

Newsletter



日本化学会
生体機能関連化学部会

巻頭言

定年を迎えて	岡本 祐幸	2
--------	-------	---

Award Accounts 部会講演賞

Tau 由来ペプチド融合タンパク質による微小管超構造体の創製	稲葉 央	4
合成化学的アプローチによる翻訳後修飾糖鎖の機能解明	真鍋 良幸	9
YK ペプチドタグによる細胞内での人工相分離液滴モデルの形成	三木 卓幸	14
腫瘍溶解性ヘアピン DNA ペア:マイクロ RNA 駆動型 DNA 自己組織化を介した選択的細胞毒性誘導剤	森廣 邦彦	19

Award Accounts ポスター賞

細胞内 GSH 濃度変化のリアルタイム追跡を可能にするオルガネラ選択的 近赤外蛍光プローブの創製	師 悠季	24
タンパク質表面修飾を利用した光スイッチング蛍光分子の光安定性の向上	鳥井 健司	26
環境汚染物質分解を目指した擬似基質添加 P450 発現細菌による菌体内反応	伊藤 史哉	28
人工核酸 L-aTNA と SNA の化学的な鑄型合成の速度論解析を基盤とした 長鎖伸長反応法の構築	沖田 ひかり	30
mRNA 配列の翻訳効率と精度への影響の網羅的解析と人工抗体・環状ペプチド の多様性ライブラリ創製への応用	梅本 駿	32
立体選択的マイケル付加反応を志向した人工金属酵素の開発	松本 隆聖	34
酸化損傷塩基 2-オキソアデニンを特異的に認識しシーケンシングを 目指した新規人工核酸の開発	宮原 涼	36
顕微ラマン分光計を用いた Streptomyces avermitilis の形態分化における avermectin の局在解析	堀井 俊平	38

ぶらり研究室の旅

北海道大学大学院地球環境科学研究院 物質機能科学部門 小野田研究室 バイオエコノミーにつながるサイエンスを探して。チリで何ができる？	小野田 晃	40
---	-------	----

部会行事

第 16 回バイオ関連化学シンポジウム開催報告	堀 克敏・村上 裕	42
第 16 回バイオ関連化学シンポジウム講演賞・ポスター賞講評	廣田 俊	44
第 16 回バイオ関連化学シンポジウム内企画 Graduate Student Session 開催報告	有安 真也・牧野 航海	46

お知らせ

第 16 回バイオ関連化学シンポジウム講演賞・ポスター賞	49
第 17 回バイオ関連化学シンポジウム会告	50

巻頭言

定年を迎えて

名古屋大学
情報基盤センター 大規模計算支援環境研究部門
国際本部 グローバル・エンゲージメントセンター
岡本祐幸



私事ですが、私は2022年3月末に名古屋大学大学院理学研究科物理学教室を定年退職しました。3月初めに最終講義というものをさせて頂きました。その準備のために、自分の(研究)人生を振り返ることができました。そして、多くの人々に導いて頂いた人生だったなあという感謝の思いを強くした次第です。私は三重県尾鷲市須賀利町で生まれましたが、尾鷲市立須賀利中学を卒業後、越境入学で静岡県立浜松北高に入り、それを卒業後、財団法人グルー基金の留学奨学金を得て、アメリカのブラウン大学へ留学して、卒業後、大学院はコーネル大学で学びました。私は小さい頃に読んだ伝記に感動し、湯川秀樹に憧れて、素粒子論の分野で学位を取りました。コーネル大学の博士論文の指導教員は木下東一郎教授でした。また、博士研究員で同じ素粒子論グループにいた川合光さん(後に、コーネル大学助教授、東大助教授、高エネルギー研究所教授、京大教授)には、物理学のいろいろなことを教えて頂きました。特に、後に私が蛋白質の折り畳みの計算機シミュレーションでフルに使うことになるモンテカルロ法を教えてもらいました。私の博士論文は、ミューオンの異常磁気モーメントの計算(木下先生の指導)と格子ゲージ理論のモンテカルロシミュレーション(川合さんの指導)についてでした。博士研究員はバージニア工科大学(Virginia Polytechnic Institute and State University)のRobert Marshak教授の下で、素粒子の複合模型の研究を行いました。Marshak教授は紙と鉛筆でできる群論に基づく複合模型の研究以外にも何かできるようにと、スーパーコンピューターの計算時間を用意してくれました。私はこの計算時間を何の研究に使うのかをコーネル大学の川合さんに相談しました。彼の提案は、「我々の共通の友人でHarold Scheraga教授の博士研究員をしている菊地武司さん(後に立命館大学教授)の研究テーマである蛋白質の立体構造予測を3人でやったらどうか。徐冷法(Simulated Annealing)が使えると思う。」というものでした。素粒子論と計算化学の分野のこのような共同研究は海外の大学にいたから可能だったと思います。コーネル大学に留学していた日本人の数が少なく、頻りに週末に一緒に遊んでいたから、全く違う分野の研究者と知り合うことができたからです。私はその後、奈良女子大学理学部物理学科の素粒子論の助手に着任しましたが、川合さん、菊地さんに更に、

化学科の中沢隆さん、京大基研の福来正孝さん（後に東大教授）も加わって、徐冷モンテカルロ法による蛋白質の立体構造予測シミュレーションを続けました。私は、奈良女に来てから6年後に長期在外研究の予算を得て、10ヶ月間スタンフォード大学を訪問する機会を得ました。訪問先は、スタンフォード線形加速器センターでしたが、医学部生化学科のRobert Baldwin教授の週一回のゼミにも参加させてもらいました。その滞在中に、フロリダ州立大学のUlrich Hansmannという素粒子論の博士研究員がやって来て、マルチカノニカル法という拡張アンサンブル法を蛋白質の立体構造予測問題に適用したいのと共同研究を提案してきました。帰国寸前に論文を投稿できました。私は、徐冷法とマルチカノニカル法という2つの物理学の分野で開発された手法を蛋白質のシミュレーションに適用した成果により、分子科学研究所理論研究系の助教授に転任し、生体系の分子シミュレーションの研究に専念することになりました。分子研は助教授でもPIとして研究室を主宰でき、また、助手を1名つけてくれて、最高の研究環境でした。2代目の助手だった杉田有治さん（現理研主任研究員）と発表した、レプリカ交換分子動力学法の論文は世界的大ヒットとなり、私は、名古屋大学物理学教室の生物物理の教授として転任しました。以上、最終講義をきっかけに振り返った私の研究人生を簡単にまとめました。名古屋大学では、教授になったのだから、研究以外でも教室や大学のためにやるべきことがあると思いましたが、17年間で以下のことをやりました。(1)名大の先人の顕彰（「物理学教室の歴史を彩った人々」を物理教室のホームページに掲載して、39名の先人の業績を紹介するとともに、特に、中野・久保公式の中野藤生さん、RKKY理論の糟谷忠雄さん、生物物理研究の創始者の大澤文夫さんをインタビューして記録を残しました）、(2)サバティカル制度の導入、(3)大学院一般入試日程の変更（東大と日程が重ならないようにした）、(4)物理学教室のホームページの教員名簿からGoogle Scholarの個人プロフィールへのリンク（全教員約90名中約70名が同意）、(5)ケンブリッジ大学セント・ジョーンズ・カレッジとの学部生交換留学制度（毎年3月に6名の名大生がケンブリッジを2週間訪問し、7月に6名のケンブリッジ生が2週間名大を訪問）、(6)物理学教室の2専攻の統合（結局、理学研究科の物理、化学、生物、地学の4専攻が一つの専攻になりました）、などなど。私は、最終講義の終わりの方で、「若者に贈る言葉」として、「楽観主義」と「野心」の重要性を強調しました。そして、最後のスライドで、「定年を迎えた今の心境」として、以下の中村真一郎の言葉「今まで、人は生まれて、仕事をして、死んで行く、という経過が、一つの完成した作品のように見えていたのだが、そうではなく、無数の可能性の中途半端な実現の束が、人の一生なのではないか、と思われてきたのだった。ほとんどの人間の人生が中断なのではないのか。」を引用し、「そして、私の研究人生もこれで中断です。」で結びました。なお、私の最終講義のスライドとビデオが、名大のホームページ「名大の授業」にアップロードされる予定ですので、興味のある方はご覧頂けると幸いです。

Tau 由来ペプチド融合タンパク質による微小管超構造体の創製

鳥取大学学術研究院工学系部門
稲葉 央



著者紹介：バイオ関連化学シンポジウムは私にとって主戦場というか、思い入れの強いシンポジウムです。講演賞には博士後期課程の学生（京都大学北川進研究室、上野隆史グループ）のときから応募を始め、米国イリノイ大学でポストドクをしていたとき以外は現所属（鳥取大学松浦和則研究室）に着任してからほぼ毎年応募していたかと思います。周りの先生からは「今年もダメだったな」といじられ（激励され？）続けてきましたが、長年の目標が叶い、今回講演賞を受賞できて大変嬉しく思います。久しぶりの対面開催で、しかも出身の名古屋大学でのシンポジウムであったことも思い出深い点です。最先端の研究というよりは、世界で誰もやっていない研究を評価していただいたものと勝手に考えております。学生自体からテーマは変遷していますが、ペプチドやタンパク質を使って独自の面白いもの（ナノ構造体など）を作りたいという考えは変わらず日々研究を進めています^[1]。

1. はじめに

細胞骨格の一種である微小管はチューブリンタンパク質からなる内径 15 nm のチューブ状構造体であり、細胞の強度や分裂、運動などの様々な細胞機能に重要な役割を果たしている（図 1a）。微小管は多様な構造（長さ・直径・後述の超構造体など）や機能（運動性・可逆的など）を有し、この多様性が生体内における多彩な役割につながっている。微小管の特性を利用した材料応用も盛んに進められており、例えば微小管とモータータンパク質を組み合わせることで、アクティブマターなどの運動性機能材料が開発されている^[2]。このような多様な微小管の構造・機能を人工的に制御することは、生体・材料応用を考える上で重要な課題である。これまで微小管の「外部」表面への分子修飾による機能化は確立されているが、チューブ構造の「内部」空間に着目した研究は少なく、微小管内部に人工的に分子を導入する方法も存在しなかった。近年微小管内部に結合する様々なタンパク質が発見され、微小管構造を内

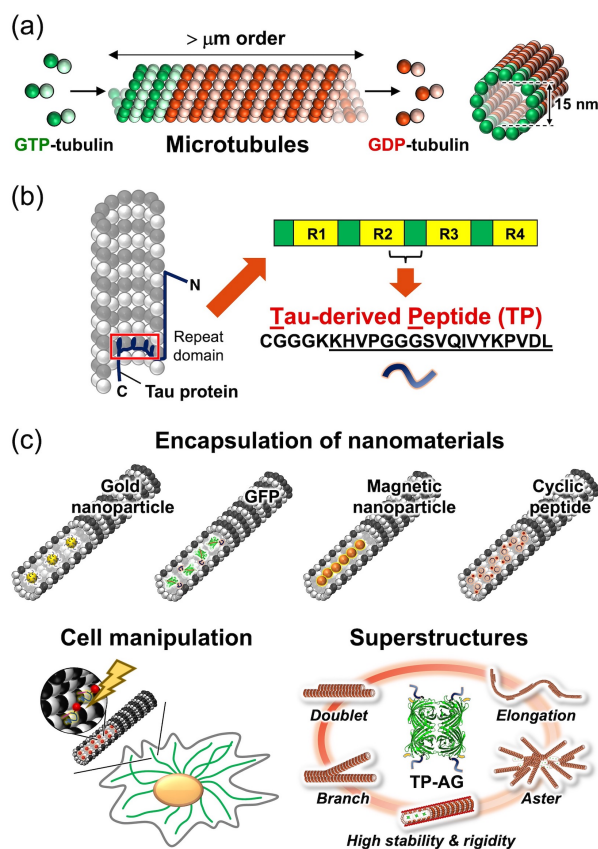


図 1. (a) 微小管の構造. (b) Tau 由来ペプチド TP の設計. (c) TP を用いた微小管の構造・機能制御.

側から制御していることが明らかとなりつつある^[3]。したがって、微小管内部に分子を導入することで新たな微小管の構造・機能制御法になると期待できる。

我々は、微小管内部に分子を導入するための結合モチーフとして、微小管関連タンパク質 Tau をもとに微小管内部に結合する Tau 由来ペプチド (TP) を開発した (図 1b)^[4]。TP はチューブリンと複合化した後に GTP またはそのアナログを用いて微小管を作製することで、微小管内部に導入されることが明らかとなっている。これまでに、TP を用いることで金ナノ粒子、GFP、磁性 CoPt ナノ粒子、環状ペプチドなど様々なナノ構造体を微小管内部に導入することに成功し、内包物に応じて微小管の構造や機能が変化することを見出している (図 1c)^[5]。また、TP が HepG2 細胞内の微小管にも結合できることを利用し、光刺激による微小管構造の安定化と細胞死誘導に成功している^[6]。これまで TP を微小管内部に分子を導入するために用いてきたが、本研究では、微小管外部でチューブリンをリクルートするために利用することで、微小管からなる超構造体を構築することに成功した^[7]。

2. TP 融合四量体タンパク質 TP-AG の開発と結合解析

微小管は *in vitro* ではほとんどが一巻きからなるシングレット構造であるが、生体内では微小管が横方向に連なったダブルレットやトリプレット、2つのシングレットに分かれる分岐構造、アスター (放射状集合) 構造などの複雑な微小管超構造体が存在し、それぞれ異なる機能を発揮している^[8]。天然のダブルレット微小管は、その内部および外部へのタンパク

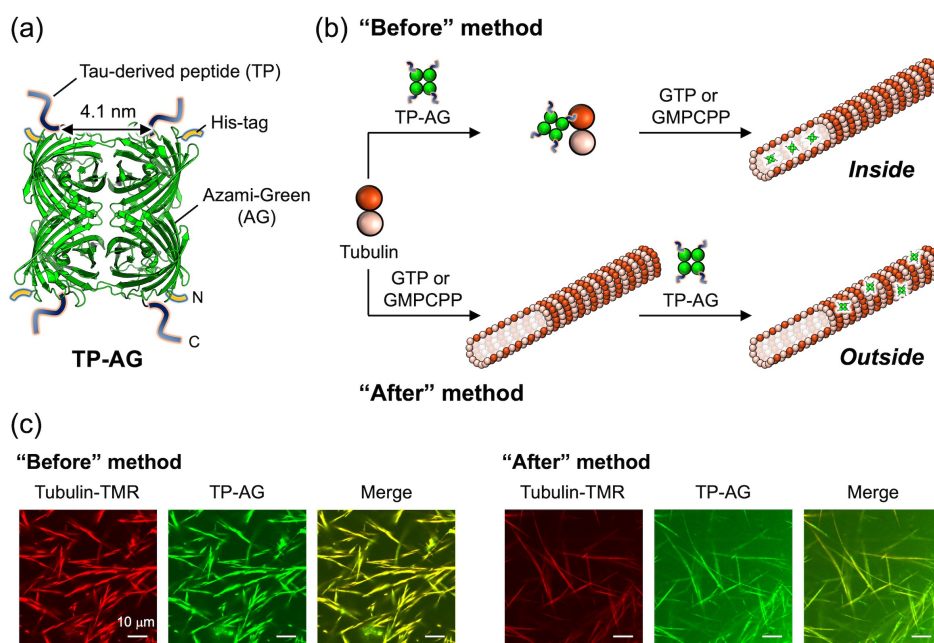


図 2. (a) TP-AG の構造. (b, c) TP-AG の微小管への複合化と CLSM 像.

質の結合により形成が誘起されていると推定されている。しかし、*in vitro* でこれら微小管超構造体を構築した例はほとんどなく、その構築原理や性質は未解明であった。

そこで、四量体を形成して蛍光を生じるタンパク質 Azami-Green (AG) の各サブユニットの C 末端に TP を連結した TP-AG を構築し、その結合を利用した微小管超構造体の構築を目指した (図 2a)。TP-AG は N 末端に His-tag を導入しており、これが微小管外部への結合モチーフとして機能すると考えられる。TP-AG は 4 つ TP を有することから、微小管内部に多価的に結合することで微小管構造を安定化すると期待できる。また、His-tag を利用して微小管外部に結合することで、表面に露出した TP に新たなチューブリンが結合し、ダブルレットなどの微小管超構造体の構築が期待できる。

TP-AG の微小管への結合位置を制御するため、2 種類の方法で微小管への複合化を行った (図 2b)。TP-AG をチューブリンと複合化後に GTP アナログ (GMPCPP) により微小管を形成する方法 ("Before" method) および微小管を形成した後に TP-AG を複合化する方法 ("After" method) を用いたところ、ど

ちらも TP-AG の微小管への結合が共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (CLSM) で確認された (図 2c)。また、抗 AG 抗体の結合解析により、TP-AG は "Before" method では抗体がアクセスできない微小管内部に、"After" method では抗体がアクセスできる微小管外部に主に結合することが明らかとなった。このことから、TP-AG 添加のタイミングを変えることで微小管における結合位置を変えることが可能であることが示された。

3. TP-AG による微小管構造の安定化

次に、TP-AG が微小管形成および安定性におよぼす影響を評価した。微小管形成に伴う濁度上昇を見かけの吸光度として測定したところ、TP-AG 添加により濁度は急激に上昇し、微小管形成が促進されていることが明らかとなった (図 3a)。その濁度上昇は微小管を安定化する抗がん剤で

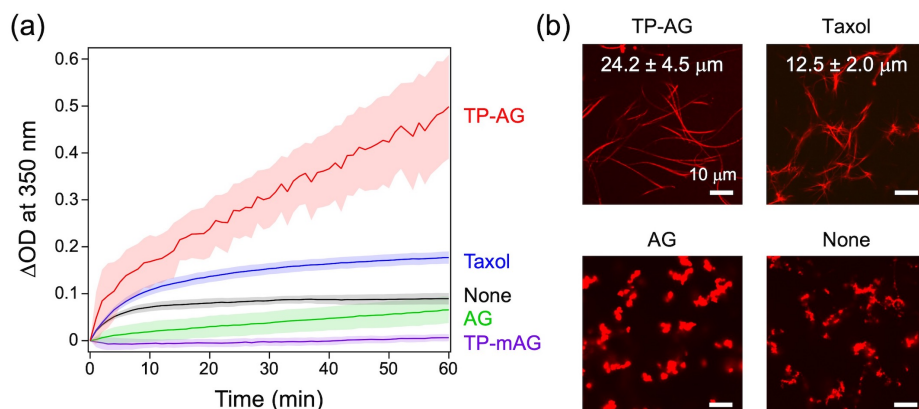


図 3. (a) 濁度測定による微小管安定性評価. (b) 一般的に不安定な GTP 型微小管の CLSM 像.

ある Taxol よりも著しく、TP-AG により微小管が強く安定化されたことが示唆された。一方、TP を持たない AG や変異導入により AG を単量体化した mAG に TP を融合した TP-mAG では濁度上昇が見られなかったことから、AG の四量体構造に TP を融合することが微小管安定化に重要であることがわかった。

また、GTP を用いて作製した微小管は一般的に不安定であり観察が難しいが、"Before" method で TP-AG を複合化することで Taxol よりも長く安定な微小管が形成された (図 3b)。一方、"After" method で複合化した場合は微小管が確認できなかったことから、"Before" method による TP-AG の微小管への内包が微小管安定化に重要であることがわかった。さらに、ネガティブ染色電子顕微鏡観察により、TP-AG が微小管構造を剛直にすることが明らかとなった。これら TP-AG の安定化効果は TP を融合した GFP^[5a] よりも大きく、四量体構造である TP-AG が微小管に強く結合してその構造を安定化することが示された。

4. TP-AG による微小管超構造体の形成

微小管超構造体の形成を評価するため、ネガティブ染色電子顕微鏡による観察を行なった。TP-AG を加えない場合はほとんどがシングレット構造であったが、TP-AG を複合化した場合はダブルレット構造や分岐構造、多層に重なった構造などの多様な微小管超構造体が観察された (図 4a)。特に "Before" method よりも "After" method で TP-AG を複合化した場合にこれら超構造体の割合が多いことから、微小管外部への TP-AG の結合が超構造体形成に重要であると考えられる。一方 TP を持たない AG のみは微小管外部に結合して微小管同士を連結するバンドル化のみが見られ、超構造体の形成は確認されなかった。クライオ電子顕微鏡でも同様に TP-AG 複合化によるダブルレット構造や分岐構造が確認され、その直径を比較することで、天然の繊毛から単離したダブルレット微小管 (完全な A 微小管と不完全な

B 微小管からなる) と類似した構造であることが示された(図4bのAとB)。

また、全反射照明蛍光顕微鏡(TIRFM)により、分岐構造の形成をリアルタイムで観察した。あらかじめ作製した赤色蛍光ラベル微小管にTP-AG、青色蛍光ラベルチューブリン、およびGTPを加えることで、分岐構造が成長していく過程を追跡することに成功した(図4c)。これらの解析から、TP-AGが微小管外部に結合し、表面に露出したTPが新たなチューブリンをリクルートすることでダブルット微小管や分岐構造が形成されたと考えられる。

さらに、キネシン固定基板上でTP-AG複合化微小管がアスター構造を形成することが明らかとなり、その中心から外側への微小管の運動が観察された(図4d)。アスター構造の中心にTP-AGの強い蛍光が確認されたことから、TP-AGにより集積した微小管が天然の微小管形成中心のように働いた可能性がある。また、TP-AGの当量を変えることで、TP-AGが微小管の内部と外部の両方に結合することによってと思われる極めて長い微小管の形成が確認された。これら分岐構造の成長やアスター構造の運動はぜひ論文の補足資料にある動画をご覧ください。

このように、TPを融合した四量体タンパク質を用いることで多様な微小管超構造体を創製することに世界ではじめて成功した。

このように、TPを融合した四量体タンパク質を用いることで多様な微小管超構造体を創製することに世界ではじめて成功した。

5. おわりに

2016年に鳥取大学に着任後、誰もやっていないからという理由で始めた微小管内部への分子導入の研究だが、ライバルがいないこともあり、分子内包による微小管の機能化や細胞応用、そして本稿で示した微小管超構造体の形成まで展開することができている。特に本稿で示した研究は微小管超構造体の形成を外来タンパク質によって誘起したはじめての例であることから、天然の微小管超構造体の形成原理の理解に繋がるとともに、動的ナノ材料や細胞操作への応用が期待できる。最近、微小管内部への人工的な分子導入の研究が報告されつつある^[9]。この分野が注目されることを願いつつ、自分達にしかできない研究を発展させていきたい。

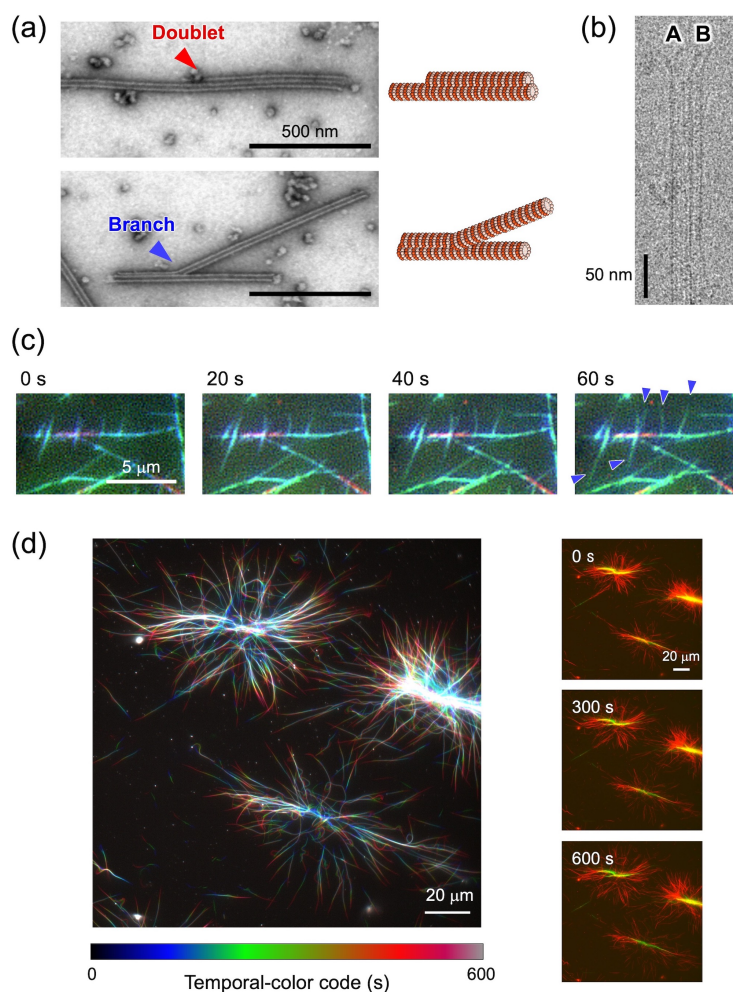


図 4. TP-AG 複合化微小管の (a) ネガティブ染色電子顕微鏡像および (b) クライオ電子顕微鏡像. (c) TIRFM 観察による分岐構造の成長. (d) 運動性を有するアスター構造. 左は撮影した画像を時間ごとに異なる色をつけ重ね合わせたもの。

謝辞

本研究は、鳥取大学学術研究院工学系部門の松浦研究室で実施されました。松浦和則教授および研究室の学生の皆様（特に本研究を行った末岐 優里菜 氏）に深く感謝申し上げます。また、本研究は多くの共同研究者の方々のご支援により遂行することができました。チューブリンの提供や微小管の運動性評価などは北海道大学の Arif Md. Rashedul Kabir 講師、角五彰准教授、佐田和己教授に、タンパク質発現や細胞実験は鳥取大学の岩崎崇准教授に、電子顕微鏡解析には复旦大学の市川宗巖テニュアトラックプロフェッサー、奈良先端科学技術大学院大学の塚崎智也教授、高輝度光科学研究センターの重松秀樹研究員にご協力いただきました。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、JST 創発的研究支援事業などの支援により遂行されました。

参考文献

- [1] 稲葉央, 「グローイングポリマー」 *高分子*, **2022**, 71, 162.
- [2] Hess, H.; Ross, J. L. *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, 46, 5570.
- [3] Ichikawa, M.; Bui, K. H. *Bioessays*, **2018**, 40, 1700209.
- [4] Inaba, H.; Yamamoto, T.; Kabir, A. M. R.; Kakugo, A.; Sada, K.; Matsuura, K. *Chem. Eur. J.*, **2018**, 24, 14958.
- [5] (a) Inaba, H.; Yamamoto, T.; Iwasaki, T.; Kabir, A. M. R.; Kakugo, A.; Sada, K.; Matsuura, K. *Chem. Commun.*, **2019**, 55, 9072. (b) Inaba, H.; Yamada, M.; Rashid, M. R.; Kabir, A. M. R.; Kakugo, A.; Sada, K.; Matsuura, K. *Nano. Lett.*, **2020**, 20, 5251. (c) Inaba, H.; Nagata, M.; Miyake, K. J.; Kabir, A. M. R.; Kakugo, A.; Sada, K.; Matsuura, K. *Polym. J.*, **2020**, 52, 1143. (d) Inaba, H.; Kabir, A. M. R.; Kakugo, A.; Sada, K.; Matsuura, K. *Chem. Lett.*, **2022**, 51, 348. (e) Inaba, H.; Matsuura, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2021**, 94, 2100 (Account).
- [6] (a) Inaba, H.; Yamamoto, T.; Iwasaki, T.; Kabir, A. M. R.; Kakugo, A.; Sada, K.; Matsuura, K. *ACS Omega*, **2019**, 4, 11245. (b) Watari, S.; Inaba, H.; Tamura, T.; Kabir, A. M. R.; Kakugo, A.; Sada, K.; Hamachi, I.; Matsuura, K. *Chem. Commun.*, **2022**, 58, 9190.
- [7] Inaba, H.;¹ Sueki, Y.;¹ Ichikawa, M.;¹ Kabir, A. M. R.; Iwasaki, T.; Shigematsu, H.; Kakugo, A.; Sada, K.; Tsukazaki, T.; Matsuura, K. *Sci. Adv.*, **2022**, 8, eabq3817 (¹Equal contribution).
- [8] Janke, C.; Magiera, M. M. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2020**, 21, 307.
- [9] (a) Nihongaki, Y.; Matsubayashi, H. T.; Inoue, T. *Nat. Chem. Biol.*, **2021**, 17, 888. (b) Joshi, F. M.; Viar, G. A.; Pigino, G.; Drechsler, H.; Diez, S. *Nano. Lett.*, **2022**, 22, 3659.

合成化学的アプローチによる翻訳後修飾糖鎖の機能解明

大阪大学大学院理学研究科
真鍋 良幸



著者紹介：2006年に東北大学理学部化学科を卒業，2008年に同大学院理学研究科博士前期課程を修了，2011年に同博士後期課程を修了，この間，日本学術振興会特別研究員 DC1 (2008-2011年)．学部時代から博士号取得に至るまで，上田実先生のご指導のもと，植物のケミカルバイオロジー研究を通して，研究者としての基礎を養成していただいた．その後，九州大学大学院理学研究院の大石徹先生の研究室で，博士研究員を務め (2011-2012年)，天然物合成に携わった．2012年より現職，大阪大学大学院理学研究科の深瀬浩一教授の研究室で助教に着任．上記のような経歴から，確固たる合成力を持つ有機化学者にしか実施できないケミカルバイオロジー研究を目指している．現在は，糖鎖を研究対象としている．糖鎖は核酸，タンパク質に続く第3の生命鎖と呼ばれているが，その合成法が確立されていないこともあり，分子基盤の解明は遅れている．一方，糖は細胞を覆うように存在することから，その機能解明・制御は，生体膜における新たなサイエンスを生み出す可能性を秘めている．筆者は，合成力を武器として，分子レベルでの糖鎖機能解明を進め，糖鎖医薬の実現につながる革新的な学理を構築したい．

1. はじめに

タンパク質の60%以上は糖鎖修飾を受け，免疫，がんなど，さまざまな生体现象と関与する．一方，生体内で糖鎖は多様な構造の混合物 (グリコフォーム) として存在するため，糖鎖の生物機能を分子構造に基づいて解明することは困難であった．*N*-結合型糖鎖 (*N*-グリカン) はタンパク質のアスパラギン残基に結合する翻訳後修飾糖鎖で，多様な構造を持ち，それぞれの構造に基づき，タンパク質の機能を調節する．中でも，コアフコース，バイセクティンググルコサミン (GlcNAc)，ポリラクトサミン，末端シアル酸などの構造は，免疫調節やタンパク質の活性制御に重要であることが，その生合成酵素のノックアウト実験により明らかにされている (図1)．

これは，*N*-グリカンが，レクチンをはじめとする種々の分子と相互作用し，タンパク質の局在や運動性などを調整して，その機能を制御するためである．本研究では，*N*-グリカンの機能解明のための合成糖鎖ライブラリ構築を目的とし，種々の構造を持つ *N*-グリカンを合成した．さらに，糖鎖修飾がタンパク質の動態に及ぼす影響を解析するために，合成 *N*-グリカンで修飾したタンパク質を調製し，ライブセルイメージングを行った．

2. *N*-グリカンの合成

まず，コアフコースとシアル酸を持つ *N*-グリカン **3** を合成した (図2)．効率的な合成を実現するために，還元末端の4糖 **1** に対して非還元末端の4糖 **2** を2度グリコシル化する収束的ルートを採用した．

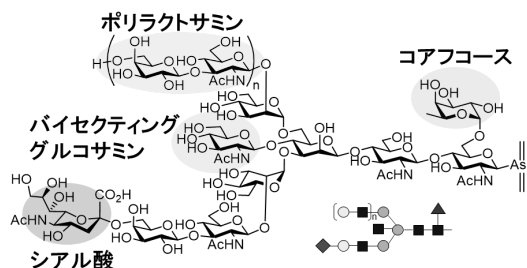


図1 *N*-グリカンの構造

この際、カギとなるグリコシル化は大きなフラグメント同士のカップリングで、挑戦的な反応である。我々はシアル酸中のNHAcがグリコシル化の反応性を大きく低下させること、反応性の低下が分子間での水素結合の形成に起因することを見出し、NHAcをNAC₂として保護することで、シアル酸から遠隔位のグリコシル化においても反応性と収率を大きく向上させることに成功した^[1]。糖供与体**2**と**1**の[4+4]グリコシル化

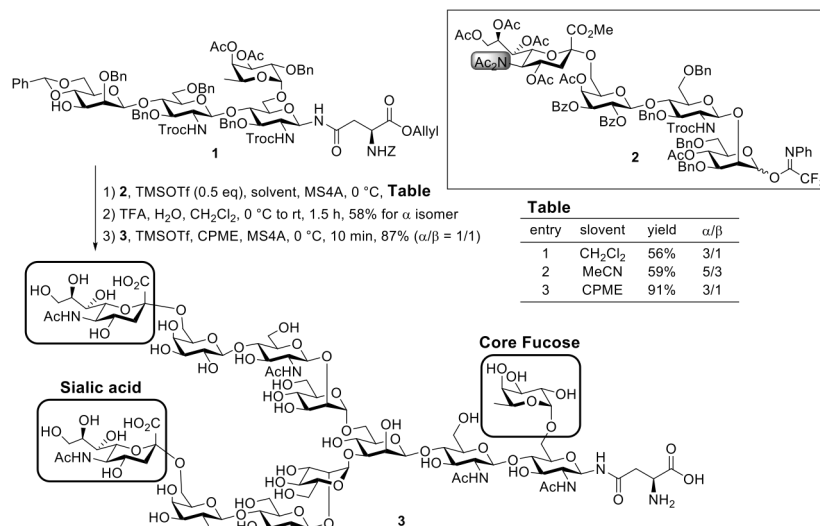


図2 コアフコース含有 N-グリカン **3** の合成

化においては溶媒が収率に大きな影響を与え、シクロペンチルメチルエーテル (CPME) を用いた際に高収率で目的の6糖を与えた (図2, Table 1). これは、エーテル系溶媒が反応中間体であるオキソカルベニウムイオンを安定化し、分解を防いだ結果であると考えている。一方、本グリコシル化の立体選択性は低く、α/β選択性は3/1にとどまった。続いて、ベンジリデン基を切断後、[8+4]グリコシル化を検討した。このグリコシル化においてもCPMEを用いることで、高収率で目的の12糖が得られた (87%, α/β = 1/1)。さらに、得られた12糖を脱保護し、目的の**3**の合成を達成した^[2]。

次に、バイセクティング GlcNAc 含有糖鎖 **7** を合成した (図3)。この合成においても、上記と同様に収束的な合成ルートを採用し、ここでは、骨格構築の鍵グリコシル化のα選択性を改善するために、非還元末端の2糖供与体の保護基パターンを検討した。上記の**3**の合成において、鍵である[4+4]、[8+4]グリコシル化の立体選択性が低い理由として、遠隔基関与を考えた (図3, 下)。Kimらはマンノースを用いたグリコシル化で、3位や4位、6位のアシル基のオキソカルベニウムイオン中間体に対する遠隔関与が、立体選択性に影響を及ぼすことを報告している^[3]。上記のコアフコース含有 N-グリカン **3** 合成においては、**2**の4位に導入したAc基がα面をブロックし、α選択性が低下したと考えた。そこで、バイセクティング GlcNAc 含有糖鎖 **7** の合成においては、4位のAc基をBn基に変更した糖供与体**5**、および3位と6位にアシル系の保護基を導入し、積極的に遠隔基関与を利用できる糖供与体**6**をそれぞれ設計・合成した。さらに、より効率的な骨格構築を目指し、還元末端の4糖**4**のマンノース3位と6位に対して、同時にグリコ

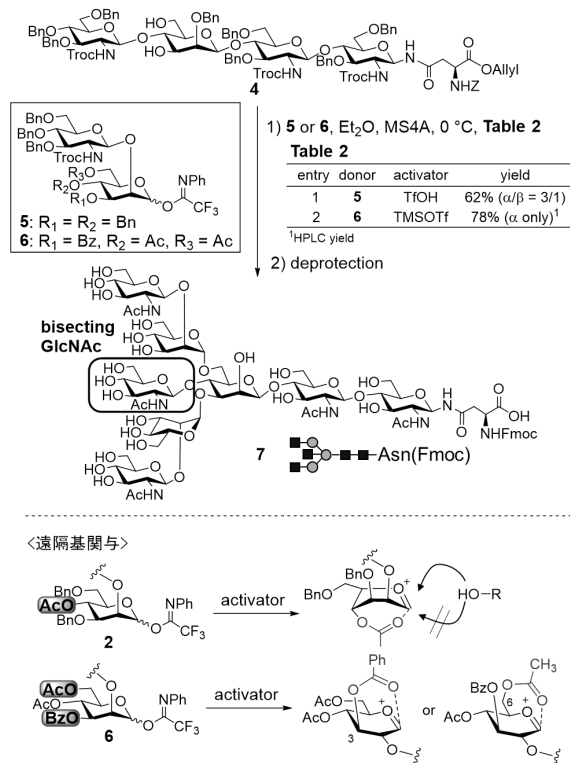


図3 バイセクティング GlcNAc 含有 N-グリカンの合成と遠隔基関与

シル化を行った (図 3, Table 2). まず, **5** を用いた場合, 活性化剤として TfOH を用いたときに反応は良好に進行し, 目的の 8 糖が 62% で得られた. なお, この際もエーテル溶媒を用いてオキソカルベニウムイオン中間体を安定化したことが高収率につながった. しかし, グリコシル化の立体選択性に関しては課題が残り, マンノース 6 位において, $\alpha/\beta=3/1$ にとどまった. 一方, **6** を用いた場合は, 目的の 8 糖が 78% で得られ, 完全な α 選択性を示した. この結果は, 今回のような大きなフラグメント同士のグリコシル化においても遠隔基関与が利用可能であることを示しており, バイセクティング GlcNAc 含有糖鎖の効率的な骨格構築が可能となった. 得られた 8 糖は脱保護を経て目的の **7** へと誘導した^[4].

続いて, ポリラクトサミン含有多分枝 *N*-グリカン **16-21** を合成した (図 4). ポリラクトサミン鎖の差長と分枝数の異なる *N*-グリカンの網羅的合成を指向して, 2 分枝糖鎖 **12**, 3 分枝糖鎖 **13** を化学合成し, これらの糖鎖を足場として酵素合成によりポリラクトサミン鎖を順次伸長した. まず, **12, 13** を化学合成した. ここでも, 収束的なルートを採用し, 還元末端の 3 糖 **8** に対し, **6** をグリコシル化することで 5 糖 **9** を得た. その後, 3 糖 **11** を

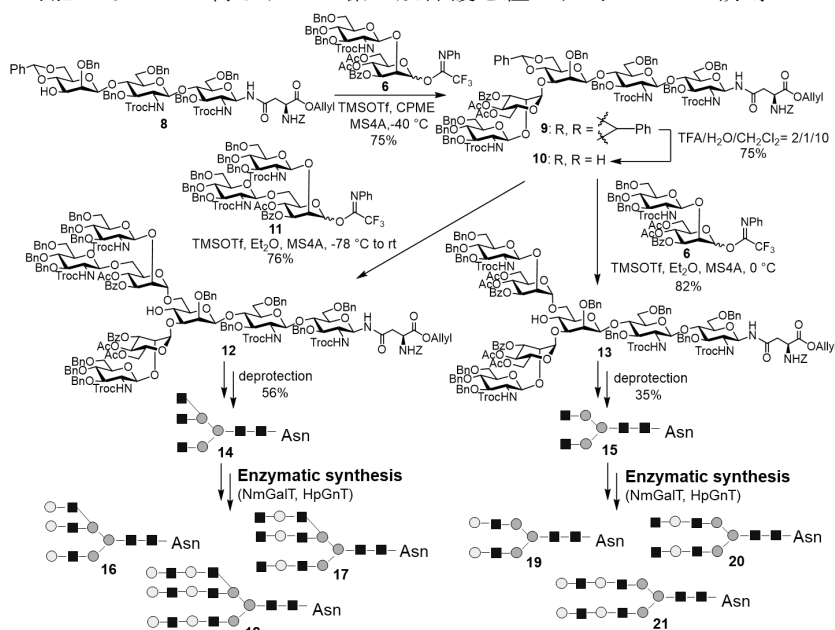


図 4 ポリラクトサミン含有多分枝 *N*-グリカン **16-21** の化学酵素合成

グリコシル化することで 3 分枝 8 糖 **12** に導いた. 同様に 2 糖 **6** をグリコシル化することで 2 分枝 7 糖 **13** を合成した. これらのグリコシル化においても, エーテル溶媒中で遠隔基関与を利用することで, 高収率かつ, 完全な α 選択性で反応は進行した. 続いて, 得られた **12, 13** に対して, 酵素を用いてポリラクトサミン鎖を伸張した. Lin らの報告に従い^[5], ガラクトース (Gal) 転移酵素 (NmGalT) と *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 転移酵素 (HpGnT) を調製し, これらの酵素を用いて, **12, 13** の非還元末端に, 順次 Gal と GlcNAc を付加した. 酵素反応はほぼ定量的に進行し, 異なる鎖長のポリラクトサミンユニットを持つ 3 分枝 *N*-グリカン **16-18**, 2 分枝 *N*-グリカン **19-21** を得た.

3. 合成 *N*-グリカンで修飾したタンパク質の調製とライブセルイメージング

糖鎖は糖タンパク質や糖脂質として細胞表面を覆っており, 糖鎖-レクチン相互作用や糖鎖-糖鎖相互作用, 糖鎖-タンパク質相互作用などを介して, 複雑な生体分子社会を形成する (図 5). 細胞外複合糖質と細胞表面分子との相互作用は *trans* 相互作用, 細胞表面複合糖質と他の細胞表面分子の相互作用は *cis*

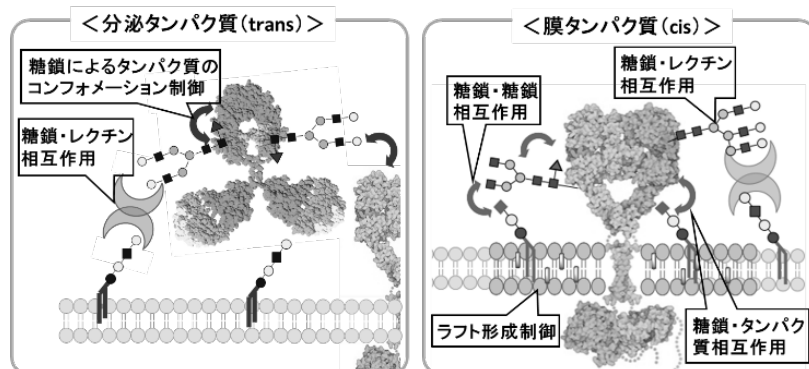


図 5 細胞表面において糖鎖が形成する生体分子社会

相互作用と呼ばれる。これらの相互作用は、糖タンパク質の動態を調節し、その機能に影響を与える。しかしながら、糖鎖の多様性、不均一性のため、生細胞上で糖鎖構造に基づいた相互作用解析は困難であった。本研究では、均一構造の *N*-グリカンでタンパク質を標識し、その動態をライブセルイメージングにより可視化することで、*N*-グリカンの機能を解析した。

まず、*N*-グリカンの *trans* の相互作用を調べるために、抗体を合成糖鎖で標識し、その動態を解析した。抗体はもともと *N*-グリカン修飾を受けており、その構造は抗体の活性に大きく影響する。ここ

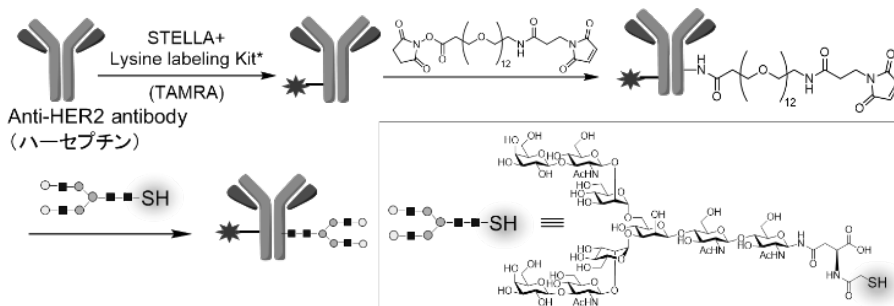


図6 抗HER2抗体への蛍光基と合成 *N*-グリカンの導入

では、抗体に新たに合成 *N*-グリカンを導入することで、抗体の動態制御を試みた。抗体として、乳がんに対する抗体医薬品である抗 HER2 抗体を用いた。まず、抗体を蛍光標識し、さらに合成 *N*-グリカンを導入した (図6)。この *N*-グリカン標識蛍光抗体

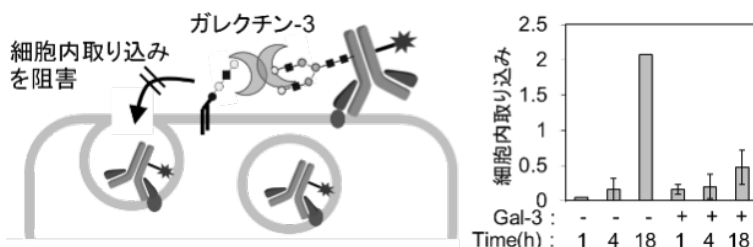


図7 *N*-グリカン標識による抗体の動態制御

を乳がん細胞に作用させ、ライブセルイメージングを行った (図7)。この際、導入した *N*-グリカンと相互作用するガレクチン-3の共存、非共存化で観察を行った。その結果、ガレクチン-3存在下で、エンドサイトーシスによる抗体の細胞内取り込みが顕著に減少した。この結果は、タンパク質の糖鎖が *trans* の相互作用を介した動態制御を受けることを明確に示すものである。

ほとんどすべての膜タンパク質は糖鎖修飾を受けているが、糖鎖修飾が膜タンパク質の活性を制御する分子基盤はほとんど解明されていない。我々は、膜タンパク質上の *N*-グリカンが形成する *cis* の相互作用ネットワークの解析を目指して、モデル膜タンパク質に合成糖鎖を導入する手法を開発した (図8)。

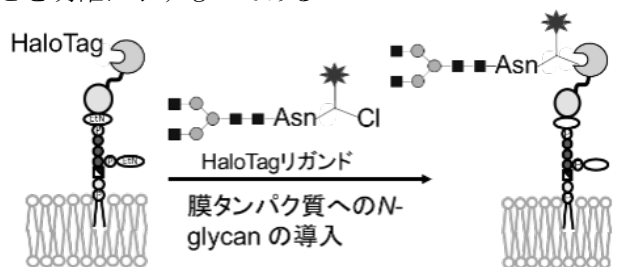


図8 *N*-グリカン修飾膜タンパク質の調製

HaloTag タンパク質は、ハロゲン化アルキル

(HaloTag リガンド) と速やかに反応し、共有結合を形成する。HaloTag 融合膜タンパク質を細胞上に発現させた後、*N*-グリカンと蛍光基を導入した HaloTag リガンドを作用させることで、均一な複合型 *N*-グリカンを導入した蛍光膜タンパク質を生細胞上に調製できる。すでに本手法を用いて、細胞表面に7種類の合成 *N*-グリカンを提示することに成功している。さらに、この方法で提示した *N*-グリカンとレクチンの相互作用を確認した (図9)。まず、バイセクティング GlcNAc 含有、非含有の *N*-グリカンを提示し、これに FITC 標識 PHA-E4 レクチン (PHA-E4 レクチン: バイセクティング GlcNAc 含有 *N*-グリカンの認識レクチン) を作用させた。その結果、FITC の蛍光はバイセクティング GlcNAc 含有 *N*-グリカンを提示した細胞でのみ観測され、提示した合成 *N*-グリカンがレクチンと相互作用することが確認できた。現在、この系を用いて種々の *N*-グリカンとそれぞれの認識レクチンとの相互作用が膜

タンパク質の動態に及ぼす影響を調べており、糖鎖-レクチン相互作用が膜タンパク質の膜上での側方拡散やエンドサイトーシスを制御することを見出している。

4. おわりに

糖鎖は、単糖、2糖といった比較的小さなフラグメントで機能を持つが、多糖構造やタンパク質や脂質との複合体（複合糖質）として存在することで、機能が高次化する。我々は、複雑な糖鎖を合成し、さらに、

それをタンパク質と複合化したり、細胞表層に再構成することで、この糖鎖の高次的な機能に迫ってきた。今後もこのような研究を通して、複雑な構造を持つ糖鎖の分子レベルでの機能解明を進める。

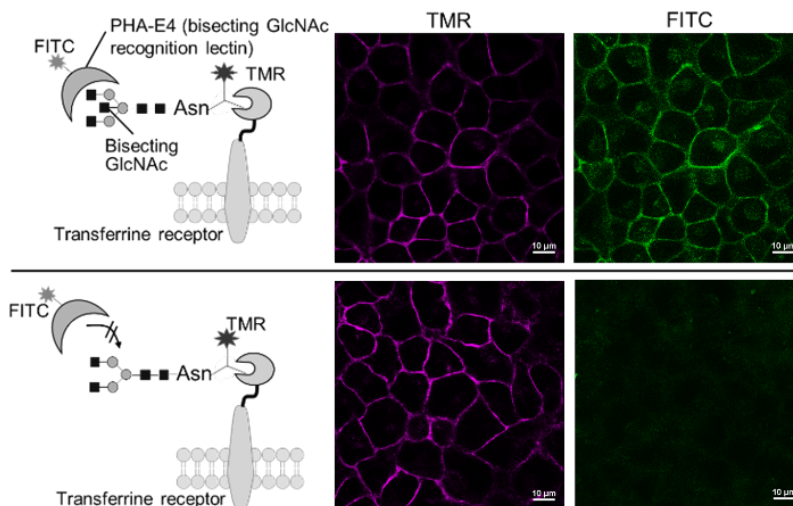


図9 N-グリカン修飾モデル膜タンパク質の調製

謝辞

この度は、栄誉あるバイオ関連化学シンポジウム講演賞を頂き、誠に光栄に存じます。受賞対象として評価いただいた研究は、大阪大学大学院理学研究科、深瀬浩一先生のご指導のもと、多くの共同研究者、スタッフ・学生の方々と共に達成した成果です。深瀬先生をはじめ、関係する全ての皆様にこの場を借りて心より感謝申し上げます。また、第16回バイオ関連化学シンポジウムを運営いただいた先生方および審査員の先生方にも深謝いたします。今後もサイエンスの発展に貢献できるよう、より一層の精進を重ねていく所存ですので、今後ともご指導ご鞭撻のほど、何卒よろしくお願い申し上げます。

参考文献

- [1] Zhou, J.; Manabe, Y.; Tanaka, K.; Fukase, K. *Chem. Asian. J.* **2016**, *11*, 1436.
- [2] Nagasaki, M.; Manabe, Y.; Minamoto, N.; Tanaka, K.; Silipo, A.; Molinaro, A.; Fukase, K. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 10600.
- [3] Baek, J. Y.; Lee, B-Y.; Jo, M. G.; Kim, K. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17705.
- [4] Manabe, Y.; Shomura, H.; Minamoto, N.; Nagasaki, M.; Takakura, Y.; Tanaka, K.; Silipo, A.; Molinaro, A.; Fukase K. *Chem. Asian. J.* **2018**, *13*, 1554.
- [5] Chien, W. T.; Liang, C. F.; Yu, C. C.; Lin, C. H.; Li, S. P.; Primadona, I.; Chen, Y. J.; Mong, K. K. T.; Lin, C. *C. Chem. Commun.* **2014**, *50*, 5786.

YK ペプチドタグによる細胞内での人工相分離液滴モデルの形成

東京工業大学生命理工学院
三木 卓幸



著者紹介：コロナ禍の閉鎖的な雰囲気から、徐々に in person での学会など交流の機会が増えて大変嬉しく思います。本バイオ関連学会では、on line では感じられなかった緊張感と、聴衆のウケを確認できる安心感の中で発表できました。やはり直接話をしないと熱量は伝わらないと感じました。本会を開催いただいた先生方、また若手フォーラムの幹事の先生方には深く御礼申し上げます。また、個人的にも、ようやく10月末に結婚式を挙げることができました（結婚してから2年半経ってしまいました）。ご来席下さいました先生方、有難うございました。渡航の制限も解除されつつあり、あまりの嬉しさで結婚式の翌日から渡米して Gordon Research Conference (Chemistry and Biology of peptide @Oxnard) に参加し、ついでに大学に訪問してセミナー&ラボツアーをしてきました。GRC ではペプチドのトップレベルの研究者が集い、また学生時代の友人にも8年ぶりに再開でき、刺激的な日々でした。また大学訪問では、暖かく受け入れて下さったホストの先生や同世代の先生に感謝です。筆者の研究をフォローしてくれている同世代の先生にも出会い、大変嬉しく思いました。「浜地研時代の研究から、全く違う内容でちゃんと論文出していて凄い。俺なんてポストクの研究を引きずっている。」と言われて照れてしまいました。初めてのGRCと、初めての海外の大学でのセミナー&ラボツアーでしたので、興奮が冷めません。

この貴重な滞在では多くの方に迷惑をおかけしました。「学生実験はやっておくから、アメリカ行っておいで」と言って送り出して下さった三原教授には大変感謝しております。また、結婚式前日まで開催されたペプチド討論会の参加と結婚式翌日からの渡米を許してくれた妻にも感謝しております。非常にワガママな行動ですが、同時に、ラボ全体の活性化に繋がると思ったのも事実です。最近のバイテクニューズレターの「若手研究者からのメッセージ」のコラムで、筆者は学生に対して「今をしっかり生きること」の重要性を説きました。しかし、説くだけでは説得力がありません。三木自身が行動に移す必要があり、助教のアクティブな姿勢が学生にも届くと信じたからです。今を一生懸命生きる姿勢を見て、アクティブで自発的な学生が一人でも増えたら、と思っています。

本学会賞の受賞を含め、楽しくアクティブに研究を邁進し、新しい science を行うことを、より一層固く決意する契機となりました。モノマネ研究ではない斬新な研究、みんなが真似したくなるワクワクする研究を頑張ります。

1. はじめに

細胞内では、蛋白質などの生体分子が相互作用して多様な集合体を形成します。相分離液滴もその一つです。多くの場合、天然変性領域をもつ蛋白質が弱い結合で多価に相互作用して液滴を形成します^[1]。既にヒト由来の100種類以上の蛋白質が相分離液滴を形成することが知られており^[2]、液-液相分離は細胞での様々な分子メカニズムを説明する上で重要な現象です。例えば、G-body^[3]やプリノソー

ム^[4]などの相分離液滴は、酵素群を集積化してカスケード反応（代謝反応）を加速します。また、抗ガン剤の薬効を説明するにも、液滴への薬剤の濃縮が重要です^[5]。

筆者は合成生物学的観点から相分離現象に迫る研究を考えました。細胞内でデザイン通りの液滴を人工的に作り上げる技術を確認すれば、細胞に摂動を与えて解析する分子ツールや細胞工学・代謝工学の強力なツールにもなり得ると考えました。既に蛋白質工学によって細胞内で人工液滴を作る研究は報告例があります。例えば、Johns Hopkins 大学の井上先生・中村先生らのグループは iPOLYMER という技術を開発しました^[6]。これは、多価に FKBP・FRB を連結した2つの蛋白質を共発現し rapamycin を添加することで、ヒドロゲルを細胞内で作成します。また、Princeton 大学の Brangwynne 先生らのグループは optoDroplet を開発し、光に応じた液滴形成を実証しました^[7]。これらのシステムは、代謝工学にも用いられ始めています。

これらの優れたシステムに対して、筆者はより集積化モチーフをペプチドレベルまでサイズダウンし、より簡便に遺伝子導入できるシステムを開発することが重要と考えました。これにより、プロテオームワイドな多成分からなる人工液滴を合理的に構築できると考えたからです。

2. 自己集合性ペプチドを用いた細胞内蛋白質集積化

人工液滴を細胞内で構築するミニマムタグを開発するため、筆者らは自己集合性の de novo ペプチドに着目しました。これは、分子間の相互作用を考慮して設計された人工ペプチドであり、これまでバイオマテリアルを目的に開発されてきました。基本的に、疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸を交互に繰り返した配列によって β -sheet で集積するペプチドを設計できます。MAX1 ペプチド^[8]や RADA16 ペプチド^[9]がその代表例です。筆者の所属する三原研では、疎水性アミノ酸として Tyr を、親水性アミノ酸として Glu と Lys を用いた Y9 ペプチド(YEYKYEYKY)を、10年ほど前に報告しています^[10]。

筆者らは、自己集合性ペプチドを集積化タグとして用いることを考えました（図 1a）。すなわち、集積したい蛋白質にペプチドを遺伝子工学的に融合することで、自在に蛋白質集合体を設計して細胞内で構築できると考えました。近年、筆者らは Y9 ペプチドの YEYK の繰り返し単位を基本配列としてペプチド鎖長の検討を行い、15 残基からなる Y15 ペプチドタグ^[11]を開発しました（図 1b）。Y15 ペプチド融合蛋白質は細胞内で集合化し顆粒状の構造を形成することを見出しました（図 1c）。また、ペプチド鎖長をコントロールすることで、分散と集合状態の比率を制御できることを報告しました^[12]。さらに、疎水性残基を変えたペプチドを併用することで、二種の蛋白質集合体を同一細胞内で構築できることを示しました^[13]。

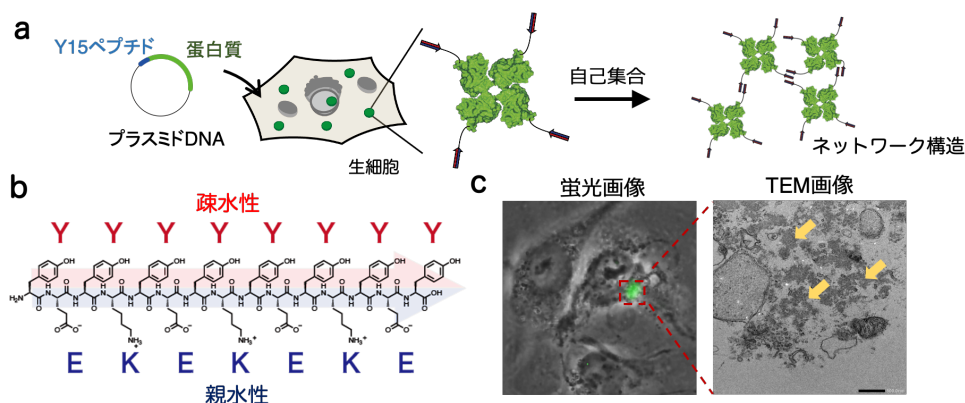


図 1. 自己集合性ペプチドタグによる細胞内での蛋白質集積化. (a) ペプチドタグによる蛋白質顆粒の形成スキーム. (b) Y15 ペプチドの化学構造. (c) 細胞内で形成した Y15-AG (AzamiGreen) 蛍光蛋白質の集合体. 透過型電子顕微鏡で観察すると、顆粒状の集合体が観察できる (矢印).

3. 相分離液滴を作る YK ペプチドタグの開発

これらのペプチドタグは、蛋白質集合体の人工構築に有効的ですが、流動性のある液滴を構築できる技術ではありませんでした。細胞内の相分離液滴を模倣し、工学的に応用するには、ゲルではなく液滴を作り上げる技術が必須です。そこで、筆者らは、ペプチド配列の検討を行いました。YEYK 配列のペプチドは、ペプチド間に(1)主鎖間の水素結合、(2)Tyr 側鎖の疎水性相互作用、(3)Glu と Lys 側鎖の静電相互作用の3つの相互作用が働きます。そのため、Y15 ペプチドは不可逆的で安定なアミロイド様の集合体を形成し、その結果、ゲル状の剛直な集合体が形成されたと推測しました。

そこで、YEYK 配列の親水性残基を全て Lys にして、静電反発を導入したカチオン性の YKYK 配列を設計しました (図 2 a)。YK ペプチドは自己集合し難いが、ポリアニオン種とコンプレックスを形成した場合には電荷が相殺されペプチドが集合すると想定しました。さらに、アニオン種が解離した場合、YK ペプチド間も解離すると考えました。この可逆性によって柔軟で流動性のある液滴が構築できると仮説を立てました。

種々検討した結果、13 残基からなる YK13 ペプチドは、ATP 等のポリアニオン種に応じた可逆的な自己集合性を示しました (図 2 b)。YK13 を緩衝液に溶かすと濁度は低く、また Thioflavin-T (アミロイド様構造体に結合する発蛍光性分子) を添加しても蛍光はほとんど見られませんでした。一方で、1 mM の ATP を添加した場合は濁度が急激に増加し、また Thioflavin-T 蛍光が著しく上昇しました。そこに ATPase を添加して ATP を加水分解したところ、濁度が低下して Thioflavin-T の蛍光がバックグラウンドレベルまで低下しました。

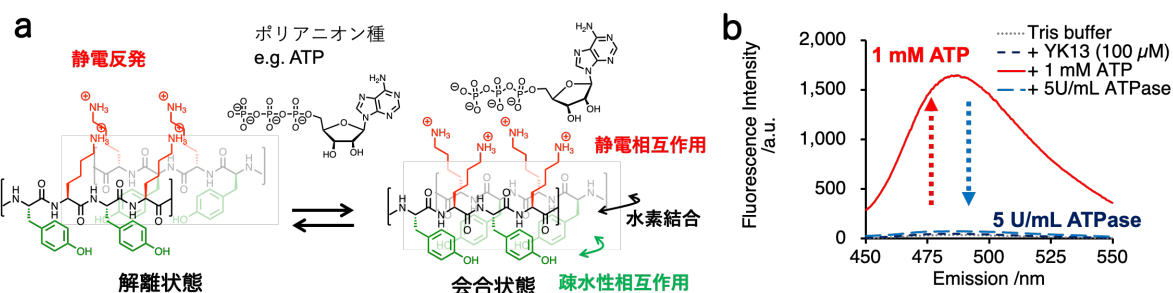


図 2. ATP に応じて自己集合する YK ペプチド. (a) YK ペプチドの会合・解離反応. (b) YK13 ペプチド溶液の Thioflavin-T 蛍光評価.

次に、細胞内で YK ペプチドによって液滴が形成されるかを検討しました。YK ペプチド融合蛍光蛋白質(sfGFP)を COS-7 細胞に発現しました (図 3 a)。その結果、細胞核内で真球度 (ラウンドネス) の高い構造体が形成されました。FRAP 実験を行うと、褪色した領域で蛍光回復が見られたため、流動性のある液滴であることが判明しました。また、核排出シグナルペプチド(NES, nuclear export signal)を融合すると、細胞質で同様な液滴が形成されることも明らかとなりました (図 3 b)。この液滴は、天然の相分離液滴であるストレス顆粒とは独立して存在することも判っています。さらに、興味深いことに、YK ペプチドの鎖長依存的に液滴の流動性が低下しました (図 3 c, d)。ペプチド間の相互作用の強さが構造体の柔軟性・流動性に直接的に影響していることが分かります。

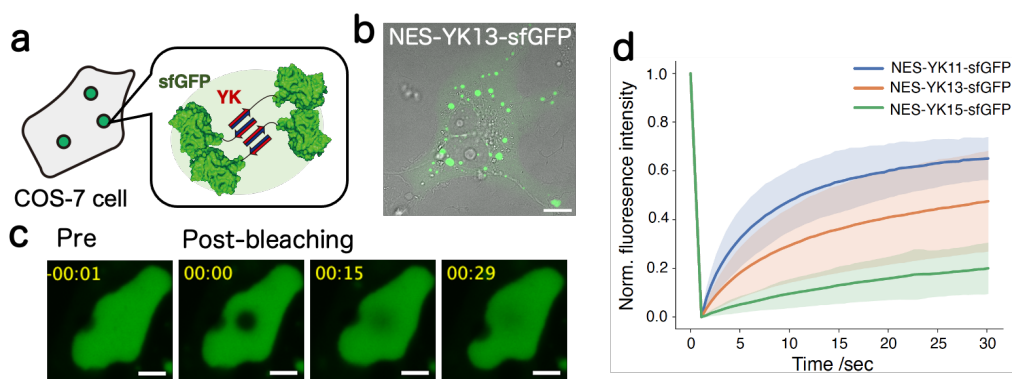


図 3. YK ペプチド融合蛋白質による細胞内での液滴形成. (a) YK ペプチド融合 sfGFP の自己集合のイメージ図. (b) COS-7 細胞に発現した NES-YK13-sfGFP の蛍光画像. (c) NES-YK13-sfGFP 顆粒の FRAP 実験結果. (d) YK ペプチド鎖長依存的な顆粒の流動性低下

しかし、YK タグを融合すればどのような蛋白質でも液滴を形成するわけではありません。sfGFP は高濃度になると二量化することが知られる蛋白質です。そこで、単量体として安定な mCherry や mAG 蛋白質を用いたところ、YK タグを融合しても oligomer 程度にしか集積しませんでした。一方で、四量体を形成する AG 蛋白質に融合した場合は、不定形な凝集体となりました。このように、YK ペプチド間の可逆的な相互作用と蛋白質間の弱い相互作用が協奏することで液滴が形成されることが示唆されました。しかし、NES-YK13-sfGFP をスキャホールド蛋白質とみなすことで、マルチコンポーネントの液滴を作成できます (図 4)。NES-YK13-sfGFP と NES-YK13-mCherry、NES-YK13-moxBFP2 を共発現したところ、それぞれが共集合して 3 成分からなる液滴が構築できました。

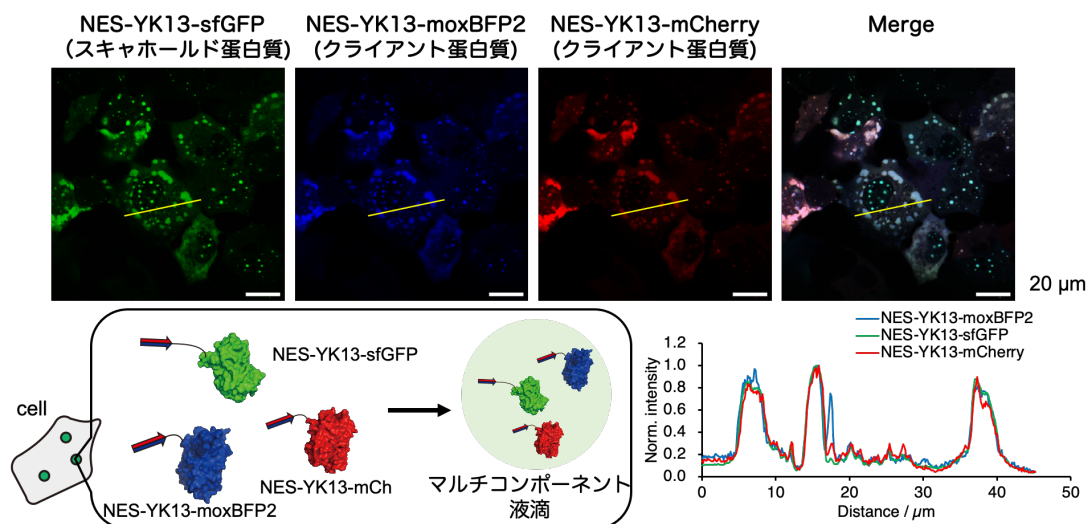


図 4. YK13 タグによるマルチコンポーネントの人工液滴の細胞内構築

4. おわりに

本稿では、近年開発した細胞内で人工相分離液滴を構築するペプチドタグ技術を紹介しました。具体的には、ポリアニオンに依存して可逆的に自己集合する YK タグを開発しました。更に、YK タグを sfGFP に融合することで人工液滴を細胞内で構築でき、同じタグを融合した蛋白質を共発現することでマルチコンポーネントの液滴を作り上げることができました。今後、本手法の実用性をデモンストレーションしていきます。

謝辞

本研究は、筆者が所属する東京工業大学 生命理工学院 三原久和教授の研究室で行われました。また、本研究に対してアイデアを出して自発的に実験を行う同研究室の D2 橋本匡浩氏、M2 高橋広樹氏、M2 中山彩恵氏に感謝申し上げます。また本研究は、JSPS 科研費(21K14739)の助成を受けて実施されたものです。

参考文献

- [1] Alberti, S.; Gladfelter, A.; Mittag, T. Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell* **2019**, *176* (3), 419–434.
- [2] You, K.; Huang, Q.; Yu, C.; Shen, B.; Sevilla, C.; Shi, M.; Hermjakob, H.; Chen, Y.; Li, T. PhaSepDB: A Database of Liquid-Liquid Phase Separation Related Proteins. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D354–D359.
- [3] Jin, M.; Han, T.; Yao, Y.; Alessi, A. F.; Freeberg, M. A.; Inoki, K.; Klionsky, D. J.; Kim, J. K.; Karnovsky, A.; Moresco, J. J.; Yates, J. R.; Baba, M.; Gitler, A. D.; Fuller, G. G.; Alessi, A. F.; Roach, N. P. Glycolytic Enzymes Coalesce in G Bodies under Hypoxic Stress. *Cell Rep.* **2017**, *20* (4), 895–908.
- [4] An, S.; Kumar, R.; Sheets, E. D.; Benkovic, S. J. Reversible Compartmentalization of de Novo Purine Biosynthetic Complexes in Living Cells. *Chemtracts* **2008**, *20* (12), 501–502.
- [5] Klein, I. A.; Boija, A.; Afeyan, L. K.; Hawken, S. W.; Fan, M.; Dall’Agnese, A.; Oksuz, O.; Henninger, J. E.; Shrinivas, K.; Sabari, B. R.; Sagi, I.; Clark, V. E.; Platt, J. M.; Kar, M.; McCall, P. M.; Zamudio, A. V.; Manteiga, J. C.; Coffey, E. L.; Li, C. H.; Hannett, N. M.; Guo, Y. E.; Decker, T. M.; Lee, T. I.; Zhang, T.; Weng, J. K.; Taatjes, D. J.; Chakraborty, A.; Sharp, P. A.; Chang, Y. T.; Hyman, A. A.; Gray, N. S.; Young, R. A. Partitioning of Cancer Therapeutics in Nuclear Condensates. *Science* **2020**, *368* (6497), 1386–1392.
- [6] Nakamura, H.; Lee, A. A.; Afshar, A. S.; Watanabe, S.; Rho, E.; Razavi, S.; Suarez, A.; Lin, Y. C.; Tanigawa, M.; Huang, B.; DeRose, R.; Bobb, D.; Hong, W.; Gabelli, S. B.; Goutsias, J.; Inoue, T. Intracellular Production of Hydrogels and Synthetic RNA Granules by Multivalent Molecular Interactions. *Nat. Mater.* **2018**, *17*, 79–88.
- [7] Shin, Y.; Berry, J.; Pannucci, N.; Haataja, M. P.; Toettcher, J. E.; Brangwynne, C. P. Spatiotemporal Control of Intracellular Phase Transitions Using Light-Activated OptoDroplets. *Cell* **2017**, *168*, 159–171.
- [8] Salick, D. A.; Kretsinger, J. K.; Pochan, D. J.; Schneider, J. P. Inherent Antibacterial Activity of a Peptide-Based β -Hairpin Hydrogel. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (47), 14793–14799.
- [9] Yokoi, H.; Kinoshita, T.; Zhang, S. Dynamic Reassembly of Peptide RADA16 Nanofiber Scaffold. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102* (24), 8414–8419.
- [10] Sawada, T.; Tsuchiya, M.; Takahashi, T.; Tsutsumi, H.; Mihara, H. Cell-Adhesive Hydrogels Composed of Peptide Nanofibers Responsive to Biological Ions. *Polym. J.* **2012**, *44* (6), 651–657.
- [11] Miki, T.; Nakai, T.; Hashimoto, M.; Kajiwara, K.; Tsutsumi, H.; Mihara, H. Intracellular Artificial Supramolecules Based on de Novo Designed Y15 Peptides. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3412.
- [12] Miki, T.; Hashimoto, M.; Nakai, T.; Mihara, H. A Guide-Tag System Controlling Client Enrichment into Y15 Peptide-Based Granules for an in-Cell Protein Recruitment Assay. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 11338–11341.
- [13] Miki, T.; Kajiwara, K.; Nakayama, S.; Hashimoto, M.; Mihara, H. Effects of Hydrophobic Residues on the Intracellular Self-Assembly of De Novo Designed Peptide Tags and Their Orthogonality. *ACS Synth. Biol.* **2022**, *11*, 2144–2153.

腫瘍溶解性ヘアピン DNA ペア：マイクロ RNA 駆動型 DNA 自己組織化を介した選択的細胞毒性誘導剤

東京大学大学院工学系研究科
森廣 邦彦



著者紹介：1984年島根県出雲市生まれ。2003年島根県立出雲高等学校理数科を卒業し、1年の浪人生活を経て大阪大学へ入学。当初は電車の自動改札の通り方が分からず困りました。大学4年次の研究室配属で核酸化学/医薬の研究を推進されていた今西武先生主宰の生物有機化学分野（通称薬化）に所属。今西先生退官後は研究室を引き継がれた小比賀聡先生に博士号取得までお世話になりました。研究面では一貫して化学修飾を施した人工核酸の開発に取り組み、現名古屋大学大学院創薬科学研究科准教授の兒玉哲也先生にいろいろと面倒を見てもらいました。博士号取得後は大阪の彩都にある医薬基盤研究所（当時）で、小比賀先生がリーダーを兼任されていたプロジェクトの研究者として勤務しました。その後は学振の海外特別研究員に採用されたため、米国ピッツバーグ大学の Alexander Deiters 教授の研究室で DNA コンピュータ関連の研究に従事。2年間の滞在中には長男が誕生しました（アメリカの医療を体験できてとても勉強になりました）。2017年2月に帰国し、翌月から現在の所属である東京大学大学院工学系研究科の岡本研究室で助教として勤務しています。これからも一見して「これは森廣の研究だ」と認識されるようなユニークな研究を展開していきたいです。

1. はじめに

がんは長年日本人の死因の第一位であり、その有効な治療法の開発は喫緊の課題である。免疫チェックポイント阻害剤の発見以来、がんに対する免疫療法は外科手術、放射線治療、そして化学療法に次ぐ第四の治療法としての地位を確立しつつあるが、その奏効率は30-50%程度にとどまっており、新たな切り口による方法論の確立が望まれている。外来のDNAやRNAなどの核酸分子は体内のさまざまなセンサータンパク質によって認識され自然免疫を活性化することから、昔から免疫療法の優れた素材であると考えられてきた。例えば、2017年に米国で承認されたB型肝炎予防薬HEPLISAV-Bには免疫補助剤（アジュバント）としてCpG配列をもつDNA（CpGオリゴ）が含まれている。しかし、CpGオリゴはあくまで補助的な役割に甘んじており免疫医薬の薬効本体として核酸を利用した実用化例はない。また、長いRNA二重鎖であるpoly(I:C)は非常に強力な抗腫瘍作用を示すことから抗がん剤への応用が期待されたが、がん選択性に乏しいため全身免疫毒性が問題となり単剤での臨床応用は断念されている^[1]。これらの状況を鑑みると、長い核酸二重鎖をがん細胞内だけでつくることができれば、選択的に自然免疫を惹起してがん細胞だけを殺すことができると着想される。このように特定の組織や細胞でのみ医薬品を構築する戦略は「生体内化学合成治療」と呼ばれ、東工大/理研の田中克典先生らのグループを中心に進められているが^[2]、言わば我々の研究はそれを核酸分子のみで達成しようとするものである。

2. Hybridization Chain Reaction (HCR)

では、特定の細胞内だけで長い核酸二重鎖を構築するためにはどうすればいいだろうか？DNA ナノテクノロジーは DNA の配列特異的な自己集合性を利用してさまざまな核酸構造体を創る技術の総称であるが、我々はその 1 種である Hybridization Chain Reaction (HCR) に着目した。

HCR は 2004 年にカリフォルニア工科大学の Pierce らの研究グループが開発した技術であり、短い 1 本鎖核酸と 2 種のヘアピン型核酸からニックの入った長鎖核酸二重鎖を構築することができる^[3]。図 1 に示したように、HCR はまず短鎖一本鎖核酸 (トリガー核酸) が片方のヘアピン型核酸の末端

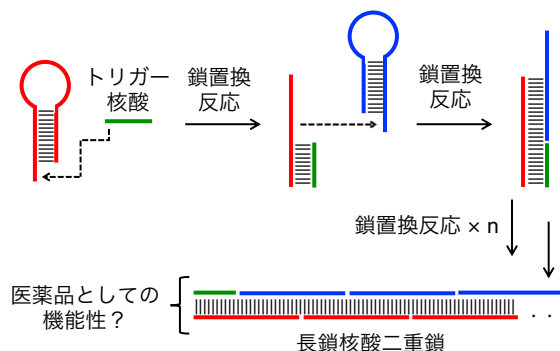


図 1. HCR による長鎖核酸二重鎖の非酵素的な構築。短鎖一本鎖核酸を反応のトリガーとして、2 種類のヘアピン型核酸の鎖置換反応がカスケード的に進行する。

一本鎖部分 (toehold 領域) を配列選択的に認識して鎖置換反応を起こすことから始まる。これによりもう一方のヘアピン型核酸との鎖置換反応が可能となり、その後は自発的に同様の反応が連続して進行することで長鎖核酸二重鎖が生成する。すなわち、特定の細胞で特徴的に発現している核酸分子を HCR のトリガーとして利用することができれば、標的細胞内でのみ自然免疫応答を活性化することができるかもしれない。HCR は代表的な核酸シグナル増幅方である PCR と異なり、特殊酵素や反応温度変化を必要としないため、生体内での利用に適している。また、非常に好感度にトリガー核酸を認識して反応が開始するため、生きた細胞内^[4]やゼブラフィッシュ^[5]、マウス個体内^[6]の核酸イメージングに用いられてきた。しかしながら、これまでに HCR をイメージング以外に応用した例はほとんど報告されておらず、特に HCR の産物である長鎖核酸二重鎖に医薬機能をもたせた研究は皆無であった。そこで著者らは、HCR 産物が細胞選択的に自然免疫応答を惹起することができるかどうか検討を始めることにした。

3. 細胞内マイクロ RNA (miRNA) によって駆動する HCR の開発

マイクロ RNA (miRNA) は 20 塩基長ほどの短い 1 本鎖 RNA であり、翻訳制御など様々な生命機能を担っていることが明らかにされている^[7]。現在ヒトでは数千種類の miRNA が同定されているが、種々のがん細胞内で特定の miRNA が過剰発現していることが明らかにされつつある^[8]。また、がん患者の体液中にも特徴的な miRNA が多く含まれていることが分かっており、miRNA はがんのマーカー分子としても大いに注目を集めている。我々はまず、代表的ながん関連 miRNA である miR-21 によって駆動する HCR プロブの設計と合成を行った。設計は核酸高次構造の安定性予測に広く用いられているオンラインソフトウェア NUPACK (<http://www.nupack.org/>) を利用し、HCR を速度論的に支配している toehold 領域の長さを変えたいくつかのヘアピン型 DNA セットを準備した。それぞれの miR-21 応答性をゲル電気泳動によって評価した結果、toehold 領域が 8ヌクレオチド長のセットが最も効率的かつ選択的に HCR を進行させることが分かった (図 2A)。続いて、最適な反応性を示したヘアピン型 DNA セットを種々のヒト細胞にトランスフェクションし、フローサイトメトリーによって細胞内 HCR の進行効率を評価した。その際、各ヘアピン型 DNA を異なる蛍光色素で標識し、HCR の進行に伴って FRET が起きるシステムを設計した。解析の結果、miR-21 をほとんど発現していないとされるヒト胎児腎 HEK-293T 細胞ではほとんど変化が見られなかったのに対し、miR-21 を過剰発現している乳がん MDA-MB-231 細胞と子宮頸がん HeLa 細胞、肺がん A549 細胞では有意に FRET が上昇した (図 2B)。すなわち、我々が設計したヘアピン型核酸セットは細胞内の miR-21 環境を認識して HCR を進行させ

ることが明らかとなった。なお、各ヘアピン型 DNA の toehold 領域は細胞内でヌクレアーゼ分解を受けやすいため、安定性を高める目的で phosphorothioate 修飾を導入している。

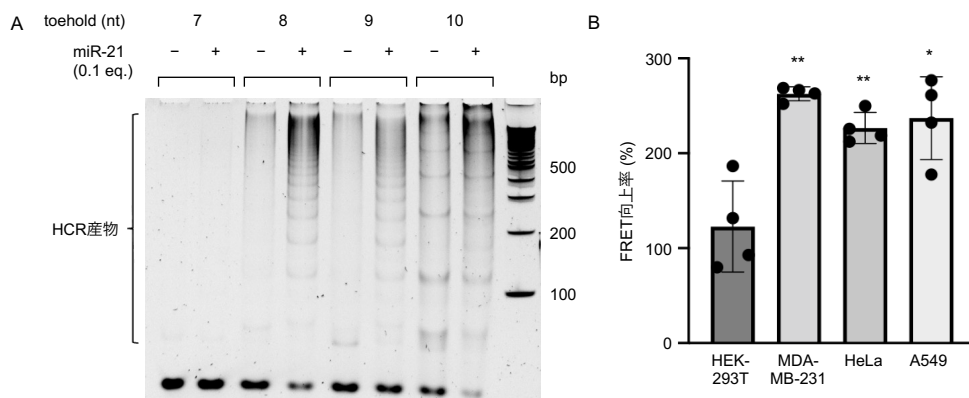


図 2. (A) PAGE による toehold 領域長の最適化. toehold が 8 ヌクレオチド長の場合に最も選択的に HCR が進行した. (B) FRET を利用した細胞内 HCR 効率の評価. miR-21 をほとんど発現していない通常細胞 (HEK-293T) 細胞と比較して, miR-21 を過剰発現している 3 種のがん細胞では高い FRET 効率が観測された. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ by unpaired Student's *t*-test.

4. 細胞選択的な毒性誘導

見出したヘアピン型 DNA セットを miR-21 を過剰発現している HeLa 細胞に導入し、細胞生存率を測定した結果、非常に強い毒性を示すことが分かった (図 3A)。これは従来強力な細胞毒性を示すことが分かっている長い DNA 二重鎖 poly(dA:dT)と同程度、もしくはそれを上回る抗がん活性であった。ヘアピン型 DNA を片方のみ導入した場合には生存率に変化が見られなかったことから、HCR の進行によって細胞内で生じた長鎖 DNA 二重鎖が強力な細胞毒性の原因であると考えられた。一方で、miR-21 をほとんど発現していない HEK-293T 細胞ではほとんど毒性を示さなかったため、ヘアピン型 DNA セットは細胞内 miR-21 環境を認識して細胞選択的な細胞死を誘導できることが明らかになった (図 3B)。この細胞毒性が自然免疫惹起によるものか調べるため、代表的な I 型インターフェロンであるインターフェロン β (INF- β) の mRNA 発現量を定量した。ヘアピン型 DNA を導入した HeLa 細胞では INF- β mRNA の発現量が大きく上昇したのに対して、STING を siRNA でノックダウンした場合にはそれが一部キャンセルされたことから、当初の設計通り cGAS-STING 経路を介して自然免疫が活性化されていることが分かった (図 3C)。なお、細胞内には cGAS-STING 経路以外にも DAI などいくつかの外來 DNA センサーが存在するため^[9]、実際のヘアピン型 DNA セットの毒性発現メカニズムはより複雑であると考えられる。

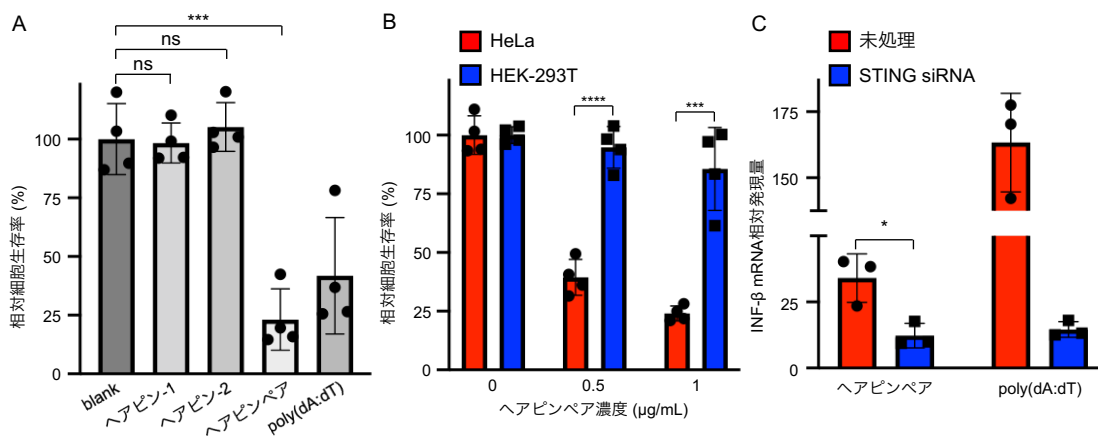


図 3. (A) HeLa 細胞に対するヘアピン型 DNA ペアの毒性 (B) 細胞内 miR-21 量に依存した選択的な細胞毒性 (C) STING ノックダウンによる INF- β 発現量の現象. ns, not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and **** $P < 0.0001$ by unpaired Student's *t*-test.

5. 抗がん核酸医薬としての可能性

これまでの検討結果から、我々のヘアピン型 DNA セットは新しい抗がん免疫医薬の素材として有望であることが示唆された。そこで最後に医薬としてより実践的な評価を実施するため、担がんマウスモデルを用いて動物個体に対する抗腫瘍活性を調べた。マウスメラノーマ B16 細胞を移植したマウスに対してヘアピン型 DNA セットを DDS 試薬 (AteloGene Local Use; 高研社) とともに局所注射し、腫瘍のサイズを経時的に測定することで抗腫瘍効果を評価した (図 4A)。その結果、実際の写真からも分かるように PBS 投与群では腫瘍が急激に増大したのに対し、ヘアピン型 DNA セット投与群ではその増大を顕著に抑制することができた (図 4B)。これはポジティブコントロールとして投与した poly(dA:dT) と比較しても優れた抗腫瘍効果であり、開発したヘアピン型 DNA セットの抗がん剤としての有用性を示すことができた。なお、体重減少などの顕著な副作用は観察されなかったことから、本医薬候補核酸は高い薬効と安全性を併せもつと期待される。

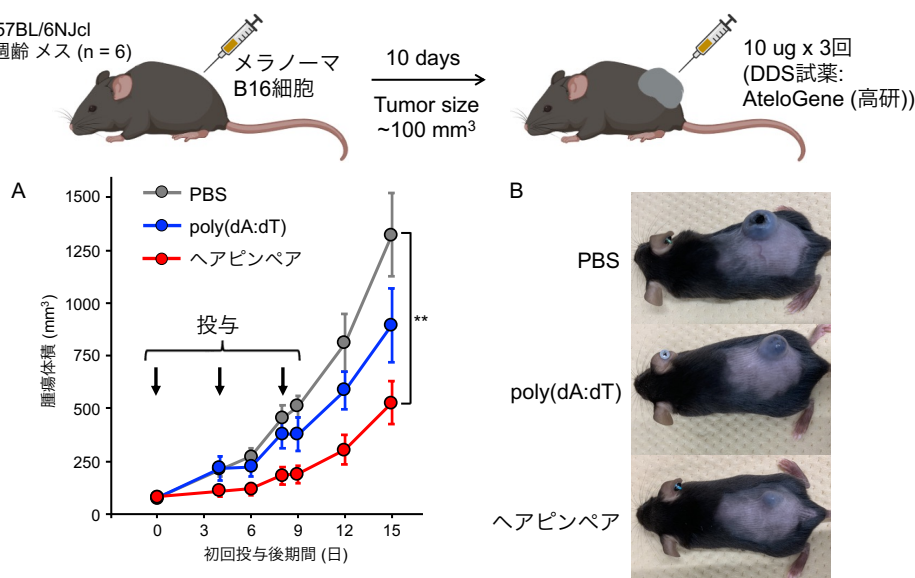


図 4. メラノーマ担がんマウスモデルを用いたヘアピン型 DNA セットの抗腫瘍活性評価. (A) 腫瘍サイズの経時的な変化 (B) 初回投与 15 日後の代表的なマウスの写真. ** $P < 0.01$ by unpaired Student's *t*-test.

4. おわりに

本項では新しいタイプの抗がん核酸医薬候補として、細胞内で自己集合することで自然免疫を活性化するヘアピン型 DNA セットの開発について述べた。得られた成果は近日中に論文発表できる予定なので詳細はそちらをご覧ください。設計した 2 種のヘアピン型 DNA はそれ自体は全く機能性を有していないが、miR-21 という目印のもとに集合した場合にのみ強い細胞毒性を示す。小さな魚が集まって巨大な魚に対抗できるようになる「スイミー」という絵本をご存知の方も多くいらっしゃると思うが、まさに同じ戦略を核酸分子で実現したと言える。本技術は、異なる miRNA の配列情報からヘアピン型 DNA セットの配列を設計することで様々ながんに対応できるテーラーメイド医薬としての可能性も有しており、より多くの患者さんに有効な治療を届けることができると期待している。また、現在がん免疫療法に用いられている免疫チェックポイント阻害剤などとの併用療法も興味深い。さらに、ヘアピン型 DNA は化学合成可能なため種々の化学修飾を容易に導入することができ、それを利用して

がん以外の疾病への拡大も現在検討中である。今後も核酸がもつ多彩な機能性をうまく引き出した研究を展開していきたい。

謝辞

本研究は、私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一緒に研究を進めてくれた学生諸氏に深く感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Levine, A. S.; Sivulich, M.; Wiernik, P. H.; Levy, H. B. *Cancer Res.*, **1979**, *39*, 1645.
- [2] Nasibullin, I.; Smirnov, I.; Ahmadi, P.; Vong, K.; Kurbangalieva, A.; Tanaka, K. *Nat. Commun.*, **2022**, *13*, 39.
- [3] Dirks, R.; Pierce, N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, 15275.
- [4] Chen, Y.; Gong, X.; Gao, Y.; Shang, Y.; Shang, J.; Yu, S.; Li, R.; He, S.; Liu, X.; Wang, F. *Chem. Sci.*, **2021**, *12*, 15710.
- [5] Choi, H. M. T.; Beck, V. A.; Pierce, N. A. *ACS Nano*, **2014**, *5*, 4284.
- [6] Wu, H.; Chen, T.-T.; Wang, X.-N.; Ke, Y.; Joang, J.-H. *Chem. Sci.*, **2020**, *11*, 62.
- [7] Meister, G.; Landthaler, M.; Patkaniowska, A.; Dorsett, Y.; Teng, G.; Tuschl, T. *Mol. Cell*, **2004**, *15*, 185.
- [8] Goodall, G. J.; Wickramasinghe, V. O. *Nat. Rev., Cancer*, **2021**, *21*, 22.
- [9] Takaoka, A.; Wang, Z.; Choi, M. K.; Yanai, H.; Negishi, H.; Ban, T.; Lu, Y.; Miyagishi, M.; Kodama, T.; Honda, K.; Ohba, Y.; Taniguchi, T. *Nature*, **2007**, *448*, 501.

細胞内 GSH 濃度変化のリアルタイム追跡を可能にするオルガネラ選択的近赤外蛍光プローブの創製

¹名古屋大学大学院理学系研究科

²名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所

師 悠季¹, Wu Qian², 多喜 正泰², 山口 茂弘^{1,2}



著者紹介: 信州大学理学部理学科を卒業後、名古屋大学大学院理学研究科に進学しました。現在、同校物質理学専攻博士前期課程2年です。大学院進学後は、機能有機化学研究室に所属し、山口先生、多喜先生のもとで構造有機化学やケミカルバイオロジーを学んでいます。学部生の時と研究テーマも研究環境も大きく変化し、まずはどんなことでも吸収していこう、という心持ちで研究に取り組んでいた中で、今回のようなポスター賞を受賞できたことは大変嬉しく、大きな励みになりました。コロナウイルスによる制限も緩和され始め、少しずつ戻ってきた研究室のイベントを楽しみに、研究にも日々邁進します。

1. はじめに

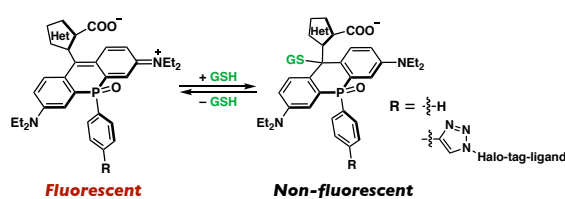
グルタチオン (GSH) は細胞内に 0.5–10 mM の濃度で存在するシステイン含有トリペプチドであり、抗酸化物質として重要な役割を果たす。生体内 GSH レベルの変化は、多様な細胞機能や疾病との関連性が知られており、その動態を観察可能な優れた手法が必要である。蛍光イメージングは、低侵襲で対象を観察できることから、GSH 濃度変化の可視化において注目され、これまでに様々な蛍光プローブが開発されてきた^[1]。GSH 濃度に対する可逆的な応答性やリアルタイム観察、およびレシオメトリックプローブによる定量的な評価が実現されている一方、500 nm 以下の励起による細胞の光毒性や、プローブのオルガネラ選択性に関して課題が残っている。本研究では、特定のオルガネラに局在し、近赤外領域で長時間観察が可能な GSH 蛍光プローブの開発に取り組んだ。

2. GSH プローブの創製

当研究室ではこれまで、近赤外領域に吸収蛍光を有し、高い光安定性を示すホスファローダミン色素 (POR) を報告した^[2]。POR はローダミン本来のカチオン性に加え、リンオキシド基に由来する低い LUMO を持つことから、高い求電子性を有する。我々は、この求電子性に着目し、GSH の付加反応によって蛍光応答を示すプローブの開発を試みた。

まず、GSH との親和性を制御するため、ローダミン骨格の 9 位に様々なヘテロアリアル基を導入した一連の化合物 **2-FR**, **3-FR**, **2-TH**, および **3-TH** を合成し、GSH との解離定数 $K_{d,GSH}$ を滴定によって算出した。**3-FR** と **2-TH** は、いずれも細胞内 GSH 濃度範囲に適した $K_{d,GSH}$ 値を示した。しかし、**3-FR** は化合物の安定性に乏しく、細胞膜透過性も認められなかった

Table 1. Photophysical Properties and $K_{d,GSH}$ Value of synthesized compounds ^{a)}.



	R	λ_{abs} /nm	λ_{fl} /nm ^{b)}	Φ_F ^{b)}	$K_{d,GSH}$ /mM ^{c)}
2-FR	H	736	760	0.03	0.08
3-FR	H	715	740	0.13	2.59
2-TH	H	727	748	0.12	1.12
3-TH	H	711	734	0.16	10.1

a) Measured in 200 mM HEPES buffer (pH 7.4 containing 0.03% DMSO); b) λ_{fl} = 670; c) Determined from absorption spectra.

ことから、**2-TH** を GSH プローブの基本骨格として採用した。**2-TH** は GSH 濃度に対して迅速かつ可逆的な応答を示した。

次に、プローブの細胞内局在を制御するため、**2-TH** に HaloTag リガンドを導入した **2-TH-Halo** を合成した。HaloTag 融合タンパク質を発現した細胞に対して **2-TH-Halo** を添加し、GSH の捕捉剤である NEM で処理したところ、標的オルガネラからの蛍光シグナルが認められた。**2-TH-Halo** は細胞膜透過性を有し、オルガネラ選択的に GSH 濃度変化を追跡できることが示された。

3. 小胞体ストレス誘導時における生細胞 GSH イメージング

小胞体内腔における GSH 濃度は細胞質よりも低く、1 mM 程度とされている^[3]。したがって、 $K_{d,GSH} = 1.12 \text{ mM}$ を有する **2-TH** は、小胞体内腔における GSH 濃度変化の観察に最適であると考え、小胞体ストレスに対する小胞体内腔の GSH 濃度変化を追跡した。KDEL-Halo を発現させた細胞を **2-TH-Halo** で染色し、その培地にツニカマイシンを添加した。その結果、GSH 濃度の減少に伴う急激な蛍光強度の上昇、および GSH の回復による蛍光シグナルの緩やかな減少が認められた (Figure 1b)。ツニカマイシンの添加により、タンパク質の正常な折りたたみが阻害され、正常に折りたたまれなかったタンパク質がポリペプチドに戻る際に GSH が還元剤として用いられたためにこのような現象が見られたと考える^[4]。これらの結果により、本プローブが小胞体ストレス研究において有用であることが示された。

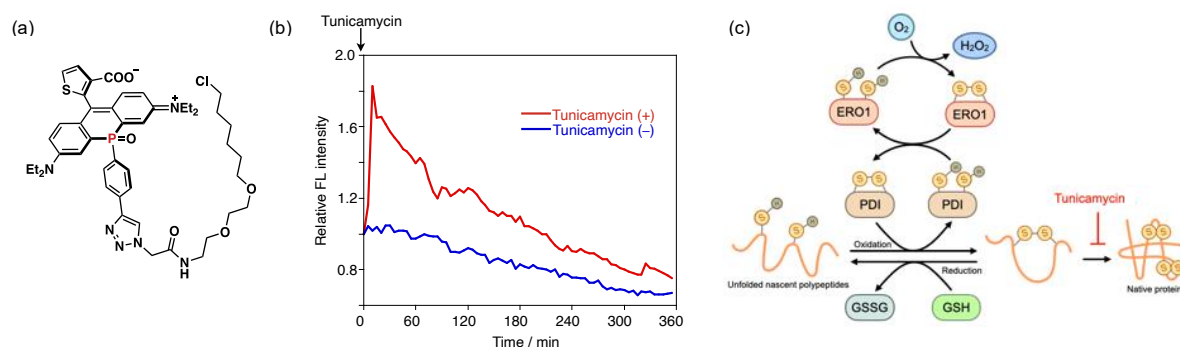


Figure 1. (a) A structure of **POR-2-TH-Halo**. (b) Relative FL intensity in ER stress induced by $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Tunicamycin. (c) A simplified schematic of protein folding and ER stress.

4. まとめ

本研究では、生細胞の GSH 濃度変化を長時間に渡り観察可能な新規 GSH 蛍光プローブ **2-TH-Halo** を開発し、小胞体ストレスに対する小胞体内腔の GSH イメージングに成功した。現在、分子構造の変換によって、 $K_{d,GSH}$ 値の調節が可能であることもわかってきた。今後は、小胞体内腔だけでなく、他のオルガネラにおける GSH イメージングや、レシオメトリックプローブへの展開を目指す。

参考文献

- [1] S. Lee, J. Li, X. Zhou, J. Yin, J. Yoon, *Coordination Chemistry Review*, **2018**, 366, 29.
- [2] M. Grzybowski, M. Taki, K. Senda, Y. Sato, T. Ariyoshi, Y. Okada, R. Kawakami, T. Imamura, S. Yamaguchi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, 57, 10137.
- [3] X. Jiang, J. Chen, M. C. Wang, J. Wang, *STAR protocols*, **2020**, 1, 110170.
- [4] J. Cao, C. Wang, N. Hao, T. Fujiwara, T. Wu, *Antioxidants*, **2022**, 11, 1240.

タンパク質表面修飾を利用した 光スイッチング蛍光分子の光安定性の向上

¹大阪大学大学院工学研究科

²九州大学大学院理学研究院

³大阪大学免疫学フロンティア研究センター

鳥井 健司¹, 堀 雄一郎², 菊地 和也^{1,3}



著者紹介: 大阪大学菊地研究室に所属している D2 です。B4 のときから、菊地研で「光スイッチング蛍光分子の開発」に取り組んできました。趣味はランニングで、来年の 2 月に開催される大阪マラソンに向けて、週末はトレーニングをしているところです。今年の 6 月から 8 月の約 3 ヶ月にわたり、英国の Edinburgh 大学に留学していました。写真は留学中にスコットランドのハイランド地方を訪れたときに撮ったものです。留学から帰ってきて、間もなく本会に参加させていただきました。「味噌カツ」「ひつまぶし」「きしめん」など名古屋めしを堪能することができ、やはり日本は食べ物が美味しいなと改めて実感することができました。(注: 英国の料理が美味しくないと言っているわけではない!) とりとめもない紹介文になりましたが、これからも今回の受賞に恥じることがないように研究に精進していきますので、よろしくお願いたします。

1. はじめに

光照射により蛍光特性が可逆的に変化する光スイッチング蛍光分子は、タンパク質の動態を局所的に追跡することや RESOLFT や MINIFLUX などの超解像蛍光イメージング技術において、非常に有用なツールである。しかしながら、合成された光スイッチング蛍光分子の多くは親水性の低さから、生体環境中で分子間(内)凝集を引き起こし、光安定性を低下させる大きな要因となっている。そのため、未だ半永久的な可逆応答を示す光スイッチング蛍光分子の開発は難しい課題である。近年、多数のカルボン酸を導入した水溶性の蛍光性ジアリアルエテンが開発されたが、細胞膜の透過性が乏しいために生細胞への応用はなされていない¹。また、スピロピランを用いた光スイッチング蛍光分子も開発されているが、熱異性化により厳密な光制御ができないことが問題である²。そこで、本研究では水溶液中でも高い光安定性を保つことが可能な「タンパク質表面修飾支援型光スイッチング戦略(Protein-surface-assisted photoswitching strategy)」を確立した。

2. 光スイッチング蛍光分子 FF-TMR

まず初めに、熱異性化しないフォトクロミック分子としてフリルフルギミド(以降 FF)³ を利用した、光スイッチング蛍光分子 FF-TMR を開発した(Fig. 1a)。FF は開環体と閉環体の 2 つの状態に可逆的に光異性化し、閉環体では可視領域に吸収帯を持つ。FF-TMR は光照射により閉環体に異性化すると、蛍光色素テトラメチルローダミン(TMR)と FF 間の FRET(Förster 共鳴エネルギー移動)により、蛍光消光を引き起こす(Fig. 1b)。FF-TMR の光スイッチング特性をリン酸水溶液中で評価を行ったところ、期待した通り、365

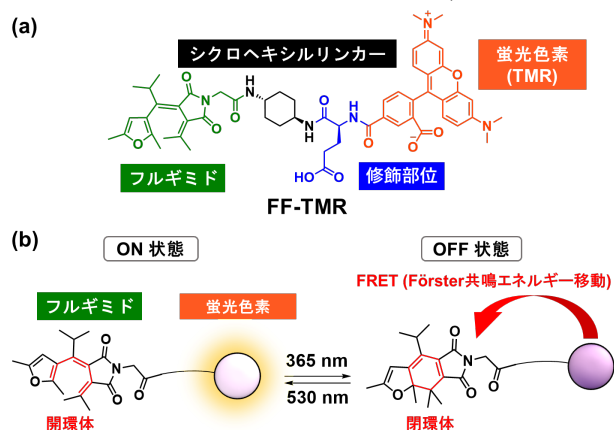


Fig. 1(a) FF-TMR の化学構造と(b)光スイッチング機構

nm の光照射で蛍光強度が低下し、530 nm 照射で完全に回復した。しかし、光照射サイクル数の増加に伴って、蛍光強度のコントラストが劣化することが明らかになった(Fig. 2a)。一方で、エタノール中では照射サイクル数の増加に伴う光劣化はほとんど見られなかった(Fig. 2b)。

その後、吸収スペクトルと光スイッチング性能の濃度依存性を詳細に調べたところ、リン酸水溶液中の FF-TMR は分子間凝集を形成したで不可逆的な光反応を誘引したことが仮説として考えられた。そこで、FF-TMR の光安定性を向上するためには、タンパク質などの生体分子表面に修飾することで、分子間凝集を解消すればよいと考察した。

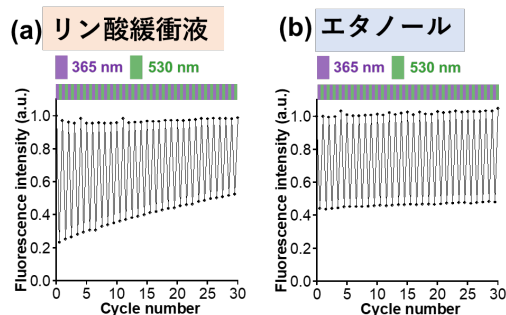


Fig. 2 (a,b) FF-TMR の光スイッチング繰り返し試験

3. タンパク質表面修飾による FF-TMR の光安定性の向上

FF-TMR に修飾させるモデルタンパク質として、Bovine Serum Albumin (BSA)を用いて複合体 FF-TMR-BSA を作製した(Fig. 3a)。光スイッチング試験をリン酸水溶液中の FF-TMR-BSA で行ったところ、優れた光照射サイクル耐久性を示し、FF-TMR と比較して大幅な光安定性の向上を達成した(Fig. 3b)。

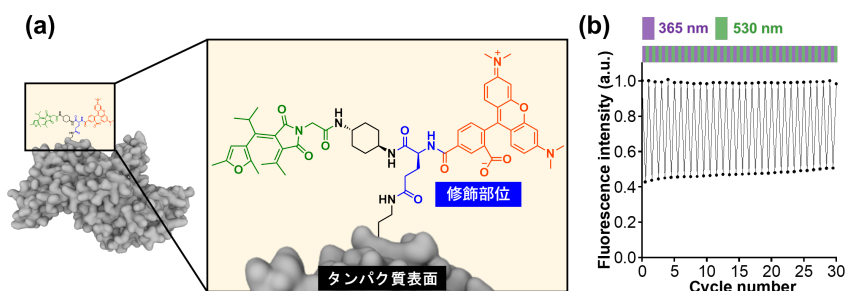


Fig. 3(a) FF-TMR-BSA の概念図と(b)光スイッチング繰り返し試験

4. 免疫染色法による FF-TMR の細胞内蛍光スイッチングの達成

次に、「タンパク質表面修飾支援型光スイッチング戦略」を抗体に適用した。モデル抗体として、Anti- β -tubulin 抗体(tubBAB)を用いて、複合体 FF-TMR-tubBAB を作製した。免疫染色法により、細胞内チューブリンを FF-TMR-tubBAB 及び二次抗体 ATTO655-IgG で染色した。定量的な蛍光強度の変化を調べるため、FF-TMR-tubBAB と ATTO655-IgG の蛍光強度比を用いたレシオイメージングを行った。365 nm 照射で蛍光強度比は減少し、530 nm で回復し、細胞内蛍光スイッチングを達成した(Fig. 4)。

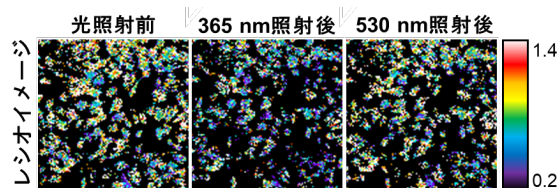


Fig. 4 FF-TMR-tubBAB と ATTO655-IgG を用いた細胞内レシオイメージング

5. 今後の目標

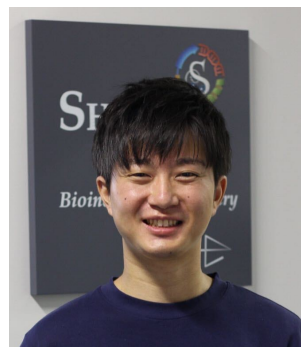
本研究で確立した「タンパク質表面修飾支援型光スイッチング戦略」は、光スイッチング蛍光分子の水溶液中における光安定性を向上することができた。今後は、タグタンパク質を利用することで、生細胞の生体分子を標的とした蛍光スイッチングを達成したいと考えている。

参考文献

- [1]. (a) B. Roubinet, et al, *Angw. Chem. Int. Ed.* **55**, 15429 (2016). (b): K. Uno, et al, *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 16471 (2019).
- [2]. (a): X. Chai, et al, *J. Am. Chem. Soc.* **142**, 18005 (2020). (b): A. T. Frawley, et al, *Chem. Sci.* **11**, 8955 (2020).
- [3]. (a): Y. Yokoyama, *Chem. Rev.* **100**, 1717 (2020). (b): D. Lachmann, et al, *Eur. J. Org. Chem.* **31**, 5018 (2019).

環境汚染物質分解を目指した擬似基質添加 P450 発現細菌による菌体内反応

名古屋大学大学院理学研究科
伊藤 史哉, 有安 真也, 唐澤 昌之,
愛場 雄一郎, 荘司 長三



著者紹介: 名古屋大学大学院理学研究科博士前期課程2年の伊藤史哉です。学部生の頃よりタンパク質や錯体化学に興味を持ち、4年次から荘司研究室に在籍しています。現在は「鍵と鍵穴」の精密なシステムと評される酵素であっても誤作動しうることについて興味を持っており、その原理解明と応用の両面を開拓したいと思い日々研究を行っています。此度の学会において初めてポスター賞をいただくことができましたので、非常に嬉しく思っています。日頃よりご指導いただいている荘司先生、愛場先生、有安先生をはじめ、ラボのメンバーや審査員の先生方に感謝致します。本学会での議論を糧に今後とも研究に邁進していきます。

1. はじめに

近年、環境汚染の低コストかつ省エネルギーな浄化手法として微生物の浄化能を利用するバイオレメディエーションが注目を集めており、中でも汚染環境外で培養した有用微生物を投入し汚染物質を分解するバイオオーグメンテーションは、多環芳香族炭化水素やダイオキシンといった難分解性物質を迅速に浄化できる可能性に期待が寄せられている(図1)。しかしながら、周囲の生態系への影響を考慮すると、遺伝子操作をしていない微生物の利用が望ましく、直ちに利用可能な菌株は限られている。

当研究室では生物界に広く分布するシトクロム P450 を対象とした研究を行ってきた。*Priestia megaterium* (*Bacillus megaterium*) 由来の長鎖脂肪酸水酸化酵素 P450BM3 (CYP102A1) に対し、鎖長が短く反応しない偽物の基質(デコイ分子)を用いて酵素内に小さな反応空間を構築することで非天然反応を促す「基質誤認識システム」を開発し、ベンゼンなどの非天然基質水酸化を達成している(図2)^[1]。また、*P. megaterium* そのものにデコイ分子を添加するだけでベンゼン等の水酸化が可能となり、環境汚染物質の微生物分解手法への道が拓かれた。ただし、この菌体内反応を達成した菌株は *P. megaterium* と P450BM3 を過剰発現させた大腸菌^[2]のみであり(図3)、バイオオーグメンテーション手法として幅広い環境へ適用するためには菌株の拡充が必要である。そこで本研究では P450 酵素を天然にて発現する多様な菌種へ本菌体内反応を展開することを目指した。

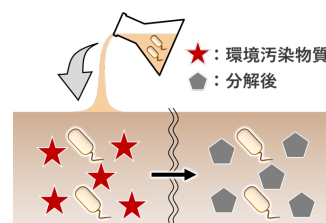


図1. バイオオーグメンテーション。

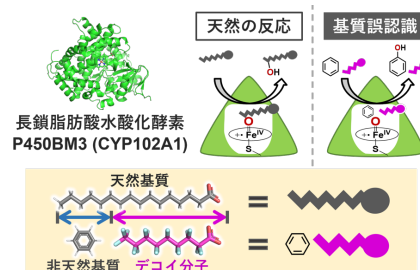


図2. 基質誤認識に基づく非天然反応。

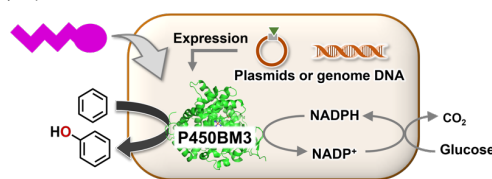


図3. デコイ分子を用いた菌体内ベンゼン水酸化反応。

2. デコイ分子存在下における 11 細菌種のベンゼン水酸化スクリーニング

P450 酵素を有する *P. megaterium* 以外の細菌種が同様に基質誤認識に基づく水酸化反応を起こさるかをスクリーニングした。対象範囲は P450BM3 の近縁酵素を天然にて発現する細菌 11 種(表1)と

し、従来の研究で開発された 41 種のデコイ分子を使用した。OD₆₀₀ 値もしくは湿菌体重量 (WCW) を調整したグルコース含有の懸濁液にデコイ分子とベンゼンを添加し、4h 反応後の上清を解析に利用した。結果として数種の細菌によるベンゼン水酸化が達成され、その活性は *B. subtilis* が最も高く、その反応を作動させるデコイ分子は(S)-イブプロフェンとフェニルアラニンが縮合した S-Ibu-Phe であった (図 4)。本菌種は自然界に遍在しているうえ、特性が広く研究されており、環境汚染浄化手法への適用可能性が高いと考えられた。そのため、以降の実験では本菌種に焦点を当てている。

3. *B. subtilis* JCM 1465^T による水酸化反応

スクリーニングにより判明した *B. subtilis* によるベンゼン水酸化反応の高活性化を目指し、最適条件を探索した。図 5a のようにデコイ分子 S-Ibu-Phe と部分構造が異なる 35 種のデコイ分子を用いた追加スクリーニングを行ったところ、(S)-イブプロフェン部位を変更した場合に比べ、アミノ酸部位を変更した場合に最大 3 倍の水酸化活性が得られた。また、反応温度による影響を検証したところ、25 °C 反応に比べ、45 °C の場合に 5 倍の活性が得られた (図 5b)。

また、遺伝子ノックアウト株を用いた酵素同定に取り組んだ。野生型 *B. subtilis* 168 株と *B. subtilis* 168 Δ*cyp102a2* および *B. subtilis* 168 Δ*cyp102a3* によるベンゼン水酸化活性を比較すると、CYP102A3 遺伝子をノックアウトした株ではフェノールが生成しなかったことから、*B. subtilis* 内に発現した CYP102A3 が水酸化反応を触媒していることが判明した。

続いて、*B. subtilis* による菌体内水酸化反応の基質範囲を調査した。汚染物質として知られる BTX (benzene, toluene, and xylene) を含む種々の化合物を用いた反応をデコイ分子 S-Ibu-Leu 存在下で行うと、幅広い基質に対する水酸化活性が得られ、本菌体内反応の有用性が示された。

最後に、CYP102A3 に対してデコイ分子 S-Ibu-Leu のドッキングシミュレーションを行い、その結合様式を調べた。CYP102A3 は結晶構造が未報告のため、ColabFold^[3]によるモデリングを行い、P450BM3 の結晶構造とのアライメントによりヘムを配置した。AutoDock Vina 1.2.3^[4]によるドッキングシミュレーションを行うと、水酸化反応を引き起こすヘムの上部にベンゼン誘導体が入りうるサイズの余剰空間が形成され、そこへ入り込んだ小分子の水酸化が進行することが示唆された (図 6)。

参考文献

- [1] O. Shoji, T. Kunimatsu, N. Kawakami, Y. Watanabe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6606–6610.
- [2] M. Karasawa, J. K. Stanfield, S. Yanagisawa, O. Shoji, Y. Watanabe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 12264–12269.
- [3] M. Mirdita, K. Schütze, Y. Moriwaki, L. Heo, S. Ovchinnikov, M. Steinegger, *Nat. Methods* **2022**, *19*, 679–682.
- [4] J. Eberhardt, D. Santos-Martins, A. F. Tillack, S. Forli, *J. Chem. Inf. Model.* **2021**, *61*, 3891–3898.

表 1. 対象とした 11 細菌種.

Screened species	CYP102
<i>Bacillus subtilis</i>	A2, A3
<i>Bacillus cereus</i>	A5
<i>Bacillus licheniformis</i>	A7
<i>Bacillus thuringiensis</i>	A8
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	A12, A13
<i>Bacillus pumilus</i>	A15
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	C2
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	K1
<i>Streptomyces avermitilis</i>	B2, D1
<i>Actinosynnema pretiosum</i>	F1
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	G2

Species	CYP102	デコイ分子
<i>B. subtilis</i>	A2, A3	S-Ibu-Phe
<i>B. cereus</i>	A5	C11-L-Leu
<i>B. licheniformis</i>	A7	PFC9-L-Ala
<i>B. thuringiensis</i>	A8	C11-L-Leu

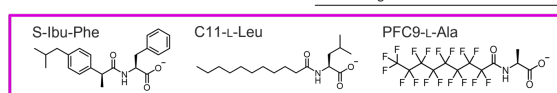
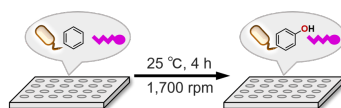


図 4. ベンゼン水酸化スクリーニングの陽性結果.

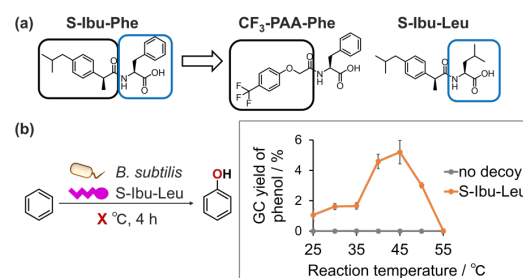


図 5. (a) デコイ分子の最適構造の探索および (b) 反応温度によるベンゼン水酸化活性への影響.

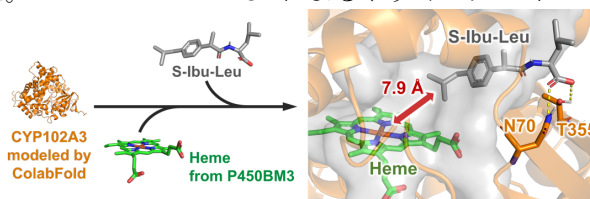


図 6. CYP102A3 に対する S-Ibu-Leu のドッキングシミュレーション.

人工核酸 L-*a*TNA と SNA の化学的な鑄型合成の速度論解析を基盤とした長鎖伸長反応法の構築

名古屋大学大学院工学研究科
沖田 ひかり, 村山 恵司, 浅沼 浩之

著者紹介: 静岡県浜松市出身、名古屋大学大学院 工学研究科 生命分子工学専攻 博士1年の沖田です。学部時代は静岡大学でペプチド化学の研究に没頭していましたが、浅沼教授の”生命の起源を追求”夢に魅せられて修士1年より浅沼研究室にて研究生活を送っています。

趣味は漫画・アニメ、競技かるた(A級)、そして約二年前に始めた民族楽器の演奏です。高校時代は趣味に熱中しすぎて成績が下から10番目でしたが、結果的にそのときに培った集中力が研究に(少しは)役立っているはず...なのでよかったです。今でも日課として家に帰ってから数時間は睡眠時間を大幅に削ってでも漫画やアニメに費やしています。そして翌朝...必ず後悔します。不思議です。

また、研究の合間に学生同士で様々な企画を立ち上げ、運営しています。今年はバイオ関連化学シンポジウムにて記念すべき1回目の Graduate Student Session という大きな企画に携わることができ、非常に嬉しく思います。コロナ禍ということもあり、横とのつながりが希薄になる中、企画委員として人のネットワークだけでなく、自身の視野も広げることができました。このような素晴らしい機会を与えて下さった運営の先生方をはじめとする皆様にこの場を借りまして心より御礼申し上げます。来年こそは本企画もオンラインで実施できることを願っております。(そしてまた企画したいです。)

最後に、いつも自由に研究をやれる、恵まれた環境を与えて下さる浅沼教授、樫田准教授、神谷准教授、村山助教の先生方をはじめとする浅沼研のメンバー全員に深く感謝申し上げます。今回いただきました栄誉ある賞に満足せず、これからも自身の研究をより面白くできるよう精進していきます。

1. はじめに

DNA のリボース骨格を改変することで高い酵素分解耐性を有した多くの XNA(ゼノ核酸)がこれまでに開発されている。当研究室でも非環状型の XNA を創出しており、特に L-スレオニノールを主骨格とする L-*a*TNA^[1]やセリノールを主鎖にもつ SNA^[2]は各々の相補鎖だけでなく天然核酸とも安定な二重鎖を形成できるため、生物学的ツールとしての応用が期待されている(図1)。しかしながら、酵素が XNA 骨格を認識できないため、酵素反応へ応用することが困難であった。

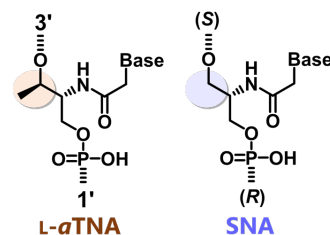


図1 非環状型 XNA の化学構造

2. 非酵素的な鑄型合成法の開発

そこで、酵素の代わりに縮合剤 *N*-cyanoimidazole と Mn^{2+} を用いた化学連結法^[3]を利用して、非環状型 XNA の鑄型合成法の開発を行うことにした。その結果、3-mer の L-*a*TNA ランダム配列プールを用いた 17-mer L-*a*TNA の配列複製の確立に成功した^[4]。また、8-mer フラグメントの連結反応において L-*a*TNA 鎖の方が SNA 鎖の場合よりも 17 倍以上連結速度が速いことから、SNA のアキラルな基本骨格よりも L-*a*TNA のキラルな基本骨格の方が連結反応において重要であることも明らかにしている。

本研究では「L-*a*TNA と SNA の配列からなるキメラ配列を用いた連結反応の速度論解析」の結果から着想を得て、「最適な伸長方向・二価金属イオンを検討する」ことで、最終的に「化学連結法による

L-aTNA の長鎖伸長反応法の高効率化」を試みた。

3. L-aTNA-SNA キメラ断片を用いた連結反応

連結部位または末端部位に数個の L-aTNA を導入した L-aTNA-SNA キメラ配列を用いて、8-mer 断片の連結反応を比較したところ、連結部位に L-aTNA を導入した方が 7 倍以上連結速度は速くなり、連結部位における L-aTNA の骨格構造が連結効率の向上に重要であることが示唆された(図 2)。また、連結部位のリン酸基側が L-aTNA であると加速の効果が大きいことも明らかになったことから、プライマー(反応開始鎖)の連結部位にリン酸基が存在するとリン酸基の構造が固定化され、連結効率が向上するのではないかと考え、伸長方向の検討を行うことにした。

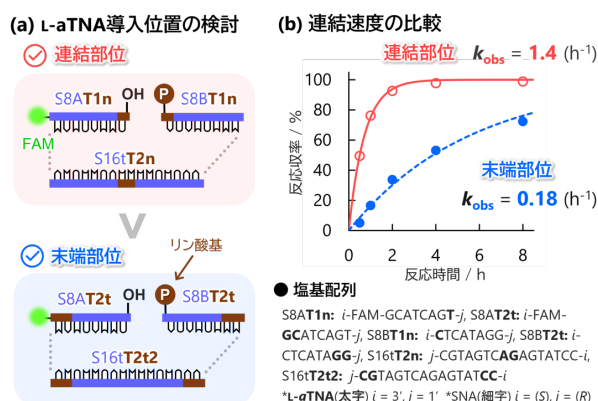


図 2 (a) L-aTNA-SNA 断片を用いた連結反応の概略図 (b) 連結部位または末端部位に L-aTNA を導入部位した場合の連結速度の比較

4. 伸長方向・二価金属イオンの最適化と L-aTNA の長鎖伸長反応の高効率化

伸長方向の検討では 3-mer の L-aTNA 断片を用いた 17-mer の配列複製にて 1'→3' 方向と従来の 3'→1' 方向の伸長速度を比較したところ、1'→3' 方向の方が高い連結効率を示した。さらに反応を加速させるために、リン酸基と相互作用することが予想される二価金属イオンの種類を検討したところ、Cd²⁺ が最も連結効率を高めることが明らかになった。

最後に、最適化された 1'→3' 方向かつ Cd²⁺ の条件のもと、29-mer の鑄型鎖上で 3-mer のランダム配列プールを用いた逐次的な連結

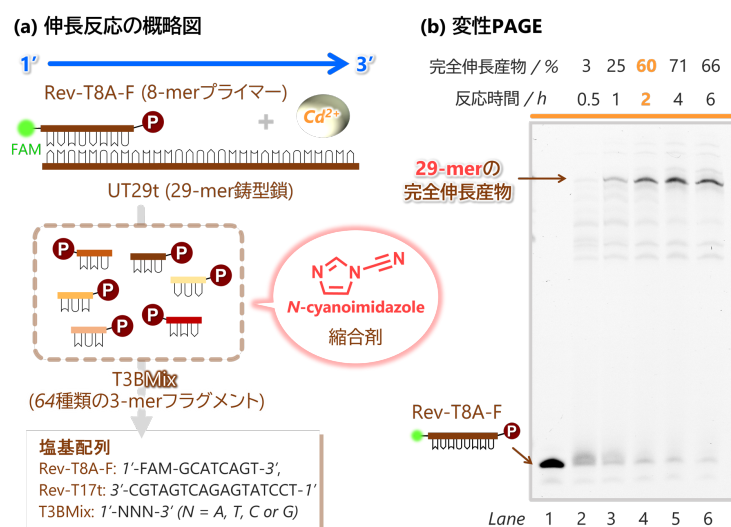


図 3 (a) 29-mer L-aTNA の化学的な鑄型合成法の概略図 (b) 変性 PAGE の結果

反応を試みたところ、2 時間で 60% と高効率に目的産物が得られたことが明らかになった(図 3)。以上の結果より、反応条件の最適化を行うことで、長鎖 L-aTNA の配列複製法の確立に成功した。

参考文献

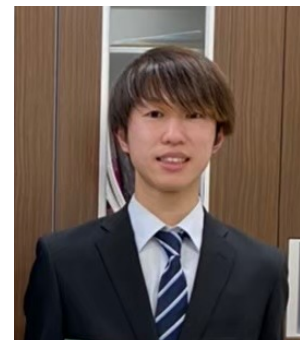
- [1] Murayama, K.; Kashida, H.; Asanuma, H. *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 6500.
- [2] Kashida, H.; Murayama, K.; Toda, T.; Asanuma, H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, 1285.
- [3] Kanaya, E.; Yanagawa, H. *Biochemistry*, **1986**, 25, 7423.
- [4] Murayama, K.; Okita, H.; Kuriki, T.; Asanuma, H. *Nat. Commun.*, **2021**, 12, 804.

mRNA 配列の翻訳効率と精度への影響の網羅的解析と人工抗体・環状ペプチドの高多様性ライブラリ創製への応用

¹名古屋大学大学院工学研究科

²名古屋大学未来創造機構ナノライフシステム研究所

梅本 駿¹, 近藤 太志¹, 藤野 公茂¹, 林 剛介¹, 村上 裕^{1,2}



著者紹介: 1998 年生まれ。滋賀県出身。名古屋大学工学部化学生命工学科を卒業し、現在は名古屋大学大学院工学研究科生命分子工学専攻の博士前期課程 2 年です。抗体や進化分子工学に興味があり、村上研究室で日々充実した研究生活を過ごしています。ビールや日本酒、ワインなど、お酒が大好きで、毎日飲みに行きたいなと思いつつピペットマンを握っています。

1. はじめに

進化分子工学ではランダム配列を含むライブラリから機能性分子を選択・取得することができ、そのライブラリの多様性が大きくなるほど、より優れた分子を得る可能性が高くなると言われている。例えば、2018 年にノーベル賞を受賞したファージ提示法[1]では約 10^9 の多様性をもつライブラリを創出でき、そこから標的に対して数 μM 程度の解離定数をもつ結合分子を取得されることが多い。より大きな多様性を目指して開発された mRNA 提示法[2,3]では、約 10^{13} の多様性をもつタンパク質-mRNA 複合体ライブラリを作製し、nM オーダーの解離定数をもつ結合分子を取得することが可能である。そして、mRNA 提示法で創出されるライブラリの多様性をさらに大きくするためには、タンパク質-mRNA 複合体を形成するまでの効率 (=“提示効率”) を上げることが重要である。

mRNA 提示法から改良された TRAP 提示法[4,5]では、mRNA からタンパク質への翻訳反応と、UAG コドン上でのリボソーム停止状態におけるピューロマイシンリンカー (PuL) とタンパク質の連結反応によって、タンパク質-mRNA 複合体が形成される。そのため、提示効率向上のためには、(i)mRNA からタンパク質への翻訳効率の向上、(ii)UAG コドンリードスルーの抑制 (翻訳精度の向上) が有効である。本稿では、mRNA 配列が翻訳精度にどのような影響を及ぼすかを解析し、その結果をもとに大きな多様性をもつライブラリを構築した結果について紹介したい。(翻訳効率への影響の解析結果等については紙面の都合で省略したため、興味がある方は発表文献[6]を参照されたい。)

2. mRNA 配列が及ぼす翻訳精度への影響の大規模解析

次に、ヒトフィブロネクチン III 型ドメイン (FN3) もしくはヒトリポカリン-2 (LCN2) のいずれかをコードし、その 3' 末端側に位置する UAG コドンの直前にランダムコドン (VVN) を 2 つ、直後にランダム塩基 (Z; Z = N or 塩基なし) を 1 つ加えた mRNA ライブラリを作成し (図 1a)、リボソームの A サイト周辺に存在する mRNA 配列が翻訳精度に与える影響を大規模解析した。各 mRNA 配列の翻訳精度の評価には、提示効率に相関する“濃縮率”という指標を用いた。

その結果、各 mRNA 配列が示す濃縮率は異なるタンパク質配列間で強く相関しており (図 1b)、mRNA 配列が翻訳精度に及ぼす影響はタンパク質配列にほぼ依存しない可能性が示唆された。したがって、濃縮率の高い UAG 周辺配列を用いれば、あらゆるライブラリの多様性を向上させられると期待される。配列と濃縮率の関係性について詳しく見ると、E サイトに GGC と GGU コドンをもつ配列は濃縮率が高く (図 1c 上)、UAG コドンの翻訳精度を上げる可能性が示された。P サイトにおいては、CGA をもつ配列が特に高い濃縮率を示す傾向にあった (図 1c 下)。CGA コドンは I-A ゆらぎ塩基対に

よって歪んだアンチコドンループを形成するため[7]、P サイトに CGA があることで A サイトでの解読に悪影響を与え[8]、UAG コドンの翻訳精度が上がったのかもしれない。A サイト直後の塩基については、ピリミジン塩基よりもプリン塩基の方が低い濃縮率を示した (図 1d)。コドン-アンチコドンペアとの強いスタッキング[9]を通して UAG コドンの翻訳精度に影響を与えたのかもしれない。

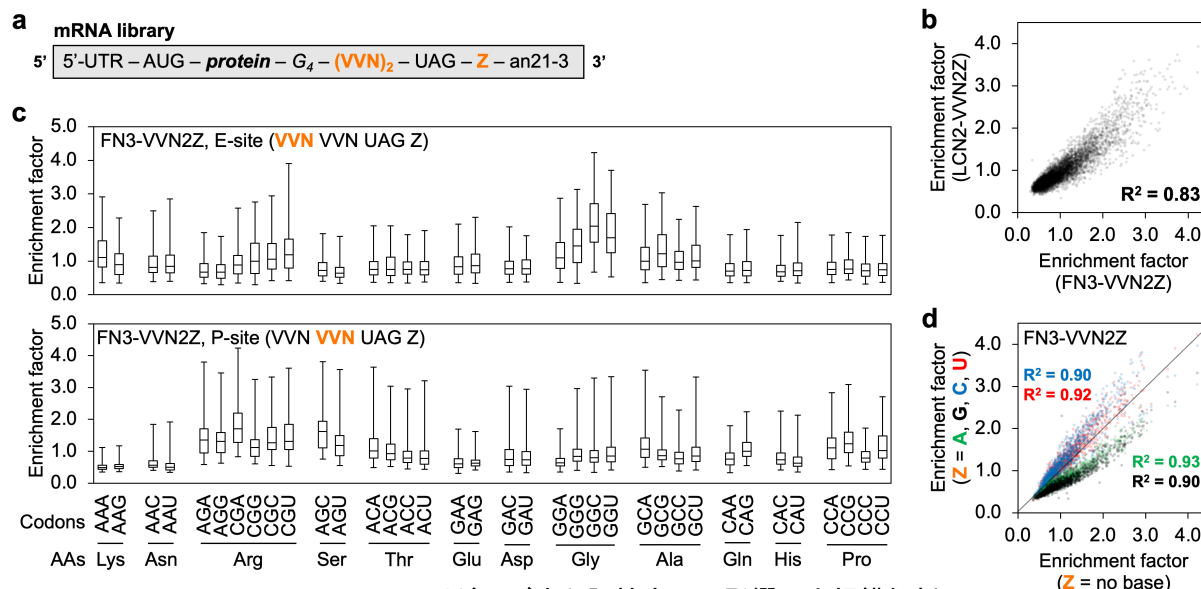


図1 mRNA配列が及ぼす翻訳精度への影響の大規模解析

3. ライブラリ構築への応用

最後に、タンパク質配列への依存性が低かった UAG 周辺配列を用い、Monobody ライブラリ[10]と大環状ペプチドライブラリ[11]の構築を試みた (図 2a)。濃縮率が最も高かった配列 c1 を導入した結果、両ライブラリの

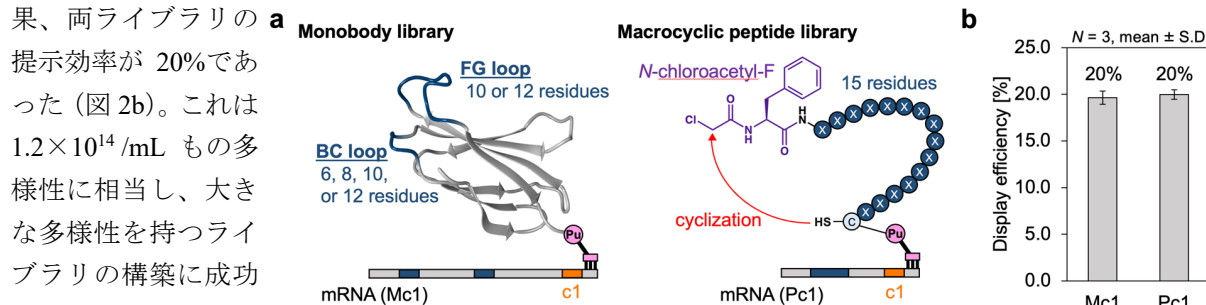


図2 構築したライブラリの実験と提示効率測定

4. まとめ

本研究では、mRNA 配列による翻訳効率および精度への影響の解析と、高多様性ライブラリの構築を実施した。ライブラリ多様性は、進化分子工学的手法において最も重要な要素の一つである。そのため、この成果は有用な人工抗体・大環状ペプチドの開発に貢献するものと期待される。

参考文献

- [1] Smith, G. P. *Science* **228**, 1315-1317 (1985). [2] Roberts, R. W., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 12297-12302 (1997). [3] Nemoto, N., *et al. FEBS Lett.* **414**, 405-408 (1997). [4] Ishizawa, T., *et al. J. Am. Chem. Soc.* **135**(14), 5433-5440 (2013). [5] Kondo, T., *et al. Sci. Adv.* **6**(42), eabd3916 (2020). [6] Umemoto, S., *et al. bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2022.05.19.492606> (2022). [7] Murphy, F.V.T., *et al. Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1251-1252 (2004). [8] Letzring, D.P., *et al. RNA* **16**, 2516-2528 (2010). [9] Grosjean, H., *et al. J. Mol. Biol.* **103**, 499-519 (1976). [10] Koide, A., *et al. J. Mol. Biol.* **284**, 1141-1151 (1998). [11] Kawakami, T., *et al. ACS Chem. Biol.* **8**, 1205-1214 (2013).

立体選択的マイケル付加反応を志向した人工金属酵素の開発

大阪公立大学大学院農学研究科

○松本隆聖, 吉岡紗穂, 丸毛智史, 森田能次, 藤枝伸宇

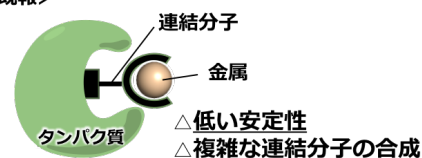


著者紹介: 大阪公立大学大学院農学研究科修士1年次の松本隆聖です。生命機能化学専攻の藤枝研究室(実は本年度のNo.1にて紹介されています(!))にて、人為酵素の設計法や酵素の反応機構の探求を目指した研究を行っています。ものづくりが好きな私にとってはうってつけのテーマであり、日々楽しみながら研究を続けています。今回は少しでも見聞を広げたいという穏やかな(?)意気込みで初参加しましたが、本シンポジウムの賞を頂くことになり非常に感激しております。特に生物無機化学の分野へ少しでも貢献できるように新たに襟を正して精進していこうと思います。また、この研究は常に丁寧なご指導を頂いている藤枝教授をはじめ森田先生、先輩や同期の助力なくして得られた成果ではなく、この場をお借りして感謝御礼申し上げたいと思います。

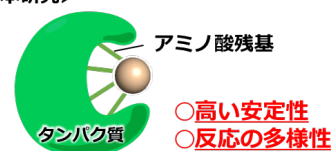
1. はじめに

近年、合成錯体の反応性や選択性をタンパク質骨格で増強した新規なハイブリッド触媒として、人工金属酵素が注目を浴びている。特筆すべきはタンパク質で内包することで水系においても錯体の化学反応性を維持しつつ、キラルな反応場としてもタンパク質が機能することで新たに立体選択性をも獲得することができる点であり、高難度な物質変換における有望な触媒として細胞内や非有機溶媒中での応用が期待される。一方で錯体の調製やタンパク質への導入方法には手間がかかるというボトルネックが存在する。そこで当研究室

<既報>



<本研究>



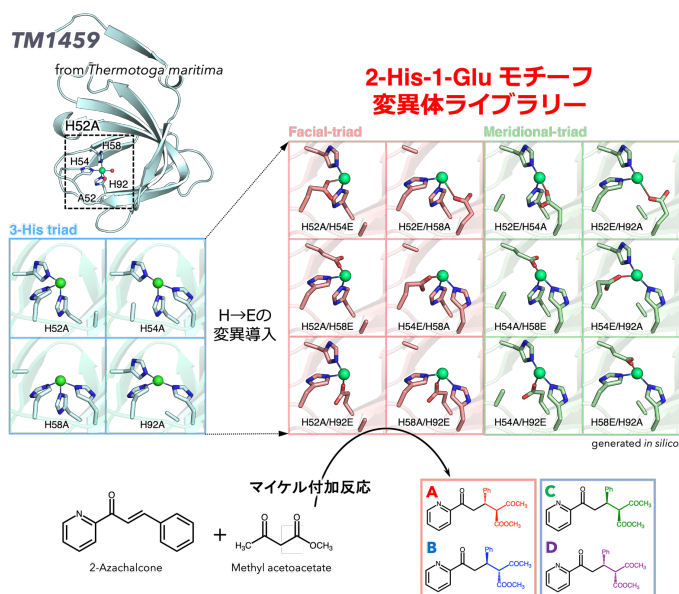
では金属イオンをタンパク質に直接配位させることでより簡便に人工金属酵素を構築してきており、4つのヒスチジン残基からなる金属結合サイトを有する超好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来の TM1459 タンパク質に着目し、様々な遷移金属イオンを導入することで多様な触媒活性を見出してきている。[1,2] 本研究では、C-C 結合形成反応の一つとして有用なマイケル付加反応をモデル反応とし、TM1459 へのステップワイズな変異導入による反応場の精密制御と高立体選択的な生成物の作り分けを目指した。

2. 2-His-1-Carboxylate Facial Triad モチーフの導入

第一段階として、サイズの大きな分子でもアクセスが可能になるように再構築するべく、金属結合サイトへの変異導入を試みた。先行研究において、4つのヒスチジンのうち1つをアラニンに変異させ、かつ、タンパク質キャビティを広げた窒素三座配位子としての3-Hisモチーフを報告している。今回、よりサイズの大きな分子を基質として扱うにあたり、さらにキャビティを広くする必要があると考え、3-Hisモチーフをベースに、3つのヒスチジンのうち1つをグルタミン酸に変異させることを目指した。この酸性アミノ酸は金属と配位結合できるだけでなく、ヒスチジンと比較してアミノ酸分子そのもののサイズも小さくなる。また、このようなヒスチジン2つとカルボン酸を側鎖に持つアミノ酸1つから構成される金属結合部位は天然の非ヘム金属酵素における鉄配位モチーフとして知られる構造(=2-His-1-Carboxylate Facial Triad)でもあることから、その有用性を本人工金属酵素にて検証した。

ドナーとしてアセト酢酸メチル、アクセプターとして 2-アザカルコンを用いることで 4 つの立体異性体が生じるマイケル付加反応においてスクリーニングを行った。その結果、3-His モチーフの H52A 変異体をベースにさらに 58 番目のヒスチジンをグルタミン酸に変異させた H52A/H58E 変異体において *anti* 体におけるエナンチオマー過剰率(*e.e.*)が 96%を達成した。3-His モチーフである H52A 変異体を用いた場合では 80%であり、16%選択性が向上した。また、X 線結晶構造解析により、銅イオンに由来する明瞭な電子密度だけでなく、狙い通りグルタミン酸が配位しており 2-His-1-Carboxylate Facial Triad 構造をとっていることが明らかとなった。加えて ICP 発光分光分析によりタンパク質と銅イオンが 1 当量で結合していることも確認された。

金属結合サイトの最適化ができたと考え、第二段階として、第二配位圏への変異導入を試みた。この H52A/H58E 変異体では 2-アザカルコンの *Si* 面側への求核攻撃による生成物が優勢であったため、この変異体の金属結合サイト近傍アミノ酸残基に着目し、それぞれをより嵩高いアミノ酸に変異させることで、立体選択性を制御することを狙った。その結果、104 番目のフェニルアラニントリプトファンに変異させることで、90%と高い *e.e.*を依然維持しながら、ジアステレオ選択性を 71%まで向上させることに成功した。これにより生成物 B を選択的に 68%まで作り分けることができるようになった。そこでこの変異体も X 線結晶構造解析を行い、得られた構造



と 2-アザカルコンとのドッキングシミュレーションを実施した。その結果、キャビティ内で 2-アザカルコンが銅イオンに配位するだけでなく、変異導入によってトリプトファンが活性中心付近の立体障害を生み出すことが示唆され、これが高い立体選択性につながっていると考えられる。[3]

3. おわりに

本研究では、金属配位タンパク質への変異導入により不斉マイケル付加反応における高立体選択的な生成物の作り分けを達成する人工金属酵素を新たに構築した。これは、タンパク質内部における金属とアミノ酸を組み合わせた精密な反応場の制御に向けた第一歩であると共に、天然酵素が実現する緻密な触媒反応の設計への解明にもつながると考えている。また、この 2-His-1-Carboxylate Facial Triad モチーフを用いて人工的に再構築し、銅イオンを導入して触媒活性を検討した例は現在のところなく、このモチーフが非天然な反応にも有効であることを支持する結果として生物無機化学的観点からも新しい知見をもたらす可能性を秘めていると考えられる。

参考文献

- [1] Fujieda, N., Nakano, T., Taniguchi, Y., Ichihashi, H., Sugimoto, H., Morimoto, Y., Nishikawa, Y., Kurisu, G., Itoh, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, 139, 5139.
- [2] Fujieda, N., Ichihashi, H., Yuasa, M., Nishikawa, Y., Kurisu, G., and Itoh, S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59, 7717.
- [3] Matsumoto, R., Yoshioka, S., Yuasa, M., Morita, Y., Kurisu, G. and Fujieda, N., *ChemRxiv*, (2022) preprint, <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2022-5sh4j>

Award Accounts

第13回バイオ関連化学シンポジウムポスター賞

酸化損傷塩基 2-オキソアデニンを特異的に認識し、シーケンシングを目指した新規人工核酸の開発

¹九州大学大学院薬学府
宮原 涼¹, 谷口 陽祐¹



著者紹介：九州大学薬学府創薬科学科で博士後期課程 2 年に所属しています。修士在学時はドラッグデリバリーシステムの研究を行っていましたが、ふと核酸化学の分野に興味を持ち、博士課程から谷口先生の下で人工核酸の開発に取り組んでいます。自由度が高い研究室なので、楽しいな—と思いつつながら実験しております。写真は、友人と石鎚山に登った時の写真です。山登りも楽しいな—と思いつつながら登ってます。研究が行き詰ったときは体を動かすことで気持ちをリセットしてます。博士課程も残りわずかになってきましたが、残りの期間も思いっきり研究を楽しんでいきたいです!!

1. はじめに

DNA は生命情報を維持する極めて重要な生体高分子である。しかし、放射線・紫外線・化学物質などの外的要因や細胞の代謝過程で発生する活性酸素種などの内的要因により絶えず損傷を受けている。中でも酸化により損傷を受けた酸化損傷塩基は、DNA 複製の際に、塩基置換型の変異を誘発し非常に強い遺伝毒性を示す。この変異がある特定の配列で生じ、修復されずに残存すると、がんや神経変性疾患などを発症すると考えられている。そのため、この発生位置を特定することができれば、配列中の損傷を受けやすい部位・頻度が明らかとなり、疾患発生メカニズム解明及び治療・遺伝子診断薬への展開が期待できる。しかしながら、既存の検出法では、損傷塩基の発生量を定量することはできるが、発生位置を特定することはできていない[1]。そこで、本研究では DNA 中の酸化損傷塩基の革新的な位置特定法の開発を目的とし、損傷塩基の一つである 2-オキソアデニン (2-oxo-dA) を特異的に認識しシーケンシングを可能にする人工核酸の開発を目指した。具体的には、図 2 に示すような酸化損傷塩基と相補的な水素結合形成可能な人工核酸を化学合成し、酸化損傷塩基の DNA 配列中の発生位置を正確に特定する。人工核酸を含んだ配列をシーケンシング解析することでシグナルが検出されない位置から損傷塩基の位置を特定する。

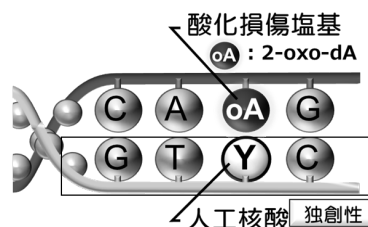


図1. 2-oxo-dAの位置特定

2. oA 認識可能な人工核酸の分子設計・合成

酸化損傷塩基 oA を認識可能な人工核酸として、5-Methyliso-dC が報告されている (図 2 上部)。しかし、5-Methyliso-dC は N-グリコシド結合が開裂しやすく、化学的に不安定なことが報告されている [2]。そこでまず、図 2 下部に示すように、5-Methyliso-dC と同様に oA と水素結合を形成でき、かつ安定な C-グリコシド結合を有している Pseudo-dC (以下 ψ dC) [3] を認識分子として設計し、合成した。

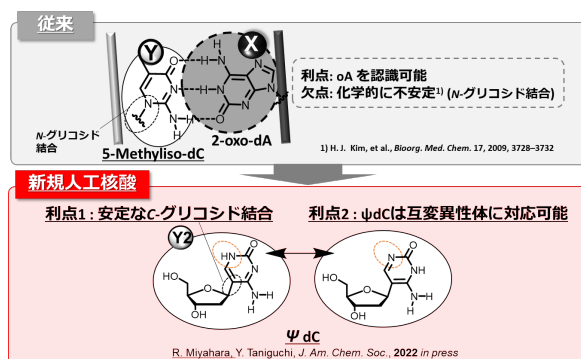


図 2 開発した人工核酸の特徴

3. 目的 1：人工核酸と oA の塩基対形成を評価(T_m 測定)

oA への認識能を評価するため、人工核酸と oA をそれぞれ組み込んだオリゴヌクレオチドを調整し、溶解温度(T_m 値)を測定した。図 3 に示してあるように、φdC と oA の T_m 値(57.1°C)はφdC と天然塩基 (A) の T_m 値(48.8°C)よりも高いことから、oA と非常に高い選択性で塩基対を形成することがわかった。この時の T_m 値は天然塩基対である dG : dC と同等の値を示しており、この塩基対が非常に安定であることが示唆された。実際に、各熱力学パラメーターを算出したところ、3 本の水素結合を介して塩基対を形成していることが示唆された。

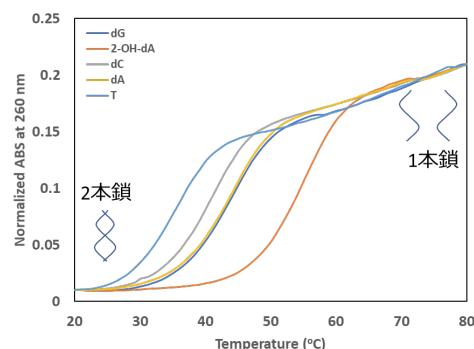


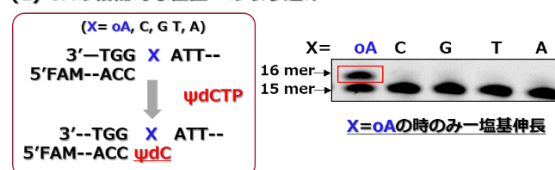
図 3. 塩基対の熱安定性評価

4. 目的 2：シーケンシングに向けた人工核酸の利用

φdC は oA に対して高い選択性が確認されたため、トリリン酸体(以下、φdCTP)を合成して、oA 位置特定法の開発を目指した。そのために、まず (1)φdCTP が oA の相補的な位置に取り込まれるのか、検討する必要がある(図 4,上部)。そこで、oA を含む DNA 鎖に FAM で蛍光標識されたプライマー、φdCTP を加えて DNA 合成酵素により一塩基伸長反応を行った。その結果、φdCTP は、配列中に oA が含まれる配列のみ伸長反応が進行した。従って、

φdCTP は DNA 合成酵素の基質となり、oA の相補的な塩基として取り込まれることが明らかとなった。次に、シーケンシングを可能にするためには、(2)他のヌクレオチド(dNTPs)存在下でも oA に対して人工核酸が選択的に取り込まれる必要がある(図 4 下部)。そこで、oA を含む DNA に dNTPs と φdCTP を加え、伸長反応を行った。その結果、dNTPs のみ(図 4 Lane 1)では伸長反応が進まなかったが、φdCTP を混合しておくことで伸長反応が進んだ(図 4 Lane 2)。従って、得られた配列(図 4 Lane 2)の φdC の位置を解析することで相補的に oA の位置情報が得られることが示唆された。

(1) oAの相補的な位置への取り込み



(2)dNTPs混合条件下でのψdCTPの取り込み

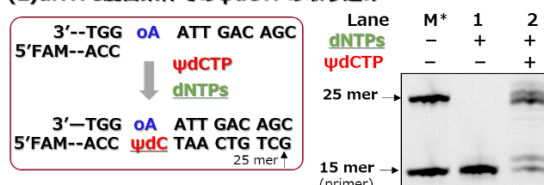


図 4. oA の位置特定

5. まとめ

本研究では、代表的な酸化損傷塩基の一つである oA を認識する新規人工核酸(φdC)の開発に成功した。特に、φdC はオリゴヌクレオチドに組み込むことで選択的、かつ安定に oA と塩基対を形成した。そこで、シーケンシング解析に向けて、φdC のトリリン酸体と酵素反応を組み合わせたところ、φdC の位置情報から oA の位置を特定できることが示唆された。今後は、損傷位置検出の高感度化を行うため、の評価系を構築したいと考えている。

参考文献

- [1] T. Hofer, et al., Biol. Chem., 387, 2006, 103-111
- [2] H. J. Kim, et al., Bioorg. Med. Chem., 17, 2009, 3728-3732
- [3] R. Miyahara, Y. Taniguchi, J. Am. Chem. Soc., 2022, 144, 35, 16150-16156

顕微ラマン分光計を用いた *Streptomyces avermitilis* の形態分化における avermectin の局在解析



¹ 早稲田大学大学院先進理工学研究科

² 産総研・早大 CBBD-OIL

³ 早稲田大学ナノライフ創新研究機構

⁴ 早稲田大学 先進生命動態研究所

堀井 俊平^{1,2}, 安藤 正浩³, 中島 琢自³,

Ashok Zachariah Samuel³, 高橋 洋子³, 竹山春子^{1,2,3,4}

著者紹介：早稲田大学大学院先進理工学研究科、先進理工学専攻、5年一貫制博士課程在学中(後期博士課程3年次相当)。シングルセル解析やビッグデータ解析等により微生物を理解する、先進的な研究に取り組んでいる点に魅力を感じ、生命分子工学研究室に所属することを決め、現在はラマン分光法を用いた微生物代謝の研究を行っています。竹山春子教授の指導の下、基礎研究と技術開発から産業化までを一つの枠組みとして捉え、全体としての目標を設定しながら俯瞰的に研究を遂行するよう努めております。また、事業マネジメントを理解するために、様々なプログラムに参画しており、俯瞰的な視点を持って、社会シーズを産業化できる人材になることを目標としています。これまで微生物学・分光学などの様々な知識をはじめ、研究者としての心構えや指針を熱心にご教授下さりました。竹山春子教授、安藤正浩先生、中島琢自先生には、この場をお借りして御礼申し上げます。

1. はじめに

ラマン分光法は非破壊・非標識な分光振動法である。従来は、化学の分野で広く用いられてきた。近年では、レーザーや分光器などの光学機器の改良により感度が飛躍的に向上し、医学・生物学の分野にも幅広く応用されている。ラマン分光法は、生体分子の分子振動に関する特徴的な分子振動スペクトルを提供し、色素標識や遺伝子操作などのサンプル前処理を必要としない。そのため、迅速かつ低侵襲の観察が可能になり、タンパク質・核酸・脂質などの個々の生体分子の検出に使用できる。また、共焦点顕微鏡とラマン分光法を組み合わせることで、レーザーを走査し、各ピクセルでスペクトルを取得することにより、対象物質の高空間分解能(~300nm)な分子分布画像を取得することができる。我々はこれまでに、微生物から取得される複数のラマンスペクトルに対して適切な情報解析を行うことで、微生物が産生する微量な二次代謝産物の検出やその細胞内局在を可視化することに成功している。そこで、本研究では、放線菌に特徴的な形態分化の過程における二次代謝産物の時空間的な細胞内局在を可視化した。放線菌 *Streptomyces* 属は、その生活環の中で複雑な形態分化を行い、それが二次代謝産物の生産と密接に関係することが報告されている。しかし、形態分化に伴う二次代謝産物の時間的産生や局在が明らかでないため、抗生物質生産を活性化するための形態分化誘導はほとんど未解明である。そこで、放線菌の形態分化時における二次代謝産物の時空間分布を評価することができれば、抗生物質生産の向上に繋がる。

2. 多変量スペクトル分解(Multivariate curve resolution, MCR)

微生物の測定により得られるラマンスペクトルは、多くの生体分子が複数のラマン散乱バンドを示し、濃度が非常に小さく生体分布が不透明な二次代謝物由来のラマンバンドを検出することは困難で

ある。そのため、細胞内に微量に存在する二次代謝物のラマンバンドを検出するためには、適切な情報解析が必要である。我々は、このような複合スペクトルから二次代謝産物の分子情報を引き出すために、多変量スペクトル分解(Multivariate curve resolution, MCR)を適用した。MCR法では、物理化学的に合理的な拘束条件下での最適化計算により、できるだけ事前知識なしにスペクトル分解を行い、分子帰属可能な個々の生体分子スペクトルを得る。我々の先行研究では、MCR法を真菌 *Penicillium chrysogenum* を標的とした in situ シングルセル測定に応用した[1]。MCR法により、各分子由来のスペクトルの強度寄与をもとに分布イメージを構築する(Fig.1)。タンパク質や脂質の影響によりこれまで分離検出が困難であった生理活性物質 penicillin の同定および菌体内での「粒子状」の局在分布を可視化することに成功している。

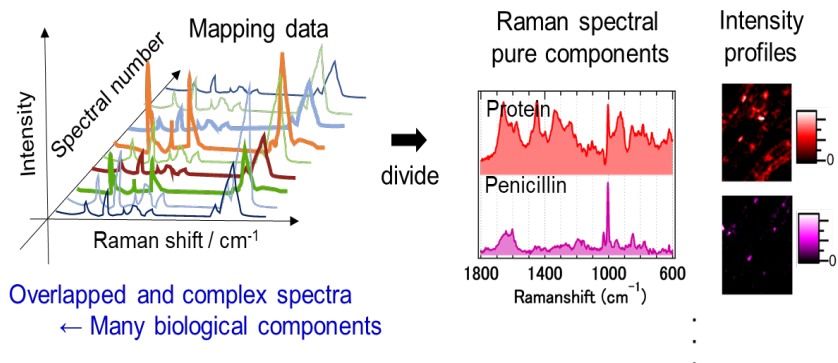


Fig.1. 多変量スペクトル分解 (Multivariate curve resolution, MCR)

3. *Streptomyces avermitilis* の形態分化における avermectin の局在解析

抗生物質 avermectin の生産菌である放線菌 *Streptomyces avermitilis* MA4680T を研究対象とし、液体(24h~168h)及び固体(48h~144h)培養における経日的な菌体ラマンスペクトル測定を行い、MCR法によるスペクトル解析を行った。液体培養では、avermectin は菌糸ペレットの中心部に集中していた。一方、固体培養では、形態分化後期に形成される有孢子菌糸及び螺旋孢子鎖に avermectin が局在していた(Fig. 2)。さらに、菌糸の化学組成が形態分化の過程で大きく変化することが観察された。また、孢子形成期の寒天培地上にナノメートルサイズの微小顆粒が観察された。ラマンイメージングの結果、タンパク質及び脂質が生体成分として検出され、一部の顆粒では avermectin の分布も確認された。以上の結果により、avermectin 生産と形態分化の相関性を評価し、形態分化の各段階において、二次代謝産物の局在に特徴的な変化があることを明らかにした。ラマンイメージングは、微生物における二次代謝産物生産・制御の研究に応用でき、微生物のライフサイクルにおける詳細な化学変化を理解することは、抗生物質を効率的に生産するための培養条件の最適化につながり、新規抗生物質の発見にもつながることが期待される。

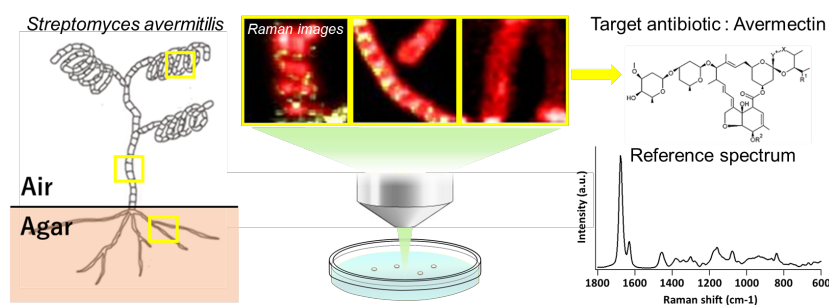


Fig.2. *S. avermitilis* の形態分化における avermectin の局在解析

参考文献

- [1] Horii, S.; Ando, M.; Samuel, AZ.; Take, A.; Nakashima, T.; Matsumoto, A.; Takahashi, Y.; Takeyama, H. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 3223-3229.
- [2] Horii, S.; Samuel, AZ.; Take, A.; Nakashima, T.; Matsumoto, A.; Takahashi, Y.; Ando, M.; Takeyama, H. in press.

北海道大学大学院地球環境科学研究院

物質機能科学部門 小野田研究室

バイオエコノミーにつながるサイエンスを探して。チリで何ができる？

北海道大学大学院地球環境科学研究院の小野田と申します。このような機会をいただいた編集委員の先生方に感謝いたします。2020年4月から研究室を立ち上げ、3年目を迎えました。学生時代からタンパク質の構造と機能に魅せられて今に至っていますが、ラボ立ち上げまでの研究の経緯と最近の取り組みを紹介させていただきます。

大阪 2008年に大阪大学大学院工学研究科 林高史先生の研究室に合流して、ヘムタンパク質の集合体や材料創製のプロジェクトに関わっていました。その中で、よりシンプルで適用範囲の広いタンパク質コンジュゲーションが自分たちの研究を進める上でも必要と認識して、井上君（現住友化学）と一緒にトリアゾールカルバルデヒドを利用したN末端修飾に2019年にたどり着いたことは、大変な幸運でした。最近も数多くの残基選択的な修飾に加えて、N末修飾についても多数発表されていますが、N末修飾の実用と応用という点では、まだ探索すべき余地があると感じています。ケミストリーはマッチポンプ的に問題を解決しながら進展する学問ですが、一方で、適用範囲の広い、根本的な問題の解決に向かうことの重要性を実感させてくれたのが、N末修飾の成果でした。もう1つの中心プロジェクトは人工金属酵素の進化工学です。林研合流前にスクリプス研究所の故Barbas先生のラボで進化工学に取り組んだ経験から、人工金属酵素を進化させたいと進めていました。振り返って当時の自身のキャリアと突き合わせても、着眼とスタートしたタイミングに間違いはなかったと今も確信を持てますが、2016年にHartwig研からのミオグロビンを使ったセンセーショナルな報告がでるなど、競争が熾烈になる変遷を実感しました。新しい研究のPOCには、思い切ってシンプルな系に立ち戻るべき選択肢を机上にのせるということが、この時得た教訓です。紆余曲折をへる中で、加藤君（現林研助教）のハードワークと驚異的な突破力のおかげで、ロジウム錯体を連結した人工金属酵素を*in vitro*で4000種以上をスクリーニングする指向性進化を2020年に達成でき、一里塚となる区切りの成果を達成することができました。

アーヘン 2018年から約1年間、林先生に後押しいただいたこともあり、サバティカルとして共同研究先のアーヘン工科大学（ドイツ）のSchwaneberg研におよそ1年研究滞在する機会を幸運にも得ました。PIのUli（Ulrich）は、専門は酵素の進化工学とハイスループット・スクリーニングです。循環型社会、バイオエコノミー社会の転換を急ぐドイツの追い風の中、基礎と実用をつなぐ酵素応用に関連したプロジェクトをUliが多数進めている様子を、側でみることができました。Uliのプロジェクト設定は、職業サイエンティストという立場で、時代のニーズと自身の研究プロジェクトのマッチングをいかにすり合わせるかについて改めて考える機会となり、今も糧になっています。

札幌 2020年春コロナ禍の中、現所属へ移り、最初は一人でのスタートでした。半年ほど遅れて、指導していた松元君（現三菱ケミカル）と橋爪君（現日油、実家が偶然に札幌の隣の江別市。）が林研から合流してくれ研究を開始しました。ベンチを新設したりとゼロからラボを整えていく過程は、やはり楽しいものです。JR貨物コンテナに詰め込まれて、大阪から遠路はるばる運ばれてきた装置を迎え

たことも、北海道ならではのよい思い出です。3年目に入り、補佐員2名、博士3名、修士9名、研究生2名と徐々に人数も増えてきました。学部がない組織ということもあり、学んだ専門が異なるメンバーが集まっており、出身も中国、バングラディッシュ、ウガンダと多士済々です。それぞれのバックグラウンドを活かしつつ研究してもらおうスタイルで進めています。

北大へ異動後も、タンパク質 N 末端修飾を利用した応用を中心に、人工金属酵素に関する研究は引き続き進めています。また新たに水産資源の有効利用を目指した研究に着手しています。その経緯はアーヘン滞在時に遡ります。ラボの関係者で、その後母国チリに帰国したロニー・マルティネス博士がアーヘンを訪問した際、巨大イカ（アメリカオオアカイカ）の研究に取り組んでいると話をしてくれました。1.5メートルを超えるイカで、欧米へカラマリなどの原料として輸出されますが、内臓など40%は廃棄されているとのこと。チリから輸入している養殖サケは身近な食材ですが、4000 km の海外線をもつチリは日本と同様に水産資源が豊富で重要な産業であり、水産廃棄物の有効利用に官民をあげて取り組んでいると教えてくれました。話は、さらに遡って東京理科大在籍時の恩師である山村剛士先生が「アニリン (K.A. シェンチンガー著)」という科学小説を当時貸して下さり、19世紀、当時の産業廃棄物であった石炭タールからアニリンをF.F. ルンゲが単離する経緯、そして、その後 BASF (バーディシェ・アニリン・ウント・ソーダ・ファブリーク) 社が興ることを初めて知りました。その時に山村先生が「化学者はゴミ屋なんですよ」というようなことを話して下さったことが頭から離れずにいました。理学部出身の私は、学生時代に化学工学も学んでおらず、高価な試薬を使うことも最先端研究の一部という感覚をもっていました、この一件以来、化学を生業としているからには、機会があれば、無から有用な何かを生み出すような研究を手掛けたいと機会をうかがっていました。およそ15年後、北海道と地球環境科学というキーワードをもつ現在のポジションを得てラボを構えることとなり、どこに向かって新しい研究を進めるかを考える中で、北海道という地の利をいかに活かして、バイオエコノミーにつながるように、農林畜水産業と自身の研究接点を模索していました。その一つの答えとして、SATREPS 地球規模課題対応国際科学技術協力プログラムへ Ronny と共同提案し、2023年から5年間、チリ水産資源廃棄物を有効利用するプロジェクトに取り組む機会を得ました。北海道の産官学の研究者に多数参画いただき、水産資源から得られるキトサンなどの有用物質の生産と応用材料創出に挑戦できることは大変な楽しみです。Ronny が所属するラ・セレナ大学の地元で、プロジェクトが新聞で紹介されるなど、期待が予想以上に大きく、期待に答えられるようにと準備しています。チリで何ができるのか、今後の進展を待って、学会発表等でお伝えできればと思います。



2022年4月の全体写真



コンテナごとラボ前に到着した引越し荷物

japonesa financia proyectos con residuos de



ホタテの養殖場視察中の一枚。なぜこの写真、、、

連絡先：北海道大学大学院地球環境科学研究院物質機能科学部門

e-mail: akira.onoda@ees.hokudai.ac.jp

住所：〒060-0810 北海道札幌市北区北十条西五丁目

電話番号：010-706-2257, ホームページアドレス：<https://onoda-lab.jp/>

部会行事

第 16 回バイオ関連化学シンポジウム開催報告

第 37 回生体機能関連化学シンポジウム・第 25 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、名古屋大学大学院工学研究科、名古屋大学未来社会創造機構ナノライフシステム研究所

名古屋大学大学院・工学研究科 堀克敏・村上裕

2022年9月10日(土)～12日(月)の三日間にわたり、第16回バイオ関連化学シンポジウム(第37回生体機能関連化学シンポジウム・第25回バイオテクノロジー部会シンポジウム)が、名古屋大学を会場として開催されました。堀克敏(実行委員長)、および村上裕(副実行委員長)を中心に、清中茂樹、荘司長三の4名で実行委員会を構成し、愛場雄一郎、林剛介、鈴木淳巨、中谷肇、有安真也、金岡英徳、堂浦智裕、藤野公茂らが実行委員として学会の運営を行いました。本年のシンポジウムは、例年と同様の規模で、参加登録者数461名(うちオンライン101名)、一般口頭発表79件(うちオンライン6件)、ポスター発表202件でした。

COVID-19の影響で、第14回バイオ関連化学シンポジウム(九州大学)と第15回バイオ関連化学シンポジウム(鳥取大学)はオンライン開催となっていたこともあり、第13回バイオ関連化学シンポジウム(東北大学)以来、3年ぶりの現地開催となりました。多くの参加者にとっては、久しぶりに旧知の仲間と直に顔を合わせサイエンスの議論ができ、また、多くの学生にとっても、久しぶりもしくは初めて参加する現地開催の学会ということで熱い学会となりました。実際に、現地の出席者は楽しそうに学会に参加しており、運営を担っている実行委員としては、現地で開催できてよかった実感しております。

ただ、COVID-19の影響はなくなったわけではなく、バイオ関連化学シンポジウムとしては初めてのハイブリッド形式での開催となりました。一般講演をオンライン配信しながらの開催は、開催コストも高く、思っていたよりも準備が大変で、前日の半日は準備に多くの時間を費やしました。ハイブリッド開催については、今後、継続するかどうか慎重な議論が必要に思います。また、ポスター発表についても、人が密集することを避けるために3日目にオンラインで行いました。オンラインでも活発な議論はできたのですが、やはり来年は対面での熱いポスター発表が期待されます。懇親会も中止になったことから、講演賞およびポスター賞受賞者は、後日、学会ホームページでの発表となりました(詳細は他報告にありますので割愛します)。

特別講演では、神取 秀樹 先生(名古屋工業大学大学院工学研究科)から「ロドプシンのメカニズム研究」、馬場 嘉信先生(名古屋大学大学院工学研究科)から「ナノ AI バイオデバイス・量子生命科学が拓く未来医療」について、対面でご講演をいただきました。また、本年度からの企画として、有志の学生が話し合っって講演者を招待し司会進行も行う Graduate Student Session において、五十嵐 龍治先生(国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 量子生命科学研究所)から「表面化学修飾が拓く次世代の生体ナノ量子センサー技術」、大嶋 篤典先生(名古屋大学細胞生理学センター)から「クライオ電子顕微鏡を用いた細胞間結合の構造研究の最前線」、古澤 力先生(国立研究開発法人理化学研究所 生命機能科学研究センター)から「微生物の大規模進化実験 ～進化の予測と制御へ向けて～」について、オンラインでご講演をいただきました。学生の質問を優先するという申し合わせがあったため、手を上げていた先生方には質問時間が回らず、学生の質問のみですべてが完結したのは、学生にとって痛快だったと思います(先生方にとっても目論見通りだったと思いますが)。

本学会では、COVID-19による開催方法の制限に対応するためにいくつか、運営や発表方法について工

夫しました。例えば現地での現金支払いはなく、当日までオンラインのクレジットカード支払いを可能としました。これにより現金を扱う必要がなくなったため、開催側の負担が大きく減りました。また、ポスターがオンラインとなったため、希望する学生限定で現地の3会場で3分間ショートトークを開催しました。166名という多くの学生がこの企画で発表しましたが、学生からは、「同じ分野の研究者や学生に対面で発表でき良い経験となり楽しかった」と前向きな感想をもらっています。また、聴衆の先生方からも「通常の1分間フラッシュトークに比べて、3分だと内容まで聞くことができ、また全体で60分というセッションなので、飽きることなく聞くことができた」とポジティブな意見をいただきました。来年度以降も、是非続けていただきたいと思います。

最後に、本シンポジウムの開催にご協賛いただきました、CEM Japan 株式会社様、PHC 株式会社様、タイテック株式会社様、オザワ科学株式会社様、伊勢久株式会社様、モレキュラーデバイスジャパン株式会社様、アジレント・テクノロジー株式会社様、株式会社レスターコミュニケーションズ様、株式会社カーク様、バックマン・コールドター株式会社様、アルテック株式会社様に心より御礼申し上げます。また、(株)アトラス社、創文印刷工業株式会社の皆様、ならびに日本化学会の保倉光邦様、守誠一朗様にはシンポジウム運営に関して様々な面でサポートをいただきました。この場を借りて感謝申し上げます。

来年度の第17回バイオ関連化学シンポジウムは、令和5年9月8日(金)～9月10日(日)の日程で青木先生・上田先生のお世話で東京理科大学野田キャンパスにて開催される予定です。また来年、バイオ関連化学シンポジウムでお会いしましょう！



部会行事

「第16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37回生体機能関連化学シンポジウム・第25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 廣田俊
 奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科

本シンポジウムの講演賞は2000年に始まって、今年で23回目を迎えました。過去2年間、本シンポジウムは新型コロナウイルス感染症の拡大のためオンラインのみでの開催でしたが、本年度は現地（名古屋大学）とオンラインのハイブリッドで開催されました。また、表彰式はシンポジウム終了後、10月5日にオンライン開催されました。講演賞には28名の応募があり、昨年度よりも大幅に応募者が増えました。審査は8名の審査委員により、講演賞規定に従って厳正かつ公平に行われました。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項目の採点をもとに審査し、審査規定に記載されている「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」の点についても精査しました。本年も例年通り、いずれの講演もレベルが高く、甲乙つけ難い内容でしたが、僅かな差ながら、4名を講演賞受賞者として選出いたしました。特に、受賞者は自らが中心となって新しい独創的な研究を展開している点が高く評価されました。また、選外となった応募者の講演にも素晴らしいものが多く、今後さらに研究を進展させ、来年以降、本講演賞に再チャレンジしていただければと思います。若手研究者の皆さんが今後も独創的な研究を展開し、本講演賞が生体機能関連化学およびバイオテクノロジー分野の将来を担う世界的な人材育成に繋がればと願っております。

受賞者の方々には心からお祝い申し上げます。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とともに、益々のご活躍を祈念しております。

部会講演賞受賞者（敬称略、五十音順）

稲葉 央 鳥取大学大学院工学研究科・准教授

Tau由来ペプチド融合タンパク質による微小管超構造体の創製

真鍋 良幸 大阪大学大学院理学研究科・助教

合成生物学的アプローチによる細胞表層糖鎖ネットワークの解析

三木 卓幸 東京工業大学生命理工学院・助教

YKペプチドタグによる細胞内での人工相分離液滴モデルの形成

森廣 邦彦 東京大学大学院工学系研究科・助教

腫瘍溶解性ヘアピンDNAペア：マイクロRNA駆動型DNA自己組織化を介した選択的細胞毒性誘導剤

本年度のポスター発表は昨年度に引き続きオンライン開催となりましたが、このような状況下でも可能な限り公平かつ厳正な審査を心がけ、評価いただきました。ポスター賞審査は名古屋大学の有安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行われました。同賞にエントリーした80名のポスター発表が、両部会に所属する55名の若手研究者により厳正に審査されました。例年通り優れた発表が多く、1点差を争う極めて厳しい審査となりましたが、上位

8名をポスター賞としました。明確なプレゼンテーション、しっかりした質疑応答が評価されたと聞いております。このうち上位3名には、RSC (Royal Society of Chemistry) 協賛により Chemical Communications 賞、RSC Chemical Biology 賞、および Organic & Biomolecular Chemistry 賞として表彰されました。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っております。

最後に、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55名の若手の先生方のご協力に心より感謝申し上げます。

ポスター賞受賞者 (敬称略、五十音順)

*1 伊藤 史哉 (名大院理)、梅本 駿 (名大院工)、沖田 ひかり (名大院工)、*2 鳥井 健司 (阪大院工)、堀井 俊平 (早稲田大院先進理工)、松本 隆聖 (大阪公大院農)、宮原 涼 (九大院薬)、*3 師 悠季 (名大院理)、

*1 Organic & Biomolecular Chemistry 賞、*2 RSC Chemical Biology 賞、*3 Chemical Communications 賞

講演賞・ポスター賞受賞者 (表彰式)



部会行事

第 16 回バイオ関連化学シンポジウム内企画、Graduate Student Session 開催報告

名古屋大学理学研究科物質理学専攻 有安真也

名古屋大学大学院工学研究科（学生実行委員長） 牧野航海

令和 4 年 9 月 12 日（月）の午前中に、バイオ関連化学シンポジウムとしては新企画である Graduate Student Session（通称、学生企画）をオンライン形式で開催し、量子科学技術研究開発機構 量子生命科学研究所の五十嵐龍治先生、名古屋大学 細胞生理学センター・大学院創薬科学研究科・糖鎖生命科学コア研究所の大嶋篤典先生、理化学研究所 生命機能科学研究センターおよび、東京大学 生物普遍性研究機構の古澤力先生にご講演頂きました。本セッションは、バイオ関連シンポジウムの 1 つのセッションを学生委員に一任し、自由にセッションを企画、運営するという新しい試みでした。本セッションの構想は昨年度のバイオ関連化学シンポジウム会期中に行われた生体機能関連化学部会役員会において発案されたものであり、学生がセッションの講演者を選び、自ら交渉し、当日のセッション運営も行うことで、学生委員の主体性、学生間の交流を促すことを目的と致しました。当初、本セッションに 3 時間を割り当てることを計画しておりましたが、コロナウイルス感染症拡大防止の観点から、シンポジウムがハイブリッド開催になり、それに伴うポスター発表の希望者によるショートトークの新設等により、プログラム編成が非常に難しい状況の中、シンポジウム実行委員の方々のご尽力の末、Graduate Student Session にオンライン形式 2 時間を用意して頂きました。Graduate Student Session の企画・運営は有志の学生委員によって行うことに致しましたが、今回、本企画が初めての試みであるため、学生実行委員の募集に関しては、シンポジウム開催地域である東海地方の大学に所属する研究グループの内、過去数年間、バイオ関連化学シンポジウムでの発表があった研究グループの指導教員に、本企画の趣旨をお伝えし、研究グループに所属している博士課程学生に伝達して頂く方式を取りました。学生が自由に立候補できるよう、学生本人から私に連絡することと致しました。Zoom で本企画の趣旨を説明した後、最終的に 8 名の博士課程学生（牧野航海(実行委員長、名大院工)、野場考策(名大院工)、笹原純(名大院工)、東秀憲(名大院工)、稲葉大晃(名大院理)、中嶋雄哉(名大院工)、沖田ひかり(名大院工)、横山侑弥(名大院理)) に学生実行委員として企画に参画して頂きました。学生実行委員決定後は、実行委員が自由に使える Zoom アドレスを提供し、質問、要望があれば、バイオ関連化学シンポジウム実行委員に相談するというサポートのみで、招待講演者の選定、交渉、大会 HP の企画紹介ページの作成、企画告知ポスターの作成、両部会の HP での告知、メーリングリストを通じた部会員への告知、サマースクールや若手フォーラム内で本企画の紹介、セッション当日の司会進行、セッション後の Zoom 懇談会の運営等、多岐にわたる活動を学生実行委員主体で実行してもらいました。

当日はまず、量子科学技術研究開発機構の五十嵐龍治先生に『表面化学修飾が拓く次世代の生体ナノ量子センサー技術』をご講演頂きました。生体ナノ量子センサーという最先端のマテリアルの発展に関して、表面化学修飾という化学的な視点から丁寧に解説していただきました。美しい生体イメージング画像を多数、紹介して頂き、当シンポジウムの主要な討論対象であるバイオイメージングの研究者に限らず、多くの聴講者に強い刺激を与えたご講演でありました。続いて、名古屋大学 細胞生理学センター・大学院創薬科学研究科の大嶋篤典先生に『クライオ電子顕微鏡を用いた細胞間結合

の構造研究の最前線』をご講演頂きました。クライオ電子顕微鏡は今や X 線結晶構造解析に肩を並べる生物構造学における重要な構造解析手段となりつつありますが、当シンポジウムにおいてはまだ発表件数は少なく、生物の巧妙なシステムを電子顕微鏡で分子レベルの画像として可視化するデータに感銘を受け、クライオ電子顕微鏡の可能性を強く感じた聴講者も多かったと想像しております。最後に、理化学研究所 生命機能科学研究センターの古澤力先生に『微生物の大規模進化実験 ～進化の予測と制御へ向けて～』のご講演をして頂きました。古澤先生の「生命とはなにか？」という問いには、私も含め、聴講者の多くに改めて生命に対する認識を考えさせる深い問いであったと感じました。また、大規模なラボオートメーションを用いた大腸菌の進化実験では、1 つ 1 つ実験を積み重ねていく伝統がある化学者にとって、新時代の研究手法の一端を見せていただき、今後の研究の進め方にも大きく影響を与えるような刺激的なご講演であったと思います。また、講演者 3 名の先生方には本企画の趣旨を汲んで頂き、短い講演時間にも関わらず、最先端の研究成果の紹介だけでなく、最先端にたどり着くまでの経緯、研究者を目指すきっかけなど、これから自分の道を決めていく学生に対するアドバイスを含めて頂き、聴講していた学生を強く激励して頂きました。当日は常時 100 名以上の聴講者が参加しており、また質疑応答では学生実行委員のみならず、非常に多くの学生から質問が飛び交い、質疑応答の予定時間を超える程、熱意のある講演会になったと感じました。また、講演後にはオンラインで講演者の先生方と学生実行委委員、希望者で懇談会を開催し、講演の質疑応答では時間不足で聞けなかった質問にも丁寧に答え頂いたと聞いております。五十嵐先生、大嶋先生、古澤先生にはご多忙の中、非常に素晴らしいご講演、そして、学生に対し激励を頂き、誠にありがとうございました。この場を借りて御礼申し上げます。内容に多少の重複はございますが、学生実行委員の活動に関しては、以降、学生実行委員の牧野航海君に執筆して頂きました。

第 16 回バイオ関連化学シンポジウムにて開催された学生企画「Graduate Student Session」の学生実行委員長を務めました名古屋大学大学院 浅沼研究室の博士後期課程 3 年の牧野航海です。学生実行委員を代表して執筆いたします。この記事はバイオ関連化学シンポジウムで初めての試みとなる学生企画の運営に携わった貴重な経験を、記録として残したいと考え、生体機能関連化学部会にお願いをして掲載ページを頂きました。私事ですが、アカデミアの道に進むにあたって、熱意ある博士学生と仲良くなり、招待講演者の先生とのご縁に恵まれない、実行委員長となってバイオ関連化学シンポジウムにおいて存在感を示したいと考え、学生企画に参画いたしました。

第 1 回となる学生企画を無事に終えることができたのは、学生実行委員の皆さんが手探りながらも主体的に活動してくれたおかげです。招待講演者の選定は、自分たちが「とにかく見たい・聞きたい・知りたい最先端の研究」に携わっている先生を挙げ、議論を重ねた末に決定しました。皆がそれぞれの研究領域に拘らず、幅広い分野の先生方を挙げてくれたことから、サイエンス全般に非常に強い関心を抱いていることが伝わりました。私が学生企画に参加してよかったと感じた最初の出来事であり、近い存在である学生の研究熱に触れ、私にとって痛気持ちいい感覚でした。そんな彼らと入念に準備を進めていき、第 1 回の Graduate Student Session では以下の 3 名の先生にお願いしご講演頂きました。

五十嵐 龍治 先生 『表面化学修飾が拓く次世代の生体ナノ量子センサー技術』

大嶋 篤典 先生 『クライオ電子顕微鏡を用いた細胞間結合の構造研究の最前線』

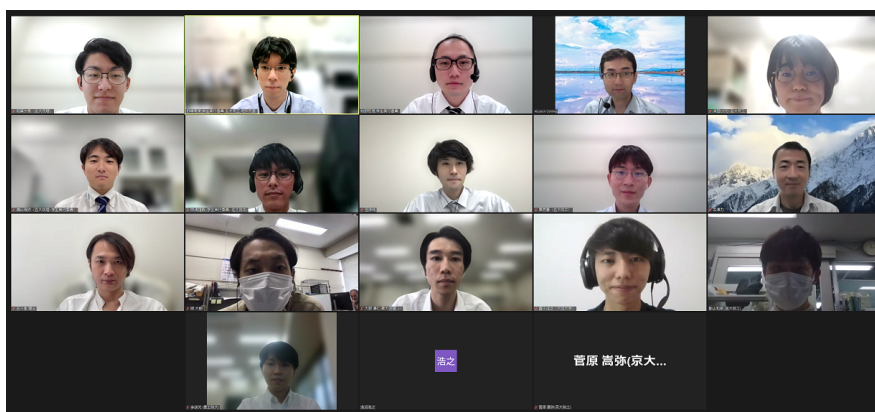
古澤 力 先生 『微生物の大規模進化実験 ～進化の予測と制御へ向けて～』

当日は 100 名以上の方にオンラインでご参加いただけました。どの先生のご講演も本当に刺激的であり、参加者の方々にもご満足いただけたと感じております。

生体機能関連化学部会の部会長である浅沼浩之先生のシンポジウム最後の挨拶でのお言葉が、時間の経った執筆当時にも印象に残っています。「学会で准教授を見れば 10 年後、学生を見ればさらに後の学会の将来が推測できます。生体機能関連化学はこれからも盛り上がっていきけると自信を持って言えます」。浅沼先生は私の尊敬するボスでもあり大変心に残りました。まだまだ未熟な学生ですが、ますます研鑽を積み、研究界限を盛り上げ、背負っていける研究者を目指していきたいと決意を新たにいたしました。今後ともご指導ご鞭撻のほどよろしくお願いいたします。

最後に、学生である我々が学会の 1 セッションを担当するという貴重な機会を設けていただきました部会の先生方、親身になって学生企画を支えて頂きました有安先生、ご講演頂いた五十嵐先生、大嶋先生、古澤先生、広報等を含め関わってくださった全ての先生方に、学生実行委員を代表して心より感謝申し上げます。

学生企画後に開催した
オンライン懇親会での
集合写真



お知らせ

第 16 回バイオ関連化学シンポジウム講演賞・ポスター賞

講演賞受賞者

稲葉 央	鳥取大学学術研究院 工学系部門	Tau 由来ペプチド融合タンパク質による微小管超構造体の創製
真鍋 良幸	大阪大学大学院 理学研究科	合成生物学的アプローチによる細胞表層糖鎖ネットワークの解析
三木 卓幸	東京工業大学 生命理工学院	YK ペプチドタグによる細胞内での人工相分離液滴モデルの形成
森廣 邦彦	東京大学大学院 工学系研究科	腫瘍溶解性ヘアピン DNA ペア：マイクロ RNA 駆動型 DNA 自己組織化を介した選択的細胞毒性誘導剤

ポスター賞受賞者

師 悠季 *1	名古屋大学大学院 理学研究科	細胞内グルタチオン濃度変化のリアルタイム追跡を可能にするオルガネラ選択的近赤外蛍光プローブの創製
鳥井 健司 *2	大阪大学大学院 工学研究科	タンパク質表面修飾を利用した光スイッチング蛍光分子の光安定性の向上
伊藤 史哉 *3	名古屋大学大学院 理学研究科	環境汚染物質分解を目指した擬似基質添加 P450 発現細菌による菌体内反応
沖田 ひかり	名古屋大学大学院 工学研究科	人工核酸 L-aTNA と SNA の化学的な鋳型合成の速度論解析を基盤とした長鎖伸長反応法の構築
梅本 駿	名古屋大学大学院 工学研究科	mRNA 配列の翻訳効率と精度への影響の網羅的解析と人工抗体・環状ペプチドの高多様性ライブラリ創製への応用
松本 隆聖	大阪公立大学大学院 農学研究科	立体選択的マイケル付加反応を志向した人工金属酵素の開発
宮原 涼	九州大学大学院 薬学府	酸化損傷塩基 2-オキソアデニンを特異的に認識しシーケンシングを目指した新規人工核酸の開発
堀井 俊平	早稲田大学先進 理工学研究科	顕微ラマン分光計を用いた <i>Streptomyces avermitilis</i> の形態分化における avermectin の局在解析

*1 Chemical Communications 賞

*2 RSC Chemical Biology 賞

*3 Organic & Biomolecular Chemistry 賞

お知らせ

第 17 回バイオ関連化学シンポジウム 2023

日程 2023 年 9 月 8 日(金)~10 日(日)

会場 東京理科大学野田キャンパス(千葉県野田市)

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 ホスト・ゲスト・超分子化学研究会

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

発表申込期間・予稿原稿提出期間 2023 年 6 月 1 日(木)~6 月 23 日(金)参加登録予約申込期間 2023
年 6 月 1 日(木)~7 月 18 日(火)

発表形式 口頭発表(全日 15 分間発表・5 分間質疑応答)およびポスター発表(原則 1 日目および 2 日
目)

※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。※現在のところ、現地開催を予定しています。

特別講演 満屋裕明博士(国立国際医療研究センター研究所)、松永幸大教授(東京大学)

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。

実行委員会 実行委員長:青木伸(東京理科大学)、副実行委員長:上田宏(東京工業大学) 実行委員:上野
隆史(東京工業大学)、藤本ゆかり(慶応義塾大学)、佐竹彰治(東京理科大学)

ニュースレター Vol. 37, No. 2 2022年12月15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：藤井 浩、藤本 ゆかり、山口 浩靖

