

社団法人 日本化学会  
生体機能関連化学部会

# NEWS LETTER

*Division of Biofunctional Chemistry*  
*The Chemical Society of Japan*

Vol. 26, No.3 (2011. 12. 09)

## 目 次

◇ 巻 頭 言	
「地震・雷・火事・親父」	……………高木 昌宏 1
◇ 研 究 紹 介	
mRNA配列情報で制御された タンパク質合成のシングルターンオーバー解析	……………高橋 俊太郎 3
カチオン性色素会合を利用した光機能性 DNA グルーの開発	……………榎田 啓 7
擬似細胞核内環境下におけるアニオン性 G-quadruplex リガンドの テロメラーゼ阻害効果	……………夜久 英信 11
細菌由来シトクロム P450 の基質誤認識を利用する バイオ触媒系の開発	……………荘司 長三 15
◇ 部 会 行 事	
第5回バイオ関連化学シンポジウム開催報告	…………… 19
第5回バイオ関連化学シンポジウム講演賞の講評	…………… 20
第26回生体機能関連化学部会若手フォーラムの開催報告	…………… 21

## 巻頭言

### 「地震・雷・火事・親父」

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科

高木 昌宏 (takagi@jaist.ac.jp)

何度も訪れる出張先には、お気に入りのレストランがある。先日も、日本人の口に合うフランス料理を出す店に、久しぶりに行ってみた。店先でウェイトレスらしき若い女性がタバコを吸っていたが、お構いなしに店内に入ろうとすると、「店は7時から。」と吐き捨てるように断られた。あまりの悪態に店を変えようかとも思ったが、7時に戻り無事に席に着いた。注文の品を選んでみると、先ほどのウェイトレスが近づいてきた。あの無愛想さを思い出して構えたが、「ご注文の品、お決まりでしょうか？何になさいますか？」と満面の笑み。別人かと思う程の豹変ぶりに、「プロだ！」と思った。彼女は、オンとオフを明確に区別し、ウェイトレスとしての役割を果たしている。ある意味彼女は、大人である。

研究室の学生で、日々の研究活動にこれだけの「プロ意識」を持って臨んでいる者がいるか考えてみた。ある不登校学生を研究室の飲み会に誘うと、元気に顔を出して皆と楽しそうにしている。これなら大丈夫だと思ったら、不登校は続いた。何がオンでオフなのか？当の学生だけでなく、こちらまで訳が分からなくなる。

NHKのクローズアップ現代で、「現代型うつ病」について放送していた。従来、「うつ病」とは、几帳面・生真面目・小心な性格を示す人が、職場での責任範囲が広がり、無理を重ね発症する無気力で自虐的な状態と言われていた。しかし「現代型うつ」は、自分を責めるのではなく上司のせいにする、仕事は休むが飲み会や旅行には出かけるというのだ。企業では休職者が増え、「怠け」と判断し解雇したところ裁判で訴えられるケースも出ている。

某製薬会社のホームページでは、現代型うつの特徴を、以下のように説明している。

倦怠感や虚脱感、疲れやすさが前面に出る。欠勤しがちで、特に連休明けや月曜日に多い。外出やドライブといった気晴らし的な活動は活発にできる。自己顕示はしないが、プライドは高くそれを守るのに汲々としがちである。人の評価を極端に気にする傾向がある。自分に対する罪責感があまりなく、「自分がこの状態になったのは今の社会が悪い、会社が悪い」といった世間や他人を責める傾向がある。特に最後の、世間や他人を責める「他罰性」が特徴のようだ。それにしても科学というのは不思議なもので、ある状態に科学的（あるいは医学的）分析を加えると、分析結果が根拠となり、かつての「怠け者」の「他罰性」に「現代型うつ病」と病名までついてしまうのである。私のような門外漢が、「怠け者」とある人を評すれば、それは差別用語だから「現代型うつ病患者」と呼びましょと、会社を休んで旅行へ出かけている人を、専門家は擁護するのだろうか？この過度の寛容さ、優しさに危機感を感じるのは、私だけでは無いはずだ。

「優しさ」や「愛」には、2種類あると思う。母性愛と父性愛、絶対的許容と絶対的価値とでも言える「優しさ」や「愛」である。父性的な愛とは、「畏怖」とも言えよう。八百万の神（自然）に対する、感謝と尊敬、そして恐怖の念である。簡単に言えば、「地震・雷・火事・親父」である。我々は、東日本大震災で、その恐ろしさ、その教訓を思い知らされた筈だが、原発事故の陰に隠

れてしまったようだ。先の危機感は、絶対的価値に対する畏怖の欠如に対するものである。

ある人の人格が一定の社会基準に到達した時、社会はその人を大人とみなすらしい。しかし現実社会では、20年生きれば誰でも大人と見なされるのだ。大学は、ちょうどその20歳を境にした若者が集う場所である。学生の理解し難い行いに対して、親が悪い、小・中学校が悪いと責めたくもなるが、それでは「現代型うつ病」の症状である「他罰性」と同類である。かと言って、突然頑固親父に変身し、「絶対的許容」に凝り固まった相手に「絶対的価値」で対抗しても、パワハラ、古い価値観の押しつけだと拒絶されるだけであろう。

昭和大学学長の板東真理子先生は、「大人になる前に身につけてほしいこと」として、「あいさつができる。」「笑顔を絶やさない。」「人の話を聞く。」「姿勢をよくする。」さらには、「人のいやがることをしない。」「失敗からも学ぶ。」を挙げておられる。この程度なら私も、学生に対して言えそうな気がする。せめてもの絶対的価値を学んで欲しいと思う。

実は私も、「人格が一定の基準に達している。」と言われても、正直分からない。「社会や組織で、ある役割を果たすことができる。」なら分かる。私が、教員、研究者、父親、夫としての役割を果たすことができれば、それは大人なのだろう。それでは「自分」としてのアイデンティティーは、どこにあるのだろうと疑問が生まれる。相田みつを氏の言葉に「無理をしないで、なまけない。私は弱い人間だから」というのがある。社会での役割を無理しないで、怠けないで、頑張っている自分を弱い人間だと認めるところに、母性愛と父性愛が共存し、アイデンティティーが生まれるのだろう。

心理学者の国分康孝先生は、著書「自立の心理学」の中でこう述べている。人生とは、愛の対象からの分離の連続である。寂しさがつきまとうものである。しかし考えてみれば、この寂しさがあるゆえに、人恋しさもおこるし、人と相和して生きるありがたさもわかるのである。分離の体験が無く、いつまでも母子一体感、親子一体感が続くと、ある日、突然分離せざるをえなくなったとき、パニックに陥る。そこでふだんから、人なかにまじり、人に和しているときでも、自分ひとりの自分を意識する必要がある。孤独を味わう必要がある。しかし孤独は、孤立ではない。孤立には、人から拒否されている感じがあるが、孤独にはそれがない。孤独とは、自立の意識である。

夜のカラオケボックスで大声で歌う若者、疲れているのに居酒屋で立ち飲みをするサラリーマン、仕事や勉強にやり甲斐を感じていても、ストレスは溜まるのだ。かく言う私も週末に愛車に乗れば、つい右足に力を入れてしまう。そして皆、明日には、それぞれの役割を、大人として演じるのである。この機微を理解できれば、「現代型うつ病」のリスクも低くなるであろう。

ところで、あのレストランのウェイトレスは、恋人や家族とは、いったいどんな態度で接しているのだろうか？見事にそれぞれの役割を演じているのだろうか？そう思うと、少し恐くもある。ふと嫁の顔が、頭に浮かんだ。

## 研究紹介（第5回バイオ関連化学シンポジウム講演賞）

# mRNA配列情報で制御された タンパク質合成のシングルターンオーバー解析

東京工業大学大学院・生命理工学研究科 高橋 俊太郎

### 1. はじめに

生体内での遺伝子発現の最終産物であるタンパク質は、DNA上の配列情報をまずRNAポリメラーゼがmRNAに転写し、続いてmRNAをリボソームが翻訳することで特定のアミノ酸配列で合成される。半世紀前にF. Crickが提唱したこのセントラルドグマ（図1）は現在でも生命の基本原則であり、この法則に反する生命体は地球上には存在しない。生命体は有機物の集合体であると同時に、時間という不可逆的な次元で活動する非平衡集団である。そのため、DNAにコードされている遺伝情報の発現が時空間的にかつ厳密に制御されることで生命体は維持されている。通常、遺伝情報はRNAポリメラーゼによる転写段階でmRNA量としてそのタンパク質発現量が制御されるが、実際は最終段階であるリボソームによる翻訳反応においてもダイナミックに制御されている。特にmRNAの配列や構造が翻訳の複雑な素過程に影響を与えることで、翻訳のon/offや速度が調節されている。そのため一連の素過程からなる翻訳反応のシングルターンオーバーをリアルタイム観察する事は重要である。本稿では、リボソームによる翻訳制御研究のための水晶発振子マイクロバランス（Quartz-Crystal Microbalance; QCM）法を利用した方法論の開発と、それから得られたmRNA配列情報に基づいた翻訳制御に関する新たな知見について紹介する。

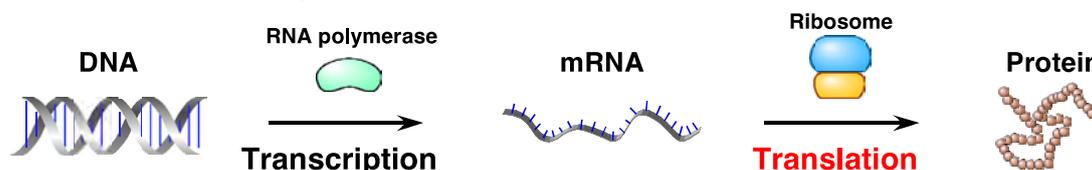


図1 遺伝情報発現のセントラルドグマ

### 2. 水晶発振子マイクロバランス（QCM）

QCMは薄い水晶板の両面に交流電圧を印加した際に生じる水晶のひずみに伴う振動が、水晶表面に吸着した物質の重さに応じて振動数に変化する事を利用した微量天秤である（図2）。東工大岡畑研究室で開発された27 MHz QCMシステムは水中での測定が可能で、 $-1 \text{ Hz} = 0.19 \text{ ng/cm}^2$ （水中でのリボソームの場合）と非常に高感度、かつリアルタイムに測定が可能であるため、生体分子間相互作用に伴う分子の結合、解離過程を“重さの変化”として量ることができる。

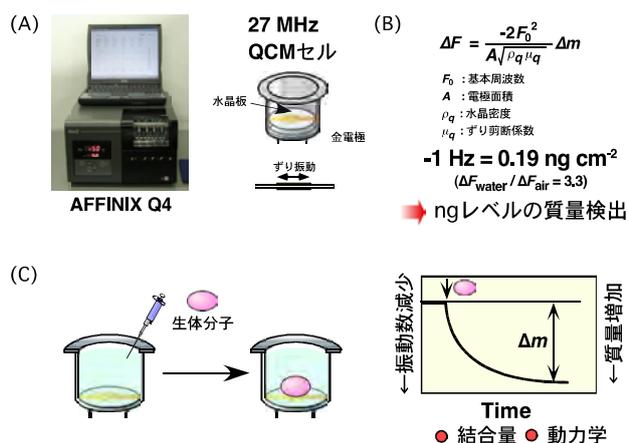


図2 (A) 市販されているQCM装置AFFINIX Q4の概観。(B) 振動数変化と質量変化の比例関係式。(C) 生体分子の結合挙動の模式図と得られる情報。

### 3. QCM法を用いた翻訳反応のシングルターンオーバー解析

タンパク質合成のリアルタイムモニタリング法は、現在蛍光タンパク質の合成過程を見たという例があるが<sup>1,2)</sup>、任意のタンパク質の合成反応を追跡できる方法はない。よって、重さというユニバーサルな単位で変化を測定できる QCM 法はタンパク質合成のリアルタイムモニタリングにとって魅力的な方法論である<sup>3)</sup>。そのために、ここでは新生ポリペプチド鎖をリガンドとし、基板上のレセプター分子でリボソームごと捕捉する戦略を考案した<sup>4)</sup> (図 3)。具体的に、N 末端側にストレプトアビジンと非常に強く結合するストレプトアビジン結合ペプチド (SBP) と、任意のタンパク質コード配列を融合した発現 mRNA を作製した。この mRNA を用いてストレプトアビジンを固定した水晶発振子セル中で *in vitro* 翻訳を行うと、まず SBP を提示したリボソーム複合体が合成され、続いて SBP を介してリボソーム複合体が素早く QCM 基板上に結合し、質量が増加する。ここで、*in vitro* 翻訳系として再構成型無細胞翻訳系 (PURESYSTEM) を利用すれば、これは翻訳反応に必要な最低限の因子を混合することで調整されたものであることから、反応系から予め翻訳終結因子 RF1 を除いておくと、終始コドン (UAG) まで翻訳されてもポリペプチド鎖がリボソームから放出されないため、リボソーム複合体が基板上に安定に保持できる。最終的に RF1 を添加すると新生ポリペプチド鎖が加水分解され、基板上に SBP 融合ポリペプチドが残り、すなわちリボソームが基板上から解離し、質量減少が生じる。実際の典型的な結果が図 3 右上に示してあり、まず mRNA を添加後最初の約 10 分間は振動数変化が観察されなかった (①)。これは翻訳開始に伴うペプチド伸長の準備段階により SBP がまだリボソーム上に提示されていないためである。mRNA 添加 10 分後くらいから振動数が減少し始めた (②)。これはペプチド重合反応が進行し、SBP がリボソーム上に提示されることで、その SBP を介してリボソーム複合体が基板上のストレプトアビジンと結合したためである。その後、RF1 を添加するとポリペプチド鎖の放出に伴う振動数増加 (質量減少) が観察された (③)。また puromycin を添加することで終始コドンより手前で翻訳が異常に止まった複合体を解消することができた (④)。以上より、一連の各翻訳反応に由来した質量変化に伴う振動数変化がリアルタイムに観察することができた。

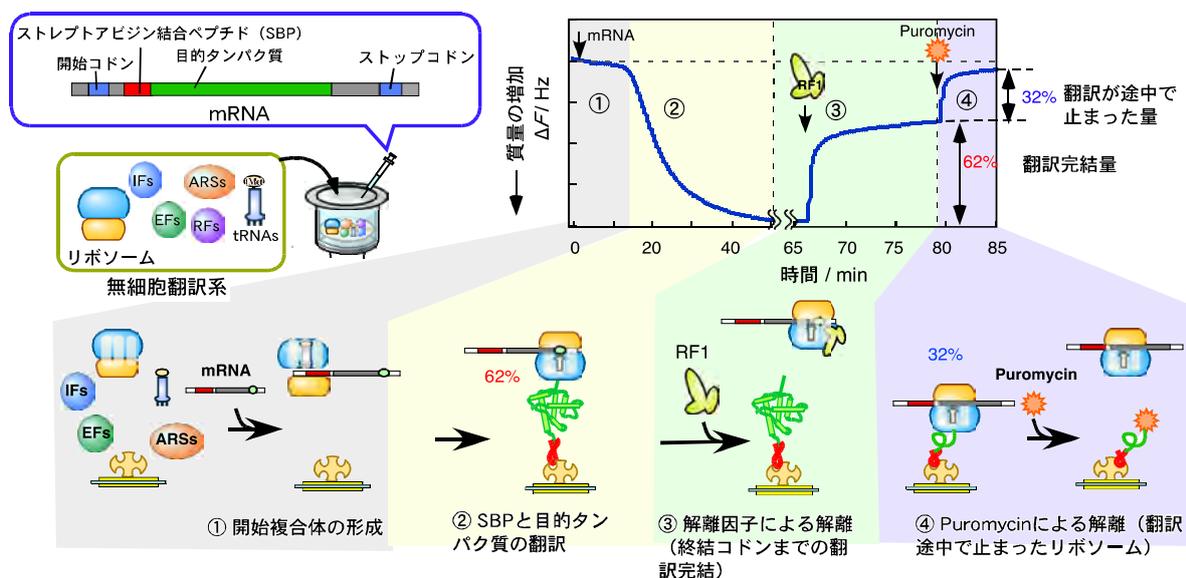


図 3 QCM法を用いた翻訳反応のリアルタイム観察。SBPをN末端にコードしたmRNAをQCMセル中で無細胞翻訳を行う。各振動数変化のタイミング、速度、変化量から一連の翻訳過程の詳細な解析ができる。

#### 4. mRNA 配列依存的な翻訳速度の評価

構築した本システムを用いて mRNA 配列依存的な翻訳速度を評価するために、目的のコード配列を SBP の前に配置した (図 4A)。それにより SBP が合成され、振動数変化が観察される前に目的の遺伝子の合成時間を要することになる。この時間差 (Time-lag) を評価することで目的遺伝子の合成速度を得た。まず、モデルとして 11 アミノ酸から成る T7-tag を SBP の前に 1、3、5、7 個連結した mRNA をそれぞれ用意し、翻訳させると、T7-tag の個数に応じて振動数減少の遅れすなわち Time-lag が観察された (図 4B)。つまり、mRNA の長さに応じて翻訳に要する時間が長いということである。その Time-lag は翻訳されたペプチド分子長に対しほぼ直線的に増加し、mRNA 配列長依存的翻訳時間が評価できた (図 4C)。その際直線の傾きから、1 アミノ酸当たり 10 秒かかる翻訳速度であった。この値は生体内で行われている速度よりも遅いが、理由としては温度と翻訳関連因子濃度が低いことがあげられる。続いて、大腸菌由来の天然の遺伝子を翻訳させたところ、例えば、分子長 72 アミノ酸の IF1 より分子長 158 アミノ酸の DHFR の方が速く翻訳される結果が得られた。実際、T7-tag には翻訳速度を低下させるレアコドンが含まれており、そのため、IF1、DHFR は T7-tag よりも 1 アミノ酸当たりの翻訳速度が上昇したと考えられる。また、DHFR は発現量が多い遺伝子としてこれまでよく用いられてきており、今回の結果から翻訳速度自体が他よりも速いことがその要因であることが示された。以上から、一遺伝子の翻訳速度は mRNA 長だけでなく配列によって異なることが示された。

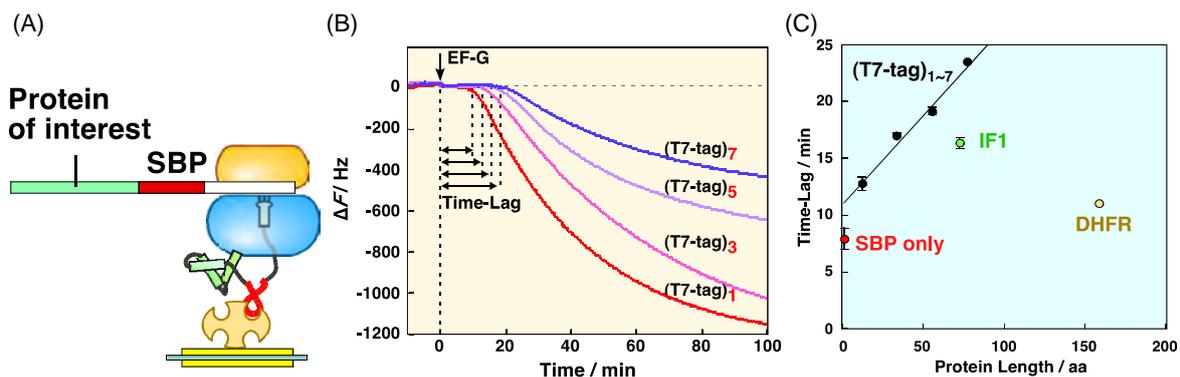


図 4 翻訳速度の評価方法 (A) mRNA 配列の設計とリボソーム複合体の模式図。(B) T7-tag を連結した mRNA の翻訳に伴う振動数変化。(C) 各種 mRNA から翻訳された振動数変化の Time-lag。T7-tag を連結したものは 10 sec / aa の翻訳速度を示した。

#### 5. mRNA 配列依存的な翻訳成功率の評価

RF1 添加時における振動数上昇率から翻訳成功率を求めた。この場合、目的遺伝子を SBP の下流に配置することで、興味のある遺伝子の翻訳成功率を評価した。こちらに関しても遺伝子の長さの効果と配列の効果の評価した。まず、長さに関しては GFP 遺伝子 (238 アミノ酸) および GFP の N 末端領域 52、70 アミノ酸を SBP の下流に置き測定したところ、翻訳領域が長くなるにつれ翻訳成功率が 65%、60%、25% と減少した (図 5A)。したがって、翻訳途中のリボソームは何らかの原因によってある確率で翻訳を異常に停止してしまうことが分かった。一方、配列の効果については、70 アミノ酸の CspA は 66 アミノ酸とほぼ同じ分子長の GlgS よりも高い翻訳成功率を示し、158 アミノ酸の DHFR は長い分子長にも関わらず、高い翻訳成功率を示した (図 5B)。GlgS は複数の  $\alpha$  ヘリックスから構成されるタンパク質であったり、DHFR は翻訳速度が速いタンパク質でもあったりするため、今後、翻訳成功率とタンパク質の構造や翻訳速度との関係性を詳細に検討する予定である。以上より、一遺伝子の翻訳成功率に関しても、基本的に長さに依存するものの、配列によっても異なることが示された。

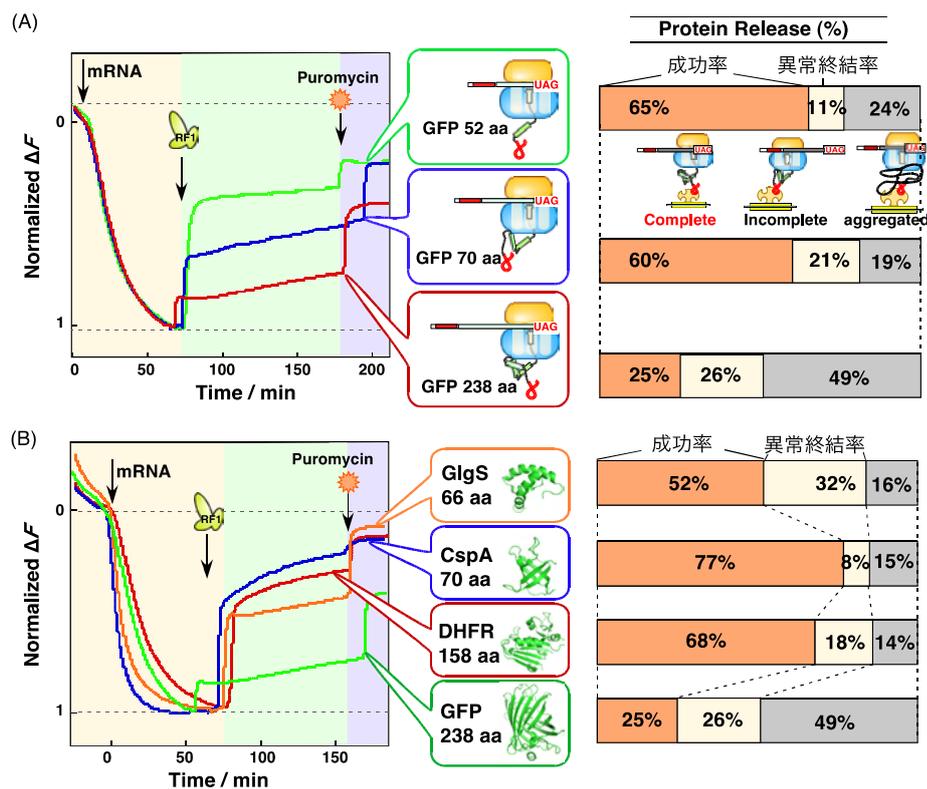


図5 翻訳成功率の評価方法 (A) 翻訳領域の長さの効果 (B) 種類の効果

## 6. 終わりに

QCM 法と無細胞タンパク質合成系を組み合わせることで一連の翻訳反応のシングルターンオーバーを観察する事ができた。目的遺伝子の配置を工夫することでタンパク質の合成速度や翻訳成功率を求めることができた。いずれも翻訳される mRNA の長さには単純に依存しないことから、mRNA の情報はアミノ酸としての遺伝暗号だけではなく、翻訳速度や効率も同時にコードされていることが示唆された。

## 謝辞

本研究は東京工業大学大学院生命理工学研究科 岡畑恵雄 研究室にて行われました。また、東京大学大学院新領域創成科学研究科 上田卓也 教授をはじめとする多くの共同研究者のご協力の下でなされました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) S. Uemura, R. Iizuka, T. Ueno, Y. Shimizu, H. Taguchi, T. Ueda, J. D. Puglisi, T. Funatsu, *Nucleic Acids Res.* **36**, e70 (2008).
- 2) A. Katranidis *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 1758-1761 (2009).
- 3) S. Takahashi, R. Akita, H. Matsuno, H. Furusawa, Y. Shimizu, T. Ueda, and Y. Okahata, *ChemBioChem*, **9**, 870-873 (2008).
- 4) S. Takahashi, M. Iida, H. Furusawa, Y. Shimizu, T. Ueda, and Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 9326-9332 (2009).

## カチオン性色素会合を利用した光機能性DNAグルーの開発

名古屋大学・工学研究科 梶田啓

### 1. はじめに

近年、生体分子を基盤としたナノ材料が盛んに研究されている。特にDNAは厳密に相補鎖を認識し、かつかたい二重らせん構造を形成するため、ナノデバイスの基盤材料として非常に注目されている。最近ではDNA Origamiに代表されるように、DNAの二重鎖形成を利用することにより、数百ナノメートルスケールの構造体を自由に設計・調製することが可能となってきた<sup>1)</sup>。しかしながら、一方でこれらのナノデバイスの実用化に関する報告はほとんどない。この原因として、天然核酸塩基が機能性に乏しい点が挙げられる。天然にみられる四つの核酸塩基は極めて優れた相補鎖認識能を持つものの、顕著な蛍光や光応答性を持たないなど、マテリアルとして最適であるとは言えない。更に、熱的安定性に乏しく、利用可能な配列に限界があるという問題点もある。そのため、DNAを基盤としたナノマテリアルを更に高機能化するためには、非天然分子の導入が必要不可欠であるといえる。

これまでに我々は非環状リンカーであるD-threoninolに着目し、このリンカーを介して色素を二重鎖の対応する位置に導入することにより、二重鎖が大幅に安定化することを見出した<sup>2)</sup>。このことは色素が二重鎖を安定化する“人工塩基対”として機能したことを意味している。この設計を利用すれば、様々な機能を持った非天然分子を導入し、かつ安定な二重らせん構造を調製することが出来る。我々はこれまでに、蛍光色素—消光色素ペアや非平面構造を持つ分子による人工塩基対の開発に成功している<sup>3)</sup>。本稿では、カチオン性色素である*p*-methylstilbazole (図1) による人工塩基対の利用によるDNA二重鎖の連結及びその二量化反応を利用したDNAの光架橋について紹介する。

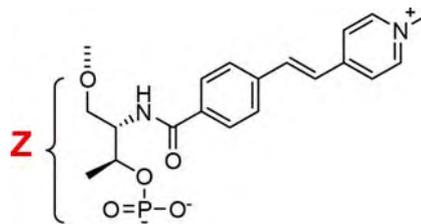


図1 *p*-Methylstilbazole の化学構造

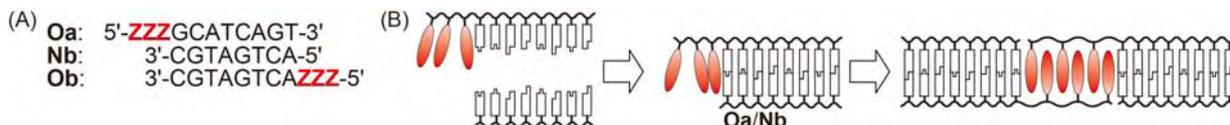


図2 (A)合成した配列及び、(B)カチオン性色素を利用したDNA二重鎖の連結の模式図

### 2. カチオン性人工塩基対によるDNA二重鎖の連結

我々はこれまでに*p*-methylstilbazoleをD-threoninolを介して二重鎖の対応する位置に導入した際に二重鎖が大幅に安定化することを見出している<sup>4)</sup>。熱力学的解析の結果、この“カチオン性人工塩基対”はリン酸基との静電相互作用によって天然の核酸塩基よりも安定な“塩基対”を形成することを明らかにした。そこで、この*p*-methylstilbazoleをDNAの末端に導入することによりDNAを連結させる“グルー”として応用することを目指した。天然塩基による粘着末端はナノ構造体の結合部位において広く利用されている。しかしながら、その安定性が低く、また配列に限りがあることが問題であった。そこで、*p*-methylstilbazoleによる人工塩基対を利用することにより、より強固にDNA二重鎖を連結することを目指した。また、この*p*-methylstilbazoleは紫外光照射によって光二量化することが知られている。そのため、この二量化反応を利用すれば、共有結合によるナノ構造の固定化が期待できる。

用いた配列を図2Aに示す。8 merのDNAの5'末端に色素を3 mer導入した配列 (図2AのOa) を合成した。まず、天然の相補鎖との二重鎖についてその安定性を評価した。Oa/Nbの二重鎖では色素が会合することにより、二重鎖の二量体の形成が期待できる (図2B)。Oa/NbのUV-VISスペクトルを図3に示す。温度の低下に伴いピークの顕著な短波長シフトが観察された。このことは、色素が分子間でH会合体を

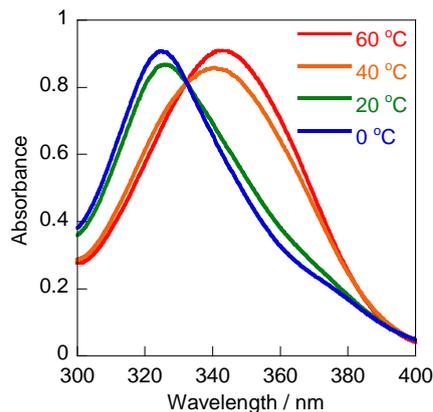


図3 Oa/NbのUV-VISスペクトル

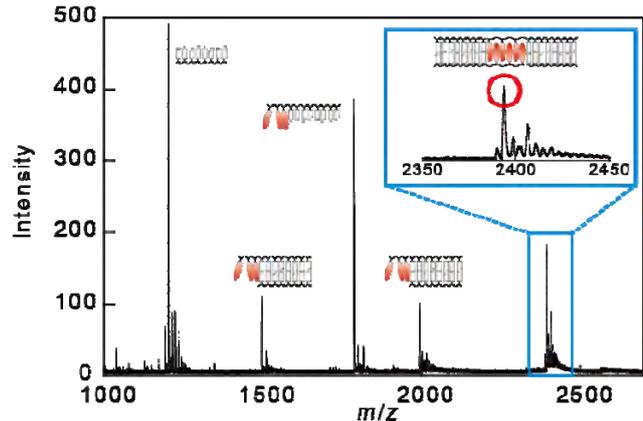


図4 二量体形成のCSI-MSによる確認

形成していることを示している。すなわち、カチオン性人工塩基対を利用することによってDNA二重鎖を連結することに成功した。また、350 nmにおける色素部位の融解温度 ( $T_m^{350}$ ) を測定したところ、36.4 °Cとなり、260 nmで測定した核酸塩基対の融解温度 ( $T_m^{260}$ : 39.0 °C) とほぼ同程度の安定性を示した (表1)。この二重鎖の二量体形成はCSI-MSによっても直接観察することが出来た (図4)。

このOa一本鎖について融解温度を測定したところ、シグモイド曲線が現れず、色素部位の融解温度は算出されなかった。このことはこの“グルー”は一本鎖では機能せず、天然核酸部位が二重鎖を形成して初めてDNAを連結できることを示している。更に、隣接塩基が欠失した相補鎖を加えても色素が会合しなかったことから、カチオン性色素による“グルー”は隣接塩基対とのスタッキング相互作用に非常に強く依存することが明らかとなった。

更に、天然塩基部位の鎖長を変化させた二重鎖について同様の検討を行った (表1)。その結果、天然核酸部位の二重鎖安定性に応じて“グルー”の安定性が変化することを見出した。この色素は天然核酸部位が二重鎖を形成して初めて“グルー”として機能する。そのため、いずれの配列にも色素を3分子ずつ導入しているにもかかわらず、その安定性が変化したと考えられる。また、色素を3'側に3分子導入しても“グルー”として機能しないことが分かった。これは、3'側に導入した色素は二量体を形成した際に隣接塩基対とスタッキング相互作用できないためと考えられる。このような隣接塩基対とのスタッキング相互作用に対する強い依存性は天然の粘着末端では見られず、*p*-methylstilbazoleに特有の性質である。

表1 天然塩基対及び色素部位の融解温度

配列	$T_m^{260}$	$T_m^{350}$
5'- <b>ZZZ</b> GCATCAGT-3' 3'-CGTAGTCA-5'	39.0	36.4
5'- <b>ZZZ</b> GCATCAGT-3'	ND	ND
5'- <b>ZZZ</b> GCATCAGT-3' 3'-GTAGTCA-5' (一塩基欠失)	24.4	ND
5'- <b>ZZZ</b> GGTATC-3' 3'-CCATAG-5'	14.2	21.4
5'- <b>ZZZ</b> GGTATCGCAATC-3' 3'-CCATAGCGTTAG-5'	52.1	47.4
5'-GCATCAGT-3' 3'- <b>ZZZ</b> CGTAGTCA-5'	47.2	ND

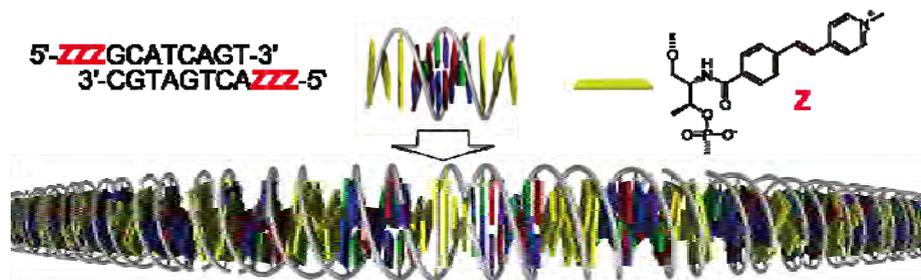


図5 カチオン性人工塩基対を利用したDNAナノワイヤーの調製

### 3. DNAナノワイヤーの調製

このカチオン性色素による“グルー”を利用すれば、安定なナノ構造体の調製が期待できる。そこで、次にこの“グルー”を利用したナノ構造体の例としてDNAナノワイヤーの調製を目指した。図5に示すように、色素を二重鎖の両端に導入すれば、DNA二重鎖が連結されたナノワイヤーを調製することが出来る。そこで、8 merの二重鎖の両端に3 merずつ色素を導入した配列 (Oa/Ob) を合成し、非変性ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) 及びAFM観察を行った (図6)。**Oa/Ob** (lane 2) では非変性PAGEにおいて、**Oa/Nb** (lane 1) と比べて明らかに高分子量側にスミアなバンドが観察された。また、濃度の増加に伴いバンドが更に高分子量側にシフトした (lane 3及び4)。また、同様の配列に対してAFM観察を行ったところ100 nm程度のひも状の構造体が観察された (図6B)。この結果、カチオン性色素をDNA二重鎖の両端に導入することによりDNAがナノワイヤーを形成することが明らかとなった。

また、天然核酸塩基3 merによる粘着末端を用いて同様に非変性PAGEによる検討を行ったところ、スミアなバンドは観察されず、ほぼ二重鎖と同位置にバンドが観察された (data not shown)。このことは少なくともこの電気泳動の条件下において3 merの核酸塩基ではDNAを連結できないことを示している。従って、カチオン性色素による人工塩基対を利用することにより、天然核酸塩基より安定に二重鎖を連結できることが明らかとなった<sup>5)</sup>。

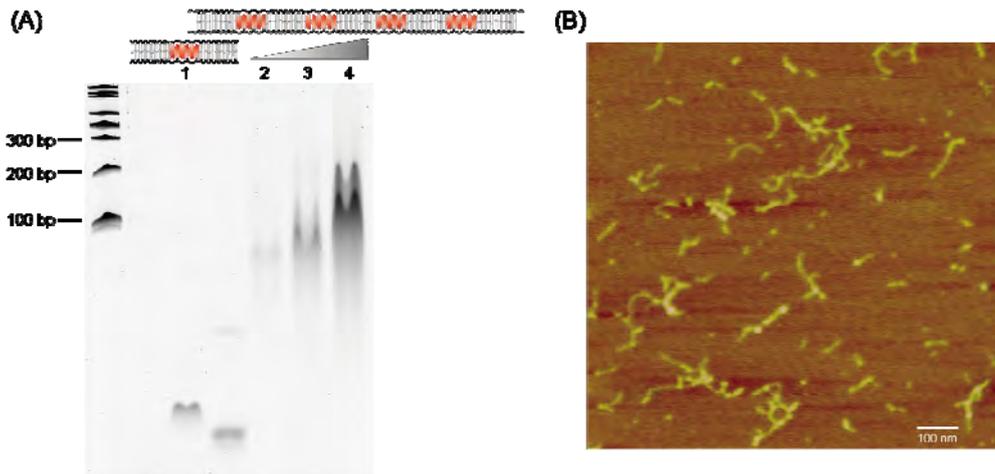


図6 (A)非変性 PAGE 及び(B)AFM によるナノワイヤー形成の確認

### 4. カチオン性人工塩基対を利用したDNAの光架橋反応

更にこの*p*-methylstilbazoleによる人工塩基対を利用することにより、DNAの光架橋を目指した (図7)。これまでもDNAの光架橋反応は報告されている<sup>6)</sup>が、本系では色素が塩基対として機能し、かつ反応するため、他の反応部位を導入する必要がないという特徴がある。この人工塩基対による光架橋反応を利用すれば、DNAを基盤としたナノ構造体の安定化、固定化が期待できる。そこで、まずモデル二重鎖 (図8Aの**9a/9b**)

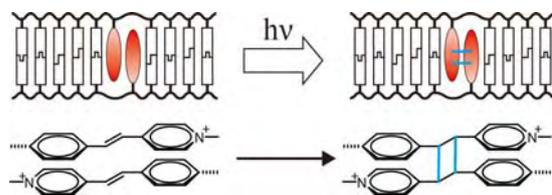


図7 *p*-Methylstilbazoleによる二量化反応を利用したDNAの光架橋

を用いて光架橋反応の速度を検討した。光照射前のサンプルではHPLCにおいて原料に対応する2本のピークが観察されたのに対し、340 nmの紫外光を30秒照射したところ、新たな一本のピークが現れた (図8A)。更に、5分間紫外光を照射したところ、原料のピークが完全に消失した。そこで、この新たなピークを分取してMALDI-TOFMSによって分析したところ、架橋された二重鎖に対応する分子量が観察された (data not shown)。従って、*p*-methylstilbazoleの光二量化反応を利用することによりDNA二

重鎖を架橋できることが分かった。また、同様にUV-VISスペクトルにおいても顕著なピークの減少が観察され、5分間照射後には*p*-methylstilbazoleに基づくピークがほぼ完全に消失した(図8B)。従って、光架橋反応は5分程度で完全に完了することが明らかとなった。以上のことから、カチオン性色素による光二量化反応を利用することによってDNA二重鎖を架橋することに成功した。

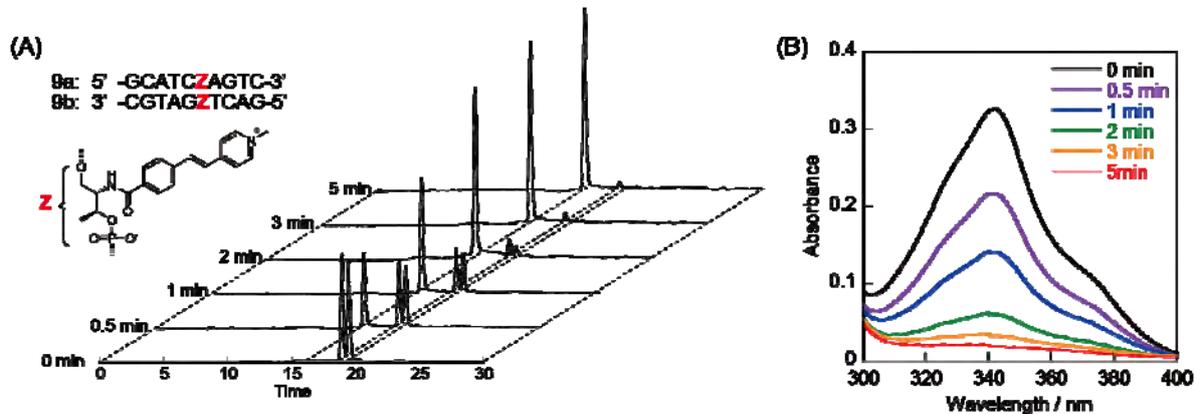


図8 (A)HPLC及び(B)UV-VIS スペクトルによる光架橋反応の確認

## 5. おわりに

DNAはその配列及び構造設計が容易であるという他の高分子には見られない、ナノマテリアルとして非常に優れた性質を有している。そのため、今後はDNAを基盤としたナノマテリアルの実用化に向けた研究が盛んになると考えられる。しかしながら、4つの天然塩基では実現できる機能・構造には限界がある。それに対し、筆者らが開発したカチオン性色素による“人工塩基”は互いに認識し、極めて安定な“塩基対”を形成する。更に、光架橋反応を利用すれば、ナノ構造体の安定性を飛躍的に向上させることが出来る。今後は、この人工塩基対を天然塩基対と組み合わせることにより、更に複雑なナノ構造体の調製を試みたい。更に、様々な分子を“人工塩基対”としてDNAに導入することによって、天然塩基対では実現しえない機能・構造を持ったナノマテリアルが調製できると考えている。

## 謝辞

本研究は名古屋大学大学院工学研究科物質制御工学専攻浅沼研究室で行われたものであり、浅沼浩之先生並びに共同研究者である学生諸氏に心から感謝致します。また、CSI-MS測定に関しましては名古屋大学八島栄次教授に多大なるご協力を賜りました。厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) (a) P. W. K. Rothmund, *Nature*, 2006, **440**, 297-302; (b) N. C. Seeman, *Annu. Rev. Biochem.*, 2010, **79**, 65-87.
- 2) H. Kashida, T. Fujii and H. Asanuma, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 2892-2899.
- 3) (a) H. Kashida, T. Takatsu, T. Fujii, K. Sekiguchi, X. Liang, K. Niwa, T. Takase, Y. Yoshida and H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, **48**, 7044-7047; (b) H. Kashida, K. Sekiguchi, N. Higashiyama, T. Kato and H. Asanuma, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 8313-8320.
- 4) H. Kashida, H. Ito, T. Fujii, T. Hayashi and H. Asanuma, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 9928-9930.
- 5) H. Kashida, T. Hayashi, T. Fujii and H. Asanuma, *Chem. Eur. J.*, 2011, **17**, 2614-2622.
- 6) (a) K. Fujimoto, S. Matsuda, N. Takahashi and I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 5646-5647; (b) M. Mukae, T. Ihara, M. Tabara and A. Jyo, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 1349-1354.

## 擬似細胞核内環境下におけるアニオン性 G-quadruplex リガンドのテロメラーゼ阻害効果

パナソニック(株)先端技術研究所, 甲南大学大学院フロンティアサイエンス研究科 夜久英信

### 1. はじめに

正常な体細胞のテロメア配列は、細胞分裂ごとに短縮し、細胞分裂の回数を制限する。<sup>1</sup>一方、がん細胞は、テロメア配列を伸長するテロメラーゼにより、細胞分裂回数に制限がない。<sup>2</sup>そのため、テロメラーゼ活性を阻害する化合物が新たな抗がん剤として期待されている。Zahlerらによって、テロメア配列が G-quadruplex 構造を形成することでテロメラーゼ反応を阻害できることが報告されて以来、G-quadruplex 構造を誘起・安定化するさまざまな化合物 (G-quadruplex リガンド) が開発されてきた (図 1)。<sup>3</sup>しかしながら、G-quadruplex リガンドを含めた薬剤候補化合物が、試験管内で所望の効果を示しても、細胞内では十分な薬効を得られない場合も多い。この一因に、試験管内と細胞内の環境の違いがある。薬剤の合目的設計には、細胞内の環境因子が薬剤の機能や動態にどのように影響するかを把握し、分子設計に活かす必要がある。一般的に試験管内での薬剤と標的化合物の結合解析を含む生化学実験は、生体分子の濃度が 1 g/L 以下の希薄溶液中で行われる。一方で、細胞中には多様な生体分子が高濃度で存在しており、その濃度は 400 g/L にも達する。我々は、様々な細胞内因子の中でも特に、G-quadruplex リガンドの機能に影響を及ぼす可能性の高いものとして、次の 2 点に注目している。

①染色体 DNA の大部分を占める二本鎖 DNA : 従来の G-quadruplex リガンドの多くは、大きな  $\pi$  平面とカチオン性の官能基を有する。大きな  $\pi$  平面は、G-quadruplex と  $\pi$ - $\pi$  スタッキング相互作用を形成する。また、カチオン性の官能基は、核酸のリン酸基との静電的相互作用を形成する。しかし、カチオン性リガンドは染色体 DNA 中の二本鎖 DNA 部分と非特異的に結合し、テロメラーゼ阻害効果が低下する可能性がある。

②生体分子が密に存在する分子クラウディング : G-quadruplex リガンドと G-quadruplex の親和力を向上させる静電的相互作用では、電荷をもつ官能基が水和圏を保ちながら相互作用が形成される。この結果、カチオン性 G-quadruplex リガンドと G-quadruplex の複合体形成には水の取り込みが伴う。これにより、分子クラウディングによって誘起される水分子の活量低下や濃度の低下に伴って、G-quadruplex リガンドの結合親和性が低下する可能性がある。

このような観点から我々は、G-quadruplex リガンドの機能向上のために導入されてきたカチオン性官能基は、細胞内環境においては、その機能を阻害する可能性があると考えた。さらに、その解決には核酸を標的としたリガンドには適さないと考えられてきたアニオン性リガンドが効果的であると予測し、その検証を行った。具体的には、試験管内において

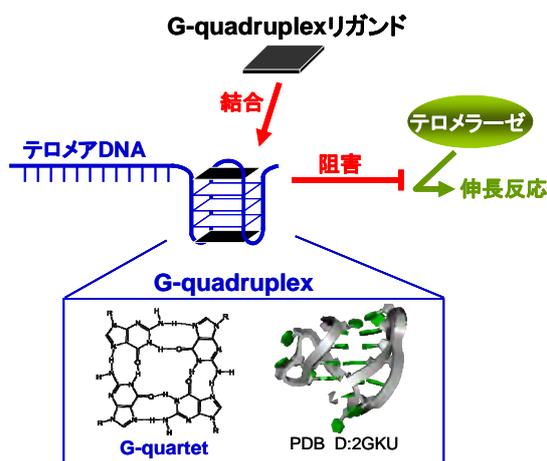


図 1. G-quadruplex リガンドによるテロメラーゼ反応阻害

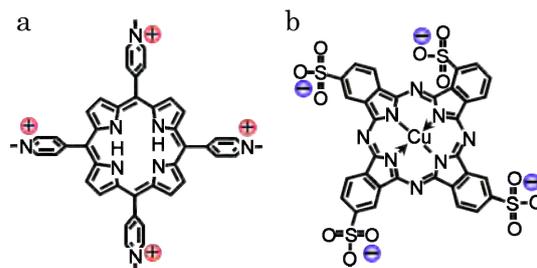


図 2. (a) TMPyP4 と (b) Cu-APC の化学構造

過剰の二本鎖 DNA が存在する状態及び分子クラウディング状態を化学的に再現し、カチオン性及びアニオン性 G-quadruplex リガンドの性能を比較した。カチオン性 G-quadruplex リガンドとしては、最もよく研究されている G-quadruplex リガンドの一つである 5,10,15,20-tetra-(*N*-methyl-4-pyridyl)porphine (TMPyP4)を用いた (図 2a)。一方、アニオン性 G-quadruplex リガンドはこれまでほとんど知られていない。アニオン性 G-quadruplex リガンドは G-quadruplex と静電的に反発することが予想される。そのため、G-quadruplex とより強い $\pi$ - $\pi$ スタッキング相互作用を形成する必要となる。そこで、TMPyP4 より広い $\pi$ 平面を有する copper(II) phthalocyanine 3,4',4'',4'''-tetrasulfonic acid, tetrasodium salt (Cu-APC)<sup>4</sup>をアニオン性 G-quadruplex リガンドとして検討した (図 2b)。

## 2. 二本鎖 DNA による G-quadruplex リガンドの G-quadruplex 結合能及びテロメラーゼ阻害能への影響<sup>4</sup>

染色体 DNA 中の二本鎖 DNA が G-quadruplex リガンドの機能に与える影響について検討するために、100 mM KCl 緩衝液中において、過剰の $\lambda$ DNA 存在下及び非存在下での TMPyP4 とヒトテロメアオリゴ DNA (HteloDNA, 5'-GGG(TTAGGG)<sub>3</sub>-3') の結合を解析した。その結果、TMPyP4 は $\lambda$ DNA 非存在下では HteloDNA と結合するが、 $\lambda$ DNA 存在下では $\lambda$ DNA と非特異的に結合するために HteloDNA とは結合しないことが示された。そこで $\lambda$ DNA の添加による TMPyP4 のテロメラーゼ阻害能への影響について Telomere Repeat Amplification Protocol 法<sup>5</sup>を用いて検討したところ、TMPyP4 の IC<sub>50</sub> 値 (テロメラーゼ活性を 50% 阻害する際の濃度) は、 $\lambda$ DNA 非存在下では 2.4  $\mu$ M であったのに対して、 $\lambda$ DNA 存在下ではテロメラーゼ阻害効果は認められなかった。これらの結果は、TMPyP4 はカチオン性であるため静電的相互作用により $\lambda$ DNA と非特異的に結合し、テロメラーゼ阻害能を失うことを示している。その一方で、アニオン性化合物である Cu-APC についても同様の検討を行ったところ、興味深いことに Cu-APC は $\lambda$ DNA の有無に関わらず HteloDNA と結合した。さらに、テロメラーゼ阻害効果における IC<sub>50</sub> 値も $\lambda$ DNA の有無に依存せず 1.2  $\mu$ M であった (図 3a)。以上の結果より、我々が予想したとおり、Cu-APC は G-quadruplex リガンドとして機能することが分かった。さらに、Cu-APC はアニオン性であるために

G-quadruplex への結合特異性が高く、 $\lambda$ DNA 存在下でもテロメラーゼ反応を阻害できたと考えられる (図 3b)。すなわち、細胞核内のように大量の二本鎖 DNA が存在している条件では、カチオン性 G-quadruplex リガンドよりアニオン性 G-quadruplex リガンドの方が効率よくテロメラーゼ反応を阻害できる可能性が示された。

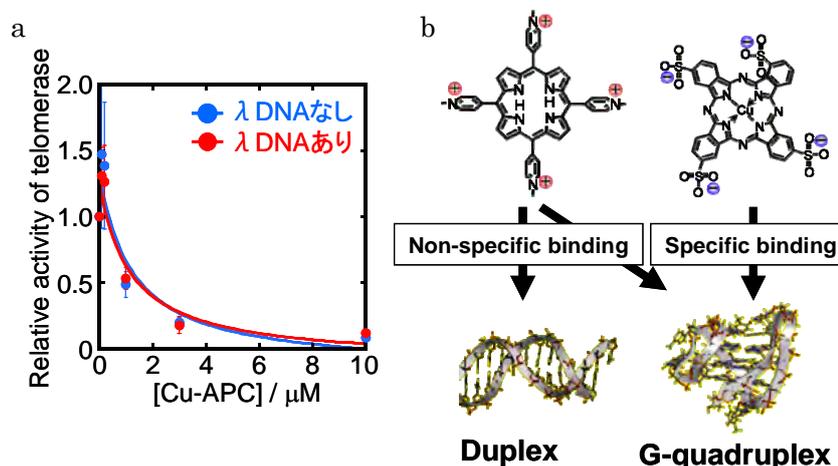


図 3. (a)  $\lambda$ DNA 存在下での Cu-APC によるテロメラーゼ阻害効果, (b) Cu-APC と TMPyP4 の G-quadruplex への結合特異性

## 3. 分子クラウディングによる G-quadruplex リガンドの G-quadruplex 結合能及びテロメラーゼ阻害能への影響

分子クラウディングによる G-quadruplex リガンドの機能に与える影響について検討するため、100 mM KCl 緩衝液に平均分子量 200 の Polyethylene glycol (PEG200) を添加した場合の G-quadruplex リガ

ンドと HteloDNA の結合解析を行った。その結果、PEG200 の濃度上昇に伴い TMPyP4 と HteloDNA の結合定数 ( $K_a$ ) は小さくなった。この要因について、PEG 添加に伴う水の活量 ( $a_w$ ) 変化の観点から解析したところ、PEG200 の添加に伴う  $\ln K_a$  と  $\ln a_w$  の間には傾きが -37.9 の直線的な相関関係が認められた。この直線の傾きは、この結合反応によって放出される水分子の数と

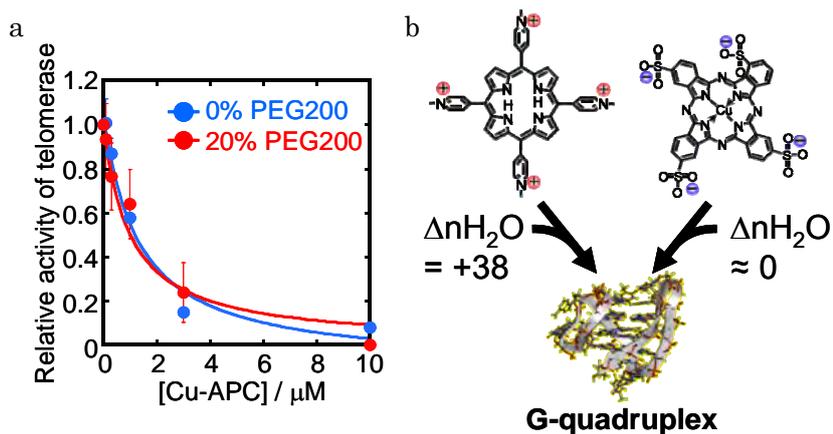


図 4. (a) PEG200 存在下での Cu-APC によるテロメラーゼ阻害効果, (b) Cu-APC と TMPyP4 の G-quadruplex への結合に伴う水分子の取り込みの関係

ほぼ等しいことから<sup>6</sup>, TMPyP4 と HteloDNA の結合には約 38 分子の水分子が取り込まれることが示された。一方, Cu-APC と HteloDNA の結合定数は PEG の濃度に依存しなかったことから, 結合に伴う水分子の出入りがないことが示された。そこで次に, PEG200 添加による両リガンドのテロメラーゼ阻害能への影響を検討した。その結果, 20%PEG200 存在下の TMPyP4 の IC50 値 (22.0 μM) は非存在下の IC50 値 (2.4 μM) の約 10 倍であった。その一方で, Cu-APC による IC50 値は, PEG200 非存在下と 20%PEG200 存在下でそれぞれ 1.2 μM 及び 1.3 μM と同等であった (図 4a)。以上の結果より, カチオン性 G-quadruplex リガンドである TMPyP4 は, G-quadruplex との結合において水の取り込みを伴うため, 水の活量低下によって G-quadruplex への結合及びそれに伴うテロメラーゼ阻害効果が抑制されたと考えられる。一方, アニオン性である Cu-APC の G-quadruplex への結合能は水の活量変化に依存しなかった。そのため, 水の活量が低下した条件下であっても, そのテロメラーゼ阻害能を保持できたと考えられる (図 4b)。すなわち, Cu-APC は細胞内の分子クラウディング条件下においても希薄溶液内と同様にテロメラーゼ活性を抑制できる可能性が示された。

#### 4. 二本鎖 DNA と分子クラウディングによる G-quadruplex リガンドの G-quadruplex 結合能及びテロメラーゼ阻害能への影響

上記 2 及び 3 の実験で認められた TMPyP4 と Cu-APC のテロメラーゼ阻害能における特性の違いが, 我々が当初予想した通り, それぞれの電荷の違いに依存するものであるかを検討した。具体的には, より細胞核内環境に近い λ DNA と PEG200 の共存下において, TMPyP4 と Cu-APC に加えて, 他のカチオン性 G-quadruplex リガンドである *N,N'*-bis[2-(1-piperidino)ethyl]-3,4,9,10-perylenetetracarboxylic diimide (PIPER) と, アニオン性 G-quadruplex リガンドである Hemin のテロメラーゼ阻害能について比較検討した (図 5)。その結果, λ DNA/20%PEG200 共存下における TMPyP4 と PIPER のテロメラーゼ阻害効果は希薄溶液条件下と比べて抑制されるのに対して, Cu-APC と Hemin のテロメラーゼ阻害効果は希薄溶液条件下と同程度であった (図 6)。これらの結果は上記 2 及び 3 の結果と一致するものであり, これまで G-quadruplex リガンドの G-quadruplex への結合能及びテロメラーゼ阻害能において重要であると考えられていたカチオン性の電荷が, 細胞核内を模倣した環境ではリガンドとしての機能を阻害することが示された。それとは対照的に, G-quadruplex とは静電的結合を形成しないと考えられるため従来ほとんど

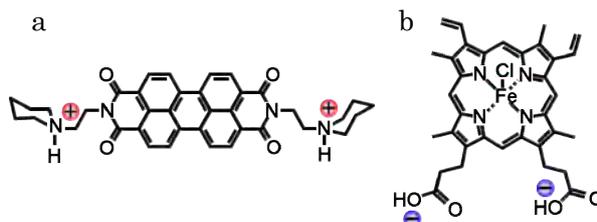


図 5. (a) PIPER と (b) Hemin の化学構造

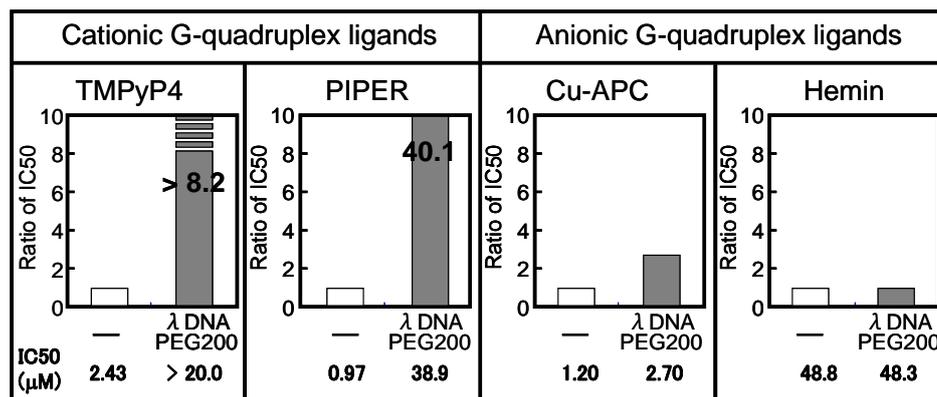


図6. λ DNA/PEG200 共存下における各 G-quadruplex リガンドのテロメラーゼ反応阻害の IC50 値

検討されたことがなかったアニオン性 G-quadruplex のテロメラーゼ阻害効果は、細胞核内環境下でも希薄溶液条件下と同程度に発揮される可能性が示された。すなわち、細胞核内環境下でも高いテロメラーゼ阻害能を有する G-quadruplex リガンドの分子設計においては、G-quadruplex との間に  $\pi$ - $\pi$  スタッキング相互作用や水素結合など、静電的結合以外の結合が形成される分子構造に設計することが重要であると考えられる。

## 5. おわりに

本研究において、アニオン性 G-quadruplex リガンドは G-quadruplex との結合において特異性が高く、水分子の取り込みも伴わないため、細胞内環境下でも希薄溶液条件下と同程度のテロメラーゼ阻害能を有する可能性が示された。今後はこれらの成果にもとづき、がん細胞を用いたアニオン性 G-quadruplex リガンドの評価や、さらに高いテロメラーゼ阻害剤能を有する G-quadruplex リガンドの分子設計指針を確立していきたいと考えている。また今回のように、薬剤候補化合物に影響を与えると考えられる細胞内因子を適切に選択し、それらを試験管内において化学的に再現した評価系を用いることは、医薬品開発の効率化にも非常に有効な手段であると言える。

## 謝辞

本研究は、甲南大学大学院フロンティアサイエンス研究科杉本直己教授、三好大輔准教授のもとで行われました。この場をお借りしまして杉本先生、三好先生のご厚意と日々のご指導に厚く御礼申し上げます。

## 文献

1. Harley, C. B.; Futcher, A. B.; Greider, C. W.; *Nature* **1990**, *345*, 458-460.; Harley, C. B.; Vaziri, H.; Counter, C. M.; Allsopp, R. C.; *Exp. Gerontol.* **1992**, *27*, 375-382.
2. Greider, C. W.; Blackburn, E. H.; *Cell* **1985**, *43*, 405-413.; Morin, G. B.; *Cell* **1989**, *59*, 521-529.; Kim, N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. D.; Ho, P. L.; Coviello, G. M.; Wright, W. E.; Weinrich, S. L.; Shay, J. W.; *Science* **1994**, *266*, 2011-2015.
3. Zahler, A. M.; Williamson, J. R.; Cech, T. R.; Prescott, D. M.; *Nature* **1991**, *350*, 718-720.; Sun, D.; Thompson, B.; Cathers, B. E.; Salazar, M.; Kerwin, S. M.; Trent, J. O.; Jenkins, T. C.; Neidle, S.; Hurley, L. H.; *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2113-2116.
4. Yaku, H.; Murashima, T.; Miyoshi, D.; Sugimoto, N.; *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5740-5742.
5. Yu, H. Q.; Zhang, D. H.; Gu, X. B.; Miyoshi, D.; Sugimoto, N.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9034-9038.
6. Nakano, S.; Karimata, H.; Ohmichi, T.; Kawakami, J.; Sugimoto, N.; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14330-14331.

## 細菌由来シトクロム P450 の基質誤認識を利用するバイオ触媒系の開発

名古屋大学 大学院理学研究科 荘司長三

### 1. はじめに

常温、常圧の温和な条件下で反応を行うことが可能となる酵素を合成反応に利用できれば、環境負荷の低い理想的な反応系を構築することができる。生物界に広範に存在するシトクロム P450 (P450) は、薬物代謝や解毒、ホルモンの生合成などに関連した不活性な有機基質を水酸化する強力なヘム酵素群で (P450<sub>SPα</sub> の結晶構造を図 1 に示した<sup>[1]</sup>)、その有機合成反応への利用が期待されてきた。細菌由来 P450 の触媒活性は動物や植物由来の P450 に比べて非常に高く、薬剤中間体合成の触媒として有望視されてきた。しかしながら、細菌由来の P450 は、基質に対する選択性、すなわち基質特異性が高く、対象とする基質以外に対する酸化活性は極端に低い。野生型酵素の基質特異性を、部位特異的もしくはランダムな変異導入を繰り返すことで、目的とする基質の酸化を行うことができるように改変した変異体が数多く報告されている。変異導入を繰り返すことで、対象とする基質に対して高い酸化活性を示す変異体を人工的に創り出すことができるのではあるが、基質が変わるたびに毎回変異導入を繰り返す必要があるために、開発に時間がかかるだけでなく、酵素の基本骨格に影響を与えるような変異を導入してしまうと、蛋白質のフォールディングがうまくいかずに機能しないという問題がしばしば生じる。そこで、変異導入を行わずに野生型 P450 を用いて広範な基質の酸化に対応できるような全く新しいバイオ触媒系を開発できないかと考え研究を始めた。P450 が高い基質特異性を示す主な理由は、酸化反応を開始する第一段階が、対象とする基質の取り込みをトリガーとして始まることに起因する。対象とする基質と構造が大きく異なる基質は、P450 に取り込まれたとしても酵素のスイッチを ON の状態にすることができない、もしくは、その効率が著しく低いために酸化活性も低くなる。P450 では、「酸化される基質」と「酸化反応のスイッチを ON にする物質」(活性化因子) が同一であるために、高い基質特異性を示す設計となっている。そこで、対象とする基質が担うこの二つの役割を分離し、活性化因子としての役割だけの分子を P450 に取り込ませて、酸化反応の第一段階をスタートさせれば、本来の対象基質と異なる幅広い基質の酸化反応を行うことができるのではないかと考えた。そして、活性化因子として、対象とする基質に構造がよく似てはいるけれどもそれ自体は酸化の対象とはならず、P450 の活性化のみをスタートさせる疑似基質(「デコイ分子」と名付けた)を反応系に添加するシステムを考案し展開してきた。これまで、過酸化水素を利用することができる P450<sub>BSP</sub> と P450<sub>SPα</sub>、P450 の中でも最大の活性を示すことで知られる P450<sub>BM3</sub> に対して、デコイ分子を反応系に添加するのみで、P450 単体では酸化の対象とならない様々な基質の酸化が進行することを明らかとしてきたのでそれらを紹介したい。



図 1 P450<sub>SPα</sub> の結晶構造 (PDB ID:3AWM)

### 2. 過酸化水素駆動型 P450

一般に、P450 の酸化活性種(オキシフェリルポルフィリン  $\pi$ -カチオンラジカル : Compound I)の生成には、電子伝達蛋白質を介した NAD(P)H からの電子供給とプロトンチャネルを介した外部からのプロ

トン供給が必須である (図 4 上). ところが, P450<sub>BSβ</sub> は例外的に過酸化水素によって酸化活性種を生成し, 長鎖脂肪酸の水酸化反応を触媒する. 安価な過酸化水素のみで機能し, 電子伝達蛋白質を必要としないシンプルな反応機構は,

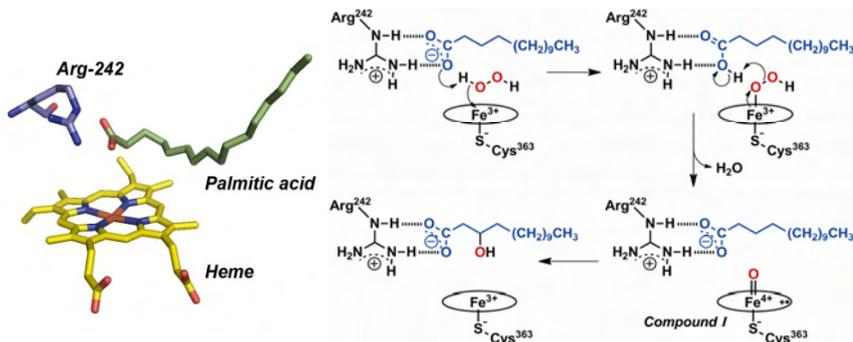
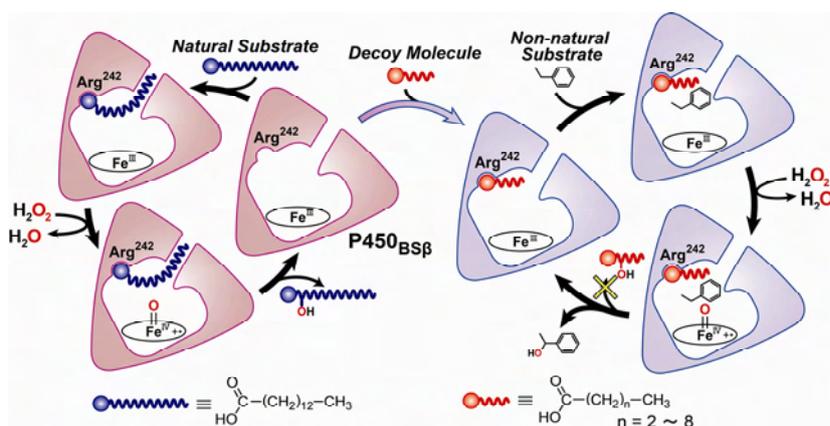


図2 パルミチン酸結合型 P450<sub>BSβ</sub> の活性部位 (左) と過酸化水素を利用する酸化活性種(Compound I)生成機構と長鎖脂肪酸の水酸化 (右)

工業的応用の観点からも有望である. P450<sub>BSβ</sub> が過酸化水素を利用可能な非常に稀な P450 であることが報告されたにも関わらず, P450<sub>BSβ</sub> をバイオ触媒として利用しようとする試みはほとんどされなかった. なぜなら, P450<sub>BSβ</sub> の基質特異性が非常に高く, 長鎖脂肪酸以外の基質を水酸化することはできないのではないかと考えられたからである. パ



スキーム 1 長鎖脂肪酸の水酸化反応 (左) とデコイ分子を用いる非天然基質 (エチルベンゼン) の酸化反応 (右) の模式図

ルミチン酸結合型の結晶構造解析から, 長鎖脂肪酸のカルボキシル基がヘム近傍の 242 番目のアルギニンと静電相互作用して固定され, このカルボキシル基が過酸化水素を用いた酸化活性種生成において一般酸塩基触媒として機能するために, 高い基質特異性を示すことが明らかとなった (図 2) [2]. すなわち, 長鎖脂肪酸が酸化される基質であると同時に反応を開始するスイッチとして機能するため, P450<sub>BSβ</sub> は長鎖脂肪酸以外を水酸化できない. そこで, 長鎖脂肪酸以外の基質を野生型 P450<sub>BSβ</sub> により酸化するために, デコイ分子としてアルキル鎖長の

表 1. 直鎖アルキルカルボン酸をデコイ分子として添加した場合のエチルベンゼンの水酸化反応活性とキラル選択性

Carboxylic acid	Rate [min <sup>-1</sup> ]	ee (R) [%]
Butanoic acid (C <sub>4</sub> )	11±1	35±4
Pentanoic acid (C <sub>5</sub> )	20±2	41±4
Hexanoic acid (C <sub>6</sub> )	24±2	51±3
Heptanoic acid (C <sub>7</sub> )	28±4	68±2
Octanoic acid (C <sub>8</sub> )	10±3	61±3

短いカルボン酸を取り込ませて反応のスイッチを強制的に常時 ON の状態にする反応系を考えた (スキーム 1 右). そして, 鎖長の短いアルキルカルボン酸を添加するとエチルベンゼンやスチレンの酸化反応が進行することを明らかとした<sup>[3-6]</sup>. また, 添加するデコイ分子の鎖長により, 酸化活性だけでなく生成物のキラル選択性が大きく変化することも見出している (表 1). デコイ分子のカルボキシル基が一般酸塩基触媒として機能することは, X 線結晶構造解析により P450<sub>BSβ</sub> がデコイ分子として炭素数 7 のヘプタン酸を取り込んだ状態を原子レベルで明らかにすることで確認した<sup>[7]</sup>. さらに, P450<sub>BSβ</sub> と

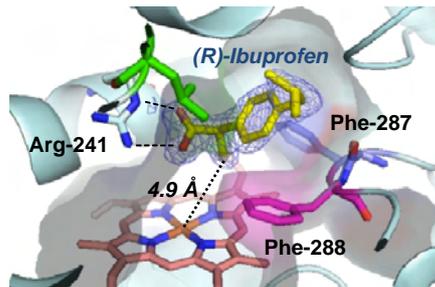
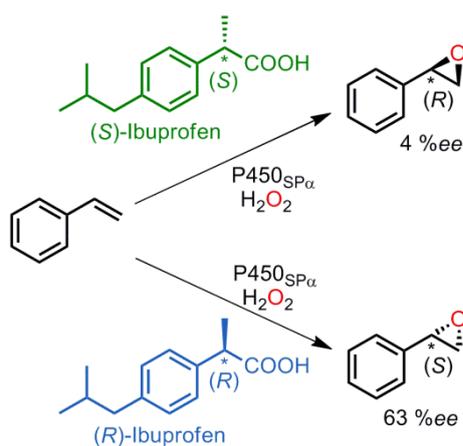


図 3 イブuproフェンをデコイ分子とするスチレンのエポキシ化反応（左）と (R)-イブuproフェンを活性部位に取り込んだ P450<sub>SPα</sub> の結晶構造（右）

同じく過酸化水素を利用することができる P450<sub>SPα</sub> に対しては、デコイ分子を利用する手法が適用できると考えた。結晶構造解析により、P450<sub>SPα</sub> の酸化活性種生成にも基質のカルボキシル基が関与することを明

らかとするとともに<sup>[1]</sup>、カルボキシル基を有するデコイ分子存在下で、スチレンのエポキシ化反応が可能となることを見出した。また、生成物のキラリ選択性とデコイ分子の構造の関連を調べ、イブuproフェンなどの  $\alpha$  位の不斉が生成物のキラリティーに大きな影響を及ぼすことを明らかとした（図 3 左）。(R)-イブuproフェン結合型の結晶構造解析により、(R)-イブuproフェンが P450<sub>SPα</sub> に取り込まれている状態を明らかにしている（図 3 右）<sup>[8]</sup>。

### 3. パーフフルオロアルキルカルボン酸存在下で進行するガス状アルカンの水酸化

酸素分子を還元的に活性化する通常の P450 も、基質の取り込みが反応を開始するトリガーとなっている（図 4 上）。そこで、デコイ分子を利用する手法を P450 の中でも最大の活性を示す P450BM3 に適用することを考えた。P450BM3 は、長鎖脂肪酸の末端を水酸化する酵素で、結晶構造解析から長鎖脂肪酸は、その末端がヘムの上方に配置されるように入り込まれる（図 4 下）。P450BM3 に対するデコイ分子として、それ自体が酸化されない条件を満たすために、長鎖脂肪酸の末端を含めたすべての水素原子がフッ素原子に置換されたパーフルオロアルキルカルボン酸を利用することを考えた。また、活性部位に酸化される基質が結合できる空間を確保するために、P450BM3 が酸化の対象とする炭素数 16 のパルミチン酸よりも鎖長が短い一連のパーフルオロアルキルカルボン酸を添加して、ガス状飽和炭化水素の水酸化を検討した。野生型 P450BM3 は、通常、プロパンやブタンなどのガス状アルカンを水酸化することはできないが、パーフルオロアルキルカルボン酸をデコイ分子として添加すると、野生型 P450BM3 でも、プロパンやブタンを水酸化できることを明らかとした（図 5）<sup>[9]</sup>。また、アルカンの分子サイズに依存して、最大活性を与えるパーフルオロアルキルカルボン酸のアルキル鎖長が変化し、プロパンの水酸化では炭素数 10 (PFC10)、ブタンとシクロヘキサンでは炭素数 9 (PFC9) のパーフルオロアルキルカルボン酸

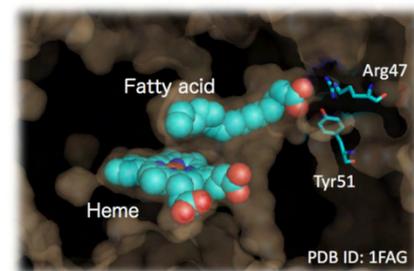
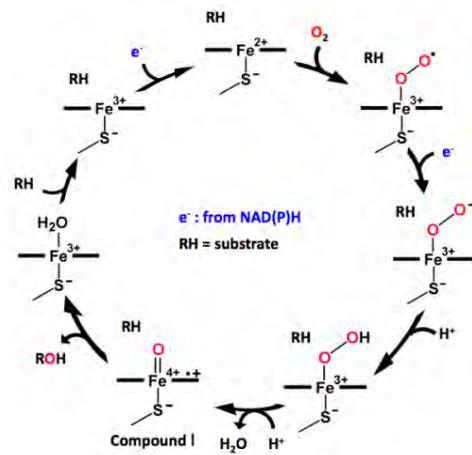


図 4 P450 による酸素分子の還元活性種生成機構（上）と長鎖脂肪酸を取り込んだ P450BM3 の結晶構造（下）

を添加したときに最大の活性を示し (図 5), プロパンのような小さなアルカン分子の場合には鎖長の長いデコイ分子, シクロヘキサンのような比較的大きなアルカンの場合には鎖長の短いデコイ分子が効果的に機能することを見出した. 反応活性にパーフルオロカルボン酸の鎖長依存性がみられることは, デコイ分子により P450BM3 の反応空間を制御できることを示している.

#### 4. おわりに

本研究では, 基質特異性の高い細菌由来 P450 に対してそれらが対象とする基質に構造がよく似た疑似基質(デコイ分子)を添加することで, 変異導入を一切施すこと無しに酵素の基質特異性を大きく変更できることを明らかにした. 今後は, より難易度の高いメタンガスの水酸化反応などに挑戦するとともに, デコイ分子を利用する手法を様々な蛋白に適用して, 新規酵素機能改変手法として確立していきたい.

#### 謝辞

本研究は, 名古屋大学物質科学国際研究センターの渡辺芳人教授の研究室で行われたもので, 渡辺先生に心から感謝いたします. 結晶構造解析では, 理研播磨/SPring-8 の城宜嗣主任研究員, 杉本宏専任研究員, 鳥取大学大学院工学研究科の永野真吾教授に多大なご協力をいただきましたことを厚く御礼申し上げます.

#### 文献

- [1] T. Fujishiro, O. Shoji, S. Nagano, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, *J. Biol. Chem.* **286**, 29941-29950 (2011). [2] D.-S. Lee, A. Yamada, H. Sugimoto, I. Matsunaga, H. Ogura, K. Ichihara, S.-i. Adachi, S.-Y. Park and Y. Shiro, *J. Biol. Chem.*, **278**, 9761-9767 (2003). [3] O. Shoji, T. Fujishiro, H. Nakajima, M. Kim, S. Nagano, Y. Shiro, Y. Watanabe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 3656-3659 (2007). [4] O. Shoji, C. Wiese, T. Fujishiro, C. Shirataki, B. Wünsch, Y. Watanabe, *J. Biol. Inorg. Chem.* **15** 1109-1115 (2010). [5] T. Fujishiro, O. Shoji, Y. Watanabe, *Tetrahedron Lett.* **52** 395-397 (2010). [6] O. Shoji, Y. Watanabe, *Metallomics* **3**, 379-388 (2011). [7] O. Shoji, T. Fujishiro, S. Nagano, S. Tanaka, T. Hirose, Y. Shiro, Y. Watanabe, *J. Biol. Inorg. Chem.* **15** 1331-1339 (2010). [8] T. Fujishiro, O. Shoji, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, *Manuscript in preparation*. [9] N. Kawakami, O. Shoji, Y. Watanabe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 5315-5318 (2011).

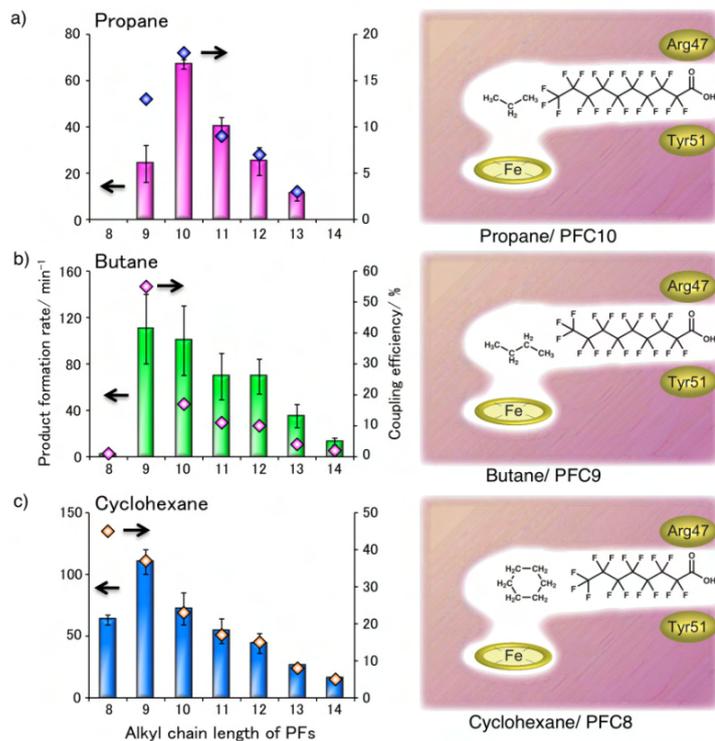


図 5 鎖長の異なる一連のパーフルオロカルボン酸をデコイ分子として添加した場合のプロパン(a), ブタン(b), シクロヘキサン(c)の水酸化活性とカップリング効率 (左). パーフルオロカルボン酸とアルカン分子を同時に取り込んだ P450BM3 の活性部位の模式図 (右)

## 部会行事

### 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム開催報告

実行委員長：筑波大学 鍋島達弥

本シンポジウムは 9 月 12 日（月）～14 日（水）の三日間、つくば国際会議場（エポカルつくば）において開催されました。震災の影響も心配されましたが全国から 571 名と、多数の参加者があり大変な盛会となりました。今回のシンポジウムは、第 26 回生体機能関連化学シンポジウム、第 14 回バイオテクノロジー部会シンポジウム、第 14 回生命化学研究会シンポジウム、第 8 回ホスト-ゲスト化学シンポジウムの四つのシンポジウムを兼ねた合同シンポジウムであり、日本化学会生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、生体機能関連化学・バイオテクノロジーディビジョン、フロンティア生命化学研究会、ホスト-ゲスト・超分子化学研究会の主催で行われました。口頭発表は特別講演 1 件、招待講演 6 件、一般講演 133 件の合計 140 件、ポスター発表は 267 件と、世界化学年の記念すべき本年に数多くの優れた研究発表が行われたことを大変嬉しく思っております。実行委員一同、改めて皆さまのご協力に深く感謝致します。

本年 3 月の東日本大震災では、つくば地区も大きな被害を被るなど、特に茨城以北の地域が被災し、大学はもちろんのこと、多くの研究機関、研究室、研究者が未曾有の困難に直面した年となりました。そこで本シンポジウムでは、被災研究者への励ましの気持ちを込めて「東日本大震災復興祈念特別セッション」を企画し、二日目に開催しました。お陰様で多くの方にご参加いただき、最先端の講演 6 件の非常に熱気にあふれたセッションとなるなど、被災研究室の皆さまへの応援のメッセージを発信することができたと考えております。

本シンポジウムを開催するにあたり、組織委員として筑波大学の新井達郎教授、木越英夫教授、小島隆彦教授、鈴木博章教授、野村暢彦准教授、山本泰彦教授、産総研の横山憲二氏、また実行委員として筑波大学の山村正樹助教（事務局担当）、秋根茂久准教授、小谷弘明助教、石塚智也助教、太虎林準研究員、西村賢宣准教授、百武篤也講師、北将樹講師、早川一郎助教にはお忙しい中、ご協力、ご尽力頂きました。この場を借りて心より感謝申し上げます。

さて来年の第 6 回バイオ関連化学シンポジウムは北海道大学の居城邦治先生を実行委員長に、北大キャンパスで開催されます。この分野の研究交流がますます活発となり世界を先導する分野であり続けるためにも、是非多くの皆さまのご参加をお願い申し上げます。

## 「第5回バイオ関連化学シンポジウム講演賞」講評

第26回生体機能関連化学シンポジウム・第14回バイオテクノロジー部会シンポジウム・第14回生命化学研究会シンポジウム・第8回ホスト・ゲスト化学シンポジウム合同シンポジウム講演賞

審査委員長 浜地 格

京都大学大学院工学研究科

本講演賞は、これまで日本化学会生体機能関連化学シンポジウムあるいはバイオ関連合同シンポジウムにおいて3,4件の優れた若手研究者の講演に対して授与されてきました。今回のシンポジウムは 生体機能関連化学部会, バイオテクノロジー部会, 生命化学研究会, ホスト・ゲスト化学研究会が合同で行ったものであり、講演賞は第5回バイオ関連シンポジウム講演賞となります。鍋島先生を組織委員長として筑波でおこなわれた本会が多様な分野から500名以上の参加者を集め大盛況であったことを反映し、講演賞に応募された研究者の分野は多岐にわたりました。ペプチド・蛋白・酵素, 分子認識・超分子・モデル系, 遺伝子関連の三つのカテゴリーに分類された講演賞の応募は、28件と昨年より10件近く増え大変な激戦でした。どの講演も高い研究レベルで、独創性も高く、発表もよく工夫されたもので、審査委員は良い意味で大変頭を悩ませました。研究テーマの新規性・独創性, 実験データの質と量, 解析の妥当性, 結果の新規性, 発表の(異分野研究者も意識した)分かりやすさ, 質疑応答などの観点から厳正に審査を行い、うち特に優れた4件を講演賞として選出しました。世界標準の視点で見た研究レベル(質・量ともに)の高さを大前提とし、評価を行いました。その上で、そのテーマにかける本人の情熱、研究の意義, 独創性と波及効果を非専門の人にも分かってもらいたいという熱意が、どれだけ審査委員に届いたかが、大きなウエイトを占めたと思われまます。このような機会が、受賞された方だけでなく、多くの若手の皆さんのますますの活躍につながればと願っています。

最後に、大変お忙しい中ご協力いただいた審査員の重責をお引き受け頂いた7名の先生方に心よりお礼申し上げます。

### 受賞講演者-発表演題(五十音順, 敬称略)

樫田 啓 (名大院工)

「カチオン性色素会合を利用した光機能性DNAグルーの開発」

荘司 長三 (名大院理)

「細菌由来シクロムP450の基質誤認識を利用するバイオ触媒系の開発」

高橋 俊太郎 (東工大生命理工GCOE)

「mRNA配列情報で制御されたタンパク質生合成のシングルターンオーバー解析」

夜久 英信 (パナソニック先端研・甲南大FIRST/FIBER)

「疑似細胞核内環境下におけるアニオン性G-quadruplexリガンドのテロメラーゼ阻害効果」

## 部会行事

### 第26回生体機能関連化学部会若手フォーラム開催報告

若手フォーラム代表世話人  
東京工業大学大学院生命理工学研究科 高橋俊太郎

第26回生体機能関連化学部会若手フォーラムは、若手会幹事関東支部の高橋俊太郎（東京工業大学）、花岡健二郎（東京大学）、山村正樹（筑波大学）が世話人となり、9月11日（日）に筑波大学総合研究棟 B 棟において開催いたしました。休日の開催でしたが、講師4名、一般22名、学生56名の合計82名と多数ご参加頂きました。

今回は「化学とバイオの横断的研究を目指して」ということで、その最先端で活躍する化学、生化学の分野から4名の先生を講師としてお招きし、それぞれ「遺伝子の機能発現を光制御するケージド化合物の設計と合成」（古田寿昭先生 東邦大学）、「RNA 修飾の生合成から細胞内の化学反応を学ぶ」（鈴木勉先生 東京大学）、「DNA 鋳型によるナノファイバーアーキテクニクス」（岩浦里愛先生 農研機構）、「共創研究！ 化学とバイオイメージング」（三輪佳宏先生 筑波大学）というタイトルで講演頂きました。最先端の研究発表はもちろんのこと、ユニークな講演内容、それぞれ独自のフィロソフィーをご披露くださりまして、会場の方からも活発な議論が飛び交い大いに盛り上がりました。タイトなスケジュールではありましたが、若手の参加者にとってそれぞれ大変刺激になったセッションだったと感じております。

講演に引き続いて行ったポスター発表は36件の発表をいただき、いずれもレベルの高い発表ばかりで、こちらでも発表時間を過ぎても白熱したディスカッションが収まりきらない様子でした。2時間という発表時間においても全てを網羅するのは困難であり、それだけが心残りです。その中で、一般参加者、および招待講演者の投票により、特に優秀なご発表と認められました江川堯寛さん（東京大学大学院薬学研究科）、寺田光良さん（名古屋大学大学院理学研究科）、藤井大雅さん（名古屋大学大学院工学研究科）の3名を優秀賞として表彰し、賞状と副賞を授与いたしました。例年通り懇親会はポスター発表と同時進行で行いましたが、学生、研究者間



の様々なインタラクションが生まれ、交流の場としての一助になりましたら運営側としては幸いです。

最後に、本会の運営と開催に関しましてご協力頂きました世話人の方々、若手会幹事の方々、ならびに日本化学会坂下修様に厚く御礼申し上げます。さらに、素晴らしい組織力で会のスムーズな運営を支えてくださいました筑波大鍋島研究室の皆様、および生体機能関連化学部会、公益財団法人サントリー生命科学財団の支援に感謝いたします。



ニュースレター Vol. 26, No. 1 2011年 12月 9日発行

事務局：101-8307 東京都千代田区神田駿河台1-5, 日本化学会生体機能関連化学部会

Office of the Secretary : The Chemical Society of Japan, 1-5 Kanda-Surugadai, Chiyodaku, Tokyo 101-8307, Japan

URL: <http://seitai.chemistry.or.jp/>

mail to: [seitai@chemistry.or.jp](mailto:seitai@chemistry.or.jp)

編集委員：大槻高史, 青野重利, 民秋均