

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. 33, No.4 (2019. 3. 15)

## 目 次

### ◇ 巻 頭 言

化学の言葉で生命現象を理解したい ..... 松浦 和則 2

### ◇ 研 究 紹 介

パーフルオロカーボン内包シリカナノ粒子を用いたマルチカラー<sup>19</sup>F MR イメージング ..... 赤澤 一樹 3

ヌクレアーゼ活性向上を指向した DNA-人工核酸キメラ分子構造設計と  
新機能創製 ..... 稲垣 雅仁 4

脂肪酸特異的ペルオキシゲナーゼの基質結合状態を模した  
非特異的ペルオキシゲナーゼの開発 ..... 小野田 浩宜 5

長鎖脂肪酸水酸化酵素の基質誤認識を利用した菌体内での芳香族水酸化反応  
..... 唐澤 昌之 6

コラーゲン量の制御による正常および線維化ヒト iPS 細胞由来心筋モデルの構築  
..... 西 宏基 7

六量体ヘムタンパク質への化学修飾によるミセル様タンパク質集合体の構築およびその  
光化学的評価 ..... 平山 翔太 8

RNA 編集を標的部位に誘導する機能性 RNA の設計と機能評価  
..... 野瀬可那子 9

貴金属イオンを組み込んだ人工金属酵素触媒の創製と選択的 C-C 結合形成反応への応  
用 ..... 松尾 徳紀 10

生命現象の制御を指向した光応答性分子糊 ..... 茂垣 里奈 11

一分子電流計測による核酸配列解析の実現に向けた非天然核酸塩基の探索  
..... 古畑 隆史 12

## 化学の言葉で生命現象を理解したい

鳥取大学 学術研究院 工学系部門  
松浦和則

こんにちは、松浦です。私は、高校生までは数学が好きで、「化学」はどちらかと言うとあまり興味がありませんでした。高校3年生(1986年)の時に「分子模型を使って好きなものを組み立てて良い」という授業があり、その時に何の気なしに切頂二十面体(要するにフラレンの形)を組み立て、化学の先生に「最近、そんな構造の化合物が見つかったんだよ」と褒めてもらってからは、化学にも興味がわいてきました。そんな因果で、大学では応用化学科に入ったわけですが、高校までと違い、有機化学反応でも数学的に説明(分子軌道論やハメット則など)ができるということを学んでから、俄然面白くなって勉強しました。大学2,3年の頃の愛読書は、井本稔・仲矢忠雄先生が書かれた「有機反応論」(東京化学同人)で、「なぜその有機反応が起こるのか」という問いに対する分子軌道論を用いた詳しい解説をワクワクしながら読んだことを覚えています。研究室に入ってから、有機反応機構や「単分子膜上での分子認識の動力学解析」について研究させてもらっていたので、私は、化学現象を理詰めで理解・整理したいといつも思っています。杉本先生が「生命現象を熱力学パラメーターで理解せよ」というようなことをよく言われると思いますが、とても共感できると思っています。さて、生体機能関連化学部会は、「生命現象を化学的に理解する学術研究」を目的としています。よくバイオ関連シンポジウムで、ペプチドや核酸のランダムライブラリーからセクションした分子が特定のターゲットに効くことを示した研究発表を目にしますが、「選びっぱなし」で相互作用メカニズムの説明が不十分なものが多いように思います。複雑な生命現象を完全に理詰めで理解・説明するのは、なかなか難しいことだとは思いますが、私達は化学者ですので、「なんでもか知らないけど、こうなりました」、「メカニズムはわからないけど、とにかく効くから良い」と言わず、できるだけ化学の言葉で生命現象を説明できるようにしてはどうかと思います。私自身の研究でも、「このペプチド配列がなぜウイルス様のナノカプセルを形成するのか」など、十分に理論的に説明できていないものも多いので、偉そうなことは言えませんが……。しかし、有機化学がただの現象論ではなく理論的に説明できるようになって発展したのと同様に、生体機能関連化学でも現象論から脱却し、理論的に説明できるようになると、さらなる発展が期待できるのではないのでしょうか。これからは私は、生命現象を化学的に理解・説明できるような研究をしたいと思いますが、そうなっていない場合は、質疑応答の際に容赦ないツッコミをお願いします。そのような攻撃的な質疑応答ができるのも生体機能関連化学部会の醍醐味だと思うので……。

## パーフルオロカーボン内包シリカナノ粒子を用いた マルチカラー<sup>19</sup>F MR イメージング

<sup>1</sup>大阪大学大学院工学系研究科, <sup>2</sup>大阪大学免疫学フロンティア研究センター  
赤澤 一樹<sup>1</sup>, 蓑島 維文<sup>1</sup>, 菊地 和也<sup>1,2</sup>

マルチカラーイメージングは複数の生体分子や細胞の動態を同時に検出できる有用なツールである。核磁気共鳴 (NMR) 現象を基にした MRI は、組織透過性に優れ、高い空間分解能でのイメージングが可能である。特にフッ素 (<sup>19</sup>F) を観測核種とした <sup>19</sup>F MRI は、<sup>19</sup>F が生体内にほとんど存在しない為、<sup>19</sup>F を含むプローブ由来のシグナルを高コントラストで検出することができる。加えて、NMR スペクトル上の <sup>19</sup>F の化学シフトは広範囲にわたっており、特定のピークを選択、励起することでマルチカラーイメージングが達成可能である。しかしながら、これまでに開発されたマルチカラー<sup>19</sup>F MRI プローブは低感度で *in vivo* 応用には限界があった。上記の問題を解決する為、我々はこれまでにコアシェル型ナノ粒子の <sup>19</sup>F MRI プローブ (FLAME) を開発している。FLAME は液体のパーフルオロカーボン (PFC) 分子を脂質で内包したミセルの表面をシリカで被覆した構造をしており、生体においても高感度な <sup>19</sup>F MRI シグナルを検出可能である。本研究では、FLAME を用いた新たなマルチカラープローブの開発とその *in vivo* 応用に取り組んだ。

マルチカラー-PFC 内包シリカナノ粒子として、従来の PFCE@SiO<sub>2</sub> に加えて TPFBME@SiO<sub>2</sub>, PFTBA@SiO<sub>2</sub> を新たに作製した (図 a)。これらのナノ粒子の <sup>19</sup>F NMR スペクトルを測定したところ、図 b のスペクトル内の矢印のように選択的に励起可能なピークを有していることを確認した。作製した各 PFC@SiO<sub>2</sub> をマウスの皮下へ投与して、図 b と同様の化学シフトで励起・撮像を行ったところ、マウス体内においても 3 色の MRI シグナルを検出することに成功した (図 c)。本プローブを用いたマルチカラー<sup>19</sup>F MR イメージングは、生体内における細胞間・分子間ネットワークを解明する有用なツールとして期待される。

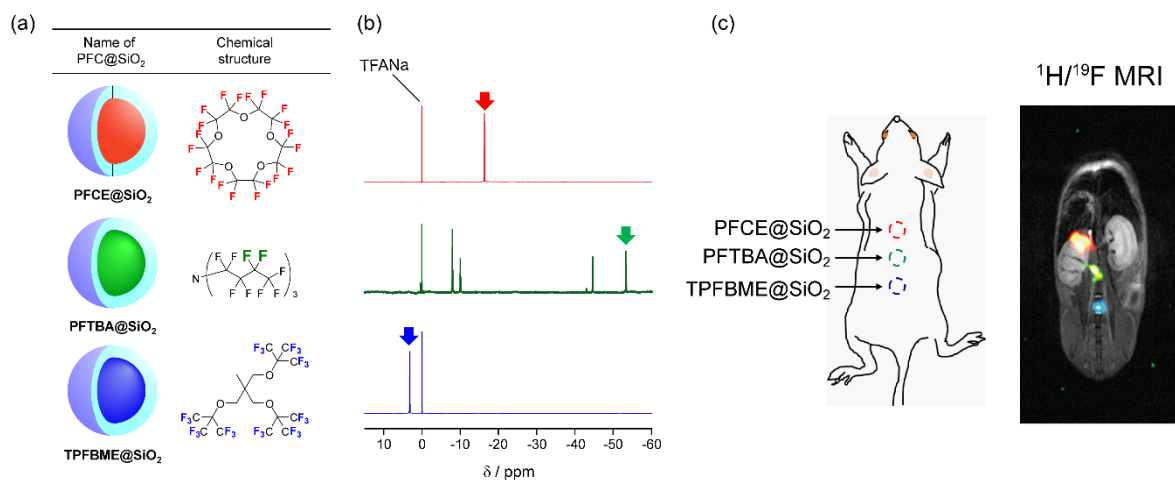


図. (a) ナノプローブの概念図、(b) 各ナノプローブの <sup>19</sup>F NMR スペクトル、(c) *In vivo* <sup>19</sup>F MRI 画像

【参考文献】 K. Akazawa, F. Sugihara, T. Nakamura, M. Matsushita, H. Mukai, R. Akimoto, M. Minoshima, S. Mizukami, and K. Kikuchi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 16742–16747.

## ヌクレアーゼ活性向上を指向した DNA-人工核酸キメラ分子構造設計と新機能創製

東北大学多元物質化学研究所 稲垣 雅仁・和田健彦

**1. はじめに：**核酸医薬は抗体医薬では標的化できない疾患も対象とでき、化学合成により比較的安価に供給できること等多数の利点を有していることから、抗体医薬と相補的で汎用性の高い次世代型分子標的薬として注目されている。<sup>1)</sup> 核酸医薬の一種であるアンチセンス核酸 (ASO) は疾患進行に関与するメッセンジャー RNA (mRNA) やマイクロ RNA (miRNA) などを標的とし、塩基配列選択的に複合体形成することで標的 RNA の機能を抑制し治療効果を発揮する。これら核酸医薬が有効に機能するためには、1) 高い生体内安定性、2) 標的核酸への高い特異性と複合体安定性が求められ、天然型 DNA/RNA に化学修飾を施した修飾核酸/人工核酸の開発が精力的に行われている。<sup>2)</sup> これまでに優れた修飾核酸/人工核酸が報告されているものの、標的核酸と類似配列を有する非標的核酸への結合に起因する副作用 (狭義の *off-target* 効果)、標的核酸認識に依存しない核酸医薬特有の毒性 (広義の *off-target* 効果) の発現が実用化に向けて解決すべき課題として指摘されている。<sup>3)</sup> 当研究室では、狭義の *off-target* 効果克服へ向けた方法論として、細胞内環境応答性人工核酸であるペプチドリボ核酸 (PRNA)<sup>4)</sup> を用いた虚血性疾患選択的核酸医薬系の構築に成功した。本研究では、広義の *off-target* 効果克服へ向けた新規方法論の構築に取り組んだ。

**2. DNA-人工核酸キメラ分子の設計と選択的 RNA 切断：**広義の *off-target* 効果の改善には、核酸医薬の投与量低減が提案されている。しかし、細胞内導入量が sub-nM レベルが限界と報告されている ASO 分子を用いて、発現量が sub- $\mu$ M レベルの mRNA を標的とする系ではもちろん、nM-pM レベルの細胞内発現量で機能発現する miRNA を標的とする系でもフィードバック機構が報告され、標的 RNA と ASO の 1:1 複合体形成に基づく薬効発現戦略では、十分な治療効果が期待できない系も報告されている。<sup>5)</sup> 本課題の解決法として、少量の ASO で標的 RNA を触媒的に切断する RNase H を活用した触媒的核酸医薬法が注目されている。<sup>6)</sup> RNase H は DNA-RNA 二重鎖を認識し、RNA 鎖のみを切断する酵素である。高効率な触媒的 ASO 系構築には、RNase H による標的 RNA の切断効率向上のみならず、ASO の代謝回転数の増加が重要だと考えられる。この観点から、我々は RNA 切断後の解離過程に着目し、RNase H による RNA 切断後、ASO との複合体安定性が生体内環境の 37 °C 以下になれば、ASO の迅速解離が実現でき、代謝回転数増加が期待される (図 1)。本方法論達成のため、RNase H-DNA-RNA 複合体の X 線結晶構造を詳細に検討した。<sup>7)</sup> その結果、RNase H の切断活性サイトの近傍に塩基性 B 型 DNA 結合チャンネルが存在し、このチャンネルへの ASO の結合位置を制御できれば、標的 RNA 結合位置ならびに切断部位も必然的に制御できると発案した。塩基性チャンネルへの ASO 結合位置の制御を目指し、負電荷を有する DNA と電荷を持たない

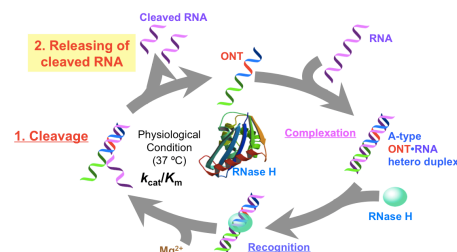


図 1. 触媒的 ASO 系

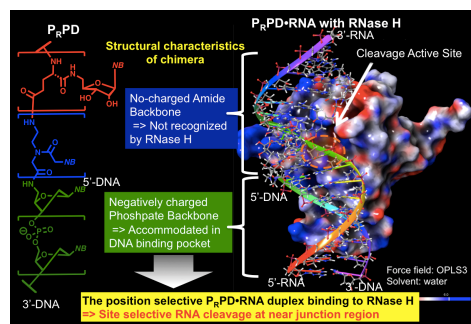


図 2. DNA-人工核酸キメラ分子の設計と RNase H による認識

アミド骨格人工核酸 (ペプチド核酸 (PNA)/PRNA) を融合したキメラ分子を設計した (図 2)。本キメラ分子を用いることにより、DNA-人工核酸ジャンクション部位での選択的 RNA 切断を誘起できると期待した。キメラ分子を用いた RNase H による標的 RNA 切断を詳細に検討した結果、予想通りジャンクション部位近傍での選択的な RNA 切断が観測され、天然型 DNA と比較して飛躍的な切断活性向上に成功した。次に、無細胞タンパク質合成系を用い、キメラ分子によるタンパク質発現抑制効果を検討したところ、RNase H 非存在下においては 1:1 複合体結合形成に基づく抑制効果しか見られなかったのに対し、RNase H 存在下においては mRNA に対してキメラ分子を 0.1 当量しか投与していないにも関わらず、90%ものタンパク質発現抑制効果を示し、その有効性の実証に成功した。以上、本研究では、アニオン性骨格 DNA と電荷を持たないアミド骨格人工核酸を融合したキメラ分子を用いることにより、RNase H による DNA 結合位置制御が可能となり、標的 RNA の位置選択的切断ならびに代謝回転数の飛躍的向上が実現できることを明らかにした。本方法論は、電荷を持たない他の人工核酸系へも応用可能であり、配列選択的 RNA 切断やゲノム編集ツールとしての展開も期待される。

参考文献: 1) Shen, X. et al., *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 1584; 2) Wan, W. B. et al., *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9645; 3) Southwell, A. L. et al., *Trends Mol. Med.* **2012**, *18*, 634; 4) Wada, T. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6900; 5) Nouaille, S. et al., *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 11711; Wang, Y. et al., *J. Pharm. Anal.* **2018**, *8*, 265; Yamakuchi, M. et al., *Cell Cycle*, **2009**, *8*, 712; 6) Liang, X. et al., *Mol. Ther.* **2017**, *25*, 2075; 7) Nowomy, M. et al., *Mol. Cell*, **2007**, *28*, 264.



## 脂肪酸特異的ペルオキシゲナーゼの基質結合状態を模した 非特異的ペルオキシゲナーゼの開発

名古屋大学大学院 理学研究科 小野田 浩宜

### 1. はじめに

脂肪酸ペルオキシゲナーゼとは、過酸化水素を酸化剤として用い、長鎖脂肪酸に酸素原子を挿入する反応を触媒するヘム酵素である。活性中心近傍のアルギニンに固定化された「長鎖脂肪酸のカルボキシル基」を、酸化活性種生成のための一般酸塩基触媒として利用するので、脂肪酸ペルオキシゲナーゼは、脂肪酸以外の非天然基質を酸化できない脂肪酸特異的な酸化酵素として考えられてきた[1]。私たちは、「酢酸イオンを含む水溶液」を反応溶液として用いるだけで、CYP152A1 や CYP152B1 といったシトクロム P450 の 152 ファミリー (CYP152) に属する脂肪酸ペルオキシゲナーゼが、脂肪酸とは全く異なる構造の芳香族化合物の酸化反応を触媒する事を報告している[2]。本稿では、カルボキシル基を側鎖に持つ「グルタミン酸」を活性部位近傍に変異導入することで、酢酸の添加を必要としない過酸化水素駆動形を開発したので[3]、この反応システムの汎用性について紹介する。

### 2. グルタミン酸を導入した脂肪酸ペルオキシゲナーゼの基質汎用性

野生型の CYP152B1 は、酢酸のような短いカルボン酸の非存在下で、長鎖脂肪酸以外の基質を酸化できないと知られている[1]。CYP152B1 のカルボン酸認識部位近傍のアラニン残基を、カルボキシル基を持つグルタミン酸に置換した CYP152B1 A245E 変異体が、過酸化水素を酸化剤として用いて、スチレンや 1-メトキシナフタレン等の芳香族化合物の酸化反応を触媒することを報告した[3]。さらに、グルタミン酸を導入する本手法が、CYP152B1 とは低い配列相同性の CYP152A1 や CYP152N1 にも適応可能であり、CYP152 ファミリーに共通して利用できる事を発見した。特に、CYP152B1 A245E 変異体は、スルホン化反応のような過剰な酸化反応を一切進行させずに、1 分間当たり 4000 回転を超える速さでチオアニソールの R 優先的なスルホキシド化反応を触媒した。

### 3. グルタミン酸を導入したシトクロム P450 モノオキシゲナーゼのペルオキシゲナーゼ反応活性

CYP152B1 のような 152 ファミリーに属する過酸化水素駆動形の P450 と異なり、一般的な P450 は過酸化水素を酸化剤として利用できず、酸素を還元的に活性化することで、天然基質の酸化反応を触媒する。私たちは、カンファー (樟腦) の 5-exo 位を水酸化する CYP101A1 (P450cam) や、脂肪酸の炭素鎖末端を水酸化する CYP102A1 (P450BM3) のような、モデル酵素として代表的に利用されている P450 の活性部位に、グルタミン酸を変異導入することで、野生型の酵素では本来利用できない過酸化水素を酸化剤として用い、それぞれ天然基質の酸化反応を触媒する事を報告した[2]。CYP101A1 T252E 変異体や CYP102A1 T268E 変異体が、天然基質とは大きく構造の異なるスチレンも、過酸化水素を用いて酸化したことから、私達は汎用的なペルオキシゲナーゼ反応系を開発した。

### 参考文献

- [1] H. Onoda, O. Shoji, Y. Watanabe, *Dalton Trans.*, **2015**, *44*, 15316-15323
- [2] O. Shoji, T. Fujishiro, K. Nishio, Y. Kano, H. Kimoto, S. C. Chien, H. Onoda, A. Muramatsu, S. Tanaka, A. Hori, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, *Catal. Sci. Technol.*, **2016**, *6*, 5860-5811
- [3] I. Matsunaga, T. Sumimoto, A. Ueda, E. Kusunose K. Ichihara, *Lipids*, **2000**, *35*, 365-371

## 長鎖脂肪酸水酸化酵素の基質誤認識を利用した 菌体内での芳香族水酸化反応

名古屋大学大学院理学研究科 唐澤 昌之

### 1. シトクロム P450BM3 とデコイ分子

巨大菌由来のヘム酵素であるシトクロム P450BM3 は、長鎖脂肪酸の末端付近 ( $\omega-1, -2, -3$  位) を高速で水酸化するが、基質適用範囲が狭く、長鎖脂肪酸と構造の異なる化合物に対する水酸化活性は著しく低下してしまう。そこで当研究室は、長鎖脂肪酸の類似体「デコイ分子」を利用することで、P450BM3 の基質特異性を変換する手法を開発し<sup>[1]</sup>、ベンゼンやプロパンといった不活性な小分子の水酸化に成功している (図 1 a, b)。特に近年、フッ素原子を含まないアミノ酸誘導体がデコイ分子として機能することを明らかとし、ベンゼンの水酸化を高効率に促進することを報告している<sup>[2]</sup>。

### 2. P450BM3 を過剰発現させた大腸菌を触媒とした菌体内での芳香族水酸化

当研究室はデコイ分子の改良を重ねてきたが、P450BM3 には酸化活性種の生成に際し、電子源として高価な NADPH (1 モル当たり 1000 万円) を消費するという一つの欠点があった。そこで本研究では、生体に備わる NADPH 供給系を利用して P450BM3 を駆動させる、菌体反応系の開発を試みた。菌体内では、P450BM3 が消費した NADPH は糖の代謝によって再生されるため、安価なグルコース (1 モル当たり 20 円程度) によって酵素反応を維持できる。実際に、P450BM3 を過剰発現させた組み換え大腸菌を触媒としてベンゼンの水酸化を行うと、デコイ分子非存在下では反応がほぼ進行しなかったのに対して、デコイ分子の添加によってフェノールの生成が確認されると共に、その生成量はデコイ分子の構造に依存して大きく変化した (図 1c)。これらのデコイ分子は精製した P450BM3 に対して同等の酵素活性化能を示すため、有効なデコイ分子は大腸菌に取り込まれやすいと推測した。デコイ分子の大腸菌に対する毒性を、増殖阻害から評価すると、用いたデコイ分子は毒性を示さなかった。また、高活性なデコイ分子は低濃度でも有効に機能することが明らかとなり、仮説を支持する結果が得られた。最後に、C7-Pro-Phe をデコイ分子として反応条件を最適化すると、フェノールの GC 収率は 59% に達した<sup>[3]</sup>。

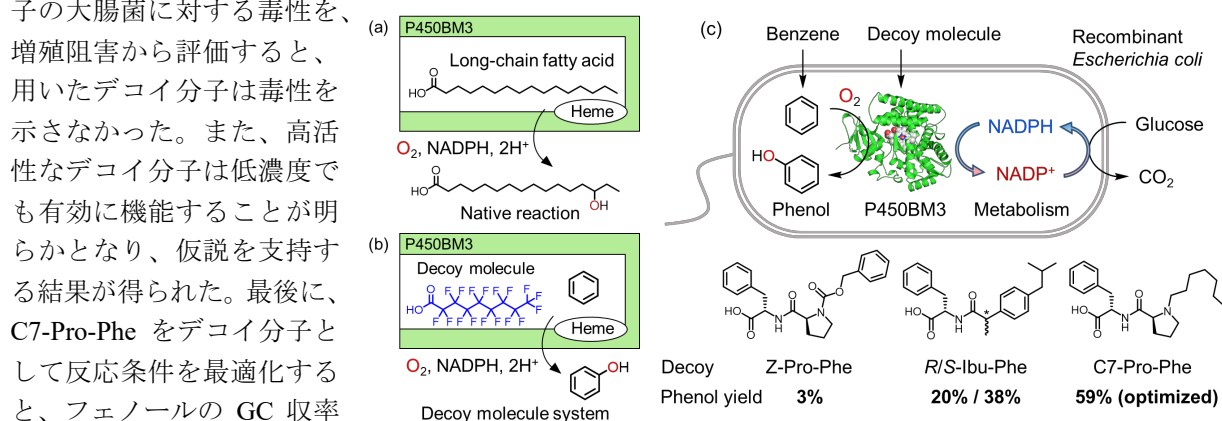


図 1. (a) P450BM3 による長鎖脂肪酸の水酸化。(b) デコイ分子を利用した P450BM3 の機能改変。(c) 開発した菌体反応系によるベンゼンの水酸化。

### 参考文献

- [1] N. Kawakami, O. Shoji, Y. Watanabe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5315–5318. [2] O. Shoji, S. Yanagisawa, J. K. Stanfield, K. Suzuki, Z. Cong, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10324–10329. [3] M. Karasawa, J. K. Stanfield, S. Yanagisawa, O. Shoji, Y. Watanabe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 12264–12269.

## コラーゲン量の制御による正常および線維化 ヒト iPS 細胞由来心筋モデルの構築

大阪大学大学院工学研究科 西 宏基

### 1. はじめに

心筋梗塞は日本における主要な死因の一つであるため、治療薬の開発が活発に研究されている。現在、このような新薬の毒性・薬効評価には二次元の培養細胞や実験動物が用いられているが、三次元組織としての収縮力や拍動などの評価が困難であることや、ヒトと動物の種差による薬物応答性の違いが課題である。また、心筋梗塞による線維化は、心筋細胞の壊死と、コラーゲンを主成分とする膠原線維の産生により誘導されることが知られているが、ヒト心筋細胞を用いた心筋線維化モデルはこれまで報告されていない。そこで我々は、新しく考案したコラーゲン繊維を解繊して作製したコラーゲンマイクロファイバー (CMF) を用いる沈殿培養法を用いた手法により、コラーゲン線維量を変えた心筋線維化モデルの作製を試みた。本稿では、コラーゲン線維量を人為的に制御した三次元ヒト心筋モデルの構築と、線維量に応じて心筋モデルの拍動機能が変化することを見出したため、それらについて述べる。

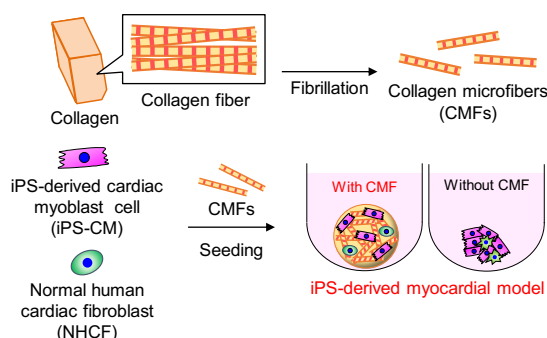


図1. 沈殿培養法の概略

### 2. 結果と考察

50 mg のブタ皮膚由来 I 型コラーゲン (日本ハム(株)より提供) を、5 mL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中でホモジナイザーにより解繊することで作製した CMF と、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (iPS-CM)、正常ヒト心臓線維芽細胞 (NHCF) を、全細胞数が  $5 \times 10^5$  cells となるように 75 : 25 の割合で混合し、非接着 96 ウェルプレートに播種した。遠心分離後、培地中で培養することで球状の心筋組織体が得られた。ヒドロキシプロリンの比色定量法により、組織体中のコラーゲンを定量した結果、CMF 量の増加に伴いコラーゲン量も増加していたことから、本手法により線維量を制御した心筋線維化モデルが構築可能であると示唆された。本組織体は自律的に拍動を示すため、画像解析により拍動数と拍動速度を評価したところ、仕込み CMF 量の増加に伴い、拍動数と拍動速度の減少がみられた。また、CMF を用いて構築した組織体では、心筋細胞が非同期的に拍動していた。これは、CMF の導入により細胞結合が阻害され、心筋細胞が孤立してしまっているためだと考えられる。

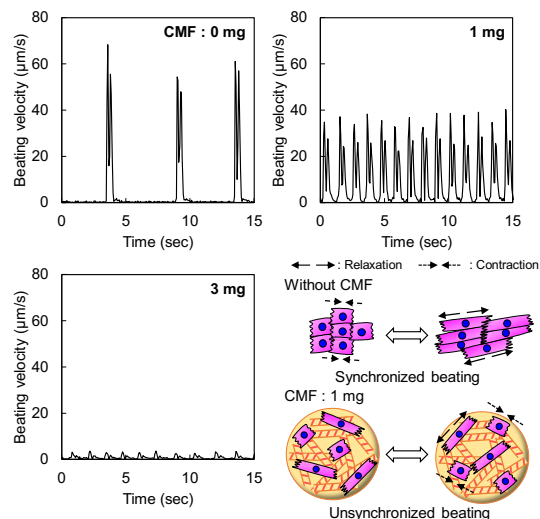


図2. 心筋モデルの拍動速度

本モデルは、CMF 量に応じて線維化の程度を制御できるため、創薬分野で薬剤評価用組織モデルとして応用が期待される。

1) M. Matsusaki and Y. T. Chang *et al.*, *Chem.* **2018**, *4*, 1128.

## 六量体ヘムタンパク質への化学修飾による ミセル様タンパク質集合体の構築およびその光化学的評価

<sup>1</sup>大阪大学大学院工学研究科, <sup>2</sup>JST さきがけ  
平山 翔太<sup>1</sup> 大洞 光司<sup>1,2</sup> 林 高史<sup>1</sup>

### 1. はじめに

天然には、集合化によりその機能を発現するタンパク質が多く存在する。例えば紅色細菌では、光増感色素を有する環状タンパク質が色素胞と呼ばれる球状光捕集系を構築し、光合成に用いる太陽光エネルギーを効率的に集めている。このような特徴を模倣し、タンパク質の人工集合化が近年盛んに研究されている<sup>1</sup>。本研究では、天然の光捕集タンパク質類似の環状6量体構造を有するヘムタンパク質 hexameric tyrosine-coordinated heme protein (HTHP)<sup>2</sup> のミセル様集合体を構築した。また HTHP の補因子であるヘムを光増感色素に置換することで、この集合体が人工光捕集系として機能することを示した。本稿ではまず化学修飾を施したタンパク質の熱応答的集合化を紹介し、最後に本タンパク質集合体の人工光捕集系への展開について述べる。

### 2. 光捕集系を指向したタンパク質の集合化およびその光化学的評価

タンパク質の集合化のため、HTHP 表面にポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm) を修飾した。PNIPAAm は低温において水に可溶である一方、加熱により不溶化・析出する熱応答性高分子である。化学修飾を指向した HTHP のシステイン導入変異体を調製し、マレイミド基を末端に有する PNIPAAm 誘導体を位置特異的に修飾し、加熱によりミセル様集合体を構築した (Fig. 1)。次にその熱応答的集合挙動を動的な光散乱法により評価した。溶液を室温程度から徐々に加温すると 30 °C 付近を境にその直径が 14 nm から 40~50 nm まで増大した。また冷却により元のサイズに戻り、可逆的な集合体の形成を確認した。次に構築したミセルを形成する HTHP の補因子ヘムを光増感色素である亜鉛ポルフィリンに置換し、光増感色素を多数有するミセル様集合体を構築した。これは紅色細菌の色素胞類似の構造であり、ミセル表面でのエネルギー移動が予測される。そこで、メチルビオロゲン(MV<sup>2+</sup>)を用いた蛍光の消光滴定実験を実施し、エネルギー移動の評価を試みた。光増感剤に対して過剰量の MV<sup>2+</sup> を添加する条件で滴定し、その蛍光強度変化の Stern-Volmer プロットにおいて、傾きは 46 M<sup>-1</sup> であった。この値は見かけの結合定数として見積もることが可能であり、別途吸収スペクトル変化から求めた実際の結合定数 (24 M<sup>-1</sup>) の約 2 倍であった。この差は、ミセル様集合体における色素間エネルギー移動によるものと考えられる。

### 3. まとめ

本研究により、環状タンパク質の集合体が光捕集系のモデルとして利用可能であることを示した。今後はエネルギー移動のより詳細な解析やその効率向上を目指す。

#### 参考文献

- [1] Q. Luo, C. Hou, Y. Bai, R. Wang, J. Liu, *Chem. Rev. Soc.*, **2016**, *116*, 13571–13632 [2] J. Jeoung, D. Pippig, B. Martins, N. Wagener, H. Dobbek, *J. Mol. Biol.*, **2007**, *368*, 1122–1131

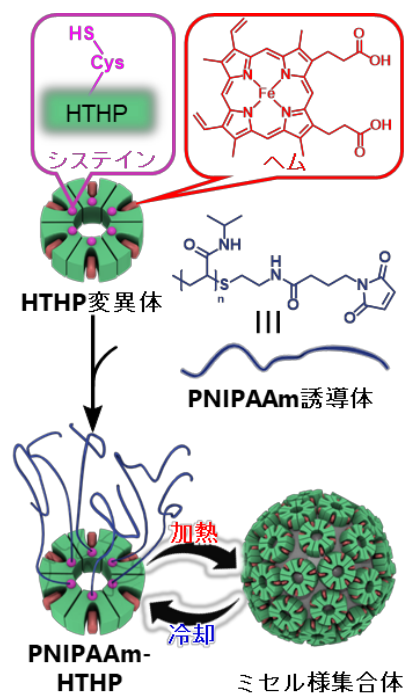


Fig. 1. HTHPの化学修飾およびその温度応答的集合化



## RNA 編集を標的部位に誘導する機能性 RNA の設計と機能評価

福岡大学理学部化学科 野瀬可那子 福田将虎

### 1. はじめに

近年、ゲノム編集技術と呼ばれる DNA 情報の書き換えを原理とする遺伝子改変技術が様々な分野で普及し始めている一方で、DNA ではなく RNA 情報を改変する技術の開発も進んでいる。RNA の情報改変効果は一過的であるため、RNA 編集技術はゲノム編集とは異なる特性を有する新たな遺伝子改変・制御技術として期待されている。我々はこれまでに、A-to-I RNA 編集機構(二本鎖 RNA 中の特定のアデノシン(A)がイノシン(I)に変換される転写後修飾機構)に着目し、RNA 編集酵素 ADAR2 の RNA 編集活性を目的部位特異的に誘導することが可能な機能性 RNA (AD-gRNA (Fig. 1)) の構築を通して、RNA 編集技術の基盤的方法論を開発した。本稿では、従来型 AD-gRNA を基盤とした短鎖型 AD-gRNA の構築について報告する。

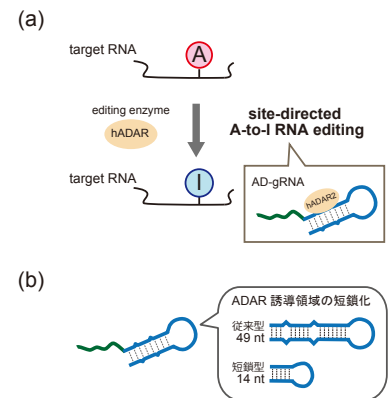


Fig. 1 AD-gRNA の概略図  
(a) AD-gRNA を用いた RNA 編集技術  
(b) AD-gRNA の短鎖化

### 2. 結果

AD-gRNA は、ADAR2 の基質 RNA であるグルタミン酸受容体 mRNA 前駆体 (GluR2 pre-mRNA) の部分構造を利用して設計した。従来型 AD-gRNA の全長は 68 nt であり、ADAR2 と相互作用する ADAR 誘導領域 (49 nt) と、標的部位を相補的な配列で設定するためのアンチセンス領域 (19 nt) で構成される<sup>[1]</sup>。本研究では、ADAR 誘導領域を段階的に短鎖化した変異体 AD-gRNA を用いて、編集誘導に必要な領域を特定すると共に、短鎖型 AD-gRNA の構築を試みた。各種変異体 AD-gRNA の *in vitro* における編集誘導活性を評価した結果、ADAR 誘導領域は 14 nt まで短鎖化可能であったことから、従来型の 68 nt から、33 nt で構成される短鎖型 AD-gRNA を新たに構築することができた (Fig. 1(b))。続いて、得られた短鎖型 AD-gRNA の ADAR2 発現細胞内における編集誘導能を評価した。ダイレクトシーケンシング法により編集誘導割合を解析した結果、従来型とほぼ同等 (28.2%) であった (Fig. 2(a))。さらに、Luciferase レポーターを用いて、短鎖型 AD-gRNA の編集誘導により誘起されるコドン変換 (UAG→UIG) が、標的遺伝子発現制御に応用できることを実験的に証明した (Fig. 2(b))。以上の結果より、従来型の機能と遜色のない新たな短鎖型 AD-gRNA の構築に成功した。

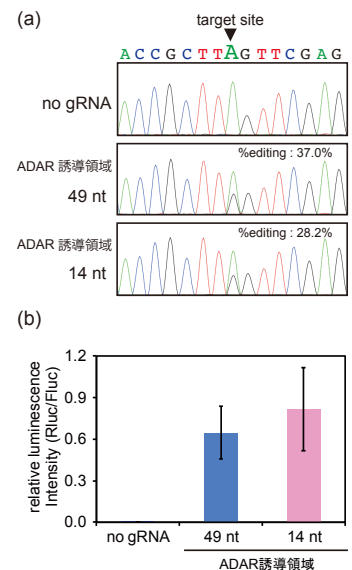


Fig. 2 短鎖型 AD-gRNA の機能評価  
(a) 標的 cDNA のクロマトチャート  
(b) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

### 3. おわりに

本研究で開発した短鎖型 AD-gRNA は、天然型 ADAR の A-to-I RNA 編集活性を設定した目的部位に誘導することができた。今後は、修飾核酸の導入を始め、より高機能な AD-gRNA の構築方法を開発し、AD-gRNA を基盤分子とした核酸医薬品開発などに展開していきたい。

参考文献 [1] M. Fukuda *et al.*, *Sci. Rep.*, 7, 41478 (2017)

## 貴金属イオンを組み込んだ人工金属酵素触媒の創製と 選択的 C-C 結合形成反応への応用

大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻 松尾 徳紀

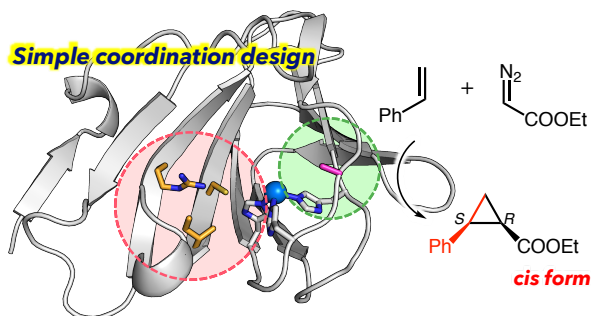
### 1. はじめに

近年、タンパク質の反応場としての有用性と遷移金属の触媒機能を巧みに組み合わせた新しい人工金属酵素の開発が活発に行なわれている。当研究室では、超好熱菌由来のキュピタンパク質 (TM1459) を配位子として用いた人工金属酵素の創製について検討を行ってきた。<sup>1)</sup> このタンパク質は、高い熱安定性を有し、*cis* 位に空いた配位座を提供可能な4つのヒスチジンからなる金属結合部位を備えている (Fig 1)。これらのヒスチジン残基に金属イオンを結合させることで、タンパク質骨格が安定化され、非常に安定な生体触媒の構築が可能となる。本研究では、この TM1459 の金属配位子としての汎用性を向上させるため、熱力学的に不利なオレフィンの *cis* 選択的なシクロプロパン化反応について系統的に検討を行った。

### 2. 結果

タンパク質は大腸菌の異種発現系により調製した。二座もしくは三座の小分子窒素系配位子を模倣し、4-His 部位のヒスチジンの1つ、あるいは2つをアラニンに変異させることで、様々な第一配位圏を含む変異体を作成した (H52A, H54A, H58A, H92A, H52A/H54A, H52A/H58A, H52A/H92A, H54A/H58A, H54A/H92A, H58A/H92A)。これら変異体に、銅(II)を導入し、単核銅タンパク質ライブラリーを調製した。次に、これら変異体を用いて、基質としてスチレンとエチルジアゾアセテート(EDA)を用いたシクロプロパン化反応についてスクリーニングを行った。銅(II)のみを触媒として用いた場合、1:2 の割合で *trans* 体が優先的に生成され、エナンチオ選択性は全く見られなかった。それに対し、H52A 変異体を用いた場合、高い *cis* ジアステレオ選択性 (89: 11) とエナンチオ選択性 (56% *ee*) が得られた。そこで、基質のドッキングシミュレーションに基づき、第二配位圏のアミノ酸残基にさらなる変異導入を行い、選択性の向上を試みた。キャビティを形成するアミノ酸残基 (R39, C106, I108, A52) に着目し、さらなる変異導入を行った。その結果、H52I 変異体において、*cis* ジアステレオ選択性 (96:4)、また R39A/H52Y/C106A/I108A 変異体において、エナンチオ選択性 (86% *ee*) の顕著な向上が見られた。さらに H52I を元に C106 に様々な残基をスクリーニングしたところ、H52I/C106E 変異体において、最大の *cis* ジアステレオ選択性 (98:2) を発揮し、水系での人工金属酵素によるこの反応において、最も高い *cis* 選択性を達成した。

Figure The cyclopropanation of styrene with ethyl diazoacetate



### 3. おわりに

このように本研究では、TM1459 タンパク質を配位子として、様々な反応場を有する金属タンパク質のライブラリーを構築した。さらにそれらを用いた反応スクリーニングと簡便な部位特異的変異導入を組み合わせることで、オレフィンのシクロプロパン化反応に対する高い *cis* 選択的な触媒能を達成し、新規な人工金属酵素を創製するとともに、タンパク質配位子の新規な反応場としての可能性を示した。

## 生命現象の制御を指向した光応答性分子糊

東京大学大学院工学系研究科 茂垣里奈

外部刺激、特に光を用いた生体分子機能の制御は、生命現象の機構解明や低副作用の化学治療へとつながる重要な課題である。当研究グループでは、グアニジニウム基 ( $\text{Gu}^+$ ) を多数有する一連の高分子化合物が、オキシアニオンとの多価的な塩橋形成 (図1) を介して生体高分子表面に強く接着する『分子糊』として働くことを見出してきた<sup>[1]</sup>。筆者らは、分子糊と光応答性ユニットを組み合わせた種々の『光応答性分子糊』を開発し、生体分子機能、さらには生命現象の制御に挑戦している。

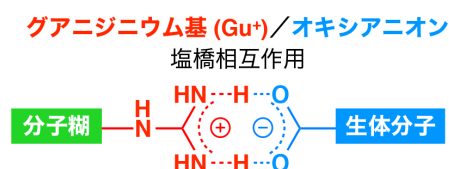


図1. グアニジニウム基 ( $\text{Gu}^+$ ) とオキシアニオンの塩橋形成.

1. タンパク質機能の可逆的な光制御: 『接着性光スイッチ』. 筆者らは、分子糊を酵素阻害剤と連結することで、酵素への結合力および阻害効果を増強できるという事実を見出している<sup>[2]</sup>。これを発展させ、光刺激に応答して構造を変化させる光応答性スペーサーを介して分子糊と酵素阻害剤を連結した『接着性光スイッチ』(図2a)を開発した<sup>[3]</sup>。対象の酵素と"混ぜるだけ"で阻害剤分子の結合/解離を光制御でき、また、夾雑タンパク質存在下における選択的な酵素活性制御にも成功している。

2. 細胞内局在の光制御: 『ケージド分子糊』. 分子糊はリン脂質膜や核移行タンパク質へと強く接着する結果、高い細胞膜透過性と核移行性を示す。そこで筆者らは、分子糊の  $\text{Gu}^+$  基を光開裂性保護基で保護し、細胞膜透過性を一時的に抑制した『ケージド分子糊』(図2b)を開発した<sup>[4]</sup>。ケージド分子糊は生細胞にエンドサイトーシスを介して取り込まれるが、光刺激によって  $\text{Gu}^+$  基が脱保護されると、エンドソームを脱出し、細胞質を経て速やかに細胞核まで移行する。ゲスト分子をケージド分子糊に連結することで、光照射細胞選択的に細胞核へ輸送できることを明らかにした。

最近筆者らは、光刺激に応答して分解する『光分解性分子糊』を新たに開発し、 $\text{Gu}^+$  基の多価性の減少に伴うタンパク質への接着→解離を利用してタンパク質間相互作用の光制御に成功している (投稿準備中)。分子糊を基盤とした生命現象の光制御ツールは、分子糊の接着という普遍性の高い現象を活用して実現したものであり、特異的結合に基づいた従来のアプローチでは困難な対象にも適用可能である。本研究の発展によって、制御可能な生命現象の範囲が大きく拡張されるものと期待している。

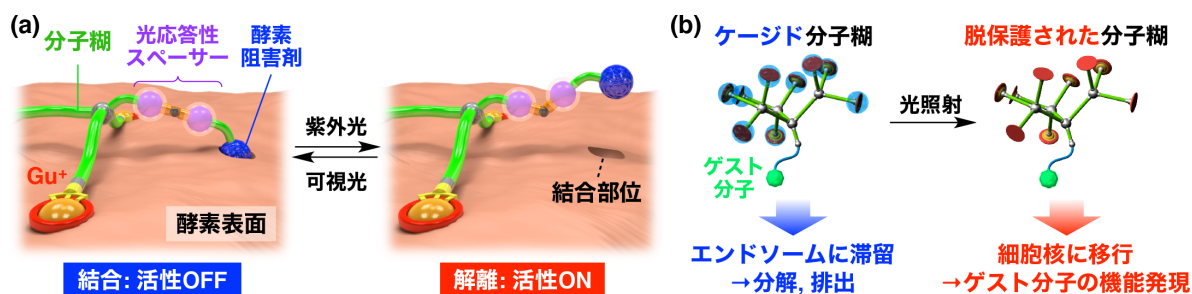


図2. (a) 接着性光スイッチによる酵素活性の光制御. (b) ケージド分子糊の細胞内局在変化.

### 参考文献

- [1] R. Mogaki, *et al.*, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 6480. [2] R. Mogaki, *et al.*, *Chem. Sci.* **2015**, 6, 2802. [3] R. Mogaki, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 10072. [4] A. Arisaka, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 2687.

## 一分子電流計測による核酸配列解析の実現に向けた 非天然核酸塩基の探索

東京大学大学院工学研究科 古畑 隆史

### 1. はじめに

近年、電気的な原理に基づく一分子電流計測技術が、次世代のDNAシーケンサー技術と注目を集めている。中でも、トンネル電流をプローブとして用いた量子シーケンサーと呼ばれる技術は、優れた一塩基分解能、解析速度、耐久性を兼ね備える固体材料ベースの手法として有望視されている。<sup>1</sup> 本手法は、ナノメートルスケールに制御された金のナノギャップ電極を用いて、その間を流れるトンネル電流値の変化から通過する核酸塩基を検出、特定する。<sup>2</sup> 核酸塩基のトンネル電流シグナルは電気化学物性により決定されるため、修飾塩基を含め、あらゆる核酸塩基を直接電気シグナルにより検出できる可能性を有する。<sup>3</sup>

しかし、量子シーケンサーはその原理上、導電性の差が小さい構造は識別が難しい。例えば、標準塩基の1種であるdAとdCはその導電性が類似しており、量子シーケンサーの応用可能性を狭めてきた。<sup>4</sup> そこで、私はこれまで導電性の類似という課題を克服し、量子シーケンサーの応用可能性を拡張する化学手法の提案を目指して、研究を進めてきた。本稿では、主に核酸の電気化学物性と導電性の相関について議論し、4種遺伝暗号の識別促進に向けた戦略について紹介する。

### 2. 核酸の電気化学物性と導電性の解明

前述のように、遺伝暗号のうちdAとdCの導電性は極めて近く、その識別が困難である。しかし、核酸の導電性が核酸のどのような化学物性に支配されるのか、これまで明らかでなかった。そこで、私は、核酸の導電性と電気化学的物性の相関について、非天然核酸塩基を用いた系統的な評価を行った。具体的には、分子の形状、および官能基が類似した一連の核酸塩基類縁体を設計し、導電性の比較を行った。これにより、金電極と分子の相互作用の影響を最小限にとどめ、注目する電気化学物性の寄与を選択的に抽出することができる。そして、核酸の導電性に重要な電気化学物性として、HOMOレベルが主要な寄与を果たすことを実証した。

### 3. 4種遺伝暗号の識別促進に向けた化学手法の提案

上記知見に基づき、DNAの配列解析を促進する非天然核酸の探索を目指した。もし、高導電なdA類縁体(dA\*)を設計し、dAと置換する事ができれば、遺伝暗号間の導電性の差異は拡張され、その識別が容易になると期待される(図1)。そこでまず、標準的な核酸塩基に比べ、高いHOMOレベルを有するdA類縁体を設計を行った。そして、導電性の評価を行ったところ、dAに対してだけでなく、標準核酸の中で導電性の最も高いdGに比べても、高い導電性を有するdA類縁体が見出された。また、酵素によるDNAの伸長反応において、dAと同等の取り込み効率と精度を有することも示された。このことから、dAをdA\*に酵素的に置き換えることで、量子シーケンサーによる4種遺伝暗号の識別が促進される可能性が示唆された。このように、HOMOレベルに基づく高導電性の非天然核酸の開発は、量子シーケンサーによる核酸配列を促進し、今後その応用可能性が拡張するものと期待される。

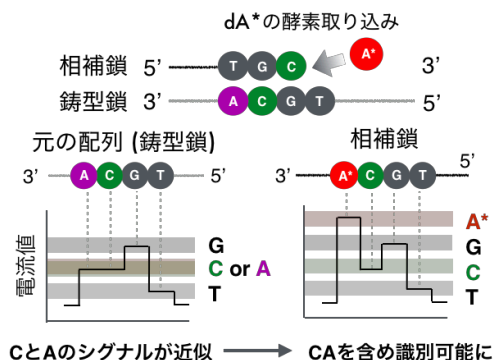


図1. 4種遺伝暗号の識別に向けた化学戦略  
(Manuscript in preparation)

### 参考文献

- [1] (a) Lindsay, S. *Nat. Nanotechnol.* **2016**, *11*, 109–111. (b) Di Ventra, M.; Taniguchi, M. *Nat. Nanotechnol.* **2016**, *11* (2), 117–126. [2] (a) Huang, S. *et al.*, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 868–873. (b) Tsutsui, M. *et al.* *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 286–290. [3] Tsutsui, M. *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9124–9128. [4] Ohshiro, T *et al.* *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 501.



ニュースレター Vol. 33, No. 4 2019年3月15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：王子田 彰夫、山東 信介、村上 裕