

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. 22, No.3 (2007. 12. 3)

## 目 次

### ◇ 巻 頭 言

偶感@杜の都.....小宮山 眞 1

### ◇ 研 究 紹 介

改変 EF-Tu を用いた翻訳系の拡張.....大槻 高史 2

非生体材料を識別する新規抗体分子：

ペプチド移植からのボトムアップ的高親和性抗体の作製.....服部 峰充 6

蛋白質・酵素活性中心の分子変換機能を有する金属錯体の開発

.....船橋 靖博 10

DNA 四重らせん構造を細胞内環境因子で制御する.....三好 大輔 14

### ◇ 部 会 行 事

第22回生体機能関連化学シンポジウムの開催報告..... 18

第7回生体機能関連化学部会講演賞の講評..... 19

若手フォーラムの開催報告..... 20

### 偶感@杜の都

東京大学・先端科学技術研究センター 小宮山 眞

仙台で開催された生体関連化学シンポジウム、内容も運営も素晴らしく、お世辞ぬきに、最近出席した学会の中でも秀逸であった。お世話いただいた先生方に心より感謝申し上げます。それにしても、発表に際して各グループの責任者（あるいはそれに準ずる人）が自ら登壇するという本会の伝統は本当に良いものである。多くの場面で、質問やコメントに対して関連研究も含めての適切な対応がなされ、これが質問者や聴衆を大いに安心させて学会を実り豊かなものにしていて、学生がわき目も振らずに一生懸命発表している姿はさすがしくて美しいし、こうした機会を若武者に与えることが必要ではあることも確かではあるが、やはりそれだけでは困る。

昨今の生体関連化学の進展、まさに目覚しくご同慶の至りである。ただ活躍されている学会が多岐にわたるために情報交換が難しくなってしまったのは残念だ。情報を十分に得ようとする（お付き合いも含めて）参加する学会がどんどん増えてしまい、一方で、色々な学会で同じ内容の話を繰り返し発表する（また聞く）こともままある。これは、時間的にも経済的にも、いかにももったいない。学会、若干多すぎないだろうか？ 次のような総合コンフェレンスがあれば多少の解決になるような気がするがいかがであろう（杜の都で美酒に酔いながらふと頭に浮かんだ戯言だから当否には自信はないが）。対象とするテーマは、仮にバイオに絞るとしても、その範疇にある限りは出来るだけ幅広い領域をカバーするように設定する。もちろん、多少の無理をしても、典型的な生物科学の内容もここに含める。発表は基本的に研究グループのヘッドが行い、自分のグループの最新の成果を、ある程度の時間をかけて、幅広い聴衆にも理解できるように説明する。詳細な説明はポスターで行い、同時に学生にも発表の機会を与える。例えば4日ぐらいの長期日程であっても、それに相当するだけの質と量の情報が1回で得られるのであれば、忙しい皆さんも時間を割いて参加できるだろう。そうすれば、コンフェレンスは活性化され、それがさらに多数の参加を促す……。現状のように、過密な日常スケジュールの合間をぬって数多くの学会を駆け巡るよりもはるかに効率的ではないだろうか？ 小生も含めて、懇親会の数が減って寂しい思いをする人も少なくないかも知れないが、これは個人レベルで解決するとして。

さて私ごとで恐縮であるが、生体関連化学の研究を始めてから、はや30年が経ってしまった。“月日は百代の過客にして……”とはいみじくも言ったもので、何もしなくても、いつの間にか年だけはとるものである。その間、多くの先生方にお世話になりっぱなしで来たわけで、その何分の一かでも恩返しができたらと考えている。こんなことを言うと長老方には“かつての悪童が何を言うか”と笑われるかもしれないが、老骨に鞭打つてもうひとがんばりしますので今後ともよろしく願いいたします。

## 改変 EF-Tu を用いた翻訳系の拡張

岡山大学大学院自然科学研究科 大槻 高史

### 1. はじめに

非天然アミノ酸を蛋白質内の特定の部位に導入する技術は、蛋白質合成系を用いて mRNA 上の特殊なコドン（終止コドン、4 塩基コドン<sup>1)</sup>、非天然塩基コドン<sup>2, 3)</sup>、などに非天然アミノ酸を対応させることにより成り立っている。このような技術は、天然アミノ酸による変異体では得られないような様々な機能を蛋白質に付加することを可能にする。しかしながら、多くの場合非天然アミノ酸の蛋白質への導入効率が低いことから、現在蛋白質に実用的に導入できる非天然アミノ酸は限られている。非天然アミノ酸の蛋白質への導入効率が低い理由としては、その導入ルートを考えて、大腸菌由来システムにおいては2つの可能性が考えられる。アミノ酸は tRNA に結合したのち、翻訳因子 EF-Tu にアミノアシル tRNA の状態で認識され、リボソームに運ばれてその内部でペプチドに組み込まれる。従って、非天然アミノ酸の導入効率が低い場合の理由は、①その非天然アミノ酸が EF-Tu に許容されないためか、②リボソームに許容されないため、のどちらかである（図1）。たとえば、D 体のメチオニンやフェニルアラニンの導入効率が低いのはリボソームとの不適合が原因のようである<sup>4)</sup>。しかし、非天然アミノ酸が導入できない場合、全てリボソームが原因ということはないであろう。非天然アミノ酸を蛋白質に導入するうえで第一関門となる EF-Tu については、意外にも見落とされてきた。

そこで筆者らは、EF-Tu と非天然アミノ酸の不適合がその原因の1つとなっていることを明らかにし、EF-Tu の改変により、これまで導入が困難だった非天然アミノ酸の蛋白質への導入を可能にした。本稿では、筆者らの研究を中心に、EF-Tu と非天然アミノ酸に関する話題を紹介する。

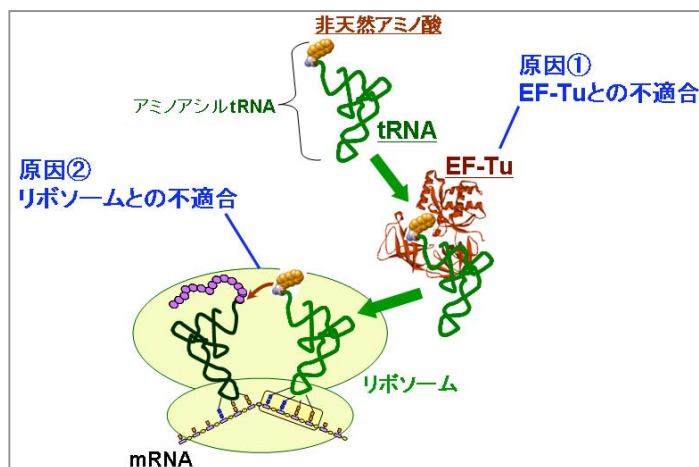


図1 翻訳系を介した蛋白質への非天然アミノ酸の導入ルートと、導入効率が低い場合の原因。

### 2. EF-Tu のアミノ酸特異性

非天然アミノ酸導入技術において、EF-Tu の役割が見過ごされてきたのも無理はない。20 種の天然アミノ酸の間でもかなりの構造的バリエーションがあるにも関わらず、EF-Tu は様々なアミノアシル tRNA（例えば、Val-tRNA<sup>Val</sup>、Ala-tRNA<sup>Ala</sup>、Phe-tRNA<sup>Phe</sup>）に同程度の親和性で結合することが古くから知られていた。そのため、EF-Tu はアミノアシル tRNA のアミノ酸側鎖をほとんど認識していないと思われる。それが本当なら EF-Tu が非天然のアミノ酸側鎖を拒絶することは無いはずである。しかし EF-Tu はアミノ酸特異性がないというのは誤解である。Uhlenbeck らはアミノアシル tRNA にはアミノ酸部分と tRNA 部分があるという当然のことに注目し、アミノ酸部分は異なるが tRNA 部分が同じのアミノアシル tRNA シリーズ（例えば、Val-tRNA<sup>Val</sup>、Ala-tRNA<sup>Val</sup>、Phe-tRNA<sup>Val</sup>）を作って EF-Tu との結合を比較した<sup>5)</sup>。そして、実は EF-Tu はかなりアミノ酸を選び好みすることに気づいた。

天然のシステムで、各種アミノアシル tRNA の EF-Tu への結合強度が揃っているのは、以下のような理由であった。例えば、Ala は Val より EF-Tu への親和性が低いが、tRNA<sup>Ala</sup> は tRNA<sup>Val</sup> より EF-Tu への親和性が高いため、Ala-tRNA<sup>Ala</sup> と Val-tRNA<sup>Val</sup> の EF-Tu への結合強度は同等であった。つまり、天然のシステムでは、アミノ酸部分と tRNA 部分とが巧妙にバランスを取って、アミノアシル tRNA の EF-Tu への結合強度を均一化していたのである。

したがって、EF-Tu はアミノ酸側鎖への特異性がほとんど無いというのは誤解であり、そうすると、非天然アミノ酸が EF-Tu に拒絶されることも当然ありうる。

### 3. EF-Tu と非天然アミノ酸の適合性

そこで、非天然アミノ酸と EF-Tu との結合を調べた<sup>6)</sup>。非天然アミノ酸を担持した tRNA と EF-Tu の結合能を測定した結果、図2に示すような結果を得た。図2左に示す BODIPY-FL-AF などの非天然アミノ酸は、天然アミノ酸と比べると弱い EF-Tu に結合することが確認された。一見するとこのような大きな非天然アミノ酸が結合することは意外だが、EF-Tu とアミノアシル tRNA の結晶構造<sup>7)</sup>に照らし合わせてみると納得のいく結果である。なぜなら、これらのアミノ酸の上半分は天然アミノ酸（フェニルアラニン）と同じ形であり、下半分（細長いリンカーと大きな蛍光基部分）は EF-Tu のアミノ酸結合ポケットの外に出ることが予想されるからである。図2の中央に示す非天然アミノ酸は、左のアミノ酸より結合が弱く、図2右の非天然アミノ酸は殆ど EF-Tu との結合が観測できなかった。これらの結果も、結晶構造と照らし合わせると納得できる。なぜなら、アミノ酸 C<sub>β</sub> 位に直接大きな芳香族基が付いていると、明らかに EF-Tu のアミノ酸結合ポケット内に収まらないからである。例えば、1pyrAla-tRNA は EF-Tu の E215 側鎖とぶつかってしまう（図3 B）。なお、図2右に示す非天然アミノ酸は、蛋白質への導入が非常に困難であった。従って、このタイプの非天然アミノ酸の導入効率の低さは、EF-Tu との親和性の低さが関係していると考えられる。

そこで大腸菌 EF-Tu を改変し、大きな非天然アミノ酸を許容させることを目指すことにした。

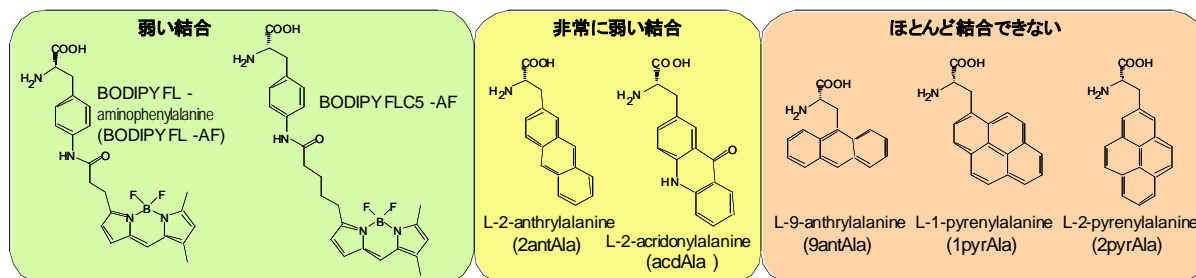


図2 大腸菌 EF-Tu と蛍光性非天然アミノ酸（アミノアシル tRNA の形で）の結合。

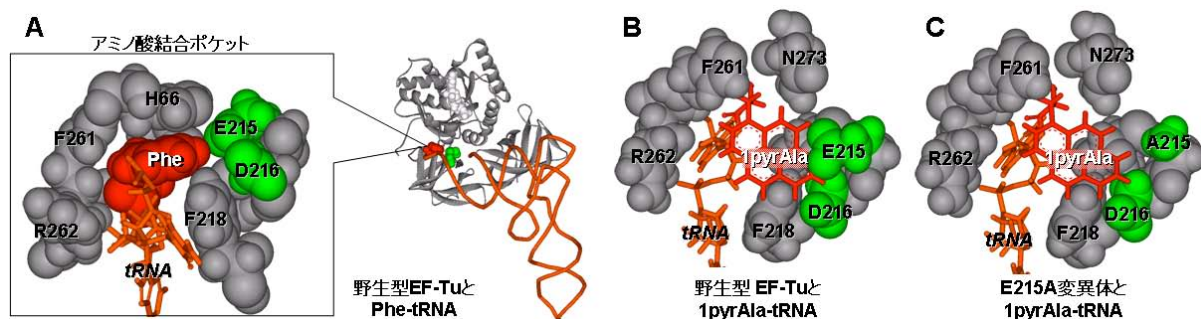


図3 EF-Tu のアミノ酸結合ポケット。

(A) 野生型 EF-Tu と Phe-tRNA の複合体の結晶構造（右）とアミノ酸結合ポケット部分の拡大図（左）。

(B) 野生型 EF-Tu と 1pyrAla-tRNA の結合モデル。E215 と 1pyrAla の側鎖がぶつかってしまう。

(C) E215A 変異体と 1pyrAla-tRNA の結合モデル。

#### 4. EF-Tu のアミノ酸特異性の改変

EF-Tu のアミノ酸特異性の改変については幾つか例がある。EF-Tu のアミノ酸特異性を見つけた Uhlenbeck らは、続いて EF-Tu のアミノ酸結合ポケットの変異実験を始め、変異により特異性が変化すると報告した<sup>8)</sup>。また、筆者らには、セリン特異的な EF-Tu 変異体を作った実績があった<sup>9)</sup>。

ここでセリン特異的 EF-Tu について紹介する。少し本題から外れるが、その経緯から話をはじめ。筆者は 2003 年までの数年間、東京大学の渡辺公綱教授の下でミトコンドリアの翻訳系の研究をしていた。ミトコンドリアは、最初は真核細胞のもととなる細胞に共生していた異種生物だったという説もあり、核や細胞質とは独立の遺伝システムや翻訳系を持っている。ミトコンドリアの翻訳系には非常に珍しい翻訳因子や tRNA が存在し、進化的な考察をするには魅力的な題材であった。なかでも線形動物のミトコンドリアには極度に異常な構造の tRNA が多数存在する。ここで「EF-Tu は 1 つの翻訳系に通常 1 種類しかないが、線形動物ミトコンドリアの様々な異常構造 tRNA に 1 つの EF-Tu で対応できるのだろうか？」と疑問が生じた。調べたところ、この翻訳系には 2 種類のユニークな EF-Tu が存在していた<sup>10)</sup>。そのうちの 1 つは、Ser-tRNA<sup>Ser</sup> のみに対応する EF-Tu で、これはアミノアシル tRNA のアミノ酸部分がセリン以外のものには結合できないという「セリン特異性」を持っていた。そこで、セリン特異性がどのような分子構造に基づくかを調べるため、標準的な EF-Tu に対してセリン特異的 EF-Tu に特徴的な残基を系統的に移植する変異実験を行った。その結果、EF-Tu のアミノ酸結合ポケットに数残基の変異を加えることで標準的 EF-Tu をセリン特異的 EF-Tu に改変することができた<sup>9)</sup>。

#### 5. 大きな非天然アミノ酸を許容する EF-Tu 変異体の作製<sup>11)</sup>

話を元に戻すと、今回は大きな非天然アミノ酸にも対応するような EF-Tu を作ることが目的である。アミノ酸特異性を甘くする改変は、特異性を厳密にするより簡単に思える。セリンのみに特異的な EF-Tu を作れたのだから、大きな非天然アミノ酸を許容する EF-Tu は作れそうである。

図 3 B を見ると、1pyrAla のようなアミノ酸が野生型 EF-Tu に結合できない理由は、大きなアミノ酸側鎖とアミノ酸結合ポケットの間の立体障害だと思われる。特に E215 や D216 などの側鎖が障害になっているように見える。そこで、EF-Tu の E215 や D216 をアラニンに置換した変異体を作製した。すると、図 3 C のように例えば 1pyrAla などアミノ酸結合ポケット内に収まるはずである。

結果として、図 4 に示す通り、野生型 EF-Tu と結合できない 1pyrAla や 9antAla に対しても、E215A 変異体や D216 変異体、E215A/D216A 変異体は結合できるようになった。また、これらの変異体は天然のアミノ酸との結合能も保持している。

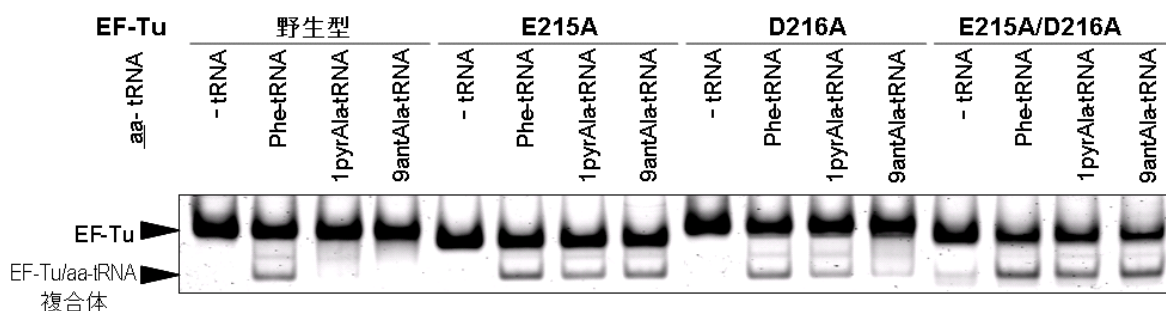


図 4 EF-Tu 変異体と非天然アミノ酸を担持した tRNA の結合。  
図中の aa-tRNA とはアミノアシル tRNA のことを示す。

さらには、蛋白質への導入が困難であった 1pyrAla, 2pyrAla そして DL-2-anthraquinonylalanine について、E215A 変異体および D216A 変異体を用いることにより、蛋白質への高効率導入に成功した (図 5)。ただし、EF-Tu とアミノアシル tRNA の結合能の高さが、そのまま蛋白質合成効率に結びつくわけではなかった。EF-Tu はアミノアシル tRNA と結合してリボソームへ運び、そこでアミノアシル tRNA を降ろして出て行かないとならないので、ただ強く結合して離さないのでは駄目なのである。E216A/D216A 変異体については、1pyrAla-tRNA や 9antAla-tRNA との結合能が最も高かったが、翻訳

系における蛋白質合成活性は極めて低かった。また、9antAla については、EF-Tu 変異体に結合したが、これら変異体を用いても蛋白質への導入は認められなかった。9antAla が蛋白質に導入できないのは EF-Tu との不適合だけでなくリボソームとの不適合も原因だったのだと考えられる。

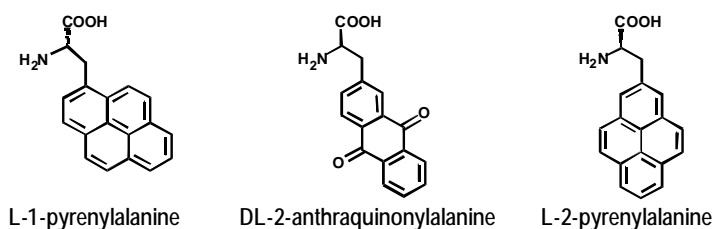


図5 EF-Tu 変異体により蛋白質への導入効率が上昇したアミノ酸。

## 6. おわりに

ここでは EF-Tu に E215A または D216A という変異を加えるのみで、運よく非天然アミノ酸との結合能および、これら非天然アミノ酸の蛋白質への導入効率が上昇した。このような結果が、最初に想定したとおり「大きな非天然アミノ酸とアミノ酸結合ポケットの間の立体障害の解消」だけに基づくのかは、まだ不明である。他にも E や D などの酸性アミノ酸を A に変えたことによる静電的な効果や、変異による EF-Tu 全体構造への影響を考える必要がある。また、小さくなくても EF-Tu への親和性が極めて低い非天然アミノ酸も存在するため、そのようなアミノ酸を蛋白質に導入するためには単にアミノ酸結合ポケットを広げるのとは別の戦略が必要であろう。以上について考察するため、今後さらに変異 EF-Tu と非天然アミノ酸のバリエーションを増やし、それらの相互作用を調べたい。

**謝辞** 本研究は岡山大学 宍戸昌彦研究室で行われた成果であり、主要な実験を担当した土井芳朗・中田秀孝の両氏および関係諸氏に感謝いたします。

## 文献

- Hohsaka, T., Ashizuka, Y., Murakami, H., Sisido, M. Incorporation of nonnatural amino acids into streptavidin through *in vitro* frame-shift suppression. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 9778 (1996)
- Bain, J. D., Switzer, C., Chamberlin, A. R. & Benner, S. A. Ribosome-mediated incorporation of a non-standard amino acid into a peptide through expansion of the genetic code. *Nature* **356**, 537 (1992)
- Hirao, I., Ohtsuki, T., Fujiwara, T., Mitsui, T., Yokogawa, T., Okuni, T., Nakayama, H., Takio, K., Yabuki, T., Kigawa, T., Kodama, K., Yokogawa, T., Nishikawa, K. & Yokoyama, S. An unnatural base pair for incorporating amino acid analogs into proteins. *Nat. Biotechnol.* **20**, 177 (2002)
- Dedkova, L. M., Fahmi, N. E., Golovine, S. Y. & Hecht, S. M. Enhanced D-amino acid incorporation into protein by modified ribosomes. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6616 (2003)
- LaRiviere, F. J., Wolfson, A. D., Uhlenbeck, O. C. Uniform binding of aminoacyl-tRNAs to EF-Tu by thermodynamic compensation. *Science* **294**, 165 (2001)
- Nakata, H., Ohtsuki, T., Abe, R., Hohsaka, T. & Sisido, M. Binding efficiency of EF-Tu to tRNAs charged with nonnatural fluorescent amino acids. *Anal Biochem* **348**, 321 (2006)
- Nissen, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Polekhina, G., Reshetnikova, L., Clark, B. F. & Nyborg, J. Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNA<sup>Phe</sup>, EF-Tu, and a GTP analog. *Science* **270**, 1464 (1995)
- Dale, T., Sanderson, L. E., Uhlenbeck, O. C. The affinity of EF-Tu for an aminoacyl-tRNA is modulated by the esterified amino acid. *Biochemistry* **43**, 6159 (2004)
- Sato, A., Watanabe, Y., Suzuki, T., Komiyama, M., Watanabe, K. & Ohtsuki, T. Identification of the residues involved in the unique serine specificity of *C. elegans* mitochondrial EF-Tu2. *Biochemistry* **45**, 10920 (2006)
- Ohtsuki, T., Sato, A., Watanabe, Y. & Watanabe, K. A unique serine-specific EF-Tu found in nematode mitochondria. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 669 (2002)
- Doi, Y., Ohtsuki, T., Shimizu, Y., Ueda, T. & Sisido, M. EF-Tu mutants expand amino acid tolerance of protein biosynthesis system. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 14458 (2007)

## 研究紹介（部会講演賞）

# 非生体材料を識別する新規抗体分子： ペプチド移植からのボトムアップ的高親和性抗体の作製

東北大学大学院工学研究科 服部 峰充  
hattori@kuma.che.tohoku.ac.jp

### 1. はじめに

生体分子の分子認識能や自己組織化能を利用したナノアセンブリ構造体の構築は、ナノバイオテクノロジー分野において魅力的な単位操作技術の一つである。これらは、組換え DNA 技術に端を発した生体分子の設計や生産技術の発展により、膨大な遺伝子ライブラリーから、未知の化合物や人工的な構造物を選択的に認識する分子の探索が可能となったことに起因している。1992 年には、Brown らにより酸化鉄( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ )結合性ペプチドが単離され、これまでにガリウムヒ素(GaAs)・金(Au)・酸化亜鉛(ZnO)など、無機材料に選択的に結合するペプチドが報告されており、さらに PMMA やポリ乳酸など、有機材料に結合するペプチドも報告されている。現在では、それらペプチドを用いて、ナノ粒子のアセンブリや基板上への生体分子の固定化分子として応用展開されている。その中で我々は、ペプチドを凌駕する高機能接合分子の開発として、「抗体」に着目してきた。抗体は、生体防御機構の重要な役割を担い、優れた分子認識能、すなわち高特異性・高親和性を有することで知られている。我々は、その優れた分子認識能の無機材料への発現を目指してきた。そこで今回、我々が行ってきた、無機材料結合ペプチドを利用した、ボトムアップ的な無機材料高親和性抗体の取得法の開発について紹介し、さらに取得した抗体の機能評価、及び、材料界面インターフェース分子への応用についても紹介する。

### 2. 機能性ペプチドの CDR への移植による無機材料結合抗体の作製<sup>[1]</sup>

目的抗原に対する抗体の取得方法として、生体内免疫応答やファージ提示法などの生体外選択手法が挙げられる。無機ナノ粒子を用いても免疫応答を誘発することができないため生体外選択手法による抗体の取得が考えられるが、生体内に存在しない抗原を標的とするため膨大なライブラリーを必要とし、抗体の取得は困難を伴う。そこで我々は、近年情報が蓄積されてきた無機材料結合ペプチドを利用し、抗体の抗原への結合に重要な相補性決定領域(CDR)にペプチドを移植することで、無機材料への結合力を持つ抗体の作製を試みてきた。

まずモデルとして、多機能セラミックスである酸化亜鉛(ZnO)へ結合性を示すペプチド [EAHVMHKVAPRP] を選択し、移植する足場となる抗体については、構造的知見が豊富な抗ニワトリ卵白リゾチームマウス抗体 HyHEL-10 を選択した(図 1)。そして、HyHEL-10 の可変領域における CDR のそ

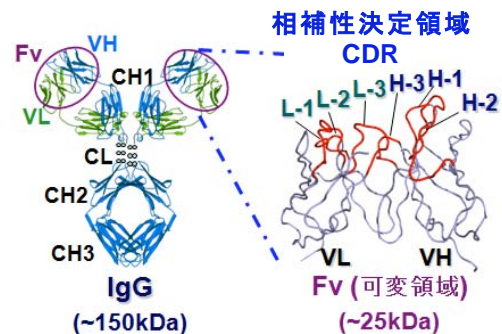


図 1. 抗体の構造

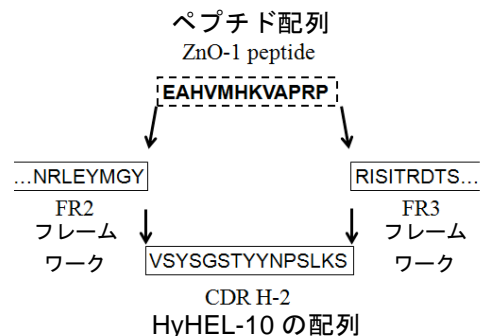


図 2. ペプチド配列と CDR 配列の置換

れぞれ一箇所(H-2,H-3,L-2,L-3)と ZnO 結合性ペプチドの配列を置換することでペプチド移植抗体を作製した(図 2)。機能評価として、大腸菌 BL21 (DE3)株を用いて分泌発現させた各々の Fv を含む各培地上清画分を ZnO 懸濁液に添加し、中性界面活性剤溶液で数回洗浄後、変性剤溶液で抗体の溶出を試みた。その結果、重鎖可変領域(VH)の CDR2 にペプチドを移植した Fv (H-2) において、溶出画分に抗体の存在を確認し、CDR へのペプチド移植により ZnO 認識作用が発現したことが確認できた(図 3)。一方で、結合評価においてヘテロ二量体である Fv の重鎖可変領域(VH)と軽鎖可変領域(VL)が解離することがわかり、ペプチド移植により VH-VL 間の相互作用が減少する可能性も示唆された。

そこで次に VH-VL の解離を解決するため、生体内で重鎖のみの抗体として存在し、高い安定性を有するラクダ抗体をペプチド移植の足場抗体として選択した(図 4)。PCR 法により抗β-ラクタマーゼラクダ抗体の重鎖可変領域断片(VHH)において 3 つ存在する CDR のそれぞれ 1 箇所にペプチドを移植した。作製した移植抗体について ZnO 結合評価を行ったところ、CDRH-1 にペプチドを移植した VHH1 のみが ZnO に結合し、ラクダ抗体を足場タンパク質とした場合においてもペプチドの機能発現を確認できた(図 5)。また、二次構造を円偏光二色性(CD)スペクトルにて評価したところ、VHH1 の CD は、野生型とほぼ同様のスペクトルであり、ペプチド移植後も正しく二次構造を保持していることがわかった。これまでの試みで、ペプチド移植による抗体断片の機能発現には、ヘテロ二量体よりも単量体であるラクダ抗体断片が適していることを明らかにすることができた。

### 3. 生体外選択システムを用いた親和性向上<sup>[2]</sup>

以上より我々は、ラクダ抗体をフレームワークとして用いることで、ペプチド移植によって抗体に無機材料認識能を賦与し、安定な無機材料結合抗体の作製に成功している。しかし、移植のみではペプチドの機能を超越することはできない。そこで我々は、ペプチド移植抗体を基点として生体外選択手法を用いて、抗体の機能向上を行った。

生体外選択系による目的抗体の取得には、用いるライブラリーの調製が重要であるが、ランダム箇所に完全に対応するライブラリーの実現することは困難である。例えば 10 アミノ酸を完全にランダムにすると理論上  $10^{13}$  通りの配列が存在するが、現状では、 $10^{7-9}$  が規模の限界である。そこで我々は、ライブラリーに予め抗原に対する親和性を持たせることでライブラリー規模の問題を補い、効率的に高親和性抗体を取得するシステムの構築を試みた(図 6)。

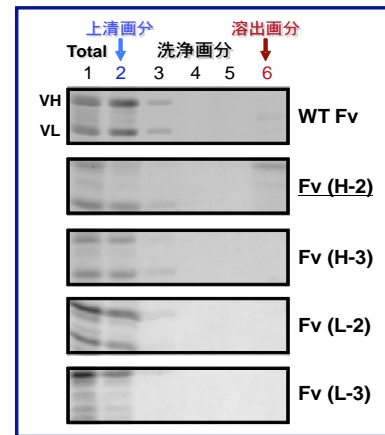


図 3. ペプチド移植抗体の ZnO 結合評価

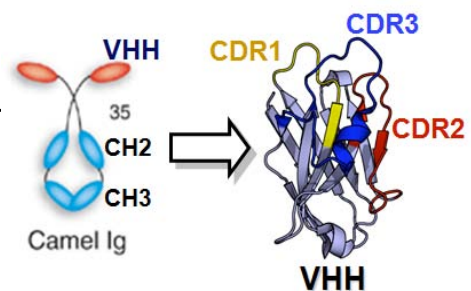


図 4. ラクダ抗体の構造

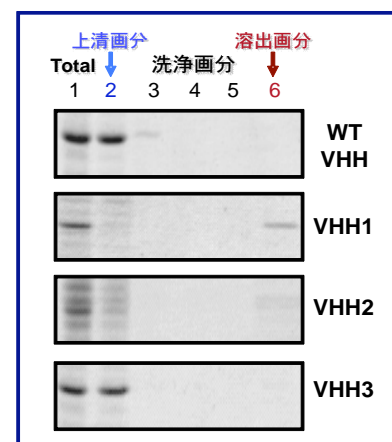


図 5. ペプチド移植ラクダ抗体の ZnO 結合評価



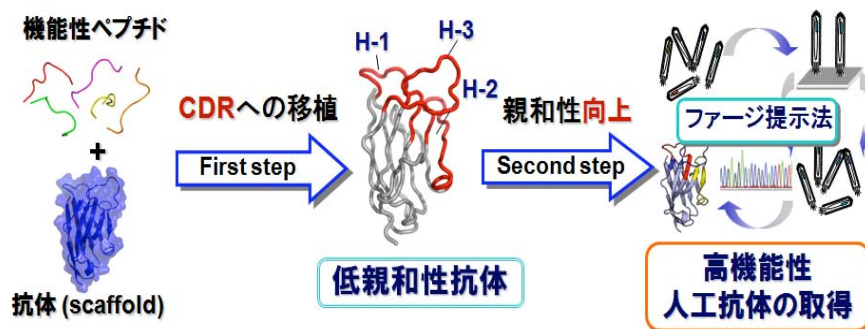


図 6. ペプチド移植を基点とした高機能性抗体取得手法

まず、ペプチドの分子認識能を賦与した移植抗体 VHH1 を鋳型としたライブラリーを構築することで、抗原への親和性を持たせ、ファージ提示法による機能向上を行った。ペプチドを移植していない CDRH-3 に対して、既報の無機材料結合ペプチド中に高頻度で現れるアミノ酸を要素とした人工ライブラリーを構築した。その後、抗体を提示したファージと ZnO との混合し、洗浄及び溶出操作後に、大腸菌に再感染させる一連のパニング操作を 4 ラウンド行った(図 7)。選択されたクローンを調製し、ZnO と混合後遠心し、上清に残存する抗体を BCA 法にて定量した。ZnO に対する吸着等温線からラングミュア式を用いて解離平衡定数( $K_D$ )を算出したところ、クローン 4F2 が  $K_D = 9\text{nM}$  という高い親和性を示した。ZnO 結合性ペプチドを移植したのみの VHH1 においては、 $K_D$  が約 180 nM であったことから、親和性が約 20 倍向上していることがわかった。生体分子を標的とした場合、抗体-抗原間の相互作用は、一般に数 $\mu\text{M}$ ～数 nM 程度であることから、4F2 は生体分子間相互作用に匹敵する分子認識能を持つといえる。

ZnO 高親和性クローン 4F2 の結合機構を解析するため、CDRH-1 の ZnO 結合性ペプチド配列を野生型配列に戻した 4F2(H1-WT)を作製し、ZnO 結合に対する定量評価を行った。その結果、4F2 (H1-WT)と VHH1 の結合力もほぼ変わらなかった(図 8)。このことは、ZnO 界面に対する 4F2 の結合において、移植ペプチド配列の CDRH-1 と選択された配列の CDRH-3 部分が、各々単独に作用するのではなく、共同的に作用することで、高い親和性を生み出していることを示唆する。

以上より、ペプチド移植と生体外選択システムを連動させることで、我々は無機材料に対して高親和性を示す抗体の作製に成功し、これまで未踏領域であったセラミックスに高親和性を有する高機能性人工抗体の作製に成功している。

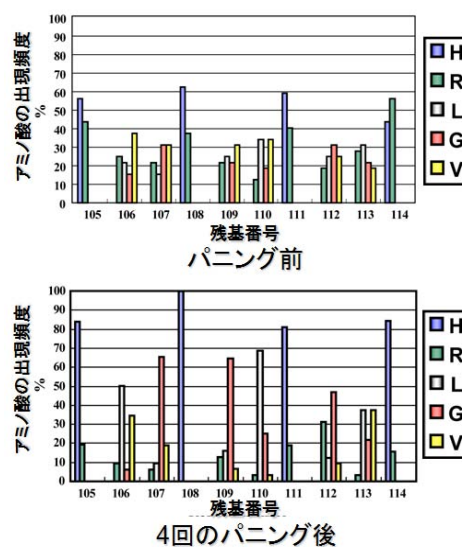


図 7. ランダム化した CDRH-3 のアミノ酸出現頻度の比較

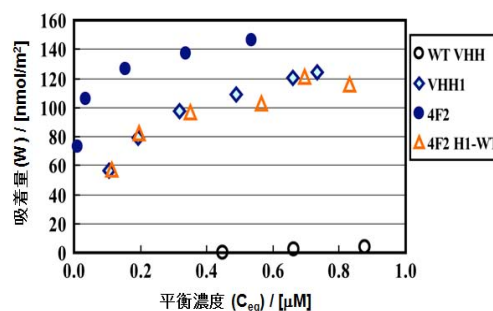


図 8. 各抗体の ZnO に対する吸着等温線の結果

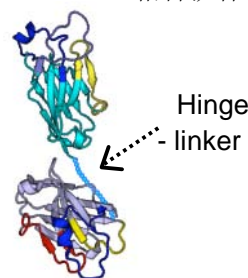
#### 4. 異種材料間接合抗体の作製と機能評価

最後に、材料特異的抗体を用いたナノ粒子接合分子としての可能性を紹介する。異種ナノ粒子間を接合する生体分子は、その自己組織化能を利用した積層化やボトムアップ的なナノ構造体の構築に応用できると我々は考えている。また生体高分子-無機材料間を接合する分子は、生体分子を固定化させるための表面加工が困難な材料に対しても、表面への生体高分子のパターニングが可能となり、センシングの分野において非常に有用である。

ZnO 高親和性抗体 4F2 を基盤とし、無機材料間を架橋する分子を構築するため、金(Au)結合性ペプチドを CDRH-1 に移植した抗体 AuVHH1 を作製し、4F2 とヒンジリンカーを介して遺伝子工学的に融合させることで、二重特異性抗体 4F2-AuVHH1 を作製した(図 9)。二重特異効果を評価するため、蛍光性 ZnO と 4F2-AuVHH1 を懸濁した溶液を Au プレート上に添加し、洗浄後、紫外線を照射することで蛍光性 ZnO の残存を観測した。4F2 抗体と AuVHH1 抗体を混合して添加した際は、Au プレート上への ZnO の吸着は観測されなかったが、4F2-AuVHH1 では明確に ZnO の蛍光が観測された(図 10)。

以上より我々は、二重特異性抗体を用いることで異種ナノ材料間の接合を達成し、材料-材料間を架橋するインターフェース分子の構築に成功している。

4F2 : ZnO 結合抗体



AuVHH1 : Au 結合抗体

図 9. ZnO 結合抗体と Au 結合抗体を融合した二重特異性抗体

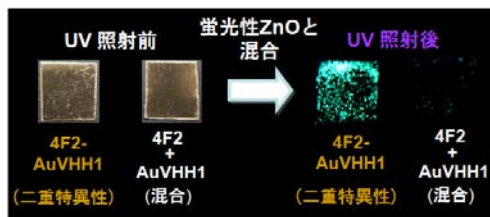
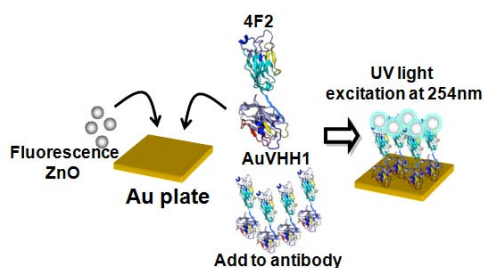


図 10. 二重特性抗体を用いた異種無機材料の接合実験

謝辞 今回紹介した研究は、東北大学大学院 工学研究科 熊谷研究室のスタッフ(熊谷泉教授, 梅津光央准教授, 浅野竜太郎助教, 中西猛研究員)の多大なるご指導・ご鞭撻のもと成されたものであり、ここに深く感謝致します。また、各種解析手法についてご指導いただいた東京大学大学院 新領域創成科学研究科 津本浩平准教授、無機材料の提供・共同研究においては、大阪大学接合科学研究所の内藤牧男教授、阿部浩也准教授、大原智准教授に多大なご協力を頂きました。ここに深く感謝致します。

1. T. Hattori, M. Umetsu, T. Nakanishi, K. Tsumoto, S. Ohara, H. Abe, M. Naito, R. Asano, T. Adschiri, and I. Kumagai, "Grafting of material-binding function into antibodies -Functionalization by peptide grafting-", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, in press.
2. T. Hattori, M. Umetsu, T. Nakanishi, S. Ohara, H. Abe, I. Kumagai, in preparation.

## 蛋白質・酵素活性中心の分子変換機能を有する金属錯体の開発

名古屋工業大学大学院工学研究科物質工学専攻 船橋 靖博

### 1. はじめに

金属蛋白質・酵素の機能をもつ人工酵素や触媒を創出するには、まずその活性中心をどうするかという問題がある。しかし非ヘム鉄系の場合、これらの活性中心部分がコア内部のアミノ酸残基から構成されているので、蛋白質から切り離して取り扱うということができない。したがって、その活性中心部分を人工的に再現した低分子量のモデル金属錯体が、その機能を抽出するために必須となる。このには、金属蛋白質活性中心構造を模倣する構造モデルと、その反応性を追求する機能モデルの2種類のタイプがある。構造モデルは、金属蛋白質の単結晶 X 線構造解析の結果などをもとに分子設計を行ない、最終的に機能モデル化を図る。活性中心金属周りの配位構造は、その金属中心の性質と密接なかかわりを持っているので、構造モデルとは、蛋白質・酵素活性中心のエッセンスを解きながら進まねばせねばならない。非ヘム鉄系の金属蛋白質・酵素においては、そのほとんどがヒスチジン残基のイミダゾールか、グルタミン酸やアスパラギン残基のカルボキシル基などが金属に配位することによって構成されており、それらには、ポルフィリンの様な特別な性質は見られない。これに対し、非ヘム鉄系の構造モデルでは、それらのアミノ酸残基に類似する化合物を配位子に導入し、さらに導入した置換基によって、中心金属に対する電子的効果を調節してきた。

しかし蛋白質内では、通常の低分子金属錯体と異なり、特殊な配位構造が中心金属周りに施されていることが多い。例えば電子移動蛋白質の TypeI 銅は常に擬四面体型構造を保つことによって、酸化数の変化によって引き

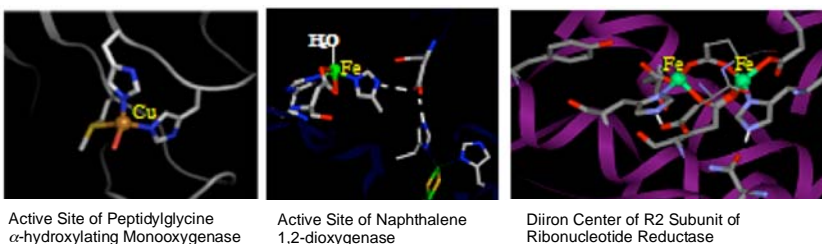


図1 酸素活性化能を有する非ヘム系各種金属蛋白質の単核ならびに二核金属中心。

起こされる金属周りの構造変化の活性化エネルギーを小さくし、電子移動速度を速めている（「entatic state」と呼ばれている<sup>1)</sup>）。酸素活性化能を有する金属活性中心においても擬四面体型構造は見られる。図1に単結晶線構造解析によって得られたペプチジルグリシン $\alpha$ -ヒドロキシル化モノオキシゲナーゼ (PHM)、ならびにナフタレンジオキシゲナーゼ (NDO) とリボヌクレオチドリダクターゼ (RNR) の R2 サブユニットの還元型二核鉄(II)中心の構造を示す<sup>2)</sup>。ここで RNR の二核鉄中心は電子伝達部位であるが、メタンモノオキシゲナーゼ (MMO) と同様に  $\text{Fe}^{\text{IV}}_2(\mu\text{-O})_2$  の生成を経由して  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{IV}}(\mu\text{-O})_2$  が生成する。これらの金属中心周りに共通して興味深いのは、いずれも擬四面体型構造を有しているということである。これらの配位構造はアミノ酸残基の立体的な配向が、ペプチド骨格構造や水素結合ネットワークなどの蛋白質環境によって規制されているために引き起こされると考えられる。

次に、金属蛋白質・酵素のなかで、クラスター構造を有するものがあることを忘れてはならない。これらは基質を活性化する反応活性点を多く含むだけでなく、クラスター全体で多電子を要する酸化還元反応をスムーズに行なっていると考えられる。例えば、漆を産生する樹木に含まれるラッカーゼなどのマルチ銅酵素に含まれる酸素分子の4電子還元部位の構造は、TypeII と TypeIII から成る三核銅クラスター構造である。また、光合成を行う独立栄養細菌および緑色植物において、水の酸化反応により電子の確保と酸素発生を行うのは Photosystem II に含まれる五核のマンガン・カルシウムクラスターである。低分子モデル金属錯体でこのような二核以上の機能性多核構造を合成しようとするれば、自己組織化によるモノマー金属錯体の集合体形成か、三核以上の多核化配位子を利用しなければならない。前者は反応中にその構造が散逸する欠点があり、後者は立体構造の設計や合成が困難に陥る。

以上のことを踏まえ、筆者らはモデル金属錯体の研究目的を次の2点に絞った。①配位子骨格の構

造規制により四面体型に歪んだ低配位数の配位環境を金属周りに施す。②構造が散逸することのないケージ型の配位子内に多核金属中心を形成する。これらに関して最近得られた成果について述べる。

## 2. 歪んだ配位環境を施した二核銅中心による分子状酸素活性化

まず配位子の配向をペプチド骨格や水素結合などを用いずに系統的に規制するために配位子骨格構造を組織化する概念図を、ジアミン型配位子を例として図2に示す。そこで今回、最も次元性の高い骨格を有する配位子として(-)-Sparteine (**Sp**)を用いた。**Sp**の三級アミン窒素原子間は何重にも架橋され、また両端のシクロヘキサン環も加わって、三級アミン窒素原子自身の位置とその非共有電子対の配向は完全に固定されている。**Sp**の各種構造異性体を用いた一部の遷移金属錯体の構造が以前から報告されており、それらは四面体型に大きく歪んだ配位構造を有することが知られていた<sup>3)</sup>。**Sp**はその両端のリングの立体的化学的な違いにより、 $\alpha$ -Isosparteine ( $\alpha$ **Sp**)と $\beta$ -Isosparteine ( $\beta$ **Sp**)の構造異性体が存在する。図3に単結晶X線構造解析で得られた $[\text{Cu}^{\text{II}}(\alpha\text{Sp})]\text{Cl}_2$ と $[\text{Cu}^{\text{II}}(\beta\text{Sp})]\text{Cl}_2$ の分子構造を示す。これらの銅(II)錯体は、いわゆる Jahn-Teller 効果によって安定化される平面的な  $D_{4h}$  構造をとらず、捻れた擬四面体型の4配位構造を有する。ここでさらに $\alpha$ **Sp**の両端のリングが銅中心側に対して立体障害として働くため、 $\beta$ **Sp**の場合より Cu-N 結合が長くなり、Cu-N = 2.031(2) Å ( $\alpha$ **Sp**) > 1.986(2) Å ( $\beta$ **Sp**)となっていた。これらのことは、 $\alpha$ **Sp**の配位様式が構造を捻るだけでなく、結合距離から見て配位窒素原子の金属中心への $\sigma$ 電子供与が非常に弱いことを示している。これらを考慮して、二核非ヘム鉄系活性中心における金属周りの捻れた配位と架橋構造に着目し、 $\alpha$ **Sp**や架橋配位子を導入してその構造的エッセンスを取り込み、分子状酸素の段階的な活性化について、二核銅錯体の系で検討した。

これまで二核銅-酸素錯体については、酸素運搬蛋白質である Hemocyanin (**Hc**)の酸素捕捉様式が北島らのモデル研究において、 $\text{Cu}^{\text{II}}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)$ 型であることがはじめて示され<sup>4)</sup>、のちに **Hc**の酸素付加型である Oxy**Hc**の単結晶X線結晶構造解析によって確認された。さらに後続の研究によって、 $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-peroxo}$ 種のO-O結合が開裂し高原子価状態を有する $\text{Cu}^{\text{III}}_2(\mu\text{-O})_2$ 種の生成や、 $\text{Cu}^{\text{II}}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)$ 種との平衡が存在することが示された<sup>6)</sup>。この $\text{Cu}^{\text{III}}_2(\mu\text{-O})_2$ 種の構造は、現在、他の複核遷移金属活性中心を有する金属蛋白質の金属-活性酸素結合種の重要なモチーフとなっている。

これまで二核銅-酸素錯体については、酸素運搬蛋白質である Hemocyanin (**Hc**)の酸素捕捉様式が北島らのモデル研究において、 $\text{Cu}^{\text{II}}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)$ 型であることがはじめて示され<sup>4)</sup>、のちに **Hc**の酸素付加型である Oxy**Hc**の単結晶X線結晶構造解析によって確認された。さらに後続の研究によって、 $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-peroxo}$ 種のO-O結合が開裂し高原子価状態を有する $\text{Cu}^{\text{III}}_2(\mu\text{-O})_2$ 種の生成や、 $\text{Cu}^{\text{II}}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)$ 種との平衡が存在することが示された<sup>6)</sup>。この $\text{Cu}^{\text{III}}_2(\mu\text{-O})_2$ 種の構造は、現在、他の複核遷移金属活性中心を有する金属蛋白質の金属-活性酸素結合種の重要なモチーフとなっている。

我々はまず、**Sp**とその構造異性体を用いた銅(I)アセトニトリル錯体 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{X})(\text{CH}_3\text{CN})_n]\text{SbF}_6$  ( $\text{X} = \alpha\text{Sp}, \text{Sp}, \beta\text{Sp}, n = 1 \text{ or } 2$ )を合成し、それらを-80 °Cのジクロロメタン中で酸素と混合すると速やかに反応して、対応する褐色の $\text{Cu}^{\text{III}}_2(\mu\text{-O})_2$ 種を生成することを確認した<sup>5,6)</sup>。この $[\text{Cu}^{\text{III}}_2(\text{X})(\mu\text{-O})_2]^{2+}$  ( $\text{X} = \alpha\text{Sp}, \text{Sp}, \beta\text{Sp}$ )では、従来の平面性の高いジアミン型配位の $\text{Cu}^{\text{III}}_2(\mu\text{-O})_2$ 種と較べて、二つのCu←O LMCTが約30 nm程度低エネルギー側に観測され( $\lambda_{\text{max}} = \text{ca. } 330, 430 \text{ nm}$ )、 $\text{Cu}^{\text{III}}_2(\mu\text{-O})_2$ コア全体に由来する振動の共鳴ラマンピークが、通常の $\text{Cu}^{\text{III}}_2(\mu\text{-O})_2$ 種より約30  $\text{cm}^{-1}$ 程度高エネルギー側に観測された( $\nu = 623\text{-}636 \text{ cm}^{-1}$ )。これらの結果は、**Sp**とその構造異性体による“歪み”がその銅中心に及ぼす効果として、金属イオン-配位子間の $d\sigma\text{-}p\sigma$ 軌道間のオーバーラップが小さくなり、それらの $\sigma$ 電子供与も弱いことを示してい

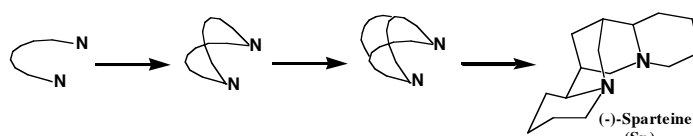


図2 高次元化によるジアミン型配位子骨格の構造規制。

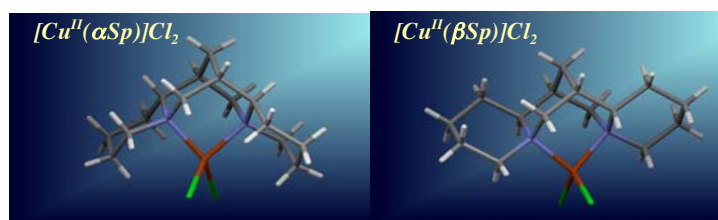


図3  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\alpha\text{Sp})]\text{Cl}_2$ と $[\text{Cu}^{\text{II}}(\beta\text{Sp})]\text{Cl}_2$ の結晶構造。

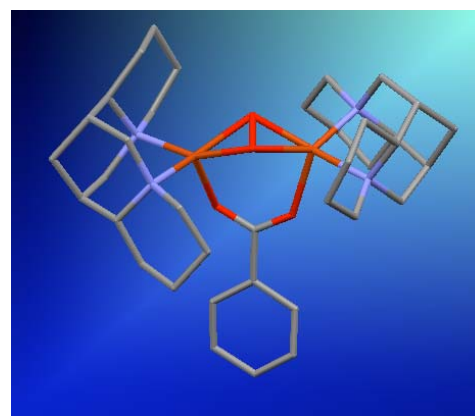


図4  $[\text{Cu}^{\text{II}}_2(\alpha\text{Sp})(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)(\text{Bz})]^+$ の分子構造。

る。特にこの共鳴ラマンスペクトルの結果を、これまでの知見<sup>8)</sup>を参照して判断すると、 $[\text{Cu}^{\text{III}}(\text{X})(\mu\text{-O})_2]^{2+}$  ( $\text{X} = \alpha\text{Sp}, \text{Sp}, \beta\text{Sp}$ )において $\alpha\text{Sp}$ の $\sigma$ 電子供与が最も弱いことが分かった。これは先に述べた、銅(II)錯体のX線構造解析で得られたCu-N結合の傾向と一致する。

次に、 $\alpha\text{Sp}$ の系において、安息香酸イオン(**Bz**)の様な架橋型配位子を共存させて、銅(I)アセトニトリル錯体を $-80^\circ\text{C}$ のアセトン中で酸素と混合すると濃青色となり、 $\lambda_{\text{max}} = 372, 741 \text{ nm}$ に $\text{Cu} \leftarrow \text{O LMCT}$ 吸収帯が現れた。さらに共鳴ラマンスペクトルでは $\nu = 752 \text{ cm}^{-1}$ 付近にO-O結合由来の振動ピークが得られ、 $\mu\text{-}\eta^2:\eta^2$ 型の二核銅(II)パーオキシ錯体の生成が示唆された<sup>4,5)</sup>。ここから析出した濃青色結晶を、単結晶X線構造解析して得られた $[\text{Cu}^{\text{II}}_2(\alpha\text{Sp})(\mu\text{-}\eta^2:\eta^2\text{-O}_2)(\text{Bz})]^+$ の分子構造を図4に示す。この構造において、酸素分子は二電子還元状態であるパーオキシ体で二核銅(II)中心をside-on型で架橋しており、その $\text{Cu}_2\text{O}_2$ 面はO-O結合に沿って $132^\circ$ と極端に折れ曲がっていた。さらにここで注目すべきことは、**Bz**の軸配位であり、その結合長は $2.11\text{-}2.12\text{\AA}$ であり比較的強く結合していた。この構造に基づいてDFT計算を行なったところ、**Bz**の軸配位の共有結合性はほとんどなく、電荷が局在化して非常にイオンのであった。これは $\alpha\text{Sp}$ の $\sigma$ 電子供与が非常に小さいことが、銅中心の実効正電荷をそれほど損なわず、アニオンである**Bz**の軸配位を招いたものと考えられる。実際にこの $\alpha\text{Sp}$ 系では、一旦 $\text{Cu}^{\text{III}}_2(\mu\text{-O})_2$ 種が生成したのち、**Bz**の添加により $\text{Cu}^{\text{II}}_2(\mu\text{-}\eta^2:\eta^2\text{-O}_2)$ 種が生成する。この平衡反応が架橋カルボン酸の脱着で制御できることは(図5)、同様な構造を持つ二核非ヘム鉄中心がパーオキシ種からオキシ種へと段階的に分子状酸素を活性化するプロセスと関連して大変興味深い。

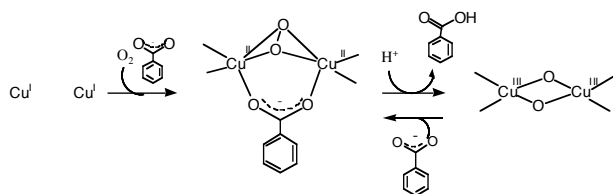


図5 架橋配位子によって制御された段階的酸素活性化反応.

### 3. ケージ型の配位子内に多核金属中心を形成する

さらに生体内で酸素などの低分子の循環に関わる金属蛋白質・酵素のなかで、活性中心に遷移金属元素と軽元素のクラスターを有するものに着目し、このような機能性のクラスター型金属錯体の合成を試みている。ここで重要なのは、反応中にそのクラスター構造が散逸することなく、人工酵素型金属活性点として機能することである。そのためにこのような遷移金属イオンを含むクラスター構造を、かご状の分子の中で簡単かつ

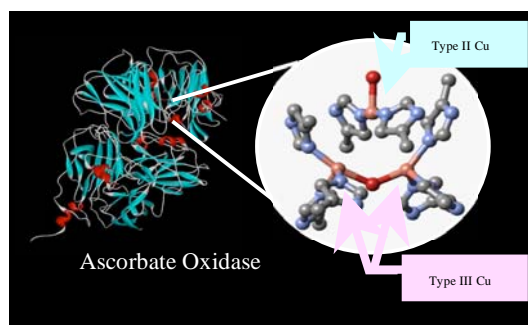


図6 マルチ銅酵素の三核銅中心の構造.

安定に形成させなければならない。現在はマルチ銅酵素に含まれる酸素分子の4電子還元部位の構造(図6)<sup>9)</sup>を目指して、かご型分子内部の配位空間に、三核銅クラスター構造を実現した。まず、環状の化合物のなかでも複数の橋架け構造を有する新規のクリプタンドをケージ型配位子Lとして合成した。これを用いて大気下で銅(II)錯体を合成したところ、三核銅(II)錯体である $[\text{Cu}^{\text{II}}_3(\text{L})(\mu_3\text{-CO}_3)](\text{ClO}_4)_4$  (**1**)が得られた(図7)。この三核銅(II)錯体**1**はケージ型分子の中心部に取り込んだ炭酸ガス分子が炭酸イオンとなり、三つの銅(II)中心を架橋した構造を有していた。各々の銅(II)イオンは、ケージ型配位子L2の橋架け部分の一つのピリジンならびに二つのアミン窒素と結合していた。他方、Ar下で同様な合成をおこなったところ、内部に炭酸イオンを含まず、三核の銅中心のそれぞれに水またはヒドロキソイオンが配位した構造を有した $[\text{Cu}^{\text{II}}_3(\text{L})(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_4$  (**2**)が得られた。これは漆を産生する樹木に含まれるラッカーゼなどのマルチ銅酵素の三核銅中心部位に類似している。この三核銅(II)錯体**2**の構造は、銅中心のそれぞれに水またはヒドロキソイオンが配位した構造を有しており、それらは他の低分子量の配位子と交換可能である。これは基質捕捉能を有すると考えられ、炭酸ガスを吹き込んだところ、容易に三核銅(II)錯体**1**を形成した。この生体内金属クラスターのモチーフを再現した構造を用いれば、マルチ銅酵素の機能である酸素分子の4電子還元のみならず、各種の触媒反応への応用が可

能であると考えられる。今後は銅イオン以外の第一、第二遷移金属イオンをこのカゴ型分子内部に導入して、その反応性について検討を行う。

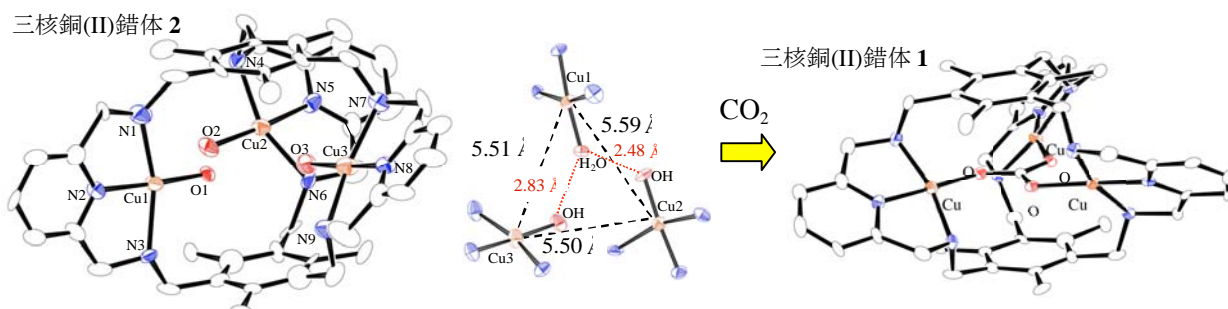


図 7 カゴ型配位子に内包した三核銅クラスター中心による二酸化炭素の捕捉。

## 6. おわりに

中心金属周りがイミダズールやカルボン酸などのごく普通の配位子であるアミノ酸残基によって形成された非ヘム系金属酵素が、ヘム鉄酵素酵素に匹敵する多様な機能を発現することを理解するのは、一見簡単な様で非常に難しい。蛋白質・酵素の金属中心には、30億年以上かけて自然淘汰された洗練された原理が働いており、これに対して錯体化学でどこまでアプローチできるか、というところまでつい立ち止まって考えてしまう。巨大な蛋白質の構造に惑わされず、分子や軌道のレベルで金属活性中心を見ることをなんとか諦めずに、未来に繋がる金属錯体モデルをつくりたい。

## 文献

1. B. L. Vallee and R. J. P. Williams, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **59**, 498 (1968).
2. a) S. T. Prigge, A. S. Kolhekar, B. A. Eipper, R. E. Mains and L. M. Amzel, *Science*, **278**, 1300 (1997).  
b) B. L. K. Kauppi, E. Carredano, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund, S. Ramaswamy, *Structure*, **6**, 571 (1998). c) D. T. Logan, X. D. Su, A. Aberg, K. Regnstrom, J. Hajdu, H. Eklund, P. Nordlund, *Structure*, **4**, 1053 (1996).
3. a) L. S. Childers, K. Folting, L. L. Merritt, Jr., and W. E. Strieb, *Acta Cryst.*, **B31**, 924 (1975). b) E. Boschmann, L. M. Weinstock, and M. Carmack, *Inorg. Chem.*, **13**, 1297 (1974).
4. a) N. Kitajima, K. Fujisawa, C. Fujimoto, Y. Moro-oka, S. Hashimoto, T. Kitagawa, K. Toriumi, K. Tatsumi, A. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1277 (1992). b) N. Kitajima and Y. Moro-oka, *Chem. Rev.*, **94**, 737 (1994). c) B. Hazes, K. A. Magnus, C. Bonaventura, J. Bonaventura, Z. Dauter, K. H. Kalk, W. G. Hol, *Protein Sci.*, **2**, 597 (1993).
5. a) J. A. Halfen, S. Mahapatra, E. C. Wilkinson, S. Kaderli, V. G. Young Jr, L. Que, Jr., A. D. Zuberbühler, and W. B. Tolman, *Science*, **271**, 1397 (1996). b) B. MaHedman, K. O. Hodgson, T. D. P. Stack, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 5583 (1999). c) M. Kodera, K. Katayama, Y. Tachi, K. Kano, S. Hirota, S. Fujinami, M. Suzuki, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 11006 (1999). d) P. L. Holland, C. J. Cramer, E. C. Wilkinson, S. Mahapatra, K. R. Rodgers, S. Itoh, M. Taki, S. Fukuzumi, L. Que, Jr., and W. B. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 792 (2000). e) L. M. Mirica, X. Ottenwaelder, T. D. P. Stack, *Chem. Rev.*, **104**, 1013 (2004). f) E. A. Lewis; W. B. Tolman, *Chem. Rev.*, **104**, 1047 (2004).
6. a) Y. Funahashi, K. Nakaya, S. Hirota, and O. Yamauchi, *Chem. Lett.*, 1172 (2000). b) Y. Funahashi and H. Masuda, *Nippon Kessho Gakkaishi*, **45**, 328-334 (2003).
7. A. Messerschmidt, R. Ladenstein, R. Huber, M. Bolognesi, L. Avigliano, R. Petruzzelli, A. Rossi, A. Finazzi-Agro, *J. Mol. Biol.*, **224**, 179 (1992).

## DNA 四重らせん構造を細胞内環境因子で制御する

甲南大学・先端生命工学研究所（FIBER） 三好 大輔

### 1. はじめに

DNA の標準構造である B 型二重らせんは、シンプルで美しく、さらに極めて合理的である<sup>1)</sup>。そのため我々は、生命体内に存在するゲノムのすべてが二重らせん構造を形成していると考えがちである。しかし、我々の最近の研究結果などにより、DNA は塩基配列と周辺環境に依存して、非常に多様な構造を形成することが明らかにされつつある。

多様な構造を形成する DNA の代表が染色体の末端に位置するテロメアである（図 1）<sup>2)</sup>。テロメア DNA は、二重らせん構造を形成すると考えられている領域と一本鎖状態の突出領域からなる。前者は、グアニンに富んだ鎖（G 鎖）とその相補鎖であるシトシンに富んだ鎖（C 鎖）から形成される。後者の突出領域は、数十から数百塩基の G 鎖で構成されている。この突出領域は、四重らせん構造を形成する。四重らせん構造では、四つのグアニン塩基が環状となり Hoogsteen 塩基対を形成し G-カル

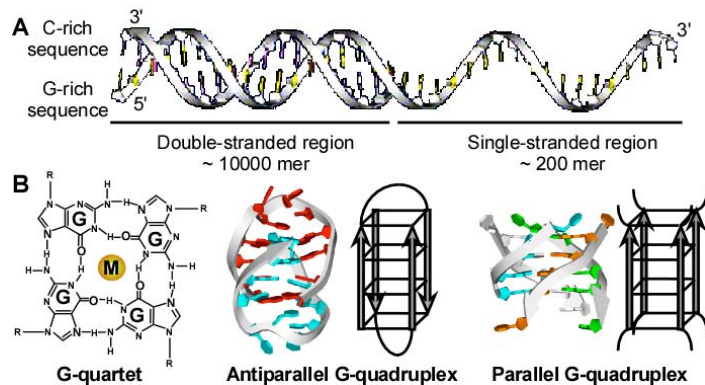


図 1. (A)テロメア DNA (B) G-カルテットの化学構造（左）、逆平行型四重らせん構造（中央）、平行型四重らせん構造

テットと呼ばれる平面構造を形成する（図 1b）。この G-カルテット同士がスタッキング相互作用を形成し、さらにその中心の空孔に金属イオンが配位することで、四重らせん構造が形成される。四重らせん構造は、細胞の寿命やガン化に関与すると考えられている。四重らせんは、細胞の運命を握る DNA の構造であるといえる。さらに、DNA 四重らせん構造は、多くの機能性核酸が形成する構造でもある。我々は、生体内外でマルチプレイヤーとして活躍する DNA 四重らせん構造とその熱力学的安定性に及ぼす細胞内の環境因子（後述）の効果を実験的に解析することで、細胞内におけるテロメア DNA の構造について検討してきた。さらに、テロメア DNA の構造を細胞内環境因子で合目的的に制御することで、生体外で有用な DNA 材料の設計にも取り組んでいる。本稿では、配列と周辺環境によって劇的に変化する四重らせん構造と、その構造変化を利用した機能性デバイス・機能性材料の構築について紹介する。

### 2. 生体内での DNA の構造を解明する

DNA が存在する細胞内の環境とはどのようなものであろうか。細胞内の環境を分子スケールで示したものが図 2 である。一般的な細胞の RNA 含有量は 75 ~ 150 g/L、タンパク質含有量は 200 ~ 300 g/L であり、RNA+タンパク質の含有量は 400 g/L にも及ぶ<sup>3)</sup>。これらの生命分子が占める体積は、細胞全体の 20 ~ 40 % に達し、分子が混み合った状況を作り出す。このように、分子が非常に混み合うことを、分子クラウディングと呼ぶ<sup>3)</sup>。一方、通常の生化学

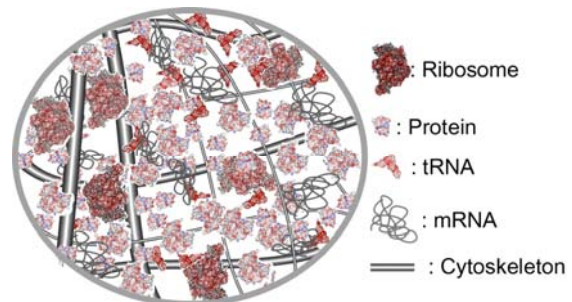


図 2. 細胞内環境の模式図

的な実験における標的分子の濃度は、1 g / L 以下である。すなわち、細胞内と試験管内実験でもっとも大きく異なる環境因子が分子クラウディングであるといえる。しかし、分子クラウディング状態における DNA の物性は殆ど報告例がなかった。そこで筆者らは、分子クラウディング環境下におけるテロメア DNA の①突出領域と②二重らせん領域（図 1）の構造と熱力学的安定性を検討した。

**①突出領域：**突出領域のモデル DNA として、*Oxytricha* 由来のテロメア DNA である  $d(G_4T_4G_4)$  を用いた。希薄溶液中で、 $d(G_4T_4G_4)$  は二分子が会合して逆平行型の四重らせん構造を形成することが知られている。しかし、このテロメア DNA の構造を PEG（ポリエチレングリコール）で誘起した分子クラウディング環境下で測定したところ、平行型の四重らせん構造を形成することが示された<sup>4)</sup>。すなわち、分子クラウディングは、テロメア DNA の構造を逆平行型から平行型四重らせん構造へとスイッチさせるのである。さらに、この平行型四重らせん構造は、多数の DNA 鎖が会合して形成される、G-ワイヤー構造であることが示唆された。この結果は、試験管内環境である希薄得溶液中と細胞内環境である分子クラウディング溶液中で、DNA の構造が全く異なる可能性を示した初めての例として注目されている。

では、このような劇的な構造はどのようにして誘起されるのであろうか。また、すべてのテロメア DNA に共通するものであろうか。このような点を解明するため、*Tetrahymena* とヒト由来のテロメア DNA の構造に及ぼす分子クラウディングの効果を検討した。両者の塩基配列を比較すると、一つの繰り返しユニットにたった一塩基の違いしかない（図 3）。また、希薄得溶液中における両者の構造は、逆平行型四重らせんである。このように非常に似た配列と構造をもつ *Tetrahymena* とヒトテロメア DNA であるが、分子クラウディング環境では、全く異なる構造を形成することが示された<sup>5)</sup>。

*Tetrahymena* テロメア DNA は、*Oxytricha* テロメア DNA と同様に、分子クラウディングによって平行型四重らせん構造へと構造が遷移する。しかし、ヒトテロメア DNA は、分子クラウディング環境下においても、希薄得溶液中と同様の逆平行型四重らせん構造を保持することが見出されたのである。これらの結果から、テロメア DNA のたった一塩基の違いにより、分子クラウディング環境下における構造が劇的に変化するということが示された。そのため、希薄溶液中で得られた知見から、テロメア DNA の細胞内環境における構造を類推することも困難であることが考えられる。希薄溶液中で得られた生命分子に関する膨大な研究結果から、細胞内における生命分子の挙動を類推するための指針が必要である。

**②二重らせん領域：**そこで筆者らは、DNA の構造とその安定性に及ぼす分子クラウディングの効果を定量化するために、四重らせん構造のみならず二重らせん構造にも研究対象を拡大した。熱力学的諸量を求めるために、希薄環境下と分子クラウディング環境下で分子内四重らせん構造、または分子内二重らせん構造を形成する DNA を設計し、クラウディング環境下におけるそれぞれの構造の熱力学的安定性を算出した。その結果、DNA 四重らせん構造は分子クラウディングによ

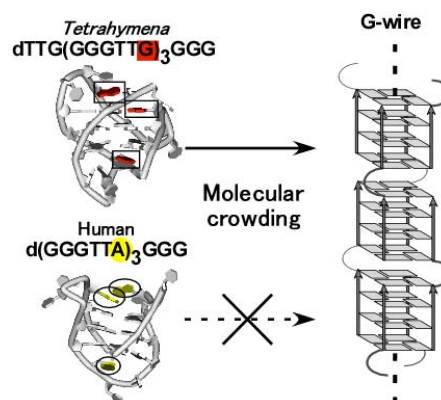


図 3. 分子クラウディングによって誘起されるテロメア DNA の構造多様性

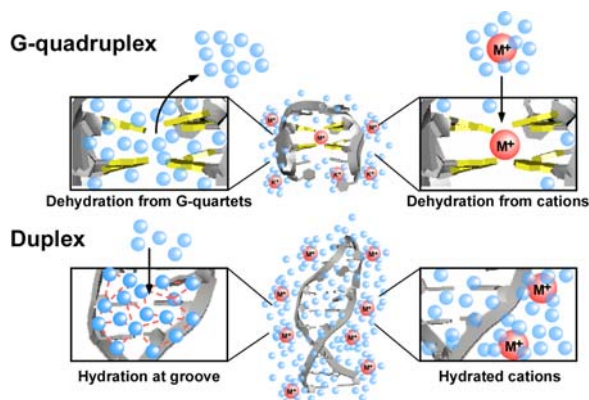


図 4. 四重らせん構造と二重らせん構造における水分子の挙動



って安定化することを見出した。これとは逆に、DNA の標準構造である B 型二重らせん構造が不安定化することも明らかになった<sup>6)</sup>。さらに、この安定化・不安定化の要因を水の活量と構造安定性の相関関係から検討した。その結果、四重らせん構造は、構造形成に伴い水分子を放出するのに対し、二重らせん構造は構造形成に伴い水分子を取り込むことが示された (図4)。このような知見から、核酸構造の安定性に水分子が非常に重要な役割を果たすことが明らかとなった<sup>6)</sup>。また、水の活量から核酸構造の熱力学的安定性を推測できることが示唆された。

分子クラウディングが二重らせん構造を不安定化し、四重らせん構造を安定化することが示されたことから、テロメア DNA の二重らせん領域が形成する構造を分子クラウディングによって制御できる可能性が示唆された。そこで G 鎖と C 鎖からなるテロメア DNA の構造に及ぼす分子クラウディングの効果を検討した。その結果、希薄溶液中で二重らせん構造を形成するが、分子クラウディング環境下ではそれぞれの鎖が四重らせん構造 (G 鎖の G-quadruplex と C 鎖の i-motif) を形成することがわかった (図5)<sup>7)</sup>。また、このようなテロメア DNA の構造遷移は、分子クラウディング以外の細胞内環境因子 (金属イオンや pH) によっても誘起できることも見出している。

### 3. 機能性 DNA 材料を設計する

以上のように、テロメア DNA の構造とその安定性を周辺環境因子で制御することが可能となりつつある。筆者らは、このような DNA 構造の合目的制御技術を利用して、DNA を用いた機能性材料を構築できるのではないかと考えた。以下では、テロメア DNA の構造スイッチを用いて設計した機能性分子について紹介する。

**①DNA 論理素子**: 論理素子とは、複数の入力に対し論理的に応答し、出力するデバイスである。DNA を用いて論理素子を開発するには、DNA の高次構造を複数の外部環境因子によって合理的に制御する必要がある。筆者らはこれまでに、G 鎖が形成する四重らせん構造の熱力学的安定性は、一価カチオンの種類と濃度に依存し、その安定化傾向が、 $K^+ > Na^+ > Li^+$  であることを見出した<sup>8)</sup>。一方、

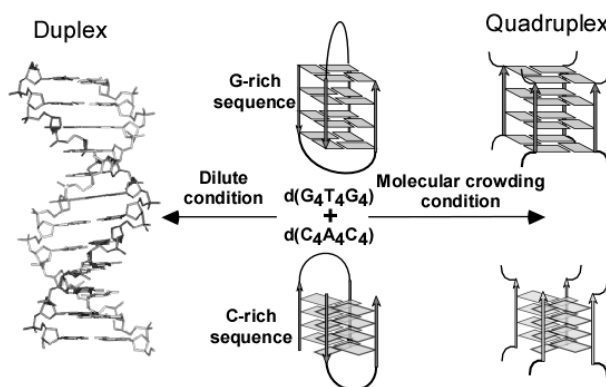


図5. 分子クラウディングによって誘起されるテロメア DNA の構造スイッチ

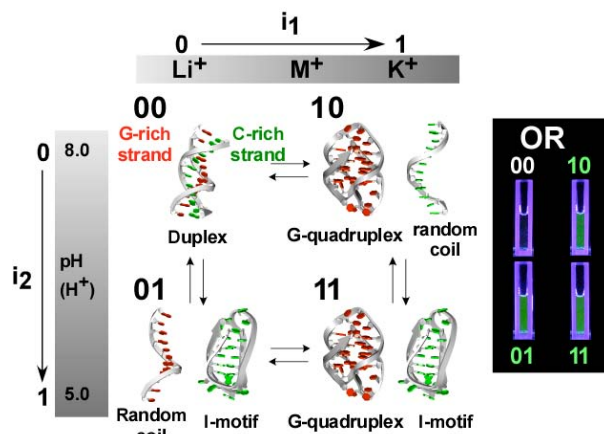


図6. テロメア DNA を用いた論理素子の設計

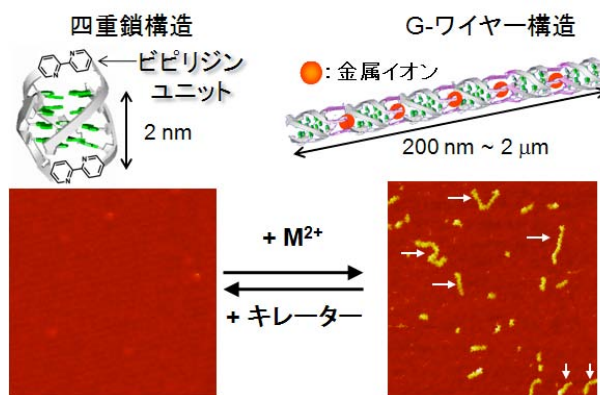


図7. テロメア DNA とピリジンによる DNA ナノワイヤースwitch の設計

C鎖が形成する i-motif の熱力学的安定性が酸性条件で安定化し、塩基性条件では不安定化することも明らかになった。さらに、G鎖とC鎖が形成する二重鎖の構造安定性は、pHにも一価カチオンの種類にも依存しない。このような結果をもとに、テロメア DNA の構造を一価カチオン ( $M^+$ ) と pH ( $H^+$ ) で四種類に制御できる (図 6)。このテロメア DNA に蛍光プローブを導入することで論理素子として機能させることができる。例えば、G鎖の3'末端に蛍光消光基を導入し、C鎖の5'末端に蛍光発光基を導入すると、G鎖とC鎖で二重らせん構造を形成した場合にのみ蛍光が消光され、他の三つの構造状態では蛍光が観測される。すなわち、テロメア DNA が OR 論理素子として機能する。さらに、蛍光色素の種類とその導入位置を変えることで、基本的論理素子のすべてを構築することも示された<sup>9)</sup>。

**①DNA ナノワイヤースイッチ**: 前述の G-ワイヤー構造は、様々な金属イオンや機能性分子と特異的に結合できることから、その構造を合理的に制御することでできれば、新素材として広範囲な応用が期待されている。しかし、上述のような化学環境因子による四重らせんから G-ワイヤーへの構造遷移は不可逆変化であり、合理的にスイッチングできない。筆者らは、この点を解決するために、金属イオンと結合して構造を異性化するビピリジンを経由してテロメア DNA へ導入した (図 7)。d(G<sub>4</sub>T<sub>4</sub>G<sub>4</sub>) のチミン部分をビピリジンで置換した非天然型 DNA を合成した。この非天然型 DNA は、金属イオンが存在しない場合には、天然のテロメア DNA と同様にコンパクトな逆平行型四重らせん構造を形成することが確かめられた。しかし、Ni<sup>2+</sup>などの金属イオンを添加すると、その構造が数百 nm から数 μm と非常に長い G-ワイヤーになることが原子間力顕微鏡で見出された。さらに、金属イオンを除去するキレーターを添加することで、G-ワイヤーがコンパクトな四重鎖構造へと戻ること確認できた。興味深いことに、この可逆変化は何度も繰り返すことが可能であった<sup>10)</sup>。開発された G-ワイヤーは、ビピリジンにより約 2 nm ごとに金属イオンが配向していると考えられることから、金属の新しい物性の探索や分子配線としての応用も期待できる。

## 6. おわりに

筆者は、ダイナミックに変化する細胞内における DNA の物性を解明すること、細胞外で DNA を用いて自在に機能性材料を開発することを夢見ての研究を続けていきたいと考えている。そのためには、DNA の構造・安定性・機能に及ぼす周辺環境の効果を定量的、かつ系統的に解析する必要がある。四重らせん構造だけではなく、核酸 (RNA も含む) は、非常に多様な構造を形成し、多彩な機能を発揮する。様々な展開研究の礎となるような知見を蓄積することで、新しいナノとバイオとナノバイオを創製できると考えられる。

## 謝辞

本研究は、甲南大学先端生命工学研究所において研究所所長の杉本直己教授が代表を務める文部科学省学術フロンティア推進事業の一環として行われた。研究を遂行するにあたり、杉本先生には厳しくも温かいご指導を頂いております。厚く御礼申し上げます。また、研究遂行にご助力を頂きました、共同研究者、博士研究員、大学院生、学部生、技術補佐員、研究所職員の方々に深く感謝いたします。

## 参考文献

- 1) J. D. Watson, F. C. H. Crick, *Nature* **171**, 737 (1953).
- 2) E. H. Blackburn, *Nature* **350**, 569 (1991).
- 3) 杉本直己 三好大輔, 高分子 **55**(5), 322 (2006).
- 4) D. Miyoshi, A. Nakao, N. Sugimoto, *Biochemistry* **41**, 15017 (2002).
- 5) D. Miyoshi, H. Karimata, N. Sugimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 3740 (2005).
- 6) D. Miyoshi, H. Karimata, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 7957 (2006).
- 7) D. Miyoshi, S. Matsumura, S. Nakano, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 165 (2004).
- 8) H.-Q. Yu, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 15461 (2006).
- 9) D. Miyoshi, M. Inoue, N. Sugimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 7716 (2006).
- 10) D. Miyoshi, H. Karimata, Z.-M. Wang, K. Koumoto, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 5919 (2007).

## 部会行事

### 「第22回生体機能関連化学シンポジウム」開催報告

実行委員長：東北大学大学院環境科学研究科 末永 智一

第22回生体機能関連化学シンポジウムが9月28日(金)、29日(土)の両日に渡って、東北大学片平キャンパス(仙台市片平)内の多元物質科学研究所および電気通信研究所を講演会場として開催され、盛会のうちに終了しました。

今回のシンポジウムでは、口頭発表102件、ポスター発表169件、企業等によるATP発表9件の講演がありました。私たちの予想を大幅に超える405名の方にご参加頂き、生体機能関連化学の最新の研究成果ついて熱心な討論が行われました。参加された皆様に深く感謝致します。私たちの見積もりの甘さで要旨集が不足し、当日参加の方々に要旨集をお配りできない事態となってしまいました。この場を借りましてお詫びいたします。なお、この方々には後日要旨集を発送させていただきます。

研究発表の内容は、シンポジウムが開催された初期の頃と比較しますと大きく変化しております。1980年代は酵素モデルに関する研究が主流でしたが、今回のシンポジウムの講演タイトルを見ますと、DNA/RNA関連の発表が半分以上を占めているように思えます。時代の流れと研究の変遷を感じます。

生体機能関連化学シンポジウムは、若手の参加者が多いことが特長であり、部会員から優秀な若手が数多く育ち、各方面で活躍しております。若手を対象とした今回の生体

機能関連化学部会講演賞もレベルが非常に高く、選考に苦勞したと聞いております。科研費の時限細目として新たにケミカルバイオロジーが採択されるなど、生体機能関連化学は日の出の勢いにあり、本部会は今後ますます発展していくものと思います。

今年の長い夏のなごりか、シンポジウム初日はやや蒸し暑く感じられましたが、2日目には秋風が吹き込み、キャンパス内での議論や散策には格好の日和となりました。東北大学は今年100周年を迎えました。片平キャンパスには歴史的な建造物や魯迅像など由緒あるものが点在しており、目にされた方も多と思います。また、この時期の仙台は美しい景色や海山の美味しい幸を味わえる頃でもあります。懇親会でも一部の幸を味わって頂けたかと存じますが、仙台の秋をお楽しみいただけましたでしょうか。

来年の第23回シンポジウムは東京工業大学の岡畑恵雄先生の実行委員長の下で、9月に合同シンポジウムとして開催される予定です。多くの参加者による活発な質疑討論を期待しております。

最後に本シンポジウム開催にあたり施設を貸して頂きました東北大学多元物質科学研究所、電気通信研究所の関係者の皆様、運営にご尽力いただきました実行委員の先生方深く感謝致します。



ポスター発表の様子



懇親会(杉浦元部会長による乾杯)



懇親会の様子

## 第7回生体機能関連化学部会講演賞

審査委員長 渡辺 芳人  
名古屋大学物質科学国際研究センター

今年度の講演賞には16件の応募があり、朝9時から夕方5時過ぎまで、ほぼ一日一杯を審査に費やした。どの講演もレベルが高くかなり難しい審査であった。そのため、つつい厳しい質問が飛ぶ場面も出てきた。これに対して講演者もなかなか立派なもので、百戦錬磨の研究者のごとくてきぱきとした答えが返ってきた。最終的に4件が選ばれたが、いずれもその差は僅かであり、どの講演者が受賞してもおかしくない内容であった。今回残念ながら受賞を逃した先生には、是非来年度も挑戦するように、審査委員長として強く申し上げておきたい。

念のため、評価項目を以下に示しておく。1) 研究の意義・重要性、2) 研究の独創性、3) 発表のわかりやすさ、4) 質問・コメントに対する対応、5) 総合評価、それぞれを5段階で評価している。応募資格は、部会に加入1年以上、受賞時40歳以下。

本部会の講演賞に対して外部からの評価も極めて高く、受賞歴はその人の履歴にとって輝かしい評価になる。この機会に部会講演賞の宣伝を周りの先生方にして頂けたら、幸いである。本講演賞選考に当たりご尽力頂いた末永組織委員長、審査委員各位に厚く御礼申し上げます。

### 講演賞受賞者・発表演題（五十音順、敬称略）

大槻 高史（岡山大院自然）

「改変 EF-Tu を用いた翻訳系の拡張」

服部 峰充（東北大院工）

「無機材料結合性抗体の異種材質間インターフェース応用と速度論的機能解析」

船橋 靖博（名工大院工）

「蛋白質・酵素活性中心の分子変換機能を有する金属錯体の開発」

三好 大輔（甲南大 FIBER）

「擬似細胞環境下における長鎖テロメア核酸の構造と熱力学的安定性」



## 部会行事

### 第 22 回生体機能関連化学シンポジウム若手フォーラム開催報告

若手フォーラム代表世話人 珠玖 仁  
東北大学大学院環境科学研究科

第 22 回 生体機能関連化学シンポジウム若手フォーラムは、北海道・東北支部が幹事(世話人:梅津光央(東北大学大学院工学研究科)、松尾保孝(北海道大学電子科学研究所)、珠玖 仁(東北大学大学院環境科学研究科))となり、9月30日(日)に東北大学大学院工学研究科総合研究棟にて開催しました。親シンポジウム後の日曜日という厳しい日程にもかかわらず、皆様のご協力により盛況を博し、参加者は総勢で65名(講師:4名、一般26名、学生35名)となりました。

秋田英万先生(北海道大学大学院薬学研究院)「細胞内動態解析に基づいた遺伝子キャリア開発へのアプローチ」、小川智久先生(東北大学大学院生命科学研究科)「真珠の輝きの秘密:アラゴナイト結晶配向性を制御するタンパク質」、栗原 正靖先生(群馬大学大学院工学研究科)「人工核酸分子の可能性～核酸医薬・診断薬の創製をめざして～」、小川雄一先生(東北大学大学院農学研究科)「テラヘルツセンシングによる非標識分析への試み」にご講演いただきました。いつもながら鋭くかつ大変建設的な質疑応答が活発に行われ、部会のポテンシャルの高さが示されました。

その後、昼食兼懇親会と並行してポスター講演(全35件)を行いました。学生および研究員の発表の中から、田中啓太氏(東京大学先端科学技術研究センター)「光応答性人工 RNase の開発」、長門石 暁氏(東京大学大学院新領域創成科学研究科)「不安定な二本鎖DNA条件下における蛋白質-DNA 間相互作用の熱力学的解析」、和田淳彦氏(京都大学大学院工学研究科)「人工ケモセンサー内包超分子ヒドロゲルによる生理活性リン酸種の検出」の3名にポスター講演優秀賞が授与されました。日本化学会生体機能関連化学部会からの補助金、科研費特定領域研究「ライフサーベイヤ」からのご支援、日本化学会企画部高橋 学様のサポートに心より御礼申し上げます。親シンポジウムの事務局とともに、今回不慣れな代表世話人の任を終え、思いがけず多くの方々からご助力、暖かいお言葉を賜り大変有難く存じます。



ポスター発表の様子

ニュースレター Vol. 22, No. 3 2007年12月3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/> <mailto:seitai@chemistry.or.jp>

編集委員：依馬 正, 塩谷光彦, 片山佳樹