



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.86

2012年10月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<http://peptide-soc.jp>

鹿児島での第49回ペプチド討論会の開催にむけて

本年は11月7日から9日までの3日間、第49回ペプチド討論会をかごしま県民交流センターを会場にして開催します。鹿児島大学は9学部を有していますので、当大学の中で本研究領域に係っておられる研究者11名にお願いして、組織委員会を立ち上げ、お世話していただいています。私の研究室が中心に動いていますので、事務局を当学科におき、理学系の伊東祐二教授にはプログラム委員長として実働してもらっています。

本年も例年とはほぼ同数の発表演題が集まりました。口頭発表が54、ポスター発表が124です。口頭発表のうち32がyoung investigator 賞候補の演題、ポスター発表の71がポスター賞候補の演題であることから、若



杉村 和久

い研究者が活発に参加されているのが分ります。若い研究者に口頭発表の機会をできるだけ提供しようと考え、プログラム編成で可能な限り組み込む事にしました。そのため、例年より、夕方の終了時間も若干遅くなり、2日目と3日目は15分朝早く開始することになりました。若い研究者向けのプログラム編成です。これもペプチド学会の将来を考えのことでご理解ください。活発な皆様のご協力をお願い致します。

本年度の赤堀賞がミュンヘン工科大学のHorst Kessler 教授に決定しました。その記念講演を1日目に予定しています。今頂いている仮題は“Molecular Imaging by Peptides and Peptidomimetics”です。また、例年とは異なって、総会は1日目に開催致します。2日目に招待講演を2題と懇親会、3日目に招待講演と奨励賞講演2題を予定しています。韓国ペプチド学会から推薦していただいたDr. Bang Jeong-Kyu (Korea Basic Science Institute) とDr. Park Yoonkyung (Chosun University) のお二人、それとインドペプチド学会の理事をされていますDr. Gautam Basu (Bose Institute) が招待講演者として参加されます。日本ペプチド学会奨励賞は尾上 誠良先生 (静岡県立大学 薬学部) と重永 章先生 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 (薬学系) が受賞されました。

鹿児島は江戸から明治への近代日本の胎動期に多くの傑出した人物を輩出した土地です。英国艦隊に砲弾を放った島津家や幕末の篤姫などの土地でもあります。噴火する桜島のエネルギーも、参加される皆さんに新鮮な影響を与えることと思います。ペプチド討論会は当初はペプチド化学から出発したと思いますが、現在はペプチド科学として生命科学全体に大きい影響を与えています。私自身は免疫学をやってきた研究者であり、そのような者が、本シンポジウムのお世話をする時代になっていますので、これからを担う若い研究者の皆さんには更に一層大きく羽ばたいて新しいペプチド科学の世界を切り開いて行って頂きたいと思います。

11月10日の土曜日は鹿児島大学の稲盛会館で市民フォーラム2012「私たちの体と健康を支えるアミノ酸とペプチド」を開催します。会長の下東康幸先生に口火を切って頂きます。京セラの創立者で、JALの復活で最近話題を提供されている稲盛和夫氏は当大学工学部出身で、この会館を寄付されました。安藤忠雄氏の設計でもあり、建物自身も一見の価値があるかもしれません。

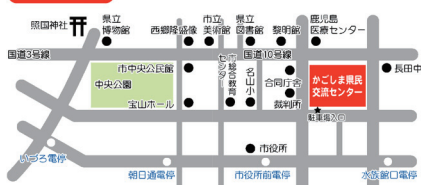
最後に、第49回ペプチド討論会を開催するにあたり、多くの企業、財団から賛助金、広告、企業展示等

第49回 ペプチド討論会
49th Japanese Peptide Symposium

会期 2012.11.7 (水) ~9 (金)
会場 かごしま県民交流センター
〒892-0816 鹿児島市山下町14番50号
世話人 杉村 和久
(鹿児島大学理工学研究科・分子生物学)
ホームページ <http://www.peptide-soc.jp/jps49/index.html>

主催 日本ペプチド学会
共催 日本化学会・日本薬学会・日本農芸化学会・日本生化学会

会場周辺地図



第49回 ペプチド討論会事務局

鹿児島大学大学院理工学研究科 化学生命・化学工学専攻
〒890-0065 鹿児島市都立1丁目21-40 FAX 099-258-4706 E-mail jps49@ipc.kagoshima-u.ac.jp

市民フォーラム 2012 ～私たちの体と健康を支えるアミノ酸・ペプチド～



日時 平成24年11月10日(土) 13:00～16:30
会場 鹿児島大学都元キャンパス内 稲盛会館

参加費
無料
ホームページから
事前登録が必要

プログラム	1	13:00～13:30	「挨拶・ペプチドって、何だるう？」 (ペプチド学会会長、九州大学理学部・教授 下東 康幸)
	2	13:30～14:00	「メイドインジャパンのペプチド医薬品」 (鹿児島大学大学院 医学部総合研究科・教授 菅田 龍郎)
	3	14:00～14:30	「ヒトの食欲を制御するペプチド」 (鹿児島大学大学院 医学部総合研究科・教授 乾 明夫)
		14:30～14:50	休憩 (20分)
	4	14:50～15:20	「食品中のアミノ酸とペプチド」 (鹿児島大学大学院 連合農学研究科・教授 杉元 康志)
	5	15:20～15:50	「運動時における分岐鎖アミノ酸及びタンパク質の摂取効果」 (大塚製薬佐賀研究所 早瀬 秀樹)
	6	15:50～16:20	「乳ペプチドの機能とその利用」 (森永乳業(株) 栄養科学研究所 若手 洋)
	7	16:20～16:30	終わりの挨拶 (鹿児島大学大学院 理工学研究科・教授 杉村 和久)

主催：日本ペプチド学会 後援：鹿児島大学 / 鹿児島県教育委員会 / 鹿児島市教育委員会
●お問い合わせ先 鹿児島大学 都元キャンパス内 稲盛会館 第49階ペプチド研究会事務局 市民フォーラム実行委員会
〒890-0065 鹿児島市都元1丁目21-35 TEL/FAX 099-285-8110
●ホームページ URL <http://www.sci.kagoshima-u.ac.jp/yito/CF2012/subscription.html>

でご支援いただきました。また、昨年度の札幌の大会をお世話された北大の坂口和靖先生には、いろいろご助言を頂きました。御礼申し上げます。また、準備と運営にご高配いただきました組織委員会の皆様、実働メンバーとしてご尽力いただいた橋口周平、有馬一成、橋本雅仁先生と事務局の永田順子さんに心より御礼申し上げます。

新幹線で鹿児島へアクセスできるようになりました。実はそれが理由の軽い気持ちでお引き受けした学会ですが、実り豊かな会議になってほしいと願っております。

すぎむら かずひさ
鹿児島大学大学院・理工学研究科
kazu@be.kagoshima-u.ac.jp

バナジウム結合蛋白質 Vanabinの構造と機能

1. はじめに

遷移金属イオンは酵素反応、酸化還元反応、電子伝達、転写調節、呼吸といった多くの生理機能において必要とされる因子である。そのため生物は環境中に存在する遷移金属元素を選択的に体内に取り込み、かつ過剰の遷移金属を排出することで体内の遷移金属量を一定に保っている。一般的に生物の体内における遷移金属元素の量



植木 龍也

は低く保たれているが、生物の中には極端に高い濃度で遷移金属を蓄積する「ハイパーアキュムレーター」と呼ばれるものがある。その典型が海産無脊椎動物ホヤ類である¹⁾。ホヤ類は海水中に35nMの濃度で溶存する五価バナジウムを取り込み、三価に還元した状態で最大で1000万倍に相当する350mMの濃度にまで濃縮する特異な生理機能をもつ。筆者らのグループはホヤにおけるバナジウム濃縮のメカニズムとその生理的役割を明らかにするために、この特異な現象に関与するタンパク質・遺伝子の同定を精力的に進めてきた。本稿では、ホヤによるバナジウム濃縮の概要を説明した後、ホヤにユニークなバナジウム結合タンパク質 Vanabinの発見とその構造・機能解析の現状について紹介する。

2. ホヤとは？

ホヤは世界中の比較的浅い海で、岩などに付着して生活している動物である。東北地方では「ホヤ貝」という名前で珍味として売られているが、実は我々ヒトと同じ「脊索動物」というグループに属する高等な生き物である。日本で良く知られているのは食用になるマボヤ *Halocynthia roretzi* とアカボヤ *Halocynthia aurantium* の2種類だが、世界中には約3000種類ものホヤが棲んでいる。脊索動物というのは、一生の間の少なくとも一時期に「脊索」という器官を持つグループであり、脊椎動物もそのグループに属する。ホヤ類は、卵から発生して孵化するとオタマジャクシ型の幼生になり、1～2日間遊泳生活を行う。この頃のホヤの体内には脊索があり、体の基本構造が脊椎動物と非常によく似ている。しかしその後、ホヤは海底の岩などに付着し、尻尾を吸収して変態する。成体の体は脊椎動物とはかなりかけ離れたもので、一生動くことなく固着生活を送る(図1)。

進化的に重要な位置を占めるホヤは、発生や免疫等の研究材料としても優れている。特にコスモポリタンな種であるカタユウレイボヤ *Ciona intestinalis* は動物として7番目にゲノム配列が決定された種であり、初期発生における遺伝子発現調節をはじめとした脊索動物に共通する分子機構に関する多くの知見が得られている。詳しくは佐藤ゆたか(京都大学)らの総説を参考にされたい^{2,3)}。

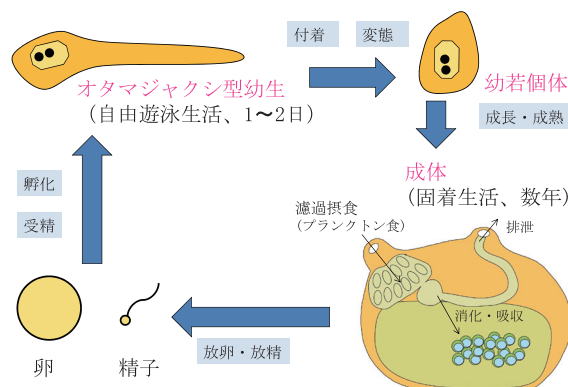


図1 ホヤの生活史。

3. ホヤによるバナジウム濃縮の発見

19世紀末から20世紀初頭にかけて分析化学が発展し、生体内の金属の定性・定量分析が可能になった。ドイツ人の化学者マーチン・ヘンツェ博士はその先駆者の一人で、定性系統分析法を用いて地中海に棲む様々な海洋生物に含まれる金属を調べた。その結果、ある種のホヤ *Phallusia mammillata* がバナジウムを特に高度に蓄積していることを発見した¹⁾。ヘンツェ博士の発見以後、多くの生物学者や化学者がこの現象に興味を持って研究を続けてきた。初期の研究は世界各地に生息するホヤ類のバナジウム含有量を定量することから始まり、やがて、バナジウムを濃縮する部位の特定、バナジウムの存在様式の分析、濃縮メカニズムの解明へと進んでいった。

1980年代、道端らによって日本各地および世界各地のホヤに含まれるバナジウムなどの金属の量が定量的に調べられた。当時主流だったのは原子炉で発生した中性子を試料に照射して生成した放射能の強度を測定し、試料中の元素を定量する「放射化分析法」であった。マボヤやアカボヤにはほとんどバナジウムは蓄積されておらず、腸性目というグループのホヤにおいて特に多くのバナジウムが含まれていることが明らかになった(表1)^{4,5)}。実はわれわれヒトも海水中の濃度を基準として約10倍のバナジウムを組織中に蓄積している。それに対して、腸性目のホヤは10万倍から1000万倍もの濃度のバナジウムを蓄積している。もっとも高度に濃縮しているのは日本産のバナジウムボヤ *Ascidia gemmata* である(図2)。では、バナジウムはホヤの体内のどこに存在するのか。器官ごとに定量した結果、筋肉や鰓といった器官に比べて圧倒的に多くのバナジウムが血球に含まれていることがわかった。

形態的に約10種類に区別される血球のうち、バナジウムを高度に蓄積するのは「シグネットリング細胞(SRC)」という細胞であることを、放射光を用いたX線顕微鏡による分析で筆者らが証明した⁷⁾。SRCはバナジウム濃縮に特化した細胞で、バナジウムを含む巨大な液胞が細胞の大部分を占めるため核や細胞質は周辺部にあり、顕微鏡で見ると指輪状をしていることからその名前が付いた。これ以外の、例えばモルーラ細胞やコンパートメント細胞、ジャイアント細胞、色素細胞にはバナジウムは蓄積されていない。

表1 主なホヤの組織ごとのバナジウム含有量 (mM)^{4,6)}

目	種	被囊	筋肉	鰓	血漿	血球*
腸性目	バナジウムボヤ	-	-	-	-	350
	ナツメボヤ	2.4	11.2	12.9	1.0	60
	スジキレボヤ	0.06	0.7	1.4	0.05	38
	カタユウレイボヤ	0.003	0.7	0.7	0.008	0.6
壁性目	シロボヤ	0.005	0.001	0.001	0.003	0.007
	マボヤ	0.01	0.001	0.004	0.001	0.007
	アカボヤ	0.002	0.002	0.002	-	0.004

* スジキレボヤは、ジャイアント細胞を除いた血球分画におけるバナジウム濃度である。それ以外のホヤは全血球のバナジウム濃度である。

バナジウム(V)は原子番号23番の遷移金属元素である。バナジウムは-3から+5の酸化数を取り得る元素で、生理的条件下では+3～+5の3つの化学種が意義をもつ(以後、 V^{III} ～ V^V と表記する)。 V^{IV} はインスリン様の薬理作用を示すことから糖尿病治療薬としての研究が進んでおり⁸⁾、血しょう中ではトランスフェリンやアルブミンによって運ばれることが分かっている⁹⁾。動物以外では、 V^V が窒素固定細菌のニトロゲナーゼや藻類のハロペルオキシダーゼの酵素活性中心となっていることが知られている¹⁰⁾。高等動物においてはラットやニワトリで実験的にその必須性が証明されているが、本来の生理作用は明らかではない。

4. バナジウム結合タンパク質 Vanabinの発見

海水中のバナジウムは五価の陰イオン(HVO_4^{2-} または $H_2VO_4^-$; V^V)として存在する。ホヤは鰓や消化管から V^V を吸収し、最終的にはSRCの液胞の中に蓄積する。液胞中ではバナジウムは三価に還元された状態(V^{3+} ; V^{III})であり、同時に高濃度のプロトンと硫酸イオンが蓄積されている⁵⁾。 V^{III} は強酸性の還元状態でしか安定ではないので、理にかなっていない。体腔液中に五価の状態で存在しているバナジウムが陰イオン輸送体によってシグネットリング細胞に取り込まれ、四価に還元された後に液胞に入り、液胞中で三価に還元されるというモデルが化学的にもっとも有力である。

そのメカニズムを明らかにするために、筆者らはスジキレボヤ *Ascidia sydneiensis samea* を主たる研究材料として、バナジウム濃縮に関わる遺伝子やタンパク質を次々と同定し、その解析を進めてきた。これまでに細胞質・血しょうに局在するバナジウム結合タンパク質としてVanabinやVanabin-binding protein (VBP)-129, Glutathione-S-transferase (GST), 細胞膜・液胞膜に存在する膜輸送体であるPit-1やNramp, SUL-1, V-ATPase, 還元物質であるNADPHの合成系やGSH代謝系に関わる酵素群等の関与を明らかにした¹¹⁻¹²⁾。

これらのタンパク質の中でVanabinは、最初、スジキレボヤ血球の抽出物からバナジウムと挙動をともにするタンパク質として同定された¹³⁾。その後、金属キレートカラムやEST解析によってスジキレボヤには少なくとも5種類のVanabinがあることがわかった(表2)。一方、カタユウレイボヤの全ゲノム解析データから、ゲノム中の約8 kbpの領域に5個のVanabin



図2 バナジウムボヤ。成体、約5 cm。

がタンデムに重複していることを見出した¹⁶⁾。またバナジウムボヤでは、筆者らによるEST解析によって少なくとも2個のVanabin遺伝子が存在することを見出した¹⁷⁾。その他の生物については公共データベースを検索した限りでは、ホモログは見つけられなかった。このように、Vanabinはバナジウムを高度の濃縮するホヤからしか見つからない特異なタンパク質である。

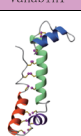
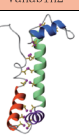
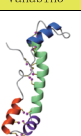
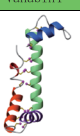
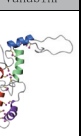
現在知られているVanabinは、いずれも100アミノ酸前後の大きさで、共通して保存された18個のシステインをもつことが一次構造上の特徴である(図3)。理化学研究所の廣田らとの共同研究で、核磁気共鳴法(NMR)によってスジキレボヤVanabin 2の立体構造を決定したところ、9対のジスルフィド結合(SS)をもつユニークな立体構造をしていることが分かった(図4A)。

システインに富む金属結合タンパク質としてメタロチオネインが知られている。ホヤ類にはメタロチオネインも存在する。メタロチオネインとVanabinは構造および金属結合部位の立体構造がまったく異なるが、一次構造の類似性から考えると共通の祖先型タンパク質から分かれて進化したのかもしれない。

5. Vanabin 2のV^{IV}結合能とV^V還元能

Vanabin 2は $K_d = 2.3 \times 10^{-5} M$ で最大20個のV^{IV}と結合するタンパク質である。V^{IV}によるNMRシグナルのクエンチングからVanabin 2のV^{IV}結合に関わるアミノ酸残基の分布を推定したところ、静電プロットにおいて正荷電に富む領域とよく一致していた(図4B)¹⁴⁾。

表2 スジキレボヤから単離した5種類のVanabin

	Vanabin1	Vanabin2	Vanabin3	Vanabin4	VanabinP
立体構造					
分子量	8968.5	10008.5	10153.9	9891.4	14041.6
局在	シグネットリング細胞				血しょう
	細胞質			細胞膜	
V ^{IV} 結合	K_d 2.1×10 ⁻⁵ M Nmax 10個	2.3×10 ⁻⁵ M 20個	データなし		2.8×10 ⁻⁵ M 13個
相互作用	Vanabin2, 3, 4 VIP1		Vanabin1, VIP1		VBP-129

Vanabin1: --MVS¹K²FTILLGVV³LVLMALS⁴VNAY⁵ES⁶EP⁷DD⁸ET⁹FE¹⁰K¹¹---GPG³⁶
 Vanabin2: --MS¹K²VIFALV³LVV⁴LVAC⁵INAT⁶VY⁷VP⁸EAY⁹---APV³³D³⁴
 Vanabin3: MAS¹L²FL³LL⁴FL⁵GM⁶FV⁷LV⁸LA⁹AS¹⁰ES¹¹PD¹²ED¹³DF¹⁴ED¹⁵VMA¹⁶QSY¹⁷YP¹⁸E¹⁹
 Vanabin4: MVT¹K²SH³I⁴IF⁵FL⁶GM⁷VV⁸IV⁹GC¹⁰PA¹¹FE¹²K¹³FVS¹⁴K¹⁵IE¹⁶ES¹⁷VI¹⁸VS¹⁹---
 VanabinP: ---M¹RV²TI³VV⁴LV⁵VV⁶AC⁷LL⁸VAA⁹EA¹⁰---R¹¹KK¹²KK¹³KK¹⁴KK¹⁵KK¹⁶KK¹⁷KK¹⁸KK¹⁹KK²⁰KK²¹KK²²KK²³KK²⁴KK²⁵KK²⁶KK²⁷KK²⁸KK²⁹KK³⁰KK³¹KK³²KK³³KK³⁴KK³⁵KK³⁶KK³⁷KK³⁸KK³⁹KK⁴⁰KK⁴¹KK⁴²KK⁴³KK⁴⁴KK⁴⁵KK⁴⁶KK⁴⁷KK⁴⁸KK⁴⁹KK⁵⁰KK⁵¹KK⁵²KK⁵³KK⁵⁴KK⁵⁵KK⁵⁶KK⁵⁷KK⁵⁸KK⁵⁹KK⁶⁰KK⁶¹KK⁶²KK⁶³KK⁶⁴KK⁶⁵KK⁶⁶KK⁶⁷KK⁶⁸KK⁶⁹KK⁷⁰KK⁷¹KK⁷²KK⁷³KK⁷⁴KK⁷⁵KK⁷⁶KK⁷⁷KK⁷⁸KK⁷⁹KK⁸⁰KK⁸¹KK⁸²KK⁸³KK⁸⁴KK⁸⁵KK⁸⁶KK⁸⁷KK⁸⁸KK⁸⁹KK⁹⁰KK⁹¹KK⁹²KK⁹³KK⁹⁴KK⁹⁵KK⁹⁶KK⁹⁷KK⁹⁸KK⁹⁹KK¹⁰⁰KK¹⁰¹KK¹⁰²KK¹⁰³KK¹⁰⁴KK¹⁰⁵KK¹⁰⁶KK¹⁰⁷KK¹⁰⁸KK¹⁰⁹KK¹¹⁰KK¹¹¹KK¹¹²KK¹¹³KK¹¹⁴KK¹¹⁵KK¹¹⁶KK¹¹⁷KK¹¹⁸KK¹¹⁹KK¹²⁰KK¹²¹KK¹²²KK¹²³KK¹²⁴KK¹²⁵KK¹²⁶KK¹²⁷KK¹²⁸KK¹²⁹KK¹³⁰KK¹³¹KK¹³²KK¹³³KK¹³⁴KK¹³⁵KK¹³⁶KK¹³⁷KK¹³⁸KK¹³⁹KK¹⁴⁰KK¹⁴¹KK¹⁴²KK¹⁴³KK¹⁴⁴KK¹⁴⁵KK¹⁴⁶KK¹⁴⁷KK¹⁴⁸KK¹⁴⁹KK¹⁵⁰KK¹⁵¹KK¹⁵²KK¹⁵³KK¹⁵⁴KK¹⁵⁵KK¹⁵⁶KK¹⁵⁷KK¹⁵⁸KK¹⁵⁹KK¹⁶⁰KK¹⁶¹KK¹⁶²KK¹⁶³KK¹⁶⁴KK¹⁶⁵KK¹⁶⁶KK¹⁶⁷KK¹⁶⁸KK¹⁶⁹KK¹⁷⁰KK¹⁷¹KK¹⁷²KK¹⁷³KK¹⁷⁴KK¹⁷⁵KK¹⁷⁶KK¹⁷⁷KK¹⁷⁸KK¹⁷⁹KK¹⁸⁰KK¹⁸¹KK¹⁸²KK¹⁸³KK¹⁸⁴KK¹⁸⁵KK¹⁸⁶KK¹⁸⁷KK¹⁸⁸KK¹⁸⁹KK¹⁹⁰KK¹⁹¹KK¹⁹²KK¹⁹³KK¹⁹⁴KK¹⁹⁵KK¹⁹⁶KK¹⁹⁷KK¹⁹⁸KK¹⁹⁹KK²⁰⁰KK²⁰¹KK²⁰²KK²⁰³KK²⁰⁴KK²⁰⁵KK²⁰⁶KK²⁰⁷KK²⁰⁸KK²⁰⁹KK²¹⁰KK²¹¹KK²¹²KK²¹³KK²¹⁴KK²¹⁵KK²¹⁶KK²¹⁷KK²¹⁸KK²¹⁹KK²²⁰KK²²¹KK²²²KK²²³KK²²⁴KK²²⁵KK²²⁶KK²²⁷KK²²⁸KK²²⁹KK²³⁰KK²³¹KK²³²KK²³³KK²³⁴KK²³⁵KK²³⁶KK²³⁷KK²³⁸KK²³⁹KK²⁴⁰KK²⁴¹KK²⁴²KK²⁴³KK²⁴⁴KK²⁴⁵KK²⁴⁶KK²⁴⁷KK²⁴⁸KK²⁴⁹KK²⁵⁰KK²⁵¹KK²⁵²KK²⁵³KK²⁵⁴KK²⁵⁵KK²⁵⁶KK²⁵⁷KK²⁵⁸KK²⁵⁹KK²⁶⁰KK²⁶¹KK²⁶²KK²⁶³KK²⁶⁴KK²⁶⁵KK²⁶⁶KK²⁶⁷KK²⁶⁸KK²⁶⁹KK²⁷⁰KK²⁷¹KK²⁷²KK²⁷³KK²⁷⁴KK²⁷⁵KK²⁷⁶KK²⁷⁷KK²⁷⁸KK²⁷⁹KK²⁸⁰KK²⁸¹KK²⁸²KK²⁸³KK²⁸⁴KK²⁸⁵KK²⁸⁶KK²⁸⁷KK²⁸⁸KK²⁸⁹KK²⁹⁰KK²⁹¹KK²⁹²KK²⁹³KK²⁹⁴KK²⁹⁵KK²⁹⁶KK²⁹⁷KK²⁹⁸KK²⁹⁹KK³⁰⁰KK³⁰¹KK³⁰²KK³⁰³KK³⁰⁴KK³⁰⁵KK³⁰⁶KK³⁰⁷KK³⁰⁸KK³⁰⁹KK³¹⁰KK³¹¹KK³¹²KK³¹³KK³¹⁴KK³¹⁵KK³¹⁶KK³¹⁷KK³¹⁸KK³¹⁹KK³²⁰KK³²¹KK³²²KK³²³KK³²⁴KK³²⁵KK³²⁶KK³²⁷KK³²⁸KK³²⁹KK³³⁰KK³³¹KK³³²KK³³³KK³³⁴KK³³⁵KK³³⁶KK³³⁷KK³³⁸KK³³⁹KK³⁴⁰KK³⁴¹KK³⁴²KK³⁴³KK³⁴⁴KK³⁴⁵KK³⁴⁶KK³⁴⁷KK³⁴⁸KK³⁴⁹KK³⁵⁰KK³⁵¹KK³⁵²KK³⁵³KK³⁵⁴KK³⁵⁵KK³⁵⁶KK³⁵⁷KK³⁵⁸KK³⁵⁹KK³⁶⁰KK³⁶¹KK³⁶²KK³⁶³KK³⁶⁴KK³⁶⁵KK³⁶⁶KK³⁶⁷KK³⁶⁸KK³⁶⁹KK³⁷⁰KK³⁷¹KK³⁷²KK³⁷³KK³⁷⁴KK³⁷⁵KK³⁷⁶KK³⁷⁷KK³⁷⁸KK³⁷⁹KK³⁸⁰KK³⁸¹KK³⁸²KK³⁸³KK³⁸⁴KK³⁸⁵KK³⁸⁶KK³⁸⁷KK³⁸⁸KK³⁸⁹KK³⁹⁰KK³⁹¹KK³⁹²KK³⁹³KK³⁹⁴KK³⁹⁵KK³⁹⁶KK³⁹⁷KK³⁹⁸KK³⁹⁹KK⁴⁰⁰KK⁴⁰¹KK⁴⁰²KK⁴⁰³KK⁴⁰⁴KK⁴⁰⁵KK⁴⁰⁶KK⁴⁰⁷KK⁴⁰⁸KK⁴⁰⁹KK⁴¹⁰KK⁴¹¹KK⁴¹²KK⁴¹³KK⁴¹⁴KK⁴¹⁵KK⁴¹⁶KK⁴¹⁷KK⁴¹⁸KK⁴¹⁹KK⁴²⁰KK⁴²¹KK⁴²²KK⁴²³KK⁴²⁴KK⁴²⁵KK⁴²⁶KK⁴²⁷KK⁴²⁸KK⁴²⁹KK⁴³⁰KK⁴³¹KK⁴³²KK⁴³³KK⁴³⁴KK⁴³⁵KK⁴³⁶KK⁴³⁷KK⁴³⁸KK⁴³⁹KK⁴⁴⁰KK⁴⁴¹KK⁴⁴²KK⁴⁴³KK⁴⁴⁴KK⁴⁴⁵KK⁴⁴⁶KK⁴⁴⁷KK⁴⁴⁸KK⁴⁴⁹KK⁴⁵⁰KK⁴⁵¹KK⁴⁵²KK⁴⁵³KK⁴⁵⁴KK⁴⁵⁵KK⁴⁵⁶KK⁴⁵⁷KK⁴⁵⁸KK⁴⁵⁹KK⁴⁶⁰KK⁴⁶¹KK⁴⁶²KK⁴⁶³KK⁴⁶⁴KK⁴⁶⁵KK⁴⁶⁶KK⁴⁶⁷KK⁴⁶⁸KK⁴⁶⁹KK⁴⁷⁰KK⁴⁷¹KK⁴⁷²KK⁴⁷³KK⁴⁷⁴KK⁴⁷⁵KK⁴⁷⁶KK⁴⁷⁷KK⁴⁷⁸KK⁴⁷⁹KK⁴⁸⁰KK⁴⁸¹KK⁴⁸²KK⁴⁸³KK⁴⁸⁴KK⁴⁸⁵KK⁴⁸⁶KK⁴⁸⁷KK⁴⁸⁸KK⁴⁸⁹KK⁴⁹⁰KK⁴⁹¹KK⁴⁹²KK⁴⁹³KK⁴⁹⁴KK⁴⁹⁵KK⁴⁹⁶KK⁴⁹⁷KK⁴⁹⁸KK⁴⁹⁹KK⁵⁰⁰KK⁵⁰¹KK⁵⁰²KK⁵⁰³KK⁵⁰⁴KK⁵⁰⁵KK⁵⁰⁶KK⁵⁰⁷KK⁵⁰⁸KK⁵⁰⁹KK⁵¹⁰KK⁵¹¹KK⁵¹²KK⁵¹³KK⁵¹⁴KK⁵¹⁵KK⁵¹⁶KK⁵¹⁷KK⁵¹⁸KK⁵¹⁹KK⁵²⁰KK⁵²¹KK⁵²²KK⁵²³KK⁵²⁴KK⁵²⁵KK⁵²⁶KK⁵²⁷KK⁵²⁸KK⁵²⁹KK⁵³⁰KK⁵³¹KK⁵³²KK⁵³³KK⁵³⁴KK⁵³⁵KK⁵³⁶KK⁵³⁷KK⁵³⁸KK⁵³⁹KK⁵⁴⁰KK⁵⁴¹KK⁵⁴²KK⁵⁴³KK⁵⁴⁴KK⁵⁴⁵KK⁵⁴⁶KK⁵⁴⁷KK⁵⁴⁸KK⁵⁴⁹KK⁵⁵⁰KK⁵⁵¹KK⁵⁵²KK⁵⁵³KK⁵⁵⁴KK⁵⁵⁵KK⁵⁵⁶KK⁵⁵⁷KK⁵⁵⁸KK⁵⁵⁹KK⁵⁶⁰KK⁵⁶¹KK⁵⁶²KK⁵⁶³KK⁵⁶⁴KK⁵⁶⁵KK⁵⁶⁶KK⁵⁶⁷KK⁵⁶⁸KK⁵⁶⁹KK⁵⁷⁰KK⁵⁷¹KK⁵⁷²KK⁵⁷³KK⁵⁷⁴KK⁵⁷⁵KK⁵⁷⁶KK⁵⁷⁷KK⁵⁷⁸KK⁵⁷⁹KK⁵⁸⁰KK⁵⁸¹KK⁵⁸²KK⁵⁸³KK⁵⁸⁴KK⁵⁸⁵KK⁵⁸⁶KK⁵⁸⁷KK⁵⁸⁸KK⁵⁸⁹KK⁵⁹⁰KK⁵⁹¹KK⁵⁹²KK⁵⁹³KK⁵⁹⁴KK⁵⁹⁵KK⁵⁹⁶KK⁵⁹⁷KK⁵⁹⁸KK⁵⁹⁹KK⁶⁰⁰KK⁶⁰¹KK⁶⁰²KK⁶⁰³KK⁶⁰⁴KK⁶⁰⁵KK⁶⁰⁶KK⁶⁰⁷KK⁶⁰⁸KK⁶⁰⁹KK⁶¹⁰KK⁶¹¹KK⁶¹²KK⁶¹³KK⁶¹⁴KK⁶¹⁵KK⁶¹⁶KK⁶¹⁷KK⁶¹⁸KK⁶¹⁹KK⁶²⁰KK⁶²¹KK⁶²²KK⁶²³KK⁶²⁴KK⁶²⁵KK⁶²⁶KK⁶²⁷KK⁶²⁸KK⁶²⁹KK⁶³⁰KK⁶³¹KK⁶³²KK⁶³³KK⁶³⁴KK⁶³⁵KK⁶³⁶KK⁶³⁷KK⁶³⁸KK⁶³⁹KK⁶⁴⁰KK⁶⁴¹KK⁶⁴²KK⁶⁴³KK⁶⁴⁴KK⁶⁴⁵KK⁶⁴⁶KK⁶⁴⁷KK⁶⁴⁸KK⁶⁴⁹KK⁶⁵⁰KK⁶⁵¹KK⁶⁵²KK⁶⁵³KK⁶⁵⁴KK⁶⁵⁵KK⁶⁵⁶KK⁶⁵⁷KK⁶⁵⁸KK⁶⁵⁹KK⁶⁶⁰KK⁶⁶¹KK⁶⁶²KK⁶⁶³KK⁶⁶⁴KK⁶⁶⁵KK⁶⁶⁶KK⁶⁶⁷KK⁶⁶⁸KK⁶⁶⁹KK⁶⁷⁰KK⁶⁷¹KK⁶⁷²KK⁶⁷³KK⁶⁷⁴KK⁶⁷⁵KK⁶⁷⁶KK⁶⁷⁷KK⁶⁷⁸KK⁶⁷⁹KK⁶⁸⁰KK⁶⁸¹KK⁶⁸²KK⁶⁸³KK⁶⁸⁴KK⁶⁸⁵KK⁶⁸⁶KK⁶⁸⁷KK⁶⁸⁸KK⁶⁸⁹KK⁶⁹⁰KK⁶⁹¹KK⁶⁹²KK⁶⁹³KK⁶⁹⁴KK⁶⁹⁵KK⁶⁹⁶KK⁶⁹⁷KK⁶⁹⁸KK⁶⁹⁹KK⁷⁰⁰KK⁷⁰¹KK⁷⁰²KK⁷⁰³KK⁷⁰⁴KK⁷⁰⁵KK⁷⁰⁶KK⁷⁰⁷KK⁷⁰⁸KK⁷⁰⁹KK⁷¹⁰KK⁷¹¹KK⁷¹²KK⁷¹³KK⁷¹⁴KK⁷¹⁵KK⁷¹⁶KK⁷¹⁷KK⁷¹⁸KK⁷¹⁹KK⁷²⁰KK⁷²¹KK⁷²²KK⁷²³KK⁷²⁴KK⁷²⁵KK⁷²⁶KK⁷²⁷KK⁷²⁸KK⁷²⁹KK⁷³⁰KK⁷³¹KK⁷³²KK⁷³³KK⁷³⁴KK⁷³⁵KK⁷³⁶KK⁷³⁷KK⁷³⁸KK⁷³⁹KK⁷⁴⁰KK⁷⁴¹KK⁷⁴²KK⁷⁴³KK⁷⁴⁴KK⁷⁴⁵KK⁷⁴⁶KK⁷⁴⁷KK⁷⁴⁸KK⁷⁴⁹KK⁷⁵⁰KK⁷⁵¹KK⁷⁵²KK⁷⁵³KK⁷⁵⁴KK⁷⁵⁵KK⁷⁵⁶KK⁷⁵⁷KK⁷⁵⁸KK⁷⁵⁹KK⁷⁶⁰KK⁷⁶¹KK⁷⁶²KK⁷⁶³KK⁷⁶⁴KK⁷⁶⁵KK⁷⁶⁶KK⁷⁶⁷KK⁷⁶⁸KK⁷⁶⁹KK⁷⁷⁰KK⁷⁷¹KK⁷⁷²KK⁷⁷³KK⁷⁷⁴KK⁷⁷⁵KK⁷⁷⁶KK⁷⁷⁷KK⁷⁷⁸KK⁷⁷⁹KK⁷⁸⁰KK⁷⁸¹KK⁷⁸²KK⁷⁸³KK⁷⁸⁴KK⁷⁸⁵KK⁷⁸⁶KK⁷⁸⁷KK⁷⁸⁸KK⁷⁸⁹KK⁷⁹⁰KK⁷⁹¹KK⁷⁹²KK⁷⁹³KK⁷⁹⁴KK⁷⁹⁵KK⁷⁹⁶KK⁷⁹⁷KK⁷⁹⁸KK⁷⁹⁹KK⁸⁰⁰KK⁸⁰¹KK⁸⁰²KK⁸⁰³KK⁸⁰⁴KK⁸⁰⁵KK⁸⁰⁶KK⁸⁰⁷KK⁸⁰⁸KK⁸⁰⁹KK⁸¹⁰KK⁸¹¹KK⁸¹²KK⁸¹³KK⁸¹⁴KK⁸¹⁵KK⁸¹⁶KK⁸¹⁷KK⁸¹⁸KK⁸¹⁹KK⁸²⁰KK⁸²¹KK⁸²²KK⁸²³KK⁸²⁴KK⁸²⁵KK⁸²⁶KK⁸²⁷KK⁸²⁸KK⁸²⁹KK⁸³⁰KK⁸³¹KK⁸³²KK⁸³³KK⁸³⁴KK⁸³⁵KK⁸³⁶KK⁸³⁷KK⁸³⁸KK⁸³⁹KK⁸⁴⁰KK⁸⁴¹KK⁸⁴²KK⁸⁴³KK⁸⁴⁴KK⁸⁴⁵KK⁸⁴⁶KK⁸⁴⁷KK⁸⁴⁸KK⁸⁴⁹KK⁸⁵⁰KK⁸⁵¹KK⁸⁵²KK⁸⁵³KK⁸⁵⁴KK⁸⁵⁵KK⁸⁵⁶KK⁸⁵⁷KK⁸⁵⁸KK⁸⁵⁹KK⁸⁶⁰KK⁸⁶¹KK⁸⁶²KK⁸⁶³KK⁸⁶⁴KK⁸⁶⁵KK⁸⁶⁶KK⁸⁶⁷KK⁸⁶⁸KK⁸⁶⁹KK⁸⁷⁰KK⁸⁷¹KK⁸⁷²KK⁸⁷³KK⁸⁷⁴KK⁸⁷⁵KK⁸⁷⁶KK⁸⁷⁷KK⁸⁷⁸KK⁸⁷⁹KK⁸⁸⁰KK⁸⁸¹KK⁸⁸²KK⁸⁸³KK⁸⁸⁴KK⁸⁸⁵KK⁸⁸⁶KK⁸⁸⁷KK⁸⁸⁸KK⁸⁸⁹KK⁸⁹⁰KK⁸⁹¹KK⁸⁹²KK⁸⁹³KK⁸⁹⁴KK⁸⁹⁵KK⁸⁹⁶KK⁸⁹⁷KK⁸⁹⁸KK⁸⁹⁹KK⁹⁰⁰KK⁹⁰¹KK⁹⁰²KK⁹⁰³KK⁹⁰⁴KK⁹⁰⁵KK⁹⁰⁶KK⁹⁰⁷KK⁹⁰⁸KK⁹⁰⁹KK⁹¹⁰KK⁹¹¹KK⁹¹²KK⁹¹³KK⁹¹⁴KK⁹¹⁵KK⁹¹⁶KK⁹¹⁷KK⁹¹⁸KK⁹¹⁹KK⁹²⁰KK⁹²¹KK⁹²²KK⁹²³KK⁹²⁴KK⁹²⁵KK⁹²⁶KK⁹²⁷KK⁹²⁸KK⁹²⁹KK⁹³⁰KK⁹³¹KK⁹³²KK⁹³³KK⁹³⁴KK⁹³⁵KK⁹³⁶KK⁹³⁷KK⁹³⁸KK⁹³⁹KK⁹⁴⁰KK⁹⁴¹KK⁹⁴²KK⁹⁴³KK⁹⁴⁴KK⁹⁴⁵KK⁹⁴⁶KK⁹⁴⁷KK⁹⁴⁸KK⁹⁴⁹KK⁹⁵⁰KK⁹⁵¹KK⁹⁵²KK⁹⁵³KK⁹⁵⁴KK⁹⁵⁵KK⁹⁵⁶KK⁹⁵⁷KK⁹⁵⁸KK⁹⁵⁹KK⁹⁶⁰KK⁹⁶¹KK⁹⁶²KK⁹⁶³KK⁹⁶⁴KK⁹⁶⁵KK⁹⁶⁶KK⁹⁶⁷KK⁹⁶⁸KK⁹⁶⁹KK⁹⁷⁰KK⁹⁷¹KK⁹⁷²KK⁹⁷³KK⁹⁷⁴KK⁹⁷⁵KK⁹⁷⁶KK⁹⁷⁷KK⁹⁷⁸KK⁹⁷⁹KK⁹⁸⁰KK⁹⁸¹KK⁹⁸²KK⁹⁸³KK⁹⁸⁴KK⁹⁸⁵KK⁹⁸⁶KK⁹⁸⁷KK⁹⁸⁸KK⁹⁸⁹KK⁹⁹⁰KK⁹⁹¹KK⁹⁹²KK⁹⁹³KK⁹⁹⁴KK⁹⁹⁵KK⁹⁹⁶KK⁹⁹⁷KK⁹⁹⁸KK⁹⁹⁹KK¹⁰⁰⁰KK¹⁰⁰¹KK¹⁰⁰²KK¹⁰⁰³KK¹⁰⁰⁴KK¹⁰⁰⁵KK¹⁰⁰⁶KK¹⁰⁰⁷KK¹⁰⁰⁸KK¹⁰⁰⁹KK¹⁰¹⁰KK¹⁰¹¹KK¹⁰¹²KK¹⁰¹³KK¹⁰¹⁴KK¹⁰¹⁵KK¹⁰¹⁶KK¹⁰¹⁷KK¹⁰¹⁸KK¹⁰¹⁹KK¹⁰²⁰KK¹⁰²¹KK¹⁰²²KK¹⁰²³KK¹⁰²⁴KK¹⁰²⁵KK¹⁰²⁶KK¹⁰²⁷KK¹⁰²⁸KK¹⁰²⁹KK¹⁰³⁰KK¹⁰³¹KK¹⁰³²KK¹⁰³³KK¹⁰³⁴KK¹⁰³⁵KK¹⁰³⁶KK¹⁰³⁷KK¹⁰³⁸KK¹⁰³⁹KK¹⁰⁴⁰KK¹⁰⁴¹KK¹⁰⁴²KK¹⁰⁴³KK¹⁰⁴⁴KK¹⁰⁴⁵KK¹⁰⁴⁶KK¹⁰⁴⁷KK¹⁰⁴⁸KK¹⁰⁴⁹KK¹⁰⁵⁰KK¹⁰⁵¹

えている（図5）。このカスケードでは各構成要素がもつシステインのチオール交換反応（すなわち可逆的なジスルフィドの開裂・再形成）が重要である。

現在、V^Vの還元に関わるアミノ酸残基を決定するための実験を進めており、還元反応において最も重要なシステイン残基を特定しつつある。システインのチオール交換反応によって還元されたV^{IV}が、高親和性結合部位であるsite 1に結合することで、還元反応のサイクルを促進するというモデルが有力である。

6. Vanabin 2 バリエーションの存在意義

Vanabin 2はスジキレボヤ血球において非常に高レベルに発現するタンパク質である。最近我々は野生のスジキレボヤを1個体ずつ解析することで、個体ごとにVanabin 2のコード領域のアミノ酸配列が異なる様々なバリエーションが存在することを見出した（図6）²⁰。すなわちコード領域の長さは互いに全く同じであるが、最大14箇所のアミノ酸が異なる様々なバリエーションが見つかった。18箇所のシステイン残基はすべて保存されており、V^{IV}結合能に違いはなかったことからその立体構造とV^{IV}結合能は保存されていると思われる。スジキレボヤのcDNA解析および部分的ゲノムDNA解析から、Vanabin 2バリエーションは3つの遺伝子座にコードされていて、他のVanabinと併せて少なくとも7遺伝子座にわたることがわかっている（未発表）。カタユウレイボヤにおいて5つのVanabinがタンデムに重複していることと考え合わせると、進化の過程でホヤの祖先型においてVanabin 遺伝子の基本型が獲得され、遺伝子の重複によって発現レベルが大きく上昇し、結果的にバナジウムの濃縮・還元が高度化されたのではないかと筆者らは想像している。

7. おわりに

蓄積されたV^{III}の生理機能は何か。同時に蓄積された硫酸イオンやプロトン、バナジウムの濃度維持の他に、生理機能を有しているのか。我々はVanabin 2を介した酸化還元反応がそのカギを握ると考えている。もし何らかの刺激で液胞内に蓄積された還元型のバナジウムV^{III}を細胞質中に放出する経路が働いてV^Vの還元カスケードが逆転すれば、Vanabin 2の還元が進み、還元物質であるGSHやNADPHの合成につながることも想定できる。バナジウム濃縮細胞であるSRCのバナジウム濃度や価数がどのような刺激によって変

動するのかを追跡することが一つのアプローチになると期待される。

一方、別の角度からのアプローチとして最近我々は、カタユウレイボヤを高濃度のバナジウムに暴露した時に変動する遺伝子の発現解析²¹や、バナジウム濃縮に異常がおこる突然変異体の作成も進めている。これらの網羅的解析で得られる結果と、これまでスジキレボヤの研究から得た知見を総合することで、ホヤにおけるバナジウム濃縮のメカニズムとその生理機能の実体に迫ろうとしている。

ここで紹介した研究は、道端 齊 博士（広島大学名誉教授）をはじめとして原著論文に名前を連ねた多くの共同研究者の方ならびに研究室に所属した学生達とともに進めてきたものです。大変お世話になりました。改めてお礼申し上げます。本会会員でもある森下文浩博士には、同じ研究グループの一員として研究室運営および研究内容に関する議論に貢献していただき、またこの原稿の内容についても多くの適確なコメントをいただきました。感謝いたします。最後にペプチドニュースレターに寄稿の機会を与えていただきました大阪大学蛋白質研究所の川上 徹先生に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Henze, M. Untersuchungen über das Blut der Ascidien. I. Mitteilung. Die Vanadiumverbindung der Blutkörperchen. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **72**, 494-501 (1911).
- 2) 佐藤ゆたか, 今井 薫. ホヤの胚発生システム. 蛋白質核酸酵素 **52**, 833-841 (2007).
- 3) Satou, Y., Satoh, N., Imai, K.S. Gene regulatory networks in the early ascidian embryo. *Biochim Biophys Acta* **1789**, 268-273 (2009).
- 4) Michibata, H. *et al.* The accumulation and distribution of vanadium, iron, and manganese in some solitary ascidians, *Biol Bull* **171**, 672-681 (1986).
- 5) Hirata, J., Michibata, H. Valency of vanadium in the vanadocytes of *Ascidia gemmata* separated by density-gradient centrifugation. *J Exp Zool* **257**, 160-165 (1991).
- 6) Ueki, T. *et al.* Identification and biochemical analysis of a homolog of a sulfate transporter from a vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis samea*. *Biochim Biophys Acta* **1790**, 1295-1300 (2009).
- 7) Ueki, T. *et al.* Scanning x-ray microscopy of living and freeze-dried blood cells in two vanadium-rich ascidian species, *Phallusia mammillata* and *Ascidia sydneiensis samea*. *Zool Sci* **19**, 27-35 (2002).
- 8) Heyliger, C.E. *et al.* Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science* **227**, 1474-1477 (1985).
- 9) Cannon, J.C., Chasteen, N.D. Nonequivalence of the metal binding sites in vanadyl-labeled human serum transferrin. *Biochemistry* **14**, 4573-4577 (1975).
- 10) Messerschmidt, A., Wever, R. X-ray structure of a vanadium-containing enzyme: chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *Proc Nat Acad Sci USA* **93**, 392-396 (1996).
- 11) Ueki, T., Michibata, H. Molecular mechanism of the

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Vanabin2	1	APVD	CKGQ	CTTP	CEPL	TACKEK	CAES	CE	TSAD	KKTCRRNCKKAD	45
1MT	1	APVD	CKGQ	CTTP	CEPL	TACKEK	CAES	CE	TSAD	KKTCRRNCKKAD	45
9MT	1	APVD	CKGQ	CTTP	CEPL	KTCKKK	CAES	CE	TSAD	KKTCRRNCKKAD	45
10MT-1	1	APVD	CKGQ	CTTE	CGPL	KTCKKK	CAES	CE	TSAD	KKTCRRNCKKAD	45
10MT-2	1	APVD	CKGQ	CTTK	CGPL	KTCKKK	CAES	CE	TSAD	KKTCRRNCKKAD	45
14MT	1	APVD	CKGQ	CTTE	CGPL	KTCKKK	CAES	CE	TSAD	KKTCRRNCKKAD	45
		10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Vanabin2	46	EPQDKV	CDACRMK	CHKACRAAN	CASE	CPKHEHKS	SDTCRA	CMKTNCK	91		
1MT	46	EPQDKV	CDACRMK	CHKACRAEN	CASE	CPKHEHKS	SDTCRA	CMKTNCK	91		
9MT	46	EPQDKV	CDACRMK	CKKACRAAN	CASE	CPKHQHKSDA	CKACMKTNCK	91			
10MT-1	46	EPEDKV	CDACRMK	CKKACRAEN	CASE	CPKHQHKSDT	CRACMKTNCK	91			
10MT-2	46	EPEDKV	CDACRMK	CKKACRAEN	CASE	CPKHQHKSDT	CRACMKTNCK	91			
14MT	46	EPEDKV	CDACRMK	CKKACRAEN	CASE	CPKHQHKSEA	CKACMKTNCK	91			

図6 Vanabin 2 バリエーションのアミノ酸配列。

transport and reduction pathway of vanadium in ascidians. *Coord Chem Rev* **255**, 2249–2257 (2011).

- 12) Michibata, H., Ueki, T. High levels of vanadium in ascidians, in *Vanadium: biochemical and molecular biological approaches* (H. Michibata, ed.), Springer, UK (2012).
- 13) Ueki, T. *et al.* Vanadium-binding proteins (vanabins) from a vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis samea*. *Biochim Biophys Acta* **1626**, 43–50 (2003).
- 14) Hamada, T. *et al.* Solution structure of Vanabin 2, a vanadium(IV)-binding protein from the vanadium-rich ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*. *J Am Chem Soc* **127**, 4216–4222 (2005).
- 15) Kawakami, N. *et al.* A novel vanadium reductase, Vanabin 2, forms a possible cascade involved in electron transfer. *Biochim Biophys Acta* **1794**, 674–679 (2009).
- 16) Trivedi, S. *et al.* Novel vanadium-binding proteins (vanabins) identified in cDNA libraries and the genome of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Biochim Biophys Acta* **1630**, 64–70 (2003).
- 17) Samino, S. *et al.* Identification of a novel vanadium-binding protein by EST analysis on the most vanadium-rich ascidian, *Ascidia gemmata*. *Mar Biotechnol* **14**, 143–154 (2012).
- 18) Fukui, K. *et al.* Vanadium-binding protein in a vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis samea*: CW and pulsed EPR studies. *J Am Chem Soc* **125**, 6352–6353 (2003).
- 19) Ueki, T. *et al.* Characterization of vanadium-binding sites of the vanadium-binding protein Vanabin 2 by site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* **1790**, 1327–1333 (2009).
- 20) Ueki, T. *et al.* Sequence variation of Vanabin 2-like vanadium-binding proteins in blood cells of the vanadium-accumulating ascidian *Ascidia sydneiensis samea*. *Biochim Biophys Acta* **1780**, 1010–1015 (2008).
- 21) Kume, S. *et al.* Differential gene regulation by V (IV) and V (V) ions in the branchial sac, intestine, and blood cells of a vanadium-rich ascidian, *Ciona intestinalis*. *Biomaterials* **25**, 1037–1050 (2012).

うえき たつや
広島大学大学院理学研究科
生物科学専攻
ueki@hiroshima-u.ac.jp

メタル化アミノ酸の最近の進歩と展開

1. はじめに

我々の研究グループでは有機金属錯体¹⁾とアミノ酸とを化学結合したメタル化アミノ酸²⁾およびこれらを連結したメタル化ペプチドの合成と機能創出に関する系統的な研究を行っている。本稿では、メタル化アミノ酸のなんたるかを知っていただくことを目的として、まずその



高谷 光

種類や合成方法について、歴史的経緯に沿って解説し、次いで我々の最近の研究成果を中心にメタル化アミノ酸によって実現される新しい物性や機能の解説を通じてメタル化アミノ酸分野の最近の進歩と可能性について言及したい。尚、グルタミン酸ナトリウムの様な典型金属とアミノ酸の化合物もメタル化アミノ酸の一種と分類されるべきであるが、本稿では遷移金属錯体とアミノ酸から得られたメタル化アミノ酸のみを取扱い、さらにpure chemistryの観点から、報告された遷移金属結合型アミノ酸のうち単離されスペクトルや諸物性が確認されたもののみを紹介した。また、紙数の関係上、メタル化ペプチドについては我々の研究と関連するもののみを紹介するに止めた。

2. メタル化アミノ酸とは

メタル化アミノ酸は、有機金属化学と生化学の境界領域に位置づけられるBioorganometallic Chemistryの分野において最も重要な分子の一つである。アミノ酸カルボキシラートを配位子とする錯塩の研究は1928年のCremer³⁾によるFe(HCysO)₂(CO)₂の合成に遡るが、近代的な有機金属化学の確立を待ってメタル化アミノ酸の起源を再考すると1957年のSchlög⁴⁾らによるフェロセニルアラニン **1** (図1)の合成に端を発するの考えるのが妥当であろう。このフェロセニルアラニン **1**の合成はフェロセンが合成・発見された1951年から、わずか数年の後に行われたことを考えるとSchlög⁴⁾らの発想力に感動を禁じ得ない。その後、フェロセンのBioorganometallic Chemistryはアミノ酸のみならず関連するペプチドや糖、核酸等のあらゆる生体分子へと展開され、現在では裾野の大きな一分野を築くに至っている。詳細はMetzler-Nolteらの総説に詳しい⁵⁾。

現在に至るまでに合成されたメタル化アミノ酸を大まかに分類すると図2の3タイプとなり、α-位側鎖先端に金属錯体が結合したタイプ、N-末端およびC-末端に金属錯体が結合したタイプに分けられる。尚、上述のFe(HCysO)₂(CO)₂の様な錯塩は一般にN,C-両末端や側鎖官能基を含む多点配位型のいわゆるキレート型錯体を与えることと、配位点の平衡解離によって溶液中では化学的に単一の構造を取らない場合があり、これらの分類には当てはまらないものとし

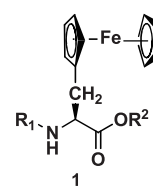


図1 フェロセニルアラニン **1**



磯崎 勝弘



中村 正治

て本稿では取扱わない。

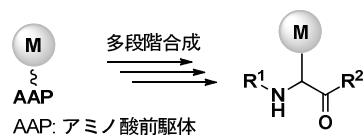
我々は第一の研究目的としてメタル化アミノ酸の連結によって金属配列や組成の制御されたメタル化ペプチドを合成すること、また酵素などの蛋白質中へのメタル化アミノ酸の組込による新機能の創出を念頭に研究を行っているため、上記3種類のメタル化アミノ酸の中でも特に α -位側鎖結合型を研究対象としてきた。これは元来のアミノ酸のデザインを考えた場合にも自然なアイデアと思われる。というのも、元々N,C-末端はアミド結合によってペプチド、蛋白質という高次構造体を構築する足場であり、またアミノ基およびカルボキシル基によって挟まれた α -位炭素は機能導入のための拡張性の高い官能基増設部位である。進化の過程で練り上げられたこの分子デザインに素直に従い、 α -位側鎖に機能部位たる金属錯体を導入し、N,C-末端はペプチド鎖構築のために温存するというのは妥当な研究戦略であろう。奇しくも初めて合成されたメタル化アミノ酸であるフェロセニルアラニン $\mathbf{1}$ はこの α -位側鎖結合型であるが、意外な事に、以降に報告されたほとんどのメタル化アミノ酸は、N-末端あるいはC-末端結合型が圧倒的に多い。これはメタル化アミノ酸が、バイオラベリングやイメージング試薬への応用を企図する生化学分野の研究者を中心に開発されてきたことに起因する。これらの用途では生理活性のあるアミノ酸あるいはペプチドにおける金属錯体の結合様式が可視化試薬としての機能にあまり影響を及ぼさないで、縮合反応によって画一的かつ簡便に金属導入が可能なN,C-末端が選ばれたと推察される。実際に、現在までに報告されているほとんどのN,C-末端結合型メタル化アミノ酸およびメタル化ペプチドは、リンカー部位に-OH基や-NH₂基を有する錯体との縮合反応によって合成されている。また後述するが、 α -位側鎖結合型では側鎖への金属導入に多段階の化学変換が必要なケースが多い。そのため、この種の合成化学的な煩雑さを避けた結果、N,C-末端結合型の開発と応用研究が先行したと思われる。

さて、我々が選んだ α -位側鎖結合型であるが、その合成方法によって、図3に示したA-Cの3タイプにさらに分類することができる。前述のフェロセニルアラニン $\mathbf{1}$ はアセチルフェロセンから6段階を経てアラニン部位を構築するAのタイプとなる。メタロセンは有機金属錯体の中でも様々な化学変換に対して安定であることが知られており、一般にメタロセン結合型アミノ酸はシクロペンタジエン配位子上の官能基を多段階の化学反応によってアミノ酸へと変換することで合成されている。メタロセン変換反応が有機金属分野において早くから確立されていることから、多種多様なメタロセン結合型アミノ酸が合成されている。代表

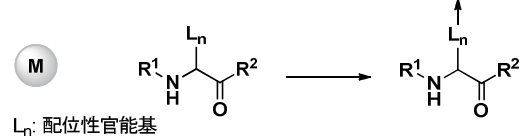
的なものを図4に示した^{5b,6)}。尚、我々のグループで開発されたメタル化アミノ酸を除いて、キラルHPLC分析による光学純度やX線結晶構造が行われているのはメタロセン結合型アミノ酸のみである。このような化学的安定性と機器分析が容易であるという特徴がメタロセン結合型アミノ酸が、生化学分野で最も広く用いられている構造モチーフとなっている理由であるが、このタイプのアミノ酸は光や酸化条件で不安定性を示すことはあまり知られていない様に思われる。例えば、フェロセニルグリシンは環境光下、空気中で速やかに分解してしまうほど不安定であり^{4,7)}、比較的安定な $\mathbf{1}$ も強い酸化条件では分解することが報告されている。

合成法Bは、 α -位側鎖に配位性官能基を有するアミノ酸と金属塩との反応によってメタル化アミノ酸を得る方法である。この手法は1980年代にメタロセン化学から発展した芳香族に金属が π -配位したアレーン錯体の研究過程で見出されることとなった。例えば、フェニルアラニンやスレオニン等の芳香族性官能基を持つアミノ酸をCr⁸⁾やRu⁹⁾錯体と反応させると、図5に示す様な側鎖芳香族基に金属が π -配位し

A: 多段階合成



B: 配位部位導入型



C: 金属錯体直接結合型

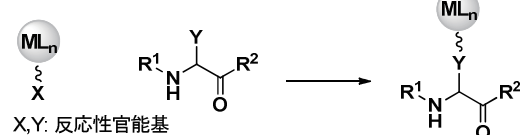


図3 α -位側鎖結合型メタル化アミノ酸の合成方法

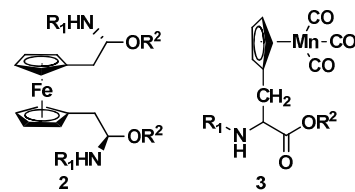


図4 メタロセン結合型アミノ酸の代表例

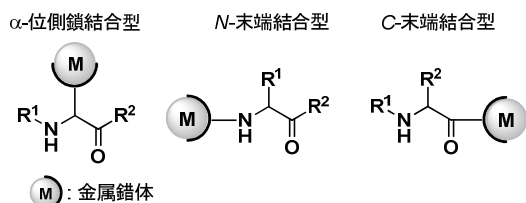


図2 結合様式によるメタル化アミノ酸の分類

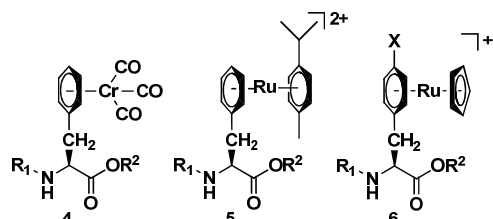


図5 芳香族 π -配位型メタル化アミノ酸の代表例

てアレーン錯体が結合したメタル化アミノ酸を与える。これらのアレーン錯体結合型アミノ酸は、実はメタル化アミノ酸そのものを得るために合成されたものではなく、アミノ酸芳香環の化学変換を目的として合成されたものが多い。金属の π -配位によって電子不足となった芳香環に対する求核置換を利用することによって、付加反応による官能基導入が可能であり、また得られた生成物中の金属は反応後に酸や加熱、光照射によって容易に除去される。例えば、Pearsonらは**6**の芳香環置換基XがCl基であるRu結合型アミノ酸とチロシンのO-アリアル化反応によってビフェニル架橋されたビスアミノ酸を合成し、これらを鍵中間体としてバンコマイシン等の環状ジフェニルエーテルペプチドの全合成に関する系統的な研究を行った。さて、B法についてはさらに1990年代に入ると天然由来の側鎖官能基をそのまま用いるのでは無く、ピペリジンの様に強力なキレート配位子を側鎖に有する人工アミノ酸から、洗練された有機金属化学的手法を用いて**7**¹⁰⁾の様なメタル化アミノ酸が合成されるようになり、図6に示す様にピコリルアミン錯体**8**¹¹⁾やポルフィリン錯体**9**¹²⁾の結合したユニークなメタル化アミノ酸が多数報告されるようになった。さらに、2000年代に入るとSPECTやMRIのための造影剤開発やバイオイメージングへの応用を指向した研究が盛んに行われ、その結果、多価カルボン酸やサイクラム等の環状アミンが結合した多種多様なアミノ酸やペプチドが開発されるが、これらの殆どは冒頭で紹介した様にN,C-末端結合型であるため、ここでは紹介しないが詳しい総説が多数発表されているので、それらを参照されたい¹³⁾。尚、B法で合成されるメタル化アミノ酸は基本的に金属を最後に導入することから、様々な化学変換や条件における金属流出の問題を考慮する必要がないというメリットがあるが、逆に金属導入後の化学変換に関しては安定性が担保されておらず、図6に挙げた一部の成功例を除いて酸や塩基等による脱金属化が予想されるものが多い。

最後のCタイプに分類されるのは、配位子を含めて予め合成した金属錯体を α -位側鎖に化学的に結合する合成手法で、多段階合成を経由するAタイプや、

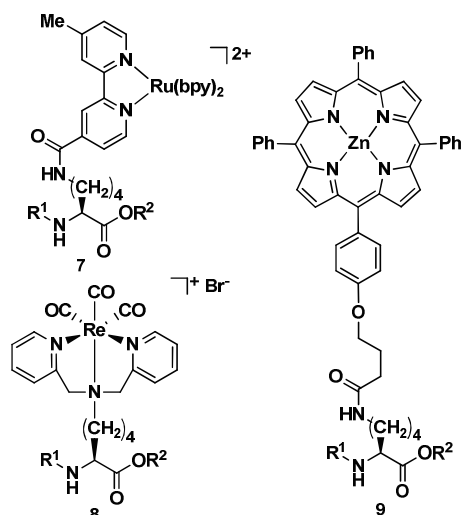


図6 キレート配位型メタル化アミノ酸の代表例

予めアミノ酸側鎖上に構築した配位部位に金属を後入れするBタイプと比べるとより集約的な合成経路であり、かつ、アミノ酸部位の構築や側鎖への配位子導入のための合成ルート設計を行う必要が無い。さらに本法では、金属錯体とアミノ酸の結合方法さえ確立してしまえば望みの金属元素を有する錯体を様々なアミノ酸へと導入できるというメリットがあり、先の二つの手法と比べてコンビナトリアルケミストリーやペプチド化による機能創出が容易となるため魅力的である。ここで成否の鍵を握るのは、錯体部位の選択は当然として、金属錯体とアミノ酸とを結合 (conjugation) する反応の選択と、またそれに付随して結合反応点として配位子上に導入する官能基の選択など考慮、解決すべき点が多い。そのため方法論的なメリットは大きいものの、諸条件で安定な有機金属錯体の開発やconjugationのための化学反応の開発が必須であり、前述のA,Bと比べて研究が遅れている。実際に現在までに合成が報告されている約91種の α -位側鎖結合型アミノ酸のうちC法で合成されたのは我々が調べた限り23例であった。実はこのC法で初めてメタル化アミノ酸を合成したのは前述のアレーン錯体結合型アミノ酸を開発したPearsonらのグループであり、(η^6 -C₆H₅Cl)Mn(CO)₃錯体の様にベンゼン環上にCl基を有するアレーン金属錯体と、チロシン誘導体との芳香族求核置換反応によって図7の**10**に示す様なジフェニルエーテルの生成にともなってアレーン錯体結合型のアミノ酸が得られる事を報告している¹⁴⁾。先にも述べたアレーン錯体およびメタロセンの安定性と豊富な反応バリエーションのため、これ以降に合成されたCタイプメタル化アミノ酸の前述の23例のうち15例が、アレーン錯体およびメタロセン錯体の芳香族求核置換や求核付加反応によって合成されることとなった。しかしながら、前述の様にこれらの π -配位型メタル化アミノ酸はアミノ酸/ペプチド合成のための合成中間体として、合成後に金属の脱配位を行うことが前提になっている。そのため、加熱や光照射あるいは酸性条件で容易に脱金属化されてしまうため、これらのアミノ酸を機能性材料や多機能触媒の分子素子として用いることは難しい。他方でJacksonらは90年代後半に目覚ましく応用が広がったクロスカップリング反応がメタル化アミノ酸の合成にも有効であることを発見した¹⁵⁾。彼らはセリンから誘導したZnホモエノレートと芳香族配位子がハロゲン化されたフェロセンあるいはCrアレーン錯体をPd触媒の存在下に反応させると、アミノ酸部位の光学純度や金属錯体の構造を損な

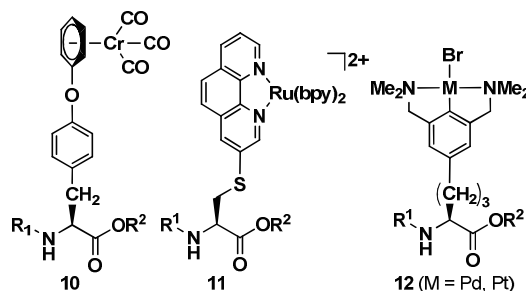


図7 金属錯体-アミノ酸の結合反応によって合成されたメタル化アミノ酸の代表例

うことなく根岸クロスカップリングが進行してフェロセニルアラニン **1** や $\text{Cr}(\text{CO})_3$ アレーン錯体が結合したフェニルアラニン誘導体 **4** が得られることを見出した。彼らの発見を契機として、種々の芳香族カップリングによる金属導入が試みられるようになり、様々な機能性金属錯体とのカップリング *conjugation* によってようやく材料研究に用いることのできる安定で高機能なメタル化アミノ酸が開発されるようになった。Torらはプロモ化されたフェナンスロリン配位子を有するRu錯体とシステインやチロシンを塩基性条件下で反応させると、カップリング反応が進行して高発光性Ru結合型アミノ酸**11**が高収率で得られる事を報告している¹⁶⁾。その後、2000年代に入ってからvan Kotenらは高い触媒活性や発光機能を持ちながら酸/塩基条件や高温等の条件に対しても安定なNCN-ピンサー型金属錯体の開発に成功する¹⁷⁾。彼らはC60や糖、 dendroliマー等の多岐にわたる分子とNCN-ピンサー錯体の*conjugation*に関する研究を精力的に行ってきた。その過程において鈴木-宮浦クロスカップリング反応が、ホウ素化ノルバリン¹⁸⁾とNCN-ピンサー錯体の*conjugation*に有効であり、NCN-PdおよびPt錯体結合型のメタル化アミノ酸**12**を高収率で与える事を見出した¹⁹⁾。また、この他に選択性が低いもののRu触媒を用いるクロスメタセシスによるメタル化アミノ酸合成も報告されている²⁰⁾。

上記メタル化アミノ酸**10-12**の研究から、適当な反応の選択をしてやれば、煩雑な合成ルートの検討を行う事無く、予め合成した金属錯体とアミノ酸の*conjugation*が効率良く進行し、光学純度や金属を損なう事無く、短段階で所望の金属を有するメタル化アミノ酸が得られることが示された。我々は先に述べた様にメタル化アミノ酸の結合による金属集積様式の制御された機能性材料や、ペプチドや蛋白質にメタル化アミノ酸を組込む事によって、錯体部分の発光機能や触媒機能を活かした新しいタイプのBioorganometallic Materialの創出を目指している。そのため α 位側鎖結合型のメタル化アミノ酸をCタイプの手法によって合成する事に注力した研究を行ってきた。その結果、CN-メタラサイクル錯体結合型グルタミン酸**13**およびNCN-ピンサー錯体結合型ノルバリン**14**等の新しいタイプのメタル化アミノ酸の合成に成功し(図8)、これらが金属錯体の構造や機能あるいはアミノ酸の不斉を損なう事無くN,C-官能基化メタル化アミノ酸やメタル化ペプチドへと変換可能なことを見出し、さらに自己組織化、発光、触媒等の様々な物性・機能を示し、機能性材料の魅力ある素材分子となることを明らかにしている。そこで以降では、これらのメタル化アミノ酸の合成、構造、物性・機能について解説しつつ、メタル化アミノ酸の可能性について俯瞰したい。

3. PdおよびPt結合型グルタミン酸

前項でも説明した様にメタル化アミノ酸にはこれまでも数多くの報告例があるが、その多くが酸、塩基、加熱、光等によって金属が流出するという問題点を抱えている。また、メタロセン結合型等の安定性の高いアミノ酸の多くは有機溶媒への溶解性に乏しく、これらのデメリットは多数の金属が結合したメタル化

ペプチド合成を行う際に必ず解決しなければならない点となる。この様な難点は前項の図6の**9**¹²⁾や図7の**12**¹⁹⁾の様な主に2000年代に開発されたアミノ酸では解決されているとの報告がある^{21, 22)}。しかしながら、これらのメタル化アミノ酸もアミノ酸合成に10段階以上の工程を要する。我々が考える様な分子材料の研究開発では、物性や機能探索にマルチグラムスケールのまとまった量が必要となることを考えるとできるだけ短い合成経路で大量合成が可能であること、加えて安定性や有機溶媒への溶解性に優れ、かつ多様な金属種の導入が可能な新しいタイプのメタル化アミノ酸を新たに開発する必要があった。そこで、我々はアミノ酸部位として天然由来のグルタミン酸を、錯体部分として安定性、可溶性、金属可換性に優れたベンズアルジミン錯体を結合したメタル化アミノ酸**13**(図8)を考案した^{23, 24)}。これらの金属結合型グルタミン酸はスキーム1に示す様にベンズアルジミン配位子から2段階で合成可能であり、3Lナスプラスコスケールから合成を出発して、10gのメタル化アミノ酸が2日で得られる生産性の高さを示す。また、これらの金属結合型グルタミン酸は予想通り酸や光、加熱条件に安定であり、ペプチド合成や超分子ゲル化条件で金属が流出しないことが確認された。そこで、我々はこれらのグルタミン酸由来のメタル化アミノ酸の中から特に安定性に優れたPtおよびPd結合型グルタミン酸を用いて自己組織化による金属集積型材料の開発に取り組んだ。

N,C-末端に種々の置換基を有するPt結合型グルタミン酸を合成し、その自己組織化能について詳細な検討を行ったところ図9に示す長鎖アルキル基を有するPt結合型グルタミン酸の有機溶媒溶液が、冷却-加熱操作によって可逆的にゾル-ゲル変換を起こすことを見出した(図10)^{23b)}。高倍率光学顕微鏡およびSEM

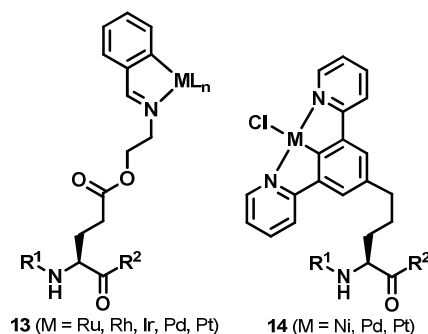
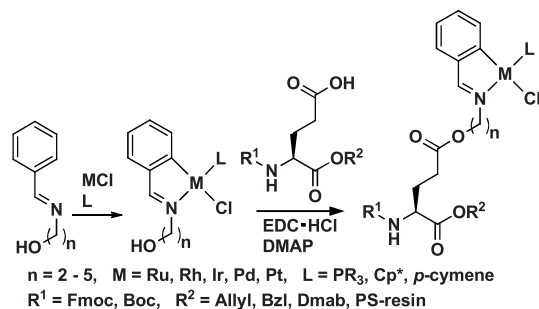


図8 メタル化グルタミン酸およびノルバリン誘導体



スキーム1 メタル化グルタミン酸の合成

観察から生成したゲルはアミノ酸の自己組織化によって生成する超分子ゲルに特有のミクロンサイズの繊維状構造体であることが示された。ゲルのIRスペクトルを測定したところ、 1627.8 および 3295.5cm^{-1} にそれぞれ溶液状態と比べて低波数シフトした $\text{C}=\text{O}$ (amide Iバンド) および N-H 伸縮振動が観察されたことから、ゲル繊維中における水素結合の形成が示唆された。これは特徴的な 1678.0 および 1527.5cm^{-1} (amide IIバンド) から**14**が分子間水素結合によって自己組織化した結果、アンチパラレル β -シート型の超分子構造体を形成していることを示す結果である。我々は精密な構造情報を得る目的で、cryo-TEMを用いて超分子ゲル繊維の構造解析に取り組んだ(図11)。その結果、 2.1nm 間隔の縞状構造を示すTEM像を得た。このTEM像は試料面より下方に焦点を合わせた画像であるため濃いラインは重元素であるPtを含有する領域と考えられる。さらにゲル繊維の制限視野での回折像測定を行ったところ、図12に示す様な綺麗な回折像を得る事に成功した。この回折像から集合様式の対称性、単位格子サイズ等の結晶学的パラメーターを算出することによって、超分子ゲル繊維中における**14**の正確な自己組織化様式を決定する事ができた(図13)。図中の黄球は**14**に結合したPt核を表すが、これがアルキル鎖で区切られるようにして交互に列をなして整列し、多

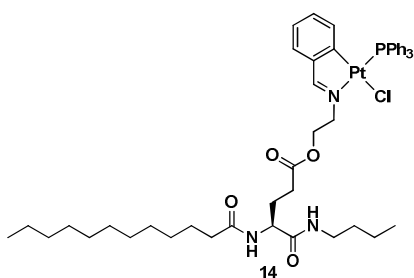


図9 長鎖アルキル基を有するPt結合型グルタミン酸

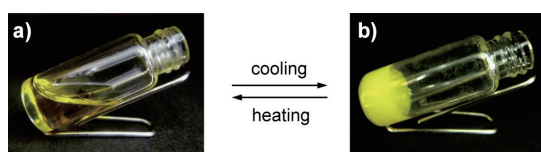


図10 Pt結合型グルタミン酸**14**のトルエン溶液のゲル化

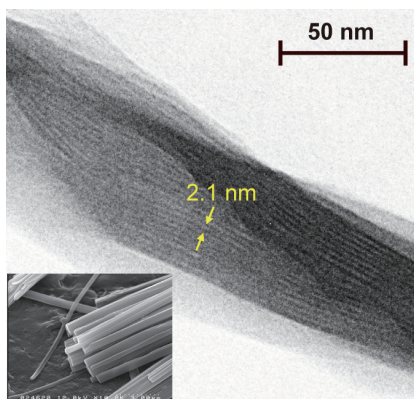


図11 Pt結合型グルタミン酸ゲル繊維のcryo-TEM像

層構造を形成している様子がよく分かる。この時、Pt核を含む層間の距離 2.18nm は図11中の濃い縞模様の間隔 2.1nm と良い一致を示している。図14に超分子構造体中におけるPtグルタミン酸の自己組織化様式を模式的に示した。この図から、Ptグルタミン酸が分子間水素結合(0.47nm)を介してアンチパラレル型の β -シート集合体を形成していることが分かるが、この構造はIRや広角X線(WAX)および小角X線(SAX)スペクトルから得られた構造情報と良い一致を示す。以上の結果より、ベンズアルジミン配位子を有するPt錯体を結合したグルタミン酸が有機溶媒中で自己組織化能を示し、超分子ゲルを与えるゲル化剤として作用する事。さらに、メタル化アミノ酸の超分子ゲル化を利用することによって、自己組織化構造をテンプレートとした金属の集積様式制御が可能であり、ナノサイズオーダーで構造の制御されたPt集積型分子材料の創出が可能である事が明らかとなった。また、本研究はメタル化アミノ酸を用いた機能性材料の開発では、

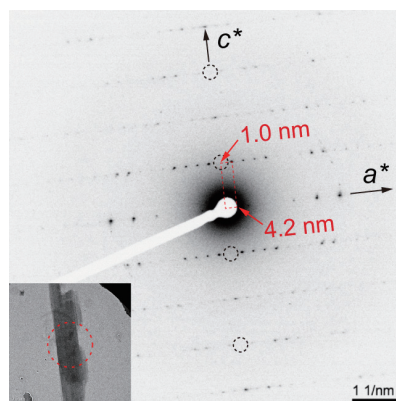


図12 Pt結合型グルタミン酸ゲル繊維の制限視野回折像

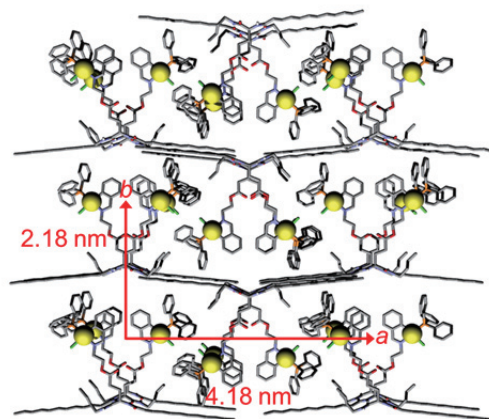


図13 Pt結合型グルタミン酸超分子のTEM解析構造

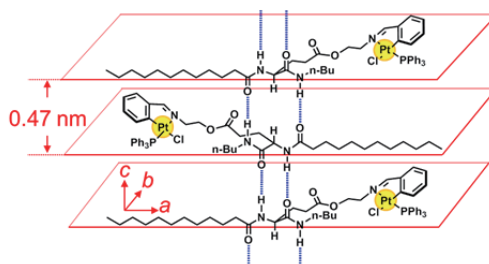


図14 超分子中ゲル中における**14**の会合様式

種々の化学変換や熱（超音波）等の物理刺激に対して安定なメタル化アミノ酸の開発が鍵となることが示された。

続いて、我々はベンズアルジミン錯体結合型グルタミン酸を連結する事によって、メタル化ペプチドを合成し、それらの自己組織化によってさらに高度な金属集積制御が行えると考え、まず、金属結合型グルタミン酸ペプチドの合成に取り組んだ。反応条件等の合成方法の詳細は省くが、保護基や縮合剤を工夫した結果、液相法を用いて良好な収率でPd-およびPt結合型グルタミン酸ペプチド**15-22**を合成する事に成功した（図15）^{23a}。尚、我々が調べた限りは現在までに文献既知のメタル化ペプチドにおいてPd錯体結合型のペプチドは上記のみである。興味深いことにこれらペプチドでは安定なヘリックス構造が誘起され、各種分析からPd錯体の塩素配位子とペプチド主鎖のアミドN-Hの分子内水素結合（Pd-Cl...H-N）によるself-lock構造の形成が確認された。グルタミン酸由来のペプチドはヘリックス構造を形成し易い事が知られているが、この様な短いペプチドで安定なヘリックスが誘起された例は無い。

続いて我々は上記ペプチド**15-18**の自己組織化による金属集積制御を試みた。その結果、溶液状態のこれらのペプチドに超音波を照射すると、超音波によって発生するマイクロキャビテーションによって前述の分子内水素結合に由来するself-lock型構造が破壊され、分子間水素結合の形成を駆動力とする自己組織化が進行し超分子ゲルが得られることを見出した^{23a, 24}。ここで我々は**15-18**の超分子ゲル化では超音波照射が必須条件であり、同じ溶液に加熱-冷却

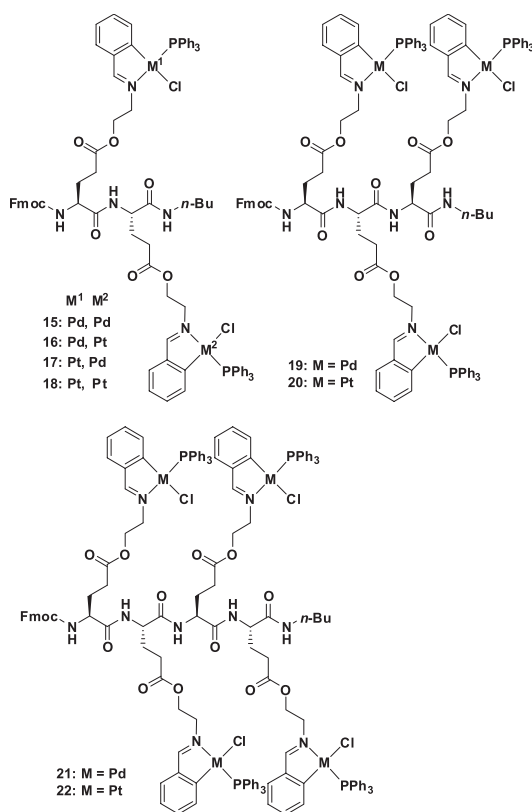


図15 Pd-, Pt-結合型グルタミンペプチド

操作を施してもゲルを生成することなく微結晶を生じるというユニーク物性を明らかにした。これら**15-18**から得られるPd,Pt-ジペプチドゲル中におけるジペプチドの自己組織化様式と金属の集積様式を明らかにするために、詳細な分析を行った。まず、Pdジペプチド**15**から得られた超分子ゲル繊維のSEM観察を行ったところ、超分子ゲルに特有のナノサイズ（～200nm）のベルト状の繊維の絡まり合った様子が観察された。また、ゲル繊維の表面には分子の長軸方向のサイズ（3.3nm）と良い一致を示す細い筋状の模様が見られた。さらに、SPRING-8において放射光を用いたWAXおよびSAX解析を行ったところ、超分子ゲル繊維中においてPdジペプチド**15**が分子間水素結合を介したパラレル配向のβ-シート会合体を形成していること、さらに、これらが階層的に集積化してβ-シート多層積層体（ラメラ構造体）を形成していることが明らかとなった（図16）。この結果は、前述のPt結合型グルタミン酸の自己組織化様式がアンチパラレル配向であったことと一見矛盾する様であるが、得られた超分子構造（図16a,c）を良く観察すると、Fmoc保護基が層間をつなぐようにπ-スタッキングした構造が見られ、これらがパラレル配向を安定化する要因になっていると考えている。このパラレル配向の会合は金属集積に関して大きなメリットとなる。つまり、N,C-末端の配向が一致しているため、**16**および**17**から得られるPd,Pt異種金属ジペプチドゲル中では、NあるいはC-末端のどちらか一方に同種の金属が配列した図16bに示す様な超構造体を与え、その結果、PdおよびPtが交互に配向制御された異種金属集積が達成されることとなる。実際に、我々は前述のSAX測定によってPd,Pt異種金属ジペプチドゲルがパラレル型β-シート会合体を形成していることを確認している。以上の結果より、PdおよびPtアルジミン錯体の結合したグルタミン酸が種々の化学変換や物理条件に対して高い安定性を示し、超音波ゲル化によって金属集積様式が精密に制御された超分子集合体を与

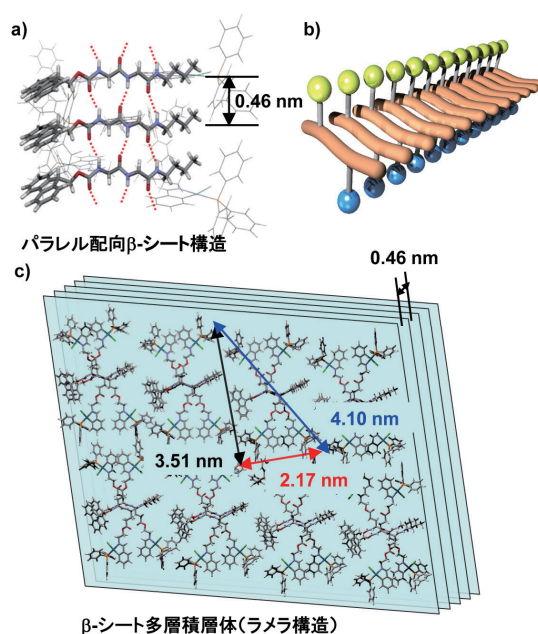


図16 Pd-, Ptグルタミンジペプチド超分子ゲルの構造

えることが示された。本研究は機能性金属錯体をアミノ酸やペプチドの自己組織化能を利用して集積制御した初めて例であり、メタル化アミノ酸やメタル化ペプチドの自己組織化が金属集積型機能性材料構築のための極めて有効な手段となり得ることを示している。

4. PdおよびPt 結合型ノルバリリン

ここまでの解説で、メタル化アミノ酸の分子設計において、導入する金属錯体の化学的、物理的な安定性が重要な鍵となることはご理解頂けると思う。合成が達成され、そしてその次に問題となるのは、触媒機能の創出には、金属がアミノ酸部位に連結した状態で、必要なタイミングで反応活性点（配位不飽和部位）を用意しなければならないということである。従って、触媒機能を有するメタル化アミノ酸やペプチドを開発しようとする時には、いくら安定であっても配位子と金属がガチガチに結合して決して外れないような錯体は使えないことになる。我々はピンサー型錯体が「挟み」と例えられる3座配位によって高い安定性を達成しながら、他方で配位子の解離・結合が可能な反応性の高い配位座を有するという点に着目して、NCN-ピンサー錯体が結合したメタル化アミノ酸の合成に着手した。尚、前述のvan Kotenらは、この様なピンサー型錯体の性質に着目し、触媒のみならず化学センサーへの応用研究を精力的に展開している¹⁷⁾。我々が注目したのはジピリジルベンゼン (dpb) 配位子を有するNCN-ピンサー錯体 (ML (dpb-X)) である (図17)。これらは金属-炭素結合を左右からピリジン配位子の窒素の配位で挟み込んで固定することによって極めて安定なシクロメタル化構造を形成する一方で、中心金属上にハロゲン等の置換活性の高い配位子が結合した「プレ活性点」を有している。まさに、触媒やセンサーへの応用に非常に適した構造モチーフである。我々はTaylor¹⁸⁾とvon Koten¹⁹⁾らの手法を参考にして、Br化されたdpb配位子 (X = Br) とパラジウム塩化物から合成したNCN-ピンサーPd錯体PdCl (dpb-Br) と、アリルグリシンから系中で調製したホウ素化ノルバリリンをPd触媒存在化下で反応させた。その結果、鈴木-宮浦カップリングが進行してNCN-ピンサーPd錯体結合型ノルバリリン**23**を72%収率で得ることに成功した (スキーム2)^{25a)}。

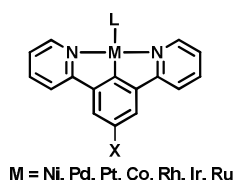
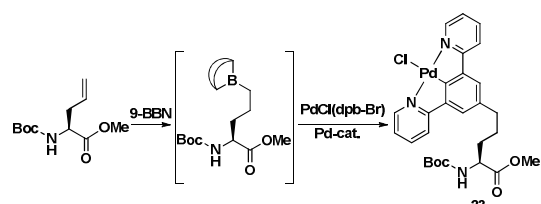


図17 ジピリジルベンゼン配位子を有するピンサー錯体



スキーム2 NCN-ピンサーPd結合型ノルバリリンの合成

NMRおよびLC-MSを用いた検証から、カップリング反応途中におけるPdの脱離副生物は一切観察されなかった。また、D体およびラセミ体の**23**を用いてキラルHPLC分析を行い、金属導入前後においてアミノ酸部位の光学純度に変化が無いことを確認した。加えて、SPRING-8 (BL38B1, BL40XU) で単結晶X線構造解析を行うことで絶対配置の決定を行い (図18)、キラルHPLC分析の結果に間違いがないことを確認した。現在までに報告されているメタル化アミノ酸についてキラルHPLCにより光学純度の確認が行われているものはわずかに2例であり、さらにX線構造解析によって絶対配置を含む分子構造が確認されているものは4例に過ぎないが、これらは全てメタロセン、アレーン錯体結合型のアミノ酸にで得られた結果である。一般にメタル化アミノ酸は結晶性が悪く、単結晶X線構造に必要な大きさの結晶を得ることが困難である。これは超分子ゲル中でも観察されたアミド水素による分子間水素結合によって、異方性の高い準安定な分子集合体の生成が速度論的に有利であるためと考えられる。実際に、我々はいくつかのメタル化アミノ酸について水素結合を阻害するような溶媒条件においてのみ、小さいながらも良好な単結晶が得られることを明らかにしている。

Pd結合型ノルバリリンの自己組織化能について研究する目的で**23**のN,C-末端へのアルキル基導入について検討を行った。スキーム3に示す様に**23**のC-メチルエステルを塩基性条件下で脱保護し、生成するC-フリー体を精製することなくDMT-MM^{26,27)}を用いて第一級アミンと反応させると縮合反応が効率良く進行し、C-末端アルキルアミド化体**24**が効率よく得られた。得られた**24**を今度は酸性条件下で脱Boc化し、生成するN-末端フリー体をDMT-MMを用いて一級カルボン酸と縮合させると対応するN,C-両末端アルキルアミド化体**25**が得られた。尚、本反応は**23**を用いた場合も良好に進行し、C-末端メチルエステルが脱保護されること無く対応するN-アルキルアミド化体

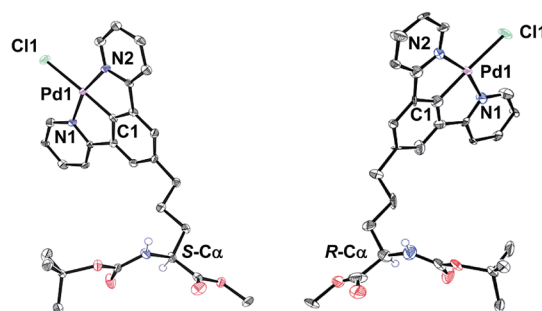
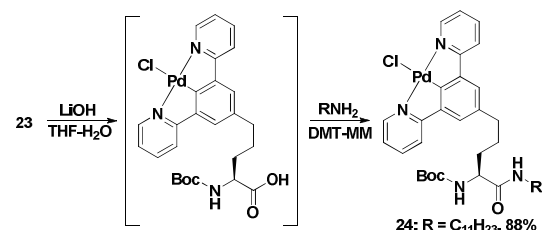


図18 D-/L-NCN-ピンサーPd結合型ノルバリリンの分子構造



スキーム3 Pd結合型ノルバリリン**23**のC-末端変換

26が得られる。我々はこれらの*N,C*-末端変換反応においても、金属の流出が無いこと、アミノ酸部位の光学純度が損なわれていないことをNMRやLC-MSおよびキラルHPLC分析によって確認しており、このことからPd結合型ノルバリリン**23**はペプチド合成における直交性を有することが示された。尚、これらの官能基導入においてDCCやEDCI等の縮合剤は望みの生成物をほとんど与えなかった。また、立体障害の高いアミノ酸のペプチド縮合に効果のあるCOMU, HATU, HBTU, PyBOP, T 3 P等の縮合剤は40-65%の収率で生成物を与えるに留まった。一方、DMT-MMではカウンターアニオンがCl⁻, BF₄⁻, PF₆⁻が異なってもいずれも良好な収率で生成物を与えた他、前駆体であるCDMT²⁶を*N,C*-フリーアミノ酸と混合した後に、適当なアミンの存在下に縮合反応を行った際にも良好な収率で生成物が得られた。

アルキル鎖を有するPd結合型ノルバリリン**24-26**の自己組織化能について検討を行ったところ、いずれも芳香族性有機溶媒に対してゲル化能を示し、溶液を加熱冷却することによって超分子ゲルを与えることを見出した。例えば、*C*-末端に長鎖アルキル基を有する**24**は図19に示す様な黄色不透明のゲルを与える。生成する繊維状の集合体をcryo-TEMで観察したところ、前項で紹介したPt結合型グルタミン**14**と同様の縞状構造が見られ、自己組織化によるPd錯体の集積制御が達成されていることが示唆された。cryo-TEMの制限視野回折像とSPRING-8 (BL19B 2, BL40B 2)における放射光WAXおよびSAX測定等の各種スペクトルの分析から、ゲル中における**24**の超分子構造は図20の様であると考えている。この構造からはPdCl(dpb)錯体ユニットがアルキル鎖の集積した領域に挟まれるように交互に集積化している様子がよく分かる。図21は**24**の超分子構造を*C*軸方向から見たものであるが、分子間水素結合を介してアンチパラレル配向の会合様式となっており、このことによってPdCl(dpb)錯体

部位が一つ飛びに π -スタッキングしながら*c*軸方向にカラムを作るようにして集積化していることが明らかとなった。この様なスタッキングの存在はUVスペクトル中における芳香族領域の顕著な淡色効果をよく説明している。

NCN-ピンサー Pd 錯体結合型ノルバリリンが各種の反応条件や物理刺激に対して高い安定性を示し、アミノ酸部位に本来備わっている自己組織化機能を利用することによって、金属集積様式の制御された超分子集合体を合成できることを明らかにした。我々は、さらに一歩進んで集積制御された金属錯体の機能探索を行った。メタル化アミノ酸超分子ゲルは金属が高密度に接近して集積化された表面を持ち、また微細な繊維状の超分子集合体が網目状に絡まりあった構造は、無数の細孔を有する表面積の大きな構造体となっている。この様な構造はメソポーラスシリカに代表されるような不均一系固体触媒と共通点が多い。我々は超分子ゲルが水に対して不溶であることに着目し、メタル化アミノ酸超分子ゲルを触媒とする水系での反応について検討を行った。その結果、式1に示す様に**24**から調製したトルエンゲルから調製したキセロゲルが水中で不均一系触媒として作用し、アルキン酸類の環化反応が効率良く進行して、対応するラクトンが得られることを見出した^{25b, 28)}。用いたゲル触媒は反応後にろ過回収するこ

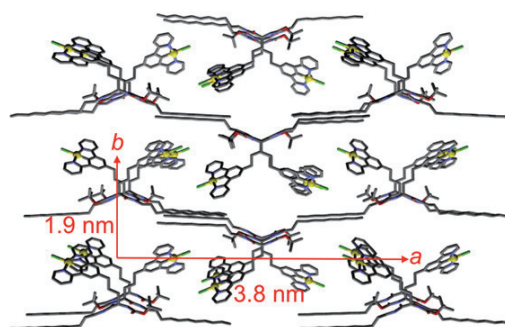
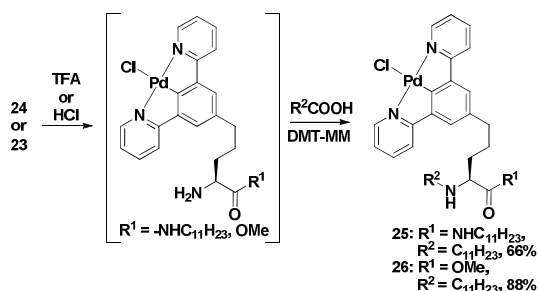


図20 Pd結合型ノルバリリン**24**超分子のTEM解析構造



スキーム4 Pd結合型ノルバリリン**24, 23**の*N*-末端変換

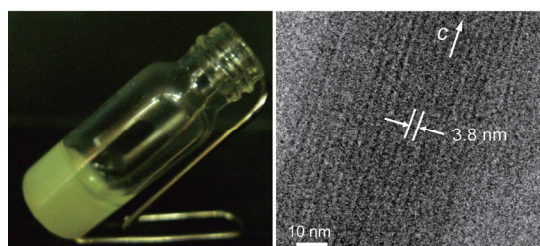


図19 Pd-ノルバリリン**24**トルエンゲルおよびcryo-TEM像

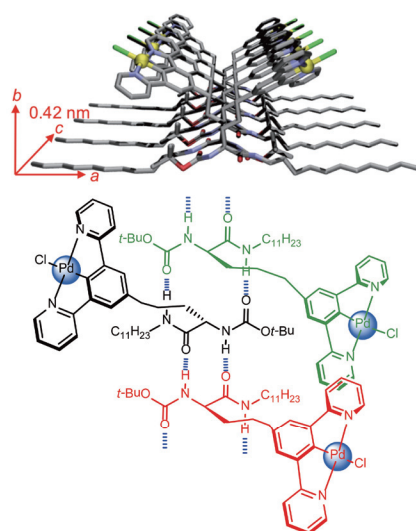


図21 超分子中ゲル中における**24**の会合様式

とで再利用が可能であり、収率の大幅な低価無しに3回程度の利用が可能である。本反応はアミノ酸部位を持たないPdCl(dpb)錯体を触媒として用いた時と比べて2-5倍程度の速度向上が見られたが、これは有機基質の水からゲル中への取込みによる濃縮効果によるものと考えている。実際に図22に見られるように、水溶液中のゲルに基質を加えると、速やかに基質を吸収してゲルが膨潤することがわかる。また、本反応では通常この種のPd触媒による反応に見られるようなPdブラックの生成が全く観察されなかった。この事はICP-MS分析によって反応終了後の水層中にPdがほとんど含まれていない事実と合わせると超分子ゲルが触媒と親和性の高い担体として作用し、脱離した0価Pd種を速やかに補足する効果があり、これが触媒寿命の向上に寄与しているのでは無いかと考えている。尚、反応中および終了後のゲル触媒のXANES分析(SPring-8, BL14B2)からは0価Pdが全く含まれていない事を確認している。

以上の様に我々は化学的、物理的な安定性と高い触媒活性を併せ持つジピリジルベンゼン錯体をアミノ酸に結合することによって、高機能な超分子触媒の開発に成功した。アミノ酸の特質たる自己組織化と機能性有機金属分子の結合によって、両者の特性をうまく利用した超分子機能性材料の創出が可能となる。我々は上記の触媒機能以外にも優れた光・電子機能を有するPtCl(dpb)結合型のノルバリן超分子が96%という高い量子収量で5 msを超える発光機能を示すことや、ポリアセチレンに迫る高い電気伝導度を示すことも見出している。

5. おわりに

メタル化アミノ酸について、結合様式、合成方法による分類を発見・開発の歴史的経緯を交えて詳しく解説した。また、機能性有機金属錯体を連結したメタル化アミノ酸に関する我々の最近の研究成果について、分子デザインの際のコンセプトや合成化学的な観点から従来のメタル化アミノ酸との違い、また、自己組織化を利用した金属集積制御への応用、得られた金属集積型超分子集合体の触媒への利用について紹介した。冒頭で述べた様にメタル化アミノ酸研究は50年以上の歴史がある古い分野である。しかし、単離され、その構造や物性あるいは化学的性質が明らかにされている

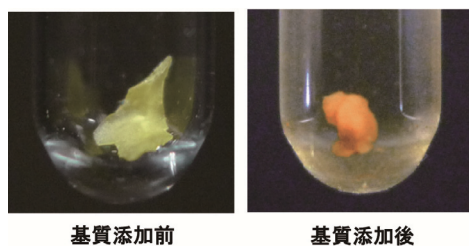
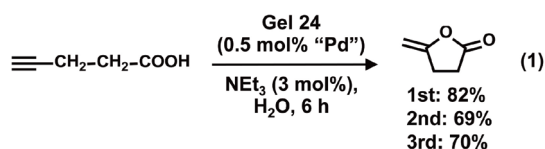


図22 水溶液中での超分子ゲル24の基質添加による膨潤

ものは驚くほど少なく、さらに機能性分子としての利用はメタロセン結合型メタル化アミノ酸を除くと、まだほとんど手付かずの状態である。高度な機能を持つ金属錯体が結合したメタル化アミノ酸の開発やその応用は2000年代に入ってからようやく始まったばかりである。アミノ酸やペプチドは生体の構造材料として抜群の堅牢性と構造多様性を有する。構造制御によって機能を生み出そうとする際に、DNAの様な情報伝達分子あるいは糖鎖や脂質の様な他の生体分子とは比較にならないほど、材料利用における優位性は高いと考えている。現在、さらに大きなポリメタル化ペプチドや蛋白質への組み込みによる人工酵素の開発等に取り組んでいるが、新しいタイプのBioorganometallic Materialの創出、細胞内での有機金属触媒反応など将来の応用への確かな手がかりを感じワクワクしながら研究を進めている。

最後に、本研究を進めるにあたって実際に実験を行なってくれた学生諸氏ならびに大阪大学在籍時に指導頂いた直田教授に深謝申し上げたい。また、共同研究者であるSPring-8の安田伸宏博士ならびにTEM測定を頂いた京都大学化学研究所の小川哲也博士、倉田博基教授に心からの感謝を申し上げたい。尚、本研究は科研費、新学術領域「配位プログラミング」、JST さきがけ「構造制御と機能」、CREST「元素戦略を基軸とする物質・材料の革新的機能の創出」ならびに「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化と生産物活用のための基盤技術の創出」によって進められた。

参考文献

- 1) 有機金属化合物というと、元来は金属-炭素の化学結合を含む化合物として定義されているが、最近ではジピリジン錯体やホスフィン錯体の様に有機分子が金属-ヘテロ元素結合を介して結合した金属錯体も広義の有機金属化合物として扱われることが多い。そのため例えばキレート配位子等を介して、金属-窒素あるいは金属-酸素結合等の金属-ヘテロ元素結合を介して金属元素と結合した生体分子も、Bioorganometallic Compoundとみなされることが多い。本稿でもこれら広義の意味で“有機金属”という用語を用いる。
- 2) 英語ではmetallated amino acidと表記されることが多く、「金属結合型の-」を意味するmetallo(語幹(metal) + 結合語(lo))を用いたmetalloamino acidあるいはmetallo-amino acidの表記もしばしば見られるが、IUPACや学協会による定義は無いようである。また、前項の有機金属の定義に基づく配位子上の炭素に結合した水素を置換する形で金属が結合したタイプのメタル化アミノ酸は置換命名法に従いmetalla-amino acidと呼称するのが相応しいと思われるが、この用語はほとんど用いられていない。
- 3) W. Cremer, *Biochem. Z.* **1928**, *194*, 231-232.
- 4) K. Schlögl, *Monatsh. Chem.* **1957**, *88*, 601-621.
- 5) a) N. Metzler-Nolte, M. Salmain in, *Ferrocenes: Ligand, Materials and Biomolecules*, (Ed: P. Stepnicka), John Wiley & Sons, West Sussex, **2008**, pp. 499-639; b) N. Metzler-Nolte in, *Bioorganometallics*, (Ed: G. Jaouen), Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, pp. 125-179; c) D. R. van

- Staveren, N. Metzler-Nolte, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 5931–5985.
- 6) For compound **2**: a) A.-S. Carlström, T. Frejd, *Synthesis* **1989**, 414–418; b) A.-S. Carlström, T. Frejd, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4175–4180; for compound **3**: J. C. Brunet, E. Cuingnet, H. Gras, P. Marcincal, A. Mocz, C. Sergheraert, A. Tartar, *J. Organomet. Chem.* **1981**, *216*, 73–77.
- 7) a) P. J. Graham, R. V. Lindsey, G. W. Parshall, M. L. Peterson, G. M. Whatman, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3416–3420; b) H. Dialer, W. Steglich, W. Beck, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4855–4816; c) R. M. Moreno, M. Catasú, C. López, A. Moyano, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2388–2396.
- 8) C. Sergheraert, J.-C. Brunet, A. Tartar, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 1417–1418.
- 9) For compound **5**: a) A. J. Gleichmann, J. M. Wolff, W. S. Sheldrick, *J. Chem. Soc., Dalton trans.* **1995**, 1549–1554; b) J. M. Wolff, W. S. Sheldrick, *J. Organomet. Chem.* **1997**, *531*, 141–149; for compound **6**: a) R. M. Moriarty, Y.-Y. Ku, U. S. Gill, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1987**, 1837–1838; b) A. J. Pearson, J. G. Park, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1744–1752.
- 10) B. M. Peek, G. T. Ross, S. W. Edwards, G. J. Meyer, T. J. Meyer, B. W. Erickson, *Int. J. Pept. Res.* **1991**, *38*, 114–123.
- 11) a) K. A. Stephenson, J. Zubieta, S. R. Banerjee, M. K. Levadala, L. Taggart, L. Ryan, N. McFarlane, D. R. Boreham, K. P. Maresca, J. W. Babich, J. F. Valliant, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 128–136; b) K. A. Stephenson, S. R. Banerjee, T. Besanger, O. O. Sogbein, M. K. Levadala, N. McFarlane, J. A. Lemon, D. R. Boreham, K. P. Maresca, J. D. Brennan, J. W. Babich, J. Zubieta, J. F. Valliant, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8598–8599; and also see, c) H. Jiang, E. J. O’Neil, K. M. DiVittorio, B. D. Smith, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3013–3016; d) A. Ojida, K. Honda, D. Shinmi, S. Kiyonaka, Y. Mori, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10452–10459.
- 12) a) N. Aubert, V. Troiani, M. Gross, N. Solladié, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8405–8408; b) T. Hasobe, K. Saito, P. V. Kamat, V. Troiani, H. Qiu, N. Solladié, K. S. Kim, J. K. Park, D. Kim, F. D’Souza, S. Fukuzumi, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 4160–4170; and also see, c) T. Yamamura, S. Suzuki, T. Taguchi, A. Onoda, T. Kamachi, I. Okura, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11719–11726.
- 13) a) S. Liu, D. S. Edwards, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2235–2268; b) J. Fichna, A. Janecka, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 3–17; c) M. Bartholomä, J. Valliant, K. P. Maresca, J. Babich, J. Zubieta, *Chem. Commun.* **2009**, 493–512; d) S. Lee, J. Xie, X. Chen, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3087–3111.
- 14) A. J. Pearson, P. R. Bruhn, S.-Y. Hsu, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2137–2139.
- 15) a) R. F. W. Jackson, D. Tuner, M. H. Block, *Synlett* **1996**, 862–864; b) I. Rilatt, L. Caggiano, R. F. W. Jackson, *Synlett* **2005**, *18*, 2701–2719 and see references cited therein.
- 16) a) D. J. Hurley, J. R. Roppe, Y. Tor, *Chem. Commun.* **1999**, 993–994; b) D. J. Hurley, Y. Tor, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7217–7220.
- 17) a) M. Albrecht, G. van Koten, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3866–3898; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3750–3781; b) B. Wieczorek, H. P. Dijkstra, M. R. Egmond, R. J. M. K. Gebbink, G. van Koten, *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 812–822.
- 18) α 位側鎖のホウ素化されたアミノ酸の鈴木–宮浦カップリングの初めての例. a) P. N. Collier, A. D. Campbell, I. Patel, R. J. K. Taylor, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7115–7119; b) P. N. Collier, A. D. Campbell, I. Patel, T. M. Raynham, R. J. K. Taylor, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1802–1815.
- 19) a) G. Guillena, G. Rodriguez, M. Albrecht, G. van Koten, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 5368–5376; b) G. Guillena, C. A. Kruithof, M. A. Casado, M. R. Egmond, G. van Koten, *J. Organomet. Chem.* **2003**, *668*, 3–7.
- 20) S. Maiorana, E. Licandro, D. Perdicchia, C. Baldoli, B. Vandoni, C. Giannini, M. Salmay, *J. Mol. Cat. A: Chem.* **2003**, *204–205*, 165–175.
- 21) キレート配位子としてterpyおよびphenを有するアミノ酸を合成し、B法によって金属を後から導入したメタル化アミノ酸とペプチドの合成を行った例として、a) P. Vairaprakash, H. Ueki, K. Tashiro, O. M. Yaghi, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 759–761; b) A. M. Fracaroli, K. Tashiro, O. M. Yaghi, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 6437–6439.
- 22) メタル化アミノ酸同士を直接縮合してメタル化ペプチドを合成した例は、我々のref 23, 24の他、ref 12a,b), ref 21が知られているが、いずれもNMRやMSスペクトルの報告が無いが、あるいは報告されたMSやNMRスペクトルが不明慮で合成途中の欠損等による不純物を多く含んでいることが考えられる。配位部位を有するアミノ酸をペプチドへと変換した後に、最後に金属を入れるB法に相当する手法で合成されたメタル化ペプチドは今までに下記の4例が報告されている。a) K. Tanaka, K. Shigenori, M. Shionoya, *Chem. Commun.* **1999**, 2475–2476; b) F. Fujimura, S. Kimura, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 793–796; c) A. Ojida, S. Fujishima, K. Honda, H. Nonaka, S. Uchinomiya, I. Hamachi, *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 877–886 and also see ref 11d and 12c. また、フェロセンを結合型のリシンをAibトリペプチドをスパーサーとして4残基毎に導入したハイブリッド型のメタル化ペプチドも報告されている。K. Kitagawa, T. Morita, S. Kimura, *Langmuir*, **2005**, *21*, 10624–10631.
- 23) a) K. Isozaki, H. Takaya, N. Naota, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2855–2857. b) K. Isozaki, K. Ogata, Y. Haga, D. Sasano, T. Ogawa, H. Kurata, M. Nakamura, T. Naota, H. Takaya, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3936–3938.
- 24) a) 高谷 光, 磯崎勝弘, 直田 健, “バイオナノプロセス-溶液中でナノ構造を作るウェット・テクノロジーの薦め”, 山下一郎, 芝 清隆 監修, シーエムシー出版, 第14章, **2008**, 129–146; b) 高谷 光, *Organometallic News*, **2009**, 38–43; c) 高谷 光, 磯崎勝弘, 中村正治, 触媒, **2009**, *51*, 588–593; d) 高谷 光, “金属と分子集合-最新技術と応用-”, 松尾 豊 監修, シーエムシー出版, 第2章, **2010**, 25–41.
- 25) a) K. Ogata, D. Sasano, T. Yokoi, K. Isozaki, H. Seike, N. Yasuda, T. Ogawa, H. Kurata, H. Takaya, M. Nakamura, *Chem. Lett.* **2012**, *14*, 194–196; b) K. Ogata, D. Sasano, T. Yokoi, K. Isozaki, H. Seike, N. Yasuda, T. Ogawa, H.

Kurata, H. Takaya, M. Nakamura, *Chem. Lett.* **2012**, 14, 498–500.

- 26) a) Z. J. Kamiński, *Synthesis*. **1987**, 917–920; b) Z. J. Kamiński, B. Kolesińska, J. Kolesińska, G. Sabatino, M. Chelli, P. Rovero, M. Błaszczak, M. L. Głowska, A. M. Papini, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 16912–16920.
- 27) a) M. Kunishima, C. Kawachi, F. Iwasaki, K. Terao, S. Tani, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 5327–5330; b) M. Kunishima, C. Kawachi, J. Monta, K. Terao, F. Iwasaki, S. Tani, *Tetrahedron* **1999**, 55, 13159–13170.
- 28) Lambert, K. Utimoto, H. Nozaki, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 5323–5326.

たかや ひかる
京都大学化学研究所附属
元素科学国際研究センター
takaya@scl.kyoto-u.ac.jp
いそざき かつひろ
京都大学化学研究所附属
元素科学国際研究センター, JST CREST
kisozaaki@scl.kyoto-u.ac.jp
なかむら まさはる
京都大学化学研究所附属
元素科学国際研究センター
masaharu@scl.kyoto-u.ac.jp

鋳型誘起反応の開発に基づくリン酸化タンパク質認識ペプチドの化学転写合成

1. はじめに

タンパク質リン酸化に起因するシグナル伝達は成長、増殖、生死などを制御する極めて重要な経路で、がん細胞においてはこのシグナルが過剰に伝達され、細胞増殖やアポトーシス抵抗性を引き起こす。そこでリン酸化シグナルの遮断は抗がん作用に繋がるため、キナーゼ阻害剤であるゲフィチニブなどの抗がん剤が開発された。一方、リン酸化タンパク質とそれを認識するタンパク質の結合を阻害することでシグナルを遮断する試みも多数行われてきた。その多くはリン酸化ペプチドやそのミミックを用いるもので、標的タンパク質が複数のリン酸化シグナルに対応しているために選択性に問題



田中 克典

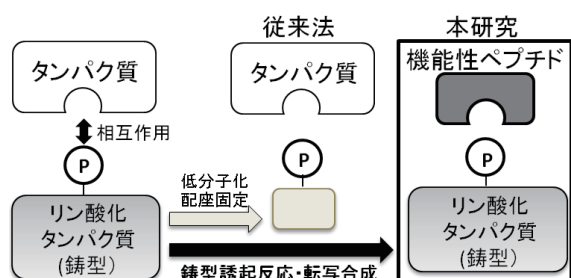


図1 リン酸化シグナルを制御するための2つのアプローチ

があった(図1, 文献1に示した報文を参照)。これに対して著者らは最近、独自の鋳型誘起反応により、リン酸化タンパク質(鋳型)を認識する機能性ペプチドを、鋳型から転写合成する方法を開発した。得られるペプチドは特定のリン酸化タンパク質に選択的で、個々のタンパク質-タンパク質間相互作用を制御可能な分子をテイラーメイドに設計できる。著者らはこの戦略により、上皮成長因子受容体(EGFR)の下流のシグナル伝達において、リン酸化タンパク質を認識する重要なアダプタータンパク質であるGrb2/SH2ドメイン(Growth-factor Receptor-Bound protein 2/Src Homology2)の疑似ペプチドを創製することに成功した¹⁾。このペプチドは、Grb2/SH2ドメインを凌駕するリン酸化タンパク質選択性を示し、EGFRを高発現する癌細胞に対して選択的な細胞増殖抑制作用を示した。さらに癌モデルマウスにおいても顕著な癌選択的増殖抑制効果を示すことを見出したので、本稿ではこれらの成果についてまとめて紹介したい。

2. 鋳型誘起合成の戦略とGrb2/SH2ドメイン疑似ペプチドの創製

著者らが想起した鋳型誘起合成の概略を図2に示す。我々はこれまでに、**1**のようなペプチド(図4, ペプチド**1**参照)が、2つのリジン残基を介してリン酸基と結合することを見出していた²⁾。そこで、アジド基のような反応基を備えたペプチド**1**に対して、鋳型となる標的リン酸化タンパク質を配位させた後(図2, ステージI)、さらに幾つかのペプチドライブラリーを同時に作用させることにより、最終的にこのライブラリーの中から鋳型にフィットするペプチドが選択されると考えた(ステージII)。この段階で、非可逆的な結合形成反応(鋳型誘起反応, ステージIII)を実施することにより、鋳型のリン酸化タンパク質に選択的に結合するペプチドが得られると予測した。

当初、非可逆的な結合形成反応として、1価銅と塩基の存在下におけるアジド基とアセチレン基とのHuisgen環化反応を検討していたが、ペプチドを基質として用いた場合には、銅イオンが基質に強く配位するために、反応が良好に進行しなかった。さらに、塩基性条件下で異性化しやすいペプチドには使用できず、鋳型誘起合成に耐えうる結合形成反応として利用することができなかった。そこで反応条件を精査した結果、塩基に代わる新たな添加剤としてヒスチジン誘導体を見出し、中性条件下でのHuisgen環化反応を実現した。さらにヒスチジンをペプチドに導入することによって(図3)、「自己活性化型」に反応を進行させることが可能であり、これまで難しいとされてきた複雑なペプチド同士の反応を良好に進行させることに成功した³⁾。尚、この「自己活性化型」クリック反応は、アスパラギン結合型糖鎖のような多くの水酸基を有する巨大糖鎖とペプチドを効率的に結合させることも可能であり、著者らは分子量が5万を超す世界最大のN-型糖ペプチドクラスターの調製に成功するとともに、その糖鎖構造依存的な生体内ダイナミクスをPETイメージングにより可視化することにも成功している⁴⁾。

そこで以上の知見を基に、Grb2/SH2ドメイン疑似ペプチドの鋳型誘起合成を実施した(図4)。実際の

検討では、Grb2/SH2が認識するリン酸化部分配列に選択的な分子を効率良く得るために、既知のモデルリン酸化環状ペプチド **3** を鋳型として用いた (図4)。さらにアセチレンペプチドライブラリー **2** を構成するアミノ酸は、既に報告されているGrb2/SH2ドメインとペプチド **3** とのX線結晶構造解析を基に選択した。すなわち、ヒスチジン残基を導入したペプチド **1** に対して、リン酸化ペプチド **3** (鋳型) の存在下、および非存在下で、アセチレンペプチドライブラリー **2** とのHuisgen 反応を行った。HPLCを用いて鋳型の有無による生成物の相違を検討した結果、3種類のクリックペプチド **4 a-c** がリン酸化ペプチド **3** の存在下で顕著に再現性良く生成することが判明した。

そこで、これらペプチドを固相法によって再合成した (スキーム1上段)。Wang resin上に担持したアジドペプチド **5** に対して、過剰量のヨウ化銅、およびジイソプロピルエチルアミン存在下、アセチレンペプチドとのHuisgen 環化反応を固相上で行った。反応終了後、金属配位子であるDOTAを用いて残留銅イオンを配位させ、洗浄操作により効率的に除去した後、酸

によるペプチド鎖の切断、HPLCによる精製を経て、目的のクリックペプチド **4 a-c** を効率的に得ることができた。この方法により、グラムスケールでペプチドを合成することが可能となり、後述の動物実験にも展

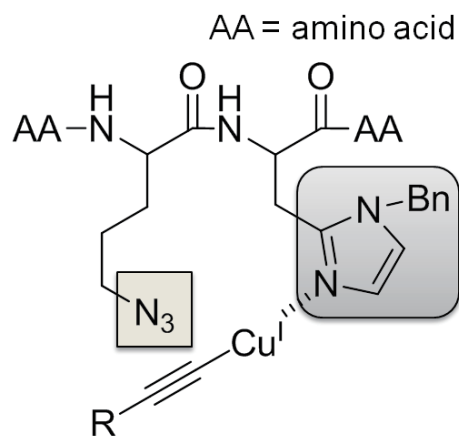


図3 ヒスチジン活性化基による自己活性化型クリック反応

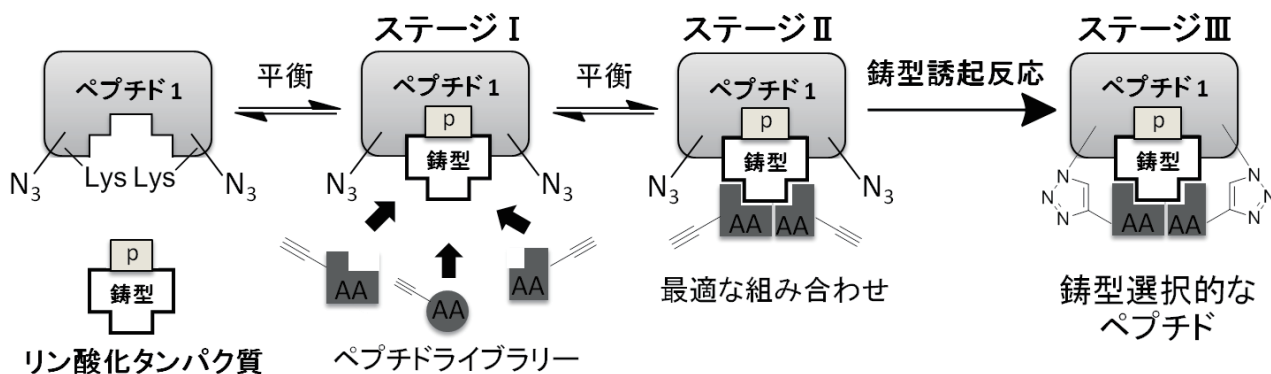


図2 リン酸化タンパク質 (鋳型) を認識する機能性ペプチドを鋳型から転写合成する概念図

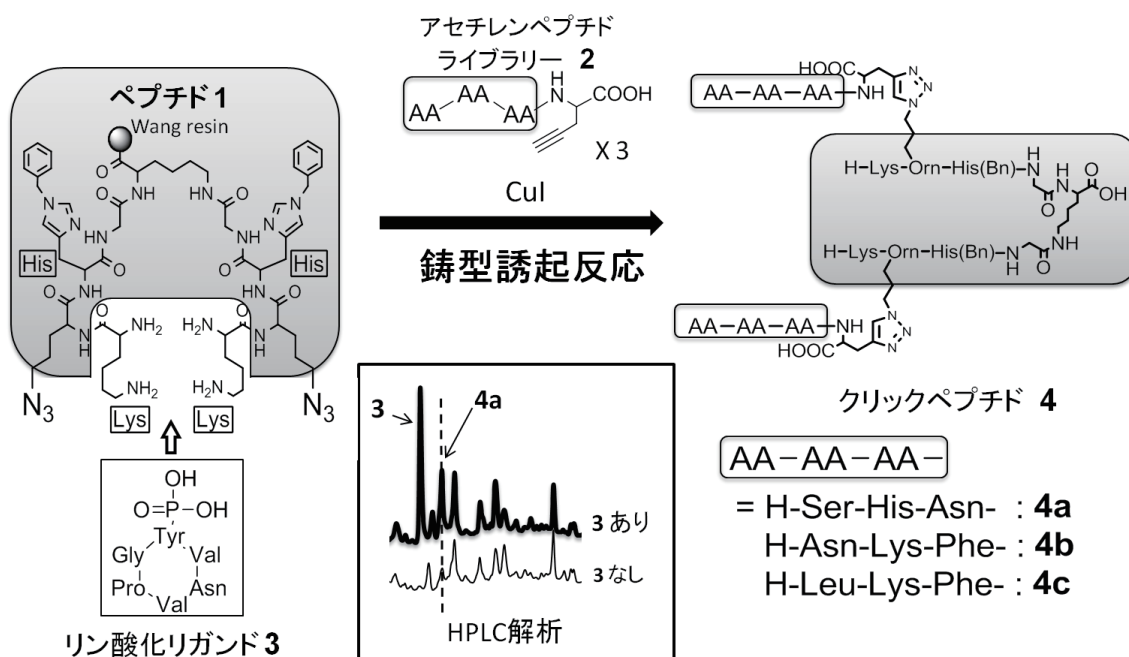


図4 Grb2/SH2ドメイン疑似ペプチドの鋳型誘起合成

開することができた。蛍光標識した環状リン酸化ペプチド **3** に対するペプチド **4 a-c** の解離定数を求めた結果、それぞれ数 μM 程度の相互作用を示すことが判明した (**4 a**: $1.5\mu\text{M}$, **4 b**: $2.4\mu\text{M}$, **4 c**: $2.4\mu\text{M}$)。このように、著者らが提起した鋳型誘起合成法を用いて、Grb2/SH2ドメインの疑似低分子となり得るペプチドを創製することができた¹⁾。

さらにリン酸化ペプチド **3** との相互作用を向上させることを目指して、ペプチド **4 a** の配座固定を検討した。すなわち、**4 a** のペプチドに対して環状構造を導入することにより、リン酸基の認識に重要な2つのリジン残基が互いにより接近し、相互作用が増大すると期待した (スキーム1下段)。グリシン側鎖にアシル基を導入した中間体ペプチド **6** に対して、1,2-ジクロロエタン中、40mol%の第二世代 Grubbs 触媒を40℃で24時間作用させたところ、固相上で閉環メタセシス反応を定量的に進行させることができた (シス体のみ生成)。さらに固相上でペプチド鎖を伸長後、アセチレンペプチドとの自己活性化型 Huisgen 環化反応を経て、目的のペプチド **9** を得た。ペプチド **9** は、リン酸化ペプチド **3** に対して590nMの解離定数を示し、直鎖型のペプチド **4 a** に比較して約3倍の向上を達成した⁵⁾。

3. Grb2/SH2ドメイン疑似ペプチドの細胞内シグナル伝達に及ぼす影響

次いで著者らは、上記で得られたクリックペプチドのうち、合成供給や誘導化が容易な **4 a** を基本分子として、TAMRA 蛍光やビオチン標識体 (図5) を調製して、細胞内のシグナル伝達に及ぼす影響を検討した。

これら標識基は、ペプチド **4 a** の活性に影響を与え

ないように、C末端に対してグリシン/システインを介して導入した。まず、EGFRを高発現するA431ヒト扁平上皮癌細胞 (Grb2/SH2を介したシグナル伝達が細胞増殖に寄与する) に対してTAMRA-**4 a** を作用させたところ、濃度依存的に細胞内に取り込まれることが判明した (図6A)。そこで、A431癌細胞に対して10 μM の**4 a**を37℃で6時間作用させたところ、顕著な細胞増殖抑制活性やアポトーシス誘導活性を示すことが判明した (図6B)。一方、EGFRを高発現しないC6ラットグリオーマ細胞に対してもペプチド**4**は細胞内に取り込まれたが、これらの効果は全く認められなかった (図6C)。さらに、Huisgen 反応前駆体ペプチド**10**を用いた場合にも、両者の細胞に増殖抑制効果は見られなかった (図6D)。

そこで、ビオチン標識体 (biotin-**4 a**, 図5) を用いてA431細胞ライセートから標的のリン酸化タンパク質を探索した。EGFR細胞のライセートに対して

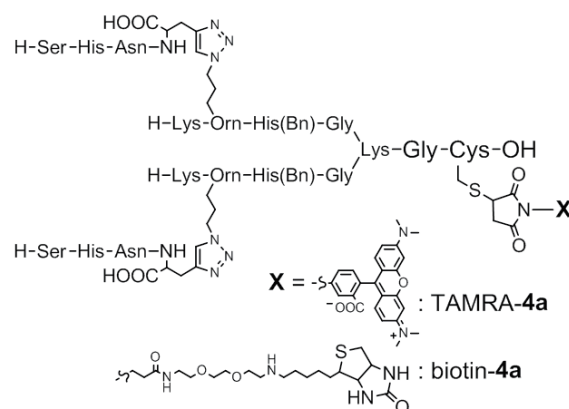
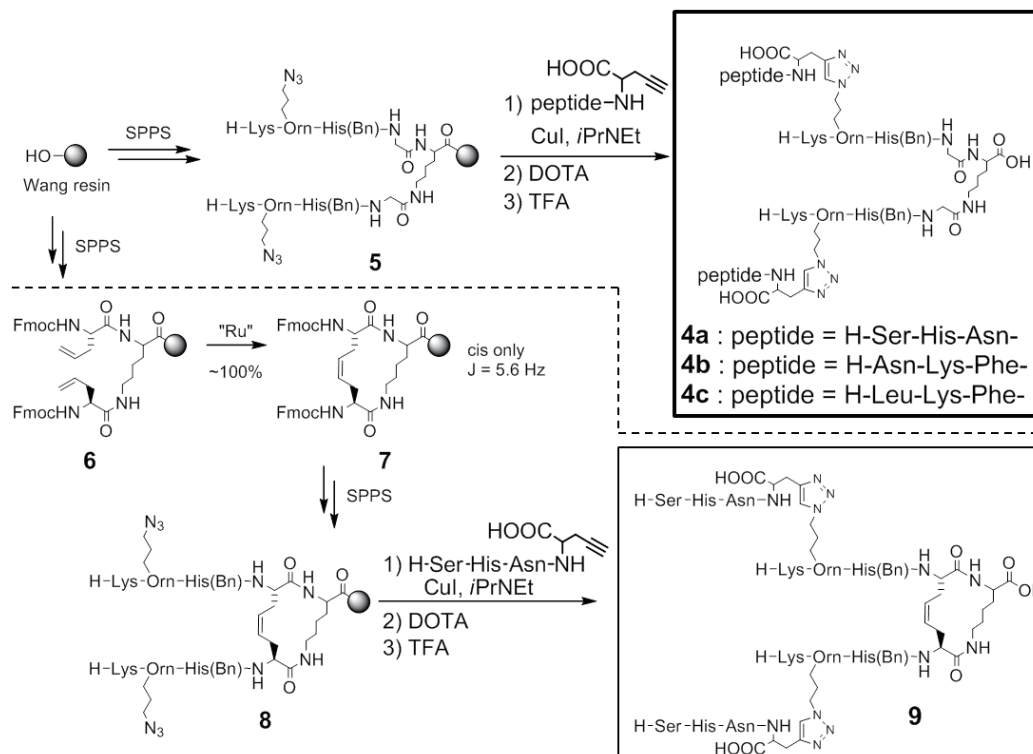


図5 蛍光やビオチン標識クリックペプチドの構造

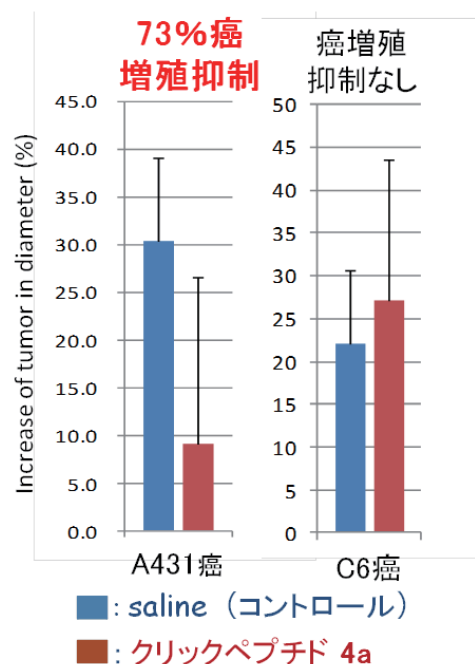


スキーム1 鋳型誘起反応により得られたクリックペプチドの再合成と相互作用向上を意図した環状アナログの固相合成

100 μ Mのbiotin-**4a**を作用させた後、アビジンビーズで標的タンパク質を抽出した。SDS-PAGE/リバー染色により解析したところ、65kDaに強度は弱いものの、明確なバンドを認めることができた(図7A)。そこで、EGFRシグナル伝達経路において、Grb2/SH2が認識する4つの代表的なリン酸化タンパク質(EGF, Gab1, Shc, IRS-1)、およびCrkL/SH2が認識する2つのリン酸化タンパク質(CAS, CBL)の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、Shc抗体を用いた場合に65kDaのバンドを検出することができた(図7B)。さらにShc抗体とproteinA-アガロースを併用することにより、細胞内で結合した**4a**/リン酸化Shc複合体を抽出することに成功した。以上のように、**4a**はA431細胞内でリン酸化Shcタンパク質に選択的に結合して、細胞選択的に増殖抑制活性を示すことが明らかとなった¹⁾。

4. Grb2/SH2疑似ペプチドの動物レベルでの癌選択的増殖抑制効果

さらにペプチド**4a**は、動物内でも選択的に望む癌の増殖を抑制することが判明した(図8)。標的のA431細胞またはC6細胞を移植したそれぞれの癌モデルマウスに対して、**4a**の血中内濃度が細胞実験で増



(※)他の臓器への毒性なし

図8 A431担癌マウスを用いたGrb2/SH2疑似ペプチドの癌選択的増殖抑制効果の検証

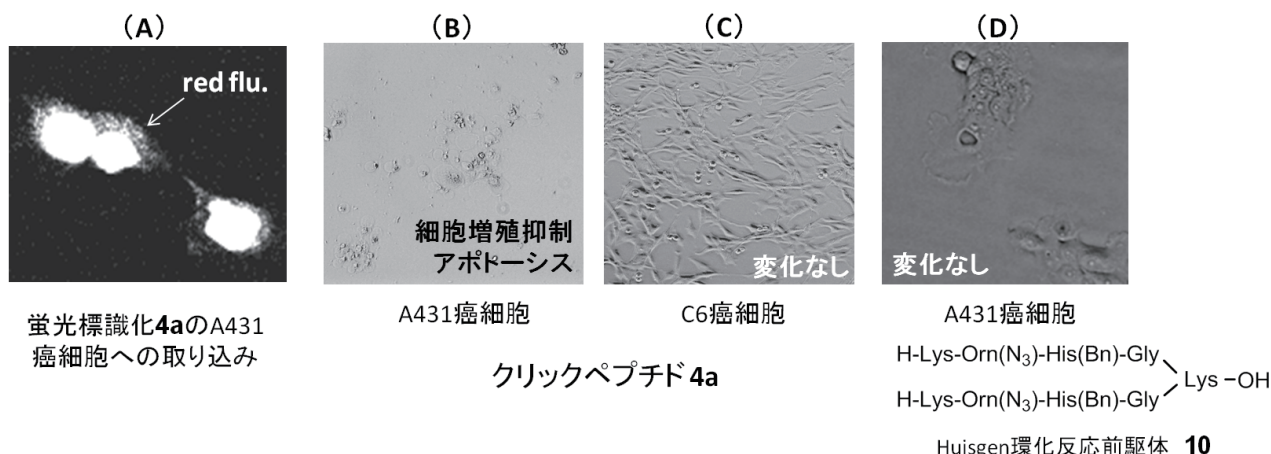


図6 クリックペプチド**4**の細胞内導入効率と細胞増殖抑制やアポトーシス誘導活性

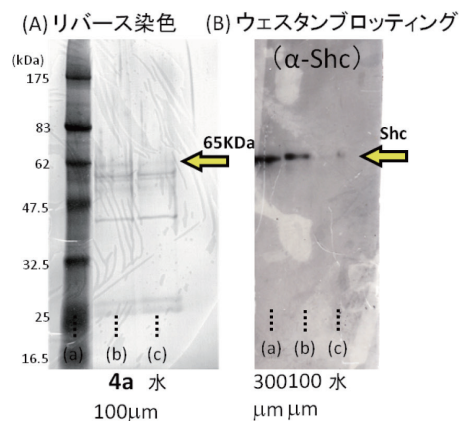
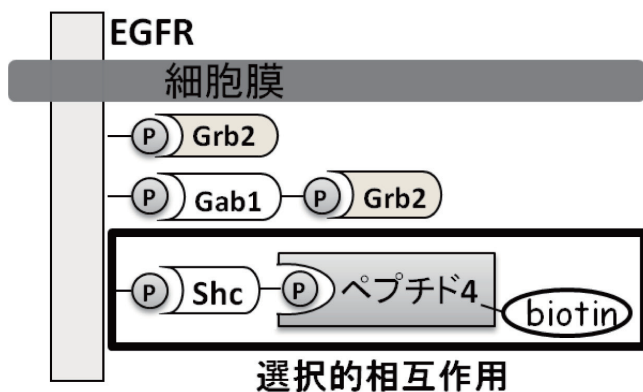


図7 ビオチン標識ペプチドを用いた標的リン酸化タンパク質の探索

殖抑制阻害を示した濃度の10倍(100 μ M)になるように、1週間継続して尾静脈注射を行った。その結果、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、あるいは腎臓の質量変化には全く影響を与えることなく、A431癌の体積増加を選択的に抑制することが分かった。さらに、EGFRを高発現しないC6癌の増殖にも全く影響を及ぼさないことが判明した。すなわち、動物内でも毒性を与えることなく、望みの細胞増殖を選択的に制御するペプチド分子を創製することに成功した¹⁾。

5. おわりに

以上述べてきたように、著者らが提案した「鋳型誘起合成」を経て創製したクリックペプチドは、細胞内に効率的に取り込まれ、リン酸化Shcタンパク質に選択的に結合するとともに、当該シグナル伝達を制御できることを示した。本戦略は、様々なタンパク質相互作用をテイラーメイドに制御する有効な方法となることが期待されるとともに、本戦略で見出されるタンパク質相互作用をターゲットとする新しい天然ペプチドの探索にも有効であると考えている。また本戦略を用いれば、様々な生理活性化合物に新たな機能を付与することも可能になると考えている。効率的な「結合形成反応」を基盤とする有機合成化学者からの新しいペプチド化学、あるいはケミカルバイオロジー分野への挑戦である。

本研究は、大阪大学大学院理学研究科・深瀬浩一教授のご指導のもとで実施されました。終始ご指導頂きました深瀬教授にこの場をお借りして心より感謝申し上げます。また、文献に記載の共同研究者の皆様方に感謝申し上げるとともに、研究助成を頂きましたJSPS, JST, NEDO, MEXT, 山田科学振興財団、および蛋白質研究奨励会(金子・成田研究奨励金)にお礼申し上げます。

参考文献

- 1) K. Tanaka, S. Shiotsuki, T. Iwata, C. Kageyama, T. Tahara, S. Nozaki, E. R. O. Siwu, S. Tamura, S. Douke, N. Murakami, H. Onoe, Y. Watanabe, K. Fukase, *ACS Chem. Biol.*, **7**, 637–644 (2011), and references cited therein.
- 2) K. Fukase, M. Wakao, M. Izumi, A. Ueno, M. Oikawa, Y. Suda, S. Kusumoto, H. P. Nestler, R. Sherlock, R. Liu, *Peptide Science* 2000, 365–368 (2001).
- 3) K. Tanaka, C. Kageyama, K. Fukase, *Tetrahedron Lett.*, **48**, 6475–6479 (2007).
- 4) K. Tanaka, E. R. O. Siwu, K. Minami, K. Hasegawa, S. Nozaki, Y. Kanayama, K. Koyama, C. W. Chen, J. C. Paulson, Y. Watanabe, K. Fukase, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 8195–8200 (2010).
- 5) T. Iwata, K. Tanaka, T. Tahara, S. Nozaki, H. Onoe, Y. Watanabe, K. Fukase, *Mol. BioSyst.*, in press.

たなか かつのり
(独)理化学研究所 基幹研究所
田中生物機能合成化学研究室
kotzenori@riken.jp

第44回若手ペプチド夏の勉強会開催報告

今年で第44回を迎えた若手ペプチド夏の勉強会は、近畿大学理工学部生命科学研究科生命工学研究室(日高雄二研究室)と大阪大学大学院理学研究科天然物有機化学研究室(深瀬浩一研究室)がお世話させていただき、去る平成24年8月5日から7日までの3日間、大阪府大阪市のロッジ舞洲に於いて開催致しました。今年も早くからたくさんのお問い合わせを頂き、最終的には全国から108人ものペプチド若手研究者の方々に参加いただきました。一方で、日程の都合により参加できなかった方々がおられましたこと、心からお詫び申し上げます。また、今年は開催地が大阪ということもあり、宿泊費、施設利用料が例年に比べ少々高めになってしまい、参加費だけでは苦しい状況にありました。しかしながら、今年も日本ペプチド学会から運営費の一部を、また各方面からもご援助を賜りましたおかげで、盛大に勉強会を開催することができました。参加者を代表して、関係各位に厚く御礼申し上げます。

3日間の勉強会では、2件の特別講演、2件のテクニカルセミナー、研究室紹介(19研究室と1企業)、11件の一般講演、22件のポスター発表がありました。特別講演として、木曾良明先生(長浜バイオ大学)と土井隆行先生(東北大学)をお招きし、「難病克服をめざして:ペプチド科学を基盤とする創薬科学」、「生物活性環状デプシペプチド天然物の全合成と機能解明に向けたアプローチ」につきまして、ご講演をいただきました。また、通常の学会の講演では聞けないような学生の素朴な質問も飛び出し、若手の会らしい特別講演になったと思います。また、テクニカルセミナーでは、北條裕信先生(東海大学)「チオエステルは友だち」、向井秀仁先生(長浜バイオ大学)「拡大するペプチドワールド—その探索法と評価法」にご講演をいただきました。いずれも先生方のこれまでの研究内容だけでなく、当該分野の歴史的背景から現状及び実践、実験上の失敗談など、普段なら絶対に聞けないような内容まで講演していただき、例年のテクニカルセミナーとは一味違ったものとなりました。この場を借りて、特別講演およびテクニカルセミナーをご講演していただいた先生方に参加者を代表して深く感謝申し上げます。

一般講演では11件の応募をいただき、いずれも、通常の学会同様に研究内容がしっかりとまとめられており、ペプチド科学分野のレベルの高さを感じさせるものばかりでした。発表後の質疑応答では、学生同士で活発なディスカッションが行われました。また、今年もポスター発表を企画し、こちらは例年より多い22件の応募がありました。特に、ポスター発表では件数が多いだけでなく、それぞれのポスターで活発な議論が



島本 茂



真鍋 良幸



行われていた為、2日目の昼食時に設定した時間では十分でなかったと感じました。

また、1日目、2日目の夜に行った懇親会も、例年通り、大盛況であったように思います。懇親会の会場では、深夜まで大勢の参加者がわいわいと交流を深めていました。新しい仲間もできたのではないのでしょうか。

さて、本会でも例年通りに勉強会における各種の優秀賞を設け、参加者の投票により、12人の学生を表彰させていただきました。学生討論部門優秀賞に清田雄平さん（北海道大学）、平 和馬さん（早稲田大学）、一般講演部門優秀賞に佐藤康平さん（徳島大学）、岩田隆行さん（大阪大学）、丸野孝浩さん（大阪大学）、小林由佳さん（京都大学）、ポスター発表部門優秀賞に小山正浩さん（信州大学）、清田雄平さん（北海道大学）、廣田雄樹さん（東京医科歯科大学）、戒能知佳さん（大阪大学）、坂本典子さん（大阪大学）、北谷方嵩さん（大阪大学）が選ばれました。おめでとうございます。受賞者の方々には賞状と副賞を贈らせていただきました。その他の発表も優秀賞に引けを取らない内容のものばかりでありました。

今年は、関西地区では7月ごろに計画停電の宣言がなされ、本勉強会についても中止ということも含めて検討させていただいておりましたが、スケジュールの調整をもって開催までこぎつけることができました。度重なるスケジュール変更などに応じてくださった特別講演やテクニカルセミナーの先生方を始め、学生や職員の皆様には深く感謝しております。

次回（第45回）の勉強会は、東京医科歯科大学の野村 渉先生と鳴海哲夫先生が世話人となり、東京都八王子市（八王子セミナーハウス）にて開催が予定されています。今回、特別講演にお招きした先生からも若手ペプチド勉強会の活発さに対して高い評価を頂き、大変光栄に思いました。今後も、更に発展させながら、これまでの反省をふまえ、若手ペプチド夏の勉強会を開催していくことができればと思います。

しまもと しげる
近畿大学 理工学部 生命科学科 生命工学研究室
sshimamoto@life.kindai.ac.jp
まなべ よしゆき
大阪大学大学院 理学研究科 天然有機化学研究室
manabey12@chem.sci.osaka-u.ac.jp

第12回中国国際ペプチドシンポジウムに参加して



佐藤 和広

私は今回初めての国際学会、そして初めての中国ということで、楽しみと緊張の入り交じった気持ちで、中国へと旅立ちました。今回の中国国際ペプチドシンポジウムは中国東北地方の中心都市である瀋陽で開催されました。瀋陽は旧満州ということで、日本にも馴染みの深い地

です。中国に着いてからは私にとってすべてが冒険でした。街の人に話しかけても全く英語は通じない状況です。全く言葉がわからない中、野水先生と大連から旧満州鉄道で瀋陽まで移動しました。列車からは、何となく昔風の広大な畑の景色が延々続き、時代錯誤しそうな異国の大陸を実感しました。

本シンポジウムの参加者は、ほとんどが中国の先生方や学生で日本人の私にとって全くのアウェーです。日本からは木曾先生をはじめ何人かの先生方が、またアメリカやヨーロッパからも数人の先生方が参加されていましたが、オープニングセレモニーで日本人の学生が自分一人ということを知り、これは大変な所に来てしまったと思いました。しかし、今思えば逆にそのようなアウェーな環境だったからこそ、何も恐れず内気な自分の殻を破ることができたのかもしれません。

私自身ポスター発表は初めてで、最初はとても緊張しました。私の研究は高分子多糖に固定化したラミニン由来インテグリン結合ペプチドの生物活性に関するものです。せっかく学会に参加するなら自分から積極的に話しかけに行こうという気持ちがあったので、ポスターを観に来て下さった方にできるだけ話しかけるよう心掛けました。実際にポスターの説明をしてみると、事前に自分の作った英語の原稿は全く意味がないことに気づき、始めは焦りからうまく説明する事ができませんでした。しかし、何度も説明していくうちに、自分の研究のアピールポイントや実験で大変だった事などを強調することで聞き手のリアクションを得られ、自分でも発表に慣れていくのがわかりました。また、ポスター発表は二日間あったので、一日目の反省を二日目に生かしたのも良かったと思います。ポスター会場では学生や研究者の方々とディスカッションする機会もありましたが、自分の考えていることがうまく表現できなかったり伝わらない時があり、もっとたくさんディスカッションできるようになりたいと感じました。

また、私が唯一の日本人学生ということで、珍しがられ（髭のおかげもあるかもしれませんが）、中国の学生の方には特にたくさん話し掛けられました。みんなとても明るく友好的で最高の仲間ができたと思っています。

クロージングセレモニーでは今回の学会を通しての表彰式が行われました。私はちょうどその時、上杉先生らと観光から帰ってきたばかりで、眠さからウトウトしていました。半ば寝ている状態でセレモニーを聞いていると、急に自分の名前が呼ばれていることに気

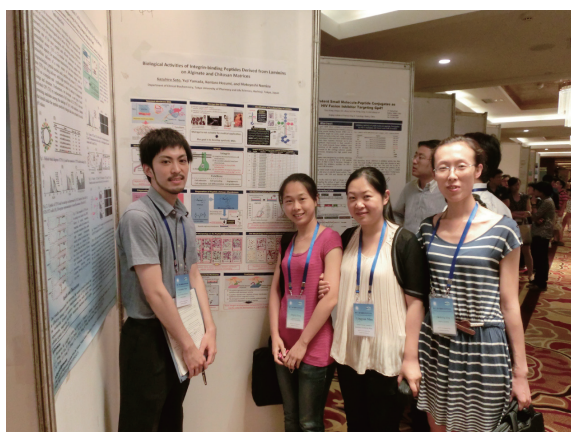


写真1 ポスター会場で中国の学生と



写真2 最優秀ポスター賞をいただき、主催者のLiu先生と

づきました。私はわけもわからず、とりあえず表彰台に立ちました。賞状を頂くとそれが最優秀ポスター賞という事を知り、正直頭の整理がつかず、夢を見ている気分でした。

今回の学会は本当に初めてづくしで、すべてが新鮮に映りました。自分の行ったことのない土地の風を感じられたこと、たくさんの人と出会えたこと、そして自分のこれからの課題を見つけられたことなど、今回の学会参加で得たことは大変多く、この経験は自分にとって大きな財産となりました。

末筆ではございますが、今回の12th Chinese International Peptide Symposiumへの参加をご支援して頂きました日本ペプチド学会の学会役員及び選考委



写真3 バンケットで瀋陽薬科大学の学生と上杉先生と野水先生

員会の先生方に、この場をお借りして深く感謝申し上げます。

さとう かずひろ
東京薬科大学 病態生化学研究室
s086101@toyaku.ac.jp

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@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
小出 隆規 (早稲田大学先進理工学部)
TEL 03-5286-2569, FAX 03-5286-2569
e-mail: koi@waseda.jp
川上 徹 (大阪大学蛋白質研究所)
TEL 06-6879-8602, FAX 06-6879-8603
e-mail: kawa@protein.osaka-u.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

(本号編集担当：川上 徹)