

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. 30, No.3 (2015. 12. 3)

## 目 次

- |   |               |
|---|---------------|
| ◇ 巻 頭 言   | .....城 宜嗣 1   |
| ◇ 研 究 紹 介   |               |
| 合成小分子化合物群を用いたペプチド性天然化合物合成酵素の選択的ラベル化技術の<br>開発と応用           | .....石川 文洋 2  |
| 巨視的な自律的機械運動を発現するアゾベンゼン誘導体・オレイン酸混合分子集合体<br>ー平衡から遠く離れた超分子運動 | .....景山 義之 6  |
| タンパク質特異的ラベル化を利用した電子顕微鏡イメージング法の開発                          | .....田畑 栄一 10 |
| ストライガ発芽機構の解明にむけた化学的アプローチ                                  | .....萩原 伸也 14 |
| ◇ 部 会 行 事   |               |
| 第 3 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 9 回 バイオ関連化学シンポジウム 開催報告                                  |               |
| 第 9 回 バイオ関連化学シンポジウム講演賞 講評                                 |               |

## 今年のノーベル賞によせて

兵庫県立大学大学院生命理学研究科  
理化学研究所 放射光科学総合研究センター  
城 宜嗣

ノーベル賞の季節である。今年は、我が国からは、医学生理学賞で大村智先生（北里大）と物理学賞で梶田隆章先生（東大）が受賞された。今更お二人の研究内容に触れるつもりは全くないが、その受賞理由が興味深い。報道によれば、大村先生の研究は「世界で数千万人を病気から救った研究」であり、梶田先生の研究は「知の地平線を拡大する作業」と言われている。「人の役にたつ研究」という観点からは、大村先生の研究は大いに役にたった研究であり、梶田先生の研究は全く役にたたない研究である。この事は、ノーベル賞の懐の深さを示すと同時に、「人の役にたつ研究」という視点は、研究を評価する上では一つの尺度でしかないことを示している。お二人共に、「知りたい」「作りたい」「分かりたい」といった知的好奇心から研究を始められて、その結果として素晴らしい研究成果をあげられたのだと拝察する。最近、課題審査や評価に携わることがあるが、若手研究者の方々があまりに「役にたつ」事を意識しすぎている。研究の波及効果はその課題を評価する上で重要な項目であるが、「人類の英知に貢献する研究」と自信を持って書いていただきたいものである。

さて、我々に関連の深い化学賞では、今年は、残念ながら日本人の受賞はなかった。しかし、そのテーマが「DNA の修復機構の解明」と聞けば、我々、生体関連化学の研究者は俄然勇気づけられる。115年にわたるノーベル賞の歴史の中で、化学賞の約三分の一は少なからず生命科学に関連した研究である。1962年の「ヘモグロビン、ミオグロビンの結晶構造解析」が我々にとっては最もなじみ深いであろう。21世紀になるとこの傾向はより顕著になって、2003年「アクアポリン、イオンチャネルの研究」、2004年「ユビキチンの研究」、2006年「真核生物の転写の研究」、2008年「GFPの研究」、2009年「リボソームの研究」、2012年「GPCRの研究」と、タンパク質そのものの研究にとどまらず、細胞機能の理解に直結する研究にシフトしているように見受けられる。ネットを見ていたら、この事をノーベル賞の分野分けを時代に合わせて再考するべきだといった意見もあった。違ふであろう。生命現象を分子レベルで理解する為には化学の力が必須であることを示していると思う。化学が挑戦できる研究分野が広がったのである。今後、化学は、より複雑で精緻な細胞機能を明らかにする方向へ向かっていても良いと思う。

このような傾向は一種の異分野融合であり、生体機能関連化学はまさにそのような場である。生体機能関連化学シンポジウムで、色々な方々の講演を聴いていて感じる事であるが、「素晴らしいな」と感じる研究は、発表者、指導者ともに、生命現象を非常によく勉強し、理解されている。化学という武器を持って、生命科学の分野に攻め込んでいる、新しい分野を拓こうという気概を感じる。私は生化学会にも参加しているが、そのような化学者の方々には是非そちらの学会にも参加していただきたいと感じている。一方、生命科学の材料を自分の分野に取り込んだ形の研究も多数見受けられる。そのような研究は精緻であり、分かり易い。役にたつ事を意識されている場合が多い。それを悪いとは一概に言えないが、わくわく感がないのはなぜであろうか。重箱の隅をつつく研究にだけは行かないでいただきたいなと感じて聞いている時もある。

ノーベル賞に話を戻せば、21世紀になって自然科学系で13名の日本人の方々が受賞されている。それらいくつかのルーツは、おそらく1970～80年代の研究に行き着くような気がする。私がちょうど研究の世界に入った時代であり、イノベーションという言葉は全く聞かなかった時代である。その頃の研究現場の雰囲気や気概をもう一度思い出してみたいと思う今日この頃である。さて、科研費の申請書には「歴史に残る研究」と書いてみようか。

## 合成小分子化合物群を用いたペプチド性天然化合物合成酵素の 選択的ラベル化技術の開発と応用

京都大学大学院薬学研究科 石川 文洋

### 1. はじめに

微生物が産生する有用な天然化合物（例: lovastatin、cyclosporin、vancomycin）は、その構造的および生物活性の多様性から重要な研究ツールとなり創薬シーズとなってきた。また、薬剤耐性菌を含む病原細菌の多くは、病原性因子として必要不可欠な機能を有する天然化合物（例: pyoverdine、mycobactin、yersiniabactin）を産生する。そのため、病原細菌の二次代謝経路は新たな創薬標的としても注目を集めている<sup>1</sup>。このような天然化合物の多くは、ポリケチド合成酵素（PKS）、非リボソーム性ペプチド合成酵素（NRPS）、PKS-NRPS ハイブリッド型酵素により合成される<sup>2</sup>。PKS、NRPS、PKS-NRPS は、複数の酵素ドメインが繋がった巨大タンパク質（平均分子量: 200-800 kDa）であるため、その全長を組換えタンパク質として発現精製し、試験管内で評価することは簡単なことではない。また、部分的に切出して調製する場合も、本来の機能を失っている可能性もある。そのため、生体内やプロテオームを含む複雑系に存在するこれら酵素群に迅速かつ簡便にアプローチできれば、遺伝子工学的手法と相補的な技術の確立につながる。また、プロテオミクスに立脚した未利用遺伝子資源の網羅的探索技術や病原細菌の二次代謝制御へ向けた創薬基盤が構築できると考えている。

本稿では、我々が開発に取り組んでいる化学プローブを利用したペプチド性天然化合物合成酵素の高選択的ラベル化技術について紹介する。

### 2. NRPS A-domain に対する選択的ラベル化剤の開発

ペプチド性天然化合物の多くは NRPS によって合成される。NRPS は多モジュール型巨大タンパク質であり、個々のモジュールは adenylation (A)-、thiolation (T)-、

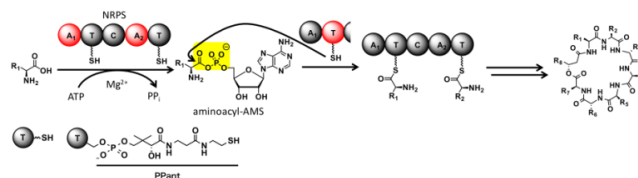


図 1. 非リボソーム性ペプチド合成酵素（NRPS）。

condensation (C)-domain を基本構成単位として有している。A-domain は、非常に厳密

な基質特異性を有し、20 種の天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アリアル酸などの生体内プールから特異的に 1 つを ATP、Mg<sup>2+</sup> 存在下、アミノアシル/アシル-AMP に活性化する（図 1）。そのため、A-domain はペプチド性天然化合物合成における”gatekeeper”の役割を担っている。次に、下流の T-domain に存在する 4'-ホスホパンテテイン（PPant）末端のチオール基（T-domain は、セリン残基が翻訳後修飾を受けてホスホパンテテイン化されている。）にその基質を受け渡す（図 1）。続いて、C-domain が上流の T-domain に担持されたアミノ酸（ペプチド鎖）および下流の T-domain に担持されたアミノ酸のペプチド結合形成反応を触媒する。一般に、基質の活性化、T-domain による基質の担持、C-domain によるペプチド結合の形成の 3 サイクルを繰り返すことによってペプチド性天然化合物の合成が進行していく。そこで、すべての NRPS モジュールに必ず存在し、厳密な基質特異性を有する、A-domain の酵素的性質を利用することにより、テーラーメイドな A-domain のラベル化技術が開発できると期待した。

1984年に放線菌から核酸系抗生物質として ascamycin が単離された (図 2)<sup>3</sup>。また, ascamycin の脱クロロ誘導体 5'-O-N-(L-alanyl)sulfamoyl adenosine (L-Ala-AMS) が、アラニル tRNA 合成酵素によるアミノアシル化反応の高反応性中間体である L-Ala-AMP の生物学的等価体であることが示された<sup>4</sup>。その後、アミノアシル-AMS は、

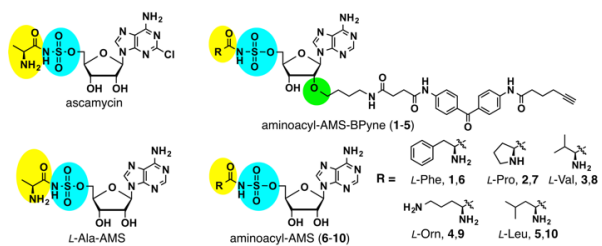


図 2. Ascamycin、L-Ala-AMS、A-domain に対するラベル化剤 (1-5) および競合的阻害剤 (6-10)。

種々の tRNA 合成酵素の X 線結晶解析を行うためのリガンドとして用いられてきた<sup>5</sup>。そのため、tRNA 合成酵素と同様のアミノアシル化反応を触媒する A-domain に対してもアミノアシル-AMS をリガンドとして応用することが可能であると予想した。さらに、リガンドのアミノ酸を入れ替えることによって、リガンド認識駆動によって 1 つ 1 つの A-domain に対して選択的に結合することが期待される。そこで、①アミノアシル-AMS リガンド、②近傍の標的タンパク質と光化学反応により共有結合形成可能なベンゾフェノン、③クリックケミストリーにより、蛍光標識あるいはビオチン官能基を導入可能なアルキンからなる A-domain に対するラベル化剤の設計を行った (図 2)。また、A-domain はアデノシン骨格の 2'-OH 基への化学修飾に非常に寛容であるため<sup>6</sup>、2'-OH 基に光反応性基およびアルキン官能基を有するクロスリンカー (BPyne) を導入した (図 2)。リガンドのアミノ酸として、L-Phe、L-Pro、L-Val、L-Orn、L-Leu を有する L-Phe-、L-Pro-、L-Val-、L-Orn-、L-Leu-AMS-BPyne (1-5)、競合的阻害剤として L-Phe-、L-Pro-、L-Val-、L-Orn-、L-Leu-AMS (6-10) の合成を行った (図 2)<sup>7,8</sup>。

夾雑系に存在する環状ペプチド性抗生物質グラミシジン S (GS) 合成酵素の 2 つの NRPS (GrsA、GrsB) を標的とし、アミノアシル-AMP-BPyne プロブの機能評価を行った (図 3a)。GrsA は L-Phe に基質特異性をもつ A-domain を有する NRPS モジュール (120 kDa) である。一方、GrsB は 4 つの NRPS モジュールから構成される巨大タンパク質 (508 kDa) であり、1 つのタンパク質中にそれぞれ L-Pro、L-Val、L-Orn、L-Leu に基質特異性をもつ 4 つの A-domain を有している。まず、GS 産生菌である *Aneurinibacillus migulanus* を培養し、微生物抽出液を作製した。続いて、微生物抽出液を L-Phe-、L-Pro-、L-Orn-BPyne (1,2,4) で処理し、UV 照射、クリック反応により標識の導入を行った (図 3a)。SDS-PAGE の解析により、GrsA、GrsB の分子量の位置にラベル化タンパク質が検出された (図 3bcd)。これらタンパク質のラベル化は、それぞれ L-Phe-、L-Pro-、L-Orn-AMS (6,7,9) の添加により特異的に阻害された (図 3bcd)。最後に、GrsB は 4 つの A-domain を有しているため、L-Pro-、L-Orn-AMS-BPyne (2,4) が標的である A-domain のみに選択的に結合することによって GrsB をラベル化しているか検討を行った。微生物抽出液を L-Phe-、L-Pro-、L-Val-、L-Orn-、L-Leu-AMS (6-10) で処理後、プロブ 2、4 を添加し、GrsB のラベル化を SDS-PAGE により評価した。その結果、プロブ 2、4 による GrsB のラベル化は、それぞれ L-Pro-AMS (7)、L-Orn-AMS (9) の添加によってのみ阻害されることから、リガンド認識駆動によって L-Pro、L-Orn に基質特異性を有する A-domain にそれぞれ選択的に結合することによって観測されることが示された (図 3e)。

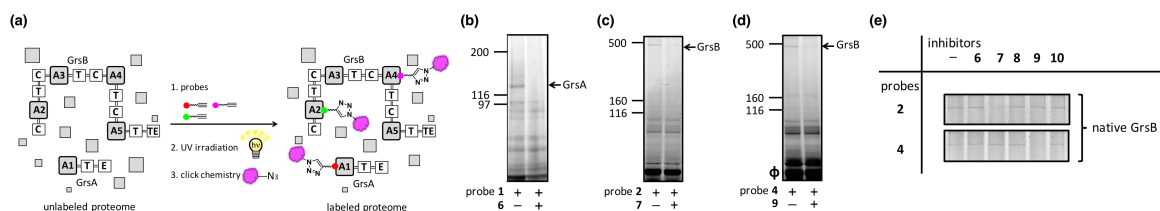


図 3. 微生物抽出液を用いたプローブ (1,2,3) による NRPS (GrsA, GrsB) のラベル化。(a) ラベル化の概略図。(b) プローブ 1 による GrsA のラベル化。(c) プローブ 2 による GrsB のラベル化。(d) プローブ 4 による GrsB のラベル化。(e) 競合的阻害剤 (6-10) 存在下におけるプローブ (2,4) による GrsB のラベル化。図 3a において、thiolation (T)、condensation (C)、epimerase (E)、adenylation (A) [A1: *L*-Phe; A2: *L*-Pro; A3: *L*-Val; A4: *L*-Orn; A5: *L*-Leu に基質特異性を有する A-domain] の略語を用いて表記している。図 3b-3e は蛍光画像 ( $\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$ ) を示している。

### 3. NRPS 酵素活性のプロファイリング

NRPS は、微量かつ一過性に発現するタンパク質であるため、網羅的に解析し、機能評価することは容易なことではない。一因として夾雑系に適応可能な解析技術が存在しないことが挙げられる。

そこで、A-domain に対する選択的ラベル化剤 *L*-Phe-*L*-Leu-AMS-BPyne (1,5) を用いて NRPS (A-domain) 酵素活性の網羅的解析へ向けた最初の取り組みを紹介する<sup>8</sup>。4 種の *A. migulanus* (DSM 5668, DSM 5759, DSM 2895, ATCC 9999) が GS 生産菌として保存されている。これら微生物株を NBYS 培地、YP 培地で培養することにより、DSM 5759、ATCC 9999

は GS 生産性を示すのに対し、DSM 5668、DSM 2895 は全く生産性を示さないことが報告されている<sup>9</sup>。まず、これら微生物株を YPG 培地 (GS 生産培地) で培養し、プローブ 1,5 により DSM 5759、ATCC 9999 が発現している GrsA、GrsB の

ラベル化を検討した。また、YPG 培地へと培養条件を変更することにより、DSM 5668、DSM 2895 の GS 産生を誘導し、培養条件を最適化できないか検討を行った。さらに、発現誘導された GrsA、GrsB をプローブ 1,5 によって検出できることを期待した。そこで、4 種の微生物株を YPG 培地で 24 時間培養し微生物抽出液を調製後、プローブ 1,5 を添加し GrsA、GrsB のラベル化を行った。その結果、DSM 5759 および ATCC 9999 抽出液中でプローブ 1 による GrsA のラベル化が観測された (図 4a)。さらに、プローブ 5 を利用することにより DSM 5759、ATCC 9999 に加えて DSM 5668 抽出液中においても GrsB を検出することができた (図 4a)。一方、DSM 2895 抽出液中ではプローブ 1,5 による GrsA および GrsB のラベル化は観測できなかった (図 4a)。また、プローブによるラベル化 (GrsA、GrsB 発現量) の結果は、GS 生産量と良い相関を示した (図 4a)。続いて、DSM 5759 を用いて NRPS 発現の経時変化を追跡することとした。培養開始から 12、16、20、24 時間後の菌体を回収し、微生物抽出液を調製後、

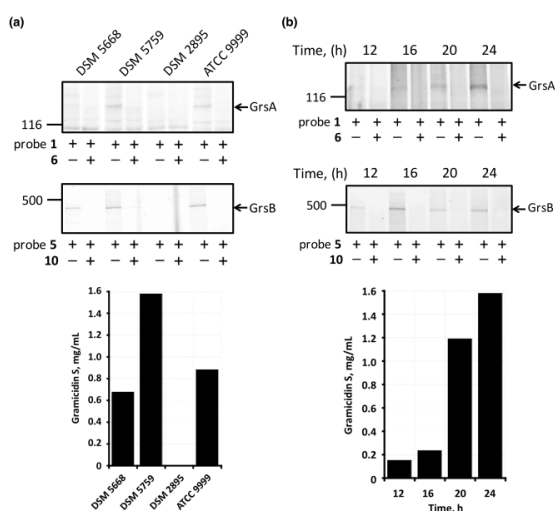


図 4. NRPS 酵素活性のプロファイリング。(a) 各微生物抽出液を用いた GrsA および GrsB のラベル化および GS 生産量。(b) DSM 5759 抽出液を用いた NRPS 発現の経時変化および各時間当たりの GS 生産量。図 4a、4b は蛍光画像 ( $\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$ ) を示している。

プローブ **1,5** で処理した。SDS-PAGE 解析の結果から、GrsA は、培養開始 16 時間後から観測され、その発現量は時間経過とともに増大した (図 4b)。一方、GrsB は、培養開始 12 時間後には検出され、その発現量は 16 時間後に最大となり時間経過とともに減少した (図 4b)。これは、GS 生産量が大きく増える時間と良く一致した (図 4b)。また、*grsA* および *grsB* は、ポリシストロニックに遺伝子発現が制御されているにも関わらず<sup>10</sup>、タンパク質レベルでは全く異なった発現プロファイルを示した。このように、A-domain に対するラベル化剤は、天然化合物生産菌あるいは非生産菌の選別、培養条件の探索、NRPS の動態解析へ応用することができ、プロテオーム解析へ向けた有用な分子ツールになると期待される。

#### 4. まとめと展望

本研究では、A-domain の有する厳密な基質特異性に着目することにより、夾雑系に存在する A-domain/NRPS を迅速、簡便、高感度にラベル化する合成化合物群を開発した。これらラベル化剤は、リガンド認識駆動によって高選択的に A-domain/NRPS を検出できる。今後は、これら一連の基盤技術に立脚し、未利用遺伝子資源の網羅的探索技術および病原細菌の二次代謝制御基盤の構築へと研究を展開する予定である。

#### 謝辞

本研究は、京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学専攻 掛谷研究室にて実施しているものです。掛谷秀昭教授には常日頃から甚大なご支援とご指導を頂いており、ここに厚く御礼申しあげます。また、日々実験を共に実施している今野翔氏、笠井昭太氏に心から感謝致します。質量分析によるタンパク質同定実験では、理化学研究所環境資源科学研究センター生命分子解析ユニットリーダー堂前直博士、専任技師鈴木健裕博士に多大なる協力を頂いており、ここに深く感謝致します。本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金の支援により実施されました。

#### 参考文献

- (1) Cisar, J. S.; Tan, D. S. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1320–1329.
- (2) Walsh, C. T. *Science* **2004**, 303, 1805–1810.
- (3) Isono, K. *et al. J. Antibiot.* **1984**, 37, 670–672.
- (4) Ueda, H. *et al. Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1080, 126–134.
- (5) Fukai, S. *et al. Cell* **2000**, 103, 793–803.
- (6) Ishikawa, F.; Takeya, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 865–869.
- (7) Konno, S.; Ishikawa, F.; Suzuki, T.; Dohmae, N.; Burkart, M. D.; Takeya, H. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 2262–2265.
- (8) Ishikawa, F.; Konno, S.; Suzuki, T.; Dohmae, N.; Takeya, H. *ACS Chem. Biol.* **2015**, 10, 1989–1997.
- (9) Berditsch, M.; Afonin, S.; Ulrich, A. S. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, 73, 6620–6628.
- (10) Kratzschmar, J.; Krause, M.; Marahiel, M. A. *J. Bacteriol.* **1989**, 171, 5422–5429.

## 巨視的な自律的機械運動を発現する アゾベンゼン誘導体・オレイン酸混合分子集合体 —平衡から遠く離れた超分子運動

北海道大学大学院理学研究院・JST さきがけ 景山 義之

### 1. はじめに

生命を模倣することは、長年、多くの研究者が目指してきた目標の一つである。生命は、人工的には作り出せていない、複雑かつ多様な魅力を有している。各学問分野において様々な方向性をもってバイオミメティクス研究が推進され、最近では、人工知能と機械運動性を兼ね備えた人型ロボットが市販されるようになってきた。

化学の視点におけるバイオミメティクス研究、すなわち生体模倣化学は、1950年代から活性化した<sup>[1]</sup>。補酵素が触媒する反応の機構探求から発展し、補酵素の分子構造を拡張したり超分子化したりすることで、有意義な模倣反応を実現してきた。このような化学における分子機能からのアプローチに対して、物理学では、生命システムの動態の探求と模倣からの研究が進められている。細胞はなぜ動くことができるのか、世代間に渡る生命活動の継続はどのようにして起こるのか、といった関心と共に、そのモデルを構築している。筆者のような化学者は、このような課題は、分子モーターや遺伝子といった、個々の分子の化学過程の理解で片付く問題であると、つい錯覚してしまう。例えば、分子モーターが動けば細胞は当然動くだろうと考えてしまう。しかし、ツルツルのスケートリンクの上で、我々が脚を動かしても前に進めないと同様、適切な摩擦が協同的に機能しないと、分子モーターがどんなに動こうが細胞は動くことができない。すなわち、動的な現象である生命を化学的に模倣するためには、機能性の分子に注目するだけでなく、協同的な仕組みが働く分子システムとして模倣していく必要がある。そのような視点の下、筆者が博士研究員として所属した菅原正研究室では、ベシクルの自触媒的自己生産系の構築<sup>[2]</sup>、ベシクル内での PCR 反応<sup>[3]</sup>と連動したベシクル自己生産系の構築<sup>[4]</sup>など、生命の動態を（分子としては生命と似ているとは全く思えないような）分子システムとして模倣していく研究を展開してきた。

筆者は現在、刺激応答型分子で分子集合体を秩序立てて動かす研究に取り組んでいる。刺激応答により構造変化をする分子は、これまで数多く創出されてきた。アゾベンゼン誘導体はその代表例である。トランス体アゾベンゼンは、紫外光照射による $\pi$ - $\pi^*$ 励起により、シス体へと異性化する。また、シス体アゾベンゼンは、可視光照射による  $n$ - $\pi^*$ 励起や熱により、トランス体へと戻る。この可逆な光異性化により、分子は大きく構造変化し、光吸収波長、遷移双極子モーメントの向き、極性も変化する。この特徴を超分子系に活かした研究が、当部会の関係においても、数々報告されてきた。アゾベンゼン修飾シクロデキストリン<sup>[5]</sup>やクラウンエーテル<sup>[6]</sup>の包摂能制御、DNA の二量化制御<sup>[7]</sup>などがその例である。光異性化によってアゾベンゼンの構造や機能はナノレベルで大きく変化する一方、それを凝縮系にしたとき、その構造変化に応じるほどの巨視的な形態変化を実現することは実は困難である。池田らが、偏光を用いてアゾベンゼンポリマーの巨視的形態変化を実現したのは<sup>[8]</sup>、19世紀半ばに端を発するアゾベンゼンの歴史の中では、ごく最近のことである。両親媒性アゾベンゼン誘導体を用いた分子集合体の光誘起形態変化も実現されてきたものの、その多くは微視的な形態変化であった。そのような中で、濱田らによる、アゾベンゼン誘導体混合リポソームの、奇抜な光誘起形態変化の報告は、先駆的なものであるといえる<sup>[9]</sup>。このような研究背景の下、筆者は、協同的な仕組みを導入することによって、アゾベンゼン光異性化が誘起する分子集合体の秩序性のある動きを実現しようと考えた。

## 2. オレイン酸・アゾベンゼン誘導体混合分子集合体（液晶相）の光誘起運動

脂肪族カルボン酸の  $pK_a$  は、一般に 4.7 程度である。しかし、水中で自己集合化すると、カルボキシ基間距離の減少に伴う静電的な相互作用や、水の活量の変化などに伴い、みかけの  $pK_a$  ( $pK_{a,app}$ ) が変化する。オレイン酸の場合、環境に依存するものの、 $pK_{a,app}$  が 7.5 程度であり、pH 7.5 付近では、pH の僅かな変化でオレイン酸・オレイン酸アニオンの組成比が大きく変化する。結果として、オレイン酸は、水中で pH 依存的な集合挙動を示す。pH 8.2 程度のアルカリ性では、オレイン酸アニオンが主成分となった二分子膜ベシクルを形成し、pH 7.9 付近では、オレイン酸がやや多い組成の紐状集合体が、pH 7.7 付近では、オレイン酸とオレイン酸アニオンが同程度混合したらせん状の集合体を形成する（緩衝液の種類や温度などで、形成する pH 領域は変化する）<sup>[10]</sup>。

ここで、もしも、自己集合体の中のオレイン酸カルボキシ基間の距離を、外的刺激によって変えることができたならば、どうなるであろうか？ カルボキシ基間に働く相互作用が変化するのだから、オレイン酸カルボキシ基の  $pK_{a,app}$  が変化する。つまり、集合体内でのオレイン酸・オレイン酸アニオン比が変化し、自己集合体の構造変化が起こることが期待される。

そこで筆者らは、オレイン酸の自己集合体に、アゾベンゼン誘導体を添加し、アゾベンゼンの光異性化に伴う分子構造変化によってオレイン酸の平均分子間距離を変化させてみることにした。

オレイン酸ナトリウムに対し、両親媒性アゾベンゼン(1)を 10wt%混合し、緩衝水溶液に分散させると、pH 依存的に、ベシクル、紐状集合体、らせん状集合体などが形成した。蛍光顕微鏡を用いて、365 nm の紫外光を照射すると、図 1 に示すように、ベシクルは扁平なベシクルへと、紐状集合体は長さが数割伸びた紐状集合体へと、形態変化した。らせん状集合体は、らせんをほどく方向への秩序だった回転運動を発現した。いずれも、435 nm の可視光を照射すると、逆方向への形態変化を示した<sup>[11]</sup>。

回転運動という、規則性のある巨視的な運動を実現できたのは、オレイン酸の特徴的な自己集積性に由来するものである。紫外光照射下における 1 のトランス・シス光異性化が、集合体の分子間距離を拓げると同時に、集合体のオレイン酸アニオンの割合が上昇し、紐状の集合体へと変化しようと回転運動を発現している。なお、紫外光照射による 1 のトランス・シス光異性化によって、オレイン酸と 1 の混合膜の平均分子断面積が広がることは、表面圧測定によって明らかとなっている。また、紫外光照射下においてカルボキシ基の脱プロトン化が起きていることは、pH 滴定および FTIR 差スペクトルの計測によって確認された<sup>[12]</sup>。

また、卵黄レシチンに対し、1 を 20wt%程度混合して形成したベシクルに対して紫外光照射をした場合、ベシクルがゆれる程度の変化を示しただけであり、同成分で形成したらせん状マルチラメラーチューブ（らせん状ミエリン）も、その長さを数%変えるのみであった。このことから、アゾベンゼン誘導体の光異性化に伴う構造変化に加え、カルボキシ基の酸解離という分子の協同的な振る舞いが、巨視的かつ秩序性のある運動発現の鍵になっていることが類推される。

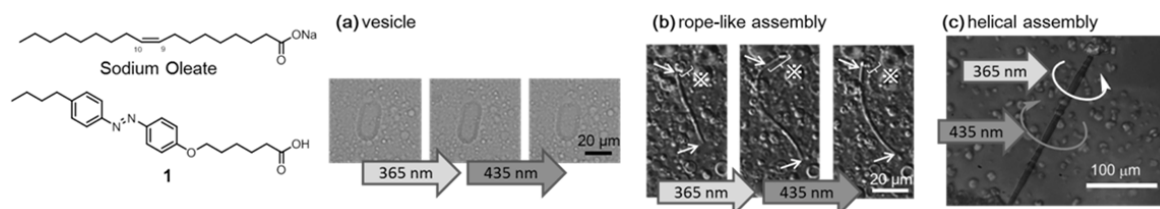


図 1 オレイン酸ナトリウム・アゾベンゼン誘導体(1)混合分子集合体（液晶相）の光誘起形態変化 (a) ベシクルの変形 (b) 紐状集合体の伸長と収縮（※部分では、らせん状集合体がほどける形態変化もみられる） (c) らせん状集合体の回転運動（参考文献 11 の補足資料に動画を掲載）。



### 3. オレイン酸・アゾベンゼン誘導体混合分子集合体（結晶相）の光誘起振動現象

昨今、分子および超分子の機械的運動の創出研究において、散逸的かつ自律的な運動を創出することの重要性が強く認識されている<sup>[13]</sup>。散逸的とは、エネルギーを与え続ける限り、そのエネルギーを消費して動き続ける、平衡から遠く離れた性質であり、自律的とは、運動する物体自体の特性に秩序づけられた運動をする性質である。例えば本年、Crediらは、アゾベンゼン誘導体の軸とクラウンエーテルの環を有する擬ロタキサンを合成し、光照射下において、環が軸の片端から反対側へと極性をもって継続的に移動する（スレディング・アンスレディングを繰り返す）ことを報告している<sup>[14]</sup>。この報告の鍵現象の一つは、アゾベンゼンのトランス体・シス体いずれにも波長 400~500 nm の領域に  $n-\pi^*$  吸収があり、青色光照射下で、トランス体とシス体の間での光異性化が繰り返される現象である。彼らの光定常状態での溶液中での分子の運動は、残念ながら巨視的運動としては観察されない。一方で、Feringa が基盤上に光駆動分子ローターを集積させることで物体の運動を実現したように<sup>[15]</sup>、適切な協同現象が働く集積型分子システムにすることで、繰り返し性と方向性のある可視的運動を実現できるかもしれない。

筆者らは、オレイン酸と **1** からなる結晶相の分子集合体を調製し、その青色（波長 435 nm）光照射下で発現する運動を観察した。結晶は、分子がラメラ状に集積した、一辺数十  $\mu\text{m}$ 、厚さ 1  $\mu\text{m}$  未満の平らな薄膜状であり、オレイン酸と **1** の組成比は 4:6 であった。青色光照射下でその結晶は、平面型から屈曲型へと形態を変えた後、さらなる光照射で元の平面型に戻る運動を周期的に繰り返した（図 2）<sup>[16]</sup>。振動周波数が光強度に比例する振る舞いは、与えたエネルギーを消費して運動を繰り返す「散逸性」を、また運動形態が集合体の構造に特徴付けられている点は、運動の「自律性」を示している。

小角側の X 線回折から、暗所における結晶は面間隔 4.6 nm であることが分かった。一方、青色光照射下では、面間隔 4.6 nm の結晶に加え、面間隔 4.0 nm の新たな結晶が生じていることが分かった。これは、青色光照射下で、二つの結晶相の間での相転移が繰り返されていることを示している。また、振動挙動の反応速度論的解析から、結晶相の違いによって光異性化反応速度が異なり、相転移前後で光異性化反応のみかけの方向が逆転していることが明確になった。すなわち、平面型（面間隔 4.6 nm）の結晶内では、青色光照射下でトランス体からシス体への光異性化が進行し、相転移を経て生じた屈曲型（面間隔 4.0 nm）の結晶内では、青色光照射下でシス体からトランス体への光異性化が進行し、組成が元の状態に戻ると共に、結晶相も元の相へと戻っている。

ではなぜ、結晶相によって反応効率が変化するのか。相転移による光吸収断面積の変化が反応効率を変えている、あるいは、結晶内での分子配列の変化が光異性化に必要な空隙を変化させ、反応効率を変えている、といったことが考えられる。本現象については、現在投稿中であることから、別の機会にてその詳細を紹介したい。

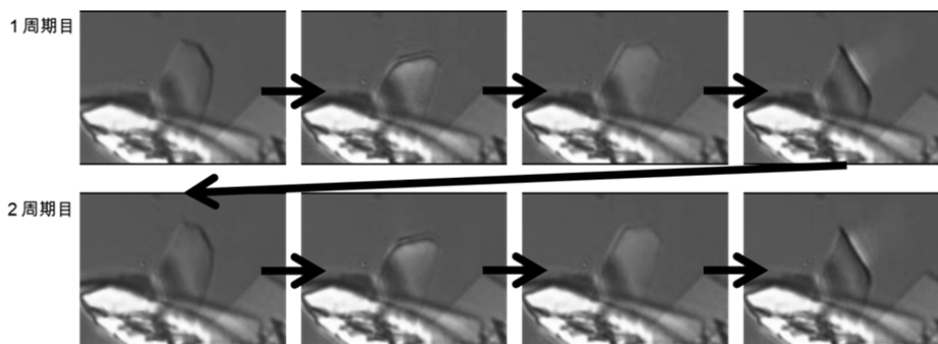


図 2 オレイン酸とアゾベンゼン誘導体(**1**)混合分子集合体（結晶相）の光誘起自励振動

#### 4. おわりに

分子の自己集合と、外界からの継続的なエネルギー摂取（化学反応）が連動することによって形成される、時空間自己組織化現象は、恒常性と動的機能を有する生命現象発現の基本的原理である。一方で、これまでの化学は、自己集合の研究を含め、「平衡に近づく系」や、「平衡における現象」を主たる対象にしてきた。換言すると、それぞれ、「死に向かう様子」や「死んでいる状態」を対象としてきた、ということでもある。生命のような生きた現象、平衡から遠く離れた現象を創出していくためには、自己組織化を見据えた設計・合成の分子技術と、その仕組みを理解する分子技術が求められる。しかし、その学理は未成熟であり、その構築は真に冒険的な研究テーマである。若手研究者の一人として、今後とも挑戦的な姿勢で研究を継続していきたいと思っている。

#### 謝辞

本研究は、北海道大学大学院理学研究院化学部門液体化学研究室で行った成果であり、武田定教授のご助言とご協力に感謝申し上げます。また、報文にならないような成果も含め、学生諸氏の数々の実験による協力が、研究の背景にあることを申し上げます。特に、池上智則氏には、自励振動現象の発現と機構探求について、多大な貢献をして頂きました。FTIR 差スペクトル計測については、理研の久保稔先生・木村哲就先生（現・神戸大）の助言をいただき、御礼申し上げます。本研究の実施にあたり、JST さきがけ「分子技術と新機能創出」の支援を頂きました。加藤隆史総括をはじめ関連する先生方に感謝申し上げます。最後に、自己組織化を利用した時空間的に展開する生命システムのモデル化を目指した重要なきっかけの一つは、第 20 回生体機能関連化学シンポジウム特別講演における国武豊喜先生の「生体模倣化学では生命の本質に迫れないので自己組織化に傾倒した」という一言であり、聴講の機会を提供して下さった生体機能関連化学部会および関連の先生方にも感謝申し上げます。

#### 参考文献

- [1] R. Breslow, E. McNeils, *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 3080-3082 (1959); R. Breslow, *Chem. Soc. Rev.* **1**, 553-580 (1972).
- [2] H. Takahashi, Y. Kageyama, T. Sugawara, *et al.*, *Chem. Commun.* **46**, 8791-8793 (2010).
- [3] K.-i. Shohda, Y. Kageyama, T. Sugawara, *et al.*, *Soft Matter* **7**, 3750-3753 (2011).
- [4] K. Kurihara, Y. Okura, M. Matsuo, T. Toyota, K. Suzuki, T. Sugawara, *Nature Commun.* **6**, 8532 (2015).
- [5] A. Ueno, Y. Hiromitsu, S. Rumiko, O. Tetsuo, *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 2779-80 (1979).
- [6] S. Shinkai, T. Ogawa, T. Nakaji, Y. Kusano, O. Manabe, *Tetrahedron Lett.* **20**, 4569-4572 (1979).
- [7] H. Asanuma, T. Ito, T. Yoshida, X. Liang, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 2393-2395 (1999).
- [8] Y. Yu, M. Nakano, T. Ikeda, *Nature* **425**, 145 (2003).
- [9] T. Hamada, R. Sugimoto, M. C. Vestergaard, T. Nagasaki, M. Takagi, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 10528-10532 (2010).
- [10] Y. Kageyama, T. Ikegami, N. Hiramatsu, S. Takeda, T. Sugawara, *Soft Matter* **11**, 3550-3558 (2015).
- [11] Y. Kageyama, Y. Kurokome, S. Takeda, T. Sugawara, *et al.*, *Chem. Commun.* **49**, 9386-9388 (2013).
- [12] Y. Kageyama, T. Ikegami, Y. Kurokome, S. Takeda, *submitted*.
- [13] E. R. Kay, D. A. Leigh, F. Zerbetto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 72-191 (2007).
- [14] G. Ragazzon, M. Baroncini, S. Silvi, M. Venturi, A. Credi, *Nature Nanotech.* **10**, 70-75 (2015).
- [15] R. Eelkema, M. M. Pollard, J. Vicario, N. Katsonis, B. S. Ramon, C. W. M. Bastiaansen, D. J. Broer, B. L. Feringa, *Nature* **440**, 163 (2006).
- [16] T. Ikegami, Y. Kageyama, S. Takeda, *submitted*.

## タンパク質特異的ラベル化を利用した電子顕微鏡イメージング法の開発

九州大学大学院薬学研究院 田畑 栄一

### 1. はじめに

電子顕微鏡は電子線を用いて対象を可視化する手法である。電子顕微鏡では数 pm という、非常に波長の短い電子線を観察に利用するため、波長が数百 nm の可視光を用いた光学顕微鏡よりもはるかに高い、1 nm 未満の分解能での観察が可能になる。電子顕微鏡で特定の分子を可視化するには、抗原-抗体反応を利用して標的分子を金ナノ粒子のように電子散乱効果の高い物質で標識する、免疫電顕法が一般的に用いられる。しかし、従来の免疫電顕法では、抗体自身の大きさにより標的分子の位置情報の精度が下がる、ということが名古屋大学の藤田らによって示されている<sup>[1]</sup>。藤田らは、金ナノ粒子で標識したグルタチオン *S*-トランスフェラーゼ (GST) を免疫電顕法により、異なるサイズの金ナノ粒子で標識して TEM で観察したところ、両者が離れて観察され、その距離は抗体二分子に相当する 16 nm であることを示した (図 1)。つまり、従来の免疫電顕法では、観察される金ナノ粒子の位置と標的分子の実際の位置は正確には対応しておらず、10 nm 以上もずれる、ということになる。我々は、この問題は標識に抗体を用いる標識法に由来するものであり、抗原-抗体反応以外の標識法に置き換えることで解決可能と考えた。

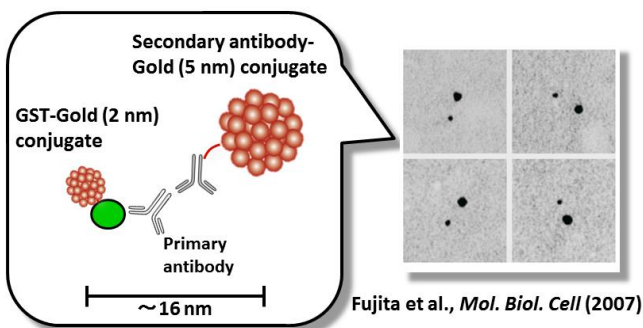


図 1. 従来法で標識した金ナノ粒子と、標的分子の位置関係

我々は、これまでに標的タンパク質に融合したペプチドタグと、これを特異的に認識するプローブのペアを利用した特異的タンパク質標識法、リアクティブ・タグ法を開発してきた<sup>[2-4]</sup>。本手法は、タグの Asp 連続配列とプローブの亜鉛錯体部位との特異的相互作用により近接した際のみ、プローブの反応基とタグ上 Cys の SH 基が反応して共有結合を形成し、タグ選択的に不可逆的標識を達成するものである (図 2)。亜鉛錯体部位に機能性分子を連結することでプローブとして利用できるため、金ナノ粒子を連結すれば電顕イメージング用プローブとして利用することができる。特に、本手法ではペプチドタグ、プローブ共に分子量は 2 kDa 未満と、抗体を用いた場合に比べて標識のサイズが非常に小さいため、本手法により従来の免疫電顕法の抱える、図 1 のような問題点を解消可能と考えた。

本稿では、我々が現在進めている、リアクティブ・タグ法を電子顕微鏡イメージングに応用する試みについて紹介する。

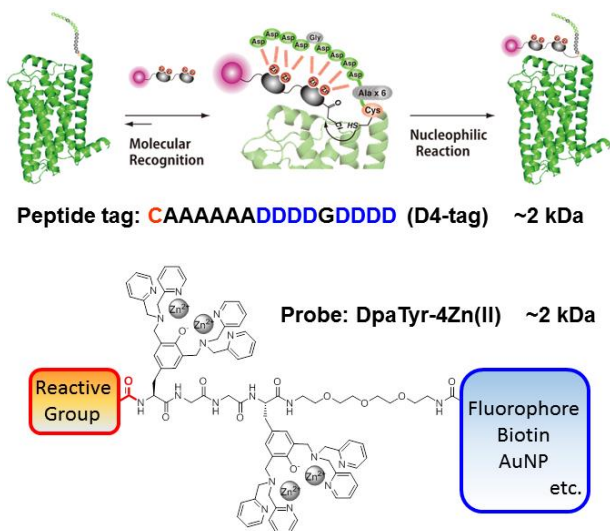


図 2. リアクティブ・タグ法の概要

## 2. 新規タグ/プローブペアの開発

電子顕微鏡では金ナノ粒子1コでも見えてしまうため、標的分子を金ナノ粒子で標識するにあたっては非常に高い特異性が要求される。しかし、我々がこれまでに報告している亜鉛錯体プローブでは、反応基として比較的反応性の高いクロロアセチル基（以下、ClAc基）を採用しており<sup>11</sup>、そのため非特異的な標識が起こりやすい、という問題があった。そこで、我々は特異性をさらに改善すべく、①低反応性の反応基に対しても効率的に反応する高反応性タグの開発、②プローブの

反応基をClAc基からより穏やかな反応基に置換する、というタグ/プローブ両方の改良を進めてきた。

まず、タグの反応性を向上させるに当たり、3つの戦略に基づいて改変を行った。1つ目としては、 $\alpha$ -ヘリックスの双極子モーメントの利用である。従来のD4-tagがAsp連続配列であったのに対し、 $\alpha$ 4位にAspを配置することで、亜鉛錯体との相互作用に伴い $\alpha$ -ヘリックスを形成することを我々は見いだした。 $\alpha$ -ヘリックスのN末端側は双極子モーメントにより電荷がプラスに幾分偏っており、これによりタグのN末端側に配置したCysのSH基の $pK_a$ が低下すると考えた。2つめは、カチオン性アミノ酸によるチオレートの静電的安定化である。タグ上Cysの近傍にLysを配置し、Lys側鎖のカチオンによりチオレートアニオンを安定化することで、SH基の $pK_a$ が低下すると考えた。3つめは、酸化還元酵素の活性モチーフの利用である。酸化還元酵素の活性部位には「CXXC」というモチーフ配列が広く保存されており、モチーフ中N末端側のCysのSH基の $pK_a$ は6未満まで低下していることが知られている<sup>12</sup>。この低い $pK_a$ にはモチーフ配列のアミノ酸側鎖との相互作用が関与しているという指摘があり<sup>12</sup>、我々は酸化還元酵素の1つである、グルタレドキシンの活性モチーフ「CPYC」をタグに組み込んだ。ただし、分子内ジスルフィド結合の形成を避けるために、C末端側のCysはSerに置換した「CPYS」とした。以上の様にして設計した新たなタグ「hD2-tag」は、合成ペプチドでの評価において、D4-tagに比べて亜鉛錯体結合時の $pK_a$ が8.2から7.1に低下し、SH基の検出試薬であるモノクロロピマンに対する反応速度定数も7倍向上していた。

一方、プローブについては従来のClAc基に変わる、より穏やかな反応基の探索を行った。反応性の評価は、亜鉛錯体に反応基をそれぞれ組み込み、hD2ペプチドに対する反応が飽和の半分まで達するのに要する時間 $t_{50}$ を比較することで行い、ClAc基の $t_{50}$ が0.2hであったのに対し、ジメチルアミノクロトン酸アミドは4.0hとかなり穏やかであり（図4）、この反応基に置換することにした。

最終的に、hD2-tagはCysの位置を調節するためにAlaをリンカーとして挿入した「hD2(A2)-tag」とし、プローブはL-Proをリンカーとしてジメチルアミノクロトン酸アミドを導入することでそれぞれ構造を微調整し、新規タグ/プローブペアとした。

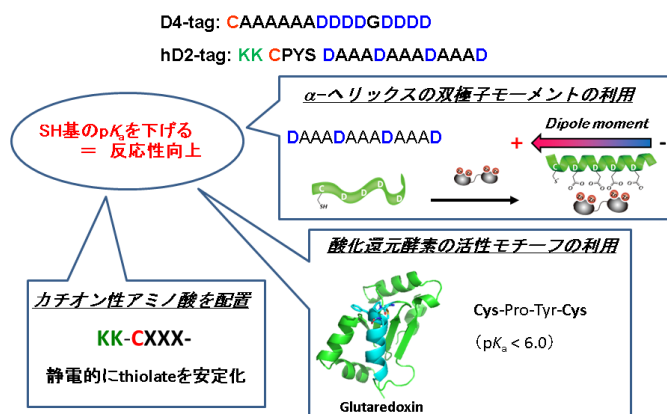


図 3. 高反応性タグの設計における3つの戦略

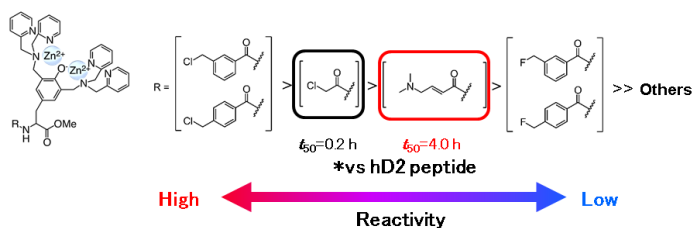


図 4. 新規反応基の探索の結果

hD2(A2)-tag: KK CPYS AA DAAADA AADAAD

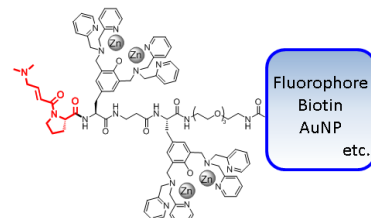


図 5. 新規タグ/プローブペア

### 3. リアクティブ・タグ法の電子顕微鏡イメージングへの応用

以上のようにして開発した新規タグ/プローブペアを、電子顕微鏡イメージングに応用すべく検討を進めている。我々は、モデルタンパク質として、これまでに本手法で選択的蛍光標識に成功している<sup>6</sup>ブラジキニン受容体B2Rを用い、図6のような手順で標識した。HeLa細胞膜上にhD2(A2)-B2R-EGFPを強制発現させ、まずディッシュ上で4%(w/v)パラホルムアルデヒド、0.1%(v/v)グルタルアルデヒドによる固定化を行った。その後、ビオチン

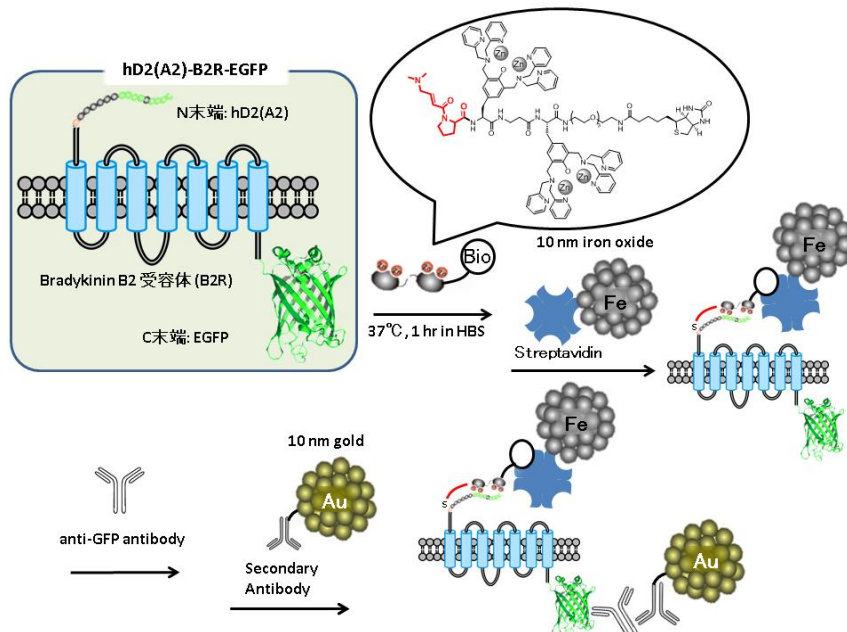


図 6. hD2(A2)-B2R-EGFP の標識手順

を組み込んだプローブ、そしてストレプトアビジン-酸化鉄 (10 nm) コンジュゲートの順にhD2(A2)-tagをラベル化した。ここで、比較対象としてEGFPを従来法で標識するにあたり、ディッシュ上では細胞内のEGFPを標識することは難しいと考え、unroofing法<sup>6</sup>という手法を用いて細胞膜を回収した。この方法では、細胞質側が露出した状態で細胞膜を回収できるため、細胞内に位置するEGFPの標識が可能になる。このようにして露出させたEGFPをanti-GFP抗体、そして金ナノ粒子(10 nm)担持二次抗体で標識し、透過型電子顕微鏡で観察した。その結果、同じ領域にanti-GFP抗体に由来する金ナノ粒子の標識と、プローブに由来する酸化鉄ナノ粒子の標識が観察された(図7左)。一方、タグ/プローブ相互作用を阻害するピロリン酸共存下でプローブの標識を行うと、酸化鉄ナノ粒子の標識が顕著に減少することから(図7右)、プローブはタグ特異的に標識できていることが示唆された。また、遺伝子導入していない細胞に対して、濃度などの反応条件を統一して従来のCIAc基のプローブと新規プローブとで標識し、非特異標識の起こりやすさを比較したところ、新規プローブでは明らかに非特異標識の数が減少しており、特異性が改善していることも示唆された。

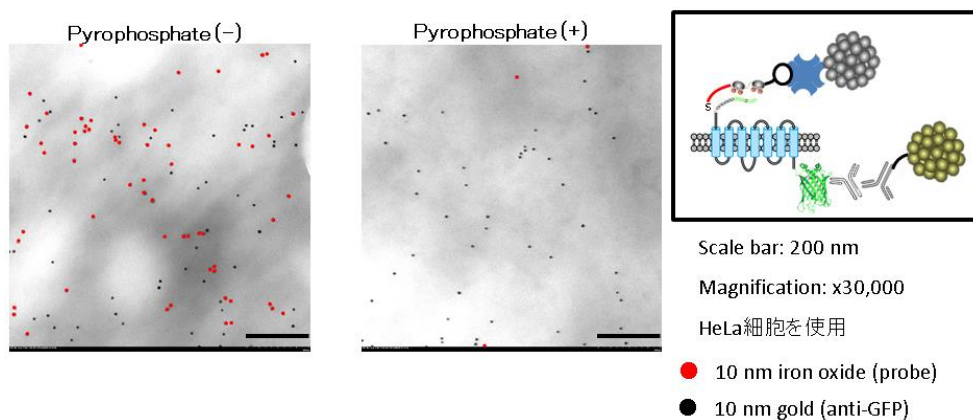


図 7. hD2(A2)-B2R-EGFP をプローブと anti-GFP 抗体で二重標識した結果

#### 4. おわりに

本稿で紹介した、ビオチン-ストレプトアビジンを利用した系はあくまでもモデル実験であり、リアクティブ・タグ法が電子顕微鏡に応用可能であることを示したに過ぎず、今後はプローブに金ナノ粒子を担持させ、タグに直接金ナノ粒子を標識する手法の開発を進めていく。また、今回紹介したオリゴ Asp 型のタグ/

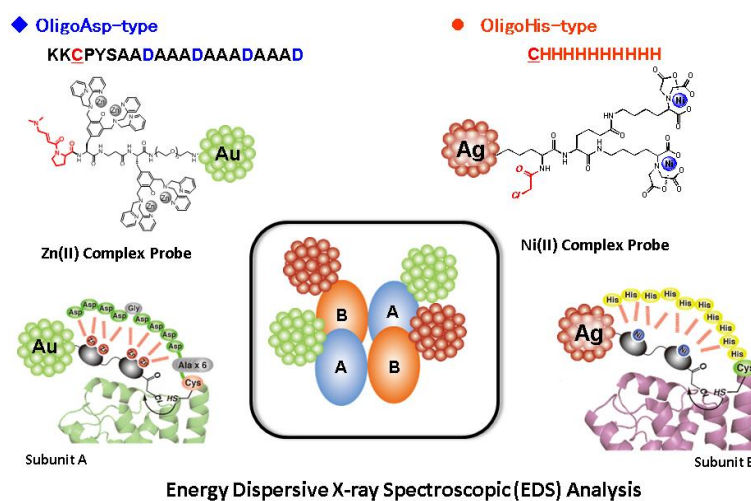


図 8. 二種類のタグ/プローブペアによるタンパク質複合体の二重標識

プローブペア以外にも、我々はオリゴ His-tag 型のペアの開発にも成功しており<sup>3)</sup>、これらは併用が可能である。将来的には、これら二種類のタグ/プローブペアにより、タンパク質複合体のサブユニットを異種金属で二重標識する手法への展開を目指している (図 8)。金属種の違いはエネルギー分散型 X 線分光分析 (EDS) が可能な電顕微鏡で観察することで識別が可能であり、これが可能になれば、タンパク質複合体を構成するサブユニットの構成比を電子顕微鏡で可視化することが可能になる。タンパク質複合体の構成を解析する手法としては、免疫沈降法や FRET を用いた手法が用いられるが、これらの手法でもサブユニットの構成比を明確にすることは難しい。しかし、電子顕微鏡の分解能であれば、構成比だけではなく、構成比が異なるタンパク質複合体の局在、存在比も可視化することが可能であり、タンパク質複合体の機能解明において、本手法が強力なツールの一つになり得ると期待している。

#### 5. 謝辞

本研究は、九州大学大学院薬学研究院 王子田彰夫教授の研究室にて行われたものです。日頃より多大なるご支援、ご助言を賜りました王子田教授に感謝致します。また、電子顕微鏡観察においてご指導頂きました IST Austria の重本隆一教授、原田春美博士、そして九州大学病院中央形態分析室の金丸孝昭博士にも感謝申し上げます。

#### 6. 参考文献

- [1]. Fujita, A.; Cheng, J.; Hirakawa, M.; Furukawa, K.; Kusunoki, S.; Fujimoto, T. *Mol. Biol. Cell.* **2007**, *18*, 2112.
- [2]. Nonaka, H.; Fujishima, S.; Uchinomiya, S.; Ojida, A.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9301.
- [3]. Takahira, I.; Fuchida, H.; Tabata S.; Shindo N.; Uchinomiya, S.; Hamachi I.; Ojida, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2855.
- [4]. Fuchida, H.; Tabata S.; Shindo N.; Takashima I.; Leng Q.; Hatsuyama Y.; Hamachi I.; Ojida, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2015**, *88*, 784.
- [5]. Jao S.; Ospina S. M. E.; Berdis A. J.; Starke D. W.; Post C.B.; Post C. B.; Mieyal J. J. *Biochemistry* **2006**, *45*, 4785.
- [6]. Sanan D. A.; Anderson R. G. *J. Histochem. Cytochem.* **1991**, *39*, 1017

## ストライガ発芽機構の解明にむけた化学的アプローチ

名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 萩原 伸也

### 1. はじめに

アフリカの大地では、ストライガ（魔女）と呼ばれる寄生植物が猛威をふるっている。ストライガは、特殊な根を生やし、それを穀物の根に侵入させて養分や水分を奪う。特に、トウモロコシやイネなどの主要穀物に寄生し、収穫量を減らしたり、時には辺り一帯の田畑を全滅させたりする。こうした被害を受けている土地は、4千万ヘクタール（日本の国土に匹敵）に及ぶ。土壤に広まったストライガの種は、寄生先となる穀物（ホスト植物）が近くに来るまで、長いときは数十年も土の中で待ち続ける。そして、ホスト植物の存在を感知すると発芽して寄生し、水分や養分を吸い取って成長する。種のまま休眠しているストライガを駆除するのは難しく、一度ストライガに汚染された土地では穀物生産が困難となる。これによる農業被害は、年間1兆円を超すと言われ、アフリカのみならず世界的な食糧安全保障に対する脅威となっている<sup>1)</sup>。

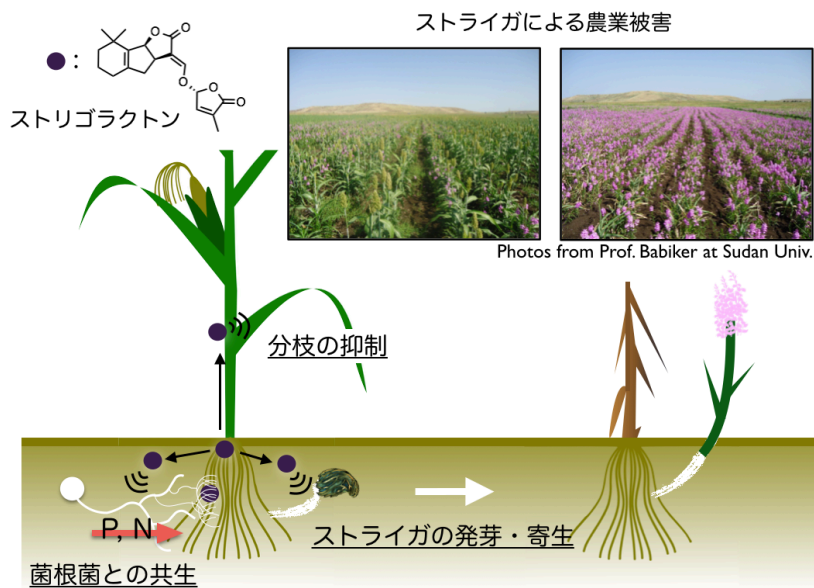


図1. ストリゴラク톤の関わる生命現象

### 2. ストライガの発芽とストリゴラク톤

ストライガがホスト植物を認識する仕組みで鍵となるのは、植物ホルモンの一つ「ストリゴラク톤」である(図1)<sup>2)</sup>。その構造は植物種によって少しずつ異なり、これまでに少なくとも17種類のストリゴラク톤が見つかった<sup>3)</sup>。植物は、リンや窒素などの養分が不足するとストリゴラク톤の合成量を増やす。根で作られたストリゴラク톤は植物全体へ輸送され、枝分かれを抑制するシグナル分子として働く<sup>4)</sup>。これと同時に、植物は根から土壤中へストリゴラク톤を放出し、菌根菌を呼び寄せる<sup>5)</sup>。菌根菌は、植物から糖分を得る代わりに、リンや窒素などの無機養分を植物に供給する。すなわち、植物は成長を抑えて養分の消費を抑えるとともに、菌根菌との共生により養分の供給を増やすことで貧栄養環境に適応する。このようにス

トリゴラクトンは植物内外の栄養状態に関わる情報伝達を担っている。ストライガは、このストリゴラクトンを傍受して発芽する。この機構を分子レベルで解明できればストライガの発芽制御分子の開発につながるが、長い間ストライガのストリゴラクトン受容体は同定されていなかった。

### 3. 非寄生植物のストリゴラクトン受容体

そもそも、枝分かれの制御におけるストリゴラクトン受容体は何か。最近、イネ、シロイヌナズナ、ペチュニアにおける研究から、その答えが明らかにされた。DWARF14 (D14)ファミリーのタンパク質である(図2)<sup>6)</sup>。D14は、 $\alpha/\beta$  hydrolase fold スーパーファミリーに属しており、ストリゴラクトンを受容してシグナルを伝達するとともに、ストリゴラクトンを加水分解する活性を持つ<sup>7)</sup>。発芽と分枝、一見かなり異なる生理現象であるが、非天然の物質を含め、これまでに知られているストライガ発芽刺激物質の殆どが D14 にも受容されることから、ストライガのストリゴラクトン受容体は D14 と類似したリガンド選択性を持つと考えられる<sup>8)</sup>。

一方、山火事の煙に含まれるカリキニンなど、非寄生植物の発芽を誘導する物質もこれまでにいくつか見つかっている<sup>9), 10)</sup>。これらの物質は、D14 のホモログ HTL に受容されるが、ストライガの発芽は誘導しない。すなわち、ストライガのストリゴラクトン受容体は、D14 に類似したリガンド選択性、HTL に類似した機能、この2つの性質を併せ持ったタンパク質と推定される。

### 4. 切れると光るストリゴラクトン「ヨシムラクトン」

植物科学に限らず、タンパク質の生理機能を調べるには欠損体を用いるなど遺伝学的手法をとることが多い。しかし、ストライガは寄生しないと育たないため実験室での生育が難しく、遺伝学的手法の適応が困難である。このため、ストライガに受容体の候補となるタンパク質が存在しても、これらのタンパク質の機能を *in vivo* で確かめる効率的手法がない。これが、ストライガにおいてストリゴラクトン受容体の同定が進まなかった要因である。

そこで筆者らは、遺伝学的手法を用いずにストリゴラクトン受容体の機能を評価する手法の開発を行った。まず筆者らは、D14 がストリゴラクトンを加水分解することに着目し、D14 に加水分解されると蛍光を発するストリゴラクトン様分子「ヨシムラクトン (YLG)」を設計・合成した。この分子をリコンビナント D14 に加えたところ、蛍光の経時的な増加が観測された。すなわち、設計通りヨシムラクトンは D14 に結合し加水分解されることがわかった。一方、ヨシムラクトンは、HTL に加水分解されないため、天然のストリゴラクトンと類似した受容体選択性を持つと考えられる。また、シロイヌナズナにおいて分枝抑制効果が見られたことから、ヨシムラクトンが *in vivo* で発蛍光性ストリゴラクトンとして機能することが確認された。

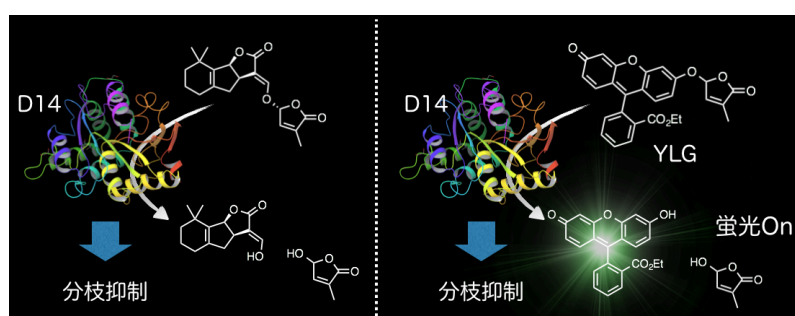


図2 加水分解により蛍光性に変化するストリゴラクトン様分子「ヨシムラクトン」



## 5. ヨシムラクトンを用いたストライガの発芽解析

次に、ストライガの種子をヨシムラクトンで処理したところ、発芽の誘導効果がみられた。さらに、発芽した種子において蛍光が観測されたことから、ヨシムラクトンはストライガにおいても発蛍光性ストリゴラクトンとして機能することが示された。逆に言うと、ストライガのストリゴラクトン受容体はヨシムラクトンを加水分解する D14 と類似の活性を持っている。

一方、ストライガの RNA-seq データベースを検索したところ、D14 や HTL と相同性を持つタンパク質が 12 個見つかった。これらのタンパク質 (ShD14、ShHTL1-11) それぞれに対してヨシムラクトンを実験したところ、10 個 (ShHTL2-11) において蛍光が観測された。すなわち、これらのタンパク質がストライガのストリゴラクトン受容体であると考えられる。これらの受容体は、ストライガ特有の遺伝子群で、HTL から派生している。つまり、非寄生植物において発芽を司る受容体 HTL が、寄生植物としての進化の過程でストリゴラクトンを検知するようになったものと考えられる。

なぜ 10 種類ものストリゴラクトン受容体が必要なのか。ヨシムラクトンの加水分解活性を指標に、各受容体の様々なストリゴラクトンに対する親和性を見積もった。その結果、受容体ごとに強く結合するストリゴラクトンの種類に違いが見られた。このことから、ストライガは様々な受容体を揃えることで多種類の宿主植物に寄生できるように進化してきたものと考えられる。

## 6. ストライガ発芽のストリゴラクトン受容ダイナミクス

ヨシムラクトンの存在下でストライガが発芽する様子を連続撮影したところ、最初に根側の先端で強く光り、それが波のようにストライガの種全体へ広がった後、光が一旦消え、再び光りながら根が伸びていくのが観察された (図 3)。この現象は、発芽した種子の全てで同じ挙動が見られたため、ストライガの発芽と強く関連していると考えられる。ここにエチレン生合成阻害剤を加えると蛍光が大幅に減少したことから、エチレンがストリゴラクトン受容を促進していることが明らかになった。一方、ストリゴラクトンがエチレンの生合成を誘導することは以前から知られており、今回の結果と合わせると、ストリゴラクトンとエチレンは互いにシグナルを増幅しあっていることになる。ストライガは、このシグナル増幅機構により土壌中のわずかなストリゴラクトンを検出していると考えられる。

ストライガの種は、宿主植物が近くにいるのを根の先端で感知し、その情報を種全体に伝えて休眠状態を解除し、宿主植物に向けて根を伸ばしていく。今回の研究成果から、ストライガが宿主植物の放出するストリゴラクトンを巧妙に活用して寄生する仕組みの一端が明らかになった。

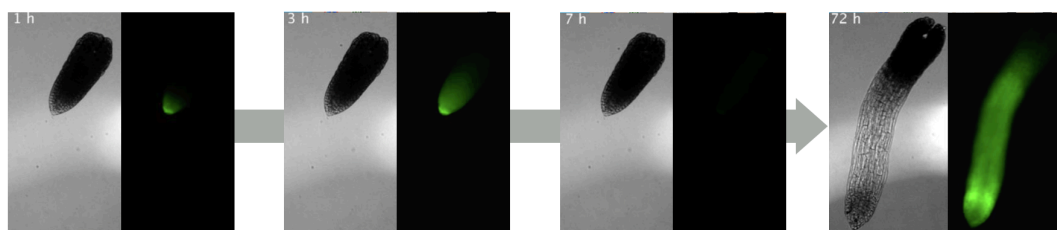


図 3 ストライガ発芽におけるストリゴラクトン受容の可視化観察

## 7. おわりに

有機合成化学者と植物生物学者がそれぞれの分野の壁を越えて共同研究することで、ストラ

イガが宿主植物を感知して発芽する仕組みにせまることができた。ストリゴラクトンを感知する受容体が明らかになった今、ストライガの発芽を制御する薬剤の探索が飛躍的に加速すると考えられる。今回開発したヨシムラクトンは、このような薬剤の探索においても効果を発揮し、ストライガ問題の解決にさらに貢献することが期待される<sup>11)</sup>。

#### 8. 謝辞

本研究は、立案から遂行に至るまで名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 (ITbM) の土屋雄一郎博士と共同で行いました。この場を借りて御礼申し上げます。本研究の実施にあたり、ご指導、ご助言頂いた ITbM の伊丹健一郎教授と木下俊則教授に感謝いたします。また、実験を強力にサポートして頂いた ITbM ライブイメージングセンター佐藤良勝講師と ITbM 分子構造センター桑田啓子助教に御礼申し上げます。最後に、殆どの実験を実施した吉村柁彦君に深く感謝いたします。

#### 9. 参考文献

1. Ejeta, G.: Integrating New Technologies for Striga Control (World Scientific Publishing, Toh Tuck Link, Singapore, 2007), pp. 3-16.
2. Cook, C. E., Whichard, L. P., Turner, B. et al.: Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and properties of a potent stimulant. *Science* 154, 1189-1190 (1966).
3. Xie, X., Yoneyama, K., Yoneyama, K.: The strigolactone story. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 93-117 (2010).
4. Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S. et al.: Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455, 195-200 (2008).
5. Akiyama, K., Matsuzaki, K., Hayashi, H.: Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435, 824-827 (2005).
6. Arite, T., Umehara, M. et al.: Ishikawa, S. et al.: d14, a strigolactone-insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers. *Plant Cell Physiol.* 50, 1416-1424 (2009).
7. Hamiaux, C., Drummond, R. S., Janssen, B. J. et al.: DAD2 is an  $\alpha/\beta$  hydrolase likely to be involved in the perception of the plant branching hormone, strigolactone. *Curr. Biol.* 22, 2032-2036 (2012).
8. Fukui, K., Ito, S., Ueno, K. et al.: New branching inhibitors and their potential as strigolactone mimics in rice. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 4905-4908 (2011).
9. Waters, M. T., Nelson, D. C., Scaffidi, A. et al.: Specialisation within the DWARF14 protein family confers distinct responses to karrikins and strigolactones in *Arabidopsis*. *Development* 139, 1285-1295 (2012).
10. Tsuchiya, Y., Vidaurre, D., Toh, S. et al.: A small-molecule screen identifies new functions for the plant hormone strigolactone. *Nat. Chem. Biol.* 6, 741-749 (2010).
11. Tsuchiya, Y., Yoshimura, M., Sato, Y., Kuwata, K., Toh, S., Smith, D.H., Zhang, H., McCourt, P., Itami, K., Kinoshita, T., Hagihara, S.: Probing strigolactone receptors in *Striga hermonthica* with fluorescence. *Science* 349, 864-868 (2015)

## 第3回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム (第30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  
熊本大学大学院自然科学研究科 北村 裕介

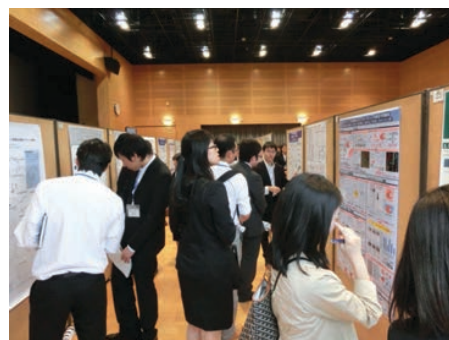
生体機能関連化学部会若手会九州支部の北村 裕介（熊本大学）、若林 里衣（九州大学）、田丸 俊一（崇城大学）、およびバイオテクノロジー部会若手会から齋藤 真人（大阪大学）、林 修平（崇城大学）が世話人となり、去る9月9日（水）、熊本大学黒髪南キャンパスにおいて第3回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラムを開催致しました。生体機能関連化学部会若手フォーラムの時代から数えますと記念すべき第30回目となります。昨年に引き続き、バイオ関連化学シンポジウムに参加する生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、フロンティア生命化学研究会、ホスト-ゲスト・超分子化学研究会から発表を募集致しました。台風18号の東海地方直撃、関東・東北地方の記録的な豪雨にも関わらず、学生65名、一般34名、招待講演者4名の、計103名の非常に多くの方にご参加頂きました。東京近辺からの参加者の方の中には電車のダイヤの乱れ等で、慌ただしい移動を余儀なくされた方もおられましたし、東海地方の方は飛行機が欠航したため、急遽、新幹線に振り替えて参加されたようです。世話人一同を代表致しまして、参加者の皆様に厚く御礼申し上げます。ご存知のとおり、今年から若手フォーラムでのポスター賞を廃止し、バイオ関連化学シンポジウムにてポスター賞を授与するという新しい試みを開始しました。ポスター賞がなくなったこともあり、開催前は、若手フォーラムへの参加者が減少するのではと危惧しておりましたが、悪天候をものともせず、多数の参加者に支えられ、無事、盛会の内に終えることができました。本フォーラムならびにバイオ関連化学分野に対する若手の皆様の強い情熱を改めて感じた次第です。

今回は最先端で活躍する4名の先生を講師としてお招きし、それぞれ「ペプチドアレイを用いたアレルギー解析」（大河内 美奈 先生 東京工業大学）、「環状オリゴ糖を用いた、がん治療戦略の構築」（本山 敬一 先生 熊本大学）、「磁性ナノ粒子を用いた医療技術の開発」（井藤 彰 先生 九州大学）、「化学的な細胞操作に基づく生体組織モデルの構築」（松崎 典弥 先生 大阪大学）というタイトルで講演いただきました。4名の講師の先生方には、若手のエンカレッジを念頭にご講演をお願いしておりましたので、参加者は皆、発想の面白さ、データの美しさに感嘆させられるだけでなく、時に織り交ぜられるご自身の経験談や、ユニークなスライドに大変楽しいひとときを過ごさせて頂きました。また、会場からも活発な議論が飛び交い、大いに盛り上がりました。



講演終了後にポスター発表を行い、65件（うち学生61件）もの発表をいただきました。こちらも講演と同様に非常に活発な議論が行われました。翌日から開催されましたバイオ関連化学シンポジウムにて、厳正な審査の結果、選出されたポスター賞受賞者10名のうち、6名もが若手フォーラムでのポスター発表者であったことは大変嬉しいかぎりでございます。

ポスター発表終了後、およそ1時間半の懇親会を行いました。講演会場とはまた違った盛り上がりを見せ、研究室や身分の垣根を超えた深い交流ができました。互いの普段の研究生活、研究内容、先生方の経験談、将来の夢など会話は尽きることなくあっという間に時間が過ぎて行った次第です。この若手フォーラムを通じて学生、研究者間で新たな交流が生まれ、互いに刺激し合うことでこのバイオ関連化学分野の発展に寄与することができましたら幸いです。



ポスター発表の様子



バイオ関連化学シンポジウムでのポスター賞受賞者の皆様

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、ご支援下さい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、フロンティア生命研究会、ホストゲスト・超分子化学研究会、公益財団法人サントリー生命科学財団、堤化学株式会社、株式会社ユーエスアイ、株式会社新興精機に厚く御礼申し上げます。

なお、来年のバイオ関連化学シンポジウム若手フォーラムは、北陸先端大学の山口拓実先生を世話人代表として金沢（金沢駅周辺）で開催される予定です。本フォーラムの今後の益々の発展を祈念しております。

## 第9回バイオ関連化学シンポジウム開催報告

熊本大学大学院自然科学研究科 井原 敏博

平成 27 年 9 月 10 (木) ~ 12 日 (土)、熊本大学黒髪南地区キャンパスにて第 9 回バイオ関連化学シンポジウム(第 30 回生体機能関連化学シンポジウム、第 18 回バイオテクノロジー部会シンポジウム)が開催されました。2003 年 両部会が初めて合同でシンポジウム(第 1 回生体機能関連化学・バイオテクノロジー部会合同シンポジウム)を開催したのが熊本であり、ひとまわりして 12 年後に再び同地に戻ってきたこととなります。

今年のシンポジウムは、例えば、日本分析化学会年会、光化学討論会、天然有機化合物討論会など、全国で開催された多くの学会、シンポジウムと日程が重なったこと、直前の台風で空の便が乱れていたことなど不運が重なり参加者の減少を心配致しましたが、幸いにも当日は晴天に恵まれ、結果的には事前登録 313 名、当日登録 132 名、合計 445 名(うち学生 205 名)もの参加者を集め、例年同様の規模で盛大に開催することができました。実行委員を代表して、参加して頂いた皆様に厚く御礼を申し上げます。3 日間をかけて、招待講演 2 件(前田 浩先生、満屋 裕明先生)、口頭発表 104 件、ポスター発表 215 件が行なわれ、終始 レベルの高いたいへん活発な討論が展開されました。2 日目(11 日)夕刻の招待講演終了後には、会場の熊本大学からバスでホテル日航熊本に移動して懇親会を開催致しました。170 人余の参加者が集い、熊本の酒食とともに、遅くまで交流を楽しんでおられたようです。

本シンポジウムでも、40 歳以下の博士号取得者を対象として、恒例の部会講演賞の審査を行ないました。また、今回から 対象を学生に限定したポスター賞を創設しました(詳細は若手フォーラム報告を参照)。厳正な審査が行なわれ、懇親会の席上 浅沼浩之審査委員長から部会講演賞 4 名、ポスター賞 10 名が発表され、受賞者にはそれぞれ賞状と副賞が授与されました。

このシンポジウムには多くの企業、団体様から多大なご支援を頂くことができました。頂いたご支援に基づいて充実した環境を整えることができました。ご厚情に対して心から感謝いたしております。今後とも本シンポジウムへの変わらぬご支援をよろしくお願い申し上げます。また、運営を支えていただいた実行委員の先生方と、特に日本化学会の坂下修一氏にはシンポジウムのアウトラインの決定から準備、運営まで終始お世話になりました。来年の第 10 回シンポジウムは北陸先端科学技術大学院大学の高木昌宏先生のお世話で、平成 28 年 9 月 7 (水) ~ 9 日 (金) に金沢(石川県立音楽堂ほか)にて開催予定です。金沢で皆さんと再会できることを楽しみに致しております。



ポスター発表の風景



講演賞受賞者(懇親会にて)

## 「第9回バイオ関連化学シンポジウム講演賞」講評

### 第30回生体機能関連化学シンポジウム・第18回バイオテクノロジー部会シンポジウム 講演賞

審査委員長 浅沼 浩之  
名古屋大学大学院工学研究科

今年度は22名の研究者が講演賞に応募し、初日に2つの講演会場で8名の審査員が厳選かつ公平な審査を行い、4名の受賞者を選出した。まずは、今年度の荣誉に輝いた以下の4名の受賞者の素晴らしいご研究とご講演、そしてそのための努力に対し、最大限の賛辞を贈りたい。

受賞者-発表演題(五十音順,敬称略)

石川 文洋(京大院薬)

「合成小分子化合物群によるアデニレシヨンドメインの選択的標識化およびプロファイリングへの展開」

景山 義之(北大院理・JSTさきがけ)

「巨視的な自律的機械運動を発現するアゾベンゼン誘導体・オレイン酸混合分子集合体—平衡から遠く離れた超分子運動」

田畑 栄一(九大院薬)

「タンパク質特異的ラベル化を利用した電子顕微鏡イメージング法の開発」

萩原 伸也(名大ITbM)

「ストライガ発芽機構の解明にむけた化学的アプローチ」

2000年に始まった講演賞も年を追うごとにレベルが高くなり、リップサービスではなくどの講演も甲乙つけがたいので、審査する側も緊張を強いられる。毎年4名もの受賞者を出しているにも関わらず常に高いレベルの受賞者を輩出し続けるのは、このシンポジウムを目指して次々と優秀な若い人材が参入していることの証であろう。この講演賞受賞者が後に独立し、そこで若い優秀な研究者が育つことでこのシンポジウムへの参加者が拡大再生産される。したがって、レベルの高い今年の受賞者を見れば、バイオ関連化学シンポジウムは今後も大いに発展するであろうと容易に予測できる。

ところで講演賞に申し込まれた方々のレベルは高くても、やはり僅差でも順位はつく。もちろん審査員が変われば多少順位が入れ替わるかもしれないが、それでも大まかな順位は変わらないであろう。ではどこで差がついているのだろうか？今後講演賞を狙うであろう若手研究者をencourageする意味も込めて、この講評を利用して小生の勝手な雑感を述べてみたい。

講演賞は、過去の業績をレビューした内容ではなく、最新の研究成果を中心とした発表を審査対象とする。したがって日本化学会の進歩賞のように過去の業績の蓄積が勝敗を分けるのではなく、現在進行中のホットな研究が審査対象になる。そして、概ね以下の5項目が評価される。

1. 研究テーマの設定、独創性
2. 実験データの質・量・解析
3. 結論の妥当性・新規性
4. 発表・スライドの分かりやすさ
5. 質疑応答

まず1～4の項目は事前の準備で決まる。そもそも1の「研究テーマの面白さと独創性」が欠如していたら、他の項目がどれほど優れていても受賞は不可能であろう。審査する側も独創性と面白さを兼ね備えた研究でなければ、「講演賞」に値しないと思っているに違いない。また研究者も「研究テ

一マの面白さと独創性」に自信があるからこそ、それを公に認めてもらおうと講演賞にエントリーするのであろう（残念ながら“ダメ元”でエントリーして受賞できる程、甘くは無い）。そして膨大な実験データを積み重ね、それらを解析して結論へと導き、専門外の研究者にも分かるように発表とスライドを工夫する。審査対象となった講演は、1から4の評価項目については概ね甲乙つけがたく、楽しめる講演ばかりである。しかし講演そのものがどんなに素晴らしくても質疑応答次第で評価は大きく変わってしまう。換言すれば質疑応答で差が付き、結果的には1から4の評価項目にも影響を与えてしまうのである。

シンポジウムや学会は、情報収集の場であると同時に互いの研究を競う場でもある。したがって聴衆全員が講演者の味方とは限らず、また良い講演をしたからといって全員が好意的に評価する訳でもない。特に講演賞の審査員は22名から4名まで受賞候補者を絞り込まなければならないのだから、差をつけようと何かと粗を探そうとする。そのため質問はどうしても厳しくなりがちである。また面白い研究であればあるほど「何か粗を探して評価を下げてやり、出る杭を今のうちに叩いてやろう」程度の意地悪な気持ちで質問してくることがあるかもしれない（小生は意地悪である）。しかしそこで質問者の術中にはまって答えに窮したり、動揺を表情に出してしまったら、折角の良い講演が台無しになる。さらに講演者の最悪な答えは、「大変良い質問をありがとうございました。ご指摘いただきましたことを、今後は是非検討させて頂きたいと思います」である。本人としては、苦し紛れとは言え、何とか躲したつもりかも知れない。しかし質問者から完全に逃げており、この瞬間に講演賞は無くなるし、聴衆は失望するであろう。研究そのものが面白かったとしても、それは講演者の貢献によるものではなく、責任著者の多大な指導によるものだと考えてしまう。

仮に質問に対する答えが実験データの中に全く無かったとしても、馬鹿正直にそれを表に出してはならない。頭をフル回転させて“引き出し”を高速スキャンし、何らかの答えをひねり出すのである。直接関係のない過去の論文でもいくつか引用して説得力を持たせ、質問に対して自分なりの答えをその場で作り出し、相手の目を見てしっかりと答えるべきなのである。もし質問が曖昧でどうしても理解できなかつたら、失礼にならないように言葉を選びつつ、質問内容を聞き返しても良い。また研究の意義を問うようなnegativeな質問に対しても、それに同意するのではなくしっかりと反論しなければならない。もちろん熱くなって感情的に反論するのではなく、様々な観点から自分の研究がpositiveであることを丁寧に説明するのである。場合によっては多少のハッターリも許される（と思う）。聴衆も決して馬鹿ではなく、的を射た質問なのかどうかは理解している。意地悪な質問にも講演者が逃げずにしっかりと答えたら、その時初めて聴衆のほとんどが味方となり、心の中で拍手を送るであろう。そして責任著者の名前ではなく、講演者自身の名前を我々は強く認識するのである。意地悪な質問者も“こやつ中々出来る”と思い、講演が終わったら、厳しい質問など無かったかのように「さっきの講演はとても面白かったよ」と言いつつ、講演者に近づくかもしれない。その時こそドヤ顔で“勝った”と思いつつ「先ほどは大変良い質問をありがとうございました」と言えば良いのである。講演賞もきっと付いてくるであろう。

最後に、大変ご多忙にもかかわらず審査員の重責をお引き受け頂いた8名の先生方に、心よりお礼申し上げます。また審査のために効率の良いプログラムを作成して下さった、熊本大学大学院自然科学研究科 井原敏博先生をはじめとする実行委員の方々にも重ねて御礼申し上げます。

ニュースレター Vol. 30, No. 3 2015年 12月 3日発行

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

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

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

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

編集委員：伊東 忍、浦野泰照、島本啓子