

生命化学研究レター

(2015年10月)

2. 巻頭言

日頃思っていること

東北大学 名誉教授 齋藤 正男

3. 研究紹介

3. エクソソームを基盤にした薬物送達技術の開発

～細胞移行機序と機能性ペプチドの利用～

大阪府立大学 21世紀科学研究機構 中瀬 生彦

9. 機能性ハイブリッドマテリアルの開発と生命科学への応用

大阪大学大学院工学研究科 水上 進

15. 終わりのない回転式タンパク質翻訳現象

～環状 RNA を用いたタンパク質合成～

名古屋大学大学院理学研究科 阿部 洋

20. 論文紹介「気になった論文」

東京大学大学院工学系研究科 植木 亮介

京都大学大学院工学研究科 田村 朋則

27. シンポジウム等会告

30. お知らせ

受賞

異動

編集後記

巻頭言

日頃思っていること

東北大学 齋藤 正男

本年1月高知での生命化学研究会延泊での講演の際に少し話した私が研究を進める上で規範としてきたことを中心に書いてみますので、“年寄りの冷や水”と思いながら眺めて頂ければ幸いです。修士課程修了後、約25年を過ごした米国での研究が私の研究スタイルを形成しました。渡米後初めに指導して頂いたペンシルバニア大学米谷隆先生には、後発でも先発を抜き且つ他の研究者が出来ない研究をするようにと教えて頂きました。ただ、当時は与えられたテーマを効率良くこなし、綺麗な論文を発表して次の実験を立案・遂行出来れば合格で、同僚や他の先生達からMasao, you did very well!と言われていい気になっていました。しかし30代初めに自分の研究テーマを考え始めた頃に、勉強不足でbig pictureが描けない自分に気がつきました。それまでは「分野違うし、たいした研究でないし時間の無駄。」と生意気を言って殆ど出なかった学科セミナーや化学科のセミナーに良く出席し、更にはfaculty向けにWister Instituteが夜に開いた細胞・分子生物学の講義も受けるようになりました。30代後半にCase Western Reserve大学、生理・生物物理学科に移ってからは生化学のみならず生理系セミナーも良く聞きました。異分野・他分野の話には考え方や研究の進め方の違い等自分の研究プログラムに参考になることが大変多く、幅広く異分野・他分野の研究者と交流し、自分の研究がbig pictureの中でどこに位置づけられるかを認識しながら研究を進めることを若い研究者に強く勧めます。40代に入ってから共同研究をしたColorado州立大学Caughy先生にDon't work on obvious problems.と批判されたことがあります。自分ではそれなりに難しいテーマに取り組んできたと自負していましたが、幾つかの例をあげてobviousと指摘され反論できなかつたことは良い教訓になりました。確実に成果の出る課題と平行して難解な問題にも取り組むことを何時も求められていると頭の隅においておりました。米国ではhypothesis-based researchが基本で、自分が解明したい現象を説明する仮説を立て、仮説を証明する実験計画を立案、遂行して研究を進めます。NIH grantもhypothesisに基づいた申請書を要求されています。Hypothesis-based researchの訓練を受けていなかった私は馴染めず悩んだ時もありましたが、確かに効率の良い研究だけでなく新しい展開にも有効です。海外留学する研究者が少なくなったと言われるようになって久しいですが、私は若い時期に数年間欧米で研究生活することを強く勧めます。確かに研究設備・待遇共に日本の方がかなり良いですが、異なった研究環境での新しい研究のみならず、海外で学んだ研究の進め方や発表の仕方、新しく知り合いになった同僚・友人は貴重な財産となります。最後になりますが、自分の研究が世界でどこに位置するかを客観的に把握することも必要です。海外の金属タンパク研究者の採用・昇進・tenureの審査を良く依頼されますが、候補者のその分野での相対的位置、leader or not?と化学にpositive wayに与えたインパクトは何かを聞かれます。自分の研究の真摯な評価をしてくれる海外の知人・友人をもつことを強く勧めて終わりとします。

研究紹介

エクソソームを基盤にした
薬物送達技術の開発

～細胞移行機序と機能性ペプチドの利用～

大阪府立大学 21 世紀科学研究機構
ナノ科学・材料研究センター

中瀬生彦

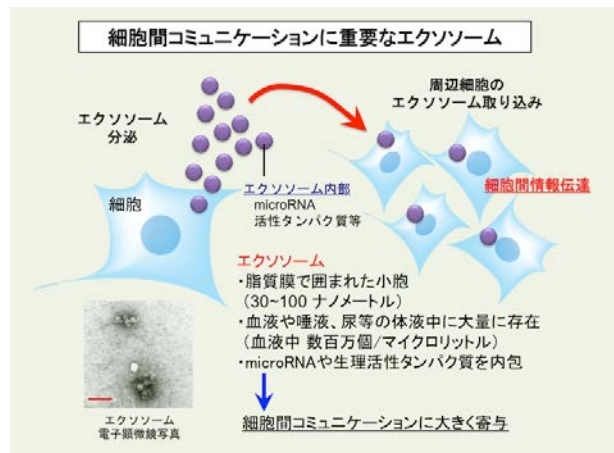
(email: i-nakase@21c.osakafu-u.ac.jp)



1. 緒論

近年、細胞の機能制御や細胞内可視化ツールの開発において、様々な材料で創製された機能性分子が生み出されている。例えば、タンパク質やペプチド、核酸といった生理活性物質や、機能性高分子ポリマー、各種蛍光分子等を含む、将来の医薬品・診断薬としての候補物質が次々に開発されている。また学際的な融合研究を進展することで生命機能システムを理解する合成生物学や、有機化学を駆使して分子レベルでの生体分子の理解を目指したケミカルバイオロジーの顕著な研究発展、また iPS 細胞技術の医学・薬学での高い貢献性によって、治療や診断に役に立つ“ものづくり”においても、それらの研究活用から得られる画期的な成果が今後も一層期待されている。しかし現状として、開発された機能性分子自体の細胞内移行性、及び、細胞内でのサイトゾルへの到達効率が悪い為に、実用性が乏しい場合が多い¹。例えば、ミトコンドリアで働くべき機能性分子がエンドサイトーシスで細胞内に多量に取り込まれたとしても、エンドソームが成熟してリソソームに到達する前に、エンドソームからサイトゾルに効率的に脱出して、目的分子がミトコンドリアに辿り着かない限り、それらの生理活性は望めない^{1,2}。これまでの細胞内導入を助けるツールとして、例えばリポソームやミセル等の脂質分子を用いた方法や、 dendriマー、ウイルス性キャリアー、膜透過性ペプチド等が幅広く利用されており、細胞内へ運びたい分子と結合、及び、目的分子をキャリアーに内包させることで、効果的な細胞内送達促進が達成されている。それぞれのキャリアーには材料としての特徴及び、薬物送達における長所と短所が存在し、細胞内へ導入させる目的に応じたキャリアーの選択が必要となる。また、細胞内導入キャリアー開発における共通の大きな課題として、さらなるサイトゾル到達効率の改善や、免疫原性・毒性を生じない生体に優しいキャリアーの開発が強く望まれている。

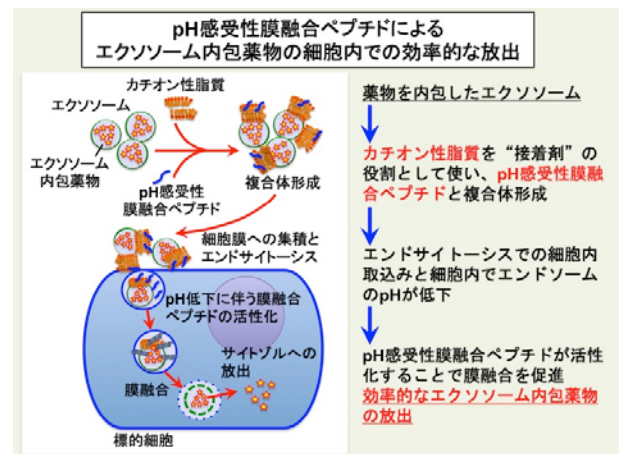
一方で、細胞内コミュニケーション活動に寄与するエクソソームが、最近大きく注目されている³⁻⁶。エクソソームは、脂質二重膜で囲まれた 30~100 nm 程度のサイズをもつ小胞で、生体を構成するあらゆる細胞から分泌される³⁻⁶(右図:文献 8 より改変して引用)。その内部には microRNA や酵素等の細胞機能を制御する分子が内包されており、分泌されたエクソソームが周辺の細胞によってエンドサイトーシスで取り込ま



れると、それらの細胞機能が制御されることが示されている。このエクソソームによる細胞間の情報伝達は、がんを含む様々な疾患の進展に関与していることが指摘されている。またエクソソームは、薬学的な観点からも優位点が高く、次世代の薬物運搬体の候補として高く注目をされている。中でも、(1)細胞自らがつくった microRNA や酵素といった機能性分子を内包、もしくは人工的な機能性分子を外から内包させることができる、(2)エクソソーム膜に機能性タンパク質を遺伝子工学的に自由に構築できる、(3)細胞からほぼ無限に分泌される、(4)毒性がほとんど無い、(5)自己のエクソソームを用いた場合は免疫原性にならないといった点が、薬物運搬体としての優位点とされる。しかしながら、エクソソームの低い細胞内移行性やサイトゾル放出性、及び細胞標的性の改善、また細胞内へエクソソームがどのように移行するのかといった詳細な機序が明らかにされておらず、課題が山積している。現在著者らの研究グループはエクソソームの細胞内移行機構の解明、及び、新たに機能性ペプチドを利用し、エクソソームを基盤にした薬物送達ツールの構築に向けて開発研究を進めている。本研究紹介では、エクソソーム内包物のサイトゾル放出を高める為の、エンドソーム内 pH 低下によって膜融合を引き起こす GALA ペプチドを利用した手法⁷、及び、最近見出したマクロピノサイトーシス誘導を介したエクソソームの細胞内取り込み増強機構と薬物送達への応用⁸を中心に研究紹介を行う。

2. pH 感受性膜融合ペプチドを用いたエクソソーム内包物の効率的なサイトゾル放出技術

エクソソーム膜は細胞の形質膜同様に負電荷を帯びているため⁹⁻¹¹、細胞内移行性が比較的悪く、細胞内送達キャリアーとしては大きく改善が必要である。著者らはエクソソームの細胞内移行性を高める為に、新たにカチオン性脂質を使うことでエクソソームの細胞内移行効率を上昇させることに成功している(右図:文献⁷より改変して引用)⁷。原理としては、カチオン性脂質で遺伝子を細胞内へ導入する手法と同じように、単純にエクソソームとカチオン性脂質と静電的に相互作用させることで複合体を形成させる。エクソソームを細胞に



取り込ませる前に、エクソソームとカチオン性脂質との複合体を形成させる。細胞内取り込みにおいて、例えば 2% (v/v)のカチオン性脂質(Lipofectamine LTX)をエクソソームに加えるだけで、血清が存在する培地においてもエクソソームの細胞内移行効率が十数倍程度上昇することが確認された⁷。一方で、カチオン性脂質の量を増やすことでエクソソームの細胞内移行量が上昇するが、過剰なカチオン性脂質の量を使うことで細胞毒性が生じることも示された。したがって、本手法では細胞内移行性と細胞毒性とのバランスを考えながら、使用するカチオン性脂質の量の最適化が必要である。

このようにカチオン性脂質を使うことで、簡便にエクソソームの細胞内移行効率を上昇させることができるようになった。エクソソーム内にエレクトロポレーションを用いてデキストラン(70 kDa)の蛍光標識体を封入し、同様にカチオン性脂質を用いた手法で細胞内へ取り込ませたところ、デキストラン内包エクソソームの細胞内移行効率は上昇することが確認された。しかし、細胞内ではエンドソームの蛍光シグナルが観察されるのみで、サイトゾルへ脱出したデキストランは殆ど観察されなかった⁷。つまり、本手法でエクソソームが効果的にエンドサイトーシスで細胞内へ取り込まれるものの、エクソソーム内包物のサイトゾル放出効率をさらに改善する必要があることが示された。生理活性物質を効率良く細胞内に運搬しても、エンドソームに包まれたまま最終的にリソソームで内包物が分解される。上記のように、エクソソーム内包物をサイトゾル

に効率よく放出させない限り、期待される細胞内での生理活性は望めない¹。

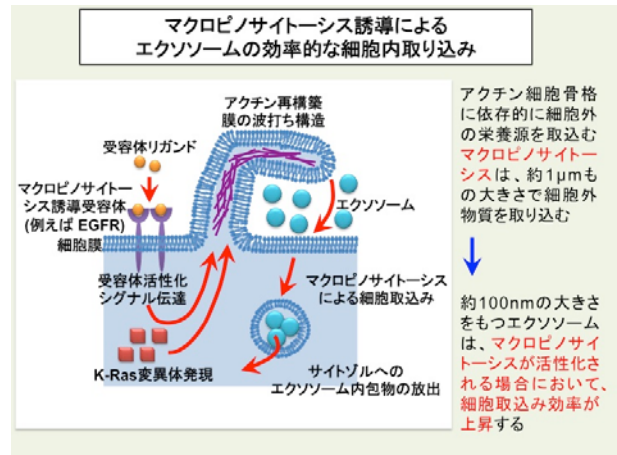
そこで著者らは、エンドソームからエクソソーム内包物のサイトゾル放出を促進させる為、さらに pH 感受性膜融合ペプチドである GALA (アミノ酸配列:WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAA-amide) を用いて、その効果について検討を行った。GALA ペプチドは、グルタミン酸-アラニン-ロイシンの繰り返し配列をもつ 30 残基のペプチドで、pH が中性の場合は殆ど二次構造をとらない。しかし、pH が 5 程度まで低下することで、ペプチドのヘリックス含量が上昇し、細胞膜を不安定化させることで膜融合を促進させることが知られている^{12,13}。また著者らは、GALA ペプチドがグルタミン酸を配列中に多く有することから、GALA ペプチドがカチオン性脂質への親和性が高いことも明らかにしている^{14,15}。著者らは、タンパク質のサイトゾル導入技術の開発において、送達したい目的タンパク質と GALA ペプチドとの複合体を調製し、カチオン性脂質と複合体を形成させることで、目的タンパク質が効率的に細胞内に移行すること、またエンドサイトーシスでこれらの複合体が細胞内移行後に、エンドソーム内の pH が低下することで GALA ペプチドが膜不安定化を誘導し、目的タンパク質を効果的にサイトゾルに送達させることが達成されている^{14,15}。エクソソームにおいても、著者らはエクソソームにカチオン性脂質と GALA ペプチドを混合し複合体を形成させ、細胞へ取り込ませることで、エクソソームの内包物がどれだけサイトゾルに放出されるか検討を行った。結果として、上記同様に人工的にエレクトロポレーションで蛍光標識デキストランを内包したエクソソームを細胞に取り込ませた場合、カチオン性脂質との複合体に GALA ペプチドが存在することで、細胞毒性が殆ど無い状態で、エクソソーム内包物のサイトゾルへの脱出効率が顕著に上昇することが明らかとなった⁷。ここで注意すべき点として、GALA ペプチドと複合体を形成する場合においても GALA ペプチドの添加量の最適化が必要になる。GALA ペプチドを過剰に添加した場合、GALA ペプチドの負電荷によって、複合体の細胞内移行量の減少、及び、サイトゾル移行効率の低下が引き起こされるので、先のカチオン性脂質の場合と同様に、GALA ペプチドの添加量に関しても、細胞内移行性とサイトゾル送達性のバランスを考慮して最適化の必要がある。

さらに、リボソーム不活化によって抗がん活性を有するタンパク質サポリンの細胞内導入に関しても検討した。デキストランの場合と同様にエレクトロポレーションでサポリンを内包したエクソソームを調製し、その抗がん活性について調べた。ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞に対して、サポリン内包エクソソームとカチオン性脂質、及び、GALA ペプチドで複合体を形成させることで、細胞に取り込ませた後の抗がん活性が顕著に上昇することが示された。カチオン性脂質との複合体形成において、GALA ペプチドを含有させない場合は、サポリンの抗がん活性が低いことから、生理活性タンパク質をエクソソームによって細胞内へ運搬する場合においても、本手法が有効であることが明らかとなった⁷。

3. エクソソームの細胞内移行におけるマクロピノサイトーシス経路の重要性

エクソソームの細胞内移行機序に関してはエンドサイトーシスの関与が報告されている。エクソソームの膜タンパク質の CD9 や CD81 が、エンドサイトーシスによるエクソソームの細胞内取り込みにおいてリガンドの役割をしている可能性が報告されている¹⁶⁻¹⁹。しかし、詳細な機序に関しては未だに解明されていない。エクソソームを介した細胞間コミュニケーションの理解や、エクソソームを基盤にした薬物送達技術の開発において、機序解明は重要な課題となっている。本研究では、アクチン骨格依存的なマクロピノサイトーシス経路^{20,21}に新たに着目し、エクソソームの細胞内移行への影響に関して検討を行った(次頁図:文献 8 より改変して引用)。

クラスリン依存的なエンドサイトーシスは通常、約 120 nm 程度の大きさで細胞内へ取り込む経路である²²。形質膜に存在する膜タンパク質や糖鎖等により、本経路でエンドソームに内包できるのはより小さな大きさとなる。加えて、エクソソームは上記のように負電荷をもち、同じく負電荷をもつ形質膜と結合しにくい。受容体を活性化して細胞内に取り込む本経路において、エンドソーム内に取り込まれる 100 nm 程度の大きさをもつエクソソームの個数が少ないものと考えられる。一方で、アクチン骨格依存的なラメリポディア構造を伴うマクロピノ



サイトーシス経路は、無秩序に細胞のあらゆるところで形質膜が大きな波打ち構造をとることで、細胞外物質を大きく囲い込み、約 1 μm もの大きさで細胞外物質を取り込む^{20,21}。よって、このマクロピノサイトーシス経路が活性化される場合、エクソソームの細胞内移行効率が上昇することが予想される。そこで本研究では、マクロピノサイトーシスを積極的に誘導するがん受容体の刺激や、がんの悪性化に関わるタンパク質の発現によるエクソソームの細胞内移行への影響に関して詳細に検討を行った⁸。まず著者らは、epidermal growth factor receptor (EGFR)を介したマクロピノサイトーシス誘導とエクソソームの細胞内移行への影響について調べた。EGFR は細胞増殖や分化、細胞生存性を制御する受容体で、様々ながん腫で高発現していることが知られている²³⁻²⁵。また、がんにおける EGFR の高発現は予後が悪いことも指摘されている²⁶。チロシンキナーゼ受容体である EGFR が、EGF 等のリガンド刺激によって活性化されると、低分子量 G タンパク質の Rac が活性化されて、アクチンの再構築を伴ったラメリポディア (葉状仮足) が形成され、細胞膜が波打つ構造をとり、細胞外物質を効率的に細胞内へ取り込む^{20,21,27,28}。本研究において、EGFR が高発現している A431 細胞 (ヒト類表皮がん) において EGF リガンド刺激でマクロピノサイトーシスを生じさせた場合、エクソソームの細胞内移行量が顕著に上昇することを初めて見出した (例えば EGF (500 nM) 刺激後 24 時間で約 27 倍の上昇)⁸。がんを高発現なケモカイン受容体 CXCR4 の活性化によるエクソソームの取り込み上昇も同様に確認されている⁸。また本実験で、マクロピノサイトーシス阻害剤 (5-(N-ethyl-N-isopropyl)amirolide) によって、エクソソームの細胞内移行量の低下も確認している⁸。上記のように、エクソソーム膜は負電荷を帯びており⁹⁻¹¹、エクソソーム自体の細胞内への移行性は基本的に低い。しかし、受容体刺激でマクロピノサイトーシスを誘導することで、そのエクソソームの移行量が顕著に上昇することは、エクソソームの膜タンパク質とは別に、受け入れ側の細胞がマクロピノサイトーシス誘導によってエクソソームの細胞内移行量を制御していることになる。

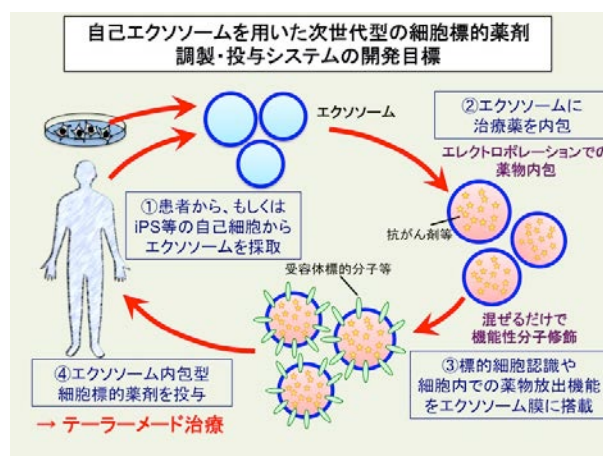
がんの悪性化に関わる K-Ras 変異体の細胞内での発現は、高いマクロピノサイトーシス経路を誘導し²⁹⁻³¹、細胞外の栄養分を細胞内へ効果的に取り込む働きをしていることが最近報告されている³²。本研究では、K-Ras 変異体を発現しマクロピノサイトーシスを積極的に引き起こす MIA PaCa-2 細胞 (膵臓がん) と、野生型 K-Ras を発現しマクロピノサイトーシス誘導効率が比較的低い BxPC-3 細胞 (膵臓がん) において、エクソソームの細胞内移行性について検討した。結果として、K-Ras 変異体を発現しマクロピノサイトーシスを積極的に引き起こす MIA PaCa-2 細胞において、BxPC-3 と比較してエクソソームの細胞内移行量が約 14 倍 (24 時間条件) も高いことを明らかにした⁸。興味深いことに、クラスリン依存的なトランスフェリンの細胞内取り込み量は、エクソソームの場合とは異なり BxPC-3 細胞のほうが MIA PaCa-2 細胞よりも顕著に高く、エクソソームの細胞内取り込みにおけるマクロピノサイトーシス誘導の重要性が示された。

また上記と同様に、抗がん活性サポリンを内包させたエクソソームを用いた場合、マクロピノサイトーシス

誘起でエクソソームの細胞内移行性を促進させることで、著しく細胞死を誘導させることに成功した。加えて、EGF リガンドは細胞内取り込みにおいてリサイクルされることが知られており³³、エクソソームの膜表面に搭載させるのではなくエクソソームの中に EGF リガンドを内包させることで、細胞内取り込み後に放出された EGF リガンドがリサイクルされることで、マクロピノサイトーシスを誘導することを考え実験を行った結果、予想通りにエクソソームの細胞内取り込み効率が上昇することを確認した⁸。さらに、EGF リガンドと一緒に抗がん活性サポリンもエクソソームに内包させることで、効果的に細胞毒性を誘導させることにも成功している⁸。本システムにより、著者らは、エクソソーム膜に機能性分子を修飾させるだけではなく、エクソソーム内にリガンド分子を搭載させることでエクソソームの細胞内取り込みを増強させるといった新しい方法論を構築するに至った。

4. 最後に

本研究によって、カチオン性脂質及び pH 感受性膜融合ペプチドを混合させるといったシンプルな手法を用いることで、エクソソームの内包物が効率良く細胞に取り込まれ、細胞内で高効率にサイトゾルへ放出させることに成功した。またエクソソームの細胞内移行において、積極的なマクロピノサイトーシス誘導が重要な経路であることも初めて明らかにした。これまでのエクソソームの細胞内移行機序の研究は、移行に関わるエクソソーム膜タンパク質の検出を目指した研究が殆どであったが、本研究は受け手側の細胞の視点からの機序解明を行った。エクソソームを介した細胞間情報伝達において、エクソソームがどのようにして細胞内に取り込まれるのかといった機序はさらに詳細に解明する必要があるが、本知見が機序解明を進展させるきっかけとなる成果になると考える。自己エクソソームを用いたテーラーメイド型の薬物運搬技術の開発(右図)は、生体にとって優しい次世代型の薬物送達技術として強く期待されているが、本知見・手法は、エクソソームを基盤にしたキャリアー創製研究、及び、生物学的な観点からの機序の理解において有用な基礎的知見・技術になり得ると考えられる。



謝辞

本研究成果は、二木史朗 教授(京都大学化学研究所)、吉田徹彦 訪問教授、ベイリー小林菜穂子 訪問講師(慶應義塾大学先端研究センター、東亜合成株式会社先端科学研究所)、中瀬朋夏 准教授(武庫川女子大学薬学部)の多大な協力によって得られました。心より感謝申し上げます。また、日々研究室を盛り上げてくれている所属メンバーの松沢美恵氏、野口公輔氏、平野佳代氏に感謝申し上げます。

参考文献

1. Nakase, I., Kobayashi, S., Futaki, S., *Biopolymers* **94**, 763–770 (2010).
2. Nakase, I., *et al.*, *Chem. Commun.* **48**, 11097–11099 (2012).
3. van den Boorn, J.G. *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **29**, 325–326 (2011).
4. Tan, A., Rajadas, J., Seifalian, A. M., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 357–367 (2013).
5. Vlassov, A.V., Magdaleno, S., Setterquist, R., Conrad, R., *Biochim. Biophys. Acta* **1820**, 940–948 (2012).

6. van Dommelen, S. M. *et al.*, *J. Control. Release* **161**, 635–644 (2012).
7. Nakase, I., Futaki, S., *Sci. Rep.* **5**, 10112 (2015).
8. Nakase, I., Kobayashi, N.B., Takatani-Nakase, T., Yoshida, T., *Sci. Rep.* **5**, 10300 (2015).
9. Sokolova, V., *et al.*, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **87**, 146–150 (2011).
10. Hood, J. L., San, R. S., Wickline, S. A., *Cancer Res.* **71**, 3792–3801 (2011).
11. Takahashi, Y., *et al.*, *J. Biotechnol.* **165**, 77–84 (2013).
12. Subbarao, N. K. *et al.*, *Biochemistry* **26**, 2964–2972 (1987).
13. Li, W., Nicol, F., Szoka, F. C. Jr., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 967–985 (2004).
14. Kobayashi, S., *et al.*, *Bioconjug. Chem.* **20**, 953–959 (2009).
15. Nakase, I., *et al.*, *Methods Mol. Biol.* **683**, 525–533 (2011).
16. Morelli, A. E., *et al.*, *Blood* **104**, 3257–3266 (2004).
17. Théry, C., Ostrowski, M., Segura, E., *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 581–593 (2009).
18. Tian, T., *et al.*, *J. Cell. Biochem.* **111**, 488–496 (2010).
19. Svensson, K. J., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **288**, 17713–17724 (2013).
20. Swanson, J. A., Watts, C., *Trends Cell Biol.* **5**, 424–428 (1995).
21. Swanson, J. A., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 639–649 (2008).
22. Conner, S. D., Schmid, S. L., *Nature* **422**, 37–44 (2003).
23. Ferguson, K. M., *et al.*, *Mol. Cell.* **11**, 507–517 (2003).
24. Dawson, J. P., *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7734–7742 (2005).
25. Eden, E. R., White, I. J. & Futter, C. E., *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 173–177 (2009).
26. Mitsudomi, T., Yatabe, Y., *FEBS J.* **277**, 301–308 (2010).
27. Araki, N., Hamasaki, M., Egami, Y., Hatae, T., *Cell Struct. Funct.* **31**, 145–157 (2006).
28. Dise, R. S., Frey, M. R., Whitehead, R.H., Polk, D. B., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **294**, G276–285 (2008).
29. Bar-Sagi, D., Feramisco, J. R., *Science* **233**, 1061–1068 (1986).
30. Walsh, A. B., Bar-Sagi, D., *J. Biol. Chem.* **276**, 15609–15615 (2001).
31. Porat-Shliom, N., Kloog, Y., Donaldson, J.G., *Mol. Biol. Cell* **19**, 765–775 (2008).
32. Commisso, C., *et al.*, *Nature* **497**, 633–637 (2013).
33. Sorkin, A., Duex, J.E., *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 15, Unit 15.14 (2010).

研究
紹介

機能性ハイブリッドマテリアルの開発と

生命科学への応用

～高機能性プローブの創製に向けて～

大阪大学大学院工学研究科

大阪大学免疫学フロンティア研究センター

水上 進

(smizukami@mls.eng.osaka-u.ac.jp)



1. はじめに

歴史をひも解けば、化学に基づく物質合成技術は社会に大きな変革をもたらしてきた。無機材料の合成は既に紀元前の時代に始まっており、合金の製造技術によって生み出された青銅器や鉄器は人々の暮らしの形態を大きく変化させた。一方、有機化合物の合成技術はそれから数千年も遅れ、ようやく20世紀に訪れた著しい進歩は材料や医薬などの産業に革新をもたらし、現代の我々の生活の礎となっている。20世紀後半には、固相合成や遺伝子組み換え等の技術革新により、核酸・蛋白質等の生体高分子さえも創り出せるようになった。現在では、有機低分子からナノ粒子、ポリマー、生体高分子に至るまで、多様な物質の構造や機能を自在に設計する技術が確立されつつある。では、21世紀のモノづくりの化学一新規物質の合成技術—はどのような方向に向かうだろうか。筆者はその一つとして、ハイブリッドマテリアルの合成が「より高次の分子機能」を産み出す鍵技術になると考える。

一例を挙げる。1990年代から大きく進展した生命科学技術に蛍光イメージング技術がある。蛍光プローブの最大の成功例とも言える細胞内Ca²⁺を可視化する蛍光プローブは、有機化学的手法により合成されるFura-2などの“低分子プローブ”と遺伝子工学技術によって開発されるCameleonなどの“蛋白質プローブ”に大別できる。前者は蛍光特性や解離定数などの精密な機能設計が可能であり、後者は生細胞中のオルガネラに限局させたり、トランスジェニック動物の作製も可能である。すなわち、低分子プローブと蛋白質プローブはそれぞれ異なる長所／短所を有している。よって、両者の長所を併せ持つようなハイブリッドプローブを創製できれば、生命科学の進展に大きく貢献することは間違いないであろう。そこで本稿では、筆者が大阪大学で行った研究のうち、特に“異種マテリアルのハイブリッドの作製と機能化”に焦点を置いた2つの研究について紹介したい。

2. ‘低分子-蛋白質’ハイブリッド～蛋白質ラベル化技術と機能性リガンドの開発

前節で低分子と蛋白質の長所を利用すれば高機能性プローブとなることを述べたが、このような低分子-蛋白質ハイブリッドを作製する“蛋白質ラベル化技術”の開発に取り組んだ。蛋白質ラベル化技術は、“タグ”と呼ばれる特定配列のペプチドや小蛋白質に対して、蛍光色素・ビオチンなどの機能性分子を特異的に結合させる技術である(図1)。タグを融合させた標的蛋白質に生細胞で発現させ、培養細胞ディッシュにリガンドと機能性分子を連結させた「ラベル化プローブ」を投与するだけで、特定の蛋白質を機能性分

子で修飾することができる。多くの場合は標的蛋白質の蛍光標識に用いられるが、別の見方をすれば蛋白質の特長(細胞内局所への発現、特異的な分子認識など)と低分子の特長(多様かつ精密な機能設計が可能など)を併せ持つ高機能ハイブリッドの作製技術と言える。このような特異的な蛋白質ラベル化技術は、2006年に研究を開始した時点で、既

にtetracysteine-tag (FlAsH-EDT₂)¹やSNAP-tag²等は報告されていた。それでもあえて新たなラベル化技術開発に取り組んだのは、「オリジナルの蛋白質ラベル化技術は高機能性の低分子-蛋白質ハイブリッドの創製に役立つ」と考えたからであった。

蛋白質ラベル化技術におけるタグとリガンドは、どちらもお互いのみと特異的に反応することが求められる。着目したのが、細菌酵素β-lactamaseとその基質であるβ-lactam系抗菌薬のペアである。β-lactamaseは哺乳類細胞中で他の生体分子と相互作用しないと考えられており、遺伝子発現を検出するレポーター蛋白質として近年注目されている³。また、β-lactam系抗菌薬は細菌への選択毒性を有しており、一般的に哺乳類細胞への毒性は非常に低い。β-lactam系抗菌薬はβ-lactamaseに選択的に認識されるが、加水分解されてしまうのでこのままではタグとして用いることはできない。しかしながら、細菌の薬剤耐性に関する研究で作成された多くの変異体のうち、E166N TEMという変異体β-lactamaseにおいて、共有結合を形成した酵素-基質複合体からの加水分解が抑制されることが報告されていた(図2)⁴。そこで、このE166N変異体をタグ蛋白質として選択し、これをBL-tagと呼ぶことにした。

まず、代表的なβ-lactam系抗菌薬であるampicillin(図3)に様々な蛍光色素を修飾したラベル化プローブを合成した^{5,6}。これらのプローブを数nM~数μMの濃度範囲でディッシュに添加し、数分間インキュベーションした後に洗浄すると、生細胞表面に発現したBL-tag融合蛋白質を特異的に蛍光ラベルすることができた(図3下左)。

既存の蛋白質ラベル化技術と比較したときのBL-tag技術の特長の一つは、リガンドに医薬品を選択したことである。抗菌薬として審査機関に承認された化合物は、哺乳類細胞への影響はあらかじめ低いことが期待できる上、化合物そのものやその原料などを入手しやすい。また、β-lactamは歴史的に非常に重要であったために合成された誘導体の数も極めて多く、図3および表1に示すようにそれらの構造の違いにより異なる特性(細胞膜透過性、発蛍光性など)を設計できる。例えば、ampicillinをプロドラッグであるbacampicillinに変えることで細胞内蛋白質のラベル化(図3下中)⁷が可能になった。また、6員環のcephalosporinを用いると共鳴エネルギー移動を利用した発蛍光ラベル化プローブ(図3下右)^{5,8}を作ることができる。発蛍光プローブを用いることで、未反応のラベル化プローブの洗浄が不要になる為、蛋白質が細胞内から細胞表面に提示される様子をリアルタイムで観察する実験が可能になった。

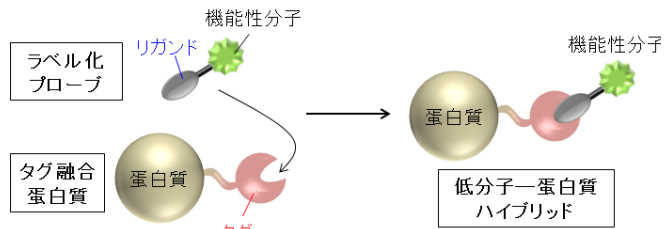


図 1. タグに基づく蛋白質ラベル化技術

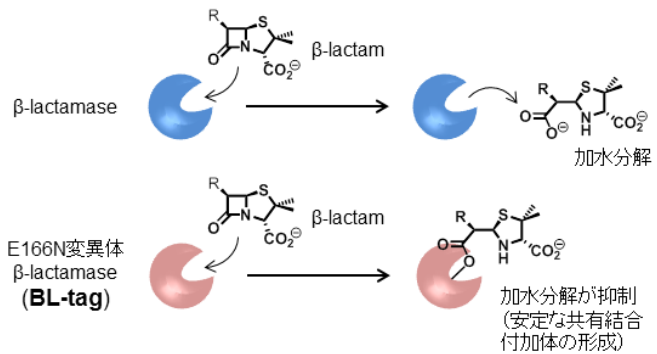


図 2. タグとして選択した変異体 β-lactamase

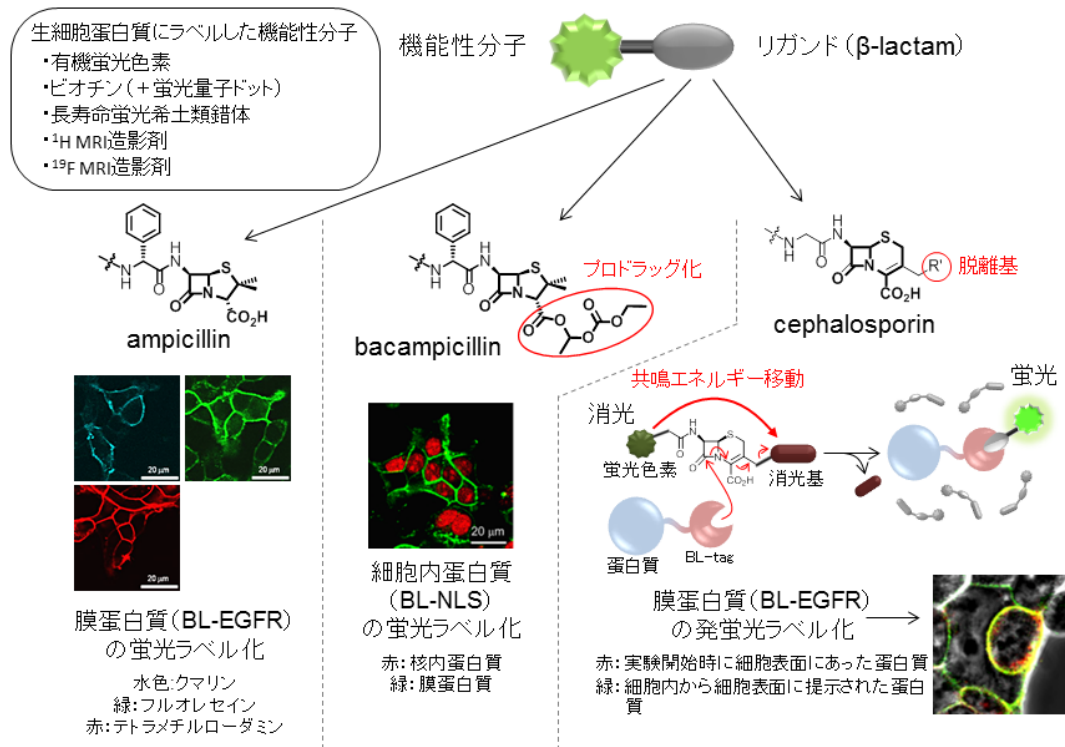


図 3. β -lactam 抗菌薬 (リガンド) の選択によるラベル化プローブの物性・機能の設計

表 1. リガンドに用いた β -lactam 系抗菌薬とラベル化プローブの特性

ampicillin	構造式中に1級アミノ基を有するため、蛍光色素などの修飾が極めて容易。 カルボキシ基により細胞膜を通らない為、細胞表面の蛋白質のラベル化に適する。
bacampicillin	ampicillinのカルボキシ基をエステル化して、腸管吸収性を改善させた抗菌薬で、生体膜透過性に優れており、細胞内蛋白質のラベル化が可能。
cephalosporin	図3中のR'の脱離能が高い場合、 β -lactamの開環に伴ってR'が脱離する。この性質を利用して、ラベル化された段階で消光基が脱離する発蛍光型プローブの設計が可能。

以上、簡単ではあるが「変異体 β -lactamaseおよび β -lactam系抗菌薬リガンドに基づく蛋白質ラベル化技術」について紹介させて頂いた。様々な機能性低分子-蛋白質ハイブリッドを生細胞の内外に自在に配置できるような技術を構築できた為、現在はこれらの技術を用いてより高機能性のプローブ開発を行っている。開発中の低分子-蛋白質ハイブリッドプローブの一例として、局在能を持った蛍光センサーが挙げられる。細胞内局所に蛍光センサー-蛋白質ハイブリッドを局在させることで、細胞内局所のイオン濃度や、蛋白質の細胞内動態に依存した周辺環境変化(エンドサイトーシスにおける周辺pH変化など)などの可視化が可能となっている。その他にも非常に多様な応用展開が可能であり、低分子-蛋白質ハイブリッドプローブは生命科学の分野で今後急速に広まっていくと予想している。

3. ‘低分子-ナノ粒子’ハイブリッド~ ^{19}F MRIプローブの開発

続いて、もう一つのハイブリッドである‘低分子-ナノ粒子’ハイブリッドに関する研究を紹介する。MRIは蛍光イメージングでは難しい深部の断層撮像が可能である為、MRIを用いて特定の生体分子を可視化する研究が近年注目されている。筆者らも生体分子の挙動や活性をMRIで可視化する技術を開発している。

通常、MRIとは ^1H MRIのことであり、主に生体内の水や脂肪などの ^1H NMRシグナルを検出するものである。組織によって ^1H 核の置かれた環境が異なるために、臨床検査でおなじみの組織によるコントラストの違いが現れる。しかしながら、この組織コントラストは特定の分子を観測したいときには不均一なバックグラウンドシグナルとなるので大きな障害となる。一方、 ^{19}F MRIは内在性シグナルが検出されないため、 ^{19}F 含有化合物を動物に投与し ^{19}F MRI測定を行い、 ^1H MRIによる断層画像と重ね合わせることで、生きた個体内における ^{19}F 含有化合物の局在を知ることができる⁹。また、 ^{19}F は天然同位体比率が100%、 ^1H に次ぐ高い感度等の長所を有するため、多核MRIを利用した分子イメージング研究の中では実用化に近い候補の一つである。

さて、蛍光プローブ開発においては共鳴エネルギー移動や光誘起電子移動に基づく蛍光のOFF/ONスイッチング原理が幅広く利用されているが、 ^{19}F MRIシグナルを何らかの機構でOFF/ON制御できれば、生体の“機能”のin vivoイメージングという革新技术につながることを期待できる。そこで、常磁性緩和促進(PRE: paramagnetic relaxation enhancement)効果に基づくプローブ原理(図4左)を構築した。常磁性の Gd^{3+} 錯体と ^{19}F 含有官能基をペプチドなどの酵素基質を介して連結すると、 Gd^{3+} の近傍に位置する ^{19}F 含有官能基の ^{19}F NMRピークの横緩和時間(T_2)は大幅に短縮し、適切な測定パラメータを用いることによってMRIシグナルを完全に消失させることができる。一方、酵素が基質を加水分解すれば、 Gd^{3+} と ^{19}F 間の距離が離れるために T_2 は延長し、MRIシグナルは回復する。このようなプローブ原理を考案し、プロテアーゼ検出 ^{19}F MRIプローブ(図4右)を開発した¹⁰。このプローブは狙い通りに標的プロテアーゼの存在下で ^{19}F MRIシグナルを回復させ、PREに基づいたプローブ原理を実証できた。このプローブ原理は一般性があり、他の加水分解酵素に適用することで、細胞内あるいは細胞表面の酵素活性の ^{19}F MRI検出も可能であった^{11,12}。

開発した低分子プローブを用いて動物個体内の酵素活性の ^{19}F MRI検出を試みたが、すぐに大きな壁にぶつかった。動物実験の結果は、筆者らが開発した ^{19}F MRIプローブは、個体イメージングに用いるにはシグナル強度が全く足りず、劇的な高感度化が必要なことを示唆していた。そこで、多数の ^{19}F 原子をプローブ中に高集積化することにした。しかし、ここにもう一つ解決すべき問題があった。MRIでは観測核の運動性が低下すると、 T_2 が短縮し、MRIシグナル強度が低下するという関係がある。よって、 ^{19}F 原子を高集積化してプローブの分子量が大きくなればなるほど、分子の運動性が低下して逆にシグナル強度が低下する可能性が懸念された。このジレンマは液体パーフルオロカーボン(PFC)を封入したナノ粒子(図5(a))を開発することで回避できると考えた。なぜなら、PFCが液体ならナノ粒子自身の運動性は低下しても、内部の

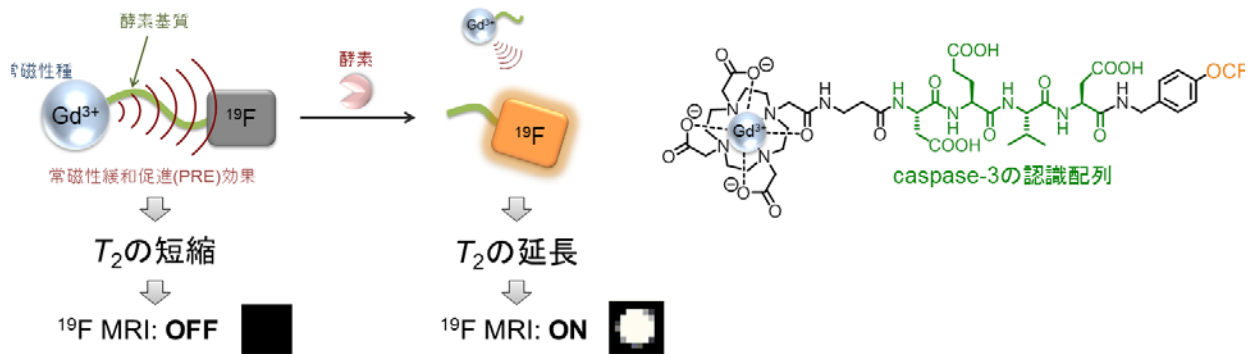


図4. 常磁性緩和促進効果を利用した酵素活性の ^{19}F MRI検出原理(左)とcaspase-3活性を検出する ^{19}F MRIプローブの構造(右)。

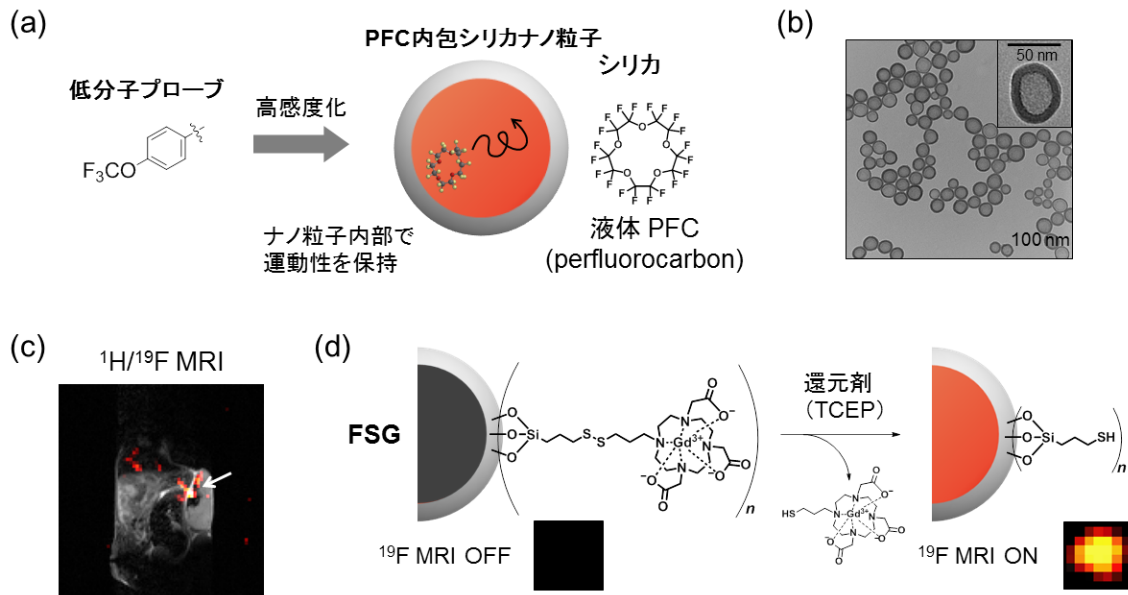


図 5. (a) PFC 内包シリカナノ粒子の概要。(b) PFC 内包シリカナノ粒子の電子顕微鏡画像。(c) PEG 化したナノ粒子を担がんマウスに静注した後の ^1H および ^{19}F MRI の重ね合わせ画像 (矢印はがん組織への集積を示している)。(d) 還元環境を検出するナノ粒子型機能性 ^{19}F MRI プローブ FSG の概要。

PFCは運動性を保持していると考えられるからである。また、粒子のシェルは様々な溶媒中で安定であり、表面や内部へ様々な分子を容易に修飾できるシリカが適していると考えた。

そこで、液体PFCをシリカで被覆した全く新しい構造のナノ粒子開発を開始した。シリカ重合の条件検討と電子顕微鏡によるナノ粒子の構造観察をひたすら繰り返す試行錯誤の連続であったが、ついに直径数十nm前後でPFCコアを持つシリカナノ粒子の開発に成功した(図5(b))¹³。期待通りにこのナノ粒子は有機溶媒中での表面修飾が極めて容易であり、様々な機能性プローブの足掛かりとなる基盤マテリアルとしての条件を満たしていた。また実際に、*in vivo*イメージングに十分な感度を有しているか確かめるために、このナノ粒子表面をPEGで修飾してから担がんマウスに打ち込んで ^{19}F MRIを測定したところ、がん組織にナノ粒子プローブが集積した画像が得られた(図5(c))。すなわち、*in vivo*でも十分検出可能な ^{19}F MRIシグナル強度を持つことが分かった。また、シリカ内部のPFCの T_2 は十分に長く、ナノ粒子の内部でも確かにPFCは液体として素早く分子運動していることが示唆された。

次の課題はこのナノ粒子をどのように機能化するかである。ここでもPRE効果に基づくMRIシグナルの制御原理(図4左)を応用した。当初は、直径が数十nmもあるシリカナノ粒子の内部までPRE効果を及ぼすには Gd^{3+} 錯体では不十分ではないかと予想していたが、多数の Gd^{3+} 錯体をナノ粒子表面に修飾することで、ナノ粒子内部のPFC由来の ^{19}F MRIシグナルをOFFにできることが分かった。これは、粒子内部のPFCが液体である為に、NMRの時間スケール内にPFC分子がPRE効果の影響を受けにくい中心部からPRE効果の影響を強く受ける粒子表面近傍に素早く拡散する為と考察している。そこで、PFC内包シリカナノ粒子の表面に還元環境に反応して切断されるようなジスルフィドリンカーを介して Gd^{3+} 錯体を修飾した図5dに示す構造の機能性ナノ粒子FSGを開発した¹⁴。TCEPやグルタチオンなどの還元剤の添加により、FSGの ^{19}F MRIシグナルは速やかに増大した。すなわち、新規のナノ粒子設計とその表面への修飾分子設計を融合させることで、高感度かつ還元環境に反応する機能を持った「低分子-ナノ粒子ハイブリッド型 ^{19}F MRIプローブ」の創製に成功した。現在、リンカー部分に加水分解酵素活性に反応する基質配列を選択し、標的酵素

活性を特異的に検出するナノ粒子型¹⁹F MRIプローブを開発中であり、いよいよ最大の難関である生体深部の酵素活性イメージングに挑戦する段階に来ている。

4. おわりに

以上、機能性‘低分子-蛋白質’ハイブリッドの作製技術、および‘低分子-ナノ粒子’ハイブリッドを用いたイメージングプローブの開発、の2つの研究を簡単に紹介した。異種マテリアルのハイブリッドにより、各々の長所を利用した多機能化や、単体では出すことが難しいような高機能化が可能であることを読者にお伝えできたら幸いである。一方、このようなハイブリッドプローブ作製には解決すべき問題がまだまだ山積している。例えば、互いを連結する位置や配向、量論比の精密な制御などが挙げられる。この課題を克服するには、非共有結合や可逆結合を用いた分子認識や超分子化学を応用した新たな物質創製技術の開発が必要かもしれない。これらのハイブリッドマテリアルの構造や機能を自在に操る技術が確立できれば、生命科学への応用のみならず、社会を変えるような新しい産業の創出にもつながるだろう。

謝辞

本研究は大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻の菊地和也教授が主催する研究室において、多くの学生・共同研究者とともに行った研究であり、お世話になりました全ての方々へ深く感謝致します。

参考文献

- 1) B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, *281*, 269–272.
- 2) A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86–89.
- 3) G. Zlokarnik, P. A. Negulescu, T. E. Knapp, L. Mere, N. Burrell, L. Feng, M. Whitney, K. Roemer, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, *279*, 84–88.
- 4) H. Adachi, T. Ohta, H. Matsuzawa, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 3186–3191.
- 5) S. Mizukami, S. Watanabe, Y. Hori, K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5016–5017.
- 6) S. Watanabe, S. Mizukami, Y. Hori, K. Kikuchi, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 2320–2326.
- 7) S. Watanabe, S. Mizukami, Y. Akimoto, Y. Hori, K. Kikuchi, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 8342–8349.
- 8) S. Mizukami, S. Watanabe, Y. Akimoto, K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1623–1629.
- 9) E.T. Ahrens, R. Flores, H. Xu, P. Morel, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 983–987.
- 10) S. Mizukami, R. Takikawa, F. Sugihara, Y. Hori, H. Tochio, M. Wälchli, M. Shirakawa, K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 794–795.
- 11) S. Mizukami, H. Matsushita, R. Takikawa, F. Sugihara, M. Shirakawa, K. Kikuchi, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1151–1155.
- 12) H. Matsushita, S. Mizukami, Y. Mori, F. Sugihara, M. Shirakawa, Y. Yoshioka, K. Kikuchi, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1579–1583.
- 13) H. Matsushita, S. Mizukami, F. Sugihara, Y. Nakanishi, Y. Yoshioka, K. Kikuchi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1008–1011.
- 14) T. Nakamura, H. Matsushita, F. Sugihara, Y. Yoshioka, S. Mizukami, K. Kikuchi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1007–1010.

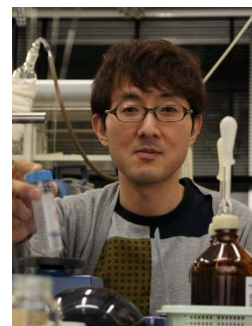
研究紹介

終わりのない回転式タンパク質翻訳現象

～環状 RNA を用いたタンパク質合成～

名古屋大学大学院理学研究科
物質理学専攻 生物化学研究室
阿部洋

(h-abe@chem.nagoya-u.ac.jp)



1. はじめに

私は RNA をナノサイズで構造設計することで機能を創出する研究に取り組んできた。一般的に、分子生物学的手法では配列を設計することで機能創出を図る。一方、本研究の特徴は、配列ではなくナノサイズの形に普遍性のある機能を見出すことにある。これまでに、図 1 に示すように、ダンベル型環状 RNA や分岐型 RNA を用いた RNA 干渉法(遺伝子発現抑制技術)、環状核酸を用いた mRNA のトポロジカル捕捉法(アンチセンス法)など、ナノ構造設計指針に基づいたバイオ医療技術を提案してきた¹⁻⁵。

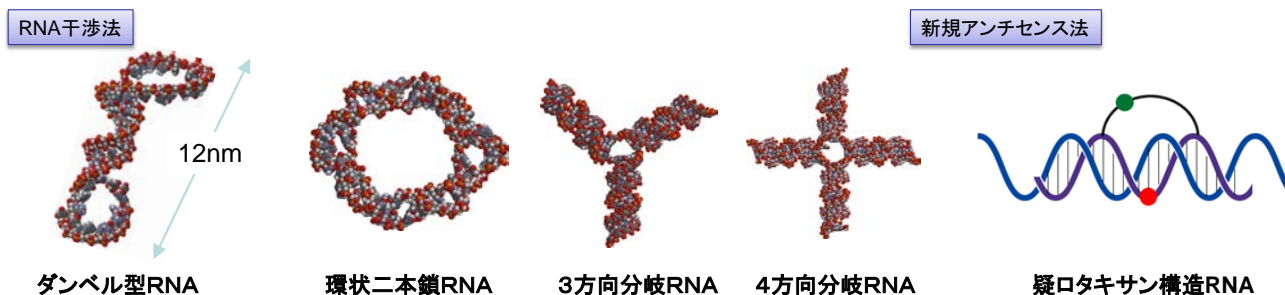


図 1 ナノ構造化 RNA 分子による機能創発

さらに、RNA のナノ構造が生み出す新しい機能を模索する過程で、リボソームが触媒するタンパク質合成の反応場を設計できるとの発想に至った。

タンパク質合成は、触媒であるリボソームがメッセンジャーRNA 鋳型上を移動し、アミノ酸をつないでいく反応である。通常、自然界では直鎖構造をもつ RNA が翻訳鋳型に用いられ、タンパク質合成反応は、開始コドンに始まり終止コドンに終わる。つまり終わりがある。しかしながら、「リボソームのタンパク質合成系において、もし終止コドンを除いた環状化 RNA が翻訳鋳型として用いられたらどうなるであろうか?」と考えた(図 2)。リボソームが一度結合し、タンパク質合成を開始すると終わりがないので原理的には永久にタンパク質合成反応が続くことになる。さらに、タンパク質合成の効率の観点から考察してみる。図 3 に示すように、原核生物である大腸菌の翻訳系を用いた場合、通常の直線型(終わりのある)

開始の律速段階はない

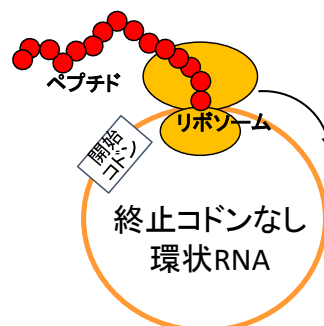


図 2 環状 RNA を用いた終わりのない回転式タンパク質翻訳現象

図 3 に示すように、原核生物である大腸菌の翻訳系を用いた場合、通常の直線型(終わりのある)

RNA を用いるタンパク質合成反応において、反応全体の律速段階はリボソームが合成反応開始複合体を形成する段階にあると考えられている^{6,7}。一方、環状 RNA をタンパク質翻訳反応の鋳型に用いた場合、律速段階は最初の翻訳開始の結合時のみとなり、それ以降のタンパク質合成は効率よく進行することが予想された。そのため、この分子メカニズムは高効率なタンパク質合成法となりえる。そこで、本構想を大腸菌の無細胞タンパク質翻訳系を用いて検討した⁸。

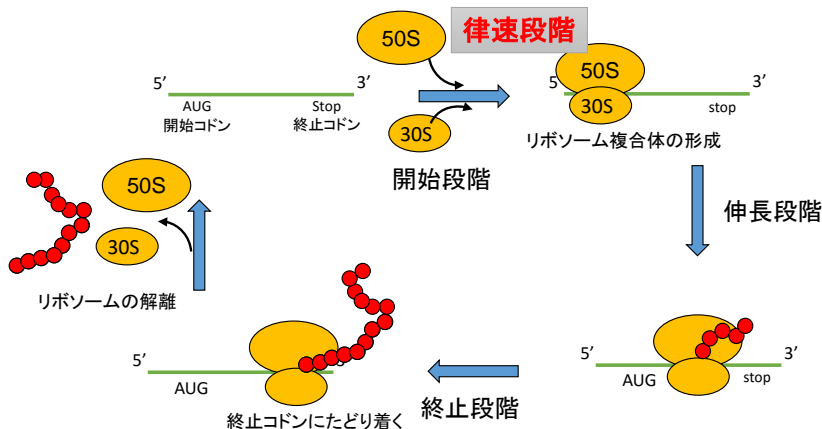


図3 直鎖 RNA における通常のタンパク質翻訳反応

2. 環状 RNA の調整

mRNA は以下のように設計した。5'末端側にシャイン・ダルガノ (SD) 配列および開始コドンを含み、FLAG タンパク質 (8 つのアミノ酸から構成され、タンパク質タグとして用いられる) を繰り返しコードし、終止コドンを含まない RNA 配列を設計した (図4)。FLAG タンパク質の繰り返し数を変えることで、塩基配列の長さが 84 塩基 (L84)、126 塩基 (L126) の RNA を設計した。また、L126 に終止コドンを加えた L126 (+stop)、L126 から SD 配列を除いた L126 (-SD) を設計した。これら設計した RNA は DNA 自動合成装置を用いて化学合成した。得られた直鎖 RNA を T4DNA リガーゼで処理することで、環化した RNA を得た。L84 を原料とした場合は、予想された 84 塩基の環化体 (C84) だけではなく、L84 の 2 量体から形成される環化体 (C168) も得た。同様に、L126 塩基を原料とした場合は、C126 及びその C252 が得られた。これらの環化体の塩基長は 3 の倍数数となり、開始コドンからタンパク質合成が始まり、一回転した後もコードンの読み枠が変わらない。L126(+stop) および L126(-SD) からそれぞれ環化体 C126 (+stop) および C126(-SD) を調製した。

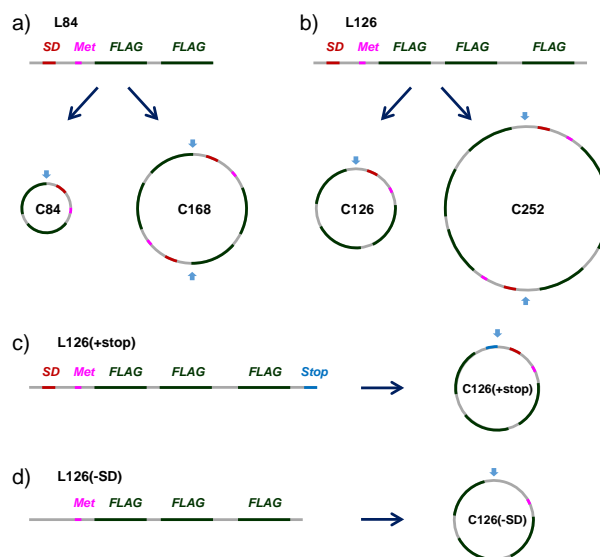


図4 合成した環状 RNA

3. 回転式タンパク質翻訳反応

上田らが開発した大腸菌再校正型無細胞タンパク質合成系 (PURE system) を用いて、合成した RNA を翻訳鋳型とした翻訳実験を検討した (図5)⁹。直鎖 RNA である L84、L126、L168、L252 および、環状 RNA である C84、C126、C168、C252 をそれぞれ当モル量用いて翻訳反応を行った。37 度で 2 時間反応後、反応液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離し、FLAG 抗体を用いたウェ

スタンブロット解析を行った。直鎖状 RNA の場合は、20~30kDa 付近に少量の短いペプチドが確認された。一方、環状 RNA の場合は、C126 および C168 において大量の長鎖タンパク質が生産されることが明らかになった。これは、FLAG タンパク質が連続的に合成された結果、長鎖のリピート配列タンパク質が生じたためと考えられる。C84 からは翻訳産物は観測されなかった。また、C252 の場合は、C126 や C168 と比較し翻訳産物が減少した。

大腸菌リボソームと C126 のドッキングモデルを図 6 に示す。大きなリボソームが小さい環状 RNA の半分近くをカバーしていることが確認できる。この図から、C84 が翻訳鋳型として機能しなかった理由は、環のサイズが小さすぎるためリボソームの結合においてひずみが生じるためと考えている。一方、C252 のタンパク質翻訳量が減少した理由は、複数のリボソームが結合したため RNA 上において交通渋滞が発生したと推察している。今後、それらの分子メカニズムを明らかにする必要がある。

4. 終止コドンの影響

終止コドンがない C126 および終止コドンがある C126 (+stop) を用いてタンパク質翻訳実験を検討した (図 7)。

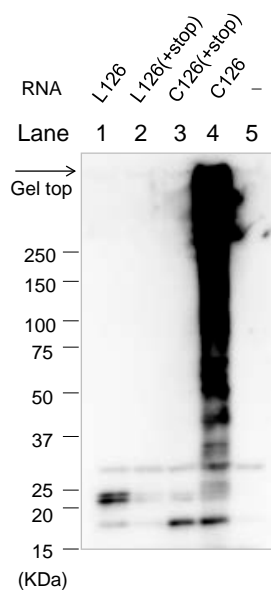


図 7 回転式タンパク質翻訳反応における終止コドンの影響

比較のため直鎖 RNA である L126 および L126 (+stop) も同様に検討した。2 時間反応させた後、反応液をウェスタン

ブロット解析した結果を図に示す。L126 および L126 (+stop) の場合は、25kDa 付近に短鎖のペプチドを生じた。また、L126 に比較し、L126 (+stop) のタンパク質発現量が少なかった。環状 RNA を用いた翻訳実験の場合、C126 は大量の長鎖タンパク質を生じるのに対して、C126 (+stop) は直鎖 RNA と同様に 20kDa 付近に短鎖のペプチドを生じた。C126 と C126 (+stop) のタンパク質翻訳量の比はおおよそ 200 倍であった。環状 RNA を翻訳鋳型として用いた場合、終止コドンはリボソームの解離を促すことで、タンパク質翻訳サイクルに律速段階を作ることになる。その結果、終止コドンがない場合に比較し、単位時間当たりのタンパク質翻訳量が減少することになると考えられる。

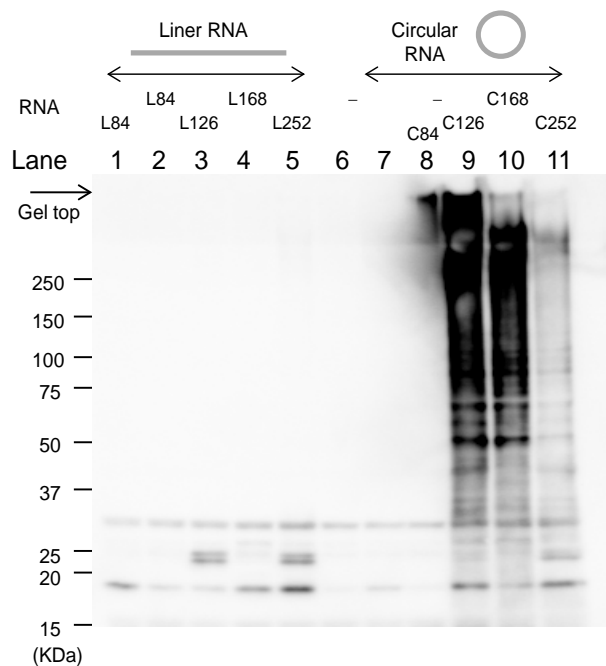


図 5 環状 RNA を鋳型としたタンパク質翻訳反応 2 時間のタンパク質翻訳反応後、ウェスタンブロット解析を行った。

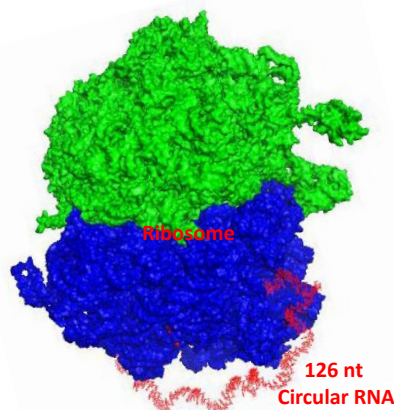


図 6 リボソームと 126nt 環状 RNA の複合体の分子モデリング

5. SD 配列の影響

次に、リボソーム結合性を有する SD 配列が翻訳反応に与える影響を検討した (図 8)。SD 配列を含む C126 および SD 配列を含まない C126 (-SD) を用いて、タンパク質翻訳反応の経時変化を測定した。C126 は、10 分から 60 分までの間にタンパク質の総量が増えるとともに、その蛋白質産物の長さの分布が長い方に移動して

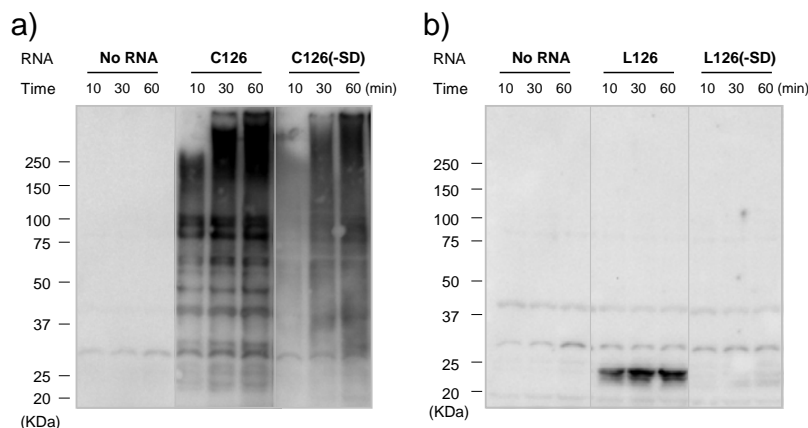


図 8 回転式タンパク質翻訳反応における SD 配列の影響
(a) 環状 RNA, (b) 直鎖状 RNA

いくことが明らかとなった。一方、C126 (-SD) の場合は、10 分から 30 分の段階ではその生産量は C126 のタンパク質生産量と比較して少ない。しかしながら、60 分後にはその生産量が C126 の生産量に近づいてくる。この結果は、環状 RNA を鋳型とするタンパク質翻訳反応において、SD 配列の存在がその翻訳効率にほとんど影響しないことを示す。次に、直鎖 RNA における SD 配列の影響を検証した。L126 の場合は、一定の割合でタンパク質の発現が確認できた。一方、L126 (-SD) の場合はタンパク質の発現が確認できなかった。このことは、直鎖 RNA を鋳型とするタンパク質翻訳反応においては、SD 配列の存在がその翻訳効率に重要な影響を与えることを示す。

6. 結論

限られた配列を検討した結果ではあるが、環状 RNA を翻訳鋳型としたタンパク質合成反応は直鎖状 RNA を鋳型として用いた場合に比較して単位時間当たりのタンパク質生産量が高いことを見出した。これは環状 RNA がタンパク質翻訳サイクルにおける律速段階 (リボソームの RNA への結合) を回避することを可能とするためである。このことは、環状 RNA に終止コドンを入れることで、律速段階が生じて翻訳の効率が下がることから理解できる。一方、環状 RNA の翻訳反応において SD 配列の影響は少ない。なぜなら、直鎖 RNA の場合と異なり、環状 RNA はリボソームの解離・結合を要求しないためである。

今後はこの終わりのない回転式タンパク質翻訳反応の分子メカニズムの詳細をあきらかにするとともに、新規なタンパク質合成技術として利用することを目指している。特に、長鎖リピートタンパク質である蜘蛛の糸やコラーゲンなどの生産に適していると考えている。

- (1) Abe, N.; Abe, H.; Ito, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15108.
- (2) Abe, N.; Abe, H.; Nagai, C.; Harada, M.; Hatakeyama, H.; Harashima, H.; Ohshiro, T.; Nishihara, M.; Furukawa, K.; Maeda, M.; Tsuneda, S.; Ito, Y. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2082.
- (3) Abe, N.; Abe, H.; Ohshiro, T.; Nakashima, Y.; Maeda, M.; Ito, Y. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2125.

- (4) Nakashima, Y.; Abe, H.; Abe, N.; Aikawa, K.; Ito, Y. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 8367.
- (5) Onizuka, K.; Nagatsugi, F.; Ito, Y.; Abe, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 7201.
- (6) Underwood, K. A.; Swartz, J. R.; Puglisi, J. D. *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, 91, 425.
- (7) Laursen, B. S.; Sorensen, H. P.; Mortensen, K. K.; Sperling-Petersen, H. U. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2005**, 69, 101.
- (8) Abe, N.; Hiroshima, M.; Maruyama, H.; Nakashima, Y.; Nakano, Y.; Matsuda, A.; Sako, Y.; Ito, Y.; Abe, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, 52, 7004.
- (9) Shimizu, Y.; Inoue, A.; Tomari, Y.; Suzuki, T.; Yokogawa, T.; Nishikawa, K.; Ueda, T. *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 751.



気になった論文

氏名 植木 亮介 (うえき りょうすけ)

所属 東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻 特任助教

r.ueki@chembio.t.u-tokyo.ac.jp

この度は、生命化学研究レター“気になった論文”への執筆機会を頂きましてありがとうございました。私は九州大学大学院工学府物質創造工学専攻にて2015年3月に学位を取得し、この4月より東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻山東研究室に特任助教として着任しました。現在は、細胞の機能・運命制御に向けた機能性分子のデザイン及びスクリーニング法の開発に取り組んでおります。

本稿では、化学合成可能な分子認識ツールとしてセンサー・医薬品などへの応用が期待される「核酸アプタマー」に着目したいと思います。任意の標的分子に結合する核酸アプタマーは SELEX 法 (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) と呼ばれる進化工学的手法によって取得することができます。具体的には、「ランダム配列を含む核酸ライブラリを標的分子と混合」「標的分子に結合した配列を単離」「PCR 法によって増幅」という工程を数回繰り返します。一見、理論上はどのような標的に対しても高親和性の核酸アプタマーを取得できそうに見えますが、実際には数 μM 程度の親和性の低い配列しか得られない場合、もしくは全くアプタマーが得られない場合すらあります。

このように SELEX 法でアプタマーが得られない場合の原因を(かなり乱暴ですが)2つに大別しますと、

- ①核酸ライブラリ = 標的分子と強く相互作用する核酸配列がライブラリ中に含まれていない
- ②実験系 = 高親和性のアプタマーを選択的に回収・増幅する効率が低い となります。これらの問題を解決すべく、これまでに様々なアプローチが報告されていますが、本稿では上記①に関連し、「核酸ライブラリの多様性を高めるため、人工塩基を用いた研究例」について2報をご紹介します。

In vitro selection with artificial expanded genetic information systems

K. Sefah, Z. Yang, K. M. Bradley, S. Hoshika, E. Jiménez, L. Zhang, G. Zhu, S. Shanker, F. Yu, D. Turek, W. Tan, S. A. Benner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 1449–1454.

本論文は、細胞を標的とした核酸アプタマーを取得する“Cell SELEX”に関する論文を報告してきた Tan らのグループと、人工塩基対の開発で著名な Benner らのグループの共同研究となっています。論文の中では Benner らの開発した Z-P 塩基対(図1-1)を含む核酸ライブラリを用いて Cell SELEX を行い、MDA-MB-231 細胞に対する核酸アプタマーを取得しています。

人工塩基対と言えば、当然、遺伝情報の拡張という非常に魅力的な応用が連想されますが、近年、理研の平尾先生らのグループによって示されたように、SELEX 法への適用も一つの強力なアプリケーションとなり得ます。(Nature Biotechnology, 2013, 31, 453-457. ※こちらはご存知の読者の方も多いためと思われ、日本語の文献紹介・プレスリリースがいくつか発表されておりますので詳細は割愛させていただきます。)

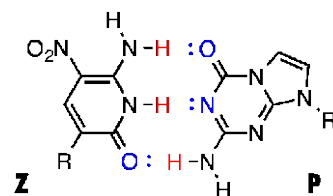


図 1-1. Benner らの開発した Z-P 塩基対

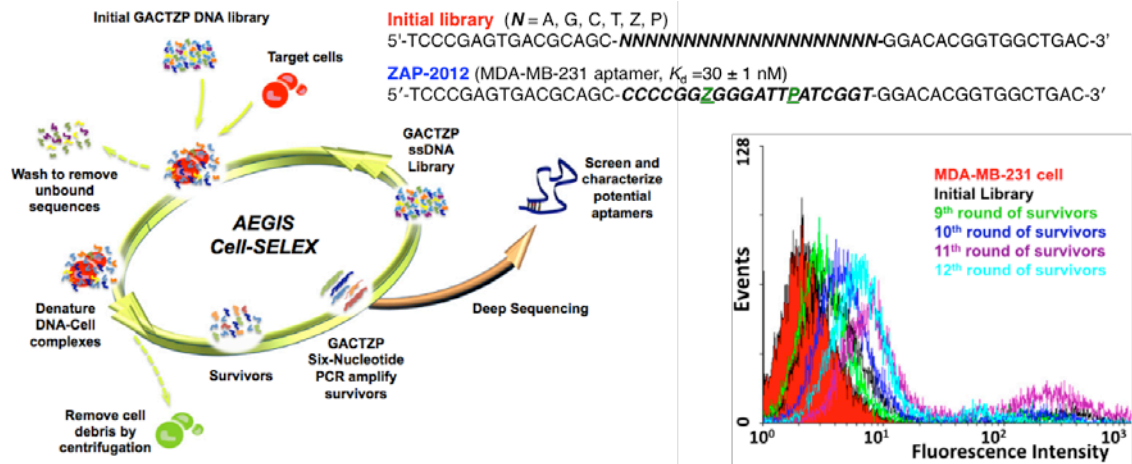


図 1-2. Cell-SELEX の概念図(左)とフローサイトメトリーによる標的細胞への結合能の評価(右)

(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 1449–1454. Fig.2, 3 より抜粋・一部改変)

今回の論文では、A、G、C、T、Z、P からなる 20 塩基のランダム配列を含む核酸ライブラリを用いた Cell-SELEX を行っています。12 回の selection round 後、核酸ライブラリが標的である MDA-MB-231 細胞への結合能を獲得していることをフローサイトメトリーによって確認しています(図 1-2)。後述のシーケンス解析から、ZAP-2012 というアプタマー配列が見出され、そのランダム領域には Z および P が 1 塩基ずつ含まれていることが判明しました。この Z および P を天然塩基によって置換した場合、親和性が大きく損なわれたことから、これら人工塩基の結合への寄与が示唆されています。

本論文では次世代シーケンサーを用いたアプタマー配列の特定を行っています。当然ですが、現行のシーケンサーは天然塩基の読み出ししかできませんので、何らかの形で①人工塩基を天然塩基に変換して配列を読み出し、②元から天然塩基だった部位と人工塩基から天然塩基へ変換された部位を区別する必要があります。この2つの要件を満たすため、著者らは図 1-3 のような方法を取っています。

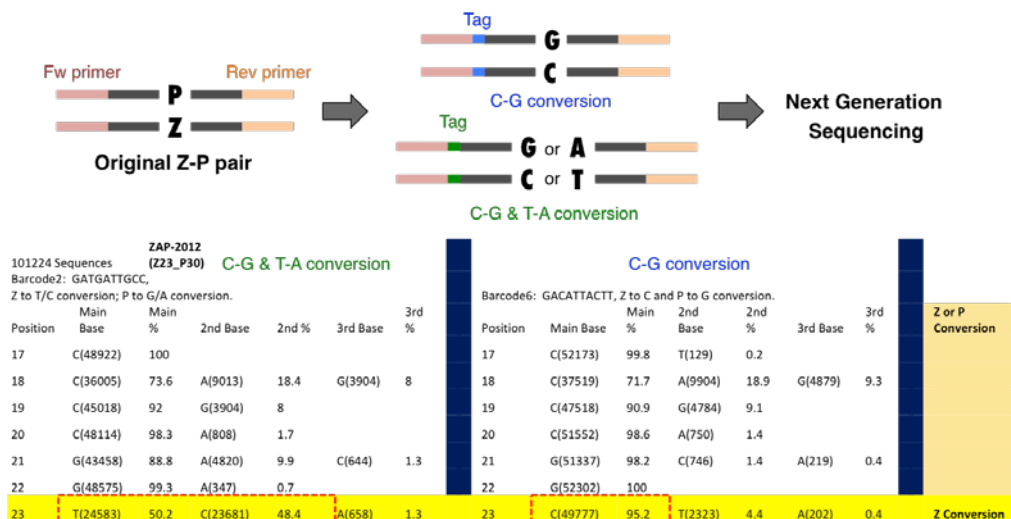


図 1-3. Z、P を含む DNA 配列の次世代シーケンサーによる解析

(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 1449–1454. Table.S4 より抜粋・一部改変)

具体的には、上記①の要件を満たすため、「dZTP あるいは dPTP を除いた条件で PCR を行うと Z-P 塩基対が天然塩基対に置き換わる」という性質を利用しています。また、Z-P 塩基対は PCR 条件によって C-G

塩基対および T-A 塩基対の双方に変異する場合と、C-G 塩基対に優先的に変異する場合があることが知られていました。そこで、上記②の要件に対しては SELEX で得られた PCR 産物を前述の2つの条件で PCR を行い、同時にシーケンス解析を行っています。読み出された配列がどちらの PCR 条件で増幅されたかは、Forward primer の 3' 末側に Tag 配列を付加することで同定できます。このような操作によって、PCR 条件によって塩基の分布が大きく変化している部位が、元々 Z-P 塩基対のあった部分と推定することができます。これによって、著者らは Z および P を含む6種の核酸塩基からなるライブラリを用いてアプタマーの探索を行うことに成功しています。

本論文での進歩の一つは人工塩基”対”を配列内に含むアプタマーの探索を実現したことにあると言えます。このようなアプタマーの標的分子との相互作用形式などは特に興味を持たれるところであり、今後、構造解析などの続報が待たれます。

A Versatile Approach Towards Nucleobase-Modified Aptamers

F. Tolle, G. M. Brändle, D. Matzner, G. Mayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10971–10974.

本論文では、クリックケミストリーを利用することによって修飾塩基を含む核酸ライブラリで SELEX を行う”click-SELEX”と呼ばれる方法論を提唱しています。修飾塩基を用いた SELEX 自体は以前から行われており、例えばピリミジン塩基の5位、プリン塩基の7位、8位などへの化学修飾はポリメラーゼの複製反応において許容されるケースがあるため、これまでも様々な修飾塩基を用いた SELEX が行われてきました。ただし、新規の修飾部位を導入する場合、ポリメラーゼによる複製反応を検討・考慮する必要がありますし、PCR に用いる triphosphate 体を合成するための設備とスキルが必要となります。そのため、「既存の核酸ライブラリでアプタマーが取れなかったので、新しい修飾塩基を利用した SELEX を検討する」というのは、(極端な話ではありますが)特に Non-chemist の方には、なかなかハードルの高いことなのではないでしょうか。

本論文においては、C5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) を導入した核酸ライブラリを用いた click-SELEX によってこれらの問題点を回避できることを報告しています(図 2-1)。EdU が持つ利点としては、①PCR によって増幅可能であること ②triphosphate 体である EdUTP が市販されていること ③クリックケミストリーによって任意のアジド誘導体を付加できることが挙げられます。具体的な実験操作は、天然 DNA を用いた SELEX 法とほぼ同様ですが、TTP の代わりに EdUTP を用いた PCR を行う点、標的分子との混合前にクリックケミストリーで任意のアジド誘導体を EdU に付加する点が異なります。

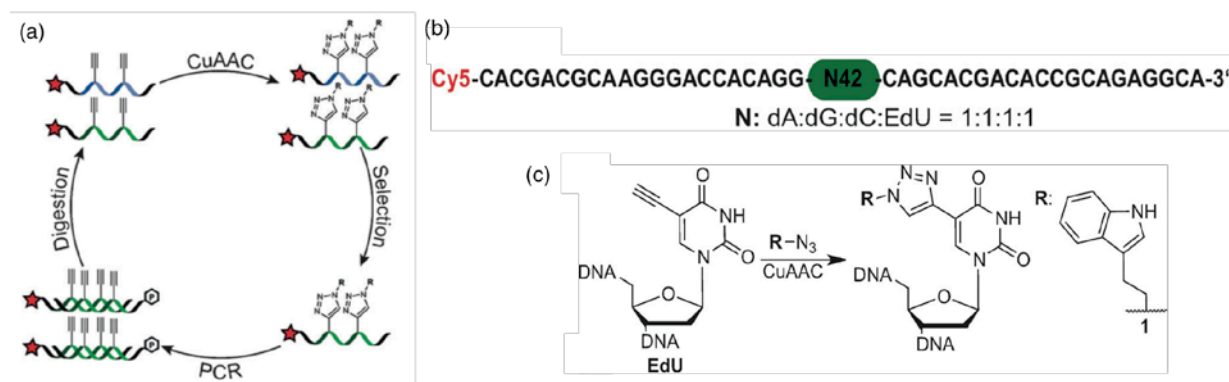


図2-1. (a)EdUを用いたSELEXの概念図 (b)著者らの使用したライブラリ配列 (c) EdUの修飾反応

(*Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10971–10974, Scheme 1より抜粋・一部改変)

本論文では、EdU にインドール環を導入した核酸ライブラリを用いて GFP に対する 15 ラウンドのセレクト

ション操作を行っています。シーケンス解析の結果、C12 というコンセンサス配列の特定に成功しています (図 2-2a)。この配列の 42 塩基のランダム領域中には 4 塩基の EdU が保存されていました。今回用いた Initial library 中の塩基組成が dA:dG:dC:EdU = 1:1:1:1 であることを考慮すると、この 4 塩基という EdU の含有率は少ないようにも感じられます。ただし、これは標的分子への結合に対する寄与というより、PCR での増幅効率によるセレクションバイアスを反映していると解釈するのが自然かもしれません。実際、C12 配列中の EdU に異なる官能基を修飾した場合、GFP に対する結合能が大きく低下したことから、インドール環が修飾された EdU は標的分子への結合に重要な役割を果たしていることが伺えます (図 2-2b)。

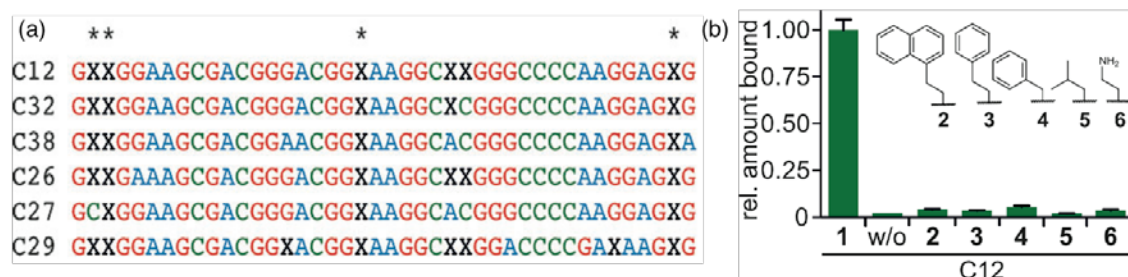


図2-2. (a) GFPに対するclick-SELEXの配列解析結果 (b) EdUに付加する官能基のGFP結合量への影響
(*Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, DOI: 10.1002/anie.201503652, Figure 2, 3より抜粋・一部改変)

本論文で提案された click-SELEX では、比較的簡便に新規の修飾塩基を用いた SELEX を行うことが可能となります。PCR での増幅後に修飾を行うことで、ポリメラーゼによる認識の問題を回避し^{*1}、幅広い化学修飾を含むライブラリが構築可能になると著者らは主張しています。個人的に惜しいと感じる点としては、著者らがインドール環を導入している点です。ピリミジン塩基5位からインドール環を提示した修飾塩基は既に SELEX に利用された実績があるため (*J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4141-4151.)^{*2,3}、この click-SELEX でこそ試す価値のあるデモンストレーション (例えば、特異な修飾基の導入や様々な化学修飾の網羅的比較など) があれば、更に印象的な論文になったのではないかと思います。

【脚注】

^{*1} 論文中でも議論されていますが、標的分子と結合した配列を再度PCRで増幅する際に、修飾基が導入された配列が鋳型になる点を考慮する必要があります。修飾基の導入がPCR効率を大きく低下させる場合には、修飾基の構造に光、酵素、化学反応などで特異的に開裂可能な部位を導入する等の工夫が必要になります。

^{*2} インドール環が修飾された核酸塩基を含むライブラリはアプタマーの取得に有効であるという報告 (*PLoS ONE*, **2010**, *5*, e15004.) もあります。SELEXの成功率を上げるという観点においては、著者らのアプローチは理にかなっていると言えます。

^{*3} ちなみに、インドール環を含む修飾塩基は Trilink Biotechnology 社から市販されています。
(<http://www.trilinkbiotech.com/cart/Scripts/prodView.asp?idproduct=6349>)

気になった論文

氏名 田村 朋則(たむら ともり)

京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻 助教

tamura@sbchem.kyoto-u.ac.jp

この度は生命化学研究レター「気になった論文」の執筆の機会を与えて頂き、大変光栄に思います。私は、2013年に京都大学で学位を取得後、東京大学およびカリフォルニア工科大学において博士研究員を経験し、2014年9月より京都大学工学研究科浜地研究室の助教として勤めさせて頂いております。現在は、細胞内環境下での選択的タンパク質化学修飾法の開発を行うとともに、それらを創薬やChemical proteomics/interactomicsのための基盤ツールへと展開することを目標に研究を進めています。今回は、自身の研究とも関連の深い“Bioorthogonal chemistry”をキーワードに、(1)シクロプロペノンを利用した新反応の開発、(2)ligand-tethering戦略に基づいたキナーゼ活性の光制御、(3)in situ click chemistryによる変異体選択的阻害剤スクリーニングの3報について紹介させていただきます。

A bioorthogonal ligation of cyclopropanones mediated by triarylphosphines

Hui-Wen Shih and Jennifer A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 10036-10039 (2015)

生体直交性の高い有機化学反応であるbioorthogonal reactionは、タンパク質や糖、核酸、脂質など様々な生体分子に望みの分子プローブを導入するために用いられる。近年では、既存のStaudinger-Bertozzi ligationやazide-alkyneのclick chemistryに加えて、様々な反応特性を有する新しいbioorthogonal反応が多数報告されている。しかしながら、実際に汎用性の高い反応は限られており、更なる反応開発が求められている。本論文の著者であるPrescherらは以前からシクロプロペンを基軸とした新規bioorthogonal反応の探索に取り組んでおり、その知見を活かして今回新たにシクロプロペノンとトリフェニルホスフィンを利用したbioorthogonal ligation反応を開発した(図1a)。

シクロプロペノンは生体内で比較的安定で、ホスフィンと反応してケテンイリド**1**を与える(図1b)。これがアミンと反応すると α, β -不飽和アミドが得られるが、このときトリフェニルホスフィンのオルト位にアミンを導入しておけば、分子内反応によってシクロプロペノンとトリフェニルホスフィンとのライゲーションが可能となる。著者らはシクロプロペノンを導入したリゾチームを用いて本反応を検討し、細胞破碎液中でも反応が進行することを確認した。生成物として得られるオレフィンも更なるbioorthogonal反応点として利用できると考えられ、今後更なる発展が期待される。

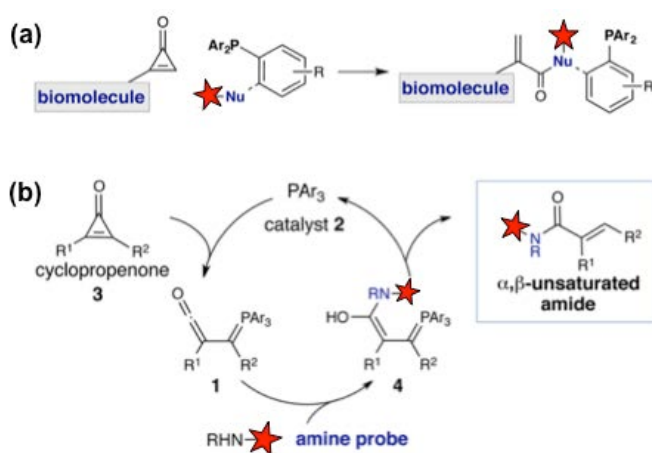


図1. (a)シクロプロペノンライゲーション反応 (b)推定される反応機構(論文より抜粋・一部改変)

Selective, rapid and optically switchable regulation of protein function in live mammalian cells

Yu-Hsuan Tsai, Sebastian Essig, John R. James, Kathrin Lang, Jason W. Chin, *Nat. Chem.* **7**, 554-561 (2015)

小分子阻害剤によるタンパク質の機能制御(抑制)は、遺伝子のノックアウトやRNAiと並んで生体システムを理解するための重要なアプローチである。しかしながら、多くのタンパク質は配列、構造ともに相同性の高いファミリーを形成しており、標的のタンパク質のみに選択的に結合する阻害剤の開発が大きな課題となっている。特に、キナーゼ類はATP結合部位の相同性が高いため、大規模なドラッグスクリーニングをもってしても、十分に選択性の高いキナーゼ阻害剤を得ることは極めて困難である。今回著者らはbioorthogonal反応とLigand(阻害剤)-tethering戦略を組み合わせることでキナーゼのアイソザイム選択的阻害法(inhibition via bioorthogonal ligand tethering: iBOLT)を開発した。さらに、本手法に光スイッチ機構を導入することで、キナーゼ活性を光制御することにも成功した(Photo-BOLT, 図2)。

著者らはこれまでに歪みアルケン/アルキンとテトラジンによる逆電子要請型Diels-Alder反応を用いたタンパク質の部位特異的修飾に成功しており、本論文でもこのbioorthogonal反応を利用している。具体的には、標的キナーゼとしてまずMEK1とMEK2を選択し(配列相同性82%)、MEK1/2阻害剤にアルキルリンカーを介してテトラジンを連結した化合物を合成した。次に部位特異的非天然アミノ酸導入法によってシクロオクチンをMEK1のATP結合部位周辺に導入し、テトラジン-阻害剤コンジュゲートによる阻害実験を行った。その結果、野生型MEK1やMEK2と比較して、シクロオクチンを有するMEK1変異体はテトラジン-阻害剤コンジュゲートによって選択的かつ不可逆的に阻害された。逆にMEK2にシクロオクチンを導入することでMEK2のみを選択的に阻害することも可能であった。

次に著者らはアゾベンゼンをリンカーユニットに導入することで、キナーゼ活性の光制御を試みた。HEK293細胞内にシクロオクチンを有するMEK1変異体を発現させ、テトラジン-アゾベンゼン-阻害剤コンジュゲートをインキュベートした。その細胞に対して360 nmまたは440 nmの光を照射し、それぞれの条件についてERKのリン酸化を指標にMEK1のキナーゼ活性を評価した。その結果、アゾベンゼンがtrans型ではMEK1活性が低下し、cis型で活性が回復することが明らかとなった。アゾベンゼンによるタンパク質の光制御は他にD. Traunerらのグループが膜表面タンパク質で成功しているが、細胞内タンパク質への適用は本研究が初の例であり、今後は細胞局所的なタンパク質の活性化などへの展開が期待される。

A protein-targeting strategy used to develop a selective inhibitor of the E17K point mutation in the PH

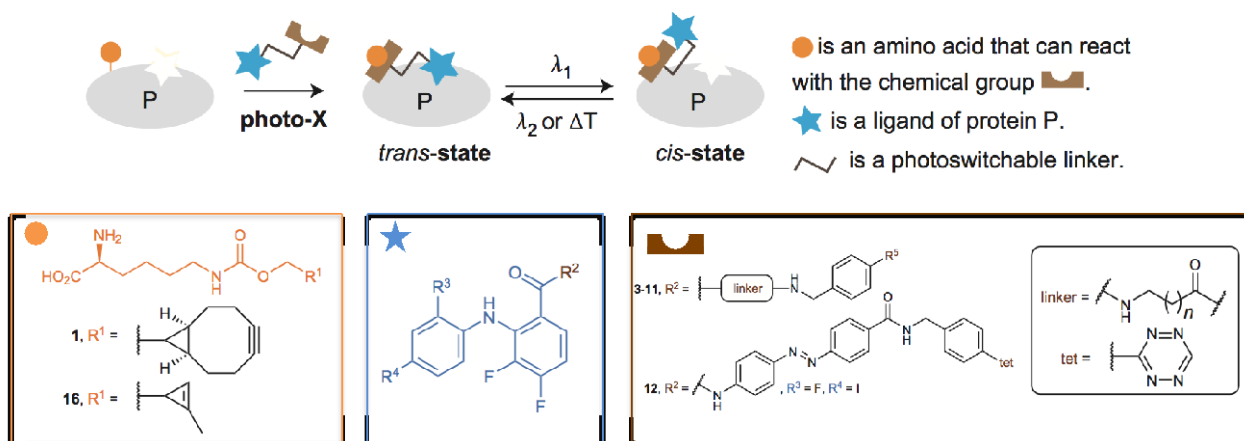


図 2 Photo-BOLT による MEK1 活性の光制御 (論文より抜粋・一部改変)

domain of Akt1

Kaycie M. Deyle, Blake Farrow, Ying Qiao Hee, Jeremy Work, Michelle Wong, Bert Lai, Aiko Umeda, Steven W. Millward, Arundhati Nag, Samir Das, James R. Heath, *Nat. Chem.* **7**, 455-462 (2015)

癌などの疾患に関わるタンパク質の点突然変異体は新しい創薬ターゲットとして近年注目を集めている。点変異体選択的阻害剤は野生型タンパク質に対する阻害活性が低いため、副作用の低減が期待されるが、開発にあたっては課題も多い。特に従来のドラッグスクリーニング手法では、タンパク質の活性ポケット以外の部位に生じる点変異に対して結合するリガンド分子の探索は極めて困難である。この課題を克服するための戦略として、著者らは新たにin situ click chemistryに基づいたスクリーニング法を開発した。

本論文では癌や白血病に関与するAkt1キナーゼのE17K変異(Akt1^{E17K})に着目し、その選択的阻害剤の探索を行った。Akt1^{E17K}は野生型と比べてPIP3(ホスファチジルイノシトール3リン酸)への結合活性が亢進しており、その結果様々な疾患を引き起こすことが知られている。著者らはまず、Akt1のE17K変異箇所を含むエピトープペプチド(33-mer)を合成しE17Kから二残基離れた位置にアルキンを導入した。これとは別にアジドをN末に有する5-merのペプチドライブラリー(およそ150万種)を作製した。通常、アジド-アルキンのclick反応はCu(I)触媒存在下で行われ、無触媒条件では長時間の加熱を必要とする。しかし、アジドとアルキンが適切に配向し、充分近接すれば銅無

しでも反応が進行する。この原理を用いて、E17K変異体に結合する5-merペプチドをスクリーニングしたところ、yleafという配列のD-アミノ酸から成るペプチドが得られた(図3a)。ELISAや蛍光異方性測定から、yleafペプチドはAkt1^{E17K}に対して強く結合($K_d=54 \pm 7.0$ nM)するのに対して、野生型に対する結合能は低かった($K_d > 1 \mu\text{M}$)。また、リガンド指向型ラベル化反応を利用した結合部位評価を行い、確かにE17K変異点近傍にyleafペプチドが結合していることを実証した。次に著者らはyleafのAkt1^{E17K}阻害能を評価したが、残念ながらyleaf単独ではAkt1^{E17K}とPIP3との相互作用を阻害できなかった。そこで彼らは、アジドとアルキンを両末端に有するyleafペプチドと、別のアジドあるいはアルキンペプチドライブラリーを用いてさらに2サイクルのin situ click screeningを行い、より多点でAkt1^{E17K}に結合できるbiligand分子およびtriligand分子を作製した(図3b)。得られたtriligandは高いAkt1^{E17K}結合能を示し($K_d=115 \pm 8.7$ nM)、Akt1-PIP3相互作用を強く阻害した(図3c)。

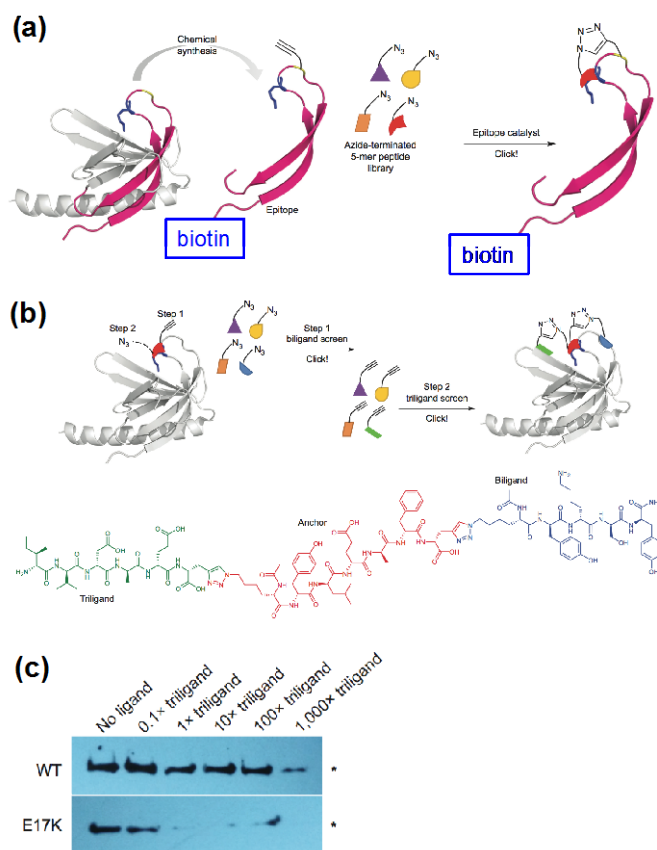


図3 (a) in situ click chemistry による Akt1E17K binding peptide のスクリーニング (b) Biligand, triligand スクリーニングスキームと、triligand の分子構造 (c) 阻害活性評価 (論文より抜粋・一部改変)



シンポジウム等会告

第 18 回 生命化学研究会 ～窮理学 Natural Philosophy を目指して

主催 日本化学会フロンティア生命化学研究会

会期 2016 年 1 月 8 日(金)14 時～9 日(土)13 時

会場 石川屋旅館(ザ・マーキーズ) (〒859-1503 長崎県南島原市深江町丙 760 TEL: 0957-72-2031)

アクセス : <http://www.bryant.jp/cn24/access.html>

1. 長崎空港よりリムジンバスで島原港 (1 時間 45 分)、島原港から車 (15 分) もしくはバス (深江船津下車、20 分)。バス停から徒歩 2 分。
2. 博多駅から JR で諫早駅 (1 時間 35 分)、諫早駅から島原鉄道で島原駅 (1 時間)。島原駅から車 (20 分) もしくはバス (深江船津下車、30 分)。
3. 熊本駅からバスで熊本港 (25 分)、熊本港からフェリーで島原港 (30 分)。島原港から車 (15 分) もしくはバス (深江船津下車、20 分)。バス停から徒歩 2 分。
4. 長崎空港から車 (約 1 時間 30 分)。
5. 研究会当日は、会場と島原駅および島原港間の送迎バスを運行します。バスの運行経路と時刻については参加者に連絡します。

講師【敬称略】: 王子田 彰夫(九州大学)、片山 佳樹 (九州大学)、樺山 一哉(大阪大学)、櫻井 和朗(北九州大学)、中島 敏博((財)化学及血清療法研究所)、長谷川 健(京都大学)

会費 : 参加登録費 一般 8,000 円・学生 4,000 円(予定)、宿泊費 4,500 円、懇親会費 8,500 円

参加申込方法 : 氏名、所属、役職(学年)、性別、E-mail アドレス、懇親会の出欠、8日および9日の昼食(各 700 円)の要・不要、送迎バスの要・不要を明記の上、11/18(水)までに下記の連絡先へ申し込みください。送迎バスはプログラムの開始と終了に合わせて運行します。原則として全員宿泊となります。

定員 : 45 名

ポスター発表の締切 : 11/18 (水) ポスター発表希望者は A4 白黒半ページで作成してください。テンプレートは生命化学研究会ホームページ (<http://res.tagen.tohoku.ac.jp/FBC/>) よりダウンロードできます。なお、題目は出来るだけ能動態で動的なタイトルをつけて下さい。(例: __は__である。__は__する。)

問い合わせ・連絡先 : 〒223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉3-14-1

慶應義塾大学理工学部生命情報学科 佐藤 智典

E-mail: sato@bio.keio.ac.jp

TEL: 045-566-1771

新規医療イノベーションのためのシンポジウム 2015

放射性核種の製造から α 線内用療法の治療へ

日時：10月21日 10:20-19:00 (意見交換会 17:30-19:00)

主催：大阪大学・理学研究科, 医学研究科, 核物理研究センター

場所：千里阪急ホテル・仙寿の間

<http://www.rcnp.osaka-u.ac.jp/~medsci/MedSci-Sympo2015/index.html>

プログラム

10:20 キックオフセレモニー

11:00 パートー1 (特別研究経費・医理核物連携プロジェクトについて)

- ・医理核物連携プロジェクトについて
- ・がん治療-医療現場からの要請

13:45 パートー2 (プロジェクト関連講演、講演概要)

1. 加速器、RI 製造関連

- ・日朝俊一 (住重) 加速器、スケルトンサイクロトロン開発、RI 製造装置 (仮題)
- ・菊永英寿 (東北大・電子光理学セ) 電子加速器、光核反応による RI 製造 (仮題)
- ・豊嶋厚 (JAEA・先端研) RI 製造技術、化学分離 (仮題)

2. ターゲティング分子合成、がん治療関連

- ・片山佳樹 (九大工) 「新しいがんターゲティングのための分子システム」
- ・木村寛之 (京都薬大・代謝分析学分野) 放射性医薬品を効果的に標的臓器へ集積させ、生理的集積を軽減させる技術 (仮題)
- ・李千萬 (阪大医付属病院・呼吸器外科・未来医療開発部) HVJ-E を用いた悪性中皮腫治療の医師主導治療について (仮題)
- ・高野徹 (阪大医・内分泌・代謝内科学講座) 甲状腺内用療法の実状と問題点について (仮題)

16:30 パート3 (他機関との連携、総合討論)

- ・延與 秀人 (理研・仁科加速器セ) 理研-阪大の連携について (仮題)
- ・総合討論

17:00 クロージング

17:30 意見交換会

PACIFICHEM 2015 (Honolulu, Hawaii, USA December 15 - 20, 2015)
におけるフロンティア生命化学研究会関係者の主催シンポジウム

Advances in Peptide and Protein Chemistry (#6)

William Lubell | Jeffery W. Kelly | A. Ian Smith | Hiroaki Suga | Vikas Nanda | Jen-Tse Huang | Kazuaki Kudo |
Richard Cheng | Ping-Chiang Lyu

http://www.pacificchem.org/symposiadesc2015/c_symp_6.htm

*Micro- and Nano-fabricated Analytical Devices for Chemical, Biochemical
and Biomedical Platforms (#129)*

Yoshinobu Baba | H. John Crabtree | Stephen C. Jacobson | J. Michael Ramsey | Koji Otsuka | Doo Soo Chung

http://www.pacificchem.org/symposiadesc2015/c_symp_129.htm

*Marine and Freshwater Toxins: Detection, Structure, and Pharmacology
(#138)*

Takeshi Tsumuraya | James Hungerford | Richard J. Lewis

http://www.pacificchem.org/symposiadesc2015/c_symp_138.htm

*Strategies for Coupling and Decoupling Diverse Molecular Units in the
Glycosciences (#201)*

Zbigniew J. Witczak | Margaret A. Brimble | Yoshiko Miura | Roman Bielski

http://www.pacificchem.org/symposiadesc2015/c_symp_201.htm

*Bioorthogonal Chemistry: Tools and Applications in Chemical Biology
(#343)*

John Pezacki | Qing Lin | M.G. Finn | Itaru Hamachi | Peng Chen

http://www.pacificchem.org/symposiadesc2015/c_symp_343.htm

Chemical Biology of Protein-Lipid Modification (#421)

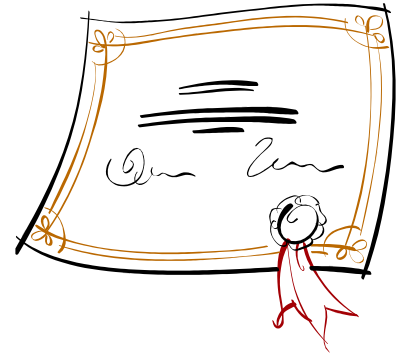
Mark Distefano | Junko Ohkanda | Yongxiang Chen

http://www.pacificchem.org/symposiadesc2015/c_symp_421.htm

お知らせ

受賞

馬場嘉信 (名大院工)
日本分析化学会 学会賞
「ナノバイオデバイスの創製と生体分析への展開」
2015年9月10日 受賞



竹中繁織 (九工大院工)
高分子学会三菱化学賞
「生体高分子 DNA の分子認識能を利用したバイオセンシング試薬への応用」
2015年9月16日受賞

異動

築地 真也
名古屋工業大学 材料科学フロンティア研究院
(大学院工学研究科物質工学専攻) 教授
2015年10月1日 付
〒466-8555 名古屋市昭和区御器所町 4号館 210室
E-mail: stsukiji@nitech.ac.jp

編集後記

生命化学研究レターは、年3回発行で、編集委員3人で担当を回しているのですが、必然的に松浦の担当は10月になっています。ここ数年、毎年のようにノーベル賞のニュースを聞きながら、本レターの編集作業を進めています。今年のノーベル医学・生理学賞は、北里大特別栄誉教授の大村智先生！フロンティア生命化学研究会の方々とも少なからず関係のある分野の先生のご受賞で、大変喜ばしいことですね。

50回記念号となる次号の生命化学研究レターは、大神田さんの担当により、2016年2月頃の発行を予定しております。ニュースレター改善のために、みなさんからのご要望・ご意見をお待ちしております。下記の編集担当まで、ご連絡をいただければ幸いです。

平成 27 年 10 月 6 日

松浦和則
鳥取大学大学院工学研究科
ma2ra-k@chem.tottori-u.ac.jp

編集担当
井原敏博(熊本大学)
大神田淳子(京都大学)