

生命化学研究レター

(2016年2月)

2. 巻頭言

新たな学問の開拓

東京大学大学院理学系研究科 小澤 岳昌

3. 生命化学研究レター発刊 50 号に寄せて

大阪府立大学大学院理学系研究科 藤井 郁雄

4. 主催研究会報告

第 18 回生命化学研究会、第 3 回 複合系の光機能化学国際会議

11. 研究紹介

11. 植物ホルモンのシグナル制御剤 ～PPI 誘導剤を PPI 阻害剤に～

静岡大学農学部応用生物化学科 轟 泰司

17. 肺におけるウイルス・宿主相互作用の体系的解析 ～染色体構造変化から免疫応答、マウス呼吸機能、創薬標的化合物探索まで～

秋田大学大学院医学系研究科 今井 由美子

21. 論文紹介「気になった論文」

東北大学大学院薬学研究科 高山 亜紀

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 菱島 維文

京都府立医科大学医学研究科 伊藤 幸裕

30. 海外のラボ便り

ミシガン大学より

Department of Biomedical Engineering, Macromolecular Science and Engineering,
University of Michigan 高山 秀一

34. シンポジウム等会告

日本化学会第 96 春季年会特別企画・第 14 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム・HGCS Japan Award 公募のお知らせ・第 63 回トキシシンポジウム～山形・天童カンファレンス～

編集後記

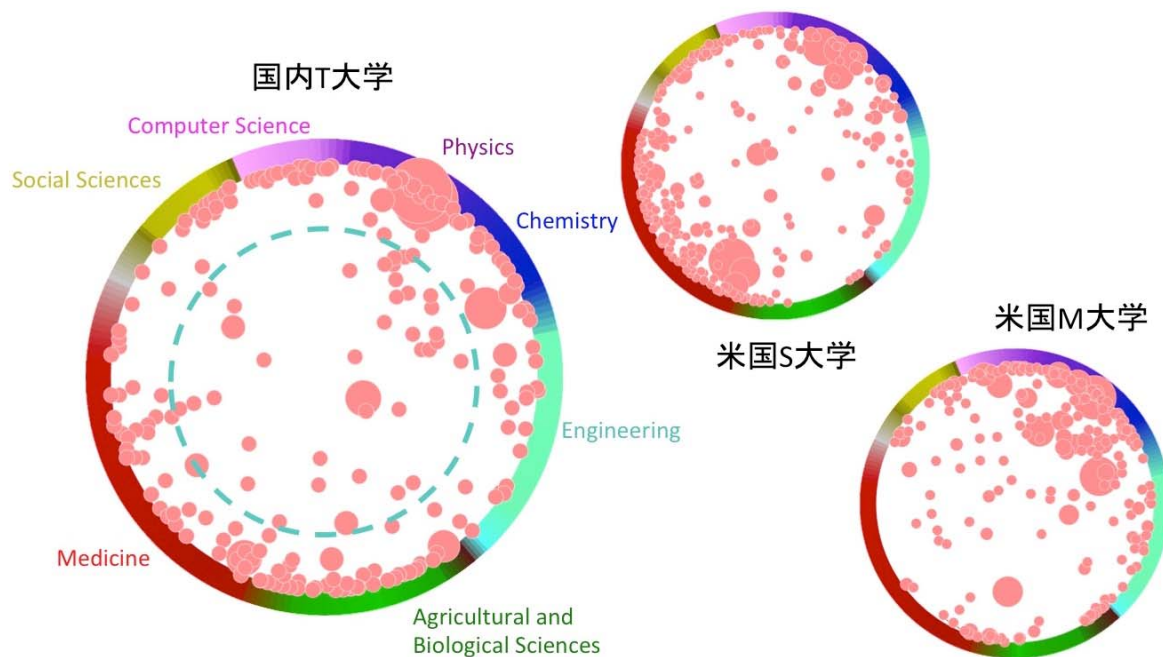
巻頭言

新たな学問の開拓

東京大学大学院理学系研究科 小澤 岳昌

生物を対象とした分析化学を始めて25年が経過しようとしている。この間、分析化学分野の様々な変遷を目の当たりにしてきた。研究当初はクロマトグラフィーや質量分析器、また電気化学分析が一大勢力として盛んに研究されていた。そのような中で、あまり日の当たらないバイオセンサーの開発をテーマに取り組んでいた。代表的なバイオセンサーの一つはグルコースオキシダーゼを用いたグルコースセンサーであり、しばしば教科書にも取り上げられている。分析化学に限らず、伝統に根ざした旧き良き研究成果は、書物の中で永続的に語り継がれる。一方、最先端の研究に目を向けると、既存分野の大きな展開のみならず、異分野融合や新興学問が勃興し、フォローすべき研究領域の線引きも極めて難しいのが現状であろう。分析化学は横断的な学問であるが故、この傾向はなおさらである。

このような異分野融合や新興学問の統計データは、SciVal (Scopusをソースとした研究パフォーマンス分析ツール) を用いると、大学別に視覚化することができる (図)。外側の大きいサークルは27分類の研究分野を色分けして示している。大学の研究活動全体における強みのある研究領域は、サークルとしてマッピングされている。国内のT大学の強みは物理学や化学であるが、外側のサークル周辺に円が散在している。これは伝統に根ざした学問領域を広くカバーしていることを示している。一方米国のS大学やM大学を例にみると、サークルの内側に大きな円すなわち融合学問領域がある。これは異分野連携が非常に進んでいることを示している。この差はT大学とS・M大学に限



桃色のサークルの大きさは論文数を表す。外側の円から中心に向かうほど、研究の異分野連携が進んでいることを示す。水色の破線領域内は学際性が高いことを示す。(SciVal2014のデータを元に作製)

らず、アメリカと日本の大学全般に言えることであり、国内の異分野連携が米国に較べて遅れていることを顕著に示す一例である。

地に足をつけた教育を行う上で、旧態依然とした伝統学問を継承する重要性がある一方、異分野融合や新しい学問の構築を目指す研究の勃興も今の日本には必要であろう。大学教員数が年々減らされる中で、どのようにこの矛盾を解消するかは悩ましい課題である。一方で、本研究会は化学を足場として生物を対象に、異なる分野の研究者が独自の技術を開発して研究を推進しており、未来を明るく感じとっている。SciValデータが示すように、円の中心に向かえばまだまだ未開の領域が沢山存在する。どのような目的と学術的価値観を持って開拓を進めるか、実現に向けた鍵を握るのは若手研究者ではなかろうか。若者が夢をもって果敢に挑戦できる研究環境づくりこそが、今最も必要とされている。



生命化学研究レター発刊50号に寄せて

フロンティア生命化学研究会会長
大阪府立大学大学院理学系研究科
藤井 郁雄

今回の生命化学研究レターは、記念すべき発刊50号になります。まずは、これまでニュースレターの刊行にご尽力頂いた編集委員の皆様、心よりお礼を述べたい。お忙しい中、ニュースレターの編集に貴重な時間を割いて頂き、毎号、最先端の研究情報を届けて頂いたことに敬意を表します。

生命化学研究会は、1996年、熊本の地でその産声を上げました。日本でもGordon会議のような活発で充実した討論のできる研究会を持ちたいということで始まりました。このことが、生命化学研究会が大都市ではなく、比較的風光明媚な地方で開催される理由です。その後、箱根（1997年）、徳島（1998年）の会議を経て、1998年3月日本化学会の研究会として再スタートしました。第1回生命化学研究会シンポジウムは、1999年1月（岡崎）で、塩谷先生のお世話で開催され、そして、この年の6月に、記念すべき生命化学研究レター1号が発刊されました。第1号の「巻頭言」には、本研究会の初代会長である杉本先生が寄稿され、「研究紹介」、「気になった論文」、「お知らせコーナー」へと話題がつづきます。特に、「気になった論文」は興味深く、毎回楽しみに拝読させて頂いています。他の学会誌にも、同じような記事が掲載されていますが、紹介されている論文が2-3年前のものだったりしています。生命化学研究レターでは、会員の皆さんが独自の視点で最新の論文を選び、最先端の研究内容を解説して頂いています。つまらない研究のダメだしもOKで、研究テーマよりもその調理法が楽しいのです。

ある研究分野の学会誌というものは、その分野の進む道について、読者より少し前を歩きその道を示してくれるものであると、私は考えています。生命化学研究レターは、確かにその役割を十分に果たしてきています。どうかこれからの100号、200号までも、そのような生命化学研究レターであってください。会員みんなで応援しています。



主催研究会報告

第 18 回 生命化学研究会～窮理学 Natural Philosophy を目指して～

2016 年 1 月 8 日～9 日に第 18 回生命化学研究会～窮理学 Natural Philosophy を目指して～を、長崎県南島原市の石川屋旅館（ザ・マーキーズ）で開催しました。全国各地から 32 名の方々に参加していただき、結婚式場も兼ねているお洒落な雰囲気の会場で、生命化学の最先端についての熱い議論が交わされました。まず、幹事の佐藤さんから「窮理学」や長崎の歴史について説明があった後、2 名の講師（片山佳樹さん（九大院工）、長谷川健さん（京大化研））による講演と、参加者（ほぼ）全員によるポスター発表がありました。二日目には 4 名の講師（樺山一哉さん（阪大院理）、櫻井和朗さん（北九大国際環境工）、王子田彰夫さん（九大院薬）、中島敏博さん（化血研））による講演があり、昼食後、解散となりました。

主催：日本化学会フロンティア生命化学研究会

会期：2016 年 1 月 8 日（金）～ 9 日（土）

会場：石川屋旅館（ザ・マーキーズ）

幹事：佐藤 智典（慶應義塾大学理工学部）

プログラム

1 月 8 日（金）

12:00 受付開始・ポスター貼付

14:00 開会の挨拶

14:10 - 14:40 「生体シグナル工学の創製に向けて(化学による生命機能制御)」

片山 佳樹（九州大学大学院工学研究院）

14:40 - 15:10 「パーフルオロアルキル化合物のバルク物性を一次構造から理解する」

長谷川 健（京都大学化学研究所）

15:20 - 16:30 ポスター発表

16:30 運営委員会

19:00 懇親会

1 月 9 日（土）

9:00 - 9:10 写真撮影

9:10 - 9:30 総会

9:30 - 10:00 「顕微鏡と質量分析を用いた糖脂質の機能および構造解析」

樺山 一哉（大阪大学大学院理学研究科）

10:00 - 10:30 「多糖核酸複合体の発見とその薬物輸送システムへの応用」

櫻井 和朗（北九州市立大学国際環境工学部）

10:30 - 11:00 休憩

11:00 - 11:30 「コバレントドラッグ創薬の試み」

王子田 彰夫 (九州大学大学院薬学研究院)

11:30 - 12:00 「実用的な凝固因子成分の組換え発現システム構築の取り組み」

中島 敏博 (化学及血清療法研究所)

13:00 ポスター撤去

解散

ポスター発表

P-1) 光増感錯体と光化学的 CO₂ 還元触媒をペプチドで架橋する

○石田 斉、板橋 淳、神谷将也、小島千明、倉持悠輔 (北里大院理)

P-2) 核酸結合蛋白質に対する架橋反応の開発

○永次 史、石山翔梧、小平健太、山田 研 (東北大学 多元物質科学研究所)

P-3) 翻訳系と修飾酵素と有機化学反応の融合で多彩な主鎖修飾ペプチドを作る

○後藤佑樹、加藤保治、菅裕明 (東大院理)

P-4) 蛍光相関分光法で人工ウイルス殻へのナノ粒子の内包を解析する

藤田聖矢、○松浦和則 (鳥取大院工)

P-5) 蛍光プローブを使って脱アセチル化酵素反応を可視化する

○蓑島維文、立松結花、菊地和也 (阪大院工、阪大 IFRcC)

P-6) アニオン性脂質含有バブルリポソームは、核酸デリバリーツールとして機能する

○根岸洋一¹、櫻井あかね¹、指田紗菜恵¹、山垣内 貴文¹、高橋葉子¹、新槇幸彦¹、鈴木亮²丸山一雄²、片桐文彦³、野水基義³ (東京薬科大学薬学部薬物送達学教室¹、帝京大学薬学部薬物送達学研究室²、東京薬科大学薬学部病態生化学教室³)

P-7) 種々の細胞表層のイノシトールリン脂質が免疫機構を調節する

相羽俊彦^{1,2}、末原紗英¹、中川翔²、Bernin Hannah³、Lotter Hanna³、井貫晋輔¹、深瀬浩一²、○藤本ゆかり¹ (¹慶応義塾大学理工学部、²大阪大学大学院理学研究科、³Bernhart-Nocht-Institute for Tropical Medicine)

P-8) 星型 dendrimer で内包分子の放出を制御する

伊藤彰浩、小松洋輔、○青井啓悟 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

P-9) 触媒的発光性錯体形成を利用したバイオ分析

宮端孝明、野崎晃広、佐々木昇司、立花暉子、北村裕介、○井原敏博 (熊本大学大学院自然科学研究科)

P-10) N-アセチルグルコサミンを有する糖鎖高分子は、細胞表面上に出現した細胞骨格分子ビメンチンと相互作用する

○伊勢裕彦¹、山崎貞徳²、三浦佳子³ (¹九州大学先導物質化学研究所、²工学研究院物質創造工学専攻、³化学工学部門)

P-11) 「急がば回れ法」によって抗体酵素の活性を向上させる

○円谷 健、吉村美穂、宮本尚樹、武田祐輔、藤井郁雄 (大阪府大院理)

P-12) キメラ人工核酸は DNA より効率的に標的 RNA を切断する!

上松亮平、菅井祥加、浅井光夫、稲垣雅仁、有吉純平、坂本清志、荒木保幸、山吉麻子、高

井まどか、石橋 哲、横田隆徳、○和田健彦（東北大多元研、阪府大 21 世紀、東大院工、東京医科歯科大医）

P-13) 細胞でのムチン型糖鎖の生合成において Ser/Thr の選択性はあるのか？

○佐倉隆馬、高橋良尚、佐藤智典（慶應大理工）

P-14) 糖脂質がアミロイドβの特徴的な凝集構造を誘起する理由は何か？

○安盛花季¹、西原昌哉¹、松原輝彦¹、下赤卓史²、長谷川 健²、佐藤智典¹（¹慶應大理工、²京大化研）



幹事 佐藤 智典 氏（慶應理工）挨拶



会長 藤井 郁雄 氏（阪府大院理）挨拶



片山 佳樹 氏（九大工）



長谷川 健 氏（京大化研）



樺山 一哉 氏（阪大院理）



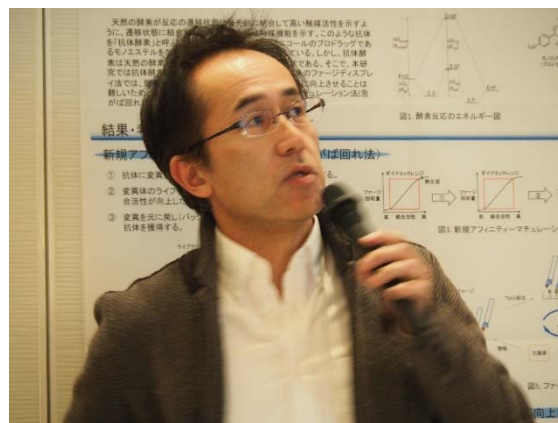
櫻井 和朗 氏（北九市大）

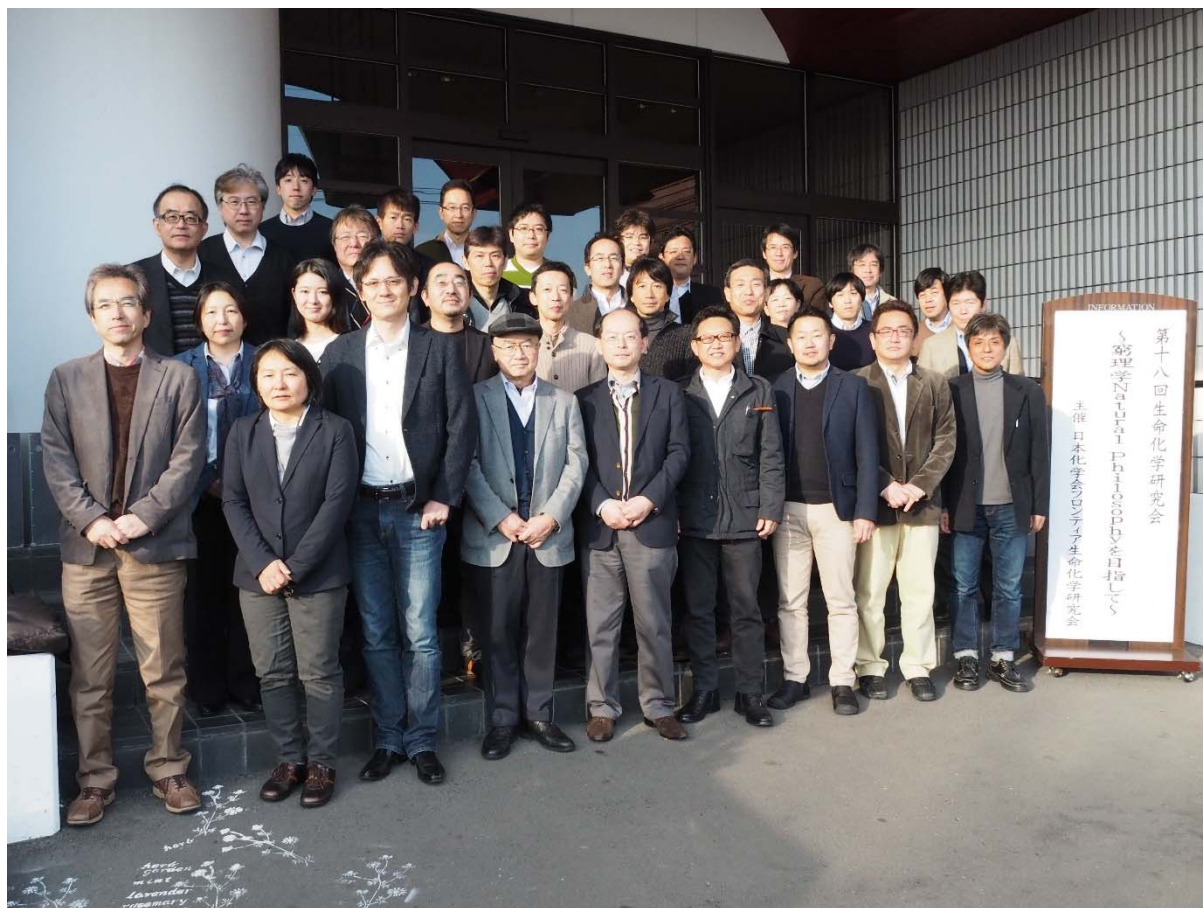


王子田 彰夫 氏 (九大院薬)



中島 敏博 氏 (化血研)





平成 28 年 1 月 8 日 出席者一同

写真撮影： 円谷 健

Third International Symposium on the Photofunctional Chemistry of Complex Systems (ISPPCS2015) (第3回 複合系の光機能化学国際会議)

主催：複合系の光機能研究会

共催：日本化学会フロンティア生命化学研究会・文部科学省研究費補助金新学術領域「人工光合成による太陽エネルギーの物質変換：実用化に向けての異分野融合」

会期：2015年12月12日(土)～14日(月)

会場：Makena Beach Resort, Maui, Hawaii, U.S.A.

オーガナイザー：Hitoshi Ishida (Kitasato University, Japan); Kazuyuki Ishii (The University of Tokyo, Japan); Peter C. Ford (Univ. of California, Santa Barbara, USA); Garry S. Hanan (Univ. Montreal, Canada); Zhong-Ning Chen (Fujian Institute of Research on the Structure of Matter, China)

本国際シンポジウムは、環太平洋国際化学会議 (PACIFICHEM) に合わせて5年ごとに開催され、今回で3回目となります。PACIFICHEMには多くの研究者が集まり、意見交換や情報収集がやりやすい反面、参加者が多過ぎるために深い議論ができないという指摘があることから、PACIFICHEMに参加する光化学分野の研究者を中心に、比較的少人数で集まって議論を深めようという趣旨で始まりました。本シンポジウムは、金属錯体ならびに超分子系の光化学について基礎研究から応用研究まで幅広く議論するものですが、今回は発光材料・センサーなどのマテリアル研究、光治療・バイオイメージングなどの生体関連分野への応用に加え、近年の人工光合成研究の進展に伴い、光触媒反応の研究も多く発表されました。

基調講演には井上晴夫先生(首都大東京)に、“How Can We Get Through the Bottle Neck in Artificial Photosynthesis?: An Alternative Route of Water Oxidation”と題してご講演いただき、人工光合成研究のこれまでの成果と今後の課題を指摘いただきました。この後、29件の招待講演、3件の口頭発表(selected)、9件のポスター発表が行われました。いずれも最新の成果を熱くご講演いただきましたが、生体関連分野ではCO₂光放出について講演された Alexander Schiller 氏 (Friedrich Schiller



Univ., Germany)、発光性イリジウム錯体を用いた酸素センサーの開発とその細胞内導入挙動をご報告された Toshitada Yoshihara 氏 (Gunma University, Japan)、二重発光現象を利用した金属イオンセンサーの開発と生物分析への応用についてご講演された Akio Ojida 氏 (Kyushu University, Japan)らのご講演に注目が集まっていました。また、ポスター発表に先立ち、ポスター発表者による2分間のプレビューを行いました。参加者からは非常に分かりやすかったと好評でした。

過去2回のシンポジウムは、コナ（ハワイ島）で開催されましたが、ホテルの都合で今回は初めてマウイ島で行いました。プログラムがタイトだったため、参加された皆さんには十分にマウイ島を楽しんでいただく時間はなかったのですが、その分、サイエンスを堪能いただけたものと思っています。日本化学会フロンティア生命化学研究会には、共催団体としてご協力いただくとともに、多数の会員の皆さんにご参加いただきましたことを、この場をお借りしてお礼申し上げます。

(世話人代表 北里大学 石田 齊)



研究紹介

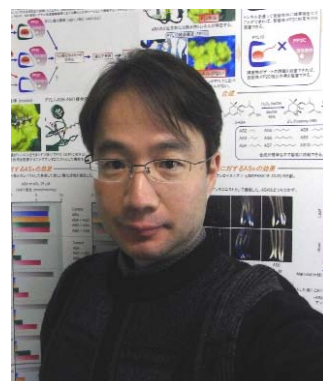
植物ホルモンのシグナル制御剤

～PPI 誘導剤を PPI 阻害剤に～

静岡大学農学部応用生物化学科

轟 泰司

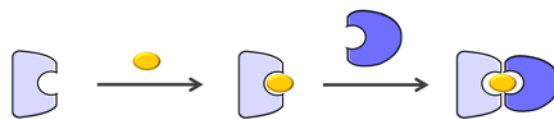
(todoroki.yasushi@shizuoka.ac.jp)



1. はじめに

植物の成長と環境応答を司る植物ホルモンが、植物細胞にどのように認識され、そのシグナルを伝えているのかについては長らく不明であったが、モデル植物であるシロイヌナズナの全ゲノムが解読された2000年を境にして、植物ホルモンの受容機構に関する研究が一気に進展した。そして大変興味深いことに、多くの植物ホルモンが直接または間接的にタンパク質間相互作用 (PPI) の誘導剤として機能していることが明らかになった(図 1)¹。種子の休眠を誘導・維持するとともに、低温や乾燥など種々の環境ストレスから植物を守るアブシジン酸 (ABA) も、PPI を誘導することでそのシグナルを伝える²。ABA は植物の生命維持に必須であるが、高温時の種子発芽阻害、乾燥・低温による花粉の形成阻害、高温・強光下時の気孔閉鎖による光合成阻害、病傷害抵抗性の低下などを誘導するため、農作物の生産という観点から見ると、その作用は必ずしも有用とはいえない。遺伝子組換え技術により、ABA の生合成を抑制したり ABA 応答の効率を下げることは可能だが、こうした植物はストレスに弱く、わずかな環境変化にも対応できずに生育不良を起こしてしまう。化合物を用いて必要な時に必要な強度で ABA の機能を下げることができれば、ABA の良い作用を維持しつつ負の側面だけを低減できる。そこで著者らは、PPI 誘導剤としての ABA の機能を利用して、ABA を構造修飾することで、逆に PPI を阻害する化合物 (ABA 受容体アンタゴニスト) を創出する研究を行っている。本研究紹介では、ABA とその受容体の複合体に存在する小さなトンネルに着目した ABA 受容体アンタゴニストの創出研究について、特にその設計の理屈に焦点を当てて述べたい。

● 分子接着剤 オーキシシン, ジャスモン酸, ブラシノステロイド



● アロステリック制御剤 ABA, ジベレリン

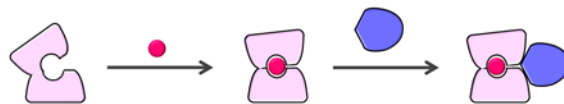


図1. タンパク-タンパク相互作用 (PPI) のモジュレーターとして機能する植物ホルモン

2. ABA の PPI 誘導メカニズムを利用した ABA 受容体アンタゴニストの設計

ABA 受容体の研究は 1970 年代から行われているが、現在のところ ABA 受容体としてコンセンサスが得られているのは、2009 年にシロイヌナズナから見出された START タンパク質の一種である PYR/PYL/RCAR (PYL) だけである^{3,4}。PYL は ABA と結合するとその配座が変化し、clade A のタンパク質

脱リン酸化酵素タイプ 2C (PP2C) と結合してその機能を阻害する。PP2C は ABA シグナル伝達における負の制御因子として機能しており、ABA 応答性遺伝子の転写制御因子や陰イオンチャネルを活性化するタンパク質リン酸化酵素 (SnRK2) を脱リン酸化して不活性化する。つまり、PYL-ABA 複合体が PP2C の阻害物質として機能することで、SnRK2 が PP2C から解放されて ABA シグナルが ON になる、というメカニズムである (図 2)。興味深いことに、ABA に限らず、多くの植物ホルモンのシグナルは、負の制御因子を阻害するか分解するという方法で ON になる仕組みになっている。基本的に動けない生物である植物が、成長や環境応答に関わる主要シグナルをこのような形で制御しているのには何か理由があると思われる。

PPI 誘導剤として機能する植物ホルモンには、分子接着剤として 2 つのタンパク質のいずれとも直接的に相互作用して両者の結合を媒介するもの (オーキシン、ジャスモン酸、ブラシノステロイドなど) と、アロステリック誘導剤として一方のタンパク質の構造変化を誘導して間接的に 2 つのタンパク質を結合させるもの (ABA やジベレリン) がある (図 1)。前者の受容体は、植物ホルモンの結合によるタンパク質の構造変化はほとんどなく、複合体形成後もリガンドポケットの入口は広く開いたままになっている。したがって、リガンドを構造修飾して、広く空いた入口から外に置換基を延ばすようにした化合物は、PPI に必要な接触面の構造を変えることができるので、PPI 阻害剤としての機能が期待できる。実際にこの方法でオーキシンの受容体アンタゴニストが作られている⁵。一方、後者の受容体は、植物ホルモンがリガンドポケットに侵入後に受容体の配座が大きく変化して、植物ホルモンをほぼ完全に閉じ込めてしまうため、大きな置換基を導入すると、受容体に対する親和性そのものが失われ、リガンドとしては機能しなくなってしまう可能性が高い。ABA 受容体 PYL が同定される以前に行われた ABA 構造活性相関研究により、ABA のどの部位を修飾しても生物活性が低下することがわかっていたが、PYL-ABA 複合体の構造を見ればその理由は明らかである。

ABA 結合ポケットの入口付近のループ (ゲートと呼ぶ) 構造により、PYL はゲート開口型とゲート閉鎖型の 2 つの配座をとり、ABA はゲート閉鎖型配座を安定化する (図 3)。したがって、もしゲート開口型配座を安定化するリガンドを見出せば、それは効果的な PYL アンタゴニストとして機能すると予想される。しかしながら、構造基盤設計でそのような分子を創り出すのも、化合物ライブラリーからのスクリーニングによって見出すのも、種々の理由からいずれも筆者らには困難であったため、何とか別の方法を適用できないか、PYL-ABA および PYL-ABA-PP2C 複合体の結晶構造をつぶさに見て検討した。

シロイヌナズナの PYL は PYR1 および PYL1

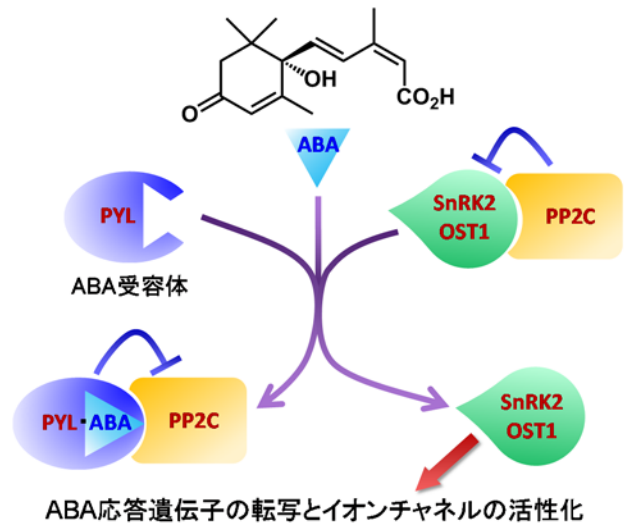


図2. ABA受容体PYLを介したABAシグナル伝達

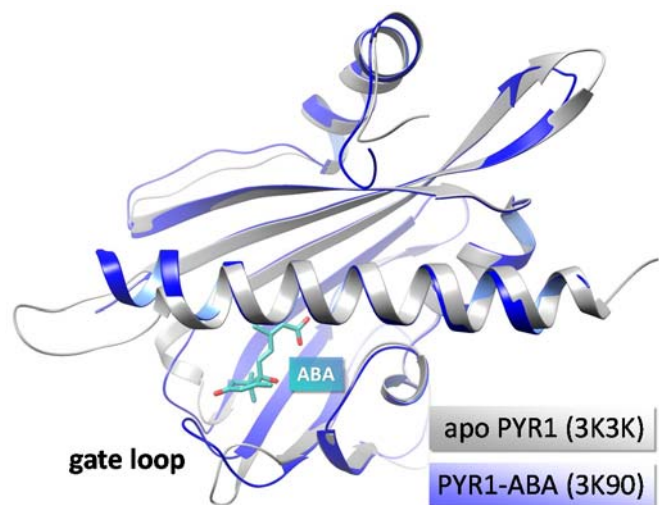


図3. ABA受容体PYL (PYR1) の結晶構造

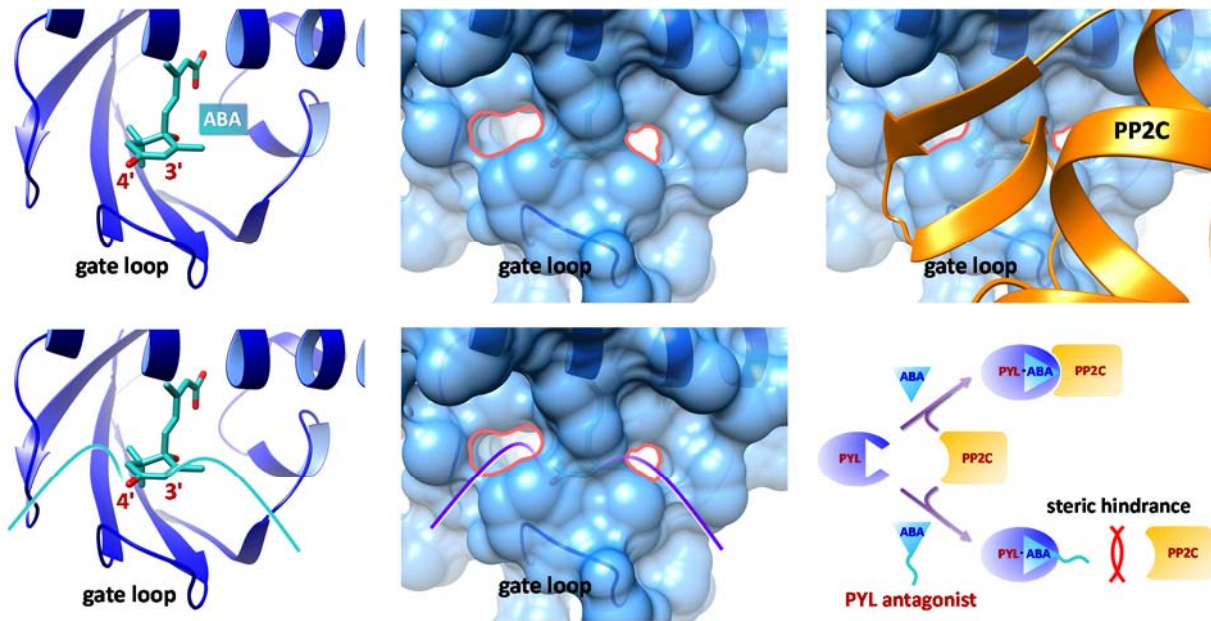


図4. PYLアンタゴニストAS6の設計戦略

から PYL13 までの 14 種類存在し、そのいくつかで ABA との共結晶構造が報告されていた⁶⁻⁹。それらの溶媒排除表面を描いてみると、表面に小さなトンネルが開いていて中の ABA が見える共結晶があることに気付いた(図 4)。このトンネルはゲート閉鎖に伴ってできたゲート両脇のすき間であり、ABA のシクロヘキセノン環の 3'位と 4'位の 2 カ所が、結晶によって外から見えたり見えなかったりする。さらに、PYL-ABA-PP2C 複合体の結晶構造と照らし合わせてみると、2 つのトンネルの出口は PP2C との接触面に存在していた。実は 4'位側のトンネルは PYL-PP2C 複合体の形成に利用されており、PP2C はトリプトファン残基の側鎖インドール環をこの穴に差し込むことで、PYL と強く結合する。3'位側のトンネルにはそのような機能はないが、いずれにしても、これらのトンネルからうまく障害物を外に向かって突き出せるリガンドであれば、PYL のゲート閉鎖を誘導して PYL に強く結合しつつも、外に突き出した障害物が PYL-PP2C 間相互作用を妨害し、PYL アンタゴニストとして機能する可能性が高いと考えられる。そこで、まず初めに 3'位側のトンネルに着目した分子設計を、次に 4'位側のそれに着目した分子設計をそれぞれ行い、いずれの方法でも PYL アンタゴニストとして効果的に機能する化合物を得ることができたので、順に紹介したい。

3. PYL-ABA 複合体の 3'位側トンネルに着目して設計した PYL アンタゴニスト AS6¹⁰

3'位側トンネルは、疎水性アミノ酸側鎖に囲まれたシンプルな短い構造であり、ちょうど C3'→H の方向に空いている。したがって、シンプルな直鎖アルキルをそのまま ABA の 3'位に導入すれば、アルキル鎖がうまくトンネルをくぐり抜けそうに思われた。しかし、直に C3'にアルキル基をくっつけるのは合成的に難しそうであったため、接続部に硫黄原子を用いてチオエーテルの形でアルキル鎖を導入することにし、この化合物を AS n (n はアルキル基の炭素数)と命名した。AS n であれば、ABA の 2'位の二重結合をエポキシ化したものにアルキルチオールを作用させれば簡単に作ることができる。実際に合成する前に、分子モデルを作成して PYL-ABA 結晶構造の ABA に重ね合わせて見ると、上手い具合にアルキル鎖がトンネルをくぐり抜けられそうな感じであった。さらにこれに PYL-ABA-PP2C 複合体を重ね合わせてみたところ、炭素数が 4 あたり、つまりブチル基ぐらいで PP2C に接触するかどうかであった(図 5 左)。このモデルを基に、筆者らは AS1~AS3 までが ABA と同様に機能する PYL アゴニストで、AS5 以上が PYL アンタゴニスト、そして AS4 は両者の中間的な機能だろうと予測して、実際に AS2~AS12 まで 11 種類を合成した。

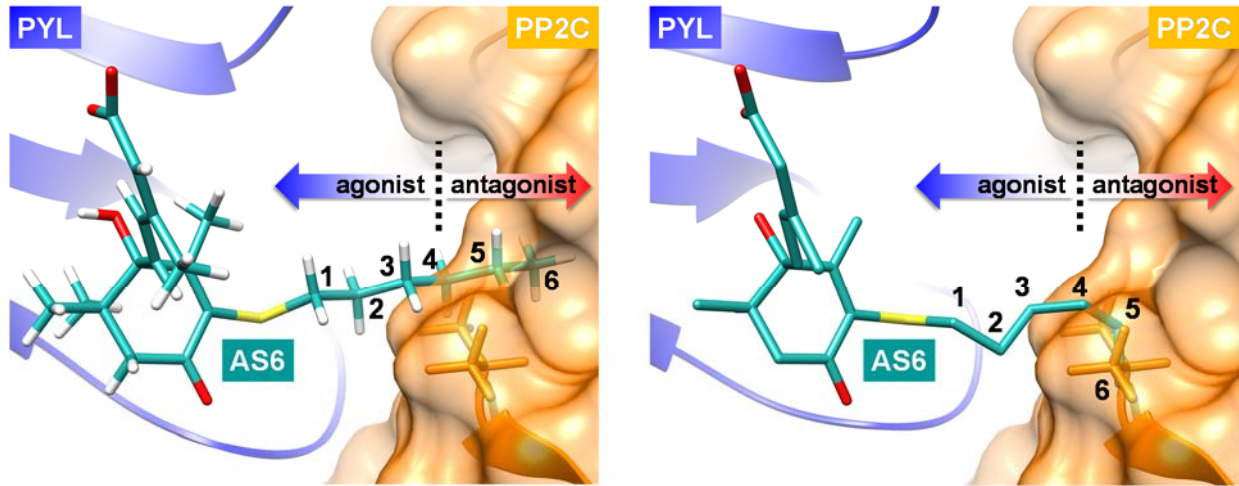


図5. モデルによるASnの活性予測(左)と実際のPYL1-AS6複合体結晶構造(右)

ABA はシロイヌナズナの種子発芽を抑制するので、まずこれを用いて ASn の機能を調べたところ、予想通りに、AS4 を境にしてアンタゴニストとアゴニストにきれいに分かれた。次にタンパク質のレベルで機能を調べてみたところ、やはり AS2 と AS3 は ABA と同様に PYL-PP2C 間相互作用を誘導して PP2C の活性を阻害し、AS5～AS12 は PYL-ABA による PP2C の活性阻害を抑制した。ここでも AS4 は、弱いアゴニストで弱いアンタゴニストという、中途半端な挙動を示した。さらに AS6 に絞ってその機能を詳細に調べたところ、AS6 は ABA よりも少しだけ強く PYL に結合し(等温滴定カロリメータで測定)、植物に外から ABA を与えた場合だけでなく、植物にストレスを与えて内生 ABA 量を増加させた場合でも、AS6 は ABA 応答性遺伝子の発現量を抑えたり、ABA とは逆に蒸散を促進することがわかった。PYL1-AS6 複合体の結晶構造の解析にも成功し、AS6 は確かに PYL のゲート閉鎖型配座を誘導して結合し、そのアルキル鎖を 3' 位側トンネルから外に突きだしていることが明らかになった(図5右)。以上より、AS6 は ABA が誘導する PYL-PP2C 間相互作用を阻害することで PYL アンタゴニストとして機能することが実証された。

4. PYL-ABA 複合体の 4' 位側トンネルに着目して設計した PYL アンタゴニスト PANMe

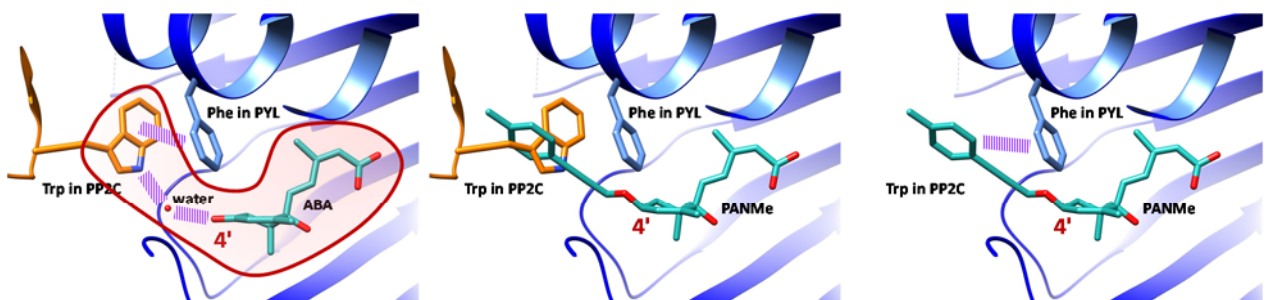


図6. PYLアンタゴニストPANMeの設計戦略

先に述べたように、4' 位側トンネルは PYL-PP2C 間相互作用において重要な役割を果たしている。PYL-ABA-PP2C 複合体の構造を見ると、トンネルに差し込まれた PP2C トリプトファン側鎖インドール環は、トンネルを形成している PYL フェニルアラニン側鎖ベンゼン環と相対して π - π 相互作用するとともに、水分子を介して ABA の 4' 位カルボニル酸素と水素結合を形成しているのがわかる(図6左)。筆者らは、インドール

環-水-カルボニル酸素をつなげてしまって ABA に取り込んでやれば、PP2C のトリプトファン側鎖がトンネルに侵入するのを妨害できるとともに、PYL-ABA 間には存在しない新たな相互作用を付与することができると考えた(図 6 中)。芳香環の種類と接続方法を検討した結果、ABA の 4'位カルボニル基を還元してヒドロキシ基とし、これに三重結合を介してベンゼン環を結合させた一連の化合物(図 6 右)が、PYL に対して非常に強い阻害活性を示すことを明らかにし、これらを PAN(Pyl ANtagonist)と総称することにした。ベンゼン環のパラ位にメチル基をもつ PANMe に絞ってその機能を紹介すると(未発表データ), この化合物は PYL-ABA による PP2C 阻害を完全に抑制し、PYL に対する解離定数は ABA のそれの約 1/10 であり、目論見通り ABA や AS6 よりも高い PYL 親和性をもつことがわかった。タンパク質レベルにおける、こうした PANMe のアンタゴニストとしての高機能性は植物に対しても発揮され、ABA によるシロイヌナズナ種子発芽阻害を AS6 よりも強く抑制し、二次休眠の症状が出る高温条件下でのシロイヌナズナ種子の発芽不良を著しく回復した。現在、PYL-PANMe 複合体の構造解析を検討している。

5. おわりに

植物ホルモン受容体の結晶構造の解明を機に、受容体の機能を制御するリガンドの開発が一挙に進むと期待されたが、現状、その歩みは期待されたほど速くはないようだ。1990年代以降、植物科学分野において有機化学的なアプローチを採用する研究者が徐々に少なくなり、特にモデル植物のゲノム解読以降、その傾向が顕著になったことが1つの要因かもしれない。植物ホルモンの多くはタンパク質間相互作用の接着剤や誘導剤として機能しており、分子設計という観点から見ても大変面白い題材である。また、生合成や代謝を制御して内生量を調節するのではなく、受容体の機能を直接マニピュレートできる分子は、ホルモン間のクロストーク、そして複雑に交差するシグナル伝達ネットワークを解明するための化学ツールとしても有用である。

筆者らは、構造活性相関とタンパク質立体構造情報に基づいてABA受容体アンタゴニストを合理的に創出することに初めて成功した。ABAのシグナル伝達機構に関する研究は主としてモデル植物の様々な遺伝的変異株を用いて行われてきたため、シロイヌナズナにおいてはその概要が明らかになっている。一方で、分子生物学的手法や遺伝学的手法の適用が困難な多くの植物種や農作物については、ABA生理作用を分子レベルで理解するための解明研究が遅れている。今回創出したAS6やPANMeは、シロイヌナズナだけではなくレタスやダイコンに対してもABA生理作用をアンタゴナイズしたことから、非モデル植物のABAシグナル伝達機構の解明においても有用な化学ツールとなることが期待されるとともに、実用可能な植物生長調節剤の創出にも繋がることを期待される。

参考文献

- 1) Kumari, S.; van der Hoorn, R.A.L. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2011**, *14*, 480–488.
- 2) Cutler, S.R.; Rodriguez, P.L.; Finkelstein, R.R.; and Abrams, S.R. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2010**, *61*, 651–679.
- 3) Ma, Y.; Szostkiewicz, I.; Korte, A.; Moes, D.; Yang, Y.; Christmann, A.; Grill, E. *Science* **2009**, *324*, 1064–1068.
- 4) Park, S.-Y.; Fung, P.; Nishimura, N.; Jensen, D.R.; Fujii, H.; Zhao, Y.; Lumba, S.; Santiago, J.; Rodrigues, A.; Chow, T.-F.F.; Alfred, S.E.; Bonetta, D.; Finkelstein, R.; Provart, N.J.; Desveaux, D.; Rodriguez, P.L.; McCourt, P.; Zhu, J.-K.; Schroeder, J.I.; Volkman, B.F.; Cutler, S.R. *Science* **2009**, *324*, 1068-1071.
- 5) Hayashi, K.; Zheng, N.; Hatate, T.; Kimura, Y.; Kepinski, S.; Nozaki, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**,

105, 5632–5637.

- 6) Melcher, K.; Ng, L.-M.; Zhou, X.E.; Soon, F.-F.; Xu, Y.; Suino-Powell, K.M.; Park, S.-Y.; Weiner, J.J.; Fujii, H.; Chinnusamy, V.; Kovach, A.; Li, J.; Wang, Y.; Li, J.; Peterson, F.C.; Jensen, D.R.; Yong, E.-L.; Volkman, B.F.; Cutler, S.R.; Zhu, J.-K.; Xu, H.E. *Nature* **2009**, *462*, 602-608.
- 7) Miyazono, K.-I.; Miyakawa, T.; Sawano, Y.; Kubota, K.; Kang, H.-J.; Asano, A.; Miyauchi, Y.; Takahashi, M.; Zhi, Y.; Fujita, Y.; Yoshida, T.; Kodaira, K.-S.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Tanokura, M. *Nature* **2009**, *462*, 609-614.
- 8) Yin, P.; Fan, H.; Hao, Q.; Yuan, X.; Wu, D.; Pang, Y.; Yan, C.; Li, W.; Wang, J.; Yan, N. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 1230-1236.
- 9) Santiago, J.; Dupeux, F.; Round, A.; Antoni, R.; Park, S.-Y.; Jamin, M.; Cutler, S.R.; Rodriguez, L.; Marquez, J.A. *Nature* **2009**, *462*, 665-668.
- 10) Takeuchi, J.; Okamoto, M.; Akiyama, T.; Muto, T.; Yajima, S.; Sue, M.; Seo, M.; Kanno, Y.; Kamo, T.; Endo, A.; Nambara, E.; Hirai, N.; Ohnishi, T.; Cutler, S.R.; Todoroki, Y. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 477-482.



研究紹介

肺におけるウイルス・宿主相互作用の体系的解析

—染色体構造変化から免疫応答、マウス呼吸機能、創薬標的化合物探索まで—

秋田大学大学院医学系研究科
情報制御学・実験治療学講座

今井 由美子

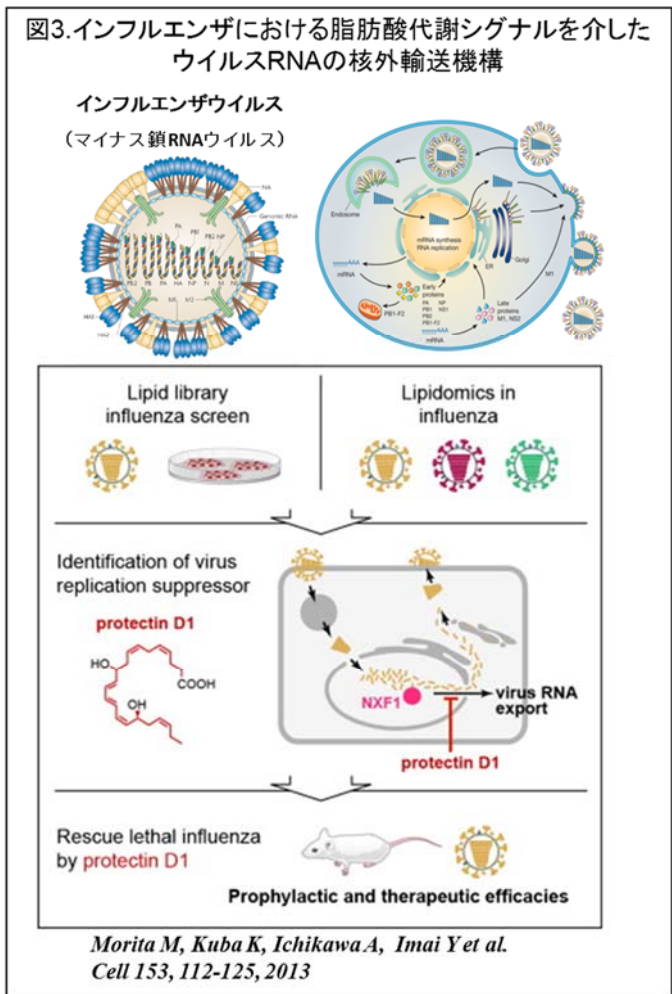
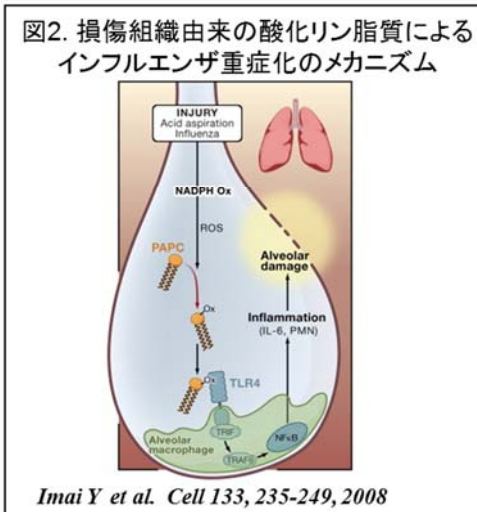
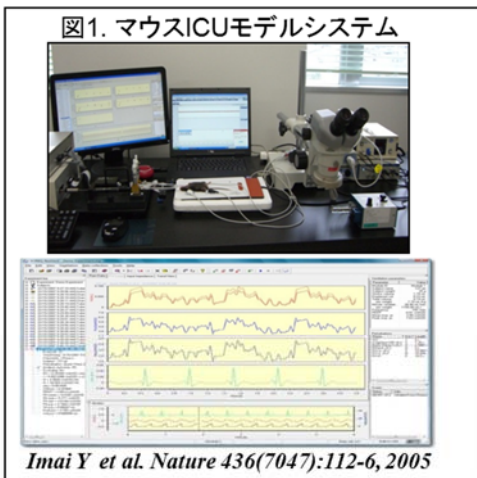
(imai@med.akita-t.ac.jp)

最近 H5N1 や H7N9 型の鳥インフルエンザ、コロナウイルスによる SARS や MARS などの重症呼吸器ウイルス感染症が社会問題になっています。これらのウイルス感染症が重症化したヒトは、集中治療室 (ICU) で人工呼吸などの治療を受けることとなりますが、残念ながら救命に繋がる有効な治療法がありません。このような現状を打破するためには、疫学的実態把握、流行予測、感染伝播機序、宿主動物や細胞における増殖機構の解明に加え、ウイルス・宿主相互作用を介した生体のシステムとしての応答機構、それらと感染症の発症、重症化の関連に関する基盤情報が必須であると考えています。しかしながら、ウイルス自体に関する様々な知見が蓄積されている一方、ウイルス・宿主相互作用、ヒトにおける重症病態の形成機構に関しては不明な点が多く残されています。そこで私たちは、マイナス鎖の RNA をゲノムに持ち、核内でウイルスゲノムの転写、複製を行うインフルエンザウイルスをモデルとして、肺でのウイルス・宿主相互作用と病原性の発現機構に関して体系的解析を進めています。その手法は、免疫学、ウイルス学、マウス遺伝学的手法をベースに、RNA 研究、染色体研究、情報生物学、ケミカルバイオロジーなどの手法を取り入れたものです。

1. ウイルス感染における宿主脂溶性代謝と核内ウイルス RNA の輸送制御

ウイルスは宿主の細胞内小器官を利用して増殖するので、ウイルスの増殖は宿主因子に依存します。ウイルスが侵入した宿主細胞においては、ウイルスと宿主の相互作用から様々なネットワークが可動し、この複雑系のネットワークによってウイルスによる生体侵襲が調節されていると考えられます。これまでウイルスによって生体が高度の侵襲を受けるメカニズム、すなわちウイルス感染症の重症化を制御している分子機構は十分に解明されていません。私たちの研究室では、ウイルスに感染して重症化した患者さんが ICU で集中治療を受ける状態を再現することが可能なマウス ICU モデル (図 1) を独自に樹立し、このモデルを用いて、新型肺炎 SARS ウイルスや H5N1 鳥インフルエンザウイルスに感染した肺組織においては、損傷組織由来の酸化リン脂質が損傷関連分子パターン(DAMPs)として作用することによって、自然免疫が過剰に活性化され、制御範囲を逸脱した重度の組織炎症が引き起こされ、致死的な呼吸不全に至ることを報告しました (図 2) (Cell 2008)。

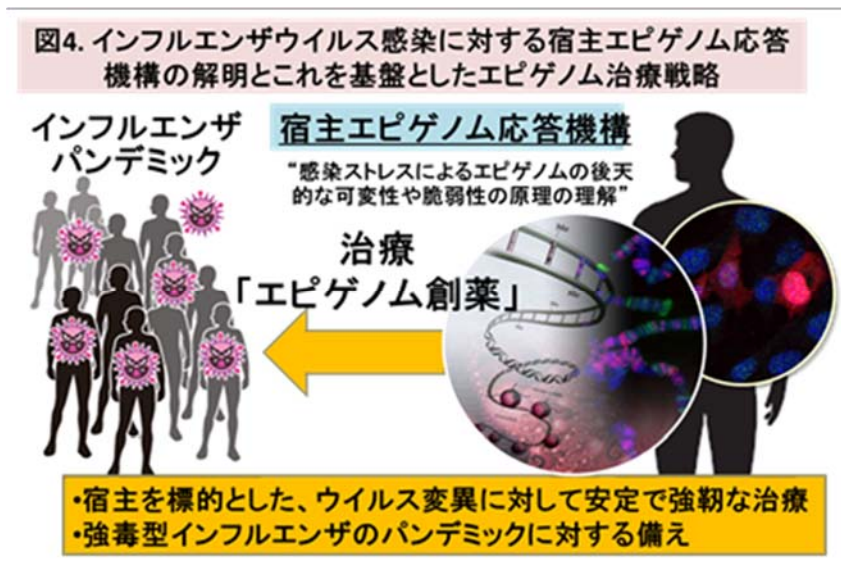
ところで、インフルエンザウイルスと宿主の相互作用に関しては、トランスクリプトーム、プロテオームの解析が既に行われていましたが、生体内化合物はほとんど注目されていませんでした。そこで私達は、脂肪酸代謝物のライブラリーを用いてインフルエンザウイルスの増殖に関するスクリーニングを行い、増殖を抑制する新規の n-3 系脂肪酸代謝物を同定しました。これは、化合物のライブラリーを用いて、インフルエンザウイルスを感染させたヒト肺上皮 A549 細胞にそれぞれの化合物を投与し、ウイルスタンパク質の mRNA 発現量を指標に、96 ウェルフォーマットでスクリーニングを行うものです。次にスクリーニングで増殖の抑制が見られた化合物に関して、ウイルスを経気道的にマウス肺に感染させた重症インフルエンザモデルを用いて、化合物の *in vivo* での有効性を確認しました。次いで、感染マウスの肺組織を用いてリポドミクス解析（理化学研究所 有田誠博士との共同研究）を行いました。さらに、同代謝物がウイルスの増殖を抑えるメカニズムの手がかりを得るために、マイクロアレイのデータを用いた Ingenuity pathway analysis (IPA)を行いました。これはオミクスデータをもとにして生物学的な機能の解釈やパスウェイ解析を行うことができるソフトウェアです。この解析で同代謝物の投与によって RNA transport のパスウェイが変動しているというおもしろい結果を得ました。そこでウイルス RNA の細胞内局在を RNA-FISH 法で解析したところ、同代謝物を投与すると、確かにウイルス RNA の核外輸送が抑えられることがわかりました。さらに RNA ゲルシフトアッセイ、RNA 免疫沈降(RIP)、RIP-seq 等を通して、同代謝物はウイルス RNA が RNA 核外輸送因子 NXF1 にリクルートされる過程を抑えることによってウイルスの増殖を抑制していることを見出しました。興味深いことに、同代謝物とノイラミニダーゼ阻害薬といった作用点の異なる 2 剤を併用すると、これまで救命が難しかった、感染から 48 時間以降



に投与を開始しても、重症インフルエンザマウスの生存率を改善させることができました。これらの研究成果は Cell 誌に報告しました¹(図3)。その後、NEJM は”Influenza Time to Target the Host”として我々の仕事を紹介し、宿主を標的とした新しい抗インフルエンザ薬の可能性を指摘しています²。

2. ウイルス感染に対する宿主染色体高次構造のダイナミクスと病原性発現

インフルエンザウイルスは、ゲノムの転写・複製を核内で行う RNA ウイルスですが、ウイルスが感染した宿主細胞の染色体にはウイルス・宿主相互作用を介した連続的な摂動 (perturbation) が加わるようになります。近年、外的要因による染色体高次構造の変化とエピジェネティックな遺伝子制御の関係が注目されています。染色体は、遺伝子転写、複製、組換え、修復、分配、エピゲノム修飾などの各種機能を通じて生命活動に深く関わっていますが、DNA メチル化やヒストン化学修飾に代表されるエピジェネティックな遺伝子発現調節に加え、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、インスレーターなどの遺伝子制御領域の相互作用に関わる染色体高次構造が、エピジェネティックな遺伝子発現制御の重要な要素であることがわかってきました。核内には遺伝情報を含む染色体テリトリーに加え、PML ボディー、核小体、核膜等数々の構造体が存在しますが、それらが空間内でどのように形成され相互作用するかは、遺伝子の効率的な発現やエピジェネティックな制御を規定していると考えられています。私達は、ウイルス感染という外的要因による染色体高次構造の変化と、各種染色体機能の連携に興味を持っています。現在、ヒストンメチル化修飾、ヘテロクロマチンと核膜の相互作用などに焦点を当て、ヒストン修飾酵素の遺伝子欠損マウスや細胞を用いたウイルス感染系や *in vitro* ウイルスポリメラーゼ転写・複製活性測定系を用いて、全ゲノムレベルのタンパク質局在情報(ChIPseq)、転写情報 (RNAseq)、染色体 3 次元構造情報 (ChIA-PET) (東京大学白髭克彦博士との共同研究) 等を獲得して、FISH 法や超高解像度顕微鏡で得られたデータと組み合わせて、ウイルス感染に伴った染色体構造の変化を解析しています。ウイルス感染に対する宿主染色体高次構造のダイナミクスと病原性発現の関係が明らかにすることによって、これを標的とした新規の抗ウイルス薬の開発につながることを期待されます。そこで、現在、ヒストン修飾酵素の活性を調節する化合物を用いて、インフルエンザウイルスの増殖に関するスクリーニングを行なっています。このような研究を通して、宿主のエピゲノム応答機構を標的とした新規の抗ウイルス薬の開発につながることを期待されます(図4)。



以上のように、現在私達が行っている研究には、異なる分野の研究者との共同研究が不可欠です。改めて国内外の共同研究者の方々に深謝申し上げます。今、ウイルス・宿主相互作用を標的とした感染症治療薬の開発といったビッグウェーブが到来していることを実感しています。私達の研究成果が、未だ有効な治療法の無い、重症呼吸器ウイルス感染症に対する創薬に向けた基盤情報となることを目指しています。

文献

1. Morita, M. *et al.* The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza. *Cell* **153**, 112-125, doi:10.1016/j.cell.2013.02.027 (2013).
2. Baillie, J. K. & Digard, P. Influenza--time to target the host? *N Engl J Med* **369**, 191-193, doi:10.1056/NEJMcibr1304414 (2013).



気になった論文

高山 亜紀 (こうやま あき)

東北大学大学院薬学研究科 博士課程後期3年

a-kohyama@dc.tohoku.ac.jp

この度は、生命化学研究レター「気になった論文」への執筆の機会を頂き、ありがとうございます。私は、東北大学薬学研究科 岩淵好治教授 指導のもと、抗腫瘍活性を有する天然物やその誘導体に基づく創薬化学研究を行っております。特に、**curcumin**誘導体の創薬化学研究においては**Michael acceptor**という構造単位に着目して構造活性相関研究やプロドラッグの創製等を行ってきました。

Michael acceptorは、従来は医薬品候補化合物としては避けられてきた構造単位であります。近年、可逆的**Michael acceptor**を利用した研究などが**Jack Taunton**らを含むいくつかのグループによって活発に行われています。しかし、特定の標的に求電子剤を作用させるということは大変難しく、構造活性相関研究の複雑性は増し、さらに、分子生物学的方法による作用機序の検証も非常に大変な作業となります。今回は、**Yimon Aye**らによって開発された、「生物活性物質としての**Michael acceptor**を、“場所・時間・濃度”の制御下で暴露することを可能とした優れた手法」について紹介させていただきます。

Temporally Controlled Targeting of 4-Hydroxynonenal to Specific Proteins in Living Cells

Fang, X.; Fu, Y.; Long, M. J. C.; Haegele, J. A.; Ge, E. J.; Parvez, S.; Aye, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14496-14499.

反応性に富む求電子剤は特異性が低くなるため、求電子剤がシグナル伝達等の生命現象にどのように関わっているのか理解することが困難となる。本論文の著者である**Aye**らは、光による脱ケージ反応と**HaloTag**^{*1補足}を利用して求電子剤が標的的特異的に運ばれ作用するようなシステムを開発した(図1b)。

まず、著者らは、求電子剤として**4-hydroxynonenal (HNE) (3)** を選択した(図2b)。HNE (3) は、不飽和脂肪酸の過酸化から生じる分子の1つで、細胞内シグナルに特定の役割を示すことが報告され、その生理的作用に興味を持たれている。しかし、非特異的な高反応性化合物であるために、実際の実験においては、“HNE処理で引き起こされる応答が標的を介するものか、**off-target**によって引き起こされるものか”がはっきりとしない(図1a)。したがって、HNEを“特定の部位・タイミング”で作用させる方法(図1b) が求められている。

著者らは、興味のあるタンパク質(**protein of interest: POI**)に求電子剤を特異的に作用させるのに、**HaloTag**を利用する戦略をとった。

具体的には、図1b に示す通りで

- ① **POI**と**HaloTag**の融合タンパク質を過剰発現させた細胞を、不活性型求電子剤(**HaloTag**リガンド▲-**HNE**前駆体●結合型化合物)で処理する。

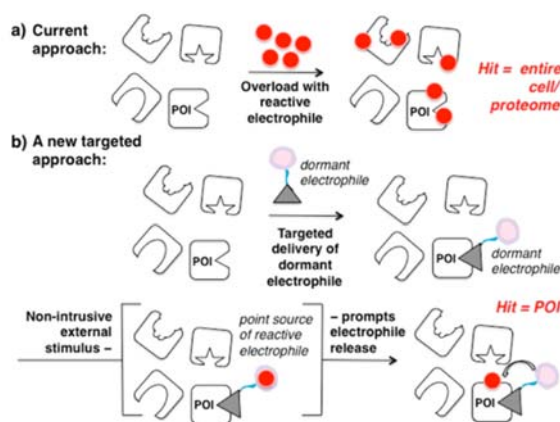


図1 求電子剤のPOI(興味のあるタンパク質)に作用させることによる影響を調べる実験方法(論文より抜粋)
 (a) 一般的な現在の方法 (b) 著者らの開発した方法

- ② 不活性求電子剤は、ハロゲン化アルキル構造(▲)がHaloTagに認識され共有結合が形成される。
- ③ 光を照射することで、活性型HNE(●)が放出される。
- ④ 暴露されたHNEは近傍のPOIと反応する。

ここで重要な点が、2点挙げられている。1つ目は、本システムで放出される活性型HNEは最大でもPOIと等量の関係になるため、その濃度がPOIに応じた低濃度に制御できる点、2つ目は、活性型HNEはPOIの近傍に放出されるので速やかな反応が期待できる点である。

著者らは、本戦略のproof-of-conceptを得るべく、モデルタンパク質としてHaloKeap1を、作用させる分子としてHtPHA (2) を適用した(図2b)。Keap1は求核性の高いCys残基を有するため、HNE (3) などの反応性求電子剤に修飾されやすく、*in vitro*では、無数の求電子剤と共有結合を形成することが知られている。1と2は、著者らによって設計・合成されたHNE前駆体を光開裂型構造とリンカーを介してハロゲン化アルキルと連結させた小分子であり、光照射によってそれぞれ3, 4を放出する(図2a, 図3)。

著者らは、2の標的分子(Keap1)への運搬能を評価した。検出では、アルキン2を蛍光標識アジド体と

Click反応させることで蛍光標識化した。Keap1と反応した4と未反応の2を区別するために、HaloKeap1タンパク質を光照射の後、酵素でHaloTagとKeap1へと開裂させた(図2a Tev cleavage)。SDS-Page後の蛍光検出の結果により、光照射前は、33 kDaのHaloTag部分に結合していることが分かり(図2d, lane 2)、光照射後は、大部分のHNEがHaloTagから放出されてKeap1に結合していることが示された(図2d, lane 3, 4)。また、2のクロ

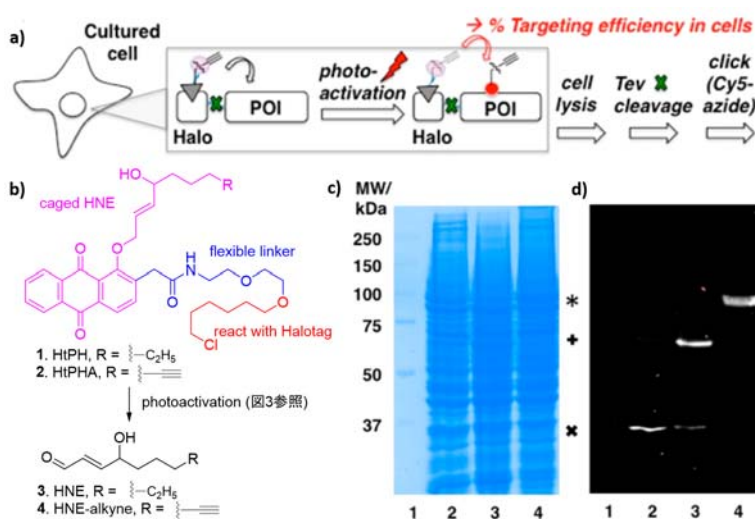


図2 (a) HNE のターゲティング戦略 (b) 1と2の構造と光開裂による活性分子の放出 (c) (d) lane 1, MW マーカー; lane 2, 光照射なし; lane 3, 光照射後; lane 4, Tev 開裂なし。*,HaloKeap1 (104 kDa); +, Keap1 (70 kDa); ×, Halo (33 kDa)。 (c) CBB 染色 (d) Click 反応による in-gel 蛍光解析 (論文より抜粋・一部改変)

アルキル基は、4がKeap1に結合するために必要で、4の放出前に一度2がHaloTagへ認識される必要があるということが確認されている。一方、CBB染色の結果をみるとHaloTag、Keap1と同程度の強度で多くの種類のタンパク質が確認されたため、“Keap1選択的なHNEの運搬”が証明された。

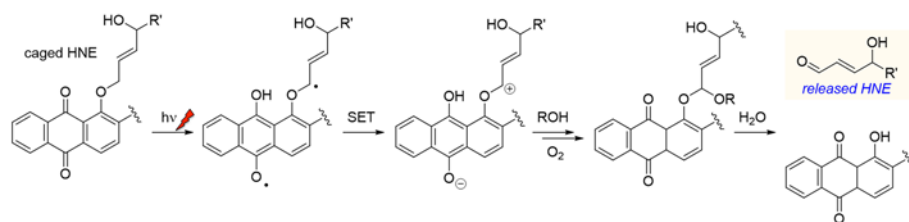


図3 光照射による pre-HNE から HNE への脱ケージメカニズム (Org.Lett. 2004, 6, 3767)

著者らの新たな手法によって、生細胞におけるKeap1へのHNE (4) のターゲティングが可能となった。

A Generalizable Platform for Interrogating Target- and Signal-Specific Consequences of Electrophilic Modifications in Redox-Dependent Cell Signaling

Lin, H.-Y.; Haegele, J. A.; Disare, M. T.; Lin, Q.; Aye, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 6232-6244.

Ayeらは、本論文で、自ら開発したターゲティングの手法をHNE (4) 以外の (lipid-derived electrophile:

LDE) **5-13**に適用した(図4a)。LDEは、細胞内で脂質の酸化によって生成する求電子化合物で、細胞内のredox依存性シグナルの中心を担うと考えられている。そこで、Ayeらは、上の論文で紹介したターゲティング手法を用いて選択的に1つのredox依存性シグナルを作動させるようなアプローチを着想し、これを“T-REX: targetable reactive electrophile and oxidant”と命名した(Aye, Y. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 10)。T-REXは、以下の3つの条件が揃ってはじめて成立する。

- ① ある一定種類の求電子剤が特定のタンパク質に運ばれるようなシステムの構築
- ② ターゲットデリバリーの動力学的追跡
- ③ 標的タンパク質、小分子がそれぞれ特異的に下流シグナルに影響するのかについての評価

従来は図1aの手法で、構造の異なる様々なLDEによって、Keap1を介するNrf2-AREシグナル伝達(図4b)^{*2補足}が引き起こされると報告されてきた。しかし、Nrf2-AREの上流に

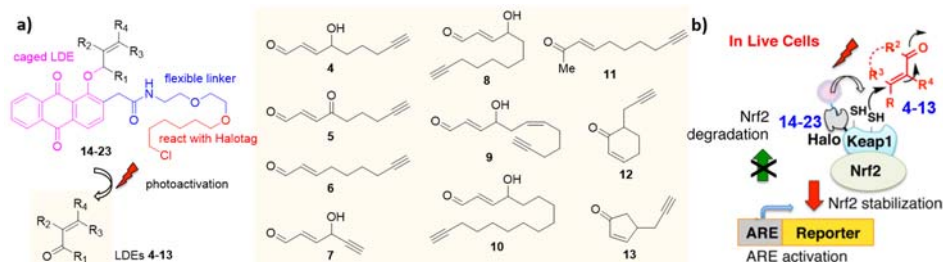


図4 (a) pre-caged LDEs (14-23), LDEs (4-13) (b) T-REXによるターゲティングとKeap1下流シグナル(論文より抜粋・一部変更)

はKeap1以外のタンパク質が存在するので、LDEによる“Keap1のみ”を介したNrf2-AREシグナルへの影響は、明らかではなかった。今回の論文では、T-REXを利用して、図4aに示す10種類のpre-caged LDE **14-23** をKeap1特異的に作用させることで、各々、Keap1にどの程度結合し、その下流シグナルにどの程度作用するのかを評価した。その評価において、著者らは、既存の方法(細胞全体をLDE **4-13** のみで処理; 図1a)とT-REXの方法(pre-LDE **14-23** を用い光で活性LDEを暴露; 図1b, 2a)をそれぞれ用いて細胞に作用させ比較した。Keap1下流シグナルの評価としては、Nrf2の安定化をWestern Blottingで評価し、AREによる遺伝子発現活性化をレポータージーンアッセイによって評価した(図5)。

その結果、T-REXを用いた場合、光に不安定な一部のpre-LDEを除きほぼすべてのLDEは、同程度の割合でKeap1に結合し、下流シグナルに作用すること、すなわちNrf2安定化とARE依存性遺伝子発現活性化を引き起こすことが示された(図5a, b)。一方、比較として細胞全体をLDEで処理した時は、Nrf2の安定化が起きず、LDEがKeap1非依存的に下流シグナルを惹起させる場合があった(図5a, Global, 図5b, 25 μM flood)。

これらの結果から、既存の単純な化合物処理では不可能だった“1つの標的への作用とその下流シグナルへの定量的評価”が、T-REXによって可能となったといえる。今後、各LDEがどのように特定のタンパク質を介したシグナル伝達に影響を及ぼすのか、より一層深く研究が進展していくものと期待される。

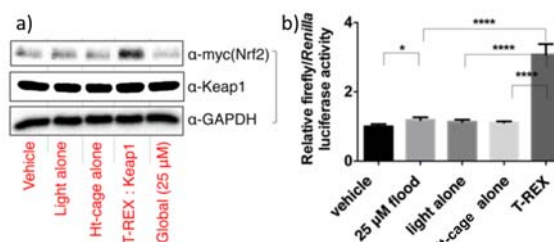


図5 (a) WBによるNrf2の安定化の評価 (b) レポータージーンアッセイによるARE upregulation (論文より抜粋・一部変更)

【補足】*1: HaloTagは、タンパク質総合解析ツールとして用いられているタンパク質。HaloTag内のAsp残基がハロゲン化アルキル基と非可逆的に共有結合を形成する。

***2:** Keap1は、通常、転写因子Nrf2と結合し、その核内移行(AREへの移行)を妨げている(図4b)。したがって、LDEがKeap1に結合すると、Keap1の下流シグナルが阻害される、すなわち、Nrf2の安定化やARE依存性遺伝子発現活性化が引き起こされる。

気になった論文

蓑島 維文 (みのしま まさふみ)

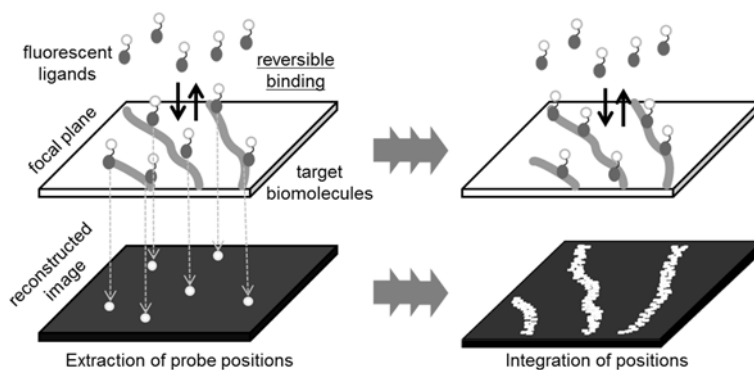
大阪大学免疫学フロンティア研究センター 化学分子イメージンググループ(菊地研究室) 特任助教
minoshima@mls.eng.osaka-u.ac.jp

この度は生命化学研究レター「気になった論文」への執筆機会をいただき、誠にありがとうございます。私は2010年3月に京都大学大学院理学研究科、杉山研究室で学位取得後、東京大学先端科学技術研究センターでの特任助教を経て、2012年より大阪大学大学院工学研究科、菊地和也研究室の特任助教として所属しております。現在は蛍光イメージングプローブの開発をはじめとしたケミカルバイオロジー研究に取り組んでおり、分子と光を利用して新たな生命現象の解明に役立つツールを創製することを目標としております。今回の執筆にあたり、最近報告された論文の中から、超解像蛍光イメージング手法について1報、光を利用した細胞操作について1報を紹介させていただきます。

Multitarget Super-resolution Microscopy with High-density Labeling by Exchangeable Probes

Kiuchi, T.; Higuchi, M.; Takamura, A.; Maruoka, M.; Watanabe, N. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 743–746.

超解像蛍光顕微鏡は2014年のノーベル化学賞に選定されたように、生体内の微細構造を可視化する画期的な技術として注目されています。超解像画像の取得方法としては、STED (Stimulated emission depletion microscopy), SIM (Structured illumination microscopy), PALM (Photoactivated localization microscopy), STORM (Stochastic optical reconstruction microscopy)などの手法がこれまでに知られています。中でもPALMやSTORMでは蛍光分子の光照射による蛍光特性の変化(光活性化, 光スイッチング)を利用し、蛍光分子の局在を一分子単位で撮像し、その輝点の中心を検出して画像化しています。これを複数枚重ね合わせることで超解像画像を得ることができ、理論上では20 nm程度まで分解能を上げることができます。しかしながら良好な超解像画像の取得は分解能だけではなく、標的分子をラベル化する密度によっても影響されることが指摘されています。実際には蛍光分子でラベル化された標的分子間距離の二倍以下の蛍光像は見分けることができません。そのため既存の蛍光タンパク質や蛍光分子-抗体コンジュゲートを使って標的分子を蛍光ラベル化する手法では、ラベル化する分子のサイズによって標識密度が制限され、得られる画像の質が低下することが考えられます。また、上記の点は複数の標的分子を染め分けてイメージングする際においても問題となってきます。



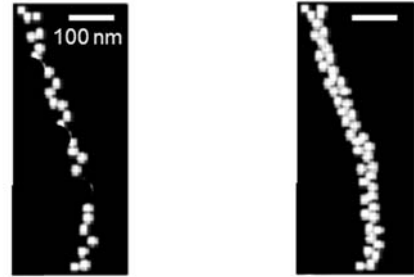
IRIS 法による超解像画像の取得 (論文より一部改変)

本論文で著者らは蛍光分子の可逆的な結合による局在変化を一分子単位で観察し、標的分子を高密度、高解像度でイメージングできる新たな手法、IRIS (Image Reconstruction by Integrating exchangeable

Single-molecule localization)を提案しています。この手法では撮像ごとに焦点面で観察される蛍光分子が入れ替わるため、撮像フレーム数を重ねることで標的分子の高密度なイメージングが可能となります。

著者らはまず、市販化されているAtto-488色素でラベルされたアクチン結合ペプチドLifeact (Atto488-MGVADLIKKFESISKEE)を用いアクチン繊維のイメージングを試みています。Lifeactはアクチン繊維上でリガンドの交換が起こるとされており、実際に一分子単位でアクチン繊維への結合を観察したところ、半減期(τ)23 msecの結合保持時間で結合・解離を繰り返すことが確認されました。この τ の値を基に1画像を取得する時間を決定し、撮像した画像フレームを重ね合わせたところ、20 nm程度の分解能で超解像画像を取得することができました。また、撮像フレーム数を上げていくことで、アクチン繊維から高密度の輝点が観察されるようになり、より鮮明な超解像画像を得ることもできました。抗体によって蛍光標識されたアクチン繊維をSTORM等の既存の手法で観察した画像と比較しても、IRISで得られた像は対象分子がより高密度にラベル化され、鮮明にイメージングできることが明らかとなりました。

本手法は蛍光分子と標的分子との結合が可逆的であるため、洗浄操作後、別の蛍光プローブを用いることで複数の分子を標的にしたマルチカラーイメージングへ適用できます。そこで著者らは微小管や中間径フィラメントといった細胞骨格に関連する分子を標的とし、これらの分子に結合する既存のタンパク質リガンドを改変してアクチン-Lifeactと同程度の結合保持時間($\tau = 20\sim 100$ msec)を示すタンパク質リガンドを調製しました。これらのタンパク質リガンドを蛍光色素でラベル化し、マルチカラーによるIRIS超解像イメージングを行ったところ、アクチン、微小管、中間径フィラメントをそれぞれ超解像でイメージングすることができ、それぞれの分子の関係を微細レベルで明らかにしました。今回の論文に示されるような分子間相互作用の調節による超解像イメージング手法は多くの研究で行われている照射による蛍光分子の点滅を利用した方法とは異なる新たな手法であります。加えて対象分子間の相互作用におけるパラメータの調節が画像取得のポイントとなっており、化学的なアプローチも可能と考えられ、興味深く感じました。



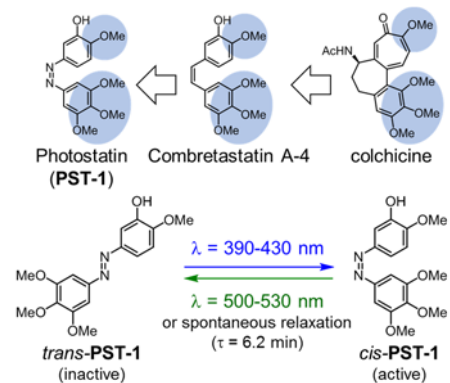
2 x 10³ frames (2 x 10² labels/μm) 2 x 10⁵ frames (1.2 x 10⁴ labels/μm)

IRIS による異なるラベル化密度でのアクチン繊維の超解像イメージング像 (論文より一部改変)

Photoswitchable Inhibitors of Microtubule Dynamics Optically Control Mitosis and Cell Death

Borowiak, M.; Nahaboo, W.; Reynders, M.; Nekolla, K.; Jalinot, P.; Hasserodt, J.; Rehberg, M.; Delattre, M.; Zahler, S.; Vollmar, A.; Trauner, D.; Thorn-Seshold, O. *Cell* **2015**, *162*, 403-411.

微小管に結合し、重合や脱重合を阻害する化合物は細胞骨格や細胞周期を調べるための研究用ツールとして生命科学研究で広く使われており、その中にはタキソールのように抗がん剤として使われているものもあります。しかしながら、これらの化合物の強力な作用は投与した直後から周りの細胞全体に及ぼされるため、望ましくない副作用が引き起こされます。この問題に対し、光刺激によって狙った照射位置とタイミングで薬剤の活性をコントロールするアプローチが行われています。光刺激により脱離する官能基で薬剤を保護したケージド化合物がその代表例ですが、活性化後



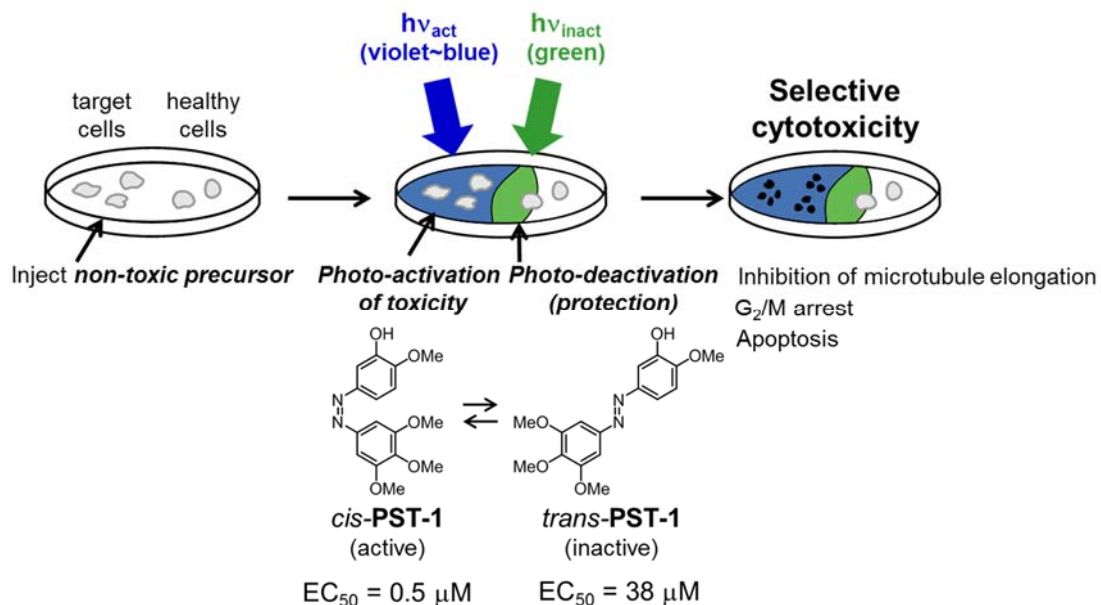
Photostatin (PST-1) のデザインと構造 (論文より一部改変)

の薬剤は徐々に拡散し影響を及ぼすため、長期間にわたって作用を精密にコントロールすることは困難でした。今回著者らは光照射により可逆的に活性の制御が可能な微小管結合分子、**photostatin (PST)**を開発し、微小管重合とそれに伴う細胞の動態を望みの場所とタイミングで制御できることを報告しています。

著者らが開発したPSTは微小管に結合し、その重合を阻害する薬剤として報告されている**コルヒチン誘導体、combretastatin A-4 (CA4)**を基に設計されています。CA4はアルケンを挟み、トリメキシベンゼンとメトキシベンゼンを有しており、シス体がトランス体に比べ強力な微小管結合能、抗がん活性を示すことが知られております。PSTはこの中央のC=C二重結合をアゾ基に置き換えた化合物で、光照射によるアゾベンゼン様のシス-トランス異性化を引き起こすことができます。この設計に基づき著者らはいくつかPST誘導体を合成し、光異性化能を評価したところ、380-420 nmの光照射により約90%が微小管結合能の強いシス体へと移行し、500-530 nmの光照射、あるいは暗所で放置することによって微小管結合能の弱いトランス体へ戻ることが示されました。また、PSTを投与した細胞に紫色~青色領域のパルス光を一定時間照射すると顕著な細胞毒性が現れました。PST誘導体の一つ、PST-1を例に挙げると、シス体でのEC₅₀値は0.5 μMである一方、トランス体では38 μMと大きな差が生じています。この細胞毒性の発現はCA4同様、微小管結合に由来するG₂/M期での細胞周期停止、アポトーシス誘導によるものであることが確認されており、細胞内で微小管重合阻害能を持つ薬剤の活性を光によって制御できることが明らかとなりました。

次に微小管の先端を赤色蛍光タンパク質で可視化できるようにした培養細胞を用いて、PST-1処理後に、405 nmと514 nmの光を2分おきに照射しながら蛍光顕微鏡観察を行いました。その結果、微小管の先端に集積している輝点が405 nm照射に伴い消失し、514 nm照射によって回復する挙動が観察され、生細胞内の微小管重合の動態を光照射によって可逆的に制御できることが示されました。また、著者らは生きている線虫の胚細胞やマウスの精巣挙筋細胞の中から一つの細胞を選択的に光照射し、*in vivo*でも細胞分裂時での停止と回復ができることも示しています。

本論文で報告されたような可逆的な光スイッチング能を有する生理活性化合物は投与と光照射によって時空間的に薬剤活性濃度を精密にコントロールできるため、生理機能の解明用ツールだけでなく、新たな治療法としての可能性を有しており、今後の展開が期待できます。



光スイッチングによる細胞活性制御の概念図 (論文より一部改変)

気になった論文

伊藤 幸裕 (いとう ゆきひろ)
 京都府立医科大学医学研究科 講師
 itohy@koto.kpu-m.ac.jp

この度は、生命化学研究レター「気になった論文」の執筆を担当させていただき、心より感謝申し上げます。私は、名古屋市立大学大学院薬学研究科(宮田直樹研究室)で博士前期課程を修了し、東京大学大学院薬学系研究科(橋本祐一研究室)で学位を取得しました。その後、米国スクリプス研究所化学科(Dale L. Boger研究室)で博士研究員を務め、現在は、京都府立医科大学大学院医学研究科(鈴木孝禎研究室)にて研究を行っております。これまでは、お名前を挙げさせていただいた4名の指導教官の下、主にメディシナルケミストリー研究を行ってまいりました。

日本の大学や教育機関において、メディシナルケミストリーを中心に研究を展開している研究室はそれほど多くありません。メディシナルケミストリー研究では、大規模な化合物ライブラリーや労力、多額の費用を必要とすることがあり、どちらかと言えば企業向きの研究分野と言えるかもしれません。また、動物試験や臨床研究まで視野に入れる場合は、一つの研究室だけで実施するのは難しいでしょう。しかし、試験管レベルあるいは細胞レベルにおいて、新規な活性化合物を見出すことは、大学の研究室レベルでも十分に行える研究です。ただし、アカデミアとしてメディシナルケミストリー研究を行うには、(1)ドラッグデザインの工夫や(2)セレンディピティ的な発見が必要ではないかと私は考えています。そこで、本稿では、この2点に焦点を絞り、最近のメディシナルケミストリー研究に関する論文を紹介させていただきたいと思います。

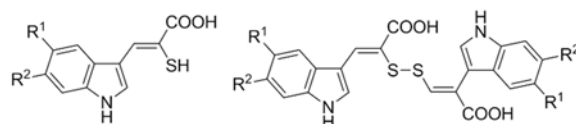
Conformationally Restricted Calpain Inhibitors

Adams, S. E.; Robinson, E. J.; Miller, D. J.; Rizkallah, P. J.; Hallett, M. B.; Allemann, R. K.

Chem. Sci. **2015**, 6, 6865–6871.

Calpainはシステインプロテアーゼの一種であり、細胞の運動をはじめ、様々な生命現象に関与している。しかし、その詳細なメカニズムは不明で、calpainのバイオロジーを解き明かすには、高活性なcalpain阻害薬の創製が求められている。そこで、著者らは新規calpain阻害薬の創製を目指した。

著者らは、まず既知のcalpain阻害薬**3**(図1)とcalpainのpenta-EF-hand (PEF)ドメインとの複合体X線結晶構造解析を行った(化合物**3**の類縁体がPEFドメインに作用することが知られている)。その結果、阻害薬**3**は図2AのようにPEFドメインの疎水性ポケットに結合していることがわかった。この部位は生体内のタンパク質性calpain阻害物質として知られるcalpastatinが結合する部位と同じであることもわかった(図2B)。特に注目すべきは、阻害薬**3**のプロモインドール構造がcalpastatinのLeu 660の側鎖を認識する疎水性ポケットと同じである点と、その近傍にはcalpastatinのLeu 656の側鎖を認識する疎水性ポケットがある点であった。そこで、2分子の阻害薬**3**をジスルフィド結合で連結し



- | | |
|--|--|
| 3: R ¹ = H, R ² = Br, IC ₅₀ = 0.5 μM | 4: R ¹ = H, R ² = Br, IC ₅₀ = 0.10 μM |
| 24: R ¹ = Cl, R ² = H, IC ₅₀ = 1.5 μM | 25: R ¹ = Cl, R ² = H, IC ₅₀ = 0.018 μM |
| 26: R ¹ = Br, R ² = H, IC ₅₀ = 0.5 μM | 27: R ¹ = Br, R ² = H, IC ₅₀ = 0.01 μM |
| 28: R ¹ = I, R ² = H, IC ₅₀ = 0.5 μM | 29: R ¹ = I, R ² = H, IC ₅₀ = 0.015 μM |
| 30: R ¹ = H, R ² = Cl, IC ₅₀ = 1.0 μM | 31: R ¹ = H, R ² = Cl, IC ₅₀ = 0.028 μM |
| 34: R ¹ = H, R ² = I, IC ₅₀ = 0.5 μM | 35: R ¹ = H, R ² = I, IC ₅₀ = 0.01 μM |

図 1 化合物 **3**, **4**, **24–31**, **34**, **35** の構造とその calpain 阻害活性。

たハイブリット化合物**4**(図1)が二つの疎水性ポケットに同時に納まると考え、化合物**4**とPEFDメインの複合体の結晶化を目指した。阻害薬**3**は還元剤非存在下の緩衝液中で速やかにジスルフィド体**4**へと変化されることがわかった。この知見を基に、化合物**4**を改

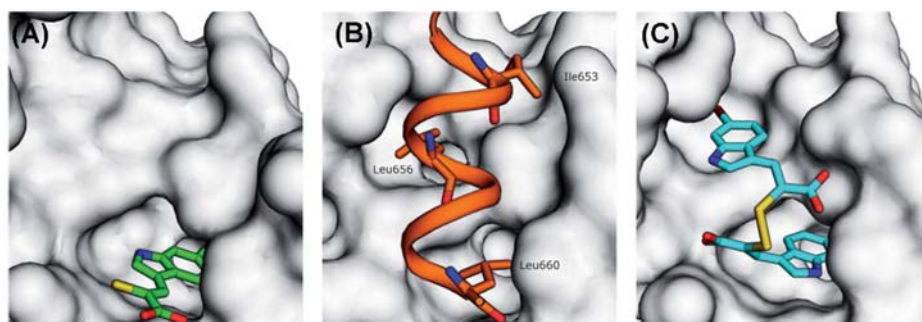


図 2 (A) calpain PEF と化合物 **3** の X 線結晶構造 (PDB code: 4WQ2). (B) calpain PEF と calpastatin の X 線結晶構造 (PDB code: 3BOW). (C) calpain PEF と化合物 **4** の X 線結晶構造 (PDB code: 4WQ3). (論文より抜粋・一部改変)

めて合成することなくcalpainとのX線結晶構造解析を行った。その結果、期待通り化合物**4**の二つのプロモインドール構造がそれぞれ二つの疎水性ポケットに同時に納まっている複合体結晶が得られた(図2C)。

続いて、還元剤存在下および非存在下にて、化合物**3**とその類縁化合物(図1)のcalpain阻害活性を評価した。その結果、すべての化合物において、還元剤非存在下の方が高いcalpain阻害活性を示した。すなわち、ジスルフィド体の方がチオール体に比べ高い活性を示した。なお、ジスルフィド結合による配座固定化が重要で、硫黄原子をメチレン基に置換した構造を持つ化合物の阻害活性は不十分であった。

今回見出されたcalpain阻害薬はジスルフィド結合を持つジカルボン酸体である。そのため、細胞評価系で用いるのは難しいかもしれない。しかし、疎水性ポケットに相互作用する置換基を種々導入し、構造最適化を行う単純なメディスナルケミストリー手法ではなく、ジスルフィド結合連結による二つの化合物のハイブリット化というアイデアを基に、ジスルフィド体が高活性化合物であることを見出した彼らの手法は賞賛すべきであろう。本文中では、「図2AのX線結晶構造解析後に、ジスルフィド体を実験的に設計した」というような論調で書かれていた。しかし、実際には、還元剤の有無で化合物の阻害活性に違いがあると実験者が気づき、そこからジスルフィド体が高活性種であると仮定し、研究を進めたのではないだろうか。

Chemical Modification of a Dehydratase Enzyme Involved in Bacterial Virulence by an Ammonium Derivative: Evidence of its Active Site Covalent Adduct

González-Bello, C.; Tizón, L.; Lence, E.; Otero, J. M.; van Raaij, M. J.; Martínez-Guitián, M.; Beceiro, A.; Thompson, P.; Hawkins, A. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 9333–9343.

1型デヒドロクイナーゼ(DHQ1)は、3-dehydroquinateの脱水反応を触媒する酵素で、細菌による病気の発生を防ぐ抗病原性薬の分子標的とされている。著者らはDHQ1の新規阻害薬の創製を目指し、研究を行った。

DHQ1の触媒機構は図3Aに示すように酵素内のリシン残基と基質のカルボニル基との間で起こるシッフ塩基形成が反応の鍵となることが知られている。そこで、著者らはこの触媒機構を基に不可逆的阻害薬として化合物**8**を設計した(図3B)。実際に化合物**8**を合成し、活性評価を行った結果、化合物**8**はDHQ1を

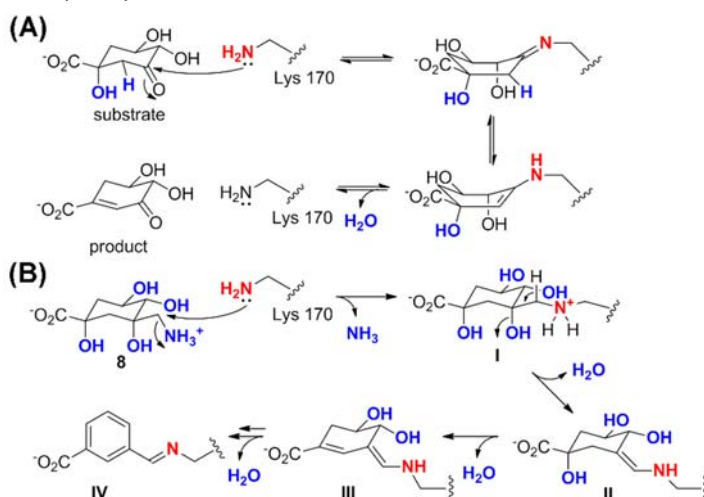


図 3 (A) DHQ1 の酵素触媒メカニズム. (B) 化合物 **8** の構造とその DHQ1 阻害触媒メカニズム

強く阻害することがわかり、その阻害は不可逆的であることがわかった(阻害パラメータ K_i および k_{inact} 値は $905 \mu\text{M}$ および 5.3 ms^{-1} であった)。次に、阻害メカニズム解析のため、X結晶構造解析・質量分析・計算化学解析を行ったところ、図3Bに示すメカニズムでDHQ1を阻害することが示唆された。すなわち、リシンの側鎖アミノ基の求核攻撃の後、脱水反応が繰り返され、阻害薬の6員環構造は安定な芳香環構造に変化することがわかった。

化合物8が、図3BのようなメカニズムでDHQ1を阻害するのは有機化学的に興味深い。著者らが、設計段階において、どの程度阻害メカニズムを予想していたかについては明記されていないが、このような触媒反応依存的な阻害薬は、酵素阻害薬を設計する際のヒントになり得るであろう。

A General Strategy for Targeting Drugs to Bone

Jahnke, W.; Bold, G.; Marzinzik, A. L.; Ofner, S.; Pellé, X.; Cotesta, S.; Bourquier, E.; Lehmann, S.; Henry, C.; Hemmig, R.; Stauffer, F.; Hartwig, J. C.; Green, J. R.; Rondeau, J. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 14575–14575.

Zoledronate (**1**, 図4)のような含窒素ビスホスホネート(N-BPs)は、骨組織に対する高い親和性と強力なファルネシル二リン酸合成酵素(FPPS:メバロン酸経路における代謝酵素で骨疾患における分子標的)阻害活性を有することから、骨疾患治療薬として広く用いられている。一般にN-BPsは安全性の高い効果的な薬剤であるが、更なる適応拡大や経口吸収性の改善、強力なFPPS阻害に基づく副作用低減という点で改善の余地が残されている。しかし、骨組織への親和性とFPPS阻害活性を同時に調整することは難しく、骨疾患を対象とした新規FPPS阻害薬の創製は困難を伴う課題である。これまでに著者らは、アロステリック部位結合型のFPPS阻害薬として化合物9(図4)を見出しているが、化合物9は骨組織移行性を示さなかった。そこで本研究では、骨疾患を対象としたアロステリック部位結合型FPPS阻害薬の創製を目指した。

著者らは、かつて抗てんかん薬として臨床試験が行われていたAMP397 (**4**, 図4)が十分な経口吸収性と中程度の骨組織親和性を有することを偶然知った。すなわち、モノリン酸構造でも骨組織親和性を十分確保できることを示している。そこで、著者らはFPPS阻害薬9のカルボン酸部位にリン酸構造を含む構造を導入したところ、化合物11および12が4と同程度の骨組織親和性を有していることがわかった。また、フレキシブルな脂肪族リン酸構造が、骨組織親和性に重要であることがわかった。本文中では、化合物11および12のFPPS阻害活性について明言していないが、これらを”best-binding allosteric FPPS inhibitors”と表現していることから、FPPS阻害活性を有していると考えられる。すなわち、著者らは、骨組織親和性を有し、ビスホスホネートの構造を持たないFPPS阻害薬を見出した。

AMP397 (**4**)の経口吸収性と骨組織への親和性に気付いたことについて、著者らは”serendipitous discovery”と表現している。「どのような構造を持つ化合物が骨組織への親和性を有しているのか」ということを日頃から考えていた彼らだからこそ、4が持つ骨組織親和性に気づけたであろう。

本稿では、メディシナルケミストリー研究における(1)ドラッグデザインの工夫と(2)セレンディピティ的な発見に着目し、3報の論文を紹介した。紹介した論文で報告されている活性化合物は、著者らが日頃から課題解決に向け、化合物の構造と向き合い、真摯に研究に取り組んだ結果、見出されたものに違いないであろう。大学に身を置くメディシナルケミストとして、私自身彼らの姿勢を見習いたい。

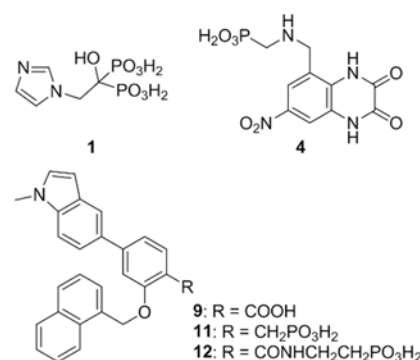


図4 化合物1, 4, 9, 11, 12の構造

ミシガン大学より

～有機合成化学からバイオ工学へ～

Department of Biomedical Engineering,
Macromolecular Science and Engineering,
University of Michigan, USA

高山 秀一
(takayama@umich.edu)



筆者は、1994年に森謙治教授(東京大学農学部)の元で修士号を取得した後、1998年にChi-Huey Wong教授(The Scripps Research Institute, La Jolla, California)の元でPhDを取得し、2000年までGeorge Whitesides教授(Harvard University)の元でポスドクをしました。2000年から、ミシガン大学のBiomedical Engineering Departmentで独立して研究と教育を行っています。

留学した理由

いくつかの理由がありました。まず、修士論文の指導教官であった森謙治先生の引退が間近だったこと。アメリカの大学院では授業料や生活費一部を大学や研究室で持ってくれること。かつて、Chi-Huey Wong先生のもとで研究をされた先輩方から興味深いお話を聞いたり、論文を読んでいたこと。また、Scripps Research Instituteからは、他にも興味深い論文がいくつも出ていたことなどです。あとは私自身、新しいこと、変わったことがもともと好きだったことでしょうか。

PhD研究の始まり

授業が始まる二か月前にSan Diegoに到着しました。まずWong先生から酵素を利用した糖の合成をテーマなのか、と私には思えるような感じで課題として頂き、研究室で張り切って言われた通りに実験を始め、合成を行ったことをWong先生に報告しました。素早く、言われた通りに実験を成し遂げたので喜ばれると期待したのが、先生からは、“なぜそんなにつまらない既知の合成をしているのだ?”と言われ、先生が言った通りにやったのにおかしいな、と感じ、研究室の先輩ポスドクに相談してみたところ、それは“当たり前だろう”という答えが返ってきました。Wong先生の下では、新しい事、先生やまだ誰も考えていない事を考案し研究することが期待されていたのです。それからは、先生に言われたことを間違えなく成し遂げるというやり方から、失敗も覚悟で、とにかく新しいこと、変わったことをやってみよう、というやり方にかえました。

PhDの授業

とても驚いたのは、各クラスから出される教科書と論文を読む量です。皆、英語が解るから早く読める。というような量ではなく、絶対に読み切れないという量の教科書の進み具合と資料の数を与えられます。いかに重要なポイントを早く見出すかを訓練されたように思います。もう一つ感じたことは、授業の内容の幅の広いこと。化学とは思えないような論文やアイデアも先生が面白いと思ったことを色々と紹介されます。それによって、読んで面白いと思える論文の種類がかなり広がりました。J. Am. Chem. Soc.やJ. Org. Chem.やTetrahedronを主に読んでいたのがScience, Nature, PNASなどにも親しむようになりました。今では、気軽なインターネットのお蔭で、皆さまが効率よく幅広く論文を読むことが出来ると思いますが、当時はまだ実際に図書館に行って論文を手にして読まなくてはならなかったので授業の押しがなければ、かなり狭い範囲にとどまっていたらと思います。

PhDからポスドクへ

PhDを終える頃、ポスドク先について色々考えました。考えた先は、おそらく将来ノーベル化学賞の受賞があるだろうという有機合成系の先生の研究室か、なんだかよくわからないが面白くて変わったことをしているという感じのWhitesides研究室でしたが、最終的に、Whitesides研究室に決めました。理由としては、Wong研究室で合成していた糖鎖が体内ではMultivalentに働いているので、Surface Chemistryをやってみると面白いかもしれないという事と、なんだかよく分からないけど面白そうだという魅力にひかれたことです。

Bostonでのポスドク

San Diegoでは、とても気候も良く、当時はまだそれ程生活費の高い地域でもなく、また、Scripps Research Instituteは小さく新しい大学院だったので、とても親切で面倒見のよいところでした。それとは反対で、Bostonでは生活費は高く、全てが密集していて、San Diegoでいつも見ていたような海岸がなく、大学は規模が大きい為か大学側もあまり面倒見がよくなく、慣れるのに時間がかかりました。

研究者自体は、特に、日本やScripps Research Instituteより優秀という感じを受けませんでした。期待度と自信がとても高いということを感じました。それまでは、レベルの高い論文（具体的にはJ. Am. Chem. Soc.）が出ると凄いという感じだったのが、レベルの高い論文が出て当たり前という感じです。皆その上をいくにはどうしたらいいかを考えていると感じました。そういう期待の高さは、プレッシャーでもありましたがとても良い経験となりました。ひとつ気が付いたことは、まああの論文ととてもよい論文とで必ずしも労力と時間の差はそんなに違わないということです。何か一捻り、メカニズムを少し分析する、生体内の現象に少し関連させる、など、何かインパクトを高める方法はないかということのを常に考えるようになりました。もう一つ Whitesides研究室で学んだことは論文の書き方です。有機合成の論文は目的がかなりはっきりしているので（全合成、新しい反応、など）、どういう風の実験をやったかということのをきちっと書けば読者に内容が伝わります。ところが、Whitesides研究室の論文は、なぜこんなことをやることに価値があるのかということのを説得するということから始まります（例えば、なぜ Microfluidicの形のゴム印鑑を作ることが大切なのかなどです）。短く、分かりやすく、やっていることの重要性と可能性を伝えなけ

ればなりません。それができて初めて何をどうやったかを書きます。さらに難しいことに、これを Whitesides 先生が納得するように書かないと投稿できません。当時どの様に論文が書き上がったかと言いますと、自分と先生以外の他の著者となるべく良い論文の骨組みを書き上げて印刷します。先生が出張中にその下書き論文を持って行き、ホテルで休む前に読み、赤ペンで思いっきり修正をします。その修正量はびっくりする量で、初めはかなりがっかりしました。しかし、自分だけではなく皆そのように質問と修正を受けているということを知り、慣れていきました。現在では、自分自身、学生の論文を修正する側になり、あのような指導はなんとありがたかったことかと思えます。Whitesides 方式の論文の書き方は、Adv Mater 2004,16,1375 に詳しく説明されています。最初の論文 (PNAS 1999) では、なかなか自分の力ではよいイントロダクションが書けませんでしたので、何回か先生とやり取りをしているうちに、とうとう Whitesides 先生にほとんど書いていただくということになりました。最終的に、自分自身でほとんどどうまく書き上げられたと納得出来た論文はポストドクが終わるその月にやっと書き上げた論文でした (Adv Mater 2001)。

最初に始めた実験は、multivalent carbohydrate display を目指した surface chemistry の研究でしたが、ある日グループミーティングで microfluidics の層流というそれまで見たことのない現象を知り、その現象を細胞培養に利用できないかと思い、研究室の仲間に相談しました。すると、直ぐに数人が手伝ってくれ、ちょっとした実験を行うことができました。結果を報告すると Whitesides 先生も関心を示して下さり、ポストドク二年間は、ほぼその偶然の巡り合いとそれから得たアイデアを生かして研究をしました。まったくの異分野 (マイクロテクノロジーと細胞培養) のアイデアを思いつき直ぐに試せたのはとても幸運なことでした。

ポストドク一年後頃に就職活動を始め、全米百校近くの大学に応募し、その殆どは有機合成化学科でしたが、応募大学の一つとして、ミシガン大学の倉林活夫先生に紹介していただいた、ミシガン大学バイオ工学科にも申し込みました。数大学から面接をしていただける機会を得ることが出来ましたが、面接は実験や論文を書くのとはまた全然違う難しさがありました。履歴では有機合成、しかし、やりたい研究は Microfluidics と細胞生物学、発表経験乏しく、人と話すのは苦手。今思い返すと面接先の大学の下調べも不十分。かなり面接では苦戦しましたが、お陰様でミシガン大学で研究し、教鞭をとる機会を得ました。

ポストドク二年目には、細胞生物学専門の Don Ingber 先生の研究室でも実験させていただく機会がありましたが、その際、Visiting Scholar で来られていた成瀬恵治先生に、細胞や顕微鏡のことを色々教えて頂き後の研究活動にとっても役に立ちました。

Michigan 大学にて

ミシガン大学に到着してから実際の研究室を得るまでに一年ぐらいかかりました。場所・部屋自体はあるのですが、必要な空調機や電源を引くのに我々の研究室だけでなくビル全体を改修しなければならないというのです。さらに、ミシガンは労働組合がとても強く、大工さんの段取りが非常に複雑なのでますます時間がかかります。分業が厳しく取り決められており、簡単なこと (例えば絵を掛ける釘を打つ) でもその担当の職人しかできません。さらに、ミシガンでは、秋に鹿狩りの期間があり、その数週間の間は職人さんが狩りに出かけてしまうのでほとんど工事が進まないのです。仕方なく、すでに買ってあった顕微鏡は小さな押入れ部屋に置きしばらく忍びました。

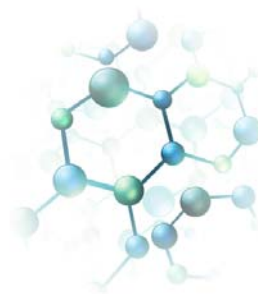
もう一つのチャレンジは学部からポスドクまでずっと理学部系の化学の研究室で学んでいたの
で工学部の感覚とバックグラウンドが全くなかったということです。初めは他の先生の授業科目の話
や、学生が提示してくる実験計画でよく理解できないところがたくさんあり、有機合成の研究では、
まず一番やりやすい反応をやってみて、それから必要があれば他の方法を考えるという取り組み方
をしていましたが、工学部の学生は流路を作る前にデザインのシミュレーションをしたいと言って
きました。簡単に試せるのでまず実験を実際にやってみようよと説得するのに最初はかなり苦労し
ました。逆に、こちらが学ぶこともたくさんありました。最近では、モデリングやシミュレーショ
ンの重要性も少しずつ理解して研究に取り入れることが出来るようにもなり、よくもこんなに工学
部のことが分からない私のようなものを雇ってくれたものだなと思います。あとで聞いたところ学
部内でもかなり議論したようです。最終的には、成功したら面白いので失敗も覚悟で雇ってみよう
ということになっていたらしいです。

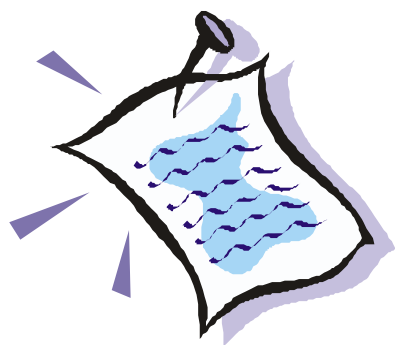
ミシガン大にて15年発ちますが、調子の上がり下がりが何度もありました。過去十年だけでも
年間研究費は三倍ぐらい上がったたり下がったりしています。自分の給料の25%は直接研究費から
取ってこなければならないので、学生のための支払いをできるように自分の給料を切り詰めるとい
うこともあります。アメリカでは、研究室が大学院の学生の授業料、生活費、保険料、さらに間接
経費を研究費から支払わなければなりません（ミシガン大学では、学生一人で年間一千万円ぐらい
必要です）。この研究と教育の運営の仕方は、研究費集めという面では大変なのですが、人材に対
する意識を高めるという面ではよい効果もあると思います。大学と先生側は良い学生をリクルート
するのにかなりの時間と経費を使います。よさそうな学生は大学側が経費もちで招待して入学勧誘
します。学生側も面白い研究室はどこか、自分の学費と生活費を持ってもらえる研究室はどこか、
将来の進路はどうなるか探り、良いと思う研究室には一生懸命に自分を売り込みます。教授側も学
生側もかなり真剣に入学先、研究室を探します。さらに、入学後も、教授も学生も自分の生活費が
直接研究費取得にかかっているの、自然と気合が入ります。

研究は一人、一研究室のみで出来ることではありません。良い研究仲間、良い秘書さんたち、
大学側のサポート、家族の協力があってこそ出来ることです。アイデア、研究費、研究施設等をサ
ポートして下さっている大学と周りのよい先生方に感謝しています。途中四年間は、韓国のUlsan
National Institute of Science and Technology (UNIST)においても、ミシガンと掛け持ちで研究室を持た
せていただきました。実際の実験をやってくれた多くの学生やポスドクの方々に感謝しています。
最初の頃は、論文を出すこと、研究費をとることが研究者として最も重要な事と考えておりました
が、最近是人材育成の大切さを感じます。論文が出る嬉しさもありますが、学生やポスドク(卒業
生の20人位が世界中の大学で活躍しています)の就職先が決まり、さらにその後、良い仕事をし、
良い家族を育てているのを見聞きするのは喜ばしい事です。

筆者の研究室や学部に興味のある方は、以下のwebsitesをご覧ください。

<http://microfluidics.engin.umich.edu>





シンポジウム等会告

日本化学会 第96春季年会 (2016)

特別企画7 生命化学研究から見た CO₂資源化：光合成研究と人工光合成の融合を目指して

日時： 2016年3月24日(木) 学会初日午後

場所： 同志社大学 京田辺キャンパス S2会場

趣旨： 化石燃料枯渇という資源問題や大気中 CO₂濃度増大による地球温暖化といった深刻な環境問題を背景に、CO₂の資源化が活発に研究されている。本特別企画では生命化学研究の立場から、光合成生物による CO₂濃縮・固定反応機構に関する研究や光合成機能強化を目指した研究、また光が届かない地下圏における微生物による CO₂資源化の研究などを紹介する。さらに化学的手法による CO₂還元あるいは固定反応系や、光反応との組み合わせによる人工光合成構築に関する研究について紹介することによって、光合成と人工光合成の研究者の架け橋となる講演会を期待する。

プログラム 3月24日(木) 午後

座長 藤井郁雄 (大阪府大理)

13:30-13:50 趣旨説明 (北里大院理) 石田 斉

座長 高木昌宏 (北陸先端大)

13:50-14:15 微細藻類における CO₂濃縮機構-モデル緑藻における無機炭素輸送体の機能と発現 (京大院生命科学) 福澤秀哉

座長 青井啓悟 (名大院生命農)

14:15-14:40 光合成 CO₂固定酵素 RuBisCO の機能進化研究からの CO₂資源化への展開 (神戸大院人間環境) 蘆田弘樹

座長 長崎 健 (大阪市大院工)

14:40-15:05 生物電気化学や地球生命工学的手法による持続的 CO₂資源化・利活用システムの創出 (海洋研究開発機構 海底資源研究開発センター) 稲垣史生

座長 和田健彦 (東北大多元研)

15:05-15:30 シアノバクテリア光化学系Iとギ酸脱水素酵素を用いた光駆動型 CO₂固定反応 (信州大農) 伊原正喜

座長 中島裕美子 (産総研)

15:30-15:55 CO₂を用いる炭素-水素結合の直接カルボキシル化反応 (東工大院理工) 岩澤伸治

座長 民秋 均 (立命館大院生命科学)

15:55-16:20 CO₂還元光触媒の開発 (東工大院理工) 石谷 治

座長 三原久和 (東工大院生命理工)

16:20-16:30 おわりに (島津製作所) 土渕 毅

企画 責任者: 石田 斉 (北里大学大学院理学研究科)

E-mail: ishida@sci.kitasato-u.ac.jp

(石田 斉)



第14回ホスト・ゲスト化学シンポジウム

<https://sites.google.com/site/hgcs2016/>

会 期: 2016年6月4日(土)~5日(日)

会 場: 高知城ホール (〒780-0850 高知県高知市丸ノ内2丁目1-10)

主 催: ホスト-ゲスト・超分子化学研究会 (AHGSC)

討論主題: 「分子認識」と「超分子」を中心とする有機化学・無機化学・分析化学・高分子化学・生化学・生体関連化学・材料科学・超分子化学・バイオテクノロジー化学など、分子間相互作用が関わるすべての研究が討論主題に含まれます。

特別講演: 秋吉一成先生 (京大院工)、Kimoon Kim 先生 (浦項工科大、韓国)

発表形式: 口頭発表 (質疑応答含め20分を予定)

ポスター発表 (ポスター賞を設けています)

発表申込期間: 3月7日(月)~4月8日(金)

予稿原稿期間: 4月1日(金)~4月26日(火)

事前参加登録申込期間: 3月28日(月)~5月20日(金)

発表申込方法: 上記シンポジウムHPを参照

連絡先: 大阪市立大学大学院工学研究科化学生物系専攻 長崎 健

〒558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138、TEL: 06-6605-2696、FAX: 06-6605-2785、E-mail: hgcs2016@gmail.com



HGCS Japan Award 公募のお知らせ

上記シンポジウムでは、Springer 社発刊 Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 誌と連携して、賞「HGCS Japan Award of Excellence 2016」を設け公募しております。受賞者には、シンポジウムにおいて受賞講演をお願いすると共に、上誌へ掲載する総説の執筆を依頼します。掲

載論文には "HGCS Japan Award of Excellence 2016" と明示されます。

応募資格：本年度シンポジウムにおける 45 才以下（2016 年度末時点）の発表者（登壇者に限らない）で、総説執筆時に筆頭著者となれる方。執筆内容の研究推進に中心的な役割を果たした方。

応募方法：執筆予定の総説について【題目（英文）・著者名（連名可）・所属/連絡先・研究経歴・概要（日本語で 500 字程度）・主な引用文献（10 編程度）】を上記メールアドレスへご送信下さい。

なお、Subject 欄に『HGCS Japan Award 応募』と記載して下さい。

応募締切：2016 年 4 月 8 日（金）

（長崎 健）



第 63 回トキシシンポジウム～山形・天童カンファレンス～

第 63 回トキシシンポジウムを下記のように、山形県・天童温泉にて開催することになりました。現在講演演題を募集しております（平成 28 年 2 月 29 日〆切）。皆様のご参加、ご発表の申し込みをお待ちしております。なお、参加、演題登録方法の詳細については、シンポジウムのホームページ http://www.agri.tohoku.ac.jp/hozo/toxin_sympto/index.html をご参照ください。

開催日：平成 28 年 7 月 14 日（木）～7 月 16 日（土）

会場：山形県天童温泉 ほほえみの宿 滝の湯

〒321-2522 山形県天童市鎌田本町 1-1-30 TEL 0288-77-1313（代）<http://www.takinoyu.com>

参加費：2 泊 3 日（朝・夕食、懇親会、予稿集代込み）

一般会員：30,000 円、学生会員：20,000 円（発表演者のみ）、非会員：35,000 円（発表しない学生会員の参加費は一般会員と同額になります）

演題登録締切：平成 28 年 2 月 29 日（月）

発表形式：

① 若手奨励演題：口頭発表（質疑を含めて 15 分～20 分程度を予定）。若手奨励演題での発表者は、平成 28 年 4 月 1 日時点で満 35 才以下の者、または発表時に大学院修士課程あるいは博士課程の学生である会員に限ります。なお、若手奨励演題の中から、特に優れた発表をし、これからの生物由来生理活性物質研究の発展に貢献しうる若手会員に対し、「毒素シンポジウム奨励賞」を授与します。

② シンポジウム指名講演：口頭発表（質疑を含めて 20 分～30 分を予定）

③ 交流演題：2～3 分でのサロン形式、懇話会場での口頭発表とポスターなどによる交流

問い合わせ先：第 63 回トキシシンポジウム実行委員会 事務局 小川 智久

〒980-8577 仙台市青葉区片平 2-1-1

東北大学大学院生命科学研究科 生命素子機能分野内

E-mail: tomohisa.ogawa.c3@tohoku.ac.jp

Tel: 022-217-6206（直通）

（小川 智久）



【編集後記】

17年に渡り、のべ377名の執筆者によるボランティア寄稿に支えられ続け、本日生命化学研究レター第50号の発刊に至りました。編集委員一同、皆様のご協力に心より感謝申し上げます。

改めてアーカイブを遡ってみますと、本誌は日本における生命化学研究の軌跡の記録そのものだということを実感します。そして17年経った現在でも、本誌の持ち味である「堅苦しくなく、分かりやすく」をモットーに、皆さんの自由闊達な意見や思いが込められた記事が寄せられ、年3回、充実したコンテンツの発行がなされてきました。時折研究会外から「面白かった」との感想をお聞かせ頂くと、本誌がこれまで会員間の議論や情報交換の場を提供してきただけでなく、会を超えたコミュニティ間の懸け橋的な、ボランティア誌らしい役割も担ってきたことに気づかされます。

冒頭の藤井会長のメッセージによれば、2016年は生命化学研究会創立20周年でもあるようです。本誌のコンテンツはここ数年定着していましたが、本研究会の魅力である、ヘテロな集団による建設的な議論、そしてトライアンドエラーが許される?懐の深さに鑑みれば、レター誌も柔軟に、より良いものを目指して行ければよいと思います。皆さんからもぜひ色々なアイデアをお聞かせ下さい。そしてこれからも広く親しまれるボランティア誌を作ってゆきましょう。次号 (No. 51) は、井原さんのご担当により、2016年6月頃の発行を予定しております。どうぞお楽しみに。

2016年（平成28年）2月8日

大神田 淳子

生命化学研究レター編集委員

第50号編集担当：大神田 淳子
京都大学、johkanda@scl.kyoto-u.ac.jp

井原 敏博
熊本大学、toshi@chem.kumamoto-u.ac.jp

松浦 和則

鳥取大学、ma2ra-k@chem.tottori-u.ac.jp

