



### モジュールアセンブリ：

#### たんぱく質表面構造を識別する有機分子の創製

#### はじめに

たんぱく質-たんぱく質間相互作用は細胞増殖と分化、アポトーシス等の様々な生命反応を制御する情報伝達系で重要な働きを担っています。それにも関わらず長い間創薬の対象として敬遠されてきた主な理由に、その作用面が広大で浅く、drug-likeな低分子による制御が極めて困難であることが挙げられます<sup>1)</sup>。近年、たんぱく質の表面構造を模倣した有機分子を創出しようとするプロテオミメティクス研究が盛んになり、抗体に頼らずとも合理的に設計された人工分子を用いることで生体内のたんぱく質間相互作用の制御が可能であることが分かってきました<sup>2)</sup>。しかし、抗体の抗原結合サイトのように広い分子表面を確保しようとすると必然的に分子量が増加するため、細胞膜透過性が欠如する等の課題を残しています。従って、今後プロテオミメティクス的手法をより実践的な創薬研究へ展開してゆくためには、分子量、分子非対称性の導入、結合選択性の向上、等の問題を解決する必要があります。

私たちはこれらの課題に対するひとつの戦略として、たんぱく質の特定表面を標的とする有機分子を「部品（モジュール）」の集積によって組み上げようとする手法を検討しています。構造上の特徴に応じて領域分けしたたんぱく質部分表面に対し、相補的相互作用点を導入したモジュール分子を設計し、これらをあらかじめ空間特異的に配置したハイブリッド型化合物を調製する、あるいは標的たんぱく質表面上で集積させ、モレキュラーグルーを使ってマクロ分子を構築することで、必要最小限の分子量に絞りつつ結合選択性の向上を図ることを目指しています。本稿では、金属錯体形成もしくは共有結合によるモジュールアセンブリと、得られた集積体による標的たんぱく質の機能制御を検討した例を紹介させていただきます。

#### トリスビピリジン金属錯体を基盤とするたんぱく質表面認識

ひとつめのアプローチでは、種々の官能基を導入したビピリジン誘導体をトリスビピリジンルテニウム錯体として集積し、たんぱく質表面部位特異的認識とたんぱく質機能の制御を行う手法の確立を目的としました。セリンプロテアーゼの $\alpha$ -キモトリプシンは等電



大神田淳子

点が9程度の塩基性たんぱく質であり、活性ポケット周辺にリシン、アルギニン塩基性アミノ酸残基を持ちます。従って適当な大きさを持つビピリジン錯体を土台にカルボン酸等の相補的な官能基を導入した集積体は、活性ポケット近傍に結合して酵素阻害活性を示すと期待しました。図1には4,4'位にイソフタル酸をスペーサーとしてフェニルアラニンを導入したビピリジンから調製したルテニウム錯体とキモトリプシンの重ね合わせ図を示しています。キモトリプシンの塩基性領域近傍にフェニルアラニンのカルボキシル基を配置し、かつその活性ポケット周辺の表面（ $\sim 600 \text{ \AA}^2$ ）をほぼ覆う大きさを持つことがわかります。ビピリジンの4,4'位にGlu, Phe, Lys, GluPhe等の種々の置換基を導入した配位子から合成したルテニウム錯体とキモトリプシンとの解離定数を蛍光滴定で測定したところ、導入した官能基に依存して親和性が顕著に変化しました。4,4'位にGluを直接導入した小さな錯体では蛍光強度に変化がなかったのに対して、イソフタル酸含有のデンドリマー様錯体ではキモトリプシンの滴下に従って顕著な蛍光強度の増大が認められ、 $\mu\text{M}$ オーダーの解離定数を持つことを明らかにしました。またこの錯体は $75 \mu\text{M}$ で73%のキモトリプシン酵素活性を阻害したのに対し、配位子のみ、もしくはアミノ基を側鎖に持つリシンを導入した錯体は全く阻害活性を示さないこともわかりました。これらの結果から、たんぱく質外部表面との結合には相補的静電相互作用点を有することのほかに、標的たんぱく質と相補的なサイズを持つことと強固な疎水性部位を含むことが重要であることを明らかにできました<sup>3)</sup>。

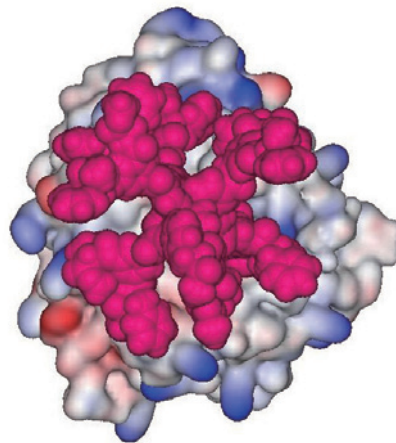


図1. Ru(bpy)<sub>3</sub>と $\alpha$ -chymotrypsin結晶構造の重ね合わせモデル

## たんぱく質内部・外部表面を標的としたプレニル転移酵素阻害剤の設計

ふたつめのアプローチでは、たんぱく質-たんぱく質相互作用に関わるたんぱく質表面を位置選択的に捕えるための阻害剤設計として、標的たんぱく質の活性ポケット（内部表面）とその近傍の外部表面を同時に1分子で認識するハイブリッド型アンカー分子を考案しました。

哺乳類細胞中のプレニル転移酵素群に属する farnesyltransferase（以下FTase）と Type I geranylgeranyltransferase（以下GGTase-I）は、Rasファミリーと総称されるGTP-結合たんぱく質に対して翻訳後修飾を行う亜鉛含有 $\alpha/\beta$ ヘテロダイマー酵素であり、近年がん、C型肝炎、もしくはプロジェリア症候群等の難治性疾患に対する創薬の標的として広く研究されています<sup>4)</sup>。FTaseとGGTase-Iは、基質たんぱく質のC末端4アミノ酸残基（CAAX; C=Cys, AA=aliphatic dipeptide, X=Ser, Gln, Met for FTase; Leu, Phe for GGTase-I）を認識してCysチオール基にfarnesyl基もしくはgeranylgeranyl基を、それぞれfarnesyl2リン酸、geranylgeranyl2リン酸より転移する反応を触媒します。また、FTaseとGGTase-Iの $\alpha$ -subunitは同一の遺伝子産物であり、その活性ポケット近傍表面にはGlu, Asp等のクラスターからなる90 Å<sup>2</sup>程の酸性領域を持ちます。私たちはまず、GGTase-Iの酸性表面と活性ポケットの2箇所の部分表面構造を1分子で同時認識する化合物の設計に着手しました。すなわち、活性ポケットに対してはCVILテトラペプチドを、外部表面に対してはアミノ基を導入した没食子酸誘導体をそれぞれモジュールとし、これらを共有結合的に連結したアンカー型ハイブリッド化合物を設計しました（図2）。この化合物は活性ポケットへの結合を足がかりとして、標的とする酸性たんぱく質表面に没食子酸誘導体モジュールを位置特異的に配置すると考えられます（図3）。これを裏付ける証拠として、1) 阻害活性にモジュールの加算性が認められるか、2) 非特異的な結合を排除し選択性が確保されるか、に主眼を置いて検証しました。

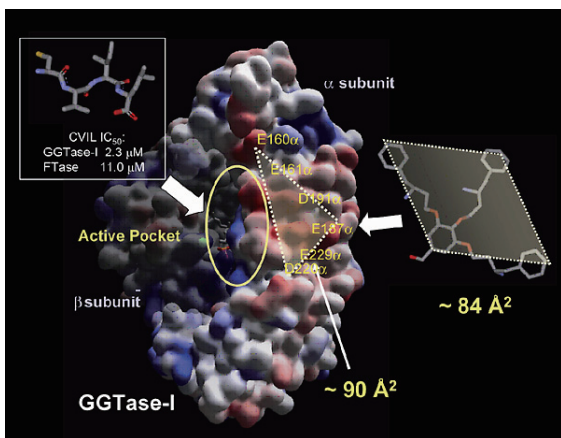


図2. GGTase-Iの結晶構造（PDB#1N4Q）とモジュール設計 活性ポケットを正面から見たところ。赤が負、青が正電価を帯びた箇所。近傍の $\alpha$ -subunit表面にAsp, Gluのクラスターが存在する

それぞれの化合物のGGTase-Iに対する阻害活性を蛍光基質を用いる方法で評価しました。ハイブリッド型化合物はGGTase-Iの活性をnMオーダーで阻害し（ $K_i = 150\text{--}210$  nM）、対応するモジュール類と比べて8~150倍活性が高いことがわかりました（図4）。このときハイブリッド型化合物はGGTase-Iに対して競合的阻害剤として働き、類似酵素のファルネシルトランスフェラーゼ（FTase）に対する選択性は150倍以上認められました。このことから本化合物は、非特異的な結合を伴うことなくGGTase-Iの活性ポケットをその内部表面認識モジュールで識別して結合していることは明らかであり、その結果としてモジュールの加算性が観測されたことは、外部表面認識モジュールは標的の酸性領域に配置されることを強く支持しています。従って、本モジュールアセンブリに基づくアンカー型阻害剤設計によって、標的たんぱく質外部表面に低分子量モジュールを位置選択的に配置させることが可能になり、たんぱく質相互作用を選択的に阻害する化合物の設計につながることが期待されます<sup>5)</sup>。

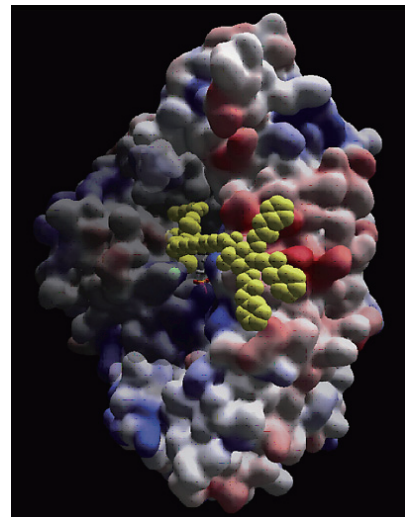


図3. GGTase-I結晶構造とハイブリッド型化合物（黄）の結合モデル

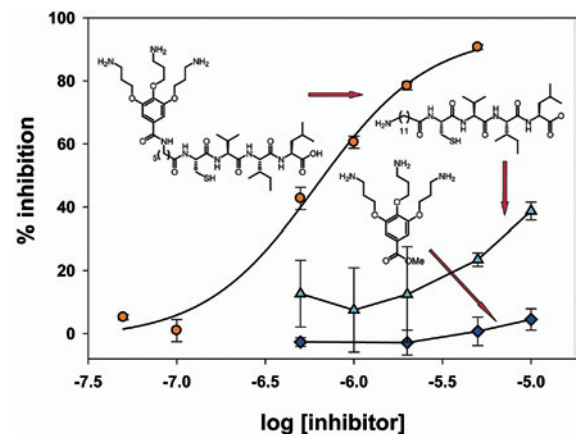


図4. 蛍光基質dansylGCVILを用いたGGTase-I阻害評価

## たんぱく質-たんぱく質間相互作用に対する阻害効果

膀胱がんには90%の高い確率で見出される変異K-Ras4Bは4種類のRas isoformのひとつであり、このもののfarnesyl化の効率的な阻害は抗がん剤開発の重要な課題です。ところがK-Ras4Bに特有の問題として、FTaseに対して他のisoformよりも異常に高い親和性を持つこと、またFTase阻害剤を作用させると本来の翻訳後修飾ではないGGTase-Iによるgeranylgeranylationを受けて活性化することが指摘されています。K-Ras4BはそのC末端配列KKKKKSKTKCVIM中にpolylysine残基に由来する特徴的な塩基性領域を持ち、FTaseの $\alpha$ -subunitの酸性領域との静電相互作用、すなわちたんぱく質-たんぱく質相互作用が関与することが複数の研究から示唆されており、近年に報告された結晶構造からも強く支持されています。そこで私たちは、アンカー型ハイブリッド化合物がたんぱく質-たんぱく質相互作用の制御にどの程度有効であるかを検証するために、K-Ras4BとFTase間の酵素反応を評価系とすることにしました。

FTase阻害剤としては、K-Ras4Bの末端CVIMテトラペプチドと、K-Ras4Bの(K)<sub>6</sub>を模倣して6個の1級アミノ基を導入した没食子酸誘導体を連結したハイブリッド型化合物を得ました(図5)。この化合物はすなわちK-Ras4Bのミメティクスと看做することができます。

K-Ras4BC末端配列にdansyl基を導入したオリゴペプチド(K)<sub>6</sub>SK(Dans)TKCVIMのFTase酵素反応に対するCVIMの阻害定数は1.1  $\mu$ M(IC<sub>50</sub> = 182  $\mu$ M)程度であったのに対し、ハイブリッド化合物は3桁低い0.005  $\mu$ Mと、非常に強力な阻害活性を示すことがわかりました(図5)。この結果は、没食子酸モジュールがFTaseの表面とK-Ras4Bモデルペプチドとの静電相互作用を阻害することを支持しており、酵素表面に結合するハイブリッド型化合物が、たんぱく質-たんぱく質相互作用の制御に極めて有効であることを示していると考えられます。

## おわりに

たんぱく質表面の機能を制御する化合物は創薬の見

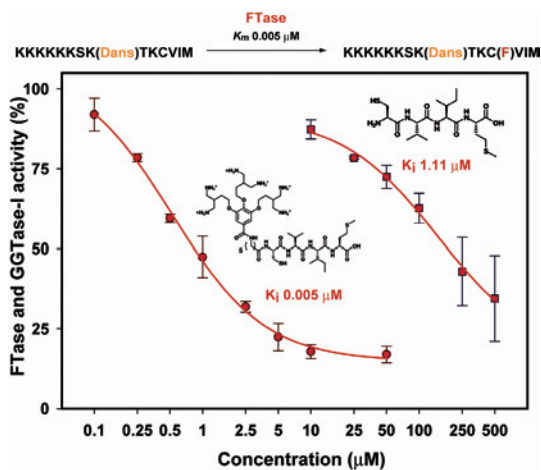


図5. たんぱく質間相互作用を再現するFTase酵素反応に対するハイブリッド型化合物の阻害活性

地からも大いに有用であると考えられますが、課題は山積しています。モジュールの組み上げに金属錯体が有効であること、またたんぱく質の外側の特異的あるいは共通の表面構造を標的として視野に入れることで、isoform選択的あるいはdual阻害剤への可能性を示すことができました。現在は、細胞内のたんぱく質間相互作用を対象に研究を展開しつつあります。将来“drug-like”な化合物でたんぱく質相互作用を制御することを目標に、私たちはモジュールアセンブリの研究に取り組んでいます。

## 参考文献

- 1) H. Ruffner, A. Bauer, T. Bouwmeester, T. *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 709-716.
- 2) For recent example of proteomimetics, see: a) B. A. Rosenzweig, N. T. Ross, D. M. Tagore, J. Jayawickramarajah, I. Saraogi, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, published on line (DOI: 10.1021/ja809219p); b) B. A. Smith, D. S. Daniels, A. E. Coplin, G. E. Jordan, L. M. McGregor, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2948; H. Zhou, L. Baldini, J. Hong, A. J. Wilson, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2421.
- 3) J. Ohkanda, R. Sato, N. Kato, submitted.
- 4) M. H. Gelb, L. Brunsveld, C. A. Hrycyna, S. Michaelis, F. Tamanoi, W. C. V. Boorhis, H. Waldmann, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 518-528.
- 5) S. Machida, K. Usuba, M. A. Blaskovich, A. Yano, K. Harada, S. M. Sebt, N. Kato, J. Ohkanda, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1392-1401. This paper was highlighted in frontispiece of the cover story. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1367.

おおかんだ じゅんこ  
大阪大学産業科学研究所  
医薬品化学研究分野・准教授  
johkanda@sanken.osaka-u.ac.jp  
<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/~johkanda/index.htm>

## 標的タンパク質を探る

### はじめに

このたび、2009年4月から東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所に着任し、新しく生命有機化学研究室というラボを立ち上げる事になりました。御茶ノ水駿河台地区にある本学生体材料工学研究所の建物内1階に実験室を現在整備中です。同研究所の玉村啓和教授が、本ニュースレターの編集委員をされている関係で、本稿執筆の機会を頂きました。まず初めに玉村先生と編集委員の先生方に厚く御礼申し上げます。

私の専門は有機合成化学で、いわゆる有用な「低分子プローブ」を開発することで生命機能発現の分子機構の解明を目指すとともに、その制御法またはイメー



細谷 孝充

ジグリング法を開拓し、最終的には疾患治療薬や診断薬の開発に貢献していきたいと考えています。私はペプチドが専門というわけではなく、どちらかという何でも屋ですが、本稿が一般概念として、本レター読者の今後の研究の何らかのヒントになれば幸いです。

私の恩師は、現在東京工業大学大学院理工学研究科の鈴木啓介教授（当時、慶應義塾大学）で、学生時代に有機化学の基礎的な考え方と実験手法を徹底的に仕込んでいただきました。1995年に学位取得後、現在理化学研究所分子イメージング科学研究センターの鈴木正昭チームリーダー（当時、岐阜大学工学部&医学研究科）のもとで10年間助手を勤めました。ここで最初に与えられたテーマの一つが、生物活性低分子化合物の作用機序解明を目指した標的タンパク質同定研究でした。私はそれ以来、光親和性標識法（photoaffinity labeling）と呼ばれる光反応による生体高分子の化学修飾法に着目して、2005年に東京工業大学大学院生命理工学研究科に助教授として赴任後も、標的タンパク質探索研究をテーマの一つとして行ってきました。本稿では、その研究過程で直面したいくつかの問題点を克服するために開発するに至った新しい手法について簡単に紹介させていただきます。

## 1. 光親和性標識法とは

有機化合物には何らかの生物活性を示すものが多く、例えば薬効のように役に立つものがあれば、毒性のように害を及ぼすものまで多種多様です。その生物活性はどのようにして発現するのでしょうか？実は現在使用されている薬剤を含めて、その生物活性の発現機構はよく分かっていないものが数多くあります。では、その機能がどのようなタンパク質（あるいは他の生体内分子）を介して発現しているのかを知るためにはどうしたら良いのでしょうか？ケミカルタンパク質間の相互作用の研究には様々なアプローチが考えられます。X線結晶構造解析やNMRによる解析などが代表的な手法ですが、これらは標的タンパク質が未知である場合には用いることができません。このような場合には、ビーズ上に化合物を固定化して標的タンパク質をアフィニティー精製する方法が良く試みられますが、固定化によって生物活性が著しく減弱してしまうケースも多く、必ずしも万能な方法とは言えません。私たちは、薬剤や天然有機化合物などの標的タンパク質の同定に有効な手法である光親和性標識法に着目して研究を行ってきました。

光親和性標識法は、光反応性官能基を有する分子プローブに光を照射することにより活性化し、高反応性化学種を発生させることで、プローブの近傍に存在する相互作用タンパク質を安定な共有結合でクロスリンク（架橋）する方法です（図1）。光反応性官能基の種類や導入位置にもよりますが、一般的には分子プローブと標的タンパク質の相互作用が特異的で親和性が高ければ高いほど（すなわち、生物活性が高いほど）、多くのタンパク質が混在する系中からでも選択的に標的タンパク質のみを光ラベル化することができる確率が高くなります。また、場合によっては、プローブがその標的タンパク質上のどの部位に結合しているのかをアミノ酸残基レベルの精度で同定することができ、

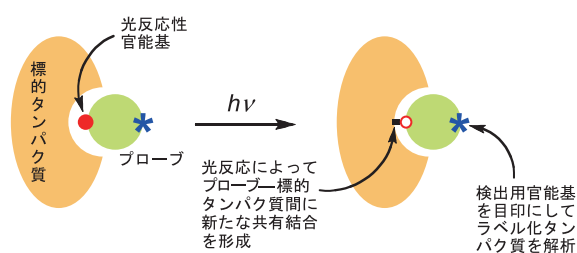
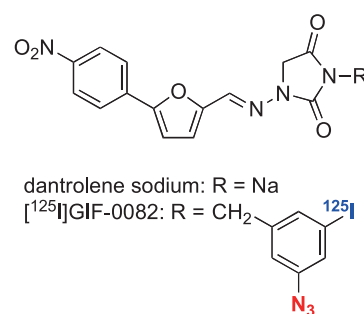


図1. 光親和性標識法の原理

低分子化合物と標的タンパク質との相互作用様式を推測することが可能です。

ある化合物を光親和性標識プローブ化するには、通常その構造に二種類の官能基を導入します。一つは光反応により標的タンパク質との間に共有結合を形成（タンパク質を捕獲）するための光反応性官能基であり、もう一つは捕獲したタンパク質を他のタンパク質と区別するための検出用官能基です。一般的に、前者には光照射によりナイトレン、カルベン、励起カルボニルなどの高反応活性種を生じる芳香族アジド、ジアジリン、ベンゾフェノンなどが、後者には<sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>125</sup>Iなどの放射性同位元素（radioisotope = RI）がよく用いられます。これら官能基の導入にあたっては、元の化合物が有している生物活性を損なわないことが重要で、可能であれば活性や選択性が向上することが望ましく、そうでないと数多くの非特異的結合タンパク質が光ラベル化されてしまいます。



## 2. 骨格筋における細胞内Ca<sup>2+</sup>動員の分子機構解明のための光親和性標識プローブの開発

ここで私たちの行った光親和性標識研究の一例を紹介します。骨格筋の収縮が筋細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度の上昇により引き起こされることは良く知られていますが、どのような分子機構で細胞内のCa<sup>2+</sup>貯蔵庫である筋小胞体（SR）内から細胞質内にCa<sup>2+</sup>が動員されるかという重要な問題はいまだ未解決のままです。私たちはこの問題を解くために、筋弛緩作用のあるダントロレンという薬の光親和性標識プローブ化を試みました。ダントロレンは、SR膜上に存在するCa<sup>2+</sup>放出チャネルであるリアノジン受容体（RyR1）による生理的なCa<sup>2+</sup>放出（PCR）と、RyR1の示すもう一つのCa<sup>2+</sup>放出様式であるCa<sup>2+</sup>によるCa<sup>2+</sup>放出（CICR）の両方を抑制する非選択的な阻害剤です。いくつかのダントロレン類縁体をプローブ候補化合物として設計・合成した

結果, RyR1 によるPCRを特異的に抑制し, CICRには無効果である, アジド基含有誘導体GIF-0082の創製に成功しました<sup>1)</sup>。さらに対応する放射標識体である [<sup>125</sup>I]GIF-0082を合成し, これをプローブとして用いてウサギやマウスの骨格筋標本に対して光親和性標識実験を行ったところ, Ca<sup>2+</sup>放出の制御に関与していると考えられる標的候補タンパク質の捕獲に成功しました。

### 3. 新しいnon-RI光親和性標識法の考案

私たちは上述した実験を契機に, 検出用官能基にRIを用いたRI標識プローブは検出感度が高い点で有効であるが, 特別な実験施設を必要とし, 実験者の被曝対策が必要であることや, プローブが分解しやすい上に捕獲タンパク質の精製や直接的解析が困難である, など多くの制約があることを体験しました。実際, RI標識プローブを用いた実験では, ラベル化タンパク質の分子量情報が得られるだけにとどまることが多く, 実態が未知である標的タンパク質の直接的な構造決定には有効ではありません。RIを用いない(non-RI)光親和性標識法としては以前から, ビオチン修飾プローブを用いる方法(photoaffinity biotinylation)が知られています。この方法では, ビオチンに対する(ストレプト)アビジンの高親和性を利用して捕獲タンパク質の検出や直接精製が可能で, 実際多くの成功例が報告されています。しかし, この方法ではプローブ構造内にあらかじめ比較的大きく高極性なビオチンユニットを導入するため, とくに低極性な低分子化合物のプローブ化の際には, 元の化合物が本来有していた生物活性が損なわれてしまう危険性があります。

そこで私たちは, この点の解決をも含めた, より一般性の高いnon-RI光親和性標識法の開発を試みることにし, 図2に示したような方法を考案しました<sup>2)</sup>。その最大の特徴は, プローブ設計の際に, 芳香族アジド基やジアジリル基などの反応性の高い光反応基とともに, 同一プローブ内に相対的に光に安かつ水中で修飾が可能であるbioorthogonalな(天然の生体分

子中には存在しない)官能基を導入しておくことです。つまり, まず光反応により標的タンパク質を捕獲した後(第一段階), 未反応のbioorthogonal官能基をタグとして利用して蛍光基やビオチン基など, 任意の検出用マーカを導入する(第二段階)二段階操作法です。アジド基が代表的なbioorthogonalな官能基で, 実際, アジド基含有生体高分子はトリアリールホスフィン誘導体とのStaudinger-Bertozzi ligationやアセチレン化合物とのHuisgen 1,3-dipolar cycloaddition(click反応)などのアジド基選択的反応を用いることで修飾できることが数多く報告されています。私たちは, 検出基導入用のタグとして比較的小さく低極性なアジドメチル基を用いれば, 元の化合物のプローブ化に伴う生物活性への影響を最小限に抑えることができ, その結果正しい標的タンパク質を光ラベル化できる可能性が高くなるのでないかと期待しました。

### 4. 脂肪族アジド基の光安定性の化学的検証

私たちの考案したnon-RI光親和性標識法の実現には, 第一段階の反応条件下, すなわち, 芳香族アジド基やジアジリル基などの光反応条件下で脂肪族アジド基が安定であることが必要です。しかし, 過去の文献を調べてもそのような報告例を発見することはできず, むしろ脂肪族アジドも光反応性があると報告されているばかりでした。そこで, 実際に自分たちの手で確かめることにしました。

まず, 芳香族アジドおよび脂肪族アジドのモデル化合物としてそれぞれフェニルアジドとベンジルアジドを用意し, これらの当量混合アセトニトリル溶液に対して波長 254 nmの光を照射し, 両者の残存量を定量しました。その結果, フェニルアジドの消失が確認された時点(5分)では90%以上のベンジルアジドが未反応のまま残存していることが確認されました。すなわち, 期待したとおり, 脂肪族アジドは芳香族アジドの光反応条件下では十分安定であることが分かりました。

次に, 実際の光親和性標識プローブへの応用を考慮し, 同一分子内に芳香族アジド基と二つのアジドメチル基を有するC<sub>2</sub>対称構造をもつトリアジド化合物**1**を用いた光反応を検討しました。すなわち, **1**のシクロヘキサン-d<sub>12</sub>溶媒中, 大過剰のジエチルアミン存在下で光(波長 254 nm)を照射しました。その結果, **1**からまずナイトレン**2**が生じた後, 環拡大反応が進行してジデヒドロアゼピン中間体**3**となり, これにジエチルアミンが求核付加した3*H*-アゼピン誘導体**4**が生成しました(式1)。つまり, 化合物**1**中の二つの脂肪族アジド基は期待どおり残存していた訳です。また, トリフルオロメチルジアジリル基とアジドメチル基を有する**5**を合成し, その光反応をCD<sub>3</sub>OD中で行った結果, 生じたカルベン種**6**にCD<sub>3</sub>ODが付加した**7**が収率よく得られました(式2)。この場合にも脂肪族アジド基は未反応のままでした。これらの結果から, 芳香族アジド基およびトリフルオロメチルジアジリル基の光反応条件下ではアジドメチル基は未反応のまま残すことが可能であり, 検出用官能基導入のためのタグとして利用できることが示唆されました。

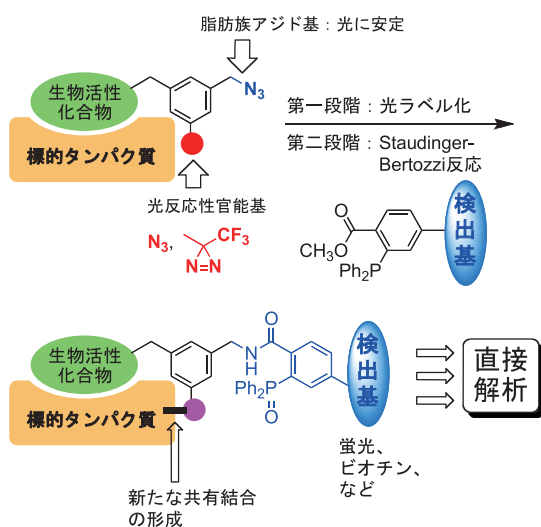
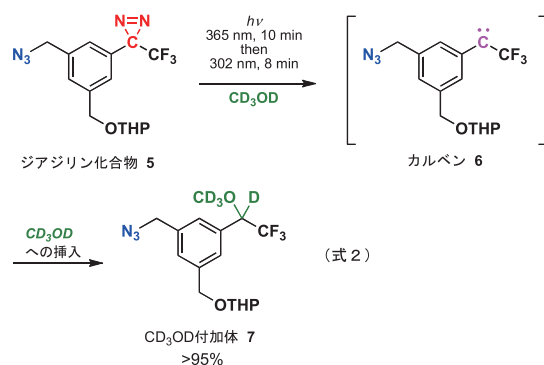
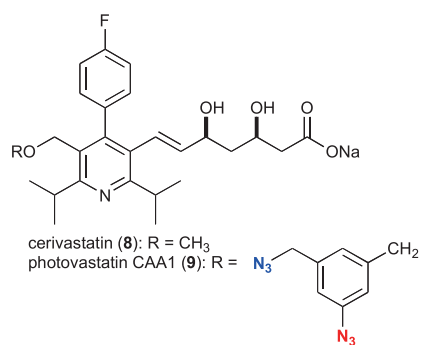
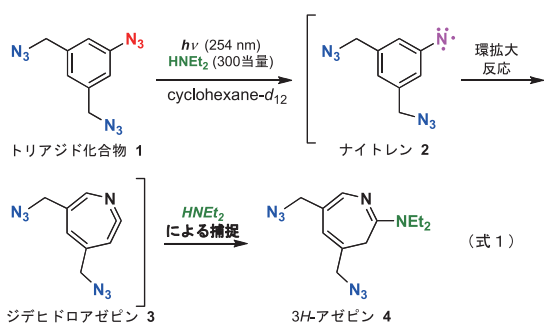


図2. アジド基の特性を利用したnon-RI光親和性標識



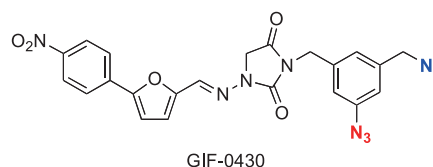
## 5. HMG-CoA還元酵素のnon-RI光親和性標識

次に、考案したnon-RI光親和性標識法の有効性を確かめる実験を計画しました。私たちは、HMG-CoA還元酵素阻害剤であるcerivastatin (8)に着目しました。8は、高脂血症治療薬として臨床使用されていましたが、横紋筋融解症などの致死性の重篤な副作用を頻発したため市場撤退を余儀なくされた薬剤です。この副作用の分子機構は不明だったため、私たちは8を光親和性標識プローブ化し、副作用に関連する標的タンパク質を同定することを計画しました。それに先立ち、まず、主作用の標的タンパク質であるHMG-CoA還元酵素が光ラベル化できるかどうかを確かめることにしました。具体的には、まず8のメトキシ部分に二官能性ジアジドユニットを導入したphotovastatin CAA1 (9)を設計・合成しました。9によるHMG-CoA還元酵素の阻害活性は8と同等でした。そこで、これを用いてHMG-CoA還元酵素との光反応を行い、つづいて蛍光性のフルオレセイン構造を有するトリアリールホスフィン誘導体を用いたStaudinger-Bertozzi反応による蛍光性官能基を導入した後SDS-PAGE解析を行いました。その結果、HMG-CoA還元酵素の光ラベル化を、蛍光シグナルを指標に検出することに成功しました。

私たちはさらに、9の酵素上での結合部位の同定を試みました。すなわち、9で光ラベル化した後、蛍光試薬を導入した酵素を消化酵素で処理し、電気泳動を行いました。強い蛍光シグナルを有しているペプチド断片のアミノ酸配列解析を行ったところ、HMG-CoA還元酵素のC末端側に対応する配列であることが分かりました。このことから9は同酵素のC末端に結合していることが示唆され、この事実は8とHMG-CoA還元酵素との複合体のX線結晶構造解析の結果と良い一致を示しました。現在、9を用いて8の副作用の発症原因鍵タンパク質の解明研究を継続中です。

## 6. ダントロレン標的タンパク質同定への応用

先述したように私たちは、骨格筋の興奮収縮連関過程におけるRyR1からのPCRを特異的に抑制するアジド基含有ダントロレン誘導体<sup>[125I]GIF-0082</sup>を用いた光親和性標識実験によりその標的候補タンパク質の捕獲に成功しています。このタンパク質およびそのプローブ結合部位の直接解析を目的に、上述したnon-RI光親和性標識用プローブの開発を試みました。具体的には、<sup>[125I]GIF-0082</sup>中の<sup>125I</sup>基をアジドメチル基に変換したジアジド化合物GIF-0430を合成しました。GIF-0430は、GIF-0082と同様にPCRに選択的な抑制能を示しました。GIF-0430を用いた光親和性標識実験を行ったところ、<sup>[125I]GIF-0082</sup>を用いた場合と同じタンパク質(分子量< 29 kDa)が特異的にラベル化されました<sup>3)</sup>。この結果は、私たちの方法論が、多くのタンパク質が混在した標本を対象とした実験においても有効であることを示しています。今後本法の活用による他の様々な分子プローブの創製とそれらの標的タンパク質の同定研究が行われると期待されます。



## おわりに

紙面の都合上、私たちが研究対象としている生命現象に関する説明は大幅に省略し、化学的背景を中心に紹介しました。詳細に関しては文中に引用した原著論文をご参照いただけますと幸いです。ちなみに本稿で紹介したダントロレンの標的タンパク質に関しては、一次構造が決定された後、遺伝子欠損マウスの作製と機能解析研究が行われ、そのタンパク質の機能が明らかとなりました(論文準備中)。研究開始から10年以上が経過しましたが、ようやく成果が得られつつあります。化学的な進捗としては、最近、ジアジドニル基とアジド基またはエチニル基を一体化させた検出用官能基一体型光反応性官能基の開発に成功しています<sup>4)</sup>。ペプチドとの関わりでは、光反応基と検出用タグを有する2官能性の非天然アミノ酸の合成も行っており、ペプチドの化学合成や非天然アミノ酸の部位特異的導入法の活用によるペプチドプローブやタンパク質プローブの作製にも挑戦中です。今後多くの生物学・医学系の先生方との共同研究を通じ、その過程で

直面するであろう様々な課題の解決策を有機化学者の視点から見出ししていくような研究を行っていきたくと考えています。

最後に、本稿の内容の大部分は現在、理化学研究所分子イメージング科学研究センター研究員である池本隆昭博士との長年の共同研究の成果です。この場を借りて、同氏に深く感謝いたします。

## 参考文献

- 1) T. Hosoya, H. Aoyama, T. Ikemoto, T. Hiramatsu, Y. Kihara, M. Endo, and M. Suzuki *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3263–3265
- 2) T. Hosoya, T. Hiramatsu, T. Ikemoto, M. Nakanishi, H. Aoyama, A. Hosoya, T. Iwata, K. Maruyama, M. Endo, and M. Suzuki *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 637–641.
- 3) T. Hosoya, T. Hiramatsu, T. Ikemoto, H. Aoyama, T. Ohmae, M. Endo, and M. Suzuki *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1289–1294.
- 4) T. Hiramatsu, Y. Guo, and T. Hosoya *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2916–2919. & 未発表

ほそや たかみつ  
東京医科歯科大学 大学院疾患生命科学部  
応用構造情報部門 ケミカルバイオロジー分野  
生命有機化学研究室  
thosoya.cb@tmd.ac.jp

## タグ-小分子プローブペアを用いたタンパク質の蛍光バイオイメージング

### はじめに

京都大学大学院工学研究科(浜地研究室)で講師をしております王子田 彰夫と申します。今回、私自身の研究を紹介させて頂けるありがたい機会を頂きました。ニュースレターですので少し気ままに肩の力を抜いて書かせていただきます。生きた細胞でのタンパク質の発現や局在などを蛍光により可視化解析するバイオイメージングは、現在ずいぶん注目を浴びている研究分野です。特に昨年のノーベル化学賞が「蛍光タンパク質GFPの発見と開発」の功績に対して下村, Tsien, Chalfieの三先生に授与されたことは、バイオイメージング技術の重要性を多くの研究者に再認識させるとともに、その注目度をますます高めることとなりました。蛍光タンパク質は確かに目的タンパク質にヒュージョンして発現するだけで蛍光を発することのできるgenetically encodableなすばらしいツールです。しかし、蛍光タンパク質はバイオイメージングをする上で何の問題のない万能なツールなのでしょうか？その答えは否です。いろいろ問題点はありますが、特徴的な一つの問題はその大きな分子サイズ(27 kDa)にあります。このような大きな分子を蛍光マーカーとしてヒュージョンした場合、しばしば目的タンパク質の機能障害が生じます。特に複数のタンパク質集積の場であるタンパク質複合体で



王子田彰夫

は、複合体形成自体が阻害されるような致命的な機能障害が生じるでしょう。ここで蛍光タンパク質に代わり見直されているのが、短くて小さなペプチドタグです。これまでにヒスタグ (HHHHHH) やFLAGタグ (DYKDDDDK) などのエピトープタグと呼ばれるものもつばらタンパク質の精製や固相表面への固定に用いられてきました。近年、このような特殊なペプチドタグと蛍光性小分子プローブとの特異的な相互作用を用いたタンパク質のバイオイメージング技術の開発が様々なグループにより報告されています。以下には、私たちが開発を行ってきた新しいタグ-小分子プローブペアの開発とそのバイオイメージングへの応用例を紹介させていただきます。

### 新しいタグ-小分子プローブペアの発見

「短いペプチドタグ配列と、これと特異的に相互作用する小分子プローブのペアを新しくデザインして下さい」と言われてもこれはすぐに答えの出せないなかなか難しい問題です。私たちが研究に着手した当初、この難問を如何に解決して自らの研究のオリジナリティを確立するかに腐心しました。それまでのいくつかの研究の手がかりと思いつき程度のアイデアから生まれてきたのがアスパラギン酸の四つ連続したD4タグ (DDDD) と、これと特異的に相互作用する二核の亜鉛錯体Zn(II)-DpaTyr(1)です。<sup>1)</sup> このタグ/プローブペアは水中で $K_d$ にして1.5  $\mu$ Mの親和性で相互作用します。水中で亜鉛錯体とアスパラギン酸のカルボキシレートとの金属-配位子間相互作用が強く働くことを明らかにした事になります。このペアは様々な配列のペプチドとZn(II)-DpaTyrとのITC測定を来る日も来る日も行い見いだしてきました。まさに泥くさい実験のたまものです。しかし、このタグ/プローブペアをバイオイメージングへと応用するためには親和性がまだ不足しています。もっと強い相互作用を獲得するために私たちがとった作戦はマルチバレンシーを利用することです。すなわち、タグ配列を二倍のD4x2 (DDDDGDDDD) とし、これに合わせてプローブもダイマー体(2)とします。これらの親和性は $K_d$ にして数十nM程度にまで向上します。このレベルにまで達すると細胞を用いたバイオイメージングが可能になります。実際に私たちは、これらの強い相互作用を利用して細胞表層に発現させたD4タグ導入アセチルコリン受容体を蛍光性プローブ2により特異的にラベル化しバイオイメージングすることに成功しています(図1)<sup>1)</sup>。

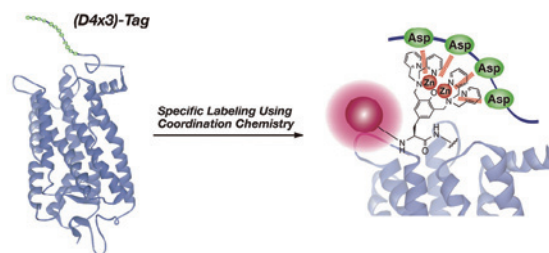
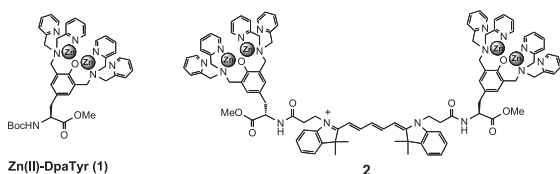


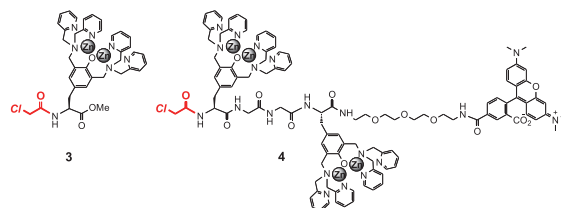
図1. Zn(II)-DpaTyrプローブによるD4タグ導入タンパク質の蛍光ラベル化



### 共有結合によるタンパク質ラベル化への展開

D4 タグ/Zn(II)-DpaTyrのタグ/プローブペアはバイオイメージングに有用でしたが、これらの相互作用は可逆的です。したがって顕微鏡を覗いているとすぐに相互作用を失い蛍光シグナルが減弱していく様子が観察されます。また、当然のことながらラベル化後のウェスタンブロットティング、FACSなどの解析は出来ません。このような問題を回避してラベル化法の解析応用の範囲を広げるため、現在私たちは共有結合によるタンパク質ラベル化法の開発に取り組んでいます。この手法は、タグとプローブが特異的に相互作用して近接することにより共有結合反応が誘起されタグ導入タンパク質の特異的なラベル化を実現する手法であり、私たちはこれを「リアクティブタグシステム」と呼んでいます(図2)<sup>2)</sup>。反応としてはタグ配列に新たに加えたシステインのチオール残基とZn(II)-DpaTyrプローブに組み込んだ $\alpha$ -クロロアセチル基との求核置換反応を用いています。システインを含むD4 タグ配列(CAAAAAADDDDD)を導入したタンパク質と反応性プローブ(3)との共有結合によるラベル化はタグ上で素早く進行します。タグ/プローブ間の親和性のおかげで他のタンパク質の共存化においてもタグ導入タンパク質が選択的にラベル化されます。ここでは、システインとD4 タグとの間のアラニンリンカーの数が6個であることがとても大事であることが分かりました。すなわちアラニンの数が6個の時に反応の速度が何故だかとても速いのです。これも泥臭くタグ配列を様々に検討してはじめて分かってきた知見です。最近、蛍光色素を有する反応性プローブ(4)を用いた「リアクティブタグシステム」により細胞表面に発現させた膜受容体の共有結合によるラベル化が可能であり、バイオイメージングへと応用できることが明らかになりつつあります<sup>3)</sup>。現在、この「リアクティブタグシステム」を切れ味のよいラベル化法とするために奮闘中です。また、さらには最近、Hisタグ

に対する「リアクティブタグシステム」も開発することにも成功しています<sup>3)</sup>。一つではなく複数のラベル化法を組み合わせることは、複数のタンパク質の同時イメージングを可能とするためタンパク質複合体形成などの解析に有用であると考えられます。



### おわりに

バイオイメージングのためのタグ-小分子プローブペアを用いたタンパク質ラベル化法の開発は、現在非常にホットな分野です。当然ながら、ここで紹介した私たちの手法以外にも様々なアイデアをこらした手法が精力的に開発されており、ちょっとした百花繚乱状態といっても言い過ぎではありません<sup>4)</sup>。これらは蛍光タンパク質の欠点を補い、バイオイメージングの幅を広げるための相補的なツールとして位置づけられ開発が続けられています。これから10年先、確固たる地位をすでに確立している蛍光タンパク質は間違いなく使われ続けているでしょうが、これらの新しい手法の内どれだけが実用レベルでバイオイメージング研究に貢献できているのでしょうか？世の中、最後はやっぱり本物しか残らないのだと思います。たとえ主論文を投稿し終えたとしても自分の手がけた手法に(ことごとく泥臭く)磨きをかけて、よりよい本物の使えるツールにしていく事が大切である様に思えます。理想論だよと笑われてしまうかもしれませんが、論文を出すことはあくまで一つの通過点に過ぎず、真に有用なモノづくりシステムづくりをすることが開発研究の本来の目標のはずなのですから。

### 参考文献

- 1) Oligo-Asp Tag/Zn(II)-complex Probe as a New Pair for Labeling and Fluorescence Imaging of Proteins, A. Ojida, K. Honda, D. Shinmi, S. Kiyonaka, Y. Mori, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* 128, 10452-10459 (2006).
- 2) Non-enzymatic Covalent Protein Labeling Using a

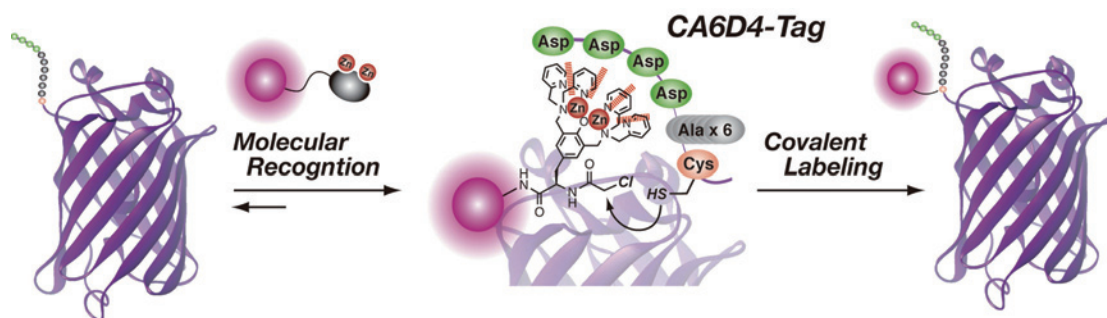


図2. 「リアクティブタグシステム」によるタンパク質の共有結合ラベル化



Reactive Tag, H. Nonaka, S. Tsukiji, A. Ojida, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 15777-15779(2007).

- 3) 日本化学会第 89 春季年会 (2009) 発表  
 4) a) Chemical Probes Shed Light on Protein Function, K. Johnsson *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 17, 488-494 (2007). b) Coiled-Coil Tag Probe System for Quick Labeling of Membrane Receptors in Living Cells, Y. Yano, A. Yano, S. Oishi, Y. Sugimoto, G. Tsujimoto, N. Fujii, K. Matsuzaki, *ACS Chemical Biol.*, 3, 341-345 (2008).

おうじだ あきお  
 京都大学大学院工学研究科  
 ojida@sbchem.kyoto-u.ac.jp

## アルギニンによる蛋白質ハンドリング

### はじめに

蛋白質は安定性が悪く変性や会合を起こすと、薬の場合は毒性の原因になりかねない。蛋白質の生産や精製、保存には、蛋白質の立体構造の安定性や分子間相互作用に様々な影響を及ぼすさまざまな溶質、例えば、硫酸やグリセロール、糖、アミノ酸のような安定化剤の存在が不可欠である。また、蛋白質のリフォールディングには凝集抑制剤として、アルギニンが主に用いられている。本稿では、蛋白質の凝集抑制やリフォールディング効率の向上などで注目されているアルギニンについて、その有用な効果と作用機序について明らかになってきたことを筆者らの研究も含め紹介する。



工藤 基徳



津本 浩平

### 蛋白質の水和

蛋白質と溶媒・溶質の弱い結合は選択的相互作用と呼ばれ、Timasheffらによる平衡透析実験から選択的相互作用の理論が構築されてきた<sup>1)</sup>。まず、1gの蛋白質あたり約 0.3gの結合水があることがNMR測定から確認されている。さらに、水と溶質が競合して蛋白質と選択的相互作用する部位が 0.7g分存在すると仮定して、選択的相互作用のパラメータ  $\xi_3$  は次式によって表される (図 1)。

$$\xi_3 = A_3 - g_3 A_1$$

ここで  $\xi_3$  が蛋白質 (成分 2) と溶質 (成分 3) との選択的相互作用を表す。  $g_3$  は溶質の濃度、  $A_3$  は溶質の結合量、  $A_1$  は水の結合量である。  $\xi_3$  は溶質の結合量  $A_3$  のみならず、水の結合量  $A_1$  や溶質の溶液中での濃度  $g_3$  にも依存する。

溶質の濃度が低いところでも結合が起こるなら、  $g_3 A_1 \sim 0$  となり第 2 項は無視できる。溶質の結合が濃度の高いところでしか起こらない場合、  $g_3 > 0$  とな

り、第 2 項の存在を無視できなくなる。表 1 に選択的相互作用をまとめた。おもしろいことに、蛋白質の立体構造に応じて、蛋白質表面との親和性が変化して、選択的水和と選択的結合が逆転する添加剤も存在する。

近年、動径分布関数を用いて蛋白質近傍の水分子の分布を描くことで、統計力学を通じた選択的結合が描写されつつある<sup>2)</sup>。動径分布関数においては、分子は剛体球近似され、分子間の反発と数密度で記述される。水分子は蛋白質の排除体積から振動しながら減衰しバルクと同じ密度に漸近する。水分子が高い密度で存在する領域を、蛋白質表面の近くから順に第 1 水和殻、第 2 水和殻と呼ぶ (図 2)。水分子と分子サイズが異なる添加剤を加えることで水和している水分子の密度に摂動を与える因子となる。水よりも大きい溶質が蛋白質表面から排除され、相対的に蛋白質の表面に水が集まる選択的水和の効果記述されている。X線結晶構造解析および中性子散乱から、水和水は蛋白質から 10 Å 以内の距離に存在しており、40-90 % の水の分布をとらえることが出来ると報告されている。蛋白質の体積は、蛋白質自体の体積と水和の体積変化に概念的に分離でき、添加剤は、蛋白質の体積と水和の体積を変化させる要因となりうるわけである。

### アルギニンの効果

#### 蛋白質構造形成に与える効果

アルギニンが蛋白質に及ぼす安定性の評価を行った報告<sup>3)</sup>がある。アルギニン存在下におけるリゾチームの変性自由エネルギーと変性中間温度は、アルギニン

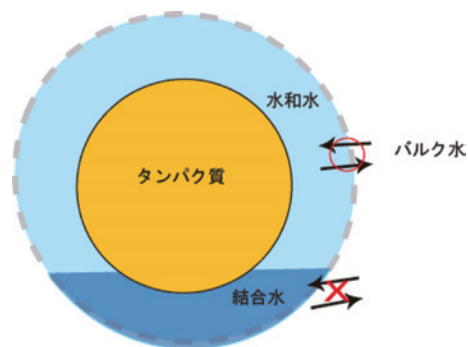


図 1. 結合水と選択的水和の概念図  
 ほとんど解離しない水 (結合水) とバルク、溶質と交換可能な水和水がある。

表 1. 選択的水和と選択的結合

選択的結合	選択的結合⇔選択的水和	選択的水和
シヨ糖 硫酸 グリシン TMAO	塩化マグネシウム アルギニン	塩酸 Guanidinium 尿素

が存在しない場合と差がなく、蛋白質の天然構造の安定化に影響を及ぼさない。このことは、結晶構造解析における温度因子からも裏付けられる。一方で、変性状態蛋白質を仮定したアミノ酸の溶解度においてもアルギニンとグアニジンではほとんど差がない。しかしながら、グアニジンが蛋白質の変性中間温度を大幅に低下させることを考えると、アルギニンは、変性状態と天然状態では蛋白質に対する結合様式が異なることを示唆している。アルギニンの持つ分子構造から、側鎖のグアニジウム基が芳香族アミノ酸と相互作用して蛋白質間の疎水性相互作用を抑制し、アミノ酸が蛋白質の安定に寄与しているという作用機序が考察されている<sup>4)</sup>。

### 水和に与える効果

分子間相互作用は第2ビリアル係数を用いて評価することが多い。第2ビリアル係数とは、ファントホフ式をビリアル展開することで得られる第2項の係数であり、分子サイズと分子間力に起因している。溶媒に添加剤を加えるなど摂動を与えることによって、蛋白質の水和状態が変化する。第2ビリアル係数が正の場合は反発を、負の場合は会合を意味する。塩酸グアニジンを添加することでタンパク質の第2ビリアル係数は減少してゆく。ここに、500mMアルギニンを添加すると、ビリアル係数は正にシフトする。つまり、アルギニンの添加によって、蛋白質の部分モル体積の変化もしくは、蛋白質間の相互作用に影響を及ぼしていることになる<sup>5)</sup>。

X線結晶構造解析から、アルギニンの添加に伴い蛋白質構造は変化せず、対照的に水和水は大幅に変化した<sup>6)</sup>。まず、アルギニン非存在下と比較して低濃度のアルギニン存在下では水分子数が増加した。その後125mMで水分子は減少に転じた後、再び増加し、ア

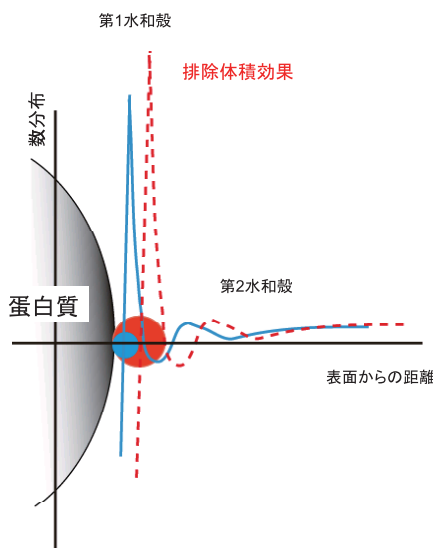


図2. 水和と密度分布関数  
密度分布関数アルギニンは、相反する二つの置換基が存在するため、選択的結合と選択的水和をタンパク質の状態に応じて変化させる。

ルギニン濃度の増加に伴い徐々に減少した(図3)。0~1000mM NaCl存在下で作製されたリゾチームの結晶構造解析を行い、高次構造と水和水を観察したところ、NaCl濃度全域において、リゾチーム構造に変化は認められなかった。NaCl濃度の増加に伴い徐々に水和水は増加したが、アルギニン存在下とは違って、NaClが高濃度になるにつれ水和水の数は変化しなかった。同様に、選択的水和をさせるベタインおよびスクロースの存在下でリゾチーム結晶を作製、結晶構造解析をしたところ、結合した水分子数はベタインが144個、スクロースが173個と大幅に増加した。以上の結果は、アルギニンは蛋白質の水和構造に影響を及ぼすこと、比較的低濃度において選択的水和効果と選択的結合効果があることを示している。

### 表面張力

溶質分子の溶媒和は、溶質分子が占有する空間から溶媒分子を排除する「排除体積効果」と、「溶質-溶媒間相互作用」の2つの寄与で成り立ち、疎水性分子であればあるほど排除体積効果が重要である。水分子間の構造化に起因する指標として表面張力がある。尿素や塩酸グアニジンに代表される変性剤同様に、アルギニンは水の表面張力を上昇させ、界面活性剤とは逆の作用をもつ。界面活性剤は気・液界面に吸着することで水の表面張力を低下させ、気・液界面における濃度が低下するものは、水の表面張力を上昇させる。もし蛋白質・水の界面が気・液界面と同様の性質であれば、表面張力を上昇させる溶質は蛋白質表面との親和性は低いことになる。しかし、蛋白質を変性させる効果からも明らかのように変性剤は蛋白質に選択的に結合する。これは、気・液界面と蛋白質・水の界面は異なっている可能性を示唆している。変性剤やアルギニンの変性能の違いは、その分子が持つ疎水性や親水性の差異が水分子-添加剤と蛋白質-添加剤の相互作用のバランスに起因するために起こるようである。そして、相互作用のバランスは、アルギニンの濃度依存的に変化するようである。

### 枯渇効果

近年、TroutらによってArgの天然構造には影響を及ぼさずに凝集を顕著に抑制する効果が枯渇効果と関連

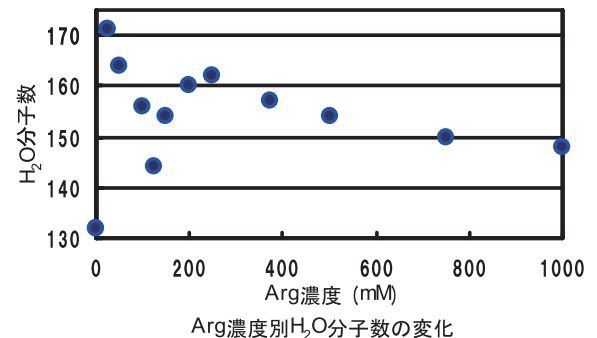


図3. アルギニン存在下における水和水の変化  
アルギニンは濃度によってタンパク質の水和水の数を変化させる。

して理論的に説明され、彼らはこれを **natural crowder** と呼んだ<sup>7)</sup>(図4)。一般に、結晶化剤として代表的な PEGなどの **crowder**の役割は、この枯渇効果で説明される。PEGはその分子サイズによって選択的に水を集め天然構造の蛋白質を安定化する、一方、蛋白質間に生じる排除体積にPEGが入り込めないために、界面に浸透圧が働き会合する。逆に、分子サイズが小さいアルギニンは、天然構造を安定化するほど、蛋白質に水を集めるわけでもなく、また、蛋白質間に生じる排除体積に進入することができるため、浸透圧が発生せず会合を促進しないと考えられている。

#### アルギニンを溶媒に用いたクロマトグラフィー

アルギニンは凝集抑制という形で蛋白質間に働く非特異的な相互作用を抑制するだけでなく、クロマトグラフィーの展開溶媒や溶出溶媒という形で異種の物質間に働く相互作用の抑制にも応用されている<sup>8)</sup>。親和性クロマトグラフィーにおいては、抗体をProtein-Aなどのリガンドから解離させるために、低pHの溶媒を用いて溶出するが、抗体の変性を伴うため、しばしば凝集する。溶出溶媒にアルギニンを添加することでマイルドなpHで抗体が溶出でき、凝集も抑制された。

疎水クロマトグラフィーでは、硫酸アンモニウムなど塩析を起こす塩を展開溶媒に用いることで樹脂担体に蛋白質を吸着させ、溶媒の塩を除くことで蛋白質を溶出させる。このとき、溶出溶液にアルギニンを混合すると、蛋白質の溶出効率が向上する。樹脂担体への吸着が強い蛋白質でも、アルギニンを展開溶媒に混合させることでサイズ排除クロマトグラフィーが利用できるようになった<sup>9)</sup>。また、アルギニンは、樹脂担体によらず蛋白質の非特異吸着を抑制し分解能を向上させた。最近では、金属親和性クロマトグラフィーにおいて、100mMという低濃度のアルギニン溶液は展開溶媒として利用できることも示されている<sup>10)</sup>。アルギニンは蛋白質の可溶化から各種クロマトグラフィーを用いた精製プロセスに至るまで、蛋白質のハンドリングのすべての場面で使用することができる添加剤である。

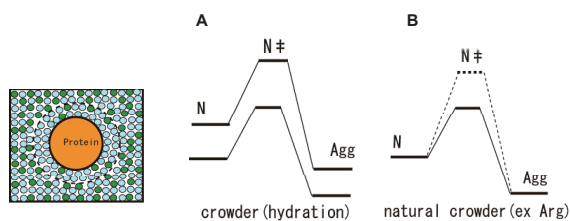


図4. 選択的水和と枯渇効果

選択的水和効果でも排除体積効果の大きさによって効果が異なる (A) 排除体積が大きいクラウダーではタンパク質から排除されることで天然構造を安定化する一方で分子間会合も促進する。(B) アルギニンは排除体積がそれほど大きくなくタンパク質を安定化させず、分子間会合のみを抑制する。

#### 最後に

蛋白質ハンドリングに大きな貢献を果たしつつあるアミノ酸、アルギニンについて、最近の研究成果を中心にまとめた。ペプチドや低分子の凝集抑制にも有効であることが報告されており、今後さらにその利用価値が高まって行くことが期待される。

#### 参考文献

- 1) 荒川力 喜多淑子 生物物理 **2005**, *45*, 4-9.
- 2) Pettitt BM, Makarov VA, Andrews BK. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 218-221.
- 3) Reddy K RC, Lilie H, Rudolph R, Lange C. *Protein Sci.* **2005**, *14*, 929-935.
- 4) Arakawa T, Ejima D, Tsumoto K, Obeyama N, Tanaka Y, Kita Y and Timasheff S.N. *Biophys. Chem.* **2007**, *127*, 1-8.
- 5) Ho JG, Middelberg AP, Ramage P, Kocher HP. *Protein Sci.* **2003**, *12*, 708-716.
- 6) Nakakido M, Tanaka Y, Mitsuohori M, Kudou M, Ejima D, Arakawa T, Tsumoto K. *Biophys. Chem.* **2008**, *137*, 105-109.
- 7) Baynes BM, Trout BL. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 1631-1639.
- 8) Arakawa T, Tsumoto K, Nagase K, Ejima D. *Protein. Expr. Purif.* **2007**, *54*, 110-116. Epub.
- 9) Tsumoto K, Ejima D, Senczuk A.M, Kita Y and Arakawa T. *J. Pharmaceut. Sci.* **2007**, *96*, 1677-1690.
- 10) Abe R, Kudou M, Tanaka Y, Arakawa T, Tsumoto K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *381*, 306-310.

くどう もとのり  
 m-kudou@k.u-tokyo.ac.jp  
 つもと こうへい  
 tsumoto@k.u-tokyo.ac.jp  
 東京大学大学院新領域創成科学研究科  
 メディカルゲノム専攻

#### スイス・ジュネーブ大学での留学生活

現在、スイスのジュネーブに留学中の武内と申します。昨年の3月に二木史朗教授(京大化研)のもとで学位をいただいたのち、ジュネーブ大学化学科のステファン・マティール教授の研究室で博士研究員として働いています。この度、東京医科歯科大学生体材料工学研究所玉村啓和先生より執筆の機会を頂き、留学途中ではありますが、留学体験記を書くこととなりました。本稿では、スイスとジュネーブでの楽しい生活について紹介したあと、マティール研での研究について少し触れてみようと思います。



武内 敏秀

#### 1. スイスについて

スイスはヨーロッパのほぼ中央に位置し、北はドイツ、東はオーストリアとリヒテンシュタイン、南はイタリア、そして西はフランスに国境を接する、日本の九州と同程度の面積の小さな国です。国土のほとんど

がアルプス山脈をはじめとした険しい山々に覆われており、山間部のごく限られたエリアに小さな町が展開しています。地域によって主要言語が異なり、大きく分けてフランス国境に近い西部地域でフランス語、南部から南東部にかけての一部地域でイタリア語とロマンシュ語、あとはほとんどドイツ語というふうになっています。このような地理的、言語的な特徴と、周辺国家の歴史的な影響を受け、それぞれの地方で独自の文化を発展させており、同じスイス国内でありながら、各都市で雰囲気が随分異なります。なかでもフランス語圏（おおらか、超適当）とドイツ語圏（真面目、しっかりしている）の雰囲気の違いには、「本当に同じ国か？」とびっくりさせられます。EUには加盟しておらず、したがって通貨はユーロではなく、スイスフランが使われています。去年は大体1フラン=約100円でしたが、最近は円高傾向で80~90円程度となっています。ちなみに首都はベルン（世界遺産の街）です。

スイスといえば、チョコやチーズ（フォンデュ）、時計などが有名ですが、実際のところ、他には特にありませんし、イタリアやフランスのような豪華な文化遺産もありません。壮大な歴史建築を期待して旅行するとがっかりさせられると思います。ただ、山並みや湖、氷河地形などの美しさは格別で、たとえば都市間を結ぶ列車に乗ればまさにハイジにあるような大自然を車窓に眺めたり、マッターホルンを横に見ながらスキーをしたりと、豊かな自然遺産を存分に楽しむことができます。また数多く運行している登山列車を利用



サンピエール大聖堂から眺めるジュネーブ市街とレマン湖



マッターホルン

すれば、直接3000~4000m地点（富士山と同じくらいの標高）にある展望台まで簡単にアクセスでき、老若男女を問わず、連日多くの観光客が訪れています。

## 2. ジュネーブについて

ジュネーブはスイス西部、フランスとの国境に程近いレマン湖の南西岸に位置する都市で、人口20万人ほどのスイス第二の都市です。国連ヨーロッパ本部をはじめとする国連の諸機関や世界保健機関（WHO）など数多くの国際機関が立ち並び、世界各国から多様な人種が集まる国際都市としても知られています。また、プライベートバンク（いわゆるスイス銀行）の本店が集中していることも有名です。『社会契約論』で知られるルソーもここジュネーブの出身らしく、確かにルソーの像がルソー島なる島にありました。以下、各項目についてジュネーブを簡単に紹介したいと思います。

**言語**…公用語はフランス語ですが、英語を話せる人も多く、フランス語が分からなくても一応生きていけます。ただし、役所や大学から来る書類はほとんどフランス語表記のもので、ドイツ語やイタリア語併記のものたまにありますが、結局わかりません。

**治安**…他のヨーロッパ諸国と比較すると、かなり安全なほうだと思います。しかし、私も含めてスリの未遂に遭ったラボのメンバーも複数いることから、海外における常識レベルの防犯意識は必要ようです。

**物価**…スイスは物価が高いことで有名ですが、実際、特に日用品や食料品は高く、日本と比較しておおよそ2倍程度（もちろん物によりますが、マクドナルドのセットメニューなら10~15フラン程度）、普通のレストランでの食事は1.5倍程度と、最初はその値段に驚きます。ただ、慣れれば案外普通になります。

**食事**…基本的に食材は乏しい（特に野菜、魚）ですが、パン、チーズ、ワイン、チョコに関しては安く手に入る割に日本のものよりもずっとおいしいです。ちなみに日本食を扱うお店もあり、ある程度は日本食を手に入れることも可能（値段は2~3倍から）。

**アパート事情**…慢性的にアパートが不足しており、空き物件を見つけることは非常に困難です。私の場合、まあ何とかなるだろうと考え、小さなシングルルームに滞在しながら不動産屋やインターネットで探しましたが、希望の物件には全く巡り合えず、ジュネーブの厳しい現実を身をもって知りました。結局最初から入っていたwaiting listにより、5ヶ月後ようやく目的のアパートを得ました。ジュネーブに留学を考えている方は、受け入れ先のラボにアパート確保をあらかじめお願いしたほうがよいと思われます。

**町の様子**…人々の生活は、とてもものんびりとしており、非常に人生を楽しんでいるように思います。平日の昼間からオープンカフェでワイン片手に盛り上がりだしたり、週末になると、何万人もの人がレマン湖沿いにぼーっと座ったり、散歩したりして

おり、日本と違って時間がゆっくり流れているのを実感できます。その反面、役所仕事や改修工事、機械の修理などはすさまじく遅く（かつ適当）、例えばエバポレータのポンプが壊れて修理に出したら半年も帰って来なかったということもありました。

**他都市へのアクセス**…中央駅であるコルナヴァン駅には、国内の急行列車だけでなく、TGVなどの国際特急列車も停車するため、国内外の様々な都市に手軽にアクセスできます。国内ではチューリッヒ、バーゼルまで3時間、国外ではパリまで3時間半、ミラノまで4時間程度で到着できます。ジュネーブ郊外にある空港から飛行機を利用すればヨーロッパ各国に2~3時間以内で到着でき、立地的には非常に恵まれた場所にあると言えます。ちなみに世界中の自動車メーカーの新型車やコンセプトカーが集うジュネーブモーターショーは、先日（3月上旬）ジュネーブ空港の隣にある会場で行われました。

### 3. ジュネーブ大学とマティール研究室について

ジュネーブ大学は、宗教改革の指導者として知られるカルヴァンにより、1559年に創立された大学で、ジュネーブ駅からバスで10分程度、アルプ川のほとりの閑静なエリアにあります。ヨーロッパでもトップクラスの研究大学のひとつに数えられ、2006年のニューズウィーク誌において世界の大学の32位にランクされています。今年ちょうど創立450周年にあたり、現在様々な記念事業が行われているようです。私が所属するマティール研は、理系学部、特に化学系や薬学系の研究室が集まるScience IIビルの中にあります。メンバーは、マティール教授を筆頭に、講師や秘書、ラボアシスタントのほか、ポスドクが8人、Ph.Dコースの学生が4人となっており、これに加え修士課程の学生がちょくちょく出入りしています。ポスドクの入れ替わりは比較的激しく、長くても2年程度で出ていきます。メンバーは主にヨーロッパ諸国を中心にインド、オーストラリアなど、世界各国から集まっています。基本的に会話は英語ですが、ほぼ全員が英語を母国語としないため、訛りがひどくて聞き取りづらい時もありますが、逆に私のように未だに英語が満足に話せない者に対しても優しく対応してくれます。



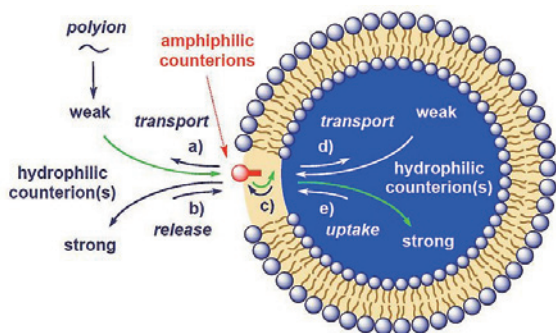
マティール研メンバーの一部

現在マティール研では、zipper assemblyあるいはself assemblyによる新たな有機太陽電池の開発<sup>1)</sup>やanion- $\pi$  slidesによる合成イオンチャネルの創出<sup>2)</sup>、バイオセンサーの開発<sup>3)</sup>などが行われています。もともとマティール研では機能性rigid rodの合成とその応用研究が主流でしたが、近年、化石燃料に代わる代替エネルギーに対する関心が、ここヨーロッパでも非常に高まっていることもあり、現在はrigid rodで培われた豊富な経験を有機太陽電池の開発に応用し、精力的にプロジェクトが進められています。

私は京都大学大学院在学中、マティール教授との共同研究として、カウンターイオンを用いてオリゴアルギニンを哺乳類細胞の細胞質に直接導入する手法の開発に関わっており、その縁からポスドクとして在籍させていただくことになりました。以下では大学時代から現在のマティール研に至る研究の流れについてほんの少しだけ述べさせていただきます。

### 4. マティール研での研究内容

細胞透過性ペプチドとして知られるオリゴアルギニンは、細胞内に効率よく取り込まれることから薬物キャリアとしての応用が期待されていますが、その多くがエンドソーム内にとどまってしまうことが一つの大きな問題と言えます。以前、私たちが開発した手法は、ポリカチオンであるオリゴアルギニンを、高い疎水性を持ったカウンターアニオンと同時に投与し、アルギニンの正電荷をマスクし、なおかつ疎水性を上げることで直接細胞膜を透過させて細胞質に移行させようというものでした。実際、オリゴアルギニンとしてオクタアルギニン[(Arg)<sub>8</sub>]、カウンターアニオンとしてpyrenebutyrateを用いると、数分で(Arg)<sub>8</sub>が細胞内に移行し細胞質全体に拡散することが分かりました<sup>4a)</sup>。アルギニン側鎖グアニジノカチオンは酸性度が非常に低く(pKa ~ 12.5)、生理的条件下では正電荷を帯びていますが、これがポリマーとなったオリゴアルギニンでは隣接する側鎖間の静電反発を避ける必要から、常にカウンターアニオンを受け入れ、交換していると考えられます<sup>4c)</sup>。系中に添加するカウンターアニオンの疎水性度の違いにより、オリゴアルギニンは水系バッファーにもCHCl<sub>3</sub>にも溶けることが分かっています<sup>4b)</sup>、私たちはこれをdynamic biphilicityと呼んでいます。つまりオリゴアルギニンは、カウンターアニオンを親水性のものから両親媒性のものへと交換することで、疎水的環境への移行を達成していると考えられるわけです。逆に、両親媒性のカウンターアニオンから親水性のものへと交換することで疎水的環境から親水的環境に戻る、すなわちカウンターアニオンを考慮に入れることで、オリゴアルギニンの膜透過現象が説明できるのではないかと考えています。また、上記のコンセプトにおけるすべての電荷を逆にした、カウンターカチオン依存的なポリアニオンのbiphilicityについても同様の性質が観測されたことから、ポリイオンがカウンターイオンを交換することでbiphilicityを獲得し、膜を透過する統合モデルを提唱しています（下図、投稿中）。



カウンターイオン依存的なポリイオン膜透過の統合モデル

## 5. おわりに

今回、このような形で発表の機会を与えて頂きました編集委員の先生方に感謝しています。留学を終え、日本に帰国した際には、改めてペプチド学会の皆様にお世話になると思いますが、その際にはどうぞよろしく申し上げます。現在進行中の研究についてあまり詳しく述べる事ができないことが残念ですが、今後日本に帰国した際に発表させていただきます。

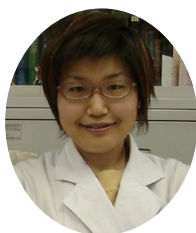
## 参考文献

- (1) (a) Sisson, A. L., *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3727-3729. (b) Sakai, N. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15758-15759. (c) Bhosale, S. *et al. Science* **2006**, *313*, 84-86.
- (2) (a) Perez-Velasco, A. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 921-923. (b) Gorteau, V. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14788-14789.
- (3) (a) Butterfield, S. M. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 325-328. (b) Hennig, A. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10338-10344. (c) Hagihara, S. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5656-5657. (d) Litvinchuk, S. *et al. Nat. Mater.* **2007**, *6*, 576-580.
- (4) (a) Takeuchi, T. *et al. ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 299-303. (b) Nishihara, M. *et al. Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1659-1669. (c) Sakai, N. and Matile, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14348-14356.

たけうち としひで  
Department of Organic Chemistry  
University of Geneva  
toshihide.takeuchi@unige.ch

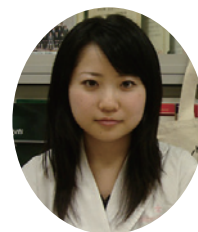
## 研究室紹介 “分子認識分野” から “メディシナルケミストリー分野” へ

東京医科歯科大学学生体材料工学研究所玉村研究室は、早いもので研究室が発足して4年になり、学生も博士課程新二年生まで埋まり、テーマもいくつか立ち上がりましたので、このあたりで私達学生の立場から研究室の紹介をしたいと思います。東



大橋 南美

京医科歯科大学は都心の真ん中、御茶ノ水駅から徒歩2分のところにあり、東京駅から一番近い国立大学という（JRで4分）のも売りの一つとしています。地の利の良さもあり、沢山の人が集まって来やすい環境です。このようにとても便利な場所にある玉村研は新年度4月に



増田 朱美

には、堤助教、野村助教以下、研究員 = 3名、事務員 = 1名、D2 = 3名、D1 = 1名、M2 = 9名、M1 = 6名、研究生 = 1名、B4 = 5名の総勢32名の構成メンバーになります。大学院のコースは、医学系と生命科学系があります。修士課程、博士課程も充実しており、大学院大学のようになっています。4年生（B4）のほとんどは、近隣の他大学から卒研生として配属されて来ます。研究テーマは、「化学から生物へ」を合い言葉にケミカルバイオロジーという幅広い分野にわたっています。大学院生、4年生とも、もともと出身大学で有機化学をやっていたひと、あるいは、生物化学をやっていたひとが、その境界領域に挑戦したいという理由で玉村研にやってくる場合が多く、最近では創薬化学研究をやりたいというひとも多くなっています。そういった傾向から、研究室名が従来の“分子認識分野”から“メディシナルケミストリー分野”へ改名しました。テーマは多岐にわたっており、合成、構造解析、分子生物学を基礎として、ペプチド、蛋白質、遺伝子、バイオミメティックを扱い、種々の疾患治療を目指した研究をしています。このような研究室で、私達は解放的に雰囲気良く、日々の研究室生活をおくっています。

以下は、私達、大橋南美（D2）と増田朱美（M2）の二人が研究室について語った会話です。

**増田**「南美さんは玉村研の最初の学生ですよ。新しい研究室に行くのには抵抗などはなかったのですか？」

**大橋**「うん。特に不安はなかったよ。ホームページの集合写真も雰囲気が良さそうだったし。ところで、増田さんは何故、玉村研に来たいと思ったの？」

**増田**「私はエイズの研究をしたかったので、それが出来る研究室を色々探しているうちに、玉村研を見つけたんです。」

**大橋**「確かに、玉村研はとくにエイズに力を入れているものね。もともと玉村先生が京大にいたときから、コレセプター CXCR4 の阻害剤の研究をされていたようだし。今では、CD4 mimic やインテグラーゼ阻害剤、そして他の作用点の阻害剤など、多くのテーマが動いているよね。」

**増田**「厚生労働省のプロジェクトでエイズワクチンもやっていますよね。ここで取り組んでいるワクチンの研究は、これまでには研究されていなかったところで、概念を全く切り換えて取り組んでいますよね。」

**大橋**「増田さんは、玉村研で一番最近にはじまった、遺伝子治療につながる研究をしているんだよね。これも別の厚生労働省のプロジェクトだけど、どんな感じ？」

**増田**「うまくいけばすごいテーマですし、やりがいも

あります。わたしは、もともと大学で分子生物学をやっていましたし、合っているのかなと思います。日々の実験は成功ばかりではないけれど、少しずつデータも出てきているので、それが励みになっています。最近、この遺伝子治療のテーマをやりたくて入ってくる学生も多いみたいです。南美さんの方はどうですか？」

**大橋**「わたしは、蛋白質リン酸化酵素PKCの研究をしているのだけど、このテーマは玉村先生がNIHのNational Cancer Instituteで留学中にやっていたことを、さらに展開したものなんだ。玉村先生は、留学当時、PKCの人工設計リガンドの合成をされていたのだけど、私はPKCのリガンド結合ドメインの化学合成と大腸菌による発現などをしていて、具体的には、リガンド結合の評価への応用を目指して、リガンド結合部位近傍に環境応答性の蛍光色素を導入した、蛍光性誘導体を合成してきたんだ。この誘導体を使えば、リガンドの結合を蛍光の波長と強度変化で評価できるから、うまく系が出来上がれば、玉村研で合成した化合物の活性を簡単に調べられるようになるんだ。もちろん、比較実験のために既存のRIを使ったアッセイ法も既に立ち上げているから、両方の利点を上手に生かして、より有用なリガンドの合成につなげられたら、と思うよ。」

**増田**「蛍光性のPKCのドメインはRIを使わなくていいし、high throughput screeningにも利用できそうですね。バイオセンサーへの応用などは考えているんですか？」

**大橋**「増田さん、いいところ突くね。もともとは、大学が文科省特別教育研究経費として5年間のプロジェクトで始まった“ケミカルバイオロジー研究基盤創出事業”の一環で設立したスクリーニングセンターで使用するつもりだったんだ。また、ケミカルバイオロジーの中のバイオセンシングの研究領域も、同じく特別教育研究経費の5年間のプロジェクトの“センシングバイオロジー事業”として、昨年からはスタートしたみたいだよ。」

**増田**「ケミカルバイオロジー”や“センシングバイオロジー”、勢いがあっていいですね。でも、それに関わる玉村先生は大変そうですね。よく文科省とかも行っていますし。ところで、南美さん、NIHへ短期留学してRIのアッセイ法を習得してきたんですね。英語への抵抗はなかったんですか？」

**大橋**「なかったと言ったら嘘になるかな。でも、その前年にオーストラリアで開催された4th International Peptide Symposium (4<sup>th</sup> IPS)に参加させてもらっていたから、大きな不安はなかったよ。もちろん、英語は全然話せなかったから、最初はコミュニケーションが上手くとれなかったけどね。」

**増田**「IPSって何ですか？藤井先生がペプチド討論会の懇親会でお話されていた山中先生のですか？」

**大橋**「それは、induced pluripotent stem cells (iPS)の方だよ。IPSについては、これまで開催されてきたシンポジウムを振り返りながら、その成り

立ちから2010年に京都で開催予定の5<sup>th</sup> IPSの紹介まで、次回のpeptide news letterで特集が組まれるみたいだし、楽しみだな。」

**増田**「そうですね。とても楽しみです。ところで、南美さんはどうしてドクター進学を決意されたのですか？」

**大橋**「実験をもっとやりたかったし、国内外での色々な学会に参加したりそこで発表もしたかったしね。将来の不安もあったけれど、それより今やりたいことをやりたいと思ったのかな。増田さんもドクターコースに行くよね。せっかくの機会だから、理由とか聞きたいな。もしかして、玉村先生に強く勧められたからとか。。。」

**増田**「いいえ、玉村先生は学生たち自身の好きなようにすればよいという感じでした。私は、「若手ペプチド夏の勉強会」に参加して、他大学の先生のお話を聞いたり、学生のひとたちと話すうちに、大学で研究を続けることに興味を持ちました。そして、日々の実験を積み重ねることで、次につながるような発展性のあることをしたくて、ドクターに進むことを決めました。」

**大橋**「私もM1の時に若手勉強会に参加させてもらったけど、皆、モチベーションが高くて、自分も負けてられないなと思ったよ。」

**増田**「そうですね、これからも活気のある学会や討論会などに参加し、そして発表しながら知識を広め、日々の実験に生かし、結果につなげていきたいです。」

**大橋**「うん、お互い頑張ろう！」



この会話から、玉村研の雰囲気伝わったでしょうか？玉村研では、私達のように、大学の学部生のときは全く別の研究をしていた人が、大学院からやってきて修士論文の研究をし、ドクターコースにも進もうという人が少なくありません。さらに、玉村研では、国際学会や短期留学を推奨しています。実際、今年も9月にM2の橋本さんがドイツへ留学します。研究室へ時々著名な先生方(外国人を含め)をお呼びして、講演や議論が行なわれることがあったり、また多くの研究者の方とお話する機会にも恵まれているため、大変



良い刺激になります。また、他大学の学生の方々と交流を深めるなどして、研究室外でも仲間をたくさんつくっています。これまで、私たちの経験を踏まえて玉村研の紹介をさせていただきましたが、この記事をお読みになっている皆様は、どのような印象を抱かれたでしょうか？百聞は一見に如かず、お近くに来られたときには、是非、玉村研究室へお立ち寄りいただければと思います。

“東京駅から4分”です。

おおし なみ  
ますだ あけみ  
東京医科歯科大学 生体材料工学研究所  
機能分子研究部門  
メディシナルケミストリー分野  
<http://www.tmd.ac.jp/i-mde/www/molb/molb-j.html>

#### PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

編集・発行：日本ペプチド学会  
〒562-8686 箕面市稲4-1-2  
(株)千里インターナショナル内

#### 編集委員

野水 基義 (担当理事)  
(東京薬科大学薬学部)  
TEL・FAX 042-676-5662  
e-mail: nomizu@ps.toyaku.ac.jp  
坂本 寛 (九州工業大学大学院情報工学研究院)  
TEL 0948-29-7815, FAX 0948-29-7801  
e-mail: sakakan@bio.kyutech.ac.jp  
玉村 啓和 (東京医科歯科大学生体材料工学研究所)  
TEL 03-5280-8036, FAX 03-5280-8039  
e-mail: tamamura.mr@tmd.ac.jp  
松島 綾美 (九州大学大学院理学研究院)  
TEL 092-642-4353, FAX 092-642-2607  
e-mail: ayami@chem.kyushu-univ.jp  
北條 裕信 (東海大学工学部)  
TEL 0463-58-1211 (代), FAX 0463-50-2075  
e-mail: hojo@keyaki.cc.u-tokai.ac.jp

(本号編集担当：玉村 啓和)