

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. 32, No. 3 (2017. 12. 21)

目 次

◇ 巻 頭 言

混 沌永次 史 2

◇ 研 究 紹 介

二価鉄イオン蛍光プローブの構造最適化とハイスループットアッセイへの展開
.....平山 佑 4

リガンド指向性 *N*-acyl-*N*-alkyl sulfonamide (NASA) 化学による高速蛋白質ラベリングとコバレントドラッグへの展開
.....田村 朋則 8

生細胞中の活性イオウ種の可逆的可視化を実現する蛍光プローブ～蛍光プローブの新しい設計法研究が切り拓く新潮流～
.....梅澤 啓太郎 13

タンパク質化学合成法を武器に多細胞生物の謎に挑む林 剛介 17

◇ 部 会 行 事

第 5 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 21

第 11 回バイオ関連化学シンポジウム開催報告 23

第 11 回バイオ関連化学シンポジウム講演賞 講評 24

混 沌

東北大学多元物質科学研究所 教授
永次 史

東北大学多元研の永次です。今回、生体機能関連化学ニュースレターの巻頭言の執筆を仰せつかり、大変光栄に思っております。歴史ある生体機能関連部会のニュースレターの巻頭言として何を書くべきか、考えもまとまらず、過去のニュースレターをさかのぼって読んでいました。皆様の書かれた巻頭言は大変面白く個性的で、ついつい自分が書くべき巻頭言のことはすっかり忘れてしまい、読みふけてしまいました。2006年の部会発足20周年特集は非常に興味深い記事が多く、特に國武先生と生越先生の対談では、部会設立の経緯から今後にむけた部会の方向性についてもお話しになっています。最初の研究会立ち上げ当時の手探りの状況、さらには部会立ち上げ前後の研究の流れなど、大変印象に残りました。1973年の「酵素類似様機能を持つ有機化学反応の研究会」から始まり、1985年の生体機能関連化学部会の設立、この部会の歴史は半世紀近くになります。この部会は、生物と化学の境界領域を行う分野として発足し、生体の化学的理解を目指して、有機化学、物理化学、無機化学など様々な分野の研究者が参集する場としてはじまりました。当初は人工モデル系を中心とし、酵素反応をモデル化する研究、さらには人工酵素の創製を目指した多くの研究が展開されてきましたが、現在では生体機能分子、細胞・生体組織そのものを扱う方向に拡張し、さらに多様化してきています。生体機能関連はもはや様々な学問の境界領域ではなく、既に一つの巨大な研究領域になったのではないかと感じます。発足当初は、モデルとしてしか取り扱えなかった生体系が、様々な技術の進歩により、実際の生体試料を非常に簡便に取り扱うことができるようになり、「生命現象を化学の言葉で語る」という、本部会の発足当初からの命題の解決にかなり近づいているようにも思えます。しかし、化学の言葉で語れる生命現象はほんの一部に過ぎず、化学と生物が近づくほど、より混沌とした世界がそこには広がっているように思えてなりません。そもそも生命はいろんなシステムが組み合わさって構成されており、一つの側面から議論するのが困難であるのは当然と考えられます。多くの化学者は（自分も含めてですが）一つの共通概念、原理で物事を理解する方向で研究を進めていこうとします。しかし長く生命の基本原則とされたDNA→RNA→蛋白質というセントラルドグマも、酵素機能を持つRNAの発見、さらには蛋白質をコードしないncRNAの発見、ncRNAの多彩な機能が明らかになるにつれ、大きく変わってきており、生命現象はこれからも、従来考えられていた原理が大きく変わる発見がなされると思われます。この「混沌とした生命現象」を化学で語るには、さらに新しい学問の体系化が必要であるように思います。

最後に私自身のお話を少し述べさせていただきたいと思います。学生の時に、ホスト-ゲスト化学に興味を持ち研究室に入り（知らなかったのですが、ちょうどこの部会が立ち上がった年が研究室に入った年でした）、私の研究人生のスタートは天然物合成でしたが、その後、放射性医薬品化学の開発研究をとおしたインビボサイエンス、それから、現在の研究テーマであります遺伝子発現の化学的制御を目指した研究と、現在、「生体と化学」をキーワードとした研究をすすめています。最近、ようやく、遺伝子発現を制御可能な化学的ツールとして細胞内でも機能する可能性を持つ人工分子の開発に成功し、複雑系である細胞での化学の検討をすすめています。今後の研究により、先人の研究者の先生方の「生命現象を化学の言葉で語る」に対する熱い思いのもと、半世紀前にはじまったこの研究分野に、さらに新しい方向性を示すことができたらと考えています。

とりとめもなく、思うことを書いてきましたが、混沌とした生命をいつの日か化学の言葉で語る日が来ることを祈念し、巻頭言を終わりにしたいと思います。

二価鉄イオン蛍光プローブの構造最適化と ハイスループットアッセイへの展開

岐阜薬科大学薬化学研究室 平山 祐

1. はじめに

鉄は我々の体内に最も多く存在する遷移金属種である。生体内ではヘモグロビンやシトクロム P450 などの補因子・活性中心金属として機能しており、これら鉄を含む金属タンパク質研究の歴史¹⁾については、生体機能関連化学部会の方々であれば、おそらくご存知のことだろう。鉄含有タンパク質の生体内での主たる機能は酸素運搬と ATP 産生であり、生体エネルギー産生に関わる重要な機能を有する。そのため、鉄不足は貧血や不整脈をはじめとするエネルギー不足に起因する不調をきたす。とは言え、鉄が過剰になってもエネルギーが満ち溢れるということにはならず、今度は鉄自身の持つ高いレドックス活性のために、生体組織・細胞が酸化ストレスにさらされることになる。実際、がんや神経変性疾患等をはじめ多数の疾患において鉄過剰が関連していることが報告されている²⁾。では、鉄不足、鉄過剰に対してはどういった治療がなされるのかというと、前者は鉄剤（クエン酸鉄）が、後者は鉄キレート剤が処方される。これらは両者とも直接的ではあるが、刺激の強い方法でもあり、とすれば逆に過剰症、欠乏症につながる。これは細胞レベルの実験でも同様であり、鉄の増減の影響を調べる場合には鉄の添加やキレート剤の添加を行なう。この事実が意味するところは、個体レベルはもとより、細胞レベルでも鉄の取込や排出をコントロールできるような生理活性化合物が無い、ということである。ごく最近になって Salinomycin やその誘導体³⁾、Hinokitiol⁴⁾が細胞内の鉄恒常性の摂動化合物として報告され、鉄の制御を可能にする化合物がにわかに注目を集めている。そこで筆者らは、細胞に対して鉄取込・鉄排出を促進・阻害するような新奇化合物の創出を目指し、化合物ライブラリを用いたハイスループットスクリーニングに資する高感度鉄イオン蛍光プローブを開発することから着手した。

2. 二価鉄イオン蛍光プローブの構造最適化

細胞内における鉄イオンの濃度を知る上で重要なのは、取込・排出により鋭敏に変化する遊離鉄（タンパク質非結合・弱結合性鉄イオン）を検出することである。細胞内の還元的環境・各種トランスポーターの存在、および水溶性といった様々な状況証拠から遊離鉄の主成分は二価鉄イオンであることが分かっている。筆者らは過去に、遊離鉄（二価鉄イオン）に対して選択的に蛍光応答を示すプローブ RhoNox-1⁵⁾を開発し、生細胞イメージングにより二価鉄イオンを捉えることに

成功した。また、近年その誘導化により可視光領域を全てカバーした一連の二価鉄イオン蛍光プローブを報告⁶⁾し、N-オキシドの化学を使った汎用性の高い二価鉄イオン検出法を確立してきた（図 1）。しかしながら、現状のプローブでは応答速度および蛍光の OFF/ON コントラストが十分とは言えず、特にハイスループット解析への応用を見据えた場合には感度と精度を兼ね備えた蛍光プローブの開発が必須であった。そこで、本研究ではまず、RhoNox-1 の構造展開を行い、その高感度化と蛍光応答速度の最適化について検討した。本プローブでは、二価鉄イオンにより N-オキシド部位が脱酸素化を受け、蛍光強度が上昇する、というしくみになっている（図 1）。最近の結果より、N-オキシド部位にお

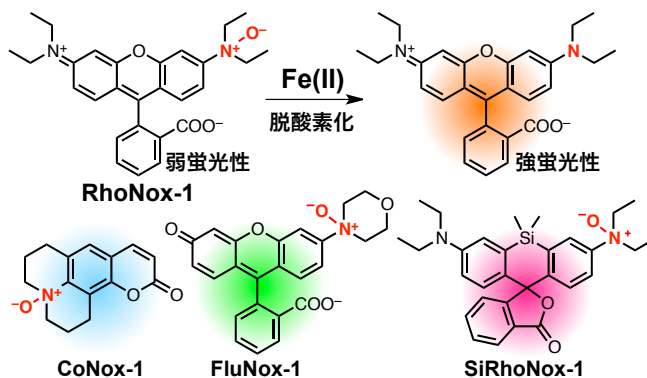


図 1. これまでに開発した各種 N-オキシド型二価鉄イオン蛍光プローブ

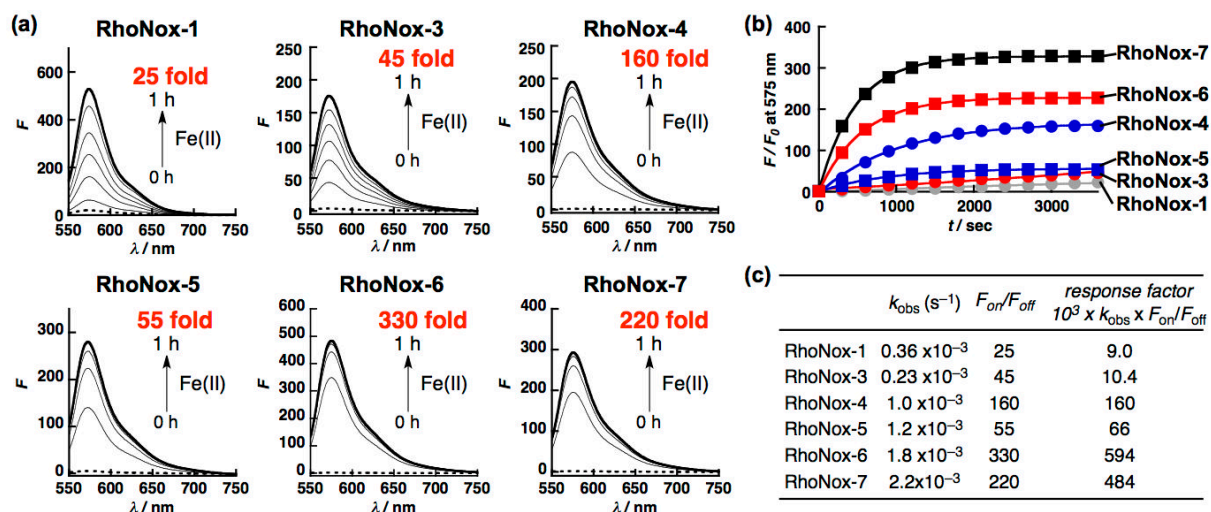


図 2. (a) 各蛍光プローブに対して二価鉄イオンを加えた際の蛍光スペクトル変化。(b) (a)における最大蛍光波長 (575 nm) における蛍光強度の時間変化。(c) 応答速度 (k_{obs})、OFF/ON コントラスト (F_{ON}/F_{OFF})、および応答性の指標 (response factor) の比較表

けるアルキル鎖が、鎖状構造のものに比較して環状構造を持つものが良好な二価鉄イオン応答性を示すことが明らかになっている。この知見を元に、N-オキシドの周辺構造について、環状構造、弱いキレート性構造、および細胞膜透過性を付与するための疎水性官能基を種々導入したプローブ (RhoNox-2~RhoNox-7) を合成し、その二価鉄イオン応答性について、キュベット中での蛍光測定と生細胞での蛍光イメージングにより評価した。RhoNox-2 については水溶液中での安定性が十分でなく、評価が困難であったものの、RhoNox-3 から RhoNox-7 についてはプロトタイプである RhoNox-1 よりも高い蛍光 OFF/ON コントラストを示した (図 2a)。特に、RhoNox-4、RhoNox-6、および RhoNox-7 については 100 倍を超えるコントラスト比を示し、非常に高感度なプローブであることが分かった。さらに応答速度についても同じ RhoNox-4、RhoNox-6、RhoNox-7 が鋭敏な応答を示した (図 2b)。その OFF/ON コントラストと見かけの反応速度定数から応答性について比較したところ、これら 3 つのプローブは RhoNox-1 に比較して 15~60 倍程度向上しており、顕著な高感度化を達成しできた (図 2c)。次に、これらプローブを生細胞イメージングへと適用したところ、RhoNox-4 が唯一良好な細胞膜透過性を示し、生細胞中でも機能した (図 3)。応答性についてはやはり RhoNox-1 を圧倒的に凌駕するものであり、細胞内においてもより明確にシグナルの上昇を観察可能になった。高感度化の程度は、RhoNox-4 で処理した細胞を蛍光顕微鏡で観察する際、RhoNox-1 と同じ感度設定ではシグナルが飽和して観察不能になる程であった。また、二価鉄イオンキレーターである 2,2'-bipyridyl (Bpy) で処理した細胞では、Bpy の濃度依存的に蛍光シグナルが減少する様子が観察された。これは RhoNox-4 を使えば、細胞内在性の二価鉄イオン濃度が減少した場合にも検出が可能であることを示唆している。このように、N-オキシド周辺の立体構造および疎水性をコントロールすることにより、細胞内二価鉄イオンの増加のみならず減少も捉えられる蛍光プローブが得られたので、ハイスループットアッセイへの応用を試みた。

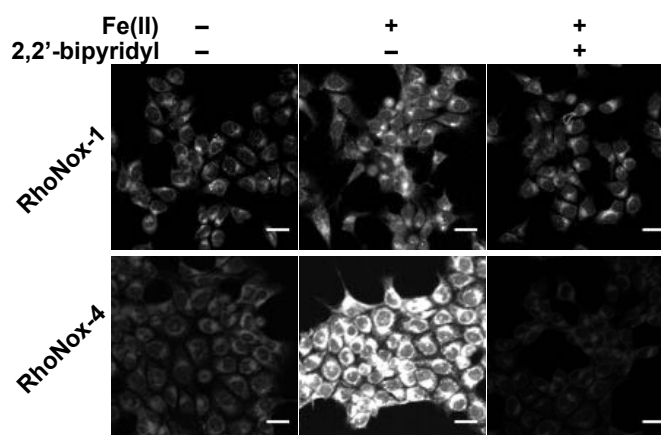


図 3. RhoNox-1 および RhoNox-4 を用いた二価鉄イオンの生細胞イメージング画像。2,2'-bipyridyl は二価鉄イオンキレーター。スケールバー : 25 μ m.

3. 二価鉄イオン蛍光プローブ RhoNox-4 を使ったハイスループットアッセイ

上記では、ガラスボトムディッシュと共焦点蛍光顕微鏡という生細胞イメージングのために

最適化された系での観察であったが、ハイスル

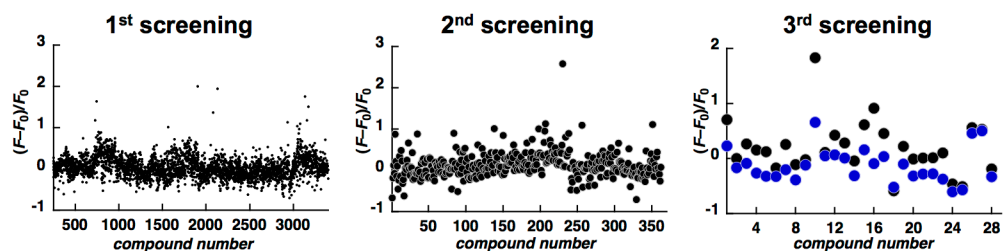


図 4. 1st スクリーニング、2nd スクリーニング、3rd スクリーニング（黒：10 μ M、青：5 μ M）において得られた各化合物の蛍光変化比。0 のラインからの振れ幅が大きいものほど鉄変動が大きい

ープットではプラスチックの 96-well プレート、（共焦点でない）高速観察用蛍光イメージャーを用いたアッセイとなる。そのため、装置・プレートに起因する誤差が最小になる条件検討と細胞処理方法の最適化、および安定したポジティブコントロール（鉄イオン投与）、ネガティブコントロール（キレーター）化合物を選択することが必要であった。これらに関する種々の条件検討より、再現性よく蛍光シグナルの増加・減少を測定可能なアッセイ系を確立した。このアッセイ系を使い、3399 化合物（東京大学創薬機構より供与）のスクリーニングを実施した。詳細は割愛するが、3 度のスクリーニング試験の結果、現在は 7 つのヒット化合物が得られており（図 4）、これらのうちいくつかは実際に細胞内の鉄濃度を上昇させるものであることが分かりつつある。

4. おわりに

生体内における鉄研究は古いようで新しい。本部会の源流となっている生物無機化学分野では、鉄イオンがタンパク質と協働して発揮する「反応性」について徹底的に研究が進められてきた。一方、細胞内・生体内における鉄の挙動に関する謎は今も多く、細胞内では鉄イオンがどこから来て、どこに行き、いつどこで増減するのか、また、その増減は疾患と関与するのか、さらに、動物ではどうなのか、鉄に関する疑問は尽きない。本稿で紹介したように、幸いにも筆者らは細胞内で動く鉄イオンを「見る」技術を確立し、それを用いて細胞内の鉄量を自在に「制御する」化合物のシードを見出しつつある。生体内における鉄イオンを「動かして、見る」という操作を可能にするケミカルツールが今後の「生命と鉄」に関する研究発展に貢献することを期待し、現在研究を進めている。

謝辞

本研究は、岐阜薬科大学創薬化学大講座・薬化学研究室（永澤秀子 教授）にて行われました。本稿で紹介いたしました研究において、十分な研究環境を用意くださった永澤教授、筆者の提案する気まぐれな構造活性相関に付き合ってくれた博士課程 3 年の丹羽正人君、3399 化合物のアッセイを独力でやり遂げてくれた学部 5 年生の廣澤舟作君の両氏に感謝いたします。また、スクリーニングを進めるにあたり、有益なご助言をいただきました東京大学創薬機構の小島宏達先生にお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 「生物無機化学」、増田秀樹・福住俊一 編著、三共出版、2005
- 2) a) Toyokuni, S. *Cancer Sci.* **2009**, *100*, 9–16. b) Zecca, L.; Youdim, M. B. H.; Riederer, P.; Connor, J. R.; Crichton, R. R. *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *5*, 863–873
- 3) Mai, T. T.; Hamai, A.; Hienzsch, A.; Cañeque, T.; Müller, S.; Wicinski, J.; Cabaud, O.; Leroy, C.; David, A.; Acevedo, V.; Ryo, A.; Ginestier, C.; Birnbaum, D.; Charafe-Jauffret, E.; Codogno, P.; Mehrpour, M.; Rodriguez, R. *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 1025–1033.
- 4) Grillo, A. S.; SantaMaria, A. M.; Kafina, M. D.; Cioffi, A. G.; Huston, N. C.; Han, M.; Seo, Y. A.; Yien, Y.

- Y.; Nardone, C.; Menon, A. V.; Fan, J.; Svoboda, D. C.; Anderson, J. B.; Hong, J. D.; Nicolau, B. G.; Subedi, K.; Gewirth, A. A.; Wessling-Resnick, M.; Kim, J.; Paw, B. H.; Burke, M. D. *Science* **2017**, *356*, 608–616.
- 5) Hirayama, T.; Okuda, K.; Nagasawa, H. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1250–1256.
- 6) Hirayama, T.; Tsuboi, H.; Niwa, M.; Miki, A.; Kadota, S.; Ikeshita, Y.; Nagasawa, H. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 4858–4866.

リガンド指向性 *N*-acyl-*N*-alkyl sulfonamide (NASA) 化学による高速蛋白質ラベリングとコバレントドラッグへの展開

京都大学大学院工学研究科 田村 朋則

1. はじめに

合成小分子による蛋白質の化学修飾（ラベリング）は、生命研究に有用な分子ツール創出のための強力な手法である。蛍光色素や親和性タグ、阻害剤（リガンド）といった機能性分子を細胞内の標的蛋白質に導入することができれば、バイオイメージング、蛋白質間相互作用の検出、人工的な活性制御など、様々な応用展開が期待される。今世紀に入り、生体直交性有機化学(Bio-orthogonal chemistry)と遺伝子工学技術の飛躍的な進展に伴って、細胞内のような夾雑環境でも適用可能な蛋白質化学修飾法がいくつか開発されている。例えば、蛋白質タグシステム (e.g. SNAP-tag, Halo-tag) や、非天然アミノ酸に対する生体直交性反応 (e.g. Cu-free click reaction, inverse electron-demand Diels-Alder (IEDDA) cycloaddition) は、細胞内や生物個体内での使用例も多く、優れた蛋白質ラベリング技術として認知されている。^[1]しかし、このような融合蛋白質あるいは非天然アミノ酸導入を基盤とした手法ではもともと細胞内に存在する内在性（天然型）蛋白質の修飾は不可能である。細胞内で起こる生命現象の真の姿を理解するためには、天然の蛋白質をそのままの環境で機能化/解析することが理想的であろう。しかし、種々雑多な生体分子が高濃度に存在する細胞内夾雑環境下で、遺伝子工学の助けを借りずに標的の内在性蛋白質のみを選択的に化学修飾することは極めてチャレンジングな課題である。

このような背景の中、我々は有機化学的なアプローチに基づいてこの難題に取り組み、生体内に存在する内在性蛋白質をその場で直接化学修飾可能な手法として『リガンド指向性化学: Ligand-directed (LD) chemistry』を考案した(図1)。^[2,3]この手法では、蛋白質に対するリガンドと導入したいプローブとの間に脱離性反応基を導入したラベル化剤を用いる。リガンド部分が蛋白質に認識されると、近接効果によって蛋白質上の求核性アミノ酸残基が反応基と反応し、プローブが修飾される。この際、反応と同時にリガンド部位が切り離されるため、蛋白質本来の活性を保ったままのラベリングが可能である。開発初期の LD 化学はラベリングに数十時間から数日を要することが課題であったが、最近では既存の蛋白質タグや最も速い生体直交性反応に匹敵する反応速度での細胞内在性蛋白質ラベリングが可能になりつつある。本稿では、こうした高速ラベリングを可能にしたリガンド指向性 *N*-acyl-*N*-alkyl sulfonamide (LDNASA)化学の詳細な反応速度論、ならびにそのコバレントドラッグへの展開について紹介する。

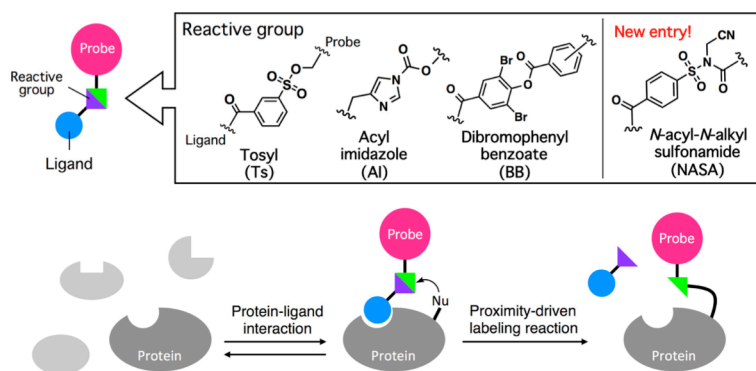


図1 リガンド指向性化学: Ligand-directed (LD) chemistry

2. リガンド指向性 NASA 化学の反応速度論

LD 化学に適用可能な反応基としてはこれまでにトシル(Ts)、アシルイミダゾール(AI)、ジプロモフ

エニルベンゾエート(BB)などが見出されている(図1)。¹³⁾しかし上述のように、これらは反応速度が遅く反応効率も低いため、修飾後のアプリケーションが困難なケースも多々あった。そこで筆者は高速かつ高効率なラベリングを目指してペプチド固相合成に古くから用いられてきた求電子剤である *N*-acyl-*N*-alkyl sulfonamide (NASA)¹⁴⁾に着目し、これを反応基とした LDNASA 化学の開発に取り組んだ。まず FKBP12 をモデル蛋白質として NASA 型ラベル化剤 **1** を設計・合成し、試験管内にてラベル化反応を行った(図2a,b)。MALDI-TOF-MS 解析の結果、**1** は FKBP12 をわずか 15 min で 98%ラベル化することがわかった。またラベル化部位解析から、この反応はリガンド結合ポケット近傍の Lys 残基特異的に進行し、安定なアミド結合を介してプローブが修飾されることが明らかとなった。

続いて、これまでに当研究室で開発した4種類のLD化学(Ts, AI, BB, NASA)の反応速度をより定量的に比較するため、それぞれの系における反応速度定数を算出した。リガンド指向性化学によるラベル化反応の速度式は図2cの式1のように表される。この微分方程式を解くと、反応系中の未反応蛋白質の濃度が式2で表され、見かけの速度定数 k_{app} は式3に従う。よって、異なるラベル化剤濃度に対する k_{app} を実験的に求めてプロットし、式3を用いてフィッティング解析することで、ラベル化プロセスの擬一次反応速度定数 k_L と解離定数 K_d が実験的に得られる。これによって、LD化学における二次反応速度定数(k_L/K_d)が算出できるため、既存の生体直交性化学との速度定数の直接比較も可能となる。反応速度解析では NASA と Ts は FKBP12 ラベリング、NASA、AI、BB は eDHFR ラベリングで比較した。なお、それぞれのラベル化剤は過去に構造最適化がなされたものを使用した。反応速度解析の結果を図2dに示す。まず FKBP12 ラベリングの結果から、NASA と Ts の反応速度パラメーターを比較すると、 K_d は二つの反応基間でほぼ同等であるのに対し、NASA の k_L は Ts に比べて 635 倍大きかった。eDHFR に対するラベリングでも同様に、 K_d はラベル化剤ごとに違いはほとんどないのに対し、NASA ラベル化剤の速度定数 k_L は AI に比べ、2241 倍大きく、BB に比べても、38 倍大きいことが明らかとなった。得られたパラメーターから二次反応速度定数(k_L/K_d)を算出したところ、NASA 型ラベル化剤は FKBP12、eDHFR のどちらに対しても、約 10^4 $M^{-1}s^{-1}$ と著しく大きな値を示したのに対して、LD化学の第一世代である Ts や AI は数十 $M^{-1}s^{-1}$ 程度、最近開発された BB でも 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ オーダーであった。

以上の結果から、LDNASA 化学は従来の LD 化学よりも大きな反応速度定数を有することが定量的に示された。さらに本検討によって他の蛋白質ラベリング法との直接的な比較が可能となり、LDNASA 化学の反応速度は、生体直交性反応の中で最も速度定数の大きい、IEDDA 反応や酵素タグとして使用される SNAP-tag システムに匹敵することが明らかとなった。^{11,5)}ただし、LD化学の二次反応速度定数(k_L/K_d)は用いるリガンドの親和性(K_d)に依存するため、実験系ごとに異なることに留意しなければならない。実際我々は、親和性の低いリガンドを有するラベル化剤

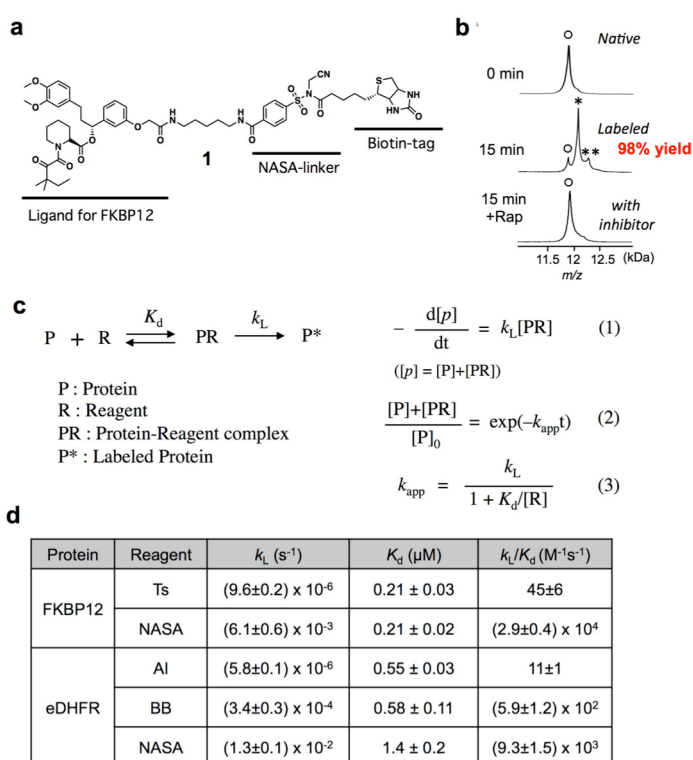


図2 (a) LDNASA ラベル化剤 **1** (b)FKBP12 ラベリングの MALDI-TOF MS 解析 (c) LD 化学の反応速度式 (d) 各 LD 化学の速度パラメーター

を使用した場合、その K_d 値に依存して反応速度が低下することを確認している。この事実は、分子認識を駆動力とする化学反応の速度に親和性が直接関与することを明確に示すとともに、適切なりガンド選択の指標を与える重要な知見となった。

3. リガンド指向性 NASA 化学の Bio-orthogonality

上述のように *in vitro* における検討から LDNASA 化学が優れた反応速度を有することが示されたが、細胞系への展開にあたっては標的蛋白質に対する選択性や生体直交性/適合性もまた重要となる。そこで次に生細胞内において内在性 FKBP12 のラベル化を行い、LDNASA 化学の標的選択性を評価した。C2C12 細胞の培養液中に **1** を添加しインキュベート後、ウエスタンブロッティングによってビオチン修飾タンパク質を検出した。その結果、反応開始 10 分後から 12 kDa 付近にのみビオチン化 FKBP12 に相当する単一のバンドが見られた(図 3)。また、反応開始 1 時間でのラベル化率を算出したところ、細胞内在性 FKBP12 の 77% がラベル化されていることが明らかとなった。なお、従来の Ts 型ラベル化剤を用いて同条件でラベル化を行った場合では、反応が遅いためラベル化シグナルは全く検出されなかった。以上のことから、NASA 型ラベル化剤は細胞内のような夾雑系においても、迅速・高効率なラベル化が進行し、生体直交性も極めて高いことが実証された。

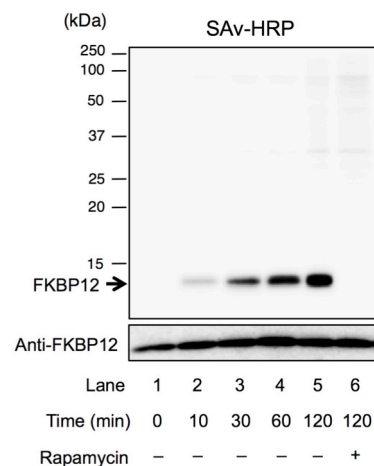


図 3 細胞内 FKBP12 ラベリング

4. NASA 反応基をベースとしたコバレントドラッグ

従来、LD ラベル化剤は蛋白質にプローブ分子を導入するように設計されていたが、リガンド部位を蛋白質に導入するように設計すれば、その化合物は不可逆阻害剤として機能すると予想される(図 4a)。そこで筆者らは、NASA を反応基 (warhead) とした新規不可逆阻害剤の開発に取り組んだ。本研究では、標的蛋白質として Heat shock protein 90 (Hsp90) を選択した。Hsp90 は蛋白質のフォールディングを促進する分子シャペロンとして知られる蛋白質であるが、その活性はガン細胞の生存・増殖に必須であるため、近年では有望な創薬ターゲットとして注目を集めている。我々はまず Hsp90 リガンドの PU-H71 を有する NASA 型ラベル化剤 **2** を合成し(図 4b)、これが細胞内在性 Hsp90 を選択的にラベル化可能であることを確認した。また、LC-MSMS 解析によって細胞内 Hsp90 のラベル化部位はリガンド結合サイト近傍に存在する Lys58 であることを明らかにした(図 4c)。この知見を基にリンカー構造を合理的に設計し、NASA を反応基として有する不可逆阻害剤 **PU-NASA** を合成した(図 4d)。試験管中で **PU-NASA** と精製 Hsp90 を混合すると、反応開始 1 時間で **PU-NASA** が 1 分子付加したプロダクトが 84% 収率で得られた。続いて、

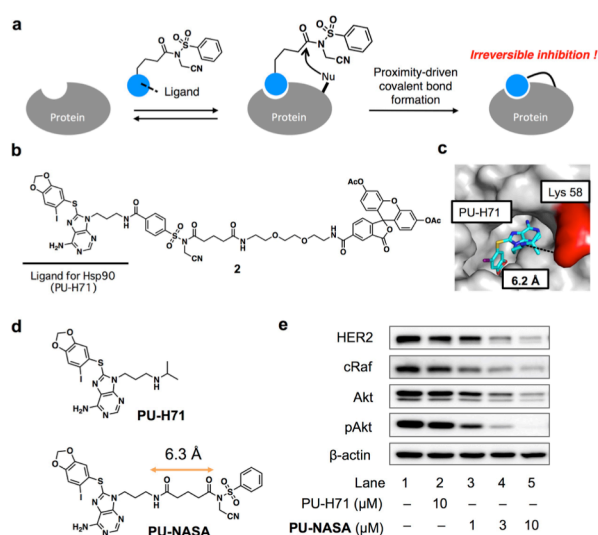


図 4 (a)NASA による不可逆阻害スキーム (b)Hsp90 に対する LDNASA ラベル化剤 **2** (c)Hsp90 のラベル化部位(Lys58) (d) PU-NASA の分子構造 (e) Hsp90 の不可逆阻害によるクライアント蛋白質の不安定化

PU-NASA によるガン細胞の増殖阻害活性を評価した。ここでは、不可逆的な Hsp90 阻害効果を評価しやすくするため、阻害剤を処理した細胞を洗浄し、長時間インキュベートした後(21~69 h)の生存率を評価した。その結果、**PU-NASA** は同濃度の可逆的阻害剤 PU-H71 よりも強い増殖阻害活性を示した。この増殖阻害の原因を確かめるために、Hsp90 のクライアント蛋白質の発現量を調べた。すると、**PU-NASA** を処置した条件では、HER2, cRaf, Akt,リン酸化 Akt といったガンの増殖に関与するクライアント蛋白質が著しく減少することがわかった(図 4e)。これは Hsp90 のシャペロン活性が長時間阻害されることによってこれらクライアント蛋白質が不安定化した結果であると考えられる。一方、同条件において可逆的阻害剤 PU-H71 は Hsp90 を長時間阻害することができないため、クライアントの減少はほとんど起こらなかった。以上の結果は、**PU-NASA** が細胞内 Hsp90 に対する不可逆的な阻害活性を有することを示しており、NASA 反応基がコバレントドラッグの反応基として適用可能であることが実証された。

5. おわりに

今回我々は系統的な反応速度解析によって LDNASA 化学が $\sim 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ という極めて大きな二次反応速度定数を示すことを明らかにした。見落とされがちであるが、二次反応速度定数の大きさは、細胞内での蛋白質ラベリングにおいて特に重要な意味を持つ。^[1,6] 蛋白質ラベリングの反応速度は、二次反応速度定数、蛋白質濃度、修飾試薬濃度のそれぞれに依存する。細胞内は分子クラウディング状態と呼ばれるほど様々な蛋白質が高密度に存在するが、細胞骨格蛋白質を除けば、一般に単一の蛋白質濃度は数 nM~数 μM 程度である(中には pM, fM 程度しか発現しない蛋白質も存在するだろう)。細胞内では水溶性や膜透過性が要因で、修飾試薬の実効濃度を増やすことには限界があるため、低発現量蛋白質のラベリングでは、大きな二次反応速度定数を示す反応が好ましい。例えば、蛋白質濃度=ラベル化剤濃度=1 μM という細胞内反応条件を想定した場合、二次反応速度定数が $1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ の反応では 50% 反応進行時間 $t_{50\%}=277 \text{ h}$ (10 日以上!)であるが、 $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ の反応では $t_{50\%}=1.6 \text{ min}$ となり細胞実験として適切であることがわかる。実際には試薬の膜透過プロセスや分解などもあるので計算通りにはいかないが、効率的な蛋白質ラベリングを行うには少なくとも $10^3\sim 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ オーダーの二次反応速度定数が必要である。そうした意味では、本研究で開発した LDNASA 化学はようやく実用的なレベルに到達した内在性蛋白質ラベリング法であると言えるだろう。

本研究ではさらに、LDNASA 化学を応用して Hsp90 の不可逆阻害剤の開発に成功した。現在開発されている不可逆阻害剤は求核性の高いシステイン側鎖のチオールを標的としたものがほとんどであるが、今回開発した NASA 反応基は Lys 側鎖のアミンに対する修飾が可能である。このように Lys を標的とした不可逆阻害剤は報告例が少なく、本研究成果は Lys-targetable inhibitor に利用可能な反応基の拡張という観点からも重要である。^[7] 今後は、システインを持たないがために不可逆阻害戦略の対象となつてこなかった蛋白質に本系を適用していくと同時に、実際に *in vivo* で使えるレベルまで brush up することを目指し、研究を進めていきたいと考えている。

6. 謝辞

本研究は、京都大学工学研究科、浜地 格教授の研究室で行なわれました。浜地 教授の熱心なご指導に心から感謝申し上げます。また本稿で紹介した内容は、上田 毅君、後藤 大輝君、月館 拓君をはじめ、多くの研究員、学生さんの協力によって得られた成果であり、この場を借りて深く感謝致します。

7. 参考文献

[1] Lang, K. & Chin, J. W. *Chem. Rev.* **114**, 4764–4806 (2014), [2] Tsukiji, S., Miyagawa, M., Takaoka, Y., Tamura, T. & Hamachi, I. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 341–343 (2009), [3] Amaike, K., Tamura, T. & Hamachi, I. *Chem.*

Commun. **53**, 11972–11983 (2017) [4] Tamura, T. *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 14181–14191 (2017), [5] Oliveira, B. L., Guo, Z. & Bernardes, G. J. L. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 4895–4950 (2017), [6] 西川 雄貴、田村 朋則、浜地 格, 有機合成化学協会誌, 74, 521-531 (2016), [7] Pettinger, J., Jones, K., Cheeseman, M.D. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **56**, 15200–15209 (2017)

生細胞中の活性イオウ種の可逆的可視化を実現する蛍光プローブ ～蛍光プローブの新しい設計法研究が切り拓く新潮流～

東京大学大学院薬学系研究所

梅澤啓太郎

1. はじめに

何億年も前に生命体が誕生したときから、イオウ元素は生命活動に不可欠の必須元素となった。それは、イオウ原子のもつ高い反応性および、とりうる多様な酸化数に起因した高いレドックス活性による細胞内環境の巧みなる制御が一因であると考えられている。そして近年、その豊かな化学的特性を基準とし、活性イオウ種 (Reactive Sulfur Species: RSS) という新しいカテゴリーが生まれた。その定義は論文や研究者によって若干異なることもあるが、本稿では Banargee ら^[1]や Slusarenko ら^[2]の論文にある「生体環境下で、他の生体内物質を酸化ないしは還元する力を持つ含イオウ低分子化合物」に倣うこととする。この定義に基づくと、多くの含イオウ化合物がこれに該当する。例えば、古くから深海生物が備えているイオウ呼吸機構、近年では神経伝達活動などに大きく寄与すると考えられている硫化水素 (H₂S) やタンパク質に重要な機能を与えるアミノ酸であるシステイン、細胞内のレドックスバランスの維持や異物の排除を司るグルタチオン (GSH) などが挙げられる。その枠組みの中に、近年はイオウ原子が複数連なって構成された“ポリスルフィド”といった分子の重要性が明らかになってきた (後述を参照)。

このように、多種多様な活性イオウ種が存在し、それぞれ細胞内・生体内で重要な役割を担っているが、これらは“レドックスホメオスタシス”というバランスのもとに互いが連動しているとも考えられている。例えば細胞内では、GSH に代表されるいくつかの活性イオウ種が外因性・内因性酸化ストレスの緩和を担っており、「時間変化に伴う活性イオウ種の濃度の増減」という現象がリアルタイムに起きていると考えられている。したがって、このような活性イオウ種の変動を可視化することが、レドックスバイオロジーの新解明に繋がる。すなわち、“活性イオウ種と可逆的に応答する特性”を持つ蛍光プローブが求められているが、この条件を満たす蛍光プローブは極めて少ないのが現実である。そこで本研究では、その問題を分子設計の側面から解決し、これまでは不可能であった生細胞中の活性イオウ種のリアルタイムイメージングを達成することを目的とした。

2. 蛍光プローブの新しいデザイン法の確立

では、なぜ可逆的蛍光プローブの開発は大きく出遅れているのか、それを蛍光プローブ開発の観点から紐解く。活性イオウ種を可視化可能な蛍光プローブはこれまでに数多存在するが^[3]、その大半は活性イオウ種と蛍光プローブの不可逆的反応による発蛍光性の獲得が応答原理となっている。例えば、活性イオウ種中のチオール基 (-SH) の高い求核性を利用し、脱離性のある消光団を蛍光団に結合させることで、蛍光の OFF/ON を制御可能となるが (図 1 上)、不可逆的な脱離反応ゆえ、“対象物質の濃度の増減をリアルタイムに追う”ことは達成できない。そこ

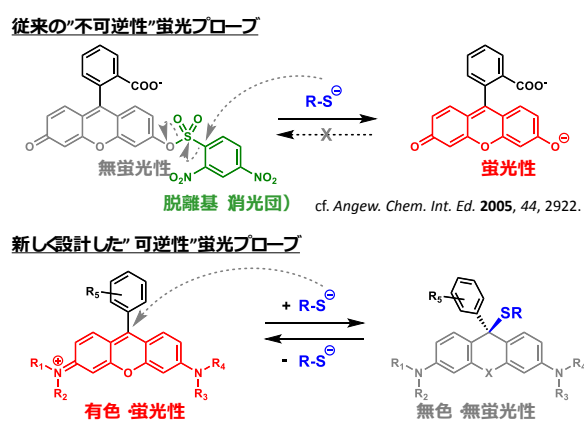


図 1 活性イオウ種に応答する蛍光プローブ

で筆者らは、ターゲットと蛍光プローブの応答に『化学的平衡性＝可逆性』を付与するというコンセプトの元、蛍光プローブの新しい分子設計法の開拓を志した。

では、どのようにして蛍光プローブに可逆性を持たせるか、そこに各研究者の独創性が現れる。その戦略として我々は、これまでに独自に開発を進めてきた分子内環化平衡型ローダミンに着目した^[4]。これは、ローダミン色素の求電子性を利用し、色素分子内に種々の求核性官能基を持たせることで、生理的 pH での分子内環化平衡反応を実現したものである。本研究ではその発想を拡張し、チオール基のような強い求核種を有する活性イオウ種による『分子間』平衡反応が実現可能であると考へ、新規蛍光プローブの開発に取り組んだ (図 1 下)。以下に、その成功例を紹介する。

3. グルタチオン (GSH) をターゲットとした可逆的蛍光プローブ^[5]

グルタチオン (GSH) は生体内で機能する代表的な抗酸化物質の一つであり、細胞内に約 0.5-10 mM の高い濃度範囲に含まれている。その大半は GSH 中のチオール基が還元構造 (-SH) を取る還元体として存在し、細胞内で生じたラジカル成分や親電子物質などの酸化ストレスを消去したり、Glutathione S-transferase (GST) による毒物や薬物の排出 (GSH 抱合) の鍵物質として働くなど重要な機能を有している。さらになん細胞においては、その高い増殖活性に高濃度の GSH が必要であり、その多量の GSH が抗がん剤/放射線治療耐性を獲得しているとも報告されている。このように、GSH を取り巻く研究は、基礎細胞生物学から医療・創薬化学といった幅広い領域にまたがっている。

そこで、前述の戦略に基づいて化学平衡型蛍光プローブを設計・開発したところ、GSH 添加後 1 秒程度で平衡に達するという極めて速い反応速度を有し、かつ解離定数 K_d が 3.0 mM となるケイ素ローダミン類が見いだされ、細胞内 GSH 濃度範囲に合致した蛍光プローブの開発に成功した。さらにこの骨格を GSH 非応答性のテトラメチルローダミン (TAMRA) にリンカーを介して結合させ、生細胞中の GSH 濃度の変化に伴い蛍光波長がシフトする FRET 型蛍光プローブを開発した。

本蛍光プローブを用いることで、これまででは不可能だった様々な応用実験が可能となった。例えば、蛍光顕微鏡下で作成した検量線を用いることで、生細胞内の GSH 濃度を直接的に定量することも可能となった。さらに、がん細胞中の GSH 濃度は細胞の種類によって大きく異なり、非常に濃度の高いがん細胞がある一方で、いくつかのがん細胞では正常細胞とあまり変わらないレベルの GSH 濃度であるという興味深い知見が見出された (図 2)。

また、酸化ストレス (過酸化水素) に対する GSH 濃度変化の秒単位での酸化還元 (GSH-GSSG) サイクルの可逆的イメージングにも成功した。その GSH の酸化還元速度をがん細胞と正常細胞で比較すると、がん細胞は正常細胞に比べて、GSSG の還元機構 (グルタチオンリダクターゼによる GSSG の還元機能) が亢進しており、がん細胞では外的ストレスへの防御機構が発達していることを示唆する結果を生細胞中で初めて見出した。

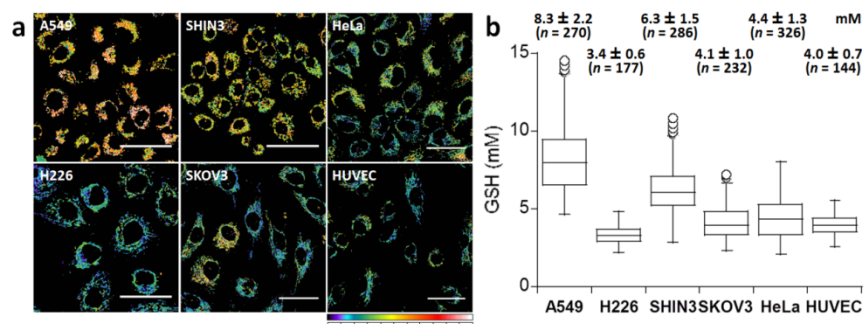


図 2 (a) 様々な腫瘍/正常細胞の GSH 濃度を疑似カラー変換した画像。
(b) それぞれの細胞の GSH 濃度の定量結果。(参考文献 5 より引用)

4. ハイドロポリスルフィド (R-S_nSH 群) をターゲットとした可逆的蛍光プローブ

次に、ハイドロポリスルフィド群 (R-S_nSH 群) をターゲットとした蛍光プローブの開発に着手した。これらの化合物は、イオウ原子が 2 つ以上連なっているのが最大の特徴であり、タンパク質中のシステイン残基 (Cys)、あるいは細胞質に存在する GSH や Cys が多硫化されたポリスルフィド体の総称で

ある。これまで、生体内での存在は確認されていたが、その存在量や生体での役割については未解明のことが多かった。その背景の中、2014年に赤池らが報告した論文^[6]が、当該分野の大きな進展に繋がった。具体的には、CysやGSHのポリスルフィド体(Cys-S_nSH, GS_nSH)は細胞内におおよそ数10 μM存在し、GSHよりも強い抗酸化作用を示すことや、硫化水素の前駆体としても機能するという報告をしている。しかし、これらの研究はいずれも細胞破碎による分析が必須であり、生きたままの情報は得られていない。そこで、前述の分子設計アイデアがR-S_nSH群の可逆的可視化に拡張可能かを研究した。

しかし、開発に当たって大きな障壁になったのは、細胞中に多量に存在するGSHに対する選択性の獲得であった。R-S_nSH群はGSHに比べて約1/1,000程度しか存在しないと予想されるため、GSHに対して10,000倍以上の選択性が求められる。これはプローブ設計においては極めて高いハードルであったが、試行錯誤の末、GSHに対して10,000倍以上の選択性を有する蛍光プローブの開発に成功した。この蛍光プローブのGSHないしR-S_nSHへの解離定数K_dはそれぞれK_{d,GSH} > 100 [mM], K_{d,RSSH} = 10 [μM]であり、生細胞中ではGSHに反応せず、かつ最適な濃度範囲でR-S_nSHのみに反応する蛍光プローブであることを確認した。

GSHプローブと同様にFRET型蛍光プローブを開発し、様々な生細胞イメージングを可能とした。例えば、2秒おきでのタイムラプスイメージングの撮像に成功し、酸化ストレス(過酸化水素)の負荷によるR-S_nSH群の増減の様子を可視化することに成功した。また、R-S_nSH濃度の定量および、細胞の種類の違いによるR-S_nSH濃度の違いを可視化することも達成した。さらに、前述のGSHプローブと併用することで、生細胞中でのGSHとR-S_nSH濃度の相関や、ある刺激に対するGSHないしR-S_nSHの濃度変動の独立性を調査することに成功した。これらはいずれも世界初の結果であり、R-S_nSH群の生細胞中での機能解明に大きく寄与するものと期待される。

5. おわりに

活性イオン種のケミカルバイオロジーは日進月歩の勢いで進展している新しい分野である一方で、蛍光プローブ開発研究は後れを取っているのが現状である。本研究は、そのような分野横断型研究に生じたギャップを大きく埋める革新的な成果であると期待している。また同時に、本研究はものづくりの化学の観点からも革新的な進展があり、求核-求電子平衡反応をモチーフとした新しい蛍光プローブ設計法という、様々な生体内小分子の可逆的可視化を達成する新しいアイデアをもたらすことができた。それはひいては、「新しい分子設計法が新しい応用を可能にする」という前例に囚われない萌芽的研究を育む好例として、後の多くの研究に貢献することを期待している。

謝辞

本研究は、東京大学大学院薬学系/医学系研究科 浦野泰照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、助言を賜りました浦野泰照教授および神谷真子講師に感謝を申し上げます。また、“有機合成の出来る耳鼻科医”の吉田昌史講師(東京大学医学部)の御協力をはじめ、浦野研究室の多くの方々のサポートに心より感謝いたします。

参考文献

- [1] T. V. Mishanina, M. Libiad, R. Banerjee, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 457-464.
- [2] M. C. H. Gruhlke, A. J. Slusarenko, *Plant Phys. Biochem.* **2012**, *59*, 98-107.
- [3] a) X. Chen, Y. Zhou, X. Peng, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2120-2135; b) V. S. Lin, W. Chen, M. Xian, C. J. Chang, *Chem. Soc. Rev.* **2015**.
- [4] a) S. Kenmoku, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7313-7318; b) M. Sakabe, D. Asanuma, M. Kamiya, R. J. Iwatate, K. Hanaoka, T. Terai, T. Nagano, Y. Urano, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*,

409-414.

[5] K. Umezawa, M. Yoshida, M. Kamiya, T. Yamasoba, Y. Urano, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 279-286.

[6] T. Ida, T. Sawa, H. Ihara, Y. Tsuchiya, Y. Watanabe, Y. Kumagai, M. Suematsu, H. Motohashi, S. Fujii, T. Matsunaga, M. Yamamoto, K. Ono, N. O. Devarie-Baez, M. Xian, J. M. Fukuto, T. Akaike, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2014**, *111*, 7606-7611.

タンパク質化学合成法を武器に多細胞生物の謎に挑む

東京大学工学系研究科 林 剛介

1. はじめに

我々ヒトを含む動物や植物などの多細胞生物が地球上で繁栄を極め頂点に立っている（ように見える）のはなぜだろうか？その要因として「分業」というキーワードがあると筆者は考えている。つまり、単細胞生物の集団は言わば「ばらばらな個人の集団」であり、各細胞が同じ働き（例えばエネルギー生産や免疫応答、遺伝子の継承など）をするのに対し、多細胞生物では細胞種ごとに与えられた役割が異なり、特定の機能に特化した結果、細胞集団全体として生存・子孫繁栄の効率が上昇するのである。アダム・スミスは1776年に「富める国家の要因は仕事の分業にある」という主旨の国富論を発表して分業の重要性を説いたが、生物はそれよりも数億年以上前から分業の重要性を認識し、取り入れていたことになる。この多細胞生物の「分業」を可能にするのが細胞種ごとに異なる遺伝子発現パターンであり、ゲノム中のどの遺伝子を利用するかを決定するエピジェネティクスの機構である。細胞複製における遺伝子発現パターンの維持や細胞分化における発現パターンの変化は、主に核内に存在するクロマチンの化学反応がドラビングフォースであることが知られている。その化学反応はDNA上だけでなくDNAと共にヌクレオソームを形成するヒストンタンパク質上でも頻繁に起こることが近年明らかになってきた。特にヒストンの化学修飾（翻訳後修飾）はDNAの修飾に比べて多様であることから、ヒストン修飾が遺伝子発現パターンを規定するという「ヒストンコード仮説」も提唱されている。本稿では、ヒストンコード仮説を検証するためにタンパク質化学合成法が有用である理由を述べた後、我々の研究成果と現在取り組んでいる研究について紹介する。

2. タンパク質化学合成で翻訳後修飾入りヒストンを作る

今日までに同定されたヒストンの翻訳後修飾サイトおよびその種類は、ここ10年のLC-MS/MS分析技術の発展とともに急速に増大した。ヌクレオソームを構成するコアヒストンには、H2A、H2B、H3、H4の4種類があるが、各々のヒストンにおいて20アミノ酸以上で翻訳後修飾が確認されている¹。修飾の種類もメチル化やアセチル化、リン酸化のような比較的小さな修飾に加えて、ユビキチン化やSUMO化、ポリADPリボシル化といった高分子の修飾も施されることが明らかになっており、その種類は20種類以上報告されている。このように多様なヒストン修飾が生命現象に関連していることが示唆されている中、その機能が解明されている修飾はごくわずかである。翻訳後修飾の機能を結晶構造解析やタンパク質間相互作用解析を用いて明らかにするためにも、まずは標的とする翻訳後修飾が部位特異的に導入されたヒストンを作製する方法が必要不可欠である。

修飾タンパク質を調製する有望な技術の一つが、タンパク質化学合成法である²。タンパク質化学合成法は、一般的によく用いられる大腸菌などの宿主に目的タンパク質を発現させて回収する方法とは大きく異なり、化学的に合成したペプチド断片を連結して全長タンパク質を得る方法である。ペプチド固相合成法は様々な化学修飾を持つ非天然アミノ酸（例えばメチル化などの翻訳後修

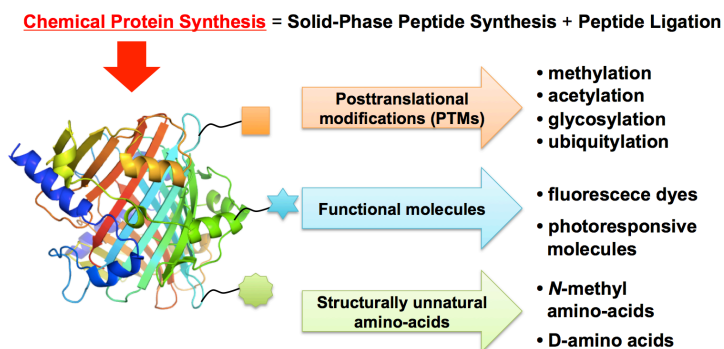


図1 タンパク質化学合成法で導入可能な化学修飾

飾を持つアミノ酸)の部位特異的導入を可能にするため、結果的にそのペプチド断片を連結させたタンパク質は多様な化学修飾を持つことになる(図1)。現段階の化学合成法には、おおよそ200アミノ酸以上のタンパク質の作製には難を伴う、という制約が存在するが、幸い4種類のコアヒストンはいずれも100-150アミノ酸程度である。ヒストンタンパク質は、他のタンパク質に比べて翻訳後修飾サイトや種類が多様であることから、タンパク質化学合成法を操る研究者にとっては格好の標的となる。実際に4種類のコアヒストンは全て今日までに化学合成ルートが開拓されており³⁻⁵、我々のグループではH2Aの合成ルートの確立に成功した⁶。

3. ヒストン H2A の化学合成と翻訳後修飾の機能解析

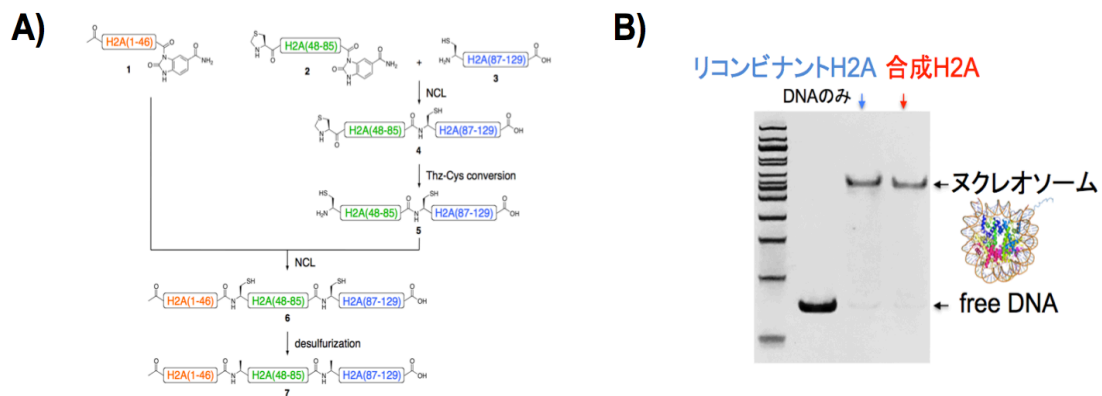


図2 H2Aの化学合成スキーム(A)とヌクレオソームの再構成(B)

全長129アミノ酸のヒストンH2Aを、3つのペプチド断片に分割し、2度のペプチド連結反応を用いて全長H2Aを得た(図2A)。連結反応には、N末端CysペプチドとC末端チオエステル含有ペプチドを反応させるNCL(Native Chemical Ligation)⁷を用いた。NCLではCysが必須になるが、天然のH2AはCys残基を持たないため、連結反応後「脱硫反応」と呼ばれるラジカル反応を用いてCys残基をAla残基に変換⁸することでネイティブな全長H2Aを得た。得られたH2Aを用いてH2A-H2Bダイマーやヌクレオソームの試験管内再構成を行い、リコンビナントH2Aと機能が同等であることを確認した(図2B)。

次に確立したルートを用いて翻訳後修飾入りH2Aを合成し、その物理化学的性質の評価を行った。3種類の異なる翻訳後修飾(リン酸化Ser、ジメチル化Lys、アセチル化Lys)が導入されたH2Aおよび57番目のTyrがリン酸化されたH2Aを作製した。これらの修飾入りH2Aを用いてヌクレオソームを再構成し、その熱安定性を評価したところ、3種類の修飾を持つH2Aは無修飾H2Aと同等の挙動を示したのに対し、リン酸化Tyrを持つH2Aは熱安定性が大きく低下することが明らかになった(図3)。この結果と結晶構造を比較することで、このリン酸化Tyrは、H2A-H2Bダイマーの相互作用を弱めることで結果的にヌクレオソームの安定性を低下させることが示唆された。H2A-H2Bダイマーの安定性を変化させる翻訳後修飾についてはこれが初めての発見となった⁹。

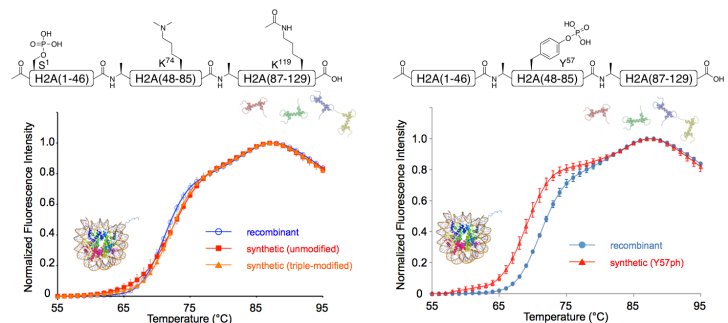


図3 翻訳後修飾入りH2Aを用いたヌクレオソームの熱安定性解析

4. 二量体やヌクレオソーム形成をプロービング可能な蛍光応答性ヒストン

ヒストン H2A および H2B は細胞質で翻訳された後、ヘテロ二量体 (H2A-H2B ダイマー) を形成し、核内に運ばれヌクレオソームに挿入される。しかし、どのようなタイミングやメカニズムで二量体の形成やヌクレオソームへの挿入が起こるのかについて、未だに大部分が明らかになっていない。またこのような単量体⇌二量体⇌ヌクレオソームの平衡状態に翻訳後修飾がどう影響するかについても全く明らかになっていないのが現状である。そこで筆者らは、単量体⇌二量体、および二量体⇌ヌクレオソ

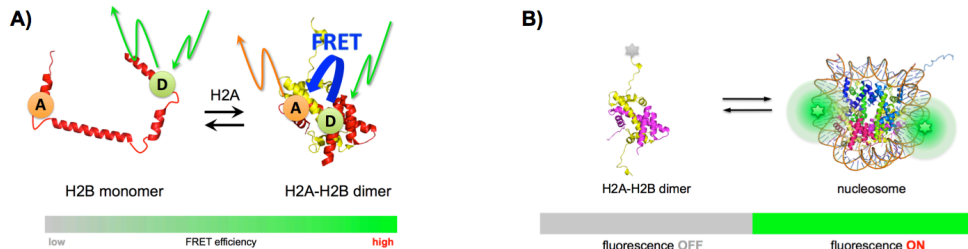


図 4 構造変化を可視化する分子内 FRET-H2B (A) およびヌクレオソーム形成を可視化する蛍光ターンオン H2A (B)

ームの平衡状態を蛍光発光の変化によって識別可能な人工ヒストンの作製を現在行っている。

ヒストン単量体は決まった構造を取らない不定形タンパク質であることが予想されており、二量体形成に伴って構造変化が起こることが予想できたため、2種類の蛍光色素 (FRET ペア) を導入した H2B を設計した (図 3A)。我々が最近開発したシリル保護アルキンを用いた機能性分子の導入法¹⁰を用いてこの人工 H2B の完成を目指している。また、DNA に結合して蛍光発光する色素を導入したヒストンを作製することで、ヌクレオソーム状態にあるヒストンだけを可視化することが可能になると考えられ、このような蛍光ターンオン機能を持つ人工 H2A も現在作製中である (図 3B)。このようにタンパク質化学合成法を使えば、翻訳後修飾だけでなく、蛍光色素に代表される機能性分子も部位特異的に導入できるため、多様な化学修飾を持つタンパク質を用いて研究を進めることができるのである。

5. おわりに

幸いなことに 2017 年夏にもこのコーナーの執筆機会を頂き、その際は「タンパク質を化学の力でいかに作るか？」というタイトルで、タンパク質化学合成法の意義や課題、将来展望について述べた。本稿では、より応用的な視点から化学合成されたタンパク質がエピジェネティクス研究において有用であることを論じた。タンパク質化学合成法のアドバンテージは、別法に比べて化学的多様性の高いタンパク質を提供できることにある。化学的多様性が高いということは、人間の創造力を盛り込める余地を多く残している、ということである。つまり、これまで思いもよらなかった新たな機能を持つタンパク質を生み出せる可能性があり、これはアカデミック研究だけでなく、将来的には医薬分子や材料分子として産業界への展開も期待される。このような可能性を信じて、タンパク質化学合成の基礎研究および応用研究を展開していきたいと意気込んでいるところである。

謝辞

本研究は、東京大学大学院工学系研究科・化学生命工学専攻および東京大学先端科学技術研究センターに所属する岡本晃充教授の研究室にて行われたものです。本研究の推進のために十分な研究環境を提供していただいた岡本晃充教授に御礼申し上げます。また、本稿で紹介させていただいた研究に対して日々努力を惜しまず研究を続けてくれている博士課程 3 年の末岡拓馬君に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Huang, H.; Sabari, BR.; Garcia, BA.; Allis, CD.; Zhao, Y. Cell 2014 159, 458.
- 2) Dawson, PE.; Kent, SBH. Annu. Rev. Biochem. 2000 69, 923-960.
- 3) Shimko, JC.; North, JA.; Bruns, AN.; Poirier, MG.; Ottesen, J. J. Mol. Biol. 2011 408, 187-204.
- 4) Siman, P.; Karthikeyan,

SV.; Nikolov, M.; Fischle, W.; Brik, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013 52, 8059-8063. 5) Li, J.; Li, Y.; He, Q.; Li, Y.; Li, H.; Liu, L. *Org. Biomol. Chem.* 2014 12, 5435-5441. 6) Hayashi, G.; Sueoka, T.; Okamoto, A. *Chem. Commun.* 2016 52, 4999-5002. 7) Dawson, PE.; Muir, TW.; Clark-Lewis, I.; Kent, SBH. *Science* 1994 266, 776-779. 8) Wan, Q.; Danishefsky, SJ. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007 46, 9248-9252. 9) Sueoka, T.; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Biochemistry* 2017 56, 4767-4772. 10) Hayashi, G.; Kamo, N.; Okamoto, A. *Chem. Commun.* 2017 53, 5918-5921.

第5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32回生体機能関連化学部会若手フォーラム・第5回バイオテクノロジー部会若手フォーラム)

若手フォーラム 世話人 東京大学大学院薬学系研究科 小松徹

9月6日(水)、東京大学本郷キャンパスにおいて、第5回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラムが開催されました。本若手フォーラムは、毎年、バイオ関連化学シンポジウムの前日に生体機能関連化学部会若手の会、バイオテクノロジー部会若手の会の若手研究者らが中心となって企画・開催されてきたもので、生体機能関連化学部会単独開催の頃から数えて32回目となる本年度は、東京大学・後藤祐樹先生、小松徹、竹澤悠典先生、長門石暁先生、早稲田大学・細川正人先生、東京農工大学・前田義昌先生、東京工業大学・正木慶昭先生、の7名の世話人により企画させていただきました。

本フォーラムでは、昨年度に引き続き、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・超分子化学研究会の皆さまから非公開のポスター発表を募集すると共に、新進気鋭の6名の先生による招待講演をお願いしました。本年度は、102名の事前参加登録に加え、多くの当日参加の申し込みをいただき、最終的には、一般44名、学生78名、計122名という非常に多くの方にご参加いただく盛会となりました。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。

招待講演は、東京大学理学系研究科化学講堂で開催され、ほぼ満席に近い会場の中、「難治性疾患の治療/診断を指向した高分子集合体の創製」(東京大学・安楽泰孝先生)、「未利用生合成遺伝子を活用する多様な天然物および擬天然物の創生研究」(東京大学・浅井禎吾先生)、「微細藻類を用いたプラスチック原料の新規増産法の開発」(明治大学・小山内崇先生)、「原子分解能電子顕微鏡で明らかにする動的分子科学」(東京大学・原野幸治先生)、「プリンテッドバイオマテリアルの開発と生体計測への応用」(早稲田大学・藤枝俊宣先生)、「ペプチドの低コスト生産を志向したマイクロフローアミド結合形成法の開発」(東京工業大学・布施新一郎先生)の6演題の招待講演がおこなわれました。化学という共通の言語を使いながらも、基礎から応用までの幅広い分野に跨る大変魅力的なご発表が並ぶ中で、各発表に対し、会場からも活発な議論が飛び交いました。

また、講演に引き続き形で、山上会館に会場を移動してポスター発表がおこなわれました。当初の予定を上回る68件のポスター発表をいただき、会場が少々手狭となってしまいましたため、蒸し暑い思いをされた方も多かったのではと、この点大変恐縮に思いますが、それでも、講演の熱を引き継いで議論が続けられました。そして、ポスター発表後、会場を移しての懇談会が開催されました。世話人の長門石先生からの若手研究者に対する熱いエールをもってはじまった懇談会は、各所に参加者の輪ができ、時間いっぱいまで話の尽きない盛会となり、最後は、翌日のバイオ関連化学シンポジウムへの余力を残しつつ、十分に英気を養った形での若手フォーラムの幕となりました。



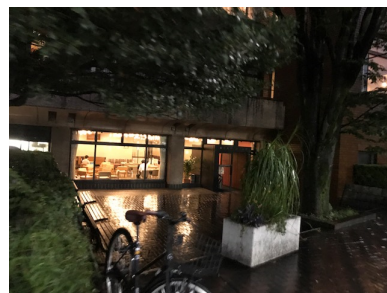
参加いただきました多くの方に、とても良い会だったとお言葉をいただきましたことは、世話人の1人として何より嬉しいことでもあります。これは、ひとえに、招待講演の先生方の魅力的なお話、そして、その講演プログラムをはじめとした本会の全てを企画いただきました世話人の先生方、ご支援いただきました団体、企業の皆さま、更には、講演会、ポスター発表での活発な議論に参加いただきました参加者の皆さまのおかげであります。先輩方が受け継がれてきた若手フォーラムの伝統の通り、今年も、この若手フォーラムをもって、「上下関係・研究室・分野を超えて、サイエンスに対して活発かつ真摯に議論する」場を提供し、新たな交流やアイデアを産み出す「触媒」としてバイオ関連化学分野の発展に少しでも寄与することができたようでしたら大変幸いに存じます。

改めまして、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先生方、若手幹事の先生方、ならびに多方面からのサポートをいただきました日本化学会 坂下修一様に厚く御礼申し上げます。

また、何より、本若手フォーラムを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、新学術領域「配位アシンメトリー」、株式会社東京化学同人、日産化学工業株式会社、理科研株式会社、五稜化薬株式会社各関係者の方々に重ねて厚く御礼申し上げます。

来年度のバイオ関連化学シンポジウム若手フォーラムは、大阪大学の太洞光司先生を世話人代表として大阪で開催される予定です。引き続き、部会の皆さまの積極的なご支援のほど、何卒宜しくお願い致します。

以上、拙文をもちまして本年度の若手フォーラムの熱気を部会の方々と共有させていただけたようでしたら幸いです。最後に、改めまして本会をご支援いただきました皆さまへの御礼をもちましてご挨拶に代えさせていただきます。



第5回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム 世話人

東京大学・後藤 佑樹
東京大学・小松 徹（文責）
東京大学・竹澤 悠典
東京大学・長門石 暁
早稲田大学・細川 正人
東京農工大学・前田 義昌
東京工業大学・正木 慶昭

第 11 回バイオ関連化学シンポジウム開催報告

(第 32 回生体機能関連化学シンポジウム・第 20 回バイオテクノロジー部会シンポジウム)

東京大学大学院 薬学系研究科 浦野泰照
理学系研究科 小澤岳昌
工学系研究科 山東信介

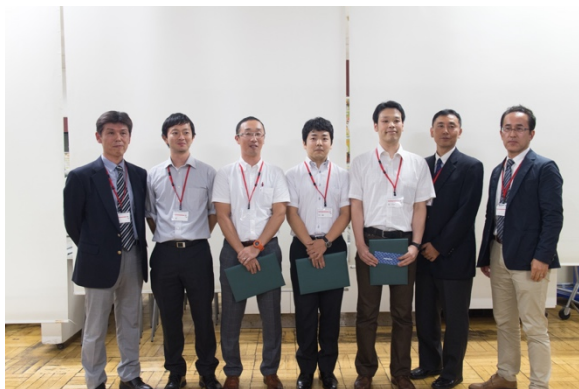
平成 29 年 9 月 7 日 (木) ~ 9 日 (土) の 3 日間、東京大学弥生キャンパスにて第 11 回バイオ関連化学シンポジウム (第 32 回生体機能関連化学シンポジウム、第 20 回バイオテクノロジー部会シンポジウム) が開催されました。2004 年に第 19 回生体機能関連化学部会シンポジウムが開催されてから、約 13 年ぶりに東京大学弥生キャンパスで開催されたこととなります。

初日に小雨が降り、その後の天候が心配されましたが、幸いにも概ね晴天に恵まれ、事前登録 352 名、当日登録 120 名、合計 472 名 (うち学生 226 名) もの参加者が集まりました。口頭 86 件、ポスター 243 件の発表が 3 日間に渡って行われ、非常に活発なディスカッションが展開されました。実行委員を代表して、ご参加くださった皆様に厚く御礼申しあげます。8 日夕刻から懇親会を開催しました。「初心に還る」を合言葉に、懇親会は大学内生協食堂で実施しましたが、ざっくばらんな雰囲気のもと、参加者の皆様には楽しんでいただけたようです。

本シンポジウムでも、部会講演賞 (40 歳以下の博士号取得者)、学生ポスター賞 (部会員の学生対象) の審査が行われました。井原敏博審査委員長のもと、部会講演賞 4 名、ポスター賞 13 名が選ばれ、懇親会の席上、受賞者には賞状と副賞が授与されました。審査を担当くださった先生、若手の会の方々に感謝いたします。

シンポジウム開催にあたり多数の企業・団体様より多大なご支援をいただきました。また、運営を担当してくださった実行委員の先生、特に日本化学会の坂下修一氏には様々な面でご尽力・サポートいただきました。心より御礼申し上げます。

来年度の第 12 回バイオ関連化学シンポジウムは、平成 30 年 9 月 9 日 (日) ~ 11 日 (火) に大阪大学で開催される予定です。大阪で皆様と熱く議論できることを楽しみにしております。



「第 11 回バイオ関連化学シンポジウム講演賞・ポスター賞」講評
(第 32 回生体機能関連化学シンポジウム・第 20 回バイオテクノロジー部会
シンポジウム講演賞・ポスター賞)

審査委員長 井原敏博
熊本大学大学院先端科学研究部

今年度の講演賞には 22 名の若手研究者がエントリーし、シンポジウム初日に 2 つの講演会場で 8 名の審査員による厳正かつ公平な審査が行われました。審査方法としては、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・発表資料のわかりやすさ、5) 質疑応答の 5 項目が採点され、合計点の上位から下記の 4 名が講演賞受賞者として選出されました。いずれの研究もレベルは高く、甲乙つけ難い内容であり、選に漏れた方も可能であれば再挑戦することをお勧めしたいと思います。容易に想像できると思いますが、上記 5 項目の点数が互いに独立していることはあり得ません。1 は研究立案のフィロソフィーに関するもの、つまりその研究が面白いかどうかであり、この評価が低いと審査員も幾らか距離をおいて講演を聴くことになるので他の 4 項目における高評価も期待できないと思います。2 と 3 はデータの分厚さ、成果の解析や考察の深さに関するもので、互いに相関の高い項目でした。講演賞にエントリーされるだけあって皆さん素晴らしい成果を発表されていましたが、中でも 4 名の受賞者はこの項目で確実に高得点を得ています。4 は発表のクオリティー。これは皆さん例外なく素晴らしい出来でした。質疑応答こそが学会の華であり、実際、5 の点数も勝者を決める主要因になっていました。質疑応答の内容で、その発表者が PI からどの程度独立して、自ら研究を推進しているかがわかります。将来の生体機能関連化学を担う世界的な人材育成を目指す本講演賞の趣旨を最も確実に担保する項目かもしれません。

受賞者の方々にお祝いを申し上げますとともに、このような機会がその他の多くの若手研究者の皆さんの今後ますますの活躍に繋がればと願っております。

部会講演賞受賞者（敬称略、発表順）

田村朋則（京大院工）

「リガンド志向型 NASA 化学による蛋白質ラベリング：反応速度解析と創薬への展開」

林 剛介（東大院工）

「DNA を足場として用いた複数ペプチド断片の同時連結反応」

平山 祐（岐阜薬大）

「二価鉄イオン検出プローブの構造最適化とハイスループットアッセイへの展開」

梅澤啓太郎（東大院薬）

「活性イオウ種の可逆的可視化を指向した蛍光プローブの開発と生細胞イメージングへの展開」

ポスター賞の審査は、東京大学の竹澤先生を中心とする若手研究者により運営されました。エントリーされた 100 名は（1 件あたり 3 名の審査員による審査）62 名の審査員により厳正に審査されました。1) ポスター・発表のわかりやすさ、2) 研究背景・目的の明確さ、3) 結果の考察・議論、4) 質疑応答の 4 項目に関して採点され、

優れた発表が多かったために優劣つけ難く、当初予定していたより多い下記の 13 名が受賞者として選出されました。うち上位 2 名には RSC (Royal Society of Chemistry) 協賛により Organic & Biomolecular Chemistry 賞 (OBC 賞) としてポスター賞が授与されました。今後は、新たな研究で本部会上位の賞である講演賞を目指してさらに研究に邁進していただきたいと思えます。

最後に、講演賞の審査を快くお引き受けいただいた 8 名の先生方、及びタイトなスケジュールの中、ポスター賞の審査を実施していただいた 62 名の若手の先生方のご協力に心より感謝申し上げます。

ポスター賞受賞者 (敬称略、発表順、*が OBC 賞)

中間貴寛 (東大院理)、松崎 隆 (九大院工)、上田 毅 (京大院工)、久野 哲 (東大院工)、*山田遼太郎 (名大院理)、*千田樹絵子 (名大院理)、宮崎雄大 (阪大院工)、秋柴美沙穂 (京大化研)、澤田隼佑 (長岡技科大院工)、栗木優五 (東大院薬)、鈴木和人 (名大院理)、加藤拳也 (名工大院工)、李 鎮熙 (農工大院生命工)

ニュースレター Vol. 32, No. 3 2017年12月21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

編集委員：王子田 彰夫、浦野 泰照、山東 信介