

Newsletter



日本化学会
生体機能関連化学部会

巻頭言

AWAY が HOME になるとき	大神田淳子	2
-------------------	-------	---

追悼文

村上幸人先生を偲んで	久枝良雄	4
------------	------	---

Award Accounts 部会講演賞

金属イオン活性型 <i>in situ</i> クリック反応による KDM5C 阻害薬の同定	伊藤幸裕	6
寄生・共生菌由来リポ多糖部分構造の化学合成と免疫調節機能の解明	下山敦史	12
抗リウマチ薬メトトレキサートと マクロファージ遊走阻害因子の相互作用解析	松村洋寿	16

Award Accounts ポスター賞

ペプチド-蛍光プローブ共集合体を用いた 細胞内取り込みにおける形状依存性の評価	大林洋貴	22
低分子リガンドに特異的に結合する人工抗体の創製	都築成晃	24
Microcavity array を用いた単一細胞変形能計測に 基づくがん細胞プロファイリング法の確立	永田涼子	26
<i>In vivo</i> で骨細胞の機能を可視化する pH 感受性蛍光プローブの開発	橋本 龍	28
タンパク質ケージの内部空間設計による芳香族クラスターの構築	菱川湧輝	30
脳内における内在受容体の固定駆動ラベリング	美野丈晴	32

ぶらり研究室の旅

愛媛大学 プロテオサイエンスセンター生体分子工学部門（小川研） 30 歳単身から始めた地方での研究室運営十数年	小川敦司	34
--	------	----

部会行事

第 14 回バイオ関連化学シンポジウム開催報告	後藤雅宏・王子田彰夫・神谷典穂	36
第 14 回バイオ関連化学シンポジウム講演賞・ポスター賞講評	上野隆史	38

お知らせ

第 14 回バイオ関連化学シンポジウム講演賞・ポスター賞	40
第 15 回バイオ関連化学シンポジウム会告	41

巻 頭 言

AWAY が HOME になるとき

信州大学学術研究院（農学系）

大神田 淳子



農場通い

COVID-19 の影響でキャンパスが静まり返ってしまった 2020 年の春、ぼんやり考えごとをしながらひとりで毎朝農場通いをしていた。4 月の伊那谷はまだ肌寒く、フリースを羽織ってラボから徒歩 10 分ほどの農場に向かう。森を抜ける途中でキツネに出会うこともある。農学部へ赴任して 4 年が経ち、最近ふとした思いつきをきっかけに植物を研究することになった。実験材料として使わせてもらう栽培作物を同僚のハウスで世話をするのが日課となったのだが、水は撒けばよいというものではなく、植物の状態を見て水やりの加減を変えないと成長に悪影響を及ぼしかねないことなど知らなかった。"AWAY"での実験が始まった。

懐に入ってわかること

分野を跨いで AWAY に踏み込むと、その道のプロに助けてもらいながら素人としてスタートを切ることになる。念入りに準備したつもりでも失敗が続き、周囲に迷惑をかけたことは一度や二度ではない。知識も経験も足りないからいつもお尻に火が付いたように駆け回ることになる。一方で、現場に身を置き、その場所の空気を吸って手を動かすことで、知識や技術を取得するだけではなく、初めて見えてくるものがある。それは慣れ親しんだ HOME グラウンドからフィルターを介して見えていたものとは明らかに違うものだ。それは何か。おそらくそれは新しい価値観のようなものではないかと思う。ひょっとすると知り得なかったかもしれない価値への気づきは新しい理解と受容を生む。受容は協働に繋がり新しい可能性を示してくれる。懐に入ることでもたらされる気づきはどこか温かさを伴う。それは研究が（研究だけではないですね）人によってなされ、人とともに日々進歩している証なのかもしれない。

AWAY と HOME の意味を教えてくれた移民の国

AWAY を多く経験していると、若いころは自分の HOME グラウンドはどこなのか、そもそも HOME とは何かと考えることがある。私の場合、かつてのアメリカの同僚たちにこの問いに対するヒントを教えられた気がしている。彼らのファミリーヒストリーは実に多様なのだが、そのなかに母国の内戦や迫害から逃れて移住してきた友人たちがいた。「（母国を離れる）両親の決断が自分と弟妹の命を繋げた」という重い話を私よりも若い子たちが淡々と話す。平和な日本の暮らししか知らない私はただ黙って聞き入ることしかできなかった。でもアメリカで生きる覚悟と民族の誇りに満ちた彼らの表情はいつも明るい。地に足をつけて日常を生きる姿は逞しい。後に、その強さの根源は、彼ら自身のなかに確固として息づいている HOME なのだということが分かった。どこに行っても私は私。私のなかに培われたものだけが誰にも奪うことができない HOME そのものだ。

AWAY が HOME になるとき

季節が巡って信大の農場にも冬がやってきた。温室では今もコマツナが寒さに耐えながら育っている。農業に 40 年以上の経験を持つ同僚がときどき覗き込んで、「ちょっと酸欠だ」「微量元素欠乏

症かもしれない」とコメントをくれる。それらを改善してみると瞬く間に元気になる。すると今度は「いい顔をしているな」と声をかけてもらえる。植物の表情を読み取って状態を判断できる農業従事者はまるで医療従事者のようだ。実に奥が深い。

AWAY に身を置けば心細い思いをすることもある。AWAY ならではの緊張感や人との距離感にも影響する。しかし HOME 特有の居心地の良さを享受しうる環境では働きにくい一種の研ぎ澄まされた感覚は、思いもよらない発見や他者との結びつきをもたらしてくれる。そしてその過程で起こった悲喜こもごもの出来事の記憶とともに自らの内に深く刻まれてゆく。スタッフのいない信大にラボを構えすべてをひとりでこなさなければならなくなったとき、地方国立大学でもケミカルバイオロジーをやるのだと学生に宣言したとき、私のなかに幾重にも雑多に存在していた AWAY での経験がいつのまにか自分の HOME として結実していたことを実感した。残り 10 年、この原点を礎に世界に向けた情報発信に挑んでゆく。いつか引退後に米国の旧友たちに再会出来たら、あのときのようにサミュエルアダムスの 6 本パック^(注)を抱えて AWAY と HOME の話をしてみたい。ああでもそんなに呑めなくなる歳になるのかな!?

注) ボストンのラガービール。アメリカのビールは 6 本単位(6 pack)で売られているのが一般的。東海岸に行く機会があれば是非お試しあれ。おすすめです。



追悼文

村上幸人先生を偲んで

九州大学理事・副学長 久枝良雄

生体機能関連化学および錯体化学の分野で多大な貢献をされた村上幸人先生が、2020年(令和2年)9月22日にご逝去されました(享年88歳)。村上先生は日本化学会・生体機能関連化学部会設立時のメンバーであり、向山光昭先生、田伏岩夫先生の後を継いで第3代部会長をお務めになり、本会の運営に尽力されました。部会設立の経緯については、部会設立20周年特集として村上先生が執筆(改訂・再録)しておられるので、News LetterのVol.21, No.4(2007年2月28日号)をご覧ください。

村上先生は厳しい指導者として有名でありましたが、非常に面倒見の良い先生で、卒業後もよく門下生の相談にのっておられました。お酒が大好きで、飲むと人柄が非常に丸くなり、カラオケもお好きで「昴」を愛唱されておられました。お酒を飲みながら夢を語り、門下生に対して幾度となく激励してくださったことを懐かしく思い出します。ご退官後はご友人や門下生達とお酒を飲むことを楽しみにされておられました。

現在の部会会員の中には村上先生をご存じない若い先生も多いので、村上先生について少し紹介させていただきます。村上幸人先生は、1954年(昭和29年)3月九州大学工学部応用化学科を卒業後、1956年(昭和31年)3月九州大学大学院工学研究科応用化学専攻修士課程を修了されました。フルブライト奨学生に採用され、錯体化学で有名なArthur E. Martell先生(当時、米国クラーク大学大学院化学科)の研究室に留学され、1959年(昭和34年)6月にPh.Dを取得されました。その後、1959年(昭和34年)10月に九州大学工学部助教授に就任し、1969年(昭和44年)12月同教授に昇任され、合成化学科第二講座(酵素及び触媒化学)を担当されました。1993年(平成5年)6月九州大学有機化学基礎研究センターに異動し、工学部教授を併任され、1995年(平成7年)3月に定年により九州大学を退官するまで教育と研究に専念され、九州大学名誉教授の称号を授与されました。また、九州大学を退官後も熊本工業大学(現崇城大学)客員教授として教育に尽力されました。

村上先生は、生体機能を分子レベルで解明し、その機能の人工的再現、さらには生体を超える機能の発現を目指す生物無機化学及び生物有機化学の発展に尽力し、多くの貢献をなされました。特に精力を傾注されたのは、人工酵素並びに人工レセプターの開発に関する研究であります。極めて優れた酵素の触媒機能にいち早く着目し、分子レベルで捉えた酵素の化学的機能をもとに数多くの人工酵素を開発されました。多くの酵素はタンパク質部分からなるアポ酵素と、共同因子としての補酵素が複合化されたホロ酵素として存在しています。補酵素であるビタミンB₆やビタミンB₁₂の機能を生物無

機化学・生物有機化学的視点から解明するとともに、種々の補酵素モデルを開発されました。また、アポ酵素としての機能発現における疎水性場効果の重要性を唱え、生物有機化学に立脚した独自の分子設計により、アポ酵素モデルとしてのマクロ環化合物及び合成ペプチド脂質二分子膜を開発されました。これらの補酵素モデルとアポ酵素モデルを組み合わせて構成される人工ホロ酵素は、酵素機能のシミュレーションにとどまらず、天然酵素を超える触媒機能を発現することを明らかにされました。さらに、生体内の情報伝達に関与するレセプターの機能解明にも着目し、優れた分子認識能を発現する人工レセプターを数多く開発されました。これらの成果は、超分子化学という新しい化学の研究分野の確立に貢献するとともに、国内外で高く評価され、その発表論文は 250 編、総説・著書は 100 編を超えています。これらの功績により、1965 年（昭和 40 年）度日本化学会進歩賞、1987 年（昭和 62 年）度日本化学会賞を受賞されました。2010 年（平成 22 年）には瑞宝中綬章を授与され、2020 年（令和 2 年）に正四位に叙せられました。また、日本化学会生体機能関連化学部会長の他、日本化学会理事・監事、近畿化学協会理事などを歴任し、学協会の発展にも寄与されました。

ここに、先生のご業績を偲び、謹んで心からご冥福をお祈り致します。



金属イオン活性型 *in situ* クリック反応による KDM5C 阻害薬の同定

大阪大学産業科学研究所
伊藤 幸裕



著者紹介：

略歴 2008 年 名古屋市立大学大学院薬学研究科 博士前期課程修了（宮田直樹研究室）
2011 年 東京大学大学院薬学系研究科 博士後期課程修了 博士（薬学）（橋本祐一研究室）
2011 年 スクリプス研究所 博士研究員（Dale L. Boger 研究室）
2012 年 京都府立医科大学大学院医学研究科（鈴木孝禎研究室）
2020 年 大阪大学産業科学研究所（鈴木孝禎研究室）

趣味 読書、将棋（将棋は今年始めました；約 30 年振りに指したところ、ハマってしまいました）

「専門は何か？」と問われれば、私は、メディシナルケミストリーと答えます（付度して、有機化学やケミカルバイオロジーなどと答えるときもありますが…）。これは、学生時代から現在にかけて、メディシナルケミストリーを専門とする宮田直樹先生、橋本祐一先生、鈴木孝禎先生の 3 名の先生の指導を仰ぎ、そして、この分野の究極のゴールと言える創薬に夢を抱いているからです。ただし、実際に私が行っているメディシナルケミストリー研究は、医薬品開発からは遠く離れた、化合物の探索段階です。しかも、製薬企業が行うそれとは少し違います。大学教員らしく、新しい方法論・これまでにないアプローチを提案し、自ら活用することで将来の創薬につながるような「薬の種」を見つけようと、日々研究に勤しんでいます。

1. はじめに

創薬標的に強く作用する化合物を探索することが、創薬研究の第一歩である。しかし、この作業は通常困難を伴うものであり、特に *de novo* で創薬研究をスタートさせる場合、一筋縄ではいかない。一般的な創薬研究では、化合物ライブラリーのスクリーニングを行うことでヒット化合物を取得し、ヒット化合物を基に、structure-based drug design (SBDD) や ligand-based drug design (LBDD) による構造展開を経て、所望の化合物を見出すことが定跡（将棋では「定石」ではなく、「定跡」と書きます）とみなされている。しかし、定跡とは言うものの、この作業には大変な労力と時間、コストを要する。実際には、数十万～数百万種といった化合物ライブラリーのクリーニングを行い、数十～百種程度のヒット化合物を得て、その中から候補化合物を選定し、その類似化合物を広範に一つ一つ合成・活性評価を行うといったプロセスとなる。これだけでも骨の折れる大変な作業であるが、創薬リードから医薬品開発を目指すとなれば、毒性や薬物動態などを意識した更なる構造展開を行わなければならない。一般に、1 つの医薬品を開発するのに 3 万種以上の化合物を合成し、評価をする必要があると言われている。このように、創薬研究は途方もない道のりを歩むものである。したがって、創薬研究を加速化させ、効率的に行うことが常に求められる。そのためには、定跡に頼るだけでなく、常に新しい発想を持って創薬研究を進めることが重要だと我々は考えてきた。

このような考えの下、我々はクリックケミストリーを利用したライブラリー構築とそれに基づく創薬研究を展開し、効率的に創薬リードとなる化合物を見出してきた¹。その一連の研究の中で、最近、標的タンパク質上の金属イオンによって活性化される *in situ* クリックケミストリーという方法を考案し、これを利用することで、がんやうつ病治療薬の創薬標的として期待されるリシン脱メチル化酵素 5C (KDM5C) に対する阻害薬を素早く見出すことに成功した²。本稿では、クリックケミストリーの概要から金属イオン活性型 *in situ* クリックケミストリーの発想に至った経緯とそれを利用した KDM5C 阻害薬の同定について概説する。

2. 金属イオン活性型 *in situ* クリックケミストリーの発想に至った経緯

クリックケミストリーは、2 つもしくはそれ以上の化合物を連結させる反応を利用して機能性分子を合成する手法・概念のことを指す³。連結反応に頻用される反応はアジド-アルキン環化付加反応 (AAC) である。この反応は、加熱条件下では *anti*-および *syn*-トリアゾールの混合物を、室温下でも進行する一価銅触媒存在下では *anti*-トリアゾールを優先的に与える (図 1A) ⁴。

クリックケミストリーの応用の一つとして *in situ* クリックケミストリーが挙げられる、これは、タンパク質上で連結反応を起こし、生成する連結化合物をそのタンパク質に結合する分子として同定する方法論である⁵。例えば、創薬標的となる酵素を本法で利用すれば、連結化合物がその酵素の阻害薬になることが期待される。以下、AAC を用いる *in situ* クリックケミストリーを例として、その概略を説明する (図 1C)。まず、多数のアルキンとアジドを用意し、それらをタンパク質と混ぜ合わせる (この場合、銅触媒は用いない)。このうち、タンパク質がもつ特有なポケットに結合するアルキンとアジドが存在し、かつ、そのアルキン構造とアジド基が互いに近接する場合、近接効果が働き、両化合物間で AAC が進行する。生じたトリアゾールはタンパク質の 2 つのポケットに作用すると考えられる。そこで、質量分析法を用いて、生成したトリアゾールの構造を決定すれば、それがそのタンパク質の結合分子として同定されることになる。なお、アルキンとアジドがタンパク質に結合しない場合やアルキ

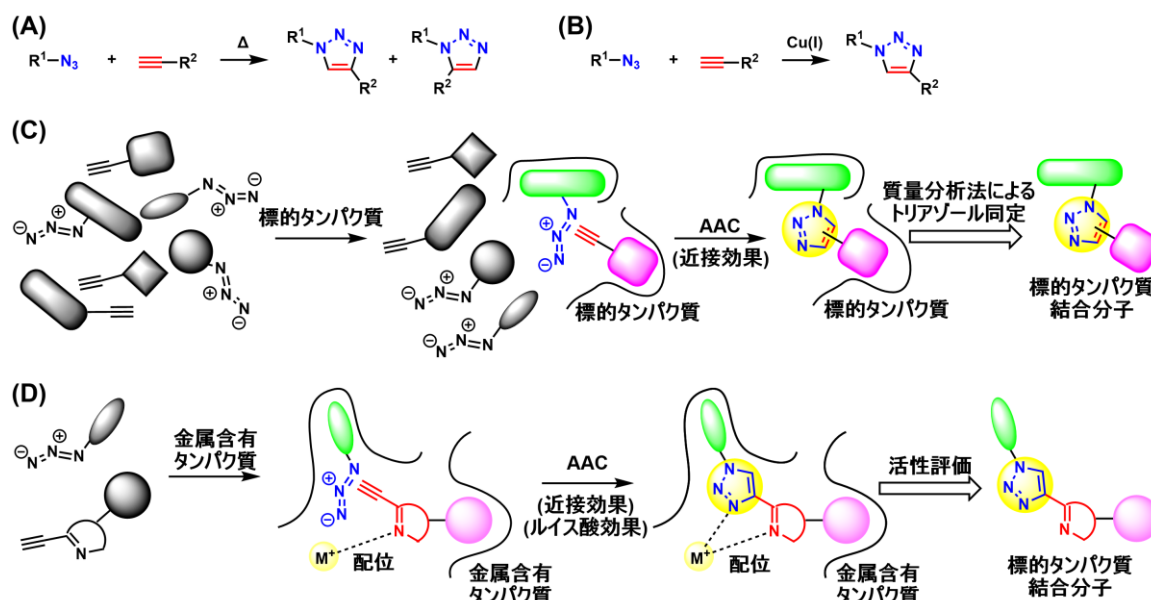


図 1. アジド-アルキン環化付加反応 (AAC)。(A) 触媒非存在下における AAC。(B) 一価銅触媒存在下における AAC。(C) *in situ* クリックケミストリー (標的タンパク質上での AAC)。(D) 標的タンパク質上の金属イオンによって活性化される *in situ* クリックケミストリー。

ン構造とアジド基が近接しない場合、トリアゾールは生成せず、これらの組み合わせからなるトリアゾールは標的タンパク質の結合分子とはならないと想定される。この方法を使って、これまでにアセチルコリンエステラーゼ阻害薬など、様々な化合物が見出されてきた⁶。しかし、本法で生じるトリアゾールは、タンパク質に対して1%未満と言われており、極めて微量である。したがって、生成物の同定には感度が優れた質量分析法を利用せざるをえず、感度の劣るタンパク質機能を基にした活性評価法は利用されてはこなかった。活性評価法が利用できないことは、同定された生成物のタンパク質結合活性が必ずしも高くないという問題を引き起こしてしまう⁷。この課題に対しては、活性評価法に基づくスクリーニングを通してトリアゾール同定ができるが必須であり、そのために、AACを効率よく進行させ、生じるトリアゾール量を増加させること、そして、そのトリアゾールに確実に活性を持たせることが必要であると我々は考えた。

こうした背景の下、我々は、標的タンパク質自身が持つ金属イオンによってAACを促進できないかと考えた(図1D)。そこで、アルキンとして、2位にアルキン構造を持つ含窒素ヘテロ環化合物を利用することを思い至った。このアルキンは、標的タンパク質上の金属イオンに配位すると、ルイス酸性の効果によりアルキン部分の電子密度が下がり、AACを促進できると期待した。さらに、標的タンパク質に結合したアジドとの反応により *anti*-トリアゾールが生じれば、これは単に標的タンパク質のポケットに納まるだけでなく、金属イオンに対して二座配位することができるため、標的タンパク質に強力に結合すると想定した。これにより、タンパク質の機能に基づく活性評価法を適応でき、高い活性を持つトリアゾールが同定できると考察した。そこで、このアイデアの下、KDM5C阻害薬の同定を試みる研究を展開した。

3. KDM5C 阻害薬の同定

KDM5Cは、Jumonji Cドメインを有する酸化脱メチル酵素の一つであり、 Fe^{2+}/α -ケトグルタル酸を補酵素とする⁸。KDM5CはヒストンH3の4番目のリシン残基のトリメチル化体(H3K4me3)やジメチル化体(H3K4me2)を基質とし、様々な遺伝子の発現制御に関わっている。特に、KDM5Cは前立腺がん細胞での発現が高いとされ、その生育に関与していることから、前立腺がんの分子標的として興味深い⁹。また、我々が独自に調査を行ってきたところ、KDM5Cの機能阻害が、うつ様作用の改善を促すことがわかり、KDM5Cはうつ病治療の創薬標的としての可能性もあることがわかってきた¹⁰。しかし、KDM5Cを強力かつ選択的に阻害する化合物は知られていなかった。そこで、金属イオン活性型 *in situ* クリックケミストリーを利用してKDM5C阻害薬の同定を試みた。

Jumonji Cドメインを有するKDMが触媒する脱メチル化反応では、活性中心にある Fe^{2+} に対する α -ケトグルタル酸の配位が鍵となる(図2A)。そこで、 Fe^{2+} がAACを促進させることが可能かを考察するために、2-アルキニルピリジンとメチルアジドをモデルとした計算化学的解析を行った(表1)。2-アルキニルピリジンとメチルアジドの間で起こるAACの活性化エネルギー ΔE_a を調べたところ、 Fe^{2+} 非存在下では、生成物が *anti*-および *syn*-トリアゾールいずれの場合も20.7 kcal/molであり、 ΔE_a の差はないと見積もられた。一方、 Fe^{2+} 存在下では、AACの ΔE_a が小さくなり、特に、*anti*-トリアゾールを与える場合は、11.3 kcal/molと算出された。また、生成する *anti*-トリアゾールが Fe^{2+} に二座配位する錯体は、*syn*-トリアゾールが配位する錯体に比べて極めて安定であることがわかった。これらのことから、 Fe^{2+} がAACを促進し、*anti*-トリアゾールを優先的に与えること、そして、生じた *anti*-トリアゾールが強く Fe^{2+} に配位することが示唆された。

以上の計算化学的解析を基に、 α -ケトグルタル酸が Fe^{2+} に配位する形式を模倣した、4位にカルボン酸アニオンやその生物学的等価体構造を有する2-アルキニルピリジンを利用することとした(図2B)。

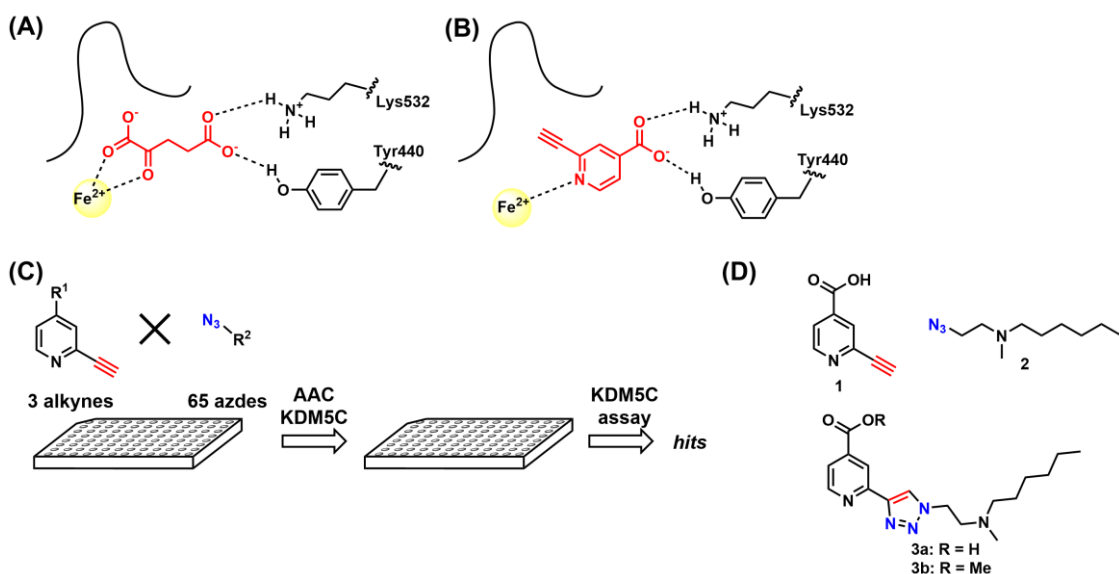


図 2. (A) KDM5C の活性中心にある Fe^{2+} に配位する α -ケトグルタル酸. (B) KDM5C の活性中心にある Fe^{2+} に配位することが期待される 2-アルキニルピリジン. (C) KDM5C 上で起こる *in situ* クリックケミストリーを利用したスクリーニング. (D) 化合物 1-3 の構造.

表 1. 計算化学的に見積もられた AAC の活性化エネルギー^a

Reaction	ΔE_a (kcal/mol)	Reaction	ΔE_a (kcal/mol)
	11.3		20.7
	19.5		20.7

^a All of the calculations were performed at the B3LYP/6-31G* level of theory.

また、アジドとして、多彩な構造を持つ 65 種類の化合物を用意した。384 穴プレートの 1 ウェル内で、アルキンとアジド一つずつを KDM5C と混合し、一定時間静置した。その後、そのまま AlphasLISA アッセイシステムを用いた KDM5C 阻害活性評価系にてスクリーニングを行った (図 2C)。その結果、アルキン **1** とアジド **2** の組み合わせで AAC が進行し、生じるトリアゾール **3a** が高い KDM5C 阻害活性を持つことが示唆された (図 2D)。この組み合わせの混合物について詳細に検証したところ、生成物は *anti*-トリアゾールであり、その収率は KDM5C に対して 27%であることがわかった。そこで、トリアゾール **3a** の活性を調べるために、別途合成単離精製し、活性評価を行った。KDM5C に対する IC_{50} 値を調べたところ、その値は 8.8 nM であり、既知の阻害薬に比べて極めて優れていることがわかった。また、他の KDM アイソフォーム (KDM2A、KDM2B、KDM3A、KDM4A、KDM4B、KDM4C、KDM5A、KDM5B、KDM6B、KDM7B) に対する阻害活性を調べた結果、他のアイソフォームはほとんど阻害しないか、KDM5C 阻害に比べて 40 倍以上劣ることがわかった。以上のように、KDM5C を強力かつ選択的に阻害する化合物としてトリアゾール **3a** を同定することに成功した。

続いて、細胞実験系におけるトリアゾール **3a** の活性を評価した。KDM5C は H3K4me3 を基質とする。したがって、トリアゾール **3a** を処理した細胞を回収し、その抽出液に含まれる H3K4me3 量をウェスタンブロッティング法で解析することで、トリアゾール **3a** の細胞系での活性を評価した。実際には、トリアゾール **3a** を KDM5C が高発現する前立腺がん細胞 PC3 に処理し、48 時間後に回収した細胞に含まれる H3K4me3 量を調べた。しかし、トリアゾール **3a** は H3K4me3 量に影響を与えなかった (図 3A)。トリアゾール **3a** は極性が高く、膜透過性に問題があると考え、細胞内のエステラーゼで容易に加水分解されるメチルエステルプロドラッグ体 **3b** を合成し、その細胞実験系における活性を同様に調べた。その結果、プロドラッグ体 **3b** は濃度依存的に H3K4me3 量を増加させた (図 3A)。なお、KDM5C の発現量が相対的に少ない MKN45 細胞では、H3K4me3 量を変化させないこと、他の KDM アイソフォームの基質となる H3K9me3、H3K27me3、H3K36me2 量を変化させないこともわかり、細胞系においてもトリアゾール **3** は選択的に KDM5C を阻害することが示唆された (図 3AB)。なお、プロドラッグ体 **3b** は動物試験において抗うつ様作用を示すことが明らかとなり、トリアゾール **3** は抗うつ薬としての応用も期待できることがわかった。

4. まとめ

以上のように、我々は標的タンパク質上の金属イオンによって活性化される *in situ* クリックケミストリーを考案し、抗うつ薬として期待できる KDM5C 阻害薬を迅速かつ効率的に見出すことに成功した。本法では、AAC の活性化に、標的タンパク質が持つ金属イオンのルイス酸性性を利用している。そのため、ルイス酸性のある金属イオンを持つ他のタンパク質にも適応にでき、その結合分子探索の効率化を可能とすることが期待される。

本法のように、*in situ* クリックケミストリーをうまく利用することで、複数のアルキン (*m* 個) とアジド (*n* 個) の組み合わせ (*m*×*n* 個) から合成できるトリアゾールを短時間で評価することが可能である。このため、化学者が *m*×*n* 個の化合物を一つ一つ合成する必要がなく、効率的に創薬リードを探索できる。実際に、我々が行った KDM5C 阻害薬の研究では、195 (=3×65) 個の化合物をわずか 2 日で評価し、阻害薬を同定することができた。1 人の創薬化学者が同数の化合物を合成し、活性評価を行うには 1 日 1 個の化合物を合成し続けたとしても、6 か月にかかる試算される。このように、*in situ* クリックケミストリーをうまく利用することで、創薬研究を加速することが可能となる。今後、*in situ* クリックケミストリーを利用した創薬研究にて、速やかに創薬リードが発見され、医薬品開発につながることを期待したい。

謝辞

本研究は、大阪大学産業科学研究所・京都府立医科大学医学研究科で行われたものであり、主催教授の鈴木孝禎先生の指導の下、遂行いたしました。本稿で示したデータは、三宅由花博士が実施した実験

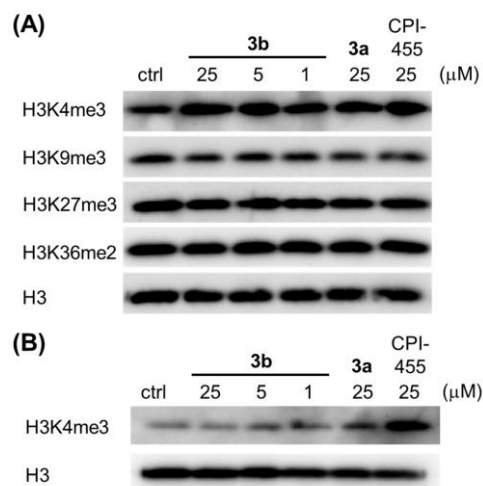


図 3. 化合物 **3a** と **3b** の細胞系での活性評価。CPI-455 は既知の KDM5 阻害薬であり、コントロールとして利用した。(A) PC3 細胞における評価。(B) MKN45 細胞における評価。

をまとめたものであります。また、生物活性評価においては、京都大学大学院医学研究科の内田周作先生のご協力を賜りました。この場を借りて深く感謝申し上げます。

参考文献

- [1] (a) Suzuki, T.; Ota, Y.; Kasuya, Y.; Mutsuga, M.; Kawamura, Y.; Tsumoto, H.; Nakagawa, H.; Finn, M. G.; Miyata, N. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 6817. (b) Suzuki, T.; Kasuya, Y.; Itoh, Y.; Ota, Y.; Zhan, P.; Asamitsu, K.; Nakagawa, H.; Okamoto, T.; Miyata, N. *PLoS One*, **2013**, *8*, e68669. (c) Suzuki, T.; Ota, Y.; Ri, M.; Bando, M.; Gotoh, A.; Itoh, Y.; Tsumoto, H.; Tatum, P. R.; Mizukami, T.; Nakagawa, H.; Iida, S.; Ueda, R.; Shirahige, K.; Miyata, N. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9562.
- [2] Miyake, Y.; Itoh, Y.; Suzuma, Y.; Kodama, H.; Kurohara, T.; Yamashita, Y.; Narozny, R.; Hanatani, Y.; Uchida, S.; Suzuki, T. *ACS Catal.* **2020**, *10*, 5383.
- [3] Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249.
- [4] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2004.
- [5] Mamidyala, S. K.; Finn, M. G. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1252.
- [6] Lewis, W. G.; Green, L. G.; Grynszpan, F.; Radić, Z.; Carlier, P. R.; Taylor, P.; Finn, M. G.; Sharpless K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1053.
- [7] 生じるトリアゾールのタンパク質結合活性は、AAC の反応性に依存しない。アルキンやアジドの結合活性が十分に高く、近接効果が働く場合、AAC は進行するが、生じたトリアゾールの結合活性が低いことはあり得る。
- [8] Klose, R. J.; Yan, Q.; Tothova, Z.; Yamane, K.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Gilliland, D. G.; Zhang, Y.; Kaelin Jr, W. G. *Cell* **2007**, *128*, 889.
- [9] Stein, J.; Majores, M.; Rohde, M.; Lim, S.; Schneider, S.; Krappe, E.; Ellinger, J.; Dietel, M.; Stephan, C.; Jung, K.; Perner, S.; Kristiansen, G.; Kirfel, J. *Am. J. Pathol.* **2014**, *184*, 2430.
- [10] 鈴木孝禎、伊藤幸裕、三宅由花、児玉英彦、鈴間喜教、内田周作 特願 2019-106166.

寄生・共生菌由来リポ多糖部分構造の化学合成と免疫調節機能の解明

大阪大学大学院理学研究科
下山 敦史



著者紹介：1982 年、神奈川県横浜市生まれ、兵庫県西宮市・三重県津市育ち。2005 年に大阪大学理学部化学科を卒業、2007 年に同大学院理学研究科博士前期課程を修了、2010 年に同博士後期課程を修了、この間、日本学術振興会特別研究員 DC2（2008-2010 年）。学部時代から博士号取得に至るまで、深瀬浩一先生にご指導いただき、大いに鍛えられました。その後、東京工業大学大学院生命理工学研究科助教（2011-2014 年）を経て、2014 年 11 月より現職、大阪大学大学院理学研究科助教として着任。

これまでに筆者は一貫して、身近ながら未解明な部分が多い目に見えるマクロな生命現象、特に免疫に着目し、これをミクロな生体関連分子と宿主受容体間の相互作用として捉えなおし、その解明・制御に挑戦してきた。このように生物間で繰り返される多様な生命現象を化合物を介した相互作用（化学コミュニケーション）として捉え直して解析する研究領域は、ケミカルエコロジーと呼ばれている。詳細は後述するが、近年筆者は、グラム陰性菌細胞外膜成分であるリポ多糖が、細菌-宿主間ケミカルエコロジーの鍵化合物の一つとして機能していると仮説を立て、研究を展開してきた。特に、宿主との共進化によりリポ多糖の化学構造変化が生じている細菌に着目し、リポ多糖およびその活性中心である糖脂質リポド A の免疫調節作用と化学構造の関連を解明することで、リポド A を介した細菌-宿主間ケミカルエコロジーという独自コンセプトの確からしさを示しつつある。

趣味は、鉱物標本収集・旅行・ウィスキー。幼少の頃は地学に興味があり、天体観測や化石・鉱物採集によく出かけていた。今でも休日には鉱物の色、発光、結晶系などを観察しながら、分子構造を想像し楽しんでいる。今となっては、仕事は有機化学、趣味は無機化学？という化学漬けな日々ではあるが、こんな状況を許容してくれている家族には、この場を借りて感謝したい。

1. はじめに

細菌による免疫調節作用は古くから知られており、例えば、細菌の感染により癌が治癒したり縮小したりすることが 300 年以上前から報告されている^[1]。脊椎動物の免疫は、先天的な自然免疫と抗原の認識により活性化される獲得免疫に分類される。自然免疫とは、細菌やウイルスなどの異物に由来する特徴的分子構造が、宿主の自然免疫受容体により認識されることで活性化される生体防御機構であり、代表的な自然免疫活性化因子の一つにグラム陰性菌細胞外膜に存在するリポ多糖 (LPS) がある。

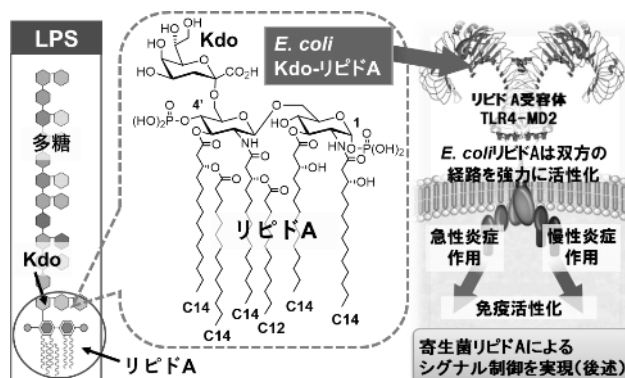


Figure 1. *E. coli* リポド A の化学構造と免疫活性化機構

LPS は、リピド A と呼ばれる糖脂質部分と多糖部分とが特異な酸性糖 Kdo を介して結合した構造をとっており (Figure 1 には代表的な *Escherichia coli* 型の構造を示した)、その活性本体リピド A が TLR4-MD2 受容体に認識されることで、下流の二つのシグナル経路が活性化される。一方は主に急性炎症、他方は慢性炎症等を誘導し、これらの複合的作用により免疫活性化が惹き起こされる。

最近我々は、細菌-宿主間のケミカルエコロジー研究の観点から、生体内環境で生息する細菌について、リピド A の免疫調節作用の解析と免疫アジュバントへの応用について研究を進めており、リピド A の活性が細菌の特徴を深く反映していることを明らかにしてきた^[2]。

2. 寄生菌由来 LPS 部分構造の合成と機能

代表的なグラム陰性菌である *E. coli* 由来のリピド A (Figure 1) は、強力な免疫増強作用を有する一方で致死毒性を示し、免疫アジュバントなどへの応用展開は困難であった。そこで寄生菌ならば、宿主との寄生関係維持のため、低毒性な免疫調節因子を有するのではないかと考え、下図に示した寄生菌 LPS 部分構造 (1-7) (Figure 2) のライブラリー合成を行い、生物活性を評価した。

胃潰瘍の起炎菌 *Helicobacter pylori* リピド A **1a**, **2a**, **3a** および歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* リピド A **4**, **5** は、急性炎症を抑えつつ慢性炎症を誘導し、TLR4-MD2 受容体の下流シグナル (Figure 1) を分子レベルで制御可能であることが明らかにされた^[2a-d]。また、これらの作用により寄生菌が急性炎症に由来する殺菌作用を回避しつつ慢性炎症を惹起する可能性を示し、リピド A の活性が細菌の特性を深く反映していることを明らかにした。

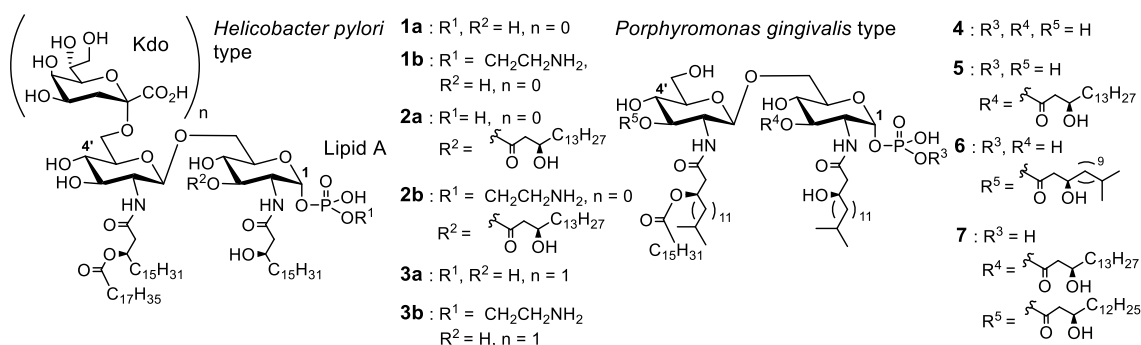


Figure 2. 合成した寄生菌リポ多糖部分構造ライブラリー

3. 共生菌由来 LPS の化学構造決定とそのリピド A の合成・機能評価

続いて、より低毒性な免疫調節因子を求め、共生菌に着目した。腸内フローラとして広く知られるように腸管表面には無数の細菌が生息しているが (Figure 3)、これら細菌は粘膜バリアにより容易に体内に入ってくることは無く、いたずらに免疫系を刺激することはない。一方で、腸管リンパ組織の一つであるパイエル板は、恒常性維持のため細菌を適度に取り込み、これを免疫担当細胞に提示する。2010 年にパイエル板の組織内および周辺の免疫担当細胞内に共生している細菌として

Alcaligenes faecalis が見いだされた^[3]。共生関係構築の鍵となる恒常性維持機能をリピド A が有し、低毒性な免疫調節因子として機能する可能性を考え、*A. faecalis* をパイエル板共生菌として見いだした清野先生 (東大医科研)、國澤先生 (現所属は医薬健栄研) と共同研究を開始し、いただいた乾燥菌体が

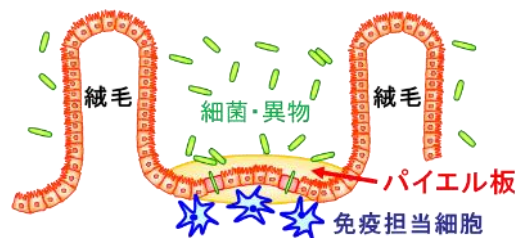
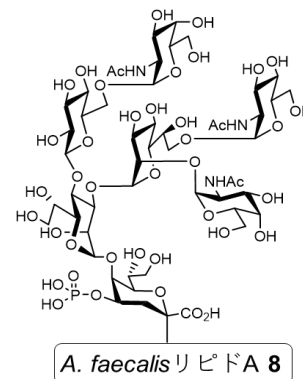
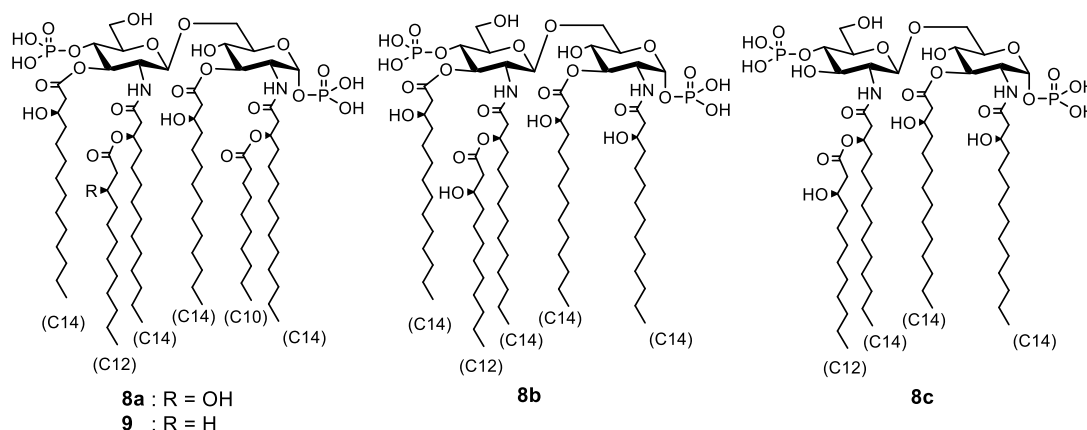


Figure 3. 腸管リンパ組織パイエル板

ら *A. faecalis* LPS 画分を抽出し、その活性を評価した。*A. faecalis* LPS は、*E. coli* LPS に比べ低炎症性で毒性は確認されなかったものの、抗体産生増強作用は同等以上に保持しており、低毒性の免疫増強因子を見いだすことに成功した。また、その活性は TLR4 受容体を介したものであり、LPS・リポド A が機能のコアであることが示唆された^[2e]。続いて、ナポリフェデリコ 2 世大学 (イタリア) の Molinaro 先生との共同研究を展開し、NMR と質量分析を用いて、*A. faecalis* 由来成分の化学構造を世界で初めて決定した。*E. coli* に代表される一般的な細菌は LPS (糖残基数は数十～数百) を産生するが、菌種によっては糖鎖の短いリポオリゴ糖 (LOS) を産生するものもあり、*A. faecalis* は Figure 4 に示した九糖から成る LOS を産生していることが明らかになった。

Figure 4. *A. faecalis* リポオリゴ糖

一方で、リポド A については、アシル鎖パターンが異なる **8a-c** (Figure 5) の混合物であることが明らかになった。*A. faecalis* リポド A **8a-c** を化学合成し、免疫機能を HEK-Blue™ hTLR4 細胞を用いて評価したところ、ヘキサアシル型 **8a** のみが免疫増強活性を示し、その活性は *A. faecalis* LOS とほぼ一致したことから、**8a** が活性中心であることが明らかになった^[2i]。また、**8b,c** については、*E. coli* LPS に対するアンタゴニストとして作用することも見いだした。さらには、**8a** の免疫制御機能の分子基盤解明を目的とした構造活性相関研究として、*A. faecalis* リポド A に特徴的な脂肪酸部のヒドロキシ基を除いたデオキシ誘導体 **9** も合成し、*in vitro* での評価を実施したところ、**8a** と比較し顕著に弱い免疫活性化作用が確認され、着目したヒドロキシ基が免疫活性化作用発現の鍵となっていることが示唆された。またマウスを用いた *in vivo* 試験により、**8a** は *A. faecalis* LOS と同様に無毒でありながら、Th17 を介した免疫応答活性化と抗原特異的な IgA、IgG 産生増強作用を示すことが確認された^[2g,2h]。このように、細菌-宿主間ケミカルエコロジー研究を基盤とした戦略により、腸管粘膜における免疫制御組織に共生する細菌に着目することで、粘膜免疫を安全に制御できる有望な経鼻ワクチンアジュバント候補を見い出せた。

Figure 5. 合成した *A. faecalis* リポド A ライブラリー

4. おわりに

リポド A の合成と機能に関する研究は、芝哲夫先生、楠本正一先生、深瀬浩一先生と紡がれてきた所属研究室系譜の中で、脈々と続くテーマである。歴史ある研究の一端を担えた事を光栄に思うとともに、重責も感じてきた。筆者は、細菌-宿主間のケミカルエコロジーを自身のキーワードに据え、免疫というマクロな生命現象を複合糖質といったミクロな生体分子間の化学反応として捉えなおし、生命

現象の解明・制御に挑戦してきた。化合物を基盤として生命現象を解明するという研究領域は、ケミカルバイオロジーとして大きな潮流となり発展している。今後も、リピド A の化学合成を基盤とした細菌-宿主間のケミカルエコロジー研究という領域を開拓し推し進めることで、科学のフロンティアを少しでも切り開いていきたいと切に願っている。

謝辞

この度は、栄誉あるバイオ関連化学シンポジウム講演賞を頂き、誠に光栄に存じます。受賞対象として評価いただいた寄生・共生菌由来リポ多糖部分構造の合成と機能に関する研究は、大阪大学大学院理学研究科、深瀬浩一先生のご指導のもと、多くの共同研究者、スタッフ・学生の方々と共に達成した研究成果です。深瀬先生をはじめ、関係する全ての皆様にこの場を借りて心より感謝申し上げます。また、第 14 回バイオ関連化学シンポジウムを運営いただいた先生方および審査員の先生方にも深謝いたします。今後もサイエンスの発展に貢献できるよう、より一層の精進を重ねていく所存ですので、今後ともご指導ご鞭撻のほど、何卒よろしくお願い申し上げます。

参考文献

- [1] (a) Kusumoto, S.; Fukase, K.; Shiba, T. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **2010**, *86*, 322-337. (b) Wei, M.Q.; Mengesha, A.; Good, D.; Anne, J. *Cancer Lett* **2008**, *259*, 16.
- [2] (a) Shimoyama, A.; Saeki, A.; Tanimura, N.; Tsutsui, H.; Miyake, K.; Suda, Y.; Fujimoto, Y.; Fukase, K. *Chem. -Eur. J.* **2011**, *17*, 14464. (b) Shimoyama, A.; Fujimoto, Y.; Fukase, K. *Synlett* **2011**, *16*, 2359. (c) Fujimoto, Y.; Shimoyama, A.; Suda, Y.; Fukase, K. *Carbohydrate Research* **2012**, *356*, 37. (d) Fujimoto, Y.; Shimoyama, A.; Saeki, A.; Kitayama, N.; Kasamatsu, C.; Fukase, K. *Molecular Biosystems* **2013**, *9*, 987. (e) Shibata, N.; Kunisawa, J.; Hosomi, K.; Fujimoto, Y.; Mizote, K.; Kitayama, N.; Shimoyama, A.; Mimuro, H.; Sato, S.; Kishishita, N.; Ishii, K.J.; Fukase, K.; Kiyono, H. *Mucosal Immunology* **2018**, *11*, 693. (f) Kanoh, H.; Nitta, T.; Go, S.; Inamori, K.; Veillon, L.; Nihei, W.; Fujii, M.; Kabayama, K.; Shimoyama, A.; Fukase, K.; Ohto, U.; Shimizu, T.; Watanabe, T.; Shindo, H.; Aoki, S.; Sato, K.; Nagasaki, M.; Yatomi, Y.; Komura, N.; Ishida, H.; Kiso, M.; Natori, Y.; Yoshimura, Y.; Cattaneo, A.; Letizia, M.; Ciampa, M.; Mauri, L.; Prinetti, A.; Sonnino, S.; Suzuki, A.; Ando, H.; Inokuchi, J. *EMBO J.* **2020**, e101732. (g) Wang, Y.; Hosomi, K.; Shimoyama, A.; Yoshii, K.; Yamaura, H.; Nagatake, T.; Nishino, T.; Kiyono, H.; Fukase, K.; Kunisawa, J. *Vaccines* **2020**, *20*, 8(3): E395. (h) Yoshii, K.; Hosomi, K.; Shimoyama, A.; Wang, Y.; Yamaura, H.; Nagatake, T.; Suzuki, H.; Lan, H.; Kiyono, H.; Fukase, K.; Kunisawa, J. *Microorganisms* **2020**, *8*(8), 1102. (i) K. Hosomi, N. Shibata, A. Shimoyama, T. Uto, T. Nagatake, Y. Tojima, T. Nishino, H. Takeyama, K. Fukase, H. Kiyono, J. Kunisawa, *Frontiers in Microbiology* **2020**, *11*, 561005. (j) Shimoyama, A.; Lorenzo, F. D.; Yamaura, H.; Mizote, K.; Palmigiano, A.; Pither, M. D.; Speciale, I.; Uto, T.; Masui, S.; Sturiale, L.; Garozzo, D.; Hosomi, K.; Shibata, N.; Kabayama, K.; Fujimoto, Y.; Silipo, A.; Kunisawa, J.; Kiyono, H.; Molinaro, A.; Fukase, K.; submitted.
- [3] Obata, T.; Goto, Y.; Kunisawa, J.; Sato, S.; Sakamoto, M.; Setoyama, H.; Matsuki, T.; Nonaka, K.; Shibata, N.; Gohda, M.; Kagiya, Y.; Nochi, T.; Yuki, Y.; Fukuyama, Y.; Mukai, A.; Shinzaki, S.; Fujihashi, K.; Sasakawa, C.; Iijima, H.; Goto, M.; Umesaki, Y.; Benno, Y.; Kiyono, H. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 7419.

抗リウマチ薬メトトレキサートとマクロファージ 遊走阻害因子の相互作用解析

秋田大学大学院理工学研究科
松村 洋寿



著者紹介：

博士後期課程（東京農工大学）と学位取得後の日本学術振興会特別研究員 PD（東京大学）、ルンド大学博士研究員（スウェーデン王国）時代は、タンパク質の生物電気化学を専門としていました。その後、オレゴン健康科学大学（アメリカ合衆国）での日本学術振興会海外特別研究員時代は、タンパク質の振動分光化学を専門としていました。2015 年4 月より秋田大学に講師として着任してからは、タンパク質の結晶構造解析と相互作用解析を主に研究手法としています。学位取得後、国も変えながら所属を転々としてきましたが、その場所その場所で周囲の方々に支えられ、多くの経験を積めたことが、現在の自分の人間的、科学的バックボーンになっていると実感しています。

タンパク質の構造と機能の相関、またタンパク質の応用技術開発に興味があり、一貫してタンパク質に関する研究を進めてきました。今後は、薬理作用が未解明の薬剤とその標的タンパク質を研究対象として、薬剤－タンパク質間相互作用解析をもとに、薬理作用解明を目指した研究を積極的に展開していきたいと考えています。

秋田大学に着任後、本格的に学生を指導する立場になり 6 年が経とうとしています。現在進めている研究プロジェクトの多くは、秋田大学着任後に立ち上げたものであり、本稿で紹介する研究内容をはじめとして、最近、次第に良い研究成果が得られはじめてきました。良い成果が得られた喜びを学生と分かち合うこと、研究での試行錯誤を通して学生が成長する様子を見ることがやりがいになっています。また、コロナ禍で外出を控えているので、行きつけのワイン屋さんでワインを見繕ってもらい、自宅呑みでワインについて勉強することが最近の楽しみです。

1. はじめに

関節リウマチは自己免疫疾患の 1 種であり、関節滑膜を病変の首座とする全身性の慢性炎症性疾患である。病状が進行すると関節の破壊、変形が生じ、不可逆的な身体機能障害をもたらすため、日常生活動作(ADL)や生活の質(QOL)の低下が起これ、社会的損失や経済的問題等を生ずる。また、関節リウマチは国内での有病率が全人口の 0.5~1.0%と推定されている最も頻度の高い膠原病であり、30~50 歳代が好発年齢ではあるが、高齢化社会を迎えている我が国では、近年、高齢発症の関節リウマチが増加しており大きな問題となってきた。

関節リウマチの発症は、遺伝的要因にウイルス感染などの環境的要因が関与することに因ると推測されているものの、未だ直接的な病因は不明である。以前は、関節リウマチの進行は阻止することができない不治の病と考えられており、その治療は主に鎮痛剤で炎症による痛みを抑制する対症療法が主体であった。しかし、1999 年に、国内において関節リウマチ治療薬としてメトトレキサート(MTX)の

保険適用が承認されたことにより、関節の腫れや痛み、炎症がほとんどない状態とする寛解を治療目標とすることが可能となった。さらに、これまでの研究成果から、関節リウマチの病態形成に関与する炎症性サイトカインについて次第に明らかになってきており、2003年にTNF α やIL-6を標的分子とした生物学的製剤が導入された。MTXと生物学的製剤を併用することで寛解に至る患者の割合は増加し、多くの症例で関節破壊の進行を阻止することが可能になった。現在、MTXは国内外において関節リウマチ治療の第一選択薬、アンカードラッグとして広く用いられている。

関節リウマチ治療のアンカードラッグとして用いられているMTXだが、関節リウマチ治療薬として新規に開発された薬剤ではない。図1に示す構造からもわかるように、1950

年代に急性リンパ性白血病の治療のための葉酸拮抗薬として開発され、その後1980年代に、低用量MTX治療が、乾癬、全身性エリテマトーデス、関節リウマチなどの様々な自己免疫疾患に対して有効であることが臨床的知見により証明され、免疫抑制薬として用いられるようになった経緯がある^[1]。

既存薬の薬理作用を再評価し、新たな適応疾患を探索することは、Drug repurposingとよばれる。MTXのように、疾患Aに対する臨床的な使用経験の蓄積から、別の疾患Bの病態への有効性が確認され、疾患Bの治療薬として用いられるようになることも少なくない。Drug repurposingにより、新たな疾患に有効性を示した薬剤は、安全性が確かめられており、開発コストが抑えられるため、非常に有益であるが、偶然想定外の効能が見つかったというセレンディピティに大きく依存している場合が多く、新たな薬効に対する作用機序は不明な場合も少なくない。MTXにおいても、白血病治療における薬理作用はよく調べられており、DNA合成に重要なジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)を阻害することによる、がん細胞の増殖抑制であることが知られている。一方、関節リウマチ治療におけるMTXの免疫抑制作用を、DHFRに対する葉酸代謝阻害作用から説明することは難しく、異なる作用機序であることが予想されている。また、関節リウマチ治療においてMTXの副作用として~7%の症例で間質性肺炎を合併し、その死亡率は13%にもなるとの報告がある^[2]。この副作用の発生機序も、葉酸代謝阻害作用では説明することが難しく、今後、より安全で効果的な治療を行うためには、MTXの作用機序ならびに副作用の発生機序の解明が求められている。これらの背景から、我々は新規MTX標的タンパク質の探索を行い、MTXの免疫系における作用機序及び副作用の発生機序の解明を目指し研究を進めている。本稿では、新規MTX標的タンパク質を探索した結果、同定されたタンパク質の1つであるマクロファージ遊走阻害因子(MIF)についての研究成果を紹介する。

2. 新規MTX標的タンパク質の探索

MTXの新規標的タンパク質の探索は、これまでに我々の研究グループで、薬剤の新規標的タンパク質の同定に実績のあるドラッグアフィニティークロマトグラフィーを用いたスクリーニングにより行うこととした。既報に従いMTXを樹脂に固定化したアフィニティークラムを作製し^[3]、ウシ脾臓または肺の粗抽液を用いてドラッグアフィニティークロマトグラフィーを行った。MTXによる溶出液を分取し、DS-PAGEにより解析したところ、複数のタンパク質バンドが得られた(図2)。各タンパク質バンドをゲルから抽出し、逆相クロマトグラフィー質量分析装置により解析を行った。その結果、20 kDa付

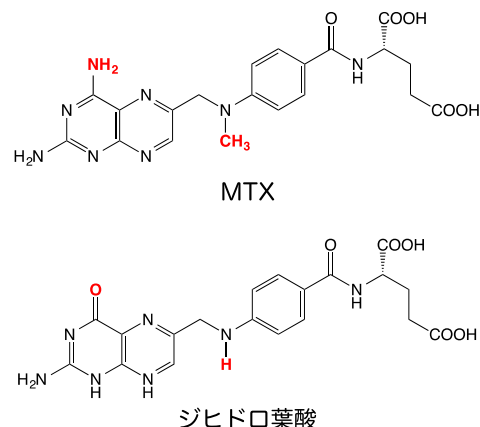


図1. MTXとジヒドロ葉酸の化学構造式.

近にみられたバンド(#1)は、DHFR と同定された。既知の MTX 標的タンパク質である DHFR の結合が確認されたことから、今回作製した MTX 固定化樹脂によるスクリーニングの有効性が示唆された。

その他のバンドについても、同様にタンパク質の同定に成功した。同定されたタンパク質について文献検索を行ったところ、12 kDa 付近にみられたバンド(#2)から同定された MIF が、炎症性サイトカインであることが明らかになった。MIF は主要組織適合性複合体(MHC)クラス II の CD74 受容体のリガンドであり、CD74 受容体を介した炎症反応を惹起するシグナル伝達系に関与しており^[4]、自己免疫疾患ほか免疫系に広範な作用を示す^[5]。MIF の発現と関節リウマチの症状の深刻度との関係性についての研究例の報告もあった^[6]。従って、MIF は MTX が関節リウマチに対して薬効を持つ上で、非常に関連性が高いタンパク質であると考え、MTX と MIF の相互作用解析を進めることとした。

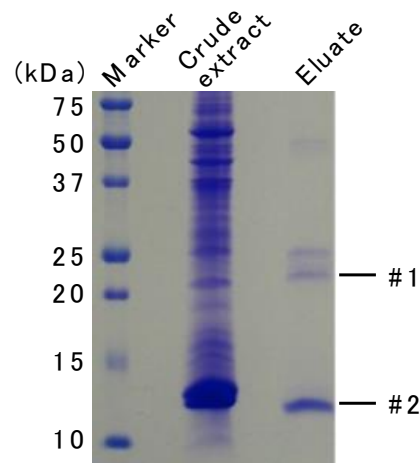


図 2. MTX 固定化樹脂を用いたドラッグアフィニティークロマトグラフィー後の SDS-PAGE 解析結果。
#1: DHFR、#2: MIF.

3. ヒト MIF に対する MTX の結合数と解離定数の決定

ドラッグアフィニティークロマトグラフィーを用いたスクリーニングでは、ウシ由来のタンパク質を用いたので、次にヒト末梢血単核球 cDNA から MIF 遺伝子(hMIF)のクローニングを行い、大腸菌により組換え体を発現させた。各種カラムクロマトグラフィーで精製後、SDS-PAGE 解析を行ったところ、hMIF のアミノ酸一次配列から計算される約 12.5 kDa と一致する分子量に、単一なバンドが確認された。また、サイズ排除クロマトグラフィー-多角度光散乱法により、精製した hMIF が三量体構造をとっていることが確認された。次に、MTX 樹脂を用いた pull-down アッセイにより、hMIF の MTX に対する結合能を確認したところ、ウシ由来 MIF と同程度の結合が確認された。hMIF とウシ由来 MIF のアミノ酸一次配列の相同性が、92%と高いことから、この結果は妥当であると考えられる。

等温滴定型カロリーメトリー(ITC)測定により、hMIF に対する MTX 結合の熱力学的パラメーターを算出した(図 3)。その結果、 $\Delta H = -5.09$ kcal/mol、 $-T\Delta S = 0.31$ kcal/mol、 $\Delta G = -4.87$ kcal/mol とエンタルピー変化の寄与が大きく、MTX の hMIF への結合は特異的であることが示された。また、MTX は hMIF 単量体に対して 1 : 1 で結合し、解離定数 $K_d = 313$ μ M であることがわかった。

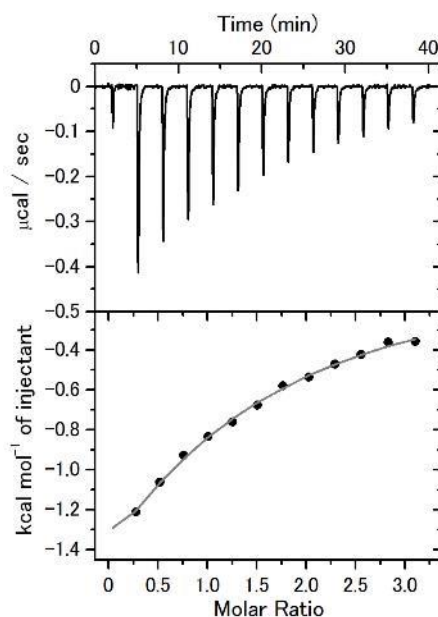


図 3. 等温滴定型カロリーメトリーによる MTX の hMIF に対する結合評価

4. MTX-hMIF 複合体の X 線結晶構造解析による MTX の結合状態の解析

MTX の hMIF への結合状態を解析するために、MTX-hMIF 複合体の共結晶化を試みた。しかし、共結晶を得ることができなかったため、hMIF の単結晶を作成し、単結晶を MTX 溶液にソーキングすることで、MTX-hMIF 複合体を形成させることとした。hMIF の単結晶は得ることができ、X 線結晶構造解析を行ったところ、既報通りに三量体の hMIF の立体構造を得ることができた⁷⁾。次に、MTX-hMIF 複合体の X 線結晶構造解析を行ったところ、分解能 1.28 Å の回折データを得ることができた(図 4a)。MTX の結合により、Tyr36 の側鎖が約 90°回転し、MTX のプテリジン環との間に π - π 相互作用の形成がみられた(図 4b)。しかし、ITC 測定の結果は、上述の通り MTX は hMIF 単量体に対して 1:1、つまり、hMIF 三量体に対しては、3 分子の MTX の結合を示していたのに対して、得られた MTX-hMIF 複合体の構造において、MTX は 1 分子のみが hMIF 三量体のサブユニット間に存在する 3 つのポケット内の 1 つに結合していた。

MTX の結合数に違いがみられた原因を調べるために、Caver3 により hMIF 外部から内部キャビティへの経路を計算した。その結果、MTX の結合しているサブユニット間では~10 Å のキャビティがみられたが、残り 2 つのサブユニット間でのキャビティは、隣接する hMIF 分子で塞がれており 5 Å 以下と予想された。このことから、MTX の結合数の違いは、hMIF 単結晶の MTX 溶液へのソーキングの際に、単結晶内の hMIF 分子のパッキングに影響を受け、MTX が hMIF サブユニット間にアクセスできなかったためだと考えられる。

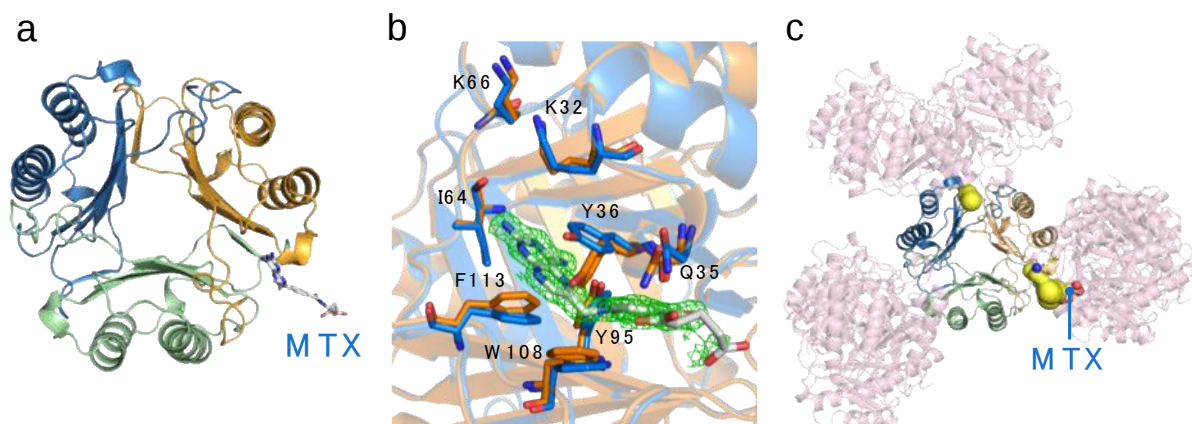


図 4. (a) MTX-hMIF 複合体の全体構造. (b) MTX-hMIF 複合体における MTX 結合部位の拡大図. MTX ありの構造をブルー、MTX なしの構造をオレンジでそれぞれ示す. (c) MTX-hMIF 複合体の結晶パッキングと Caver3 を用いたキャビティ予想の結果. 隣接する hMIF 三量体分子をピンク、キャビティをイエローでそれぞれ示す.

5. MTX の hMIF への結合が hMIF と CD74 の複合体形成に及ぼす影響

上述のように、hMIF が関与する炎症反応を惹起するシグナル伝達は、hMIF と CD74 受容体とのタンパク質複合体形成により起こる。これまでに hMIF-CD74 複合体の構造解析は成功していないが、CD74 の可溶性部分のみを発現させた sCD74 の NMR 構造を用いた hMIF-sCD74 複合体の Docking モデルが報告されている¹⁰⁾。今回得られた MTX-hMIF 複合体と hMIF-sCD74 複合体の Docking モデルを比較すると、MTX-hMIF 間と hMIF-sCD74 間の相互作用には、いくつか共通のアミノ酸残基が関与していることが明らかになった。このことから、hMIF における MTX の結合部位は、sCD74 との結合部位に近いことが予想された。そこで、MTX-hMIF 複合体構造を用いて、sCD74 との Docking シミュレーションを行い、MTX の結合が hMIF-sCD74 複合体の形成に与える影響を検討した。MTX-hMIF 複合体には、

X線結晶構造解析で得られた1分子のMTXが結合している複合体構造と、ITC測定の結果から溶液中でとっていると予想される3分子のMTXが結合している複合体構造モデルを作成して用いた。得られた各hMIF-sCD74複合体のDockingモデルを用いたMDシミュレーションとMM-GBSA計算により、hMIF-CD74複合体の結合エネルギーを算出したところ(図5)、MTXのhMIFへの結合により、hMIF-CD74複合体の安定性が低下することが示された。以上の結果から、MTXはhMIFのサブユニット間に結合することで、hMIF-CD74複合体の形成を阻害し、その結果hMIFによるシグナル伝達を抑制される可能性が示唆された。今後、細胞実験により、hMIFによる炎症性サイトカイン産生誘導に対するMTXの抑制効果の検討を進めていきたい。

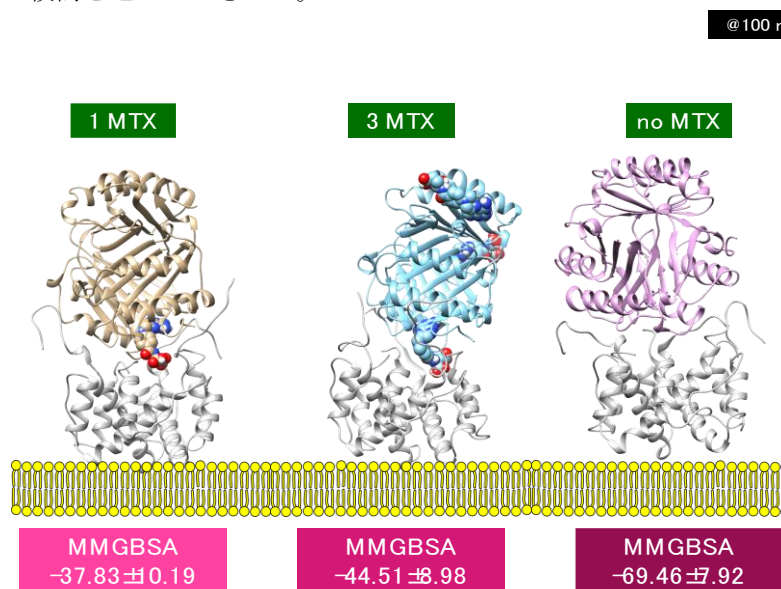


図5. MM-GBSAによるMTXのhMIFへの結合がhMIFとCD74の複合体形成に及ぼす影響の計算結果。

6. おわりに

本稿では、新規MTX標的タンパク質としてMIFを同定し、MTXとの相互作用解析について紹介した。MTXは関節リウマチ治療のアンカードラッグとして広く用いられており、一方、MIFは関節リウマチの病態に関与していることがわかっていたが、これまでに、MTXとMIFとの関連性を示す研究報告はなく、本研究でMTXのhMIFへの結合により、hMIF-CD74複合体の形成が阻害され、hMIFによるシグナル伝達を抑制される可能性が示された。関節リウマチ治療において、MTXは投与後生体内で代謝され、その代謝産物が薬効を示すという研究報告がある。現在、MTXの代謝産物を用いたhMIFとの相互作用解析を進めている。また、今後、細胞実験ならびにモデルマウスを用いた動物実験により、MTXとhMIFの関連性について詳細な検討を進めることで、MTXの免疫系における作用機序及び副作用の発生機序の解明に取り組んでいきたい。

謝辞

本研究は、私が所属する秋田大学大学院工学研究科、尾高研究室で行われました。研究を遂行するにあたり、十分な研究環境をご提供くださり、数多くのご助言を賜りました尾高雅文教授に深く感謝いたします。秋田大学の涌井秀樹教授には、有益なご助言を数多く賜りました。心より感謝申し上げます。

本稿で紹介いたしました研究内容は、主に学生の杉島小雪さんが精力的に進めてくれた成果になります。杉島さんをはじめとする、本研究に携わったすべての学生に深く感謝申し上げます。

また、本研究は多くの共同研究者の方々にご支援いただくことにより進めることができました。X線結晶構造解析は、東京農工大学の養王田正文教授と野口恵一教授に、ITC解析は、東京大学の津本浩平教授と長門石曉准教授に、MDシミュレーション解析は、筑波大学の重田育照教授にご協力いただきました。この場を借りて心より感謝申し上げます。

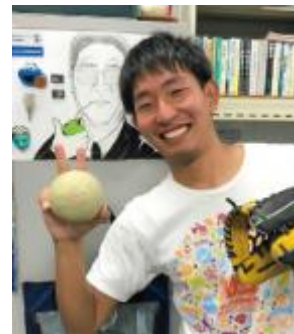
本研究は、日本学術振興会科学研究費若手研究(B)、基盤研究(C)及び上原財団助成金の助成により実施されました。

参考文献

- [1] (a) Cipriani, P.; Ruscitti, P.; Carubbi, F.; Liakouli, V.; Giacomelli, R. *Expert. Rev. Clin. Immunol.* **2014**, *10*, 1519.; (b) Brown, PM.; Pratt, AG.; Isaacs, JD. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2016**, *12*, 731.; (c) Cronstein, BN.; Aune, TM. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2020**, *16*, 145.
- [2] Imokawa, S.; Colby, TV.; Leslie, KO.; Helmers, RA. *Eur. Respir. J.* **2000**, *15*, 373.
- [3] Nakagawa, M.; Sugawara, K.; Goto, T.; Wakui, H.; Nunomura, W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *473*, 999.
- [4] (a) Morand, EF.; Leech, M.; Bernhagen, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 399.; (b) Leng, L.; Metz, CN.; Fang, Y.; Xu, J. *J. Exp. Med.* **2003**, *197*, 1467.
- [5] (a) Subbannayya, T.; Variar, P.; Advani, J.; Nair, B.; Shankar, S.; Gowda, H.; Saussez, S.; Chatterjee, A.; Prasad, TS. *J. Cell. Commun. Signal.* **2016**, *10*, 165.; (b) Stosic-Grujicic, S.; Stojanovic, I.; Nicoletti, F. *Autoimmun. Rev.*, **2009**, *8*, 244.
- [6] (a) Onodera, S.; Tanji, H.; Suzuki, K.; Kaneda, K.; Mizue, Y.; Sagawa, A.; Nishihira, J. *Cytokine*, **1999**, *11*, 163.; (b) Ichiyama, H.; Onodera, S.; Nishihira, J.; Ishibashi, T.; Nakayama, T.; Minami, A.; Yasuda, K.; Tohyama, H. *Cytokine*, **2004**, *26*, 187.; (c) Radstake, TR.; Sweep, FC.; Welsing, P.; Franke, B.; Vermeulen, SH.; Geurts-Moespot, A.; Calandra, T.; Donn, R.; van Riel, PL. *Arthritis Rheum.*, **2005**, *52*, 3020.
- [7] Sun, HW.; Bernhagen, J.; Bucala, R.; Lolis, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1996**, *93*, 5191.
- [8] Meza-Romero, R.; Benedek, G.; Leng, L.; Bucala, R.; Vandenbark, AA. *Metab. Brain. Dis.* **2016**, *31*, 249.

Award Accounts

第14回バイオ関連化学シンポジウムポスター賞

ペプチド-蛍光プローブ共集合体を用いた
細胞内取り込みにおける形状依存性の評価¹九州大学大学院工学研究院²九州大学未来化学創造センター大林 洋貴¹, 若林 里衣¹, 神谷 典穂^{1,2}, 後藤 雅宏^{1,2}

著者紹介: 香川県立丸亀高校卒。九州大学後藤・神谷研究室所属の博士1年です(私の後ろにいるのが後藤先生です)。好きなスポーツはソフトボール、好きな学会はバイオ関連化学シンポジウムです。この度は、このような栄えある賞をいただいたこと大変うれしく思います。本シンポジウムは参加するたびに多くの刺激をもらえるため毎回楽しみにしております。今回はオンライン開催でしたが、開催をきっかけに、これまでに知り合った友人や先生と連絡を取ったり、発表を聴いたりすることで私も負けずに頑張ろうという気持ちになりました。コロナ禍においてもシンポジウム開催を途切れさせずに運営していただいた先生方のおかげです。誠にありがとうございました。

昨年のバイオ関連化学シンポジウムでは、当時東北大 D1 だった M さん企画の学生の飲み会に参加し、居酒屋→バー→公園と、はしご酒しました。皆様私のことを覚えていますか? この一夜だけでも、進路や研究についての考え方の話、各々の研究室の話など、日頃各々のコミュニティだけでは語れない類の話が出来て非常に楽しかったです。その後の帰り道で先生方の飲み会終わりに遭遇し、ある先生とサシ飲みする機会も得られました。その先生とは、私の研究に関する議論だけでなく先生の海外での研究生生活について等、刺激的な話を聞かせていただきました。来年の学会までにはコロナ禍が収まり、このように偶発的な素敵な出会いのあるオンサイトの学会が行われてほしいと願うばかりです。友人や先生方との再会や、新たな人との出会いを楽しみに、また面白い研究内容を発表できるように来年にむけて研究を頑張ろうと心新たにできた本シンポジウムでした。

1. はじめに

ナノ構造体の形状が生体膜との親和性に与える影響[1]を明らかにすることは、ドラッグデリバリーシステム(DDS)等のバイオナノテクノロジー分野の発展において重要です。近年、形状のナノデザインが可能な自己集合材料を用いることで、材料の形状と細胞内取り込みの相関に関する研究が報告されています。これらの研究では、プローブ分子を内包した自己集合体を細胞へ作用させ、細胞内に送達されたプローブ分子を定量することにより形状と細胞内への送達性との関連性を示しています。しかしながら、形状に応じて変化する集合体の表面状態やプローブ分子の内包率等の影響を無視することはできません。これらを解決するためには、精密に一定のプローブ分子を導入可能で、わずかな設計の差異で異なる形状をもたらす自己集合システムを構築することが必要であると考えました。

2. 分子設計および戦略

私たちは前項で述べた自己集合システムを達成するために、(I) 均一なプローブ分子の導入を担う相補的な水素結合ユニットの利用、(II) 形状制御ユニットを担う両親媒性ペプチド (Peptide amphiphile; PA) の利用という二つの戦略を用いまし

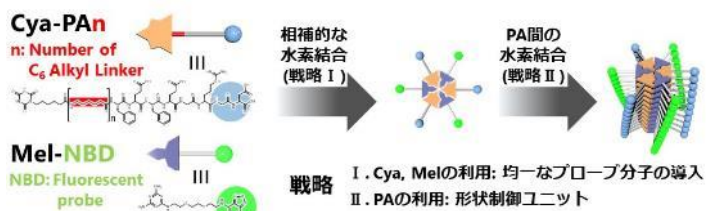


Fig. 1 研究の戦略と概略図。アルキルリンカー長が異なる Cya-PAN と蛍光プローブ分子を導入した Mel-NBD は相補的な水素結合と PA 間の水素結合によって共集合する。

た。(I) に関して、3:3の相補的な水素結合ネットワークを形成するシアヌル酸 (Cya) とメラミン (Mel) を利用し、これを集合形成のコアとすることで PA とプローブ分子の比の制御を可能としました。(II) に関して、PA はペプチド鎖に疎水性の置換基を導入した構造を持ち、主骨格がアミノ酸であることに起因する高い生体適合性が魅力的です。また、デザイン性に富み、分子設計上の違いが様々な形状を有する自己集合体をもたらすことができます [2]。Cya と Mel を PA と蛍光小分子ニトロベンゾフラザン (NBD) にそれぞれ導入した Cya-PA と Mel-NBD を合成しました。Cya-PA に関しては Cya 部とペプチド部分の間を 0 個から 3 個の C6 アルキルリンカーでつないだ四種類の Cya-PAn ($n = 0-3$; n は C6 アルキルリンカー数) を合成しました (Fig. 1)。

3. 結果と考察

Cya-PA と Mel-NBD は、二成分間の相補的な水素結合とペプチド間の水素結合によって 3:3 の比で精密に共集合した構造体を形成しました [3]。走査型プローブ顕微鏡 (SPM) 観察を行った結果、Cya-PA のアルキルリンカー長に応じて異なる形状の共集合体を確認されました。具体的には Cya-PA0/Mel-NBD は球状、Cya-PA1/Mel-NBD はナノロッド状、Cya-PA2/Mel-NBD および Cya-PA3/Mel-NBD はナノファイバー状構造をとっていました (Fig. 2 (A))。また、それぞれの共集合体に関してがん細胞への Mel-NBD の送達能をフローサイトメトリーによって評価しましたところ、球状やナノロッド状の構造体がファイバー状の構造体に比べて優れた細胞内取り込みを示しました (Fig. 2 (B))。この結果から本共集合体が細胞内取り込みの形状依存性を調べるツールとして有用であることが示唆されました。

また、本共集合体のナノ材料としての応用可能性を探るため、より詳細に細胞への作用を評価しました。具体的には細胞内への取り込みメカニズムや細胞内局在を評価しました。結果として、本共集合体は PA 末端に導入した細胞接着性 RGD 配列によって細胞へ近接したのち、エネルギー非依存的なメカニズムで細胞内に素早く取り込まれること、さらに、細胞内において膜構造を有する小器官であるミトコンドリアや小胞体等に局在することが明らかとなりました。これらの特徴から、本共集合体が DDS のキャリアやバイオイメーキング材料等への応用可能性が非常に高いことが示唆されました。

謝辞

本研究は、私が所属する九州大学大学院後藤・神谷研究室で行われました。日頃よりご指導を頂きました後藤教授、神谷教授ならびに若林助教、南畑助教に心より感謝申し上げます。また、本研究は JSPS 特別研究員奨励費の助成および所属するリーディング大学院の支援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] Kinnear, H. *et al. Chem. Rev.*, **2017**, *117*, 11476.
- [2] Eskandari, R. *et al. Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2017**, *110*, 169-187.
- [3] Wakabayashi, R. *et al. Chem. Commun.*, **2019**, *55*, 6997.

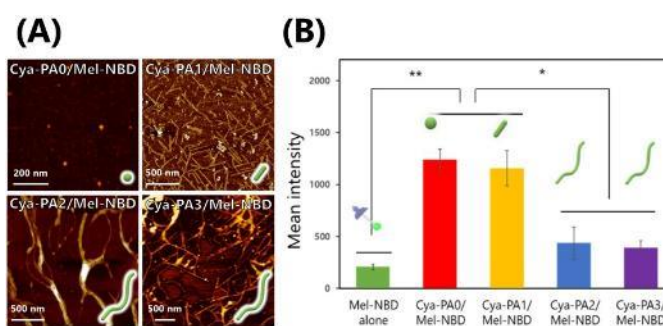


Fig. 2 (A) 各共集合体の SPM 像と (B) 細胞内取り込み。Cya-PA/Mel-NBD は PA の設計に応じて球状、ナノロッド状、ファイバー状の共集合体を形成し、その形状に応じた細胞内取り込みを示す。

低分子リガンドに特異的に結合する人工抗体の創製

¹ 名古屋大学大学院工学系研究科² 名古屋工業大学大学院工学研究科³ 名古屋大学未来創造機構ナノライフシステム研究所都築 成晃¹, 吉井 達之², 近藤 大志¹, 藤野 公茂¹,林 剛介¹, 築地 真也², 村上 裕^{1,3}

著者紹介: 名古屋大学大学院工学研究科修士 2 年。学部生 4 年で村上研究室に入ってから一貫して、進化分子工学を利用した人工抗体の創製に取り組んできました。趣味はアカペラと読書。大学入学後にはじめてのボイスパーカッションがアイデンティティです。

村上研を選んだ理由は、正直なところフィーリングでした(笑)。しかし幸いなことに、村上裕教授をはじめとした周りの方々に恵まれ、充実した研究生生活を過ごしております。今回ポスター賞を受賞できたことは大変嬉しく、多くを学ばせて頂いた研究室にも恩返しができたかなと思っております。

村上研はまだ比較的若い研究室であり、手探りで実験を進めていくような場合がほとんどです。進捗が滞ることも多く、心が折れそうになったことも何度かあります。ですが、粘り強く取り組むことで、自ら道を切り開き整備することができるという面では、大きなやりがいにもなっています。

1. はじめに

低分子リガンドに特異的に結合するタンパク質は、生物学の研究において重要な役割を果たしている。最も一般的なものでは、ビオチン-アビジン相互作用が挙げられる(図 1)。しかし、アビジンは四量体であるため、ビオチン化した標的分子とアビジンを「1 対 1」で結合させることは難しい。また、ビオチンは天然の化合物であるため、生体内に存在するビオチンやビオチン化タンパク質もアビジンと結合してしまう。このような点から、非天然の低分子リガンドに「1 対 1」の関係で結合し、

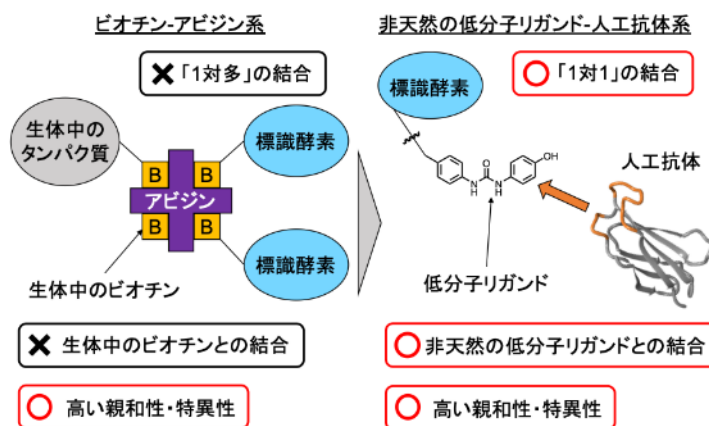


図 1. 非天然の低分子リガンドに特異的に結合する人工抗体

かつ高い親和性と特異性を持つタンパク質の開発が求められている。これまでも、いくつか低分子リガンドに結合するリポカリンファミリータンパク質の作製が報告されているが¹⁾、これらには発現が難しいという欠点がある。そこで我々は、より簡便に発現できる人工抗体骨格を用いて、低分子リガンドの微細な構造の差異を識別する人工抗体を作製することを目指した。

2. TRAP 提示法による低分子特異的な人工抗体の選択

まず、当研究室が開発した人工抗体選択技術である TRAP 提示法^{2), 3)}を利用することで、HPPU [1-(4-hydroxyphenyl)-3-phenylurea] に特異的に結合する人工抗体の選択を行なった(図 2)。本研究で用いた人工抗体ライブラリは、大腸菌で容易に発現できる第 10 ヒトフィブロネクチン III 型ドメイン⁴⁾を骨格とし、2 箇所のループ部分をトリヌクレオチド合成によりランダム化したものである。10¹³程度の

多様性を持つ人工抗体ライブラリから、ベンジル基を導入した HPPU に結合する人工抗体を取り除き、さらに、ベンジル基を持たない HPPU に結合する人工抗体の回収を行った。これを繰り返すことで、ベンジル基を持たない HPPU に対して選択的に結合する人工抗体を濃縮し、次世代シーケンサ (NGS) によってその配列を決定した。当該の人工抗体を大腸菌で発現・精製し、HPPU に対する親和性を測定した。その結果、獲得した人工抗体は HPPU に対して数十 nM 程度の親和性を示した。一方で、本人工抗体はベンジル基を持つ HPPU には結合せず、高い特異性を持つことが判明した。

3. 飽和変異ライブラリによる配列の最適化

親和性をさらに向上するために、得られた人工抗体配列を鋳型とする飽和変異ライブラリを作製した (図 3)。多様性を網羅するために、二箇所のループを部分的に 6 残基ランダム化したライブラリを 4 種類用意した。これらのライブラリに対して再び人工抗体選択を行い、回収率が上がったところで NGS による配列決定を行った。変異箇所ごとのアミノ酸出現割合を算出したところ、あるアミノ酸に収束する箇所と、比較的どのようなアミノ酸も許容される箇所が存在することが明らかとなった。これらの結果を踏まえて、NGS から得られた配列の中から複数の人工抗体の候補配列を選出し、大腸菌で発現・精製を行った。解離定数測定の結果、獲得した人工抗体のうち、最も強い結合をもつクローンは HPPU に対して数 nM という、鋳型クローンと比較してより高い親和性を持つことが判明した。さらに面白いことに、アミノ酸

残基が数個異なる他のクローンは、それぞれ異なる結合速度定数と解離速度定数を持っていることが分かった。今後、これらを研究に合わせて使い分けることで、有用なツールが構築できると考えられる。本研究で開発した HPPU-人工抗体系は、将来、細胞機能の解析や人工制御、ドラッグデリバリーなど様々な用途に応用できると期待される。

参考文献

- [1] Gregory A Weiss, et al., *Chemistry & Biology* **2000**, Vol 7 No 8.
- [2] T. Ishizawa et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 5433–5440.
- [3] T. Kondo, et al., submitted.
- [4] A. Koide, et al., *J. Mol. Biol.* **1998**, 284, 1141-1151

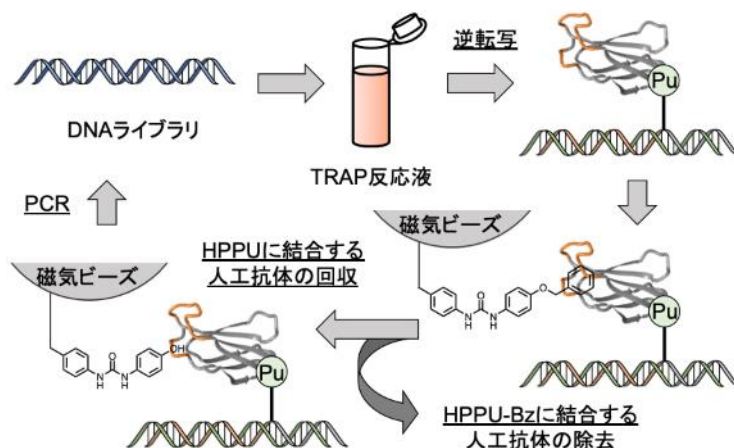
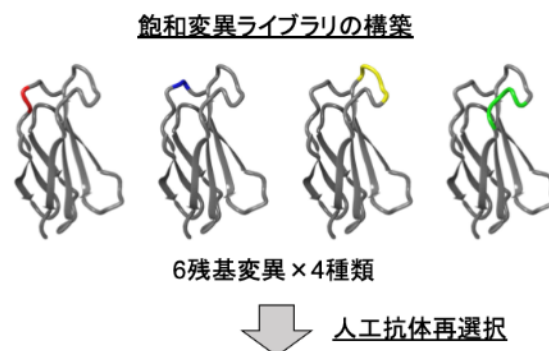


図 2. TRAP 提示法を用いた HPPU 特異的な人工抗体選択



Monobody	K_d (nM)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)
1 (鋳型)	34	1.5×10^4	5.2×10^{-4}
8	26	2.0×10^4	5.3×10^{-4}
9	8.9	4.7×10^4	4.2×10^{-4}
10	8.9	1.9×10^4	1.7×10^{-4}
11	6.6	1.3×10^4	8.5×10^{-5}
12	5.3	1.5×10^4	7.9×10^{-5}

図 3. 飽和変異ライブラリによる人工抗体配列の最適化

Award Accounts

第 14 回バイオ関連化学シンポジウムポスター賞

Microcavity array を用いた単一細胞変形能計測に基づくがん細胞プロファイリング法の確立

東京農工大学大学院工学研究院
永田 涼子, 根岸 諒, 田中 剛, 吉野 知子



著者紹介: 熊本高等専門学校生物化学システム工学科卒業後、3 年次編入で東京農工大学工学部生命工学科に進学しました。現在、同校工学府生命工学専攻博士前期課程 1 年です。高専在学時は、ネジバナという植物の花粉を用いた重複受精機構の解明に取り組んでいましたが、大学進学後は研究分野を大きく変えて単一細胞解析技術を開発している吉野研究室に所属しています。今年度はコロナの影響でなかなか実施できていませんが、スポーツ大会、合宿、飲み会などの様々なイベントを楽しみつつ、日々研究活動に邁進しています。

1. はじめに

真核細胞は、弾性及び粘性の力学特性を併せ持つ粘弾性材料であり、特にがん細胞では変形能と浸潤能に相関があることが知られている^[1]。このことから、細胞の力学特性はがん細胞の状態をモニタリングする無標識バイオマーカーとして注目されている。これまでに原子間力顕微鏡 (AFM) やマイクロ流体デバイスを用いた細胞力学特性測定用の技術が開発されている。一方、これらの技術はハイスループットとイメージング解析の両立が困難である。

当研究室では、血球細胞などの高集積化を目的とした単一細胞捕捉用デバイス Microcavity array (MCA) を開発している^[2]。MCA とは、微細貫通孔を多数有するデバイスであり、下部からの吸引によって細胞を 1 細胞ずつ微細貫通孔上に捕捉させる技術である (図

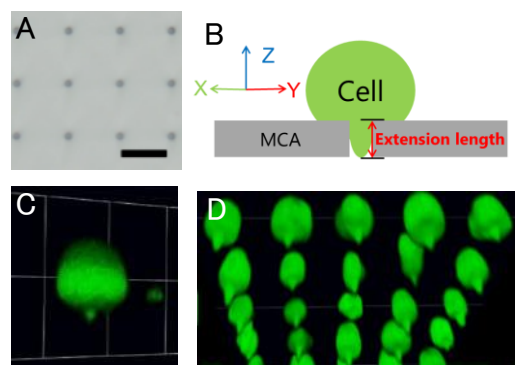


図 1 細胞捕捉デバイス (Microcavity array)
(A) MCA の表面構造
(B, C) MCA に捕捉された単一細胞の模式図と 3D 画像
(D) アレイ化された細胞の 3D 画像

1)。これまでに MCA を用いて細胞捕捉時に吸引圧によって生じる細胞の変形をイメージング解析に基づいて計測し、正常細胞とがん細胞の判別が可能であることを確認している^[3]。そこで本研究では、がん細胞の浸潤能評価に向けて、細胞変形能計測に基づく細胞プロファイリング法の確立を目指した。具体的には、MCA 上への細胞捕捉数及び観察領域の検討により変形能測定条件を決定し、異なるがん細胞株間における変形能比較を試みた。

2. がん細胞の変形能計測条件の決定

細胞導入量が変形能計測に与える影響を評価するために、MCA 上の孔数が 10 万孔に対して導入した細胞数を細胞充填率と定義し、充填率 40%、60%、80%におけるヒト肺がん細胞株 (NCI-H1975 細胞) の細胞伸長距離を計測した。その結果、伸長距離は細胞導入量に依存して増加することが確認された。そこで、細胞の変形が明確で細胞間の比較に適した充填率 80%における細胞伸長距離及び細胞の体積を測定し、相関分析を行った。その結果、細胞体積と伸長距離は相関を示さなかった。このことから、

MCA を用いた変形能計測は細胞サイズに依存せずに評価できることが示された。現在使用されている主要な変形能計測技術であるマイクロ流体デバイスは、マイクロスケールの狭窄部に細胞を通過させた際の通過時間や変形度で細胞変形能を測定する技術である。そのため、高いスループットを有するが、測定結果が細胞サイズの違いに影響を受けることから試料に制限があることが課題とされていた。一方で、本手法を用いた変形能計測では異なるサイズの細胞が混在する試料においても、サイズ分画処理を必要とせず、すべての細胞の変形能を同時に評価できる測定技術の開発に成功した。

3. 異種がん細胞の変形能評価

続いて、検討した条件をもとに異種がん細胞間での細胞伸長距離の比較を行った。細胞にはヒト非小細胞肺癌である NCI-H1975 及びヒト乳がん細胞 MCF-7、ヒト胃がん細胞 SNU-1 を用い、細胞種ごとに 90 細胞ずつ測定を行った。その結果、NCI-H1975 では $4.6 \pm 1.7 \mu\text{m}$ 、MCF-7 では $5.5 \pm 2.1 \mu\text{m}$ 、SNU-1 では $9.6 \pm 2.5 \mu\text{m}$ となり、SNU-1 が他の 2 種と比較して伸長距離が長いことが確認された(図 2)。SNU-1 は細胞骨格タンパク質の発現量が低く、悪性度の高い細胞と知られている^[4]。このことから、細胞伸長距離は悪性度に対応した変形能だけでなく、細胞骨格の組織度を反映していることが予想された。これにより、細胞伸長距離の評価によって、がん種の特性を反映した変形能情報を取得可能であることが示唆された。

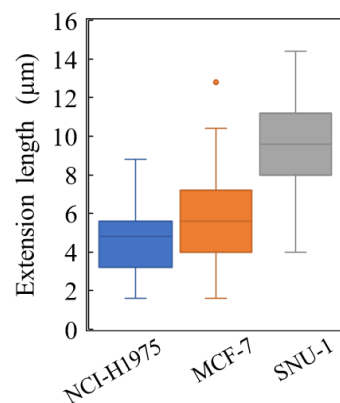


図 2 異なる細胞株の伸長距離

4. おわりに

本研究では変形能評価の測定条件を決定し、3 種類の異なるがん細胞から特性を反映した変形能情報を取得可能であることを示した。これにより、MCA を利用した細胞変形能の計測はがん細胞の悪性度を予測するプロファイリング技術として有効であることが示唆された。今後は、血液などの体液中に含まれるがん細胞の変形能の計測を行うことで、低侵襲な臨床診断ツールへの応用を目指す。また、本変形能計測はイメージング解析とも併用が可能であるため、がん細胞内のオルガネラや細胞物性情報など多角的に細胞情報を取得することで、より細分化されたがん細胞プロファイリング技術の構築を目指していきたい。

参考文献

- [1] Xu, W.; Mezencev, R.; Kim, B.; Wang, L.; McDonald, J.; Sulchek, T. *PLoS One* **2012**, *7*(10), e46609.
- [2] Hosokawa, M.; Hayata, T.; Fukuda, Y.; Arakaki, A.; Yoshino, T.; Tanaka, T.; Matsunaga, T. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6629-6635.
- [3] Yoshino, T.; Tanaka, T.; Nakamura, S.; Negishi, R.; Shionoiri, N.; Hosokawa, M.; Matsunaga, T. *Anal. Biochem.* **2017**, *520*, 16-21.
- [4] Park, J. G.; Frucht, H.; LaRocca, R. V.; Bliss, D. P., Jr.; Kurita, Y.; Chen, T. R.; Henslee, J. G.; Trepel, J. B.; Jensen, R. T.; Johnson, B. E.; Bang, Y. J.; Kim, J. P.; Gazdar, A. F. *Cancer Res.* **1990**, *50*(9), 2773-80.

Award Accounts

🏆 第14回バイオ関連化学シンポジウムポスター賞

In vivo で骨細胞の機能を可視化する pH 感受性蛍光プローブの開発

¹ 大阪大学大学院工学系研究科² 大阪大学免疫学フロンティア研究センター³ 大阪大学量子情報・量子生命研究センター橋本 龍¹, 蓑島 維文¹, 菊地 和也^{1,2,3}

著者紹介：大阪大学工学部応用自然科学科応用化学コース在籍時から菊地研究室に所属しています。現在、大阪大学工学研究科生命先端工学専攻物質生命コース博士前期課程2年生。これまで学んできた化学の知識を使って生命現象の解明に近づくためのツール開発に取り組んでいます。日々、実験や得られたデータを見て一喜一憂しながら研究に励んでいます。しかし自分の作った分子が生体内で思い通りに機能することを目にした際は何にも変えることのできない喜びを感じます。博士前期課程を卒業した後は、同研究室にて博士後期課程に進学する予定です。まだまだやりたいこと、できないことがたくさんあるので後期課程の三年間でできるだけ多くのことを吸収していきたいと考えています。

1. はじめに

骨細胞(Osteocyte)は、骨組織内でもっとも多く存在する細胞であり骨基質中の骨小腔(Osteocytic lacuna)と呼ばれる空間に存在している。骨細胞は骨細管(Canaliculus)と呼ばれる管を通して骨細胞同士でネットワークを形成し、さらには骨組織上の破骨細胞(Osteoclast)や骨芽細胞(Osteoblast)とシグナル伝達を行っていると考えられている^[1]。近年、骨細胞が果たしている機能の解明が進められており、破骨細胞と骨芽細胞による骨リモデリングの制御に大きく関与していることが示唆されている。

2. pH 感受性蛍光プローブ "pHocas-RIS"

骨細胞が持つ機能の中の一つに、骨細胞自身が骨小腔内で酸性領域を作り出し、骨吸収を行う骨細胞性骨溶解という機能についてその存在が議論となっていた。骨細胞は骨組織内部に存在するため、その機能を生きたままリアルタイムで観察することは困難である。一方、われわれは破骨細胞の活性を検出する蛍光プローブ(pHocas)と二光子励起顕微鏡を用いたイメージング技術により骨の組織上の細胞を生きたまま可視化することに成功し、破骨細胞の骨吸収活性およびその分子機構を明らかにしてきた^[2]。pHocas は破骨細胞が骨吸収時に作り出す酸性領域を検出できる pH 応答性色素とプローブを骨組織へと送達を可能にするリガンド部位から成り立っている。しかしこの pHocas は骨組織上に分布するように設計されているため、骨細胞が存在する骨組織内部へとプローブを送達させることはできず、骨細胞の活性検出への応用展開は達成できなかった。そこで、本研究では pH 応答性を持つ新規

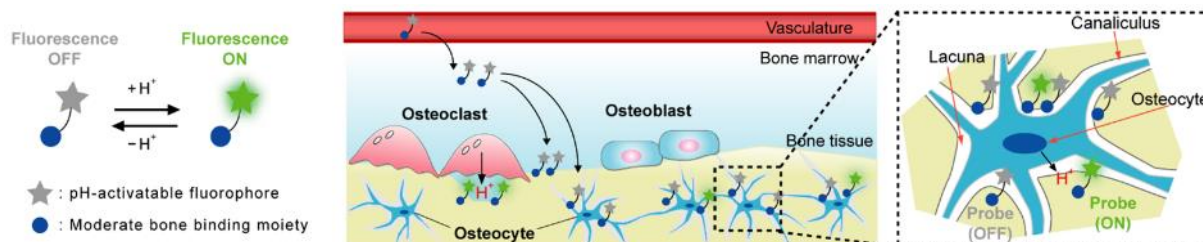


Figure 1. pHocas-RIS プローブの骨小腔へのデリバリーと低 pH 環境の検出

プローブを骨細胞の存在する骨小腔へとデリバリーさせ、骨細胞性骨溶解の可視化を目的とした (Figure 1.)。骨小腔へプローブを送達させるため、骨小腔への分布が報告されているリセドロネート (RIS) という化合物をリガンドとして選択した^[3]。そして骨小腔内の pH 環境を可視化するために pH 応答性を持つプローブ (pHocas-RIS) と常時蛍光性のプローブ (pHocas-AL-RIS) を設計、合成した (Figure 2.)。プローブの pH に依存した光学特性はバッファー中、及びヒドロキシアパタイト上で確認した。

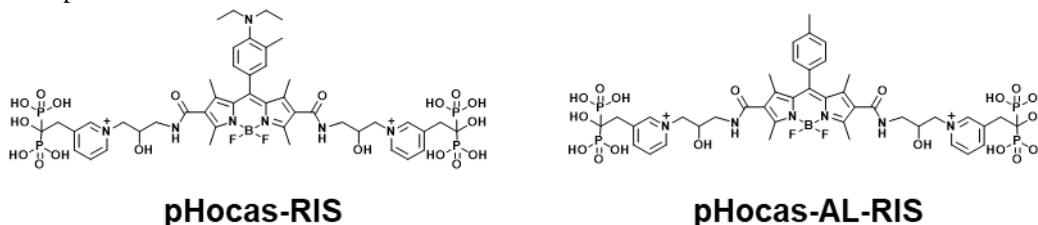


Figure 2. 骨小腔をターゲットとした蛍光プローブ pHocas-RIS, pHocas-AL-RIS の構造

3. 生体骨イメージング

次に、二光子励起顕微鏡を用いてマウスの生体イメージングを行った。プローブを投与し骨組織表面を観察したところ、常時蛍光性の pHocas-AL-RIS は骨組織表面から一様に蛍光シグナルが観察されたのに対し、pH 応答性の pHocas-RIS は骨組織上の一部において蛍光シグナルが観察された。また pHocas-RIS を投与したマウスから骨組織切片を作製し各 pH に調製したバッファーに浸漬したところ、pH の低下に応じて骨小腔内の pHocas-RIS の蛍光強度が増大していくことを確認し、pHocas-RIS が骨小腔まで送達されていることを確認した。さらに pHocas-RIS を投与したマウスでの生体イメージングでは骨小腔の一部から低 pH に応答した pHocas-RIS の蛍光が見られ、骨小腔内の低 pH 環境を生きたまま可視化することに成功した (Figure 3.)。

4. まとめ

骨組織の深部へと到達が可能なりガンドを有した pHocas-RIS を開発し、骨小腔へと pH 感受性プローブを送達させることに成功した^[4]。さらに生体イメージングにより骨小腔内の低 pH 環境を可視化することに成功した。今後はこのプローブを用いて骨細胞性骨溶解のさらなるメカニズムの解明が期待される。

謝辞

生体二光子イメージングでお世話になりました大阪大学大学院医学系研究科/生命機能研究科の石井優教授、菊田順一准教授、鎗伸弥さんに感謝申し上げます。

参考文献

- [1] A. G. Robling, and L. F. Bonewald, *Ann. Rev. Physiol.* 2020, 82, 485-506.
- [2] H. Maeda, *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **2016**, 12, 579-585.
- [3] S. Sun, *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2016**, 27, 329-340.
- [4] R. Hashimoto, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59, 20996-21000.

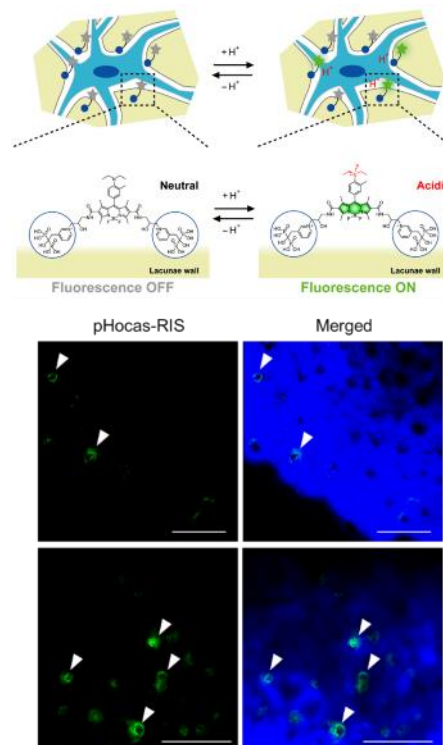


Figure 3. pHocas-RIS を用いた骨小腔の生体二光子イメージング

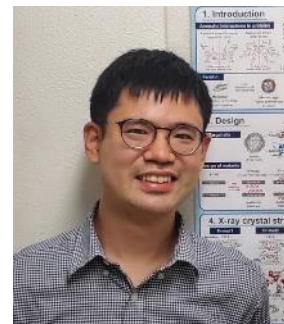
Award Accounts

🏆 第14回バイオ関連化学シンポジウムポスター賞

タンパク質ケージの内部空間設計による
芳香族クラスターの構築

東京工業大学生命理工学院

菱川 湧輝, 野谷 大樹, MAITY Basudev, 安部 聡, 上野 隆史



著者紹介: 鈴鹿工業高等専門学校生物応用化学科卒業(2016 年)。東京工業大学生命理工学部生命工学科卒業(2018 年)、同校生命理工学院修士課程修了(2020 年)。東工大-清華大大学院合同プログラムにより、2018 年 9 月から 1 年間中国の清華大学化学工程系へ留学し、分子動力学シミュレーションを習得。現在、東京工業大学生命理工学院博士後期課程に在学し、上野研究室にて、実験と計算の両アプローチから、タンパク質集合体の精密な設計に取り組んでいます。高専時代の微生物燃料電池の研究から一貫して、生命の複雑な現象を化学的な視点でどのように定量的かつ理論的に捉えるか、また、生命の精巧な構造を生かして、新しいバイオ材料をどのように設計するかを探索し続けています。

1. はじめに

芳香族アミノ酸は、リガンドの認識や、タンパク質のフォールディング、二次構造の安定化など、重要な役割を担っている。芳香族アミノ酸が密集した構造は、芳香族クラスターや π - π ネットワークと呼ばれており、多くのタンパク質で確認されている[1]。芳香族クラスターの物性や機能制御の重要性は以前から指摘されており、ペプチドや小分子レベルでは、人工的な芳香族クラスターの構築が試みられている[2]。しかしながら、タンパク質レベルの詳細な情報を得る手法は確立されておらず、タンパク質中の動的要素を含むモデル構築が必要であると考えられる。そこで、本研究では、24 個のサブユニットからなり、様々な機能化や分子集積が可能なフェリチンケージ(Figure 1a)に着目し[3]、ケージ内部に芳香族クラスターを体系的に構築することで、芳香環の数と配向性制御、動的挙動解析、および反応性評価を目指した。

2. 芳香族クラスターの設計・結晶構造解析

芳香族クラスターの設計部位として、フェリチンの 2 回対称界面に着目した(Figure 1b)。フェリチン単量体あたり 4 残基(24 量体ケージあたり 96 残基)のフェニルアラニン(Ph)を 2 回対称サブユニット界面の内側に導入した **Fr-mut1** を設計した。比較のため、2 回対称界面の外側、または中心から離れた位置に Ph を導入した **Fr-mut2** および **Fr-mut3** をそれぞれ設計した (Figure 1c)。これらの変異体が大腸菌で発

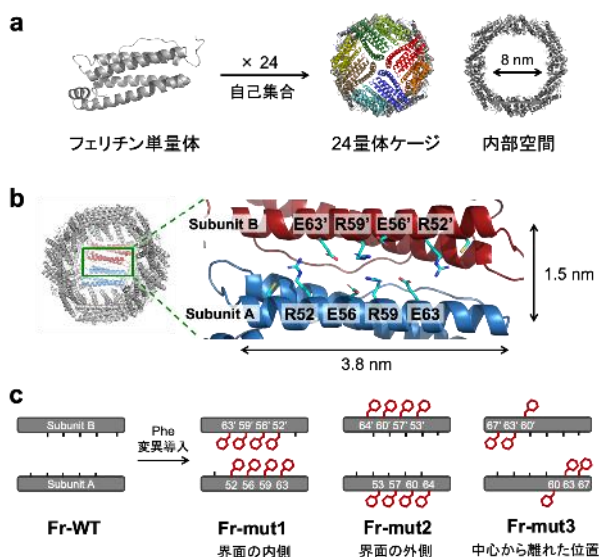


Figure 1. (a) フェリチンの構造 (PDB ID: 1DAT)。 (b) フェリチンの 2 回対称サブユニット界面。 (c) フェニルアラニン導入部位の模式図。

現・カラム精製した後、MALDI-TOF-MS により同定した。Native PAGE および X 線結晶構造解析により、**Fr-mut1, 2, 3** は、変異導入後も 24 量体構造を保持していることを確認した。

Fr-mut1 では、6 個のフェニル環が、フェニル環の中心間距離 7 Å 以内に位置し、2 回対称界面の内部で芳香族クラスターを形成した。また、**Fr-mut2, Fr-mut3** においては、6 個、5 個のフェニル環からなるクラスターが形成された。**Fr-mut1** および **Fr-mut3** の比較から、Phe35 の配向は同じであるが、Phe63 の配向が異なり、周囲に存在する他のフェニル基が配向に影響を与えることが示唆された。

3. 芳香族クラスターの動的挙動・芳香族色素複合化

芳香族クラスターの動的挙動を明らかにするため、Amber による MD シミュレーションを実施し、Phe 側鎖のねじれ角の時間変化を追跡した。**Fr-mut1** では、Phe56 および Phe63 の側鎖のフェニル環の配向が、他の Phe に比べ大きく変化した。これらの Phe は、いずれもクラスター形成に関与していることから、周囲のフェニル側鎖の共同効果である可能性が示唆される[4]。

ナイルレッド複合化試験では、フェニル環の配向・キャビティの有無によって、芳香族色素の取り込みに顕著な差が見られた(Figure 3a, b)。**Fr-mut1** は、2 回対称界面の中央部にキャビティを有しており(Figure 2b)、これが芳香族色素の取り込みを促進したと考えられる。

4. まとめ

フェリチンケージ内部空間における Phe 導入位置の精密な設計により、5-6 個のフェニル環からなり、異なる幾何学構造を有する芳香族クラスターの構築と構造決定に成功した。今後は、さらに芳香環の構造・動的挙動・機能の関係性を体系的に整理したいと考えている。

謝辞

本研究を指導して下さった上野隆史教授、安部聡助教、Maity 特任助教、協力して下さった研究室のメンバーに、感謝申し上げます。芳香族化合物の候補選定、内包方法について助言を承りました東京工業大学科学技術創成研究院の吉沢道人教授、成田陽奈さん、X 線回折測定に関して助言を承りました東京工業大学技術部すずかけ台分析支援センターの清悦久技術職員に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Lanzarotti, E.; Biekofsky, R. R.; Estrin, D. A.; Marti, M. A.; Turjanski, A. G. *J. Chem. Inf. Model* **2011**, 51, 1623.
- [2] Makwana, K. M.; Mahalakshmi, R. *Protein Sci.* **2015**, 24, 1920.
- [3] Hishikawa, Y.; Maity, B.; Ito, N.; Abe, S.; Lu, D. N.; Ueno, T. *Chem. Lett.* **2020**, 49, 840.
- [4] Dreydoppel, M.; Raum, H. N.; Weininger, U. *J. Biomol. NMR* **2020**, 74, 183.

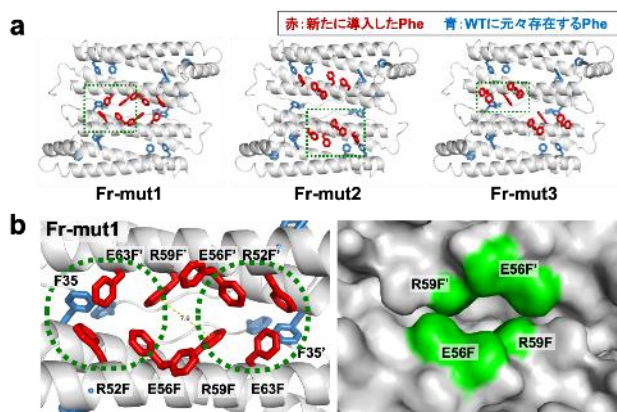


Figure 2. (a) 設計した変異体の X 線結晶構造。(b) **Fr-mut1** の 2 回対称界面に形成された芳香族クラスターおよびキャビティ

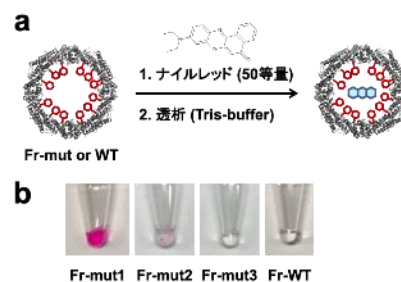


Figure 3. (a) ナイルレッドの内包スキーム。(b) 透析後の溶液の写真。

脳内における内在受容体の固定駆動ラベリング

京都大学大学院工学研究科
美野 丈晴



著者紹介：

1995 年生まれ。兵庫県神戸市出身。京大工学部工業化学科を卒業。学部時代には、マイコンクラブ、映画研究会、落語研究会、学生団体 (AIESEC)、スキーサークル etc.様々な団体で活動しながら、学業にも邁進しました (留年 1 回)。

現在は京大・浜地研に所属 (博士前期課程 2 年生)。配属から 2 年半、分子レベルでの脳機能解明に貢献したいとの想いで研究を続けてきました。デスクでゴリゴリと騒音を立てながら珈琲豆を挽いても許してくださる、寛容な研究環境に感謝しています。写真は今年の研究室旅行 (城崎) にて。

1. はじめに

タンパク質は我々の生理機能を担う重要な生体高分子の一つであり、生体組織中での局在や発現を明らかにすることは、タンパク質機能を調べる上で重要である。遺伝子工学的に蛍光タンパク質を融合させる手法は、標的タンパク質の発現・局在を直接可視化することを可能とする。しかしながら、蛍光タンパク質融合法は多くの場合過剰発現となり、また融合が標的タンパク質の発現や局在に摂動を与える可能性がある。免疫染色法は内在性タンパク質の可視化を可能とするが、組織や器官全体の 3D イメージングは難しく、組織固定処理等が結果に与える影響を完全には排除出来ない。

2. 固定化駆動ラベリング戦略

以上の問題を解決する新たなタンパク質イメージング法として、発表者らは組織や器官で適用できる固定化駆動ラベリング法の開発を行なっている。本手法では、1) 標的タンパク質に特異的親和性を有するリガンド、2) 蛍光色素、3) 求核性官能基を導入したプローブを用いる。本プローブを生きた動物個体へ投与したのち、PFA (パラホルムアルデヒド) による全身灌流固定を行うことで、標的タンパク質への共有結合を介した蛍光標識が可能となる (Figure a)。本手法では、生きた動物体内でリガンド認識を行うため、既存の免疫染色法よりも標的タンパク質の局在を天然に近い状態で可視化できると期待している。

3. 培養細胞上での GABA(A)受容体タンパク質の可視化

はじめに、固定化駆動ラベリングの proof-of-principle 実験として培養細胞上に発現した GABA(A)受容体のイメージングを試みた。GABA(A)受容体選択的なリガンドとして phenylgabazine (Gzn) を採用し、求核性官能基 (Lys) と蛍光色素 (AlexaFluor555) を導入したプローブ Gzn-Lys-AF555 を設計・合成した (Figure b)。Gzn-Lys-AF555 を GABA(A)受容体発現細胞へ添加し、PFA 溶液による細胞固定化処理を行った結果、細胞膜上からの強い蛍光シグナルが観測された (Figure c)。このシグナルは、GABA(A)を発現していない細胞では見られなかったことから、標的の選択的な蛍光ラベル化が進行していることが示唆された。一方、リガンドとして Gzn を有さないプローブや、求核性部位を持たないプローブを用いた場合、細胞膜上の蛍光シグナルが観測されなかった。以上の結果は、リガンドの親和

性による標的タンパク質認識と、プローブ上の求核性官能基を介したクロスリンクによってラベル化が進行することを示している。

4. マウス小脳内在性 GABA(A)受容体のイメージング

次いで、固定化駆動ラベリング戦略によって、マウス小脳に内在する GABA(A)受容体の可視化を試みた。具体的には、Gzn-Lys-AF555 を生きたマウスの小脳へ直接注射し、PFA 溶液による全身灌流固定を行った。単離した小脳を切片化し共焦点蛍光顕微鏡で観察すると、GABA(A)受容体の高発現が知られる小脳分子層及び顆粒層領域から、AF555 由来の蛍光シグナルが観測された (Figure d)。このシグナルは、求核性部位を持たないプローブや、リガンドとして Gzn を用いていないプローブでは観測されなかった。これらの実験結果から、マウス小脳に内在的に発現している GABA(A)受容体をも、固定化駆動ラベリング戦略により蛍光標識可能であることが示された。

5. まとめと今後

我々が新たに開発した固定化駆動ラベリング戦略によって、マウス小脳に内在する GABA(A)受容体の可視化に成功した。我々の研究室では、本手法が、mGlu1 受容体や AMPA 受容体といった他の内在タンパク質にも適用可能であることが明らかになりつつある。今後は、標的タンパク質の拡張や本手法を用いた受容体の発現パターン変化の解析などを目指す。

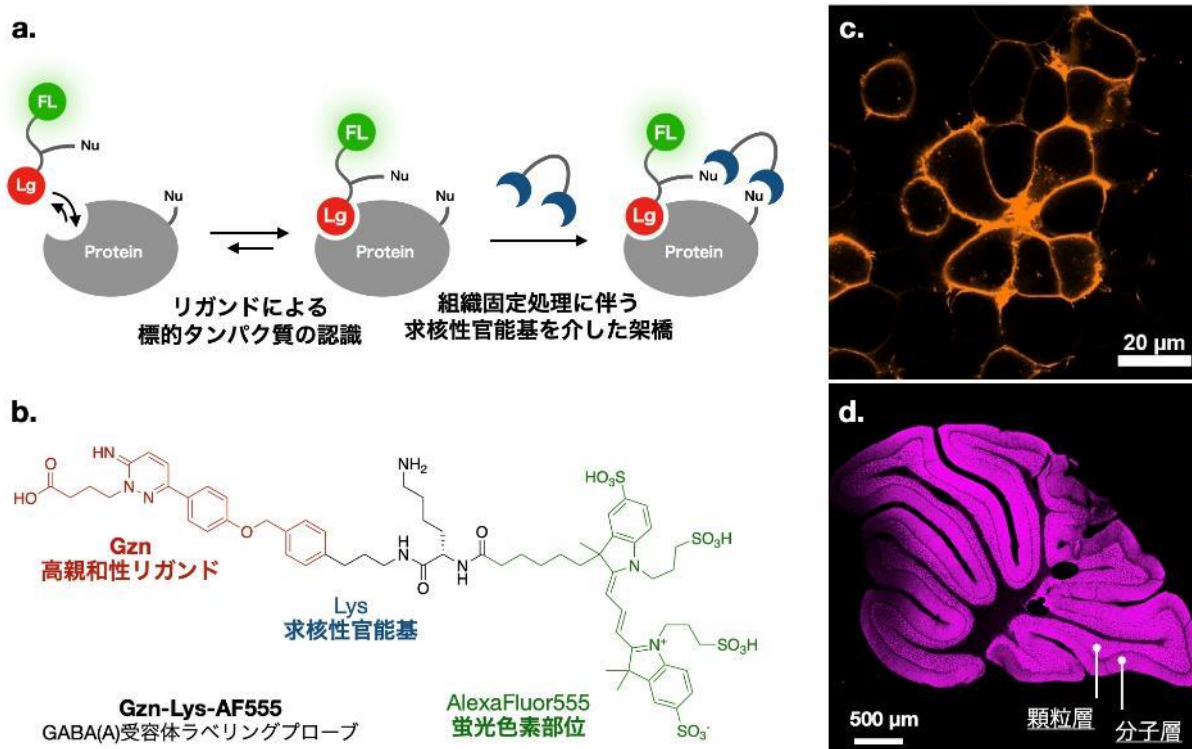


Figure (a) 固定化駆動ラベリング戦略の概念図. (b) GABA(A)受容体をターゲットとした固定化駆動ラベリングプローブ. (c) 固定化駆動ラベリングによる培養細胞発現系 GABA(A)受容体のイメージング. (d) 固定化駆動ラベリングによるマウス小脳内在性 GABA(A)受容体の可視化.

ぶらり研究室の旅

愛媛大学 プロテオサイエンスセンター

生体分子工学部門（小川研）

30 歳単身から始めた地方での研究室運営十数年

皆さん、こんにちは。愛媛大学の小川と申します。はじめに、このような機会を与えていただきました編集委員の先生方に感謝申し上げます。まだまだ若輩者ではございますが、比較的特殊な経緯で独立・研究室運営に至ったこともあり、その辺りのことも含めてご紹介できれば興味を持って下さる方もおられるだろうと思い、僭越ながら寄稿させていただくことに致しました。

独立に至る経緯： 京都大学の学生だった私は、齋藤烈先生の研究室で中谷和彦先生に合成化学（修飾核酸の化学合成）の手ほどきを受けた後、修士課程では一転して、藤本博先生・榊茂好先生の研究室で理論化学（分子間軌道相互作用の解析）の研究を行い、博士課程では、また一転して、青山安宏先生の研究室で山東信介先生の直接指導の下、分子進化工学（機能性生体分子のセレクション）の研究に取り組みました。特に、修士課程 2 年時に自由に研究する環境を与えられたこと、博士課程時に山東先生の研究立ち上げに携わったことが、早くから独立を目指す契機になったと思います。学位を取得した後は、理研の前田瑞夫先生の研究室にて基礎科学特別研究員（基礎特研）として研究することになりました。博士課程 3 年時の 4 月に娘を授かったこともあって、就職先は日本に決めており、自分の好きな研究を自由に行える基礎特研制度に魅せられたのが志望の最大理由です。前田先生には、実際に制度の趣旨通りに扱っていただきました。そのおかげで、博士課程時の分子進化工学研究からシフトした「合理的な核酸工学研究」を自分なりに立ち上げることができ、理研在籍時に執筆した全ての論文で私が責任著者（一部は共責任著者）となりました。すっかり独立心に火がついた私は、基礎特研 3 年の任期満了を迎える少し前に、まだ確立期であった「テニュアトラック制度」の波に上手く乗る形で、愛媛大学にて研究室（小川研！）を構えることになりました。2008 年 12 月、当時、弱冠 30 歳でした。

独立後からテニュア取得までの苦闘： 愛媛大学を選択した理由は、（松山が子育てに良さそうな環境ということに加えて）遠藤弥重太先生が開発された「コムギ無細胞系」に興味を持ったからです。核酸工学と組み合わせ、真核生物系の生体分子工学を展開できるのでは？と研究を開始しました。ただ、「独立した」と言ってもテニュアトラック教員（本学では当時「上級研究員」という名称）です。幸いにも潤沢な研究費をいただいたおかげで実験機器はある程度整備できたものの、実験室は 1 部屋の半分（28 m²）のみで、メンバーは私 1 人だけというスタートでした（写真 1）。最初に単著の研究論文を投稿した際に、エディターから「レビューでもないのに単著？素晴らしいけど（お世辞）、普通じゃないよね。所属長の確認書出してくれる？」と疑われたのは良



写真 1. 2009 年 5 月頃の実験室の様子。
手前半分が小川研スペース。

思い出です。2010 年からは学生が毎年 2 人ずつ来てくれたのですが、テニユアの取得基準はやや厳しくて、実際に研究を開始した 2009 年 2 月頃から 2012 年 9 月頃の審査会までの実質 3 年半で約 10 報分の業績が必要というものでした。そのため、当該期間は単身研究も多く、共著論文 4 報に加えて、単著論文 6 報を数えます。何とか基準をクリアして、2013 年 4 月、テニユア准教授として採用され、小川研も存続することになりました（写真 1 の奥側半分を入手し、実験室は 2 倍になりました）。

現在の研究室の状況： テニユア取得後の小川研の所属先は、「プロテオサイエンスセンター (PROS)」になりました（当初は工学部、現在は理学部を兼任）。ちょうどテニユアを取得した時に、無細胞生命科学工学研究センターとプロテオ医学研究センターが融合（+α）して設立されたセンターです。生体分子工学部門の小川研では、部門名の通り、「コムギ無細胞系を活用した生体分子工学研究」に引き続き取り組んでいます（紙面の都合上、詳細は HP や最近の論文をご参照ください）。学位取得後以降、上述の事情から 1 匹狼的に自分の好きなことをやってきましたが、テニユア取得後あたりから共同研究のお誘いを受ける機会も増えてきました。私の興味の性質上、小川研単独では極めて基礎的な研究を行っていますが、「それ何の役に立つの？」「それやってどうするの？」という質問が「これに使えるんじゃない？」「うちの研究に使えるさだから一緒にやろう」という建設的なものになってきたのを感じます。学内外の先生方に声をかけていただいて、最近では、血管新生を制御する核酸医薬の創出、葉緑体やマラリア原虫内における人工リボスイッチ媒介発現制御、核酸修飾ナノ粒子の一分子計測を用いた高感度分子検出法の開発など、幅広い共同研究を展開しています。1 人から始めて孤軍奮闘した時期もあったものの、歴代の小川研所属学生のサポートもあって、研究室立ち上げから十数年を経て『小川研』の看板も少しずつ光ってきたようです（単著の研究論文を書くことはもう無さそう？）。

小川研には、私が兼任している学部の学生が毎年 2 人ほど来てくれます。当該学部の修士課程進学率は 3 割程度で、博士課程進学率はほぼゼロですが、これまで小川研で指導した学生（20 人強）は 7 割以上が修士課程に進学し（うち 4 割は旧帝大などに行ってしまいましたが・・・）、今年是小川研初の博士課程学生を受け入れました。ここ最近では、私を含めて毎年 5 人程度の体制で研究室を運営しています。今年はコロナの影響で、感染者の少ない四国にある愛媛大学でも一時は「研究室閉鎖」という未曾有の事態になりましたが、執筆時現在は、博士課程 1 人、修士課程 1 人、学部 4 回生 2 人、私の計 5 人で、56 m² の 1 部屋実験室にて研究に励んでいます（写真 2）。

30 歳という若さで独立してこれまで何とかやってこれたのは、ここで紹介させていただいた諸先生方を始め様々な先生方・学生のご助力があったからです。この場を借りて厚くお礼申し上げます。



写真2. 2020 年 9 月末の実験室の様子。

写真1と何が違うでしょう？

連絡先: 愛媛大学 プロテオサイエンスセンター

e-mail: ogawa.atsushi.mf@ehime-u.ac.jp

住所: 〒790-8577 愛媛県松山市文京町 3 番

電話番号: 089-927-8450 (直通)

ホームページアドレス: <http://www.pros.ehime-u.ac.jp/ogawa/>

部会行事

第14回バイオ関連化学シンポジウム開催報告

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

九州大学大学院	工学研究院	後藤 雅宏
	薬学研究院	王子田彰夫
	工学研究院	神谷 典穂

令和2年9月7日（月）～8日（火）の二日間にわたり、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）がオンライン形式で開催されました。

当初、本シンポジウムは九州大学馬出キャンパスにて開催する予定でしたが、新型コロナウイルス感染拡大のため、通常の形式での開催が危ぶまれる状況となりました。このため5月12日に生体機能関連化学、バイオテクノロジー両部会の幹部、ならびにシンポジウムの開催準備にあたる実行委員との間で協議を行い、本年度は福岡での現地開催を中止し、オンライン形式での学会開催に切り換えることとなりました。

過去の例のないオンライン開催準備であり、実行委員会としては戸惑いがありましたが、オンライン学会運営のサポートをお願いする業者の選択、オンラインでの口頭ならびにポスター発表の形式、参加申し込みの方式等について、運営サポート会社であるブランドコンセプト社を交えた複数回のオンライン会議を実施しつつ、準備を進めて行きました。また、オンライン開催に切り替わった事を受けて、学会ホームページの作り変えを行いました。

学会初日の9月7日早朝は九州地方に非常に強い勢力を持った台風10号が襲来しましたが、オンライン開催であったため、特に支障なくシンポジウムを開始することができました。当初の予定どおり現地開催であったならば学会中止になっていたかも知れず、オンライン開催に切り替えたことは不幸中の幸いであったといえます。シンポジウムは、本シンポジウムの実行委員長である後藤雅宏先生のご挨拶からスタートしました。その後二つのオンライン会場に別れ zoom を用いた口頭発表が行われました。いずれの口頭発表においても参加者から多くの質問があり、活発な議論が行われました。また、午後のポスター発表では、発表者全員が各自 zoom サイトを開設し、聴衆は興味のあるポスターの zoom サイトに入り発表者とリアルタイムで自由討論できる形式としました。このスタイルは、他の多くのオンライン学会がチャット形式でポスター発表を行う中で、全く未知の試みでしたが、通信上の問題もほとんど起こる事なくスムーズに会を進行することができました。一方でオンラインシンポジウムとなったため、毎年恒例の懇親会ならびに特別招待講演は止むなく中止としました。

本年は、オンラインシンポジウムであったため参加者数は例年よりも少なく、当日参加者を含め計331人でした。また、口頭発表の件数は53件、ポスター発表の件数は176件となりました。一方で、オンラインシンポジウムであったにもかかわらず、5つの企業から広告掲載のご協力を賜りました。運営を担当していただいた実行委員の先生方、ならびに日本化学会の保倉光邦様には様々な面でサポートをいただきました。この場を借りて感謝申し上げます。

来年度の第15回バイオ関連化学シンポジウムは、9月2日（木曜日）～9月4日（土曜日）の日程で松浦先生のお世話で鳥取大学工学部にて開始される予定です。

第14回バイオ関連化学シンポジウム2020(オンライン開催)

会期 2020年9月7日(月)～8日(火)

[HOME](#)
[シンポジウム概要](#)
[発表申込](#)
[参加登録](#)
[タイムテーブル・プログラム](#)
[参加者・発表者へのお知らせ](#)

第14回 バイオ関連化学シンポジウム2020(オンライン開催)

会期 2020年9月7日(月)～8日(火)



株式会社 新興精機







令和2年度のバイオ関連化学シンポジウムのオンライン開催について

実行委員長 後藤 雅宏

新型コロナウイルスの非常事態宣言が全国的に解除され、皆様におかれましては、少しずつ研究活動の日常が取り戻されつつあるところだと存じます。

本年の第14回バイオ関連化学シンポジウムは、オンライン方式で開催することを決定いたしました。本シンポジウムの運営は、旧来の実行委員会が主体となって実施いたします。実行委員会としても初めての試みで、皆様に色々とご迷惑をおかけするかと存じますが、例年と変わらず多くの皆様にご参加頂けると幸いです。



部会行事

第 14 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 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
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 21 回を迎えた講演賞には、コロナ禍で研究を進めるのが困難な状況にもかかわらず、17 名も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、講演賞規定に従って、2 つの講演会場で 8 名の審査員による厳正かつ公平な審査が行われました。審査方法は、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 項目の採点に加え、審査規定に記載されている「過去の業績をレビューした内容ではなく、最新の研究成果を中心とした発表」についても精査しました。合計点の上位から下記の 3 名が講演賞受賞者として選出されました。本年は ZOOM による遠隔発表となり、講演者、聴衆、審査員のいずれにとっても不安が入り混じった中での開催でしたが、例年通り研究レベルも高く、どの発表も甲乙つけ難い内容でありました。3 名の受賞者は、上記 5 項目に関して、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 から 3 の項目で差がついていました。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、自身で推進している研究であるかが露わになります。将来の生体機能関連化学を担い世界に通用する人材育成を目指す本講演賞の趣旨を最も示す項目であり、皆さんがオリジナリティーのある研究を推進するために重要な視点です。これまで想像できなかった自然災害や疾患など、今後ますます本分野の社会的必要性が増しています。若手研究者の皆さんにはブレない研究を目指すと共に、自身の研究を通して積極的に社会に貢献していただきたいと思います。

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、五十音順）

伊藤 幸裕 大阪大学産業科学研究所・准教授

金属イオン活性型 in situ クリック反応による KDM5C 阻害薬の同定

下山 敦史 大阪大学大学院理学研究科・助教

寄生・共生菌由来リポ多糖部分構造の化学合成と免疫調節機能の解明

松村 洋寿 秋田大学大学院理工学研究科・講師

抗リウマチ薬メトトレキサートとマクロファージ遊走阻害因子の相互作用解析

本年度のバイオ関連シンポジウムは web 開催という異例の形式で開催されるためポスター審査に関しても通常とは異なる方法で審査をせざるを得ない状況になりました。本シンポジウムにおきましてはこのような状況下でも可能な限り公平かつ厳正な審査を心がけ、オンライン審査を含めた 2 段階審査にて評価いたしました。

ポスター賞審査の準備は熊本大学の勝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ました。同賞にエントリーした56名のポスター発表が、両部会に所属する59名の若手研究者により厳正に（一次審査：1件あたり5名の審査、二次審査：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6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 RSC Chemical Biology 賞、Molecular Omics 賞、および Organic & Biomolecular Chemistry 賞として表彰されました。今後は、新たな研究で本部会上位の賞である講演賞を目指してさらに研究に邁進していただきたいと思います。

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59名の若手の先生方のご協力と共に、初めてのオンライン開催を支えていただいた事務局の皆様、この場を借りて心より感謝申し上げます。

ポスター賞受賞者（敬称略、五十音順）

*1 大林 洋貴（九大院工）、*2 都築成晃（名大院工）、*3 永田涼子（東農工大院工）、橋本龍（阪大院工）、菱川湧輝（東工大院生命理工）、美野丈晴（京大院工）

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



Zoom による各賞の授賞式（2020/10/5）

お知らせ

第 14 回 バイオ関連化学シンポジウム講演賞・ポスター賞

講演賞受賞者

伊藤 幸裕	大阪大学	産業科学研究所	金属イオン活性型 <i>in situ</i> クリック反応による KDM5C 阻害薬の同定
下山 敦史	大阪大学	大学院理学研究科	寄生・共生菌由来リポ多糖部分構造の化学合成と免疫調節機能の解明
松村 洋寿	秋田大学	大学院理工学研究科	抗リウマチ薬メトトレキサートとマクロファージ遊走阻害因子の相互作用解析

ポスター賞受賞者

大林 洋貴 *1	九大院工	ペプチド-蛍光プローブ共集合体を用いた細胞内取り込みにおける形状依存性の評価
都築 成晃 *2	名大院工	低分子リガンドに特異的に結合する人工抗体の創製
永田 涼子 *3	東農工大院工	Microcavity array を用いた単一細胞変形能計測に基づくがん細胞プロファイリング法の確立
橋本 龍	阪大院工	In vivo で骨細胞の機能を可視化する pH 感受性蛍光プローブの開発
菱川 湧輝	東工大院生命理工	タンパク質ケージの内部空間設計による芳香族クラスターの構築
美野 丈晴	京大院工	脳内における内在受容体の固定駆動ラベリング

*1 Organic & Biomolecular Chemistry 賞

*2 RSC Chemical Biology 賞

*3 Molecular Omics 賞

お知らせ

第 15 回バイオ関連化学シンポジウム会告

第 36 回生体機能関連化学シンポジウム・第 24 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 3 年 9 月 2 日（木）～9 月 4 日（土）

会 場：鳥取大学工学部の講義室など（鳥取市湖山町南 4-101）

（状況によってはオンライン開催の可能性があります）

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 3 日

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：〒680-8552 鳥取市湖山町南 4-101

鳥取大学大学院工学研究科 化学・生物応用工学専攻 松浦研究室内

第 15 回バイオ関連化学シンポジウム事務局

E-mail: ma2ra-k@tottori-u.ac.jp

実行委員会：

委員長 松浦 和則（鳥取大学工学部、生体機能関連化学部会 役員）

委員 神谷 典穂（九州大学工学部、バイオテクノロジー部会 役員）

永野 真吾（鳥取大学工学部）

野上 敏材（鳥取大学工学部）

日野 智也（鳥取大学工学部）

佐藤 裕介（鳥取大学工学部）

櫻井 敏彦（鳥取大学工学部）

稲葉 央（鳥取大学工学部）

ニュースレター Vol. 35, No. 2 2020年12月14日発行

事務局：101-8307 東京都千代田区神田駿河台1-5, 日本化学会生体機能関連化学部会

The Chemical Society of Japan, 1-5 Kanda-Surugadai, Chiyodaku, Tokyo 101-8307, Japan

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

E-mail: seitai@chemistry.or.jp

編集委員：村上 裕、人見 穰、藤本 ゆかり

