## 生命化学研究レター

(2020年10月)

2. 巻頭言

現実はSFより奇なり

星薬科大学薬学部・医薬品化学研究所 叶 直樹

#### 4. 研究紹介

4. 植物ホルモン受容体サブタイプ選択的ケミカルツールの開発 ~PPI の組み合わせを制御する小分子~

東北大学大学院理学研究科 高岡 洋輔

10. 核酸非二重らせん構造と疾患の関わりを解析する ~非二重らせん構造による転写制御と相分離形成機構を物理化学的に解明する~

甲南大学先端生命工学研究所 建石 寿枝

16. 分子ロボットから人工細胞からオートマターへ

東北大学大学院工学研究科 野村 M. 慎一郎

22. 論文紹介「気になった論文」

東京大学大学院工学系研究科 齋藤 雄太朗

京都大学大学院工学研究科 ERATO 浜地ニューロ分子技術プロジェクト

國枝 一輝

29. 留学体験記

カリフォルニア大学アーバイン校 留学体験記

名古屋大学大学院理学研究科 稲垣 雅仁

33. お知らせ

受賞

編集後記

## 卷頭盲

### 現実は SF より奇なり

#### 星薬科大学薬学部・医薬品化学研究所 叶 直樹

大変ご無沙汰しております。いかがお過ごしでしょうか…これは、久しぶりに連絡を取る相手に対する常 套句ですが、まさか「ご無沙汰する」ことが推奨され、世界標準となる日が来るとは思ってもいませんでした。 皆様もそうではないでしょうか?

2019年末の中国・武漢を起源とする新型コロナウイルス感染症により、現時点(2020年初秋)でもソーシャルディスタンスや飛沫拡散防止の重要性が叫ばれ、ほぼ全世界の人々が恐る恐る生活しています。昨年までは日本人の専売特許であった「マスクをつけた日常」は、今や、それを見て呆れていた欧米諸国の人々にまで広がり、マスクなしでは行動制限がかけられたり、飛行機を降ろされたりします。感染症の治療薬や、感染を予防するワクチンの開発に世界規模で一喜一憂し、挙げ句の果てには最も安全性が求められるワクチンの「特例による前倒し使用」が国によっては認められ、推奨されているというニュースも目にします。

新型コロナウイルスは非常に困ったウイルスです。感染しても、軽症または無症状のケースが約8割を占め、更に感染者の8割は人に感染させないと報告されていますが(少し古い厚労省新型コロナウイルス感染症対策専門家会議HPより)、2020年2月頃からの世界的第一波の惨状の記憶や、時々ニュースになる無症状のスーパースプレッダーの存在が、人々を疑心暗鬼にさせています。大声で喋ってはいけません、人とは距離をとらなければいけません、3密を避けましょう、帰省や旅行は控えましょう…1年前に1年後そんな世界が来ると予言した人が居たとしても(居たかもしれませんが)、誰も本気にしなかったでしょう。そんなのは、サイエンスフィクション(SF)の世界の中だけの話でした。

しかし、最近はそんなSFじみたことが結構世界全体で起こっているような気がします。80年代末に一世を 風靡したSF映画に自動車型タイムマシンを駆使して過去と未来を往来する三部作がありましたが、その中 に出てくる悪役キャラクターが米国の不動産王から着想を得ていたことは有名な話です。悪役キャラクター はあくまでも悪役ですので、映画では一時期カジノオーナーにまで成り上がりますが、最後には主役にや られてしまいます。しかし、何ということでしょう、現実の世界では…(ここでは明記するのは避けます)。欧州 では、某連合からの主要国離脱がまさかの現実となり、その国内では離脱時に連合と合意した協定を反故 にする法案が平気で可決されたりしています。国家間や人種間の分断も盛んに報道されています。

人種間の分断は色々なコミュニティーに影を落としています。化学コミュニティーも例外ではありません。 高いインパクトファクターを誇るAngewandte Chemie誌では、ひとりの米国人化学者の論文(エッセイ)中に 差別的な内容が含まれていたことが問題になりました。その内容にも関わらず論文が受理され、一時掲載 されたことで(現在は撤回)、その論文を通したエディターが首になったり、論文受理に反発したadvisory board memberが大勢辞職したりする騒ぎになりました。

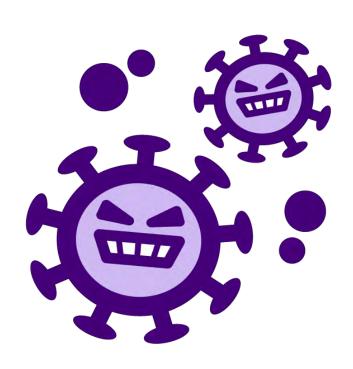
一方、米国化学会では、「有機化学の人名反応(named reactions)は、主に白人男性の名前がついてい

ることが多いため、フェアではない。使用をやめるべきか」なんて話も出ています。実際、女性の名前や有色人種の名前がついた人名反応は少ないそうで、例えば、670種を超える人名反応のうち、女性の名前に由来するのは4個か多くても6個だそうです。確かにフェアじゃないのかもしれません。日本人としては、鈴木カップリングや根岸カップリングなど、有機化学の歴史に燦然と輝く反応がありますので、少なくてもあまり気にしたことがありませんでしたが…。ただ、ACSのPodcastでも議論されていましたが、例えばClaisen転位を教える時に、常に「このアリルビニルエーテルが[3,3]シグマトロピー転位を起こして γ,δ-不飽和カルボニル化合物になる反応」なんて言っていると、講義時間も倍くらいかかりそうな気がします。

閑話休題。ネガティブな内容もポジティブな内容も入り乱れて、まさに「現実はSFより奇なり」です。そう言えば、SF的な経験としては、1000年に一度の大地震が引き起こした9年半前の東日本大震災もありました。 当時の私は、この世で最も経験深そうな各領域の専門家や国のリーダー達が口を揃えて「こんな状況は想像していなかった、想定外だ」と発言することを耳にして、大きな違和感を覚えていました。人間の想像や想定なんてそんなものなのですね。今後、想定を超える災害が起こる可能性を考えると心が暗くなります。

しかし、逆に、同じくらい自分の想定を超える科学的発見や研究に出会える可能性があるとも言えそうです。そう考えると、ワクワクしませんか?自身の仕事でなくても、もしかしたら次ページ以降にその世界が広がっているかもしれません。

現在はコロナ禍その他に付随する「なんやかんや」でいろいろ大変ですが、そんなことは一時忘れて、皆さん、本レターのページをめくり、最新の生命化学研究の世界をエンジョイしましょう!



研究紹介

# 植物ホルモン受容体サブタイプ選択的 ケミカルツールの開発

~PPI の組み合わせを制御する小分子~



## 東北大学大学院理学研究科 高岡 洋輔

ytakaoka@tohoku.ac.jp

#### 1. はじめに

植物ホルモンとは、植物自らが合成し、植物体内で微量でも強い生理活性を示す天然有機化合物であり、現在までにおもに9種類の小分子が定義されている」。その活性は、植物の生長や分化、発芽、成熟、防御など多岐にわたり、古くは19世紀ダーウィンの時代から研究されてきた。ただしその活性発現機構の詳細、特に植物ホルモンの受容に関する構造的知見とシグナル伝達の詳細が明らかになったのはほんの15年ほど前であり、それ以降爆発的に進展した古くて新しいホットトピックの一つである(2020年夏、長年の謎であった植物免疫に重要なサリチル酸の受容メカニズムの一部が8例目として報告された)2。筆者が興味をそそられたのは、植物ホルモンの多くが特定のタンパク質間相互作用(PPI)を制御する点であり、オーキシンやジベレリン、サリチル酸、ジャスモン酸など比較的小さな構造の分子1つで複数のタンパク質を呼び込み、シグナル伝達を巧みに制御するサマはとても魅力的で、天然有機化合物の圧倒的なパワーを感じさせる(Fig. 1)。しかも、分子は単純だが機能は複雑で、まだわかっていないことだらけである。例えば植物体内のどこでどれくらい活性を示すか?それはどう制御されるか?モデル植物の結果は他の植物でも同じか?など、様々な難題が残されている。ただし、未だケミカルな技術があまり使われていない、あるいは植物に合った技術になっていないために解明されていない点も残されているように思う。この現状を打開するには、植物科学にマッチしたケミカルバイオロジー研究が今後ますます重要になると考えられる。

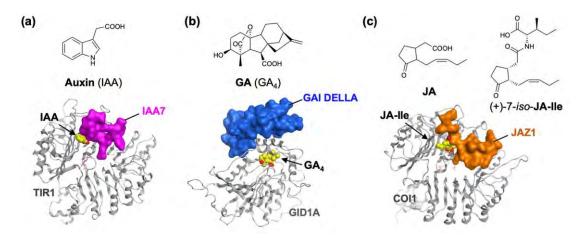


Figure 1. 植物ホルモンとその PPI 型共受容体の結晶構造の例; (a) オーキシン(IAA) と TIR1/IAA7 (PDB ID: 2P1Q)², (b) ジベレリン(GA4)と GID1A/GAI (2ZSI)³, (c) JA 及び活性本体 JA-Ile と COI1/JAZ1 (3OGL)⁴.

筆者は約6年前まで、九大・京大で浜地格先生のもとで学生からスタッフに至るまでお世話になり、その間は主に動物細胞を対象として、細胞内在性タンパク質の可視化や化学修飾法の開発を行なってきた。その過程で、タンパク質の構造の美しさに魅了されつつ、これが主役の一つである生命化学研究を学ぶにつれ、シグナル伝達の根幹をなすPPIを化学で制御する研究がしたいという欲求がふつふつと湧いてきた。浜地研での最後の仕事(ケモカイン/受容体間のPPIに基づく化学修飾法)は、そんな筆者の想いを込めた研究ではあったが、そううまくは行かず、浜地研を卒業して4年後にようやく論文として報告できた(当時系を引き継いでくれた内之宮博士(現九大助教)に大感謝)5。そんな折に縁あって現所属の東北大、上田実先生に拾っていただいてから、本稿で紹介する植物ホルモンを対象とする研究プロジェクトに参画した。後述するように、本研究の過程で植物ホルモン受容体とリガンドとの結合を評価する方法論を構築したが、これには浜地研の頃に培ったタンパク質科学のノウハウは大いに役に立ち、化学/生化学をベースにしていれば動物も植物も関係なく、フル活用することができた。最終的に、曖昧な選択性を持つリガンドをリードとして、結晶構造に基づく合理的設計も取り入れながら構造改変を行い、植物個体でもPPIの組み合わせを制御できる新たなケミカルツールを開発することに成功した。本稿ではこの一連の過程を紹介する6。

#### 2. 植物ホルモン ジャスモン酸による植物の生長と防御の制御

植物は病原菌などへの感染や害虫からの食害を受けると、ジャスモン酸(1, Fig. 1c)と呼ばれる免疫ホル モンを生合成して、様々な防御応答を活性化する7.8。一方で防御に必要なエネルギーを使う代わりに、植 物自体の生長を抑制したり、老化を促すことも知られている。このジャスモン酸が引き起こす活性の「生長と 防御のトレードオフ | の関係は、その制御メカニズムに不明な点が多く残されている。 ジャスモン酸は最終 的に、イソロイシンと縮合して生成するジャスモン酸イソロイシン(JA-Ile, 2, Fig. 1c)が活性本体としてはたら き、ユビキチンリガーゼの構成要素であるF-boxタンパク質COI1と、転写リプレッサータンパク質JAZとの間 のPPIを誘起することで、JAZのユビキチン化による26Sプロテアソーム系での分解を促して、様々な遺伝子 の転写を活性化させる9。モデル植物シロイヌナズナでは、1種のCOIIと13種類のJAZサブタイプが存在し、 JA-Ileはこのほとんど全ての組み合わせのPPIを一つの分子で誘起することが可能であり、これが防御応答 だけでなく、生長抑制などを同時に引き起こすことにつながっていると考えられる。ただし、多くの植物ホル モン受容体にもみられるのだが、JAZの機能は遺伝的重複性が高く(一つの現象に対し複数の遺伝子が 重複して機能していること)、一つの遺伝子をノックアウトしても他が相補的に働いて表現型が出ないなど解 析が困難であり、どのJAZがどの応答をおもに制御しているかはほとんど解明されていない。このような背景 のもと、我々はいくつかのJAZサブタイプにのみ結合する小分子リガンドを開発し、この複雑なシグナル伝 達を解析するケミカルツールの開発を目指して検討を開始した。とはいえ、COIIとJA-Ileに対するJAZの相 互作用ドメインはたかだか27アミノ酸程度(Jas motif)であり、13種類あるJAZのJas motifは高度に保存され ていることから、滅多なことでは選択的小分子を開発することはできない。しかも、どのJAZサブタイプがど の機能を担っているかわからないので、どれをターゲットにするかの指標もない。このような状況ではあった が、とりあえず始めてみる上で選択的小分子リガンドを開発する利点として考えられたのは、時空間的に JAZサブタイプの機能を制御できるという元来のケミカルツールの利点に加えて、たとえ曖昧でもいくつか のサブタイプ選択的に結合するリガンドが複数開発できれば、それを用いて活性化できるJAZサブタイプの バリエーションは無限大になる可能性を秘めているという点である。一方、様々なJAZサブタイプの組み合 わせを、何の指標もなく同時に遺伝子改変するのは現実的に難しい(例えば3種類のJAZを同時に遺伝子 改変する組み合わせは<sub>13</sub>C<sub>3</sub> = 286通りにもなる)。サブタイプの様々な組み合わせを網羅的に解析し理解す るには、遺伝学的アプローチに加えて化学的アプローチが非常に有効な手段になると考えられる。

#### 3. ジャスモン酸共受容体サブタイプ選択的リガンドの設計開発

当初、上田研究室ではJA-Ileの構造ミミックでありCOI1/JAZ共受容体の強力なアゴニストである植物毒素 コロナチン(COR, 3, Fig. 2a)の全合成研究と、これに付随して得られるCORの立体異性体の生物活性評価 が行われ、興味深い結果が見出されつつあった10,11。CORはイソロイシン類似体である異常アミノ酸・コロナ ミン酸(CMA, 4)と、ジャスモン酸類似体であるコロナファシン酸(CFA, 5)からなるが、それぞれの鏡像異性 体も同様の合成ルートから合成され、それらを組み合わせた4種類の立体異性体を得ることができる(3、 ent3, 6, ent6, Fig. 2a)。これらを既存のCOII/JAZ9共受容体との結合評価法であるイーストツーハイブリッド 法(Y2H)で確認したところ、天然型のCORのみが結合することが示された。一方で、シロイヌナズナに投与 して応答を観察すると、3だけでなくent6が、微弱ながらジャスモン酸活性(生長阻害やアントシアニン蓄積 など)を示した。すなわちent6は、Y2HではCOII-JAZ9に結合しないか活性が弱いのに対し、その他のJAZ サブタイプと結合してジャスモン酸応答を弱く亢進することが示唆された。筆者はこのリード分子ent6の活性 を検証する段階から本プロジェクトに参画した。ただし、既存のCOII-JAZ共受容体へのリガンド結合能の 評価法は、Y2Hに加えて、それぞれの全長タンパク質を用いたプルダウン法など数例に限られていた。ま た化合物のサブタイプ選択性を議論するにはCOI1/JAZの全組み合わせのPPIを同時に評価する必要があ るが、全ての組み合わせを安定に評価できる例は当時なかった。その一つの要因として、JAZタンパク質が 不安定で扱いが難しいことが挙げられる。実際我々も全長JAZタンパク質によるプルダウンを行なってみた が、一旦単離すると失活することから、大腸菌ライセートのまま実験に供する必要があった。

そこでまず、13種類のCOII/JAZ共受容体全てのPPIを正確に評価する系の構築を目指した。着目したのは、唯一この共受容体で報告のあるCOII/JAZ1の共結晶構造の論文である<sup>5</sup>。この論文ではCOIIは全長タンパク質を昆虫細胞系で大量発現できるが、JAZ1は結合ドメインであるJas motifペプチドを用いていた。ペプチドであれば全てのサブタイプを安定に調整可能であると考え、まずはJas motifに蛍光色素を導入して、蛍光変化などでPPIを検出する系が構築できないか検討してみた。しかしいくつかの蛍光色素やリンカー長を試したものの、残念ながらPPIが起こったときに蛍光変化が検出できる系は見出せなかった。赴任してから研究が何も進んでいなかったので少々焦ったが、ここで導入していた蛍光色素であるOregon Green (OG) がanti-Fluorescein抗体でプルダウンできることを思い出して(浜地研でも利用されていた)、まずは蛍

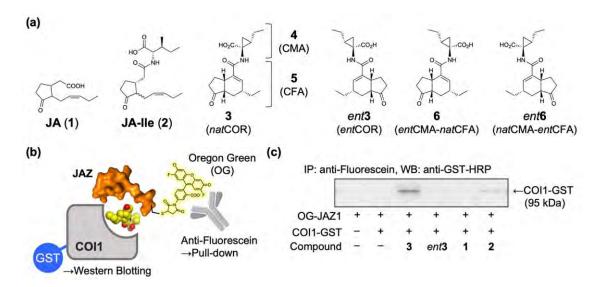


Figure 2. (a) JA, JA-IIe, 及び COR 立体異性体 4 種類の構造式. (b) COI1-GST/OG-JAZ の化合物によるプルダウン評価系の模式図. (c) JA 関連化合物の COI1-GST/OG-JAZ1 によるプルダウンの結果.

光変化による検出を諦め、プルダウン評価系に舵を切った(Fig. 2b)。これは想定以上にうまくいって、COII/COR/OG-JAZ1の三者複合体をanti-Fluorescein抗体で回収し、COIIに精製用として導入しておいたGSTタグの抗体で検出すると、非常に綺麗なバンドが検出された。このGST-COIIのバンドは、COII/JAZに結合することがわかっているJA-Ile(ここでは活性本体の(+)-7-iso-JA-Ileを5%含むジアステレオマー混合物を使用、Fig. 2a)でも弱く検出できたのに対し、結合しないent3や活性前駆体である1では検出できなかったことから、COII/JAZに結合するリガンドのPPI誘導能を正しく評価できることが実証された(Fig. 2c)。そこで、前述の4種類のCOR立体異性体を早速評価してみた。Jas motifを有する全てのOG修飾JAZペプチドとCOIIとのPPIを評価した結果、CORは全てと結合するのに対し、ent3は全く結合しなかった一方で、ent6は、COII/JAZ3、9-12の5種類の組み合わせでのみPPIを誘起することが判明した。すなわちent6は、in vitroで実際にJAZサブタイプと、ある程度選択的に結合するリード分子であった。

#### 4. ジャスモン酸共受容体サブタイプ選択的リガンドのin vivo機能解析

上記の結果から、ent6の選択性をさらに向上させることを目的として、COII/COR/JAZ1の立体構造を基にして、他のJAZサブタイプ(JAZ3,9,10,11,12の5種類)に対するin silicoドッキングスタディを行なった。計算科学の共同研究者のご助言なども踏まえて、まずはCOII/COR/JAZ1の構造からJAZ1の部分を他のサブタイプに変更し、MD計算によって構造を最適化したのち、リガンドを除いたアポ体に対してent6をドッキングさせ、さらにMD計算をかけて最安定構造を導き出し、3とent6との結合様式を比較した。その結果3はそのケトン部位でCOII/JAZ両側から水素結合を形成する

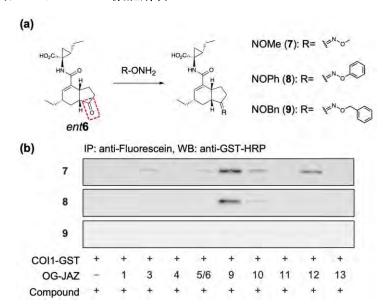


Figure 3. (a) In silico ドッキングスタディに基づいて設計した新規 リガンド **7–9** の構造式と, (b) **7–9** の COI1/JAZ サブタイプ選択性.

のに対し、ent6ではいくつかのサブタイプでCOII側もしくはJAZ側からの水素結合が消失していた (Fig. 3a)。そこでこのケトン基を足がかりに誘導体化した3種類のオキシム化合物7-9 (NOMe、NOPh、NOBn)を新たに合成し、これらのJAZサブタイプ選択性を評価した (Fig. 3a)。その結果、7 (NOMe)の選択性はent6とさほど変化せず、9 (NOBn) はどのJAZサブタイプにも結合しなかった一方で、8 (NOPh) はJAZ9と10のみに結合することが判明した (Fig. 3b)。

得られた化合物の植物個体での活性を評価したところ、さらに興味深い結果を得ることができた。まず典型的なジャスモン酸応答の一つである根の伸長阻害とアントシアニン蓄積について、1週齢のシロイヌナズナ幼植物を用いて評価したところ、3は無処理に比べて半分程度まで根長を短くするのに対し、ent6はその効果が減弱し、8はほとんど生長阻害活性が見られなかった。またアントシアニン蓄積でも同様の傾向が認められた。一方でマイクロアレイ解析の結果、3が引き起こす様々なジャスモン酸応答遺伝子のうち、ent6は約60%、8では約45%の遺伝子の転写を活性化していた。すなわちent6、および8は、そのJAZサブタイプ選択性に応じて、3の引き起こすジャスモン酸応答のうち一部を活性化しうることが示唆された(Fig. 3ab)。そ

の中でも、特に植物病原菌への毒素タンパク質であるPDF1.2の発現は、3よりも5倍以上に転写活性が亢進しており、この遺伝子の上流転写因子であるORA59にも同様の傾向が認められた。これらのことから、海外の共同研究グループにお願いして実際に病原菌への耐性試験を実施した。50 μMの溶液を2回投与する必要はあったが、5週齢の植物に事前投与すると、3と同様に8がアブラナ科に感染する病原菌(Alternaria brassicola)に対して耐性を示すことが明らかとなった。この週齢の植物体に対しても生長試験を実施すると、3の投与で優位に植物体が小さくなる一方、8はほとんど生長への影響が見られなかったことから、植物の生長抑制効果と病原菌耐性の効果を、この濃度で切り分けていることが示された(Fig. 3ab)。

この化合物8は、in vitroの解析によってJAZ9/10の2種類のサブタイプとの結合が見られたが、その生理活性は2種類のうちどちらを介するものかは定かではない。そこでそれぞれの変異体を用意して検証した結果、8によるPDA1.2及びORA59の転写活性化は、jaz9変異株でのみ活性が消失した。また過去の報告によると、ジャスモン酸の主要転写因子であるMYCと、PDF1.2の上流転写因子EIN3/EIL1-ERF1/ORA59の間にはクロストーク制御が報告されている12ことから、8の選択的な生理活性は、JAZ9を介してEIN3/EIL1-ORA59/PDF1.2のシグナル伝達を選択的に亢進すると同時に、MYCの下流遺伝子の発現をうまく抑制することで、生長抑制をあまり引き起こさないことにつながっていると考えられた(Fig. 4c)。このように、in vitroで精密に分子設計したJAZサブタイプ選択的アゴニストをケミカルツールとして利用することで、植物の生長と防御のトレードオフの関係を制御するだけでなく、病原菌耐性の応答に重要なJAZサブタイプの特定につなげることに成功した。

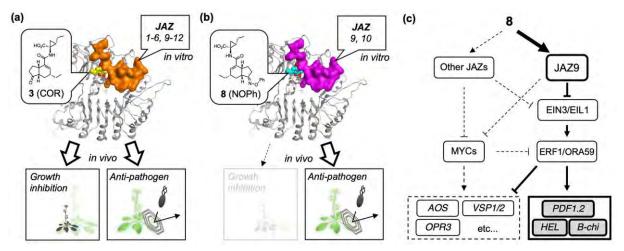


Figure 4. (a, b) 天然型 COR(3, a)及び NOPh (8, b)の JAZ サブタイプ選択性と、植物個体における活性の模式図. (c) 8 の選択的ジャスモン酸応答のシグナル伝達の様子.

蛍光修飾JAZペプチドを用いたプルダウンアッセイとin silicoドッキングスタディによって、4種類のライブラリーからJAZサブタイプ選択的アゴニストの構造最適化に成功し、その結果ジャスモン酸応答の一部を活性化でき、植物の生長と防御のトレードオフの関係を切り離すことにつながった。一方ジャスモン酸には、虫害に対する防御や、有用二次代謝産物の生合成など、植物免疫に関わる重要な活性が他にもある。それらの活性を選択的に引き起こす、あるいはそれぞれに重要なJAZサブタイプの同定には、さらに広範囲に化合物をスクリーニングする技術が必要であるが、プルダウンアッセイ系では物足りない。もともとこのペプチドは、そういった目的で蛍光変化によるCOII/JAZ間のPPIのハイスループット解析を目指していたが、前述のとおり頓挫していた。しかしこのプルダウンアッセイ系などを学会で当時4年生だった岩橋さんに発表してもらった際に、ある先生に「その系は蛍光異方性でも検出できるのでは?」と質問され、目からウロコが落ちた。確かにこのPPIは見かけの分子量変化が非常に大きいため(蛍光修飾JAZペプチドの分子量が

3,500 Da程度に対し、COIIとリガンドとの三者複合体形成後は約100,000 Daまで大きくなる)、蛍光変化が起こらなくとも異方性ならしっかり変化が検出できるはずであるし、これならプルダウンアッセイ系の問題点も克服できる。3月の学会の後、早速仙台に戻って機械をお持ちの学内の西澤先生にお願いして測定してみた。その結果、GST-COIIとOG-JAZ1に天然型3を添加したところ、3の濃度依存的に明確な異方性値の上昇が見られた。その後自前の機械も用意して、蛍光色素の構造やリンカー長を最適化することで、全

JAZサブタイプとCOIIとのPPIをプレートリーダーでも検出可能な感度のハイスループットスクリーニング系を構築できた(Fig. 5)<sup>13</sup>。当時質問していただいた先生に改めて感謝するとともに、学会発表もやはり大事であると再認識させられる経験だった。今後これを用いて類縁体の評価を行うと同時に、他の植物体への適用も視野に入れ、より有効なケミカルツールの開発に応用していく。

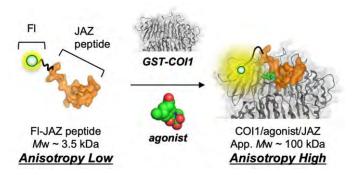


Figure 5. 蛍光修飾 JAZ ペプチドを用いた蛍光異方性による COI1/JAZ アゴニストの検出原理の模式図.

#### 5. あとがき

思い起こせばD2の頃に参加させていただいたのが、本研究会との最初の出会いでした。群馬県の水上温泉の旅館で、大の大人達が夜中まで研究を熱く議論し夢を語り合う姿に感銘を受けたり、自慢話に辟易したり、(一番大事なことは)自分のポスター発表を親身に聞いてもらって、相当に熱く議論を交わしてもらった経験はとても有意義でした。当時アカデミアか企業か、将来を少し迷っていた自分の背中を押してくれた大きな材料の一つになったと思います。学生からスタッフになって10年が経過したこのタイミングで、本レターに執筆させていただく貴重な機会をいただき、松浦先生に改めて感謝いたします。当時の先生方のように若手をエンカレッジする姿勢でいられるように、まずは自分の研究を大いに楽しむという初心に帰ることができました。また最後になりましたが、本研究は、東北大学理学研究科化学専攻・有機化学第一研究室で行われました。日々厳しくも温かいご指導をいただいている主宰者の上田実先生には、植物ケミカルバイオロジーという魅力的な研究分野に導いていただいて、大変感謝しております。具体的な研究では卒業生の岩橋万奈さん(2018年修士卒)、上田研スタッフの加藤信樹博士、石丸泰寛博士(現東北大院工・准教授)らにも大変お世話になりました。In silicoドッキングスタディは理研・齋藤大明博士(現北陸先端大・准教授)に、マイクロアレイ解析では理研・関原明博士、Bashir Khurram博士、田中真帆研究員に、植物病原菌の実験はスペイン国立研究所・Roberto Solano教授、Andrea Chini博士らに、異方性の測定では西澤精一先生、佐藤雄介先生(東北大院理)にご協力をいただきました。改めて御礼申し上げます。

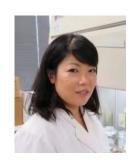
#### 参考文献

[1] Jiang, K.; Asami, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2018**, *82*, 1265. [2] Tan, X. *et al. Nature* **2007**, *446*, 640. [3] Murase, K.; Hirano, Y.; Sun, T.-P.; Hakoshima, T., *Nature* **2018**, *456*, 459. [4] Sheard, L. B. *et al. Nature* **2010**, *468*, 400. [5] Takaoka, Y., Uchinomiya, S., Hamachi, I. *et al*, *Chem* **2018**, *4*, 1451. [6] Takaoka, Y., Ueda, M. *et al. Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3654. [7] Thins, B. *et al. Nature* **2007**, *448*, 661. [8] Chini, A. *et al. Nature* **2007**, *448*, 666. [9] Fonseca, S. *et al. Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 344. [10] Okada, M. *et al. Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3065. [11] Ueda, M. *et al. ACS Cent. Sci.* **2017**, *3*, 462. [12] Song, S. *et al. Plant Cell* **2014**, 26, 263. [13] Takaoka, Y., Ueda, M. *et al. J. Biol. Chem.* **2019**, 294, 5074.

研究紹介

# 核酸非二重らせん構造と疾患の関わりを解析する

~非二重らせん構造による転写制御と 相分離形成機構を物理化学的に解明する~



甲南大学 先端生命工学研究所 (FIBER) 建石 寿枝 tateishi@konan-u.ac.jp

#### 1. はじめに

細胞内での核酸の役割は遺伝情報の保持だけにとどまらず、生体反応やタンパク質の機能や局在までも制御していることが明らかになりつつある。これらの核酸の新しい役割には、核酸の構造が密接に関係している。核酸の標準的な構造は、ワトソン・クリック塩基対から成る二重らせん構造であるが、核酸は非二重らせん構造(例えば、フーグスティーン塩基対から成る三重らせん構造や四重らせん構造など)も形成する '。非二重らせん構造を形成できる塩基配列は疾患関連遺伝子上に多く存在し、非二重らせん構造が形成されると転写・翻訳など遺伝子発現機構が高い効率で抑制される。そのため、非二重らせん構造の生体内での役割を解明するための研究が、世界的に行われている。筆者は、物理化学的手法により核酸構造を定量的に解析し、がんや神経変性疾患に関わる非二重らせん構造の細胞内における役割を解明する研究を遂行している。本稿では、最近のおもな研究成果を紹介する。

#### 2. 核酸の"構造"と周辺環境

核酸の標準的な構造は、二重らせん構造であるが、核酸は三重らせん、四重らせん等の非二重らせん構造も形成する(図 1)。米国 The University of Arizona Health Sciences の L.H. Hurley 教授らによって、がん遺伝子上での非二重らせん(四重らせん)構造の形成が、試験管内の実験において転写を阻害することが報告された  $^2$ 。その後、非二重らせん構造の形成が翻訳などの生体反応を阻害することも見出され、

細胞内での非二重らせん構造の役割が世界的に注目され始めた。さらに、英国University of Cambridge の S. Balasubramanian 教授は四重らせん構造に結合する抗体を開発し<sup>3</sup>、がん細胞内における四重らせん構造の形成が確認され、細胞内における非二重らせん構造の役割を解明する研究が加速された。

時を同じくして、甲南大学先端生命 工学研究所 (FIBER (Frontier Institute

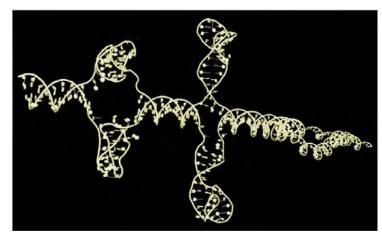


図 1. DNA 二重らせん中に形成させる非二重らせん構造。

for Biomolecular Engineering Research))でも所長の杉本直己教授を筆頭に、核酸の非二重らせん構造に注目した研究が遂行されていた。細胞内は、核などの細胞小器官やタンパク質によって込み合った分子クラウディング環境であり、このような環境は生化学的実験の標準的な溶液(100 mM NaCl を含む中性溶液)とは大きく異なる 4。杉本教授らは特に細胞内の分子クラウディングが核酸の構造や安定性に及ぼす影響を物理化学的手法により解析していた。筆者は、甲南大学理学部に在籍していた際に 4 回生から杉本教授の研究室に配属され、FIBER の中野修一先生、三好大輔先生(現甲南大学フロンティアサイエンス学部教授)とともに、博士後期課程修了まで、核酸構造と環境に注目した研究に携わった。FIBER では、中性高分子や糖などによって擬似細胞内(分子クラウディング)環境を構築し、核酸の構造安定性に及ぼす分子環境の効果を解析していた。その結果、擬似細胞内環境下では二重らせん構造が不安定化しず、非二重らせん構造が安定化することを見出した6。溶液の物理化学的特性(水の活量、誘電率、粘度変化など)と核酸の相互作用パラメータを解析した結果、溶液の水の活量変化に応じて核酸の安定性は大きく影響を受け、分子クラウディング環境下における核酸の安定性は、核酸や共存する溶質の水和状態によって予見できることが示された1。つまり、これらの研究成果は、細胞内でも核酸は分子クラウディング状態の変化に応じて、安定な水和状態の構造へ構造を変化させていることを示唆していた。

#### 3. 核酸とイオンの相互作用の重要性

核酸の構造が分子環境に応答して変化するという特徴は、細胞内でどのような役割を担うのだろうか。 筆者は、甲南大学で博士後期課程を修了後、化粧品や健康食品を取り扱う企業において、研究開発に携わった。その後、出産・育児のため退社したが、運よく甲南大学 FIBER に助教として着任することができ、再び細胞内における核酸構造の役割を解明するための研究活動を再開した。

そのころ筆者は、細胞内では、細胞周期や疾患発症等によるイオンチャネルの活性や発現量の変化によって、イオン濃度のバランスが変化していることに注目していた。核酸は骨格に負電荷を有するため、共存するカチオンの濃度によって、その構造安定性が大きく変化する。また、非二重らせん構造は、特定のカチオンと特異的に結合するため、共存するカチオンの種類によっても安定性が大きく異なる。例えば、三重らせん構造はMg<sup>2+</sup>、四重らせん構造はK<sup>+</sup>との特異的な結合によって安定化される。筆者はFIBERの

杉本教授と共に、イオンと核酸の相互作用に注目し、金属イオンや細胞内で浸透圧調節分子としてはたらく分子イオンと核酸の相互作用を解析した。従来、一般的な生化学実験が行われる標準水溶液ではワトソン・クリック塩基型 G-C 塩基対は A-T 塩基対より安定である。しかし、高濃度の塩化コリンやリン酸ニ水素コリン(水和イオン液体)を含む溶液中では、A-T 塩基対が G-C 塩基対より大きく安定化することを見出した 7。さらに、標準水溶液では形成できないほど不安定な三重らせんやi-モチーフ構造はコリンイオン共存下では安定に形成されるが、標準水溶液中で安定な四重らせん構造は大きく不安定化することがわかった 8.9。また、熱力学的解析による相互作用パラメータ、NMR および分子動力学計算の構造解析によって、この

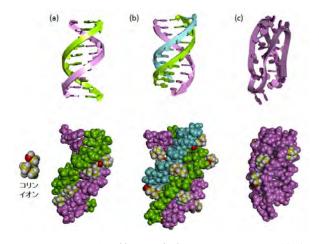


図 2. 分子動力学計算により解析したコリンイオンと核酸の相互作用 (a) 二重らせん、(b) 三重らせん及び (c) i-モチーフ四重らせん構造の結合様式。コリンイオンは核酸構造の溝やループの特徴的な構造を認識して結合する。このような結合は核酸の構造特異的な安定化に寄与している。

ような核酸構造の安定化は、コリンイオンの核酸の部位特異的な結合(溝やループ等)に由来することも見出している(図2)。また、核酸構造特異的な安定性の変化はアンモニウムイオン等その他の分子イオンでも誘発され、種々の分子イオンと核酸構造の親和性は、核酸構造と分子イオンの溶媒露出面積(SASA)によって決定されていることが示された。つまり、SASA を考慮することで、細胞内の核酸構造安定性を予見できることがわかった 10。従来、核酸の構造や安定性は、核酸の"塩基配列"に依存する相互作用(水素結合、スタッキング相互作用、構造エントロピー)によって決定されていると考えられていた。しかし、筆者らの研究成果から、擬似細胞内環境下では、核酸と水分子やカチオンとの結合などの"溶液環境"に由来する因子も核酸の構造や安定性を決定する重要な因子であることがわかった。

#### 4. 核酸の"構造"の役割を紐解く

#### 4-1. 非二重らせん構造は生体反応を制御する

DNA 二重らせん構造は、塩基配列によって、遺伝情報を保持する役割をもつ。一方で DNA の非二重らせん構造の形成は分子環境に大きく依存し、DNA 非二重らせん構造の形成は生体反応の変異を誘発しやすい <sup>11</sup>。 筆者らは、このような DNA 構造の特性に注目し、DNA の"構造"は、細胞内で遺伝情報の発現を"制御する"役割をもつのではないかという新しい仮説を立て、本仮説を証明する研究を遂行した。

異なる安定性の非二重らせん構造をもつ鋳型 DNA を設計し、非二重らせん構造が転写反応に及ぼす影響を試験管内の分子クラウディング環境下で解析した。その結果、非二重らせん構造は転写変異(転写量の抑制や転写配列の変異)を誘起することを見出した。一方で、通常は転写変異を誘起する非二重らせん構造でも、細胞小器官などの膜近傍では、その構造が不安定化され転写変異を誘起しないことがわかった。このような転写変異は鋳型 DNA 上に安定な非二重らせん構造 $(-\Delta G^\circ_{37}=8.2 \text{ kcal mol}^{-1} \text{以上})$ が形成されることで誘発されることが、物理化学的解析により明になった。つまり、複雑な分子環境下においても DNA の非二重らせん構造の安定性によって、転写変異が誘起されるかどうかを予測できることが示された。

そこで、実際の細胞 内の遺伝子発現に及ぼ すDNA構造の影響について解析を行った。細胞 のがん化やその進行に よって細胞内の化学環 境は大きく変化する(例、 K+濃度の低下、誘電率 の低下、特定のタンパク 質の過剰発現によるクラ ウディング環境の変化

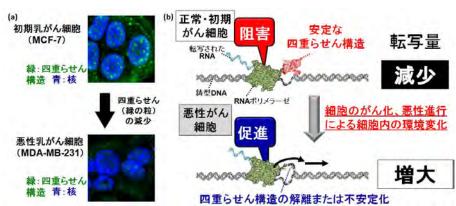


図3. (a) 共焦点レーザー顕微鏡による細胞内の四重らせん構造のイメージ。 (b) 細胞のがん化とその進行に応じて DNA 四重らせん構造によって制御される新規の遺伝子発現制御機構。

等)。そのため、転写変異を最も高い効率で誘発する四重らせん構造を対象に、がん発症と進行過程における細胞内の化学環境変化が、四重らせん構造と転写活性に及ぼす影響を解析した。四重らせん構造をもつ DNA から転写される RNA の産生量を正常細胞、がん細胞、悪性がん細胞内で比較した。その結果、四重らせん構造をもたない DNA と比べて、正常細胞内では四重らせん構造をもつ DNA から転写される RNA 量は少なく、四重らせん構造によって転写が抑制されていることが示された。一方で、がん細胞、悪性がん細胞中では、四重らせん構造をもつ DNA から転写される RNA 量が、がん細胞、悪性がん細胞の

順に増大することを見出した。さらに、四重らせん構造に特異的に結合する抗体(BG4)を用いた蛍光抗体 法を用い、細胞内における DNA 構造を共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。その結果、初期がん細胞内で形成されていた四重らせん構造は(図 3a、上段)、悪性がん化によって劇的に減少することも見出した(図 3a、下段)。細胞内の環境変化を解析するため、細胞内から K+を放出するイオンチャネル KCNH1 の発現量を解析した。その結果、KCNH1 の発現量は正常細胞、がん細胞、悪性がん細胞の順に増大した。つまり、四重らせん構造の安定化に寄与する K+濃度は、がん細胞内で低下していると推察された。本研究結果から、正常細胞では、がん活性化遺伝子上で四重らせん構造が形成され、転写が阻害されていることが考えられる(図 3b、上段)。一方で、悪性がん細胞では、四重らせん構造が不安定化され、がんを活性化遺伝子の転写が促進されると考えられる(図 3b、下段)。本研究によって、遺伝子中に形成された四重らせん DNA が、細胞のがん化やがん悪性化による細胞内の環境変化に応じて、がん遺伝子を活性化する新規のメカニズムが見出された 12。

細胞の表面には、細胞内のイオンの出入りを制御するイオンチャネルが多数存在し、細胞周期の制御やシグナル伝達、疾患発症に関与すると考えられている。筆者らの研究成果から、がん細胞だけでなく、イオンチャネルを介した一過的な細胞内のイオン環境変化が核酸の"構造"に影響を及ぼし、疾患発症を"制御"している可能性が示された。

#### 4-2. 非二重らせん構造は相分離形成を制御する

細胞内の重要な現象として、液—液相分離が注目されている。細胞内では相分離によって多様なタイ

プの液滴が作り出され、可逆的に形成、消失を繰り返している。液滴は、転写・翻訳 反応、タンパク質会合反応、アミロイド形成 反応など、多くの生体反応の反応場となる ことが知られており、液滴によるこれらの生体反応の制御機構が注目されている。近年、米国 Johns Hopkins University Baltimore の J. Wang 教授らは、神経変性疾患に関わる遺伝子から転写されたヘアピンや四重らせん構造の RNA が、液滴を形成することを見出した。これらの RNA は神経変性疾患細胞内で細胞毒性を示すペプチドとも相互作用することから、RNA の相分離と細胞毒性の関連性が議論され始めている 13。

神経変性疾患の細胞内は、細胞のイ

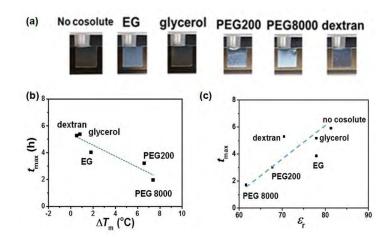


図 4. (a) 10 wt%クラウディング分子を含む溶液中における  $r(GGGGCC)_8$  の液滴形成。 $r(GGGGCC)_8$  の液滴形成速度の指標 となる  $t_{max}$  の値と(b) 四重らせん構造の  $\Delta$   $T_m$  値と(c) 10 wt% クラウディング分子を含む溶液の誘電率の値の比較。  $\Delta$   $T_m$  は クラウディング溶液中の四重らせんの  $T_m$  (融解温度) からクラウディング分子を含まない溶液中の  $T_m$  を差し引いた値である。

オンチャネルが不活性化しており、イオン環境は正常細胞と異なると考えられる。また、細胞毒性を示すようなペプチドの過剰発現や細胞の体積変化により、細胞内のクラウディング環境も正常細胞とは大きく異なる。 筆者らは、液滴を形成するような RNA 同士の会合においても細胞内の分子環境の変化が液滴形成に重要なのではないか、と考えた。そこで、リピート RNA 配列の相分離形成を分子クラウディング環境下において解析した。 まず、神経変性疾患に関連するリピート RNA r(CAG)<sub>8</sub>、r(CUG)<sub>8</sub>、r(GGGUUA)<sub>8</sub>、r(GGGGCC)<sub>8</sub>を用いて、リピート RNA の相分離機構を解析した。まず、CD スペクトルおよび未変性ゲル電気泳動によってリピート RNA の構造を解析した結果、100 mM KCI を含む緩衝溶液中において r(CAG)<sub>8</sub>と r(CUG)<sub>8</sub> はヘアピン構造を、r(GGGUUA)<sub>8</sub>と r(GGGGCC)<sub>8</sub> は四重らせん構造を形成することが示された。さらに、これらのリピート RNA を含む溶液の 350 nm の紫外線散乱強度を測定した結果、四重らせん構造を形成するリピート RNA は液滴を形成することが示された。さらに、r(GGGGCC)<sub>8</sub> の液滴形成をエチレングリコール (EG),平均分子量が 200 および 8000 のポリエチレングリコール (PEG200、PEG8000)、グリセロール、デキストランを添加した分子クラウディング環境下において解析した結果、クラウディング分子の添加によって液滴形成は促進されることがわかった。さらに、クラウディング分子の種類によって、液滴形成の速度が異なることも示された (図 4a)。そこで、これらの液滴形成速度の指標となる $t_{max}$ の値とクラウディング分子の添加による四重らせん構造の安定化の指標である  $\Delta T_{m}$ 値および溶液の物性変化(粘度、水の活用、共存溶質の排除体積や誘電率)を比較した。その結果、四重らせん構造の安定性と溶液の誘電率変化が $t_{max}$ 値と相関があることがわかった(図 4b、4c)。四重らせん構造が形成される際には  $K^+$ が G-カルテットに結合するため、溶液の誘電率の低下は  $K^+$ との相互作用に有利である。つまり、溶液の誘電率の低下による四重らせん構造の安定化が、RNA の液滴を促進することが示された 14。

液滴は外界と仕切る膜を持たないため、液滴内の RNA は、液滴表面で内外を迅速に行き来しており、液滴 自身も外部の刺激によって出現、消失、融合を繰り返す。 そのため、液滴はRNAやRNAと相互作用するタンパク質 などを適度に集合させ、適切な反応場へ運び、種々の反 応を制御しやすい環境場である。前述したように、核酸の 構造は周辺の分子環境(物性変化)によって大きく変化す る。液滴の形成は、π-πスタッキングやカチオン-π相互作用 が重要であると知られているが、核酸の構造に注目すると 二重らせん構造より、四重らせんなどの非二重らせん構造 は、π-π スタッキングやカチオン-π 相互作用を形成しやす い。細胞内の環境は細胞周期によって著しく変化するため、 細胞内環境変化に応答して核酸構造が変化し、液滴の形 成を介して生命現象をコントロールしている機構があると推 察される(図 5)。液滴は、神経変性疾患に関わるアミロイド 凝集の制御や転写の活性化にも関与することが報告され ているため、神経変性疾患の発症や進行に関しても核酸 構造が重要な役割を果たしているかもしれない。



図 5. 転写産物 RNA が構造を変化させ液滴を 形成する様子のイメージ。イオン濃度等の環 境変化に応答した RNA の"構造"は液滴の形 成・解離させることで、生体反応を制御して いるのかもしれない。

#### 6. さいごに~物理化学的視点から生命現象を解明する~

本稿では筆者らが所属研究所(FIBER)で取り組んできた研究について紹介した。研究を遂行するにあたり、筆者らは実験により得られた生命分子の興味深い挙動を物理化学的観点から相互作用レベルで解明することを試みている。物理化学的視点からの生命現象を解明することで、生命現象を一般的化でき、得られた知見から、生命現象を制御するための機能性分子を合理的に設計することができる。試験管内の実験では、核酸の水和状態や静電的相互作用によって核酸構造が制御されていることを示すことができた

19。 実細胞内での疾患に特有のタンパク質の発現変化やイオンチャネルの活性変化を考慮すると、やはり細胞内でも水の活量や誘電率が疾患の発症や進行に応じて変化し、核酸の"構造"を変え、生体反応が制御されていると筆者らは考えている。筆者らは、細胞内でも外部刺激に応じた物性変化を評価し、核酸の構造や機能変化との相関を解析しているが、細胞内の物理化学的パラメータの算出はとても難しい。何とか苦労して算出したパラメータを基に、論文を投稿した際には、査読者からもそんなに疾患の原因は単純ではない、との厳しいコメントをもらったこともある。しかしながら、核酸の構造変化を誘起する鍵を握る相互作用はシンプルであるはずで、その相互作用を解明することで生命現象の本質に迫ることができる。そのため、困難が伴っても物理化学的視点から生命現象を議論していこうと筆者は考えている。幸い筆者の所属するFIBERやFIBERが共同研究を実施している研究機関には物理化学的解析において協力を仰ぐことができる先生方が多い。物理化学的視点から生命現象を解明するという責務を全うすべく、工夫を重ね、先生方と連携し、強靱な東(fiber)となって、研究活動を展開していきたい。

#### 謝辞

本研究を遂行するにあたりご指導・ご鞭撻を賜りました甲南大学先端生命工学研究所(FIBER) 所長・教授 杉本直己先生に感謝申し上げます。本研究の一部は、JSPS 科研費(JP17H06351)"分子夾雑の生命化学"および JSPS 科研費(JP20H02864、JP20K21258 など)、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業、甲南学園平生太郎基金科学研究奨励助成金、公益財団法人内藤記念科学振興財団および資生堂女性研究者サイエンスグラント、公益財団法人川西記念新明和教育財団からの助成により実施されました。最後に、本稿の執筆の機会をいただきました鳥取大学工学部教授 松浦和則先生に深く御礼申し上げます。

#### 参考文献

- (1) S. Nakano, D. Miyoshi, and N. Sugimoto, Chem. Rev., 114, 2733-2758 (2014).
- (2) A. Siddiqui-Jain, C. L.Grand, D.J. Bearss, L. H. Hurley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**, 11593-11598 (2002).
- (3) G.Biffi, D. Tannahill, J. McCafferty, and S. Balasubramanian, *Nat. Chem.*, 5, 182-186 (2013).
- (4) S. B.Zimmerman and A. P. Minton, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 22, 27-65 (1993).
- (5) S. Nakano, H. Karimata, T. Ohmichi, J. Kawakami, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 14330-14331 (2004)
- (6) D. Miyoshi, H. Karimata, and N. Sugimoto, J. Am. Chem. Soc., 128, 7957-7963 (2006)
- (7) H. Tateishi-Karimata and N. Sugimoto, Angew. Chem. Int. Ed., 51, 1416-1419 (2012)
- (8) H. Tateishi-Karimata, M. Nakano, and N. Sugimoto, Sci. Rep., 4, 3593 (2014)
- (9) H. Tateishi-Karimata and N. Sugimoto, Nucleic Acids Res., 42, 8831-8844 (2014)
- (10) M. Nakano, H. Tateishi-Karimata, S. Tanaka, and N. Sugimoto, *J. Phys. Chem. B*, **118**, 9583-9594 (2014)
- (11) H. Tateishi-Karimata and N. Sugimoto, Chem. Commun., 56, 2379-2390 (2020)
- (12) H. Tateishi-Karimata, K. Kawauchi, and N. Sugimoto, J. Am. Chem. Soc, 140, 642-651 (2018)
- (13) A. R. Haeusler, C. J. Donnelly, G. Periz, E. AJ. Simk and J. Wang, et al., *Nature*, **507**, 195-200 (2014)
- (14) Y. Teng\*, H. Tateishi-Karimata\*, and N. Sugimoto (\*These authors contributed equally), *Biochemistry*, **59**, 1972-1980 (2020)

研究紹介

## 分子ロボットから人工細胞から オートマターへ

東北大学大学院工学研究科 ロボティクス専攻 野村 M. 慎一郎

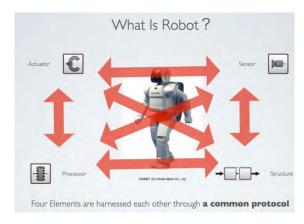
(SMNomura@tohoku.ac.jp)



皆さんこんにちは、野村です.この項では、私の手がけてきた分子ロボットの開発についてお話しします.いきなりですが、ロボットとは何でしょうか?一般的にはSpotやペッパー君のような大きなロボットを思い浮かべる方が多いと思います.しかしながら、ロボット工学の教科書では、外界の情報を受け取るためのセンサー、その情報を処理するためのプロセッサ、プロセッサで生成された信号で世界を変化させるためのアクチュエータ、これら3種のデバイスをひとつのボディに納めて統合された人工物のことをロボットとよぶ、と定義されています(右下図).つまり、自動運転車や惑星探査機、AIスピーカーなど、大型や人型でなくても、十分にロボットと言える人工物が、我々の暮らしの中から最先端の科学分野にまで活躍の場を広げています.

#### 分子ロボットを企画しよう:

さて、皆さんがタンスの隙間にコインを落としたとします。どうやって拾いましょうか?ピッキングツールが欲しくなりますね。それがさらにタンスの裏に回ってしまったら?タンスをどかすのでなければ、隙間を抜けられるような小さなエージェントが欲しくなります。ではコインがもっと小さく、隙間がもっともっと小さく複雑に迷路のようになってしまったら?物理学者リチャード・ファイマンは有名な1984年の講演で「底にはまだまだ余裕がある」と述べましたが、人間には見えないほどの、隠された迷路の奥でコインを探すため



ロボットを構成する要素と通信プロトコル.

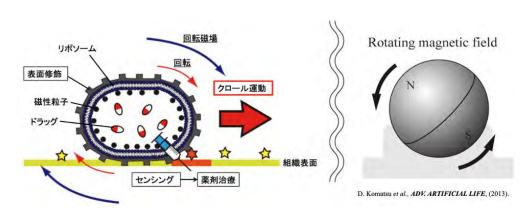
に必要になるのは、極微小のロボットです。コインでピンとこなければ、自然界の不思議はそもそも極微小のパーツでできていて、極微小の奥の奥に隠されていることがほとんどです。そんな場所を探査し謎に迫るためのロボットをつくるために、先ほど挙げたロボットの4つの要素は、どこまで小さくすることができるのでしょうか。

分子にがんばってもらいましょう。我々が使えるエネルギーの大きさを考えると、自在に物作りが許される最小の単位が分子で、そのサイズはオングストローム $(10^{-10}\,\mathrm{m})$ 、ナノメートル  $(10^{-9}\,\mathrm{m})$ を単位とする極小のものです。この研究レターのおもな読者でもあるはずの化学者という人たちは、

新たな分子を設計して作り世に送り出すことを使命としている錬金術師の末裔で、実に様々な分子 センサー、分子プロセッサ、分子アクチュエータを生み出しています. そして高分子・超分子化学 の進展により、分子でボディを編み上げることも可能になってきています. ではこれら分子デバイ スを組み合わせれば、最小のロボットができるのでしょうか?これがなかなかどうして、単に混ぜ 合わせるだけでは欲しいロボットはできません. それは超音波で分解したバクテリアが復活しない ことにも似ているでしょう.きちんと配線し,それぞれのデバイスが相互に利用可能な,情報通信 の共通言語(プロトコル)が整っていることが重要なのです。では、分子による情報通信プロトコ ルとは何でしょうか? 我々は、その通信に用いる分子としてDNAを選びました.とはいえ遺伝情 報として用いるわけではありません. 最近では分子生物学の発展のおかげもあり, ATGCの組み合 わせからなるDNAの配列が自在に設計できるようになり、そして素早く、安価(0.2 \$/base~)に合 成されるようになってきています. Ned Seemanの提唱したDNA構造ナノテクノロジーは, このよう に人工的に設計したDNA分子の塩基たちが、完全相補に組み合わされた安定な二重らせん構造を形 成するに至るまでの自由エネルギー変化を用いて、設計通りのかたちを生み出す技術です。また、 DNAの相補鎖形成反応は、溶液の中にある全ての配列の組み合わせの中から最安定な構造を総当た りで検証することから、これを用いてDNAスイッチ、DNA回路、そしてDNA分子コンピュータとす る研究も盛んに行われてきています. 我々は、DNA分子による計算反応をプロトコルとして、分子 センサー、分子プロセッサ、分子アクチュエータを、分子ボディの中に配線することで分子ロボッ トをつくりだせるにちがいないと考えました、どんな分子ロボットを?目標は、白血球です、白血 球は、バクテリアの放出する分子を認識し、その方位を定め、自ら移動してバクテリアを追跡し、 捕獲します、こうした一連のメカニズムが人工物として実現されれば、細胞に匹敵するような分子 ロボットが構築できたと言えるでしょう. このようなロボットは、将来的に人の手の届かない、顕 微鏡による観察すら困難なミクロ環境において、標的を認識し、操作したり排除したりするような 動作が可能になるにちがいありません. 我々はその, 自律的に運動する細胞サイズの分子ロボット 「アメーバ型分子ロボット」を組み上げる研究を続けています。天然細胞の完全コピーを目指すの とは異なる,スクラッチビルドな「コレジャナイ人工細胞」とも呼んでもらえそうです.

#### 分子ロボットをつくろう:

分子ロボットのボディとして、細胞と同様の大きさと構造をもつ脂質二分子膜のカプセル、マイクロメートルサイズの「リポソーム」を用います。水中のシャボン玉に相当する、割れやすくてやわらかい人工細胞膜です。まず考えたのが磁石で操作できる分子ロボットです(下図)。企画倒れで

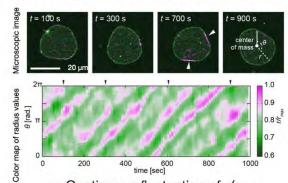


外部からの回転磁場で操作可能な分子ロボットの「企画」図.

造はしかし、ブラウン運動によるランダムな変形をするだけで、全体として運動することはありません。そこで、内部にアクチュエータを導入します。分子アクチュエータとして、モータータンパク質「キネシン」を採用します。この分子は、ATPをADPに加水分解する過程で得られるエネルギーを用いてレール状の剛直で長い細胞骨格タンパク質分子集合体「微小管」(直径25 nm、長さ数 μm以上)の上を二足歩行します。キネシンをガラス基板に並べて、その上に微小管を添加すると、ATPを消費してわらわらと滑り運動を行うことが観察されます。我々のアイディアでは、このアクチュエータを、リポソームの内部の膜に導入することで、内部から変形挙動を、ありていに言えば蹴っ飛ばさせることで、アメーバ運動の実現を目指しました。リポソームは通常、真球状をしています。

このリポソーム膜の内側にキネシンを固定し、その上で硬くて長い微小管をスライドさせることで、局所的に膜が押し出されて、ぐにやもあったと変形をしつづけるもの子デがあるには技術的な苦難が数をしたが、生物物理分野でメカニズムの駆動に上が、生物物理分野というメチュータの駆動によってボディがあるようになりました(右図). そのは約80分であり、微小管が折れて分解されるか、ATPが枯渇するかで

## 運動するアメーバ型分子ロボット



- Continuous fluctuation of r/r<sub>max</sub>
- A slant stripe pattern

#### Dynamic rotational shape change

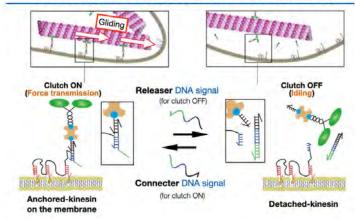
リポソームは内部の分子モーターと細胞骨格分子によって 変形動作を続ける. 回転方向はランダム [1].

運動は停止し、ボディは真球状に戻ります.

しかしロボットに重要なのはヒトの言うことを聞くこと,可制御性です. 勝手にぐにゃぐにゃと動く人工細胞のようなものを,人間の手でコントロールできるようにするにはどうすればよいでしょ

うか?バクテリアの一種である大腸菌は、餌を探す時に、ランダムな方向に泳ぐモードと、その場で停止するモードを切り替えます。餌のあるところにやってきたときに運動を止めることで、群れ全体としては餌の場所に集まってくるような挙動を示しているのです。これにヒントを得て、人工細胞の動きを、分子信号で止める/動かすための「センサ/プロセッサ」をデザインしました。注目したのはキネシンと膜を繋ぐ部分で、ここにDNAで「分子クラッチ」を設置します(右図)。車のエンジンとギアボックスをつなぐ本物の

#### クラッチ,それは機械系のDNAだ(標語風)



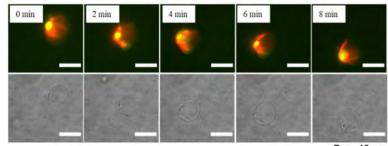
分子モーターと膜との結合/解離をおこなう分子クラッチは 人工 DNA 配列で構成されている[1].

クラッチと同様、分子クラッチが繋がっていると、モーターの力がボディに伝わり、クラッチが切れていると、モーターは空回りしてボディは動かない、というメカニズムです。その切り替えを、特定の配列をもつ「制御用DNA分子」の入力によって実現するように設計しました。企画段階から大学のえらい先生に「なんでオートマじゃないの?」とコメントされたことが思い出されます。本当は、外部から制御用DNA分子を取り込んで、その命令にしたがって動作すると最高にかっこいい人工細胞になるのですが、脂質膜越しにDNAを取り込ませる工夫には死屍累々であることを知っていた我々は、涙を飲んでずるをします。外部からUV光照射を行うと、制御用DNA分子が露出して運動が開始される、または運動が止まるシステムを、光応答性DNAとしてクラッチのON/OFFのために使うことで実現しました。まだ開始と停止は一方通行ですが、波長応答性の異なる分子を用いることで、大腸菌のように運動と停止を繰り返すことも可能になるでしょう。ここにいたって我々は、やっとアメーバ型分子ロボットのプロトタイプができたねと喜びました[1]。当時博士後期課程の佐藤さんの渾身のお仕事でした。海外のブログで「こいつらはターミネータ2の敵役をつくろうとしてやがる」と紹介されてちょっと可笑しかったのが思い出されます。ちなみにランダムながら最高速度は約320μm/hで、この「分子ロボット速度」という単位を世界ではじめて制定いただいたのは鳥取大学の松浦先生でした。

#### 分子ロボットに満足しないで居よう:

それでは、アメーバ型の分子ロボットが将来、白血球のように「賢く」振る舞うようになるために、足りないものは何でしょうか?まずパワーです。プロトタイプでは、膜の変形は実現できるものの、基材表面に付着ささせた本体を引っ張り、クローリング運動させるのに十分な出力は得られていません。試算では、少なくとも100倍のパワーアップが必要です。そこで我々は、より強力な力を得るために、モータータンパク質を強化することも検討しています。パワーで何をするのか。まず、考えられるのが、方向性を持った運動です。現在リポソームの中で、個々のアクチュエータが運動する方向はまるっきりランダムで、ボディ全体として動く方向は定まりません。そこで、アクチュエータを東ねることを考えます(右下図)。北大の角五先生らは、微小管アクチュエータに一本

鎖DNAを修飾し、その相補配列を含むDNA分子を添加することで、微小管が東になって運動することを見出しました[2]. この集団運動は、別のDNA分子の入力によって再びバラバラにすることが可能です。この、DNA分子の信号に応じて、微小管アクチュエータを東にして運動の向きを揃える、というシステムを、アメーバ型分子ロボ



Bars: 10 µm

微小管の集合により方向性をもつ運動を取り出そうとしている 通称「アメーバ2型」. 上が細胞骨格を染色した蛍光像.

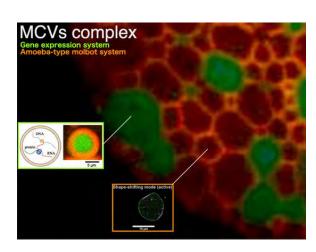
ットの内部に仕込むための研究を進めています.そして、このON/OFFの順番とタイミングをあらかじめプログラムしておくことができるDNA分子回路も動きはじめています.

次に重要な開発項目は、死屍累々のはずの、外部からの分子信号の入力です。白血球は、バクテリアの分子を局所的に入力することで、運動の向きを変えていると考えられています。アメーバ型分子ロボットの場合は、どうでしょうか?DNAクラッチ分子は現在、ロボット内部で800 nMという濃

度です。今これに、仮に外部から制御用のDNA分子が導入できたと考えてみましょう。DNAは油の膜に阻まれてしまい、疎水性の分子を修飾して直接刺したとしても、ほとんど、最大でも1 nM程度しか導入できません。信号が弱いのです。通常、欲しい信号が微弱な場合、皆さんはどうされるでしょう?そうです増幅です。特定の配列のDNA分子を、リポソーム内部で等温的に増幅できるようなシステムを埋め込みました。作者は人工アメーバを生み出したのと同じ、佐藤さんです[4]。さらにさらに、死屍累々にもめげず、分子を透過させる人工膜チャネルについても学生さんががんばって開発しています(現在投稿中です[3])。ものづくりへの情熱と意地と根性は分子の世界でいまだ絶えず、という実感がありますね。年に数回は目頭が熱くなります。

最後に、多細胞化です。よくできた人工細胞は、統合された分子デバイス群で構成される複合体そのものが自律動作し、その振る舞いをプログラム可能とする(たとえば群がる/散らばる、機能分化

する等) 化学システムとして構築されるようになるでしょう. そして,個々の力は小さくとも,相互に情報を交換し,適材適所で組織化されることで,巨視的な仕事をもこなせるようになるはずです. 我々はそんな人工物をオートマター(AutoMatter)と呼びはじめました. しなやかな機械応答を実現する分子集合体ソフトマター(SoftMatter)、それが物理法則に従いつつもいきいきと動くアクティブマター(ActiveMatter)、そしてはたらきを分子レベルからプログラム可能にした存在のオートマター、というわけです. 自動機械=Automataと引っかけているのは恥ずかしながら言うまでもありません. 投稿中のその多細胞プロトタイプ(Multi Cellular Vesicles、右上図)は刺



多細胞型の人工細胞/分子ロボットハイブリッド 構造. 全長は 1mm を超える.

激に応答して電気的なふるまいを示しています[5]. そして多細胞体がミリメートルスケールを越えて半自動的に合成される装置をいま学生さんが一生懸命つくってくれており、もうすぐ肉眼で見えるにちがいないとワクワクしています. だじゃれだろうがなんと呼ばれようが、プログラムにしたがい群れで動作する分子ロボット/人工細胞は、分子分解能で設計された自動機械がマクロな仕事やそのサポート業務へと進出するための重要な基盤技術となるでしょう.

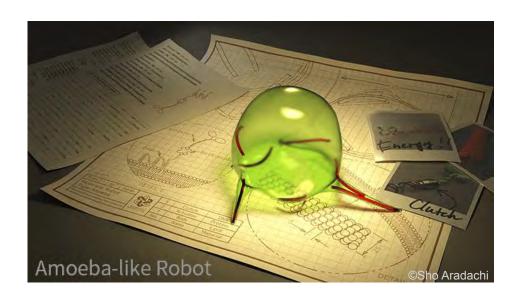
#### おわりに:

これらの研究がどうにかこうにか実を結び、より「賢い」「つよい」真の人工細胞と呼べるような機能と構造を手にすることができれば、タンスの裏のコインを取ってくるよりもさらに高度な難問に挑戦することができるでしょう。細胞と同じスケールで、しかし細胞の遺伝子発現系と直接干渉しないような回路で動く人工細胞は、直接全ての細胞の状態を観察することのできない人間に代わって、細胞の健康状態をモニタリングし、必要なケアを行うことができるようになるかもしれません。まだまだSFの片隅のような分子ロボット/人工細胞分野ですが、現在合成生物で盛んに行われている、細胞が用いるDNAやタンパク質などの分子機械を流用可能な形で開発が進められています。さらにDNA分子回路という、フリーの設計ソフトを使えば学部学生にも設計できる安価な技術を得て、自律的な、しかし細胞のそれとは異なる様式での運動が実現されるようになるかもしれません。

自然の進化から分岐した,プログラマブルな人工微粒子群は,今後のマイクロマシンの新たな分野 として広がってゆくことでしょう.

#### Reference:

- 1. Sato, Y. *et al.*, "Micrometer-sized molecular robot changes its shape in response to signal molecules." *Science Robotics*, 2(4), eaal3735, 2017.
- 2. Keya, J. J. *et al.* "DNA-assisted swarm control in a biomolecular motor system." *Nature communications* 9.1, **453**, 2018.
- 3. Iwabuchi S. *et al.* "Sealable Large Pore by DNA Origami on Lipid Membrane." *ChemRxiv*. Preprint. https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12814544.v1, 2020.
- 4. Sato, Y. *et al.*, "Isothermal amplification of specific DNA molecules inside giant unilamellar vesicles." *Chemical Communications.*, 55, 9084-9087, 2019.
- 5. Nomura, S.-i. M. *et al.*, "On Multicellular Lipid Compartments and Their Electrical Activity." *ChemRxiv*. Preprint. https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12129114.v1, 2020.



## 気になった論文

齋藤 雄太朗 (さいとう ゆうたろう) 東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻 助教 saito.y@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」の執筆機会をいただき、ありがとうございます。私は東京大学工学系研究科化学生命工学専攻・山東信介教授の研究室で次世代生体分子イメージングを実現する分子プローブおよび疾患治療や生命現象解明に資する生命制御分子の開発を行っております。

私は、この分野に参入する以前から「生命を制御する有機低分子」に強い憧れを抱いていました。一方、その代表ともいえる医薬分野では、創薬標的の枯渇が問題視され、バイオ医薬品へのパラダイムシフトが謳われて久しくなりました。また、バイオ医薬品の欠点を補うため、ペプチドや核酸が中分子という新しいモダリティとして盛んに研究され「低分子から中分子へ」という言葉がよく聞かれます。しかしながら、有機低分子の供給コストの低さ、化学構造の多様性、これまで培われてきた豊富な知見、生体安定性、投与方法の豊富さなどの点は、未だ他のモダリティに比べ圧倒的優位にあります。また、近年創薬標的として有力視されているタンパク質ータンパク質相互作用(PPI)の阻害は、小分子では難しく、抗体医薬や中分子でなければならないと考えられてきましたが、解析手法やクリーニング技術、計算科学などの目覚ましい発展に伴って、有機低分子PPI阻害剤が次々に報告されています。バイオ医薬から低分子医薬へのリバース・パラダイムシフトという言葉も以前にも増して耳にするようになってきました。今回は解析法やスクリーニング技術、計算科学を駆使し、フラグメントアプローチ創薬によってPPI阻害を有機低分子で達成した論文を2報紹介させていただきます。低分子医薬王政復古の予兆を感じていただければ幸いです。

Small molecule inhibitions of RAS-effector protein interactions derived using an intracellular antibody C. E. Quevedo, A. Cruz-Migoni, N. Bery, A. Miller, T. Tanaka, D. Petch, C. J.R. Bataille, L. Y.W. Lee, P. S. Fallon, H. Tulmin, M. T. Ehebauer, N. Fernandez-Fuentes, A. J. Russell, S. B. Carr, S. E.V. Phillips, T. H. Rabbitts, *Nat. Commun.* 2018, *9*, 3169.

従来、PPIは広いタンパク質表面で起こるため広い相互作用領域をもつ抗体が阻害に有利であるとされてきました。抗体は、細胞膜透過性が低く細胞内で起こるPPIを標的にすることはできないため、遺伝子操作により細胞内に抗体の結合に関与するフラグメントを発現させることで細胞内PPIを阻害するintracellular antibody fragmentアプローチが開発されました。この手法を用いることで、細胞内PPIを高選択的に阻害でき、対象となるPPIの役割の解明に大いに役立ちました。しかし、このアプローチをそのまま治療法として応用するのが困難であることは想像に容易と思います。一方、標的タンパク質と抗体フラグメントとの相互作用部位に結合する低分子は、PPI阻害剤として機能すると考えられます。

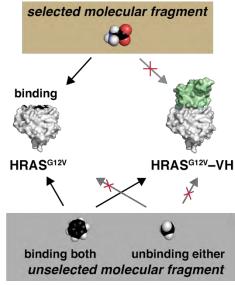
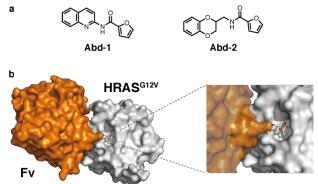


図 1. 抗体フラグメントを用いた低分子フラグメントスクリーニング

そこで、細胞内でPPI阻害剤として働く抗体フラグメン a トを低分子PPI阻害剤のスクリーニングに用いるという 戦略がとられました(図1)。

本論文のターゲットは、オンコロジー分野で特に注目を浴びるRASタンパク質によるPPIです。RASファミリータンパク質は多くのがんで変異が見られ、例えばアイソフォームの1つであるKRASでは、膵臓がんの大部分、大腸がんの約40%、肺がんの約30%で変異が認められます。著者らは、以前にHRAS、KRAS、



が認められます。著者らは、以前にHRAS、KRAS、 図 2. a) Abd-1 および 2 の構造. b) 変異型 HRAS に対する NRAS の 活性 化フォームに 選択的に結合する FvとAbd-2 の結合

intracellular antibody fragmentを開発し、RASエフェクター経路の阻害を達成しています。本論文では、この抗体フラグメントを用いるスクリーニング系により有望な低分子フラグメントを取得しています。具体的には表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて、HRAS<sup>G12V</sup>に結合する化合物を低分子フラグメントライブラリーから選抜し、その中から抗体フラグメントが予め結合しているHRAS<sup>G12V</sup>-VHには結合しない化合物を選定しました。その結果、Abd-1が最も有力な化合物として見出され、HRAS<sup>G12V</sup>に対する結合能の濃度依存性が確認されました(図2a)。続いて、水溶性向上のため、キノリン環をベンゾジオキサン環に変更したAbd-2がHRAS<sup>G12V</sup>-GppNHp および KRAS<sup>G12V</sup>-GppNHp に濃度依存的に結合することが見出されました。HRAS<sup>G12H</sup>-FvとKRAS<sup>G12V</sup>-Abd-2の共結晶構造を比較するとAbd-2が結合する領域はHRAS<sup>G12H</sup>-Fvの相互

作用表面と重複しており、抗体フラグメントによって Abd-2の結合が阻害されるのは抗体フラグメントによって結合部位が覆われるためであることが分かりました (図2b)。その後の構造最適化によりAbd-7~と導かれ 解離定数 $K_d$ は、Abd-2の235  $\mu$ Mから51  $\mu$ Mから51

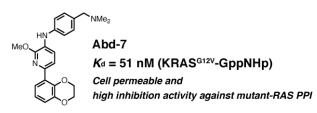


図 3. 最適化された変異型 RAS PPI 阻害剤 Abd-7

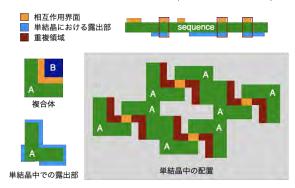
ナルであるAKTのリン酸化やERK1/2のリン酸化も抑制できることが確認されました。

Mining the PDB for tractable cases where X-ray crystallography combined with fragment screens can be used to systematically design protein–protein inhibitors: two test cases illustrated by IL1 $\beta$ -IL1R and p38 $\alpha$ -TAB1 complexes

C. Nichols, J. Ng, A. Keshu, G. Kelly, M. R. Conte, M. S. Marber, F. Fraternali, G. F. De Nicola, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 7559–7568.

近年、低分子によるPPI阻害が可能になった要因として、上記のような(1) フラグメント化合物によるアプローチの進歩、(2) 物理化学的解析による特異性評価の向上が挙げられます。これに加えて(3) インフォマティクスの進展も大きく影響しています。PPIはタンパク質同士の広い界面で緩く相互作用すると考えられてきましたが、ホットスポットを抑えれば阻害できることが分かってきたため、(1)-(3)を駆使することによって低分子でのPPI阻害がより実現されやすくなりました。本論文は、この(1)-(3)を組み合わせ低分子によるPPI阻害を達成しています。

フラグメントスクリーニングの手法として、タンパク質の結晶を取得し化合物溶液に浸し(ソーキングし)てからX線結晶構造解析を行うことで、結合部位を特定しながら化合物スクリーニングを行う手法があります。この手法には高度な測定・解析技術が必要ですが、技術の進歩によってその精度が飛躍的に向上しました。このスクリーニングは一般的に酵素の活性ポケットに結合するフラグメントのスクリーニングに用いられますが、著者らはこのアプローチをPPI阻害剤に適用しようと考えました。しか



重複領域を有する結晶を選別 → この部位に結合するフラグメントをスクリーニング

図 4. in silico スクリーニング解析の概要

し、酵素ポケットの場合と異なり、タンパク質表面に結合するフラグメントを見つけるためには、標的となる PPI表面が結晶格子中で露出し候補フラグメント化合物がアクセスできなければならないという制約があります。そのため、著者らはタンパク質データバンク(PDB)からバイオインフォマティクスを用いて、このアプローチに適した標的を選定することにしました。タンパク質Aとタンパク質Bの共結晶データから、そのPPI界面においてタンパク質Aの単結晶構造中で露出している領域と重複する領域が存在するものを候補として選出しました(図4)。選出された400の候補のうち、サイトカインIL1βとその受容体IL1Rおよび分裂促進因

子活性化キナーゼp38αとTAB1の相互作用の2つを 今回の対象としました。p38α-TAB1相互作用は、虚 血再灌流障害の治療標的としてすでに研究が進んで おり、p38αのATP結合部位に結合する阻害剤が開発 されていますが、皮膚および肝臓への毒性によって 開発中止となっています。そのため、ATP結合部位以 外に結合するp38α-TAB1阻害剤があれば、副作用を 生じない新薬として期待できます。著者らは上記の手 法によって、報告されているp38αの結晶構造がこのス

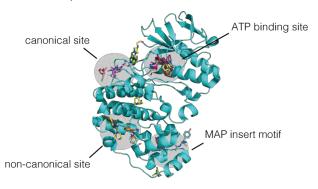


図 5. 各フラグメントの結合部位

クリーニングに適していることに着目し、フラグメントスクリーニングを行いました。その結果、ATP結合部位を含む4つのリガンド結合領域があることが分かりました(図5)。さらに、この中でnon-canonical siteはF1, F2, F3の3つの領域に区分することができ、in silicoスクリーニングも併用することでadamantylguanidinomethane (1)がF1部位に、N-(2-pyridyl)succinimide誘導体(KCL802)がF2部位に結合することを見出しました。これら2つのフラグメントを構造最適化しながら適切なリンカーで架橋することによってKCL1088を開発しました

(図6)。各々のフラグメントは結合力が等温滴定カロリメトリー(ITC)が測定できなかったのに対し、リンカーで架橋したKCL1088はITCが測定可能で、 $K_d$ が約25  $\mu$ Mと算出されました。

以上、本稿では小分子によるPPI阻害剤開発の例を2つ紹介しました。ひと昔前は「低分子ではPPIは阻害できない」と考えられてきましたが、その認識は今や変わりつつあります。一方で、低分子のみでできることも限られているのは事実で、1つ目に紹介した論文のように、抗体医薬や中分子の開発とともに互いの技術や知見を組み合わせながら、新しい医薬の開発を進めていくことが最も良い方法だと思われます。また、固定観念に囚われず絶えず新しい技術を取り入れて研究開発をしていくことも重要であると言えます。

図 6. KCL1088 の開発

## 気になった論文

國枝 一輝 (くにえだ かずき) 京都大学大学院工学研究科 ERATO 浜地ニューロ分子技術プロジェクト 博士研究員 kunieda.kazuki.4a@kyoto-u.ac.jp

この度は、生命化学研究レター"気になった論文"の執筆機会を頂きまして、心より感謝申し上げます。私は2019年3月に名古屋市立大学大学院薬学研究科薬化学分野で中川秀彦教授のご指導のもと博士号を取得し、現在は京都大学工学研究科浜地格教授、野中洋特任准教授に師事し、分子夾雑環境下、とりわけ脳内においても理想的に機能する有機化学の開拓と、それを用いた内在性タンパク質のラベリングやイメージング観察を実現する分子ツールの開発に取り組んでいます。そのための戦略の1つに分子同士の近接および濃縮があります。本稿では"近接"をキーワードに内在性タンパク質を制御し、proximity pharmacology もしくは proximity therapy に繋がることが期待される方法論を3つ(4報)紹介します。

#### Lysosome-targeting chimaeras for degradation of extracellular proteins

Steven M. Banik, Kayvon Pedram, Simon Wisnovsky, Green Ahn, Nicholas M. Riley, Carolyn R. Bertozzi *Nature*, **2020**, *584*, 291-297.

従来のタンパク質を標的とする低分子医薬品の多くは、酵素の基質認識部位や受容体のリガンド結合部位を阻害し、"活性を喪失させる"ことで機能します。それに対し近年ケミカルノックダウンと呼ばれる生体が備えるタンパク質分解機構を利用する手法が注目を集めています。PROTACs や SNIPERs などと称されるこれらの手法は、低分子リガンドの結合サイトを持たず undruggable な標的と考えられてきた転写因子などへの適用も期待されています。しかし、これらの手法で利用する分解機構は細胞内で機能しており、細胞外や細胞膜に存在するタンパク質を標的とすることはこれまで困難でした。細胞外や細胞膜に存在するタンパク質はがんや自己免疫疾患など病態との関連が深く、選択的な分解が可能となれば人類の健康に大いに資すると期待されます。今回、Bertozzi らは細胞表面に存在しタンパク質をリソソームへ輸送するlysosome-targeting-receptor (LTR)と、細胞外もしくは膜関連タンパク質の双方と相互作用するよう設計したLYTACs というキメラ分子を合成し、標的タンパク質の内在化とリソソーム分解の誘導を達成しました。LTR

にはマンノース-6-リン酸 (M6P) からなる糖鎖を標的とするカチオン非依存性マンノース-6-リン酸受容体 (Cl-M6PR) を用いました。一方、基質となるM6P には加水分解耐性の低さとマンノース受容体を介する内在化が懸念されたため、生

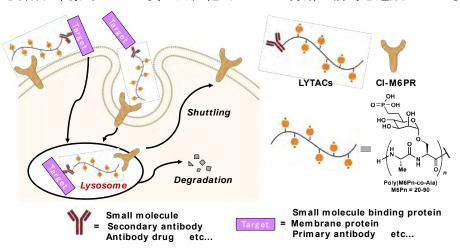


図1. LYTACsの作動原理およびMPnの化学構造. (論文より一部改変)

体内での利用を志向しセリン-*O*-マンノース-6-ホスホネート (M6Pn) から成るポリペプチドへと変更し、CI-M6PR を CI-M6PR のリガンドとして用いる工夫を施しています。

著者らはまず、poly(M6Pn) に小分子リガンドのビオチンと蛍光色素修飾したビオチン結合性タンパク質を用い、LYTAC により標的タンパク質がリソソームに移行する様子を共焦点顕微鏡で観察しました。次にこれらを FACS および CRISPRi Screening と組み合わせ、LYTACs の機能には細胞表面からリソソームへのエンドサイトーシス経路が重要だと明らかにしました。その後 anti-mouse IgG 抗体に M6Pn を conjugation した LYTACs を用い、抗原 (mCherry) に結合した一次抗体 (mouse anti-mCherry) の取込を細胞レベルで確認し、可溶性タンパク質にも適用範囲を拡張しました。ここで神経変性疾患関連タンパク質の ApoE4 に対するデモンストレーションも行い、新たな治療戦略に繋がる可能性を示しています。最後に、膜タンパク質の分解へと応用しました。EGFR や PD-L1 など FDA に認可された抗体がある場合には直接 M6Pn を導入し、抗体医薬品がない CD71 に一次抗体を利用するアプローチでこれらがん関連膜タンパク質の分解が誘導されることを western blotting で確認しました。このように LYTACs は既存の技術では不可能な疾患関連分泌タンパク質や膜タンパク質を選択的に分解可能かつ高度にモジュール化された新たな分子ツールと言えます。LTR を拡張し in vivo まで進展した続報が既に ChemRxiv に掲載されており、今後一層注目される技術へと昇華していくことに疑いの余地はありません。

#### Phosphorylation-inducing chimeric small molecules

Sachini U. Siriwardena, Dhanushka N. P. Munkanatta Godage, Veronika M. Shoba, Sophia Lai, Mengchao Shi, Peng Wu, Santosh K. Chaudhary, Stuart L. Schreiber, Amit Choudhary, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 14052-14057.

#### Heterobifunctional molecules induce dephosphorylation of kinases-a proof of concept study

Sayumi Yamazoe, Jeffrey Tom, Yue Fu, Wenqiong Wu, Liang Zhen, Changlei Sun, Qi Liu, Jie Lin, Kui Lin, Wayne J. Fairbrother, Steven T. Staben, *J. Med. Chem*, **2020**, *63*, 2807–2813.

ヘテロ二機能性低分子化合物の用途 は LYTACs や PROTACs など標的分子 の分解を誘導する手法にとどまりません。 Choudhary および Staben らは近接させる タンパク質をリン酸化酵素あるいは脱リン 酸化酵素に変更することで、標的タンパ ク質のみに翻訳後修飾 (Post-translational modification, PTM) を施すことが可能な分子ツールを開発し ました。PTM はタンパク質の高次構造や 安定性の変化を惹起し、活性や局在性、 生体分子との相互作用などを制御するこ とで細胞内シグナルネットワークなど生 命機能の制御に重要な役割を果たして います。このような PTM を司る酵素はヒト のプロテオームのおよそ 5%存在し、 PTM の異常や破綻はがんや自己免疫

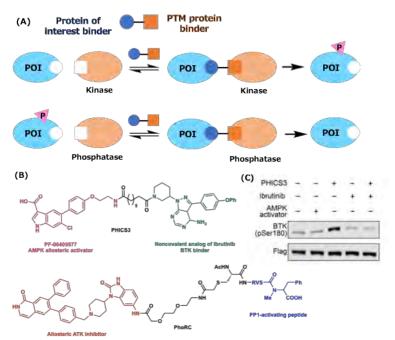


図2 (A) 翻訳後修飾を誘導するキメラ分子および近接駆動型標的タンパク質のリン酸化・脱リン酸化のイメージ図. (B) キメラ分子 (PHICS3: for phosphorylatin, PhoPC: for dephosphorylation) の化学構造. (C) 細胞内におけるPHICS3によるBTKのリン酸化の検証. (論文より一部改変)

疾患、神経変性疾患などの疾病にも深く関与しています。PROTACsも標的タンパク質に対しPTM の一種 ユビキチン化を施しプロテアソームによる分解へと導いていることから、同様の分子設計で他の PTM を標 的タンパク質に施すことが可能と考えられます。

そこで2つの研究グループは標的タンパク質の阻害剤とkinase (AMPK, PKC) もしくは phosphatase の活性化剤とを繋いだ化合物 (phosphorylation-inducing chimeric small molecule, PHICS; phosphatase recruiting chimeras, PhoRCs) を設計・合成しました。 In vitro での機能評価の結果、これらの化合物はそれぞれの kinase や phosphatase の基質かどうかに依らず、標的タンパク質へのリン酸化および脱リン酸化を誘導しました。 BRD4を標的とした PHICS では報告例のない位置へのリン酸化も、BTK が標的の PHICS ではシグナル伝達に関与する位置へのリン酸化が進行することを western blotting で確認しました。 PhoRCs には現状優れた低分子リガンドがなく Halo Tag (遺伝子操作が必要) およびペプチド (膜透過性、加水分解への安定性が懸念)を用いていますが、キメラ分子で phosphatase をリクルートし脱リン酸化が促進されることを初めて実証しました。 PHICS, PhoRCs 共に今は in cell の段階で proof-of-concept の域であり、今後安全性や ADMET など医薬品として満たすべき基準は多数あると思われます。しかし、本年 Arvinas 社のPROTAC、ARV-110が第1相臨床試験で有効性が認められた事実を踏まえると、ユビキチン化以外の生体内が備える PTM を利用した proximity pharmacology および proximity therapy の実現は十分期待してもよいものと思われます。

#### Developing covalent protein drugs via proximity-enabled reactive therapeutics

Qingke Li, Qu Chen, Paul C. Klauser, Mengyuan Li, Feng Zheng, Nanxi Wang, Xiaoying Li. Qianbing Zhang, Xuemei Fu, Qian Wang, Yang Xu, Lei Wang, Cell, 2020, 182, 85–97.

Covalent inhibitor は標的タンパク質と共有結合を形成するため、従来のnon-covalent な医薬品と比較し、標的タンパク質の完全な不活性化による薬効の増強や作用時間の延長、投与量および回数の減少などの望ましい特徴を有します。現在、上市されている酵素を標的とする医薬品のおよそ 30%がこの共有結合形成を作動原理としており、非共有結合型医薬品では困難な標的への適用も増えつつあります。このように

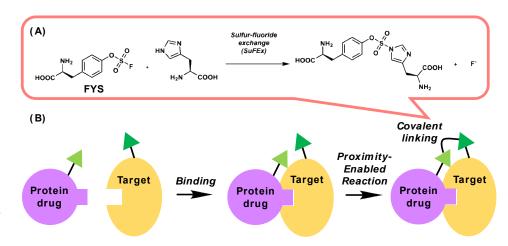


図3 (A) 本手法で利用するFSY-His間の共有結合形成反応. (B)共有結合性タンパク質医薬品の作動原理 (論文より一部改変)

能なモダリティとして期待されています。

今回、Wang らは programmed cell death protein-1 (PD-1) および Z<sub>HER2</sub>という affibody に自身が開発した 近接駆動型の化学反応性非天然アミノ酸 fluorosulfate-L-tyrosine (FSY) を遺伝的に導入し、タンパク質 医薬品へと誘導しました。 標的タンパク質に対する親和性を保持するために PD-1 のエクトドメインおよび

Z<sub>HER2</sub>の結合表面を FSY の導入部位に選定し、タンパク質医薬品と標的タンパク質の近接効果により FSY と標的タンパク質のアミノ酸側鎖でのみ反応が進行することを期待しました。Western blotting やフローサイトメトリーで評価した結果、PD-1 に FSY を導入した PD-1(FSY) は *in vitro*, がん細胞表面, *in vivo* で PD-L1 と選択的に共有結合を形成するだけでなく、WT の PD-1 と比較して T 細胞やキメラ抗原受容体 T 細胞の活性を向上させヒト免疫系モデルマウスにおいても腫瘍の増殖を著しく抑制しました。PD-1 同様に、affibody の Z<sub>HER2</sub>でも *in vivo* で機能することも確かめられており、既存の抗体や nanobody など種々のタンパク質に適用することで、theranostics やイメージング、一細胞解析への応用が期待できます。特筆すべきは、ヒト PD-L1 の PD-1(FSY)と反応するアミノ酸 His69 が Ala69 に置換されたマウス PD-L1とは共有結合を形成しなかったことで、非特異的な相互作用があっても反応可能なアミノ酸がなければ共有結合形成反応は進行しない点は夾雑環境下における有機化学にとって非常に魅力的な戦略だと思います。Proximity-enabled reactive therapeutics (PERx)と称される本戦略はあらゆる相互作用タンパク質を共有結合型タンパク質医薬品へと変換する極めて一般的な技術になりえ、創製された共有結合型タンパク質医薬品を利用することで生命科学研究や疾患治療などが一層発展、拡充されることが期待されます。



## カリフォルニア大学アーバイン校 留学体験記

#### 名古屋大学大学院理学研究科 稲垣 雅仁

inagaki.masahito@a.mbox.nagoya-u.ac.jp



#### はじめに

名古屋大学大学院理学研究科(阿部研究室)で研究員を務めております稲垣雅仁と申します。私は、2019年3月に東北大学理学研究科・和田健彦先生のもと博士号を取得し、2019年4月から2020年3月まで同研究室にて博士研究員を務めておりました。その間、2019年10月から2020年2月までの5ヶ月間をカリフォルニア大学アーバイン校で研究を行う機会をいただきました。本稿では、留学に至った経緯から現地での生活までを留学体験として報告させていただきます。本稿を通じて、少しでもこれから留学を予定している・興味を持っている方々の参考になれば幸いです。

#### 留学に至った経緯と渡航先確定まで

学生時代から海外留学に興味を持っており若いうちに一度は留学を経験し、英語での十分なコミュニケーション能力を身に付けたいと考えておりました。そのような状況の中、幸いなことに博士後期課程3年目から日本学術振興会(JSPS)特別研究員のDC2として採用していただいたことをきっかけにそのサポートのもと留学を決意しました。学振DC2の一年目は学位取得に集中するため、引き続き和田研究室での研究を継続していました。学位取得後、DC2をPDに資格変更し、その二年目を利用し、留学することを決意しました。学位取得後すぐに論文や研究室ホームページから興味深い研究室を15件ほど選定し、その中から5研究室を厳選し、メールアポイントをとることにしました。1件目はドイツにある研究所の教授にアポイントをとってみましたが、返信をいただけませんでした。その後、2件目に本留学においてお世話になることになったカリフォルニア大学アーバイン校のJohn Chaput教授にアポイントをとったところ、メールを送って約4時間後に受け入れ承諾の返信をいただき、無事に渡航先を確定することができました。

#### カリフォルニア大学アーバイン校

カリフォルニア大学アーバイン校(University of California-Irvine, UCI)は、ロサンゼルス国際空港(LAX) から車で1時間ほどの場所に位置しています。キャンパスは住宅地の中にあり自然豊かな美しいキャンパスです。車がないと少々不便ではありましたが、大学近くにスーパーなどがあり、バスや自転車を使えば問題なく生活はできました。アメリカは治安が良くないイメージがありましたが、アーバインに関しては日本と同じくらい治安が良いと感じました。UCIのキャンパスは、キャンパス名物の一つであるAldrich Parkを中心として、その公園の周りを囲むようにして円形に各建物が並んでいます。キャンパス中心のAldrich Parkでは多くの人たちがスポーツ、読書、ディスカッションなどを楽しんでおり、都会から離れ自然豊かで非常に落ち着い

た環境でした。私も実験の待ち時間に研究室メンバーとともにコーヒーを片手に研究のディスカッションや 将来の目標などを語りあい、とても有意義な時間を過ごせました。

#### John Chaput研究室での研究

John Chaput研究室では、主に有機合成、分子生物学、構造生物学からなる三つのサブグループに分かれ人工/修飾核酸の合成、ポリメラーゼ改変と人工/修飾核酸導入アプタマーの開発、ポリメラーゼおよび核酸のX線結晶構造解析に取り組んでいました。私は学部時代から博士課程まで一貫して核酸関連化合物の有機合成を行ってきたため、John Chaput研究室でも有機合成のグループに配属されました。John Chaput研究室でも有機合成のグループに配属されました。John Chaput研究室はさほどメンバーが多くなく(15人程度)、実験室はいくつかの研究室で広い部屋を共有するスタイルでした。分子生物学・構造生物学のグループはMcGaugh Hallという建物で活動しており、John Chaput教授のオフィスと私の所属していた有機合成グループは建物が異なり、Natural Science Iというところにありました。有機合成グループの実験室は研究科長のRichard Chamberlin教授、Robert Spitale教授の研究室メンバーとスペースを共有していました。とても広いドラフト・実験台・デスクを一人一つづつ使うことができ広々としていてとても実験しやすい環境でした。研究環境において特に日本との違いを感じたこ



バイオ系の実験室がある McGaugh Hall



有機合成系の実験室がある Natural Science I

とは、実験室が共通ということもあり他の研究室のメンバーとの壁が全くなく装置や試薬の貸し借りが自由であることです。大学内の全研究室の所有している試薬が全てデータベース化され管理されており、web上で調べることができました。また、他の研究室のメンバーと同じスペースで研究を行うことにより所属する研究室だけでなく他の多くの人たちと交流でき、積極的にディスカッションすることにより新しいアイデアや問題解決のヒントをくれることが最も大きなメリットだと感じました。



左から、Natural Science I 内にある有機合成系の実験室、私が使用していたドラフト、二人でシェアしていたドラフト (写真ではあまり分かりませんがドラフトは日本のものと比べてかなり広いです)

John Chaput研究室では、ミーティングが週に3回ありました。毎週月曜日にサブグループミーティングがあり、グループごとにJohn Chaput教授のオフィスに集まり各々一週間の実験内容・進捗状況とその週一週間の予定を発表します。毎週水曜日には、Richard Chamberlin教授を中心としてDepartment of Pharmaceutical Scienceの有機合成系研究者と学生が集まり、合同ミーティングが開催されます。ここでは毎週ローテーションで担当者がテーマを設定し、有機合成の勉強会(反応機構など)、最新論文の紹介、自身の研究成果紹介、研究で何か問題があった場合にはその問題解決に向けたディスカッションを行い解決を目指す、など様々なことを行っていました。木曜日には、研究室全体でのMonthly reportが開催され、

メンバー全員が毎月一回まとめ報告を行います。これらミーティングでは多くの場合、軽食と飲み物(アルコールもたまに有り)が配られとても明るい雰囲気の中、活発なディスカッションが行われました。

John Chaput教授は、いつも情熱的でお忙しいなか毎日必ず実験室に来てくださり、「How are you doing? What are you doing?」と話かけてくれました。その時に、今やっている実験内容や得られた結果などを尋ねられます。私は、John Chaput教授が実験室に来られる際に毎回必ず何か新しい知見を得て何かしらの進捗を報告するように努めました。そのおかげか、次第に話かけられる頻度が多くなり新しい研究テーマや私の意見を求められたり、自分の研究テーマ以外のお仕事を任せられたりしました。さらに、他大学や企業との共同研究メンバーにも入れていただき、共同研究サンプル合成や共同研究先企業との打ち合わせなどにも参加させていただきました。まだ研究を始めて数ヶ月しかたっていない上に英語能力も乏しい状態での現地企業の方々の前でのプレゼンは非常に緊張しましたがこれまでに無い良い経験でした。

他の研究室と実験室を共有している関係で、他の研究室のメンバーとも非常に密に交流させていただくことができました。その中でも特にRobert Spitale教授は、実験室に来られた際にいつも励ましの言葉をくださりました。また、ジョークだとは思いますが「Johnの研究室での仕事が終わったら、今度はうちの研究室に来ないか?」などと言ってくださりました。Dr. Michael Arnoldは、研究面はもちろん生活面でも大変お世話になり、彼の影響を大きく受けました。彼は、自分一人でいくつも化学プラントを稼働させ、そのマネージメントをしておりビジネスパートナーと会社を経営しつつ、UCIにも自身の実験スペースがあり早朝から深夜までよく一緒に実験しました。プラントの設計図・構造や彼のビジネスのことについてたくさん教えてくださり、アカデミアでの研究成果をどのようにしてビジネスに繋げるかについて学びました。また、毎日のように美味しいコーヒーをいれてくれ、一緒にコーヒーを飲みながら実験をしていたのは良い思いでです。留学の期間が短いため実験成果を急いでいた私に彼が言ってくれた、「化学研究は常にStep-by-stepなんだから、焦らずやろう」という言葉は、先を急ぎがちな自分に対して今でも思いだし言い聞かせることがあります。

#### カリフォルニア州アーバインでの生活

アーバインは一年を通して温暖な気候で私が滞在した期間中12月~1月は、朝晩は冷え込むことがありましたが、日本ほどの冬の寒さはなく昼間は半袖でも快適に過ごすことができました。雨もほとんど降ることはなく常に快晴で気持ちよく過ごせました。日本とは違い湿気が少なく、有機合成実験を行う場合には脱水溶媒を使用しなくても禁水反応がとても綺麗に進行することに感動しました。

私は大学の比較的近くのアパートを借りることができたので現地で購入した自転車で大学まで通いました。自転車で片道30分ほどかかりましたが、天気が良く自然豊かな環境でしたのでさほど苦にはなりませんでした。アパートでは中国人の学生と一緒にルームシェアをしていました。彼はUCIの英語コミュニケーションの学部に所属しており私とは10才近く歳が離れており弟ができたような気分でした。日本の大学院で博士号をとってUCIに研究をしにきたという話をしたら、「すごい!」と言ってとても興味を持ってくれ、わからないなりにも私の研究内容を理解しようと色々と聞いてきてくれました。まだ若く全くバックグラウンドが違うにもかかわら



キャンパス内のスターバックスでのカフェタイム(筆者は最左側)



有機合成系ポスドクメンバーで ハイキングに行きました(筆者は 最左側)

ず興味を持って聞いてくる姿を見て、何事に対しても知的好奇心を持って理解できるように努めることの大切さを再認識しました。アーバインでの生活では、ルームメイト以外にもUberの運転手が研究内容を聞いて

きたり、UCIで実験室や大学施設の掃除や工事をしてくれている人達が実験中に「それはどういう実験をしているの?」と尋ねてきたりと、知的好奇心の旺盛な人が多く感じました。日本では掃除してくれている人達が研究内容について尋ねてくることはまず無いと思い、びっくりしたとともに全く分野外の人に英語で研究内容を説明する良いトレーニングになりました。

#### 留学を終えて

留学に行く前は不安もありましたが、不安よりも今の自分の実力で見知らぬ場所での生活・研究面ともにどれだけ通用するのか確かめたいという挑戦心が勝っていました。良い意味で何事もうまく行かないことを覚悟の上、失敗を恐れずに積極的に行こうと決めていました。英語面で初めは苦労することはありましたが、とても親切な人たちばかりで理解できなかったところを何度も表現を変えて説明してくれたり、理解できるようにゆっくり話してくれたり、みなさんサポートしてくれました。そのおかげで、渡米してすぐにはほとんど理解できなかった現地の人たちの会話が二ヶ月過ぎる頃にはだいぶ理解できるようになりました。現地で仲良くなった友人達が渡米後二ヶ月をすぎた頃に、「初めは私たちの言葉を全然理解できていなかったけど今はジョークも含め完全に理解できている」と言ってくれた時には、自分の成長を実感でき嬉しく思いました。僅か5ヶ月という短い間ではありましたが、研究面のみならず人生においても非常に多くのことを学び考える機会になり、とても濃い充実した時間になりました。この紙面上では書きされないほどの、とてもわずか5ヶ月とは思えないくらい素晴らしい経験をさせていただきました。研究生活を通じて今までになかった新しい経験ができたことから、研究者を志し、ここまでやってきて本当に良かったと思いました。まだまだ未熟ではありますが、今後も本留学で学んだことを最大限に生かしグローバルに活躍できる研究者になりたいと思っています。







左から、親友の Dr. Sunit Jana との一枚(筆者は右側)、帰国前日に実験室で撮った一枚(左側は大学院生で親友の Allan、筆者は右側)、Farewell パーティの時のラボメンバー全員で撮った写真(John Chaput 教授は右前から5番目、筆者はその正面)

#### 謝辞

末筆ではございますが、本留学体験記執筆の機会を与えてくださいました鳥取大・松浦先生に感謝申し上げます。また、本留学において、快く送り出していただき留学中においても常に励ましのお言葉をくださいました和田健彦先生に心よりお礼申し上げます。和田先生には、本留学にあたり研究室選定・CV作成・メールアポイントの取り方などのご指導をいただいたとともに、留学前の在学中においても海外からお招きした先生方とのディスカッションの時間を設けていただくなど今回の留学を決意するに至るたくさんのきっかけをくださりました。経済面においてご支援いただきましたJSPSにお礼申し上げます。また、全く面識がなかったにも関わらず快く受け入れていただきましたJohn Chaput教授、現地での研究・生活面において親切にサポートしてくださった研究室内外の全ての方々に深く感謝いたします。

## お知らせ

## 受賞

澤田 敏樹(東京工業大学 物質理工学院) 日本ペプチド学会 奨励賞(2020年11月 受賞) 「ファージ提示ペプチドに基づく機能性ソフトマテリアルの創製」

#### 編集後記

COVID パンデミックのため、ここ半年ほど新幹線や飛行機に乗っておらず、鳥取県からも出ていない松浦です。オンライン会議・オンライン学会も最初のうちは便利で楽しかったのですが、やっぱり対面での学会の方が盛り上がりますね。学会の懇親会・飲み会などでも、皆さま方と情報交換したいと思っている今日この頃です。

そのような状況の中、今号も熱い研究紹介・論文紹介・留学体験記を書いていただいた執筆者の 方々にお忙しいところご執筆いただき、どうもありがとうございます! 次号の生命化学研究レタ ーは、大神田さんの担当により、2021 年 4 月頃の発行を予定しております。その頃には、COVID パンデミックが収まっていると良いですね!

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。

令和2年10月1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(信州大学)