

# 生命化学研究レター

(2019年10月)

2. 巻頭言

やってみなはれの前後

サントリー生命科学財団 島本 啓子

4. 主催研究会報告

第22回生命化学研究会

7. 研究紹介

7. 生理活性蛍光リガンドとLA-LDIMS ～標的生体分子の結合位置解析法の開発～

名古屋大学大学院生命農学研究科 北 将樹

12. 組織中 lacZ 発現細胞のライブ検出を可能とする蛍光プローブの開発 ～化学の力で見たい細胞だけを光らせる～

東京大学大学院医学系研究科 神谷 真子、浦野 泰照

19. リン酸化酵素阻害剤研究の新展開 ～フォールディング中間体を標的とした創薬～

信州大学学術研究院（農学系） 喜井 勲

25. 論文紹介「気になった論文」

九州大学大学院薬学府 創薬科学専攻 徳永 啓佑

慶應義塾大学大学院理工学研究科 荒井 洋平

31. 海外のラボ便り

アメリカで研究室を持つということ

～大学ポジションの獲得とテニユア～

ミシガン大学歯学部 黒田 賢一

36. シンポジウム等会告・受賞・異動

日本ペプチド学会第26回ペプチドフォーラム

編集後記

# 巻頭言

## やってみなはれの前後

公益財団法人サントリー生命科学財団 島本啓子

手前味噌な話で恐縮ですが、今年は弊財団の創設者である佐治敬三の生誕100周年だそうです。佐治はサントリー社(当時は寿屋)創業者である鳥井信治郎の次男として生まれましたが、家業は長兄が継ぐというので、佐治家に養子に出され、自分は化学者になりたいと阪大理学部化学科に進みました。しかし、戦争中に兄が亡くなり家業を継がざるをえず、自分の夢を恩師 小竹無二男先生に託し、弊財団の前身となる財団法人食品化学研究所を設立しました。サントリー社の2代目社長としての活躍は、日経新聞で連載(「琥珀の夢」伊集院静)されたりしたので、お読みになった方もあるでしょう。さて、佐治や父である鳥井信治郎のモットーである「やってみなはれ」という言葉は有名で、数年前の朝ドラでも鴨居の大將なる人が口癖にしていたようです。国産初のウイスキーや40年赤字なのに続けたビール、不可能と言われた青バラ等とともに「やってみなはれ」が紹介されます。「やってみなはれ」と聞くと、新しいことに挑戦し、好きなことが自由にできるというイメージを持たれることと思います。皆さんは、この言葉に対語があるのをご存知でしょうか? 「やってみなはれ」を言われた人は、「みとくんなはれ」と結果を示さないといけません。任された以上は責任もってやり遂げる。これは、なかなかのプレッシャーです。最近、私はもう一つの対語があるのではないかと思っています。それは「やらせておくんなはれ」です。ビールにしろ、青バラにしろ、担当者の熱いプレゼンテーションがあってこそ、「やってみなはれ」という言葉が引き出せたはずです。もし熱い思いが無く、上から言われたことに取り組むだけなのであれば、それは「やってみなはれ」ではなく「やりなはれ」でしょう。

「自分は『みとくんなはれ』と言えるような研究ができていだろうか?」と自問してみます。昨年日本糖質学会の特別講演で東北大の栗原和枝先生が、「純粋に科学が好きというのは素晴らしいことだけど、研究するだけで満足というのでは、結果に責任を持つというプロ意識が低い」と言われており、考えさせられました。楽しんでやっただけじゃダメだとちょっと反省。世界に「みとくんなはれ」を突きつけるような研究テーマを設定し、それを「やらせておくんなはれ」と提案することが、プロの研究者なのかもしれません。もちろん、研究の申請書を書く度に、計画を熱く語り「通りますように」と祈りながら出すわけですが、それは「やらせておくんなはれ」なんですか? 阪大の元総長の山村雄一先生の言葉に「夢見て行い、考えて祈る」というものがあります。まず「これがしたい!」という思いに突き動かされて行動することが大切だという教えと捉えています。山村先生の言葉で言うと「祈る」の順番は最後ですね。

私も年齢のせいか、最近、若い人のグラント選考に関わらせていただくことが多くなってきました。申請書を読むだけで、あるいは面接で顔を見ただけで、溢れ出てくる「やらせておくんなはれ!」を感じる人がいます。そういう申請は(もちろん、科学的な内容を伴っているという前提ですが)、審査員が一致して「やっ

みなはれ！」を出します。感じるものは同じなのでしょう。一方、「今回の募集課題は〇〇だったから、、、」とこじつけた形で出したなという印象を受ける申請書もあります。昨今の研究費事情や若手の雇用事情を鑑みれば、それは仕方ないことではあります。また、無理やりこじつけたことによって、これまでとは全然違う切り口が見えてくることもありますから、一概に悪いことでもないでしょう。でも、やはり「やらせておくんははれ！」がほとぼる提案は、読む人、聞く人を動かす力があります。きっかけが「こじつけ」だったとしても、新しい切り口を発見した興奮が伝わるプレゼンは迫力があります。是非、「みとくんははれ！」と成果を突きつけてほしいものです。

さて、ここまで書いて改めて考えてみると、「やってみなはれ」の後には実はもう一つ大切な言葉があることに気づきました。それは、「やらな、わからしまへんで」です。「みとくんははれ」が「やってみなはれ」を言われた側が返す言葉なのに対して、こちらは、「やってみなはれ」を言った側の言葉です。佐治は常々「やる前から諦めるやつは一番つまらん人間だ」と言っていたそうです。冒険を容認できないのであれば、それはやはり「やってみなはれ」ではなく「やりなはれ」でしかありません。

政府が今年出した科学技術白書では、「基礎研究が大切」ということがテーマに上がったそうです(1998年テーマを設定するようになって以降初めて)。論文数の減少や研究力の国際的な地位低下など近年の傾向を受け、すぐに実用化に結びつかない独創的な「基礎研究」の重要性を取り上げたそうです。ノーベル賞受賞者が訴えてくれた甲斐があったのでしょうか。それまでも現場の研究者はさんざん言っていたと思いますけど……。白書にどれほどの影響力があるのか分かりませんが、うまく政策に結びつくことを願ってやみません。

現代の研究現場は構造的な息苦しさを抱えており、夢を語れる機会も少なくなってきたかもしれません。夢を語っても食えない、論文を出せる仕事でなくちゃ、というのは実際のところでしょう。でも、自由に語らせたら、いつまでも語り続ける若者(年寄りもだけど)は周りにも沢山います。なかなか「やってみなはれ」と言ってくれる御大尽を見つけるのは難しいでしょうが、若い人は「やらせておくんははれ」と声を出してほしいと思います。言わなければ伝わりません。そして、我々の世代としては、「やらな、わからしまへんで」と大きな気持ちで後押ししたいものです。挑戦する気概やよし、成功すれば尚よしです。「やらせておくんははれ」「やってみなはれ、やらな、わからしまへんで」「みとくんははれ！」これが3点セットで回るような枠組みを考えていきたいと思います。

最後に、常々「訛っている」と馬鹿にされている筆者ですが、さすがに普段はここまで「ベタな関西弁」を話しているわけではないことを申し添えておきます。ほんまやで。



# 主催研究会報告

## 第22回 生命化学研究会（北見）～開拓者魂を思い出せ～

当研究会の主要行事である生命化学研究会が今年も開催されました。22回目の今回は、野水 基義氏（東薬大薬）と吉田 孝氏（北見工大）のお世話により北海道の北見で行われ、新進気鋭の若手講師による講演と活発な議論が交わされました。

**主催：**日本化学会フロンティア生命化学研究会

**会期：**2019年6月21日（金）、22日（土）

**会場：**北見工業大学講演ホール・多目的ホール、サロマ湖鶴雅リゾート

**幹事：**野水 基義（東京薬科大学薬学部）、吉田 孝（北見工業大学バイオ環境化学科）

### プログラム

6月21日（金）北見工業大学講演ホール・多目的ホール

14:00- 開会の挨拶

14:05-14:35 小澤 岳昌（東京大学大学院理学研究科）

「細胞膜リセプターの機能を観る・操作する新たな技術」

14:35-15:05 今西 未来（京都大学化学研究所）

「RNAを標的とした遺伝子発現操作」

15:05-15:35 吉田 孝（北見工業大学）

「硫酸化糖鎖の抗ウイルス性作用メカニズムの解析」

15:35-16:05 ポスタープレビュー

16:05-17:00 記念撮影ののち、ポスター発表

17:00-18:00 サロマ湖鶴雅リゾートへ移動

19:00- 会食

21:00- 情報交換会

6月22日（土）サロマ湖鶴雅リゾート

8:50-9:20 総会

9:20-9:50 建石 寿枝（甲南大学先端生命工学研究所）

「DNA四重らせん構造はがんの悪性を制御しているのか」

9:50-10:20 川井 清彦（大阪大学産業科学研究所）

「核酸1分子を見つける、調べる」

10:20-10:50 山吉 麻子（長大薬）

「遺伝子の非コード領域を標的とした機能性核酸開発」

10:50 閉会の挨拶

11:00 解散

## ポスター発表

- P-1 GFP を内包して微小管の機能を制御する  
松浦 和則<sup>1</sup>、山本 昂久<sup>1</sup>、稲葉 央<sup>1</sup>、岩崎 崇<sup>2</sup>、A. Md. R. Kabir<sup>3</sup>、  
角五 彰<sup>3</sup>、佐田 和己<sup>3</sup> (<sup>1</sup>鳥取大院工、<sup>2</sup>鳥取大農、<sup>3</sup>北大院理)
- P-2 D-ルシフェリンを用いた生物発光で有機酸トランスポーターの活性を可視化する  
井上 勝央、古屋 貴人、鷲巢 百恵、志村 明日香、岸本 久直、白坂 善之 (東薬大薬)
- P-3 擬 AUG コドンからの翻訳開始は周辺配列によって制御されている  
倉澤 光、相澤 康則 (東工大生命理工)
- P-4 マウス前駆体由来ミオスタチン阻害ペプチドは筋肉を増強する  
日向 宏輝<sup>1</sup>、渡部 琢也<sup>1</sup>、高山 健太郎<sup>2</sup>、林 良雄<sup>2</sup>、伊東 史子<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東薬大生命、<sup>2</sup>東薬大薬)
- P-5 糖鎖分枝を持つシクロデキストリンの合成と抗 HIV 性  
白 明学、宮崎 健輔、吉田 孝 (北見工大)
- P-6 迅速型発蛍光イメージングによる新生タンパク質の動態解析  
玉村 啓和 (東京医科歯科大)
- P-7 RNaseH による RNA 切断配列と活性を制御する  
稲垣 雅仁<sup>1</sup>、上松 亮平<sup>1</sup>、西嶋 政樹<sup>1</sup>、荒木 保幸<sup>1</sup>、石橋 哲<sup>2</sup>、  
横田 隆徳<sup>2</sup>、山吉 麻子<sup>3</sup>、中谷 和彦<sup>4</sup>、和田 健彦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東北大多元研、<sup>2</sup>東京医科歯科大、<sup>3</sup>長大薬、<sup>4</sup>阪大産研)
- P-8 伝統的モンゴル発酵乳中の乳酸菌産生抗菌ペプチド  
Ganzorig Oyundelger<sup>1</sup>、Batdorj Batjargal<sup>2</sup>、大和田 淳<sup>1</sup>、  
宮崎 健輔<sup>1</sup>、吉田 孝<sup>1</sup> (<sup>1</sup>北見工大、<sup>2</sup>モンゴル国立大学)
- P-9 ラミニン由来ペプチド修飾リポソームは筋ジストロフィー疾患における病変部位に集積する  
濱野 展人<sup>1</sup>、林由 浩<sup>1</sup>、佐々木 愛理<sup>1</sup>、菝沢 慧<sup>1</sup>、片桐 文彦<sup>1</sup>、坂井 崇亮<sup>1</sup>、  
吉田 彰宏<sup>2</sup>、平島 真一<sup>1</sup>、三浦 剛<sup>1</sup>、高橋 葉子<sup>1</sup>、吉川 大和<sup>1</sup>、野水 基義<sup>1</sup>、  
根岸 洋一<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東薬大薬、<sup>2</sup>城西大薬)
- P-10 環状一本鎖抗体を実用化する  
森岡 弘志<sup>1</sup>、山内 聡一郎<sup>2</sup>、福田 夏希<sup>1</sup>、寺本 真香<sup>3</sup>、劉 宸江<sup>2</sup>、  
豊田 湧也<sup>2</sup>、池口 友佳<sup>2</sup>、佐藤 卓史<sup>1</sup>、小橋川 敬博<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>熊大院薬、<sup>2</sup>熊大院薬学教育部、<sup>3</sup>熊大薬)
- P-11 ラミニン  $\alpha 2$  鎖 LG4-5 モジュールに着目した  $\alpha$ -ジストログリカン結合ペプチドの探索  
濱田 圭佑、張 光端、山田 雄二、吉川 大和、野水 基義 (東薬大薬)
- P-12 コウジ酸はがん幹細胞の標的化に使えるか？  
長崎 健、堂脇 聖史、河崎 陸 (大阪市大院工)
- P-13 核酸高次構造選択的アルキル化反応は遺伝子発現を制御する  
鬼塚 和光、ハゼミ・マドカ、石川 俊也、永次 史 (東北大多元研)
- P-14 ペプチド錯体触媒で人工光合成を目指す  
石田 斉、小島 千明、大塚 敦史、板橋 淳 (北里大院理)

- P-15 Elastin-like polypeptide-laminin  $\alpha$ 1 chain peptide model as an extracellular matrix mimetic  
Anh Tan Truong<sup>1,2</sup>, Keisuke Hamada<sup>2</sup>, Yuji Yamada<sup>2</sup>, Hao Guo<sup>1</sup>,  
Yamato Kikkawa<sup>2</sup>, Curtis T. Okamoto<sup>1</sup>, J. Andrew MacKay<sup>1</sup>, Motoyoshi Nomizu<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>University of Southern California, USA、<sup>2</sup>東薬大薬)



2019年6月21日 出席者一同

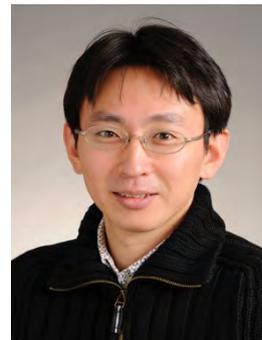
## 研究紹介

## 生理活性蛍光リガンドと LA-LDI MS

～標的生体分子の結合位置解析法の開発～

名古屋大学 大学院生命農学研究科  
北 将樹

(mkita@agr.nagoya-u.ac.jp)



## 1. はじめに

強力な生理活性を有する化合物 (リガンド) の標的分子の同定および結合様式の解明は、創薬やケミカルバイオロジーの研究で重要である。標的分子-リガンド複合体の構造は、その相互作用が十分強く、安定な複合体を作る場合は、X線回折やNMRスペクトル、クライオ電子顕微鏡などにより結合様式を詳細に解析できる。一方、これらの解析方法が適用できない場合は、リガンドに反応性官能基と検出基を導入した誘導体 (ケミカルプローブ) を用いて、標的分子と共有結合させるケミカルラベル法が有用である。例えば、標的分子がタンパク質の場合、ラベル化後、酵素消化と断片ペプチドのMS解析あるいはアミノ酸配列分析などを行うことで、標的分子の種類や結合位置を推定できる。一方で、ケミカルプローブを用いる場合、ラベル化反応の効率や検出感度の低さが課題であり、本手法をより高感度、ハイスループットで実施できる方法の開発が望まれている。著者は強力な活性を有する天然物の標的分子の同定や結合様式の解明にこれまで取り組んできたが<sup>1-3</sup>、複合体の不安定さ・希少さゆえに結晶化や既存の蛍光ラベル化法などでは結合様式の解析が困難な場合が多々見られることから、新たな検出法の開発を目指すこととした。本稿では、マトリックスを使用しないラベル支援レーザー脱離イオン化による質量分析法 (LA-LDI MS) を用いて、プローブと結合した標的分子由来の断片ペプチドを高選択性かつ高感度で検出できるケミカルプローブの創製と、標的分子におけるリガンド結合部位を高精細に解析する手法の開発について紹介する。

## 2. LA-LDI MS に適用できるアミドピレン基の開発

高極性、高分子量の生体分子の質量を測定するソフトなイオン化法の一つにマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 法があり、標的タンパク質の酵素消化産物を網羅的に同定するペプチド・マス・フィンガープリント (PMF) の基盤技術として生命科学の幅広い研究分野で普及している。MALDI法ではサンプルのイオン化を促進するため、 $\alpha$ -CHCA や 2,5-DHB などの紫外光を吸収するマトリックスを添加する。一方でピレンなど多環芳香族炭化水素やヘテロ環を持つ分子は、マトリックスを添加しなくても紫外線レーザーにより分子自身が励起され、イオン化する例が知られていた。2013年に、米国スタンフォード大学の Kozmin らは合成反応における反応追跡法としてピレン化合物の検出に本法を利用し、LA-LDI と命名した<sup>4</sup>。そこで著者は、ケミカルプローブの検出基としてピレン基を用いれば、標的分子を酵素消化したラベル化ペプチドを選択的に検出でき、PMF解析にも応用できると考えた。

ところが、実際にピレン化合物を LA-LDI MS で測定してみると検出感度はマイクロ～ナノモル量と低く、PMF 解析におけるラベル化産物の解析を行うには実用性に欠けていることが分かった。そこで、レーザー波長や蛍光基としての特徴に注目して、ピレンの 6 位に窒素官能基を導入した 6-アミドピレン誘導体を合成した (図 1)。LA-LDI MS で解析した結果、この誘導体は非修飾のピレン化合物よりも約 1,000 倍少ない量 (0.1 pmol 量) でも、42 mu 少ない特徴的なフラグメントイオンとともに、高い S/N 比で分子イオンピークが検出された<sup>5</sup>。

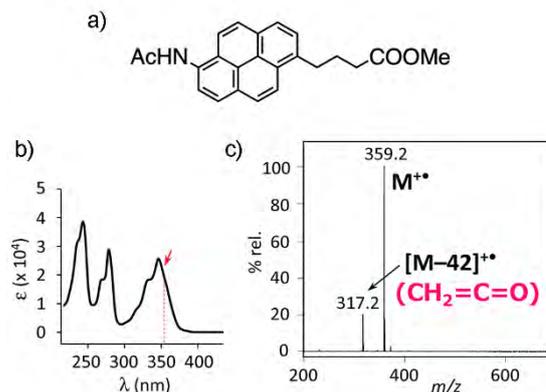


図 1 6-アミドピレン誘導体の (a) 構造式、(b) UV スペクトル、(c) LA-LDI マススペクトル

### 3. 光親和性アミドピレンプローブの合成と LA-LDI MS

次に、細胞骨格タンパク質アクチンとチューブリン間の特異な相互作用を誘導する海洋天然物アプリーロン A<sup>6-9</sup> をリガンドに選び、反応性官能基をジアジリン、検出基をアミドピレンとしたケミカルプローブを合成した (図 2)。本プローブは天然物が持つ強力な生物活性 (がん細胞の増殖阻害活性、アクチン脱重合活性、紡錘体形成の阻害活性) を保持していた。標的タンパク質のラベル化反応のモデル実験として、このプローブに 365 nm の紫外光を照射して光反応を行い、ジアジリン基が溶媒分子 (水・メタノール) と定量的に反応し、紫外光を吸収するアミドピレン基が共存しても反応性を失わないことを確認した。さらに、このアミドピレン基を持つプローブの反応物を用いた LA-LDI MS および MS/MS を詳しく解析したところ、アミドピレン基から MS 系内でケテンが脱離して生じるアミノピレン基により、チャージリモートフラグメンテーションが効率よく起こり、ラベル化体の内部構造を詳しく解析できることが分かった<sup>5</sup>。

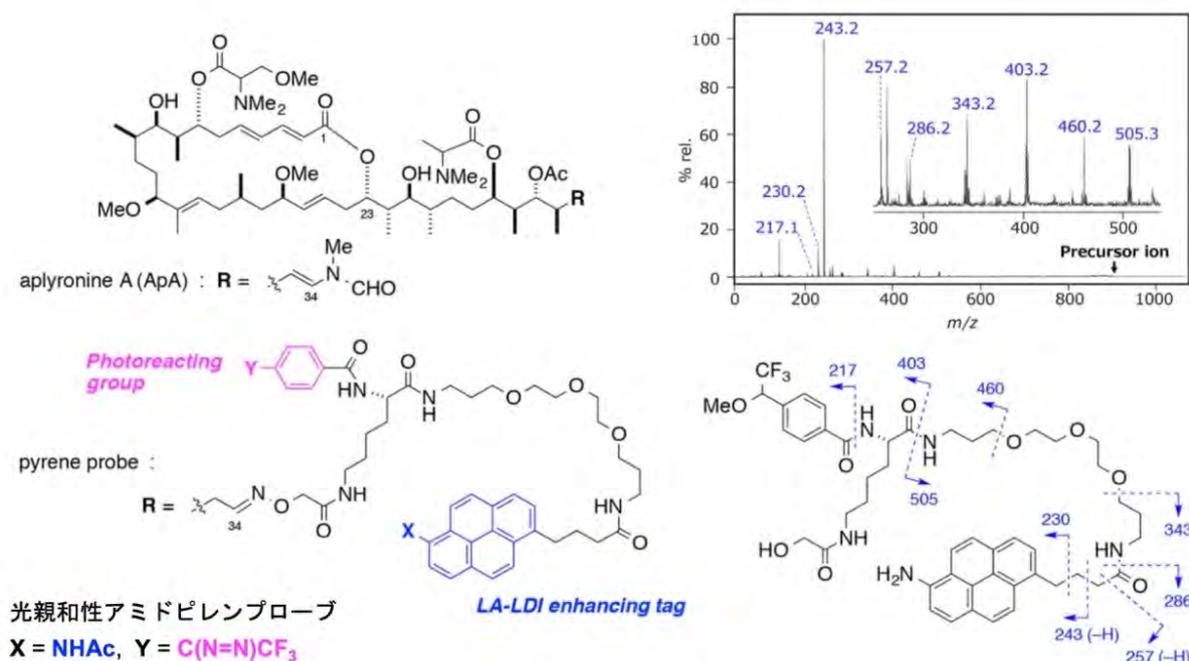


図 2 アプリーロン A の光親和性アミドピレンプローブの構造と LA-LDI MS/MS 解析

なお、アミドピレン基よりもさらに高感度で LA-LDI MS 検出が可能な蛍光タグの開発を目指して誘導体の合成と機能評価を行い、アミドピレン基よりも約 100 倍検出感度が高い新規ピレン誘導体を創製した (論文投稿中)。また *N*-アルキルピリジニウム化合物など、分子内で電荷を持ち、親水性も高い市販の芳香族化合物 20 種類についても LA-LDI MS の検出タグとして評価し、その一種が上記の新規ピレン誘導体に匹敵する感度で検出されることを見出している (未発表)。

#### 4. 標的タンパク質のラベル化および LA-LDI MS による検出

次に、アミドピレンを結合したラベル化ペプチドの LA-LDI MS での検出を検討した。アミドピレンに *N*-ヒドロキsuccinil (NHS) 基を結合させた誘導体をアクチンと反応させ、酵素消化で得られたペプチド混合物を解析した結果、MALDI 法ではラベル化体と非ラベル化体が同程度の強度で観測されたのに対し、LA-LDI MS では感度は劣るものの、アミドピレン標識ペプチドがほぼ選択的に検出され、想定したコンセプトを実証することができた (図 3)<sup>10</sup>。

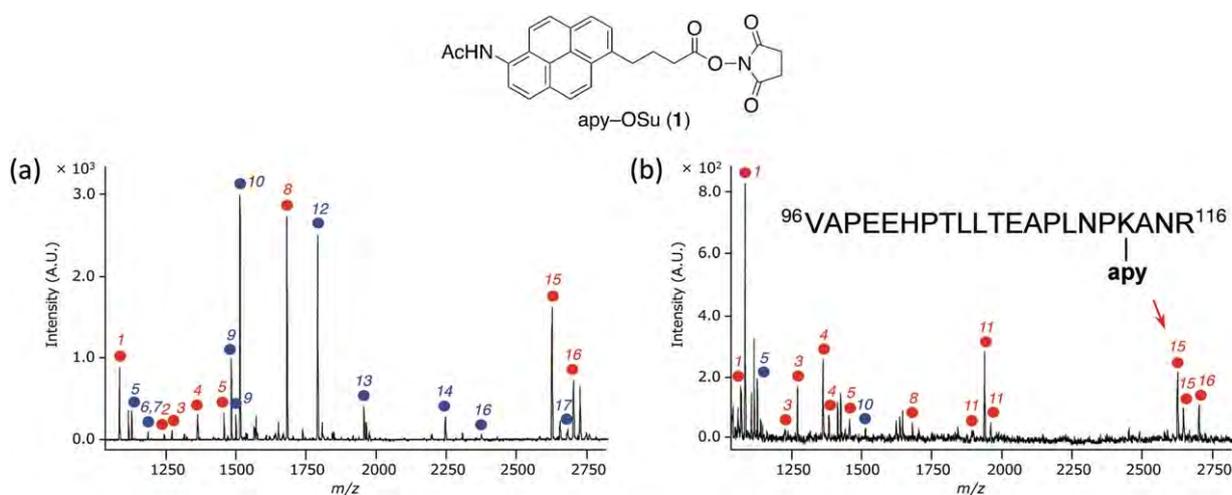


図 3 ラベル化されたアクチンの断片ペプチドの (a) MALDI および (b) LA-LDI MS。

赤色はアミドピレンが結合したラベル化ペプチド、青色は非ラベル化ペプチドを指す

さらに、リガンドにビオチン、検出基にアミドピレン基を持ち、反応性官能基 NHS を内包したリガンド解離型アミドピレンプローブを合成し、標的タンパク質アビジンのラベル化と酵素消化後のラベル化ペプチドの MS 解析を行った (図4)。結晶構造をもとに NHS 基とリガンド間の距離を適切に設計することで、リジン残基の一箇所のみで特異かつ高効率で標的分子がラベル化される条件を見出した。一方で、アビジンはアクチンとは異なり、構造が非常に強固なタンパク質である。そのため通常の方法では酵素消化は全く進行せず、グアニジン塩酸塩など高濃度の変性剤を加えて酵素消化する必要があるが、この不揮発性の塩を除かないと LDI MS では検出できず、一方で ODS 樹脂など従来の脱塩法では回収率が著しく低いことが分かった。種々の検討により、ポリスチレン製ゲルろ過樹脂 TSK-G3000S 担体にペプチド混合物を吸着させ、水からメタノールの割合を増やして溶出することで、非ラベル化ペプチドは 25~75%メタノール画分で主に溶出されるのに対し、ラベル化ペプチドが 75%メタノール画分で主に溶出されるため概ね分離でき、MALDI 法でもピレンラベル化ペプチドを基準ピークとして検出できた。また LA-LDI MS についても、高濃度の不揮発性の塩を含まないサンプルに比べると感度は低いものの、350 pmol 量のアビジンから酵素消化したラベル化ペプチドの分子イオンピークを検出した。当初期待してい

た LA-LDI MS による高感度なアミドピレンラベル化ペプチドの検出には至らなかったが、本脱塩法を組み合わせることで、取り扱いが難しい標的生体分子のラベル化とその結合位置の解析を達成した。また、実際にラベル化された Lys<sup>135</sup> 残基のε-アミノ基とプローブの NHS 基との間で共有結合を形成したヘミアセタール中間体の構造に基づく covalent-Dock 計算を検討し、プローブのビオチン基の配座がもとの結晶構造中のリガンドとほぼ一致する (RMSD < 0.4 Å) という結果を得た。これにより、プローブでラベル化されたアミノ酸残基の情報から、もとのリガンドの結合様式を精密に決定する手法を開発できた<sup>11</sup>。

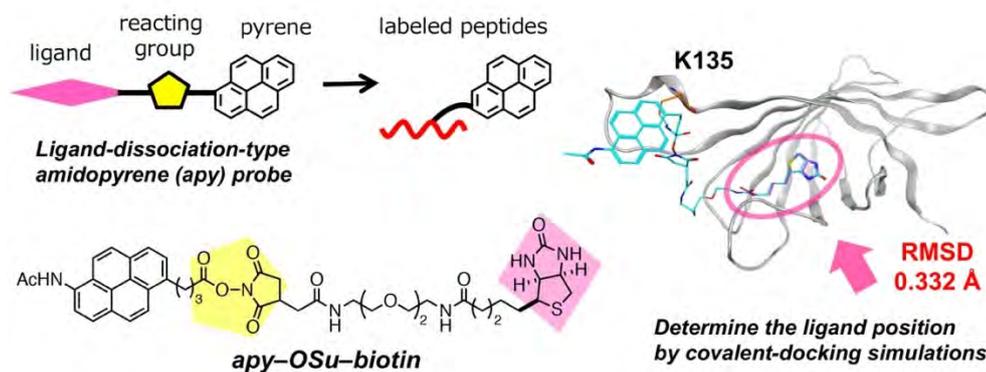


図4 リガンド解離型アミドピレンプローブの構造と分子モデリング計算

## 5. おわりに

本研究は機器分析法の最先端の手法をケミカルバイオロジー分野に応用することで、標的分子の結合位置解析法を高度化することを目指した。従来よりも高感度で LA-LDI MS 法で検出できる新規蛍光基としてアミドピレン誘導体を開発した。これをケミカルプローブの検出基として用いることで、酵素消化後の反応混合物からラベル化ペプチドを選択的に検出した。またリガンドと検出基の間に標的分子との反応において開裂する反応基を導入したりガンド解離型プローブを開発し、ラベル化ペプチドを選択的に検出することに成功した。

今後は、これまでの *in vitro* の系から発展させて、細胞レベル、さらには組織や個体レベルの実験にも適用できるよう、ラベル化の手法開発を進めたい。本手法の有用性を一層高めて広く応用するためには、標的生体分子との効率的な共有結合形成が重要となる。これまでに国内外の研究者により開発されてきた優れた化学ラベル化の様々な手法を、本研究のピレン化合物にも適用していきたい。また、複数のタンパク質と相互作用して不安定な複合体をつくるアプリロニン A や、炎症や痛みの関連受容体に特異的に結合する神経毒など、特異な生理活性を示す天然物リガンドの標的受容体との結合様式の解明にも挑戦していきたい。

## 謝辞

本研究は、筑波大学・数理物質系で在籍した木越研究室にて、および現所属の名古屋大学・生命農学研究科にて実施しました。多くのご助言をいただいた木越英夫先生、研究室のメンバー、および共同研究者の皆様には厚くお礼申し上げます。また本研究に関して JST さきがけ「疾患代謝」領域に採択していただき、ご指導いただいた研究総括の小田吉哉先生、アドバイザーの浦野泰照先生ら関係者の皆様に感謝いたします。最後に、本稿の執筆の機会をいただいた信州大学農学部の大神田淳子先生に深くお礼申し上げます。

## 参考文献

1. 北将樹, 木越英夫: 光親和性プローブを用いた抗腫瘍性天然物アピロニン A の標的分子と作用機序の研究. *有機合成化学協会誌* **2015**, *73*, 151–160.
2. 北将樹, 米田耕三, 胡亜萍, 渡邊礼, 木越英夫: タンパク質-リガンド相互作用を解析するアミドピレンプローブの開発. *日本ケミカルバイオロジー学会機関誌* **2017**, *15*, 11–14.
3. 北将樹: 質量分析を用いた海洋天然物の構造解析および標的分子における結合位置解析. *有機合成化学協会誌* **2018**, *76*, 442–445.
4. J. R. Cabrera-Pardo, D. I. Chai, S. Liu, M. Mrksich, and S. A. Kozmin, Label-assisted mass spectrometry for the acceleration of reaction discovery and optimization. *Nature Chem.* **2013**, *5*, 423–427.
5. K. Yoneda, Y. Hu, M. Kita, and H. Kigoshi: Development of an aplyronine A photoaffinity amidopyrene derivative applicable for label-assisted LDI MS. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17853 [DOI: 10.1038/srep17853].
6. M. Kita, Y. Hirayama, K. Yoneda, K. Yamagishi, T. Chinen, T. Usui, E. Sumiya, M. Uesugi, and H. Kigoshi: Inhibition of microtubule assembly by a complex of actin and antitumor macrolide aplyronine A. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18089–18095.
7. M. Kita and H. Kigoshi: Marine natural products that regulate multiple cytoskeletal protein interactions. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 534–542.
8. Y. Hirayama, K. Yamagishi, T. Suzuki, H. Kawagishi, M. Kita, and H. Kigoshi: Analysis of the aplyronine A-induced protein-protein interaction between actin and tubulin by surface plasmon resonance. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 2809–2814.
9. M. Kita, K. Yamagishi, K. Tsuchiya, Y. Seguchi, H. Nakane, and H. Kigoshi: Development of photoaffinity derivatives of the antitumor macrolide aplyronine A, a PPI-inducer between actin and tubulin. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 6322–6331.
10. K. Yoneda, Y. Hu, R. Watanabe, M. Kita, and H. Kigoshi: Binding position analysis of target proteins with the use of amidopyrene probes as LA-LDI enhancing tags. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 8564–8569.
11. R. Watanabe, Y. Hu, K. Iio, K. Yoneda, A. Hattori, A. Arai, H. Kigoshi, and M. Kita: Specific protein-labeling and ligand-binding position analysis with amidopyrene probes as LDI MS tags. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 7883–7890.

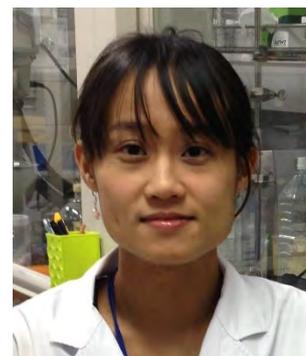


## 組織中 *lacZ* 発現細胞のライブ検出を 可能とする蛍光プローブの開発

～化学の力で見たい細胞だけを光らせる～

東京大学大学院医学系研究科  
神谷真子、浦野泰照

(mkamiya@m.u-tokyo.ac.jp, uranokun@m.u-tokyo.ac.jp)



### 1. はじめに

大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼをコードするレポーター遺伝子*lacZ*は、医学・生命科学研究において、観察対象となる遺伝子の発現を可視化し解析するための強力なツールとして利用されてきた。*LacZ*がコードする $\beta$ -ガラクトシダーゼは、酵素活性が高く安定な酵素であり、その触媒活性・代謝回転により可視化シグナルが増幅されるため、対象遺伝子の発現量が少ない場合でも高感度な検出が期待できる。これまで、*lacZ*発現細胞の可視化には発色基質であるX-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside)が主に使用されてきた。X-Gal染色は1細胞レベルの解像度で*lacZ*発現細胞を検出する優れた方法であるが、色素の発色に酸化処理が必要であるため、その利用は固定処理後の細胞・生体組織に限定される。一方で、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性に依存して蛍光を発する蛍光プローブも種々開発されてきたが、細胞膜透過性や細胞内滞留性などの問題から、*lacZ*発現細胞を生きた状態のまま1細胞レベルの解像度で解析することは容易ではなかった。この状況を打破するため著者らは、蛍光制御原理として分子内スピロ環平衡を、細胞内滞留性を獲得する機構としてキノンメチド化学を用い、*lacZ*発現細胞を1細胞レベルの解像度でライブ検出可能な新たな蛍光プローブSPiDER- $\beta$ Gal (Spiro-based immobilisable diethylrhodol- $\beta$ Gal)を開発した<sup>1</sup>。本稿ではまず、分子内スピロ環平衡を蛍光制御原理として用いた蛍光プローブの設計について紹介し、さらに、キノンメチド化学を分子設計に取り入れて開発したSPiDER- $\beta$ Galについて、細胞内の $\beta$ -ガラクトシダーゼと反応して蛍光性と細胞内滞留性を同時に獲得する原理、生きた組織中の*lacZ*発現細胞を染色した結果、さらに長波長化のための誘導体展開について紹介する。

### 2. 分子内スピロ環化平衡を利用した蛍光プローブの設計

#### 2.1 分子スピロ環化平衡とは

分子内スピロ環化平衡とは、分子内求核基が分子内の電子欠損部位を攻撃してスピロ環フォームを形成する現象である。例えば、代表的な蛍光色素であるrhodamine (図1a) はいずれのpHにおいても強い吸収と蛍光を発することが知られているが、この2'位のcarboxy基をamide基に置換したrhodamine spiroamideは、吸収・蛍光特性がpHに依存することが知られている。つまりrhodamine spiroamideは、可視光領域に強い吸収と蛍光を示すキサンテンフォームと、amide基がキサンテン環の9位を攻撃したスピロ環化フォームの平衡状態にあり(分子内スピロ環化平衡)、その存在比率はpHに依存して変化する(図1b)。キサンテンフォームは、蛍光団であるキサンテン環の共鳴構造が維持されているため、可視光領域に強い吸収を持ち強い蛍光を発するが、スピロ環化フォームは、キサンテン環部位が共役していない二つのベンゼン環に分断されるため、可視光領域に吸収も蛍光も持たない。ここで、観測対象分子との結合や反応前後で2つのフォームの存在比を変化させることができれば、観測対象分子の高感度な検出が可能になると考えられ、

実際に様々な蛍光プローブの蛍光制御原理として用いられてきた。

一方で我々はrhodamine spiroamideのamide基をhydroxymethyl, mercaptomethyl基などの他の分子内求核基に置換したrhodamine誘導体においても同様のスピロ環化平衡が観察されることを明らかにし、蛍光プローブ設計法を拡張してきた。例えば、当教室で開発したgGlu-HMRGは、分子内求核基としてhydroxymethyl基を有し、無色・無蛍光のスピロ環化フォームで存在するが、一部のがんで発現が亢進しているGGT( $\gamma$ -glutamyltranspeptidase)との反応により $\gamma$ -glutamyl基が切断されると、主に、可視光領域に吸収を持ち強蛍光性のキサントンフォームとして存在するHMRGに変換される(図1c)<sup>2,3</sup>。そのため、gGlu-HMRGを用いることで、生きた培養細胞や組織におけるGGT活性を高感度かつ迅速に可視化することが可能となった。

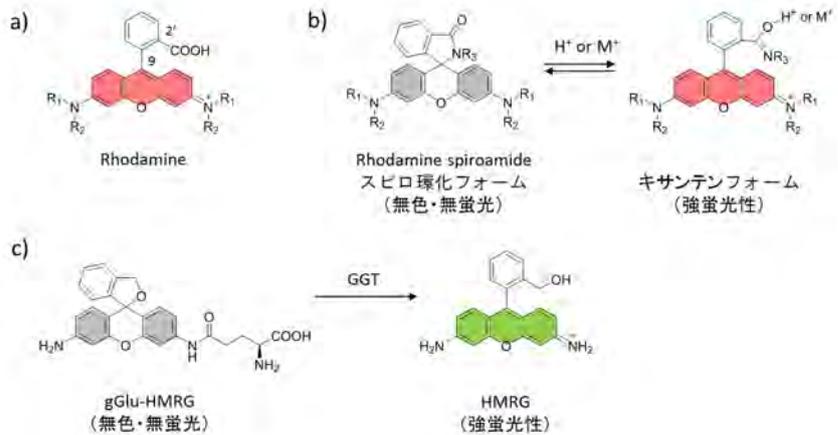


図1 a) Rhodamineの構造式、b) Rhodamine spiroamideの分子内スピロ化平衡、c) 分子内スピロ感化平衡を利用したGGT活性検出蛍光プローブgGlu-HMRG

## 2.2 分子内スピロ環化平衡に基づく $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性検出蛍光プローブHMDER- $\beta$ Galの開発

次に著者らは、分子内スピロ環化平衡に基づき、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を検出する新たな蛍光プローブを開発することを考えた。上述の通り、分子内スピロ環化平衡を用いると、脂溶性の高いスピロ環化フォームから水溶性の高いキサントンフォームに変換することが可能であるため、細胞膜透過性や細胞内滞留性の低さといった既存の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性検出蛍光プローブが有する課題が解決できるのではないかと考えた。

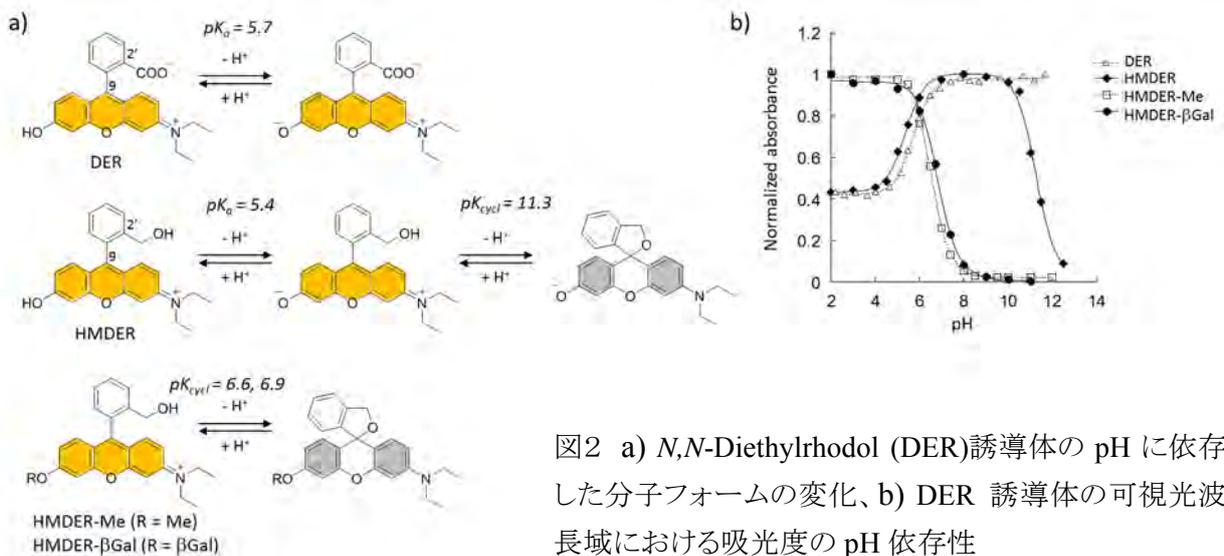


図2 a) *N,N*-Diethylrhodol (DER)誘導体の pH に依存した分子フォームの変化、b) DER 誘導体の可視光波長域における吸光度の pH 依存性

まず始めに、母核として選択したrhodol骨格においても上述の分子スピロ環化平衡が蛍光制御原理として利用できるか検討した。2'位がcarboxy基の*N,N*-Diethylrhodol (DER) では、フェノール性水酸基の酸塩基平衡に起因する吸光度の変化が観察された(図2)。一方で、DERのcarboxy基をhydroxymethyl基に置換したHydroxymethyldiethylrhodol (HMDER)では、酸性～中性pHではDERとほぼ同じ挙動を示すが、pH10以上のアルカリpHにおいては吸光度が減少し、分子内スピロ環化平衡を示すことが明らかになった。弱酸性から中性pHでの吸光度の変化からキサンテン環のフェノール性水酸基の $pK_a$ が5.4、pH10以上の吸光度の減少からスピロ環化を伴う $pK_a$ が11.3と算出された。2つ目の平衡は単純な酸塩基平衡ではなくスピロ環化を伴う平衡であることから、我々はこの平衡定数を $K_{cycl}$ と定義し、吸光度が最大時の半分になるpHを $pK_{cycl}$ とした。つまり、HMDERの $pK_{cycl}$ は11.3であり、生理的pHの7.4ではほぼ蛍光性のキサンテンフォームで存在することが示された。一方で、HMDERのフェノール性の水酸基をアルキル化した誘導体、例えばHMDERのメチルエーテル化体(HMDER-Me)では $pK_{cycl}$ が6.6となり(図2)、HMDERと比較して4オーダー以上低下することが明らかとなった。すなわち生理的pHの7.4では、アルキル化されたHMDERはほぼ無色・無蛍光のスピロ環化フォームで存在するのに対し、HMDERは蛍光性のキサンテンフォームで存在することから、この変化を原理とする新たな蛍光プローブ設計が可能であることが明らかとなった。そこで、HMDERのフェノール性水酸基に $\beta$ -ガラクトシダーゼとの反応部位である $\beta$ -ガラクトシド基を組み込んだHMDER- $\beta$ Galを開発した(図3a)。このプローブは設計通り、酵素との反応前は、可視光領域に吸収・蛍光を持たないスピロ環化フォームで主に存在するためその蛍光性が抑えられているが、酵素との反応後にはキサンテンフォームが優先するHMDERが産生し、強い蛍光を発するという特性を有することが明らかとなった(図3b)。さらに、スピロ環化フォームで存在するHMDER- $\beta$ Galは脂溶性が高いため、細胞導入性に優れ、生きた細胞における $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素活性をS/N比良く可視化できることも示された(図3c)<sup>4</sup>。さらに、蛍光性生成物であるHMDERは双性イオンであるため、既存の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性検出蛍光プローブと比較すると、細胞内滞留性が向上したことが示された。しかしながらやはりHMDERも、時間が経つにつれて細胞外へ拡散してしまうため、*lacZ*発現細胞( $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現する細胞)と*lacZ*非発現細胞( $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現しない細胞)が混在する共培養系において、*lacZ*発現細胞を選択的に蛍光検出することは難しいことも明らかとなった。

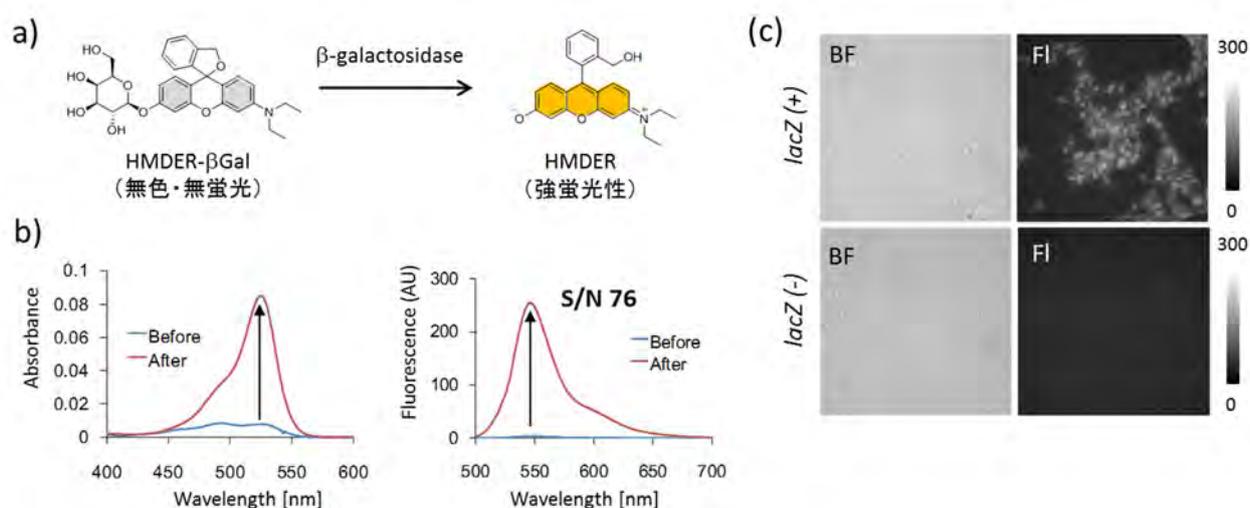


図3 a) HMDERを基本骨格とした $\beta$ -ガラクトシダーゼ蛍光プローブHMDER- $\beta$ Gal、b) HMDER- $\beta$ Galの酵素との反応前後における吸収・蛍光スペクトル変化、c) 生細胞における $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性イメージング(文献4より許可を得て転載)

### 3. キノンメチド化学を活用した新たな細胞内滞留性蛍光プローブの開発

#### 3.1 キノンメチド化学を用いたSPiDER-βGalの開発

そこで著者らは次に、β-ガラクトシダーゼと反応して産生する蛍光性生成物が細胞外へと拡散するのを防止するため、キノンメチド化学を活用することを考えた。キノンメチドの化学はこれまでに酵素阻害剤<sup>5</sup>や自己結合性蛍光プローブ<sup>6,7</sup>、プロドラッグ<sup>8</sup>などに広く利用されている。例えば、エーテル結合のオルト位またはパラ位にフルオロメチル基などの脱離基が存在する誘導体では、エーテル結合が切断されると、フッ素原子が脱離して求電子性のキノンメチド体が生成する(図4a)。電子欠損のキノンメチド体は周囲の分子に素早く捕捉され、結果的に周囲の分子に結合する。そこで著者らは、このようなキノンメチド化学を分子設計に取り入れることで、酵素との反応によりキノンメチド体が産生し、蛍光性生成物がタンパク質などの細胞内分子に捕捉されるよう設計した。具体的には、HMDER-βGalのキサンテン環4位にフルオロメチル基を導入したSPiDER-βGalを設計・合成した(図4b)<sup>1</sup>。

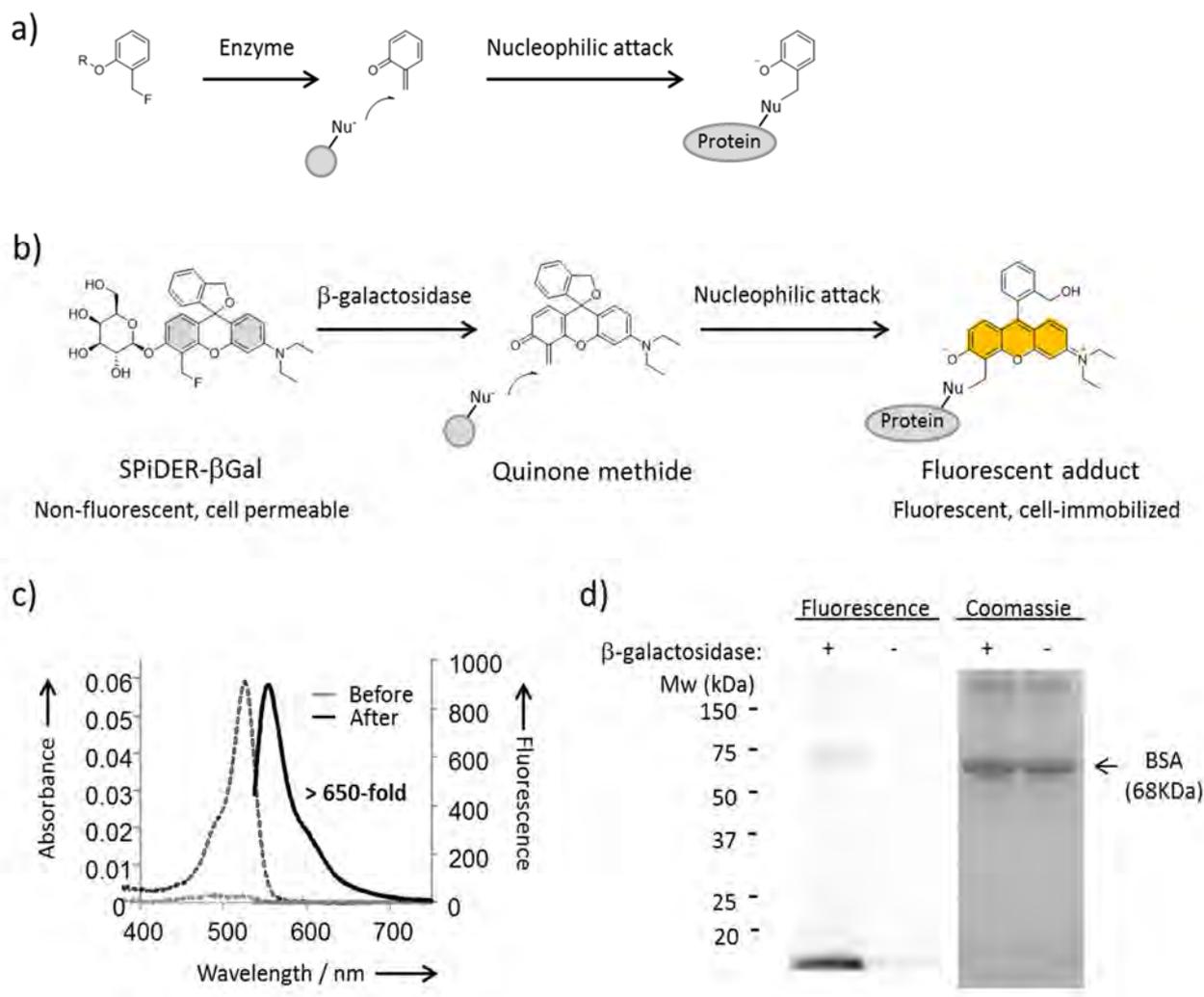


図4 a) キノンメチド化学、b) キノンメチド化学を分子設計に取り入れた新規β-ガラクトシダーゼ蛍光プローブSPiDER-βGal、c) SPiDER-βGalの酵素との反応前後における吸収・蛍光スペクトル変化、d) β-ガラクトシダーゼとの反応前後のSPiDER-βGal溶液のSDS-PAGE (BSA存在下)

開発したSPiDER-βGalは中性緩衝液中においてスピロ環化フォームとして存在し、酵素との反応前は無色・無蛍光性であるが、β-ガラクトシダーゼとの反応により、大きな吸収スペクトル・蛍光スペクトルの回復を示すことが明らかとなった(図4c)。さらに、酵素との反応により、キノンメチド中間体が産生し、それが周辺のタンパク質などの求核分子と反応することをSDS-PAGEにより確認した(図4d)。これらの結果から、SPiDER-βGalは細胞内でβ-ガラクトシダーゼによる加水分解を受けると、フッ素原子が脱離して求電子性のキノンメチド体が生成し、これがタンパク質などの細胞内求核分子と反応して蛍光性を獲得するとともに、タンパク質にラベル化された蛍光色素は細胞外へ漏出しないため、蛍光色素の拡散を防ぐことができるのではないかと考えた。

### 3.2 SPiDER-βGalを用いたlacZ発現細胞のライブ蛍光検出

そこでまず、lacZ発現細胞にSPiDER-βGalを適用し、生きた細胞内における細胞内滞留性の評価を行った。その結果、従来型のHMDER-βGalを用いた場合には、洗浄操作や固定操作により蛍光シグナルが大幅に減弱してしまうのに対し、新しく開発したSPiDER-βGalを用いると、洗浄操作や固定操作後のサンプルにおいても蛍光シグナルが保持され、細胞内滞留性が大幅に改善されたことが示された。そこで次に、lacZ発現細胞とlacZ非発現細胞の共培養系にSPiDER-βGalを適用したところ、lacZ発現細胞とlacZ非発現細胞が混在している中からlacZ発現細胞のみを選択的に可視化できることが示された(図5a)。

次に、生きた組織中におけるlacZ発現細胞を検出できるか検討するべく、遺伝学におけるモデル動物として汎用されているショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)組織を用い、lacZ発現細胞のライブ検出が可能か検討した。まず、posterior regionのみにlacZを発現しているwing disc(将来羽になる組織)をショウジョウバエ幼虫から取り出し、SPiDER-βGalとインキュベートしたところ、lacZを発現している領域のみで蛍光シグナルの

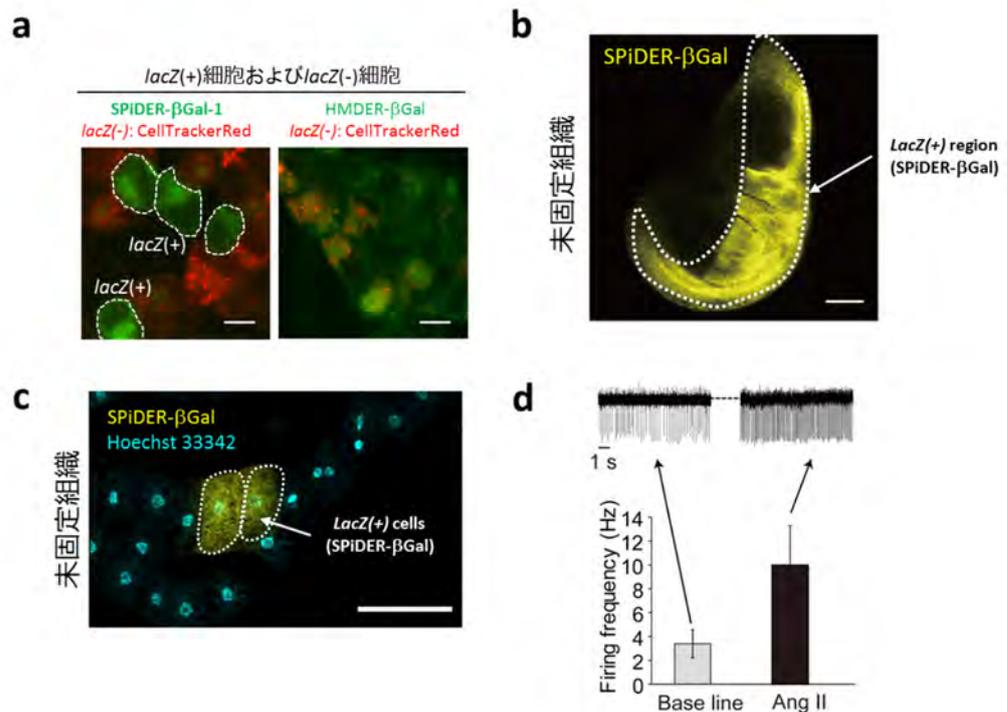


図5 a) HEK-lacZ(+)細胞とHEK-lacZ(-)細胞の共培養系におけるlacZ発現細胞のライブ蛍光検出。b) ショウジョウバエのwing discにおけるlacZ発現領域の蛍光検出、c) ショウジョウバエの脂肪体組織中におけるlacZ発現細胞の蛍光検出。スケールバー: 100 μm (東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室 三浦正幸先生との共同研究)、d) マウス急性脳ライスにおけるlacZ発現細胞の電気生理実験(基礎生物学研究所 野田 昌晴先生・檜山 武史先生との共同研究) (文献1より許可を得て転載)

上昇が観察され、明瞭な境界線をもって、*lacZ*発現領域と非発現領域を区別可能であることが明らかとなった(図5b)。次に、*lacZ*を発現するショウジョウバエ脂肪体組織にSPiDER-βGalと核染色剤Hoechst 33342を同時適用したところ、10分程度の短い時間で*lacZ*発現細胞を1細胞レベルで描出できることが明らかとなった(図5c)。さらに、SPiDER-βGalによる蛍光シグナルは固定した組織においても保持されることから、抗体染色との併用も可能であることが示された。

また、哺乳類動物の未固定の組織においても機能することが、マウスの脳スライスを用いた検討から示された。具体的には、angiotensin II type 1A 受容体陽性ニューロンに*lacZ*が発現しているマウスの急性脳スライスを作成し、未固定の状態ですPiDER-βGalで染色したところ、PVN領域におけるangiotensin II type 1A 受容体陽性ニューロンを特異的に染色することが可能であった。なお、この蛍光シグナルが*lacZ*発現由来であることは免疫染色で確認している。また、SPiDER-βGalによる蛍光シグナルを指標に電極を刺し、電気生理実験を行うことも可能であり、通常時と比べて、リガンド添加時には発火頻度が増加することが示され、*lacZ*発現細胞における神経活動を計測することに成功した(図5d)。これらの結果から、SPiDER-βGalが生体組織中の*lacZ*発現細胞の選択的な蛍光検出に有用であることが実証された。

### 3.3 SPiDER-βGalの長波長化:SPiDER-Red-βGalの開発

前項までに、SPiDER-βGalは、生きた組織中における*lacZ*発現細胞を1細胞レベルで検出可能なβ-ガラクトシダーゼ活性検出“緑色”蛍光プローブであることを紹介したが、一方で本プローブは、蛍光イメージングで多用されるGFP (green fluorescent protein)との共染色が困難であることも明らかとなった。そこで最近、

SPiDER-βGalの分子構造の改変による長波長化を行った。具体的には、キサントン系色素の10位元素を酸素からケイ素に置換することで100 nm程度長波長化することができるという先行文献<sup>9</sup>に基づき、SPiDER-βGalの10位元素をケイ素に置換することを考えた。同時に、蛍光団の求電子性の変化に伴い、ベンゼン環2'位の置換基(分子内求核基)も最適化したところ、2'-carboxy silicon-rhodolが本目的に適する特性を有することが示唆された。そこで、2'-carboxy silicon-rhodolを母核として新たなβ-ガ

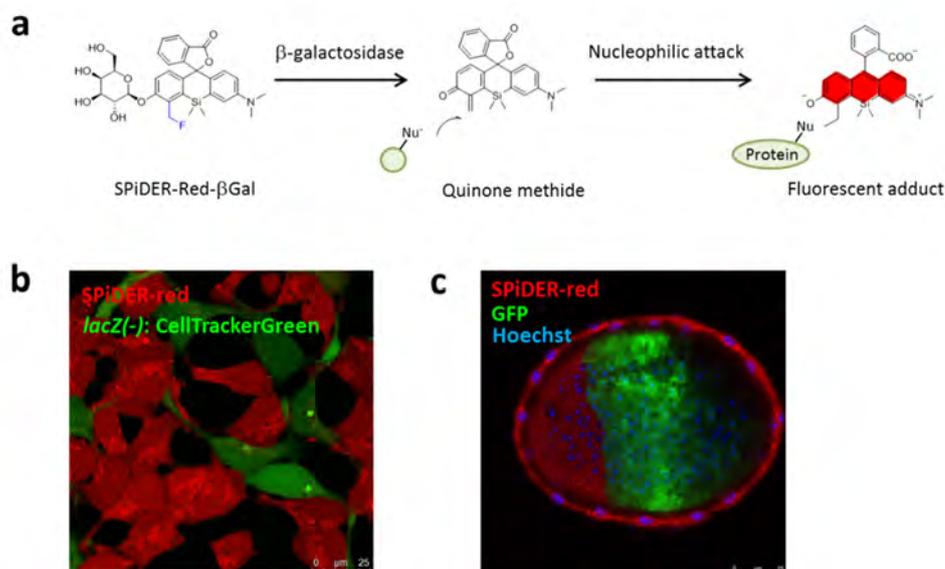


図6 a) SPiDER-Red-βGalの構造式と動作原理。b) HEK-*lacZ*(+)細胞とHEK-*lacZ*(-)細胞の共培養系における*lacZ*発現細胞のライブ蛍光検出。赤色:SPiDER-Red-βGal、緑色:Cell Tracker Green。c) ショウジョウバエのen-*lacZ*/dpp-GFP wing discにおける*lacZ*発現領域の蛍光検出。赤色:SPiDER-Red-βGal、緑色:GFP、青色:へキスト(核染色剤)(東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室 三浦正幸先生との共同研究)(文献10より許可を得て転載)

ラクトシダーゼ活性検出”赤色”蛍光プローブSPiDER-Red- $\beta$ Galを設計・合成した(図6a)<sup>10</sup>。SPiDER-Red- $\beta$ Galを基質とした酵素反応を精査した結果、酵素との反応によりキノンメチド中間体を産生すること、その活性中間体が細胞内求核分子と反応し得ることを確認した。さらに、*lacZ*発現細胞と*lacZ*非発現細胞の共培養系にSPiDER-Red- $\beta$ Galを適用した結果、*lacZ*発現細胞のみを選択的に可視化できることが示された(図6b)。さらに、ショウジョウバエの未固定の組織における*lacZ*発現細胞のライブ検出が可能か評価したところ、*lacZ*発現領域と非発現領域を検出できることを確認した(図6c)。同時に、開発したSPiDER-Red- $\beta$ Galの励起・蛍光波長はそれぞれ610nm、630nmであるため、GFPやヘキストとの共染色が可能であることも示した。また、一部の細胞でのみ*lacZ*を発現する腸管組織を染色した結果、本プローブは組織中の*lacZ*発現細胞を1細胞レベルの分解能での染色が可能であることを示した<sup>10</sup>。

#### 4. おわりに

本稿で紹介したSPiDER- $\beta$ GalやSPiDER-Red- $\beta$ Galは、*lacZ*発現細胞をライブで蛍光検出可能な蛍光プローブであり、これはX-Gal染色を初めとする従来のプローブにはない特長である。つまり、分子内スピロ環化平衡による蛍光制御とキノンメチド化学による細胞内滞留性の制御を分子設計に取り入れることで、組織中の1細胞レベルの空間分解能で、標的酵素の活性を検出する蛍光プローブの創製が可能であった。さらに今後、酵素の基質部位( $\beta$ -ガラクトシド基)を変更することで、他の酵素を標的とした蛍光プローブ群の開発が可能であり、さらに多色化したこれらの蛍光プローブを同時に用いることで、生体内で複数種の標的酵素の活性を1細胞レベルの分解能で同時に検出することも可能になると考えられる。またSPiDER- $\beta$ Galは、細胞老化マーカーであるSA- $\beta$ Gal (senescence-associated- $\beta$ Gal)が検出できることも示されてきており、今後、種々の医学・生物学研究に用いられることで、病態や生命現象に関する新たな知見が得られることを期待している。

#### 参考文献

- 1) Doura, T. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 55, 9620-9624 (2016).
- 2) Urano, Y. et al. *Sci. Transl. Med.* 3, 110ra119 (2011).
- 3) Sakabe, M. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 409-414 (2013).
- 4) Kamiya, M. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 12960-12963 (2011).
- 5) Myers, J. & Widlanski, T. *Science* 262, 1451-1453 (1993).
- 6) Komatsu, T. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 15946-15947 (2006).
- 7) Kwan, D. H. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 300-303 (2011).
- 8) Haba, K. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 716-720 (2005).
- 9) Fu, M. et al. *Chem. Commun.* 15, 1780-1782 (2008).
- 10) Ito, H. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 57, 15702-15706 (2018).

## 研究紹介

リン酸化酵素阻害剤研究の新展開  
～フォールディング中間体を標的とした創薬～

信州大学学術研究院(農学系)  
喜井 勲  
(ikii@shinshu-u.ac.jp)



## 1. リン酸化酵素と【kinase】

リン酸化酵素は、英語ではkinaseと呼ばれる。この【kinase】は、ギリシャ語の「動く」という言葉である【kinein】と、酵素に使われる接尾辞である【-ase】を繋げて作られている。当初、kinaseにはリン酸化酵素よりも、活性化酵素の意味合いが強かった。そのため、Thrombokinase (プロトロンビンを分解して血液凝固を促進するプロテアーゼであるトロンビンを生成) や、Enterokinase (トリプシノーゲンを分解してトリプシンを生成)、Urokinase (プラスミノゲンを分解してプラスミンを生成)、Nattokinase (納豆に含まれる酵素であり、血栓の主成分であるフィブリンを分解) などのプロテアーゼにも【kinase】が使われてきた。

余談だが、【kinein】は映画の語源でもある。【kinein】の名詞であるキネマ【kinema】からシネマ【cinema】が生まれた。近年では、リン酸化酵素を示す言葉としての【kinase】が有名になり過ぎて、上記のようなプロテアーゼとしての【kinase】をリン酸化酵素と勘違いするケースもあるようだ。

リン酸化酵素に対して【kinase】が使われた背景には、リン酸化されたタンパク質や脂質などによる細胞内シグナル伝達の活性化がある。1950年代に細胞内ではタンパク質のリン酸化と脱リン酸化が繰り返されていることが発見された。さらに、このリン酸化と脱リン酸化のターンオーバーはがん細胞で顕著であることから、細胞がん化の原因として注目され、これらのリン酸化・脱リン酸化ターンオーバーを担う酵素(リン酸化酵素と脱リン酸化酵素)の存在が予想された。1954年にそれらの酵素もまたタンパク質であることが発見され、タンパク質リン酸化酵素【protein kinase】が定義された(1)。

## 2. ヒトゲノムにコードされるリン酸化酵素ファミリー

これまでに様々なタンパク質リン酸化酵素が同定され、活性ドメインの構造類似性が発見された。さらに、構造類似性探索によりヒトゲノムには518種類のタンパク質リン酸化酵素がコードされると解明された。タンパク質以外の脂質などを基質とするリン酸化酵素も多数存在し、これらリン酸化酵素群は巨大なファミリーを形成していると判明した。リン酸化酵素ファミリーは総称してキノーム(Kinome)と呼ばれている(2)。

## 3. リン酸化酵素に対する非選択的阻害剤スタウロスポリン

これまでに同定されたほぼ全てのリン酸化酵素に対して強い阻害活性を示す化合物としてスタウロスポリンが挙げられる。スタウロスポリンは、1977年に大村智博士らによって放線菌から単離された天然物である。リン酸化酵素のATPポケットに結合することで、ATPのポケットへの結合を競合的に阻害する。

リン酸化酵素の構造は、ATPポケットを中心としてN末端側のN-lobeとC末端側のC-lobe、これら二つのlobeを繋ぐhinge領域に分けられる(図1)。ATPポケットの奥側にhinge領域が位置しており、このhinge領域はリン酸化酵素ファミリーで比較的保存性が高い。スタウロスポリンは、このhinge領域と相互作用することで、ATPポケットに強力に結合する。これが非選択性の理由と考えられている(3)。

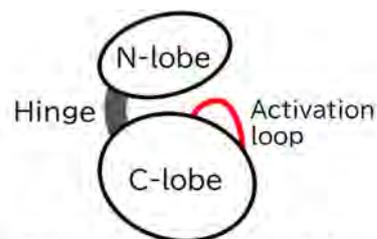


図1 リン酸化酵素活性ドメイン

スタウロスポリンは選択性がほぼないにも関わらず、世界中の研究者に利用されている。理由の一つは、細胞のアポトーシスを誘導するため、アポトーシス研究者に汎用されていることである。もう一つは、リン酸化酵素の阻害剤研究開発でのポジティブコントロールとして使用されるからである。大村智博士には多額のロイヤリティーが入ったことが想像される。さらに余談だが、大村智博士は抗寄生虫薬イベルメクチンの発見で2015年にノーベル生理学・医学賞を受賞されており、スタウロスポリンやイベルメクチン以外にも様々な生理活性天然物を単離・同定されている。

#### 4. Rhoリン酸化酵素ROCKに対する選択的阻害剤ファスジル

ファスジルは、三重大学の日高弘義博士らによって開発されたRhoリン酸化酵素であるROCKに対する選択的阻害剤である。1995年にくも膜下出血後の脳血管攣縮治療薬として日本で承認・上市された(4)。エリルという医薬品名で現在でも病院にて処方されている。ファスジルもスタウロスポリンと同様にROCKのATPポケットに結合することで、ATPの結合を競合的に阻害する。スタウロスポリンと異なり、ATPポケット内のhinge領域以外の部分との結合が選択性を担保している。ROCK阻害により、Rho依存的な細胞の張力が低下した結果、血管が拡張し、血流量が維持される。

ROCK阻害剤は様々な場面で活用されており、例えばヒトiPS細胞の培養では、ROCK阻害剤Y-27632がヒトiPS細胞の生存維持に重要である。ROCK阻害剤Y-27632非存在下にてヒトiPS細胞を培養すると、細胞は「死の舞」を踊りながら自滅していく(5)。

#### 5. リン酸化酵素ABLに対する選択的阻害剤イマチニブ

2001年に慢性骨髄性白血病の治療薬として、リン酸化酵素ABLに対する阻害剤イマチニブが承認された。医薬品名はグリベックである。この白血病では、染色体の転座によりリン酸化酵素ABL遺伝子にBCR遺伝子が融合した結果、ABLが過剰活性化している。この過剰な活性化による細胞内シグナルの亢進により細胞が異常増殖する。イマチニブは、この過剰活性化を抑えることで、細胞の異常増殖を抑制する。従来型の抗がん剤(DNA複製阻害剤)やインターフェロンによる治療と比較し、劇的な生存率の向上と副作用の低さを実現し、白血病治療に革命を起こした。

白血病患者は長期にわたってイマチニブを服用する必要があると考えられてきたが、近年イマチニブの服用を中止しても、その後再発しないことが判明し、白血病治療のあり方が再度変革してきている(6)。

#### 6. リン酸化酵素を標的とした創薬の課題

これまでに様々な疾患に関与するリン酸化酵素が数多く同定されているが、その全てに対して選択的な阻害剤が開発され、治療薬として使われている訳ではない。その大きな理由は、阻害剤が結合するATPポケットがリン酸化酵素間で比較的良く似ていることが挙げられる。ATPが結合するためのポケットであるため、その大きさや形状、またATPのリン酸基と相互作用するリジンの側鎖、N-lobeとC-lobeを繋ぐhinge領域の構造など、リン酸化酵素間で共通する部位が多くある。これらの共通部位が阻害剤との相互作用に関与する

ため、リン酸化酵素のATPポケットを標的とした化合物において選択性を担保することは困難である。

リン酸化酵素に対する阻害剤の使用に際して、その阻害剤がデータシートに記載されている標的リン酸化酵素以外に対してどの程度阻害活性を示すのかは重要な情報となる。阻害剤を使った研究で得られた結果が、標的と考えられていたリン酸化酵素以外の酵素を阻害することによってもたらされたものだとしたら、果たして誰かそれに気がつくことはできるのだろうか？いくつかのグループは、この危惧に対する答えの一つとして、入手可能なリン酸化酵素阻害剤(百種類以上)の阻害活性を数百種類のリン酸化酵素に対して網羅的に解析した結果を報告している(7-10)。これらの論文のデータを活用することで、阻害剤を使用した研究の結果を正しく解釈することは不可能ではないと思われる。一方、これらのデータは、ただ唯一の標的リン酸化酵素しか阻害しない化合物は存在しないことも示している。このような研究成果が一流誌に掲載されるほど、リン酸化酵素阻害剤の選択性の低さは課題として認識されている。

2002年の調査では、リン酸化酵素は製薬企業やアカデミアでの創薬標的として最大の規模(約22%)を占めていた(11)。しかし2017年には、その座をGタンパク質共役型受容体(GPCR)やイオンチャンネルに明け渡し、約10%までシェアを下げる結果となっている(12)。リン酸化酵素に対する阻害剤の研究開発がシェアを回復するには、その根底にある課題である選択性の低さを解決しなければならない。選択性の低いリン酸化酵素阻害剤は、スタウロスポリンのように細胞アポトーシスを誘導するなどの重篤な副作用を引き起こすため、開発途中でドロップアウトし、それまでにかけて研究開発資金や努力・時間が水泡に帰す結果となる。次項からはリン酸化酵素に対する阻害剤の特徴について説明し、選択性の高いリン酸化酵素阻害剤を取得するための取り組みを紹介する。

## 7. リン酸化酵素阻害剤の分類 タイプI阻害剤

リン酸化酵素の多くは、ATPポケット近傍にあるループ状のペプチド領域のリン酸化によって、このループの位置が変化して活性化される。そのためこのループは、Activation loopと呼ばれている(図1)。Activation loopのリン酸化は、①他のリン酸化酵素(MAPKカスケードなど)(図2A)、②分子間自己リン酸化(リガンド結合依存的な受容体型リン酸化酵素の二量体化:EGFによるEGF受容体の二量体化など)(図2B)、③分子内自己リン酸化(自分自身のActivation loopをリン酸化)(図2C)の3つのパターンのどれかによって触媒される。③は特殊なケースであり、これは後述する。

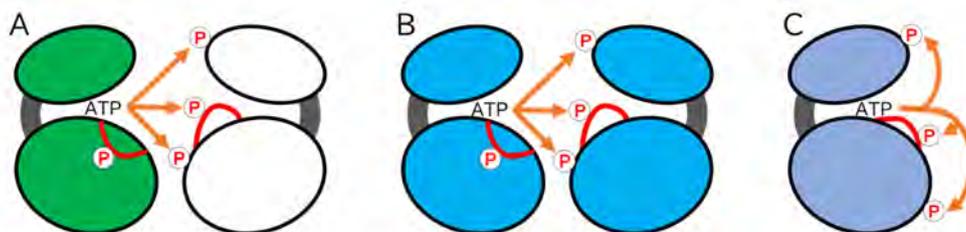


図2 リン酸化酵素の活性化  
A) 分子間のリン酸化 B) 分子間の自己リン酸化 C) 分子内の自己リン酸化

リン酸化酵素阻害剤は、その作用機序によっていくつかのタイプに分類されている。タイプI阻害剤は、Activation loopがリン酸化された状態、つまり活性化状態のリン酸化酵素のATPポケットに結合することで、ATPの結合を競合的に阻害する。上述のスタウロスポリンがこれに該当する。リン酸化酵素阻害剤の研究開発では多くの場合、活性型のリン酸化酵素を用いて化合物のスクリーニングや評価を行うため、このタイプI阻害剤が得られるケースが多い。タイプI阻害剤は、ATPポケットの奥にあるhinge領域と相互作用する機会が多く、選択性が低くなる傾向がある。そのためATPポケットを標的としつつも選択性を高める研究がこれまでになされてきた。

## 8. リン酸化酵素阻害剤の分類 タイプII, III阻害剤

タイプII阻害剤は、Activation loopがリン酸化されていない状態、つまり不活性化状態のリン酸化酵素に結

合する。具体的には、ATPポケットとリン酸化されていないActivation loopの両方と相互作用することで安定に結合して、ATPに対して競合的にはたらく。タイプII阻害剤は、不活性型のActivation loop (DFG-out構造と呼ばれる)と相互作用することから、タイプI阻害剤よりも選択性が高くなる傾向がある。上述のイマチニブ(グリベック)はタイプII阻害剤である。

選択性の高いタイプII阻害剤であるが、その研究開発はなかなか難しい。不活性型のリン酸化酵素は、酵素活性を有していないため、阻害剤が結合して酵素活性が阻害されたことを評価することが難しいのである。培養細胞系などでは評価可能であるが、精製タンパク質を用いたin vitroでの評価が難しく、このことが研究開発を阻害している。標的リン酸化酵素のATPポケット周辺の立体構造が判明している場合は、タイプI阻害剤を構造展開することでタイプII阻害剤を創出することが可能である。

タイプIII阻害剤は、不活性型Activation loop (DFG-out構造)の近傍に結合することで、ATPの結合を競合的に阻害する。タイプII阻害剤と異なり、ATPポケットとは相互作用しないため、タイプIIよりもさらに選択性が高くなると期待されている。タイプIII阻害剤の取得には、不活性型リン酸化酵素への化合物の特異的な結合を検出するための評価系が必要となる。

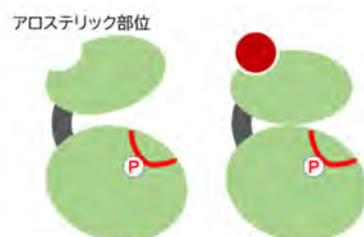


図3 リン酸化酵素タイプIV阻害剤

### 9. リン酸化酵素阻害剤の分類 タイプIV阻害剤

タイプIからタイプIII阻害剤は、おもにATPポケット及びその近傍に結合する。一方、ATPポケットから離れた位置に結合することで構造変化が起こり、それがATPポケットへと波及することでポケットへのATPの結合を阻害する、もしくは基質の認識を阻害するタイプの化合物も存在する(図3)。これはタイプIV阻害剤、もしくはアロステリック阻害剤と呼ばれている。タイプIV阻害剤の結合するアロステリック部位は、それぞれ特有の構造であるため、タイプI~III阻害剤と比較して高い選択性が期待できる。タイプIV阻害剤は、タイプII, III阻害剤と違い、活性型のリン酸化酵素を用いることができるため、スクリーニングと活性評価は容易である。一方、その標的としているリン酸化酵素にアロステリック部位がなければ、タイプIV阻害剤は得られないため、このタイプIV阻害剤の研究開発では標的を選ぶことになる。まだ全てのリン酸化酵素が評価された訳ではないため、タイプI阻害剤をスクリーニングする過程で偶然取れてくるなど、狙ってタイプIV阻害剤を取得することは難しい。

### 10. リン酸化酵素の分子内自己リン酸化とフォールディング

上記項目7.の③(図2C)にて分子内自己リン酸化(自分自身のActivation loopをリン酸化)によっていくつかのリン酸化酵素は活性型になると述べた。この場合、自分自身のActivation loopを分子内で自己リン酸化することは、その反応を触媒するリン酸化酵素はActivation loopがリン酸化されていない不活性型であることを意味している。不活性型がリン酸化活性を有するという矛盾した事態に陥って

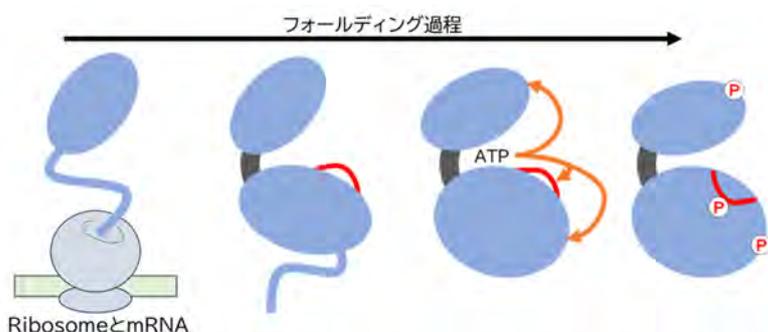


図4 リン酸化酵素フォールディング中間体による分子内自己リン酸化の概念図

しまうのだが、ある特別な状態ではこの不活性型が活性を有することが報告されている。その特別な状態とは、フォールディング途中に一過的に存在する遷移状態である「フォールディング中間体」である(図4)。

Dr. Lochheadらは、リン酸化酵素DYRKのActivation loopの分子内自己リン酸化が、タンパク質生合成過

程のフォールディング途中に一過的に起こることを実験的に証明した(13)。つまり、フォールディング途中には、Activation loopがリン酸化されていない状態でも、ポケットにATPが結合し、そこからリン酸基がActivation loopのアミノ酸残基へと転移する反応が触媒される構造が存在することを意味している。これは活性型・不活性型のようなこれまで解明されてきた構造とは本質的に異なると予想される。一方で、フォールディング中間体はATPを基質として分子内自己リン酸化反応を触媒することから、フォールディングの完了した構造とそこまで大きな違いがあるとも考えにくい。Lochheadらは、完成型とフォールディング中間体の立体構造が異なる可能性を、二つの化学構造の全く異なる低分子阻害剤を用いて実証している。片方のTBBは完成型による基質ペプチドのリン酸化を阻害したが、フォールディング中間体が触媒する分子内自己リン酸化反応は阻害しなかった。もう片方のPurvalanol Aは完成型と共にフォールディング中間体も阻害した。これらの結果から、二つの化合物が認識するATPポケットの構造が完成型とフォールディング中間体で異なる可能性が示唆された。そして、Lochheadらはフォールディング中間体のみを阻害し、完成型を阻害しない化合物も存在するであろうと予想した。

## 11. リン酸化酵素フォールディング中間体を標的とした特異的阻害剤

筆者(喜井)は、2010年に東京工業大学大学院から京都大学大学院医学研究科に移籍し、研究テーマをリン酸化酵素阻害剤の研究開発へと大きく変更した。京都大学では萩原正敏教授(上述の日高弘義博士の弟子)の研究室に所属し、リン酸化酵素DYRK1Aに対する阻害剤の研究に取り組んでいた。その際、精製DYRK1Aタンパク質を用いたin vitroでの基質ペプチドのリン酸化評価結果と、培養細胞での阻害活性があまり相関しないことに気がついた。特に、精製DYRK1Aに対する阻害活性はそれほど高くないにも関わらず、培養細胞系では高い阻害活性を示す化合物が複数得られたことから、何か培養細胞内にしかないリン酸化酵素の構造を認識する分子機構があると考えた。その分子機構の一つとして思い至ったのがフォールディングである。精製DYRK1Aはフォールディングが完了した構造である。一方、培養細胞内には、転写・翻訳後にフォールディングされて完成型タンパク質となる一連の生合成過程が存在している。この違いが原因であると考え、化合物によるフォールディング中間体特異的阻害を評価する実験系を構築し、小規模化合物ライブラリをスクリーニングしたところ、DYRK1Aのフォールディング中間体が触媒する分子内自己リン酸化を特異的に阻害する低分子化合物FINDY (folding intermediate-selective inhibitor of DYRK1A) を発見した(14)。発見の経緯についての詳細は論文に記載してあるため、本稿では少し裏話を紹介したい。

このFINDYは、リン酸化酵素DYRK1Aの完成型である精製タンパク質に対して強い阻害活性を示したRD0392という化合物の構造類縁体のうちの一つである。つまり、フォールディング中間体特異的阻害剤と完成型に対する阻害剤は、その構造がよく似ている。FINDYを同定したスクリーニングでは、RD0392や既知DYRK1A阻害剤などの構造類縁体を含むオリジナルのフォーカスライブラリ約200化合物を用いた。たったの200個の中から、世界中で誰も同定しなかった新規阻害様式の化合物を発見したのである。これが他のリン酸化酵素に適用できるかは現在研究中であるが、その可能性は高いと考えている。他のリン酸化酵素でスクリーニングを行う場合でも、ランダム構造ライブラリをスクリーニングするよりは、完成型に対する阻害剤の構造類縁体を中心とした小規模ライブラリを対象することをお勧めする。

この研究の中での棚からぼた餅的発見は、FINDYが極めて高い選択性を有することであった。FINDYはDYRK1Aと構造的類似性が高い近縁リン酸化酵素DYRK1Bや、周辺のDYRKファミリーリン酸化酵素全てに対して全く阻害活性を示さなかった。この結果は、フォールディング中間体を標的とすることで、高い選択性を有するリン酸化酵素阻害剤を取得できる可能性を示唆している。何故フォールディング中間体が

選択性の高い阻害剤の取得に有利なのかは全く解明できていない。現在、構造解析によるアプローチを進めており、近い将来その理由を明らかにできるだろう。

このリン酸化酵素フォールディング中間体阻害剤は、タイプI~IVのどれにも当てはまらない阻害様式である可能性が高い。今後の解析次第ではあるが、これが新しい阻害様式の場合はタイプI~IV阻害剤が標的とする構造が出現する以前の構造を標的としているので、タイプZERO阻害の分類を新しく提唱したいと考えている。

## 12. おわりに

本研究では、リン酸化酵素のフォールディング中間体を標的とした。しかし、天然変性タンパク質を除くと、ほとんど全てのタンパク質にフォールディング中間体が存在している。このフォールディング中間体に化合物が結合しうるポケットが存在すれば、それは創薬標的となり得るはずである。リン酸化酵素DYRK1Aフォールディング中間体研究にて基礎知見を蓄積し、将来は他のリン酸化酵素、他の酵素、さらにはフォールドする構造を有するタンパク質全般にこの創薬概念を拡張し、映画の題材になるような新しい時代を築く研究を成し遂げたい。

## 13. 謝辞

本研究は、京都大学大学院医学研究科の萩原正敏教授研究室にて多くの共同研究者のご尽力によって達成されました。この場をお借りして深く御礼申し上げます。科研費 若手研究A(16H05926)と新学術領域「新生鎖の生物学」(17H05678)の支援のもと遂行されました。加えて、現在は新学術領域「分子夾雑の生命化学」(18H04568)と科研費 基盤研究B(19H02856)の支援によりさらなる研究を展開しています。

## 参考文献

- (1) Burnett G. and Kennedy E. P., *J Biol Chem*, **211**, 969-980 (1954)
- (2) Manning G., et al., *Science*, **298**, 1912-1934 (2002)
- (3) Tanramlik D., et al., *Chem Biol Drug Des*, **74**, 16-24 (2009)
- (4) 日高 弘義, 渋谷 正人, *脈管学*(日本脈管学会発行), **50**, 633-642 (2011)
- (5) Ohgushi M., et al., *Cell Stem Cell*, **7**, 225-239 (2010)
- (6) Etienne G., et al., *J Clin Oncol*, **35**, 298-305 (2017)
- (7) Anastassiadis T., et al., *Nat Biotechnol*, **29**, 1039-1045 (2011)
- (8) Davis M. I., et al., *Nat Biotechnol*, **29**, 1046-1051 (2011)
- (9) Elkins J. M., et al., *Nat Biotechnol*, **34**, 95-103 (2016)
- (10) Jacoby E., et al., *Drug Discov Today*, **20**, 652-658 (2015)
- (11) Hopkins A. L. and Groom C. R., *Nat Rev Drug Discov*, **1**, 727-730 (2002)
- (12) Santos R., et al., *Nat Rev Drug Discov*, **16**, 19-34 (2017)
- (13) Lochhead P. A., et al., *Cell*, **121**, 925-936 (2005)
- (14) Kii I., et al., *Nat Commun*, **7**, 11391 (2016)

## 気になった論文

徳永 啓佑 (とくなが けいすけ)

九州大学大学院薬学府 創薬科学専攻 博士後期課程 1年

tokunaga.keisuke.907@s.kyushu-u.ac.jp

この度は生命化学研究レター「気になった論文」の執筆機会をいただき、誠にありがとうございます。私は九州大学大学院薬学府創薬ケミカルバイオロジー分野で王子田彰夫教授のご指導のもと、コバレントドラッグの研究に携わっております。コバレントドラッグはその不可逆性ゆえにオフターゲットタンパク質と反応した際の副作用が懸念され、これまでは企業での開発が避けられる傾向にありました。しかしながら最近では、標的特異性の高い TCI (Targeted Covalent Inhibitor) の登場のほか、共有結合性化合物ライブラリーによる新規阻害剤の探索や、共有結合性の小分子を用いたプロテオミクス研究などが盛んにおこなわれています。そこで本稿では、共有結合性の小分子を活用した論文を2報紹介します。

### An activity-based probe targeting non-catalytic, highly conserved amino acid residues within bromodomains

Melissa D'Ascenzio, Kathryn M. Pugh, Rebecca Konietzny, Georgina Berridge, Cynthia Tallant, Shaima Hashem, Octovia Monteiro, Jason R. Thomas, Markus Schirle, Stefan Knapp, Brian Marsden, Oleg Fedorov, Chas Bountra, Benedikt M. Kessler, and Paul E. Brennan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 1007–1012.

Activity-Based Protein Profiling (ABPP) のようなケミカルプロテオミクスの手法は、ケミカルプローブが細胞や組織中のタンパク質をコンフォメーションや機能を保ったままの状態 で捕捉し、解析を行うことのできる手法である。これに用いられるプローブは、タンパク質と相互作用するリガンド構造と求核性アミノ酸残基と反応し共有結合を形成する求電子性の反応基を持つ。そのため、ヒットしたタンパク質の阻害剤として機能できる可能性を持つ。本論文で筆者らは、ヒストン上のアセチルリジン を認識するブロモドメイン (BRD) を標的とした共有結合性プローブの開発と、それを用いたプロテオミクス研究によって筆者の開発したプローブが阻害剤として有用である可能性を報告している。

ヒストンのアセチル化を制御する BRD を有するタンパク質は転写因子のリクルートやクロマチンのリモデリング、また様々な癌の発生に関与することが知られている。しかしながら、今までにこれらの BRD タンパク質を標的とした共有結合性プローブの開発やプロテオミクス研究は報告されていなかった。そこで筆者らこれらの研究を行うために、多様な BRD を修飾するためのプローブの設計を行った。様々な BRD と相互作用することが報告されているブロモスポリン (BSP) と BRD4 のドッキングシミュレーションをもとに、スルホンアミドを BRD4 の Lys91 を標的とした反応基であるジクロロトリアジンに変換し、アルキンハンドルを導入したブロモトリアジン (BTZ) を設計した (図 1)。この BTZ が

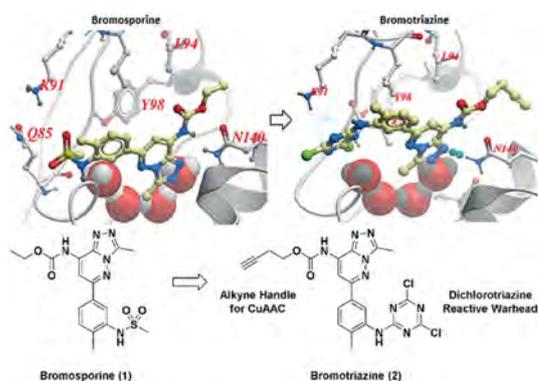


図 1. ブロモスポリンとブロモトリアジンの BRD4 とのドッキングシミュレーション (論文より抜粋、一部改変)

BRD ファミリーのリジン残基 (BRD4 の 85, 90 or 91 番目に相当する位置に保存されている) を修飾することを LC-MS を用いて調べたところ、それぞれの修飾率は異なるものの、今回評価した 12 種の BRD のうち 10 種の BRD が修飾されていた。

また、面白いことに BRD のプローブ結合サイトにリジンではなくチロシンを持つ場合には、チロシンが修飾されている結果が得られた。特に修飾率に関して、リジンを持つ BRD ファミリーの中では BRD2 の 67% が最高だった一方で、チロシンを持つ BRD9 や CECR2 ではそれぞれ 77%, 100% であった。これを受けて、筆者らは BRD (1  $\mu$ M) と BTZ (100  $\mu$ M) を反応させ、擬一次反応として反応速度定数  $k_{app}$  を比較したところ、リジンを有する 4 種の BRD よりもチロシンを有する 2 種の BRD の方が  $k_{app}$  が大きかった (図 2)。これは BRD の修飾率とも相関がある。

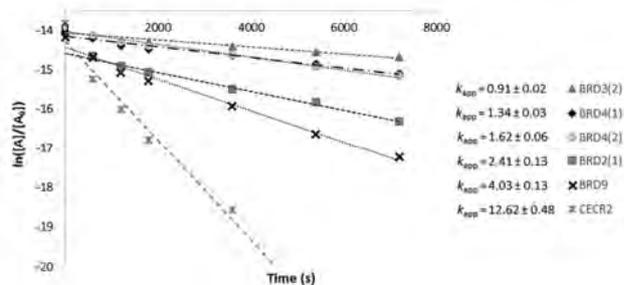


図 2. BTZ のキネティクス (論文より抜粋)

最後に筆者らは慢性骨髄性白血病細胞である K-562 細胞のライセートを BTZ で処理し、クリック反応を用いてアルキンハンドルを介してビオチンを導入後、タンパク質を濃縮し、Label Free Quantification (LFQ) 法を用いた質量分析によってヒットタンパク質を同定した。その結果、BRD4 や BRD8、その他の BRD 関連タンパク質 (SMARCA4, SUPT16H) が検出された。特に BRD8 は vitro の試験を行っておらず BTZ との共有結合形成が確認されていない。しかしながら、この細胞ライセートを用いた結果から、BRD8 が BTZ と反応していることが確認され、BTZ が BRD8 の阻害剤となりうることが示された。

### Rapid covalent-probe discovery by electrophile-fragment screening

Efrat Resnick, Nir London. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, 141, 8951–8968.

これまでに可逆的な化合物ライブラリーを用いたスクリーニングが多数行われてきたが、一般に化合物のアフィニティが低いため、高感度な検出方法と人工的な要因を排除するための入念なバリデーションが必要だった。そのために、リード化合物の探索は非常にコストがかかるものだった。一方で、反応性フラグメントを用いたスクリーニングでは、ヒット化合物と標的タンパク質が共有結合を形成しているため、分子量の増加から MS で容易に検出でき、一次ヒットの段階ですでに薬効があるため後の化合物の創出が行いやすい。本論文で筆者らは、反応性フラグメントライブラリーを用いたスクリーニングを行い、今まで阻害剤が知られていなかった標的タンパク質に対する不可逆阻害剤の開発に成功したことを報告している。

まず筆者らは、反応性の穏やかな反応基としてクロロアセタミド (CA) や、上市薬で汎用されているアクリルアミド (AA) を有するライブラリーを構築した。ライブラリーの内容としては CA を有する化合物が 752 種類、AA を有する 241 種類の合計 993 種類で、そのうち 92% の化合物の分子量が 300 未満となっている (図 3)。さらに、良質な化合物ライブラリーの指標の一つとされる“ルールオブ 3” (水素結合ドナー、アクセプター、回転可能結合数、 $\text{clogP}$  値がすべて 3 以下であること) に関しても、ほぼすべての化合物が満たしている。

次に標的タンパク質を修飾する反応性フラグメントの探索を行った。今回標的としたタンパク質は 10 種類あり、ネガティブコントロールの BSA を除いて、いずれもシステイン残基を持ち創薬標的となりうるタンパク質である。スクリーニングは 384 穴プレートの 1 つのウェルに予め 5 つの反応性フラグメントを加えた後に、標

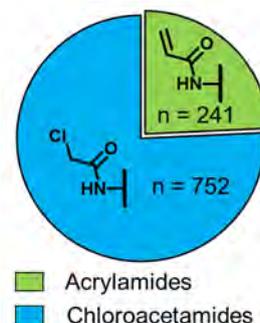


図 3. ライブラリーの反応基とその内訳 (論文を基に作成)

的タンパク質を添加し、4 °C, 24 時間インキュベートして、LC-MS を用いて、ヒット化合物とその修飾率を調べた(図 4)。その結果、QSOX1 と PCAF を除く 7 つの標的タンパク質に 50% 以上の修飾率を示すヒット化合物が確認された(表1)。

ヒット化合物が確認された 7 つのタンパク質のうち筆者らは OTUB2 に着目し、その阻害剤開発を行った。OTUB2 は脱ユビキチン化酵素(DUB)の一つであり、筋萎縮性側索硬化症(ALS)のバイオマーカーとして知られている。そのため、OTUB2 の特異的な阻害剤は ALS の潜在的な治療薬になりうると考えられている。OTUB2 のヒット化合物 47 種類の中で、低濃度(100 μM)でも 50% 以上修飾した化合物を調べたところ、9 種類確認された。そして、これらの 9 つの化合物と OTUB2 の共結晶構造解析を行い、クロロアセタミドと OTUB2 の Cys51 が共有結合を形成していることが確認できた。またヒット化合物の内の 2 つの化合物に共通の構造として存在していたクロロアセトヒドラジド部位(図 5. 赤い構造)が OTUB2 の Ser223, Asp48, Gly49, Cys51 と水素結合を形成しており、クロロアセトヒドラジドが相互作用に重要なことを見出した。

そこで市販のヒドラジド化合物にクロロアセタミドを導入した誘導体 21 種を同様にスクリーニング(100 μM, 4°C, 24 hr)したところ、ヒット化合物(修飾率 >50%)が 6 つ得られ、その中でも OTUB2-COV-1 および 17 が修飾率 100% であった。特に OTUB2-COV-1 について、さらに低い濃度の 2 μM でも修飾率 46% であった。また OTUB2 の阻害活性評価(2 mM Cysteine)を行ったところインキュベート時間 30 min と 2.5 hr でそれぞれ IC<sub>50</sub> 値が 31.5 μM, 15.4 μM であり、時間依存的に阻害活性が上昇していることから、阻害様式が不可逆的であることが示唆された。

最後に OTUB2-COV-1 の DUB ファミリー間での選択性を、ABPP を用いて評価した。OTUB2 を過剰発現させた HEK293 細胞を OTUB2-COV-1 (0–100 μM) で処理し OTUB2-COV-1 が反応するタンパク質と修飾させた後に、アルキンハンドルを持ち様々な DUB と反応する DUB プロブで未反応の DUB を修飾し、蛍光色素を導入後、ゲル電気泳動後の蛍光バンドから OTUB2-COV-1 が修飾した DUB を調べた。その結果、蛍光が減少しているのは OTUB2 のみであることが確認され、OTUB2-COV-1 は OTUB2 選択的に修飾することが示された。

本論文ではフラグメントライブラリーに導入した反応基によって、LC-MS を用いたスクリーニングの検出が可能となり、分子量の違いから簡便にヒット化合物とその修飾率を知ることができる。また、それによりスクリーニング数やバリデーション作業を抑えられることが示され、本法がこれからの創薬において有用な手法の一つになると思われる。

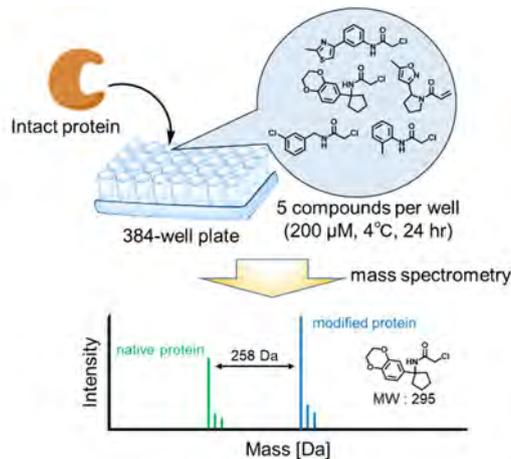


図 4. スクリーニング法の概要 (論文を基に作成)

protein	hit	catalytic Cys	Cys residues	possible therapeutic indications
QSOX1	0/993	no	12	cancer
PCAF	0/993	no	3	HIV, cancer
PBP <sup>R504C</sup>	2/983	no	1	antibiotic resistance
K-Ras <sup>G12C</sup>	10/968	no	3	cancer
USP8	20/923	yes	12	cancer, Cushing's disease
NNMT	30/299	no	8	cancer, diet-induced obesity
OTUB2	47/938	yes	4	viral infection, diabetes, ALS
NUDT7	36/973	yes	4	diabetes
NV3CP	10/824	yes	5	viral infection
BSA	0/981	no	23	negative control

表 1. スクリーニング結果のまとめ (論文を基に作成、一部改変)

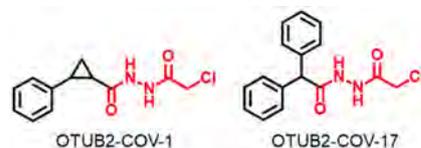


図 5. ヒット化合物の構造

## 気になった論文

荒井 洋平 (あらい ようへい)

慶應義塾大学大学院理工学研究科 後期博士課程 3年

youhei7510@keio.jp

この度は生命化学研究レター「気になった論文」への執筆機会を頂き、誠に有難うございます。私は現在、慶應義塾大学大学院理工学研究科にて藤本ゆかり先生のご指導のもと、免疫機構の解明と制御を目指した細菌由来化合物の合成と解析を行っています。免疫受容体を活性化させる細菌由来リガンドについて蛍光標識基や機能性官能基を導入した構造を設計・合成し、その機能解析を行うことで、免疫受容体のリガンド認識機構の解明や、高活性・高選択的なリガンド開発のための新しい分子設計の指針を得ることを目指して研究に取り組んでいます。本稿では、最近報告された新しい生体共役反応についての論文を2報ご紹介させていただきます。

### A protein functionalization platform based on selective reactions at methionine residues

Michael T. Taylor, Jennifer E. Nelson, Marcos G. Suero and Matthew J. Gaunt

*Nature* **2018**, *562*, 563–568.

タンパク質を部位選択的に化学修飾することができる生体共役反応は、抗体薬物複合体 (Antibody-drug conjugate, ADC) あるいは生物学的製剤のPEG化など、標的タンパク質に新たな機能を付加させる手法として広く用いられています。これまでにシステイン、リジン、チロシンなど求核性アミノ酸に対して多くの生体共役反応が開発されてきましたが、その他のアミノ酸を標的にした新たな手法を見い出せば、生体共役反応が利用できるタンパク質の種類を大きく広げることができます。本論文では、メチオニンを選択した新しい生体共役反応の手法が報告されています (図1)。

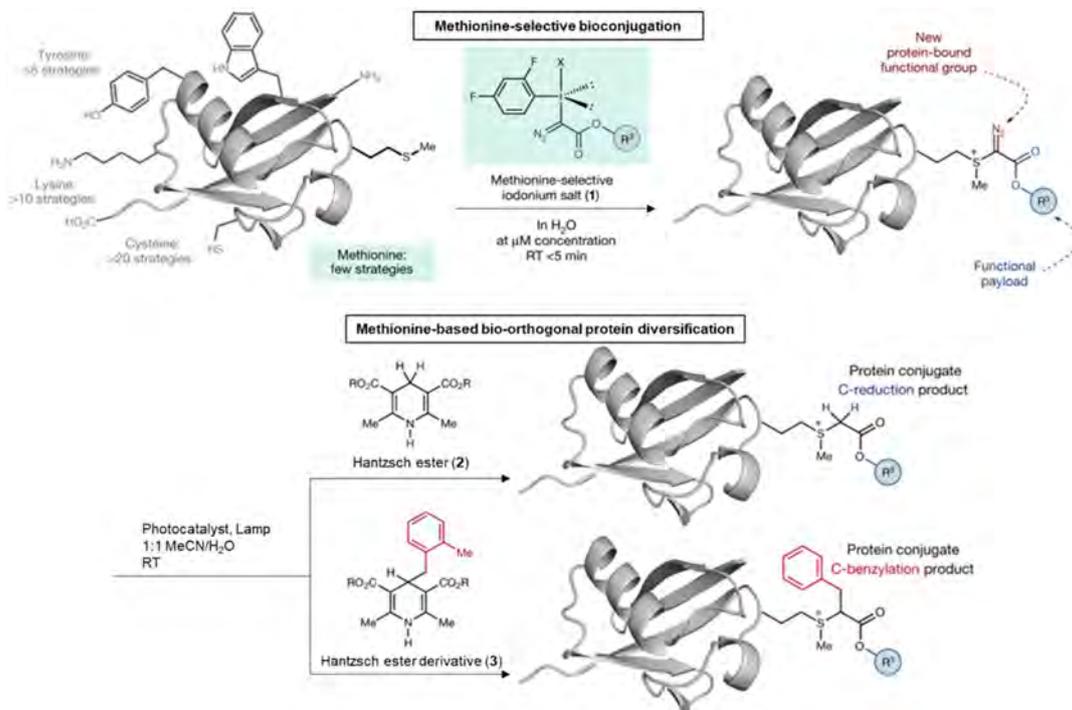


図1: メチオニン選択的生体共役反応の概要 (論文より抜粋、一部改変)

メチオニン含有タンパク質に対し超原子価ヨウ素試薬 **1** を用いると、メチオニン側鎖のチオエーテルが修飾されたジアゾスルホニウム付加体を得られました。この反応は5分以内という短い時間で高収率にて進行し、さらにシステインやリジンなどの求核性アミノ酸やシステインのジスルフィド結合には反応せず、メチオニン側鎖のチオエーテルのみ選択的に修飾が行われました。

さらに修飾後のジアゾスルホニウム複合体タンパク質に対して、フォトレドックス触媒とHantzschエステル **2** 存在下で可視光照射を行うことで還元プロセスが生じ、より安定なトリアルキルスルホニウム化合物へ変換できることを示しました。さらにC-4位がベンジル化されたHantzschエステル誘導体 **3** を用いることでベンジルラジカルとのクロスカップリングが進行しC-ベンジル化生成物が形成されたことから、メチオニン側鎖に対して2つの異なる官能基を連続的に導入することができます。

本戦略はメチオニンに対して生体共役反応が行えるようになっただけでなく、これまでに多くの生体共役反応が開発されている他のアミノ酸と比較して、メチオニンはタンパク質における機能が限られているため修飾によりタンパク質本来の機能を損なう可能性が低いことも注目すべき点であり、本手法を用いることで生体共役反応を利用できるタンパク質の種類が拡大されることが期待されます。

## Dinitroimidazoles as bifunctional bioconjugation reagents for protein functionalization and peptide macrocyclization

Qunfeng Luo, Youqi Tao, Wangjian Sheng, Jingxia Lu and Huan Wang

Nat. Commun. 2019, 10, 142-150.

システインを標的とした生体共役反応はこれまでに20種類以上の様々な反応が開発されており、特にマレイミドを用いた共役付加反応はシステインに対して最も広く使用されている生体共役反応です。しかしながらマレイミドは中性および塩基性pH条件下でリジンとの交差反応が進行してしまうこと、また付加反応後も水溶液存在下では生成した結合が加水分解を受けることが問題とされています。したがって生体共役反応としてはより高い化学選択性と結合安定性を兼ね備えた反応が求められています。本論文で著者らは、1,4-ジニトロイミダゾール (1,4-DNIm) がシステイン特異的に反応し、生体共役反応に適した特徴を持つ試薬であることを報告しました(図2)。

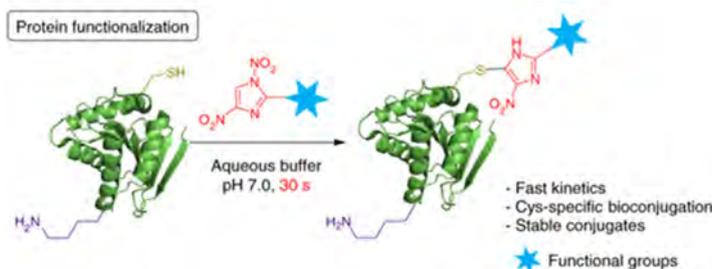


図2: 1,4-DNImによるシステイン選択的生体共役反応 (論文より抜粋)

これまでに1,4-DNImは有機溶媒中弱塩基性条件下にてアミンと反応することが報告されていましたが(図3下)、今回著者らは1,4-DNImとシステイン含有タンパク質をHEPESバッファー中にて反応させたところ、*cine*置換を介したチオール付加体が見出されました(図3上)。この反応は中性および塩基性条件下では2分以内に完結し、さらにpH5.0の酸性条件下でも反応時間を30分に延長することで収率74%にてチオール付加体を得ることができました。また化学選択性についての検討では、中性水溶液条件下においてリジンなどの求核性アミノ

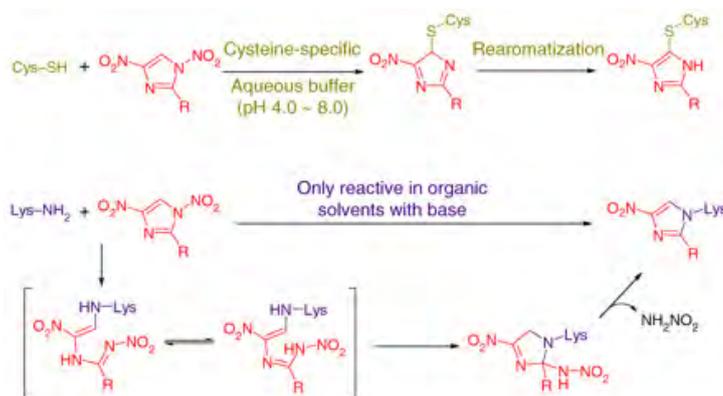


図3: 1,4-DNImとシステインおよびリジンの反応機構 (論文より抜粋)

酸には反応せず、システインのチオールのみを選択的に反応することを見出しました。さらに反応後の1,4-DNImチオール付加体はPBSバッファー中にて10時間経過しても加水分解を受けず、またpH 2.0、pH 10.0の緩衝溶液中や10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の存在下でも分解しないことが示されました。以上の結果から、1,4-DNImは水溶液中で幅広いpHの範囲においてもシステイン選択的に反応し、かつ安定した結合を形成する試薬であることを示しました。

次に著者らはリジンに対しても1,4-DNImを用いた生体共役反応の検討を行いました。種々反応条件を検討した結果、DMSO溶媒中にてDIEAを塩基として用いるとリジン含有ペプチドに対して30分で修飾できることを示しました。この条件はその他の求核性アミノ酸では反応が起こらず、また生成した4-ニトロイミダゾール結合は酸性、塩基性および酸化条件下でも分解されませんでした。このことから1,4-DNImはチオールを含有しないペプチドおよびタンパク質に対して、有機溶媒中で反応を行うことでリジン選択的に修飾できることを見出しました。

最後に著者らは1,4-DNImを用いたステーブルペプチド合成手法の確立を行いました。二次構造を維持できない短鎖ペプチドに対して分子内を架橋させたステーブルペプチドは、二次構造を維持できることに加え膜透過性を向上させプロテアーゼによる分解を受けにくくするため、タンパク質間相互作用を標的とする創薬への応用が期待されています。2つの1,4-DNImをリンカーにてつなげた二官能性1,4-DNImを合成し、2つのシステインもしくはリジンを含む様々なペプチドに対してそれぞれ確立された反応条件下で二官能性1,4-DNImを加えると、対応する環状ペプチド化合物が高収率で生成されました(図4左)。さらに著者らは1,4-DNImの特性を利用し、位置選択的な二環式ペプチドの合成を行いました(図4右)。2つのシステインと2つのリジンを含むペプチドを調製し、HEPESバッファー中にて二官能性1,4-DNImを加えることでシステイン特異的に架橋した環状ペプチドを合成しました。さらに凍結乾燥後の反応混合物に対しDMSOにて再溶解し、新たに二当量の二官能性1,4-DNImを加えることによりリジン間で架橋を形成し、二環式ペプチドの合成を達成しました。

本手法はマレイミドによる修飾手法と同条件で、システイン選択的に安定した結合を迅速に生成できる修飾法であることから、新しい生体共役反応として幅広く使用されることが期待されます。

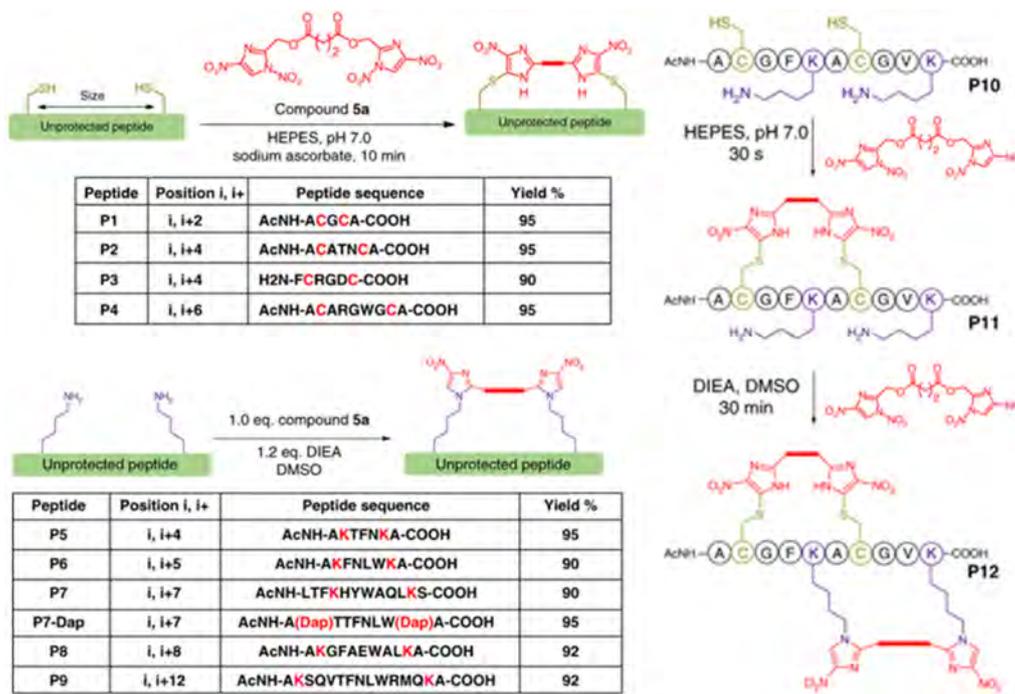


図4: ステーブルペプチドの合成 (論文より抜粋)

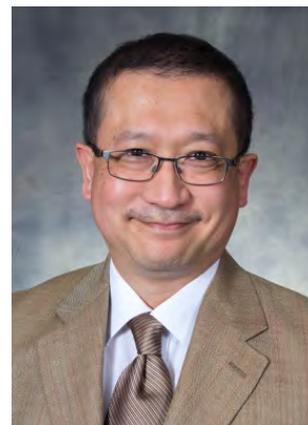
## アメリカで研究室を持つということ

### ～大学ポジションの獲得とテニユア～

ミシガン大学歯学部

黒田賢一

(kkuroda@umich.edu)



私は現在アメリカのミシガン大学歯学部で研究室を運営し、次の論文の心配と研究費の工面に追われる日々を過ごしております。他のアジア諸国と比べて、アメリカで学位を取得しようとする日本人の留学生は圧倒的に少ないのが現状です。これは、日本人学生や研究者にとってアメリカでの就職や研究事情を知る機会は限られていることもその一因かもしれません。最近では日本の大学教員の方がアメリカの研究室に短期留学されることが多いので、研究室運営などに関してはご存知の方が多いかと思います。そこでこの寄稿では、私の経験や現在の教員としての立場から「大学のポジションの獲得」と「テニユア(終身雇用)の仕組み」を紹介したいと思います。

#### 大学のポジションの獲得

Assistant Professorのポジションを得るためには、応募書類の提出から始まり、大学で面接してオファーをもらうまでに長いプロセスがあります。私の就職活動の経験と、逆に現在の雇う立場から考えると、以下の3点が候補者を選定する上でのキーポイントになるかと思います。

- (1) 研究内容がその学部や大学にフィットしているか？
- (2) 大学にとっていい投資になるか？
- (3) いい同僚になり得るのか？

こうした点を踏まえて、応募書類の作成や面接を準備する必要があります。以下にそれぞれのステップでの詳細を説明します。

<応募書類と書類選考>化学系の場合には、博士号取得後の博士研究員(ポスドク)の期間に大学のポジションに応募します。科学雑誌やその大学のホームページに掲載されている広告に応じて必要書類を大学へ送ります。私の就職活動の当時はまだ印刷した書類の入った封筒を郵送していました。文字通り100通ほど送りました。我が家の地下室にはまだ100通近いrejection lettersが眠っています。また、ポスドクの指導教官に他大学から問い合わせがあつて、ポスドクを紹介する場合があります。一般にカバーレター、履歴書、研究計画書(プロポーザル)を提出します。私はカバーレターにこれまでの履歴や研究の紹介を簡単に書きました。私の場合にはMITでの博士課程3年目に指導教官が変わっています。これは最初の指導教官だった田中豊一先生が亡くなられたために、化学科のTim Swager教授の研究室に移ったためです。こうした事情は履歴書からは読めませんので、カバーレターで説明しました。

一般に学部内外の4~6人の教員からなるSearch Committeeが作られていて、ポジションの広告や書類審査、面接の手配などをし、最終的に候補者の選定を行います。まず書類審査において、応募者がその

分野でどういった貢献をしてきたか判断します。今までの研究内容や論文の社会的・科学的重要性が大切です。「この研究は今非常にホットな分野を扱っている」「この論文が新しい分野を開いた」というインパクトが一つの基準になります。それと同時に論文数(Productivity)も考慮されます。後述するテニユアの審査は一般に就任後5-7年ほどです。Productivityはそのテニユアまでの期間に十分な数と質の論文を出すことができるかどうかの判断材料になります。こうした理由から、ポスドクの期間が長くてもそれに見合う論文数がない場合、また何年ものブランクがある場合には、研究経験年数が長いことがプラスの判断材料にはならないかもしれません。こうした応募書類に合わせて、3通の推薦状が必要です。一般的には博士課程での指導教官、ポスドクでの指導教官、共同研究者に応募者がお願いする、もしくは応募者が大学に推薦者リストを渡して、大学側から依頼することになります。

<面接と研究発表> Search Committeeは4-5人ほど候補者を選び、大学での面接に招待します。候補者は1時間ほどの研究発表(公開セミナー)をします。多くの場合、現在進行中のポスドクでの研究を発表します。これはポスドクでの研究とプロポーザルの内容と関連しているので、ここで基盤となる研究を知ってもらうことになります。またこうしたセミナーではちゃんと人前で話ができるか、質問などに答えられるかどうか見ます。これは授業ができるかどうかの判断にもなります。私はよく候補者が自分の研究を熱意を持って話すことができるかどうか見えています。

<プロポーザルの発表> 研究発表に加えて、今後の研究の計画(プロポーザル)の発表(非公開)をします。今はラップトップコンピューターを使つてのパワーポイント発表が多いですが、以前は黒板に書いて説明をしていたことからChalk talkとも呼ばれます。現在でも実際にホワイトボードなどに補足の説明をする場合もあります。一般的には1-2時間もしくはそれ以上の時間を取っている場合もあります。一般的にはポスドクや博士課程での研究内容から発展した内容です。この数時間は質問漬けで、ここでどれだけ耐えることができるかで最終決定に大きな違いが出ます。科学的に正しいアプローチをしているか、数年のうちに外部から研究費が獲得できるかどうかを調べます。つまりテニユアまでの期間に論文と研究費が取れるかどうかを判断します。大学側からの視点では、初期投資に見合うだけの研究成果が期待できるかどうか重要です。また「この研究内容が現在の学部・大学内でうまくフィットするのか」、「他の研究者との相乗効果があるのか」、「どんな機材が必要なのか」など色々な観点から判断します。研究発表、論文のリスト、プロポーザルの書類は良くても、発表では受け答えが悪かったりする場合もあり、「研究の理解がまだ足りないな」と思わせることもあります。これは新規性を追うために、どうしても背伸びしたプロポーザルになってしまうことが多いためです。事前に指導教官からアドバイスをもらうのが良さそうです。

<2日間の個別面談と食事> 面接に呼ばれると、その学部内外の関係する先生と30-60分ほどの個別のミーティングをします。すべての食事も誰かと一緒です。一



写真 1. (上)研究室を立ち上げ当時の様子と(下) 2008年度研究室メンバー 著者は最左側。最右側は安原主馬先生(現・奈良先端技術大学)。

挙一動を常に監視されているのではないかと思います。いつも誰かと一緒です。通常2日間ですので、合計10-20人ほど会うことになります。通常はミーティングスケジュールを事前に知らせてくれるので、相手を事前に研究することができます。こうして個別に会うことで将来いい同僚になれるかどうかの判断もします。こうした観点は万国共通で、研究業績だけでなく人柄や性格にもそのポジション・大学での適性があります。

〈オファーと決定〉 最終的にオファーをもらうことができれば、そのあとは研究室立ち上げのための初期研究費の交渉などになります。私がミシガン大学からオファーをもらった時は大変嬉しかったです。荒川静香選手がトリノオリンピックで金メダルを取った頃でした。面接で大変だった時に、日本人が世界で活躍しているのを見て自分も頑張ろうと思ったことを覚えています。

### テニユア(終身雇用)の仕組み

私の研究室でポストドクとして頑張ってくれた高橋治子先生が現在広島大学理学部でテニユアトラックのポジションにおられます。高橋さんは抗菌性・抗がん性ポリマーの研究を推し進めてくれた原動力でした (*Bioconjugate Chem.* 2017, *Sci. Rep.* 2019)。近年、日本国内の大学でもこうしたテニユアトラックのポジションが増えてきました。しかしながら、テニユアの仕組みはあまり日本には馴染みがなく、実際のテニユアの判定基準などは明確ではないのが現状ではないでしょうか？ そこで、アメリカでのテニユアトラックの仕組みを紹介したいと思います。私の所属するミシガン大学では以下の3点について総合的に評価されます。

- (1) Scholarly Activity (研究活動)
- (2) Teaching (授業・学生指導)
- (3) Service (大学や社会への貢献)

テニユアの最終決定はProvost Officeを経て、五月のRegentの会議で承認されます。その1-1.5年ほど前に必要書類を学部に提出します。私の場合にはCVとPortfolioを提出しました。CVはいわゆる履歴書で、今までの活動の記録(データ)です。Portfolioは前述の3点についてどんな活動し、業績を残したかを記述し、「いかに自分がテニユアに値するか」の売り込みをします。以下にそれぞれに項目でのポイントを紹介します。

〈研究活動〉 ここでのキーワードは「National Recognition」です。つまり、その分野で候補者の研究がどれくらい認知されているかが鍵です。この指標となるのが、まずは論文と研究費獲得です。最初に論文の質と数が大切です。何本論文が出ればテニユアの獲得ができるという具体的な規定はありません。ここでの「質」は、新しい分野を開拓したり、大きなインパクトを残すことで後に多数引用されるような論文を意味します。こうした論文を通して、科学の分野で「誰々といえば、なんとかの研究をしている人」(誰もがその候補者の研究を知っている)、そして「この研究といえば誰々さん。」(その分野の第一人者)というように認識されると一番理想的だと思います。研究費の獲得もその分野での貢献や研究活動が評価されたことの表れです。獲得研究費額面や数に決まった規定はありません。アメリカでは学生の給料と授業料を研究費から払いますので、外部からの研究費獲得は研究費運営において最も重要です。



写真 2. 日本人留学生とバーベキュー。著者は左から2番目。肉を調理中。右から2番目は高橋治子先生(現・広島大学)、最右側は戸谷匡康先生(現・九州大学)。

また、大学や学会での招待講演、受賞歴なども、National Recognitionの大事な指標です。ここで気をつけたいのは、こうしたNational Recognitionは一過性でなく、継続してさらに伸びていくことを示唆することが大切です。また、National Recognitionが候補者の独立した研究活動によってもたらされていることを示す必要があります。博士課程・ポスドク時の指導教官との共著論文や連名の研究費、またその候補者がCorresponding authorでない論文が大多数を占める場合があります。それは独立して自分の研究が確立できていない可能性を示唆します。

National Recognitionがダイレクトに表現されるのが外部からの評価状で、その分野の先生方に大学が依頼します。この評価書はArm's-length lettersと呼ばれます。評価書を依頼されるのは候補者の指導教官や共同研究者といった身内ではなく、直接には関係がない人たちです。候補者から評価書を書いて欲しい数人の名前を学校に提出します。学校側も独立したリストを持っています。その中から評価書を依頼します。候補者には実際に誰が評価書を書いたかはわかりません。いわゆる身内からの推薦状と違って、その分野の客観的な評価になります。そのため、その分野で認知されているかどうかが直接的に反映されます。自分の研究をよく知ってもらうために、テニユア審査の時期が近づくと、候補者は他大学を訪問してセミナーをする機会を増やします。これはよく「Tenure tour」と呼ばれます。こうして自分の研究を知ってもらうことは、テニユアのためだけでなく、論文やプロポーザルの審査においても有効です。



写真 3. 名古屋大学—ミシガン大学ジョイントシンポジウム。2008年名古屋大学開催。著者は最後列右から5番目、中日ドラゴンズのキャップをかぶっている。前年2007年にドラゴンズ日本一。

<授業・学生指導> 授業内容・活動も評価の一部です。まずは「Teaching philosophy」を明確に提示する必要があります。このphilosophyに応じて授業をどのように行い、授業内容を構築していったかを示す必要があります。もしも新しいコースを作ればそれも実績になります。また学生からの授業の評価も期末に行われます。これに合わせて実際の授業の仕方の評価も他の先生にお願いします。それらの書類もPortfolioに添付します。ここでは「良い評価を受けた」という結果だけよりも、「指摘された悪い点をいかに対処して授業を改善したか」を示すことが大切です。例えば「授業内容がわかりにくい」と指摘された場合、「大学主催のTeachingのワークショップに参加して、話し方や授業の構成のアドバイスを受けたことで、次の年には良い評価を受けた」ことが大切です。別の見方をすると「問題を認識して、それに対して対処する能力・学習能力がある」ことが評価されます。また、研究室における学生指導も評価の一環です。

<Service> 学部内外、大学内外、国内・国際レベルでの貢献も評価されます。例えば入学選考委員やプログラムディレクター、学会のオーガナイザーなどがそれに該当します。学内で他学部の博士号論文の審査に加わることも、貢献の一つです。また、学術論文の審査やNIHのstudy section(プロポーザルの審査)などへの参加といったReviewerとしての活動もServiceの一環です。私は当時、ミシガン大学のマ

クロプログラムと名古屋大学、奈良先端技術大学との研究協定と学生交換留学に携わっておりました。名古屋大学と奈良先端技術大学とは共同シンポジウムを開催し、双方からの学生の短期留学も実現できました。こうした国際協定も学術分野・教育への貢献です。

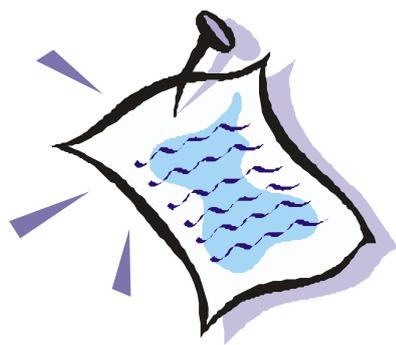
この寄稿の情報がこれから海外（特に米国）でのキャリアパスを目指す若い日本人の方達の役に立つことを願っております。こうした就職活動やテニユアの経験を振り返ると、自分自身、とにかく一生懸命だったなと感じます。言葉や文化、仕組みの違いなどによる海外ゆえの苦労は何かとよく訊かれます。しかしながら、そういう心配をする以前に、いろいろな問題を解決したり、論文を書いたり、学生を指導するのに手一杯でした。そう考えてみると、そもそも海外ゆえの苦労を心配しているうちはまだアメリカでのキャリアパスは本気ではないのかもしれないかもしれません。実のところ現状も同じで、常に一生懸命生きてます。

執筆の機会を与えてくださいました大神田淳子先生（信州大学）に感謝いたします。執筆にあたり、松永行子先生（東京大学）、安原主馬先生（奈良先端技術大学）、高橋治子先生（広島大学）、戸谷匡康先生（九州大学）に助言をいただきました。ありがとうございました。



写真 4. ミシガン大学卒業式。著者は右側。ガウンはレンタル。





# シンポジウム等会告



日本ペプチド学会第 26 回ペプチドフォーラム

## 機能性ペプチド材料の創製と評価

主旨・概要:近年、ペプチド配列を精密設計することで、期待通りの二次構造・三次構造および集合構造(四次構造)を創製することができるようになってきました。また、ランダムライブラリーからのセレクションにより、狙った機能を有するペプチド材料の創製も盛んに行われています。本フォーラムでは、ペプチドからなるナノ集合体・イオンチャネル・触媒・細胞機能調節材料の創製と評価について、国内の主たる研究者に話題を提供して頂き、材料化学や創薬・医療への展開に関して討論することを目的とします。

日程:2019年10月5日(土)13:00 ~ 18:00

場所:鳥取大学工学部講堂

<https://eng.tottori-u.ac.jp/>

主催:日本ペプチド学会

共催:日本化学会

後援:高分子学会

参加費:無料

オーガナイザー:松浦和則(鳥取大学工学部)

### 講演者

13:05~13:50 玉村 啓和(東京医科歯科大学 生体材料工学研究所)

「機能性素材・創薬を指向したペプチドミメティック」

13:50~14:35 川野 竜司(東京農工大学工学研究院)

「脂質二分子膜デバイスを用いた膜ペプチド計測」

14:35~15:20 稲葉 央(鳥取大学工学部)

「Tau 由来ペプチド設計に基づく微小管内部空間の機能開拓」

15:40~16:15 新井 亮一(信州大学繊維学部)

「タンパク質ナノブロックによる自己組織化ナノ構造複合体の創製」

16:15~17:00 高谷 光(京都大学化学研究所)

「メタル化ペプチドを基盤とする人工酵素の創製」

17:00~17:45 溝端 知宏(鳥取大学工学部)

「環境応答型分子シャペロンが見せる可逆線維化反応とその応用」



## 受賞

**松浦 和則 (鳥取大学教授)**

2019 年度 高分子学会三菱ケミカル賞

「ペプチドの分子設計による自己集合ナノシステムの創製」

(2019 年 9 月 26 日)

**竹中 繁織 (九州工業大学教授)**

2019 年度 日本分析化学会学会賞

「4 本鎖 DNA 構造を利用した新しい分析法の開発」

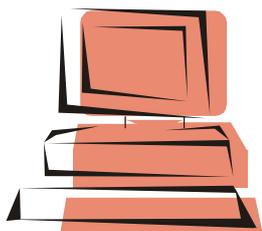
(2019 年 9 月 12 日)

**勝田 陽介 (熊本大学助教)**

2019 年度 日本分析化学会奨励賞

「小分子を用いた非標準型核酸高次構造の検出」

(2019 年 9 月 12 日)



### 【編集後記】

記念すべき令和第1号となった本号ですが、今回も7名の皆様の力作が揃い盛りだくさんの内容となりました。お楽しみ頂けましたでしょうか。

大阪の言葉には独特の温かさを感じさせる不思議な魅力がありますが、今回の巻頭言では、生粋の大阪人であられる島本先生が、独特の温かな”島本節”で若い世代を励ますメッセージを寄せて下さいました。高知の生命化学研究会でお聞きした杉山雄一先生のお話を思い出します。「年齢を重ね、同時に、経験も積み重ねる。すると、つい楽だからその経験に頼りがちになってしまい、「経験の牢屋」に閉じ込められてしまう。それではいけない、常に新しいことに挑戦する気概を持ち続けたい。」わずかな経験だけでなく、溢れる情報にさえ惑わされがちな昨今、石橋を叩いて渡らず、な

んてことも身に覚えがあります。「やらの、わからしまへんで」も、世代を問わず人の原点に響く言葉ではないでしょうか。

次号は井原さんのご担当で、2020年4月頃の発行を予定しています。レターに関しまして皆様からのご要望・ご意見をお待ちしております。

2019年（令和元年）9月30日

大神田 淳子

生命化学研究レター編集委員

第 59 号編集担当 : 大神田 淳子

信州大学、[johkanda@shinshu-u.ac.jp](mailto:johkanda@shinshu-u.ac.jp)

井原 敏博

熊本大学、[toshi@chem.kumamoto-u.ac.jp](mailto:toshi@chem.kumamoto-u.ac.jp)

松浦 和則

鳥取大学、[ma2ra-k@chem.tottori-u.ac.jp](mailto:ma2ra-k@chem.tottori-u.ac.jp)