

Newsletter



日本化学会
生体機能関連化学部会

巻頭言

リソースフルな研究者 小野田 晃 3

Award Accounts

部会講演賞

二置換シクロプロパンの stereodivergent 合成を目的とした微生物ヘム依存性酵素の探索	加藤 俊介	5
直列型ユビキチン鎖の非酵素的修飾を介した標的タンパク質の分解経路制御	古畑 隆史	10
コアセルベート形成のための抗体スキャホールド創製と抗体の細胞内送達	川口 祥正	16

Award Accounts

ポスター賞

超偏極 MRI 分子プローブ群を用いたアミノペプチダーゼ活性の生体内多重解析に基づくがん診断	谷田部 浩行	21
抗原タンパク質修飾ペプチド集合体の表面電荷制御とワクチンアジュバントへの応用	難波江 友紀	23
2 種類の短鎖 DNA をビルディングブロックとした DNA 集合体の形態制御	牧野 哲尚	25
二価鉄精密イメージングに向けた分子内イミントラップ戦略による <i>in situ</i> 鉄(II)		
イオンプローブ合成法	河合 寛太	27
蛍光イメージングのための世界最小モノボディタグの創製	宮崎 友輝	29
細胞内局所の粘度計測を可能にする FRET 型粘性感受性蛍光プローブの開発	笠井 柊杜	31

ヒト直交性のあるキシロシダーゼを増感酵素とする沈着型蛍光性基質の開発

黒田 晃大 33

ペプチド固定化ビーズを用いた環境中の鉛イオンの簡便な検出

吉田 秀平 35

ぶらり研究室の旅

京都大学大学院 工学研究科 高分子化学専攻 生体機能高分子研究室

人と地球を結ぶ高分子の実現を目指して

佐々木 善浩 37

部会行事

第 18 回バイオ関連化学シンポジウム開催報告

-第 39 回生体機能関連化学シンポジウム・第 27 回バイオテクノロジー部会シンポジウム-

中村 史・花岡 健二郎 39

第 18 回バイオ関連化学シンポジウム講演賞・ポスター賞講評

松浦 和則 41

お知らせ

第 19 回バイオ関連化学シンポジウム 会告

-第 40 回生体機能関連化学シンポジウム・第 28 回バイオテクノロジー部会シンポジウム-

43

巻頭言

リソースフルな研究者

北海道大学地球環境科学研究所
小野田 晃



近所のスーパーに設置された古本コーナーは、近頃のささやかな楽しみです。いらなくなった書籍を自由に寄付（無料で処分）でき、興味があれば1冊10円で自由にもってかえてよいサステイナブルなコーナーで、意外にローテーションがよく、古本の新書入荷は期待がもてます。ビジネス書が一気に並んでいたり、寄付した方の職業や人柄に想像を膨らませてしまいます。

巻頭言の依頼を受けてから、いつも通り古本コーナーを眺めていると、「発想法」の文字が目にとまり、渡部昇一氏の著作を手に取りました。副題は、リソースフル人間のすすめ。発想のヒントになりそうです。

表紙には、リソースフル「resourceful」とは、発想の豊かさを表す言葉である。語源的には「再び立ち上がる」「再び湧き出す」転じてどんな状況においてもアイデアが出てくること、つまりは「汲めども尽きぬ知恵の泉」をもつことである。渡部氏は、英語学者、評論家で、以前はテレビにもよく出演されていましたし、多くの書籍を残された方です。研究者である限りは、新しい研究のアイデアを生み出し続けたいと常々考えているもの。リソースフルな研究者でありたいものです。

以下、「発想法」より抜粋を交えて。

リソースフルとは— 英語辞典では、1) 機略縦横の、計略（知謀）に富んだ、思い付きのうまい、やりくり上手の、2) 資力のある、物質の豊かな、資源のある、鉱物資源に乏しい国の住人としては2)は反射的に浮かびますが、1)の意味は馴染みがありません。resourceにも、その時々状況に対応できる能力、または技量、という意味があるとは新鮮です。

発想の井戸を掘る— resourceに「汲んでも湧き出す」という語源的な意味があることから、泉や井戸が連想されます。確かに、sourceも源。resourcefulであるためには、井戸の数を増やせばよいとは至って明解なアドバイスです。一本の井戸を掘り過ぎでは枯れてしまうとの指摘は納得できます。備えあれば憂いなしでしょうか。ボール1つと2つの出し方で、単純な順列と組合せで考えると、AとBの2つあれば、A、B、AB、BAの4通りです。3つあれば15通り。言われてみれば当然ですが、15通りの手の内があれば、研究提案を考えるにも心強い。井戸も枯らさずに使っていけるに違いありません。

「発想法」では、自分の体験をみがく、井戸の深さが自信を生む、カンを養う、異質の目をもつ、などの章立てで、「知謀沸くが如し」と称された秋山真之中将、江戸川乱歩氏、堺屋太一氏など歴史に残るプロダクティブな方々の例が引き合いに出され、発想のヒントが散りばめられており、学ぶところが多い一冊です。

研究者の醍醐味は、自由に研究テーマを描いて、進みたい方向へ、知りたい方向へ失敗しながらも向かっていけることです。諸々の環境要因に左右されつつも、流行に流され過ぎずに、独自のサイエンスを進めるためにも、resourcefulな研究者でありたいものです。

四半世紀前、私が大学院生の時に恩師から何度も聞いた話が思い出されます。ロスチャイルド家の伝書鳩、ユダヤ人研究者の情報整理術、文化人類学者の川喜田二郎氏のKJ法など、活かした情報をどのようにして早く入手するのか、たくさんの情報をどのように整理すれば新しい変化や折れ曲がり気づく可能性を高めることができるか、研究者としての知恵を授けてもらったことは、感謝しかありません。情報の移動速度が限られた時代の知恵は、情報入手が容易となった現在も重要と言えるでしょう。

2024年は、人工知能に関する2つのノーベル賞受賞もあり、その発展と発展速度を改めて認識する年となりました。生体分子研究も、人工知能と並走して加速度的に発展していくことが分かってきました。大学院生の時分には、夢だった技術が現実となったと感じます。一方で、発想法には研究者独

自の視点、経験、直観が欠かせないことは今後も変わらないでしょう。2025年を目前に控え、次の25年の生体分子研究が、どのように進むか、興味が尽きません。アラフィフ研究者となり、25年後を想像する時、たくさんの若い研究者の皆さんが、生体機能関連化学部会に参加していることは心強く、楽しみに感じられます。2050年のバイオ関連化学シンポジウムの講演会場やポスター会場で、どのような発表があるのかと想像を逞しく、新しい井戸に思いをはせたいと思います。

二置換シクロプロパンの stereodivergent 合成を目的とした微生物ヘム依存性酵素の探索

大阪大学大学院工学研究科
加藤 俊介



著者紹介：兵庫県立川西緑台高校を卒業後、2012年に大阪大学工学部応用自然科学科に入学。2015年の研究室配属から2021年の学位取得まで一貫して、大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻の林高史先生・小野田晃先生（現 北海道大学大学院環境科学院 教授）にご指導いただき、非天然金属錯体を含む人工金属酵素に関する研究を行ってきました。特に在学当時から「生物無機化学」という学際領域で研究を行う中で、広く自分は化学者であり生物学者だと名乗れる研究者になることを目標に研鑽に励んできました。2016年には、大阪大学大学院基礎工学研究科の真島和志先生・劔隼人先生（現 大阪大学大学院工学研究科 教授）にご指導いただき、遷移金属触媒を用いた化学反応開発の研究に従事させていただきました。2017年から2018年まで、ドイツ・アーヘン工科大学のUlrich Schwaneberg先生の研究室に留学し、進化分子工学をはじめとする生物工学の専門知識と実験技術を学びました。また、2019年には住友化学株式会社バイオサイエンス研究所にお世話になり、微生物を用いた農薬中間体の合成に関する研究に参画させていただきました。現在は、学位を取得した林高史先生の研究室（大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻）の助教に着任し、これまでの経験で深めた「化学」と「生物工学」の両分野における専門性を活かしながら、新しい学際研究領域を立ち上げることを目標に研究を行っております。特に最近は、下記にもあるように、微生物がもつゲノム情報や代謝反応に強く興味があり、それらを活用した化学反応開発の研究に取り組んでおります。自身にとっても研究室にとっても新しい挑戦ということもあり、手探りと失敗の繰り返しの中で開始した研究でしたが、この度はこのような栄えある賞をいただけたことを大変光栄に思います。

1. はじめに

酵素や微生物等を用いた物質変換法（Biocatalysis）に注目が集まる昨今において、優れた触媒活性を示す酵素を高精度に探索するハイスループットスクリーニング（HTS）技術の開発は必要不可欠である。特に、精製された酵素サンプルを用いたHTSは、細胞夾雑物による影響を完全に排斥し、より厳密な反応条件下でのスクリーニングを可能にする点で非常に有用である。しかしながら、タンパク質精製に要するコストや労力の観点から、既存のタンパク質精製手法（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーなど）を大規模なHTSへと応用することは難しく、より高効率かつ安価なタンパク質精製手法の開発が望まれている。そこで本研究では、安価な多糖高分子であるキチン粉末を用いた新規アフィニティー精製手法「CSAP法」を開発した^[1]。このCSAP法では、市販のキチン粉末（市場価格：100gあたり2,000円程度）をクロマトグラフィー担体として利用し、独自の結合タンパク質ChSavを共役させることで、*Strep-tag II* 融合タンパク質の効率的かつ簡便なアフィニティー精製が実現した。さらに本研究では、開発したCSAP法を活用し、二置換シクロプロパンのstereodivergent合成を実現する微生物ヘム依存性酵素のゲノムマイニングに基づく探索を行った。本稿では、このCSAP法を用いたタンパク質精製の詳細と、実際の酵素探索への応用について紹介したい。

2. 結合タンパク質 ChSav の構築と CSAP 法の開発

Strep-tag II は、8残基のアミノ酸（配列：WSHPQFEK）から構成される比較的分子量の小さなアフィニティー精製用タンパク質タグである^[2]。His-tag や MBP-tag などの一般的な他のタンパク質タグと比較した際の *Strep-tag II* の利点として、① タグの結合特異性が高くアフィニティー精製後のタンパク質純度が優れること、② タグの化学的反応性が低くペプチド長も短いため融合タンパク質の物性に影響を与えにくいこ

と、③ アフィニティークロマトグラフィーの溶出条件 (2.0 mM 程度のビオチンの添加) が温和であることなどが挙げられる。しかしながら、*Strep-tag II* 精製用の市販のクロマトグラフィー担体は非常に高価であり、さらに、繰り返し利用のためのカラム再生操作が煩雑である。従って、*Strep-tag II* 融合タンパク質のアフィニティー精製に、安価かつ使い捨て可能なクロマトグラフィー担体を使用することは、精製酵素サンプルを用いた HTS を実施する上で大きなアドバンテージを与える。

そこで本研究では、安価かつ使い捨て可能なクロマトグラフィー用担体として、キチン粉末を利用することを着想した。天然由来の多糖高分子であるキチン粉末は、主にカニやエビなどの水産物から加工廃棄物として得られ、非可食性バイオマスとして、現在さまざまな活用法の検討がなされている。本研究では、このキチン粉末を *Strep-tag II* のクロマトグラフィー担体として利用するべく、*Strep-tag II* 結合能を有するストレプトアビジン変異体^[3]と、*Thermococcus kodakarensis* KOD1 由来キチナーゼのキチン結合ドメイン^[4]を融合

した独自の結合タンパク質 ChSav を調製した (図 1a)。ChSav の発現には、*Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP3 を用いた分泌発現システムを採用し、キチン粉末を担持したカラムに対して、ChSav を含む *Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP3 の培養液の上澄みを流通させることで、ChSav のカラムへの固定化を行った。続いて、目的の *Strep-tag II* 融合タンパク質を含む大腸菌溶菌液を、この ChSav を固定化したキチン粉末へと添加し、カラムの洗浄操作後、ビオチン溶液により *Strep-tag II* を選択的に解離・溶出させることで、目的タンパク質のアフィニティー精製を行った (図 1b)。例として、図 1c に *Strep-tag II* を融合したヘムタンパク質 (計 8 種類) の精製画分の SDS-PAGE を示す (左から順にミオグロビン、ペルオキシ亜硝酸異性化酵素、色素分解ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、切断型ヘモグロビン、フラボヘモグロビン、トリプトファン-2,3-ジオキシゲナーゼ、シトクロム P450)。目的タンパク質の分子量や多量体構造、*Strep-tag II* の付加位置 (N 末端・C 末端) に関係なく、目的の *Strep-tag II* 融合タンパク質が単一のバンドとして高純度で得られていることが明らかとなった。これらの結果を受け、筆者らは、このアフィニティー精製手法を「Chitin- and Streptavidin-mediated Affinity Purification (CSAP) 法」と名付け、さらなる精製条件・実験操作の検討を行った。

3. 大腸菌共発現系を用いたワンステップ精製 CSAP 法の開発

上記の分泌発現系を用いたアフィニティー精製手法では、目的の *Strep-tag II* 融合タンパク質とは別に、ChSav を含む *Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP3 の細胞培養上澄み液を調製する必要がある。CSAP 法に要する実験操作の更なる簡略化・効率化をめざし、次に本研究では、大腸菌共発現系を用いた一段階のアフィニティー精製系の構築に取り組んだ。具体的には、図 2a に示すように、同一の大腸菌細胞内で ChSav と目的の *Strep-tag II* 融合タンパク質を共発現させて両者の複合体を系中で形成することができれば、別途

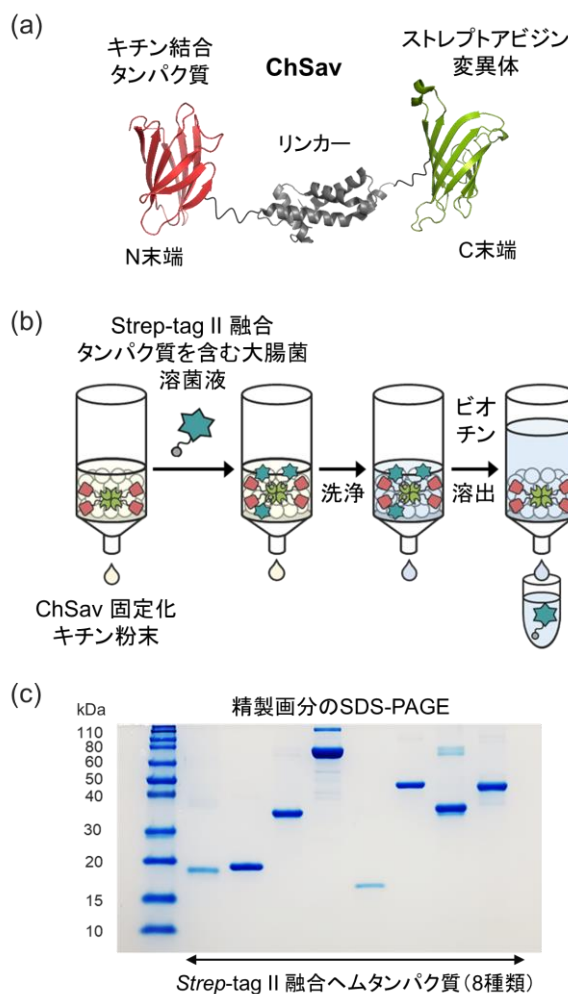


図 1 : 結合タンパク質 ChSav を用いた *Strep-tag II* 融合タンパク質の精製

ChSav を調製する必要なく、続くキチン粉末を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、目的タンパク質をワンステップで容易に精製可能であると予想した。

この仮説のもと、次に本研究では、アラビノースプロモーター P_{BAD} 支配下に ChSav 遺伝子をコードする pACYC 系プラスミド (pAR3b-ChSav) を調製し、pET システムとの併用による ChSav と *Strep-tag II* 融合タンパク質の共発現を実施した。一例として、ChSav と *Strep-tag II* 融合緑色蛍光タンパク質 (GFP) を共発現させた *Escherichia coli* BL21(DE3) 派生株の SDS-PAGE を図 2b に示す。アラビノースと IPTG の二つの誘導剤を用いた直交型の遺伝子発現制御により、設計通りの両タンパク質の共発現が実現していることが分かる。さらに、この ChSav と GFP を共発現させた大腸菌溶菌液を、キチン粉末を担持したカラムへ添加し、上記と同様にカラムの洗浄操作後、ビオチン溶液を用いて溶出させることで、*Strep-tag II* 融合タンパク質の一段階のアフィニティー精製に成功した。図 2c の精製画分の SDS-PAGE に示す通り、アラビノースと IPTG の両誘導剤の添加により ChSav と GFP の共発現を行った場合のみ、高純度の GFP が得られることが明らかとなった。

また、GFP だけでなく、他の様々な *Strep-tag II* 融合タンパク質についても、この大腸菌共発現系を用いたワンステップ CSAP 法が機能することが明らかとなった^[1]。さらに、この大腸菌共発現系を用いた CSAP 法は、HTS を目的とした小スケールでのタンパク質精製だけでなく、大スケールでのタンパク質精製にも応用することができ、7.5 L の大腸菌培養液から約 500 mg の *Strep-tag II* 融合タンパク質 (GFP) を高純度に回収できることを実証している^[1]。

4. 二置換シクロプロパンの stereodivergent 合成を目的とした微生物ヘム依存性酵素の探索

最後に、開発した CSAP 法の応用として、スチレン (1) とジアゾ酢酸エチル (2) のシクロプロパン化反応を触媒する微生物酵素の探索を実施した (図 3a)。本反応のようなカルベン転移によるシクロプロパン化反応を、自然界で行う酵素は未だ発見されていないものの、近年、進化分子工学的アプローチにより改変されたシトクロム P450_{BM3} 変異体が、本反応に対して触媒活性を示すことが F. H. Arnold らの研究グループが報告している^[5]。本研究では、これらシトクロム P450_{BM3} 等の既知タンパク質の進化分子工学的アプローチに捉われず、微生物ゲノムデータベース上の多種多様なヘム依存性酵素を網羅的に探索 (ゲノムマイニング) することで、シクロプロパン化反応においてより高い触媒活性と立体選択性を示す酵素を同定することをめざした。特に、このスチレン (1) とジアゾ酢酸エチル (2) のシクロプロパン化反応では、2つの不斉炭素中心を有する二置換シクロプロパンが、4種類の立体異性体 (*S,S*)-3, (*R,R*)-3, (*R,S*)-4, (*S,R*)-4 の混合物として生成する。本研究では、この4種類の立体異性体の Stereo-divergent 合成を実現するヘム依存性酵素を同定することを目標に、ゲノムマイニングおよび酵素スクリーニングを開始した。

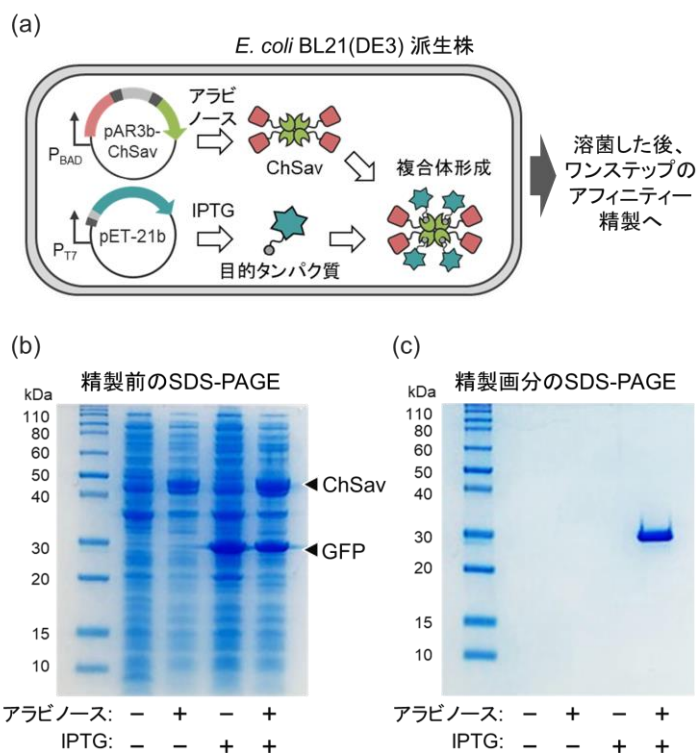


図 2: 大腸菌共発現系を用いたワンステップアフィニティー精製 CSAP 法の開発

まず初めに、種々の微生物由来の 96 種類のヘム依存性酵素（シトクロム P450、色素分解ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、トリプトファン-2,3-ジオキシゲナーゼ等を含む）の遺伝子をゲノム DNA から大腸菌発現用ベクターにクローニングし、*Strep-tag II* を末端に付加した組換え酵素の遺伝子ライブラリを構築した。そして、この遺伝子ライブラリを *E. coli* BL21-Gold(DE3) 株を用いて発現した後、CSAP 法によるタンパク質精製を 96-well 形式で実施し、精製条件下でのシクロプロパン化反応に対する触媒活性および立体選択性の評価を実施した（図 3b に各シクロプロパン立体異性体 (S,S)-3、(R,R)-3、(R,S)-4、(S,R)-4 の反応収率を図 3a に対応する色別に示す）。その結果、目的のシクロプロパン化反応に対して有望な触媒活性と立体選択性を示すいくつかのヘム依存性酵素の同定に成功した。中でも、グロビンフォールドを有する比較的小さなヘムタンパク質（以降、グロビン）は、他のヘムタンパク質と比較して特に高い触媒活性と優れた立体選択性を示すことが判明した。例えば、硫黄酸化細菌 *Starkeya novella* 由来グロビン（SnGb）は、非常に高い触媒活性（ $k_{\text{cat}} = 4.9 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$, $K_M = 3.4 \text{ mM}$ 、触媒回転数 $\text{TON} = 9.2 \times 10^4$ ）を示し、目的生成物のうちトランス異性体 (S,S)-3 を立体選択的 (>96% de, >98% ee) に与えた（図 3c）。その一方で、放線菌 *Streptosporangium roseum* 由来のグロビン（SrGb）は、熱力学的に不利なシス異性体 (S,R)-4 を立体選択的 (>96% de, >98% ee) に与えることが明らかとなった（図 3d）。通常、酢酸ロジウム (II) ダイマー等の遷移金属触媒を用いたシクロプロパン化反応では、熱力学的に有利なトランス異性体の生成が優先するため、シス異性体 (S,R)-4 をジアステレオ選択的に与えた SrGb の触媒特性は、有機化学的な視点から見ても大変興味深い。また最近では、ゲノムデータベース上の類似配列を有するグロビンの配列相同性検索とクラスタリング解析を実施し、微生物由来グロビンの体系的なスクリーニングを実施することで、シクロプロパン生成物のうちこれまで未獲得であったトランス異性体 (R,R)-3 とシス異性体 (R,S)-4 を立体選択的に与える微生物由来グロビンをそれぞれ同定することにも成功している。このように、本研究で開発した CSAP 法は、精製条件下での酵素探索を指向した 96-well 形式の HTS へと応用可能であることが実証された。

5. おわりに

本研究で開発した CSAP 法は、高価なクロマトグラフィー担体を使用することなく、市販のキッチン粉末を利用し *Strep-tag II* 融合タンパク質のアフィニティー精製を実現する独自手法である。他の既存のタンパク質精製手法と比較した際の、(i) キッチン粉末のコスト面での優位性や、(ii) *Strep-tag II* の汎用性と利便性、(iii) 実験操作のシンプルさ、について考慮すると、この CSAP 法がもたらすアドバンテージは非常に大き

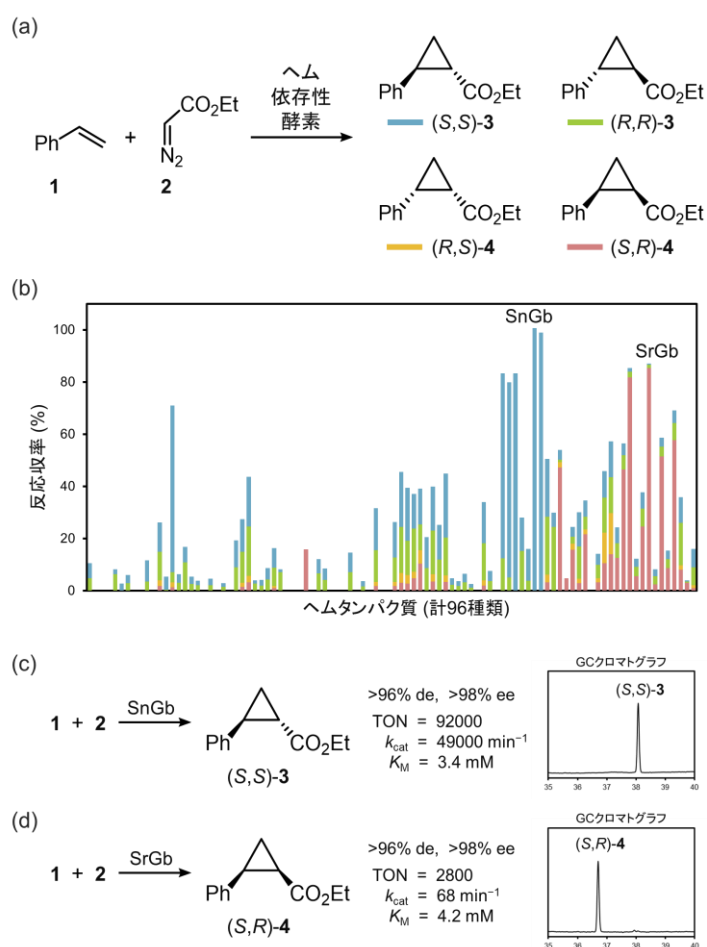


図 3: CSAP 法を用いたシクロプロパン化反応を触媒するヘム依存性酵素の探索

い。また、本稿では一例として、酵素探索にむけたハイスループットスクリーニングへの応用を示したが、他にもタンパク質の進化工学実験や、大規模スケールでの精製タンパク質の調製、固定化酵素触媒の開発など、様々な学術的・工業的用途にも CSAP 法を幅広く利用できる可能性が高い。また、本稿の後半で紹介した二置換シクロプロパンの stereodivergent 合成を実現する微生物ヘム依存性酵素は、自然界の生物にとって新規かつ有機合成化学的手法でも達成困難な化学反応を触媒する酵素である。酵素を用いた物質変換法 (Biocatalysis) に注目が集まる昨今において、今後、このような CSAP 法を用いた微生物酵素探索と反応開発研究が、Biocatalysis の発展と拡張に貢献することを期待したい。

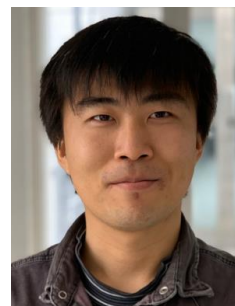
謝辞

本研究は、筆者が所属する大阪大学大学院 工学研究科 林研究室で行われました。林高史教授ならびに本研究に多大な貢献をしてくれた学生の 竹内康基さん、岩木元直さん、梅田康平さんに感謝申し上げます。また、共同研究者である神戸大学先端バイオ工学研究センター 蓮沼誠久教授、工藤恒博士、大阪大学生物工学国際交流センター 本田孝祐教授、宮崎健太郎教授に御礼申し上げます。また、本研究を進めるにあたって、*Thermococcus kodakarensis* KOD1 のゲノム DNA を分与してくださった京都大学 工学研究科の跡見晴幸教授に感謝申し上げます。本研究は、JST ACT-X「環境とバイオテクノロジー」領域、JSPS 科学研究費助成事業 新学術変革領域研究 (A) 「無細胞分子システム」「予知生合成」公募研究、基盤研究 (B)、若手研究、蛋白質研究奨励会 金子・成田研究奨励金の助成を受けています。最後に、我々の研究の紹介の機会をくださった日本化学会生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会幹事の先生方、特にニュースレター編集委員の先生方に深く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Kato, S.; Takeuchi, K.; Iwaki, M.; Miyazaki, K.; Honda, K.; Hayashi, T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, *62*, e202303764.
- [2] Schmidt, T. G.M.; Skerra, A. *Nat. Protoc.*, **2007**, *2*, 1528-1535.
- [3] Voss, S.; Skerra, A. *Protein Eng.*, **1997**, *10*, 975-982.
- [4] Hanazono, Y.; Takeda, K.; Niwa, N.; Hibi, M.; Takahashi, N.; Kanai, T.; Atomi, H.; Miki, K. *FEBS Lett.*, **2016**, *590*, 298-304.
- [5] Coelho, P.; Brustad, E. M.; Kannan, A.; Arnold, F. H.; *Science*, **2013**, *339*, 307-310.

直列型ユビキチン鎖の非酵素的修飾を介した標的タンパク質の分解経路制御
 東京大学大学院工学系研究科
 古畑 隆史



著者紹介：長野県立松本深志高等学校を卒業後、東京大学教養学部理科二類を経て、同大学工学部化学生命工学科へ進学。学部4年次（2014年）から山東研究室に配属され、脂質修飾核酸を用いた細胞表層の機能化手法の開発を目指して研究生活をスタートした。大学院進学から2020年の博士号取得までも同研究室に所属し、山東信介先生のご指導のもと、大阪大学産業科学研究所の谷口正輝先生と大城敬人先生との共同研究にて単分子導電計測に基づく核酸の配列決定を促進する非天然核酸の開発に取り組んだ。学位取得後は、同専攻の岡本晃充先生の研究室に所属し、半合成的なアプローチによるタンパク質の人工構築や化学的機能化手法の開発、および機能解明に関する研究に従事している。核酸をメインとする研究からタンパク質に主眼を置いた研究へとシフトはしたものの、遺伝子に直接コードされていない生体分子の機能や情報（エピジェネティクス修飾や翻訳後修飾など）を化学の力を使って解読し、未探索の生体機能を明らかにしたいという思いで研究活動を行ってきた。

1. タンパク質標的分解

タンパク質標的分解は、特定のタンパク質を選択的に分解へと導く分子技術である。特に、細胞内に本来備わる分解機構をハイジャックし、内在性のタンパク質を分解誘導できれば、分解による不可逆的な機能の阻害により高い効果を示す分子標的薬としての応用が期待できる^[1]。そうした分解誘導剤の代表例がタンパク質分解誘導キメラ分子（PROteolytic TARgeting Chimera、通称 PROTAC）である。PROTACは、標的タンパク質とユビキチン連結酵素 E3 に結合するリガンド分子をリンカーを介して共有結合により連結したヘテロ二機能性分子であり、両者を空間的に近接させることで標的タンパク質のユビキチン化とプロテアソームによる分解を促進する。前述のように高い薬効が期待できるだけでなく、標的タンパク質に備わるあらゆる機能を阻害できる。したがって、小分子をベースとした分子標的薬ではアプローチが困難であった酵素活性を持たないタンパク質（足場タンパク質など）や多機能性タンパク質など、いわゆる **undruggable target** に対して潜在的に適応可能な薬剤としても注目を集めることとなった^[2]。2015年に von Hippel-Lindau（VHL）と celebron（CRBN）を標的の E3 とする小分子ベースの PROTAC が相次いで報告されると応用は瞬く間に広がり、2024年11月現在 Phase 3 を含む臨床試験が進められるに至っている^[3,4]。

しかし、研究の進展に伴い、PROTAC の問題点も指摘されるようになってきた。一つは、内在のユビキチン化機構の変調に伴う分解効率の減退である。実際、VHL や CRBN を E3 として用いる PROTAC を細胞に対して長期投与すると、生存に必要とされる機能を維持したまま PROTAC 依存的な標的タンパク質のユビキチン化を妨げる変異が E3 に蓄積される^[5]。最終的に PROTAC による標的タンパク質のプロテアソームによる分解が誘導されなくなり、がんは薬剤に対する耐性を獲得することとなる。また、近年の研究で、PROTAC による標的分解には複数の E3 リガーゼの協働的な作用が重要であり、RPOTAC が直接結合する E3 以外の E3 活性の低下が分解効率を著しく減退させることが明らかとなった^[6]。これら補助的な役割を担うユビキチン連結酵素の変異も薬剤耐性の獲得につながるかもしれない。2つ目は、分解のプロテアソーム依存性である。プロテアソームは、細胞内における全タンパク質分解量の 7-8 割を担い、その観点から標的分解においてハイジャックする分解機構として理に適っている。しかし、プロテアソームが苦手とする性質を持つタンパク質も存在する。その一例が、アミロイドβのような凝集タンパク質である。プ

ロテアソームは円筒状の構造であり、その内部に活性中心を持つ^[7]。そのため、効率的な基質分解にはタンパク質を紐状に解く必要がある。しかし、凝集タンパク質のように末端構造が露出していないタンパク質では解きほぐしが難しい。そのため、そうしたタンパク質に対しては、もう一つの主要な分解機構であり、よりバルクの分解に適したオートファジーへと誘導することが効果的と考えられる。実際、ユビキチン（および、多量化した構造体であるポリユビキチン）は、その構造に応じてプロテアソームだけではなく、オートファジーへ基質を誘導する場合がある^[8]。したがって、適切に構造を制御した(ポリ)ユビキチンを非酵素的に標的タンパク質へ修飾する方法を確立できれば、内在のユビキチン化機構の活性に関わらず、標的となるタンパク質の性質に応じて分解経路も規定できる新しい標的分解法の確立につながるものと期待される。

2. ユビキチン-核酸キメラによる非酵素的な標的タンパク質のユビキチン化

非酵素的なユビキチン化手法の開発に向けて、我々はユビキチン-リガンドキメラ分子 (Ub-ligand) を設計した (図 1a)。Ub-ligand は、分解シグナルであるユビキチンと標的タンパク質に対するリガンド分子を共有結合で連結したヘテロ分子である。リガンドを介して、標的タンパク質と相互作用することで非共有結合的にユビキチンを提示できる。また、あらかじめポリユビキチンの構造（長さやユビキチン同士を繋ぐ側鎖や主鎖の位置など）を適切に規定しておくことで、プロテアソーム誘導型とオートファジー誘導型を作り分けることもできる可能性がある。発想と分子設計は非常にシンプルであり、化学的な相互作用による修飾であるから、ユビキチン化において細胞内の酵素的なプロセスを必要としない。これにより、PROTAC に対する薬剤耐性がんや凝集タンパク質を原因とする神経変性疾患のような、既存の薬剤の適応が難しかった細胞・組織へ応用するための足掛かりになると考えた。

コンセプトの実証に向け、我々はまずユビキチン部位として最もシンプルなモノユビキチンを用いたユビキチン-リガンドキメラの合成と評価を行なった。標的タンパク質としてがんや自己免疫疾患の関連が指摘される転写因子 NF-κB に着目し^[9]、ステム部分が NF-κB の認識配列となったヘアピン DNA (NFdecoy) をリガンドとして採用することとした (図 1a)。NFdecoy は 5'末端にアミノ基、3'末端には蛍光色素 fluorescein が修飾されており、*N*-Succinimidyl 4-(*N*-Maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylate (SMCC) と反応させることにより、5'末端にマレイミド基を付与することができる。これを C 末端にシステインを導入したユビキチン (Ub^{C77}) と混合することでマイケル付加反応によりユビキチンと連結し、生成されたユビキチン-NFdecoy (Ub-NFdecoy) をサイズ排除クロマトグラフィーにより単離した。続いて、標的タンパク質を Ub-NFdecoy 依存的にプロテアソームによる分解へと誘導できるか検証するために、試験管内にて標的タンパク質 (NF-κB p50 サブユニット)、Ub-NFdecoy、酵母 26S プロテアソームを混合し、37°C で 1 時間静置したのちの標的タンパク質の残存量をウエスタンブロッティングにより調べた。すると、Ub-NFdecoy の濃度が 0-1 μM まで上がるにつれて p50 の残存量は減少し、最少で 10-30%に達することが確かめられた

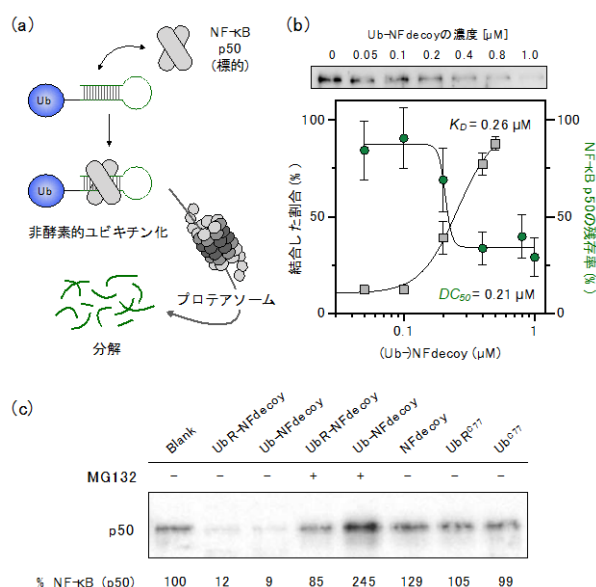


図 1. (a) ユビキチン-核酸キメラ (Ub-NFdecoy) による NF-κB の非酵素的ユビキチン化と標的分解. (b) Ub-NFdecoy による濃度依存的な NF-κB p50 サブユニットの分解、および NFdecoy と p50 の結合における親和性の評価. (c) UbR-NFdecoy による p50 の分解とプロテアソーム阻害剤 MG132 による分解抑制.

(図 1b)。分解量が最大分解量の半分となる時の Ub-NFdecoy の濃度 (DC₅₀) は 0.21 μM と求められ、ゲルシフトアッセイにより求めた見かけ上の解離定数 $KD = 0.26 \mu\text{M}$ とほぼ一致していた (図 1b)。このことから、p50 は Ub-NFdecoy との相互作用依存的に分解されているものと考えられた。また、細胞内への応用に向け、脱ユビキチン化酵素に対する切断耐性を向上させたユビキチン変異体 (UbR, Ub^{R72A/R74T}) をユビキチンユニットとして用いた UbR-NFdecoy も Ub-NFdecoy と同様に機能し、濃度 1 μM において 90% 程度の分解効率を示した (図 1c)。一方、p50 の分解はプロテアソーム阻害剤である MG132 により強く抑制されるとともに、UbR-NFdecoy の代わりに Ub、UbR、NFdecoy 単体を添加した場合にはほとんど確認されなかった (図 1c)。このことから、Ub(R)-NFdecoy 依存的に p50 をプロテアソーム分解へ誘導できることが試験管内において実証された。しかし、UbR-NFdecoy をリポフェクションにより細胞内に導入したところ (培地中の UbR-NFdecoy 濃度は 1 μM)、標的タンパク質である NF-κB p50 と p65 はほとんど分解されなかった。これは、モノユビキチンの分解誘導能は、夾雑な細胞内において機能するには不十分であることが一因と考えられた。また、UbR-NFdecoy の細胞内導入効率も十分ではない恐れもある。以上から、ユビキチン-リガンドキメラによる細胞内での標的分解誘導には、さらなる分子デザインの改良が必要であることが示唆された。

3. 細胞内で効果的にタンパク質分解を誘導する直列型ユビキチン鎖モチーフの探索

細胞内においては、単量体であるモノユビキチンは一般的に分解誘導能が低いとされている。一方、ユビキチンがさらにユビキチン化された多量体が修飾されるポリユビキチン化、もしくは、単一のタンパク質が複数のモノユビキチンで修飾されるマルチユビキチン化は細胞内でも機能するより強力な分解シグナルとして知られる^[10]。さらに、多量体の構造に応じて基質を誘導する分解経路も異なる。そこで、細胞内で強力かつ経路選択的に分解誘導可能な多量体型ユビキチン鎖構造を探索することとした。今回特に着目したのは、直列型ユビキチン鎖である。直列型ユビキチン鎖は、主鎖の N 末端と C 末端を介したペプチド結合によりユビキチンが複数連結した構造体であり、リシン側鎖を介して連結したその他のポリユビキチン鎖と違って核酸配列に一次構造としてコード可能であるという特徴を持つ。そのため、複数のユビキチンが協働的に機能することによる強力な分解誘導が期待できるほか、プラスミド DNA やメッセンジャーRNA (mRNA) などの核酸配列にコードすることで細胞内で発現させることができる。したがって、リガンドの構造としてペプチドを採用すれば、ユビキチン-リガンドキメラの全長を核酸にコードすることができ、核酸配列を基に細胞内で持続的に再生させることができるため、Ub-NFdecoy のケースで懸念された導入効率の低さも克服できる可能性がある。

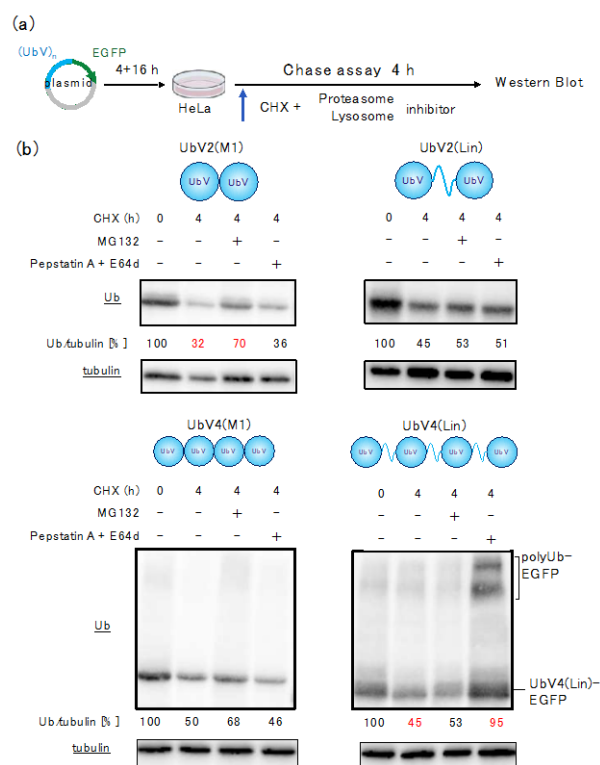


図 2. (a) 直列型 UbV 鎖-EGFP 融合タンパク質を用いた高い分解誘導能と経路選択性をもつ直列型ユビキチンモチーフの探索. (b) タンパク質翻訳後阻害剤 CHX を用いた直列型ユビキチン鎖の分解誘導能の評価、およびプロテアソーム阻害剤とリソソーム阻害剤を用いた各分解経路への依存性の評価.

直列型ユビキチン鎖を用いた分解誘導剤の開発に向け、高い分解誘導能と経路選択性を有するユビキチン鎖モチーフの探索を行なった。具体的には、モデルとなる基質タンパク質として enhanced green fluorescent protein (EGFP) を採用し、直列型ユビキチン鎖を連結した融合タンパク質を細胞内で発現した際の分解挙動を評価することとした (図 2a)。直列型ユビキチン鎖としては、ユビキチン同士が C 末端のグリシン (G76) と N 末端のメチオニン (M1) を直接連結した M1 鎖と、ユビキチン間に GSGGGG の 6 残基からなる柔軟なペプチドリンカーを挿入したリンカー鎖の 2 種に着目し、ユビキチンユニット数を 2、もしくは 4 とした計 4 種のユビキチン鎖 [UbV2(M1), UbV2(Lin), UbV4(M1), UbV4(Lin), UbV の隣の数字がユビキチンのユニット数、括弧内が M1 鎖かリンカー鎖であるかを示している] を採用している。なお、UbV は、ユビキチンに脱ユビキチン化による切断に対し耐性を付与するため、C 末端の 2 つのグリシンをバリンに置換 (G75V, G76V) したことを示している。それぞれのユビキチン鎖と EGFP の融合タンパク質を CMV プロモーター下にコードしたプラスミドをリポフェクションにより Hela 細胞に導入し、タンパク質翻訳阻害剤である cycloheximide (CHX) を用いた Chase アッセイを行うと、CHX 添加後 4 時間でいずれの直列型ユビキチンを用いた際にも融合タンパク質の発現レベルは 30–50%程度まで低下していることが確かめられた (図 2b)。直列型ユビキチン鎖を付与していない EGFP 単体では Chase アッセイにおける発現レベルの減少はほとんど見られなかったことから、直列型ユビキチン鎖は細胞内で分解を誘導可能な構造モチーフであることが示唆された。さらに、分解の経路を調べるため、CHX と同時にプロテアソーム阻害剤である MG132 またはリソソーム阻害剤である Pepstatin A と E64d を添加し、融合タンパク質の分解量の変化を確認した。すると、UbV2(Lin) (図 2b, 右上) と UbV4(M1) (図 2b, 左下) においてはいずれの阻害剤を用いた場合にも顕著なタンパク質レベルの回復は見られなかった一方、UbV2(M1) (図 2b, 左上) はプロテアソーム阻害剤で、UbV4(Lin) (図 2b, 右下) はリソソーム阻害剤でタンパク質レベルの回復が明確に観察された。さらに、直列型ユビキチン鎖と EGFP の融合タンパク質を発現した細胞を免疫染色により観察すると、UbV4(Lin)-EGFP の発現細胞において、ユビキチンによるオートファージ活性化の特徴^[11]として見られるオートファージ受容体 p62 の凝集体形成が見られた。以上の結果は、UbV2(M1)はプロテアソーム経路で、UbV4(Lin)はオートファージ経路で基質を分解へと誘導可能な構造であることを示唆する。このように、UbV2(M1) と UbV4(Lin) は、分解を誘導するだけでなく、分解経路を規定するための有望な構造モチーフであることが見出された。

4.直列型ユビキチン-ペプチドキメラによる細胞内でのタンパク質分解誘導

前項で見出された UbV2(M1) と UbV4(Lin) を用いて、直列型ユビキチン-リガンドキメラを設計し、タンパク質の標的分解を試みた (図 3a)。具体的には、モデルタンパク質としてがんの亢進への関与が知られる抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2 に着目し、各直列型ユビキチンと Bcl-2 に対するリガンドを連結したキメラタンパク質を CMV プロモーター下でプラスミド内にコードした。さらに、Hela 細胞にリポフェクションにより導入し、20 時間培養した後の Bcl-2 レベルをウェスタンブロットティングにより評価することとした。まず UbV2(M1)-リガンドキメラについて、すでに Bcl-2 ファミリータンパク質に対するリガンドとして報告されている 2 種類のリガンド (L1^[12], L2^[13]) (図 3b, 右上) を採用して調べると、プラスミドを導入した細胞でキメラ分子の発現が確認されるとともに、プラスミドを導入していない未処理の細胞に比べて標的タンパク質である Bcl-2 が顕著に減少していることが確かめられた (図 3b)。特に、 $K_D=6.6\times 10^{-2}\mu\text{M}$ と Bcl-2 に対して比較的強い親和性を持つリガンド L1 で大きく Bcl-2 レベルが減少しており (分解率 = 85%)、リガンドペプチドを介した直列型ユビキチン鎖の非共有結合的な修飾により Bcl-2 の分解が誘導されていることが示唆された。さらに、UbV4(Lin) による分解誘導についても同様に評価したところ、L1 をリガンドとして用いた際に Bcl-2 の発現レベル 58%減少していた (図 3c)。一方、親和性の低い L3 ($K_D=1.1\mu\text{M}$)^[14] をリガンドとして用いた場合には、直列型ユビキチン-リガンドキメラの発現細胞で未処理の細胞に比べて Bcl-2 発現レベルの低下は見られなかった (図 3c)。このことから、UbV4(Lin) もリガンド部位を

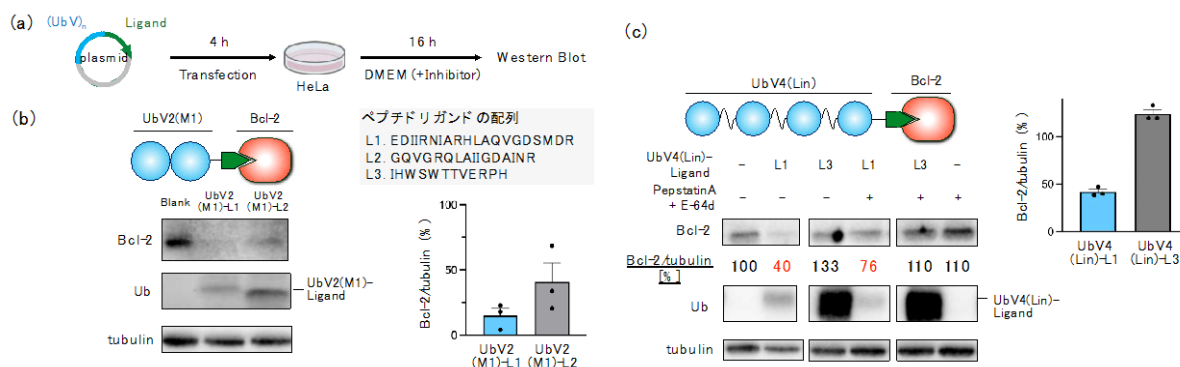


図 3. (a) 直列型 UbV 鎖-ペプチドリガンドキメラを用いた Bcl-2 の標的分解. (b) UbV2(M1)-リガンドによる Bcl-2 の分解評価. (c) UbV4(Lin)-リガンドによる Bcl-2 の分解とオートファジー依存性の評価

介した相互作用依存的に Bcl-2 の分解を誘導していることが示唆された。さらに、UbV4(Lin)-L1 による分解誘導が、EGFP と融合させていた場合 (図 2) と同様にオートファジー経路に依存しているかを、リポフェクション後の培地にリソソーム阻害剤 (Pepstatin A と E64d) を添加することで検証した。すると、UbV4(Lin)-L1 キメラを導入した細胞において、リソソーム阻害剤の添加による Bcl-2 レベルの回復が確認された(図 3c)。一方、L3 をリガンドとして用いた際には、阻害剤の有無に関わらず Bcl-2 レベルの分解は認められなかった。このことは、EGFP を使ったモデル系と同様に、UbV4(Lin)が標的タンパク質に非共有結合的に結合することでオートファジー経路に依存したタンパク質の分解を誘導していることを示唆している。

以上の評価から、直列型ユビキチン-ペプチドキメラが細胞内におけるタンパク質標的分解とその分解経路のコントロールに有用な分子基盤であることが示された。

5. おわりに

本稿では、タンパク質標的分解における新しい分子戦略として、ユビキチン-リガンドキメラを用いたタンパク質の非酵素的なユビキチン化法についてご紹介した。内在のユビキチン化機構に依存しないタンパク質の標的分解誘導や、オートファジーを介した分解誘導は近年急速に注目を集めている分野でもある^[1,15]。その中で、本手法は生体の分解機構が目印として用いる (ポリ) ユビキチンを分解誘導の鍵としており、生体システムとの高い適合性と構造のモジュール性の高さから目的に応じた活性の精密制御が期待できる。ユビキチンの構造機能相関に関する理解を深め、最適化された構造のユビキチン鎖を用いることで、より強力な分解誘導能や高い経路選択性、分解以外の生体反応を媒介する機能を持つ分解剤の開発が可能となり、応用可能性もさらに広がるかもしれない。その中で、今回紹介することはできなかったが、直列型ユビキチン鎖以外にも側鎖で連結したポリユビキチンの構造編集を可能とする有機化学的タンパク質の合成・変換技術は、ユビキチン構造と機能の結びつきの学術的な理解に大きな貢献を果たすと期待できる^[16]。遺伝子工学的なアプローチと有機化学的なアプローチの融合により、既存の方法論ではアプローチできなかった生体分子の未探索な側面を明らかにしていくことで、ライフサイエンスや創薬の新展開に資する科学と分子技術の発展にさらに貢献していきたい。

謝辞

本研究は、筆者が所属する東京大学大学院工学系研究科、岡本研究室で行われました。岡本晃充教授ならびに本研究に大きく貢献してくれた卒業生の藤田涼香氏、吉田和生氏、修士 2 年生の宮本丈太郎氏に感謝申し上げます。研究の遂行においては、酵母 26S プロテアソームの提供や研究方針に関するディスカッションなど東京大学医科学研究所の佐伯泰先生と富田拓也先生、順天堂大学の土屋光先生に多大なご協力を

いただきました。この場を借りて感謝申し上げます。本研究は、JSPS 科研費、JST ACT-X の助成を受けて行われました。

参考文献

- [1] Zhao, L.; Zhao, J.; Zhong, K.; Tong, A.; Jia, D. *Signal Transduct. Target Ther.*, **2022**, *7*, 113.
- [2] Samarasinghe, K. T. G.; Crews, C. M. *Cell Chem. Biol.*, **2021**, *28*, 934–951.
- [3] Chirnomas, D.; Hornberger, K. R.; Crews, C. M. Protein Degraders Enter the Clinic — a New Approach to Cancer Therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2023**, *20*, 265–278.
- [4] 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部: <https://www.nihs.go.jp/mtgt/> (2024/12/10).
- [5] Hanzl, A.; Casement, R.; Imrichova, H.; Hughes, S. J.; Barone, E.; Testa, A.; Bauer, S.; Wright, J.; Brand, M.; Ciulli, A.; Winter, G. E. *Nat. Chem. Biol.*, **2023**, *19*, 323–333.
- [6] Kaiho-Soma, A.; Akizuki, Y.; Igarashi, K.; Endo, A.; Shoda, T.; Kawase, Y.; Demizu, Y.; Naito, M.; Saeki, Y.; Tanaka, K.; Ohtaka, F. *Mol. Cell*, **2021**, *81*, 1411–1424.
- [7] Collins, G. A.; Goldberg, A. L. *Cell*, **2017**, *169*, 792–806.
- [8] Pohl, C.; Dikic, I. *Science*, **2019**, *366*, 818–822.
- [9] Yu, H.; Lin, L.; Zhang, Z.; Zhang, H.; Hu, H. *Signal Transduct. Target Ther.*, **2020**, *5*, 209.
- [10] Komander, D.; Rape, M. *Annu. Rev. Biochem.*, **2012**, *81*, 203–229.
- [11] Morimoto, D.; Walinda, E.; Fukada, H.; Sou, Y.-S.; Kageyama, S.; Hoshino, M.; Fujii, T.; Tsuchiya, H.; Saeki, Y.; Arita, K.; Ariyoshi, M.; Tochio, H.; Iwai, K.; Namba, K.; Komatsu, M.; Tanaka, K.; Shirakawa, M. *Nat. Commun.*, **2015**, *6*, 6116.
- [12] Certo, M.; Moore, V. D. G.; Nishino, M.; Wei, G.; Korsmeyer, S.; Armstrong, S. A.; Letai, A. *Cancer Cell*, **2006**, *9*, 351–365.
- [13] Sattler, M.; Liang, H.; Nettesheim, D.; Meadows, R. P.; Harlan, J. E.; Eberstadt, M.; Yoon, H. S.; Shuker, S. B.; Chang, B. S.; Minn, A. J.; Thompson, C. B.; Fesik, S. W. *Science*, **1997**, *275*, 983–986.
- [14] Park, H.-Y.; Kim, J.; Cho, J.-H.; Moon, J. Y.; Lee, S.-J.; Yoon, M.-Y. *J. Biomol. Screen.*, **2011**, *16*, 82–89.
- [15] Bashore, C.; Prakash, S.; Johnson, M. C.; Conrad, R. J.; Kekessie, I. A.; Scales, S. J.; Ishisoko, N.; Kleinheinz, T.; Liu, P. S.; Popovych, N.; Wecksler, A. T.; Zhou, L.; Tam, C.; Zilberleyb, I.; Srinivasan, R.; Blake, R. A.; Song, A.; Staben, S. T.; Zhang, Y.; Arnott, D.; Fairbrother, W. J.; Foster, S. A.; Wertz, I. E.; Ciferri, C.; Dueber, E. C. *Nat. Chem. Biol.*, **2023**, *19*, 55–63.
- [16] Kriegesmann, J.; Brik, A. *Chem. Sci.*, **2023**, *14*, 10025–10040.

コアセルベート形成のための抗体スキャホールド創製と抗体の細胞内送達

京都大学化学研究所
川口 祥正



著者紹介：1988年生まれ。2007年に東京理科大学薬学部に入學し、鉄イオンを用いたリポソームによる核酸デリバリーに関する研究を開始しました。その後、指導教員であった芳賀信教授の退官に合わせて、膜透過性ペプチドで著名な京都大学化学研究所の二木史朗教授の研究室に入り、ペプチドによる細胞内送達に関する研究に取り組みました(2014年4月-2016年3月まで学術振興会特別研究員DC2)。学位取得後は、塩野義製薬株式会社に入社し、ペプチド医薬やペプチドの細胞内送達に関する研究に従事しました。最終的に、リードペプチドの特許出願にも漕ぎつけ、充実した社会人生を送ることができました。塩野義製薬において、実際の創薬研究に携われた経験はこれからの研究生活においても大変大きな意味を持つと考えています。5年半勤めた後に、塩野義製薬を退社して、京都大学化学研究所の二木史朗教授の研究室に助教として採用いただき、タンパク質・核酸の細胞内送達やディスプレイスクリーニング、細胞外小胞など新たな創薬モダリティ創出に関する研究に取り組んでいます。これだけ幅広い研究を展開できるのは、偏に二木先生の寛大な配慮や自由な研究環境があるからであると思っています。本研究は、異動後、抗体工学のための研究環境を整えるところから開始したテーマであり、講演賞をいただき、また、研究紹介の場をいただけたことは大変嬉しく光栄に思います。今後も、新たな創薬モダリティの創生に向けて、基礎研究と社会実装を見据えた応用研究の両輪で研究に取り組んでいきます。

1. はじめに

近年、液-液相分離による膜のないオルガネラの存在が脚光を浴びている^{1,2}。これらを形成する生体分子として、低複雑性ドメインを持った天然変性タンパク質が知られている。これらのタンパク質は、点変異や翻訳後修飾などのわずかな物性の変化によって、液滴や凝集体に姿を変え、生命機能を制御したり、疾患発症原因となりうる³。これら液-液相分離の挙動や機能を理解するための手法として、*in vitro*での再構成を利用したアプローチや⁴、細胞内においては光遺伝学を利用した遺伝子工学的な取り組みがある⁵。実際、TDP-43やFUS、TIA-1のようなタンパク質は液滴や凝集体を形成することでアルツハイマー病や前頭側頭葉変性症(FTLD)などの神経変性疾患を発症することがわかってきている。一方で、液滴形成に重要な低複雑性ドメインは、特定の構造を持たないことから疎水性ポケットがなく低分子阻害剤の設計が極めて難しく、外的に、かつ、特異的に制御することは容易ではない。

抗体は、優れた標的結合能を有しており、構造に依存しない短いペプチドエプトープをも認識可能であることから、天然変性タンパク質など高難度な標的も容易に制御可能である。しかし、抗体は約150kDaという分子量の親水性タンパク質であり細胞膜透過性が乏しいため、生細胞において細胞内分子を制御することは困難であり、抗体によって細胞内液-液相分離の制御を達成した研究は未だない。したがって、高効率、かつ高汎用性の抗体の細胞内送達プラットフォーム技術を開発することで、細胞内の液-液相分離の空間的制御が可能になり、生命科学・創薬科学研究においてイノベーションをもたらすと期待される。

2. 負電荷抗体スキャホールドの創製

これまでに我々は、IgG と混合することで IgG のサイトゾル送達を可能にするカチオン性の細胞内送達ペプチド L17E を開発している⁶。さらに、当研究室において、L17E の三量体と Fc 結合ペプチドのコンジュゲートである FcB(L17E)₃ とアニオン性の蛍光分子である Alexa488 が標識された IgG (Alexa488-IgG) が液-液相分離を起点として数 μm のコアセルベートを形成し、そのコアセルベートによって Alexa-IgG がサイトゾルに一気に流入する現象が見出された⁷。しかし、このコアセルベート形成には、IgG に対して 10 個程度の非特異的な Alexa488 標識が必要であり、Alexa488 標識の再現性や IgG の抗原認識能が低下する恐れがあった。そこで、本研究では、まず Alexa488 標識なく、FcB(L17E)₃ とコアセルベート形成し、サイトゾル送達される負電荷抗体スキャホールドの創製に取り組んだ (図 1A)。これまでに、生物学的な液-液相分離において、静電的相互作用やカチオン-π、π-π スタッキングが大きく寄与し、そのタンパク質にはグルタミン酸やリシン、アルギニンに加え、チロシンなどが多く含まれていることが報告されている⁸。そこで、カチオン性のペプチドと相互作用するためにグルタミン酸とチロシンからなる負電荷タグを設計して、IgG の軽鎖の C 末端には 20 アミノ酸からなるタグ [E₂₀, (E₄Y)₂] と HA タグ、重鎖の C 末端には 10 アミノ酸からなるタグ [E₁₀, (EY)₅, (E₄Y)₂] と FLAG タグを遺伝子工学的に導入し、それぞれを組み合わせた 6 種の軽鎖重鎖負電荷タグ修飾抗体 (LHAT-IgG) を創製した (図 1B)。調製した LHAT-IgG と FcB(L17E)₃ を 1:1 のモル比で混合し、共焦点顕微鏡観察を行なったところ、粒子の数や大きさは異なるものの、すべての LHAT-IgG においてコアセルベートが形成されることがわかった (図 1C)。軽鎖に E₁₀ 配列を有する LHAT-IgG や LHAT-

IgG-(E₄Y)₄-(E₄Y)₂ では小さい粒子が形成され、(EY)₅ 配列を有する LHAT-IgG では一部不均一な形状の粒子が含まれていた。それに対して、LHAT-IgG-E₂₀-(E₄Y)₂ では液滴様の粒子が形成されていた。よって、LHAT-IgG と FcB(L17E)₃ の混合比が 1:1 においては、軽鎖のチロシンはコアセルベート形成に不利に働き、重鎖のチロシンは有利に働く可能性が示された。

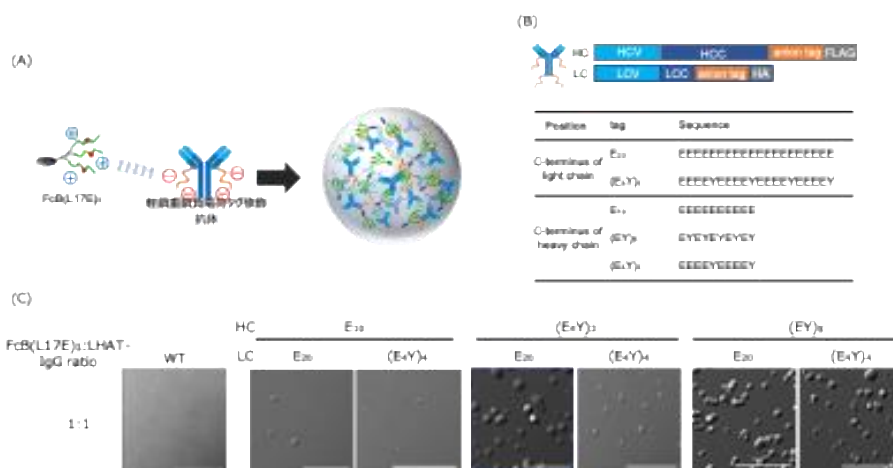


図 1. 軽鎖重鎖負電荷タグ修飾抗体 (LHAT-IgG) とコアセルベート形成. (A) FcB(L17E)₃ と LHAT-IgG とのコアセルベート形成の模式図. (B) LHAT-IgG における軽鎖および重鎖に付与したタグ配列. (C) LHAT-IgG と FcB(L17E)₃ によって形成されたコアセルベートの顕微鏡観察. スケールバー; 20 μm.

3. コアセルベートによる LHAT-IgG のサイトゾル送達

FcB(L17E)₃ とコアセルベート形成する LHAT-IgG が創製できたため、IgG のサイトゾル送達を試みた。形成されたコアセルベートを血清含有培地で希釈して、HeLa 細胞に添加して、1 時間後に免疫染色によって IgG の細胞内局在を観察したところ、LHAT-IgG-(E₄Y)₄-E₁₀ を除くすべての LHAT-IgG においてサイトゾルへの IgG の送達を確認された (図 2A)。その中でも、LHAT-IgG-E₂₀-(E₄Y)₂ が最も効率が高く 50% 以上の細胞においてサイトゾル送達されていることがわかった (図 2B)。

これまでの結果から、コアセルベート形成がサイトゾル送達に不可欠であることが示されたため、液-液相分離の形成を評価する一般的な手法である濁度測定によってコアセルベートの安定性を評価した。まず、50 mM NaCl が含まれる HEPES バッファー中でコアセルベートを形成させ、150 mM NaCl になるよう

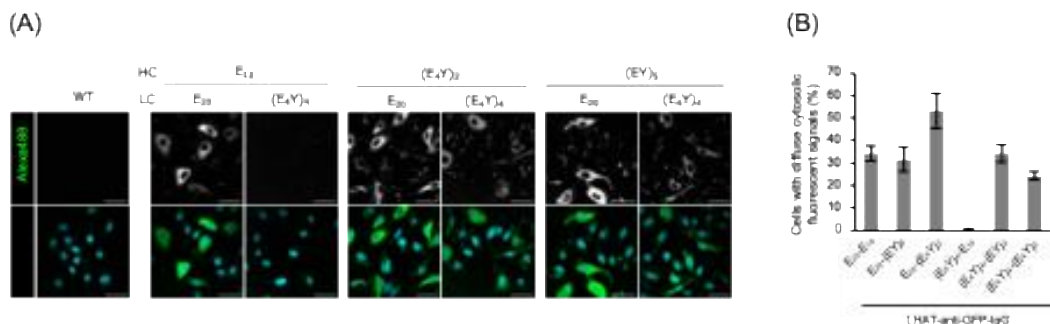


図 2. (A) 各種 LHA-IgG と FcB(L17E)₃ からなるコアセルベートによる IgG のサイトゾル送達. スケールバー: 50 μm. (B) IgG のサイトゾル送達効率.

にコアセルベートを希釈して濁度を測定した (図 3). 最も送達効率が高く液滴様粒子が形成された LHA-IgG-E₂₀-(E₄Y)₂ では吸光度の低下はわずかであり、一部不均一な粒子形成が見られた重鎖に(EY)₅ タグを有する LHA-IgG では吸光度の低下はほとんど見られなかった。

一方で、サイトゾル送達が見られなかった LHA-IgG-(E₄Y)₄-E₁₀ では、150 mM NaCl 中での吸光度はほとんど検出されず、LHA-IgG-E₂₀-E₁₀ や LHA-IgG-(E₄Y)₄-(E₄Y)₂ では 150 mM NaCl 中での吸光度の低下が見られ、顕微鏡観察において小さい粒子が見られたことと相関した。よって、重鎖におけるサイトゾル送達を可能にするコアセルベートは 150 mM NaCl 中での安定性が不可欠であることが明らかとなった。しかし、コアセルベートの安定性が低下するにも関わらず、送達効率に大きな差がない LHA-IgG があることから、安定性以外の要素も寄与している可能性が考えられた。

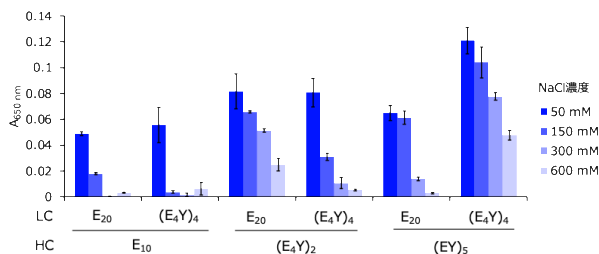


図 3. 各種 LHA-IgG と FcB(L17E)₃ とのコアセルベートにおける各 NaCl 濃度における濁度測定.

4. コアセルベートの物理的性質

サイトゾル送達に寄与するコアセルベートの物性を明らかにするために、それぞれの LHA-IgG からなるコアセルベート内部の屈折率をホロトモグラフィック顕微鏡によって評価した (図 4)。コアセルベートの屈折率の差は含水率の差を反映していることから、コアセルベート内部の疎水性環境を比較できると考えられる⁹。LHA-IgG-(E₄Y)₄-E₁₀ はコアセルベートの数が少なく、粒子径も小さいことから測定が困難であったため評価から除外した。最も送達効率の高かった LHA-IgG-E₂₀-(E₄Y)₂ は、屈折率が約 1.38 であったのに対して、コアセルベートの安定性が高い(EY)₅ を持つ LHA-IgG-E₂₀-(EY)₅ や LHA-IgG-(E₄Y)₄-(EY)₅ では 1.4 前後と上昇した。この結果から、重鎖のタグに含まれるチロシンは疎水性相互作用を形成し、より密なコアセルベートの形成に寄与すると考えられた。一方で、150 mM NaCl 中での吸光度の低下が見られた LHA-IgG-E₂₀-E₁₀ や LHA-IgG-(E₄Y)₄-(E₄Y)₂ では 1.38 前後の屈折率であり、LHA-IgG-E₂₀-(E₄Y)₂ と同程度の水を含んだコアセルベートであることが明らかとなった。

濁度測定の結果と合わせて考えると、最も送達効率が高かった LHA-IgG-E₂₀-(E₄Y)₂ では、細胞添加条件に近い塩濃度である 150 mM NaCl 溶液において安定性が高く、ある程度水を含む粒子が形成されていることが示された。一方で、LHA-IgG-E₂₀-(EY)₅ や LHA-IgG-(E₄Y)₄-(EY)₅ では、チロシンによる強い疎水性相

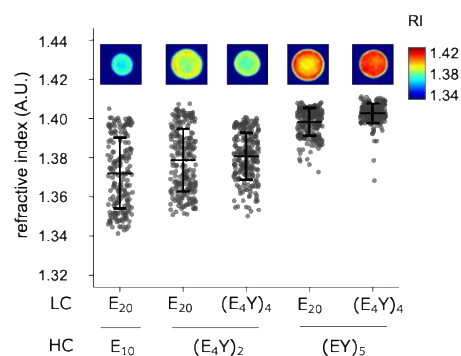


図 4. LHA-IgG と FcB(L17E)₃ とのコアセルベートにおけるホロトモグラフィック顕微鏡観察による屈折率測定.

相互作用が形成されることで、含水率が低い粒子が形成されていることから、150 mM NaCl 中で高い安定性を示した可能性が考えられた。また、LHAT-IgG-E₂₀-(EY)₅ や LHAT-IgG-(E₄Y)₄-(EY)₅ と同程度の送達効率であった他の粒子については、150 mM NaCl 中での安定性が低かったが、水を含み柔らかい粒子が形成されていた。よって、IgG の効率的なサイトゾル送達を達成するコアセルベートは、150 mM NaCl 溶液中で高い安定性を示す一方で、疎水性相互作用は強すぎず、ある程度水が含まれることが重要であると示唆された。

5. サイトゾル送達抗体による TDP-43 の細胞内液-液相分離制御

TDP-43 は、低複雑性ドメインをもった天然変性タンパク質であり、細胞ストレスにตอบสนองして細胞質でストレス顆粒を形成し、継続的なストレスがかかることで凝集体を形成し、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の発症につながるとされている。そこで、LHAT-IgG と FcB(L17E)₃ によるコアセルベートによって IgG をサイトゾル送達することで、TDP-43 の細胞内液-液相分離を抑制できるか検討した (図 5)。

TDP-43 の天然変性領域である C 末端領域に対する抗体に対して、最も送達効率の高かった LHAT-IgG-E₂₀-(E₄Y)₂ を適応した LHAT-anti-TDP-43-IgG-E₂₀-(E₄Y)₂ を調製した。LHAT-anti-TDP-43-IgG-E₂₀-(E₄Y)₂ と FcB(L17E)₃ がコアセルベートを形成するかどうか共焦点顕微鏡によって観察したところ、これまでと同様に液滴様の粒子が形成された (図 6A)。さらに、このコアセルベートによってサイトゾル送達できるか確認したところ、HT1080 細胞に対してサイトゾル送達可能であることがわかった (図 6B)。

次に、LHAT-anti-TDP-43-IgG-E₂₀-(E₄Y)₂ による TDP-43 の液-液相分離制御を評価するために、HT1080 細胞に対して TDP-43 の核移行シグナルを欠損させた TDP-43 Δ NLS に対して黄色蛍光たんぱく質 (YFP) を融合させた TDP-43 Δ NLS-YFP を一過的に発現させた HT1080_TDP-43 Δ NLS-YFP 細胞を作製した。HT1080_TDP-43 Δ NLS-YFP 細胞に亜硫酸ナトリウム (S.A.) を処理することで、TDP-43 Δ NLS-YFP が細胞質で顆粒を形成することが確認された (図 7A)。そこで、HT1080_TDP-43 Δ NLS-YFP 細胞に対して、コアセルベートによって LHAT-anti-TDP-43-IgG-E₂₀-(E₄Y)₂ をサイトゾル送達し、その後、S.A. によってストレス刺激を与え、免疫染色によって細胞を観察し、細胞質での顆粒形成阻害を評価した (図 7B)。コントロールの LHAT-control-IgG-E₂₀-(E₄Y)₂ をサイトゾル送達した細胞では、S.A. 処理によってストレス顆粒が形成された。一方で、LHAT-anti-TDP-43-IgG-E₂₀-(E₄Y)₂ をサイトゾル送達した細胞においては、S.A. 処理後もストレス顆粒が形成されていない細胞の割合が増加していた。顕微鏡画像に基づいて、定量的解析を行ったところ、ストレス顆粒をもつ細胞の割合、1 細胞あたりのストレス顆粒の数およびストレス顆粒の面積が低下していた (図 7C)。よって、本コアセルベートによって LHAT-anti-TDP-43-IgG-E₂₀-(E₄Y)₂ をサイトゾル送達することで、TDP-43 の細胞内液-液相分離を抑制できることが示された。

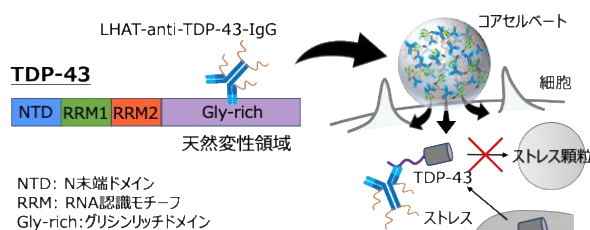


図 5. TDP-43 に対する抗体のサイトゾル送達による細胞内のストレス顆粒形成抑制。

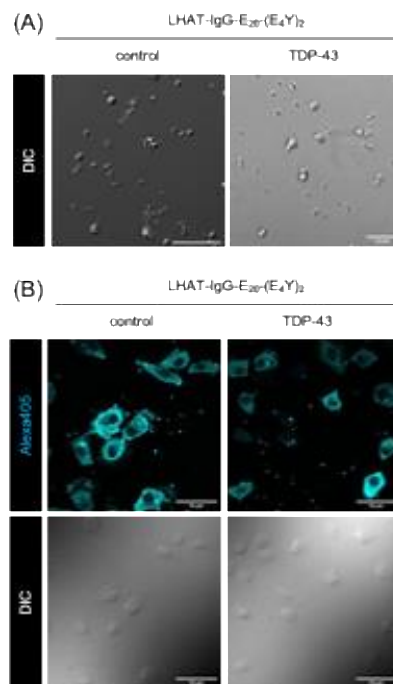


図 6. (A) LHAT-anti-TDP-43-IgG-E₂₀-(E₄Y)₂ と FcB(L17E)₃ とのコアセルベート形成。スケールバー: 10 μm. (B) HT1080 細胞に対するコアセルベートによる LHAT-anti-TDP-43-IgG-E₂₀-(E₄Y)₂ のサイトゾル送達。スケールバー: 50 μm.

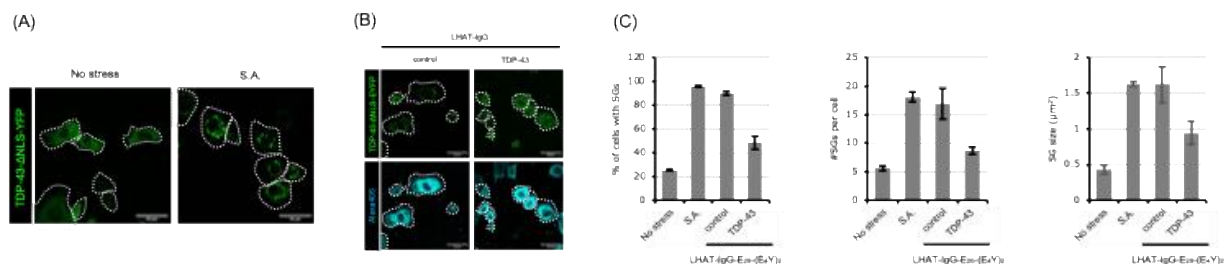


図 7. (A) TDP-43 Δ NLS-YFP 発現 HT1080 細胞における亜ヒ酸ナトリウム (S. A.) 処理によるストレス顆粒形成. スケールバー: 50 μ m. (B) TDP-43 Δ NLS-YFP 発現 HT1080 細胞に対する LHAT-anti-TDP-43-IgG-E₂₀-(E₄Y)₂ のサイトゾル送達によるストレス顆粒形成阻害. スケールバー: 50 μ m. (C) LHAT-anti-TDP-43-IgG-E₂₀-(E₄Y)₂ のサイトゾル送達によるストレス顆粒の形成抑制効果の定量的解析. (左; ストレス顆粒が形成された細胞の比率. 中央; 細胞あたりのストレス顆粒の数. 右; ストレス顆粒の大きさ).

6. おわりに

本研究では、FcB(L17E)₃ とコアセルベートを形成し、IgG のサイトゾル送達を可能にする負電荷抗体スキヤホールド (LHAT-IgG) の創製およびその物性評価からサイトゾル導入抗体による細胞内液-液相分離阻害を達成した。細胞内に移行するコアセルベートの物性解析はこれまでにほとんど報告がなく、本結果は、細胞内移行機構の理解につながる可能性がある。また、本手法を利用して天然変性タンパク質などによる細胞内液-液相分離を制御することで、液-液相分離の細胞生物学的意義についてより詳細に解析できると期待される。さらに、抗体の細胞内送達は生命科学研究のみならず、創薬研究にも展開できると考えられることから、将来的に本成果を社会に還元すべく医薬品開発など実用化に向けた取り組みも進めていきたい。

謝辞

本研究は、筆者が所属する京都大学化学研究所、二木研究室で行われました。二木史朗教授ならびに本研究の推進に貢献してくれた M1 清川めぐみ氏、M2 山崎大輔氏に感謝申し上げます。ホロトモグラフィック顕微鏡測定では東北大学学際科学フロンティア研究所の奥村正樹准教授、渡部マイ氏にご協力をいただきました。この場を借りて感謝申し上げます。本研究は JST による ACT-X および CREST、JSPS による科研費、学際統合物質科学研究機構による若手共創研究をはじめとする研究費により遂行されました。最後に、研究紹介の機会をくださったニュースレター編集委員の先生方に深く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Hyman, A. A.; Weber C. A.; Jülicher F. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2014**, 30, 39–58.
- [2] Banani, S.; Lee, H.; Hyman, A.; Rosen M. K. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, 18, 285–298.
- [3] Boeynaems S.; Alberti S.; Fawzi N. L.; Mittag T.; Polymenidou M.; Rousseau F.; Schymkowitz J.; Shorter J.; Wolozin B.; Bosch L. V. D; Tompa P.; Fuxreiter M. *Trends Cell Biol.* **2018**, 28, 420-435.
- [4] Murray D. T.; Kato M.; Lin Y.; Thurber K. R.; Hung I.; McKnight S. L.; Tycko R. *Cell* **2017**, 171, 615-627.
- [5] Bracha D.; Walls M. T.; Brangwynne C. P. *Nature Biotech.* **2019**, 37, 1435–1445.
- [6] Akishiba M.; Takeuchi T.; Kawaguchi Y.; Sakamoto K.; Yu H. H.; Nakase I.; Takatani-Nakase T.; Madani F.; Gräslund A.; Futaki S. *Nat. Chem.* **2017**, 9, 751–761.
- [7] Iwata T.; Hirose H.; Sakamoto K.; Hirai Y.; Arafles J. V. V.; Akishiba M.; Imanishi M.; Futaki S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 19804-19812.
- [8] Martin E.; Holehouse A.; Peran I.; Farag M.; Incicco J.; Bremer A.; Grace C.; Soranno A.; Pappu R.; Mittag T. *Science* **2020**, 367, 694–699.
- [9] Kim, D., Lee, S., Lee, M., Oh, J., Yang, S. A., Park, Y. *Advanced Imaging and Bio Techniques for Convergence Science.* **2021**, 1310. 211-238.

超偏極 MRI 分子プローブ群を用いたアミノペプチダーゼ活性の生体内多重解析に基づくがん診断

¹ 東京大学大学院工学系研究科

² 量子科学技術研究開発機構

³ 千葉大院融合理工

⁴ 米国国立衛生研究所

谷田部浩行¹, 齋藤雄太郎¹, 高草木洋一^{2,3}, 齋藤圭太²,
山本和俊⁴, Murali C. Krishna⁴, 山東信介¹



著者紹介：東京大学大学院 工学系研究科 博士課程三年 山東研究室所属。日本学術振興会特別研究員 (DC1)。研究分野はケミカルバイオロジー。キーワードは、分子プローブ・アミノペプチダーゼ・超偏極・NMR/MRI・分子イメージングなど。この度はこのような栄えある賞を賜り、誠に光栄に存じます。これまで当研究室の先輩方が本学会でポスター賞を受賞される姿に刺激を受け、私もいつかこの場で評価をいただきたいと願っておりました。その念願が叶いましたことを、心より嬉しく思います。本研究を遂行するにあたりご指導ご鞭撻賜った、山東教授・齋藤助教、並びに共同研究でお世話になっている QST の高草木主幹研究員・齋藤研究員、NIH の Murali 主任研究員・山本上級研究員に深く御礼申し上げます。今後も、本受賞を糧にさらに邁進して参りますので、引き続きどうぞよろしくお願い申し上げます。

1. 序論

アミノペプチダーゼ (AP) は、ペプチドの N 末端アミノ酸残基を特異的に認識し、切断する酵素群である。AP はがんをはじめとする様々な疾患に関わるため、重要なバイオマーカーとして知られている。本研究では、中でもレニン-アンジオテンシン系 (RA 系) にする AP (APN, APA, APB, ロイシン AP (LAP)) に着目した。RA 系において、アンジオテンシン II (Ang II) は、APA によって Ang III に代謝され、さらに APN, APB, LAP によって Ang IV へと代謝される (図 1A)。これら Ang ペプチドは、それぞれの受容体と相互作用することで、血管系や循環系の制御において重要な役割を果たしている。よって腫瘍など様々な疾患において、Ang ペプチドの存在量を動的に制御する RA 系 AP 活性バランス異常が認められている。RA 系 AP 活性の多重解析は、このバランス異常を捉えることで、がんや腎疾患などの診断を可能にする有用なアプローチである¹。我々は、検出手法として、核磁気共鳴イメージング (NMR/MRI) とその感度を劇的に向上させる動的核偏極法 (DNP) に着目した²。DNP-MRI は、生体透過性が高い分子イメージング手法であり、化学シフトの違いによって複数の化学種を生体深部で同時に検出することができる。本研究では、RA 系 AP 活性の生体内多重解析を指向した DNP-MRI 分子プローブ群の設計と開発を行った。そして、開発した分子プローブ群を用いて、がん診断応用に向けた検討を行った。

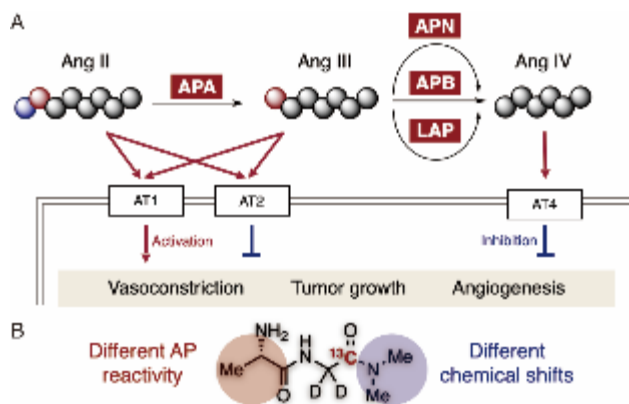


図 1. 本研究の概要

(A) Physiological role of renin-angiotensin system (RAS)-related aminopeptidases (APs). (B) Design strategy of hyperpolarized MRI probes for *in vivo* multiplexed analysis of RAS-related AP activities.

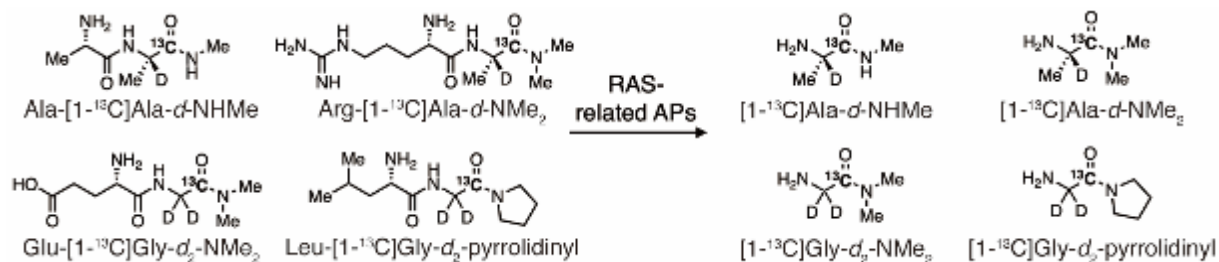


図 2. 同時偏極した MRI 分子プローブ群による複数の生体内アミノペプチダーゼ活性の同時検出

2. 生体内 RA 系 AP 活性の同時検出を指向した DNP-MRI 分子プローブ群の設計・合成

これまでに、我々は生体内 APN 活性を検出可能な DNP-MRI 分子プローブ Ala-[1-¹³C]Gly-d₂-NMe₂を開発している³。この分子プローブは、DNP-MRI 分子プローブが生体内で標的酵素活性を検出するために必要とされる要素を全て満たしている。よってこの分子プローブを基盤骨格とすることで、DNP-MRI 分子プローブに必要な要素を損なうことなく、構造展開できると考えた。まず、この分子の N 末端 Ala 残基を異なるアミノ酸残基に置換することで、他の RA 系 AP に標的を変更した (図 1B)。また、検出部位である標識炭素に距離的に近い C 末端構造のバリエーションによって、化学シフトを制御し、同時検出可能な分子プローブ群を設計した。そして、両末端構造を組み合わせることで、複数の生体内 RA 系 AP 活性を同時検出可能な DNP-MRI 分子プローブ群の開発に成功した (図 2)。

3. RA 系 AP 活性の生体内多重解析に基づくがん診断に向けた検討

次に、開発した分子プローブ群を用いて、がん種の判別が可能かどうかを検討した。MC-38 及び SCC VII 担がんマウスに、同時偏極した 3 種類の分子プローブを尾静脈投与し、MRI によって各プローブの代謝を観察した。その結果、がん種によって APN プローブと LAP プローブの代謝が有意に異なる様子が見られた一方で、APA プローブの代謝に有意な違いは見られなかった。さらに、腫瘍判別診断を Receiver Operating Characteristics 曲線解析によって評価したところ、単一のプローブ代謝よりも複数のプローブ代謝を反映した方が感度と特異度が共に向上した。以上より、本手法によって RA 系 AP 活性バランスの違いを非侵襲的に検出することで、がん種のより正確な判別ができることが示唆された。

4. RA 系 AP 活性の生体内多重解析によって抗がん剤治療を追跡する試み

最後に、本手法によって、血管新生阻害剤及び抗がん剤として知られるスニチニブ⁴の治療効果を追跡できるかどうかを検討した。SCC VII 担がんマウスに対して、スニチニブを毎日経口投与する治療モデルを用いて、同時偏極した 3 種類のプローブ代謝を治療前後で比較した。治療前に対する治療後の各プローブの代謝率を比較すると、非治療群に対して治療群では、APN プローブの代謝率だけが有意に減少した。以上より、スニチニブの治療効果を追跡するための診断マーカーとして、APN 活性の重要性が示唆された。

5. 結論

本研究では、複数の生体内 RA 系 AP 活性を同時検出可能な DNP-MRI 分子プローブ群を合理的に設計・開発した。これらの分子プローブ群を用いて、担がんマウス腫瘍部位での RA 系 AP 活性を生体内多重解析することで、より正確な腫瘍診断や抗がん剤 (スニチニブ) の治療効果の追跡ができる可能性が示唆された。今後、これらの分子プローブ群の実用的な腫瘍診断応用が期待される。

参考文献

- [1] M. P. Carrera, *et al.*, *Anticancer Res.* **2006**, 26, 1011. [2] Ardenkjaer-Larsen, J. H. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 10158. [3] Y. Saito, *et al.*, *Sci. Adv.* **2022**, 8, eabj2667. [4] Deeks, E. D. *et al.*, *Drugs* **2006**, 66, 2255.

抗原タンパク質修飾ペプチド集合体の表面電荷制御とワクチンアジュバントへの応用

¹九州大学大学院工学研究院

²九州大学未来化学創造センター

難波江 友紀¹, 樋口 亜也斗¹, 若林 里衣¹,
神谷 典穂^{1,2}, 後藤 雅宏^{1,2}



著者紹介：

福岡県出身、九州大学大学院工学府応用化学専攻 後藤・神谷研究室 修士 2 年の難波江です。この度は、このような特別な賞を頂戴し、この上なく嬉しく思います。小さいころから手を動かすことが好きな質で、夢中になると時間を忘れてしまうことが多いのですが、学部 4 年次から取り組み始めた研究も同様に、ラボの皆さんと和気藹々と新しい研究に取り組むことができ、大変充実した日々を過ごしております。私の研究室のモットーである「よく学び、よく遊び、よく考える」を胸に、残りの大学院生活も学業遊びに全力を注ぎ、現状に満足することなく、更なる成長を目指して邁進したいと考えています。最近では、海外のハンドメイド作品に心惹かれ、手芸を趣味として始めました。不器用ながらも、年内に納得のいくタブレットケースを完成させることを目標にしています。一つでも編み位置を間違えると、その箇所からすべてやり直しになってしまうこの作業は、自分の器の広さを試されているようで、非常に挑戦的で気の遠くなる道のりですが、完成したときの達成感は研究における成果と同じくらい大きいと信じて日々頑張っております。最後になりますが、自由な発想と多様な可能性に満ちた研究ができる環境を提供して下さった後藤教授、神谷教授、若林准教授、川口助教をはじめ、先輩方、ラボの関係者の皆様に日々ご支援を賜り、心より御礼申し上げます。

1. はじめに

ワクチンアジュバントは抗原と同時に投与することでワクチン効果を増強する物質であり、免疫応答の向上や制御が可能な新規アジュバント材料の開発に注目が集まっている。近年、両親媒性ペプチド (Peptide amphiphile; PA) の自己組織化により形成された集合体がアジュバント効果を示すことが報告されている¹。しかし、抗原として用いられるのは主にエピトープペプチドであり、タンパク質抗原を導入したものは合成上の困難さから数例に限られる。そこで我々は、酵素反応による PA 集合体へのタンパク質修飾技術²を用いて (Fig. 1)、PA 集合体へ直接抗原タンパク質を修飾し、高い効果を示すワクチンアジュバントの創製を目指した。さらに、免疫応答の制御は依然として困難であることから、荷電性アミノ酸を導入した PA との共集合化によって表面電荷を改変した抗原修飾 PA 共集合体を利用することで、未だ解明されていない免疫メカニズムに関する知見の収集と体系化を目指した

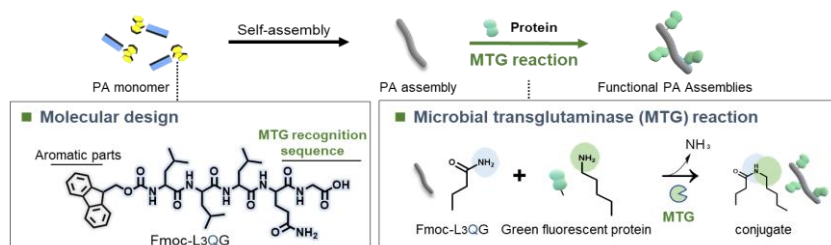


Fig. 1 Conceptual diagram of previous study.

ド (Peptide amphiphile; PA) の自己組織化により形成された集合体がアジュバント効果を示すことが報告されている¹。しかし、抗原として用いられるのは主にエピトープペプチドであり、タンパク質抗原を導入したものは合成上の困難さから数例に限られる。そこで我々は、酵素反応による PA 集合体へのタンパク質修飾技術²を用いて (Fig. 1)、PA 集合体へ直接抗原タンパク質を修飾し、高い効果を示すワクチンアジュバントの創製を目指した。さらに、免疫応答の制御は依然として困難であることから、荷電性アミノ酸を導入した PA との共集合化によって表面電荷を改変した抗原修飾 PA 共集合体を利用することで、未だ解明されていない免疫メカニズムに関する知見の収集と体系化を目指した

2. 分子設計および戦略

私たちは免疫応答の向上と制御を可能とするワクチンアジュバントを創製するために、架橋酵素である微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) が認識する配列を導入した Pyrene-L₃QG を設計し、2 種類の

荷電性アミノ酸を導入した Pyrene-L₃QGX (X = E, K, NH₂) と共集合化させることで表面電荷を改変した PA 集合体の創製を試みた (Fig. 2)。

モデル抗原タンパク質として、MTG 認識配列を持つ EGFP を用いた。今回は、Pyrene-L₃QG のみの単独集合体 QG、Pyrene-L₃QG と Pyrene-L₃QGX (X = E, K, NH₂) を等モル比で混合した共集合体 QG + QGX (X = E, K, NH₂) の 3 種類の PA 集合体について次の評価を行った。

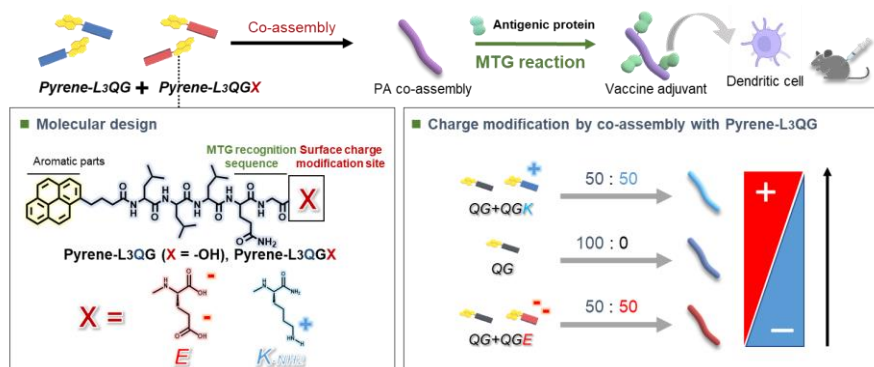


Fig. 2 Conceptual diagram of this study.

3. 結果と考察

各集合体に対して MTG 反応によってモデル抗原タンパク質 EGFP を反応させたところ、いずれの集合体にも高効率に修飾できることが確認された。また、樹状細胞 (DC2.4) に EGFP 修飾 QG 集合体、QG + QGX (X = E, K, NH₂) 共集合体を作用させた結果、EGFP のみを作用させた場合と比べて有意に高い抗原取り込みを示した。集合体間で比較すると、正電荷アミノ酸を有する共集合体 (QG + QGK) の場合に最も抗原取り込みが高いことが確認された (Fig. 3)。このことから、PA 共集合体の表面電荷の違いによって免疫細胞の抗原取り込み効率が変わり、免疫応答の向上と制御に繋がる可能性が示唆された。さらに、抗原を修飾した各集合体をマウスに皮下投与し、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) を用いて *in vivo* の EGFP 特異的な抗体産生量を評価したところ、EGFP 修飾 PA 集合体は、EGFP のみを投与した場合や EGFP と PA 集合体を物理混合した場合 (PM)、Alum アジュバントを用いた場合と比べて高い抗体産生量を示した (Fig. 4)。特に、正電荷アミノ酸を有する共集合体 (QG + QGK) を用いた場合に、強力な抗体産生を示すことを確認した。以上の結果から、アジュバントとして機能する PA 集合体に対して共有結合的に EGFP を修飾することで、免疫応答の向上が確認された。さらに、PA 集合体の表面電荷の違いによって細胞への取り込み効率、抗体産生量が変わったことから、免疫応答の制御にも繋がる可能性が示唆された。今後は、PA 集合体の表面電荷をはじめとする物理化学的因子が免疫細胞やその後の免疫メカニズムにどのように影響を与えるかを解明する。

参考文献

- 1 J. H. Collier *et al.*, *PNAS*, **107**, 622-627 (2010)
- 2 R. Wakabayashi *et al.*, *Chem. Commun.*, **55**, 640-643 (2019)

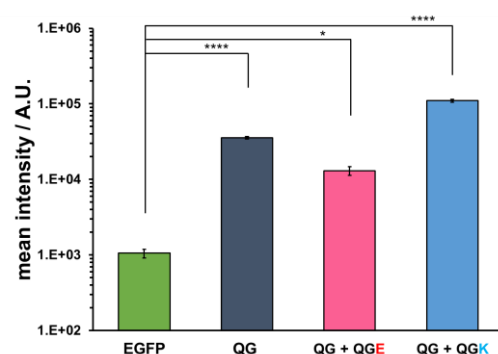


Fig. 3 Mean EGFP fluorescence intensities of DC2.4 cells treated with EGFP samples. N = 3,

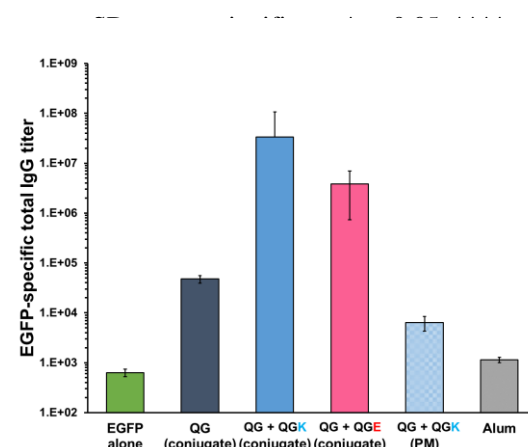
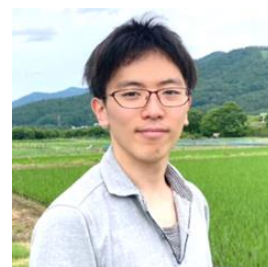


Fig. 4 EGFP-specific Total IgG antibody titers in sera of mice 6 weeks after the 1st immunizations.

2 種類の短鎖 DNA をビルディングブロックとした DNA 集合体の形態制御

¹電気通信大学大学院情報理工学研究科牧野 哲直¹, 田仲 真紀子¹

著者紹介：2000年 東京都青梅市生まれ。電気通信大学大学院 田仲研究室 博士後期課程1年の牧野です。

研究室に配属してから1か月のころ、DNAが六角形状に集合する現象を発見しました。当時は驚きと好奇心から、なぜ六角形になるのか、内部はどうなっているのかという根本的な疑問が湧き、自分の研究テーマにしたいと先生に打診しました。それ以来、その魅力にどんどん引き込まれ、「もっと知りたい」「もっと深く追究したい」という情熱が今なお私を突き動かしています。

この度は荣誉ある Organic & Biomolecular Chemistry 賞をいただき、心から感謝しております。日々の研究で抱えてきた思いや努力がこのような形で評価されたことは大変ありがたく、身の引き締まる思いです。本シンポジウムでは、多くの方々と熱い議論を交わし大変刺激を受けました。また、ご指導いただいた田仲先生に心より感謝申し上げます。先生のご指導と支えがなければ、ここまでたどり着くことはできなかったと感じています。これからも、さらに面白く意義ある研究を目指し、一層努力して参ります。

1. はじめに

生命の設計図として知られる DNA は優れた配列認識能力を有している。核酸塩基には相補となる塩基間で水素結合を形成する性質をもつため、加熱と徐冷という簡便な手法によって DNA 鎖同士の結合が可能である。我々の研究グループでは1種類の二本鎖 DNA が、幅 5~30 μm の平らな六角形構造 (Hexagonal platelet) に自己集合する現象を発見している¹。用いた DNA は両端に2塩基の粘着末端を有し、共溶質としてポリエチレングリコール (PEG) と NaCl が混在している。しかし、ただ混合しただけでは Hexagonal platelet にはならない。水溶液の加熱とその後の徐冷によって安定して形成するのだ。さらに、もう一度加熱すると Hexagonal platelet は融解し、冷却すると再び形成することから温度による可逆的な形成制御が可能である。このとき、DNA の融解温度 (T_m)、すなわち徐冷時に二本鎖にハイブリダイズする温度と、Hexagonal platelet の自己集合が始まる温度に関連性があることが我々の研究により示唆されていた。そこで、本研究では DNA の T_m による集合形態の制御に着目した。

2. 二種の短鎖 DNA で構成された集合体

Hexagonal platelet は1種類の DNA (25mer DNA) によって構築されるが (Fig.1a)、 T_m の異なる別の DNA がそこに加わればどうだろう。徐冷時に T_m の高い DNA から二本鎖を形成し、段階的に自己集合することで、集合形態を制御できると考えた。そこで、2塩基の粘着末端をもった塩基長のより短い DNA (18mer DNA) を用意した。長短の異なる2種類の DNA を混合したところ、粘着末端が互いに AA/TT の場合には H 字型にも見える筒状の集合体 (Molecular tube) が形成し、25mer DNA が AA/TT、18mer DNA が GG/CC と異なる粘着末端をもつ場合には六角形フレーム型の集合体 (Hexagonal frame) が形成した (Fig.1b)。各種 DNA の集合体内部の分布を調べるため、蛍光色素 Cy5 を末端に修飾した DNA を混合したところ、どちらの構造においても 18mer DNA が外枠部分に分布することが明らかとなった。したがっ

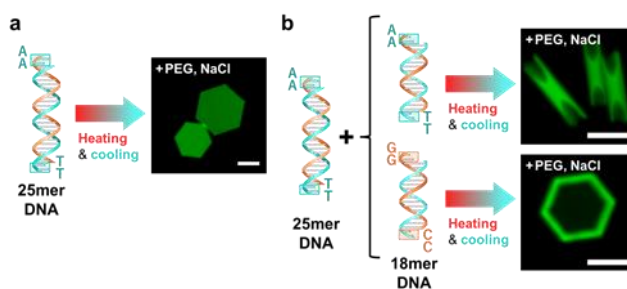


Fig. 1 Fluorescence images of DNA assemblies built from (a) one kind and (b) two kinds of DNA. DNAs were stained using SYBR Green I. Scale bars = 10 μm .

て、加熱後の徐冷で先に二本鎖となった 25mer DNA が核となり、その後により T_m の低い 18mer DNA が加わるという段階的な集合が起きたと考えられる。

3. 集合体内部の秩序構造

続いて、集合体内部の DNA の配向を調べるため偏光顕微鏡観察を行った。プレート状の六角形は、Fig.2a のように傾くと複屈折性を示すため、DNA が六角形の正面に対して垂直に配向した構造だと分かる。一方で、Molecular tube は観測面に対し水平に DNA が配向し (Fig.2b)、Hexagonal frame はプレート状の六角形構造と同様に二本鎖が垂直に並ぶ配向を示した (Fig.2c)。さらに、小角 X 線散乱 (SAXS) 測定を行ったところ、全ての集合体に共通して六方柱状相に特徴的な (100) (110) の回折ピークが観測された (Fig.2.d)。したがって、Molecular tube は他の集合体と一見まったく異なる形態に思われたが、Hexagonal frame と同様に内部に六角形プレートを含み、その周辺が著しく長く伸ばした構造であることが明らかになった。

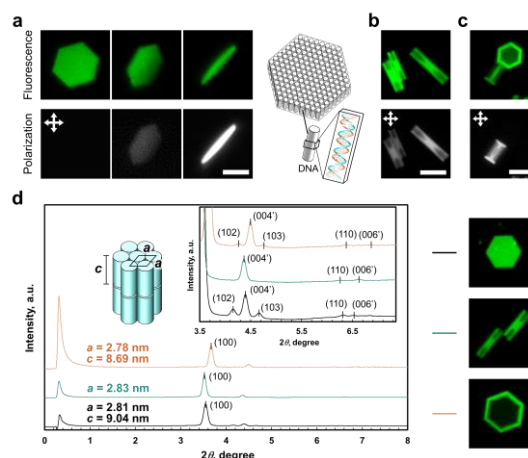


Fig. 2 Fluorescence and polarization images of (a) hexagonal platelet, (b) Molecular tube, and (c) hexagonal frame in PEG-

4. 形成メカニズムの考察

最後に、Molecular tube と Hexagonal frame の形成メカニズムについて考察する。使用した DNA の塩基長は 10 nm 以下であり、その二本鎖は剛直な棒状分子とみなすことができる。図中の水色の領域で示した DNA 周囲の排除体積が減少すると PEG の並進エントロピーの利得が最大となるため²、二本鎖を形成した DNA 同士は隣り合って集合する (Fig.3a)。徐冷過程では、まず 25mer DNA が核を形成し、その後 18mer DNA が加わる。2 種類の DNA 同士が相補な粘着末端をもつ場合は、長短の異なる DNA が混じり合って積層するため DNA の塩基長の違いから「ずれ」が生じ、新たに集合体に加わる溶液中の DNA は排除体積を最も減らせる Fig.3b の紫色で示した領域同士を重ねるように集合する。このプロセスにより、六角形の面に対して垂直方向への伸長が促進されたと考えられる。一方、粘着末端同士の親和性が低い場合は、25mer DNA による六角形プレートの核形成の後に 18mer DNA が集合体の周りに加わったため、Hexagonal frame が形成したと考えられる (Fig.3c)。

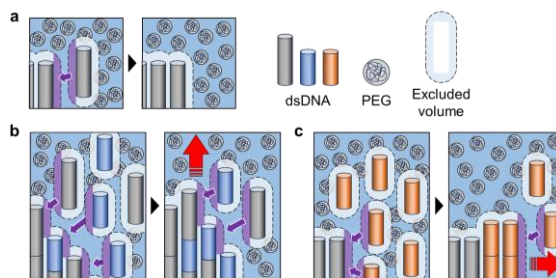


Fig. 3 Schematic illustration of organization processes of (a) a hexagonal platelet, (b) a molecular tube, and (c) a hexagonal frame. DNA is represented as a cylinder. Light blue area

5. まとめ

2 種類の DNA をビルディングブロックとすることで形態制御が可能な DNA 集合体を構築した。各 DNA の T_m の違いは段階的な自己集合を可能にし、粘着末端のわずかな違いによって DNA 集合体の伸長方向が変わり、集合体全体の形態を変えることができた。本研究は、生体分子をビルディングブロックとした機能的な材料開発や DNA ナノテクノロジーに応用できると見込んでいる。

参考文献

- [1] T. Makino, *et al.*, *ChemBioChem*, **2022**, 23, e202200360.
 [2] S. Asakura, *et al.*, *J. Polym. Sci.* **1958**, 33, 183.

二価鉄精密イメージングに向けた分子内イミントラップ戦略による *in situ* 鉄(II)イオンプローブ合成法

¹ 岐阜薬科大学

河合 寛太¹, 辻 美恵子¹, 平山 祐¹



著者紹介：岐阜薬科大学大学院薬学研究科薬学専攻、薬化学研究室所属の博士課程2年、河合寛太です。所属研究室で永澤秀子教授や平山祐准教授からの叱咤激励を頂きながら研究に没頭する中で、機能性分子を設計、合成、評価、改良していくことの楽しさに目覚め研究者としての道を目指すようになりました。大学入学当初は薬剤師になろうと考えていたことを思い返すと大きな変化だなと思います。考えが変わったのも本賞を頂けたことも全て、これまで指導して頂いた先生方と日頃から研究の話に付き合ってくれるラボの皆様のおかげです。この場を借りて深く感謝を申し上げます。

昨年の例に倣い、私の趣味についても述べると、趣味はランニング、登山、猫とラッコの写真集を眺めることです。常に研究のことを考えていると良いアイデアが思いつく時もありますが、気疲れを起こすこともあります。そこで気分転換に始めた帰宅後ランニングが思いのほか楽しく、とうとう11月初旬に掛斐川マラソンを走り、次は3月の穂の国豊橋ハーフを走る予定です。来年はフルマラソンに挑戦するべく、日々時間を見つけてランニングしています。

1. 研究背景

当研究室では、第3級アミノオキシド(*N*-オキシド)が二価鉄選択的に反応する化学構造であることを利用して二価鉄選択的検出プローブを多種開発し、鉄動態解明研究を行ってきた。さらなる細胞内鉄代謝機構の解析には、小器官レベルの鉄動態を分析可能な手法の創出が求められているものの、従来法を利用した小器官集積型鉄検出プローブの原理的課題として、標的部へ集積前に二価鉄と反応したプローブも同様に標的部へと集積することである。そこで私たちはごく最近 Kim らによって報告された Retro-Cope 型クリック反応(*J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, *143*, 5616)を応用し、鉄検出能を標的部で新たに発現させる *in situ probe* 合成戦略を考案した。本戦略は、あらかじめ標的部に固定化した環状アルキンとヒドロキシルアミン(HA)導入蛍光団(HAR)との Retro-Cope 反応により、*N*-オキシド構造を標的部でのみ合成する。これにより、狙った場所でのみ鉄検出能を発現することが可能となる。

2. *in situ probe* 合成戦略の課題と解決策

先行研究において筆者らは HAR-2 を開発し、ビスクロノニン(BCN)と反応させることで所望の *N*-オキシド化合物(EnRhoNox-2)が得られること、また EnRhoNox-2 に二価鉄を添加することで脱酸素化反応が進行することを LCMS により確認した。しかしながら、脱酸素化反応後のイミニウム中間体が速やかに加水分解され、時間とともに標的部からのプ

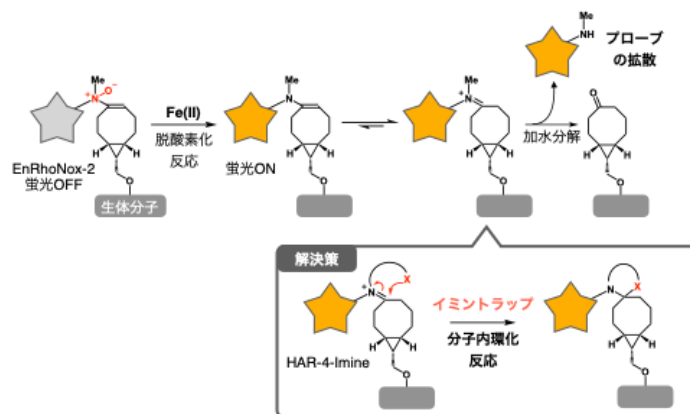


Fig. 1 : HAR-2 の課題と解決策

プローブの遊離が確認された。微小環境下における二価鉄変動を評価するためには、プローブ自体が細胞内で動かないことが望ましい。そこで分子内でイミニウム中間体を捕捉することで二価鉄反応後の加水分解を抑制する戦略を考案した。過去に確立したヒドロキシルアミン誘導体合成法を基に、分子内イミニウムを捕捉する求核性官能基として3-ヒドロキシルプロピル基を持った HAR-4 を合成した(Fig. 1)。

3. HAR-4 の安定性、Retro-Cope 反応性、分子内環化反応の評価

はじめに水中における HAR-4 の安定性を LCMS により評価した。HAR-2 の課題として水中における安定性が低いことがあった。一方で HAR-4 の水中安定性を評価したところ、5 時間後もプローブが約 80% 残存しており高い水中での安定性を示した(Fig. 2)。

続いて BCN との Retro-Cope 反応を LCMS により評価した。1 mM の HAR-4 と 10 mM の BCN を水溶液下で反応させたところ、30 分後には目的とする *N*-オキシド生成物のピークを確認し、2 時間後にほとんどの原料が消失した。

続いて、本戦略の肝となる分子内環化反応が進行し、イミニウム中間体の加水分解反応を抑制できるか評価した。BCN と HAR-4 を 2 時間反応後の溶液を 10 倍に希釈し、1 mM となるように二価鉄を添加後 LCMS により反応モニタリングを行った。その結果、加水分解体のピークも新たに確認されたものの分子内環化体のピークが生じたことを確認した。加水分解反応を完全に抑制することはできなかったものの一部のイミニウム中間体の加水分解を抑制することに成功した。続いてイミントラップ戦略が細胞内の夾雑環境下において実現可能が評価するべく HAR-4 を生細胞イメージングへと応用した。

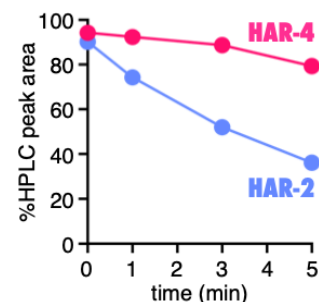


Fig. 2: 水中での安定性試験

4. 生細胞イメージング

Halo タグタンパク質に小胞体局在化シグナルである KDEL 配列を導入し、これを発現する HeLa KDEL 細胞を作成し、使用した。またアルキン部位として BCN に Halo tag リガンドを結合させた BCN-Halo を使用した。

HeLa KDEL 細胞に BCN-Halo をインキュベート後、遊離 BCN-Halo を洗浄し、続いてプローブを硫酸アンモニウム鉄(FAS)と共にインキュベート後イメージング実験を行った。HAR-2 において FAS 処理群と未処理群での蛍光強度の差は見られなかった一方で、HAR-4 において FAS 処理により未処理群と比較して蛍光強度の上昇を確認した。これはイミニウム中間体の加水分解速度の差によると考えられる。

以上の結果から、標的部位にプローブを固定することを目的としたイミントラップ戦略を用いることで、二価鉄による脱酸素化反応後の加水分解反応を部分的に抑え、洗浄耐性を確立することに成功した。

5. 今後の展望

本研究は、従来法では困難であったオルガネラの細分化した区画、ミトコンドリアでいう内膜や外膜近傍などのマイクロ環境下の鉄動態解明に加え、依然として未達成であるマウスの特定臓器または細胞腫選択的鉄イメージングへの応用が期待できる。

蛍光イメージングのための世界最小モノボディタグの創製

¹名古屋工業大学大学院 工学研究科

²名古屋大学大学院 工学研究科

³名古屋大学未来創造機構ナノライフシステム研究所

⁴トランスフォーマティブ生命分子研究所 (ITbM)

⁵鳥取大学大学院 工学研究科

宮崎 友輝¹, 梅本 駿², 遠藤 鴻志郎⁵, 都築 成晃², 深谷 菜摘¹,

Chung Nguyen Kim², 吉井 達之¹, 佐藤 良勝⁴, 藤野 公茂²,

林 剛介², 日野 智也⁵, 村上 裕^{2,3}, 築地 真也¹



著者紹介：名古屋工業大学大学院工学研究科博士前期（修士）課程2年の宮崎友輝です。高校1~2年生時は天文学に興味があり、大学では物理系・宇宙工学系の専攻を考えていました。しかし、高校3年で有機化学に出会い、その面白さに感銘を受け、気づいた頃には化学と生物学の融合分野であるケミカルバイオロジーを専門とするようになりました。普段は、培養細胞を用いた蛍光イメージングや細胞内シグナル活性の（光）操作、タンパク質工学、遺伝子工学、有機合成化学など、幅広く研究活動を行っています。現時点では、研究初学者であることを肝に銘じ、「○○の研究がしたい！」、「○○を解明したい！」という明確な興味は敢えて持たないようにしており、幅広い分野への興味・知識を蓄積しつつ、来年度からの博士後期課程とその先の研究活動を通じて、自身の研究の方向性を徐々に定めていけたらと考えています。

謝辞：本研究を遂行するにあたり、日々の研究活動にご指導をいただく築地真也教授と、第二の師匠である村上裕教授（名古屋大学）に深く御礼申し上げます。また、本研究の共同研究者である日野智也准教授（鳥取大学）、佐藤良勝准教授（名古屋大学 ITbM）、ならびに関係者の方々にこの場を借りて深く御礼申し上げます。

－ 研究紹介 －

1. 本研究の概要 蛍光イメージングによる生体分子の可視化は、生命科学研究を支える重要な基盤技術です。その一つとして、HaloTag/クロロアルカンやSNAP-tag/ベンジルグアニンなどのタグタンパク質/小分子リガンドペア（以降、タグ/リガンドペア）を利用した「タグラベリング技術」があります（C. Hoelzel et al., *ChemBioChem*, 2020）。この手法は、タグを融合した標的タンパク質を細胞に発現させ、タグ特異的リガンドの蛍光誘導体を用いることで、タグ融合標的タンパク質を簡便に蛍光標識することができます。その一方、重要な課題点として、HaloTag（33 kDa）やSNAP-tag（19 kDa）は決して小さなタンパク質ではないため、タグ融合による標的タンパク質への機能摂動が常に懸念されます（蛍光タンパク質でも同様）。そのため、よりサイズの小さなタグタンパク質（FKBP12 変異体やPYP-tag など）がこれまでにいくつか開発されてきましたが、対応する小分子リガンドそのものやその蛍光誘導体の合成が困難であるなどの課題が存在します。そのため、タグタンパク質のサイズは小さく、リガンド合成も容易で、直交性と汎用性の高い、新たなタグ/リガンドペアの開発が求められています。

以上のような背景から、本研究では、小さなタグタンパク質と、構造がシンプルな小分子リガンドのペアからなる新規タグラベリング技術の開発を目指しました。このゴールを達成するための戦略として、私たちは、既存の天然タンパク質に依存した従来のアプローチとは異なり、“独自に設計した小分子化合物に結合する人工タンパク質を進化分子工学（*in vitro* セレクション）によって創製する”というアプローチを展開することにしました。実際に、本研究では、設計した合成小分子に特異的に結合する人工抗体様タンパク質・Monobody（~10 kDa）の創製に成功しました。さらに、小分子リガンドの蛍光プローブ誘導体を開発す

ることで、無洗浄条件下、高いコントラストで細胞内の標的タンパク質を特異的に蛍光可視化することのできる新規タグラベリング技術を開発しました。以下に、本研究の概要をご紹介します。

2. HPPU 特異的 Monobody-tag の *in vitro* セレクション

まず、私たちは合成リガンドとして、シンプルな構造を有する HPPU (1-(4-hydroxyphenyl)-3-phenylurea) を独自に設計しました (図 1)。また、サイズが小さいタグタンパク質を開発するために、フィブロネクチン由来の Monobody (~10 kDa) を基本骨格として選択しました。そして、HPPU 特異的に結合する Monobody を取得するために、特定領域をランダム化した DNA ライブラリーを構築し、TRAP 提示法 (T. Ishizawa et al., *JACS.*, 2013) を用いた *in vitro* セレクションを行いました (名古屋大学村上研究室で実施)。3 段階のセレクションと親和性成熟実験の結果、HPPU に対して 8.5 nM の解離定数で結合する Monobody クローン (Monobody-tag) を取得することに成功しました。また、鳥取大学日野研究室との共同研究により、その X 線結晶構造も明らかにしました (図 1)。

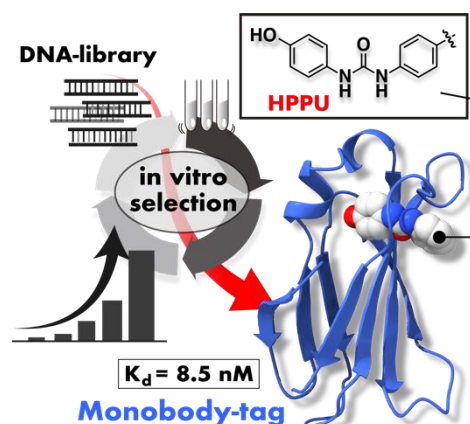
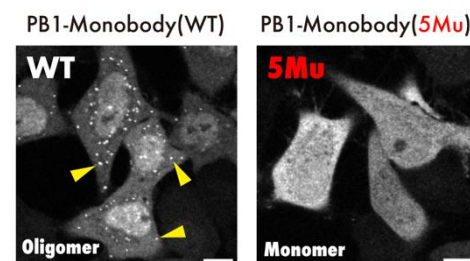


図 1: HPPU に結合する Monobody-tag の *in vitro* セレクションと X 線結晶構造

3. Monobody-tag/HPPU ペアの細胞内応用

取得した Monobody-tag を細胞内に発現させてみたところ、Monobody-tag は細胞内で顕著なオリゴマーを形成することが判明しました。そこで、モノマー化を目指した Monobody-tag のエンジニアリングを行いました。上記の結晶構造を元に、オリゴマー形成への関与が疑われるアミノ酸を複数選定し、それらの部位に対するラショナルな変異導入を展開しました。計 12 種類の変異体を評価した結果、Monobody-tag に 5 つの変異導入を施すことで、オリゴマー形成能が顕著に改善された Monobody-tag(5Mu) を創製することに成功しました (図 2)。



オリゴマー形成が十分解消された Monobody-tag(5Mu)を見出した

図 2: Monobody-tag(WT)と(5Mu)の細胞内発現した時の共焦点イメージング

4. 誘導放出抑制 (STED) 顕微鏡による超解像ライブセルイメージング

最後に、上記タグの蛍光イメージングツールとしての応用に取り組みました。HPPU をリガンドとする発蛍光性プローブ (HPPU-MaP555) を用いることで、細胞内に発現させた Monobody-tag(5Mu)融合タンパク質を、無洗浄条件下、高いコントラストで可視化できることを実証しました (図 3)。本ツールは、STED 顕微鏡による超解像ライブセルイメージングにも適用できることも確認しました (名古屋大学 ITbM 佐藤良勝先生のご協力のもと実施)。

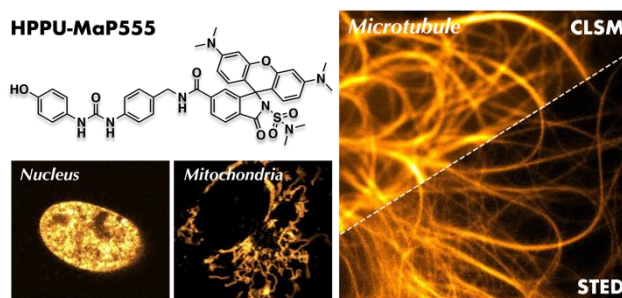


図 3: HPPU-MaP555 による Monobody-tag 融合タンパク質の共焦点/STED 超解像ライブセルイメージング

5. 総括

本研究では、有機小分子の合理的設計と進化分子工学を融合することで、世界最小サイズのタグタンパク質と、シンプルな小分子リガンドからなる新規タグ/リガンドペアの創製を達成しました。さらに、本ペアを基盤とする新規蛍光タグラベリング技術の開発にも成功しました。Monobody-tag/HPPU ペアは、従来のタグタンパク質や蛍光タンパク質よりも小さいため、タグ融合による蛍光観察が難しかったさまざまな生体分子の蛍光イメージングへの応用展開が期待されます。

細胞内局所の粘度計測を可能にする FRET 型粘性感受性蛍光プローブの開発

¹ 慶應義塾大学大学院薬学研究科

² 慶應義塾大学薬学部

³ 東京大学大学院薬学系研究科

笠井柊杜¹, 佐々木栄太^{1,2}, 榛葉満理奈², 森貴裕³, 阿部郁朗³, 花岡健二郎^{1,2}



著者紹介：慶應義塾大学大学院薬学研究科修士課程 1 年の笠井柊杜です。小さい頃から生物学や化学が好きだったことや、高校の頃に化学を起点として生物学的な研究を行うケミカルバイオロジーに興味を引かれ、学部 3 年生の夏から現在に至るまで、花岡先生の主宰する創薬分析化学講座で日々の研究に励んでいます。現在は、粘性感受性蛍光プローブの開発と応用に注力しており、非常にやりがいを感じています。この度はこのような権威のある学会のポスター発表で、シンポジウムポスター賞を戴けたことを大変光栄に思います。日頃より懇切丁寧なご指導をいただいている先生方を始め、日々研究室でともに過ごしている花岡研のメンバー全員に深く感謝申し上げます。

1. はじめに

細胞内における粘性は、生体内において様々な現象に影響を及ぼすため、細胞内の粘性を測定する技術は、これらの現象を調べるために重要である。近年、細胞内における「液-液相分離」という現象が注目を集めており、様々な生命現象や疾患に関与することが報告されている。これらは、天然変性領域と呼ばれる特定の立体構造を持たない領域を有するタンパク質が、核酸などと共に高密度に集積した液滴として観察されるが、その物性や形成メカニズムについては不明な点が多く、新しい解析技術の開発が求められている。我々は、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) と HaloTag の融合タンパク質 (Chimera 1) に赤色蛍光色素である HaloTag TMR (tetramethylrhodamine) ligand を結合させた Chimera 1-TMR が、フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) 型の粘性感受性蛍光プローブとして働く可能性を見出し、これを利用した細胞内液滴内の粘度計測を試みている。

2. FRET 型粘性感受性蛍光プローブの設計・合成・評価の流れ

- ① EGFP と HaloTag からなる 2 種類の融合タンパク質 (Chimera 1, Chimera 2) を発現・精製し、それぞれに TMR を HaloTag ligand を介して結合させた (Figure 1)。粘性測定に良く用いられているグリセロールの濃度を変えることで、EGFP を直接励起した際の粘性感受性を測定した。
- ② メカニズム解明のため、Chimera 1-TMR と Chimera 2-TMR の X 線結晶構造解析を行った。
- ③ FUS (fused in sarcoma) の天然変性領域と、24 量体を形成することが知られている Ferritin サブユニット (FTH1) の間に Chimera 1 を挿入した融合タンパク質 (FUS:Chimera 1:FTH1) を設計し (Figure 2)、その発現ベクターを HEK293 細胞に導入した。発現融合タンパク質に TMR HaloTag ligand を付加することで、Chimera 1-TMR の細胞内局所のイメージングを試みた。

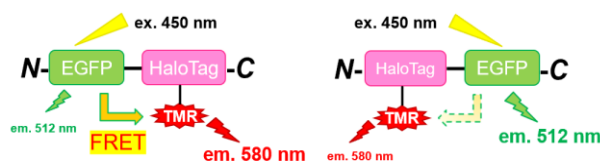


Figure 1: Chimera 1-TMR と Chimera 2-TMR の設計

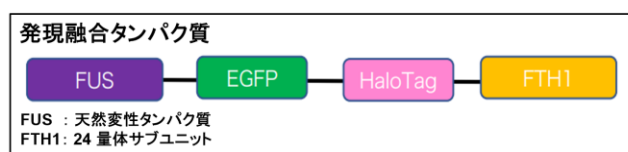


Figure 2: 融合タンパク質(FUS:Chimera 1:FTH1)の設計¹

3. FRET 型粘性感受性蛍光プローブ評価

様々なグリセロール濃度により粘度を変化させたリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で、Chimera 1-TMR の蛍光スペクトルを測定した。その結果、粘度変化に伴い EGFP から TMR への FRET の効率が大きく変化した (Figure 3)。この際、EGFP と TMR 由来の蛍光強度比 ($FI_{580\text{ nm}}/FI_{512\text{ nm}}$) は、粘度の上昇に伴って 12.9 から 0.8 まで大きな変化を示した (Figure 4)。

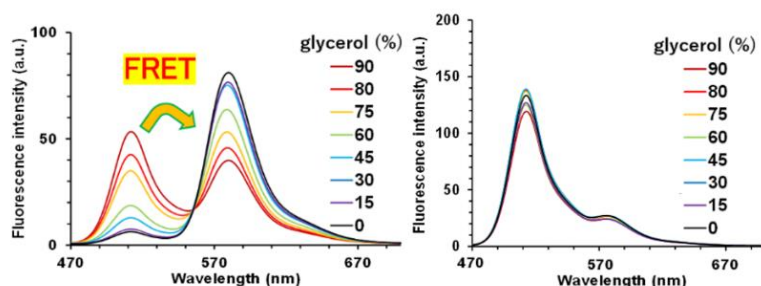


Figure 3: Chimera 1-TMR (左)、Chimera 2-TMR (右) の蛍光スペクトルの変化 (Ex. 450 nm)

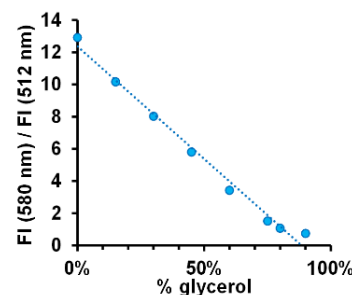


Figure 4: 異なるグリセロール濃度における Chimera 1-TMR の蛍光強度比の変化

4. X 線結晶構造解析

続いて、東京大学大学院薬学研究科の阿部郁朗教授、森貴裕准教授にご協力頂き、X 線結晶構造解析を行った。その結果、Chimera 1-TMR において、EGFP と TMR の蛍光団の距離は、約 18Å と非常に近接していることが明らかになった。また、EGFP の側鎖と TMR との間で 2 つの π - π 相互作用および塩橋が形成され、TMR が EGFP 近傍に固定されることで、高効率の FRET が引き起こされたと推測した。これに対し、Chimera 2-TMR の EGFP 蛍光団と TMR との間の距離は 56.3 Å と大きく離れており、色素分子間 Förster 半径 (50% の FRET 効率を示す距離) の報告値を参考にしても距離が大きく離れていることから FRET が起こらなかったと推測された。

5. 細胞内液滴における粘性のレシオイメージング

さらに、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて、EGFP を励起した際の EGFP と TMR の蛍光レシオ画像を取得した。液滴の内外における蛍光強度のレシオ値を比較したところ、液滴内において $[TMR \text{ の蛍光強度}] / [EGFP \text{ の蛍光強度}]$ の値が大きく低下していたことから、細胞内液滴では液滴外と比較して粘性が上昇している可能性が示唆された (Figure 5)。

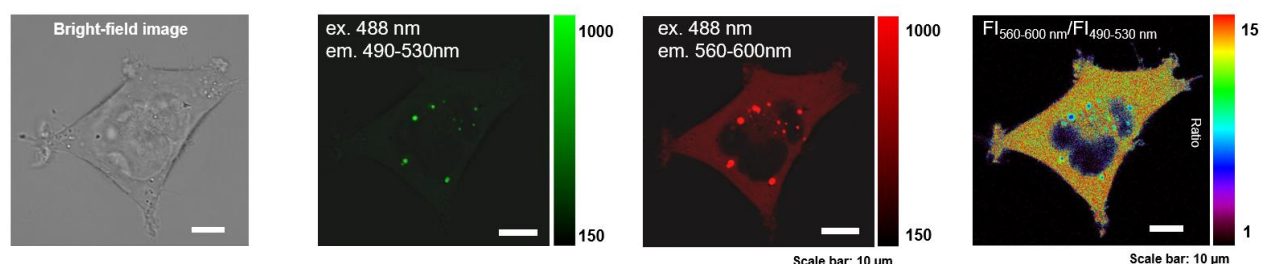


Figure 5: HEK293 細胞を用いた細胞内液滴のレシオイメージング

6. まとめ

Chimera 1-TMR では、粘度の上昇に伴う FRET 効率の低下によって、蛍光強度に大きな変化が見られた。また、Chimera 1-TMR を用いることで細胞内液滴内部の粘性イメージング系の立ち上げに成功した。今後は、Chimera 1-TMR を用いたイメージングによって、細胞内局所の粘性の定量を試みるほか、粘性依存的に FRET 効率が変わる分子メカニズムを解明することによって、更なる蛍光プローブの開発へと繋げていきたい。

参考文献

[1] Bracha, D. et al. *Cell*, 2018, 175, 1467-1480.

ヒト直交性のあるキシロシダーゼを増感酵素とする 沈着型蛍光性基質の開発

¹九州大学大学院システム生命科学府

²九州大学大学院工学府

³九州大学分子システム科学センター

黒田 晃大¹, 古賀 朗寛¹, 宮崎 裕之¹, 金子 諒右²,
新居 輝樹², 岸村 顕広^{2,3}, 森 健², 片山 佳樹^{2,3}



著者紹介：2000年、兵庫県姫路市出身。九州大学大学院システム生命科学府一貫制博士課程2年、機能組織化学講座片山研究室の黒田晃大です。家族が抗がん剤の副作用で苦しむ姿を目の当たりにした経験から、甲南大学の生体材料創成学研究室において、疎水性抗がん剤を腫瘍組織特異的に送達し、徐放可能なナノ粒子の開発に取り組みました。研究の中で、近年、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤などの新たな薬剤が開発されている一方、患者一人ひとりに最適な薬剤や治療法を判断するためのコンパニオン診断技術の開発が追いついていない現状を知り、本研究室に入学しました。現在に至るまで、細胞膜上に発現する複数の抗原タンパク質を同時かつ高感度に検出できる診断薬の開発に取り組んでいます。この度、栄誉あるシンポジウムポスター賞を戴けたことを大変光栄に思います。日頃よりご指導いただいている諸先生方を始め、片山研のメンバーに深く感謝申し上げます。

1. はじめに

抗原タンパク質の検出は、がんなどの疾病の有無を診断するだけでなく、治療方針の決定や治療効果のモニタリングにも利用される。一般的に用いられる蛍光抗体法は、抗原に対応する抗体と蛍光基の組み合わせを変えることで、複数種類の抗原を同時に検出できる。一方で、細胞由来の自家蛍光の影響で数千コピー以下の低発現量の抗原タンパク質の検出が難しいという課題があった。そこで、抗原に酵素を標識し、添加した蛍光性基質との反応でシグナルを増幅する手法が開発されてきた。しかし、使用する酵素ごとに至適反応条件が異なるため同時に使用することが困難である点や、ヒト体内に内在活性を持つことによりバックグラウンドシグナルが発生するという課題があった。

2. HOE-QS の利点

これまでに当研究室では、従来の増感酵素に代わる酵素としてヒト直交性酵群 (Human Orthogonal Enzymes: HOEs) を提案してきた¹。HOEs はヒト細胞に存在しないため、従来の酵素で問題となるバックグラウンドシグナルを抑制できる。さらに、互いに交差反応せず、同一の条件で高い反応性を示すことから同時に使用できる。本研究では、HOE を用いて細胞表面上に発現する抗原タンパク質特異的に細胞を蛍光標識する基質である HOE-QS (HOE-reactive-Quinone methide Substrate) を開発した。HOE-QS は、HOE と酵素反応することでキノンメチド構造を生成し、これが細胞表面及び細胞内のタンパク質と共有結合することで、抗原特異的に細胞を蛍光標識する (Fig. 1.)

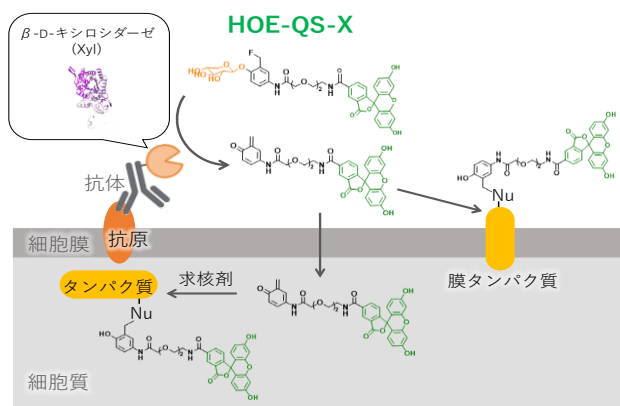


Fig. 1. HOE-QS の細胞標識メカニズム

これまでに HOEs の一種であるラムノシダーゼ (Rham) に応答して細胞を染色する基質 HOE-QS-R を開発し、細胞標識に適用した。HOE-QS-R によって高感度な検出が可能となることが証明した。本研究では、複数抗原の同時検出を目指して、HOEs の一種であるキシロシダーゼ (Xyl) に応答して細胞を標識する基質 HOE-QS-X を計 11 段階の合成により開発した (Fig. 2.)。

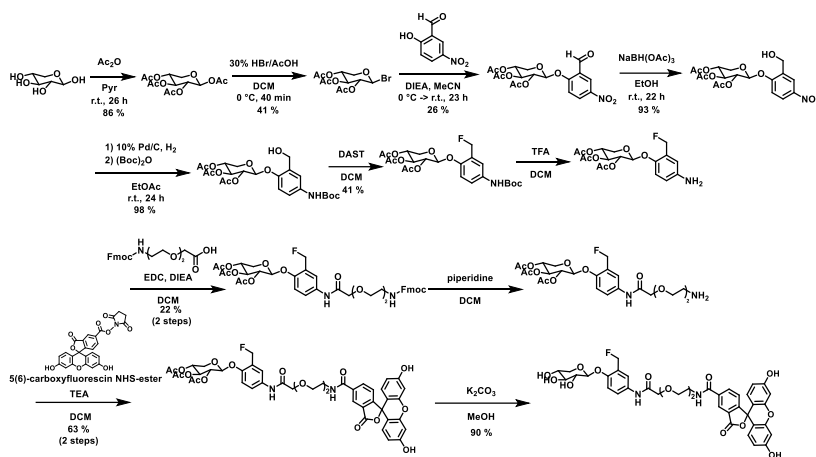


Fig. 2. HOE-QS-X の合成経路

3. 同一細胞種、複数抗原の同時検出

標的として、ヒト肺腺がん細胞 PC9 上に発現している CD44 および EGFR を選択した。ビオチン化 Xyl および Rham をそれぞれ、抗 CD44 抗体、抗 EpCAM 抗体と架橋し、酵素-抗体コンジュゲートを作製した。コンジュゲートで抗原を標識した後、HOE-QS-X、HOE-QS-R を添加し 37 °C で反応させ、フローサイトメトリー (FCM) (Fig. 3.) と蛍光顕微鏡 (Fig. 4.) を用いて細胞染色を評価した。その結果、それぞれの抗原タンパク質に応答して細胞を染色できることが示された。

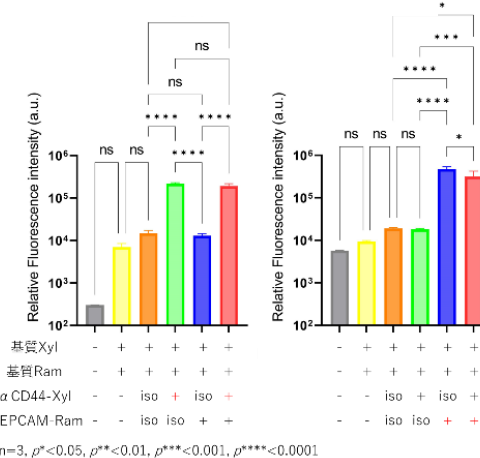


Fig. 3. FCM による複数抗原タンパク質の同時検出の結果

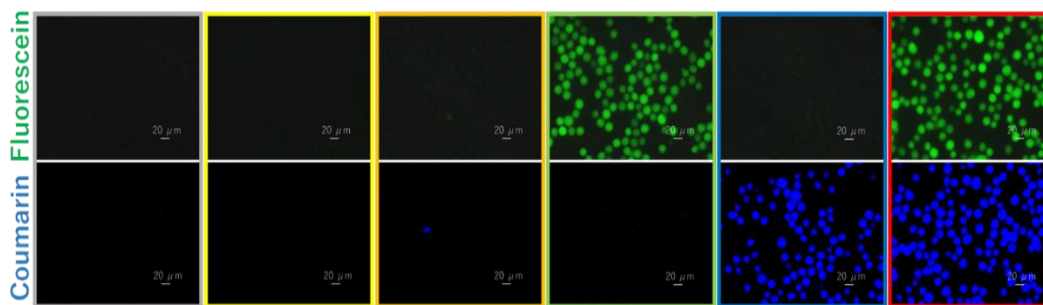


Fig. 4. 蛍光顕微鏡観察の結果 (枠線色は Fig. 2. の棒グラフの条件, 色に対応する)

4. まとめと今後の展開

複数の HOEs とそれに対する基質を用いることで、高感度な複数抗原の同時多色染色が可能であることが示された。一方で、今回合成した HOE-QS-X は、酵素反応の有無にかかわらず細胞への非特異的な吸着が見られた。これは HOE-QS-X の疎水性によるものだと考えており、親水性のスルホ基を有する Alexa Fluor 488 を導入した新規蛍光性基質の合成を現在進めている。さらに、大阪大学の加藤俊介先生のご協力のもと、各 HOE の中からより高活性な酵素の探索と発現を行っていただき、抗原タンパク質の検出感度をさらに向上させることを目指している。最後に、本手法の確立により、従来では感度が十分でなかった複数種類の抗原タンパク質の同時検出が可能となる。最終的には、臨床検査や創薬研究などの分野で活用され、多くの人々の命を救う技術になることを切望する。

参考文献: [1] R.Kaneko, et al. Chem. Lett. 50, 8, 1493-1495 (2021)

ペプチド固定化ビーズを用いた環境中の鉛イオンの簡便な検出

甲南大学大学院フロンティアサイエンス研究科

吉田秀平、吉田光輝、鶴岡孝章、臼井健二



著者紹介：甲南大学大学院 バイオ計測化学研究室 博士課程 2 年の吉田秀平で

す。写真に興味を持たれた方がいらっしゃったら嬉しいのですが、博士課程に進学後に鉄道旅と一眼カメラにも挑戦しており、日本全国を飛び回っています。基本的に大学か線路上に localization しています。どこかで見かけたら声をかけてみてください。喜びます。

さて、ペプチドに興味を持ち研究室配属された学部 3 年生から早 6 年。色々なことに挑戦することが好きで、配属当初は凝集性ペプチドの合成や同位体含有アミノ酸誘導体の有機合成なども行っていました。現在はペプチドと金属イオンの相互作用を利用した金属ナノ構造体の作製や金属イオンの検出システムの構築を行っています。その成果が認められ栄えある賞を受賞でき、大変励みになり、嬉しく思います。今後とも精進を続けて行きたいと思いますので、どうかよろしく願いいたします。また、この場をお借りしまして、研究室の臼井健二先生をはじめ、先生方、先輩方・後輩に心より感謝申し上げます。

1. はじめに

近年、重金属による環境汚染が世界的な問題となっている。中でも重金属の環境中への排出を原因とする水質の汚染が深刻となっている¹。特に、鉛イオン (Pb^{2+}) による水質汚染と鉛中毒の拡大は世界保健機関が警鐘を鳴らすほど重大な問題となっている。環境水の安全性を確認するために誘導結合プラズマ原子発光分光分析 (ICP-AES) 測定などが用いられる。しかしながら、ICP-AES などの微量分析では、有機物などの高濃度の夾雑物を含む試料を測定することができない。そのため、測定前に高温、低 pH の処理が必要という課題がある。そこで、我々は高濃度の夾雑物を含む溶液中から、目的の金属イオンを生理条件などの温和な条件で分離することができれば、容易な重金属イオンの検出が可能になると考えた。生理条件で重金属イオンを選択的に分離する方法として生体分子と金属の相互作用がある。生体内のタンパク質の一部は金属イオンと相互作用することで適切な立体構造を保っていることが知られており、その部分配列であるペプチドも金属イオンと選択的に相互作用できることが報告されている^{2,3}。さらに、ペプチドはマイクロサイズのビーズに固定化できることも知られており⁴、ペプチド固定化ビーズを用いた金属イオンの選択的な分離が可能になると考えた。そこで本研究では、 Pb^{2+} 結合ペプチドを固定化したマイクロビーズを作製、混合溶液中から Pb^{2+} を選択的に分離し、分離した Pb^{2+} を EDTA で簡便に検出するシステムの構築を試みた (Figure 1)⁵。

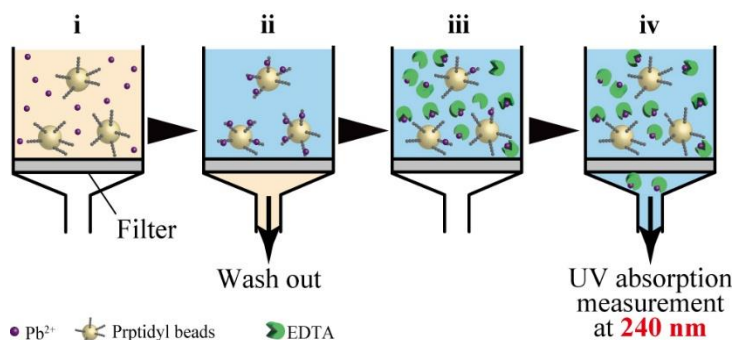


Figure 1 本実験のプロトコル

2. ペプチド固定化ビーズの設計と合成

まず、ペプチドビーズに固定化するペプチド配列を設計した。 Pb^{2+} 結合ペプチドは R. Nian らのファージディスプレイにより選定された配列を基に設計した。本手法では環境中での使用を想定しており、ペプチド配列に分解耐性を付与する必要がある。自然界に存在する酵素などは L-アミノ酸を認識しやすいが、D-アミノ酸でペプチドを作製することで分解耐性を付与することができ⁶、環境測定にも利用できると考えた。さらに、N 末端に 2-ナフチルメチル基を修飾することで分解耐性を付与できることも明らかとなっている。

これらのD-アミノ酸と化学修飾したペプチド (PbBP: Pb²⁺ binding peptide) を Fmoc 固相合成で amino PEGA resin に合成し、PbBP-beads を得た。

3. 測定条件の最適化

次に、Pb²⁺の測定条件の検討を行った。実験操作は Figure 1 に示した手順で実施した。i) PbBP-beads をフィルター付の容器に秤量してから測定溶液を添加し、24 時間攪拌する。ii) 反応溶液を濾過し、PbBP-beads を MilliQ 水で 5 回洗浄する。iii) 1 mM EDTA を用いて PbBP-beads 上に分離した Pb²⁺を溶液中に抽出する。iv) 得られた EDTA 抽出液の UV-Vis 測定を行う。その結果、Pb²⁺存在下では EDTA-Pb(II)由来の吸収が 240 nm に確認された。一方で、Pb²⁺未添加の条件においては吸収が見られなかった。また、EDTA による抽出操作を 2 回行ったところ、2 回目の抽出液においては吸収が見られなかった。以上の結果から、Figure 1 のプロトコルを用いた Pb²⁺の検出が可能であることが示された。さらに、低濃度の Pb²⁺の定量を行ったところ、500 nM から 50 μM の領域において、Pb²⁺の濃度と 240 nm の吸光度の間に正の相関があることが明らかとなり、低濃度の Pb²⁺の定量も可能であることが明らかとなった。この定量限界は ICP-AES に匹敵するものであり、定量を簡便に行うことができるようになった。

4. 環境水中での Pb²⁺の検出と定量

最後に、海、川、池の水を用いて、環境中の Pb²⁺の定量を検討した。緩衝液中と環境水中で各濃度の Pb²⁺を添加した際の 240 nm の吸光度をプロットしたところ、Figure 2 のようになり、緩衝液、環境水にかかわらず同じ吸光度を示すことが明らかとなった。この結果から、本手法は環境水中においても加熱や酸処理などの処理を必要とせず Pb²⁺を検出できることが明らかとなった。

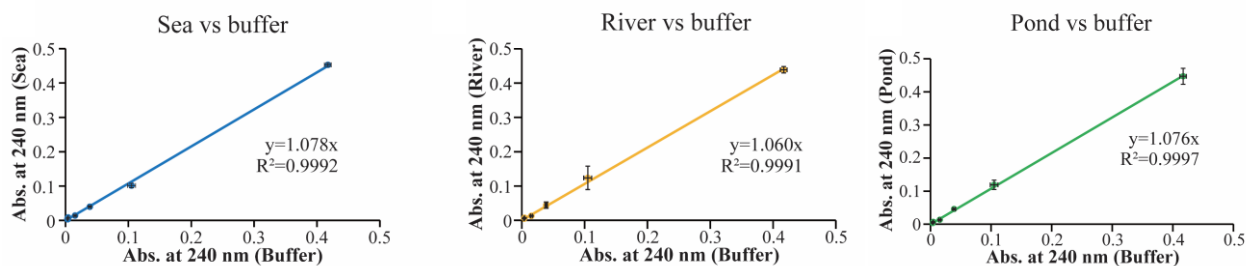


Figure 2 環境水中での吸光度と緩衝液中での吸光度の比較。a: 海、b: 川、c: 池の水。

5. まとめ

本手法では環境中の様々な夾雑物に含まれる低濃度の Pb²⁺を検出・定量することに成功した。また、本手法のコンセプトはペプチドの配列や抽出するための分子を色素に変更するなど、他の金属イオンの定量へ応用することも期待できる。現在、これらの結果は特許を出願し (特願 2023-113327)、国際誌⁵に投稿中である。

参考文献

1. S. Bolisetty, M. Peydayesh and R. Mezzenga, *Chem. Soc. Rev.*, **48**, 463-487 (2019).
2. S. Yoshida, K. Y. Tomizaki and K. Usui, *Chem. Commun.*, **59**, 13239-13244 (2023).
3. R. Nian, D. S. Kim, T. Nguyen, L. Tan, C. W. Kim, I. K. Yoo and W. S. Choe, *J. Chromatogr. A*, **1217**, 5940-5949 (2010).
4. H. Miyazaki, Y. Hamada, H. Takaishi, Y. Minamino, H. Ikeda, H. Mekata, M. Takaishi, K. Yamashita and K. Usui, *Analyst*, **145**, 3211-3216 (2020).
5. S. Yoshida, K. Yoshida, Y. Hamada, T. Tsuruoka and K. Usui, *Sci. Rep.* (submitted)
6. X. Li, X. Du, J. Li, Y. Gao, Y. Pan, J. Shi, N. Zhou and B. Xu, *Langmuir*, **28**, 13512-13517 (2012).

ぶらり研究室の旅

京都大学大学院 工学研究科 高分子化学専攻

生体機能高分子研究室

人と地球を結ぶ高分子の実現を目指して

京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻の佐々木善浩と申します。このたび、このような機会を頂戴できましたことを、九州大学の三浦佳子先生をはじめとする編集委員の先生方に心より感謝申し上げます。2024年7月に研究室を立ち上げたばかりですが、私自身と研究グループについてご紹介いたします。

私はこれまで、生体由来の高分子や超分子に関連するさまざまな分野の研究に携わってまいりました。学部4年次から、たんぱく質が高度な機能を発現するために重要な分子シャペロンの機能を人工的に再現する分子システムに関する研究を行い、学位を取得しました (*Bioconj. Chem.*, 10, 1999, 32: 指導教員: 砂本順三教授)。その後、1999年から奈良先端科学技術大学院大学の菊池純一先生の研究室で助手および助教として勤務し、人工細胞膜などの分子集合体の会合制御に取り組みました (*Nature Protocols*, 1, 2006, 1227)。さらに、2003年からはアメリカ・ノートルダム大学に文部科学省長期在外研究員および Research Associate として滞在し、生体膜のフリップ-フロップ現象を制御する分子フェリーの開発を行いました (*Org. Biomol. Chem.*, 2, 2004, 214)。一歳だった長男を連れての留学は大変なことも多かったですが、大変有意義で、楽しい思い出として心に残っています。

この時期、NTT ドコモおよびカリフォルニア大学アーバイン校 (UCI) との共同研究を通じて、天然の情報伝達システムを模倣した分子通信の研究にも取り組みました (*Supramol. Chem.*, 23, 2011, 218)。リボソームのようなナノカプセルを使い、細胞が行う情報通信システムを模倣して未来の通信に応用しようという野心的な研究でした。当時は、このシステムに該当する天然の現象がそれほど注目されておらず、学会で発表した際には賛否両論がありました。しかし、2010年代初頭から天然において、細胞間の情報伝達を担う脂質ナノカプセルとしてのエクソソーム (細胞外ベシクル) が注目され、当時この領域を見逃していたことを悔しく思っています。

2008年からは、東京医科歯科大学 (のちに京都大学) の秋吉一成先生の研究室で准教授を務め、バイオマテリアル応用を目指した研究を進めてきました。具体的には、プロテオーム創薬やバイオインフォマティクス分野に適用可能な人工細胞膜を使った自己集積型バイオチップの構築や、ナノゲルを集積したマクロゲルの作製を行いました。これらは創傷治癒材料、骨・筋肉再生材料、細胞スフェロイド基板などとして有用であることを、臨床医師との共同研究で明らかにしました。

このような研究の積み重ねを経て、2024年7月に「生体機能高分子研究室」を秋吉一成から引き継ぎました。比較的大きな研究室を引き継いだため、立ち上げ時に語られがちな苦労話は少ないものの、装置の移設や維持費の調達には苦労しました。ひきつづき、研究室を軌道に乗せるため努力を続けており、現在は水田涼介助教、博士課程学生3名、修士課程学生7名、学部生4名の計15名が在籍しています。以前にも増して学生たちに主体性が芽生え始めており、日々その成長に頼もしさを感じています。

最後に、現在の研究テーマおよび未来の目標についてお話しします。私たちは現在、「生体分子の自己組織化によるソフトナノ材料の開発とバイオ機能発現」に取り組んでいます。具体的には、天然の多彩な高分子システムを再構築し、生命現象の解明やバイオマテリアルの医療応用を目指した研究を進めています。たとえば、生体膜をナノ粒子にコーティングする新しい手法「ナノディップコート法」を開発し、効率的に合成エクソソームを大量生産する方法を見出しました (*Nano Lett.* 2024, 24, 12907)。また、ペプチド固相合成に似た原理を用い、膜タンパク質を固相合成する方法も明らかにしました (*Small*, 19, 2023, 2206153)。さらに、磁気ナノ粒子とナノゲルを複合化してタンパク質やエクソソームを効率的に細胞内に送達する技術を開発し、医療応用を目指した研究を推進しています (*Adv. Healthcare Mater.*, 10, 2021, 2001988)。



上記の研究は、生体分子と無機材料をナノレベルで融合させることで、バイオ機能を発現させた例であるといえます。これらの研究を端緒とし、私たちは、1935年にアレクシス・カレルとチャールズ・リンドバーグが試作した世界初の人工心臓「カレル・リンドバーグポンプ」に学び、異分野の連携を通じて無機化学と生体化学をナノレベルで融合し、新しいバイオマテリアル学を創出したいと考えています。生体高分子であるたんぱく質、核酸、多糖は、これまでも、そしてこれからも「人」と「地球」に深く関わり続ける存在です。私たちは、高分子化学を通じて「人」と「地球」がより調和し、健康に共存できる未来を目指していきたいと考えています。

また、学生たちが世界をリードする研究成果を得られるよう支援するとともに、何よりも研究を楽しめる環境を整えたいと考えています。異分野との共同研究や海外留学生の受け入れも積極的に推進してまいりますので、興味をお持ちの方はぜひ京都観光を兼ねて私たちの研究室にお越しいただければ幸いです。

連絡先：京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻

e-mail: sasaki.yoshihiro.8s@kyoto-u.ac.jp

住所：〒615-8510 京都市西京区京都大学桂 A3-317

電話番号：075-383-2823

部会行事

第18回バイオ関連化学シンポジウム開催報告
第39回生体機能関連化学シンポジウム・第27回バイオテクノロジー部会シンポジウム

産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門 中村 史
 慶應義塾大学 薬学部 花岡 健二郎

第18回バイオ関連化学シンポジウム(第39回生体機能関連化学シンポジウム・第27回バイオテクノロジー部会シンポジウム)が、2024年9月12日(木)～14日(土)につくば国際会議場で開催されました。中村史(実行委員長)および花岡健二郎(副実行委員長)を中心に、山岸彩奈、佐々木栄太、中村貴志、前田義昌、山崎智彦の7名で幹事メンバーを構成し、吉野知子、寺正行、細川正人、藤田聡史、神谷真子、岡田智、小嶋良輔、山次健三、口丸高弘らが実行委員としてシンポジウムを運営しました。

2019年末から始まった新型コロナウイルス感染によるパンデミックの影響を受けることなく、久しぶりにオンライン開催を伴わない現地開催のみで学会を開催することができました。実行委員会の先生方および学会運営を手伝ってくれた学生など皆さまに対し改めて謝意と敬意を表したいと存じます。

第18回のシンポジウムの参加登録者は476名(一般270名、学生206名)、一般口頭講演者81件、ポスター発表218件でした。また、懇親会には合計199名(一般139名、学生60名)の方が参加してくださいました。

招待講演には、菅裕明先生(東京大学大学院理学系研究科)と宮脇敦史先生(理化学研究所脳神経科学研究センター/光量子工学研究センター)、柳沢正史先生(筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構)をお招きし、菅先生には「ベンチリサーチからイノベーションへ、そして資金調達への道のりと挑戦」、宮脇先生には「Cruising inside cells」、柳沢先生には「睡眠の謎に挑む：基礎研究から社会実装まで」というタイトルでご講演いただきました。いずれの講演も壮大な研究内容をご紹介頂くもので、学生を含めた若手研究者を鼓舞すると共に、菅先生にはベンチャーの運営に関するお話もして頂き、大いに刺激を受けました。

懇親会では、審査委員長の松浦和則先生から講演賞3名とポスター賞9名を発表し、生体機能関連化学部会長の永次史先生とバイオテクノロジー部会長の堀克敏先生から受賞者全員へ賞状を授与していただきました。受賞者全員から一言ずつコメントをもらい、ユニークなコメントに懇親会も大変盛り上がりました。最後に、次回の第19回シンポジウム実行委員長の沼田圭司先生(京都大学大学院工学研究科)の代理として副実行委員長の跡見晴幸先生(京都大学大学院工学研究科)に挨拶をしていただき、会を締めました。また第18回の新たな試みとして、9月13日(金)に、つくば市内のスーパーサイエンススクールの指定校である茗溪学園高等学校(引率教諭1名、学生2名)および茨城県立並木中等教育学校(引率教諭1名、学生3名)から教諭と高校生らに参加していただき、学会発表や招待講演を聴講してもらうとともに、同日午前中のポスター発表にて茗溪学園高等学校から「キノコのアレロケミカルに関する研究」および「チョコレート投与時のナルコレプシー様症状誘発に関する研究」というタイトルで2件のポスター発表を、並木中等教育学校からも「挿し木の成功率を上げるために～光の波長と発根の関係について～」および「アレロケミカルと細胞周期の関係」というタイトルで2件のポスター発表をしていただきました。学会発表に向けて高校生らが頑張っている準備していたとのこと、このような経験が次世代研究者を育成する一助になるものと期待しています。

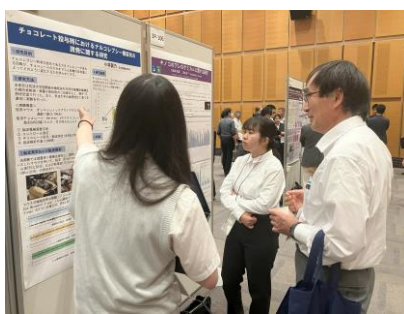
最後に、本シンポジウムを共催してくださった日本化学会および日本薬学会、日本ケミカルバイオロジー学会、日本分子イメージング学会、日本生物物理学会様に、また後援を認めてくださった応用物理学会および日本生物工学会様に深謝申し上げます。また、ランチョンセミナーを開催していただきましたオック

スフォード・インストゥルメンツ様、日立ハイテク様、産業技術総合研究所様、堀場製作所様、東レリサーチセンター様、ニコンソリューションズ様に心より感謝申し上げます。さらに、広告掲載をいただきました久保田商事様および黒鉄化成様、スクラム様、スタンダード・バイオツールズ様、住商ファーマインターナショナル様、太平洋セメント様、東ソー様、日本化学会ジャーナル編集委員会様、日立ハイテク様、ビットバイオーム様、フナコシ様、ブルカージャパン様、山本薬品様、ライフテクノロジージャパン様に心より感謝申し上げます。それから、日本化学会の守誠一郎様や関係者の皆様に、この場を借りて感謝申し上げます。第 18 回では、昨年と同様に、基本的に当日参加も含めて全て Confit システムのシンポジウムホームページ上での参加登録並びに支払いとしました。これにより、現金取扱上のトラブルが無くなることから、受付担当実行委員の負担を大幅に軽減できました。また会期中に懇親会を含め参加登録者の情報をリアルタイムに把握することもできました。発展途上の点もありますが Confit システムの良い点を活かし、今後の運営に繋げて頂ければと願うところです。

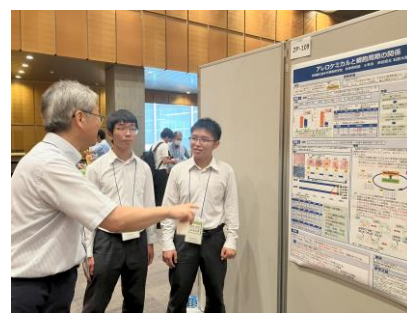
来年度の第 19 回バイオ関連化学シンポジウムは、2025(令和 7 年)年 9 月 2 日(火)～4 日(木)に、沼田圭司先生、跡見晴幸先生らのお世話で京都大学桂キャンパスにて開催される予定です。また来年皆様とお会いできることを楽しみにしています。



柳沢正史 先生(招待講演)



高校生のポスター発表①



高校生のポスター発表②



口頭発表(A会場)



ランチョンセミナー(C会場)



宮脇敦史 先生(懇親会)



懇親会



実行委員の集合写真

部会行事

第18回バイオ関連化学シンポジウム講演賞・ポスター賞講評

第39回生体機能関連化学シンポジウム・第27回バイオテクノロジー部会シンポジウム 講演賞・ポスター賞

審査委員長 松浦 和則
鳥取大学学術研究院工学系部門

今年の第18回バイオ関連化学シンポジウムの講演賞には、20名の若手研究者に応募いただきました（昨年度は28件の応募があったので、今年はやや少なめでした）。講演賞規定にしたがって、シンポジウム初日に2つの講演会場で8名の審査委員による厳正かつ公平な審査が行われました。規定により、生体機能関連化学部会もしくはバイオテクノロジー部会に入会してから1年以上経過していない方は、審査対象外としました（来年度応募される方はご注意ください）。

審査方法としては、1) 研究テーマの設定・独創性、2) 実験データの質・量・解析、3) 結論の妥当性・新規性、4) 発表・発表資料のわかりやすさ、5) 質疑応答の5項目が採点され、合計点および審査委員による熱い議論により、下記の3名が講演賞受賞者として選出されました。例年のことながら、上位者の点数は非常に僅差でしたが、**「過去の業績をレビューした内容ではなく、最新の研究成果を中心とした発表を審査対象とする」ことを重視**して、最終的には審査委員の合議により受賞者を決定いたしました。受賞者の発表は、プレゼン能力が長けていただけでなく、**テーマの新規性・独創性が高く、結論を導くための説得力のあるデータが豊富であったことが評価**されました。また、審査委員や会場からのキツイ質問にもうまく切り返して答えていたことが印象的でした。今回は選に漏れた方々も、研究レベルが非常に高いと思われるので、可能であれば来年度も講演賞にエントリーすることをお勧めしたいと思います。

バイオ関連化学シンポジウムの懇親会において、受賞者の方々を永次部会長から表彰し、一名ずつ受賞コメントを頂きました（図1）。受賞者の方々、誠におめでとうございます！副賞の1万円分の図書カードを有効にご活用いただければ幸いです！また、応募者の皆さんの素晴らしい研究と講演に対して敬意を表するとともに、このような機会がその他の多くの若手研究者の皆さんの今後ますますの活躍に繋がればと願っております。

部会講演賞受賞者（敬称略、五十音順）

加藤 俊介 大阪大学大学院工学研究科・助教

「二置換シクロプロパンの Stereodivergent 合成を目的とした微生物ヘム依存性酵素の探索」

川口 祥正 京都大学化学研究所・助教

「コアセルベート形成のための抗体スキャホールド創製と抗体の細胞内送達」

古畑 隆史 東京大学大学院工学系研究科・助教

「直列型ユビキチン鎖の非酵素的修飾を介した標的タンパク質の分解経路制御」

ポスター賞審査の準備は東京大学の松長先生を中心とした生体機能関連化学部会およびバイオテクノロジー部会の若手の会幹事でを行い、ポスター発表総数219件のうち、同賞にエントリーした88名のポスター発表が、両部会に所属する51名の若手研究者により厳正に審査されました。優れた発表が多く、1点差を争う極めて厳しい審査になりました。その結果、明確なプレゼンテーションや質疑応答内容が評価され、上位11%に相当する10名をポスター賞として懇親会にて表彰しました（図2）。このうち上位3名をRSC（Royal Society of Chemistry）の協賛により Chemical Communications 賞、RSC Chemical Biology 賞、Organic & Biomolecular Chemistry 賞として、2名を日本化学会の協賛により BCSJ 賞、Chemistry Letters 賞として表

彰しました。今後は、新たな研究で本部会上位の賞である講演賞を目指してさらに研究に邁進していただきたいと思います。副賞の3000円分の図書カード（およびRSC, CSJからの素敵な副賞）を有効にご活用いただければ幸いです！

ポスター賞受賞者（敬称略、五十音順）

今井 翔月（農工大院工）、笠井 終杜（慶応大院薬）、河合 寛太（岐阜薬大院）*4、黒田 晃大（九大院システム生命）、難波江 友紀（九大院工）*2、牧野 哲直（電通大院情報理工）*3、三宅 良介（早大院先進理工）、宮崎 友輝（名工大院工）*5、谷田部 浩行（東大院工）*1、吉田 秀平（甲南大院FIRST）

*1 Chemical Communications 賞、*2 RSC Chemical Biology 賞、*3 Organic & Biomolecular Chemistry 賞、*4 BCSJ 賞、*5 Chemistry Letters 賞

最後に、講演賞の審査を快くお引き受けいただいた8名の先生方、及びタイトなスケジュールの中、ポスター賞の審査を実施していただいた51名の若手の先生方のご協力に心より感謝申し上げます。



図1. 部会講演賞受賞者および審査委員長・両部会長



図2. ポスター賞受賞者および審査委員長・両部会長・運営委員長

お知らせ

第19回バイオ関連化学シンポジウム

—第40回生体機能関連化学シンポジウム・第28回バイオテクノロジー部会シンポジウム—

主催 日本化学会生体機能関連化学部会、日本化学会バイオテクノロジー部会

共催 日本化学会、日本薬学会、日本生物物理学会、日本生物工学会、日本ケミカルバイオロジー学会、日本分子イメージング学会など（予定）

会期 2025（令和7）年9月2日（火）～4日（木）

会場 京都大学 桂キャンパス（京都府京都市） <https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/access/campus>

発表申込期間・予稿原稿投稿期間 6月2日（月）～6月20日（金）

参加登録申込期間 6月2日（月）～7月18日（金）

討論主題 ペプチド・タンパク質・酵素・核酸・糖鎖・脂質・分子認識・超分子・生体モデル系・遺伝子・DDS等が関連する幅広いバイオ関連化学

発表形式 口頭発表・ポスター発表

申込分類 (1)分子認識・超分子・モデル系、(2)ペプチド、(3)タンパク質・酵素、(4)核酸関連、(5)糖・脂質、(6)メディカルバイオ、(7)環境バイオ、(8)分析・計測・センサー・デバイス、(9)DDS

ポスター発表 原則1日目および2日目

口頭発表 全日で15分間発表・5分間質疑応答

※口頭発表は原則として1研究室1件。ただし申込は2件までは可。

※優れた発表を対象とした部会講演賞、学生ポスター賞表彰を予定しています。

※シンポジウムwebシステムとしてアトラス社Confitを継続して使用する予定です。

※参加登録費および登録方法などについては、追ってお知らせいたします。

招待講演 浜地 格 教授（京都大学 大学院工学研究科 合成・生物化学専攻生物化学講座）

「Biomimetic から分子夾雑の生命化学へ（仮）」

参加登録費 [事前登録]部会員：一般9,000円、学生4,000円、非部会員：一般11,000円、学生5,000円

[当日]部会員：一般11,000円、学生6,000円、非部会員：一般13,000円、学生7,000円

懇親会 9月4日（金）開催（詳細は後日シンポジウムのホームページでお知らせ致します）

実行委員会 実行委員長（生体機能関連化学部会）：沼田圭司（京都大学工学研究科）

副実行委員長（バイオテクノロジー部会）：跡見晴幸（京都大学工学研究科） 実行委員：秋吉一成（京都大学医学研究科）/大庭誠（京都府医科大学医学部医学科）/角五彰（京都大学理学研究科）/後藤佑樹（京都大学理学研究科）/佐々木善浩（京都大学工学研究科）/高橋俊太郎（甲南大学先端生命工学研究所）/竹中瑞樹（京都大学理学研究科）/田村朋則（京都大学工学研究科）/野中洋（京都大学工学研究科）/野村幸汰（京都大学工学研究科）/寺田佳世（京都大学工学研究科）

問合せ先 第19回バイオ関連化学シンポジウム事務局 〒615-8510 京都府京都市西京区京都大学桂 A クラスター沼田研究室内 E-mail: bio2025@t.kyoto-u.ac.jp

ニュースレター Vol. 39, No. 2 2024年12月16日発行
事務局：101-8307 東京都千代田区神田駿河台1-5, 日本化学会生体機能関連化学部会
The Chemical Society of Japan, 1-5 Kanda-Surugadai, Chiyodaku, Tokyo 101-8307, Japan
URL: <http://seitai.chemistry.or.jp>
E-mail: seitai@chemistry.or.jp

編集委員：三浦 佳子、山口 浩靖、築地 真也

