

Newsletter



日本化学会
生体機能関連化学部会

巻頭言

国内学会の適正数	沼田圭司	3
----------	------	---

Award Accounts

部会講演賞

小脳運動学習の分子基盤に迫る GPCR 型グルタミン酸受容体 1 の in vivo ケモジェネティクス	堂浦智裕	5
完全キャップ化 mRNA の合成を可能とする PureCap 法の開発と生物活性の評価	稲垣雅仁	10
キノンメチド放出プローブによるミトコンドリア β 酸化活性の蛍光イメージングと不均一性の評価	内之宮祥平	16
1:1 結合型バイパラトピック抗体の創出と利用	秋葉宏樹	21

Award Accounts

ポスター賞

重度な低酸素環境を選択的に可視化する近赤外蛍光プローブの開発 (Chemical Communications 賞)	笠井貴文	27
1 分子ペプチドアミノ酸配列決定法の開発を目指した N 末端 Gly・Phe 結合人工抗体の創製 (RSC Chemical Biology 賞)	菅野晃矢	29
抗 OX40 抗体のエピトープと速度論的性質に基づくアゴニスト活性デザイン (Organic & Biomolecular Chemistry 賞)	氏家寛	31
腫瘍細胞特異的酵素活性を活用した新規低分子 BNCT 薬剤の開発	常富純矢	33
細胞上でのダイレクトな増感分析を可能にする「ヒト直交性酵素」を用いたマルチカラー解析と上皮間葉転換の評価への応用	金子諒右	35

未培養口腔細菌ゲノムから獲得したファージ由来の <i>Streptococcus</i> 属細菌特異的認識分子	岩井直哉	37
--	------	----

ペルオキシソームの β 酸化活性の検出を可能とする 新規ケミカルプローブの開発	松尾祐治	39
--	------	----

ぶらり研究室の旅

慶應義塾大学 薬学部・大学院薬学研究科 創薬分析化学講座 独自の機能性分子で生命科学研究を切り拓く	花岡健二郎	41
---	-------	----

部会行事

第 17 回バイオ関連化学シンポジウム開催報告	青木伸	43
-------------------------	-----	----

第 17 回バイオ関連化学シンポジウム講演賞・ポスター賞講評	松浦和則	45
--------------------------------	------	----

お知らせ

第 18 回バイオ関連化学シンポジウム 会告		47
The 3 rd International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2024) 会告		48

巻 頭 言

国内学会の適正数

京都大学 大学院工学研究科
理化学研究所 環境資源科学研究センター

沼田 圭司



国内外を問わず、現在非常に多くの学会、コンソーシアム、集会などが同時並行的に走っており、自らの研究が関係するものに限定したとしても、その全てに参加することは不可能である。欧米では学会の数が減少しているという話を聞いたことがあるが、日本国内では増えているようだ。学会やシンポジウムのオンライン化が進んでいるため、一概に学会数の増加が、若手研究者の研究時間およびプライベートな時間を割くことには繋がらない。しかしながら、この巻頭言では、学会やシンポジウムなどの成果発表や意見交換の場は、どれくらいが適正な頻度なのか考える機会として利用したい。

コロナ禍において、オンラインシンポジウムが多数開催された際には、学術的な発表以外の非公式な会話、要は立ち話などが消滅し、研究活動に影響があるという意見をチラホラ拝聴した。国際学会にオンラインで参加すると、夜中に一人で発表して、地味に終了してしまうと少し虚しさも漂う。確かに、学会発表やその後の質疑応答に加えて、学会会場で執り行われる種々のオフレコードな議論は、時として研究に大いに役立つ。これらの効能は、既報の論文や教科書では得られない情報も多く、学会やシンポジウムが研究活動において重宝される理由にもなっている。

一方で、学会運営やシンポジウムなどの開催には労力も伴い、大なり小なり影響を受ける研究者もいるであろうことは想像に難くない。オンライン化が進むことで、学会会場への移動時間やスケジュール確保に対する考え方も多様化している。オンラインネイティブな、これからの研究者にとって、学会等の学術集会の適正数・適正頻度はどれくらいなのであろうか。仮に自然科学系の国内学会が一つに集約されたらどうなるか。例えば、日本科学会ができたとしよう。会員数は、調べれば想像できるのだろうが、調べてないので良くわからない。しかし会員数は非常に多い。年次大会を開くと適正な会場を確保することが難しく不可能と考えられるが、オンラインなら大丈夫。委員会なども統一され、政府や経済界との意見交換も交通整理されて良いかもしれない。知りませんが。学生さんや若手研究者を含め誰でも、自分の分野と大きく離れた研究発表にも参加できる。とても楽しそうな気がするし、学際研究を拡張する一助になる気配がする。一方で、対面形式で直接開催する学会・シンポジウムは、結局のところ、現状の大きさに分割して開催することになるのかもしれない。それなら、意味がないという意見もあると思う。流石に、自然科学を一つに纏めるのは、私が想像もしない多くの問題があるのだろうが、学会などの適正数を検討し最適化する必要はあるように思う。

私だけかもしれないが、日常生活において、ぼーっとしていると研究する時間があっという間に無くなる。いかに、「研究する時間を確保するか。」という命題において、学会や学術集会関係の問題も一つの重要な議題であろう。学会関連の話題よりも先に検討すべき業務は多いだろうが、ここでは割愛する。本稿を執筆しているのが10月末であり、個人的な予測データになるが、2023年に私が対外的にプレゼンした回数は120回ほどになる。一回の講演を45分とすると90時間となり、おおよそ

半月分くらいの業務時間となる。移動時間も考慮すると、かなりの時間となる。色々な考え方があると思うが、研究時間を確保するという観点からは、もう少し検討の余地はありそうだ。「スケジュールをパンパンに埋めれば、現状でも回るでしょうから、問題ないでしょう。」という考え方もあると思うが、学術的に創造するという作業は、スケジュールがパンパンでは難しいのではないだろうか。正直、創造的な仕事をした経験がないため自信はないが、時間的にゆとりがあることはマイナスにはならないだろう。さらに、これからの研究者世代は、プライベートとの両立もあり、時間的・労力的にゆとりのない学術研究活動は避けるべきである点は間違いない。小職にはどうすることもできないが、そんなことを考えながら、日々、研究活動している。それを考えている時間が無駄だという説もある。

小脳運動学習の分子基盤に迫る GPCR 型グルタミン酸受容体 1 の in vivo ケモジェネティクス

名古屋大学大学院工学研究科
堂 浦 智 裕



著者紹介：この度、優秀かつ将来性のある若手研究者が受賞されてきた映えある賞を受賞させていただき大変光栄に思います。私が大学 4 年生の時に最初に携わった研究は薬物あるいは核酸の細胞への送達を指向した分子の開発であり、現在の研究とは毛色の違うものでした（大阪府立大学河野健司研究室）。その後、縁があって核酸化学に触れ（大阪大学中谷和彦研究室）、NMR 化学プローブを作って学位をいただき（九州大学山東信介研究室）、蛍光プローブ開発に携わり（東京大学浦野泰照研究室）、薬学・医学に触れ（千葉大学薬学研究院、山口大学医学系研究科、東京薬科大学薬学部）、と研究内容を転々としてきましたが、研究の始めより一貫して化学と生物学の融合領域に携わっており、バイオ関連化学シンポジウムは自分に適した学会だと考えています。現在は下記のように膜受容体の細胞種選択的あるいは時空間的な制御技術の開発に取り組んでいます。本研究は医学・生物学の発展に資するツールや方法論の開発に主眼を置いています、このような基礎研究の成果が将来の日本の創薬産業の発展につながることも夢想着います。

1. はじめに

記憶や学習のような高次脳機能は、膨大な数の神経細胞とグリア細胞の相互連間に基づく神経回路形成と神経回路内でのシナプス伝達強度の変化により生み出されることが明らかにされてきた。神経回路の形成と神経回路内でのシナプス伝達強度の変化は神経細胞やグリア細胞の細胞膜に発現している神経伝達物質受容体によって制御されている。そのため、神経伝達物質受容体の活性を制御して神経伝達物質受容体の生理学的あるいは病理学的機能の解明を目指した研究が進められてきた。伝統的には標的受容体に対する阻害剤や活性化剤（薬物、合成リガンド）を実験動物に投与し、その結果得られる実験動物の行動や状態（表現型）を解析するという薬理学的な手法が用いられてきた。しかしながら、標的受容体は複数の細胞種に発現しているため、薬物の投与によって得られる表現型がどの細胞種に発現している標的受容体に関与するのか判断することは困難である。

細胞種選択的な標的受容体の活性制御を目指し、私達は化学遺伝学（ケモジェネティクス）に着目した。ケモジェネティクスは薬理学に遺伝学を組み合わせたような融合領域である。遺伝学が有する標的受容体への変異導入技術と細胞種選択的な遺伝子発現技術を駆使することにより変異型受容体を細胞種選択的に発現させることが可能であり、変異型受容体もしくは野生型受容体に選択的に作用する薬物を投与することにより細胞種選択的な標的受容体の制御が可能になると考えられる。これまでに G タンパク質共役型受容体（GPCRs）やイオンチャネルに対するケモジェネティクスが構築されてきたが^[1,2]、従来のケモジェネティクスは特定の受容体の生理学的・病理学的機能解明を指向したものではなく、特定の細胞種を操作するための「細胞操作技術」として開発されてきた。そのため、現在ケモジェネティクスツールとして利用されている変異型受容体は野生型受容体が有する内在リガンド応答性を喪失していることが大きな特徴となっている。例えば神経科学分野における代表的なケモジェネティクスツールである DREADD（designer receptor exclusively activated by designer drugs）は変異型ムスカリン受容体と変異型ムスカリン受容体に選択

的に作用するリガンドから構成されるが^[1]、DREADD に使用される変異型ムスカリン受容体は内在リガンドであるアセチルコリン応答性を喪失している。一方、標的受容体の生理学的・病理学的機能を解明するためのケモジェネティクスツールでは変異型受容体の内在リガンド応答性は維持される必要がある。そのため私達は上記の点に留意し、高次脳機能の分子レベルでの理解を実現するためのケモジェネティクスツールの開発に取り組んでいる。

2. 標的受容体の in vivo 制御を目指したケモジェネティクスツールの開発

これまでに私達は標的受容体の生理学的・病理学的機能解明を目指したケモジェネティクスツールとして配位ケモジェネティクス (coordination-based chemogenetics: CBC) を開発してきた^[3,4]。CBC は受容体が不活性状態から活性状態に移行する時の構造変化に着目した手法であり、標的受容体にヒスチジンのような配位性アミノ酸残基を変異導入し、配位性アミノ酸残基に配位結合可能な金属錯体を加えることにより、金属錯体と配位性アミノ酸残基との配位結合形成による変異型受容体の構造変化が生じて変異型受容体が活性化する。本手法を用いることにより小脳の分子層介在神経細胞に発現する代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGlu1) の機能に関する知見を得ることに成功しているが^[4]、薬物動態が未知の金属錯体を用いて in vivo で標的受容体の生理学的・病理学的機能を検討することは困難である。そのため、発想を変えて予め薬物動態が検証されている薬物 (合成リガンド) を利用可能なケモジェネティクスツールの開発を目指した。

本研究における標的受容体として mGlu1 を選択した。mGlu1 は小脳、視床、海馬、線条体、嗅球などに発現する GPCR であり、動物の運動機能との関与に関心が持たれている。饗場らにより、mGlu1 遺伝子欠損マウスでは重篤な運動失調が生じるが、小脳プルキンエ細胞選択的に mGlu1 を発現させた mGlu1 遺伝子欠損マウスでは運動失調が回復することが報告されており、mGlu1 が小脳性運動機能に重要であることが示されている^[5]。しかしながら、mGlu1 遺伝子欠損マウスは幼若期から重篤な運動失調を示すため、運動機能を司る神経回路に関する詳細な解析に利用することは不可能である。現在、mGlu1 が運動の協調性に関与することは広く認められているが、運動学習にも関与するのかどうかは明らかにされていない。そのため、任意のタイミングで動物脳内の mGlu1 を細胞種選択的に制御可能なケモジェネティクスツールの開発に着手した。

mGlu1 選択的なアロステリック阻害剤として FITM が知られている^[6]。FITM の薬物動態は検証されており、血液脳関門を透過して脳内の mGlu1 に結合することが示されている^[7]。また、FITM と mGlu1 の複合体構造が解かれている^[8]。これらの点から FITM またはその誘導体が本ケモジェネティクスツールの合成リガンドになり得ると考えた。FITM と mGlu1 の複合体構造から FITM 結合部

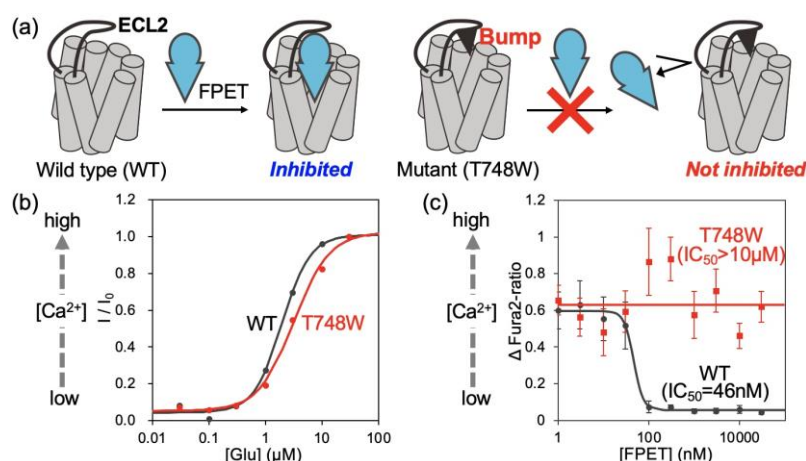


図 1. (a) 細胞外ループ 2 (ECL2) への変異導入に基づく標的受容体の活性制御戦略. (b) 変異型受容体の内在リガンド応答性. (c) FPET による野生型 mGlu1 選択的な活性阻害.

位の近傍に細胞外ループ 2 (ECL2) が存在することがわかったため、mGlu1 の受容体機能を維持するためにリガンドが結合する 7 回膜貫通ドメインではなくリガンドに近接する ECL2 に変異を導入する戦略を講

じた。本研究では変異型 mGlu1 が FITM またはその誘導体によって阻害されない系を構築するため、FITM に近接する ECL2 の T748 に嵩高いトリプトファンを変異導入した mGlu1 (T748W) を作製した (図 1a)。

初めに mGlu1 (T748W) のグルタミン酸応答性を受容体の活性化に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度変化に基づき測定し、mGlu1 (T748W) がグルタミン酸応答性を維持していることを確認した (図 1b)。また、FITM による受容体の阻害実験の結果、mGlu1 (T748W) への FITM の 50% 阻害濃度 (IC_{50}) は数倍高濃度シフトし、受容体への変異導入により FITM の結合性が低下したことが示唆された。野生型 mGlu1 と mGlu1 (T748W) に対する IC_{50} の差がより大きい阻害剤を取得するため、ECL2 に近接する FITM のイソプロピルアミノ基を様々なアミノ基に置換した FITM 誘導体を合成し、受容体活性の阻害評価を実施した結果、野生型 mGlu1 を阻害する一方で mGlu1 (T748W) を阻害しない FITM 誘導体が複数得られた。本研究では生きた実験動物の脳内の mGlu1 を制御することを目指しているため、使用する合成リガンドは野生型 mGlu1 と mGlu1 (T748W) に対する IC_{50} の差が大きいだけでなく、中枢移行性 (血液脳関門透過性) を有する必要がある。後者の観点から FITM に最も類似した構造を持つ誘導体を FPET と名付け、より詳細な受容体阻害実験を実施した。その結果得られた用量反応曲線より、FPET の野生型 mGlu1 に対する IC_{50} は 50 nM ほどであるのに対し、30 μM ほどの高濃度の FPET を処置した場合でも mGlu1 (T748W) は阻害されないことが示された (図 1c)。このように FPET は野生型 mGlu1 を阻害する一方で mGlu1 (T748W) を阻害しない優れた選択性を示したが、in vivo での使用を考慮すると野生型 mGlu1 に対する阻害能がやや不十分な点と水溶性の低さが課題となった。そのため、FPET の誘導体化を検討し、フルオロ基をメトキシ基に変換した MPET を得た。受容体阻害実験より MPET の野生型 mGlu1 に対する阻害能は FPET のそれよりも強いことがわかり、また MPET が最も優れた水溶性を有することが明らかになったため、実験動物の運動学習評価実験では MPET を使用することとした。

実験動物に投与した MPET が脳内の mGlu1 に結合するのかどうか検証するため、放射性ラベル化した $[^{11}\text{C}]\text{MPET}$ を合成して 4 週齢の C57BL/6N マウスに尾静脈注射し、陽電子放出断層撮影 (positron emission tomography: PET) を実施した。 $[^{11}\text{C}]\text{MPET}$ を尾静脈注射後 1 分以内にマウス脳内からの PET シグナルが検出され、 $[^{11}\text{C}]\text{MPET}$ が血液脳関門透過性を有することが示された (図 2a)。mGlu1 が高発現している小脳から強い PET シグナルが検出されたことから、 $[^{11}\text{C}]\text{MPET}$ は脳内の mGlu1 に結合することが示唆された (図 2b)。また、経口投与した MPET が脳内の mGlu1 に結合するのかどうか検証するため、4 週齢の C57BL/6N マウスに 6 mg/kg の MPET を経口投与した後に $[^{11}\text{C}]\text{MPET}$ を尾静脈注射したところ、MPET を経口投与しなかった場合に検出されていた小脳からの PET シグナルが検出されなくなったことから、経口投与した MPET が血液脳関門を透過して脳内の mGlu1 に結合することが示唆された (図 2c)。以上の結果より、薬物動態が既知のリガンドの活用と細胞外ループへの変異導入により in vivo において脳内の mGlu1 を制御可能なケモジェネティクスツールの開発に成功したことが示された。

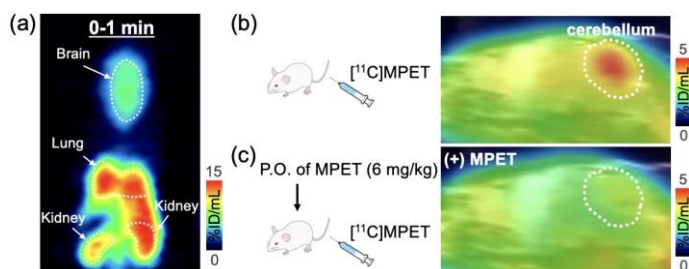


図 2. (a) MPET の血液脳関門透過性. (b) 小脳への $[^{11}\text{C}]\text{MPET}$ の集積. (c) 経口投与 (P.O.) した MPET の小脳への集積による PET シグナルの消失.

3. FITM 誘導体の変異型 mGlu1 を阻害しないメカニズムの解明

上記のように、FITM 誘導体である FPET とその誘導体である MPET は高濃度処置時にも mGlu1 (T748W) を阻害しない。この現象のメカニズムを探るため、蛍光プローブ Cy3-FITM^[4]を用いたリガンドの結合実験を実施した。Cy3-FITM が mGlu1 (T748W) に結合することを確認した後、FPET を Cy3-FITM と共処置した

時の mGlu1 (T748W)発現細胞の共焦点蛍光顕微鏡観察を実施した。その結果、高濃度の FPET を Cy3-FITM と共処置した場合には細胞膜上の Cy3-FITM 由来の蛍光が消失したことから FPET が細胞膜上の mGlu1 (T748W)に結合することが示唆された。この点について mGlu1 (T748W)の阻害実験から検証するため、mGlu1 (T748W)を阻害する FITM と FPET を共処置した時の mGlu1 (T748W)の活性を測定した。FITM 処置時には阻害されていた mGlu1 (T748W)の活性が共処置する FPET の濃度が高くなるにつれて回復したことから、FPET は mGlu1 (T748W)に結合するが阻害作用を示さないことが明らかとなった。FPET を加えた場合と加えていない場合に mGlu1 (T748W)のグルタミン酸応答性に変化が生じないこともわかり、これらの結果から FPET および MPET は mGlu1 (T748W)に対するサイレントリガンドとして結合するために mGlu1 (T748W)を阻害しないと推測される。

4. ケモジェネティクスツールを用いた小脳 mGlu1 の運動学習への関与に関する検証

実験動物の脳内の mGlu1 活性を操作可能なケモジェネティクスツールとして中枢移行性を示す MPET と MPET による阻害を受けない mGlu1 (T748W)のペアを得たため、本ツールを用いて小脳に発現する mGlu1 の運動学習への関与について検証することを計画し、実験に必要なマウスを 3 種類準備した。1 つ目は野生型マウスであり、MPET を投与すると体内に発現している野生型 mGlu1 は細胞種に関係なく阻害される。2 つ目は mGlu1 (T748W)遺伝子ノックインマウスであり、MPET を投与しても体内に発現している mGlu1 (T748W)は阻害されない。3 つ目は Pcp2-Cre/mGlu1 (T748W)遺伝子ノックインマウスであり、MPET を投与すると小脳選択的に発現する Cre リコンビナーゼにより野生型に置換された小脳の mGlu1 が選択的に阻害され、小脳以外に発現している mGlu1 (T748W)は阻害されない (図 3a)。

運動学習評価系として加速型ロータロッド試験を選択し、試験開始前に 6 mg/kg の MPET を経口投与した上記マウスをロッド上に乗せ、ロッドの回転速度の加速に耐えられずに転落または前向きに回転するまでのロッド上での滞在時間を測定した。この実験を 6 回実施するプログラムを 3 日間連続して行った。初めに MPET を投与していない野生型マウスに対してこの実験を実施したところ、試行回数の増加に伴いロッド上での滞在時間の延長が確認されたことから、野生型マウスが本実験において運動学習することが示された。MPET を投与したマウスに対して本実験を実施すると MPET 非投与群の結果と比較して滞在時間の延長が短縮された。この結果は mGlu1 の阻害が運動学習の阻害につながることを意味している。次に mGlu1 (T748W)遺伝子ノックインマウスに対して本実験を実施すると mGlu1 (T748W)遺伝子ノックインマウスも本実験において運動学習することが示された。一方、MPET 投与群と MPET 非投与群の間に滞在時間の差は認められなかったことから、改めて mGlu1 が運動学習に関与することが示された。同時に、この結果は野生型マウスを用いた実験で得られた結果が mGlu1 以外の分子への MPET の作用によるものではないことを示している。最後に Pcp2-Cre/mGlu1 (T748W)遺伝子ノックインマウスに対して本実験を実施すると、野生型マウスを用いた実験で得られた結果と同様に MPET 投与群と MPET 非投与群の間に滞在時間の差が認められたことから、小脳に発現する mGlu1 が運動学習に関与していることが示された (図 3b)。以上の結果より、薬物動態が既知のリガンドを活用した分子標的ケモジェネティクスツールが記憶や学習のような高次脳機能の解明に有用であることが実証された。

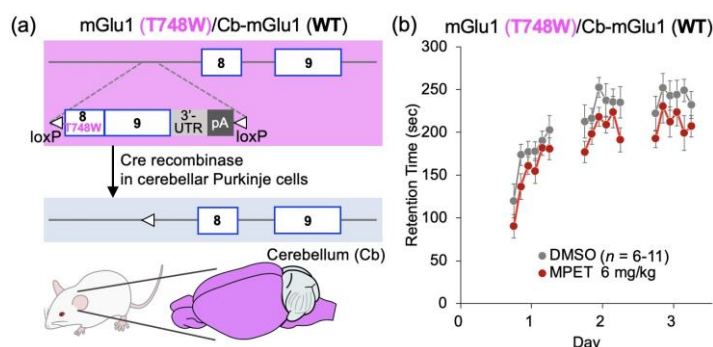


図 3. (a) 小脳選択的に野生型 mGlu1 が発現する mGlu1 (T748W) 遺伝子ノックインマウス. (b) (a)のマウスに対する MPET 投与時の運動学習の評価.

5. おわりに

本研究では高次脳機能の解明に資するツールの開発を目的として薬物動態が既知のリガンドと標的受容体の複合体構造情報を基に新たなリガンドと変異型受容体をデザインするというアプローチを実施した。構造生物学の発展によりリガンド-受容体複合体の構造情報が多数解明されており、標的となる生体分子に結合する分子のデザインに利用可能な情報は蓄積され続けているが、デザインされたリガンドの薬物動態（体外への排出、体内での代謝、中枢移行性など）を予測することは現在でも困難である。筆者はリガンドの中枢移行性を制御可能なサイエンスの発展に興味を持っており、このような分野横断的なサイエンスを発展させるためには、化学のみならず分子生物学や遺伝学、組織・解剖学に及ぶ広い知識と視野を持つことが必要であると考えている。

謝辞

本研究は、筆者が所属する名古屋大学大学院工学研究科、清中研究室で行われました。清中茂樹教授ならびに本研究に多大な貢献をしてくれた M1 近藤匠氏、卒業生の柏俊太郎氏、長谷川寛太氏に感謝申し上げます。PET を用いた MPET の薬物動態研究では量子科学技術研究開発機構（QST）の張明榮部長、山崎友照先生、藤永雅之先生に、Pcp2-Cre/mGlu1 (T748W) 遺伝子ノックインマウスの作製およびマウスの行動実験では慶應義塾大学医学部の掛川渉准教授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 ERATO 浜地ニューロ分子技術プロジェクトをはじめとする科研費の支援により遂行されました。

参考文献

- [1] Urban, D. J.; Roth, B. L. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2015**, 55, 399-417.
- [2] Magnus, C. J.; Lee, P. H.; Atasoy, D.; Su, H. H.; Looger, L. L.; Sternson, S. M. *Science*, **2011**, 333, 1292-1296.
- [3] Kiyonaka, S.; Kubota, R.; Michibata, Y.; Sakakura, M.; Takahashi, H.; Numata, T.; Inoue, R.; Yuzaki M.; Hamachi, I. *Nat. Chem.*, **2016**, 8, 958-967.
- [4] Ojima, K.; Kakegawa, W.; Yamasaki, T.; Miura, Y.; Itoh, M.; Michibata, Y.; Kubota, R.; Doura, T.; Miura, E.; Nonaka, H.; Mizuno, S.; Takahashi, S.; Yuzaki, M.; Hamachi, I.; Kiyonaka, S. *Nat. Commun.*, **2022**, 13, 3167.
- [5] Ichise, T.; Kano, M.; Hashimoto, K.; Yanagihara, D.; Nakao, K.; Shigemoto, R.; Katsuki, M.; Aiba, A. *Science*, **2000**, 288, 1832-1835.
- [6] Satoh, A.; Nagatomi, Y.; Hirata, Y.; Ito, S.; Suzuki, G.; Kimura, T.; Maehara, S.; Hikichi, H.; Satow, A.; Hata, M.; Ohta, H.; Kawamoto, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 5464-5468.
- [7] Yamasaki, T.; Fujinaga, M.; Maeda, J.; Kawamura, K.; Yui, J.; Hatori, A.; Yoshida, Y.; Nagai, Y.; Tokunaga, M.; Higuchi, M.; Suhara, T.; Fukumura, T.; Zhang, M.-R. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2012**, 39, 632-641.
- [8] Wu, H.; Wang, C.; Gregory, K. J.; Han, G. W.; Cho, H. P.; Xia, Y.; Niswender, C. M.; Katritch, V.; Meiler, J.; Cherezov, V.; Conn, P. J.; Stevens, R. C. *Science*, **2014**, 344, 58-64.

完全キャップ化 mRNA の合成を可能とする PureCap 法の開発と生物活性の評価

名古屋大学大学院理学研究科
稲垣 雅仁



著者紹介：1991 年 9 月生まれ。中学・高校時代には部活のテニスに全力を注いできた。2010 年 4 月に愛知工業大学工学部応用化学科に入学し、部活で鍛えた体力とやる気を活かし勉学に励み、2014 年 3 月に愛知工業大学工学部を主席卒業、恩師の早川芳宏先生のご紹介により 2014 年 4 月に東北大学理学研究科に進学した。早川芳宏先生から研究の面白さや核酸化学・有機化学の魅力を教えていただき研究者を志した。この時期は実験が面白くてたまらず、寝食を忘れ意味もなく泊まり込みで実験していたことが懐かしい。愛知工業大学工学部応用化学科は、規模は小さいが国立大学などと比較してアットホームな雰囲気であり、早川先生をはじめ多くの先生方や技術職員の方々に支えられ、著者の研究生活の素晴らしいスタートを切ることができた。東北大学では、和田健彦教授のもと新規人工核酸の開発と核酸医薬への応用に取り組んだ。和田研究室は、核酸化学だけではなく生物有機化学、超分子化学、分光学、高分子化学など幅広い研究を展開しており、多くの専門性を身につけることができた。和田研究室は自由な発想で自主的に様々な研究に挑戦できる環境であり、その環境で培った実験技術は著者の現在の研究能力の基盤になっている。2016 年 3 月に同大学博士前期課程を修了、2019 年 3 月に同大学博士後期課程を修了。この間、日本学術振興会特別研究員 DC2、2019 年 DC2 から PD への繰り上げによりカリフォルニア大学アーバイン校へ留学し、John C. Chaput 教授のもと人工塩基対を導入した新規人工核酸の合成とアプタマー創薬研究に取り組んだ。留学当初は英語でのコミュニケーションをとることができず苦労したが、研究室内外多くの方々に助けられ、少しは英語能力がついたと実感している。この時の経験については日本化学会フロンティア生命化学研究会生命科学研究レター（2020 年 10 月）にも取り上げていただいた。その後、2020 年 4 月、名古屋大学理学研究科の阿部洋教授に博士研究員として採用していただき、2022 年 4 月からは同研究室の特任助教として研究させていただいている。阿部研究室では、主に AMED-LEAP プロジェクト「化学を基盤とした mRNA の分子設計・製造法の革新とワクチンへの展開」に携わらせていただいている。このような経歴から、有機合成化学を基盤とした核酸化学研究に一貫して取り組んできた。筆者は核酸誘導体の有機合成に関する経験を武器として、生命現象の分子レベルでの理解と新規創薬ツールやバイオテクノロジーツールの開発により学術・社会貢献を目指し研究に取り組んでいる。

1. はじめに

COVID-19 感染拡大に伴いメッセンジャーRNA (mRNA) 医薬の研究が注目されている。mRNA は本来、生体内でゲノム DNA から転写され生成するものであり、mRNA の配列情報をもとにタンパク質が生産される。一方で、mRNA を試験管内で合成し医薬品として使用する試みも古くから興味を持たれていた。しかし、外部から添加された mRNA は非自己物質として認識され過剰な炎症反応が起こる。この問題点を克服しうる新技術を生み出したのが、今年度のノーベル生理学医学賞を受賞した Katalin Karikó 博士と Drew Weissman 博士である。彼らは、mRNA に N1-メチルシュードウリジンや 5-メチルシチジンなどの修飾塩基

を導入することで炎症反応を抑えられることを発見し、mRNA を医薬品として応用できる可能性を示した¹。mRNA は、5'キャップ構造、5'/3'非翻訳領域 (Untranslated Region: UTR)、タンパク質コード領域、ポリ A テールから構成される。特に重要な構造として、5'キャップ構造と呼ばれる 7-メチルグアノシンが 5'-5'トリリン酸結合を介して結合した構造が存在する (図 1)²。キャップ構造は、生物学的に多くの重要な機能を持っている。例えば、mRNA の翻訳開始、細胞内安定性、スプライシング、核外輸送、自然免疫応答などに深く関与している。このことから、mRNA のキャップ構造純度が mRNA 医薬の活性に大きく影響する。5'キャップ構造を持たない mRNA は外来 RNA として認識され自然免疫受容体である Retinoic Acid-Inducible Gene 1 (RIG-I) や Melanoma Differentiation-Associated Protein 5 (MDA5) などと強く結合し過剰免疫応答に由来する副作用を発現することが知られている³。したがって、高純度のキャップ化 mRNA を製造する手法の確立は核酸創薬分野における喫緊の課題である。

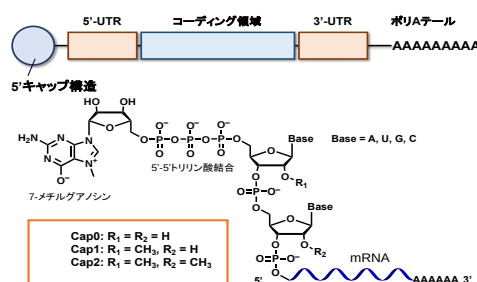


図 1. mRNA の構造と 5' キャップ構造

2. mRNA 合成法の問題点と PureCap アナログの開発

これまでに、mRNA の合成法として、ジヌクレオチド型キャップアナログ (ARCA) を用いた T7 RNA ポリメラーゼによる *in vitro* 共転写法が開発された⁴。この手法では、T7 RNA プロモーター配列下流のグアニン塩基から転写が開始される。その際に ARCA とグアノシントリリン酸 (GTP) とが競合的に取り込まれるため、一定確率で ARCA が取り込まれ、生成物 RNA はキャップ化体と 5'-トリリン酸構造を有する未キャップ化体との混合物となる (図 2)。数百~数千塩基からなる長い mRNA においては、末端トリリン酸体とキャップ化体とを分離するのが困難であり、実際には混合物として使用されるのが現状である。COVID-19 ワクチンとして緊急承認された Pfizer-BioNTech 社製 mRNA は、キャップ構造の純度が治験用で 78%、商業生産用では 55% となりロット間でもばらつきがあることが知られている⁵。キャップ構造を持たない不純物 mRNA が強い炎症反応を惹起するとともに翻訳活性の低下を招くことが問題視されている。このような背景から、副作用が少なく高いタンパク質翻訳活性を発揮する mRNA 医薬の開発が求められている。

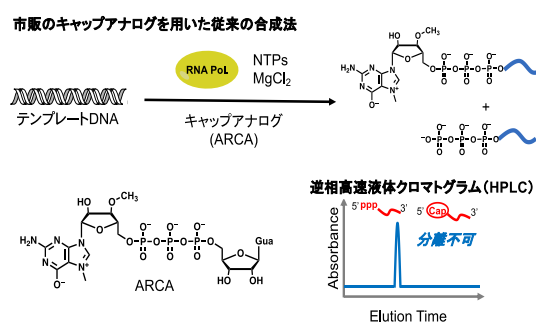


図 2. ARCA を用いた一般的な mRNA 転写合成法

そこで筆者らは、上記課題の解決を目的とした、完全にキャップ化された mRNA の製造技術の開発に取り組んだ。筆者らは、mRNA の新規合成法として、転写合成法により導入可能な新規キャップアナログ「PureCap アナログ」を独自に設計・合成した。PureCap アナログは疎水性の高い *o*-ニトロベンジル基を有しており、修飾位置の異なる様々な PureCap アナログ (DiPure (1), DiPure/ N2 (2), DiPure/ 2'OMe (3), DiPure/ 3'OMe (4)) を合成した (図 3)⁶。その中でも特に、7-メチルグアノシンの 2'位にアセタール結合を介して *o*-ニトロベンジル基を導入した DiPure(1)が物性・大量合成・翻訳活性といった観点から優れており、最も汎用性高く利用できることがわかった。

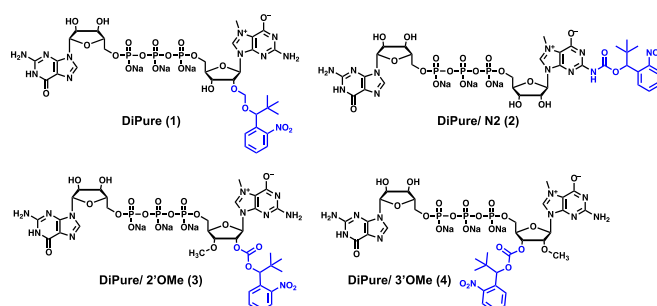


図 3. 開発した PureCap アナログの構造

3. PureCap 法による高純度 mRNA 製造

DiPure(1)と GTP を 1:1 の比率で添加し、RNA ポリメラーゼによる転写反応を行ったところ、*o*-ニトロベンジル基を有するキャップ化 mRNA と 5'トリリン酸体がほぼ 1:1 比率の混合物が得られた (図 4)。これらは、ニトロベンジル基の疎水性を利用し、逆相高速液体クロマトグラフィー (逆相 HPLC) により明確に分離できた。このようにして、キャップ化 mRNA のみを単離精製できるとともにキャップ化効率を逆相 HPLC により簡単に算出可能である (PureCap 法)。逆相 HPLC 精製後、*o*-ニトロベンジル基を 365 nm の紫外光照射により除去した。逆相 HPLC 上においても明確なピークシフトが観測され、完全にキャップ化された高純度 mRNA の合成を達成した (図 5) ⁶。

キャップ構造には、2'-*O*-メチル修飾の有無によって Cap0、Cap1、Cap2 といった多様性がある。DiPure(1)を用いた転写反応により、Cap0 型 mRNA が得られるが、PureCap 法は Cap1 や Cap2 型 mRNA の高純度合成にも適用できる。これまでにトリヌクレオチド型アナログやテトラヌクレオチド型アナログが開発され、これらに 2'-*O*-メチル修飾を導入した CleanCap アナログ (Cap1/Cap2) を転写導入することにより、Cap1/Cap2 型 mRNA を合成できる ^{7,8}。しかし、既存の Cap1/Cap2 誘導体による mRNA 製造では、得られる

mRNA の Cap1・Cap2 構造純度はそれぞれ 60%・22%であり、純度の高い mRNA を得るのは困難であった (図 6)。そこで、筆者らは PureCap 法による Cap1/Cap2 型 mRNA の高純度製造を目指し、TriPure_1 や TetraPure_2 を開発した。これらのアナログを用いて、mRNA の転写合成を行い、得られた mRNA を逆相 HPLC 精製と紫外光照射により Cap1/Cap2 型 mRNA を得た。つづいて、DNAzyme による 5'末端切断により生成した 5'キャップ構造を持つ 23 塩基フラグメントをアクリルアミドゲル電気泳動により分析し、キャップ構造純度を算出した。TriPure_1 を用いて合成した Cap1 型 mRNA は純度 99%、TetraPure_2 を用いて合成した Cap2 型 mRNA は 95~98%となり、筆者らの開発した PureCap アナログを用いることにより、構築が難しい Cap2 構造であっても 95%以上の純度で得られた。

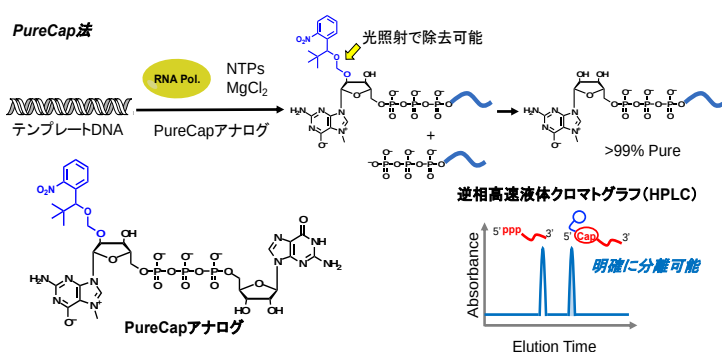


図 4. PureCap 法による完全キャップ化 mRNA 合成法 (PureCap 法)

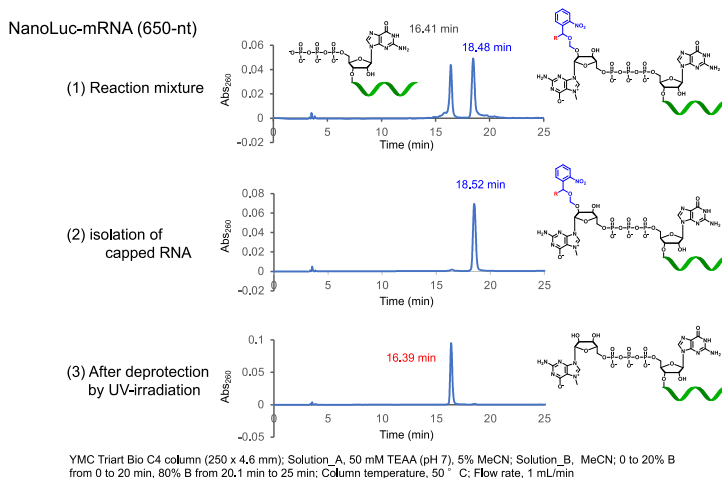


図 5. 逆相 HPLC による mRNA の分析結果

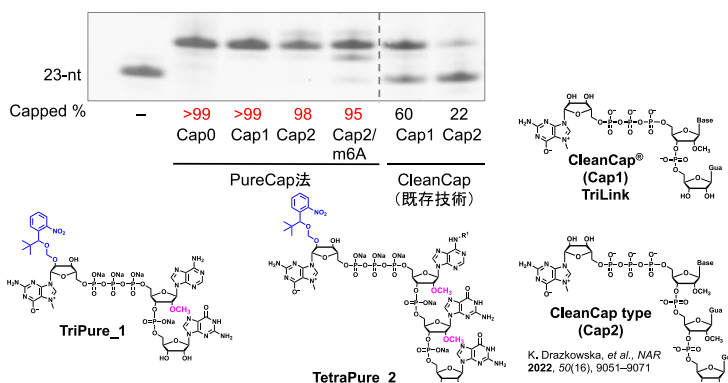


図 6. 合成した Cap1/Cap2 型 mRNA のキャップ純度解析

4. PureCap 法により製造した mRNA の生物活性の評価

合成した mRNA の翻訳活性は、HeLa 細胞ならびに JAWS II 細胞を用い、ルシフェラーゼ発現量を定量することで評価した。PureCap 法により製造したナノルシフェラーゼをコードする PureCap-mRNA と ARCA を用いて製造した ARCA-mRNA の翻訳活性を、HeLa 細胞を用いて評価したところ、PureCap-mRNA が ARCA-mRNA よりも 2 倍以上高い翻訳を示した (図 7)。

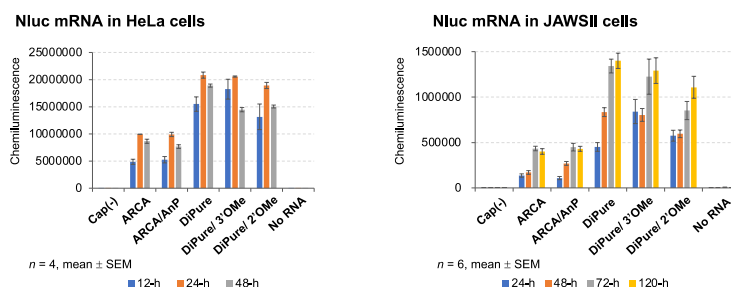


図 7. PureCap-mRNA の翻訳活性と 2' / 3' -O-メチル修飾の影響

この結果は、キャップ構造純度の翻訳活性への影響を反映しており、ARCA-mRNA のキャップ純度が 50~60%であるのに対して、PureCap-mRNA のキャップ構造純度がほぼ 100%であることに起因する。次に、PureCap-mRNA の構造と翻訳活性との関連研究に取り組んだ。DiPure (1), DiPure / 2'OMe (3), DiPure / 3'OMe (4)を用いて PureCap-mRNA を合成した。DiPure(1)を用いた場合、紫外光照射による *o*-ニトロベンジル基の除去後、キャップ構造の 7-メチルグアノシン部位 2',3'水酸基に修飾が入らないが、DiPure / 2'OMe (3)および DiPure / 3'OMe (4)を用いて合成した PureCap-mRNA には、それぞれ 2'-O-メチル修飾、3'-O-メチル修飾が導入される。この実験により、メチル基導入における翻訳活性への影響を定量的に評価できた。HeLa 細胞および JAWSII 細胞における翻訳活性を比較したところ、DiPure(1)を用いて合成した PureCap-mRNA は、DiPure / 2'OMe (3)および DiPure / 3'OMe (4)を用いて合成した PureCap-mRNA よりも高い翻訳活性を示し、DiPure(1)が最も有用なアナログであると言える。一方で、2'-O-メチル基の導入位置によってわずかに翻訳活性は異なり、3'-O-メチル体の方が2'-O-メチル体よりも高い翻訳活性を示した (図 7)。

次に、DiPure / N2(2)を用いて合成した PureCap-mRNA の翻訳活性を評価した。この mRNA は 7-メチルグアノシンキャップ構造の塩基部 2 位アミノ基上に *o*-ニトロベンジル基が導入されている。紫外光照射前後における mRNA の翻訳活性を比較したところ、*o*-ニトロベンジル基が残った状態 (光照射なし) では翻訳がオフになったのに対して、光照射により *o*-ニトロベンジル基を除去すると翻訳がオンになることを発見した。一方で、リボース骨格 2'位に *o*-ニトロベンジル基を導入した DiPure(1)を用いて合成した PureCap-mRNA は紫外光照射の有無に関わらず常に翻訳がオンになることが明らかになった。このことから、2'水酸基への修飾は翻訳に影響がない一方で核酸塩基部への修飾は翻訳活性を阻害するという知見が得られた (図 8)。このことから、何らかの刺激により除去可能な保護基を塩基部に有する mRNA は翻訳の時空間制御が可能である。ほぼ同様の研究が Andrea Rentmeister 博士らによっても筆者らと同時期に報告されており、今後の更なる展開が期待される⁹。

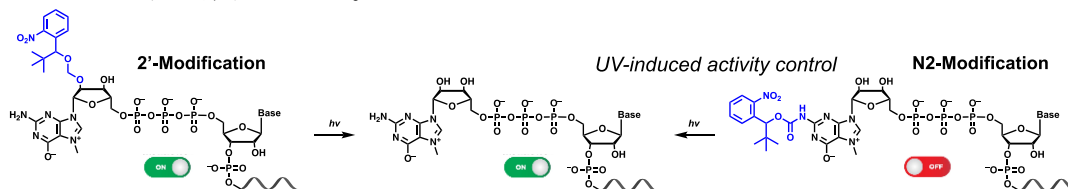


図 8. 2'修飾は翻訳に影響を与えない一方で N²修飾は翻訳を阻害する

DiPure(1)を用いて合成した PureCap-mRNA のモデル動物における翻訳活性についても評価した。ナノルシフェラーゼをコードした mRNA を NanoAssemblr Spark によって脂質ナノ粒子化し、Balb/c マウス (メス、7 weeks-old) に尾静脈投与した。その結果、肝臓と脾臓において高い発現が見られ、従来の ARCA を用いて製造した mRNA よりも 6 倍以上高い翻訳活性を示した。このように、モデル動物の系においては、PureCap-mRNA の ARCA-mRNA に対する優位性が顕著に現れた。

次に、Cap1/Cap2 構造を有する Luc2 をコードした PureCap-mRNA を合成し、HeLa 細胞を用いた翻訳活性試験を行った。その結果、Cap1 型 PureCap-mRNA は Cap0 型 PureCap-mRNA よりも約 2 倍、Cap2 型 PureCap-mRNA は Cap1 型 PureCap-mRNA よりも 1.5 倍ほど高い翻訳活性を示した。最も翻訳活性が高かった Cap2 型 PureCap-mRNA と ARCA-mRNA ならびに CleanCap アナログを用いて合成した Cap 1 型 CleanCap-mRNA の翻訳活性を比較したところ、Cap2 型 PureCap-mRNA は、ARCA-mRNA の 13 倍、CleanCap-mRNA の 10 倍高い翻訳活性を示したことから PureCap 法の高活性 mRNA 開発への有用性が示唆された (図 9)。Cap2 型 mRNA が高純度で製造できるようになったことは翻訳活性向上のみならず生物学的に重要である。つい最近、コーネル大学の Jaffrey 博士らは、人体内で mRNA が時間の経過に伴い Cap1 型から Cap2 型に変換されることを発見した。さらに、Cap0 型 mRNA および Cap1 型 mRNA は炎症に関わる RIG-I と結合するのに対して、Cap2 型 mRNA はその認識が著しく低下することも明らかにされた¹⁰。このことから、mRNA のキャップ構造多様性が自己-非自己の識別に関与していると考えられ、高純度 Cap2 型-mRNA を用いることにより mRNA が関わる免疫システムの更なる理解につながると期待される。

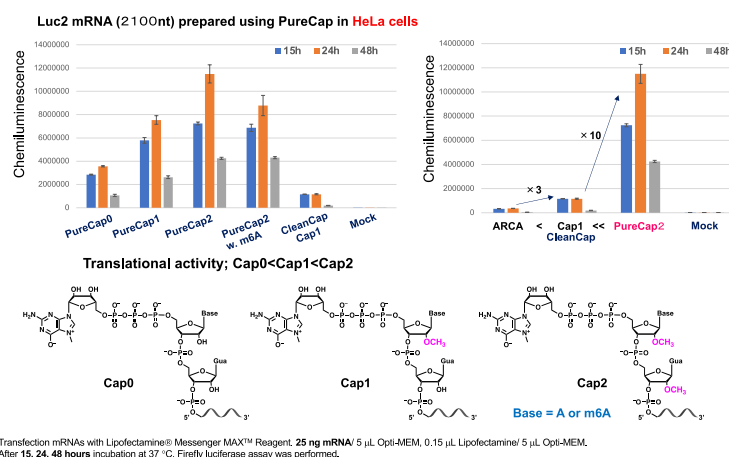


図 9. Cap1/Cap2 型 mRNA の翻訳活性比較

5. PureCap アナログの疎水性と mRNA 分離性能

筆者らは、*o*-ニトロベンジル基の導入位置の異なる誘導体を合成し、それらを用いて合成した mRNA の生物活性の定量的な評価に取り組んだ。これまでの設計では、ベンジル位に *tert*-ブチル基を持つ *o*-ニトロベンジル誘導体を用いてきた。*tert*-ブチル基を有するアナログは化学的安定性・合成容易さといった観点から有用であったが、より長い mRNA を製造する上では、逆相 HPLC での分離性能には課題が残されている。特に、COVID-19 の mRNA ワクチンは 4 キロ塩基以上の長さであり、これまでに開発した PureCap アナログを用いた逆相 HPLC による分離性能は、ラボレベルでは問題はないもののスケールアップを視野に入れた製造においては不十分である。そこで、*o*-ニトロベンジル基上のベンジル位置換基に着目し、*tert*-ブチル基よりも疎水性の高いフェニルエチル基、*n*-ヘキシル基、*n*-ウンデシル基を有する新規 DiPure アナログを設計・合成した (図 10)。これらのアナログを用いて COVID-19 スパイクタンパク質をコードする mRNA を転写合成したとこと、*tert*-ブチル誘導体(1)、フェニルエチル誘導体(5)、*n*-ヘキシル誘導体(6)を用いて合成した場合には、目的長の mRNA が得られた。一方で、*n*-ウンデシル誘導体(7)は、反応溶液中で沈澱し転写が阻害された。このことから、アナログの疎水性を高めすぎると水溶性が低下し、転写反応に使用できないことが示唆された。*tert*-ブチル誘導体 (1)、フェニルエチル誘導体(5)、*n*-ヘキシル誘導体(6)を用いて合成した PureCap-mRNA の逆相 HPLC 分析を行い、未キャップ化 RNA とキャップ化 mRNA との保持時間の差 (Δ RT) を算出し、分離性能の指標とした。 Δ RT が大きいほど分離性能が高いと言えます、

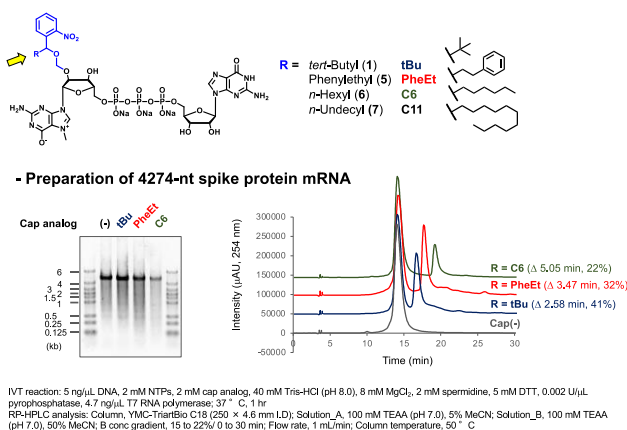


図 10. PureCap アナログの疎水性制御による逆相 HPLC 上での分離性能向上

DiPure アナログを設計・合成した (図 10)。これらのアナログを用いて COVID-19 スパイクタンパク質をコードする mRNA を転写合成したとこと、*tert*-ブチル誘導体(1)、フェニルエチル誘導体(5)、*n*-ヘキシル誘導体(6)を用いて合成した場合には、目的長の mRNA が得られた。一方で、*n*-ウンデシル誘導体(7)は、反応溶液中で沈澱し転写が阻害された。このことから、アナログの疎水性を高めすぎると水溶性が低下し、転写反応に使用できないことが示唆された。*tert*-ブチル誘導体 (1)、フェニルエチル誘導体(5)、*n*-ヘキシル誘導体(6)を用いて合成した PureCap-mRNA の逆相 HPLC 分析を行い、未キャップ化 RNA とキャップ化 mRNA との保持時間の差 (Δ RT) を算出し、分離性能の指標とした。 Δ RT が大きいほど分離性能が高いと言えます、

mRNA のスケールアップ製造に適している。転写生成物の逆相 HPLC 分析の結果、*tert*-ブチル誘導体 (1)、フェニルエチル誘導体(5)、*n*-ヘキシル誘導体(6)を用いて合成した PureCap-mRNA の ΔRT はそれぞれ、2.58 分、3.47 分、5.05 分となり置換基の疎水性が上がるほど分離性能も向上することがわかった。一方で、キャップ化効率といった点では、*tert*-ブチル誘導体 (1) では 41%、フェニルエチル誘導体(5)では 32%、*n*-ヘキシル誘導体(6)では 22%となり、疎水性と負の相関が見られた。このことから、疎水性のチューニングによる分離性能のコントロールには成功したが、キャップ化率と分離性能のバランスを考慮してデザインする必要性が示唆された。

6. おわりに

これまで困難とされていた完全にキャップ化された mRNA を合成できる新技術「PureCap 法」の開発について紹介した。*o*-ニトロベンジル基を疎水性タグとして用いた逆相 HPLC によるキャップ化 mRNA の単離精製を実証し、紫外光照射脱保護により高純度キャップ化 mRNA を合成できるようになった。*o*-ニトロベンジル基の導入位置の異なる様々な PureCap アナログを開発し、それらを用いて合成した mRNA の生物活性を明らかにした。また、PureCap 法の応用として、Cap2 型 mRNA の高純度合成を実証した。完全にキャップ化された Cap2 型 mRNA を用いることにより、炎症反応の少ない高活性 mRNA 医薬への展開が切り開かれるとともに、純度が確かな mRNA を用いてキャップ構造と mRNA 医薬の構造活性相関研究が可能となり、より活性の高い mRNA 医薬を開発するための有用なツールとして展開できる。

謝辞：本研究は、私が所属する名古屋大学大学院理学研究科、阿部研究室で行われました。研究を進めるにあたりご指導ご鞭撻いただいた阿部洋教授、木村康明准教授、橋谷文貴助教に感謝申し上げます。また、本研究の推進にご助力いただいた阿部奈保子特任准教授、中嶋裕子研究員をはじめとした研究室の皆様にも感謝申し上げます。本研究における動物実験は東京医科歯科大学の内田智士教授に行っていただき、JST-CREST ならびに AMED-LEAP プロジェクトのサポートにより行われました。本誌をお借りし厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Karikó, K.; Buckstein, M.; Ni, H. P.; Weissman, D. *Immunity*, **2005**, 23 (2), 165.
- [2] Furuichi, Y.; Miura, K. I. *Nature*, **1975**, 253 (5490), 374.
- [3] Nikonov, A.; Mölder, T.; Sikut, R.; et al. *Plos. Pathog.*, **2013**, 9 (9), e1003610.
- [4] Jemielity, J.; Fowler, T.; Zuberek, J.; Stepinski, J.; et al. *RNA*, **2003**, 9 (9), 1108.
- [5] Tinari, S. *Brit. Med. J.*, **2021**, 372, n627.
- [6] Inagaki, M.; Abe, N.; Li, Z. M.; Nakashima, Y.; Acharyya, S.; Ogawa, K.; Kawaguchi, D.; Hiraoka, H.; Banno, A.; Meng, Z. Y.; et al. *Nat. Commun.*, **2023**, 14 (1), 2657.
- [7] Henderson, J. M.; Ujita, A.; Hill, E.; Yousif-Rosales, S.; et al. *Curr. Protoc.*, **2021**, 1 (2), e39.
- [8] Drazkowska, K.; Tomecki, R.; Warminski, M.; Baran, N.; Cysewski, D.; Depaix, A.; Kasprzyk, R.; Kowalska, J.; et al. *Nucleic Acids Res.*, **2022**, 50 (16), 9051.
- [9] Klöcker, N.; Weissenboeck, F. P.; van Dülmen, M.; Spacek, P.; Hüwel, S.; Rentmeister, A. *Nat. Chem.*, **2022**, 14 (8), 905.
- [10] Despic, V.; Jaffrey, S. R. *Nature*, **2023**, 614 (7947), 358.

キノンメチド放出プローブによるミトコンドリア β 酸化活性の蛍光イメージングと不均一性の評価

九州大学大学院薬学研究院
内之宮 祥平



著者紹介：福岡県福岡市で育ち、京都大学工学部工業化学科に入学。入学時に同期から「九州から海（関門海峡のこと）を越えてきたんだね」と言われ「九州から遠く離れたのだ」と思ったことをまだ覚えています。2007 年の研究室配属から 2014 年の博士号取得まで一貫して京都大学大学院工学研究科の浜地格先生にご指導いただき、タンパク質の化学修飾に関する研究を行いました。研究に加え教育とはという点も含め、浜地先生に多くのことを教えていただきました。学位を取得後は JSPS 海外特別研究員としてシンガポール国立大学の Young-Tae Chang 先生の下でスクリーニング研究を行い、異文化での研究や生活という貴重な経験ができました。帰国後は地元福岡の九州大学薬学研究院に赴任し、王子田彰夫先生の研究室で代謝経路を検出するケミカルプローブの開発と阻害剤スクリーニングの研究を行っています。解糖系や TCA 回路を始めとする代謝経路の研究は古くから行われていますが、特定の代謝経路の活性を一細胞レベルで評価可能なツールの開発は遅れています。代謝経路は知れば知るほど奥が深く魅力的な研究対象であり（同時にプローブ開発が難しい対象ですが）、ケミカルバイオロジーを基盤とした代謝経路の研究と創薬への展開を行うことでアカデミア研究において何か自分の軌跡を残すことができればと思います。

1. 代謝経路とその活性測定

代謝経路とは複数の酵素による連続的な化学反応であり、解糖系や TCA 回路を始め多様な代謝経路が生命機能の維持に重要な役割を果たしている。さらに、ガンや脂肪肝炎などの疾病や細胞老化などの様々な生命現象において多くの代謝経路の活性が変化していることから¹⁾、標的とする代謝経路の活性を測定する手法の開発は生命現象・疾病メカニズムの理解や創薬研究に重要である。従来、代謝経路活性の測定には安定同位体標識された化合物の代謝挙動を追跡する手法が用いられてきたが、一細胞レベルでの詳細な解析は困難である。最近では一細胞メタボローム解析も行われているが、高価な機器が必要であり現時点では一般的に広く使用できる手法とは言えない。一方、ケミカルバイオロジー分野では、標的酵素の活性を一細胞レベルで高感度かつ簡便に検出可能な手法として蛍光プローブが盛んに開発されている²⁾。また、蛍光プローブはスループット性も高いため阻害剤スクリーニングにも応用可能である。そのため、プロテアーゼなど様々な酵素反応を標的とした蛍光プローブが開発され、分子生物学研究から創薬研究まで幅広い分野で使用されている。一方、解糖系や TCA 回路などの代謝経路に目を向けると、これらを検出可能な蛍光プローブはほとん

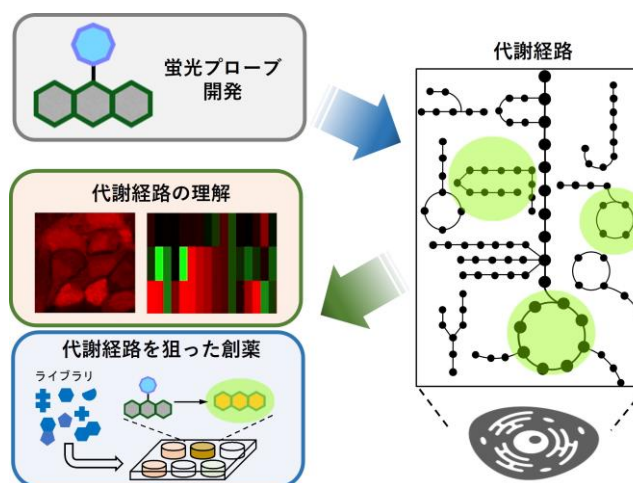


図 1. プローブ開発を基盤とした代謝経路の理解と創薬

ど開発されていない。これは、代謝経路内酵素の基質選択性が高いことが一因として挙げられる。また、従来の蛍光プローブは単一の酵素反応を標的としているため、連続した酵素反応を経て蛍光変化を起こすというコンセプトに基づくプローブデザインはほとんどない。そこで我々は蛍光プローブの開発による代謝経路の理解と創薬への展開をテーマに研究をスタートさせた（図 1）。

2. 脂肪酸 β 酸化を検出可能なクマリンプローブの開発

我々は標的として脂肪酸を分解する β 酸化に着目した。 β 酸化とはミトコンドリアまたはペルオキシソームで脂肪酸を分解しアセチル CoA や NADH, FADH_2 を生産する経路であり、脂質代謝の中心的な経路の一つである。特にミトコンドリア β 酸化は ATP 合成に関与することから重要なエネルギー代謝として知られ、様々なガン細胞でミトコンドリア β 酸化の活性化が報告されている（図 2a）^[3]。また、脂肪肝炎や細胞老化においてもミトコンドリア β 酸化の活性が変化しており^{[4][5]}、 β 酸化が様々な疾病や生命現象に深く関与することが示唆されている。そこで我々は β 酸化を生細胞で検出可能な蛍光プローブの開発に取り組み、中鎖脂肪酸部位と色素部位からなる turn-on 型のプローブを設計した^[6]。プローブの脂肪酸部位が β 酸化によって分解されることで蛍光色素が放出される戦略である（図 2b）。まず β 酸化の基質となる色素骨格を探索したところ、構造の小さなクマリンを有するプローブ **1** が β 酸化の基質となることが分かった。プローブ **1** を細胞に添加するとクマリン蛍光が検出されるが、ミトコンドリア β 酸化の阻害剤である etomoxir 存在下ではクマリン蛍光は検出されなかったため、プローブ **1** は生細胞で β 酸化活性をイメージング可能であることが分かった。また、二光子顕微鏡を用いることでマウスの肝臓でも β 酸化イメージングが可能であった^[7]。一方、クマリンは短い励起波長、低い蛍光強度という欠点のほか、長時間インキュベートによって徐々に細胞外に流出するという問題点も有している。そのため、 β 酸化の基質となるコンパクトなプローブ構造とアプリケーションに有用な長波長蛍光色素の使用、高い細胞内滞留性を満たすプローブ開発が必要であった。

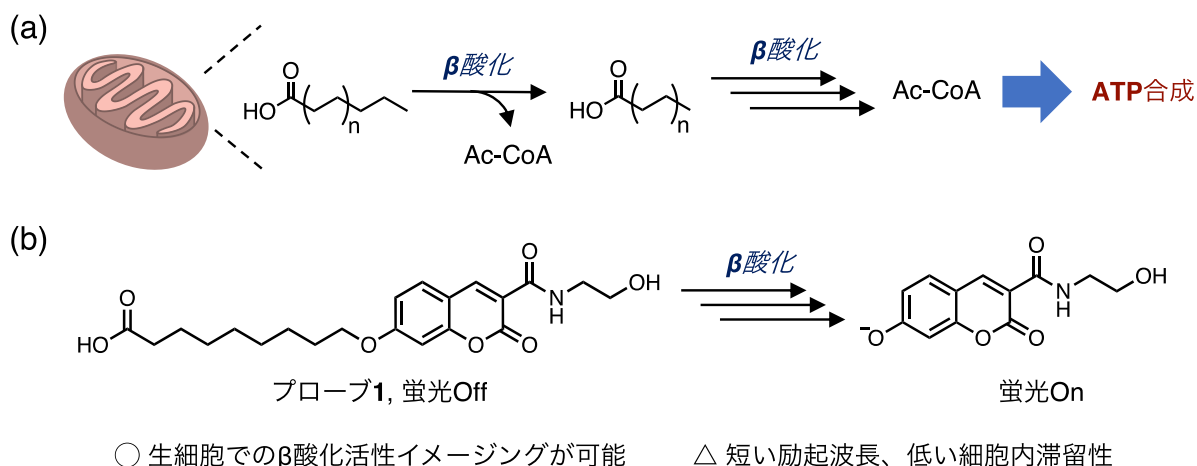


図 2. (a)ミトコンドリア β 酸化. (b)ミトコンドリア β 酸化をイメージング可能なプローブ

3. β 酸化によってキノンメチドを放出するプローブの開発

そこで、我々は β 酸化によってパラキノンメチドを放出するプローブ **2** を設計した（図 3）^[8]。本プローブは脂肪酸部位とキノンメチド前駆体、アルキン部位からなり、 β 酸化によって脂肪酸部位が分解されることでアルキンを有するキノンメチドが β 酸化依存的に放出される。このキノンメチドが細胞内のタンパク質と反応することでアルキンを細胞内に共有結合を介してトラップする。細胞を固定化後に銅触媒のア

ジド-アルキン環化付加反応(CuAAC)によって任意の蛍光色素を導入することで、 β 酸化活性を蛍光イメージングや FACS、ABPP によって検出可能となると期待した。

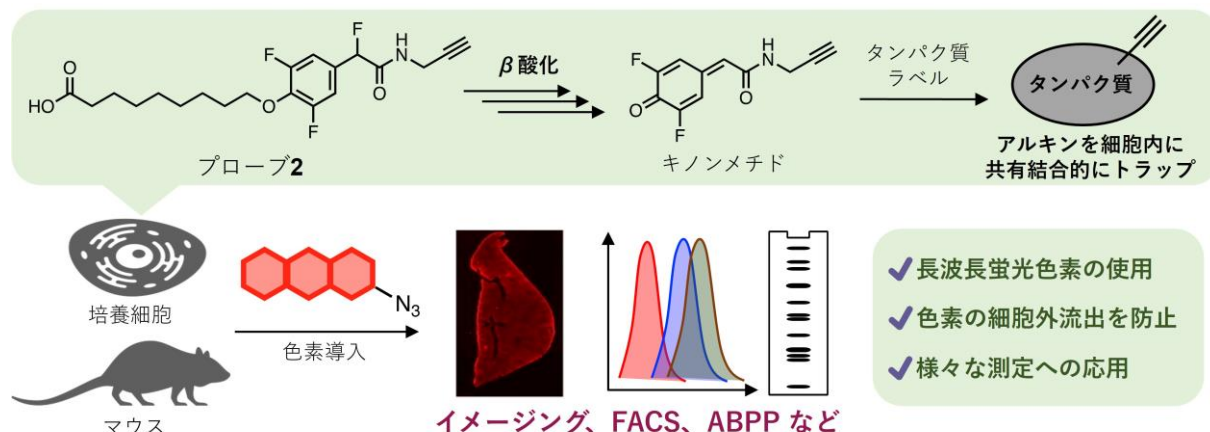


図 3. キノンメチド放出プローブによる β 酸化の検出と様々なアプリケーションへの展開

まず我々はプローブ 2 を用いて細胞内でタンパク質をラベル化可能か ABPP によって評価した (図 4a)。HepG2 細胞にプローブを添加した後、細胞を破碎しライセート内でアジドを有する TAMRA(TAMRA-azide) を CuAAC によって導入した。その結果、in-gel 蛍光解析において様々なラベル化バンドが検出され、これらのバンドは etomoxir 存在下では検出されなかったことから、プローブ 2 が β 酸化を検出可能であることが分かった。

続いて我々はプローブ 2 を用いて培養細胞での蛍光イメージングを行った(図 4b)。HepG2 細胞にプローブ 2 を添加した後、細胞を固定化し CuAAC によって TAMRA-azide を導入した。メタノール洗浄によって余剰のプローブと TAMRA-azide を除去し共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、細胞内から TAMRA の蛍光が検出された。また、etomoxir 共存下では TAMRA の蛍光は検出されなかった。以上から、プローブ 2 を用いた β 酸化活性のイメージングが可能であることが分かった。

なお、Fluorescein や Cy5-azide など、様々な蛍光色素による β 酸化活性のイメージングも可能である。

さらに我々はプローブ 2 を用いたマウス肝臓での β 酸化検出に取り組んだ。プローブ 2 をマウスに腹腔内投与した後、肝臓を単離しスライスサンプルを作成した。このスライスサンプル上で CuAAC によって TAMRA-azide を導入したところ、イメージングにおいて TAMRA 蛍光が検出された(図 5a)。この蛍光強度

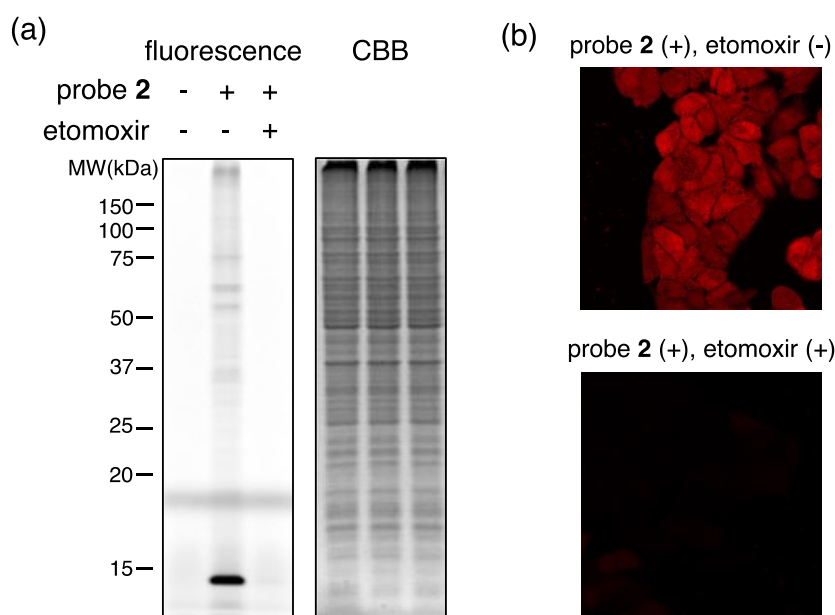


図 4. (a)ABPP によるラベル化確認. (b)培養細胞での β 酸化イメージング.

は etomoxir を投与したマウスでは大きく減弱したことから、マウスの肝臓でも β 酸化をイメージング可能であることが示された。また、 β 酸化の活性化剤である bezafibrate を投与したマウスでは蛍光強度が増加することも FACS でも確認できた(図 5b)。最後に我々は、プローブ 2 の蛍光強度が高い細胞での mRNA の発現量変化を調べることで、 β 酸化活性が高い細胞でどのような変化が起こっているかを解析した。Bezafibrate およびプローブ 2 を投与したマウスの肝細胞を単離し、FACS によってプローブの蛍光強度に応じて細胞群を分離した。その後、RNA-sequence によって各細胞群を解析したところ、プローブの蛍光強度が高い細胞群では腫瘍形成に関する mRNA が高発現していた(図 5c)。Bezafibrate は齧歯類に投与した際に腫瘍形成を促進することから^[9]、本結果は β 酸化活性が高い細胞では bezafibrate 投与に伴う腫瘍形成が進行していることを示唆していると考えている。また、この結果はプローブ 2 と FACS/RNA-sequence を組み合わせることで β 酸化が活性化している細胞で生じる変化を選択的に解析することが可能であることを示しており、プローブ 2 を用いて様々な β 酸化変化が疾病や生命現象に関与するメカニズムの解明につながることを期待される（他の代謝経路を検出可能なプローブを開発できれば、同様の展開が期待できる）。

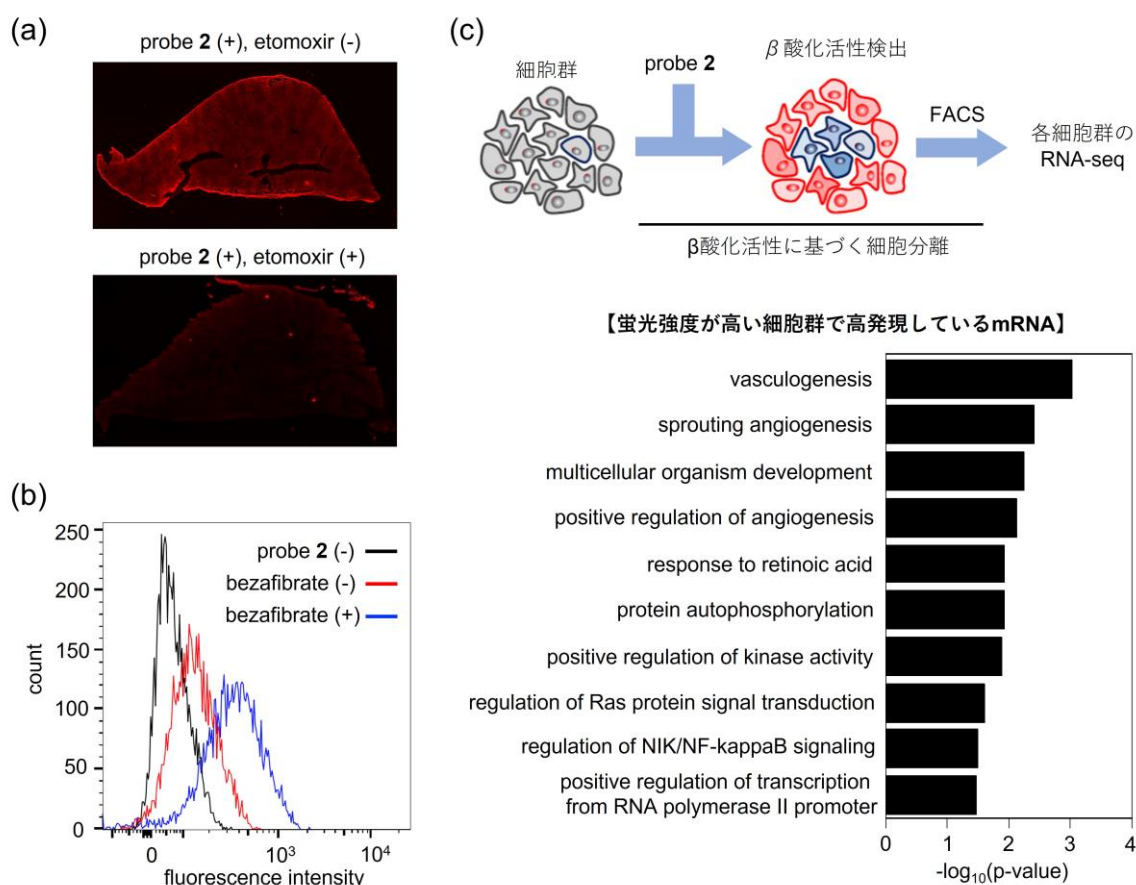


図 5. (a)マウス肝臓での β 酸化イメージング. (b)FACS によるマウス肝臓での β 酸化活性変化の測定.
(c)Bezafibrate 投与マウス肝細胞におけるプローブ蛍光強度をもとにした RNA-sequence 解析.

4. おわりに

本稿ではミトコンドリア β 酸化を検出可能なプローブの開発に関して紹介させていただいた。現在はプローブを利用したミトコンドリア β 酸化の阻害剤探索に加え、ミトコンドリア β 酸化だけでなくペルオキシソーム β 酸化を検出可能なプローブの開発にも取り組んでいる（後者については当研究室の学生が本ニュースレターで研究紹介の機会をいただいておりますので、そちらも合わせてご覧いただければ幸いです）。代謝経路は古くから研究されてきたが、未解明な部分も多く魅力的な研究対象である。ケミカルバイオロ

ジの立場から代謝経路を眺め、生化学・分子生物学などバイオリジストとの共同研究を積極的に行うことで、代謝経路の理解や代謝経路を標的とした創薬研究をさらに進めることができると期待している。今後もプローブ開発を基盤とした代謝経路の理解と創薬への応用をテーマに研究を発展させていきたい。

謝辞

本研究は、私が所属する九州大学大学院薬学研究院、王子田研究室で行わせていただきました。研究をサポートしご指導してくださる王子田彰夫先生および一緒に実験を進めてくれた王子田研の学生の方々に深く感謝します。また、九州大学大学院薬学研究院の大戸茂弘教授、松永直哉教授、小柳悟教授、鶴田朗人助教、吉田優哉助教にはマウスでの実験などにおいて共同研究をしていただきました。本成果は多くの方々のご協力のおかげであり、素晴らしい環境で研究をさせていただいていることに深く感謝します。本研究は JSPS 科研費などの支援により遂行されました。

参考文献

- [1] Luengo, A.; Gui, D. Y.; Heiden, M. G. V. *Cell. Chem. Biol.* **2017**, 24, 1161
- [2] Liu, H. W.; Chen, L.; Xu, C.; Li, Z.; Zhang, H.; Zhang, X. B.; Tan, W. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, 47, 7140.
- [3] Ma, Y.; Temkin, S. M.; Hawkrige, A. M.; Guo, C.; Wang, W.; Wang, X.-Y.; Fang, X. *Cancer Lett.* **2018**, 435, 92.
- [4] Hliwa, A.; R.-Molina, B.; Laski, D.; Mika, A.; Sledzinski, T. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 6900.
- [5] Hamsanathan, S.; Gurkar, A. U. *Front. Physiol.* **2022**, 13, 796850.
- [6] Uchinomiya, S.; Matsunaga, N.; Kamoda, K.; Kawagoe, R.; Tsuruta, A.; Ohdo, S.; Ojida. *Chem. Commun.* **2020**, 56, 3023.
- [7] Matsumoto, A.; Matsui, I.; Uchinomiya, S.; Katsuma, Y.; Yasuda, S.; Okushima, H.; Imai, A.; Yamamoto, T.; Ojida, A.; Inoue, K.; Isaka, Y. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2023**, 325, E552.
- [8] Uchinomiya, S.; Nagaura, T.; Weber, M.; Zenmyo, N.; Matsuo, Y.; Yoshida, Y.; Tsuruta, A.; Koyanagi, S.; Ohdo, S.; Matsunaga, N.; Ojida, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, 145, 8248.
- [9] Corton, J. C.; Peters, J. M.; Klaunig, J. E. *Arch. Toxicol.* **2018**, 92, 83-119.

1:1 結合型バイパロットピック抗体の創出と利用

京都大学大学院薬学研究科
(国研) 医薬基盤・健康・栄養研究所
秋葉 宏樹



著者紹介: 静岡県立富士高等学校を卒業、東京大学教養学部理科一類を経て、同工学部化学生命工学科卒。卒論配属から、2013 年同大学院工学系研究科先端学際工学専攻博士課程修了まで、小宮山眞教授の研究室に在籍し、希土類錯体の合成とその分光特性を利用したセンサー分子の開発で学位を取得しました。その後、東京大学大学院工学系研究科 津本研究室において、抗体の分子認識を中心に蛋白質科学を学び直しました。2016 年から医薬基盤・健康・栄養研究所 (医薬健栄研) 創薬デザイン研究センターに勤め、抗体創薬技術の開発へと本格的にシフトし、講演内容の基盤を築き始めました。2020 年からは京都大学大学院薬学研究科 (京大院薬) と医薬健栄研の連携による未踏創薬を掲げて新たに開設されたバイオ医薬品化学分野に所属し、1:1 クロスアポイントメントによる両機関兼務にて現在に至ります。自由な研究環境に加え、両機関の施設、学生の皆さんや先生方の支援をいただきながら、基礎薬学の基盤 (特に有機化学) と抗体創薬技術を融合した研究を進めています。本部会、そしてバイオ関連化学シンポジウムは、学生時から多くの大先輩や友人の皆様に囲まれ、深夜まで交流を深めつつ、喜びも苦難も共有してきた、私にとってホームグラウンドのような場です。講演賞をいただき、さらにこのような研究紹介の場をいただけたことを大変栄誉に思います。

1. Tumor necrosis factor receptor superfamily (TNFRSF)

TNFRSF 蛋白質は細胞膜に発現し、TNF α 等の特異的リガンドとの相互作用によって活性化する。リガンドは 3 量体蛋白質であり、相互作用によって 3 分子の TNFRSF が集積し、これを介してクラスターを形成することで、細胞内のシグナル下流蛋白質の再配置を促すことが TNFRSF に共通する活性化メカニズムであると考えられている (Fig. 1) [1]。TNFRSF の活性化は免疫細胞の制御やアポトーシスに関わるため、活性化を促すアゴニストやこれを抑制するアンタゴニストが医薬品候補として開発されている。我々は、抗体をアゴニストやアンタゴニストとして利用するための技術開発を進めてきた。

2. バイパロットピック抗体 (BpAb) の利用

通常の抗体は 2 つ以上の抗原結合領域 (可変領域、Fv) をもち、多価結合の作用を示す。特に TNFRSF に対しては、多価の同時結合作用や解離平衡を通じて TNFRSF の多量化を促進し、効果的にアゴニストとして利用される抗体が数多く報告されている [1]。一方で、抗体をアンタゴニストとして利用する場合、多価結合能が仇となる。例として、リウマチなどの炎症性疾患で活性化される TNF α -TNFR1 シグナル経路があ

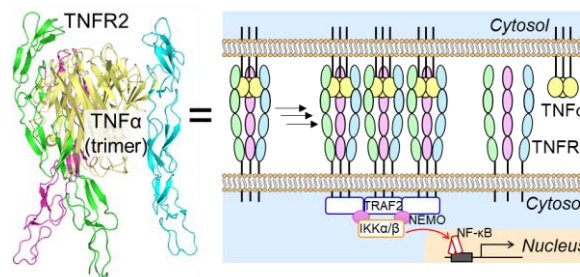


Fig. 1. TNFRSF の活性化メカニズム。我々が標的としたうちの 1 つ、TNFR2 を例に示す。

る。TNFR1 に対するアンタゴニストは医薬品として期待されるが、2つの Fv をもつ通常 IgG 抗体では、2つの可変領域の同時結合に由来する弱いアゴニスト活性が観察されてしまう (Fig. 2、中央)。このために、通常型の TNFR1 アンタゴニスト抗体が治験において副作用を示し、開発中止となった例がある^[2,3]。この抗体の開発者は、1つの Fv をもつ形に改変することでこの欠点を克服し、さらなる開発を進めている^[3]。

このような背景の下、我々は、バイパトピック抗体 (BpAb) という改変抗体に着目した。BpAb は、標的分子の異なる 2つのエピトープに結合する二重特異性抗体である。2つの Fv をもつ IgG 型 BpAb の場合、多数の標的分子を架橋するような n:n 複合体形成や (Fig. 2 左)、1:1 に限局された複合体形成が可能である (Fig. 2 右)^[4]。特に分子間架橋はクラスター形成を通じたシグナル活性化やエンドサイトーシスを促すために、薬理活性が期待され、これまでに Her2 等を標的に複数の分子が開発されている^[5]。我々は、TNFRSF のクラスター形成による活性化を制御するのに BpAb が有効であると考えた。そこで、TNFRSF の中でも制御性 T 細胞 (Treg) に発現しその増殖を制御する TNFR2 に着目した。TNFR2 に対するアゴニストは Treg 誘導による自己免疫疾患等の治療に、アンタゴニストは腫瘍環境中の Treg 抑制を通じて抗がん剤として利用できるため、多様な活性の分子に医薬品としての有用性が期待されるためである^[6]。

TNFR2 の 5 点の異なるエピトープに結合する Fv を利用し、我々の最適化した二重特異性抗体取得法によって高純度の IgG 型の BpAb を網羅的に取得した (Fig. 3A)^[7]。BpAb は通常抗体や凝集体の混在がその機能に大きな影響を与えるため、高純度の二重特異性抗体を取得する手法の開発が、研究全体の質の担保によって非常に重要であった。10 点の BpAb の生物活性をレポーター細胞によって 5 点の通常型抗体と比較したところ、通常型抗体はいずれも弱いアゴニストであり、うち 1 点は TNF α 競合アンタゴニストとしての性質も示した。一方で、BpAb 群は 10 点のうち 6 点もの強いアゴニストを含んでいた。これに加えて、通常型抗体に避けられなかった、活性化能を完全に失う強いアンタゴニストを創出することにも成功した

バイパトピック抗体 (BpAb) :
同一標的分子の異なる2つのエピトープに結合する二重特異性抗体

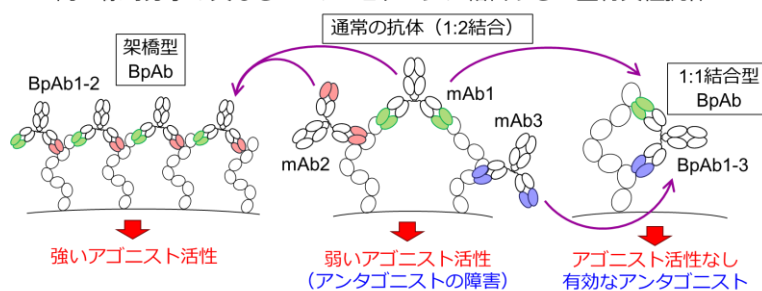
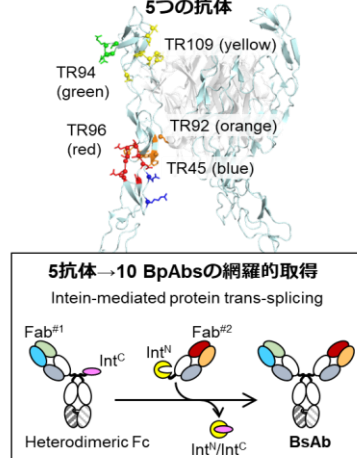


Fig. 2. 通常 IgG 抗体とバイパトピック抗体の抗原結合様式ならびに TNFRSF を標的とした場合に想定される機能。

A) 異なるエピトープに結合する 5つの抗体



B)

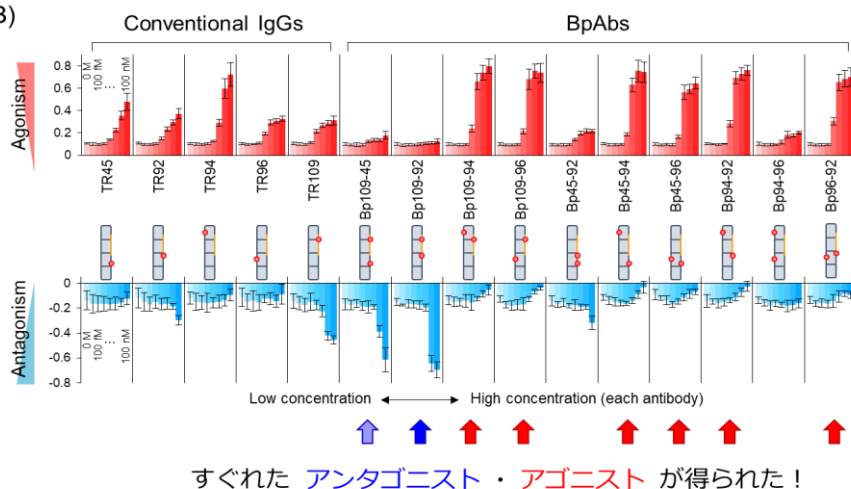


Fig. 3. A) TNFR2 の異なるエピトープに結合する 5つの抗体から取得される BpAb. B) TNF α 不在/存在下のレポーター細胞株による TNFR2 下流シグナルの抗体濃度依存性評価。アゴニスト (上段)・アンタゴニスト (下段) 両活性とも、棒グラフが大きいほどその活性が高い。

(Fig. 3B)。このアンタゴニスト Bp109-92 は、ヒト末梢血単核細胞中の Treg 増殖活性の抑制も示し、医薬品リードとしての有用性を示した^[8]。現在この分子を基点に、実用化に向けた取り組みが進んでいる。

3. 複合体構造解析によるメカニズム解析

通常型抗体や BpAb が TNFR2 と形成する複合体について、サイズ排除クロマトグラフィー・多角度光散乱やマスフォトメトリーを利用したサイズ分析を実施した。その結果、通常型抗体はいずれも抗体:TNFR2 = 1:2 複合体を形成した。一方で、強いアゴニスト BpAb は 2:2 以上の大きな複合体、強いアンタゴニスト Bp109-92 は 1:1 複合体のみを排他的に形成した。当初の想定通り、複合体形成プロファイルと BpAb のシグナル誘導活性の関係性は、クラスター形成による活性化メカニズムと一致した (Fig. 4)。特に Bp109-92 による 1:1 形成は、濃度や当量比に依存せず、多価結合の特性を示さない排他的な現象であった。Bp109-92 は由来となる単独の抗原結合フラグメント (Fab) よりも抗原に強く結合するため、単独の Fab を利用する場合と比較して、シグナルを誘導しないアンタゴニスト設計としての有用性が明らかになった。

Bp109-92 が 1:1 複合体を選択的に形成することに着目し、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によって複合体構造を解析した。構造解析によって得られたエピトープ位置は、変異体解析によって同定していた位置と完全に一致し、2 つの Fab が並列して結合する構造をとることが示された (Fig. 5)。この複合体構造情報に、エピトープ、BpAb-TNFR2 複合体サイズ、シグナル誘導活性についての網羅的な情報を組み合わせることで、エピトープの相対位置情報から IgG 型 BpAb の活性をデザインできることを明らかにした^[8]。

4. 1:1 複合体形成は特殊であるか？

BpAb による 1:1 複合体形成は、BpAb の概念の登場当初から結合能の向上策としてしばしば試みられてきた^[4]。一方で、「1:1 複合体のみを排他的に形成させる」ことで抗体分子の機能化を実現したのは、我々に独自の試みである。そこで、この 1:1 複合体形成のメカニズムに迫り、これを通じて 1:1 複合体形成を制御したいと考えた。

Bp109-92-TNFR2 複合体においては、BpAb を形成する 2 つの Fab 間に接触があった。一方で、この領域に荷電アミノ酸を変異導入しても、TNFR2 との相互作用ならびにその生物活性にはほとんど差異が観察さ

複合体サイズ分析 (マスフォトメトリー)

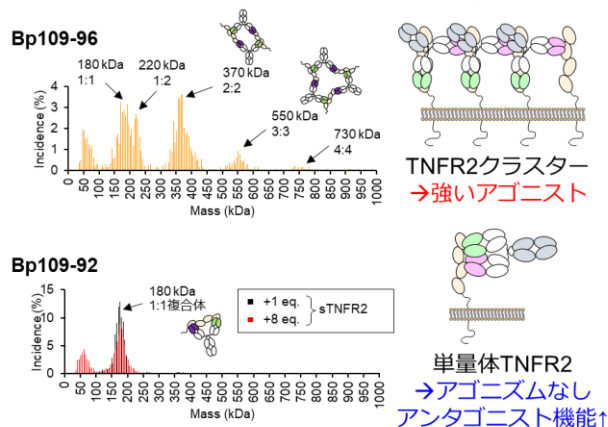


Fig. 4. アゴニスト・アンタゴニスト BpAb が TNFR2 と形成する複合体のサイズ分析。

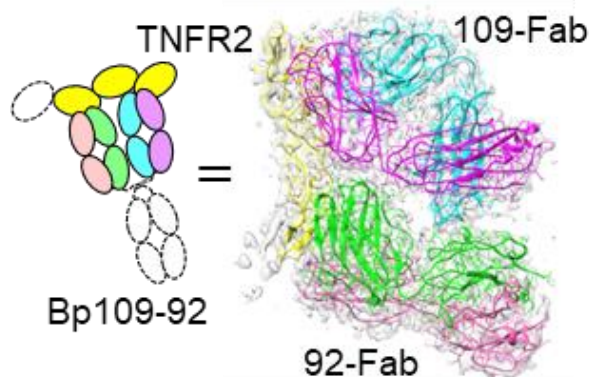


Fig. 5. Bp109-92 – TNFR2 複合体の構造。

れず、Fab 間の接触が 1:1 複合体形成にさほど重要でないことが示唆された。そこで、立体的な制約がなければ 1:1 複合体形成が優先するのではないかと着想した。これを示すべく、2 つの取り組みを実施した。

第一には、TNFRSF の一員である CD30 に対する BpAb のデザインである。CD30 はドメイン間に柔軟領域をもつため、これを挟むように抗体を選定すれば、1:1 結合するものが取得可能であると考えた。実際に、Brentuximab vedotin の由来となった抗体 (cAC10) の Fv と、柔軟領域を挟んだ位置に結合する抗体の Fv を有する BpAb#2, #3 は、1:1 複合体を優先的に形成することが、複合体サイズ分析によって明らかとなった。これらの BpAb は、cAC10 や、柔軟領域を挟まない BpAb#1 が強いアゴニストであるのと対照的に、強いアンタゴニストとしての機能を示した (Fig. 6A)。

第二には、TNFR2 に対するアゴニスト BpAb のリンカー伸長である。CD30 では抗原側が柔軟性を示したのと同様に、BpAb が柔軟性を示すのであれば、1:1 複合体形成を優先するのではないかと考えた。強い TNFR2 アゴニストの 1 つ、Bp96-92 は、一方の Fv が TNFR2 表面上で TNF α と競合する。そのため、アゴニスト活性を失えばアンタゴニストに転換する可能性がある。多種のリンカーを検討したところ、32 アミノ酸からなる GP リンカーを複数ユニット導入することで、形成する複合体の制御に成功した。Fab 間に 4 ユニット分の GP リンカーを導入することで、1:1 複合体を優先的に形成し、アゴニストからアンタゴニストへと転換した (Fig. 6B)。

これら 2 つの実験系では、立体的制約を取り払うことで BpAb が 1:1 複合体形成を優先した。物理化学的解析のみならず、クラスター形成に伴うシグナル活性が完全に抑制されることによって、細胞膜上でも同様に 1:1 複合体形成が優位であることが示唆された。現在、さらに詳細な 1:1 複合体形成機序を調べており、これを複合体制御法デザインへつなげたいと考えている。

5. 1:1 複合体の利用

1:1 複合体形成する BpAb はここまでに示したように、TNFRSF の活性化を示さないアンタゴニストとして有用である。これのみならず、構造解析やテンプレート反応等の多様な応用が可能である。

まず、複合体構造解析に挑んだ。先述の通り我々は、通常 IgG 型で 1:1 複合体形成する Bp109-92 と TNFR2 との複合体解析に成功している (Fig. 5)。4. で取得した、GP リンカーを 4 ユニット挿入した Bp96-92-GP4 について、TNFR2 との 1:1 複合体を単離し、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析を実施したところ、2 つの Fab が相対する位置に結合した複合体が観察された。Bp109-92 の例と同様に、エピトープ

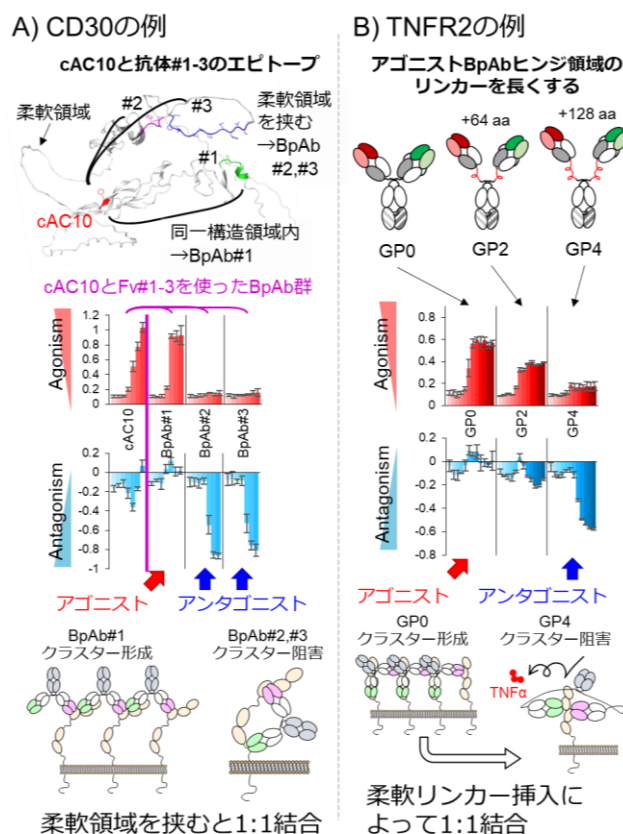


Fig. 6. 立体的制約を除くことによる 1:1 複合体優先形成。A) 標的が柔軟領域をもつ CD30 のケース。柔軟領域を挟む場合、1:1 複合体を形成する。B) TNFR2 アゴニスト BpAb のケース。長鎖リンカー挿入によって 1:1 複合体を形成しアンタゴニストに転換する。

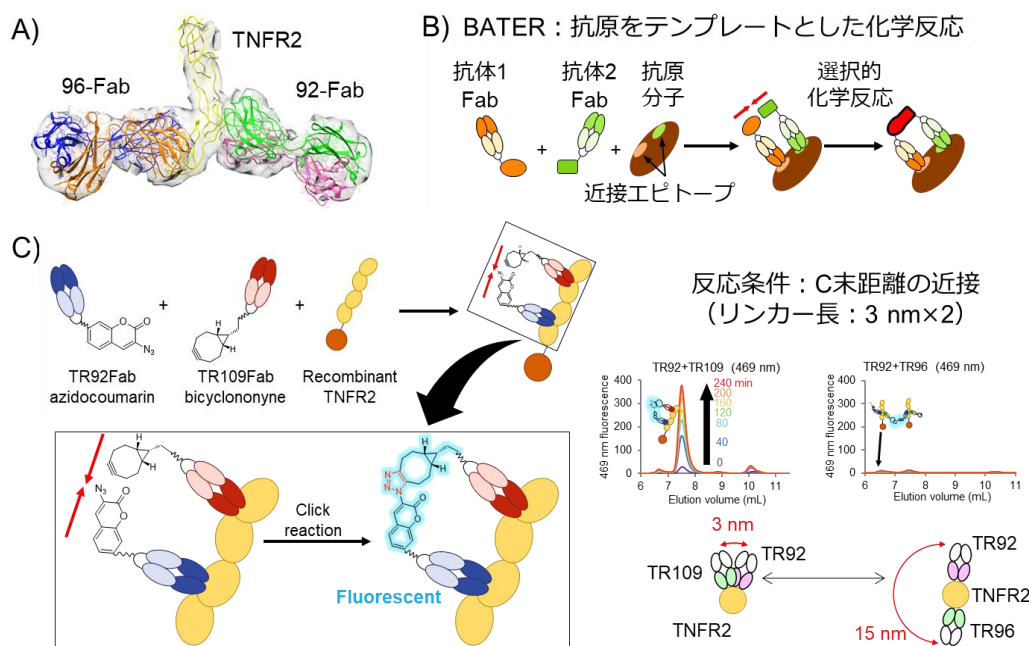


Fig. 7. A) Bp96-92-GP4 – TNFR2 複合体の構造。B) BATER の概念。C) 発蛍光性のクリック反応を利用した BATER の評価。Fab の C 末端が近接する組み合わせではテンプレート反応が進行したが、C 末端が近接しない組み合わせでは反応進行が観察されなかった。

位置が変異体解析により決定されたものと完全に一致していただけでなく、Fab がどのような配向で結合するかを含む完全なエピトープ情報を得ることができた (Fig. 7A)。この情報は、BpAb の機能メカニズムの理解を助けるだけでなく、抗体改変を含めた分子工学の基盤となる。

分子工学の例として、構造情報を利用した「抗原テンプレート反応」を新たに開発し、これを **biepitopic antigen-templated chemical reaction (BATER)** と名付けた (Fig. 7B) ^[10]。テンプレート反応とは、生体高分子等の示す高い特異性・親和性の相互作用をテンプレートとして利用し、反応性官能基の局所濃度を向上させることで、迅速かつ部位特異的に反応を進行させる手法である。DNA の二本鎖形成を利用した DNA テンプレート反応がよく知られ、分子検出などに利用される^[9]。一方で、抗原抗体間の相互作用を利用したアプローチは未開拓であった。これは、補助的な親和性部位なしには、反応進行に十分な近距離に反応性官能基を近接させる技術がなかったためである。我々は Bp109-92 が TNFR2 に結合する際に、2 つの抗体 Fab が並列し、その C 末端側が近接することに着目し、C 末端側に反応性官能基を導入することで、テンプレート反応が実現できるのではないかと考えた。実際に、発蛍光性の銅フリークリック反応を示す官能基を 2 つの抗体 Fab (TR92Fab、TR109Fab) の C 末端側にそれぞれ導入し、両者を混合した際の反応進行を蛍光強度によりモニターしたところ、TNFR2 の存在下で連結反応の速度が飛躍的に高まることを観察した (Fig. 7C)。また、この反応速度は PEG リンカー長に依存した。本研究で利用したリンカーは最長でその平均末端間距離が 2.6 nm 程度であるが、TNFR2 に結合した際の 2 つの Fab の C 末端間距離は 3.1 nm 程度であることから、衝突頻度が十分に高まったためと考えられる。一方で、TR92 と相対した位置に結合する TR96Fab を利用したところ、C 末端間が十分に近接しないために連結反応の加速は観察されなかった (Fig. 7C)。BATER はエピトープの組み合わせに従って化学反応をもたらす点が特徴であり、これを利用した諸機能への応用が期待される。このように、1:1 複合体から、新たな分子工学技術を創出することができた。

6. おわりに

本研究は、抗体機能の改変の一つの手法として理解されていた BpAb 創製技術の中で、近年創薬の場面で着目される多量体形成ではなく、1:1 複合体形成に光を当て、リンカー構造改変を通じてその制御を実現した。特に、1:1 複合体の形成技術を、優れた TNFR2 アンタゴニストとして実用化するのみならず、研究の過程で得られた複合体構造情報を利用して異なる概念の分子工学技術の開発へと進めつつある。今後も、本研究で得られた知見を基に、化学、生命科学への基礎的な側面からの貢献、医薬品としての実用化への貢献の両者を視野に入れて、多様な分子改変技術開発を推し進めていきたい。

謝辞

本研究は京大院薬と医薬健栄研の連携研究として、両機関の皆様のご協力の下で実施されました。特に、現所属である京大院薬 バイオ医薬品化学分野の学生の皆様、大野浩章先生、医薬健栄研 創薬デザイン研究センター 伊勢知子先生、鎌田春彦先生、永田諭志先生、津本浩平先生（東京大学大学院工学系研究科、研究時代に同センターを兼務）に御礼申し上げます。また、共同研究者である大阪大学大学院生命機能研究科 藤田純三先生、難波啓一先生に御礼申し上げます。本研究においては、AMED 創薬基盤推進研究事業、生命科学・創薬研究支援基盤事業、JSPS 基盤研究(C)、武田科学振興財団、京都大学教育研究振興財団、京都市京都発革新的医療技術研究開発助成事業の助成を受けています。最後に、私たちの研究の紹介の機会をくださった、日本化学会生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会幹事の先生方、特にニュースレター編集委員の先生方に深く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] (a) Wajant, H. *Cell Death Differ.*, **2015**, 22, 1727; (b) Vanamee, E. S.; Faustman, D. L. *Cells*, **2020**, 9, 764; (c) Yu, X.; Orr, C. M.; Chan, H. T. C.; James, S.; Penfold, C. A.; Kim, J.; Inzhelevskaya, T.; Mockridge, C. I.; Cox, K. L.; Essex, J. W.; Tews, I.; Glennie, M. J.; Cragg, M. S. *Nature*, **2023**, 614, 539.
- [2] Richter, F.; Zettlitz, K. A.; Seifert, O.; Herrmann, A.; Scheurich, P.; Pfizenmaier, K.; Kontermann, R. E. *mAbs*, **2019**, 11, 166.
- [3] Fischer, R.; Kontermann, R. E.; Pfizenmaier, K. *Front. Cell. Dev. Biol.*, **2020**, 8, 401.
- [4] Akiba, H.; Tsumoto, K. *Translat. Regulat. Sci.*, **2020**, 2, 1.
- [5] Oostindie, S. C.; Lazar, G. A.; Schuurman, J.; Parren, P. W. H. I. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **1999**, 21, 715.
- [6] (a) Bai, J.; Ding, B.; Li, H. *Front. Immunol.*, **2022**, 13, 844931; (b) Medler, J.; Kucha, K.; Wajant, H. *Cancers*, **2022**, 14, 2603; (c) Faustman, D.; Davis, M. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2010**, 9, 482.
- [7] Akiba, H.; Ise, T.; Nagata, S.; Kamada, H.; Ohno, H.; Tsumoto, K. *Sci. Rep.*, **2021**, 11, 19411.
- [8] Akiba, H.; Fujita, J.; Ise, T.; Nishiyama, K.; Miyata, T.; Kato, T.; Namba, K.; Ohno, H.; Kamada, H.; Nagata, S.; Tsumoto, K. *Commun. Biol.*, **2023**, 6, 987.
- [9] (a) Li, X.; Liu, D. R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 4848; (b) Di Pisa, M.; Seitz, O. *ChemMedChem*, **2017**, 12, 872.
- [10] Nishiyama, K., Akiba, H.; Nagata, S.; Tsumoto, K.; Kamada, H.; Ohno, H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, 62, e202306431.

Award Accounts

🏆 第17回バイオ関連化学シンポジウムポスター賞

重度な低酸素環境を選択的に可視化する
近赤外蛍光プローブの開発¹ 東京大学大学院薬学系研究科² 東京大学大学院医学系研究科笠井 貴文¹, 藤田 恭平², 小松 徹², 浦野 泰照^{1,2}

著者紹介: 東京大学大学院薬学系研究科博士課程一年。薬品代謝化学教室所属。東京大学生命科学技術国際卓越大学院 (WINGS-LST) 所属。研究領域はケミカルバイオロジー分野で、がんイメージング、低酸素環境、蛍光プローブ、光音響プローブ、機能性ペプチド開発、光物理化学などに関する研究をしています。研究生活では、生み出した有機化学プローブを生物や医工学領域へ展開できることに達成感を感じつつ、偶発的な飲み会や週一回のサッカーを楽しんでいます。趣味は野球観戦や水泳をすることです。あと、最近はつけ麺屋や肉料理屋の開拓にもはまっています。

この度はこのような栄えある賞を頂き、身に余る光栄です。本研究を遂行するにあたり大変お世話になった、浦野泰照教授、藤田恭平助教、小松徹助教に深く御礼申し上げます。また、普段の研究生活で共に励まし合い、共に研究に勤しむ、薬品代謝化学教室・生体情報学分野の研究員の皆様にも感謝申し上げます。これからもより面白い研究を展開できるよう精進してまいりますので、今後ともどうぞよろしくお願いいたします。

1. はじめに

低酸素環境とは生体内において酸素の供給不足や過剰消費などにより正常な機能を維持するための酸素濃度が不足した環境のことを指し、がんや虚血など様々な疾患と関与している。また、これらの疾患では酸素濃度が1%以下の重度な低酸素環境になっていることが報告されている^{1,2}。したがって、リアルタイムで重度な低酸素環境の検出を可能とする蛍光プローブは、疾患のメカニズム解明や新たな診断法を開発する上で極めて重要である。特に、生体で利用できる近赤外蛍光プローブは非常に有効なツールと成り得る一方、既存の *in vivo* 有用性の高い近赤外蛍光プローブは酸素濃度が5%においても活性化されるため^{3,4}、疾患における低酸素環境を選択的にイメージングすることは極めて困難であった。そこで本研究では、*in vivo* イメージングにも利用可能な重度の低酸素環境を選択的に可視化する近赤外蛍光プローブの開発を行った。

2. 近赤外蛍光プローブ T-azoJSiR640 の設計・合成

近赤外蛍光団として Julolidine Si-rhodamine を用いた近赤外蛍光プローブ T-azoJSiR640 を設計・合成した (Figure 1)。本プローブは常酸素環境下では無蛍光性 ($\Phi_f < 0.01$) であるが、低酸素環境下でアゾ基の還元的切断が生じることで、近赤外領域に最大蛍光波長を有する T-JSiR640 が生成する。

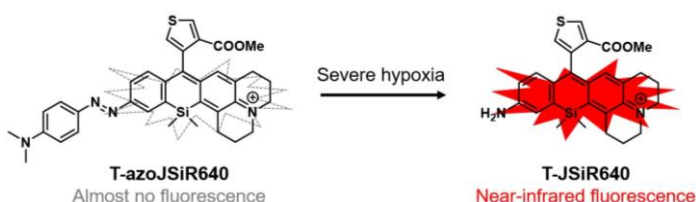


Figure 1: 本研究で開発した近赤外蛍光プローブ

3. ラット肝ミクロソームを用いた *in vitro* アッセイ評価

T-azoJSiR640 が低酸素環境を検出できるか調べるため、NADPH-シトクロム P450 還元酵素などの各種生体還元系を含むラット肝ミクロソームを用いた *in vitro* アッセイにおいて評価した。アルゴン置換にて溶媒・容器内酸素の脱気を 30 分間行った場合、蛍光シグナルの上昇が確認された。その一方、脱気を行わなかった場合では、蛍光シグナルの上昇は確認されなかった。

4. 生細胞イメージング

次に、肺腺がん A549 細胞を用いた生細胞イメージングを行った。その結果、酸素濃度 0.3%と 1%で顕著な蛍光上昇が確認され、本プローブは重度な低酸素環境を選択的にイメージングすることが可能であった (Figure 2)。このように T-azoJSiR640 が重度な低酸素環境下で選択的に活性化されたのは、アゾ基の還元的切断において初発過程で生成するアゾアニオンラジカルの逆酸化速度が速いためだと考察している。また、フラボプロテイン阻害剤である diphenyleneiodonium chloride を添加したところ、酸素濃度 0.3%において蛍光シグナルの増加が大きく抑制されたことから、本プローブのアゾ基の還元的切断は酵素反応依存的であることが示唆された。

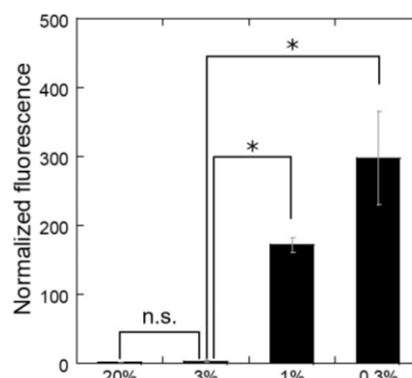


Figure 2 : 各酸素濃度における蛍光強度

Fluorescence intensity of individual condition was normalized to that of 20% oxygen concentration. * $p < 0.01$ by Welch's t-test. n.s. = not significant. Error bar represents S.D. $n = 4$.

5. 肝臓虚血モデルマウスを用いた蛍光イメージング

最後に、肝臓虚血モデルマウスに対してプローブを全身投与し、麻酔下でイメージングを行った。その結果、非虚血状態では肝臓において蛍光シグナルの上昇は確認されなかった一方、虚血状態では顕著な蛍光シグナルの上昇が確認された (Figure 3)。また、LC-MS/MS 解析より、虚血肝臓からアゾ基が還元的に切断された T-JSiR640 が顕著に生成していることを確認した。以上の結果より、近赤外蛍光プローブ T-azoJSiR640 は生きた動物個体での虚血状態を検出可能な近赤外蛍光プローブとして機能することが示唆された。

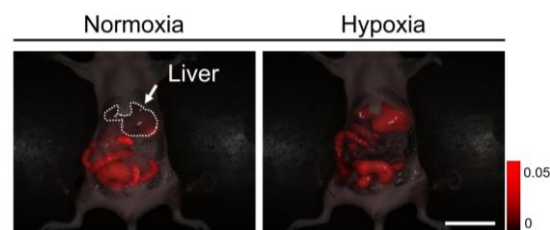


Figure 3 : 肝臓虚血モデルマウスを用いたイメージング

The portal vein was ligated at 30 min after probe injection to induce liver ischemia. The photograph of hypoxia was taken 25 min after liver ischemia. Scale bars = 2 cm.

6. まとめ

開発した近赤外蛍光プローブ T-azoJSiR640 は、低酸素環境と関連する疾患のメカニズム解明や新たな診断の開発に極めて有用なツールと成り得ることが示唆された。今後は、がんや虚血などの疾患イメージングへの応用が大いに期待される。本研究の一部は ChemRxiv にて公開している (DOI: 10.26434/chemrxiv-2023-k3r73)。

参考文献

- [1] Brown, J. Martin; Wilson, William R. *Nat. Rev. cancer*, **2004**, 4, 437-447.
- [2] Sekhon, Mypinder S.; Ainslie, Philip N.; Menon, David K.; Thiara, Sharanjit S.; Cardim, D.; Gupta, Arun K. MBBS; Hoiland, Ryan L.; Gooderham, P.; Griesdale, Donald E. *Crit. Care Med.*, **2020**, 48, 378-384.
- [3] Guo, T.; Cui, L.; Shen, J.; Zhu, W.; Xu, Y.; Qian, X. *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 10820-10822.
- [4] Hanaoka, K.; Kagami, Y.; Piao, W.; Myochin, T.; Numasawa, K.; Kuriki, Y.; Ikeno, T.; Ueno, T.; Komatsu, T.; Terai, T.; Nagano, T.; Urano, Y. *Chem. Commun.*, **2018**, 54, 6939-6942.

Award Accounts

第17回バイオ関連化学シンポジウムポスター賞

1 分子ペプチドアミノ酸配列決定法の開発を目指した
N末端 Gly・Phe 結合人工抗体の創製¹ 名古屋大学大学院工学系研究科² 名古屋大学未来創造機構ナノライフシステム研究所菅野 晃矢¹, 近藤 太志¹, 梅本 駿¹, 藤野 公茂¹, 林 剛介¹, 村上 裕^{1,2}

著者紹介：名古屋大学大学院 村上研究室 博士前期課程 1 年の菅野です。日々研究室だけでなく外でも様々な刺激を受ける日々を過ごしています。具体例??そうですね…。2つだけ挙げると、コンビニエンスストアで私のポイントカードがレンジでチンされたり、帰宅途中の地元駅で、見知らぬ女子高生が私の目の前でスマホを落としたにも関わらず、気付かずに自転車で元気良く走り去ったために、彼女を追いかけて 200 メートル全力疾走したりと、とても愉快的な毎日です。

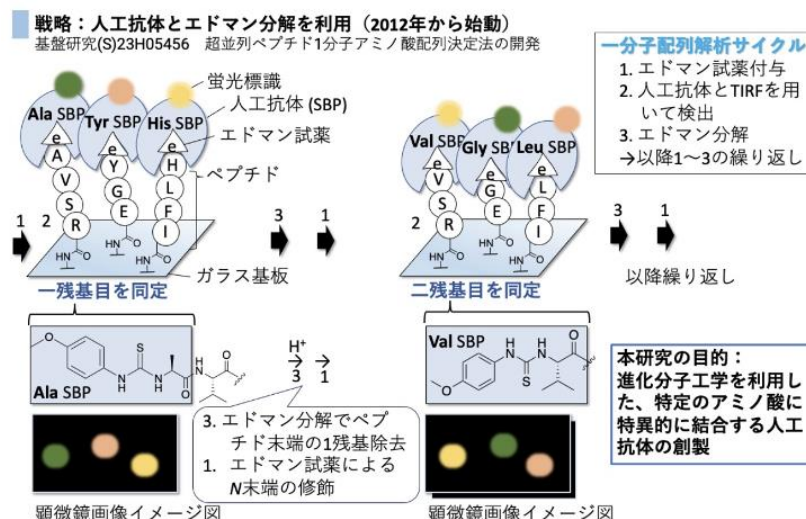
さて、今年度は学会の準備に並行して大学院の研究・講義だけでなく、学部生の実験補佐や就職活動、裁判員裁判へのノミネート、市役所からの地域福祉アンケートの依頼など、公私共に忙しい毎日を過ごしていました。そんな中でも今回初めての学会のポスター発表で、このような特別な賞を頂けたことを、この上なく嬉しく思います!! 今後の励みにすると共に、この輝かしい賞に満足せず、2023 年 9 月の菅野に誇れるような成長を、これからも一層遂げていきたいと強く思います。

最後になりましたが、研究室の村上先生をはじめ、先生方・先輩方には日夜助けていただいております。この場を借りて、心より感謝を申し上げる次第です。

1. 背景及び研究目的

DNA やタンパク質の 1 分子配列解析は、生命現象を詳細に解き明かすための新たな技術として注目を集めている。これまで DNA に関しては一分子配列解析手法が開発・実用化されているが、タンパク質の一分子配列解析は未だその手法が開発途上で、世界の研究室やベンチャー企業が、開発にしのぎを削っている。

なぜタンパク質の 1 分子配列解析は難しいのでしょうか。その要因の一つに、DNA の構成因子は A、T、G、C の 4 種類であるのに対し、タンパク質を構成するアミノ酸は天然だけでも 20 種類存在することがある。そこで、当研究室では、N 末端アミノ酸に特異的に結合する人工抗体群を開発し、これら 20 種類のアミノ酸を見分けることを試みている。具体的には、ガラス基板上に固定したペプチドに対して 3 つの操作、1. エドマン試薬の付与、2. 人工抗体と顕微鏡を用いた検出、3. 末端アミノ酸をエドマン分解により除去、を繰り返すことで、ペプチド N 末端アミノ酸から連続的に配列解析する手法を開発している (図 1)。本戦略の鍵となるのは、エドマン分解試



と顕微鏡を用いた検出、3. 末端アミノ酸をエドマン分解により除去、を繰り返すことで、ペプチド N 末端アミノ酸から連続的に配列解析する手法を開発している (図 1)。本戦略の鍵となるのは、エドマン分解試

薬で修飾したペプチド *N* 末端をアミノ酸特異的に認識し、ペプチドに結合する人工抗体である。そこで本研究ではペプチドの *N* 末端にエドマン分解試薬を反応させた標的分子を合成し、100 兆種類からなる人工抗体ライブラリから、ペプチドの *N* 末端に特異的に結合する人工抗体を TRAP 提示法^{1, 2)} を用いて得ることを試みた。

2. バイオレイヤー干渉法による人工抗体のアミノ酸特異性解析評価

TRAP 提示法、次世代シーケンサ解析、大腸菌発現・精製を経て、得られた人工抗体のアミノ酸特異性の有無と K_D をバイオレイヤー干渉法により測定した (図2)。得られた人工抗体のうち、ここでは2種類について詳細に解析した

データを示す。まず AntC14 は、Gly や Ala に結合した。Leu や Ser などのアミノ酸群や、エドマン試薬をつけていない Gly には結合能をほとんど示さなかった。続いて、AntC1 は Phe に強く結合能を示した。ここで特筆したいのは、エドマン試薬を付していない Phe はもちろんのこと、Tyr、Trp、His にもほとんど結合をしない点である。本結果は、エドマン修飾をもつ *N* 末端アミノ酸の種類を、厳密に

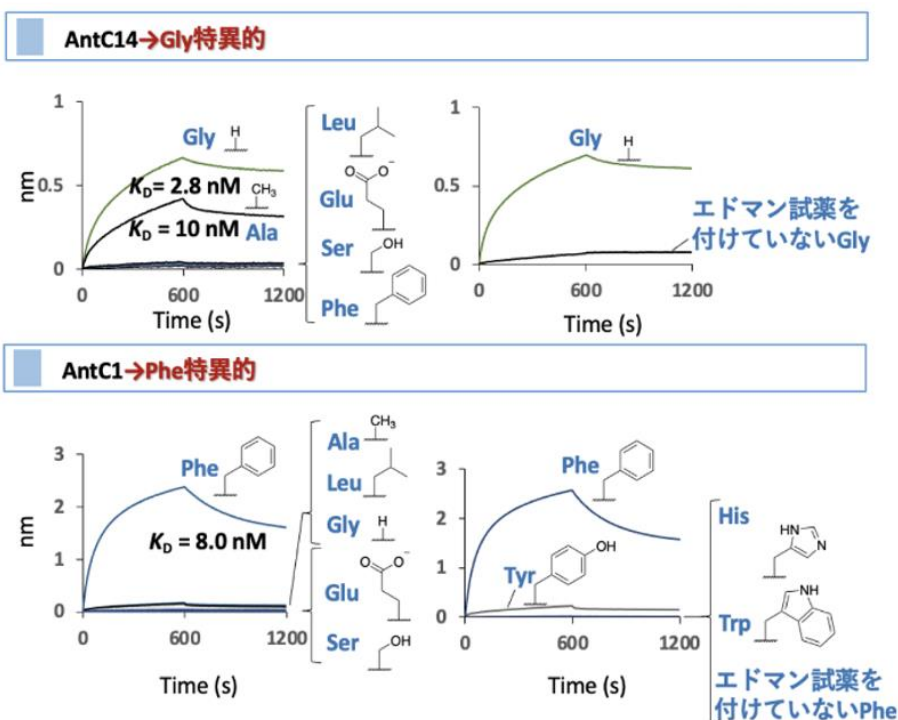


図2. 人工抗体2種のアミノ酸特異性解析評価

認識仕分ける人工抗体が、進化分子工学を用いて創製可能であることを示している。

3. 展望

近年、ペプチドの Cys や Lys を修飾することで、一部のアミノ酸のみに対応した1分子ペプチドシーケンス法が発表された³⁾。さらに、アミノペプチダーゼと、天然から得られた *N* 末端アミノ酸結合タンパク質を利用することで、さらに対応アミノ酸の種類を7種に増やしたのも報告されている⁴⁾。しかし、これらの方法は、天然アミノ酸全てに対応することは難しいと考えられ、さらなる研究が必要である。これに対し、我々は改良した TRAP 提示法を利用した進化分子工学を用いて⁵⁾、20 種類の天然アミノ酸に加えて、翻訳後修飾アミノ酸、非天然アミノ酸を認識する人工抗体を創製することで、汎用性の高い一分子ペプチドシーケンス法の開発を進めている。本方法の確立により、生命活動のさらなる解明や病気の超早期診断に繋がることを期待される。

参考文献

[1] Ishizawa, T., et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 14. [2] Kondo, T. et al., *Sci. Adv.*, **2020**, 6, 42. [3] J. M. Rothberg., et al., *Science*, **2020**, 378, 186. [4] E. M. Marcotte., et al., *Nat. Biotech.*, **2018**, 36, 1076. [5] Umemoto, S., et al., *Nucleic Acids. Research*, **2023**, 51, 11.

Award Accounts

第 17 回 バイオ関連化学シンポジウムポスター賞

抗 OX40 抗体のエピトープと速度論的性質に基づくアゴニスト活性デザイン

東京大学大学院工学系研究科
氏家寛, 田部亜季, 長門石暁, 津本浩平



著者紹介: 津本研究室・博士後期課程2年の氏家寛(うじいえかん)です。広く構えると「生体機能分子の物理化学的解析」、より詳細には「膜蛋白質を制御する抗体の分子機構の物理化学的解明と設計指針の提案」をテーマに日々研究しています。昨年初めて本シンポジウムに参加し、デザインした分子を用いて生命現象を検出・操作・利用する鮮やかな研究発表の数々に心を奪われました。学会で学んだ発想や戦略と、生命現象の分析・解明・制御を主体とする当研究室の知識や技術の両輪で、今後も自分の研究をより深化させ、学会に恩返しできるような成果を上げるべく精進いたします。

歌が趣味です。大学時代にはアカペラサークルに所属しており、先日の学園祭で OB として博士課程に残った同期4人で歌ってきました。4人とも研究分野は全く違いますが、日々の研究の喜びや苦悩を共有できる素敵な仲間です。学会などで交流を広げたり、懐かしい友人と連絡を取ったりすることの大切さを改めて感じております。

1. はじめに

工学の本質は「ものづくり」であると考えます。研究分野が宇宙であろうと、建造物であろうと、生物であろうと、光子であろうと。研究目的が現象理解であろうと、技術革新であろうと、社会実装であろうと、課題解決であろうと。では、生命現象と対峙することを選んだ私たち工学者が採るべき「工学的アプローチ」とは何だろうか。それは(あるいは私が始めるよりもずっと前から)皆様が行われていることである—自分でデザインした「もの」が生命現象をどう記述、制御するのかを調査することだ。偉大な先輩科学者、Feynman の言葉“*What I cannot create, I do not understand*”の通り、創った「わかっているもの」を利用して、「わからないもの」を解明することが「工学」の礎であると考えている。

さて。私が研究標的としたのは T 細胞活性化因子の一つ、OX40 である。OX40 は T 細胞表面で会合・集簇化しシグナルを活性化させ、T 細胞の分化や生存に関わるとされており¹(Fig.1), OX40 を人工的に集簇化しシグナルを活性化するアゴニスト抗体は、T 細胞の活性を増強する癌免疫療法に利用できると期待されている。すでに複数のアゴニスト抗体が臨床試験段階にあるが、未だ上市には至っておらず、その分子メカニズムも明らかとなっていないのが現状である。

先行研究において、そのうち 2 つのアゴニスト抗体の活性の違いについて言及がある。Cudarolimab と Pogalizumab は、Fc 受容体発現細胞存在下では同様のアゴニスト活性を示すが、非存在下では Cudarolimab のみがアゴニスト活性を示す、というものだ²。「抗体によって Fc 発現細胞依存性が異なるというのはどういうことか?」私はこの点に OX40 制御の分子メカニズムのカギがあると睨んだ。臨床試験段階にあるアゴニスト抗体(つくれるもの)を利用し、それらが OX40 を制御する分子メカニズムを明らかにすることで、アゴニスト活性に重要な抗体の物理化学的性質の抽出を目指すこととした。

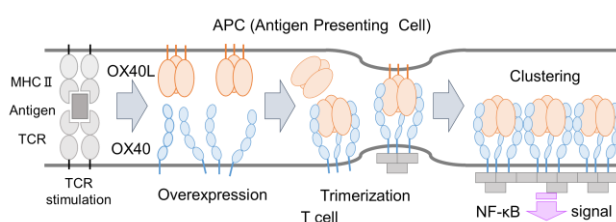


Fig. 1 OX40 は集簇化し T 細胞を活性化する

2. 抗体の結合が弱いほうが活性が高い？

まず注目したのは、抗体の結合親和性(K_D)である。一般に抗体は K_D が低く、低濃度で抗原に結合できる抗体が「よい抗体」だと考えるのが自然である。OX40 の細胞外ドメインと抗体を組み換え発現により取得し、表面プラズモン共鳴法(SPR)を用い、チップに固定化した抗体に対する OX40 の結合を定量的に測定したところ、驚くべきことに Cudarolimab は Pogalizumab と比べ、結合親和性がとても低かったのだ(Fig.2)。

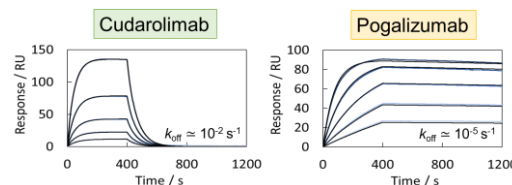


Fig. 2 OX40 と抗体の SPR 相互作用解析

細胞表面での相互作用を模倣するため、今度は OX40 の C 末端に Avi-tag を付加したコンストラクトを作製し、Biotin-Streptavidin の相互作用を用いて OX40 の C 末端をチップ表面に固定化することで相互作用解析を行った。すると Cudarolimab の解離が大幅に遅くなり、1 価の結合の解離が速くても、結合部位が 2 か所あることで結合と解離を繰り返しやすくなっていることが示唆された。

次に注目したのは、抗体の結合部位(エピトープ)である。OX40 の部分欠損変異体を作製し、変異体に対する抗体の結合の有無を SPR で調べたところ、OX40 の C 末端欠損変異体に対してはどちらの抗体も結合を示した一方で、N 末端欠損変異体に対しては Pogalizumab のみが結合を示した。これは先行研究の Pogalizumab と OX40 の共結晶構造³と矛盾のない結果であり、Cudarolimab が OX40 の N 末端側に、Pogalizumab が C 末端側に結合することを示唆している。

以上 2 つの結果から、Cudarolimab と Pogalizumab のアゴニスト活性が異なる原因について次のように考察した：Cudarolimab は「速い 1 価結合の解離」と「細胞膜から遠い N 末端領域」への結合によって、結合と解離を繰り返しながら OX40 を集簇化できる一方、Pogalizumab は「遅い解離」と「細胞膜に近い C 末端領域」に結合し、OX40 と安定な複合体を形成すること OX40 同士の距離を固定化する(Fig.3)。

3. 抗体の変異体を作って結合親和性をデザインする

では「1 価結合の解離が速いこと」と「結合部位が細胞膜から遠いこと」のどちらがより重要なのか？ ここで相対論に強い工学的アプローチが生きる；Pogalizumab-OX40 の共結晶構造における結合界面残基に変異を導入し、解離速度の速い Pogalizumab 変異体をデザインすることが解決になりうる。

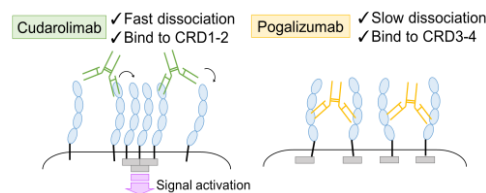


Fig. 3 考えられるアゴニスト活性メカニズム

界面の残基に Ala 単変異を導入したいくつかの変異体と OX40 の相互作用を測定し、解離速度がおおよそ 10 倍(R55A), 100 倍(Y49A)速くなった変異体を 2 つ見つけ出したが、これらの変異体はいずれも WT 同様アゴニスト活性を示さなかった。このことから、「結合部位が細胞膜から遠いこと」がより重要である、というのが現在の結論である。引き続き解離速度の遅い Cudarolimab のデザインや、フローサイトメトリーを用いた各変異体の細胞結合活性を定量的に評価することで、分子メカニズムと細胞での活性をつなげる物理化学的因子を探っていく。

謝辞

平素より指導教員である津本浩平先生に深く感謝いたします。また、本研究内容は JSPS 特別研究員奨励費の助成を受けて遂行されました。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- [1] M. Croft *et al.*, Nat. Rev. Rheumatology, **2017**, 13, 217-233.
- [2] Z. Kuang *et al.*, Cancer Immunology, **2020**, 69, 939-950.
- [3] Y. Yang *et al.*, mAbs, **2019**, 11, 6, 996-1011.

腫瘍細胞特異的酵素活性を活用した新規低分子 BNCT 薬剤の開発

¹ 東京大学大学院薬学系研究科² 京都大学複合原子力科学研究所³ 東京工業大学生命理工学院⁴ 東京大学大学院医学系研究科常富 純矢¹, 鈴木 実², 神谷 真子³, 浦野 泰照^{1,4}

著者紹介：1996 年、東京都府中市出身。東京大学大学院薬学系研究科博士課程 3 年の常富です。ケミカルバイオロジーの世界に魅了され、学部 4 年から現在に至るまで、浦野研で研究に没頭する日々を送ってきました。現在は、ホウ素中性子捕捉療法へと応用可能な小分子プローブの開発に注力しており、非常にやりがいを感じながら研究を行っています。この度シンポジウムポスター賞を戴けたことを大変光栄に、そして嬉しく思います。日頃よりご指導いただき、研究の面白さを伝えて下さった諸先生方を始め、浦野研のメンバー全員に深く感謝申し上げます。

1. はじめに

BNCT (ホウ素中性子捕捉療法) は、ホウ素原子核が熱中性子と核反応し α 線と反跳リチウム核を放出する現象を腫瘍細胞内で局所的に引き起こすことで、正常部位の損傷を最小限に抑えつつ、選択性高くがん治療を実現する新しいがん放射線療法として近年注目されている (Fig.1a)。唯一の既存承認ホウ素薬剤である BPA (*p*-boronophenylalanine) は、腫瘍細胞で過剰発現する LAT1 を利用することで腫瘍細胞選択的に取り込まれる。しかし BPA は、①

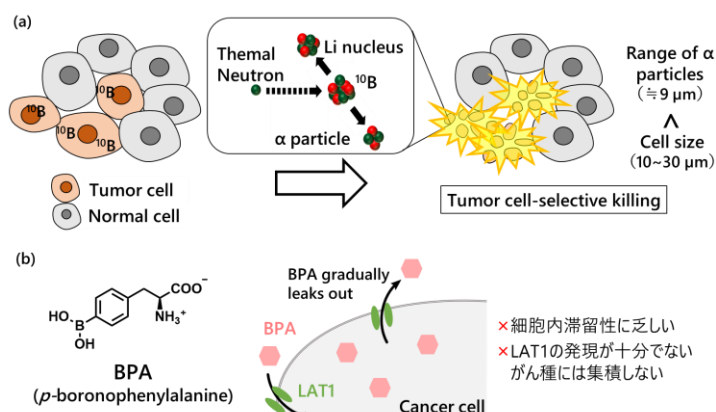


Fig. 1 (a) Mechanism of BNCT. (b) Drawback of the only approved BNCT drug, BPA.

LAT1 発現が低い腫瘍では蓄積が不十分であり、また②時間経過とともに細胞外へ徐々に漏出し、高いホウ素濃度を長時間維持できない、といった課題を抱えている (Fig.1b)。従って、BNCT の適応拡大の為に新しいがんバイオマーカーを標的とし、細胞内に長時間滞留するような仕組みを有する新規 BNCT 薬剤の開発が必要である。

2. 分子設計

我々はこれまでに、がんバイオマーカーとして各種プロテアーゼに着目し、これらの活性を検出可能な蛍光プローブ群 (～400 種類) を開発している [1]。これを生細胞や臨床検体へと適用することで、腫瘍細胞特異的な酵素活性を網羅的に評価可能であり、実際にこうした酵素を複数見出すことに成功した。これを利用することで、腫瘍細胞に高選択的に蓄積する BNCT 薬剤の開発が可能であり、蛍光プローブによるがん診断法と組み合わせれば、患者固有の酵素活性プロファイルに対応した BNCT も実現できると考えた。まずは、食道がん部位などで特異的に高発現することが見出されている Dipeptidyl Peptidase 4 (DPP-4) を

標的酵素として選択した[2]。さらに、キノンメチドケミストリーに着目し、タンパク質等の細胞内求核種と共有結合を形成させることで、長時間細胞内に滞留するよう図った(Fig.2)。以上のデザインにより、新規ホウ素薬剤候補化合物 EP-4OCB-FMA を新たに設計・合成した。

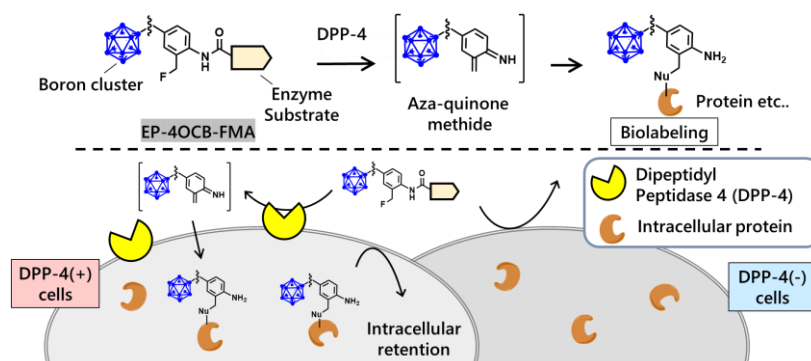


Fig. 2 The molecular design of novel BNCT drug.

3. *in vitro* での薬剤機能評価

次に、合成した薬剤 EP-4OCB-FMA を用いて詳細な評価を行った。まずは、薬剤を DPP-4 精製酵素と反応させ代謝物を LC-MS により解析したところ、速やかにキノンメチド種を生成することが示唆された。この時酵素反応にシステインを共存させると、これがキノンメチドに共有結合した化合物の生成が確認された。また、EP-4OCB-FMA を DPP-4 positive/negative 細胞へと投与した後、細胞内ホウ素濃度を MP-AES により定量したところ、本薬剤は DPP-4 positive な細胞選択的に十分量のホウ素を集積させることが明らかとなった。さらに細胞内の薬剤を washout する操作を挟んだ場合には、BPA では細胞内ホウ素濃度が大きく低下した一方で、本薬剤は wash 操作後も十分な細胞内ホウ素濃度を維持していたことから、本薬剤が設計通り DPP-4 との酵素反応依存的に高い細胞内滞留性を獲得することも確認された。

4. 中性子捕捉療法による治療効果評価

京都大学研究用原子炉 (KUR) との共同研究により、培養細胞系での BNCT 実験を行った。具体的には、EP-4OCB-FMA を培養細胞に数時間曝露した後、中性子照射を行い、細胞増殖阻害能を colony formation assay により評価した。その結果、DPP-4 positive である H226 細胞、Caco-2 細胞いずれにおいても強力な細胞増殖阻害が確認された。この効果は DPP-4 阻害剤 sitagliptin の共投与によってキャンセルされ、さらに Caco-2 細胞では BPA よりも優れた増殖阻害が見られた。以上の結果は、EP-4OCB-FMA が DPP-4 活性依存的に治療効果を発揮する BNCT 薬剤であることを示している。

また、本薬剤を *in vivo* 評価系へと応用し BNCT 実験を行った。具体的には、H226 皮下腫瘍モデルマウスに対して EP-4OCB-FMA を所定の濃度で腫瘍内投与した後、数時間後に中性子照射を行った。その結果、EP-4OCB-FMA 投与+中性子照射群では、副作用による体重減少などはなく、Control+中性子照射群と比較して高い抗腫瘍効果が確認された。さらに sitagliptin を共投与した際には、この抗腫瘍効果が減弱したことから、本薬剤の抗腫瘍効果が DPP-4 活性依存的であることも明らかになった。以上の結果は、EP-4OCB-FMA が *in vivo* においても有用な BNCT 薬剤であることを示唆している。

5. おわりに

開発した EP-4OCB-FMA は、培養細胞ならびにモデルマウスにおいて、DPP-4 活性依存的に抗腫瘍効果を示す有望な BNCT 薬剤であることが明らかになった。現在、DPP-4 以外の様々なバイオマーカー酵素へと応用を拡大しているところである。一方で、EP-4OCB-FMA は血中半減期が短く、全身投与による薬剤の腫瘍細胞集積は難しいという課題も抱えている。これを解決するため、高分子に薬剤を担持させることで、血中滞留性を改善した新たな薬剤開発も現在検討中である。

参考文献

[1] Y. Kuriki *et al.*, *Chem.Sci.*, **13**, 4474-4481 (2022), [2] H. Onoyama *et al.*, *Sci Rep.* **6**, 26399 (2016).

Award Accounts

🏆 第17回バイオ関連化学シンポジウムポスター賞

細胞上でのダイレクトな増感分析を可能にする「ヒト直交性酵素」を用いたマルチカラー解析とその応用

¹九州大学大学院工学研究院²九州大学大学院システム生命科学府金子 諒右¹, 森 健¹, 片山 佳樹^{1,2}

著者紹介: 長野県出身、九州大学大学院 工学研究院 応用化学専攻の金子です。地元の長野は山が多く、秋は山に行ってキノコを取って食べたりしていました。ときには文字通りがけつづちに生えているキノコや、見た目は毒キノコとそっくりだけど美味しいキノコを採って食べたりしていました。なんであんなに危険な思いをしてまでキノコ狩りをしたのか分かりませんが、自然科学の真理を追いかけて寝食を忘れる研究とどこか似ているところがあるのかもしれません(?)。

私はラボではゴリゴリの有機合成と酵素化学を生かしたバイオ分析の研究に主として取り組んでいます。それと並行して片山教授が代表を務める「共創の場」という枠組みの中で「人々が健康寿命を伸ばすにはどうしたらよいのか」というテーマで医療ビッグデータ解析にも取り組んでいます。昼間はラボ、夜は病院キャンパスに行く二足のわらじは想像以上に大変であったうえ、応用化学の研究と医療データ解析という一見かけ離れたことをやっている自分は「結局何者になれるのか?」と悩んだこともありました。そんな中、今年は学会やインターンなどで新しい出会いがあり、色んな人と語り明かす中で「自分はどんな研究者になれるのか」や「どうやったら日本の学問を盛り上げられるのか」について自分なりに答えが見えて来ました。その一つが網羅的なロジックの導入・活用です。

科学では「AならばB」、「BならばC」よって「AならばC」というようにロジックを一つ一つ積み重ねて体系的な論理が構成されます。ですが、とりわけ生化学のような複雑な系ではこのようなシンプルな記述ができないときがあります。そのようなときに、機械学習的な網羅的手法が役に立ちます。機械学習はときにロジックがわかりにくいと言われるものの、様々なデータベースが利用できる現在では、どのようなロジック(解析法や可視化の仕方)を組むかの工夫次第で、あらゆる場面で様々な形で活用できるはずです。逆にこのようなところを「うまくサボる」ことで、研究者のインスピレーションや経験に基づく第六感のような「人にしかできない仕事」を最大限に発揮できるのではないかと考えています。今は、そんなハイブリットな研究スタイルで、未知の分野の開拓をしていきたいと思っています。こんなことを考えるきっかけやアツい議論、学ぶための自由な環境等を与えてくださった片山教授や森准教授、岸村准教授、および本学会にこの度、深く感謝申し上げます。

1. はじめに

バイオ分析において、酵素を用いた分析は幅広く用いられている。代表的なものに Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)や、Western Blotting (WB)などが挙げられる。これらは主に特定のタンパク質の検出や定量に用いられ、酵素に応答する基質プローブを用いる感度の高い化学的手法である。基本原理は「酵素を抗体によって標的に結合させ、その酵素活性を見ることによって標的の量を調べる」というものである。しかしサンプルによってはこれらを適用するにあたり、事前に必要な処理がある。例えばサンプルが細胞や組織の場合、ELISA や WB を行う前にタンパク質を抽出する必要がある。さらに、非標的タンパク質による影響を抑えるため、ELISA では抗体をもう一つ用いたり WB では電気泳動をしたりして標的タンパク質を単離する。細胞や組織のタンパク質の分析においてはこれらのこういった高コストあるいは煩雑で、標的の状態が変化するような処理を省くことは再現性や分析の正確さという点でも重要である。

2. バイオ分析における「ヒト直交性」の重要性と酵素探索

そこで我々は細胞のサンプルに対して、抽出や単離といった操作を施すことなくタンパク質の発現解析ができないかを検討してきた。しかし、従来よく用いられている酵素を用いて細胞膜上の標的に対してダイレクトに ELISA を行うと、細胞由来の内在酵素活性のバックグラウンドの影響が顕著となり、標的の定量が困難になる[1]。

そこで、ヒトの細胞に活性が内在しないような酵

素の探索を行ってきた。その結果、現時点では約 30 種類の加水分解酵素が有望であることが示唆され、そのうち 8 種類に関して、*in vitro* の実験により細胞の内在活性が無視できるほど小さいことを確認し、これらの酵素を「ヒト直交性」の酵素と名付けた。8 種類のうち α -アラビノフラノシダーゼ、 β -キシロシダーゼ、 α -ラムノシダーゼの 3 種類の酵素に関して発現・精製して次の評価を行った（図 1）。

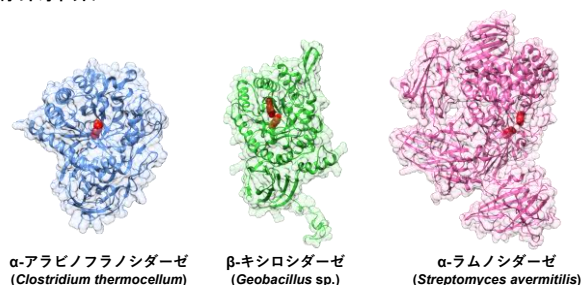


図 1 発現・評価した 3 種類の HOE

3. サンプルダイレクトアッセイにおける酵素の性能の評価とマルチカラー蛍光システムの構築

3 種類の酵素によって実際に細胞表面上でサンプルダイレクトに ELISA ができるかどうかを実験により確かめた。基質としてはすべてメチルウンベリフェロン型の青色蛍光基質を用いた。HepG2 細胞の表面マーカーである HER3 および EpCAM の検出を行ったところ、従来用いられる一般的な酵素であるアルカリフォスファターゼと比較して、感度が 10 倍から 50 倍程度向上した。また、標的に対する定量性も確認できた。次に、同一分析空間内においてマルチカラー分析を行うため、互いに異なる蛍光を示す基質の合成を行った。フルオレセインキシロシドおよび、レゾルフィンラムノシドを有機合成により作成し、購入したメチルウンベリフェロンアラビノフラノシドと合わせて次の実験を行った。

4. サンプルダイレクトな ELISA

本手法の応用例のデモンストレーションとして、シグナル分子の濃度に依存した発現変動を定量した。A549 細胞を TGF- β で 72 時間刺激したサンプルを用意し、これと刺激(-)のサンプルの細胞表面の 3 種類のマーカーの発現量を比較した（図 2）。E-cadherin、N-cadherin、EpCAM をそれぞれアラビノフラノシダーゼ、ラムノシダーゼ、キシロシダーゼで標識し、定量を行った結果、フローサイトメトリー（FCM）による解析結果と一貫する発現変動の傾向が見られた（図 3 a, b）。今後、簡便かつハイスループットな定量法である本手法を用いて薬剤活性スクリーニングなどへの応用を目指す。

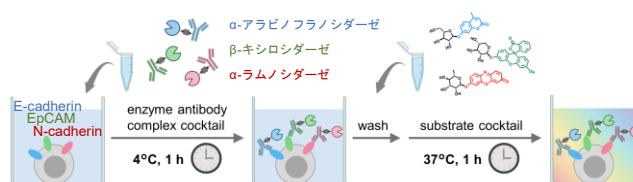


図 2 マルチカラー定量分析の概念図

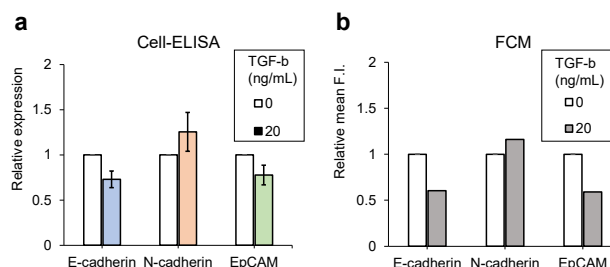


図 3 シグナル応答的な発現変動の定量の結果

参考文献

[1] R. Kaneko *et al.*, “A-L-Arabinofuranosidase As an Orthogonal Enzyme for Human Cells,” *Chem. Lett.*, vol. 50, no. 8, pp. 1493–1495, 2021, doi: 10.1246/cl.210231.

Award Accounts

🏆 第 17 回 バイオ関連化学シンポジウムポスター賞

未培養口腔細菌ゲノムから獲得したファージ由来の
Streptococcus 属細菌特異的認識分子¹ 早稲田大学大学院先進理工学研究科² 早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構³ 産総研・早大 CBB-D-OIL⁴ 早稲田大学先進生命動態研究所岩井 直哉¹, 竹山 春子^{1, 2, 3, 4}, 細川 正人^{1, 2, 3, 4}

著者紹介：早稲田大学大学院先進理工学研究科生命医科学専攻修士課程 2 年の岩井直哉です。学部 4 年から竹山・細川研究室に在籍し、日々研究に取り組んでいます。この度は、このような名誉ある賞をいただき大変光栄に思っております。大学入学当初は医学系の研究をしたいと思っていましたが、学年が進むにつれ生物工学の分野に興味を持ちはじめ、微生物のシングルセルゲノム解析という独自の技術をもつ現在の竹山・細川研究室に進むことを決めました。私は手を動かす wet 実験の方が好きのため、ワクワクしながら新たな技術開発に取り組んでいます。また、今年度は研究の傍ら大学附属の中学校で理科の非常勤講師としても勤務しています。1 人でも多くの生徒が将来有望な科学人材に成長してくれることを心の片隅で祈りながら指導にあたっています。恵まれた研究環境と熱心なご指導をいただいている竹山春子教授、細川正人准教授にこの場を借りて御礼申し上げます。

1. はじめに

当研究室では、環境中に存在する多種多様な未培養細菌の理解に向けて 1 細胞ゲノム解析技術手法 SAG-gel 法を開発してきた (Fig. 1)。本手法により取得された 1 細胞ゲノムからは、細菌に感染するウイルスであるファージの配列 (プロファージ) も検出でき、ファージと宿主細菌の相互関係を網羅的に明らかにすることができる。ファージ由来の細菌認識分子は、ファージが元来自然界に存在し、宿主特異的に結合する性質を活かして、工学的な応用が可能である。本研究では、ヒト唾液より獲得した未培養の口腔内細菌由来のゲノムからファージ配列を取得し、ファージ溶菌酵素の宿主選択性に関わる分子である細胞壁接着ドメイン (CBD) を人工的に合成することで、細菌種特異的な標識ツールとして応用することを目指した。



Fig 1. Workflow for SAG-gel-based single-cell genome sequencing.¹⁾

2. ファージ由来 CBD の人工発現

SAG-gel 法を用いて、ヒト口腔内細菌の約 450 個の 1 細胞ゲノム配列情報を獲得した。そのうち、*Streptococcus* 属細菌を対象としてゲノム配列からファージ由来の CBD を *in silico* で探索し、23 個の CBD 様ドメインが特定され、さらに複数のドメインに分類された。アミノ酸アライメントや AlphaFold2 を用いた立体構造予測を行った結果、ドメイン間及びドメイン内において配列や立体構造が多様であることが確

認された (Fig.2)。これらの CBD について、蛍光タンパク質(sfGFP)と融合させた CBD を大腸菌を用いた組換え発現により複数種作製した。*Streptococcus* 属細菌株に対し、*Streptococcus* 由来の sfGFP-CBD を添加することで、蛍光による菌体への結合性を評価した。その結果、菌体の輪郭に沿って蛍光タンパク質由来の蛍光が確認された。一方、*Streptococcus* 由来 sfGFP-CBD を大腸菌懸濁液に添加し蛍光顕微鏡観察を行った結果、菌体から蛍光は確認されなかった。このことから、合成した CBD は標的細菌特異的な標識能をもつことが示唆された。また、複数の CBD の結合性を評価した結果、CBD の由来や種類によって結合性に差があることが確認された。



Fig 2. Structural prediction of CBDs by AlphaFold2.

次に、*Streptococcus* 属細菌と大腸菌を等量混合したサンプルに sfGFP-CBD を添加し、顕微鏡観察とフローサイトメーターによる標的細菌選択的な分離性能を検証した。蛍光顕微鏡観察の結果、*Streptococcus* 属細菌のみから蛍光が確認された (Fig. 3)。フローサイトメトリーの結果、蛍光強度の弱い集団と強い集団がおおよそ 1:1 の割合で確認され、蛍光による標的細菌の分離が可能であることが示唆された。同様に、磁性ビーズを用いた磁気分離についても評価を行った。その結果、CBD を修飾した磁気ビーズのみが菌体と局在することが観察され、CBD が標的細菌を捕捉していることが示唆された。

最後に、ヒトの口内すすぎ液をサンプルとして、実際に口腔内細菌集団から CBD による標的細菌の分離能を評価した。CBD を用いた磁気分離前後について、それぞれ 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンスを行った。その結果、*Streptococcus* 属細菌の相対存在量が上昇し、口腔内細菌集団から

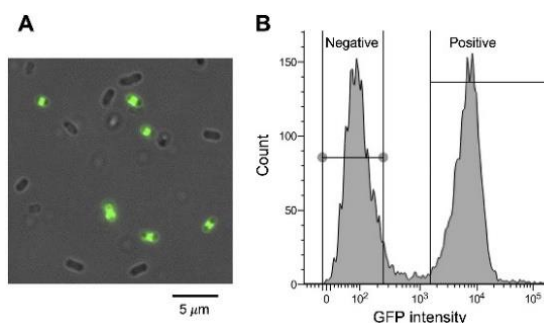


Fig 3. (A) Fluorescence image and (B) histogram of flow cytometric analysis for a mixture of *E. coli* and *S. oralis* after incubation with sfGFP-CBD.²⁾

Streptococcus 属細菌を広範に濃縮できることが示された。さらに、口腔内細菌集団から分離した細菌を血液寒天培地で培養した結果、*Streptococcus* 属細菌に特有の緑色の溶血環を伴うコロニーが観察された。このことから、CBD は細菌の生存性を維持したまま集団から分離できることが示唆された。

3. おわりに

本研究で開発したファージ由来 CBD による細菌標識分子は、特異的な細菌種の標識と細菌集団からの分離に有効であることが示唆された。未培養細菌の 1 細胞ゲノム情報からファージ分子を探索することで、様々な細菌特異的な制御ツールを生み出すことができる。本手法は、特にグラム陽性細菌を選択的に捕捉または検出する分子を自在に設計することができ、多様な細菌集団からの有用菌や病原菌の *in situ* 検出や分離解析などへの応用が期待される。

参考文献

- [1] Chijiwa, R.; Hosokawa, M.; Kogawa, M.; Nishikawa, Y.; Ide, K.; Sakanashi, C.; Takahashi, K.; Takeyama, H. *Microbiome*, **2020**, *8*, 5.
- [2] Hosokawa, M.; Iwai, N.; Arikawa, K.; Saeki, T.; Endoh, T.; Yoda, T.; Tsuda, S.; Takeyama, H. *J. Biosci. Bioeng.*, **2023**, *136*, 58-66.

Award Accounts

第 17 回 バイオ関連化学シンポジウムポスター賞

ペルオキシソームの β 酸化活性の検出を可能とする
新規ケミカルプローブの開発¹九州大学大学院薬学府松尾 祐治¹, 内之宮 祥平¹, 永浦 智樹¹, 王子田 彰夫¹

著者紹介：九州大学大学院薬学府創薬科学専攻修士 2 年の松尾祐治です。学部生の頃に受けた王子田先生による研究室紹介で学んだ様々なオルガネラの蛍光プローブに興味を持ち、王子田研究室に入りました。趣味はボウリングと野球観戦であり、ボウリングに関してはハイスコア 268 で友人の中では自分よりスコアが高い人に出会ったことがありません。ボウリング仲間を募集中です。当研究室では代謝経路を検出する蛍光プローブを開発に取り組んでおり、私の研究ではペルオキシソーム内の主要な代謝経路の一つである脂肪酸分解代謝 (β 酸化) を標的としています。ペルオキシソームはごく最近になって注目され始めたオルガネラであり、未解明な点が多くあります。私はペルオキシソーム代謝の生理的意義の解明を目指し、日々研究活動に勤しんでいます。その研究活動の中で、今回のシンポジウムにおいてポスター賞をいただけたことを非常にうれしく思います。これからも自分の研究に自信をもって、共に博士課程に進学する同期と切磋琢磨しながら研究に邁進してきます。

1. はじめに

ペルオキシソームは直径 0.1~1.0 μ m の球状もしくは楕円状の形をしたオルガネラであり、ほぼすべての真核生物に存在する。ペルオキシソームは脂質代謝や ROS 代謝、生体分子の酸化などの代謝反応を担うが、その生理的意義はほとんど解明されていない。ごく最近になってペルオキシソームの機能異常とがんや糖尿病など疾患や細胞老化との関連が明らかになりつつあるが、ケミカルバイオロジー的手法を含めペルオキシソーム代謝を解析する手法は非常に少ない。¹⁾ そこで我々はペルオキシソーム代謝を検出するツールの開発を目指し、本研究ではペルオキシソームの主要な代謝経路である β 酸化に着目した。 β 酸化はミトコンドリアとペルオキシソームで行われ、前者は短~長鎖脂肪酸を基質とし ATP 合成に関与する。一方、後者は極長鎖脂肪酸・分枝鎖脂肪酸を基質とするが、その生理的意義は脂質毒性の軽減以外はほとんど分かっていない。

2. ペルオキシソーム β 酸化標的プローブの開発

今回我々はペルオキシソーム β 酸化を検出するために、 β 酸化によってアルキンを有するキノンメチドを放出するプローブを開発した。プローブは脂肪酸部位、キノンメチド前駆体、アルキンからなる。 β 酸化によって脂肪酸部位が分解されたのちに生成したキノンメチドが周囲に存在するタンパク質と共有結合を形成することでアルキンを細胞内にトラップし、細胞を固定化後に CuAAC 反応によって蛍光色素を導入することで β 酸化のイメージングや ABPP による検出を可能とする。これまで我々は中鎖脂肪酸を導入したプローブによってミトコンドリア β 酸化を検出することに成功してきた²⁾。本研究ではペルオキシソーム β 酸化の基質である極

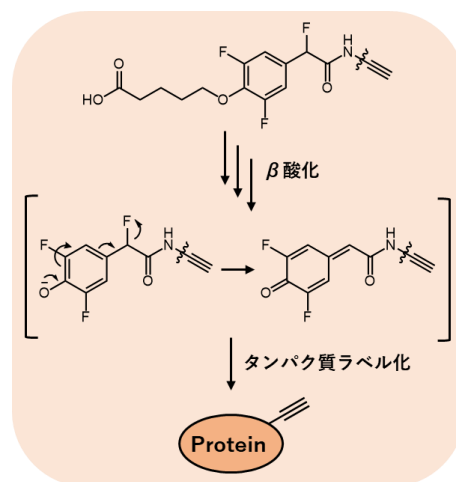


図 1. プローブのタンパク質ラベル化機構

長鎖脂肪酸を模したプローブを設計し、プローブの炭素鎖長を検討した。蛍光イメージングによる評価において、比較的短い炭素鎖を有するプローブではミトコンドリアから主に蛍光が検出され、ミトコンドリア β 酸化の阻害剤である etomoxir 共存下ではプローブ蛍光が消失した。そこで我々は様々な炭素鎖長を検討したところ、図 2 に示すプローブにおいてベシクル状の蛍光が検出された。この蛍光は etomoxir を添加した場合でも検出されたこと、ペルオキシソーム内 β 酸化阻害剤である 10,12-tricosadiynoic acid 添加時には蛍光が消失することが分かった(図 3)。また、ペルオキシソーム内 β 酸化関連酵素である ACOX1 の抗体を用いた免疫染色の結果、プローブ蛍光がペルオキシソームから検出されていることが分かった。さらにケミカルプロテオミクスの結果、プローブがペルオキシソーム内タンパク質を選択的にラベル化していた。以上の結果より、本プローブがペルオキシソーム β 酸化を選択的に検出していることが分かった。

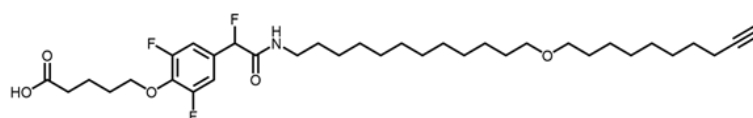


図 2. 設計したペルオキシソーム β 酸化検出プローブの構造

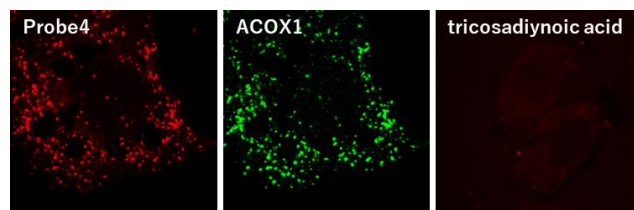


図 3. プローブ由来蛍光のペルオキシソーム局在

3. ペルオキシソーム β 酸化の活性変化の検出

続いて我々はペルオキシソーム内の β 酸化活性変化の検出に取り組んだ。老化細胞ではペルオキシソーム内へのタンパク質の輸送が減少することでペルオキシソーム機能が低下することが報告されている³⁾。そこで長期培養によって作成したモデル老化細胞にプローブを添加したところ、プローブの蛍光が減少することをイメージング及び ABPP によって明らかにした(図 4)。また、ACOX1 の発現量は老化細胞において減少していたことも確認した。これらの結果から、本プローブによって老化細胞内でペルオキシソーム β 酸化の活性が実際に低下していることが分かった。

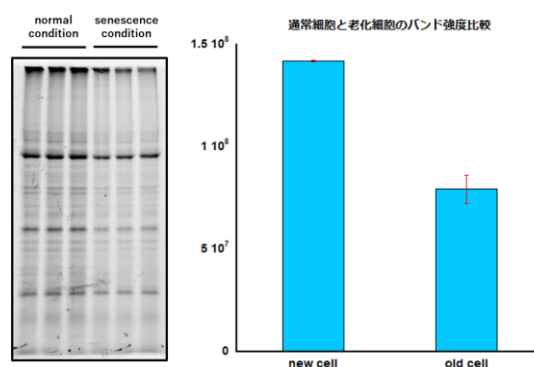


図 4. 老化細胞での ABPP

4. まとめと今後の展開

本研究ではペルオキシソーム β 酸化を選択的に検出可能なプローブの開発に成功した。ペルオキシソーム代謝を解析可能なツールは非常に少ないことから、本プローブはペルオキシソーム研究の進展を促進すると期待できる。今後は疾病モデルでのペルオキシソーム β 酸化活性変化の解析や本プローブを基盤としたペルオキシソーム β 酸化阻害剤の探索など、ペルオキシソーム代謝の生理学的意義の解明と創薬研究への展開を行いたい。

参考文献

- [1] Einat Zalckvar and Maya Schuldiner, *Mol. Cell*, **2022**, 82, 2228-2235.
- [2] Shohei Uchinomiya et al, *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, 145, 14, 8248-8260.
- [3] Julie E Legakis et al, *Mol. Biol. Cell*, **2002**, 13, 4243-4255.

ぶらり研究室の旅

慶應義塾大学 薬学部・大学院薬学研究科 創薬分析化学講座

独自の機能性分子で生命科学研究を切り拓く

慶應義塾大学 薬学部・大学院薬学研究科の花岡 健二郎です。この度は我々の研究グループを紹介させて頂く機会を頂きましてありがとうございます。

私は 2000 年に東京大学薬学部を卒業後、2002 年に東京大学大学院・修士課程を修了し、2005 年に東京大学大学院・博士課程(博士(薬学))を修了しました。当時は薬学部には 4 年生コースしかありませんでしたので、学部卒業時に国家試験を受け薬剤師免許も取得しています。学士・修士・博士は長野 哲雄 先生の指導の下で研究を行いました。2005 年より米国 University of Texas, Southwestern Medical Center (Prof. Thomas Kodadek)にて博士研究員を経て、2007 年より東京大学大学院薬学系研究科・助教、2010 年より同講師、2011 年より同准教授、2021 年より

現職である慶應義塾大学 薬学部・大学院薬学研究科の教授になりました。講座名を付ける際には、長野 哲雄 先生か

ら「創薬」の文字を入れたらとのアドバイスを頂き「創薬分析化学講座」としました。

慶應義塾大学 薬学部の 1 学年の定員は薬科学科(4 年制)が 60 名、薬学科(6 年制)が 150 名であり、毎年、薬科学科(学部 3 年生)と薬学科(学部 4 年生)の学生がそれぞれ 5~6 名配属されます。慶應義塾大学に着任してから今年で 3 年目となりますが、現在は大学院生が 12 名、学部生が 29 名在籍しています(図 1)。研究室スタッフは、教授 1 名、准教授 1 名、講師 1 名、特任助教 1 名、博士研究員 1 名、研究員 1 名で運営しています。所属人数は多いものの 6 年制である薬学科の学生は、病院実習や薬局実習があり研究室にこない時期もあるため、薬科学科(4 年制)の学部生・大学院生が研究を推進することとなります。

慶應義塾大学 薬学部(芝共立キャンパス)は、東京タワーや増上寺の近くに位置し、港区役所の隣にあります(図 2,3)。慶



図 1. 現在のグループメンバー(筆者は前列の中央): 1 号館の屋上にて



図 2. 薬学部 1 号館の正面玄関

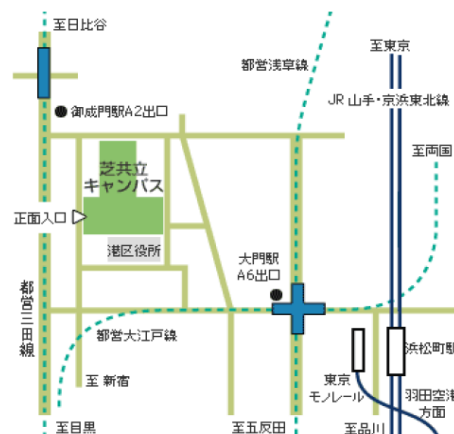


図 3. 薬学部の場合

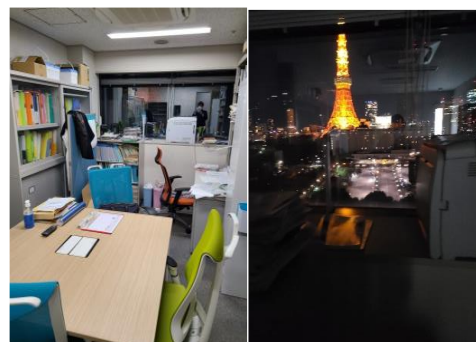


図 4. 教授室(3 号館 10 階)と部屋から見た東京タワーなどの夜景

應義塾大学の本部のある三田キャンパスまでは徒歩でおよそ 15 分の距離にあります。JR 浜松町駅へも歩いて行けるので、国内外出張などの交通アクセスは便利です。研究室の主な居室と実験室は 3 号館 10 階にあり、3 号館 4 階にも居室兼測定室があります(図 4)。前任者は分析化学の研究者であり有機合成の設備が殆どなかったため、2021 年 4 月に着任して以来 1-2 年



図 5. 実験室の様子(上)と有機合成及び生化学用設備(下)

間かけて有機合成を問題なく行える設備を立ち上げました(図 5)。また、薬学部の創薬研究センターにおいて、2 号館 4 階に部屋を借りて、(株)日立ハイテックおよび(株)日立ハイテックサイエンスとの共同研究として、分子診断システムの開発や個別化医療のための分析技術の開発(プレジジョン・メディシン分子診断プロジェクト(PreMo))を行っています。

現在、我々の研究室では「特殊な機能を持つ分子」を有機合成、蛋白質工学、高分子化学を利活用して開発し、これまでの手法ではできなかった生命現象の可視化や機能発現・制御を目指しています。例えば、独自の長波長蛍光色素である Si 置換キサンテン系蛍光色素(図 6)を基盤とした蛍光プローブの開発や、ローダミン系蛍光色素における分子内ねじれを利用した TICT(twisted intramolecular charge transfer)機構による蛍光プローブの開発(*JACS* 144, 19778 (2022))(図 7)、さらに高度ドラッグデリバリーシステム(DDS)の確立を目指して、機能性人工ケージタンパク質の開発、機能性高分子ミセル・リポソームの開発、さらにはこれら技術を組み合わせたハイブリッドな DDS システムの開発などを行っています(図 8)。

今後、一生懸命研究に取り組み、東京大学大学院薬学系研究科・浦野研究室の時にしていた蛍光プローブ以外の成果も学会などで発表できるように学生共々頑張りたいと考えています。また随時ポスドクも募集していますので、よろしくお願いします。今後とも何卒よろしくお願い申し上げます。

Recent references: 1) *Sci. Rep.*, 13, 16456 (2023); 2) *RSC Chem. Biol.*, 3, 859 (2022); 3) *Analyst*, 145, 7736 (2020); 4) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 59, 6015 (2020); 5) *Chem. Asian J.*, 15, 524 (2020); 6) *Anal. Chem.*, 91, 9086 (2019); 7) *Bioorg. Med. Chem.*, 27, 2122 (2019); 8) *Chem. Commun.*, 54, 6939 (2018); 9) *J. Am. Chem. Soc.*, 140, 5925 (2018); 10) Review: *Chem. Asian J.*, 12, 1435 (2017); 11) Review: *Analyst*, 140, 685 (2015).

連絡先：慶應義塾大学 薬学部・大学院薬学研究科 創薬分析化学講座

e-mail: khanaoka@keio.jp

住所：〒105-8512 東京都港区芝公園 1-5-30

電話番号：03-5400-2684

ホームページアドレス：http://keio-analchem.jp/index.html

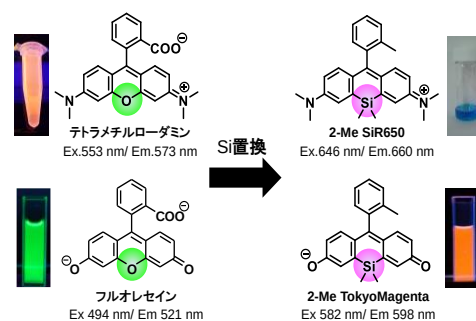


図 6. 我々が精力的に開発し、長波長蛍光プローブの母核としている Si 置換キサンテン系蛍光色素

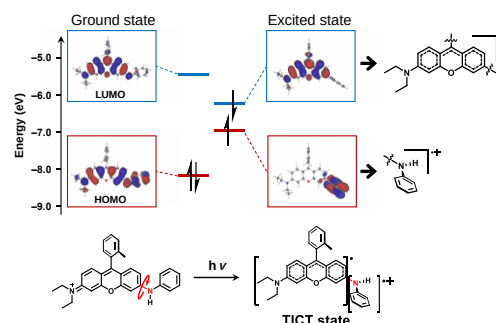


図 7. 最近、我々グループが見出したローダミン蛍光色素における TICT(ねじれ型分子内電荷移動)機構

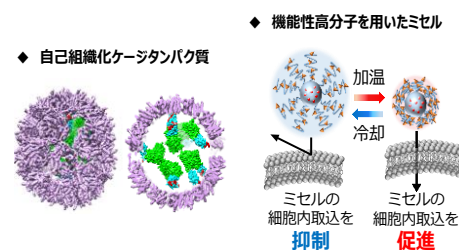


図 8. 慶應義塾大学に着任時から新たに開始した新規ドラッグデリバリーシステム

部 会 行 事

第 17 回 バイオ関連化学シンポジウム開催報告

第 38 回 生体機能関連化学シンポジウム・第 26 回 バイオテクノロジー部会シンポジウム

東京理科大学薬学部生命創薬科学科 青木 伸

第 17 回 バイオ関連化学シンポジウム (第 38 回 生体機能関連化学シンポジウム・第 26 回 バイオテクノロジー部会シンポジウム) が、2023 年 9 月 8 日 (金)～10 日 (日) に、東京理科大学野田キャンパスで開催されました。青木伸 (実行委員長)、および大河内美奈 (副実行委員長) を中心に、佐竹彰治、上野隆史、藤本ゆかりの 5 名で実行委員会を構成し、倉持幸司、坂井教郎、秋津貴城、高橋秀依、鳥越秀峰、椎名勇、吉田優、田中智博、東條敏史、中村佳代らが実行委員として学会の運営を行いました。

2019 年末から始まった新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)感染によるパンデミック (COVID-19) によって、本シンポジウムもここ数年はオンライン開催および現地開催およびオンライン配信のハイブリッド形式での開催を余儀なくされました。これまでの実行委員会の先生方および関係者の皆様のご尽力に対し、改めて謝意と敬意を表したいと存じます。我々が第 17 回シンポジウムの企画運営をお引き受けしてから、感染状況と国内外の状況を注視していましたが、2023 年 5 月に COVID-19 の分類が「2 類相当」から「5 類」へ移行したことを受け、東京理科大学野田キャンパスで現地開催させていただくことになりました。部会の役員会でもご相談しまして、ポスター発表と懇親会も対面で実施することにいたしましたので、対面形式が当たり前だった COVID-19 以前の段取りを思い出しながらの準備いたしました。

幸い、統計および公式発表上での COVID-19 感染は問題になりませんでしたが、シンポジウム前日から初日にかけて台風 13 号が関東地方への接近が予想されました。予め、天候などの不測の事態に備えてオンライン開催も検討していましたので、台風の接近を目の前にして実行委員の先生方とご相談したのですが、開催直前の開催形式変更はかえって大きな混乱を招くことが危惧されたため、予定通り現地での対面開催といたしました。参加者の皆様には、初日の午前中に最寄り駅である東武アーバンパークラインの「運河」駅から薬学部まで嵐の中を歩いていただくことになってしまいました。改めてお詫び申し上げます。

第 17 回のシンポジウムの参加登録者数は事前参加登録および当日までの参加登録者合わせて 410 名 (一般 221 名、学生 189 名)、一般口頭発表 74 件、ポスター発表 194 件でした。また、懇親会には合計 189 名 (一般 132 名、学生 57 名) の方が参加してくださいました。

招待講演には、松永幸大先生 (東大院・新領域創成科学研究科) と満屋裕明先生 (国立国際医療研究センター研究所長) をお招きし、松永先生には「細胞融合による動植物ゲノムハイブリッド細胞の作製とその可能性」、満屋先生には「抗ウイルス薬の研究・開発と展望：次のパンデミックに備えて」というタイトルでご講演をいただきました。お二人とも感動的なご講演だったと思います。

なお懇親会では、以前と同様に講演賞 4 名とポスター賞名の方を発表し、生体機能化学部会長の永次史先生とバイオテクノロジー部会長の竹山春子先生、審査委員長の松浦和則先生から受賞者全員へ賞状を渡していただきました。参加者皆さんとお祝いすることができましたので、大変良かったと思います。

また第 16 回からの企画として、有志の学生が話し合って講演者を選考して招待し、当日の進行も行う Graduate Student Session も実施しました。今回は、東京理科大学、東大、東工大、慶応大の学生さん合計 10 名の学生諸君が実行委員を引き受けてくださいました。有安真也先生 (名大院理学研究科) には「合成分子で酵素の能力を引き出す技術の最前線」について、景山義之先生 (北大院理) と辻真博先生 (科学技術振興機構研究開発戦略センター) には、それぞれ「細胞サイズでの自己秩序挙動を示す分子集合体の化学」と「創薬の潮流と展望～多様化するモダリティ～」についてご講演をいただきました。学生諸君が熱心に質問をし、講師の先生方もその熱意に応えてくださっていたのが印象的でした。

本シンポジウムを共催してくださった日本化学会のフロンティア生命化学研究会とホスト・ゲスト・超分子化学研究会および東京理科大学様に、また後援をお認めくださった日本薬学会、日本ケミカルバイオ

ロジー学会、光化学協会様に深謝申し上げます。また、多大なご支援をいただきましたペプチド研究所様、日本電子様、MDPI 様、日本分析工業様、Royal Society of Chemistry 様に心より感謝申し上げます。それから、日本化学会の守誠一郎様や関係者の皆様と、本シンポジウムの参加登録、要旨提出用システムを提供、運用してくださった（株）アトラス社の皆様に、この場を借りて感謝申し上げます。第 17 回では、昨年と同様、基本的に参加登録を全てシンポジウムホームページ上（Confit）でのクレジットカード支払または銀行口座振り込みといたしました。このシステムで、参加者および懇親会の登録情報を把握することができましたので、運営が楽になっていると思います。そして、このシンポジウムの実行委員会の先生方と東京理科大学および東工大の学生諸君には、シンポジウムの準備から当日の運営、開催後の手続きなど、全ての面で世話になりました。今回のシンポジウムが無事の終了したのは、この方々と参加者、関係者の皆様のおかげです。改めてお礼を申し上げます。

最後になりますが、本来副委員長をお願いしていた上田宏先生（東工大）が 2022 年暮れに急逝されました。あれから一年ほど経ちますが、まだそのお知らせをお聞きした時のショックが残っています。改めてご冥福をお祈り申し上げます。

来年度の第 18 回バイオ関連化学シンポジウムは、2024（令和 6）年 9 月 12 日（木）～14 日（土）に、中村史先生、花岡健二郎先生、山岸彩奈先生らのお世話で、つくば市にて開催される予定です。また来年皆様とお会いできるのを楽しみにいたしております。



松永幸大博士（招待講演）



満屋裕明博士（招待講演）



ポスター会場



懇親会



学生企画の講演者の先生方と学生企画実行委員会の学生諸君

部 会 行 事

第 17 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 38 回 生体機能関連化学シンポジウム・第 26 回 バイオテクノロジー部会シンポジウム 講演賞・ポスター賞

審査委員長 松浦 和則
鳥取大学学術研究院工学系部門

今年の第 17 回 バイオ関連化学シンポジウムの講演賞には、例年よりも少し多めの 28 名の若手研究者に応募いただきました。講演賞規定にしたがって、シンポジウム初日に 2 つの講演会場で 8 名の審査委員による厳正かつ公平な審査が行われました。審査方法としては、1) 研究テーマの設定・独創性、2) 実験データの質・量・解析、3) 結論の妥当性・新規性、4) 発表・発表資料のわかりやすさ、5) 質疑応答の 5 項目が採点され、合計点および審査委員による熱い議論により、下記の 4 名が講演賞受賞者として選出されました。例年のことながら、上位者の点数は非常に僅差でしたが、「過去の業績をレビューした内容ではなく、最新の研究成果を中心とした発表を審査対象とする」ことを重視して、最終的には審査委員の合議により受賞者を決定いたしました。受賞者の発表は、プレゼン能力が長けていただけでなく、テーマの新規性・独創性が高く、結論を導くための説得力のあるデータが豊富であったことが評価されました。また、審査委員や会場からのキツイ質問にもうまく切り返して答えていたことが印象的でした。今回は選に漏れた方々も、研究レベルが非常に高いと思われますので、可能であれば来年度も講演賞にエントリーすることをお勧めしたいと思います。

数年ぶりに開催されたバイオ関連化学シンポジウムの懇親会において、受賞者の方々を永次部会長から表彰し、一名ずつ受賞コメントを頂きました（図 1）。受賞者の方々には心からお祝いを申し上げたいと思います。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、五十音順）

秋葉 宏樹 京都大学大学院薬学研究科・助教

1:1 結合型バイパロピック抗体の創出と利用

稲垣 雅仁 名古屋大学理学研究科・特任助教

完全キャップ化 mRNA の合成を可能とする PureCap 法の開発と生物活性の評価

内之宮 祥平 九州大学大学院薬学研究院・助教

キノンメチド放出プローブによるミトコンドリア β 酸化活性の蛍光イメージングと不均一性の評価

堂浦 智裕 名古屋大学大学院工学研究科・助教

小脳運動学習の分子基盤に迫る GPCR 型グルタミン酸受容体 1 の *in vivo* ケモジェネティクス

ポスター賞審査の準備は東京大学の三木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、ポスター発表総数 194 件のうち、同賞にエントリーした 67 名のポスター発表が、両部会に所属する 52 名の若手研究者により厳正に審査されました。優れた発表が多く、1 点差を争う極めて厳しい審査になりました。その結果、明確なプレゼンテーションや質疑応答内容が評価され、上位 7 名をポスター賞として懇親会にて表彰しました（図 2）。このうち上位 3 名には、RSC (Royal Society of Chemistry) の協賛により Chemical Communications 賞、RSC Chemical Biology 賞、Organic & Biomolecular Chemistry 賞として表彰されました。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います。

ポスター賞受賞者（敬称略、五十音順）

岩井 直哉（早大院先進理工）、*1 氏家 寛（東大院工）、*2 笠井 貴文（東大院薬）、金子 諒右（九大院工）、*3 菅野 晃矢（名大院工）、常富 純矢（東大院薬）、松尾 祐治（九大院薬）

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

最後に、講演賞の審査を快くお引き受けいただいた 8 名の先生方、及びタイトなスケジュールの中、ポスター賞の審査を実施していただいた 52 名の若手の先生方のご協力に心より感謝申し上げます。



図 1. (A) 部会講演賞受賞者および審査委員長・永次部会長, (B) お祝いする人々.



図 2. ポスター賞受賞者および審査委員長・竹山バイテク部会長.

お知らせ

第 18 回 バイオ関連化学シンポジウム 2024

日程： 2024 年 9 月 12 日（木）～14 日（土）
会場： つくば国際会議場（茨城県つくば市）
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： 日本化学会、日本薬学会、日本生物物理学会、日本生物工学会、日本ケミカルバイオロジ
ー学会、日本分子イメージング学会など（予定）
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：2024 年 6 月 3 日（月）～6 月 21 日（金）

参加登録予約申込期間：2024 年 6 月 3 日（月）～7 月 19 日（金）

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。

シンポジウム web システムとしてアトラス社 Confit を継続使用予定。

参加登録費および登録方法などについては、追ってお知らせいたします。

招待講演 1 柳沢 正史 教授（筑波大学）「睡眠の謎に挑む：基礎研究から社会実装まで (仮)」

招待講演 2 宮脇 敦史 チームリーダー（理化学研究所）「細胞を遊ぶ (仮)」

特別講演 菅 裕明 教授（東京大学）「バイオ関連化学の未来 (仮)」

上記講演は 9 月 13 日開催予定、菅先生の特別講演では 2024 年 5 月まで務められる日本化学会会長と
しての視座から、中長期的視点で両部会の方向性にご提言を頂く予定です。

実行委員会 実行委員長：中村 史（産業技術総合研究所）

副実行委員長：花岡 健二郎（慶應義塾大学）

実行委員：岡田 智（東京工業大学）、神谷 真子（東京工業大学）、口丸 高弘（自治医科
大学）、小嶋 良輔（東京大学）、佐々木 栄太（慶應義塾大学）、寺 正行（東京農工大
学）、中村 貴志（筑波大学）、藤田 聡史（産業技術総合研究所）、細川 正人（早稲田
大学）、前田 義昌（筑波大学）、山岸 彩奈（産業技術総合研究所）、山崎 智彦（物質・
材料研究機構）、山次 健三（千葉大学）、吉野 知子（東京農工大学）

お知らせ

生体機能関連化学部会第3回国際シンポジウム
The 3rd International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2024)
<https://confit.atlas.jp/guide/event/isbc2024/top>

生体機能関連化学部会では、5年に1度、部会国際会議を開催しております。本来ならば2022年に開催予定でしたがコロナ禍により延期となり、この度、ISBC2024を来年4月に開催する事が役員会で決定されましたので、ご案内申し上げます。本部会員の皆様におかれましては、是非ご参加をお願いいたします。シンポジウムではポスター発表を募集しておりますので、お申込みのほどよろしくをお願いいたします。またシンポジウムでは博士課程学生及びポスドクを対象にポスター賞も募集しております。過去にバイオ関連シンポジウムでポスター賞を受賞された方も対象となりますので、是非お申込み頂ければと思います。どうぞよろしくお願い致します。

趣旨：生体関連部会独自の会員サービス、および国際交流促進の一環として、

- (1) 部会員の皆様へ分野や国を越えたトップレベルのサイエンスやホットトピックに触れる機会を提供する
- (2) 部会員である博士課程学生からポスドク、若手スタッフ（助教、准教授）を中心に国際的なトップレベル研究者との議論の場を提供し、visibilityの向上を促進する。
- (3) 参加者間の相互交流やネットワーク構築の促進によって、部会の人材育成、当該分野の発展を図る。

日時：令和6年（2024）4月24日（水）～26（金）

場所：名古屋大学 豊田講堂

参加登録費：

事前参加（2024年1月10日～3月31日）一般部会員/25,000円、非会員/30,000円、学生/10,000円

当日参加（2024年4月1日以降）一般部会員/35,000円、非会員/40,000円、学生/10,000円

懇親会費：

事前参加（2024年1月10日～3月31日）一般部会員/7,000円、非会員/7,000円、学生/3,000円

当日参加（2024年4月1日以降）一般部会員/10,000円、非会員/10,000円、学生/3,000円

ポスター発表申し込み：2023年11月1日～2024年2月1日（詳細はwebページをご参照下さい）

組織委員長：永次 史（東北大学・教授）

実行委員長：浅沼 浩之（名古屋大学・教授）

組織委員：2024年 生体機能関連化学部会役員全員

会議構成：6セッション（各セッション3時間程度）：口頭発表は招待講演のみ、およびポスターセッション（1.5時間を2日間、ポスター発表のshort introduction（1min/1人程度））。2日目夜：懇親会を予定

招待講演者リスト (敬称略) :

セッション番号 : **1. Synthetic Biology Based on Biomolecular Engineering**

Session Organizer: 齊藤博英 (京都大) / 横林洋平 (沖縄科学技術大)

Bryan Dickinson (Univ. of Chicago)

Beatrix Suess (TU Darmstadt)

Miho Yanagisawa (Univ. Tokyo)

Ai Niitsu (RIKEN)

Shunsuke Tagami (RIKEN)

セッション番号 : **2. New Approaches to Drug Discovery based on Chemical Biology Research**

Session Organizer: 王子田彰夫 (九州大) / 山東信介 (東京大)

Tom Grossmann (Amsterdam Institute of Molecular and Life Sciences)

Brian Paegel (Univ. of California, Irvine)

Yu Rao (Tsinghua Univ.)

Hiroshi Abe (Nagoya Univ.)

Yoshiyuki Manabe (Osaka Univ.)

セッション番号 : **3. Chemical Probes for Cell Analysis and Imaging**

Session Organizer: 水上進 (東北大) / 花岡健二郎 (慶応大)

Luke Lavis (Janelia Research Campus)

Stefan Matile (Univ. of Geneva)

Amandeep Kaur (Monash Univ.)

Masayasu Taki (Nagoya Univ.)

Toru Komatsu (Univ. Tokyo)

セッション番号 : **4. Organic Chemistry in Cells**

Session Organizer: 大神田淳子 (信州大) / 築地真也 (名工大)

Luca Salassa (DIPC)

Jeremy Baskin (Cornell Univ.)

Peng Zou (Peking Univ.)

Itaru Hamachi (Kyoto Univ.)

Kenzo Yamatsugu (Chiba Univ)

セッション番号 : **5. Beyond Naturally-Occurring Biomolecular Self-Assembly: Engineered Bio-Functional Supramolecules**

Session Organizer: 三浦佳子 (九州大) / 葛谷明紀 (関西大)

Stefan Howorka (Univ. College London)

Jonathan Heddle (Jagiellonian Univ.)

Guosong Chen (Fudan Univ.)

Daisuke Takahashi (Keio Univ.)

Kohei Sato (Kansei Gakuin Univ.)

セッション番号 : **6. Designer Proteins and Enzymes**

Session Organizer: 上野隆史 (東工大) / 荏司長三 (名古屋大)

Franziska Thomas (Univ. Heidelberg)

Zac Ball (Rice Univ.)

Ivan Korendovych (Syracuse Univ.)

Nobuyasu Koga (Osaka Univ.)

Naohiro Terasaka (Tokyo Institute of Technology)



The 3rd International Symposium on Biofunctional Chemistry

ISBC2024

Second circular

Venue: Toyoda Auditorium, Nagoya University

Period: April 24 (Wed.) > 26 (Fri.), 2024

<https://confit.atlas.jp/guide/event/isbc2024/top>



Invited speakers

Hiroshi Abe (Nagoya Univ., Japan) Zac Ball (Rice Univ., USA) Jeremy Baskin (Cornell Univ., USA) Guosong Chen (Fudan Univ., China) Bryan Dickinson (Univ. of Chicago, USA) Tom Grossmann (VU Amsterdam, Netherlands) Itaru Hamachi (Kyoto Univ., Japan) Jonathan Heddle (Jagiellonian Univ., Poland) Stefan Howorka (Univ. College London, UK) Amandeep Kaur (Monash Univ., Australia) Nobuyasu Koga (Osaka Univ., Japan) Toru Komatsu (The Univ. of Tokyo, Japan) Ivan Korendovych (Syracuse Univ., USA) Luke Lavis (Janelia Research Campus, USA) Yoshiyuki Manabe (Osaka Univ., Japan)	Stefan Matile (Univ. of Geneva, Switzerland) Ai Niitsu (RIKEN, Japan) Brian Paegel (Univ. of California, USA) Yu Rao (Tsinghua Univ., China) Luca Salassa (DIPC, Spain) Kohei Sato (Kwansei Gakuin Univ., Japan) Beatrix Suess (TU Darmstadt, Germany) Shunsuke Tagami (RIKEN, Japan) Daisuke Takahashi (Keio Univ., Japan) Masayasu Taki (Nagoya Univ., Japan) Naohiro Terasaka (Tokyo Tech., Japan) Franziska Thomas (Univ. Heidelberg, Germany) Miho Yamagisawa (The Univ. of Tokyo, Japan) Kenzo Yamatsugu (Chiba Univ., Japan) Peng Zou (Peking Univ., China)
--	--

Important dates (Tentative)

Poster & abstract submission: Advance registration:	Nov. 1st, 2023 - Feb. 1st, 2024 Jan. 1st, 2024 - Mar. 31, 2024
---	--

Registration (Tentative)

Jan. 10, 2024 - Mar. 31, 2024

General: Division members;
25,000 JPY (tentative)

Student: Division members;
10,000 JPY (tentative)

Access to Toyoda Auditorium



Organizer Division of Biofunctional Chemistry, The Chemical Society of Japan
Co-organized by Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.
Molecular cybernetics.
Support from RIKEN is also acknowledged.

Organizing committee

Chair:

Fumi Nagatsugi (Tohoku Univ.)
Hiro Asanuma (Nagoya Univ.)

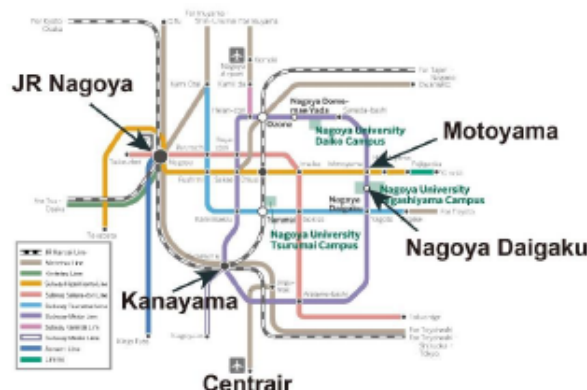
Members:

Kazunori Matsuura (Tottori Univ.)
Takafumi Ueno (Tokyo Tech.)
Shin Aoki (Tokyo Univ. of Science)
Kuniharu Ijima (Hokkaido Univ.)
Toshihiro Ihara (Kumamoto Univ.)
Kenjiro Hanaoka (Keio Univ.)
Akio Ojida (Kyushu Univ.)
Takashi Ohtsuki (Okayama Univ.)
Takeaki Ozawa (The Univ. of Tokyo)
Shinsuke Sando (The Univ. of Tokyo)
Osami Shoji (Nagoya Univ.)
Masahiro Takagi (JAIST)
Shinya Tsukiji (NITech)
Keiji Numata (Kyoto Univ.)
Yutaka Hitomi (Doshisha Univ.)
Shun Hirota (NAIST)
Hiroshi Fujii (Nara Women's Univ.)
Yukari Fujimoto (Keio Univ.)
Manabu Horikawa (SUNBOR)
Misaki Homma (Takeda)
Yoshiko Miura (Kyushu Univ.)
Hiroshi Murakami (Nagoya Univ.)
Shin Mizukami (Tohoku Univ.)
Hiroyasu Yamaguchi (Osaka Univ.)
Daisuke Miyoshi (Konan Univ.)
Takayuki Miki (The Univ. of Tokyo)
Shinobu Itoh (Osaka Univ.)

Access to Nagoya Univ.

JR Nagoya → Motoyama → Nagoya Daigaku

Centrair → Kanayama → Nagoya Daigaku



Scientific program committee

Chemical probes for cell analysis and imaging

Shin Mizukami (Tohoku Univ.)
Kenjiro Hanaoka (Keio Univ.)
Mako Kamiya (Tokyo Tech.)
Satoshi Okada (Tokyo Tech.)
Masayasu Taki (Nagoya Univ.)
Tasuku Hirayama (Gifu Pharmaceutical Univ.)

Organic chemistry in cells

Junko Ohkanda (Shinshu Univ.)
Shinya Tsukiji (NITech)
Katsunori Tanaka (Tokyo Tech., RIKEN)
Kaori Sakurai (Tokyo Univ. Agriculture and Tech)
Tomonori Tamura (Kyoto Univ.)
Tomohiro Doura (Nagoya Univ.)

New approaches to drug discovery based on chemical biology research

Akio Ojida (Kyushu Univ.)
Shinsuke Sando (The Univ. of Tokyo)
Yuki Goto (The Univ. of Tokyo)
Masumi Taki (The Univ. of Electro-Communications)
Satoru Nagatoishi (Tokyo Tech.)
Daisuke Fujiwara (Osaka Metropolitan Univ.)
Yousuke Katsuda (Kumamoto Univ.)

Beyond naturally-occurring biomolecular self-assembly: engineered bio-functional supramolecules.

Yoshiko Miura (Kyushu Univ.)
Akinori Kuzuya (Kansai Univ.)
Yuki Suzuki (Mie Univ.)
Satoshi Abe (Tokyo Tech.)
Hiroshi Inaba (Tottori Univ.)
Daisuke Takahashi (Keio Univ.)

Chemical approaches to synthetic biology: synthetic biology based on biomolecular engineering

Hirohide Saito (Kyoto Univ.)
Yohei Yokobayashi (OIST)
Tatsuyuki Yoshii (Kyoto Univ.)
Keisuke Fukunaga (Tokyo Tech.)
Ryosuke Kojima (The Univ. of Tokyo)
Satoshi Toda (Kanazawa Univ.)

Designer proteins and enzymes

Osami Shoji (Nagoya Univ.)
Takafumi Ueno (Tokyo Tech.)
Akira Onoda (Hokkaido Univ.)
Nobutaka Fujieda (Osaka Metropolitan Univ.)
Toshiki Sawada (Tokyo Tech.)
Ai Niitsu (RIKEN)

(Blue: session leaders)

ニュースレター Vol. 38, No. 2 2023年12月25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、三浦 佳子、山口 浩靖

