

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. 28, No.3 (2014. 1. 23)

## 目 次

◇ 巻頭言	
・「機能」＝「化学」	伊東 忍 1
◇ 研究紹介	
・リンゴ果実におけるマイコパラサイト現象の 生物有機化学的研究	橋本 勝 3
・マルチブロック型交互両親媒性分子の開発と 脂質二分子膜中でのイオンチャネル形成	村岡 貴博 7
・生体分子集合体の局所構造と分子認識	松岡 茂 11
・人工細胞システム構成に役立てたい組換えプロテオリボソーム技術	湊元 幹太 15
◇ 行事实施報告	
・第7回バイオ関連化学シンポジウム実施報告 (第28回生体機能関連化学シンポジウム)	浅沼 浩之 19
・第1回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム開催報告 (第28回生体機能関連化学部会若手フォーラム)	檜田 啓 21
◇ 部会行事	
◇ お知らせ	

大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻・伊東 忍

本会が創設されてから約30年が経過し、昨年秋に第28回目のシンポジウムが名古屋大学で開催された。実は本会が日本化学会の部会になる2年前に、「第1回生体関連化学シンポジウム」(1984年)と「第2回生体関連化学シンポジウム」(1985年)が、それぞれ九州大学工学部の村上幸人先生と、東京大学工学部の吉川貞雄先生のお世話で開催されている。小生も博士課程の学生として発表させて頂いた。その後、「生体機能関連化学部会」と名称に「機能」という単語が加わり、日本化学会の部会として新たにスタートし、「第1回生体機能関連化学シンポジウム」が大阪大学工学部の田中敏夫先生のお世話で開催された。その頃の要旨集を見直してみると、殆どは手書きで書かれており、あらためて時代を感じさせられた。研究の内容は、モデル化合物(モデル錯体)を使った生体反応や分子認識に関連する純粋な「化学」に関するものが殆どであった。その後、本会はよりバイオ色を強めて大きく発展を遂げ、現在に至っている。

私がまだ助手のころ、生体機能関連化学部会の創成期のコアメンバーであられた砂本順三先生に言われた一言が今でも頭に残っている。『最近「機能化学」って単語をよく見るけど、「機能」 = 「化学」だろ。私には、同じ意味の単語が二つ並んでいるように見えるんだ』。当時、大学院改革で多くの学部、専攻で名称の変更が検討されていた。

先日、リーディング大学院学生の間評価で学生の発表を聴いた。デバイス評価に関する発表で、「従来、無機材料が使われていたところを有機材料に変えて検討してみました」というような内容の発表であった。「って、有機材料って何を使っているのかな?」と思って聞いていたが、化合物名の省略記号が出てきて終わりであった。物理系の学生さんの発表だったので、ある程度仕方がないかもしれないが、彼にとっては、「無機材料」と「有機材料」の区別はしても、有機化合物の構造と機能の相関関係までは意識の中になかったようだ。

雑誌会やセミナーで文献を紹介するとき、化合物の構造を全く理解せず、化合物の略称記号だけを示して論文の内容を紹介する学生がいる。ひどいときには、自分の実験で使っている試薬の構造も頭に入っていない学生すらお目にかかることがある。これではダメだと思い、最近の学部授業では、「化学を学ぶ際には、必ず化合物の構造を十分に理解した上で勉強して下さい」と念を押している。

最近、ある人から愚痴を聞いた。「ケミカルバイオロジー系の予算申請書の審査をしたが、申請書の中に化学構造式が全く出て来ない申請書が沢山あった。ケミカルなのだから、少なくとも化合物の構造を意識したプロポーザルである必要が有る」との事であった。全く同感である。

最近コマーシャルで、「ポリフェノール」と言う単語を良く耳にする。私には、フェノール（ヒドロキシベンゼン）の重合体（ポリマー）としか思えないのだが、世間では、水酸基が沢山ついた環状化合物のことを意味するようだ。誰がこのような名称を使い出したのか知らないが、少なくとも化学をあまり知らない人に違いない。このような事例は他にも沢山ある。

昨今、境界領域の重要性が叫ばれる。本部会はその先駆的な組織として、上述のように1986年にスタートした。しかし忘れてほしくないことは、我々の軸足は今でも「化学」にあるということである。「機能」を創成するのは「化学」であり、化学は化合物（分子）の構造に立脚した学問であることを、特にバイオ系の分野で活躍する学生さん達に再確認してもらいたい。

## 研究紹介

### リンゴ果実におけるマイコパラサイト現象の生物有機化学的研究

弘前大学農学生命科学部 橋本勝

#### 1. 背景

チャイロミキンカク菌 *Lambertella corni-maris* (*L. corni-maris*)は、リンゴ灰星病菌 *Monilinia fructigena* (*M. f.*) に罹病したリンゴ果実上でマイコパラサイト（菌寄生）する<sup>1</sup>。本現象は寒天培地上でも菌の置き換わりとして観察され、顕微鏡下では *L. corni-maris*（パラサイト）が *M. f.*（ホスト）菌糸へ侵入している様子が観察される。この時、競争阻害は観察されず、通常の抗生物質生産では説明できない。我々は本現象の機構解明研究を展開してきた。本稿ではこれまでの成果について紹介したい。

#### 2.1. Lambertelloid 類の発見

この現象は弘前大学原田幸雄名誉教授から紹介いただいた。同時に 2 種のマイコパラサイト、*L. corni-maris* 及び *Lambertella* sp.1346 (*L. sp.* 1346) をご恵与いただいた。両菌とも同様な症状を示すリンゴ果実から単離された。前者は寒天培地上で *M. f.* と対峙培養しても容易に混じり合うが、しばらくすると培養シャーレの何処からでも *L. corni-maris* しか単離されない。一方、後者は対峙培養により *M. f.* の成長を阻害する。本研究では、これら 2 つの菌を用いたことがさまざまな点で幸いした。実験開始当初はマイコパラサイト現象機構について両菌の関連性は未知であった。そこで、成長の速い *L. sp.* 1346 を用いて実験を開始した。その結果、培養液から既知の *lambertellin* (**3**) と共に新規プレノリド *lambertellois* A (**1**) 及び B (**2**) を単離構造決定した (図 1)<sup>2</sup>。興味深いことに、*L. corni-maris* の場合、通常の培養ではこれら物質は痕跡量しか検出されず、これら物質のマイコパラサイト現象との関連性に疑問が生じた。しかし、ホスト *M. f.* と共培養することにより **1, 2** の検出量が著しく増大したことからこれら化合物は共通したマイコパラサイト現象に関連した物質であると推定した。ホスト *M. f.* の培養液は pH3.5 の酸性を示したことから、塩酸などの酸を添加して *L. corni-maris* を培養したところ、ホストと共培養したときと同程度に **1, 2** が検出されることも明らかにした<sup>3</sup>。また構造決定研究の過程で、図 2 に示した機構により、**1, 2** は容易に中間体 A を経由して **3** に分解することも明らかにした。さらに、最近 **1, 2** の全合成に成功し、これより天然物の鏡像体や安定誘導体を生物活性試験に供することが可能になった<sup>4</sup>。その結果、真の活性体は **3** であり **1, 2** は拡散容易な前駆体であることが判明した。研究初期段階では、**3** が形成する *M. f.* の阻止円が小さいことから関連物質から除外していたが、これは **3** の結晶性の高さのため、周辺に拡散しなかったことが原因であると結論した。

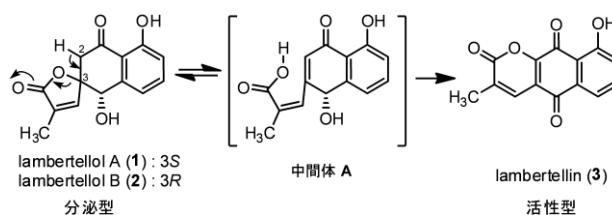


図 2. *lambertelloid* A (1), B (2) の構造と *lambertellin* (3) への分解機構

#### 2.2. 非酵素的な 1, 2 の 3 への変換速度.

*Lambertelloid* 類(**1, 2**)は非酵素的に **3** に分解される詳細を検討した。**3** の UV 吸収極大である 430nm で追跡したところ、酸性条件 (pH 4.5, 5.5) では **2** は比較的安定で **3** の生成速度は小さい。しかし、中性～弱塩基性 (pH 6.5, 7.5) では **3** の生成速度は著しく増大した。吸光度 1.3 付近で **3** の生成が停止し

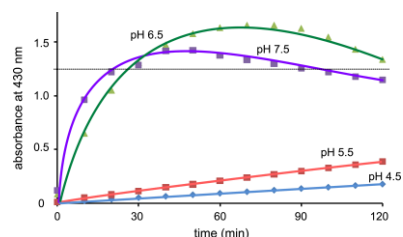


図 2. pH による 2 から 3 の生成速度

たように見えるのは飽和のためである。この結果は、先の実験で *L. corni-maris*, *L. sp. 1346* いずれの場合においても、酸性条件下でのみ **1, 2** を検出したことに矛盾しない。

### 2.3. パラサイト *L. corni-maris* による **3** の生分解

Lambertellin (**3**)の検出量は常に lambertelloid 類の 5%前後であった。**3** が **1, 2** の分解物であるならば蓄積されるはずで、前項の結果だけでは説明できない。著者らは、**3** は生産者である *Lambertella* 自身によって分解されるのではと予想して実験を行った。いうまでもなく **3** は安定物質であり 24 時間後もその量は全く変化しない(図 3)。一方、パラサイト *L. sp. 1346* 培養液をスポイトで添加した場合、24 時間後にその量は著しく減少した。また、メンブランフィルター(GHP 0.45  $\mu\text{m}$ )を通して培養液を添加した場合はその量はほとんど変わらなかった。正確にはわずかに **3** の量が減少したが、これはフィルターで菌を完全に除くことができなかつたためと判断した。実験では培養液を、酸性化により **1, 2** を安定化して *denovo* **3** の影響が小さくなる *L. sp. 1346* を用いて実験を行ったが、*L. corni-maris* を用いた場合も同様な傾向を観測した。以上の結果から、パラサイトは **3** を生分解することが判明した。

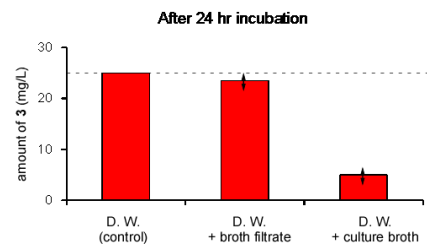


図 3. *Lambertella sp. 1346* による **3** の分解。

### 2.4. 生産者 *L. corni-maris* に対する **3** の毒性。

*Lambertella* 属菌が自身の作った **3** を分解する理由について、**3** はホストのみでなく生産者であるパラサイトに対しても毒性を示すためと考え、**3** の菌成長に与える影響を調べることにした。糸状菌の成長速度を培養液の濁度などで測定することは難しい。そこでコロニー堆積の増加を測定することとした。コロニーを壊さないようにゆっくりした攪拌で培養し、時間ごとにフラスコの底から、定規でコロニーの長径 ( $diameter_{major}$ )と短径 ( $diameter_{minor}$ )を、それぞれの実験開始時ともとの比で求め、相対体積を換算して成長を追跡した。実験は成長の速い *L. sp. 1346* を用いた。前述したように、*L. sp. 1346* は **3** を分解するため時間と共に減少する。そこで、一定時間ごとに **3** を追加しながら実験を行った。結果を図 4 に示したが、通常条件ではコロニー堆積は順調に増大するのに対し、**3** を添加するとその成長は著しく阻害された。また、途中 (48 時間後) で培地を新しい通常のものに交換すると成長が再開されることを観察した。*L. corni-maris* を用いても実験を行ったが、ほぼ同様な結果が得られた。以上のように **3** は生産者である *Lambertella* 属菌に対して毒性を示すことが明らかになった。パラサイト *Lambertella* 属、ホスト *M. f.*はともにキンカク菌科に属する。恐らく、互いに生体システムは類似しており、ホストにのみ選択的に毒性を示す代謝物を得ることができず、進化の過程で、両者に毒性を示す **3** を分泌し自身は解毒分解する方法を獲得したのではないかと想像した。

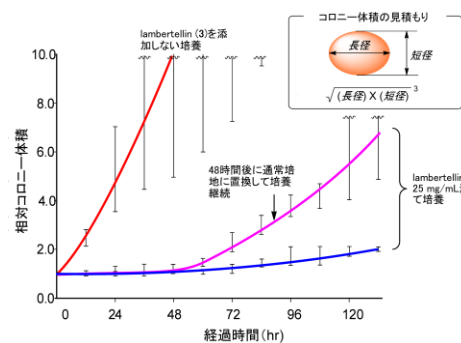


図 4. Lambertellin (**3**, 25  $\mu\text{g/mL}$ )の *L. sp. 1346* の成長に与える影響. ( $n=3$ )

### 2.5. *L. corni-maris* による恒常的な lambertelloid 類の生産

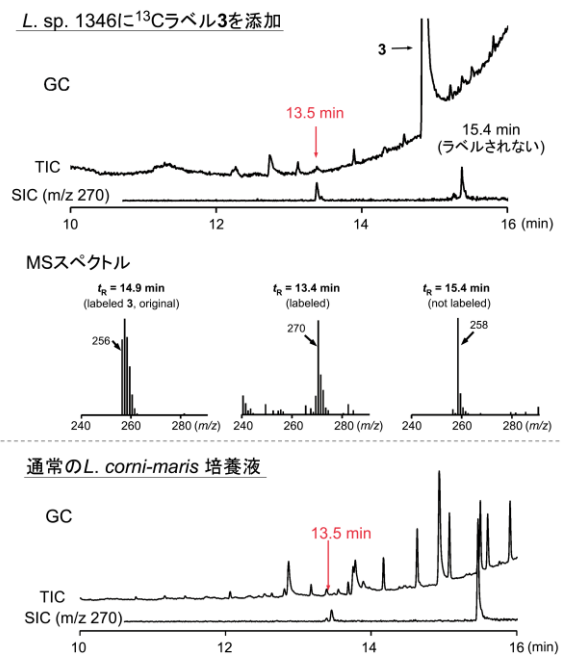
研究の初期段階では、ホストの存在が **1, 2** の生合成を刺激すると考えていた。しかし、**1, 2** が恒常的に生合成されているとした場合も、ホスト不在条件で活性型 **3** への変換が直ちに起き、続く自身による生分解も十分に速いとすれば、ホスト不在条件で **1-3** の検出量が小さくても矛盾しない。これらが痕跡量となるホスト非存在下で **3** の分解物を検出することができれば、後者仮説の実験的証明となる。我々はこれをラベル実験により調べることにした。

我々は、**1, 2**の生合成研究の過程で、これらに高レベルで<sup>13</sup>Cラベル酢酸を取り込ませる方法を確立している<sup>5,6</sup>。本手法を応用して<sup>13</sup>C取り込み率約40%のラベル**3**を調製した。このような高レベル<sup>13</sup>Cラベル化した**3**は、マススペクトルでは特徴的なアイソトポログ分布を示す。したがって、これを培養液に添加した場合、その分解物にもアイソトポログ分布は反映されると期待した。この実験で *denovo* **3**の生成はラベル化率を著しく損なう。これを最小化する目的から、酸性化により *denovo* **3**の生成が抑えられる *L. sp. 1346*を用いて実験を行った。

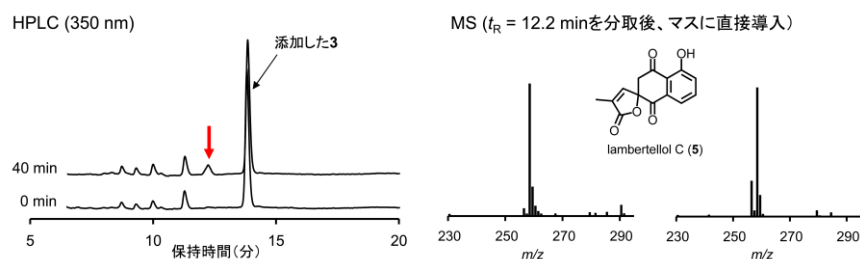
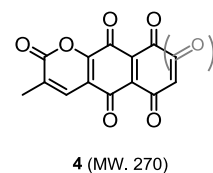
ラベル**3**を培養液に添加、40分間インキュベートした後、培養液をGCMSで分析したところ、**図5**に示したように保持時間13.5分の微小シグナルにおいて、*denovo* **3**による希釈を伴うものの、ラベル**3**のアイソトポログ分布を反映したマススペクトルを与えることが判明した。非ラベル**3**を用いた場合は、そのパターンが単純化されたことから、このシグナルは**3**の分解物の一つであると判断した。 $m/z = 270$ のSIC (selected ion chromatogram)を用いることによりこのシグナルをはっきりと確認することができた。この時、保持時間15.4分にもシグナルを与えたが、ラベル**3**を添加した場合でもそのアイソトポログ分布は全く反映されず、**3**とは無関係であることは明白である。次に、**1, 2**をほとんど与えない *L. corni-maris*の通常培養液を調べたところ、TIC (total ion chromatogram)では全く判別ができなかったものの、 $m/z = 270$ のSICで先と同じ13.5分の保持時間に同物質の明確なシグナルを与えることが判明、lambertellol類はホストの存在に関係なく *L. corni-maris*によって恒常的に生産されていることが明らかとなった。またこのシグナルはlambertellin (MW = 256)より14 u分大きいことから、**3**がオルトまたはパラキノン型に酸化された**4**の構造を推定している。

初期段階では、HPLCを用いて実験を行っていた。この時、**3**の添加により**1, 2**の酸化体であるlambertellol C (**5**)<sup>7</sup>のシグナルが明らかに増大した。*in vitro*実験では**5**から**3**への速やかな変換を確認しているが、その逆反応は酵素反応といえども構造的に考えにくい。ラベル体**3**の添加実験を行ったところ、アイソトポログ分布が全く反映されないことを確認し、**3**の添加で増大した**5**は、*denovo*体の**1**あるいは**2**から生成したと結論した。

恐らく、過剰の**3**を検出したパラサイトは、解毒すべく酸化酵素(群)を活性化するのであろう。これは推定する**4**がキノンであることも矛盾しない。この時、活性化された酸化酵素(群)の一つが**1**あるいは**2**もしくは両者を**5**へ酸化したとすれば、これまでの実験と矛盾な



**図5.** *L. sp. 1346*を用いたラベル実験におけるTIC及びSIC ( $m/z = 270$ )クロマトグラムと保持時間13.4, 14.9, 15.4 minのマススペクトル(上)と通常培養における *L. corni-maris* 培養液のガスクロマトグラム



**図6.** HPLCを用いたラベル実験

く説明できる。尚、5はESI法ではイオン化せず、GC条件では、1,2や5は完全に装置の中で分解されて3として検出されることが判っており、分取後直接導入によりEI法でイオン化した。

## 2.6, “Lambertellin システム”

以上の実験結果により、通常の抗生物質では寒天培地上における「パラサイト *L. corni-maris* は競争阻害を引き起こさず宿主 *M. f.*を駆逐する」という現象全体を矛盾なく説明することができる。本現象は通常の抗生物質では説明することができない。我々はこれを **Lambertellin システム**と名付けた。即ち、(i) *L. corni-maris* は宿主の *M. f.*の存在に関係なく、拡散性の高い前駆体 lambertellol 類 (1, 2)を生産する。(ii) 1, 2は中-塩基性領域では、不安定で容易に毒性の3に変換される。宿主不在時、生育条件は中性であるため、直ちに3に変換される。3は溶解性が低くその場にとどまる。(iii) 変換された3は宿主 *M. f.*のみでなく生産者である *L. corni-maris* にも毒性を示すため、*L. corni-maris* はこれを酸化的に分解・解毒する。(iv)パラサイト *L. corni-maris* - 宿主 *M. f.*間が接近した場合にパラサイト生育域も酸性化する。その結果、酸により1, 2は安定化を受け、宿主生育域深くまで到達する時間が与えられる。宿主領域に到達後1, 2は徐々に3に変化し、宿主を駆逐する。

寒天培地上では酸の拡散速度と宿主 *M. f.* の成長速度はほぼ同じである。このため両菌が非常に接近しない限り、非拡散性の3の濃度は低く、宿主は成長を阻害されないため、競争阻害が観察されなかったと説明することができる。

## 2.7,リンゴ果実上におけるマイコパラサイト現象

以上の結果を基にリンゴ果実上での菌の置き換わりについて考察する。健全なリンゴ果皮には微生物感染を防ぐ防御機構が存在する。*L. corni-maris* は単独では健全なリンゴ果実に侵入できないと考える。*M. f.*の場合、その経路は不明だが感染力が強く単独で侵入できるのであろう。果実に侵入した *M. f.*が増殖するにつれ、果皮の防御機構が低下し、*L. corni-maris* の侵入を許すことになるかと考える。栄養の独占、あるいは宿主遺伝子の水平伝播を嫌うなどの理由から、*L. corni-maris* にとって *M. f.*との共存には不都合があるのであろう。そこで *L. corni-maris* は、先住者の *M. f.*を **Lambertellin システム**により駆逐すると考えることができる。

以上、リンゴ果実上における *L. corni-maris* と *M. f.*間の菌の置き換わりの機構として明らかにした **Lambertellin システム**は、これまでにはないアレロパシー現象と結論することができる。

最後に、本研究の機会を与えてくださいました弘前大学原田幸雄名誉教授に感謝申し上げます。

## 文献

1. Harada, Y. et al., *Rep. Tottori Mycol. Inst.* **1990**, 28, 275.
2. Hashimoto, M. et al., *Organic Letters* **2004**, 6, 157.
3. Hashimoto, M. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, 71, 1230.
4. Hashimoto, M. et al., *M. J. Org. Chem.* **2008**, 73, 5039.
5. Hashimoto, M. et al., *T. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 2591.
6. Hashimoto, M. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9214.
7. Hashimoto, M. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 2587.

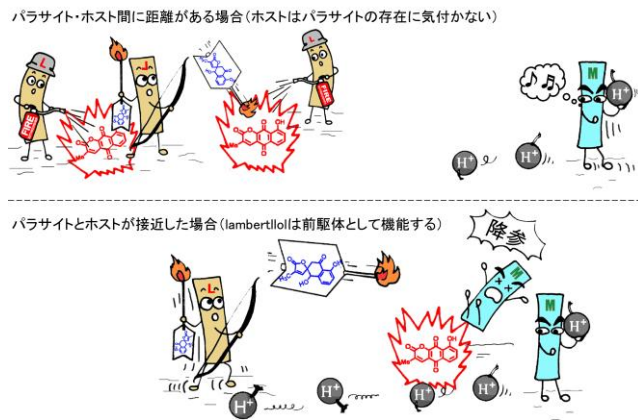


イラスト 1. 明らかにした Lambertellin システム

## 1. はじめに

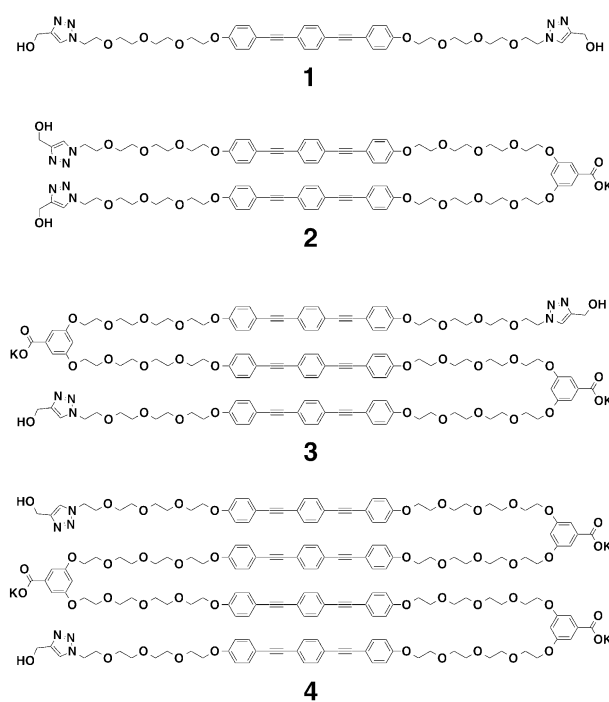
生体分子は、フォールディングと呼ばれる直鎖状分子の三次元的な折りたたみにより、興味深い立体構造と機能を発現する。得られる折りたたみ構造は、通常、水素結合や $\pi$ - $\pi$ スタッキング、疎水性相互作用などの非共有結合により安定化される。ここから着想を得て、非共有結合部位を適切に配置した合成分子を設計し、らせんなどのフォールディング構造を合成分子で実現する研究が盛んに行われ、分子認識などの機能を示すものが開発されてきた<sup>[1]</sup>。我々は、細胞膜を介した情報伝達や物質透過など、生命維持に密接に関わる多彩な動的機能を有する膜タンパク質に着目し、その構造と機能を模倣した合成分子の開発を行っている。

膜タンパク質は、大きく二つの構造モチーフに分類できる。一つは、 $\beta$ -シート構造がコイル状に巻き上がって構築される $\beta$ -バレル型構造である。Matileらは、オクタフェニレンにオリゴペプチドを導入した分子を用いて、脂質二分子膜中で $\beta$ -バレルと同様のチャネル型超分子複合体を構築し、物質透過などの機能を実現している<sup>[2]</sup>。二つ目の構造モチーフは、複数の $\alpha$ -ヘリックスが膜を貫通して形成される複数回膜貫通型構造である。我々はこの構造モチーフを模倣した合成分子を開発し、タンパク質同様の機能の実現を目指している<sup>[3,4]</sup>。

## 2. 複数回膜貫通型構造を形成する合成フォールディング分子の開発

2. 1 分子設計と脂質二分子膜中の立体構造<sup>[3]</sup>

複数回膜貫通型構造を形成する膜タンパク質は、親水的なアミノ酸残基を多く含む部分と、疎水的なアミノ酸残基を多く含む部分が交互に連結された特徴的な一次構造を有することが知られる<sup>[5]</sup>。脂質二分子膜は、それを構成する脂質分子の親水部が膜表面側に、疎水的なアルキル基が膜内側に配置される形で形成されているため、タンパク質の疎水的なドメインが膜内部に、親水的なドメインが膜外部に配置されることで、複数回膜貫通型構造へ折りたたまれると考えられる。従って、複数回膜貫通型構造を形成する合成分子として、タンパク質同様に親水部と疎水部を交互に連結した直鎖状分子 **1-4** を設計した (図 1)。マルチブロック型交互両親媒性分子 **1-4** は、疎水部として、ビス(フェニルエチニル)ベンゼン (BPEB)、親水部としてテトラエチレングリコール(TEG)とベンゾエートを用い、両者がそれぞれ一から四回繰り返された構造で形成される。**1-4** が脂質二分子膜へ取り込まれるかどうかについて、位

図 1. マルチブロック型交互両親媒性分子 **1-4**。

相差・蛍光顕微鏡を用いて調べた (図 2)。ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC) と **1-4** をモル比 90:10 で混合し、ジャイアント単層ベシクル (GUV) を静置水和法により作成した<sup>[6]</sup>。位相差顕微鏡観察から、**1-4** を含む全てのサンプルで GUV の生成が確認された。ここで、疎水部として用いた BPEB は紫外光照射により蛍光を示す。そこで、330-385 nm の励起光照射下で蛍光顕微鏡観察を行ったところ、いずれのサンプルでも位相差顕微鏡像と同様のリング像が得られた。従って、得られた GUV の脂質二分子膜内に **1-4** が含まれることが示された。さらに **1-4** の脂質二分子膜内での向きについて、スピン標識されたリン脂質を用いた変位蛍光



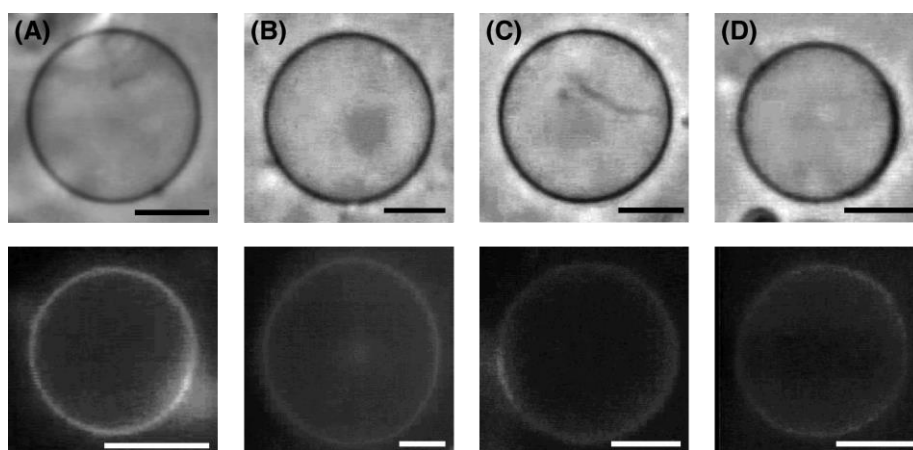


図 2. (A) **1**, (B) **2**, (C) **3**, (D) **4** を含む DOPC GUV ( $[1-4]/[\text{DOPC}] = 0.10$ ) の (上段) 位相差顕微鏡像、(下段) 蛍光顕微鏡像 (励起光: 330–385 nm、スケールバー: 10  $\mu\text{m}$ )。

消光解析<sup>7)</sup>を行ったところ、**1-4** いずれも BPEB 部が膜の内側に存在し、かつ DOPC 分子とほぼ平行方向、つまり膜面に対し垂直方向を向いていることが示唆された。

次に、**1-4** の脂質二分子膜内での立体構造や自己集合挙動について調べた。BPEB は、溶液中分散状態で 320 nm の励起光により 390 nm 付近に極大を持つ蛍光を発するが、自己集合により蛍光極大波長が 440 nm へ長波長シフトすることが知られる<sup>8)</sup>。従って、蛍光スペクトルによって、BPEB 部の分散・集合状態を把握することができる。脂質二分子膜内の **1-4** の濃度を変えた蛍光スペクトル測定から、興味深い濃度依存性が観察された (図 3)。**1** の濃度を  $[1]/[\text{DOPC}] = 0.00050$  から 0.10 へ上昇させたところ、蛍光極大波長はレッドシフトした。従って、**1** の BPEB 部は、脂質二分子膜中で分子間会合することが示唆された。**3** も同様のスペクトル変化を示した。一方、**2** および **4** の濃度を  $[2, 4]/[\text{DOPC}] = 0.00050$  から 0.10 へ上昇させた場合、蛍光極大波長の変化はほとんど観察されず、濃度依存性は見られなかった。また  $[2, 4]/[\text{DOPC}] = 0.00050$  の希薄条件において、428 nm に極大を持つ BPEB が自己集合した状態に由来する蛍光が見られた。以上の分光学的解析から、**2** および **4** は、DOPC 脂質二分子膜内で BPEB 部が分子内でスタックした立体構造、つまり二回および四回膜貫通型構造をとっていることが示唆された。ここで **2** と **4** は、濃度上昇に伴い  $>480$  nm のさらに長波長側の蛍光強度が増加することから、分子間でも自己集合する性質を持つことが分かる。

次に、**1-4** の脂質二分子膜内での立体構造や自己集合挙動について調べた。BPEB は、溶液中分散状態で 320 nm の励起光により 390 nm 付近に極大を持つ蛍光を発するが、自己集合により蛍光極大波長が 440 nm へ長波長シフトすることが知られる<sup>8)</sup>。従って、蛍光スペクトルによって、BPEB 部の分散・集合状態を把握することができる。脂質二分子膜内の **1-4** の濃度を変えた蛍光スペクトル測定から、興味深い濃度依存性が観察された (図 3)。**1** の濃度を  $[1]/[\text{DOPC}] = 0.00050$  から 0.10 へ上昇させたところ、蛍光極大波長はレッドシフトした。従って、**1** の BPEB 部は、脂質二分子膜中で分子間会合することが示唆された。**3** も同様のスペクトル変化を示した。一方、**2** および **4** の濃度を  $[2, 4]/[\text{DOPC}] = 0.00050$  から 0.10 へ上昇させた場合、蛍光極大波長の変化はほとんど観察されず、濃度依存性は見られなかった。また  $[2, 4]/[\text{DOPC}] = 0.00050$  の希薄条件において、428 nm に極大を持つ BPEB が自己集合した状態に由来する蛍光が見られた。以上の分光学的解析から、**2** および **4** は、DOPC 脂質二分子膜内で BPEB 部が分子内でスタックした立体構造、つまり二回および四回膜貫通型構造をとっていることが示唆された。ここで **2** と **4** は、濃度上昇に伴い  $>480$  nm のさらに長波長側の蛍光強度が増加することから、分子間でも自己集合する性質を持つことが分かる。

また  $[2, 4]/[\text{DOPC}] = 0.00050$  の希薄条件において、428 nm に極大を持つ BPEB が自己集合した状態に由来する蛍光が見られた。以上の分光学的解析から、**2** および **4** は、DOPC 脂質二分子膜内で BPEB 部が分子内でスタックした立体構造、つまり二回および四回膜貫通型構造をとっていることが示唆された。ここで **2** と **4** は、濃度上昇に伴い  $>480$  nm のさらに長波長側の蛍光強度が増加することから、分子間でも自己集合する性質を持つことが分かる。

## 2. 2 イオン透過性<sup>4)</sup>

**4** を含む DOPC 平面二分子膜を用いて、伝導度測定を行った<sup>9)</sup>。HEPES バッファー (20 mM HEPES, 50 mM KCl, pH 7.5) 中に作成された **4** を 10 nM 含む平面膜に +50 mV の電圧をかけたところ、 $15.6 \pm 0.6$  pA のほぼ一定な電流が観測され、**4** がイオン透過性を示すことが示唆された。ここで、**1** の濃度を 1.0 pM にまで下げたところ、不連続な電流が観測された (図 4A)。各電流の平均持続時間は 2.6 ms であった。ミリ秒オーダーのダ

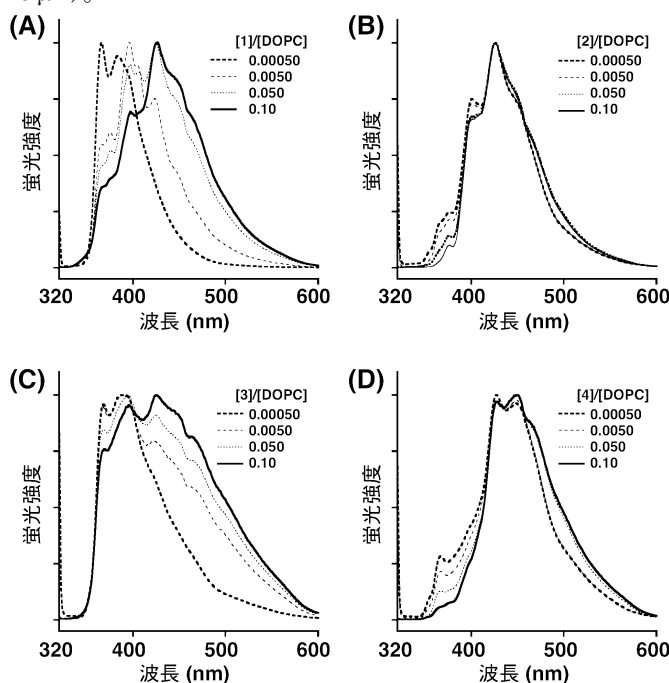


図 3. (A) **1**, (B) **2**, (C) **3**, (D) **4** を含む DOPC GUV の蛍光スペクトル (励起光: 315 nm)。

イナミクスから、**4**によるイオン透過はフリップフロップ機構<sup>[10]</sup>ではなく、チャンネル形成によるものであることが示唆される。 $+80$  mVの電圧に対し、 $5.6 \pm 0.5$  pAと、その約二倍に相当する  $10.4 \pm 0.9$  pAの電流が観測された(図4B)。この濃度において、平面膜上に126分子程度の**4**しか存在していないことを考慮すると、前者が一つのチャンネル、後者はほぼ同時に形成された二つのチャンネルに由来するものと考えられる。このチャンネルは、オームの法則に則った電流-電圧特性を示し、伝導度は70 pSであった。

8-ヒドロキシピレン-1,3,6-トリスルホン酸三ナトリウム(HPTS)は、450 nmの励起光照射で510 nmに極大を持つ蛍光を発生し、pH上昇に伴いその蛍光強度が増加することが知られ、pH変化を蛍光でモニターする目的で用いられる<sup>[11]</sup>。この性質を利用し、HPTSを内部に封入した100 nmサイズの**4**を含むDOPC単層ベシクル( $[4]/[DOPC]=0.012$ )を調整し、イオン透過性を調べた。HEPESバッファ溶液中(20 mM HEPES, 50 mM KCl, pH 7.1) NaOH水溶液を加えpHを0.8上昇させたところ、510 nmの蛍光強度の増加が観測された。この結果から、 $\text{Na}^+$ がベシクル内部に透過したことが示唆された。**4**を含まないDOPC単層ベシクルでは蛍光強度の増加は見られないことから、 $\text{Na}^+$ の透過は**4**に由来するものと考えられる。この蛍光強度の増加速度は、LiOH、NaOH、KOH、RbOH、CsOHの順に遅くなった。この順列はアイゼンマンシーケンス XI<sup>[12]</sup>であり、これはカチオン選択性が主にカチオンとチャンネル、つまり**4**との間の結合エネルギーによって決められることを示す。従って、**4**のBPEB部とのカチオン- $\pi$ 相互作用が、イオン透過の主な原動力になっていることが示唆される<sup>[13]</sup>。このイオン透過性の**4**の濃度依存性を調べ、ヒル係数<sup>[14]</sup>が  $3.8 \pm 0.1$ と算出されたことから、イオン透過に寄与しているチャンネルは、**4**の四量体であることが示された。

変位蛍光消光解析では、**1**も**4**と同様二分子膜に垂直に挿入される。しかし**1**は、BPEB部が分子間自己集合する濃度であってもイオン透過性を示さない。つまり、イオン透過性はBPEB部のスタックだけでは実現できないことが分かる。さらに**4**のエチル基を水素添加して得られる柔軟性の高い化合物もイオン透過性を示さない。従って**4**のように、BPEB部が膜内で分子内スタックし、パネルのようなフォールド構造を形成することが、イオン透過性を生み出す上で重要であると考えられる。

ヒル解析から、**4**の四量体がイオンチャンネルを形成することが分かった。さらに図4の不連続な電流プロファイルから、イオンチャンネルが動的な開閉運動を行なっていることも示唆される。**4**がパネル状フォールド構造を取ることを踏まえ、我々は**4**が図5のように菱形のチャンネルを形成すると考えている。各分子が動くことで、閉状態と開状態の間で切り変わる。この構造を仮定し、実験で得られた物性値(伝導度  $g = 70$  pS、溶液抵抗値  $\rho = 2.35 \Omega \text{ m}$ )と膜厚3.5 nmを用いてヒルの式<sup>[15]</sup>  $1/g = \rho L/S + 2\epsilon\rho/C$ を解くことで、菱型チャンネルの断面積  $S = 0.76 \text{ nm}^2$ と求められた。分子モデリングから、フォールドした**4**の幅は1.4 nmと計算されたことから、孔径は0.53 nmであると算出された。

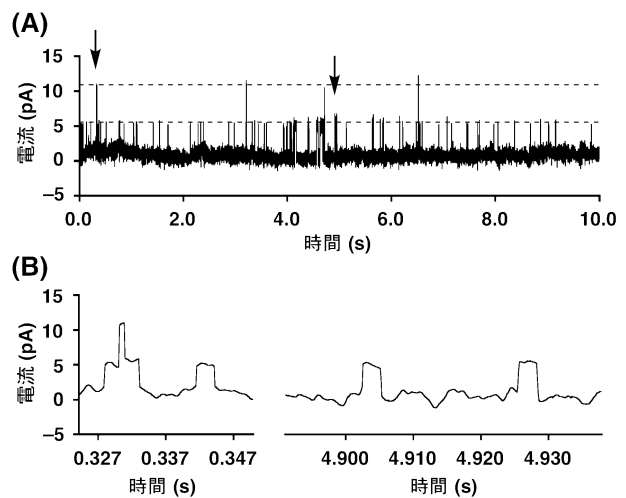


図4. (A) **4** (1.0 pM)を含むDOPC平面二分子膜の電流透過測定(+80 mV)。 (B) (A)内の矢印で示された部分の拡大図。

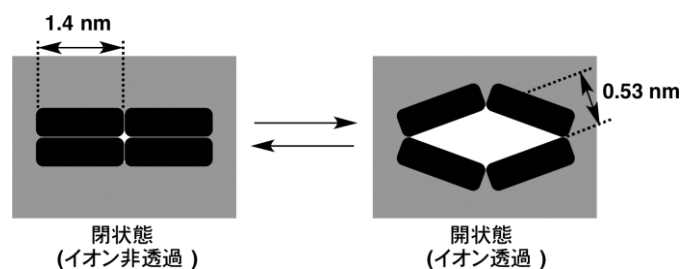


図5. 脂質二分子膜(灰色部分)に挿入された**4**(黒色部分)で構築された超分子イオンチャンネルのモデル図。イオンチャンネルを形成する四分子の**4**は、熱運動により膜中で開閉運動すると考えられる。

### 3. おわりに

膜タンパク質の分子構造から着想し、親水部と疎水部を交互に連結したマルチブロック型両親媒性化合物を開発し、脂質二分子膜中で複数回膜貫通型構造を形成することに成功した。さらに、疎水部を四つ有する分子が、四量体で開閉運動を行うイオンチャネルを形成することも明らかにし、脂質二分子膜中での精密な構造解析まで行った。折り畳まれた分子が集合化する、という階層構造で機能が生み出される点に生体分子との類似性が見られ、本研究コンセプトが、フォルダマーを利用した新たな機能性分子開発の方法論になり得ると考えている。

### 4. 謝辞

本研究は東北大学多元物質科学研究所、生命類似機能化学研究分野、金原数教授の研究室で行った成果であり、金原教授のご指導に心から感謝の意を表します。ジャイアントベシクルの作成と観察では、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の高木昌宏教授、濱田勉准教授、森田雅宗博士（現 東京工業大学）にご指導賜りました。また、イオン伝導度測定では、東京大学大学院工学系研究科の野地博行教授、田端和仁助教にご協力頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。最後に、研究遂行にご助力頂いた嶋建也氏に深く感謝致します。

### 5. 参考文献等

- [1] S. Hecht, I. Huc, Eds., *Foldamers: Structure, Properties and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.
- [2] (a) N. Sakai, J. Mareda, S. Matile, *Acc. Chem. Res.*, **2005**, *38*, 79; (b) N. Sakai, J. Mareda, S. Matile, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 1354.
- [3] T. Muraoka, T. Shima, T. Hamada, M. Morita, M. Takagi, K. Kinbara, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 194.
- [4] T. Muraoka, T. Shima, T. Hamada, M. Morita, M. Takagi, K. V. Tabata, H. Noji, K. Kinbara, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 19788.
- [5] B. K. Kobilka *et al.*, *Nature*, **2007**, *450*, 383.
- [6] (a) T. Hamada, Y. Miura, K. Ishii, S. Araki, K. Yoshikawa, M. Vestergaard, M. Takagi, *J. Phys. Chem. B.*, **2007**, *111*, 10853; (b) K. Ishii, T. Hamada, M. Hatakeyama, R. Sugimoto, T. Nagasaki, M. Takagi, *ChemBioChem*, **2009**, *10*, 251; (c) M. Morita, M. Vestergaard, T. Hamada, M. Takagi, *Biophys. Chem.*, **2010**, *147*, 81.
- [7] (a) L. A. Weiss, N. Sakai, B. Ghebremariam, C. Ni, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 12142; (b) J. Ren, S. Lew, Z. Wang, E. London, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 10213; (c) A. S. Ladokhin, *Methods Enzymol.*, **1997**, *278*, 462.
- [8] M. Levitus, K. Schmieder, H. Ricks, K. D. Shimizu, U. H. F. Bunz, M. A. Garcia-Garibay, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 4259.
- [9] K. V. Tabata, K. Sato, T. Ide, T. Nishizaka, A. Nakano, H. Noji, *EMBO J.*, **2009**, *28*, 3279.
- [10] D. D. Lasic, *Liposomes: From Physics to Applications*, Elsevier, Amsterdam, 1993.
- [11] (a) K. Kano, J. H. Fendler, *Biochim. Biophys. Acta*, **1978**, *509*, 289; (b) N. R. Clement, J. M. Gould, *Biochemistry*, **1981**, *20*, 1534.
- [12] G. Eisenman, R. Horn, *J. Membrane Biol.*, **1983**, *76*, 197.
- [13] (a) R. A. Kumpf, D. A. Dougherty, *Science*, **1993**, *261*, 1708; (b) M. M. Tedesco, B. Ghebremariam, N. Sakai, S. Matile, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **1999**, *38*, 540; (c) M. Jung, H. Kim, K. Baek, K. Kim, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2008**, *47*, 5755.
- [14] A. V. Hill, *Biochem. J.*, **1913**, *7*, 471.
- [15] B. Hille, *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd Edition, Sinauer Associates, Sunderland, 2001.

## 1. はじめに

細胞膜やペプチド凝集体は、複雑な分子集合体として特徴的な物性を示す。これらの分子集合体に選択的に結合する分子には、細胞膜障害物質やアミロイド様線維染色試薬など、医学・生物学的な利用価値が高く、その分子認識機構に興味を持たれる。しかし、細胞膜やペプチド凝集体は、単分子では構造・物性を再現しないため、結合標的分子を単離・精製し、希薄溶液として系を単純化する、従来の相互作用研究法の適用が難しい。このような分子集合体の認識機構を明らかにするには、非結晶固体中に形成される規則的な局所構造を、単離せずに取り扱う研究戦略が必要となる。

筆者はこれまで、ペプチド凝集体に結合する小分子や脂質膜の研究に携わり、主に固体 NMR を用いた局所構造研究方法の開発と応用を行ってきた<sup>1</sup>。本稿では、ペプチド凝集体局所構造研究と現在取り組んでいる脂質集合体の構造および相互作用の研究の一部を紹介したい。

## 2. アミロイド染色試薬チオフラビン T が認識する短鎖ポリグルタミン凝集体の局所構造解析

チオフラビン T (ThT, 図 1a) は、最も広く利用されるアミロイド染色剤の一つである。現在までに、20 種類以上のタンパク質がアミロイド様凝集体を形成することが知られており、アミロイドの化学的構造は一義的には定義できない。しかし、この構造多様性にも関わらず、ThT は多くのアミロイド様凝集体を一様に染色する性質を持っている<sup>2</sup>。ThT の分子認識は、アミロイド様構造に対する特異性と多様なアミノ酸配列に対する寛容性を併せ持つ特異なものであり、その構造基盤は興味深い。ThT 結合サイトは不均一固体であるタンパク質凝集体中に僅かに形成される局所構造であり、その解析には新しい方法論の開発が必要とされた。我々はこの問題に対し、固体 NMR の適用を試みた。

固体 NMR の利点は、試料状態に依存せず、分子構造を高い分解能で解析できる点である。例えば、原子間距離測定法の一つである Rotational-Echo Double-Resonance (REDOR) 法では、非晶質固体中の原子間の距離を 1 Å 程度の分解能で見分けることが比較的容易にできる<sup>3</sup>。この特徴を利用すれば、凝集体を形成するペプチド分子上で、ThT 分子と接触する部位を特定することができる。

我々は、アミノ酸残基選択的に[1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Gln 標識した 8 つの短鎖ポリグルタミン H-Gln<sub>8</sub>-OH(図 1 b,c) を合成し、それぞれのペプチド凝集体に[3-Me-d<sub>3</sub>]ThT(図 1 a) を結合させ、<sup>13</sup>C{D}DQF-REDOR を用いて <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C と CD<sub>3</sub> の接近を調査した。DQF により標識部位の <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C シグナルを選択観測し (図 1d S<sub>0</sub>)、<sup>13</sup>C{D}REDOR 差スペクトルから <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C と CD<sub>3</sub> の距離を測定した (図 1d ΔS)。その結果、N 末端一番目残基を <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C 標識したペプチドのみで、分子間 <sup>13</sup>C{D}REDOR 減衰が確認された (図 1d)。この結

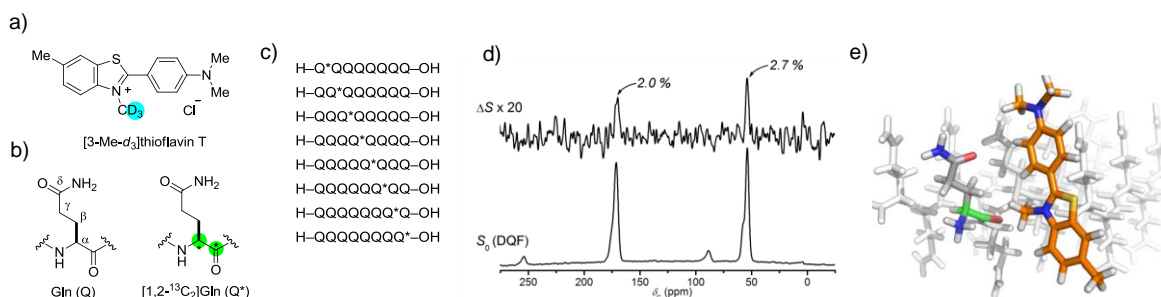


図 1 D 標識 ThT と標識ポリグルタミンの構造と固体 NMR スペクトル

果から H-Gln<sub>g</sub>-OH の高親和性 ThT 結合サイトは N 末端に形成されることが明らかとなった<sup>4</sup>。図 1e は REDOR 距離制限を満たす分子モデルの一例である。

生体膜やペプチド凝集体の固体 NMR では、注目する局所構造以外のマトリックス部分から、巨大なバックグラウンド信号が生じる。局所構造を効率良く抽出・解析するためには、複数の NMR 活性核種のクラスターを導入し、多量子フィルターにより NMR シグナルを選択観測する方法が有効である<sup>5</sup>。現在我々は、生体膜中で形成される脂質-膜タンパク質、脂質-脂質分子会合体の構造解析を目指し、位置・立体選択的スピクラスタ標識脂質の合成と<sup>6</sup>、上記の局所構造解析法の脂質二重膜試料への応用を試みている (図 2)。

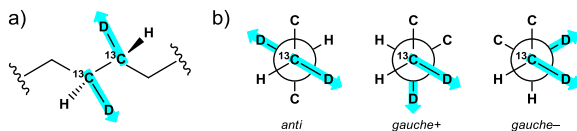


図 2 脂質アルキル鎖のスピクラスタ標識  
a) D-<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-D スピクラスタ。 <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C あるいは <sup>2</sup>H-<sup>13</sup>C の生じる多量子コヒーレンスを利用した選択的 NMR 観測を可能とする。 b) 二面角は隣り合う <sup>13</sup>C-D 結合の相対的な配向から決定できる。

### 3. 脂質二重膜の動的局所構造の分離観測法

膜タンパク質を取り囲む境界脂質や脂質ドメインは、信号伝達やタンパク質の機能発現に関与する生物学的に重要な動的局所構造であり<sup>7</sup>、構成脂質の同定と定量は、細胞膜の構造・機能解明に重要な研究課題である。脂質の物理化学的性質は、二重結合の数や立体配置の僅かな差異により大きく影響を受けるので、脂質分子の挙動を知るには、構造への摂動が少ない同位体標識を利用する NMR は理想的な分析手段である。しかし、境界脂質やドメイン脂質は、バルクの脂質と化学構造が同じであり、化学シフトによる区別が難しい。これらの脂質の区別には、分子の運動性を強く反映する異方性相互作用 (化学シフト異方性や四極子相互作用など) や磁気緩和の利用が有効となる<sup>8</sup>。

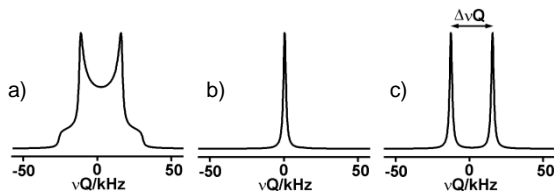


図 3 固体試料の <sup>2</sup>H NMR スペクトルの概念図  
a) 異方性相互作用 (四極子相互作用) により広幅化した <sup>2</sup>H NMR スペクトル。 b) 等方スペクトル。 MAS 下では等方スペクトルがスピニングサイドバンドとともに観測される。 c) 配向試料の <sup>2</sup>H NMR スペクトル。分子配向を揃えた試料調製により、異方性相互作用を収束させ、分解能を高める。

異方性相互作用は、固体 NMR スペクトルを著しく低分解能化・低感度化する。多成分系の脂質二重膜から特定の局所構造を高い精度で分離・解析するには、スペクトルの高分解能化が鍵となる (図 3)。この問題に対し我々は、(1) マジック角試料回転 (MAS) 高分解能スペクトル下での異方性相互作用の選択的再結合による脂質運動性評価と (2) 配向試料を用いた静止スペクトルの高分解能化と異方性相互作用を利用した相状態の分離観測を試みた。(1) では MAS により消去される異方性相互作用のうち、化学シフト異方性をスピネコー法により再結合して、固体 NMR スペクトルの感度と分解能を損なうことなく、脂質分子の部分構造特異的な運動情報を得ることに成功した (図 4)<sup>9</sup>。(2) では、ガラス板上に配向した脂質膜を調製し<sup>10</sup>、相状態の異なる脂質のシグナルを四極子結合の大きさにより分

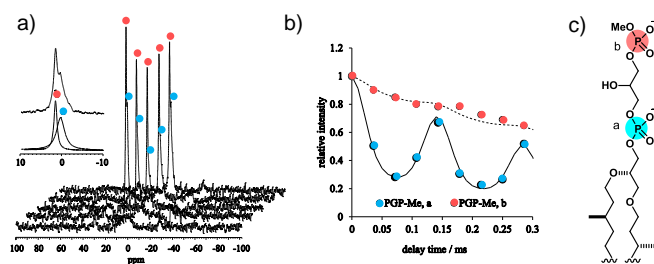


図 4 高度好塩菌紫膜の MAS <sup>31</sup>P NMR  
a) 水和紫膜の <sup>31</sup>P NMR。 MAS 高分解能条件下、スピネコー法により化学シフト異方性を再結合した。 b) スピネコーシグナルの強度変化。 MAS 周期に同調した強度減衰が大きい程、リン酸基の揺らぎが小さいこと示す。 c) 代表的な紫膜リン脂質極性部の化学構造。 赤と青のリン酸は全く異なる運動性を有する。

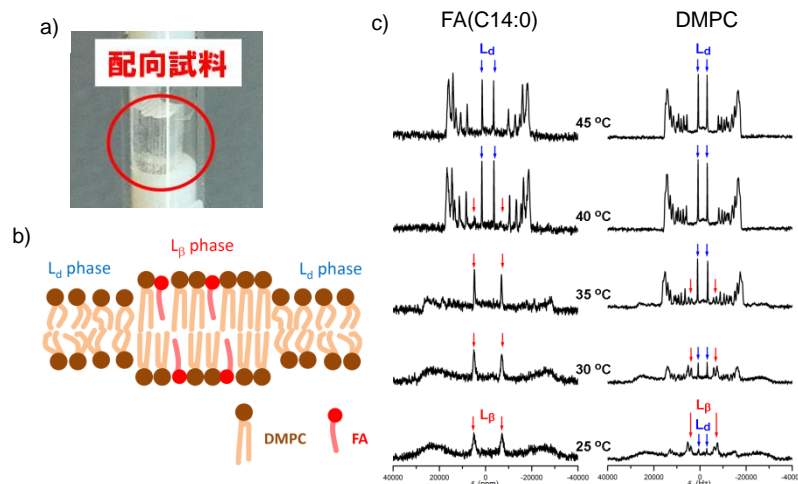


図5 配向膜試料の<sup>2</sup>H NMR

a) カバーガラスで支持した配向脂質二重膜。b)リン脂質(DMPC)–脂肪酸(FA)混合膜モデル図。c) DMPC(diC14:0PC):FA(ミリスチン酸、C14:0) = 7:3の混合膜の固体<sup>2</sup>H NMR。C14:0-*d*<sub>27</sub>(左)、DMPC-*d*<sub>54</sub>(右)を利用し、分子種選択的に運動性を調べた。図中の矢印はアルキル鎖末端メチル基のシグナルを示す。DMPCは低温から液晶相(青、L<sub>d</sub>)を形成するのに対し、FAはDMPCのゲル相(赤、L<sub>β</sub>)が完全に消失するまで、液晶相にならない。この結果はFAがゲル相に局在する事を示す。

分離観測することで、各相状態間での構成分子の局在を明らかにできた(図5)。現在、これらの手法を用いて膜タンパク質周辺の境界脂質の分離観測と分子種の特定および定量を目指している。

#### 4. タンパク質と脂質の分子認識

我々は、細胞膜疎水部を形成する脂質アルキル鎖とタンパク質の構造認識の単純なモデルとして、ヒト心筋脂肪酸結合タンパク質(fatty acid binding protein 3, FABP3)と脂肪酸の分子認識機構研究を行っている。FABP3は、脂肪酸の細胞内輸送に関与する分子量15 kDaの可溶性タンパク質であり、一分子の脂肪酸を結合することが知られている<sup>11</sup>。

FABP3は可溶性であるため取扱いは比較的容易であったが、長鎖脂肪酸は疎水性が高く水に難溶であり、正確な結合親和性の測定が困難であった。この問題は、疎水性リガンド研究の共通の課題とも言える。実際の生体内における脂肪酸の存在形態を考慮すると、単分子あるいはミセルとして可溶化している可能性は低く、そのほとんどは細胞膜が輸送タンパク質に結合している<sup>12</sup>。そこで我々は、細胞膜モデルであるリポソームに脂肪酸を結合して可溶化し、ITCによる精密相互作用解析を試みた(図6a)。その結果、水に不溶である超長鎖脂肪酸(>C22)を含めたC6~C24の脂肪酸に対して、同一条件でFABP3への親和性および熱力学パラメータを取得することに成功した<sup>13,14</sup>。また、脂肪酸親和性の網羅的な比較が可能となり、FABP3はC10~C18の脂肪酸に対して比較的高い親和性を示すことが明らかとなった<sup>14</sup>。現在、FABP3の広い基質許容性の分子機構解明を目指し、C10~C18の脂肪酸とFABP3のX線共結晶構造解析をおこなっている。

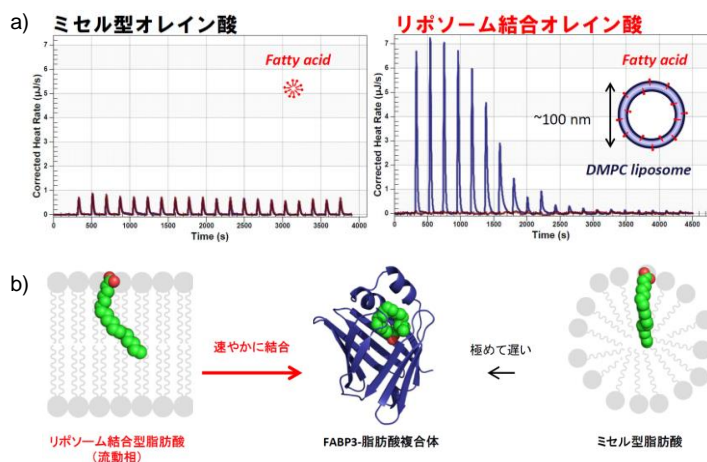


図6 リポソーム結合脂肪酸のITC実験

a) オレイン酸のみをミセルとしてFABP3に滴下した場合、FABP3との結合熱は観測されなかった(左)。一方、オレイン酸をリポソームに結合して滴下した場合は、FABP3との結合による発熱が見られた(右)。b) ITCの結果の概念図。FABP3はリポソームに結合したオレイン酸とは速やかに結合できるが、ミセル型の脂肪酸と結合が遅く、ITCで反応熱が観測されない。

図 6a は、FABP3 の生理的リガンドの一つであるオレイン酸の ITC 実験結果である。ミセル状態のオレイン酸を添加した場合、結合熱は観察されなかった。一方、リポソーム結合オレイン酸では結合にともなう発熱が明確に観測された。この比較から、リン脂質二重膜上で形成される脂肪酸と周辺リン脂質の集合体構造が、FABP3 との速やかな反応に重要であると推察される (図 6b)。FABP3-脂肪酸の結合反応とリン脂質二重膜上で脂肪酸が形成する局所構造の関係も、今後明らかにしていきたい。

## 5. おわりに

本稿で紹介したように、我々は脂質二重膜中での脂質-脂質あるいは脂質-タンパク質の分子認識機構の解明を目指し、生体分子集合体中の局所構造解析の方法論の開発と応用を試みている。ペプチド凝集体や脂質ドメイン、境界脂質などは、いずれも分子種や構造を一義的に特定できない分子集合体であるが、アミロイド選択的染色薬や脂質ラフト親和性分子は、分子レベルのスケールで形成される特定の局所構造を認識していると考えられる。本研究の発展により、構造定義があいまいな分子集合体の分子認識に、化学構造に基づいた明確な解釈を与えられると期待している。

## 謝辞

本稿では、筆者の前所属である東京大学大学院薬学系研究科有機反応化学研究室で行った ThT の固体 NMR 研究と、現所属である大阪大学大学院理学研究科 JST-ERATO 村田脂質活性構造プロジェクトで行っている膜脂質の構造研究を紹介しました。阪大院理の村田道雄教授、杉山 成特任准教授、東大院薬の井上将行教授をはじめとする共同研究者の皆様に感謝申し上げます。

## 参考文献

1. S. Matsuoka, *J. Pharm. Soc. Jpn.* **2012**, *132*, 969–978.
2. H. LeVine III, *Methods Enzymol.* **1999**, *309*, 274–284.
3. T. Gullion, J. Schaefer, *Adv. Magn. Reson.* **1989**, *13*, 58–83
4. S. Matsuoka, M. Murai, T. Yamazaki, M. Inoue, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5787–5790.
5. S. Matsuoka, J. Schaefer, *J. Magn. Reson.* **2006**, *183*, 271–277.
6. S. Lethu, S. Matsuoka, M. Murata, *Org. Lett.* DOI:10.1021/ol4036159.
7. K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, *387*, 569–572.
8. S. Louic, B. L. Vermeer, V. R. de Groot, M. Alain, C. Jerzy, *Eur. Biophys. J.* **2007**, *36*, 919–931.
9. 梅川雄一, 松岡 茂, 山口敏幸, 村田道雄, 第 52 回 NMR 討論会講演要旨集 266–267.
10. H. C. Jarrell, P. A. Jovall, J. B. Giziewicz, L. A. Turner, I. C. P. Smith, *Biochemistry* **1987**, *26*, 1805–1811.
11. M. Furuhashi, G. S. Hotamisligi, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 489–503.
12. G. V. Richieri, A. M. Kleinfeld, *J. Lipid Res.* **1995**, *36*, 229–240.
13. 松岡 茂、村田道雄、特願 2013-171684.
14. 松岡 茂, 杉山 成, 松岳大輔, 廣瀬末果, 新山真由美, 大塚康平, 村田道雄, 溝端英一, 井上 豪、第 55 回天然有機化合物討論会講演要旨集 67–72.

組換えプロテオリポソーム技術

三重大学 大学院工学研究科 分子素材工学専攻 湊元幹太

1. はじめに

生命の構造単位である細胞の機能を、人工的に構成した脂質 2 分子膜に再構築し、類似の機能・様態を引き出そうとする試みは“人工細胞モデル”研究のねらいの1つとなっている。Bangham 博士の発見以来、リポソーム（脂質ベシクル）は常に重要な素材としてこの研究目的のために利用され、さらにその流れにおいて、創成期から、わが国の諸先輩方が輝かしい成果を挙げてこられたことも、周知のとおりである。このあたりについては、優れた和/欧文の成書・総説が多く書かれており、是非、参照いただきたいが、ここでは拙文を紹介するにとどめる[1]。細胞(膜)の起源の研究、細胞区画構造の本質的理解、から、今ある細胞の機能の模倣まで、人工細胞モデルの研究は多岐にわたる。そこで、本稿では主題を絞り、細胞膜の機能発現に必須の膜タンパク質をリポソーム膜に再構成する方法（プロテオリポソーム作製法）のうち、シグナル伝達経路など、複数要素がはたらくことが必要なシステムの再構成に今後役立つだろうと私たちが考えている、私たちの技術を中心に紹介させていただく。

2. バキュロウイルスによる組換えプロテオリポソーム作製法

膜タンパク質が脂質膜に天然の性状で組み込まれたリポソームは、プロテオリポソームと呼ばれ、膜タンパク質研究には欠かせない道具となっている。直径 100 nm 程度までの所謂 conventional な proteoliposome の調製には、界面活性剤除去法（膜タンパク質、脂質の可溶化。それに続く可溶化剤の透析除去）が常法である。しかし、膜タンパク質の量、可溶化剤の選択、配向性の維持、に問題がないわけではない。さらに、人工細胞モデル研究には、~10 μm サイズの巨大リポソーム (giant unilamellar vesicle, GUV) がよく使われるが、そのサイズのプロテオリポソーム調製法でも、現行では、まず conventional proteoliposome を作製

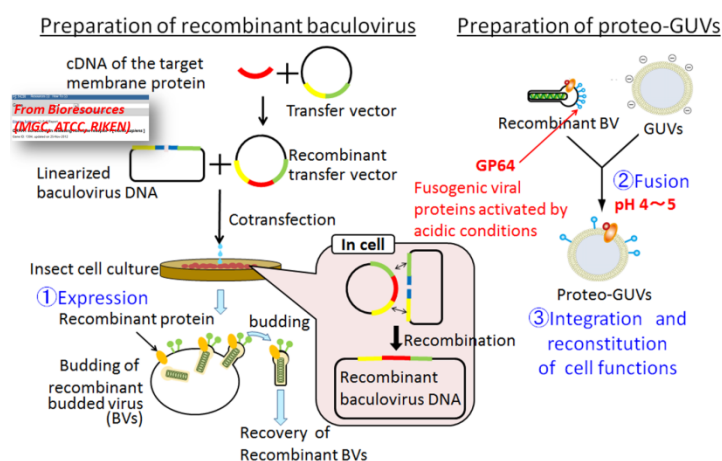


図 1: 組換えバキュロウイルス-リポソーム膜融合法のスキーム

した後に、膜融合などでサイズ増大を図っている[2]。

三重大学工学研究科の吉村哲郎教授は、これら従来法とは異なり、可溶化を伴わない組換えバキュロウイルスを用いる新技法を考案し、筆者は、ともに開発に携わってきた。鱗翅目のヨトウガの幼虫に核多角体病を引き起こすバキュロウイルス (*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, AcNPV。脂質 2 分子膜にくるまれたエンベロープウイルス) の強力なポリヘドリンプロモーターを利用し、昆虫培養細胞 (Sf9 細胞など) に感染させることで組換えタンパク質を発現する方法は、一般的なものである。小胞輸送のシグナルとなるリーダーペプチド配列をもった膜タンパク質の遺伝子 (cDNA) を組み換えたバキュロウイルスを、昆虫細胞に感染・増幅させると、目的の膜タンパク質がエンベロープに載った出芽ウイルス粒子 (budded virus, BV) が、培養上清中に得られることが明らかにされてい



る[3, 4]。私たちは、BV が細胞内に侵入する際に必須のエンベロープタンパク質 GP64 の膜融合誘起機能を利用して、組換え膜タンパク質を搭載した BV を、リポソーム膜に融合することでプロテオリポソームを得る方法を考案した(図 1) [5, 6]。この方法は、目的膜タンパク質の遺伝子を、cDNA ライブラリーからクローニングしたり、バイオリソース機関から入手したりすることが可能なら、簡単に BV 上に提示できる。また、膜融合させる条件も、①酸性リン脂質を含み、かつ、②pH を弱酸性 (4-5) に調節できればよく、リポソームの種類 (膜多重度やサイズ) を問わない。この方法は、上記のことからも高い汎用性が期待されるが、当初、自己免疫疾患の責任遺伝子産物である膜受容体をプロテオリポソームとして固定化し、それに対する自己抗体の検出効果を高めた診断薬を作ろうとするなかで、開発に至った (「診断用組換えプロテオリポソームの作製法」として特許を受けた[7])。活性官能基やビオチンの修飾を受けたリン脂質を成分に含められるので、例えば、GPCR である甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSHR) を提示した組換えプロテオリポソームをストレプトアビジンコートプレートに固定し、ELISA 法により甲状腺自己免疫疾患患者血清の中から自己抗体を特異的に検出することができる[8]。

### 3. GUV への GPCR 構成例

近年、ヒトやその他モデル生物の遺伝子の多くを、研究者がバイオリソース機関から容易く入手できるようになってきた。そのため、私たちは、組換えバキュロウイルスを用いたプロテオリポソーム調製法が、膜シグナル伝達経路のような、複数の膜タンパク質が結合・解離を行いながら機能発現する複合システムを人工的に構成する実験などに、今後、有用となるだろうと考えている。上でも触れたように、人工細胞モデル研究では、GUV が多用される。そこで、私たちは、7 回膜貫通タンパク質である GPCR をモデルに選び、シグナル伝達経路の再構成の手始めとして、BV との膜融合による GUV のプロテオリポソーム化を検討した。

まず、野生型 BV を蛍光色素 (Alexa488) で標識し、静置水和法で調製した GUV との融合を調べた[9]。融合効率は、共焦点顕微鏡画像から得た GUV 膜の蛍光強度により評価した。GP64 は、細胞感染時、ホスファチジルセリン (PS) に結合し、さらに BV がエンドソーム内に取込まれると、低 pH によりその膜融合能が活性化、BV をエンドソーム膜に融合させる。この実験では、DOPC のほかに酸性リン脂質 (DOPS、DOPG、DOPA のいずれか) を含む GUV を用いた。図 2 に示すように、GUV が酸性リン脂質を含み、かつ、低 pH (4-5) で BV と混合されたときに、GP64 の機能により効率よく膜融合が起こることが分かった。膜融合は GUV 膜の流動性とも関連し、飽和/不飽和リン脂質膜にコレステロールを添加した実験から、膜が流動的なら高い融合効率が得られることが示された[9]。

ここで野生型 BV の代わりに、膜タンパク質を載せた組換え BV を用いれば、giant proteoliposome が得られるはずである。そこで、GPCR のアドレナリン  $\beta 2$  受容体 (ADRB2) 遺伝子を組み換えた BV を用意した。組換え BV を感染させた Sf9 細胞培養上清から超遠心分離により得た BV 粒子を、ショ糖密度勾配遠心操作により分離・精製することで、BV にヌクレオキャプシドのない異常粒子と、正常粒子

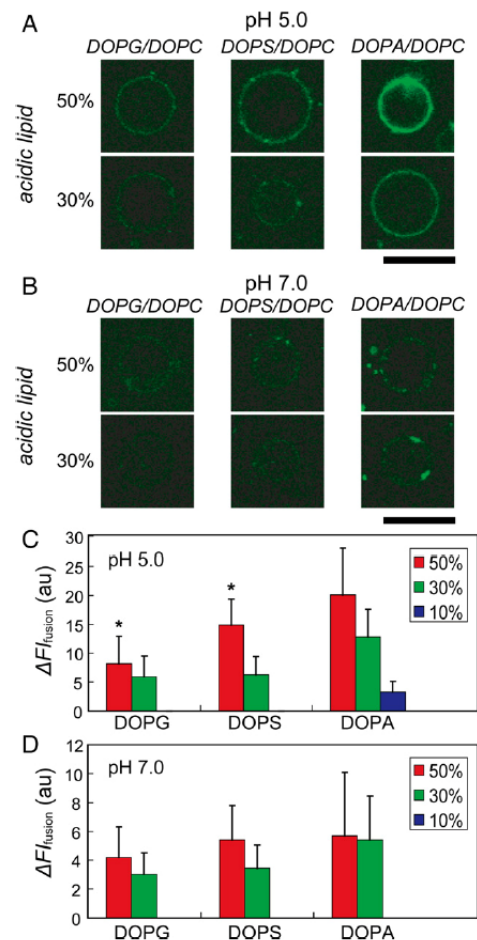


図 2: 蛍光標識 BV による GUV 膜融合[9]。酸性脂質含有且つ低 pH 処理時に融合が観察された。バーは 10  $\mu$ m。原著論文より、許可を得て転載。

とを含む画分が得られ、それぞれに、 $\beta 2$  受容体が発現していることが、再確認された (図 3)。このようにして得た  $\beta 2$  受容体発現 BV を、GUV と融合することで GUV 膜に  $\beta 2$  受容体を移行することができた。この  $\beta 2$  受容体は蛍光修飾アゴニストと特異的に結合した (図 4) [9]。

BV は、貫通型だけでなく、表在型やアンカー型の膜タンパク質を載せることができる。したがって、膜シグナル経路に関与する様々な要素を、逐次、人工膜へ導入することや、少数の要素からなるシステムを構成することなどを、狙ってみたい。実際は、GUV を生かしたアッセイを組むことが、なかなか難しく、目下、格闘中である。12 回貫通型の adenylate cyclase をこの方法で GUV 上に組込むと、GUV 内の基質が cAMP に転換されることは、最近確認した (投稿中)。

#### 4. GUV-細胞間相互作用

細胞間相互作用は、細胞分化、増殖、ステージの維持、各種細胞生理に関係するシグナル伝達や細胞間コミュニケーションを担ううえで重要である。ここでも多くの膜タンパク質の機能発現が必要であり、その再構成方法の開発は、生物物理化学的研究の他、医学的応用の側面からも重要と期待される。秋吉一成教授 (京都大学・工学研究科) と神谷厚輝博士 (神奈川科学技術アカデミー) は、共同研究を通じて、このバ

キュロウイルスリポソーム膜融合法を、コネクシン 43 (Cx43) の巨大リポソーム膜への組込みに適用し、成功した。さらに、Cx43 を搭載した GUV (蛍光プローブ (カルセイン) 封入) と Cx43 を発現する培養細胞との間で、“細胞間連絡路”であるギャップジャンクションが再構成されることを、GUV から細胞へのプローブの拡散により、明らかにした [10]。

また、秋吉教授らは、細胞接着分子であるカドヘリン (N-cadherin) の再構成にも、この方法を用いて成功している。ポリカーボネートメンブレン (孔径  $0.2 \mu\text{m}$ ) の押出しにより、サイズを小さくしたプロテオリポソームは、細胞への吸着後、エンドサトーシスで取り込まれた後、内容物が細胞質へ放出された。エンドソーム内で弱酸性環境を経験したことが、プロテオリポソーム膜に残存する GP64 活性を引き出し、恐らくエンドソーム膜との融合が起こったと考えられる。この経路は、まさしく、野生型 BV の感染時の侵入経路そのものである。このカドヘリンリポソームは、内容物を自在に選べることから、細胞内導入のための新規送達体として、利用が期待される [11]。

表 1 に、原著未発表のものも含めて、これまでにリポソームに組込めたタンパク質をまとめた。異種のサブユニットやタンパク質からなる、複雑な複合体システムを形成する場合は、まだまだ検討が

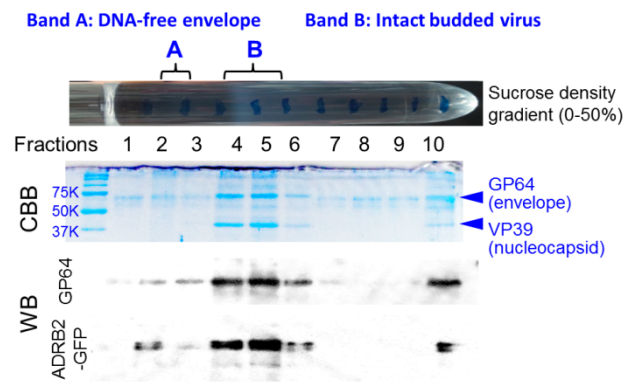


図 3: 組換え BV に搭載された  $\beta$  受容体。BV は、まず、超遠心分離後、シヨ糖密度勾配遠心で分離される (上部写真)。異常粒子 (A) は、エンベロープを含み、正常粒子 (B) にはさらにヌcleoキャプシドまで含まれる (中段 CBB 染色 SDS-PAGE 写真参照)。 $\beta$  受容体 (ADRB2) の C 末側融合した GFP に対する抗体で Western blot したところ、両粒子にも受容体が発現されていた (下段 WB 参照)。

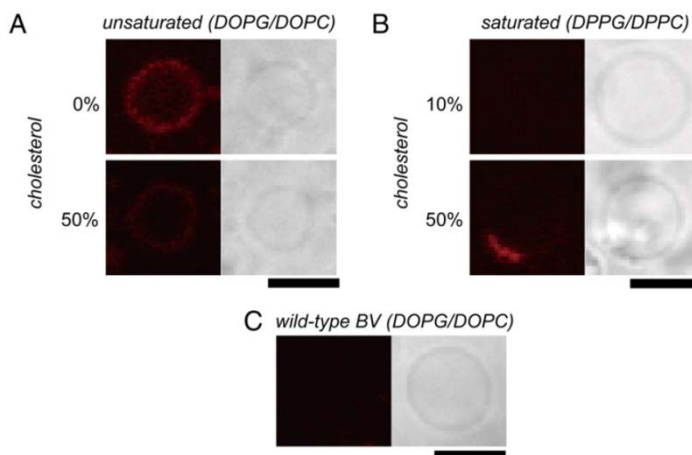


図 4: 組換え BV との膜融合により  $\beta$  受容体 (ADRB2) が搭載されたプロテオ GUV の共焦点顕微鏡像 [9]。蛍光標識アゴニスト (BODIPY630/650-conjugated  $\beta 2$  adrenaline receptor agonist) との結合により、受容体を可視化した。不飽和脂質含有 GUV では均一に受容体が分布した。飽和脂質含有 GUV では、コレステロールの添加により融合が起こったが、不均一な分布が目立った。バーは  $10 \mu\text{m}$ 。原著論文より、許可を得て転載。

必要である。一方、単一のサブユニットからなるタ、表 1: BV リポソーム膜融合による膜タンパク質の組み込み例 たと信じている。

## 5. おわりに

細胞機能の模倣を、GUV 上で実現する研究は、歴史は古いながら、今日までその意義・魅力は衰えることなく、多くの研究者が携わっている。GUV 調製方法も、マイクロデバイスなどを使ったトップダウンの手法から、水中における自己組織化に頼るボトムアップ的の手法など、さまざまなものが開発され続けている[12, 13]。GUV そのものも性質も、例えば、流動性や、形態変化、物質封入効率[14]といった、細胞を使った実験と比しても比較的単純と思われれる内容であっても、実は未知のことが多く、盛んに、研究対象とされている。リポソームなどの人工膜の研究開発と、本稿で紹介したバキュロウイルス膜融合法のような、膜に生物機能を付与する方法の開発とが、組み合わせられていけば、生きた細胞らしいふるまいをみせる人工細胞システムの実現に、本当に近づけるのではないかと考えている。

Membrane Proteins	Type	Functions	References
Thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR)	7TM	GPCR: Stimulation of Gas that promotes ADCY to produce cAMP	[5],[8]
Acetylcholine Receptor $\alpha$ subunit (AChR $\alpha$ )	4TM	Nicotinic cholinergic channel	[6]
Adrenergic receptor ( $\beta$ receptor) (ADRB2)	7TM	GPCR: Stimulation of Gas that promotes ADCY to produce cAMP	[9]
Adenylate cyclase (ADCY6)	12TM	Effectors under a GPCR pathway that produce cAMP	Submitted
Corticotropin-releasing hormone receptor (CRHR1)	7TM	GPCR: Stimulation of Gas that promotes ADCY to produce cAMP	In preparation
Connexin (Cx43)	4TM	Gap junctions that connect neighboring cells	[10]
N cadherin	1TM	Cell adhesion	[11]
tagRFP-GP64	1TM	Viral glycoproteins that cause membrane fusion	In preparation
Acetylcholinesterase (AChE)	GPI-anchored	Catalysis of hydrolysis of acetylcholine in synapses	

## 謝辞

本稿の内容は、本文中に挙げさせていただいた先生方のほか、小林淳先生（山口大・農）、冨田昌弘先生（三重大・工）との共同研究と、そして多くの学生さんの協力によって得られた成果です。ここに感謝申し上げます。本研究の実施にあたっては、科研費（23770222, 24107512）および物質・デバイス領域共同研究拠点共同研究の支援を得ました。

## 参考文献

- [1] 湊元幹太, *人工血液* (2010) 18, 15-24
- [2] Girard P, Pécéréaux J, Lenoir G, Falson P, Rigaud JL, Bassereau P, *Biophys. J.* (2004) 87, 419-429
- [3] Loisel TP, Ansanay H, St-Onge S, Gay B, Boulanger P, Strosberg AD, Marullo S, Bouvier M, *Nat. Biotechnol.* (1997) 15, 1300-1304
- [4] Masuda K, Itoh H, Sakihama T, Akiyama C, Takahashi K, Fukuda R, Yokomizo T, Shimizu T, Kodama T, Hamakubo T, *J. Biol. Chem.* (2003) 278, 24552-24562
- [5] Fukushima H, Mizutani M, Imamura K, Morino K, Kobayashi J, Okumura K, Tsumoto K, Yoshimura T, *J. Biochem.* (2008) 144, 763-770
- [6] Tsumoto K, Yoshimura T, *Methods Enzymol.* (2009) 465, 95-109
- [7] 吉村哲郎, 湊元幹太, 今村幸治, 森野和彦, 小林淳, 特許 5266459 (平 25. 5. 17)
- [8] Fukushima H, Matsuo H, Imamura K, Morino K, Okumura K, Tsumoto K, Yoshimura T, *J. Biosci. Bioeng.* (2009) 108, 551-556
- [9] Kamiya K, Kobayashi J, Yoshimura T, Tsumoto K, *Biochim. Biophys. Acta.* (2010) 1798, 1625-1631
- [10] Kamiya K, Tsumoto K, Arakawa S, Shimizu S, Morita I, Yoshimura T, Akiyoshi K, *Biotechnol. Bioeng.* (2010) 107, 836-843
- [11] Kamiya K, Tsumoto K, Yoshimura T, Akiyoshi K, *Biomaterials* (2011) 32, 9899-9907
- [12] Walde P, Cosentino K, Engel H, Stano P, *ChemBioChem* (2010) 11, 848-865
- [13] Tsumoto K, Matsuo H, Tomita M, Yoshimura T, *Colloids Surf. B* (2009) 68, 98-105
- [14] Shimizu T, Mori T, Tomita M, Tsumoto K, *Langmuir* (2014) DOI: 10.1021/la403361j

## 第7回バイオ関連化学シンポジウム開催報告 (第28回生体機能関連化学シンポジウム)

実行委員長 浅沼浩之 (名古屋大学大学院)

生物化学に関連する日本化学会の4つのコミュニティー(生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、生体機能関連化学・バイオテクノロジーディビジョン、フロンティア生命化学研究会)およびホスト・ゲスト・超分子研究会が主催する第7回バイオ関連化学シンポジウム(第28回生体機能関連化学シンポジウム)が、平成25年(2013年)9月27日(金)から29日(日)にかけて、名古屋大学豊田講堂・野依記念学術交流館で開催された。例年通り、ペプチド・タンパク・酵素、分子認識・超分子・モデル系、遺伝子関連などが関連する幅広いバイオ関連化学をシンポジウムのテーマとして掲げ、123件の口頭発表と240件のポスター発表が行われた。今年度は第11回ホスト・ゲスト化学シンポジウムも兼ねたこともあり、大変嬉しいことに3日間で500名を超えるほどの参加者が集い、口頭発表とポスター発表いずれも大いに議論が盛り上がった。

今年度は特別企画として「講演賞受賞者の“現在過去未来”」と銘打ち、現在バイオ関連の各分野をリードする第一線の研究者としてご活躍されている、初期のバイオ関連化学シンポジウム講演賞の受賞者の中から4名(以下参照)にご講演をお願いした。その際、招待講演者に対して大変僭越とは思ったが、1)受賞当時に行っていた研究内容、2)その内容が現在の研究にどのように発展あるいは展開したのか、といった内容をご講演のどこかに盛り込むよう注文を付け、受賞当時の研究内容と現在の研究を対比させながら今後の研究を熱く語っていただくようお願いした。

津本浩平 教授(東大院工):平成12年(2000年)受賞

菊地和也 教授(阪大院工):平成13年(2001年)受賞

田中健太郎 教授(名大院理):平成14年(2002年)受賞

一二三恵美 教授(大分大学全学研究推進機構):平成15年(2003年)受賞

各先生方は私の無粋なリクエストに対して期待以上に応えていただき、10年以上前の受賞当時の研究をどのように発展させて現在に至ったのか、そして今後何をを目指すのか、まさに「過去⇒現在⇒未来」を語っていただいた。またご講演者と同じ年に受賞された先生に座長をお願いし、受賞当時の世相を振り返りながら司会していただいた。当時はまだ駆け出しだった(失礼!)先生方の御研究が大きく展開されていく過程は圧巻であり、会場で聴講された多くの方々は魅了されると同時に圧倒されたことと思う。また講演賞を狙っている若い研究者にとっては応募するモチベーションが更に高まったのではないかと思う。

ここでバイオ関連化学シンポジウム講演賞(生体機能関連化学部会講演賞)の歴史を簡単に振り返らせていただく。平成12年(2000年)の第15回生体機能関連化学シンポジウムから講演賞が設けられ、生体機能関連化学に関する若手研究者の育成を目的として40歳以下(受賞時に部会員になって1年以上経過した者)の研究者を対象に、選考希望者の中から毎年4名(平成15年度より生体機能関連化学部会とバイオテクノロ

ジ一部会との合同開催が開始、そのため平成 15 年のみ 6 名) が選ばれている。13 回目となる平成 24 年 (2012 年) までに 54 名が受賞しており、そのほとんどがそれぞれの分野をリードする研究者へと成長している。レベルの高い 4 名の若手研究者が途切れることなく毎年輩出されているという事実は、バイオ関連分野の activity の高さを物語っていると思う。なお平成 25 年度 (2013 年) は、以下の 4 名が講演賞を受賞した

後藤佑樹氏 (東大院理)

PatD-FIT システム : アゾリン含有ペプチドの汎用合成系

遠藤玉樹氏 (甲南大 FIBER)

新生 RNA の転写共役フォールディングを利用した RNA 構造スイッチの設計

堀雄一郎氏 (阪大院工)

環境応答性発蛍光プローブと PYP タグを利用した細胞内蛋白質高速イメージング技術の開発と生物応用

山口拓実氏 (分子研)

ランタノイドイオンを活用した常磁性 NMR 法による糖鎖の動的構造解析



(左から) 浜地先生、深瀬先生、後藤氏、堀氏、遠藤氏、山口氏、鍋島先生、民谷先生

ところで今回過去の受賞者を調べていて分かったことだが、女性の受賞者は何と今回ご講演いただいた一二三先生だけであった。来年度以降、女性研究者も多数応募していただき、バイオ関連化学分野は女性もレベルが非常に高いことを是非示して頂きたいと、切に願っている。

最後に、本シンポジウムの開催に当たり、実行委員会を代表して参加者の皆様に厚く御礼申し上げます。また、運営でご協力頂きました名古屋大学大学院工学研究科および理学研究科の実行委員の先生方および研究室の皆様、部会の事務局の坂下修一様に御礼申し上げます。

## 第1回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム

### (第28回生体機能関連化学部会若手フォーラム) 開催報告

若手フォーラム世話人代表  
名古屋大学大学院工学研究科 榎田啓

第1回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラムは、生体関連若手会東海支部の榎田啓、荘司長三、萩原伸也（いずれも名古屋大学）、及びバイオテクノロジー部会から大河内美奈（名古屋大学）が世話人となり、9月26日（木）に名古屋大学野依記念物質科学研究館において開催いたしました。

今回初の試みとして、生体機能関連化学部会だけではなく、バイオ関連シンポジウムに参加する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・超分子化学研究会からも発表を募集いたしました。また、名称もバイオ関連化学シンポジウム若手フォーラムに変更いたしました。その結果、学生70名、一般31名、招待講演者4名、計105名の非常に多くの方にご参加いただきました。

今回は最先端で活躍する化学、生化学の分野から4名の先生を講師としてお招きし、それぞれ「人工シデロフォアによる微生物センシング素子の開発」（猪股智彦先生 名古屋工業大学）、「ナノを意識した蛋白質スマートデザイン」（梅津光央先生 東北大学）、「酵素基質の分子設計に基づく機能性タンパク質の翻訳後修飾技術の開発と展開」（神谷典穂先生 九州大学）、「交雑育種における種の壁を打破する分子を目指して」（東山哲也先生 名古屋大学）というタイトルで講演頂きました。講演はどれも興味深く、会場の方からも活発な議論が飛び交い大いに盛り上がりました。スケジュールがタイトであったため必ずしも十分なディスカッションが行えたとは言えませんが、参加者にとってそれぞれ大変刺激になったセッションだったと感じております。

また、今回からの試みとして学生ポスター賞受賞者をバイオ関連化学シンポジウムの懇親会に招待することに致しました。ポスター発表は講演に引き続いて行われ、61件（うち学生54件）もの発表をいただきました。いずれもレベルの高い発表ばかりで、こちらも発表時間を過ぎても白熱したディスカッションが収まりきらない様子でした。学生ポスター賞の審査には招待講演者も含め、29名もの先生にご尽力いただきました。その



結果、特に優秀な発表と認められた松村亮さん（東京大学大学院薬学系研究科）、白瀧千夏子さん（名古屋大学大学院理学研究科）、田部博康さん（京都大学大学院工学研究科）、平林和久さん（東京大学大学院薬学系研究科）、赤羽真理子さん（名古屋大学大学院工学研究科）の5名を学生ポスター賞受賞者としてバイオ関連シンポジウム懇親会に招待いたしました。今回は会場の関係から懇親会はポスター発表終了後に行いましたが、その分ポスター発表・審査と研究者間の交流をメリハリをつけて行うことが出来たと感じています。ポスター賞受賞者への表彰はバイオ関連シンポジウム懇親会の最中に執り行われました。懇親会に参加されている先生方と交流の機会が持てたことは受賞者の方にとってもよかったと思います。今回の若手フォーラム・ポスター発表・懇親会を通じて学生、研究者間の様々なインタラクションが生まれ、交流の場としての一助になりましたら運営側としては幸いです。

最後に、本会の運営と開催に関しましてご協力頂きました世話人の方々、若手会幹事の方々、ならびに日本化学会坂下修一様に厚く御礼申し上げます。また、合同若手フォーラムの件をご快諾頂きました日本化学会生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、フロンティア生命化学研究会、ホストゲスト・超分子化学研究会の先生方に厚く御礼申し上げます。さらに、事前準備や当日の運営でお世話になった名古屋大浅沼研究室、渡辺研究室、本多研究室、伊丹研究室の皆様、および生体機能関連化学部会、公益財団法人サントリー生命科学財団のご支援に感謝いたします。



ニュースレター Vol. 28, No. 3 2014年 1月 23日発行

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

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

URL: <http://seitai.chemistry.or.jp/> mail to: [seitai@chemistry.or.jp](mailto:seitai@chemistry.or.jp)

編集委員：高木昌宏、民秋 均、大槻高史、島本啓子