在期間中には機会がありませんでした。少々残念。

帰国前には研究室一員で盛大にパーティーを開いてくれました。もちろん(?)、Sushiパーティー。アメリカ出張から帰国したてのBeateも空港から直接、Sushiレストランへ直行。半年の滞在には見合わない、非常に感動的な最後のイベントでした。その数日後、別れの時。研究室の一員からドイツ土産として定番(!)のビアマグをいただきました。そして、半年の滞在の思い出アルバムをA1サイズで作成してもらいました(これこそサプライズ!)。これまで、卒業式など涙知らずの私も、半年間のベルリン生活をいろいろと思い出し、涙止まりませんでした。ベルリン自由大学でBeateそして研究室の仲間と仕事を行えたことを誇りに、現在、日本で研究に打ち込んでいます。また、上記の通り、この半年の成果について詰めの実験を日本で取り組んでいる最中です。現在もベルリンでの仲間とは時々、メールをやりとりしています。「次に会うときは研究者としてさらに成長した姿で」こうりたいものです。



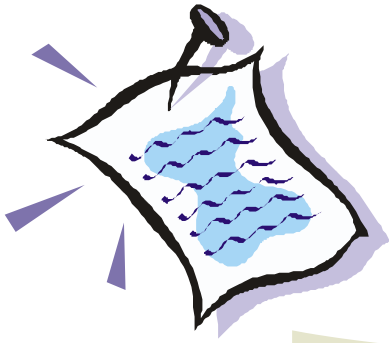
## おわりに

これまで留学体験記に寄稿されている多くの先生方がおっしゃられていますとおり、海外留学は自身の研究、そして人間そのものの世界観を広げることができるよい機会であることを実感いたしました。欲を言えば、もっと若い時期に、もっと長期間留学を経験できたらと思いました。Beateのもと、ドイツならびに多国籍軍の研究室生活は今後の研究生活において(人生そのものにおいても)、かけがえのない財産になることを確信しております。

なお、私にこのような機会を与えていただいたProf. Beate Koksche(Beate)ならびに研究室メンバーに感謝いたします。また、経済的支援をいただいた日本大学にもこの場を借りて御礼申し上げます。最後になりましたが本体験記執筆の機会を与えていただいた大阪市立大学長崎健教授、そして大阪大学大神田淳子准教授をはじめとする編集委員各位に御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) C. Jaeckel, M. Salwiczek, B. Koksche *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4198-4203.
- 2) K. Pagel, S. C. Wagner, K. Samedov, H. v. Berlepsch, C. Böttcher, B. Koksche *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2196-2197.
- 3) S. C. Wagner, M. Roskamp, H. Cölfen, C. Böttcher, S. Schlecht, B. Koksche *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 46-51.
- 4) A. Kashiwada, M. Tsuboi, T. Mizuno, T. Nagasaki, K. Matsuda *Soft Matter*, **2009**, *5*, 4719-4725.



# シンポジウム等会告

## 第 6 回 ナノバイオ国際シンポジウム

[http://www.nanobioexpo.jp/nanobio\\_6th.html](http://www.nanobioexpo.jp/nanobio_6th.html)

主催:ナノバイオ Expo 実行委員会

会期:2010 年 2 月 17 日(水)9:00 - 17:15

会場:東京ビッグサイト 会議棟 605 会議室

テーマ : 「ナノテクノロジーがもたらすバイオ・アグリ・コスメ革命」

テーマ 1 「ナノテクノロジーによるがん・認知症の最先端診断・治療・予防」

基調講演

9:00-9:45 : 「がんのゲノム研究・ゲノム医療の概況と展望」

国立がんセンター研究所 腫瘍ゲノム解析・情報研究部 部長 吉田 輝彦 氏

9:55-10:40 : 「ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション」

東京大学大学院工学系研究科 教授 片岡 一則 氏

招待講演

10:50-11:25 : 「アルツハイマー病の根本治療・予防をめざして:J-ADNI の試み」

東京大学大学院医学系研究科神経病理学分野 大学院薬学系研究科 臨床薬学教室  
教授 岩坪 威 氏

11:30-12:05 : 「高分子ナノテクノロジーに基づくがん診断・治療システムの開発」

東京大学大学院医学系研究科 附属疾患生命工学センター 臨床医工学部門 准教授  
西山 伸宏 氏

12:10-12:45 : 「「遥かなる創薬の夢の実現を目指して」～企業研究から大学の研究とベンチャー企業へ～」

京都大学大学院薬学研究科 創薬神経科学講座 客員教授 杉本 八郎 氏

テーマ 2「ナノテクノロジーによる最先端アグリ・フード・コスメ開発」

基調講演

14:00-14:45 : 「工業ナノ材料のリスク評価と管理」

(独)産業技術総合研究所 安全科学研究部門 研究部門長 中西 準子 氏

14:55-15:40 : 「感性ナノバイオセンサの開発」

九州大学大学院システム情報科学研究院 情報エレクトロニクス部門 教授 都甲 潔 氏

招待講演

15:50-16:15 : 「プロテオグリカン水溶液を直接塗布した場合及び経口摂取した場合の肌状態に関する有用性調査」

バイオマテックジャパン(株) 代表取締役 工藤 義昭 氏

16:20-16:45 : 「ウロコ・コラーゲンの化学的特徴と生物学的機能」

多木化学(株) 研究所 コラーゲン開発チーム 山口 勇氏

16:50-17:15 : 「ナノテクノロジーによるコスメ革命」

聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 准教授 / (株)ナノエッグ 取締役研究開発本部長 山口 葉子 氏

(情報提供:馬場 嘉信)



**日本化学会第 90 春季年会(2010)**  
**<http://www.csj.jp/nenkai/90haru/index.html>**

会期:2010 年 3 月 26 日(水)- 29 日(土)

会場:近畿大学本部キャンパス(〒577-8502 東大阪市小若江 3-4-1)

**「特別企画」**

**新薬創製のための化学的アプローチとその展望**

平成 21 年 3 月 26 日(金)(第一日目 S3 会場 21 号館 205)9:30 ~ 12:35

主催:先端錯体工学研究会

現在、日本人の死亡理由のほとんどがガンと心疾患で占められている。また、生活習慣病の一つである糖尿病の患者数は、糖尿病予備軍を含めると 2000 万人に及ぶとも言われている。そこで、これらの疾患に対する有効な治療薬の開発に加え、疾患の早期発見・早期治療につながる診断薬や診断法の開発が重要視されている。近年、これらを背景に MRI 等の診断薬や生活の質(QOL)の向上を目指した薬剤としての新薬の創製に関する学術的研究が活発に行われている。今回は、「新規製薬の創製」を中心とした特別企画講演とし、合成化学が医療分野に果たす役割について情報を発信する場としたい。

企画責任者:中井 美早紀(関西大化学生命工)、松村 有里子(成蹊大理工)

座長:木下 勇(阪市大院理)

9:35-10:05 : 「合理的な分子設計に基づく新しい医薬機能分子の創製」

樋口 恒彦(名市大院薬)

10:05-10:35 : 「G-quadruplex を標的とする癌化学治療へのアプローチ」

長澤 和夫(東農工大)

座長:須貝 祐子 (阪市大院理)

10:35-10:55 : 「創薬研究への応用を目指した蛍光プローブの開発」

寺井 琢也 (東大院薬)

10:55-11:25 : 「ヒドロキシアジン系複素環化合物-錯体の合成と金属含有医薬品への応用」

加藤 明良 (成蹊大理工)

座長:矢野 重信 (京大 産官学連携センター)

11:25-11:45 : 「世界を元気にする「アスタキサンチン」の開発と企業戦略」

山下 栄次 (富士化学工業)

11:45-12:30 : 「カイロモルフォロジー:キラリティーの創製、転写、増幅から測定まで」

黒田 玲子 (東大院総合文化)

(情報提供:長崎 健)

## 「特別企画」

### 化学で切り拓く未来医療

平成 21 年 3 月 26 日(金)(第一日目 S3 会場 21 号館 205)13:30 ~ 16:30

主催:フロンティア生命化学研究会

先端医療分野では化学者が果たすべき責任が年々増大している。その中には創薬・DDS・バイオマテリアルから高度医療機器・診断システム開発まで広範な領域が含まれ、分子から装置まで設計し創製することのできる化学者に対する期待は大きい。しかし化学者、特に学生・若手研究者にとって、新規融合領域に対する情報不足は化学側からのアプローチの妨げとなっている。

本特別企画では、医療分野の中でも特に化学研究分野の貢献が期待される領域(デリバリーシステム・メディカルマテリアル・メディカルデバイスなど)に関する最先端研究動向を紹介して頂き、活発な議論を交わしたい。

企画責任者:長崎 健(阪市大院工)、川本 哲治(武田薬品工業)

座長:深瀬 浩一 (阪大院理)

13:40-14:20 : 「GPI アンカータンパクの生物学と医学」

木下 タロウ (阪大微研)

座長:長崎 健 (阪市大院工)

14:20-15:00 : 「ペプチドをツールとして用いた生体高分子の細胞内送達技術」

二木 史朗 (京大化研)

座長:川本 哲治 (武田薬品)

15:00-15:40 : 「がん治療増感の化学的新戦略から宇宙研究へ」

大西 武雄 (奈良県医大)

座長: 藤井 郁雄 (阪府大院理)

15:40-16:20 : 「再生医療を実現するための化学的アプローチ」

山岡 哲二 (国立循環器病センター研究所)

(情報提供: 長崎 健)

## アドバンスト・テクノロジー・プログラム(ATP)

### グリーンバイオ・フロンティアバイオ未来産業を支えるバイオケミカルズ

3月26日(金) 午後

12:30-14:00 ポスター発表

14:30-15:00 岡本晃充(理化学研究所)

15:10-15:40 近藤史郎(帝人)

15:50-16:40 杉本直己(甲南大学フロンティアサイエンス学部学部長教授)

16:50-17:50 パネルディスカッション「フロンティアバイオケミカルテクノロジーの利用と産業化」

3月27日(土) 午前

9:30-10:00 武本浩(塩野義創薬イノベーションセンター長)

10:10-11:00 梶原康宏(阪大理)

11:10-11:50 菅裕明(東京大学先端科学技術研究センター)

3月27日(土) 午後

13:00-13:40 岩田博夫(京都大学再生医科学研究所)

13:50-14:30 浜地格(京大工)

14:40-15:30 楠本正一(サントリー生物有機科学研究所所長)

15:40-16:20 浜田博喜(岡山理科大学)

16:30-17:00 広瀬芳彦(天野エンザイム)

(情報提供: 深瀬 浩一)



## 2010 環太平洋国際化学会議 Pacifichem (2010)

<http://www.pacifichem.org/>

主催: American Chemical Society, Canadian Society for Chemistry, Chemical Society of Japan, New Zealand Institute of Chemistry, Royal Australian Chemical Institute, Korean Chemical Society, Chinese Chemical Society

会期: 2010年12月15日(水)~20日(月)

会場: Honolulu, Hawaii, USA

アブストラクト締切: 平成22年4月5日(月)

発表申込／アブストラクト提出: <http://www.pacificchem.org/abstracts/>

その他: 詳細は「化学と工業」1月号62ページ以降をご参照ください。

**Frontiers in Peptide Chemistry: Synthesis and Applications** (Symposium No. 41)

Organized by: John C. Vederas, Steven L. Castle, Craig Hutton, Shiroh Futaki, Ian Smith, Jeff Kelly, Dawei Ma and William D. Lubell

Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, December 18 and 19, 2010

Peptide science has grown rapidly in recent years due to interest in the synthesis of these natural products, and their utility for various applications in the fields of medicine, catalysis and nanotechnology. Focusing on recent developments in the chemistry and biology of these polyamide oligomers as well as organic molecules designed to mimic their form and function, this symposium will serve to highlight a broad variety of subjects in which peptides are synthesized and employed today. For example, peptides as therapeutics will be featured, in the light of the rapid growth of the market for peptides, which now outpaces twice as fast as the overall pharmaceutical market due to an increased number of targets and improved delivery methodologies. Similarly, the use of peptides in nanotechnology will be presented as this field has expanded rapidly in recent years because of the remarkable utility of peptides to serve as templates for the assembly of supramolecular architectures in a predetermined manner. Focus will include the synthesis of novel peptide natural products and peptide mimics possessing challenging architectures. Moreover, this symposium will reflect the impact of peptide science in cross-disciplinary research including chemistry, physics, biology, medicine and engineering.

(情報提供: 二木 史朗)

**New Directions of Supramolecular Chemistry toward Nanomaterial Science, Biomedical Science, and Supramolecular Catalysts** (Symposium No. 47)

Organized by: Shin Aoki, Takeharu Haino, Jeffery T. Davis, Wen-Sheng Chung

Oral presentation: Hilton Hawaiian Village; Poster presentation: Hawaiian Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, December 15 and 16, 2010

Recently, the study of multimolecular assembled systems that have well-defined and discrete three dimensional structures are extremely attractive topic in research fields of not only chemistry, nanotechnology but also biomedical and pharmacological science, and catalytic organic synthesis. The purpose of this symposium is to discuss and forecast multimolecular assembled systems that have unique properties in liquid phases (organic phase and aqueous solution), solid phases, and gas phases from the point of chemical, biological (recognition of biorelevant molecules), and physical scientific views. Contributions from the related scientific fields are welcome and we would like to offer good opportunities for the participants to enjoy attractive research topics, discussing research interests, and making valuable personal relationships with active chemists.

またポスター発表応募者の中から口頭発表を選出し、また学生ポスター賞も予定しております。

(情報提供: 青木 伸)

# お知らせ

## 異 動



及川 雅人

横浜市立大学 大学院生命ナノシステム科学研究科 准教授

〒236-0027 横浜市金沢区瀬戸22-2

Tel: 045-787-2403

E-mail: moikawa@yokohama-cu.ac.jp

栗原 正靖

群馬大学大学院工学研究科応用化学・生物化学専攻 准教授

〒376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1

Tel:0277-30-1222

E-mail: kuwahara@chem-bio.gunma-u.ac.jp

三浦 佳子

九州大学大学院工学研究院化学工学部門 教授

〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡744番地

Tel: 092-802-2749

E-mail: miuray@chem-eng.kyushu-u.ac.jp



## 編集後記

東京学芸大学の原田和雄氏より編集委員を引継ぎ、今回初めて生命化学研究レターの編集を担当させていただきました。皆様のご助力により、ここに無事 第32号 をお届けできることを喜んでおります。執筆者の方々にはご多忙の中、熱意が籠められた力作をご寄稿いただきましたことを改めて御礼を申し上げます。

今号では、第12回生命化学研究会の幹事を代表して松浦和則さん(九大)に巻頭言をご執筆頂きました(松浦さん、大神田のプッシュを寛大に受け止めて下さり、ありがとうございました)。また、長年本誌の編集に当たってこられた長崎 健さん(大阪市大)には、核酸医薬の細胞内デリバリーシステムの開発について、生物無機化学の分野からは青木 伸さん(東京理科大)に亜鉛金属錯体のバイオツールへの応用に関するご研究を、また、棚谷 綾さん(お茶大)には、芳香族アミドフォルダマーの構造と機能に関するご研究を、それぞれご紹介頂きました。またそのほかに、4名の若手の方々に合計13報の新作論文の紹介を、葛谷さん(東大)にはLACE-PCRについての解説記事をご担当いただきました。さらに、ドイツからご帰国されたばかりの柏田さん(日大)には、記憶も感動もフレッシュなうちにご留学中の体験談をご執筆いただき、極めて盛りだくさんかつ充実した内容となりました。次号(No. 33)は、井原さんのご担当により、2010年6月頃の発行を予定しております。より充実した内容に向けて、皆様からの建設的なご意見、ご提案をお待ちしております。下記編集委員までご連絡をいただければ幸いです。

(文責：大神田)

平成22年2月1日

生命化学研究レター編集委員

第32号編集担当：大神田 淳子

大阪大学産業科学研究所、johkanda@sanken.osaka-u.ac.jp

写真：円谷 健

大阪府立大学、tsumu@b.s.osakafu-u.ac.jp

題字・レイアウト：井原 敏博

熊本大学、toshi@chem.kumamoto-u.ac.jp