

生命化学研究レター

(2017年2月)

2. 巻頭言

国際ネットワークの発展を願う！～競争と協創と協奏～

東京工業大学生命理工学院 三原 久和

4. 研究紹介

4. タンパク質の様な機能を有する高分子ナノ粒子の設計原理 ～プラスチック抗体・酵素の実現を目指して～

九州大学大学院工学研究院 星野 友

10. 低分子ゲル化剤の細胞内自己組織化に基づく新しい薬理活性の提案 ～選択的抗ガン活性を目指して～

神戸大学大学院工学研究科 丸山 達生

15. 論文紹介「気になった論文」

静岡大学学術院工学領域化学バイオ工学系列 佐藤 浩平

理化学研究所袖岡有機合成化学研究室 大金 賢司

京都大学大学院医学研究科ケミカルバイオロジー分野 浅野 理沙

26. 留学体験記

SUNY/ミシガン/UCSD ～From Art To Chemistry～

Spiber 株式会社 鈴木 雄太

34. シンポジウム等会告・受賞・次期会長選出

2016年ノーベル化学賞 Jean-Pierre Sauvage 教授 講演会・日本化学会 第97春季年会(2017)・日本薬学会 第137年会(仙台)・お茶の水女子大学リーディング大学院・第27回金属の関与する生体関連化学シンポジウム(SRM2017)・受賞報告・次期会長選出のお知らせ

編集後記

巻頭言

国際ネットワークの発展を願う！～競争と協創と協奏～の開拓

東京工業大学生命理工学院 三原久和

大学の国際化・グローバル化がうたわれて久しく、各大学でも文部科学省プログラムへの申請や教育研究体制や組織の改革に大きな時間をさかれ、努力をされていると思います。大変な時代になってきましたが、世界がこのような教育研究の国際競争激化の環境に置かれている限り、「やるしかない、やってみよう。」というのが、自身の現在の立場です。

一方、最近の世界の政治の流れを見ていると、トランプ問題が最大ですが、ポピュリズム等という言葉で、国益優先主義の観点が大きくなってきており、反グローバル化への民衆の動きだとも解説を聞きます。

しかし、アカデミアの世界での研究の国際的観点については、長い歴史があり、国際的な競争というのは今に始まったことではありません。近年は、教育の国際競争に拍車がかかっており、国際ランキングという欧米に有利な指標での評価が、それに油を注いでいるようです。これに即応できた、シンガポール国立大学 (NUS) や南洋工科大学 (NTU)、中国の清華大学 (THU)、韓国のKAIST等アジアの大学がランキングを急激に上げてきています。国の規模や各国の政策、法律の制限の差があったとしても、彼らは着実に研究と教育のシステムを改変させて、次世代の人材育成のための環境整備に投資し、努力をしていることは間違いありません。

今までの日本の大学体制のいいと思うところは、組織的な取組よりも、個人での研究や教育のやり方を大事にしてきており、それに応じた科研費等の基礎研究費を充実させてきたところだと思います。これによって、最近の連続したノーベル賞受賞者の輩出につながっているのだと思います。お隣の韓国では、基礎科学分野の研究者に韓国でノーベル賞が出るのにあと何年かかるかというアンケートをとったようです。その結果は、6～10年 (27%)、11～15年 (23%)、16～20年 (22%) だそうです。結構長くかかりそうだと考えている研究者が多いのに驚きます。韓国の研究の興隆を見れば、もう少し早く出るようには感じますが、ご存じのように、韓国・中国での多くの研究室では、資金獲得のために応用の観点まで視野に入れた研究が重視されているからでしょうか？

話を戻します。このような国際的競争が激化した教育研究環境のもとで、10年後20年後に、よりグローバル化された企業、アカデミアや国研、あるいは官で活躍する若手人材を育成することが仕事でもある我々大学教員がやっておかなければならないことは何でしょうか？論文数の減少も問題視されていますが、国際的な研究者ネットワーク構築の伸びにおいて近年、アジアの中韓シンガ

ポールには、差をつけられていると強く感じています。タイやインド、インドネシア等が国力を上げて、伸ばしてくることもそう遠くないでしょう。

生命化学研究会では、発足当時から、個人の切磋琢磨と小さいですが組織としての集団の取組の相乗効果を目指して活動をしています。アジアや欧州とのシンポジウムを含めて関係強化の取組を積極的に行っており、皆様が関係している他の学会・研究会とも協力して、成果をあげていると思います。今後の国際的な競争環境下においては、協創の観点での各国の友人との研究ネットワークの構築はますます重要であり、それが次世代の研究者にとって、やりやすい環境となってゆくためにも、若い研究者も含めた積極的活動を促さなければいけないと感じています。

国の予算も限られて、取組に多大な工夫が必要な時代ですが、逆に問題点が見えてきた今が各研究者、研究グループや大学等のチャンスの時だと思っています。日本人特有の工夫のうまさを活かして、研究者のネットワーク強化を、研究会や学会でのボランティア的取組と大学等の職務的な取組も協奏させて、盛り上げていきませんか？

実際、国内でも国外でも信頼できる友人が多くできることは、楽しいことです。



研究紹介

タンパク質の様な機能を有する
高分子ナノ粒子の設計原理
～プラスチック抗体・酵素の実現を目指して～

九州大学大学院工学研究院
星野 友

(yhoshino@chem-eng.kyushu-u.ac.jp)



【緒言】

タンパク質は標的分子を正確に認識し、結合・輸送し、特定の反応を触媒して高次な生命機能を実現している。タンパク質の様な高度な機能を有する安価で安定な合成高分子を合成できれば、医療・環境問題を解決するキーマテリアルとなる。例えば、抗体の様な高い抗原認識能を有する安価で安定な高分子ナノ粒子を開発できれば、プラスチック抗体として医療・診断のみならず、タンパク質生産プロセスにおける安価な分離材料として有用である。また、酵素のように温和な条件下で効率よく目的の反応を触媒する高分子ナノ粒子を開発できれば、プラスチック酵素として工業的な反応プロセス・分離プロセスを省エネルギー化できる。本稿では、汎用性のアクリル系モノマーのラジカル重合によりタンパク質の様な高次機能を有する安価で安定な水ゲルナノ粒子を合理的に設計する為の方法論を紹介する。

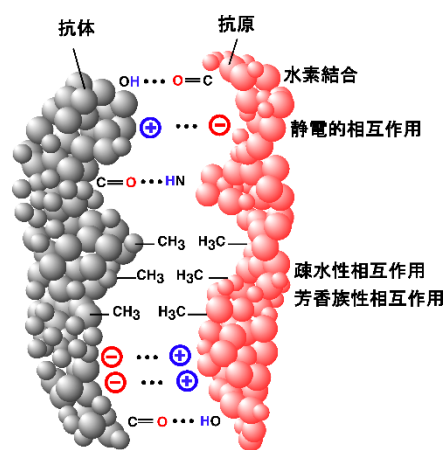


図1 タンパク質による多点認識による標的分子認識機構の模式図⁴

(1)動物の血中で毒素を認識・中和するナノ粒子“プラスチック抗体”の開発

抗体と同等の抗原認識能を持ち、抗体と同じサイズのナノ粒子をプラスチック原料のみから合成できれば、安価で安定な抗体の代替品『プラスチック抗体』として医療、診断、生体分子生産プロセス、研究試薬等に应用できる。抗体はタンパク質表面に静電的相互作用、疎水性相互作用、 $\pi-\pi$ 相互作用、水素

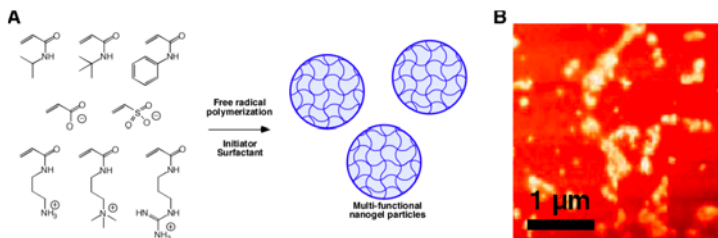


図2 A. ナノ粒子ライブラリーを構成する機能性モノマーの構造。B. 合成したナノ粒子のAFM像。

結合が可能な官能基を組み合わせることでマルチモードの多点結合により抗原と強く結合する(図1)。タンパク質の多点認識機構を模倣すべく、我々はカチオン性の膜障害性ペプチド『メリチン』をモデル抗原として、これを多点認識する合成高分子ナノ粒子の研究を行った。Pelton¹やLyon²等により開発された、*N*-イソプロピルアクリルアミドの水中擬沈殿重合法を応用し、様々な官能基を組み合わせランダム共重合した合成高分子ナノ粒子のライブラリーを作成しメリチンとの相互作用の詳細な解析を行った(図2)。その結果、特定の組合せの官能基を導入した合成ナノ粒子は標的ペプチドをマルチモードの多点相互作用

用により認識できることが明らかとなった^{3,4}。例えば、負電荷を有するアクリル酸と疎水性を有する t -ブチルアクリルアミドを組み合わせ N -イソプロピルアクリルアミドと共重合すると、正電荷を有する両親媒性ペプチドであるメリチンを静電相互作用と疎水性相互作用の組合せにより認識するナノ粒子を合成できる^{5,6}。さらに t -ブチルアクリルアミドの代わりにフェニルアクリルアミドやペンタフルオロフェニルアクリルアミドを用いると芳香族性のアミノ酸を多く有するペプチドを π - π 相互作用により認識するナノ粒子を合成できる⁷。カチオン性のモノマーであってもアンモニウム基とグアニジウム基等の違い、アニオン性のモノマーであってもその重合条件やモノマーの構造によって標的分子との相互作用は異なる^{8,9}。以上のように多官能性のナノ粒子のライブラリーを調製し、水晶発振子マイクロバランス(QCM)法⁵、酵素免疫測定(ELISA)法⁹、活性阻害法⁴など既存のタンパク質間相互作用解析の実験手法を用いて標的タンパク質との相互作用を網羅的にスクリーニングすることで任意の標的タンパク質と強く相互作用するナノ粒子を開発できる。

以上のようにして最適化されたハイドロゲルナノ粒子は、抗体と同様のサイズを持ち、血中で安定のため、マウス血中においても抗原ペプチドを認識しその毒性を完全に中和出来る⁶。ナノ粒子および抗原ペプチドの体内動態観察の結果、溶血ペプチド結合性のナノ粒子は、血中で抗原を認識・結合・中和した後に、抗原を肝臓に輸送することも明らかとなった⁶。以上のように安価な汎用性モノマーを適切に組み合わせ共重合するだけで生きた動物の血流内で標的分子を強く認識し、捕獲するだけでなく、これを肝臓に輸送することで毒性を中和するプラスチック抗体が合成できる。最近では、血管成長因子(VEGF)などガン治療における標的分子を認識するプラスチック抗体の開発にも成功している¹⁰。これらのプラスチック抗体は、プロテアーゼや酸・塩基に対して非常に安定のため、体内における医療応用やタンパク質生産の為のアフィニティリガンドや分離材料としても期待されている¹¹⁻¹⁴。

(2) プラスチック抗体のモノクローナル化の試み

抗体医薬が実用化されるようになったのは、構造が完全に規定されたヒト型モノクローナル抗体を大量生産する技術が確立されたことによるところが大きい。一方、前項で紹介したプラスチック抗体はランダム共重合により合成されるためモノマー配列や立体構造が全く規定されておらず、一つの溶液の中に無数の構造を持ったナノ粒子が存在している。故に個々の粒子と標的分子との相互作用も不均一で、非特異的な相互作用を低減することは理論的に難しい⁴。

構造の規定されたナノゲルを合成する為に鋳型として標的ペプチドを用いて重合する“分子インプリント重合法”が有効である。本手法によりナノ粒子の内部に標的分子と強く結合する結合サイトを構築できる^{15,16}。しかし、分子インプリント重合では、ペプチドを鋳型として消費する為、ナノゲルの価格がペプチドよりも高価となる。そこで、固相に標的ペプチドを固定化し、ナノゲル溶液の中から標的分子と特に強く相互作用するナノゲルを精製する“アフィニティ精製法”が有望である(図3)。アフィニティ精製により精製前に比べ標的と格段に強く相互作用するナノ粒子を安価に何度でも調製できる¹⁷。

理論的には多官能性高分子は高分子の分子量や官

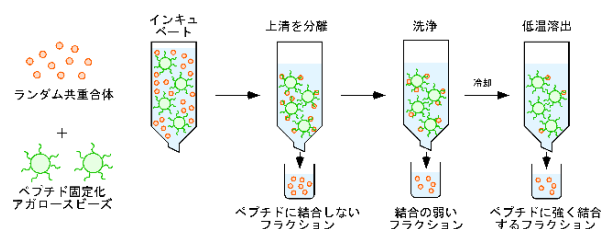


図3 アフィニティ精製によるペプチド認識性ナノ粒子の精製。

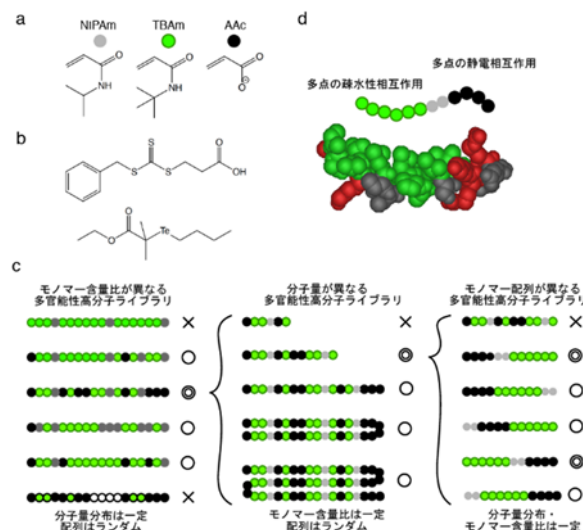


図4 リビング重合による多官能性高分子ライブラリーの合成と相互作用スクリーニングによる構造の最小化。

能基数が少ないほど構造多様性が低減され、結合の特異性が向上すると予想される。よって当然分子量が非常に大きいナノ粒子を用いる限り分子インプリント重合やアフィニティー精製法を駆使しても真にモノクローナルなプラスチック抗体は単離できない。そこでリビング重合法によりナノ粒子よりも圧倒的に分子量が小さく分子量分布の狭い多官能性直鎖状高分子を合成し構造の多様性を極限まで低減する試みを行っている(図4)^{18,19}。リビング重合法により多官能性の高分子を合成し、メリチンとの相互作用を解析したところ、面白いことに300量体程度の分子量の高分子においてはナノ粒子と同様に官能基の共重合比が結合挙動に大きな影響を与えるが¹⁸、30量体以下のオリゴマーになるとナノ粒子とは全く異なる挙動を示す¹⁹。すなわち、導入する機能性モノマーの『導入比』ではなく、『導入数』が標的結合能と強く相関する。さらに、重合度や導入数を最適化することでアミノ酸配列が非常に良く似ている二種類のペプチドから標的ペプチドのみを認識できる“特異性が高い”高分子を合成可能であることが明らかとなっている¹⁹。

30量体のランダム共重合体の構造多様性はナノ粒子に比べて非常に少なくなっている。しかし、依然として天文学的な数の構造異性体の混合物である。これらの構造多様性を極限まで低減するために、現在当研究室では、ブロック共重合、高分子の重合度による分離、アフィニティー精製法等を組み合わせて完全に“モノクローナルな”プラスチック抗体の取得を目指した技術開発を行っている⁴。

(3)タンパク質凝集体を巻き戻す高分子ナノ粒子“プラスチックシャペロン”の開発

近年、抗体医薬等のタンパク質医薬が大量に生産されている。タンパク質の生産においては、宿主細胞により大量発現されたタンパク質溶液を高度に精製して製品となるが、一連のプロセスでタンパク質が変性・凝集することが大きな問題となる。変性体を取り除く、或いは凝集体の生成を抑制するために多段階の洗練された精製プロセスが必要となり、生産コストの増大を招いている。

一方、細胞内には変性・凝集したタンパク質を可溶化し巻き戻す分子シャペロンというタンパク質群が存在し正常な細胞機能を維持している。変性状態のタンパク質は、本来タンパク質内部に存在する疎水性残基がタンパク表面に露出している。そのために周囲のタンパク質と疎水性相互作用により結合し容易に凝集、沈殿する。分子シャペロンは、変性タンパク質が他のタンパク質と相互作用する前に疎水性相互作用により変性タンパク質を捕捉し凝集体の形成を予防している(図5左)。また、多くの分子シャペロンはタンパク質内部に変性タンパク質を内包可能な、空間や溝を有している。分子シャペロンと相互作用した変性タンパク質は、シャペロン内部の空間に取り込まれ外界から隔離されて、自発的に最も安定なネイティブ構造にフォールドする(図5中央)²⁰。分子シャペロンが触媒的に変性タンパク質のフォールディングを促進するためには、正しくフォールドした後のタンパク質を敏速に放出することも必要である。その為、分子シャペロンは疎水性の変性状態のタンパク質とは強く相互作用するが親水性のネイティブ構造のタンパク質との相互作用は比較的弱い(図5右)²¹。

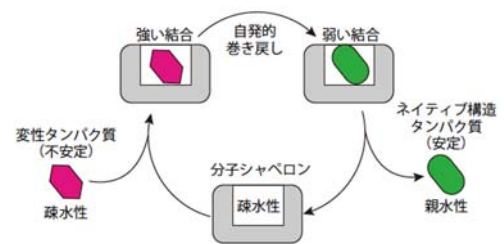


図5 分子シャペロンによる変性タンパク質のリフォールディング機構模式図。

分子シャペロンのように変性したタンパク質の疎水部と相互作用し、これを狭い空間内に孤立させることができれば、人工材料でもタンパク質の凝集を抑制しネイティブ構造にリフォールドできる。秋吉等は、疎水化した多糖から成る両親媒性ハイドロゲルナノ粒子が、疎水性相互作用により変性タンパク質をゲルの内部空間に取込み

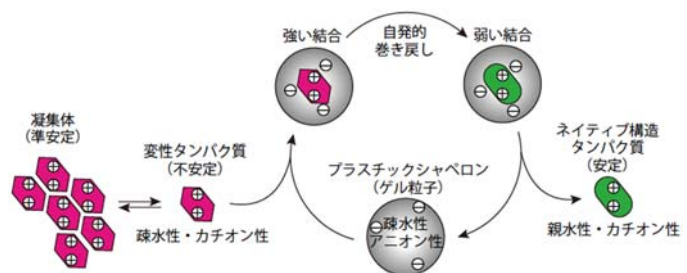


図6 プラスチックシャペロンによる変性タンパク質のリフォールディング機構模式図。

凝集を抑制できることを明らかにしている²²。さらに、化学物質の添加や外部刺激により変性タンパク質とナノ粒子との間の疎水性相互作用を弱めるとリフォールドされたネイティブタンパク質を再生できる。

最近我々は、分子シャペロンの様な機能を有する材料を安価で安定なプラスチック原料(アクリル系モノマー)のみから合成できることを明らかにした。当研究室の仲本等は、親水性、疎水性、正電荷、負電荷など様々な官能基を有するアクリルアミドモノマーを混合ラジカル重合して様々な組合せの官能基を導入したプラスチックナノ粒子のライブラリーを合成し、カチオン性タンパク質(リゾチーム)のリフォールディングを試みた。すると疎水性とアニオン性両方の官能基を導入したナノ粒子が変性したタンパク質をナノ粒子内の空間に取込み凝集を抑制できた。興味深いことに低濃度のナノ粒子を用いて同様の実験を行うと、ナノ粒子は変性タンパク質を取込み安定化するだけでなく、リフォールドされたタンパク質を溶液内に放出する。疎水性官能基のみ或いは負電荷のみを導入したナノ粒子では同様の活性を示さないことから、ナノ粒子が疎水性相互作用と静電的な相互作用の両方で変性したリゾチームと強く結合し、低濃度においても効果的に変性タンパク質を捕捉したと考えられる(図6左)。

さらに、導入する疎水性官能基や負電荷の官能基の量が最適化されたナノ粒子は、タンパク質が凝集した後であってもこれを巻き戻しネイティブ構造のタンパク質を再生できる。これは、最適化されたナノ粒子が 10^7 M^{-1} という高い結合定数で変性タンパク質と強く相互作用して、変性タンパク質を凝集体から引きはがし、ゲル内部に取り込んでリフォールドを促進すると共に、親水性のネイティブ構造のタンパク質とは弱い結合しか示さずこれを効果的に解離できるからである(図6)。結果として少量のナノ粒子が大量の凝集タンパク質(ナノ粒子1 gで10 g超)を次々に取込み、ネイティブ構造に巻き戻した²³。

以上のように、適切な官能基を有するプラスチック原料を組み合わせて重合するだけで、凝集したタンパク質を巻き戻す機能を持った人工シャペロン『プラスチックシャペロン』を合成できるようになった。現在は、リゾチームのフォールディングしか報告されていないが、ナノ粒子ライブラリーの中から最適な組成をスクリーニングすることで任意のタンパク質凝集体を効率よく可溶化する安価で安定なプラスチックシャペロンの開発が可能であろう。

(4) ナノの物性制御による標的分子結合・解離速度の設計

動物体内におけるプラスチック抗体の抗原中和量は、*in vitro* 実験における抗原中和量の僅か5分の1程度に低下する⁶。また、上述のプラスチックシャペロンは、凝集したタンパク質の全てを可溶化して巻き戻せない²³。これは、ナノ粒子が標的分子と結合する過程と競合してナノ粒子が代謝される、或いは標的分子がより安定な状態に変化する過程等、現実の世界には様々な素過程が競合的に存在する為である。生体内や工業的な化学プロセスは、非平衡且つ動的なシステムであるため、実世界でタンパク質の様に機能する合成材料を実現するには、結合の強さだけでなく、結合の速さまで設計する必要がある。

プラスチック抗体の研究で標的分子と相互作用する官能基のナノ粒子内の密度と相互作用の『強さ』には強い相関があることがわかっていたが、相互作用の『速さ』についての知見は得られていなかった⁶。そこで我々はナノ粒子内で標的分子と相互作用する官能基の密度は一定で、高分子鎖の密度や柔軟性が異なるナノ粒子を合成し、標的分子との相互作用動力学を詳細に解析した。その結果、標的分子との相互作用の強さ(平衡定数)や結合・解離速度定数が、ナノ粒子内部の高分子密度や高分子鎖の柔軟性に依存することを見いだした^{24,25}。例えば、*N*-イソプロピルアクリルアミドから成るナノ粒子は低温では膨潤し高分子鎖がランダムコイル状で高い運動性を示すが、相転移温度以上では収縮し高分子鎖がグロービュール状の固い構造となる。同じ官能基密度を有するナノ粒子と標的タンパク質の相互作用は、グロービュール状のナノ粒子よりもランダムコイル状のナノ粒子の方が強くなり、相転移温度付近ではさらに強い²⁴。これは高分子鎖の柔軟性により官能基が効果的に標的分子表面に適合する induced fit に似た結合安定化機構によ

ると考えられている。一方、同様の官能基密度と柔軟性を有するナノ粒子であれば高分子密度が変化しても結合の強さは変化しない²⁵。しかし、高分子密度が高くなると標的分子の結合速度と解離速度が等しく低下する。これは、ナノ粒子内部の高分子密度上昇により標的分子がナノ粒子表面あるいは粒子内部を拡散し、安定な結合部位へのアクセスが阻害されるためである。これらの知見は、動物体内や工業的な化学プロセス等実際の開放系システムでナノ粒子を効率よく活用する際の材料設計の重要な指針となると考えている。

(5) プロトンインプリント法によるナノ粒子の pK_a チューニング

最近ではよりダイナミックな機能を有するナノ粒子の開発を目指し、酵素をモデルとしたナノ粒子の設計原理の開発に着手している。

酵素は、標的分子との結合や光や熱刺激に応じてタンパク構造を変化させ、活性部位周囲の誘電率や隣接イオンとの距離を変化させることで活性部位に存在するカルボン酸、アンモニウムイオン、イミダズリウムイオン等の pK_a を可逆的に変化させて効率的なイオン分離や輸送を達成している²⁶。例えば、ヘモグロ빈は、ヘムへの酸素の結合がタンパク質構造変化を誘起し、この構造変化によりタンパク質表面のアンモニウムカチオンが疎水鎖に覆われ脱イオン化される。すなわちアンモニウム基の pK_a が低下する。この pK_a 低下は、血液の pH 低下を誘発し、肺の毛細血管からの効率的な炭酸ガス(重炭酸イオン)の排出を可能にしている(ボーア効果)²⁷。

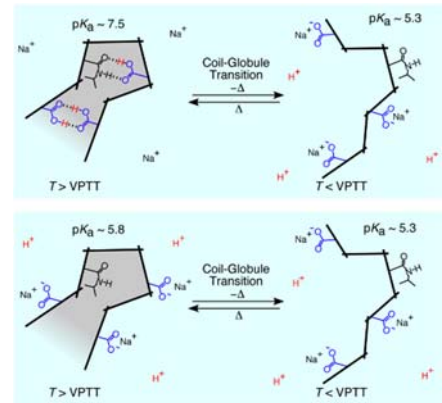


図7 (上)酸性条件、(下)中性条件下で pNIPAm内に導入されたアクリル酸のプロトン化状態の模式図。

我々はナノ粒子内に導入されたアクリル酸の pK_a もまたナノ粒子の体積相転移前後で大きく可逆的に変化することを見いだした。これは、膨潤状態では官能基の周囲は高極性の水に覆われるためカルボン酸はイオン化されやすく(低 pK_a) なるが、収縮状態では低極性の高分子鎖に覆われてイオン化しにくくなる(高 pK_a) 為だと考えられる。さらに、ナノ粒子の重合水溶液を酸性にしてカルボン酸をプロトン化させた状態で重合するとカルボン酸の pK_a がさらに高くなる。これはプロトンを鋳型としたインプリント重合機構によりプロトン親和性が高い構造が形成されるためだということが明らかとなった(図7)²⁸。

(6) ヘモグロ빈を模倣した CO_2 可逆吸収材料および CO_2 選択透過膜の開発

ヘモグロ빈のボーア効果を模倣して外部刺激を用いてアンモニウムイオンの pK_a を可逆的に変化させれば、可逆的に CO_2 を吸収可能な CO_2 の分離材料となる。我々は3級のアミノ基を有するモノマーを NIPAm と共重合すると40℃付近に相転移温度を有し、相転移温度前後で pK_a が8から6に低下するハイドロゲルナノ粒子を合成できることを見いだした²⁹。このナノ粒子水溶液に CO_2 を流通すると相転移温度以下で効率よく CO_2 を吸収し、相転移温度以上に加熱するとほぼ完全に CO_2 を放散する³⁰。さらにナノ粒子を用いて作成したキャストフィルムも僅かな温度変化に回答して大量の CO_2 を可逆的に吸収可能である³¹。これは、相転移温度以下の温度においてはナノ粒子内のアンモニウムイオンの pK_a が炭酸の pK_a (6.3) より高い一方で、相転移温度以下ではアンモニウム基の pK_a が 6.3 以下に低下するためである(図8)。

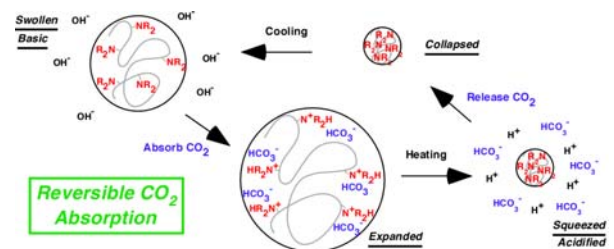


図8 ヘモグロ빈を模倣したアミン含有ナノ粒子の温度変化に回答した可逆的な CO_2 吸収メカニズムの模式図。

本アミン含有ナノ粒子は、工業的炭酸ガス回収プロセスで使用されてきた低分子アミン水溶液よりも遙かに小さい温度変化幅で炭酸ガスを回収可能であるため、省エネルギー型炭酸ガス分離剤や二酸化炭素

選択透過膜として期待されている。

【結言】

以上の様に、汎用性の機能性のアクリルアミド誘導体を適切に組合せ共重合するだけで、標的の分子やイオンを望みの強さで、望みの速さで認識するナノ粒子を設計可能になってきている。ナノ粒子は『プラスチック抗体』のように動物体内で抗原を認識して中和可能である。標的分子に対する結合特異性は、分子インプリント法、アフィニティー精製法やリビング重合を用いた分子量の最小化戦略により向上可能である。さらに、外部刺激に応答した官能基密度変化や官能基の pK_a 変化を利用して、タンパク質、ペプチド、プロトン、二酸化炭素などの標的分子を可逆的に認識する『プラスチック酵素』も設計できるようになっている。ナノ粒子を固定化、フィルム化した材料は抗体などのタンパク質や炭酸ガスの分離担体、水の浄化材料として応用研究が進められており、今後様々な分野で実用化されると期待されている。

【謝辞】

本研究は、カリフォルニア大学アーバイン校の Kenneth J. Shea 研究室および九州大学の三浦佳子研究室において行われました。研究指導・支援を頂いた両先生および研究チームメンバーに感謝致します。また、共同研究者である静岡県立大学の奥直人先生、小出裕之先生、ミズーリ州立大学の吉松啓一先生、京都大学の井上元先生、九州大学の仲本正彦博士、Mengchen Yue 博士、谷口育雄先生、与那嶺雄介先生、株式会社アルバックの小関智光博士には深く感謝致します。研究資金援助いただいた新学術領域研究融合マテリアル(加藤隆史代表)、新学術研究領域分子ナノ創発(川合知二代表)、科研費若手 A、B、NEDO 若手グラント、JST-ALCA、JST-A-STEP に深く感謝致します。

【参考文献】

- (1) R.H. Pelton, P. Chibante, *Colloids Surf.*, 20, 241, 1986.
- (2) J. D. Debord, L. A. Lyon, *Langmuir* 19, 7662, 2003.
- (3) Y. Hoshino, K. Y. Shea, *J. Mater. Chem.* 21, 3517, 2011.
- (4) Y. Hoshino, H. Lee, Y. Miura, *Polym. J.* 46, 537, 2014.
- (5) Y. Hoshino, T. Urakami, T. Kodama, H. Koide, N. Oku, Y. Okahata, K. Y. Shea, *Small* 5, 1562, 2009.
- (6) Y. Hoshino, H. Koide, S.-H. Lee, N. Oku, K. J. Shea, *PNAS* 109, 33, 2012.
- (7) A. Weisman, Y. A. Chen, Y. Hoshino, H. Zhang, K. J. Shea, *Biomacro.* 15, 3290, 2014.
- (8) Y. Yonamine, K. Yoshimatsu, S.-H. Lee, Y. Hoshino, Y. Okahata, K. J. Shea *ACS Appl. Mater. Inter.* 5, 374, 2013.
- (9) Y. Yonamine, Y. Hoshino, K. J. Shea, *Biomacro.* 13, 2952–2957, 2012.
- (10) H. Koide, Y. Hoshino, K. Yoshimatsu, Y. Yonamine, A. C. Weisman, Y. Nishimura, N. Oku, Y. Miura, K. J. Shea, *Nat. Chem. in press.*
- (11) K. Yoshimatsu, T. Yamazaki, Y. Hoshino, P. E. Rose, L. F. Epstein, L. P. Miranda, P. Tagari, J. M. Beierle, Y. Yonamine, K. J. Shea, *JACS*, 136, 1194, 2014.
- (12) S.-H. Lee, Y. Hoshino, A. Randall, K. Shea, *JACS*, 134, 15765, 2012.
- (13) K. Yoshimatsu, B. K. Lesel, Y. Yonamine, J. M. Beierle, Y. Hoshino, K. J. Shea, *ACIE* 51, 2405, 2012.
- (14) Y. Hoshino, Y. Arata, Y. Yonamine, S.-H. Lee, A. Yamasaki, R. Tshuhara, K. Yano, K. J. Shea, Y. Miura, *Polym. J.* 47, 220, 2015.
- (15) Y. Hoshino, T. Kodama, Y. Okahata, K. J. Shea, *JACS* 130, 15242, 2008.
- (16) Y. Hoshino, H. Koide, T. Urakami, H. Kanazawa, T. Kodama, N. Oku, K. J. Shea, *JACS* 132, 6644, 2010.
- (17) Y. Hoshino, W. W. Haberaecker, T. Kodama, Z. Zeng, Y. Okahata, K. J. Shea, *JACS* 132, 13648, 2010.
- (18) Y. Wada, H. Lee, Y. Hoshino, S. Kotani, K. J. Shea, Y. Miura *J. Mater. Chem. B* 3, 1706, 2015.
- (19) H. Lee, Y. Hoshino, Y. Wada, Y. Arata, A. Maruyama, Y. Miura, *JACS* 137, 10878, 2015.
- (20) F. U. Hartl, M. Hayer-Hartl, *Science*, 295, 1852, 2002.
- (21) N. Murai, H. Taguchi, M. Yoshida, *J. Biol. Chem.* 270, 19957, 1995.
- (22) K. Akiyoshi, Y. Sasaki, S. Sunamoto, *Bioconjugate Chem.* 10, 321, 1999.
- (23) M. Nakamoto, T. Nonaka, K. J. Shea, Y. Miura, Y. Hoshino, *JACS* 138, 4282, 2016.
- (24) Y. Hoshino, M. Nakamoto, Y. Miura *JACS* 134, 15209, 2012.
- (25) M. Nakamoto, Y. Hoshino, Y. Miura *Biomacro.* 15, 541, 2014.
- (26) W. Kühlbrandt, *Nature*, 406, 569, 2000.
- (27) C. Bohr, K. Hasselbalch, A. Krogh, *Skand. Arch. Physiol.* 16, 401, 1904.
- (28) Y. Hoshino, R. Ohashi, Y. Miura, *Adv. Mater.*, 26, 3718, 2014.
- (29) M. Yue, Y. Hoshino, K. Imamura, Y. Miura *Chem. Sci.*, 6, 6112, 2015.
- (30) Y. Hoshino, K. Imamura, M. Yue, G. Inoue, Y. Miura, *JACS*, 134, 18177, 2012.
- (31) M. Yue, Y. Hoshino, Y. Oshiro, K. Imamura, Y. Miura *ACIE* 126, 2692, 2014.

研究紹介

低分子ゲル化剤の細胞内自己組織化

に基づく新しい薬理活性の提案

～選択的抗ガン活性を目指して～

神戸大学大学院工学研究科

丸山達生

(tmarutcm@crystal.kobe-u.ac.jp)



1. はじめに

本研究は、筆者が九州大学後藤雅宏教授の下で開始し(当時助手)、神戸大学に移籍した現在も続けているものです。当初筆者はゲルの研究をしていたわけでも、また動物細胞の研究をしていたわけでもありませんでした。後藤先生は、元々金属イオンの選択的分離、特に金属イオンの溶媒抽出、および酵素反応を専門とする研究者であったため(現在はDDSもご専門です)、後藤研に助手として採用された後、筆者はタンパク質を使った金属分離・回収に取り組んでおりました。タンパク質が思いの外、貴金属イオンの選択的吸着剤として有用であることを見いだし¹、かつHisを含むペプチド鎖が貴金属イオンに対して高選択的な相互作用を示すことがわかってきました²⁻⁴。そこでHisを含むペプチド鎖(Gly-Gly-His)に疎水鎖(パルミチン酸)を結合し、貴金属イオンの抽出剤として利用できないかと検討しました。ところが、多くの有機溶媒および水にpalmitoyl-Gly-Gly-Hisが溶解せず、抽出剤として全く使えませんでした。仕方なく、加熱して強制的にpalmitoyl-Gly-Gly-Hisを溶解させたところ、冷却後に有機溶媒/水の二相系がゲル化しました。詳しく調べてみると、palmitoyl-Gly-Gly-Hisが水や一部の有機溶媒をゲル化し、Glyを一つ追加したpalmitoyl-Gly-Gly-Gly-Hisは非常に低濃度(0.03 wt%)で水をゲル化できることが判明しました。そこで抽出剤としての検討をあきらめ、低分子ヒドロゲルの研究を行うことにしました。しかし、当時後藤先生はゲルの研究に難色を示しました。

後藤教授:「丸さん、僕はゲルが好きじゃないんだよ。」

丸山:「え? どうしてですか?」

後藤教授:「だってゲルってぶによぶによしていて、取り扱いがやっかいだし、はっきりしないものだよ。しかも、有機合成の失敗作としてよくでてくるんだよ。」

幸いにして後藤先生は部下の意向を尊重してくだり、それ以降は全面的に支援してくださいました。また当時同じ専攻に浜地先生(現京大教授、当時九大教授)がいらっしやり、非常にインパクトのある低分子ヒドロゲル化剤を報告しておられ^{5,6}、ゲル研究の世界的な価値は否めないものでした。以下、筆者らの低分子ヒドロゲル化剤の開発および細胞毒性の発現に関して簡単にご説明します。

2. ペプチド脂質型低分子ゲル化剤 palmitoyl-Gly-Gly-His (palmitoyl-GGGH)⁷

上述の通り、偶発的に見つかったpalmitoyl-GGHは水、アセトニトリル、水/エタノール混合溶液、トルエン/水二相系等を温度刺激に応じてゲル化しました。このゲル化剤分子中のGlyの数およびHisの位置、さらにHis以外のアミノ酸を様々検討したところ、palmitoyl-GGGHが、2007年当時世界最低濃度である0.03 wt%で塩酸やリン酸緩衝液をゲル化できることが判明しました。得られたゲルを乾燥させ、TEM観察を行ったところ、低分子ゲル化剤によく見られる、絡まったナノファイバーが観察されました(図1)。このナノファイバーは、palmitoyl-GGGHが自己組織化して形成した紐状ミセルのようなものであると考えられます。ナノファイバーは太さ約20 nm程度と比較的細く、そのため比較的透明性の高いヒドロゲルが得られました。

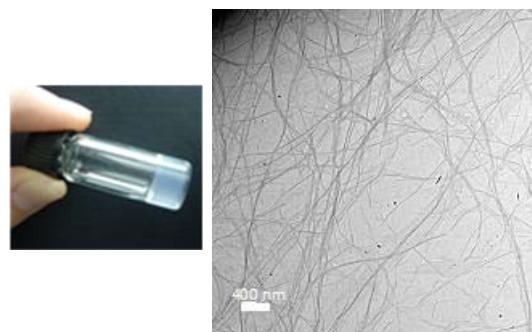


図1 palmitoyl-GGGH によるヒドロゲル(左)とゲル化剤分子の自己組織化によるナノファイバーのTEM観察(右)

このゲル化剤分子の疎水鎖の炭素数を変化させたところ、パルミチン酸より炭素数が二つ多いステアリン酸、二つ少ないミリスチン酸ではゲル化したものの、最低ゲル化濃度がかなり上がってしまい、ゲル化能が大きく低下することがわかりました。また炭素数12のラウリン酸ではゲル化はしませんでした(後述)。既にいくつかの報告にもあるとおり⁸、筆者らの低分子ゲル化剤においても疎水鎖の長さがゲル化能に非常に重要な役割を担っていることがわかりました。

3. 酵素応答性ゲル化剤前駆体 palmitoyl-GGGHGPLGLARK⁷

この極めて低濃度で機能する低分子ゲル化剤の応用について、当時九大大学院生だった香田君と話し合った結果、ガン細胞が比較的多く分泌する



図2 酵素応答性ゲル化剤前駆体の分子構造
矢印は、酵素(MMP-7)による切断部位

matrix metalloproteinase-7(MMP-7)に応答するゲル化剤に発展させようということになりました。低濃度で劇的な変化(ゾルーゲル)する系は、細胞刺激のような微小刺激にも応答するであろうと考えました。このMMP-7は、比較的ガン細胞が多く分泌する酵素であり、しかも基質としてのアミノ酸配列特異性が高く、ガン患者の血液や痰にも含まれています。つまりガン細胞関連酵素に反応してゲル化する低分子ゲル化剤を開発し、MMP-7の検出、ひいてはガンの検出につながるのではないかと考えました。そこで前述のpalmitoyl-GGGHにMMP-7の基質配列を導入、さらに末端にカチオン性アミノ酸を二つ付加することで前駆体分子間の静電反発を生じさせ、ゲル化能を封印することを目指しました(図2)。

合成した酵素応答性ゲル化剤前駆体 palmitoyl-GGGHGPLGLARKを0.2 wt%となるようにトリス緩衝液に溶解させたところ、そのままではゲル化せず、MMP-7の添加により緩衝液がゲル化しました。またMMP-7添加量(1~5 µg/ml)に応じてゲル化に要する時間が変化しました。HPLCおよびMALDI-TOF MS分析の結果、期待通り-Gly-Leu-間で加水分解が生じていることもわかりました。つまり、MMP-7の触媒作用で、酵素応答性ゲル化剤前駆体が分解し、ゲル化が進行したわけです。TEM観察でも、MMP-7添加により、そのモルフォロジーが

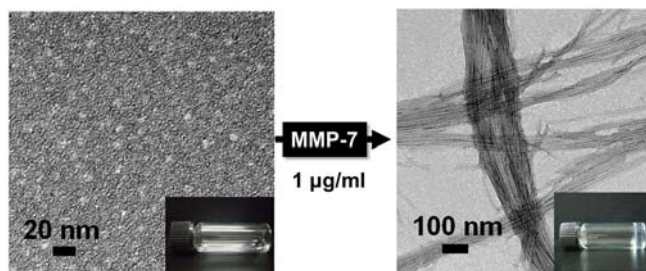


図3 酵素応答性ゲル化剤前駆体 0.2 wt%水溶液のMMP-7添加前後のモルフォロジー変化(TEM観察)

大きく変化することが観察され、特有のナノファイバーが確認されました(図3)。

4. 酵素応答性ゲル化剤前駆体による細胞死滅⁹

神戸大に移った後、筆者らはこの酵素応答性ゲル化剤前駆体をガン細胞の殺傷に使えないかと考えました。可能性として考えていたのは、ガン細胞が分泌するMMP-7に応答して、ガン細胞周囲をゲル化し、栄養分等の物質移動が阻害され、結果的にガン細胞が死滅するのではないかと考えました。実際にヒト由来ガン細胞であるHeLa細胞、正常ヒト皮膚毛細血管内皮細胞(MvE細胞)に前駆体を0.02 wt%の濃度で投与したところ、投与18時間後にHeLa細胞のほぼ全てが死滅しました(図4)。MMP-7による前駆体加水分解物である低分子ゲル化剤そのもの(palmitoyl-GGGHGPLG)を、HeLa細胞およびMvE細胞に投与したところ、明確な死滅効果が両者に見られたことから、ガン細胞が分泌するMMP-7がこのガン細胞選択的細胞死に関与していることが示唆されました。しかも、前駆体を用いることでガン細胞と正常細胞の生存率に大きな違いが観察されました。

またMMP-7の触媒作用でゲル化剤を生じない酵素非応答性前駆体2種(palmitoyl-Gly-Gly-Gly-His-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Ala-Arg-Lys, palmitoyl-Gly-Gly-Gly-His-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Ala-Arg-Lys)を合成し、HeLa細胞に対する細胞毒性を調べたところ、明確な死滅効果はみられませんでした。また酵素応答性前駆体と同じペプチド配列を持ちながら、疎水鎖を炭素数12のラウロイル基にしたところ、こちらも細胞毒性を示しませんでした。これらのことは、ゲル化能(自己組織化能)を有するpalmitoyl-GGGHGPLGの分子構造が細胞毒性に極めて重要であることを示しています。

ガン細胞および正常細胞も多くの種類があります。また細胞種によりMMP-7の分泌量も異なります。そこで5種のガン細胞および2種の正常細胞に対する酵素応答性ゲル化剤前駆体の細胞毒性およびMMP-7分泌量を測定してみました(図5)。その結果、程度の差こそあれ、多くのガン細胞で死滅効果が高く、正常細胞では目立った死滅効果を示しませんでした。しかもMMP-7分泌量と細胞毒性に相関が見られ、筆者らの目論見通り、MMP-7をターゲットにしたガン細胞選択的細胞死が可能であることが示されました。

5. ゲル化剤分子はどこに？

上述の条件下では、この酵素応答性ゲル化剤前駆体の添加後に培地がゲル化することはありませんでした。そこで死滅した細胞をトリプシン処理で剥がし、その細胞を超音波で破碎し、その細胞破碎液をMALDI-TOF MSにより分析したところ、細胞破碎液中に低分子ゲル化剤の分子量に由来するピーク(m/z

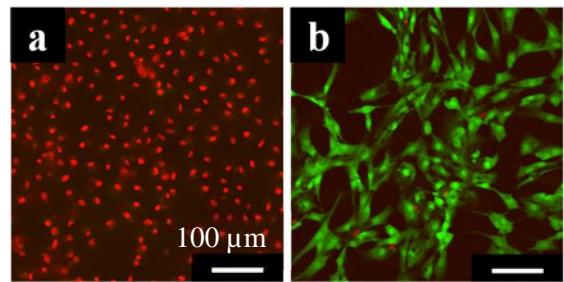


図4 酵素応答性ゲル化剤前駆体添加時の細胞のLive/dead染色(赤:死細胞、緑:生細胞)
a) HeLa細胞(ガン細胞)、b) MvE細胞(正常細胞)

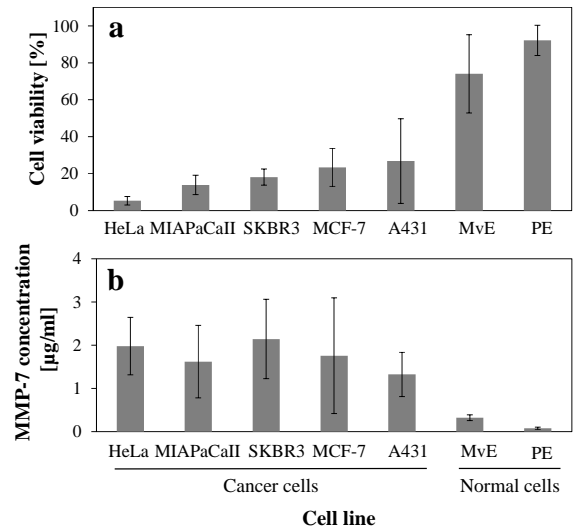


図5 a) 各種細胞に対する酵素応答性ゲル化剤前駆体(0.02 wt%)の細胞毒性、b) 各種細胞のMMP-7分泌量

890)を観測しました。

また細胞破碎液を加熱冷却すると、破碎液がゲル化しました(図6a)。さらに細胞破碎液をTEM観察したところ、ナノファイバー(図6b中矢印)が観測されゲル化剤分子が細胞内で自己組織化していた可能性が示されました。つまり当初の予想(細胞外のゲル化)とは異なり、低分子ゲル化剤がガン細胞に取り込まれ、細胞内で自己組織化し、ガン細胞に大きな影響を与えていることが示唆されました。これを実証するために、ゲル化剤分子と類似構造を持ち、かつ蛍光団を有するanalogue(図7a)を合成し、前駆体共にHeLa細胞に取り込ませました。その結果、細胞内で蛍光団に由来する強い蛍光が観察され

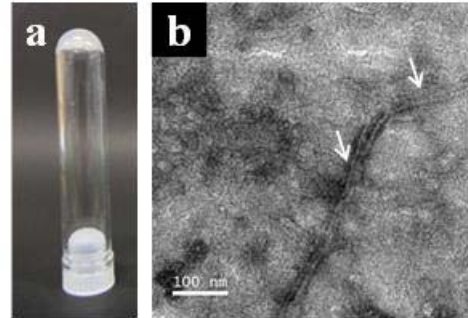


図6 a) 前駆体により死滅後の HeLa 細胞破碎液のゲル化試験、b) 前駆体添加後の HeLa 細胞破碎液の TEM 観察

ました。この細胞内の蛍光に対して光褪色後蛍光回復法(FRAP)を検討したところ、40分経過後も蛍光が回復せず、細胞内が高い粘性状態にあることが判明しました(図7b)。これらの結果から、酵素応答性ゲル化剤前駆体がMMP-7の作用により加水分解され、これがガン細胞に取り込まれて、細胞内で自己組織化(ゲル化)し、このことが細胞の生命機能に大きなダメージを与えている可能性が極めて高いことが考えられます(図8)。細胞質の粘性と細胞死の関連性を議論した研究例もあり¹⁰、本研究における細胞内異常増粘が細胞死を引き起こしていると考えています。

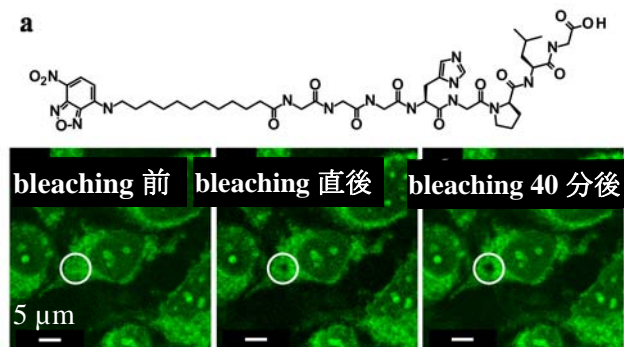


図7 a) 蛍光ラベル化ゲル化剤 analogue、b) 前駆体と蛍光ラベル化 analogue を取り込ませた HeLa 細胞に photobleaching を行った際の蛍光回復挙動

6. まとめ

本研究では世界で初めて、ガン細胞の選択的死滅を従来の抗がん剤とは大きく異なり、外来合成分子の細胞内での自己組織化により達成可能であることが示されました。従来の生理活性物質のほとんどは、分子単体で阻害効果等の薬理活性を示しておりましたが、単体では何の機能も示さない

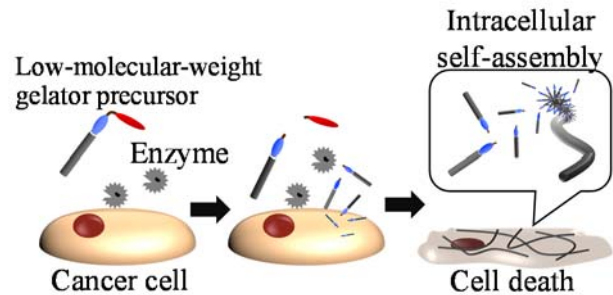


図8 低分子ゲル化剤の細胞内自己組織化によるガン細胞死滅のイメージ

分子が集まり、自己組織化することで新たな生理活性を生み出せることがわかってきました。このことは生物個体群における個体あるいは人間社会における個人にも通じるものがあり、非常に興味深いです。

現在筆者らはこのゲル化剤分子の応用先として、iPS細胞分化時のガン化細胞の除去を考えております。ご存じの通りiPS細胞に代表される万能細胞では、低確率ながらガン化が生じる可能性があり、このような一部のガン化細胞を選択的に除去する手段として、ここで開発した酵素応答性低分子ゲル化剤が活用できると期待しております。

実験系では“よくある”偶発的な発見から、意外な研究展開を見せてくれた低分子ゲル化剤の研究ですが、細胞毒性を検討し始めた頃は”非論理的である”等の多くの批判を頂きました。それらの批判にめげずに、あるいは逆に奮起して(?)がんばってくれた学生諸氏の努力のおかげで、ようやくここまでの結果にた

どり着きました。さらに非ペプチド性ゲル化剤やイオン液体のゲル化にも広がってきています¹¹⁻¹³。なお冒頭の後藤先生はゲルに対する認識を改め、最近ではゲル好きになった模様です。

謝辞

ここでご紹介した研究成果は、筆者の九大在籍中から神戸大移籍後にも及ぶ、九州大学後藤教授の温かいご支援・激励によるものであり、深く感謝いたします。またペプチド合成から細胞評価まで幅広い分野で助けていただいた九州大学および神戸大学の方々、ならびに実験をがんばってくれた学生諸氏にこの場を借りて心より感謝申し上げます。最後になりましたが、見ず知らずの筆者に、このような研究紹介の機会を与えてくださった信州大学・大神田教授に感謝いたします。

参考文献

1. T. Maruyama, H. Matsushita, Y. Shimada, I. Kamata, M. Hanaki, S. Sonokawa, N. Kamiya and M. Goto, *Environ. Sci. Technol.*, 2007, **41**, 1359-1364.
2. S. L. Best, T. K. Chattopadhyay, M. I. Djuran, R. A. Palmer, P. J. Sadler, I. Sovago and K. Varnagy, *J. Chem. Soc. Dalton*, 1997, 2587-2596.
3. T. Maruyama, S. Sonokawa, H. Matsushita and M. Goto, *J. Inorg. Biochem.*, 2007, **101**, 180-186.
4. T. Maruyama, Y. Terashima, S. Takeda, F. Okazaki and M. Goto, *Process Biochem.*, 2014, **49**, 850-857.
5. I. Yoshimura, Y. Miyahara, N. Kasagi, H. Yamane, A. Ojida and I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 12204-12205.
6. S. Kiyonaka, K. Sada, I. Yoshimura, S. Shinkai, N. Kato and I. Hamachi, *Nat. Mater.*, 2004, **3**, 58-64.
7. D. Koda, T. Maruyama, N. Minakuchi, K. Nakashima and M. Goto, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 979-981.
8. S. Roy, A. Dasgupta and P. K. Das, *Langmuir*, 2007, **23**, 11769-11776.
9. A. Tanaka, Y. Fukuoka, Y. Morimoto, T. Honjo, D. Koda, M. Goto and T. Maruyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 770-77.
10. M. K. Kuimova, S. W. Botchway, A. W. Parker, M. Balaz, H. A. Collins, H. L. Anderson, K. Suhling and P. R. Ogilby, *Nat. Chem.*, 2009, **1**, 69-73.
11. N. Minakuchi, K. Hoe, D. Yamaki, S. Ten-No, K. Nakashima, M. Goto, M. Mizuhata and T. Maruyama, *Langmuir*, 2012, **28**, 9259-9266.
12. Y. Ishioka, N. Minakuchi, M. Mizuhata and T. Maruyama, *Soft Matter*, 2014, **10**, 965-971.
13. T. Kataoka, Y. Ishioka, M. Mizuhata, H. Minami and T. Maruyama, *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, **7**, 23346-23352.

気になった論文

佐藤 浩平 (さとう こうへい)

静岡大学学術院工学領域化学バイオ工学系列 助教

sato.kohei@shizuoka.ac.jp

筆者は徳島大学・大高章先生のご指導のもと学位を取得した後に、静岡大学・間瀬暢之先生のもとで教育・研究に携わっています。学生時代から一貫してペプチド・タンパク質化学合成に関する研究に従事してきました。一般にタンパク質の化学合成は、ペプチド固相合成法によるペプチド鎖構築と続くペプチド鎖間の化学選択的縮合という二段階からなります。後者の縮合手法としてペプチドチオエステルとN末端Cys含有ペプチドを利用するnative chemical ligation(NCL)法が汎用されます。本稿ではNCL法を利用するタンパク質化学合成の現状について最新論文の研究成果を通して紹介させていただきます。

Parallel chemical protein synthesis on a surface enables the rapid analysis of the phosphoregulation of SH3 domains

Zitterbart, R.; Seitz, O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 7252–7256.

タンパク質翻訳後修飾の機能解明プローブとして、任意の修飾を任意の位置に持つ翻訳後修飾タンパク質を自在に調製することが望まれますが、遺伝子工学的手法でこの要請を満たすことは容易ではありません。例えば、慢性骨髄性白血病患者においてリン酸化が促進されることが知られているAblタンパク質SH3ドメインには3つのリン酸化部位が存在しますが、現在利用できるキナーゼでリン酸化できるのはこのうち2箇所だけであり、従来法による網羅的解析は困難を極めます。そこで著者らは、任意の位置に修飾可能な化学合成法を利用して、リン酸化タンパク質ライブラリー構築から活性評価までをプレート上で行うことを計画しました。

著者らの立案した戦略は、1)アルデヒド修飾プレート上にN末端Cysペプチドヒドラジドをヒドラゾン結合で固定化、2)ペプチドチオエステルとNCL反応により縮合、3)強固な固定様式であるヒドラジドへと変換、4)縮合部位のチオールを脱硫しAlaへと変換し所望のタンパク質を合成、5)蛍光標識バインダーとの結合能評価までをプレート上で実施するというものです(Figure 1)。本手法を適用してAbl SH3ドメインの機能解析に取り組みました。Ablタンパク質は非受容体型チロシンキナーゼで、通常SH3ドメインは分子内ドメインと結合して不活性型をとりますが、SH3リガンドが

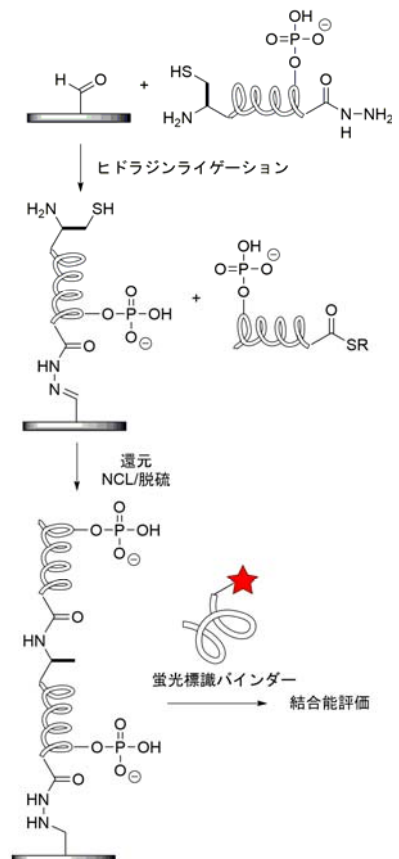


Figure 1. on-surface 合成/評価

存在すると分子間で結合しキナーゼ活性を示します。SH3ドメインがリン酸化されると分子内ドメインとの親和性が低下しキナーゼ活性が向上することが報告されていますが、分子間での結合能に与える影響はほとんど知られていません。そこでAbl SH3ドメインのリン酸化部位である3つのTyrについて、8種類のリン酸化状態を網羅したタンパク質ライブラリーをプレート上に構築しました。分子内ドメイン配列との結合能を評価したところ、これまでの報告と同様に非リン酸化体のみと結合することが明らかとなりました。一方で、内

因性リガンドである3BP1および3BP2配列との結合能は、リン酸化されることで向上することを見出しました。特筆すべき点は、リン酸化様式が異なる場合に3BP1と3BP2に対する親和性が逆転することが見いだされた点です。これはAbl SH3ドメインのリン酸化が分子内ドメインとの結合能を弱めキナーゼ活性を調節するという従来の知見に加え、Abl SH3ドメインのリン酸化様式に依存して異なるアダプタータンパク質がリクルートされる可能性があることを示唆しています。本研究成果は、プレート上で効率的にリン酸化タンパク質を合成したという点だけでなく、化学合成タンパク質が生命科学研究を加速する強力なツールとなりうることを示したという点で意義深いと考えます。

Aromatic thiol-mediated cleavage of N–O bonds enables chemical ubiquitylation of folded proteins

Weller, C. E.; Dhall, A.; Ding, F.; Linares, E.; Whedon, S. D.; Senger, N. A.; Tyson, E. L.; Bagert, J. D.; Li, X.; Augusto, O.; Chatterjee, C. *Nat. Commun.* **2016**, 7, 12979.

ユビキチンやSUMO (small ubiquitin-like modifier) などのユビキチン様修飾因子による機能制御は、タンパク質の分解・局在の制御など多岐に渡ります。機能解明を指向した化学合成タンパク質プローブが開発されてきましたが、従来の合成手法では合成段階における変性は避けられずその利用範囲は骨格構築後にリフォールディング可能なタンパク質に制限されていました。著者らは過去に2-メルカプトエチルオキシ基を補助基として利用するユビキチン化タンパク質合成法を報告していますが、この際も補助基除去時に変性条件が必要でした。

今回著者らは補助基含有タンパク質とユビキチンユニットとの縮合効率を上げるために、NCLにおいて反応加速効果が認められている4-メルカプトフェニル酢酸(MPAA)を添加する条件で反応を試みました。この結果、縮合生成物は得られたものの予期せず縮合と同時に補助基が除去されることを見出しました。詳細な反応機構解析の結果、N–O結合切断は芳香族チオールを添加したときのみ進行すること、芳香族チオールから生じるジスルフィドラジカルアニオンが活性種であることが示唆されました。

今回見出した反応は非変性条件下において補助基を除去可能なことから、発現タンパク質を一度も変性させずにユビキチン様修飾因子で修飾することを最終目標に掲げ、ヒストンH2Bタンパク質のSUMO化に取り組みました。最終的にはアンバーサプレッション法を用いて修飾したい部位に光感受性保護型2-メルカプトエチルオキシ基含有Lysを導入することを想定していますが、本研究では保護された補助基を含むH2Bを半合成により調製しました (Figure 2)。半合成H2B誘導体をリフォールディングした後は、1) 光感受性保護基の除去、2)

SUMOチオエステルとの縮合、3) MPAA添加による補助基除去までの各段階を非変性条件下実施し、フォールディング状態を保ったまま化学的SUMO化が進行することを確認しました。補助基含有リコンビナントタンパク質の調製法が確立できれば、フォールディング状態を保ったままユビキチン様修飾因子を導入可能な利点を生か

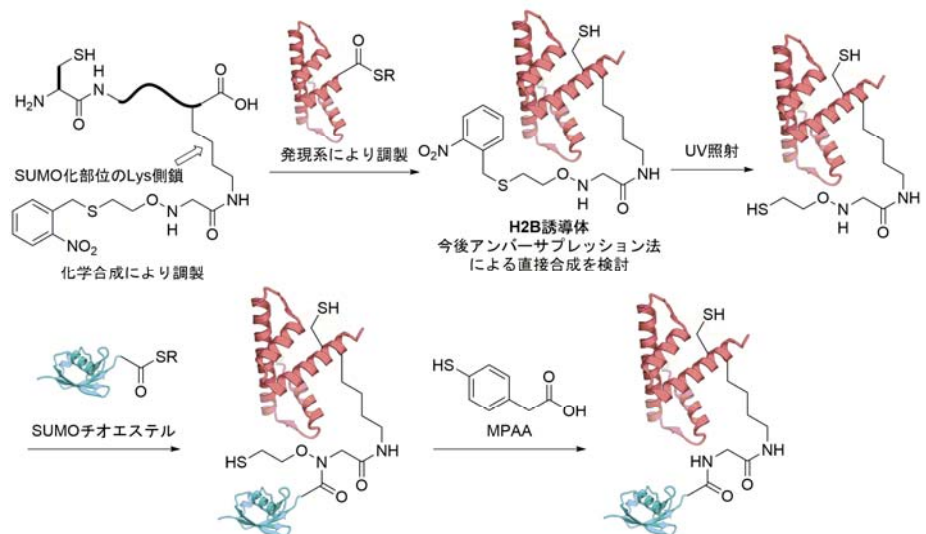


Figure 2. SUMO 化 H2B の半化学合成

シリフォルディング困難なタンパク質へと適用拡大することが期待されます。

A helping hand to overcome solubility challenges in chemical protein synthesis

Jacobsen, M. T.; Petersen, M. E.; Ye, X.; Galibert, M.; Lorimer, G. H.; Aucagne, V.; Kay, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 11775–11782.

タンパク質化学合成を実施するうえで、合成途中のペプチド鎖が低溶解性／易凝集性を示す場合には縮合反応／精製時に困難を伴います。溶解性改善を指向して水溶性タグ配列を難溶性ペプチドに導入する手法が報告されてきましたが、第一選択肢として利用される手法は不在であるのが現状です。

ここで著者らは理想的な水溶性タグ配列導入手法の開発に取り組むうえで、アミノ基保護基として利用される(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl (Dde) 基に着目しました。Dde基は、ヒドラジン処理により選択的に除去されます。そこでDde骨格を含むリンカー (Fmoc-Ddae-OH) を設計し、これを利用する水溶性タグ配列導入戦略を立案しました (Figure 3)。本手法は、タグ配列を導入したいLysの側鎖保護基としてDde基を用いて通常のFmoc固相合成法によりペプチド鎖を構築し (step 1)、固相上で選択的Dde基除去 (step 2) とFmoc-Ddae-OHの縮合 (step 3) およびリンカー上へのタグ配列 (本研究では (Lys)₆) の伸長を行い (step 4)、水溶性タグ配列導入型ペプチドを得るという手法です。水溶性タグ導入型ペプチドは固相担体から切り出された後 (step 5)、ライゲーション・精製等の一連の操作に供された後、最終的にヒドラジン水溶液処理することで所望のペプチド／タンパク質へと変換されるという戦略です (step 6)。想定した一連の反応について、モデルタンパク質の合成を通じて有用性が示されました。

過去に著者らは、GroEL/ESシャペロンの基質となるDapAタンパク質の鏡像体を化学合成し、このフォールディングに対してもGroEL/ESがシャペロン活性を示すことを明らか

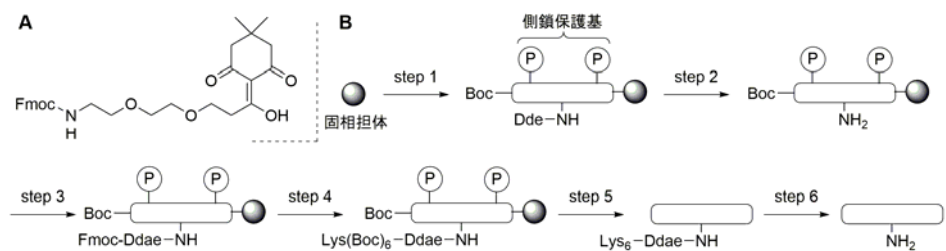


Figure 3. (A) Fmoc-Ddae-OH の構造 (B) 水溶性タグ導入法

にしています (DapAは312残基からなり、筆者の知る限り最長の化学合成タンパク質の例 (*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 11679.)). GroEL-GroES間相互作用の特異性が低いとの報告を基に、本研究ではL-GroELとD-GroESのヘテロキラル複合体もシャペロン活性を示すのではないかと仮説を立て、LおよびD-GroESの合成に取り組みました。そこでGroESを二つのペプチド鎖から合成しようとしたのですが、ペプチド鎖の低溶解性が問題となり満足いく合成結果は得られませんでした。そこで今回開発した水溶性タグ配列を導入したところ、溶解性の問題を解決することに成功しLおよびD-GroESの化学合成を達成しました。リコンビナントGroELと合成品からなる複合体のシャペロン活性を評価したところ、L/L体は活性を示したのに対してL/D体はシャペロン活性を示しませんでした。当初の仮説は支持されなかったものの、今回開発した水溶性タグを導入することで従来法では合成困難なタンパク質を合成可能なことが示されました。タグ部位として種々の機能性部位を導入可能であることから今後の応用展開が期待されます。

タンパク質化学合成分野における技術開発により、様々なタンパク質の化学合成が可能となりつつあります。特に翻訳後修飾タンパク質やD-タンパク質の調製法として化学合成法は威力を発揮し、今後タンパク質科学における化学合成タンパク質プローブの利活用がさらに進められることが期待されます。

末筆ではありますが執筆機会を与えていただきました信州大学・大神田淳子先生に感謝申し上げます。

気になった論文

大金 賢司 (おおがね けんじ)

理化学研究所 袖岡有機合成化学研究室 / 基礎科学特別研究員

kenji.ohgane@riken.jp

この度は、「気になった論文」の執筆機会をいただき、ありがとうございます。私は2013年に東京大学薬学系研究科(橋本祐一教授)にて博士号を取得し、現在は理化学研究所の袖岡有機合成化学研究室(袖岡幹子主任研究員)に所属しております。博士課程時には、ニーマンピック病C型という難病を標的として「ファーマコロジカルシャペロン」と呼ばれる低分子化合物の探索研究に取り組んでおりました。初めはいわゆる医薬化学研究でしたが、化合物の結合部位が、標的タンパク質上のこれまで知られていたリガンド結合ドメインとは異なることが判明し、ケミカルバイオロジー的な研究へと進むきっかけとなりました。現在は、理研にて遷移金属の化学を利用したアルキン選択的な固相抽出法の開発を行っています。この方法は、click chemistryを使わず、SepPakのようなミニカラムやスピнкаラムで直接・簡便にアルキンタグがついた分子を精製する方法です。代謝物やリガンド結合部位・翻訳後修飾部位の同定などに、実際に「使える」方法にしたいと考えて研究を進めています。

今回紹介する論文の一報目は、見えそうな気がした手法ということで、「large-scale mutagenesis」の新しい方法について紹介します。二・三報目は、どちらもスクリーニング系の論文で、ゼブラフィッシュを用いた抗精神病薬探索と、マウスでのin vivo multiplexスクリーニングです。

Massively parallel single-nucleotide mutagenesis using reversibly terminated inosine.

Haller G, Alvarado D, McCall K, Mitra RD, Dobbs MB & Gurnett CA, *Nat Methods* 13: 923–924 (2016)

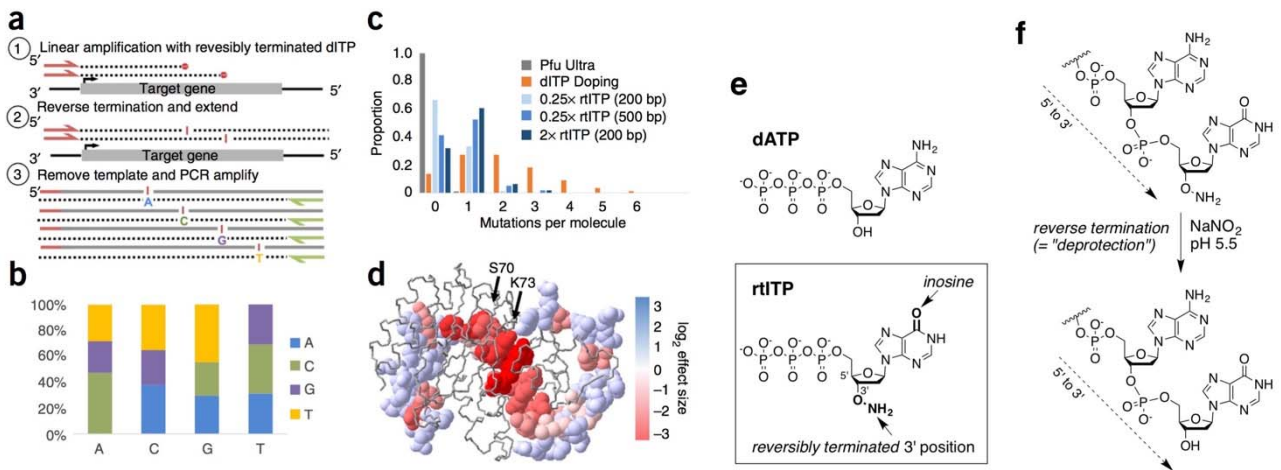


図1: 論文より抜粋・図を追加。(a) 原理。(b) ランダムに塩基の置換が起きる。(c) 点変異はほぼ1つだけ入る。(d) 本手法を用いたmutagenesisから得られたβ-lactamaseの各アミノ酸残基の機能的な重要性。(e) dATPとrtITPの構造。(f) "reversible termination"の解除(脱保護)。

特定のタンパク質の機能を調べるために、点変異体を作成してそのアミノ酸残基の機能的な重要性を調べる実験は、よく使われるアプローチだと思います。この論文で報告している変異導入(mutagenesis)法は、特

定の遺伝子配列内に1塩基置換をランダムに導入した遺伝子ライブラリーを作る方法です。これまでの方法(error-prone PCRなど)では、一つの配列内に複数の変異が入ってしまう割合が高かったのに対し、本論文の方法はほぼ1つの点変異しか入らないという点が特長です。

内容はシンプルですが、個人的には原理が面白いと思いましたので、基本的な背景も含めて解説したいと思います。大事なポイントは、"reversibly terminated deoxyinosine triphosphate" (rtITP)を用いる点です。まず一つ目のポイントは、イノシンがATGCのいずれの塩基とも塩基対を形成する点です(図1e)。この特長は、PCRで遺伝子を増幅する際にイノシン三リン酸(dITP)を少量混ぜておくことで変異を一定割合導入する、という方法に利用されてきました。もう一つのポイントは、"reversibly terminated"なdITP (rtITP)を用いる点です(図1e)。通常、PCRでDNAを増幅する際には、DNAポリメラーゼがdeoxynucleoside triphosphate (dNTP)をテンプレート配列に相補的な順番で、5'から3'の方向へとつなげていきます(リボース3位のヒドロキシル基をリン酸がついた5位側とつないでいきます)。このrtITPは、3'位のヒドロキシル基がアミノオキシ基で置換されているのがポイントで、PCR時に新たに合成されたDNAに組み込まれはしますが、3'位がブロックされているためにそこで伸長反応が止まるという特長があります(図1f)。つまり、rtITP存在下でPCR反応を行うことで配列上のランダムな位置にrtITPが組み込まれ、そこで伸長反応が止まることになります(図1a)。そして、次のステップとして酸性条件で亜硝酸ナトリウム処理で脱アミノ化し、アミノオキシ基をヒドロキシル基に戻し、通常のPCR条件で残りの配列分を伸長します(図1a,f)。これにより、標的遺伝子配列上のランダムな位置一箇所に1塩基変異が入ったDNA断片のライブラリーを作ることができます。

著者らはこの方法で確かに「ほぼ一箇所のみ」に点変異を導入できること(図1b)、ランダムに(ATGCばらつきなく)塩基を置換できること(図1c)を確認しています。最後に、この手法の適用例として、 β -lactamase 遺伝子のランダム変異体を作成し、各アミノ酸残基の機能的な重要性をマッピングした結果を示しています(図1d)。

最近では次世代シーケンズが注目を集めていますが、"reversibly terminated"な核酸を用いる点は本手法と共通です。一般的なシーケンシングで用いられるSanger法はいわば蛍光標識したATGC各種に対応した"irreversible terminator"でDNA伸長反応をランダムに止め、キャピラリー電気泳動で分析することでDNA配列を読んでいました。次世代シーケンズでは、蛍光標識した"reversible"なterminatorを用いて固相上で、(1) 伸長反応、(2) イメージングによる蛍光検出、そして(3) terminatorによる伸長ブロックの解除("脱保護")、の繰り返しで配列を読んでいきます。紹介した論文も次世代シーケンズも、ケミストの方々からするとあまり馴染みがないかもしれませんが、その背景では化学が生きていると言えるかもしれません。

Zebrafish behavioral profiling identifies multitarget antipsychotic-like compounds.

Bruni G, Rennekamp AJ, Velenich A, McCarroll M, Gendele L, Fertsch E, Taylor J, Lakhani P, Lensen D, Evron T, Lorello PJ, Huang X-P, Kolczewski S, Carey G, Caldarone BJ, Prinssen E, Roth BL, Keiser MJ, Peterson RT & Kokel D, *Nat. Chem. Biol.* 12: 559–566 (2016)

この論文では"zebrafish behavioral profiling"という方法を提案しています。ポイントは、既存の(一般にマルチターゲット性を持つ)抗精神病薬と類似の活性を持つ化合物を、本手法によりライブラリーから発見できることを示した点だと思われます。この論文のストーリーでは、「抗精神病薬」が目的として掲げられています。現在使われている抗精神病薬の多くは、「この標的を活性化(あるいは阻害)するから効く」というような単純明快な作用機序ではなく、複数の標的に作用するような化合物です。これは疾患自体が特定の遺伝子・タンパク質・シグナル伝達経路の異常で説明できるほどシンプルではないため、と考えることができます。

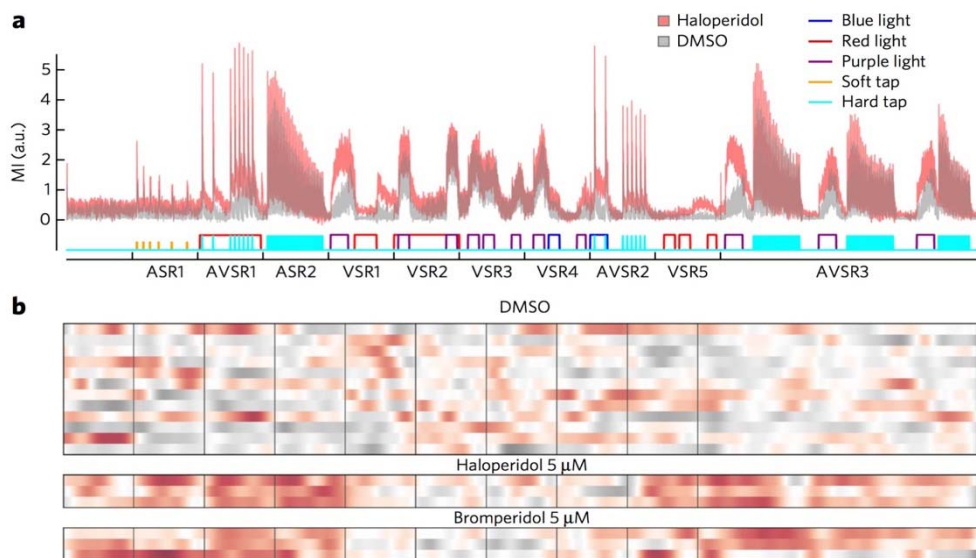


図 2: 論文より一部抜粋。(a) Zebrafish behavioral profiling (DMSO 処理と Haloperidol 処理の比較)。96 well 中の zebrafish 幼生に対して各種刺激(光・音)を順次加え、動きを記録する。(b)類似した活性を持つ化合物のプロファイルの例(一部のみ)。

となると、はたして単一標的分子を狙ったハイスループットスクリーニング(HTS)による探索で本当に良い薬が見つかるのでしょうか。(もちろん抗精神病薬の"活性"を反映するようなin vivoの実験系はあるとは思いますが)何を指標にスクリーニングすれば良いのかもあまり明確ではないのではないのでしょうか。このような背景から、著者らはzebrafishの行動パターンをprofiling(定量的に評価)し、既存の抗精神病薬と類似のパターンを引き起こすような化合物を探索すれば良い、という考え方を提唱しています。

このような考え方で化合物を探索するには、zebrafishの行動パターンをどのようにして定量的かつ十分なスループットで取り扱うかが重要になります。著者らは、96 well plate上でzebrafishに対して音や振動といった刺激を順次(一定のタイミングで)与え、zebrafishの動き(運動量)を時間を追って記録する方法を取っています(図2a)。得られた運動量のタイムコースデータを"behavioral profile"として定義し、実際に既存の抗精神病薬がbehavioral profileをどう変化させるのか調べたところ、機序の異なる薬剤は異なるbehavioral profileを引き起こすことを確認しています(図2b)。つまり、特定の薬剤と似たprofileを示す化合物は、同様の機序・作用を持っている可能性が高いといえます。

このような結果を受け、筆者らは代表的な抗精神病薬としてハロペリドールを選択し、これと類似なプロファイルを示す化合物を約25000化合物のライブラリーから探索しました。得られたヒット化合物に関して、実際に類似の標的受容体群に結合するのか(中枢神経系の受容体群に対する結合能)を調べた結果、ヒット化合物6557321(著者らはFinazineと命名)などが、ハロペリドールと類似の受容体結合プロファイルを有していることを確認しました。この結果から、behavioral profileで類似の作用機序を持つ化合物を探索することができることを確認しました。得られた化合物Finazineはマウスの統合失調症モデルでの評価においてもハロペリドール同様の作用を示したことから、著者らはこの化合物が抗精神病薬のシーズとなる可能性を述べて論文を締めくくっています。

An in vivo multiplexed small-molecule screening platform.

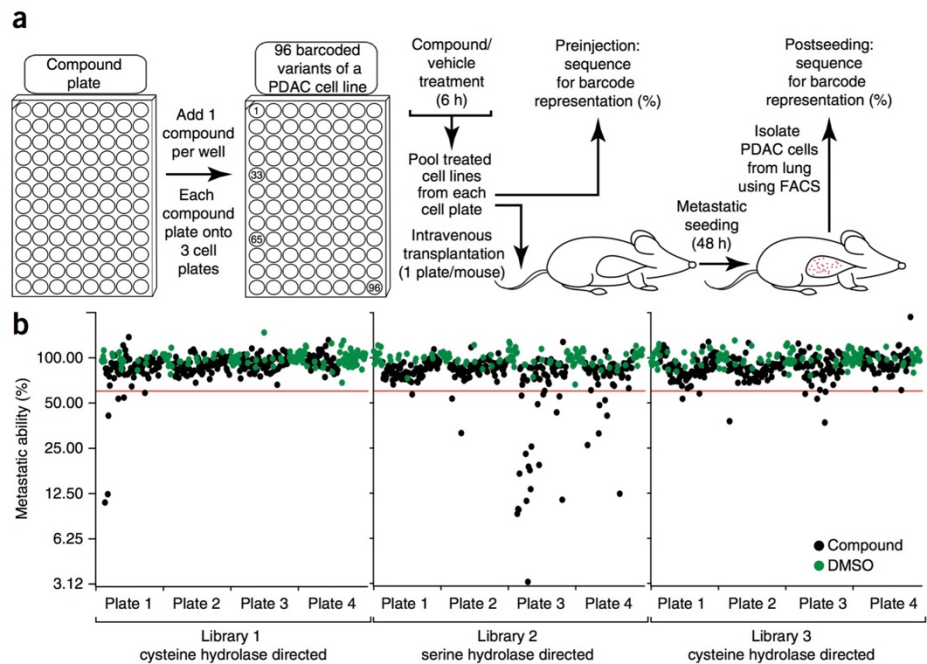
Grüner BM, Schulze CJ, Yang D, Ogasawara D, Dix MM, Rogers ZN, Chuang C-H, McFarland CD, Chiou S-H, Brown JM, Cravatt BF, Bogyo M & Winslow MM, *Nat. Methods* 13: 883–889 (2016)

この論文は、"in vivo"で"multiplexed"なスクリーニングを行っています。この点は前報と共通です。しかしながら、前報は化合物に対するレスポンスを"behavioral profile"として多数取得していた(レスポンスのmultiplex化)のに対し、本論文はレスポンスは転移の度合いという1データのみで、多数の化合物を同時に

(1匹のマウスで)評価するという、化合物処理のmultiplex化を行っている点で異なります。

実際にやっていることの原理はシンプルです。まず、浸潤性の膵癌 (PDAC) 由来の細胞株にまず蛍光タンパク質を発現させ、"barcode"遺伝子を導入したものを96種用意します。この96種のバーコード付き細胞を各種化合物で処理("pretreatment")し、すべてのwellから細胞をまとめてマウスに移植します。移植後、肺や肝臓に集まった(=転移した)細胞からバーコード付き細胞を蛍光を指標にFACSにより回収。回収したバーコード付き細胞のバーコード遺伝子部分をPCRで増幅し、どのバーコードがどの程度含まれているか(つまりどの化合物で処理した細胞がどのくらい転移したのか)をシーケンシングにより解析します。そして、転移する細胞数を減らした化合物をヒットとするというものです。細胞のバーコード標識を化合物のmultiplexedスクリーニングに用いたことが新しさのポイントだと思われます。

図 3: 論文より抜粋。(a) 本論文で行われている multiplexed screening の概要。(b) screening 結果の例。



著者らの実験デザインのもう一つのポイントは、用いる化合物ライブラリーを共有結合性の反応性官能基を持つプロテアーゼ阻害剤ライブラリーに絞っている点です (あえて絞ったというよりも、前処理した細胞を無処理のマウスに移植するという実験上、作用の持続性を考えると必要だったという側面もあると思いますが)。化合物のバリエーションや標的は小さいライブラリーであるがゆえに限られますが、ヒット化合物のバリデーションの段階で大きな利点があります。ライブラリー自体がいわゆるactivity-based profiling probeですので、標的タンパク質の同定や競合などの実験が容易になります。一般に分子レベルではなくフェノタイプレベルでスクリーニングを行った場合、標的・作用機序を決めるのは容易ではありません。この論文では、この標的同定の段階が定法でこなせるように仕組みである点で、(論文化の)実現可能性が高い実験デザインだったものと思います。

以上、最近気になった論文から三報、なるべくわかりやすいように原理を中心に説明させていただいたつもりです。理解不足・至らぬところなど多々あるかと思いますが、お許しいただければと思います。最後になりましたが、本原稿の執筆機会を下さいました、信州大学・大神田淳子先生に感謝申し上げます。

気になった論文

浅野 理沙 (Asano Lisa)

京都大学大学院医学研究科 ケミカルバイオロジー分野 博士課程 3 年

asano@scl.kyoto-u.ac.jp

この度は、生命化学研究レター「気になった論文」の執筆機会を頂きまして、心より感謝申し上げます。私は修士課程まで、東大薬学系研究科の蛋白構造生物学教室に所属し、タンパク質の結晶構造解析を行っていましたが、低分子への興味から京大の上杉研究室へ移り、博士課程からケミカルバイオロジーを学んでおります。分野を変えながらの数年間であったため、研究内容も一貫しておらず、今回どのような論文を取り上げるべきかとも迷いましたが、結晶構造解析が他分野の研究にうまく利用されているなど感じた例を、3 報紹介させていただきます。

Profiling of engineering hotspots identifies an allosteric CRISPR-Cas9 switch

Benjamin L Oakes, Dana C Nadler, Avi Flamholz, Christof Fellmann, Brett T Staahl, Jennifer A Doudna & David F Savage, *Nature Biotechnology* 34, 646–651 (2016)

Cas9 は、RNA によって誘導される DNA エンドヌクレアーゼであり、ゲノムの改変に広く有用とされていますが、Cas9 の活性構造的な制約は明らかにされていませんでした。そこでまず、マウス α -syntrophin の PDZ ドメインをモデルとして、合成トランスポゾンにより Cas9 にランダムにドメイン挿入を行い、Fig.1 に示すようなスクリーニングとシークエシングによって、Cas9 の機能に影響せずにドメイン挿入可能なホットスポットを同定しました。更に上記スクリーニング法が、実際 Cas9 の活性制御に利用可能なサイト同定に利用可能かどうかを検討するため、PDZ ドメインの代わりに ER-LBD (Estrogen Receptor Ligand Binding Domain) の挿入を行いました。ER-LBD は、その結晶構造から、アンタゴニスト結合時にもみ C 末端と N 末端が接近することが分かっています (Fig.2)。つまり、アンタゴニスト結合前後の構造変化を利用して、Cas9 の On/Off を制御できることが期待できます。ER-LBD の挿入個所のスクリーニングは、上記同様に FACS でセレクションを行い、アンタゴニスト 4-HT (4-hydroxytamoxifen) 存在下では Cas9 の活性が On になり、かつ非存在下では Off になるような大腸菌のコロニーを選択後、実際の On/Off 活性を評価しています。その結果、4-HT 依存的な Cas9 の活性化が起こる ER-LBD 挿入サイトが見出されました。このサイトは、PDZ ドメインを用いたスクリーニングで見出されたホットスポットの一つであることが分かり、本スクリーニング法が、Cas9 のアロステリック制御部位の同定に有効であることを示していると言えます。

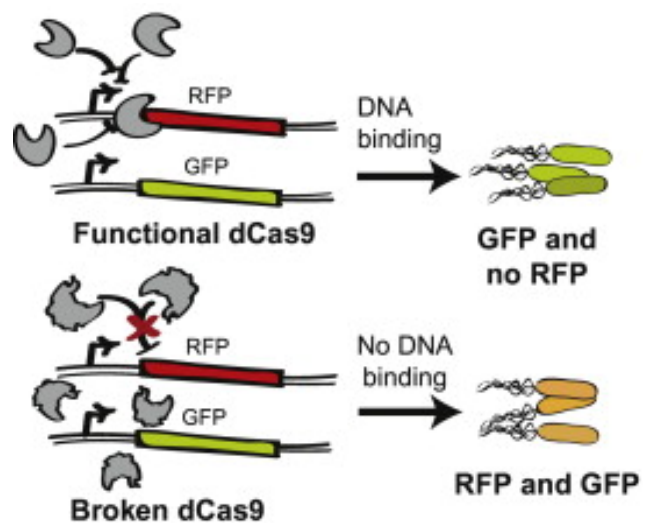


Fig.1 スクリーニングの概略: Cas9 の機能が保たれているときのみ、RFP の発現が抑制され、GFP のみが発現するため、FACS での分離を用いて、機能性 Cas9 のクローンのみを容易にセレクションできる。

最後に上記 ER-LBD 挿入 Cas9 が真核細胞でも機能するかを検討しています。WTCas9 または ER-LBD を挿入した変異 Cas9 を含むコンストラクトを作成し、**Fig.3A** に示すように d2-EGFP 発現 HEK293 細胞に対してトランスフェクションし、これまで同様 FACS でセレクションします。その結果、HEK293 細胞においても ER-LBD 挿入 Cas9 が、4-HT の濃度依存的に活性化することが確認できました (**Fig.3B**)。また、T7 エンドヌクレアーゼを用いた Cas9 の機能検証を行ったところ、ER-LBD 挿入 Cas9 においては、4-HT 存在下でのみヌクレアーゼ活性が認められました (**Fig.3C**)。これらのことから、本技術を用いることで、活性真核細胞にお

いても Cas9 の活性の On/Off が低分子を用いてアロステリックにコントロール可能であることが示されました。

本研究におけるアロステリックに On/Off 制御可能な Cas9 の構築は、今後 Cas9 を用いた新たなゲノム編集技術の発展に貢献することが期待されます。

今回の例においては、結晶構造により明らかとなった ER のダイナミックな構造変化が、Cas9 のスイッチングに利用されており、構造情報が有効に利用されている例ではないかと思ひます。

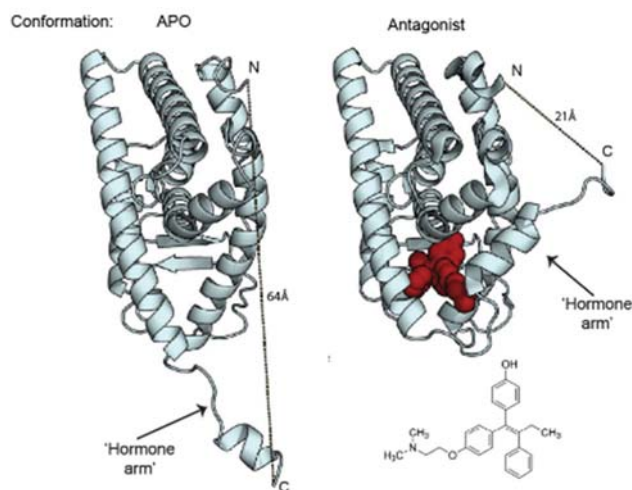


Fig.2 ER-LBD の結晶構造: リガンド非結合型 (左) 及び、アンタゴニスト(4-HT) 結合型 (右)

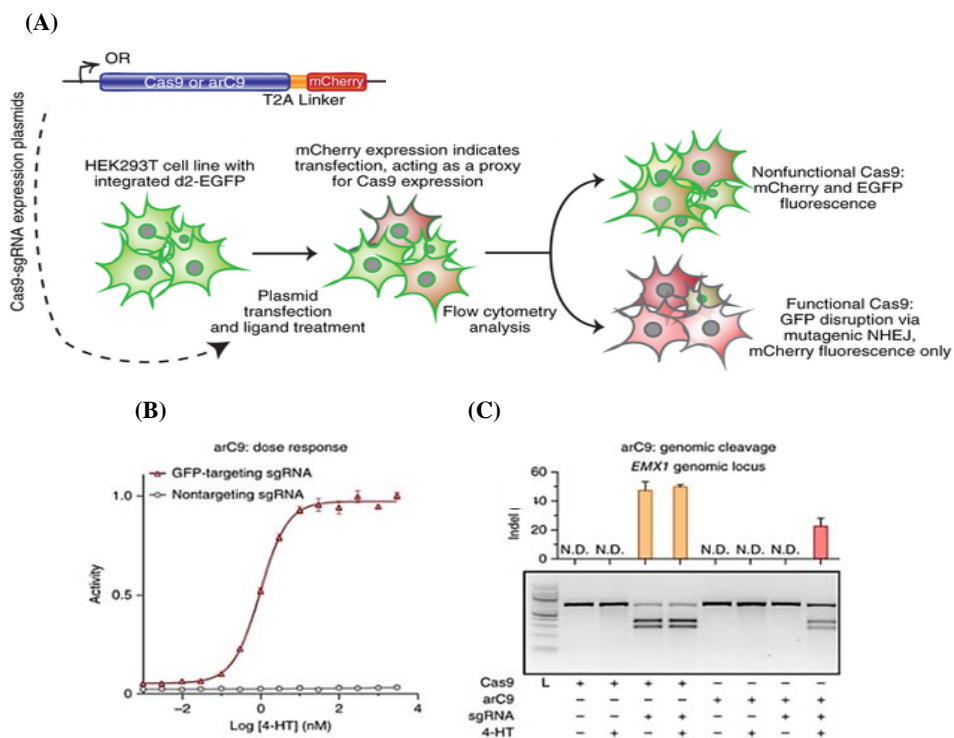


Fig.3 (A) 真核細胞への Cas9 導入及び EGFP の蛍光によるセレクション概略図 (B) Cas9 活性の 4-HT に対する Dose Response (C) T7 エンドヌクレアーゼ I を用いたヌクレアーゼ活性測定

A far-red fluorescent protein evolved from a cyanobacterial phycobiliprotein

Erik A Rodriguez, Geraldine N Tran, Larry A Gross, Jessica L Crisp, Xiaokun Shu, John Y Lin & Roger Y Tsien, Nature Methods 13, 763–769 (2016)

遠赤外蛍光タンパク質(FP)は、内在性生体分子による散乱や吸収などが少ないため、生体内イメージングに有用です。本研究では、アロフィコシアニン α サブユニット(APC α)から FP の新しいクラスを開発しました。ランダム変異体を用いたセレクションの詳細な過程はここでは省略しますが、ネイティブ APC がフィコシアノビルリン (PCB) を組み込むためにリアーゼを必要とするのに対し、今回開発された進化型 FP small

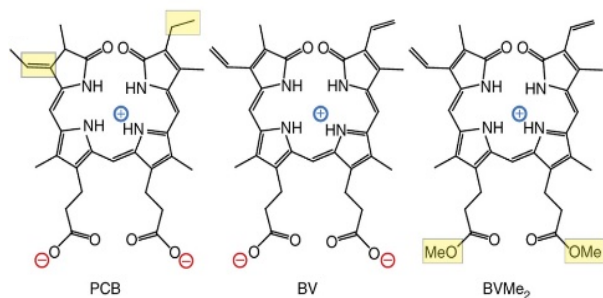


Fig.1 本研究で用いられている化合物の構造

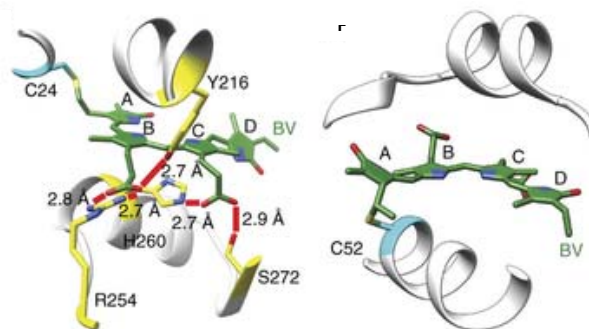


Fig.2 BPHとBVとの共結晶構造 (左)、及びそれをもとにしたホモロジーモデリングによる smURFP の BV 結合部位の構造 (右)

ultra-red FP (smURFP) は、リアーゼなしでビリベルジン (BV) 発色団を共有結合させ、強力で安定な蛍光を呈しました。この smURFP を用いた哺乳細胞のイメージング及び、*in vivo* でのガンのイメージング、更には bacteriophytochrome (BPH) FP と組み合わせることにより、遠赤色および近赤外蛍光細胞周期インジケータを作製することに成功しました。また結晶構造を利用した新たな可能性に触れておきたいと思います。

Fig.2 は BPH と BV との共結晶構造、及びそれをもとにホモロジーモデリングを行った smURFP と BV の結合様式ですが、後者の場合二つのカルボキシ基が smURFP との相互作用に関与していないことが分かります。このことより筆者らは BV の類縁体として BVMe₂ (**Fig.1**) を作成し、細胞透過性を上げ、細胞観察においても高い蛍光強度を得ることに成功しました。また蛍光特性の改善など、更なる構造展開の可能性を指摘しています。

これまでもイメージングのための様々な蛍光タンパク質が使われてきましたが、smURFP は高い強度と安定性を持ち合わせており、また上述したような誘導体展開や、他の APC 遺伝子を利用した新たな蛍光タンパク質の開発などにも期待が持てると考えられます。

Steric trapping reveals a cooperativity network in the intramembrane protease GlpG

Ruiqiong Guo, Kristen Gaffney, Zhongyu Yang, Miyeon Kim, Suttipun Sungsuwan, Xuefei Huang, Wayne L Hubbell & Heedeok Hong, *Nature Chemical Biology* 12, 353–360 (2016)

タンパク質の正しいフォールディング/アンフォールディング状態を知るためには、変性剤や熱・圧力を加えることなく、天然状態で解析を行うことが重要です。それを可能にした一つ方法として、Hong らが 2009 年に発表した「ステリック・トラッピング (steric trapping) 法 (**Fig.1A**)」が挙げられます。本方法は、標的タンパク質の 2 カ所をビオチンで標識し、一価ストレプトビオチン (mSA) の立体障害性を利用して、タンパク質のアンフォールディングを導きます。mSA は一方のビオチンにはストレスなく容易に結合できますが、もう一方のビオチンへの結合は、標的タンパク質がどの程度アンフォールドしているかに依存するため、後者の mSA 結合親和性からフォールディング、あるいはアンフォールディング状態の自由エネルギーを知ることができます。更に、遊離速度が遅い野生型 mSA を利用することで、標的タンパク質をアンフォールドコンフォメーションにトラップすることも可能です。

今回は、ビオチンとチオール反応基、及び蛍光性(1)あるいは常磁性のレポーター基(2)を一体化した新たなステリック・トラッピング・プローブを開発し(Fig.1B)、それぞれ FLET 法と DEER(電子-電子二重共鳴)法によって mSA 結合とタンパク質のアンフォールディングの直接的な観察を可能にしました。またこの方法の実用性を検証するために、膜内プロテアーゼ GlpG のフォールディング状態の解析に適用しました。その結果、従来の変性下における解析では知られていなかったアンフォールディング状態が見出されました。更に GlpG の場合には、ビオチンプローブ修飾が N 末端領域か C 末端領域かにより、異なるエネルギープロファイリングが得られたことより、異なる領域間での複雑な相互作用の存在が予測されました。そこでまず GlpG の高分解能結晶構造から予測される相互作用様式、及び実験から求められたエネルギー変化から、GlpG を二つの領域(全体構造を決定付けているより安定な N 末端領域と、より不安定な C 末端領域)に分けました。そしてそれぞれの領域において、様々なアミノ酸変異によるエネルギー変化をステリック・トラッピング法を用いて算出し、その差を領域間比較することで、どのアミノ酸が GlpG のどの領域の安定性に影響するかを見出しました。それらを結晶構造と照らし合わせることで、新たな協調的相互作用ネットワーク及び局所的相互作用を明らかにしました。

以上の結果は、今回開発した手法が膜タンパク質の天然状態でのフォールディング機構の解明に有用であることを示しています。

今回紹介させて頂いた 3 報から、タンパク質の修飾や組み換え、相互作用の解析やモデリングなど、結晶構造が様々な場面で生かされていることが分かります。タンパク質の構造を解くことだけが目的ではなく、構造生物学的技術によって得られた情報が、分野を超えて更なる研究の発展につながることを期待します。

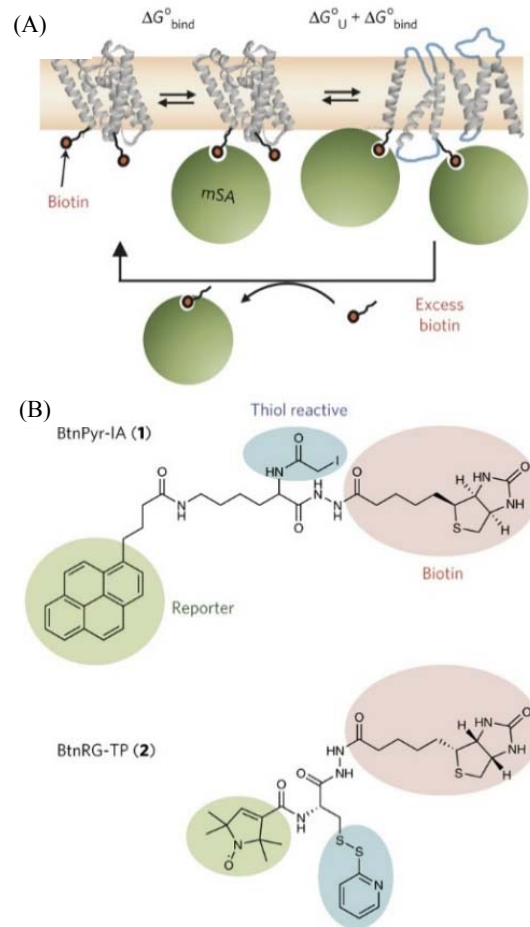


Fig.1 (A) ステリック・トラッピング法の概略図 (B) 今回開発されたステリック・トラッピングプローブの構造。mSA 結合評価のための pyrene が付いたもの (1)、およびドメイン間の距離の変化などをとらえるためのスピントラップ剤である pyrroline のついたもの (2)



留学体験記

SUNY/ミシガン/UCSD

大学留学体験記

～From Art To Chemistry～

Spiber 株式会社
鈴木雄太
(yutagonjp@gmail.com)



はじめに

高校卒業後、2001年7月より渡米しELS（英語学校）、Lorain County Community College、State University of New York at BuffaloにてBS Medicinal Chemistryを、University of MichiganにてPh.D.を取得しました。その後、University of California, San Diegoにて2016年5月までポストドクターをしていました。計15年弱と留学と呼べるのかわかりませんが、今回このような執筆の機会をいただいたので、その経験を総括したいと思います。

留学開始まで

日本では大学に入るまでに、おおよその自分の進路を決めなければならない。その分野の勉強を何もしていない状態で、手探りで進路を選択しそれに向けて受験勉強をする。本当にこの分野で良いのだろうか・・・他にやりたいことが出てくるのではないのだろうか・・・と漠然とした不安を感じた。色々と試行錯誤しながら考えぬいた結果、子供の頃から得意でありまた好きでもあったArtの分野に原点回帰することとし、どうせやるならアメリカでやってみたいと思った。思い立ったが吉日、すぐに留学センターに行き2ヶ月後に渡米した。今考えると英語のわからない自分にとっては非常に大きな決断であったが、その当初は行けばなんとかなるんじゃないかと感じていた。

この決断をする少し前、阪神タイガースの新庄選手がNew York Metsへの移籍を決めた。彼を一度メジャーで見てみようというNew Yorkに2週間ほど旅行に行った。英語はほぼわからなかったが、その何も分からない環境がとても新鮮で楽しく、会話はおぼつかなくても多くの人たちと触れ合えたので、アメリカで暮らしていけるんじゃないかと少し自信がついていた。おこがましい話だが、新庄ができるならきっと自分もできる！と思っていたと記憶している(そういう気にさせてくれる魅力が彼にはあるのだと思う！)。

ELS Language Centers at San Francisco, CA and Cleveland, OH : 2001年8月～2002年6月

留学前におおよその大学を決め、その近郊であるSan FranciscoのダウンタウンにあるELSに通うことになった。ELSには、各国から英語を学びに、また大学進学を目指して留学生が来ている。しかし時期・場所が悪く半分以上が日本人という環境だった。英語(特に文法・読解)が苦手だった私は多くの短期留学生より一つ低いレベルのクラスに属したため、クラスメートは中国人、台湾人、私のたった3人(他のクラスは10

人程)で、ある意味英語を学ぶには恵まれた。このクラスメート達に昼ご飯や休み時間も連れまわされていたため(笑?)、ある程度英語の環境が保てた。ただ、やはり環境に日本人が多く、日本語を喋る場面が多くなってしまった。そのため、自分の留学目的を再確認し、場所を変えることにした。そこで選んだのがCleveland, Ohio。今ではLeBron Jamesの活躍のおかげでCleveland Cavaliersが日本でも知られるところになったが、その当初は目立ったものもなくまさにアメリカの田舎だった(今でも田舎にあることに変わりはないが)。当初は環境が変えられればどこでも良かったため、名前の響きが良いといった安易な考えで決めていた。後に分かったことだが、Ohioの人々はアメリカでも比較的なまりが少ないスタンダードな英語を喋るため、英語学習には良い環境であった。思っていた通り、San Franciscoとは違い日本語の環境はほぼ皆無となった。やる気があればどこでも学ぶことはできると思うが、やはり環境も大事だと思う。自分の他に数名日本人学生がいたがこのような辺鄙な場所に来ている人は意気込みがあり、彼らは現在アメリカをはじめ海外で活躍している。

2001年9月11日はSan Franciscoにいた。その時の町並みの変わりようは今でも鮮明に覚えている。朝の町の中には泣き叫んだり、戸惑いを隠せない人達があった。昼頃には、日常とはかけ離れ、街は閑散としていた。イスラム過激派の犯行とのことだった。その後、Clevelandで友達となったUAE出身の留学生たちは、当時警察によく職務質問をされたらしい。ルームメイトでもあった彼らは毎日の祈り・モスルへの礼拝を欠かさずしており、とても尊敬できる宗教であると肌で感じた。多くの方が認識はしていると思うが、ISとイスラム教を一緒のものと考えないでほしいと心から願う。

Lorain country community college (Elyria, Ohio): 2003年1月～2004年8月

San Franciscoの短大から入学許可は得ていたが、Ohioでの環境が気に入ったため、中西部を中心にArtを専攻できるCommunity Collegeを探し始めた。Clevelandから20分ほど北東の町ElyriaにあるLorain Country Community Collegeを見つけ、訪問した。そこはアメリカの良い田舎町といったところで、話した人々とても良い方ばかりだったためすぐ入学を決めた。Community Collegeにしては規模が大きく、4年制私立大学を優に上回る生徒数(3000-4000人と記憶している)が在籍していた。ただ、当時は留学生が50人弱と非常に少なく、日本人は私を含め4人であった。最初のセメスターは英語学校の延長のような英語学習のクラスに加えて、他のクラスを数個選択するという形であった。次のセメスターからは、20単位弱とかなり多くのクラスを受講した。学校での英語勉強もある程度役に立ったとは思いますが、英語力が向上した一番の要因は学生アルバイトとして図書館やジムで働いたことだったと思う。英語学校や大学の教授・クラスメートと話すこととは違い、相手が聞いてくれるというスタンスではなく対等に話さなければならないし、喋るスピードも格段に速い。最初の頃は何を言っているのか本当にわからなく、あたふたしたのを覚えている(特に電話は出たくなかった!)。大学での授業も最初の頃は、何を言っているのかわからなかった。もちろん否応なくやってくるテストも英語。問題の解答がわからないならともかく、問題の内容がわからないのでは話にならないので、ひたすら教科書を読んで出てくる単語を覚えていた。その甲斐あってか、成績は一つのクラスを除いてAをとることができた。そのような日々を2年弱過ごし4年制大学に編入することになった。この時アメリカで有名な芸術大学からの入学許可ももらっていた。ただ、この頃から、本当にArtをやりたいのなら大学なんか入らずとも、自分でやっているのではないかと思い始めていた。まさにちょうどその時、化学合成による世界最小の車の開発(今年のノーベル化学賞の研究内容)という記事をたまたま見て、『化学でArt』っていうのも楽しそうだなと感じ、専攻を化学に決定した。

State University of New York at Buffalo (Buffalo, New York): 2004年9月～2007年6月

超有名大学からの入学許可も頂いていたのだが、とにかく学費が高い(留学生はどこでも州外の学費になるため特に高い)。奨学金受給の有無は編入してからの決定であったため、もし出なかったらと考えると…。そこで、留学生の学費が比較的安価で、研究も活発な大学を幾つか選んだ。そして、特に興味があったState University of New York at Buffaloの化学学部へ直接連絡を取り、訪問・見学に行き、転入することを決定した。Buffalo wingで有名なBuffaloは約30分でナイアガラの滝に行ける場所にある。化学学部のあるノースキャンパスはAmherstにあり、全米で最も安全な街として選ばれたこともある治安のよい場所である。五大湖の一つエリー湖の東に位置しているため、冬は豪雪でとても大変なのだが(Erie effect)。

転入時に学部長から“研究に興味があるのなら今すぐにでも研究を始めた方が良い”という話を聞き、数名の教授にメールし面談をした。Sophomore (2年生)だったが、有機合成・ペプチドの研究をしているProf. Richard P. Chengの研究室(現National Taiwan University)に配属させていただくことになった。ここで研究は新しい非天然アミノ酸を合成しペプチドに組み込み、ペプチド内での物理的性質を解析するというものであった。2年半の間に、JACSの第2著者をはじめとし計3報の論文を出すことができた。またこの期間中に他の大学生・院生への指導などの経験もしていたため、自然と教育・研究に興味を湧き大学院への進学を決定した。教授が学部生というより博士課程の学生のように扱ってくれたため(良くも悪くも)、大学院に進学した際の大きなアドバンテージとなった。

University of Michigan, Ann Arbor (Ann Arbor, Michigan): 2007年7月～2012年12月

入学時の2007年は、各大学の化学学部へケミカルバイオロジーが新しい分野として新設され始めた年である。ケミカルバイオロジーは有機化学的な手法を用い生体内の機能や反応を解析する分野である。化学→Artと考えていた私にとって非常に魅力的であり、この分野の教授が多くいたDepartment of chemistry, University of Michiganに進学を決めた。University of Michiganの化学学部は創立1908年、全米で最も歴史の古い化学学部である。Ann Arborは全米でも有名なCollege townで、治安が良い住みやすい場所である。大学生に限らず多くの世代の人が住んでおり、最も教育レベルの高い人たちの集まる街としても全米一位に選ばれている。アメリカのCollege townはどこでもそうだが、Footballの日には早朝からTail Gateが始まり、一日中Football一色に染まる。スタジアムは全米で一番大きく、収容人数は10万overとAnn Arborの人口を上回るほど。まさに熱狂的だ。特にMichigan-Ohio戦は全米でも伝統の一戦である。熱狂的なファンであったハウスメイトに連れられ、私も早朝から(早い時は朝6時)お祭り騒ぎに参加していたのはとても良い思い出だ(試合はあまり覚えていない時もあったが)。

化学学部は最初の一年間はローテーションシステムを採用しているため、院生は幾つかのラボを回る。2年目の初めに研究室を選択し決定する。2年目の終わりにあるCandidacy examに合格すれば、正式にPh.D.のCandidateとなる。この間に、6クラスの受講及び学部生の授業・ラボを教える。私の場合、やはり授業を教えるのが非常に大変であった。アルバイトとは違い今度は



1908年に創立された化学学部の建物。この建物の奥に連なって1948年、1988年と40年おきに増設されている。

教える立場であり、またネイティブではないハンデを補うため、どのように授業を進め、どのように話せば相手に伝わるのか常に考え、授業の準備やレポートへのコメントには丁寧に時間かけ、生徒によりよい授業・採点をできるように努力する必要があった。

また、大学院4年目に指導教授の異動のため研究室(むろん研究内容も)を変更した。2年半の間に研究論文を筆頭著者として3報発表して卒業するという目標を自分自身に課し、Prof. E. Neil G. Marshに新たに指導教授となってもらった。その目標を達成するためには、自分自身の力だけでは足りず、様々な共同研究者とチームを作り研究を進めていく必要があった。自ら様々な共同研究者達とのネットワークを作り、研究・議論・定期的なミーティングを重ねて行った。研究を推進し最終的に研究論文まで仕上げて行く過程で、共同研究で必要なコミュニケーション能力やリーダーシップ力を顕著に向上させることができたと思う。最終的には目標に掲げた研究論文3報発表し(*Biochemistry*, 52, 1903 – 1912, *Biochemistry*, 51, 8154 – 8162, *Biochemistry*, 50, 5979–5987)、さらに卒業後は指導教授と共著でこれらの論文をもとにした総説(*ACS Chem. Biol.*, 9, 1242 – 1250)を発表することもできた。大学院4年目で研究室を変えるという逆境を乗り越えられたのも、共同研究者と築いたチームワークがあったからこそだと感謝している。



Michigan Wolverine VS Ohio State Buckeyes

ミシガン大学での研究内容: 『¹⁹F NMR を利用した生理活性ペプチドの生体分子間相互作用の検出』

¹⁹F NMR 測定は ¹H NMR 同様に感度が良く、天然存在比が 100%のため同位体の影響がない上、測定範囲が広いシグナルの分離が良好である。さらに目的以外の成分にフッ素が含まれることがまずないため、¹H, ¹³C, や ¹⁵N NMR で問題となる標的以外からのシグナルによる影響がなく、生化学における分子構造解析や酵素活性の解析に適している¹。本研究では、含フッ素アミノ酸の合成及びペプチド合成により生理活性ペプチド(アミロイド・抗微生物ペプチド)にフッ素を修飾し、¹⁹F NMR によるペプチドの構造解析・生体分子相互作用の検出することに成功した²⁻⁴。

アミロイド線維はアルツハイマーや第二型糖尿病を始めとする様々な病気の原因とされている。近年、中でもアミロイド中間体の毒性が特に強いと注目されているが、その中間体の検出方法に関してはほとんど報告がない。本研究では、

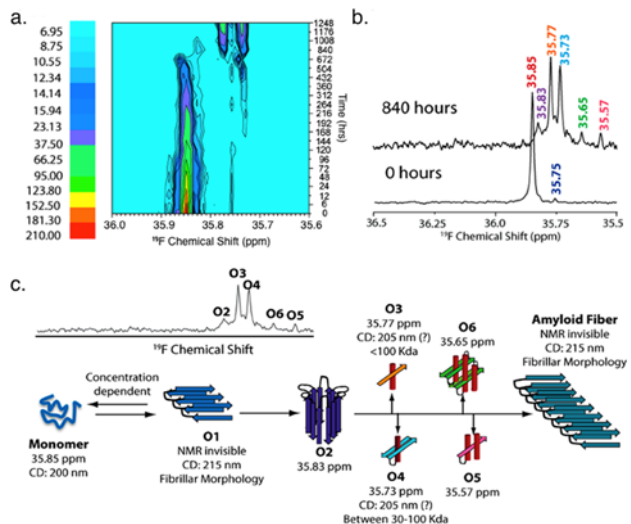


図1. ¹⁹F NMRによるアミロイド中間体の検出. a. 等高線図による¹⁹F NMRピークの変化. b. ¹⁹F NMRピークの経時変化. c. 本研究で得られた結果に関するアミロイド線維形成過程の考察.

新規含フッ素アミノ酸を修飾したアミロイドβ蛋白(Aβ₁₋₄₀)を使用することで、これまで検知できなかった多くの中間体を¹⁹F NMRによりリアルタイムで観察できることを見出した(図1)²。¹⁹F NMRと共に、CD、イオンモビリティ質量分析、原子間力顕微鏡を用いることにより、検出された中間体をより詳しく調べることに成功した。¹⁹F NMRと並行して、Thioflavin T fluorescence assayによるアミロイド線維の検出、及びCDによる構造解析を行った結果、Aβ₁₋₄₀とは異なり、第二型糖尿病の原因とされている膵島アミロイド蛋白(IAPP)からは、アミロイド中間体は検出されなかった³。また本研究では、¹⁹F NMRを使用し、アミロイド阻害剤であるEGCGによるアミロイド線維の防止作用も検知することに成功した。

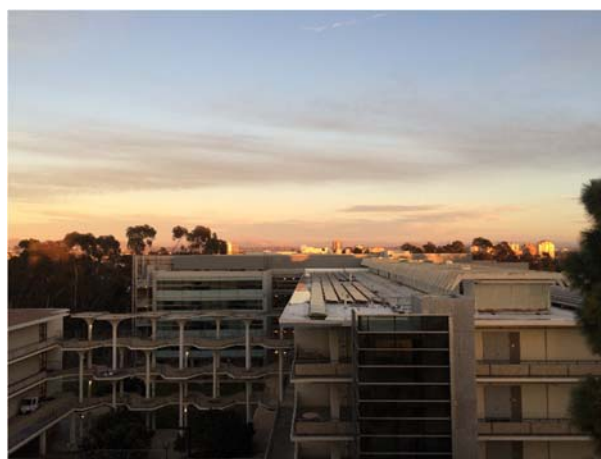
従来のアミロイド線維の検出とは異なり、モノマー体の減少を調べることのできる¹⁹F NMRは今後、アミロイドの研究に更に貢献することが期待できる。例として、本研究で使用したペプチドを用いることにより、細胞壁などの生体分子相互作用の解析及び、アミロイド中間体をターゲットにした創薬の研究にも役立つことが期待できる。また、抗微生物ペプチドと脂質層の相互作用も¹⁹F NMRを利用し検出することに成功している⁴。

発表論文リスト：

1. Marsh, E.N.G. and **Suzuki, Y.** (2014) “Using ¹⁹F NMR to Probe Biological Interactions of Proteins and Peptides.” *ACS Chem. Biol.*, 9, 1242 – 1250.
2. **Suzuki, Y.**, Brender, J. R., Soper, M. T., Krishnamoorthy, J., Zhou, Y., Ruotolo, B. T., Kotov, N. A., Ramamoorthy, A., and Marsh, E.N.G. (2013). “Resolution of Oligomeric Species during the Aggregation of Aβ₁₋₄₀ Using ¹⁹F NMR.” *Biochemistry*, 52, 1903 – 1912.
3. **Suzuki, Y.**, Brender, J. R., Hartman, K., Ramamoorthy, A., and Marsh, E.N.G. (2012). “Alternative Pathways of Human Islet Amyloid Polypeptide Aggregation Distinguished by ¹⁹F NMR Detected Kinetics of Monomer Consumption.” *Biochemistry*, 51, 8154 – 8162.
4. **Suzuki, Y.**, Buer, B.C., Al-Hashimi, H.M., Marsh, E.N.G. (2011) “Using Fluorine NMR to Probe Changes in Structure and Dynamics of Membrane-Active Peptides Interacting with the Lipid Bilayer.” *Biochemistry*, 50, 5979–5987.

University of California, San Diego (La Jolla, California)

サンディエゴ、ようやくアメリカにきて人から羨ましがられる街に住んだ。気候は一年を通して常夏とまではいかないがそれ以上に過ごしやすい気候であり、海にも近いためリゾートとしても有名な場所だ。そのため、ポストドクターにはかなり厳しい物価で、大学の付近のアパートはStudioで\$1700以上とかなり高い。大学院生は最初の2年ほど(少し前まではPh.D.取得までだったらしいが)は大学のアパートがありかなり安くすむ。そのため、ポストドクの方が生活をするのが金銭的には厳しい。とにかく気候は良い場所であったが、私は研究テーマの関係で、寒い電子顕微鏡の部屋に昼間から籠っていることが多く、実際の恩恵は少なかった。



Tezcan Lab(UCSD chemistry and Biochemistry)からの外観

アメリカでの大学院からポストドクターの移動の際、同じような研究内容を続ける研究者もいる一方で、全く違う研究分野に挑戦する研究者も珍しくない。私は後者で、大学院時代に行っていた有機合成・ペプチド研究から、タンパク質の構造を利用し様々な構造物を作成したり、人工酵素の開発を行う研究に大きく変更した。全く違う分野に挑戦する場合は指導教授を探すのが容易ではなく、また本分野の研究は世界的にも限られており難航した。様々な教授に連絡を取ったが、運良くProf. F. Akif Tezcanにポストドクターとして雇ってもらえる手筈となった。Tezcanラボはその当時ポストドクターが私を含め4人、大学院生が8人程度と中規模の研究室であった(現在もほぼ同じくらい)。そのため、教授は毎日一度はラボに立ち寄り全員と進捗状況を話していた。また、チームごとに毎月曜日に報告会・全員でのミーティングがあり、話す機会がかなり多かった。研究室では二人の大学院生を指導し、自ら発案したアイデアをもとに大学院生達と新しい研究を立ち上げるなどプロジェクトリーダーとしての役割も務めた。また、実用的な成果を挙げることも視野に入れて研究を進め(下記の内容参照)、当研究室では初めてとなる特許の出願にも携わった。

最終的に、研究をまとめた論文はNature (*Nature*, 533, 369 – 373)で発表することができた。この研究内容は私がスピノフとして始めた研究であったため、論文の先駆けとなったデータへの教授からの評価は、当初はあまり良いものではなかった。理由は“シンプル過ぎてつまらない!”とのことだった。しかし、“タンパク質を基盤として2Dマテリアルを作る方法は複雑な手法ばかりで、逆にシンプルだからこそ価値があるんだ!”と反論し、教授と言い争いをした。その他の場面でも、理論詰めで話をする教授と感覚で話をする私との間ではいつも議論が白熱しすぎる事が多く、もはや喧嘩のようになった時も度々であった。“あのような白熱した喧嘩も今では良い思い出だね”と後に教授と話したが、それは研究室を離れる際になってであった(笑)。色々と紆余曲折はあったが研究が進むにつれ、教授も徐々に“これならNatureを狙えるのでは!”とポジティブな方向に意見を変えていき、Natureに投稿するに至った。論文投稿から一ヶ月半、首を長くして待っていた返信を受け取った。幸いにもReviewerの反応はみな好意的であった。Reviseをとにかく早く出す!という方針のもと、予定していた年末の冬休みの日本への一時帰国を取りやめ、研究室でReviseのための追加実験をした。休み返上で頑張った結果、1月の中旬に返信を出すことができ、アメリカ時間の2016年2月8日に実質のAcceptの連絡を受け取った。そのAcceptのメールを見た時は、本当に嬉しかったし、とても安堵したのを覚えている。また、2月8日は奇しくも私の誕生日で、最高の誕生日プレゼントとなった!

また、この研究は特に、『化学でアート』するという意味でもアメリカでの集大成になったと自負している(～From Chemistry to Art～)。

研究内容: 『タンパク質を基盤とした2Dバイオマテリアルの開発と応用』

近年、グラフェンを始めとする2Dマテリアルは構造・機械・電子的にユニークな物性を持つため、電子部品分野や医療分野など幅広い分野での応用が期待されている。タンパク質は化学構造の多様性と機能性があり、遺伝子組み換えによる再構成が出来ることから、バイオマテリアルの基盤として魅力的な構成単位である。しかし、既存のタンパク質の設計 (Sinclair/Noble, *Nat. Nanotechnol.* **6**, 558 (2011); Gonen/Baker, *Science* **348**, 1365 (2015)) では、構造の多様性に伴い複雑性も増すため高度な技術が必要である一方、成功確率が低くコストパフォーマンスが悪いため、一般化はほぼ不可能であった。

本研究では、タンパク質の対称性と遺伝子組み換えを利用することにより、既存のものと比較しシンプルなデザインによる2D超分子集合体の構築に成功した。図2に示した通り、透過型顕微鏡での観察により、同じタンパク質から3つの異なった2D超分子集合体を構築及び詳細を明らかとすることに成功し、またこれらの集合体がデザインしたものと一致することも証明した。本研究の新規アプローチは既

存の設計に比べ、簡易的にデザインすることができ、成功率も高くコストパフォーマンスが良いため、タンパク質工学と材料サイエンスの架け橋になると期待できる。現在、酵素やアフィニティタグなどを基盤のタンパク質に融合することにより、外部応答型バイオ材料としての利用可能性を探索している。将来的に、本材料を使用し、既存の方法では不可能なタンパク質の構造解析や医療及び工業での新素材としての応用も期待できる。

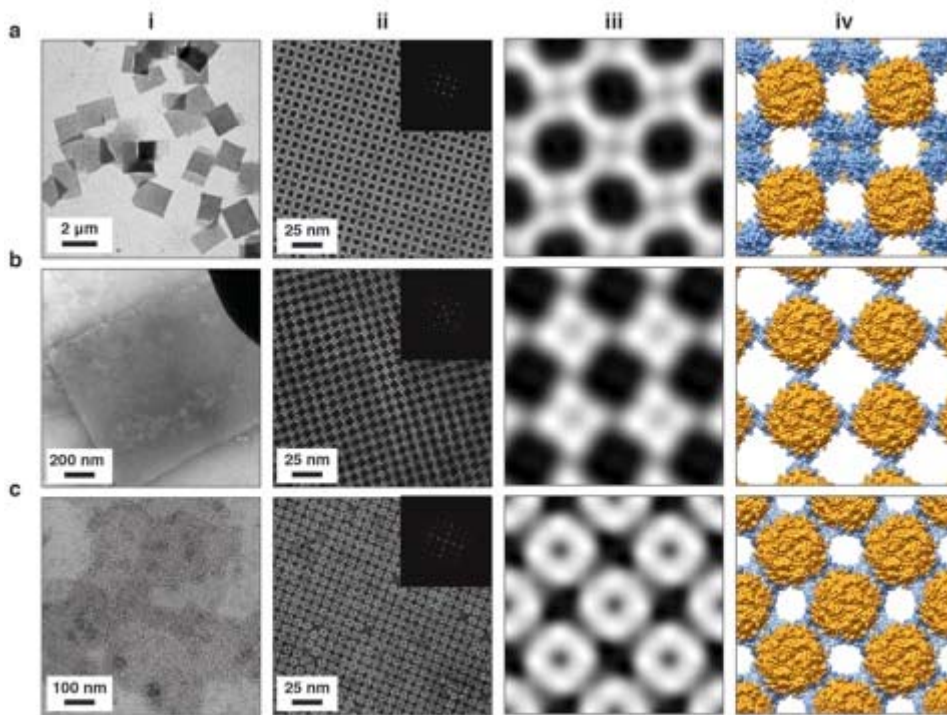


図 2. 透過型顕微鏡による 3 つの異なる 2 D 超分子集合体の観察及び考察 (a, b, c). Column (i) Low-magnification views, (ii) High-magnification views, inset: Fourier transforms, (iii) reconstructed 2D images, (iv) Structural models based on the 2D reconstructions. The high-resolution limits in panels iii are $\sim 14 \text{ \AA}$.

論文:

Suzuki, Y., Cardone, G., Restrepo, D., Zavattieri, P. D., Baker, T. S., Tezcan, F. A., (2016) "Self-Assembly of Coherently Dynamic, Auxetic Two-Dimensional Protein Crystals." *Nature*, 533, 369 – 373. *Highlighted by C&EN, Chemistry world, ScienceDaily, Daily Mail, and Materials Today.*

知的財産:

1. "Method for fabricating two-dimensional protein crystals" **Suzuki, Y** and F. A. Tezcan, U.S. patent application filed, 2015
2. "Self-Assembled, Molecular Auxetic Materials" **Suzuki, Y** and F. A. Tezcan, U.S. patent application filed, 2015

英語に関して:

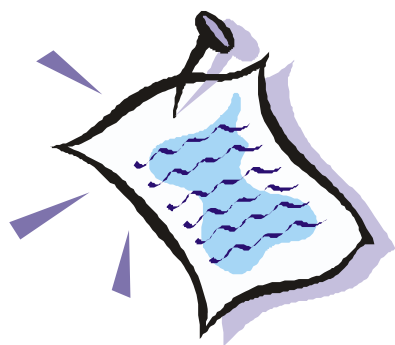
最近英語はペラペラ?とよく聞かれるが、渡米前に自分が考えていた程ではないと思う。数年いれば Nativeみたいに〜と思っていたが、そんなに甘いものではなかった(笑)。やはり、留学する時の年齢は非

常に重要で、高校生の時から渡米していた友達の英語は私のものよりも、Nativeが理解し易いようである。また、大学院生として留学するよりも、できれば学部生の方が望ましいと思う。大学院生は研究室に滞在する時間がほとんどとなるので、多くの人と触れ合い、喋る機会が必然的に少なくなる。むしろポストドクターも同様で、研究をするのは当然として、それに加えて積極的に周りと話さず環境を作らないと“アメリカにいたけど英語は全然喋れない”といったことにもなり得る。

最後に:

今考えると、かなり無謀な渡米であったが、気づいてみれば15年弱と長期の間アメリカで過ごすこととなった。最初は英語もままならない中の生活だったが、すべてが新鮮で楽しかった。ここまでやってこれたのは多くの人々の支えのおかげであり、素晴らしい人々に出会えたことはとても幸運であったと思う。英語学校・LCCC・SUNY Buffalo・ミシガン大学・UCSDでお世話になった方々に感謝いたします。また、本稿の編集をしてくださった千葉大学東頭二郎先生に感謝いたします。最後になりますが、本稿を執筆する機会を与えて頂きました信州大学大神田淳子先生に深く感謝いたします。





シンポジウム等会告

2016年ノーベル化学賞 Jean-Pierre Sauvage 教授 講演会

2017年3月2日(木)に、(仏)ストラスブール大学より Jean-Pierre Sauvage 先生をお招きし、東京大学の安田講堂にて講演会を開催致します。ご存じの通り、Sauvage 先生は、分子トポロジーそして分子機械の創造のご業績により、2016年のノーベル化学賞の荣誉に輝かれました。ご受賞以来、大変ご多忙にされている中の貴重なお時間を頂いて、本講演会の開催の運びとなりました。Sauvage 先生のご研究とその哲学に直接触れられる滅多にない機会ですので、貴研究室ならびに貴専攻の学生・若手研究者へお勧め下さいますようお願い申し上げます。なお、会場の安田講堂は700名(1階席)収容できますので、万障お繰り合わせのうえ奮ってご参加下さい。

日時： 2017年3月2日(木) 15:00 - 17:00
(14:30 開場)

場所： 安田講堂 (東京大学本郷キャンパス)

参加費： 無料 (事前参加登録不要)

対象： 学生・研究者 (学内、学外問わず)

主催： 東京大学大学院理学系研究科 化学専攻、同工学系研究科 化学・生命系3専攻

2016年
ノーベル化学賞
Jean-Pierre Sauvage 教授
講演会
「分子トポロジー
そして分子機械の創造」
2017 3/2 (木) 安田講堂
(開場14:30)
15:00 - 17:00
(東京大学 本郷キャンパス)
参加料無料
事前参加登録不要
(※当日は学生証・職員証をお持ち下さい)
主催：理学系研究科 化学専攻
工学系研究科 応用化学専攻・化学システム工学専攻・化学生命工学専攻

*セキュリティの都合上、当日入口にて、学生証(職員証)を拝見し、お名前とご所属のご記入をお願いする点、ご了承下さい。

*会場地図：http://www.u-tokyo.ac.jp/campusmap/cam01_00_01_j.html

連絡先：東京大学 塩谷 光彦 (理学系研究科) / 藤田 誠 (工学系研究科)

E-mail: shionoya@chem.s.u-tokyo.ac.jp / mfujita@appchem.t.u-tokyo.ac.jp

(塩谷)

日本化学会 第97春季年会 (2017)

<http://www.csj.jp/nenkai/97haru/>

特別企画

生命化学が先導する分子機能創成の最先端：生体機能・生体分子を超えるためのアプローチ

Frontiers of Functional Molecules Inspired by Biomolecular Chemistry: Approaches toward Functions beyond Biological Molecular Systems

生体機能や生体分子に学び、従来の発想にはない機能性材料開発が盛んに進められてきた。これらは洗練された材料合成技術、材料加工技術などに裏打ちされ、生体模倣材料として急速な発展を遂げている。一方で、遺伝子工学の進歩に伴い、タンパク質をはじめとする生体分子を思いのままに設計し、天然に存在しない生体分子を材料として活用できる時代になっている。本特別企画では、精密有機合成技術を基盤とした材料開発に基づくアプローチ、及び、バイオテクノロジーを活用した生体分子創製技術に基づくアプローチに焦点を当て、生体、及び、人工分子を用いて、『生体機能・生体分子を超える』新奇機能材料を開発する気鋭の研究者を集め、今後の機能性材料創製の新機軸について議論していく。

日時：2017年3月16日 13:30-16:30

会場：慶應義塾大学 日吉キャンパス

13:30-13:45 趣旨説明 金原 数 (東工大生命理工)

(座長) 松浦和則 (鳥取大院工)

13:45-14:15 櫻井和朗 (北九大院環境システム) 「プラトニックミセルの創製と生体材料への応用」

14:15-14:40 星野 友 (九大院工) 「プラスチック原料からのタンパク質様の機能を有するナノ粒子の合成」

(座長) 上野隆史 (東工大生命理工)

14:40-15:05 古田健也(情報通信研究機構未来 ICT 研) 「人為的に設計した新しい生物分子モーターの合成」

15:05-15:30 梅津光央 (東北大院工) 「超機能タンパク質の創製」

(座長) 三好大輔 (甲南大 FIRST)

15:30-15:55 安原主馬 (奈良先端大物質創成) 「天然ペプチドを超える抗菌性分子のバイオミメティック・デザイン」

15:55-16:20 松村和明 (北陸先端大マテリアルサイエンス) 「両性電解質高分子による超機能バイオマテリアル創成」

16:20-16:30 クロージング 岸村顕広 (九大院工)

(金原)

特別企画

先端計測の動向

研究を支える機器開発と共用プラットフォームの構築 (CSJ カレントレビュー企画)

日時：2017年3月19日 13:30-16:30

会場：慶應義塾大学 日吉キャンパス S6 会場(第4校舎独立館 DB203 教室)

13:30- 趣旨説明 (東理大理工) 二瓶 好正

13:40- 次世代質量分析システムの開発
(島津製作所) 田中 耕一

14:10- 次世代 DNA シークエンサーの開発
(名大院工) 馬場 嘉信

14:40- 次世代電子顕微鏡の開発—原子分解能・ホログラフィー電子顕微鏡
(日立製作所) 品田 博之

15:10- 誘電スペクトロサイトメーターによる単一細胞誘電分光
(ソニー) 大森 真二

15:30- ガスクラスタライオンビームを用いた二次イオン質量分析法の開発
(京大院工) 松尾 二郎

15:50- 計測分析共用プラットフォームの構築
(慶大理工) 鈴木 孝治・尾嶋 正治・一村 真悟

(馬場)

特別企画

最新の発光測定技術が支える発光性材料開発の最前線

Frontiers of Development of Luminescent Materials Supported by Recent Technologies in Emission Measurements

近年の EL 材料、発光性プローブの進歩は目覚ましく、このような開発研究では発光スペクトル・発光量子収率・発光寿命など基本的な光物性が材料(分子)設計上、重要である。しかしながら、自動化された装置類の普及により測定原理を十分理解せず、誤ったスペクトルや数値が報告される事例が増加している。このような事態に警鐘を鳴らすべく、最近、発光測定ガイドラインが IUPAC Technical Report として報告された(Pure Appl. Chem., 2016, 88, 701)。本企画では、同ガイドライン執筆者と光化学分野で活躍される先生方に、最新の発光測定技術と正しい結果を得るための技術的なポイントをご紹介いただくとともに、それらによって評価された発光性材料開発の研究の最前線をお話しいただく。

日時：2017年3月19日 13:30-16:30

会場：慶應義塾大学 日吉キャンパス S4 会場 (第4校舎(B棟)32 教室)

Chairperson: Ken Sakai

13:30-13:55 Opening remark: background of the IUPAC project for publishing the guidelines for luminescence measurements (Kitasato University) Hitoshi Ishida

Chairperson: Koichi Nozaki

13:55-14:30 Avoiding common pitfalls in luminescence spectroscopy (Durham University, UK) Andrew Beeby

Chairperson: Miki Hasegawa

14:30-15:05 Evaluation of circularly polarized luminescence from lanthanide complexes and application

to chiral sensing system (Univ. of Toyama) Munetaka Iwamura

Chairperson: Kengo Suzuki

15:05-15:30 Absolute emission quantum yield of singlet molecular oxygen in solution determined using an integrating sphere instrument (Gunma University) Seiji Tobita

Chairperson: Masako Kato

15:30-15:55 Fluorescence quantum yield measurements in highly purified organic crystals (Nihon University) Ryuzi Katoh

Chairperson: Kazuyuki Ishii

15:55-16:20 Estimation of the emission quantum yield for luminescent lanthanide materials (Hokkaido University) Yasuchika Hasegawa

16:20-16:30 Closing remark (Kyushu University) Ken Sakai

※ 化学と工業誌 1月号記載のプログラムから一部変更になっています。

(石田)

特別企画

Coordination Asymmetry: Science of Asymmetric Structures and Functions

自然界で最も高次な機能を有する生命分子システムは、それらを構成する物質や空間の非対称な構造と機能に基づいている。不斉炭素の化学は、我が国の有機合成および高分子化学分野の研究者によって著しい発展を遂げてきたが、周期表の約 8 割を占める金属元素を含む物質の非対称な構造と空間の化学は、未だ未開拓な部分が多い。本企画では、物質構築における非対称な構造と空間の構築およびその解析法に焦点を当て、特に立体、反応、物性の要になりうる金属錯体分子や金属含有物質を用いた新しいアプローチについて議論し、今後の物質科学を展望する。

日時：2017年3月19日 13:30-16:30

会場：慶應義塾大学 日吉キャンパス

13:30- Opening remarks (Grad. Sch. Sci., The Univ. of Tokyo) SHIONOYA, Mitsuhiro

13:35- Absolute structure determination by the crystalline sponge method : applications to asymmetric synthesis and natural product chemistry (Grad. Sch. Eng., The Univ. of Tokyo) FUJITA, Makoto

14:00- Metalloprotein assembly toward photodevice construction (Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.) HAYASHI, Takashi

14:25- Local optical activity of nanomaterials (PMS, IMS) OKAMOTO, Hiromi

14:50- Development of asymmetric magnetic coordination compounds (Grad. Sch. Pure Appl. Sci., Univ. of Tsukuba) TOKORO, Hiroko

15:15- Optical Activity in Chiral Nanoparticle system (Grad. Sch. Mat. Sci., NAIST) NAKASHIMA, Takuya

15:40- Asymmetric photoredox catalysis with chiral-at-metal complexes (Philipps-Univ. Marburg) ERIC, Meggers

16:25- Concluding remarks (Mitsui Chemicals, Incorporated) KAWASHIMA, Nobuyuki

(塩谷)

日本薬学会 第137年会 (仙台)

<http://nenkai.pharm.or.jp/137/web/>

「中分子創薬研究のフロンティアー反応集積化が導く中分子戦略：高次生物機能分子の創製」

日時：平成29年3月27日(月) 午後13時15分～15時15分

会場：仙台国際センター C会場 (大会議室 萩)

近年、次世代の創薬技術として中分子創薬が注目を集めている。中分子とは低分子と高分子の間サイズである中分子領域の化合物(分子量500-5000程度)であり、天然物、糖鎖、ペプチド、核酸など化学多様性に富んでいる。本シンポジウムでは、幅広い視点での中分子創薬に向けた展開を行っている研究者を中心にシンポジウムを計画した。生体分子の機能集積型中分子創製には、しばしば精密な有機合成反応さらには多段階の合成が必要とされる。そこで、今回、精密合成に基づいたペプチド中分子の合成、さらには合成が困難である高次生物機能複合糖質の合成に関する講演を計画した。本講演では高いレベルの科学的基礎に基づく研究に関する議論が可能になると期待される。また、中分子ペプチドの機能に着目した新たな生体機能の創製研究、さらには特殊な核酸構造に結合する中分子開発についての講演を通し、今後の中分子創薬に向けた展望について議論したい。

- | | |
|-------------|--|
| 13:15～13:20 | シンポジウムの開催趣旨
永次 史 (東北大・多元研) |
| 13:20～13:40 | 代謝に着目した中分子糖鎖分子の設計と機能
平井 剛 (九大・薬) |
| 13:40～14:00 | ペプチド系天然物中分子の合成・機能・活性
井上将行 (東大・薬) |
| 14:00～14:20 | ペプチド化学を基盤とした中分子創薬への展開
林 良雄 (東京薬科・薬) |
| 14:20～14:40 | 生物機能中分子の細胞内へ導入基盤の創出
二木史朗 (九大・薬) |
| 14:40～15:00 | 核酸高次構造をアルキル化する中分子の開発
永次 史 (東北大・多元研) |
| 15:00～15:15 | 総合討論 |

(永次)

お茶の水女子大学リーディング大学院・化学科講演会

日時：2017年3月29日(水) 14:30～16:40

場所：お茶の水女子大学理学部化学科第1講義室(理1-415)

参加費無料

連絡先：お茶の水女子大学理学部化学科 棚谷 綾 (03-5978-2716)

- 14:30-15:30 Peptides as Tools to Eradicate Intracellular Pathogenic Bacteria and Develop Biomaterials for Regenerative Medicine
(Department of Chemistry, Purdue University) Jean A. Chmielewski
- 15:40-16:40 Modulating ABC Transporters at Blood Brain Barrier
(Department of Chemistry, Purdue University) Christine A. Hrycyna

化学科&リーディング大学院講演会
Department of Chemistry, Faculty of Science &
Leading Graduate School Promotion Center, Ochanomizu University
お茶の水女子大学理学部化学科、共催：リーディング大学院推進センター

Peptides as Tools to Eradicate Intracellular Pathogenic Bacteria and Develop Biomaterials for Regenerative Medicine



講師 Prof. Jean A. Chmielewski
Alice Watson Kramer Distinguished Professor
Department of Chemistry, Purdue University, USA


This seminar will provide insights into two different areas in Chemical Biology: the development of agents that target intracellular pathogenic bacteria and biomaterials for tissue engineering. The first half of the talk will focus on the significant challenges posed by bacterial pathogens that have evolved to inhabit mammalian cells, such as phagocytic macrophages. Within these intracellular safe havens bacteria, such as *Mycobacterium*, form a repository and are able to evade the host immune response as well as a number of antibiotic drugs. We have developed a class of molecules, cationic amphiphilic polyproline helices (CAPHs), that have a dual mode of action: non-lytic antibacterial activity with the ability to localize within mammalian cells. These agents efficiently target and kill pathogenic intracellular bacteria, including *Salmonella* and *Brucella*, within human macrophages. In the second half of the talk the focus will switch to an innovative strategy to produce synthetic, three-dimensional, functionalized collagen-based materials with enhanced biological functionality over native collagen. Small collagen peptides have been designed that self assemble into well-ordered nano and microscale structures. Strategically placed metal-binding sites within the collagen peptides drive metal promoted assembly, producing unique micron-sized spheres, fibers, meshes and disks. Additional ligand binding sites within and on the surface of the collagen materials are harnessed for inclusion of bioactive molecules, including growth factors and cell adhesion agents. The use of these materials in drug delivery and tissue growth will be discussed.

日時： 2017年3月29日(水) 14:30～15:30
場所： 化学科第1講義室(理1-415)

連絡先： 理学部化学科 棚谷(内2716)

化学科&リーディング大学院講演会
Department of Chemistry, Faculty of Science &
Leading Graduate School Promotion Center, Ochanomizu University
お茶の水女子大学理学部化学科、共催：リーディング大学院推進センター

Modulating ABC Transporters at Blood Brain Barrier



講師 Prof. Christine A. Hrycyna
Professor
Department of Chemistry, Purdue University, USA

The multidrug resistance transporters P-glycoprotein (P-gp) and ABCG2 are highly expressed in capillary endothelial cells of the blood-brain barrier. These transporters effectively limit the brain penetration of many drugs, including antipsychotic agents used to treat schizophrenia, by actively effluxing the drugs out of cells and into the blood stream before they can reach their targets. This seminar will discuss our novel chemical approach to increase the brain concentration of drugs used to treat brain disorders. We have developed a new class of agents - Trojan Horse dimers of known drugs to evade transporters at the BBB and deliver therapies to the brain. The synthesis, biochemical characterization and cellular and *in vivo* efficacy of these novel agents will be presented.

日時： 2017年3月29日(水) 15:40～16:40
場所： 化学科第1講義室(理1-415)

連絡先： 理学部化学科 棚谷(内2716)

(大神田)

第27回金属の関与する生体関連化学シンポジウム (SRM2017)

- 日時 2017年(平成29年)6月16日(金)～17日(土)
- 場所 東京理科大学神楽坂キャンパス 1号館記念講堂 (JR 総武線飯田橋駅から徒歩約5分)
- 主催 日本薬学会物理系薬学部会
- 共催 東京理科大学総合研究院イメージングフロンティアセンター、分子連関相乗系研究部門、医理工連携研究部門、バイオオルガノメタリクス研究部門
- 協賛 日本薬学会化学系薬学部会・医薬化学部会、日本化学会

発表申込締切 2017年(平成29年)4月7日(金)

発表要旨締切 2017年(平成29年)5月2日(火)

参加登録締切 2017年(平成29年)5月19日(金)

参加費(事前登録) 一般(会員)5,000円、一般(非会員)7,000円、学生(会員、非会員)3,000円

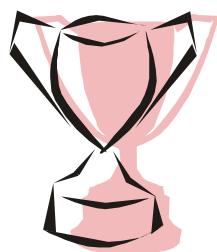
参加費（当日登録） 一般（会員）7,000 円、一般（非会員）9,000 円、学生（会員、非会員）4,000 円
懇親会費（事前登録） 一般 7,000 円 学生 3,000 円
懇親会費（当日登録） 一般 8,000 円 学生 4,000 円

問合先

〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641 東京理科大学薬学部 青木 伸

Tel 04-7121-3670 <https://sites.google.com/site/srm2017tus/>

（青木）



お知らせ

受賞

馬場 嘉信（名古屋大学 教授）

寺部 茂 賞

「ナノバイオデバイスの創製と生体分析への展開」

（2016 年 11 月）

村上 裕（名古屋大学 教授）

平成 28 年度 第 13 回 日本学術振興会賞

「非天然アミノ酸を含むペプチドの翻訳合成」

（2016 年 12 月）

南 豪（東京大学 講師）

日本分析化学会関東支部 2016 年度 新世紀新人賞

「超分子分析化学に立脚したセンサデバイス・チップの創製」

（2017 年 1 月）

森井 孝（京都大学 教授）

平成 28 年度 第 34 回 日本化学会学術賞

「核酸タンパク質複合体の分子認識に関する生物有機化学研究」

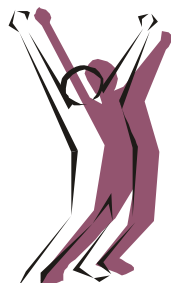
（2017 年 3 月）

後藤 佑樹 (東京大学 准教授)

平成 28 年度 第 66 回 日本化学会進歩賞

「試験管内人工生合成系による新規生物活性分子の創製」

(2017 年 3 月)



次期会長が選出されました



佐藤 智典 氏

第 19 回生命化学研究会において総会が開催され、佐藤 智典 氏 (慶應理工) が第 7 代会長として選出されました。任期は 3 年で、新体制は 3 月 1 日から始動致します。これまで会の発展にご尽力下さいました藤井 郁雄 会長、誠にありがとうございました。



【編集後記】

本号の巻頭言は三原久和氏 (東工大) に頂きました。教育の国際競争に拍車のかかる昨今を見据え、グローバルに活躍する若手人材を育成し国際的な研究者ネットワークを構築してゆくことの大切さを示されました。そして「実際、国内でも国外でも信頼できる友人が多くできることは、楽しいことです」と結ばれています。留学体験記はSpiber (株) の鈴木雄太氏に執筆願いました。鈴木

氏も留学生生活を振り返り、「素晴らしい人々に出会えたことはとても幸運であったと思う」と述べられています。私も最近、新たな国際交流の脈絡を得ました。2015年の暮れ、ある国際学会で米国人科学者であるJean Chmielewski 氏に巡り会い懇意になり、さらに彼女の紹介で同僚のChristine Hrycyna氏とも親しく話す機会を得ました。この時の出会いがきっかけで、彼女たちが3月に来日し、大阪府立大学の藤井郁雄氏ならびにお茶の水女子大学の棚谷綾氏のお世話で両大学における講演会を開催することになりました。年度末の慌ただしい頃ですが、できれば多くの学生さんに彼女たちの話を聞いて何かを感じて欲しい。そう願っています。言うまでもなく科学に国境や性差の壁はありません。若手の皆さんには研究仲間を国際的に求め、グローバルな視点で切磋琢磨してゆくためにも、海外留学を是非目指して欲しいと思います。

本号では、生理活性人工合成分子に向けた新しい切り口として、機能性高分子によるたんぱく質認識とリフォールディングに関する研究を星野友氏（九大）に、がん特異的な細胞内ゲル形成と細胞死誘導に関する研究を丸山達生氏（神戸大）にご紹介頂きました。加えて、3名の若手に先端研究の論文を紹介して頂くなど、読み応えのある内容となっております。力作をお寄せ下さった7名の著者の皆さんに心よりお礼を申し上げます。

次号（No. 54）は、井原さんのご担当により、2017年6月頃の発行を予定しております。どうぞお楽しみに。

2017年（平成29年）2月7日

大神田 淳子

生命化学研究レター編集委員

第53号編集担当：大神田 淳子

信州大学、johkanda@shinshu-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

