

生命化学研究レター

(2010 年 7 月)

2. 巻頭言

ちょっと先まで足を延ばしてみると...

慶応義塾大学理工学部 佐藤 智典

4. 研究紹介

4. 化学的に設計された生細胞内 RNA 蛍光イメージング法

理化学研究所・JST さきがけ 岡本 晃充

11. SUMO 修飾を利用したタンパク質と細胞機能操作

熊本大学大学院自然科学研究科 斉藤 寿仁

18. 細胞死経路の代謝工学と遺伝子回路の進化工学

千葉大学大学院工学研究科 梅野 太輔

24. 論文紹介「気になった論文」

東京大学 駒場オープンラボラトリー・先端科学技術研究センター 澤田 敏樹

九州大学大学院薬学研究科 辻 厳一郎

東京大学大学院理学系研究科 窪田 亮

35. 生命化学研究法

変異 β -ラクタマーゼを用いた蛋白質の機能性分子ラベリング法

大阪大学大学院工学研究科 水上 進

39. 留学体験記

イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校留学体験記

東京大学大学院理学系研究科 後藤 佑樹

43. シンポジウム等会告

第4回バイオ関連化学シンポジウム（第25回生体機能関連化学シンポジウム、第13回バイオテクノロジー部会シンポジウム、第13回生命化学研究会シンポジウム）

45. 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



ちょっと先まで足を延ばしてみると・・・

慶応義塾大学理工学部 佐藤 智典

今年の正月に長崎に帰省した折に「長崎まちなか龍馬館」に行ってみた。ちょうどその日は1月3日で「龍馬伝」の1回目の放送日でもあり館内は賑わっていた。ちょっと時間があつたので、展示で紹介されていた龍馬ゆかりの場所を散歩してみることにした。風情のある「寺町通り」を歩いて、禅林寺と深崇寺の間にある「龍馬通り」と呼ばれる長崎らしい細い坂道を上って行くと「亀山社中の跡」がある。当時を再現した狭い記念館は観光客であふれていた。そこからさらに20分程、急な坂道を息を切らしながら上って行くと風頭公園があり、そこには坂本龍馬之像が立っていた。風頭公園は長崎名物のハタ揚げが行われる高台にあり、長崎港が一望できる。司馬遼太郎の「竜馬がゆく」では、長崎港に入ってくる船を見て「長崎はわしの希望じゃ」と感動した場面がある。幕末あるいは開国という不安定な時代にあつて、初めて目にする光景から、日本回天への希望を感じていたのであろう。ちょうど日没の時間だったので、長崎港を囲むように立っている稲佐山や伊王島には綺麗な夕焼けが広がっていた。龍馬像はそのような長崎港を見渡せる場所に立てられている。さらに、同書では、土佐から江戸に向かう途中で富士山を初めて見て、「日本一の男になりたい」と感動する場面がある。全く感動していない藤兵衛に向かって、「一瞬でもこの絶景を見て心のうちがわくわくする人間と、そうでない人間とは違う」と言う場面がある。坂本龍馬の人物像に惹かれる人は多いようであるが、その理由がこの年になってわかるようになってきた。長崎に住んでいた高校時代および長崎大学での助手時代には、坂本龍馬にゆかりの場所を訪れたこともなかったが、その頃に興味を持てば良かったと後悔している。

さて、生命化学研究会が1998年に立ち上がって12年目となった。これまでの、ニューズレターの巻頭言を始めとする多くの記事には、生命化学分野の創成に対する期待や夢、その分野での自らの研究に対する熱い思いが語られている。当時は30歳代のメンバーが多く、研究者として自立を始めた時期でもあり、自らの進むべき道を作り上げようと言う雰囲気になり過ぎていた。ポストゲノム時代の新たな生命化学とはどのように発展するのか興味津々で議論を重ね、新たな概念や技術の誕生に刺激を受けてきた。独創的な発想と研究分野を開拓しようとするメンバーの意気込みにより自身パワーをもらっていたような気がする。研究会の御陰で新たな世界にも目を向けるようになってきたし、この分野でやってみたいことも生まれてきた。それから、研究会としての活動が積み重ねられ、さらには個々の組織の中での責務を重ねることで、次のステップアップの必要性和共に研究会に対する責任感のようなものが感じられるようになってきた。研究会であっても、一旦スタートすると社会的な責任も生まれてくるし、継続するためには魅力的な研究分野の創出と活発な運営が望まれるようになってくる。

生命化学が魅力的であり続けるためには、新しいサイエンスを構築することに加えて、バイオ研究の産業上の価値を高める必要もある。サイエンスの進歩は著しいが、産業への応用は決して成功してはいない。海外ではバイオベンチャーの技術は大手の企業の製品化に貢献するようになってきているが、日本ではそのような産業基盤にまだ発展していない。シーズ提供者の力不足なのか開発環境の仕組みの問題なのか見極める必要はあるが、大きな壁にぶつかっているのは事実である。この壁をどうすれば越えることができるのかが大きな課題になっている。

さて、YouTube でも見ることができる Prof. Randy Pausch の最後の講義では、自分の夢を達成するための「壁」が何度も出てきた。彼はそのいくつも壁を越えてみせたが、大学で研究できることの意義を感じさせてくれる講義でもあった。比較にはならないが、佐藤研の紹介ビデオが YouTube で閲覧することができる。その中では残念ながら超えることのできた壁の話はしてはいない。もっとも話せるような話題もないのであるが、その「最後の講義」を事前に見ていたら、ちょっと違った話ができたかもしれない。

自慢できるほどのことはないが、最近、自分の中でのちょっとした壁を越えた。それは 10 km の壁である。横浜の我が家は鶴見川沿いにあり、片道 5 km を走ると新横浜駅の近くまで行くことができる。多くのランナーが走るジョギングコースであるが、これまでは片道 3.5 km のところで折り返していた。休日といってもゆっくり走れる時間が取れる訳でもなく、若い時には何でもなかった距離であるが、この年齢になるとその先まで行く体力的な自信もなかった。ところが、思い切って半年前から距離を延ばすようになった。するとそこには、春になると 500m にわたり桜並木が続き、対岸は菜の花で埋め尽くされた風景が広がっていた。週変わりで草花が咲く春、アジサイの初夏、道を譲ってくれる散歩中の犬、野球少年の歓声。距離を延ばすと疲れるだけだろうという予想に反して、退屈しない光景に出会えて走る楽しみが増えた。研究のゴールは遠いが、ちょっと先まで行ってみると案外面白い世界を見ることができるかもしれないという気持ちになってきた。



研究紹介

化学的に設計された生細胞内 RNA
蛍光イメージング法

理化学研究所 基幹研究所 岡本独立主幹研究ユニット・
科学技術振興機構 さきがけ
岡本 晃充
(aki-okamoto@riken.jp)



1. はじめに

RNAは、細胞を構成する分子群の中でもきわめて重要な働きを担っていることはいうまでもない。細胞内のRNAは常に動的に変化し続けており、どのような配列・サイズのRNAが、いつ、細胞のどこで、どの位の量が発現し、どのような高次構造を持って働き、時間とともにどの程度増減しているかをモニターする必要がある。数多くの蛍光プローブが、生細胞内の分子機能解析のために作成されてきたが、これまでRNA検出のために設計されてきた蛍光プローブについては、タンパク検出プローブのバラエティーと比較して大変貧弱である。さらには、生細胞内RNAの効果的なモニタリングへ向けて、標的RNAの増減に対してプローブの蛍光発光が鋭敏に応答すること、バックグラウンドの蛍光や洗浄工程をできる限り回避することが要求される。RNAイメージングに期待されることは、細胞内で活動しているRNAをその機能を妨げずに可視化することである。時間情報を得ながらRNAの局在、発現量を捉えられるという強みは、固定した標本では達成できない。また、集団からの平均化された情報ではなく1細胞からの連続データを得られるという点もイメージングの魅力である。ここでは、著者は、化学的に設計された生細胞内RNA蛍光イメージング法を振り返るとともに、新しい生細胞内RNAイメージング法としてわれわれが開発した色素励起子の制御に立脚したハイブリッド特異的ライトアップ核酸プローブを紹介したい。

2. これまでのRNAイメージング法の概説

2-1. タンパク質を利用したイメージング

特定の配列を認識するRNA結合タンパク質と蛍光タンパク質を融合させた分子は、RNAの局在を示す蛍光プローブとして有効である。しかしこのままでは、RNAと関係無しに蛍光を発してしまうので、RNA存在時にのみ発光するための工夫が必要になる。ここではタンパク質を利用した2種類のイメージング手法について、RNA結合タンパク質の選び方とシグナルの切り分け方を紹介する。

まず第一に、ステム-ループ構造を有するMS2 RNA と呼ばれる19塩基のRNA配列を利用したイメージング手法がある。解析対象のRNAの非翻訳領域にMS2 RNAをタンデムに挿入する。検出には、蛍光性タンパク質を融合したMS2結合タンパク質(MCP-GFP)を用いる(図1)。MCP 2分子がひとつのMS2 RNAを認識するため通常では1回のMS2ステム-ループ構造に対して2分子のGFPが結合することになる^{1,2}。MS2配列を複数回繰り返した構造を持つRNAを作成することにより結合GFPの数を増やし、検出感度を上げることがで

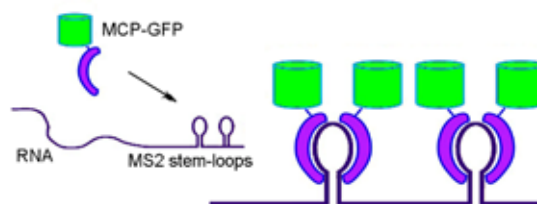


図1 MCP-GFP による RNA の標識

きる。例えば、24回の繰り返しMS2配列を持つRNAが作られ、1分子蛍光観察が可能な明るさになることが示されている³。RNAと結合していないMCP-GFPからの蛍光はそのままバックグラウンドノイズとなるため、MCP-GFPに核移行シグナルペプチドをあらかじめ付加することで標的のRNAに結合できなかったMCP-GFPを核内に収納し細胞質内RNAの観察を行う。6回繰り返しのMS2配列を末尾に導入した酵母*ASH1* mRNAの細胞内局在が観察され⁴、また、同様の方法で、ラット培養神経細胞でのCaMKII α mRNA顆粒形成や*Arc* mRNAの輸送も報告されている^{2,5}。最近では8回の繰り返しMS2配列を持つ細胞質 β -アクチン mRNAの1分子イメージングも達成されている⁶。

タンパク発光を利用した別の方法として、蛍光タンパク質の再構成を利用した方法もある。その中で最も代表的な方法が、小澤岳昌先生のグループによって報告されている⁷。ここでは、特定のRNA配列と特異的に結合するPumilioタンパク質をEGFPの再構成法と組み合わせている。2種類の改変Pumilioタンパク質(mPUM1、mPUM2)をそれぞれ8塩基の異なる配列を持つRNAと結合するよう作成する。それぞれにEGFPの断片を融合させることにより、内在性RNAの可視化に成功している。この実験についての、詳細かつ正確な情報は、小澤先生の論文を照会されたい。

2-2. 蛍光性人工核酸を利用したイメージング

オリゴハウスが合成して届けてくれるオリゴDNA(あるいはRNA)の合成には既に確立されたホスホロアミダイト法が利用され、1塩基ずつ3'末端から任意のヌクレオチドを順番に結合させていく。この合成は完全に化学反応の繰り返しである。核酸自動合成機を用いれば、配列の長さに制限があるものの、自分の欲しい配列をもったDNAを合成できる。生物に作らせるのではなく自動合成機を用いる最大の利点は、非天然のDNAさえも合成できてしまうことである。これらの特徴を最大限に利用して作られたのが次の機能性人工蛍光核酸プローブである。

最も代表的なのが、モレキュラービーコンである。モレキュラービーコンは、ステム構造とループ構造を単一鎖内に持ち、両末端に接続された蛍光団と消光団が近接するように設計されている(図2(a))⁸。この構造でのモレキュラービーコンでは、消光団が蛍光を消光している。一方、ターゲット鎖の存在下では、モレキュラービーコン中央のループ部分とターゲット鎖が二重鎖を形成すると同時にステム構造が解かれるので、蛍光団と消光団の間に距離が生じ、それまで抑制されていた蛍光が現れる。プローブ自身に巧妙に機能を持たせることによりターゲットの存在下でのみ蛍光を示したモレキュラービーコンは画期的なプローブである。これまでに様々な対象を狙って研究がなされている。ショウジョウバエ卵における*oskar* mRNA、繊維芽細胞での β -アクチンmRNA、細胞に感染したインフルエンザAウイルスのmRNAなどの輸送と局在

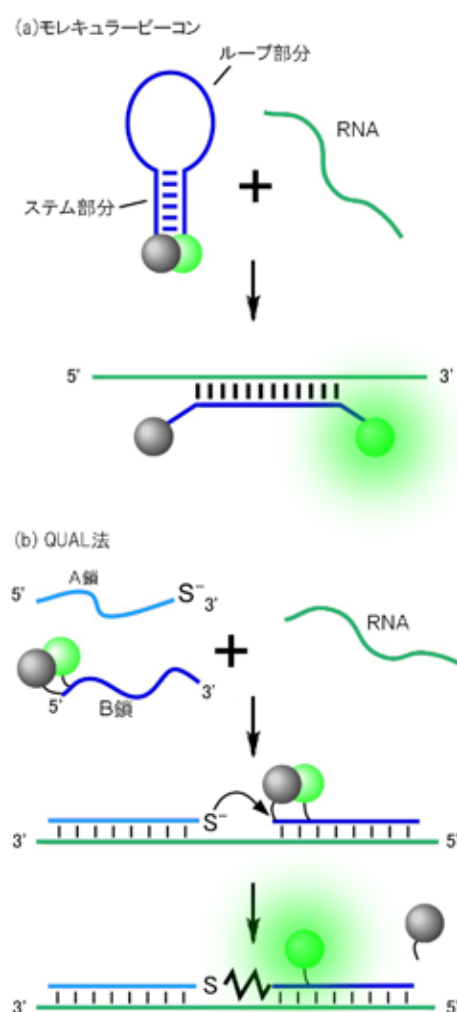


図2 蛍光性人工核酸を利用した RNA 検出の例

などが報告されている⁹⁻¹¹。

ほかにも、反応性核酸のオートライゲーションを利用したプローブ (QUALプローブ) が開発されている^{12,13}。これは2つの人工核酸プローブを必要とする(説明のため便宜上A鎖とB鎖とする(図2(b)))。A鎖は、3'末端にホスホロチオエート(リン酸基上の1つの酸素原子Oを硫黄原子Sに置換)を有する。B鎖の5'末端側に脱離基としての消光団と、その近傍に蛍光団を連結する。この状態ではB鎖は蛍光を示さない。両者がターゲットの核酸に対して近接してハイブリダイゼーションすると、B鎖の消光団が結合する炭素原子に対してA鎖の硫黄原子が自動的に攻撃し、消光団がB鎖から脱離する。結果として、ターゲットと二重鎖を形成した新しい蛍光核酸が生じる。蛍光団を選ぶことにより複数色のQUALプローブ (FAM、TMR、Cy5など) としても使える¹⁴。さらに、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用した改良版も報告された¹⁵。モデル系として、固定した大腸菌のrRNAの検出が報告されている。また、生きた動物浮遊細胞内に取り込ませ、GAPDH mRNAや28S rRNAをフローサイトメトリーで検出した報告がある。

3. 新規ハイブリダイゼーションプローブ:ECHO法

3-1. 励起子相互作用による蛍光制御

チアゾールオレンジ系の色素群は、元来、独特の蛍光特性を持つ。このタイプの色素が複数個並行に集合した状態(H会合体)を形成すると、蛍光発光は大きく抑制される¹⁶。この効果は、励起子相互作用と呼ばれ、色素の励起状態が、色素の会合に伴い複数のエネルギーレベルへ分裂する。許容である上位エネルギーレベルの軌道への励起のあと速やかに下位エネルギーレベルの軌道への内部変換が起こるが、下位軌道からの蛍光発光経路が禁制であり、その結果として会合状態の色素からの蛍光が強く抑制される。この効果は、会合体を形成した色素の吸収帯が単一の色素の吸収帯より短い波長に現れるということで確認できる。この色素間励起子相互作用が解除された状態になれば、再び蛍光発光を取り戻すだろう。したがって、標的核酸へのハイブリダイゼーションに応じて複数個の色素による励起子相互作用が制御できるよう分子設計すれば、明確な蛍光のON・OFFを示す効果的な新規ハイブリダイゼーションプローブを得ることができるだろう。

3-2. プローブ設計

2008年にわれわれが新たに報告した人工核酸プローブは、上項に説明した機構を利用している。このプローブを、ECHO (Exciton-Controlled Hybridization-sensitive Oligonucleotide) プローブもしくはNABiT (Nucleic Acids with Bis-Thiazole-orange) プローブとわれわれは呼んでいる(本稿では、ECHOプローブで統一する)。ECHOプローブは、チミンまたはシトシン5位の炭素原子からリンカーを介して2分子のチアゾールオレンジが連結されたヌクレオチド(D₅₁₄)を有している(図3)^{17,18}。ひとつのヌクレオチドに対してリンカーで連結された色素によって形成される分子内会合体は、色素の光物理学的特性を劇的に変えた。つまり、プローブが未ハイブリダイゼーション状態にあったとき480nmの吸収帯が強く現れた一方で、プローブが相補的DNA鎖とハイブリダイゼーションしたとき510nmの吸収帯が優勢になった。吸収帯のシフトは、未ハイブリダイゼーション状態のプローブにおいて色素間で会合体を形成し、それに起因する分子内色素間励起子相互作用

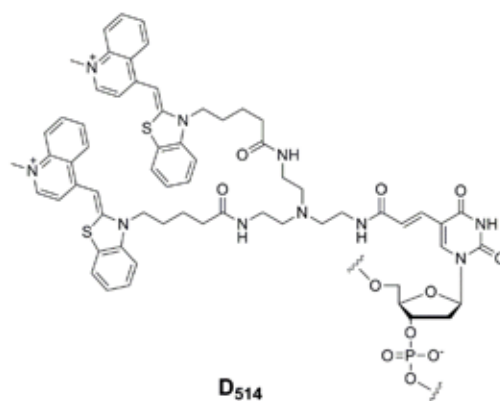


図3 ECHO プローブ(D₅₁₄)

用が現れていることを示した。その結果、標的DNAとハイブリダイゼーションする前には蛍光発光が強く抑制された一方で、相補的DNA鎖とハイブリダイゼーションしたときは、色素会合体の解離とそれらの核酸構造への緩やかな結合によって励起子相互作用は解除され、強い蛍光発光を示した。この蛍光強度の変化は、標的核酸とのハイブリダイゼーションを明確に検出するのに十分である。実際、相補的DNA鎖を含む溶液とプローブ溶液を混合すると、プローブ由来の黄緑色の明るい蛍光が白色光照明下で目視により鮮明に観察された。一方、プローブ単独の溶液や無関係な配列を持つDNAとの混合溶液は、蛍光を示さなかった。このような蛍光発光制御効果は、チアゾールオレンジ色素が2個同時にひとつのヌクレオチドに結合しているから生じるのであって、プローブに色素1個だけを接続するだけでは発揮されない。つまり、励起子制御系を基盤とした分子設計が、ハイブリダイゼーションプローブとしての機能を発揮するのに重要である。ハイブリダイゼーションに応じた蛍光強度の明確な変化は、概念的に新しいオン/オフ動作のDNA/RNA検出蛍光プローブとして、目に見える遺伝子解析に役立った。

3-3. mRNAの蛍光検出

前項で述べたような色素の会合と解離が、標的がRNAである場合にも効果的に制御できれば、この特性を新しいRNA検出プローブの設計に有効に応用できる。われわれは、上記ECHOプローブを相補的なRNA鎖とハイブリダイゼーションさせることによって、蛍光強度がどれほど変化するか検討した¹⁹。たとえば、ポリアデニンRNAを標的としたポリチミジン5'-d(TTTTTT₅₁₄TTTTT)-3'は、未ハイブリダイゼーション状態のときには蛍光はほぼ認められない。他方、アデノシン13量体(A₁₃)RNA溶液と混合した後は、黄緑色蛍光が白色光照明下で観察された。ハイブリダイゼーションに敏感な蛍光強度変化の原因は、この場合にも、吸収最大波長の変化によって説明できる。477nm(ハイブリダイゼーション前)から510nm(ハイブリダイゼーション後)への吸収帯の移動は、RNA鎖とのハイブリダイゼーションの前後で、チアゾールオレンジ色素間での励起子相互作用が効果的にスイッチしたことを示している。標的RNAとのハイブリダイゼーションが色素会合体の解離を誘発し、各々の色素は点灯する。A₁₃RNA鎖とのハイブリダイゼーションでの蛍光強度は、未ハイブリダイゼーション状態のときと比べて116倍(537nmの蛍光強度比)に増大した。蛍光強度の顕著な変化は標的RNA配列に対してのみ選択的に観察され、他の無関係なRNAを添加した場合の増大率は非常に小さい(<1.2倍)。未ハイブリダイゼーション状態で抑制されていた蛍光は、標的RNA混合後30秒以内に本来の蛍光強度の90%以上にまで回復した。蛍光強度は、プローブ濃度一定条件で、標的RNAの量との比例関係を示すので、RNAの定量も可能だろう。

われわれは、次に、生きた細胞の中のmRNAを視覚化するために、マイクロインジェクションを使ってECHOプローブ5'-d(TTTTTT₅₁₄TTTTT)-3'をHeLa細胞内へ導入した。細胞質領域へのプローブのインジェクションの直後、488nm励起での蛍光が細胞(特に細胞核)から観察された(図4)。その蛍光は、マルチチャンネルスペクトル検出器から得られた蛍光スペクトルによって、試験管内で観察された5'-d(TTTTTT₅₁₄TTT

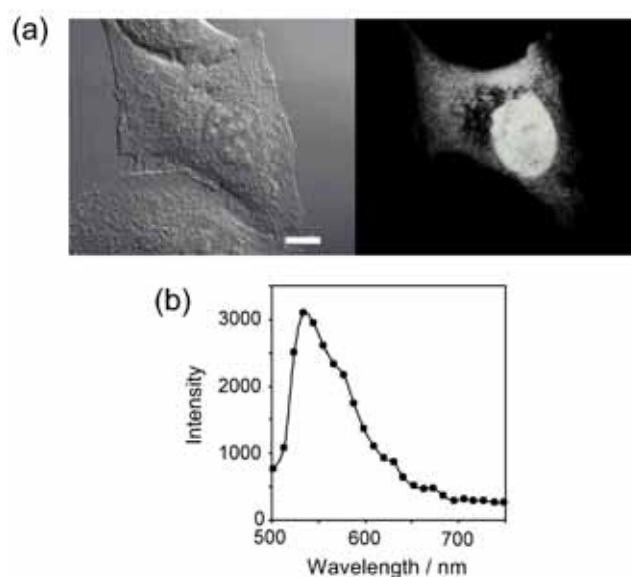


図4 HeLa 細胞の中で蛍光を発する ECHO プローブ(写真(a))とその蛍光スペクトル(b)

TTT)-3'の蛍光と同一であると確認された。mRNAを認識しない配列からなる蛍光プローブ2種類も同様の方法で生細胞内にインジェクションされたが、それらにおいて蛍光発光はほぼ観察されなかった。この結果は、5'-d(TTTTTT₅₁₄TTTTT)-3'が細胞内mRNAのpolyAテールを染色したことを示唆すると同時に、他の細胞構成要素と結合することによる非特異性の発光は現れないことを示している。ハイブリダイゼーション可能な細胞内RNAの量が時間とともに変われば、プローブの蛍光強度も変化する。たとえば、mRNAのpolyAテールに結合したプローブからの蛍光は、試験管内実験においてチミジン70量体(T₇₀)DNAの添加によって速やかに減少することが確認された。このT₇₀DNA添加による蛍光消光は、生細胞中の mRNAとハイブリダイゼーションして蛍光発光しているプローブに対しても観察された。T₇₀DNAのインジェクションの後、50秒以内に50%まで蛍光強度が減少した。この結果は、polyAテールに結合したプローブがT₇₀DNAによって置換され、未ハイブリダイゼーション状態に戻り蛍光消光に至ったことを示している。その間において、T₇₀DNAがインジェクションされなかった細胞の蛍光強度の減少はわずかである。(この減少分は、1分間の連続照射下で2%以内であり、褪色もしくはプローブの分解によると思われる)。われわれは、励起子相互作用に起因する蛍光消失の概念を適用し、ハイブリダイゼーションに敏感な、消光剤のない、RNA検出蛍光プローブを設計することができた。

ECHOプローブを用いれば、タンパク発現に関与するmRNAの増減を時空間的に追跡することが容易になる。われわれは、蛍光タンパクDsRed2の発現を標的にした。次の段落で紹介するプローブ設計戦略とRNAの高次構造予測の2点を考慮してDsRed2 mRNA検出プローブを設計し、DsRed2エンコーディングベクターとともに細胞にインジェクションした。すると、5分以内にプローブに由来する黄緑色の蛍光が核内に現れた。もちろんベクターとプローブの混合物は蛍光を持たないし、ベクターのみを細胞にインジェクションしても蛍光発光を示さない。この蛍光発光は、発現したmRNAにプローブが結合したことに由来するといえる。その後細胞質領域へ蛍光が広がっていく一方で、核内の蛍光は徐々に弱まっていった。しばらくすると、拡散した黄緑色の蛍光も弱まり始める一方で、赤色の蛍光が細胞質領域に現れ始めた。RNAがタンパクへ翻訳され、そのタンパクが会合して4量体を形成することによって蛍光タンパクとしての機能を発揮し始めたことを意味する。この実験において生細胞内でのRNAの増減や移動を時間を追って観察することができた。プローブの性能として真にRNAの挙動(特に定量性)を追跡できているのかまだチェックすべき点は多く残っていると考えるが、いずれにせよ、ECHOプローブが生細胞の中のRNAの検出とそれらの時空間的な特徴のモニタリングのための効果的道具として有効にはたらくことが確認できた。

ECHOプローブ配列の設計の段階で注意する点が1つある。原理上このプローブは自己相補的な配列を含むと自ら二本鎖を形成してしまい蛍光を生じる²⁰。結果として、ターゲット存在下でのシグナル変化が小さくなるとともに、バックグラウンド蛍光が目立ってくる。この自己二重鎖形成問題は、配列の中で色素標識ヌクレオチドの位置を変えてみたり、認識配列を数塩基ずらしてみたりすることで、容易に解決することが多い。われわれは、この問題を容易に解決するために、プローブ配列設計支援ソフトウェアを徳島文理大学喜納克仁講師のご協力を得て開発することができた。このソフトウェアを用いてプローブ合成前にあらかじめ配列について検討しておくことによって、未ハイブリダイゼーション状態において消光効率が悪いと思われる配列を事前に排除することができる。また、どうしても自己二重鎖形成を避けられない場合はグアニンとシトシンの誘導体であるイノシンとN⁴-エチルシトシンを用いることで解決できることがある²¹。イノシンはシトシンと、エチルシトシンはグアニンとそれぞれ水素結合を形成して相補的であるが、イノシンとエチルシトシンの結合力は弱く相補塩基対の形成には不十分である。この塩基でプローブを作成すると自己二重鎖形成が起こりにくくなる。いずれにせよ、より効果的なプローブを得るために、色素標識ヌクレオチドと認識配列の位置の選択に十分に注意を払わなければならない。配列選択の自由度を拘束する項目はそれだけ

であり、あとは標的RNA側の事情(高次構造の形成に関与する部分を避けるなど)に応じてプローブ設計すればよい。

4. おわりに

ECHOプローブを用いたさらなる実験として、24時間を超える長時間生細胞モニタリング²²、マルチカラーRNAイメージング²³、定温増幅法SmatAmp2法による血液1滴からのSNP解析²⁴などについても行ってきたが、紙面に限りがあるため今回は割愛したい。現在さらに進めているいくつかのプロジェクトとともに次の機会に紹介することでお許しいただきたい。

蛍光タンパクを融合したタンパクを細胞内で発現させるのとは異なり、いわゆる「蛍光RNAを融合したRNA」を細胞内で作り出すことはできない。目的のRNAに結合する何かを別途に細胞内で発現させるか細胞の外で作ったものを細胞の中に導入する必要がある。そして目的のRNAのどこに標識をするかは大変重要なことである。RNAの高次構造を変えるかもしれないし、RNAの機能を変えるかもしれない。RNAが何かにハイブリダイゼーションして発揮する機能が阻害されるかもしれない。しかし、外的要素無しにRNAを測定することは実際には不可能である。したがって、RNAを標識する場合には、プローブ設計だけではなく、RNA側の要請にも細心の注意を払わなければならない。観察しているRNAが真にそのRNA本来の挙動を示しているのかは、RNAの異なるサイトに対して標識を行って同じ結果が得られるか、もしくは異なる方法でRNAをそれぞれ標識して同様の結果が得られるかなど、多面的な考察が重要である。さもないと、蛍光プローブが「そこ」にあるということが示されるだけ、またはRNAがその条件でたまたまそういう挙動を示したというだけで、本来のRNAの局在化や移動や働きとかけ離れたものを観察している危険性を避けることができない。いずれのイメージング手法を用いるにしてもRNAの挙動への影響を最小限に抑えつつ最大の情報を得る努力を行うことが重要である。

本研究は、理化学研究所基幹研究所岡本独立主幹研究ユニット池田修司、久保田健の両ユニット研究員を中心にして精力的に進められた。本稿は、岡本が執筆した羊土社「実験医学増刊 生命現象の動的理解を目指すライブイメージング」(宮脇敦史／編)第3章-5と岡本研究ユニットメンバーである久保田健博士が執筆した日本組織細胞化学会「第35回細胞組織化学講習会テキスト」(2010年8月山梨大学)から一部抜粋・引用した。そちらにも詳しく述べているので、あわせて参照いただけると幸いである。関係の皆様は厚く御礼申し上げたい。

References

1. Valegard, K.; Murray, J. B.; Stonehouse, N. J.; van den Worm, S.; Stockley, P. G.; Liljas, L. *J. Mol. Biol.* **1997**, *270*, 724-738.
2. Rook, M. S.; Lu, M.; Kosik, K. S. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 6385-6393.
3. Fusco, D.; Accornero, N.; Lavoie, B.; Shenoy, S. M.; Blanchard, J. M.; Singer, R. H.; Bertrand, E. *Curr. Biol.* **2003**, *13*, 161-167.
4. Bertrand, E.; Chartrand, P.; Schaefer, M.; Shenoy, S. M.; Singer, R. H.; Long, R. M. *Mol. Cell* **1998**, *2*, 437-445.
5. Dynes, J. L.; Steward, O. *J. Comp. Neurol.* **2007**, *500*, 433-447.
6. Yamagishi, M.; Ishihama, Y.; Shirasaki, Y.; Kurama, H.; Funatsu, T. *Exp. Cell. Res.* **2009**, *315*, 1142-1147.
7. Ozawa, T.; Natori, Y.; Sato, M.; Umezawa, Y. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 413-419.

8. Tyagi, S.; Bratu, D. P.; Kramer, F. R. *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 49-53.
9. Tyagi, S.; Alsmadi, O. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 4153-4162.
10. Bratu, D. P.; Cha, B. J.; Mhlanga, M. M.; Kramer, F. R.; Tyagi, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13308-13313.
11. Wang, W.; Cui, Z. Q.; Han, H.; Zhang, Z. P.; Wei, H. P.; Zhou, Y. F.; Chen, Z.; Zhang, X. E. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 4913-4928.
12. Sando, S.; Kool, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2096-2097.
13. Sando, S.; Kool, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9686-9687.
14. Sando, S.; Abe, H.; Kool, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1081-1087.
15. Abe, H.; Kool, E. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 263-268.
16. Kasha, M. *Rad. Res.* **1963**, *20*, 55-71.
17. Ikeda, S.; Okamoto, A. *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 958-968.
18. Ikeda, S.; Yuki, M.; Yanagisawa, H.; Okamoto, A. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 7191-7195.
19. Kubota, T.; Ikeda, S.; Okamoto, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2009**, *82*, 110-117.
20. Ikeda, S.; Kubota, T.; Kino, K.; Okamoto, A. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1719-1725.
21. Ikeda, S.; Kubota, T.; Yuki, M.; Yanagisawa, H.; Tsuruma, S.; Okamoto, A. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 546-551.
22. Kubota, T.; Ikeda, S.; Yanagisawa, H.; Yuki, M.; Okamoto, A. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1256-1261.
23. Ikeda, S.; Kubota, T.; Yuki, M.; Okamoto, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 6480-6484.
24. Lezhava, A.; Ishida, T.; Ishizu, Y.; Naito, K.; Hanami, T.; Katayama, A.; Kogo, Y.; Soma, T.; Ikeda, S.; Murakami, K.; Nogawa, C.; Itoh, M.; Mitani, Y.; Harbers, M.; Okamoto, A.; Hayashizaki, Y. *Hum. Mutat.* **2010**, *31*, 208-217.

研究紹介

SUMO修飾を利用したタンパク質と
細胞機能操作

熊本大学大学院自然科学研究科

斉藤 寿仁

(hisa@kumamoto-u.ac.jp)



1. はじめに [1]

細胞内では、タンパク質の合成の途中あるいは合成された後に、ポリペプチド鎖を構成するアミノ酸にリン酸基、アセチル基、メチル基といった化学基やユビキチンなどの低分子量タンパク質分子が架橋することが観察されている。翻訳後修飾と呼ばれるこうした現象は古くから知られ、タンパク質分子の構造や機能を細胞外環境あるいは細胞内の状況変化に応じて変換するメカニズムと考えられている。表1には1977年のScience誌に掲載されたUy & Woldの論文を引用しているが、今から30年以上も前にすでに140種類もの翻訳後修飾の存在が報告されていた。その後も新たな翻訳後修飾の発見やその修飾反応を制御する

酵素群の発見は続き、翻訳後修飾に関する研究は分子生物学や生化学、細胞生物学といった分野と連動し活発な研究領域を形成している。

以下では、Small Ubiquitin-related Modifier (SUMO)と呼ばれるタンパク質による翻訳後修飾に関する研究の中から、著者らが中心となって進めてきた研究成果の一部を紹介する。

表1 タンパク質中に検出されるアミノ酸の誘導体・修飾アミノ酸

Table 2. Amino acids and amino acid derivatives in proteins. The following symbols are used to identify certain classes of derivatives: [] indicates derivatives, the existence of which is based on indirect evidence; italics indicate glycosylamino acids. The selection of the references in the table is rather arbitrary and does not properly acknowledge the individuals who discovered the different derivatives; an attempt was made to include the most recent research articles and reviews rather than the original reports. An attempt has been made to follow the nomenclature rules recommended by the IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry and the IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature. Abbreviation, ADP, adenosine diphosphate.

Primary amino acids	Secondary (derived) amino acids
Alanine	<i>N</i> -Acetylalanine (19); <i>N</i> -methylalanine (32)
Arginine	<i>N</i> ^ω -Methylarginine (33); <i>N</i> ^ω , <i>N</i> ^ω -dimethylarginine (34); <i>N</i> ^ω , <i>N</i> ^ω -dimethylarginine (35); ADP-ribosylarginine (36); citrulline (37); ornithine (38); arginyl-protein* (13)
Asparagine	Aspartic acid (16, 39); <i>N</i> ^ε -(<i>N</i> -acetylglucosaminyl)asparagine (10, 40); <i>N</i> ^ε (β-aspartyl)lysine† (41)
Aspartic acid	Aspartic α-amide (42); <i>N</i> -acetylaspargic acid (43); [<i>O</i> ⁴ -phosphonoaspartic acid] (44)
Cysteine	Cystine†, [<i>S</i> -mercaptocysteine] (45); <i>S</i> -galactosylcysteine (46); <i>S</i> -glucosylcysteine (47); <i>S</i> -cysteinyl-heme (48); 8α-(<i>S</i> -cysteinyl) flavin thiohemiacetal (49); [dehydroalanine]‡ (50)
Glutamic acid	Glutamic α-amide (42); γ-carboxyglutamic acid (51); γ-methylglutamic acid (52)
Glutamine	Glutamic acid (16); glutaminamide (53); pyroglutamic acid (54); <i>N</i> ^ε -(γ-glutamyl)lysine† (55)
Glycine	Glycinamide (56); <i>N</i> -acetylglycine (19); <i>N</i> -formylglycine (57); <i>N</i> -glucuronidylglycine (58)
Histidine	Histidinamide (59); π-methylhistidine (60); [π-phosphonohistidine] (61); [τ-phosphonohistidine] (61); 4-iodohistidine (62); 8α-(π-histidyl)flavin (49); 8α-(τ-histidyl)flavin (49)
Isoleucine	Leucyl-protein (14)
Leucine	
Lysine	<i>N</i> ^ε -Methyllysine (33, 34); <i>N</i> ^ε -dimethyllysine (33); <i>N</i> ^ε -trimethyllysine (33, 34); [<i>N</i> ^ε -phosphonolysine] (61); <i>N</i> ^ε -acetyllysine (63); <i>N</i> ^ε -(phosphoryldoxy)lysine (64); <i>N</i> ^ε -lipoyllysine (65); <i>N</i> ^ε -biotinyllysine (66); <i>N</i> ^ε -murein-lysine (67); allysine (68); dehydrolysinonorleucine† (68); lysinonorleucine† (68); allysine aldol† (68); dehydroallysine aldol† (68); dehydromerodesmosine† (68); merodesmosine† (68); dihydrodesmosines† (68); desmosines† (68); tetrahydrodesmosines† (68); "compound 285" † (68); (allysine aldol)histidine† (69)
Methionine	δ-Hydroxylysine (Hyl); the following compounds are derivatives of Hyl and the δ has been omitted: <i>N</i> ^ε -trimethylhydroxylysine (70); <i>O</i> ⁴ -(β-D-galactosyl)hydroxylysine (71); hydroxyallysine (68); (dehydrohydroxylysino)norleucine† (68); hydroxylysinonorleucine† (68, 72); (dehydrohydroxylysino)hydroxynorleucine† (68); (hydroxylysino)hydroxynorleucine† (68); syndesin† (68); dehydrohydroxymerodesmosine† (68); (dehydrohistidino)hydroxymerodesmosine† (73); (hydroxy-allysinealdol)histidine† (74)
Phenylalanine	Methioninamide (42, 75); <i>N</i> -acetylmethionine (76); <i>N</i> -formylmethionine (77)
Proline	Phenylalaninamide (78); [β-hydroxyphenylalanine] (79); <i>O</i> ⁶ -glycosyl-β-hydroxyphenylalanine (79); phenylalanyl-protein* (14)
Serine	Prolinamide (80); [3,4-dihydroxyproline] (81); 4-hydroxyproline (4Hyp) (4, 82); 3-hydroxyproline (3Hyp) (4, 82); <i>O</i> ⁴ -arabino-sylhydroxyproline (83); <i>O</i> ⁴ -galactosylhydroxyproline (84)
Threonine	Pyruvate (85); <i>N</i> -acetylserine (19, 30); <i>O</i> ⁶ -phosphoserine (86); <i>O</i> ⁶ -(ADP-ribosyl-phosphono)serine (87); [<i>O</i> ⁶ -methylserine] (88); <i>O</i> ⁶ -(4'-phosphonopantetheine)serine (89); <i>O</i> ⁶ -xylosylserine (90); <i>O</i> ⁶ -mannosylserine (91); <i>O</i> ⁶ -(<i>N</i> -acetyl-galactosaminyl)serine (92); <i>O</i> ⁶ -galactosylserine (93)
Tryptophan	[α-Ketobutyrate] (94); <i>N</i> -acetylthreonine (95); <i>O</i> ⁶ -phosphothreonine (86, 96); [<i>O</i> ⁶ -methylthreonine] (88); <i>O</i> ⁶ -fucosylthreonine (97); <i>O</i> ⁶ -mannosylthreonine (98); <i>O</i> ⁶ -(<i>N</i> -acetyl-galactosaminyl)threonine (92); <i>O</i> ⁶ -galactosylthreonine (93)
Tyrosine	Tyrosinamide (99); tyrosine <i>O</i> ⁴ -sulfate (100); 3-iodotyrosine (62); 3,5-diiodotyrosine (62); 3-chlorotyrosine (101-103); 3,5-dichlorotyrosine (103); 3-bromotyrosine (102, 103); 3,5-dibromotyrosine (102, 103); 5-bromo-3-chlorotyrosine (103); 3,5,3'-triiodothyronine† (104); 3,5,3',5'-tetraiodothyronine† (104); 3,3'-bityrosine† (105); 3,3',5',3'-tertyrosine† (105); <i>O</i> ⁶ -adenylyltyrosine (106); <i>O</i> ⁶ -uridylyltyrosine (107); [β-hydroxytyrosine] (79); <i>O</i> ⁶ -glycosyl-β-hydroxytyrosine (79); [dihydroxy-phenylalanine] (108); proteinlytyrosine* (15)
Valine	Valinamide (42); <i>N</i> -acetylvaline (109)

*These designations, aminoacyl-protein or proteinyl-amino acid, are used to list derivatives produced by the direct transfer of the aminoacyl moiety of aminoacyl-tRNA or of free amino acids to acceptor proteins. Since several amino acids are derived in these reactions, the derivatives have been listed under the amino acid that is transferred.

†These derivatives constitute protein cross-links. ‡The in vivo precursor of dehydroalanine is unknown. Since dehydroalanine is known to be a product of alkali treatment of cystine in vitro, it has been tabulated as a derivative of cysteine.

2. SUMO 修飾 [2]

SUMO は酵母からヒト、動物および植物に至る真核生物に保存されているユビキチンファミリーに属するタンパク質である。ユビキチンファミリーに属する SUMO、ユビキチン、Nedd8 の 3 つのタンパク質の立体構造を示したのが図1である。いずれも β -grasp と呼ばれる球状の安定したフォールドをとる特徴を有している。ユビキチンファミリーの中で、ユビキチンは前述の表1には載っているが、SUMO および Nedd8 は載っていない。これは SUMO と Nedd8 による翻訳後修飾システムの発見がユビキチン修飾に比べて新しいことを示している。

図2と図3には、SUMO 化反応が示されている。SUMO 化反応は、SUMO の C 末端のグリシン残基が Aos1 と Uba2 と呼ばれる2量体タンパク質から構成される E1 活性化酵素により活性化される反応、そしてそれに連続して起こる Ubc9 と呼ばれる E2 転移酵素による反応の2段階からなる。E2 酵素が標的タンパク質内の特定のリジン残基(アクセプター)側鎖の ϵ -アミノ基にイソペプチド結合することで SUMO 化反応は終結する。図3で用いている C2 と呼ばれる基質タンパク質は、RanGAP1 の C 末端領域である。この領域は生体内で極めて効率よく SUMO 化される基質として見出された[3]。RanGAP1 の 517 番目のリジン残基が特異的に SUMO 化されるが、C2 はこのリジン残基を含んでいることから SUMO 化反応を解析する際に人工的な基質として良く利用されている。RanGAP1 や C2 を試験管内(*in vitro*)で SUMO 化しようとする場合は、E1 と E2 のみで特異的な SUMO 化を行うことができるが、基質の種類によっては E3 と呼ばれる SUMO 化反応を基質の種類に応じて促進する因子が必要となる場合もある。

これら SUMO 化に関与する E1、E2、E3 酵素は SUMO に特異的であり、他のユビキチンファミリーの架橋反応を触媒することはない。また、ユビキチン化反応との比較においては、ユビキチン化が基質タンパク質内の特定のリジン残基を標的にすることが少ないのに対して、SUMO のアクセプターは、通常、特定のリジン残基として同定されることが多い。これは、SUMO の E2 酵素である Ubc9 が SUMO 化コンセンサス配列 Φ KxE(Φ : 疎水性アミノ酸残基、K: リジン、x: 任意アミノ酸、E: グルタミン酸)を直接認識できるためと考えられる。一方、解析が進んでいるユビキチン化反応では、多くの基質において E3 が必要なことや E2 因子にコンセンサス配列の認識機能がないと考えられ、こうした特徴は、反応を人為的に操作する上で、ユビキチンに比べて SUMO の方が操作しやすいことを示している。

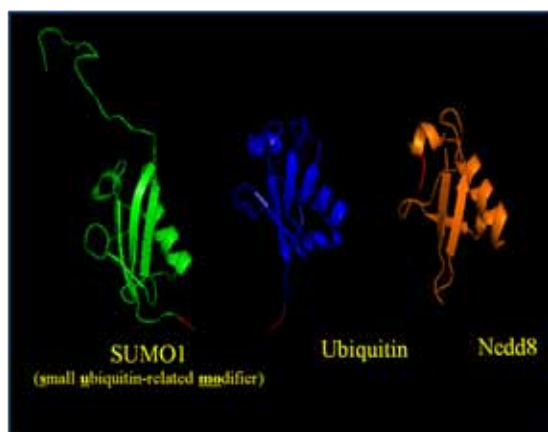


図1 ユビキチンファミリーに属する SUMO、ユビキチン、Nedd8 の立体構造 SUMOにはそのN末端領域に他のユビキチンファミリーにはない天然変性構造をとる約 20 アミノ酸を有する。この特性は SUMO の N 末端領域に他の機能ドメインを融合してもその構造と機能が独立することを保証すると考えられる。

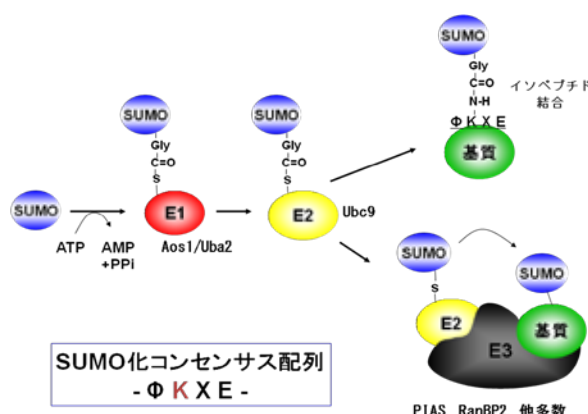
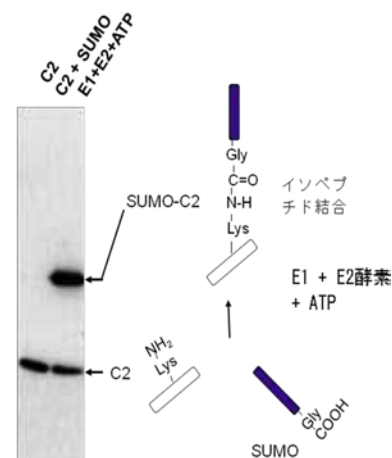


図2 SUMO 化反応 SUMO は E1 と E2 酵素(必要に応じて E3 酵素)を経て最終的に基質リジン残基にイソペプチド結合する。 Φ KxE(Φ : 疎水性アミノ酸残基、K: リジン、x: 任意アミノ酸、E: グルタミン酸)は SUMO 化コンセンサス配列を示す。

図3 RanGAP1-C2を基質に用いた場合の *in vitro* SUMO 化反応 C2 が SUMO 化されると SUMO の分子量分(約 15kDa)が SDS-PAGE でシフトして検出される。左は SDS-PAGE とウエスタンブロット法で合成産物を検出した結果。

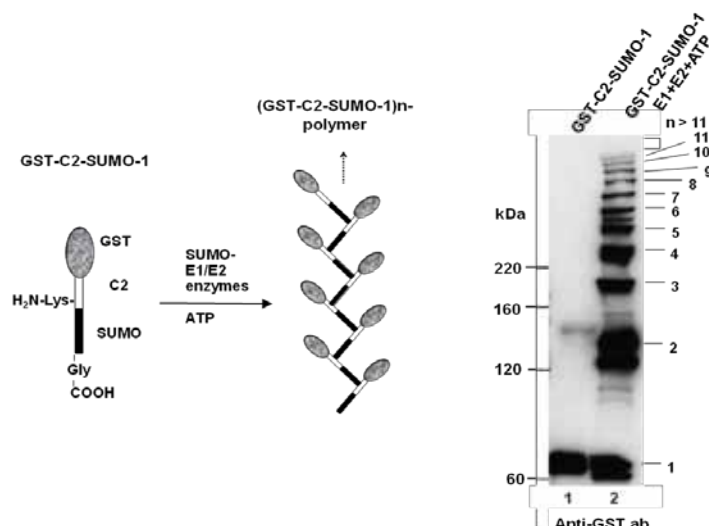


3. C2-SUMO 基軸を持つコンジュゲイト・ポリマーの作製

著者らは SUMO 修飾の研究を進める中、人為的にデザインしたリコンビナントの融合タンパク質が SUMO 化酵素の基質となることを見いだした。例えば、図4にはグルタチオン転移酵素 (GST) の C 末端を C2 タンパク質の N 末端領域に融合し、さらに C2 の C 末端に SUMO の N 末端を連結させた融合タンパク質 (GST-C2-SUMO) を大腸菌体内で合成させ、E1 および E2 による *in vitro* SUMO 化反応を行った結果が示されている。反応産物を SDS-PAGE に供し、ウエスタンブロットで検出したところ、ラダー状のバンドが高分子領域に多数検出された。この結果は図 4 の模式図で示す $(-C2-SUMO-)_n$ 基軸を持つ GST コンジュゲイト・ポリマーが合成されたと考えたと説明できる。ラダーの数を数えると 11 個のバンドが検出されていることから、この反応系では最長 $n = 11$ の重合度を持つ人工的な GST コンジュゲイト・ポリマーが反応産物として合成されたと推定できる。

ところで、現在までに報告されている RanGAP1-C2 の3次元構造の研究から、C2 と SUMO 間の相互作用は弱く、C2-SUMO 基軸は比較的高い自由度を持つと予想される。従って、C2 をアクセプターとした C2-SUMO 基軸構造の場合は、機能ドメインとして導入した GST はポリマー分子内で互いに干渉し合うことなく縦列して、それぞれの機能は独立に制御されると期待される。しかしながら、図4の GST-C2-SUMO 融合タンパク質の *in vitro* 合成結果を見る限り、 $n = 11$ 以上の重合度を持つコンジュゲ

図4 GST-C2-RanGAP1 リコンビナントタンパク質を用いた $(-C2-SUMO-)_n$ の基軸を持つ GST コンジュゲイト・ポリマーの合成 右は SDS-PAGE とウエスタンブロット法で合成産物を検出した結果。



イト・ポリマーの合成は難しく、ポリマー化反応の進行に伴う反応産物の高次構造の形成が何らかの障害(例えば立体構造による物理的な障害)を起こしている可能性を示唆している。今後、C2-SUMOの基軸構造の自由度を十分にいかし、より鎖長の長いポリマーを安定的に効率よく合成するためには、C2-SUMO 融合タンパク質の架橋化を促進する E3 因子や、C2-SUMO の重合化にともなう分子集合を調節するシャペロン因子を探索し、それらを反応系に加えるなどの工夫が必要と考える。

4. 様々なアクセプター配列と SUMO とのコンビネーション [4]

いくつかの問題点があるにせよ上述の GST-C2-SUMO 融合タンパク質のコンジュゲイト・ポリマーの合成結果は、C2 といった SUMO 化基質から SUMO 化のアクセプター部位を選択して、SUMO とアクセプターの融合タンパク質からなるコンジュゲイト・ポリマー分子をデザイン・合成できる可能性を示唆している。タンパク質の重合反応として一般的に用いられている架橋剤の場合、反応を非生理的な pH や温度で行うことで、目的タンパク質の構造や機能を著しく変性させてしまう場合が多い。また、トランスグルタミナーゼのような重合酵素を用いる場合は、結合部位の特異性を精密に制御することが困難であり、これもすべてのタンパク質のコンジュゲイト化およびポリマー化に十分対応しているとはいいがたい。一方、別の原理に基づく方法として、リコンビナント技術による融合タンパク質の合成もあるが、この方法では目的の機能単位を直鎖状に (α -アミノ基を介して) 配位させなければならず、合成された融合タンパク質内の機能ドメインの方向性は一義的に決定されてしまう。従って、いずれの手法を用いるにしても、タンパク質コンジュゲイト・ポリマーの空間的な配位を制御することは容易なことではなく、タンパク質工学の観点から見ると、既存の手法だけでは、タンパク質のコンジュゲイト・ポリマー化に十分対応できない状況にある。

上述した SUMO とそのアクセプター配列の組み合わせ基軸によるコンジュゲイト・ポリマーの合成は、SUMO 修飾酵素群を用い、導入する機能タンパク質に損傷を与えにくい点、そして空間配位のバリエーションを豊富に生み出せる可能性において、他の方法より優れた特性を有すると考える。現在、C2 以外のアクセプターの利用も考えている。例えばチミン DNA グリコシラーゼ (TDG) TDG は C2 同様に SUMO 化基質としての解析が進んでおり、C2 と異なり SUMO と TDG はそれぞれの分子間相互作用により安定な複合体を形成することが報告されている。このことから、仮に GST を TDG-SUMO 基軸に付随させた場合は GST が TDG-SUMO 基軸に対して一定の距離と角度を保ち、ポリマー基軸に対する機能ドメインの自由度は制限され、ポリマーの重合度や GST の機能発現において、C2-SUMO 基軸とは異なる性質を持つようになると期待される。

5. *in situ* SUMO 化法を用いた核膜孔の SUMO 修飾 [5-7]

ここからは、今までに紹介してきた SUMO 修飾酵素によるコンジュゲイト・ポリマーの合成に関する研究に加えて、最近の研究成果の中から応用的な発展が期待される SUMO 修飾を用いた細胞の機能操作に関する研究を紹介する。

SUMO 修飾は多くのタンパク質を細胞内の様々な場所で修飾することが知られているが、近年になり著者らは特定の条件下で SUMO 修飾が核膜孔において極めて効率よく起こることを見出した。この核膜孔における特異的な SUMO 修飾反応は、細胞膜の物質透過性を高めた培養細胞に蛍光標識した SUMO 分子を細胞内に取り込ませることで比較的容易に検出できる(図5)。生きている状態に近い細胞内部(*in situ*)で SUMO 化反応を行っていることから、著者らはこの反応系を“*in situ* SUMO 化法”と呼

んでいる。

この方法では、膜透過性を増すために細胞をジギトニンと呼ばれる界面活性剤で処理している。ジギトニンはコレステロールに対する特異性が高く、ヒトを含む動物細胞においてはコレステロール含量が比較的低い核膜に比べその含有量の高い細胞質膜に対する効果が格段に高く、ジギトニン処理した細胞では細胞質には十分量の穴があくが、核膜はインタクトのまま残る性質を持つ。こうした性質を利用することで、ジギトニン処理した細胞の細胞質領域に細胞外部から物質を透過させることができる。ジギトニン処理した細胞に E1 と E2 酵素、そして GFP-SUMO 融合タンパク質を ATP 存在下で反応させ細胞を蛍光顕微鏡下で観察したのが図6である。核の輪郭をなぞるように GFP 蛍光の集積が観察される。GFP-SUMO-G (SUMO 化が起こらない変異体)を導入したり、SUMO-E3 酵素である核膜孔タンパク質 RanBP2/Nup358 を siRNA でノックダウンさせた細胞を用いてこの反応を行うと GFP-SUMO の核膜への集積が観察されなくなることから、GFP 蛍光の核膜での検出は核膜孔において SUMO 化が活性化されたことを示すと考えている。細胞小器官である核の輪郭のみを特異的に修飾できる方法は今までに報告がなく、SUMO 化反応は核膜修飾を行う上で極めて有用と言える。さらに前述した人工的なコンジュゲイト・ポリマーを合成する反応を応用すれば、核膜に特異的な機能ドメインをポリマー化して導入することも可能になる。現在、核の操作は iPS 細胞をはじめとする細胞の初期化の研究や細胞(核)融合によるリプログラミングの研究などで重要な技術として注目されており、*in situ* SUMO 化法の発見は細胞の核オルガネラ機能の操作への新たな技術開発につながっていると考えている。

本法については最近さらなる改良が進んだので最後に簡単に述べることにする。図5には新旧2つの方法の概略が示されているが、右に示した改良法では、1) GFP-SUMO の蓄積は E1 や E2 酵素を反応系に加えなくても観察できる、2) 反応に用いる GFP-SUMO は精製する必要もなく、大腸菌体を超音波

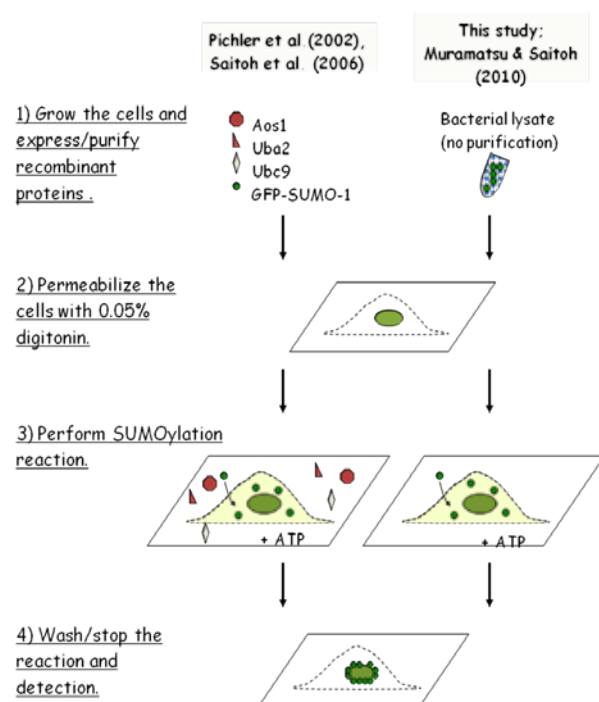


図5 *in situ* SUMO 化法の概略図 左は反応系に精製した因子群を加える手法で、右は簡略法である。右の簡略法は極めて簡便であるが左の手法に比べてシグナルの強度は弱い。

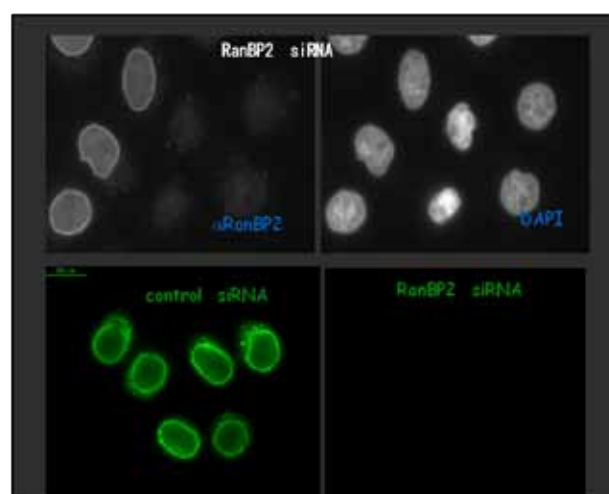
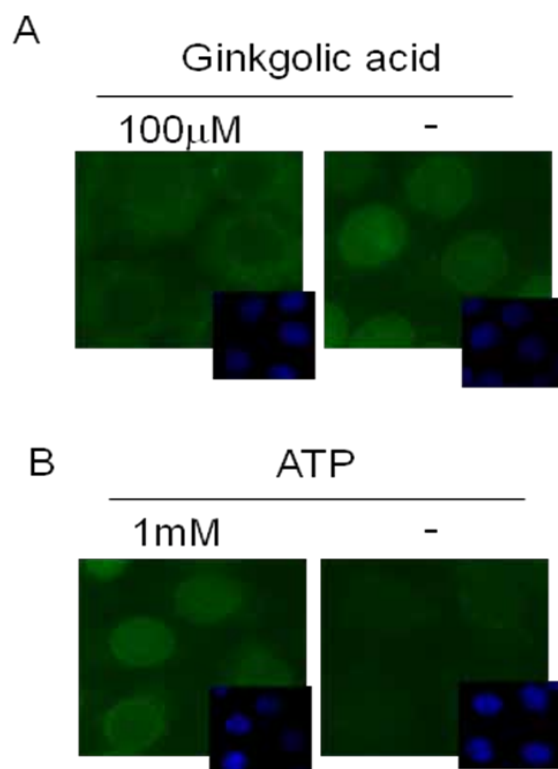


図6 *in situ* SUMO 化反応は核膜孔構成成分の RanBP2 に依存する RanBP2 を siRNA によって効果的にノックダウンした細胞では *in situ* SUMO 化反応において核膜への GFP-SUMO の集積が確認されない。

処理して破碎した抽出液を用いる、の2点において左に示す従来の方法と比べて、SUMO 化反応の検出時間は格段と早まり、全体の操作時間も短縮されている。また、必要とする試薬類が大幅に軽減されている。一般に低分子化合物のスクリーニングは簡便で短時間で操作が完了することが望まれており、加えて操作に関わる費用が安価に抑えられることも強く望まれる。簡易 *in situ* SUMO 化法はこうした条件をすべて満たすことから、大規模な低分子化合物ライブラリーのスクリーニングに向いていることが強く示唆される。図7に示すように簡易 *in situ* SUMO 化法を用いた ATP やギンコール酸の効果の検証がすでになされており、今後この方法を用いて様々な SUMO 化阻害因子や制御因子が探索されることが考えられる。

図7 簡易 *in situ* SUMO 化法を用いた低分子化合物の検定 簡易 *in situ* SUMO 化法を用いることで低分子化合物のスクリーニングも可能である。上図はギンコール酸を用いて、下図は ATP の非存在下で簡易 *in situ* SUMO 化反応を行った結果を示す。ギンコール酸は阻害的に、ATP は促進的に働く低分子化合物であり、これらの結果は、本法が低分子化合物のスクリーニングにも適していることを示す。



6. まとめ

本稿では SUMO とその修飾酵素を用いた人為的なタンパク質コンジュゲイト・ポリマーの合成法と細胞の核膜の特異的な修飾法を紹介した。いずれの方法もそれらを用いた基礎的な研究レベルにとどまっており、まだ実用化されるような応用例あるいは応用的な展開はなされていない状況にある。今後は、幅広い分野の研究者の方々との共同研究等を通じて、実用性と付加価値の高いバイオコンジュゲイト・ポリマーのデザイン・合成に挑戦したり、核膜操作を介した細胞融合やエピゲノム操作を行いたいと考えている。また、他のユビキチンファミリーを用いた系の開発や、その他の翻訳後修飾酵素群を用いたタンパク質工学・細胞工学の研究分野への展開も進めていきたい。

謝辞

本研究を行うにあたり、J-Power 電源開発株式会社、(財)くまもとテクノ産業財団から研究助成を受けました。ここに篤く感謝申し上げます。研究を遂行するにあたり、熊本大学大学院自然科学研究科博士課程前期の村松みゆきさん、同大学院博士課程後期の宇和田淳介さん、同大学理学部理学科生物環境プログラム4年生の松本尚之さんの協力を得ました。ここに深謝します。

参考文献

- [1] Uy, R.; Wold, F. *Science* **1977**, *198*, 890-896.
- [2] Geiss-Friedlander, R.; Melchior, F. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 947-956.
- [3] Reverter, D.; Lima, C. D. *Nature* **2005**, *435*, 687-692.
- [4] Baba, D.; Maita, N.; Jee, J.-G.; Uchimura, Y.; Saitoh, H.; Sugasawa, K.; Hanaoka, F.; Tochio, H.; Hiroaki, H.; Shirakawa, M. *Nature* **2005**, *435*, 979-982.
- [5] Pichler, A.; Gast, A.; Seeler, J. S.; Dejean, A.; Melchior, F. *Cell* **2002**, *108*, 109-120.
- [6] Saitoh, N.; Uchimura, Y.; Tachibana, T.; Sugahara, S.; Saitoh, H.; Nakao, M. *Exp. Cell Res.* **2006**, *312*, 1418-1430.
- [7] Muramatsu, M.; Uwada, J.; Matsumoto, N.; Saitoh, H. *Biosci. Biotech. Biochem.* **2010**, in press.

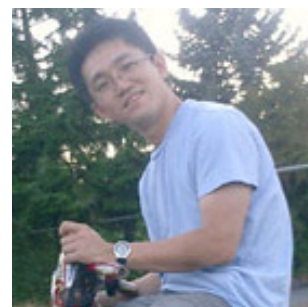
研究紹介

細胞死経路の代謝工学と遺伝子回路の
進化工学

千葉大学大学院工学研究科

梅野太輔

(umeno@faculty.chiba-u.jp)



1. はじめに

本年5月、ついに J. Craig Venter研究所で、純粋な配列情報から「おこした」遺伝子をゲノムとする「人工」細胞が造られ、大きな話題となっている¹⁾。「細胞を創る」最大の障壁は、遺伝子の合成そのものではなく、「何を書くか」という問題に回帰しつつある。

望むかたち、望む性質、望む振る舞いをする細胞。それは、いったいどのような遺伝子配列を描けば、創れるのであろうか。組換え技術に基づく「遺伝子プログラミング」技術は、異種由来の蛋白質の発現や有用物質の生産経路のようなものから、より高度でダイナミックなもの、カウンタとかメモリとか、細胞間コンソーシアム形成や同期機能など、情報統合・処理、通信などに変わりつつある²⁾。

また、造り上げた細胞を現実世界で活躍させるつもりならば、自律性や永続性、利他性など、分子レベルでの道徳教育／訓練が不可欠になってくる。ここで想起するものは、研究室教育の現場におけるそれと、殆ど変わらない。正確に24時間周期を刻む体内時計(男子生徒諸君…欲しいよね?)、与えられた仕事に全細胞資源を投じる集中力(スタッフ諸君…メタボリック?)、オフの日は代謝経路を閉じ冬眠する経済性(みなさん是非考えましょう)、公共の福祉のために身を捨てる利他性・社会性(ココ、うちではパスで結構です)、失敗から学び、二度と同じ轍を踏まない学習力(…みんなで深く反省しよう)…私たちの研究室では、それぞれが我が身を棚におき、大腸菌や酵母などにこのような「高度な？」分子教育を施すことを究極の目標とし、代謝経路や情報経路などの進化工学を展開してきた。本稿では、その幾つかのプロジェクトを紹介させていただきます。

2. 細胞のプログラム死機構の構築

プログラム死(Programmed Cell Death、PCD)は、遺伝的に制御された自殺機構であり、多細胞生物の発生・分化、組織形成などに中心的な役割を果たしている。最近になって、微生物界にもPCDが広く定着しており、細胞の集団機能や、その集団の適応度や健全性の維持に不可欠な役割を担うことが知られるようになった。身勝手に見える原核細胞も、集団の中で「空気を読みながら」、たまには異種とさえ互いに協力し、自分の所属する共生システムの永続性に寄与している。

この利他性は、我々がつくった組換え生物(細胞)の集団操作にも、是非取り入れたいものである。遺伝子組換え体をフィールドワークさせるためには、それを保証する完璧な安全技術が前提となる。環境浄化にせよ物質生産にせよ、細胞(微生物)は、単独ではなく集団単位で働く。膨大な集団の中には、遺伝子回路が損傷し、プログラムに従わなくなってしまった細胞しばしば現れる。その出現は、それらが請け負う仕事の負荷が高いほど、そして細胞内に実装する遺伝子回路の集積度が高いほど、深刻な問題である。

これを受けて、特にバイオレメディエーション分野の研究者たちは、自らの故障やタスク終了を感知し自己消去する機構を古くから検討してきた(図1)。いままで、細胞壁破壊、タンパク質合成阻害、核酸分解…

さまざまな毒性蛋白質や経路によってPCD機構が創られてきたが³⁻⁵⁾、いずれも、それを生き延び無力化する適応変異が知られている。また、それぞれの細胞死装置が示す馬力(死の効率)も高くないものが多く、それらの組み合わせなどが検討されているのが現状である。

一方で、HIV などレトロウイルス集団の根絶法として有望視されているのが、「情報毒」による殲滅機構⁶⁾である。自己複製する分子システムは、その複製精度がある閾値を下回ると、ランダム変異を高速に蓄積する。その子孫はどれも、さまざまな機能不全に陥り絶滅する。この機構を条件依存的に誘発してやれば、細胞集団を任意のタイミングで安全に消去できる。

この機構の特徴として、耐性化菌の出現しにくさが指摘されている。ある細胞がたまたまその適応変異を得たとして

も、そのときは既に、より多くの有害変異を蓄積して増殖能力を著しく失っている。遺伝子情報の破壊は「その力価が十分高いとき」逃げ道のない確実な殺菌プログラムとなりうると期待される。

さて、細胞性生物の自己複製は、微生物も含めて、極めて高い精度で行われている。そのため、ウイルスなどとは違い、細胞性生物の「絶滅」機構には向かないと信じられてきた。私たちは、「無理かもね」、などと話し合いながらも、修復機構やミューテータ型複製酵素、塩基デアミナーゼなど、さまざまな変異発生因子のPCD装置としての性能を試してきた。これらのなかで、突出した可能性を示したのが、dPという変異源性ヌクレオシドに依存する変異発生装置である。この分子は細胞膜を通過し、ピリミジンのサルベージ回路を経由してDNAに取り込まれる(図2a)。この塩基はAともGとも対合できるため、ゲノムにトランジション変異が頻発する(図2b)。これを発見した岡山大の根岸らによれば、十分量(一数十 μ M)のdPを加えた培地では、実に9割近い大腸菌がコロニー形成能を失うという⁷⁾。

私たちはこれにおおいに興奮し、この「dP キナーゼ」の経路を一から鍛え上げることにした。最終生産物が「死」であることを除けば、物質生産量の最適化と同じであり、代謝工学者のふつうの営みが適用される: 律速段階の解明、律速酵素活性のスクリーニング、改良酵素のコンビナトリアル発現、など…。詳細は省くが、極低濃度(nM: 正常細胞には全く影響ない濃度)のdPを与えるだけで、数分のうちに、文字通り「一匹

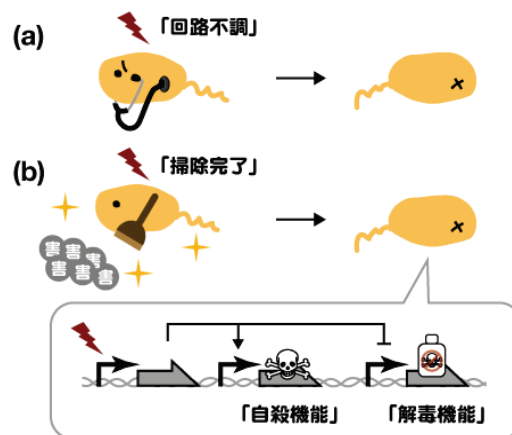


図1 細胞の自己消去装置 (a) 自己の状態に異常を感じたら、あるいは、(b) タスク終了と同時に、宿主に毒を盛り、自己消去させる

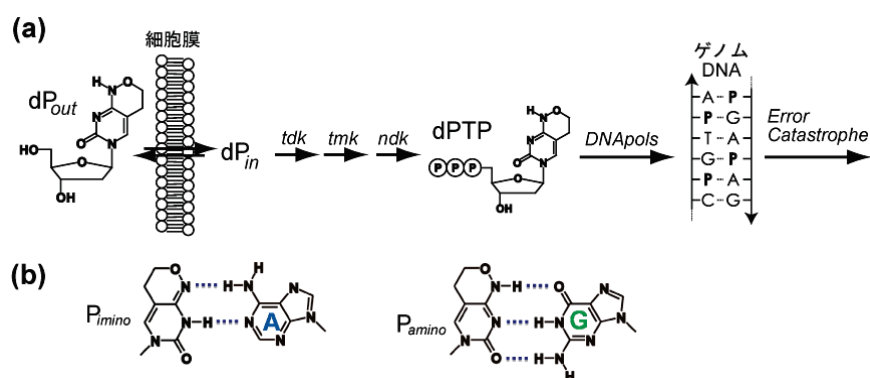


図2 dPとりこみによるエラーカタストロフィ: (a) dPはピリミジンのサルベージ回路を経由してDNAに取り込まれる、(b) DNAは、AあるいはGのどちらとも対合できるため、GC/TAあるいはTA/GCトランジション変異を頻発する⁷⁾。

残らず」絶滅する(その「死の効率」は高すぎて、いまだに測定不能である)、極めて堅牢／強力な「情報死」の経路を得ることができた。

複製に依存する本機構が、たった5分の暴露で不可逆的に細胞死をもたらすことを、奇異に感じられる方もおられるかもしれない。これは、ひとたびキナーゼ経路が発現すると、dP のリン酸化産物 (dPMP、dPDP、dPTP) の膜透過性が極小であるため、細胞内に蓄積してゆくことを考えると理解できる。細胞は dPTP を蓄積している段階ではまったく正常であるが、次に複製する際に、細胞内の dPTP をゲノムに取り込み、その時点で細胞死に至る。実際に dP 処理した細胞を観察すると、何時間もの間、走性もタンパク質合成能／代謝機能を保持していた: 増殖能力を奪われながらも、生化学的に無傷な死細胞集団 (Zombees と呼んでいる) は、生態系を破壊しない安全なフィールドワーカーとして極めて有望である。また、キナーゼ活性によって創られる毒性物質 (dPTP) は、細胞透過性が極小なリン酸化産物であり、隣接細胞に取り込まれることは殆ど考えられない。自分だけ、迷わず死ぬ機構という点でも、優れた PCD 機構である。

3. PCD 回路の Plug & Play

この「死の経路」は、任意の遺伝子回路の出力側に連結して使うことができる。たとえば、図3aに示す遺伝子回路では、キナーゼ経路はLuxスイッチの制御下に配置されている。Luxスイッチとは、グラム陰性菌 (*Vibrio fischeri*) のクオラムセンシング機構の一部を取り出したものである。アシル化ホモセリンラクトン (AHL) という分子群の濃度が高いとき、センサタンパク質LuxRを常時発現しており、これがAHLと結合すると、LuxRは2量化し、Luxプロモータに結合する。Luxプロモータに結合したLuxRは、転写装置をリクルートし、プロモータ下流の遺伝子発現を促す…。この分子過程はたいへん複雑で、未解明な点も多々あるが、要するに、この遺伝子回路は、AHL濃度が高いとき、細胞内のdPキナーゼ活性を発現する。このときdPが培地にあると、宿主細胞は速やかに死滅する。

一方、図3bの回路は、AHL(入力)によって、ファージ由来のCIというタンパク質を発現させる。このCIは P_L プロモータと呼ばれる配列に結合し、その下流におかれたキナーゼ経路の発現を抑制している。AHL濃度が下がると、この抑制因子(CI)は解除されるため、キナーゼ活性は発現する。dP培地では細胞は速やかに死滅する。

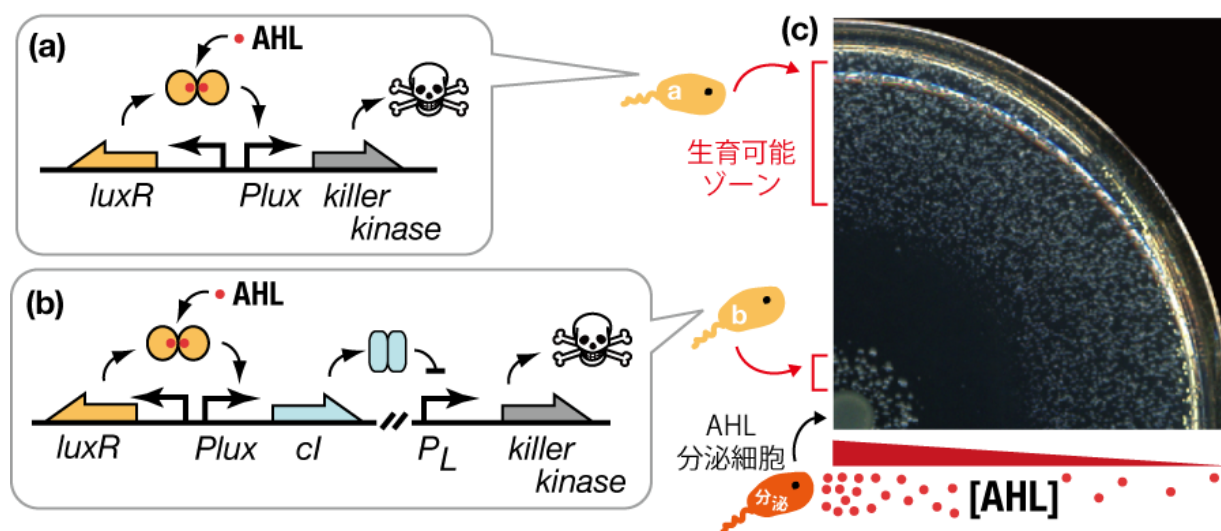


図3: 遺伝子回路によるPCDの起動制御 (a) AHL→細胞死の回路、(b) AHL→インバーター細胞死の回路、(c) 均一な細胞混合系にAHL分泌細胞をスポットすると、その周囲にマクロなパターンを形成する。



図4: dPキナーゼは、宿主細胞を殺しもしれば、生かしもする。ヌクレオシドキナーゼを発現した細胞は緑色蛍光タンパク質(GFP)で、発現していない細胞を赤色蛍光タンパク質(mRFP)で着色してある。5FdUの存在下はキナーゼ経路がON状態にある細胞のみが、dPの存在下ではキナーゼ経路がOFF状態の細胞のみが選択的に生き残る。

図3cに示すのは、図3aおよび図3bの回路をもつ大腸菌混合物を寒天プレートの上に塗り広げたものである。その中心に、AHLを分泌するグラム陰性菌をスポットすると、前者は、AHLの届かないところ、すなわちその送信者から遠く離れた区域でしか生き残れない。それとは逆に、図3bの回路を導入した細胞は、AHLレベルが低いところで死の経路が発動してしまうため、送信者コロニーのごく周辺でしか生きられなくなる。このような細胞の「位置決め」機構は、細胞の労働区域を指定する安全技術として、あるいは、多細胞集団に人工のボディプランのプログラムとして役に立つと考えている。

なお、これまで述べて来た dP キナーゼは、本来は、細胞内のチミジン合成経路のバックアップ機構(サルベージ経路)に関わる酵素である。5-フルオロウラシル(5FdU)などの薬剤などでチミジン合成経路を阻害すると、その細胞は、その増殖を、この酵素の活性に完全に依存するようになる。内在性のヌクレオシドキナーゼを欠損させた細胞(tdk 株)は、5FdU 存在下では、外から導入したキナーゼが発現するときのみ、増殖できるようになる(図4)。

4. 遺伝子回路とスイッチ素子の進化工学

Device Genetics が始まって約10年、最近は、カウンタや光／陰境界の検知など、かなり複雑な遺伝子回路も制作され始めている²⁾。しかし、機械や電子回路に比べると、遺伝子回路の集積度はまだまだ、はるかに低い。遺伝子回路の集積化(高度化)を阻む最大の要因は、各要素(遺伝子スイッチや基本回路)の特性(Device Physics)の記述が不十分であること、更に、特性や振る舞いが環境やコンテキストに強く依存すること、にある。このような状況では、いかに正しいモデルを構築しても、インプットが信用できないため、モデルのアウトプットを信じて建設作業に入ることはできない。

この問題への処方箋として、横林とArnoldらは、「遺伝子回路の進化工学」を提案した⁸⁾。彼らによれば、遺伝子回路は、とりあえずモデルに従いプロトタイプとして組み立てるべきである。次に、それを試験管内で多様化して回路「ライブラリ」をつくる。この中には、デザインどおりの振る舞いを示すのに必要なパラメータセットをもつ回路も存在するはずである。

どんな凝った複雑な回路も、結局は、入力条件に従って出力の ON/OFF 変換をするのみである。それゆえ、遺伝子回路の進化工学の作業工程はたいへんシンプルになる。我々は、図4に示すキナーゼ経路のデュアル機能を用いた、遺伝子スイッチの選択法を開発した(図5a)。その工程は以下のとおりである。

- (1) 多様な遺伝子回路のライブラリを調製する。

- (2) 上のライブラリを大腸菌に導入し、ON 条件(タイミング)にて 5FdU と dT のカクテルを添加する。正しくキナーゼ経路の発現を ON としたものはサルベージ回路に依存して増殖させる。このとき、不適当にも OFF 状態を示す回路変異体は、チミジン欠乏によって死滅する(ON 選択)。
- (3) 上の生き残った回路ライブラリを、OFF 条件の培地において、dP を添加する。誤ってキナーゼ回路が起動状態にある細胞は、速やかに細胞死に至る。一方、正しく OFF 状態にあった回路はすべて生き残る(OFF 選択)。

こうして、任意の回路機能を簡単に得ることができる。たった1ラウンド(およそ1日)の作業で、正しく働く遺伝子回路を、漏電やクロストークなどの不適当なスペックを持つダメ回路の中から再現性よく拾い上げることができた。その濃縮効率は $\sim 30,000$ 倍/run という驚嘆すべき効率であった。

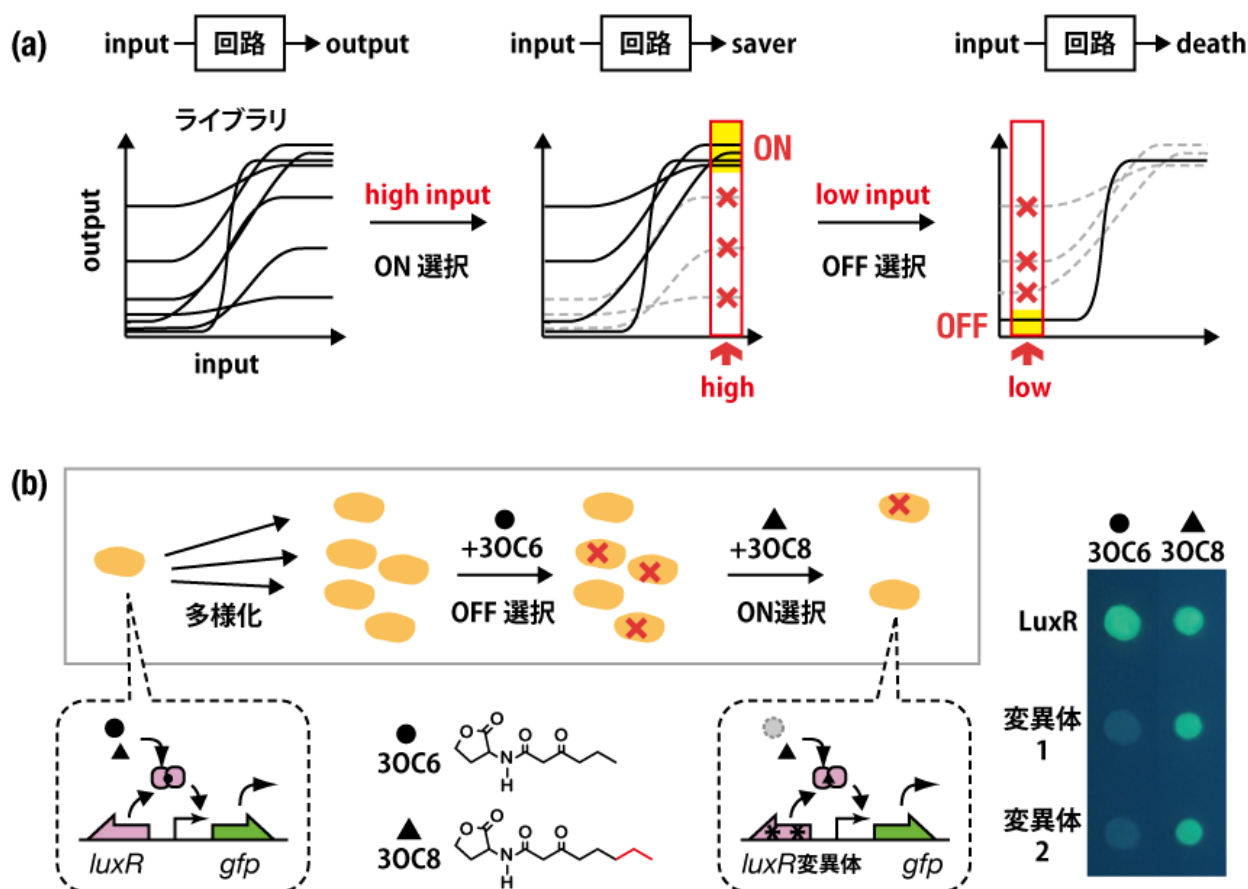


図5: 遺伝子回路の進化デザイン (a) その作業概要。回路ライブラリを、それぞれ細胞に導入し、起動すべき条件下(タイミング)におく。このとき、回路の出力側には、発現が細胞の生存に必須となる遺伝子を繋いでおく。回路が正しくON状態にならない回路は、細胞ごと死滅してしまう(ON選択)。つぎに、このON選択を生き残った回路群を、こんどは起動してはならない条件下におく。このときの出力側は、細胞死をもたらす毒性遺伝子に置換する。不適当にもON状態にある回路は、速やかに除去される(OFF選択)。この2つの操作を生き残った回路(あるいは素子)こそが、デザインどおりの機能をもつ、正しい遺伝子回路にちがいない。(b) AHL→GFP回路の特異性進化。3OC8型シグナルの存在下でON選択をし、3OC6型シグナルの存在下でOFF選択を行ったところ、3OC6にのみ応答する回路が得られた。

たとえば、図5bは、図2aに示した AHL→GFP 回路の機能改変を試みた結果である。LuxR タンパク質は基質選択性が低いため、それを基本素子として構成した回路はいろいろな構造の AHL 分子に応答する性質がある。本系を用いて、この回路を、異種アグロバクテリアの分泌する 3OC8 型 AHL にのみ応答する回路につくりかえる作業を行った。

- (1) LuxR の構造遺伝子部位のみを変異 PCR によってランダム化した。
- (2) 3OC6 型 AHL の存在下で dP を加え、30 分温置した (OFF 選択)。
- (3) 3OC8 型 AHL の存在下で 5FdU/dT を加え、一晚培養した (ON 選択)。

その結果、2つのシグナル分子(その構造的差異はメチレンユニット2つ分である)を、ほぼ完全に見分け、3OC6 に選択的に応答するセンサ回路を、たった1ラウンドで得ることができた。このようなシグナル選択性の高い AHL 受信回路は、混線なく多チャンネルで細胞間に化学通信を行わせるためには不可欠であり、合成生物学のよきスタンダードツールになると期待される。

本手法は、選択条件をかえるだけで、リガンド選択性のみならず、応答感度やダイナミックレンジの向上、二相性(切れ味)の改良や、応答(遅延)速度、アゴニスト/アンタゴニスト応答の逆転など、センサ/スイッチ素子の Device Physics を自在に変換することが可能である。もちろん、得た変異体に見いだされるアミノ酸置換の構造マッピングは、一他の進化工学プロジェクトがそうであるように、一遺伝子発現に関わる多くの蛋白質に対して、貴重な構造情報を与えるに違いない。

5. おわりに

自然界の複雑で精巧な遺伝子ネットワークはすべて、進化というアルゴリズム(多世代にわたる多様化→機能選択の繰り返し)が生み出したものである。この過程を実験室内で加速的に、そして並列におこなうことが可能となった。回路の進化デザイン工程を規格化、自動化することによって、自然界にみられる堅牢で精緻な遺伝子ネットワークを短期間に効率的に建設できるようになる。

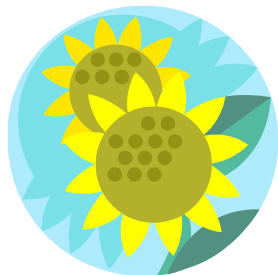
Device geneticsという言葉が提唱されて10年、細胞機能のプログラミング技術は多に発展した。その一方で、細胞の安全操作技術の実施者は存外に少ない。航空機産業や原子力技術なども、たゆまぬ安全技術開発によって、世に貢献する機会を得た。細胞工学においても同様、遺伝子組換え生物の雇用拡大には、さまざまな安全技術の開発が不可欠であろう。我々は本稿で述べた PCD のほかにも、細胞に利他性、献身、チームワークなどを「プログラム」するいくつかの試みを行なっている。これらを含めたあらゆる安全技術は、合成生物学者を「tinkering」から「save the world」に宗旨替えさせるために、一定の価値があると信じる次第です。

6. 謝辞

本稿は田代洋平君(博士2年)の率いるチームの成果をまとめたものです。また、私の話から本稿の図を起こしてくれた古林真衣子さん(修士2年)にも感謝申し上げます。

参考文献

1. D. G. Gibson, *et al.*, *Science*, **329**, 52-56 (2010)
2. A. S. Khalil and J. J. Collins, *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 367-79 (2010)
3. J. Davison, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 639-50 (2005)
4. G. Pandey, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **327**, 637-9 (2005)
5. D. Paul, *et al.*, *Bioessays*, **27**, 563-73 (2005)
6. C. O. Wilke, *BMC Evol. Biol.*, **5**, 44 (2005)
7. K. Negishi, *et al.*, *Genetics*, **161**, 1363-71 (2002)
8. Y. Yokobayashi, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16587-91 (2002)



気になった論文

澤田 敏樹 (さわだ としき)

東京大学 駒場オープンラボラトリー 助教

東京大学 先端科学技術研究センター 助教(兼務)

t-sawada@bionano.rcast.u-tokyo.ac.jp

この度は生命化学研究レターへの執筆機会を頂き、心より感謝致します。私は本年3月に三原久和先生のご指導のもとで学位を取得し、4月より東京大学先端科学技術研究センターにおいて、芹澤武先生の研究室に助教として着任致しました澤田敏樹と申します。若輩者ですが、研究・教育に精進して参りたいと思いますので今後ともよろしくお願い致します。現在は、生物や生体の優れた機能を最大限利用し、化学の力でマテリアルを新たに創製し、機能化へと導くことを目標に日々研究に励んでおります。さて一口に生物・生体と言いましても、分子であるタンパク質・ペプチドや DNA から、細胞、個体と実に様々ですが、ここではウイルスを巧みに利用し、マテリアル創製への展開を目指した論文をいくつかご紹介させていただきます。

ウイルスが、ホストである細胞によって増殖される感染性の構造体であることは言うまでもありませんが、化学者の視点からウイルスを見ますと、ウイルスは DNA とタンパク質との複合体である“有機ナノ分子”と見なすことができます。特に、ウイルスのサイズや形状、また表面に存在する官能基は明確にゲノム遺伝子によって規定されており、さらにウイルス自体は細胞への感染によって容易に増幅可能です。それ故、ウイルスはハイブリッドマテリアル構築のための優れたスキャフォールドとして非常に魅力的な分子組織体と言えます。こうした研究の中から、ウイルスの自己組織化を制御する論文を1報、ウイルス自体をマテリアルとして利用する論文を2報、紹介させていただきます。

Self-assembly and optically triggered disassembly of hierarchical dendron-virus complexes

M. A. Kostianinen, O. Kasyutich, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. Nolte, *Nat. Chem.*, **2**, 394-399 (2010)

天然においては、多価相互作用はいたるところに存在し、他に例を見ない特性や機能の発現に大きく影響しています。著者らは、ウイルスや他のケージ構造の表面に接着能を有する可逆的な結合骨格の構築を目的とした研究を展開してきました。本論文ではデンドロンを巧みに活用し、20面体の外殻タンパク質が180個自己組織化した構造を持つ、RNA ウイルスである cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) の自己組織化の制御を達成しました。用いた CCMV 外殻タンパク質表面にはカルボン酸が多数存在することから、自己集合化促進のためにデンドロン末端にはアミンをもつ設計とし、さらに集合体を解離させるため光照射により分解する官能基を導入しています(図1)。

このデンドロン存在下においては、デンドロンを介した CCMV の集合化が速やかに進行し、用いるデンドロンの世代(G0~G2)や濃度によって集合体のサイズの制御が可能でした(約200 nm~1.5 μ m)。さらに1

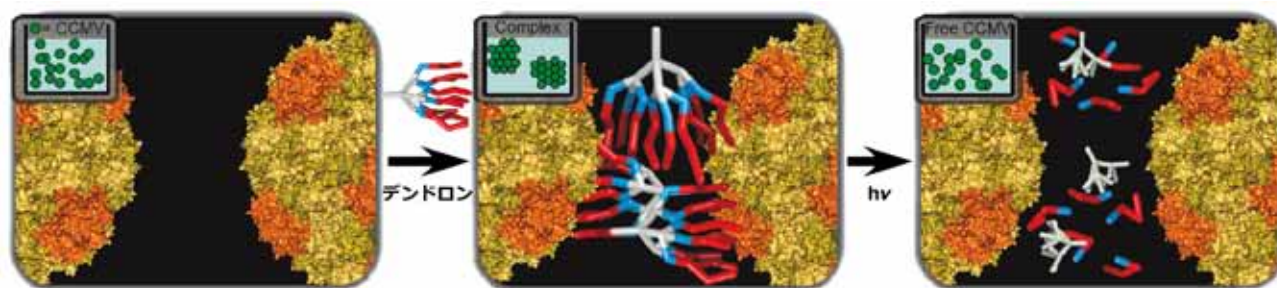


図1 デンドロンを利用した CCMV の集合化(左～中)と光をトリガーとした解離の模式図(中～右)
(論文より一部抜粋して改変)

分間の UV 照射によってデンドロンは分解し、CCMV は速やかにデンドロン添加前の分散状態へと解離しました。また、この集合化はデンドロンの世代が高いほど低濃度で効率的に起こり、さらに塩の添加によって集合化に必要なデンドロン濃度が上昇することから、デンドロン依存的に、静電的相互作用を駆動力とした集合化が起きていることを示しました。デンドロンの添加による自己集合化、光照射による解離という非常にシンプルな手法は、構造の類似した他のケージタンパク質(本論文ではマグネトフェリチンを使用)にも応用することが可能であるため、表面が帯電したかご構造であれば適用できると考えられます。これらの集合・解離は繰り返すことが可能であり(分解したデンドロンの残存の問題はありますが…)、デンドロンに任意の機能性基を導入することで、望みの刺激によって、望みの環境で、集合と解離を制御し得る新たなストラテジーを導くと提唱していました。

Virus-templated assembly of porphyrins into light-harvesting nanoantennae

Y. S. Nam, T. Shin, H. Park, A. P. Magyar, K. Choi, G. Fantner, K. A. Nelson, A. M. Belcher, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 1462-1463 (2010)

光捕集アンテナとして機能する色素分子の超分子構造体は、光化学におけるエネルギー・電子異動モデルとしてセンサーや光触媒システム、あるいは光子デバイスといった応用に向けて魅力的なマテリアルです。本論文の責任著者である Belcher らのグループは、ファージディスプレイ法で多く用いられている繊維状ウイルスである M13ファージを利用し、マテリアル結合ペプチドを提示させることでリチウムイオンバッテリーを構築するなど、多くの斬新な先駆的研究を行ってきています。本論文では、光捕集アンテナ構築を目的とし、ポルフィリン分子を配列させるためのテンプレートとして M13ファージを利用しました。M13ファージは5 nm 直径×1 μm 長、分子量約1400万と極めて細長く巨大なウイルスであり、自らを構成するタンパク質として5種の安定なタンパク質を持っています。それら表面は遺伝子工学的により任意のペプチドを提示することができますが、本論文では PEG リンカーをもつ亜鉛が配位したジウテロポルフィリン IX (ZnDPEG) をファージ外殻タンパク質の Lys 側鎖アミノ基とカップリングさせています。その結果、反応条件を制御することで、それぞれ平均1564個、2900個のポルフィリンが修飾されたファージを得ることに成功しました(それぞれ ZP-M13-1, ZP-M13-2と命名)。それら2種のファージおよび野生型(WT)ファージそれぞれの Trp 由来の蛍光スペクトルを測定した結果 WT が最も強い蛍光を示し、修飾したポルフィリン分子数に依存して蛍光強度が減少したことから、ポルフィリンの修飾によって Trp 残基近傍がより外側の水環境へ露出していることが示唆されました。目的の修飾を施したウイルスが得られたため、ファージ上に修飾したポルフィリンによる励起子の移動とその機構をさらに検討しました。励起子の移動を比較するため、著者らはピコ秒ポンププローブ吸収分光測定を行いました。その結果、高密度にポルフィリン修飾されたファージほど、励起状態の

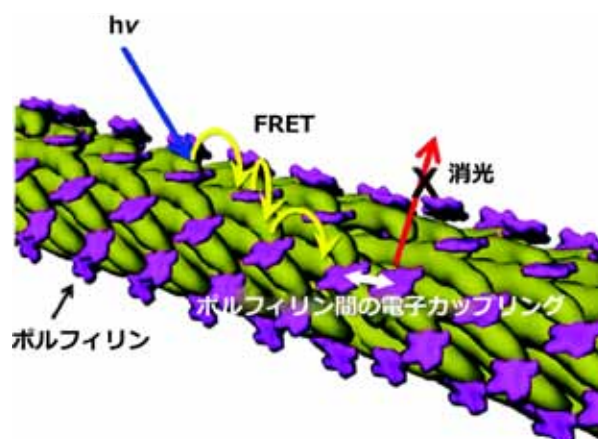


図2 ファージ表面に結合したポルフィリンによるエネルギー移動の模式図(論文 TOC より抜粋して一部改変)

緩和が速くなっており、ファージ上のポルフィリン間で励起子の非局在化が起こっていることを見出しました。色素間の距離が長く(ZP-M13-2の場合 ~ 3.5 nm)、ソーレー帯に吸収スペクトルをもたないことから、励起子の非局在化は Förster 機構でエネルギー移動していることを示唆しています。さらに、ポルフィリン修飾ファージの CD スペクトル解析から、一部は H 型会合していることが示唆されました。著者らはこの色素の会合によって電子カップリングが起き、トラップサイトとなって蛍光が消光していると考察していました。

また本文中では簡単にしか触れていませんでしたが、ポルフィリン修飾することで、柔らかい構造の繊維状ファージが硬く変化しており、結果として高効率なエネルギー移動が起こっているものと考察しています。合成化学的にファージ表面を機能性分子で修飾することによっても、繊維状ウイルスの構造制御が達成出来る点も興味深いと感じました。

Biologically templated photocatalytic nanostructures for sustained light-driven water oxidation

Y. S. Nam, A. P. Magyar, D. Lee, J. -W. Kim, D. S. Yun, H. Park, T. S. Pollom Jr., D. A. Weitz, A. M. Belcher, *Nat. Nanotechnol.*, **5**, 340-344 (2010)

本論文も、ZnDPEG 修飾した M13ファージを利用した Belcher らの論文です。本論文では先の論文よりさらに一歩進み、主要外殻タンパク質(pVIII)に酸化イリジウム(IrO_2) 結合ペプチドを提示させたファージを用いています。そのファージ表面にポルフィリン修飾し、さらに IrO_2 を吸着させ、バイオミネラリゼーション

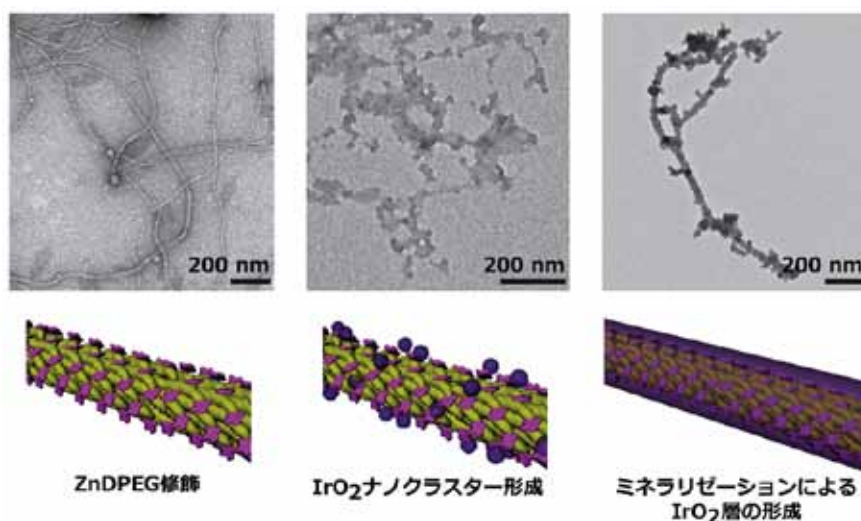


図3 IrO_2 ナノワイヤーの TEM 像および模式図(論文より抜粋して一部改変)

させることでファージをテンプレートとして酸化イリジウム-ポルフィリンナノワイヤーを構築しています(図3)。著者らは構築した“ウイルス”ナノワイヤーに可視光を照射することで、水中での酸素産生の触媒として利用できることを明らかにしました。酸素産生量はナノワイヤー上に導入した ZnDPEG が最大の時に最も大きくなり、作成したナノワイヤーが効果的に働いていることが示唆されました。しかしながらその効率はナノワイヤーの質量を考慮するとそれ程高くはなく(質量に対する表面積が小さいためと考察していました)、ファージにより分散マイクロゲルを構築することで、より高効率な触媒となり得ることを示しました。また、反応後にマイクロゲルを遠心分離により回収して再利用した結果、4サイクル目で酸素産生量は56%まで低下しましたが、光照射による水からの酸素産生としては、一定程度の再利用が可能な初めてのシステムであると提唱していました。

本論文は分子生物学的および合成化学的にウイルスに機能導入することで、新規バイオナノマテリアルを構築しており、今後も多様な分子修飾によって、ウイルスが様々なナノマテリアルとして機能することが期待されます。

辻 徹一郎 (つじ げんいちろう)

九州大学大学院薬学研究院 博士後期課程 1 年

ps208052@gmail.com

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、誠に有難うございます。私は現在、九州大学薬学府 生物有機合成化学分野にて佐々木茂貴教授、谷口陽祐、阿部由紀子助教のご指導のもと、一般的な右巻きの B 型 DNA とは異なる左巻き構造を有する Z 型 DNA に結合する分子に関する研究を行なっています。

今回はDNAに関連する最近の報告として、①DNAの特殊な高次構造に対して結合するキラル分子、②DNA配列中の一塩基を検出する方法、③光スイッチング機能を搭載したヌクレオシドに関する論文を紹介させていただきます。

A chiral wedge molecule inhibits telomerase activity

K. Shinohara, Y. Sannohe, S. Kaieda, K. Tanaka, H. Osuga, H. Tahara, Y. Xu, T. Kawase, T. Bando, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 3778-3782 (2010)

G四重鎖(G-quadruplex)はヒトテロメアに存在する (TTAGGG)_n という繰り返し配列において形成されるDNA高次構造であり、この構造の形成によってテロメア伸長酵素であるテロメラーゼ(ガン細胞などで活性)の活性が阻害されることからガン治療などの標的としても期待されています。

著者らはこの構造に結合するキラル分子として環状ヘリセン誘導体を合成し、そのG四重鎖結合能を評価しています。以前著者らによって開発され、光学活性体の片方がZ型DNA特異的に結合したヘリセンではG四重鎖への結合における光学選択性はみられず、光学活性体の両方が結合するという結果になりました。著者らはG四重鎖との相互作用にヘリセン分子の二面角が寄与していると予想し、二面角の異なる(22~59°)種々の環状ヘリセン誘導体を合成しました(図1左)。CDスペクトルや蛍光測定法、またSPR (Surface Plasmon Resonance) 法によってM1(二面角22°)がG四重鎖に対して光学選択的に結合していることが示されました。また著者らはこのM1が濃度依存的にテロメラーゼの阻害作用を示し、P1では阻害作用を示さないことを明らかにしています。M1とG四重鎖の光学選択的な結合について、著者らはM1が二量

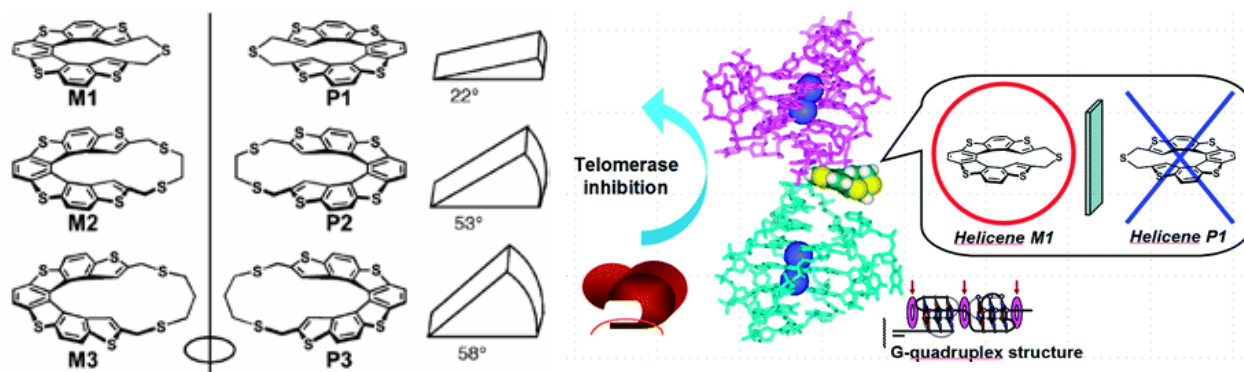


図 1 Helicene 誘導体(左)、Dimer G-quadruplex(magenta and cyan)と Helicene(M1,P1) (右) 論文より一部改変

体を形成しているG四重鎖同士の継ぎ目 (cleft pocket) に結合している (他のヘリセン分子では立体的な障害によって結合しにくい) と考察しています (図1右)。キラル分子によるDNA高次構造認識の詳細は未だに明らかになっておらず、今後こういった研究によってこの分野に新たな知見がもたらされることが期待されます。

DNA analysis by dynamic chemistry

R. B. Frunk, J. D. Juan, D. S. Michael, B. Mark, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 1809-1812 (2010)

一塩基多型 (SNP) はDNA配列中における一つの塩基の違いを指し、これが薬剤効果などに対して個人差を生じさせる可能性があることから、SNPの検出は大きな意義を持っています。この論文で著者らは dynamic chemistryの応用としてPNA (Peptide Nucleic Acid) を用いたDNA分析について報告しています。

一塩基検出の戦略としてはblank siteをもつPNA鎖を合成し、ターゲット鎖 (DNA) とPNA/DNA duplexを形成させます。そこへアルデヒド基をもつ4種の塩基 (A、G、T、C) を添加するとPNA鎖のblank siteと相補的な位置の塩基間で塩基対が形成されます (平衡系なので安定な塩基対を形成する方向へ反応が進む)。その後、還元剤 (NaBH_3CN) でアルデヒドとアミノ基を還元的アミノ化することで結合させてからPNA/DNA duplexを解離させ、MALDI-TOF MSにて検出することでblank siteと相補的な位置の塩基を検出することができます (図2左)。この方法では検出したい塩基 (例えばC) と塩基対を形成する塩基 (G) 以外のアルデヒド修飾核酸塩基 (A、T、C) を先に添加すると、若干のミスペアーを形成するものの、そこへアルデヒド修飾したGを添加することでミスペアーは減少し、標的とする塩基が導入されたPNAが形成されることが示されました。さらに著者らは添加するアルデヒド修飾核酸塩基の比率を様々変更して検討した結果、G、CはA、Tに比べ水素結合の数が多い分、選択的に塩基対を形成しやすく、またプリン塩基はピリミジン塩基よりも選択的に塩基対を形成することが分かりました (i.e. $A > T$, $G > C$)。この方法を囊胞性線維症関連SNPであるW1281XやG551Dなどに適用したところ、検出感度向上のためにtriphenylphosphonium tag修飾をすることで一塩基の違いを識別することに成功しました。また一塩基だけでなく対合する塩基が2ヶ所以上異なるヘテロ型のSNPに対しても検討しており、この方法がその識別に適用できる可能性があること、さらにはabasic siteという核酸塩基が欠落した部分 (生体内で頻繁に発生 図2右) もアルデヒド基をもつpyreneを用いることでその識別に成功しています。比較的感度よく一塩基を識別しており、abasic siteも検出できることから簡便な方法としての発展が望まれます。

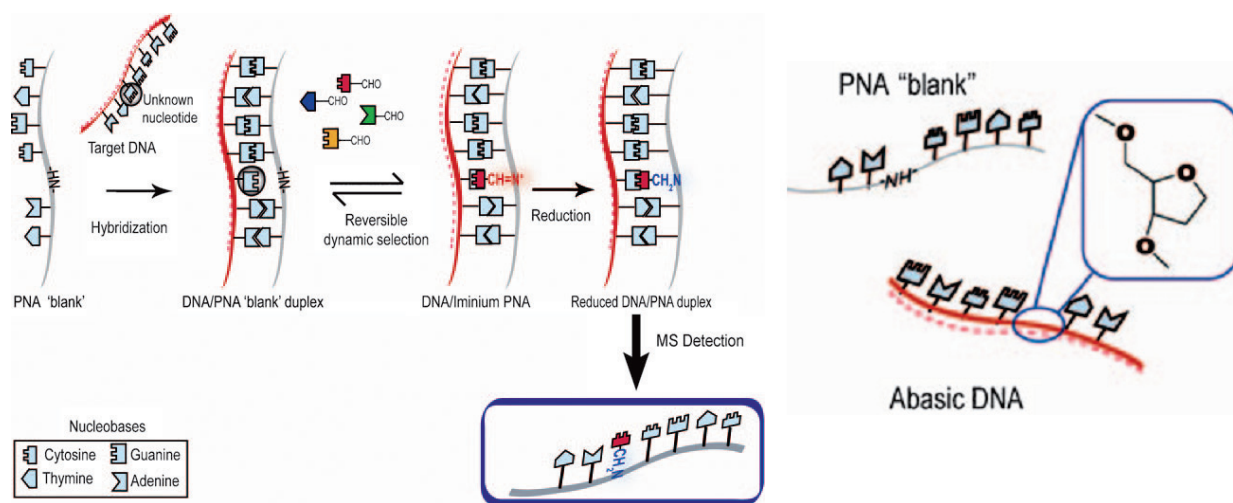


図2 Dynamic chemistry を利用した SNP 検出(左)、abasic site をもつ DNA(右) 論文より抜粋

Reversibly photoswitchable nucleosides: Synthesis and photochromic properties of diarylethene-functionalized 7-deazaadenosine derivatives

S. Merco, J. Andres, *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 8372-8377 (2010)

外的な刺激によって DNA の構造を変化させることでその性質を制御できれば、DNA の機能解明や新たな分子ツールの開発等に発展する可能性があります。本論文では外的刺激として光を照射することで可逆的な構造異性化を起こすヌクレオシドを設計し、その機能評価を行っています。これまで DNA における可逆的な光異性化反応、つまり光スイッチング反応においてはアゾベンゼンやスピロピランユニットを導入したものが報告されていました。しかし欠点としてアゾベンゼンでは水素結合ネットワークを形成できないことなどの理由でこれらのユニットの導入が DNAzyme などの酵素の活性を減少させることになります。著者らはこれらとは異なる光スイッチング分子として核酸塩基を含むジアリルエテンユニットを導入しています。

ジアリルエテンは他のフォトクロミック化合物群に比べて熱緩和がほとんど無く、スイッチング反応の繰り返しによる消耗が少ないことなど光スイッチング分子として優れた特徴を有しているものの、これまで生体高分子ユニットとしてはほとんど利用されていませんでした。著者らは光スイッチング効率を上げるために芳香環の連結部としてシクロペンテンを採用し、また機能評価のためにチオフェン環に異なる芳香環を導入した非対称ジアリルエテン型ヌクレオシドを設計しました(図 3. 1a-c)。このデアザアデニンヌクレオシドは天然のアデニン(A)と同様にチミン(T)と Watson-Crick 型の塩基対を形成することができ、UV(250-370 nm)の照射によって opened form から closed form へと変化することで発色することが示されました。Closed form は室温で安定に存在し(20℃、> 1day)、visible light (> 400 nm)の照射によって速やかに opened form へと変換され、構造のスイッチングによる消耗はわずかに見られる程度でした。

またチオフェン環に導入した官能基によってその性質が変化することも分かりました。例えば、1aでは opened form から closed form への変換率が 60 %だったのに対して1cでは 97 %という結果であり、さらに極大吸収波長が異なることから1a、1cの opened form と closed form を独立して形成させることも可能であることが示されました。さらに1cに関しては酸を添加してpHを下げることでpyridine部がプロトン化され、スイッチング波長が長波長にシフトすることも明らかとなり、これは短波長の光照射によるDNAへの障害を避けることができるため、光スイッチングを行なう上で有利な特徴だといえます。今回はモノマーとしての機能評価のみでしたが、今後はポリマーとした場合の性質に興味がもたれるところです。

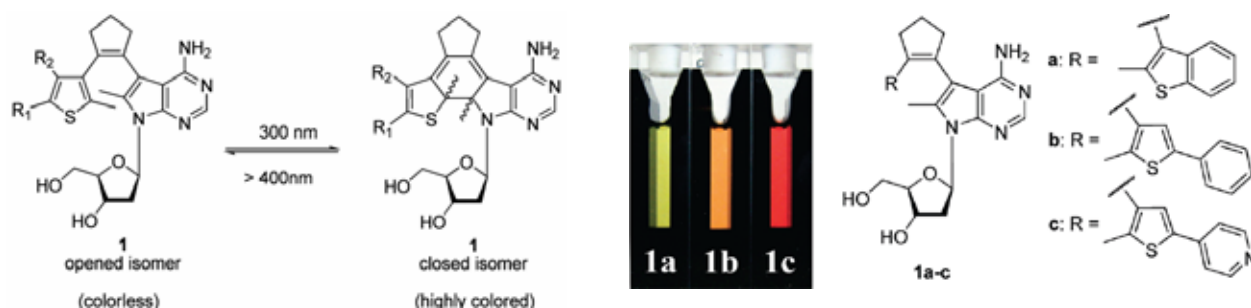


図 3 Diarylethene ユニートを導入した 7-deazaadenosine 誘導体の可逆的な光異性化反応 論文より抜粋

窪田 亮(くぼた りょう)

東京大学大学院理学系研究科化学専攻 博士課程1年

rkubota@chem.s.u-tokyo.ac.jp

このたびは、生命化学レターの「論文紹介」コーナー執筆の機会をいただき、深く感謝申し上げます。現在、私は東京大学大学院理学系研究科化学専攻 塩谷光彦教授の御指導のもと、両親媒性大環状三核金属錯体をビルディングブロックとする自己集合システムの構築と高次機能化に関する研究を行っております。自己集合システムが示す機能は、そのビルディングブロックの構造や化学的性質に大きく依存します。そこで、今回は人工両親媒性分子の構造や化学的性質を巧みに設計し、高機能性のベシクルを構築した論文を3報紹介させていただきます。

Effects of linker sequences on vesicle fusion mediated by lipid-anchored DNA oligonucleotides

Y. H. M. Chan, B. van Lengerich, S. G. Boxer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 979 (2009)

まず始めにベシクル融合に関する論文を紹介いたします。生体内では膜タンパク質の一種である SNAREs (soluble *N*-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors) がリボソームの融合に関与していることが広く知られていますが、リボソームの融合に関して詳細な物理的機構は明らかになっていません。筆者らは、本論文において脂質の親水頭部を DNA で置き換えた DNA 接合型脂質を利用し、ベシクル融合の基礎的なメカニズムの解明を試みています(図 1a)。一般的にベシクル融合には、SNAREs もしくは DNA が結合する“Docking”、二つのベシクルが二重膜の外側の脂質を交換する“Lipid mixing”、すべての脂質が融合しベシクル内部の物質が交換する“Content mixing”という段階が存在すると考えられます(図 1b)。筆者らは、DNA に導入したスペーサー(Tを複数配列した polyT)の長さを調節することにより、ベシクル間距離とベシクル融合の各段階における速度の相関を評価することに成功しました。

筆者らは始めに、スペーサーを持たない相補的な DNA 鎖(5'-*a*、3'-*a'*:*a*は24塩基配列、*a'*は*a*と相補的な塩基配列を示します)のみを有する脂質と、スペーサーとしてTを24塩基連結したDNA(5'-T₂₄*a*、3'-T₂₄*a'*)

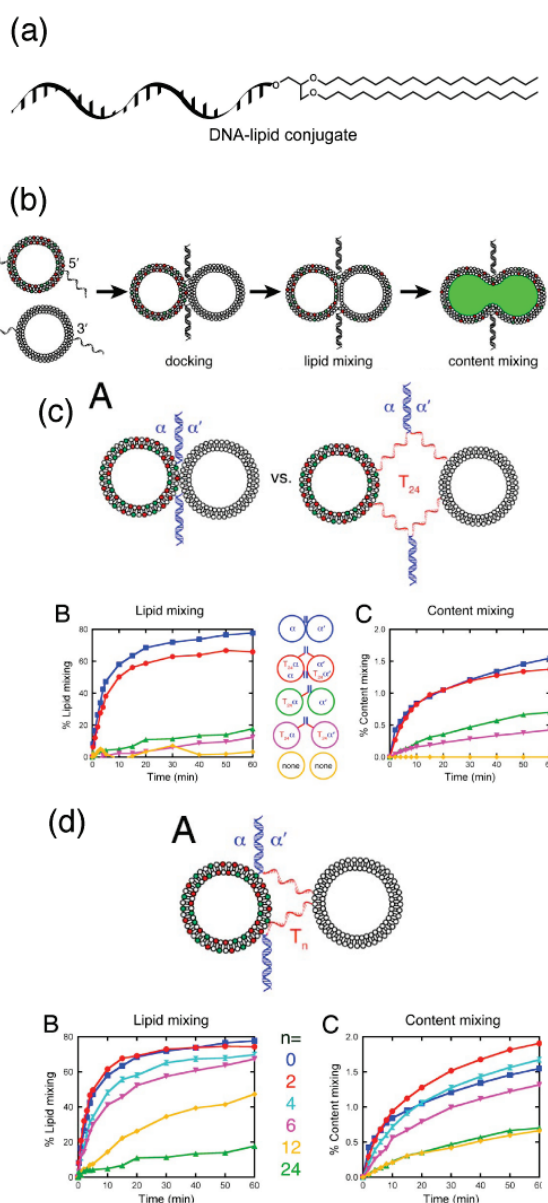


図1. (a) DNA 接合型脂質、(b) ベシクル融合の推定メカニズム、(c、d) ベシクル融合における“Lipid mixing”と“Content mixing”の時間変化 (論文より一部改変)

を比較することにより、ベシクル融合に対するスパーサーの影響を調べました(図 1c)。スパーサーが存在する場合、ベシクル間の“Docking”の速度は速くなる一方で、“Lipid mixing”および“Content mixing”の速度は著しく遅くなることが明らかとなりました。さらに筆者らは、スパーサーの長さを変えることでベシクル間距離がベシクル融合の各段階の速度に与える影響を評価しています(図 1d)。“Lipid mixing”に関しては、スパーサーを持たない DNA 鎖($n=0$)と T_2 をスパーサーとする DNA 鎖($n=2$)はほぼ等しい速度を示しますが、スパーサーが伸長するにつれて“Lipid mixing”の速度は減少することがわかりました。また“Content mixing”は“Lipid mixing”と同様の傾向を示します。以上の結果から、ベシクル融合のメカニズムに関する重要な知見が得られています。それは二重膜内部の脂質が交換し、ベシクル内の包接物が交換しない中間体が存在することです。二重膜内部の脂質の交換は直接観測できませんが、“Lipid mixing”が 50%以上進行した段階で二重膜内部の脂質交換が開始されていると考えることができます。そのため、“Content mixing”の速度は内部の脂質の交換速度と比較して明らかに遅いことから、前述の中間体の存在が予測されます。

以上のように、DNA を利用したベシクル融合のモデルは、塩基配列を変更することでベシクル間の相互作用を精密制御できる点から有用です。本論文は生体内の重要なプロセスであるベシクル融合に関する知見を与えた点から興味深い論文です。今後、分子設計をより精密に行うことにより、ベシクル融合のメカニズムがさらに詳細に解明されることが期待されます。

Drug delivery by an enzyme-mediated cyclization of a lipid prodrug with unique bilayer-formation properties

L. Linderoth, G. H. Peters, R. Madsen, T. L. Andresen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 1823 (2009)

続いて、ベシクルをドラッグデリバリーシステムに応用した例を紹介します。ドラッグデリバリーシステムにリポソームやベシクルを活用するメリットとして、両親媒性分子を適切にデザインすることにより、pH や温度、光等の刺激を利用しドラッグを放出する場所・時間を調節できる点が挙げられます。本論文では両親媒性分子の設計に一工夫施すことにより、新しいコンセプトに基づくドラッグデリバリーシステムを構築しています。筆者らは、ベシクル内にドラッグを入れるのではなく、ベシクルを形成する両親媒性分子自体をプロドラッグとしてデザインし、酵素によりベシクルを破壊すると同時にドラッグを放出するというコンセプトを発案しています。実際の両親媒性分子 **1** のデザイン、および酵素によるドラッグ放出のメカニズムを図 2 に示します。両親媒性分子 **1** は、抗癌剤であるカプサイシンの構造を含んでおり、プロドラッグとして働くことが期待されます。**1** は、グリセリン脂質の *sn*-2 位のエステル加水分解酵素である sPLA₂ を作用することにより、エステルの加水分解を受け、*sn*-1 位のエステルとの環化反応を経てカプサイシンを放出すると考えられます。

実際にプロドラッグである **1** を HEPES バッファー (pH 7.5) に溶解させると、平均直径 66 nm の単層ベシクルが形成することが動的光散乱

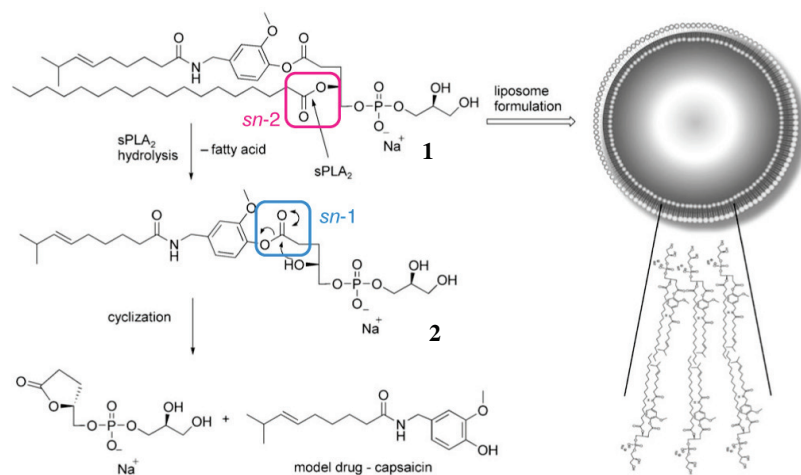


図 2. プロドラッグ **1** の構造とドラッグ放出のメカニズム (論文より一部改変)

(DLS)、cryo-TEM 測定により確認されました。続いて筆者らは、**1** からなるベシクルに蛇毒由来の sPLA₂ を作用させることにより、**1** の sPLA₂ に対する活性度および分解挙動を静的光散乱 (SLS)、HPLC、MALDI-TOF 測定により評価しています。散乱角度 90°における SLS 測定では、sPLA₂ を投与した後、散乱強度が大きく変化していることから、sPLA₂ による加水分解の結果、ベシクル構造に変化が生じていることが示唆されました。また HPLC 測定から、プロドラッグ **1** が sPLA₂ を加えて 24 時間後には完全に加水分解されていることが確認されました。さらに筆者らは、カプサイシンが放出されている直接的な証拠を得るために MALDI-TOF 測定を行っています。sPLA₂ を加えると、**1** 由来のシグナルは徐々に減少し、代わりにカプサイシン由来のシグナルが増大しました。すなわち、sPLA₂ の加水分解により **1** からカプサイシンが放出することが確かめられました。また、中間体である **2** は MALDI-TOF 測定では観測されないことから、sPLA₂ によるエステルの加水分解が律速段階であると考えられます。最後に、筆者らはヒト由来の sPLA₂-IIA を用いて同様の実験を行っており、sPLA₂-IIA 作用後 24 時間で (90 ± 11) % のカプサイシンが放出されることを確認しています。

本論文の両親媒性分子をプロドラッグとして用いるコンセプトは面白いと感じました。この研究が今後どのように発展するのか、興味深い一報だと思います。

Vesicular perylene dye nanocapsules as supramolecular fluorescent pH sensor systems

X. Zhang, S. Rehm, M. M. Safont-Sempere, F. Wurthner, *Nat. Chem.*, **1**, 623 (2009)

最後に、ベシクルを pH センサーとして用いた論文を紹介します。筆者らは、pH 変化に応じてコンフォメーションを変化させるゲスト分子とベシクルの二重膜間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用することにより、全可視光領域に及ぶ蛍光色変化を示す pH センサーを構築しました。

筆者らは、ベシクルを構築する両親媒性分子にペリレンビスイミド (PBI) を導入しています。PBI は蛍光色素分子として人工集光システム、有機半導体として発光ダイオードや太陽電池等に広く用いられています。PBI を含む両親媒性分子 **1** と **2** は水中で直径 23 nm の二重膜ベシクルを形成することが TEM 測定により明らかとなりました。このベシクルの内部に包接するゲスト分子として、筆者らはビスピレン誘導体である **3** を選択しました。**3** は、酸性条件下ではプロトン化した窒素原子間の静電反発によりピレン同士がスタックしない伸張したコンフォメーション、塩基性条件下ではピレンがスタックした (エキシマー) コンフォメーションをとることから、蛍光スペクトルが pH 依存性を示すことが知られています。また、**3** を包接したベシクルは広い pH 領域で構造を保持する必要があるため、PBI の末端の二重結合を光重合反応させることで、ベシクル構造を安定化させています。重合したベシクルは TEM 測定から重合する前と同様の二重膜構造であり、DLS 測定から pH 3~11 の範囲においてサイズを一定に保っていることが確認されています。ここで、ゲスト分子 **3** の蛍光波長を考えると、酸性ではモノマー発光に由来する 370~420 nm であるのに対し、塩基性ではエキシマー発光に由来する 460~540 nm となります。興味深いことに、酸性条件下の蛍光スペクトルはベシクルの吸収スペクトルと全く重なりませんが、エキシマー発光の蛍光スペクトルはベシクル内の PBI の吸収とよく一致します。すなわち、酸性ではゲストとベシクル間には FRET は起こりませんが、塩基性ではゲスト-ベシクル間の FRET が起こると考えられます。実際、**3** を包接したベシクルに 363 nm の励起光を照射すると、pH 依存性を示す蛍光スペクトルが得られ、pH センサーとして働くことが示されました。ゲスト-ベシクル間の FRET を利用することで、ゲスト分子 **3** だけでは達成不可能な高感度の pH センサーとなっていることがわかります。この pH による蛍光色の変化は全可視光領域に及び、特に pH 9 では白色蛍光を発することがわかりました。

本論文は、ベシクルを形成する両親媒性分子とゲスト分子の構造、およびゲスト-ベシクル間の FRET を

適切にデザインすることで美しい分子システムを構築しています。このように、ベシクルとゲスト分子間の相互作用を精密に制御することにより、様々な機能を有するナノカプセルへの応用が期待されます。

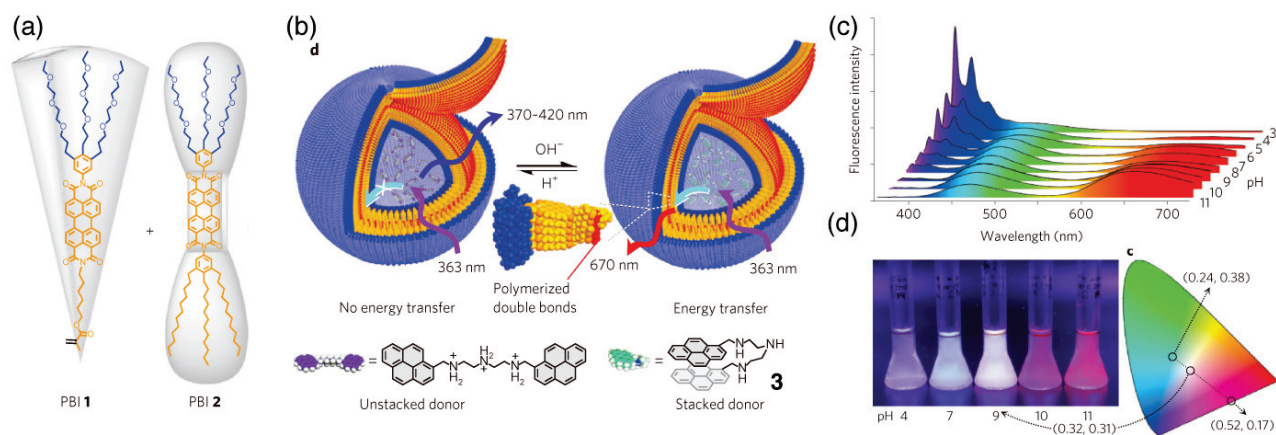


図 3. (a) 両親媒性分子 PBI1、2 の構造、(b) ゲスト分子 3 の構造と pH に応じた分子間相互作用の変化、(c、d) pH に応じた蛍光色変化 (論文より一部改変)

変異 β -ラクタマーゼを用いた蛋白質の機能性分子ラベリング法

大阪大学大学院工学研究科 水上 進

(smizukami@mls.eng.osaka-u.ac.jp)

1. はじめに

各々の生体分子は他の様々な分子と相互作用しながら機能しているため、生体分子の相互ネットワークが破壊された *in vitro* での機能は、生体分子の真の生理機能を反映するとは限らない。それゆえ近年、生きた細胞・組織、あるいは動物個体内における生体分子の挙動や機能を直接可視化する「分子イメージング」技術が注目されている。とりわけ、小分子蛍光プローブや蛍光蛋白質(FP)等を用いた蛍光イメージングは、医学・生物学分野で汎用されており、様々な生命現象や病気のメカニズムの解明に多大な貢献をしてきた。ある標的蛋白質の機能を調べるために、その蛋白質を蛍光標識して可視化することは一般的な方法であるが、このような場合には蛍光蛋白質を標的蛋白質に遺伝子工学的に融合させる。蛍光蛋白質を用いた実験はその幅広い応用性は周知のとおりであるが、技術的な制限も存在する。例えば、蛍光蛋白質の発現を時間制御することは一般的に困難である。また近年、分子イメージングの研究対象として、生細胞だけでなく動物個体を用いることの重要性が認識されており、このような場合は蛍光蛋白質の励起および観測波長領域の光の組織透過性が問題となってくる。

そこで最近、標的蛋白質を蛍光色素などの機能性分子で特異的にラベル化する手法が注目されている。これまでに様々な手法が報告されており、その一部は市販されている。多くはタグと呼ばれるペプチドあるいは蛋白質を標的蛋白質に遺伝子的に融合させ、そのタグに特異的に結合する機能性分子をラベルする方法である(図1)。一方、これら既存のラベル化法は、特異性に問題がある場合や、ラベル化前後でのプ

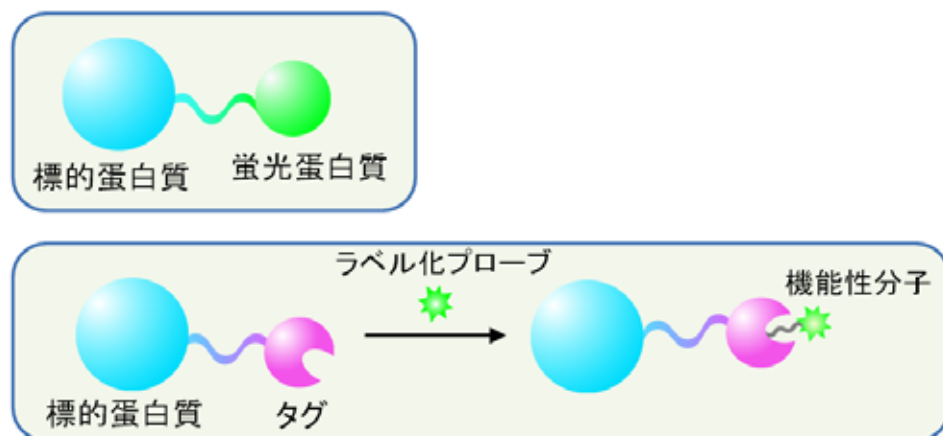
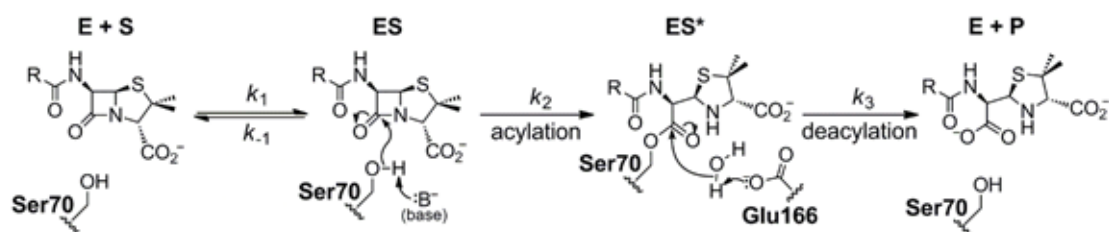


図1. 標的タンパク質の可視化技術。(上) 蛍光タンパク質との融合蛋白質として発現。(下) タグタンパク質との融合タンパク質として発現させた後、機能性ラベル化プローブを修飾

TEM-1 の基質分解反応機構



変異 (E166N) TEM-1 の反応機構

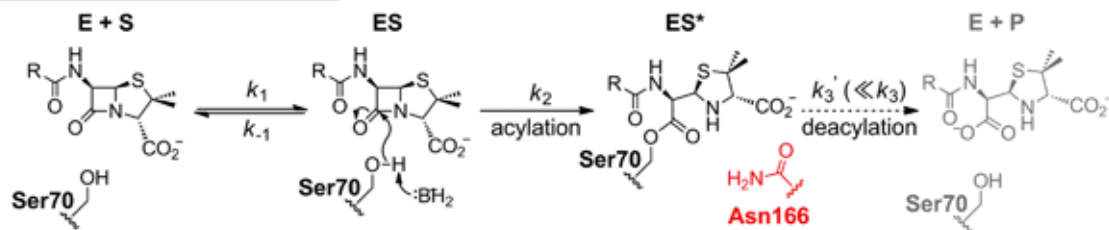


図 2. TEM-1 およびその変異体 (E166N) の反応機構

ローブの蛍光特性が変化しないために未反応のプローブを洗浄で完全に除く必要があるなど、技術改良の余地はまだ残されている。そこで、筆者らの研究グループでもこれらの問題点を克服すべく、より高機能かつ汎用的な蛋白質ラベル化法の開発を目指して、研究を行っている。まだ完全な技術として確立してはいないが、幾つかの応用実験にも成功していることから、様々な分野の研究者に本手法を利用して頂きたいと考え、本稿ではその研究実施例および基本的な実験プロトコルを紹介する。

2. BL-tag テクノロジーについて

我々が開発したラベル化法は、標的蛋白質を変異 β -ラクタマーゼタグと融合発現させた後、このタグに対して β -ラクタム構造を有する機能性ラベル化プローブを特異的に共有結合させる技術である。本手法でタグ蛋白質として用いた変異 β -ラクタマーゼを BL-tag と名付けた。

本ラベル化法は、 β -ラクタマーゼの酵素反応機構に基づいている。野生型 β -ラクタマーゼ (TEM-1) は β -ラクタム化合物を基質として認識し、特異的に加水分解する酵素である (図2上)。このとき、活性部位を構成するアミノ酸の一つ (Glu166) を Asn に変異させると、酵素と基質がエステル結合を形成した状態のまま安定に存在することが報告されている (図2下)。この機構を利用することで、酵素反応の基質特異性を損なうことなく、安定に機能性分子を共有結合させることができる。

標的タンパク質を蛍光色素でラベルする場合は、蛍光分子を β -ラクタム化合物と共有結合させたラベル化プローブを用いる。プローブデザインに関しては、原理的には修飾する機能性分子に制限は無い。現在までに7-ヒドロキシマリリン、フルオレセイン、テトラメチルローダミンを蛍光色素として有するプローブを開

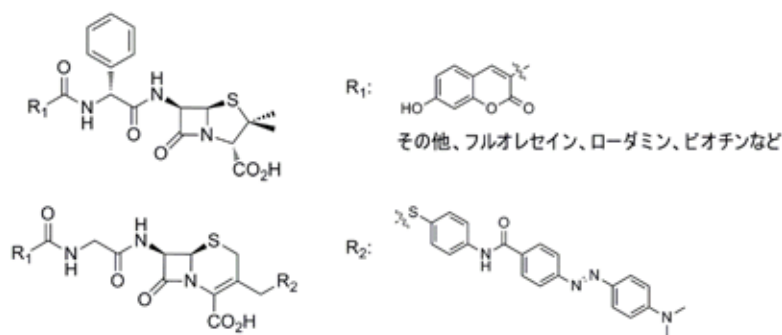


図 3. 開発したラベル化プローブの構造

発している(図3上)。さらに高次の機能を有するラベル化プローブとしては、セファロスポリン骨格および蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)のアクセプターを組み合わせることで、ラベル化によって蛍光強度が増大する OFF/ON 蛍光スイッチ型プローブの開発にも成功している(図3下)。これらのプローブはクエンチャーである DABCYL 基を分子内に有するために、蛍光色素から DABCYL への FRET によって消光しているが、BL-tag へのラベル化によって DABCYL が脱離し、FRET が解消することで蛍光が回復する。これにより未反応プローブのバックグラウンドシグナルを大きく抑制することが可能になる。

3. 実験プロトコル

ここからは、実際に BL-tag テクノロジーを用いた蛋白質ラベル化実験法について紹介する。実験の概要は図4に示す手順となる。ターゲット蛋白質には、細胞表面に発現する上皮成長因子受容体(epidermal growth factor receptor: EGFR)を選択した。ここでは、ラベル化プローブとしてフルオレセインとアンピシリンの融合体である FA(図4)を用いている。

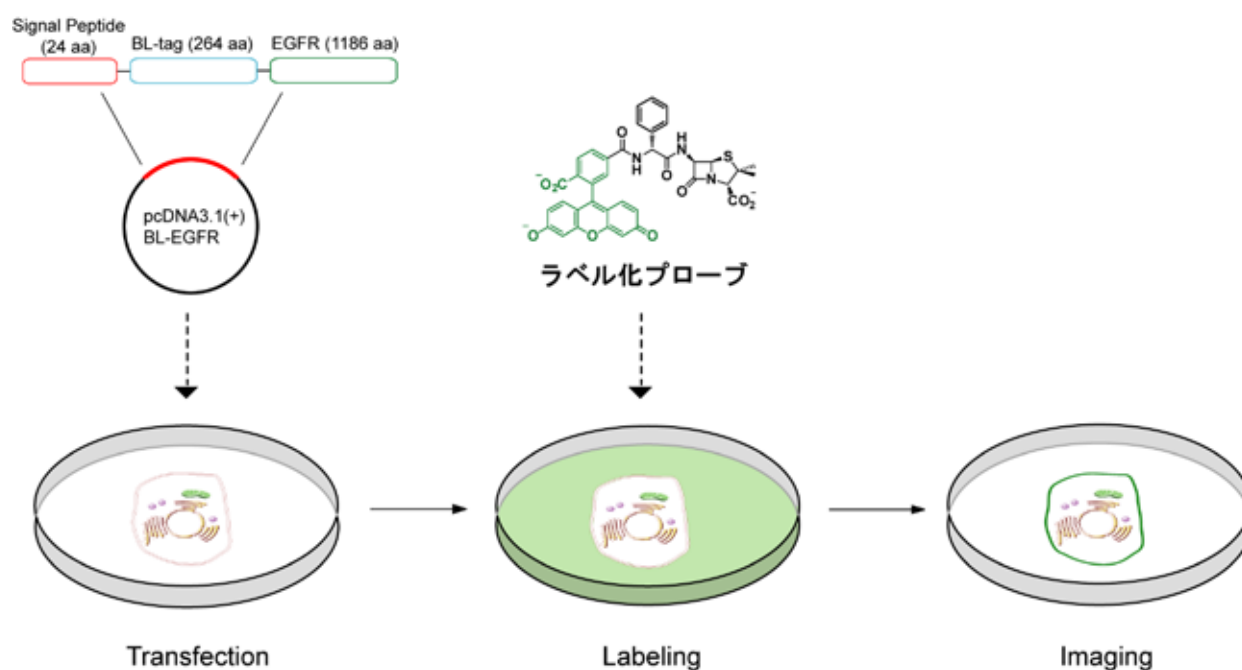


図4. EGFR の蛍光ラベル化実験の概要

①プラスミドの作製

1. 遺伝子工学手法により、標的蛋白質と BL-tag の融合タンパク質の遺伝子をコードするプラスミドを作製する。BL-tag 遺伝子は、シグナル配列と標的タンパク質の間に挿入する。

②トランスフェクション

2. 直径 30 mm のガラスボトムディッシュに HEK293T 細胞を 2.0×10^5 個/dish となるように撒き、抗生物質を含まない培地(10% FCS 含有 DMEM)中、5% CO₂ 雰囲気下、37℃で 24 時間培養する。
3. 上で作製したプラスミドを Lipofectamine2000 を用いて細胞に導入する。その後、5% CO₂ 雰囲気下、37℃で 24 時間培養する。このとき、プラスミド溶液を加えてから 5 時間経過した段階でカナマイシンを含

む培地に交換する。(注:β-ラクタム系の抗生物質は使用できない。)

③ラベル化および蛍光イメージング

4. PBS (pH 7.4)で細胞を wash する。
5. フェノールレッドを含まない培地にラベル化プローブ (FA, 10 μ M)を溶解し、ディッシュに添加する。
6. 5% CO₂ 雰囲気下、37℃で 30 分間培養する。
7. HBSS で細胞を 3 回 wash する。
8. 蛍光顕微鏡を用いて細胞観察を行う。(核を共染色する場合は、観察の 30 分前に Hoechst 33342 を最終濃度 100 ng/mL になるように培地に添加する(図5)。)

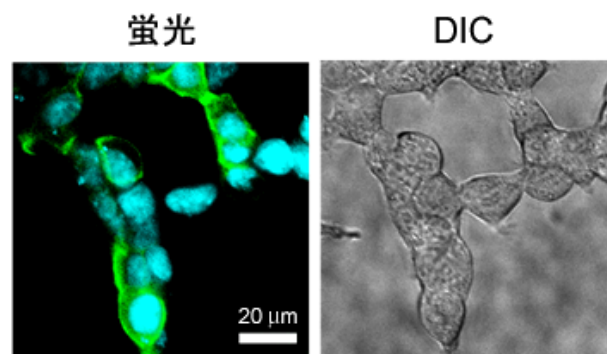


図5. 標的タンパク質 (EGFR) をラベル化した細胞の蛍光顕微鏡観察像. 細胞核は Hoechst 33342 で染色した (水色). DIC: 微分干渉顕微鏡

4. おわりに

本稿では、BL-tag を介して蛍光色素を標的タンパク質にラベル化するプロトコルを紹介した。また、本手法は蛍光色素以外の機能性分子のラベル化にも汎用可能である。現在までに、広範囲な応用が可能なビオチンラベル化プローブを合成し、これを用いて細胞膜蛋白質のビオチンラベル化や、その応用例である蛍光量子ドットのラベル化にも成功している(吉村ら、日本化学会第 90 春季年会)。また、本手法は蛍光 OFF/ON などのスイッチング能を付与することも可能であり、そのプローブデザインには幅広い可能性を有している。もし読者の中で、本稿で紹介したラベル化プローブを使用してみたい、あるいはこの技術を応用して特定の化合物を蛋白質にラベル化したいなどの要望がありましたら、是非御一報下さい。

参考文献

1. S. Mizukami, S. Watanabe, Y. Hori, and K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5016–5017.

留学体験記

イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校

留学体験記

東京大学大学院理学系研究科 菅研究室

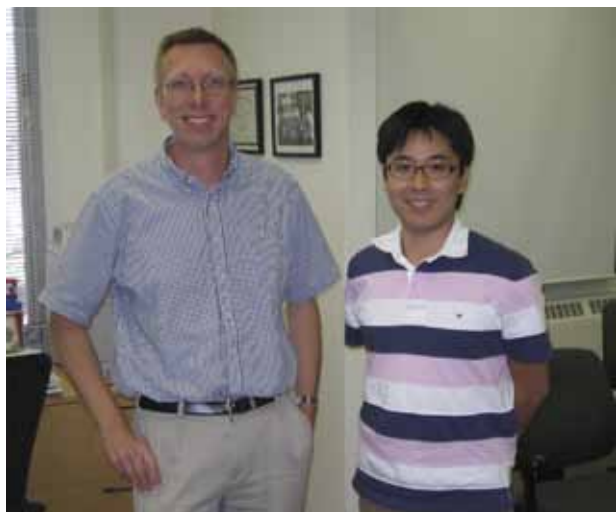
助教 後藤 佑樹

私は現在、東京大学理学系研究科化学専攻の菅裕明教授の研究室で、助教として研究を行っています。博士号を取得した直後の2008年4月から2009年9月の一年半の間、イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校（University of Illinois at Urbana-Champaign）のWilfred A. van der Donk教授の下、博士研究員として研究を行って参りました。今回、この様に留学体験記を執筆するチャンスを頂きましたので、編集委員の井原先生に感謝すると共に、今後海外での研究留学を計画している学生の皆さんのお役に少しでも立てればと思い、ポスドクポジションの獲得、イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校での研究生活などについて紹介させていただきます。

ポスドク先決定まで

私がWilfredに初めて連絡を取ったのは、博士課程修了まで約一年となった2007年3月のことでした。当時はリボソームによるペプチドの翻訳合成系について研究を行っていましたが、ポスドクでは別の生合成系について研究を行いたいと考えていました。そこで日本学術振興会・海外特別研究員（海外学振）の申請が迫っていたこともあり、翻訳後修飾酵素について興味深い研究を行っていたvan der Donk研究室にターゲットを絞って、海外学振の受け入れ先として申請できるか問い合わせたのです（ご存じの方も多いとは思いますが、海外学振の申請では事前に受け入れ先からのapproval letterが必要です）。一般に、教授は多数のポスドク志願メールを受けとるため、メールでの連絡は無視されることがあると先輩から聞いていたので、Wilfredの研究に興味を持っていることに言及しつつ、ポスドクとして受け入れてくれるか伺う手紙を書き、

国際郵便で送りました。…が、手紙を送ってから待てども待てども全く連絡はありませんでした。しかし、海外学振は諦めて別の研究室を探そうかと考え始めていた4月、Wilfredから「NIHの予算を確保できたので、年間〇〇〇ドルでポスドクとして雇います」という旨のメールが届いたのです。海外学振申請の可否をお願いしただけの手紙だったので驚きましたが、実は当時の指導教官であった菅先生に推薦メールをお願いしており、その推薦文の中で先生が「万が一海外学振から援助を受けられなかった場合でも、彼をポスドクとして雇って損はない」と書いて下さっていたらしいのです。返信に時間がかかったのは、このメールを受けたWilfredが私を雇う



Wilfred A. van der Donk 教授と筆者
身長の違いに注目！（私が特別小柄なわけではありません）

ための予算を獲れるかどうか調整していた為でした。この様にWilfredと菅先生のご厚意のおかげで、博士号取得前に余裕を持ってポスドク先を決めることができました。熱意が伝わる手紙でのアプライ、それとボスに頼んでしっかりプッシュしてもらい、これが私が実感した海外のポスドクポジションをうまく手に入れるためのポイントです。こうして無事Wilfredからオファーを頂いた訳ですが、この後が大変でした。最初の問い合わせから一ヶ月以上経っていた為、海外学振の申請書の締切りまで一週間しかなかったのです。

イリノイ州シャンペーンでの生活

私は、自分が留学することになるまで、イリノイ州は名前を聞いたことがある程度、実際に住むことになるシャンペーンについては全くと言って良いほど知識はありませんでした。イリノイ州はアメリカ中西部に位置し、大都市シカゴがあります。そのシカゴから車で3時間ほど南へひたすらトラウモロコシ畑が広がる真っ平らな地平線の中を下ったところ、大穀倉地帯コーンベルトの真っ只中にイリノイ大学アーバナ・シャンペーン校はあります。



Champaign 郊外の風景
これでも半径 200 キロ以内では最大の街らしいのですが…

イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校は、アーバナとシャンペーンという隣り合う二つの市にまた

がっています。このツインシティは人口約11万人の小さな町ですが、一方でアーバナ・シャンペーン校の学生数は四万人を越えています。イリノイ大学を中心とした大学の町(というより大学以外何も無い)と言ったところでしょうか。治安も良く、金曜の夜などは酔った学生が平気で一人ふらふらと歩いていることもよくありました。また、この町は規模の割にバス網がよく発達しており、しかもイリノイ大学の学生・職員はIDを提示すれば無料で乗ることができます。特に素晴らしいと感じたのが、同じくバス会社が提供するSafeRidesというサービスでした。これは通常のバスが運行していない深夜から早朝の時間、電話をすれば指定した場所まで乗り合いバスが迎えに来てくれ、目的地まで送ってくれるというものです。これももちろんIDを見せれば無料でしたし、最終バスを気にせず実験をすることができたという点で、ありがたいシステムでした。

大学の町ならではのイベントがたくさんあることも特徴でしょうか。イリノイ大学はスポーツが盛んで、大学チームの試合観戦は、娯楽の少ないこの町の楽しみの一つでした。特にアメフトやバスケットボールの試合が行われる日には大学の周りがチームカラーであるオレンジと紺色の服を着た人で溢れ、圧巻です。また、国際色豊かな人が集まる大学らしく、国際交流や地元の人との交流の機会もたくさんありました。近くの農家に訪問する催しに参加した時は、大型トラクターに乗ったり、ブルーベリー狩りをしたりと貴重な体験を楽しむことができました。それに、物価が安いこともこの町の魅力の一つです。東海岸や西海岸の大都市に住む友人からは家賃が高いという話をよく耳にしますが、私が住んでいたアパートは80m²の2LDK、駐車場付きで600ドルでした。まあ、土地が有り余った田舎なので、当たり前といえば当たり前のかもしれませんが。

一方でこの町の最大の欠点と言えるのが、長く厳しい冬です。積雪は少ないのですが、とにかく寒い。私が過ごした冬で一番冷えた時はマイナス30℃まで下がりました。この気温に加えて、大平原で遮るものがない強風が吹く為、体感温度としては恐ろしく寒くなります。しかし慣れとは恐ろしいもので、3月にマイナス5℃ くらいにまで上がっただけで、温かい小春日和の様に感じられてくるので不思議なものです。

この様に日本とは全く違う環境の中で生活を送り、日々新たな発見を持てたことは、アメリカ生活の大切な経験の一つでした。都会にある大学で眩いシティライフを過ごすのも捨てがたいですが、この穏やかな田

舎町で古き良きアメリカを体感しながらのんびりと研究生生活を送った日々は、これはこれで楽しかったと考えています。

イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校化学科

イリノイ大学はアメリカ中西部を代表する州立大学で、そのメインキャンパスとなっているのがアーバナ・シャンペーン校です。化学科の研究環境も申し分ないものでした。特に実感したのは、共通機器やサービスの充実ぶりです。NMRや質量分析などの高額機器はもちろん、他にも専任の技官が管理している多種多様な測定機器を利用することができ、また遺伝子配列解析やコンピテントセル・培地の調製といったサービスも委託することができます。そのような充実した設備のバックアップを学科として行うことで、各自の研究室では貴重な研究費をより専門的な機器の購入や、学生・ポスドクの人件費に使っていかうという姿勢があるように思えました。また、手続きさえ踏めば他の学科が所有する機器も使うことができます。こういった仕組みで幅広い機器を使用できることが、最低限の投資で気軽に新しい分野の研究に参入できる下地の一つとなっているのではないのでしょうか。このような広い分野の共通機器の充実は、日本でももっと広がってくれればいいと思います。また、日本の大学との大きな違いを感じたのが、化学科の各専攻が主催するセミナーです。おそらくアメリカの大学ではどこでも行われていることと思いますが、毎週1、2回様々な分野のトップクラスの研究者が訪問し、一時間の講演をしてくれます。研究室の近くの講義室で定期的に最先端の研究成果を生声として聞くことができるメリットは非常に大きいと感じました。大学の設備やシステム以外で驚かされたのが、中国・韓国からの留学生の多さです(undergrad/grad問わず)。私が所属した化学科においても、ほぼ全ての研究室にこの両国の学生が所属している状態でした。一方、日本人の学生は学科全体でわずか数人です。もちろん他の地域や大学では多少状況は異なるのですが、それでもアメリカで高レベルな研究教育を受けた彼ら・彼女らが将来活躍していくであろう事を想像するに、若輩者ながら日本の将来を心配せずにはいられませんでした。私たち若い世代が一層努力し、これまで以上に日本の科学界を盛り上げていかねばならないと実感しています。



研究室メンバーと大学の芝生でランチ
食べているのはメンバーお気に入りの絶品フィッシュサンド

van der Donk研究室での研究生生活

ここで私が所属していた研究室について紹介します。大まかに言うと、van der Donk 研では抗菌活性を持つ天然物の合成酵素を基礎・応用の両面から研究しています。行われている実験は有機合成から、分子生物学、タンパク-ペプチド相互作用解析、構造生物学、微生物を用いた化合物の活性評価まで幅広いものであり、まさにケミカルバイオロジーの研究室といったところでしょうか。研究室メンバーは PI である Wilfred、秘書が1人、ポスドクが6人、大学院生がおおよそ20人という構成でした。この研究室には organic chemistry、biochemistry、chemical biology、microbiology、四つの学科から学生が集まって来ており、それと同様ポスドクとしてやってくるメンバーのバックグラウンドも多種多様です。私自身、渡米前は遺伝子組換えや大腸菌の扱い、バイオインフォマティクスはほとんどしたことがありませんでしたが、van der Donk 研ではメンバーに教えてもらいながら日常的に行うようになりました。具体的な研究テーマとしては、私は以下の二つのプロジェクトを平行して進めていました。一つ目は新規翻訳後修飾酵素の発見・同定を目指すプロ

ジェクトで、新しいスキルを身に付けることができる上、科学的にも大きな発見に繋がりそうだという期待があったものの、その反面、なにぶん経験のない実験をやらなければいけないので直ぐに結果を出せるだろうかという不安もありました。そこでもう一つ、翻訳後修飾酵素の阻害剤を開発するプロジェクトも同時に行うことにしました。こちらは自分が博士課程までに習得していた技術を活用できる為、なんらかのアウトプットを出していける自信はあったからです。結局、こちらの阻害剤のプロジェクトでは大きな結果は得られませんが、この過程で研究室内でのプレゼンスや私はこういう事をできるんだ、というアピールになり、研究室の戦力として認められる一助になったと考えています。新規酵素同定のプロジェクトはその後うまく発展していき、幸い最近になって論文にまとめることができました(Goto, Y. *et al.*, *Plos Biol.*, **2010**, 8, e1000339)。研究は基本的にポストドクも学生も独立して行いますが、二週間に一回、4〜6 人のサブグループメンバーで Wilfred の部屋に集まり、各自の研究進行を報告し、議論する機会があります。また、これとは別に一ヶ月に一回は Wilfred とマンツーマンで議論する時間も設けられています。私の拙い英語でディスカッションを行うのは難しかったですが、みんな寛容に見守ってくれ、そのおかげでなんとか有意義な議論を積み上げることができました。ですので、私のアドバイスでメンバーの行き詰まっていた実験がうまくいき、最初に「Thanks, Yuki!」と言われた時は日頃の恩返しのできた様でとてもうれしかったのを覚えています。

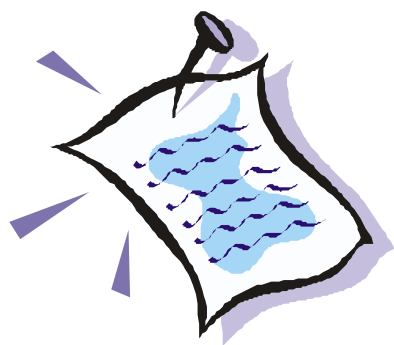
最後に

イリノイ大学での生活は一年半と短い間で、振り返ればあっという間に終わったように感じっていますが、とても濃い貴重な時間であったと思います。英語で議論し、苦労しながら新しい技術を学んだ研究面での経験はもちろんですが、なにより文化が異なる国で生活したことがとても新鮮で楽しい経験でした。今後博士課程やポストドクへと進もうとしている学生の皆さんも、国内外に関わらず、異文化・異分野交流ができお互いに切磋琢磨できる環境に身を置いて、修行していくことをお勧めしたいと思います。

最後になりましたが、研究室に受け入れてくださり、また研究に対して心強いサポートをしてくださった Wilfred A. van der Donk 教授、温かい雰囲気の中で研究・生活の両面で助けてくれた Team WAV のメンバー、良き理解者であり私の希望による渡米にも同伴してくれた妻に深く感謝致します。また、イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校での研究を経済的に支援して頂いた日本学術振興会にもこの場を借りて御礼申し上げます。



van der Donk 研究室 (Team WAV) のメンバー Wilfred 宅でのクリスマスパーティーにて



シンポジウム等会告

第4回バイオ関連化学シンポジウム (第25回生体機能関連化学シンポジウム、第13回バイオテクノロジー部会シンポジウム、 第13回生命化学研究会シンポジウム)

<http://jointsympo.csj.jp/index.php>

主催：生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、生体機能関連化学・バイオテクノロジーディビジョン、フロンティア生命化学研究会

共催：日本化学会他

会期：2010年 9月24日（金）、25日（土）、26日（日）

会場：大阪大学豊中キャンパス共通教育管理講義棟

（〒560-0043 豊中市待兼山町1-16）、大阪モノレール柴原駅下車北西へ徒歩約10分、または阪急電車宝塚線石橋駅下車東へ徒歩約15分

発表申込締切：6月28日（月）

予稿原稿締切：7月26日（月）

参加登録（予約）締切：8月9日（月）

内容：生体機能、バイオテクノロジー、生命化学に関する日本化学会2部会・1ディビジョン・1研究会の合同シンポジウム。

発表形式：口頭ならびにポスター

*口頭発表（15分発表、5分質疑、3会場）は原則として1研究室1件まで。但し、申込は2件まで可。この場合は発表優先順位をつけ、2件目の採否は実行委員会の判断による。

参加申込方法：5月10日から公開予定のWEBサイト（<http://jointsympo.csj.jp>）から発表申込、予稿原稿の提出、参加登録のすべての手続を行う。

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

参加登録費：

8月9日（月）（参加登録（予約）締切）まで：

部会員：一般 5,000円、学生3,000円、非部会員：一般7,000円、学生 4,000円

8月10日以降：上記の各参加種別に2,000円プラス。

*いずれの価格にも予稿集代金が含まれています。

*予稿集の事前送本は予定していません。事前に予稿原稿の閲覧ができるよう、PDFでの限定公開を計画しています（9月15日以降）。

懇親会：9月25日（土）。費用5,000円（必ず事前に申込のこと）。

実行委員長：深瀬浩一（大阪大学大学院理学研究科化学専攻）

連絡先：深瀬浩一（〒560-0043豊中市待兼山町 1-1 大阪大学大学院理学研究科 化学専攻）

Tel: 06-6850-5388、Fax: 06-6850-5419、E-mail: koichi@chem.sci.osaka-u.ac.jp

第 13 回ペプチドフォーラム “ペプチド研究の最先端と製剤化”

主催：日本ペプチド学会

日時：2010年 9月18日（土）（12：00～17：00）

会場：京都薬科大学A31講義室（京都市山科区御陵中内町 5）

大石真也（京都大学大学院薬学研究科・講師）

「ウイルスの変異に学ぶ抗HIV活性ペプチドのデザイン」

中瀬生彦（京都大学化学研究所・助教）

「膜透過性アルギニンペプチドの細胞内移行機序と薬物送達」

梶本和昭（北海道大学大学院薬学研究院・特任准教授）

「肥満予防に向けた摂食調節ペプチドの経皮送達」

山下親正（大塚製薬株式会社ODPI事業部・研究開発部長）

「高分子医薬に適した新規粉末吸入システムOtsuka Dry Powder Inhalation Systemの開発」

尾関哲也（名古屋市立大学薬学部・教授）

「脳腫瘍治療を目的としたp53p-Ant含有マイクロスフェア製剤の設計」

問合せ先：〒607-8414 京都市山科区御陵中内町 5

京都薬科大学 代謝分析学分野 安井裕之

TEL 075-595-4629、E-mail: yasui@mb.kyoto-phu.ac.jp

お知らせ



受賞

青木 寛(産業技術総合研究所環境管理技術研究部門 主任研究員)

平成21年度 日本分析化学会 奨励賞

「電気化学的遺伝子検出法と迅速遺伝子診断技術の開発」

(2009年9月25日、日本分析化学会第58年会において受賞)

山東 信介(九州大学稲盛フロンティア研究センター 教授)

平成22年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞

「細胞解析に向けた高機能核酸システムの研究」

(2010年4月13日、平成22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



菅 裕明

東京大学大学院理学系研究科・化学専攻 生物有機化学講座 教授

E-mail: hsuga@chem.s.u-tokyo.ac.jp

井原 敏博

熊本大学大学院自然科学研究科産業創造工学専攻 教授

〒860-8555 熊本市黒髪2-39-1

Tel: 096-342-3873

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

澤田 敏樹

東京大学 駒場オープンラボラトリー 助教

〒153-8904 東京都目黒区駒場4-6-1

TEL: 03-5452-5225 FAX: 03-5452-5225

E-mail: t-sawada@bionano.rcast.u-tokyo.ac.jp



編集後記

編集者(井原)の怠慢で、出版が少々遅れましたが、ついに No. 33 を皆さんのお手元に届けることができました。執筆者の皆さんには、お忙しい中たいへんご苦勞をおかけ致しました。あらためてお礼を申し上げます。お影様で今回も多彩な内容に仕上げることができました。幅広いそれぞれの専門分野でご活躍されている多くの読者の方々に興味を持って頂けると確信しております。

6月、日本は、サッカー ワールドカップ、岡田ジャパンの健闘で大いに盛り上がりました。私自身も寝不足の日が数日ありました。この日本列島を覆っていたサッカー熱も足早に去り、それと入れ替わるように、今度は太平洋高気圧が暑い夏を連れてやってきます。皆様、ご自愛ください。9月、大阪大学にて開催されるシンポジウムにて元気にお会いしましょう。

次号(No. 34)は、円谷さんの担当により、2010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22年7月9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)