

生命化学研究レター

(2017年10月)

2. 巻頭言

分子の多様性を求めて

東京工業大学生命理工学院 金原 数

4. 研究紹介

4. インテリジェントナノハイブッド

～ナノ微粒子操作によるバイオ応用～

京都大学大学院工学研究科 佐々木 善浩

10. Holy Grail をさがして

～研究者にとっての聖杯～

東京農工大学工学研究院 川野 竜司

15. 酸化酵素の誤作動を誘起する疑似基質の開発と高難度酸化反応

～酵素だって間違える～

名古屋大学大学院理学研究科 荘司 長三

21. 論文紹介「気になった論文」

東北大学多元物質科学研究所 稲垣 雅仁

大阪大学大学院工学研究科 大洞 光司

27. 留学体験記

マックスプランク陸生微生物学研究所留学体験記

～化学から生物学へ～

埼玉大学理工学研究科 藤城 貴史

31. お知らせ

会告

編集後記

巻頭言

分子の多様性を求めて

東京工業大学生命理工学院 金原 数

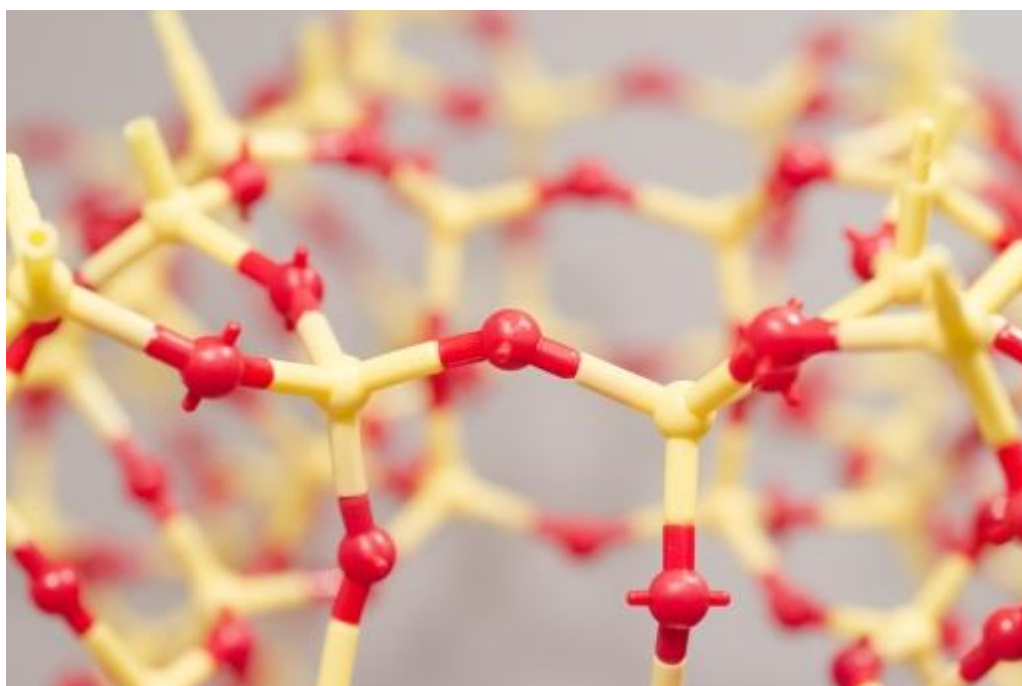
CASに登録された化合物数は2015年には1億件を超えたい。その後も指数関数的に登録数は増えている。一方で、20種類のアミノ酸をつないでペプチドを作れば7量体ですでに12億種類くらいになるので、そう考えると自然が生み出した仕組みは極めて効率よく多様性を実現できるようになっている。自然界の分子がもつ様々な洗練された機能と人工分子で実現できている機能とのギャップを考えると、人工分子の多様性はまだまだ不十分であろう。合成原料として利用できる物質の種類を考えると、もちろんその潜在的な可能性は無限大であるが、実際に試行錯誤できる数は限られている。そういった視点から、これまでにないようなオリジナリティーの高い分子構造を見出すことは重要であり、これを常に追い求めていくべきだと思っている。

実際に機能分子を生み出す過程では様々な試行錯誤を繰り返すことになる。多くの場合、研究を進めるにつれ予測不可能な山が次々と現れ、それをいくつも乗り越えたところで、新しい分子が誕生する。論文でデビューする分子はこのような山々を越えてきているため、多くの場合に予想を超えた面白さがある。時には、全くの偶然により予想外の機能を発見することもある。機能性分子を開発している化学者の多くは、そこに面白さを感じワクワクするのではないかと思う。このようにして開発されたマイ分子は、その研究者のオリジナリティーの源泉ともいえる。一方で、このような分子は、新規性が高いものほど合理的な設計というよりもセレンディピティーに由来している。その裏では、膨大な数の無駄な分子が作られており、数多の試行錯誤を経なければそのような新規性の高い分子構造は発見できない、これは多くの化学者が身を以て感じていることではなかろうか。

現在、ちょうど科研費申請の時期がきているが、最近では研究費を申請するにあたり、基礎科学的な重要性だけでなく社会的な波及効果、さらには社会実装への道筋までを示すことを求められることが多い。このような場合、目的とする物性を実現するための説得力のある論理が必用であり、これに真面目に取り組むと、ある程度予測可能な範囲内で分子設計をせざるを得なくなる。いわゆる「出口」を徹底的に突き詰めると、そもそもマイ分子を用いる必然性はなくなってくる。しかしながら、他人のマイ分子を使うとオリジナリティーを問われてしまう。これを避けるためには、公知の分子構造をもとにした本当に無難な分子設計しかできなくなる。これでは多様性とは全く逆の方向性に進んでしまうことになる。とはいえ、マイ分子を無理にアピールしようとする、時として、必ずしも必用とされていない機能について問題提起をして、自分の分子を用いて解決を図るよう提案する、マッチポンプのようなことをする羽目になる。このような出口を過剰に意識した研究展開が科学的にプラスであるかは大いに疑問である。

大きなブレークスルーをもたらすようなセレンディピティーに出会うためには、分子構造の多様性を拓け

る挑戦を続けていくことが極めて重要だと思われる。膨大な種類の一見役立たずな分子を作りつづけることが許される環境を維持できないと、スーパースターを見つけるのは困難になるであろう。これは、化学という0から1を生み出すような研究分野の本質なのではないかと思う。最近、実社会で役立つ研究に対する研究費の選択と集中が進み、価値観が画一化されつつある。研究において無駄や遊びを許す雰囲気はどんどん感じられなくなっており、このまま流れに身を委ねていると化学という分野が死んでいってしまうのではないかと危惧している。そのためにも、機会を捉えて分子の多様性の重要性を訴えていきたい。



研究紹介

インテリジェントナノハイブリッド
～ナノ微粒子操作によるバイオ応用～

京都大学大学院工学研究科
佐々木善浩
(sasaki.yoshihiro.8s@kyoto-u.ac.jp)



1. はじめに

近年、光、熱、磁場、電場、音波など、極めて多岐にわたる外部刺激に応答するマテリアル開発が盛んに行われている。また、外部刺激に対して単純な応答を示すものだけでなく、複数の応答特性を組み合わせることでより高度な状態変化を誘起することも可能になってきている。これらはインテリジェントマテリアルとして注目を集めており、バイオメディカル分野でも応用展開が期待されている。さらに外部刺激に応答するインテリジェントマテリアルを活用することで、迅速かつ正確な診断や侵襲性の低い治療などへの適用も検討されている。このようなインテリジェントマテリアルを設計する上で、無機ナノ材料の構造特性や、高い強靭性、無機物固有の電気的、光学的、磁気的な機能的特性を、有機物と融合させたハイブリッド材料を用いるアプローチは極めて有用であり、その構造・機能をナノレベルで精密に作製する技術の確立はナノテクノロジーやバイオテクノロジーにおける重要な課題の一つである。

自然界においては、そのようなハイブリッド構造が巧みに作り出されている。例えば、珪藻などの生物はバイオミネラリゼーションにより緻密なナノ構造をもつ自らの「かたち」を構築している。我々人類もさまざまな研究により有機-無機ハイブリッドを作製する手法を見いだしてきた。最近ではメソ多孔質材料をはじめ、ラメラ、チューブ、らせんなど、様々な構造をもつ有機-無機ナノ材料が作製されている。中でも、有機-無機ハイブリッドナノ微粒子はドラッグデリバリーシステム(DDS)の担体として有用な材料であり、最近、盛んに研究が行われている。しかしながら、これらの系の多くにおいては、得られるナノ構造を三次元的に制御して作製することは必ずしも容易ではなく、臨床レベルを含め、現実的な医療応用にまでこのようなハイブリッド材料を展開した例は少ないのが現状である。本稿では、ナノ微粒子をマニピュレーション(図1)することで、人工細胞膜や多糖からなるナノゲルなどのソフトマテリアルの構造を制御し、細胞膜構造制御や細胞機能応答などのバイオマテリアルとしての応用展開を試みた結果について紹介したい。

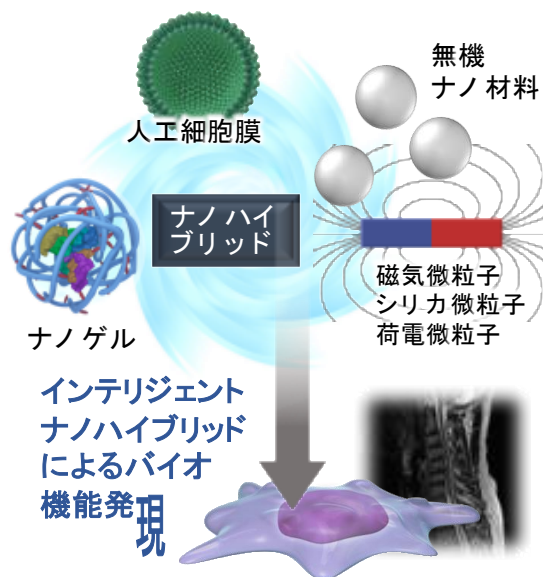


図1. インテリジェントナノハイブリッドによるバイオ応用

2. 人工細胞膜ハイブリッド

脂質は、その単離・精製・安定性などの理由から、薬学・医学・工学的な展開を行うための材料としては

必ずしも適していない。これまでに様々な両親媒性化合物が合成され、その集合体の特性と人工細胞膜材料として利用する研究が多く行われてきた[1,2]。例えば、脂質頭部と疎水性二本鎖の間にアミノ酸残基をペプチド結合で導入したペプチド脂質は、膜内水素結合帯の形成によって会合安定性に極めて優れたリポソームを形成する。また、極性頭部もしくは疎水性尾部に重合性官能基を導入し、脂質分子を重合することで安定な重合性リポソームを得ることも可能である。さらにその安定性を向上させるため、膜表面はシリカのコロイド粒子と同様であるが、内部は細胞膜類似の二分子膜構造と内水相をもつ有機-無機複合材料(セラソーム)も調製されている[3]。

一方、生体膜モデルとしての脂質膜リポソームと疎水化多糖からなるナノサイズの水ゲル(ナノゲル[4,5])を混合すると、リポソーム表面にナノゲルが吸着し、リポソームをナノゲルが一層被覆したナノゲル-リポソームハイブリッドを作製できる[6]。リポソームは、様々な物質を脂質膜や内水相に内包することができ、疎水化した多糖の一種であるコレステロール置換プルラン(CHP)が水中で自己組織的に形成されるナノゲルは、安定にタンパク質を内包しえるドラッグデリバリーシステム(DDS)材料として有用である。このナノゲルにさらに重合性基を導入し、形成したナノゲルと水溶性モノマーを共重合させることにより、ナノゲルを架橋点とするマクロゲルが作製できることも明らかになっている[7,8]。これらの系を複合化し、ナノゲル-リポソーム複合体を架橋点とする新規ハイブリッドゲルを作製することもできる(図2)[6]。このハイブリッドゲルの分解においては、ナノゲルがまず放出され、それに引き続きリポソームが放出される二段階での徐放制御が可能であり、再生医療などにおける薬剤やサイトカインを逐次的で

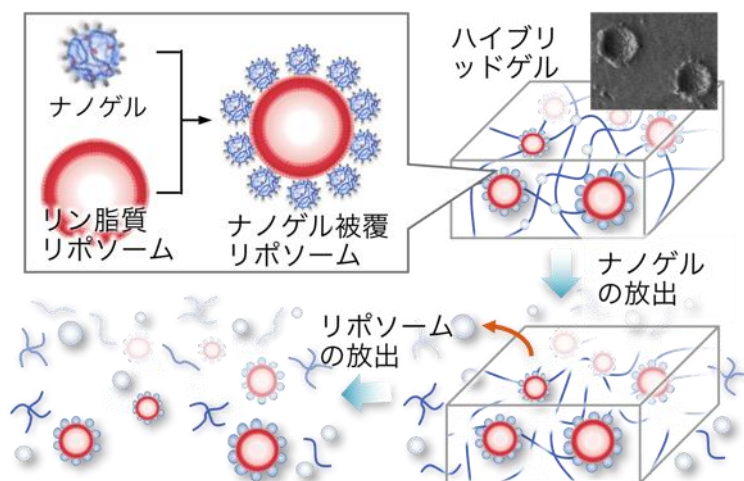


図2. ハイブリッドゲルからのナノゲルとリポソームの放出

きる新しい足場材料としての応用が期待される[6]。

3. 膜タンパク質ハイブリッド

膜タンパク質は、細胞膜において物質輸送・エネルギー産生・情報伝達・代謝などの極めて高度な生体機能を担う生体分子であり、その構造・機能解明は、新規医薬品の創製や、膜タンパク質そのものを用いるバイオデバイス開発において重要な課題である。このような膜タンパク質をリポソームに組み込んだ人工細胞いわゆるプロテオリポソームは、次世代ナノバイオデバイスとしてのバイオ機能素子として有望である。一般に、プロテオリポソームは、膜タンパク質を細胞系で大量発現した後に、界面活性剤により可溶化・精製後にリポソームに組み込んで調製されるが、操作が煩雑で効率など問題も多い。この問題の一解決手法として、無細胞タンパク質発現と同時にリポソームへ再構成させるリポソーム-シャペロン法を開発した[9]。

無細胞タンパク質合成系は、タンパク質が合成されるために必要な成分をすべて含んだ細胞抽出液を利用し、材料である遺伝子 DNA や mRNA、アミノ酸やエネルギー源を添加して無細胞でタンパク質を生産させるものである。リポソームは、水に溶けにくい膜タンパク質をその膜に取り込むことで凝集を抑制し、折り畳みを助けるシャペロン機能を有することがわかった。リポソーム存在下、コムギ胚芽由来の無細胞タンパク質合成系で1回膜貫通のチトクロームb5 (b5)を合成させたところ、膜上にb5が集積して機能化リポソームを構築することができた。細胞間チャンネル(細孔)を形成する4回膜貫通型のコネキシン(Cx)43組み

リポソームの構築にも成功し、実細胞とのCxを介した新規DDSの開発も行われている。また、この手法によりイオンチャネルを組み込んだプロテオリポソームを構築することも可能である。具体的には、放線菌 *Streptomyces Lividans* のカリウムチャネルであるKcsAを再構成し、電位依存性、pH依存性といった電気生理学的機能が確認された[10]。従来、その調製に1週間程度を要していたのに対し、本手法はわずか半日以上と時間を大幅に短縮できる点でも興味深い。

このような、リポソームへの再構成効率は再構成したい膜タンパク質そのものの性質に強く依存しており、現在までに多種多様な膜タンパク質の構造とリポソームへの再構成効率を系統立てて解析するにはいたっていない。そこで大腸菌由来の85種類の膜タンパク質を無作為抽出し、リポソーム存在下、無細胞膜タンパク質合成を行い網羅的な解析をおこなった[11]。例えば、リポソームによる膜タンパク質の可溶化率を系統的に評価したところ、リポソームの添加無しでは、70%以上の膜タンパク質で可溶化率は5%以下であったのに対し、リポソームを添加することで90%以上の膜タンパク質で可溶化率が50%以上に増加することがわかった。さらに可溶化率と膜タンパク質の構造因子とをバイオインフォマティクス解析した結果、その可溶化率と相関関係を示すいくつかの因子が同定された。

ここまで述べた膜タンパク質が再構成されたリポソーム、いわゆるプロテオリポソームの研究が多く行われている。しかしながら、一般にリポソームは不定形で動的な構造をしており、その扱いが比較的困難である。この問題を解決するため、リポソームの代わりにシリカ微粒子に脂質二分子膜を被覆した脂質膜被覆シリカ微粒子を用い、無細胞タンパク質発現系による膜タンパク質再構成を行った(図3)。具体的には、リン脂質脂質膜を被覆した粒径1 μm のシリカ微粒子を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、シリカ微粒子が脂質膜により被覆されていることが確認された。次に、モデル膜タンパク質として細胞間の物質のやりとりを担うコネキシン43 (Cx43)を用い、無細胞タンパク質発現系により発現したCx43を組み込んだ脂質膜被覆シリカ微粒子に対し、ウェスタンブロットを行いCx43の検出量を測定したところ、発現したCx43の約40%が脂質膜に組み込まれていることが分かった。ここで、シリカ微粒子のみを用いた場合にはCx43はほぼ検出されないことから、Cx43がシリカ微粒子に被覆した脂質膜上に組み込まれていることが明らかになった。さらに、脂質膜上にCx43が存在していることを確認するため、抗体を担持した量子ドットにより、微粒子上のCx43を染色し、共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、その表面に抗体を担持した蛍光物質Qdot®525由来の蛍光が観察されたことから、シリカ微粒子に被覆した脂質膜にCx43が組み込まれていることが分かった。

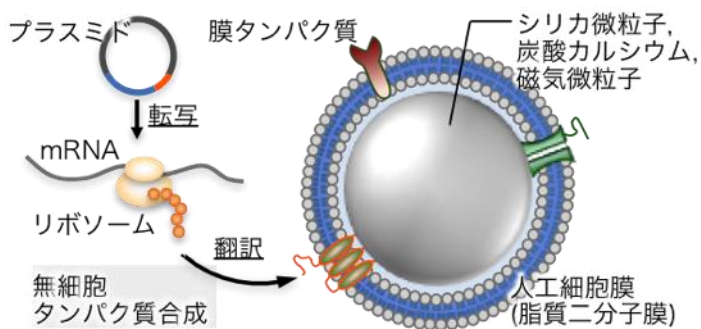


図3. 脂質膜被覆シリカ微粒子への膜タンパク質の再構成

以上の結果から、コロイド微粒子をテンプレートとする脂質膜を用いることで、無細胞タンパク質発現系により発現した膜タンパク質を、比較的効率的に脂質膜上に組み込めることが明らかとなった。本手法は、複数の膜タンパク質をその脂質膜に組んだ多機能プロテオリポソームを容易に作製することが可能な手法として興味深い。

4. 外部刺激による膜モルフォジェネシスの制御

細胞膜は、その膜構造をダイナミックに変化させることで細胞の機能に深く関与していることが近年明らかになっている[12]。例えば、細胞は微小胞やエクソソームなどの細胞外ベシクルを分泌し、タンパク質や

核酸などを他の細胞に輸送している[13]。また、トンネルナノチューブと呼ばれる脂質ナノチューブにより細胞を連結し、サイトゾル内の物質を直接やり取りしていることも明らかになってきている[14]。免疫細胞や神経細胞などの様々な細胞系において物質輸送や情報伝達にこの脂質ナノチューブが関与していることが示されており、バクテリアなどにおいてもこの脂質ナノチューブにより遺伝子を介さない形質導入が行われていることも報告されている。

このように生体系においては、細胞膜を支える細胞骨格などの構造を巧みに変化させることで、最安定な平衡状態ではなく速度論的に準安定状態にある脂質膜構造を動的に制御し、その多彩な膜構造を利用した機能化を行っている。このような膜構造変化は、細胞膜がその形態 (*morph-*) を形成 (*-genesis*) するプロセスすなわち「膜モルフォジェネシス」(*membrane morphogenesis*) と捉えることができ、生体はこの膜モルフォジェネシスを巧みに誘導・制御することで、細胞間コミュニケーションなどの高度な細胞機能を発現している。従来、主に生物物理学的な観点から、これら細胞膜の力学的な特性などに関する研究が盛んに行われており、脂質膜のモルフォロジー形成に関する基礎的な知見は多く蓄積されているが、その過程を人工的に制御することは未だ困難である。このような観点のもと、ナノ材料としての人工細胞すなわち「膜モルフォジェニックマテリアル」を工学的に創出し、ナノ医療応用を見据えた研究をおこなっている。具体的には、外部場によるコロイド微粒子の電気泳動により、生体と類似の脂質膜ナノチューブを効率的にかつ容易に作製する手法を見出してきた[9,15]。

電荷を有するナノ微粒子を内包したリポソームを固定化し、電場印可によるナノ微粒子の電気泳動現象を利用することで電場方向に配向した脂質ナノチューブを作製する新しい手法を開発した。具体的にはまずリン脂質にビオチン修飾脂質を1-4 mol%添加し、静置水合法により負電荷を有する数十から数百nmの粒径を有するラテックスナノ粒子を内包したジャイアントリポソームを得た。次に、マイクロチャンバーにビオチン修飾BSA、ストレプトアビジンを注入することでチャンネル表面をストレプトアビジンにより修飾した。その後、前述のビオチン修飾リポソーム溶液でチャンバーを満たし、ナノ微粒子内包リポソームを固定化した。このリポソーム固定化基板に、電圧を印可することで、ナノ微粒子の電気泳動に伴い脂質膜が牽引されることで脂質ナノチューブが容易に作製できることがわかった。これら脂質チューブ形成のメカニズムなどについて、脂質の種類や電圧強度などの諸パラメーターが及ぼす効果を網羅的に検討するため、脂質チューブ形成挙動の定量化を試みた。その結果、電極形状や、ジャイアントリポソームの固定化法等を改良することで、電圧強度に依存した脂質ナノチューブの形成挙動を定量的に評価しうることを見いだした。

荷電微粒子を内包したリン脂質をアガロースゲル中に固定化し、外部電場を印加することでヒドロゲル中に固定化された脂質ナノチューブを作製することも可能である。具体的には、まずジャイアントリポソームとアガロースゲルの混合物をマイクロチャンバー中でゲル化させる事によりリポソームを固定化した。このゲルに電場を印加し、蛍光顕微鏡によりナノチューブ形成を評価したところ、電場印加による微粒子の泳動に伴い、ゲル中に固定化されたリポソームから、ゲルの網目に沿ってチューブの伸長が確認された。さらに、このチューブの伸長方向に対し直交する方向に新たに電

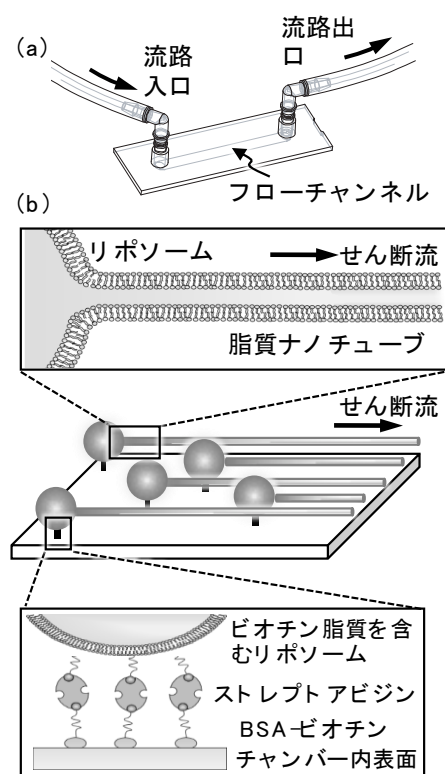


図4. せん断流によるソフトナノチューブ作製の概念図

場を印可したところ、網目状にチューブが形成されることがわかった。この結果は、ネットワーク化された脂質ナノチューブを外部場により容易に作製しうることを示しており、脂質膜ナノチューブを流路として用いる脂質膜デバイスへの展開が期待される。

ビオチン脂質修飾リポソームを上述と同様の手法によりガラス基板に固定化し、せん断流を加えるのみで脂質ナノチューブを作製しうることも明らかになった[16]。まずリン脂質にビオチン修飾脂質を1-4 mol% 添加し、静置水和法によりジャイアントリポソームを得た。次に、フローチャンバー(μ -Slides VI, ibidi GmbH) にビオチン修飾BSA、ストレプトアビジンを注入することで、チャンネル表面をストレプトアビジンにより修飾した基板を得た。その後、前述のビオチン修飾リポソーム溶液でチャンバーを満たし、リポソームを固定化した(図4)。このチャンバーに流速数百mL/minのせん断流を加えることで、その配向が制御された脂質ナノチューブを容易に作製し得ることがわかった。共焦点レーザー顕微鏡観察により、このチューブ中に内水相が保持されていることが示された。ここで固定化したリポソームの40%程度からチューブが伸長していること、チューブの直径は500 nm以下であることが明らかとなった。

5. 磁性ナノハイブリッドによるタンパク質デリバリー

磁場は紫外線などの光と比較しても生体組織に対する高い透過性を有し、かつ毒性が低いことが知られている。しかし、高分子系材料においては、高分子そのものに磁場応答性を付与することは磁場配向性などの一部の例外を除いて極めて難しい。一方で、ナノサイズの無機の磁性粒子などを適切に制御して水溶性高分子等と複合化したナノハイブリッドとすることで、磁場機能を有するインテリジェントマテリアルの合成が可能であり、ここ10年で様々な取り組みがなされている。我々は、磁性ナノ粒子ハイブリッドを用い、外部磁場による物理的な運動を利用したDDS応用をおこなってきた[17,18]。一般に、磁場は細胞、組織、器官を含め、生体に対してのその侵襲性が極めて低いため、これら薬物を細胞外部からターゲティングする手法として非常に有効である。例えば、磁性ナノ微粒子に結合した低分子薬物を外部磁場により細胞内に導入する手法が報告されてきた。また核酸との複合化により遺伝子を細胞内に磁気誘導により導入する手法(magnetofection)も報告されており、その高い遺伝子導入効率から有用性が期待されている。

近年の遺伝子工学の進展により、人工的にタンパク質を設計・合成することが可能となり、抗体医薬をはじめとするバイオ医薬品などとしての展開が注目を集めている。しかしながら、医薬品としてのタンパク質は安定性に乏しいことが多く、細胞内へ活性・機能を保持したまま、効率的に導入することも極めて困難であるため、その適用範囲は細胞外で機能するものに制限されてきた。磁性ナノ粒子ハイブリッドナノゲルはこのようなタンパク質を安定に複合化し、磁気誘導により細胞内に送達することが可能なキャリアとしても機能する(図5) [19]。

例えば、モデルタンパク質として牛血清アルブミンを用い、その細胞内導入をフローサイトメトリーなどにより評価したところ、極めて高い効率で細胞内にタンパク質を導入できることが示された。さらにこのようにナノゲルにより細胞内磁気導入されたタンパク質はその機能を有していることも明らかになっている。抗がん剤などの低分子薬物や核酸などとは異なり、タンパク質デリバリーにおいては単に細胞内に導入するだけ

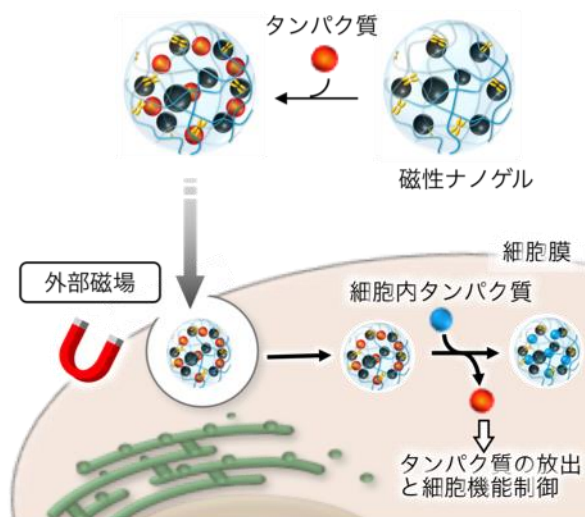


図5. 磁性ナノゲルによる細胞内タンパク質デリバリー

ではなく、導入されたタンパク質がその機能を示すことが極めて重要である。カチオン性ポリマーやナノ微粒子を用いてタンパク質を細胞内導入する研究はこれまでも多く行われてきているが、タンパク質を活性を有したまま細胞内導入できるシステムは極めて少ないのが現状である。ナノゲルが有する分子シャペロン機能により実現するこのような磁気導入技術は、抗体、転写因子のようなタンパク質を機能を有したまま細胞内に導入する方法論を提供するものとして、基礎研究のみならずタンパク質医薬品の医療応用などにもブレイクスルーをもたらすものと期待される。

参考文献

- [1] 佐々木善浩, 「合成脂質分子」 *リポソーム応用の新展開*, 秋吉一成, 辻井薫 監修, NTS, 東京, pp. 20-26 (2006).
- [2] 佐々木善浩, 秋吉一成, 「ナノバイオ材料」 *最先端材料システムOne Point*, 加藤隆史 監修, 共立出版, 東京, Vol. 3, 113-122 (2012).
- [3] Y. Sasaki, K. Matsui, Y. Aoyama, J. Kikuchi, *Nat. Protocol*, **1**, 1227-1234 (2006).
- [4] Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *Chem. Rec.*, **10**, 366 (2010).
- [5] Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *Chem. Lett.*, **41**, 202 (2012).
- [6] Y. Sekine, Y. Moritani, T. Ikeda-Fukazawa, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *Adv. Healthcare. Mater.*, **1**, 722 (2012).
- [7] Y. Hashimoto, S. Mukai, S. Sawada, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *Biomaterials*, **37**, 107-115 (2015).
- [8] Y. Tahara, S. Mukai, S. Sawada, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *Adv. Mater.*, **27**, 5080-5088 (2015).
- [9] 佐々木善浩, 秋吉一成, 「リポソームによる人工細胞の創製」 *人工細胞の創製とその応用*, 植田充美 監修, CMC, 東京, pp. 75-82 (2017).
- [10] M. Ando, M. Akiyama, D. Okuno, M. Hirano, T. Ide, S. Sawada, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *Biomater. Sci.*, **4**, 258-264 (2015).
- [11] T. Niwa, Y. Sasaki, E. Uemura, S. Nakamura, M. Akiyama, M. Ando, S. Sawada, S. Mukai, T. Ueda, H. Taguchi, K. Akiyoshi, *Sci. Rep.*, **5**, 18025 (2015).
- [12] 佐々木善浩, 秋吉一成, *化学*, **67**, 68-69 (2011).
- [13] C. Kilchert, S. Wittmann, L. Vasiljeva, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **17**, 227-239 (2016).
- [14] J. Hurtig, D. T. Chiu, B. Onfelt, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, **2**, 260-276 (2010).
- [15] Y. Sasaki, K. Akiyoshi, PCT Int. Appl. JP2011, 069337 (2011).
- [16] Y. Sekine, K. Abe, A. Shimizu, Y. Sasaki, S. Sawada, K. Akiyoshi, *RSC Advances*, **2**, 2682-2684 (2012).
- [17] K. Katagiri, K. Ohta, K. Koumoto, K. Kurosu, Y. Sasaki, K. Kazunari, *Colloid Polym. Sci.*, **291**, 1375, (2013).
- [18] K. Katagiri, K. Ohta, K. Sako, K. Inumaru, K. Hayashi, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *ChemPlusChem*, **79**, 1631, (2014).
- [19] R. Kawasaki, Y. Sasaki, K. Katagiri, S. Mukai, S. Sawada, K. Akiyoshi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**, 11377-11381 (2016).

研究紹介

Holy Grail をさがして

～研究者にとっての聖杯～

東京農工大学・工学研究院・生命機能科学部門

川野 竜司

rjkawano@cc.tuat.ac.jp



1. はじめに

鳥取大学の松浦先生からこの原稿の依頼をメールで頂いた時に、「ふざけた感じで読み物的な文章をお願いします。」とあった。なるほど、ふざけた感じであれば私の大得意分野だ。私に原稿の依頼が来たのも納得である。お盆休みを使って、この原稿を一気に書き上げた。ふと気になってもう一度依頼メールをよく見てみると、そこには「ふざけた感じ」ではなく「くださった感じ」と書いてあった。やってしまった。私はよくこのような勘違いをする。しかしまあ書き終えた原稿を読んでみると、ギリギリ「くださった感じ」で納得していただけたような仕上がりである。素晴らしい研究の紹介は、この文章の前後に掲載されている先生方に譲るとして、私の研究紹介は、どうしても暇を持て余している、または研究に疲れて頭を緩めたい、という方だけに広い心で読んで頂き、少しでも楽しんでいただければ幸いである。

2. 序章～聖杯伝説～

博士課程2年生の時、当時私が所属していた研究室（横浜国大渡邊正義研）の助手であったT岡先生（現名古屋大学）とボストンで開催された国際学会に参加した。二人で参加し、ホテルの部屋も同じということで、長い時間様々な話ができた。その中でボストンという町の持つ雰囲気こそがそうさせたのか、T岡先生と当時から研究者を志していた私で「研究者にとって重要なことは？また我々はなぜ研究者になるのか？そもそも研究者とはどのような存在なのか？」という話をした。その中でT岡先生が語った「研究者はHoly Grail (図1) を持たないかん。一生の研究を通して自分だけの聖杯を見つけるべきや。」という言葉聞いて、根が素直な私は「研究者はHoly Grailを持つべし！」と強く心に誓った。Holy Grailはキリスト教における聖遺物であり、中世の騎士達が失われた聖杯を見つける旅をする物語がキリスト教における一種の普遍的テーマとなっている。自分も一人前の研究者になり、ニュートンでいえばリンゴ、アインシュタインでいえば相対性理論、山中先生でいえばiPS細胞のようなものを自分でも見つけよう、と心に誓ったD2の冬であった。



図1 Holy Grail (聖杯)。
Wikipedia より引用。

3. モルモン教の約束の地：ソルトレイクシティ

2005年無事博士号を取得し、いよいよ私のHoly Grailを探す旅が始まった。ドラゴンクエストで言えば、はじめの街を出たところだろうか。博士課程在学時にはイオン液体中でのイオン輸送を電気化学的に調べる研究を行っていた。水分子の移動度は水の状態よりも氷になったときの方が速い。これは水分子のGrotthuss機構（ホッピング）によるものである。研究を進めるうちにイオン液体中でヨウ化物イオンがこのGrotthuss機構で移動していることを発見し、またその時の物理的な拡散係数とホッピングによる拡散係数をそれぞれ独立に決定できた¹。この発見をベースにヨウ素イオンを電荷輸送体とする色素増感太陽電池の電解質部分を固体化し、高速のイオン電導を利用した高性能な太陽電池を作ることができた（図2）²。この結果はこれまで知られていなかった新しい発見で、もしかしたらこれが自分の聖杯か？とも思い卒業後しばらくこの研究を続けてみた。しかし、どうも研究の方向性が実用化に向かいはじめ、この横浜の地に聖杯はないと確信した。



図2 固体太陽電池。日経サイエンスでも紹介された。

聖杯といえばキリスト教的概念の産物であり、これはもしかしたら日本にはなく海外にあるのではと考え留学することに決めた。イオン液体中での高速電荷輸送のメカニズムを明らかにすることはできたが、実際に太陽電池内ではナノ粒子酸化物でできた光電極内のナノ空間をイオンが移動する。この極小空間でのイオンの輸送の様相に関して全くわかっていなかった。そこでユタ大学にナノ空間内での物質輸送を研究しているHenry White先生がおり、そこに留学することにした。

ユタ大学はユタ州の州都、ソルトレイクシティにあり、ソルトレイクはモルモン教の総本山である。モルモン教を開いたジョセフ・スミスは19世紀末にアメリカのニューヨーク州で聖書（モルモン書）を見つけたようである。この話を聞いて、私もユタ大学で自分の聖杯を見つけることができるのではないかと期待した。White研では、ナノ空間内での物質輸送を詳細に検討するため、平面脂質二分子膜中に形成したチャンネル膜タンパク質（ナノポア）を用いた。この1 nm程度の空間を有すナノポアを分子が通過し、パッチクランプアンプでイオン電流を計測することで、その通過の様子を一分子レベルで計測する方法（ナノポア計測）、つまり電氣的な一分子計測である。標的はポリアニオンであるDNAで、一本鎖DNAがmsでナノポアを通過する様子を精密に観測することで、その拡散係数や³、溶液粘性の効果⁴を見積もっていた（図3）。ユタ大学で3年近く過ごし、ナノポア計測が自分のHoly Grailかもという予感を持ちつつ帰国の途についていた。

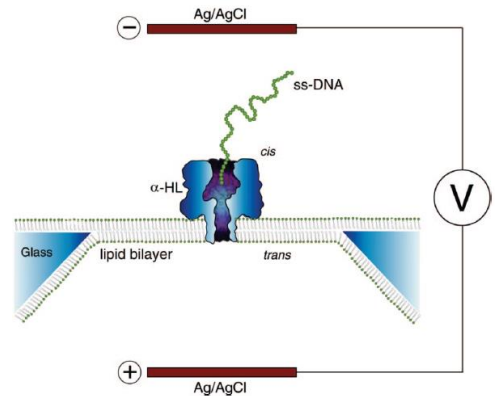


図3 ナノポア計測。脂質二分子膜中にナノポアタンパクを再構成し、一分子のDNAが通過するところを電氣的に観測できる。

4. MEMSというメソッドと機械工学の概念によるレベルアップ

2009年東大の竹内昌治先生のグループの一つである神奈川科学技術アカデミー（現神奈川産総

研)に加えていただいた。竹内研ではMEMSという半導体微細加工技術を基盤とした生体材料とマイクロデバイスの融合研究を行っていた。私は帰国してもナノポア計測を続けたかったので、脂質二分子膜をマイクロデバイス中で作製していた竹内研に加わる事ができたのは幸運であった。また当時の竹内研では真の分野横断人材が集まっており、物理、化学、機械工学、医学、分子生物学など同年代の研究者といつても議論ができる環境がとても刺激的だった。

ここではナノポア計測に用いる脂質二分子膜を大量にかつ安定に再現よく作るために、マイクロ加工、マイクロ流体技術を学びそれを駆使してハイスループットの平面膜システム(図4)を作ることができた^{5,7}。これによりナノポア計測だけではなく、その他の膜タンパク質計測にも応用でき研究の幅が広がった。またボトムアップとトップダウンの融合というような機械工学の考え方や、生物物理や分子生物学、情報工学といった他分野の研究を肌で感じる事ができた。竹内研で4年と少しを過ごし、かなりのレベルアップを実感しP8(我々の言い方でポスドク8年生のこと)となった私はいよいよ独立すべく動き出した。

私事ながら私の妻は文芸翻訳家である。私が独立先を探している時、妻が「武蔵野には昔から文豪が住んでおり、我々も武蔵野の地に居を構えるべきだし、また武蔵野にある東京農工大はあなたにぴったりの大学だと感じている」と託宣を下した。基本的に私は妻の言うことは100%尊重すると決めて生きており、ちょうどテニユアトラックの公募が出ていた東京農工大学に急いで応募した。妻の予言?通り書類と面接が2回ある結構ハードな選考であったが、あれよあれよと言う間に採択をいただくことができた。

5. 約束の地：武蔵野、東京農工大

2014年、研究者として十分なレベルと装備を身につけ、いよいよ独立研究者として本格的なHoly Grailを探す旅の最終地にたどり着いた。テニユアトラックながら自分の研究室である。何をテーマにしても良い。どんな突飛なアイデアにでもトライすることはできる。まずはこれまでの研究をベースに研究テーマを立ち上げ、現在次第にその幅を広げつつある。そのいくつかについてごく簡単に紹介する。

- ① **ナノポアを検出器としたDNAコンピューティング**：自律診断治療を目指してDNA分子による演算の出力分子をナノポア計測で検出することにより、高速にかつ分子情報を電子情報として取り出すことができる。最近では腫瘍細胞から分泌されるmicroRNAをDNA演算によりパターン認識し、診断治療に応用展開を目指している^{8,9}。
- ② **人工膜輸送体**：制御可能な膜ゲート機構の構築：分子ロボット開発を目指して分子機械をアセンブルし、分子ロボットを作る研究が面白い。分子ロボットの駆体となる脂質膜中に情報や分子のやりとりを制御可能な人工のゲート(人工の膜タンパク質)を作っている。1)との組み合わせで自律的に動作可能な分子ロボットができると期待している¹⁰。

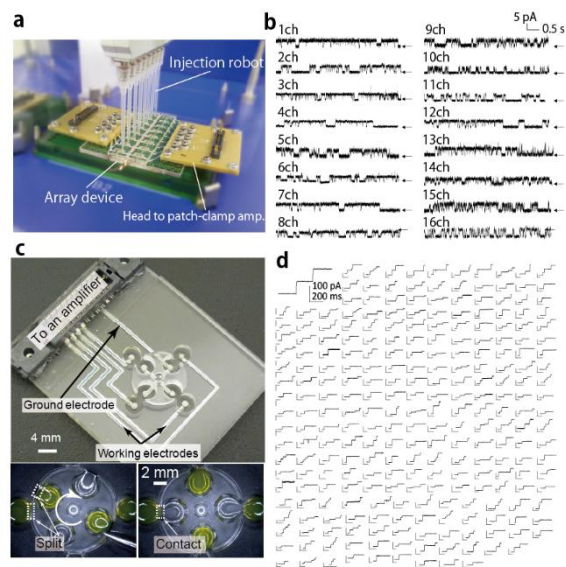


図4 a),c)ハイスループット平面脂質膜デバイス。b)ヒトのK⁺チャネルの計測。d) ナノポアの大量計測。

- ③ **ナノ空間内での物性観測**：ナノポアの内部はおよそ20 yL (ヨクトリットル) という制限された空間であり、これを再現よく単一に作る事ができる。このナノポア内にヘアピンDNAを挿入し、その空間中でのDNA分子の運動を観測することで、ナノ空間中の物性を評価する。現在ナノ空間内での粘性やホフマイスター効果について検討中である。
- ④ **生物進化に伴う膜ペプチドの進化**：脂質膜にチャンネルを形成し抗菌活性を発現する膜ペプチドは、様々な生物種に保存されている。生物系統樹の根元から先までの生物種、ホヤ・昆虫・魚・カエル・サル・ヒトの持つ抗菌ペプチドの構造と活性が、生物進化に伴ってどのように変化したのかについて調べている。

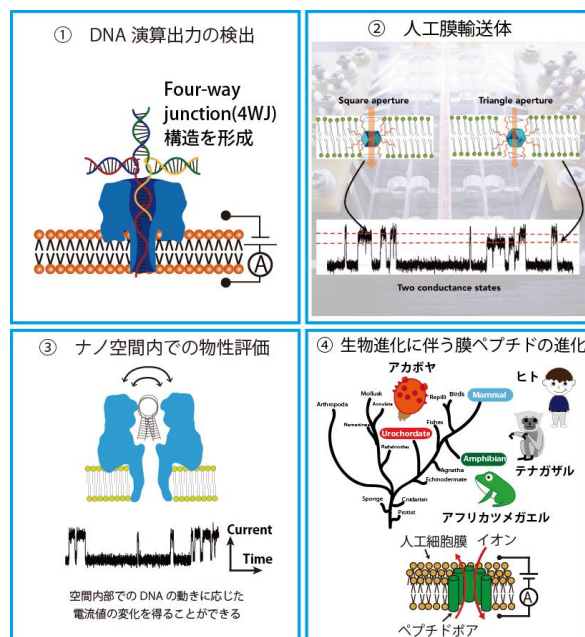


図5 最近の研究例。

ナノポア計測以外にも人工の細胞膜（脂質二分子膜）を大量に作って計測可能なシステムを基盤とし、人工の膜輸送体や膜ペプチドの進化など新しいテーマを進めている。

自分で考えたテーマを優秀な学生と一緒に自由に進めていけるので楽しくてしょうがない。一方でHoly Grailのほうは未だ暗中模索と行った状態に戻ってしまった。四十にして惑わずという言葉もあるが、独立して自由に研究する中ではじめて自分の聖杯が見えてくるのではないかと最近では感じている。

6. さいごに

2005年に博士号を取得し、プロの研究者としてHoly Grailを追い求めて早12年。独立してますます自分の研究の中心となるべき聖杯についてその姿が朧気になってきている。妻からは昨年4年間の比較的長期の予算が取れたときに、この4年はあまりお金に振り回されず自分の研究者としての地歩を固めよと言われたが、東に受託研究があれば行って申請し、西に研究分担者の口があれば喜んで参加するといったような状態である。定年までの25年を考えると、あまりうかうかとはしてられないが、これからはしばらくは聖杯を捜す旅が続きそうだ。

参考文献

- 1 Kawano, R. & Watanabe, M. Equilibrium potentials and charge transport of an I^-/I_3^- redox couple in an ionic liquid. *Chem. Commun.*, 330-331, (2003).
- 2 Kawano, R., Matsui, H., Matsuyama, C., Sato, A., Susan, M., Tanabe, N. & Watanabe, M. High performance dye-sensitized solar cells using ionic liquids as their electrolytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry* **164**, 87-92, (2004).
- 3 Lathrop, D., Ervin, E., Barrall, G., Keehan, M., Kawano, R., Krupka, M., White, H. & Hibbs, A. Monitoring the Escape of DNA from a Nanopore Using an Alternating Current Signal. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 1878-1885, (2010).

- 4 Kawano, R., Schibel, A., Cauley, C. & White, H. Controlling the Translocation of Single-Stranded DNA through alpha-Hemolysin Ion Channels Using Viscosity. *Langmuir* **25**, 1233-1237, (2009).
- 5 Kawano, R., Tsuji, Y., Sato, K., Osaki, T., Kamiya, K., Hirano, M., Ide, T., Miki, N. & Takeuchi, S. Automated Parallel Recordings of Topologically Identified Single Ion Channels. *Sci. Rep.* **3**, 1995, (2013).
- 6 Kawano, R., Osaki, T., Sasaki, H., Takinoue, M., Yoshizawa, S. & Takeuchi, S. Rapid Detection of a Cocaine-Binding Aptamer Using Biological Nanopores on a Chip. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 8474-8477, (2011).
- 7 Kamiya, K., Kawano, R., Osaki, T., Akiyoshi, K. & Takeuchi, S. Cell-sized asymmetric lipid vesicles facilitate the investigation of asymmetric membranes. *Nat. Chem.* **8**, 881-889, (2016).
- 8 Hiratani, M., Ohara, M. & Kawano, R. Amplification and Quantification of an Antisense Oligonucleotide from Target microRNA Using Programmable DNA and a Biological Nanopore. *Anal. Chem.* **89**, 2312-2317, (2017).
- 9 Ohara, M., Takinoue, M. & Kawano, R. Nanopore Logic Operation with DNA to RNA Transcription in a Droplet System. *ACS Synth. Biol.*, (2017).
- 10 Kawano, R., Horike, N., Hijikata, Y., Kondo, M., Carne-Sanchez, A., Larpent, P., Ikemura, S., Osaki, T., Kamiya, K., Kitagawa, S., Takeuchi, S. & Furukawa, S. Metal-Organic Cuboctahedra for Synthetic Ion Channels with Multiple Conductance States. *Chem* **2**, 393-403, (2017).

研究紹介

酸化酵素の誤作動を誘起する疑似基質
の開発と高難度酸化反応

～酵素だって間違える～

名古屋大学大学院理学研究科
庄司 長三

shoji.osami@a.mbox.nagoya-u.ac.jp

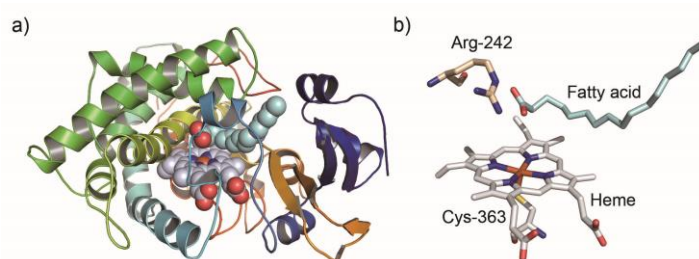


1. はじめに

酵素反応という常に正確な反応というイメージが強いのではないかと思います。本稿で紹介させていただく我々の酵素反応システムは、酵素を誤作動させて間違った反応を進行させるという手法です。酵素を意図的に誤作動させるために我々が開発しているのは、本来の基質に形を似せた「疑似基質」というもので、阻害剤の一種に分類することができます。阻害剤は、酵素を不活性な状態にするものですが、阻害剤の中には本来の反応は阻害するけれども、それ以外の別の反応を加速させてしまうものが存在し、それが我々の開発している「疑似基質」です。本稿では、「疑似基質」を用いる少し変わった反応系がどのようにして生まれ、発展していったのかを紹介させていただきたいと思います。

2. 過酸化水素を利用するシトクロムP450の誤作動

2005年に名古屋大学に異動した筆者は、過酸化水素駆動型のP450_{BSP}に関する研究を始めました。P450はヘム(鉄ポルフィリン錯体)を活性中心として有するヘム酵素で、一般的には酸素分子を還元的に活性化して酸化活性種のオキソフェリルポルフィリン π -カチオンラジカル(Compound I)を生成し不活性な有機基質を酸化するのですが、

図1 P450_{BSP}の結晶構造 a)と活性部位の構造 b)

P450_{BSP}は、過酸化水素を利用して酸化活性種を生成することができる当時では珍しいP450でした。安価で取り扱いの容易な過酸化水素を利用できるP450_{BSP}は、バイオ触媒として利用するには魅力的ではありましたが、基質選択性が非常に高く、長鎖脂肪酸の水酸化反応以外の反応を触媒することはできないのが欠点でした。長鎖脂肪酸が結合したP450_{BSP}の結晶構造も明らかになっており(図1)、長鎖脂肪酸のカルボキシル基が活性部位のヘム近傍にあるカチオン性の側鎖をもつアルギニン(Arg242)と相互作用してヘムの上方に固定化されていることが分かっていました。また、この固定化されたカルボキシル基が過酸化水素を使って酸化活性種を生成する際に、プロトンの受け渡しに関与する一般酸塩基触媒として機能する反応機構が提唱されており(図2a)、P450_{BSP}がカルボキシル基を持たない基質を水酸化できない理由であること

が明らかにされていきました。また、鎖長の短い脂肪酸は水酸化の対象とはならず、デカン酸よりも鎖長が短くなると水酸化反応が進行しないということも報告されていきました。この酵素を使って何かしらの研究を進めるといふ非常に自由度の高い研究テーマを頂き、何をしようかとあれこれと思案しながら、まずは、鎖長の短い脂肪酸でも水酸化できるように酵素を変異導入によって改変すること、活性中心のヘムを合成金属錯体に置換して活性を強化するというようなことを当面の研究目標として研究を進めることを考えましたが、蛋白や酵素の研究に初めて取り組む筆者が文献を調べるうちに分かってきたことは、酵素や蛋白質の機能改変では、変異導入が非常に一般的で一辺倒な感じであることでした。そして、変異導入でインパクトのある研究成果を出すには、相当にクリアな結果を出す必要があると感じていました。すでにランダムに変異導入を行う分子進化学なども含め変異導入による酵素機能改変では、多くの研究者が活躍されているという現状であり、変異導入による機能改変だけでは、自分の研究が似たような多くの研究に埋没してしまうとの危機感も覚えたのもこの頃のことです。

一通りの関連論文を読んだあとに、あれこれと半年ほど考えていたときに、「鎖長が短い脂肪酸は取り込まれているのかどうか？」が非常に気になりました。なぜなら、静電的な相互作用だけを考えれば、鎖長が短くても取り込まれる可能性が高かったからです。また、「そういった短い脂肪酸が取り込まれて水酸化反応が進行しなかったときに酸化活性種はどうなっているのだろうか？」ということがすごく気になりました。

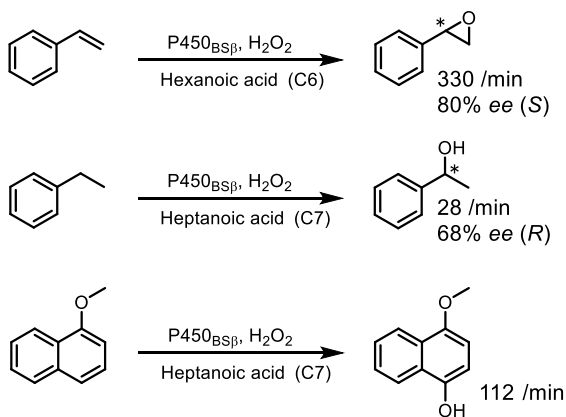


図3 デコイ分子存在下での P450_{BSβ} による第二の基質の酸化

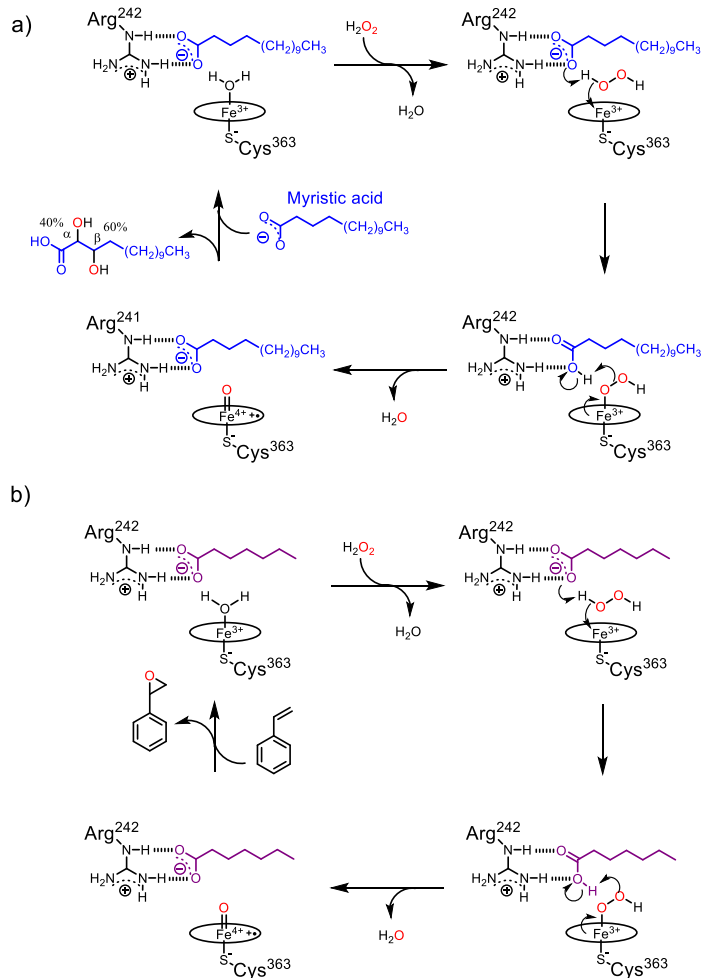


図2 P450_{BSβ} による長鎖脂肪酸の水酸化 a)とデコイ分子存在下でのスチレンのエポキシ化 b) の反応機構

そこで、鎖長の短いヘキサノ酸の存在下で、酸化されることで発色するグアイアコールを第二の基質として反応系に加えて反応を行ってみたところ、過酸化水素を加えてすぐに反応溶液が茶色に変色しました。ヘキサノ酸の存在下で第二の基質が酸化されることを示した初めてのデータであり、これが「疑似基質」を用いる酸化酵素の基質特異性変換法の始まりです¹。我々は、「疑似基質」が第二の基質を呼び込む「おとり」のような役割をすることから、「疑似基質」を「デコイ分子」、デコイ分子を用いる酵素反応系を、「基質誤認識システム」と名付けました。デコイ分子を用いる反応では、スチレンのエポキシ化(図2b)や、エチルベンゼンのベンジル位の水酸化、そして、メキシナ

フタレンの芳香環水酸化が比較的早い速度で進行することなどを明らかにしました(図3)¹⁻²。P450_{BSP}だけでなく、P450_{SPa}などの他の過酸化水素駆動型P450にもデコイ分子を用いる反応系は適用できることを示すとともに^{3,4}、様々なデコイ分子を検討する過程で、高濃度の酢酸イオンを含む緩衝溶液中で反応を行うだけで、第二の基質を酸化できるという事実に辿り着きました⁵。高濃度酢酸イオン存在下で反応を行うという発想は非常にシンプルではありますが、過酸化水素駆動型P450が報告されて20年以上も誰もそのようなことには気づかなかつたというのは実に面白いことだと思っています。ヘム近傍にアルギニンやリジンなどのカルボキシル基が相互作用できるアミノ酸残基を持つ蛋白質では、高濃度の酢酸イオン存在下で同様の反応が進行すると予想していて、そういった研究も今後行っていきたいと考えています。

3. 酸素分子を活性化するシトクロムP450の誤作動

過酸化水素駆動型のP450では、長鎖脂肪酸のカルボキシル基は蛋白の内側に取り込まれます。一方で、長鎖脂肪酸が取り込まれる向きが逆で、カルボキシル基が蛋白の外側を向いた状態で取り込まれるP450も存在するので、それらにデコイ分子として鎖長の短い脂肪酸を取り込ませれば、より小さな基質が活性部位に取り込まれて水酸化されるのではないかと考えて、長鎖脂肪酸の末端を水酸化するP450BM3の研究を2009年ごろからスタートさせました(図4, 図5a)。P450BM3は、P450の中でも最も酸化活性が高いP450としても知られていて、毎分1万5千回転で酸化活性種を生成することができますが、基質特異性が高く、長鎖脂肪酸以外の基質に対する酸化活性は著しく低くなることが報告されており、目的の基質を酸化するための変異体の作成が盛んに行われていました。デコイ分子を用いる反応系が、P450研究の中でも研究者人口の多いP450BM3で成立すればそのインパクトは高いであろうと考えました。また、P450BM3の高い酸化活性をうまく生かすことができれば、有機合成反応にも利用可能なバイオ触媒反応系を開発できるのではとも考えていました。P450BM3の蛋白質発現系を譲ってもらい、P450BM3を発現・精製し、鎖長の短いデカン酸存在下で第二の基質の酸化反応を試しましたが、反応は全く進行しませんでした。P450BM3は、炭素数が16のパルミチン酸などを高効率に水酸化できますが、鎖長の短い脂肪酸では鎖長が短くなるほどに酸化活性が低くなることを報告されていたので、デカン酸(炭素数10)を取り込ませて誤作動させれば、カルボキシル基を持たない小さな基質であっても水酸化できると期待していましたが、そうは簡単に酵素を騙すことはできませんでした。そこで、デコイ分子としてパーフルオロアルキルカルボン酸を利用することを考えました。C-F結合はC-H結合よりも強く安定であるために、P450BM3はパーフルオロア

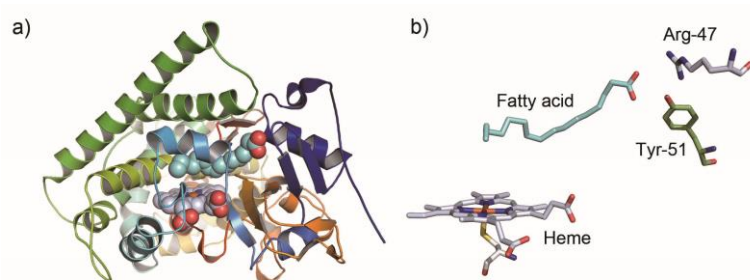


図4 P450BM3の結晶構造 a)と活性部位の構造 b)

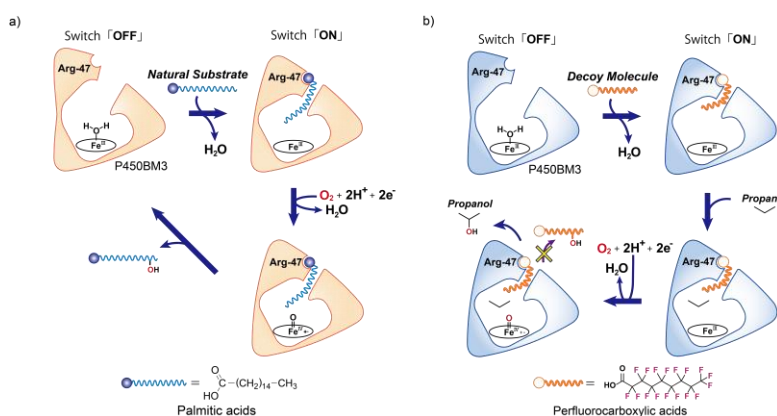


図5 P450BM3による長鎖脂肪酸の水酸化 a)とデコイ分子存在下でのプロパンの水酸化 b)の模式図

有機合成反応にも利用可能なバイオ触媒反応系を開発できるのではとも考えていました。P450BM3の蛋白質発現系を譲ってもらい、P450BM3を発現・精製し、鎖長の短いデカン酸存在下で第二の基質の酸化反応を試しましたが、反応は全く進行しませんでした。P450BM3は、炭素数が16のパルミチン酸などを高効率に水酸化できますが、鎖長の短い脂肪酸では鎖長が短くなるほどに酸化活性が低くなることを報告されていたので、デカン酸(炭素数10)を取り込ませて誤作動させれば、カルボキシル基を持たない小さな基質であっても水酸化できると期待していましたが、そうは簡単に酵素を騙すことはできませんでした。そこで、デコイ分子としてパーフルオロアルキルカルボン酸を利用することを考えました。C-F結合はC-H結合よりも強く安定であるために、P450BM3はパーフルオロア

ルキルカルボン酸を水酸化することはできないけれども、フッ素原子と水素原子の原子半径は非常に近いパーフルオロアルキルカルボン酸の構造は、脂肪酸とほぼ同じになり、P450BM3には見分けられないのではないかと考えたからです。文献を調べてみるとP450BM3にパーフルオロアルキルカルボン酸を取り込ませた研究が報告されていましたが、第二の基質を加えて反応させるという研究は皆無でした。アルキル鎖長の異なる一連のパーフルオロアルキルカルボン酸を購入して、さっそく、プロパンの酸化を行ってみると、我々の期待したとおりにパーフルオロアルキルカルボン酸をデコイ分子として添加した場合にのみプロパンが水酸化され、パーフルオ

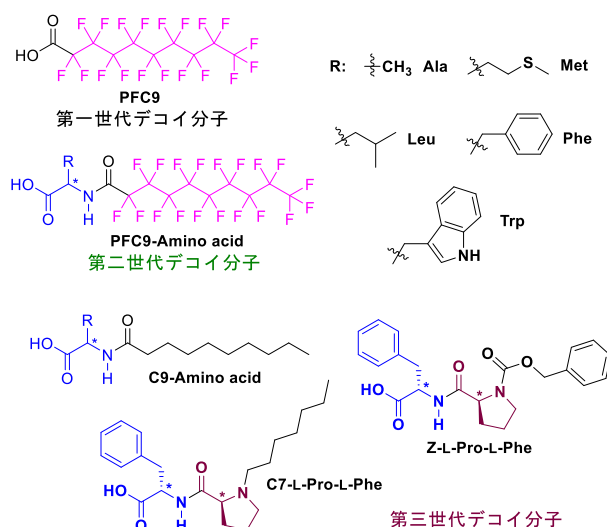


図6 P450BM3 に第二の基質を酸化させるために反応系に添加するデコイ分子

ロデカン酸(PFC10)をデコイ分子として用いた場合に毎分67回転の速さでプロパノールが生成されました(図5b)⁶。ブタンやシクロヘキサンなども水酸化でき、さらに、ベンゼンを直接的にフェノールに変換する反応も進行しました⁷。ガス状アルカンの供給圧力を5気圧に上げて反応させるとエタンも僅かながら水酸化できることなども

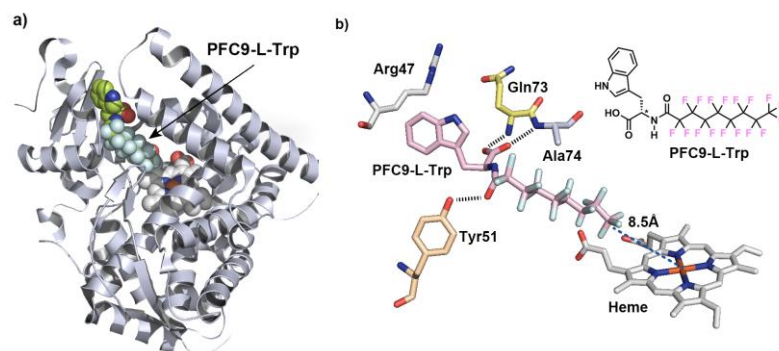


図7 PFC9-L-Trp を取り込んだ P450BM3 の結晶構造 a)と活性部位の構造 b)

見出すことができましたが(毎分0.67回転)⁸、パーフルオロアルキルカルボン酸をデコイ分子とする反応系の限界も分かかってきてしまったので、なんとかして、もっと強力なデコイ分子を開発しなくてはと考えるようになり、P450BM3がパルミチン酸よりもそのカルボキシル基がグリシンで修飾されたパルミトイルグリシンをより強く結合して、より高い酸化活性を与える報告に着目しました。パーフルオロアルキルカルボン酸のカルボキシル基をアミノ酸で修飾すれば、より強くP450BM3に結合する第二世代のデコイ分子を開発できるのではと考えたのです(図6)。アイディアは非常にシンプルですが、第二世代のデコイ分子の効果は非常に高く、例えばパーフルオロノナン酸のカルボキシル基をロイシンで修飾したPFC9-L-Leuを用いると、プロパンの水酸化が毎分256回転、エタンの水酸化が毎分45回転で進行するようになりました⁹。さらに、幾度となく失敗し続けたデコイ分子を取り込んだP450BM3の結晶構造解析にも成功し、デコイ分子が取り込まれている状態をはじめて明らかにすることもできました(図7)⁹。結晶構造解析によって、デコイ分子がどのようにP450BM3に取り込まれているのかが分かったことは非常に重要でした。特に、第二世代デコイ分子の場合には、修飾したアミノ酸の効果でデコイ分子のアルキル鎖末端が活性中心のへムから酸化を受けない距離に位置していることが分かり、この結晶構造解析のデータから、末端が酸化されないのであれば、パーフルオロアルキルカルボン酸を利用する必要はないのでは?といった発想につながりました。ノナン酸のカルボキシル基をアミノ酸で修飾すればよいはずだということになり、フッ素

原子を持たない第三世代デコイ分子開発がスタートしました。デコイ分子を構成する骨格にパーフルオロアルキルカルボン酸を用いている限りは、利用できるカルボン酸の数が少なくデコイ分子の構造に大きな制限がありました。フッ素化する必要がなくなったことで、ほとんどすべてのカルボン酸が利用可能となり、様々な構造のデコイ分子を作製できるようになりました。ベンゼンの水酸化反応では、Z-L-Pro-L-Phe (図6) が高い活性を示すとともに、結晶構造解析にも成功し、第三世代デコイ分子でも末端が活性中心から離れていることを明らかにしています (図8)¹⁰。最終的に、長鎖脂肪酸とは大きく構造の異なるC7-L-Pro-L-Phe (図6) がベンゼンの高効率な水酸化 (毎分259回転、P450BM3一分子当たりの総回転数4万回転) を可能とするデコイ分子として機能することを報告することができました¹⁰。第三世代デコイ分子の開発に成功したことでデコイ分子を利用する反応の潜在的可能性が大きく広がりました。デコイ分子の構造の違いによって生成物のキラリティーを制御し、一つの酵素を用いながら、両方のエナンチオマーを作り分けられる反応系の開発にも成功しています¹¹。現在も、第三世代デコイ分子を中心に様々なデコイ分子を開発していますが、同時に第四世代デコイ分子はどのようなものになるのかが研究室でも活発に議論されていて、今後の研究展開を私自身が非常に楽しみにしています。

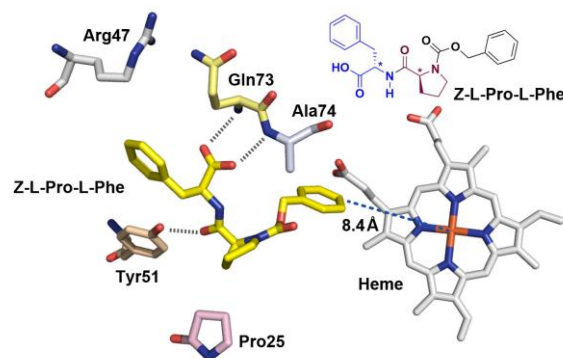


図8 Z-L-Pro-L-Phe を取り込んだ P450BM3 の活性部位の構造

4. おわりに

筆者が研究テーマを考えるときには、まずは他の研究との差別化を図ることを第一に考えています。多くの論文を読んだり、学会発表を聞いたりして多くの情報をインプットすることも非常に重要なことではありますが、インプットした他の研究者の考え方が知らずのうちに影響して、似たような研究をしてしまいそうになることあり気を付けるようにしています。特に自身が主戦場としている学会での華麗な研究成果には憧れを抱くことも多く、所属する学会の先生方となんとなく似たようなテーマを設定してしまう可能性が高くなるため注意が必要だと思っています。こういったことを言ってしまうと多くの諸先輩方にお叱りを受けてしまうかもしれませんが、ある程度、自分の中に眠っている感性と直感を信じてテーマ設定をするように心がけています。私の考えた一風変わった研究の方向性と学生さんの試行錯誤とがうまく混ざり合わさると、これまでにない独特な研究として育っていくのだと思っています。前例のない変わったテーマを軌道修正しながら進めていく過程で多くの人材が育っていくのではないかというのが私の考えで、皆で議論しながらテーマを熟成していくような研究を続けて、唯一無二の研究成果を多く報告できる体制になって欲しいと思っています。そして、独特な研究テーマを自らに立案できる人材が多く育つことを願っています。

謝辞

ここで紹介した研究成果は、2005年に筆者が名古屋大学の渡辺研究室に異動してからの研究成果の一部です。非常に恵まれた環境で自由に研究をさせていただき、渡辺芳人先生に深く感謝致します。また、強力に研究を進めてくれた博士研究員と学生諸氏に心から感謝いたします。本稿では、

そのほかの多くの研究成果に言及することができませんでしたが、それらの研究で頑張ってくれた学生諸子にも心から感謝しています。さらに、国内外の多くの共同研究者の方々および研究を支援いただいた渡辺研関係者の方々に深く感謝いたします。本稿で紹介した研究成果は、文部科学省科学研究費補助金「若手研究A」、新学術領域研究「直截的物質変換をめざした分子活性化法の開発」「高難度物質変換反応の開発を指向した精密制御反応場の創出」、科学技術振興機構CREST「多様な天然炭素資源の活用に資する革新的触媒と創出技術」の研究助成により行われました。この場を借りて感謝申し上げます。

5. 参考文献

1. Shoji, O.; Fujishiro, T.; Nakajima, H.; Kim, M.; Nagano, S.; Shiro, Y.; Watanabe, Y., Hydrogen peroxide dependent monooxygenations by tricking the substrate recognition of cytochrome P450_{BSB}. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (20), 3656-3659.
2. Shoji, O.; Wiese, C.; Fujishiro, T.; Shirataki, C.; Wünsch, B.; Watanabe, Y., Aromatic C–H bond hydroxylation by P450 peroxygenases: a facile colorimetric assay for monooxygenation activities of enzymes based on Russig's blue formation. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15* (7), 1109-1115.
3. Fujishiro, T.; Shoji, O.; Nagano, S.; Sugimoto, H.; Shiro, Y.; Watanabe, Y., Crystal structure of H₂O₂-dependent cytochrome P450_{SPa} with its bound fatty acid substrate: insight into the regioselective hydroxylation of fatty acids at the alpha position. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (34), 29941-29950.
4. Fujishiro, T.; Shoji, O.; Kawakami, N.; Watanabe, T.; Sugimoto, H.; Shiro, Y.; Watanabe, Y., Chiral-substrate-assisted stereoselective epoxidation catalyzed by H₂O₂-dependent cytochrome P450_{SPa}. *Chem Asian J* **2012**, *7* (10), 2286-2293.
5. Onoda, H.; Shoji, O.; Watanabe, Y., Acetate anion-triggered peroxygenation of non-native substrates by wild-type cytochrome P450s. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (34), 15316-15323.
6. Kawakami, N.; Shoji, O.; Watanabe, Y., Use of perfluorocarboxylic acids to trick cytochrome P450BM3 into initiating the hydroxylation of gaseous alkanes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (23), 5315-5318.
7. Shoji, O.; Kunimatsu, T.; Kawakami, N.; Watanabe, Y., Highly selective hydroxylation of benzene to phenol by wild-type cytochrome P450BM3 assisted by decoy molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (26), 6606-6610.
8. Kawakami, N.; Shoji, O.; Watanabe, Y., Direct hydroxylation of primary carbons in small alkanes by wild-type cytochrome P450BM3 containing perfluorocarboxylic acids as decoy molecules. *Chem. Sci.* **2013**, *4* (6), 2344-2348.
9. Cong, Z.; Shoji, O.; Kasai, C.; Kawakami, N.; Sugimoto, H.; Shiro, Y.; Watanabe, Y., Activation of Wild-Type Cytochrome P450BM3 by the Next Generation of Decoy Molecules: Enhanced Hydroxylation of Gaseous Alkanes and Crystallographic Evidence. *ACS Catal.* **2015**, *5* (1), 150-156.
10. Shoji, O.; Yanagisawa, S.; Stanfield, J. K.; Suzuki, K.; Cong, Z.; Sugimoto, H.; Shiro, Y.; Watanabe, Y., Direct Hydroxylation of Benzene to Phenol by Cytochrome P450BM3 Triggered by Amino Acid Derivatives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (35), 10324-10329.
11. Suzuki, K.; Stanfield, J. K.; Shoji, O.; Yanagisawa, S.; Sugimoto, H.; Shiro, Y.; Watanabe, Y., Control of stereoselectivity of benzylic hydroxylation catalysed by wild-type cytochrome P450BM3 using decoy molecules. *Catal. Sci. Technol.* **2017**, *7* (15), 3332-3338.

気になった論文

稲垣 雅仁 (いながき まさひと)

東北大学多元物質科学研究所 生命機能制御物質化学研究分野 博士後期課程 2年

inagaki.masahito.s8@dc.tohoku.ac.jp

この度は、生命化学研究レター「気になった論文」への執筆機会をいただきまして、編集委員の先生方に厚くお礼申し上げます。私は、学部生時代、愛知工業大学工学部応用化学科・早川芳宏教授のもと、環状ジヌクレオチドと呼ばれる低分子 RNA の合成研究に携わり、核酸関連化合物の有機合成化学について学んできました。その後、東北大学多元物質科学研究所・和田健彦教授のもとで修士号を取得したのち、同研究室の博士後期課程に進学し今に至ります。現在は、疾患細胞に特徴的な細胞内環境変化や光照射などをトリガーとして選択的に機能発現可能な人工核酸の設計・合成及びそれら人工核酸を利用した核酸医薬への応用研究に取り組んでいます。したがって、人工核酸などの核酸関連化合物の設計・有機合成とその核酸医薬への応用研究に大変興味を持っております。本稿では、人工核酸を導入したオリゴヌクレオチドの有機合成を基盤として、遺伝情報制御ツールや機能性分子へと応用した最新の興味深い例を紹介させていただきます。

Chirality Dependent Potency Enhancement and Structural Impact of Glycol Nucleic Acid Modification on siRNA

Schlegel, Mark K.; Foster, Donald J.; Kel'in, Alexander V.; Zlatev, Ivan; Bisbe, Anna; Jayaraman, Muthusamy; Lackey, Jeremy G.; Rajeev, Kallanthottathil G.; Charissé, Klaus; Harp, Joel; Pallan, Pradeep S.; Maier, Martin A.; Egli, Martin; Manoharan, Muthiah; *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (25), 8537-8546

近年、siRNAによるRNAi干渉機構を利用した核酸医薬開発研究が精力的に行われています。siRNAを核酸医薬として用いる場合、ヌクレアーゼ耐性、免疫原性、細胞膜透過性などの問題点を克服するため、化学修飾を施した人工核酸を用いる必要があります。これらの課題の解決法の一つとして、非環状型核酸類の活用が検討されており、siRNA中の適切な位置への導入によるRNAi活性の向上が報告されました。本論文では、非環状型核酸の一種としてGlycol Nucleic Acid (GNA、**図1**)のsiRNAへの導入が検討されています。誌面の都合上詳細は割愛いたしますが、GNA導入によるsiRNAの二

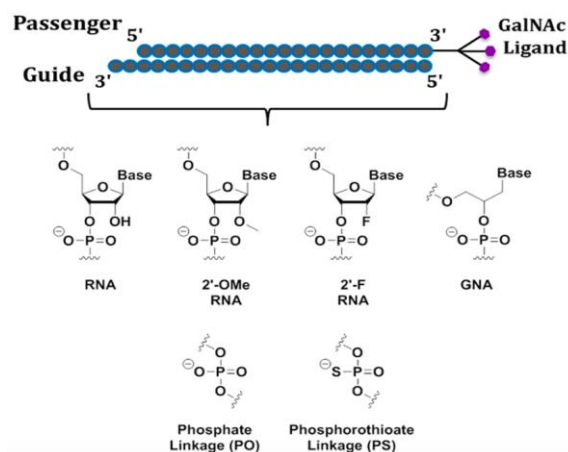


図 1. siRNA と人工核酸(論文より抜粋)

重鎖融解温度 (T_m) と GNA のキラリティーの影響について、X線結晶構造をもとに詳細に考察されています。さらに、GNA を導入した siRNA の mRNA 阻害活性を調べたところ、(S)-GNA の方が (R)-GNA よりも最大で 15 倍程度高い阻害効果を示しました。siRNA に (S)-GNA を A:T 塩基対で導入した場合には、(R)-GNA の場合よりも 10000 倍高い活性を示し、siRNA 活性における GNA のキラリティーの重要性が示されました。この結果は、X線結晶構造より (R)-GNA は左巻きらせんを優先するため、右巻き RNA 二重らせんに導入すると大

きな歪みを誘発し、 T_m が低下することからも矛盾無く説明されています。次に、siRNAに対するGNAの導入位置の検討がなされ、ガイド鎖5'側から7残基目(シード領域)に導入するとAgo2タンパクによる認識・取込みにおいて有利に働き、RNAi活性の向上が期待できることが示されました。さらに、TTR遺伝子を標的としたsiRNAに対してガイド鎖5'末端から7残基目、パッセンジャー鎖3'末端から7残基目にそれぞれ(S)-GNAを導入した場合(D2, D3)、ガイド鎖5'末端から7残基目に(S)-GNA塩基対を導入した場合(D4)においてモデルマウスを用いた検討が報告されています。その結果、投与後7日経過後ではいずれのsiRNAも阻害活性はほぼ同等ですが、21日後の肝臓内mRNAレベルおよび血清中TTRタンパク質レベルを見るとD3の場合は、D2, D4よりも高い活性を維持していること示されました。このようにX線結晶構造と T_m との相関関係から得られた結果を基に分子設計に改良を加え、*in vitro*系さらには*in vivo*系においても高い活性を示すことが証明されました。本設計指針はGNAだけではなく他の人工核酸をsiRNAに導入する際にも大いに参考になり、今後の展開が期待されます。

Synthesis of Phosphorodiamidate Morpholino Oligonucleotides and Their Chimeras Using Phosphoramidite Chemistry

Paul, Sibasish; Caruthers, Marvin H.; *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (48), 15663-15672

Morpholino 核酸 (PMO) は、nonionic な dimethylamino phosphorodiamidate結合を有し、リボース部位をMorphorino骨格に変換した人工核酸であり、近年、アンチセンス核酸をはじめとした医学・生物学ツールとしての幅広い応用が期待されています。特に、昨年度にはPMOが世界初のデュシェンヌ型筋ジストロフィーのエキソンスキッピング核酸医薬(Eteplirsen)として承認されたことから、その有用性が広く知られています。しかし、天然型核酸がanionicな骨格を有しているのに対してPMOはnonionicな骨格を有しているために、通常の核酸医薬の細胞導入に使用される細胞導入

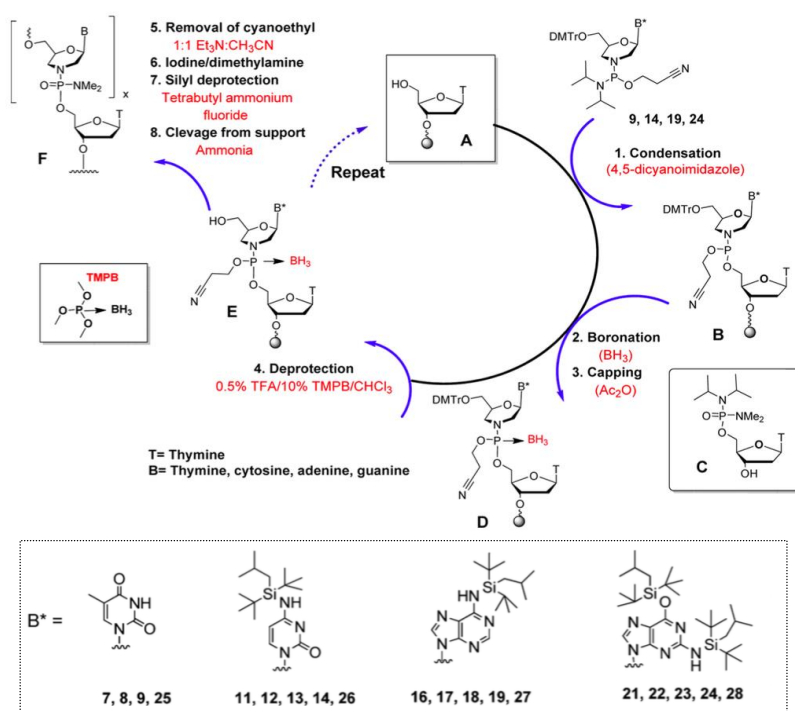


図 2. PMO/DNA キメラ分子の新規合成法 (論文より抜粋、一部改変)

試薬を用いても導入効率が低いこと、さらに、PMOはRNase Hによって認識されないため、アンチセンス法の現在主流となっているRNase H活性化によるRNA切断法が適用できず、投与薬剤量が多くなりがちであるという問題点が指摘されています。そこで、これら問題点の解決策としてPMOと天然型DNAを融合したキメラ分子が有用だと考えられますが、PMO合成は固相上にてchlorophosphoramidite法またはH-phosphonate法により5'→3'方向へ伸長させる方法が一般的であり、phosphoramidite法により通常3'→5'方向へ伸長させるDNA合成とPMO合成を組み合わせることは困難です。そこで、本論文では、PMO/DNAキメラ分子合成に適用可能な新規PMO phosphoramiditeモノマーを開発し、本モノマーを用いた新規PMO/DNAキメラ分子合成法の確立に成功しています(図2)。筆者らの合成上のポイントとしては、1)

phosphoramidite法によりPMOを導入したのち、boranephosphonateに変換し、つづく酸化的アミノ化によるphosphorodiamidate骨格の形成、2) 各種モノマーの核酸塩基部環外アミノ基の保護基としてbis(*tert*-butyl)isobutylsilyl (BIBS)基を使用(通常DNA/RNA合成に使用されるphosphoramiditeモノマーの保護基であるアシル系保護基はboranephosphonateに変換するためのホウ素化反応において還元されるため適用不可)、3) 既存のPMO合成では活性化剤として5-(ethylthio)-1H-tetrazole (ETT, $pK_a = 4.3$)を使用していたが、ETTよりも酸性度の低い4,5-dicyanoimidazole (DCI, $pK_a = 5.2$)を用いることにより副生成物の生成が抑制され収率の大幅な向上、が挙げられます。これらの改良により、目的とするPMOとDNAキメラ分子に合成に成功しています。得られたPMO/DNAキメラ分子を用い、そのRNase H活性・RNA切断活性、細胞導入についても検討されています。このように、合成化学的なアプローチから医学・生物学ツールとして有用な新分子創製に関する研究は古典的ではありますが、とても興味深いと考えられます。また、本論文のように画期的な新規合成法の確立により、生命化学研究がますます発展・充実することが期待されます。

Toward Complete Sequence Flexibility of Nucleic Acid Base Analogue FRET

Wranne, Moa S.; Füchtbauer, Anders Foller; Dumat, Blaise; Bood, Mattias; El-Sagheer, Afaf H.; Brown, Tom; Gradén, Henrik; Grøtli, Morten; Wilhelmsson, L. Marcus; *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (27), 9271-9280

蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)は、生体分子の構造や動的挙動を解析する手法として広く用いられています。FRETによるdonor-acceptor間のエネルギー移動効率はdonorとacceptorの遷移双極子モーメントの配向と距離に大きく影響されるため、X線結晶構造解析やNMRなどにとって代わるDNAやRNAなどの核酸の立体構造解析法としても期待されています。しかし、天然

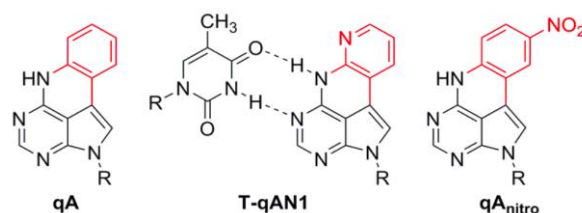


図3. qA, チミン(T)-qAN1 塩基対, qAnitroの構造 (論文より抜粋)

型DNAやRNAは非蛍光性であり、蛍光分析により構造解析するためには蛍光色素で修飾する必要があります。さらに、蛍光色素導入による解析では、色素の配向を制御することが困難であるという問題点が指摘されています。このような背景を踏まえ、名古屋大学の浅沼先生・樫田先生らによって、D-threoninol骨格にピレン・ペリレンFRETペアを導入し、DNA配列中に組込むことによる配向制御の成功例(*J. Am. Chem. Soc.* **2013**; *Nucleic Acids Res.* **2017**)が既に報告されています。一方、本論文の筆者らは、蛍光性核酸塩基(Fluorescence Base Analogues: FBAs)をDNA配列中の天然型核酸塩基と置き換えることにより、配向制御を達成しています。筆者らは既に、FBA-FRET対として三環性シトシン誘導体(tC^0 - tC_{nitro} ペア)を報告しており、本論文では蛍光性新規四環性アデニン誘導体のFBA-FRET対として、FRET-donorのqAN1とFRET-acceptorのqAnitroの合成とDNA配列中への導入を検討し、両誘導体が相補鎖チミン塩基選択的に結合することを実証しています(図3)。DNA配列中のqAN1は既存の蛍光性アデニン誘導体qAよりも20倍高い蛍光量子収率を示すことも明らかになり、その優れた光物理学的特性は非常に興味深いと考えられます。qAN1-qAnitroペアによるFRET効率は、qAN1とqAnitroとの距離(塩基対数)の異なる幾つかのDNAを用い、定常状態蛍光および蛍光寿命から算出されています。さらに、DNA二重鎖のマイナーグループバインダーとして知られているNetropsinの結合に伴う二重鎖構造変化のFRETによる検出も報告されています。Netropsin以外にも様々な核酸結合性低分子やペプチド、蛋白質などの結合の検出へと応用可能だと考えられ、今後一般性の高い分析手法として展開が期待されます。

気になった論文

大洞 光司 (おおほら こうじ)

大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻 林研究室 助教

oohora@chem.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」への執筆の機会を与えて頂き、心より感謝申し上げます。私は、2011年9月に大阪大学大学院にて学位を取得し、同年2011年10月から、大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻・林 高史教授の下で、助教として勤めております。現在は、ヘムタンパク質を基盤として、化学的および遺伝子工学的手法を用いて、機能性タンパク質の集積化によるバイオマテリアルや人工酵素の開発に取り組んでおります。

最近、タンパク質を反応場とし、非天然の物質変換反応に触媒作用を示す人工酵素の開発が盛んに行われております。特に、有機化学をバックグラウンドに持つ研究者が参画しており、とてもユニークな研究が多数報告されております。今回はその中でも、特殊な活性種を用いる酵素的反応と細胞内での進化工学について、3報の気になった論文を紹介させていただきます。

Enantioselective, Intermolecular Benzylic C–H Amination Catalysed by an Engineered Iron-haem Enzyme

C. K. Prier, R. K. Zhang, A. R. Buller, S. Brinkmann-Chen and F. H. Arnold, *Nat. Chem.*, **2017**, 9, 629.

C–H結合の官能基化は有機化学において非常に重要な反応である。しかしながら、非常に不活性なC–H結合を、狙った結合にのみ選択的かつ直接的に官能基化し、物質変換に用いることは容易ではない。現代有機化学におけるC–H結合官能基化の大部分の触媒はロジウム等の貴金属を用いるが、酵素は鉄や銅等の第一遷移金属を用いて、この困難な官能基化を達成している。しかしながら、天然が担う反応は限られており、最近、非天然酵素反応が注目されている。特にヘムタンパク質を用いた鉄カルベン種を活性種とする研究が盛んに行われている。これは天然におけるC–H結合活性化に関わる鉄オキソ種と似た活性種を利用しており、シクロプロパン化や分子内C–C結合形成反応等、様々な応用が実施されている。これらに対して、筆者らは鉄ナイトレン種に注目しており、これまで報告されてきた分子内でのナイトレン移動に対して、本論文では分子間かつ比較的難易度の高いベンジル位の鉄ナイトレン種によるアミノ化を、天然酵素を元に変異を多数導入した人工酵素で達成した(図1)。

基盤となる天然酵素としてシトクロムP450_{BM3}を選択しており、これは還元ドメインがペプチド結合で連

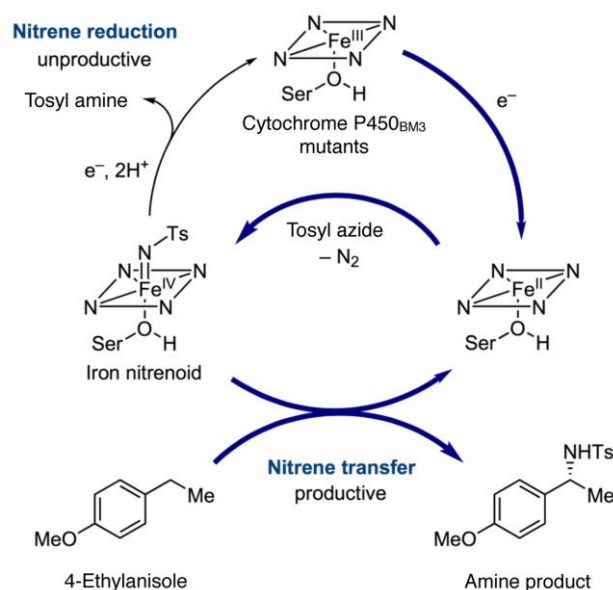


図1 シトクロム P450_{BM3}を基盤とする人工酵素が示すベンジル位のアミノ化反応における触媒サイクルの模式図。(論文より許可を得て抜粋・一部改変)

結された非常に活性の高い水酸化酵素である。以前より分子内ナイトレン移動反応で注目してきた多重変異体を元に、大腸菌内での whole cell catalyst (細胞内触媒) として進化工学的にランダムな変異をさらに多数加え、トシルアジドを窒素源とするエチルベンゼンおよびその類縁体のアミノ化を実施した。P450に対して17個変異を導入したタンパク質P-4は4-エチルアニソールを基質とした場合、目的生成物を11%の収率で得ている。さらに進化工学的に最適化を行い最終的にP-4に6つの変異を導入したP411_{CHA}は同反応に66%の収率を与え、1000以上の触媒回転数を示し、生成物は99%以上のエナンチオ選択性であった。これはこれまで、高い活性を示すと報告されているIrを活性中心とする人工酵素のアミノ化反応の触媒回転数 (<300) を大きく上回る値である。さらに幅広い基質への適用性を示し、それぞれに高いエナンチオ選択性を与えている。本稿では、詳細は割愛するが、P-4に変異を3つ導入したタンパク質の結晶構造を明らかにしており、この構造を元にしたドッキングシミュレーションにより高いエナンチオ選択性に言及している。

Highly Diastereo- and Enantioselective Synthesis of Trifluoromethyl- Substituted Cyclopropanes via Myoglobin-Catalyzed Transfer of Trifluoromethylcarbene

A. Tinoco, V. Steck, V. Tyagi, and R. Fasan, *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*, 5293.

非常によく研究されている酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビン (Mb) が、近年、非天然反応の人工酵素として再注目されている。著者らのグループは特に、簡単な変異を導入するのみで、カルベン種を経由するスチレンおよびその誘導体のシクロプロパン化について報告している。一方で、カルベン源として用いられる化学種は ethyl diazoacetate (EDA) に限られている。本稿では、2-diazo-1,1,1-trifluoroethane (DTE) をカルベン源とする、医薬品化学において注目されるトリフルオロシクロプロパン誘導体の合成について報告している。

DTEは不安定で毒性が高いため、*ex situ* で2,2,2-trifluoroethylamineと亜硝酸ナトリウムから発生させたDTEを使用した(図

2)。Mbの変異体(H64V,V68A)の溶液にDTEを吹き込み、*p*-クロロスチレンのトリフルオロシクロプロパン化を実施したところ、タンパク質のみで22%の収率(触媒回転数 = 220) で高いジアステレオ選択性をよび高いエナンチオ選択性を達成した。さらに変異体を発現した大腸菌をそのまま用いて、whole cell catalystとして同反応を評価すると、92%の収率を示し、99.9%のジアステレオ選択性およびエナンチオ選択性で生成物が得られている。興味深いことに、これまでカルベン源として非常によく用いられてきたEDAよりもDTEの方が高い収率を与え、ジアゾ基の反応性に強く依存していると考えられる。さらにwhole cell catalystとして基質の適用性を調べると、パラ位に電子求引基や供与基を持つスチレン誘導体に加え、ビニルナフタレンやプロペニルチオフェンを用いた場合でも高い収率を与えることが明らかになった。またグラムスケールでの反応にも適用でき、実際に触媒として利用可能な系であることが期待される。また種々の変異体を用い

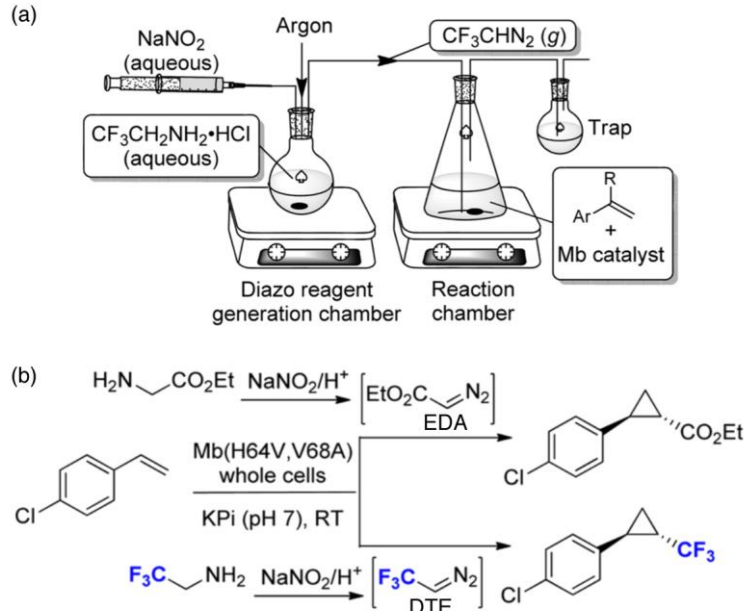


図2 (a) 本反応における *ex situ* での DTE の発生と触媒反応システムの模式図。(b) *p*-クロロスチレンの EDA および DTE を用いたカルベン移動反応のスキーム。(論文より許可を得て抜粋・一部改変)

てEDAとDTEを用いた反応のエナンチオ選択性を比較している。興味深いことに、両者の選択性には高い相関が得られ、EDAを用いた場合に高い選択性を示す変異体はDTEを用いた場合にも高い選択性を示すことがわかった。この結果から、Mb中でのカルベン種はEDA、DTEを用いた場合に関わらず、似た配向で生成し、スチレンとの反応も同じように似た配向で起こっていることが示唆された。

Directed Evolution of Artificial Metalloenzymes for *in vivo* Metathesis

M. Jeschek, R. Reuter, T. Heinisch, C. Trindler, J. Klehr, S. Panke and T. R. Ward, *Nature*, **2016**, 537, 661.

オレフィンメタセシス反応は、重要なC-C結合形成反応であり、近年では、タンパク質マトリクスとHoveyda-Grubbs触媒を組み合わせた人工酵素が複数のグループから報告されている。しかしながら、これらの貴金属類を含む人工酵素を*in vivo*で実施した例は非常に限られており、特にHoveyda-Grubbs触媒は還元型グルタチオンに強く阻害されてしまうため、whole cell catalystとしての展開は困難とされてきた。筆者らは、大腸菌における細胞膜と細胞外膜の間のペリプラズム空間に注目し、Hoveyda-Grubbs触媒を含む人工酵素のwhole cell catalystを報告している。ペリプラズム空間ではグルタチオンは酸化型として存在し、Hoveyda-Grubbs触媒を含む人工酵素が*in vivo*で機能することを見出し、さらに進化工学的に活性の向上を達成した(図3)。

本研究におけるタンパク質マトリクスにはストレプトアビジン(SAV)を用いて、ビオチン化したHoveyda-Grubbs触媒を活性中心としている。タグを用いてペリプラズム空間

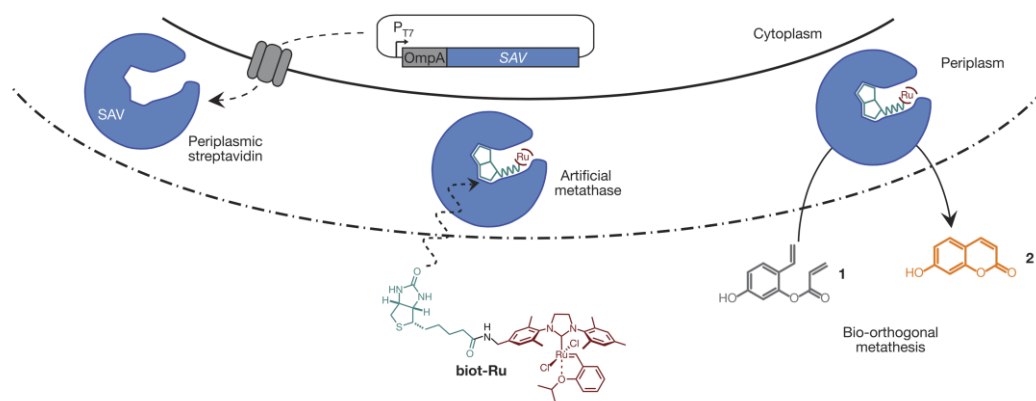


図3 ペリプラズム空間で発現したストレプトアビジン(SAV)への*in vivo*でのHoveyda-Grubbs触媒(biot-Ru)の挿入とメタセシス反応によるクマリン誘導体の生成の模式図。(論文より許可を得て抜粋・一部改変)

に発現したSAVは外部より添加したビオチンラベル化蛍光色素を効率よく取り込み、同様にビオチン化したHoveyda-Grubbs触媒を取り込んだ。これに対して、蛍光で容易に検出できるよう、クマリン誘導体2の前駆体となるジオレフィン1を基質としてオレフィンメタセシス反応をwhole cell catalystとして実施した。興味深いことに、種々のコントロール実験に対して、whole cell catalystとして機能していることが確かめられた。この系を元に活性中心近傍の14残基をsite saturation mutagenesisにより進化工学的に種々の変異体の活性を評価した。本系では、生成するクマリンの蛍光強度により容易に活性評価でき、ハイスループットな変異体の選定が可能になっている。最終的に5重変異体において、 k_{cat}/K_m は2倍程度まで向上し、完全に人工的な酵素の進化工学への応用が達成された。

以上のように、様々な非天然反応に対しての人工酵素が注目を集め、細胞内での利用と進化工学の組み合わせにより、実用的な触媒としての利用が将来的に期待されています。最後になりましたが、今回執筆機会を与えてくださいました鳥取大学の松浦和則先生に厚く御礼申し上げます。

留学
体験
記

マックスプランク陸生微生物学研究所

留学体験記

～化学から生物学へ～

埼玉大学理工学研究科分子生物学科

藤城貴史

tfujishiro@mail.saitama-u.ac.jp



はじめに

今回、留学体験記を執筆いたします、埼玉大学理学部分子生物学科の助教の藤城貴史と申します。私は、現在は生物系の学科に所属していますが、もともとは化学を専攻し、博士号は、名古屋大学理学部化学科の生物無機化学研究室の渡辺芳人先生のもとで取得しました。その後、今回の体験記の舞台である、マックスプランク陸生微生物学研究所の嶋盛吾先生のグループで4年間、ポスドクとして研究を行いました。今回、そのポスドク時代の留学体験を綴らせていただきたいと思います。

留学に至る経緯

私は、博士課程のとき、「過酸化水素を酸化剤として利用するヘム酵素の基質特異性を、人工的に作成した基質類似分子により変換し、非天然基質を酸化可能な触媒系をつくる」、というテーマで研究を行っていました。当時から、渡辺先生の研究室は、この種のヘム酵素関連研究の究極目標として、「メタンを酸化してメタノールを作る酵素触媒の開発」を掲げていましたので、できる限り高難度な有機化合物(例:飽和アルカン)をターゲットとした、酵素による温和な酸化触媒系の構築を目指し、酵素=生体材料(生体触媒)という化学的な観点で研究を行っていたと思います。博士号を取得した後の進路として、海外でのポスドクを、なんとなくですが考えていました。というのも、指導教員の渡辺先生が、ご自身もアメリカにいた経験から、積極的に海外での研究を勧められていたことや、博士課程時に様々な国際会議などに参加するうちに海外で自分の学んだことを試したい、という思いがあったような気がします。また、生物無機化学という融合分野を専攻し、多様な技術を取得していく過程で、「ポスドク時は、思い切って専攻を大きく変えて、自分にこれまでと全く違う知識や技術を身につける最後のチャンス」、という考えがあったため、学生時代の専攻分野と離れた分野を探しました。そこで、海外で、かつ、当時私が興味を持っていた研究ができそうな大学・研究所に絞り、ポスドク先を探しました。キーワードとしては、1つは「生体触媒系によるメタンの酸化」、そしてもう1つは、化学の視点で酵素を用いていたので「酵素反応中間体の構造/機能解析」でした。そこで、いろいろ探した結果、前者に関連した「メタンの嫌氣的代謝を行う微生物(メタン菌)」を扱っていた、マックスプランク陸生微生物学研究所のProf. Thauerのグループのポスドクの公募に応募しました。ですが、その枠が先に埋まってしまい、Prof. Thauerから、「(当時)同じグループでPIとして独立して研究をされていた嶋盛吾先生が、1ヶ月後にポスドクの公募をするかから、もし興味があれば、そのprojectはどうか」、と勧められ

たというのが、直接の留学のきっかけでした。嶋先生のグループでは、メタン菌のみが持つユニークな金属酵素、[Fe]-ヒドロゲナーゼの研究が長年展開されており、私が参加した時期は、ちょうど[Fe]-ヒドロゲナーゼの結晶構造が報告され、これら一連の研究がひと段落し、さらに研究が発展していくような機運がありました。またヒドロゲナーゼという金属酵素やその水素活性化の触媒反応は、生物無機化学分野で活発に研究がなされ、私自身も前から興味を持っていたため、すぐに申し込みました。まず、日本で嶋先生と面接させていただき、次にドイツのMPI Marburgで、Prof. Thauerも含めたラボメンバー全員の前で、面接(プレゼンテーション)+スタッフ面接を行い、無事ポスドクとして採用され、私の化学分野から生物学分野への道の第一歩が始まりました。

研究所での研究と生活

私の所属したマックスプランク陸生微生物学研究所は、ドイツのマルブルク(Marburg)という、自然豊かな比較的小さな田舎街にあります。そのため、マックスプランク陸生微生物学研究所は、MPI Marburgとも呼ばれます。また大都市フランクフルトからも交通の便が比較的良好(電車で1.5時間程度)、海外出張や休みにはフランクフルト空港や中央駅から、ドイツ国内外へと移動が容易となっています。MPI Marburgには、大学のように、当時3つの大きなDepartmentがあり、それぞれDirector(大学でいうProfessor)をトップにGroup leaderをPIとしたサブグループから構成されていました。それらDepartmentとは別に、Independent groupが幾つかあり、嶋先生やProf. Thauerのグループがそれらに当たります。研究所全体としては、研究に携わる人間が100名ちょっと、外国人はそのうち1/3から半数くらいだったと思います。研究所には学生も居て、連携協定があるMarburg大学の学生や、MPIの海外学生向けのFellowshipや自国のグラントを持って留学してきた外国人などがいました。基本的に、研究所内は英語が十分に通じる一方で、研究所外の日常生活では、ドイツの田舎町ということもあり、若いドイツ人大学生が話せるくらいで基本的に英語は通じません。ですので、来て半年くらいは生活に結構困ることが多かったです。幸い、研究所の同僚の図書館司書の方が大変親切な方で、空き時間を見つけて英語でドイツ語の練習をお願いし、多少のドイツ語がわかるようになりました。

ラボでの生活としては、比較的皆、朝早くから仕事に取り組み、皆仕事が終わった段階で、さっと引き上げるという感じでした。そんな中でも、私は、同僚の結晶学者のフランス人ポスドクと一緒に、例外的に深夜まで実験をやっていたので、良い意味であり周りに流されず、全力で研究に取り組めた気がします。有給もちゃんとあって、常勤の方は40日、ポスドクや学生は20日まで休みが取れます。ドイツは祝日が少ないので、貴重な祝日に有給をくっつけて1、2週間休みをたっぷりとる方が多いです。私の場合も、ドイツ国内各地、ヨーロッパ各地を旅行したりして休日を楽しみました。研究報告会は毎週(場合によっては隔週)ありProf. Thauerのグループや、滞在後半では新しくMPI Marburgに来たPIのDr. Erbとも共同で行いました。加えて、研究所全体でゲストとして第一線で活躍している研究者を呼んでのセミナーもありました。福利厚生としては、有料の講師を呼んでの早朝ヨガサークルやnon-nativeへのドイツ語講座、託児所など(ただしベビーシッターは自分で雇う必要があります)があり、研究生活をサポートする体制もある程度整っています。レクリエーションとしては研究所の夏祭りがあり、若い学生を中心に街のスタジアムを貸し切ってサッカー大会



Marburg の街(上)と MPI Marburg(下)

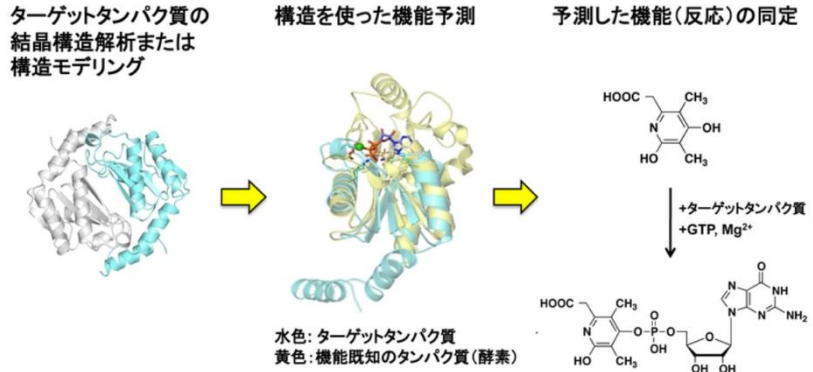
が開かれます。またクリスマスシーズンは研究所全体でクリスマスパーティーがあり、4年おきにDepartmentごとに順番が回ってきてイベントを行います。また、嶋先生のグループでは、Prof. Thauerのグループと一緒に、年1回、9月の初頭にドイツとオーストリアの国境付近のアルプスの麓で関連研究分野の仲間と行う合宿があります。その会は、午前～午後にかけて毎日(!)登山、(彼らは"ハイキング"だそうです)、帰ってきて夕方四時頃から夕食を挟んで九時頃まで参加者全員が充てられるセミナー(口頭発表)を行うタフなものでした。歩きながら、教授から若い学生含め研究の話や、雑談をしながらの登山は楽しく、また、途中の山小屋で飲むビールが最高でした。



(上) アルプス合宿ハイキングと山小屋での休憩
(左下) MPI Marburg 内のクリスマスパーティー
(右下) Marburg 市庁舎前のクリスマスマーケット

MPI Marburgで取り組んだテーマは[Fe]-ヒドロゲナーゼそのものの研究ではなく、[Fe]-ヒドロゲナーゼの活性中心である鉄コファクターの生合成の研究でした。具体的には、その生合成遺伝子/酵素を同定するというものでしたが、当時生合成遺伝子は7種ほどコンピュータを用いた方法で予測されていたものの、それらの遺伝子がどのような役割をするのかは全く明らかではありませんでした。生物学分野でこの種の生合成系(代謝系)を研究する手法は、ターゲットとなる遺伝子を不活化(knock-out)した遺伝子組換え生物(変異体)の表現型解析(phenotypic analysis)や、代謝物解析(metabolomics)などにより進めることが多いのですが、[Fe]-ヒドロゲナーゼを持つ生物であるメタン菌は、遺伝子操作がそもそも非常に難しいことが知られており、また私自身化学者であったので、定法である遺伝学的解析は行わず、タンパク質生化学をメインとして研究を進めることとしました。生合成候補遺伝子がコードするタンパク質の調製系はかなり早い段階で確立したものの、そこから先の手がない状態がしばらく続きました。いろいろ試行錯誤していたある時、学生時代の研究で培った考え、すなわち「酵素に対し、天然の基質だけでなく、類似の人工分子を添加しても、反応機構を再現できれば、活性そのものは維持される」に基づき、「最終産物 [Fe]-ヒドロゲナーゼの鉄コファクターの部分骨格(鉄コファクター類似の人工分子)を酵素系に与えてもある程度反応するのは？」という仮説を立てました。と言っても、有機合成を自在にできる環境ではなかったもので、とりあえず、化学メーカーで売っている[Fe]-ヒドロゲナーゼの鉄コファクターの部分骨格を持つ物質を買いあさり、基質として試すこととしました。それだけでは、やみくもすぎるので、ここで結晶構造が唯一「構造ゲノミクスプロジェクト」で明らかとなっていた、生合成酵素の候補タンパク質"HcgB"に絞って反応解析を試みました。構造ゲノミクスとは、聞きなれない言葉ですが、あるターゲット生物のゲノムがコードする全タンパク質を"網羅的に"結晶構造解析し、それらの立体構造データベースを基に、機能既知のタンパク質構造との情報比較などを通して、機能未知のタンパク質の「構造に基づく機能予測、さらに機能解析を行う」、というものです。詳細は論文が出ているので割愛しますが、この"構造ゲノミクスの手法"により、HcgBの結晶構造から種々のデータベース等を活用してHcgBの触媒機能をある程度予測し、最終的にHcgBが鉄コファクターの配位子部分を合成する酵素活性を持つことを、生化学的解析/タンパク質X線結晶構造解析により証明することができました。このHcgBの解析で用いた戦略は、残りの[Fe]-ヒドロゲナーゼ鉄コファクター生合成酵素の同

定にも適用することができました。これらの結果は、遺伝学が難しい系でも、化学者が触媒設計や酵素機能改変で頻繁に行なう「構造と機能の関係性から、反応をデザインする」考えにより、生物学の生合成系の研究ができることを示せた例と考えています。



構造ゲノミクス的手法による機能未知酵素の機能同定／解析の流れ

就活～現在まで

MPI Marburgでの私の契約は1年契約、可能であれば年度末に更新する、というものでした。それで4年目の終わりに契約が切れると伝えられたので、就職活動を最後の年にしました。先のHcgBに関する論文が *Angew. Chem. Int. Ed.*誌に出ていたこともあり、主にスタッフサイエンティスト(助教相当)を狙いました。4年もいると、周りの同僚、特にヨーロッパの人からいろいろ情報を学べるので、主にヨーロッパと日本に国を絞り、いろんな大学、研究所の公募に応募しました。ヨーロッパの研究業界も、すごく狭き門です。なので、少しでも分野が引っかかっていれば、応募することとしていました。半年で10～15箇所くらいはApplicationを出し、縁あって、最終的に埼玉大学の高橋康弘先生のラボの助教になることができました。甘い期待などはせず、自分が何の目的で今ここにいるのか、を見失わないようにする覚悟が必要のように思います。

おわりに

現在は、埼玉大学理学部分子生物学科で研究／教育に携わらせていただいております。埼玉大学理学部分子生物学科は、MPI Marburgとはまた違う生物系の学科で、微生物学系以外に遺伝学や植物学など、動物系を除く全てのいわゆる基礎生物学分野を幅広くカバーするスタッフで運営されております。その中で、ここでも唯一化学出身である私がどのように分子生物学を専攻する学生の教育に貢献できるかは自身への大きな課題の1つです。また、研究に関しても課題は多く、昨今言われる日本の基礎研究に対しての予算削減の流れを受け、基礎研究を主とする私たち理学部もそのあり方が難しくなっている中、いかに限られた予算や人員で成果をあげるかが問われているように思います。ポスドク経験を十分に積んだ若手研究者にとっても、依然としてポストは少なく、今回述べたような厳しい状況が待っているかもしれません。そのような中で、いかに自分に付加価値をつけるかというのは一つの考えのように思います。それは、留学なのかもしれませんし、異なる分野への挑戦なのかもしれません。私自身、留学に関しては決まってから腹をくくって取り組んだという感じで、余り偉そうなことを言える立場ではありませんが、今回の体験談が、次の世代の方々にとっての進路選択の助けになれば幸いです。

謝辞

第一に、この貴重な海外での研究機会を与えてくださった、MPI Marburgの嶋盛吾先生にこの場をお借りして深く御礼申し上げます。またドイツでの研究生活を支えてくださった方々、博士過程で懇切丁寧に指導してくださった名古屋大学理学部化学科の渡辺芳人先生、荘司長三先生にも御礼申し上げます。最後に本稿の執筆機会を与えてくださった、鳥取大学工学研究科の松浦和則先生、稲葉央先生に、改めて御礼申し上げます。

お知らせ

第20回 生命化学研究会 ～未来を拓く生命化学～

主催：日本化学会フロンティア生命化学研究会

会期：2018年1月5日(金)13時～6日(土)12時

会場：箱根湯本 四季の宿 箱根路 開雲(<http://www.odakyu-hotel.co.jp/kaiun/>)

アクセス：小田急線箱根湯本駅から徒歩8分(<http://www.odakyu-hotel.co.jp/kaiun/access/>)

講師【敬称略】：津本浩平(東大院工・医科研)

上野隆史(東工大生命理工)

宮成悠介(基礎生物学研究所)

福田真嗣(慶応義塾大学)

南 豪(東大生産研)

五十嵐龍治(京都大学)

会費：参加登録費 一般 5,000円・学生 3,000円, 宿泊費 12,000円

参加申込方法：氏名, 所属, 役職(学年), 性別, E-mail アドレス, 6日の昼食(1,620円)の要・不要を明記の上, 11/20(月)までに下記の連絡先へメールにてお申し込みください。メールタイトルは「第20回生命化学研究会参加申し込み」として下さい。

定員：60名

要旨締切：11/20(月)

ポスター発表希望者はA4 白黒半ページで作成してください(最大30件程度)。テンプレートは生命化学研究会ホームページ(<http://res.tagen.tohoku.ac.jp/FBC/>)よりダウンロードできます。なお、題目は出来るだけ能動態で発表内容が解りやすいタイトルをつけて下さい。

問い合わせ・申込先：〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

東京大学大学院理学系研究科化学専攻 小澤岳昌

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

TEL: 03-5841-4351

編集後記

今号もパッション溢れる執筆者の方々にお忙しいところご執筆いただき、どうもありがとうございます。最近、涼しくなってきましたが、会員の皆様におかれましては体調など崩されませんよう、ご自愛ください。

次号の生命化学研究レターは、大神田さんの担当により、2018年2月頃の発行を予定しております。ニュースレター改善のために、みなさんからのご要望・ご意見をお待ちしております。下記の編集担当まで、ご連絡をいただければ幸いです。

平成 29 年 10 月 5 日

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

編集担当
井原敏博(熊本大学)
大神田淳子(信州大学)