

# Newsletter



日本化学会  
生体機能関連化学部会

## 巻頭言

生体機能関連化学部会と私 二木 史朗 2

## Award Account 🏆 部会講演賞

植物ホルモン共受容体サブタイプ選択的アゴニストの開発と植物免疫制御 高岡 洋輔 4

核酸の代謝的ラベル化と近接効果を利用した高速クリック試薬の開発 寺 正行 9

非環状型人工核酸 aTNA の高速かつ高効率な鋳型特異的ケミカルライゲーション法の開発  
村山 恵司 17

主鎖アラニン型ペプチドの配座安定性評価と生体分子認識への応用 森本 淳平 23

## Award Account 🏆 ポスター賞

小分子リガンドによる細胞接着蛋白質 P-カドヘリンの分子間相互作用制御と構造情報に基づくリガンド設計 妹尾 暁暢 28

線維芽細胞増殖因子受容体の活性化を制御する機能性核酸の開発 江口 晃弘 30

photoSLIPT による細胞内分子の光操作と多色イメージング 沖 超二 32

RNA 高次構造形成に基づく新規遺伝子発現制御技術の開発 嘉村 匠人 34

1 分子酵素活性プロファイリングによる疾患関連酵素の超高感度検出 坂本 眞伍 36

リガンド指向性化学による NMDA 型グルタミン酸受容体の選択的なラベリング 白岩 和樹 38

Ru 光触媒担持アフィニティービーズを駆使した抗体の Fc 領域選択的化学修飾の開発 中根 啓太 40

糖分解酵素活性検出蛍光プローブ群の開発と悪性及び良性腫瘍特異的蛍光イメージングへの応用  
藤田 恭平 42

生体分子の網羅的イメージングを可能とする蛍光バーコードの開発 牧野 航海 44

## ぶらり研究室の旅

萩原 伸也 46

## 部会行事

第 13 回バイオ関連化学シンポジウム 開催報告 和田 健彦・珠玖 仁 48

市民公開講座「生活そして人生を豊かにし、社会に貢献するバイオ関連化学最前線」開催報告  
和田 健彦 52

第 13 回バイオ関連化学シンポジウム講演賞 講評 上野 隆史 56

## お知らせ

第 13 回バイオ関連化学シンポジウム講演賞・ポスター賞 58

生体機能関連化学部会ロゴ決定 59

第 14 回バイオ関連化学シンポジウム会告 60

## 巻頭言

## 生体機能関連化学部会と私

京都大学化学研究所  
二木 史朗

生体機能関連化学部会のシンポジウムに初めて参加したのは、1990年代前半だったように思う。討論では、弁舌鋭い強面？の先生方が前の方にお座りになっておられ、講演が終わるや否や核心を突く辛口の質問やコメントが連発され非常に緊迫したシンポジウム（えっらい恐ろしいシンポジウムだ！）と感じた。この緊迫したシンポジウムの雰囲気に加えて、ものの見方の違いが新鮮であった。たとえば、薬学部出身の私は、生体高分子は生理活性物質というコンセンサスの中で教育を受けてきた。しかし、例えば工学系の方は生体高分子を材料としてとらえる視点や興味を持っておられる方も多く、ペプチドのヘリックスの側鎖にヘムをつけたら光が通る、電気が流れるのではと言われて、これは文化が違うぞと、正直頭がクラクラすると同時に、別の視点を持つ楽しみを覚えた。また、スペクトル解析に非常に強い先生方も多くおられ、これらを用いた相互作用の精密解析に感嘆すると同時に、当時のスペクトル解析の対象ではなかった一層生物寄りの現象を何らかの手法で捉えられたらいいなと思ったりした。もう一つ印象に残っているのは、参加者には部会の設立に関わった先生方の流れを汲む方（弟子・孫弟子）が多かったためか、しばしば「二木さんはどの研究室のご出身ですか？」という質問を受けたことである。この質問の意味は、私が生体機能関連化学部会の創立に関わったどの先生の流れを汲むのかというもので（どの研究分野でも同様の傾向はあるが）、逆に言うと、生体機能関連化学とは全く関係ない研究室出身の私は、正直言ってちょっと肩身が狭く感じた。

時を経て（私もいつの間にか60歳になってしまった）、生体機能関連化学部会の雰囲気も大分変わった。シンポジウムはバイオテクノロジー部会との合同でバイオ関連化学シンポジウムとして開催されるようになった。また、分子細胞生物学や構造生物学等の発展により、バイオ分野へのケミストの参入を容易とし、化学的アプローチにより細胞や個体を扱う意欲的な研究も非常に多くなってきた。一方、本部会の特徴でもあり、実際の生体反応とは距離があると感じるものの、そのエッセンスを積極的に取り入れた生体模倣化学（あるいは生体機能モデル研究）の比重は下がっているように思う。この巻頭言を書くにあたって過去のニューズレターを見ているとたまたま21巻1~4号(2006年度)に「部会20周年特集」(1)-(4)が組まれているのを見つけた。田伏岩夫、国武豊喜各先生をはじめとして1970年代から80年代にかけてこの分野を牽引された先生方のお名前を聞いたことのある若手の研究者や学生の方は多いと思うものの（知らなかった人は是非知っておいてください）、実際にどのような研究を展開されていたかを知っている人は少ないのではと思う。自分がその流れの中で研究生活

を送っていたせいもあるが（時代の共有）、今なお先達の先生方の示されたコンセプトの斬新さとインパクトを覚えている。上記のニュースレターは部会の Web ページからダウンロード可能である。可能なら一読して、その流れを踏まえての自分の現在の立ち位置を考えてみるのも良い経験になるのではないかと思う。（なお、上記の特集記事とは別に、たまたま私も同 2 号に寄稿しているのを発見した。決して、それを読めと言っているのではないことにご留意。）



Award Account

🏆 第13回バイオ関連化学シンポジウム部会講演賞

## 植物ホルモン共受容体サブタイプ選択的アゴニストの開発と植物免疫制御

東北大学大学院理学研究科・JST さきがけ  
高岡 洋輔



### 著者紹介：

出身地：島根県松江市

出身高校：島根県立松江北高校

出身ラボ：浜地研究室（九大～京大工学研究科）～学部4年からお世話になりました。浜地先生をはじめ、林田修助教授、堤浩博士、中田栄司博士、築地真也博士にご指導いただき、優秀な先輩／同期／後輩に恵まれて悪戦苦闘した経験から現在があるのだと思います。改めて皆さまに深謝致します。ポスドク：廣瀬研究室（東大医学系研究科）～短い時間でしたが、新しい分野（神経生物学）で学ぶ貴重な経験ができました。その間東大薬・長野研でも合成をさせていただきました。廣瀬先生、並木先生、長野先生、浦野先生と、スタッフの皆さん、学生さんに感謝いたします。

助教：浜地研究室（京大工学研究科）～短い期間でしたが、免疫学／天然物領域の先生方と知り合い視野を広げる機会になった3年半でした。当時の池田将助教、清中准教授にもお世話になりました。

2014年7月より現職（上田研究室）。2016年10月よりJST さきがけ研究員兼任。

興味ある研究分野：植物ホルモン、植物科学、ケミカルバイオロジー、タンパク質工学

好きなこと：研究と撮り溜めた深夜番組、好きな作家の小説、ビールとラーメン

好きな人物：伊坂幸太郎、井之頭五郎、高田純次、三村マサカズ

### 1. はじめに

植物の分化、生長等を司る植物ホルモンと呼ばれる天然有機小分子は、動けない植物が環境に適応するため、あるいは植物間や他生物間とのコミュニケーションを行なう上で欠かせないシグナル物質である。そのシグナルを受容する植物ホルモン受容体は、多くの高等植物ではサブタイプが複数存在し、複雑かつ精密に植物ホルモンの活性を制御するとされているが、その機能が重要であるがゆえに、機能的に重複しているか、変異導入によっては致死性をもたらすこともあり、遺伝学的手法だけでは解析が困難である。このような背景から、植物ホルモン受容体の活性を解析もしくは制御する、標的選択的なケミカルツールに注目が集まっている<sup>[1]</sup>。ジベレリン<sup>[2]</sup>やオーキシン<sup>[3]</sup>、アブシシン酸<sup>[4]</sup>に代表されるように、多くの植物ホルモンは2種類のタンパク質間相互作用 (PPI) を誘起する化合物であり、ここで言うケミカルツールには、選択的なPPI制御が求められる (Fig. 1a)。

植物は病原菌等への感染や害虫の食害を受けると、ジャスモン酸 (1)<sup>[5-8]</sup>と呼ばれる免疫ホルモンなどを分泌して様々な防御応答を活性化するが、防御に必要なエネルギーを産生するために生長も停止させる。ジャスモン酸が制御する生長と防御のトレードオフの関係は、その制御メカニズムに不明な点が多く残されている。ジャスモン酸の活性本体であるジャスモン酸イソロイシン (JA-Ile, 2) は、F-

box タンパク質 COI1 と転写リプレッサー-JAZ の PPI を誘起することで、JAZ のユビキチン化による分解を促して活性を発現する。モデル植物シロイヌナズナでは 1 種の COI1 に対して JAZ は 13 種類のサブタイプが存在し、これらの組み合わせが複雑な応答を制御するのだが、前述の通り JAZ のような遺伝的冗長性の高い標的では解析が困難であり、どの JAZ がどの応答を制御しているか、多くは解明されていない (Fig. 1b)。このような背景のもと、本研究ではいくつかの JAZ サブタイプに選択的に結合する小分子リガンドを設計し、この複雑なシグナル伝達制御メカニズムを解析するケミカルツールを開発することを目指した<sup>[9]</sup>。

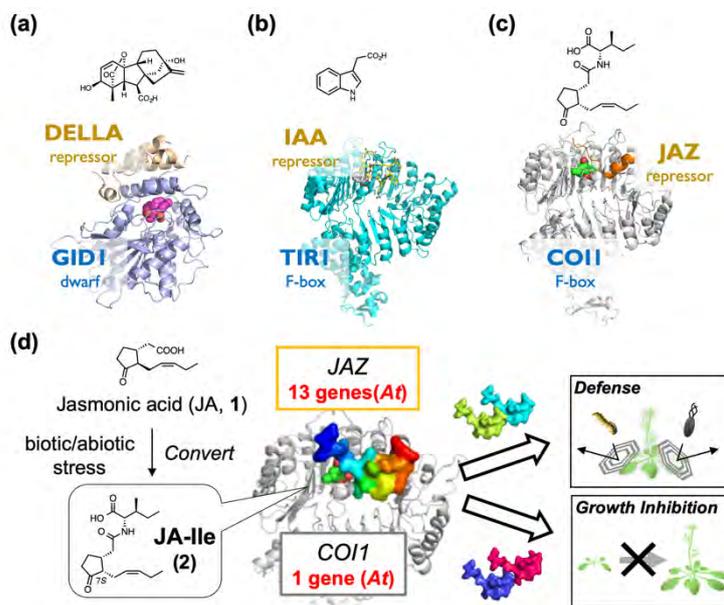


Figure 1. (a-c) 植物ホルモンと共受容体の例 (a: ジベレリン<sup>[2]</sup>, b: オーキシン<sup>[3]</sup>, c: ジャスモン酸<sup>[5]</sup>). (d) ジャスモン酸 (1) 及び JA-Ile (2) の構造式と、COI1-JAZ 共受容体を介した植物応答の模式図。

## 2. COI1-JAZ 共受容体リガンドの in vitro 結合評価系の構築と in silico 解析による構造最適化

本研究で開発する選択的小分子リガンドのリード分子として、JA-Ile の構造ミミックで、COI1-JAZ 共受容体への強力なアゴニストである天然毒素コロナチン (COR, 3) を選択した。すでに所属研究室では COR の全合成が達成されており、その立体選択的合成法で得られる異性体 4 種類のうち、JAZ サブタイプ選択的分子の候補が見出されつつあった<sup>[10,11]</sup>。具体的には、COR はジャスモン酸ミミックであるコロナファシン酸 (CFA, 4) と、イソロイシンミミックである異常アミノ酸であるコロナミン酸 (CMA, 5) からなるが、それぞれの鏡像異性体も同様のルートから合成され、それらを組み合わせた 4 種類の立体異性体を得ることができる (3, ent3, 6, ent6, Fig. 2)。これらを既存の COI1-JAZ9 共受容体との結合評価法である酵母ツーハイブリッド法 (Y2H) で評価したところ、4 つのうち天然型コロナチンのみが結合することが示唆された。一方で、モデル植物シロイヌナズナに投与することでジャスモン酸応答を起こすか確認したところ、3 以外に ent6 (natCMA-entCFA の構造) が、微弱な生長阻害や遺伝子応答を示すことなどが明らかとなった<sup>[11]</sup>。すなわち ent6 は、Y2H では COI1-JAZ9 と結合しないのに対し、そのほかの JAZ サブタイプと結合してジャスモン酸応答を弱く亢進することが示唆された。

筆者はこのリード分子を検証する段階から本格的に参画した。ただし、既存の COI1-JAZ 共受容体へのリガンド結合評価法は、前述の Y2H を含め限られていた。特に Y2H は酵母細胞への化合物の透過性や毒性を加味した評価法であるために偽陽性を含みやすいのが難点であり、COI1-JAZ 系では安定した結果を得るのが困難であった。その他、いくつかのグループが異種発現系で用意したそれぞれのタンパク質を用いた二重標識プルダウン法を用いていたが、JAZ タンパク質が不安定で扱いが難しいこともあり、それぞれの論文では限定的な JAZ サブタイプでのみ評価されるのが常であった<sup>[6,7]</sup>。実際我々のグループでも全長 JAZ タンパク質の発現・精製は検討しているものの、一旦単離すると失活することから、大腸菌ライセートのままプルダウンアッセイに供する必要があるがあった。

そこでまず、13 種類ある COI1-JAZ 共受容体全ての組み合わせのタンパク質間相互作用 (PPI) を正確かつ定量的に評価する系を構築した。着目したのは、唯一この共受容体で報告例のある COI1-COR-JAZ1 の X 線結晶構造解析の論文である<sup>[5]</sup>。この論文で著者らは、COI1 は全長タンパク質を昆虫細胞系で大量発現が可能だが、JAZ1 は COI1-COR への結合ドメイン (Jas motif と呼ばれ、保存性の高い領域) のペプチドで結合の選択性が確認されていた。ペプチドであれば、全長タンパク質とは異なり全ての JAZ サブタイプを安定に用意できると考え、この Jas motif にエピトープとなる蛍光色素 (オレゴングリーン : anti-Fluorescein 抗体を使用可能) を導入した、蛍光修飾 JAZ ペプチドを用意した。まず結晶が取られている JAZ1 ペプチドを用いて、GST を融合させた COI1 と、COR (3) あるいは COR の鏡像異性体 (*ent3*) やジャスモン酸類をそれぞれ添加し、anti-Fluorescein で回収後に anti-GST で検出を行なう二重標識プルダウンアッセイを行なった (Fig. 2a)。その結果、COI1-JAZ1 に結合する COR と JA-Ile は PPI が検出できたのに対し、結合しない *ent3* や、活性前駆体である JA では検出できなかったことから、COI1-JAZ に結合するリガンドの PPI 誘導能を正しく評価できることが明らかとなった (Fig. 2b)。そこでこの系を用いて、4 種類の COR 立体異性体ライブラリーを用いて、Jas motif を有するほぼ全ての蛍光修飾 JAZ ペプチドと COI1 との PPI を評価したところ、COR は全ての COI1-JAZ と結合するのに対し、その鏡像体は全く結合しなかった。一方、選択的アゴニストと推察された *ent6* は、COI1-JAZ3, 9-12 の 5 種類の組み合わせでのみ PPI を誘起することが判明した。すなわち、*ent6* は *in vitro* で実際に JAZ サブタイプ選択的なりガンドであることが示された。

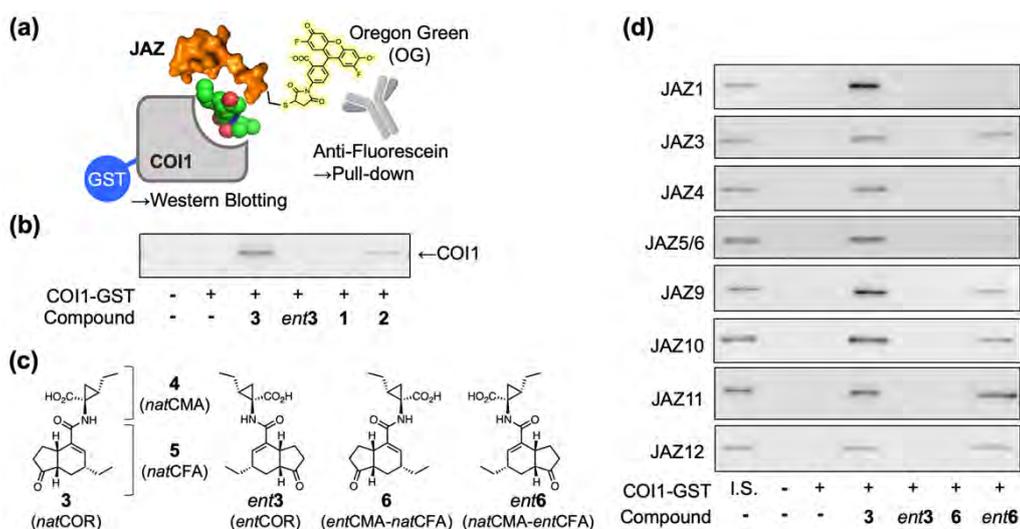


Figure 2. (a) OG 修飾 JAZ ペプチドを用いた二重標識 pull-down アッセイ系. (b) 本系を用いた既知りリガンドの結合活性評価. (c) COR の立体異性体の化学構造式. (d) COR 立体異性体を用いた COI1-JAZs に対する結合活性評価 (I.S. = 内部標準).

同時に、さほど選択性が高くないことも判明したことから、さらなる選択性の向上を目指して、COI1-COR-JAZ1 の三次元立体構造を元に、他の JAZ サブタイプに対する *in silico* docking study を実施した。計算科学の共同研究者のご助言やご指導により計算方法の最適化を行い、COR と比較してこのリード分子 *ent6* の COI1-JAZ3, 9-12 に対する結合様式について詳細な検討を重ねた。その結果、COR はその

ケトン部位で COI1/JAZ 両側から水素結合を形成するのに対し、*ent6* ではいくつかのサブタイプにおいてこの水素結合パターンの変化が確認された (Fig. 3a)。そこでこのケトン基を足がかりに誘導体化することで、さらなる選択性の向上を目論み、3 種類のおキシム化合物 7-9 (メチルオキシム (NOMe)、フェニルオキシム (NOPh)、ベンジルオキシム (NOBn)) を新たに合成した。これらの JAZ サブタイプ選択性を評価した結果、NOMe (7) はベースとした *ent6* と選択性がさほど変わらず、NOBn (9) はどの JAZ サブタイプとも結合しなかった一方で、NOPh (8) は JAZ9 と 10 のみに結合することが判明した。すなわち、13 種類の JAZ サブタイプのうち、2 種類のサブタイプ選択的アゴニストを得ることに成功した (Fig. 3b)。

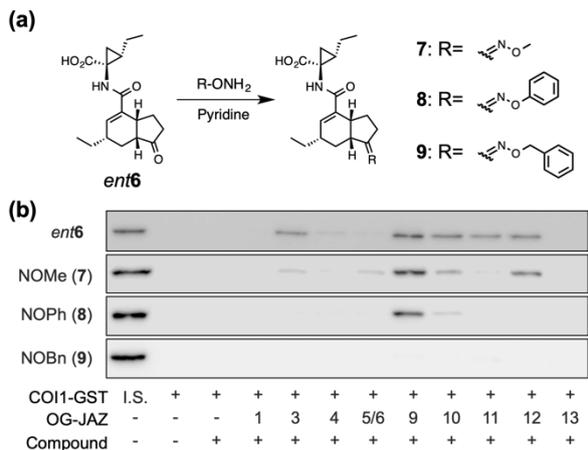


Figure 3. (a) *ent6* をリードとしたオキシム誘導体. (b) *ent6*, 7-9 の COI1/JAZ 共受容体への結合活性評価.

### 3. COI1-JAZ サブタイプ選択的アゴニストの in vivo アッセイによる機能解析

そこで次に、化合物 8 の植物個体での活性を評価した。典型的なジャスモン酸応答の一つである生長阻害効果を、1 週齢の幼植物を用いて評価した結果、天然型 COR は無処理に比べて根の長さを半分程度まで短くするのに対し、*ent6* はその効果が減弱し、化合物 8 はほとんど生長阻害活性が認められなかった。ジャスモン酸応答の一つであるアントシアニン蓄積効果においても、同様の傾向が確認された。一方で、様々なジャスモン酸応答遺伝子の転写活性化を qRT-PCR で解析した結果、一部の遺伝子において 8 によって顕著な遺伝子応答が確認された。特に、植物病原菌への毒素タンパク質である *PDF1.2* の発現は、天然型 COR よりも 5 倍以上の転写活性が亢進しており、この遺伝子の転写因子である *ORA59* にも同様の傾向が見られた。これらのことから、スペインの共同研究グループにお願いして実際に病原菌への耐性試験を実施した。その結果、50  $\mu$ M の溶液を 2 回投与する必要はあったが、5 週齢の植物に対してアブラナ科に感染する病原菌 (*A. brassicola*) に対して、天然型 COR と同様に耐性を示した。この週齢の植物体に対しても生長試験を実施したところ、COR 投与では有意に植物体が小さくなる一方、化合物 8 はほとんど生長への影響は見られなかったことから、植物の生長と防御応答を切り分けていることが示唆された (Fig. 4) [9]。

最後に、この化合物は *in vitro* では JAZ9/10 の 2 種類のサブタイプとの結合が見られたが、*in vivo* ではどちらの JAZ サブタイプを通して、病原菌耐性をもたらすかは定かではない。そこでそれぞれの mutant を用意して検証した結果、8 による *PDF1.2* および *ORA59* の転写活性化は、*jaz10-1* mutant ではほぼ影響がなかったが、*jaz9-1* mutant では消失した。また、過去の報告によると、ジャスモン酸の主要転写因子である *MYC* と、*ORA59* の上流遺伝子 *ERF1-EIN3/EIL1*

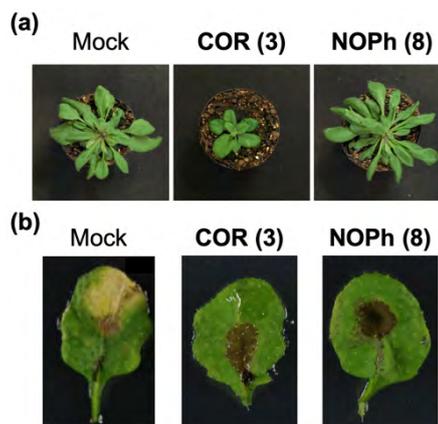


Figure 4. COR (3) 及び NOPh (8)を用いたシロイヌナズナの生長試験 (a) と病原菌耐性試験(b).

の間にはクロストーク制御が確認されており<sup>[12]</sup>、さらに *ERF1* は直接的に *JAZ1, 3, 9* の 3 種類のサブタイプとの相互作用が確認されている<sup>[13]</sup>ことから、化合物 **8** の選択的な活性は、*COI1/JAZ9* を介して、*ERF1-EIN3/EIL1-ORA59* の経路を選択的に亢進すると同時に、主要転写因子である *MYC* の下流遺伝子の発現をうまく抑制することで、天然型 *COR* や *JA-Ile* とは異なり、生長と防御のバランスを崩すことにつながったと考えられる。このように、*in vitro* で精密に分子設計した *JAZ* サブタイプ選択的アゴニストをケミカルツールとして用いることで、植物の生長と防御のバランスをコントロールするだけでなく、それぞれの応答に重要な *JAZ* サブタイプの特定につなげることに成功したと言える。

#### 4. おわりに

2016 年、植物の生長と防御を制御した先駆的な研究が報告された。Greg Howe らは、13 種類の *JAZ* サブタイプのうち 5 種類を同時にノックアウトした 5 重変異体によって、虫害耐性を高めることに成功した。この植物体は生長阻害が著しいことから、生長を促す変異をさらに掛け合わせた 6 重変異体を用いて、植物の生長と防御を切り分けることに成功している<sup>[14]</sup>。彼らは最近になって 10 および 11 種類の *JAZ* サブタイプ同時ノックアウト株 (*jazD, jazU*) の作出にも成功しており<sup>[15]</sup>、すべての *JAZ* サブタイプを制御しようとするまで目前に迫っているが、逆に言えばこの報告は、遺伝子操作のみでは植物ホルモン受容体の活性制御/解明が非常に難しいことも示している。ジャスモン酸以外の植物ホルモンでは、ケミカルツールを用いた受容体の活性制御により複雑な植物ホルモンに関連するシグナル伝達の理解が深まりつつある<sup>[16]</sup>。Sean Cutler、宇都宮大岡本らの報告した *ABA* 受容体選択的なアゴニストの開発によって、植物に乾燥耐性をもたらす化合物の開発<sup>[17]</sup>や、名大 ITbM 伊丹、萩原、鳥居らの開発した *Bump-and-hole* 戦略に基づくオーキシン受容体の選択的制御など<sup>[18]</sup>の例が相次いで報告されている。今後我々も、ジャスモン酸の他の活性制御や、他の植物種への展開などを目指して検討を続けていく。

#### 謝辞

本研究は、東北大学院理学研究科化学専攻・上田研究室で行われました。上田 実先生には、植物と天然物の魅力的な世界に導いていただいただけでなく、日々の確なご指導と多大なる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。本研究を遂行するにあたり、共同研究者の加藤信樹講師、石丸泰寛助教（現東北大院工）、岩橋万奈さん（2018 年修士卒）らに心より感謝申し上げます。*in silico* ドッキングは理研・齋藤大明博士、植物病原菌の実験はスペイン国立研究所・Roberto Solano 教授、Andrea Chini 博士らにご協力いただきました。重ねて感謝申し上げます。本研究は、JST さきがけおよび JSPS 科研費等の助成を受けました。

#### 参考文献

- [1] Jiang, K.; Asami, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2018**, *82*, 1265. [2] Murase, K.; Hirano, Y.; Sun, T.-P.; Hakoshima, T., *Nature* **2018**, *456*, 459 (PDB ID: 2ZSH). [3] Tan, X. *et al. Nature* **2007**, *446*, 640 (PDB ID: 2PIQ). [4] Santiago, J. *et al. Nature* **2009**, *462*, 665. [5] Sheard, L. B. *et al. Nature* **2010**, *468*, 400 (PDB ID: 3OGM). [6] Thins, B. *et al. Nature* **2007**, *448*, 661. [7] Chini, A. *et al. Nature* **2007**, *448*, 666. [8] Fonseca, S. *et al. Nat. Chem. Biol.*, **2009**, *5*, 344. [9] Takaoka, Y. *et al. Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3654. [10] Okada, M. *et al. Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3065. [11] Ueda, M. *et al. ACS Cent. Sci.* **2017**, *3*, 462. [12] Song, S. *et al. Plant Cell* **2014**, *26*, 263. [13] Zhu, Z. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 12539. [14] Campos, M. L. *et al. Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12570. [15] Guo, Q. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E10768. [16] Halder, V.; Russinova, E. *Nat. Chem. Biol.* **2019**, *15*, 1025. [17] Vaidya, A. S. *et al. Science* **2019**, *366*, 446. [18] Uchida, N. *et al. Nat. Chem. Biol.* **2018**, *14*, 299.

## 核酸の代謝的ラベル化と近接効果を利用した 高速クリック試薬の開発

東京農工大学大学院工学研究院  
寺 正行



**著者紹介：**2010年に東京農工大学工学府博士後期課程修了（長澤和夫教授）後、2010–2011年：日本学術振興会特別研究員、2011–2012年：帝人ファーマ株式会社創薬化学研究所研究員（片岡健一郎所長）、2012–2019年：（公財）サントリー生命科学財団、生物有機化学研究所研究員（中西重忠所長、島本啓子主幹）、この間2016–2018年：チューリヒ大学化学科博士研究員（Nathan W. Luedtke教授）、を経て2019年7月より東京農工大学大学院テニュアトラック准教授として着任。学位取得後は産官学の研究機関に所属するも、一貫して低分子有機化合物の合成と生体分子（核酸、タンパク質、細胞表面）との相互作用解析、機能制御に従事しています。恩師の「学位があれば自由に生きられる」という言葉をきっかけに博士課程に進学し、今振り返ると周囲の方々に支えられながら、確かに自由に好きなところで働くことができていると実感しています。今まで個人型研究（研究員、ポスドクとして）に従事してきましたが、グループを率いた研究へとシフトするなかで、手探りの日々を過ごしています。今の楽しみは、学生さんに「面白い！すごい！」と言ってもらえる研究結果を共有することと、休日に家族とドライブに出かけることです。

### 1. はじめに 核酸の代謝的ラベル化と生物直交反応

ゲノム DNA の代謝的ラベル化とその検出法では、チミンジエンアナログである 5-bromodeoxyuridine (BrdU) とその特異的抗体が古くから報告されており、細胞の DNA 合成量の正確な定量を行う際には、今でも第一選択的に使用されている (Fig. 1) <sup>1</sup>。BrdU はチミンと構造的にはピリミジン 5 位がメチル基からブロモ基に置換されただけであり、基質特異性の高いチミンキナーゼの良い基質となることで速やかに 5'水酸基がリン酸化され、さらにこれは三リン酸化された後 DNA ポリメラーゼによって複製時にゲノム DNA に取り込まれる。他にも、BrdU は細胞毒性が低いという利点も持つ。一方、抗原抗体反応の際には、この極めて小さな差異である抗原提示部位が不利に働く。すなわち、二本鎖 DNA の状態では抗原提示部位であるブロモ基が DNA 主鎖に覆われてしまい、抗体が接近できず抗原抗体反応が阻害されてしまう。そこで、強酸または強アルカリ条件で二重鎖の Watson-Crick 塩基対を破壊し、一本鎖に変性させてから抗 BrdU 抗体を作用させる必要がある。このような過酷な変性条件はしばしば核酸-タンパク質などの弱い相互作用情報を喪失させてしまうため、温和な条件で代謝的

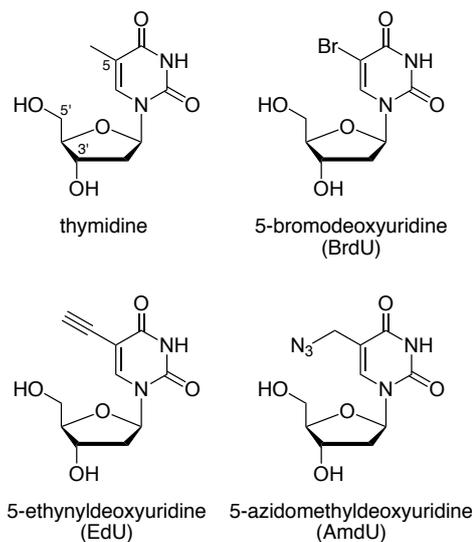
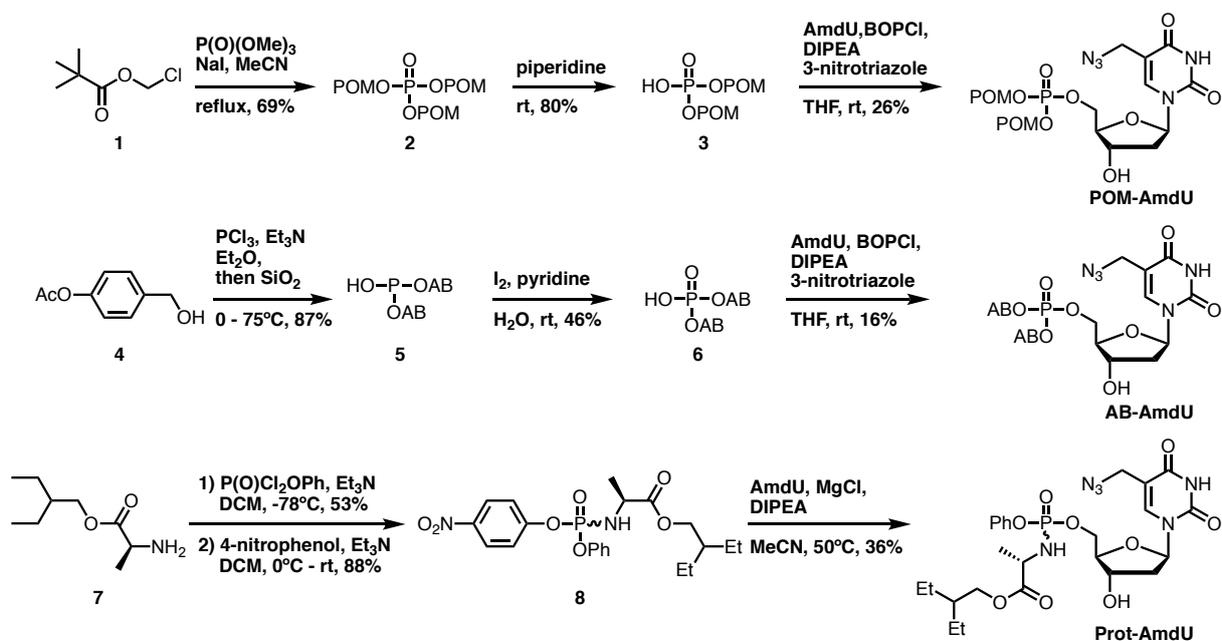


Fig. 1 Thymidine とそのアナログの構造式.

にラベル化したゲノム DNA を検出する方法論が望まれていた。2008 年にピリミジン 5 位にエチニル基を導入した 5-ethynyldeoxyuridine (EdU) と生物直交反応による検出方法が報告され、これにより二重鎖 DNA 上のラベル官能基を変性処理に付すことなく検出することが可能になった<sup>2</sup>。すなわち、EdU の末端アルキンに対してアジド蛍光試薬を銅触媒存在下で Huisgen 付加環化反応 (Copper catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC)) を行うことで、DNA 中に代謝的に取り込まれたエチニル基と検出分子を共有結合的に連結し、これらの可視化が可能になった。しかし、CuAAC 反応における銅イオンは細胞毒性<sup>3</sup>のみならずラジカルイニシエーターとなり、DNA とタンパク質等との非特異的な架橋反応を惹起してしまい<sup>4</sup>、CuAAC 処理後の細胞サンプル解析がしばしば困難になる。そこで本研究ではゲノム DNA の代謝的ラベル化法を可能とする 5-azidomethyldeoxyuridine (AmdU) プロドラッグの開発と、これを非触媒的に生物直交反応により連結できるダブルクリック試薬 dimorpholino-cyclooctadiyne (DiMOC) の開発を行った。さらにこれらを用いて初めての細胞内生物直交型 DNA クロスリンク法を開発したので、概説する。

## 2. アジド改変ヌクレオチドプロドラッグ (POM-AmdU) の開発 (ChemBioChem, 2018, 19, 1939.)

Luedtke 研究室では、これまでに生物直交性官能基を有する核酸アナログとして、チミン 5 位にアジド基を有するアナログ AmdU を報告している<sup>5</sup>。AmdU のアジド基は歪みアルキンと、Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition (SPAAC) 反応<sup>6</sup>により、混ぜるだけで連結できる。しかし、チミンメチル基部位の水素原子をアジド基へと変換するだけで、AmdU はヒト細胞やモデル生物であるゼブラフィッシュ由来の一般的なチミジンキナーゼによるリン酸化を受けなくなってしまう。そのため AmdU の 5 位リン酸化にはウィルス由来の忠実度の低い特殊なチミジンキナーゼの遺伝子導入が必須であった。ヌクレオシドアナログの細胞ゲノムへの代謝的取り込みにおいては、一般的に最初のモノリン酸化キナーゼが最も基質特異性が高いと言われており<sup>7</sup>、一段階目のリン酸化をクリアすることが核酸の代謝的ラベル化を実現する鍵となる。そこで、合成化学的にモノリン酸エステルしてヌクレオチドとし、負



Scheme 1. 5-(azidomethyl)-2'-deoxyuridine (AmdU) に対してモノリン酸トリエステル化することにより bispivaloyloxymethyl phosphoester (POM)、acetoxymethyl phosphoester (AB), phenyloxalanylphosphoramidate (Prot) の三種類のヌクレオチドプロドラッグを合成した。BOPCl = bis(2-oxo-3-oxazolidinyl) phosphinic chloride, DIPEA = *N,N*-diisopropylethylamine, THF = tetrahydrofuran, DCM = dichloromethane.

電荷の遊離リン酸部位を生分解性保護基にてリン酸トリエステルとする、ヌクレオチドプロドラッグ戦略により、ゲノム DNA の代謝的アジドラベル化を検討することとした。

リン酸エステルの生分解性保護基には細胞内エステラーゼにより除去される pivaloyloxymethyl (POM) 基<sup>8</sup>および、POM の分解速度をさらに向上した acetoxybenzyl (AB) 基<sup>9</sup>、そして肝細胞にて高発現している HINT-1 活性による除去を受けるペプチド性プロドラッグ Protide (Prot)<sup>10</sup> の三種類を検討することとした (Scheme 1)。AmdU は還元性のアジド基の存在ゆえに、DNA 固相合成で汎用される 3 価リンによる所謂アミダイトケミストリーが適用できないため、リン酸エステルとの縮合反応またはエステル交換反応により POM-、AB-、Prot-AmdU をそれぞれ合成した (Scheme 1)。

合成した三種の AmdU リン酸トリエステルのヒト細胞に対する DNA 代謝的ラベル化を検討するため、HeLa 細胞に対してこれらを 24 時間、添加培養した。その後、細胞固定化と一本鎖 DNA への変性条件の後でアルキン蛍光色素と CuAAC 反応によって DNA 中のアジド基を検出した (Fig. 2)。その結果、POM-AmdU と AB-AmdU はどちらも時間、濃度依存的に DNA に取り込まれたが、AmdU、Prot-AmdU は一切取り込まれなかった。これは HeLa 細胞由来のチミジンキナーゼでは AmdU はリン酸化されず、また同細胞では HINT-1 が発現していないことを示している。AB-AmdU は HeLa 細胞のほか U2OS 細胞に取り込まれるものの、短時間 (12 時間以内) で強い細胞毒性を示すことがわかった。そこで AB-AmdU と POM-AmdU の培地中における安定性を比較したところ、AB-AmdU の半減期は 2 時間以内であることがわかった。すなわち、AB-AmdU は非酵素的に構造中のアセチル基が除去され、生じたパラキノンが細胞毒性を示すと考察した<sup>11</sup>。以上の結果より、POM-AmdU が DNA への取り込み効率、毒性、安定性の観点から最も優れていると判断した。POM-AmdU は U2OS 細胞、AML 細胞、孵化直後のゼブラフィッシュ (POM-AmdU の水溶液に浸漬) の増殖の盛んな細胞に取り込まれ、アジド基ラベル化できることがわかった。

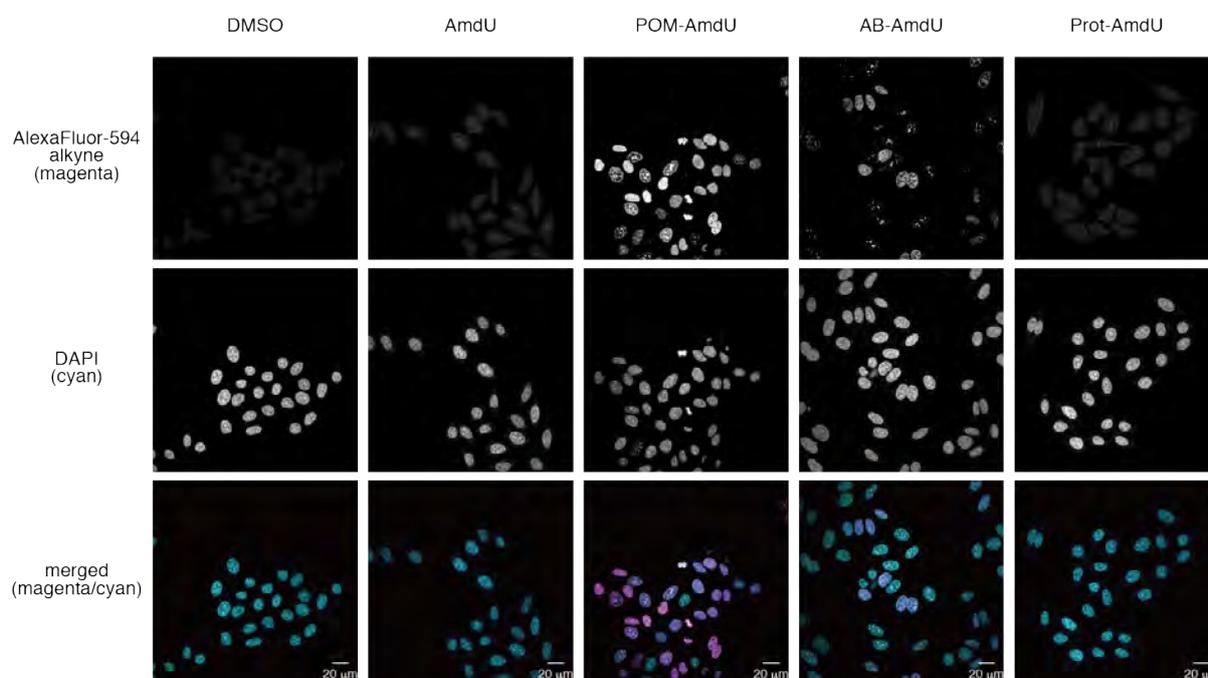
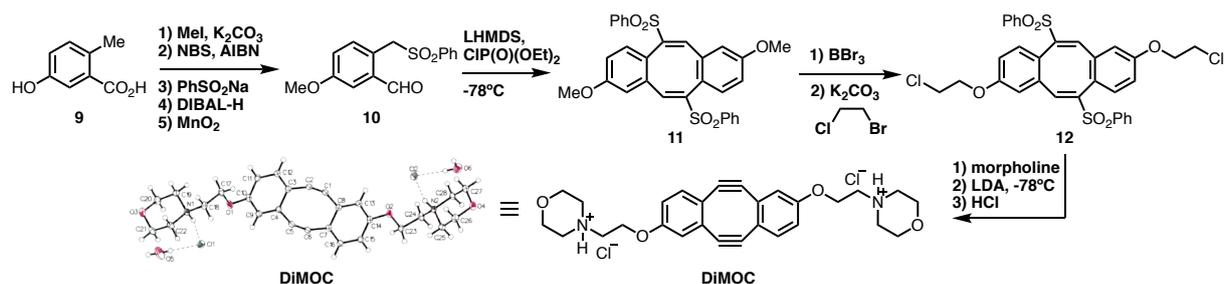


Fig. 2 AmdU およびそのアナログである POM-, AB-, Prot-AmdU をそれぞれ 10  $\mu\text{M}$  の濃度で HeLa 細胞に対して 24 時間作用させた。固定化後に 2M HCl にて DNA を変性し、AlexaFluoro-594-アルキンと銅触媒存在下にて Huisgen 環化を行ない、生物直交的にゲノム DNA を蛍光ラベル化した。POM-AmdU が最も効率よく蛍光シグナルを与え、これらは核酸染色剤 (DAPI) 由来の蛍光シグナルと一致した。

### 3. 核酸指向型歪みシクロオクタジイン (DiMOC) の開発

核酸の代謝的ラベル化とその生物直交反応において、前者では酵素による認識を損なわないために核酸アナログに対して如何に小さい改変に抑えるかが鍵となる。一方、後者では負電荷に覆われた二重鎖 DNA から如何に反応点を露出させ、検出分子との反応性を向上させるかが重要となり、両者は二律背反となる。我々は、生物直交反応の検出分子側に標的親和性、この場合は二重鎖 DNA への親和性、を付与することで近接効果による局所高濃度環境を誘導し、反応速度を向上させることで、この課題にアプローチすることとした。Sondheimer ジインとして知られる dibenzocyclooctadiyne (CODY) は、分子構造中に 2 つの歪みアルキンを有する化合物である<sup>12</sup>。2010 年に細谷らにより CODY は 2 つのアジド分子を連続的かつ生物直交的に SPAAC 反応により連結できることが報告された<sup>13</sup>。しかし、本構造は極性官能基を持たない炭化水素分子であるため水溶性が低く、その生物直交反応分子としての応用は細胞表面や無細胞系に限られていた。我々は CODY の持つ平面骨格に着目し正電荷官能基を側鎖に導入すれば、水溶性の向上とインターカレーションによる二重鎖 DNA への親和性向上が同時に可能になると考えた。そこで、側鎖にモルホリノ基を導入した dimorpholino-CODY (DiMOC) を設計した (Scheme 2)。本合成の鍵となる 8 員環形成とジイン骨格の形成は、大寺、折田らにより報告された温和な方法<sup>14</sup>を採用し、ほぼ全ての工程で再結晶のみで DiMOC を合成することに成功した。得られた DiMOC は塩酸塩として安定に単離することができ、黄色針状結晶が得られたため、X 線結晶構造解析を行った。その結果、CODY の平面骨格の両側鎖上にあるモルフォリン窒素原子がプロトン化を受けてアンモニウム塩となっており、かつ結晶水を取り込むことがわかった。DiMOC 塩酸塩は純水に高濃度に溶解し (> 10 mM)、室温で安定であった。

DiMOC の二重鎖 DNA に対する親和性を測定することを目的とし、DiMOC 存在下における DNA 溶液の粘度測定、DNA 滴定下における DiMOC の UV 吸収変化を用いた解離定数測定を行った。その結果、DiMOC は二重鎖 DNA に対して最大で 3 塩基対に 1 分子がインターカレーションし、その解離定数は 15  $\mu\text{M}$  であった。DiMOC の歪みジイン部位とアジド基との反応速度は水溶液中 AmdU を用いて測定し、 $1.0 \text{ M}^{-1}\cdot\text{sec}^{-1}$  の反応速度定数を与え、本反応は未修飾の二重鎖 DNA やグルタチオン (チオール) には一切阻害されないことがわかった。以上の結果から、DiMOC は二重鎖 DNA に対する親和性を示すが、アジド基との生物直交反応性は十分に保持していることがわかった。



Scheme 2. Dimorpholino cyclooctadiyne (DiMOC) 塩酸塩の合成. NBS = N-bromosuccinimide, AIBN = azobis(isobutyronitrile), DIBAL-H = diisobutylaluminium hydride, LHMDS = lithium bis(trimethylsilyl)amide, LDA = lithium diisopropylamide.

#### 3-1. DiMOC を用いたアジド改変 DNA の生物直交的検出反応 (Bioconjug. Chem., in press.)

次に DiMOC の二重鎖親和性により DiMOC-アジド間の連結反応が加速されるかを検討した (Fig. 3)。オリゴヌクレオチドの中央一箇所のみ AmdU を配置した ODN-1 は、通常の歪みアルキンを結合した蛍光試薬 BCN-TAMRA を作用させた場合、50 倍量加えてもその反応効率は 4% に止まった。これは、二重鎖構造中では AmdU のアジド基が主鎖に覆われているために BCN 部位が接近できないためだと

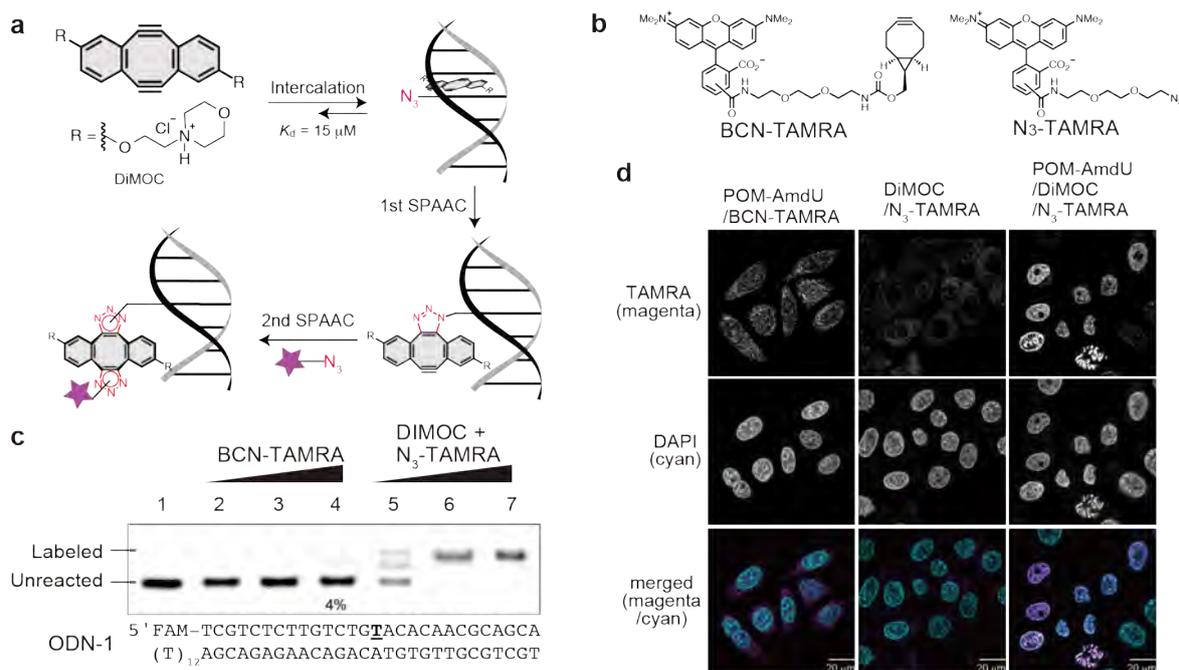


Fig. 3 a) DiMOC による AmdU 改変二重鎖 DNA のダブル SPAAC 反応模式図. b) BCN-TAMRA と N<sub>3</sub>-TAMRA の構造式. c) AmdU 改変二重鎖 DNA (ODN-1) に対する BCN-TAMRA または連続的 DiMOC/N<sub>3</sub>-TAMRA による反応性を変性ゲル電気泳動により比較した. ODN-1 中の下線 T の位置に AmdU が埋め込まれている. d) POM-AmdU を HeLa 細胞に対して作用させ代謝的ラベル化を行なったのち、BCN-TAMRA または連続的 DiMOC/N<sub>3</sub>-TAMRA によりゲノム DNA を蛍光ラベル化した.

考えられる。一方、ODN-1 に対して DiMOC と N<sub>3</sub>-TAMRA を連続的に作用させた場合、ODN-1 に 5 倍量ずつ加えたのみで反応は完全に進行し、本反応の速度定数は 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>sec<sup>-1</sup> 程度であることがわかった。DiMOC の高い二重鎖 DNA 移行性に着目し、細胞におけるアジド改変 DNA に対する連結反応を検討した。POM-AmdU を HeLa 細胞に 24 時間添加培養後、細胞固定して DiMOC、N<sub>3</sub>-TAMRA を連続的にそれぞれ 10 分作用させると、細胞核から強いシグナルが観察された (Fig. 3d)。なお、二重鎖 DNA の変性処理は行っていない。このシグナルは DAPI と一致し、DiMOC による二重鎖中の AmdU との生物直交反応はクロマチン構造においても効率よく進行することがわかった。POM-AmdU と DiMOC の組み合わせによるゲノム DNA の可視化法は、U2OS 細胞、AML 細胞、ゼブラフィッシュの個体レベル、オルガノイドにおいても同様に、変性工程を経ずに感度よく機能することが確認できている。

DiMOC は他のアジド改変ヌクレオシドアナログに対しても適用可能であった (Fig. 4)。すなわち、RNA アナログである 2'(R)-azidodeoxyadenosine、DNA アナログである AzC をそれぞれ細胞に対して処理した後、

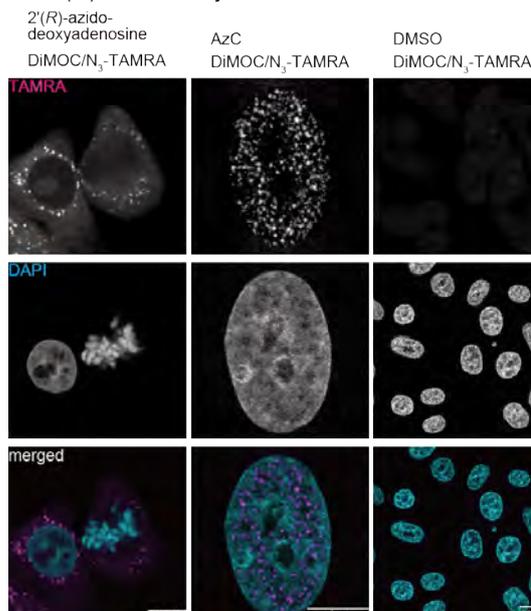
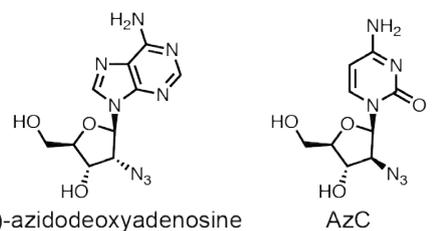


Fig. 4 RNA アナログである 2'(R)-azidodeoxyadenosine、DNA アナログである AzC をそれぞれ用いた細胞染色。

DiMOC と N<sub>3</sub>-TAMRA を上記と同様に処理すると、それぞれ細胞中の RNA、DNA を感度良く検出できた。特に AzC の DiMOC/N<sub>3</sub>-TAMRA による染色パターンは、中断された DNA 複製中心での AzC の取り込みによるものである<sup>15</sup>。変性条件と銅試薬を用いた今までの検出法において同様の染色パターンを得るためには、超解像蛍光顕微鏡による検出が必須であった。一方、DiMOC/N<sub>3</sub>-TAMRA による染色は変性条件が不要で、細胞内の構造情報を保つため、通常の共焦点蛍光顕微鏡で高解像度のイメージを得ることができた。

### 3-2. DiMOC を用いた生物直交的 DNA クロスリンク法 (*Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, *57*, 15405.)

シスプラチン (Cis-Pt) やシクロホスファミドといった DNA-DNA 鎖間クロスリンク (ICL) 剤は、臨床的に使用されている抗がん剤の一種であるが、化学的には二価の求電子剤であり、標的とするプリン塩基以外にも細胞内に存在する様々な求核剤と反応してしまう。そこで、生物直交反応により DNA-DNA 鎖間クロスリンクできれば、純粋な ICL 成績体を細胞内に生じさせることができると期待した。すなわち、細胞に対して POM-AmdU による DNA の代謝的アジドラベル化を行い、相補鎖同士の 2 箇所のアジド基を DiMOC による連結することで DNA-DNA 鎖間クリック反応を行うことを考えた。まず、AmdU と DiMOC による ICL 形成の可否について、アジド改変オリゴヌクレオチドを用いて検討した (Fig. 5)。1 箇所にのみアジド改変を加えた ODN-2、相補鎖にも AmdU を導入した ODN-3 を、AmdU 三リン酸を用いたポリマーゼ伸長反応によりそれぞれ酵素合成した (Fig. 5a)。これら二重鎖 ODN に対して DiMOC を 2 当量作用させ、変性ゲル電気泳動を行ったところ、ODN-2 にのみ移動度の小さいバンドが検出され (Fig 5b, lane 2)、これを MALDI-MS により質量分析をおこなったところ ICL 成績体に対応する分子量が検出された (Fig. 5c)。またその反応速度定数は  $2.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$  であった。これは AmdU 単量体と DiMOC との速度定数に比べて 10 万倍以上の速度向上を意味し、DiMOC の二重鎖 DNA に対する親和性が本反応を大幅に加速したと考えられる。

最後に本反応を生細胞内のクロマチン上で検討した。HeLa 細胞に対して POM-AmdU を 72 時間処理すると、細胞は 2 回以上分裂し (PD time = 30 時間)、その後 DiMOC を処理すると、各々単独での処理に比べて細胞毒性が増強されることがわかった。そこで細胞内からの ICL 成績体を検出することを目的とし、denaturing-renaturing アッセイによる ICL 成績体の濃縮を試みた。POM-AmdU、DiMOC の

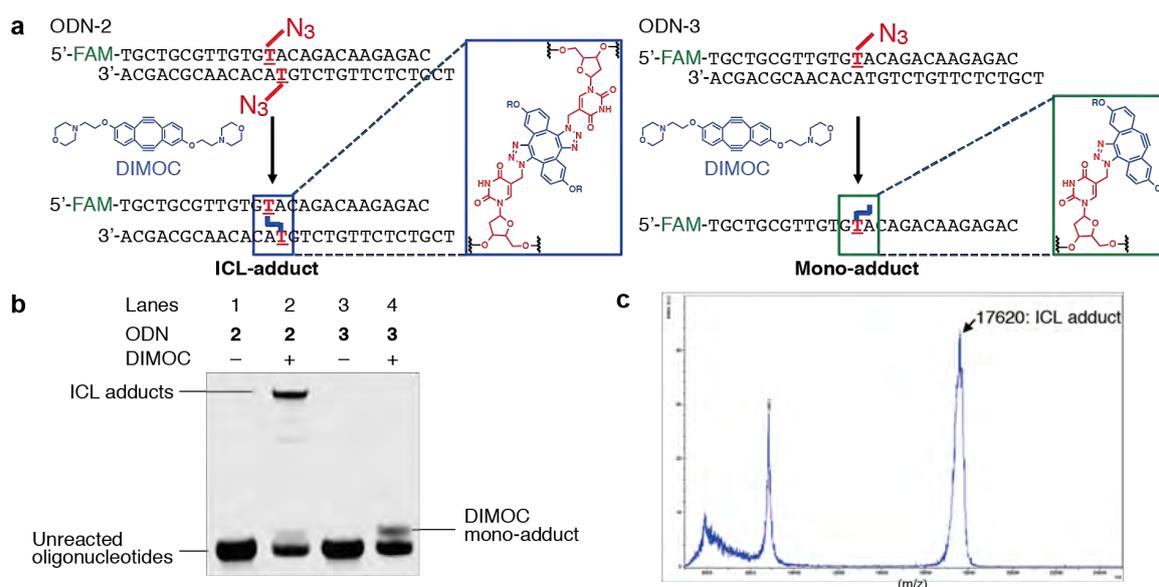


Fig. 5 a) DiMOC による AmdU 改変二重鎖 DNA の ICL 反応模式図. b) ODN-2、ODN-3 の DIMOC 処理後の変性ゲル電気泳動バンドパターン. c) Lane 2 の移動度の低いバンドの MALDI-MS による分子量測定.

連続的な処理の後、細胞からゲノム DNA を抽出し、超音波により 100-300 bp の DNA フラグメントを調製した。これに対して、強アルカリ処理と中和処理により二重鎖を一本鎖へと解離させる。しかし、ICL を有するフラグメントは相補鎖が必ず近傍に位置するため、再び二重鎖を形成する。そこに S1 ヌクレアーゼ (一本鎖選択的ヌクレアーゼ) を処理により一本鎖を消化することにより、ICL を濃縮することができる (Fig. 6a)。この消化物を変性ゲル電気泳動したところ、ICL 薬剤であるシスプラチン、POM-AmdU と DiMOC の連続的な処理を行った細胞 DNA からは S1 ヌクレアーゼ未消化物がスミア状に検出された (Fig. 6b, lane 8, 10, 12)。さらにこの未消化物をエキソヌクレアーゼ、アルカリホスファターゼで処理することで、ヌクレオシドへと消化し、UPLC-MS で分析したところ、ICL 成績体を検出することに成功した (Fig. 6c, d)。これは、AmdU-DiMOC による ICL が、細胞内のクロマチン上でも形成できることを示しており、DiMOC の高い反応性と生物直交性を裏付ける結果である。今後、POM-AmdU のリン酸エステル部位、DiMOC の側鎖部位の構造展開により、バイナリドラッグ (二段階処理薬剤) による副作用を低減した抗がん剤への応用が期待される。

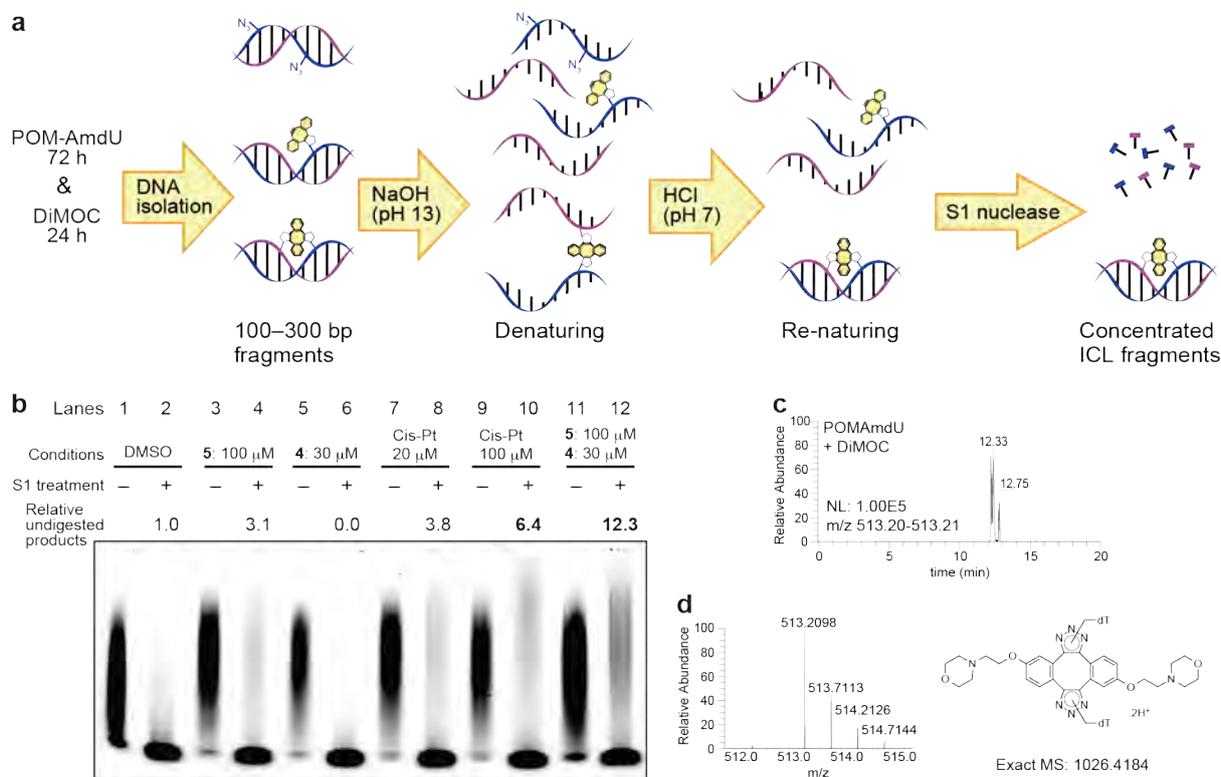


Fig. 6 a) ゲノム DNA からの ICL 検出を目的とした denaturing-renaturing アッセイの模式図. b) ゲノム DNA の denaturing-renaturing 処理後に、さらに S1 ヌクレアーゼ処理をした変性ゲル電気泳動バンドパターン. c) S1 ヌクレアーゼ未消化物をさらにアルカリホスファターゼとエンドヌクレアーゼによりヌクレオシドへ分解したサンプルの UHPLC-MS による分子量測定 ( $m/z=513.20-513.21$  の SIM モードクロマトグラム). d) 検出された ICL 成績体の精密質量分析.

#### 4. まとめ

本稿では DNA の代謝的アジドラベル化試薬として POM-AmdU と、標的指向型高速クリック試薬 DiMOC の開発の経緯について概説した。SPAAC 反応は一般的に反応速度が遅く、それによってチオール付加反応など、副作用がしばしば問題となっていた。本研究で開発した DiMOC は、クリック試薬自身に標的分子へ親和性を付与することで反応性を向上させ、副反応の少ない生物直交反応を実現

することができた。特に POM-AmdU と DiMOC によるアジド改変二重鎖 DNA における連結反応は、POM-AmdU の低い細胞毒性 (HeLa 細胞に対する IC<sub>50</sub> > 100 μM) 、DiMOC のアジド改変二重鎖 DNA に対する高い反応速度のため、BrdU や EdU による代謝的ラベル化試薬の代替として実用可能であると期待される。現在 DiMOC の構造展開、標的分子の適用範囲の拡張を実施しており、新しいケミカルバイオロジーツールとして貢献したいと考えている。

## 謝辞

本研究は、Department of Chemistry, University of Zurich において Nathan W. Luedtke 教授 (現 McGill University) のもとで行われました。Luedtke 教授にこの場を借りて感謝いたします。DiMOC の X 線結晶構造解析は、Tony Linden 教授 (University of Zurich) に、UPLC-MS 解析は、Jorn Piel 教授、上岡麗子博士 (ETH Zurich) にご協力いただきました。ここに厚く御礼申し上げます。留学をサポートしていただきました公益財団法人サントリー生命科学財団、また研究費のサポートをいただきました Dr. Helmut Legerlotz Foundation に深謝いたします。

## 参考文献

- [1] R. C. Leif, J. H. Stein, R. M. Zucker, *Cytometry* **2004**, 58A, 45–52.
- [2] A. Salic, T. J. Mitchison, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105, 2415–2420.
- [3] D. C. Kennedy, C. S. McKay, M. C. B. Legault, D. C. Danielson, J. A. Blake, A. F. Pegoraro, A. Stolow, Z. Mester, J. P. Pezacki, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 17993–18001.
- [4] S. H. Chiou, *J. Biochem.* **1983**, 94, 1259–1267.
- [5] A. B. Neef, N. W. Luedtke, *ChemBioChem* **2014**, 15, 789–793.
- [6] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046–15047.
- [7] M. E. Black, L. A. Loeb, *Biochemistry* **1993**, 32, 11618–11626.
- [8] D. Farquhar, D. N. Srivastva, N. J. Kuttesch, P. P. Saunders, *J. Pharm. Sci.* **1983**, 72, 324–325.
- [9] W. Thomson, D. Nicholls, W. J. Irwin, J. S. Al-Mushadani, S. Freeman, A. Karpas, J. Petrik, N. Mahmood, A. J. Hay, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 1239–1245.
- [10] C. McGuigan, R. N. Pathirana, N. Mahmood, K. G. Devine, A. J. Hay, *Antiviral Res.* **1992**, 17, 311–321.
- [11] J. L. Bolton, *Curr. Org. Chem.* **2014**, 18, 61–69.
- [12] H. N. C. Wong, P. J. Garratt, F. Sondheimer, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 5604–5605.
- [13] I. Kii, A. Shiraiishi, T. Hiramatsu, T. Matsushita, H. Uekusa, S. Yoshida, M. Yamamoto, A. Kudo, M. Hagiwara, T. Hosoya, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 4051.
- [14] F. Xu, L. Peng, K. Shinohara, T. Morita, S. Yoshida, T. Hosoya, A. Orita, J. Otera, *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 11592–11608.
- [15] T. Triemer, A. Messikommer, S. M. K. Glasauer, J. Alzeer, M. H. Paulisch, N. W. Luedtke, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, 115, E1366–E1373.



## 非環状型人工核酸のケミカルライゲーション

名古屋大学大学院工学研究科  
村山 恵司

### 著者紹介

よく「村上」と間違われますが、「村山」です。

中学時代：工業高校への進学を考えていたが、担任の先生に勧められ進学校の高校へ  
(ちなみに、工業高校へ行っていたら修理職人になっていたと思います。)

高校時代：地元の大学への進学を考えていたが、担任の先生に勧められ名古屋大学へ  
研究室配属：別の研究室を志望していたが、じゃんけんで負け第二希望の浅沼研究室に配属

修士時代：修士卒で就職を考えていたが、浅沼先生に(強引に)勧められ博士課程進学、学位取得後、  
名古屋大学 VBL のポスドクを経て名古屋大学工学研究科助教に着任

自分の思い描いていた進路とは全く異なるものとなりましたが、その結果辿り着いた現職を楽しませていただいております。進路に関しては自分を持っていないと思われても仕方ありませんが、研究に関しては周囲の意見に吞まれず、媚びず、個性を發揮していきたいと思っています。

現在は、新たな骨格構造の人工核酸の設計と合成、人工核酸を利用したマクロ材料の開発、人工核酸による生命の創生など、人工核酸を様々な方面へ展開していくことを目指しています。核酸とは全く関係のない研究にも積極的に触れていきたいと思っています。

### 1. はじめに

骨格改変型人工核酸(XNA)は、天然のDNAやRNAのリボース環骨格の代わりに非天然の骨格を持つ分子であり、これまでに様々な構造が設計されてきた(Fig. 1)。XNAのみで構成される鎖は、その骨格構造に応じて二重鎖形成能やその他高次構造の安定性が大きく変化する。例えば、架橋構造を持つBNA(LNA)<sup>[1]</sup>はエントロピーロスの緩和により二重鎖を安定化するのに対し、柔軟な非環状構造のUNA<sup>[2]</sup>やFNA<sup>[3]</sup>は二重鎖を大幅に不安定化する。GNA<sup>[4]</sup>は同じ非環状骨格でありながら、プレオーガナイズの効果で安定なホモ二重鎖を形成できるとされている。当研究室でも新たな非環状型XNAの開発を行っており、その中でD- $\alpha$ TNA (acyclic D-Threosinol Nucleic Acid)<sup>[5]</sup>、L- $\alpha$ TNA (acyclic L-

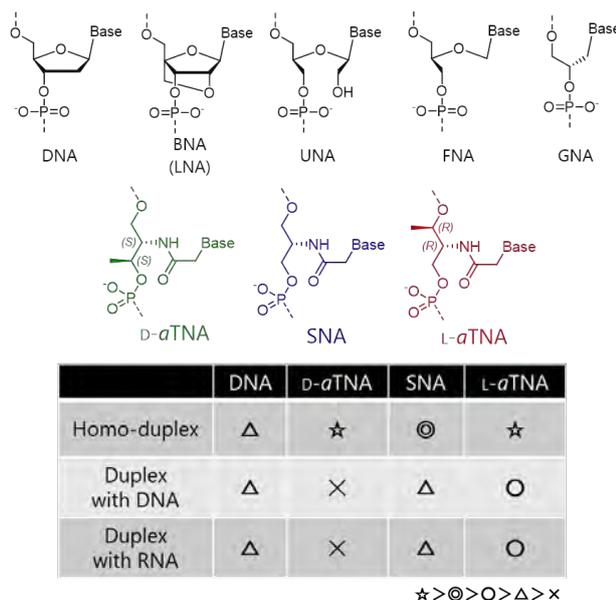


Figure 1. 骨格改変型人工核酸の構造と二重鎖形成能

Threoinol Nucleic Acid)<sup>[6]</sup>, SNA (Serinol Nucleic Acid)<sup>[7]</sup>の3つが極めて安定なホモ二重鎖を形成することを見出した(Fig. 1)。一方で D-*a*TNA は天然核酸 (DNA や RNA) とは二重鎖を形成しないが、SNA は天然核酸との二重鎖形成が可能、L-*a*TNA は更に強く天然核酸と二重鎖形成することを明らかにし、主鎖骨格上のメチル基一つの違いで二重鎖形成能が全く異なることを見出した。

これら XNA の最大の特徴は天然の酵素に認識されないことであり、核酸分解酵素に対して安定なため生細胞内での応用や核酸医薬として非常に適した骨格といえる。しかし逆に考えると、酵素反応に用いることができないという欠点となる(Fig. 2)。例えば DNA はポリメラーゼ伸長反応を用いることで配列増幅・配列解析が可能であるが、XNA は天然のポリメラーゼに

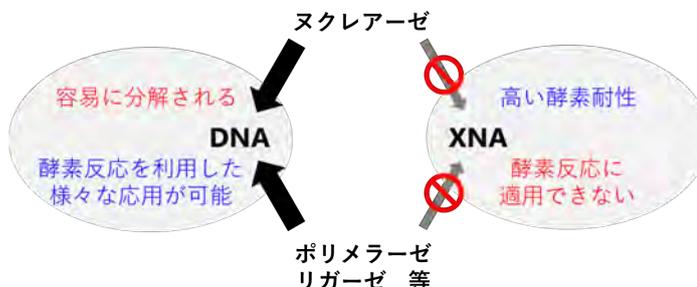


Figure 2. 天然核酸と人工核酸に対する酵素認識の違い

全く認識されないため未知の XNA 配列を決定するのは困難である。特定の XNA 配列を伸長できる改変型酵素も報告されてはいるが、その探索は困難であり反応の正確性も十分とは言い難い<sup>[8]</sup>。もし、これら XNA に対して酵素反応と同等の反応を、酵素を用いずに行うことができれば、XNA の応用範囲の更なる拡張が期待できると考えた。

まずは、最も単純な酵素反応の一つである鋳型特異的ライゲーション反応を、我々が開発してきた XNA で実現することを目指し、ケミカルライゲーション法に注目した。ケミカルライゲーションはその名の通り、酵素を用いず化学反応で核酸断片を連結する手法である。しかしその多くは、連結させる鎖末端に特殊な修飾を必要とし、新たに生成する結合は天然のリン酸ジエステル結合ではなくなってしま<sup>[9]</sup>。一方で、リン酸基と水酸基を縮合するタイプの試薬も少数ながら報告があり、中でも *N*-Cyanoimidazole は効率よく近傍のリン酸基と水酸基を縮合し、リン酸ジエステル結合を生成することで DNA 断片を連結可能であることが示されている(Fig. 3)<sup>[10]</sup>。

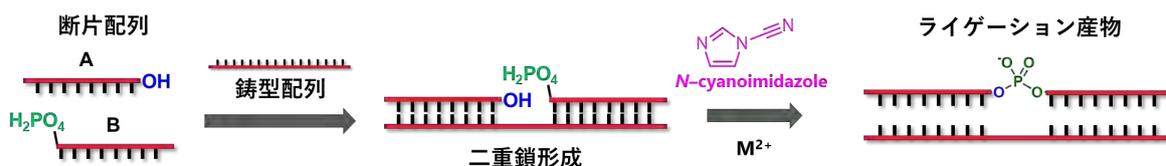


Figure 3. *N*-Cyanoimidazole を用いたケミカルライゲーション反応

二重鎖の安定性も立体構造も DNA と大きく異なる L-*a*TNA に対して *N*-Cyanoimidazole を用いたライゲーションを行った場合、良くも悪くも反応性が大きく変化するのではないかと、という興味本位かつ安易な考えのもと本研究はスタートした。

## 2. L-*a*TNA のケミカルライゲーション

16-mer の鋳型 L-*a*TNA (Template) に対し、相補的な 8-mer の L-*a*TNA 断片(8A、8B)を設計した。8B の 3'末端はリン酸基となっており、8A の 1'末端水酸基と反応できる。8A の 3'末端を蛍光標識しておき、反応後の生成物を変性 PAGE にて解析した(Fig. 4)。その結果、反応後に原料のバンドの減少と新たな

移動度の低いバンドが確認され、MS 測定により目的のライゲーション産物が生成していることが確認された。以上のように、いともあっさり *L-a*TNA 断片を連結させることに成功した。大変興味深いことに、同様の配列の DNA (反応収率 27%) に比べ *L-a*TNA のライゲーション収率(74%)は極めて高く、副生

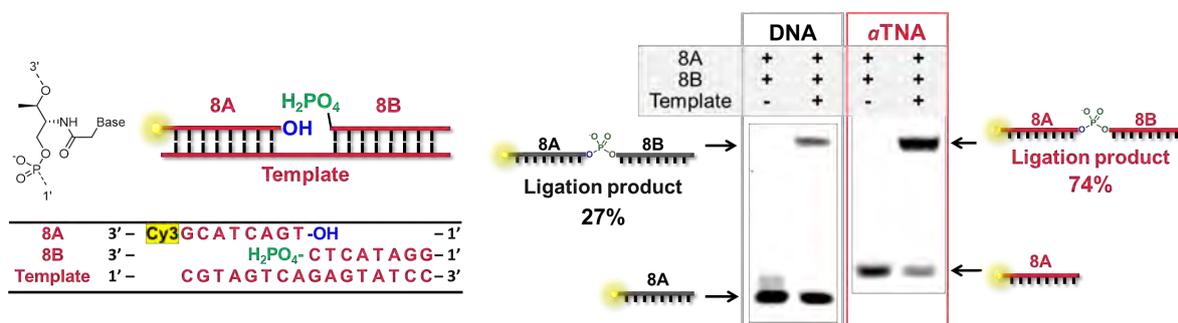
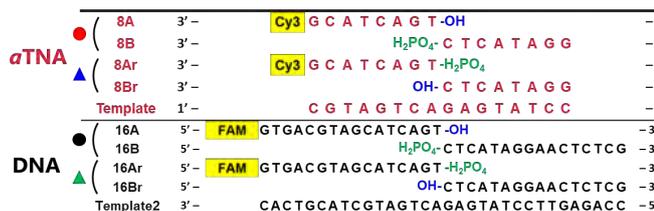


Figure 4. *L-a*TNA のケミカルライゲーション反応 (左)配列設計 (右)反応産物のゲル電気泳動結果

Reaction conditions: 4°C, 12 h, [oligomer] = 1.0 μM, 20 mM *N*-Cyanoimidazole, 20 mM ZnCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, Denaturing PAGE: 15% AA, 8 M Urea, 1.5 h, 750 V.

成物もほとんど見られなかった。

*N*-Cyanoimidazole を用いた反応については機構の詳細が明らかにされていない。応用へと展開する前に、なぜ *L-a*TNA のライゲーションが高効率に進行したかを解明したいと考えた。まず注目したのが二重鎖の熱的安定性の違いである。同じ配列設計においては、*L-a*TNA は DNA に比べ圧倒的に二重鎖が安定である。そこで、DNA 断片の鎖長を 16-mer、鋳型を 32-mer に伸ばし、*T<sub>m</sub>* がほぼ同じとなる条件で反応の比較を試みたが、それでも *L-a*TNA のライゲーションの方がかなり高速であった (data not shown)。



次に、反応点周辺の環境に注目した。*N*-Cyanoimidazole による縮合反応の機構は明らかにされていないが、リン原子への水酸基の求核攻撃が関与していることは示唆されてきた<sup>[10]</sup>。反応する水酸基に注目すると、これまでの配列では *L-a*TNA は 1 級水酸基であるのに対し、DNA はより高い 2 級水酸基となっていた。この立体障害の違いが反応性に影響している可能性を考え、A/B 断片に対しリン酸基と水酸基の位置を入れ替えた断片(Ar/Br)を新たに設計・評価した (Fig. 5)。この設計では、*L-a*TNA は 2 級水酸基、DNA は 1 級水酸基が反応することになる。結果は予想通り、*L-a*TNA においても、DNA においても 1 級水酸基が反応する組み合わせの方が、2 級水酸

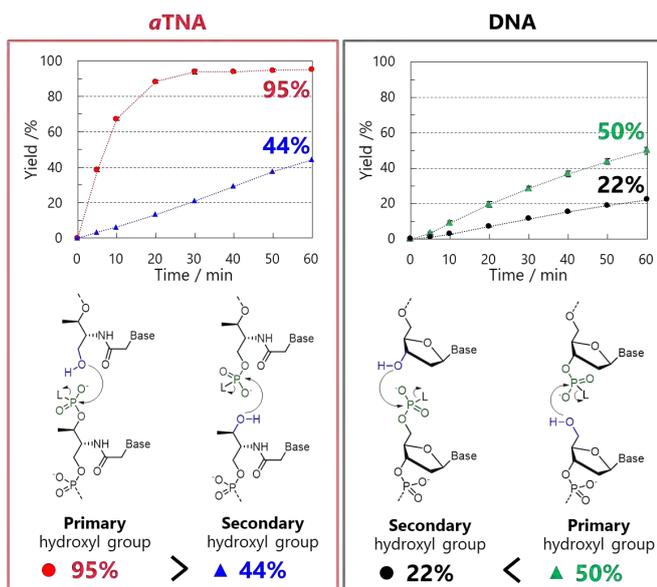


Figure 5. ライゲーション反応速度の比較

Reaction conditions: 25°C, [oligomer] = 1.0 μM, 10 mM *N*-Cyanoimidazole, 20 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl.

基が反応するものに比べ明らかに反応速度向上が見られ、水酸基の級数が重要な因子の一つであることをつきとめた。しかし、1級水酸基が反応する配列同士を比べても、やはり *L-a*TNA の方が有意に高い反応速度を示した。このことから、*L-a*TNA の反応性の高さを決める別の因子の存在が考えられ、主鎖骨格のアミド結合の水素結合や、ニック部分の運動性の違い等の寄与について現在も検討を続けている。理由については未だ検討中ではあるが、*L-a*TNA のケミカルライゲーションは極めて効率よく、選択的に進行することを明らかにした。

### 3. *L-a*TNA の配列複製システム構築を目指した短鎖断片ライゲーション

*L-a*TNA の二重鎖は DNA に比べ極めて安定であることから、より短鎖の断片も連結できるはずである。もし、3-mer や 4-mer といった短鎖断片を鋳型上で連続的に連結させることができれば、断片のランダムプール存在下でライゲーションさせた際に鋳型と相補的な配列を選択的に生成させる、*L-a*TNA の配列複製システムを構築することができると考えた(Fig. 6)。また、変性ステップを取り入れることができれば、PCR の様に配列増幅をすることも可能となる。

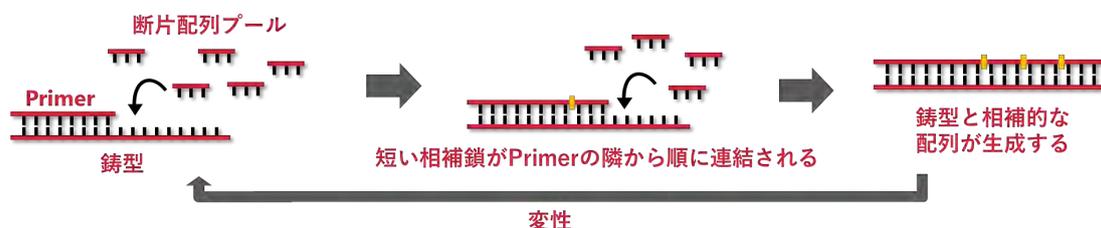


Figure 6. 逐次的ライゲーションによる *L-a*TNA 配列複製システム

まず、どれほど短い *L-a*TNA 断片が連結可能か評価を行った。蛍光標識した 8-mer の断片の隣に 5-mer, 4-mer, 3-mer, 2-mer の断片が並ぶよう設計し、それぞれの断片存在下でケミカルライゲーションを試みた(Fig. 7)。その結果、6h 後には 5-mer と 4-mer の断片はほぼ完全に連結され、24h 後には 3-mer の断片も半分程度連結されることが確認できた。DNA の場合このような短鎖の断片においては、二重鎖形成がほぼ起こらず、ライゲーションは非常に難しい。*L-a*TNA 二重鎖の高い安定性により、短鎖でも二重鎖を形成し、ライゲーション反応が実現できたと考えられる。以上のように、3-mer という非常に短い *L-a*TNA 断片であってもライゲーション反応が進行することが確認できた。

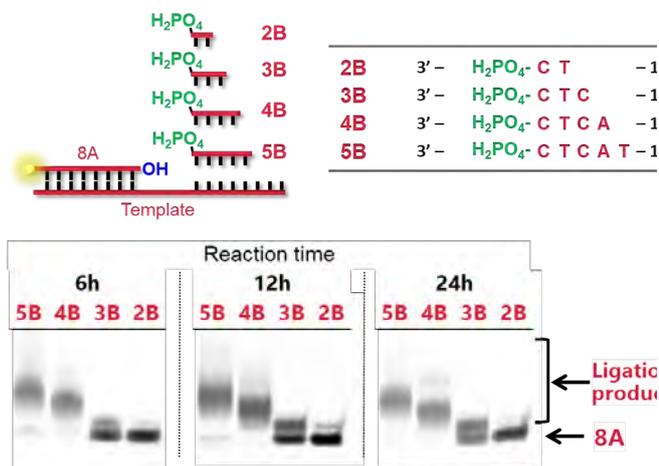


Figure 7. 短鎖 *L-a*TNA 配列断片のライゲーション

Reaction conditions: 4°C, [8A] = [Template] = 1.0 μM, [5B] = [4B] = [3B] = [2B] = 10 μM, 10 mM *N*-Cyanoimidazole, 20 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl.

そこで、4-mer の断片が 2 個連続で逐次的に連結されるよう配列設計し、2 つの断片が同時に存在する条件下で反応を行った(Fig. 8)。最初に現れた反応中間体 (12-mer) のバンドが次第に減少していくのが見られたと同時に、目的生成物 (16-mer) のバンドは時間とともに増加し、逐次的な反応の進行が示された。12h 後には 84% 程度の収率で完全長の産物が得られた。一方で断片 A 非存在下では一切伸長が観測されなかったことから、配列特異的に伸長が起きていることが確認された。以上のように、L-aTNA 鋳型上で配列特異的に短鎖断片を連結させることで相補鎖配列を複製するモデル実験に成功した。今後は、断片配列プール存在下で同様の反応を行い、鋳型と相補的な配列を選択的に合成することを目指し検討を進めていきたい。

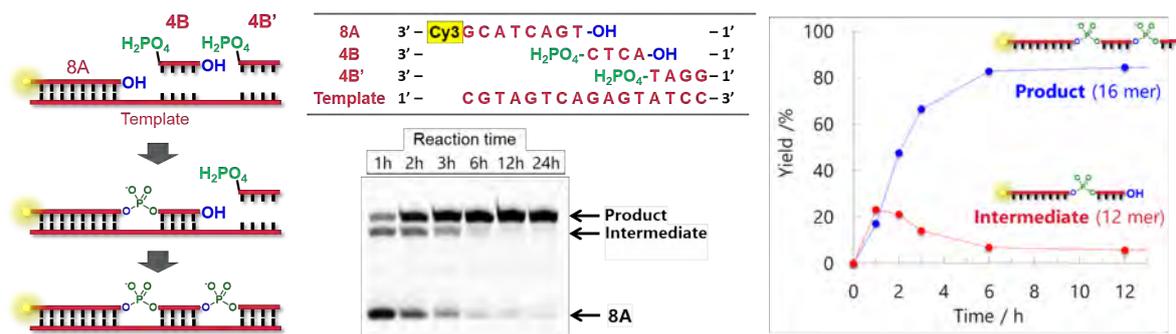


Figure 8. 逐次的ライゲーションの検証実験

Reaction conditions: 4°C, [8A] = [Template] = 1.0 μM, [4B] = [4B'] = 10 μM, 10 mM *N*-Cyanoimidazole, 20 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl.

#### 4. おわりに

本項では、近年著者らが研究を進めている非環状型人工核酸のケミカルライゲーション法について紹介した。*N*-Cyanoimidazole を用いたケミカルライゲーション法によって、L-aTNA 断片を鋳型特異的に連結させることに成功し、この L-aTNA ライゲーション反応が DNA に比べ非常に高速かつ高効率であることを明らかにした。また、反応効率を決定する要因の一つが水酸基周辺の環境であることを示唆する結果が得られ、効率良いケミカルライゲーション反応の設計指針を得ることができた。更に、L-aTNA の短鎖断片を逐次的に連結可能であることを証明した。今後は L-aTNA の配列複製反応へと展開し、L-aTNA 配列解析や、それを利用した SELEX 法による XNA アプタマー獲得等、様々な応用を行っていきたい。XNA が Prebiotic world に存在していたと主張するつもりはないが、最終的には“XNA world”の構築を目指したい。

#### 謝辞

本研究は、私が所属する名古屋大学大学院工学研究科 浅沼研究室で行われました。学生時代から現在に至るまで自由に研究する環境をご提供いただき、数多のご助言をいただきました浅沼浩之教授に心より感謝申し上げます。特に、「人工核酸でライゲーション」という発想のヒントを賜ったおかげで、本稿の研究を発展させることができました。樫田啓准教授、神谷由紀子准教授からも研究に関する多くのアドバイスをいただきまして、心より感謝申し上げます。また、本稿の内容は学生の栗木琢実君に

実験をご協力いただいた結果でありますので、この場を借りて感謝申し上げます。

参考文献

- [1] (a) Obika, S.; Nanbu, D.; Hari, Y.; Andoh, J.; Morio, K.; Doi, T.; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5401.;  
(b) Singh, S. K.; Nielsen, P.; Koshkin, A. A.; Wengel, J. *Chem. Commun.* **1998**, 455
- [2] Campbell, M. A.; Wengel, J. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5680.
- [3] Schneider, K. C.; Benner, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 453.
- [4] Zhang, L. L.; Peritz, A.; Meggers, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4174.
- [5] Asanuma, H.; Toda, T.; Murayama, K.; Liang, X.; Kashida, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14702.
- [6] Murayama, K.; Kashida, H.; Asanuma, H. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6500.
- [7] Kashida, H.; Murayama, K.; Toda, T.; Asanuma, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 1285.
- [8] Pinheiro, V. B.; Taylor, A. I.; Cozens, C.; Abramov, M.; Renders, M.; Zhang, S.; Chaput, J. C.; Wengel, J.;  
Peak-Chew, S-Y.; McLaughlin, S. H.; Herdewijn, P.; Holliger, P. *Science* **2012**, *336*, 341.
- [9] Silverman, A. P.; Kool E. T. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3775.
- [10] Kanaya, E.; Yanagawa, H. *Biochemistry* **1986**, *25*, 7423.

## 主鎖アラニン型ペプチドの配座安定性評価と生体分子認識への応用

東京大学大学院工学研究科  
森本 淳平



**著者紹介：**生体分子の多様で美しい3次元構造とそれに基づいて発揮される卓越した機能、そして、それを生み出す構造的基盤に興味がある。こうした生体分子の設計の妙に学びながら、新奇な三次元構造と機能をもつ人工分子を創出することが、目指す研究。目下は、生体膜透過性の高いペプチドミメティクスを生み出すことを目標に据えて研究を展開している。

感動した分子は、シクロスポリン、フレキシザイム、フッ化物リボスイッチ、ペプチド。（こんな分子を自分も創りたい・発見したい。）

最近、フォルダマー研究に熱い興味が湧いており、関連論文をよく読んでいます。

2012年3月に博士（工学）の学位を取得。3年間のアメリカ留学の後、2015年3月より東京大学大学院工学系研究科で助教。

### 1. はじめに

望みの機能を発揮する人工分子を創出することは、生体関連化学研究における1つの大きな目標である。分子生物学研究や創薬研究の発展に資する機能性分子としては、細胞内のタンパク質間相互作用（PPI）を阻害するものが、いまだ十分に実現されていない分子として望まれているといえる。細胞内PPIを阻害するためには、①高い細胞膜透過性を示す、②PPI面をカバーする広い分子表面をもつ、という2つの要件を満たす分子が必要である。小分子や抗体といった主流の創薬分子では、これらの要件を同時に満たすことは難しく、近年は、中分子が細胞内PPI阻害剤の有望な骨格として注目を集めている。中分子の中でも特にペプチドは、簡便に多様な生体分子リガンドを創出できる点で魅力的であるが、細胞膜透過性が低いために、細胞内PPIに対する阻害剤開発の成功例は少ない。このようなペプチドの課題を克服する膜透過性が高いペプチドミメティクスとして、1990年代からペプチドと呼ばれる分子が研究されている<sup>[1]</sup>。ペプチドとは、N置換グリシンのオリゴマー（オリゴNSG）のことで、ペプチドの低い膜透過性の主要因であるアミドプロトンが存在しない構造であるため、高い膜透過性を示すことが知られている<sup>[2]</sup>。しかしながら、オリゴNSGは主鎖の柔軟性が高いために、特定の立体配座を安定に形成することが難しく、標的タンパク質に対して高い親和性を示すものを取得することが困難であった<sup>[3]</sup>。

### 2. オリゴNSA：局所的な立体反発により立体配座制御されたペプチド

上述のような背景の中、剛直性の高いペプチドとして、2013年にN置換アラニンのオリゴマー（オリゴNSA）が提唱された（図1a）<sup>[4]</sup>。この主鎖アラニン型のペプチドは、局所的な立体反発により、主鎖の3つの二面角 $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\omega$ 全ての回転が制限される。まず、 $\phi$ と $\psi$ については、擬似的1,3-アリル歪みにより回転が制限される（図1b）。また、 $\omega$ については、主鎖同士の立体反発によりトランスに制

限される。しかしながらこの分子は、合成が困難であり、最近まで、メチル基より大きな置換基を持つ N 置換アラニンが連続したオリゴマーが単離されたことはなかった。

我々は最近、この N 置換アラニンのオリゴマーの固相合成法を確立し、メチル基より大きな置換基を持つ N 置換アラニンのオリゴマーの合成・単離に初めて成功した。そして、N ベンジルアラニンのペンタマーの結晶構造を明らかとし、オリゴ NSA がまっすぐに伸びた 3 次元構造を形成することを明らかにした (図 1c)。結晶構造中の主鎖の二面角は、上述の局所的な立体反発から予想される角度に制限されており、オリゴ NSA の 3 次元構造は、モノマーの最安定立体配座から予測可能であることが示唆された<sup>5)</sup>。

なお、オリゴ NSA の基礎骨格となる N メチルアラニンのオリゴマーについては、2006 年に Arvidsson らが結晶構造を報告している<sup>6)</sup>。この分子も結晶中で、上述の N ベンジルアラニンのペンタマーと同様の伸びたかたちを形成しているが、主鎖二面角の角度は互いに異なっており、この違いは今後の興味深い研究対象と言える。

### 3. 水溶液中でのペプチドの配座安定性の研究

上述の結晶構造中で見られたまっすぐに伸びた形は、果たして水溶液中で安定に保持されるだろうか？この問いに答えるために、我々は計算化学と実験の両面から、水溶液中でのオリゴ NSA の 3 次元構造の評価を行った。まず、オリゴ NSA の結晶構造を初期配座として水中での分子動力学 (MD) シミュレーションを行ったところ、オリゴ NSA は 500 ナノ秒に渡って初期配座から最小二乗距離が平均 0.8 Å 程度と大きく立体配座を変化させず、水溶液中で剛直にまっすぐに伸びた形を保持することが示唆された。比較対象として、オリゴ NSG の MD シミュレーションを同様に行ったところ、初期配座から最小二乗距離が平均 1.6 Å 程度と大きく立体配座が変化し続け、水溶液中で特定の立体配座を安定に形成できないことが示唆された。これらのことから、オリゴ NSA は、その主鎖アラニン骨格に起因する局所的な立体反発によって、直線的に伸びた 3 次元構造を水中でも安定に形成することが示唆された。

こうしたシミュレーション結果によって得られた示唆を実験によって確かめるため、我々は次に、double electron-electron resonance (DEER)を用いたオリゴ NSA の末端間距離の測定を行った (図 2)。両末端にニトロキシドスピン標識を施したオリゴ NSA を合成し、DEER 測定を行ったところ、オリゴ NSA は結晶構造から予想されるのと同程度の末端間距離を比較的狭い分布で形成することがわかった。一方で、オリゴ NSG は、末端間の平均距離がオリゴ NSA よりも明らかに短く、また距離の分布も広いことがわかった。このことから、オリゴ NSA は、実際に水溶液中で剛直にまっすぐに伸びた立体配座を形成することが示唆された。

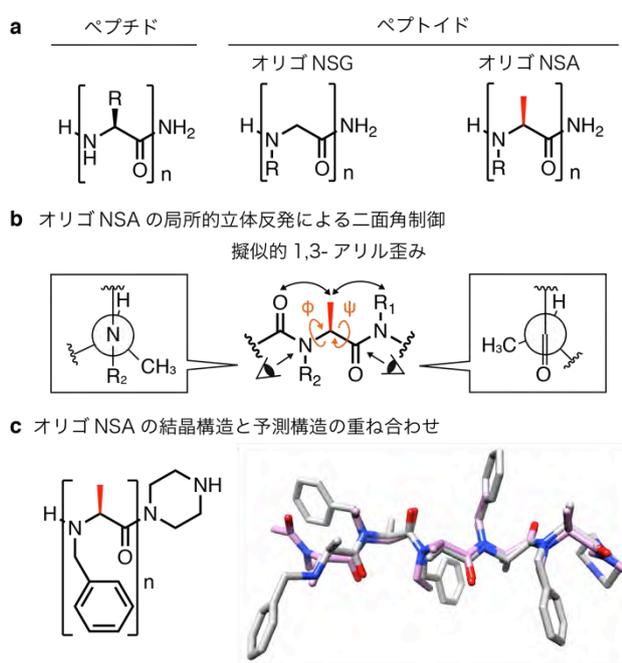


図 1. オリゴ NSA の構造。(a) ペプチドとペプチドの構造。(b) オリゴ NSA の主鎖二面角  $\phi$ 、 $\psi$  回転の制御。(c) オリゴ NSA の結晶構造 (グレー) と量子化学計算に基づく予測構造 (ピンク) の重ね合わせ。

水溶液中での立体配座が、結晶構造中のものと同じであることを検証するために、次に NMR によって溶液中での構造解析を行った。<sup>1</sup>H、COSY、HMQC、HMBC の各種 NMR スペクトル測定によって主鎖のプロトンを帰属した後、NOESY スペクトルによって主鎖の立体配座に関する情報を取得した。その結果、結晶構造と矛盾のない NOE 信号が得られ、この結果から、オリゴ NSA は水溶液中でも特定の立体配座を形成することが確認された。

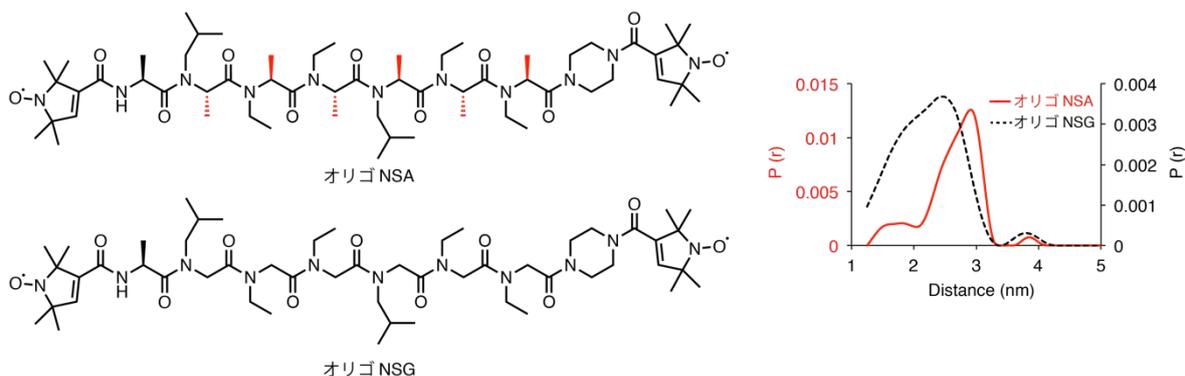


図 2. DEER 測定によるオリゴ NSA (赤実線) とオリゴ NSG (黒点線) の末端間距離の推定。両末端をニトロキシドスピリン標識した化合物で測定を行った。得られたシグナルを Tikhonov 正規化したプロットとして示している。

#### 4. オリゴ NSA を基盤とする PPI 阻害剤の設計と評価

オリゴ NSA の剛直な主鎖構造は、タンパク質リガンドの足場として有用であると考えられる。なぜなら、オリゴ NSA の主鎖は N 置換基に依らず特定の 3 次元構造を安定に形成するため、これを足場とすることで、タンパク質を認識するための官能基を空間上の特定の位置に提示できると考えられるからである。このタンパク質リガンドの足場としての有用性を検証するために、MDM2 と p53 の相互作用をモデル標的としてタンパク質リガンドの設計、ひいては、PPI 阻害剤の創出に取り組んだ。MDM2 は、多種のがん細胞の中で過剰発現していることが知られており、p53 のユビキチンリガーゼとして働くことでがん細胞のアポトーシスを抑制していることが知られている。MDM2 と p53 との相互作用は、p53 の C 末端に存在する transactivation domain (TAD) を介してなされているが、そのうち相互作用に支配的な寄与をしているのは、p53-TAD 中の Phe19、Trp23、Leu26 の 3 残基である (図 3 a) [7]。そのため、これら 3 つの残基の相対的な位置や配向を再現するような分子は、この相互作用の競合的な阻害剤として働くことが期待される。p53-TAD 上のホットスポット残基とオリゴ NSA の N 置換基の配置を比較すると、オリゴ NSA の 1 つおきの N 置換基が、p53-TAD 上のホットスポット残基の位置・配向関係をよく再現することがわかった (図 3 b)。そこで、1、3、5 残基目の N 置換基としてベンジル基、インドリルメチル基、イソペンチル基を導入したオリゴ NSA を合成して、その結合能や阻害能を評価した (図 3 c)。まず、等温滴定型カロリメトリーを用いて、結合能を評価したところ、設計したオリゴ NSA は  $K_D = 1.1 \mu\text{M}$  で MDM2 に結合することがわかった。また、この結合はエンタルピー駆動であり、疎水性部分の非特異的な吸着などではなく、特異的な相互作用であることが示唆された。次に、競合的な蛍光偏光実験による評価を行ったところ、設計したオリゴ NSA は MDM2 と p53-TAD の相互作用を  $K_i = 0.93 \mu\text{M}$  で阻害することがわかり、設計した分子は、ねらい通り、MDM2 の p53-TAD 結合サイトと同じ位置に結合することがわかった。最後に、オリゴ NSA の剛直性がタンパク質結合において有利であるかどうかを検証するために、MDM2 に対して設計したリガンドの主鎖骨格を全て NSG に

変換した分子を合成し、同様の結合・阻害実験を行った。その結果、NSG 骨格を有する分子は、MDM2 と強く相互作用できないことがわかり、オリゴ NSA の主鎖の剛直性が、MDM2 結合に重要な寄与をしていることが示唆された。

今後は、この PPI 阻害剤が、ペプチド型分子に期待される通り高い細胞膜透過性を発揮して細胞内 PPI 阻害剤として働くかどうかを、検証していきたい。

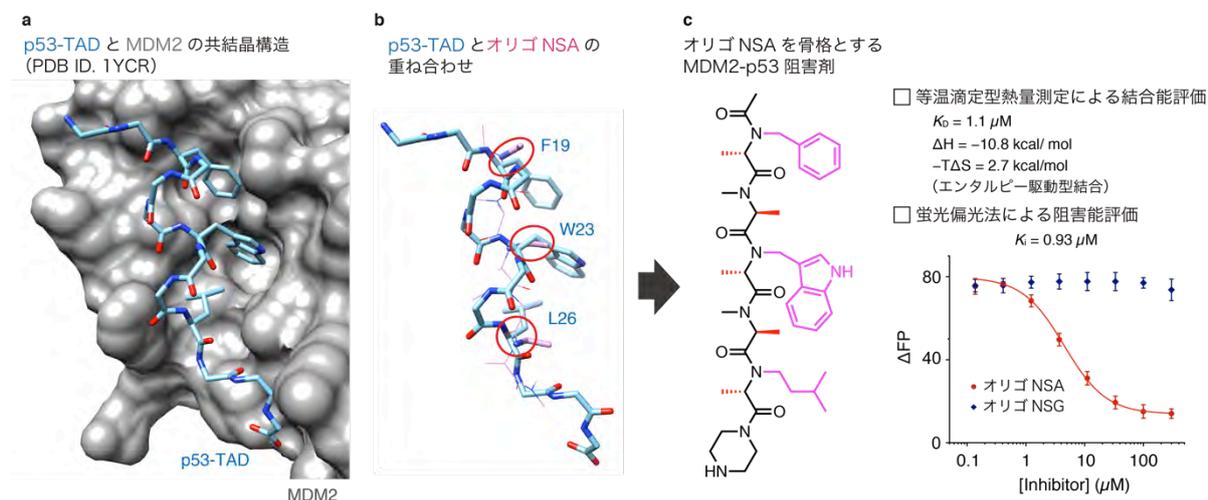


図 3. MDM2-p53 を標的としたオリゴ NSA 型の PPI 阻害剤の設計。(a) p53-TAD と MDM2 の共結晶構造。(b) 共結晶構造中の p53-TAD とオリゴ NSA のモデル構造との重ね合わせ。p53 の3つのホットスポット残基(F19、W23、L26)の  $\alpha$ 、 $\beta$  炭素とオリゴ NSA モデル構造の1、3、5残基目のアミド窒素と  $N_{\alpha}$  炭素を重ね合わせた。(c) p53 との重ね合わせを元に設計したオリゴ NSA を骨格とする MDM2-p53 の阻害剤。結合能を等温滴定型熱量測定で、阻害能を蛍光偏光法で、それぞれ評価した。

## 5. おわりに

近年、ペプチドを基盤とする細胞内 PPI 阻害剤の研究が盛り上がりを見せている。本研究で我々は、オリゴ NSA 骨格からなる剛直なペプチドが、細胞内 PPI 阻害剤の骨格として有用であることを示した。一方で、ニューヨーク大学の Kirshenbaum らは、最近、剛直な環状ペプチド骨格を利用した PPI 阻害剤のインシリコスクリーニングでの創出に成功している<sup>[8]</sup>。また、スクリプス研究所の Kodadek やポステックの Lim らは、ペプチドのコンビナトリアルライブラリーから、細胞内タンパク質の阻害剤を獲得することに成功している<sup>[9,10]</sup>。今後、こうした複数の研究グループの多様なアプローチから、細胞内 PPI を標的としたペプチド創薬が実現していくことが期待される。私たちは、この潮流の中で、分子の3次元構造の合理的設計を追求し、こうした細胞内 PPI 阻害剤研究を加速していきたいと考えている。

## 謝辞

本研究は、私が所属する東京大学大学院工学研究科・山東研究室で行われました。研究を遂行するにあたり、常にエンカレッジなコメントとともに本質を突く真摯なディスカッションをくださった山東信介教授に深く感謝いたします。また、いつも異なる専門領域からの洞察の深い意見・アドバイスをくださる植木亮介・齋藤雄太郎両助教および野中洋先生（現・浜地研究室 准教授）にも感謝いたします。この研究の突破口を拓き、力強く前へと進めてくれたのは、現在 D2 学生の福田泰啓君です。不

屈の精神で合成困難なオリゴ NSA の研究に取り組み、初志貫徹して、PPI 阻害剤の合理設計を見事に達成してくれました。福田君をはじめ、日々一緒に研究を遂行してくれる山東研の学生達に、感謝しています。

この研究は、共同研究者の方々なくしては実現することはできませんでした。東京大学の津本浩平先生、長門石曉先生、黒田大祐先生、妹尾暁暢君、および、分子化学研究所の中村敏和・浅田瑞枝 両博士に感謝申し上げます。

この研究は、CREST および科研費の助成のもと、実施されました。

#### 参考文献

- [1] Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K.; Spellmeyer, D. C.; Tan, R.; Frankel, A. D.; Santi, D. V.; Cohen, F. E.; Bartlett, P. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 9367–9371.
- [2] Yu, P.; Liu, B.; Kodadek, T. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 746–751.
- [3] Kodadek, T.; McEnaney, P. J. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 6038–6059.
- [4] Gao, Y.; Kodadek, T. *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 360–369.
- [5] Morimoto, J.; Fukuda, Y.; Kuroda, D.; Watanabe, T.; Yoshida, F.; Asada, M.; Nakamura, T.; Senoo, A.; Nagatoishi, S.; Tsumoto, K.; Sando, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*, 14612–14623.
- [6] Zhang, S.; Prabpai, S.; Kongsareeb, P.; Arvidsson, P. I. *Chem. Commun.* **2006**, 497–499.
- [7] Kussie, P. H.; Gorina, S.; Marechal, V.; Elenbaas, B.; Moreau, J.; Levine, A. J.; Pavletich, N. P. *Science* **1996**, *274*, 948–953.
- [8] Shneider, J. A.; Craven, T. W.; Kasper, A. C.; Yun, C.; Haugbro, Briggs, E. M.; Svetlov, V.; Nudler, E.; Knaut, H.; Bonneau, R.; Carabedian, M. J.; Kirshenbaum, K. Logan, S. K. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4396.
- [9] Trader, D. J.; Simanski, S.; Kodadek, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 6312–6319.
- [10] Oh, M.; Lee, J. H.; Moon, H.; Hyun, Y. J.; Lim, H. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 602–606.

## 小分子リガンドによる細胞接着蛋白質 P-カドヘリンの分子間相互作用制御と構造情報に基づくリガンド設計



東京大学大学院工学系研究科  
妹尾 暁暢

**著者紹介：**東京大学大学院工学系研究科津本研究室に所属しています、妹尾暁暢(せのおあきのぶ)です。現在博士後期課程 2 年生です。現在の研究領域を表すキーワードは蛋白質-蛋白質間相互作用・蛋白質-リガンド相互作用・分子認識・物理化学解析などです。もともと自分で創った分子で生命現象を視る・操る研究に関心がありましたが、この学会は私のそんな知的好奇心をドンピシャで満たし、私の研究の血となり肉となる要素を提供して下さいる学会のひとつです。

### 1. はじめに

蛋白質-蛋白質間相互作用(Protein-protein interaction; PPI)は細胞内外で綿密なネットワークを形成し、あらゆる生命現象において重要な役割を担っている。PPI を制御する低分子は新規分子標的薬の候補分子となるだけでなく、機能未知な蛋白質に対するケミカルノックダウンの手段として有用である。しかしながら、低分子による PPI 制御は殊に難しいというのが通説である。理由は大きく分けて 2 つある。一般に低分子が蛋白質表面でアクセスできる面積が数百 Å<sup>2</sup>なのに対して、蛋白質間相互作用界面の埋没表面積(Buried surface area; BSA)は 10-20 倍ほども広い。また、PPI 界面には酵素のような明確な化合物結合ポケットが存在しないことも多く、PPI 界面をブロックする高親和性の低分子リガンドを得ることが難しい。この様な理由から、広くて滑らかな PPI 界面の低分子による制御という“ジャイアントキリング”を可能にする戦略が求められている。

本研究で私たちは「P-カドヘリンによる細胞接着」をその闘いの舞台に設定した。P-カドヘリンは癌細胞特異的な発現や浸潤への関与から創薬標的として注目を集める分子である。P-カドヘリンは細胞外においてホモ二量体を形成することで細胞接着機能を発揮する。その際、X ダイマーと呼ばれる中間体を経て最終的に自身のトリプトファン残基を相手の疎水ポケットに互いに組み込み合うストランド・スワップダイマー(S-S ダイマー)を形成することが知られている<sup>1</sup>(Fig. 1)。カドヘリンを制御しようとしたとき、S-S ダイマー形成時に用いられる疎水ポケットに結合するリガンド開発は極めて妥当な戦略にも拘わらず、20 年以上の研究を経ても未だに成功していない。そういう意味でカドヘリンはいわば日く付きの分子だった。そこで私たちは既知の疎水ポケットに拘らず、全く新しい機序に基づく P-カドヘリンの細胞接着制御を目指して研究を開始した。

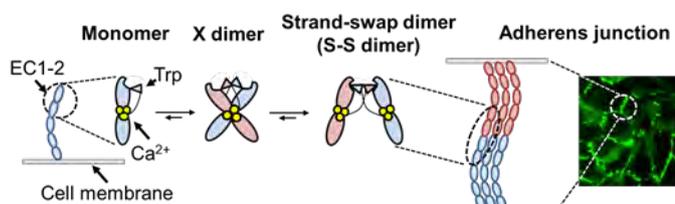


Fig. 1 P-カドヘリンによる段階的な細胞接着形成

### 2. 表面プラズモン共鳴(SPR)を用いた低分子リガンドスクリーニング

私たちは手始めに、標的蛋白質表面の浅く小さな窪みに対しても結合しうるモダリティとして分子

量の小さなフラグメント化合物を選択した。SPR を活用し、フラグメント化合物ライブラリーから P-カドヘリンに対する低分子リガンドを取得した。続けて、SPR のセンサーチップ上で P-カドヘリンのホモ二量体のモノマーへの解離を検出する系を構築し<sup>2</sup>、P-カドヘリンのホモ二量体を阻害する低分子を取得した。その後、当該低分子は P-カドヘリンを強制発現させた細胞同士の凝集形成も阻害できる有望なヒット化合物だと分かった。得られたヒット化合物の構造はトリプトファンと類似したトリプタミン骨格だった(Fig. 2)ことから、この化合物は矢張り、S-S ダイマー形成の際トリプトファン残基が収まる疎水ポケットに結合しているのだろうというのが当初の推測だった…。

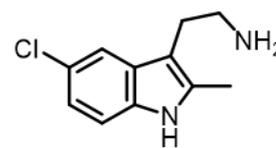


Fig. 2 ヒット化合物の骨格

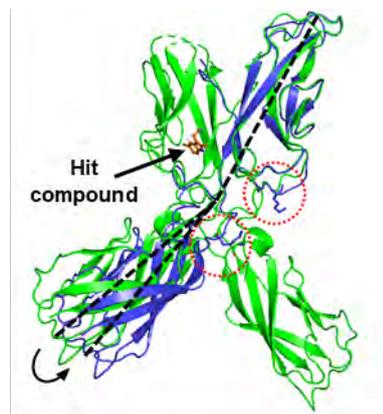


Fig. 3 Xダイマーとヒット化合物の複合体構造. 緑の構造はリガンド非結合のXダイマーで、青の構造ではヒット化合物が結合している.それにより生じた矢印方向の構造変化により赤丸で囲った部分でXダイマー形成に重要な水素結合の切断が確認された.

### 3. リガンド結合部位の同定と阻害機構解明

私たちは幸運にもヒット化合物と P-カドヘリンの複合体結晶構造の取得に成功した。(ヒット化合物は)Y140 の近く(結合して)いるけれども、(生物学的に)意味ある？—当時回折データを解析いただいた先輩とのやり取りは鮮明に記憶している。カドヘリン研究者にとり 140 番目のアミノ酸残基は極めてメッセージ性の強い残基である。なぜなら X ダイマーの PPI 界面のすぐ傍に位置するからだ。ヒット化合物は予想に反し、例の疎水ポケットではなく X ダイマーの PPI 界面付近に結合していた。その後、水素重水素交換質量分析によってヒット化合物が X ダイマーを確かに阻害することを示唆する結果が得られた。さらに、ヒット化合物の結合に伴い X ダイマーを構成するモノマーに構造変化が起こり、X ダイマー形成に重要な水素結合が切れている様子も確認された(Fig. 3)。このヒット化合物は、広くて滑らかな PPI 界面に直接結合しブロックする阻害様式ではなく、PPI 界面のすぐ傍の窪みにはまり込むことで蛋白質の構造変化を誘起し、結果として PPI 界面で形成される水素結合を切断するという、従来見られなかったアロステリック様の阻害様式を持っていることが示唆された。このヒット化合物は先発の抗 P-カドヘリン抗体<sup>3</sup>により示された X ダイマーの阻害による細胞接着制御をたった数百 Da の低分子で再現してのけた。現在、このヒット化合物を中心とした合成展開や構造ベースでのドッキングなど多角的な視点でのリード探索を行っている。

### 謝辞

指導教員である津本浩平先生、長門石曉先生、そして津本研究室の皆様にご感謝申し上げます。また、X線結晶構造解析にてサポートを賜りました SPring-8 BL26B2 のスタッフの先生方、合成展開でお世話になりました山東信介先生、齋藤雄太朗先生、山東研究室の皆様にも深く御礼申し上げます。本研究は JSPS 特別研究員奨励費の助成を受けて遂行しました。この場を借りて御礼申し上げます。

### 参考文献

- [1] Kudo, S.; Caaveiro, M. M. J.; Tsumoto, K. *Structure*, **2016**, *24*, 1523.
- [2] Senoo, A.; Nagatoishi, S.; Moberg, A.; Babol, N. L.; Mitani, T.; Tashima, T.; Kudo, S.; Tsumoto, K. *Chem. Commun.*, **2018**, *54*, 5350.
- [3] Kudo, S.; Caaveiro, M. M. J.; Nagatoishi, S.; Miyafusa, T.; Matsuura T.; Sudou Y.; Tsumoto K. *Sci. Rep.*, **2017**, *7*, 39518

Award Account

第13回バイオ関連化学シンポジウムポスター賞

## 線維芽細胞増殖因子受容体の活性化を制御する機能性核酸の開発

東京大学大学院工学系研究科  
江口 晃弘\*, 内海 彩香, 植木 亮介, 山東 信介



### 著者紹介：

東京大学山東研、博士後期課程の江口晃弘と申します。修士までは同じく東京大学の長棟研にて、受容体工学や機能性細胞に関する研究をしていました。現在は受容体というターゲットは維持したまま、核酸ベースの人工アゴニストによって受容体活性を制御する研究を行なっています。

ここまで5年ほど受容体の研究をしてきましたが、受容体の大きな魅力（謎）は、その活性が外部から改変可能であるという点だと感じています。ファージディスプレイをはじめとする様々なセレクション法の発展のおかげで、受容体活性化能を持つ人工アゴニストが続々と開発されてきています。そしてそれぞれの人工アゴニストが、同じ受容体を違った様式で活性化します。これらの活性化様式は天然には存在していなかったはずで、そのような天然に存在しない現象を“受容体自体は何も改変しないままで”誘導できるという点に非常にわくわくしています。ただ、“なぜ改変可能なのか”、“いかにして予想通りの改変を行うか”といった点はまだまだ未明な為、今後はその謎に突撃していきたいと思っています。

日本の院生/教員の待遇が悪すぎるという話がよくあがる昨今ですが、そんな待遇にも負けずアカデミアに進む予定です。もちろん研究も頑張りますが、日本の研究環境が良くなるように活発に活動していきたいと思っています。院生・教員の待遇を向上し、現代の人間社会において科学研究の果たすべき役割をアピールしていけるよう頑張りたいと思います。皆様、どうぞよろしくお願い致します。

### 1. はじめに

著者紹介で述べたように、私の研究のターゲットは受容体というタンパク質です。その中でも、線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR）と呼ばれるタンパク質ファミリーに着目した研究を行なっています。

FGFR は線維芽細胞増殖因子（FGF）の結合により二量化することで活性化し、細胞内にシグナルを伝達します（右図）。FGFR によるシグナル伝達は組織形成や創傷治癒などにおいて非常に重要である一方で、異常な活性化によって細胞のがん化を誘導することがあるという危険性があります。このような異常な活性化の原因は、受容体の過剰発現による FGF 非依存的な二量化によるものと考えられており、FGFR の二量化状態を制御できるような分子の開発が望まれています<sup>1</sup>。

受容体の二量化状態を制御する分子ツールとして近年注目されているのが、DNA アプタマーです。DNA アプタマーは特定のタンパク質に対して高い親和性で結合可能な分子であり、DNA である為に価数や構造を調節しやすいという利点を有しています。これまでに当研究室では、受容体結合性の二価 DNA

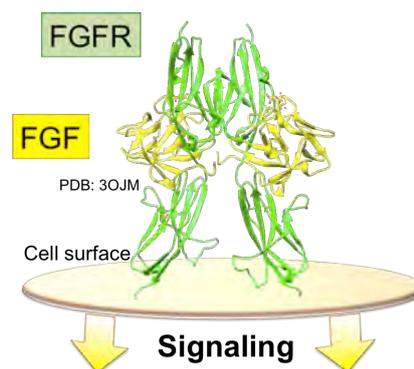


図. FGF による FGFR の活性化

アプタマーを用いることで、受容体の二量化及び活性化を誘導可能な DNA アプタマーアゴニストを開発することに成功しています<sup>2,3</sup>。これらの先行研究から、FGFR の二量化状態を制御可能な DNA アプタマーの開発を試みることにしました。

## 2. 研究概要

まず、胃がん等に関わることが知られている FGFR2 を標的として、SELEX 法を用いたセレクションにより FGFR2 結合性 DNA アプタマーを取得しました。これまでの研究ではアプタマーを二価にして受容体二量化を誘導していましたが、まずは一価の状態でのアプタマーの活性を確認してみました。アプタマーを FGFR2 過剰発現胃がん細胞に作用させたところ、驚くべきことに FGFR2 の活性化を阻害する機能を持つことが判明しました。

阻害メカニズム解明のためにケミカルクロスリンカーを用いて受容体の二量化割合を調べたところ (右図 A)、アプタマーの添加により FGFR2 の FGF 依存的な二量化が阻害されていることが確認されました。このことから、本アプタマーは FGFR2 に結合することで二量化を阻害する機能を持ち (右図 A)、それにより FGFR2 の異常な活性化を防いでいることが示唆されています。

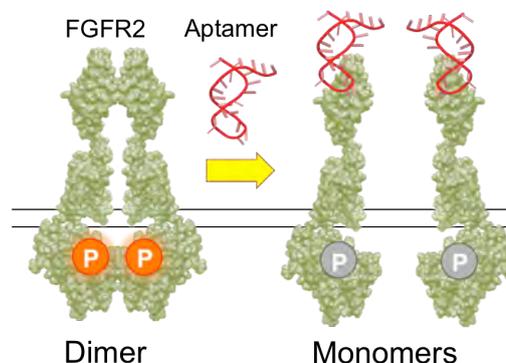


図. 本 Aptamer の作用機序

## 3. 今後の展望

以上の結果から本アプタマーは新規のメカニズムで受容体の活性を阻害していることが考えられ、その阻害メカニズムの更なる解明のため、現在は「1. 重水素交換質量分析や ITC によるアプタマー結合時の FGFR2 の構造変化の解析」「2. 細胞内リン酸化プロテオーム解析による下流シグナルへの影響の確認」「3. 細胞膜上の FGFR2 の一分子解析による二量化状態の直接観測」といった実験を行なっています。既知の FGFR2 阻害剤とは細胞シグナルへの影響が異なることも確認されており、阻害メカニズムの違いによる細胞への影響の差も示唆されています。

## 4. 謝辞

本研究は、東京大学山東研究室にて行われています。ご指導いただいております山東教授及び植木助教に心より感謝申し上げます。和気藹々とした研究室で楽しい毎日を送っています。メンバーのみんなにも感謝しています。山東研の [instagram](https://www.instagram.com/sando_lab) も是非ご覧ください。

([https://www.instagram.com/sando\\_lab](https://www.instagram.com/sando_lab))

また、相互作用解析に際しては東京大学津本研研究室の津本教授並びに長門石准教授から多大なご支援とご助言を頂きました。質量分析では、名古屋大学 ITbM の桑田助教に測定とご助言を頂いております。この場を借りて感謝申し上げます。また、このようなレターを書く機会を与えてくださった日本化学会生体関連化学部会の方々にも感謝申し上げます。

## 参考文献

- [1] Sarabipour and Hristoba. *Nat. Commun.* **2016**, 4:7, 10262.
- [2] Ueki *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55, 579.
- [3] Ueki *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 6554.

Award Account

🏆 第13回バイオ関連化学シンポジウムポスター賞

## photoSLIPT による細胞内分子の光操作と多色イメージング

<sup>1</sup>名古屋工業大学大学院工学研究科

<sup>2</sup>JST さきがけ

<sup>3</sup>名古屋工業大学材料科学フロンティア研究院 (FRIMS)

沖 超二<sup>1</sup>, 吉井 達之<sup>1,2</sup>, 築地 真也<sup>1,3</sup>



**著者紹介**：1990年生まれ。東京都葛飾区出身。長岡技術科学大学大学院工学研究科修士課程を修了。修士課程修了後、民間企業に就職しましたが、アカデミックな環境で研究がしたく大学に出戻りました（大学は異なりますが、研究室は修士課程時代と同じ築地研究室です）。現在、大学院博士後期課程在学中で、企業での経験を活かしつつ（？）、日々、楽しみながら研究に励んでいます。本名が珍しい名で、「超二（ちょうじ）」と読みます。よく留学生に間違われますが、下町育ちの生粋の日本人です。名には「何かを超える人になるように」「平成二年生まれで、二男」の意味があります。

### 1. はじめに

細胞内における生体分子の時空間的なダイナミクスの理解するための手法として、蛋白質の細胞内局在を光で操作する技術が盛んに研究されている。近年、光遺伝学（オプトジェネティクス）に基づいた光操作技術が注目を集めているが、光遺伝学は蛍光イメージングとの併用において問題となる場合がある。例えば、現在、CRY2 や LOV などの、フラビン補酵素を持つ光受容蛋白質が広く用いられているが、これらの蛋白質は、汎用的な CFP、GFP、YFP の励起光に応答してしまうため、mCherry などの赤色もしくはそれより長い蛍光波長の蛍光蛋白質としか併用することができない。そこで、我々は、さまざまな蛍光蛋白質と併用可能な新しい光局在制御ツールの開発を試みた。我々はこれまでに、細胞内の特定のオルガネラに自発的に局在化するリガンド化合物（局在性リガンド）を用いた細胞内蛋白質の局在制御法「SLIPT」（self-localizing ligand-induced protein translocation）を確立している [1], [2], [3]。本稿では、局在性リガンドに光スイッチを組み込むことで SLIPT を光で操作可能にした「photoSLIPT」の開発とシグナル伝達の光制御および多色蛍光イメージングへの応用について紹介する。

### 2. 蛋白質の局在を光で制御する photoSLIPT の構築

我々がこれまでに開発した局在制御手法「SLIPT」を光で制御可能にすることを考えた。局在性リガンドは、標的蛋白質に対するリガンドと細胞内の特定領域に結合する局在化モチーフから構成されたハイブリッド型化合物である。我々は、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) と動物細胞内で高い親和性と選択性で結合することが知られている小分子トリメトプリム (TMP) を誘導化しリンカーを介して脂質化配列を連結

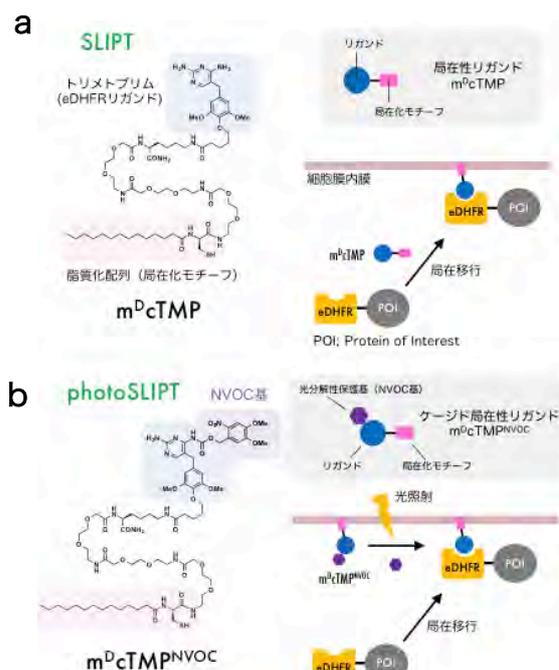


図1 (a)SLIPT、(b)photoSLIPT の概略図

した局在性リガンド ( $m^DcTMP$ ) を既に開発している (図 1a)。 $m^DcTMP$  は培地に添加することで、細胞質に発現させた eDHFR 融合蛋白質を細胞膜内膜へ誘導することができる。そこで、TMP のアミノ基の一つに光分解性保護基である *o*-ニトロベラトリルオキシカルボニル (NVOC) 基を導入することで、光で蛋白質を細胞膜へ誘導できるケージド局在性リガンド ( $m^DcTMP^{NVOC}$ ) を設計・合成した (図 1b)。細胞質中の eDHFR の局在は、 $m^DcTMP^{NVOC}$  を培地へ添加するだけでは変化しないが、NVOC 基の脱保護が可能で 405nm の光を細胞へ照射することで、細胞膜へ誘導できることを確認した。また、NVOC 基は CFP、GFP などの励起光では脱保護されないことも確認している。

### 3. photoSLIPT による細胞内 $PIP_3$ の光産生制御と多色イメージングへの応用

我々は、photoSLIPT を応用し、細胞膜内膜に存在する脂質ホスファチジルイノシトール-3, 4, 5-三リン酸 ( $PIP_3$ ) の生産を光で制御することを試みた。 $PIP_3$  は、細胞の生存、増殖、分化、運動などの機能に關与する重要な脂質セカンドメッセンジャーである。 $PIP_3$  の産生は、細胞膜上の脂質ホスファチジルイノシトール-4, 5-二リン酸 ( $PIP_2$ ) が脂質キナーゼであるホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ (PI3K) によってリン酸化されることで制御されている。また、PI3K の活性化は、細胞膜内膜への局在移行を鍵として引き起こされる。そこで、まず、PI3K の局在を  $m^DcTMP^{NVOC}$  を用いて光制御できるようにする仕組みを考えた (図 2a)。PI3K の触媒サブユニット p110 と複合化するドメイン iSH2 を eDHFR に融合した蛋白質 (eDHFR-Venus-iSH2) を設計した。eDHFR-Venus-iSH2 は細胞内に発現させることで、iSH2 を介して eDHFR と複合化する PI3K を細胞質に構成することができる。

細胞に発現させた eDHFR-Venus-iSH2 は、 $m^DcTMP^{NVOC}$  を添加した後、光を照射することで、細胞膜へ誘導することが可能であった。また、同一細胞内に共発現させておいた異なる蛍光蛋白質を融合した 3 種類のプローブ分子を同時にモニターした。その結果、光照射による eDHFR-Venus-iSH2 の細胞膜移行に伴い、細胞膜上の  $PIP_3$  の産生 ( $PH_{Akt}$  の細胞膜移行) および、下流の Akt の活性化 (AKT-KTR の核外移行) が誘導できていることを確認した (図 2b)。したがって、photoSLIPT は標的シグナル蛋白質の局在を光で細胞膜内膜へ誘導してシグナル伝達を制御することができ、さらに、蛍光イメージングにおいて同時に多色 (4 種類) の蛍光蛋白質との併用が可能であることを示した。

### 4. おわりに

photoSLIPT は、既存の光遺伝学では困難であった多色イメージングでの併用が可能になることから、細胞内シグナル伝達を精密に制御しながら同時に複数の生体分子を調査することが可能になる。今後、複雑な生命現象を解明するための強力なツールとして、医学・生命研究における利用が期待される。

#### 参考文献

- [1] Ishida, M.; Watanabe, H.; Takigawa, K.; Kurishita, Y.; Oki, C.; Nakamura, A.; Hamachi, I.; Tsukiji, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12684.
- [2] Nakamura, A.; Katahira, R.; Sawada, S.; Shinoda, E.; Kuwata, K.; Yoshii, T.; Tsukiji, S. *Biochemistry*. in press
- [3] Nakamura, A.; Oki, C.; Kato, K.; Fujinuma, S.; Maryu, G.; Kuwata, K.; Yoshii, T.; Matsuda, M.; Aoki, K.; Tsukiji, S. *ChemRxiv*, DOI: 10.26434/chemrxiv.8222456

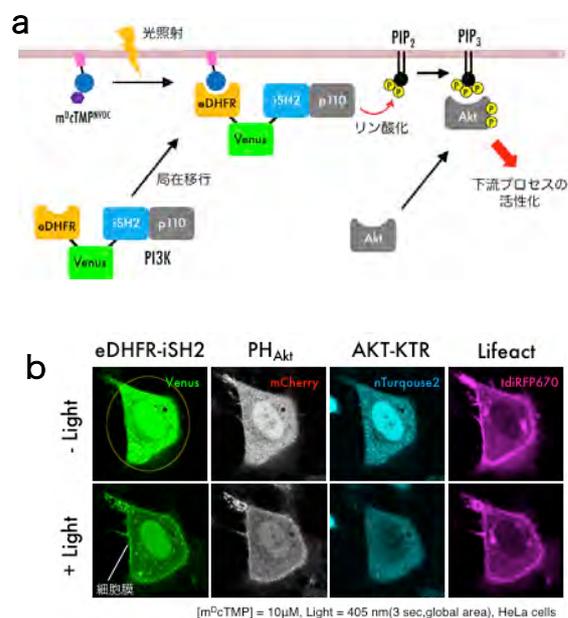


図 2 (a) photSLIPT による  $PIP_3$  光生産制御、  
(b) 共焦点顕微鏡による多色イメージング

## RNA 高次構造形成に基づく新規遺伝子発現制御技術の開発

熊本大学大学院自然科学教育部  
嘉村 匠人



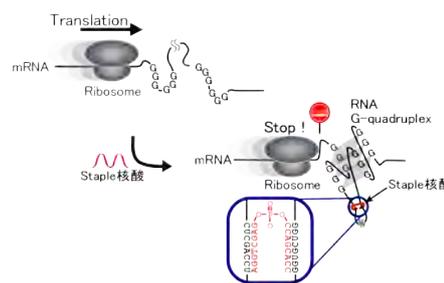
**著者紹介：**2020年熊本大学大学院自然科学教育部材料・応用化学専攻博士前期課程修了後、同大学院工学専攻博士後期課程へ進学予定（博士前期、後期課程共に井原敏博教授研究室）。学部4年に研究を始めてから現在まで一貫して、核酸を利用して生命現象を操る研究を行っています。研究が進めば進むほど「確かめなければいけないこと」に加えて「確かめてみたいこと」が増えていき、たいへんだと思う一方でどんな結果になるのかわくわくしながら日々研究を進めています。

### 1. はじめに

アンチセンス法や RNAi に代表される遺伝子発現制御技術を利用した核酸医薬は、これまでに標的化することが難しかった疾病に対する創薬モダリティとして大きな注目を集めている。

従来の核酸医薬は生体内安定性や広義狭義のオフ・ターゲットに課題があるものの、少しずつではあるが臨床現場に出現するようになった。しかし、肝・腎毒性や核酸医薬にとって最大の課題とされるドラッグデリバリーシステムに関する問題に対しては更なる改善が求められている。これらの課題を解決するために人工核酸を使うアプローチが試みられているが、RISC 複合体形成や RNase 認識に対する配慮が必要であり、人工核酸の使用には限界がある。

そこで我々は安定な RNA の高次構造である G-quadruplex に着目した<sup>1)</sup>。G-quadruplex はタンパク質翻訳反応を抑制することが知られており、この構造を制御することで酵素反応を必要としない遺伝子発現制御技術の開発を目指すことにした (Fig. 1)。



**Fig. 1.** Staple 核酸により標的 mRNA 上のグアニン繰り返し配列を近接させて RNA G-quadruplex を構築し、タンパク質翻訳反応を抑制する。

### 2. Staple 核酸による RNA G-quadruplex 構造の形成誘導とその位置特定

本技術の本質は Staple 核酸と名付けた短鎖核酸により mRNA 上に G-quadruplex を形成することにある。本コンセプトを証明するために G-quadruplex 構造に結合すると蛍光を発することが知られている Thioflavin T を用いた蛍光測定評価を行った<sup>2)</sup>。その結果、Staple 核酸を導入した場合にのみ G-quadruplex の形成を示す蛍光を発することを確認した。次に RNA G-quadruplex 構造が逆転写酵素の DNA 合成伸長反応を阻害することを利用した RT ストップアッセイを行った<sup>3)</sup>。この方法では、RNA テンプレートに相補的な蛍光標識プライマーを用いて逆転写反応を行い、得られた cDNA の配列を解析することで RNA G-quadruplex が形成された位置がわかる。本アッセイの結果、DNA を Staple 核酸として加えた検討において我々が設計した位置で G-quadruplex が形成していることが明らかになった (Fig. 2)。また RNA を Staple 核酸として利用し同検討を行ったところ、DNA の場合と同様の結果を得ることに成

功した。以上の結果より、核酸の種類を問わず Staple 核酸を導入することで RNA G-quadruplex 形成の誘導が可能であることが明らかになった。

### 3. Staple 核酸を利用したタンパク質発現抑制効果

次に、Staple 核酸存在下で RNA G-quadruplex の形成誘導が可能な配列 (TPM3 遺伝子の 5'UTR) が上流に挿入された Firefly luciferase (Fluc) をコードする mRNA を設計した。これを用いてレポーターアッセイを行い、Staple 核酸による遺伝子発現抑制効果の評価した。その結果、Staple 核酸存在下でのみ Fluc のタンパク質発現量が減少することがわかった (Fig. 3 (a))。また、同じ 5'UTR 付近に相補的な短鎖核酸と単純な二重鎖を形成させても Fluc 発現の抑制は観察されなかった。本結果は Staple 核酸が標的外に結合してしまっても G-quadruplex 形成を誘導しないので狭義のオフ・ターゲット効果が発現しないことを示唆している。

最後に、TPM3 遺伝子を標的に Staple 核酸を用いた内在性タンパク質発現抑制能を評価したところ、我々が期待したとおり、Staple 核酸を導入した場合にのみ TPM3 タンパク質の発現量を抑制することに成功した (Fig. 3 (b))。以上の結果から、試験管内だけでなく細胞内においても Staple 核酸が問題なく機能し、内在性 mRNA を標的としたタンパク質翻訳抑制が可能であることが示された。

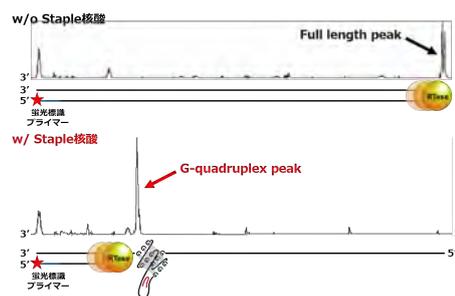


Fig. 2. RT ストップアッセイの結果

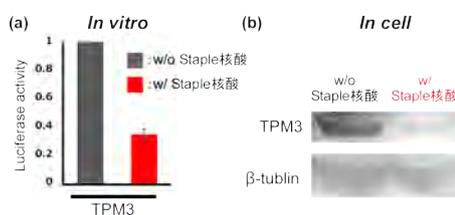


Fig. 3. Staple 核酸を利用したタンパク質発現抑制効果 (a)レポーターアッセイの結果 (b)ウエスタンブロットの結果

### 4. おわりに

本研究では、Staple 核酸により mRNA 上の狙った位置に G-quadruplex 構造を誘起し、細胞内外において標的遺伝子の発現を効率的に抑制できることを証明した。今後は本システムが動物個体内で機能するか評価し、さらにタンパク質発現量を網羅的に定量することで標的外遺伝子への影響も評価する。更に種々の修飾核酸を Staple 核酸として利用し遺伝子発現能に優れ、かつ肝・腎毒性などに代表されるオフ・ターゲット効果が生じない Staple 核酸の作製を試みる。我々は Staple 核酸をアンチセンス法や RNAi に並ぶ「第三の遺伝子発現制御技術」へと発展させたいと考えている。

### 謝辞

本研究は、私が所属する熊本大学大学院自然科学教育部井原研究室で行われました。日頃よりご指導を頂きました井原敏博教授ならびに勝田陽介助教、北村裕介助教に心より感謝申し上げます。また、京都大学の佐藤慎一准教授ならびに弘前大学の萩原正規准教授からも多大なるご助言・ご協力を頂きました。この場をお借りして深く感謝申し上げます。

### 参考文献

- [1] Kumari, S.; Bugaut, A.; Huppert, J. L.; Balasubramanian, S. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 218–221
- [2] Xu, S.; Li, Q.; Xiang, J.; Yang, Q.; Sun, H.; Guan, A.; Wang, L.; Liu, Y.; Yu, L.; Shi, Y.; Chen, H.; Tang, Y. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24793.
- [3] Hagihara, M.; Yoneda, K.; Yabuuchi, H.; Okuno, Y.; Nakatani, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 2350–2353.

Award Account

🏆 第13回バイオ関連化学シンポジウムポスター賞

## 1 分子酵素活性プロファイリングによる疾患関連酵素の超高感度検出

坂本眞伍<sup>1</sup>、小松徹<sup>1</sup>、渡邊力也<sup>2</sup>、張翼<sup>3</sup>、井上大輝<sup>1</sup>、川口充康<sup>4</sup>、中川秀彦<sup>4</sup>、植野高章<sup>5</sup>、奥坂拓志<sup>6</sup>、本田一文<sup>7</sup>、野地博行<sup>3</sup>、  
浦野泰照<sup>1, 9, 10</sup>



<sup>1</sup>東大院薬、<sup>2</sup>理研、<sup>3</sup>東大院工、<sup>4</sup>名市大院薬、<sup>5</sup>大阪歯大、<sup>6</sup>国立がん研究センター中央病院、<sup>7</sup>国立がんセンター研究所、<sup>8</sup>革新的研究開発推進プログラム、<sup>9</sup>東大院医、  
<sup>10</sup>AMED-CREST

著者紹介：東京大学大学院薬学系研究科博士2年。興味のある分野は生体分子の超高感度検出で、学士時代より一貫してマイクロデバイスを用いた酵素の1分子活性検出について研究を行っています。最近タンパク質のアミノ酸配列シーケンシングが自分の中でのホットトピックです。趣味は日々のウェイトトレーニングで、重いおもりが挙げれば挙がるほど研究もうまくいっているような気がします。

### 1. はじめに

生体内における酵素活性の測定は、古くから疾患の診断に広く利用されてきた。しかしながら、従来の溶液条件における酵素活性測定では、特に血中に微量存在する酵素の検出における感度が不十分である場合が少なからず見られ、その感度の向上は、特に疾患の早期発見や新規バイオマーカーの発見に大きく資すると期待される。酵素活性検出の超高感度化を実現し得る技術としては、近年、マルチウェルチャンバー型のマイクロデバイスが開発されている<sup>[1]</sup> (Fig. 1)。このデバイスは1つのチップに微小なウェルが数十万個並んでいる構造をしており、ここに十分に希釈した酵素溶液を添加することで、確率論的にそれぞれのウェルに酵素が1分子以下しか存在

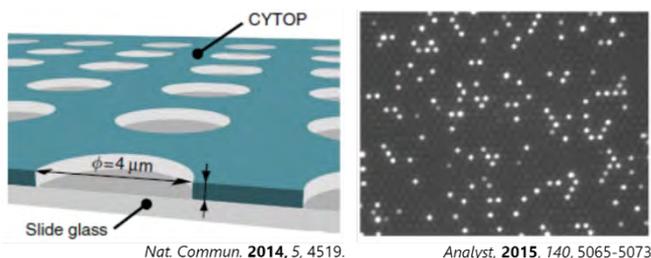


Fig. 1 マイクロデバイスの構造と、酵素と蛍光基質が封入されたデバイスの蛍光顕微鏡画像

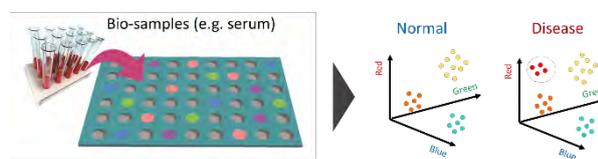


Fig. 2 本研究の戦略

しないような条件を作り、蛍光基質と反応させることで、その活性をシグナルとして検出することが可能である。しかしながら、生体サンプルのような多数の酵素種の混合する溶液を本手法に適用する場合、各ウェルに酵素はランダムに封入されてしまうため、どのウェルに何の酵素が入っているかを知ることができないという問題があった。特に疾患関連酵素として知られる alkaline phosphatase のように、類似の活性を持つ酵素群 (アイソザイム) を持つ酵素種を検出する場合には、それぞれが同じ基質を代謝してしまうため、その判別はより困難である。そのため、生体サンプル中の多数の分子を酵素種毎に分離しつつ検出する方法論を確立できれば、マイクロデバイスの超高感度という長所

を最大限に生かした、革新的な診断プラットフォームになり得ると考えられる。

具体的な手法としては、各ウェル中に含まれる酵素を、異なる反応点と異なる蛍光波長を有する複数の蛍光基質との反応性の組み合わせの違いから 1 分子ごとにプロファイルし、これらを分離・検出するという手法を考案した (Fig. 2)。そしてこれに基づき、生体サンプル中の多数の酵素を、アイソザイムのように類似の活性を有する酵素群まで含めて区別し検出する方法論の開発を行うこととした<sup>[2]</sup>。

## 2. 血清サンプル中の phosphatase 活性検出

私は、各チャンバー中に含まれる酵素を、異なる反応点と異なる蛍光波長を有する複数の蛍光基質との反応性の違いから 1 分子ごとにプロファイルし、これらを分離検出するという手法を考案し、生体サンプル中の多数の酵素を、アイソザイムのように類似の活性を有する酵素群まで区別して検出する実験系の開発をおこなった。まず、様々な疾患に関連する複数のアイソザイムをもつ alkaline phosphatases (ALPs) をターゲットとしてプローブ開発を行った。その結果、精製酵素を用いた実験において、小腸型 ALP (ALPI) と組織非特異型 ALP (TNAP) の 2 つのアイソザイムについて、それぞれ異なる活性プロファイルを見出し、溶液中の両アイソザイムを 1 分子レベルで判別しつつ検出することに成功した (Fig. 3)。さらに、血清を用いた測定においても、サンプル中に存在する両アイソザイムの分離・検出、さらに定量を行うことにも成功した。

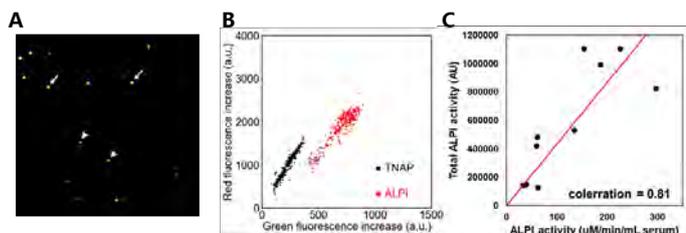


Fig 3. マイクロデバイスにおける血清中の ALP の活性検出。(A) 血清サンプルを封入したデバイスの顕微鏡画像。(B) 血清サンプルの活性パターンを表した散布図。(C) 10 人の検体について、吸光法によるサンプル中 ALPI の活性値と、本手法により ALPI として検出された分子の活性の合計値は高い相関を示した。

## 3. 血清サンプル中の ENPP 活性検出

続いて、別のターゲット酵素として、7 種類のサブタイプを持ち、これまで血清中の活性検出が困難であった ectonucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases (ENPPs) を選択してプローブ開発を行った (Fig 4)。血漿サンプル中で検出された酵素に対し、その活性パターンに基づいてクラスター分析を行ったところ、3 つのクラスターに分類された。この分析手法に基づき、健常者 14 名・膵臓がん患者 31 名の血漿サンプルを測定したところ、クラスター 1 に相当する酵素 (ENPP3) について、膵臓がん患者における血漿中の分子数の有意な増加を見出した (Fig 5)。

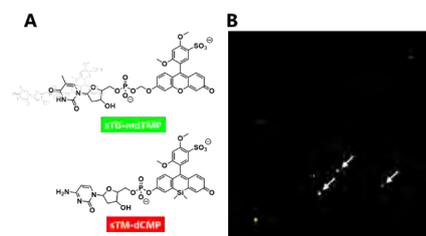


Fig 4. (A) ENPP 活性検出蛍光プローブ (B) 血漿サンプルを封入したデバイスの顕微鏡画像

## 参考文献

- [1] R.Watanabe *et al.*, *Nat. Commun.*, **2014**, *5*, 4519.  
 [2] S.Sakamoto *et al.*, *Sci. Adv.*, in press

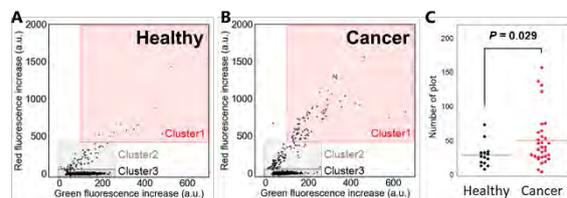


Fig 5. (A, B) 健常者と膵臓がん患者の血漿サンプル中酵素活性パターンを可視化した散布図。(C) クラスター 1 に分類される分子数は膵臓癌患者において有意に増加していた。

Award Account

🏆 第13回バイオ関連化学シンポジウムポスター賞

## リガンド指向性化学による NMDA 型グルタミン酸受容体の選択的ラベリング

京都大学大学院工学系研究科 合成・生物化学専攻  
白岩 和樹



**著者紹介：**岡山大学工学部化学生命系学科を卒業した後、修士課程より浜地研究室に所属。神経機能を chemistry の視点から解明すべく奮闘中…(?)。素晴らしいスタッフ、優秀なポスドク、ドクターから様々なことを吸収しつつ日々成長しているはず…です……。少しでも神経機能解明に役に立てるよう頑張っていきたいと思います。野球がとても好きなので、最近はプロ野球スピリッツという野球ゲームに睡眠時間を削るくらいはまっています。

### 1. はじめに

ニューロンは様々な神経伝達物質やその受容体などを通じて、情報の伝達や統合を行なっている。神経伝達物質受容体はアルツハイマー病やパーキンソン病など様々な神経性疾患に関与することが知られており、その分子レベルでの機能解明が求められている。その中でも NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDAR) は、AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) とともに興奮性の神経伝達を担う神経伝達物質受容体であり、記憶・学習の分子メカニズムや神経疾患に深く関与している。そのため、NMDAR および AMPAR の動態を解析することは非常に重要である。しかし、従来の蛍光タンパク質を融合させる標識法では、蛍光タンパク質の大きさによる機能阻害や標的タンパク質の1つのサブユニットだけの過剰発現などに由来するアーティファクトとの懸念があり、内在性の NMDAR や AMPAR の本来の動態を解析することは困難でありそれらを可能とする新たなケミカルツールが求められていた。

### 2. NMDA 受容体の選択的ラベル化

このような背景のもと我々は、遺伝子操作を必要としないタンパク質の選択的化学修飾法として、リガンド指向性化学を開発してきた。この手法は、タンパク質の活性を損なうことなくケミカルラベルすることが可能なため、タンパク質の機能解明において非常に重要なツールである。実際、これまでにアシルイミダゾールを反応基として用いたリガンド指向性アシルイミダゾール化学<sup>1</sup>(LDAI 化学)を用いることで、ニューロンや脳切片中の内在性 AMPAR 選択的ラベル化に成功している<sup>2</sup>。しかし、内在性の NMDAR のラベル化は未達成であった。今回、NMDAR 選択的なアンタゴニストを新たなリガンドとするラベル化剤を用いることで、培養神経細胞および脳スライス中の内在性の NMDAR の選択的なケミカルラベルに初めて成功した(図1)。

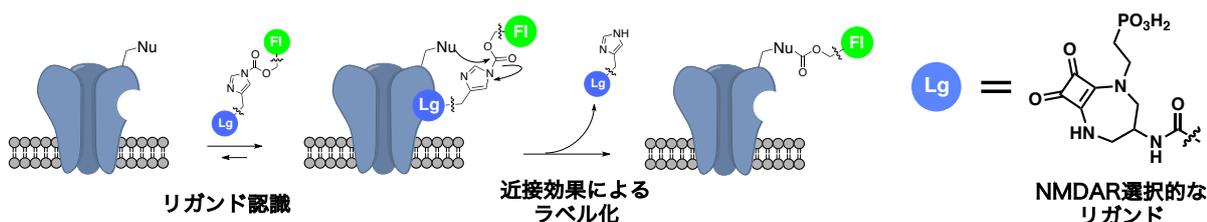


図1 (a) リガンド指向性化学によるラベル化戦略

### 3. 新規ラベル化戦略および NMDA 受容体の動体解析

NMDA 受容体はシナプス表層に存在する受容体の存在量が記憶や学習に関与しているため、細胞表層に存在する NMDA 受容体のみをケミカルラベルし、その動体解析を行うことが非常に重要である。神経伝達物質受容体の細胞内に取り込みは数分で行われるが、従来のリガンド指向性化学のラベル化反応はアシル転位反応を用いているため、短時間での選択的なラベルには限界があり、細胞表層に存在する受容体の正確な機能や動態解析へと応用することは非常に困難であった。そこで、望みの瞬間に細胞表層に存在している神経伝達物質受容体のみを、迅速かつ特異的にラベル化する手法の開発を目指した。細胞表面上の受容体のみを迅速にラベル化する手法として、リガンド指向性化学によるラベル化により反応基を修飾し、その後、迅速な生体直交反応により蛍光色素を修飾する手法を考案した。二段階目の反応には、細胞毒性がなく数分で反応が進行する歪みアルケンとテトラジンによる逆電子要請型 Diels—Alder 反応 (IEDDA) を用いることにした。この反応は 5 分以内に反応が進行するため、望みのタイミングで細胞表層の受容体のみを蛍光色素の導入が可能であると期待される (図 2a)。

NMDA 受容体の標識に二段階ラベル化を試みた。迅速かつ特異的な反応である二段階目のラベル化のお陰で、ある時点で細胞表層に存在する NMDA 受容体の選択的なケミカルラベルに成功したことを、Western Blotting によって確認した。また、この二段階ケミカルラベル手法は、小脳や大脳皮質から単離した初代培養神経細胞や急性小脳スライス中の内在性 NMDA 受容体に対しても十分選択的であることを確認した。さらに、二段階ラベル化法を用いることで、小脳顆粒細胞の表層上の NMDA 受容体の減少量や分解速度の解析に成功した (図 2b)。

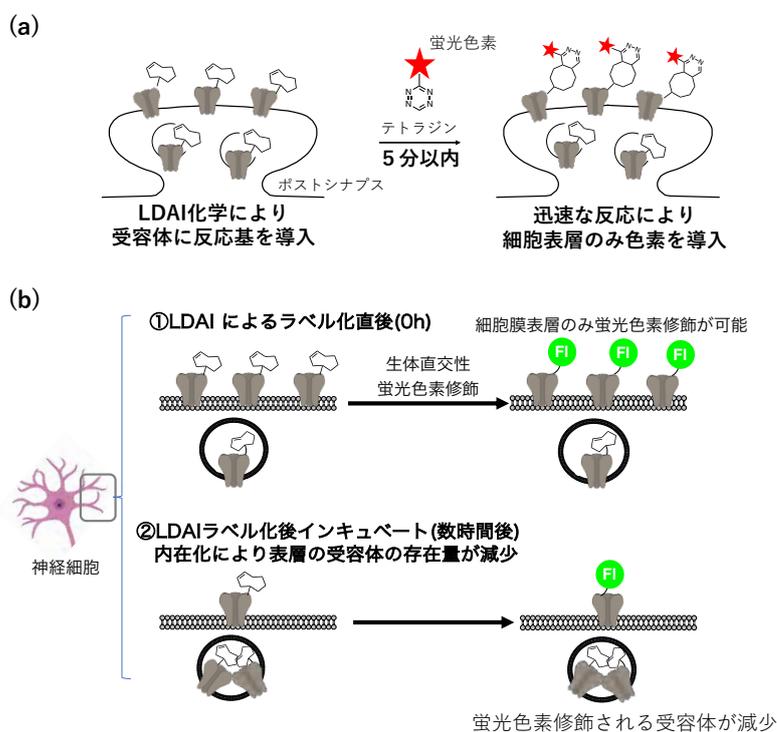


図 2(a) 細胞表層選択的な二段階蛍光ラベル化の模式図

(b) 2 段階ラベルを用いた動態解析の概要図

### 4. まとめ

内在性 NMDA 受容体の選択的なラベル化に成功し、二段階ラベル化戦略を用いることで NMDA 受容体の詳細な局在解明が可能な方法論を提供することに成功した。培養細胞のみならず小脳スライスでもラベル化が進行することから、脳組織そのものへの適応も期待できる。

### 参考文献

- [1] Fujishima, S. *et al. J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 3961.
- [2] Wakayama, S. *et al. Nat. Commun.*, **2017**, *8*, 14850

Award Account

第 13 回バイオ関連化学シンポジウムポスター賞

## Ru 光触媒担持アフィニティービーズを駆使した抗体の Fc 領域選択的化学修飾の開発

<sup>1</sup> 東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所<sup>2</sup> 東京工業大学生命理工学院○中根 啓太<sup>1,2</sup>, 對馬 理彦<sup>1,2</sup>, 佐藤 伸一<sup>1</sup>, 中村 浩之<sup>1</sup>

著者紹介：群馬県前橋市出身。出身校は群馬工業高等専門学校物質工学科（2011 年入学-2016 年卒業）および同校専攻科環境工学専攻（2016 年入学-2018 年修了）。現在、東京工業大学生命理工学院生命理工学系ライフエンジニアリングコース修士課程（2018 年入学-2020 年修了予定）。研究分野はケミカルバイオロジー、タンパク質化学修飾。趣味は小旅行（休日は鎌倉・江の島によく行きます）。

私は群馬高専在学時に植物の病害や生体応答に関わる生理活性物質の探索や生体応答機構の解明に関心を持ち研究する中で、人体において生体応答を制御する分子や、モノづくりを通じた制御システムの創成を行いたいという気持ちを抱き、中村研究室に飛び込みました。中村研究室所属以前は、有機合成は全くの未経験でしたが、今では大きなタンパク質と低分子をつなげて、価値を付与するタンパク質修飾に日々面白さを感じています。

## 1. はじめに

抗体の化学修飾技術は抗体薬物複合体（antibody-drug conjugate; ADC）に代表される抗原認識能を利用した薬剤送達システムに応用される<sup>[1]</sup>。現在 ADC 薬品に汎用される抗体修飾法の多くは、修飾数や修飾部位の制御まで至っておらず、抗体の部位特異的修飾技術の開発が望まれている。抗体の Fc 領域は種を超えて保存された領域であり、抗原認識部位を含まないため、近年修飾数と修飾部位の制御を目指した天然抗体の Fc 領域選択的修飾法は盛んに研究されている<sup>[2]</sup>。一方、当研究室では Ru 光触媒を用いたラジカル的チロシン残基修飾法を研究している。修飾剤 1-methyl-4-arylurazole(MAUra)は Ru 光触媒から半径数 nm 以内のチロシン残基を選択的に修飾することが可能である<sup>[3]</sup>。そこで、本研究ではチロシン残基修飾反応を抗体の Fc 領域選択的修飾法へと展開した。

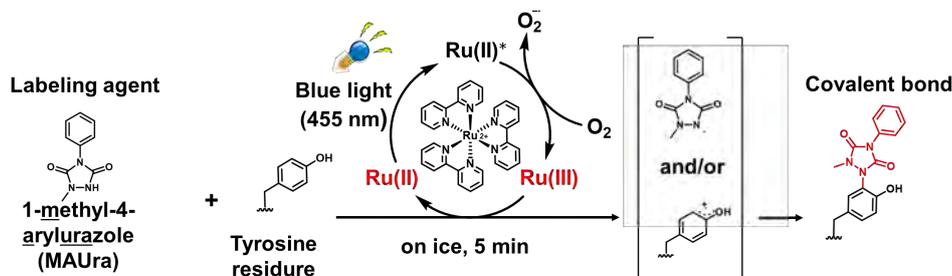


Figure 1. 近接チロシン残基修飾反応

## 2. アフィニティービーズ上近接チロシン残基修飾反応の部位選択的抗体修飾への応用

近接チロシン残基修飾反応の修飾半径および約 10 nm の大きさの抗体を考慮し、Fc 領域選択的に結合する低分子リガンド ApA<sup>[4]</sup>と Ru 光触媒を担持したアフィニティービーズ上で反応を制御する技術<sup>[5]</sup>を組み合わせることで、Fc 領域選択的な抗体修飾が達成できると考えた(Figure 2a)。実際に、Ru 光触媒担持アフィニティービーズを用いて、抗 HER2 抗体トラスツズマブ、抗 CD20 抗体リツキシマブ、抗 EGFR 抗体セツキシマブの Fc 領域選択的修飾に成功した(Figure 2b)。また、修飾したリツキシマブの LC-MS/MS 解析により、Fc 領域のリガンド結合サイト付近に位置するチロシン残基 Try282 および Try440 が修飾されていることを明らかにした。さらに、修飾したトラスツズマブの抗原認識能が保持されていることを HER2 発現細胞(NIC-N87 細胞)の免疫染色によって示した。

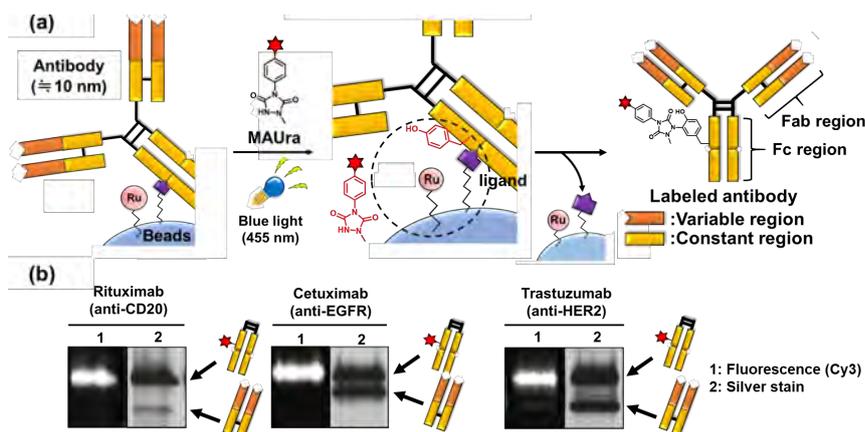


Figure 2. Fc 領域選択的ラベル化

## 3. おわりに

「ラジカル反応による触媒から半径数 nm 以内で完結する局所反応はタンパク質の部位選択的修飾に応用できる」という仮説を立証し、抗体修飾に有用な手法を開発した。また、紙面の都合上紹介しなかったが、作成した Ru 光触媒担持アフィニティービーズは抗体の精製にも用いることができるため、タンパク質混在系から本手法により修飾した後に修飾した抗体を精製することができる。

## 謝辞

本研究は、東京工業大学化学生命科学研究所中村研究室で行われました。中村浩之教授をはじめとする多くの方々に感謝いたします。また、LC-MS/MS 解析においてお世話になりました、東京工業大学科学技術創成研究院細胞制御工学研究ユニット田口英樹教授、丹羽達也助教に感謝申し上げます。

## 参考文献

- [1] Beck, A.; Goetsch, L.; Dumontet, C.; Corvaia, N. *Nat. Publ. Gr.* **2017**, *16* (5), 315.
- [2] Yamada, K.; Ito, Y. *ChemBioChem* **2019**, *20*, 2729.
- [3] Sato, S.; Hatano, K.; Tsushima, M.; Nakamura, H. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (46), 5871.
- [4] Li, R.; Dowd, V.; Stewart, D. J.; Burton, S. J.; Lowe, C. R. *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 190.
- [5] Tsushima, M.; Sato, S.; Niwa, T.; Taguchi, H.; Nakamura, H. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 13275.

Award Account

第13回バイオ関連化学シンポジウムポスター賞

## 糖分解酵素活性検出蛍光プローブ群の開発と 悪性及び良性腫瘍特異的蛍光イメージングへの応用



<sup>1</sup> 東京大学大学院医学系研究科, <sup>2</sup> 薬学系研究科, <sup>3</sup> 東京大学附属病院, <sup>4</sup> うえお乳腺外科, <sup>5</sup> JST-PRESTO, <sup>6</sup> AMED-CREST  
藤田 恭平<sup>1</sup>, 神谷 真子<sup>1,5</sup>, 吉岡孝房<sup>1,3</sup>, 小笠原輝<sup>2</sup>,  
上尾 裕明<sup>4</sup>, 浦野 泰照<sup>1,2,6</sup>

**著者紹介:** 東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻博士課程に在学中。生体情報学分野、浦野研究室所属。日本学術振興会特別研究員 (DC1)。東京大学生命科学技術国際卓越大学院 (WINGS-LST) 所属。孫正義育英財団会員。学部生時代に超分子化学分野の研究を行い、成果を運よく国際誌に掲載できた事がきっかけで研究の楽しさを知りました。現在はケミカルバイオロジーという化学的観点から生命現象を解き明かし生物学や医学にアプローチする分野俯瞰的な学問に興味を持っており、日夜研究に励んでいます。私にとって研究とは、“挑戦的であるが常に困難を乗り越えていく過程を与えてくれるもの”であり、また努力して思考した先に得られる結果は人類未踏のもので非常に刺激的であると感じています。勿論博士課程は様々な面で厳しい事もありますが、実験が成功した時の楽しさは研究だからこそ得られるものであると思います。来年は渡米しスタンフォード大学で研究できる機会を得られるので、自分なりの武器をさらに身に着け常に新しい事に挑戦していきたいと考えています。

### 1. はじめに

癌の蛍光イメージング手法は、目視で確認できない腫瘍を迅速かつ高感度に検出できる為、手術中の癌部位の特定・診断に対して最も有効な手段であると考えられる。中でも特定の酵素活性の存在下で強い蛍光を発する“蛍光プローブ”を用いたイメージング手法は酵素の turnover の性質からシグナル増強により、高いコントラストでの癌組織の可視化が期待できる。<sup>1</sup> 当研究室ではこれまでに乳癌組織で活性の高い事が知られるγ-グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) の酵素活性を利用して、この活性が細胞に存在すると強い蛍光を発する蛍光プローブを開発してきた。この蛍光プローブは乳癌が疑われる組織にスプレーするだけで、迅速に癌部位を検出する事が可能であった。<sup>2</sup> しかしながら GGT を標的とする上では制限があり、例えば正常組織でのバックグラウンド蛍光、あるいは良性腫瘍に対しても同様な応答が確認されるという問題点があった。従って、より感度・特異度の高い乳癌検出を達成する為、GGT に代わる新たな乳腺腫瘍特異的な酵素活性の探索が求められていた。

### 2. 糖分解酵素活性検出蛍光プローブ群の開発と乳癌検出プローブの探索

本研究において、我々は新たにこれまで精査されてこなかった乳癌組織の糖分解酵素活性に着目した。糖分解酵素活性はいくつかの癌種でその高発現が報告されていたが、腫瘍組織における生体条件下の酵素活性については殆どが明らかになっておらず、どの糖分解酵素活性を利用すれば癌特異的イメージングが達成できるかの予測は困難であった。そこで我々は、分子内スピロ環化反応に基づい

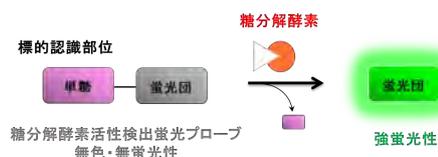


図1. 蛍光プローブによる糖分解酵素活性の検出

た蛍光制御原理を利用する蛍光団<sup>3</sup>を用いて、生体条件下で糖分解酵素活性を検出可能な蛍光プローブを12種類開発した(図1)。さらに、開発した蛍光プローブ群を用いてヒト手術検体の乳癌組織で糖分解酵素活性の評価を実施した(図2)。その結果、中でも糖分解酵素Xを標的とした蛍光プローブが乳癌特異的な蛍光上昇を示す事が明らかとなり、この蛍光プローブの乳癌検出における感度・特異度はGGTを標的とする蛍光プローブのそれを大きく上回る事が明らかとなった。また、目視では乳癌組織と正常乳腺組織の判別がつかない外科切除検体に対して、酵素Xを標的とした蛍光プローブを散布したところ、数ミリメートルの癌組織まで選択的かつ迅速に蛍光可視化する事に成功した。これらの結果から酵素Xを標的とした蛍光プローブの乳癌検出における高い有効性が明らかとなった。さらに我々は蛍光アッセイとペプチドマスフィンガープリンティング解析を組み合わせたDEGアッセイ法<sup>4</sup>により標的酵素であるXのサブタイプの同定にも成功した。同定したXのサブタイプは免疫染色法により、乳癌組織においての特異的高発現が確認された。これまで乳癌において酵素Xは全く着目されてこなかった標的であり、本研究がその特異的バイオマーカーとしての有効性を示した初の報告である。



図2. ヒト手術検体を用いた蛍光プローブ群のスクリーニング戦略

### 3. 悪性腫瘍と良性腫瘍の識別への応用

免疫染色の結果、酵素Xのサブタイプは乳癌組織だけでなく、乳腺で頻度の高い良性腫瘍Yにおいても顕著な高発現が認められた。酵素Xを標的とした蛍光プローブの応答性を乳癌と良性腫瘍Yと比較したところ、興味深い事に乳癌組織よりも良性腫瘍Yの方が高い蛍光上昇を示す傾向にある事が明らかとなった。この結果から、良性腫瘍Yに高く応答する酵素Xを標的とした蛍光プローブ(緑色)、悪性腫瘍と良性腫瘍において同様に応答するGGTを標的とする赤色の蛍光プローブの双方を組み合わせれば、悪性腫瘍と良性腫瘍を異なった色で識別できると考えた。そこで我々は、これらの蛍光プローブをカクテルにし、乳癌組織及び良性腫瘍Yの組織に散布したところ、酵素Xを標的とした蛍光プローブは良性腫瘍Yで強い緑色蛍光を、GGTを標的とする蛍光プローブは両腫瘍において同様な赤色蛍光を呈した。両者の波長のイメージング像を複合した画像では、癌組織は赤色に、良性腫瘍組織は黄色にイメージングされる傾向にあり、両腫瘍を異なった色で識別する事に成功した(図3)。悪性腫瘍と良性腫瘍を酵素活性を元に光学的に識別した例は本研究が初であり、将来的に臨床で識別の難しい様々な腫瘍の組み合わせの迅速な識別に応用できる可能性が期待される。

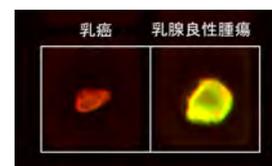


図3. 2色イメージングによる酵素活性に基づいた悪性腫瘍と良性腫瘍の識別例

### 参考文献

[1] Urano, Y. *et al. Science Transl Med*, 3, 110 (2011). [2] Ueo, H. *et al. Sci. Rep.*, 5, 12080 (2015). [3] Asanuma, D. *et al. Nat. Commun.*, 6, 6463 (2015). [4] Komatsu, T. *et al. J. Am. Chem. Soc.*, 135, 6002-6005 (2013).

Award Account

第 13 回バイオ関連化学シンポジウムポスター賞

## 生体分子の網羅的イメージングを可能とする 蛍光バーコードの開発

名古屋大学大学院工学研究科  
牧野 航海, 檜田 啓, 浅沼 浩之



**著者紹介:** 名古屋大学大学院工学研究科 浅沼研究室で核酸化学と光化学を中心に学び蛍光バーコードの開発を目指し研究をしています。そもそも浅沼研究室に入ったのは、時に教育者として厳しく、時に少年のようにユーモラスに指導して下さる浅沼教授や、意思を尊重して研究を任せて下さる檜田准教授をはじめ、神谷准教授、村山助教と尊敬する方々の存在が大きいです。そんな尊敬する村山助教とこのバイオ関連化学シンポジウムで受賞できたことは大変誇りに思うと同時に嬉しく思います。これからも研究者として、人生の先輩として多くのことを先生方から学びたいと思い浅沼研究室で博士後期課程に進学することを決めています。浅沼研究室に入った理由は他にもあり、浅沼教授が自身の研究をとっても楽しく語っていたことが浅沼研究室に魅力を感じた一つです。今では私自身も核酸の魅せる生理現象、マテリアルとしての美しさに携わる研究ができ楽しく思っています。将来的には核酸とも相性のよい情報、計算化学を学び活用してオミックス解析による新たな知見を生み出していきたいです。今後も楽しく研究をしていくためにも真摯に正直に一生懸命に邁進していく所存です。

### 1. はじめに

蛍光分子を利用したイメージング方法は、高感度かつ汎用性が高いことからバイオテクノロジーの分野において広く利用されている。しかしながら、蛍光分子を利用した方法では励起波長・蛍光波長がオーバーラップしてしまうことから通常 3,4 色程度した同時に使用することができない。つまり、同時に検出可能な生体分子の種類に制限があり網羅的な解析は困難であるという問題点がある。そこで、本研究ではこの問題点を解決することを目指し、限られた数の蛍光色素で多種類の生体分子の同時検出を可能とする蛍光バーコードの開発を目指した。

### 2. 蛍光バーコードの設計

蛍光バーコードは、核酸の鎖交換反応を利用して発光する蛍光色素を変化させることで蛍光色の配列をもたせた蛍光ラベル化剤である(Fig.1)。具体的には、半分ずつずれて相補的な色素修飾核酸二重鎖(F鎖)を標的となる生体分子に結合しておく。この F 鎖に相補的な消光剤導入核酸(Q鎖)を添加していくと鎖交換反応が起こり、発光する蛍光色素が変化するという設計である。本設計であれば、予め F 鎖に結合させる蛍光色素を任意の順番に配列させることで、膨大な種類のラベル化剤を調製可能である。

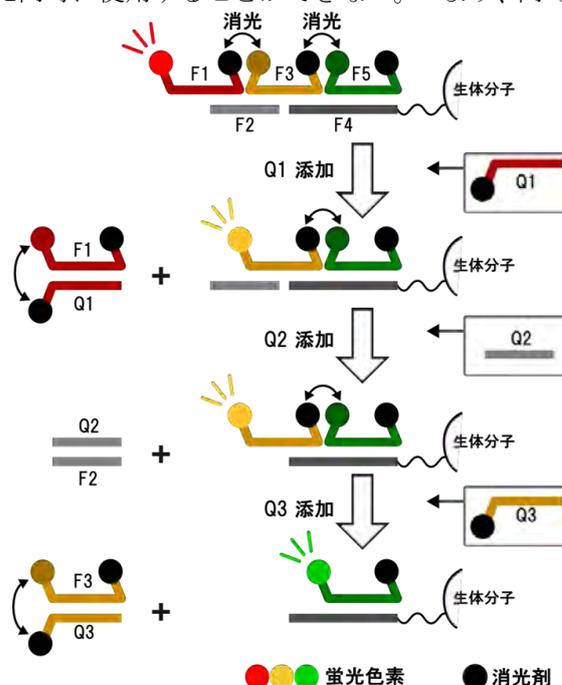


Fig. 1. 核酸の鎖交換反応を利用した発光する蛍光色素が順番に変化する蛍光バーコードの設計

蛍光バーコードを構成する核酸分子として、浅沼研究室で開発された人工核酸 D-*a*TNA を利用した<sup>[1]</sup>。これまでに D-*a*TNA に蛍光色素及び消光剤を修飾することで消光能が飛躍的に向上することを明らかにしている<sup>[2]</sup>。そのため DNA と比較してバックグラウンド発光の低減を狙った。さらに D-*a*TNA は天然核酸と二重鎖形成をしないため、RNA などの細胞内夾雑物による擬陽性シグナルの問題を回避することが期待できる。

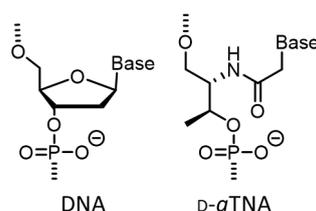


Fig. 2. DNA と D-*a*TNA の化学構造

### 3. 共焦点レーザー顕微鏡イメージング

上記の設計で 7 mer ずつずれて相補的な D-*a*TNA の蛍光バーコードを合成した。蛍光色素には Cy5、Cy3、及び FAM の 3 色、消光剤には Dabcyl を導入した。合成した蛍光バーコードの機能評価として、共焦点レーザー顕微鏡を用いたイメージングを行った。はじめに Cy5→Cy3→FAM の順番に蛍光変化する蛍光バーコードを調製し、ビオチン-ストレプトアビジン相互作用でポリスチレンビーズに担持した。この蛍光バーコード修飾ビーズに相補的な Q 鎖(Q1、Q2、Q3)を一つずつ順番に添加し、その際の蛍光色素の蛍光変化を観察した(Fig.3)。その結果、添加前には Cy3、FAM は消光されており、Cy5 の蛍光が強く観察された。一方、Q1 を添加した際には、Cy5 の消光と Cy3 の蛍光増大が観察された。同様に Q3 を添加した際には、Cy3 の蛍光減少と FAM の蛍光増大が観察された。つまり、設計通りに Cy5→Cy3→FAM の順番に蛍光変化させることに成功した。

同様の実験で 9 種類の蛍光バーコード修飾ビーズを調製し同時に蛍光イメージングを行った(Fig.4)。その結果、9 種類のラベルを独立して認識可能であることが示唆された。つまり、この蛍光バーコードをラベル化剤として利用することで、多種類の生体分子を同時検出可能であることが示唆された。

加えて、固定化細胞のゴルジ体を標的に蛍光バーコードを抗体にコンジュゲーションすることで蛍光免疫染色を行ったところ、設計通りに Cy5→Cy3→FAM の順番に蛍光変化させることに成功し、タンパク質検出への応用が可能であることが示唆された(Fig.5)。

### 参考文献

- [1] H. Asanuma, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 14702-14703.  
 [2] K. Murayama, *et al.*, *ChemBioChem*, **2015**, *16*, 1298-1301.

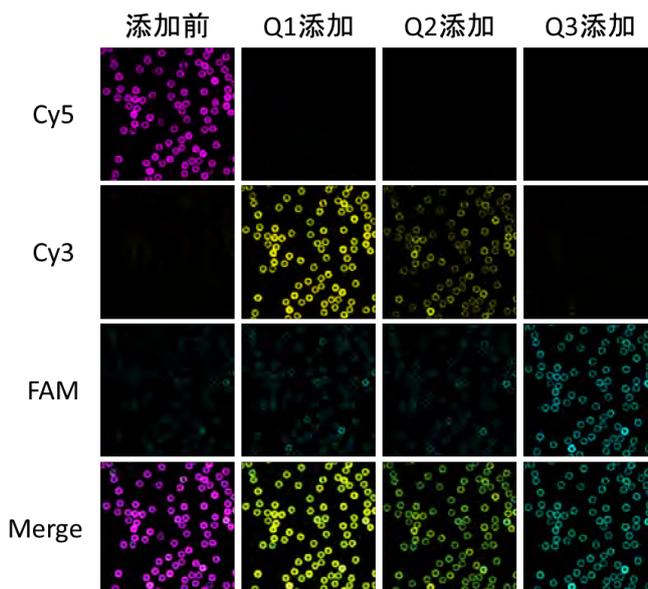


Fig. 3 蛍光バーコード修飾ビーズのイメージング

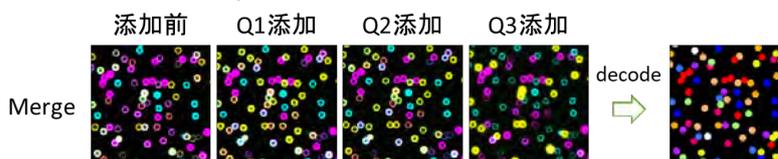


Fig. 4 9種類の蛍光バーコード修飾ビーズの同時イメージング

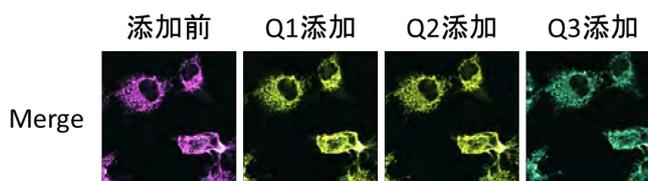


Fig. 5 蛍光バーコードの蛍光免疫染色への応用

## 理化学研究所 環境資源科学研究センター

## 分子生命制御研究チーム

## 化学の視点から食糧問題に挑む

理研チームリーダーの萩原伸也と申します。「ぶらり研究室の旅」第二回は、2018年4月に立ち上がった我々の研究室「分子生命制御研究チーム」を紹介させていただきます。

**植物科学とケミカルバイオロジー** 我々の研究の特色は、植物を題材としたケミカルバイオロジーを進めているところです。私と植物との出会いは、名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 (ITbM) に着任した2013年になります。ITbMは当時、植物科学と有機化学の融合により世界を変える新しい分子の発見を目指す世界トップレベル研究拠点 (WPI) として生まれたばかりでした。幸いなことに、私は伊丹健一郎拠点長の研究室に准教授として採用していただき、植物ケミカルバイオロジーの切り込み隊長 (自称) となりました。植物の知識が全くない素人の私でしたが、ITbMに集った植物科学者と毎日話すうちに、植物研究の虜になりました。

初めに引き込まれたのは、自分たちの合成した化合物の効果が目に見えることです。それまで培養細胞しか実験経験のなかった私にとって、個体レベルで“見える”表現型の変化は、毎日を興奮のつらさにしました。また、植物科学では遺伝学的手法が主として用いられ、様々な表現型を示す変異体が取られていることを知り、これを化合物で起こすのがケミカルジェネティクスなのかと、それまで漠然と捉えていたことが身近に感じられるようになりました。

とは言え、最初の頃に考えた研究は全般的を得ないもので、うやむやに消えていったテーマが殆どです。そんな中、光明を見出したのも、植物の専門家との会話からでした。植物ホルモンの1つ「ストリゴラクトン」や寄生植物を専門とする土屋さんがポロッと言った言葉「この受容体、ストリゴラクトンを加水分解するんです」。ストリゴラクトン受容体の発蛍光性センサーを思いついた瞬間です。それまで別のテーマをやっていた吉村君は、すぐさまこの仕事に取り掛かり、あれよと言う間に寄生植物ストライガのもつストリゴラクトン受容体の同定に結びつけました。この分子は、我ながら恥ずかしいくらい簡単な分子設計でしたが、アフリカで食糧問題を引き起こしていることや遺伝学を使えないというストライガの特徴と相まってITbMを代表する研究の1つになり、植物科学においてケミカルバイオロジーが非常に強力な手段になるという手応えを与えてくれました。

**新ラボの立ち上げ** さきがけ研究領域「フィールドにおける植物の生命現象の制御に向けた次世代基盤技術の創出」に参画させていただいたこともあり、ITbMで過ごした5年間で、研究所内にとどまらず幅広い分野の植物研究者と知り合うことができました。こうしたなか、おぼろげながら自分のやりたい研究の方向性が見えてきました。

植物科学における課題の1つは、交配にかかる労力と時間です。多くの場合、植物の新しい系統の作成や維持は、タネをとる事が基本となります。これは、実験用の遺伝子組換え植物の作成から、種苗会社で行う販売用品種の製造まで、ほぼ全ての植物に当てはまります。タネをとるためには、交配が必要で、そのためには花を咲かせる必要があります。植物によっては、ここに時間がかかります。特に果樹のような木本植物は、桃栗三年柿八年というように、花が咲くまでの幼若期間の長い種が殆どです。

この期間を（例えば3ヶ月くらいに）短縮できたら、基礎研究から新品種の創出まで、全ての事が今まで考えられないくらい加速するはずです。しかも、これは化合物で実現する必要があります。幼若期間は植物が成熟し、しっかりと実をつけるのに本来必要な時間であり、遺伝子操作により早熟にしてしまうと収穫に影響を与える可能性があります。すなわち、研究開発の段階でのみ化合物を投与する事で早咲きにする、まさに化合物の力が活きる領域と言えます。他にも育種や基礎研究において課題となっていることは多々存在しており、これらを解決する化合物を見つけることで、植物科学全般を加速させることができます。こうした研究は、気候変動に適応した植物を作出し、安定的に食糧を供給するうえで極めて重要です。そういうのも大事ですが、日々のモチベーションはもっと単純です。植物にかけただけで早く花が咲く分子、考えただけでもワクワクしませんか？ 数十年に一度しか咲かない竹やリュウゼツランの花がすぐに見られるかもしれません。

この様なやりたい研究の方向性が見えた時、好き放題やらせてもらった ITbM を卒業する時機の訪れを感じました。また、数年後にはやりたい事が変わっているかもしれませんが、その時はラボのメンバーと話し合いながら方向転換すれば良いといういいかげんな考えから、独立して自分の責任で研究を進める状況に身を置く必要性を感じました。ただ、ITbM でとても良かったのは出身分野の異なる研究者と毎日話ができる Mix Lab の仕組みで、新しくできるラボに来てくれるメンバーには、そういう環境を提供したいと強く思っていました。

ちょうどそんな折、理化学研究所でチームリーダーとしての機会を得ました。環境資源科学研究センターは、化学、ケミカルバイオロジー、植物科学の研究者が集まった組織で、まさに私にとって打って付けの場所です。理研に来てみて思ったのは、スタートアップの補助から日々の研究のサポートまで非常に充実していて、PI としての研究生活をスタートするのに抜群の環境だということです。大型予算をもたない若手が研究に集中してフルスイングするには最適ですので、ぜひ将来の選択肢に入れて頂きたいと思います。

幸いなことに、植物科学が専門の泉正範博士と中村咲耶博士、合成化学やケミカルバイオロジーが専門の草野修平博士と西山康太郎博士、名大から一緒に来てくれた山田遼太郎と加藤里佳という異分野からのスタッフ、ポスドク、学生が集まり、思い描いていた通りの研究チームが結成できました。このミニ Mix Lab の効果はすでに現れていて、お互いの良さを出し合って研究が予想もしなかった方向へどんどん膨らんでいくのを日々実感しています。できたてのピカピカのラボで、自ら合成した分子の生物活性を目で見て感じてみたい方、学生とポスドクは随時募集中です。見学だけでも結構ですので、ぜひ遊びに来てください。



連絡先：理化学研究所 環境資源科学研究センター

e-mail: [hagi@riken.jp](mailto:hagi@riken.jp)

住所：〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1 理化学研究所 生物科学研究棟 N401

電話番号：048-467-9772（直通）

ホームページアドレス：<http://molecular-bioregulation.riken.jp/index.html>

## 部会行事

## 第13回バイオ関連化学シンポジウム 開催報告

(第34回生体機能関連化学シンポジウム・第21回バイオテクノロジー部会シンポジウム)

東北大学多元物質科学研究所 和田健彦

東北大学大学院光学研究科 珠玖 仁

令和元年9月4日(水)～9月6日(金)の3日間、東北大学の青葉山南キャンパスにおいて第13回バイオ関連化学シンポジウム(第34回生体機能関連化学シンポジウム・第21回バイオテクノロジー部会シンポジウム)が開催されました。仙台・東北大学での開催は、2007年片平キャンパスで前身の生体機能関連化学シンポジウムを御世話させて頂いた以来で、12年ぶりとなります。同年は今回の実行委員長和田教授が東北大学に着任した年で有り、暦が一回りしたのと併せ感慨深い開催となりました。会場に関しては、バイオ関連化学シンポジウムとなり開催規模が大きくなったこと、地下鉄東西線も開通し交通の便も良くなったことから東北大学青葉山キャンパスに場所を移し、工学部中央棟付近の工学部大講義室、マテリアル理工系第1講義室、第3講義室、サイエンスキャンプホール(受付、ポスター会場、企業展示など)、青葉記念会館(会期中の各種会議など)、そして工学部中央棟大会議室(特別講演(市民公開講座など))にて実施されました。当日雨との予報で、降雨を想定して準備を進めましたが、幸いほとんど雨は降らず、かつ気温も程よい天候の下、初日を迎えることができ、2日目以降は暑いくらいの晴天に恵まれ、移動など大きな問題なく運営でき、世話人一堂ホッと致しました。

昨年度の大阪大学に比べ、交通の便が悪く、また近隣に企業研究所なども少ない地理的問題もあり、参加者の減少を心配致しましたが、事前登録353名、当日登録125名、招待・依頼講演14名、合計492名(うち学生219名)、両部会会員以外の実行委員47名を合わせると合計539名ものみなさまにご参加頂け、例年と同様の規模で開催することが出来ました。実行委員を代表して、参加頂いたみなさま厚く御礼申し上げます。今回、口頭発表110件、ポスター246件が3日間にわたって行われ、非常に活発なディスカッションが展開されました。また今回、最近参加研究室がほぼ定まっている傾向を打開し、新たな分野/研究室からの参加者の増加の切掛けになればとの思いから、実行委員会で検討を重ね、新しく依頼講演を中心とした3つのフォーカスセッションを設定しまし



メイン会場となった工学部中央棟



A会場での講演

た。今年度は、1. ゲノム編集最前線、2. 先端分光・分析技術を活用したバイオ関連化学最前線&量子アニーリング・AI を駆使したバイオ関連化学の将来、3. 最先端合成化学を駆使したバイオ関連化学最前線、です。依頼講演を中心としたものの、一般からの講演申込もあり、いずれも充実したプログラムとなりました。セッションによる多少のバラツキはあったものの、いずれも会場も聴衆が多く、活発な議論で盛り上がっておりました。来年度以降、フォーカスセッションでの講演者が引き続きバイオ関連化学シンポジウムに参加下さり、新しい共同研究やサイエンスが始まることを願っております。



B 会場での講演

さらに 3 日目午後には“生活そして社会を豊かにし、社会に貢献するバイオ関連化学最前線”と題する特別講演を市民公開講座として開催しました。極めて優れた研究成果を社会実装され、正しくタイトル通り、社会に大きく貢献下さっている東大院工 石原一彦先生、東大院理 菅 裕明先生、そして東北大学 末永智一先生にご講演頂き、230 名を超える参加を得ました。詳細は「生活そして社会を豊かにし、社会に貢献するバイオ関連化学最前線」市民講座開催報告をご参照下さい。

加えて、例年日本化学会春季年会時に併設開催され、今回 10 回を迎える Royal Society of Chemistry (RSC)-Chemical Society of Japan (CSJ) Joint Symposium を、今年度は第 13 回バイオ関連化学シンポジウムとの併設開催としてシンポジウム終了後の 9 月 7 日(土)には実施した。東北大学の片平キャンパス“片平さくらホール”を会場として、清中茂樹名古屋大学教授をリーダーとして基本、若手・中堅研究者を中心とした依頼参加形式とし、英国側から 7 名の参加者を得て開催した。シンポジウムは、通常の間頭発表と併せて、間頭発表者も含め参加者全員がポスター発表することを基本とされた。全員がポスタープレビューを行った後、ランチタイムも含め、会期中随時ポスター発表を行える環境を整え、お互いの研究内容を深く理解し、議論することで日英の若手・中堅研究者間に新しい Society 形成をし、将来的に研究者のグローバルな活躍につながる事を願っています。

また、二日目の夕刻から工学部中央棟生協食堂で懇親会を開催しました。招待講演、依頼講演の先生方も含め、200 名を超える多数のみなさまに参加頂き、お刺身、牛タンや笹かまぼこ、仙台風芋煮など仙台ならではの食材と東北地方の美味しい 11 種類の日本酒を楽しみながら、情報交換と交流を深めて頂きました。

本年度のバイオ関連化学シンポジウムでも、40 歳以下の博士号取得者を対象とした部会講演賞ならびに学生部会員を対象とした学生ポスター賞の審査が行われました。東大院生命理工教授 上野隆史審査委員長の下、厳正な審査を行っていただき、4 件の部会講演賞と 9 件の学生ポスター賞が選ばれました。候補の講演、発表いずれも非常にレベルが高く、審査結果は拮抗しており、両賞とも僅差での選定となったとお伺いしています。高い競争率と厳しい選考を



懇親会での部会講演賞ならびに学生ポスター賞授賞式の様子

経て受賞された先生方、学生さん、御受賞本当におめでとうございます。また、残念ながら受賞には至らなかった皆さんには、来年度のチャレンジをお待ちしています。懇親会では恒例の各賞の授与式が行われ、表彰状と副賞が授与されました。特に学生ポスター賞の上位3名にはイギリス化学会（RSC）から Organic & Biomolecular Chemistry 賞、Metalloinics 賞、そして Molecular Omics 賞が授与されました。審査を担当下さった先生方、若手の会の先生方、3賞の授与設定にご尽力頂いた RSC 浦上様に深く感謝申し上げます。

シンポジウム運営の観点からは、従来日本化学会事務局に御願いし、大きなご負担をお掛けしてきた発表申込・参加申込ならびに参加費・懇親会費収集と管理、参加証送付、そして予稿集原稿収納と印刷などのシンポジウム運営業務一式を、外部業者に委託可能かの検証に取り組みました。

日本化学会事務局保倉さんと打合せを重ね、バイオ関連化学シンポジウム以上の規模の学会実施実績のある複数業者に対するヒアリングも行った後、仕様書を作成し、入札を行った。その結果、関連国際学会などの運営実績を有し、評価も高く、業務委託経費も妥当な近畿日本ツーリスト北海道支社を業務委託先として選定し、運営業務を行って貰った。発表申込み、参加申込、要旨集原稿収納、要旨集編集ならびに印刷、要旨集広告受付ならびに企業展示、そしてシンポジウムホームページ作成などを担当頂き、日本化学会事務局への負担の大幅軽減とホームページへの協賛企業バナー広告の受付など、昨年度までのシンポジウムでは実現

できなかった新しい試みを実施することも出来、有益であったと感じている。

このように第13回バイオ関連化学シンポジウムは、前回の御世話から暦が一回りし、2011年の東日本大震災を経験したことを糧として、新しい時代のバイオ関連化学シンポジウムの創成に資するべく、いくつかの新しい企画を提案・実施することも出来出来たかと考えている。

シンポジウムならびに RSC-CSJ Joint Symposium 開催にあたり、多くの企業・団体より多大なご支援を頂きました。また、準備・運営などでは多くの実行委員の先生方ならびに実行委員の先生方の研究



ポスター会場の様子

室学生さん、そして日本化学会の保倉光邦様、櫻田恵美子様（主にジョイントシンポでは）に色々ご尽力頂きました。この場を借りて、心より御礼申し上げます。ありがとうございました。

来年度の第14回バイオ関連化学シンポジウムは、後藤雅宏先生（九州大学）、王子田彰夫先生（九州大学）の御世話で、令和二年9月7日（月）～9日（水）九州大学（馬出キャンパス）百年記念館で開催される予定です。福岡でみなさまにお会い出来、熱く議論できることを楽しみにしております。

### 第13回バイオ関連化学シンポジウム実行委員会 実行委員（敬称略）

実行委員長・和田健彦（東北大多元研）

実行副委員長・珠玖仁（東北大院工）

有本博一（東北大院生命）

石川稔（東北大院生命）

岩渕好治（東北大院薬）

上田実（東北大院理）

魚住信之（東北大院工）

梅津光央（東北大院工）

土井隆行（東北大院薬）

中山亨（東北大院工）

永次 史（東北大多元研）

西澤精一（東北大院理）

西澤松彦（東北大院工）

水上進（東北大多元研）

荒木保幸（東北大多元研）

伊野浩介（東北大院工）

鬼塚和光（東北大多元研）

梶弘和（東北大院工）

高岡洋輔（東北大院理）

松井敏高（東北大多元研）

岡村秀紀（東北大多元研）

小和田俊行（東北大多元研）

佐藤雄介（東北大院理）

梨本裕司（東北大院工）

西嶋政樹（東北大多元研）

稲垣雅仁（東北大多元研）

保倉光邦（日本化学会）

部会行事

生活そして人生を豊かにし、社会に貢献するバイオ関連化学最前線

The Forefront of Biorelated Chemistry for  
Life Innovation and Affluent Society Contribution

- 主催： 市民公開講座 「生活そして人生を豊かにし、社会に貢献するバイオ関連化学最前線」講演会実行委員会
- 共催： 東北大学多元物質科学研究所、ネットワーク型物質デバイス領域共同研究拠点、ダイナミックアライアンス、日本化学会、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、日本核酸化学会、日本化学会・フロンティア生命化学研究会、高分子学会バイオ・高分子研究会、東北大学大学院工学研究科
- 後援： 公益財団法人 仙台観光国際協会
- 開催日時： 令和元年9月6日(金) 13:30~17:30
- 場所： 東北大学青葉山キャンパス 工学部中央棟 2階大会議室&大講義室
- 申込方法・参加費： メールによる参加者情報送付(当日参加可能)・参加費無料

**主 題**：最先端科学・技術の推進は、学術的側面のみならず、安全・安心で快適な社会構築にとっても欠かすことの出来ない非常に重要な課題である。しかし学術研究の深化と尖鋭化が進み、その普及を目指す講演会でも専門性が高くなりがちで、一般の方々のみならず科学者であっても専門が異なると十分には理解出来ない場合もあり、その有効性の限界が指摘されている。超高齢化、グローバル化など大きな変革期を迎えた日本における科学技術イノベーション創造プロセス、特に2030年における科学技術イノベーション像を展望すると、オープンサイエンス化が世界的に浸透し、研究者等の専門家だけの営みにとどまらず、一般市民が参画した活動が必要不可欠になることが文部科学省科学技術白書にも明記されている。そのうえで、社会を変革するイノベーション創出には、生活現場の発想を取り込む「市民科学」の視点が重要であり、専門家と一般市民との新たな“協働の場”の創生と参画機会増加への取り組みの必要性が指摘され、生活現場に密接した先端研究成果に関する一般の方々の理解を進めるための分かり易い啓蒙的講演会などの企画・開催の有効性が提案されている。先端研究に対する理解が進むことで、多くの方々の興味が湧き、市民科学の推進、そして専門家との協働の実現、延いてはイノベーションが創出の可能性の高まりが期待される。

このような背景を踏まえ、今回公益財団法人仙台観光国際協会の後援を得て、第13回バイオ関連化学シンポジウム(第34回生体機能関連化学シンポジウム・第22回バイオテクノロジー部会)を利用し、一般市民の方々も含め、異分野研究者や学生さんなど、幅広い聴衆を対象とした生活に密接した先端研究の紹介、特にバイオ関連化学の先端研究とその応用に関する講演会を、東北大学多元物質科学研究所、ネットワーク型物質デバイス領域共同研究拠点、ダイナミックアライアンスの共催として、企画・開催した。



会場全景

プログラム(敬称略)

- 13:30-13:40 「趣旨説明」 東北大多元研 和田健彦
- 13:40-14:40 「基礎研究から医療現場に届いたポリマーバイオマテリアルの開発」  
東大院工 石原 一彦教授  
(生体親和性高分子材料の開発によりバイオ関連先端技術の限界を突破した開拓者)
- 14:40-14:50 休憩
- 14:50-15:50 「異端は認められた瞬間に先端に変わる」  
- 特殊ペプチド創薬イノベーション、創薬の革命 -  
東大院理 菅 裕明教授  
(バイオ関連先端研究により世界中の製薬企業に革新的薬剤開発戦略をもたらした革命児)
- 15:50-16:00 コーヒーブレイク
- 16:00-17:00 「COI東北拠点の取り組み: 健康幸福社会を実現するデータ・インテグレーション」  
東北大 イノベーション戦略推進センター 末永智一教授  
(バイオ関連先端研究により健康管理の常識を打ち破る日常人間ドックを目指す先駆者)
- 17:00-17:10 「総括」 東北大院工 珠玖 仁

演者プロフィール(抜粋):



石原一彦教授:

東京大学 教授 大学院工学系研究科 マテリアル工学専攻、バイオエンジニアリング専攻教授を併任、多数他大学客員教授等、ご専門:高分子科学、ポリマーバイオマテリアルの創製等、ご受賞:第2回日本医療研究開発大賞 厚生労働大臣賞、平成30年度全国発明表彰 経済産業大臣賞、平成29年度文部科学大臣表彰科学技術賞、平成27年度高分子学会賞、日本バイオマテリアル学会賞、米国バイオマテリアル学会クレムソン賞他多数。生体親和性の材料である MPC ポリマーを開発し、日油(株)での工業製造プラントの設立とバイオ・医療関連市場の開拓に尽力されている。



菅 裕明教授

東京大学 教授 大学院理学系研究科 化学専攻 ご専門:ケミカルバイオテクノロジー、触媒機能を有するRNA開発、特殊ペプチド創薬、ご受賞:2001年日本学術会議会長賞、2015年文部科学大臣表彰科学技術賞、2016年読売テクノ・フォーラム ゴールド・メダル賞、2016年マックス・バークマンメダル、2016年日本イノベーター大賞特別賞、2017年名古屋メダル賞シルバー、他多数:東証一部上場 バイオベンチャー企業「ペプチドリーム」の創始者。「特殊ペプチド」という創薬開発プラットフォーム技術を確立するため、20年以上研究し続け、このプラットフォーム技術で「日本発の新技术で世界初の創薬を」との夢を叶えるためペプチドリーム社を創業。現在新しい会社も設立され、ますます御活躍中。ペプチドリーム社は、2013年日本バイオベンチャー大賞、2014年ビジネスモデル大賞等受賞、革新的な独自技術で成長を続ける。



末永智一教授

東北大学イノベーション戦略推進センター 特任教授 COI 東北拠点 副拠点長・研究統括、東北大学 名誉教授 ご専門:マイクロ・ナノテクノロジーをベースとし、環境、医療、食品などの分野で使用できるバイオセンシングデバイスやシステムの開発、バイオイメージング等、ご受賞:2011年電気化学会 電気化学会論文賞、2011年日本化学会 日本化学会学術賞、2006年、電気化学会 電気化学会技術賞、2002年電気化学会 電気化学会学術賞他多数  
センター・オブ・イノベーション・プログラム研究統括として、さりげないセンシングと日常人間ドックを実現する自動と共助の社会創成を目指した研究を推進されている。

令和元年9月6日(金) 13時半から、市民公開講座 「生活そして人生を豊かにし、社会に貢献するバイオ関連化学最前線」講演会実行委員会主催、東北大学多元物質科学研究所、ネットワーク型物質デバイス領域共同研究拠点、ダイナミックアライアンス、日本化学会、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、日本核酸化学会、日本化学会・フロンティア生命化学研究会、高分子学会バイオ・高分子研究会、東北大学大学院工学研究科共催、公益財団法人 仙台観光国際協会後援で、「生活そして人生を豊かにし、社会に貢献するバイオ関連化学最前線」講演会を、東北大学工学部中央棟大会議室ならびに大講義室で開催した。

本講演会は主題にも記載したように、2030年における専門家と一般市民との新たな“協働”による「市民科学」の視点に基づく科学技術イノベーション創造プロセスの実現を見据え、生活現場に密接した先端研究成果に関する一般の方々の理解を進めるための分かり易い啓蒙的講演会として、第13回バイオ関連化学シンポジウムを利用して、一般市民の方々も含め、異分野研究者や学生さんなど、幅広い聴衆を対象とした生活に密接した先端研究の紹介、特にバイオ関連化学の先端研究とその応用に関する講演会の開催を目指して、東北大学多元物質科学研究所、ネットワーク型物質デバイス領域共同研究拠点、ダイナミックアライアンスなどの共催を得て、企画・開催したものである。

いずれも先端研究のみならず、研究成果の社会実装を実現されている3名の先生方に御出講を御願いました。生体親和性の材料であるMPCポリマーを開発し、日油(株)での工業製造プラントの設立とバイオ・医療関連市場の開拓に尽力されている東京大学大学院工学研究科 石原一彦先生、「特殊ペプチド」という創薬開発プラットフォーム技術の確立するため、20年以上研究し続け、このプラットフォーム技術で「日本発の新技术で世界初の創薬を」との夢を叶えるためペプチドリーム社を創業された後、現在新しいベンチャー起業も設立され、ますます御活躍中の東京大学大学院理学研究科 菅 裕明先生、そしてインター・オブ・イノベーション・プログラム研究統括として、さりげないセンシングと日常人間ドックを実現する自動と共助の社会創成を目指した研究を推進されている東北大学イノベーション戦略センター 末永智一先生に御願いました。前日まで京都での国際会議基調講演を行われ、翌日からは海外出張に出かけられる超過密なスケジュールを縫って御出講頂いた菅先生をはじめ、3名の先生方とも超ご多忙な予定を調整頂き御講演頂くことが出来た。

東北大学広報、東北大学多元物質科学研究所広報情報室、仙台観光国際協会などの御協力を得て、ホームページ、Facebook、インスタグラムなどSNSや、仙台駅でのメッセージボード、「まなびのめ」などに会告を掲載頂いたことも効を奏し、230名を超える非常に多数の参加者を得て、開催することが出来た。メイン会場として準備した180名収納可能な東北大学工学部中央棟2階大会議室では収まりきれず、インターネット中継により同じく工学部中央棟2階の大講義室も会場として利用し、配付用資料リーフレットも急遽追加印刷せざるを得ない嬉しい悲鳴を上げながらの実施となった。

実行委員会の和田委員長による開会挨拶ならびに企画の趣旨説明に引き続き、プログラムに従いコーヒーブレイクをはさみながら、石原一彦先生、菅 裕明先生、そして末永智一先生にご講演頂いた。石原先生からは、抗血栓性材料を目指したMPCポリマー開発研究と臨床実験など基礎的機能開発研究、そして現在コンタクトレンズや化粧品にまで活用されているMPCポリマーの社会実装にいたる研究展開をいくつかの逸話を交えて分かり易くそして楽しくご講演頂いた。菅先生からは、30代から「特殊ペプチド」という創薬開発プラットフォーム技術の確立を強く意識し、それを実現する為にリボザイムと呼ばれるRNA酵素の開発、そして非天然アミノ酸を組み込んだ簡便かつ効率的なペプチド合成法の確立、さらにペプチドを環状化することにより画期的に生理活性向上に成功した「環状特殊ペプチド」系の確立など、アメリカにおける研究開発経験も交え、まさに「異端は認められた瞬間に先端が変わる」との極めて魅力的なコンセプトを平易な言葉とご経験に基づく聴衆の心に響く逸話を交えて楽しくご講演頂いた。末永先生か

らは、さりげないセンシングと日常人間ドックを実現する自動と共助の社会創成を目指したセンター・オブ・イノベーション・プログラム研究統括としてのご研究を日常の生活のなかでの問題点とその解決を相関させて下さいながらとても分かり易く、かつその有用性を実感させて頂きながらご講演頂けた。

3名の先生方、みなさま世界最高の研究ご業績とその社会実装を実現された卓越された研究者としてのみならず、極めて魅力的な人間性と優れた話術で聴衆を魅了して下さった。市民講演会でありながら、質疑応答も活発で各先生 1 時間のご講演時間でも十分ではなく、コーヒーブレイクなども活用されていたことが印象的であった。このようにアツというまに時間が過ぎ、予定時間をオーバーするほど、非常に充実した講演会となった。

本シンポジウム開催にご尽力頂いた関係者のみなさま、力強くサポート頂いた東北大学多元物質科学研究所ならびに共同研究拠点、ダイナミックアライアンス事業に深く感謝致します。

市民公開講座 「生活そして人生を豊かにし、社会に貢献するバイオ関連化学最前線」  
講演会実行委員会 委員長  
東北大学多元物質科学研究所  
和田 健彦



石原一彦先生ご講演



菅 裕明先生ご講演



末永智一先生ご講演



質疑応答の様子

部会行事

「第13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34回生体機能関連化学シンポジウム・第22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 上野隆史  
東京工業大学生命理工学院

2000年に始まって、今年で第20回を迎えた講演賞には、例年同様25名の多くの若手研究者にエントリーして頂きました。シンポジウム初日に、講演賞規定にしたがって、3つの講演会場で8名の審査員による厳正かつ公平な審査が行われました。審査方法としては、1) 研究テーマの設定、独創性、2) 実験データの質・量・解析、3) 結論の妥当性・新規性、4) 発表・発表資料のわかりやすさ、5) 質疑応答の5項目が採点され、合計点の上位から下記の4名が講演賞受賞者として選出されました。毎年なのですが、いずれの研究もレベルは高く、甲乙つけ難い内容であり、選に漏れた方も可能であれば再挑戦することをお勧めしたいと思います。4名の受賞者は、上記5項目に関して、概ねいずれも高い点数を獲得していましたが、今年度は特に1、次に2と3の項目で点差がついているようでした。1は研究立案のフィロソフィーに関するもので、この部分の説明で研究そのものの独創性はもちろん、発表者がどの程度PIから独立して自身で推進している研究であるかが露わになり、ここで審査員を惹きつけなければ他の点数にもプラスにはたらくのかも知れません。将来の生体機能関連化学を担う世界的な人材育成を目指す本講演賞の趣旨を最も確実に担保する項目であり、今後、意義ある研究を推進するために最も重要な視点だと思います。

受賞者の方々には心からお祝いを申し上げます。また、応募者の皆さんの素晴らしい研究と講演に対して敬意を表するとともに、このような機会がその他の多くの若手研究者の皆さんの今後ますますの活躍に繋がればと願っております。

部会講演賞受賞者（敬称略、発表順）

高岡 洋輔 東北大学大学院理学研究科・講師

植物ホルモン共受容体サブタイプ選択的アゴニストの開発と植物免疫制御

寺 正行 東京農工大学大学院工学府・特任准教授

核酸の代謝的ラベル化と近接効果を利用した高速クリック試薬の開発

村山 恵司 名古屋大学工学研究科・助教

非環状型人工核酸 aTNA の高速かつ高効率な鋳型特異的ケミカルライゲーション法の開発

森本 淳平 東京大学大学院工学系研究科・助教

主鎖アラニン型ペプチドの配座安定性評価と生体分子認識への応用

ポスター賞審査の準備は東北大学の小和田先生を中心とした生体機能関連化学部会およびバイオテクノロジー部会の若手の会幹事で行い、同賞にエントリーした91名のポスター発表が、両部会に所属する53名の若手研究者により厳正に（1件あたり3名の審査）審査されました。優れた発表が多く、1点差を争う極めて厳しい審査になりましたが、上位9名をポスター賞としました。明確なプレゼンテーション、しっかりした質疑応答が評価されたようです。このうち上位3名には、RSC (Royal Society of Chemistry) 協賛により Organic & Biomolecular Chemistry 賞、Molecular Omics 賞、および

Metallomics 賞として表彰されました。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。

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53名の若手の先生方のご協力に心より感謝申し上げます。

ポスター賞受賞者（敬称略、五十音順）

妹尾 暁暢（東大院工）、江口 晃弘（東大院工）、沖 超二（名工大院工）、嘉村 匠人（熊大院先端）、\*1 坂本 眞伍（東大院薬）、\*2 白岩 和樹（京大院工）、\*3 中根 啓太（東工大化生研）、藤田 恭平（東大院医）、牧野 航海（名大院工）

\*1 Molecular Omics 賞、\*2 Organic & Biomolecular Chemistry 賞、\*3 Metallomics 賞

部会講演賞受賞者



ポスター賞受賞者



お知らせ

 第13回バイオ関連化学シンポジウム講演賞・ポスター賞

部会講演賞受賞者

高岡 洋輔	東北大学	大学院理学研究科	植物ホルモン共受容体サブタイプ選択的アゴニストの開発と植物免疫制御
寺 正行	東京農工大学	大学院工学府	核酸の代謝的ラベル化と近接効果を利用した高速クリック試薬の開発
村山 恵司	名古屋大学	大学院工学研究科	非環状型人工核酸 aTNA の高速かつ高効率な鋳型特異的ケミカルライゲーション法の開発
森本 淳平	東京大学	大学院工学系研究科	主鎖アラニン型ペプチドの配座安定性評価と生体分子認識への応用

ポスター賞受賞者

妹尾 暁暢	東京大学	大学院工学系研究科	小分子リガンドによる細胞接着蛋白質P-カドヘリンの分子間相互作用制御と構造情報に基づくリガンド設計
江口 晃弘	東京大学	大学院工学系研究科	線維芽細胞増殖因子受容体の活性化を制御する機能性核酸の開発
沖 超二	名古屋工業大学	大学院工学研究科	photoSLIPTによる細胞内分子の光操作と多色イメージング
嘉村 匠人	熊本大学	大学院先端科学研究部	RNA 高次構造形成に基づく新規遺伝子発現制御技術の開発
坂本 眞伍*1	東京大学	大学院薬学研究科	1分子酵素活性プロファイリングによる疾患関連酵素の超高感度検出
白岩 和樹*2	京都大学	大学院工学研究科	リガンド指向性化学による NMDA 型グルタミン酸受容体の選択的なラベリング
中根 啓太*3	東京工業大学	化学生命科学研究所	Ru 光触媒担持アフィニティービーズを駆使した抗体のFc 領域選択的化学修飾の開発
藤田 恭平	東京大学	大学院医学系研究科	糖分解酵素活性検出蛍光プローブ群の開発と悪性及び良性腫瘍特異的蛍光イメージングへの応用
牧野 航海	名古屋大学	大学院工学研究科	生体分子の網羅的イメージングを可能とする蛍光バーコードの開発

\*1 Molecular Omics 賞、\*2 Organic & Biomolecular Chemistry 賞、\*3 Metallomics 賞

おめでとうございます。



お知らせ

## 生体機能関連化学部会ロゴ決定

生体機能関連化学部会のロゴが決定しました。2019年5月31日締め切りで会員の皆様から広くロゴマークの案を募集し、部会役員での投票により決定となりました。ロゴを以下に載せます。

ロゴは BioFunctional Chemistry の B, F, C から構成されています。円は生体機能分子の一つであるタンパク質を表現し、Bの結合部位（鍵穴）にFとCからなる化合物（鍵）が結合しています。

「ロゴ原案提案者：国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 中西郁夫 氏」



Division of BioFunctional Chemistry 小サイズ

中西郁夫先生（左）、伊東忍部会長（中央）、和田健彦副部会長（右）



Division of  
**BioFunctional Chemistry**  
The Chemical Society of Japan

英語



日本化学会  
**生体機能関連化学部会**

日本語

お知らせ

## 第 14 回 バイオ関連化学シンポジウム

— 第 35 回 生体機能関連化学シンポジウム・第 23 回 バイオテクノロジー部会シンポジウム —

**主催：**日本化学会生体機能関連化学部会・日本化学会バイオテクノロジー部会

**会期：**令和2年9月7日（月）～9月9日（水）

**会場：**九州大学医学部百年記念講堂（福岡市東区馬出3丁目1-1）

<https://www.med.kyushu-u.ac.jp/100ko-do/>

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

**発表形式：**口頭発表・ポスター発表

**発表、参加予約申し込み、参加費等：**確定後にシンポジウム HP にて公表予定。

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

**ポスター発表：**1日目および2日目

**口頭発表：**全日、15分間発表および5分間質疑応答

（口頭発表は原則として1研究室1件まで。ただし申し込みは2件まで可）

**懇親会：**9月8日（火） 会場、参加費等の詳細は確定後にシンポジウム HP にて公表予定。

**問い合わせ先：**〒819-0395 福岡市西区元岡7-4-4番地 後藤・神谷研究室内

第14回バイオ関連化学シンポジウム事務局 TEL (092) 802-2810

E-mail: m-goto@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp



ニュースレター Vol. 34, No. 2 2019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/>  
mail to : [seitai@chemistry.or.jp](mailto:seitai@chemistry.or.jp)

編集委員: 山東 信介、村上 裕、人見 穰

