



# DOJIN NEWS

2015 No.154  
ISSN 0385-1516

ドージンニュース

## CONTENTS

### ●Review

超分子形成を利用した多点認識型分子認識  
システムの開発

上智大学理工学部 土戸 優志 早下 隆士

### 連載

界面活性剤による膜タンパク質 X 線結晶構  
造の分解能向上

大阪大学大学院薬学研究所 青山 浩

### ●Topics on Chemistry

ホスフィンを利用した新しいニトロキシル  
(HNO) 検出用蛍光プローブ

株式会社同仁化学研究所 立中 佑希



表紙撮影：人吉市の西人吉駅手前  
photo：永島俊介氏

## CONTENTS

### Review

超分子形成を利用した多点認識型分子認識システムの開発 ●—— [1]

上智大学理工学部 土戸 優志 早下 隆士

### 連載

界面活性剤による膜タンパク質 X 線結晶構造の分解能向上 ●—— [7]

大阪大学大学院薬学研究科 青山 浩

### Topics on Chemistry

ホスフィンを利用した新しいニトロキシル(HNO)検出用蛍光プローブ ●—— [12]

株式会社同仁化学研究所 立中 佑希

### Commercial

#### 新製品

LDH 活性測定キット ●—— [6]

加水分解性徐放型硫化水素ドナー ●—— [13]

還元物質応答性硫化水素ドナー ●—— [14]

#### 関連製品

膜タンパク質可溶化剤 ●—— [11]

その他テタージェント ●—— [11]

生細胞数測定キット ●—— [6]

### お知らせ

パンフレットのご案内 ●—— [6]

※希望納入価格には消費税等は含まれておりません。

## 新製品案内

\*容量・価格等の詳細は各ページをご覧ください。

### LDH 活性測定キット

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST

### 生体硫黄研究用ドナー類

#### 加水分解性徐放型硫化水素ドナー

-SulfoBiotics- GYY4137

#### 還元物質応答性硫化水素ドナー

-SulfoBiotics- H<sub>2</sub>S donor 5a

-SulfoBiotics- H<sub>2</sub>S donor 8I

-SulfoBiotics- H<sub>2</sub>S donor 8o

## 超分子形成を利用した多点認識型分子認識システムの開発

### Development of multipoint molecular recognition systems based on supramolecular formation



土戸 優志

上智大学理工学部 特別研究員



早下 隆士

上智大学 学長  
上智大学理工学部物質生命理工学科  
教授

#### Abstract

Multipoint recognition is an important strategy which is widely used in biological systems for enhancing binding affinity and selectivity. By mimicking these recognition systems, many researchers have attracted much attention for the design of artificial supramolecular systems over the last several years. In this review, we described the development of supramolecular sensor based on the multipoint molecular recognitions. Several design concepts of molecular recognition systems based on (1)self-assembly of amphiphilic probes, (2)molecular recognition probes/cyclodextrin complexes, (3) molecular recognition probes/dendrimer complexes, and (4) molecular recognition moieties-modified linear polymer have been reviewed. These bio-inspired molecular recognition systems based on the formation of supramolecular complexes are expected for the development of novel nanomaterials or functional materials.

#### 1. はじめに

生命において重要な役割を担っている生体内の分子は、きわめて精緻で巧妙に機能している。生体内の分子はその動きを共同的に調節したり（フィードバック調節）、生体内の小分子が自己組織的に複合体を形成して機能を発現したりすることで、生命の維持を行っている。例えば、タンパク質は疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸から構成されている、両親媒性の高分子である。その構成比率は通常の水溶性タンパク質ではほぼ等量であり、膜タンパク質では疎水性アミノ酸の割合が高い。タンパク質は、水中においてポリペプチド中の疎水性残基が「のり」の役割を果たし、その疎水性会合力により疎水面を内核として球状の形態をとる。他にも、酵素や抗体、DNA や RNA などの多種多様な分子が生体内で自己組織的に高次構造を形成して複雑な機能を発現している<sup>1)</sup>。このように、生命の長い進化の過程において築きあげられてきた巧妙な生体機能に倣って、人工系の合成分子によって高次構造形成やその機能を実現するだけでなく、それを凌駕する分子の設計・開発が数多くの研究者によって進められている。

生命においては、方向性を有する結合である水素結合が高度な分子認識の発現に大きく関与している。生体内では周囲が水で覆われた親水的な環境下でありながら、分子認識や自己組織化を起こす部位が疎水的な場におかれるよう、巧妙な分子設計がなされている。タンパク質の一種である酵素は特定の基質と反応する酵素活性部位を持つが、その基質の分子認識場である活性部位の多くが疎水場に存在している。このように、高度な分子認識を実現するにおいて分子認識に適した場を形成することが重要である。人工系においても、ターゲットとなる特定のタンパク質を認識できる合成分子の開発が進められてきた。その代表的な例が医薬品であり、ターゲットとなるタンパク質に応じて分子認識部位を精密に分子設計して作られている<sup>2)</sup>。しかし、より低分子量の分子をターゲットとした分子認識に目を向けると、従来型の人工系の合成分子は有機溶媒中では高い分子認識能を持つものの、極性溶媒である水中では分子の相互作用が打ち消されるために有効に機能しない場合が多い。例えば、クラウンエーテルは有機溶媒中に

おいてその環サイズに応じて特定のアルカリ金属イオンと選択的に結合を形成するが、水中ではその結合定数は非常に小さい<sup>3)</sup>。また、多くの有機分子は疎水性が高いものが多いために、水への溶解性が課題となっている。

その一方、比較的単純な構造の分子同士を組み合わせた超分子型の分子認識プローブが近年注目を集めている。超分子型の分子認識プローブは、①合成が比較的容易で低コストである、②分子認識部位を持つ分子を複数組み合わせることで多点での分子認識が期待できる、③外部環境に応じた分子構造の変化によって分子認識能を制御できる、などの利点があげられる。筆者らのグループでは、従来の1:1型の相互作用に基づく分子設計では得られない多様な分子認識機能を有する、超分子複合体形成を利用した分子認識システムの開発を進めている<sup>4)</sup>。本稿では、近年の超分子複合体形成を利用した分子認識系について、筆者らの研究を中心に紹介する。

#### 2. 自己会合形成を利用した分子認識システム

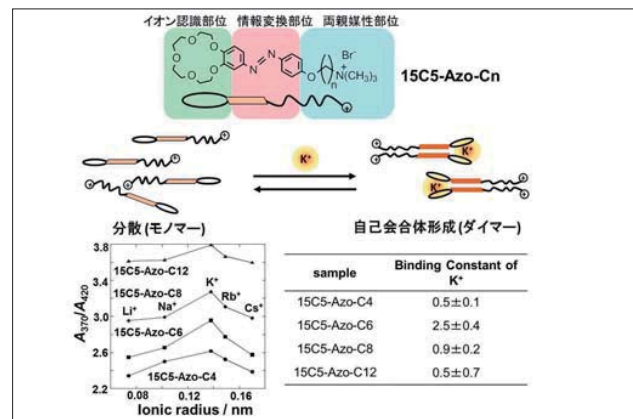


図1 15C5-Azo-Cnの自己会合形成によるアルカリ金属イオン認識<sup>5), 6)</sup>

親水性部位と疎水性部位を分子内に併せ持つ両親媒性分子は、臨界ミセル濃度を超えると分子同士が自己会合し、ミセル形成することが知られている。臨界ミセル濃度は両親媒性分子の親水性部位と疎水性部位のバランス (Hydrophile-Lipophile Balance, HLB) によって決まる。筆者らは、HLB を分子認識などの外部刺激によって変化させ、分子認識に伴って生じる自己会合状態の変化を光学的情報で検出することのできる両親媒性分子の開発を行った。図1に開発したクラウンエーテル型両親媒性アゾプロブ (15C5-Azo-Cn) の基本骨格を示した<sup>5), 6)</sup>。親水性部位として四級アンモニウム、疎水性部位として直鎖状アルキル鎖および光情報変換部位であるアゾベンゼン、末端にアルカリ金属イオン認識部位であるクラウンエーテル骨格 (ベンゾ-15-クラウン-5) を導入した。アゾベンゼンは紫外光照射によって  $\pi$ - $\pi^*$  遷移に由来する 350 nm 付近の吸収が大きく減少するが、アゾベンゼンが会合すると、励起子相互作用によって、分子同士が積み重なった状態 (H 会合) では短波長シフト、ずれて配置された状態 (J 会合) では長波長シフトを示すことが知られている<sup>7)</sup>。15C5-Azo-Cn に、種々のアルカリ金属イオンを添加したときのイオン選択性について吸光度比 ( $A_{370}/A_{420}$ ) をとって検討したところ、15-クラウン-5 と 1:1 錯体を形成することで知られる  $\text{Na}^+$  イオンよりも、イオン半径の大きな  $\text{K}^+$  イオンを添加した系において、より大きな吸光度変化および短波長シフトが見られた。これは、 $\text{K}^+$  イオンによってサンドイッチ型の二量体形成による会合が促進されたためであると考えられる。また、その会合応答はアルキル鎖長に依存し、 $n=6$  の場合に最も高い  $\text{K}^+$  イオン選択性が得られた。水中において金属イオンの配位結合に誘起された会合を形成するには、会合力を高めるために適当な長さのアルキル鎖が必要であるが、長すぎるとアルキル鎖の疎水性相互作用によって金属イオンがない条件でも自己会合がおこるため、金属イオンに対する認識能は低下することがわかる。以上より、アルカリ金属イオンを認識することでプローブ分子が単分子の状態から二量体を形成し、吸収スペクトルの変化として観察することができた。この会合形成にはアルキル鎖長の長さ、つまり疎水性部位における疎水性相互作用の強さを制御することが重要であることを明らかにした。従来、水中でのアルカリ金属イオン認識は難しいとされてきたが、イオン認識に伴う会合形成の制御によって実現できる点が興味深い。

### 3. シクロデキストリンを用いた分子認識システム

シクロデキストリン (cyclodextrin, CyD) は、グルコース分子同士が  $\alpha$ -1,4 グリコシド結合で結合している環状のオリゴ糖であり、その環を形成するグルコース分子数に応じて、 $\alpha$ -CyD (6 個)、 $\beta$ -CyD (7 個)、 $\gamma$ -CyD (8 個) の 3 種類が知られている。CyD は環の内部が疎水場であるため、有機分子を疎水性相互作用により包接し、安定化することができる。この性質を利用して、これまでに食品や化粧品、医薬品分野への応用が進んでいる。そこで筆者らは、CyD の疎水場に着目し、ここに種々の分子認識プローブを包接させ超分子複合体を形成させることにより、新しい機能が発現することを報告している。

前述した系と同様に認識部位にベンゾ-15-クラウン-5 を用いた蛍光型のプローブ (15C5-C3Py) を設計した (図2)<sup>8), 9)</sup>。15C5-C3Py は有機溶媒中ではその環サイズに対応して 1:1 型錯体を形成する  $\text{Na}^+$  イオンに選択性を示すが、水中では、 $\gamma$ -CyD 存在下  $\text{K}^+$  の添加によってピレンのモノマー蛍光が消光し、長波長側で新たにブロードな蛍光を生じる。これは 15C5-C3Py が  $\gamma$ -CyD に

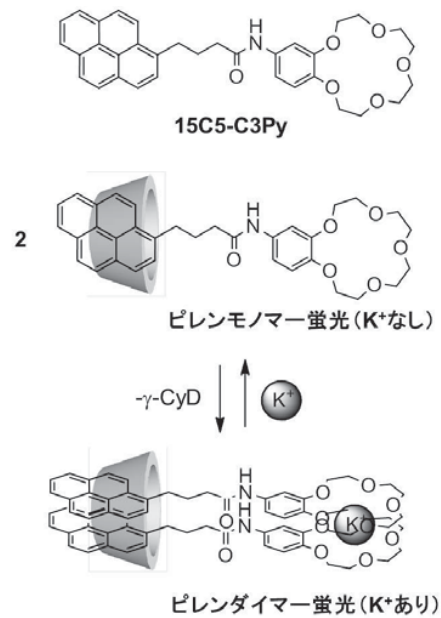


図2 クラウンエーテル型蛍光プローブ/ $\gamma$ -CyD 複合体<sup>8), 9)</sup>

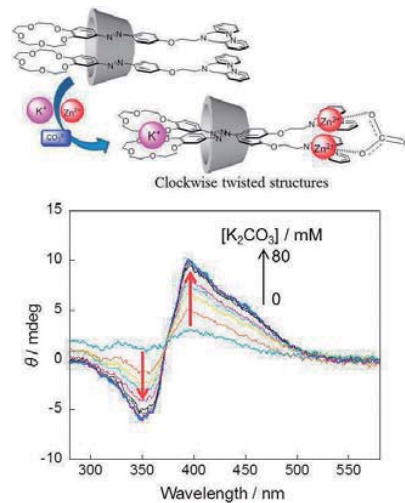


図3 ジトピック型アゾプローブによる多点分子認識<sup>10)</sup>

包接されて  $\text{K}^+$  イオンを認識してサンドイッチ型の二量体を形成したことで生じたダイマー蛍光であり、水中で  $\text{K}^+$  イオンのみを高感度に検出できることを明らかにした。

また、ベンゾ-15-クラウン-5 およびジピコリルアミノ基の 2 つの異なる分子認識サイトを 1 分子の両末端に有するジトピック型のアゾプローブ (15C5-Azo-dpa) を設計した (図3)<sup>10)</sup>。15C5-Azo-dpa は、水中において  $\gamma$ -CyD に 2 分子包接された (15C5-Azo-dpa)<sub>2</sub>/ $\gamma$ -CyD 複合体となることが Job plot による包接比の算出より確認している。興味深いことに、この複合体は、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$  または  $\text{CH}_3\text{CO}_2^-$  が存在している時のみ、二量体ねじ

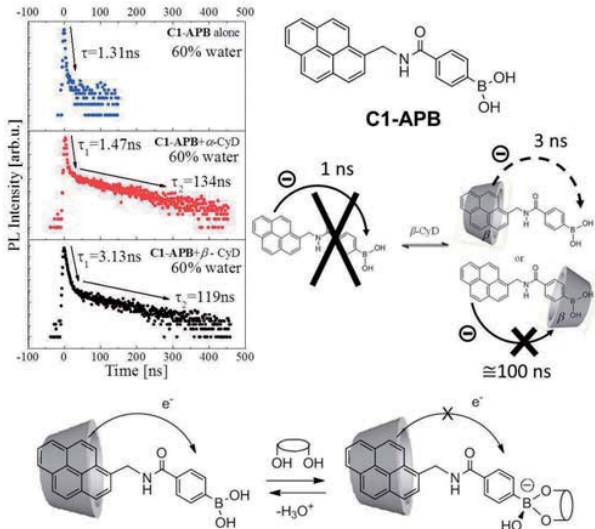


図4 C1-APB/ $\beta$ -CyD 複合体が示す糖認識機能<sup>11), 12)</sup>

れ構造をとることがICDスペクトルおよびNOESY測定により明らかになった。特に、 $\text{CO}_3^{2-}$ 架橋によって大きなねじれ構造を生じて、スプリット型の顕著な誘起円二色性が現れる。このように、分子認識プローブとCyDを組み合わせた超分子複合体は、多点で分子を認識することによって、分子の空間配置を制御することができ、多様な分子構造をとり得る。この包接構造変化を光情報として取り出すことで、多様な応答機能を有する化学センサーの開発が期待できる。

次に、糖の検出を目的として、分子認識部位をクラウンエーテルからフェニルボロン酸に変えた分子認識プローブ(C1-APB)を設計した(図4)<sup>11)</sup>。フェニルボロン酸は、糖分子などのシスジオールを有する化合物と可逆的な環状エステルを形成することが広く知られている。一般的に、フェニルボロン酸はフルクトース選択性であるが、周囲の環境を変化させることで、その選択性を

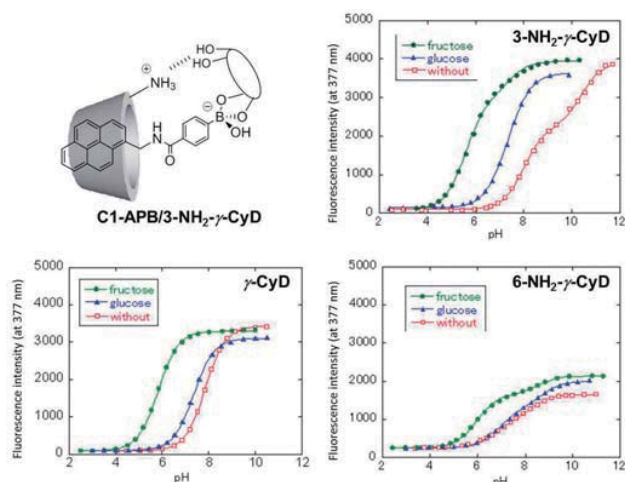


図5 C1-APB/ $3\text{-NH}_2\text{-}\gamma\text{-CyD}$  複合体によるグルコースの多点認識<sup>13)</sup>

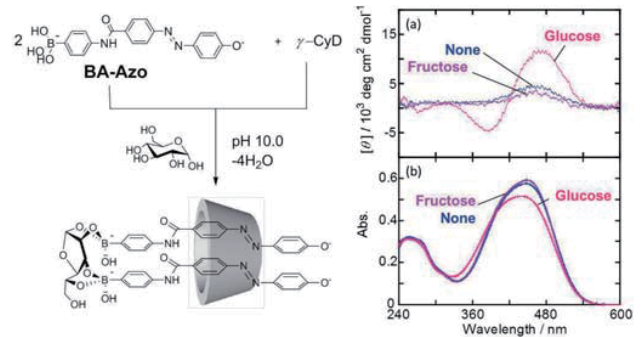


図6 BA-Azo/ $\gamma$ -CyD 複合体が示すグルコース認識機能<sup>14)</sup>

制御できる。まず初めに、C1-APBとCyDとの超分子複合体形成について検討したところ、C1-APBは単独では水中で自己会合してほとんど蛍光を発しないが、 $\beta$ -CyDを添加すると、水中でもピレン由来のモノマー蛍光が著しく増加した。C1-APBとCyDの包接挙動について光誘起電子移動(PET)の緩和時間を調べたところ、C1-APB単独や $\alpha$ -CyD共存下に比べて $\beta$ -CyD共存下でのみ、緩和時間が2~3倍長くなった<sup>12)</sup>。これは、C1-APBのピレン部位が $\beta$ -CyDに包接されて超分子複合体を形成していることを示している。C1-APBと $\beta$ -CyDとの超分子複合体形成によってC1-APBの水中での自己会合が抑制されたことに加えて、ピレン周囲の環境が疎水場におかれて水による消光が抑えられたことで、モノマー蛍光が増加することが明らかになった。このC1-APB/ $\beta$ -CyD複合体の糖応答挙動について評価すると、フルクトース存在下では $\text{pK}_a$ の値が7.95から6.06へとシフトした。この $\text{pK}_a$ の低下により、中性条件下において糖の添加による蛍光強度の増加が見られ、興味深いことにC1-APB/ $\beta$ -CyD複合体では、ピレン蛍光団が電子供与体、フェニルボロン酸が電子受容体となっている。C1-APB/ $\beta$ -CyD複合体は中性条件下、糖が存在しない状態ではピレン蛍光団から酸型(中性型)のフェニルボロン酸受容体へのPETにより消光しているが、糖とフェニルボロン酸のエステル形成によって電子受容性が減少し、PETに基づく消光が阻害されたことで、蛍光が回復する応答機構になっている。

さらに、C1-APBと $\gamma$ -CyDの二級水酸基側の3位をアミノ化した $3\text{-NH}_2\text{-}\gamma\text{-CyD}$ を用いてその糖認識機能について評価したところ、興味深いことにC1-APB/ $3\text{-NH}_2\text{-}\gamma\text{-CyD}$ 複合体はグルコースに高い選択性を示すことを明らかにした(図5)<sup>13)</sup>。C1-APB/ $3\text{-NH}_2\text{-}\gamma\text{-CyD}$ 複合体のグルコース認識機能を解明するために、 $\gamma$ -CyDの一級水酸基側の6位をアミノ化した $6\text{-NH}_2\text{-}\gamma\text{-CyD}$ について同様に糖認識機能の評価を行ったところ、アミノ化していない $\gamma$ -CyDと応答がほぼ一致した。これらの結果より、C1-APBの糖認識部位であるフェニルボロン酸部位は $\beta$ -CyDの時と同様に6位の一級水酸基側ではなく、3位の二級水酸基側にあることがわかる。このことから、フェニルボロン酸と糖の結合形成に加えて糖と $3\text{-NH}_2\text{-}\gamma\text{-CyD}$ のアミノ基との間に静電相互作用が働き、多点で相互作用することによってグルコースを認識していると考えられる。

一方、図6のようなBA-Azoを $\gamma$ -CyDに包接させたBA-Azo/ $\gamma$ -CyD超分子複合体の糖応答挙動について調べたところ、グルコース存在下でICDスペクトルに包接構造変化による $\pi\text{-}\pi^*$ 遷

移由来のスプリット型コトロン効果が観測され、紫外可視吸収スペクトルにおいても、グルコース存在下で極大波長の短波長シフトが観測された<sup>14)</sup>。BA-Azo の  $\gamma$ -CyD への包接挙動を調べたところ、BA-Azo は  $\gamma$ -CyD に 2 分子包接され、BA-Azo 同士が平行配置でダイマー形成した際のアゾ官能基間の励起子相互作用に起因する超分子応答を示していることが明らかになった。このことから、 $\gamma$ -CyD に包接された 2 分子の BA-Azo でグルコースを認識していることが分かった。以上のように、分子認識プローブを超分子 CyD 複合体として多点認識させることによって、糖応答の選択性を容易に制御できる。

#### 4. デンドリマーを用いた分子認識システム

デンドリマーは規則的に分岐を繰り返す樹木状の高分子である。このような特徴的な構造を有することから、デンドリマーは次に示すような他の高分子には見られない種々の特徴を持つ。①高分子にもかかわらず、分子量分布が非常に狭い、均一な分子量を持つ分子である。②末端に反応性の官能基を多数有していることから、デンドリマー末端を修飾することで多点認識機能を持った化学センサーの設計が期待できる。そこで、デンドリマー末端にアミノ基を有するポリアミドアミン (polyamidoamine, PAMAM) デンドリマー表面に、結合部位としてカルボン酸基、分子認識部位としてフェニルボロン酸を有する還元活性ルテニウム錯体  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{acac})_2(4\text{-Bpy})(4\text{-Cpy})]$  (Hacac: acetylacetonate, 4-Bpy: 4-boronic pyridine, 4-Cpy: 4-carboxylic pyridine) を静電相互作用により集積させ、糖の電気化学的検出を行った (図 7)<sup>15)</sup>。糖認識機能の評価には、高い電流感度と電位検出能を有する微分パルスボルタンメトリー (DPV) 法を用いている。フルクトースを  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{acac})_2(4\text{-Bpy})(4\text{-Cpy})]/\text{PAMAM-G2}$  溶液に添加した時、元の  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{acac})_2(4\text{-Bpy})(4\text{-Cpy})]/\text{PAMAM-G2}$  の波の負電位側に新たなピークが生じる。グルコースやガラクトースを添加した時には電位シフトは小さく、電位シフトを見ることによって選択的にフルクトースを検出できる。また、PAMAM デンドリマーの世代を変えて同様の測定を行ったところ、世代の低い方が糖に対する

応答能が高くなった。これは用いた錯体がシス型で、糖の認識部位であるフェニルボロン酸が PAMAM デンドリマーの内側に向いているため、ターゲットである糖分子がボロン酸部位に近接できる程度の間隔が必要であることを示している。

また、筆者らはデンドリマー表面上へアニオン性のフェニルボロン酸を集積させた化学センサーの開発も行っている<sup>16)</sup>。分子認識部位にフェニルボロン酸基を持つアゾプローブ (1-BAzo-NP) を合成し、中性条件下において PAMAM デンドリマーの表面に静電的に自己集積させた超分子複合体である (図 8)。1-BAzo-NP はリン酸バッファー中、中性条件下においてフルクトース、グルコースやガラクトースには殆ど応答を示さない。しかし、この溶液中に PAMAM デンドリマー第 4 世代 (PAMAM-G4) を添加すると、PAMAM デンドリマー表面に 1-BAzo-NP が集積し、特異な糖応答機能が現れる。例えば、1-BAzo-NP/PAMAM-G4 複合体は、グルコースに反応して凝集体を形成した。この凝集体形成は長波長側の吸光度変化 (濁度) の測定で評価できる。1-BAzo-NP を PAMAM-G4 デンドリマーの表面上に最密に自己集積させた時に、この濁度が最も高くなることが明らかになった。加えて、PAMAM デンドリマーの世代を第 3 世代から第 5 世代まで変化させて同様の測定を行ったところ、応答する単糖の種類が PAMAM デンドリマーの世代数に応じて変化した。興味深いことに、1-BAzo-NP/PAMAM-G5 では、ガラクトース選択的な応答が起こる。これらの結果は、PAMAM デンドリマー表面における 1-BAzo-NP の集積密度を制御することによって、糖認識選択性も制御できることを示している。

さらに筆者らは、カルボン酸末端を有するフェニルボロン酸型アゾプローブ (B-Azo-Cb) と PAMAM デンドリマー末端のアミノ基を化学結合によって結合させた B-Azo-Cb/PAMAM 複合体も設計した (図 9)<sup>17)</sup>。この B-Azo-Cb/PAMAM 複合体を包埋した酢酸セルロース薄膜を作製し、種々の糖の輸送能を調べたところ、B-Azo-Cb/PAMAM 複合体を酢酸セルロース薄膜に包埋した時の糖の輸送能は、溶液中での B-Azo-Cb/PAMAM 複合体の糖選択性と一致した。これは、フェニルボロン酸を介した固定膜型の糖輸

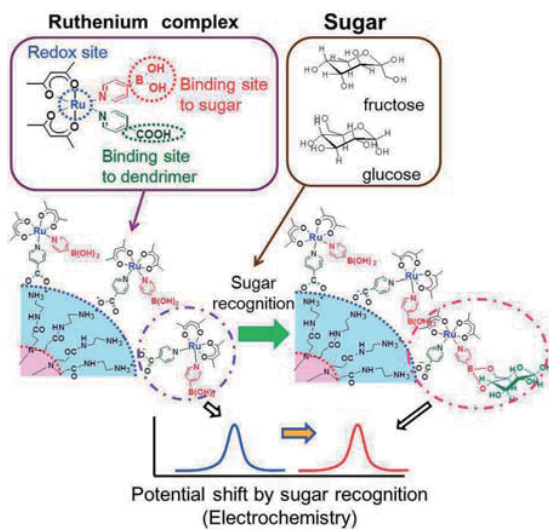


図 7 フェニルボロン酸ルテニウム錯体/デンドリマー複合体を用いた電気化学的糖認識<sup>15)</sup>

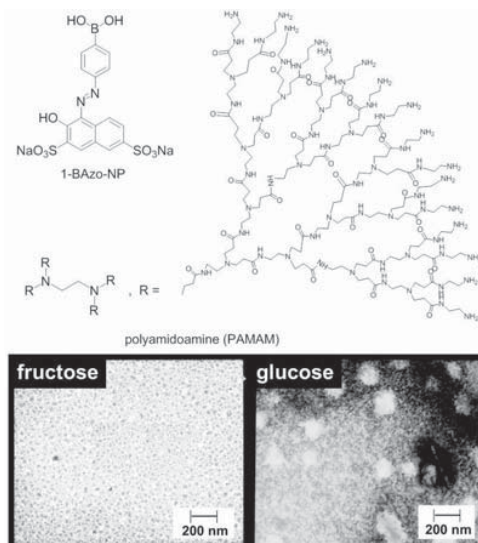


図 8 フェニルボロン酸アゾプローブ/デンドリマー複合体が示すグルコース認識機能<sup>16)</sup>

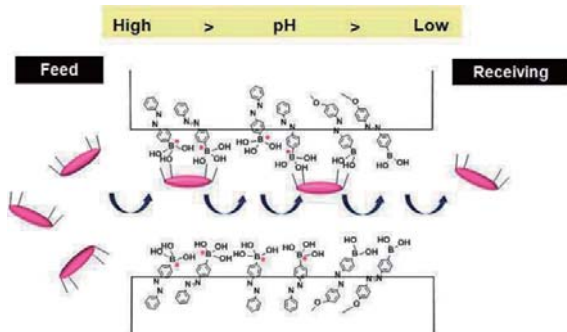


図9 フェニルボロン酸修飾 dendrimer 複合体包埋薄膜による糖の分離<sup>17)</sup>

送が起きていることを示している。また、フェニルボロン酸型アゾプローブを静電的に PAMAM dendrimer 表面に自己集積させた際の結果と同様に、用いた PAMAM dendrimer の世代によって糖の輸送能に違いが現れることも明らかにしている。これらの結果は、フェニルボロン酸型プローブ/PAMAM 複合体を用いて、その dendrimer の世代数やフェニルボロン酸型プローブの修飾密度制御によって、糖の選択的な検出や分離への応用の可能性を示したものである。

### 5. 直鎖状ポリマーを用いたマクロな分子認識システム

多点相互作用は天然の系において結合の親和性や選択性を高めるためによく用いられている戦略である。このような生命の系に倣った、人工系において多点の弱い相互作用を組み合わせたバイオインスパイアードシステムの開発が進んでいる。序論にて述べたようなタンパク質の高次構造形成に倣って分子設計されているものに「ナノゲル」がある。ナノゲルは多糖などの直鎖状の親水性高分子に疎水基や機能性官能基を側鎖に少数導入した分子からなり、その側鎖を架橋点にして自己組織的にネットワーク化することで、粒径数十 nm のナノ粒子を形成する。筆者らは、多糖の側鎖にビタミン B<sub>6</sub> をわずかに修飾したビタミン B<sub>6</sub> 置換多糖を設計した (図 10)<sup>18), 19)</sup>。このビタミン B<sub>6</sub> 置換多糖を用い、中性条件下においてビタミン B<sub>6</sub> のアルデヒド基とタンパク質中のアミノ基とを Schiff 塩基形成させることによって、タンパク質を架橋点としたタンパク質架橋ナノゲルを開発した。ビタミン B<sub>6</sub> に亜鉛イオンを配位させ、Schiff 塩基形成を促進することでカチオン性/アニオン性タンパク質のいずれともナノゲルを形成することができる。また、興味深いことに、このタンパク質架橋ナノゲルは元のタンパク質の高次構造を保持しており、ナノゲルへの官能基修飾によって細胞内導入効率も向上し得ることから、タンパク質デリバリーキャリアとしての応用展開が期待されている。

### 6. おわりに

本稿では、超分子複合体形成を利用した多点分子認識システムについて、筆者らの研究を中心にまとめた。現在、超分子複合体形成による分子認識を利用して、金属イオンや生体分子の選択的な検出・分離システムの開発や、病原性細菌のようなマクロな系の簡易・迅速な検出法の開発を進めている。初めに述べたように、ある分子が他の分子を 1 : 1 で認識して応答する比較的単純な系に基づくホスト・ゲスト化学や分子認識化学から、生命が進化の

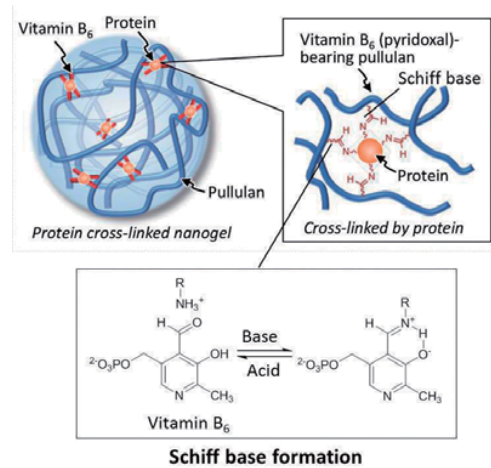


図10 自己組織化によるナノゲル形成<sup>18), 19)</sup>

過程で創り出した、高度で緻密な多点認識型の分子認識系を人工的な系で構築し、それを凌駕する機能を創成することがこれからの課題であると考えられる。このような生命のしくみに倣ったバイオインスパイアードシステム、すなわち多点認識型の分子認識システム開発を進めていくことが、次世代のナノマテリアルや機能性材料の開発を行っていく上で益々重要になるとと思われる。

#### [参考文献]

- 1) G. M. Whitesides, J. P. Mathias and C. T. Seto, *Science*, **1991**, 254, 1312-1319.
- 2) D. B. Kitchen, H. Decornez, J. R. Furr and J. Bajorath, *J. Nat. Rev. Drug Discov.*, **2004**, 3, 935-949.
- 3) R. M. Izatt, K. Pawlak, J. S. Bradshaw and R. L. Bruening, *Chem. Rev.*, **1991**, 91, 1721-2085.
- 4) H. Kobayashi, T. Hashimoto and T. Hayashita, "Synergy in Supramolecular Chemistry", *CRC Press*, **2014**, 235-246.
- 5) F. Sato, K. Sakamoto, W. Umemoto, T. Hashimoto and T. Hayashita, *Chem. Lett.*, **2007**, 36(7), 880-881.
- 6) F. Sato, M. Tsukano, K. Sakamoto, W. Umemoto, T. Hashimoto and T. Hayashita, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2008**, 81(12), 1589-1594.
- 7) M. Kasha, H. R. Rawls and A. El-Bayoumi, *Pure Appl. Chem.*, **1965**, 11, 371-392.
- 8) A. Yamauchi, T. Hayashita, A. Kato, S. Nishizawa, M. Watanabe and N. Teramae, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 5841-5846.
- 9) A. Yamauchi, T. Hayashita, S. Nishizawa, M. Watanabe and N. Teramae, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 2319-2320.
- 10) K. Nonaka, M. Yamaguchi, M. Yasui, S. Fujiwara, T. Hashimoto and T. Hayashita, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 10059-10061.
- 11) A.-J. Tong, A. Yamauchi, T. Hayashita, Z. Zhang, B. D. Smith and N. Teramae, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 1530-1536.
- 12) H. Kano, D. Tanoue, H. Shimaoka, K. Katano, T. Hashimoto, H. Kunugita, S. Nanbu, T. Hayashita and K. Ema, *Anal. Sci.*, **2014**, 30(6), 643-648.
- 13) M. Kumai, S. Kozuka, T. Hashimoto and T. Hayashita, *J. Ion Exch.*, **2010**, 21(3), 249-254.
- 14) C. Shimpuku, R. Ozawa, A. Sasaki, F. Sato, T. Hashimoto, A. Yamauchi, I. Suzuki and T. Hayashita, *Chem. Commun.*, **2009**, 13, 1709-1710.
- 15) A. Endo, H. Minesaka, T. Hashimoto and T. Hayashita, *Anal. Methods*, **2012**, 4, 2657-2660.
- 16) Y. Tsuchido, Y. Sakai, K. Aimu, T. Hashimoto, K. Akiyoshi and T. Hayashita, *New J. Chem.*, **2015**, 39, 2620-2626.

- 17) Y. Tsuchido, K. Aimu, Y. Toda, T. Hashimoto and T. Hayashita, *J. Ion Exch.*, **2014**, 25 (4), 146-150.  
 18) Y. Tsuchido, Y. Sasaki, S. Sawada and K. Akiyoshi, *Polym. J.*, **2015**, 47, 201-205.  
 19) Y. Sasaki, Y. Tsuchido, S. Sawada and K. Akiyoshi, *Polym. Chem.*, **2011**, 2, 1467-1470.

[プロフィール]

氏名：土戸 優志 (Yuji Tsuchido)  
 所属：上智大学理工学部 特別研究員  
 連絡先：〒 102-8554 東京都千代田区紀尾井町 7-1  
 TEL：03-3238-3371、FAX：03-3238-3361  
 E-mail：y-tsuchido@sophia.ac.jp  
 出身学校：東京医科歯科大学大学院生命情報科学教育部高次生命科学専攻  
 学位：博士（理学）  
 専門：分子認識、ナノバイオマテリアル、超分子化学

氏名：早下 隆士 (Takashi Hayashita)  
 所属：上智大学理工学部物質生命理工学科 教授  
 上智大学 学長  
 連絡先：〒 102-8554 東京都千代田区紀尾井町 7-1  
 TEL：03-3238-3372、FAX：03-3238-3361  
 E-mail：ta-hayas@sophia.ac.jp  
 出身学校：九州大学大学院工学研究科合成化学専攻  
 学位：工学博士  
 専門：分子認識、超分子化学、分析化学

パンフレットのご案内

はじめてシリーズ

小社ではお寄せいただいたお問合せを基にプロトコル「はじめてシリーズ」を作成しております。



**第一弾「はじめての細胞内 Ca<sup>2+</sup> 測定プロトコル」**  
 原理・Ca<sup>2+</sup> プローブの特徴・測定方法・トラブルシューティングなど問い合わせ担当者がわかりやすく解説したプロトコルです。



**第二弾「はじめての抗体標識プロトコル」**  
 直接標識法の利点や実施例などをわかりやすくまとめました。  
 はじめて抗体を標識される方にご覧いただきたいプロトコルです。



**第三弾「はじめての酸化ストレスマーカー測定プロトコル」**  
 各酸化ストレスマーカーの説明や試料の前処理方法、小社製品を使用しての測定方法などをまとめたプロトコルです。

各資料のご請求は小社マーケティング部までご連絡下さい。  
 フリーダイヤル：0120-489548  
 E-mail: info@dojindo.co.jp

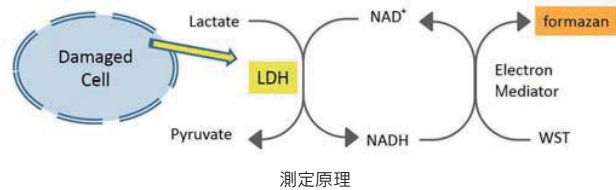
新製品 **DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.**

LDH 活性測定キット

**Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST**

<特長>

1. 生細胞存在下（ホモジニアス）、および細胞培養液のみ（ノンホモジニアス）の両方の系で死細胞数の測定が可能。
2. 測定毎の溶液調製が不要。
3. [<sup>51</sup>Cr] リリースアッセイのようなラジオアイソトープは不要。



Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST は、細胞から培地中に放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定することにより細胞傷害を測定するキットです。

本キットは、生細胞と反応せず、かつ、細胞にダメージを与えないため、生細胞と死細胞が混在する細胞培養液中に直接試薬を加えて細胞傷害を測定することが可能です（ホモジニアスアッセイ）。なお、一般的に用いられる細胞培養液を取り出して LDH 活性を測定する方法も可能です（ノンホモジニアスアッセイ）。また、調製した試薬溶液は長期間保存でき、用時調製する必要がありません（表 1）。そのため、多検体アッセイから、少ない検体数の測定にも対応することができます。

表 1 各社指定の Working solution の保存条件

製品	保存条件	使用期限
Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST	冷蔵	2 か月
他社 P (ノンホモジニアス)	冷凍	6 ~ 8 週間
他社 R (ホモジニアス)	—	用時調製
他社 R (ノンホモジニアス)	—	用時調製

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST	100 tests	9,600	CK12

関連製品：生細胞数測定キット

**Cell Counting Kit-8**

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Cell Counting Kit-8	100 回用	4,800	CK04
	500 回用	12,800	CK04
	2500 回用	36,200	CK04
	10000 回用	100,000	CK04



## 連載

## 界面活性剤による膜タンパク質 X線結晶構造の分解能向上 ～ウシ心筋チトクロム酸化酵素を例として～

青山 浩  
大阪大学大学院薬学研究所

### 1. はじめに

第1回の本連載(No.152)では、ピコバイオロジーの概念と現状について、ウシ心筋チトクロム酸化酵素(Cytochrome c Oxidase、以下CcO)の研究事例を取り上げて概説した。CcOは、ミトコンドリア内膜に位置し呼吸鎖複合体の一つで細胞呼吸の末端酸化酵素として機能し分子状酸素を水にまで還元するとともに、プロトン内膜の内側から外側に能動輸送する。この2つの反応により生じたプロトン濃度勾配がATP合成酵素によるATP合成に利用される。ウシ心筋CcOは13種類の異なるサブユニットからなる分子量20万の膜タンパク質複合体である。この酵素の分子状酸素還元機構、電子移動反応とプロトン輸送反応の共役機構を解明するためには、振動分光法によってもたらされるピコメートル( $10^{-12}$ m)の精度での化学結合距離とX線結晶構造解析法によってもたらされる全原子の空間的位置情報の融合が求められる。これにより明らかになると期待される「既存の化学の言葉だけでは説明できない生命現象との出会い」のためには、膜タンパク質の高分解能X線結晶構造は不可欠である。そこで、第2回の連載ではピコバイオロジーの中核を担う膜タンパク質のX線結晶構造解析において主要な因子の一つである界面活性剤について基礎的な概略を述べた。最終回の本連載では、ウシ心筋CcOのX線結晶構造の分解能向上に界面活性剤の選択がいかに重要であったかを考察する。

### 2. ウシ心筋CcO酸化酵素の精製、結晶化における界面活性剤

#### 2.1. ウシ心筋CcOの選択

酸素呼吸を行うほとんどの生物はCcOをもっており、現在までに数十種の生物種から単離・同定されている。生物種が変わっても触媒する反応や酸化還元反応を担う金属中心の構造もほとんど共通であるが、サブユニット組成は哺乳動物の13個から細菌の2個まで大きく異なる<sup>1)</sup>。我々は、これら生物種の中からウシ心筋CcOをX線結晶構造解析の材料として選択した。その第1の理由は、生物科学の目標の一つはヒトを理解することにある。そのため、ヒトと同じサブユニット組成で我が国で新鮮な材料の供給の最も容易な哺乳動物の組織としてウシ心筋を選択した。第2の理由は、図1に示したように界面活性剤に可溶化された膜タンパク質では、界面活性剤が結合していない親水性領域の相互作用

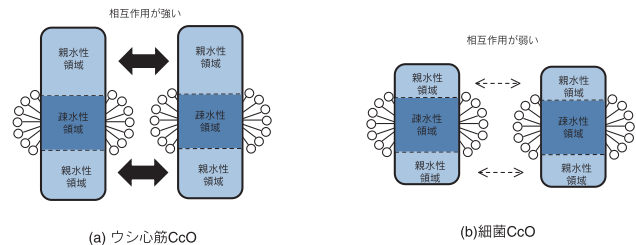


図1 ウシ心筋CcOと細菌CcOの親水性領域の大きさの違い

で結晶を形成するため、大きな親水性領域をもつウシ心筋CcOの方が有利なためである。同時期に発表された細菌CcOでは抗体を結合させることで親水性領域の拡大を図っており、今では膜タンパク質結晶化の常法の1つとなっている<sup>2)</sup>。

#### 2.2. ウシ心筋CcOの精製

膜タンパク質の精製の一般的な方法はまだまだなく、膜タンパク質の種類が違えば別世界といえるほど条件が異なる。それでも、ある膜タンパク質の精製するとき注意しなければならなかったことが他の膜タンパク質にも必要であることが多いと思われる。以下に我々が行っているウシ心筋CcOの精製の手順を記述する。

##### 2.2.1. コール酸ナトリウムによるミトコンドリア内膜からのCcOの可溶化

ウシ心筋800gからミトコンドリア内膜を分離し、コール酸ナトリウムと硫酸アンモニウムによりCcOを可溶化する。次にコール酸ナトリウム濃度を透析によって低下させると大部分のチトクロムbc<sub>1</sub>複合体や可溶性タンパク質を除去することができる。残余の不純タンパク質はコール酸存在下で硫酸アンモニウム分画により除去する。イオン性界面活性剤であるコール酸を用いたこの方法は1941年に開発されたものであるが、今でも最も有効なミトコンドリア内膜からの可溶化法である<sup>3)</sup>。

##### 2.2.2. 非イオン性界面活性剤による可溶化

動物の消化液に含まれているコール酸やデオキシコール酸は、特に動物組織の膜タンパク質の可溶化には有効であることが多い。一方、酵素の活性を阻害したり、変性を引き起こす可能性がある。そこで、非イオン性界面活性剤の存在下で硫酸アンモニウム分画を繰り返しコール酸ナトリウムと交換するとともに、さらに純化を進める。このようにして得られた標品を限外ろ過膜で濃縮すると、微結晶が非晶質の沈殿を伴わずに生じる。微結晶化によって、硫酸アンモニウム分画では除去できない微量の不純タンパク質を取り除くことができる。この方法で4日間で0.5gの微結晶標品を得ることができる<sup>4)</sup>。

##### 2.2.3. 非イオン性界面活性剤の種類

ウシ心筋CcOの結晶化では、前項の非イオン性界面活性剤の種類が高分解能X線結晶構造解析の実現に最も重要であった。以下にその概略を示す。

当初は、非イオン性界面活性剤としてポリオキシエチレンアルキルエーテル(AE)を選択した。まず、Brij-35(C<sub>12</sub>E<sub>23</sub>)を用いることで六方晶系の結晶を作製し、高等生物の膜タンパク質の結晶として初の回折像を得た<sup>5)</sup>。しかし、X線による分解能は8Åであり原子レベルでの構造解析にはかけ離れていた。さらに、当時は室温でのX線回折実験が通常であったが、ガラスキャピラリーに封入はできるものの回折能を示す結晶が得られる頻度が少ないという問題があった。Brij-35は疎水性であるアルキル基の炭素数は12であるが、親水性領域のオキシエチレン鎖の数は $23 \pm n$ であ

り均一ではない。この親水性領域の多分散性や長さは、結晶を形成する親水性領域の分子間相互作用を不安定化すると考えられた。そこでアルキル基の炭素数は12のまま、オキエチレン鎖の長さが8のオクタエチレングリコールモノドデシルエーテル (BL-8SY) を用いて微結晶標品を作製し、硫酸アンモニウム分画を沈殿剤として結晶化したところ 5 Å 分解能の回折像を与え、物理的衝撃にも安定な結晶が得られた<sup>9)</sup>。その後の検索の結果、炭素数10のアルキル基とマルトースがβ-グリコシド結合したn-デシル-β-D-マルトシドを(β-DM)用いることで2.8Å分解能のX線結晶構造解析に成功した<sup>7),8)</sup>。この場合、結晶化の沈殿剤にポリエチレングリコール(PEG)4000を用いており界面活性剤の構造変化に応じて結晶化条件の最適化を図った。

### 3. X線回折実験条件の検討による分解能の向上

上述の2.8Å分解能のX線結晶構造は、つくば市のフotonファクトリーにてビームラインの実験ハッチ全体を約10°Cに設定した測定によって得られた。次に複数の結晶を利用することでX線の露光時間を延ばして2.3Å分解能の構造を決定した<sup>9)</sup>。その後、第三世代放射光施設(SPring-8)での実験が可能となったため、さらに分解能向上が期待された。しかし、強い光源による放射線損傷を低下させるため100 K付近での低温測定は必須である。そのためには、結晶の溶媒をグリセロールなどのクライオプロテクタントに置換する必要がある。我々は、粘性の低いエチレングリコールもしくはプロピレングリコールを選択した。CcO結晶の場合、高分解能データ収集には最大辺が1 mm程度の大きさの結晶が必要となる。また結晶内では分子量20万の分子が中央部分を界面活性剤に覆われて残りの親水性部分の相互作用のみで結晶構造を維持している。そのため、急激な溶媒条件の変化は見た目でも明らかな損傷を与える。35%のクライオプロテクタントが必要であるが、結晶を直接この溶液に浸透させると直ちに結晶は壊れる。そこで、1%、3%、5%、10%、15%、20%、25%、30%のクライオプロテクタント溶液を準備して30分以上時間を

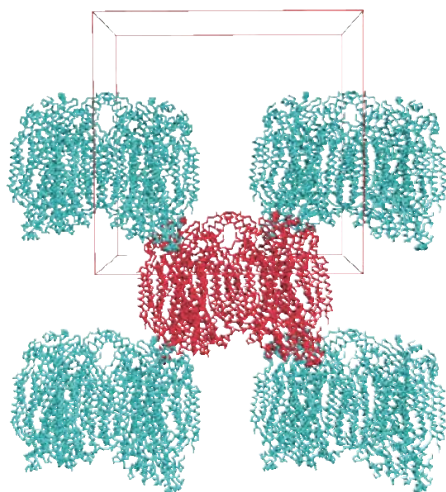


図2 n-デシル-β-D-マルトシドを用いて得られたウシ心筋チクロム酸化酵素結晶の分子パッキング  
赤い線は結晶格子、Cα炭素をribbon modelで表示。赤で示した二量体酵素の周囲を水色の4分子が対角線上に固定している。

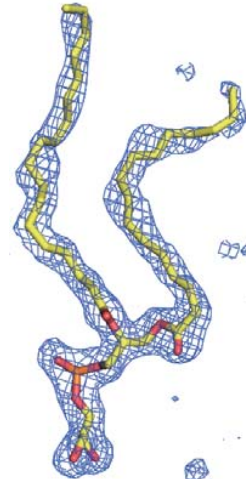


図3 ウシ心筋チクロム酸化酵素結晶中で確認されたリン脂質(ホスファチジルグリセロール)の電子密度図

においてから濃度を上げていく方法を採用した。また結晶を液体窒素に直接投入する方法と100 Kの窒素気流下で最初に凍結させてから液体窒素に保存する方法があるが、結晶の同型性を維持するには後者の方法が適していた。このようにして、低温条件下でSPring-8の大阪大学蛋白質研究所ビームライン(BL44XU)に於いてX線回折データを収集したところ1.8Å分解能の構造決定に成功した<sup>10)</sup>。また凍結結晶の同型性が確保できれば、X線の露光時間を延ばして複数の結晶からのX線回折データを収集し、それらを1本化することで更に分解能の向上が期待できるし、放射線損傷の少ないX線構造も決定できると予想される。しかし、CcOは低温下では酸素還元中心がX線照射によって還元されることが結晶の吸収スペクトル測定から明らかにされた。そこで、約200個の結晶を使用してX線還元をできるだけ抑えたX線構造を決定しへムa<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub>複核中心の間に過酸化物の存在を決定することができた<sup>11)</sup>。

## 4. X線結晶構造における界面活性剤

### 4.1. 非イオン性界面活性剤の種類による結晶中の分子パッキングの変化

Brij-35、BL-8SY及びβ-DMの3つの非イオン性界面活性剤が結晶中の分子のパッキングにどのような影響を与えたかをX線結晶構造から考察する。β-DMで可溶化したCcO標品から得られた結晶は、界面活性剤に覆われている疎水性領域は結晶形成に関与せず2量体のウシ心筋CcO(図2、赤色)の親水性領域を四方から対角線上に隣接分子が取り囲むことで(図3、水色)、分子全体の動きを最小限に抑えた理想的な分子パッキングであった。一方、Brij-35とBL-8SYで可溶化した標品から得られた結晶のX線構造では、隙間の多い分子パッキングのため結晶中の分子は不安定であり低分解能の原因となっていた<sup>12)</sup>。AEのオキエチレン鎖の繰り返し構造は運動性が高く、結晶形成の鍵となる親水性領域の相互作用にも影響を与えたのに対し、β-DMのマルトシドの運動性は低いため親水性領域の相互作用に影響はなく結晶形成に最適の分子間相互作用が得られたと考えられた。

### 4.2. 脂質と界面活性剤の立体構造解析

界面活性剤は、膜タンパク質と脂質二重層の間を切り離して代

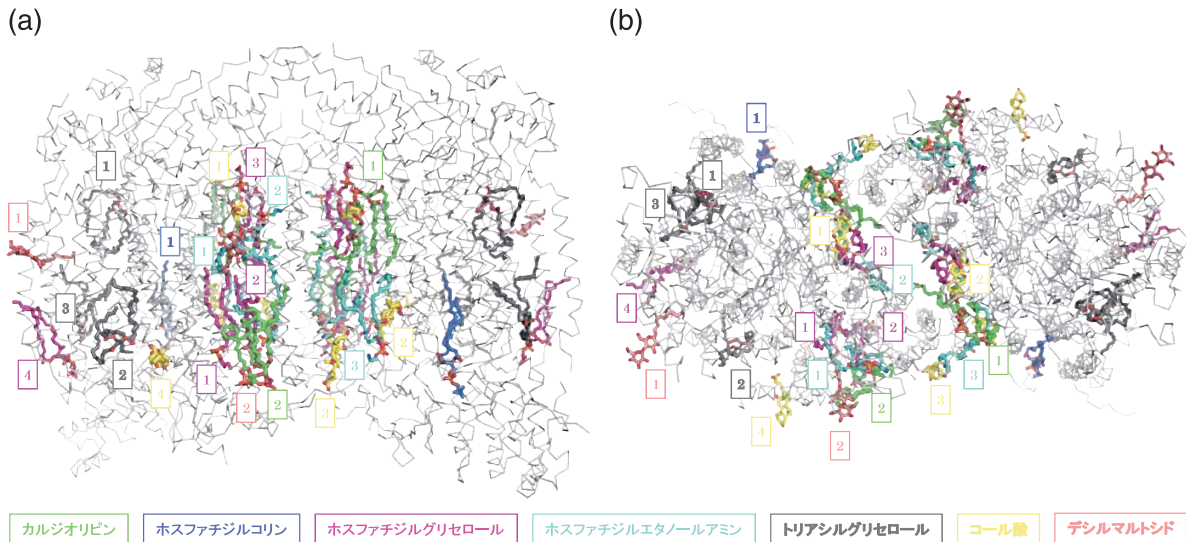


図4 ウシ心筋チトクロム酸化酵素の1.8 Å分解能のX線結晶構造にみられる脂質及び界面活性剤の立体構造  
二量体主鎖構造（灰色）のうち、単量体に結合する脂質、界面活性剤の数を色つき囲み数字で表示  
(a)膜面に平行方向からみた図 (b)膜面に垂直方向からみた図

わりの疎水結合を提供するため、膜タンパク質-脂質間の立体構造を含めた相互作用解析は困難なように思われる。しかし、1.8 ÅまでX線構造の分解能を高めると脂質の明瞭な電子密度が観測された(図3)。各単量体には、カルジオリピン2分子、ホスファチジルコリン1分子、ホスファチジルグリセロール3分子、ホスファチジルグリセロール4分子、トリアシルグリセロール3分子がX線構造で検出された(図4)。これらの脂質の種類、脂肪酸の鎖長などは質量分析やリン定量などで得られた結果とよく一致した。また脂質の役割については、サブユニットⅢに含まれる3分子のリン脂質(2分子のホスファチジルグリセロールと1分子のホスファチジルグリセロール)は活性中心への酸素供給を制御していること、他の10分子はサブユニット間もしくは二量体間で構造の安定化に寄与していることが明らかとなった<sup>13), 14)</sup>。膜タンパク質では、固有の脂質の役割について古くから議論があ

るが、界面活性剤の適切な選択によって精密に化学構造と立体構造を決定し、その機能を提唱することが可能となった。さらに、可溶化に使用したコール酸とβ-DMの電子密度も観測された(図5)。同定された4分子のコール酸は膜タンパク質の親水性領域と疎水性領域の界面付近に位置する傾向があるのに対して、2分子のβ-DMは疎水性領域の真ん中に位置していた(図4)。前者の結果は膜タンパク質を生体膜から可溶化するためには生体膜を構成するリン脂質と膜タンパク質の相互作用を弱めることが必要であるため、コール酸のようなイオン性界面活性剤が有効であったことを示している。しかし、安定化には当該膜タンパク質の水との直接の接触を防ぐ(そのためにはコール酸で十分であるはずである)だけでは不十分であり、β-DMへの交換が必須であることを後者の結果は示している。このような界面活性剤の2つの異なる役割に注目した界面活性剤の探索はほとんど行われていない。こ

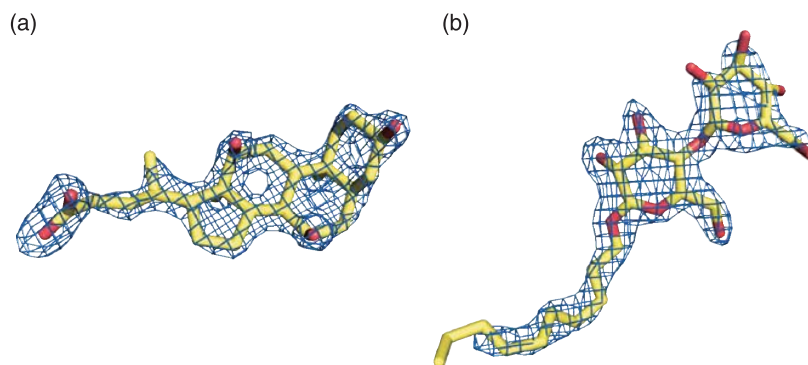


図5 ウシ心筋チトクロム酸化酵素結晶中で確認された界面活性剤の電子密度図  
(a)コール酸 (b)n-デニル-β-D-マルトシド

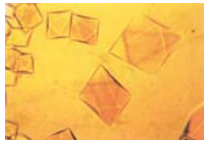

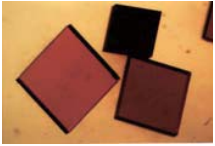

非イオン性界面活性剤	ウシ心筋チトクロム酸化酵素の結晶
<p>Brij-35</p> <chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCCOCCO</chem>	
<p>BL-8SY</p> <chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCCOCCO</chem>	
<p>n-デシル-β-D-マルトシド</p> <chem>CCCCCCCCCCCCOC1C(C(C(C(O1)O)O)O)O</chem>	
<p>3-オキサトリデシル-α-マンノシド</p> <chem>CCCCCCCCCCCCOC1C(C(C(C(O1)O)O)O)O</chem>	

図6 ウシ心筋チトクロム酸化酵素結晶と非イオン性界面活性剤の構造

のような視点の導入により膜タンパク質結晶化条件探索の可能性は飛躍的に向上すると考えられる。

## 5. 新しい界面活性剤による分解能の向上

2章で述べたようにβ-DMの使用はこの酵素の構造解明に最も重要な因子であったが、その他の界面活性剤が更なる分解能向上につながる可能性は十分にある。そこで1997年当時に市販で入手可能なすべての界面活性剤で検討を行ったがβ-DM以上の良質の結晶は得られなかった。そこで、β-DMをリード化合物とした新しい界面活性剤の合成に着手した。まずβ-DMの構造を単純化して二糖であるマルトースを単糖であるグルコースにしたデシル-β-D-グルコシドを合成した。しかし、親水部の水酸基の数が半分になったためか水溶性が大幅に減少した。そこで、水溶性を向上させるために炭素数10のアルキル基とグルコースの間にエチレングリコールを一つ導入した3-オキサトリデシル-α-マンノシドを合成し、CcO結晶を作製したところ1.8Å分解能以上のX線回折データの収集に成功した(未発表データ)。図6にこれまでに得られた結晶の写真と非イオン性界面活性剤の構造を示す。

## 6. まとめ

放射光実験施設の充実、解析ソフトウェアの開発や汎用性の向上などのX線解析技術の開発は目を見張るものがあるものの、X線結晶解析の成否は結晶化によって決まるし、結晶化の成否は目的のタンパク質をいかに立体構造を損なうことなく精製するかにかかっている。これまでの結果から、膜タンパク質の場合は、どの界面活性剤をどの段階で用いるかが実験成功の可否を決めることが明らかとなった。ウシ心筋CcOの場合、ミトコンドリア内

膜からの可溶化はコール酸で行い、その後の非イオン性界面活性剤のアルキル基の炭素数は10で親水部は糖であることが適切であるように思われる。しかし、糖の異性体は数多く存在するためその他の界面活性剤をデザインすれば分解能が向上する可能性は否定できないであろう。我々は構造の単純化を目指した分子をデザインしたが、そのため界面活性剤のミセル形成時における水溶性の問題を克服せねばならなかった。逆にマルトースとアルキル基を2つにした複雑な界面活性剤が合成され、細菌の末端酸化酵素では精製標品の安定化に寄与したとの報告例もあるため<sup>15)</sup>、まだまだ開発の余地はあるであろう。

本稿で紹介した内容は、兵庫県立大学大学院理学研究科 吉川信也、月原富武両教授のグループとの長年の共同研究の成果である。また界面活性剤の合成は、兵庫県立大学大学院理学研究科 杉村高志教授の指導の下で行われた。各グループ所属の多くの方々に厚く感謝する。

### [参考文献]

- 1) S. Yoshikawa and A. Shimada, *Chem. Rev.*, **2015**, *115*, 1936-1989.
- 2) S. Iwata, C. Ostermeiner, B. Ludwig and H. Mitchel, *Nature*, **1995**, *376*, 600-669.
- 3) E. Yakushiji and K. Okunuki, *Proc. Impact Acad. Japan*, **1941**, *17*, 205-223.
- 4) 月原富武、伊藤-新澤恭子、吉川信也, *蛋白質・核酸・酵素*, **1996**, *7*, 1353-1362.
- 5) S. Yoshikawa, T. Tera, Y. Takahashi, T. Tsukihara and W. S. Caughey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, *85*, 1354-1358.
- 6) K. Shinzawa-Itoh, H. Ueda, S. Yoshikawa, H. Aoyama, E. Yamashita and T. Tsukihara, *J. Mol. Biol.*, **1995**, *246*, 572-575.
- 7) T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono and S. Yoshikawa, *Science*,

- 1995, 269, 1069-1074.
- 8) T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono and S. Yoshikawa, *Science*, **1996**, 272, 1136-1144.
  - 9) S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, M. J. Fei, C. P. Libeu, T. Mizushima, H. Yamaguchi, T. Tomizaki and T. Tsukihara, *Science*, **1998**, 280, 1723-1729.
  - 10) T. Tsukihara, K. Shimikata, Y. Katayama, H. Shimada, K. Muramoto, H. Aoyama, M. Mochizuki, K. Shinzawa-Itoh, E. Yamashita, M. Yao, S. Ishimura and S. Yoshikawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100, 15304-15309.
  - 11) H. Aoyama, K. Muramoto, K. Shinzawa-Itoh, K. Hirata, E. Yamashita, T. Tsukuhara, T. Ogura and S. Yoshikawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, 106, 2165-2169.
  - 12) S. J. Lee, E. Yamashita, T. Abe, Y. Fukumoto, T. Tsukihara, K. Shinzawa-Itoh, H. Ueda and S. Yoshikawa, *Acta Cryst. D*, **2001**, 57, 941-947.
  - 13) K. Shinzawa-Itoh, H. Aoyama, K. Muramoto, H. Terada, T. Kurauchi, Y. Tadehara, A. Yamasaki, T. Sugimura, S. Kurono, K. Tsujimoto, T. Mizushima, E. Yamashita, T. Tsukihara and S. Yoshikawa, *EMBO J.*, **2007**, 26, 1713-1725.
  - 14) 吉川信也, 蛋白質・核酸・酵素, **2009**, 7, 1353-1362.
  - 15) P. S. Chae, S. G. F. Rasmussen, R. R. Rana, K. Gotfryd, R. Chandra, M. A. Goren, A. C. Kruse, S. Nurva, C. J. Loland, Y. Pierre, D. Drew, J. L. Popot, D. Picot, B. G. Fox, L. Guan, U. Gether, B. Byrne, B. Kobilka and S. H. Gellman, *Nat. Methods*, **2010**, 7, 1003-1008.

[著者プロフィール]

氏名：青山 浩 (Hiroshi Aoyama)

所属：大阪大学大学院薬学研究所

連絡先：〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6

E-mail: haoyama@phs.osaka-u.ac.jp

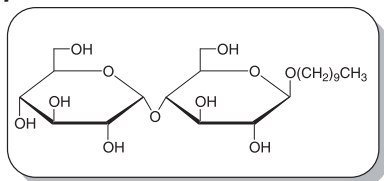
学位：博士 (理学)

現在の研究テーマ：X線結晶解析に基づく生命現象の理解と薬学領域への展開

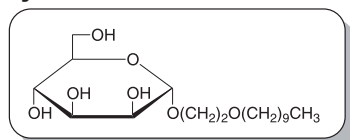
関連製品

膜タンパク質可溶化剤

***n*-Decyl-β-D-maltoside** cmc = 1.8 mmol/l



**3-Oxatridecyl-α-D-mannoside** cmc = 0.63 mmol/l

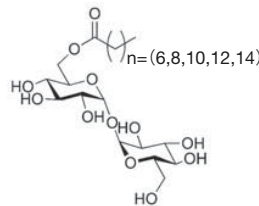


品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
<i>n</i> -Decyl-β-D-maltoside	1 g	13,400	D382
	5 g	54,000	D382
3-Oxatridecyl-α-D-mannoside	500 mg	18,000	O401

関連製品

その他デタージェント

**Trehalose C8, Trehalose C10, Trehalose C12, Trehalose C14, Trehalose C16**



品名	cmc (mmol/l)
Trehalose C8	5.6
Trehalose C10	3.0
Trehalose C12	0.15
Trehalose C14	0.012
Trehalose C16	0.0061

**Trehalose 型デタージェントを用いた膜タンパク質結晶化の例**

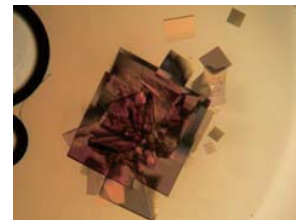
実験例①

膜タンパク質可溶化剤として知られている、*n*-Decyl-β-D-maltoside と Trehalose C8 を混合して使用することにより、1.55 Å の分解能を持つ X 線回折像を得ることが出来た。(未発表データ)

結晶化条件

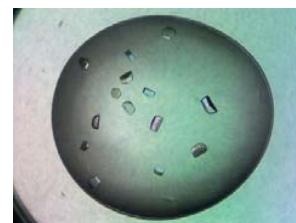
膜タンパク質	ウシ心筋子トクロム酸化酵素
Detergent	<i>n</i> -Decyl-β-D-maltoside + Trehalose C8
分解能	1.55 Å

(兵庫県立大学理学部教授 吉川信也先生よりご提供)



実験例②

Trehalose C12 を用いて、12 回膜貫通型膜タンパク質を可溶化し、結晶化することに成功している。(ユーザー様よりご提供)



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Trehalose C8	500 mg	20,000	T459
Trehalose C10	500 mg	20,000	T460
Trehalose C12	500 mg	20,000	T461
Trehalose C14	500 mg	20,000	T464
Trehalose C16	500 mg	20,000	T465

# Topics on Chemistry

## ホスフィンを利用した新しいニトロキシル(HNO)検出用蛍光プローブ

株式会社同仁化学研究所 立中 佑希

哺乳動物系における一酸化窒素(NO)の生合成は、1980年代後半に発見され、反応性窒素種(RNS)の生物学的役割への関心が高まり研究が活発に行われている<sup>1)</sup>。NOは、免疫系による心臓血管循環系におけるシグナル伝達、中枢神経系における神経伝達、及び異物の拒絶反応といった生理学および病理学的プロセス媒介において重要な役割を果たすことで知られている。また、他のRNSとしてパーオキシナイトライト(ONOO<sup>-</sup>)は、さまざまな疾患および生体分子のニトロ化の調節に関与し、三酸化二窒素(N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)、亜硝酸塩(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)及び二酸化窒素(NO<sub>2</sub>)はDNAのアルキル化に関与していると考えられている<sup>2)</sup>。

近年、新しいRNSとしてニトロキシル(HNO)が注目されている。HNOとは、NOの一電子還元体に相当するプロトン化された誘導体であり、生物学的・薬理学的効果を有し、重要な作用を示すと考えられている。例えば、HNOは、タンパク質チオールと直接反応してアルデヒドデヒドロゲナーゼの阻害を引き起こし、カルシトニン遺伝子関連ペプチドのアップレギュレーションによって血管弛緩を誘発する。また、最近の生化学的研究では、HNOはヘム酵素によって触媒されるヒドロキシルアミンが二電子酸化することにより生成され、その生合成には硫化水素(H<sub>2</sub>S)が関与していることも分かっている (Fig. 1)。特に、心血管系に対してNOとは異なる独自の作用を示すことから、心不全治療への利用が期待されており、HNOはNOと異なる作用機序を有する新たな生理活性物質として関心が高まってきている<sup>3)</sup>。しかし、HNOは非常に不安定であるため、生体内でHNOを選択的に検出する方法が確立されておらず、研究が進んでいるとは言えないのが現

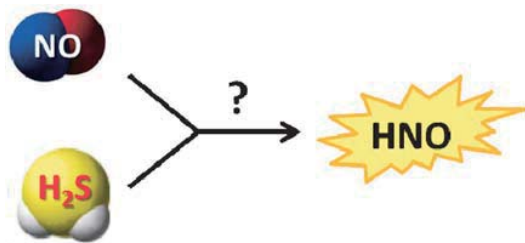


Fig. 1 一酸化窒素(NO)と硫化水素(H<sub>2</sub>S)からのHNO生成

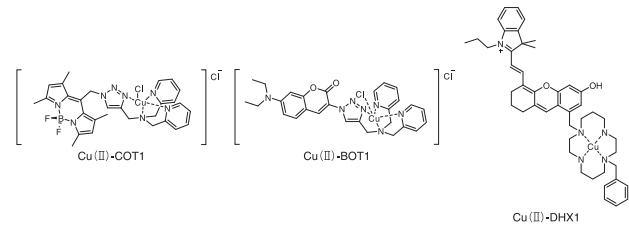


Fig. 2 銅錯体を利用したHNO蛍光プローブ

状である。

これまで、HNOを特異的に検出する蛍光プローブとして、BODIPY骨格に銅錯体を組み込んだプローブであるCu(II)-BOT1<sup>4)</sup>やCoumarin骨格のCu(II)-COT1<sup>5)</sup>が報告されている (Fig. 2)。これらのプローブのHNO検出メカニズムは、銅一価から銅二価への還元に基づいている。一重項励起状態からのキレート化された状態では、光誘起電子移動(photo-induced electron transfer; PET)効果によって消光しているが、HNOによって銅二価の還元が起こるとPET効果が解消され、蛍光が回復する。しかしながら、これら銅の還元によるメカニズムでは、細胞内に存在するグルタチオンやアスコルビン酸の影響を容易に受けてしまうため、選択性が低いという問題があった。また、高エネルギー照射による細胞損傷や、細胞の自家蛍光を最小限にするために、長波長領域の蛍光(近赤外蛍光)をもつプローブCu(II)-DHX1<sup>6)</sup>も開発されているが、同じく銅錯体の還元に基づいているため選択性が低く、特に硫化水素による還元の影響を受けてしまうという課題がある。

そこで本稿では、上記の課題を克服した新規のHNO蛍光プローブを紹介したい<sup>7)</sup>。

中川らは、選択性の課題を解決するために、HNOとホスフィンとの反応に焦点を当て、分子設計を行っている。HNOはトリアリールホスフィンと反応し、ホスフィンオキシド及びアザイリドを生成することが知られている。HNOのホスフィン誘導体との反応速度は $9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と十分速いため、HNO検出部分としてトリフェニルホスフィンを採用し、蛍光団には優れた光物理的特性、高い蛍光量子収率、良好な膜透過性・溶解性を有しているロドールを用いている。これらを鑑みて、アミノ基がアシル化口

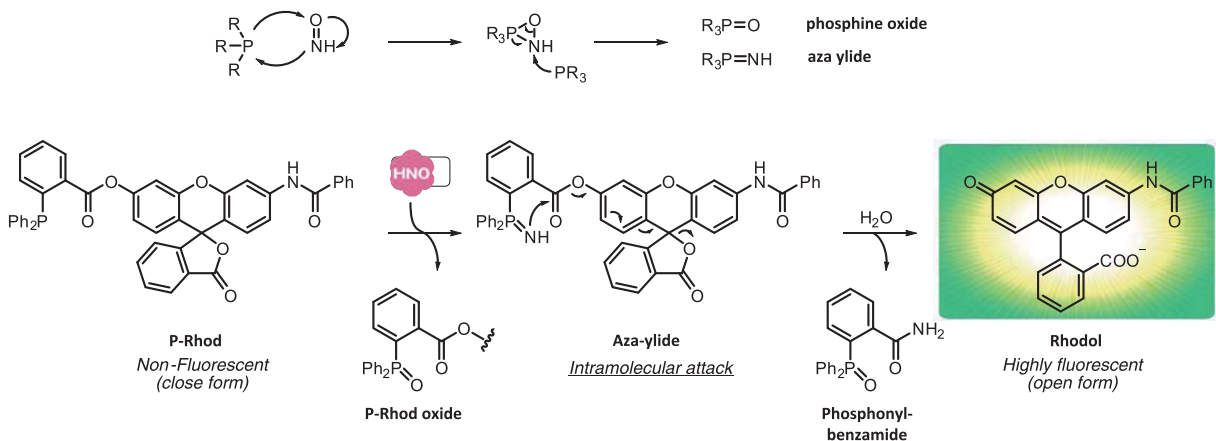


Fig. 3 P-RhodとHNOの反応メカニズム

新製品 **DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.**

加水分解性徐放型 硫化水素ドナー

**-SulfoBiotics- GYY4137**

ドールから成り、エステルリンカーを介してトリフェニルホスフィンを結合した新規 HNO 蛍光プローブ P-Rhod を設計している。P-Rhod は、HNO と反応するとアザ-イリドを生成し、カルボニル炭素の分子内求核攻撃によって Phosphonyl-benzamide を脱離し、蛍光キサンテン形（オープン型）ロドールを生成する (Fig. 3)。ロドールは 491 nm に吸収極大 ( $\epsilon = 2.95 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )、526 nm に最大蛍光波長（緑）を示すが、ロドールがエステル化された P-Rhod では 491 nm の吸収は非常に弱く ( $\epsilon = 9.58 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )、全く蛍光を生じない。これは、ローダミンのアミノ基およびヒドロキシル基のアシル化によって、キサンテンが分子内でラクトン環を形成しているためである（クローズ型）。また、P-Rhod が効果的に機能する pH 領域は、pH が 5.0 ~ 10.0 の範囲であり、生理的環境下で十分測定可能である。

実際に緩衝溶液中で P-Rhod に HNO 発生剤である Angeli's salt を添加すると、濃度依存的な蛍光強度の増大が確認されている。また、課題となる選択性に関して検討した結果、RNS のドナー、様々な酸化剤 (ONOO<sup>-</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ClO<sup>-</sup>、および塩化鉄)、生物学的還元剤 (GSH、セレノメチオニン、アスコルビン酸、ヒドロキシルアミン)、硫化水素ドナー (Na<sub>2</sub>S) の全てにおいて P-Rhod の大きな蛍光変化は観察されていない。これは、P-Rhod が HNO に対して非常に高い特異性を持っていることを示している。

さらに、P-Rhod を取り込ませたヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 (A549 細胞) に Angeli's salt を添加した結果、細胞質で明瞭な蛍光増大が観測されている。一方、HNO 発生剤を添加しない場合、あるいは NO ドナーや酸化剤を添加した場合は、細胞内の蛍光増加は観察されていない。この結果は、P-Rhod が生細胞内の HNO を選択的に可視化できることを示唆するものである。

今回紹介した P-Rhod は、他の ROS 及び RNS に対して優れた選択性を持ち、高感度に HNO を検出できる優れた蛍光プローブである。また、金属を含んでおらず生体適合性が高い点や様々な生物学的還元による影響も受けにくい点から、本プローブは生体内における HNO の役割の解明に大いに貢献できるものと期待される。

[参考文献]

- 1) J. M. Fukuto, M. D. Bartberger, A. S. Dutton, N. Paolocci, D. A. Wink and K. N. Houk, *Chem. Res. Toxicol.*, **2005**, *18*, 790.
- 2) P. C. Dedon and S. R. Tannenbaum, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2004**, *423*, 12.
- 3) M. Eberhardt, et al., *Nat. Commun.*, **2014**, *5*, 4381.
- 4) J. Rosenthal and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 5536.
- 5) Y. Zhou, K. Liu, J-Y. Li, Y. Fang, T-C. Zhao and C. Yao., *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*(6), 1290.
- 6) A. T. Wrobel, T. C. Johnstone, A. D. Liang, S. J. Lippard and P. Rivera-Fuentes, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*(12), 4697.
- 7) K. Kawai, N. Ieda, K. Aizawa, T. Suzuki, N. Miyata and H. Nakagawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 12690.

硫化ナトリウム (Na<sub>2</sub>S) や硫化水素ナトリウム (NaHS) は、最も一般的な硫化水素ドナーとして硫化水素研究に用いられています。しかしながら、水に溶解するとすべて硫化水素 (イオン) に変換されるため、一過性の硫化水素刺激しか与えることができません。そのため、近年数多くの徐放型の硫化水素ドナーが開発されてきており、小社でも GYY4137 を製品化致しました。GYY4137 は、P. K. Moore らによって開発された徐放型の硫化水素ドナーであり、加水分解によって持続的に硫化水素を放出する試薬です (Fig. 1, 2)<sup>1)</sup>。そのため、硫化ナトリウムや硫化水素ナトリウム添加のような一過性の刺激では観察されない細胞応答を引き起こすことが確認されています<sup>1, 2)</sup>。

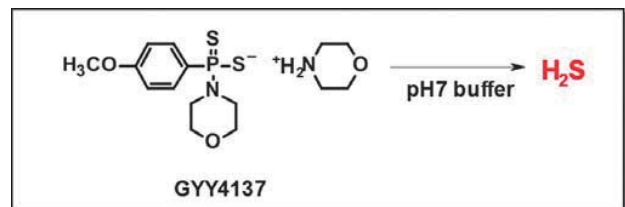


Fig. 1 GYY4137 の加水分解による硫化水素放出

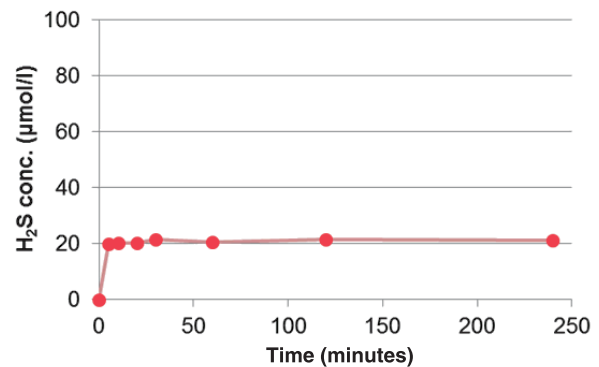


Fig. 2 GYY4137 (100 μmol/l) の PBS 中における硫化水素放出パターン ※放出された硫化水素はメチレンブルー法により定量

[参考文献]

- 1) L. Li, M. Whiteman, Y. Y. Guan, K. L. Neo, Y. Cheng, S. W. Lee, Y. Zhao, R. Baskar, C-H. Tan and P. K. Moore, *Circulation*, **2008**, *117*, 2351.
- 2) Z. W. Lee, J. Zhou, C-S. Chen, Y. Zhao, C-H. Tan, L. Li, P. K. Moore and L-W. Deng, *PLoS One*, **2011**, *6*, e21077

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
-SulfoBiotics- GYY4137	10 mg	7,000	SB06

新製品

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

還元物質応答性 硫化水素ドナー

硫化水素研究において、硫化水素の量や発生速度はその生理活性を決める重要な因子となります。しかし現在、一般的に硫化水素ドナーとして使用されている硫化ナトリウム (Na<sub>2</sub>S) や硫化水素ナトリウム (NaHS) は、水溶液中に添加するだけで硫化水素を生成するため、硫化水素の発生量や発生時間を制御することは困難です。

M. Xian らが開発した硫化水素ドナーは、生体内に存在する還元物質 (グルタチオンやシステインなど) に応答して硫化水素を発生する新規の硫化水素ドナーで、その構造の違いによって硫化水素の発生時間と発生量が異なります (Fig. 1 - 4)<sup>1,2)</sup>。これらドナーの硫化水素発生機構は、生体内の硫化水素産生メカニズムに基づいており、パーサルファイドを経由して硫化水素を発生します。小社では構造の異なる3種類の還元物質応答性硫化水素ドナーを製品化致しました。

-SulfoBiotics- H<sub>2</sub>S donor 5a

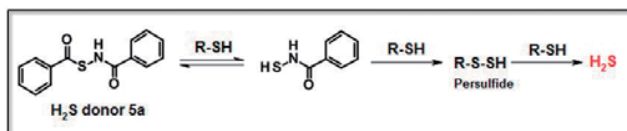


Fig. 1 H<sub>2</sub>S donor 5a の還元物質による硫化水素放出機構

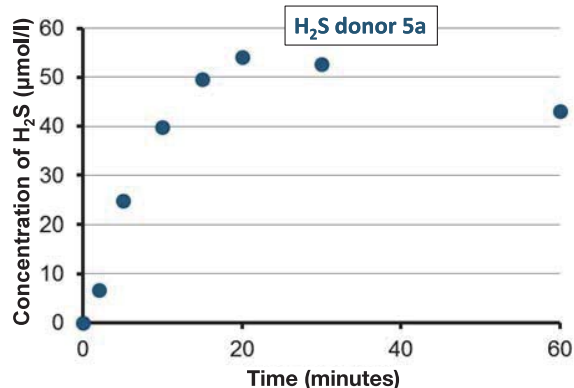


Fig. 2 H<sub>2</sub>S donor 5a (100 μmol/l) の 5 mmol/l GSH 添加による硫化水素放出パターン  
※放出された硫化水素はメチレンブルー法により定量

-SulfoBiotics- H<sub>2</sub>S donor 8l  
-SulfoBiotics- H<sub>2</sub>S donor 8o

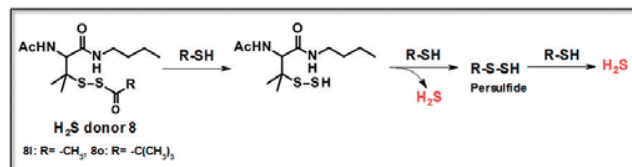


Fig. 3 H<sub>2</sub>S donor 8l, 8o の還元物質による硫化水素放出機構

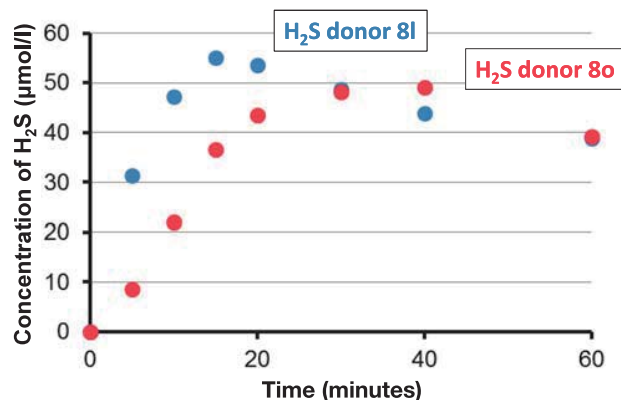


Fig. 4 H<sub>2</sub>S donor 8l, 8o (100 μmol/l) の 5 mmol/l GSH 添加による硫化水素放出パターン  
※放出された硫化水素はメチレンブルー法により定量

[参考文献]

- 1) Y. Zhao, H. Wang and M. Xian, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 15.
- 2) Y. Zhao, S. Bhushan, C. Yang, H. Otsuka, J. D. Stein, A. Pacheco, B. Peng, N. O. Devarie-Baez, H. C. Aguilar, D. J. Lefer and M. Xian, *Chem. Biol.*, **2013**, 8, 1283.

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
-SulfoBiotics- H <sub>2</sub> S donor 5a	10 mg	15,000	SB07
-SulfoBiotics- H <sub>2</sub> S donor 8l	10 mg	18,000	SB08
-SulfoBiotics- H <sub>2</sub> S donor 8o	10 mg	18,000	SB09

ホームページアドレス  
URL : <http://www.dojindo.co.jp/>  
E-mail : [info@dojindo.co.jp](mailto:info@dojindo.co.jp)

フリーファックス 0120-021557  
フリーダイヤル 0120-489548