

公益社団法人 日本化学会 バイオテクノロジー部会

# NEWS LETTER

*Division of Biotechnology, The Chemical Society of Japan*

Vol. 21, No. 2 (2018. 02. 01)

## 目 次

◆ 巻頭言 .....	1
	中村 聡 (東京工業大学)
◆ 先端研究ウォッチング .....	2
	竹内 俊文(神戸大学)
◆ 若手研究者からのメッセージ .....	17
	① 梅澤 啓太郎 (東京大学)
	② 田村 朋則 (京都大学)
	③ 平山 裕 (岐阜薬科大学)
◆ 海外の研究室から .....	30
	① 山岸 彩奈 (ニューヨーク市立大学ハンター校)
◆ 学会活動報告 .....	35
	斎藤 真人 (大阪大学)
◆ 各種研究会、国際会議から .....	37
	① 細川 正人 (早稲田大学)
	② 林 剛介 (東京大学)
◆ 編集後記 .....	42
	藤田 聡史 (産業技術総合研究所)

## ◆巻頭言◆

### 成人式を迎えたバイオテクノロジー部会の過去と未来

バイオテクノロジー部会は、その母体となった生物工学研究会の発足から数えると、ちょうど20周年を迎えることになる。当時、既に生体関連化学部会が存在していた中、日本化学会からの強い要請を受けての発足と聞いている。というのも、1980年代末から全国の大学にバイオ系の学科・専攻が続々と新設され、その学会活動の受け皿が必要という背景があった。また、当時は科学研究費の審査員を学協会から推薦する制度があり、日本化学会からもバイオ系の審査員をより多く輩出すべしという強い要請があったという、いささか生臭い噂話も漏れ聞こえていた。

本部会の発足に際し、初代部会長には故・掘越弘毅先生（当時、東京工業大学教授・理化学研究所主任研究員）に、そして役員には日本農芸化学会、日本生物工学会、電気化学会、酵素工学会といった関連学協会の枢要な先生方にご就任いただいた。その後、本部会は上述の関連学協会や生体関連化学部会との連携のもとに活動の幅を広げていった。そして、科学研究費においても多くの独創的な研究分野を提案し、我が国のバイオ系学術研究を先導・牽引してきたことは周知の通りである。

本年4月、東京工業大学にリーダーシップ教育院が発足する。本教育院は、既設の本学イノベーション人材養成機構の後継組織の位置づけであり、現在、本学内で進行中の4つの博士課程教育リーディングプログラムで実施されてきたリーダーシップ教育の血も受け継ぐことになる。以前は「リーダーシップ」といえば「自らが先頭に立って周囲を引っ張っていく能力」を指したが、現在ではその考え方も多様に変化している。また、リーダーシップは必ずしも個人の能力だけではなく、集団がもつ機能も含まれ、その集団で有効なリーダーシップスタイルは集団のメンバー構成や集団が置かれた状況によって決まると考えられている。

話をバイオテクノロジー部会に戻させていただく。これまでの本部会のアクティビティは、部会発足当初からの有力メンバーの個人的なリーダーシップに依るところが大であったことは否めない。一方で、我が国のバイオ分野の競争的研究資金のかなりの部分が日本医療研究開発機構（AMED）に移管されつつある現在、日本化学会が我が国のバイオ系学協会の中核となり、医学系以外にも新しい学問領域を創出する必要性を強く感じる。価値観が多岐にわたるバイオ系学協会の中でリーダーシップを発揮する意味では、必ずしも「化学」だけを基盤としない本部会の役割がますます重要となろう。二十歳の成人式を迎えたバイオテクノロジー部会の今後のさらなる活躍に期待したい。

2018年1月 東京工業大学生命理工学院 中村 聡  
(元・バイオテクノロジー部会部会長)

## Beyond Natural Antibodies—分子インプリンティングの挑戦

神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻

竹内 俊文

### 1. はじめに

抗体は、免疫システムを担う抗原選択性の高いタンパク質であり、抗原抗体反応は免疫測定法に応用され、高い選択性と感度を持つ分析法として、病気の診断、食品分析、環境アセスメントなどにおけるゴールドスタンダードとなっている。最近では、抗体を用いた医薬品も開発され、がん細胞をピンポイントで狙い撃ちして高い治療効果を挙げている。しかし、抗体は高い性能をもつ反面、タンパク質がもつ本質的な問題も抱えている。たとえば、バイオテクノロジーを駆使して行われる製造は容易ではなく、構造安定性が低く、機能を保持できる期間が限られる。もし、人工高分子で抗体と同様の機能が再現できれば、容易に製造が可能以上に高い安定性も実現できると研究者が考えるのは自然の流れである。これまでに、抗体に代わる人工材料として、ポリペプチド<sup>[1]</sup>や Affimer<sup>[2, 3]</sup>といったアミノ酸やタンパク質の部分構造を利用したものや核酸アプタマー<sup>[4]</sup>、人工レセプター<sup>[5]</sup>などの完全に人工物によって作製されるもの等が報告されている。

### 2. 黎明期の分子インプリンティング—その限界

高分子重合技術を駆使して得られる分子認識材料においては、1940年代ぐらいから、標的分子の鑄型を高分子に取ることで、抗体のような標的分子に対する分子認識能が発現するという発想の下に人工抗体を獲得しようとする挑戦が Pauling<sup>[6]</sup>や Dickey<sup>[7]</sup>らにより始まった。この挑戦は、1970年に入ってから Wulff<sup>[8]</sup>と Mosbach<sup>[9]</sup>の一連の研究により「分子インプリンティング」として結実し、分子の鑄型を高分子内に取り込む技術として確立された<sup>[10-17]</sup>。分子インプリントポリマー（MIP）は、鑄型分子を機能性モノマーと複合化して架橋後、鑄型分子を取り除くことで、鑄型分子の鑄型空間を高分子内に形成することで得られる（図

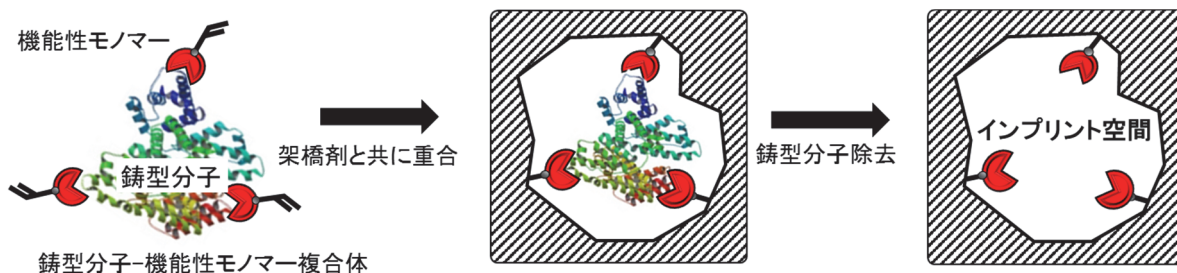


図 1. 分子インプリンティングの概念

1)。鑄型分子に機能性モノマーを複合化させたまま共重合することから、鑄型分子を除去した後に形成される分子インプリント空間は、鑄型分子にフィットしたサイズ・形状をもち、その空間内には機能性モノマー由来の官能基が、鑄型分子を結合するために都合のよい位置に配置されている。すなわち、鑄型分子のサイズ・形状・表面官能性を記憶したテラーメイド分子認識空間が有機高分子マトリクス内に形成される。MIP は合成高分子ゆえのメリット、すなわち標的分子に合わせて適切に鑄型分子や機能性モノマー、架橋剤を選択したり設計したりすることが可能であることから、多様な分子認識材料を創製することができる。これまでに糖、アミノ酸、農薬（除草剤）、ペプチド、タンパク質やウイルスなど、低分子から高分子に至る様々な標的に対する MIP 作製例が報告されている。

MIP は、作製法の簡便さと発現する機能の高さからタンパク質に代わる生体機能性材料として期待されてきたが、残念ながら、これまで報告されてきた MIP は、基本的には 1970 年代から 2000 年代に確立された技術をもとに作製されていることから、分子認識能などの単一機能しか持たず、天然の抗体や酵素がもつ多様な機能にまったく及ばないのが現状であり、従来の方法論では、限界があることも明白である。

### 3. タンパク質の翻訳後修飾にインスパイアされた次世代 MIP

タンパク質の生合成は、DNA の遺伝情報が mRNA に転写され、mRNA の配列情報に従い tRNA がアミノ酸を運搬することで DNA の遺伝情報に対応したポリペプチドが合成されることが基本である。ポリペプチドは折りたたまれ三次元構造体を形成後、グリコシル化やリン酸化、ユビキチン化などの機能分子の付加や、形成されたポリペプチドが加水分解されるなどの部位特異的な化学修飾（翻訳後修飾）を施されることで、最終的に様々な機能をもつ成熟したタンパク質となる。この翻訳後修飾は、「構造体合成ステップ」と「機能性付加ステップ」が独立していることから、それぞれの最適条件で合成が進行し、その結果タンパク質は高い機能を獲得している。

我々は、このタンパク質の翻訳後修飾に着目し、人工高分子構造体を作製した後に部位特異的に化学修飾して機能の付与・調整を行う重合後修飾を分子インプリンティングに適用することで MIP の高機能化が可能ではないかと考え、これをポストインプリンティング修飾（Post-imprinting Modification, PIM）と名付けて研究を開始した<sup>[18-19]</sup>。PIM は、予め可逆的結合部位や修飾可能な官能基を機能性モノマーに導入しておき、これと鑄型分子の複合体を用いて分子インプリンティングを行い、鑄型分子を切り出してポリマーマトリクス内に分子インプリント空間を構築した後に、導入しておいた可逆的結合の切断部位や修飾可能な官能基に化学修飾を施すことによって、MIP に新たな機能の付与・官能基改変・結合



選択性の調整を行うものである（図 2）。本手法の利点は、あらかじめ構築されているインプリント空間内の機能性モノマー残基を標的として部位特異的に化学修飾を行うことから、ポリマーの分子認識特性を保ったまま機能化のための修飾を行うことができることや、物理的・化学的に安定な架橋性高分子に対して行う化学修飾であるため、利用できる化学反応の種類も豊富で多様な機能性の付与が期待されることが挙げられる。以下に、PIM による高機能 MIP に関する研究について初期から最新のものまで具体例を挙げながら概説する。

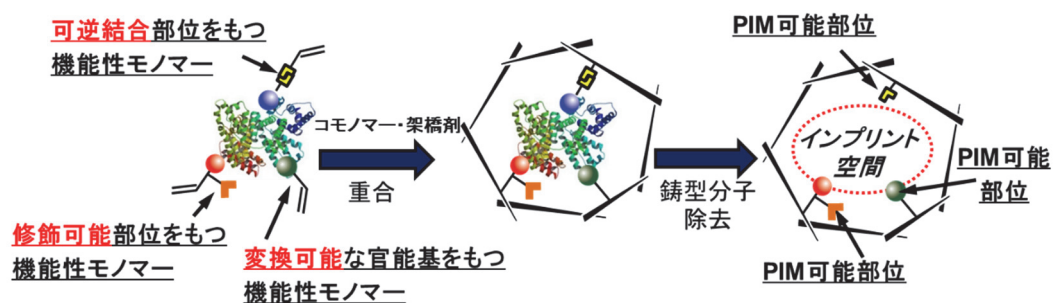


図 2. ポストインプリンティング修飾の概念。

#### 4. PIM による鑄型空間内の官能基の改変

分子インプリント空間内において、機能性モノマー由来の官能基は、標的分子と相互作用するうえで大きな役割を果たしている。しかしこの官能基はポリマー重合時において必ずしも安定であるとは限らない。また、強く相互作用する官能基は分子認識のためには望ましいが、そのまま共重合すると鑄型空間外にも配置されてしまい、非特異的吸着の原因となりかねない。そこでポリマー重合時には安定な鑄型分子-機能性モノマー複合体を用い、重合後、形成されたインプリント空間内の機能性モノマー由来の官能基を PIM により適切な官能基に変換して高機能化できないかと考えた。

一例として、ジスルフィド結合を利用した PIM によるドーパミンの MIP の例を示す（図 3）<sup>[20]</sup>。鑄型分子は、末端に重合可能なジスルフィドをもつカテコール誘導体のカテコール部分が、4-ビニルフェニルホウ酸と環状ジエステルを形成

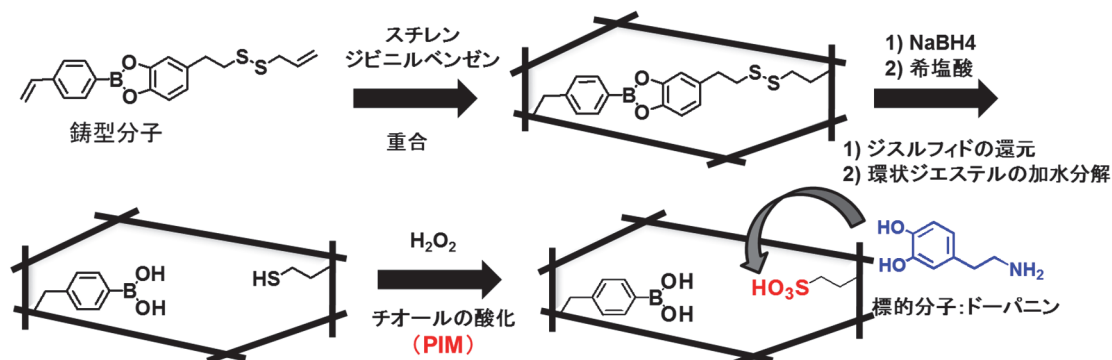


図 3. PIM によるドーパミンの MIP.<sup>[20]</sup>

したもので、この鋳型分子をスチレンおよびジビニルベンゼンと共重合した後、環状ジエステルの加水分解およびジスルフィド結合の還元的切断によりインプリント空間を構築した。さらに、還元的切断により生成したチオール基を、過酸化水素により酸化してスルホン酸基に変換することで、ドーパミンのカテコール部位に相互作用するフェニルボロン酸、およびアミノ基に相互作用するスルホン酸が同一空間内に配置されたドーパミン認識空間が構築できた。実際、このポリマーは、PIMによる酸化処理の前に比べて約400倍親和性が向上した。また、チラミン、カテコール、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸、ホモバニリン酸、エピネフリン、およびノルエピネフリンを対照化合物として用いた選択性実験において、標的分子であるドーパミンに対して最も高い吸着能を示すことが確認された。この高い結合親和性と選択性は、インプリント空間内のみスルホン酸を配置するPIMを行ったゆえに達成された結果で、PIMによる官能基変換の有用性が示された。PIMによる酸化還元のほかの例として、アトラジン分解のための人工酵素<sup>[21]</sup>、ビスフェノールAの表面プラズモンセンシング<sup>[22]</sup>などがある。

## 5. PIMによる鋳型空間内へのセンシング機能の後天的付加

病気の診断、食品品質、環境計測に関わるマーカー分子を認識して検出できる材料は年々その重要が増している。もちろん免疫測定法に用いられる抗体が代表例ではあるが、MIPにセンシング能を付与することができれば、免疫測定法では必須の試薬の添加や洗浄が必要ない reagent-less 分析が可能な操作性の高い分析法となることから、極めて有用である。ここでは、がんのバイオマーカーである $\alpha$ -フェトプロテイン (AFP) の免疫測定法に匹敵する高感度センシング<sup>[23]</sup>について紹介する。

これまで標的分子の分子認識挙動を可視化する結合情報発信型MIPとして、蛍光性の機能性モノマーを用いた蛍光性MIPの報告例がある<sup>[24-26]</sup>。この場合、結合空間を形成しなかったり、不完全に形成された結合空間を形成したりする蛍光性機能性モノマーが必ず存在する。これが蛍光バックグラウンドとなり、S/N比(感度)を低下させる一因となる。そこで、バックグラウンド蛍光の低減のため、AFPのインプリント結合空間をまず形成し、その後、PIMによりその空間内のみ選択的に蛍光分子を導入できないか検討した。ここでは、PIM可能な可逆的結合を有する2種の機能性モノマー、(オキシム結合をもつモノマーFM1とジスルフィド結合をもつモノマーFM2)を設計・合成した(図4)。これらを共有結合でAFP表面に導入したAFP複合体を鋳型分子としてセンサ基板上に固定化し(図5a)、

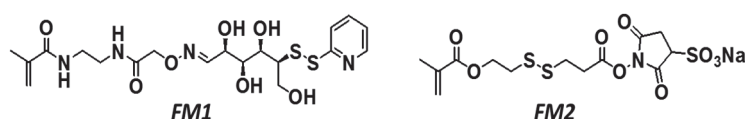


図4. PIMのための可逆的結合部位をもつ機能性モノマー.<sup>[23]</sup>

ポリマー膜厚が重合時間で調整可能な表面開始原子移動ラジカル重合を行い、基板上からポリマー薄膜を約 10 nm 成長させた (図 5b)。ジスルフィド結合およびオキシム結合を切断して AFP をポリマー薄膜内から除去することで、AFP の形状にフィットするインプリント空間を形成した。この空間内には、ジスルフィド結合およびオキシム結合を切断した後の遊離のチオール基とオキシアミノ基が残存する (図 5c)。ここで強調したいことは、この 2 種類の官能基は、AFP に共有結合されたままポリマー内に導入された可逆的結合部位由来であることから、原理的にインプリント空間のみにしか存在しない。従って、インプリント空間の形成後に行う PIM は空間内選択的な修飾となる。今回は、チオール基には AFP に対する相互作用基 (カルボキシ基)、オキシアミノ基には蛍光レポーター分子 (Cy5) を導入した (図 5d)。この PIM 処理により、相互作用部位や蛍光レポーター分子がインプリント空間の外に配置されることで引き起こされる非特異的吸着やバックグラウンド蛍光による感度の低下が防止でき、高感度かつ高選択的に AFP を認識・検出可能な MIP が合成可能となる。

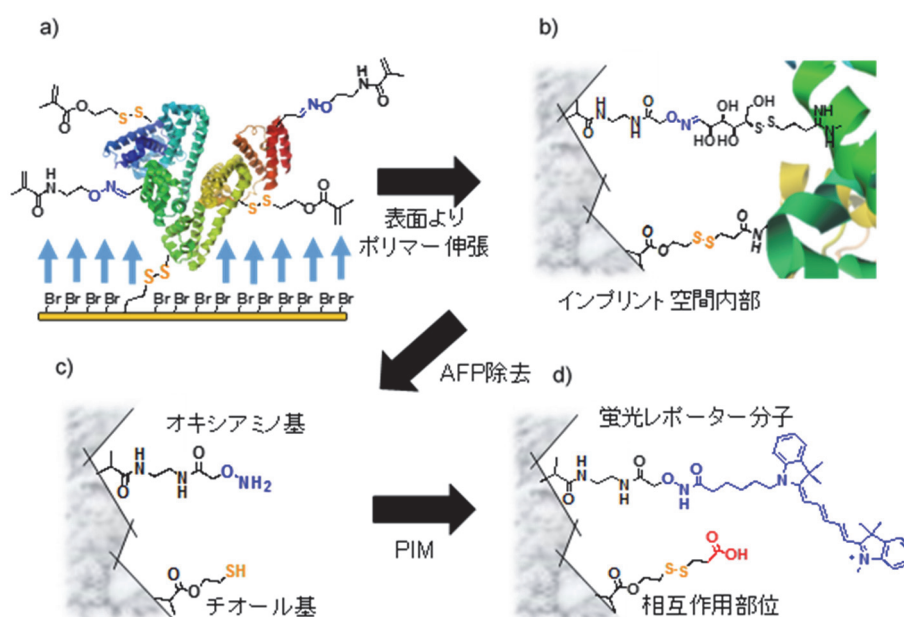


図 5. AFP インプリント空間の形成(a, b)と PIM による相互作用部位と蛍光レポーター分子(d)の導入.[23]

実際、同じ MIP を成膜して、高感度バイオセンサとして汎用されている表面プラズモン共鳴センサ (SPR センサ) と蛍光顕微鏡によるセンシングの検出限界を比較してみた。まず、SPR センサについて検討した結果、その検出限界は 20 ng/mL (280 pM) であった (図 6a, COOH)。ここで、PIM の効果を確認するため、インプリント空間内の相互作用基 (カルボキシ基) をヒドロキシ基に変更した (容易に官能基を変換できる<sup>[27]</sup>ところも PIM のメリットである)。その結果、SPR シグナル変化はほとんど観察されず (図 6a, OH)、確かに PIM の足場となるインプリント空間内にはチオール基が残存し、PIM により相互作用基が AFP との結合

に都合のよい位置に導入されていることが明らかとなった。

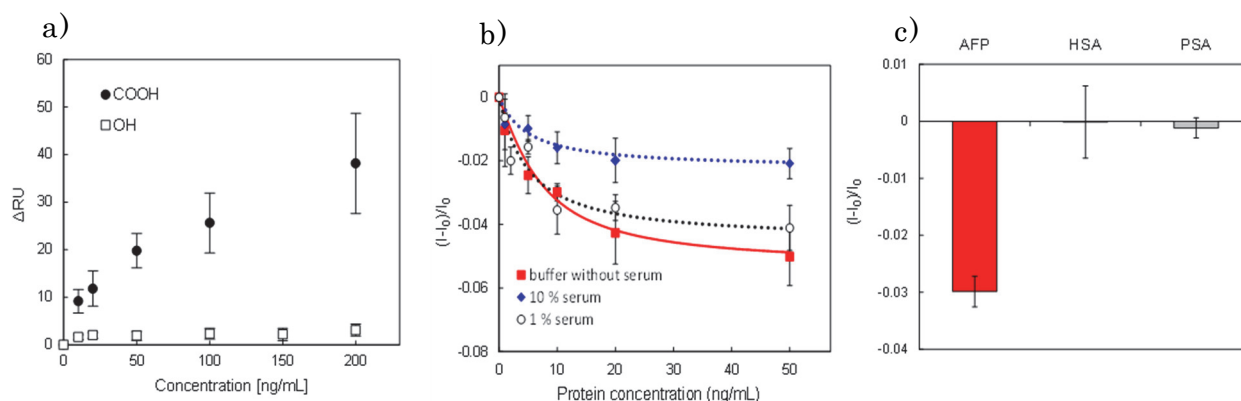


図 6. 相互作用基としてカルボキシ基およびヒドロキシ基を導入した MIP の AFP に対する応答(a);カルボキシ基を導入した MIP リン酸緩衝液および希釈血清中 AFP の応答(b)および;ヒト血清アルブミン(HSA)および前立腺特異抗原 (PSA)に対する選択性(c).<sup>[23]</sup>

一方、蛍光センシングでは、その検出限界は 1 ng/mL (14 pM) であった (図 6b)。同じ MIP 薄膜を用いているにもかかわらず、検出限界が 20 倍向上し、市販の ELISA と遜色ない検出感度を達成した。これは、SPR センサは MIP に結合する物質すべてを検出してしまいが、蛍光センシングでは、PIM により、インプリント空間のみに蛍光を導入しているため、インプリント空間に対する AFP の結合をより選択的に検出した結果といえる。また、ヒト血清アルブミンや前立腺特異抗原 (前立腺がんのバイオマーカー) はほとんど検出されず (図 6c)、高い選択性をもつことも実証した。

その他に、機能性モノマーを共有結合でタンパク質と複合化する共有結合型 MIP の例として、シトクローム C の MIP<sup>[28]</sup>がある。また、機能性モノマーを静電的相互作用や水素結合などの非共有結合でタンパク質と複合化する非共有結合型 MIP の例として、図 7a のような機能性モノマーを用いたリゾチームの MIP がある<sup>[29-31]</sup>。塩基性タンパク質であるリゾチームの場合、安息香酸部位がタンパク質との静電的および疎水性相互作用部位、2 級アミン部位が PIM 処理される部分となる。逆に 2 級アミン部位を相互作用部位とし、安息香酸部位を PIM 処理する酸性タンパク質の MIP も合成可能である。

## 6. PIM による非特異的吸着を低減するためのキャッピング

MIP の課題の一つに、形成される分子インプリント空間が標的分子に対して示す親和性が一様ではないことが挙げられる。すなわち、高い親和性を示す結合空間がある一方、不完全な空間も存在する。これは特に非共有結合で機能性モノマーと鋳型分子の複合体を形成するとき顕著である。そこで、不完全な空間に配置された官能基を無効化し、高い親和性を示す結合空間のみに PIM を施す方法に



ついて検討した<sup>[31]</sup>。具体的には、非共有結合で鋳型分子のリゾチームと複合体を形成する PIM 可能な 2 級アミノ基を分子内にもつ安息香酸型機能性モノマー (図 7a) を用いて合成したリゾチームの MIP に、希薄なリゾチームを加えることで、高親和性のリゾチーム結合空間のみに標的タンパク質を結合させて保護し、リゾチームが結合していない (未保護) 低親和性結合空間内の PIM 用官能基に *p*-イソチオシアノフェニル- $\alpha$ -D-マンノピラノシド (図 7b) を反応させることでキャッピングし、蛍光分子が導入されないように無効化した。その後、高親和性の結合空間に結合していた標的タンパク質を洗い出して、高親和性結合空間内の PIM 用官能基を露出させた後、その官能基に蛍光標識 PIM を行った (図 7c)。キャッピング処理を行った MIP と未処理の MIP に対してリゾチーム吸着量に対するシトクローム C (Cyt) およびリボヌクレアーゼ A (RNase) の蛍光シグナルの比 (選択率) を求めたところ、キャッピング処理 MIP の方がそれぞれ約 4 倍および約 25 倍高くなり、PIM により選択性が改善されることが確認された (図 7d)。このことから第一段階の PIM としてキャッピング処理、第二段階の PIM として蛍光標識を行う多段階 PIM で、高い選択的情報発信特性をもつ MIP が実現可能であることが示された。

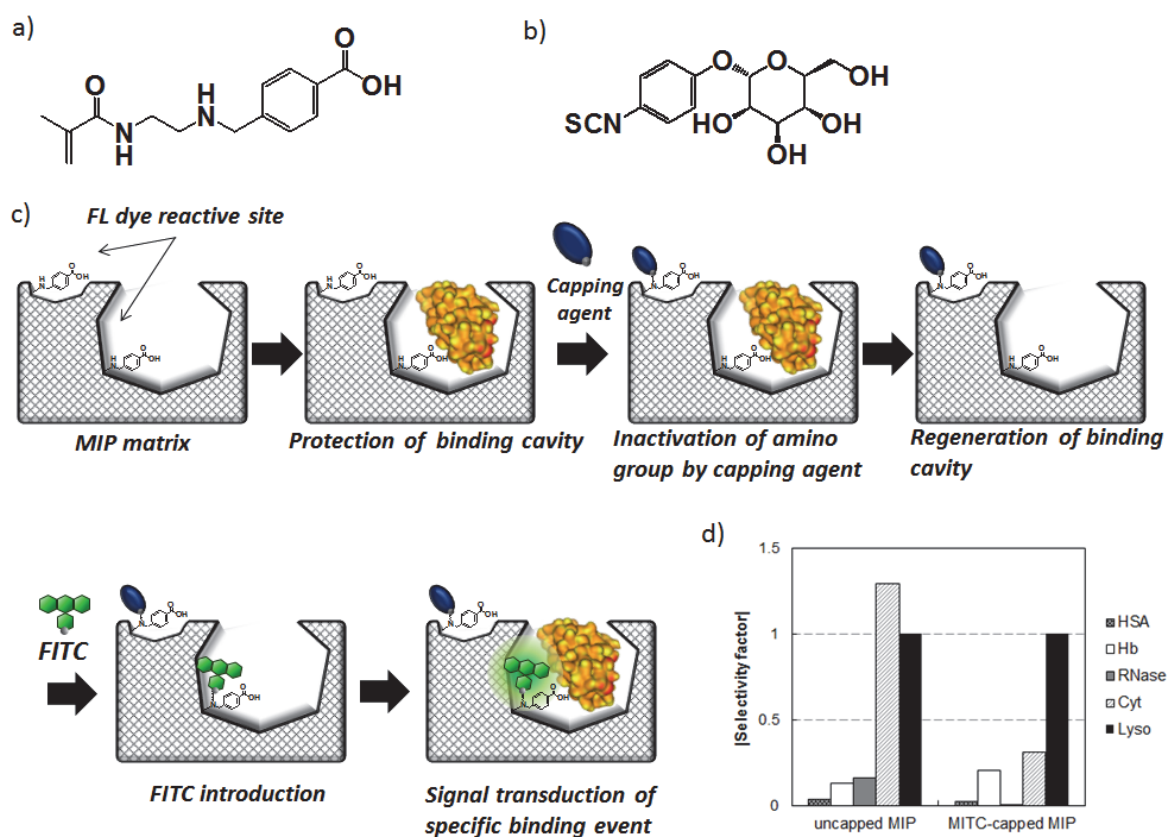


図 7. PIM 可能な非共有結合型機能性モノマーの構造(a); キャッピング試薬 (b); 多段階 PIM による非特異的吸着を低減するためのキャッピング処理の概念図(c); キャッピング前後の選択性(d).<sup>[31]</sup>

## 7. PIM による結合空間の再構築—人工複合タンパク質

様々な機能を有するタンパク質において、補因子や補欠分子族と呼ばれる非アミノ酸要素の結合・解離によってその機能を調製している複合タンパク質と呼ばれるタンパク質群が存在する。代表的な例を挙げるとヘム部位を有するヘモグロビンやミオグロビン等が挙げられる。これらのシステムを人工材料に応用することができれば新たな材料創製の可能性が拓がると考えられる。

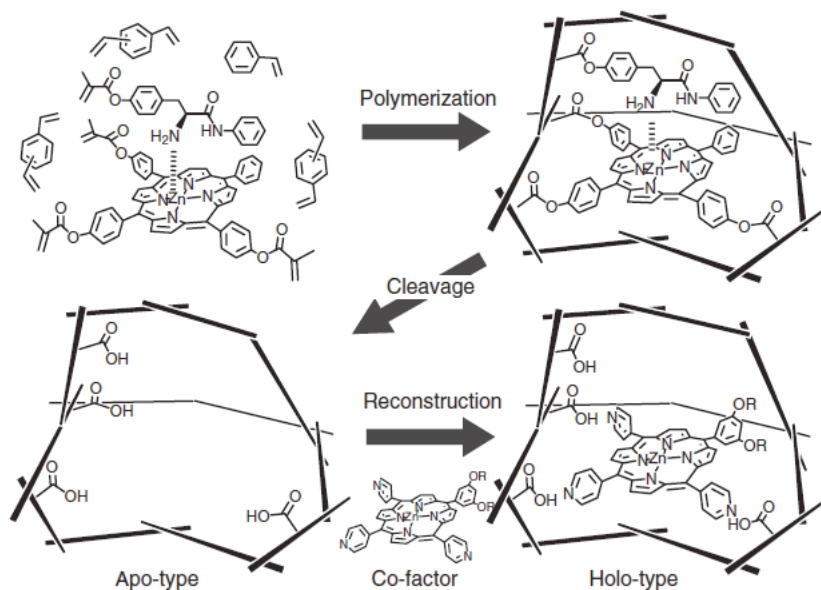


図 8. ポルフィリン誘導体の吸脱着による結合部位が再構築可能な D-チロシニアニリドの MIP.<sup>[32]</sup>

この複合タンパク質を模倣した最初の例として、ポルフィリン誘導体を補因子として組み込んだ MIP を開発した<sup>[32]</sup>。光学活性なアミノ酸誘導体である D-チロシニアニリド (D-TyrAN) を標的分子とし、D-TyrAN のフェノールにメタクリル酸をエステル結合したメタクリロイル D-TyrAN を鋳型分子とし、重合性のメタクリロイル化亜鉛 (II) ポルフィリン (Zn-TMPP) に軸配位させた後、架橋剤と共重合した (図 8)。加水分解により D-TyrAN および Zn-TMPP を除去し、インプリント空間 (apo-MIP) を構築した。このとき apo-MIP 空間内には 4 つのメタクリル酸残基が存在する。その 1 つはメタクリロイル D-TyrAN 由来、後の 3 つは Zn-TMPP 由来である。Zn-TMPP が欠落しているこの apo-MIP 空間は、D-TyrAN を認識するには空間サイズが大きすぎ、D-TyrAN を認識しなかった。

そこで、この空間に亜鉛(II)ポルフィリンを再導入することで D-TyrAN 認識場の再構築を試みた。ピリジル基を 3 つもつ亜鉛(II)ポルフィリン Zn-TPyP は、apo-MIP 空間内の 3 つの鋳型分子由来メタクリル酸残基と 3 点で水素結合/静電的相互作用可能であることから、Zn-TPyP を補因子として導入して、D-TyrAN 認識場を再構築 (holo-MIP の構築) した。得られた holo-MIP は標的分子である

D-TyrAN に対して高い結合特性およびエナンチオ選択性を示し、Zn-TPyP を補因子として導入・除去することによって分子認識能の on/off ができることが示され、MIP で複合タンパク質様機能が人工的に再現できることが初めて示唆された。

MIP において正確に鑄型が取れていれば、前出のポルフィリン誘導体よりも小さい補因子を用いても MIP の機能を調節することが可能であると考えられる。それを検証するため、標的分子をビスフェノール A (BPA) とし、重合官能基と BPA の間に補因子をはさんだ鑄型分子を合成した<sup>[33]</sup>。ここでは、補因子をポルフィリンより小さいサイズの安息香酸とした。すなわち、(4-アリルジチオ)安息香酸をエステル結合にて BPA と複合化させた BPA-D を鑄型分子として用い、スチレンおよびジビニルベンゼンと共重合させた後、水素化アルミニウムリチウム ( $\text{LiAlH}_4$ ) によってジスルフィド結合を還元することで、2 つのチオール基をもち、かつ BPA より安息香酸 2 つ分大きなインプリント空間 (Apo-SH) を作製した (図 9)。Apo-SH は BPA に対して結合特性を示さなかったが、ジスルフィド交換反応により安息香酸部位が補因子として導入された Holo-COOH (BPA 認識空間の再構築) は、BPA に対して強い結合選択性を示した。BPA 類似ジアミン化合物 4,4'-ジアミノジフェニルメタン (DAD) は、安息香酸補因子との静電的相互作用が可能のため若干の交差反応性を示したので、補因子をプロトンドナー性の安息香酸からプロトンアクセプター性のピリジンに変更して BPA 認識空間を再構築した Holo-Py を作製した。Holo-Py は、BPA への結合能は少し弱まるが、DAD

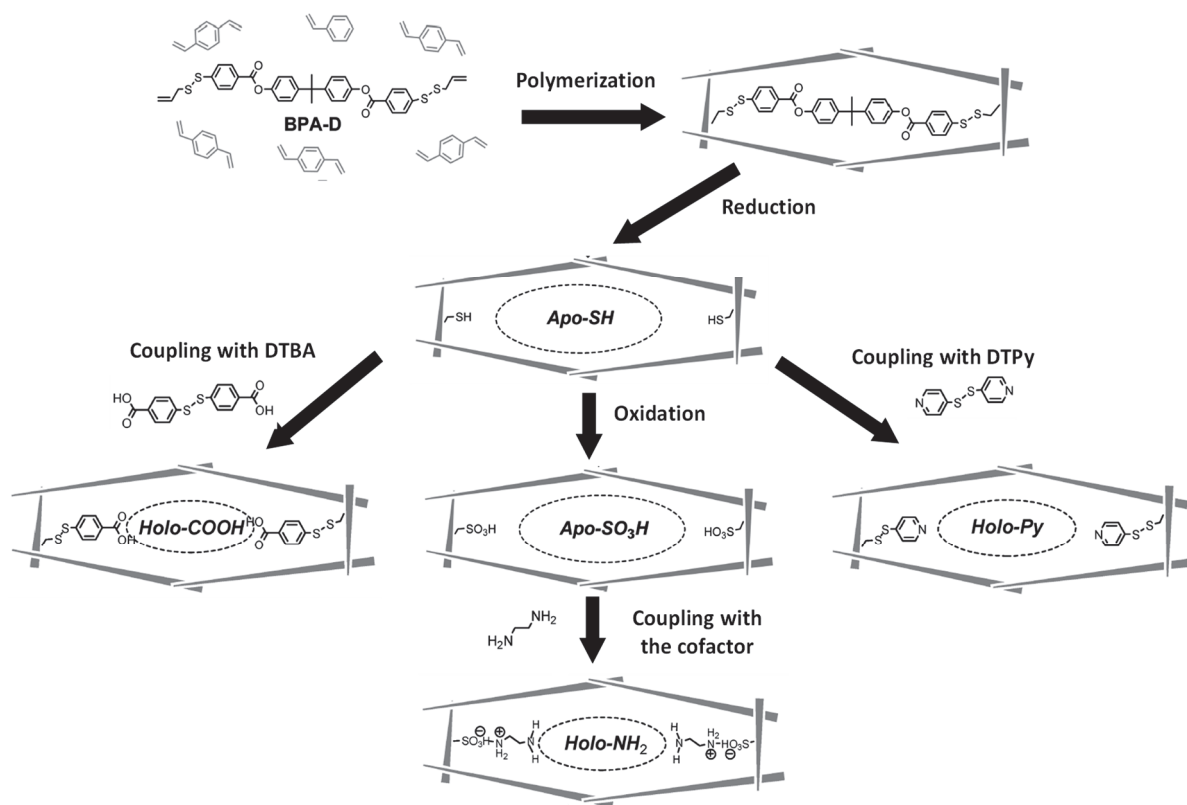


図 9. 共有結合・非共有結合する補因子で再構築される Bisphenol A の MIP.<sup>[33]</sup>



の結合を大きく抑制することが明らかとなり、補因子を選択することで、MIP の吸着選択性を調整し、最適化できることが示された。

さらに上記の共有結合型補因子ではなく、静電的相互作用を利用して補因子を動的にインプリント空間に導入し、結合特性を制御することを試みた (図 9 の中央ライン)。Apo-SH を酸化してチオールをスルホン酸に変換し (Apo-SO<sub>3</sub>H)、補因子として 1,2-ジアミノエタン (DAE) を静電的相互作用により導入した (Holo-NH<sub>2</sub>)。Holo-NH<sub>2</sub> は共存させる DAE の量に従って結合の強弱が変化し、また、モノアミンである *n*-プロピルアミンを添加すると BPA に対する結合親和性が低下した。すなわち、Holo-NH<sub>2</sub> の BPA に対する結合親和性は、添加物により競合的に調整できることが確認された。このように、鋳型分子をもとに形成される MIP のインプリント空間は、PIM として導入される小分子の補因子の有無により、その結合特性が大きく影響を受けるほど、分子レベルで厳密に規定された空間であることが明確に示された。

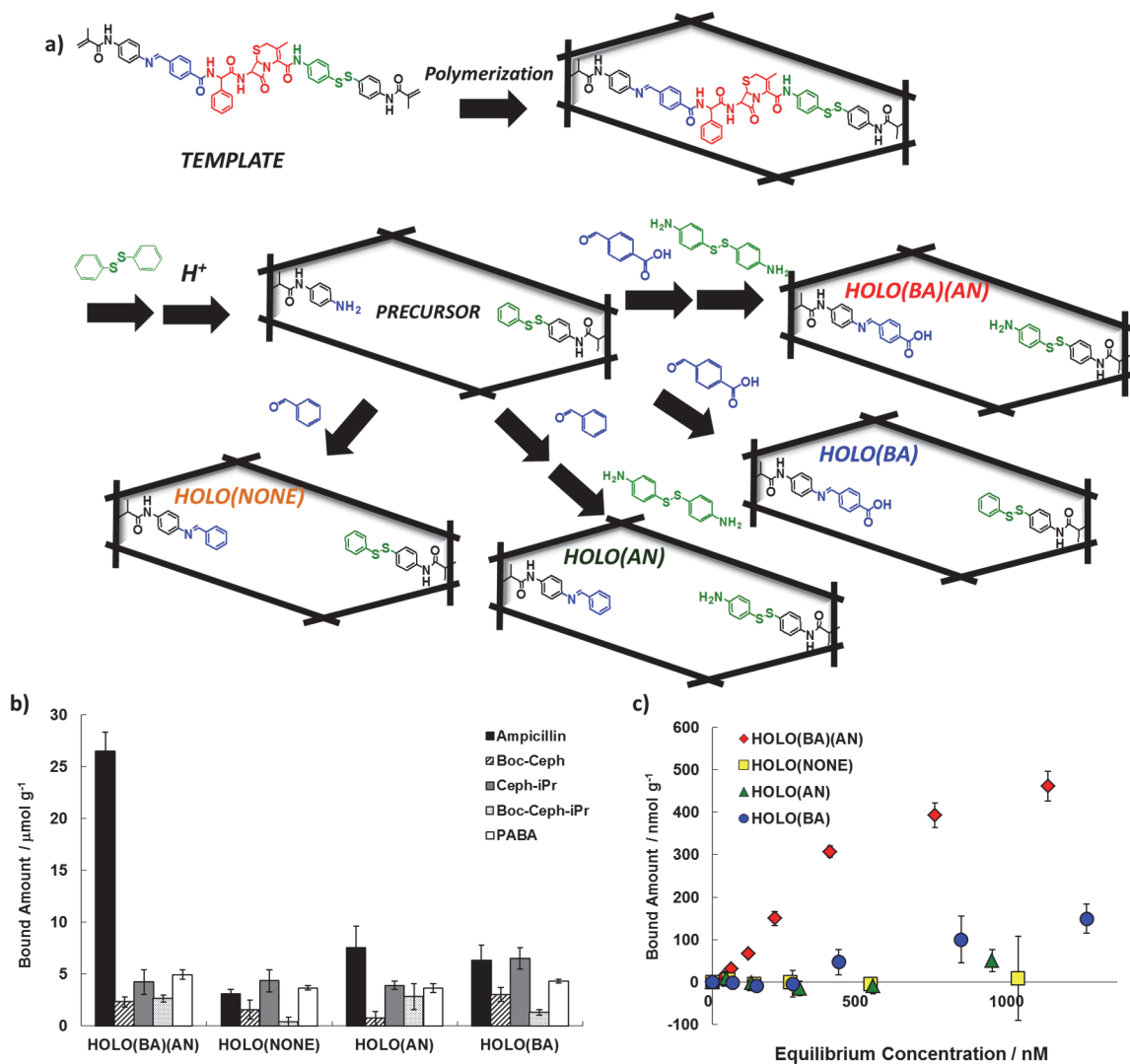


図 10. 複数の異種補因子で再構築される  $\beta$ -ラクタム系抗生物質の MIP の概念(a). 全再構築および部分再構築された MIP の選択性(b)と吸着等温線(25°C)(c).<sup>[34]</sup>

さらに、MIP 機能の PIM による多様化を目指し、異なる PIM 反応条件で可逆的結合する 2 種の補因子連結機能性モノマーを用いることを検討した<sup>[34]</sup>。具体的には、標的分子を  $\beta$ -ラクタム系抗生物質とし、ジスルフィド結合またはイミン結合（シッフ塩基形成）を有する補因子連結機能性モノマーをそれぞれ合成し、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質のひとつであるセファレキシンのアミノ基およびカルボキシ基にそれぞれ連結させて、これを鋳型分子とした（図 10a）。この鋳型分子と架橋剤トリエチレングリコールジメタクリレートとを共重合させた後、ジフェニルジスルフィドとのジスルフィド交換反応および酸処理によるイミンの加水分解反応により、apo 型分子インプリント空間 PRECURSOR を得た（図 10a）。この PRECURSOR に、PIM としてシッフ塩基形成反応で 4-ホルミル安息香酸（BA）を、またジスルフィド交換反応により 4,4'-ジチオアニリン（AN）をインプリント空間内の余剰スペースを埋める形で独立して導入し、結合空間を再構築した HOLO(BA)(AN)を得た。この二つの補因子結合反応は化学的に直交性を有し、いずれも高収率で得られることが確認された。HOLO(BA)(AN)は構造類似体を用いた選択性実験において特異性を有していることが示され（図 10b）、さらに、補因子が片方だけ導入された HOLO(BA)および HOLO(AN)、スペースは埋めるが相互作用部位をもたない HOLO(NONE)の  $\beta$ -ラクタム系抗生物質に対する結合性は低く、HOLO(BA)(AN)においてのみ強い結合が観察された（図 10c）。このことから、2 種の相互作用部位が協同的に働くことによって高い分子認識能が発現していることが示された。この分子認識能は、補因子を可逆的に結合・解離させることで、発現、消失を繰り返すことができ、生体内の補因子同様、複数の独立した補因子により、より複雑な分子認識能の on/off スwitchングが可能であることが明らかとなった。

さらに PIM による MIP の多様性の創出を実証するために、PRECURSOR に新たな機能をもつ補因子を導入することで、機能性 MIP が作製可能かどうか検討した。蛍光を有し、オリジナルの補因子である BA とほぼ同じサイズの分子である 5-ホルミルサリチル酸（SA）をイミン側の補因子として用い、ジスルフィド側には 4-メルカプト安息香酸（MBA）を補因子として導入することで蛍光性 HOLO(SA)(MBA)を構築した（図 11a）。HOLO(SA)(MBA)に 365 nm の励起光を照射すると 450 nm 付近にサリチル酸に由来する蛍光が確認され（図 11b）、標的分子である  $\beta$ -ラクタム系抗生物質を添加したところ、この蛍光は添加濃度依存的に増強した（図 11c）。すなわち、HOLO(SA)(MBA)は標的分子の結合情報を蛍光変化として読み出せることから、低分子を標的とする MIP においても PIM によりセンシング機能を導入することが可能であることが示された。また、構造類似体を用いた選択性実験において、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質に対して最も大きな蛍光変化を示したことから、オリジナルの補因子を蛍光性補因子に変換しても、同様

のサイズをもち、インプリント空間が再構築される限り、分子認識特性は維持されることが示された (図 11d)。また、2種の蛍光分子を導入し、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用したセンシング MIP も報告している<sup>[35]</sup>。

別の多様性創出の例として、光応答性材料への展開を検討した。PRECURSOR に対して 4-ニトロソ安息香酸を反応させることにより、イミン形成部位にアゾベンゼンカルボン酸 (Az-BA) を導入した。アゾベンゼンは  $\pi-\pi^*$  に相当するエネルギーを有する UV を照射することによりトランス体からシス体への光異性化が起こり、構造が大きく変化することが知られている。光応答性完全 holo 型 MIP の HOLO(Az-BA)(AN) に 365 nm の UV 光を照射すると、アゾベンゼンカルボン酸部分はシス体に変化し、その結果協調的に結合に寄与していたカルボキシ基の位置関係が変化すると予想される。実際、UV 光照射後、HOLO(Az-BA)(AN) の  $\beta$ -ラクタム系抗生物質に対する吸着性は低下した。そこでアゾベンゼンカルボン酸部分をトランス体に戻すために可視光を照射したところ、その吸着性は回復した。この吸着性のスイッチングは可逆的に進行することが示され、PIM によってポリマーに可逆的光応答性が付与可能であることが示された。

以上示したように、補因子も含めたインプリント空間を厳密に作製し、適切に機能性補因子を選定することにより、on/off スwitching 性、蛍光シグナリング性、光応答性などの多様な機能を MIP に付与できることが示され、PIM による MIP の後天的改変が極めて有用で、これまでの重合後修飾とは一線を画す機能性材料創製の構築ルートであることが示された。

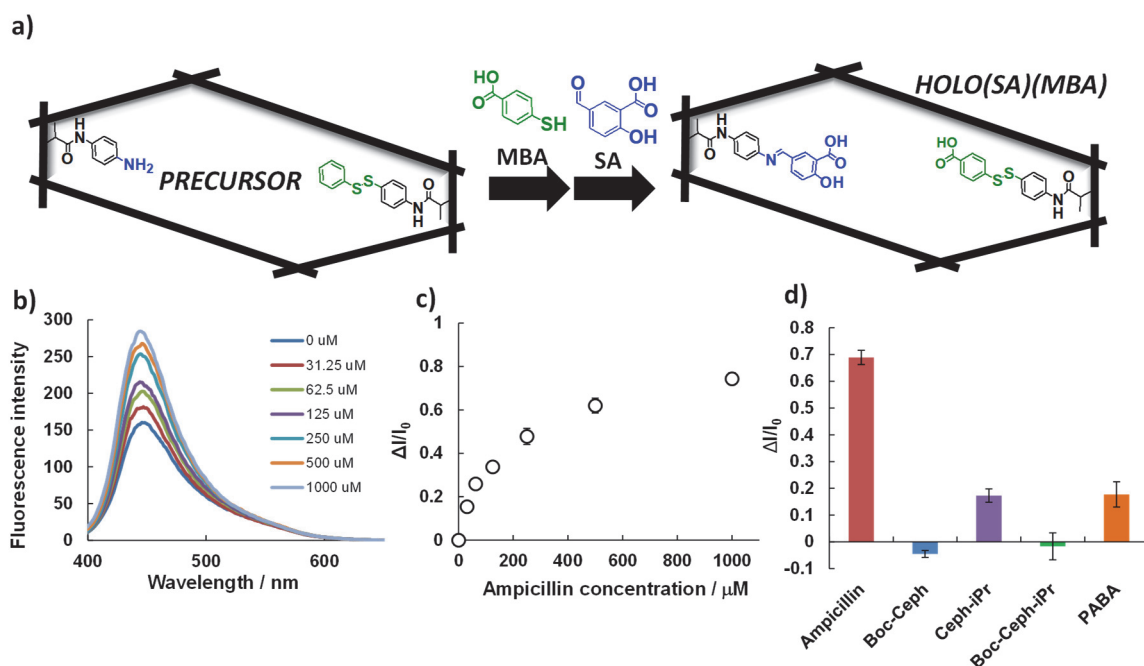


図 11. 蛍光性補因子で再構築される  $\beta$ -ラクタム系抗生物質の MIP の概念図 (a); MIP の蛍光スペクトル濃度依存性 ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 365 nm) (b);  $\beta$ -ラクタム系抗生物質添加に対する MIP の相対蛍光強度変化 ( $\lambda_{\text{em}}$ : 446 nm) (c) と選択性 (d).<sup>[34]</sup>

## 8. おわりに

分子インプリンティングは、テーラーメイド分子認識高分子材料として注目されているが、その製造方法の簡便さゆえ発現する機能も限界があった。MIP 合成の際、ポリマーマトリクス合成によるインプリント空間の構築と PIM による機能性付与のステップを完全に独立して行うことで、様々な機能を MIP に導入できることが示されたことから、限界と思われていた MIP の機能を劇的に拡張できることが明らかとなった。ここで示した PIM による部位特異的な官能基変換や分光学的特性の導入、複合タンパク質のような補因子による分子認識空間の再構築や新機能付与などは、PIM による機能性 MIP 創出のほんの一例に過ぎない。最近、光架橋を後から行う PIM を施した MIP<sup>[36]</sup>や、PIM を用いてはいないが MIP ナノ粒子によるドラッグデリバリーシステム<sup>[37]</sup>も報告されるなど、MIP は、ライフサイエンスやバイオテクノロジーなどの抗体を多用する分野に対して、確実に大きな影響と波及効果を与えつつある。現在、分子インプリンティングによる機能性人工材料に関する研究はヨーロッパやアジア諸国を中心に進展しつつあり、生体機能に匹敵する革新的な MIP が実現する日も遠からず訪れると思われる。夢物語であった *Beyond natural antibodies* が現実味を帯びつつあることから、今後の MIP 研究の発展が大いに期待される。

## 9. 引用文献

- [1] E. Pazos, O. Vázquez, J. L. Mascarenas, and M. E. Vázquez, *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 3348 (2009).
- [2] R. Woodman, J. T. -H. Yeh, S. Laurensen, and P. K. Ferrigno, *J. Mol. Biol.*, **352**, 1118 (2005).
- [3] C. Tiede, A. A. S. Tang, S. E. Deacon, U. Mandal, J. E. Nettleship, R. L. Owen, S. E. George, D. J. Harrison, R. J. Owens, D. C. Tomlinson, and M. J. McPherson, *Protein Eng. Des. Sel.*, **27**, 145 (2014).
- [4] The aptamer handbook: functional origonucleotides and their applications, S. Klussmann, ed., WILEY-VCH, Weinheim (2006).
- [5] K. Singh, D. Sareen, P. Kaur, H. Miyake, and H. Tsukube, *Chem, Eur. J.*, **19**, 6914 (2013).
- [6] L. Pauling, and D. H. Campbell, *J. Exp. Med.*, **76**, 211 (1942).
- [7] F. H. Dickey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **35**, 227 (1949).
- [8] G. Wulff, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **34**, 1812 (1995).
- [9] K. Mosbach, *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 9 (1994).
- [10] Molecularly imprinted polymers: man-made mimics of antibodies and

their applications in analytical chemistry, B. Sellergren, ed., Elsevier, Amsterdam (2001).

[11] M. Komiyama, T. Takeuchi, T. Mukawa, and H. Asanuma, *Molecular imprinting: from fundamentals to applications* Wiley-VCH, Weinheim (2003).

[12] *Molecularly imprinted materials: science and technology*, M. Yan and O. Ramström, eds., Marcel Dekker, New York (2005).

[13] 竹内俊文, 分子インプリンティング, ラジカル重合ハンドブック, NTS, pp. 723-740 (2010).

[14] *Molecular imprinting*, K. Haupt, ed., Springer, Berlin (2012).

[15] *Handbook of molecular imprinting: advanced sensor applications*, S-W. Lee and T. Kunitake, eds., Pan Stanford Publishing, Singapore (2013).

[16] R. Schirhagl, *Anal. Chem.*, **86**, 25 (2014).

[17] T. Takeuchi, T. Hayashi, S. Ichikawa, A. Kaji, M. Masui, H. Matsumoto, R. Sasao, *Chromatography* **37**, 43 (2016). [Open Access].

[18] T. Takeuchi, H. Sunayama, E. Takano, Y. Kitayama, in *Molecularly imprinted polymers in biotechnology*, B. Mattiasson, and L. Ye, eds., Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 95-106 (2015).

[19] 竹内, 砂山 「分子インプリンティングの新展開—ポストインプリンティング修飾による分子インプリント材料の多機能化」 *高分子論文集*, **73**, 19-29 (2016).

[20] T. Takeuchi, N. Murase, H. Maki, T. Mukawa, and H. Shinmori, *Org. Biomol. Chem.*, **4**, 565 (2006).

[21] T. Yane, H. Shinmori, and T. Takeuchi, *Org. Biomol. Chem.*, **4**, 4469 (2006).

[22] Y. Taguchi, E. Takano, and T. Takeuchi, *Langmuir*, **28**, 7083 (2012).

[23] R. Horikawa, H. Sunayama, Y. Kitayama, E. Takano, and T. Takeuchi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**, 13023 (2016).

[24] H. Kubo, N. Yoshioka, and T. Takeuchi, *Org. Lett.*, **7**, 359 (2005).

[25] Y. Inoue, A. Kuwahara, K. Ohmori, H. Sunayama, T. Ooya, and T. Takeuchi, *Biosens. Bioelectron.*, **48**, 113 (2013).

[26] W. Wan, M. Biyikal, R. Wagner, B. Sellergren, and K. Rurack, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 7023 (2013).

[27] H. Sunayama, Y. Kitayama, and T. Takeuchi, *J. Mol. Recogn.*, in press (2017) (DOI:10.1002/jmr.2633)

[28] Y. Suga, H. Sunayama, T. Ooya, and T. Takeuchi, *Chem. Commun.*, **49**, 8450 (2013).

[29] H. Sunayama, T. Ooya, and T. Takeuchi, *Biosens. Bioelectron.*, **26**, 458

(2010).

[30] H. Sunayama and T. Takeuchi, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **6**, 20003 (2014).

[31] H. Sunayama, T. Ooya, and T. Takeuchi, *Chem. Commun.*, **50**, 1347 (2014).

[32] S. Murakami, K. Yamamoto, H. Shinmori, and T. Takeuchi, *Chem. Lett.*, **37**, 1028 (2008).

[33] K. Takeda, A. Kuwahara, K. Ohmori, and T. Takeuchi, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 8833 (2009).

[34] T. Takeuchi, T. Mori, A. Kuwahara, T. Ohta, A. Oshita, H. Sunayama, Y. Kitayama, and T. Ooya, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 12765 (2014).

[35] H. Sunayama, T. Ohta, A. Kuwahara, and T. Takeuchi, *J. Mater. Chem. B*, **4**, 7138 (2016).

[36] Y. Kitayama, K. Yoshikawa, and T. Takeuchi, *Macromolecules*, **50**, 7526 (2017).

[37] T. Takeuchi, Y. Kitayama, R. Sasao, T. Yamada, K. Toh, Y. Matsumoto, and K. Kataoka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **56**, 7088 (2017). [Hot Paper]

竹内 俊文 (たけうちとしふみ)

1984年 富山医科薬科大学大学院薬学研究科博士後期課程修了 薬学博士取得

1984年 日本大学理工学部薬学科 助手

1988年 米国デラウェア大学化学・生化学科 博士研究員

1989年 米国ハワイ大学マノア校化学科 博士研究員

1991年 東京大学先端科学技術研究センター 客員助教授

1994年 広島市立大学情報科学部 教授

2001年 神戸大学大学院自然科学研究科 教授

2002年 さきがけ研究員併任 (2006年3月まで)

2006年 神戸大学大学院工学研究科教授

現在に至る

◆ 若手研究者からのメッセージ ◆

東京大学大学院薬学系研究科 特任研究員

梅澤 啓太郎

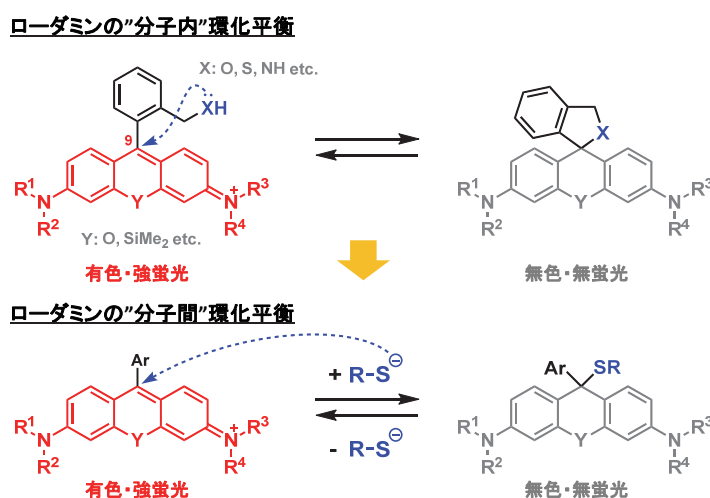
はじめに

まずは、この度僭越ながらバイオテクノロジー部会から執筆依頼を賜りましたことを、この場をお借りして御礼を申し上げます。その執筆内容は比較的自由に構わないと伺っていましたので、通常の私の寄稿とは若干趣を変え、「どのようにして研究のブレイクスルーが訪れたか、そのターニングポイント」をテーマとして執筆することにしました。

私は、見たいものを可視化する、いわゆる小分子蛍光プローブを開発しています。もちろん、そのような研究は数多とあるので、どこに自身のオリジナリティーを見出すかが極めて大事になってきます。その中で、私が研究の軸として注力したのは、『化学的にユニークなスイッチング原理を追究し、それにより蛍光プローブの新たな可能性を開拓する』という点です。6年前に研究を開始した時点では、新奇なスイッチング原理の発見はあったものの、応用までたどり着くことができず、お蔵入りとなったものも少なくありません。その中で、あるユニークな着想が酸化ストレス、具体的には活性イオウ種 (Reactive Sulfur Species: RSS) という分野と結びつき、研究成果として発表するまでに至りました。そこで今回は、グルタチオン (GSH) とポリスルフィド群 ( $R-S_nSH$ ) をセンシング可能な蛍光プローブの創製という2つの例を紹介いたします。

ある“ひらめき”から生まれた研究

これらの研究の発端となったのは、私の共著者らが行っていた“変哲のない”研究でした。彼は、キュベットの中では極めて明るい蛍光色素を細胞に導入すると、なぜか蛍光がとても弱くなるという問題に悩んでいました。その時、私たちは「理由はよくわからないけど、そういうこともあるだろう」と深く追究せずにはいましたが、教授の視点は違いました。彼は、「このプローブは、グルタチオンによる求核攻撃を受けて、暗くなっているのではないか」という仮説を立てました。驚きの発想でしたが、議論を深めるうちにその未知なる可能性に皆





が期待を抱くようになりました。この“ひらめき”から、新しい研究は始まりました。

この話の詳細をお話します。3, 4年前にその現象を発見した時点では、当研究室では『分子内環化を利用した蛍光スイッチング』に注目して様々な応用を行っていました<sup>[1,2]</sup>。図1に示すように、ローダミン(キサンテン部位)の9位の炭素原子は求電子性に富んでいて、分子内に求核基があれば閉環するという、開環—閉環平衡反応を利用した蛍光プローブの開発です。つまり、“ローダミンは求電子性をもつ化合物である”という認識に基づけば、「強い求核種(チオール)を有するグルタチオンなら分子間でも反応してもおかしくない」という推論に至ったわけです。言われてみればある意味当然ですが、言われるまでは気づかない、まさにコロンブスの卵でした。

### 可逆的に応答するグルタチオン感受性蛍光プローブの確立

この仮説を精査すべく、その蛍光プローブに数 mM のグルタチオンを添加すると、瞬時に色が消えて蛍光も消失し、チオールのスカベンジャー(マレイミド)を添加することで色と蛍光が元に戻るという可逆性を確認しました。これが、「求核—求電子平衡反応をトリガーとした新しいスイッチング原理として提唱でき、新しい蛍光プローブとなりうる」と実感した瞬間でした。実際には、グルタチオンに応答する蛍光プローブは数多と報告されていましたが、そのほぼ全ては“不可逆的な応答”に基づくものでした。しかしこれらの蛍光プローブでは、グルタチオンの濃度の増減をリアルタイムに可視化することは不可能であり、また濃度の推定・定量という領域までは踏み込めません。一方、可逆型の蛍光プローブは、それらの問題を解決しうるポテンシャルを秘めているのですが、これまでにほとんど報告例がなく、体系的な研究がなされていませんでした。そのような歴史的背景を鑑み、新規性・進捗性を満たす研究となりうることを確信しました。

そこで、まずは本研究を有機化学の基礎から見直し、反応速度論、化学平衡論の両観点から再構築しました。様々なローダミン分子骨格を設計・合成・評価することで、蛍光色

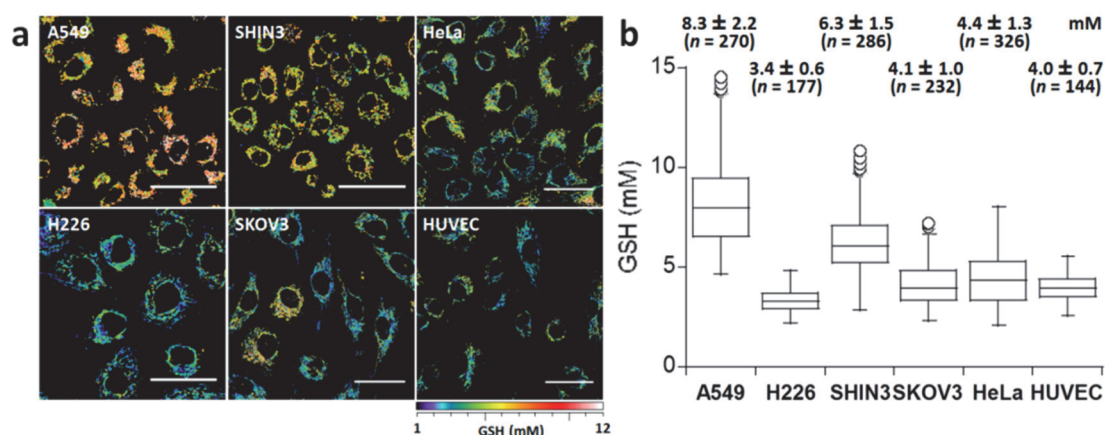


図2 (a) 様々な腫瘍/正常細胞のGSH濃度を疑似カラー変換した画像  
(b) それぞれの細胞のGSH濃度の定量結果<sup>[3]</sup>

素骨格とグルタチオン応答性の相関を体系化し、細胞内のグルタチオン濃度（1 – 10 mM 程度）に解離定数  $K_d$  を有し、数秒以内に応答する蛍光プローブを開発しました。さらに、グルタチオン濃度に応じて蛍光波長がシフトするレシオ型蛍光プローブ（FRET 原理に基づいた分子設計）の開発にも成功しました。

この蛍光プローブを用いることで、これまでは不可能だった様々な応用実験が可能となりました。例えば、蛍光顕微鏡下で作成した検量線を用いることで、生細胞内のグルタチオン濃度を直接的に定量することができました。さらに、グルタチオン濃度が非常に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グルタチオン濃度であるという興味深い知見が見出されました（図 2）。また、酸化ストレス（過酸化水素）に対するグルタチオン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、がん細胞と正常細胞の間でのグルタチオンの酸化還元速度の違いを発見し、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ました。さらにここでは割愛しますが、栄養飢餓状態でのがん細胞のグルタチオン濃度の変動の可視化に世界で初めて成功し、これらの成果を 2017 年に論文として発表することができました<sup>[3]</sup>。

### ポリスルフィド群のセンシングへの挑戦とセレンデピティ

グルタチオンの研究に道筋が立ってきた頃（2014 年ごろ）、さらなる研究の開拓のために別のターゲットの可視化の可能性を模索し始めた時、『ポリスルフィド（R-S<sub>n</sub>SH）』というキーワードに出会いました。「どうやら細胞内のシステインやグルタチオンの一部は、イオウ原子を余剰に有していて（ポリスルフィド化されていて）、これらが重要な機能を担っているようだ」という話を伺ったときには、門外漢の自分にとっては初めて聞く話ばかりでした。それから間もなくして発表された東北大赤池教授らの論文<sup>[4]</sup>により、その知見が証明され、新たな活性イオウ種（RSS）のケミカルバイオロジー分野の起爆剤となりました。その報告の概要は、Cys や GSH のポリスルフィド体（Cys-S<sub>n</sub>SH, GS<sub>n</sub>SH）は細胞内におおよそ数 10 μM 存在し、GSH よりもきわめて強い抗酸化作用を示すことや、硫化水素と類似したような機能を有するというものであり、現在もその役割については常々更新されています。

それから 3 年ほど経った現在でこそ、ポリスルフィド群という物質の認知度は高くなり、それに相応する蛍光プローブもいくつか報告されるようになりましたが（九大王子田教授らの報告例など<sup>[5]</sup>）、当時はまだメジャーではない話でした。そこで、グルタチオンの次はこれをターゲットとできないかと考えましたが、「そんなことできるわけない」と思い、二の足を踏んでいました。なぜ躊躇したかという、その存在推定濃度があまりに低いからです。グルタチオンが細胞内に 1 – 10 mM 程度存在するのに対し、GSSH や Cys-SSH は数 10 μM 程度、すなわち 1/1,000 ほどしか存在しないと推定されていて、グルタチオンに対して 10,000 倍以上の選択性を持った蛍光プローブを開発しないといけないため、こ

れがとてつもなく高い壁でした。それ故、研究を始めることをためらっていましたが、教授の励ましのおかげでモチベーションを維持して研究を進められました。

しかし、私の予想通り研究は難航し、様々な構造を考えて合成・評価するものの、なかなか思うような選択性が生まれず、苦しんでいました。ところがある時、セレンデピティに恵まれました。それは、「応答しないだろう」と（勝手に）思い込み、まともに精査していなかった蛍光色素を改めて評価・測定したところ、この色素が極めてよい性能を有したことです。グルタチオンには応答しないが、ポリスルフィドに対して濃度依存的に応答し、解離定数  $K_d$  が  $10 \mu\text{M}$ （細胞内の推定濃度域に近い値）であり、10,000 倍以上の選択性をもつという驚くべき性能であることを発見しました。

この偶然の発見が研究を飛躍的に進展させました。まずは 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ました。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<sub>m</sub>SH 群の増減の様子を可視化することに成功しました。また、R-S<sub>m</sub>SH 濃度の定量および、細胞の種類の違いによる R-S<sub>m</sub>SH 濃度の違いを可視化することも達成し、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<sub>m</sub>SH 濃度の相関や、ある刺激に対する GSH ないしは R-S<sub>m</sub>SH の濃度変動の独立性を観測するという、誰も成しえなかった成果を上げることができました。現在本論文を執筆中であり、近日中に学術論文という形で報告できることを期待しています。

## メッセージ

ここで紹介させて頂いた研究は、あくまで偶然うまくいった例に過ぎず、セレンデピティに恵まれた幸運の産物です。最初にも述べましたが、実際には陽の目を見ずに終わった研究も多く、まさに「失敗から何を学び、次にどう繋げるか」を身を以て経験した数年間でもありました。しかしこの苦しい経験が、自身の精神的な成長に大きく繋がり、成功することよりも大事な教訓を得ました。

今思うと、博士号を取得してから間もないころは、「予想・期待した通りの良い結果」になるかどうか、ただその軸だけで研究を捉えていた節があります。それ故、短絡的で偏狭な視野しか持たず、望んだ結果になるかどうかだけを考えて一喜一憂し、自らを苦しめていました。予想通りの結果に満足して、予想外の結果に失望しての繰り返しというように。しかし、様々な研究機関で活動し、多くのトップランナーの先生方に出会う過程で、「巨視的な視野をもつこと」の重要性を学びました。中でも、ある機関で出会った恩師が発した言葉は、私の心に印象深く残っています。それは、「自分が思った通りの結果になるということは、それ以上にはならない（予想の範疇を超えない）ことでもあるから、ある意味ではつまらない」というものであり、これまでの私の考えを大きく変えるものでした。目的志向型の研究の視点とは矛盾するかもしれないこの意見こそ、今回の研究の真髄に通ずるものがあります。そして私は、自分の狭い判断軸に基づいて物事を決めるのでは

なく、研究を大局的に俯瞰する視野を持ち、結果を多角的に捉えることの重要性を学びました。(もちろん、現実にはそのような綺麗事で済む話は少ないことは承知の上ですが)

若手と呼ばれる年代のうちにこのような経験をでき、社会人として多少なりとも成長できたことが、何よりも一番大きな財産だと思います。その機会を与えてくださった、これまでの多くの恩師の方々に、改めて御礼を申し上げます。

## 参考文献

- [1] S. Kenmoku, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7313-7318.
- [2] 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.
- [3] K. Umezawa, M. Yoshida, M. Kamiya, T. Yamasoba, Y. Urano, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 279-286.
- [4] 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.
- [5] R. Kawagoe, I. Takashima, S. Uchinomiya, A. Ojida, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 1134-1140.

梅澤 啓太郎 (うめざわ けいたろう)

2008年3月 慶應義塾大学大学院 理工学研究科 博士課程修了  
(PI: 鈴木孝治名誉教授)

2008年4月 慶應義塾大学 応用化学科 助教 (有期)

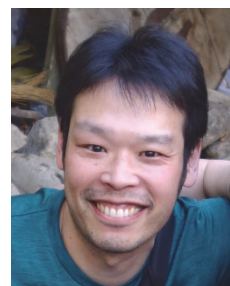
2009年4月 慶應義塾大学大学院 理工学研究科 生命情報学科  
学振 PD (PI: 岡浩太郎教授)

2009年11月 スイス連邦工科大学ローザンヌ校 (EPFL) 学振 PD  
(PI: Prof. JOHNSON, Kai)

2011年5月 東京大学 大学院医学系研究科 学振 PD (PI: 浦野泰照教授)

2012年4月 東京大学 大学院医学系研究科 特任研究員 (同上)

2015年4月 東京大学 大学院薬学系研究科 特任研究員 (同上) 現職



◆ 若手研究者からのメッセージ ◆

京都大学工学研究科  
合成・生物化学専攻  
浜地研究室助教 田村 朋則

## はじめに

蛋白質は生命活動を司る主要な生体高分子群であり、その構造・機能の解明や人工制御は生命科学的興味だけでなく、疾病診断や創薬開発への応用という観点からも極めて重要である。ポストゲノム時代と呼ばれる現代において、蛋白質研究は高度に精製された *in vitro* 解析から、生細胞や組織といった *in situ* での解析へと関心がシフトしている。現在、このような研究トレンドに対して最も強力かつ一般的なアプローチは、GFP に代表される蛍光蛋白質をプローブとして用いたバイオイメージングであろう。しかし、融合蛋白質のトランスフェクションを必要とするこの手法では本来観察すべき『天然（内在性）蛋白質』の真の姿を捉えることはできず、外因性遺伝子の過剰発現や蛍光蛋白質自身のサイズ・凝集特性に起因するアーティファクトも懸念される。このような背景から筆者は、細胞内の狙った天然蛋白質を選択的に化学修飾するための有機化学的方法論の開発に取り組んでいる。<sup>[1, 2]</sup> 合成プローブは蛍光蛋白質と比較して遥かに分子量が小さく、蛍光色素や MRI プローブ、光反応基など、合成化学者が用途に応じて自在に設計可能である。従って、細胞内蛋白質に望みの機能性プローブを導入出来れば、可視化解析のみならず人工的な活性制御や相互作用解析など、様々な応用に柔軟に対応できると期待される。本稿では、筆者が最近開発した2つの蛋白質化学修飾法についてその概要を紹介する。

## Ligand-Directed *N*-acyl-*N*-alkyl sulfonamide (LDNASA) Chemistry

これまで筆者の所属する浜地研究室では、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するための手法として『リガンド指向性化学(Ligand-directed chemistry), LD 化学』を開発してきた(図 1a)<sup>[3]</sup>。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。筆者は学生時代、特にフェニルスルホン酸エステル(トシルエステル, Ts)を反応基とした Ligand-directed tosyl (LDT)化学の開発に携わり、生細胞内で起こる蛋白質間相互作用の光架橋検出<sup>[4]</sup>や FRET イメージング解析<sup>[5]</sup>に成功した。一方、LDT 化学は反応が遅く、アプリケーションに十分な修飾率を得るためには十数時間から数日を要するといった問題を抱えていた。その後、アシルイミダゾール(AI)やジブプロモフェニルベンゾエート(BB)といった新しい反応基が開発されたものの<sup>[2]</sup>、劇的な反応速度の改善には

至らなかった。そこで筆者は助教着任後、より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) に着目し、これを反応基とした LDNASA 化学の開発に取りかかった。まず FKBP12 をモデル蛋白質としてラベル化剤を設計・合成し、試験管内にてラベル化反応を行った。MALDI-TOF-MS 解析の結果、LDNASA ラベル化剤は 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、それぞれの二次反応速度定数を算出した (図 1b)。その結果、NASA 型ラベル化剤の二次反応速度定数は FKBP12 や eDHFR といった蛋白質に対して、約  $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  と著しく大きな値 (この反応速度は酵素タグの SNAP タグに匹敵する) を示したのに対して、従来の Ts や AI は数十  $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  程度、より近年開発された BB でも  $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  オーダーであった。以上の結果から、新たに開発した LDNASA 化学は従来の LD 化学よりも 100 倍から 1000 倍大きな反応速度定数を有することが定量的に示された。続いて生細胞内において内在的に発現している FKBP12 のラベル化を行った。その結果、反応開始 10 分後から FKBP12 への特異的なラベル化を検出することができ、反応開始 1 時間での反応収率は 78% であった。なお、従来の Ts 型ラベル化剤では反応が遅いため、このような短時間の反応時間では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

複雑系においても、迅速・高効率・高選択的なラベル化が進行することが実証された。この高い生体直交性・生体適合性を利用して、筆者らはさらに NASA を反応基とする Hsp90 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。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

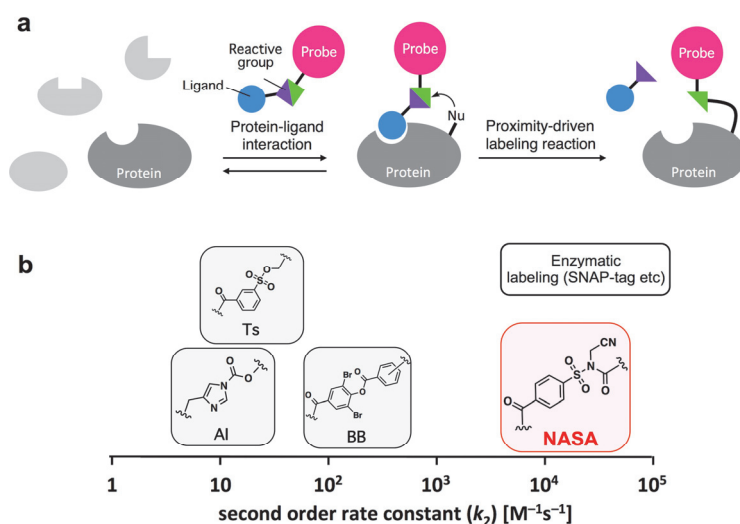


図 1 (a) LD 化学による蛋白質ラベリング (b) 各 LD 化学の二次反応速度定数の序列



用していきたいと考えている。

## Affinity-Guided Oxime (AGOX) Catalyst

LD 化学とは別の蛋白質ラベル化戦略として、筆者は『アフィニティ駆動型 Oxime 触媒 (Affinity-Guided Oxime catalyst, AGOX 触媒)』を近年開発した<sup>[6]</sup>。AGOX 法では、標的蛋白質に親和性を有するリガンドにアシル転移反応を促進する Pyridinium Oxime (PyOx) 触媒を連結したリガンド連結 PyOx 触媒を用いて蛋白質ラベリングを行う (図 2)。この分子のリガンド部位が蛋白質に結合すると、PyOx 触媒が蛋白質表面に配置される。そこに標識プローブを有する *N*-acyl-*N*-alkylsulfonamide (NASA) 型アシルドナーを加えると、PyOx 触媒がこのアシルドナーを活性化する。この活性中間体に対して近傍に存在するアミノ酸残基が求核攻撃することで、標的蛋白質に対するプローブの導入が完了する。我々は以前に同様の触媒的蛋白質修飾法を報告しているが (Affinity-guided DMAP (AGD) 触媒)<sup>[7]</sup>、新たに開発した AGOX 法では反応性を適切にチューニングした NASA 型アシルドナーと、中性 pH 条件で極めて高い求核性を示す PyOx 触媒のペアを用いることで、標的選択性・生体適合性が飛躍的に向上している。筆者らは本手法を用いて carbonic anhydrase XII や Folate receptor といった膜蛋白質を細胞内でそのまま蛍光ラベルし、イメージング解析からこれらの拡散係数を計測することに成功した。また特筆すべきことに、AGOX 法は培養細胞系だけではなく生体組織にも適用でき、脳組織に内在的に発現する AMPA 型グルタミン酸受容体を脳切片サ

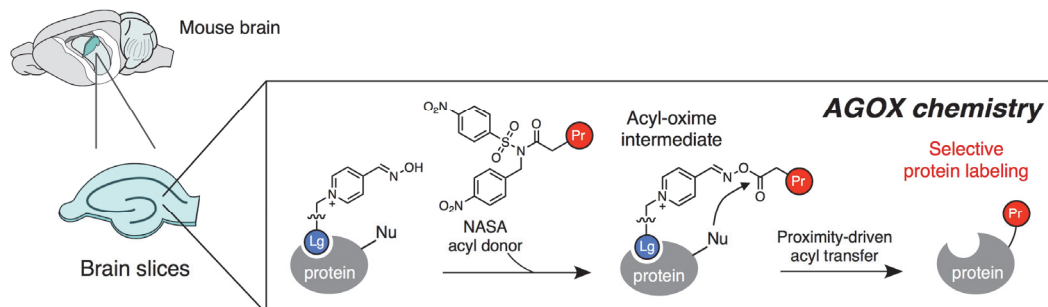


図 2 Affinity-Guided Oxime (AGOX) Catalyst による蛋白質ラベリング

ンプル中で直接蛍光ラベルすることも可能であった。生体組織中の蛋白質を化学修飾可能な手法は未だ限られており、本手法は今後強力な蛋白質ラベル化・機能化ツールとしての展開が期待される。

## 結びに代えて

最近参加した学会で、iPS 細胞で有名な山中伸弥教授の講演を聴く機会があった。そこで先生は研究者として大事なものは Vision & Hard Work だ、とおっしゃられていた (アメリカ留学中のボスのお言葉らしい)。ノーベル賞受賞後あちこちで話されているので聞いたことがある読者もいるかもしれない。筆者もこの言葉は学生時代に何度か聞いたことがある。当時は特に感慨もなく聞き流していたが (ろくな学生ではなかった・・・)、アカデミックポストに



職を得た今、この言葉に改めて触れたとき、内省せずにはいられなかった。Hard Work はできるとしても、自分固有の Vision とは何か？その Vision を同僚や学生に自分の言葉で熱く語れるか？そして彼らの共感を得て同志を増やし、新しい研究分野の潮流を創れるか？現在の職に就いて以来、自分の研究や自分自身の Vision、Philosophy は何なのか折に触れて考えるようになった。人から問われればそれなりの答えをひねり出すことはできるかもしれないが、それが本当に自分のオリジナルなのかボスも含めた誰かの答えのつぎはぎなのか、現時点では恥ずかしながら確信は持てない。ただ、自分が面白いと思ったことに真剣に取り組み、考え、挑戦し続けていればいつか本当にオリジナルの自分だけの Vision が見えてくるのだろうと何となく考えている（盲信しているといったほうがいいかもしれない）。ということで、取り急ぎ自分がしなければいけないことは目の前の仕事をさっさと片付けて、学生とああだこうだ言いながら頭と身体をフルに使って面白い論文を書くことである。

## 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、浜地研究室の多くの研究員、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。

## 参考文献

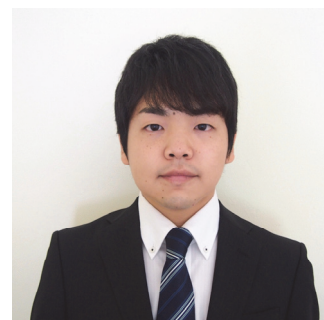
- [1] 西川 雄貴、田村 朋則、浜地 格, 有機合成化学協会誌, 74, 521-531 (2016)
- [2] Amaike, K., Tamura, T. & Hamachi, I. *Chem. Commun.* **53**, 11972–11983 (2017)
- [3] Tsukiji, S., Miyagawa, M., Takaoka, Y., Tamura, T. & Hamachi, I. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 341–343 (2009)
- [4] Tamura, T., Tsukiji, S., Hamachi, I., *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 2216–2226 (2012),
- [5] Tamura, T., Kioi, Y., Miki, T., Tsukiji, S., Hamachi, I., *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 6782–6785 (2013)
- [6] Tamura, T. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **139**, 14181–14191 (2017)
- [7] Wang, H., *et al, J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 12220 (2011)

田村 朋則 (たむら ともりのり)

2013年3月 京都大学工学研究科合成・生物化学専攻  
博士後期課程修了 博士(工学)取得

2013年4月 日本学術振興会特別研究員 (PD)

2014年9月 京都大学工学研究科合成・生物化学専攻 助教



## はじめに

鉄は成人男性だと平均 4 g 程度が体内に保有されている。この量自体が多いか少ないか、人により感じ方が違うとは思いますが、遷移金属に限ると最も多く体内に存在する金属である。酸素運搬、エネルギー産生等、その役割を考えると生命維持において無くてはならないことは明白であるが、酸化ストレスの観点から鉄の役割を見ると、どちらかという悪役扱いされることが多い。筆者らは、このような二面性を持つ生体内の鉄イオンの挙動に興味を持ち、有機化学者の立場から鉄の生命科学研究を進めようとしている。ここでは、少し大げさかもしれないが、鉄イオン蛍光プローブ分子開発に関する話をネタにして、研究の面白さをお伝えできればと思う。

## 二価鉄選択的蛍光プローブ分子の「発見」

細胞内では鉄イオンはタンパク質に強固に結合しているか否か、その価数が二価か三価か、といった化学種としての性質が問題になる。詳細は割愛するが、その中で酸化ストレスや細胞内鉄輸送に深く関わるような化学種としては、二価鉄イオンが重要な鍵を握る。さて、それでは細胞内で二価鉄イオンを(蛍光)検出するにはどうすればよいか？実はこの問いに対する回答は全くの偶然により得られた。話は少し遡るが、留学先より帰国し、助教に着任したばかりの筆者は何か新しいことをしようとして色々模索していた。特に、留学中は銅(I)イオンの蛍光検出分子(蛍光プローブ)の開発に携わっていたことから<sup>[1]</sup>、前ボスと競合したくなかつ

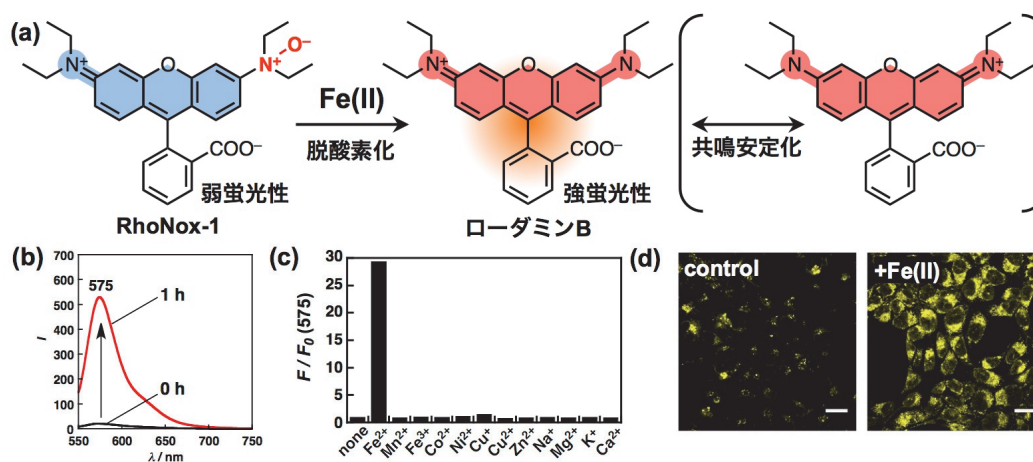


図 1 (a) RhoNox-1 の構造と二価鉄イオンへの応答機構 (b) RhoNox-1 に二価鉄イオンを添加した際の蛍光スペクトル変化、黒：添加前、赤：添加して一時間後 (c) 各種金属イオンに対する蛍光応答性評価 (d) 生細胞イメージングでの二価鉄イオン検出、スケールバー：25  $\mu\text{m}$

たこともあり、むしろ金属イオンに関する研究とは別の分野で一花咲かせるのだと意気込んでいた。そんな中で合成した化合物が RhoNox-1 (図 1a) である。本化合物は当初は金属とは関係ない全く別の用途を想定していたが、実際のところ期待していた活性は見られなかった。しかしながら、その構造がなんとなく個性的であり面白そうである (筆者の個人的な見解) こと、せっかく作ったのだから色々調べてみたい、という単純な好奇心からとりあえずいくつかの活性酸素種に対する応答性を調査した。するとなぜかヒドロキシルラジカルの生成反応条件において、肉眼ではっきり分かるほど蛍光強度が増大した。最初は信じられず、何度か繰り返したが同じように蛍光増大が見られたため、何かが起こっているのは明らかであった。このとき、系中には RhoNox-1 の他には二価鉄イオンと過酸化水素、それに配位子として EDTA が入っていた。そこで、それぞれの試薬と 1 つずつ反応させたところ、二価鉄イオンだけでも蛍光上昇が見られ、RhoNox-1 が二価鉄イオンに反応している、ということを見出した。この時、「二価鉄イオン選択的に蛍光が増えるようなプローブが全く無い(当時)<sup>[2]</sup>のは難しいからだろうか」と留学中に考えていたことが頭をよぎり、これはおもしろいことになるかもしれない、と胸が高鳴った。さらに幸いなことに、RhoNox-1 は金属選択性が極めて高いこと、生細胞イメージングへも適用可能であることが分かり、世界で初めての二価鉄イオンに高選択的な蛍光プローブとして報告した<sup>[3]</sup>。筆者が金属イオン研究に引き戻された出来事であった。その半年後、留学先であったラボより二価鉄イオンの蛍光プローブが報告<sup>[4]</sup>され肝を冷やしたが、タッチの差で先に報告できたのは幸いであった。

## N-オキシド化学の発展

ここでようやく少し化学の話になるが、RhoNox-1 における蛍光 OFF/ON の制御機構は以下の通りである。①母核であるローダミン B は強蛍光性化合物であり、その蛍光性は 2 つある窒素原子の両者に広がる  $\pi$  共役系がその高い蛍光性の要因となっている (図 1a 右側)。②片側の窒素原子を N-オキシド化することで、 $\pi$  共役系が切断され、これにより蛍光性が大き

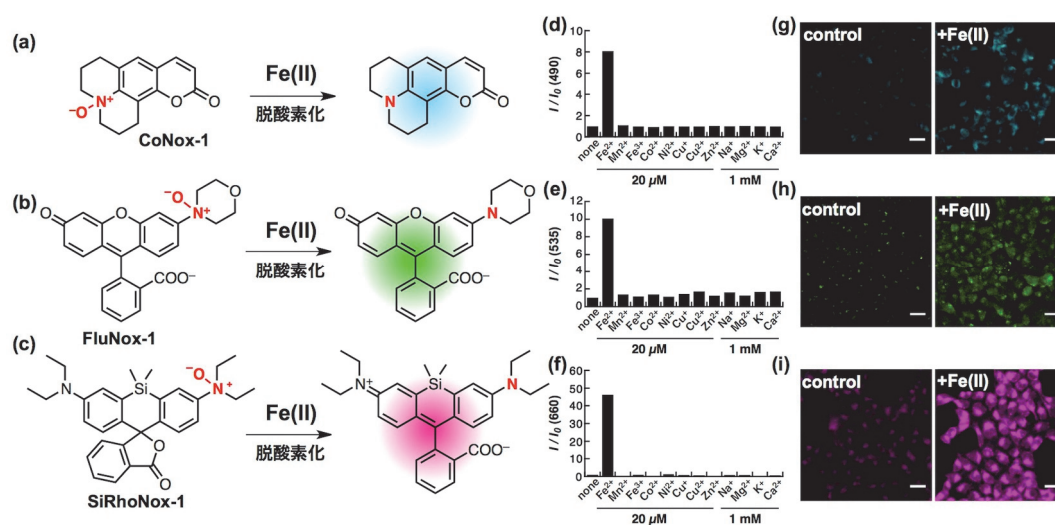


図 2 (a-c) CoNox-1、FluNox-1、SiRhoNox-1 の構造と二価鉄イオンへの応答機構 (c-f) 各種金属イオンに対する蛍光応答性評価 (d-f) 生細胞イメージングでの二価鉄イオン検出 (g) CoNox-1 (e) FluNox-1 (f) SiRhoNox-1、スケールバー: 25 μm.

く減弱する（図 1a 左側）。③二価鉄イオンにより N-オキシドが脱酸素化され、元の強蛍光性の化合物に戻ることで蛍光が増大する。ここで、③については、よくよく調査すると鉄を使って還元的に N-オキシドを脱酸素化する（もしくは N-オキシドにより鉄を酸化する）反応は古くから知られており、この反応が起こっていることが分かった。そこで、今度はローダミン B と同じように蛍光骨格の中に窒素原子があり、N-オキシド化により共役系が切断されるような蛍光色素があれば、二価鉄イオン蛍光プローブになるのでは、と考えた。つまり一般化は可能かどうか、確かめることにした。幸い、蛍光骨格の中に N-オキシド化ができる窒素原子を持つようなものは世の中に多数存在する。ここでは、ローダミン B とは異なる蛍光色を持つクマリン（青色）、ロドール（黄緑色）、およびケイ素ローダミン（赤色）を持つような色素を選び、これらを N-オキシド化した化合物 CoNox-1、FluNox-1、SiRhoNox-1 を合成し、その二価鉄イオン応答性を評価した。結果はというと、どの化合物も二価鉄イオンに対して応答し、金属イオン選択性も完璧であった。さらに、生細胞イメージングにも使用できることより、これらプローブが全て二価鉄イオンの蛍光プローブとして機能することが分かった。つまり、N-オキシドの化学が、二価鉄イオンに対する蛍光応答性分子スイッチとして一般化できることが分かった<sup>5</sup>。さらに、SiRhoNox-1 は非常に応答性がよく、RhoNox-1 を超える機能を示し、これをさらに応用することで細胞内での酸素濃度に応じて鉄イオンの酸化還元平衡が変動する様子を可視化することにも成功した。

### 終わりに（メッセージ）

ここでは、現在筆者が取り組んでいる生体内鉄の挙動解明研究のきっかけとその進展の一部を紹介させていただいた。これまで簡便に使える二価鉄イオン蛍光プローブが無かったこと、共焦点蛍光顕微鏡がかなり普及していること、鉄に関する研究をされている先生がたとの出会い、様々な幸運が重なり、現在 RhoNox-1 をはじめ筆者らの作った蛍光プローブを多くの研究者の方々に使っていただいている。また、RhoNox-1 については五稜化薬社より販売していただいております、合成していた段階では世に出るとは考えてもいなかったが、思いもよらぬ発展を見せている。金属研究から離れようともがき苦しんだ結果、むしろ鉄の生命科学研究への挑戦権を得ることになったのは、（留学先のボスと競合することになったのは誤算だが）天啓（？）とも受け取れる。ちなみに今回見つけた二価鉄イオンと N-オキシドの反応については、筆者は全く予期していなかった。自分を基準に述べるのは恐縮だが、自然科学を相手に所詮人間の思いつく範囲は限られている。果たして AI に分子設計をさせたならもっと良いものを予想通りに生み出せるだろうか、なんてことを最近考えることもあるが、それでも予期しない問題は発生するだろう。それを切り捨てるか、チャンスに変えるかは自分次第であるが、これまでに多くの先人達が語ってきたように後者の可能性を模索するのが研究の醍醐味であることは間違いないように思う。実際、少なからずチャンスに変わる瞬間を味わってしまったことで研究にのめり込んだという研究者の話の聞くことが多い。目的の活性が出なくても、捨てる前に徹底的に調べてみると何かが起こる...かもしれない。そんな未

知との遭遇の瞬間を楽しみに今日も研究を進めている。また、研究が進まず日々苦しんでいる学生さんにおいては、一人でも多くの方がそんな瞬間を経験し、研究者を志してくれることを期待して本稿を締めくくりたい。

#### 参考文献

- [1] T. Hirayama, G. C. Van de Bittner, L. W. Gray, S. Lutsenko, and C. J. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, **109**, 2228–2233.
- [2] E. L. Que, D. W. Domaille, and C. J. Chang, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 1517–1549.
- [3] T. Hirayama, K. Okuda, and H. Nagasawa, *Chem. Sci.*, 2013, **4**, 1250–1256.
- [4] H. Y. Au-Yeung, J. Chan, T. Chantarojsiri and C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 15165–15173.
- [5] T. Hirayama, H. Tsuboi, M. Niwa, A. Miki, S. Kadota, Y. Ikeshita, K. Okuda, and H. Nagasawa, *Chem. Sci.*, 2017, **8**, 4858–4866.

平山 祐 (ひらやま たすく)

岐阜薬科大学創薬化学大講座 薬化学研究室 准教授

2009年3月 京都大学大学院人間・環境学研究科 博士課程修了 博士(人間・環境学)取得

2009年4月 カリフォルニア州立大学バークレー校 化学専攻 博士研究員

2010年10月 岐阜薬科大学創薬化学大講座 薬化学研究室 助教

2016年4月 現職

◆ 海外の研究室から ◆

ニューヨーク市立大学ハンター校

山岸彩奈

ニューヨーク市立大学ハンター校は、マンハッタン島の中央に位置するセントラルパークの東、アッパーイーストにあります。私が 2017 年 10 月から 12 月半ばまで滞在した研究室の PI である松井宏教授は Department of Chemistry の所属ですが、ラボは同じアッパーイーストにあり、ハンター校から徒歩 10 分ほど離れたワイルコーネル医科大学の Belfer research building に居を構えていることから、私も毎日そちらに通っていました。この Belfer research building にはワイルコーネル医科大学の研究室もあることから、大学の枠を超えたコラボレーションを推進するためにこのような 2 つの大学の研究室が一つの建物に同居するという体制を取っています。

私は 2016 年に産総研特別研究員として着任して以来、乳癌細胞の転移に関わる中間径フィラメントネスチンの機能解析に取り組んでいます。ネスチンは神経系幹細胞のマーカーとしてよく利用されている細胞骨格蛋白質なのですが、乳癌細胞をはじめとして前立腺癌や膵臓癌など高転移性の癌細胞において高発現していることが報告されています。これらの細胞でネスチンの発現を抑制すると癌細胞の浸潤能や遊走能、転移能が低下したことから、ネスチンは癌転移を抑制する新規分子標的として注目を集めています。私は高転移性のマウス乳癌細胞株を用いて CRISPR/Cas9 システムによりネスチンのノックアウト株を作成し、そのキャラクターゼーションを行っている過程でネスチンのノックアウトにより細胞の弾性率が上昇し、固くなることを明らかにしてきました。ネスチンの発現量抑制による転移能の低下は、癌細胞が固くなることで組織や細胞の間隙を通過しにくくなるためではないかと考えています。細胞弾性とネスチンの関係については現在も研究を進めているのですが、この結果から生体内の血中循環腫瘍細胞(CTC)を標的にネスチンのノックアウトを行うことで細胞弾性率を上昇させ、その転移を阻害できないかと考えました。ここで問題となるのはノックアウトに用いる Cas9-gRNA 複合体を血管内に投与し、CTC まで運搬する方法です。松井先生はケージ状という特徴的な形状のナノ磁性粒子を用いて効率的に薬剤を運搬するという研究をされており、この技術を Cas9-gRNA あるいはプラスミドベクターの運搬にも利用できないかと考えました。そこで松井先生のラボにてケージ状磁性ナノ粒子の合成方法を教えていただけないか、またこれを利用したタンパク質や核酸の運搬に使ってみたいという提案をご快諾いただき、約二か月半を松井先生のラボで過ごさせていただくことになりました。

松井先生のラボには Ph. D student、under graduate student に加え、これから自分が所属するラボを決めるためにラボローテーション中の大学院生も所属しており、総勢 10 名前後

のラボです。みな授業や試験、TAの合間にラボで実験をしており個人の予定に合わせて研究を進めていました。同じフロアには癌関連の研究を行うハンター校のラボが並んでおり、大体10時から17時過ぎまで実験し帰宅するというスタイルです。さらに金曜日は少し早めに帰る人も多く、時には夜遅くまで学生が実験室にいる日本とはかなり異なるライフスタイルです。ただし研究室に配属された後はほとんど授業のない日本の大学生や大学院生とは異なり、アメリカでは授業や試験も受けながらラボで研究を進めるため、自分で予定を組み立てることが出来なければいけないという印象を受けました。ある月曜日の朝に私がラボに着くと、誰かが合成したナノケージが透析されており、効率よく研究を進めるために休日に実験の仕込みをすることも学生の判断で自由に行っており、学部生のころから研究に対して主体性を持って取り組んでいる様子が様々な場面で見受けられました。

松井ラボでは毎週火曜の10時からミーティングを行っており、この時進捗の報告や実験の方向性の相談を行うことで研究を推進していました。ミーティングの時間以外でも松井先生が部屋にいる時に自由に訪れてその都度相談することもできるため、研究で行き詰って一人で悩み続けるという恐れもなく、私自身も何度もご助言いただきました。ここでラボが入っているフロアの構造を簡単に説明すると、長い廊下を挟んで片側に教授、秘書の方の個室や会議室、学生たちがランチで利用する簡単なキッチンとテーブルがあるフリースペースが並び、もう片側がガラスで仕切られた実験スペースとなっています。ミーティングは主にフリースペースで行っており、設置されているホワイトボードや、実験室と廊下を隔てている磨りガラスにマーカーで図を描きながらディスカッションしていました。実験スペースはガラス扉で区切られてこそいますがフロア全体で繋がっており、ガラス扉を開けていくと端から端まで全てのラボを通過することが出来るため、いつでも議論ができるだけでなくそのフロアの実験装置を共有し、お互いに貸し借りしながら実験していました。また、同じ建物内のワイルコーネル医科大学の研究者とも、思い立ったらすぐにフロアを移動してディスカッションやサンプル解析の依頼に行くことも可能であり、共同研究をするための環境として整えられた意図がよくわかりました。実際に松井先生が共同研究を進める時のスピードは早く、実験の結果が出たらすぐに共同研究を行っているPIとディスカッションする様子を何度も見ました。このようなラボ間の活発な交流は建物内にとどまらず、ワイルコーネル医科大学の近隣にあるロックフェラー大学やハンター校まで実験装置を借りに行くためにサンプルが入っていると思われる発泡スチロールや小さなバケツを持った人が通りを歩く姿も見られました。

ニューヨークでの生活ですが、大学があり、セントラルパークやタイムズスクエア、ワールドトレードセンターなどが存在するマンハッタン島では、ルームシェアのアパートでも一か月の家賃が10万円以上と高額であったため、私が滞在先に選んだのはマンハッタン島の東に位置するクイーンズというエリアです。マンハッタンとはイーストリバーを挟んで向かい



に位置するこの地域には中国や韓国といったアジア系や、ギリシャ、スペインなどの様々な移民街が形成されており、マンハッタンより家賃も安く、日本人が多く住むエリアも存在します。私は中国系の移民が多く住む Elmhurst という駅から徒歩 10 分、バストイレキッチンを 4 人でシェアするアパートの一室を借りていました。ニューヨークの建物は築数十年、古いものでは築百年のものもあり、繰り返しリフォームすることで昔と同じ建物を活用しています。洗濯は基本的にコインランドリーを使うため、洗濯物を詰めた大きな袋を担いだ人が歩いている姿が日常風景でした。食に関しては近くのアジア系スーパーで中華料理の調味料だけでなく醤油やカップラーメン、日本のお菓子も売っており、マンハッタンのオーガニック専門スーパーと比べると野菜も安く、物価の高いニューヨークで問題なく自炊ができ、大変助かりました。少し歩けば公園や学校もあり、夜は道路沿いに八百屋の路面店や屋台が並ぶなど、暗くなっても人通りが多く治安に関しては問題なく過ごせました。

私が借りていたアパートからラボへの移動には地下鉄を利用していました。通勤だけでなく休日の観光の際にも大変お世話になった地下鉄ですが、やはり日本とは勝手が違うため、最初は大いに戸惑いました。時刻表がないため次の電車は何分後とだけ電光掲示板に表示されます。運行本数が多いのでそのうち慣れましたが、頻繁に起こる運休には最後まで苦勞しました。ニューヨークの建物同様、地下鉄も開通から 100 年以上が経過しているため平日でも夜から翌日の朝までメンテナンスのために運休することが多く、駅の張り紙やホームページで運行の予定を確認し忘れると、場合によってはバスやタクシーを利用しないと家に帰れなくなります。各駅停車の電車に乗っていたと思ったのに途中で急行に切り替わるというアナウンスが入り、アパートの最寄り駅を通り過ぎてしまったこともありました。このように一筋縄ではいかないニューヨークの地下鉄事情ですが、構内では時にパフォーマーが歌を歌い楽器を演奏し、遅れた電車を待つ間に音楽を楽しむこともあり、日本との違いを楽しみながら通勤していました。

私の滞在時期は、10 月のハロウィン、11 月のサンクスギビングデー、12 月のクリスマスと毎月イベントがあり、ニューヨークの街の雰囲気が変わっていく様子を楽しむことができました。残念なことにハロウィン当日にテロと思われる事件が起こり、改めて日本とは違う国にいることを思い起こされました。通常の海外旅行での注意事項と同じように夜遅くは歩き回らない、人通りの少ない道には行かないということに気を付けていれば、日常生活を送る上でニューヨークの治安に不安を覚えたことはなく、それだけにこのような事件が起こったことに私のような短期滞在者だけでなく同じフロアのラボメンバー達も驚いていたことが印象深いです。

こうした日々の生活での驚きや疑問、実験を進めるうえでの相談事などを実験室やランチの時にラボメンバーや松井先生と気軽に話すことが出来たおかげで、ニューヨークでの生活とラボでの研究生活に馴染むことが出来ました。大学の近くには屋台やカフェ、好きなおかずを詰められるデリ専門のお店が集まっているため、お昼ご飯にラボメンバーと何度も買い

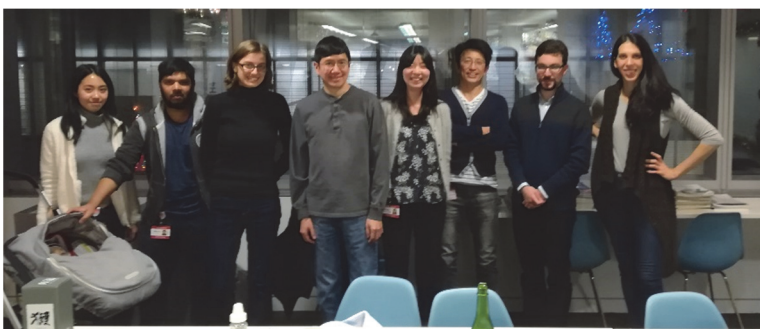
出しに行ったことが滞在中の良い思い出です。ラボメンバーも他のラボの学生たちもみな親切で、実験をするときには何度も助けてもらいました。今回の短期滞在での収穫の一つに彼らと知り合うことが出来たことがあり、これからも研究を通じて繋がる事が出来ればと考えています。

## 謝辞

本稿を執筆する機会を与えていただいた産業技術総合研究所 藤田聡史先生と、留学に際して多くの助言をいただいた産業技術総合研究所 中村史先生に御礼申し上げます。また、経済面でご支援いただいた未来価値創造実践人材育成コンソーシアムに御礼申し上げます。最後に二か月半私をラボの一員として研究室に受け入れてくださった松井教授とラボメンバーに深く感謝致します。



実験スペースとガラス面で仕切られたフリースペース。白い磨りガラス部分には、ディスカッションのために誰かが書き込んだ名残があります。毎年クリスマスが近づくとフロアのみんなでツリーを飾るそうです。



Farewell party で撮影したラボメンバーとの写真。右から3番目が松井教授、4番目が筆者。

山岸 彩奈 (やまぎし あやな)

産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門

セルメカニクス研究グループ 研究員

平成 23 年 3 月 東京農工大学 工学部 生命工学科 卒業

平成 25 年 3 月 東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻  
博士前期課程修了

平成 27 年 3 月 東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻  
博士後期課程修了 博士 (工学) 取得

平成 27 年 4 月 東京農工大学 産学官連携研究員

平成 28 年 2 月 産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門  
セルメカニクス研究グループ 産総研特別研究員

平成 30 年 1 月 現職



◆ 学会活動報告 ◆

第5回 バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム –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–

日本化学会バイオテクノロジー部会  
若手会幹事 齋藤真人  
(大阪大学大学院工学研究科)

日本化学会バイオテクノロジー部会若手の会・生体機能関連化学部会若手の会が主催した第5回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラムが、2017年9月6日(水)に東京大学理学系研究科化学講堂(招待講演)および山上会館(ポスター発表、懇親会)で開催されました。このフォーラムはその名の通り若手中心で運営しており、若手教員やポスドク研究員および特に学生にとってエンカレッジや交流、自由な議論や勉強の場となることを願いまして、非公式の勉強会という位置付で企画・開催しているものです。本年は、世話人として小松徹先生(代表、東京大学大学院薬学系研究科)、竹澤悠典先生(東京大学大学院理学系研究科)、後藤佑樹先生(東京大学大学院理学系研究科)、長門石曉先生(東京大学大学院工学系研究科)、細川正人先生(早稲田大学先進理工学部)、前田義昌先生(東京農工大学工学部)、正木慶昭先生(東京工業大学生命理工学院)が運営されました。

フォーラムは、招待講演とポスター発表から構成され、今回の招待講演者は下記に示すように分子、材料、計測、技術、医療応用など幅広い領域から相互刺激を期待して、各分野において顕著な成果をあげられている先生方に講演いただきました。

招待講演者(※50音順)

1. 「難治性疾患の治療/診断を指向した高分子集合体の創製」  
安楽 泰孝 先生 東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻
2. 「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」  
浅井 禎吾 先生 東京大学大学院総合文化研究科
3. 「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」  
小山内 崇 先生 明治大学農学部農芸化学科
4. 「原子分解能電子顕微鏡で明らかにする動的分子科学」  
原野 幸治 先生 東京大学総括プロジェクト機構・大学院理学系研究科
5. 「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」  
藤枝 俊宣 先生 早稲田大学高等研究所・JST さきがけ
6. 「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」  
布施 新一郎 先生 東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所

各講演では、基礎から応用までを幅広いご講演いただき、会場からも活発な議論が飛び交い

ました。また演者の先生から、学術的な成果のみならず研究の面白さや苦労話、失敗談など、学生に向けて研究の魅力をわかりやすく伝えていただいていたのが印象的でした。また、ポスター発表も68件ののぼり、山上会館において時間ギリギリまで活発な議論が行われていました。

本年度は、102名の事前参加登録に加え、当日参加の申し込みもいただき、最終的には一般44名、学生78名、計122名と多くの方にご参加いただけ盛会となりました。本会の運営と開催に関しまして、ご支援いただきました日本化学会バイオテクノロジー部会、生体機能関連化学部会、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、五稜化薬株式会社の各関係者の方々に心より御礼申し上げます。また、ご協力頂きました世話人の先生方、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。加えて、翌日のバイオ関連化学シンポジウムにおいては、学生ポスター賞の運営も若手の会において行いました。この場を借りて、運営に携われた先生方および審査員をお引き受けくださいました先生方に厚く御礼申し上げます。

次回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（代表世話人・大洞光司先生）で開催する予定です。来年度も皆さまのご支援ご協力を賜れますよう、どうぞよろしくお願い申し上げます。



若手フォーラムの講演風景



ポスター発表の様子



若手フォーラムの集合写真



◆ 研究会・国際会議から ◆

MIRAI セミナー 2017

早稲田大学 ナノ・ライフ創新研究機構 招聘研究員  
科学技術振興機構 さきがけ研究者  
細川正人

「MIRAI プロジェクト」はスウェーデンの 6 大学及び我が国の 11 大学の連携国際コンソーシアムが進める共同事業で、2016 年 10 月に始動しました。スウェーデンからは、チャルマース工科、リンショーピン、ルンド、ストックホルム、ヨーテボリ、ウプサラ、ウメオの 7 大学が参加し、日本からは、広島、北海道、九州、名古屋、上智、東京、東京工業、早稲田の 11 校が参加しています。本プロジェクトの目的は、スウェーデンと日本の共同研究を推進し、主に若手研究者の育成、交流と研究力の向上を促進するために多角的な事業を展開することです。2019 年までの 3 年間にわたり、Materials Science、Sustainability、Aging の 3 分野に焦点を当て、共同でのセミナーやワークショップ開催、研究者の交流プログラムおよび博士課程教育などが展開されることが計画されています。筆者は、早稲田大学の代表団の 1 人として、ルンド大学にて開催された第一回国際共同セミナーに参加する機会を得ました。

ルンドは、スウェーデン南部に位置する古都で、大学職員・学生が人口の 4 割を占める学園都市です。デンマークからのアクセスが便利で、コペンハーゲン空港から列車で海上を渡り、1 時間ほどでルンドに到着します。ルンド大学はスウェーデンで最古の大学とされ、歴史を感じさせる重厚な外観の建物と美しい景観の庭園が隣接していました。



ルンド大学本部の外観(左)と講堂(右)



今回の MIRAI セミナーは 2017 年 10 月 17 日から 19 日までの 3 日間にわたって開催され、170 名が両国から参加しました。初日の午前、白亜の重厚な建築が見事な大学本部の講堂内でセッションが行われました。ここでは、国際的な研究成果拡大に向けた政策、大型研究インフラの活用、研究資金提供機関のあり方について両国から紹介がなされ、パネルディスカッションが行われました。本邦からは Spring-8、J-Parc、JASRI などの国内外に開かれた共同利用施設の活用について、各所の所長/部長から説明がありました。その後は、Materials Science、Sustainability、Aging の 3 分野に分かれ、別会場にて、残りの 2.5 日間にわたってセッションごとに発表とグループディスカッションが行われました。

私は、このうち Aging のセッションに参加しましたが、この分野の特徴は、自然科学・医学を専門とする理系研究者と社会学者が同じセッションに参加していたことです。他の Materials Science、Sustainability のグループは比較的分野の近い理系研究者で構成されている一方で、本 aging 分野は非常に多様性に富んだグループ構成となっていました。本セッションでは、両国から参加した大学院生から若手研究者までが、高齢化社会に対するソリューションをテーマに、人口統計研究や医療保険制度など社会構造のあり方から、高齢者の脳活動や運動を支援するロボット、健康増進のための診断技術や基礎生物学研究など、非常に幅広い研究内容について、各々の研究を紹介しました。そのうち、4~6 人のグループに別れてグループセッションに移り、Aging の分野での異分野研究者間の課題共通理解が目指され、両国の社会制度の違いと双方の問題点の認識、その課題解決に向けたアプローチについて議論することがテーマに課されました。最終日に各グループから討論内容を発表し、約 30 名の参加者で議論を交わしました。全く異なる研究背景を持つ者が集まったため、互いの分野を理解することに長い時間が割かれていましたが、異なる視点から共通の課題を眺めている研究者と議論を交わすことで、自身の生み出そうとする科学技術が、実際に未来社会でどのように活用できるのかを考え直す良い機会となりました。また、研究内容を一般化した言葉でわかりやすく外国語で伝える難しさを感じながらも、異分野研究者とのコミュニケーションは新鮮であり、グループディスカッションは大いに盛り上がりました。

余談ですが、セミナー中のランチやディナーでは縦長の机に何十人も押し詰められ非常に身動きが取りづらい状況だったのですが、これは一人あたりのテーブル幅が狭いことで有名なノーベル賞の晩餐会に倣ったスウェーデン式なのだと説明がありました(会場手配のミスではないそうです)。このエピソードの真偽のほどは不明ですが、このような交流を目的としたセミナーに参加すること、異国の文化や新たな視点に触れることは、普段研究室での活動にて狭くなってしまいがちな視野を広げ、新しい視点を吸収することがつながるように思います。国際学会は自身の研究を発信する場として大変重要ですが、このような機会も大切にしていけることが重要かと思えます。

MIRAI セミナーは、次年度は日本で開催される予定で、再来年までセミナー・ワークショップが開催される予定です。国際的な共同研究の推進や SDGs への対応が求められる中、Materials Science、Sustainability、Aging の 3 分野を推進する本国際プロジェクトの役割

は大きくなっていくのではないかと考えられます。

未来

MIRAI



MIRAI プロジェクトロゴ(左)と MIRAI セミナー2017 参加者集合写真(右)

◆ 研究会・国際会議から ◆

## American Peptide Symposium 2017

東京大学大学院 工学系研究科 化学生命工学専攻  
林 剛介

ペプチド科学の国際会議は毎年世界各地で行われていますが、その中でも規模の大きな会議が2年に1度アメリカ(あるいはカナダ)で行われる American Peptide Symposium (APS) です。ヨーロッパでも同様の規模の会議として European Peptide Symposium (EPS) が APS とは年をずらして隔年で行われています。2017 年の APS はカナダ南西部のブリティッシュコロンビア州にある山間の町ウィスラーで 6 月 17~22 日の日程で開催されました。ウィスラーは州最大都市であるバンクーバーから車で 2 時間程度とアクセスがよいこともあり、冬は世界有数のスキーリゾートになりますが、APS が行われた初夏のウィスラーも大自然を背景にしたハイキングなどのアウトドア活動が楽しめるため、多くの人で賑わっていました。



学会会場近くのホテルからの展望

APS2017は Jonathan Lai 教授と John Vederas 教授が世話役を務められ、American Peptide Society によって運営されています。78 件の口頭発表と 259 件のポスター発表がありました。初日の最初に行われた Opening Lecture では、計算科学を用いて新たなタンパク質をデザインする研究で現在世界的に注目されている David Baker 教授が発表され、とても良い刺激を受けました。また、最終日最後の Closing Lecture では、ペプチドを連結する反応として最も汎用されている Native Chemical Ligation 反応を開発した Stephen Kent 教授がタンパク質化学合成の歴史と将来展望について講演され、タンパク質化学合成研究を推進している筆者としてはとても感慨深いものがありました。本シンポジウムで発表された内容は幅広く、ペプチドが関連する研究であれば化学的なものから細胞・個体生物学的な研究まで多岐にわたります。特に、ペプチド医薬に関する研究の割合がとても多い印象を受けました。医薬品候補となるペプチド原薬を見つける方法、そのペプチド分子を大量に純度よく合成する方法、ペプチドを細胞内や個体内で標的部位へデリバリー



David Baker 教授の講演

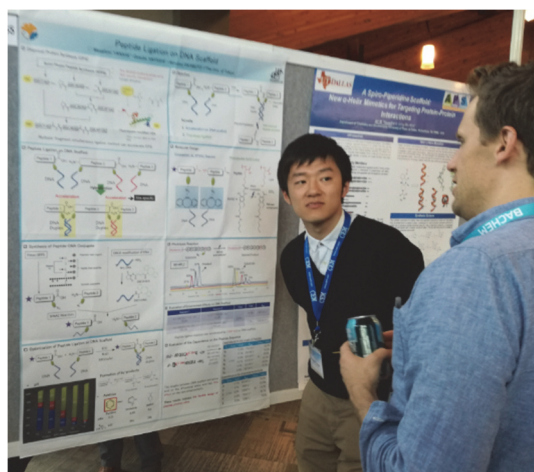
する方法について、いかに使える技術を開発するか、という点がペプチド研究でホットトピックなのだと感じました。

日本からも 30 人以上の参加があり、アカデミックだけでなく企業の方の参加も多く見られました。口頭発表では、筆者の恩師の一人でもある東京大学の菅裕明先生が「**The RaPID Discovery of Pseudo-Natural Peptides**」というタイトルで菅研独自のペプチドスクリーニングシステムについての成果を、また徳島大学から大高章先生が「**Application of N-Sulfanylethylanilide (SEAlide) Unit to Protein Chemical Synthesis and Protein Enrichment**」というタイトルで、大高研オリジナルのチオエステル合成法を用いたタンパク質化学合成やその応用研究についての成果を発表されました。ポスター発表では、日本のペプチド研究を牽引する著名な先生達が発表されている姿が印象的で、「これだけ有名な先生達を口頭発表にしないのはもったいない。やはり APS はアメリカ人最良なんだな」と感じたのを覚えています。

我々の研究室からは博士過程の学生 2 人と私の 3 人で参加し、新たなペプチド連結法やタンパク質やペプチドの修飾法、化学合成タンパク質を用いたエピジェネティクス解析法についての研究成果をポスター発表しました。幸運な事に D3 の学生の末岡拓馬君が **Young Investigator Poster Competition Award** を日本人で唯一受賞することができました。筆者らの研究室では、ペプチド・

タンパク質研究に本格的に取り組み始めたのが約 5 年前だったこともあり、APS や EPS はこれまで参加した事がなかったのですが、初めて参加した学会で新参者に賞を頂けて非常に嬉しかったことを覚えています。また、日本のペプチド研究のスター研究者の先生達と本学会を通して仲良くさせてもらったことがとてもありがたく、大きな収穫でもありました。

最後になりますが、2018 年はアイルランドのダブリンで行われる EPS だけでなく、3 年に一度行われる **International Peptide Symposium (IPS)** が京都大学の二木史朗先生と松崎勝己先生の世話役のもとロームシアター京都で行われます (<http://www.aeplan.co.jp/10thips/index.html>)。世界中のペプチド研究者達が日本で一堂に会する希有な機会ですので、今熱いペプチド研究の世界に興味のある方はぜひ参加されてみてはいかがでしょうか？



ポスター発表する D2 の梁瀬将史君



受賞した D3 の末岡拓馬君と筆者



## ◆編集後記◆

本号よりニュースレター編集担当をさせて頂く、産業技術総合研究所の藤田聡史です。以後、よろしくお願い申し上げます。

バイオテクノロジー部会は、1995年に発足した生物工学研究会を前身として、1997年に発足した研究部会ですが、昨年が丁度20年の節目となりました。そのような経緯から「巻頭言」では、元バイオテクノロジー部会長で長年部会に貢献を賜りました、東京工業大学の中村聡先生にご執筆を頂き、20年前の部会発足の経緯をご紹介頂きながら、今後の部会の在り方について、提言を頂きました。「先端研究ウォッチング」には、神戸大学の竹内俊文先生にご寄稿頂きました。先生のライフワークである分子インプリンティングについて、歴史的経緯から最新の研究まで非常に分かり易く解説頂きました。「若手研究者からのメッセージ」には、バイオ関連シンポジウムで講演賞を受賞された東京大学・梅澤先生、京都大学・田村先生、岐阜薬科大学・平山先生からご寄稿を頂きました。研究の試行錯誤、その中で得た先生方の研究ポリシーを示して頂いています。ニューヨーク市立大学ハンター校の山岸先生は、原稿を依頼させて頂いた時期に研究留学をされていた事から、「海外の研究室から」にホットな話題を提供頂きました。「学会活動報告」には、バイオテクノロジー部会若手の会の幹事を頂いている大阪大学の斎藤先生に若手フォーラムの活況をご紹介頂きました。早稲田大学の細川先生、東京大学の林先生には、「研究会・国際会議から」にご寄稿頂きました。それぞれの分野において、日本の研究者がプレゼンスを示して行くにはどうすればよいのかを考えさせる内容となっています。

次号は、Vol.22, No.1は8月1日の発行を目指して、編集を進める予定です。最後になりましたが、年末年始の大変お忙しい時期にも関わらず、先生方には執筆を賜り、渾身の原稿を頂いた旨、深く感謝申し上げます。

NEWS LETTER Vol. 21, No.2 2018年2月1日発行

事務局：〒101-8307 東京都千代田区神田駿河台1-5, 日本化学会バイオテクノロジー部会

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