

早稲田応用化学会報

Bulletin of
The Society of Applied Chemistry
of Waseda University

平成8年11月発行 通算53号

(November 1996, No. 53)

早稲田応用化学会

The Society of Applied Chemistry
of Waseda University

目 次

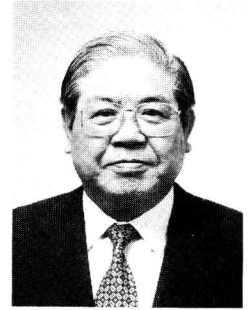
平成8年11月号

| | |
|------------------|---|
| 巻 頭 言 | 期待されるセールスエンジニア…………… 1 柳澤 巨 |
| 総 説 | コンビナトリアルケミストリ～創薬研究における新技術～… 2 長澤 和夫 |
| ト ピ ッ ク ス | タンパク質が100℃以上でも使える？ …… 6 大野 弘幸 現状の石油精製法は理論的に間違っている。…………… 8 —特に白物や軽質化を目的とした時— 久野 雅也 |
| 随 想 | 最近の応用化学科の求職事情……………10 清水 功雄 |
| 研究室紹介 海外シリーズ② | 黒田・菅原研究室……………12 在外研究報告～アメリカ、ドイツ、スイス、そしてフランス～ ……………16 平澤 泉 |
| 職 場 だ よ り | 千代田化工建設㈱……………18 |
| 応化教室近況 | ……………21 |
| 新博士誕生 | ……………22 |
| 応化出身の女性は今⑬ | …“多彩”…な科学技術を夢みて ……24 荻野 久美子 |
| 会 員 だ よ り | 7月号のつづき, 他……………26 |
| 学 生 部 会 | 新入生オリエンテーション……………34 木下 敦寛 |
| 会 務 報 告 | ……………36 会費前納者ご芳名 担当・名手 孝之 |
| 「編集後記」 | |

巻 頭 言

期待されるセールスエンジニア

副会長 柳 澤 亘



夏の都市対抗野球大会も終り、ようやくこの原稿に筆を取ることにになりました。それというのも、入社して間もなく、会社の社会人野球チームの応援リーダーを命ぜられ、数か月の特訓を受け、地方予選から後楽園球場の本大会へと、真夏の炎天下のなか汗を流し、声を嗄らして応援席を走り回り、逆転に次ぐ逆転で見事に優勝し、勝利の美酒に酔ったのは38年も昔のこと、以来、都市対抗野球のシーズンともなれば自社チームの勝敗の決着がつくまでは落ち着かないからであります。

応化を卒業し、石油化学か石油精製の工場の技術者を目指して、石油会社に入社しましたが、配属になったのは販売部門で、セールスエンジニアとして社会人のスタートを切りました。

「米国の石油会社では Marketing 部門で技術者が活躍している」と米国への視察旅行から帰国した会社幹部の報告がもとで、この会社の販売部門に技術者を配置したのは昭和4年と聞いております。第二次大戦後、米国の石油会社と提携し、先進的な Sales Engineering や Product Engineering の手法を導入し、石油製品の需要拡大のなかでセールスエンジニアの活動の場が広がりました。

その主たる活動は市場の技術動向調査、商品開発、需要開拓、技術サービス、品質保証など多岐にわたっておりますが、いずれも石油製品の需要家や石油製品を使用する装置・機器のメーカーと深く接触するものであります。とりわけ販売部門ですから需要開拓に力が入りますが、日頃の需要家折衝を通じ自社製品の実力と製品に対する需要家の Needs や Wants を適確に把握し、いち早く商品の開発、改良に結びつける努力こそ大切な役割であります。

セールスエンジニアの仕事はなかなか厳しいが、やりがいのある仕事であります。10年前頃よりセールスエンジニア志望の新卒就職希望者が増えてきたことはうれしいことです。ただし、セールスエンジニアには知識や経験だけでなく、対人関係、バイタリティ、体力など特有の適性が求められます。余談ですが、冒頭に述べた応援リーダーを新人のセールスエンジニア全員に経験させ、もう30年以上も続いています。その多くは数か月で見違えるほど覇気のある頼もしい青年となります。

「Engineering」という英語はなかなか理解しがたい用語ですが、昭和40年前後、わが国にマーケティング・ブームが起り、その頃ある講習会の講師が「Engineering とはムダを省いて、より能率的、効率的にする仕事であり、工夫である」と解説しましたが、私はこの解釈を適切に思い、それ以後、Sales Engineering もそのような理解をしております。

産業界は今、メガコンペティションの時代に入ったと言われ、企業は生き残りをかけ体質改善、競争力強化に努めております。企業内の販売部門も大いなる変革を求められており、このような時代こそセールスエンジニアの活躍が期待されましょう。

早稲田応化卒業生も今日、数多くの企業の販売部門で活躍されておられますが、厳しい環境のなか皆さんの御健闘を祈ります。
(平成8年9月5日記)

(経歴) 日本石油化学(株) 常務取締役化学品事業本部長 (昭和33年応用化学科卒, 新制8回)

前 日本石油(株) 取締役技術商品部長

コンビナトリアルケミストリー

— 創薬研究における新技術 —

長澤 和夫



1. はじめに

膨大な種類の化合物を系統的に一度に合成する技術“コンビナトリアルケミストリー”が最近製薬業界を中心に大変注目を集めている。現在企業での創薬研究は、天然物や既存の化合物をリード化合物として数多くの誘導体を一一つ合成し（これらの化合物群をライブラリーという）、これらの生物活性試験（アッセイ）を行い新薬への開発を行っている。最近ではコンピュータを使った分子設計の分野が急速に発達し、作用機序、構造などに基づいた分子の設計もかなり実用段階に入りかなり効率が良くなってきたが、創薬にはやは

り時間がかかるという印象がある。これに対し、“コンビナトリアルケミストリー”は数種から数十種類の試薬を組み合わせるだけで何万、何百万といった化合物群（ライブラリー）を合成し、これらを一度にアッセイを行い、活性な化合物の構造を特定する技術である。本稿では医薬品の開発とコンビナトリアルケミストリーとの関連を中心に、この新しい技術について紹介したい。

2. ライブラリーの合成について

コンビナトリアルケミストリーの画期的な特徴の一つに、一度に多くのライブラリーが合成でき

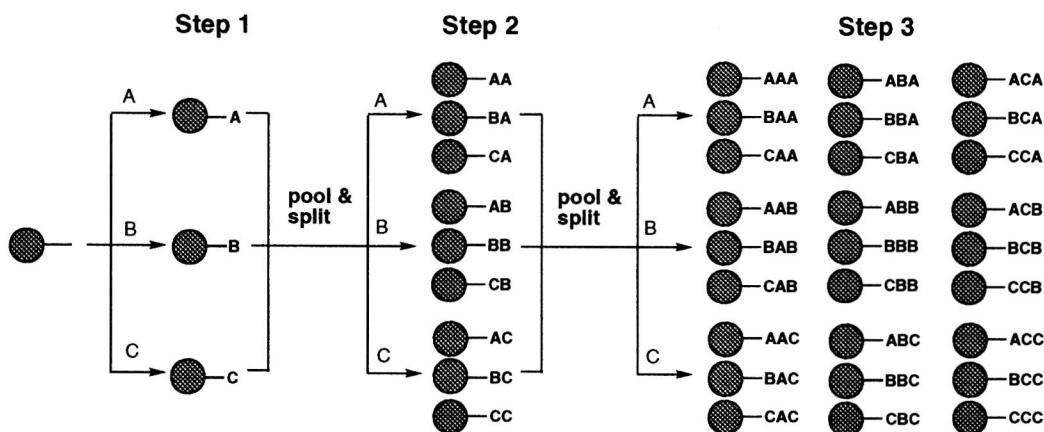


図 1. Split synthesis による combinatorial library の合成

理化学研究所 有機合成化学研究室 研究員
昭和63年 応用化学科卒業（新38回）

ることがある。従来は一人の研究者が合成できる化合物の数は年50~100個といわれていた。

コンビナトリアルケミストリーを用いると一人あたり約一万倍の効率化が可能と言われている。それではこのような沢山のライブラリーは、どのように合成されるのだろうか。ライブラリーの合成は、大きくわけて split synthesis と parallel synthesis と呼ばれる方法で行われる。まず始めに split synthesis 法について、3種類のアミノ酸 (A, B, C) を用いてビーズ (固体の樹脂, 後述) 上でトリペプチドをライブラリーを合成する例を用いて説明する (図1)。まずビーズを3つの反応容器に等分して入れ、それぞれアミノ酸 A, B, C と反応させる (操作1)。得られたビーズを一旦混合し再び3つの反応容器に等分して入れ、それぞれアミノ酸 A, B, C と反応させる (操作2)。ここで、一つの容器内には、3種類のビーズができており、合計9種類のビーズができたことになる。再度同様の行程を繰り返すと合計27種類のビーズが合成できたことになる (3^3 (用いるアミノ酸の数)^(操作数) = 27)。従って、使用するアミノ酸の種類と操作回数を変えることにより色々なライブラリーを合成することができる。例えば、20種類のアミノ酸を用いてペプタペプチドのライブラリーを合成しようとする、 $20^5 = 320$ 万個のライブラリーを五回の操作で合成できることになる。ここで、ビーズについて説明を加えておく。合成する化合物は、通常固相合成の技術を用いて樹脂上に合成していく。樹脂の種類としては、以前から用いられてきたポリスチレン樹脂のほかに、最近ではポリエチレングリコール鎖の伸びたポリスチレン樹脂 (Tenta-Gel) が用いられている。これは、各種有機溶媒や水との親和性が良いため化学反応を行う際に大変都合が良い。また化合物を水溶液中でアッセイを行うのにも適していることから今後広く用いられると思われる。Split syn-

thesis で得られたライブラリーは混合物である。そこでこのライブラリーを用いてアッセイを行った場合、活性を示した化合物 (ビーズ) の構造を決定する必要がある。ペプチドライブラリーの場合には直接アミノ酸配列分析器で構造を決定できる。これは非常に高感度であるためビーズ1個分のペプチドでも充分分析可能である。またヌクレオチドライブラリーの場合には、polymerase chain reaction (PCR) 法によって十分な量を確保した上で構造決定を行う。これらは、構造決定のためにライブラリー合成時に特別な操作を必要としないので合成は容易であり、構造決定も迅速に行える利点があるが、ペプチドやオリゴヌクレオチド以外の化合物の構造を決定するのは難しい。そこでコロンビア大学の W.C.Still 教授等は、化合物にバーコード様の札 (tag) をつけこのバーコードを解読することにより構造がわかるような、encode 法 (コードをつける方法) を開発している。つまりビーズにビルディングブロックをつなげてライブラリーを構築していく際に、各ビルディングブロックに対応する tag 分子をビーズの別な場所につなげていき、これにより反応の履歴をビーズ上に記録していくのである。活性試験でヒットしたビーズはガスクロマトグラフィーにより tag の種類が検出され、これにより対応する化合物の構造が同定される方法である。Still 教授等の tag はポリハロベンゼン系化合物で化学的に安定で、ガスクロマトグラフィーに対して非常に感度が良く、活性試験でアッセイの妨害になる可能性が低いなどの特徴を有し、幅広い化合物のライブラリーに応用できると期待されている。ライブラリーの合成に手間はかかるが、tag を用いることで構造決定が迅速にでき、ライブラリー自体の純度がそれ程良くなくても構造の確定ができるなどの利点

がある。

ライブラリー構築のもう一つの方法に parallel synthesis 法がある。これは、最終生成物が一つのプール内に目的化合物一つだけになるように数十～数百個を同時に合成する方法で、ビーズやピン（固相合成用のポリアクリル酸を導入したポリエチレン）の先端を用いて building block を次々結合させることにより合成される。この合成法のメリットは、ロボットを用いた自動合成が可能で、短時間で数千個の化合物を合成することができる。ライブラリーの種類は split 法に比べて少ないが、ある程度の量が確保できるという長所がある。またライブラリーの確認が確実で既存の assay 系をそのまま使用できるため、企業等では parallel 法でライブラリーを作成している場合が多い。これら2つの方法の中間的な手法として Houghten が開発した tea bag 法が知られている。これはポリプロピレン製の tea bag にビーズを封入し、tea bag ごとに split 合成するもので、ピン法よりも合成は簡単で大量合成できるという長所がある。

ライブラリーの構築法は、その目的により異なってくる。新薬のリード化合物を探索する場合には、化合物の純度よりも変化に富んだ大きなサイズのライブラリーが要求されるので split 法が適していると思われる。また、リード最適化のためのライブラリーでは、得られたリード化合物の骨格をもとに類縁体を合成していくので、ライブラリーのサイズはそれほど大きくなくてもよいが個々のライブラリーメンバーの純度は高い方が良く、量も得られた方がよいので parallel 法が適していると思われる。

3. 活性試験方法について

得られたライブラリーの活性試験は、混合物で

行うか単品で行うかによって異なってくる。これは構築したライブラリーの合成方法に依存する場合が多い。

Parallel synthesis で構築されたライブラリーは、単独の化合物として assay を行うので、独立した assay をライブラリーのサイズと同じだけ行わなくてはならない。既存の assay 系をそのまま使用できるというメリットはあるが、大きなサイズのライブラリーの assay を行う場合は容易ではない。Split synthesis で構築されたライブラリーではサイズが大きいのもっと効率の良い方法で assay が行われる。例えば新規リード化合物を1万個のライブラリーの中から探索する場合、一つ一つのビーズについて assay を行っていたのでは大変である。そこで20の化合物を一つにまとめて一つの穴に入れて混合物として活性試験を行う方法がとられる。これにより1万のライブラリーを500のライブラリーサイズのものとして活性試験が行える。この中で一つの穴のみが強い活性を示せば化合物は20個に絞ることができ、これらを再合成することによりあと1回の assay で活性を示す目的の化合物の構造を明らかにすることができる。Split synthesis 法のライブラリーではこれら溶液中での assay とは別に固相上でそのまま assay を行う方法も開発されている。これは、化合物がビーズに結合したままで assay を行い、活性なビーズを色、蛍光、同位体標識、磁石などで選別する方法であり、cell sorter などを用いた迅速な自動スクリーニングも可能であるので100万を越えるライブラリーでも assay が比較的容易に行える。しかしながら化合物が樹脂に結合しているため溶液中の assay とは異なる結果を与える可能性があるため注意が必要である。

4. ライブラリーの例

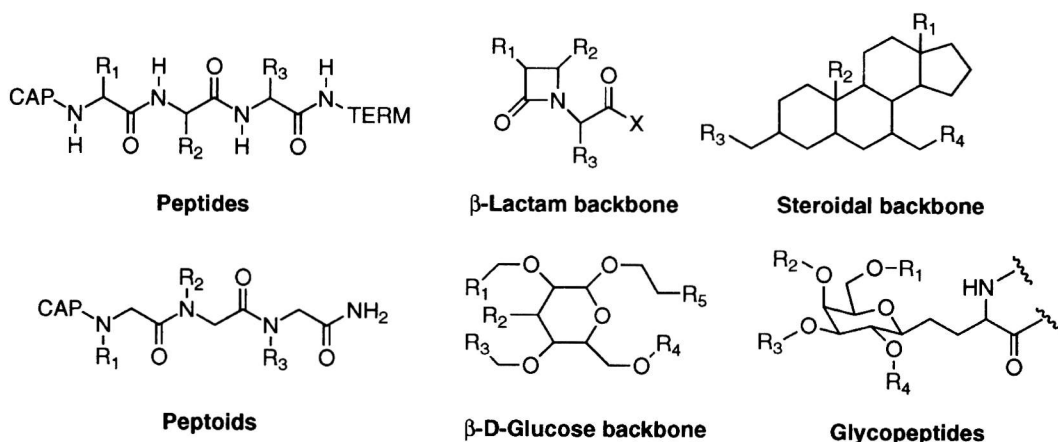


図2. ライブラリーの例

コンビナトリアルケミストリーは、ペプチドの自動合成技術の開発の中で発展してきた。1984年のGeysenのマルチピン法、85年のHoughtenのtea bag法、91年にはsplit合成法が確立して広まっていった。その後、ペプチドライブラリーは、ノンペプチドのコンビナトリアル合成へと発展していき現在では様々なライブラリーが報告されている(図2)。コンビナトリアルケミストリーを用いた新薬の開発例も多く報告されており、HIV protease 阻害剤、candida albicans RNA Polymerase 阻害剤、抗ガン剤、抗トロンビン薬、骨代謝治療薬、骨髄回復促進剤等に成功を収めている。

5. 最後に

以上コンビナトリアルケミストリーについてその概観を述べてきた。この技術は創薬研究においてこれまでとは全く異なる切り口を見せてくれた。多くの面で我々に発想の転換を要求してくる。さらに創薬研究のみならず、様々な研究分野で発展する可能性を秘めた技術である。合成化学的には

まだまだ解決しなくてはならない問題を数多く含んでいるが創薬研究の効率はかなり加速されてきた感じがする。今後の発展が大いに期待される。

謝辞: 本総説を執筆するにあたり、理化学研究所末永俊朗博士から資料提供及び御助言校閲を賜りました。ここに感謝致します。

参考文献

化学同人発行 「化学」8月号(1996)。
軒原、深瀬 「化学と生物」Vol.34, No.9~12 (1996)。(No.10~12は近刊予定)

タンパク質が100°C以上でも使える？



大野 弘 幸

1. はじめに

「タンパク質，なかでも酵素などは生理温度で最も活性が高くなるよう設計された機能分子である」と，高校生の頃に教わった。だが，早稲田で高分子科学について多くを学んだ後に，生体高分子の機能を再び考えた時，至適環境から大きくはずれた条件でも働くタンパク質を作れないだろうかと思ったことがあった。同時に40°Cを超えると活性が大きく低下する原因である高次構造に大変興味を覚えたものだった。合成高分子を使いながら，はからずもタンパク質に著しい耐熱性を与えることができるようになってきたので，ここに最近の成果を紹介する。

2. ポリエーテルを溶媒に使う

我々は水と良く似た構造の高分子を使い，水中で発現される現象を高分子中で再現することを研究している。溶媒として用いている高分子はポリエーテルである。水分子(H-O-H)の水素をメチレン基で置換すると(-CH₂-O-CH₂-)が得られる。これを繰り返し単位とする高分子がポリエチレンオキシド((PEO)，ポリエチレングリコール，ポリオキシエチレンとも呼ばれる)である。構造の類似性から容易に予測されるとおり，PEOは多くの水溶性分子を溶解できる。高分子のPEOにでさえも1.0mol/l以上溶解する無機塩は多い。一方，エチレン単位は疎水性の分子の溶解に効力を発揮するため，PEOは水に溶けない有機分子

の溶媒としても有力である。

マトリックスの高極性によって多くの無機塩はPEOに溶解し，イオンに解離する。また，ガラス転移温度が-80°Cと低いため，電位差を与えると電位勾配に沿ってイオンが移動する。これが，イオン伝導性高分子としてPEOが汎用されている理由である。

イオンが存在でき，しかも移動できる場であるならば，電極反応が可能である。無機塩を溶解させたPEOを二次電池などに応用した例が既に報告されており，不十分な特性ながらも固体溶媒としての有用性は証明されていた。そこで，ポリエーテルに無機塩を溶解させ，広く電気化学一般の反応溶媒としての可能性の検討を開始した。

3. ポリエーテルにタンパク質を溶かす

水溶液系の電極反応をPEO中で再現するというテーマを掲げ，東京農工大学に研究室を立ち上げたのは8年以上も前になってしまった(URL: <http://www.cc.tuat.ac.jp/~ohno>)。この間，遅々として研究は進んでいないが，低分子，金属錯体，高分子と，対象とする基質の分子量を大きくしていった。数年前からタンパク質の酸化還元反応についての研究も始めたが，この系はスタートからつまずいた。タンパク質がPEOに溶けないのである。当然ではあるが，すべての水溶性物質がPEOに可溶ではないことを痛感した。しかし，タンパク質の周りに強制的に溶媒状態を作ってやれば溶けるだろうと考え，PEO鎖をタンパク質の表面に化学修飾した。PEOという衣を羽

東京農工大学工学部生命工学科 助教授
(昭和51年応用化学科卒業・新制26回)

織ったタンパク質は予測通りに PEO オリゴマーに溶解した。タンパク質の PEO 修飾法が、抗原抗体反応を回避する薬剤開発の大きな方法論として、研究例が多く出てきていた時期に重なったことも幸いした。我々が使っているのは、活性中心に鉄ポルフィリン錯体を有するヘムタンパク質である。これらの酸化還元は電氣的にもスペクトル的にも解析が容易である。PEO に可溶化したタンパク質を加え、電極を導入して電位を印加すると、タンパク質の活性中心を酸化還元させることができた。この小さな成功に力を得て PEO 中のタンパク質の電気化学に進んでいった。

4. 120°Cでも酸化還元可能なタンパク質

PEO 修飾したヘモグロビン (PEO-Hb) を分子量200の PEO オリゴマーに溶解させ、酸化体と還元体のスペクトルを異なる温度で解析した。ITO 透明ガラス電極を利用した薄層電極セルを用い、作用極近傍の変化を追跡した。PEO-Hb 中の鉄イオンは初めは3価であり、図1に示すように、

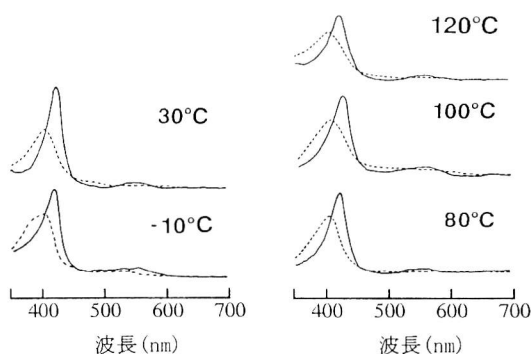


図1 0.5M の KCl を含む PEO200に PEO-Hb を 0.1mM 溶解させ、+0.7V (vs. Ag) (---) と-1.0V (—) を印加したときの可視スペクトル

403nmに吸収極大を持つスペクトルを与えるが、作用極に-1.0ボルトを印加すると徐々に還元され、2価になってゆく。

-10°Cでも酸化還元できる(但し遅い)というのも興味深い、常圧の水の中では考えにくい高温でも電極応答を示すことが解った。徐々に高温で実験を行うと、120°Cでも1時間以上繰り返し酸化

還元できた¹⁾。高温側では徐々に立体的なコンフォメーションが崩れてくるものの、生理温度に戻すとほぼ初期の構造に戻ることも示唆された。

水中と PEO 中とでの実験結果を比較するまでもなく、水中ではコンフォメーションの乱れと、大過剰に存在する水による加水分解の危機が昇温により顕著になる。PEO 中ではプロトン濃度が極めて低く、系の分子運動性も穏やかなので、場の相対的な熱運動は水中よりもはるかに低い。これが100°C以上でもタンパク質が熱変性しにくい(より正確に言えば、構造変化があるものの、可逆的なコンフォメーション変化にとどまる)原因であろう。「タンパク質は水を含まない乾燥状態では耐熱性がある」とか、「有機溶媒中の酵素活性が高温でも発現される」など、我々の結果を支持する報告もある。水中の溶質は、常に溶媒分子の強烈な体当たり(？)にいるのではないだろうか。

高分子量のタンパク質の拡散は PEO 中では遅いので、全体の反応は拡散律速となりがちである。そこで、タンパク質を電極に固定した系で溶媒 PEO の分子量依存性を解析したところ、分子量増大に伴い熱安定性も向上した。しかし、耐熱性は限りなく改善されるというのではなく、どうやら140°C付近が上限であるようだ。また、種類によっても耐熱性に違いがみられている。これらをすべて die-hard にするのはまだ時間がかかりそうだ。今の処、タンパク質への電子移動に関する耐熱性の改善に留まっているが、水を使わずに PEO を溶媒とする条件が受け入れられるならば、他の機能についても期待が持てる。

ようやくタンパク質も工業的な材料として眺められるようになってきたので、今後は、タンパク質個々の機能を制御できるような工夫をして、素子化に向けて努力してみたい。

引用文献

- 1) H. Ohno and N. Yamaguchi, *Bioconjugate Chemistry*, **5**, 379 (1994)