

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. 23, No.1 (2008. 5. 31)

目 次

◇ 巻 頭 言

協働のとき三原 久和 1

◇ 研 究 紹 介

リン原子修飾型核酸医薬の精密化学合成一次世代核酸医薬の創製を目指してー
.....和田 猛 2

微生物・酵素触媒を活用する有用物質合成.....須貝 威 6

三回対称生体分子の自己集合を利用したナノ～マイクロ構造体の構築
.....松浦 和則 9

◇ 部 会 行 事

第 22 回生体機能関連化学シンポジウム開催のお知らせ..... 1 3

若手の会サマースクール案内..... 1 5

◇ お 知 ら せ

平成 19 年度 生体機能関連化学部会役員..... 1 6

平成 19 年度 生体機能関連化学部会若手の会支部幹事..... 1 7

巻頭言

協働のとき

東京工業大学大学院生命理工学研究科 三原久和

この度、編集委員の先生からのご依頼で巻頭言を書かせていただくことになりました。思い起こすとアメリカから帰国して九州で助手をしていた時代に、広島で第5回生体機能関連化学シンポジウムが木村栄一先生のお世話で開催されたときが、初めての部会との関わりでした。理学部化学科出身の自分としては、どちらかという工学系の先生方中心で開催されている部会と信じきっていたので勇気を出して参加させていただいたことを思い出しています。当時は、基本的に2セッションのシンポジウムで無機系と有機系ではっきりと別れていたように思います。ペプチド・タンパク質の発表は余り無く、私自身DNA結合ペプチドの人工設計に関する発表をしていたのですが、京都大学の某大先生がポスターの前に来てくださって、「こういう分野どんどん頑張ってください」と励まされ、勇気をいただいたのが懐かしくもあります。あれからかれこれ20年近く経ち、部会のシンポジウムも、核酸、タンパク質、糖質など天然の生体高分子の取り扱いが当たり前ようになっており、また細胞そのものや分子生物学、化合物ライブラリなどの生命化学展開もルーチンなものになってきました。すべて先達の諸先生方の努力のおかげでこのように自由な形でのディスカッションの場を継続できていると思ひ、感謝の念が絶えません。

この間、大学院の高度化や国立大学等の法人化を経て、大競争時代になっています。皆さんも過去には経験したことのない大学等での取り組みの渦に巻き込まれているでしょう。過去との経験的対比ができない学生さんやポストクの方もいつの間にかその変革の渦の中にいる筈です。このジレンマからどうにか脱却できないかなーという社会状況です。また最近、いろいろな会で「現在と幕末時代との類似性」についてのお話を耳にします。当時の攘夷あるいは開明で諸藩が競い合い、結果として瞬く間に外国の制度を日本人特有の技能をもって導入し、明治維新に繋がっていったわけですが、しかし、現在の学問、教育、研究の国際レベルでのグローバルな競争に打ち勝つには、幕末とはまた違った相当な意識改革と犠牲が伴いそうです。失敗すれば当時のような負け組みになってしまうのでしょうか？ そうならないように先輩諸氏は、幕末時代のように決死の覚悟での取り組み、と発破をかけていただいているのだと思います。

このような競争に加えて、本部会のように自由な組織では、協力して若い研究者層および大学院学生の弛まない研究への熱意を継続的に発展させるべく仕組みを考えていく必要があります。大学間競争も大事ですが、そろそろ色々な層（レベル）で協働する時が来ているように思えてなりません。攘夷＝開明の流れであったように、部会・学会のレベルからも時代の変化と継続性を議論し、努力する機会がますます重要になってきているように感じています。日本化学会のバイオ関連研究グループが、その先駆けとなることを願っています。

こういうふうに意見を書かなくてはならないという意識が、私の年齢では多分に恐縮感の強いものですが、最近強く感じていることとして巻頭言とさせていただければ幸甚です。

研究紹介

リン原子修飾型核酸医薬の精密化学合成 一次世代核酸医薬の創製を目指して

東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻 和田 猛
wada@k.u-tokyo.ac.jp

1. はじめに

ヒトゲノム計画が完了し、様々な疾病の原因や発症メカニズムが DNA レベルで理解可能な時代が到来した。我々は、疾病の原因遺伝子をコードする二本鎖 DNA に直接結合して遺伝情報の転写を抑制することが可能な新規アンチジーン核酸医薬、DNA から転写された mRNA に結合してタンパク質の合成を制御する新規アンチセンス核酸医薬や化学修飾 siRNA 型核酸医薬などを創製することを目指して研究を行っている (Figure 1)。核酸を医薬として用いる場合、それらが生体内で安定に存在できるか否かは極めて重要な問題である。天然型の DNA や RNA は核酸分解酵素、特にヌクレアーゼによって認識され速やかに分解されるため、生体内で用いる場合には分子の安定性を向上させることが必須である。本研究は、核酸のインターヌクレオチドのリン原子を修飾することにより、化学的にも生物学的にも安定な新しい構造と機能を有する核酸類縁体を創製することを目指している。最近我々は、次世代の核酸医薬としての有用性が指摘されながらもその化学的合成手法が確立されていないボラノホスフェート DNA に着目し、その効率的な新規合成法を開発した^{1,2)}。一方、核酸のインターヌクレオチドリン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子の一つを他の元素や置換基に変換すると、リン原子が不斉となり、これを化学合成すると、多くの立体異性体の混合物となる。リン原子修飾核酸類縁体は、リン原子のキラリティーによって異なる物理化学的性質、分子認識能および生理活性を示すために、リン原子の立体化学が厳密に制御された核酸類縁体の合成は極めて重要である。しかしながら、これまでに実用的な不斉リン原子構築反応はほとんど報告されておらず、新しい効率的な新手法の開発が望まれている。このような状況の中で、我々はリン原子修飾核酸としてホスホロチオエート DNA および RNA に着目し、その新規立体選択的合成法の開発を行った³⁻⁵⁾。本稿では、これらリン原子修飾型核酸類縁体の新規合成法の概略を紹介する。

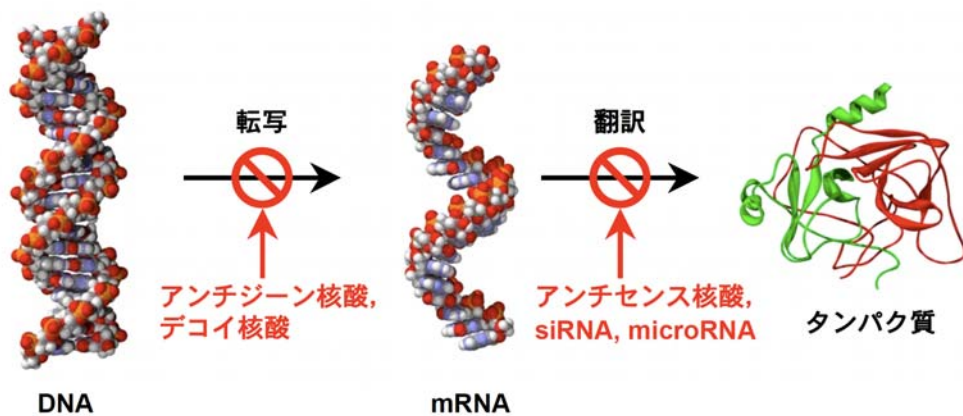


Figure 1. 核酸医薬による遺伝子の発現制御

2. ボラノホスフェート DNA の新規合成法

天然型 DNA の非架橋酸素原子の一つをボランに置換したボラノホスフェート DNA (Figure 2) は、天然型の DNA と比較して脂溶性が高く、高い細胞膜透過性が期待できること、ヌクレアーゼ耐性が高いこと、アンチセンス核酸として重要な RNase H 活性を有すること、ホウ素中性子捕捉療法への応用が可能なことなどから、次世代の核酸医薬として極めて有望視されている。しかし、ボラノホスフェート DNA の化学合成法は未だ確立されておらず、4 種類の核酸塩基を有するオリゴマーの合成例は無い。

従来報告されているボラノホスフェート DNA の化学合成法は、ホスホロアミダイト法や H-ホスホネート法によって構築した 3 価のホスファイト型オリゴヌクレオチド中間体に対してボラノ化試薬を反応させる工程を含むため、アシル基によって保護された核酸塩基が還元されるという致命的な副反応が起こる。このため、これまで核酸塩基部に保護基を必要としないチミン塩基を含むボラノホスフェート DNA の合成しか報告されていない。そこで、我々はこの問題を根本的に解決するために、塩基部が保護されたヌクレオシドと、あらかじめリン原子にホウ素が結合したボラノホスホリル化剤を縮合させることで核酸のリン原子にホウ素を導入する新規手法を開発した (Scheme 1)^{1,2)}。得られたボランが結合したモノマーを用い、固相合成により、4 種類の核酸塩基を含むボラノホスフェート DNA (4-12 量体) の合成に初めて成功した。このボラノホスフェート DNA の新規合成手法をボラノホストリエステル法と呼ぶ。得られたオリゴマーと相補的な塩基配列を有する天然型 DNA および RNA との二重鎖形成能を評価した (Table 1)。

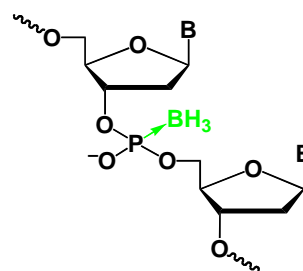


Figure 2. Boranophosphate DNA

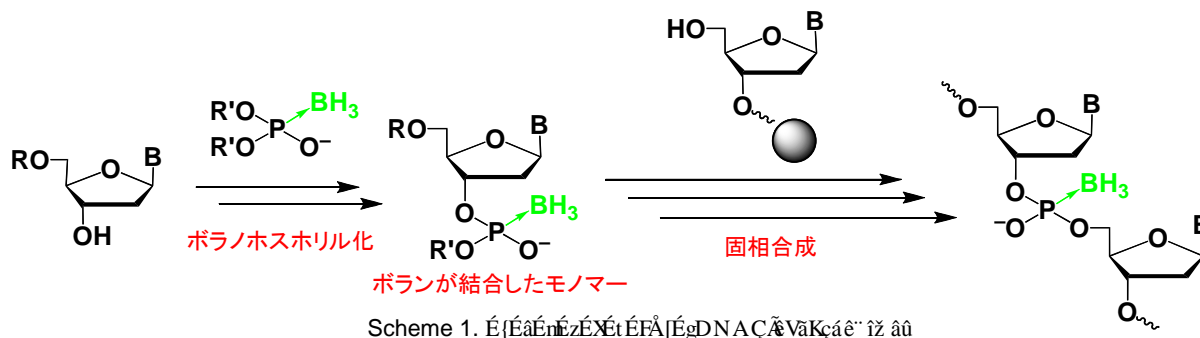


Table 1. Boranophosphate DNA と相補的な DNA および RNA が形成する二重鎖の融解温度²⁾

entry	Boranophosphate DNA	Counterparts	T _m (°C)	ΔT _m (°C)*
100 mM NaCl, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)				
1	T(pbT) ₁₁	dA ₁₂	< 10	< 10
2	d(CpbApbGpbT) ₃	d(ACTG) ₃	39.7	-14.6
3	d(CpbApbGpbT) ₃	r(ACUG) ₃	45.0	-7.4
1.0 M NaCl, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)				
4	T(pbT) ₁₁	dA ₁₂	12.8	-31.3
5	d(CpbApbGpbT) ₃	d(ACTG) ₃	44.7	-13.3
6	d(CpbApbGpbT) ₃	r(ACUG) ₃	50.5	-4.3

*天然型核酸二重鎖が示す T_m 値との差。

これまでに報告例の有るチミン塩基のみを含むボラノホスフェート DNA 1 2 量体 T(pbT)₁₁ と dA₁₂ が形成する二重鎖は、100mM NaCl を含む水溶液中では予想通り顕著な T_m 値を示さなかったが、今回初めて合成に成功した 4 種類の核酸塩基を含む d(CpbApbGpbT)₃ と相補的な d(ACTG)₃ が形成する二重鎖は 39.7°C の T_m 値を示した。さらに、4 種類の核酸塩基を含むボラノホスフェート DNA が相補的な RNA と形成する二重鎖 d(CpbApbGpbT)₃·r(ACTG)₃ は 45.0°C の T_m 値を示した。以上の結果より、ボラノホスフェート DNA は DNA よりも RNA に対する親和性が高く、4 種類の塩基を含むオリゴマーは、相補的な塩基配列を有する DNA および RNA と生理的条件下で十分安定な二重鎖を形成可能であることがわかった²⁾。今回の実験で用いたボラノホスフェート DNA のリン原子の立体は全く制御されておらず、ランダムなジアステレオマー混合物である。今後、立体化学的に純粋なボラノホスフェート DNA を合成することができれば、リン原子の立体配置と二重鎖形成能の関係を明らかにすることができると思われる。

3. ホスホロチオエート DNA の立体選択的合成

前述のボラノホスフェート DNA のように、核酸のインターヌクレオチドリン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子の一つを他の元素や置換基に変換すると、リン原子が不斉となり、各リン酸ジエステル結合につき 2 種類のジアステレオマーが生成する。したがって、n 量体のリン原子修飾核酸類縁体を合成すると、2ⁿ⁻¹ 種類の立体異性体の混合物を与えることになる。リン原子修飾核酸類縁体は、リン原子のキラリティーによって異なる物理化学的性質、分子認識能および生理活性を示すために、リン原子の立体化学が厳密に制御された核酸類縁体の合成は極めて重要である。しかしながら、これまでに実用的な不斉リン原子構築反応はほとんど報告されておらず、新しい効率的な新手法の開発が望まれている。我々は、不斉リン原子を有する核酸類縁体としてホスホロチオエート DNA (Figure 3) に着目し、その立体選択的な新規合成手法の開発を行った。この方法によって合成される、リン原子の絶対立体配置が厳密に制御された核酸類縁体は、ランダムな立体異性体の混合物とは全く異なる構造と機能を発現することが期待される。

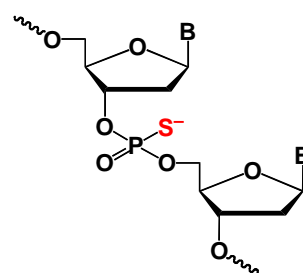
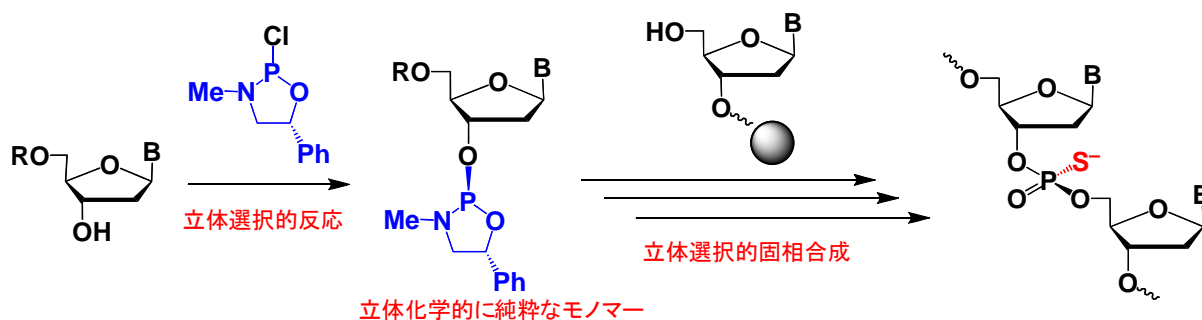


Figure 3. ÉzÉzÉzÉçÉ ÉÍÉÇÁ[ÉgDNA



Scheme 2. ÉzÉzÉzÉçÉ ÉÍÉÇÁ[ÉgDNA ÇÄVäKçáé· iz äü

これまでに報告されている立体選択的ホスホロチオエート合成反応では、モノマービルディングブロックがジアステレオマーの混合物として合成され、必要とするジアステレオマーを HPLC などにより光学分割する必要があった。我々は、5 員環構造を有する 1,3,2-オキサザホスホリジン誘導体の立体電子効果を活用することにより、オキサザホスホリジンモノマーを立体選択的に合成することに成功した。さらに、立体化学的に純粋なモノマーの立体化学純度を損なうこと無くインターヌクレオチドのホスファイト結合を構築可能な求核性の小さい新規酸性活性化剤、CMPT³⁾を開発し、得られたホスファイト中間体を硫化することにより、立体がほぼ完全に制御されたホスホロチオエート DNA オリゴマ

ー (4-10 量体) の固相合成に成功した (オキサザホスホリジン法)^{3,4)}。現在, この方法は DNA 合成機に適用され, 立体が制御されたホスホロチオエート DNA オリゴマーの自動合成が可能となった。

4. ホスホロチオエート RNA の立体選択的合成

次に, オキサザホスホリジン法を siRNA などの RNA 型核酸医薬として有用な, ホスホロチオエート RNA の立体選択的合成に応用した。ホスホロチオエート DNA の合成で最適化されたオキサザホスホリジン構造を, 2'-水酸基が TBDMS 基で保護されたリボヌクレオシド 3'-位に導入し, 酸性活性化剤 CMPT の存在下で縮合反応を行ったところ, 顕著な反応性および立体選択性の低下が観測された。2'-デオキシリボヌクレオシド誘導体の場合は, 縮合反応が速やかに進行するため, モノマーのエピマー化は問題とならなかったが, 2'-位に嵩高い保護基を有するリボヌクレオチド誘導体の場合は, 縮合反応速度が遅く, モノマーのエピマー化が重大な問題となる。そこで, オキサザホスホリジン構造の再検討を行ったところ, 酸性活性化剤の存在下でもエピマー化しない, 熱力学的に安定な二環式オキサザホスホリジン構造を見出した (Figure 4)。4種類の核酸塩基を有する立体化学的に純粋なモノマーを合成し, 液相法および固相法により, ジリボヌクレオシドホスホロチオエートの立体選択的合成を検討したところ, ApsU, CpsU, UpsU, GpsU それぞれについて, 2種類のジアステレオマーを 99:1 以上の立体化学的純度で得ることに成功した。さらに, 10量体の固相合成を行ない, 立体化学的に純粋な all-Rp-(Ups)₉U および all-Sp-(Ups)₉U を得ることができた。2量体以上の立体化学的に純粋なホスホロチオエート RNA の化学合成はこれが世界で初めての例である。得られたオリゴマーの二本鎖形成能を T_m 測定 (高塩濃度条件下) を行なうことにより評価した。all-Rp-(Ups)₉U/(Aps)₉A の T_m 値は 28.9°C であり, 天然型 RNA 二本鎖 (Ups)₉U/(Aps)₉A (25.7°C) よりも高い T_m 値を示した, 一方, all-Sp-(Ups)₉U は相補的な (Aps)₉A と二本鎖を形成せず, リン原子の立体が制御されていない random-(Ups)₉U/(Aps)₉A の T_m 値は 10.3°C であった。以上の結果は, リン原子の絶対立体配置がホスホロチオエート RNA の二本鎖形成能に大きな影響を及ぼすことを示しており, 化学修飾型機能性 RNA の分子設計に対してきわめて重要な知見が得られたといえる⁵⁾。

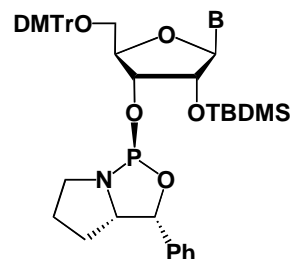


Figure 4. 4種類の核酸塩基を有する立体化学的に純粋なモノマーを合成し, 液相法および固相法により, ジリボヌクレオシドホスホロチオエートの立体選択的合成を検討したところ, ApsU, CpsU, UpsU, GpsU それぞれについて, 2種類のジアステレオマーを 99:1 以上の立体化学的純度で得ることに成功した。さらに, 10量体の固相合成を行ない, 立体化学的に純粋な all-Rp-(Ups)₉U および all-Sp-(Ups)₉U を得ることができた。2量体以上の立体化学的に純粋なホスホロチオエート RNA の化学合成はこれが世界で初めての例である。得られたオリゴマーの二本鎖形成能を T_m 測定 (高塩濃度条件下) を行なうことにより評価した。all-Rp-(Ups)₉U/(Aps)₉A の T_m 値は 28.9°C であり, 天然型 RNA 二本鎖 (Ups)₉U/(Aps)₉A (25.7°C) よりも高い T_m 値を示した, 一方, all-Sp-(Ups)₉U は相補的な (Aps)₉A と二本鎖を形成せず, リン原子の立体が制御されていない random-(Ups)₉U/(Aps)₉A の T_m 値は 10.3°C であった。以上の結果は, リン原子の絶対立体配置がホスホロチオエート RNA の二本鎖形成能に大きな影響を及ぼすことを示しており, 化学修飾型機能性 RNA の分子設計に対してきわめて重要な知見が得られたといえる⁵⁾。

5. 結語

以上述べたように, 従来合成が困難であったボラノホスフェート DNA の新規合成法 (ボラノホストリエステル法^{1,2)}) を確立し, 相補的な DNA および RNA との二重鎖形成能を評価することができた。我々が初めて 4 種類の核酸塩基を有するボラノホスフェート DNA オリゴマーの合成に成功し, それらが特に相補的な RNA と安定な二重鎖を形成し, 核酸医薬として十分有効であることを示すことができた。また, リン原子の立体が厳密に制御されたホスホロチオエート DNA および RNA の新規合成法 (オキサザホスホリジン法³⁻⁵⁾) を世界に先駆けて確立することができた。この方法は, モノマーが立体選択的に合成可能であること, 縮合反応が立体特異的に進行することなど, 優れた特長を有する実用的な手法であり, 今後はホスホロチオエート以外のリン原子修飾核酸の合成に応用し, 新しい核酸医薬の創製を目指す。

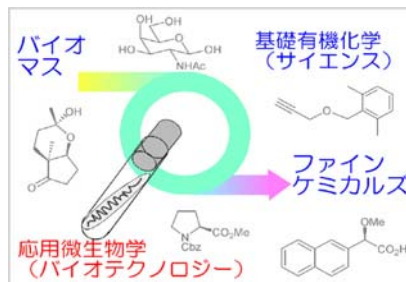
- 1) M. Shimizu, T. Wada, N. Oka, K. Saigo, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5261-5268.
- 2) M. Shimizu, K. Saigo, T. Wada, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4262-4269.
- 3) N. Oka, T. Wada, K. Saigo, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 4962-4963.
- 4) N. Oka, T. Wada, K. Saigo, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 8307-8317.
- 5) T. Wada, T. Kondo, S. Fujiwara, T. Sato, N. Oka, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2007**, *51*, 119-120.

研究紹介

微生物・酵素触媒を活用する有用物質合成

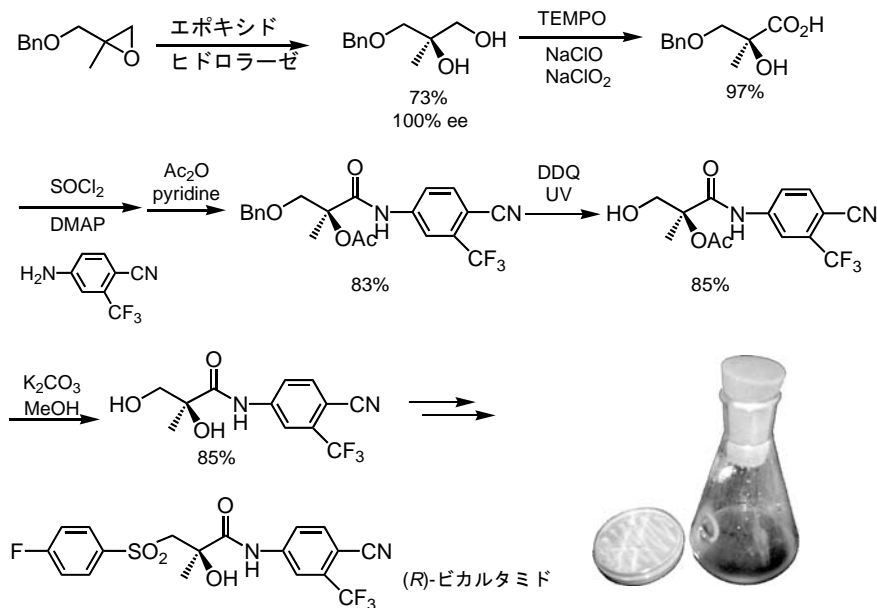
慶應義塾大学薬学部 有機薬化学講座 須貝 威

私たちのグループは、新しい薬をつくる（創薬）有機化学と、よい方法でつくる（プロセス）有機合成化学の研究に取り組んでいます。新しい薬のもととなる多様な物質を産み出し、また、画期的で新しい有機反応を見つけ、薬の作用を徹底的に解明するような、純度の高い物質を大量につくる方法の開拓に貢献しています。



特に、私たちの体内で生命維持に不可欠な働きをしている「酵素」を、化学反応の触媒として有機合成に活用する研究で、大きな成果を挙げています¹⁾。2つの例を紹介します。

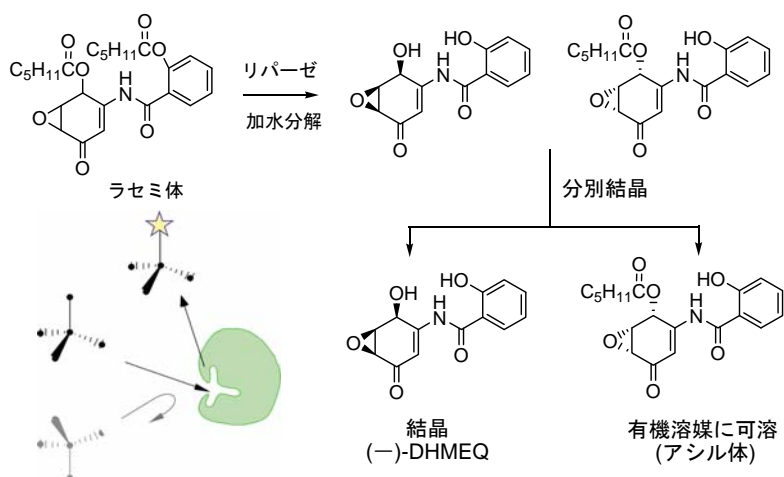
まず、抗男性ホルモン作用を有するピカルタミドの合成です。この化合物は、(R)-体が活性本体で、これだけを作る新しい合成法が求められていました。私たちは微生物が生産するエポキシドヒドロラーゼを、光学活性体合成の鍵段階にしました



²⁾ 酵素触媒は、化学合成で使われる Sharpless 触媒や Jacobsen 触媒を、触媒生産効率や、環境・資源負荷を含め、はるかに凌いでいます。

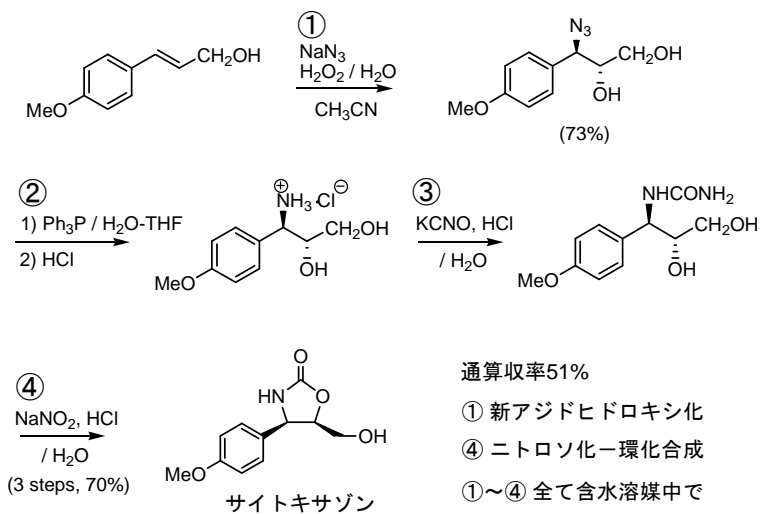
NF-κB 活性化阻害剤 DHMEQ の合成では、リパーゼが、欲しい(-)鏡像異性体だけを純粋に取り出す切り札として活躍しています。化学合成で簡単に作れる、ラセミ体 DHMEQ をアシル化した化合物のうち、一方の鏡像体だけを加水分解しました。こういう反応を、速度論的分割といいます。反応が済んだ後は、分別結晶だけで(-)-DHMEQ をきれいに取り出すことができるようになり、従来、クロマト法でし

かできなかった物質を分ける、飛躍的に優れた方法を確立しました。研究から前臨床、臨床に進めるには、純粋な物質を大量につくれる合成法が大切な役割を果たします。



さて、非常に基礎的な有機化学にも、大きなヒントがかくれている、これもしっかり活用しています。私たちは求核置換反応、ニトロソ化やジアゾ化というシンプルな反応から、新しい化学の扉を開いてきました。サイトカイン産生調節物質、サイトキサゾンの新しい合成³⁾を紹介します。入手容易な原料から、わずか4工程の合成を達成しました。全工程を通じあらゆる反応が、水を含んだ溶媒でもできる、ということが大きな特徴です。

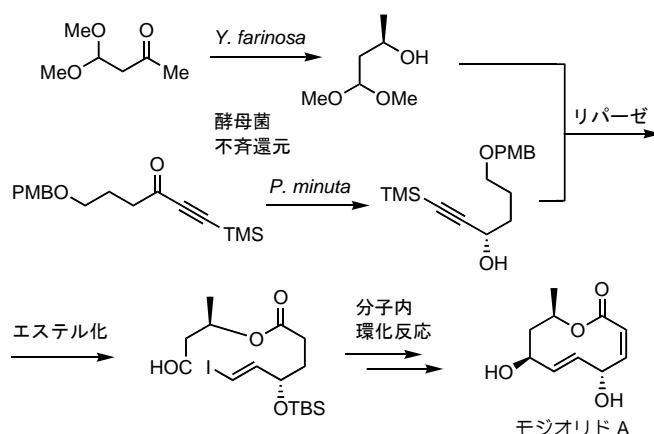
これを可能にしたのが、新しいアジドヒドロキシル化という反応です。そして、もう一つ、カルバミル基のニトロソ化環化反応です。ニトロソ化は非常に歴史が古い反応ですが、これを新しい視点から見直し、オキサゾリジノン合成の反応に仕上げました。



新しい物質を、本当に薬として世の中の役に立つようにするには、よい合成の設計図が必要です。身の回りの車や携帯をみてください。エンジンとか液晶とか、それぞれの部品がいくら立派でも、ハードウェア全体をまとめるような設計図がなければ、一台も作れません。設計図こそが、有機合成化学だと思います。

私たちは、新しい物質を、よい方法で合成するために、今まで誰もひけなかった、「よい設計図」作りを目標に、独自に見つけた酵素反応を鍵段階にして、さまざまな物質の有機合成に挑戦しています。例えば、酵母菌を用いるケトンの不斉還元、

そしてリパーゼを活用した独自のルートで、抗菌性物質の一種、モジオリド A の全合成に一番乗りしました⁴⁾。



慶應義塾大学薬学部は、2008年4月1日、共立薬科大学と慶應義塾大学が合併し新しい組織としてスタートをいたしました。須貝は慶應義塾大学理工学部から、望

月正隆先生（3月31日ご定年）の後任として、有機薬化学講座を担当することになり、「有機合成化学と微生物・酵素触媒を相乗的に活用する、医薬品を中心とした有用物質の合成研究」を主なテーマとし、さらに発がんや制がんに関係する、ニトロソ化や多価フェノール関連物質という、有機薬化学講座の伝統あるテーマも融合しつつ、スタッフの稲見圭子専任講師、東利則助教とともに教育研究にあたっています。研究スペースは9階、望月先生の実験室をそのまま継承させていただいています。実験台の上にドラフトチャンバーが配備され、実験者の健康と環境に配慮した、企業の研究室に匹敵する（？ちょっと狭いですが、）設備です。2つの研究室が合併したかたちになり、スタッフも合わせ一時的に20人以上になっていますが、理工学部時代から、須貝グループは他大学や他研究室からの移籍者の比率が高く、今年は、いわば全員が新人としてスタートラインに並んだ状況です。東京タワーが正面の芝公園の地、お近くにお寄りの際にはぜひ声をおかけ下さい。

- 1) 富宿賢一、西山 繁、須貝 威：酵素・微生物触媒反応を基盤とする有用物質合成への展開；有機合成化学協会誌、**64**, 664-676 (2006).
- 2) A. Fujino, M. Asano, H. Yamaguchi, N. Shirasaka, A. Sakoda, M. Ikunaka, R. Obata, S. Nishiyama, T. Sugai: *Bacillus subtilis* epoxide hydrolase-catalyzed preparation of enantiopure 2-methylpropane-1,2,3-triol monobenzyl ether and its application to expeditious synthesis of (*R*)-bicalutamide; *Tetrahedron Lett.*, **48**, 979-983 (2007).
- 3) M. Asano, C. Nagasawa, M. Suzuki, S. Nishiyama, T. Sugai: The short-step and scalable synthesis of (±)-cytoxazone; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 145-148 (2005).
- 4) M. Matsuda, T. Yamazaki, K. Fuhshuku, T. Sugai: First total synthesis of modiolide A, based on the whole-cell yeast-catalyzed asymmetric reduction of a propargyl ketone; *Tetrahedron*, **63**, 8752-8760 (2007).

三回対称生体分子の自己集合を利用したナノ～マイクロ構造体の構築

九州大学大学院工学研究院, JST さきがけ 松浦和則
ma14tcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp

1. はじめに

水中での両親媒性分子の自己集合により、人工ベシクルが構築できることが示されて以来、生体分子もしくはそのモデル化合物を用いたナノ構造体の構築が盛んに研究されている¹⁾。一方、自然界においては、タンパク質・核酸・糖鎖・脂質などの生体分子が自己集合することにより、様々なナノ～マイクロ構造体が自発的に形成されている。例えば、トマトブッシュスタントウイルスのような球状ウイルスの多くは、キャプシドタンパク質が 60 の倍数個だけ自己集合してナノ構造が構築されており、その骨格は、三回対称性の自己集合性ペプチドから成っている²⁾。また、細胞のエンドサイトーシスに参与しているクラスリン粒子は、三回対称性を有する triskelion が Mg^{2+} イオン存在下でサッカーボール状に自己集合することで構築されている³⁾。そのような自然界の戦略に学び、生体分子の自己組織化によるナノ～マイクロ構造体を人工的に構築する方法論を確立することができれば、ボトムアップ型ナノテクノロジーの発展に大きく寄与できると思われる。

筆者らは、そのような観点から、生体分子認識を用いてナノ構造体を構築する研究を行ってきた。例えば、オリゴ DNA-糖鎖コンジュゲートを半分ずらし相補鎖とハイブリダイゼーションすることで、糖鎖を一定間隔に配列制御した一次元糖クラスターを構築することに成功し、糖鎖の空間配置によってレクチン認識能が大きく変化することを示した⁴⁻⁶⁾。また、単層カーボンナノチューブと糖のコンジュゲートをレクチン認識により組織化することで、カーボンナノチューブネットワークの構築に成功している⁷⁾。

ここでは、筆者らが最近行っている生体分子の対称性を利用した自己集合によるナノ～マイクロ構造体の構築について述べる。すなわち、上述の球状ウイルスやクラスリンの骨格構造に学び、三回対称性の DNA やペプチドコンジュゲートを開発し、それらが水中で自発的に集合して、特徴的なナノ～マイクロ構造体を形成することについて述べる。DNA やペプチドを三回対称性とすることで、①水素結合点の増加によりエンタルピー的に有利、②事前組織化効果によりエントロピー的に有利であるため、水中でも効率的に水素結合が働き、自己集合するものと思われる。

2. 三叉路 DNA の自己集合による Nucleo-cages の構築

DNA は、(数 10nm 程度の長さ領域においては) 比較的剛直な構造を有し、塩基配列の設計によりその集合構造をある程度自在にプログラムできるため、N. C. Seeman らの「DNA-cube」と呼ばれる 10 nm 構造体の多段階合成の報告以来、ナノ構造体構築の材料として注目を集めている⁸⁾。

筆者らは、上述の球状ウイルス骨格やクラスリン粒子で見られる三回対称性ユニットの自己集合をヒントに、単純な三本の DNA の自己集合による球状ナノ構造体を構築する方法論を考案した^{9,10)}。つまり、DNA の三叉路構造の末端に「糊」部分として、自己相補性配列 $d(A_5T_5)$ を導入した 30-mer DNA **1, 2, 3** を設計した (図 1)。これらの末端の糊が全てハイブリダイゼーションし、立体的に無理のない構造に自己集合すれば、閉じた籠状構造体を形成すると考えた。

30-mer DNA **1, 2, 3** を全核酸濃度 1 μM となるように 0.5 M NaCl 水溶液中に等モル量混合し、一旦解離させるために 70°C まで加熱後、10°C まで自然冷却した水溶液をサンプルとして、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察および動的光散乱 (DLS) 測定したところ、粒径約 50 nm 程度の粒子の存在が確認された⁹⁾。

「糊」部分の有無は、DNA の球状集合体形成に重要であり、三つのうち一つでも欠けると無定形な構造体になってしまう。この DNA 集合体は、一本鎖を切断する本鎖をマンビーンヌクレアーゼおよび二本鎖を 5' 末端から切断するエキソヌクレアーゼ III により殆ど切断されないことから、末端を持たない、

すなわち三次元的に閉じた籠状構造であることが示唆された。三つのうち一つでも欠けると無定形な構造体になってしまう。この DNA 集合体は、一本鎖を切断するマンビーンヌクレアーゼおよび二

1, 2, 3 の全核酸濃度を 20 μM まで上げると、粒径が 3-4 μm まで大きくなり、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (CLSM) により、水中でのその場観察が可能となった (図 2)^{11,12}。二重鎖選択的蛍光色素 YOYO-1 で染色した球状 DNA 集合体の断層像により、この球状集合体は内部にまで DNA が存在している構造であることが示唆された。興味深いことに、環境応答性の蛍光色素である 8-アニリノナフタレンスルホン酸ナトリウム (ANS) 存在下、球状 DNA 集合体を構築すると、ANS が集合体内部に取り込まれた像が CLSM により観察された。この時の ANS の蛍光スペクトルから、球状 DNA 集合体内部の極性が水よりも低い (エタノール程度) ことがわかった。この疎水的な球状 DNA 集合体内部への各種色素の取り込みを検討したところ、本来 DNA に結合しにくいアニオン性の色素であっても、疎水性相互作用により球状集合体内部に効果的に取り込まれることがわかった。さらに、この DNA 集合体に内包された色素は、水中において長期間自然には放出されないが、DNA 二重鎖の融解により、徐放されることがわかった (図 3)¹²。

また、この粒径 3-4 μm の球状 DNA 集合体をラクトース修飾したコンジュゲートを調製し、ピーナッツレクチンとの相互作用を CLSM により観察したところ、球状集合体表面への吸着のみならず、集合体内部にまでレクチン (6 nm 程度の大きさ) が浸透していることがわかった¹³。つまり、この球状 DNA 集合体は、タンパク質を透過できる程度の穴を有しており、糖のようなリガンドを固定すれば、タンパク質をトラップできる材料であることがわかった。

3. 三回対称性ペプチドコンジュゲートの自己集合によるペプチドナノ構造体の構築

次に筆者らは、天然のウイルスにより近い人工のナノ構造体構築のために、 β -シート構造に基づく繊維状集合体を容易に形成することが報告されている自己集合性ペプチド FKFEFKFE¹⁴ を三回対称に配置したコンジュゲート分子 Trigonal(FKFE)₂ を設計・合成した (図 4)¹⁵。CD スペクトルおよび FT-IR スペクトルから、Trigonal(FKFE)₂ が酸性水溶液 (24 μM , pH 3.3) 中で逆平行 β -シート構造を形

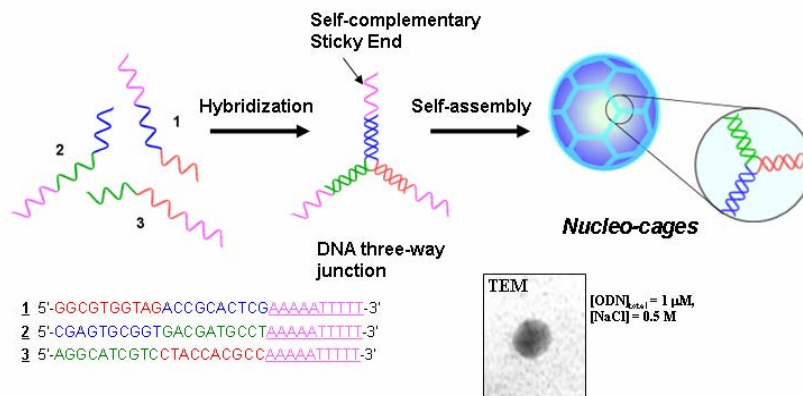


図 1. 自己相補性末端を有する三叉路 DNA の自己集合による球状 DNA 集合体の構築。

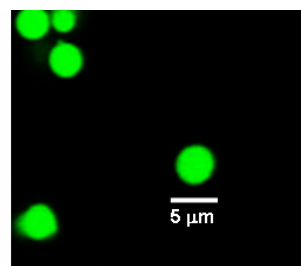


図 2. 球状 DNA 集合体の CLSM 像。[1+2+3] = 20 μM , [NaCl] = 0.5 M, [YOYO-1] = 1 μM 。

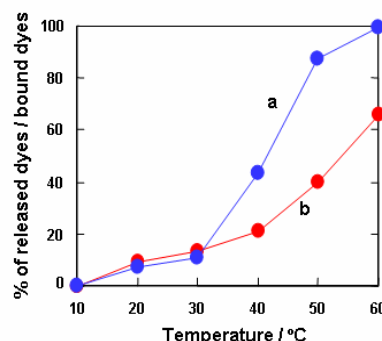


図 3. DNA 二重鎖融解による球状 DNA 集合体から色素の徐放. (a) Rose Bengal, (b) Crystal Violet.

成していることが示唆された。この酸性水溶液の動的光散乱(DLS)測定から、 19.1 ± 4.0 nm の粒子が存在していることがわかった。この大きさは、Trigonal(FKFE)₂ がフラレン様の幾何構造や正十二面体構造を取ったときの大きさ(それぞれ約 27 nm および約 16 nm)に匹敵する。また、この溶液を吸着させ

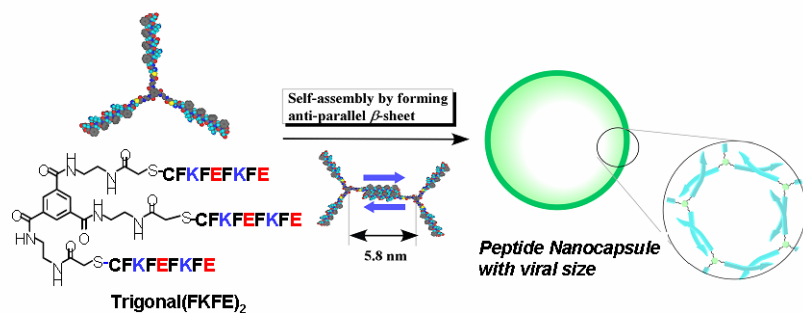


図 4. 三回対称性 β シート形成ペプチドの自己集合によるペプチドナノカプセルの構築の模式図。

たマイカ基板を原子間力顕微鏡(AFM)で観察すると、直径 35-70 nm、高さ 2.3 ± 0.4 nm のドーム状構造体が観察された(図 5A)。一方、ペプチド CFKFEFKFE は、幅約 40 nm、高さ約 1.0 nm、のアミロイド繊維状構造体が観察された。さらに、Trigonal(FKFE)₂ を吸着させたマイカ基板の走査型電子顕微鏡(SEM)観察では、直径 22-34 nm の球状構造と 50-100 nm サイズの凹んだ構造体が観察された(図 5B)。これは、Trigonal(FKFE)₂ の中空カプセル構造が基板上で潰れて凹んだためと思われる。

次に、類似の β シート形成ペプチド FKFECKFE を周回状の三回対称に配置したコンジュゲート Wheel-FKFE を合成し、水中での自己集合挙動を観察した¹⁶⁾。この Wheel-FKFE の場合は、Trigonal(FKFE)₂ の場合と異なり、 β シートを形成する pH において均一な太さ (3.0 nm) の繊維状構造体を与えることがわかった(図 6)。これは、Trigonal(FKFE)₂ が逆平行 β シートのみを形成するのに対し、Wheel-FKFE の場合は、平行 β シートも形成しうるためではないかと考えられる。ペプチド FKFECKFE 単独では、不均一な太さのリボン状構造体になるのに対し、三回対称の Wheel-FKFE とすることで、一分子レベルの太さ (3.0 nm) の均一な繊維を与えるという点では興味深いと思われる。

また最近、より単純な天然トリペプチドであるグルタチオン(γ -Glu-Cys-Gly)を三回対称性に配置したコンジュゲートを合成し、水中での自己集合挙動を観察したところ、100-200 nm 程度の大きさのカプ

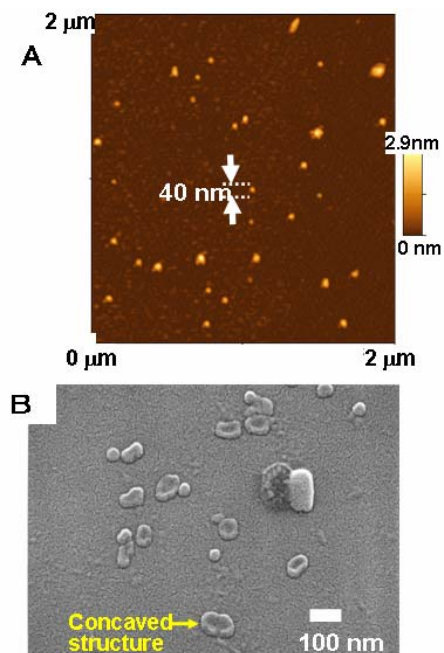


図 5. Trigonal(FKFE)₂ のマイカ基板上における AFM 像 (A) および SEM 像 (B)。

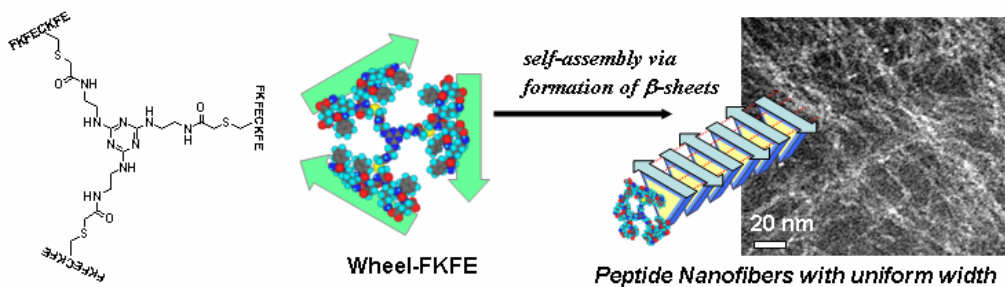


図 6. Wheel 型三回対称性 β シート形成ペプチドの自己集合によるペプチドナノファイバーの形成。

セル状集合体を形成することがわかった¹⁷⁾。グルタチオンのような両親媒性でない（水に易溶の）ペプチド分子を三回対称性とするこゝで、ベシクル状の構造体が得られるという発見は、今後の有機系分子集合体を設計する上で大変興味深いと思われる。

4. おわりに

本研究では、球状ウイルスやクラスリンの自己集合原理を模倣し、DNA やペプチドを素材とした三回対称性の分子を設計し、水中での自己集合により、興味深いナノ～マイクロ構造を構築することができることを示した。生体分子の持つ高度な分子情報を利用すれば、より精密な分子の配置や高次構造制御が可能となると思われる。今後、ナノ構造を作るだけでなく、生体分子のナノ構造体の分析化学・医療分野などへの応用や、天然の鞭毛モータータンパク質のように高度な機能性を付与した人工ナノ構造体が構築などを目指して、夢を持って研究を進めていきたい。

謝辞

本研究は、九州大学大学院工学研究院 君塚信夫教授との共同研究の成果である。君塚研究室スタッフおよび学生諸君に感謝いたします。また、研究を遂行するにあたり、資金面の援助をいただいた文部科学省、日本学術振興会、積水化学工業株式会社、科学技術振興機構（JST）にあつく感謝いたします。

参考文献

- 1) T. Kunitake, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **31**, 709 (1992).
- 2) A. J. Olson, G. Bricogne, S. C. Harrison, *J. Mol. Biol.*, **171**, 61 (1983).
- 3) S. C. Harrison, T. Kirschhausen, *Cell*, **33**, 650 (1983).
- 4) K. Matsuura, M. Hibino, Y. Yamada, K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 357 (2001).
- 5) K. Matsuura, M. Hibino, T. Ikeda, Y. Yamada, K. Kobayashi, *Chem. Eur. J.*, **10**, 352 (2004).
- 6) Y. Yamada, K. Matsuura, and K. Kobayashi, *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 1913 (2005).
- 7) K. Matsuura, K. Hayashi, and N. Kimizuka, *Chem. Lett.*, **32**, 212 (2003).
- 8) N. C. Seeman, *Nature*, **421**, 427 (2003).
- 9) K. Matsuura, T. Yamashita, Y. Igami, N. Kimizuka, *Chem. Commun.*, 376 (2003).
- 10) 松浦和則, 山下太郎, 君塚信夫, 特許第 4061401 号
- 11) K. Kim, K. Masumoto, K. Matsuura, N. Kimizuka, *Chem. Lett.*, **35**, 486 (2006).
- 12) K. Matsuura, K. Masumoto, Y. Igami, T. Fujioka and N. Kimizuka, *Biomacromolecules*, **8**, 2726 (2007).
- 13) K. Kim, K. Matsuura, and N. Kimizuka, *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 4311 (2007).
- 14) D. M. Marini, W. Hwang, D. A. Lauffenburger, S. Zhang, R. D. Kamm, *Nano Lett.*, **2**, 295 (2002).
- 15) K. Matsuura, K. Murasato, and N. Kimizuka, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10148 (2005).
- 16) K. Murasato, K. Matsuura, and N. Kimizuka, *Biomacromolecules*, **9**, 913 (2008).
- 17) K. Matsuura, K. Murasato, A. Kawaharada, H. Matsuyama, T. Fukuda, and N. Kimizuka, *Abstract Book of 2nd Japan-Australia Symposium in The 60th Divisional Meeting on Colloid and Surface Chemistry*, The Chemical Society of Japan, 3G03 (2007).

部会行事

第3回バイオ関連化学合同シンポジウム

(第23回生体機能関連化学シンポジウム、第11回バイオテクノロジー部会シンポジウム、第11回生命化学研究会シンポジウム、第4回ホスト-ゲスト化学シンポジウム)

主催：生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、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

共催：日本化学会、東京工業大学生命系 G-COE 教育研究拠点

会期：2008年9月18日(木)、19日(金)、20日(土)

会場：東京工業大学 すすかけ台キャンパス
(〒226-8501 横浜市緑区長津田町 4259)

発表申込締切：6月23日(月)

予稿原稿締切：7月22日(火)

参加登録(予約)締切：8月4日(月)

内容：生体機能、バイオテクノロジー、生命化学、超分子包接化学に関する日本化学会2部会・2研究会の合同シンポジウム。

発表形式：口頭、ポスター

*1つの会場で各日の午後1時から3時をポスター、それ以外を口頭発表(15分発表、5分質疑、3会場)とする。

*口頭発表は原則として1研究室1件まで。但し、申込は2件まで可。この場合は発表優先順位をつけ、2件目の採否は実行委員会の判断による。

参加申込方法：4月末から公開予定のWEBサイト(<http://www.joint-sympo.org/>)から発表申込、予稿原稿の提出、参加登録のすべての手続を行う。

部会講演賞：生体機能関連化学部会あるいはバイオテクノロジー部会のいずれかの部会員になって1年以上が経過し、受賞時40才以下の部会員が対象。賞応募申請は発表申し込み時点で受付を行う。

参加登録費：

8月4日(参加登録(予約)締切)まで・・・

部会員：一般5,000円、学生4,000円、非部会員：一般7,000円、学生5,000円

8月5日以降・・・上記の各参加種別に2,000円プラス。

*いずれの価格にも予稿集代金が含まれています。

*予稿集の事前送本は予定していません。事前に予稿原稿の閲覧ができるよう、PDFでの限定公開を計画しています(9月8日以降)。

懇親会：9月19日(金)。費用6,000円(必ず事前に申込のこと)。

連絡先：実行委員長 岡畑 恵雄(〒226-8501 横浜市緑区長津田 4259 B-53 東京工業大学 大学院生命理工学研究科 生体分子機能工学専攻) Tel: 045-924-5781, Fax: 045-924-5836, E-mail: yokahata@bio.titech.ac.jp

第3回

バイオ関連化学合同シンポジウム

- ・第23回生体機能関連化学シンポジウム
- ・第11回バイオテクノロジー部会シンポジウム
- ・第11回生命化学研究会シンポジウム
- ・第4回ホスト-ゲスト化学シンポジウム

日時 : 2008年9月18日(木), 19日(金), 20日(土)

会場 : 東京工業大学すずかけ台キャンパス(横浜市緑区長津田町4259)

発表 : 口頭・ポスター発表

申込締切 : 2008年6月23日(月)

詳しくはホームページをご覧ください

<http://www.joint-sympo.org/index.html>

主催 : 生体機能関連化学部会, バイオテクノロジー部会,

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

共催・協賛 : 日本化学会、生体関連・バイテクディビジョン、高分子学会、

日本生物物理学会、日本農芸化学会、日本生物工学会、

有機合成化学協会、バイオインダストリー協会、

触媒学会生体関連触媒研究会、東工大生命系G-COE教育研究拠点

お問い合わせ先

実行委員長 : 岡畑 恵雄

Tel: 045-924-5781 Fax: 045-924-5836

E-mail: yokahata@bio.titech.ac.jp

〒226-8501

横浜市緑区長津田町4259 B-53

東京工業大学 大学院生命理工学研究科 生体分子機能工学専攻

第20回生体機能関連化学若手の会サマースクール

会期:平成20年8月6日(水)13時 - 8月7日(木)12時

会場:宮城県白石市小原字湯元 23 小原温泉 かつらや(<http://www.katsuraya.com/>)

招待講演

下村 政嗣 先生 (東北大学 多元物質科学研究所 教授)

「自己組織化による階層構造を有するハブリッドマテリアルとそのバイオメテック・エンジニアリング」

和田 健彦 先生 (東北大学 多元物質科学研究所 教授)

「外部刺激応答性人工核酸の創製 - がん細胞特異的遺伝子治療薬の開発を目指して -」

永次 史 先生 (東北大学 多元物質科学研究所 教授)

「遺伝子発現の選択的制御を目指した機能性分子の合成」

高村 禪 先生 (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 准教授)

「テーパー状流路を用いた選択的生体分子トラップと一細胞の遺伝子発現解析への応用」

三重 正和 先生 (東京工業大学 大学院生命理工学研究科生命情報専攻 助教)

「タンパク質導入による細胞機能制御と生細胞イメージング」

田中 良和 先生 (北海道大学創成科学共同研究機構 特任助教)

「構造生物学の新展開 - 巨大分子の立体構造解析 -」

ポスター発表(8月6日夕方開催) **研究員-学生を対象にポスター講演賞を授与**

参加申込締切:平成19年6月20日

参加費:一般:9000円、学生:7000円

発表申込方法 発表題目、所属、発表者氏名(講演者に○)、連絡先(住所、電話、E-mail)、講演概要(200字程度)を明記の上、E-mailにて申してください。折り返し、予稿原稿ファイルをE-mailで送信致します。

参加申込方法 氏名、所属、連絡先を明記の上、E-mailにて申してください。

主催:日本化学会 生体機能関連化学部会 若手の会

共催:科研費特定領域「ライフサーベイヤ」

<アクセス>《東北新幹線》JR白石蔵王駅で下車。《東北本線》JR白石駅で下車。駅からはタクシーで15分、バスで20分程度。バスの場合は小原方面のバスに乗車:白石蔵王駅 11:35 発/白石駅 11:43 発/小原温泉 着 12:01(徒歩 10分くらい)

世話人: 珠玖 仁(東北大院環境)、梅津光央(東北大院工)、松尾 保孝(北大電子研)

問合先: <http://www.joint-sympo.org/> 珠玖 仁 shiku@bioinfo.che.tohoku.ac.jp

お知らせ

平成20年度 生体機能関連化学部会役員

【部会長】

岡畑 恵雄（東工大院生命理工）

【副部会長】

渡辺 芳人（名大院理）

杉本 直己（甲南大理工・FIBER）

【幹事】

青野 重利（岡崎統合バイオ）

朝倉 則行（東工大院生命理工）

浦野 泰照（東大院薬）

依馬 正（岡大院自然）

片山 佳樹（九大院工）

川本 哲治（武田薬品）

塩谷 光彦（東大院理）

島本 啓子（サントリー生有研）

杉山 弘（京大院理）

高木 昌宏（北陸先端大マテリアル）

民秋 均（立命大理工）

鍋島 達弥（筑波大院数理）

西村 紳一郎（北大院先端生命）

浜地 格（京大院工）

深瀬 浩一（阪大院理）

末永 智一（東北大院環境）

三原 久和（東工大院生命理工）

和田 健彦（東北大多元研）

【監査】

青山 安宏（京大院工）

お知らせ

平成20年度 生体機能関連化学部会若手の会支部幹事

【北海道・東北支部】

珠玖 仁 (東北大院環境)

松尾 保孝 (北大電子研)

【関東支部】

朝倉 則行 (東工大院生命理工)

葛谷 明紀 (東大先端研)

堤 浩 (東京医歯大生材研)

【東海支部】

山田 泰之 (名大院理)

山中 正道 (静大理)

【関西支部】

館 祥光 (阪市大院理)

田邊 一仁 (京大院工)

寺尾 嘉人 (武田薬品)

【中国・四国支部】

岩本 啓 (広大院理)

瀧 真清 (岡山大院自然科学)

【九州支部】

藤ヶ谷剛彦 (九大院工)

森 建 (九大院工)

ニュースレター Vol. 23, No. 1 2008年5月31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