

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. 31, No. 3 (2016. 12. 27)

目 次

◇ 巻 頭 言

Revival of Biofunctional Chemistry.....山東 信介 1

◇ 研 究 紹 介

第10回バイオ関連化学シンポジウム 部会講演賞

DNA ナノ構造体に酵素を配置した分子スイッチボード
.....中田 栄司 3

グルタミン酸受容体の選択的活性化を可能とする錯体化学的アプローチ
.....窪田 亮 7

微小な腹腔内転移を可視化する β -ガラクトシダーゼ蛍光プローブの開発
.....浅沼 大祐 10

RNA G-quadruplex 選択的化合物を用いた RNA G-quadruplex の探索
.....勝田 陽介 13

巻頭言

Revival of Biofunctional Chemistry

東京大学大学院工学系研究科 山東信介

生体機能関連化学 (Biofunctional Chemistry) と聞くと、何だか古い学問のように感じるのは私だけだろうか？「酵素類似様機能をもつ有機化学反応の研究会」を源流に持ち、生体分子化学、機能性分子化学、バイオミメティクスなど明確な方向性をもって生命と分子化学の接点を模索し、世界をリードしてきた研究領域である。かくいう私も、学生時代から生体機能関連化学に育てられたと言っても過言ではなく、非常に愛着のある研究領域であり、現状をものかしく感じている。

私の研究分野を例にとって考えてみたい。この状況に至った原因の1つは、遺伝子工学／タンパク質工学／細胞工学の出現と爆発的な発展であろう。「酵素類似機能」を目指すのであれば、合成分子でミミックするのではなく、遺伝子工学をもとにタンパク質や細胞自体を改造してやればよい。実際、抗体医薬や iPS 細胞などは、圧倒的な速度で発展してきた。しかし同時に、これらの分野でも問題が顕在化している。例えば、抗体医薬や iPS 細胞医療などの最先端医療は、とても個人が支払える額ではない。治療に対する期待の一方で、その医療を選択せざるを得ない患者の家族にとっては、「悪魔の医療」になってしまう可能性も持つ。発展途上国での応用など、現状では夢のまた夢であろう。その一因は、抗体や増殖因子などの遺伝子工学や細胞工学で生み出す材料に多額のコストがかかってしまうことにある。しかしもし、抗体や増殖因子などと類似の機能を持つ合成分子を設計できれば、この問題は飛躍的に改善する。そのためには、これら生体分子の機能を分子レベルで定量的に解析し、その現象を物理化学的観点から理解し、その機能を模倣できる類似様機能分子を設計する力が必要である。何より、このような素晴らしい機能を持つ生体分子の謎を分子、原子レベルで1つ1つ解いていく基礎研究の面白さは何物にも変えがたい。複雑な細胞や生体の機能を分子レベルの解像度で理解できる時代が近づいている。生体機能関連化学が大事にしてきた基礎化学研究は、今後益々重要になるであろう。

もう一点、生体機能関連化学の更なる復活を願う理由がある。学生の教育である。生体機能関連化学シンポジウムに参加する学生、研究者の研究領域は広く、生物系や医学系学会を中心にして活躍されている研究者も多いと思う。私も医学・生物系のシンポジウムなどに出ることは多い。やはり実際の医療応用や生命現象解明を目指すのであれば、医学・生物系

のシンポジウムで発表し、その現場で学術的課題に向き合うことは重要だと考える。ただ、学生の教育にとって不安を感じることもある。幸い、私たちの世代は学生時代から研究室や化学系シンポジウムで、生命を分子レベルで定量的に理解し、説明することを叩き込まれてきた。例えば、私が助手になって初めて招待講演に呼んでいただいたのは甲南大学であったと記憶している。ホストの先生が、バリバリの細胞生物学研究者に、「細胞内でのその現象の ΔH と ΔS はどうなっているのか？それがわからなければ生命の本質は分からないのでは？」と質問され、その方が答えに四苦八苦していたのは今でも私のトラウマである。一方で、非常に重要な示唆を含む問いであると理解している。

最初から医学・生物系のシンポジウムにしか出たことがない学生は、物事を化学的に、分子レベルで定量的に考えることの重要性に気づいてくれるだろうか？今後、更に技術革新が進み、生命が分子の活動レベルで深く理解され、語られる日が来た時、生命・医学研究においても、分子や反応の本質を理解できる(物理)化学研究者が研究をリードする時代が来る。その時に慌てて教育しても手遅れである。生体機能関連化学は、時流にのっていないと言われても、あくまでも定量的で、(物理)化学的で、分子レベルの議論を大事にする未来志向の部会であって欲しいと願っている。

DNA ナノ構造体に酵素を配置した分子スイッチボード

京都大学エネルギー理工学研究所 講師 中田 栄司

1. はじめに

生体内では、酵素などの複数の反応点がネットワークを形成し、様々な物質を高効率に変換して生命活動を営んでいる。このような生体内ネットワークを手本とし、試験管内で再現することができれば、単純に混ぜ合わせたのみでは達成できない高機能な物質変換をおこなえる反応場の構築が期待される。これまでも、例えばリポソーム内水相などを反応場として利用したナノリアクターに関する研究例は数多く報告されている^[1]。しかしながら、それらはナノ空間を構築することで各要素が高密度化された状態を作り出しているものの、生体内でみられるようなナノ空間で各要素を一分子レベルで分子数や空間配置・配向を制御することまでは実現できてはおらず、ナノ構造情報と活性の相関関係を導出するための知見が乏しいのが現状である。その原因は、これらを精密に制御して評価するための方法論がこれまでになかったことにある。近年 DNA オリガミ法^[2]に代表される DNA ナノ構造体^[3]が、人工分子などの機能性分子を配置するための足場として注目されている。これは、DNA の塩基配列に従って二次元や三次元のナノ構造体を精密かつ自在に設計でき、分子レベルで制御して配置できるという他のナノ構造体にはない特徴を有しているためである。このような特徴を生かして、これまでもタンパク質や酵素を DNA ナノ構造体に配置した機能性複合体を構築する試みはなされてきている^[4]。しかしながら、一分子レベルの精度で DNA ナノ構造体上にタンパク質や酵素を配置する方法論が乏しいため、幅広い研究展開が困難であった。我々はこれまでに、DNA 結合性タンパク質をアダプターとして、DNA ナノ構造体上の狙った場所に DNA 結合性アダプターを融合したタンパク質や酵素を高選択的かつ高収率に配置する方法を開発し、その問題の解決に取り組んできた^[5-7]。本稿では、その方法を利用して、DNA ナノ構造体上に連続する反応を触媒する二種類の酵素を配置し(図 1)、その空間的配置と反応効率の相関関係について検討した結果について紹介する^[8]。

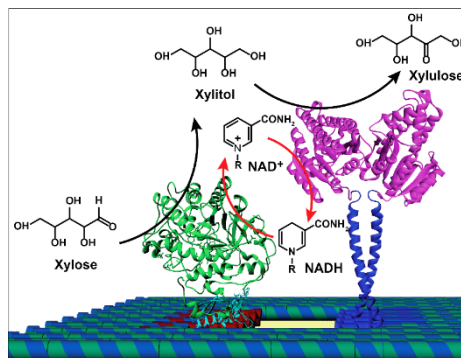


図 1. DNA ナノ構造体上に代謝酵素 (XR-XDH) を配置した分子スイッチボード

2. DNA ナノ構造体へのタンパク質配置技術の開発

これまでにタンパク質や酵素を含む様々な機能性分子を DNA ナノ構造体上に選択的に配置する様々な手法が報告されている^[9]が、そのほとんどが DNA のハイブリダイゼーションを利用した方法である。これをタンパク質や酵素に適用した場合には、タンパク質にランダムな化学修飾を施して一本鎖 DNA を導入するのが一般的である。この方法では、煩雑な操作を経て調製する必要性や化学修飾の過程でタンパク質が機能を損なう可能性があり、満足な配置効率が得られないなどの問題を含んでいる。そこで我々は、これらの問題を伴わない DNA ナノ構造体上の特定の場所にタンパク質を配置する方法の開発からおこなった。我々が注目したのは、亜鉛フィンガータンパク質(ZFP)やロイシンジッパータンパク質(ZIP)などの DNA 結合性タンパク質である (図 2)^[10]。DNA 結合性タンパク質は、特定の塩基配列の DNA に対して、高選択的かつ強固に結合する。その中でも ZFP は、多様な DNA 配列に単

量体として特異的に結合する人工亜鉛フィンガータンパク質(AZP)が作製できることが報告されている。実際に、複数のタンパク質を融合した ZFP を調製することで、特定の塩基配列を導入した任意の場所に目的のタンパク質を直交性を持って一分子ずつ配置することが可能であった^[5]。また、配置したいタンパク質が二量体の場合には、二量体を形成して DNA に結合する ZIP をアダプターとして融合することで対応できる^[6]。一方で、これら DNA 結合性アダプターと DNA の結合は非共有結合であるため、複合体を安定に保つためには、過剰の融合タンパク質を共存させる必要があり、その後の評価段階において未結合の融合タンパク質が系中に存在したままとなる。そこで、アダプターの配置効率を高め、後から余剰の融合タンパク質を除去できるようにするため、共有結合型アダプター(モジュール型アダプター)の開発をおこなった(図 2)^[7]。SNAP-tag^[11]などのタンパク質タグシステムは、特定の基質と反応して安定な共有結合を形成するツールとして知られている。既にこれらタンパク質タグを介して目的タンパク質を DNA ナノ構造体上に配置する戦略についての報告例はあったが、反応性が低いことが原因で長時間大過剰の融合タンパク質で処理をしても、定量的な配置を達成することは困難であった^[12]。我々は、DNA 結合性アダプターの迅速かつ高い DNA 認識能とタンパク質タグの安定な共有結合形成能を組み合わせることで、共有結合形成過程の反応速度を飛躍的に高めることができ、安定かつ定量的に目的の融合タンパク質を DNA ナノ構造体上に配置することができると考えた。実際に、ZFP のひとつである zif268 と SNAP-tag を組み合わせた共有結合型アダプターでは、SNAP-tag の基質を修飾した DNA 配列を導入した場所に、わずか数分間の処理で融合タンパク質を定量的に配置することが可能であった^[7]。

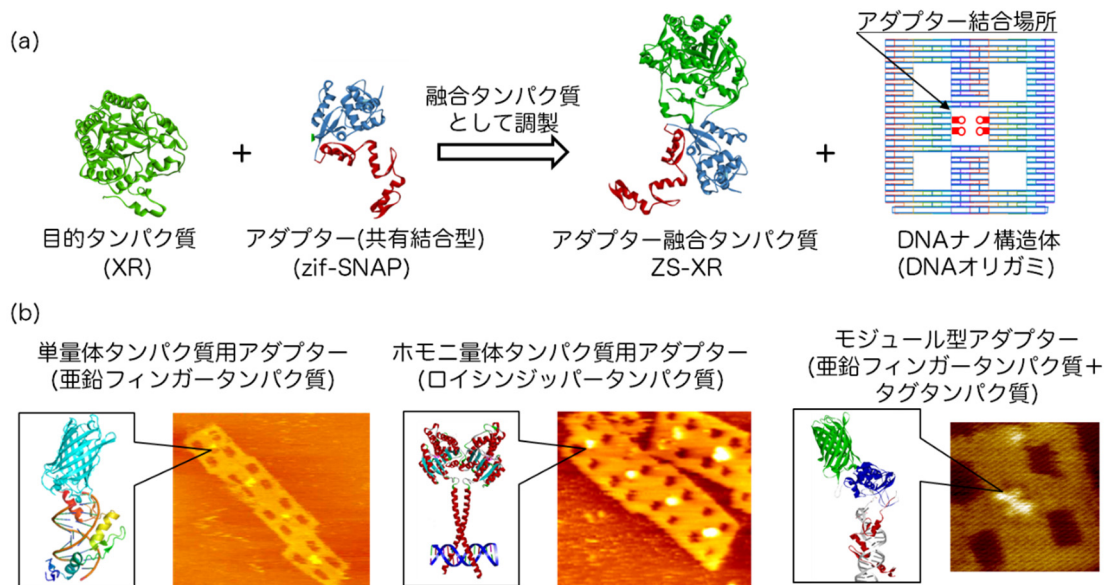


図 2. (a) アダプター融合タンパク質の構築概念(ZS-XR)と DNA ナノ構造体への配置 (b)これまでに我々が開発した DNA 結合性アダプター^[5-7]とそれぞれを DNA ナノ構造体上に配置した AFM 画像

3. DNA ナノ構造体上に代謝酵素を配置した分子スイッチボードの評価

直交性を有する DNA 結合性アダプターの開発に成功したので、それらを組み合わせて DNA ナノ構造体上に連続する代謝反応を触媒する二種類の酵素を配置した分子スイッチボードの開発をおこなった(図 1)^[8]。モデルとなる代謝反応として、実際に五単糖を原料とした酵母によるバイオエタノール生産システムにおいて、その効率が低いことが問題視されている初発の二段階反応(キシロース→キシリトール→キシリロース)に注目した^[13]。この反応は、二種類の酵素キシロースリダクターゼ(XR)とキシリトールデヒドロゲナーゼ(XDH)によって触媒されるが、反応中間体であるキシリトールと共に補酵

素(NAD⁺)も再利用されることから、二種類の物質が酵素間を移動するシステムとなっている(図 3a)。これは、これまでに DNA ナノ構造体上で評価されてきた酵素反応系の多くが、例えばグルコースオキシダーゼ(GOx)とペルオキシダーゼ(HRP)による酵素連続反応^[4,15]のように評価のしやすい完全モデル系(かつ一種類の物質が移動するシステム)であるのに対して、生体内で実際に存在する代謝反応である点からも、得られる知見の重要性は高いと考えられる。また、反応条件の設定により、二種類の物質と一種類の物質が酵素間を移動するシステムを構築することができるため、これまで DNA ナノ構造体上での評価実績のないそれらの距離依存性についての比較評価ができると考えた。二種類の酵素にアダプターを融合したキメラ酵素、具体的には、XR に対して共有結合型アダプターを融合した ZS-XR と二量体酵素である XDH に ZIP の一つである GCN4 を融合した G-XDH を調製した。それぞれの酵素活性はキメラ酵素として調製しても維持されていることが確認できており、我々のアダプター戦略の優位性のひとつとして挙げられる^[6,8]。また、これらのキメラ酵素を距離や分子数を制御して配置するための DNA ナノ構造体を設計し、調製した(図 3b)。DNA ナノ構造体上へのそれぞれキメラ酵素の配置効率を、原子間力顕微鏡(AFM)を用いた分子レベルでの統計的解析により評価することで定量した(図 3c)。その上で、二段階の代謝反応の効率を生成物量とその反応初速度に注目して評価した結果、最近接させた場合(10 nm)にその反応効率が最大となることが明らかとなった(図 3d)。さらに、二物質(キシリトールと NAD⁺)と一物質(NAD⁺)が酵素間を移動するシステムに関してそれぞれ距離と反応効率との相関関係を導出した結果、二物質が移動するシステムにおいてより顕著に酵素間の距離の影響を受けることが明らかとなった。これらの結果は、それぞれの物質の拡散に関するシミュレーションをおこなった結果と良い一致を示しており、反応効率が物質の拡散に如実に影響を受けることを改めて実証することに成功した^[8]。この知見を生かしてより拡散を抑制できる三次元空間にキメラ酵素を配置することで、更なる反応の効率化が期待できる。

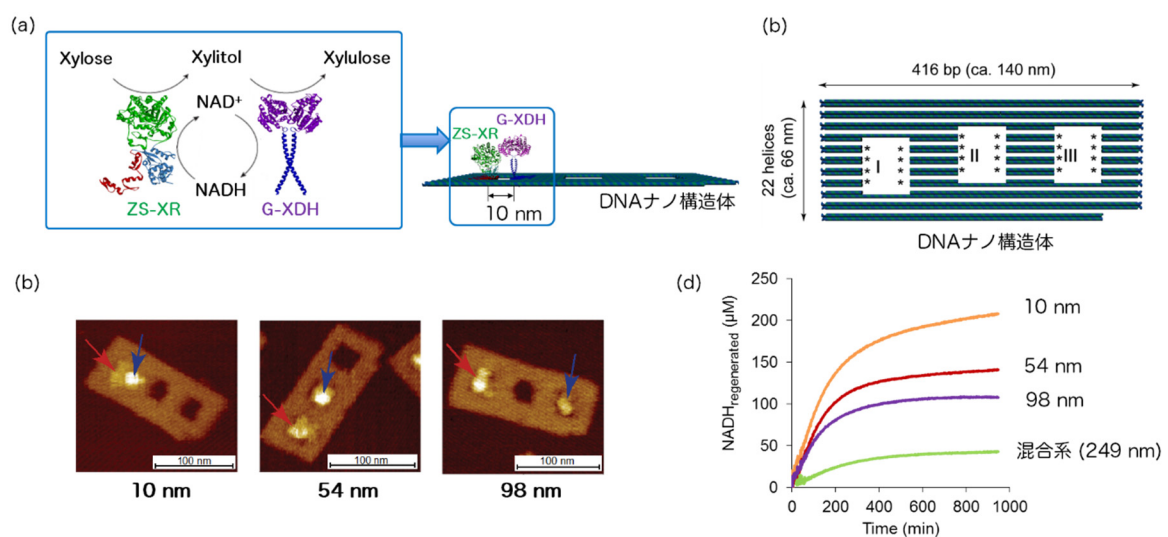


図 3. (a) XR と XDH によるキシロース代謝過程の模式図 (b)酵素間距離を様々に変化させた DNA ナノ構造体の構造 (DNA ナノ構造体図中の*に結合場所が導入可能) (c) 結合場所間距離が異なる DNA ナノ構造体に酵素配置後の AFM 画像(赤矢印: ZS-XR, 青矢印: G-XDH) (d) 二物質が移動するシステムにおける反応効率(NADH 再生過程)と酵素間距離の比較(一部のみを記載)^[8]

4. まとめと今後の展望

本稿では、空間制御能の高い DNA ナノ構造体を足場とした高効率な物質変換システム(分子スイッチボード)の構築を目指し、DNA ナノ構造体上に酵素を高選択的かつ定量的に配置する技術を開発し、実際にそれらを利用して、二種類の酵素が関与する代謝反応の効率と酵素間距離の相関関係について

評価するまでの過程を示した。前述のように、本研究で注目した反応系は、実際の生体内に存在している代謝システムであり、ここで得られた知見は、将来的に実在の代謝経路の効率化へと還元することも可能である。また、本代謝反応では、本研究で取り上げた二段階反応を経た後の次反応のリン酸化過程までを含めた三段階反応の効率化が鍵とされている^[13]ことから、今後拡張して三段階代謝反応の効率化に関して評価することは、有意義である。また、更なる効率化を目指すうえでは、二次元平面上での酵素間の空間距離のみならず、三次元空間上での配置についての評価が重要である。実際に DNA オリガミ法により構築される DNA ナノ構造体は、二次元構造体に限定されず、三次元構造体をも構築できることが知られている^[16]。そこで、さらなる DNA 結合性アダプターの拡張をおこないつつ、三段階代謝反応への展開とその三次元空間への展開を視野に研究を進めているところである。その成果については、またの機会に紹介させていただければと考えている。

5. 謝辞

本稿の内容は京都大学エネルギー理工学研究所の森井研究室で立案・遂行された研究成果です。森井 孝 教授には、常日頃から多大なるご指導とご支援をいただいております。ここに厚く御礼申し上げます。また、Ngo Anh Tien 博士 (現デンマーク工科大学 博士研究員)をはじめとする研究室メンバーとエネルギー理工学研究所の才村 正幸 技術専門職員、そしてすべての共同研究者の方々に感謝いたします。本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金 (24651150・15H05492) の支援により実施されました。

6. 参考文献

- [1] 総説として : D. M. Vriezema, M. Comellas Aragonès, J. A. A. W. Elemans, J. J. L. M. Cornelissen, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1445.
- [2] P. W. Rothmund, *Nature* **2006**, *440*, 297.
- [3] 総説として : N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427.
- [4] 総説として : V. Linko, S. Nummelin, L. Aarnos, K. Tapio, J.J. Toppari, M.A. Kostiainen, *Nanomaterials* **2016**, *6*, 139.
- [5] E. Nakata, F. F. Liew, C. Uwatoko, S. Kiyonaka, Y. Mori, Y. Katsuda, M. Endo, H. Sugiyama, T. Morii, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2421.
- [6] T. A. Ngo, E. Nakata, M. Saimura, T. Kodaki, T. Morii, *Methods* **2014**, *67*, 142.
- [7] E. Nakata, D. Huyen, T. A. Ngo, M. Saimura, T. Morii, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 1016.
- [8] T. A. Ngo, E. Nakata, M. Saimura, T. Morii, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3012.
- [9] 総説として : Y. R. Yang, Y. Liu, H. Yan, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 1381.
- [10] 総説として : K. J. Brayer, D. Segal, *Cell Biochem. Biophys.* **2008**, *50*, 111.
- [11] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86.
- [12] B. Saccà, R. Meyer, M. Erkelenz, K. Kiko, A. Arndt, H. Schroeder, K. S. Rabe, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9378.
- [13] T. W. Jeffries, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, *17*, 320.
- [14] O. I. Wilner, Y. Weizmann, R. Gill, O. Lioubashevski, R. Freeman, I. Willner, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 249.
- [15] J. Fu, M. Liu, Y. Liu, N. W. Woodbury, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5516.
- [16] 総説として : F. Zhang, J. Nangreave, Y. Liu, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 1198.

グルタミン酸受容体の選択的活性化を可能とする錯体化学的アプローチ

京都大学大学院工学研究科 窪田 亮

1. はじめに

生細胞に存在する膜タンパク質受容体は、細胞外の神経伝達物質・ホルモン・サイトカインを受容し、様々な細胞応答を引き起こす生理学的に重要なタンパク質群である。膜タンパク質受容体には、リガンド作動性イオンチャネルやGタンパク質共役受容体(GPCR)、受容体型チロシンキナーゼ等の種類が存在し、極めて複雑な細胞内シグナル伝達を制御している。生細胞において、これら受容体の活性を人工的に制御する事が出来れば、望みの膜タンパク質受容体の生理機能解明、および細胞機能の人工編集への展開が期待される。しかし膜受容体の立体構造・活性化メカニズムは極めて複雑なため、膜受容体の活性を制御できる手法は限定されている。例えば、近年盛んに研究が行われているOptogeneticsは、膜受容体の機能解析への適用は原理上不可能である¹。また非天然リガンドのみ応答する人工GPCRを構築できるDREADDは強力な手法だが²、リガンド結合サイトに点変異を導入するため膜受容体本来の機能を損なう危険性がある。こうした背景から、本研究では標的の膜受容体を選択的に活性化する新たな手法として、錯体化学を基盤とする化学遺伝学的手法(On-cell Coordination Chemistry: OcCC)を考案した(図1)³。OcCCでは、膜受容体に導入したHisと金属錯体の間に形成する配位結合により膜受容体の活性化構造を安定化することで活性化を惹起する。本稿では、OcCCの概略を説明する。

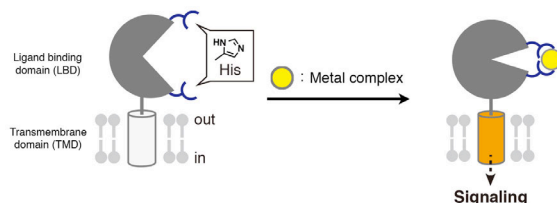


図1. OcCCの概略。

2. イオンチャネル型グルタミン酸受容体の設計と活性化

OcCCの標的として、神経伝達物質受容体の一種であるイオンチャネル型グルタミン酸受容体(iGluR)を選択した⁴。iGluRは、我々の脳・神経細胞に存在し、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を受容し、細胞内へNa⁺やCa²⁺イオンを流入させる。iGluRは記憶や学習のメカニズムに関与するとされ、脳機能を解明する上で重要である。iGluRの立体構造は、N末端ドメイン(amino-terminal domain)、リガンド結合ドメイン(ligand-binding domain: LBD)、膜貫通ドメイン(transmembrane domain: TMD)の三種に大別され、LBDとTMDの構造変換が活性化に重要である⁵。すなわちアゴニスト(活性化剤)であるグルタミン酸の結合に伴い、LBDがopenからclosedへ構造変化を示す(図2a)。その結果、イオンチャネルが開くことで活性化する。そこで我々は、この活性構造相関に基づき、LBDのclosed構造を配位結合により安定化することで活性化できると考えた。具体的には、LBDの活性化時に近接するアミノ酸残基に対して二つのHis変異を導入し、その変異Hisが金属錯体(金属イオン)に対して二座配位子として機能することで、LBDのclosed構造を安定化させることで活性化を惹起する(図2a)。

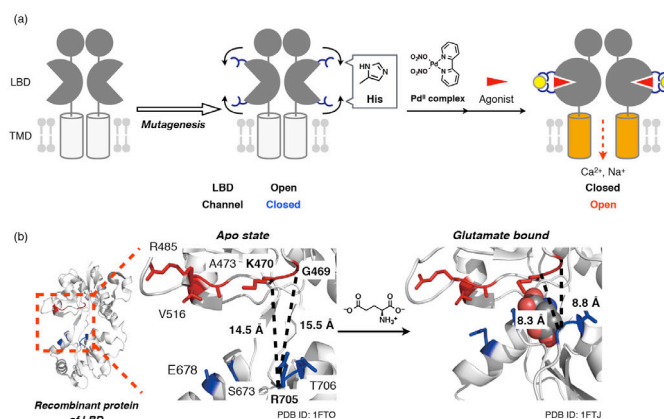


図2. (a) OcCCによるGluA2の人工活性化。(b) S1S2Jの結晶構造。

この設計指針に則り、His変異を導入したiGluRを設計した。本研究ではiGluRの中でも、結晶構造解析に代表される構造情報が豊富に存在するAMPA型グルタミン酸受容体のサブタイプの一つであるGluA2を標的として選択した。具体的には、LBDの可溶性リコンビナントタンパク質(S1S2J)の結晶構造を基礎として変異体を設計した。S1S2Jのアポ状態とグルタミン酸結合状態の結晶構造を比較すると、

この設計指針に則り、His変異を導入したiGluRを設計した。本研究ではiGluRの中でも、結晶構造解析に代表される構造情報が豊富に存在するAMPA型グルタミン酸受容体のサブタイプの一つであるGluA2を標的として選択した。具体的には、LBDの可溶性リコンビナントタンパク質(S1S2J)の結晶構造を基礎として変異体を設計した。S1S2Jのアポ状態とグルタミン酸結合状態の結晶構造を比較すると、

グルタミン酸結合に伴い、近接するアミノ酸残基が存在する(図 2b)^{5a}。そこで、この近接するアミノ酸残基のうち”上唇”と”下唇”から一つずつ選択し、二つの His 変異を導入した変異型 GluA2 を構築した。各アミノ酸残基の距離・配向を考慮し、変異箇所を変えた変異型 GluA2 を合計 8 種類構築した。

続いて、構築した変異型 GluA2 の活性を蛍光 Ca²⁺イメージングにより評価した。構築した変異型 GluA2 及び野生型 GluA2 (WT GluA2)を、モデル細胞である HEK293T 細胞に強制発現させたのち、種々の金属イオン・錯体存在下においてグルタミン酸を作用させた際の細胞内 Ca²⁺濃度変化を蛍光 Ca²⁺インジケータである Fura-2 を用いて定量的に評価した。検討した金属イオン・錯体は、His と高親和性を示すソフトな金属中心を持つ ZnCl₂, NiCl₂, PdCl₂, Pd(en)(NO₃)₂ (en: エチレンジアミン), Pd(bpy)(NO₃)₂ (Pd(bpy), bpy: 2,2'-ビピリジン)を選択した。結果、Pd(bpy)(NO₃)₂ と K470H/R716H 変異体(GluA2(KR)) および G471H/R705H 変異体が Hit pair であることが明らかとなった。これら二つの pair は、Pd(bpy)非存在下ではほとんど活性化を示さない一方で、Pd(bpy)存在下では顕著な活性を示した。また興味深いことに、金属錯体による活性化は Pd(bpy)以外の金属イオン・錯体では観測されなかった。一方で、WT GluA2 では Pd(bpy)存在下でも活性増強を示さないことから、変異体で観測された活性増強は導入した His 変異と Pd(bpy)の相互作用に由来することが示唆された。

続いて、GluA2(KR)を用いて Pd(bpy)による活性化の詳細評価を行った。まず始めに、Pd(bpy)の濃度依存性を確認した。一定濃度(10 μM)のグルタミン酸存在下における Pd(bpy)の濃度依存性を蛍光 Ca²⁺イメージングにより評価した結果、シグモイド型の飽和曲線が得られ、その EC₅₀ は 1.2 μM であった。一方で野生型 GluA2 では明確な飽和曲線は示さなかった。このことから Pd(bpy)は変異導入した His と相互作用することで、GluA2(KR)の活性増強を誘起していることが示唆された。さらに、3 μM Pd(bpy)存在下におけるグルタミン酸の濃度依存性を蛍光 Ca²⁺イメージングにより確認したところ、GluA2(KR)ではその EC₅₀ 値が Pd(bpy)有無で 30 倍低濃度シフトすることが明らかとなった(Pd(bpy)非存在下 110 μM、存在下 3.6 μM)。一方で WT GluA2 では EC₅₀ 値の顕著な低濃度シフトは観測されなかった。さらに可溶性タンパク質である S1S2J を用いた NMR 実験から、変異導入した His が Pd(bpy)に対して二座配位子として機能することも確認できた。

以上の実験から、Pd(bpy)は GluA2(KR)の「アロステリックモジュレータ」として機能することが示唆される。すなわち、変異導入した二つの His が Pd(bpy)と錯体形成することで二座配位子として機能することで LBD の closed 構造を安定化する。その結果、GluA2(KR)に対するグルタミン酸の見かけの親和性が向上することで、低濃度のグルタミン酸により活性化できたと考えられる。

3. 代謝型(GPCR 型)グルタミン酸受容体の設計と活性化

続いて OcCC の一般性を主張するため、class C GPCR の一種である代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)に OcCC を適用した。mGluR の構造活性相関は iGluR と非常に類似しており、LBD の open から closed の構造変換が進行することで活性化する(図 3)。そこで LBD の結晶構造をもとに、iGluR と同様の設計指針で二つの His 変異を有する変異型 mGluR を 8 種類構築した(サブタイプとしては mGluR1 を用いた)。

構築した変異型 mGluR1 の活性を蛍光 Ca²⁺イメージングにより評価した。mGluR1 は Gq カップルの GPCR であることから、活性化に伴い細胞内 Ca²⁺濃度が上昇する。Pd(bpy)有無におけるグルタミン酸添加時の活性を評価したところ、三種類の変異型 mGluR1 で活性増強が起こることが判明した。その詳細を見てみると、予想外にもこれら三種の変異体は Pd(bpy)のみ添加しただけで活性化することが明らかとなった。そこで変異体のうちの一つである mGluR1(P58H/N264H)の Pd(bpy)濃度依存性を評価したところ、飽和曲線を示し

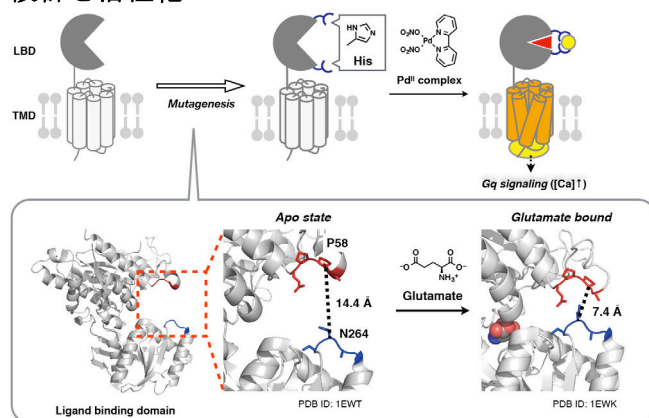


図 3. OcCC による mGluR の活性化

EC₅₀ 値は 0.2 μM であった。一方で WT mGluR1 は全く Pd(bpy) 応答を示さなかった。以上の結果から、Pd(bpy) は変異型 mGluR1 に対して「アロステリックアゴニスト」として機能することが判明した。

4. OcCC の培養神経細胞への適用

最後に、OcCC が培養神経細胞において機能するかを確認した。神経細胞では、イオンチャンネル型・代謝型グルタミン酸受容体が内在的に発現しているため、変異型 GluA2 のみを選択的に活性化することは挑戦的な課題である。実際、GluA2(KR) を強制発現させた培養神経細胞(大脳皮質)のグルタミン酸応答を蛍光 Ca²⁺ イメージングにより活性を評価した。その結果、Pd(bpy) の存在下で、グルタミン酸応答が顕著に増大することが明らかとなった。

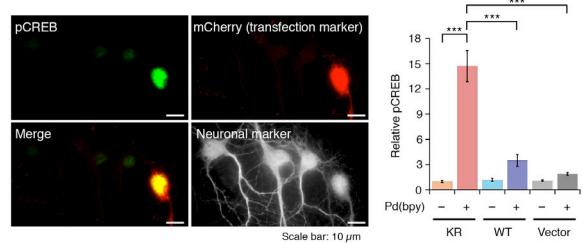


図 4. OcCC 活性化後の神経細胞の免疫染色画像と定量評価

一方で、WT GluA2 を発現させた神経細胞では Pd(bpy) 有無でグルタミン酸応答に変化は見られない。さらにグルタミン酸応答による細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇におけるシグナル伝達経路の下流である CREB (転写因子の一種) のリン酸化を免疫染色により確認した。結果、図 4 に示したように、トランスフェクションマーカーである mCherry 蛍光を示す細胞のみからリン酸化 CREB 由来の蛍光が観察された。また他のコントロール条件と比較して、有意差があることも明らかとなった。以上の結果から、OcCC は培養神経細胞に適用可能であり、かつ変異型 GluA2 を活性化するだけでなく下流のシグナル伝達経路も活性化できることが示された。

5. 最後に

これまで述べてきた通り、OcCC はイオンチャンネル型・代謝型グルタミン酸受容体を生細胞において選択的に活性化できる優れた手法である。OcCC は、GluA2 は約 100 kDa のモノマーからなる四量体型膜タンパク質の活性をたった二本の配位結合で制御可能である。よくよく考えれば、この事実は驚異的であり、金属錯体が持つポテンシャルの凄みを端的に示している。また OcCC は、膜タンパク質受容体の活性化構造を配位結合により安定化させるというシンプルな発想に基づくため、グルタミン酸受容体だけでなく多様な膜タンパク質受容体への応用が期待される。今後は、金属錯体が持つポテンシャルをフル活用することで、生命が持つ未知なる機能解析へ挑戦していきたい。

6. 謝辞

本研究は、京都大学大学院工学研究科 浜地格教授の研究室にて行われたものです。日頃より多大なるご支援・ご助言を賜りました浜地教授・清中茂樹准教授に感謝致します。¹H-¹⁵N HMQC 測定を行っていただきました横浜市立大学生命医科学研究科 高橋栄夫教授・坂倉正義助教に御礼申し上げます。また電気生理測定にあたりましては、福岡大学医学部 井上隆司教授・沼田朋大講師に多大な援助をいただきました。深く感謝申し上げます。最後に mGluR に関する膨大な量の実験を行ってくれた道籬友紀子さんに感謝いたします。

7. 参考文献

1. (a) Boyden, E.S., *et al. Nature Neurosci.* **8**, 1263–1268 (2005). (b) Zhang, F., *et al. Nature* **446**, 633–639 (2007).
2. (a) Armbruster, B. N. *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 5163–5168 (2007). (b) Conklin, B. R., *et al. Nature Methods* **5**, 673–678 (2008). (c) Magnus, C. J. *et al. Science* **333**, 1292–1296 (2011).
3. Kiyonaka S., Kubota, R. *et al. Nature Chem.* **8**, 958–967 (2016).
4. (a) Traynelis, S. F. *et al. Pharmacol. Rev.* **62**, 405–496 (2010).
5. (a) Armstrong, N. & Gouaux, E. *Neuron* **28**, 165–181 (2000). (b) Sobolevsky, A. I., Rosconi, M. P. & Gouaux, E. *Nature* **462**, 745–756 (2009).

微小な腹腔内転移を可視化するβ-ガラクトシダーゼ蛍光プローブの開発

東京大学大学院医学系研究科 浅沼 大祐

1. はじめに

腹膜播種は腹腔内の腹膜に転移した腫瘍であり、卵巣がんをはじめとした種々の悪性腫瘍で認められる。とりわけ、卵巣がん患者はその過半数が高悪性度の腹膜播種を患っていると診断され、5年生存率が10-20%と予後が極めて不良である。標準的な治療では腫瘍の外科的切除の後に全身化学療法が施されるが、外科手術において1 mm未満の微小な腫瘍まで徹底的に切除することにより5年生存率が改善することが明らかになっている。しかしながら、腫瘍はしばしば正常組織と区別することが難しく、微小な転移を含めて見落としなく効率的な細胞切除を行うことは困難である。本研究では、卵巣がんで活性亢進が知られるβ-ガラクトシダーゼを分子標的として、新規の高感度なβ-ガラクトシダーゼ蛍光プローブの開発に基づき腫瘍の簡便な蛍光可視化法の構築を行った(図1)。

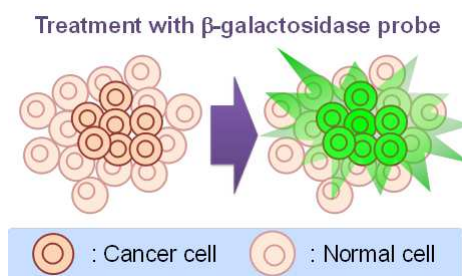


図1. がんの蛍光可視化

2. 蛍光プローブの分子設計・開発

1979年にChatterjeeらが、正常の卵巣と比較して原発性の卵巣がんではβ-ガラクトシダーゼ活性が亢進していることを報告している。本研究では、ヒト卵巣がん由来の腹腔内転移細胞株7種類(SHIN3、SKOV3、OVCAR3、OVCAR4、OVCAR5、OVCAR8およびOVK18)を対象に酵素活性を評価したところ、β-ガラクトシダーゼ活性が非腫瘍細胞株に比べて亢進していることが分かった。この結果から、腫瘍の可視化にβ-ガラクトシダーゼ活性を検出する蛍光プローブを用いることが有用であることが示唆された。

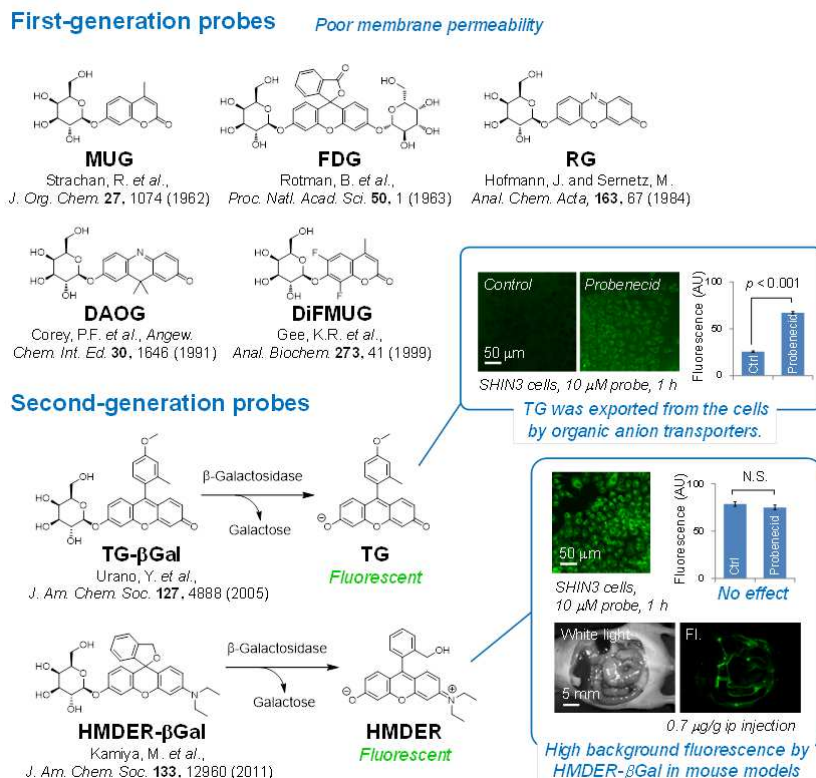


図2. 既存の蛍光プローブはがんの可視化に適さない

MUG、FDG や RG をはじめとして多様のβ-ガラクトシダーゼ蛍光プローブがこれまでに報告されている (図2)。しかしながら、上述した第一世代の蛍光プローブは、水溶性の高さから細胞膜透過性に乏しく、目的とする細胞内のβ-ガラクトシダーゼ活性の検出には適していない。第二世代となる細胞膜透過性に優れた TG-βGal を SHIN3 細胞に応用したところ、プローブの酵素反応後の蛍光生成物である TG が細胞で発現する有機アニオントランスポーターにより排出されてしまうため目的のβ-ガラクトシダーゼ活性の検出は困難であった (図2)。この結果を踏まえて、正味電荷がゼロの HMDER を蛍光性の酵素反応生成物とする HMDER-βGal を用いたところ、培養細胞実験にて目的の酵素活性を検出することが可能であったが、腹膜播種マウスモデルでは HMDER-βGal 自体に由来する高いバックグラウンド蛍光が腹腔内全

体で観察され、がんの可視化は困難であった (図2)。HMDER-βGal の特性を見直したところ、分子内スピロ環化反応に関わる酸塩基平衡のパラメータ pK_{cycl} が 6.9 であり、生理的 pH 7.4 では 25%程度が蛍光性の開環型構造となることが高いバックグラウンド蛍光の原因と考えられた (図3)。

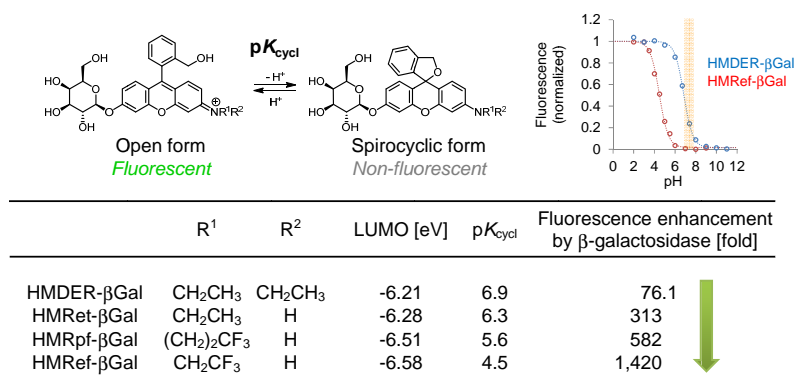


図3. 蛍光プローブの特性の最適化

そこで、バックグラウンド蛍光を極小化するため、蛍光団であるロドールのN置換基に着目して分子構造の最適化を図った。電子吸引性のN置換基の導入により pK_{cycl} は小さくなり、トリフルオロエチル

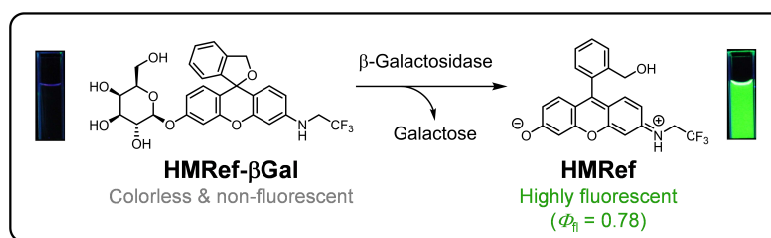


図4. 開発した高感度蛍光プローブ HMRRef-βGal

基を置換した HMRRef-βGal (図4) は pH 7.4 におけるバックグラウンド蛍光が極小化し、β-ガラクトシダーゼを用いた *in vitro* 酵素反応実験では 1,400 倍以上の蛍光増大を示した (図3)。電子吸引性のN置換基の導入により、蛍光プローブの分子内スピロ環化反応について特性の最適化を実現した。また、HMRRef-βGal を培養細胞に応用したところ、先述の7種類の転移がん細胞株のいずれにおいても細胞内のβ-ガラクトシダーゼ活性を蛍光検出することが可能であった。

3. がんイメージング

卵巣がん細胞を用いて作製した腹膜播種マウスモデル7種に HMRRef-βGal を応用したところ、いずれにおいても 1 mm 未満の微小な腹腔内転移を高精細に可視化することに成功した (図5)。プローブの蛍光は明るく、転移は肉眼で容易に識別し切除することが可能であった。また、蛍光内視鏡による転移の検出も可能であった。これらの結果から、構築した可視化法は外科手術や診断における腹腔内転移の簡便な識別技術として前臨床的に極めて高いポテンシャルを有していることを明らかにした。

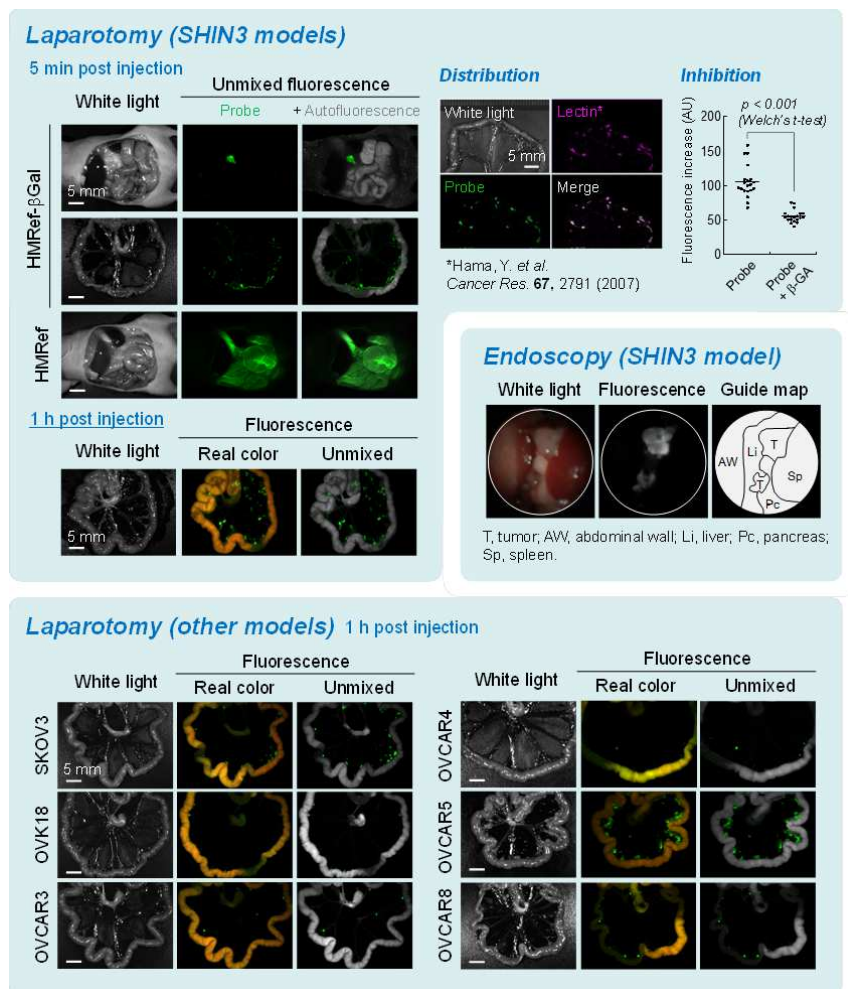


図5. HMRef-βGalによるがんイメージング

4. おわりに

本研究では、β-ガラクトシダーゼ活性を高感度に検出する蛍光プローブを開発して微小な腹膜播種の可視化を実現した。β-ガラクトシダーゼに限らず、他のグリコシダーゼもまた多様のがんで活性の亢進が報告されている。HMRef-βGalの糖構造置換からグリコシダーゼ蛍光プローブライブラリを構築することが可能であり、各病態に合わせたテーラーメイド診断技術への展開が期待できる。

5. 謝辞

本研究の立案・遂行にあたり、東京大学の浦野泰照教授、長野哲雄教授、米国 NIH の小林久隆主任研究員をはじめ、坂部雅世博士、神谷真子博士、山本恭子修士、平竹潤教授、小川美香子教授、小坂信之博士、Peter L. Choyke, MD から多大なるご協力・ご支援を頂戴しましたことをこの場を借りて御礼申し上げます。

6. 参考文献

Asanuma D, Sakabe M, Kamiya M, Yamamoto K, Hiratake J, Ogawa M, Kosaka N, Choyke PL, Nagano T, Kobayashi H & Urano Y. Sensitive β-galactosidase-targeting fluorescence probe for visualizing small peritoneal metastatic tumours *in vivo*. *Nat. Commun.* **6**, 6463 (2015). doi: 10.1038/ncomms7463.

RNA G-quadruplex 選択的化合物を用いた RNA G-quadruplex の探索

京都大学物質-細胞統合システム拠点 勝田 陽介

1. はじめに

高校生が使う教科書で mRNA は一本の紐として描かれ、DNA に保存された遺伝情報を基にタンパク質をつくるための単なる伝令役として取り扱われている。しかし、実際の mRNA は単に遺伝情報を伝令するのみにとどまらず、ステム構造やシュードノット構造を利用して複雑な三次元構造を形成し、内部リボソーム侵入サイト¹やリボスイッチ²のように情報の伝令を制御する RNA 構造を併せ持つことが明らかとなってきた。近年、mRNA のグアニン塩基を豊富に含む領域で、リボソームによる mRNA からのタンパク質翻訳を制御する RNA G-quadruplex と呼ばれる安定な四重鎖構造を形成することが見出され、mRNA 自身が担う新たなタンパク質翻訳制御機構として注目されてきている³。しかし、細胞内において“どの遺伝子”が“どの位置”で RNA G-quadruplex 構造を作り、遺伝情報の伝令に影響を与えているのかは、ほとんど明らかになっていない。現在、RNA G-quadruplex の存在位置を掴む手法として RNA の配列情報から計算に基づく構造予測が主流であるが⁴、RNA は存在環境下で高次構造を大きく変化させることから、一次配列情報からの単純な計算ですべての G-quadruplex 構造を見出すことはできない。細胞内環境で構築され、機能している RNA G-quadruplex を発見するには、細胞内で形成されている RNA G-quadruplex 構造を実験的に直接捉える方法の確立が必要であろう。

本稿においては、筆者らが考案した生細胞内で形成し機能する RNA G-quadruplex 構造をケミカルバイオロジー的なアプローチで捉える方法を紹介する。

2. RNA G-quadruplex 結合性化合物のスクリーニング

本研究における「ケミカルバイオロジー的なアプローチ」とは「化合物」を道具として利用して RNA G-quadruplex を探すこと。そのためには、第一段階として RNA G-quadruplex に結合する化合物が必要だ。

DNA G-quadruplex に結合する化合物は TMPYP4・ピリドスタチン・テロメスタチンなど数多く知られている。しかし、不思議なことに RNA G-quadruplex 構造選択的に結合し、細胞実験に利用できる化合物は、ピリドスタチン誘導体を除いてほとんど報告されていない^{5,6}。生細胞内における RNA G-quadruplex 構造の生理学的意義を解明するには、合目的に研究ツールとして利用できるように、異なる化学的性質を持つ様々な RNA G-quadruplex 結合性化合物が必要であろう。

そこで筆者らは既知の RNA G-quadruplex 結合化合物とは全く異なるような基本骨格をもつ RNA G-quadruplex 結合化合物を開発するため、2010 年大阪大学中谷和彦先生らのグループによって報告された論文を参考に、化合物ライブラリーからのハイスループットスクリーニング法を考案した⁷。

スクリーニングの方法は単純で、RNA G-quadruplex を形成することが知られている配列（本研究においては Telomeric

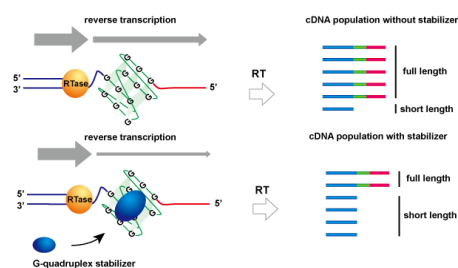


Fig.1 今回著者らの提案した新規スクリーニング法。

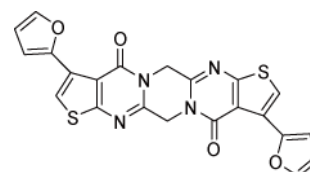


Fig.2 新規 RNA G-quadruplex 結合性化合物 RGB-1 の化学構造

repeat-containing RNA: TERRA を用いた) を有する RNA に対して逆転写反応を行い、完全長 cDNA が増幅するように設計した Primer で定量的 PCR を行うのみである。RNA G-quadruplex 構造は逆転写酵素の cDNA 合成伸長反応を阻害するため、化合物が RNA G-quadruplex に結合・安定化すれば完全長 cDNA の量は減少するはずだ (Fig. 1)。

この新規スクリーニング方法を利用して 8,000 種の化合物を評価し、RGB-1 を見出すことに成功した (Fig. 2)。本稿には詳細な結果は示さないが、種々の実験から RGB-1 は RNA G-quadruplex に対して極めて高い結合選択性を持つことが明らかになった。

3. RGB-1 を用いたタンパク質翻訳反応制御

RNA G-quadruplex の役割の一つはタンパク質翻訳反応の制御である。そこでまず、無細胞タンパク質合成システムを利用して RGB-1 のタンパク質翻訳に与える影響を評価した。5'UTR に RNA G-quadruplex 構造を配置した mRNA を用いた場合、著者らが期待した通り、RGB-1 の存在下でレポータータンパク質の発現量が減少した。一方で、RNA G-quadruplex 構造をヘアピンシステム構造や構造を取らない配列に置換した mRNA を準備し同様の検討を行ったが、RGB-1 はレポータータンパク質の発現に影響を与えなかった。この結果は、RGB-1 が RNA G-quadruplex 構造を選択的に安定化し、タンパク質の翻訳を抑制することを示唆する。

次に RGB-1 が生細胞において機能を発揮することが出来るかを確認するため、HEK-293 に 5'UTR に G-quadruplex 構造を配置したレポーター遺伝子を導入し、RGB-1 のタンパク質翻訳抑制活性を評価した。その結果、RGB-1 濃度依存的にレポータータンパク質の発現量が抑制ことが確認された。無細胞タンパク質合成システムと同様に設計した対照実験では、RGB-1 はレポータータンパク質の発現に影響を与えなかった。この結果は、筆者らが期待した通り、RGB-1 が細胞内環境で形成する RNA G-quadruplex を標的とし、タンパク質翻訳反応を制御することが出来る事を示唆した。

上記の結果から考えれば、RGB-1 は RNA G-quadruplex 構造を持つ内在性 mRNA のタンパク質翻訳を選択的に抑制するはずである。筆者らは 5'UTR に RNA G-quadruplex を有していることが知られている NRAS 遺伝子を標的として、RGB-1 処理による内在性 NRAS タンパク質の発現量の変化をウエスタンブロットにより評価した。その結果、RGB-1 は NRAS タンパク質選択的に発現量を抑制することが分かった (Fig.3)。

「化合物」をツールとして使って RNA G-quadruplex を探すという目標を達成するためにクリアすべき検討課題として、内在性タンパク質の発現量を制御できるか否かが挙げられる。本評価は NRAS に限らず、RGB-1 は RNA G-quadruplex を有する mRNA のタンパク質翻訳反応に影響を与えることができることを強く示唆している。

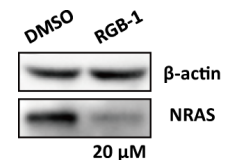


Fig.3 ウエスタンブロットによる内在性 NRAS 発現量の評価。

4. 新規 RNA G-quadruplex の発見

筆者らは内在性 NRAS 発現量を評価するにあたり、RGB-1 が“どこか”に結合し NRAS 発現量を制

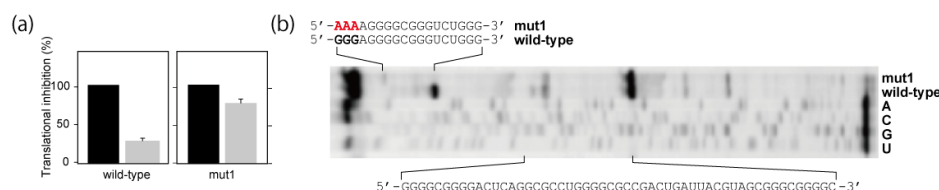


Fig. 4(a) 細胞タンパク質合成システムによる評価の結果。mut1 も RGB-1 の存在でレポータータンパク質が減少している。(b) Stop Assay の結果。wild-type も mut1 も今まで知られていなかった位置に RNA G-quadruplex の存在を示すバンドが確認できる。

御することを見出した。しかし、“どこか”ではサイエンスとして不十分である。いったん、戻るようなかたちになるが、NRAS 遺伝子の 5'-UTR を配置したレポーター遺伝子を作製して、無細胞タンパク質合成システムで RGB-1 発現抑制活性の評価を行ってみた。すると、既知の RNA G-quadruplex を形成する配列に変異を導入し、構造体を形成しえない配列 (mut1) にしてもなお、レポータータンパク質の発現量は低下したままであった (Fig.4(a))。今までの評価で RGB-1 は RNA G-quadruplex に高い選択制を持っていると評価したにも関わらずだ。

そこで著者らは弘前大学工学部萩原正規先生のご協力を仰ぎ、RNA G-quadruplex の存在位置を確認するため、逆転写酵素の伸長阻害試験を行うことにした。その結果、NRAS 遺伝子の 5'-UTR には今まで知られていなかった RNA G-quadruplex が存在し、さらにこの新規 RNA G-quadruplex は今までの構造予測に用いてきた法則には当てはまらないものであることが解った (Fig.4(b))。

5. まとめと展望

今回、筆者らは標的遺伝子を NRAS という一つの遺伝子に絞って研究を行った。RGB-1 が持つ最大の特徴は細胞内の RNA G-quadruplex に結合し、タンパク質翻訳反応に変調をもたらすことが出来る点にある。つまり、2次元電気泳動や抗体アレイなどによってタンパク質翻訳量を RGB-1 処理の有無で評価することにより、実験的に RNA G-quadruplex の網羅的検索を行うことが出来るはずだ。逆転写酵素の伸長阻害試験と組み合わせることで、RNA G-quadruplex が存在する正確な場所まで特定することができる。将来的には見出した RNA G-quadruplex の安定性を変化させ、このユニークな構造体の生物学的な機能を解き明かしていきたいと考えている。

謝辞

本研究は、京都大学物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS)・化学研究所 上杉研究室にて実施しているものです。上杉志成教授のご助言及びご協力に感謝申し上げます。また、立案から遂行に至るまで、iCeMS の佐藤慎一准教授と共同で行いました。この場をお借りし御礼申し上げます。また、Stop Assay 及びデータ解析に関して多大なご協力を頂きました弘前大学の萩原正規准教授、その他本研究にご協力いただきいただきました多くの方々に深く感謝申し上げます。

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金の支援により実施されました。

参考文献

1. Jang, S.K. et al. *Journal of virology* **63**, 1651-1660 (1989).
2. Mandal, M. et al. *Cell* **113**, 577-586 (2003).
3. Endoh, T. et al. *Angewandte Chemie* **52**, 5522-5526 (2013).
4. Bugaut, A. et al. *Nucleic acids research* **40**, 4727-4741 (2012).
5. Bugaut, A. et al. *Organic & biomolecular chemistry* **8**, 2771-2776 (2010).
6. Di Antonio, M. et al. *Angewandte Chemie* **51**, 11073-11078 (2012).
7. Hagihara, M. et al. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **20**, 2350-2353 (2010).

ニュースレター Vol. 31, No. 3 2016年 12月27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：浦野 泰照, 伊東 忍, 王子田 彰夫