

# 生命化学研究レター

(2012年10月)

**2.** 巻頭言

いにしえのアジアの交差点にて

大阪大学大学院理学研究科 藤本 ゆかり

**3.** 主催研究会報告

The Second Asian Chemical Biology Conference (ACBC2012)

**5.** 研究紹介

**5.** ペプチドから多糖、ウイルスへ ~バイオと高分子の融合~

東京工業大学大学院理工学研究科 芹澤 武

**11.** Inchworm 型分子の機能

鳥取大学大学院工学研究科 櫻井 敏彦

**17.** 高性能膜融合レセプターの設計と評価~人工膜融合系の目指すところ~

日本大学生産工学部 柏田 歩

**22.** 論文紹介「気になった論文」

東京大学大学院医学系研究科 堂浦 智裕

The Scripps Research Institute 森本 淳平

**29.** 留学体験記

ボストン大学留学体験記

東京大学先端科学技術研究センター 林 剛介

**33.** お知らせ

受賞

編集後記

# 巻頭言

## いにしえのアジアの交差点にて

大阪大学大学院理学研究科 藤本ゆかり

今夏、古(いにしえ)のアジアにおける交易拠点の一つであった琉球の地で、第2回アジアケミカルバイオロジー会議(ACBC2012)(第15回生命化学研究会)が深瀬浩一組織委員長の下開かれた。微力ながら運営に関わったご縁で(あるいはおいしい泡盛のせいだったか)、本稿をお引き受けすることになり、いくつかの点で印象的だった本会で感じた事を弱輩ながら書き留めてみたい。

会議は、7月初め日本の他の地方では梅雨で大雨が続くなか、沖縄の青い空と碧い海、熱い空気を感じながらスタートし、レベルの高い講演と熱いディスカッションが行われた。アジアにおいて世界の最先端を走るアクティブな講師の発表を聞きながら、研究自体はもちろんのこと、それを支えるシステム、研究アプローチ...等々、自らあるいは日本の現状を考える機会にもなった。そのひとつは、あらためて今回、シンガポールや韓国、中国、台湾の、昨今の高い研究水準をみて、人の面での政策的なサイエンスの振興策の効果は大きいのかもしいと感じた。色々と議論されているところではあると思うので今更と言われてしまうようにも思うが、一研究者の視点で周囲を見回してみても、もう少しシステムティックに安定的に、日本の若手世代が(ある程度の期間の)海外での研究経験を積むしくみを増やせないものかな、と思う。色々なプログラムがあって、科学分野では総数としてはそれほど海外に行く人の数は減っていないと思うのだが(今後減る?)、タイミングを逃すと、以前よりも、優秀な助教クラスの人が留学の機会を逃すケースが多くなっているようにも思う。日本が自国で優秀なPh.Dを育てられる事は誇れる部分であると思うし、アメリカでPh. D-ポストドクと修行を積んだあとにアジアに帰って自国の科学を支えるといった状況は理想形ではないのだけだと思うのだけれども、アジアに帰って活躍している若手Professor達と対比して、日本の状況を考える機会であった。

また今回、かなり広い“ケミカルバイオロジー”分野の講演を聞く機会を得、ケミカルバイオロジーの言葉が生まれた当初の、多少限定した分野から、良い意味での広がりを持って発展しているようにあらためて感じた。良い意味で手段を選ばずに生命現象における問題解決を目指す分野として、化学、生物学の枠を超え、医学、物理学等々の周辺分野を巻き込んだ研究も増えているように感じる。製薬会社の現場でもターゲットの解析にケミカルバイオロジーの手法を使う場面が増えているとも耳にする。新奇な解析手法のアピールを(問題解決よりも?)主眼としているような印象の仕事も依然あるように思うもの。。。

今回の開催がかつての激戦地の近くであったこともあり、科学のフィールドの中で、各国から各々バックグラウンドは異なるものの、似た目標を目指す研究者が集まり、科学を共通の拠りどころに、熱く語れることは非常に幸せなことだししみじみ感じる機会でもあった。アジアにおいても世界においても、サイエンスの進歩のための情報交換をするとともに、人と人との繋がりを広くあるいは強くして、将来に繋がる“何か”を動かす原動力につなげていくことができればと思う。

# 主催研究会報告

## The Second Asian Chemical Biology Conference (ACBC2012)

2012年7月4日から6日にかけて沖縄県糸満市サザンビーチホテルにて The Second Asian Chemical Biology Conference (ACBC2012)が開催された。本会議は、大阪大学深瀬浩一教授(フロンティア生命化学研究会会長)を実行委員長としてフロンティア生命化学研究会が主催する会議であり、1<sup>st</sup> Asian Chemical Biology Conference (ACBC2010)は2年前に Seoul National University で開催されている。総数107名の参加者(日本75名, 韓国16名, シンガポール4名, 台湾4名, 香港1名)が一堂に会して最新の研究成果を発表した。会議は、以下の5つのセッションに分かれ、それぞれ5~7件の口頭発表および61件のポスター発表が行われた。いずれのセッションでも熱心な討論が続いた。

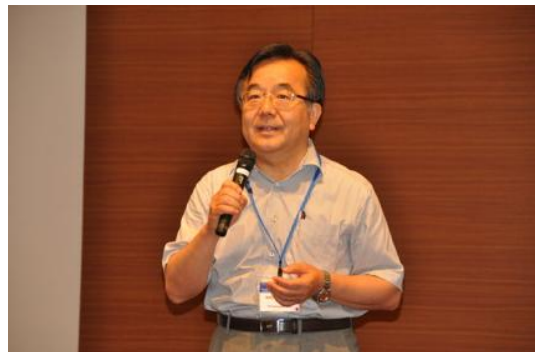
Session 1	Protein and Peptide Structure and Interaction
Session 2	Molecular Strategies for Chemical Biology
Session 3	DNA Structure and Biological Function
Session 4	Nanobio-science and Technology for Living Systems
Session 5	Glycan/Lipid; Biofunctional Molecules and Materials

また、会議中行われたバンケット、バーベキューや美ら海水族館へのオプションツアーなどを通じて更にアジア各国の研究者との親交を深めることができた。次回の会議は2014年に Yao 教授, Chang 教授らのお世話によりシンガポールで開催される予定である。

最後に、深瀬浩一教授および藤本ゆかり准教授をはじめとする深瀬研究室の学生の皆さんには、非常に円滑な会議運営をしていただいたおかげで、サイエンスに集中してディスカッションすることができた。厚く御礼申し上げます。

(大阪府大院理・円谷 健)





研究紹介

ペプチドから多糖、ウイルスへ

～バイオと高分子の融合～

東京工業大学大学院理工学研究科

芹澤 武

(serizawa@polymer.titech.ac.jp)



はじめに

2011年11月に、7年10ヶ月在籍した東京大学先端科学技術研究センターから現在の東京工業大学大学院理工学研究科に異動し、大岡山キャンパスにて新たな研究室をスタートさせました。当研究室では、既存の概念にとらわれない斬新かつ独創的な発想をもとに、生体由来の高分子(ペプチド、タンパク質、核酸、ウイルスなど)がもつ秘めた機能や特性を発掘し、工学材料として応用する研究を行っています。高分子化学、有機化学、物理化学を基礎とし、最新のバイオテクノロジーを駆使しながら、高分子科学における新たな学術領域の開拓にチャレンジすることで、医療・環境・エネルギー・製造分野などに貢献することを目指しています。本稿では、主に東大時代に得られた研究成果をまとめさせていただき、最後に現在の研究状況について紹介いたします。

合成高分子を見分けるペプチド

生命活動を分子レベルで眺めると、その本質が互いの分子構造を認識し、結合と解離を繰り返す相互作用の積み重ねからなることが分かる。これらの相互作用は一般に“特異的”であり、このことが精緻な生命反応を維持するうえで不可欠である。一方、医用材料研究に端を発し、材料表面に対する生体成分の相互作用を理解、制御することの重要性が長く提唱されてきた。そのような中、最近、ある種のペプチドが無機材料などの人工物の表面に特異的に結合することが明らかにされた。このようなペプチドは、ファージウイルスの外殻タンパク質や、細胞の表層タンパク質の一部にランダムペプチドを提示したペプチドライブラリーから、親和性の違いに基づき選別することにより同定できる

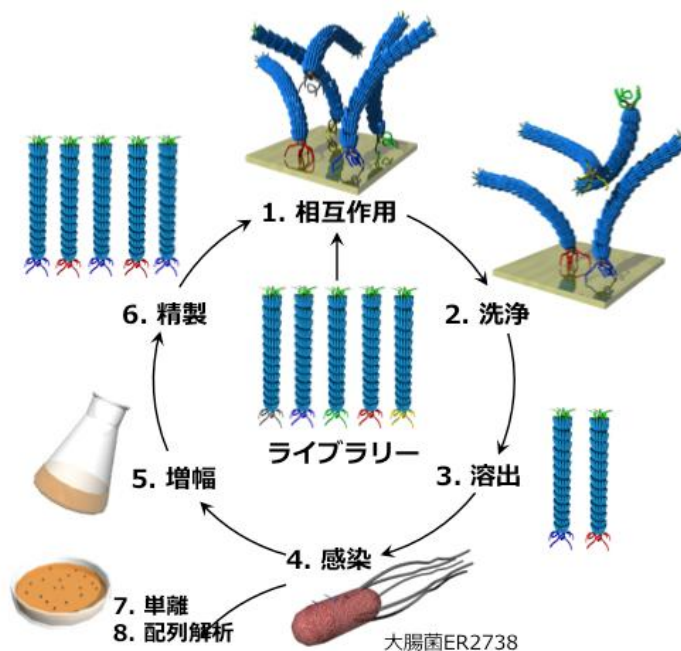


図1 PD法 (バイオパニング) の模式図

(それぞれファージディスプレイ法(以下PD法、図1)および細胞表層ディスプレイ法)。ペプチドは、比較的

短い長さで分子認識能をもつこと、容易に化学合成できること、水系で取り扱うことができること、有機化合物やタンパク質に修飾あるいは融合できることなどから、ナノ材料創製のための分子ツールとして期待されている。

2004年に鹿児島大から東大に異動し、自らの研究室を立ち上げたばかりで、藁にもすがる思いでテーマを探索していた私は、ペプチドが認識する標的分子として合成高分子に着目することにした(と言うよりは、むしろこれをやるんだ、と自分に言い聞かせた)。その際に、単純な化学構造をもつ合成高分子にPD法を適用することにより、両者の特異的相互作用の一般性を示すとともに、それらを高分子の世界で利用することを目指した。ところが、残念ながらPD法に関する知識や技術が何一つなかったため、博士課程時代の指導教員である佐藤智典先生(現在、慶應大教授)に頼み込み、PD法のプロコールのすべてをご教示いただくことから始めた。

最初の高分子として、既に取り扱いに慣れていて(かなりの思い入れがあった)<sup>1)</sup>、イソタクチックポリメタクリル酸メチル(イソタクチックPMMA)を選択し、そのフィルム表面にPD法を適用した<sup>2)</sup>。PMMAが水不溶性の比較的疎水性の高い高分子であるにも関わらず、取得した7残基ペプチドには水酸基やアミノ基を側鎖にもつアミノ酸が多く含まれていた。ファージに提示された状態から合成ペプチドのレベルにすると結合性を失うことはよくあることなので、果たして本物か内心冷や冷やしていたものの、得られた7残基ペプチド(Glu-Leu-Trp-Arg-Pro-Thr-Arg)の結合挙動を表面プラズモン共鳴法により評価すると、イソタクチックPMMAフィルムに対して $2.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ の結合定数( $K_a$ )で結合した。この値は立体規則性のみが異なるシンジオタクチックPMMAフィルムの2オーダー高い値となり、胸のつかえが下りたのを覚えている。このペプチドの特異性は、マテリアル結合性ペプチド全体の中でも秀逸であると自負している。その後の解析により、特異性に必要な最小単位はC末端側の4残基(Arg-Pro-Thr-Arg)であることや、水素結合を駆動力とする、誘導適合型の結合であることが分かった(図2)。高分子フィルム界面といった特殊な環境下であるために、水中における水素結合の利用を可能にしているものと考えられる。

これを機に、他の高分子にも適用するしかないと決意し、まずは必死になってその意味づけを考えた。その結果、シンジオタクチックPMMAの両親媒性に基づくフィルム表面での官能基の変化(高分子の両親媒性表面)<sup>3)</sup>、シンジオタクチックポリスチレンの多孔質構造<sup>4)</sup>、ポリ乳酸の結晶

Glu-Leu-Trp-Arg-Pro-Thr-Arg

- RPTRが必須結合モチーフ
- 水素結合が主な駆動力
- 誘導適合による結合

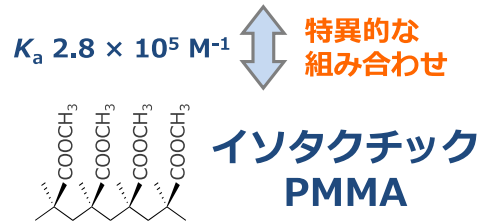


図2 イソタクチックPMMAに特異的に結合する代表的な7残基ペプチド

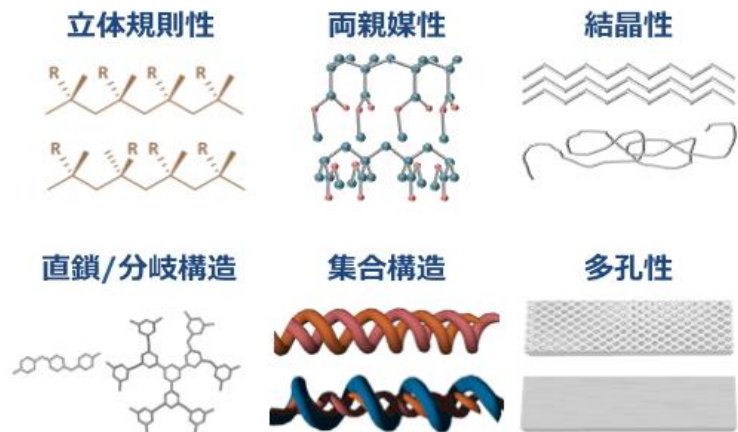


図3 ペプチドの標的となる高分子のナノ構造

性<sup>5)</sup>、アゾ基を側鎖に有する高分子の光異性<sup>6)</sup>、共役系高分子の直鎖および分岐構造<sup>7)</sup>などを見分けるペプチドの取得に成功した(図3)。また、水溶性高分子の主鎖骨格に結合するペプチド<sup>8)</sup>の同定にも成功し、特異的な相互作用がフィルム表面に限らず水溶液中でも観察できることを明らかにした(本誌の編集に関わっているM浦先生からいただいた「フィルム表面だけでは面白くない」という学会会場での有難いご指摘を受けて)。相互作用の駆動力は高分子とペプチドの組み合わせに明らかに依存しており、水素結合のみならず疎水性効果や $\pi$ - $\pi$ スタッキング相互作用などの存在が観察された。

このように、まさに研究室メンバーの力業の賜として(PD法をご存じの方ならば、一つのペプチドをきちんと同定するまでの気の遠くなる時間と作業がお分かりいただけると思う)、ペプチドによる高分子鎖の認識が一般的に起こりうる現象であることを見出した(確信した)<sup>9)</sup>。

### ナノ材料としての高分子結合性ペプチドの利用

得られた高分子結合性ペプチドを高分子の世界で利用しない手はない。手始めとして、京都工繊大の田中直毅先生のご協力のもと、遺伝子工学的手法により融合タンパク質を調製し、高分子表面に対するタンパク質の安定な固定化について検討した。モデルタンパク質として、分子シャペロンとして知られるDnaKの基質結合ドメイン(DnaK419-607)を選択し、このN末端側にイソタクチックPMMAに結合する7残基ペプチド(Glu-Leu-Trp-Arg-Pro-Thr-Arg)を融合した<sup>10)</sup>。得られた融合タンパク質はイソタクチックPMMAフィルムに対して $4.9 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ の吸着定数( $K_{\text{ads}}$ )で固定され、この値はもとのタンパク質の75倍であった(図4)。これで気をよくし、同様の発想で、シス体のアゾベンゼンに結合する7残基ペプチド(Trp-His-Thr-Leu-Pro-Asn-Ala)

を緑色蛍光タンパク質に融合すると、得られた融合タンパク質はトランス体リッチなアゾ高分子フィルムよりもシス体リッチなフィルムに対して優位に吸着した<sup>11)</sup>。このように、タンパク質に高分子結合性ペプチドを融合することにより、タンパク質の安定吸着が実現できた。

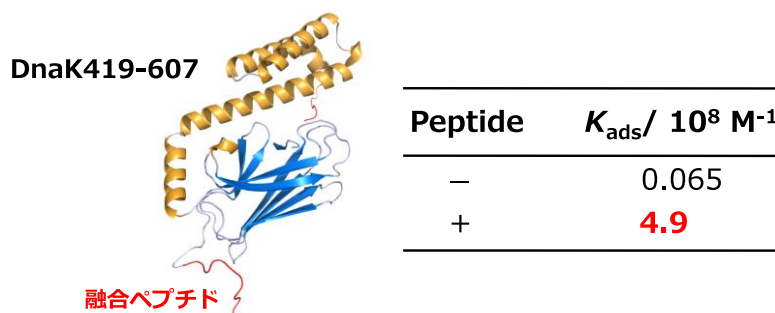


図4 ペプチド融合タンパク質の高分子表面への安定固定化

高分子結合性ペプチドで金ナノ粒子を修飾し、高分子表面に対するナノ粒子の固定化についても検討した。イソタクチックPMMAに結合する4残基のモチーフペプチド(Arg-Pro-Thr-Arg)を選択し、N末端にシステインを導入することで、金-チオール結合を介して金ナノ粒子を修飾した。得られたペプチド保護金ナノ粒子は、シンジオタクチックPMMAフィルムに比べて、標的高分子であるイソタクチックPMMAに対してより多く吸着した<sup>12)</sup>。ペプチド保護金ナノ粒子の調製を検討する過程において、ペプチド配列に応じて金ナノ粒子の生成速度が変化することに気づき、新たなバイオセンシング系の提案にも成功した<sup>13)</sup>。このように、無機ナノ粒子と高分子の界面設計にペプチドが利用できることを見出した。

ペプチドを高分子表面の修飾剤として利用できないかという観点でも評価を行った。ここでは、より簡単で確実な表面処理法の開発が期待される、代表的なエンジニアリングプラスチックであるポリエーテルイミド (PEI) を選択し、これに特異的に結合する7残基ペプチド (Thr-Gly-Ala-Asp-Leu-Asn-Thr) を同定した<sup>14)</sup>。ペプチドのC末端を所定のスペーサーを介してビオチン化した後、PEI表面に固定化した。この表面に対するstreptavidinの固定化について評価した結果、ペプチドを介した場合にのみstreptavidinは均一かつ単層で効率よく固定化できた (図5)。原子間力顕微鏡 (AFM) でstreptavidinの吸着状態を視覚化したときには、ペプチドを介したときにのみ観察される美しい吸着状態に驚いた。また、ペプチドを介して固定化したstreptavidinはその活性を保持しており、余ったビオチン結合サイトを利用することで、DNAハイブリダイゼーションの検出が可能であった。このように、高分子表面の修飾剤としてペプチドが利用できることが明らかになった。

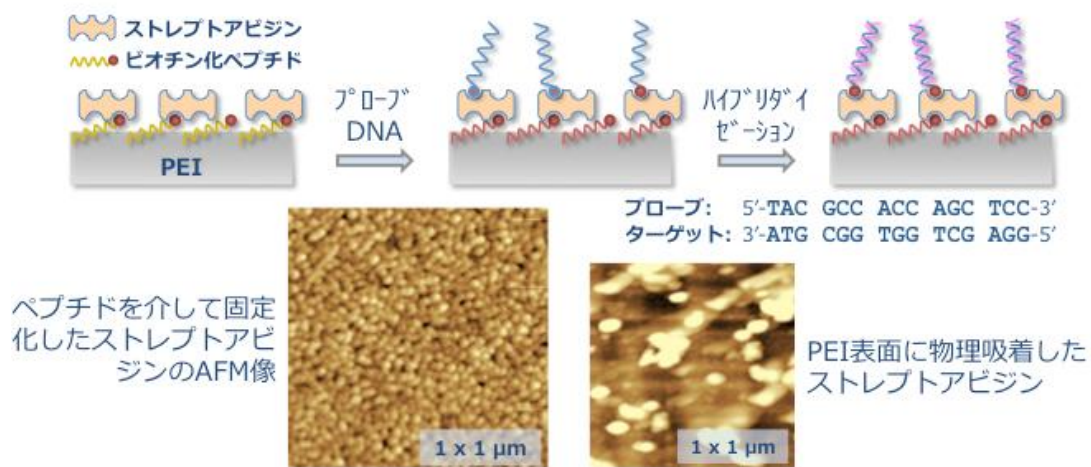


図5 ペプチドによるエンプラ表面の機能修飾

意外だったことに、同様のstreptavidin固定化実験をイソタクチックあるいはシンジオタクチックPMMAとそれぞれに特異的に結合するペプチドを用いて行ったところ、ビオチン化ペプチドを十分に固定化しているにもかかわらず、streptavidinはほとんど固定化できなかった<sup>15)</sup>。ペプチド固定化前後における表面特性を解析した結果、PEIではペプチドが再表面に露出しているのに対し、PMMAではペプチドが界面近傍の水和層に潜り込むため、streptavidinを固定化できないことが分かった。この研究では、イソタクチックとシンジオタクチックPMMAからステレオコンプレックスを形成し、それに結合するペプチドを利用すると、PEIの時と同様にstreptavidinを固定化できることを示しており、一口にペプチドを用いる高分子表面の機能化と言っても、高分子の種類や水中での凝集構造が機能発現に影響することが分かった。このように、水環境に特徴的な高分子表面の特性を理解したうえで、ペプチドを利用していく必要があるようである。

疎水性高分子の水中分散剤としてペプチドが機能するかについても検討した。ここでは、バイオイメージングやDDS分野への応用が期待される、発光性の樹状ポリ(p-フェニレンビニレン) (hypPPV) を選択した<sup>16)</sup>。これに特異的に結合する12残基ペプチド (His-Thr-Asp-Trp-Arg-Leu-Gly-The-Trp-His-His-Ser) の水溶液に極少量の有機溶媒に溶解したhypPPVを添加し超音波処理すると、50 nm程度の粒径をもつ高分子ナノ粒子が調製できた (図6)。ペプチドなしでは不定形の凝集塊が観察されたことから、ペプチドの明確な寄与が示唆された。予想外なこととして、ナノ粒子あたりのペプチドの担持量を定量したところ、その量は非常に



多く、その他の結果と合わせて考えると、ペプチドが微粒子の内部にまで取り込まれたハイブリッド型のナノ粒子であることが分かった。一方、組み合わせは異なるが、発光性高分子にペプチドが結合すると、その発光特性を変調できることも見出し、このことを利用したバイオセンシング系が構築できた<sup>8)</sup>。

ナノチューブの水中分散剤としてもペプチドは機能した。カーボンナノチューブの水中分散は既にいくつかの報告例があったため、一般には入手が困難な窒化ホウ素ナノチューブ (BNNT) に着目し、ペプチドが良好な水中分散剤として機能することを明らかにした<sup>17)</sup>。これに端を発し、ヌクレオチドや水溶性多糖<sup>18)</sup>、あるいは水溶性高分子<sup>19)</sup>によるBNNTの水中分散へと研究を展開した。

上記したすべての系は高分子をペプチドの標的としたものであるが、研究室の知識の幅を広げるために、無機材料に結合するペプチドの同定と利用についても取り組んだ。細々とした研究ではあるが、酸化スズ表面に特異的に結合するペプチドが常温・常圧における結晶性酸化スズナノ粒子の水中合成に利用できることを明らかにした<sup>20)</sup>。

このように、高分子の世界におけるペプチドの新機能<sup>9)</sup>を世界に先駆けて提案できたものと考えている。

## 最近の研究状況

木や草などに多く含まれるセルロースは、地球上で最も豊富に存在する有機物である。天然物から生成するセルロースは、数nm～数十nmの直径、数百nm～数 $\mu\text{m}$ の長さをもつ細長い単結晶繊維の形態をしている(図7)。最近我々は、この単結晶セルロース繊維に特異的に結合するペプチドをPD法により探索する過程において、ペプチドが単結晶セルロースに結合すると、ペプチドの主鎖であるアミド結合がその場で加水分解される新しい現象を偶然にも見出した(セルロースが触媒として働く…?)。常温・常圧・中性の温和な水溶液中でおこる、全く予想外の化学反応であり、我々が知る限り、これまでに報告例はない。現在、「最先端次世代研究開発支援プログラム」の支援を受けながら、反応パラメータの整理や、様々な有機分子の加水分解反応の解析を通じて、その反応メカニズムの解明と応用について検討している。にわかに信じがたい反応であることや詰め甘さも相まって、初報の受理には苦戦しているものの、新たな事実が明らかになる度に、本系の面白さや可能性に胸を躍らせる日々を送っている。

一方、ファージに対する研究室内での知見が充実したことに端を発し、現在、澤田助教を中心として、繊維状のM13ファージを形態が定まった直鎖状の高分子に見立てながら新しいソフトマテリアルを創製する研究にも着手している。望みの位置に欲しい機能を付与できることや、電子顕微鏡下で可視化できる分子

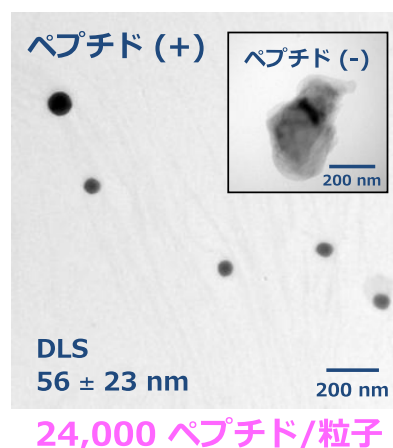


図 6 ペプチドと高分子からなるハイブリッドナノ粒子

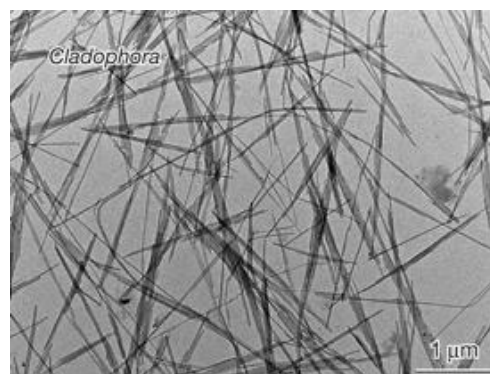


図 7 天然物から抽出、生成した単結晶セルロース繊維の電子顕微鏡像

サイズであることもウイルスの魅力である。材料を構成するウイルスの集積構造を解析し理解したうえで構造・物性・機能の相関について明らかにできれば、前例のない材料系が構築できる(可能性がある)。ウイルス研究は生物学や医学の世界で発展を遂げてきたが、化学の力でウイルスに新しい価値を創造することを目指している(つもり)。

## 謝辞

ここで紹介した研究は、JSTさきがけ「構造制御と機能」(岡本佳男 領域代表)、JST顕在化ステージ、科研費(No. 18710093、20350052、21106506)、次世代プログラム、小笠原財団、いくつかの民間企業のご支援をもとに行いました。ここに感謝の意を表します。また、本研究を行うにあたり多大なご協力をいただいた研究室学生およびスタッフ(特に、現・九州大学准教授 松野寿生 博士、現・当研究室助教 澤田敏樹 博士)、また多くの共同研究者の方々に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- (1) T. Serizawa *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 355–362; H. Matsuno *et al.*, *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 2174–2179.
- (2) T. Serizawa *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13780–13781 (*Science Editor's Choice*); T. Serizawa *et al.*, *Langmuir* **2007**, *23*, 11127–11133.
- (3) T. Serizawa *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 723–726.
- (4) T. Serizawa *et al.*, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 989–993.
- (5) H. Matsuno *et al.*, *Langmuir* **2008**, *24*, 6399–6403.
- (6) J. Chen *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2917–2920; *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*, 163–168.
- (7) H. Ejima *et al.*, *Langmuir* **2010**, *26*, 17278–17285.
- (8) H. Ejima *et al.*, *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 6032–6034.
- (9) T. Serizawa *et al.*, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 10252–10260 (Review).
- (10) H. Matsuno *et al.*, *Chem. Lett.* **2007**, *38*, 834–835.
- (11) J. Chen *et al.*, *Chem. Lett.* **2011**, *40*, 482–483.
- (12) T. Serizawa *et al.*, *Langmuir* **2009**, *25*, 12229–312234.
- (13) T. Serizawa *et al.*, *Mol. BioSyst.* **2010**, *6*, 1561–1564; T. Sawada *et al.*, *Chem. Lett.* **2011**, *40*, 142–3143.
- (14) T. Date *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 351–359.
- (15) T. Date *et al.*, *Polym. J.* **2012**, *44*, 366–369 (Highlighted).
- (16) H. Ejima *et al.*, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7707–7709.
- (17) Z. Gao *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4976–4977.
- (18) Z. Gao *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 627–632; *Soft Matter* **2011**, *7*, 8753–8756; *RSC Adv.* **2012**, *2*, 6200–6208.
- (19) Z. Gao *et al.*, *Polym. J.* **2012**, in press.
- (20) H. Matsuno *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2012**, *85*, 746–757 (BCSJ Award).

研究紹介

Inchworm 型分子の機能

鳥取大学大学院工学研究科 化学・生物応用工学専攻  
 櫻井 敏彦  
 (sakurai@bio.tottori-u.ac.jp)



はじめに

機能を発現するであろう分子を設計し、具体的な合成・精製を経て、評価系に適用する。得られた結果の再現性を確認し、想定外の結果について次の評価系を考える。一つ解れば、必ずと言っていいほどより多くの疑問が生じる。私の研究テーマは、前述のようなほぼ終わりのないサイクルに陥りつつあるが、“どのような”機能を念頭に、“どのような”分子を設計するのか、楽しくも難しいこの自己設定は千差万別で、多くの研究テーマが存在する理由であると思っている。

本稿では、人工核酸による遺伝子発現制御を目的として設計したinchworm型機能性分子について、アミロイド線維化阻害効果の簡易スクリーニングとあわせて紹介したい。

2005年に共に熊本大学を転出した奥野貴士先生(山形大学理学部准教授)と、新天地での不安を払拭するかのように今後の研究テーマについて語り合った。京都駅前のスターバックスで4時間以上も研究について話をした際に何気なくスケッチした単純なこの分子は、重合度が制御されたポリエチレングリコールの両末端にペプチド核酸(PNA)やペプチドを配する分子構造を持つ(図1)。この何の変哲もない構造を持つ分子が、意外と面白い成果へと私を導いてくれたのである。

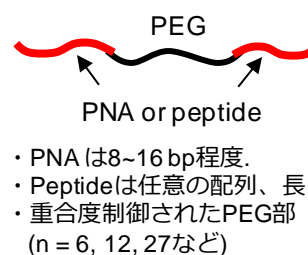


図1. Inchworm 型分子の基本構造.

紹介内容までの経緯

2000年、博士号未取得のまま、恩師である伊原博隆教授(熊本大学大学院工学研究科)のもとで助手として研究をご一緒させていただいた。複雑なアミノ酸配列を持たないモデルペプチドを用いた1~3次元的な高配向性会合体の構築<sup>1, 2)</sup>を試みていた私は、特にβ構造からなる繊維状会合体(当時の私には“線維”ではなかった)の美しさに魅力を感じていた(図2)。ナノファイバーを形成するであろうモデルペプチドを合成し、この会合挙動を検討していた<sup>3)</sup>ものの、九州地区高分子若手研究会で田中敬二先生(九州大学教授)に会合体構築の意義を問われることとなる。考えがなかったこともないが、当時の私は分子の化学構造と会合構造の関連性

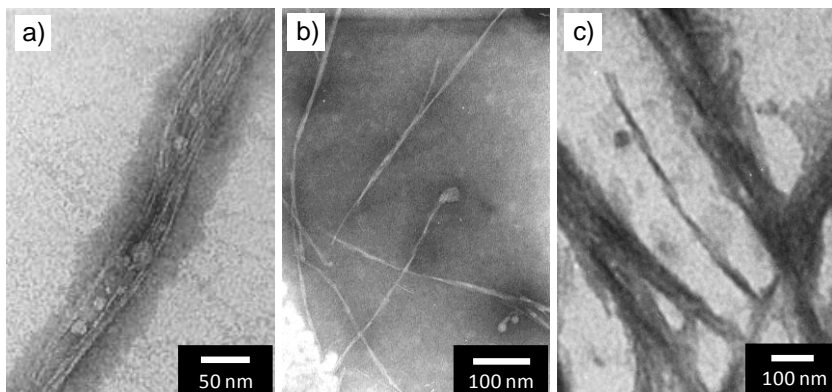


図2. Pyr-(LK)<sub>8</sub>の線維化過程。a) 5分後、b) 2時間後、c) 3日後。初期で形成した幅5 nm程度のナノファイバーが、ねじれながらバンドルする様子がわかる。

に興味を持っていて、その後の展開に必要性を感じていなかった。今思うと、確信的に目を背けていたのだと思う。結果、2005年に鳥取大学工学部生物応用工学科に転任してから、わずかながら考えていたアプローチに少しずつ着手することとなった。当時の私には全く知識のない、“バイオ”の考え方を身につけたくもあった。修士学生の時に、研究で細胞を扱ったこともこの分野へ興味を持った一因だと思う。

### 人工核酸による遺伝子発現制御

ヒトゲノムの配列が決定・解析され、多くの疾患・疾病遺伝子、癌遺伝子などの病因遺伝子配列が明らかにされていた。解析法に標的遺伝子(mRNA)に作用させるRNA干渉(RNAi)が機能解析に多用される中で、天然核酸の化学構造を模倣した核酸モデル化合物は異なる発展を遂げている<sup>4)</sup>。1991年P. E. Nielsenらが報告したペプチド核酸(peptide nucleic acid; PNA)<sup>5)</sup>は、

1) スクレアーゼ・プロテアーゼ耐性, 2) DNA, RNAとの安定な二重鎖形成能, 3) 高いミスマッチ選択性, 4) 核酸二重鎖への相互作用など、従来の人工核酸とは異なる特性を示す反面、長鎖化に伴う溶解性の低下、タンパク質との非特異吸着、細胞膜透過性等の問題点が残る。特に、遺伝子上の一カ所を特定するのに必要な14-20 bp程度では融解温度( $T_m$ 値)は60~70°C程であり、この配列中の1塩基が異なった場合では数°C低下するだけで、生体内(37°C)では1塩基認識能を示さない点(図3)に興味を持った。

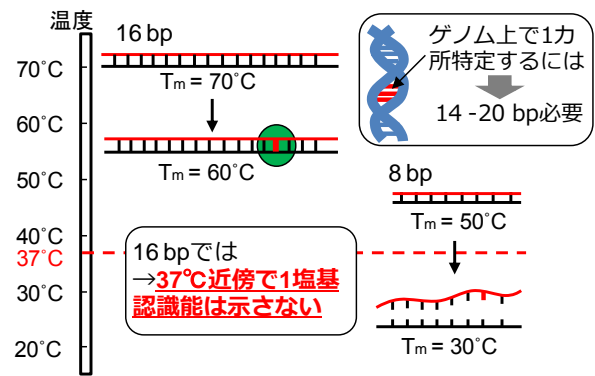


図3. 生体内1塩基認識能を目標とした際のPNA鎖長と融解温度( $T_m$ )との問題点。

“生体内温度近傍で1塩基認識を可能とする人工核酸”を目的とし、様々な人工核酸を合成したものの、いずれも所用時間、コストに見合うだけの認識能を達成できなかった。最終的に、PNA-ポリエチレングリコール(PEG;  $n=12$ )-PNAのブロック構造を持つinchworm型PNA-PEGコンジュゲート(図4.左下)にたどり着いた。PEGを配する分子設計自体に新規性はなく、既に多様なPEG化PNAが報告されている<sup>6)</sup>ものの、これらのアプローチでは $T_m$ 値の生体内温度近傍への誘導と遺伝子発現制御効率の両立は困難であった。

遺伝子発現の評価には、無細胞タンパク質合成システムを用いた。30~40°Cでタンパク質を合成することに加え、有機合成が中心の実験室でもルミノメーターさえあればかなり詳しく評価できるためである。無細胞タンパク質合成システムに最適化されたルシフェラーゼ発現プラスミド pIVEX2.3d Luc+ (図4.左上)を

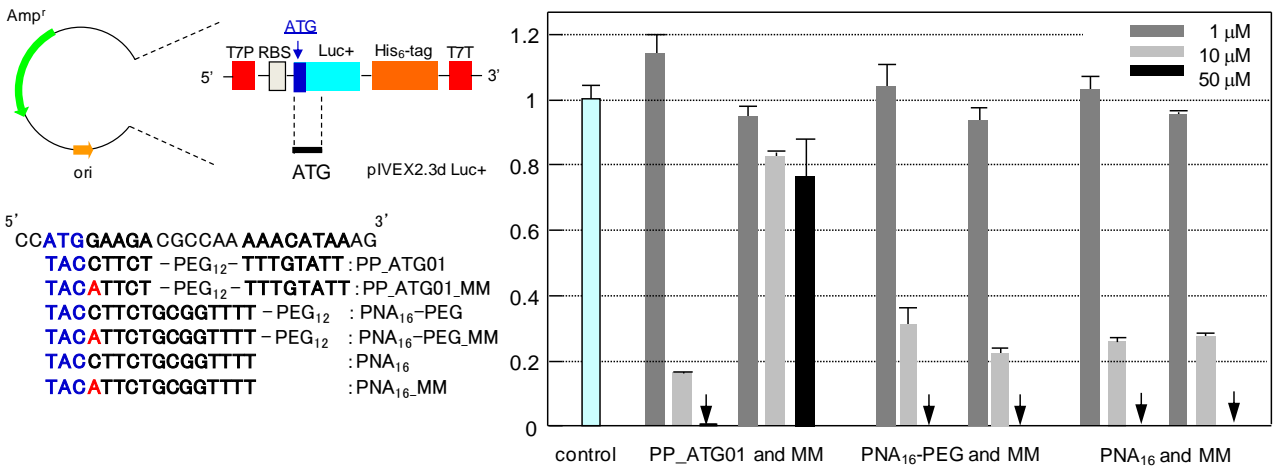


図4. PNA-PEG コンジュゲートの塩基配列(左)とルシフェラーゼアッセイの結果(右). PP\_ATG01 とそのミスマッチ配列で、顕著な遺伝子発現量の差が確認できる。

作製し、肝心のルミノメーターは河田康志教授(鳥取大学大学院工学研究科)からなかば永久借用した状況での実験だった。T7プロモーター領域と開始コドン領域と相補鎖を形成するPNA-PEGコンジュゲートを合成してアッセイした際に、開始コドン近傍で顕著な発現抑制が定量できたときは“本当に抑制できるんだ・・”と少々感激したことを覚えている。続いて、開始コドンをターゲットとして、PNA-PEGコンジュゲートの1塩基認識能を、重合度12のPEGの両末端に8残基のPNAを配するinchworm型 (PP\_ATG01)、PEGの片末端に16残基のPNAを配するコンジュゲート (PNA<sub>16</sub>-PEG)、さらに16残基からなるホモPNA (PNA<sub>16</sub>)および各々のミスマッチ配列 (MM) によるルシフェラーゼ発現量から評価した。その結果、inchworm型 PNA-PEGコンジュゲートはフルマッチ塩基配列の際に発現を抑制するのに対し、1塩基配列が異なるミスマッチ配列ではルシフェラーゼ発現をほぼ抑制しなかった。一方で、従来型のコンジュゲート (PNA<sub>16</sub>-PEG) やPNA<sub>16</sub>ではフルマッチ、ミスマッチいずれの配列においても添加量に伴いルシフェラーゼ発現量が低下することが示された(図4.右)。この結果は、inchworm型PNA-PEGコンジュゲートが発現温度近傍 (30°C) で1塩基を認識して遺伝子発現を制御していることを意味している。このメカニズムは、合成DNAとの相補鎖形成に関する熱力学パラメーターより、PNA各部のT<sub>m</sub>値が1塩基認識能に大きく関与していることがわかってきた。この他にも、このPNA-PEGコンジュゲートは、inchwormの名が示すとおり、擬似的な長鎖人工核酸としても作用すること(図5)、発現系においてアンチセンスとして作用していること、など機構がわかりつつある<sup>7)</sup>。ただ、お気づきのとおり、mRNAの1カ所を認識しているのか、プラスミドでなくゲノム長に適用で

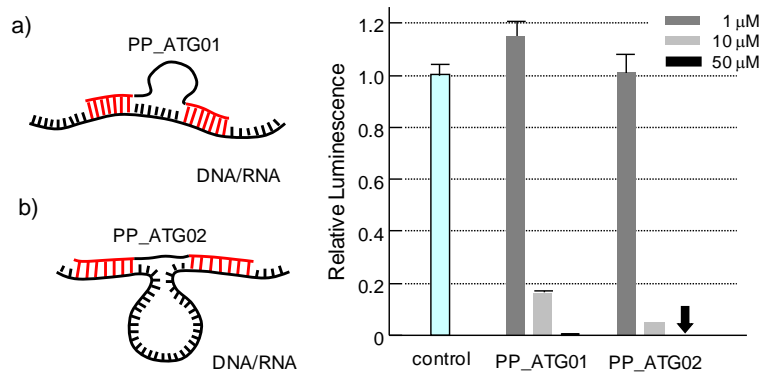


図5. 擬似的な長鎖型 PNA-PEG コンジュゲート(PP\_ATG02)のイメージ図(左)とルシフェラーゼアッセイの結果(右). PP\_ATG02 のほうが、わずかながら発現抑制効果が高いことがわかる。

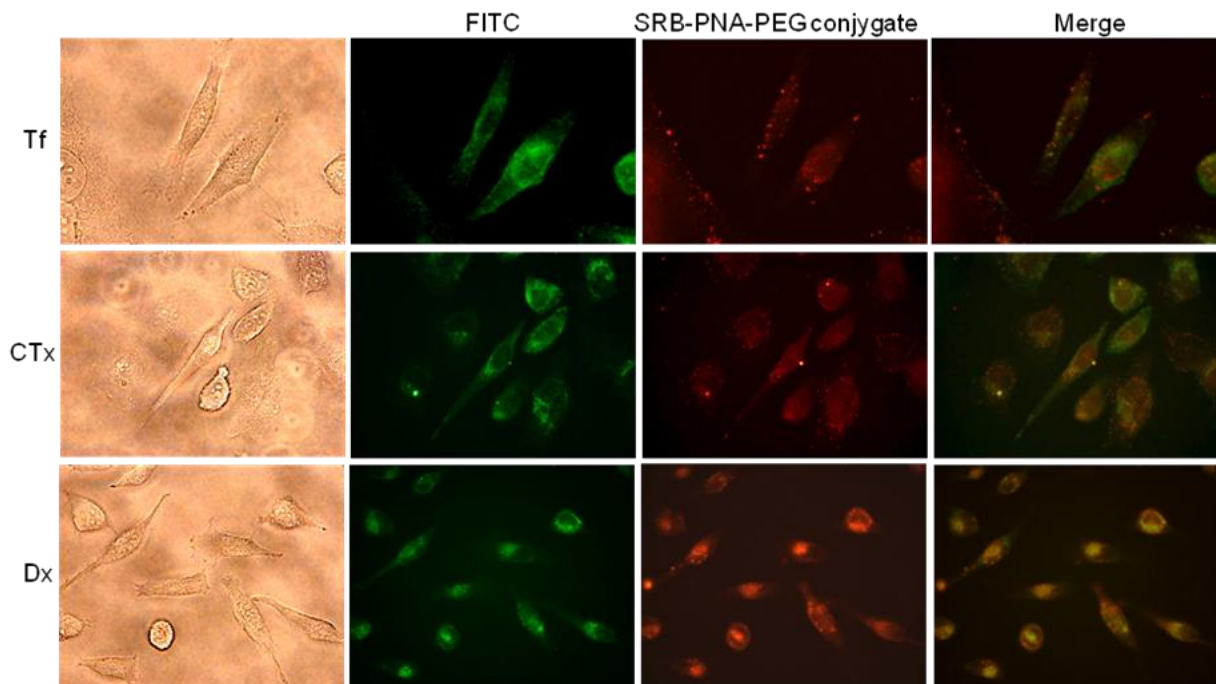


図6. ローダミン修飾(SRB-)PNA-PEG コンジュゲートのエンドサイトーシスマーカーとの局在性. FITC 標識されたトランスフェリン (Tf)、コレラトキシン B (CTx)、デキストラン (Dx) を用いた結果では、マクロピノサイトーシス経路依存的である FITC-Dx と共局在しているようにも見えるが、現時点では明確にできていない。

きるのか、など、さらに多くの疑問点が湧いてきている。冒頭で述べたとおりの状況であるが、現在は細胞内での遺伝子発現制御を目標として、細胞内輸送挙動について検討中である(図6)。

### アミロイド線維化阻害効果の簡易スクリーニング<sup>8)</sup>

ここまでの人工核酸の研究とは関係ない話のようだが、ペプチドの自己組織化構造への関心を無くしたわけではない。ペプチドの繊維状会合体に興味を持っていたため、アミロイド線維・アミロイドβと出会うのも自然の成り行きだったのかもしれない。すでにご存じの通り、アミロイドβの線維化プロセスがアルツハイマー病と密接に関係していることが指摘されており<sup>9)</sup>、核形成を経て伸長すると考えられているこの形成プロセスにおいて、初期段階の溶解性オリゴマーが細胞毒性を示す結果が報告された<sup>10)</sup>。これは、初期のオリゴマー化を阻害する化合物を効率よく簡便にスクリーニングすることであれば、治療あるいは予防薬の発見・開発への足がかりとなることを示している。効率よく簡便にスクリーニングするには、アミロイドβのコアドメイン (KLVFF)<sup>11)</sup>がオリゴマー状態で存在できればよいだろうという安直な考えで、先のinchworm型の分子構造をそのまま適用した。この際、分子の両末端に分子内FRETを誘起する官能基 (Dansyl基、Trp基)を導入して、ダイマー構造を分光学的に検出できるようにした(図7.左)。実際のところ、溶解当初 (10 mM

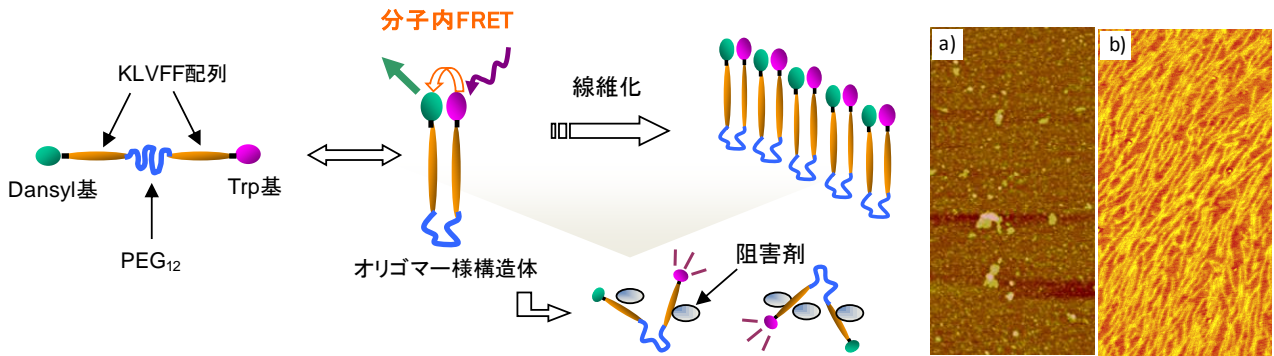


図7. アミロイドのオリゴマー様構造体形成を目的とした(KLVFF)-PEG コンジュゲートの化学構造とこれを利用した線維化阻害剤のスクリーニングの概念. 実際には、1.0 μM (臨界会合濃度(cac): 4 μM)で FRET を誘起していたものの、90 日後には極細のナノファイバーを形成してしまう。

PB, pH 7.4, 25°C) はダイマー構造であったが、時間の経過と共に高さ1 nm程度のナノファイバーを形成してしまうことがわかった(図7.右 a)5分後、b) 90日後のAFM像)。この結果は溶液を随時調製しなければならないことを意味しているが、溶液調製後の(KLVFF)-PEGコンジュゲートにアミロイド凝集の阻害剤として知られているクルクミンを添加すると、FRETが消失することがわかった。この結果は、(KLVFF)-PEGコンジュゲートが低分子化合物の線維化阻害効果を検出できる可能性を示していた。かなり疑わしかったのだが、FRET強度に対するクルクミンの濃度依存性を評価しつつ、一般的な変性剤であるウレア、グアニジン、アルギニンやその誘導体など片っ端から添加してFRET強度を測定していた。某研究所の薬理色素も手に入れようと頑張ったが断られたのもよい思い出である。タンパク質が染まれば阻害剤になるだろうと、研究室にあったCBB G-250, R-250 (電気泳動ゲルの染色剤)を用いたが、ふと食品色素である青色一号(ブリリアントブルーFCF;以降FCF)を試してみた。血液脳関門を通過する色素<sup>12)</sup>

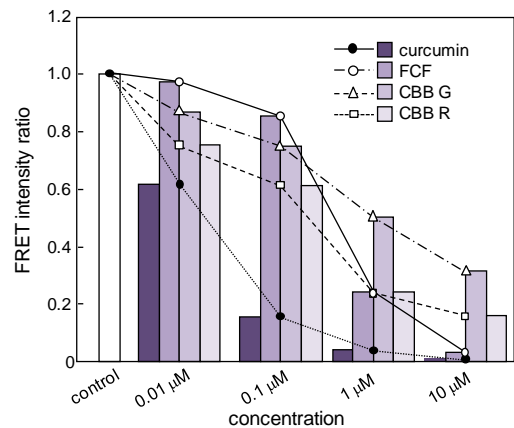


図8. 各濃度の低分子化合物を添加した際の(KLVFF)-PEG コンジュゲートの FRET 強度のうつりかわり. [(KLVFF)-PEG conjugate] = 1.0 μM.

というのも面白かった。色素が蛍光スペクトル測定において分光的に干渉してしまい、正確なFRET強度を見積もることはできないが、CBB R-250およびCBB G-250はいずれも添加濃度に対して一次的にFRET強度が減少したのに対して、クルクミンでは0.1  $\mu\text{M}$ を、FCFでは0.1 ~ 1.0  $\mu\text{M}$ を境にFRET強度が急激に低下している傾向が示された(図8)。もしやと思ったのだが、まだ信じられず、 $\text{A}\beta_{1-40}$ を用いたアミロイド線維化阻害効果をチオフラビンT (ThT) を用いて評価した。この結果、4  $\mu\text{M}$ の $\text{A}\beta(1-40)$ に対し同濃度のFCFを添加した場合には時間の経過と共に蛍光強度がわずかに増加し続けたのに対し、40  $\mu\text{M}$ 添加した際はある程度抑制されつつも線維化した $\text{A}\beta(1-40)$ が2時間経過後より減少する結果が示された(図9)。この線維化プロセスは詳細に知り得ていないが、いずれ紐解いていきたいと思う。実は、ThTアッセイすら信じられず、AFMによる直接観察も行った。得られた画像は、これまでの結果を支持する、つまりFCFに顕著なアミロイド線維化抑制が見られた(図9)。以上の結果は、(KLVFF)-PEGコンジュゲートは、ごく数分で簡便に化合物の線維化阻害効果をスクリーニングできることを意味している。

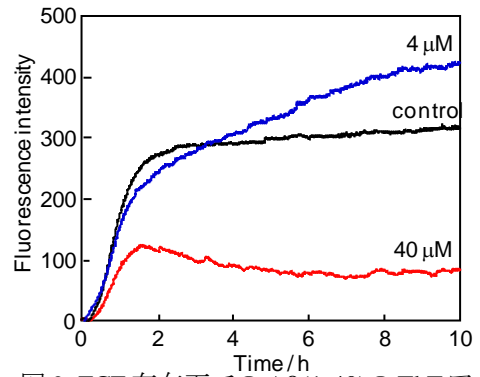


図9. FCF存在下での $\text{A}\beta(1-40)$ のThTアッセイ。濃度によって不思議なアミロイド線維形成・抑制挙動が見られる。  
[ $\text{A}\beta(1-40)$ ] = 4.0  $\mu\text{M}$ 。

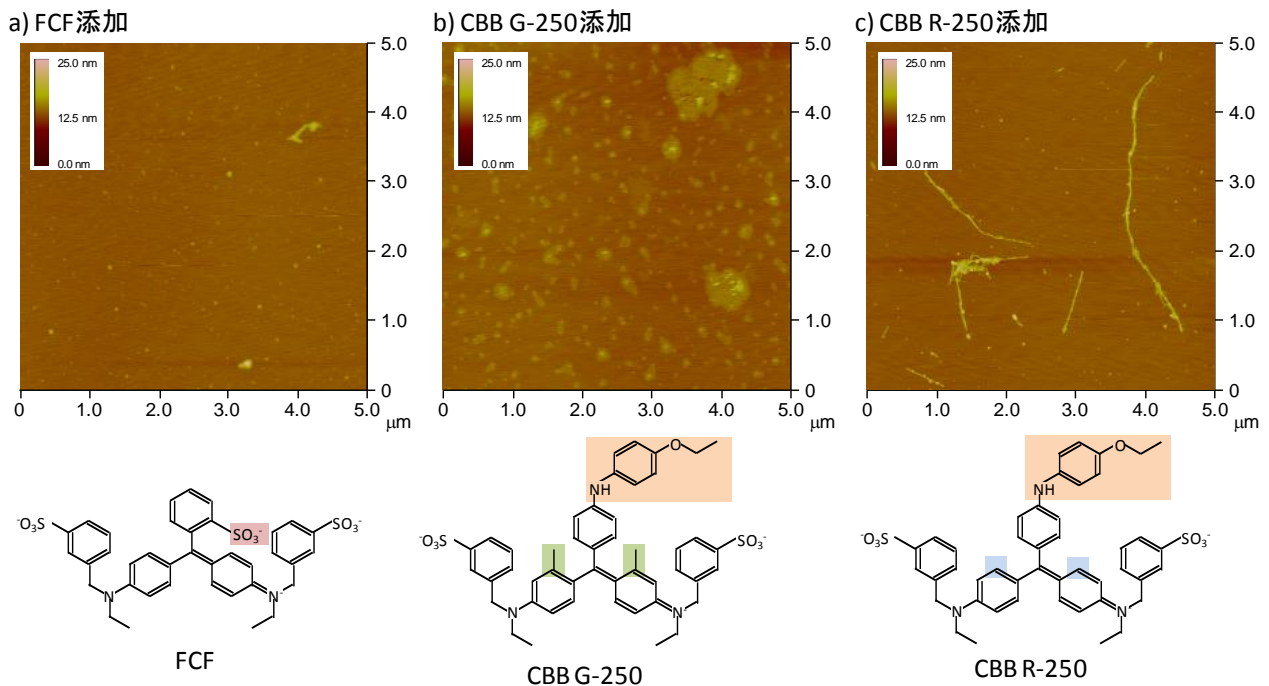


図9. 各色素存在下における $\text{A}\beta(1-40)$ のAFM像。FCFが顕著な線維化抑制を示すことがわかる。  
[ $\text{A}\beta(1-40)$ ] = 4.0  $\mu\text{M}$ , [blue dyes] = 40  $\mu\text{M}$ 。

### 今後の展開

今回紹介したinchwormとはシャクトリムシを意味する。改めて紹介する程の分子構造ではないのだが、この構造ですら、まだ多数の機能を担うことのできることを改めて実感している。いずれの内容も研究途中の結果であり、検討すべき点が多々残っていることはご容赦願いたい。現在、人工核酸の研究は、細胞内での遺伝子発現制御を目指して分子構造を再検討している。アンチセンスとしてだけでなく、アンチジーンとして、またmiRNAを中心としたncRNAやSNPs等の網羅的な検出、機能解析の手法として展開したい。ア

ミロイドの研究では、NMRによるFCFの線維化抑制メカニズムを解明しつつ、今はアミロイドオリゴマーの早期検出を試みている。夢風呂敷を広げつつ、生じる疑問を1件ずつ紐解いていきたい。

## 謝辞

今回紹介させていただいた研究は、鳥取大学大学院工学研究科に赴任してから始めた内容です。これらの研究のコンセプトをディスカッションし、研究を共に進め、時に激しく言い争った奥野貴士准教授(山形大学理学部)に深く感謝いたします。その他、多くの研究者の方々に助言いただきました。この場を借りてお礼申し上げます。そして、研究のコンセプトを大学院時代よりご指導いただきました伊原博隆教授(熊本大学大学院)に深く感謝いたします。最後になりますが、当研究グループは毎年修士に1人進学するかしないかの小さなグループです。このような状況でも、笑いながら、泣きながら、飲みながら、死にかけながら共に研究を進めた学生諸氏に心より感謝いたします。

## 参考文献

1. Sakurai, T.; Oka, S.; Kubo, A.; Nishiyama, K.; Taniguchi, I. *J. Pep. Sci.* **2006**, 12, 396.
2. 櫻井敏彦, "ペプチド会合構造の制御", 生物工学会誌 **2006**, 84, 401.
3. Sakurai, T.; Koga, M.; Takafuji, M.; Ihara, H. *Chemistry Letters* **2003**, 152.
4. 櫻井敏彦, "核酸モデル化合物の発展", 化学と工業 **2011**, 64, 698.
5. Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. *Science* **1991**, 254, 497.
6. Xodo, L. E.; Cogoi, S.; Rapozzi, V. *Current Pharmaceutical Design* **2004**, 10, 805.
7. 櫻井敏彦, 1塩基認識能を増幅する人工核酸コンジュゲート, 特願2011-027898.
8. Sakurai, T.; Iwasaki, T.; Okuno, T.; Kawata, Y.; Kise, N. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 4709.
9. Selkoe, D. J. *Science* **1990**, 248, 492.
10. Behl, C. J.; Davis, B.; Lesley, R.; Schubert, D. *Cell* **1994**, 77, 817.
11. Hilbich, C.; Kisterswoike, B.; Reed, J.; Masters, C. L.; Beyreuther, K. *J. Mol. Biol.* **1992**, 228, 460.
12. Peng, W.; Contrina, M. L.; Han, X.; Yu, H.; Bekar, L.; Blum, L.; Takano, T.; Tian, G.-F.; Goldman, S. A.; Nedergaard, M. *PNAS* **2009**, 106, 12489.





## 研究紹介

## 高性能膜融合レセプターの設計と評価

～人工膜融合系の目指すところ～

日本大学生産工学部応用分子化学科

柏田 歩

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



## はじめに

リン脂質二分子膜からなるリポソームは生体機能を模倣した人工膜として生命化学研究において広く利用されてきている。また、生体膜同様にリポソーム系において会合 (Aggregation)、融合 (Fusion)、分裂 (Fission) 挙動の制御が可能となれば、生体内における新規な物質・情報伝達システム構築が可能となり、これまで以上に医工学分野への貢献が期待できる。特にリポソームのベシクル構造中に薬剤や遺伝物質を担持・内包させ、標的細胞との融合を通じた送達系への利用には未だ大きな可能性を秘めている。しかしながら、リポソームは流動性に富んだ「動的な」超分子ベシクル構造であるにもかかわらず、生理環境中では界面での水和層形成に伴うエネルギー障壁のため、人工的に融合挙動を制御することは難しい。

このような中でリポソーム間における膜融合制御に関する研究はすでに 15 年以上前から行われており、リポソーム界面でのバルビツール酸と 2,4,6-トリアミノピリミジンの分子認識を駆動力とした成功例をきっかけに、動的界面での分子認識が人工的な膜融合系構築につながる有用な手段であることが認知された。<sup>1,2)</sup> 具体的には DNA ハイブリダイゼーションやコイルドコイルペプチドをはじめ、現在まで種々の分子認識対が膜融合制御に利用されている。<sup>3-10)</sup> 著者自身も 2007 年頃からリポソーム間における膜融合制御に関して研究を進めており、現在までの成果について本稿で紹介したい。

## 膜融合系との出会い

著者は名古屋工業大学出身で恩師の南後守先生 (現大阪市立大学特任教授) のもとの、「光合成タンパク質-色素複合体の再構成」という主テーマで 2000 年に学位を取得した。南後研での学生時代にリポソームというものを扱ったことはあったものの、現在の職場である日本大学に赴任して数年は「タンパク質の機能化における研究」優先でリポソームは学会発表や論文誌上で他人事のように見聞きするのみであった。そんな著者に転機が訪れたのは 2006 年頃である。ペプチドの *de novo* 設計で以前からお世話になっていた名古屋工業大学の田中俊樹先生と以前から共同研究者として仲良くお付き合いいただいていた水野稔久先生から「ヘマグルチニンモデルのコイルドコイルペプチドを用いたリポソーム膜融合系構築」に関し、一緒に研究を行う機会を得た。当時は一時限りのスポット的な研究と考えていたが、卒研究生が熱心にテーマとして取り組み、成果として公表できた。<sup>11)</sup> ちなみに著者が所属する日本大学生産工学部は典型的な実業主義の私立大学のため、博士課程学生はほとんどおらず、有能な (モチベーションが高い) 卒研究生や修士課程学生が主戦力となる。修士課程への進学が決まっていた上記の卒研究生は「自分で設計した膜融合系で論文投稿したい」ということで、系の設計に関する多くの議論を経た結果、著者は名古屋工業大学との共同研究とは別に膜融合の仕事をはじめたことを決断した。

糖類縁体をターゲットとする膜融合系の構築

これまで、単なる超分子化学としての興味、センシング、デリバリー担体など種々の見地からリポソーム膜融合系構築が行われてきた。そんな中、著者は最終的に細胞への膜融合を意識できるデリバリー担体としての融合系に着目した。ただし、研究を始めた当初、膜融合現象はもとより、リポソームに関しても勉強中の身であったため試行錯誤の繰り返して系の構築を行った。実際に名古屋工業大学の南後研まで出向き、出羽毅久先生に相談させていただき、ドタバタしていたのは事実だった。標的として細胞を意識したいので最終的には特定の糖タンパク質か糖脂質を認識し、その駆動力で膜融合に至る系が理想であった。しかし、まずは迅速に結果を出したいがゆえに、あまり難しく考えず、手っ取り早い予備実験みたいなノリで臨んだ。そして、研究室の冷凍庫にホスファチジルイノシトール (PI) が転がっていたので、「これを糖類縁体として用いよう！」と思いついた(イノシトール骨格はもちろん糖ではないが水酸基を含む六員環ということで許してもらおうと単純に標的として決定した)。次に糖水酸基を認識するレセプターであるが、これも安易な発想で

多くの研究成果があるフェニルボロン酸誘導体

に決定した。レセプターにはフェニルボロン酸部位とリポソーム導入のための疎水性アンカーが必要であったが、リシンを起点にペプチド合成用樹脂上で容易に合成できた(図 1:レセプター(1))。ちなみに著者はいつもペプチド固相合成を行っているので、難易度高い合成を含まず、固相合成のみで解決できた点は非常にラッキーであった。そして、ついに、合成したレセプターを担持した担体リポソームと PI を含む標的リポソーム間による膜融合の評価に至った。評価はリポソーム間における脂質膜相混合の FRET 観察とリポソーム内水相の混合挙動の FRET 観察、そして動的光散乱によるリポソームサイズ変化測定を基本とした。これら評価の結果、膜融合を示唆する結果を得ることができた。<sup>12)</sup> 図 2 の模式図に示されるような、まさに絵に描いたようにボロン酸とイノシトール骨格上の cis-ジオールとの間の分子認識に基づく膜融合が実現できたわけである。しかしながら、著者ら初めての膜融合系は生理 pH 条件では達成できず、pH 10.5 という尋常でない系でのみでの達成に至り、系としては不満の残る成果となった。もちろん、フェニルボロン酸の pKa が 8.7 程度ということを見ると当たり前の結果であろうが...

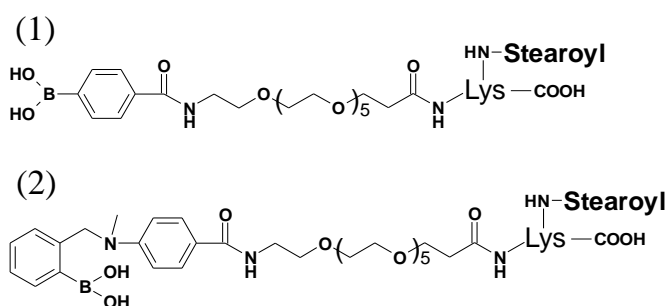


図 1 フェニルボロン酸誘導体レセプター

多くの研究成果があるフェニルボロン酸誘導体

に決定した。レセプターにはフェニルボロン酸部位とリポソーム導入のための疎水性アンカーが必要であったが、リシンを起点にペプチド合成用樹脂上で容易に合成できた(図 1:レセプター(1))。ちなみに著者はいつもペプチド固相合成を行っているので、難易度高い合成を含まず、固相合成のみで解決できた点は非常にラッキーであった。そして、ついに、合成したレセプターを担持した担体リポソームと PI を含む標的リポソーム間による膜融合の評価に至った。評価はリポソーム間における脂質膜相混合の FRET 観察とリポソーム内水相の混合挙動の FRET 観察、そして動的光散乱によるリポソームサイズ変化測定を基本とした。これら評価の結果、膜融合を示唆する結果を得ることができた。<sup>12)</sup> 図 2 の模式図に示されるような、まさに絵に描いたようにボロン酸とイノシトール骨格上の cis-ジオールとの間の分子認識に基づく膜融合が実現できたわけである。しかしながら、著者ら初めての膜融合系は生理 pH 条件では達成できず、pH 10.5 という尋常でない系でのみでの達成に至り、系としては不満の残る成果となった。もちろん、フェニルボロン酸の pKa が 8.7 程度ということを見ると当たり前の結果であろうが...

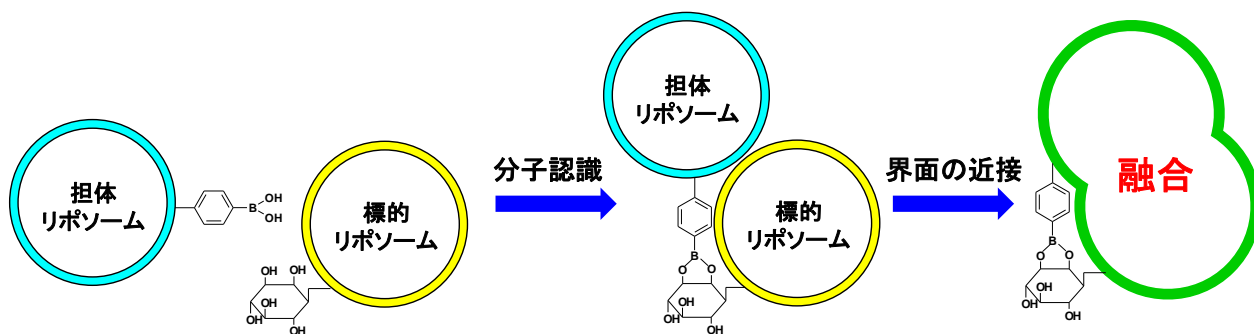


図 2 フェニルボロン酸誘導体とイノシトール骨格間の分子認識を駆動力とした膜融合系の模式図

次の目的は生理 pH 条件で PI を含む標的リポソームを融合に至らせるレセプター的设计である。これはボロン酸に対する N→B 相互作用形成を用い、ボロン酸の pKa を低下させれば容易に解決できると確信していた。実際に容易に解決できるなら、なぜ、はじめから実践できなかったのかを後悔しつつ、新規レセプター的设计と合成を行った(図 1:レセプター(2))。新規に合成したレセプターを担持した担体リポソームは予想通り、pH 7.4 の条件において標的リポソームに対する膜融合活性を示した。さらに pH 5.0 のエンドソーム条件でも良好な膜融合活性を示すことがわかった。<sup>13)</sup>そして、エンドソーム条件まで膜融合系を拡張することができ、本研究で合成したレセプターは今後の研究のベースとなると確信した。

### 膜融合初速度の制御

膜融合の操作 pH の選択は細胞への膜融合を意識する上で重要であるが、膜融合挙動のみならず初速度など膜融合ダイナミクスの制御は基礎研究において重要な検討課題となる。現実に論文投稿の際のレフェリーや学会発表の場でも「融合速度に関する定量的な評価方法」や「融合速度の制御の可能性」について言及されるようになった。天然系における膜融合タンパク質は標的認識部位

の存在のみならず、タンパク質のコンホメーション変化を利用して融合速度を調節する機能を有している。そこで、簡易ながらも膜融合に必要な標的認識部位としてのフェニルボロン酸誘導体とともに、膜透過性ペプチドを共有するレセプター的设计と合成を行った(図 3)。そして、レセプターによる標的認識と膜透過性ペプチドによる標的リポソーム挿入との間の共同効果(イメージ図:図 4)に基づく、膜融合初速度の増大を実現することができた。また、膜透過性ペプチドに pH 応答性を保持させることにより、pH による膜融合初速度の制御も可能となった。<sup>14)</sup>

リポソームの動的界面上での分子認識は膜融合の大きな駆動力となるが、融合におけるダイナミクスの制御が本研究において実現できたことから、今後、より高性能な人工膜融合タンパク質の創出に一層の期待が持てる。

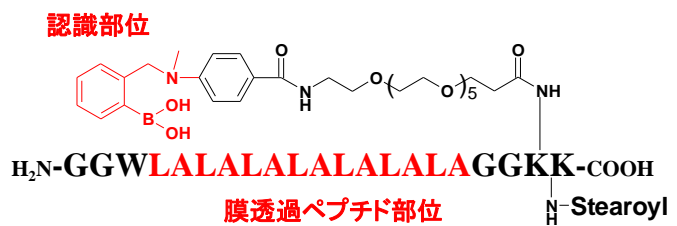
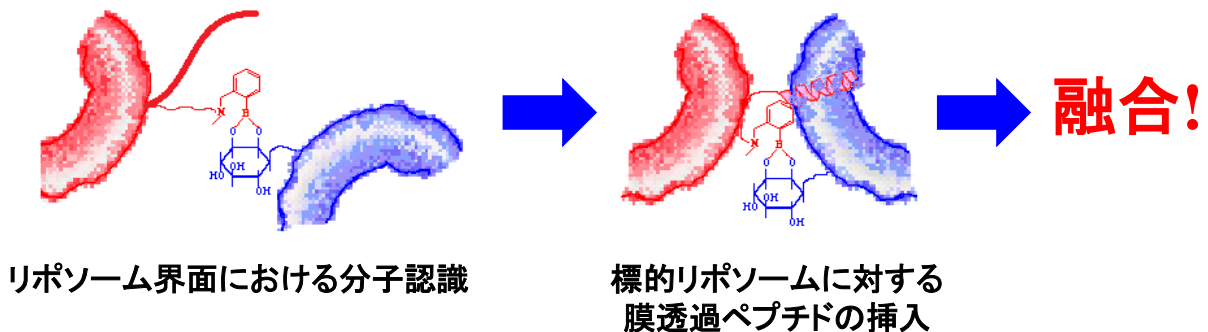


図 3 フェニルボロン酸/膜透過ペプチド共有レセプター



リポソーム界面における分子認識

標的リポソームに対する  
膜透過ペプチドの挿入

図 4 レセプターによる標的認識と膜透過性ペプチドによる標的リポソーム挿入の共同効果イメージ

糖類縁体をターゲットとする膜融合系へのエンドソーム pH 応答性の付与

これまでに合成した膜融合レセプター分子の中には pH 5.0 のエンドソーム条件でも良好な膜融合活性を示すものが存在した。そこで、次の流れとしてエンドソーム環境下に特化した膜融合系の構築を目指した。非常にイメージしにくいのが、以下のような系を考案した。pH 7.4 の生理条件ではレセプターを担持した担体リポソームは標的となる細胞(本研究ではモデルとしてのリポソーム)を認識するものの、融合には至らない。そして、エンドサイトーシス後を意識し、系の pH が 5.0 付近に低下すると融合が起こるといふ系である。このような系の構築は複雑怪奇に見えるが、ペプチドの de novo 設計の経験を踏まえると意外に単純にイメージすることができた。2009 年の前期に著者は日本大学の研究員派遣制度を利用してドイツ・ベルリン自由大学の Prof. Beate Koksch の研究室で環境応答性ペプチド設計を実践していた。その際に弱酸性 pH に応答してランダムから $\alpha$ 2-コイルドコイルに構造変化を起こすペプチドを設計・合成に成功した。そして、このペプチドこそ、pH 応答性膜融合を引き起こすレセプターの幹となることに気付いた。すなわち、このペプチドの末端にボロン酸誘導体を結合させたレセプター(図 5)は pH 7.4 では担体リポソームから遠位で標的を認識するために融合には至らない。しかし、pH 5.0 では $\alpha$ 2-コイルドコイルへの構造変化により標的リポソームが担体側に手繰り寄せられて融合に至ることになる(図 6)。ベルリンでは膜融合活性評価の研究は行っていなかったが、共同研究ということで日本の学生を遠隔操作して予想通りの成果を得ることができた。<sup>15)</sup>

さらに、別なコイルドコイルポリペプチドを用いたエンドソーム pH 応答型膜融合系の構築にも成功し、前がやっと見えてきた気がする。

弱酸性応答性 $\alpha$ 2-コイルドコイル部位



図 5 弱酸性応答性 $\alpha$ 2-コイルドコイル部位を含むフェニルボロン酸誘導体レセプター

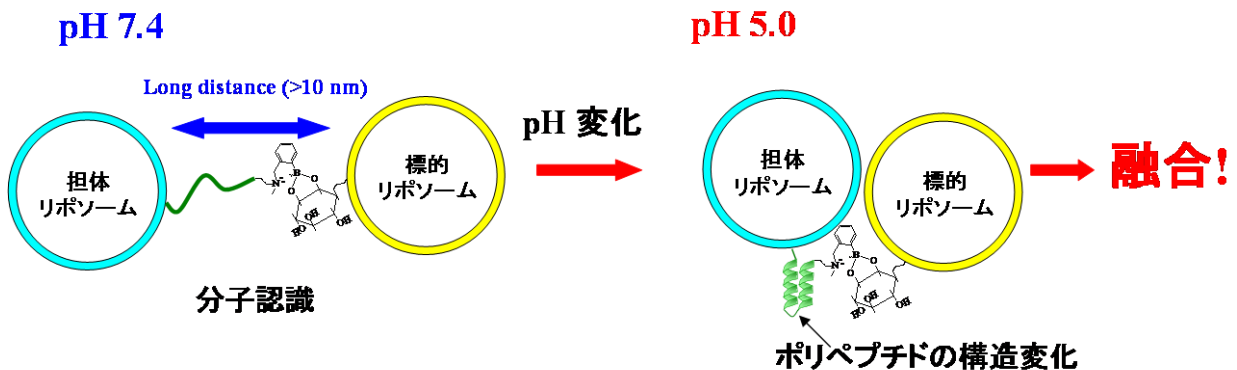


図 6 弱酸性エンドソーム環境応答型膜融合系の模式図

## おわりに～著者が本当に目指す膜融合系とは？

本研究紹介では著者がリポソーム間における膜融合制御に関して研究を進めてきた経緯を述べた。しかし、「最終的に細胞への膜融合を意識できるデリバリー担体としての融合系」には程遠いモデル系に留まっているのが現実である。生命化学研究の世界は非常に速いスピードで細胞にチャレンジしており、著者自身も論文を通じてその目まぐるしい流れは実感している。しかし、言い訳と言われればそれまでだが、実業主義の私立大学での研究遂行には主戦力の学生のペースも見据えながら研究に向かわなければならない。ロンドンオリンピックは閉幕したが(この原稿を記載しているのはオリンピック閉幕翌日)、スピードのアフリカ勢がひしめくマラソン競技に日本選手団が挑む気分である(うまく戦えば勝負にはなる?!)。現時点で著者は特定の細胞表層認識への継続を考え、ある重要な糖配列を選択的に認識できる人工レクチンの合成と膜融合実験を通じた認識能の評価を行っている。共同研究の都合で詳細は明かせないが、「少しずつでも目標に近づけたらいいな」と考えながら研究を進めている。そして、近いうちに学会あるいは論文誌上で公開できるものとする。

最後になりましたが、恩師である南後守先生はじめキツいながらも有益なアドバイスをいただける周囲の先生方には大変感謝しております。感謝の気持ちを忘れず、研究に精進いたします。また、この度、生命化学研究会ニュースレターの研究紹介執筆の機会を与えていただいた鳥取大学の松浦和則先生にも御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Marchi-Artzner, V.; Jullien, L.; Gulik-Krzywicki, T.; Lehn, J. -M. *Chem. Commun.* **1997**, 117-118.
2. Marchi-Artzner, V.; Gulik-Krzywicki, T.; Guedeau-Boudeville, M. -A.; Gosse, C.; Sanderson, J. M.; Dedieu, J. -C.; Lehn, J. -M. *ChemPhysChem* **2001**, 2, 367-376.
3. Stengel, G.; Zahn, R.; Höök, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 9584-9585.
4. Stengel, G.; Simonsson, L.; Campbell, R. A.; Höök, F. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 8264-8274.
5. Chan, Y.-H. M.; van Lengerich, B.; Boxer, S. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, 106, 979-984.
6. Marsden, H. R.; Elbers, N. A.; Bomans, P. H. H.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Kros, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 2330-2333.
7. Meyenberg, K.; Lygina, A. S.; van den Bogaart, G.; Jahn, R.; Diederichsen, U. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 9405-9407.
8. Gong, Y.; Luo, Y.; Bong, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14430-14431.
9. Gong, Y.; Ma, M.; Luo, Y.; Bong, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 6196-6205.
10. Ma, M.; Gong, Y.; Bong, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 16919-16926.
11. Kashiwada, A.; Matsuda, K.; Mizuno, T.; Tanaka, T. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 7343-7350.
12. Kashiwada, A.; Tsuboi, M.; Matsuda, K. *Chem. Commun.* **2009**, 695-697.
13. Kashiwada, A.; Tsuboi, M.; Mizuno, T.; Nagasaki, T.; Matsuda, K. *Soft Matter* **2009**, 5, 4719-4725.
14. Kashiwada, A.; Yamane, I.; Tsuboi, M.; Ando, S.; Matsuda, K. *Langmuir* **2012**, 28, 2299-2305.
15. Kashiwada, A.; Tsuboi, M.; Takamura, N.; Brandenburg, E.; Matsuda, K.; Kokschi, B. *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 6179-6186.
16. Kashiwada, A.; Tsuboi, M.; Matsuda, K. *Langmuir* **2011**, 27, 1403-1408.

## 気になった論文

堂浦 智裕 (どううら ともひろ)

東京大学大学院医学系研究科 生体情報学分野 特任研究員

doura\_t@m.u-tokyo.ac.jp

この度は、生命化学研究レター「気になった論文」への執筆機会を与えていただき、誠に有り難うございます。私は今年の3月に、九州大学工学府物質創造工学専攻の山東研究室にて学位を取得した堂浦智裕と申します。今年の4月から東京大学大学院医学系研究科の浦野研究室に特任研究員として勤めさせていただいております。今後ともどうかよろしくお願い致します。現在、私は浦野泰照教授指導の下、遺伝子発現や酵素活性を検出するための細胞からの漏出が少ない蛍光分子プローブの開発を目指し、研究を進めております。今回は気になった論文として、微生物に関する論文を3報紹介させていただきます。

### A magnetic gram stain for bacterial detection

G. Budin, H. J. Chung, H. Lee, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 7752-7755 (2012).

グラム染色は微生物を検出し、分類するために汎用される手法の一つで、医療上の診断や環境サンプル中の微生物の検出に用いられます。グラム染色にはトリアリールメタン色素の一つであるクリスタルバイオレット(CV)を用いており、微生物は染色によってグラム陽性菌とグラム陰性菌に分類されます。本論文において筆者らはグラム陽性菌を磁気により選択的に検出、分類する方法を開発しました。

グラム染色は汎用性に優れていますが、最終的な検出は光学顕微鏡によって行われてきました。しかしながら、光学顕微鏡による方法では使用者による観測結果のばらつきが起りやすくなります。磁気を用いたラベル化や検出は光学的な方法より感度に優れ、夾雑物を含む試料を精製することなく診断可能という利点を有しています。筆者らは、CV誘導体はグラム陽性菌上に磁気ナノ材料を固定するためのリガンドになると考え、*trans*-cycloocteneを修飾したCV(CV-TCO)を合成しました。CV-TCOはCVと同様に大きな吸収係数を示しました。HPLC-MSの結果より fluorescein-tetrazine(Fluo-Tz)と定量的に反応し、付加環化生成物を与えることが確認されました。CV-TCOを用いてグラム染色を行ったところ、グラム陽性菌のみが595 nmに強い吸収を示しました。また、CVを用いた同様の実験結果ときれいな相関が得られたことから、CV-TCOはCVと同様にグラム陽性菌のみを選択的に染色することが示されました。さらに、CV-TCOによって染色したグラム陽性菌を tetrazine 修飾した磁気蛍光ナノ粒子(MFNP-Tz)とインキュベーションし、 $\mu$ NMRによりサンプルの $T_2$ 緩和時間を測定したところ、グラム染色の程度とグラム陽性菌の緩和能( $T_2$ の逆数)にはきれいな相関が得られました。これより、グラム陽性菌上のCV-TCOはMFNP-Tzと反応していることが確認されました。また、緩和能による検出限界は微生物数4000であるのに対し、

吸収による検出限界は微生物

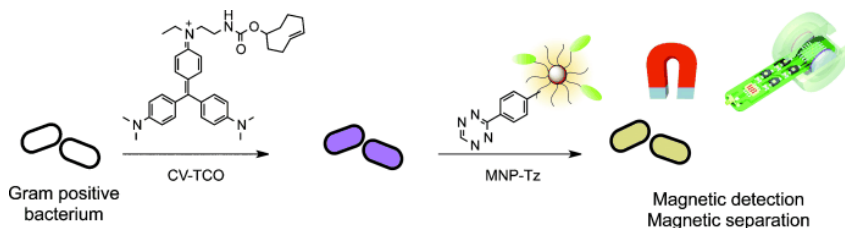


図1 CV-TCOとtetrazine修飾磁気ナノ粒子を用いたグラム陽性菌選択的検出(論文より抜粋)

数  $10^5$  であるため、検出感度において本論文の手法は従来法より優れていることが証明されました。また、共焦点蛍光顕微鏡による蛍光解析や tetrazine 修飾金ナノ粒子を用いた透過型電子顕微鏡解析から、CV-TCO により染色したグラム陽性菌上にも tetrazine 修飾ナノ粒子が固定化していることを確認しています。

以上のように、本論文では古くから使用されていた染色剤をリガンドとして捉え直すことにより、グラム陽性菌選択的な磁気検出を実現しています。筆者らは本研究とは別に、ベッドサイドでのスマートフォンを利用した医療診断用  $\mu$ NMR デバイスも開発しており (*Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 71ra16)、本研究と組み合わせることにより感染症の迅速な診断法が開発されるのではないかと期待されます。

### Metallo- $\beta$ -lactamases withstand low Zn(II) conditions by tuning metal-ligand interactions

J. M González, M.-R. Meini, P. E Tomatis, F. J M. Martín, J. A Cricco, A. J Vila, *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 698-700 (2012)

メタロ $\beta$ -ラクタマーゼ (M $\beta$ Ls)は $\beta$ -ラクタム系抗生物質の効果を無効にしてしまう加水分解酵素類であり、これらをコードした遺伝子が世界中の病原菌に広く浸透しているため、M $\beta$ L 阻害剤や新たな $\beta$ -ラクタム系抗生物質の開発が急務となっています。M $\beta$ Ls の中でも活性中心に Zn(II)をもつ B1 ラクタマーゼに関心が寄せられています。B1 ラクタマーゼは 2 等量の Zn(II)と結合し、M1 部位と M2 部位を生じさせます。これら M1 部位と M2 部位の機能についてはこれまで十分に解明されていませんでした。

M2 部位にはシステイン残基 (Cys221) がありますが、M $\beta$ Ls が存在するペリプラズムのような酸化されやすい好氣的環境において Zn(II)結合部位に存在することは稀です。実際、 $\beta$ -ラクタマーゼ活性をもたない M $\beta$ L スーパーファミリータンパク質の多くはこの位置にアスパルギン酸残基をもっています。筆者らは典型的な B1 ラクタマーゼである BcII の C221D (BcII<sup>C221D</sup>) を作製し、Zn(II)濃度と $\beta$ -ラクタマーゼ活性について検討しました。その結果、過剰量の Zn(II)が存在するときは、B1 ラクタマーゼ IMP-1 の C221D に関する報告と同様に BcII<sup>C221D</sup> は wild-type と同様の酵素活性を示しましたが、Zn(II)が低濃度 (1 等量以下) しか存在しないときには酵素活性を示しませんでした。また、wild-type の BcII と Zn(II)の二つの解離定数は共に低い nM ですが、BcII<sup>C221D</sup> の Zn(II)との二つの解離定数はそれぞれ  $K_{d1} = 9 \pm 1.7$  nM、 $K_{d2} = 267 \pm 71$  nM と算出されました。この結果より、BcII<sup>C221D</sup> では二つ目の Zn(II)との結合力が減少していることが明らかとなりました。これらの結果より、筆者らは BcII<sup>C221D</sup> の Zn(II)単核種は酵素活性をもたず、Zn(II)二核種が酵素活性を示すと考察しました。BcII<sup>C221D</sup> と Zn(II)の単核種、二核種の X 線結晶構造解析を行ったところ、M1 部位はどちらにおいても BcII の結晶構造より歪んだ 4 面体配置をとっていましたが、M2 部位の Asp221 の配置に差異がありました。単核種では、Asp221 は Arg121 のグアニジニウム基と水素結合していましたが、二核種では M2 部位の Zn(II)に二座配位していました。単核種における強い水素結合が Asp221 を捕捉し、M2 部位での Zn(II)への配位を困難にし、段階的な錯形成反応が生じる原因になっていると予想されました。一方、BcII<sup>C221D</sup> の二核種の金属結合部位の構造は酵素活性をもつ wild-type の二核種での構造と類似していました。これらの結果は Asp221 により金属への配位力が低下していることを示す解離定数の結果と一致しており、Zn(II)が低濃度のときに生成する活性をもたない単核種は M1 部位に Zn(II)が配位結合した

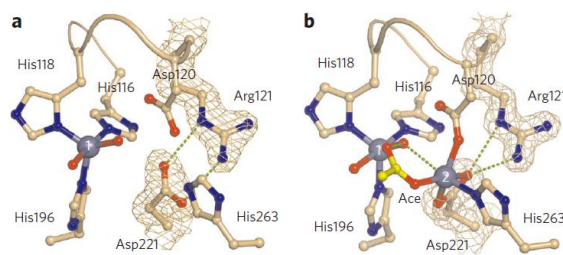


図 2 BcII<sup>C221D</sup> の Zn(II)単核種と二核種の結晶構造 (論文より抜粋)

単核種であることが確認されました。最後に BcII<sup>C221D</sup> の Co(II)二核種と Co(II)単核種による抗生物質イミペネムの加水分解反応を行い、反応直後の吸収スペクトルを測定したところ、Co(II)二核種とイミペネムを含んだ溶液でのみ反応中間体に由来する 390 nm の吸収が観測されました。この結果は、M2 部位での Zn(II)の配位が反応中間体を安定化することを示しています。

細胞から酵素の単核種や二核種を単離することはできませんでしたが、以上の結果は病原菌内での B1 ラクタマーゼが活性な二核種として存在することを示唆しています。MβLs は Zn(II)濃度の低いペリプラズムでフォールディングされていない形で局在しているため、β-ラクタム系抗生物質に曝されたときに生き残るために B1 ラクタマーゼは Zn(II)が不足している環境でもフォールディングできるように進化したと予想されます。本研究は好氣的環境では Zn(II)結合部位として選択されることが少ないにも関わらず、Zn(II)低濃度環境での二核種の生成を確実にするために B1 ラクタマーゼでは Cys221 が自然選択されたことを示しています。さらに、本研究により B1 ラクタマーゼの活性種は M2 部位に Zn(II)をもつことが示唆されたことから、今後 Zn(II)二核種を標的とした阻害剤の設計につながると期待されます。

### The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection

K. S Chaturvedi, C. S Hung, J. R Crowley, A. E. Stapleton, J. P Henderson, *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 731-736 (2012)

シデロフォアは微生物に用いられる化学的に多様な二次代謝産物であり、鉄イオンに結合し、種類によっては生体内で特有の機能を発揮するものも存在します。シデロフォアの中には鉄以外の金属イオンと結合するものも知られていますが、シデロフォアの病態生理学的な機能についての研究は鉄イオンとの結合に焦点を当てたものに限られていました。

イエルシニアバクチン (Ybt) は尿路疾患性大腸菌 (UPEC) が発現するシデロフォアの一つであり、病原性に関係しています。疫学研究より、膀胱での感染から腎臓、血流へと感染を拡大していく大腸菌は、Ybt の産生に関わる *fyuA* 遺伝子を発現していることが示されています。しかしながら、Ybt の発現が感染の拡大を促進する機構については明らかにされていませんでした。

筆者らは金属イオンと Ybt の錯体を同定するために、イオンのフラグメンテーションに基づいた LC-constant neutral loss (LC-CNL) MS によるスクリーニング系を考案して Ybt を加えた尿を解析し、さらに金属イオンの同位体存在比や HRMS 解析を行うことにより、Ybt の Cu(II)錯体が生成していることを明らかにしました。また、Fe(III)が共存していても Ybt の Cu(II)錯体は安定であることも確認しました。UPEC の感染時において Ybt が発現され、Cu(II)と結合しているのかどうかを決定するため、病原菌 UTI89 に実験的に感染させたマウスの尿と膀胱を LC-MS/MS を用いて解析したところ、全てのサンプルから Cu(II)-Ybt 錯体に由来する強いシグナルが観測されました。また、ほぼ全ての尿サンプルにおいて Cu(II)-Ybt 錯体が Fe(III)-Ybt 錯体より多量に存在していました。これらの結果より、UPEC はマウスへの感染時に Ybt を発現し、その多くはマウス内で Cu(II)-Ybt 錯体として存在していることが明らかになりました。膀胱炎と診断された女性患者の尿を用いた解析からも、生体内で Cu(II)-Ybt 錯体が生成していることを確認しました。

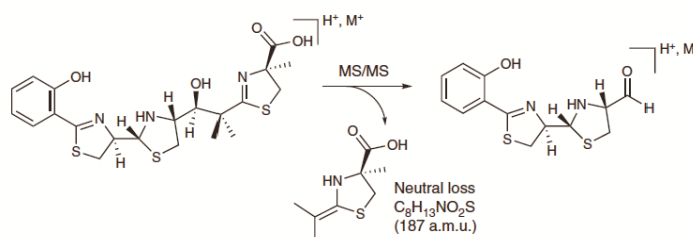


図3 Ybtとその金属錯体は LC-CNL MS において末端のチアゾリンに由来する 187 a.m.u. の特徴的な減少を示す。(論文より抜粋)



銅イオンは低い $\mu\text{M}$ ほどの濃度で存在しているとき、大腸菌やその他の微生物に毒性を示すことが知られています。Ybt は銅イオンを捕捉することにより銅の毒性を抑制しているのではないかと考え、尿由来の大腸菌とそれ以外の大腸菌を  $10 \mu\text{M}$  の銅濃度存在下で培養したところ、尿由来大腸菌の方が銅に対して抵抗性を示す結果になりました。Ybt の産生が銅への抵抗性に与える影響を決定するため、Ybt を産生しない変異体 UTI89 $\Delta\text{ybtS}$  と wild-type の UTI89 の硫酸銅存在下での培養を行ったところ、wild-type の UTI89の方が生育する結果になりました。このとき、wild-type では Cu(II)-Ybt 錯体が生成していましたが、UTI89 $\Delta\text{ybtS}$  では生成していないことを LC-MS より確認しています。これより、Ybt の生合成が銅への抵抗性の機能的役割を担っていることが示されました。さらに、UTI89 $\Delta\text{ybtS}$  に Ybt を加えて  $10 \mu\text{M}$  の硫酸銅存在下で培養したときは生育しましたが、Cu(II)-Ybt 錯体を加えて同様の実験を行ったときは生育しませんでした。以上より、Ybt の銅への結合が直接的に微生物を銅の毒性から保護していることが示されました。

カテコール類は Cu(II)をより毒性の高い Cu(I)に還元することが知られています。銅存在下で、カテコール類の生合成を司る遺伝子 *entB* と *ybtS* を欠損した UTI89 $\Delta\text{entB} \Delta\text{ybtS}$  は UTI89 $\Delta\text{ybtS}$  よりもよく生育しました。また、UTI89 $\Delta\text{entB}$  は wild-type の UTI89 よりもよく生育する結果になりました。UTI89 $\Delta\text{entB}$  の銅に対する抵抗性の増大がカテコール部位をもつシデロフォアによる銅の還元反応の欠如により説明可能か検討するために、wild-type の UTI89 にカテコール部位をもつシデロフォアであるエンテロバクチン (Ent) やそのカテコール部位である 2,3-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) を加えて培養実験を行ったところ、銅のみが存在するときよりも Ent や DHB が共に存在するときの方が生育しないという結果になりました。この結果は Ent と Cu(II)による相乗的な抗菌活性は Ent のカテコール基に由来するものであることを示しています。さらに、Cu(I)指示薬であるバスキュプロインを用いた評価から、Ent のカテコール基が Cu(II)を Cu(I)に還元しており、Ybt は Cu(II)を隔離するだけでなくカテコールを介した Cu(II)の還元反応を妨害することによっても微生物を保護していることが実証されました。

本研究より、これまで鉄結合分子として重複する機能をもつとされてきた Ybt と Ent のようなカテコール化シデロフォアが宿主と病原菌の界面における銅の化学において全く異なる機能をもつことが示されました。また、尿路疾患における病原菌に対する防衛手段の一つとして銅イオンが重要な役割を担っていることが示唆されました。銅の免疫における機能に関しては、感染により銅イオン濃度が増大することや貪食細胞の銅輸送体により貪食した微生物を殺菌することも知られており、本研究で示唆された銅の抗菌性も確からしいと思われます。Cu(II)よりも Cu(I)の方が強い毒性を示す理由に関しては、Cu(I)を介した Fenton 反応によりヒドロキシルラジカル等の活性酸素種が産生されることや、細胞膜透過性をもつために細胞内の鉄硫黄クラスターを不活性化することが予想されます。Ybt の銅イオンへの配位がなぜ促進されるかについては明らかにされていませんが、分子内のチアゾリンやチアゾリジンに含まれる三つの窒素原子が結合に関与しているのではないかと考えられます。本研究で用いた LC-MS/MS は感度に優れているため、生体サンプルから直接的に分子種の解析が可能であり、その優れた感度が本研究の成功の鍵になったと思われます。病原菌は進化の過程で様々な機能をもつ二次代謝産物やタンパク質を生み出しているため、LC-MS/MS を有効な研究手段として活用することにより、今後さらなる興味深い機能をもつ生物機能分子の同定及び機能解析が進展すると予想されます。

最後になりましたが、本稿への執筆の機会をいただきました鳥取大学大学院工学研究科の松浦和則教授に心より感謝申し上げます。

## 気になった論文

森本 淳平(もりもと じゅんぺい)

The Scripps Research Institute, Scripps Florida, Department of Chemistry, Research Associate

jmorimot@scripps.edu

この度は執筆の機会を頂きありがとうございます。私は昨年度に東京大学の菅裕明教授の研究室で学位を取得し、今年度4月より米国スクリプス研究所(フロリダキャンパス)の Thomas Kodadek 教授の研究室で博士研究員として研究を行っております。Kodadek 研究室はペプチドミメティクスの合成を基盤技術として様々な生命現象にアプローチする研究を行っていますが、最近では特に免疫現象に関する研究に力を入れており私もその一端を担う研究を開始しています。

免疫学分野における生命科学の人類への偉大な貢献の一つはワクチンの開発です。その中で、病原体の特定のタンパク質など一部の構成要素だけを用いるサブユニットワクチンは、免疫現象の理解を元に分子レベルでワクチンをデザインする必要があるという面で、生命”化学”分野の研究者の活躍が期待される領域であると言えます。サブユニットワクチンは病原体全体を用いる生ワクチンに比べて製造時間・コストや安全性といった面で優れていますが、一般に生ワクチンに比べて免疫原性が低く、効果の高いワクチンへと発展させるためには未だ様々な課題が残されています。そこで本稿ではまずこのサブユニットワクチンに関する生命化学分野の最近の成果として、効率よく中和抗体の産生を誘導するような抗原のデザインの研究と強い免疫反応を引き起こすための抗原のデリバリー技術の研究の論文を一報ずつ紹介したいと思います。最後の三報目では、生ワクチンとサブユニットワクチン以外のワクチン研究として、病原体全体を不活化して利用する不活化ワクチンの研究を紹介します。この不活化ワクチンの作製においても、単純ではありませんが、免疫現象の理解に基づいた化学的アプローチの重要性が見られます。

### Elicitation of structure-specific antibodies by epitope scaffolds

Gilad Ofek, F. Javier Guenaga, William R. Schief, Jeff Skinner, David Baker, Richard Wyatt, and Peter D. Kwong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 17880–17887 (2010).

HIV-1 に対するモノクローナル抗体 2F5 は、gp41 タンパクの膜近傍の領域 (Membrane-Proximal External Region, MPER) を認識して HIV-1 を中和する (感染を防ぐなどウイルスを無毒化する) ことが知られています。この 2F5 のような抗体の産生を人の体の中で効率的に促すようなワクチンができれば、HIV に対する有効な予防策になるのではないかと考えられます。しかしながら MPER は様々な構造を取るフレキシブルな領域であるため、そのままの形で抗原として用いると 2F5 のように MPER に結合する中和抗体の産生を効率よく促すことができません (図 1A, B)。そこで筆者らは、MPER が 2F5 と結合したときと同じ構造で提示されるような足場のタンパク質を *in silico* で設計し、この足場上に MPER を植え付けた人工的なタンパク質を抗原とすることを考えました。

筆者らはまず 2F5 と結合したときの MPER の主鎖構造と類似した主鎖構造を含むタンパク質を Protein Data Bank から 5 つ探し出しました。そしてその部分の側鎖を MPER のものと置換し、さらにその他の部分にいくつかの変異を導入することで、MPER を目的の形で提示するタンパク質を 5 つ構築しました (ES1–ES5)

(図1C)。実際にこれら5つの抗原提示タンパク質を抗原として豚に免疫したところ、ES5が特に強くMPERに対する免疫反応を誘導することがわかりました。次に、このES5とES1を使って免疫したマウスからいくつかのモノクローナル抗体を獲得し、この中で最も結合の強かったクローン6a7とMPERとの共結晶構造を解いたところ、MPERが2F5と結合した場合とほぼ同じ形で6a7に結合していることがわかりました。このことから、狙い通りの形でMPERと結合する抗体の産生を誘導できたことが示されました。

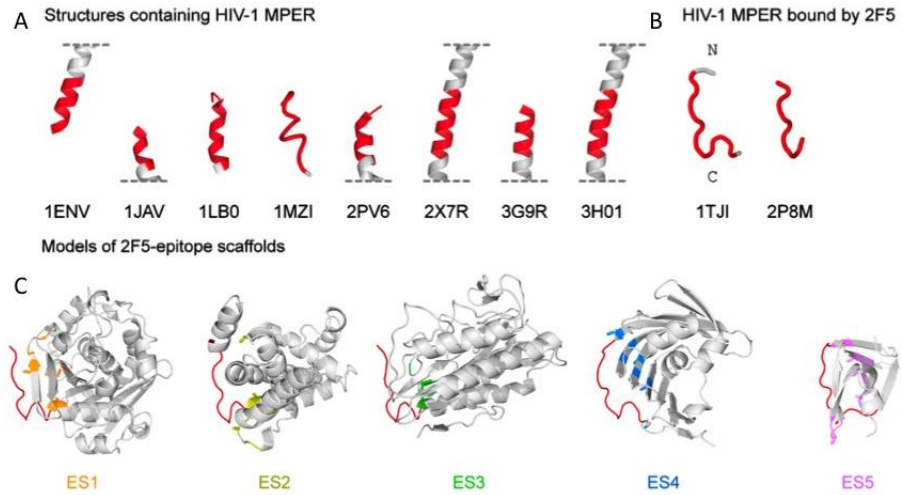


図1. (A) 様々な文献で報告されたMPERの構造(赤色で示された部分)。MPERはフレキシブルで多様な構造を取り得ることがわかる。(B) これまでに報告されている2F5に結合したMPERの構造。2つの独立した報告があるがどちらにおいてもMPERがほぼ同じ形をしていることがわかる。(C) *in silico*で設計された足場タンパク質の構造。赤で示された部分がBのMBPRと同じ形になるように設計されている。(論文より一部改変)

一般に病原体の感染によって体内で産生される抗体は病原体の様々な部位を認識する多様(ポリクローナル)な状態ですが、その中に病原体を中和する作用を示す抗体を多く産生させるようにすることが抗原のデザインの重要な課題です。本研究は、抗原と抗体の分子レベルでの相互作用の理解を元にした *in silico*でのモデリングがこうした抗原のデザインに有効であることを示しています。

### Interbilayer-crosslinked multilamellar vesicles as synthetic vaccines for potent humoral and cellular immune responses

James J. Moon, *et al.*, *Nat. Mater.*, **10**, 243–251, (2011).

HIV やマラリアなど細胞内に感染する微生物に対して身を守るためには、抗体の産生だけでなく細胞障害性 T 細胞などの細胞性免疫をも誘導するような強力なワクチンが必要です。サブユニットワクチンにおいては、抗原をそのまま使用すると細胞性免疫を引き起こせないため、自然免疫を刺激するアジュバントを抗原と一緒に人工膜のベクターに乗せて輸送し、樹上細胞などの抗原提示細胞に取り込ませる必要があります。リポソームはこうしたベクターとして有用ですが、血中で不安定なために免疫細胞への輸送が十分でなく思うような免疫反応を引き起こせないことが問題でした。筆者らは、各層の間がクロスリンクされた多層の脂質性ベシクル

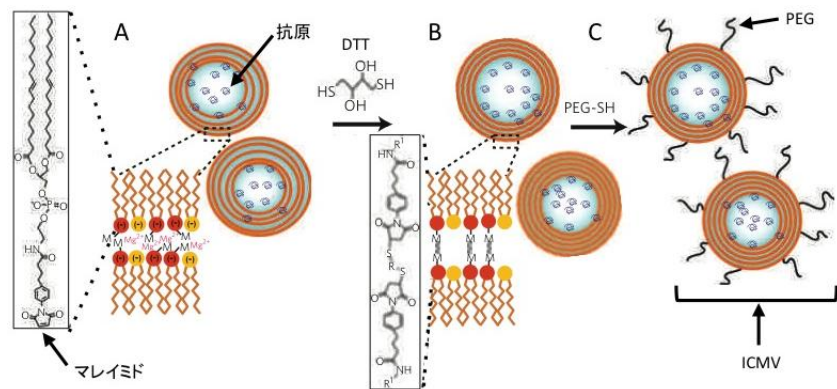


図2. ICMVs の作製法。(A) マレイミド修飾された脂質分子を用いて多重膜を形成する。(B) DTT によって各層の間を共有結合的にクロスリンクする。(C) 外側に残ったマレイミドには PEG を結合させる。(論文より一部改変)

(Interbilayer-crosslinked multilamellar vesicles, ICMVs)をベクターとすることで、血中内を安定に移動して免疫細胞に取り込まれ効率的に抗原提示を促すようなワクチンができるのではないかと考えました。

筆者らはまず、マレイミド化されたリン脂質を用いて多層の脂質ベシクルを形成し(図2A)、続いて DTT をマレイミドと反応させることで各層を共有結合的にクロスリンクしました(図2B)。また最外層に残ったマレイミドには PEG を結合させることでさらに血中安定性を向上させています(図2C)。この ICMVs の性質を *in vitro* で評価したところ、単層のリポソームやクロスリンクされていない多層のベシクル(Multilamellar vesicles, MLVs)と異なり、血清中で非常に安定でありながらリソソームに取り込まれると速やかに分解されて抗原を放出することが示唆されました。この ICMVs の内部に抗原分子として Ovalbumin を包みこみ、さらに樹上細胞などを活性化することが知られている Monophosphoryl lipid A をアジュバントとして膜の中に埋め込んで、実際にマウスに免疫したところ、単層のリポソームや MLV を用いた場合に比べて遥かに強く細胞障害性 T 細胞の誘導と IgG の産生が誘導されることがわかりました。

最近、本論文の筆者らは ICMVs を用いたマラリアワクチンを開発し報告しています(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2012)。このように細胞性免疫を効果的に誘導する手法の発展によって、マラリアなど未だ十分な防御策のない病原体に対する有効なワクチンが開発されることが期待されます。

### Development of a new hydrogen peroxide-based vaccine platform

Ian J Amanna, Hans-Peter Raue, and Mark K Slifka, *Nat. Med.*, **18**, 974–979, (2012).

抗原、アジュバント、ベクターなど様々な構成要素のデザインが必要なサブユニットワクチンに比べると、病原体全体を化学的処理によって不活化して用いる不活化ワクチンは安全で効果の高いワクチンの作製法としてシンプルで効率的であるように思えます。しかしながら現在最もよく利用されているホルムアルデヒドによる不活化法は、時に重要な抗原分子の構造を破壊してしまうために、ワクチンの効果が不十分になってしまったり実際の病原体に感染した際の症状を却って悪化させてしまったりと、大きな問題を抱えています。筆者らは、生体の自然免疫系では病原体が過酸化水素によって不活化されることに着目し、過酸化水素処理による不活化法を考案しました。

筆者らはまず、3%過酸化水素水溶液によって RNA ウイルスと DNA ウイルスの双方を迅速に不活化できることを確認しました。この不活化が起こる理由の一つは、水酸化ラジカルがウイルスの核酸を破壊するためであると述べられています。ホルムアルデヒド処理ではウイルスの完全な不活化に2–3週間もの時間がかかるのに対して、過酸化水素処理では2時間未満でウイルス価が100万倍以下に減少することがわかりました。しかも処理後のウイルスは、元のウイルスで免疫したマウスの血清に対しての結合能を90%程度保っており、本手法が迅速で且つウイルスの構造に対するダメージの少ない不活化法であることが示されました。続いて筆者らは過酸化水素で不活化したウイルスをワクチンとして用いると生ワクチンのように強い免疫作用が誘導されることを *in vivo* で示しています。まず、Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) を不活化してマウスに免疫したところ細胞障害性の T 細胞が誘導され、後の LCMV による感染から守られることがわかりました。また、不活化した Vaccinia virus または West Nile virus をマウスに免疫した実験では、強く中和抗体の産生が見られ、やはりその後のウイルスの感染から守られることがわかりました。

本手法は、ウイルスの増殖を防ぐ一方で免疫作用の重要なエピトープとなる部分には大きなダメージを与えない、安全かつ効果の高い不活化ワクチンの作製法であると言えます。今後、過酸化水素処理によって引き起こされる病原体の分子レベルでの変化の理解が進むとともに、本手法を用いた不活化ワクチンが汎用化されていくことが期待されます。

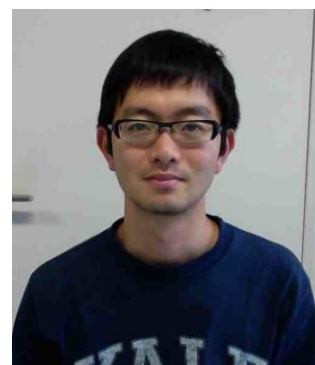
留学  
体験  
記

## ボストン大学留学体験記

東京大学 先端科学技術研究センター

林 剛介

(ghayashi@bioorg.rcast.u-tokyo.ac.jp)



私は、2009年3月に大阪大学の中谷和彦教授の研究室にて博士号を取得し、2011年2月まで東京大学の菅裕明教授の研究室で博士研究員として働いた後、ボストン大学のJames J Collins教授の研究室に留学しました。2012年6月に東京大学の岡本晃充教授の研究室で特任助教に就任するまでの1年4ヶ月という短い留学期間ではありますが、個人的には貴重な体験ができたと思っており、この体験を発信する事で少しでも読者の皆さんの刺激になれば幸いです。また、今回留学体験記執筆の機会を与えて頂いた、菅裕明先生、松浦和則先生、井原敏博先生にこの場を借りてお礼申し上げます。

## 留学先の決定から渡米まで

私はもともと、「どうしても留学したい」派の人間ではありませんでしたが、これまで同じ研究室で過ごしてきた優秀な諸先生・先輩方が皆一様に海外留学しているのを見て育ったため、博士課程の頃には「研究者たるもの一度は海外留学するものだ」という意識が芽生えていたように思います。また、留学先の研究室として、自分がこれまでに未経験の分野の研究を行っているところを選ぼうとも思っていました。これは、自分のバックグラウンドを広げる機会がポストクのうちぐらいしかないだろうと考えていたからです。私はこれまでに、生命化学分野の中でもDNAやRNAを主に扱う「核酸化学」の分野の研究に従事してきました。生命化学分野の知見を得る中で、化学の知識や技術が生物学研究に及ぼす影響の大きさを実感すると共に、生命機能の拡張や生命体の人工的合成を目標に掲げる「Synthetic Biology (合成生物学)」という分野の研究に興味を持つようになりました。Synthetic Biologyに関する論文を読んでいくうちに、留学したい候補研究室が自分の中でいくつか決まり、ポストクアプライのメールを送った中で最初に受け入れの返事もらったのが、ボストン大学のJim Collins教授でした。通常アメリカの研究室でポストクのポジションを得るには、候補先の研究室に赴いて研究室メンバーの前でそれまでの研究内容の発表および質疑応答を行う「interview」と、その後所属するポストク達とのディスカッション等をこなします。その後最終的にポストクとして雇うかどうかを教授が判断しますが、私の場合は幸運な事に、留学開始時点で日本学術振興会の研究員だったため(つまり給料が日本から支払われることが決まっていたため)、初めて海外留学する日本人にとってはかなり労力のいると思われる「interview」なしで受け入れてもらえる事になりました。それでも、給料を払う必要がないとは言え異分野から来た人間(つまり即戦力ではない人間)を雇うことはJimにとってリスクの高い決断だったと思いますが、中谷和彦先生、菅裕明先生、齋藤烈先生にそれぞれ書いて頂いた推薦書がこの決定を強く後押ししてくれたのだと思います。こうして留学先の研究室が決まった私は、エイブルのボストン支店を利用して日本語で難なく住居を決め、ビザの取得を済ませ、インターネット上で¥を\$に

格安手数料で変換するルートを先輩に教えてもらい、ろくに英語の勉強もしないまま(これは到着後すぐに後悔しましたが、)日本を発ったのでした。

## ボストンでの生活

ご存知の通りボストンはアメリカ東海岸のマサチューセッツ州最大の都市であり、アメリカの中では最も歴史ある都市の一つです。ボストンに到着した最初の印象は、町並みが古くヨーロッパの建築物を連想させる感じで、アメリカらしい広大な土地がほとんど見られず狭い！というものでした。実際ボストンは、人口は60万人程度で全米20位ぐらいなのですが、人口密度は4位とかなりcrowdedな街なのです。また、到着したのが2月だったため、いきなりマイナス10度以下の日が続き、家の回りの散歩もままならなかった記憶があります。しかし、ボストンの夏は東京や大阪と比べると湿度が低く快適で、外に出かけたくくなります。夏休みに1ヶ月ほど休暇をとって夏を楽しむ人が多いのもうなずけます。テニスコートはどこでも大抵予約なしかつただで使う事ができ、人がたくさんになれば1時間ぐらいで順番に交代するといった感じでした。また、ボストニアンの(ボストン市民のこと)はスポーツ観戦が好きで、ボストンにはアメリカの4大人気スポーツである、アメリカンフットボール、野球、バスケットボール、アイスホッケーのチームが全てそろっています。松坂大輔の所属するボストンレッドソックスの本拠地であるフェンウェイパークはボストン大学から歩いて数分のところにあるため、試合の日はいつもボストン大学の駐車場がいっぱいになっていました。レッドソックスがヤンキースをライバル視しているように、ボストンのチームはニューヨークのチームをライバル視している感じがします。日本で言うと阪神と巨人の関係に近いのかもしれませんが。ボストンの治安に関しては、場所によっては犯罪が多発する地域も存在しますが、日本人が多く住んでいるような地域を選べば、事件もほとんどなく夜の一人歩きも問題ないレベルです。また、ボストンはハーバード大学やマサチューセッツ工科大学(MIT)を筆頭に、数多くの大学が存在しており、日本人がかなり多く住んでいます。そのため日本人コミュニティがしっかりしているのもボストン留学の特長と言えるのではないのでしょうか。留学して生活をスタートさせる時には、買わなければならないものがたくさん出てくるものですが、ボストン在住の日本人の多くはBIC (Boston Internet Community)というサイトの掲示板で欲しいものを探します。ボストンは人の出入りが激しいので、新しくやってきた人は帰国する人が行う「moving sale」(帰国に伴っていらなくなったものを売る行事)で欲しい物を格安で探す事ができます。私の場合も、車や家電、家具等をmoving saleで手に入れる事ができました。すべて日本語でやりとりするのでとても気楽なのですが、英語のレベルアップという点では無益なので、モチベーションの高い方は、craigslistのような市民全体が参加する英語サイトから欲しいものをゲットするといいかもかもしれません。食事に関しても、ボストンで困る事はほとんどないと思います。レストランでの外食は日本よりも少し割高な印象(毎回チップを払わなければならないため！?)ですが、留学前に想像していたよりもおいしい店が多く、特にクラムチャウダーやロブスターが食べられる海鮮系や、ハンバーガーは文句なくおいしい店がいくつもありました。日系あるいは中華系、韓国系のスーパーマーケットに行けば、日本で食べているものと遜色ないお米が手に入ります。また、現地のスーパーに売られている、牛乳やチーズ、オレンジジュース、ソーセージ等は日本のものよりおいしいと感じました。ハーゲンダッツのアイスクリームは日本よりもフレーバーの種類が多く、かつ値段も半額以下で手に入るので、週3ぐらいで食べていました。安いと言えば、なんと言ってもお酒です。おそらく酒税率が日本よりだいぶ低いのだと思いますが、おいしいワインやビールが安く(缶ビール1個100円以下！)手に入るので、これまた週5ぐらいで楽しんでおりました。このように、ボストンでの生活は特に不自由することなく楽しむ事ができますが、敢えて一つ不自由な点を上げるとすれば、やはり英語、、、これはもっと勉強してから来れば良かったと後悔しました。

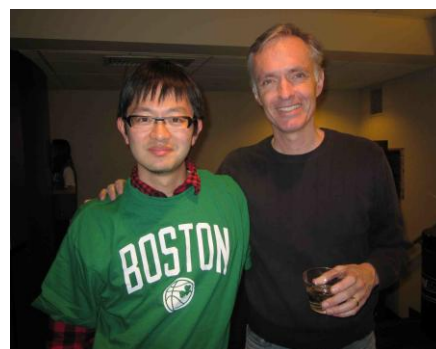
## ボストン大学Collins研究室

私が留学していたJim Collins研究室は、ボストン大学のチャールズリバーキャンパスというボストンの中心部にかなり近い場所にあります。実を言うと、Jimはハーバード大学の教授も兼任しており、ハーバードにも研究室があるのですが、本稿では私が勤務していたボストン大学の研究室について紹介します。ボストン大学(Boston University、通称BU)は、ハーバードやMITの陰に隠れて日本人にはなじみが薄いかと思いますが、実は全米で4番目の規模を誇る超巨大大学です。2010年の世界大学ランキングでは64位とかなりレベルの高い大学でもあります。ボストンにはもう一つボストンカレッジ(Boston College、通称BC)という大学がありますが、これとは全く別物です。



ボストン大学チャールズリバーキャンパスの顔である Marsh Plaza

Collins研では「Synthetic Biology」と「Systems Biology」という2つのキーワードで研究を進めています。「Synthetic Biology」は上述のように、生命機能の拡張や生命の人工的創造を目指す、比較的新しい学問分野ですが、Collins研では特に、遺伝子回路を数理計算によって設計して細胞に新たな機能を付加する、という視点からアプローチする研究が多いです。「Systems Biology」とは、トランスクリプトームやプロテオームなどのOmics解析データからコンピュータープログラムによる解析をすることで、生命現象をシステムとして取り扱うことを目指した分野です。このような研究を行うためには幅広い知識を持った人材が必要で、分子生物学、遺伝子工学、バイオインフォマティクス、微生物学、生物物理学、生化学といった分野の専門家がおり、学際的な研究室になっています。また、Collins研の特長として、ポスドクの割合が高いということが挙げられます。実にラボメンバーの70%ぐらいがポスドクなのです。これはJimが非常にたくさんの研究費を獲得している事を意味しています。中でも特に大きいのがHHMI(Howard Hughes Medical Institute)からの財源で、年間で1億円以上はあると思われま。全米の医学・生物学の研究者達はHHMIの研究費・称号を求めて、Nature、Science、Cellといったトップジャーナルへの掲載を目指し、コンスタントにハイクオリティの研究成果を出し続ける研究者にだけHHMIのInvestigatorの研究費・称号が与えられます。実際にCollins研では、毎年トップジャーナルに研究成果を発表し続けています。研究テーマの設定は、各個人が考えてJimに提案し、JimからGoサインが出たら研究をスタートさせることができます。うまくいけばNature等に載る可能性がある研究提案でないとJimの承諾をもらえないため、私の場合研究室に入ってから研究をスタートするまでに2ヶ月以上かかりました。この間たくさんの論文を読んでいろんなアイデアを考えることに集中していました。私の場合は、多剤耐性菌に効力を発揮するペプチド抗生物質の新しい取得法の確立、というテーマをJimに提案した時に、Jimが気に入ってくれて実験をスタートすることができました。結局私はこのテーマを推進させている途中で帰国する事になりましたが、周りを見ていると論文にするまでに少なくとも2年以上はかかっている人がほとんどでした。研究分野が変わると、あるいは、大きなテーマを設定すると研究をまとめるまでに時間がかかる、ということを感じた1年間でした。20人程度のポスドクが働いて、年1、2報のトップジャーナルを出す、ということを考えれば、1テーマにどのぐらい時間がかかって、どのぐらいの確率で研究提案が成功するのか、ということがわかると思います。こういう研究室運営の仕方もあるのだと、感心したものでした。また、月に



Jim Collins 教授

2、3回の頻度でCollins研にポスドク希望の人が、「interview」のために研究室にやってきて研究発表をします。この中で7、8人に1人ぐらいの割合で最終的にCollins研のポスドクになります。Jimの特徴を挙げますと、早口過ぎて英語を聞き取るのにとっても苦労した、というのがあります(nativeの人ですら聞き取れない時があるらしい)。しかし、人柄はユーモアがあって本当にいい人でした。私がボストンに来た直後の震災の時も、最初に「日本の家族は大丈夫か？」というメールをくれたのはJimでした。また、学会発表の時もJimの発表では要所要所で爆笑が起きていて(僕はそのネタについていけない時が多かったですが)楽しい雰囲気でした。また、人脈が幅広く、レッドソックスの始球式で登板したり、ハリウッドの俳優さんがラボに遊びに来たり、研究室の恒例行事であるNBA観戦の時にNBAの優勝トロフィーにさわらせてくれたりと、教授でありながらちょっとした有名人、といった感じでした。研究室では「How is your result?(Jimの口癖)」と言いながら週1ぐらいで研究室をぶらぶらしながら軽くメンバーにプレッシャーをかけていましたが、基本的に勤勉さを強要することはなく、皆がある程度自分のペースで日々の生活を楽しみつつ研究できるような雰囲気を作っていたという印象でした。

### 最後に ～留学のススメ～

冒頭にも述べましたが、私はもともと海外留学を熱望していたわけではありませんでした。それは、自分が目指すべきおもしろい研究・価値ある研究というものは、留学したからと言ってできるようになるものだとは思っていませんでした。しかし、今では留学した事がかけがえのない財産になっていると感じています。国や研究分野、研究室によってそれぞれ異なる研究スタイルや研究室運営の方法、時間の流れ方があり、それらを学ぶ事は、日本の研究室のやり方(例えば、とにかく手を動かして勤勉に働いていればそれでいい、的な考え方)が必ずしも正しいわけではないことを実感する事にもつながります。こういった事を実感するには実際に留学するしかないと思うので、少しでも留学に興味がある若い研究者の皆さんには留学する事を強く勧めたいと思います。

最後になりましたが、留学に当たって快く送り出して頂いた菅裕明教授、学生の頃から留学を強く勧めて頂いた中谷和彦教授、齋藤烈教授には心より御礼申し上げます。また、この留学を援助して頂いた日本学術振興会にも深く感謝致します。最後に研究室に快く受け入れて下さった、Jim Collins教授と、研究室生活をサポートしてくれたCollins研のメンバーにこの場を借りて深く感謝いたします。

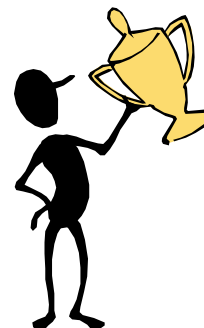


Collins 研究室のメンバー(NBA 観戦で言ったセルティックスの本拠地 TD ガーデンにて。真ん中が NBA 優勝チームに送られるトロフィー)



# お知らせ

## 受賞



**金原 数** (東北大学多元物質科学研究所 教授)

平成 24 年度 高分子学会 Wiley 賞

「生体分子システムを基盤とする刺激応答性機能物質の開発」  
(2012 年 9 月 20 日、第 61 回 高分子討論会にて受賞)

**佐藤 しのぶ** (九州工業大学大学院工学研究系応用化学部門 助教)

平成 24 年度 日本分析化学会 奨励賞

「超分子相互作用を利用した電気化学的遺伝子検出法の構築」  
(2012 年 9 月 19 日、日本分析化学会第 61 年会にて受賞)

**北村 裕介** (熊本大学大学院自然科学研究科産業創造工学専攻 助教)

平成 24 年度 日本分析化学会 奨励賞

「金属錯体の特異的な形成および相互作用を利用した新規核酸プローブの開発」  
(2012 年 9 月 19 日、日本分析化学会第 61 年会にて受賞)



## 編集後記



10月に入って朝晩は肌寒くなり、すっかり秋めいてまいりましたが、昨日は、山中先生のノーベル医学・生理学賞のニュースでもちきりでした。化学者の私から見ても、このニュースは大変うれしく感じるとともに、研究の長期的ビジョンと信念をもって研究に精進することの大切さを再認識させていただいたと思っています。

さて、今回は、私にとって初めての生命化学研究レター編集担当となりました。執筆者の皆様方には、ご多忙のところ気合の入った読み応えのある原稿を、〆切までにお送りいただき、大変感謝しております。秋の学会シーズンということもあり、私の手が回らなかったため、原稿〆切から発行までは結構時間がかかってしまいました。編集作業は結構大変であることを実感した今日この頃です。

次号の生命化学研究レター(No.41)は、大神田さんの担当により、2013年2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に、みなさんからのご要望・ご意見をお待ちしております。下記の編集担当まで、ご連絡をいただければ幸いです。

平成 24 年 10 月 9 日

松浦和則  
鳥取大学大学院工学研究科  
ma2ra-k@chem.tottori-u.ac.jp

編集担当  
井原敏博(熊本大学)  
大神田淳子(大阪大学)