

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.3 (2008. 11. 30)

目 次

◇ 巻 頭 言

「異質」、「異端」を許容する大学成田 吉徳 1

◇ 研 究 紹 介

- L/F-転移酵素を用いた蛋白質 N 末端への
機能性非天然アミノ酸導入瀧 真清 3
- 超高熱性蛋白質に対する温度に対応した DNA の相互作用特性 ...長門石 暁 7
- カテコールジオキシゲナーゼの反応機構に対するモデル研究 ...人見 穰 1 1
- 酵素活性を検出する可視化プローブの開発水上 進 1 5

◇ 部 会 行 事

- 第 23 回生体機能関連化学シンポジウムの開催報告 1 9
- 第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム講演賞の講評 2 0
- 若手フォーラムの開催報告..... 2 1

「異質」、「異端」を許容する大学

九州大学 成田 吉徳

本稿の依頼を受けて間もなく、2008年度のノーベル物理学、化学両賞の発表があり、日本人研究者4名*が顕彰を受けられることとなり日本人の研究成果を世界に強くアピールできたことは日本の化学界にとり大変喜ぶべきことである。

とりわけ本年度の化学賞がグリーン蛍光タンパク質(GFP)の発見とそれによる分子イメージングへの発展への寄与として下村 脩博士ら3名に授与されることとなり、生命科学や医学研究に必須の手法を確立するに先駆的な業績が大きく評価された結果である。これは本部会において進められているChemical Biologyから生命科学研究の中核となる方法論の一つであることから、部会員の方々にとっても感慨が深いことと思う。

これまで生体関連化学はともすると学際的分野との認識が強かったが、本年の化学賞は本領域の重要性が広く社会に認識される契機となり、関連分野の研究者にとって強い励みとなったことと思う。

下村博士のGFP発見の報告は1962年であり、本年の物理学賞と同様に実に三十一四十数年も前の発見が根拠となっている。ご本人も述べられているように生物発光に魅せられ、管理業務に煩わされることなく、他の研究者が手掛けない課題の追求に最適の場所を求め自力で取り組まれてきたことが大きな結果を生んだといえる。今回の受賞の基となる研究は個人の興味から出発しているとはいえ、当初は人の取り組まない孤高の課題であったろうと思われる。見方によっては当時の「主流」の課題ではなかったことが、今回の結果につながったと云える。語弊を恐れずに云えば、流行とは無縁の「異質な」研究であったことが幸いした。

今回の受賞は大学における研究やその評価のあり方、研究資金分配システム、ひいては教育、科学行政等に重要な課題を投げ掛けている。

研究費の面から見ると、政策的課題に対する研究経費と比べると個々の研究費の規模は少ないものの、研究者独自の発想に基づく研究費支援の中心となる科研費の総額はこの10年間に2倍弱の増加となっている。研究基盤である中規模の設備の更新も渋滞しがちであるが、大変な充実振りである。一方、今回の授賞に繋がる研究が進められた1960-70年代を考えると、当時の大学には現在のように多くの設備はなく、研究費も潤沢であったわけではない。しかし、競争や効率一点張りではなく、現在よりはるかに研究に対して寛容であったように思える。競争的資金や個人業績など短期の評価で管理するような事は無かったため、研究生産性の低い研究者や異端・異質の研究者も許容されていた。フェジーではあるが、その中でおのずとその見識や達成成果から評価が決まっていた。

国立大学法人化後、日本での教育組織や研究者の評価を厳正に行う方向へと向かってきた。趣旨は結構なのだが、評価を始めてまだ年月が浅く、評価の方法や評価に基づく研究者へのフィードバックの方法もまだ試行の段階である。最大の課題は、教育・研究組織も研究者も全て評価し、その結果を資金配分に反映するようになったため、その対応に日々追われることになったことである。いわば、評価制度が人を振り回している印象は拭えない。厳正な政策実行や組織運営を求めるあまり、寛容さを失ってきているといえる。

産業界との関係で云えば、現在、日本の大学が置かれている財政環境と企業における短期利益指向が、企業での「基礎研究」の大学へアウトソーシングや産学連携の推奨につながっている。これは社会に支えられている大学がその成果を社会へ還元する点からは必要なことであり、国の産業力増強にも寄与する。しかし、その資金獲得高を競い、それを評価する雰囲気が行き過ぎると本末転倒となる。社会は大学が産業に寄与する実利面だけを期待しているだけでなく、次世代を支える人材の育成と根元的な知を生み出すことを求めている。大学の研究者が産学連携を行う場合には、自らが生み出した

成果を産業界が利用するとの姿勢を貫くべきであろう。

ヒューレット・パカードや Google などのベンチャー起業を数多く輩出していることから、ベンチャー起業の本拠地と目されているスタンフォード大学での研究は徹底した基礎重視である。そこから生まれた革新的な成果に、いち早く着目した研究者が実用へと展開している。このような環境を考えるとむしろ、多様な思考の持ち主を許容する自由闊達な土壌と高レベルの研究チームの存在がこれらの起業が生んでいると見るべきであろう。

今回のノーベル賞授賞を振り返ると、短期的成果や応用への傾斜を強めている現在の日本の大学や科学行政に対してノーベル化学賞選考委員会は意図せず警鐘を鳴らしたのかも知れない。

現在、科学分野で研究を進めている大学の若い研究者の人達は、様々の評価や競争に耐えて生き抜かねばならない厳しい環境に置かれており、自由に発想を巡らす時間・空間的な余裕が失われつつあるのは大変に由々しきことである。大学の人件費圧縮による副作用により、若い助教の海外派遣もままならない事例も出ている。また、短期の研究成果に対する圧力やひいては研究費獲得に結びつかない課題に手を出ことを自己規制されるかも知れない。しかし、時には一研究者として何が生涯をかけた究極のゴールであるのかを考えてみるのは必要である。例え、応用的研究課題で研究資金を獲得したとしても、それで得られた研究環境をうまく生かして、独自の視点を失うことなく、日々の成果を残しつつ基礎に立脚した研究を進める器用さを身につけて、最後には次世代まで残るインパクトの強い研究へと発展させられ得ることを願っている。

L/F-転移酵素を用いた蛋白質 N 末端への機能性非天然アミノ酸導入

岡山大学大学院自然科学研究科 瀧 真清

1. はじめに

蛋白質（ポリペプチド）の生合成とは、通常、mRNA 上の遺伝暗号（コドン）に従って、アミノ酸がある一定の順序で重合することを指す。この過程は「翻訳」と呼ばれる。翻訳中のポリペプチド鎖は、触媒であるリボソーム（50 種類以上の蛋白質と数種類の RNA との複合体）の移動に従って、蛋白質の N 末端から C 末端の方向に伸長されていく。一方、現存生物の登場より先に、RNA だけからなる生物世界（RNA world）が存在したという見方がある。RNA 世界から、現在の蛋白質世界へと移行する過程では、いきなりリボソームのような非常に複雑な分子複合体が登場したとは考えづらい。

mRNA およびリボソームを使わないペプチド生合成を触媒する酵素として、非リボソームペプチド合成酵素 (Nonribosomal-peptide synthetase; NRPS)¹⁾、ジペプチド合成酵素^{2a)} やアミノアシル転移酵素 (Aminoacyl-transferase)^{2b)} などが知られている。NRPS は細菌などが環状ペプチドを合成する際に必須である。NRPS のサブユニットドメイン 1 つ毎に 1 つのアミノ酸を伸長する役割を持つ。その結果、サブドメインが数珠つなぎになって恐ろしく大きな酵素となる。これだけ大きな酵素を合成するためには、リボソームのような発達した蛋白質合成系が先に必要なのかもしれない。対照的に、ジペプチド合成酵素は NRPS に比べ分子量が圧倒的に小さく、アミノアシル転移酵素は更に小さい。NRPS はリボソームと同じようにポリペプチド鎖を N→C 末端へと伸長させるが、アミノアシル転移酵素は逆の方向 (C→N 末端) へと伸長させる。リボソームのような高度な組織ができるまでの過渡的な世界は存在したのだろうか？ もしも存在した場合、分子量の小さなこれらの酵素が重要な役割を果たしてきたのだろうか？ 素朴な疑問が湧き、想像がふくらむ。

2. 野生型 L/F-転移酵素を用いた蛋白質 N 末端への機能性非天然アミノ酸導入

話を現実に戻そう。機能性分子である非天然アミノ酸を蛋白質に導入する場合、通常は非天然アミノ酸を特定 tRNA の 3' 末端に共有結合させたものを作製し、これを翻訳系に混合することで行う³⁾。我々はこれまでに、アミノアシル転移酵素を使って蛋白質工学への応用を目指してきた。

その結果、翻訳系ではなくアミノアシル転移酵素を使って、機能性非天然アミノ酸を蛋白質に導入する手法を世界ではじめて開発した (図 1)⁴⁾。この手法では、標識したい目的蛋白質やペプチドの N 末端に塩基性アミノ酸（リジンもしくはアルギニン）を持たせることがポイントである。我々は、N 末端にリジンやアルギニンを持つ目的蛋白質を作製し、目的蛋白質 N 末端と非天然アミノ酸とを酵素 (L/F-転移酵素) を用いて結合させた。L/F-転移酵素は元々、ロイシンまたはフェニルアラニン (L/F) でアミノアシル化された tRNA を認識する酵素で、蛋白質 N 末端の塩基性アミノ酸に L/F を転移させ

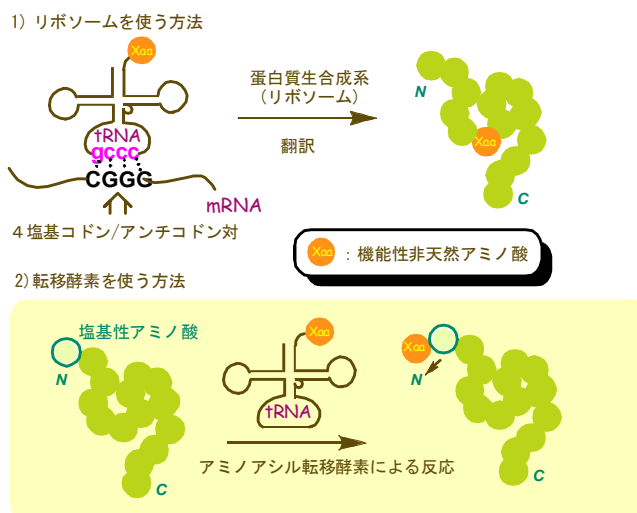


図 1. 蛋白質への機能性非天然アミノ酸導入法

る。一方、非天然アミノ酸でアミノアシル化されたtRNAもまた、L/F-転移酵素によってある程度曖昧に認識を受ける。この酵素の曖昧さを利用して、バイオ直交性反応基を持つアミノ酸など、様々な機能性アミノ酸を蛋白質のN末端に導入することができる。バイオ直交性反応基を持つ非天然アミノ酸をN末端に導入した蛋白質やペプチドは、N末端特異的に更なる化学修飾が可能である。具体例として、アジドフェニルアラニン(N末端に導入させたキシラン結合蛋白質と、ビオチンまたは蛍光基を持つアルキン誘導体とを混ぜ、[3+2]環化付加反応(クリックケミストリー)を利用して、ビオチン化および蛍光修飾されたキシラン結合蛋白質を得ることができた⁵⁾。

3. 変異L/F-転移酵素を用いた蛋白質N末端の蛍光修飾

次に、よりスマートに蛋白質の蛍光修飾を行うため、クリックケミストリーを利用することなく、蛍光性アミノ酸を直接的に蛋白質N末端に転移酵素で導入することを考えた。蛍光性非天然アミノ酸として、我々は高い蛍光量子収率($\Phi=0.6$)を持ち可視光で励起可能なアクリドン系アミノ酸(badAla)を新規合成し、転移酵素に認識させることを試みた。ここで言う「認識」とは、アミノ酸でアミノアシル化された基質tRNAの認識を指す。しかしながら野生型L/F-転移酵素を用いて、このような比較的大きなアミノ酸を認識させることはできなかった。L/F-転移酵素は40年以上も前に見つかった酵素だが、X線結晶構造解析が難しく、反応機構が殆ど分かっていなかったため、この実験を半ば諦めかけた。この時タイムリーにも、

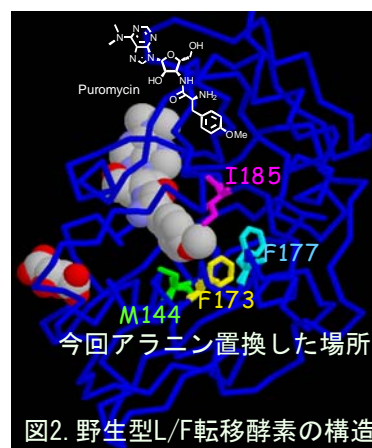
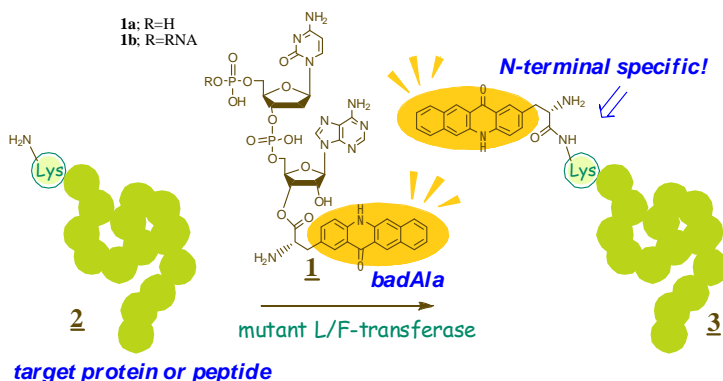


図2. 野生型L/F転移酵素の構造

産総研および理研のグループが独立に同時に構造解析に成功した^{6),7)}。特に野生型L/F-転移酵素とアミノアシルtRNA類縁体(ピューロマイシン)との複合体のX線結晶構造解析結果(図2)⁶⁾が、我々の研究に役立った。我々は、転移酵素の基質結合ポケット付近に含まれる疎水性アミノ酸が、比較的大きな非天然アミノ酸を認識するときに立体障害になるのではないかと考えた。そこで、転移酵素内にある立体障害になりそうなアミノ酸残基を、

小さなアラニン残基に置換した変異酵素を4種類作製し(図2)、badAlaを認識できるかどうか調べた。幸いこれら4種類の変異酵素のいずれもが、badAlaを認識し、蛋白質やペプチドのN末端特異的な蛍光修飾に成功した(スキーム1)。さらに基質であるアミノアシルtRNAを低分子化した1)アミノアシルマイクロヘリックス、2)アミノアシル1本鎖マイクロRNA、および3)アミノアシル核酸2量体(アミノアシルpdCpA; **1a**)のいずれもが、L/F-



Scheme 1. N-terminal specific fluorescence labeling of a protein

転移酵素の基質となることを見いだした⁸⁾。実験結果の最も良かったF173A変異体(173番目のフェニルアラニンをアラニンに変異させたL/F-転移酵素)の分子モデリングを、立体構造予測ツール(SWISS-MODEL)⁹⁾を使って行った。次に、F173A変異体の予測構造とアミノアシルpdCpA(**1a**)とのドッキングモデルをAutoDock¹⁰⁾を用いて作製した。得られた最安定配座の一つを図3に示す。

F173A変異体では、蛍光性アミノ酸側鎖の縮合芳香多環が無理なく酵素の基質結合ポケットに入っていることが示唆される。置換前の野生型L/F-転移酵素(F173)では、フェニルアラニンの立体障害のため、このような構造を取らせることは不可能であった。

このように、L/F-転移酵素の活性中心付近のアミノ酸を変異させることで、野生型L/F-転移酵素が認識することのできない非天然アミノ酸を認識させることに成功した。

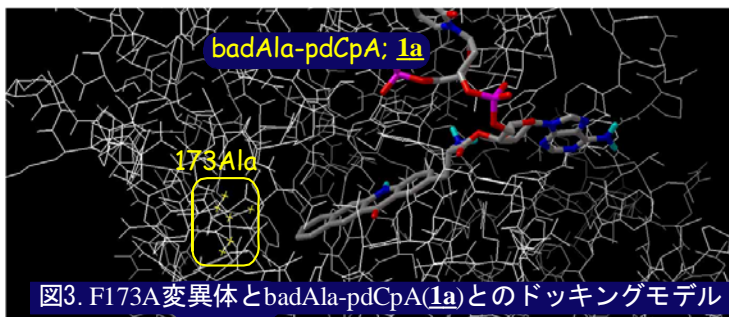
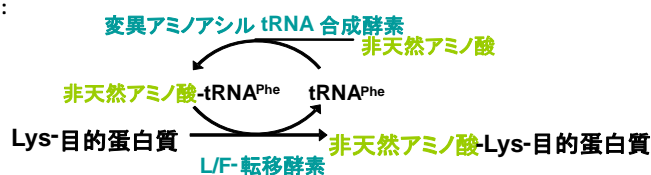


図3. F173A変異体とbadAla-pdCpA(1a)とのドッキングモデル

4. 反応系の改良 (NEXT-A 法)

前述した従来のアミノ酸導入方法では、導入するアミノ酸をRNAの3'末端に予めアミノアシル化した分子(アミノアシルRNA; 1)を作製し、それを単離する必要があった。アミノアシルRNAの作製には、アミノ酸の誘導體化が必要であり、操作が煩雑である。その結果、得られるアミノアシルRNAの量は極めて限定されるため、非天然アミノ酸を導入した目的蛋白質を大量に作製することは困難であった。

NEXT-A法:



従来法:

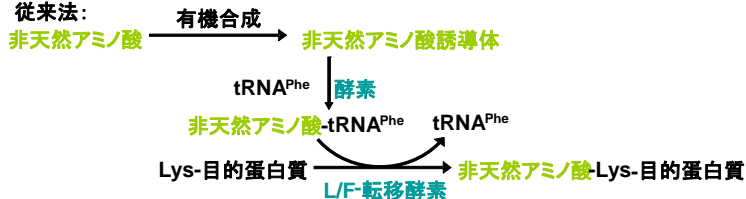


図4. NEXT-A 法と従来法の比較

これを改善するため、我々は大腸菌由来のアミノアシルtRNA合成酵素変異体(変異ARS)¹¹⁾によるアミノアシル化反応を行うことにした。その際、変異ARSとL/F-転移酵素とを同じ混合液中に共存させておく。こうすることで、単一の容器内で2つの酵素反応を連続して行うことができ、高効率・迅速かつ簡便に蛋白質やペプチドのN末端に非天然アミノ酸を導入することができる(図4)。そこでこれをN-terminal EXtention with TTransferase and ARS (NEXT-A)法と名付けた¹²⁾。NEXT-A法を用いた場合、高価なtRNA分子(市販)は系中で触媒として働きリサイクルされるため、前述した量的な問題がかなり解決された。NEXT-A法を用いて、2項で述べたバイオ直交反応点を蛋白質に付与することで、基板やゲルなどへの蛋白質の固定化等の応用も考えられる。また、迅速性・定量性や操作性の点で有利なNEXT-A法の特性を生かし、特定の癌細胞のみに結合する蛋白質やペプチドのN末端特異的に放射性標識した非天然アミノ酸を導入し、画像診断技術(PET; Positron Emission Tomography)への応用を目指している。従来の化学修飾法では時間がかかる上にペプチドや蛋白質中の特定の位置への標識は難しく、活性部位付近に標識されると蛋白質やペプチドが失活する原因となる。また、PETに用いることのできる放射性同位元素の半減期は通常1時間以内と非常に短く、PETプローブ標識蛋白質やペプチドの作製は極めて短時間で効率よく行わなければならないことも問題とされる。NEXT-A法を用いると、ごく短時間にペプチドや蛋白質のN末端1カ所だけに放射性アミノ酸を導入でき、これら問題点を解決できると考えられる。

5. おわりに

L/F-転移酵素を使った手法（特に NEXT-A 法）の長所・短所を以下にまとめる。

長所：

1. 本手法を用いることで、蛋白質 1 分子に対し非天然アミノ酸 1 分子の割合で厳密に導入できる。
2. 酵素反応であるため副反応がおこらず、非常に素早く（数分～20 分程度で）非天然アミノ酸を導入できる。
3. 夾雑物の存在する細胞抽出液などの汚い環境下でも、目的蛋白質やペプチド N 末端への特異的標識が可能である。
4. 低温(4℃)でも反応が進行するため、熱的に不安定な蛋白質の標識に向いている。

短所：

1. 蛋白質の N 末端が蛋白質の内側に埋もれていると反応が進行しづらい。
2. 蛋白質やペプチド N 末端以外への修飾はできない。

今後は NEXT-A 法を更に拡張して、多段階の反応を 1 つの試験管内で望みの順序通りに起こさせる、いわば人工カスケード反応とでも言えるような反応系 (one-pot multi-step organized reaction) の構築も行いたい。また単に試験管の中で蛋白質工学をするだけにとどまらず、夾雑物の存在する系で目的蛋白質だけに特異的に標識できる強みを生かして、冒頭の素朴な疑問を解き明かすような生物学の本質をつく研究を行いたい。

謝辞

本研究の立ち上げ、および展開に際して、常に新しいことを考えるよう厳しくご指導頂きました、岡山大学工学部・宍戸昌彦先生に厚く御礼申し上げます。また、日頃から様々なご助力を頂きました、共同研究者、学生、技術補佐員、および教職員の皆様に深く感謝いたします。

参考文献など：

- 1) S.A. Sieber, M. A. Marahiel, *Chem. Rev.*, **105**, 715 (2005). 2a) K. Tabata, S. Hashimoto *et al.*, *J. Bacteriol.*, **187**, 5195 (2005). b) E. Graciet, A. Varshavsky *et al.*, *PNAS*, **103**, 3078 (2006). 3) T. Hohsaka, M. Sisido *et al.*, *JACS*, **118**, 9778 (1996). 4) M. Taki, M. Sisido *et al.*, *ChemBioChem*, **7**, 1676 (2006). 5) M. Taki, M. Sisido, *Biopolymers: Peptide Science*, **88**, 263 (2007). 6) K. Suto, K. Tomita *et al.*, *EMBO J.*, **25**, 5942 (2006). 7) X. Dong, S. Yokoyama *et al.*, *Protein Sci.*, **16**, 528 (2007). 8) M. Taki, H. Kuroiwa, M. Sisido, *ChemBioChem*, **9**, 719 (2008). 9) T. Schwede *et al.*, *NAR*, **31**, 3381 (2003). 10) G. M. Morris *et al.*, *J. Comput. Chem.*, **19**, 1639 (1998). 11) K. Kirshenbaum, D. A. Tirrell *et al.*, *ChemBioChem*, **3**, 235 (2002). 12) 瀧 真清、宍戸昌彦ら, 特許出願中. なお、Caltech のグループが同時に独立にこの手法を開発している (R. E. Conner, D. A. Tirrell *et al.*, *ChemBioChem*, **9**, 366 (2008)).

超好熱性蛋白質に対する温度に対応した DNA の相互作用特性

東京大学大学院・新領域創成科学研究科 長門石 暁

1. はじめに

極限環境生物が生育している環境は、例えば二本鎖 DNA が不安定化するような高温(80 °C 以上)で、また静電的な相互作用を遮蔽する高塩濃度(1 M 以上)と、蛋白質-DNA 間相互作用において不利な条件になっている。蛋白質側は高温環境に対して、蛋白質内部の疎水性を高め、さらに蛋白質表面の残基間による ion-pair 形成によって高い熱安定性を獲得しており、また高塩濃度環境に対しては、DNA との結合界面にカチオン分子を取り込むことで静電的遮蔽を緩和させている。では DNA には温度に適応した塩基配列特異性、それに伴う機能特異性はないのだろうか？

近年、古細菌におけるその生育温度とゲノム配列において興味深い報告がなされている^[1]。低温 (37 °C) 環境下では YR または RY 配列(Y : ピリミジン塩基, R : プリン塩基)が多く存在している一方で、高温環境になるに従い YY または RR 配列が多くなる。この温度によって異なる配列傾向には、二本鎖 DNA のコンホメーション変化に関連する柔軟性に違いがあることが明らかになりつつある。従って DNA にも環境温度に適応した配列(構造)特性があるのではないかと考えられる。本稿では超好熱菌由来の TATA-box 結合蛋白質をモデル分子として、二本鎖 DNA への配列特異性探索を行い、熱力学的な解析を基盤に温度に対応する塩基配列とその相互作用特性について紹介する。またゲノム配列に関連した生物学的な意義についても議論する。

2. 超好熱菌由来 TATA-box 結合蛋白質の分子特性

基本転写因子の1つとして知られる TATA-box 結合蛋白質(TBP)は、転写開始位置を示す A/T-rich 塩基配列 DNA (TATA-box プロモーター) に対し特異的に結合する。その際 DNA は折れ曲がった bending と呼ばれる構造を形成し複合体は安定化する。また TBP は様々な 8 bp の A/T-rich 配列 DNA と結合することができ、ある特異的な DNA 構造を認識しているとされている^[2]。本研究では超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 TBP (*PhoTBP*) をモデル分子として用いた。示差走査型熱量測定より、*PhoTBP* の変性温度は 100 °C と非常に高い熱安定性を示した(data not shown)。TBP の TATA-box に対する結合は、疎水性相互作用による脱水合作用を主な駆動力としている(図 1)。等温滴定型熱量測定(ITC)による *PhoTBP* と *Archaea* 系 TATA-box プロモーター (box-A) との相互作用は、高温条件下において高い結合親和性($K_a = 10^6 \text{ M}^{-1}$)を示し、脱水合作用に由来するエントロピー駆動型の相互作用が観察された (図 2)。

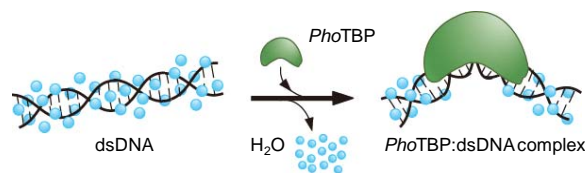


図 1. TBP と二本鎖 DNA 間の相互作用モデル図

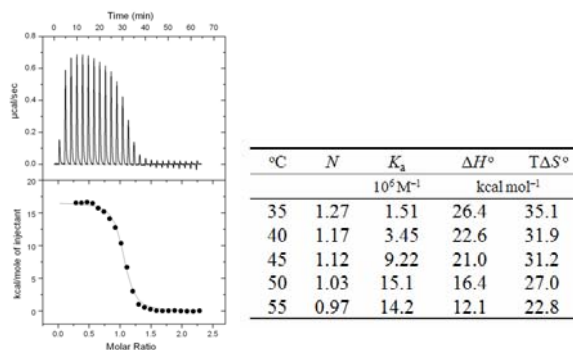


図 2. TBP と二本鎖 DNA 間相互作用における反応熱と熱力学的パラメータ(ITC 測定)

3. *PhoTBP* の SELEX 解析

二本鎖 DNA に対する塩基配列特異性の探索を行うにあたり、*PhoTBP* の SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) 解析を行った。SELEX の方法としては、① 24 bp のランダム領域

と PCR 増幅用プライマー配列を含む全長 70 bp の二本鎖 DNA プール (50 pmol) を準備し, ② ニッケル固定化樹脂に His₆-tag 融合 *Pho*TBP (5 nmol) を固定化させたカラムと混合させ, ③ 非特異 DNA を洗い流し(5回洗浄), ④ *Pho*TBP をイミダゾール溶液でカラムから溶出し, ⑤ フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により DNA を抽出, ⑥ PCR 増幅させた DNA 溶液を再度 *Pho*TBP 固定化カラムへ添加する, という操作を 7 サイクル繰り返した。以上の操作より得られた二本鎖 DNA の塩基配列をシーケンサーで解読し, これらを *Pho*TBP 特異的に結合する DNA 配列とした。

高温環境下として 50 °C での SELEX を行った。全 83 サンプルの塩基配列を解読した結果, 24 bp のランダム配列領域には A/T-rich な塩基配列 (5~8 bp) が含まれていた (図 3A 上段)。MEME (Multiple EM algorithm for motif Elicitation, <http://meme.sdsc.edu/meme/meme.html>) を用いて 8 bp スケールで共通する塩基配列モチーフの解析を行った。その結果, 50 °C では TTTA というモチーフで構成された A/T-rich 配列がコンセンサスであることが明らかとなり (図 3A 中段), 二か所の結合サイトが存在することが示唆された (図 3A 下段)。Archaea 由来 TBP に関するゲノム DNA 上のコンセンサス配列は, T T T A a/t A N N (box-A) が知られており, この 50 °C における SELEX の結果は *Pho*TBP のゲノムコンセンサス配列に類似していた。

続いて低温条件下での SELEX を実行した。37 °C においては, TTTA に TATA というモチーフが混在した塩基配列が選択され (図 3B), さらに低温の 25 °C になると, TATA モチーフをコンセンサスとした A/T-rich 配列が選択された (図 3C)。このように, 高温では TTTA 配列, 低温では TATA 配列に対し有意に *Pho*TBP と相互作用していることが明らかとなった。

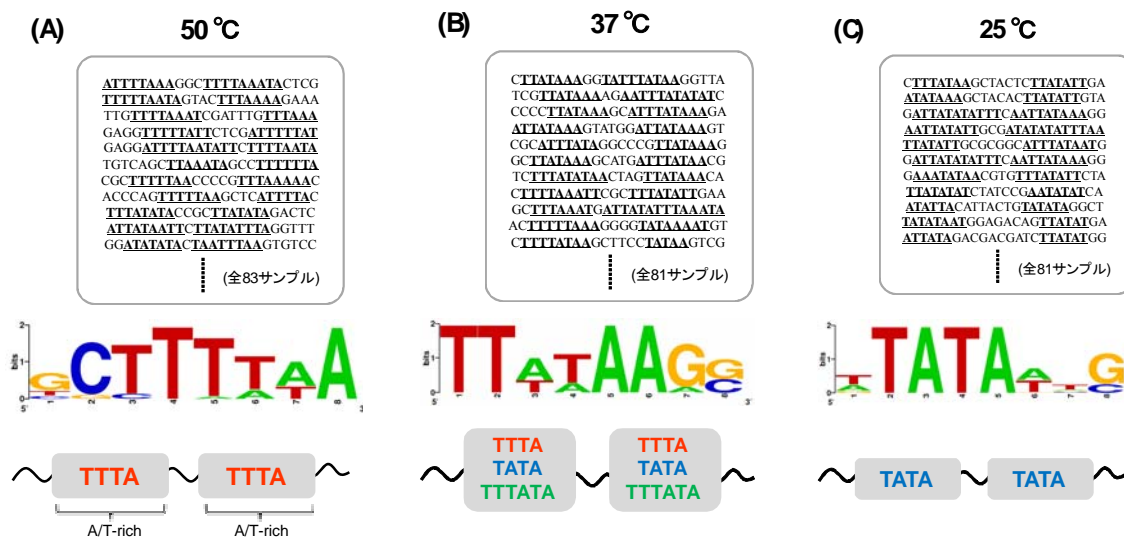


図 3. 各温度条件下における SELEX 解析の配列結果。上段;ランダム領域の配列例, 中段;MEME による 8 bp スケールでの塩基配列モチーフ(Weblogo 表示), 下段;ランダム領域の配列概略図。灰色は A/T-rich な配列領域。(A) 50 °C, (B) 37 °C, (C) 25 °C。

4. SELEX DNA の熱力学的な相互作用解析

50 °C と 25 °C の SELEX で選択された DNA 配列 (50 °C ; oligo50, 25 °C ; oligo25) を用いて, ITC 測定による相互作用の熱力学的解析を行った。50 °C における測定の結果, oligo50, oligo25 とともに同程度の結合定数 ($K_d = 10^5 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$) が得られた (表 1)。しかし熱力学的パラメータに関しては, oligo25 の方がエンタルピー的に有利な値を示した。25 °C においても同様の結果が得られ, oligo50 と oligo25 は *Pho*TBP に対する結合親和性に温度によって有意な差がないことが明らかとなった。各測定温度における熱量変化 ΔH° の値をプロットしたところ, oligo25 と oligo50 では比熱容量変化 ΔC_p に相違がみ

られた(図 4, oligo50-1: $-0.43 \text{ kcal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$, oligo25-1: $-0.49 \text{ kcal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$)。これは *PhoTBP* との相互作用において, oligo50 と oligo25 では水和変化に違いがあることを示唆する。また測定温度 25°C においては, 熱量変化 ΔH° が直線プロット上に乗らず, *PhoTBP* の構造変化に違いがあることが示唆された。

表 1. SELEX で選択された塩基配列 DNA と *PhoTBP* 間の相互作用における熱力学的パラメータ

<25 °C-selected DNA>					<50 °C-selected DNA>				
oligo25-1 GTCGAGTCGTTTATAAGCTACTCTTATATTGCACAAATGTAC					oligo50-1 GTCGAGTCATTTTAAAGGCCTTTTAAATAGTCGCAATGTAC				
oligo25-2 GTCGAGTCATATAAAGCTACACTTATATTGTACAAATGTAC					oligo50-2 GTCGAGTC TTTTAAATAGTACTTTTAAAGAAACAATGTAC				
oligo25-3 GTCGAGTCGATTATATATTTCAATTATAAAGCAATGTAC					oligo50-3 GTCGAGTC TTTTAAATCGATTGT TTTAAACAATGTAC				
<measurements at 25 °C >					<measurements at 50 °C >				
sample	N	K_a	ΔH°	ΔS°	sample	N	K_a	ΔH°	ΔS°
		10^6 M^{-1}	kcal mol^{-1}				10^6 M^{-1}	kcal mol^{-1}	
oligo25-1	1.43	0.42	18.8	88.6	oligo25-1	1.65	2.07	11.3	63.7
oligo25-2	1.05	0.15	17.6	82.8	oligo25-2	1.69	0.98	14.9	73.6
oligo25-3	1.20	0.23	21.5	96.6	oligo25-3	1.93	1.14	14.2	71.8
oligo50-1	1.57	0.27	22.3	99.6	oligo50-1	1.80	3.27	16.6	81.2
oligo50-2	1.78	0.20	22.5	99.6	oligo50-2	2.30	2.03	16.6	80.1
oligo50-3	0.56	0.10	31.9	130	oligo50-3	1.84	0.97	16.7	78.9

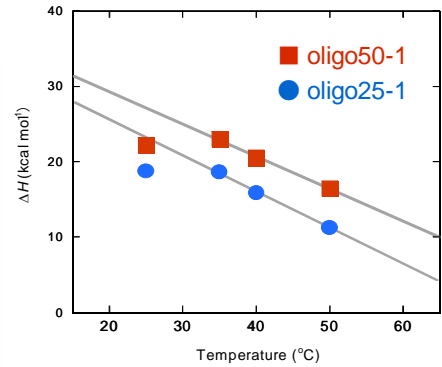


図 4. oligo50 と oligo25 の熱量変化 ΔH° の温度依存性

5. SELEX DNA の塩濃度依存性

SELEX DNA と *PhoTBP* 間の相互作用において, oligo50 と oligo25 では水和変化に違いがあることが示唆された。そこで塩濃度 (NaCl) 変化における各相互作用の結合定数を算出し, $\log[\text{NaCl}]$ を x 軸に, $\log K_a$ を y 軸にプロットし, 以下の式(1)による fitting を行うことで, 係数 A よりイオンの挙動 (正の値; イオンの放出, 負の値; イオンの取込み) が, 係数 B より水分子の挙動 (正の値; 水分子の放出, 負の値; 水分子の取込み) をパラメータとして算出でき^[3], これより相互作用特性の比較を行った。

$$\log K_{\text{obs}} = \log K_{\text{obs,1M}} - A \log[\text{NaCl}] + 0.016B [\text{NaCl}] \quad (1)$$

高温として 50°C , 低温として 37°C を設定し, oligo50-1 と oligo25-1 を用いて解析を行った(図 5)。表 2 より, oligo50-1 は 50°C においてわずかなイオンの取込み ($A = -0.51$) と共に多くの水分子の放出 ($B = 28$) があったのに対し, 37°C では水分子はあまり放出されず ($B = 8$), イオンの取込みが増加する ($A = -2.28$) ことがわかった。逆に, oligo25-1 では 37°C においてわずかなイオンの取込み ($A = -0.40$) と多くの水分子の放出 ($B = 41$) があったのに対し, 50°C ではイオン, 水分子ともに取込ま

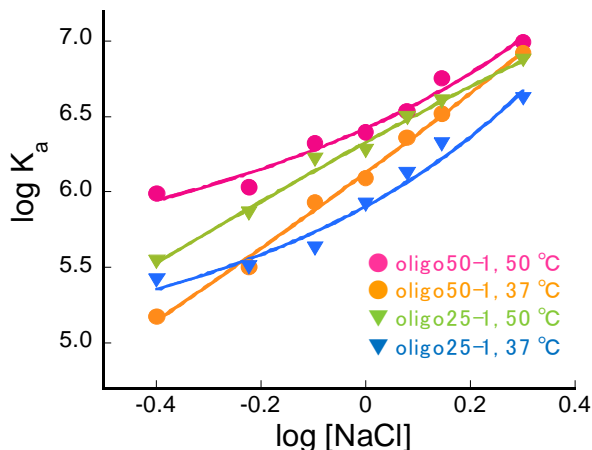


図 5. *PhoTBP* と SELEX DNA 間の相互作用における NaCl 濃度変化に伴う会合定数 K_a 変化

表 2. 図 5 から式 1 より算出した係数 A, B の値

sample	Ions (A)	Water (B)	$\log K_{\text{ref}}$
oligo50-1, 50°C	-0.51	28	5.97
oligo50-1, 37°C	-2.28	8	6.00
oligo25-1, 50°C	-2.34	-11	6.53
oligo25-1, 37°C	-0.40	41	5.25
ScTBP (酵母)	3.45	71	5.00
PwTBP (古細菌)	-2.12	39	5.70

れる (A = -2.34, B = -11) ことが分かった。以上の結果は、本実験の SELEX ではより多くの水分子を放出する塩基配列 DNA が選択されていることを示す。TBP は二本鎖 DNA と相互作用するために脱水反応を必要とする。従って十分な水分子の放出による TBP の DNA 結合は、より安定な複合体を形成すると考えられる。TBP-DNA 複合体における DNA の構造変化に関して更なる詳細な解析が必要である。

6. ゲノム配列における生物学的意義

TBP のゲノムコンセンサス配列に関して、生育温度の異なる好塩古細菌や真核生物(常温環境)と、高熱菌を含む古細菌(高温環境)では塩基配列の特徴が異なることが知られている(図 6) [4]。本実験の SELEX 解析の結果である、高温では TTTA、低温では TATA という配列傾向は、図 6 の環境の異なる生物種間のコンセンサス配列の違いと類似している。古細菌のゲノム配列においても [1], 常温環境下では YR または RY 配列が多く存在し、これは TATA 配列に相当する。逆に高温環境では YY または RR 配列が多くなり、これは TTTT(AAAA)配列に相当する。つまり生物種間での TBP コンセンサス配列の違いは、生育環境における温度因子に寄与した配列特性の違いを反映していると考えられる。

	1	2	3	4	5	6	7	8
古細菌(好熱菌を含む):	T	T	T	A	a/t	A	N	N
好塩古細菌:	T	T	a/t	a/t	A	N	N	N
真核生物:	T	A	T	A	a/t	A	a/t	a/g

図 6. 生物種間で異なる TBP のゲノムコンセンサス配列

7. おわりに

*Pho*TBP は温度の違いでその塩基配列特性が変化することが明らかとなった(25 °C : TATA 配列, 50 °C : TTTA 配列)。DNA も蛋白質と同様に特有の構造を形成し、特異的な機能を果たしていることが明らかとなってきている。本研究はまだまだ不十分な実験量ではあるが、これらの結果からも、ゲノム DNA をただのひも状の遺伝情報物質としてのみ捉えるのではなく、DNA 自身もある塩基配列によって構成される固有の分子特性があり、環境因子に適応して蛋白質らと特異的に相互作用し機能を果たす高度な機能性高分子であると考えられる。RNA とともに、核酸分子の更なる機能解明が生命現象を紐解く新たな鍵となることを期待したい。

謝辞

本研究は、東京大学大学院新領域創成科学研究科の津本浩平准教授の親身なご指導のもと、また日本学術振興会の支援(学術振興特別研究員)のもと行われました。厚く御礼申し上げます。研究遂行においては常に温かく支えて頂いた東京大学津本研究室の皆様に深く感謝いたします。

参考文献

- [1] T. Kawashima, N. Amano, H. Koike, S. Makino, S. Higuchi, Y. Kawashima-Ohya, K. Watanabe, M. Yamazaki, K. Kanehori, T. Kawamoto, T. Nunoshiba, Y. Yamamoto, H. Aramaki, K. Makino, and M. Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, (26), 14257-14262 (2000).
- [2] G. A. Patikoglou, J. L. Kim, L. P. Sun, S. H. Yang, T. Kodadek, and S. K. Burley, *Genes Dev.* **13**, (24), 3217-3230 (1999).
- [3] S. Bergqvist, M. A. Williams, R. O'Brien, and J. E. Ladbury, *Structure* **10**, (5), 629-637 (2002).
- [4] J. R. Palmer, and C. J. Daniels, *J. Bacteriol.* **177**, (7), 1844-1849 (1995).

カテコールジオキシゲナーゼの反応機構に対するモデル研究

同志社大学理工学部 人見 穰

1. はじめに

言うまでもなく分子状酸素を用いた酸素添加反応は過酸などの酸化剤を用いる酸素添加反応よりも理想的な反応である。この究極の酸素化反応が生体内では、いとも簡単に行われている。もちろん、我々の体内においても。これらの反応の主は活性中心に遷移金属イオンを含む酵素、金属酵素である。この生体内で行われる酸素添加反応のメカニズムを解明するために、金属酵素の金属活性中心を模した金属錯体を作り、酵素反応のシミュレーションから反応機構を解析する研究（機能モデル研究）は、今尚、生物無化学研究の主要な一分野を形成している。酸素に関わる金属タンパク質の活性中心として鉄イオンと銅イオンが最もよく知られているが、これらの中でもポルフィリン鉄錯体を有する Cytochrome P450 は、酸素添加酵素として最も研究されてきたと言える。鉄イオンを含有する同様の酸素添加酵素には、二核鉄を有するメタンモノオキシゲナーゼ(sMMO)が存在するが、単核鉄イオンを活性中心に有する単核非ヘム鉄酵素も多く存在する。その多くが 2 His-1 Carboxylate Facial Triad と呼ばれる配位構造を有し、鉄 2 価イオンを有している。Cytochrome P450、sMMO、鉄 2 価依存性が酸素活性化酵素と称されるのに対して、基質活性化酵素として分類されてきた酸素添加酵素が存在する。それが、我々がモデル研究を継続してきた鉄 3 価依存性カテコールジオキシゲナーゼである。

2. カテコールジオキシゲナーゼとは？

カテコールジオキシゲナーゼは 1955 年、早石修らが $^{18}\text{O}_2$ を用いて酸素分子がカテコールの芳香環に直接挿入されることを証明し、基質には水の酸素が挿入するとしていた「脱水素学説」を覆し、酸素添加酵素の存在を確立した記念すべき酵素である¹⁾。この酵素は土壌バクテリアによる芳香族化合物の代謝において中心的な役割を果たす酵素であり、芳香環を酸素化開裂し脂肪族化合物に変換する反応を触媒する。この酵素には、Fe(III)を活性中心とするものと Fe(II)を活性中心とする 2つのタイプがあり、前者は Intradiol 型開裂、後者は Extradiol 開裂を行う(図1)。Extradiol 型酵素は、多くの単核非ヘム鉄酵素に見られる 2 His-1 Carboxylate Facial Triad 配位構造を有する。一方、我々の研究対象である Fe(III)を活性中心とする Intradiol 型酵素の結晶構造は Ohlendorf らによって 1987 年に 2.8 Å の解像度で発表され、1994 年には 2.15 Å の解像度まで上げられている²⁾。休止状態では、二つの Tyrosine、二つの Histidine が配位するが、基質であるカテコールのキレート配位に伴い、一つの Tyrosine (Tyr447)が解離する。また、この鉄 3 価カテコール錯種が分子状酸素と反応する活性種であることが分かっている。我々が最も興味を持っているのはこの点にある。ヘム酵素で見られるように、分子状酸素と反応するのは鉄 2 価種である。鉄 3 価錯体が如何にして分子状酸素と反応するのか？教科書や多くの総説³⁾に見られるように、鉄 3 価依存性カテコールジオキシゲナーゼは果たして基質であるカテコールを活性化して酸素添加を行うのだろうか？2002 年、米国留学から帰国し、京都大学大学院分子工学専攻の船引研究室に助手として着任した筆者はこの問題の検証から研究をスタートさせた。

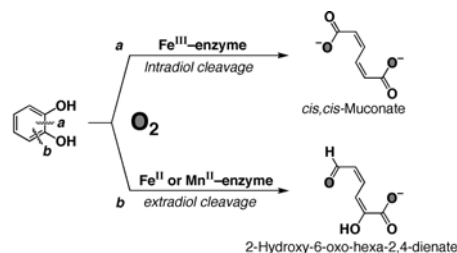


図1. カテコールジオキシゲナーゼによるカテコールの酸素添加開裂

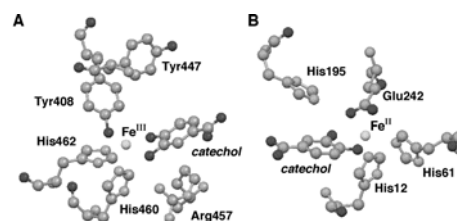


図2. Intradiol 型酵素(3PCA)と Extradiol 型酵素(1B4U)の X 線結晶構造

2. カテコールか鉄か？

1983年に船引卓三らは、Fe(III)イオンと bipyridine と pyridine との混合系が分子状酸素によるカテコールの酸素化開裂を行うことを世界に先駆け報告している⁴⁾。この場合、Intradiol 型だけでなく、Extradiol 型の酸素添加開裂生成物も得られるが、1991年、L. Que, Jr.らが、窒素四座三脚型配位子 TPA (tris(pyrid-2-ylmethyl)amine)からなる鉄3価カテコール錯体が、DMF 溶液中、分子状酸素と一分以内に反応し、選択的に Intradiol 型の酸素添加開裂生成物を与えることを報告して衝撃を与えた⁵⁾。また、彼らは、この錯体が鉄3価イオンからカテコール配位子への電荷移動(LMCT)吸収帯を可視領域に示しカテコール配位子がセミキノンラジカル性を帯びていること、Fe(III)イオンが配位飽和であることなどを捉え、ラジカル性を帯びたカテコール配位子と分子状酸素が直接反応すると唱えた(基質活性化機構)。

この反応機構は、酵素およびモデル研究者の間で広く受け入れられていたが、我々は“酸素が活性中心である鉄に直接反応する経路(酸素活性化機構)”の可能性を念頭に、酸素付加の段階に関する LMCT 吸収帯と反応速度の相関の詳細な検討に着手した。その結果、種々のカテコールを用いて $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPA})(\text{cat})]\text{BPh}_4$ 錯体を合成し、LMCT 吸収帯のエネルギー値と酸素との反応速度の対数値の間に良好な直線関係が存在することを見いだした(図4)⁶⁾。この結果より、鉄2価セミキノン性と反応速度との間に密接な関係が存在することが確認できたが、同時に、3,5 位に置換基を有する 3,5-di-*tert*-butylcatechol とほぼ同じ LMCT 吸収帯のエネルギーを持つ構造異性体 3,6-di-*tert*-butylcatechol の反応速度が著しく小さいという興味深い結果も得た。この反応速度の差は立体障害が関与していると考え、分子モデルで検討した結果、酸素分子がカテコール配位子に接近する場合には立体障害は生じないが、鉄に近づく場合には 3,6-di-*tert*-butylcatechol 錯体でのみ大きな立体障害が生じ、これが大きな反応性の低下の原因であると考えられた。

さらに、我々は、鉄周辺の立体的因子だけでは不十分と考え、反応速度に対する電子的効果からも酸素活性化機構を支持する情報を得るために、立体的因子を無視できる新しい系を構築した⁷⁾。すなわち、pyridine の4位に様々な置換基を導入した TPA 配位子を用いて 4-クロロカテコール錯体を合成し、酸素との反応速度を測定した。図5に示すように、LMCT 吸収帯のエネルギー値と反応速度の対数値の間に極めて良好な直線関係を示すことができたが、ニトロ基を有する TPA の場合はこの直線から負の方向へ逸脱するという結果が得られた。これまでに報告されていた鉄3価カテコール錯体が高スピン状態であるのに対し、ニトロ基を導入した錯体は低スピン状態を含むことから、スピン状態による反応性の違いが直線関係からの負の逸脱の原因と考えられた。最近、我々は、酸素との反応性が高い 3,5-di-*tert*-butylcatechol を用いて、溶液状態において 100% 近く低スピン状態をとる鉄3価カテコール錯体を合成することに成功しているが、この錯体の酸素との反応速度は高スピン状態の錯体に比べ 1/100 以下である。これらの低

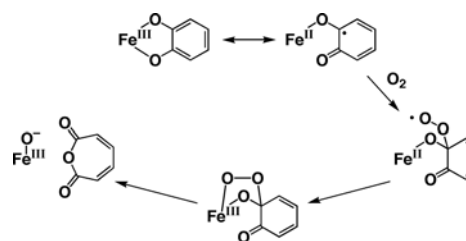


図3. 基質活性化機構

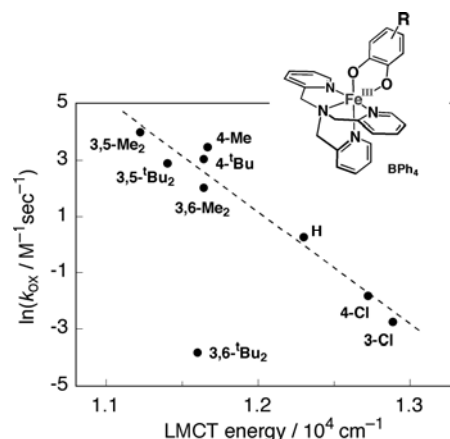


図4. $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPA})(\text{cat})]^+$ 錯体の酸素との反応速度と LMCT 吸収帯との相関

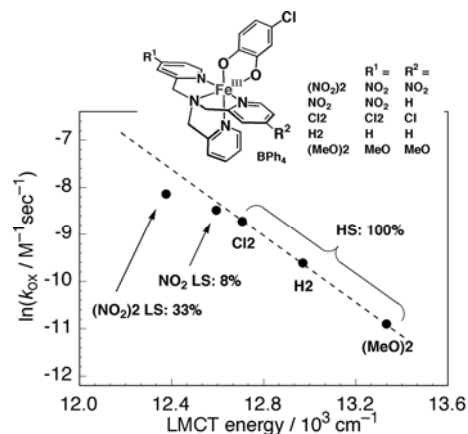


図5. $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{R-TPA})(4\text{Cl-cat})]^+$ 錯体の酸素との反応速度と LMCT 吸収帯との相関

スピン状態の鉄3価カテコール錯体の電子吸収、NMR、EPR スペクトルは、これらの錯体が非常に大きな鉄2価セミキノン性を有することを示し、基質活性化機構とは矛盾が生じる。正に、我々の得た結果は、Fe(III)と結合しラジカル性を有するようになったカテコール配位子が分子状酸素と反応するとする基質活性化機構ではなく、図6に示すような酸素付加過程に鉄中心が深く関わる新しい反応機構の必要性を示すものである。

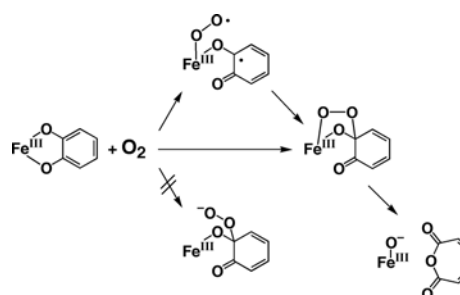


図6. 新しい反応機構の提案

3. 酸素付加体の発見

鉄2価依存性酵素では活性中心であるFe(II)へ酸素が付加すると考えられ、酸素存在下でのカテコール結合体の結晶構造解析により酸素結合位置に関する情報も得られている。一方、鉄3価依存性酵素では、結晶構造解析によりカテコールがキレート配位した基質複合体には、配位空座が存在することが確認できる(図2)。酸素付加反応中間体の形成がストップフロー法により観測されてはいるものの、そのキャラクタリゼーションは依然進んでいない⁸⁾。一方、モデル鉄錯体に関しては、Yoon らが直線型3座配位子を用いて鉄3価カテコール錯体を調製し、酸素との反応で緑色の反応中間体の形成を観測しており、EPR 測定から反応中間体は低スピン鉄3価種スピン状態であることをいち早く示している⁹⁾。我々は、鉄イオンに配位不飽和サイトを形成すれば分子状酸素との反応を加速し反応中間体を観測することが出来ると考え、Me₃TACN (1,4,7-trimethyl-1,4,7-triazacyclononane) を用いて配位不飽和サイトを有する鉄3価カテコール錯体[Fe^{III}(Me₃TACN)(3,6-DTBC)]⁺を合成した¹⁰⁾。この錯体の酸素との反応速度は対応する配位飽和錯体と比べて著しく大きい。このことは、図7に示すように、鉄イオン上に配位不飽和サイトの存在が分子状酸素と効率良く反応する為に重要であることを示している。また、この錯体は低温で分子状酸素と可逆的に反応し、緑色の中間体を形成した。この反応中間体は吸収スペクトル、共鳴ラマン測定からセミキノン配位子を含んでいることが示唆されている。鉄3価依存性酵素のカテコール付加体や反応性を有する鉄3価カテコール錯体のFe(III)はいずれも基底高スピン状態であり、これらの錯種が三重項状態の分子状酸素とどのようなメカニズムで反応するのかに興味を持たれる。酸素付加により生成する錯体種の電子状態に関する情報が得られるようになれば、この点は明らかになると期待される。

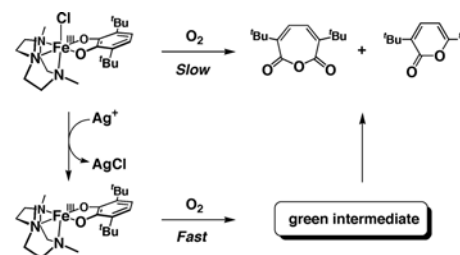


図7. 酸素付加中間体の形成

4. 酸素添加の位置を制御するもの

カテコールジオキシゲナーゼによる位置選択的酸素添加反応の機構を考察するためのモデル反応として、オルトキノンの過酸による酸素化反応に着目し、様々な条件下でのオルトキノンの1原子酸素添加生成物である無水ムコン酸と7員環 α -ケトラクトンの生成比を制御する因子を吟味した¹¹⁾。その結果、図9に示すように、Criegee 中間体の heterolytic な O-O 結合開裂により Extradiol 型生成物が生成し、homolytic な O-O 結合開裂により Intradiol 型生成物が得られることを明らかにした。Extradiol 型開裂は Baeyer-Villiger 反応機構で進行するため、転移する C-C 結合と O-O 結合が直線上に並ばなければならないという構造化学的制約 (primary stereoelectronic effect) が課される。また、酸触媒が Extradiol 型開裂を促進するという結果が得られたが、この結果は

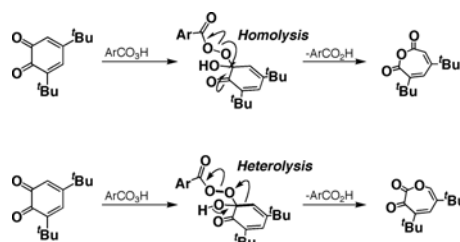


図8. O-O 結合開裂様式による酸素添加位置の相違

O-O 結合の heterolytic な開裂への酸触媒促進効果として理解される。これらの結果は、構造的な制約が満たされ、且つ、O-O 結合の heterolysis に十分な環境が整った時はじめて Extradiol 型生成物が得られ、それ以外の場合は O-O 結合の homolysis によって Intradiol 型生成物が得られることを示唆するものである(図 10)。次に、この過酸とキノン系で得られた結果が、酵素反応機構に適用できるかを考察した。鉄 2 価依存性酵素ではモノプロトン型のカテコールが 2 座キレート配位しており、このプロトンが近傍の His 残基に渡され O-O 結合の heterolysis を促進する酸触媒として働くと考えられる(図 2)。実際に、この His 残基を

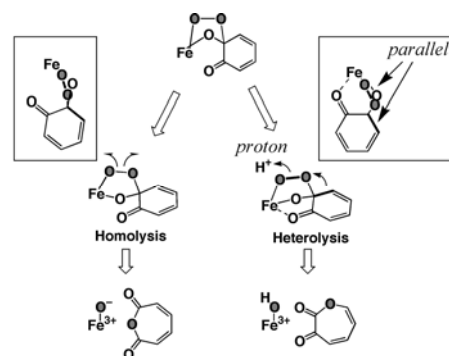


図10. O-O 結合開裂様式の制御因子

Phe 残基に変換した変異体では Intradiol 型生成物が得られている。また、酸素雰囲気下の鉄 2 価依存性酵素の結晶構造解析の結果から、鉄 2 価カテコール錯体に酸素分子が付加して生じる Criegee 中間体は O-O 結合と転移する C-C 結合が直線上に並ぶことが示されており、鉄 2 価依存性酵素は O-O 結合の heterolysis のための上記の 2 つの条件を満たすものと考えられる。逆に、鉄 3 価依存性酵素では、この二つの条件のどちらかが満たされておらず、その為に O-O 結合の homolysis が進行するものと推測される。実際に、鉄 3 価依存性酵素の活性部位には酸触媒として働くアミノ酸残基は存在しない。しかし、本来の基質とは異なる種のカテコールを用いると Extradiol 型生成物が得られるため、鉄 3 価イオンのみでも十分に O-O 結合の heterolysis を誘起できるものと推測される。従って、鉄 3 価依存性酵素は選択的に Intradiol 型開裂が進行するために O-O 結合の heterolysis を抑制する特別なメカニズムを備えているものと考えられる。最も有力なものは、Arg 残基によって誘起される Criegee 中間体の構造変化である。活性部位に保存されている Arg 残基と Criegee 中間体のカルボニル基が相互作用することによって、転移する C-C 結合と O-O 結合とが直線上に並ぶのを抑止することが可能であり、今まで不明であった Arg 残基の役割を説明することが出来る(図 2)。

謝辞

本研究は、京都大学大学院工学研究科船引卓三教授の指導のもと行われた研究の成果です。モデル研究の先陣を切ってこられた船引先生には自由に研究を展開させていただき、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、大学院生、学部生の方々に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) O. Hayaishi, M. Katagiri, S. Rotherberg, *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 5450 (1955).
- 2) D. H. Ohlendorf, P. Weber, C., J. D. Lipscomb, *J. Mol. Biol.* **195**, 225 (1987); D. H. Ohlendorf, J. D. Lipscomb, P. C. Weber, *Nature* **336**, 403 (1988); D. H. Ohlendorf, A. M. Orville, J. D. Lipscomb, *J. Mol. Biol.* **244**, 586 (1994).
- 3) M. Costas, M. P. Mehn, M. P. Jensen, L. Que, Jr., *Chem. Rev.* **104**, 939 (2004).
- 4) T. Funabiki, A. Mizoguchi, T. Sugimoto, S. Yoshida, *Chem. Lett.* 917 (1983).
- 5) H. G. Jang, D. D. Cox, L. Que, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 9200 (1991).
- 6) Y. Hitomi, M. Yoshida, M. Higuchi, H. Minami, T. Tanaka, T. Funabiki, *J. Inorg. Biochem.* **99**, 755 (2005).
- 7) Y. Hitom, M. Higuchi, H. Minami, T. Tanaka, T. Funabiki, *Chem. Commun.*, **13**, 1758 (2005); M. Higuchi, Y. Hitomi, H. Minami, T. Tanaka, T. Funabiki, *Inorg. Chem.* **44**, 8810 (2005).
- 8) C. Bull, D. P. Ballou, S. Otsuka, *J. Biol. Chem.* **256**, 12681 (1981); T. A. Walsh, D. P. Ballou, R. Mayer, Que, *J. Biol. Chem.* **258**, 4422 (1983); H. Fujisawa, K. Hiromi, M. Uyeda, M. Zozaki, O. Hayaishi, *J. Biol. Chem.* **246**, 2320 (1971); H. Fujisawa, K. Hiromi, M. Uyeda, S. Okuno, M. Nozaki, *J. Biol. Chem.* **247**, 4422 (1972).
- 9) S. Yoon, H. J. Lee, K. B. Lee, H. G. Jang, *Bull. Korean Chem. Soc.* **21**, 923 (2000).
- 10) Y. Hitom, Y. Tase, M. Higuchi, T. Tanaka, T. Funabiki, *Chem. Lett.* **33**, 316 (2004).
- 11) Y. Hitomi, H. Yoshida, T. Tanaka, T. Funabiki, *J. Mol. Catal. A: Chemical* **251**, 239 (2006).

酵素活性を検出する可視化プローブの開発

大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 水上 進

1. はじめに

近年、生きた状態において生体分子の挙動を観察するバイオイメージング技術の重要性が認識されている。とりわけ、蛍光イメージングはその優れた感度、時間空間分解能、簡便性などにより、生体分子の機能を調べる強力な手法として幅広く利用されている。蛍光イメージングによって、細胞内のシグナル伝達の研究が爆発的に進展したことを受けて、今後は生きた動物個体内での生体分子の挙動観察に注目が集まっている。しかしながら、紫外可視領域の蛍光は個体深部の観察には適しておらず、より組織透過性の高い近赤外蛍光を用いた個体イメージングが注目されている。一方、MRI (Magnetic Resonance Imaging: 磁気共鳴イメージング) は、感度や簡便性の面では蛍光イメージングに劣るものの、臨床で利用されていることから分かるように、生体深部を高解像度で撮像可能である。それゆえ、生きた動物個体内の生体分子の挙動を MRI で観察する試みが始まっている。MRI による酵素活性の可視化は、T. J. Meade (Northwestern University) らによって先駆的な研究が行われている¹⁾。彼らは、合理的にデザインしたプローブを用いて、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の胚における酵素活性を ¹H MRI で可視化している。このような MRI による酵素活性の可視化研究は、まだ報告例は少ないものの、ここ数年着実に増加している。しかしながら、¹H MRI は体内の水や脂肪などの水素原子を検出する手法であり、常にバックグラウンドシグナルが観察され、プローブシグナルとバックグラウンドシグナルとの区別が困難である。そこで、近年注目されているのが ¹⁹F MRI である。

¹⁹F は天然存在比率 100% のフッ素の安定同位体である。¹⁹F は ¹H に匹敵する高い磁気回転比を持つことから比較的高感度で NMR 測定が可能な核種である (¹H に対する相対感度: 0.83)。また、生体内には歯や骨以外にはほとんど存在しない為、内在性のバックグラウンドシグナルは全く見られない。この為、外から ¹⁹F を含むプローブ化合物を動物に投与した場合、¹⁹F MRI 測定ではプローブシグナルのみが観察されることになる。得られた ¹⁹F MRI 画像を、解剖学的情報を与える ¹H MRI 断層画像と重ね合わせることで、プローブの動物個体内での局在を調べることができる²⁾ (図1)。もし動物個体内で酵素活性を ¹⁹F MRI シグナルとして検出できれば、生きた個体内において、いつ、どのような場所で酵素活性が上昇しているかを調べることが可能となる。そこで、まず最初に加水分解酵素活性を ¹⁹F MRI シグナルへと変換する基本原理の開発を行なった。

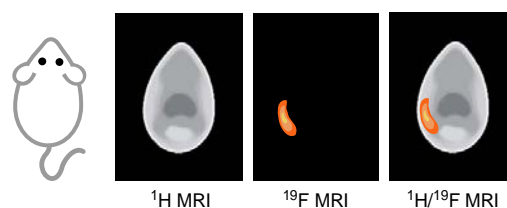


図1. ¹⁹F MRI プローブ投与マウスの ¹H MRI、¹⁹F MRI、および両者の重ね合わせイメージ図

2. 加水分解酵素活性を ¹⁹F MRI で検出する原理

MRI は、 $x \cdot y \cdot z$ 軸のそれぞれに磁場勾配をかけることで NMR シグナルを分離し、三次元画像を構築する撮像法である。それゆえ、あるボクセルの MRI シグナル強度は、ボクセル内に存在する観測核の NMR シグナル強度と等しい。NMR シグナル強度に影響を与えるパラメーターに緩和時間がある。緩和時間には、縦緩和時間 T_1 および横緩和時間 T_2 の 2 種類が存在する (図2)。NMR 現象において、共鳴周波数に相当するラジオ波を照射すると、観測核種の磁化の z 軸成分に相当する縦磁化が消失する (90° パルスの場合)。この消失した縦磁化が熱平衡状態の値へと回復する過程が縦緩和であり、元の 63% まで回復するのに要する時間が T_1 である。 T_1 が短縮されると、図2 (a) で示すようにある時点での縦磁化 M_z が大きくなる。時間 T_R 経過後に次の測定の為の 90° パルスを照射すると、発生する横磁化の大きさはその時点での縦磁化の大きさと等しいことから、短めの T_R を選択したときには T_1 が短縮すると MRI シグナルは増大する。一方、横緩和はスピンエコー法などによりエコーシグナルとして検出

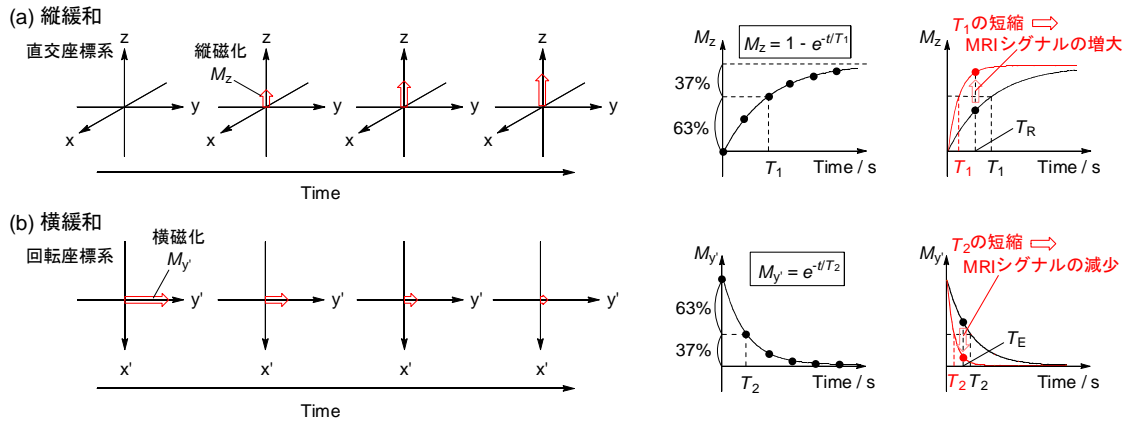


図2. 縦緩和(a)と横緩和(b)の概要とMRIシグナルへの影響

する横磁化が減衰する過程である。横緩和時間 T_2 はエコーシグナルの横磁化 M_y が最初の 37% まで減少するのに要する時間である (図 2 (b))。 T_2 の短縮は、エコー時間 T_E における横磁化 M_y の減少につながり、MRI シグナルの低下となって観測される。以上から、緩和時間は T_1 、 T_2 とともに MRI シグナル強度を制御するパラメーターであることが分かるが、酵素活性を ^{19}F MRI シグナルの増大として検出するには、①酵素反応によってプローブ (^{19}F) の T_1 を短縮させる、あるいは② T_2 を延長させる、の二通りの戦略が考えられる。我々は横緩和時間 T_2 に着目し、あらかじめ短縮させておいた T_2 を酵素反応によって延長させるシステムの開発に取り組んだ。

プローブの T_2 を短縮させる為に、常磁性緩和促進 (PRE: Paramagnetic Relaxation Enhancement) と呼ばれる現象に着目した。PRE は常磁性物質が持つ対電子スピンの影響で、近傍に存在する NMR 観測核の緩和時間が著しく短縮する現象である。常磁性金属イオンの中でも Gd^{3+} イオンは 4f 軌道に 7 つの対電子を有し、PRE 効果が非常に大きいことが知られている。すなわち、 Gd^{3+} イオンの近傍にある観測核の T_2 は大幅に短縮すると予想される。そこで、図 3 に示すように Gd^{3+} と ^{19}F を同一分子内に修飾し、両者の間のリンカー部分を加水分解酵素によって切断できれば、PRE によって短縮していた T_2 が再び延長すると考えられる。この原理により酵素活性を ^{19}F MRI シグナルの増大として検出できると考えた。

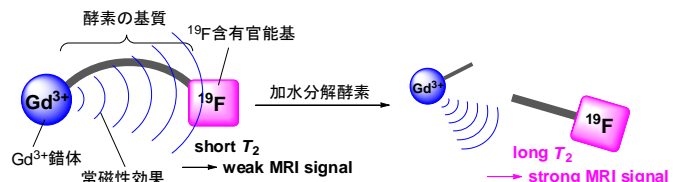


図3. 酵素活性を ^{19}F MRI で検出する原理とプローブ

Gd-DOTA-DEVD-Tfb の構造

3. Caspase-3 活性を検出する ^{19}F MRI プローブ³⁾

上記原理における MRI 観測核 (^{19}F) と常磁性核 (Gd^{3+}) の関係は、蛍光プローブのデザインで汎用されている蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer) のドナーとアクセプターの関係に良く似ている。そこで、FRET 蛍光プローブとしても報告例の多いプロテアーゼを原理の検証に用いることにした。ターゲット酵素としては基質特異性が高く、アポトーシスに関連するプロテアーゼである Caspase-3 を選択した。

Caspase-3 は高い基質特異性を有し、テトラペプチド DEVD の C 末端ペプチド結合を加水分解することから、DEVD を含むペプチドの両端に Gd 錯体と ^{19}F 含有官能基を修飾した化合物 Gd-DOTA-DEVD-Tfb をデザインした (図 4)。まず、液相法および Fmoc

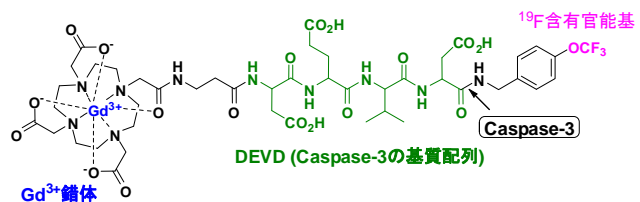


図4. Gd-DOTA-DEVD-Tfb の構造

固相法により、配位子である DOTA-DEVD-Tfb を合成し、その後緩衝液中で Gd^{3+} を配位させることで Gd-DOTA-DEVD-Tfb を合成した。

Gd^{3+} を配位させたプローブ Gd-DOTA-DEVD-Tfb の ^{19}F NMR を測定したところ、配位子 DOTA-DEVD-Tfb に比べてピークの大幅なブロード化が観測された(図 5 a)。NMR ピークの半値幅は、 $\Delta\nu_{1/2} = 1/\pi T_2^*$ で表される。ここで、 T_2^* は空間的な磁場の不均一性によって起こる位相分散を考慮に入れた実効横緩和時間のことである。すなわち、ピークのブロード化は Gd-DOTA-DEVD-Tfb の T_2^* が短縮したことを意味している。また、真の横緩和時間 T_2 をスピンエコー法により測定したところ、DOTA-DEVD-Tfb の T_2 が 326 ms であったのに対して、Gd-DOTA-DEVD-Tfb の T_2 は大幅な短縮のため正確な値は算出できなかった。また、Gd-DOTA-DEVD-Tfb は T_1 についても著しく短縮しており、こちらも算出できなかった。

次に、Gd-DOTA-DEVD-Tfb を含む緩衝液に Caspase-3 を添加したときに、 ^{19}F NMR スペクトルが変化するかどうかを調べた。酵素添加後の ^{19}F NMR のピークは、時間依存的にシャープに変化した(図 5 b)。この結果は、プローブの T_2 が酵素活性によって延長したことを示唆している。実際、スピンエコー法により T_2 を測定したところ、酵素反応が完了(HPLC によって確認)した試料では、 T_2 は 32 ms まで延長していた。続いて、このプローブを用いて Caspase-3 の ^{19}F MRI 検出を試みた。図 5 c に示すように Caspase-3 の添加によって特異的に ^{19}F MRI シグナルが増大する画像を得た。以上により、PRE 効果を利用して加水分解酵素活性を検出する ^{19}F MRI プローブの設計原理を開発し、in vitro における Caspase-3 活性検出への応用に成功した。現在、in vivo ^{19}F MRI に向けて、各条件の検討を進めている。

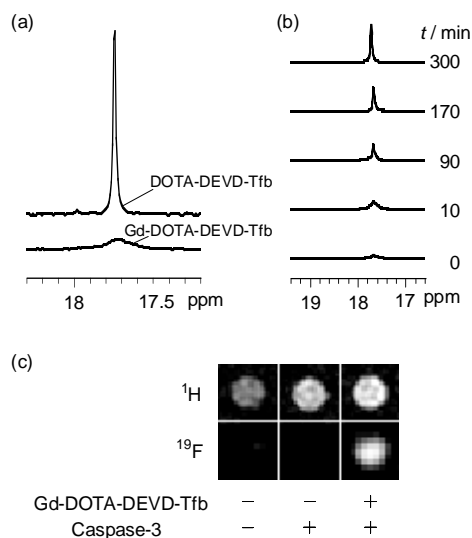


図 5 . (a) DOTA-DEVD-Tfb と Gd-DOTA-DEVD-Tfb の ^{19}F NMR スペクトル; Caspase-3 を添加による Gd-DOTA-DEVD-Tfb の (b) ^{19}F NMR 変化、および (c) ^{19}F MRI

4. 遺伝子発現を可視化する ^{19}F MRI プローブ

開発した ^{19}F MRI プローブの設計原理は、Caspase-3 活性の検出のみにとどまらず、他のプロテアーゼ、および他の加水分解酵素の検出プローブにも一般化できると考えられた。そこで、遺伝子発現を可視化するプローブの開発にも取り組んだ。 β -ガラクトシダーゼは、ラクトースを加水分解する酵素であり、大腸菌や生細胞を用いた実験系において、遺伝子発現の指標となるレポーター酵素として汎用されている。そこで、 β -ガラクトシダーゼによって加水分解されると PRE 効果が消失し、 ^{19}F MRI シグナルが現れるようなプローブ化合物 Gd-DMFP-gal を開発した(図 6)。この化合物は、 β -ガラクトシダーゼによって加水分解を受けると自動分解反応を起こし、 ^{19}F と Gd^{3+} の距離が増大するようにデザインされている。Gd-DMFP-gal を含む緩衝液に、 β -ガラクトシダーゼを加えたところ、ブロード化していた ^{19}F NMR シグナルはシャープになり、消失していた ^{19}F MRI シグナルは増大した。以上により、PRE 効果を利用してレポーター酵素活性を検出する ^{19}F MRI プローブの開発に成功した。こちらもまずは培養細胞系を用いて、レポーター酵素活性の in vivo MRI 検出に向けて研究を進めている。

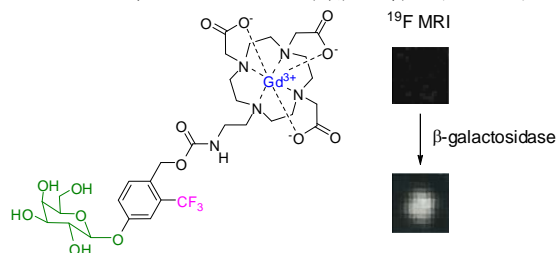


図6. Gd-DMFP-gal の構造(左)と β -ガラクトシダーゼ活性による ^{19}F MRI シグナルの変化(右)

5. 常磁性緩和促進効果の距離依存性

PRE 効果は双極子-双極子相互作用に基づく効果である。それゆえ、理論的には常磁性核と観測核の距離 R の 6 乗に反比例するはずである。この関係は FRET におけるエネルギー移動効率の距離依存性と等しい。すなわち、FRET がドナー-アクセプター間の距離変化の検出に用いられるのと同様に、常磁性核-観測核間の距離変化を PRE 効果の大きさから算出できる可能性がある。そこで $Gd^{3+}-^{19}F$ の距離をオリゴプロリンによって変化させた一連の化合物 (図 7) を合成し、 ^{19}F に作用する Gd^{3+} の PRE 効果の距離依存性について検討した。これまでに、分子内 PRE 効果により観測核の NMR 緩和速度が、分子運動を考慮に入れた補正後の距離の 6 乗に反比例して減少することを確認している。また今後は、他の希土類イオンや遷移金属イオンの PRE 効果の距離依存性に関して検討する予定である。現在、PRE 効果を利用した NMR および MRI のシグナル制御を利用して、タンパク質のコンフォメーション変化の検出など、イメージングにとどまらない様々な分野への応用を模索している。

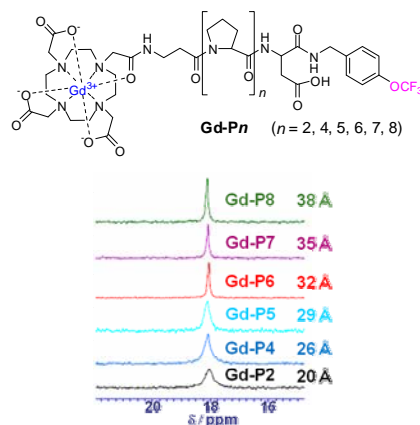


図7. PRE 効果の距離依存性の検討に用いた一連の化合物の構造(上)、およびそれらの ^{19}F NMR スペクトル(下)

6. おわりに

筆者らは、古くから知られる PRE 効果を利用して、 ^{19}F MRI で加水分解酵素の活性を可視化するプローブの設計原理を開発した。この原理は一般性を有しており、極めて多様なプローブ開発に繋がることが期待される。プローブの感度については、現段階では実用化に立ちほだかる壁であることは否定できない。しかしながら、近年の MRI 装置の進歩による感度の向上は目を見張るものがあり、高速撮像法の開発も盛んである。また、化学的なアプローチによるプローブの高感度化の研究も着実に進められている。化学者は装置や撮像法の開発に直接的に携わることは難しいが、新たなプローブを開発し需要を生み出すことにより、間接的に装置開発の進歩に貢献しているとも言える。大きなポテンシャルを有する MRI を分子イメージングの汎用技術へと育てる鍵の一つは化学者が握っていると感じつつ、日々研究に取り組んでいる。

謝辞

本研究は、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻・菊地和也教授が代表を務める科学技術振興調整費「科学技術連携施策群の効果的・効率的な推進」プログラム (課題名: 生体内分子を可視化するナノセンサ分子) の一環として行われました。菊地先生には常日頃から多大なる御支援・御指導を頂いており、ここに厚く御礼申し上げます。また、本研究の実験の多くを行って頂いた大学院生の滝川利佳氏および辻慎太郎氏、NMR および MRI の理論および実験で大変お世話になりました京都大学大学院工学研究科・白川昌宏教授ならびに朽尾豪人准教授、横浜市立大学大学院国際総合科学研究科・杉原文徳氏、ブルカーバイオスピニング株式会社・Markus Wälchli 博士、大阪大学大学院工学研究科・堀雄一郎博士、および多くの関係者の方々に深く感謝致します。

参考文献

- 1) A. Y. Louie, M. M. Hüber, E. T. Ahrens, U. Rothbächer, R. Moats, R. E. Jacobs, S. E. Fraser, T. J. Meade, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 321–325.
- 2) E. T. Ahrens, R. Flores, H. Xu, P. Morel, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 983–987.
- 3) S. Mizukami, R. Takikawa, F. Sugihara, Y. Hori, H. Tochio, M. Wälchli, M. Shirakawa, K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 794–795.

部会行事

「第23回生体機能関連化学シンポジウム」開催報告

実行委員長：東京工業大学大学院生命理工学研究科 岡畑 恵雄

9月18日(木)から20日(土)の3日間に渡って、東京工業大学すずかけ台キャンパス(横浜市緑区)で、第23回生体機能関連化学シンポジウムが第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との共催で、第3回バイオ関連化学合同シンポジウムとして開催されました。

今回の合同シンポジウムでは、口頭発表138件、ポスター発表256件、企業等によるATP発表12件の講演がありました。合同シンポジウムは隔年で開いており、今回は熊本、京都に続いて3回目です。参加登録者も615名にのぼり、多くの方々に参加していただき、活発な議論が行われました。

今回からweb上での参加・講演申込と予稿の投稿、さらには連絡をすべてメールで行うシステムに変えました。おかげで主催者としては負担が軽減されましたが、不慣れな点もあり、申込漏れなどで一部参加者の皆様にご迷惑をお掛けしました。次回までにシステムをよりよいものに改良したいと思います。

研究発表の内容は、合同シンポジウムということもあり、核酸・遺伝子、糖鎖・脂質、ペプチド・酵素・タンパク質、分子認識・超分子、センサ・イメージング、金属錯体、細胞、と多岐にわたりました。日本化学会のバイオ部門が集結しているという印象を強く感じました。特にポスター会場は3日間とも超満員で活発な議論が行われていました。

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、大阪大工・水上 進氏、東京大新領域・長門石曉氏、岡山大自然・瀧 真清氏、同志社大理工・人見 穰氏の4人が選ばれました。

今年は台風13号の影響でシンポジウム初日から雨模様で、2日目には台風が関東に接近するという事態になり、やきもきました。台風による雨は2日目の懇親会終了後くらいから強くはなりましたが、3日目には台風一過の秋晴れになり、ほっとしました。すずかけ台キャンパスは都会からは少し離れたところにあるので、懇親会はお金をかけてがんばった甲斐があり、参加者の皆様には好評でした。

来年の第24回シンポジウムは九州大学の成田吉徳先生、片山佳樹先生のお世話でバイオ部会シンポジウムと連携して福岡で9月に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ご協力いただきました日本化学会部会担当の高橋学様、運営にご尽力いただきました東工大・生命理工の実行委員の先生方や職員および学生の方々に深く感謝致します。



口頭発表会場の様子



実行委員長の挨拶



ポスター会場の様子

第3回バイオ関連化学合同シンポジウム講演賞

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

日本化学会生体機能関連化学シンポジウムでは講演賞を3ないし4件選定しています。今回は、日本化学会バイオ関連2部会、2研究会の合同シンポジウムということで、これまで以上に広い分野の講演が選考対象になりました。応募件数は14件で、ほぼ丸一日を審査に費やしたことになります。

応募された皆さんの発表は、どれもよく準備されており、内容的にも高いレベルでした。従って、講演賞受賞者と残念ながら選考されなかった方々のポイントの差は非常に小さく、今回受賞を逃した皆さんには、来年度も積極的にチャレンジしていただきたいと思います。あえて、受賞された皆さんが優れていた点を挙げるとすれば、講演全体が「一つの研究課題に対して、全身全霊を傾けて、とことん突き詰めていく迫力」が強く感じられたということです。

今回の審査対象者を含めて、全体の発表で気になった点について述べさせていただきます。1) 専門家以外の人間には理解できない略号の使用が結構目に付きました。特に、今回のシンポジウムのように参加者が広い分野にわたる学会では、聴衆を意識したプレゼンテーションを心がけていただきたいと思います。2) 「今やっている研究の意義」、「どのような問題点をこの研究で解決しようとしているのか」等が十分に説明されないまま、ご自分の研究結果に入ってしまう発表も相当数ありました。せっかくの研究の価値が伝わらない結果となりますので、十分注意して発表の準備を御願ひしたいと思います。

なお、審査にご協力いただいた6名の先生方に深く御礼申し上げます。

受賞講演者-発表演題（五十音順、敬称略）

瀧 真清（岡山大院自然）

「L/F-蛋白質転移酵素と新規蛍光基質とを用いた蛋白質 N 末端特異的標識」

長門石 暁（東大院新領域）

「超好熱性蛋白質に対する温度に対応した DNA の相互作用特性」

人見 穰（同志社大理工）

「カテコールジオキシゲナーゼの反応機構に対するモデル研究」

水上 進（阪大院工）

「酵素活性を検出する MRI プローブの開発」

部会行事

第 23 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 朝倉 則行
東京工業大学大学院生命理工学研究科

第 23 回 生体機能関連化学シンポジウム若手フォーラムは、若手の会関東支部が幹事となり、9月17日（水）に東京工業大学すずかけ台キャンパスにて開催されました（関東支部幹事：葛谷明紀（東大先端研）堤 浩（東京医科歯科・生体材料）朝倉則行（東工大生命理工））。

翌日にバイオ関連化学合同シンポジウムを控えた忙しい中、皆様にご参加いただき、盛況の中で無事終了しました。学生の参加も多く、若手の会として非常に嬉しく思っています（参加人数 講師：4名、一般16名、学生59名の計75名）。

午後2時から4名の先生、細谷孝充先生（東工大生命理工）、上田宏先生（東大院工）、相澤康則先生（東工大バイオセンター）、村田智先生（東大院総合理工）にご講演いただきました。

午後5時からは、懇親会と並行してポスター発表（32件）を行いました。多数の素晴らしい発表の中から、特に優れた学生にポスター賞が授与されました。受賞者は、内之宮 祥平さん（京大院工）、木村真弓さん（東大先端研）、西岡英則さん（名大院工）以上の3名です。

最後になりましたが、本フォーラムを開催するにあたり、日本化学会生体機能関連化学部会からのご支援いただきましたこと感謝いたします。また、若手の会の運営に際してご協力くださいました日本化学会企画部 高橋学様に心より御礼申し上げます。



ニュースレター Vol. 23, No. 3 2008年11月30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：片山佳樹, 依馬 正, 塩谷光彦