

Newsletter



日本化学会
生体機能関連化学部会

巻頭言

ニューノーマル	山口浩靖	2
---------	------	---

Award Accounts 部会講演賞

細胞小器官内遊離 Zn^{2+} の濃度定量と動態観察を可能とする小分子蛍光プローブの開発	小和田俊行	4
ライブラリーvs. ライブラリーの試験管内選択を通じた直交性 RNA-RBP ペアの発見	福永圭佑	10
可視光による分裂期染色体の光操作法	松尾和哉	15

Award Accounts ポスター賞

DNA に基づく増殖因子受容体パーシャルアゴニストの開発および生理作用評価	秋山桃子	20
高輝度 CPL 発現に適した DNA 導入ピレン会合体の探索	伊藤有香	22
液-液相分離による抗体と高分子送達ペプチドの濃縮と抗体の細胞内送達	岩田恭宗	24
固定化駆動法による脳内での分子動態解析を指向した新規プローブ開発	對馬暁洋	26
Yn 設計ペプチドによる細胞内でのクラスター形成を伴う蛋白質間相互作用解析	橋本匡浩	28
メンブレンコンタクトの化学遺伝学操作を介した膜脂質代謝の可逆制御	吉川 優	30

ぶらり研究室の旅

北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス系（山口研） 化学と生物の橋渡し	山口拓実	32
--	------	----

部会行事

第 15 回バイオ関連化学シンポジウム開催報告	松浦和則	34
第 15 回バイオ関連化学シンポジウム講演賞・ポスター賞講評	廣田 俊	36

お知らせ

第 15 回バイオ関連化学シンポジウム講演賞・ポスター賞		38
第 16 回バイオ関連化学シンポジウム会告		39

巻頭言

ニューノーマル

大阪大学 大学院理学研究科
山口 浩靖

2019年(令和2年)12月に隣国で初めて新型コロナウイルス感染症(COVID-19)について報告されてから早くも2年が経過しようとしている。2021年12月1日時点のデータではこれまでに日本で172万人が感染したと診断されている。7月下旬からのウイルスの流行「第5波」で感染者数が急速に増えた後、9月には急減した。人の流れを強く抑制しなくても感染が急減したのは、ワクチン接種が進んだことによる感染抑制効果があったのか、季節性コロナウイルスに感染した経験がある人が新型コロナウイルスに抵抗性を示す「交差反応」によるものなのか、私にはわからないが、今のところ日本の人口あたりの感染者数・死者数は全世界の平均や主要国に比べて低い水準で推移している。とは言え、新たな変異ウイルスが日本を含め多くの国や地域で確認されるようになり、今後も新型コロナウイルスの報道を気にしながら「新しい日常生活」を続けていくことになるのであろう。

一時期は研究報告会や雑誌会等の研究室活動をオンラインで行っていたが、最近は通常通り対面型で実施している。いつもと違うところはマスクをしていることくらいであろうか。しかし、いざ、学会活動となると話は違うようである。2022年の日本化学会春季年会は関西学院大学で開催される予定になっているが、やはりオンラインでの実施の可能性も考慮して準備に取り組んでいるようである。皆さんはオンサイトとオンライン、どちらが良いと感じておられるであろうか。準備に携わる側としては急な社会状況変化にも対応できるようにフレキシブルな体制を整えたいところであるが、再び行動制限がかかる可能性がゼロではない状況下ではオンラインが無難なように思われる。参加する側としては、会場の雰囲気を感じながら侃々諤々議論できることを望んでおられる人もいれば、出張せずに時間を有効利用できてスライドも見やすいオンラインの方がストレスレスであると考えておられる人もいるであろう。「オンライン」が多用されるようになって感じた便利さと、人としてこれまでに自然に行ってきたコミュニケーションがどこことなく不足して感じられる不自由さが共存するのが今の「新しい日常」であると感じている。活気ある学会・部会活動を介して皆が元気と勇気を得られることを願う。

近年の自由貿易圏の拡大やインターネットの普及等を背景とした急速なグローバル化が、国家間・企業間の競争を激化させ、他方ではエネルギー・環境・食糧・新型コロナウイルスの感染拡大等々、地球規模の諸課題が深刻化している。このような状況では、地球規模の課題解決に資する緊密なグローバル連携が今後益々重要になる。競争を超越する国際的な学術研究活動が求められている。つまり、競

争ではなく、共創によって社会が抱える諸問題を解決し、社会の発展へ貢献すべきであると思われる。私は現在大学で国際交流の委員を務めている都合、世界各国・地域から留学生・研究者を受け入れ、多様な知と人材が交差し、卓越した研究成果の創出やイノベーティブな人材の育成を実現したいのであるが、この2年間、大学では研究者や学生の渡航がかなり制限され、留学生受け入れや日本からの海外派遣が思うようにできていない。海外の大学や部局の研究者や学生との交流は専らインターネットである。今夏、当研究科では毎年開催していたサマープログラムにおける留学生の受け入れが実現できなかったために、全専攻に呼び掛けて研究紹介や模擬講義をオンラインで配信することにした。実地では数十人受け入れるのが最大だったのが、オンラインにした途端に参加登録者数が1万8000人を超えた。オンライン配信の恐るべき威力を目の当たりにした。ただ、オンラインを体験しただけでその視聴者の記憶に残るイベントになっているかは別問題で、実際に渡航して体験して得たものに比べれば儂いものかもしれない。ここでもオンサイトとオンラインの一長一短を垣間見たように思う。

国際連合が掲げる持続可能な開発目標 (SDGs) の達成にも国際共創は必要不可欠だ。この先、世界が今以上に良くなるために2030年までに世界の人々が協力して解決したい17の目標が定められたSDGs、ここでも新しい日常にあたる「ニューノーマル」が求められている。地球環境に負荷をかけないSDGsを達成するには、化学とバイオの融合による新たなイノベーションに期待が寄せられている。生物を利用したバイオ化学品生産、生体系の仕組みを模倣した機能性材料創製、感染症に対処する方法論等、本部会が中心となって解決の糸口を発信できることが多々あるように思う。本部会のホームページにおいても記載されているように、生体機能関連化学部会では、理学・工学・薬学・医学・農学の領域に及ぶ生体機能に関連する化学について、生体分子や機能性分子、生体機能模倣分子等を駆使して、生物有機化学、生物無機化学、さらにはケミカルバイオロジー等の化学的研究を展開し、タンパク質、酵素や核酸、ペプチド、糖質、脂質分子から細胞が関わる生命現象を化学的に理解する学術研究とそれらを応用するための化学技術の発展を担っている。持続可能なニューノーマルの実現に資する・世界を支える生体機能関連化学の研究成果に期待を膨らませたい。

細胞小器官内遊離 Zn^{2+} の濃度定量と動態観察を可能とする小分子蛍光プローブの開発

東北大学多元物質科学研究所
小和田 俊行



著者紹介：1982年、奈良県生駒郡斑鳩町生まれ（聖徳太子ゆかりの法隆寺のある町）、小4まで東京都小平市で過ごし、その後再び斑鳩町へ。京大工学部工業化学科にて学生実験の時に、山東信介先生に「世界には自分たちより実験のうまい人はいくらでもいる。アイデアで勝負しないとアカン！」と言われたのが強く印象に残っています。学部4回生から博士号取得まで大江浩一先生のご指導のもと有機合成の研究に携わっていました。その後、阪大免疫学フロンティア研究センターの菊地和也先生にケミカルバイオロジー研究に携わるきっかけを与えて頂きました。菊地先生のご指導のもとで4年半過ごしたのち、米国スタンフォード大学にポスドクとして異動し、Jianghong Rao 教授の研究室でカリフォルニアワインとホップ（IPA）漬けの日々を送りました。その後、現在の所属である水上進教授の研究室に着任し、蛍光プローブ・光操作化学プローブの開発研究に従事しています。東北（仙台）に来て日本酒の美味しさに気づかされました。皆とワイワイやるのが好きなので、同年代の化学者を集めて化学を語らう研究会（化学フロンティア研究会）を主宰しています。

1. はじめに

亜鉛は生体内で鉄に次いで多く存在する微量必須元素である。細胞内で Zn^{2+} の多く（数十～数百 μM ）は蛋白質に結合した状態で存在している。一方で遊離（生体分子に弱く結合した状態も含む）の Zn^{2+} も細胞内に存在するが、細胞毒性を抑制するためにその濃度はごく微量（ $pM \sim nM$ ）に保たれている。こうした細胞内 Zn^{2+} の恒常性は、金属結合蛋白質であるメタロチオネインや複数の亜鉛トランスポーターによって制御されており、恒常性破綻はアルツハイマー病などの疾患に関連していることが知られている^[1]。また近年の研究で遊離 Zn^{2+} がシグナル因子として機能することがわかってきており、細胞内 Zn^{2+} の分布と動態の解析が進められている。具体的には、免疫細胞の一種であるマスト細胞では、細胞表面上に存在する IgE 受容体の刺激により小胞体付近から Zn^{2+} が放出される「Zinc wave」という現象が報告されている^[2]。また、プロテインキナーゼ CK2 は小胞体膜上の亜鉛トランスポーター ZIP7 を活性化することで小胞体から細胞質への亜鉛放出を誘導し、細胞遊走や細胞増殖に関連する細胞内シグナルを活性化するという報告もある^[3]。しかし、これらの研究において、亜鉛動態の観察には細胞内滞留性の Zn^{2+} 検出用蛍光プローブ（Newport Green DCF や Zinquin）が用いられており、定量的な評価がなされていないことや、 Zn^{2+} が小胞体から放出されていることの確証は得られていない、などの課題が残されている。したがって、各細胞小器官に局在可能な蛍光プローブを開発することで、細胞内 Zn^{2+} の動態とシグナル因子としての機能の理解が促進されると期待される。

現在までに数多くの Zn^{2+} 検出用蛍光プローブが開発されており、中でも ZapCY^[4] や eZinCh^[5]、eCALWY^[6] といった蛋白質型プローブが細胞内亜鉛濃度の定量解析に用いられている。その結果、細胞質や核内には数百 pM から nM 程度の遊離 Zn^{2+} が存在すると言われている（Figure 1）。一方で、小胞体

やミトコンドリアの遊離 Zn^{2+} 濃度の報告値は様々であり、ある研究グループはサブ pM 程度、別の研究グループは nM 程度であると報告している。このように報告値が極端に異なる要因として、細胞小器官内の pH 変化や酸化還元環境が大きく影響していると考えられる。例えば先に挙げた蛋白質型プローブの Zn^{2+} に対する解離定数は、pH が 1 変化するだけで 50 倍から 250 倍変化してしまう。したがって、蛍光顕微鏡を用いて亜鉛動態を観察した際に、蛍光シグナル変化が Zn^{2+} 濃度の変化を反映しているのか、pH の変化を反映しているのか判断が困難となる。また蛍光プローブの物性が pH の影響を受けてしまうことは、酸性のリソソームにおける Zn^{2+} の定量解析の障壁にもなる。そこで我々は、より正確な亜鉛動態観察と遊離 Zn^{2+} 濃度定量をめざし、pH 変化に応答しにくい蛍光プローブの開発に取り組んだ。

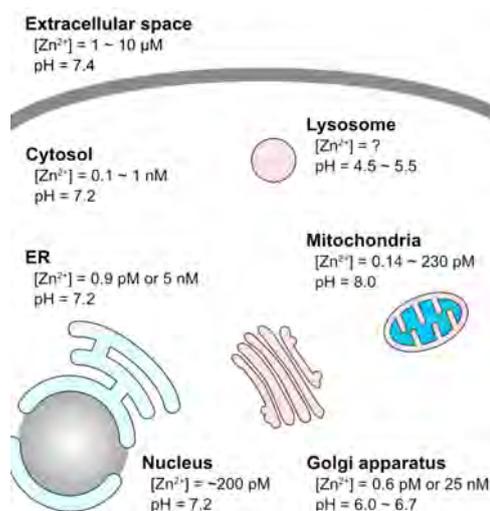


Figure 1. 細胞小器官の遊離 Zn^{2+} 濃度と pH.

2. Zn^{2+} 検出用小分子蛍光プローブ ZnDA の開発

細胞小器官内の遊離 Zn^{2+} を検出するためには蛍光プローブは脂質膜を 2 度通過する必要がある。そこで我々は、十分な細胞膜透過性を持ち、蛍光特性が pH 変化に影響を受けにくい構造として 7-アミノクマリンに着目し、ZnDA (仙台銘菓ずんだ餅にちなんで「ずんだ」と読む) を設計した (Figure 2)。標的とする細胞小器官へのプローブの局在化には、共有結合性のタグ蛋白質である HaloTag を利用した⁷⁾。まず初めに開発したのが、亜鉛配位子として DPA (dipicolylamine) 構造を有する ZnDA-1H であり、我々はこれまでに ZnDA-1H を用いてゴルジ体内の遊離 Zn^{2+} 濃度の定量に成功している⁸⁾。しかし、ZnDA-1H の Zn^{2+} に対する見かけの解離定数 (K_d) は 0.30–0.54 μM (pH 7.4–6.5) であり、ゴルジ体以外の細胞小器官内の遊離 Zn^{2+} を検出するには親和性が十分ではなかった。そこでより

亜鉛親和性の高い蛍光プローブを開発するために、亜鉛配位子を DPA からより配座数の多い配位子へと変更した ZnDA-2H および ZnDA-3H を開発した。さらに、ZnDA-3H を用いて様々な細胞小器官の遊離 Zn^{2+} の濃度定量、ならびに小胞体における亜鉛動態観察に取り組んだ⁹⁾。

ZnDA-2H と ZnDA-3H の紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、 Zn^{2+} 非存在下ではそれぞれ 394 nm と 402 nm に吸収極大波長を示し、 Zn^{2+} の添加に伴って 20~30 nm 長波長シフトした (Figure 2a)。 Zn^{2+} 添加量に対して吸収極大波長の吸光度変化をプロットすると、 Zn^{2+} とプローブが 1:1 の時に最大となった (Figure 2b)。 Zn^{2+} 添加に伴うスペクトル変化が等吸収点を示していることと合わせて考えると、1:1 錯体が形成していると考えられる。蛍光スペクトル測定では、ZnDA-2H は Zn^{2+} 非存在下でも弱い蛍光を示し、 Zn^{2+} の添加に伴いわずかに短波長シフトしながら蛍光強度が約 5 倍増大した (Figure 2c)。一方で ZnDA-3H は Zn^{2+} 非存在下ではほとんど蛍光を示さず、 Zn^{2+} の添加により約 30 倍の蛍光増大が観察された。pH 5.5 から 8.0 の緩衝液中でも ZnDA-2H と 3H は同様の Zn^{2+} 応答性の蛍光増大を示した

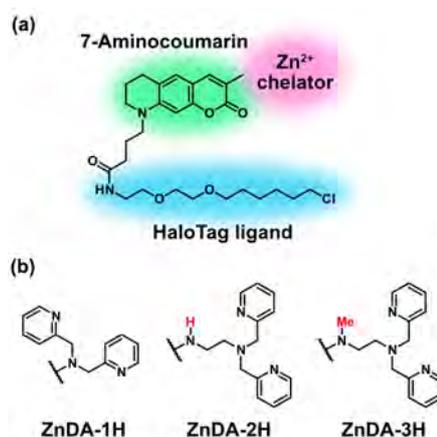


Figure 2. Zn^{2+} 検出用蛍光プローブ ZnDA の構造 (a) と亜鉛配位子の構造 (b).

(Figure 2d)。クマリンの3位と7位のアミノ基の pK_a を Marvin^[10]を用いて予測したところ4以下であったことから、妥当な結果であると考えられる。金属イオン選択性について検証したところ、ほとんどの金属イオン共存下でも ZnDA-2H と 3H は亜鉛配位に伴う蛍光増大を示した。しかし、類似の配位子構造を有する既存のプロープと同様に、銅イオン (Cu^+ , Cu^{2+}) 存在下では消光し、カドミウムイオン存在下では Zn^{2+} を添加しなくても蛍光増大が見られた。

ZnDA-2H と 3H の蛍光特性の違いについてより詳細に検証するために、溶媒の粘性と極性に対する応答性を評価した (Figures 2e,f)。その結果、溶媒の粘性が増すにつれて ZnDA-2H と 3H の蛍光強度は上昇し、クマリンの3位に3級アミノ基を有する ZnDA-3Hの方がより粘性の変化に影響を受けやすいことが分かった。さらに、溶媒の極性が高くなると両者の蛍光量子収率は減少した。特に、ZnDA-2H では Δf の値が 0.31 付近で減少の傾きが極端に変わっていた。これらの結果は、 Zn^{2+} 非存在下における ZnDA-2H と 3H の消光にはクマリンの3位のアミノ基が強く関与しており、励起状態においてアミノ基が直交した構造をとる TICT 状態への遷移が起こっていることを示唆している。

最後に、様々な pH 緩衝液中での Zn^{2+} に対する K_d を算出した (Figure 4)。pH 6.5 から pH 7.4 へと pH が約 1 変化したときの K_d の変化量は、ZnDA-3H で 4.5 倍、ZnDA-2H ではほとんど変化が見られなかった。ZapCY などの蛋白質型プロープの K_d が 50~250 倍変化することから考えると、我々の開発した ZnDA を用いることで pH 変化の影響をほとんど受けずに細胞内亜鉛動態をイメージングできると期待される。特に、ZnDA-3H の検出可能な Zn^{2+} 濃度域は過去に報告されている各細胞小器官の Zn^{2+} 濃度域の多くをカバーしていることがわかった。したがって、ZnDA-3H を用いることで、様々な細胞小器官内の遊離 Zn^{2+} 検出が可能であることが期待された。

3. ZnDA-3H を用いた細胞内遊離 Zn^{2+} の定量解析と動態観察

ZnDA-3H の細胞内局在性を検証するために、HeLa 細胞に対して HaloTag と細胞小器官局在シグナルとの融合蛋白質をコードするプラスミドをトランスフェクションし HaloTag を様々な細胞小器官に発現させた。HaloTag の細胞質への発現には局在化シグナルを用いず、その他の細胞小器官に対しては

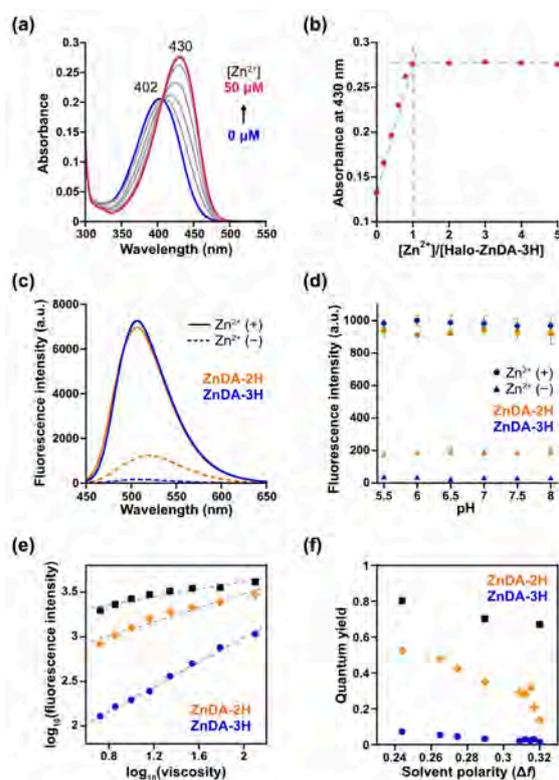


Figure 3. ZnDA-2H と ZnDA-3H の光物性。ZnDA-3H の吸収スペクトル (a) と 430 nm の吸光度変化 (b)。 (c) Zn^{2+} 添加による蛍光スペクトル変化。 (d) 蛍光強度の pH 依存性。溶液の粘性 (e) と極性 (f) に対する蛍光応答。黒四角 (■) は亜鉛配位子無し ($-NH_2$) の誘導体。

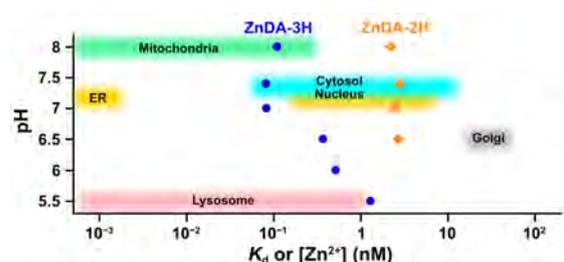


Figure 4. ZnDA-2H と ZnDA-3H の K_d と各細胞小器官の遊離 Zn^{2+} 濃度の報告値。

NLS (核)・KDEL (小胞体)・COX8 (ミトコンドリアマトリクス)・VAMP7 (後期エンドソーム・リソソーム) を用いた。トランスフェクションから 36 時間経過後に各細胞小器官の蛍光染色試薬と ZnDA-3H を加えてラベル化を行った後に、共焦点レーザー顕微鏡を用いて両者の蛍光シグナルを観察し、ピアソンの相関係数 (r) を算出することで共局在性を評価した (Figure 5)。その結果、細胞質以外の細胞小器官においては細胞小器官染色試薬と良い共局在 ($r = 0.72-0.91$) を示しており、ZnDA-3H は HaloTag を介して様々な細胞小器官特異的に局在させることが可能であることが明らかとなった。

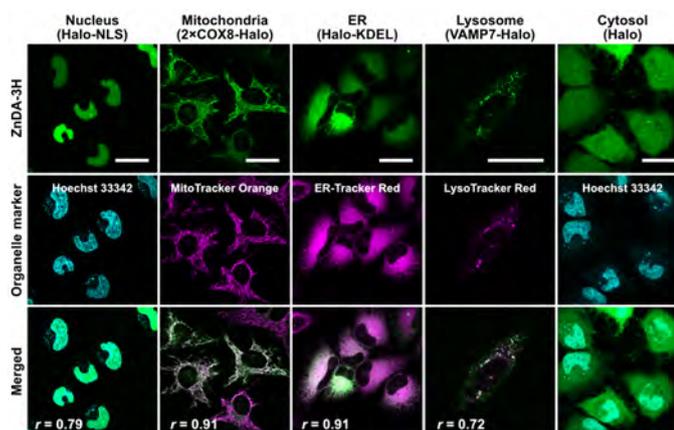


Figure 5. HaloTag を介した ZnDA-3H の細胞小器官への局在化。

遊離 Zn^{2+} 濃度の定量にはひと工夫必要である。というのも、ZnDA-3H は蛍光増大型プローブなのでそのままでは濃度定量には使えない。そこで我々が過去の報告で提案したのが、内部標準となる HaloTag TMR リガンド (HTL-TMR) を同時に用いる「*in situ* 標準化定量法」である (Figure 6) [11]。具体的には、細胞内に発現させた HaloTag を ZnDA-3H と HTL-TMR でラベル化すると、顕微鏡画像の各ピクセル内に緑と赤の蛍光を示す HaloTag がある比率で存在することになる。この観察条件下において、定常状態の画像を取得した後に、続けて ZnDA-3H の最小・最大蛍光シグナルを取得するために亜鉛キレーター (TPEN もしくは TPA) と zinc pyrithione を用いて細胞内キャリブレーションを行う。緑と赤の蛍光シグナルの比と *in vitro* で算出した K_d から Zn^{2+} 濃度の定量が可能である。

上記手法を用いて HeLa 細胞の核・細胞質・小胞体・ミトコンドリアマトリクス・リソソームの遊離 Zn^{2+} 濃度の定量解析を行った (Figure 7)。その結果、ZnDA-3H を用いると、いずれの細胞小器官においても定常状態において十分な強度の蛍光シグナルが観察され、定量可能な濃度の遊離 Zn^{2+} が存在することがわかった。算出された値は、細胞質が 0.13 nM、核が 0.11 nM、ミトコンドリアマトリクスが 0.060 nM、小胞体が 0.014 nM、リソソームが 1.5 nM であった。細胞質

と核の遊離 Zn^{2+} 濃度については、ZnDA-2H を用いてもそれぞれ 0.22 nM、0.17 nM と近い値が算出された。また、他の研究グループの定量結果として、細胞質と核は数百 pM^[12]、ミトコンドリアは 72 pM^[13] と報告されており、本研究で算出された値が妥当なものであると考えている。

最後に、細胞内亜鉛動態観察に ZnDA-3H が適用できるか検証した。実験に用いたのは、亜鉛トランスポーター ZIP7 の阻害剤 (NVS-ZP7-4) [14] とカルシウムポンプ SERCA の阻害剤 (thapsigargin) [15] であ

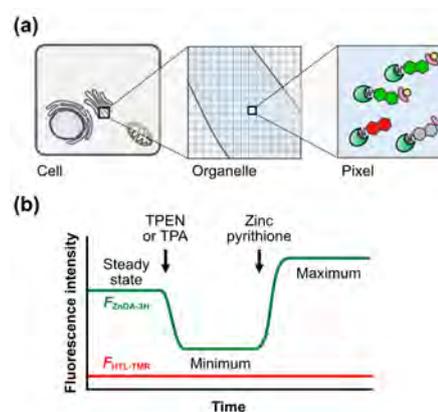


Figure 6. *in situ* 標準化定量法の概念図。

(a) HaloTag ラベル化による内部標準色素と Zn^{2+} プローブの共局在。(b) 生細胞内キャリブレーション。

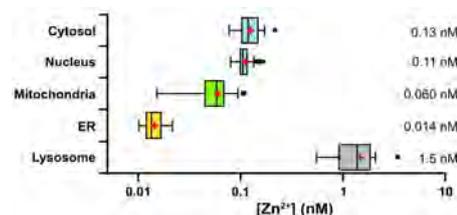


Figure 7. ZnDA-3H を用いて定量した HeLa 細胞の細胞小器官の遊離 Zn^{2+} 濃度。

る。ZIP7は小胞体から細胞質への亜鉛輸送を担っているため、阻害剤添加により小胞体内 Zn^{2+} 濃度が上昇することが報告されている。一方、thapsigarginはSERCAによるカルシウムイオンの小胞体への流入を阻害することで小胞体ストレスを誘導することが知られている。いくつかの研究グループが、小胞体ストレスにより小胞体から細胞質への亜鉛放出が起こると報告しているが、その詳細は明らかにされておらず、本当に小胞体から放出されているのかについては疑問が残っている。

そこで、それぞれの阻害剤添加時の亜鉛動態を小胞体および細胞質に局在化させたZnDA-3Hを用いて観察した。結果として、ZIP7阻害剤の添加により既報と同様に小胞体内 Zn^{2+} 濃度が速やかに上昇する様子が観察された (Figure 8a)。一方、thapsigarginを添加した際には、細胞質内濃度が上昇し、小胞体内濃度が減少した (Figure 8b)。異なる細胞で評価しているため今後更なる検証が必要ではあるが、これらの結果は、SERCAの阻害による小胞体ストレス誘導に続いて、小胞体から細胞質へ Zn^{2+} が放出されていることを示唆している。以上の通り、ZnDA-3Hは細胞内小器官の遊離 Zn^{2+} 濃度を定量できるだけでなく、細胞内亜鉛動態を可視化する有力なプローブであることが明らかとなった。

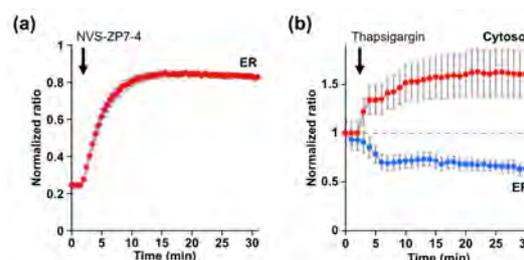


Figure 8. 細胞内亜鉛動態の観察. 亜鉛トランスポーターZIP7阻害剤 (a) および SERCA 阻害剤 (b) に対する蛍光レシオ値 (ZnDA-3H/HTL-TMR) の変化.

4. おわりに

本稿では、著者らが近年研究を進めている細胞内局在型の Zn^{2+} 検出用蛍光プローブの開発と、それらを用いた細胞内遊離 Zn^{2+} 濃度の定量ならびに動態観察について紹介した。我々が開発したZnDAは蛍光特性ならびに亜鉛親和性がpH変化にほとんど影響を受けない、という蛋白質型プローブにはない優れた特性を有している。またZnDA-3Hは様々な細胞小器官の遊離 Zn^{2+} を検出するのに適した亜鉛親和性を有しており、細胞内局所における Zn^{2+} の生理的役割を解析するのに非常に有望なプローブであると考えている。とは言うものの、課題がないわけではない。これは多くの亜鉛プローブに言えることではあるが、より Zn^{2+} 選択的な配位子の開発が重要であると考えている。一般的に含窒素複素芳香環（ピリジンやイミダゾールなど）を配位子として用いると銅イオンに対しても親和性が高くなるため、細胞内で競合する銅イオンへの配位による影響が無視できなくなる。また、細胞内亜鉛動態を長時間にわたって解析するためには、蛍光プローブの耐光性も重要な要素である。さらに、 Zn^{2+} の機能を理解するためには様々な生体分子を同時に可視化する必要があり、GFPなどが併用できるように蛍光波長の長波長化が望まれる。2017年に本研究に着手した際、正直なところ、「 Zn^{2+} プローブ研究は既にやりつくされている」と考えていた。ところが、研究を進めれば進めるほど、課題が見えてきた。亜鉛トランスポーターの機能についてはまだまだ不明なことが多く、現在精力的に研究が進められている。今後、生命現象を理解するために見たいものを見えるようにする、そのようなプローブを開発することで科学の発展に貢献していきたい。

謝辞

本研究は、私が所属する東北大学多元物質科学研究所・水上研究室で行われました。研究を遂行するにあたり水上進教授には多大なるご指導ご支援を賜り、この場を借りて深く感謝申し上げます。また松井敏高准教授には、生化学実験の技術指導ならびにご助言を賜り感謝申し上げます。本研究は最初に大きな道を切り拓いた渡邊朝美さん、それを発展させた劉熔さん、杜雨音さんの日々の努力なしに

は成しませんでした。また、共同研究者である稲葉謙次教授、天貝佑太博士（ともに東北大多元研）には細胞生物学的観点から多くのご助言とご支援を賜り、深く感謝申し上げます。

本研究は JSPS 科研費ならびに多くの財団助成金の支援のもと遂行されました。

参考文献

- [1] Kambe, T.; Tsuji, T.; Hashimoto, A.; Itsumura, N. *Physiol. Rev.* **2015**, *95*, 749.
- [2] Yamasaki, S.; Sakata-Sogawa, K.; Hasegawa, A.; Suzuki, T.; Kabu, K.; Sato, E.; Kurosaki, T.; Yamashita, S.; Tokunaga, M.; Nishida, K.; Hirano, T. *J. Cell Biol.* **2007**, *177*, 637.
- [3] Taylor, K. M.; Hiscox, S.; Nicholson, R. I.; Hogstrand, C.; Kille, P. *Sci. Signal.* **2012**, *5*, ra11.
- [4] Qin, Y.; Dittmer, P. J.; Park, J. G.; Jansen, K. B.; Palmer, A. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 7351.
- [5] Hessels, A. M.; Chabosseu, P.; Bakker, M. H.; Engelen, W.; Rutter, G. A.; Taylor, K. M.; Merckx, M. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2126.
- [6] Vinkenborg, J. L.; Nicolson, T. J.; Bellomo, E. A.; Koay, M. S.; Rutter, G. A.; Merckx, M. *Nat. Methods* **2009**, *6*, 737.
- [7] Los, G. V.; Encell, L. P.; McDougall, M. G.; Hartzell, D. D.; Karassina, N.; Zimprich, C.; Wood, M. G.; Learish, R.; Ohana, R. F.; Urh, M.; Simpson, D.; Mendez, J.; Zimmerman, K.; Otto, P.; Vidugiris, G.; Zhu, J.; Darzins, A.; Klaubert, D. H.; Bulleit, R. F.; Wood, K. V. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 373.
- [8] Kowada, T.; Watanabe, T.; Amagai, Y.; Liu, R.; Yamada, M.; Takahashi, H.; Matsui, T.; Inaba, K.; Mizukami S. *Cell Chem. Biol.* **2020**, *27*, 1521.
- [9] Liu, R.; Kowada, T.; Du, Y.; Amagai, Y.; Matsui, T.; Inaba, K.; Mizukami, S. *under revision*.
- [10] Manchester, J.; Walkup, G.; Rivin, O.; You, Z. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 565.
- [11] Kowada, T.; Watanabe, T.; Liu, R.; Mizukami, S. *STAR Protoc.* **2021**, *2*, 100395.
- [12] Qin, Y.; Miranda, J. G.; Stoddard, C. I.; Dean, K. M.; Galati, D. F.; Palmer, A. E. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2366.
- [13] Xue, L.; Li, G.; Yu, C.; Jiang, H. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1050.
- [14] Nolin, E.; Gans, S.; Llamas, L.; Bandyopadhyay, S.; Brittain, S. M.; Bernasconi-Elias, P.; Carter, K. P.; Loureiro, J. J.; Thomas, J. R.; Schirle, M.; Yang, Y.; Guo, N.; Roma, G.; Schuierer, S.; Beibel, M.; Lindeman, A.; Sigoillot, F.; Chen, A.; Xie, K. X.; Ho, S.; Reece-Hoyes, J.; Weihofen, W. A.; Tyskiewicz, K.; Hoepfner, D.; McDonald, R. I.; Guthrie, N.; Dogra, A.; Guo, H.; Shao, J.; Ding, J.; Canham, S. M.; Boynton, G.; George, E. L.; Kang, Z. B.; Antczak, C.; Porter, J. A.; Wallace, O.; Tallarico, J. A.; Palmer, A. E.; Jenkins, J. L.; Jain, R. K.; Bushell, S. M.; Fryer, C. J. *Nat. Chem. Biol.* **2019**, *15*, 179.
- [15] Stork, C. J.; Li, Y. V. *J. Mol. Signal.* **2010**, *5*, 5.

PD-SELEX 法を用いた直交性 RNA-RBP ペアの指向性進化

沖縄科学技術大学院大学
福永 圭佑



著者紹介： 2012-2014 年 電気通信大学 産学官連携研究員（瀧真清研究室）。2014 年 電気通信大学において博士（工学）取得。2014-2018 年 北陸先端科学技術大学院大学 博士研究員（芳坂貴弘研究室）を経て、2018 年から OIST 核酸化学・工学ユニット（横林洋平教授）にポストドクトラルスカラーとして参加。ペプチド → タンパク質 → 核酸と研究対象は変遷しているものの、生体分子のエンジニアリングに興味を持っており、4 塩基コドン法のようなユニークな技術・方法論の開発を行いたいと日々空想している。

1. はじめに

MS2 RNA stem loop–MS2 Coat Protein, kink-turn RNA–L7Ae などの RNA–RNA 結合タンパク質 (RBP) のペアは目的の RNA とタンパク質とを繋ぐアダプター分子として広く用いられている。これら RNA–RBP ペアはケミカルバイオロジー・合成生物学研究などで任意のツールを開発するための分子パーツとして特に需要が高まってきているものの、哺乳動物細胞で機能することが知られている RNA–RBP ペアの数に限られており拡充の必要性が指摘されている^[1]。このような分子パーツの種数を増やすためには、哺乳動物細胞で機能することが分かっている既存の RNA–RBP ペアの結合特性を改変し、新規 RNA–RBP ペアを創製することが有効な戦略となる。今回、我々は PD-SELEX 法を新たに開発し、ライブラリー vs. ライブラリーの *in vitro* セレクションを行うことで直交性 RNA–RBP ペアを作り出すことに成功した^[2]。

2. PD-SELEX 法の開発

PD-SELEX 法は、標的分子に結合するタンパク質/ペプチドをセレクションする手法であるファージディスプレイ (PD) 法と核酸をセレクションする手法である Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) 法を組み合わせ、二種

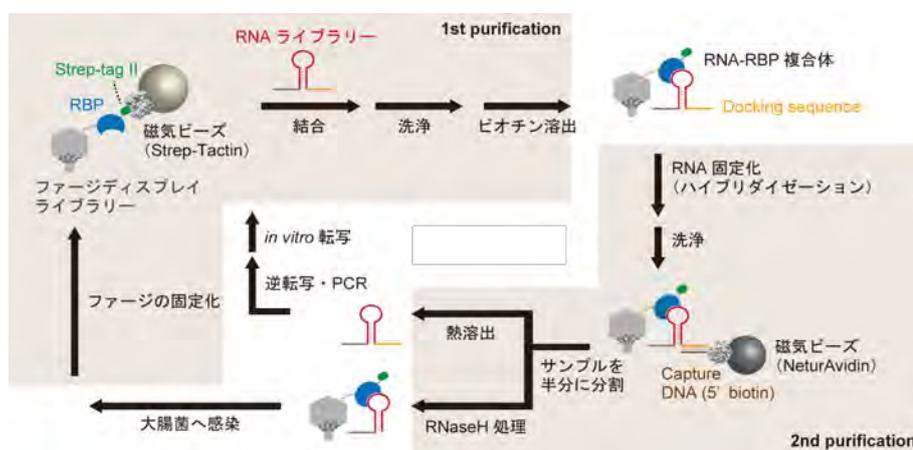


Figure 1. PD-SELEX 法の概略図

類のライブラリーの混合物の中から RNA-RBP 複合体を作ることができるペアを試験管内で選択・共進化させる手法である (Fig. 1)。

複合体の選択は二段階のアフィニティーセレクションにより行われる。まず、ファージウィルスに提示させた RBP の C 末端側に融合したペプチドタグ (Strep-tag II) を用い、Strep-Tactin 磁気ビーズ上に PD ライブラリーを固定化する。この固定化した RBP に対して RNA ライブラリーのセレクションを行う (Fig. 1, 1st purification)。次に、RNA ライブラリーの 3' 側 (Docking sequence) に対して相補的な配列の DNA を固定化した磁気ビーズを用いて RNA を捕捉し、RNA と複合体を作っている PD ライブラリーのセレクションを行う (Fig. 1, 2nd purification)。熱溶出または RNase H 処理によって回収した RNA ライブラリー、PD ライブラリーはそれぞれ RT-PCR - *in vitro* 転写、又は大腸菌感染により増幅することができ、一連の操作 (ラウンド) を複数回行うことで RNA-RBP 複合体が濃縮される。最終的にライブラリーのシーケンシングを行うことで、どのような配列が濃縮されたのかを調べることができる。

3. “RNA ライブラリー” vs. “PD ライブラリー” *in vitro* セレクション

今回、超好熱性古細菌 *A. fulgidus* 由来のリボソームタンパク質 L7Ae とそれに結合するキックターンモチーフ RNA を PD-SELEX 法のモデル系とすることにした。L7Ae とその結合モチーフは、齊藤博英

教授 (京都大学 CiRA) らが初めて動物細胞で翻訳制御スイッチとして使い^[3]、合成生物学研究で広く利用されている。結合選択性を改変するためには相互作用部位への変異導入が必要であり、共結晶構造が解かれているこの RNA-RBP ペアは初期ライブラリーをデザインするために好都合であった。

ステムループ構造のループ部分 20 塩基をランダム化した全長 76 塩基の RNA ライブラリーをまずデザインした (Fig. 2, 左)。

$4^{20} =$ 約 1.1×10^{12} のライブラリーサイズであり、*in vitro* では配列空間全体をカバーすることができる。また、L7Ae の RNA 結合面に位置するアミノ酸 8 残基を NNK コドンでランダム化 (E34X, K37X, E40X, I88X, E89X, V90X, P91X, C92X; X = 20 amino acids) した PD ライブラリーを構築した (Fig. 2, 右)。



Figure 2. RNA ライブラリー (左), PD ライブラリー (右) のデザイン

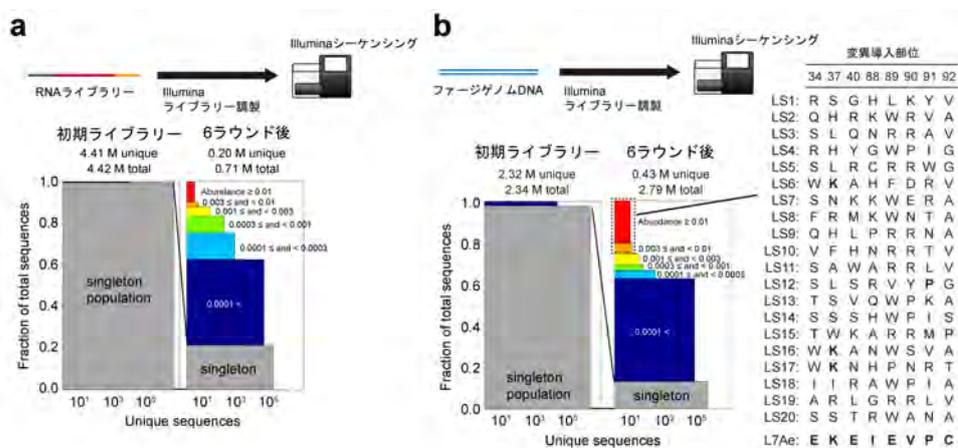


Figure 3. NGS によるセレクションの評価。(a) RNA ライブラリー, (b) PD ライブラリーのセレクション前後での配列の濃縮を示している。

ライブラリーの多様性 (ライブラリーサイズ) は約 4.0×10^8 であった。6 ラウンドの試験管内共進化実験 (RNA ライブラリー vs. PD ライブラリー セレクション) を行い、次世代シーケンシング (NGS) でセレクションの評価を行った。6 ラウンド後の RNA ライブラリーを NGS 解析したところ配列の濃縮を観察することができた (Fig. 3a)。PD ライブラリーにおいても同様に配列の濃縮が見られ (Fig. 3b)、上位クローン (LSx, x=1-20) の 89 残基目では Arg/Trp、90 残基目では Arg の出現頻度が高いことが分かった。スキヤフォールドとして用いた親タンパク質 L7Ae と比較した場合、明瞭な配列相同性は見られなかった。

4. 再セレクションによる RNA-RBP ペアの決定と結合親和性解析

次に、どの RNA と RBP が結合するペアなのかを決定するため、濃縮された RBP の上位クローン 20 種類 (LSx, x=1-20) をリコンビナントタンパク質として個別に調製した。また、6 ラウンド後の RNA 上位配列を含む第二世代 RNA ライブラリーをオリゴ DNA プールから *in vitro* 転写で調製し、個々のリコンビナント LSx タンパク質に対して 1 ラウンドのセレクション (従来の SELEX 実験) を行った (Fig. 4)。頻出する 2 つのコンセンサス配列、CS1: UUGUGASGC (S = G or C) (Fig. 4a)、CS2: UCCAUGACGC (Fig. 4b) に着目して統計的に結合選択性の解析をしてみると、“CS1 を持つ RNA と LS4 タンパク質”のペアと“CS2 を持つ RNA と LS12 タンパク質”のペアは直交性 RNA-RBP ペアである可能性が高いことが分かった。二次構造予測を行ったところ CS1 は対称的な形の内部ループ構造、CS2 は典型的なキントーン構造

の形成に関与していることが示唆された。これらを含む最小化構造の RNA を合成し、表面プラズモン共鳴 (SPR) による結合解析を行ったところ “CS1 RNA-LS4” ペア、“CS2 RNA-LS12” ペアはそれぞれ解離定数 7 pM と傑出した結合を示した (Fig. 5)。一方、“CS1 RNA - LS12”、“CS2 RNA - LS4” の組み合わせではそれぞれ 28 nM、114 nM の解離定数であり、本来の RNA-RBP ペアよりも 4000 倍以上結合力が弱いことが明らかとなった。つまり、これら二組は直交性の RNA-RBP ペアであることが分かった。

5. LS4 の生体直交性

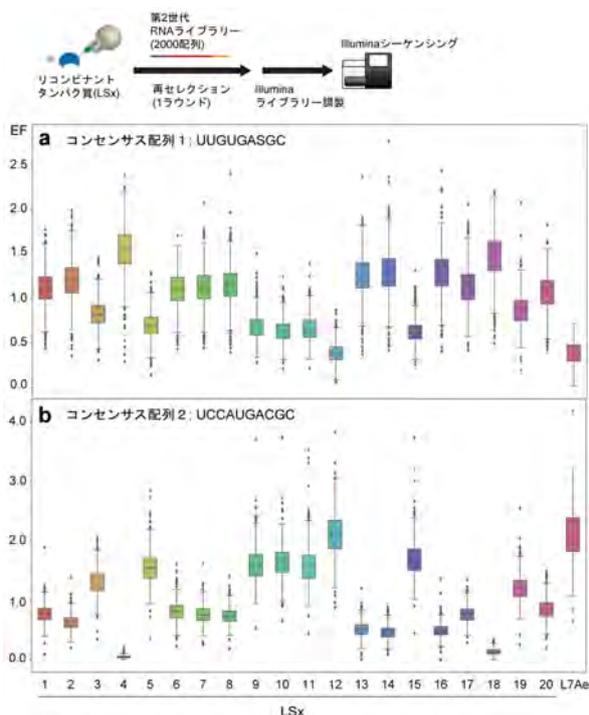


Figure 4. 個別のリコンビナントタンパク質に対する第二世代 RNA ライブラリーのセレクション。

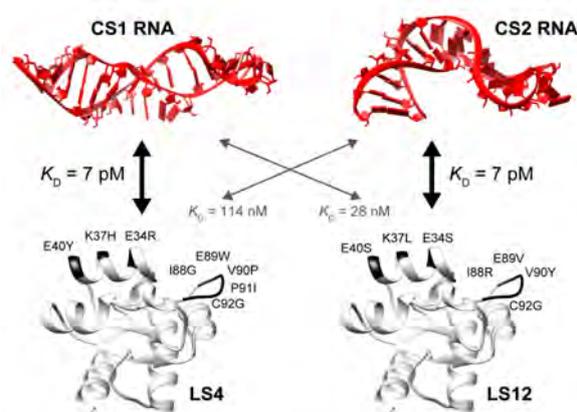


Figure 5. 共進化実験によって得られた直交性 RNA-RBP ペア。RNA の構造予測には RNAComposer を用いた。

古細菌由来 L7Ae を大腸菌や哺乳動物細胞で過剰発現させると増殖異常や細胞死などのある種の細胞毒性を示すことが知られている^[4]。L7Ae は様々なキンクターンモチーフ RNA に対して広範に結合活性を持つと考えられており^[5]、細胞内で目的以外の RNA に結合するであろうことは想像に難くない。大腸菌で L7Ae を発現させてアフィニティー精製すると内在性 RNA がコンタミネーションすることが示唆されており^[6]、実際筆者らも経験した (Fig. 6)。一方で、LS4 を大腸菌で発現・精製した場合、核酸成分の共精製は大幅に抑えられていた (Fig. 6)。SPR を用いた結合実験でも、LS4 は Box C/D Kt に対して K_D 値 599 nM、CS2 に対して K_D 値 114 nM とキンクターンモチーフ RNA に対する結合親和性が減弱していることが分かっており、実験的に示す必要があるものの、哺乳動物細胞においても生体直交性が向上している可能性がある。

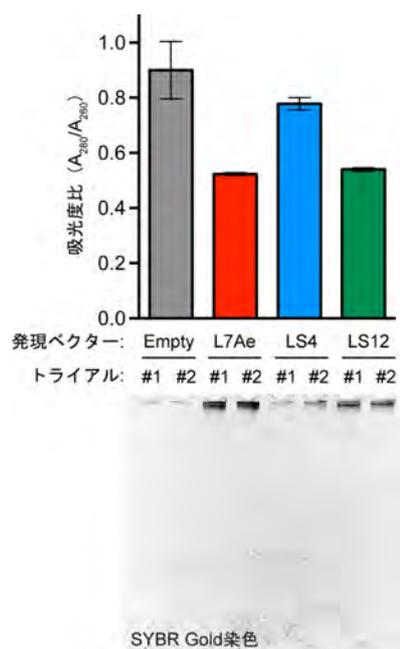


Figure 6. 核酸成分の共精製。大腸菌で発現させた His-tag 融合タンパク質を RNase/DNase 非存在下でアフィニティー精製した。上のグラフはタンパク質の精製度を示す。下は変性 PAGE でサンプルを分離し、核酸成分を SYBR Gold で染色した。

6. おわりに

今回、PD-SELEX 法を用いて約 4×10^{20} という莫大な組み合わせ (理論値) の中から二つの直交性 RNA-RBP ペア: CS1-LS4 と CS2-LS12 を得ることに成功した。これら RNA-RBP ペアを新たに実験に使ってみようかと思っている、使ってみたところ国内外から思いがけず反響があり、これら分子パーツがどのようなツールとなって登場するのか楽しみにしている。PD-SELEX 法の派生型はいくつか考えられ、RNA の代わりに DNA、PD タンパク質ライブラリーの代わりに以前筆者が使っていた化学修飾 PD ペプチドライブラリー^[7]なども用いることができるかもしれない。今後、核酸-タンパク質 (ペプチド) 間相互作用を解析、または結合選択性を改変するための基盤技術として PD-SELEX 法が活用されることが期待される。

謝辞

本研究は OIST 核酸化学・工学ユニットにおいて行われたものです。研究計画の立案・遂行にあたり横林洋平教授から多大なるご支援を頂きました。また、研究データの取得・解析に際して、OIST のシーケンシングセクション、機器分析セクション、科学計算・データ解析セクションの技術的支援を受けました。サンガーシーケンスはテクニシヤンの Mayumi Suzuki さん、及び Laura Croenen さん、SPR 解析の立ち上げでは野村陽子博士にご助力を頂きました。また、T7 フェージディスプレイ系は電気通信大学在籍時に瀧研究室で習得しました。本研究は OIST ユニット予算、及び日本学術振興会・科学研究費の支援により実施されました。この場を借りて厚くお礼申し上げます。

参考文献

- [1] Kawasaki, S.; Ono, H.; Hirose, M.; Saito, H. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2020**, *63*, 99.
- [2] Fukunaga, K.; Yokobayashi, Y. *Nucleic Acids Res.*, **2021**, DOI: 10.1093/nar/gkab527
- [3] Saito, H.; Kobayashi, T.; Hara, T.; Fujita, Y.; Hayashi, K.; Furushima, R.; Inoue, T. *Nat. Chem. Biol.*, **2010**, *6*, 71.

- [4] (a) Daume, M.; Uhl, M.; Backofen, R.; Randau, L. *mBio*, **2017**, *8*, e00730.; (b) Wagner, T.E.; Becraft, J.R.; Bodner, K.; Teague, B.; Zhang, X.; Woo, A.; Porter, E.; Albuquerque, B.; Dobosh, B.; Andries, O.; Sanders, N.N.; Beal, J.; Densmore, D.; Kitada, T.; Weiss, R. *Nat. Chem. Biol.*, **2018**, *14*, 1043.; (c) Ono, H.; Kawasaki, S.; Saito, H. *ACS Synth. Biol.*, **2020**, *9*, 169.
- [5] Liu, J.; Lilley, D.M.J. *RNA*, **2007**, *13*, 200.
- [6] Turner, B.; Lilley, D.M.J. *J. Mol. Biol.*, **2008**, *381*, 431.
- [7] (a) Fukunaga, K.; Hatanaka, T.; Ito, Y.; Taki, M. *Mol. BioSyst.*, **2013**, *9*, 2988.; (b) Tokunaga, Y.; Azetsu, Y.; Fukunaga, K.; Hatanaka, T.; Ito, Y.; Taki, M. *Molecules*, **2014**, *19*, 2481.; (c) Fukunaga, K.; Hatanaka, T.; Ito, Y.; Minami, M.; Taki, M. *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 3921.

可視光による分裂期染色体の光操作法

京都工芸繊維大学分子化学系
松尾 和哉



著者紹介：

バイオ関連化学シンポジウムは、私が博士課程の学生（京都大学 浜地研究室）の頃から慣れ親しんできたシンポジウムです。初めて参加したのは、エポカルつくばで開催された2011年9月の第5回バイオ関連化学シンポジウムだったと記憶しています。それから10年後の2021年9月に行われた第15回バイオ関連化学シンポジウムは、前職の北海道大学 電子科学研究所 助教として参加した最後の学会であり、このようなタイミングで講演賞を受賞でき、大変嬉しく思います。これまでご指導くださった先生方、諸先輩、同輩、後輩のみなさまに感謝申し上げます。

2021年10月からは、令和3年度 文部科学省 卓越研究員事業を通じて、京都市松ヶ崎にあります京都工芸繊維大学 分子化学系にテニュアトラック助教として着任しました。

本稿を書いている現在は、まだ異動して間もなく、セットアップなどでバタバタしていますが、メンターである小堀哲生 教授をはじめとして、周囲の人に支えられながら、セットアップの日々を忙しくも楽しく過ごしています（右の写真：小堀研究室の皆さんとの一枚）。

この場で得た新たな成果を、近い将来のバイオ関連化学シンポジウムで、できることならオンラインではなく、face to face で発表できることを楽しみにしています。



1. はじめに

細胞分裂は、1つの細胞が2つ以上の細胞に分かれるという動的な現象であるにもかかわらず、極めて高い正確性と精密性で達成される^[1]。遺伝情報を次世代へと正確に系譜するため、S期で染色体を複製し、倍加した染色体を一度赤道面に並べた後、等分配することで、2つの等価な娘細胞が発生する。この染色体を中心としたダイナミックな動きは、細胞が情報を正確に伝播するために必要不可欠である。特に、細胞分裂の前中期において、染色体の動きを制御しているのが、モータータンパク質 CENP-E (Centromere-associated protein E)^[2]である。CENP-Eは、紡錘体に沿って、染色体を輸送し、赤道面上に整列させる。しかし、CENP-Eが機能異常を起こすと、赤道面上にうまく整列することができず、異

数性を示す娘細胞 (染色体の数が過不足した状態の細胞) が発生したり、細胞死が誘導される。本稿では、筆者らが開発してきた CENP-E を光制御する技術^[3]を駆使し、新たに構築した分裂期染色体の光操作法に関して紹介する。

2. 光制御型 CENP-E 阻害剤の開発

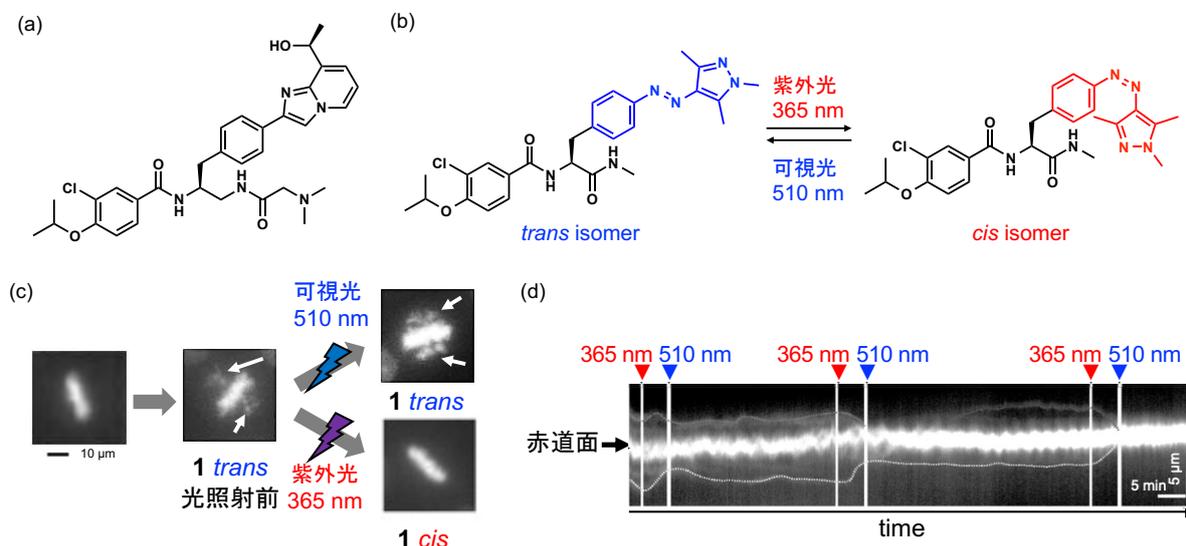


図 1. 光制御型 CENP-E 阻害剤. (a) 標準的な CENP-E 阻害剤 **GSK923295** の化学構造. (b) 光制御型 CENP-E 阻害剤 **1 (PCEI-HU)** の光応答性. (c) **1** による染色体の整列異常制御 (白矢印が整列異常状態の染色体を示す). (d) 分裂期染色体の光操作 (カイモグラフ)

細胞分裂時、CENP-E が阻害されると、一部の染色体は赤道面に整列できなくなることから、CENP-E の活性を自在に制御できれば、染色体の配置を操作できると着想し、非侵襲的で操作性能が高い外部刺激である「光」を利用した光制御型 CENP-E 阻害剤を開発することを計画した。まず、CENP-E の小分子阻害剤として汎用される **GSK923295** (図 1a)^[4]の構造活性相関研究の報告^[5]を参考に、定量的な *cis-trans* 光異性化反応を示す arylazopyrazole^[6]を導入した **1** (図 1b、試薬 **PCEI-HU** としてフナコシ株式会社より販売中。商品コード：FDV-0037) を開発した^[3a]。化合物 **1** は、照射前には 100% *trans* isomer として存在するが、紫外光 (365 nm) 照射による光定常状態では *cis* isomer が 93%となり、可視光 (510 nm) 照射による光定常状態では *trans* isomer が 88%となる。この光異性化反応は、何度も可逆的に起こすことができた。**1** の CENP-E 阻害能を ATPase assay (ATP/NADH coupled assay) により検討すると、照射しない条件 (100% *trans* isomer) で $IC_{50} = 5.9 \mu\text{M}$ であり、365 nm の照射による光定常状態で $IC_{50} = 120 \mu\text{M}$ であったことから、約 20 倍の阻害能の差が確認できた。さらに、HeLa 細胞を **1** で処理したところ、CENP-E 阻害に特徴的な染色体の整列異常が観測され、365 nm の紫外光を照射することで、正常状態に回復した。また、510 nm の可視光を照射すると、整列異常が誘起されたことから、**1** を用いることで、染色体の異常配置を光で自在に制御できた (図 1c)。

この光制御型 CENP-E 阻害剤 **1** を利用した染色体の動きの光操作を検討した。HeLa 細胞に対し、**1** を処理することで、CENP-E を阻害し、染色体を異常配置させた状態を誘導し、365 nm の紫外光と 510 nm の可視光をディッシュ全体に交互に繰り返し照射することで、染色体の動きを光操作した。365 nm の紫外光を照射することで、CENP-E は活性状態となり、染色体は赤道面方向へと動き出したが、510 nm の可視光を照射すると、CENP-E は阻害状態となって、染色体の動きはほぼ停止した。ここで、再び 365 nm の紫外光照射を行うと、染色体は再び赤道面方向へと動き出した。この照射による染色体の

動きの制御は、少なくとも染色体が赤道面に整列するまでの間に3回繰り返すことができた (図 1d)。

しかしながら、光制御型 CENP-E 阻害剤 **1** では染色体の動きを制御するために、細胞障害性の高い 365 nm の紫外光と、500~530 nm の可視光の2つの光源を用いる必要があった。そのため、分裂期細胞内の一部の染色体だけを光操作するといったピンポイント制御を行うことは容易ではなく、高度な光学系を構築する必要があった。そこで、光制御型 CENP-E 阻害剤 **1** の性質を改変することを試みた。すなわち、2つの異なる光源で光操作するのではなく、単一波長の可視光だけで制御できる CENP-E 阻害剤を開発することを計画した。

3. 可視光制御型 CENP-E 阻害剤の開発

一般的な共焦点レーザー走査顕微鏡に装備されている 405 nm の可視光レーザーによる光刺激で、CENP-E 活性を制御できる光制御型 CENP-E 阻害剤を開発するため、アゾベンゼン誘導体における *cis* isomer の熱的緩和過程に着目した。アミノ基や水酸基などを導入したアゾベンゼン誘導体では、 π - π^* 遷移が長波長側にシフトし、 n - π^* 遷移と重なることで、*trans* isomer が安定化し、*cis* isomer の寿命が極めて短くなることが知られる^[7]。この原理を **1** へと組み込み、アミノ化した arylazopyrazole 誘導体を有する可視光制御型 CENP-E 阻害剤 **2** を設計・合成した (図 2a)。

化合物 **2** の吸光度スペクトルを測定すると、確かに 405 nm の領域に吸収を有することが確認できたが、そのサンプルに 405 nm の光を照射しても通常の分光光度計ではスペクトル変化は見られなかった。このことは **2** の *cis* isomer が *trans* isomer へと変化する熱的緩和過程が極めて速いことを示唆する。そこで、レーザーフラッシュフォトリシスによる **2** の *cis* isomer の寿命解析を行った結果、その寿命は 0.57 ミリ秒であり、**2** を光励起しても数ミリ秒後にはほぼ全ての分子が *trans* isomer となっていることが明らかとなった。

この **2** を用いて、CENP-E による *in vitro* ATPase assay (ADP-Glo assay) を行った結果、光照射しない条件では、 $IC_{50} = 44$ nM であり、**GSK923295** ($IC_{50} = 24$ nM) と遜色ない CENP-E 阻害活性を示したのに対し、405 nm の光を持続して照射した場合では $IC_{50} = 233$ nM と 5 倍程度阻害能が減弱した。

さらに、HeLa 細胞を **2** で処理し、分裂期染色体の配置を確認したところ、光照射しない条件で、CENP-E 阻害に特徴的な染色体の配列異常を誘導した。そこに、405 nm の可視光を持続して照射すると、染色体は赤道面で整列した (図 2b)。以上から、**2** は 405 nm の可視光を照射するだけで CENP-E の

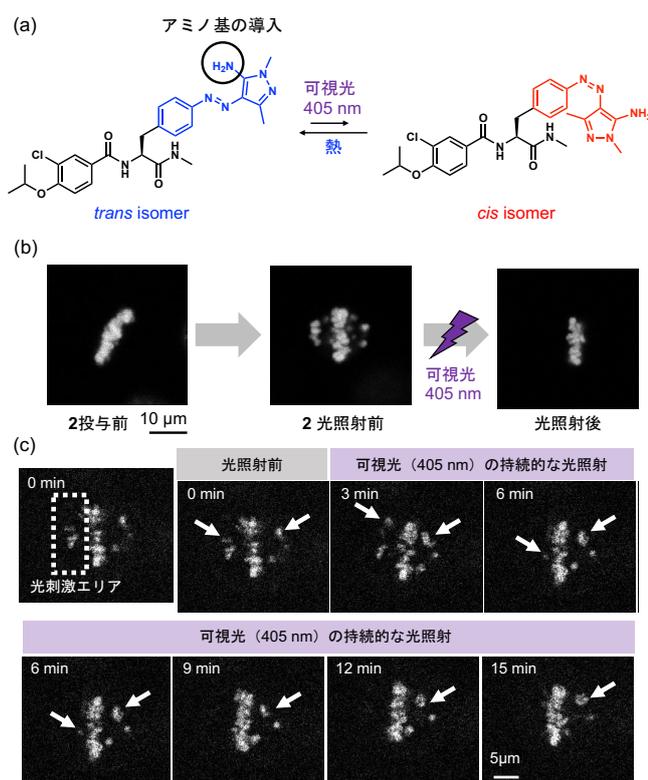


図 2. 可視光制御型 CENP-E 阻害剤 **2** を駆使した分裂期染色体のピンポイント光操作. (a) 可視光制御型 CENP-E 阻害剤 **2** の光・熱応答性. (b) **2** による染色体の整列異常制御. (c) 分裂期染色体の左右非対称配置の光誘導 (白矢印が整列異常状態の染色体を示す).

活性を制御できる可視光制御型 CENP-E 阻害剤として機能することが示唆された。

4. 分裂期染色体をピンポイントに光操作するシステムの構築

開発した可視光制御型 CENP-E 阻害剤 **2** を用い、分裂期細胞において、一部分の染色体の動きを、ピンポイントに光操作し、左右非対称に染色体を異常配置させることを試みた。まず、HeLa 細胞に **2** を作用させ、CENP-E 阻害による整列異常を誘導した。次に、図 2c に示した左側の点線の枠で囲った部位の染色体 (0 min 時) に対し、共焦点レーザー走査顕微鏡 (本研究では、北海道大学ニコイメーシングセンターに設置されている Nikon の A1 を用いた) に付属する 405 nm の可視光レーザーを持続して照射した結果、右側の染色体では整列異常状態を保っていたが、左側の染色体は赤道面方向へと移動し、最終的に赤道面で整列した。

以上から、分裂期細胞における染色体を局所的に光操作するシステムを構築することに成功した。さらに、本システムで染色体の左右非対称な配置異常を誘導し、その状態のまま、分裂期チェックポイントを抑制することで、細胞分裂を強制的に起こし、非対称な娘細胞を生成させることにも成功している。

5. おわりに

本稿では光制御型 CENP-E 阻害剤を駆使した染色体の光操作法について紹介した。Arylazopyrazole 誘導体の熱的緩和過程を精密に調整することで、一波長 (405 nm) の可視光だけで制御できる可視光制御型 CENP-E 阻害剤 **2** を開発し、それと共焦点レーザー走査顕微鏡を駆使することで、染色体の動きや配置をピンポイントに光操作し、非対称な細胞分裂を誘導することに成功した。本技術は、遺伝子操作をすることなく、光と薬剤だけで細胞の性質や運命を制御するという方法論の新たな可能性を示したものである。今後は、CENP-E だけでなく、他の細胞分裂関連タンパク質へと標的を拡張した新たな分子技術⁸⁾の開発を行い、細胞を自在にエンジニアリングする方法論へと拡張していきたいと考えている。

謝辞

本研究は、私が所属していた北海道大学 電子科学研究所 玉置 信之 教授の研究室で行われました。また、本研究を遂行するにあたり、北海道大学大学院 生命科学院 上原 亮太 准教授および菊川 峰志 准教授、Noushaba N. Mafy 博士 (当時、玉置研究室 博士課程学生)、比留間 翔太 氏 (当時、上原研究室 博士課程学生) に尽力いただきました。この場を借りて感謝申し上げます。

本研究は、日本学術振興会 科研費および文部科学省 卓越研究員事業の支援を受けて、実施されました。

参考文献

- [1] Batty, P.; Gerlich, D. W. *Trends Cell Biol.* **2019**, *29*, 717–726.
- [2] Wood, K. W.; Sakowicz, R.; Goldstein, L. S.; Cleveland, D. W. *Cell* **1997**, *91*, 357–366.
- [3] (a) Mafy, N. N.; Matsuo, K.; Hiruma, S.; Uehara, R.; Tamaoki, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 1763–1767.;
(b) Matsuo, K.; Tamaoki, N. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 6979–6984.
- [4] Wood, K. W.; Lad, L.; Luo, L.; Qian, X.; Knight, S. D.; Nevins, N.; Brejc, K.; Sutton, D.; Gilmartin, A. G.; Chua, P. R.; Desai, R.; Schauer, S. P.; McNulty, D. E.; Annan, R. S.; Belmont, L. D.; Garcia, C.; Lee, Y.; Diamond, M. A.; Faucette, L. F.; Giardinere, M.; Zhang, S. Y.; Sun, C.-M.; Vidal, J. D.; Lichtsteiner,

- S.; Cornwell, W. D.; Greshock, J. D.; Wooster, R. F.; Finer, J. T.; Copeland, R. A.; Huang, P. S.; Morgans, D. J., Jr.; Dhanak, D.; Bergnes, G.; Sakowicz, R.; Jackson, J. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 5839–5844.
- [5] Qian, X.; McDonald, A.; Zhou, H.-J.; Adams, N. D.; Parrish, C. A.; Duffy, K. J.; Fitch, D. M.; Tedesco, R.; Ashcraft, L. W.; Yao, B.; Jiang, H.; Huang, J. K.; Marin, M. V.; Aroyan, C. E.; Wang, J.; Ahmed, S.; Burgess, J. L.; Chaudhari, A. M.; Donatelli, C. A.; Darcy, M. G.; Ridgers, L. H.; Newlander, K. A.; Schmidt, S. J.; Chai, D.; Colón, M.; Zimmerman, M. N.; Lad, L.; Sakowicz, R.; Schauer, S.; Belmont, L.; Baliga, R.; Pierce, D. W.; Finer, J. T.; Wang, Z.; Morgan, B. P.; Morgans, D. J., Jr.; Auger, K. R.; Sung, C.-M.; Carson, J. D.; Luo, L.; Hugger, E. D.; Copeland, R. A.; Sutton, D.; Elliott, J. D.; Jackson, J. R.; Wood, K. W.; Dhanak, D.; Bergnes, G.; Knight, S. D. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 30–34.
- [6] Weston, C. E.; Richardson, R. D.; Haycock, P. R.; White, A. J. P.; Fuchter, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11878–11881.
- [7] Bandara, H. M. D.; Burdette, S. C. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1809–1825.
- [8] Matsuo, K.; Thayyil, S.; Kawaguchi, M.; Nakagawa, H.; Tamaoki, N. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 12500–12503.

DNAに基づく増殖因子受容体パーシャルアゴニストの開発および生理作用評価



¹ 東京大学大学院工学系研究科

² 理化学研究所 開拓研究本部 (CPR)

³ 理化学研究所 生命機能科学研究センター (BDR)

秋山 桃子¹, 柳川 正隆², 阿部 充宏², 廣島 通夫^{2,3},
佐甲 靖志², 植木 亮介¹, 山東 信介¹

著者紹介: 東京大学大学院工学系研究科博士二年の秋山桃子です。学部三年次より、山東研究室で受容体に関する研究を行なっています。受容体が細胞機能を制御する仕組みに興味があり、自分がデザインした化学ツールでその謎を明らかにしたいという思いから研究を続けています。楽しく優秀な山東研究室のみんなに刺激を受けながら、毎日楽しく研究しています。

1. はじめに

増殖因子は、特定の細胞膜受容体の二量化およびリン酸化を誘起することで、増殖・分化・遊走といった様々な細胞挙動の発現を制御しています。そのため、増殖因子は、疾病治療や再生医療への応用が期待されていますが、一方、その多面的な機能ゆえに発がんやアレルギー反応などの副作用を併せ持ち、受容体を活性化するリガンド分子 (アゴニスト) としての応用は限られているのが現状です。こういった背景から、適切なレベルの受容体活性を誘起可能な人工アゴニストの開発が求められています。

本研究では、適切なレベルの受容体活性を誘起可能なアゴニストとして、パーシャルアゴニストに着目しました。天然の増殖因子よりも低い最大受容体活性化 (リン酸化) 量 (E_{max}) を示すパーシャルアゴニストは、適切なレベルの受容体活性を引き起こすことができるため、副作用の少ない治療を可能にする分子として期待されています¹⁾。そこで、本研究では、肝細胞増殖因子 (HGF) の受容体である Met をターゲットとし、DNA アプタマーに基づく人工パーシャルアゴニストの開発を目指しました。

2. DNA アプタマーを用いた人工パーシャルアゴニスト設計

本研究では、受容体活性を制御する要素として、受容体の二量化頻度に着目し、それらを制御可能なアゴニスト設計を行いました。具体的な戦略としては、受容体への親和性が異なるリガンド分子からなる、ヘテロ二量体型アゴニストを作成することとしました。この二量体型アゴニストのうち、一方のリガンドの親和性を調節することで、受容体の二量化頻度を調節可能であると考えました (図1)。

この戦略を実現する分子として、本研究では、DNA アプタマーを用いることとしました。DNA アプタマーとは、標的に対して特異的に結合する核酸分子であり、これまでに、受容体に結合する DNA アプタマーを二量化させることで、増殖因子と同様に受容体を活性化できることが示されています²⁾。本研究では、肝細胞増殖因子 (HGF)

の受容体である Met をターゲットとし、3種類の二量体型アゴニスト、50-50、47-50、42-50 を設計しました。この二量体型アゴニストでは、3'末端側には全て同じ高親和性のアプタマーを、5'末端側に

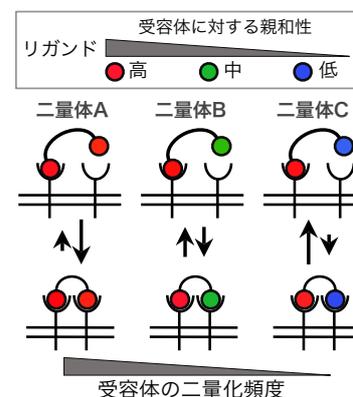


図1. パーシャルアゴニスト設計戦略 (参考文献[3]より改変して掲載)

は、それぞれ Met に対する親和性が異なるアプタマーを用いました (図 2 a、上段)。

3. 設計した人工パーシャルアゴニストの機能評価

設計したアゴニストの Met 活性化能を評価するため、Met 発現細胞である A549 細胞を各アゴニストで刺激し、ELISA によって Met リン酸化量を定量しました。その結果、アゴニストが示す E_{max} の値が、5' 末端側のアプタマーの親和性に応じて低下していることが確認できました (図 2 a、下段)。50-50 は HGF と同等の E_{max} を示すことから、今回設計した 47-50、42-50 が Met 受容体パーシャルアゴニストとして機能することが確認されました³⁾。

さらに本研究では、再生医療分野への応用において重要となる、細胞の増殖、遊走、血管新生に着目し、開発したパーシャルアゴニストによって、これら細胞機能の精密制御が可能であるか調べました。その結果、細胞増殖・血管新生・細胞遊走が、アゴニストの示す E_{max} に応じて制御されることが確認されました (図 2 b)。

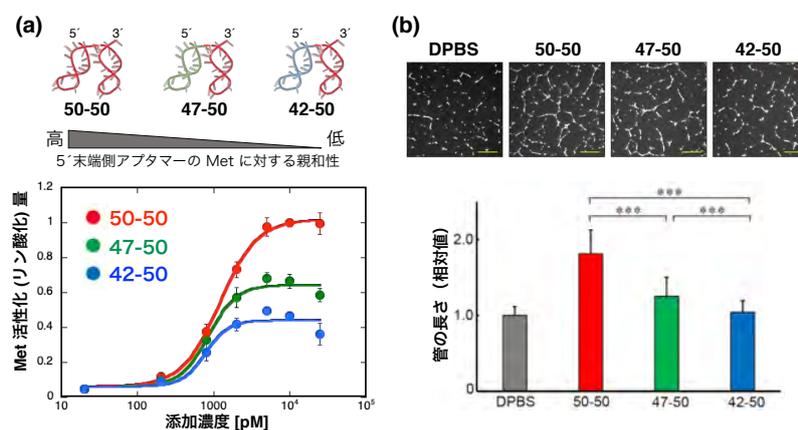


図 2. (a) 上段: DNA アプタマーを用いて設計した 3 種類の二量体型アゴニスト。下段: 設計したアゴニストの Met リン酸化量に関する用量効果曲線 (10 nM 50-50 刺激の値に対する相対値)。 (b) HUVEC を用いた血管新生アッセイ。上段: HUVEC を各アゴニストで刺激後 18 時間の位相差画像。スケールバー 400 μ m。下段: 各アゴニスト刺激により形成された管の長さ (DPBS 刺激条件での管の長さに対する相対値)。(参考文献[3]より改変して掲載)

4. まとめと今後

本研究では、 E_{max} の精密制御を実現する人工パーシャルアゴニストの設計指針を見出しました。また、設計したパーシャルアゴニストが、誘起する受容体リン酸化レベルに応じ、細胞の増殖、血管新生、遊走を制御可能であることを示しました。今後は、設計した人工アゴニストの作用メカニズムについて、受容体の一分子イメージングによって明らかにしていく予定です。

謝辞

ご指導いただいております山東教授、植木助教、そして、山東研究室の皆様には感謝申し上げます。また、受容体一分子解析で共同研究いただいております佐甲研究室の皆様にも深く御礼申し上げます。本研究は、東京大学生命科学技術国際卓越大学院およびリーダー博士人材育成基金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] Ho, C. C. M.; Chhabra, A.; Starkl, P.; Schnorr, P. J.; Wilmes, S.; Moraga, I.; Kwon, H. S.; Gaudenzio, N.; Sibilano, R.; Wehrman, T. S.; Gakovic, M.; Sockolosky, J. T.; Tiffany, M. R.; Ring, A. M.; Piehler, J.; Weissman, I. L.; Galli, S. J.; Shizuru, J. A.; Garcia, K. C. *Cell*, **2017**, *168*, 1041.
- [2] Ueki, R.; Ueki, A.; Kanda, N.; Sando, S. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, *55*, 579.
- [3] Akiyama, M.; Ueki, R.; Yanagawa, M.; Abe, M.; Hiroshima, M.; Sako, Y.; Sando, S. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*, 22745.

高輝度 CPL 発現に適した DNA 導入ピレン会合体の探索

¹ 名古屋大学大学院工学研究科
² 金沢大学大学院自然科学研究科
³ 京都大学大学院工学研究科



伊藤 有香¹, 角田 貴洋², 生越 友樹³
 浅沼 浩之¹, 櫻田 啓¹

著者紹介 :

名古屋大学大学院工学研究科、生命分子工学専攻、博士前期課程在学中。生命超分子化学講座、浅沼研究室所属。生体分子である DNA を“マテリアル”として応用するという観点で、私にとっては新たな価値観であり強く感銘を受けたため、浅沼研究室で研究することを決めました。現在は、DNA を利用することで、円偏光発光 (CPL) 原理の解明を目指した研究を行っており、DNA の持つマテリアルとしての可能性を実感しております。また、研究室生活を送る中で、研究にはかなりの時間を要するにも関わらず、世界で初めての結果しか通用しないことから、正確さと早さが最重要であることを学びました。それ故、今後も一研究者として、常に効率性を重視しながら精進していきたいと思っています。これまで核酸化学・光化学などの様々な知識をはじめ、研究に対する心構えから指針・計画の立て方まで熱心にご教授下さりました、浅沼教授、櫻田准教授、神谷准教授、村山助教には、この場をお借りして御礼申し上げます。

1. はじめに

円偏光発光 (Circularly Polarized Luminescence ; CPL) はキラルな蛍光分子を励起した際に生じる蛍光が円偏光する現象であり、近年非常に注目されている。これまでに、色素単量体や二量体が発する CPL に関する研究が多数報告されてきた。また、自己集合させた色素会合体が発する CPL についても研究が行われている。しかし、これらの系では色素の会合数や配向を変化させることが難しいという問題点があった。また、異なる種類の色素によるヘテロ会合体を調製することも困難である。そのため、色素会合形態が CPL 特性に及ぼす影響については未だ詳細が明らかとなっていなかった。

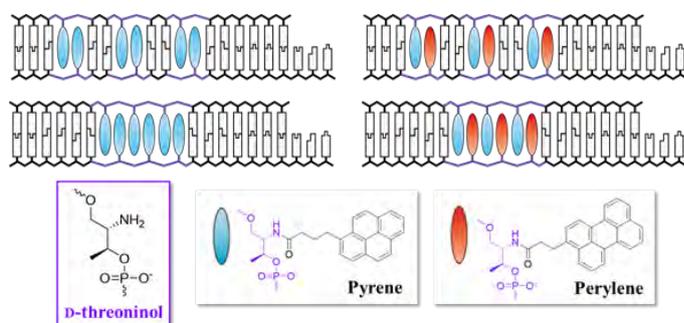


Fig. 1. Pyrene aggregates in DNA duplex

それに対し、我々は D-threoninol を利用して色素を DNA 二重鎖中で会合させる手法の開発に成功している (Fig. 1) [1]。この手法を用いれば、DNA 二重鎖中の任意の場所に色素を導入することができるため、色素の数や配向を厳密に制御することが可能である。また、他の手法では調製が困難なヘテロ会合体も容易に調製することが出来る。そこで本研究では、D-threoninol を利用して様々な会合形態の蛍光色素会合体を調製することで、色素の化学構造や会合数、色素配列が CPL 特性に及ぼす影響について検討を行った。CPL 発現に適した会合形態が明らかとなれば、新たな光学材料や生体プローブへの応用が期待できる[2]。

2. DNA 導入ピレン会合体の設計

具体的には、ピレンに着目した。ピレンは会合することでエキシマー発光を示し、また比較的強いCPLを発現することが報告されている [3]。そこで、D-threoninol を介して種々のピレン誘導体 (P, P^T, P^B) を DNA に導入した (Fig. 2)。それぞれの色素を 1 から 3 分子 DNA に導入し、二重鎖形成させることで色素数が 2, 4, 6 の会合体を調製した。また、異なる色素を含む配列を二重鎖形成させることで、ヘテロ会合体の調製も行った。

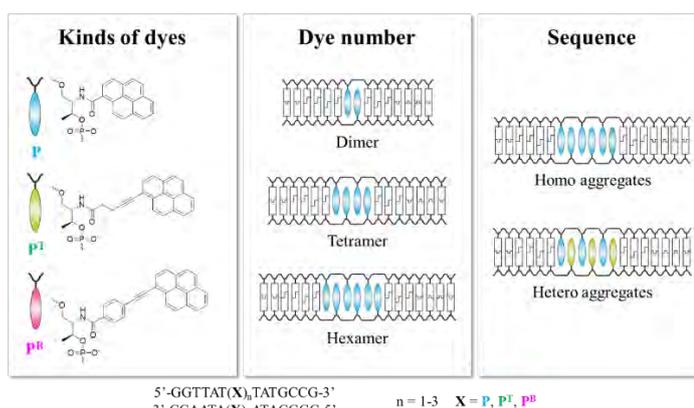


Fig. 2. Design of pyrene aggregates

3. CPL 強度 (g_{lum}) の比較

調製した二重鎖についてCPL測定を行ったところ、P^TやP^Bのホモ会合体よりもPのホモ会合体において、より強いCPLが観測されることが分かった (Fig. 3a)。この結果は、CPL強度が色素構造に強く依存しており、剛直な構造を有するPが最もCPL発現に適した色素であることを示唆している。また、ヘテロ会合体よりもホモ会合体の方がCPLが高輝度化することも示された (Fig. 3b)。さらに、いずれの系においても会合数の増加とともにCPL強度の低下が確認された (Fig. 3c)。このことは、色素数の少ない会合体の方がCPL発現に適していることを示している。このように、DNA及びD-threoninolを利用することで色素会合形態がCPL特性に及ぼす影響を詳細に検討出来ることが分かった。以上の検討の結果、高輝度CPL発現に最も適した会合体は、Pを二分子会合させた会合体であることが明らかとなった ($g_{lum} = 1.5 \times 10^{-2}$)。

参考文献

- [1] H. Kashida, K. Sekiguchi, X. Liang, H. Asanuma, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 6223.
 [2] H. Kashida, K. Nishikawa, Y. Ito, K. Murayama, I. Hayashi, T. Kakuta, T. Ogoshi, H. Asanuma, *Chem. Eur. J.*, **2021**, *27*, 14582.
 [3] M. Nakamura, J. Suzuki, F. Ota, T. Takada, K. Akagi, K. Yamana, *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 9121.

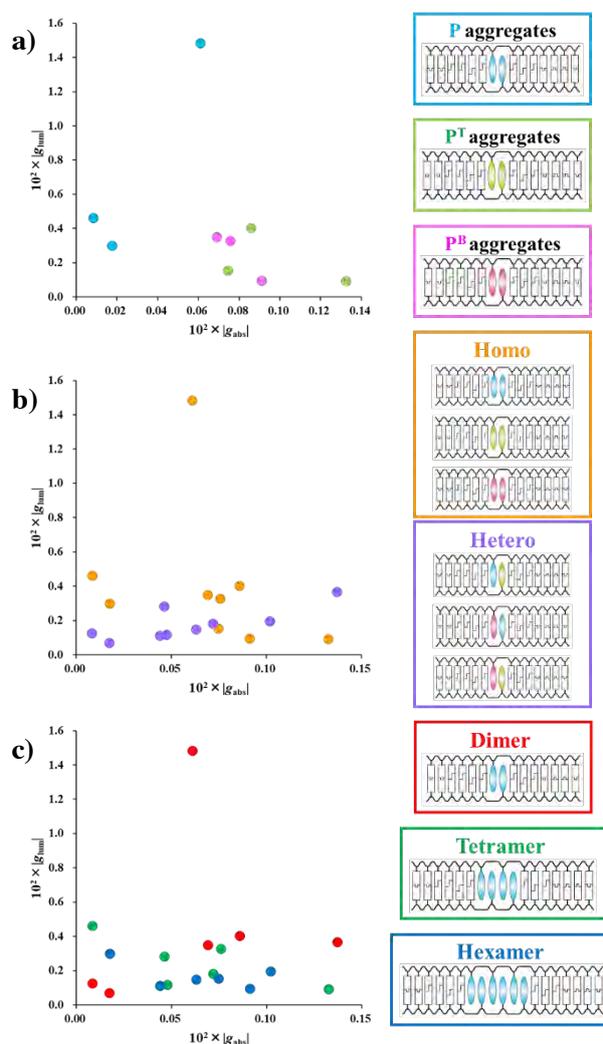


Fig. 3. Effects of (a) chemical structure of pyrene derivative, (b) sequence of fluorophores and (c) dye number on g_{abs} and g_{lum} .

液-液相分離による抗体と高分子送達ペプチドの濃縮と抗体の細胞内送達

京都大学化学研究所

岩田 恭宗, 広瀬 久昭, 坂本 健太郎, 平井 勇祐,

Jan Vincent V. Arfiles, 秋柴 美沙穂, 今西 未来, 二木 史朗



著者紹介: 京都大学大学院薬学研究科薬科学専攻博士後期課程 1 年次の岩田恭宗です。京都大学化学研究所にも所属しており、学部 4 年生の頃から二木研究室に在籍しています。

この度は、このような栄えある賞を頂き光栄に思います。本シンポジウムもそうですが、学会に参加し自身の研究発表を行ったり、他の研究者の発表を聞いたりしながら、色々なバックグラウンドを持った方々と交流できることは、私にとって非常に刺激的でとても楽しみにしているものです。大変な時期ではありますが、運営に携わっていただいた先生方のご尽力のおかげで、本シンポジウムにて私も非常に有意義な時間を過ごすことができました。ありがとうございました。

二木研では、周りの先生や先輩方に助けられながら、毎日楽しく研究しています。今回報告した研究成果は、まさに棚から牡丹餅的な、驚きの発見に端を発しています。まだまだ基礎研究段階ですが、人々の命を救える新たな医薬品開発につながる可能性があると考えています。この研究で経験した、新たな現象を発見するという喜びと、それが新規医薬品につながるかもしれないという期待は、今後の研究活動における大きなモチベーションになると思います。今後も研究者として画期的な薬品開発につながるような、夢のある研究をしていきたいと思っています。

来年こそはオンサイトで開催できることを願っております。私自身も、より素晴らしい研究成果をあげて、来年のシンポジウムでも発表できるよう頑張りたいと思います。

1. はじめに

抗体は優れた抗原認識能を有しており、生命科学分野において特定の分子解析ツールとして用いられているだけでなく分子標的薬としての開発が進んでいる。しかし抗体は自身のサイズ (約 150 kDa) や親水性のために単独で細胞膜を透過することができない。そのため、抗体医薬品の利用は細胞外分子を標的としたものに限定されている。抗体を効率よくサイトゾルへと送達する手法を開発することができれば、抗体医薬品の適用を細胞内分子にまで拡張することが可能である。当研究室では溶血性ペプチド M-lycotoxin の配列を改変した高分子送達ペプチド“L17E”を開発した[1]。L17E により抗体を含む高分子を効率よくサイトゾルへと送達することが可能となった。しかし、L17E と抗体の十分な活性を得るためには両者ともに高濃度でなければならず (L17E 40 μ M, IgG 1 mg/mL)、細胞生物学などの基礎研究への適用や臨床応用を見据えると、L17E と抗体がともに低濃度でも高効率でサイトゾル送達が可能な手法の開発が求められる。

2. 高効率抗体送達ペプチドの設計

我々は、抗体の効率のよいサイトゾル送達を実現するためには L17E と抗体との複合体形成、そして膜近傍での L17E の局所濃度の増加によるサイトゾル送達能の向上が重要であるという仮説を立てた。抗体へのアダプターとして我々はすでに報告されている抗体 Fc 領域に親和性を持ったペプチド、Fc-region binding peptide を採用した[2]。さらに、L17E の局所濃度の増加のために L17E を多量体化させる

ことで Fc-region Binding L17E trimer (FcB(L17E)₃) を作製した。想定される送達メカニズムとしては抗体と FcB(L17E)₃ が 1 対 1 ないしは 1 対 2 の複合体を形成し、抗体自身にサイトゾル到達能を付与させるというものである (Fig. 1)。

3. 液-液相分離を介した抗体のサイトゾル送達

FcB(L17E)₃ のサイトゾルへの抗体送達活性は、Alexa Fluor 488 により蛍光標識された抗体を FcB(L17E)₃ と共投与した後に共焦点顕微鏡にて観察を行い、蛍光標識抗体のサイトゾル全体への拡散を指標に評価した。結果として、FcB(L17E)₃ を用いることで L17E よりも低いペプチドおよび抗体濃度で蛍光標識抗体をサイトゾルに効率よく導入することに成功した[3] (Fig. 2A, B)。また、その送達様式は元来の想定とは異なり、FcB(L17E)₃ と Alexa Fluor 488 標識抗体が直径 2 μm 程の粒子を形成し、細胞膜に付着した後、一挙に抗体をサイトゾルへと放出するというものであることが分かった (Fig. 2C)。本実験系において、抗体は蛍光標識により電荷が全体として負に偏っている一方、FcB(L17E)₃ はリジンやアルギニンといった正電荷アミノ酸残基を含み全体として正電荷に偏っている。そのため、これら二つの静電的相互作用により液-液相分離が引き起こされ、抗体と FcB(L17E)₃ が濃縮された液滴が形成されたものと考えられる (Fig. 2D)。このように L17E のような膜傷害性ペプチドと抗体を液-液相分離により液滴に濃縮しサイトゾルへ送達した例は未だなく、サイトゾルへの新規抗体送達プラットフォームの可能性を示唆している。

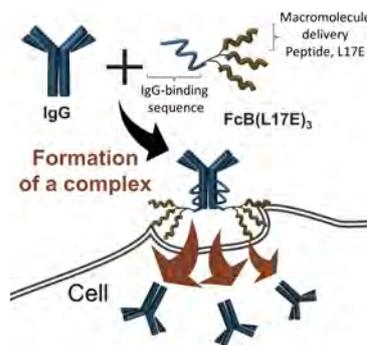


Fig. 1 研究初期の FcB(L17E)₃ による抗体のサイトゾル送達戦略

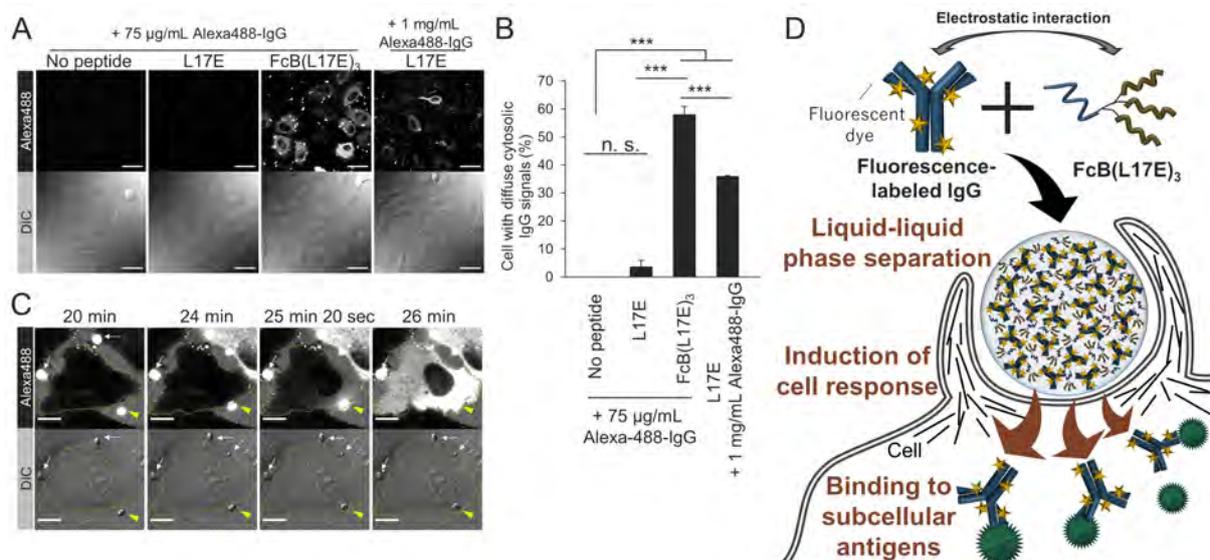


Fig. 2 A) 30 分間、L17E または FcB(L17E)₃ と蛍光標識抗体を含む血清含有培地中で培養した HeLa 細胞の共焦点顕微鏡画像。B) サイトゾルに蛍光標識抗体が送達された細胞の割合。C) 液滴に濃縮された蛍光標識抗体がサイトゾルに流入する様子をつえた経時的観察画像。D) 想定される FcB(L17E)₃ による蛍光標識抗体のサイトゾル送達様式。

参考文献

- [1] Akishiba, M. *et al.*, (2017) *Nat. Chem.*, 9(8), 751.
- [2] Yang, H., *et al.*, (2005) *J. Pept. Res.*, 66, 120-137
- [3] Iwata, T. *et al.*, (2021) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 60(36), 19804-198

固定化駆動法による脳内での分子動態解析を指向した新規プローブ開発

京都大学大学院工学研究科
対馬 暁洋



著者紹介：京都大学大学院工学研究科浜地研究室に所属しており、現在修士課程一回生です。スピッツの大ファンです。曲ももちろんですが、彼らの爽やかだけどどこことなく尖っている雰囲気は憧れています。いつか自分もそんな人間になりたいです（笑）。浜地研究室では、マウス脳内での分子解析を目指した蛍光プローブの開発に取り組んでおり、非常に恵まれた環境で学生生活を送らせていただいています。このような恵まれた環境を作ってくださいとスタッフをはじめとした浜地研究室のメンバー全員に感謝申し上げたいと思います。

1. 外来性小分子動態の解析法：FixEL

医薬品や医療診断用イメージングプローブのように生体で機能を果たす有用な小分子が数多く存在する。これら外来性小分子の生体組織における機能は、それらの組織内における空間分布、標的選択性、拡散・排出動態に強く依存する。しかし、生体組織内でこれらのパラメータを高い時空間分解能で評価する方法は限定されており、新規の解析法が必要とされている。我々は、組織における外来性小分子動態の新規解析法として、*FixEL* (Fixation-driven chemical crosslinking of exogenous ligands) 法を開発してきた。¹ *FixEL* 法では、19世紀後半から用いられてきた組織固定化法であるホルムアルデヒド水溶液 (PFA 溶液) によるタンパク質間の架橋/固定化反応 (Figure 1A) にヒントを得て開発した手法である。動態を知りたい外来性小分子リガンドに化学的な修飾を加え、PFA 固定によってタンパク質と一緒に架橋・解析できるように工夫を施した。まず、標的小分子に一級アミノ基と蛍光色素を修飾した分子をプローブとする。これをマウスに投与後、任意のタイミングで PFA を用いた生体組織の灌流固定を行うと、固定液が組織へ速やかに浸潤し、*FixEL* プローブが相互作用タンパク質と架橋/固定化される。その後、蛍光シグナルを解析することで、灌流固定した瞬間のプローブの局在を高い分解能で得ることができる (Figure 1B)。

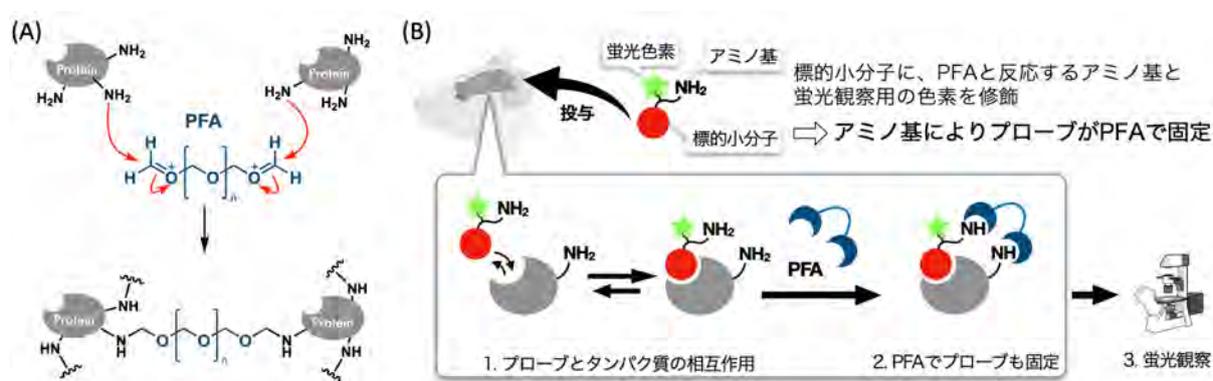


Figure 1. (A)PFA によるタンパク質の架橋/固定化反応. (B)*FixEL* 法の概略図.

2. 抗精神病薬 spiperone を解析対象とする *FixEL* プロープの開発と原理実証実験

私は、*FixEL* 法を実際に医薬品や PET プロープとして用いられている spiperone に適用した。この分子は、ドパミン受容体(DRD2)のアンタゴニストであり、抗精神病薬としても用いられている。

まず、spiperone にアミノ基と蛍光色素(AlexaFlour647)を修飾した分子プロープ(Figure 2A)を設計・合成し、DRD2 を強制発現させた HEK293T 細胞での原理実証実験を行なった。DRD2 を強制発現させた HEK293T 細胞にプロープを添加し、PFA による固定を行うと DRD2 が発現している細胞形質膜からプロープ由来の蛍光が確認できた。一方で、プロープと一緒に競合阻害剤を添加した条件や、アミノ基を持たないプロープを添加した条件では、プロープ由来の蛍光は確認できなかった(Figure 2B)。以上の結果から、今回のプロープは、プロープのリガンド部位の親和性と、アミノ基と PFA によるクロスリンクにより固定されることが確認された。

3. *FixEL* 法による spiperone のマウス脳内での動態解析

次に、マウスの脳内での spiperone プロープの動態解析を試みた。マウスの側脳室にプロープを注入し、一定時間経過後 PFA による灌流固定を行い、脳スライスを作製して共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、DRD2 が多く発現する線条体から蛍光が確認され、この蛍光は Anti-DRD2 抗体による共免疫染色のシグナルと一致した。また、大脳皮質領域からも蛍光が確認された。これは spiperone のオフターゲットであるセロトニン受容体(5-HT_{2A})への結合を反映していることが、Anti-5HT_{2A} 抗体による共免疫染色より示された。以上の結果は、*FixEL* 法によって、生きたマウス脳内での spiperone リガンドの空間分布と標的を可視化解析できることを強く示唆している (Figure 2C)。さらに、プロープ投与後から灌流固定までの時間を変えることで、プロープ分布の時間変化解析にも成功した。組織透明化技術と合わせて用いることで、プロープ分布の3次元解析も可能であった。

4. まとめ

今回、我々は抗精神病薬である spiperone を解析対象にした *FixEL* プロープを開発し、生きたマウス脳内での分子動態を高分解能で解析することに成功した。

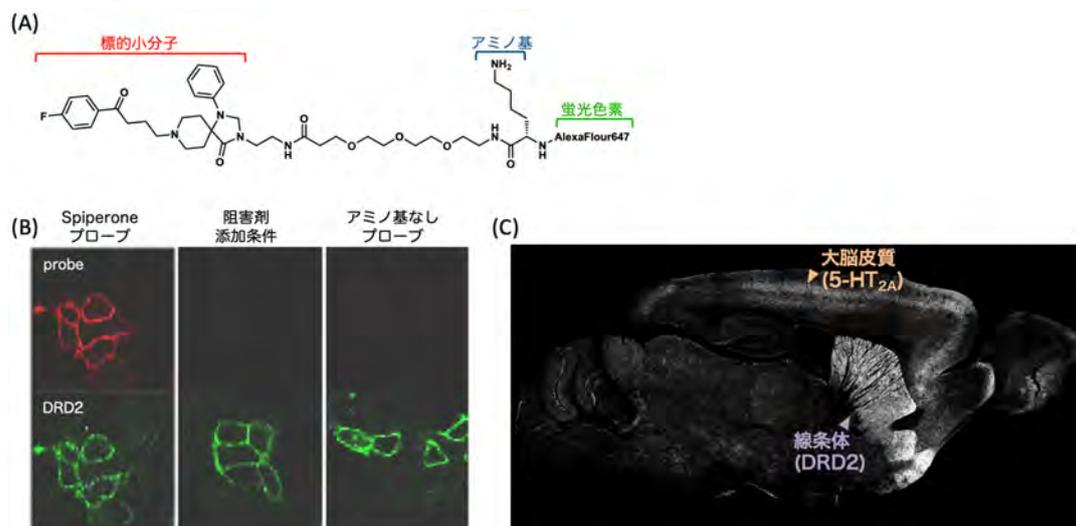


Figure 2. (A)Spiperone を対象とした *FixEL* プロープ. (B)DRD2 発現細胞を用いた原理実証実験.

(C)マウス脳内でのプロープ分布の解析.

謝辞：本研究を進めるにあたって、浜地研究室のメンバーから多大なるご指導・ご協力を賜りました。この場を借りて感謝申し上げます。

Yn 設計ペプチドによる細胞内でのクラスター形成を伴う蛋白質間相互作用解析

東京工業大学 生命理工学院

橋本 匡浩, 三木 卓幸, 中井 太一, 三原 久和



著者紹介: 東京工業大学大学院生命理工学院博士1年。趣味はピアノを弾くこと、ゲームやアニメに出てくるアイテムを現実世界で作ることです。学部4年で三原研に配属された当初は、標的分子を蛍光検出できる蛍光バイオセンサーの効率的な構築法に関する研究を行っていました。その研究が一段落ついた頃から、かねてから興味をもっていた細胞内で蛋白質を集積化できる自己集合性ペプチドタグに関する研究に取り組み始めました。今回の学会では、自己集合性ペプチドタグのテーマで多くの方々と議論でき、栄えある賞も頂くことができ大変嬉しく思います。今後もより一層精進していきます。

1. はじめに

細胞内のシグナル伝達や液-液相分離などの様々な生理イベントにおいて、蛋白質のクラスター化を伴う蛋白質間相互作用がよく見られる¹⁾。個々の蛋白質間の相互作用は弱い²⁾が、クラスター化により局所的に濃度が高まることでパートナーと強く相互作用する。このようなクラスター化と相互作用の関係を解析するため、細胞内で bait 蛋白質を人工的にクラスター化し、その濃縮率を制御できる技術の開発を目指した。これにより、bait 蛋白質がクラスターを形成し、prey 蛋白質がリクルートされる過程のスナップショットを取得し、クラスター化と相互作用の関係を解析することができる³⁾と考えた (Fig. 1)。

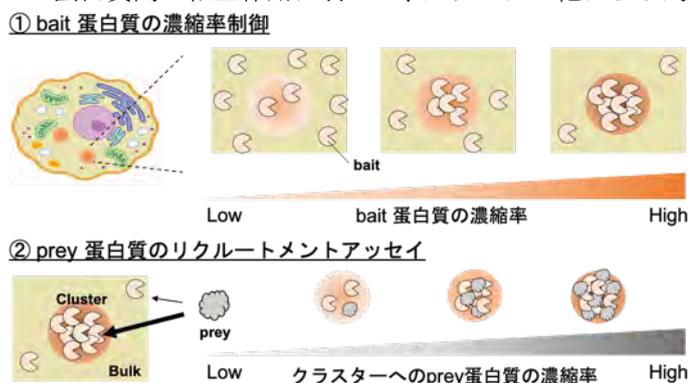


Fig.1 bait 蛋白質の濃縮率制御および prey 蛋白質のリクルートメントアッセイ

2. 細胞内で蛋白質の濃縮率制御が可能なガイドタグの開発

当研究室では、細胞内で蛋白質を人工的にクラスター化させるための基盤として、両親媒性 Y15 ペプチドタグ (YEYKYEYKYEYKYEY) を開発している²⁾。両親媒性ペプチドは、疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸の繰り返し配列から設計でき、 β シート構造を形成して自己集合し、水中でナノファイバー構造を形成しやすい特徴をもつ。Y15 ペプチドはタグとして蛋白質に融合することで、細胞内で蛋白質を人工的にクラスター化できる。また、Y15 ペプチドタグを融合した四量体蛍光蛋白質 AzamiGreen (Y15-AG) は、細胞内でマイクロメートルサイズの集合体を形成し、Y15 ペプチドを融合した機能性蛋白質を濃縮できるスキャホールドとして利用できることが見出されている (Fig.2A)。

そこで我々は Y15 ペプチドタグを基軸とし、bait 蛋白質の濃縮率を制御できる技術の開発を目指した。具体的には、Y15 ペプチドタグの鎖長を短縮して相互作用点を減らした4種類のガイドタグを bait 蛋白質に融合することで、Y15-AG スキャホールドへの濃縮率を制御し、prey 蛋白質との結合を評価できると考えた (Fig. 2A)。

まず、鎖長の異なる4種類の Yn ペプチド (9,11,13,15 残基) を mCherry-HA に融合し、Y15-AG-myc スキャホールドへの濃縮率を蛍光観察によって評価した。その結果、Yn ペプチドの鎖長依存的に Yn-mCherry-HA の濃縮率が増加し、Yn ペプチドは蛋白質の濃縮率を制御可能なガイドタグとして機能することが示された (Fig. 2B)。

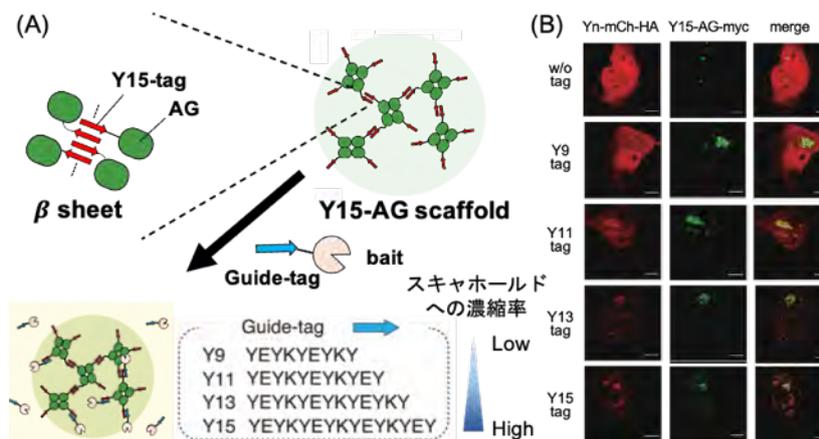


Fig.2 (A) ガイドタグを用いた bait 蛋白質の濃縮率制御 (B) ガイドタグ融合 mCherry-HA と Y15-AG-myc を発現した COS-7 細胞の蛍光画像

3. クラスター形成を伴う蛋白質間相互作用の解析

次にこれらのガイドタグを、bait 蛋白質のクラスター形成に伴う prey 蛋白質の集積化の解析へと応用した。今回は、Nck1 (bait) と N-WASP (prey) 間の相互作用に着目した。

開発した4種類のガイドタグを bait 蛋白質に融合し、様々な濃縮率でクラスターを形成させ、prey 蛋白質がクラスターにリクルートされる程度を検討した (Fig. 3A)。蛍光観察の結果、ガイドタグの鎖長依存的に bait 蛋白質の濃縮率が高まり、それに伴って prey 蛋白質が bait 蛋白質のクラスターにリクルートされた (Fig. 3B)。bait 蛋白質と prey 蛋白質の濃縮率をプロットした結果、比例関係が見られ、Nck1 の濃縮に伴って N-WASP が徐々に濃縮することが示唆された (Fig. 3C)。

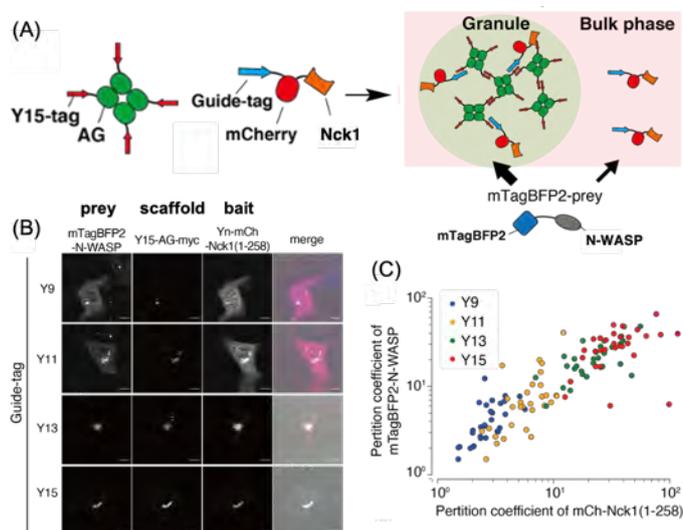


Fig. 3 (A) bait 蛋白質の濃縮に伴う prey 蛋白質との相互作用を示した概要図 (B) Yn-mCherry-Nck1 (bait) と mTagBFP2-N-WASP (prey) を共発現した COS-7 細胞の蛍光画像 (scale = 10 μ m) (C) Y15-mCherry-Nck1 (bait) と mTagBFP2-N-WASP (prey) の濃縮率を示した散布図

4. おわりに

本研究では、細胞内で蛋白質の濃縮率を制御できるガイドタグを開発し、bait 蛋白質のクラスター形成を契機として生じる prey 蛋白質との相互作用をイメージすることができた。本手法は、Nck1 – N-WASP 間以外の蛋白質間相互作用の解析にも適用可能であることが明らかになっている³⁾。今後は、bait 蛋白質のクラスターにどのような内在性 prey 蛋白質がリクルートされるかをプロテオーム解析によって同定できる技術を開発することで、蛋白質のクラスター形成を伴う蛋白質間相互作用をより深く理解することを目指している。

参考文献

- [1] C. Metcalfe, C. M. Topaz, J. Mieszczynek and M. Bienz, *J. Cell Sci.*, **2010**, 123, 1588–1599.
- [2] T. Miki, T. Nakai, M. Hashimoto, K. Kajiwara, H. Tsutsumi and H. Mihara, *Nat. Commun.*, **2021**, 12, 3412.
- [3] T. Miki, M. Hashimoto, T. Nakai and H. Mihara, *Chem. Commun.*, **2021**, 57, 11338

メンブレンコンタクトの化学遺伝学操作を介した膜脂質代謝の可逆制御

¹名古屋工業大学大学院工学研究科

²名古屋工業大学工学部

³新潟大学大学院医歯学総合研究科

吉川 優¹, 阿喰 萌香², 中津 史³, 築地 真也^{1,2}



著者紹介: 博士後期課程から築地研究室所属となり、ケミカルバイオロジーを駆使した細胞の人工制御技術の開発に取り組んでいます。いろいろな実験技術や装置に興味があり、液相有機合成やゲノム編集にも手を出すチャンスを見ていましたが、どうやらその前に卒業が来てしまいそうです。

1. はじめに

真核生物の細胞内には、小胞体やゴルジ体をはじめとしたさまざまな種類の細胞小器官（オルガネラ）が存在している。これらは脂質膜に包まれた構造をしているため、各々のオルガネラは機能的にも空間的にも独立していると考えられてきた。しかし近年、オルガネラ同士の近接によりメンブレンコンタクト（以降、コンタクト）と呼ばれる膜-膜間接触領域が形成され、そこで生体分子の交換などが行われていることが明らかになってきた。一方、コンタクトの詳細な生理的機能や役割については不明な点が多く残されており、その解明に向けた研究が現在世界的に進められている。コンタクトの機能を解析する上で強力な研究ツールとなるのが、任意のオルガネラ間のコンタクトを人工的に誘導する技術である。これまでに、ラパマイシンによる FKBP と FRB の二量化を利用したコンタクト誘導法が開発されているが^[1]、この手法は不可逆的であるため、コンタクトの解消後の生命現象や細胞動態を解析するには不向きであった。そこで今回我々は、築地研究室が得意とするタンパク質局在制御化合物技術を応用することで、コンタクトの形成と解離を可逆的に制御可能なツールの開発を目指した。

2. コンタクトの形成機構と可逆的な人工制御システムの設計

小胞体（ER）は細胞内のコンタクトの中心となるオルガネラであり、細胞膜（PM）や他のさまざまなオルガネラとコンタクトを形成している。コンタクト部位では、膜タンパク質によってオルガネラ膜間に架橋が形成されており、これが膜同士の近接状態を実現している。例えば、ER と PM のコンタクト形成を誘導するタンパク質として、小胞体膜上に存在するオキシステロール結合タンパク質 ORP5 が知られている。ORP5 は PH ドメインを介して PM 上の PI4P（phosphatidylinositol-4-phosphate）に結合することで ER 膜と PM が架橋され、これが ER-PM コンタクトの形成を誘導している^[1]。

我々はこれまでに、細胞内の標的オルガネラ膜に自発的に局在化するリガンド（局在性リガンド）を創製し、これを用いて細胞質中のリガンド結合タンパク質を標的オルガネラ膜に局在移行させる技術を開発してきた^[2-4]。この手法では、標的タンパク質と標的オルガネラ膜は局在性リガンドを介して架橋された状態となっており、またその結合は可逆的である。そのため、このシステムを ORP5 と細胞膜の架橋形成に応用することで、可逆的に ER-PM コンタクト形成を制御可能なシステムが構築できるものと考えた。中でも、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素にカチオン性タグ（K6）を付与した¹⁶DHFR^[5]は、トリメトプリム（TMP）にパルミチン酸を修飾した palTMP によって細胞膜に局在移行するため、本研究ではこのペアを ER-PM コンタクト形成システムの設計に利用した。

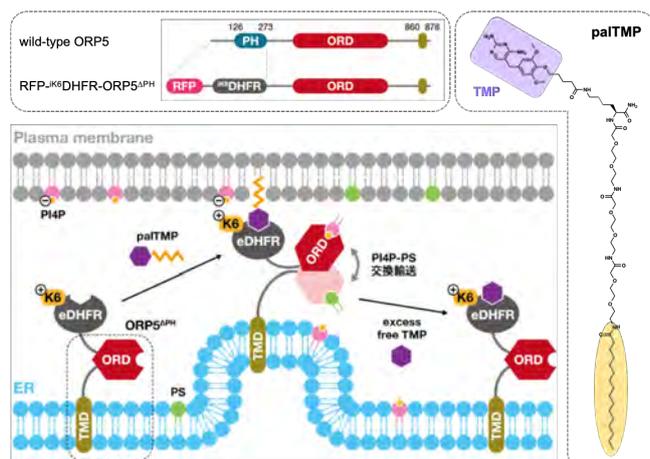


図1 ER-PMコンタクトの可逆誘導システムの設計

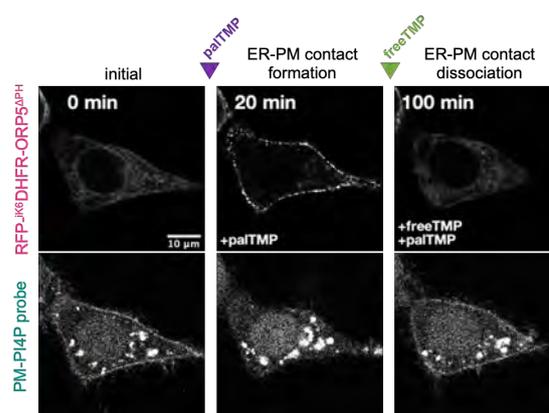


図2 化合物を用いたER-PMコンタクト形成の可逆制御とPM-PI4Pの代謝制御

3. ER-PM contact 形成の人工制御

我々の設計を図1に示す。本系ではまず、ORP5のPHドメインを $ik6$ DHFRで置換したRFP- $ik6$ DHFR-ORP5 Δ PHをER膜上に発現させる。その培養液にpalTMPを添加することで、RFP- $ik6$ DHFR-ORP5 Δ PHがPMに係留され、ER-PMコンタクトの形成を誘導できると考えた。また、ここに未修飾のTMP (free TMP)を過剰量添加することで、palTMPと $ik6$ DHFRの結合が競合的に阻害され、ER-PMコンタクトを外せるものと期待した(図1)。HeLa細胞を用いて検証した結果、リガンド添加前の条件では、RFP- $ik6$ DHFR-ORP5 Δ PHはER膜上に均一に分布しており、ER-PMコンタクトの形成は認められなかった。一方、palTMPを添加すると、RFP- $ik6$ DHFR-ORP5 Δ PHの局在がPM上に輝点となって集まる様子が見られ、ER-PMコンタクトが形成されていることが示唆された。さらに、ここにfree TMPを添加することで、RFP- $ik6$ DHFR-ORP5 Δ PHの局在が元の状態に戻ったことから、一度形成したER-PMコンタクトを可逆的に解消可能であることが示された(図2上)。

ORP5はER-PMコンタクトを形成すると、PMのPI4PをERへ、またそれに対向してER膜のPS(phosphatidylserine)をPMへと交換輸送する機能を持っており、ER-PMコンタクト形成時にはPM上のPI4Pレベルが低下することが知られている。そこで、PM-PI4Pマーカーを共発現させた状態で、本システムによるER-PMコンタクトの誘導を行った。その結果、ER-PMコンタクトの誘導に伴ってPM上のPI4Pが急速に消失する様子が見られ、さらにER-PMコンタクトの解消によってPI4Pが再度PMに再合成される様子も確認された(図2下)。このことから、本システムは、ER-PMコンタクトの形成ならびにコンタクトで進行する分子プロセス(脂質交換輸送)を可逆的に制御できることが示された。

5. おわりに

本研究では、局在性リガンドを用いて人工ORP5を細胞膜へ係留することで、ER-PMコンタクトを可逆的に制御する新規化学遺伝学システムを構築した。本システムは、コンタクトが制御する生命現象の機構解明や、コンタクト形成分子の構造-機能相関研究などに展開できるものと期待している。また、他のオルガネラを標的とした局在性リガンドを利用することで、ERと他のオルガネラ膜間のコンタクト制御も可能になるものと期待される。

参考文献 [1] J. Chung et al., *Science* **2015**, 428-432. [2] M. Ishida et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 12684-12689. [3] A. Nakamura et al., *Biochemistry* **2020**, 59, 205-211. [4] S. Sawada et al., *Chem. Comm.* **2020**, 56, 15422-15425. [5] Y. Hatano et al., *bioRxiv* DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.03.16.435568>.

ぶらり研究室の旅

北陸先端科学技術大学院大学

マテリアルサイエンス系 山口研

化学と生物の橋渡し

“からだの中のコミュニケーションツール・糖鎖に挑む”、これは私たちの研究室で掲げているキャッチフレーズです。北陸先端大の山口拓実と申します、今回の「ぶらり研究室の旅」は、私たちが取り組んでいる糖鎖研究や、北陸先端大の魅力について紹介させていただこうと思います。

私たちは、“糖鎖の物理化学”を標榜しています。一言で糖といっても、グルコースに代表される単糖からコンドロイチン硫酸のような多糖まで、様々な分子があります。中でも私たちが主な研究対象としているのは、2~10糖程度で構成されるオリゴ糖鎖類です。オリゴ糖鎖は生体内では一般に、タンパク質や脂質と結合した複合糖質として存在します。その役割は（おそらく）多様ですが、解明が進んでいる機能の一つが、糖鎖-タンパク質間の相互作用を通じた情報分子としての働きです。では分子間コミュニケーションに関わるオリゴ糖鎖は、いったいどんなコンフォメーションをとっているのか、その立体構造はどれくらい揺れ動いているのか？糖鎖のしなやかな“動的立体構造”が、どのように生体機能と関連するのか、そのメカニズム解明に興味をもって研究を進めています。

糖鎖というのは、生体分子の中でもとりわけ手付かずなことが多い分子群だと言えます。そんな中、国内ではヒューマングライコームプロジェクトが動き出すなど、糖鎖研究は、今まさに大きく扉が開きつつある研究分野となります。そのため、基礎研究が、新たな技術開拓や社会課題の解決にダイレクトにつながる可能性を大いに秘めていると考えています。糖鎖研究の中でも物理化学はマイナーな分野なのですが、化学と生物学の間を取り持ち、生命の仕組みや病気の原因の解明につながる応用基礎研究に違いない！と夢に描いて研究しています。

こうした話を自慢げにすると、時に「糖鎖って難しそう、扱えるのはすごいですね」と言われることがあるのですが、実は私も根っからの糖鎖研究者というわけではありません。もともと学生時代は藤田誠先生の研究室で、自己組織化錯体の合成とホスト-ゲスト化学を学びました。現・東工大の河野正規先生に、結晶構造解析の手ほどきを受けたりもしました。その後チャンスに恵まれ、分子科学研究所・加藤晃一先生のグループに加わりました。藤田先生の「是非、フジタの色が見えない研究をしなさい」という言葉を胸に、心機一転、構造生物学の研究に従事することとなり、このときに糖鎖研究をスタート。ところが当時は、糖鎖はもちろん、生物のことはほとんど何も知らず、研究室内で交わされる言葉の意味がわからず右往左往してばかりでした。コタイと聞けば“固”体と誤変換する有様（個体が正解）。しかし加藤先生や糖鎖コミュニティの諸先輩方から、糖鎖に新しく入ってきてくれる人は大歓迎と、多くのアドバイスとサポート



実験室にて

をいただき、どうにかこうにか進んでこられました。また分子研および岡崎統合バイオサイエンスセンターでの、多彩な研究者との交流も大きな財産となりました。化学と生物の文化の違いを肌で感じ、我ながら大きく路線を変更したものだ、と思いましたが、よくよく考えてみると、学生時代から今に至るまで興味の根底には「分子認識」があるのだなと気付きます。

ところで、三つ子の魂ではないですが、今も“自分の分子を自分でつくる”をモットーにしています。北陸先端大の現研究室では、研究対象の糖鎖は自分で合成して自分で解析する、を基本に考えています。さらに物理化学解析で見えてきたことをフィードバックすることで、天然にはない糖鎖を設計したり、自分なりの分子設計を通して新しい機能を発揮させたり制御したりできるのではないかと、構造-機能相関の理解と予測をしながら“糖鎖を創る”ことにも注力しています。

このような研究背景から、実験室の風景はというと、エバポレータやオイルバスが並ぶ、ごくごく一般的な合成化学の研究室の様相となっています。学生時代と比べると、よく使うフラスコのサイズが一回り小さくなったことが、大きな変化でしょうか…。そのため、糖鎖研究の現場とはどのような様子だろうと、期待や好奇心を胸に見学にいらした方がっかり(?)させることも多々あります。

一方、糖鎖の動的構造解析には、主にNMRや分子シミュレーションを活用します。これらはもっぱら、北陸先端大が誇る共通装置群のお世話になっているわけです。北陸先端科学技術大学院大学は、高度な研究と教育を理念に掲げて創設された国立大学院大学。研究環境がとても充実しています。例えばNMR装置は、合成した化合物の同定などルーティン測定に適した400 MHz、固体計測用の500 MHz、ここの解析には800 MHzと各種使い分けています。大型計算機にも自由にアクセスすることができ、とても助かります。他にも各種装置・設備が多数。良い意味で大学の規模が小さく、化学・生物・物理の垣根や研究室間の敷居が低いこともあり、様々な実験にトライすることができます。私自身、最近になって、材料科学の共同研究のためラマン散乱やX線光電子分光なども使い始めました。また学内では、情報科学や社会科学の研究者とも身近に接しています。私たちの研究室でも、文化人類学や経営学の研究室とのコラボレーションも実施してきました。新しいことへ挑戦したい学生のみなさん、大学院大学はいかがですか？



NMR 実験 (左: 400 MHz, 右: 800 MHz) の様子

原稿をのんびり書いていたら、すっかり冬の気配が色濃くなってしまいました。恩師の先生方からの影響もあり、私のささやかなこだわりの一つが、教員室のドアを常にオープンにしておくことです。寒い日も、そこは譲れない。扉は開いていますので、是非ぶらりと覗いていただけたら嬉しいです。

連絡先：北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス系

e-mail: takumi@jaist.ac.jp

住所：〒923-1292 石川県能美市旭台 1-1

電話番号：0761-51-1641

ホームページアドレス：<http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/t-yamaguchi/>

部会行事

第 15 回バイオ関連化学シンポジウム開催報告

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

鳥取大学 学術研究院工学系部門 松浦 和則・稲葉 央

令和 3 年 9 月 8 日 (水) ~10 日 (金) の三日間にわたり、第 15 回バイオ関連化学シンポジウム (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) がオンライン形式で開催されました。実行委員長:松浦和則 (鳥取大学) および副実行委員長:神谷典徳 (九州大学) を中心に、鳥取大学および広島大学の実行委員会 (稲葉・永野・野上・日野・佐藤・櫻井・舟橋・黒田) を組織して運営させていただきました。当初、本シンポジウムは鳥取大学工学部での開催を目指しておりましたが、新型コロナウイルスの影響が収まらず、実行委員会および生体機能関連化学・バイオテクノロジー両部会の両会長と協議した結果、やむを得ずオンラインで開催することを 4 月末に決定いたしました。慣れないオンライン学会の運営でしたが、オンラインシステムとして (株) アトラスの Confit を用いて参加登録・演題登録・プログラム編集を用い、オンライン開催・要旨集に関しては創文印刷工業 (株) にもご対応いただき、大きな問題もなく開催することができました。

最終的に本年のシンポジウムでは、参加登録者数 466 名、口頭発表 71 件、ポスター発表 188 件となり、いずれも昨年度のオンラインシンポジウムを上回る結果となりました。また、昨年度は行えなかった特別講演を 2 名の先生方をお願いすることができました。

浅沼 浩之 先生 (名古屋大学) 「RNA 以前の世界を妄想する」

城 宜嗣 先生 (兵庫県立大学) 「分子構造を基盤にした鉄結合タンパク質の機能解明～生命金属科学への展開をめざして～」

シンポジウム初日は、実行委員長のご挨拶からスタートし、その後に 3 つのオンライン口頭発表会場に別れ 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。初日の C 会場で、講演中に Zoom が突然ダウンする事態が生じましたが、これは世界中で Zoom の使用が集中し負荷がかかったためと思われます。当該の講演は再度 C 会場を開き途中から再開していただきましたが、翌日の B 会場で再度講演していただくことになりました。ポスター発表は、ポスター資料の事前アップロードと Zoom のブレイクアウトルームでの発表を組み合わせることといたしました。まず、Confit のシステムを用いてあらかじめポスター形式の発表資料をアップロードいただき、シンポジウムの一週間ほど前から参加者に閲覧していただけるようにいたしました。初日のポスター発表の奇数番号と偶数番号の発表に切り替わる際に、Zoom のブレイクアウトルームに入れないという問題が生じました。Zoom アカウントを増やしブレイクアウトルームを分散させるなどの対応をすべきだったと反省しております。初日は一度ミーティングを閉じ再度開くことで対応し、二日目は奇数番号と偶数番号の発表を 2 人 1 ルームとしてブレイクアウトルームの数を半分にすることで対応いたしました。シンポジウム 2 日目 3 日目は、2 つのオンライン口頭発表会場およびポスター会場で、引き続き活発な議論が行われました。また、昨年度は実施できなかった懇親会を、SpatialChat を用いてオンラインで開催いたしました。鳥取砂丘や鳥取大学などを背景としたバーチャル会場において、講演賞およびポスター賞受賞者を発表・表彰し、受賞者から一言いただくことができました。

本シンポジウムの開催にご協賛いただきましたアステック (株) 様、(株) オンチップ・バイオテクノロジー様、神戸天然物化学 (株) 様、CEM Japan (株) 様、重松貿易 (株) 様、(株) 新興精機

様、タイテック（株）様、（株）テクノシグマ様、鳥取科学器械（株）様、（公財）とっとりコンベンションビューロー様、鳥取サイエンス（株）様、富士シリシア化学（株）様、フナコシ（株）様、ブルカージャパン（株）様、プレジジョン・システム・サイエンス（株）様、（株）マリンナノファイバー様、ライフサイエンスソリューションズ（株）様、Royal Society of Chemistry 様に心より御礼申し上げます。また、（株）アトラス社、創文印刷工業株式会社の皆様、ならびに日本化学会の保倉光邦様にはシンポジウム運営に関して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16回バイオ関連化学シンポジウムは、令和4年9月9日（金）～9月11日（日）の日程で堀先生・村上先生のお世話で名古屋大学東山キャンパスにて開始される予定です。来年こそ、対面で皆様方と熱いディスカッションができることを祈っております！

The screenshot shows the 'confit' website interface. On the left is a navigation menu with the following items: 開催情報, 実行委員長挨拶, シンポジウム概要, 発表申込, 参加登録, 口頭発表形式, ポスター発表形式, 講演費・ポスター費, 協賛団体, オンラインセミナーについて, 懇親会, 鳥取土産のご案内（懇親会のお供に！）, 若手フォーラム, シンポジウムポスターダウンロード, 特定簡取引に基づく表記, お知らせ (21). The main content area features a blue-bordered box with the following text:

第15回バイオ関連化学シンポジウム
 (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)

令和3年9月8日(水)～10日(金) オンライン開催

主催: 日本化学会生体機能関連化学部会・日本化学会バイオテクノロジー部会
 共催: 日本化学会、日本薬学会、フロンティア生命化学研究会、ホスト・ゲスト・超分子化学研究会、日本生物物理学会、鳥取大学

部会行事

「第15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講演賞・ポスター賞

審査委員長 廣田俊
 奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科

本シンポジウムの講演賞は2000年に始まって、今年で22回目を迎えました。新型コロナ感染症の拡大で研究を進めるのが大変な状況であったにもかかわらず、今年の講演賞に19名の若手研究者から応募がありました。審査はシンポジウム初日に、講演賞規定に従って、8名の審査員により厳正かつ公平に行われました。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項目の採点をもとに審査し、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」の点についても精査しました。本年も例年通り、いずれの講演もレベルが高く、甲乙つけ難い内容でしたが、僅かな差ながら、合計点の上位から3名を講演賞受賞者として選出いたしました。選外となった応募者の講演にも素晴らしいものが多く、今後さらに研究を進展させ、来年以降、本講演賞に再チャレンジしていただければと思います。3名の受賞者は、自らが中心となって新しい独創的な研究を展開している点が特に高く評価されました。若手研究者の皆さんが今後も独創的な研究を展開し、本講演賞が生体機能関連化学およびバイオテクノロジー分野の将来を担う世界的な人材育成に繋がればと願っております。

受賞者の方々には心からお祝い申し上げます。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とともに、益々のご活躍を祈念しております。

部会講演賞受賞者（敬称略、五十音順）

小和田 俊行 東北大学多元物質科学研究所・助教

細胞小器官内遊離 Zn^{2+} の濃度定量と動態観察を可能とする小分子蛍光プローブの開発

福永 圭佑 沖縄科学技術大学院大学・研究員

ライブラリーvs.ライブラリーの試験管内選択を通じた直交性 RNA-RBP ペアの発見

松尾 和哉 北海道大学電子科学研究所・助教

可視光による分裂期染色体の光操作法

本年度のポスター発表は昨年度に引き続きオンライン開催となりましたが、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、評価いただきました。ポスター賞審査は鳥取大学の稲葉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われました。同賞にエントリーした63名のポスター発表が、両部会に所属する63名の若手研究者により厳正に審査されました。例年通り優れた発表が多く、1点差を争う極めて厳しい審査となりましたが、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と聞いております。このうち上位3名には、RSC (Royal Society of Chemistry) 協賛により RSC Chemical Biology 賞、Chemical Communications 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、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63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）

*1 秋山 桃子（東大院工）、伊藤 有香（名大院工）、*2 岩田 恭宗（京大化研）、對馬 暁洋（京大院工）、橋本 匡浩（東工大生命理工）、*3 吉川 優（名工大院工）

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

部会講演賞受賞者



ポスター賞受賞者



お知らせ

第 15 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

小和田 俊行	東北大学 多元物質科学研究所	細胞小器官内遊離 Zn^{2+} の濃度定量と動態観察を可能とする小分子蛍光プローブの開発
福永 圭佑	沖縄科学技術大学院大学	ライブラリー-vs. ライブラリーの試験管内選択を通じた直交性 RNA-RBP ペアの発見
松尾 和哉	北海道大学 電子科学研究所	可視光による分裂期染色体の光操作法

ポスター賞受賞者

吉川 優 *1	名工大院工	メンブレンコンタクトの化学遺伝学操作を介した膜脂質代謝の可逆制御
秋山 桃子*2	東大院工	DNAに基づく増殖因子受容体パーシャルアゴニストの開発および生理作用評価
岩田 恭宗*3	京大化研	液-液相分離による抗体と高分子送達ペプチドの濃縮と抗体の細胞内送達
伊藤 有香	名大院工	高輝度CPL発現に適したDNA導入ピレン会合体の探索
對馬 暁洋	京大院工	固定化駆動法による脳内での分子動態解析を指向した新規プローブの開発
橋本 匡浩	東工大生命理工	Yn設計ペプチドによる細胞内でのクラスター形成を伴う蛋白質間相互作用解析

*1 RSC Chemical Biology 賞

*2 Chemical Communications 賞

*3 Organic & Biomolecular Chemistry 賞

お知らせ

第 16 回バイオ関連化学シンポジウム

－ 第 37 回生体機能関連化学シンポジウム・第 25 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 4 年 9 月 9 日(金)～9 月 11 日(日)
 会場： 名古屋大学東山キャンパス（名古屋市千種区不老町）野依記念学术交流館、坂田・平田ホール、ES 総合館（状況によってはオンライン開催の可能性があります）
 HP：<https://www.nagoya-u.ac.jp/access-map/index.html>
- [交通] 名古屋駅から地下鉄東山線藤が丘行きに乗車し、本山駅で地下鉄名城線右回りに乗り換え、名古屋大学駅で下車。
 HP：<https://www.nagoya-u.ac.jp/access/index.html>
- 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。
- 申込分類： (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： 全日で 15 分間発表、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 10 日(土) 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。
- 問合先： 〒464-8603 名古屋市千種区不老町 名古屋大学大学院工学部 堀克敏研究室内 第 1 6 回バイオ関連化学シンポジウム事務局 E-Mail：dai3hisho@chembio.nagoya-u.ac.jp
- 実行委員会：
- 堀 克敏（名古屋大学工学部、バイオテクノロジー部会 役員）委員長
 村上 裕（名古屋大学工学部、生体機能関連化学部会 役員）副委員長
 荘司 長三（名古屋大学工学部、生体機能関連化学部会 役員）
 清中 茂樹（名古屋大学工学部、バイオテクノロジー部会 役員）
- 実行委員：愛場 雄一郎（名古屋大学理学部）、林 剛介（名古屋大学工学部）、鈴木 淳巨（名古屋大学工学部）、中谷 肇（名古屋大学工学部）、有安 真也（名古屋大学理学部）、石川 聖人（名古屋大学工学部）、金岡 英徳（名古屋大学工学部）、堂浦 智裕（名古屋大学工学部）、藤野 公茂（名古屋大学工学部）

ニュースレター Vol. 36, No. 2 2021年12月28日発行

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

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

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

E-mail: seitai@chemistry.or.jp

編集委員：藤本ゆかり、藤井 浩、人見 穰

