

畑中 保丸 (Yasumaru HATANAKA)

富山大学 (University of Toyama)

生命は、絶えず生み出される分子の相互作用の上に成立している。無限ともいえる生命科学の将来に対し「有機化学が応用される分子システム」の可能性は、限り無く有望である。本研究の「高速光アフィニティーラベリング」の開拓が、生命科学上の難題の一つ「細胞膜上受容体」という極めて重要な難結晶性生体高分子の研究領域に、画期的な展望を開くための一助となることを願う。

【既存法の限界】 1960年台の初頭、Westheimer教授が創始した光アフィニティーラベリングは、未知タンパク質を特定する化学修飾法として今日に至るまで次第に力を発揮しつつある。ラベル位置がリガンド結合部位近くに集中する長所は、リガンドの結合状態を解析する有用法として期待されたが、既存法はまだ実用性に乏しく、ナトリウムチャンネルの光アフィニティー解析に参加する中で、これら未解決の難問に直面した。この経験から、1. 解析対象のタンパク質量が微量である、2. 解析に時間がかかり過ぎる、の2点が既存法の発展を阻む主因と考え、有機化学の視点から光アフィニティーラベリングの総合的開拓に取り組むとともに、その応用を国内外の共同研究者と広範囲に連携推進した。

【ジアジリンを光反応基とした高速化への新展開】 第一に解決の鍵となる光反応基を「ジアジリン」の一点に絞り込んだ。ジアジリンは、当時すでに有望な光反応基候補と目されていたが、誘導体が少なく汎用性に乏しかったため、まず効率的合成法を開拓して新しいジアジリン群を創出した。第二に、このジアジリン合成におけるブレークスルーで、ジアジリンユニットを鍵とするプローブ合成戦略の柔軟性が格段に向上した。例えば、DNA、ペプチド、糖鎖、脂質の生体4大機能分子に容易にジアジリンを導入する道がひらけ、種々の有用ジアジリンユニットが誕生した。幸いこれらが功を奏し、半世紀の歴史を持つ光アフィニティーラベリングを、最新の化学的高速解析法へと進める基礎を築くことができた。

【多機能化による解析課程のスピードアップ】 機能部位解析には、ラベルが正確に結合部位へと導入される必要が有る。このため、光反応性部分をコンパクトにするプローブ設計が常法とされる。しかし、ラベル体の単離精製が最大の難関であり、この解決なしには、そもそも解析研究がゴールしないとの経験から、これとは異なる発想で、あえて「光反応基に機能構造を付加する」戦略を進めた。当時リガンド結合部位が不明であった β -1,4ガラクトース転移酵素の解析に、かさばるビオチンを搭載した多機能プローブを開発し、糖転移酵素で初めて機能部位解析を果たすことでその有用性を実証した。以後、多機能プローブの有用性は多くの例で検証され、プローブ設計にビオチン化が採用されるようになった。

【微量タンパク質での応用達成】 解析タンパク質の量は限られるため、微量タンパク質へ応用可能なことが実用上の重要ポイントとなる。微量タンパク質に適用できる多機能プローブへのブラッシュアップを目的に、ペルオキシソーム脂質代謝関連タンパク質のナノモル微量解析を共同研究で推進し、多機能プローブと釣り上げ法で、触媒中心の近傍に脂肪酸収納キャビティーが存在することを明らかにした。

【機能集積プローブによる数日での超高速解析】 ビオチンで釣り上げた試料はアビジンに強く結合して再遊離が難しいため、ビオチン部分を切断して試料を効率よく回収する方法が多く検討されてきた。この目的に、ジアジリンユニットをオルトヒドロキシ桂皮酸型に誘導することで、これまでに例がない機能集積型の高性能光プローブを開発した。これにより、特異的ラベル、アビジン上への釣り上げ精製・濃縮、切断による蛍光化タンパク質の効率的回収、回収試料の酵素断片化・HPLC精製・MS/MS解析、に至る一連の解析シーケンスは、これらの経験者であれば一人の手で数日内に完了可能になった。

ナトリウムチャンネルの解析に数名がかりで数年を要したことを考えると、驚異的な効率・高速化が実現できたことになる。この研究に導いていただきました、恩師金岡祐一先生、中山仁先生、をはじめ、お世話になった研究室の学生・院生・スタッフと国内外の多くの共同研究者に心から感謝します。