

社団法人 日本化学会
生体機能関連化学部会

NEWS LETTER

Division of Biofunctional Chemistry
The Chemical Society of Japan

Vol. 33, No.3 (2018. 12. 15)

目 次

◇ 巻 頭 言

大学教員に研究時間を 大槻 高史 2

◇ 研 究 紹 介

増殖因子ミメティクス核酸による細胞シグナル制御 植木 亮介 4

合成生物学的手法によって改変された”Designer Cells”による新規ドラッグデリバリープラットフォーム 小嶋 良輔 7

バイセルと溶液 NMR を組合せた手法で可能になるシトクロム *c* と脂質膜の相互作用の高分解能解析 長尾 聡 15

両親媒性ポリマーによる脂質ナノディスクの形成とアミロイドタンパク質解析への応用 安原 主馬 19

◇ 部 会 行 事

第 6 回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム開催報告 23

第 12 回バイオ関連化学シンポジウム開催報告 25

第 12 回バイオ関連化学シンポジウム講演賞 講評 26

大学教員に研究時間を

岡山大学大学院
ヘルスシステム統合科学研究科
大槻 高史

私の所属する岡山大学工学部化学生命系学科の卒業生へのアンケート結果で印象的なのは、在学中の授業科目のうち、最も満足度の高い科目は卒業研究（つまり4年生の時期）という結果である。専門性や教養を身につけるうえで最も役立ったのも、卒業研究であった。つまり、4年間の在学期間のうち、研究室に配属してからの期間は最重要なのである。教員にとっても研究室に配属した学生はとても大事な存在である。

問題に思うのは、その学生たちに接する時間が非常に限られていることである。自分の経験上では、なるべく研究室にいて細かいケアをした方が成果も出るし学生のやる気も保たれる。研究を始めて間もない学生には、できることなら教員が直接教える方がよい。しかし学生間の伝達に任せることが多くなってしまった。あまりしつこく付きまとうのは逆効果かもしれないが、時間がないのでその心配はない。理想的には、1週間のうち4日間くらいは、学生の世話も含めて研究に時間を使いたい。

現実には、かなり時間を奪われる学内の役職や委員が多数存在し、順番がきたら引き受けるしかない。周りには、会議と雑務ばかりの1週間を過ごす教員もいる。私も昨年度は学科長になって忙殺され、研究はおざなりになってしまった。今年はまだ余裕があるが、岡山大学が文科省から任された赴日本国留学生予備教育事業に関わり1ヶ月近い中国出張に行ったりした。こういう雑務中に面白い経験もあり悪いことばかりではないが、その間、研究は留守になり、世の中の研究はどんどん先に進んでしまう。

大学教員の研究時間の拡充ができれば、もう少し日本の研究力は上がるのではないかと少しどころではないかもしれない。研究は（時間に比例ではなく）加速的に進むこともあると思う。まとまった時間をかけて深く追求するからこそ答えに辿り着く研究もあるだろう。まとまった時間があればスピード重視の競争的課題にも参戦できる。

昔はもう少し時間があったように思う。初めて大学教員になったのは19年前の29歳のとき。最初の数年間は数名の学生の研究を見ながら自分でも実験する方式で、たまの講義・実習日を除けば、かな

り研究に集中できた。今とは職位が違うせいもあるが、研究の日々を過ごせた。当時は教員評価は無かったし、授業評価も無かったし、FD業務の存在も感じなかったし、受験生集めの行事も極めて少なかったし、化学物質管理も今ほど細くなかった。私の見た19年間だけでも様々な雑務が増えた。

大学教員にとって「研究」と「研究を通じて学生と向き合う教育」が最重要だと個人的には思う。学生側も研究室に入ってから教育が最重要と感じるようだ。ところが教員は、最も重要なことを最優先できない。講義・会議・出張・締切のある雑務／書き物などの方が優先である。そして、大学雑務は徐々に増える傾向のようである。これでは貴重な研究時間が無くなるので、やめてもよさそうな業務や会議を見つけてやめないとならない。たとえば教員評価はやめた方がいいような気がする。教員評価に基づく少々の給与の変化をエサに頑張らせようという狙いに反し、頑張るための時間を削る効果の方が大きい気がする。

大学の研究力を削ぐ要因のうち、全国的問題（研究予算、人員削減、学生の就職活動長期化など）は解決しづらいが、研究時間不足は学科や専攻レベルでも少しは対処が可能である。変えられる範囲については私も関与して研究時間の確保を図ろうと思う。全学的・全国的な対処は、それが可能な方々にお願い申し上げたい。

増殖因子ミメティクス核酸による細胞シグナル制御

東京大学大学院工学系研究科 植木 亮介

1. はじめに

増殖因子は、細胞の増殖・分化・遊走等の制御に関与するタンパク質であり、近年の再生医療分野において重要な役割を果たしている。例えば、幹細胞の分化誘導においては、生体内での分化シグナルを模倣するため、培地中に増殖因子を添加するプロトコルが広く浸透している¹。しかし、タンパク質である増殖因子はロット間の活性差や熱変性のリスクを抱えており、生物宿主を用いた生産を要する点も品質管理の観点から問題となる。これらの点を解決するため、タンパク質の改変や安定化を志向したアプローチが試みられている一方で、増殖因子と同様の活性を示す分子をペプチド/タンパク質以外の物質に基づいて構築するアプローチは根本的な解決策として有望である。本稿では、我々が進めている「増殖因子ミメティクス核酸」の開発について紹介したい。

2. DNA からなる増殖因子ミメティクス (*Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 579, 2016)

核酸アプタマーは SELEX 法 (*Systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) と呼ばれる進化工学的手法によって取得可能な一本鎖核酸であり、特定の高次構造を形成して標的分子を選択的に認識する²。核酸アプタマーは (1) 固相合成法による化学合成が可能、(2) 熱的に安定であり均一な活性を持つため、タンパク質の代替合成化合物として望ましい特性を持つと言える³。

本研究では、肝細胞分化や肝再生に関与することが知られる肝細胞増殖因子 (HGF) に着目し⁴、HGF の機能を再現する増殖因子ミメティクス核酸の開発を行った。増殖因子の機能を模倣する機能的核酸を開発するにあたり、増殖因子の作用機序に着目した。すなわち、細胞表面に発現する受容体に結合し、二量体形成を誘起することで、細胞内のシグナル伝達を誘導可能であると考えた (Figure 1a)⁵。この仮説は、HGF 受容体 (Met) に結合する核酸アプタマー⁶ に相補鎖を導入した際に、二本鎖形成依存的に Met の活性化が起こることで確かめられた (Figure 1b)。過去の研究例における HGF の部分断片、抗体、ペプチドを用いた検証例もこの結果と矛盾しない⁷。

HGF ミメティクスとしての最適化を行うべく、アプタマー間の一本鎖・二本鎖リンカーの長さを変化させて Met のリン酸化量を評価した結果、アプタマーをタンデムに連結した 100 塩基の DNA1 本鎖配列 (ss-0) が最も高い Met 活性化能力を示した (Figure 2a)。この配列は、約 1 nM という半数効果濃度を示し、受容体のリン酸化のみならず、細胞の増殖・遊走など HGF がもたらす細胞機能発現も誘起した (Figure 2b)。このような特性から、化学合成可能かつ熱安定性の高い HGF ミメティクスとしての応用が期待される。

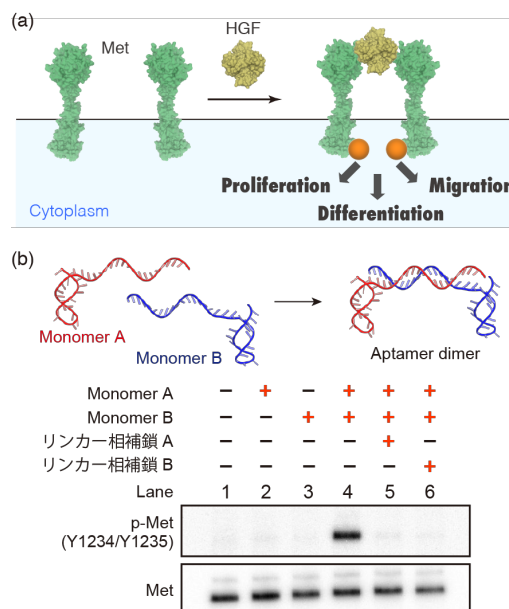


Figure 1 (a) HGF による Met の二量化を経る活性化機構 (b) ウェスタンブロットによるアプタマー単量体・二量体の Met 活性化能力評価

(Adapted with permission from Reference 5)

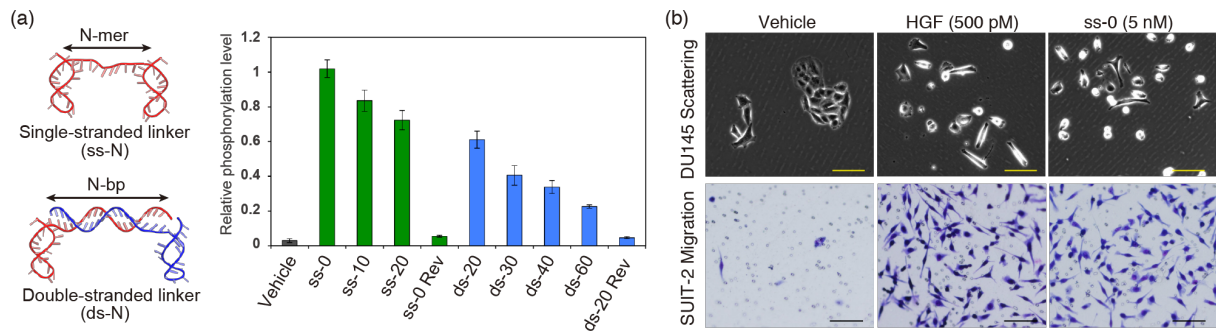


Figure 2 (a) ELISA 測定によるアプタマー二量体のリンカー最適化 (Rev は逆配列を示す) (b) DU145 細胞および SUI2 細胞の遊走試験 (Adapted with permission from Reference 5)

3. 受容体シグナルの非遺伝子工学的リプログラミング (*J. Am. Chem. Soc.* **139**, 6554. 2017)

増殖因子は増殖・分化などの多様な細胞機能の制御に関与するため、その作用は生体内において厳密に制御されている。例えば発生や創傷治癒などの過程においては、増殖因子の時空間的な発現パターンが存在することが知られている。そのため、増殖因子による作用を特定の環境下でのみ誘導可能な分子は、より精巧な増殖因子ミメティクスであると言える。

我々は、前述の研究における設計コンセプトを拡張し、任意の抗原に応じてアプタマーが受容体の二量化を誘導する DNA スイッチを開発した (Figure 3a) ⁸。この DNA スイッチは標的抗原に対するアプタマーと、増殖因子受容体に対するアプタマーを連結した「二重特異性アプタマー」である。抗原存在下で受容体の二量化を誘起させるためには、抗原認識において異なるエピートプを標的とするか、ホモダイマー分子を標的とすることが設計の重要なポイントである。この設計指針に基づき、創傷部位のバイオマーカーである血小板由来増殖因子 (PDGF) を標的とした DNA スイッチを構築した (Figure 3a)。Figure 3b に示すように、この実験で用いた細胞株は PDGF に対する応答性を示さないはずが、この DNA スイッチによって、創傷部位で見られる HGF/Met シグナルによる遊走挙動を示すよう細胞応答がリプログラムされている。

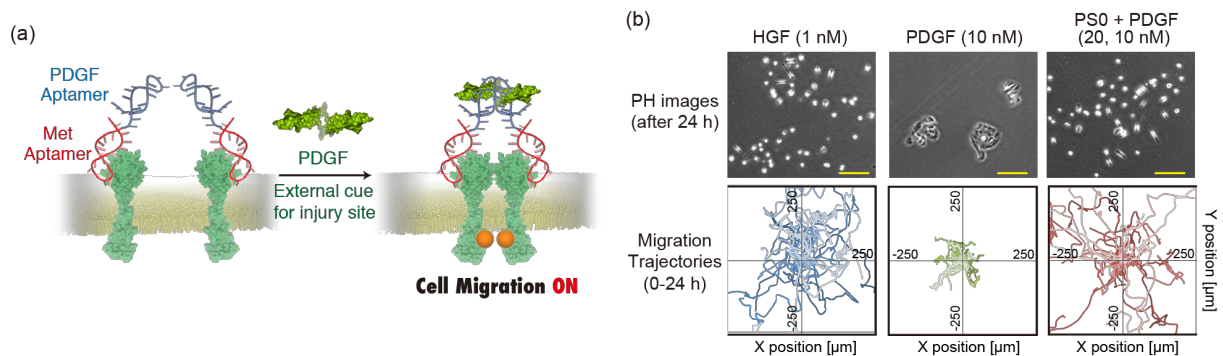


Figure 3 (a) PDGF 依存的な Met 活性化を誘導する DNA スイッチの設計 (b) PDGF 依存的な DU145 細胞の遊走 (Adapted with permission from Reference 8. Copyright 2018 American Chemical Society.)

このように受容体/リガンドの組み合わせを人為的に改変する試みは、疾病部位特異的に機能する細胞療法の開発に貢献する重要技術であり、既にキメラ抗原受容体 T 細胞 (CAR-T) に基づく免疫治療などへの応用がなされている⁹。本手法では遺伝子操作を一切行うことなく、対象となる細胞の受容体特異性を組み替えることに成功しており、多様な機能の発現を担う増殖因子シグナルを局所的に制御する新たな方法論となり得る。

4. おわりに

以上、本稿では核酸アプタマーを用いた増殖因子受容体シグナル制御に関する我々の研究について概説した。タンパク質の機能を模倣する分子を設計する上で、1) 進化工学による受容体認識リガンドの創出、2) 塩基対形成の特異性による論理的構造設計が可能といった観点から核酸という分子は非常に魅力的である。はじめに紹介した HGF ミメティクスの開発は受容体の二量化というシンプルかつ一般的なメカニズムに着目したものであるが、DNA の配列設計の容易さによって、より高度な機能発現のパターンを実現する DNA スイッチへの展開が可能となった。一方で、「どこまで増殖因子の機能を再現できているのか？」という疑問は残されており、この点は今後構造的・生化学的検証によって明らかにしていきたいと考えている。また、単に DNA を用いて天然タンパク質の機能を再現するのみならず、細胞に人為的な刺激・摂動を与える化学ツールとしての応用にも魅力も感じており、今後の研究の目指すべきところとしたい。

謝辞

はじめに、このたび大変貴重な執筆の機会を頂きました編集委員の皆様には感謝申し上げます。本研究は、私が所属する東京大学大学院工学研究科 山東研究室にて行われました。山東 信介教授をはじめとする研究室スタッフの皆様・研究に携わってくれた学生の皆様に感謝申し上げます。また、本研究の遂行には CREST (No. JPMJCR13L4)・若手 B (No. 17K14512) の助成を頂きました。この場をお借りして感謝申し上げます。

参考文献

- [1] N. S. Hwang, S. Varghese, J. Elisseeff, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 199–214.
- [2] (a) A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818–822; (b) C. Tuerk, L. Gold, *Science*, **1990**, *249*, 505–510.
- [3] J. Zhou, J. Rossi, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2017**, *16*, 181–202.
- [4] L. Trusolino, A. Bertotti, P. M. Comoglio, *Nat. Rev. Mol. Cell*, **2010**, *11*, 834–848.
- [5] R. Ueki, N. Kanda, A. Ueki, S. Sando, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 579–582.
- [6] (a) R. Ueki, S. Sando, *Chem. Commun.* **2014**, 13131–13134; (b) A. Boltz, B. Piater, L. Toleikis, R. Guenther, H. Kolmer, B. Hock, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 21896–21905.
- [7] (a) K. Ito, K. Sakai, Y. Suzuki, N. Ozawa, T. Hatta, T. Natsume, K. Matsumoto, H. Suga, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6373; (b) C. Simonneau, B. Leclercq, A. Mougel, E. Adriaenssens, C. Paquet, L. Raibaut, N. Ollivier, H. Drobecq, J. Marcoux, S. Cianfani, D. Tulasne, H. Jonge, O. Melnyk, J. Vicogne, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2110–2121; (c) W. D. Tolbert, J. Daugherty, C. Gao, Q. Xie, C. Miranti, E. Gherardi, G. Vande Woude, H. E. Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14592–14597; (d) M. Prat, T. Crepaldi, S. Pennacchietti, F. Bussolino, P. M. Comoglio, *J. Cell Sci.* **1998**, *111*, 237–247.
- [8] R. Ueki, S. Atsuta, A. Ueki, S. Sando, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 6554–6554.
- [9] (a) Z. Eshhar, T. Waks, G. Gross, D. G. Schindler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 720–724. (b) B. N. Armbruster, X. Li, M. H. Pausch, S. Herlitze, B. L. Roth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 5163–5168. (c) L. Morsut, K. T. Roybal, X. Xiong, R. M. Gordley, S. M. Coyle, M. Thomson, W. A. Lim, *Cell* **2016**, *164*, 780–791. (d) K. A. Schwarz, N. M. Daringer, T. B. Dolberg, J. N. Leonard, *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 202–209.

合成生物学的手法によって改変された”Designer Cells”による 新規ドラッグデリバリープラットフォーム

東京大学大学院医学系研究科・JST さきがけ 小嶋 良輔

はじめに

小分子医薬品や核酸医薬などの副作用を抑えつつ、効果を最大限に得るために、ナノパーティクルなどを用いたドラッグデリバリーシステムが注目を集めている。しかしながら、これまで開発されてきたシステムに関しては、その生体適合性が十分とは言えないものが多い。そこで、生体適合性が高い、細胞から分泌される微粒子であるエクソソームや、特定部位への遊走活性を持つ細胞そのものなどを、デリバリーのプラットフォームとして用いる試みも行われているが、薬剤の効率的な送達を行うための機能設計原理は未だ十分開発されていないのが現状である。

このような背景において、我々は、合成生物学的手法を用いて 1.多機能化された疾患治療用エクソソームを、生体内で効率的に分泌可能な Designer Cells 2. 特定の細胞接触を感知して、ターゲット細胞の内側に侵入し、自身の細胞質をすべて放出する Designer Cells を開発することに成功し、またこれらの細胞が、パーキンソン病やがんなどの治療に原理的に役立ち得ることを示した。本稿では、これら二つのシステムに関して、その詳細を報告する。

1. 多機能化された疾患治療用エクソソームを生体内で効率的に分泌可能な Designer Cells の開発 (Kojima et al, *Nat. Commun.* 2018, 9, 1305)

エクソソームは、細胞から分泌される直径 30-150 nm の小胞であり、様々な RNA やタンパク質を内包し、動物個体内において細胞間コミュニケーションを介在する重要な役割を担っていると考えられている^{1,3}。また、このような基礎生物学的な興味と同時に、生体適合性が高く血液脳関門を透過可能であるといった優れた特性から、ドラッグデリバリーのキャリアとして、応用利用の面からも注目を集めている^{4,5}。しかしながら、血中半減期が短く、繰り返しの静注が必要になる場面が多いと想定される他、特定の内容物を効率的にターゲットに届けるためのエクソソームの機能設計原理・効率的産生法が限られているため、エクソソームを用いた疾患治療は未だ黎明期にあるといえる。

本研究において、我々は 1. エクソソームの分泌を大幅に亢進するデバイス 2. エクソソーム内に特定の RNA を効率的にパッケージングするデバイス 3. エクソソーム内の RNA をターゲット内に効率的に送達するデバイス (図 1 a) の開発に成功し、これらを搭載した Designer exosome producer cells を、*in cellulo*, *in vivo* において、パーキンソン病で問題となる神経炎症の抑制に応用できる可能性を示した。

まず我々は、エクソソームの分泌を亢進する genetic device をスクリーニングするために、エクソソームのマーカーとして知られる CD63 に極めて明るルシフェラーゼとして知られる nanoluc を結合したコンストラクトを作製し、これとエクソソームの分泌に影響を与える可能性がある因子を同時に HEK-293T 細胞にトランスフェクションすることで、上清のルシフェラーゼ活性をモニターするだけでエクソソームの分泌量を簡便に定量できる系を構築した。本系を用いて、STEAP3, SDC4, NadB fragment を一つのプラスミドから発現するプラスミドベクター (以下 production booster) が、エクソソームの分

泌を数十倍増幅できることを見出した。

続いて、特定の RNA をパッケージングするためのデバイスを開発すべく、RNA 結合タンパク質である L7Ae と、これに結合する RNA モチーフである C/Dbox の相互作用^{6,7}に着目した。すなわち、CD63 に L7Ae を結合しておき、エクソソーム内に封入したい mRNA の 3'非翻訳領域に C/Dbox を導入しておくことで、L7Ae と C/Dbox の相互作用によって、特定の mRNA をエクソソームに積極的に封入できると考えた。また、エクソソームに封入した mRNA を効率的にターゲット細胞の細胞質に送達するために、Gap junction を介して細胞間コミュニケーションを増幅することで知られる Cx43 に着目し、この恒常活性型(Cx43 CA)⁸をエクソソーム上に発現することを考えた。Nanoluc の mRNA のデリバリーによって評価した結果、これらのデバイスは設計通りに働き、production booster、およびアセチルコリンレセプター(CHRNA7)を発現する細胞をターゲティングできることで知られる RVG-Lamp2b^{9,10}と共発現することによって、CHRNA7 を高発現する HEK-293T 細胞に対して数百倍の効率で mRNA を送達できることを見出した(図 1 a,b)。我々は、これら、production booster, mRNA パッケージングデバイス, Cx43 CA, ターゲティングシステム(RVG-Lamp2b)を総称して、EXOsomal transfer into cells (EXOtic) devices と命名し、今後の実験に用いた。

EXOtic devices によって改造された mRNA を効率的に送達するための designer cells が開発できたので、これを疾患治療に応用することを目指した。Proof of concept として、我々は、パーキンソン病において問題となる神経炎症を catalase mRNA の送達によって抑制することを試みた。パーキンソン病様の病態を引き起こす化合物として知られる 6-OHDA は活性酸素種を介して神経細胞を障害することが知られているが、catalase はこれを抑制できることが知られてい^{11,12}。我々は、開発した designer cells に catalase mRNA を内包する mRNA を送達させることで、6-OHDA によって引き起こされる神経細胞死が抑制できるか検討した。結果、エクソソームによる catalase mRNA の送達は、神経細胞を顕著に保護する作用を示した。

In cellulo で治療効果が見られたので、in vivo での治療に応用可能か検討した(図 1 c)。まず、nanoluc mRNA を内包するエクソソームを分泌する EXOtic devices で改変された designer cells をマウスの皮下に埋め込み、一定時間後に、ターゲットの脳内の nanoluc の活性を測定することで、マウス体内に埋め込まれた designer cells からエクソソームを介して脳内に mRNA を送達できることを確認した。続いて、6-OHDA を脳内に直接注入してパーキンソン病のモデルマウスを作成する際に、catalase mRNA を内包するエクソソームを送達する designer cells を埋め込んでおくことで、脳内で発生する炎症を抑制できるか検討した。結果、designer cells の体内埋め込みにより、脳内の炎症を抑制できることが確かめられ(図 1d)、本システムの治療への応用可能性が示された。我々は、エクソソームを分泌する designer cells を、ホストの免疫から隔離するためのマクロインプラン¹³に封入しても同様の mRNA delivery のシステムが機能することも確認しているため、このような in situ で治療用のエクソソームを放出可能にするシステムは、血中半減期が短いエクソソームを長期間安定してデリバリーするためのプラットフォームとして有用かもしれない。

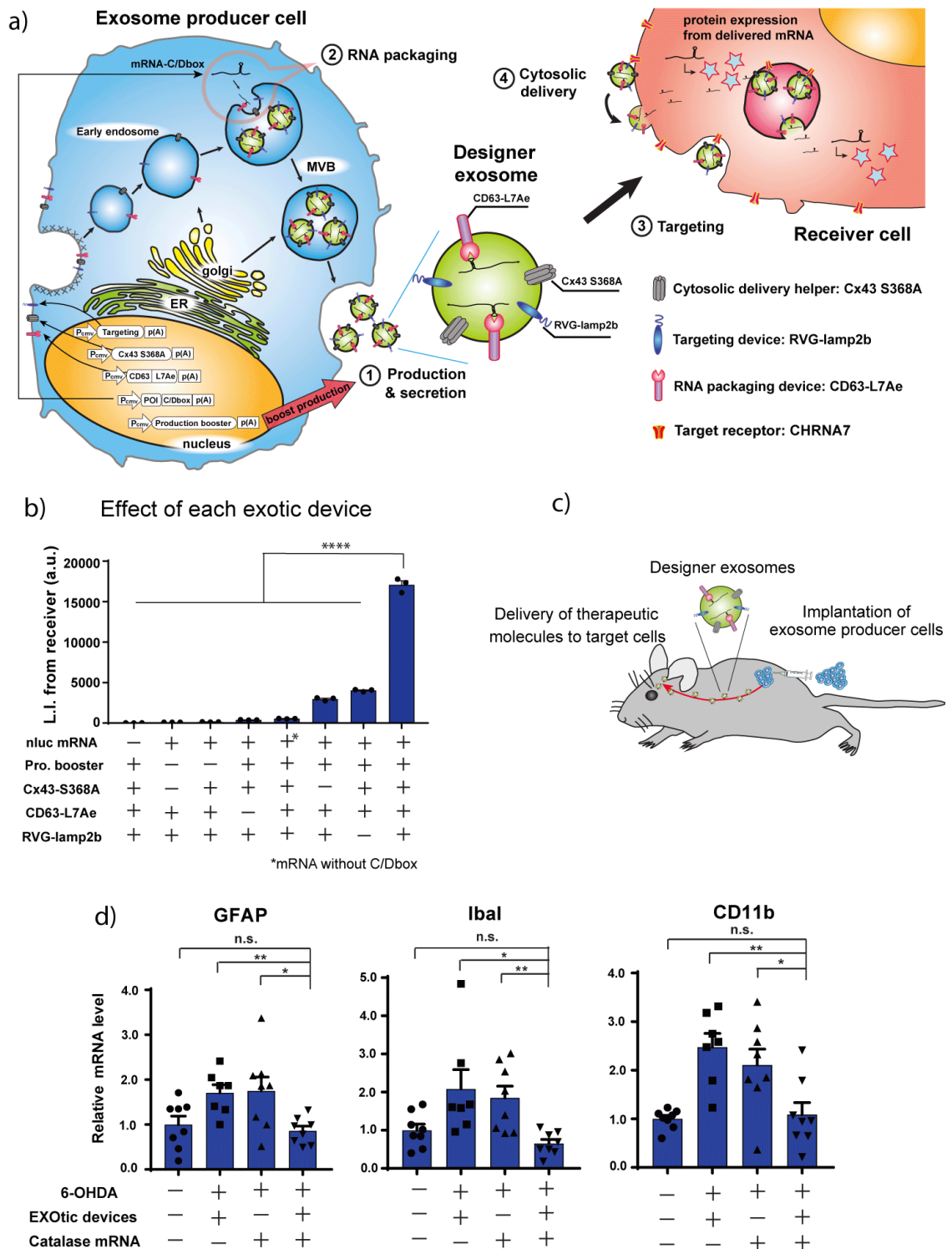


図 1: EXOTIC devices の概略とその応用 a) EXOTIC devices の概略。エクソソーム産生細胞からターゲット細胞の細胞質に mRNA が送達されるまでの過程を、1.生産と分泌 2. RNA のパッケージング 3. ターゲティング 4. ターゲット細胞の細胞質へのリリース のステップに分けて考え、それぞれのステップを増幅するデバイスを開発した。b)各デバイスの効果のアッセイ。グラフは、エクソソーム産生細胞に各デバイスを導入し、nanoluc mRNA をターゲット細胞に送達した際に、ターゲット細胞から観測される発光値。EXOTIC devices の協奏的な利用によって、mRNA の送達が大幅に促進されていることがわ

かる。c) Designer exosome producer cells を用いた in vivo での疾患治療のコンセプト。細胞を生きた動物個体内に埋め込むことで、in situ でエクソソームを産生し、ターゲットに疾患治療用の mRNA を送達する。本研究では、calatase の mRNA delivery によって、脳内に 6-OHDA を投与したときの神経炎症を抑えられるか検討した。d) In vivo Catalase mRNA delivery が神経炎症に与える効果の検証。各 device を発現する exosome producer cell をマウスに埋め込んだ後に、6-OHDA を脳内に投与、6 日後に全脳から RNA を抽出して、神経炎症のマーカーを qPCR で定量した。(エラーバー: ±SEM, n=3~8)(*Nat. Commun.* 2018, 9, 1305 より転載, 改変(CC BY 4.0))

2. 特定の細胞接触を感知して、ターゲット細胞の内側に侵入し、自身の細胞質をすべて放出する” Synthetic Invader Cells”の開発 (Kojima and Fussenegger, *Adv. Sci.* 2018, 5, 1700971)

我々は、エクソソームのような小さなベシクルだけでなく、細胞自身をデリバリーベシクルとして使用することを可能にするような細胞機能のデザインも試みた。

自然界では、生きた細胞が、別の生きた細胞に特定の条件下で積極的に invasion し、cell-in-cell 構造を形成することがあることが知られている(ectopic, emperipolesis)¹⁴が、この invasion を、ターゲット選択的に、人為的に引き起こすことができれば、細胞自身をデリバリーベシクルのような形で使うことができると考えられる。我々は、ectopic が起きる際に観察される、invader 側で起きる RhoA 活性の polarization (細胞接触面で RhoA の活性が低下し、反対側で RhoA の活性が上昇する)^{15,16}を、特定の細胞接触に伴って人為的に引き起こすことができれば、これが十分条件となって cell invasion を引き起こすことができるのではないかと仮説を立てた。ここで、どのようにすればこのような RhoA の polarization を人為的に引き起こすことができるかが鍵となる。

我々は、大きな細胞外ドメインを持つタンパク質である CD45 や CD43 が、細胞が特定の抗原抗体反応を介して別の細胞と接着した際に、その接触面から物理的な力によって隔離されること¹⁷に着目した。すなわち、CD43 の細胞内ドメインを恒常活性型の RhoA (RhoA_{CA})と挿げ替え、また、ターゲット抗原を認識する一本鎖抗体を細胞膜に提示するキメラ膜タンパク質の細胞内ドメインに、ドミナントネガティブ RhoA(RhoA_{DN})を結合しておくことで、ectopic が起きる際に観察される RhoA 活性の polarization と同様の polarization を、特定の細胞接触に伴って人為的に引き起こすことができるのではないかと考えた(図 2a)。

まず我々は、モデルターゲット細胞として多くの乳がんが高発現することが知られる HER2 を高発現する HEK-293 細胞を用意し(HEK-HER2)、モデル非ターゲット細胞として、iRFP (infrared fluorescent protein) を発現する HEK-293 細胞である HEK-iRFP 細胞を用意した。一方、CD43 の細胞内ドメインを YFP(yellow fluorescent protein)に挿げ替えたタンパク質と、HER2 に結合する一本鎖抗体である ML39 を細胞膜上に提示するキメラ膜タンパク質の細胞内ドメインに CFP(cyan fluorescent protein)を結合したものを用意し、これをセンサーの HEK-293 細胞に発現した。蛍光イメージングにより、ターゲットとの細胞接触によってのみ、望んだパターン膜タンパク質の局在を引き起こせることを確認した。

つづいて、YFP と CFP をそれぞれ RhoA_{CA} と RhoA_{DN} に置換したものを HEK-293 細胞 (センサー細胞) に発現し、ターゲット、および非ターゲット細胞と混合して観察したところ、センサー細胞がターゲット細胞にのみ高い効率で侵入することが明らかとなり、ターゲット選択的な synthetic cell invasion を引き起こすことに成功した(以後、センサー細胞を invader と呼ぶ)(図 2b)。これは、RhoA の polarization が (少なくとも invader 側の条件としては) invasion を引き起こすのに十分であることを示

唆する。この invasion は、少なくとも改変した HEK-293T 細胞をターゲットの HEK-HER2 細胞に invade させるという系においては効率的に起きる現象であり、invader 細胞がターゲットに接触しさえすれば、8 割以上の確立で invasion が起きていることが示唆された。また、同様の設計原理を用いて、がんに遊走する活性を持つ MSC の不死化株に invader 活性を持たせることも可能であった。

細胞をデリバリー用のベシクルとして用いる可能性を鑑みると、invader 細胞の細胞質をターゲット細胞の細胞質に放出することができれば面白い。しかしながら、invasion を起こした細胞を長時間観察すると、invader は 1 日以内にターゲット細胞内で死んでしまう場合が多く、invader の細胞質がターゲット細胞の細胞質内に直接送達されることはなかった。Entosis など、自然界で起きる invasion の後には、通常 invade された細胞がリソソームの融合により、侵入してきた細胞を殺傷することが知られている¹⁸ため、invasion 後、invader 細胞の周りが酸性になることが予想された。そこで、我々は、酸性環境下で細胞膜を融合する効果があることで知られる VSV-G¹⁹を invader 細胞に発現した。結果、invader 細胞の細胞質は、invasion 後にターゲット細胞の細胞質と完全に融合し、蛍光タンパク質や、転写因子などの機能性タンパク質を送達することが可能になった(図 2c)。

融合した細胞は 1 週間~10 日程度生存するが、ほとんど増殖しないことが明らかになったので、これを特定の細胞を殺す selective cell ablation の系に応用することを試みた。

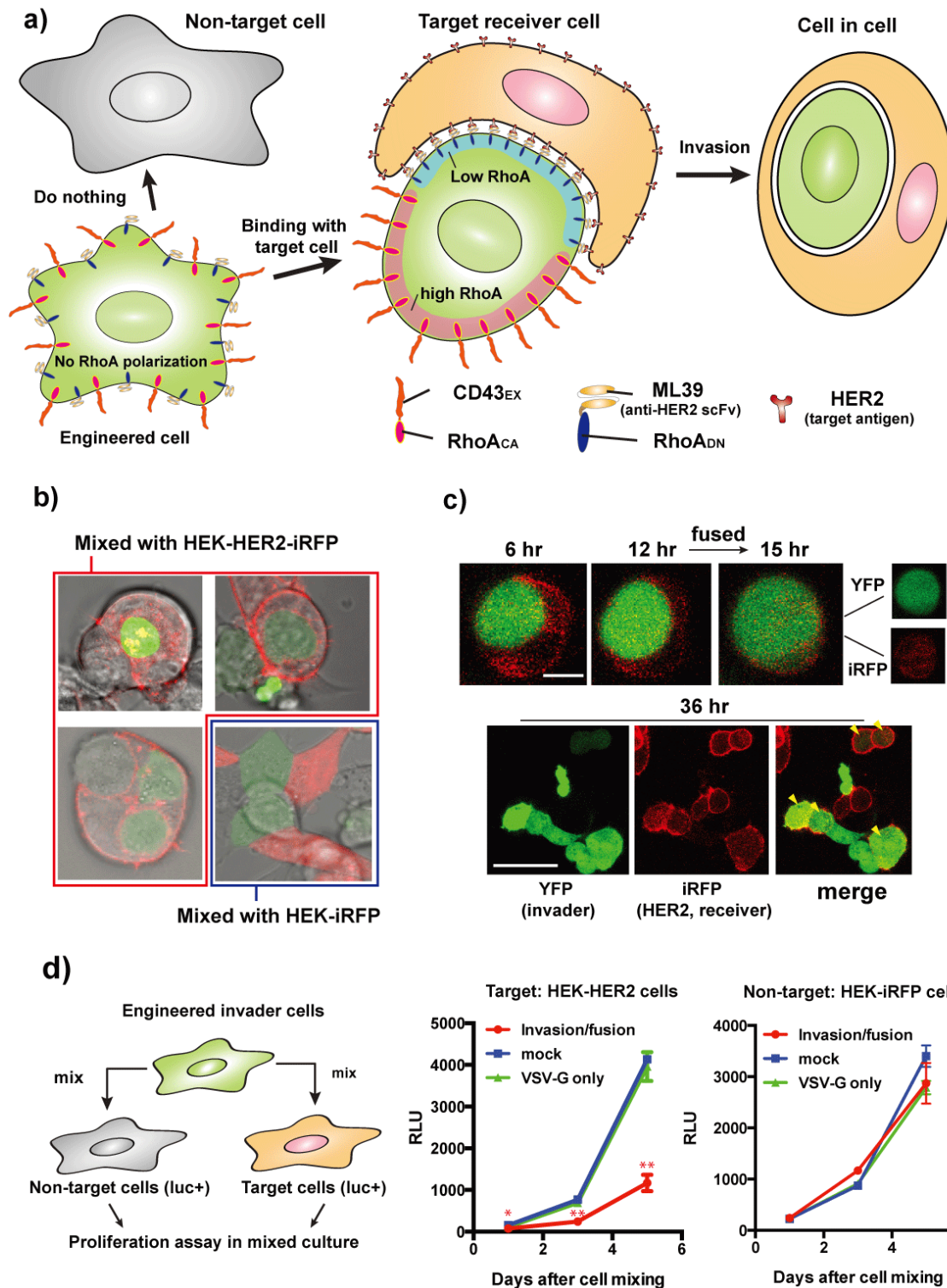


図 2: Target-specific synthetic cell invasion system. a) システムの概略。ターゲットとの細胞接触によって CD43ex- RhoA_{CA} は細胞接触面から隔離される一方で、ターゲット抗原を認識するレセプター ML39- RhoA_{DN} は細胞接触面に集積する。これにより、RhoA 活性の polarization が生じる。これが十分条件となり、インベーターはターゲット内に侵入する。b) インベーター細胞 (緑) がターゲット細胞 (赤、右下以外) に侵入した様子。非ターゲット (右下) には侵入しない。c) インベーター細胞に VSV-G を発現させておいた時の cell-fusion の様子。黄色の矢尻は、fuse した細胞を指す。d) Cell-ablation への応

用。ルシフェラーゼを発現するターゲット (HEK-HER2)、もしくは非ターゲット細胞(HEK-iRFP)とインベーター細胞を混合して、生物発光によってターゲット、および非ターゲット細胞の増殖をモニタリングした。ターゲットに、VSV-Gを発現するインベーターを作用させた時のみ、細胞増殖が抑制されていることがわかる。(エラーバー: \pm SEM, n=3) (*Adv. Sci.* 2018, 5, 1700971 より転載, 改変(CC BY 4.0))

VSV-Gを装備した invader 細胞と、ホタルルシフェラーゼを発現するターゲット細胞(HEK-HER2-luc)もしくは非ターゲット細胞(HEK-iRFP-luc)を混合して、それぞれの細胞の生存率を生物発光によって追跡したところ、ターゲット細胞の増殖のみが選択的に抑制されることがわかった(図 2d)。これは、開発した invader 細胞を、がん細胞などのターゲット細胞を選択的に殺傷する目的で利用できる可能性を示している。融合した細胞が正常に増殖しない、ということは、デリバリーという観点からみると好ましくはないが、これは同一の細胞内に核が2つ存在する、という異常事態が起きてしまっていることが原因である可能性がある。脱核した細胞などを invader として用いれば、デリバリー目的でも有用な細胞になるかもしれない。

おわりに

このように、我々は、合成生物学的手法によって改変した”designer cells”を用いて、細胞から分泌される小胞であるエクソソームや、細胞自身を新しいデリバリーシステムのプラットフォームとして利用できる可能性を示した。エクソソームに関しては、狙ったところにターゲティングするための技術がまだまだ未熟であり、今後利用可能なターゲティングシステムが拡張されていけば、様々な小分子や核酸医薬などをデリバリーするための有用なプラットフォームになるかもしれない。細胞自体をデリバリーのモダリティーとして使用する試みに関しては、作製された細胞の安定性・均一性の確保などに課題が残り、また *in vivo* で細胞がどのようにふるまうかまだ予想できない、という課題はある。しかしながら、細胞自身がかもともと持つ遊走活性などを治療に用いることができるかもしれない、という点において他のデリバリーシステムにはないメリットが存在する。こちらのモダリティーも、今後さらに研究が進展していくことで、新しいドラッグデリバリーのプラットフォームとして実際の治療に役に立つ時がくるかもしれない。

謝辞

本研究は、著者が ETH Zurich, Department of Biosystems Science and Engineering に留学中に行ったものであり、研究室の主催者である Martin Fussenegger 教授に感謝したい。また、著者は、Human Frontier Science Program (HFSP)の Long-term fellowship によってサポートされ、ETH での研究生生活を送った。この場を借りて深謝したい。

参考文献

1. Alenquer, M. & Amorim, M.J. Exosome Biogenesis, Regulation, and Function in Viral Infection. *Viruses* 7, 5066-5083 (2015).
2. Milane, L., Singh, A., Mattheolabakis, G., Suresh, M. & Amiji, M.M. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *J. Control Release* 219, 278-294 (2015).
3. Robbins, P.D. & Morelli, A.E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 195-208 (2014).

4. Ha, D., Yang, N.N. & Nadithe, V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm. Sin B* 6, 287-296 (2016).
5. Tan, A., Rajadas, J. & Seifalian, A.M. Exosomes as nano-theranostic delivery platforms for gene therapy. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 65, 357-367 (2013).
6. Auslander, S., Auslander, D., Muller, M., Wieland, M. & Fussenegger, M. Programmable single-cell mammalian biocomputers. *Nature* 487, 123-127 (2012).
7. Saito, H. et al. Synthetic translational regulation by an L7Ae-kink-turn RNP switch. *Nat. Chem. Biol.* 6, 71-78 (2010).
8. Soares, A.R. et al. Gap junctional protein Cx43 is involved in the communication between extracellular vesicles and mammalian cells. *Sci. Rep.* 5, 13243 (2015).
9. Alvarez-Erviti, L. et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* 29, 341-345 (2011).
10. Hung, M.E. & Leonard, J.N. Stabilization of exosome-targeting peptides via engineered glycosylation. *J. Biol. Chem.* 290, 8166-8172 (2015).
11. Haney, M.J. et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *J. Controlled Release* 207, 18-30 (2015).
12. Saito, Y. et al. Molecular mechanisms of 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in PC12 cells: involvement of hydrogen peroxide-dependent and -independent action. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 675-685 (2007).
13. Lathuiliere, A., Cosson, S., Lutolf, M.P., Schneider, B.L. & Aebischer, P. A high-capacity cell macroencapsulation system supporting the long-term survival of genetically engineered allogeneic cells. *Biomaterials* 35, 779-791 (2014).
14. Overholtzer, M. et al. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell* 131, 966-979 (2007).
15. Purvanov, V., Holst, M., Khan, J., Baarlink, C. & Grosse, R. G-protein-coupled receptor signaling and polarized actin dynamics drive cell-in-cell invasion. *eLife* 3, e02786 (2014).
16. Sun, Q., Cibas, E.S., Huang, H., Hodgson, L. & Overholtzer, M. Induction of entosis by epithelial cadherin expression. *Cell Res.* 24, 1288-1298 (2014).
17. James, J.R. & Vale, R.D. Biophysical mechanism of T-cell receptor triggering in a reconstituted system. *Nature* 487, 64-69 (2012).
18. Krishna, S. & Overholtzer, M. Mechanisms and consequences of entosis. Cellular and molecular life sciences. *Cell Mol. Life Sci.* 73, 2379-2386 (2016).
19. Nagaraj, S., Mills, E., Wong, S.S.C. & Truong, K. Programming Membrane Fusion and Subsequent Apoptosis into Mammalian Cells. *ACS Synth. Biol.* 2, 173-179 (2013).

バイセルと溶液 NMR を組合せた手法で可能になる シトクロム *c* と脂質膜の相互作用の高分解能解析

奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学領域 長尾 聡

1. はじめに

生物の多くは呼吸により空気中から取込んだ酸素を細胞内器官のミトコンドリアで消費し、生命活動のエネルギー源であるアデノシン三リン酸を合成している。シトクロム *c* は細胞呼吸を担う呼吸鎖タンパク質の一員であり、ミトコンドリアの脂質内膜に含まれるカルジオリピン (CL) という負電荷リン脂質に結合し、呼吸鎖タンパク質間の電子輸送をしている¹。一方で、シトクロム *c* は CL と強く結合すると部分変性し、CL を酸化して膜空間からサイトゾルへと移行し、アポトーシスを促進することが明らかになっている²。シトクロム *c* のような表在性膜タンパク質は、膜との結合および膜からの解離が機能に重要であるため、X 線結晶構造解析に代表される静的な高分解能構造解析ではその機能の全容解明は困難である。また、溶液中におけるシトクロム *c* の脂質膜相互作用部位はこれまでアミノ酸変異導入や化学修飾などにより様々な部位が提唱されてきたが、いずれの方法もシトクロム *c* の構造や分子表面に摂動を与える、空間分解能に乏しい、個々の実験条件が大きく異なり比較が困難、などの問題から明らかになっていなかった。

溶液 NMR は水溶液中での分子の動的な挙動を高い空間分解能で調べることができる測定手法であるが、観測対象の分子が大きくなるにつれてシグナルが著しくブロードニングし、シグナルの縮重によって解析が困難になるのが問題である。脂質膜のモデルとして一般的に用いられるベシクルは数十万の高分子量であり、一方で微小なミセルは結合するタンパク質を変性させることが知られている。そこで、筆者は脂質二重膜構造を有し、かつ溶液 NMR で解析可能なサイズまで小さくできるバイセルを用いて、溶液 NMR によりシトクロム *c* と脂質膜の動的な結合挙動を高分解能で解析することを考えた。本稿では、シトクロム *c* の CL 含有バイセル相互作用部位のアミノ酸残基レベルでの特定と、シトクロム *c* と負電荷リン脂質バイセルの結合様式の解析結果について述べる。

2. 溶液 NMR によるシトクロム *c* のカルジオリピン含有バイセル相互作用部位の解析

CL 含有バイセルは、短鎖脂質として DHPC (1,2-Dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)、長鎖脂質として DMPC (1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) および CL (Bovine heart cardiolipin) を用い、それらをクロロホルム中で混合し、溶媒をエバポレーターで除去した後、脂質混合物を HEPES 緩衝液 (pH 6.8) に溶解させて作製した。長鎖脂質である DMPC と CL の比は 9:1 となるようにし、短鎖脂質に対する長鎖脂質のモル比 q を 0.5、0.75、1 に増加させるとバイセル径の増加が見られた (Figure 1)。次に、CL 含有バイセルを ¹⁵N ラベル化シトクロム *c* に添加し、¹H-¹⁵N HSQC スペクトル測定を行い、各アミノ酸残基の主鎖アミドプロトンの化学シフト摂動 (CSP) 解析を行った (Figure 2)。シトクロム *c* に添加したバイセルのサイズが大きい場合に、特定のアミノ酸残基の CSP が大きく観測さ

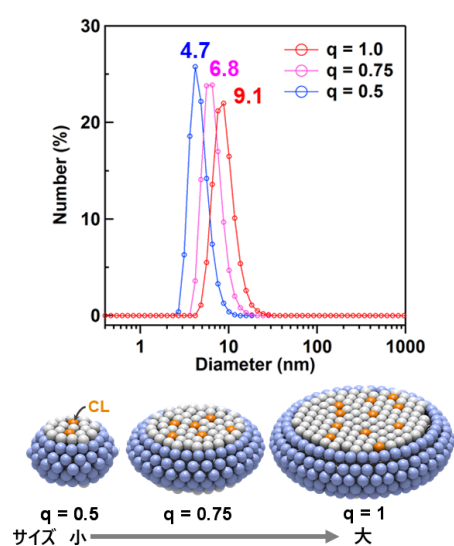


Figure 1. CL 含有バイセルの動的散乱測定結果と模式図。模式図中では各脂質を球で示した(青:DHPC、白:DMPC、橙:CL)。

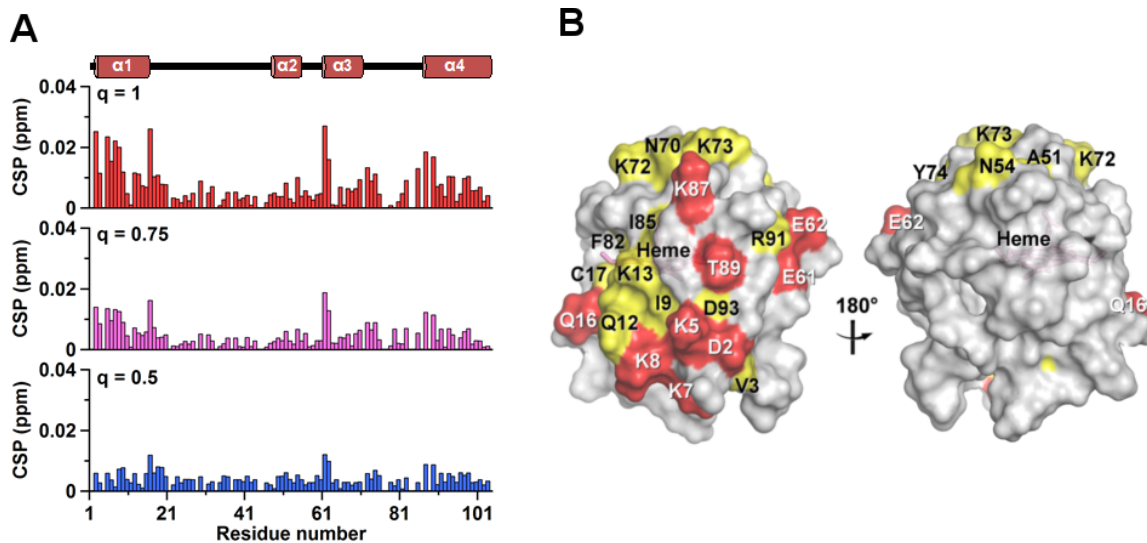


Figure 2. (A) CL 含有バイセルを添加したシトクロム *c* において観測された CSP。横軸は残基番号。グラフ上部の図はシトクロム *c* の二次構造の模式図。(B) シトクロム *c* の立体構造にマッピングした $q = 1$ のバイセル添加時の CSP。黄色は中程度、赤色は大きな CSP が観測されたアミノ酸残基。

れた(Figure 2A)。また、シトクロム *c* が N 末端から数えて 5、7、8、13、72、73、87 番目のリシン残基 (Lys5、Lys7、Lys8、Lys13、Lys72、Lys73、Lys87) を含む広い分子表面でカルジオリピンと相互作用していた(Figure 2B)。さらに、Lys8 と Lys72 をそれぞれ欠損させた変異型シトクロム *c* では、CL との結合が弱いことも明らかとなった。以上より、CL が脂質膜に含まれる分子数が多い場合にシトクロム *c* と脂質膜の結合が強くなり、この結合には複数のリシン残基が協同的に関わっていることが明らかとなった。本研究で明らかにしたシトクロム *c* の CL 相互作用部位を、呼吸鎖タンパク質である複合体 III および複合体 IV との相互作用部位と比較すると類似していたことから、シトクロム *c* はミトコンドリア内において特定の分子表面で膜と結合して膜近傍に局在しており、同じ相互作用面で呼吸鎖タンパク質間の電子輸送を行っていると考えられる(Figure 3)³。

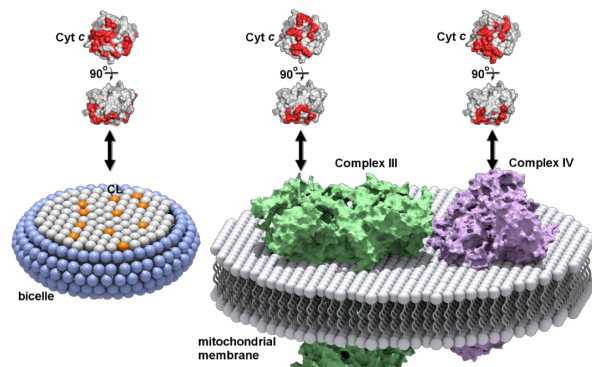


Figure 3. シトクロム *c* の CL、複合体 III および IV 相互作用部位。赤で示した部位が相互作用に関わるアミノ酸残基。

3. シトクロム *c* の負電荷リン脂質バイセル結合状態の溶液 NMR 解析

CL 含有バイセルとの結合では、シトクロム *c* は比較的小さな CSP を示したことから天然様の構造を有しており、CL 酸化を生じる部分変性構造はとっていないと考えられる。そこで、シトクロム *c* と相互作用する脂質膜中の負電荷リン脂質を増やすために、CL のモデル脂質分子として用いられる DMPG (1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphorylglycerol) を DHPC と混合し、 $q = 0.5$ 、1、2 の DMPG バイセルを作製した。動的光散乱測定では、DMPG バイセルの流体力学的直径は $q = 0.5$ のとき 3.5 nm、 $q = 1$ のとき 4.7 nm、 $q = 2$ のとき 8.8 nm だった。吸収および円二色性スペクトル測定により、 $q = 0.5$ の DMPG バイセルを添加したシトクロム *c* は CL 含有バイセル添加時と同様に天然様の構造をとっており、 $q = 1$ および 2 の DMPG バイセルを添加した場合は、ヘリックスが一部ほどけた部分変性状態をとることが示唆された。

次に、DMPG バイセルを ¹⁵N ラベル化シトクロム *c* に添加し、¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定した。

q = 0.5 の DMPG バイセルを添加したシトクロム *c* の CSP 解析より、脂質膜との相互作用に関わるシトクロム *c* のアミノ酸残基は、q = 0.5 の DMPG バイセルと CL 含有バイセルで類似していることが明らかとなった(Figure 4A)。一方、q = 1 および 2 の DMPG バイセルを添加したシトクロム *c* では、q = 0.5 のバイセル添加時には観測されなかった HSQC シグナルが新たに 21 本観測された(Figure 4B)。これらの 21 本のシグナルはすべて 8 ppm 付近の狭い領域に観測されたことから、シトクロム *c* は部分変性した状態にあることが示唆された。また、q = 2 の DMPG

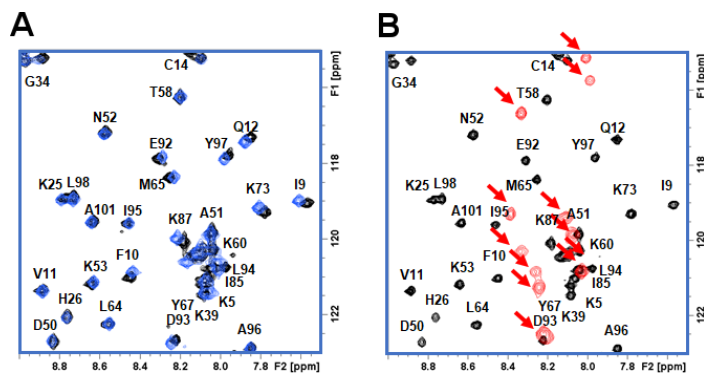


Figure 4. シトクロム *c* の HSQC スペクトル(一部領域を拡大)。(A) q = 0.5 の DMPG バイセル添加時(青)とシトクロム *c* のみ(黒)のスペクトル。(B) q = 2 の DMPG バイセル添加時(赤)とシトクロム *c* のみ(黒)のスペクトル。赤い矢印は部分変性状態に由来するアミノ酸残基のシグナル。

バイセルと結合して部分変性状態にあるシトクロム *c* に対し、q = 0.5 になるように DHPC を添加すると、シトクロム *c* は天然様構造へと変化したことから、天然様構造と部分変性構造の間に可逆性があり、その変化が膜サイズ依存的事であることが示された。次に、部分変性状態にあるシトクロム *c* の構造を調べるため、21 本のシグナルの帰属を行った。一般に、変性状態にあるタンパク質の NMR シグナルの帰属は困難であるため、本研究では、選択的アミノ酸 ¹⁵N ラベル化したシトクロム *c* を作製し、21 本の HSQC シグナルをアミノ酸の種類毎に分けて帰属する方法をとった。シトクロム *c* の部分変性領域のアミノ酸が連続しているという仮定のもと、観測された各アミノ酸の数から変性領域を推定すると、Lys39 から Lys60 の領域のみが帰属結果と矛盾しなかった。以上の結果より、シトクロム *c* は相互作用する負電荷リン脂質が少ない場合には天然様構造、多い場合には Lys39–Lys60 が部分変性した構造をとり、その機能を膜構造によって可逆的に変換していることが明らかとなった。

4. おわりに

以上、バイセルと溶液 NMR を組合わせて可能になるシトクロム *c* と脂質膜の相互作用の高分解能解析について報告した。溶液 NMR は動的な膜結合状態をとる表在性膜タンパク質の解析と相性が良く、本手法を用いることで、シトクロム *c* 以外の表在性膜タンパク質についても膜構造によって変化する構造や機能を調べられるようになると考えられる。また、観測対象となる表在性膜タンパク質の分子量の上限は近年のアミノ酸同位体ラベル化技術やパルスプログラム開発により大きく引き上げられると予想される。現在、申請者は本手法のさらなる発展を目指し、バイセルに再構成した内在性膜タンパク質と任意のタンパク質の溶液 NMR による高分解能相互作用解析に向けて取り組んでいる。

謝辞

本研究は、私の所属している奈良先端大物質、廣田俊教授の研究室で行われました。廣田教授ならびに、博士課程の間ずっと本研究に携わってくれた小林紀君に感謝申し上げます。NMR スペクトル測定では大阪大学蛋白質研究所の藤原敏道教授、宮ノ入洋平准教授、新家粧子博士、横浜国立大学大学院工学研究院の児嶋長次郎教授、ならびにミシガン大学化学科の Ayyalusamy Ramamoorthy 教授にお世話になりました。また、バイセルの実験では本学バイオメティック分子科学研究室の安原主馬准教授に大変お世話になりました。皆様に深く感謝致します。本研究は大阪大学蛋白質研究所超高磁場 NMR 共同利用研究課題の成果であり、本研究の一部は日本学術振興会科学研究費若手研究 B の助成に

より実施されました。

参考文献

- [1] (a) S. J. Singer, *Annu. Rev. Biochem.* **1974**, *43*, 805–833; (b) B. E. Ramirez, B. G. Malmström, J. R. Winkler, H. B. Gray, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 11949–11951; (c) H. Witt, F. Malatesta, F. Nicoletti, M. Brunori, B. Ludwig, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *251*, 367–373.
- [2] (a) M. Rytömaa, P. K. Kinnunen, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 1770–1774; (b) M. Rytömaa, P. K. Kinnunen, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 3197–3202; (c) V. E. Kagan, V. A. Tyurin, J. Jiang, Y. Y. Tyurina, V. B. Ritov, A. A. Amoscato, A. N. Osipov, N. A. Belikova, A. A. Kapralov, V. Kini, I. I. Vlasova, Q. Zhao, M. Zou, P. Di, D. A. Svistunenko, I. V. Kurnikov, G. G. Borisenko, *Nat. Chem. Biol.*, **2005**, *1*, 223–232.
- [3] H. Kobayashi, S. Nagao, S. Hirota, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, *55*, 14019–14022.
- [4] K. I. Tong, M. Yamamoto, T. Tanaka, *J. Biomol. NMR*, **2008**, *42*, 59–67.

両親媒性ポリマーによる脂質ナノディスクの形成と アミロイドタンパク質解析への応用

奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学領域 安原 主馬

1. はじめに

生体膜は、細胞や細胞内小器官を形づくる単なる隔壁としてのみならず、エネルギー変換や物質輸送、情報伝達といった「生きる」ために不可欠な多くの細胞機能を担っている。これら生体膜が果たす細胞機能は、脂質膜と膜タンパク質が協働することによって実現している。また、近年では、創薬ターゲットとしても膜タンパク質は注目を集めており、新たに開発される薬剤の半数強が膜タンパク質を作用対象としている。膜タンパク質は、ヒトゲノムの約3割を占めるが、そのうち構造が明らかになっているものはPDB登録全タンパク質中のわずか3%程度にすぎない。これは、膜タンパク質が脂質膜環境中においてのみその高次構造を維持でき、水溶液中では不安定なためである。これまで、膜タンパク質の水溶化においては界面活性剤ミセルが広く用いられてきたが、用いる界面活性剤の種類によって膜タンパク質の変性と失活を招くため、対象となる膜タンパク質が極めて限定されていた[1]。近年では、MSPナノディスクと呼ばれるタンパク質-脂質複合体を用いた膜タンパク質の解析が注目を集めているが、その形成過程において界面活性剤の使用が不可避け複雑な手順が必要である[2]。

我々はこれまでに、より汎用的に用いることのできる膜タンパク質の再構成マトリックスをめざして、脂質二分子膜構造を保持した様々なナノディスク材料の開発に取り組んできた。例えば、疎水鎖長の異なる混合脂質によって形成されるバイセルをテンプレートとして、表面に分子間架橋されたシロキサン骨格を導入することで、飛躍的に構造安定性が向上した有機-無機ハイブリッドナノディスクを開発した[3]。近年では、より生体膜に近い環境を再現できる脂質ナノディスクの形成手法に関する研究を進めている。本稿では、脂質二分子膜の直接断片化によって自発的にナノディスクを形成する新しい両親媒性ポリマーのデザインおよび脂質ナノディスクを用いたアミロイドタンパク質の評価について紹介する(Figure 1) [4]。

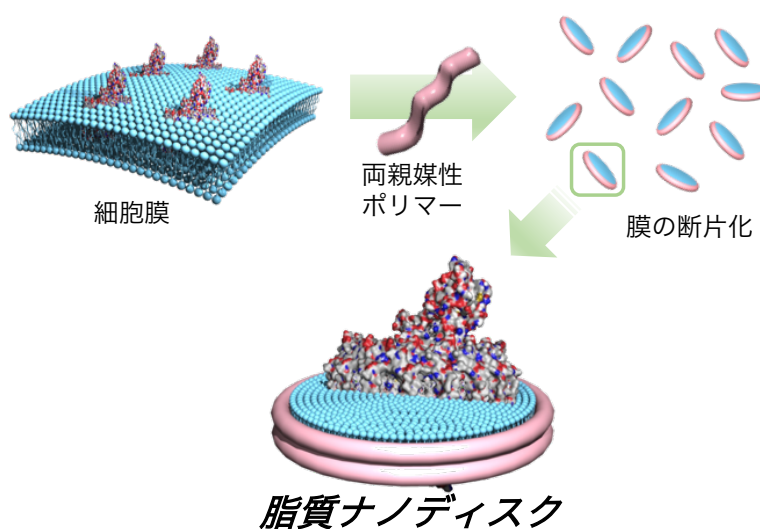


Figure 1. 両親媒性ポリマーによる脂質ナノディスクの自発形成

2. 脂質膜からナノディスクを自発形成する両親媒性ポリマー

細胞膜からナノディスクを自発形成するポリマーを設計するにあたって、天然に存在するアポリポタンパク質 A-I (Apo A-I) の構造にヒントを得た。Apo A-I は、体内でのコレステロール輸送を担う高比重リポタンパク質 (HDL) を構成するタンパク質であり、脂質と複合化することでディスク状の分子集合体を形成することが知られている。Apo A-I の膜結合ドメインは、 α -ヘリックスの一方の面に親水性アミノ酸残基が、他方の面に疎水性のアミノ酸残基が局在する Amphipathic helix と呼ばれるモチーフが基本となって

おり[5]、脂質二分子膜の疎水性端部を覆うように膜と結合し、ナノディスクを形成する。また、Apo A-I の部分配列を取り出したペプチドにおいても脂質とディスク状の分子集合体を形成することが知られており、Amphipathic helix 構造がナノディスクの形成においては重要な鍵を握ると考えられる[6]。本研究では、脂質膜と相互作用することが知られている両親媒性ポリメタクリル酸[7]を分子骨格とし、Apo A-I の有する巨視的な両親媒性構造を模倣することで、ナノディスクを自発形成するポリマーの構造探索を行った(Figure 2A)。ナノディスク形成ポリマーの設計にあたって、親水性側鎖としてコリン基を、疎水性側鎖としてブチル基を導入した。目的とするポリマーは、AIBN を開始剤としたフリーラジカル重合によって合成した。各モノマーの仕込み比によって、ポリマーの両親媒性バランスを調整し、連鎖移動剤として 3-メルカプトプロピオン酸メチルを用いて分子量の調整を行うことでポリマーライブラリの構築を行った。

はじめに、得られたポリマーの膜断片化活性に関してリン脂質リポソームを用いて評価を行った。具体的には、1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC)リポソームを調製し、ポリマー添加に伴う濁度の変化から膜の断片化を評価した。リポソームが断片化され、ナノディスクへと構造転移すると、分子集合体のサイズが小さくなるために溶液の濁度が顕著に低下する(Figure 2B)。これにもとづき、得られたポリマーライブラリのスクリーニングを行ったところ、脂質膜の断片化に求められるポリマーの特徴として、(i)適切な親疎水性バランス(疎水性モノマー割合 0.4~0.6 程度)と(ii)適切な分子量範囲(3,000~9,000 g·mol⁻¹)が存在することが明らかになった。続いて、高い膜断片化活性を示したポリマーを対象として、得られた脂質-ポリマー複合体の TEM 観察を行った。ネガティブ染色 TEM 像、クライオ TEM 像のいずれにおいても、直径 10~20 nm の均一なディスク構造の形成が確認された(Figure 2C)。クライオ TEM 像を元に算出したナノディスクの厚みは 5.5 nm であり、それぞれのナノディスクは単一の脂質二分子膜から形成されていることがわかった。得られたナノディスクを対象として、示差走査熱量測定(DSC)を行ったところ、ゲル-液晶相転移に対応する吸熱ピークが確認されたことから、ナノディスク中においても、二分子膜構造とその膜物性を維持していることが確認された。

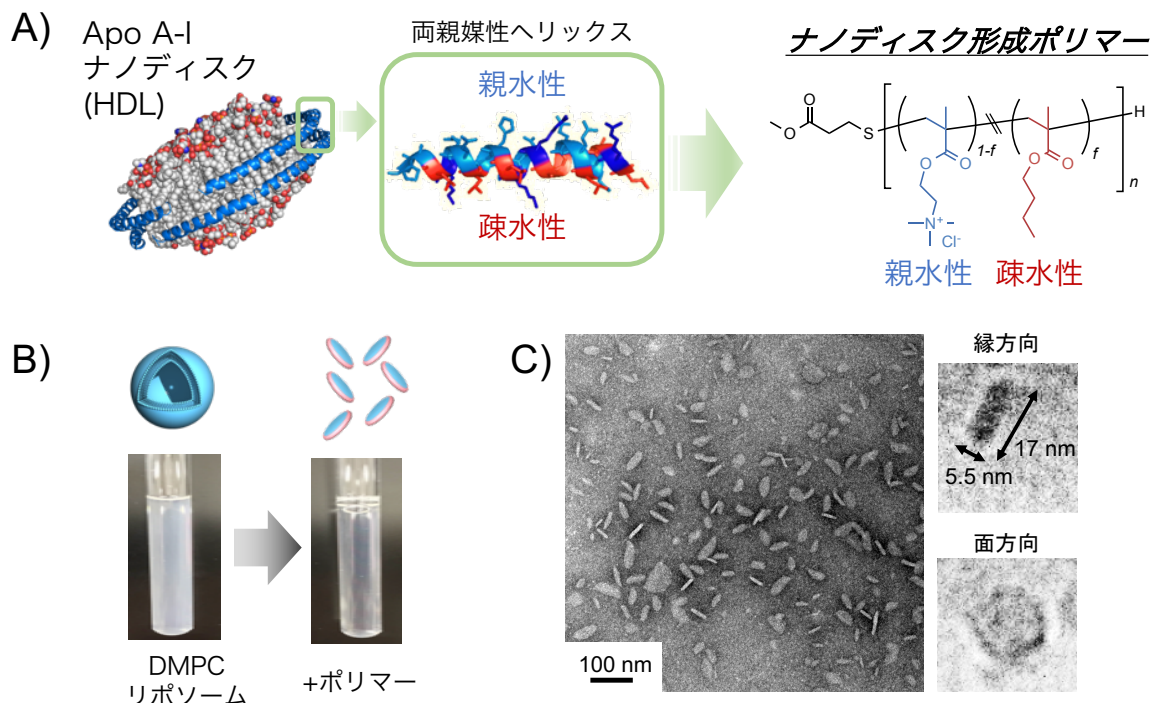


Figure 2. (A) 脂質ナノディスクを形成する両親媒性ポリマーの設計指針、(B)ポリマーによる脂質二分子膜の断片化および(C)得られたナノディスクの TEM 像

3. 脂質ナノディスクとアミロイドタンパク質との相互作用

両親媒性メタクリレート誘導体によって形成されたナノディスクは、MSP ナノディスクのように評価対象とするタンパク質やペプチドと類似の分子骨格を有しておらず、かつ紫外・可視領域に大きな吸収を示さないことが大きな利点である。従って、膜タンパク質や膜作用性ペプチドの評価を行う際に、各種分光法が直接適用可能であり強力な分子ツールとなる。ここでは、2型糖尿病との関連が指摘されているヒト膵島アミロイドポリペプチド(hIAPP)と脂質膜の相互作用に関して評価を行った。チオフラビン T(ThT)蛍光によるアミロイド繊維形成の評価を行ったところ、ナノディスク非存在下においては、アミロイド繊維の形成に伴う蛍光強度の上昇が見られた。一方で、ナノディスクを添加することでThT 蛍光の上昇は見られず、繊維形成が顕著に阻害されることがわかった(**Figure 3A**)。また、円二色性(CD)スペクトル測定において、ナノディスク非存在下では長時間の静置後、アミロイド繊維に対応する β -シート構造の形成がみられた一方で、ナノディスク存在下では、 α -ヘリクス構造を維持していることが確認された(**Figure 3B**)。このことは、ナノディスクの表面積が微少であり、結合することのできるペプチドの分子数が限定されたことによると考えられる。アミロイドタンパク質の生理活性および繊維形成機構の解明においては、初期課程に形成されるオリゴマーの理解が重要であると考えられており、本ナノ

ディスクを用いることでオリゴマー状態をトラップすることができることが示された。また、他のアミロイドタンパク質への適用例として、アルツハイマー病の原因となるアミロイド β に関して評価を行ったところ、hIAPP と同様にナノディスクによるアミロイド繊維の形成抑制がみられ、神経細胞に対する毒性低減効果があることも確認された[8]。

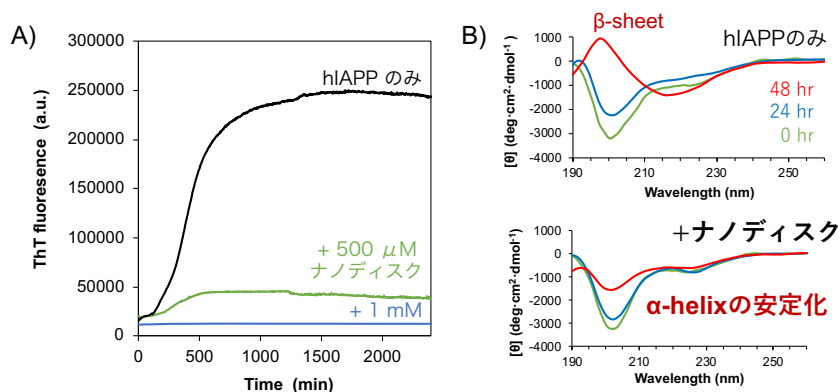


Figure 3. 脂質ナノディスクによる hIAPP アミロイド繊維の形成阻害 (A)チオフラビン T 蛍光の経時変化および(B) CD スペクトル

4. おわりに

本研究においては、天然に存在するナノディスク形成タンパク質である Apo A-I にヒントを得て、脂質二分子膜を断片化し、ナノディスクを自発的に形成する両親媒性ポリマーのデザインを行った。合成高分子を分子骨格とすることで、天然のタンパク質と類似構造（とそれに伴う分光学的シグナルのオーバーラップ）を有さず、かつ安価に大量生産可能であるという大きなアドバンテージを有する新しい膜材料の創出が可能になった。アミロイドタンパク質との相互作用において示されたように、ナノディスクは単に脂質膜とタンパク質の相互作用を評価するツールとしてのみならず、生理活性を制御することのできる新たな生体機能性材料としての展開も今後期待される。本研究で設計したポリマーは、タンパク質のようにある決まったモノマー配列を有さないランダムコポリマーである。脂質膜と相互作用をすることで機能を示す様々な分子群の設計にあたっては、タンパク質やペプチドに固有のアミノ酸配列や特定の官能基をそのまま再現することよりも、むしろ分子全体の物理化学的な特徴を如何に模倣するかという観点が重要になってくると考えられる。

謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・バイオメテック科学研究室で行われました。菊池純一教授（現・名誉教授）ならびに本研究に携わったすべての学生に感謝申し上げます。また、本研究の一部は、Prof. A. Ramamoorthy (米・University of Michigan)との共同研究により実施しました。本研究は科学研究費補助金 挑戦的研究（萌芽, No. 17K19353）の助成をうけたものです。

参考文献

- [1] (a) A. M. Seddon, P. Curnow, P. J. Booth, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1666, 105–117; (b) Y. Gohon, J.-L. Popot, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2003**, 8, 15-22.
- [2] M. A. Schuler, G. I. G. Denisov, S. G. Sligar, *Methods Mol. Biol.* **2013**, 974, 415–433.
- [3] (a) K. Yasuhara, S. Miki, H. Nakazono, A. Ohta, J. Kikuchi, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 4691–4693; (b) K. Yasuhara, H. Hayashi, J. Kikuchi, *Chem. Lett.* **2012**, 41, 1223–1225.
- [4] K. Yasuhara, J. Arakida, T. Ravula, S. K. Ramadugu, B. Sahoo, J. Kikuchi, A. Ramamoorthy, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 18657–18663.
- [5] D.W. Borhani, D. P. Rogers, J. A. Engler, C. G. Brouillette, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 12291–12296.
- [6] T. Imura, Y. Tsukui, T. Taira, K. Aburai, K. Sakai, H. Sakai, M. Abe, D. Kitamoto, *Langmuir*, **2014**, 30, 4752–4759.
- [7] (a) H. Takahashi, E. F. Palermo, K. Yasuhara, G. A. Caputo, K. Kuroda, *Macromol. Biosci.* **2013**, 13, 1285–1299; (b) C. Ergene, K. Yasuhara, E. F. Palermo, *Polym. Chem.* **2018**, 9, 2407–2427.
- [8] B. R. Sahoo, T. Genjo, M. Bekier II, S. J. Cox, A. K. Stoddard, M. Ivanova, K. Yasuhara, C. A. Fierke, Y. Wang, A. Ramamoorthy, *Chem. Commun.*, **2018**, 54, 12883–12886.

第6回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム 開催報告

(第33回生体機能関連化学部会若手フォーラム・第6回バイオテクノロジー部会若手フォーラム)

若手フォーラム 世話人
大阪大学大学院工学研究科 藁島維文

9月8日(土)、大阪大学吹田キャンパスにおいて第6回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラムが開催されました。本若手フォーラムは毎年、バイオ関連化学シンポジウムの前日に生体機能関連化学部会若手の会・バイオテクノロジー部会若手の会の若手研究者らが中心となって企画・開催されてきたものであり、生体機能関連化学部会による単独開催の頃から数えて33回目となります。本年度は大洞 光司(阪大院工)、齋藤 真人(阪大院工)、多畿山 敬(株塩野義製薬)、古谷 俊介(産総研)、藁島維文(阪大院工)の5名の世話人により企画いたしました。

本フォーラムでは昨年度に引き続き、バイオ関連化学シンポジウムに参加する生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、ホスト・ゲスト・超分子化学研究会の皆様から非公開のポスター発表を募集致しました。加えて新進気鋭の5名の先生による招待講演をお願いしました。会場となった大阪大学吹田キャンパスでは台風21号による被害の爪痕が残っており、当日もあいにくの雨模様となってしまいましたが、本年度は104名の事前参加登録に加え、若干名の当日参加の申し込みをいただき、最終的に一般33名、学生76名、計109名という非常に多くの方にご参加いただき、無事盛会となりました。世話人一同を代表しまして招待講演の先生方、ならびに参加者の皆様に厚く御礼を申し上げます。

招待講演は大阪大学工学研究科 U3 棟講義室で開催され、「SACLA の先端 XFEL 技術を用いたタンパク質構造研究」(阪大院工・溝端 栄一先生)、「超高感度 CE-MS を用いた一細胞メタボローム・プロテオーム分析」(理研・川井 隆之先生)、「生体内 CO の擬ロックダウン法による機能解明」(同志社大理工・北岸 宏亮先生)、「蛍光を持つ非天然アミノ酸を利用した膜電位依存性ホスファターゼ(VSP)の構造変化の検出」(大阪医科大学・坂田 宗平先生)、「細菌薬剤排出システムの機能と制御」(阪大産研・西野 邦彦先生)の5演題にわたり行われました。各講演では、それぞれ独自のアプローチを駆使して、生体関連分子の機能解明から制御への応用まで魅力的にお話しいただき、大変面白く聴かせていただきました。各発表に対し、会場からは学生も含め活発な議論が飛び交い、大いに盛り上がりました。



招待講演に引き続き、同棟別講義室にてポスター発表が行われました。今年度は計59件、学生による発表を中心にポスター発表をいただきました。こちらでも熱い議論が各所で起こり、大いに盛り上がりを見せました。参加者の中にはこちらでの議論を励みに、翌日からの本会のポスター発表に臨み、ポスター賞を受賞した方もいたのではないかと思います。

ポスター発表後には会場を移して懇談会が行われました。研究室や学生・スタッフ間の垣根を越えて、参加者同士が親睦を深め合い、大変盛況となりました。参加者にとっては、お互いを切磋琢磨できる同世代の研究者と、あるいは目標となりうる少し上の世代の研究者と交流できる場は非常に意義があり、刺激を受けたものと思います。この若手フォーラムをきっかけに新たな交流や研究のアイデアが生まれ、今後の部会の発展のための活力として寄与することができれば幸甚に存じます。

なお次年度のバイオ関連化学シンポジウム若手フォーラムは、北海道大学の松尾 和哉先生を世話人代表として仙台で開催される予定です。本フォーラムが今後益々盛り上がり発展していけるよう、若手一同尽力してまいります。引き続き部会の皆様からの積極的なご支援のほど、何卒宜しくお願い申し上げます。

最後になりましたが、本会の運営と開催に関しましてご協力頂きました世話人の先生方、若手幹事の先生方、ならびに多方面からのサポートをいただきました日本化学会 保倉 光邦様に厚く御礼申し上げます。また、本若手フォーラムをご支援下さいまし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、ホストゲスト・超分子化学研究会、公益財団法人サントリー生命科学財団に重ねて厚く御礼申し上げます。



第6回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム世話人

大洞 光司 (大阪大学大学院工学研究科)

齋藤 真人 (大阪大学大学院工学研究科)

多幾山 敬 (塩野義製薬株式会社)

古谷 俊介 (産業技術総合研究所)

藪島 維文 (大阪大学大学院工学研究科) (文責)

第 12 回バイオ関連化学シンポジウム 開催報告
(第 33 回生体機能関連化学シンポジウム、第 21 回バイオテクノロジー部会シンポジウム)

大阪大学大学院工学系研究科 民谷栄一・伊東 忍

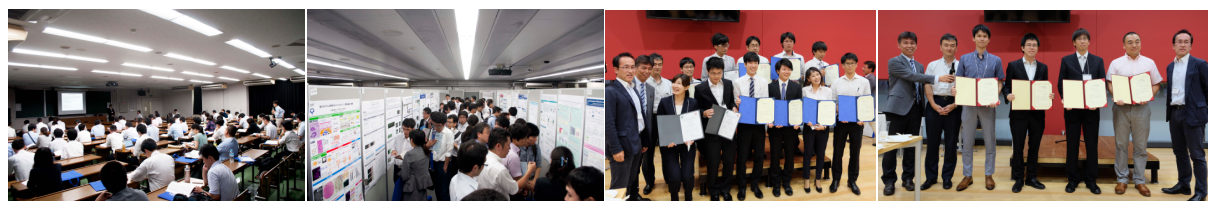
平成 30 年 9 月 9 日 (日) ~11 日 (火) の 3 日間、大阪大学の吹田キャンパスにおいて第 12 回バイオ関連化学シンポジウム (第 33 回生体機能関連化学シンポジウム、第 21 回バイオテクノロジー部会シンポジウム) が開催されました (講演会場: U3-211、U2-311、U2-312、ポスター会場: U3-311、U2-213、U2-214)。2010 年に第 4 回バイオ関連化学シンポジウムが大阪大学の豊中キャンパスで開催されて以来、8 年ぶりに大阪大学で開催されたこととなります。

吹田キャンパスは、6 月 18 日の大阪北部地震 (震度 6 弱、マグニチュード 6.1)、続く 9 月 4 日の台風 21 号の直撃により大きな被害を被りましたが、それを乗り越え何とか開催にこぎ着けることができました。事前登録 373 名、当日登録 121 名、合計 494 名 (内学生は 225 名) の参加者を得て、ほぼ例年通りの規模で滞りなく開催することができました。特別講演 2 件、口頭発表 100 件、ポスター発表 258 件が 3 日間に渡って行われ、非常に活発なディスカッションが展開されました。実行委員会を代表して、ご参加下さった皆様に厚く御礼申し上げます。2 日目の夕刻から懇親会を同キャンパス内のレストラン「クルール」で開催しましたが、181 名の参加者の皆様には、和やかな雰囲気のもと情報交換や交友の場として利用していただけたものと思います。

今年のシンポジウムにおいても例年通り、部会講演賞 (40 才以下の部会員・博士号取得者) および学生ポスター賞 (部会員の学生対象) の審査が行われました。井原敏博 (熊本大学・教授) 審査委員長のもと、部会講演賞 4 名、学生ポスター賞 11 名が選ばれ、懇親会の席上で、受賞者には賞状と副賞が授与されました。なお、学生ポスター賞上位 3 名には、RSC より Metallomics 賞、Organic & Biomolecular Chemistry 賞、Molecular Omics 賞が付与されております。審査を担当して下さった先生、若手の会の方々、RSC 浦上様に感謝申し上げます。

シンポジウムの開催にあたり、23 の企業・団体様より多大なご支援をいただきました。また、初日と 2 日目の昼食時には、ランチョンセミナーを開催し、多くの方々に参加していただきました。今回、運営を担当して下さった実行委員の先生方 (菊地和也教授、林高史教授、木田敏之教授、内山進教授、松浦友亮准教授) や民谷研、伊東研を含む各研究室のスタッフ (特に齋藤真人助教、簗島維文助教、大洞光司助教、合田真紀子様) と学生の皆様、日本化学会の保倉光邦様には心より感謝申し上げます。

来年度の第 13 回バイオ関連化学シンポジウムは、2019 年 9 月 4 日 (水) ~6 日 (金) に東北大学青葉山キャンパスにおいて開催される予定です。仙台での再会を楽しみにしております。



口頭講演とポスター発表、および授賞式の様子

「第 12 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 33 回生体機能関連化学シンポジウム・第 21 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 井原敏博
熊本大学大学院先端科学研究部

2000 年に始まって、今年で第 19 回を迎えた講演賞には、例年よりも多い 28 名の若手研究者にエントリーして頂きました。シンポジウム初日に、講演賞規定にしたがって、2 つの講演会場で 8 名の審査員による厳正かつ公平な審査が行われました。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、合計点の上位から下記の 4 名が講演賞受賞者として選出されました。毎年のことですが、いずれの研究もレベルは高く、甲乙つけ難い内容であり、選に漏れた方も可能であれば再挑戦することをお勧めしたいと思います。4 名の受賞者は、上記 5 項目に関して、概ねいずれも高い点数を獲得していましたが、今年度は特に 1、次に 2 と 4 の項目で点差がついているようでした。1 は研究立案のフィロソフィーに関するもので、この部分の説明で研究そのものの独創性はもちろん、発表者がどの程度 PI から独立して自身で推進している研究であるかが露わになり、ここで審査員を惹きつけば他の点数にもプラスにはたらくのかも知れません。将来の生体機能関連化学を担う世界的な人材育成を目指す本講演賞の趣旨を最も確実に担保する項目であり、今後、意義ある研究を推進するために最も重要な視点だと思います。

受賞者の方々には心からお祝いを申し上げます。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、発表順）

長尾 聡（奈良先端大物質）

「バイセルと溶液 NMR を組合せた手法で可能になるシトクロム c と脂質膜の相互作用の高分解能解析」

安原主馬（奈良先端大物質）

「両親媒性ポリマーによる脂質膜ナノディスクの形成とアミロイドペプチドとの相互作用」

植木亮介（東大院工）

「増殖因子ミメティクス核酸による細胞シグナル制御」

小嶋良輔（東大院医）

「合成生物学的手法によって改変された”Designer Cells”による新規ドラッグデリバリープラットフォーム」

ポスター賞審査の準備は大阪大学の大洞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い、同賞にエントリーした 102 名のポスター発表が、両部会に所属する 58 名の若手研究者により厳正に（1 件あたり 3 名の審査）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が、上位 11 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ようです。このうち上位 3 名には、RSC (Royal Society of Chemistry) 協賛により Organic & Biomolecular Chemistry 賞、Molecular Omics 賞、および Metallomics 賞として RSC ジャパンの浦上様から表彰して頂きました。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。

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 58 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、発表順）

茂垣里奈（東大院工）、唐澤昌之（名大院理）^{*1}、平山翔太（阪大院工）^{*2}、稲垣雅仁（東北大多元研）、赤澤一樹（阪大院工）、松尾徳紀（阪大院工）、小野田浩宜（名大院理）、山下 隼（名大院理）、野瀬可那子（福岡大理化学）^{*3}、古畑隆史（東大院工）、西 宏基（阪大院工）

^{*1} Metallomics 賞、^{*2} Organic & Biomolecular Chemistry 賞、^{*3} Molecular Omics 賞

ニュースレター Vol. 33, No. 3 2018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

Office of the Secretary : The Chemical Society of Japan, 1-5 Kanda-Surugadai, Chiyodaku, Tokyo 101-8307, Japan

URL: <http://seitai.chemistry.or.jp/>

mail to: seitai@chemistry.or.jp

編集委員：王子田 彰夫、山東 信介、村上 裕