

# 生命化学研究レター

(2021年4月)

## 2. 巻頭言

生命分子はヒントの宝庫

東京大学大学院理学系研究科 塩谷 光彦

## 3. 研究紹介

3. 次世代シーケンシングによる核酸酵素の活性測定  
～To select, or not to select?～

沖縄科学技術大学院大学 横林 洋平

9. 標的タンパク質を分解する低分子  
～疾患関連タンパク質をゴミ箱へ～

東北大学大学院生命科学研究所 石川 稔

15. 百聞は一見に如かず  
～タンパク質が機能する瞬間を X線自由電子レーザーで観る～

東北大学多元物質科学研究所 南後 恵理子

## 21. 論文紹介「気になった論文」

東京農工大学大学院工学府 根岸 諒  
静岡大学グリーン科学技術研究所 呉 静

## 27. 海外のラボ便り

海外留学・海外就職

シンガポール工科デザイン大学 橋本 道尚

## 32. お知らせ

受賞・異動  
編集後記



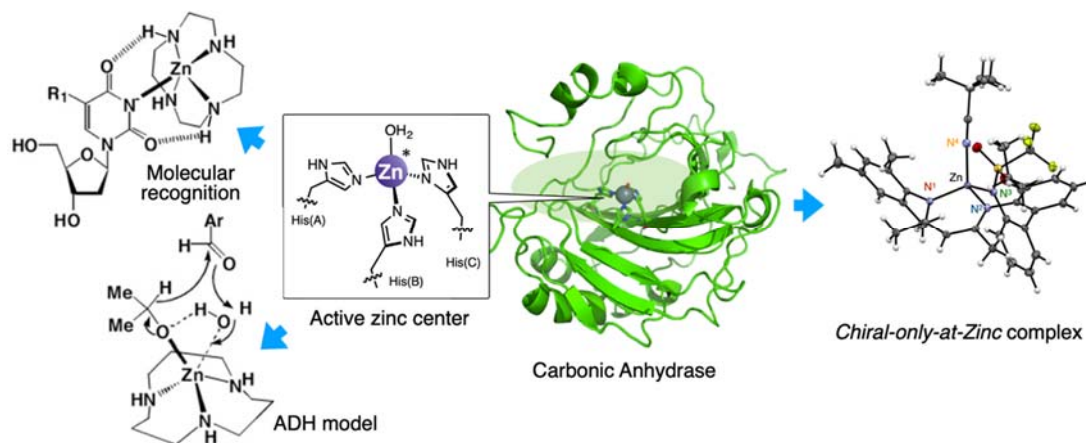
# 巻頭言

## 生命分子はヒントの宝庫

東京大学大学院理学系研究科 塩谷 光彦

東京から広島に移ったときから「亜鉛」に縁がある。学生時代は不斉合成に明け暮れていたため、金属酵素の化学は大変刺激的であった。特に、可視領域に吸収がないために発展が遅れていた亜鉛酵素は、配位構造と反応性の関連性の観点から、大変興味深い研究対象であった。例えば、*Carbonic Anhydrase*の活性中心は、ヒスチジン由来の非等価な三つのイミダゾール窒素と水分子が亜鉛イオンに配位した四面体型構造をもつ。これは、亜鉛イオンのルイス酸性を引き出すのに最も適した構造であり、配位した水分子や水酸基の活性化を可能にしている。これをヒントに、大環状亜鉛錯体を*Alcohol Dehydrogenase*様触媒反応(*J. Am. Chem. Soc.* 1992)や核酸塩基認識(*J. Am. Chem. Soc.* 1993, 1994)に適用することができた。

それから20年以上が経ち、再び亜鉛酵素と対峙することになった。酵素中の亜鉛イオンが不斉中心であることにあらためて焦点を当て、Werner型の四面体型亜鉛錯体は置換活性である、という常識を覆すことに挑戦した。実際、アキラルな非対称配位子の設計、不斉誘導、反応環境の設定を精密に行うことにより、亜鉛中心にのみ不斉中心をもつ、光学純度99%以上の亜鉛錯体を作ること成功した。溶液中のラセミ化の半減期は10年オーダー、これは通常1分以内とされる寿命の $10^6$ 以上に相当する。エナンチオ選択的な不斉反応にも適用できた(*Nat. Commun.* 2020)。ヒントは、配位子の解離を抑える、解離を伴わない立体反転を抑える、の2点であった。「不斉金属」化学の新たなスタートである。



国際周期表年(2019)に、亜鉛に関するメッセージを出した(「私たちの周期表—産学からのメッセージ」WebBook):「金属中心の非対称配位圏の制御は、新しい機構の不斉金属触媒や異方性を有する機能分子・材料への展開を可能にします。特に、亜鉛錯体のような配位子交換の速い金属中心の非対称制御は、基礎化学の挑戦課題です。」

生命分子システムを発想の原点とするもの作りが目覚ましい発展を遂げてきたが、それらの物性や反応機構が生命分子システムの理解に新たな視点を与えるフィードバックになりうることを忘れてはいけない。

## 研究紹介

## 次世代シーケンシングによる

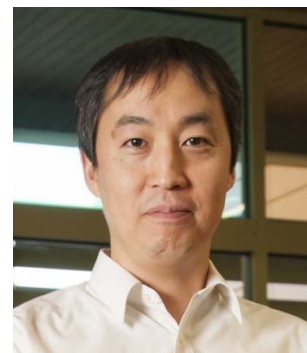
## 核酸酵素の活性測定

～To select, or not to select?～

沖縄科学技術大学院大学 核酸化学・工学ユニット

横林 洋平

(yohei.yokobayashi@oist.jp)



## 1. はじめに

様々な分子の「機能」について考えると、核酸ほど多機能な分子はないであろう。もちろん生体内では、DNAやRNAが遺伝情報の保持、伝達の中心を担っており、タンパク質など他の生体分子で代用はできない。その他にも分子認識、化学反応触媒、自己組織化、遺伝子発現の制御など、生体内外で様々な機能が実現されており、望みの機能を持った分子を設計したいと考える化学者にとって、核酸は非常に魅力的な研究対象である。

筆者は学生からポストド時代に、機能を持ったペプチドやタンパク質の設計を行っていた。20種類ものアミノ酸からなるペプチドやタンパク質は、化学的に多様で、その可能性も無限である。しかし、その複雑さゆえに、望みの機能はもちろん、構造を持ったタンパク質を設計することも簡単ではない。現実的には、既に自然界が進化を通じて編み出したタンパク質やペプチド構造を、目的の機能を持つように改変することがほとんどであり、高度な機能を持ったタンパク質やペプチドをゼロから(*de novo*)設計することは、現在でも困難である。

一方で4種類の塩基からなる核酸は、同じ機能ではタンパク質の性能に劣ることは否めないが、塩基対という直感的でデジタルな相互作用に基づいた構造により、上述の多彩な機能を実現している。また、1990年代から*in vitro selection*によって、真に*de novo*といえる機能性核酸分子(アプタマー、リボザイムなど)が比較的容易に得られることが明らかになった。2004年に米国カリフォルニア大学デイビス校(UC Davis)で独立した際、研究対象をそれまで筆者が扱ったことのなかったRNAに変えたのは、タンパク質に圧倒的に劣る化学的多様性にも関わらず、タンパク質に勝るとも劣らないRNAの**機能的多様性**に惹かれたからである。また、当時はRNA干渉、マイクロRNA、バクテリアにおけるリボスイッチなどが発見され、細胞内におけるRNAの機能が大きく見直されていた時期であったことも影響した。2015年に現在の所属である沖縄科学技術大学院大学(OIST)に移り、引き続き機能性核酸の設計について研究している。本稿では、次世代シーケンシング(NGS)技術を用いた核酸酵素の活性測定法と、その応用について紹介する<sup>1,2</sup>。

## 2. 核酸酵素の活性測定

数あるRNAの機能の中でも、触媒活性は興味深い。RNAワールド仮説によると、原始生命ではRNAが遺伝情報の複製と伝達だけでなく、現在タンパク質である酵素が担う、数々の代謝反応の触媒機能も果たしていたと考えられている。現在の生物では、真にRNA触媒(リボザイム)と呼べるのは、自己スプライシングと自己切断(もしくはその逆反応)を触媒するものしか残っていないが、*in vitro selection*によって、リン酸

化、RNA結合、アミノアシル化、Diels-Alder反応など、様々な触媒活性を示すリボザイムが獲得されている。さらに、RNAだけでなくDNAも同様の触媒活性を示すことがわかっている(デオキシリボザイム)。これらの核酸酵素を、分子認識能を持つアプタマーや、相補的な配列によるDNA/RNA配列認識と組み合わせ、センサーや遺伝子スイッチなどへの応用も盛んに研究されている。

したがって、リボザイムやデオキシリボザイムの配列と機能の相関を理解することは、基礎的にも応用面からも非常に重要である。例えば様々な触媒活性を示すリボザイム配列が、どれくらいの割合で存在するのか、という問題はRNAワールドのシナリオを考える上でも大切である。また、大規模な配列機能相関データは、センサーなどの機能を持つ核酸酵素を設計するために大いに役立つ。

例として自己切断リボザイムを考える。タンパク質と同様、RNAも分子内で塩基対を形成することにより、二次・三次構造をつくり、その構造がリボザイム機能を実現する。配列のどの部分がリボザイム機能に重要かを調べるにはどうすればよいだろうか？一番自然な(簡単な)実験は、塩基を一つずつ変異させ、その一塩基変異体が活性を保つか否かを調べることである(図1A)。変異により活性が失われたら、その塩基は活性もしくは構造に重要な役割を持つことが推察できる。逆に、変異しても活性が保たれるのであれば、その塩基は触媒機能に直接関わっていないことを示唆する。また、二つの位置にある塩基が、個別に変異すると活性が失われるが、同時に変異(二塩基変異)すると活性が復活するということがある。この場合、その二つの塩基が相互作用していることが強く示唆される。これをcompensatory mutationという。このように、一塩基および二塩基変異体の触媒活性は、リボザイムの配列機能相関を理解する上できわめて有用である。

では、そのようなリボザイム変異体の活性測定はどのように行えばよいのか？実は核酸酵素の活性測定法はリボザイムの発見以来30年以上ほとんど進歩していない。基本的にはリボザイム変異体の一つずつ合成し、個別に反応させ、ゲル電気泳動などで切断率を測定する(図1B)。しかし50塩基のリボザイムでも、150種類の一塩基変異体が存在し、二塩基変異体にいたっては11025種類も存在する。古典的なリボザイム活性測定法では、せいぜい数十種類の変異体を測定するのが精一杯であり、そうすると実験者は、測定対象となる変異体配列を恣意的に選ばざるを得ない。

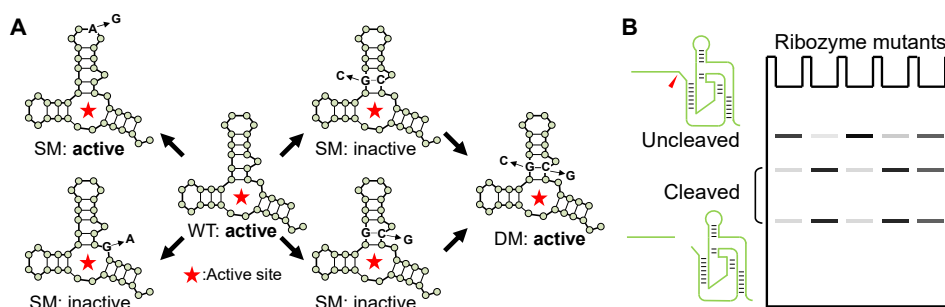


図1. リボザイムの変異解析。(A)一塩基変異と二塩基変異。(B)ゲル電気泳動によるリボザイム活性測定。

### 3. 次世代シーケンシングによる核酸酵素の活性測定

我々は核酸酵素の活性測定法のスループットの劇的な向上を目指して、次世代シーケンシング(NGS)を利用した新しい手法を考案した。NGSは、当初ゲノム配列解読に利用されてきたが、近年トランスクリプトーム解析など、定量的な解析にも応用されてきている。我々は、多数のリボザイム変異体を含む混合物を反応させ、その生成物をNGSで解析することにより、一度に多数の変異体について活性を定量的に求めることができるのではないかと考えた。

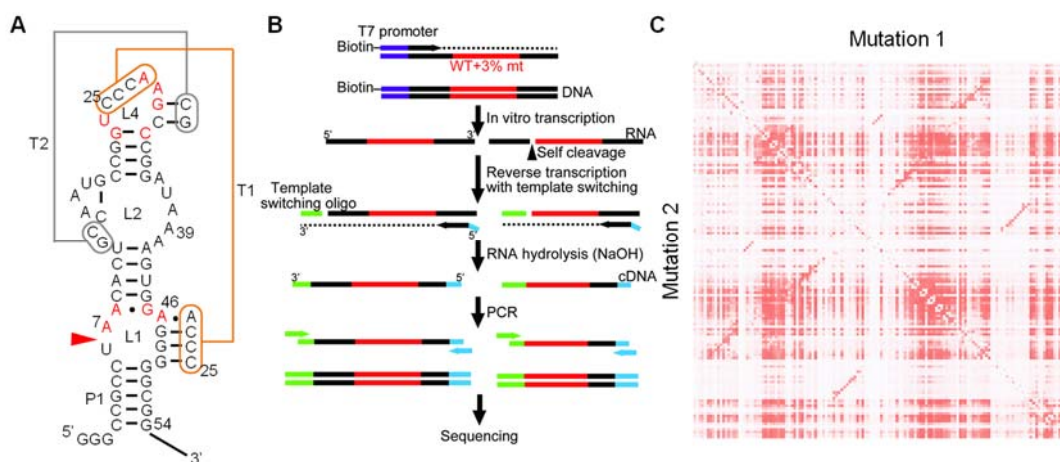


## 自己切断リボザイムの変異解析

まず、**図2A**に示す、イネのゲノムから発見された自己切断活性を示すtwisterリボザイムを解析した。このリボザイムは約50塩基とコンパクトながら、二つのpseudoknotを含む複雑な構造がX線結晶構造解析により明らかになっている(**図2A**)<sup>3</sup>。また、他のtwisterリボザイムとの比較により、保存率の高い10塩基も特定されている。我々はU6とA7の間の切断部位以降の47塩基について、すべての一塩基および二塩基変異体の解析を行った<sup>4</sup>。変異体ライブラリは、DNA鋳型を化学合成する際、変異対象部位に相当する塩基を97%本来の塩基、3%を残り3つの塩基の混合物としてカップリングしたdoped oligoとして合成した。このDNA鋳型をもとに、*in vitro*転写反応でリボザイム変異体を混合物として生成し、同時にその過程で自己切断反応が起こる。一定時間後にRNAを精製し、逆転写反応を行う。ここで同時にNGSに必要なアダプター配列を付加するのだが、切断されたRNA断片と未切断のRNA断片は、切断部位付近の配列で明確に区別できる。後はPCRでNGS用のサンプルを調製し、解析する(**図2B**)。

この解析において重要なのは、各変異体について多くのリード数(>100)が得られることである。ある変異体*i*について、未切断配列が $N_{i,uncleaved}$ 回、切断済み配列が $N_{i,cleaved}$ 回読まれたとすると、その変異体の切断率(fraction cleaved,  $FC_i$ )は、 $FC_i = N_{i,cleaved} / (N_{i,cleaved} + N_{i,uncleaved})$ で計算できる。つまり、十分なリード数が得られる変異体配列について、切断率という定量的な活性指標が求められる。この実験では、野生株とすべての一塩基および二塩基変異体(合計10296種類)について、切断率を得た(**図2C**)。このような核酸酵素の網羅的な配列機能相関データは、古典的活性測定法では得られなかったであろう。

この配列機能相関を精査すると、様々な興味深い知見が得られる。例えば、このリボザイムは変異に対して意外と堅牢であることがわかった。また、compensatory mutationから、pseudoknot相互作用も確認できた<sup>4</sup>。最近になり、他の理論研究グループが我々のデータをより厳密に統計的に解析し、リボザイムの三次元構造の予測に活用した<sup>5,6</sup>。



**図 2.** Twister リボザイムの変異解析。(A) Twister リボザイム Osa-1-4 の二次構造。赤字は 97%以上の twister リボザイムで保存されている。(B) NGS によるリボザイム変異体活性測定の流れ。(C) 全ての一塩基変異体および二塩基変異体の活性。赤色の濃さが、相対活性に相当。一塩基変異体は左上から右下に向かう対角線上に相当。

## RNAリガーゼリボザイムの変異解析と最小化

上で述べたように、*in vitro* selectionによって、多くの自然界には存在しない触媒活性を持つ核酸酵素が得られている。その中でも、鋳型依存的にRNA断片の結合を加速するRNAリガーゼ活性は、RNAワールドにおける遺伝情報の伝達および複製の観点から、多くの報告がある。今回我々はJoyceらが発見したF1リガーゼ<sup>7</sup>に対して、NGSによる変異解析を適用した。F1リガーゼは、5'三リン酸基を有するRNA断片と、

3' 水酸基を有するRNA断片の連結反応を触媒する。この反応は、化学的には現代生物が持つRNAポリメラーゼが触媒する反応と等価である。Joyceらは、このリガーゼをもとに、指数関数的に増殖する自己複製RNAを構築しており<sup>7</sup>、原始的な生命、もしくはその前駆体のモデルとしても興味深い系である。

我々はF1リガーゼをもとにしたF1\*について、その「活性部位」と思われる31塩基について、すべての一塩基変異体、二塩基変異体、一塩基欠失変異体、二塩基欠失変異体を合成、解析した(図3)<sup>8</sup>。また、これらの変異体を作成するにあたり、上記のdoped oligoではなく、任意のDNA配列を混合物として得られるoligo poolを利用した。Oligo poolを利用することにより、欠失変異体などの任意の配列を解析対象に含められること、各変異体の量がほぼ等量得られること、などの利点がある。

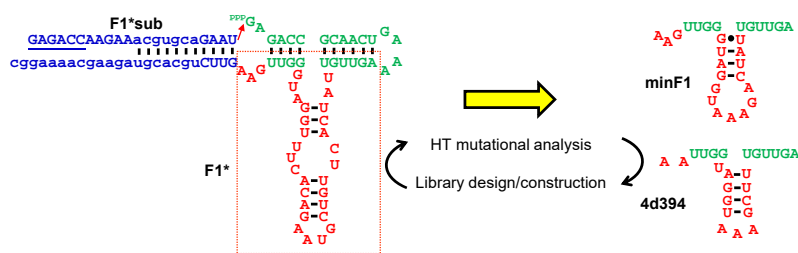


図3. RNAリガーゼリボザイムの変異解析と最小化。赤字部分が変異対象となった活性部位。minF1 および 4d394 は最小化された活性部位の一部。

この網羅的な解析により、F1\*リガーゼは変異や欠失に高い耐性をもつことが明らかになった。このデータをもとに、活性に不要と思われる部位を削除し、さらに大規模変異解析を行った結果、活性部位のサイズをほぼ半減させることに成功した(図3)<sup>8</sup>。もちろん速度定数は低下するが、このような「小さいリボザイム」の存在は、RNAワールドにおけるリボザイムの役割を考える上で興味深い。

#### デオキシリボザイムの変異解析と速度論的解析

NGSによる活性測定はデオキシリボザイムにも適用できる。我々はBreaker研究室で発見された、 $Zn^{2+}$ 存在下で加水分解的に自己切断するデオキシリボザイムI-R3<sup>9</sup>を変異解析した。さらに、複数の反応時間において変異解析を行うことにより、検出可能な活性を持つ533種類の変異体について、単なる「切断率」ではなく、一次速度定数( $k_{obs}$ )を得ることができた<sup>10</sup>。速度定数が得られると、アレニウスの式によって活性化エネルギー( $E_a$ )が計算できる。したがって、多種の一塩基変異体とその組み合わせについて、変異による触媒活性の変化(例えば、それが加算的であるか否か?)を定量的に評価できる。

#### 4. NGSによるリボザイム活性解析の応用

上記ではNGSにより核酸酵素全体の変異解析を行ったが、この手法を開発した動機の一つは、リボザイムの工学的応用であった。我々のグループでは、低分子と結合するRNAアプタマーをmRNAに組み込み、細胞内で遺伝子発現を化学的に制御する「人工リボスイッチ」の研究を行ってきた。特に近年は、将来的な遺伝子治療などへの応用を念頭に、ヒトを含む哺乳類細胞において機能するリボスイッチの開発に力を入れている<sup>11</sup>。哺乳類細胞で機能するリボスイッチの設計戦略はいくつかあるが、一番ポピュラーな方法は、アプタマーと自己切断リボザイムを組み合わせた「アプタザイム」を、制御したい遺伝子のmRNAの非翻訳領域(UTR、主に3'UTR)に挿入するタイプである(図4A)。このアプタザイムは、アプタマーのリガンドが結合すると自己切断が活性化もしくは阻害されるように作られる。そして、mRNAのUTR内で自己切断がおこると、mRNAの両末端に結合する翻訳制御因子が失われるため、翻訳が起きず、mRNA自体も速やかに分解される。

このようなアプタザイムを開発するにあたっては、アプタマーとリボザイムを接続し、これら二つのRNAモジュールが、アプタマー-リガンド結合に応答するような接続配列(communication module)をデザインする

必要がある(図4B)。多数の接続配列の候補をNGSにより解析することにより、望みの応答を示すアプタザイムを(もし存在すれば)一度の実験で発見することができる。このような方法でグアニンに応答するアプタザイムを、最大16384種類の接続配列候補から発見することができた<sup>12,13</sup>。

この方法の利点の一つは、単に機能するアプタザイムが得られるということだけではなく、その多くの変異体の配列と活性も同時に得られることである。例えば、ある接続配列がよい応答を示したとして、その接続配列の変異体がどのような応答を示すかを(追加実験なしに)調べることで、そのアプタザイムの機構に関する知見を得ることができる。一方で従来のスクリーニングや選択においては、多数の変異体の中から、少数の機能する「ヒット」配列とその活性が得られても、残りの大多数の(「ヒット」しなかった)配列の情報は失われる。

詳細は省くが、他にも細胞内で機能するリボザイムの工学的応用に本手法を適用した<sup>14,15</sup>。

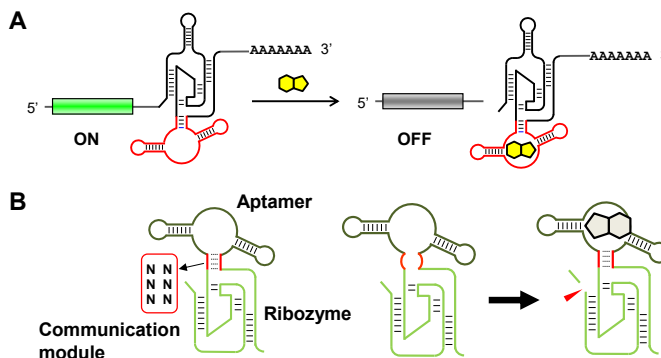


図 4. アプタザイムによる遺伝子発現制御。(A)アプタマーに低分子が結合することにより、自己切断が活性化されるアプタザイムを mRNA の 3' UTR に挿入。低分子存在化で遺伝子発現が OFF となるリボスイッチ。(B)アプタザイムの概念図。アプタマーとリボザイムを接続する communication module を最適化することにより、リボザイム活性を化学的に制御する。

## 5. To select, or not to select?

言うまでもなく、核酸酵素の研究はin vitro selection、つまり選択を生化学的に行うことで飛躍的に発展した。NGSによって、 $10^8$ 以上の配列リードが比較的簡単に得られる現在、大量の核酸配列(変異体)から、選択によって触媒活性を持つ配列を得て、それらの配列をNGSにより大量に解析すること(mutate-select-and-sequence)も日常的に行われている。では、従来の選択を経た核酸配列のNGS解析と、本稿で紹介したNGSによる核酸酵素活性測定(mutate-and-sequence)には、どのような違いがあるだろうか?

二つの戦略の違いは、選択の有無である。mutate-select-and-sequenceにおいては、**選択されなかった**配列の情報は失われる。NGSにより発見されなかった配列は、「活性がない」と考えがちであるが、いくつかの注意点がある。まず、選択においては実験者による恣意的な淘汰圧が課せられており、その条件により選択される配列やその構成は変化する。また、特に複数ラウンドに渡る選択が行われると、逆転写反応やPCRによるバイアスが、選択される配列に影響する可能性がある。このようなバイアスは、最終的に得られた配列の出現頻度や濃縮速度が、必ずしもその配列の触媒活性と定量的に相関しないことを意味する。もちろん、定量的な活性データを得るためには、選択された配列を従来法(もしくは我々の手法)で新たに測定する必要がある。

一方mutate-and-sequenceアプローチでは、作成した変異体全てについて、定量的な活性データ(切断率、速度定数など)を得ることができる。実質的に、従来のゲル電気泳動による活性測定をスケールアップしたのと同様の結果を得られる、ということである。もちろん、選択をしないことに対するトレードオフがある。それは測定できる変異体配列の数である。mutate-and-sequenceにおいては、一つの変異体配列を最低数百回は読む必要がある。したがって、解析できる配列数の上限は、NGSによって得られるリード数によって決まる。例えばIllumina社のNovaSeq 6000では、一度の解析で最大 $10^{10}$ リードを得られるとされる。したがって、一変異体あたり平均500リードとすると、最大 $2 \times 10^7$ 種類の配列について活性解析を行うことができるは

ずである。

## 6. おわりに

NGSという技術が生命科学を変えたのは誰の目にも明らかである。新しい技術は、単なるゲノム解読を超えて、一細胞レベルでの遺伝子発現の定量的解析など、当初の想定を超えた、様々な応用を産み出し続けている。核酸化学におけるNGSの活用例の多くは、従来サンガー法で行っていた選択後の配列解析をNGSで置き換える、というものに留まっていた。本稿では、NGSを単に「配列を読む」ためだけでなく、核酸酵素の活性を定量的に測定するために活用する、というアプローチを紹介した。関連する手法として、RNAアプタマーの結合定数の高スループット測定にNGSを応用した複数の例がある<sup>16,17</sup>。このように、新しい手法により、今まで得られなかったデータ(配列機能相関)が得られるようになり、そのデータを活用して新しい知見(配列からの構造予測など)が得られるのが理想である。そして、今後も続くであろう核酸配列解析技術の発展を、生命科学だけでなく、核酸化学・生命化学の発展につなげる可能性も注視していきたい。

## 謝辞

本稿を執筆する機会をいただきました、信州大学農学部の大神田淳子先生に御礼申し上げます。本稿で紹介した研究は、UC DavisおよびOISTにおいて、米国NIH、OIST、JSPS(18K19944、19H02855)による研究費助成を受けて実施されました。

## 参考文献

- (1) Yokobayashi, Y. *Methods* **2019**, *161*, 41-45.
- (2) Yokobayashi, Y. *Acc. Chem. Res.* **2020**, *53*, 2903-2912.
- (3) Liu, Y.; Wilson, T. J.; McPhee, S. A.; Lilley, D. M. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 739-744.
- (4) Kobori, S.; Yokobayashi, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10354-10357.
- (5) Rollins, N. J.; Brock, K. P.; Poelwijk, F. J.; Stiffler, M. A.; Gauthier, N. P.; Sander, C.; Marks, D. S. *Nat. Genet.* **2019**, *51*, 1170-1176.
- (6) Zhang, Z.; Xiong, P.; Zhang, T.; Wang, J.; Zhan, J.; Zhou, Y. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 1451-1465.
- (7) Robertson, M. P.; Joyce, G. F. *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 238-245.
- (8) Nomura, Y.; Yokobayashi, Y. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 8950-8960.
- (9) Gu, H.; Furukawa, K.; Weinberg, Z.; Berenson, D. F.; Breaker, R. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9121-9129.
- (10) Dhamodharan, V.; Kobori, S.; Yokobayashi, Y. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 2940-2945.
- (11) Yokobayashi, Y. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *52*, 72-78.
- (12) Kobori, S.; Nomura, Y.; Miu, A.; Yokobayashi, Y. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, e85.
- (13) Kobori, S.; Takahashi, K.; Yokobayashi, Y. *ACS Synth. Biol.* **2017**, *6*, 1283-1288.
- (14) Kobori, S.; Yokobayashi, Y. *ACS Synth. Biol.* **2018**, *7*, 371-376.
- (15) Nomura, Y.; Chien, H.-C.; Yokobayashi, Y. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 12540-12543.
- (16) Buenrostro, J. D.; Araya, C. L.; Chircus, L. M.; Layton, C. J.; Chang, H. Y.; Snyder, M. P.; Greenleaf, W. J. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 562-568.
- (17) Tome, J. M.; Ozer, A.; Pagano, J. M.; Gheba, D.; Schroth, G. P.; Lis, J. T. *Nat. Methods* **2014**, *11*, 683-688.



## 標的タンパク質を分解する低分子

～疾患関連タンパク質をゴミ箱へ～

東北大学 大学院生命科学研究科

石川 稔

minoru.ishikawa.e4@tohoku.ac.jp



## 1. はじめに

低分子合成医薬品(鍵)の多くは、酵素・受容体・イオンチャネルなどのタンパク質に存在する、内因性リガンドが結合するポケット(鍵穴)に結合し、内因性リガンド由来の機能を制御する。しかし、薬に適した性質の化合物が結合できるポケットを有するタンパク質(druggableなタンパク質)は、全タンパク質の10%との試算もある。つまり、先述以外のタンパク質群は、上記「鍵と鍵穴創薬」では対応が難しい事例も多い。例えばアルツハイマー病は、アミロイドβ本来の機能が本疾患を引き起こすのではなく、変性したアミロイドβの異常凝集により発症すると考えられている。他例としてタンパク質複合体は、低分子の結合ポケットと比較すると、広く浅い部位の相互作用によって形成されることから、低分子でこれを阻害することは一般的に難しい。このことから、低分子に対してundruggableな疾患関連タンパク質に対応すべく、機能を制御する「鍵と鍵穴創薬」以外の創薬手法が求められている。本稿では、タンパク質の機能制御ではなく、存在量を減少させる創薬手法について述べる。

## 2. プロテインノックダウン法の作業仮説と先行研究 PROTACs (PROteolysis Targeting Chimeras)

細胞内のタンパク質は、ユビキチン-プロテアソーム系(図 1a)と呼ばれる経路により分解される。ヒトでは600種以上存在するユビキチンリガーゼは、細胞内の基質タンパク質のリジン側鎖を起点として、タンパク質ユビキチンを重合させる。加水分解酵素を含む複合体プロテアソームは、ポリユビキチン化修飾を受けたタンパク質を加水分解する。cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1)、cIAP2、XIAP は、アポトーシス阻害タンパク質(IAP: inhibitor of apoptosis protein)ファミリーに分類されるユビキチンリガーゼである。全身に発現しているこれら IAPs は、BIR (baculovirus IAP repeat)ドメインによってカスパーゼなどの基質を認識し、基質のユビキチン化や核内因子κB (NF-κB)の活性化を介してアポトーシスを阻害することから、がん治療の創薬標的として注目を浴びている。2008年、当時東京大学分子細胞生物学研究所の内藤幹彦先生と日本化薬株式会社のグループは、ベスタチンメチルエステル(1、図 1b)が、cIAP1のBIRドメインに結合し、cIAP1自身のポリユビキチン化を誘導し、cIAP1の存在量を減少させることを発見した<sup>1</sup>。cIAP1はアポトーシスを阻害するがん関連タンパク質であることから、cIAP1の存在量を減少させる1は抗がん作用が期待される。著者の元所属研究室(東京大学分子細胞生物学研究所橋本祐一研究室)では、内藤先生と共同研究のもと、当時修士課程の佐藤伸一氏らが、1の構造活性相関研究に取り組んでいた<sup>2</sup>。

IAPと標的タンパク質を人工的に近接させれば、ユビキチンリガーゼの基質特異性を超えて、標的タンパク質を人工的にユビキチン化・分解できると期待した。(図1c)。そして、リンカーを介して1と標的タンパク質リガンドを連結させた低分子が、この非生理的なヘテロ二量体の形成を誘導すると期待した。この連結分

子を設計する際、1) ツイン薬と呼ばれる、二種の生物活性化合物をリンカーを介して連結するハイブリッド分子と、2) 生物活性化合物の標的タンパク質を同定するアフィニティクロマトグラフィ法を参考にした。即ち、ツイン薬とアフィニティクロマトグラフィ法を、化合物の生物活性が大きく損なわれない位置にリンカーを導入できた成功事例として、研究計画の妥当性を論じた。また、ユビキチンリガーゼと標的タンパク質間の物理的距離は、ユビキチン化効率に重要と思われたが、最適な距離(リンカー長)を理論的に設計することが難しかった。そこで、アフィニティクロマトグラフィ法に用いられるリンカーを参考に、リンカーの種類と長さを選択した。

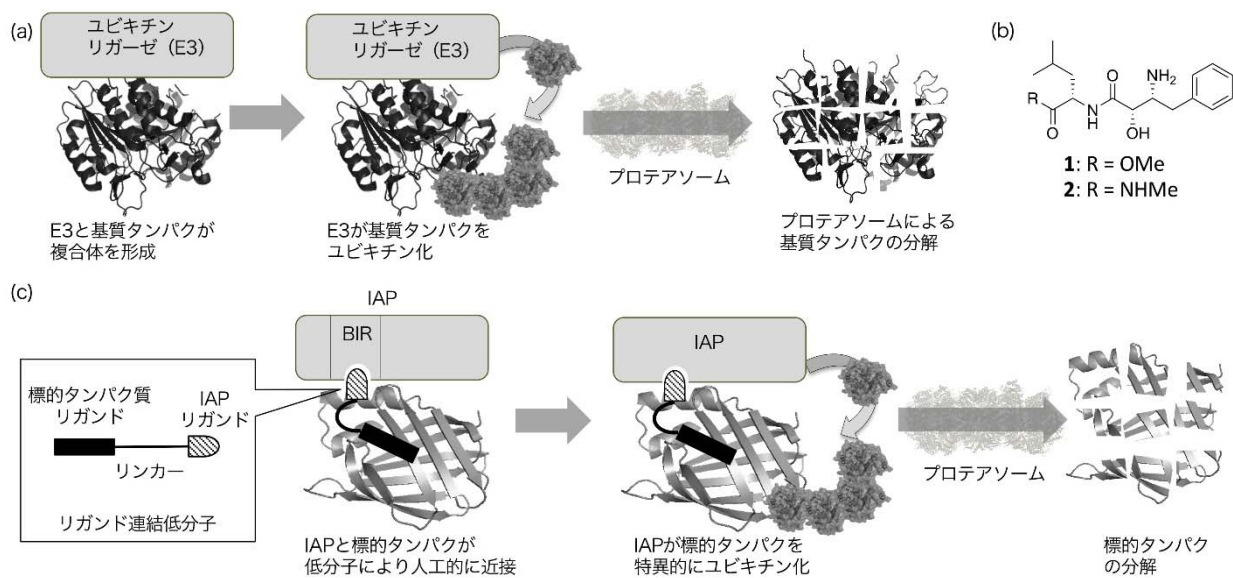


図1 (a) ユビキチンプロテアソーム系 (b) cIAP1リガンドの構造 (c) 標的タンパク質を分解する作業仮説

上記は橋本先生と内藤先生と共に独自に考案した仮説である。橋本研究室に着任した2008年に筆者は、期待と共に連結低分子の合成を開始した。実は、後述とは別のガン関連タンパク質を最初の標的として検討したが、タンパク質減少を確認できなかった。その原因を考察すべく、文献を検索している過程で、高分子PROTACsの報告に気付いた。Yale大学のCrewsらは2004年に、ユビキチンリガーゼVHL (von Hippel Lindau) の基質タンパク質上のペプチド配列と、標的タンパク質リガンドを連結したペプチド性高分子**3**が、標的タンパク質を分解することを報告していた(図2)<sup>3</sup>。本研究は先駆的であるものの、細胞膜透過性などペプチド構造・高分子に由来する課題があり、高濃度を必要としていた。またVHLはがん抑制タンパク質であることから、基質に対するポリユビキチン化がもしペプチド**3**により阻害されれば副作用をもたらす可能性も考えられた。他に、ユビキチンリガーゼMDM2 (murine double minute

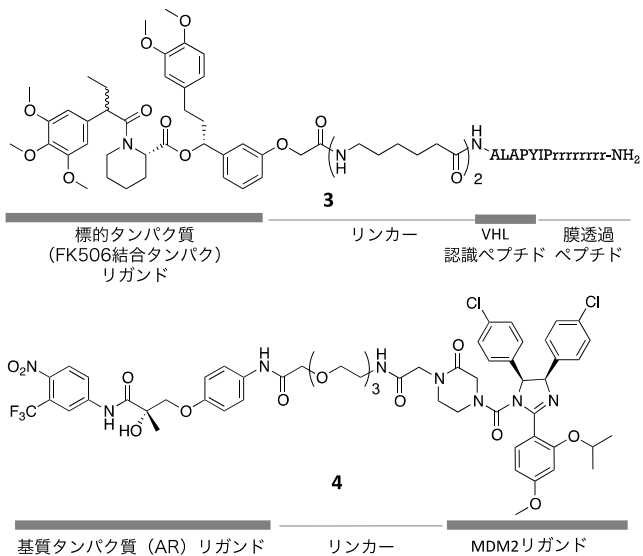


図2 高分子PROTACなどの先行研究

2)の低分子リガンドとアンドロゲン受容体(AR)リガンドを連結した低分子**4**が、ARを減少させることが2008年に報告されていた<sup>4</sup>。しかし、ARはMDM2の基質タンパク質である。加えて、MDM2リガンド自体がAR量を減少させる作用を有するため、**4**がPROTACとして機能しているか更なる検証が必要と思われた。当時博士課程の伊藤幸裕氏による上記分析にも助けられ、もし連結低分子によって、ユビキチンリガーゼの基質では無い標的タンパク質を広く分解誘導することができれば、実用的な創薬手法になると期待し、研究を継続することにした。

### 3. 細胞内レチノイン酸結合タンパク質(CRABP)を減少させる低分子

標的タンパク質の選定において著者らは、鍵と鍵穴創薬では対応が難しい標的を選択すべく、標的タンパク質の機能を制御できないリガンドの利用と、**1**によるcIAP1減少作用に伴う抗がん作用の付与を計画した。そして、標的をがん関連タンパク質から選定することに決め、CRABPを選択した。CRABPは、全トランス型レチノイン酸を核内に移行させる基質結合タンパク質で、CRABP-I、CRABP-IIの2種類が知られている。CRABP-IIは神経芽腫細胞の遊走に参与しているとの報告があるが、この作用はレチノイン酸非依存的である。過去の構造活性相関からリンカー導入位置を決定し、このプロジェクトに参画した先述の伊藤氏が連結低分子**5**を合成した(図3a)。そして、生細胞株を用いた実験系において、**5**がCRABP-IおよびCRABP-II(図3b)を減少させることを見出した。また、**1**と同様に**5**もcIAP1を減少させた。CRABPが減少したウェスタンブロットの結果を見た際の感動を、今でも覚えている。更に、神経芽腫細胞に対する遊走阻害作用を評価したところ、**5**は濃度依存的に遊走を阻害することが明らかになった。本結果より、阻害剤の知られていないがん関連タンパク質に対して、本創薬手法が新しい分子標的薬になる可能性も提案した。以上、伊藤氏を筆頭著者として、生細胞において基質以外の標的タンパク質を分解誘導する低分子を2010年に報告し、本手法をプロテインノックダウン法と名付けた<sup>5</sup>。著者は、橋本研究室に所属して初めて分子細胞生物実験を経験した。研究開始後、内藤先生は国立医薬品食品衛生研究所へご栄転され、身近にウェスタンブロットを行う人がいなかった。イメージャーも隣の研究室から拝借する状況で、コツが分からず研究が進まなかった。周囲にご指導頂きながら、本論

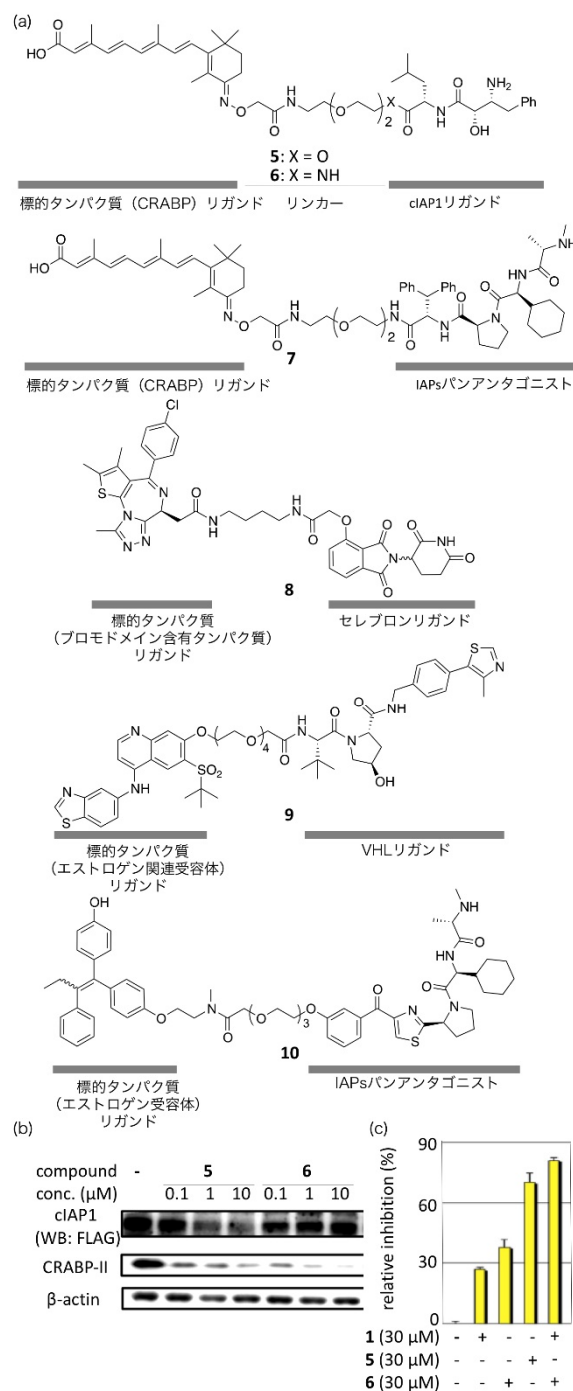


図3 (a)標的タンパク質分解薬と(b,c)活性評価

文の合成・生物評価を研究室で全て実施できたことで、大きな自信になった。ちなみに我々は当該連結低分子をSNIPERs (Specific and Nongenetic IAP-dependent Protein Erasers) とよんでいるが、この命名は当時修士課程の大金賢司氏の発案である。

#### 4. プロテインノックダウン法の選択性向上・活性向上・一般性確認

次に、がん以外の疾患を標的とする場合を想定し、cIAP1 を分解することなく標的タンパク質のみ分解誘導する低分子の創製を目指した。詳細は割愛するが、cIAP1 の分解を誘導しない cIAP1 リガンドであるベスタチンメチルアミド(2、図 1b)と CRABP リガンドを連結した低分子 6 は、CRABP-II を減少させた一方で、その 100 倍高濃度でも cIAP1 を減少させないことを見出した(図 3b)<sup>6</sup>。そこで次に 1、5、6 を用いて、神経芽腫細胞増殖抑制作用に対する cIAP1 と CRABP-II の寄与を考察した。その結果、cIAP1 と CRABP-II の両方を減少させる条件の方が、cIAP1 と CRABP-II の片方を減少させる条件よりも増殖抑制作用が強いことが確認された(図 3c)。このことから、cIAP1 とがん関連タンパク質のダブルノックダウンが、抗がん薬として優れている可能性が示唆された。このダブルノックダウンは、後述する主要な低分子 PROTACs には無い特長である。

cIAP1・cIAP2・XIAP と基質タンパク質の結合阻害を介してアポトーシスを活性化する IAPs パンアンタゴニストが、抗がん剤として注目されている。cIAP1 リガンド 1 の代わりに、IAPs パンアンタゴニストとがん関連タンパク質リガンドを連結した化合物は、1) 複数のユビキチンリガーゼによる標的タンパク質に対する効率的なユビキチン化と、2) がん関連タンパク質分解と IAPs パンアンタゴニストによるアポトーシス促進作用による強い抗がん作用が期待された。著者らは、IAPs パンアンタゴニストを連結させた化合物 7 が、5 よりも低濃度で CRABP-II を減少させること、またヒト神経芽腫細胞の増殖を 5 よりも強く抑制することを 2012 年に報告した<sup>7</sup>。このことから、IAPs パンアンタゴニストとがん関連タンパク質リガンドを連結した化合物は、抗がん剤として優れていることが期待された。

次に著者らは、本手法の一般性を確認した。IAP リガンドと標的タンパク質リガンドを連結させた低分子によって、酵素<sup>8</sup>、受容体<sup>9</sup>、基質結合タンパク質<sup>5</sup> を分解誘導できること、細胞膜(内藤先生らとの共同研究)<sup>10</sup>、細胞質<sup>5</sup>、核<sup>8</sup> に局在するタンパク質を分解誘導できることを示した。

#### 5. 他グループの動向と神経変性疾患の原因タンパク質の分解誘導

標的タンパク質を分解誘導する低分子が、2015 年に相次いで報告された。Bradner<sup>11</sup> はユビキチンリガーゼセレブロンリガンドであるサリドマイドを、Crews<sup>12</sup> は VHL に対する低分子リガンドを、それぞれ利用した低分子 PROTACs 8、9 などを報告した。内藤先生と武田薬品工業株式会社のグループは、IAPs パンアンタゴニストを連結した 10 を 2017 年に報告した<sup>13</sup>。これら低分子は、より低濃度で分解誘導活性を示し、動物モデルにおいても有効性を示す。これを機に多くのグループが本分野に参入し、凄まじい広がりを見せている<sup>14</sup>。また、これに利用されたユビキチンリガーゼは、10 種類以上に拡張されている。近年では、SNIPERs も含めたこれら一連の連結低分子も PROTACs と呼ばれている。

低分子 PROTACs 研究の加速が予測されたため、著者らは undruggable なタンパク質である神経変性疾患の原因タンパク質を標的に設定した。神経変性疾患は、神経細胞の脱落などにより、認知障害や運動失調などの様々な神経・精神症状を呈する難治性の疾患群である。アルツハイマー病ではアミロイド β、ハンチントン病では変異ハンチンチン(mHtt)などの疾患原因タンパク質が、細胞内外で異常凝集を引き起こすことが発症の原因と考えられている。これらの疾患原因タンパク質は共通して、βシート構造に富む折りたたみ不全構造に変性し、高毒性のオリゴマーなどの可溶性凝集体を形成する。神経変性疾患の治療に



は、毒性の高い凝集タンパク質を減らすことが重要と考えられているが、神経変性疾患に対する根治療法は知られていない。著者らが標的としたハンチントン病は、異常に伸長したグルタミン配列 (polyQ) を有する mHtt が神経細胞内に凝集し、舞踏運動などの不随意運動などを引き起こす疾患である。mHtt に対する低分子リガンドが知られていないため、代わりに凝集タンパク質の  $\beta$  シート構造に特異的に結合する神経変性疾患診断薬に著者らは着目し、診断薬と cIAP1 リガンド **2** を連結した低分子 **11** を設計・合成した (図 4a)。ハンチントン病患者由来細胞に **11** を処理したところ、mHtt 量が減少することを見出した (図 4b)。更に、化合物処理により凝集体数も有意に減少することを見出した (図 4c)。当時修士・博士課程の友重秀介氏と、それを引き継いだ当時博士課程の野村さやか氏を共筆頭著者として、本成果を 2017 年に報告し、神経変性疾患の新

しい治療戦略の可能性を示すことができた<sup>15</sup>。発案から 7 年以上かかってしまった主原因は生物実験の再現性であり、研究を中断したこともあった。今振り返ると、再現性問題の原因を特定しては改善していった二人の観察力と忍耐力に感謝するばかりである。ハンチントン病の他にも、ポリグルタミンが異常に伸長した変異タンパク質が原因となる遺伝性神経変性疾患が知られている。それらに対する一般性を確認すべく、変異 ataxin-3、変異 ataxin-7、変異 atrophin-1 を発現する細胞に **11** を処理したところ、これらタンパク質がいずれも減少することが明らかになり、本法の一般性を示すことができた<sup>16</sup>。

## 6. おわりに

標的タンパク質の寿命を短縮させる PROTACs の医薬応用が国内外で盛んに検討されており、2019 年に米 Arvinas 社により AR を標的とした PROTAC を用いた第一相臨床試験が開始された。標的タンパク質分解薬の発展には多くの研究者が貢献しているが、本稿では著者らの研究を中心に時間軸も意識しながらまとめた。筆者らは、1) ユビキチンリガーゼと標的タンパク質を物理的に近接させる低分子によって標的タンパク質の存在量を初めて減少させたこと、2) cIAP1 や IAPs が本手法に利用できること、3) IAP とがん関連タンパク質のダブルノックダウンが抗がん剤として有望である可能性、4) 適用範囲の拡大 (酵素・受容体、基質結合タンパク質、凝集性タンパク質、細胞内局在の確認) を通じて、本手法の開発に部分的に貢献できたと自負している。加えて、機能を制御できないリガンドを利用できる可能性、また難病である神経変性疾患の原因タンパク質も減少できることを示し<sup>17</sup>、タンパク質の機能を制御する従来の「鍵と鍵穴創薬」とは異なる本手法の特長も提案できたと考えている。近年、我々の研究は PROTACs の影に埋もれてきた感も否めないが、少なくとも 2016 年発行の C&EN には、我々の成果を評価する記述が確認できる<sup>18</sup>。

2019 年に現所属 (東北大学大学院生命科学研究科) に異動する機会を頂き、友重秀介助教、当研究室兼担の佐藤伸一助教と共に、周囲に支えられながらも研究活動を再開することができた。スタッフ同士のディスカッションから派生した共創研究も多く、研究室に配属してくれた学生達も日々研究に努めている。まだ歩み始めたばかりだが、皆様にこれら研究を披露することが、現在の夢である。

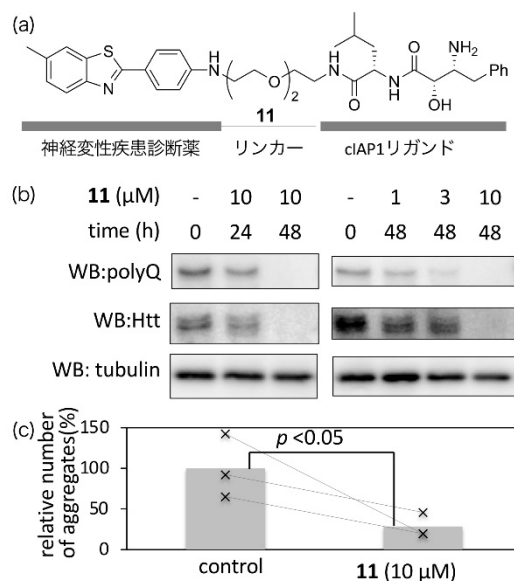


図4 凝集性タンパク質分解薬

謝 辞 本稿の研究は、東京大学定量生命科学研究所(旧 分子細胞生物学研究所)生体有機化学研究分野で行われたものであり、橋本祐一名誉教授に感謝申し上げます。また佐藤伸一博士(現東北大学助教)、伊藤幸裕博士(現大阪大学准教授)、北口梨沙氏、大金賢司博士(現東京理科大学助教)、友重秀介博士(現東北大学助教)、野村さやか氏(現防衛医科大学校助教)、山下博子博士に深謝致します。また、発案段階からの共同研究者である東京大学の内藤幹彦特任教授に感謝致します。最後に、東北大学大学院生命科学研究科の関係者に、この場を借りて感謝申し上げます。本研究は、JSPS 科研費 JP18H05502、JP18H02551の支援を受けたものです。

1. Sekine, K.; Takubo, K.; Kikuchi, R.; Nishimoto, M.; Kitagawa, M.; Abe, F.; Nishikawa, K.; Tsuruo, T.; Naito, M.\* *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 8961–8968.
2. Sato, S.; Tetsuhashi M.; Sekine K.; Miyachi, H.; Naito, M.; Hashimoto, Y.; Aoyama, H.\* *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4685–4698
3. Schneckloth, J. S.; Fonseca, F. N.; Koldobskiy, M.; Mandal, A.; Deshaies, R.; Sakamoto, K.; Crews, C. M.\* *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3748–3754.
4. Schneckloth, A. R.; Pucheault, M.; Tae, H. S.; Crews, C. M.\* *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5904–5908.
5. Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Naito, M.; Hashimoto, Y.\* *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5820–5826.
6. Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Kitaguchi, R.; Sato, S.; Naito, M.; Hashimoto, Y.\* *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3229–41.
7. Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Kitaguchi, R.; Okuhira, K.; Naito, M.; Hashimoto, Y.\* *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4453–7.
8. Tomoshige, S.; Naito, M.; Hashimoto, Y.; Ishikawa, M.\* *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 9746–9750.
9. Itoh, Y.; Kitaguchi, R.; Ishikawa, M.; Naito, M.; Hashimoto, Y.\* *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6768–6778.
10. Okuhira, K.; Shoda, T.; Omura, R.; Ohoka, N.; Hattori, T.; Shibata, N.; Demizu, Y.; Sugihara, R.; Ichino, A.; Kawahara, H.; Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Hashimoto, Y.; Kurihara, M.; Itoh, S.; Saito, H.; Naito, M.\* *Mol. Pharmacol.* **2017**, *91*, 159–166.
11. Winter, G. E.; Buckley, D. L.; Paulk, J.; Roberts, J. M.; Souza, A.; Dhe-Paganon, S.; Bradner, J. E.\* *Science* **2015**, *348*, 1376–1381.
12. Lu, J.; Qian, Y.; Altieri, M.; Dong, H.; Wang, J.; Raina, K.; Hines, J.; Winkler, J. D.; Crew, A. P.; Coleman, K.; Crews, C. M.\* *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 755–763.
13. Ohoka, N.; Shibata, N.; Okuhira, K.; Ito, M.; Nagai, K.; Hattori, T.; Ujikawa, O.; Shimokawa, K.; Sano, O.; Koyama, R.; Fujita, H.; Teratani, M.; Matsumoto, H.; Imaeda, Y.; Nara, H.; Cho, N.; Naito, M.\* *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 4556–4570.
14. Lai, A. C.; Crews, C. M.\* *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 101–114.
15. Tomoshige, S.; Nomura, S.; Ohgane, K.; Hashimoto, Y.; Ishikawa, M.\* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 11530–11533.
16. Yamashita, H.; Tomoshige, S.; Nomura, S.; Ohgane, K.; Hashimoto, Y.; Ishikawa, M.\* *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28*, 115175.
17. Tomoshige, S.; Ishikawa, M.\* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 3346–3354.
18. Borman, S. *C&EN* **2016**, *94*, 33–34.

研究紹介

百聞は一見に如かず

～タンパク質が機能する瞬間を

X線自由電子レーザーで観る～

東北大学 多元物質科学研究所

南後 恵理子

(eriko.nango.c4@tohoku.ac.jp)



“X線自由電子レーザー”というタイトルをご覧になって、聞きなれないな、生命科学研究とかけ離れている、といったイメージを持たれた方が多いかもしれません。私は元々天然物化学の出身でX線自由電子レーザーのような放射光科学から離れた分野におりました。今回の研究紹介では、何故、最先端の計測手法を手掛けることになったのか、その経緯から測定技術開発並びに実際にタンパク質構造変化を捉えた成果について、ご紹介していきたいと思います。

1. タンパク質構造解析は万能か？

20年ほど前の話になります。私は学生の頃、アミノ配糖体抗生物質の生合成酵素を研究テーマとしておりました。カナマイシンにも含まれる 2-deoxystreptamine の前駆体にあたる 2-deoxy-scyllo-inosose (DOI)を生成するDOI合成酵素の反応機構は、glucose-6-phosphateを基質として直接炭素六員環化します(図1)。この酵素は、多段階反応を立体選択的に行う点で興味深く、合成した基質類縁体や変異体を用いた活性測定などから反応機構を明らかにしようとして取り組んでいましたが、やはり酵素の立体構造そのものを知りたくて共同研究先でX線結晶解析を始めました。当時は構造ゲノム科学が始まったばかりで、Protein data

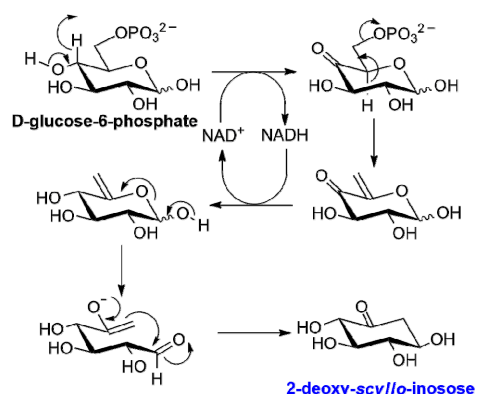


図1: DOI 合成酵素の反応機構

bankへの構造登録も少なく(2000年当時で13,589構造、現在は174,826構造)、類似のタンパク質構造を用いて位相決定する分子置換法では解くことができず、重原子置換法や多波長異常分散法など様々な位相決定法を駆使して、ようやく構造決定できたのが基質を含まない酵素のみの構造でした<sup>1</sup>。当時は、原子分解能の立体構造が得られたら、どの残基が反応を触媒し、どんな反応機構であるか全てわかるのだろうと期待していたのですが、アポ体構造を見ても、このあたりが活性部位だろう、といったことしかわからず、数年かけて解いた構造を前にがっかりした記憶があります。得られた分子構造を基に基質を置いてシミュレーションも行ってみましたが、予想外に活性部位が広く、基質を配置するのが困難でした。この後で、阻害剤を合成して酵素との複合体構造を得ることができ、基質と各アミノ酸残基の相互作用は明らかになりました。しかし、基質の有無で活性部位の周辺構造が大きく変化しており、従来の構造解析方法では測定時間の限界から動きを捉えることはできませんでした。酵素反応が行われる瞬間を原子レベルで観るにはどうしたらいいか、それが学生の頃からの問いでした。

## 2. X線自由電子レーザーによるタンパク質構造解析

しばらくして、私は大学からSPring-8/SACLAのある理化学研究所の放射光科学研究センターに移りました。抗生物質生合成酵素以外の試料についても結晶構造解析に取り組み、特に阻害剤合成とその複合体構造解析のアプローチから反応機構の解明を目指してきましたが、やはり新たな技術開発が必要と痛感していた時期でした。異動して2年ほど経ち、X線自由電子レーザー(XFEL)のプロジェクトが立ち上がることで、岩田想先生が率いるSACLA利用技術開拓グループに採用して頂きました。当時の私の認識では、強力なX線レーザーならば、微結晶の構造解析が可能であろう。微結晶が利用できるなら、分子内同期が容易で“反応を観察”するには向いているのかもしれない、とぼんやりと思うくらいで、とにもかくにも、この新しい測定手法は従来の方法とは全く異なることに驚かされていました。

従来のX線結晶回折実験は、単結晶を数度振動させつつ、回転させながら測定するのが常法で、放射光X線が利用されるようになってからは、強力なX線からの放射線損傷を防ぐために100 Kなど極低温下で測定するのが一般的です。一方、XFELを用いたタンパク質結晶構造解析方法として、シリアルフェムト秒結晶構造解析(SFX)が挙げられ、この手法では、①微結晶を連続的に輸送し、②常温で測定します。これは、XFELにより結晶が照射後崩壊すること、繰り返し周波数の高いXFELパルスを試料に照射するためであり、試料を連続的に導入するために、“流して輸送”する手段をとっています(図2)<sup>2</sup>。

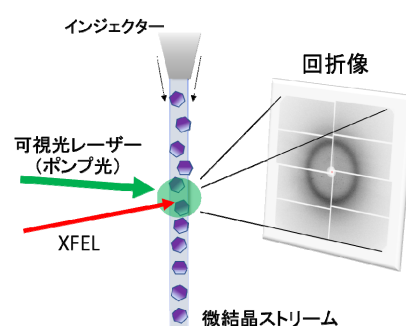


図2: SFX 実験の概要図  
(ポンプ光は時分割実験時に使用)

具体的な実験方法としては、微結晶を溶液や高粘度媒体に懸濁させ、インジェクター(結晶導入装置)よりXFEL照射領域へと送り、多数の異なる配向の微結晶から回折像の収集を行っています。ここで得られる回折像は、結晶の方位だけでなく、結晶サイズやXFELのビーム強度、スペクトルも異なる静止写真で、モンテカルロ積分により平均化された回折強度により三次元構造を決定します。2011年にChapmanらによって初めて報告されたSFX実験では、Liquid jetと呼ばれるインジェクターを用いて、緩衝液と結晶混合液を細い流れとして吐出することにより実験が行われました<sup>2</sup>。この方法では、結晶溶液を高い流速(流速10~300  $\mu\text{l}/\text{min}$ 程度)で吐出するため、試料を大量に消費します(数100 mg程度)。流速を下げると表面張力の影響で直線状のジェットを維持できないため、流速を下げるにはノズル径を数10  $\mu\text{m}$ 程度に細くするしかありません。そのため結晶サイズは小さい方が望ましく、回折能にもよりますが、数  $\mu\text{m}$ ~数10  $\mu\text{m}$ ほどの微結晶が用いられます。一方で、XFELビームはSACLAでは約1.5  $\mu\text{m}$ ×1.5  $\mu\text{m}$ 程度と非常に細く、必ずしも結晶に当たるとは限らないことから、結晶密度を高くする必要があります。そうすると今度は、結晶がノズル部分で重なり合うことが起きるために詰まって流れない、もしくは複数の結晶からの重なった回折像が得られるといった問題を生じます。そういったことを考慮して、実際の実験では概ね $10^7$ ~ $10^8$ 個/mLの結晶密度で実験を行っています。試料ストリームの径や結晶サイズにもよりますが、この結晶密度で実験を行った時はヒット率が10~30%程度となります。複数結晶からの重なった回折像を避けるためにも40%を超えないヒット率が推奨されています。

初期においては、Liquid jet法を用いておりましたが、数100 mgもの結晶を調製するのはリゾチームなど一部の試料でしかできない量です。一般的に、結晶解析で必要とするタンパク質の量は概ね数~数10 mg程度です。そこで必要試料量を削減するために開発したのが、高粘度試料インジェクターです(図3)<sup>3</sup>。



当時、海外では、脂質を使った膜タンパク質向けの結晶化である *lipidic cubic phase* (LCP) で得た結晶を脂質と共に低流速で流す方法が行われつつある、と聞き、それならば結晶を高粘度媒体に懸濁して流せばよいのではと急遽、高粘度試料向けのインジェクターと輸送媒体の開発が行われました。高粘度媒体と混合した結晶をどのようにインジェクターに充填するのか? など従来にはない方法に戸惑いもありましたが、最終的には透明な試料カートリッジに高粘度媒体と混合した結晶を充填し、プランジャーを通して水圧で流す方式のインジェクターを構築しました。同時に高粘度媒体として、グリース、ヒアルロン酸、セルロースと SFX 実験に適した媒体を見出し、0.3  $\mu\text{l}/\text{min}$  程度と *liquid jet* と比べて非常に低流速で結晶を連続的に輸送し、必要試料量を激減させることが可能となりました。

SFX で得られたタンパク質構造は、室温下の構造であり、放射光を用いた極低温下の構造と比べると構造に違いが見られます。違いを生じる主な原因は、結晶格子による影響と放射線損傷が挙げられます。前者は凍結すると格子が縮むことから、室温構造では分子パッキングの影響を受けやすい末端構造が見えることがあります。後者については、放射線損傷を受けやすい金属配位子などを含む場合に、放射線損傷が顕在化する前に回折像を得る SFX は強力な手段と言えます。また、高粘度媒体の利用の場合は、脱水など媒体の影響を受けて格子長が変わることがありますが、最近では媒体を加えず比較的少ない試料量で測定可能な液滴インジェクターも利用できるため、抗凍結剤などの影響のない構造を観察したい、生体内条件に近い室温構造を決定したい場合に SFX による構造決定法は有効な手段です。

さて、反応や構造変化を可視化するための時分割 SFX 実験では、結晶中のタンパク質分子を何等かの方法で一斉に反応開始させ、一定の遅延時間後に XFEL を照射し、その回折像より中間体構造情報を得ます。光照射を反応開始に利用するポンププローブ法は、分子を一斉に励起させる点で有利であり、一般的によく用いられてきました。最初の時分割 SFX 実験としては、光駆動型プロトンポンプのバクテリオロドプシン (bR) をターゲットとし、ポンププローブ実験装置の開発を行いました。この実験では、細い試料ストリームに空間的・時間的に高精度でレーザーを照射すると同時に、生成する中間体の割合をできるだけ高く得る必要がありました。bR の励起効率は十分に励起されても 60% 程度であり、必ず基底状態との混合になることが知られています。そこで、通常の SFX 実験では、バックグラウンドを減少させるためにヘリウムチャンバー内で試料導入を行ってきましたが、励起効率と実験の容易さを優先して、二方向から同時にレーザー照射が可能で、チャンバーを取り外した設計となりました<sup>4</sup>。

この装置を用いて検証を繰り返し、2016 年初めには bR のナノ秒からミリ秒における 13 タイムポイントの構造変化を捉えることに成功するに至りました<sup>5</sup>。その後、光化学系 II<sup>6</sup>、P450nor (ケージド基質使用)<sup>7</sup>、phytochrome<sup>8</sup> などの時分割実験が行われ、現在も XFEL 施設 SACLA ではこの時分割 SFX 実験装置により様々な種類のタンパク質の時分割実験が行われています。

### 3. 光駆動型プロトンポンプが起こす構造変化を原子レベルで観測

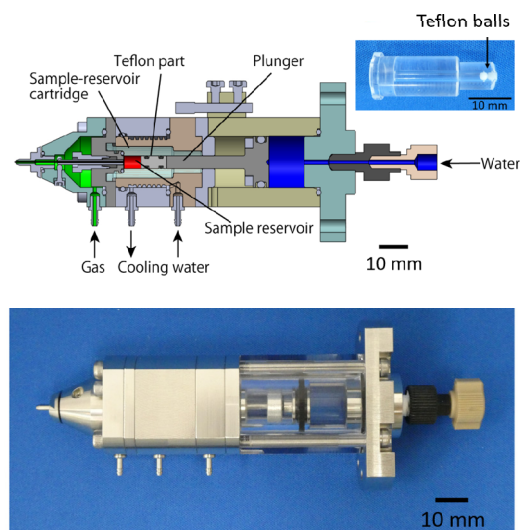


図3: 高粘度試料輸送インジェクター  
(上:断面図, 下:実物, 右上は試料用カートリッジ)

bRは、高度好塩菌の膜脂質に存在する7つのヘリックスで構成される膜貫通型タンパク質です(図4)。bRに含まれるレチナール分子が光を吸収すると、トランス体からシス体へと異性化が起こり、約15ミリ秒の間に複数の中間体(K,L,M,N,O)を経てプロトン細胞外へと輸送し、元の状態に戻ります。最初のプロトン移動は、レチナールのプロトン化された Schiff 塩基から4 Åほど離れたプロトンアクセプター(Asp85)に移るところから始まります。基底状態のbR構造では、プロトン化 Schiff 塩基と Asp85 の間に複数の水分子が存在し、水素結合ネットワークを形成しています。これが、Schiff 塩基(pK<sub>a</sub> 13.3)と Asp85 (pK<sub>a</sub> 2.2) という酸解離定数の大きな差を生じ、プロトン輸送が起きにくい仕組みとなっています。このような状態から、最初のプロトン移動がどのようにして達成されるのか、また逆流せず同一方向の輸送が行われる仕組みについて興味をもたれてきました。2000年頃から多くの研究グループにより極低温下で中間体を捕捉する方法(クライオトラップ法)により、多くの中間体構造が決定されてきましたが、分光学的に同じ中間体でもそれぞれ構造には違いが見られたことから、プロトン輸送機構の議論終結には至っていませんでした<sup>9</sup>。その理由として、bRは低い放射線量でも放射線損傷を受けやすく、レチナール周辺の水分子や残基の構造が変化すること、またクライオトラップ法は時間依存的でなく、平衡化後の準安定構造を観測していることが挙げられ、真の中間体構造の解明が期待されてきました。

そこで、先に述べた時分割SFX実験装置を用いて、LCP法で作成したbRの結晶を用いて検討を行ったところ、最終的には光照射後16ナノ秒から1.7ミリ秒の13タイムポイントでの測定を行うことができ、それぞれの中間体構造を2.1 Åの分解能で決定することに成功しました<sup>5</sup>。光励起後16ナノ秒の構造を見てみると、レチナール周辺に主な構造変化が見られ、シス体へと異性化したレチナールが平面ではなく捻じれた構造をしていることがわかりました。同時に Schiff 塩基と水素結合していた水分子(W402)が移動していることも明らかとなりました。従来この水分子の移動については、放射線損傷によっても消失することから、どのタイミングで起こるのか議論となっていました。290ナノ秒後には、レチナールは捻じれない平面構造となっており、20位のメチル基が細胞質側にシフトすることにより、近傍の Trp182 が上側に移動する様子も見られました。

動画のように時間毎に構造変化を観測していく利点は、どのタイミングでどんな事象が起こるのかがわかるだけでなく、一時的に表れる変化を発見できる点です。今回の観測では、一過性の水分子が現れることがわかりました(図5)。光励起から760ナノ秒程度経過すると、レチナール付近の Trp182 や Leu93 などのアミノ酸残基が細胞質側へと動き、Leu93 の側鎖が動いて生じた空間には、水分子に相当する電子密度が現れます。興味深いことに、こ

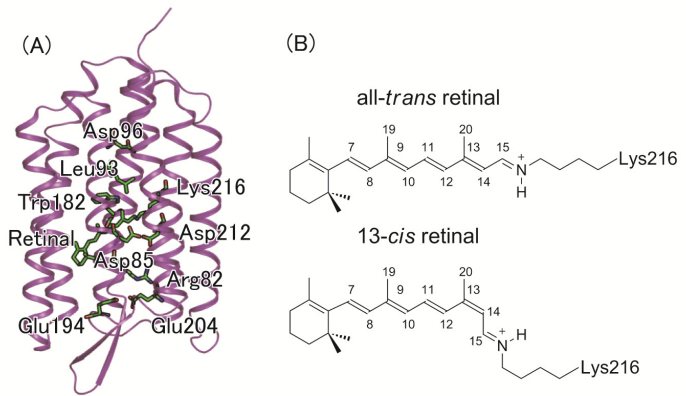


図4: バクテリオロドプシン  
(A: 全体構造, B: レチナール構造)

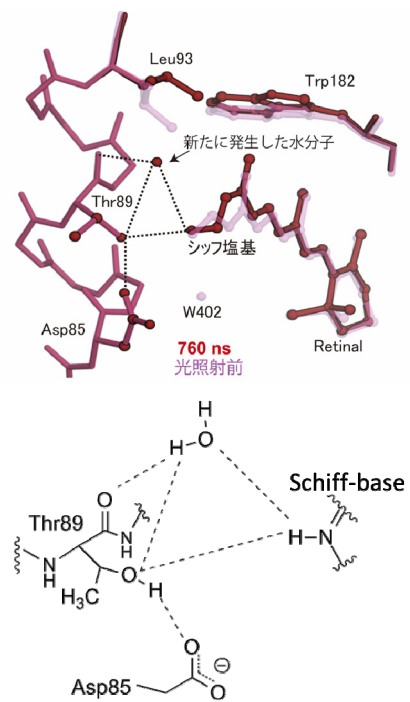


図5: 760 ナノ秒後の構造変化  
(上: 構造モデル, 下: 水素結合様式)

の水分子は光照射後 40 ナノ秒から 10 マイクロ秒の間のみ観測され、その後消失します。結晶を用いた分光実験により、このタイミングは M 中間体の前の L 中間体に相当し、M 中間体でプロトン移動が起こることが知られていることから、水分子はプロトン移動の際に現れることが明らかとなりました。また、この水分子はシッフ塩基及び Thr89 と水素結合しており、シッフ塩基から Asp85 へとプロトンを受け渡す重要な役割をしていると考えられます(図5)。レチナールの光異性化が起こると、シッフ塩基上のプロトンは細胞質側を向くため、移動するべき方向とは逆向きに動くことが謎でした。今回の結果により、一過性の水分子が現れることによって、Thr89 を経由して Asp85 に受け渡してプロトンを輸送する bR の巧みな仕組みが明らかとなりました。我々の構造解析では、どのようにプロトンが移動するのかまでは言及できませんでしたが、その後、Ono らにより我々の構造を用いてシミュレーションが行われ、Thr89 が一過性水分子のプロトンを引き抜き、水酸化物イオンが発生して、最後にシッフ塩基のプロトンを引き抜く反応機構が最も有利であることを提唱しました<sup>10</sup>。我々はこの水分子が消失した 36.2 マイクロ秒の前のタイムポイント(13.8 マイクロ秒)まではプロトン輸送が終わっていないと考えていましたが、シミュレーション結果より、もっと早い時点の 2 マイクロ秒から 5.25 マイクロ秒の間で起こる可能性を示唆しました<sup>10</sup>。

さて、シッフ塩基から Asp85 へのプロトン移動が達成されると、今度は、一時的に現れた水分子が消えるだけでなく、Asp85 と Thr89 の水素結合も時間 (~250 マイクロ秒) が経つと消失していきます。これにより、シッフ塩基と Asp85 の間は断絶された状態になり、プロトンの逆流が起こりにくくなります。また、最初のプロトン移動が終了するまでに、光照射からマイクロ秒オーダーの時間がかかっていました。これは、プロトン輸送が行われるまでに起こる構造変化には 3 番目や 7 番目のヘリックスの動きを伴うためと考えられます(図6)。プロトンが移動するきっかけはピコ秒オーダーで起こるレチナールの光異性化ですが、同一方向へのプロトン輸送を達成するため、それよりも長い時間を必要とすると思われます。

この実験では、ナノ秒からミリ秒にかけて“動画”のように bR の構造変化を追跡することで、最初は中心に存在するレチナール付近の小さな構造変化であったのが、時間経過につれて構造変化が外側へと広がっていく様子を捉えることができました。レチナールの光異性化を起点として、どのように bR が同一方向へのプロトン輸送を達成するのか、その巧みな仕組みを目の当たりにして、まさに“百聞は一見に如かず”と衝撃を受けました。その後も、フェムト秒~ピコ秒にかけて起こるレチナールの光異性化の瞬間を捉えることにも成功し、フェムト秒からミリ秒にかけて起こる壮大な分子動画の観察に至りました<sup>11</sup>。

必要試料量の削減など課題はありますが、光励起性タンパク質の反応や構造変化を可視化することは現実のものとなりました。一方で、タンパク質全般をターゲットとするにはまだ障壁が高く、特に今後は、酵素や受容体など光非感受性試料への応用を可能としていく必要があります。“酵素反応が行われる瞬間を原子レベルで観たい”という学生の頃からの問いを解くべく、これからも倦まず弛まず研究を進めたいと思っています。

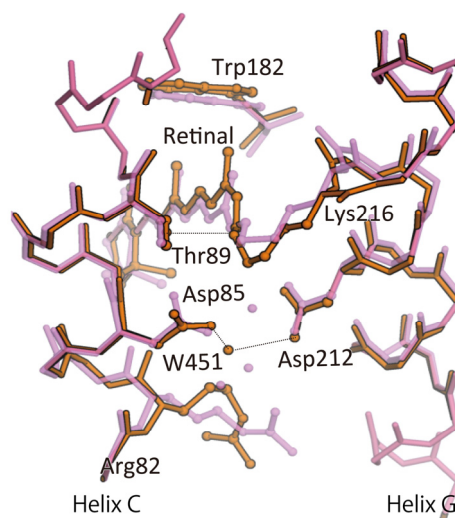


図6: 36.2 マイクロ秒後の構造変化  
(黄色: 36.2 マイクロ秒後, 薄紫: 基底状態)

## (参考文献)

- 1 Nango, E., Kumasaka, T., Hirayama, T., Tanaka, N. & Eguchi, T. (2008). *Proteins* **70**, 517-527.
- 2 Chapman, H. N., Fromme, P., Barty, A., White, T. A., Kirian, R. A., Aquila, A., Hunter, M. S., Schulz, J., DePonte, D. P., Weierstall, U., Doak, R. B., Maia, F. R. N. C., Martin, A. V., Schlichting, I., Lomb, L., Coppola, N., Shoeman, R. L., Epp, S. W., Hartmann, R., Rolles, D., Rudenko, A., Foucar, L., Kimmel, N., Weidenspointner, G., Holl, P., Liang, M. N., Barthelmeß, M., Caleman, C., Boutet, S., Bogan, M. J., Krzywinski, J., Bostedt, C., Bajt, S., Gumprecht, L., Rudek, B., Erk, B., Schmidt, C., Homke, A., Reich, C., Pietschner, D., Struder, L., Hauser, G., Gorke, H., Ullrich, J., Herrmann, S., Schaller, G., Schopper, F., Soltau, H., Kuhnel, K. U., Messerschmidt, M., Bozek, J. D., Hau-Riege, S. P., Frank, M., Hampton, C. Y., Sierra, R. G., Starodub, D., Williams, G. J., Hajdu, J., Timneanu, N., Seibert, M. M., Andreasson, J., Rucker, A., Jonsson, O., Svenda, M., Stern, S., Nass, K., Andritschke, R., Schroter, C. D., Krasniqi, F., Bott, M., Schmidt, K. E., Wang, X. Y., Grotjohann, I., Holton, J. M., Barends, T. R. M., Neutze, R., Marchesini, S., Fromme, R., Schorb, S., Rupp, D., Adolph, M., Gorkhover, T., Andersson, I., Hirsemann, H., Potdevin, G., Graafsma, H., Nilsson, B. & Spence, J. C. H. (2011). *Nature* **470**, 73-81.
- 3 Shimazu, Y., Tono, K., Tanaka, T., Yamanaka, Y., Nakane, T., Mori, C., Terakado Kimura, K., Fujiwara, T., Sugahara, M., Tanaka, R., Doak, R. B., Shimamura, T., Iwata, S., Nango, E. & Yabashi, M. (2019). *J Appl Crystallogr* **52**, 1280-1288.
- 4 Kubo, M., Nango, E., Tono, K., Kimura, T., Owada, S., Song, C., Mafune, F., Miyajima, K., Takeda, Y., Kohno, J. Y., Miyauchi, N., Nakane, T., Tanaka, T., Nomura, T., Davidsson, J., Tanaka, R., Murata, M., Kameshima, T., Hatsui, T., Joti, Y., Neutze, R., Yabashi, M. & Iwata, S. (2017). *J Synchrotron Radiat* **24**, 1086-1091.
- 5 Nango, E., Royant, A., Kubo, M., Nakane, T., Wickstrand, C., Kimura, T., Tanaka, T., Tono, K., Song, C., Tanaka, R., Arima, T., Yamashita, A., Kobayashi, J., Hosaka, T., Mizohata, E., Nogly, P., Sugahara, M., Nam, D., Nomura, T., Shimamura, T., Im, D., Fujiwara, T., Yamanaka, Y., Jeon, B., Nishizawa, T., Oda, K., Fukuda, M., Andersson, R., Bath, P., Dods, R., Davidsson, J., Matsuoka, S., Kawatake, S., Murata, M., Nureki, O., Owada, S., Kameshima, T., Hatsui, T., Joti, Y., Schertler, G., Yabashi, M., Bondar, A. N., Standfuss, J., Neutze, R. & Iwata, S. (2016). *Science* **354**, 1552-1557.
- 6 Suga, M., Akita, F., Sugahara, M., Kubo, M., Nakajima, Y., Nakane, T., Yamashita, K., Umena, Y., Nakabayashi, M., Yamane, T., Nakano, T., Suzuki, M., Masuda, T., Inoue, S., Kimura, T., Nomura, T., Yonekura, S., Yu, L. J., Sakamoto, T., Motomura, T., Chen, J. H., Kato, Y., Noguchi, T., Tono, K., Joti, Y., Kameshima, T., Hatsui, T., Nango, E., Tanaka, R., Naitow, H., Matsuura, Y., Yamashita, A., Yamamoto, M., Nureki, O., Yabashi, M., Ishikawa, T., Iwata, S. & Shen, J. R. (2017). *Nature* **543**, 131-135.
- 7 Tosha, T., Nomura, T., Nishida, T., Saeki, N., Okubayashi, K., Yamagiwa, R., Sugahara, M., Nakane, T., Yamashita, K., Hirata, K., Ueno, G., Kimura, T., Hisano, T., Muramoto, K., Sawai, H., Takeda, H., Mizohata, E., Yamashita, A., Kanematsu, Y., Takano, Y., Nango, E., Tanaka, R., Nureki, O., Shoji, O., Ikemoto, Y., Murakami, H., Owada, S., Tono, K., Yabashi, M., Yamamoto, M., Ago, H., Iwata, S., Sugimoto, H., Shiro, Y. & Kubo, M. (2017). *Nat Commun* **8**, 1585.
- 8 Claesson, E., Wahlgren, W. Y., Takala, H., Pandey, S., Castillon, L., Kuznetsova, V., Henry, L., Panman, M., Carrillo, M., Kubel, J., Nanekar, R., Isaksson, L., Nimmrich, A., Cellini, A., Morozov, D., Maj, M., Kurttala, M., Bosman, R., Nango, E., Tanaka, R., Tanaka, T., Fangjia, L., Iwata, S., Owada, S., Moffat, K., Groenhof, G., Stojkovic, E. A., Ihalainen, J. A., Schmidt, M. & Westenhoff, S. (2020). *elife* **9**, e53514.
- 9 Wickstrand, C., Dods, R., Royant, A. & Neutze, R. (2015). *Biochim Biophys Acta* **1850**, 536-553.
- 10 Ono, J., Imai, M., Nishimura, Y. & Nakai, H. (2020). *J Phys Chem B* **124**, 8524-8539.
- 11 Nogly, P., Weinert, T., James, D., Carbajo, S., Ozerov, D., Furrer, A., Gashi, D., Borin, V., Skopintsev, P., Jaeger, K., Nass, K., Bath, P., Bosman, R., Koglin, J., Seaberg, M., Lane, T., Kekilli, D., Brunle, S., Tanaka, T., Wu, W., Milne, C., White, T., Barty, A., Weierstall, U., Pannells, V., Nango, E., Iwata, S., Hunter, M., Schapiro, I., Schertler, G., Neutze, R. & Standfuss, J. (2018). *Science* **361**, eaat0094.



## 気になった論文

根岸 諒 (ねぎし りょう)  
東京農工大学大学院 工学府 特任助教  
r-negishi@go.tuat.ac.jp

この度は、生命化学研究レター「気になった論文」への執筆の機会をいただき、ありがとうございます。私は、東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門の吉野知子教授の研究室にて、血液中を循環するがん細胞である血中循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cell: CTC)を対象とした単一細胞解析技術の開発を進めています。

がんは遺伝子の異常により発生し、無秩序に増殖を繰り返すことで、患者の身体を蝕む病気です。がんによる主な死因は、最初に発生した部位(原発巣)と異なる臓器に移動し増殖する「転移」が挙げられ、がん細胞の浸潤・転移を抑制することががんの治療法開発において重要な課題となります。CTC はがん原発巣から血管内に侵入し、血流に乗って全身を循環するため、がんの転移に直接的に関与する細胞であると考えられています。そのため、CTC はがんの転移機構を理解する上で重要な研究対象であり、リキッドバイオプシー(体液検査によるがん診断技術)などを含めた幅広い応用が見込まれています。一方で、CTC は正常血球 50 億個を含む血液 1 ml 中に多くても 100 個程度しか存在しない非常に希少な細胞であり、効率的な CTC 回収技術の開発が進められてきました。技術開発そのものは 2000 年代初頭から進められていたこともあり、一旦成熟を迎えているのですが、ここ数年での新たな動きとして、処理可能な血液量を増大させる方向でのブレイクスルーが達成される機運が高まってきました。そこで、本稿では関連する論文を 2 報紹介したいと思います。

**Single-Cell Analyses of Prostate Cancer Liquid Biopsies Acquired by Apheresis**

Lambros, M. B.; Seed, G.; Sumanasuriya, S.; Gil, V.; Crespo, M.; Fontes, M.; Chandler, R.; Mehra, N.; Fowler, G.; Ebbs, B.; Flohr, P.; Miranda, S.; Yuan, W.; Mackay, A.; Ferreira, A.; Pereira, R.; Bertan, C.; Figueiredo, I.; Riisnaes, R.; Rodrigues, D. N.; Sharp, A.; Goodall, J.; Boysen, G.; Carreira, S.; Bianchini, D.; Rescigno, P.; Zafeiriou, Z.; Hunt, J.; Moloney, D.; Hamilton, L.; Neves, R. P.; Swennenhuis, J.; Andree, K.; Stoecklein, N. H.; Terstappen, L.; de Bono, J. S., *Clinical Cancer Research* **24** (22), 5635-5644. (2018)

単一細胞解析はここ 10 年ほどの技術革新により一気に普及を見せており、多種多様なサンプルへの適応が進められています。CTC の解析においても、単一細胞解析は非常に有効な手段であり、様々な先進的な研究から CTC 独自の性質が徐々に明らかとなってきました。一方で、CTC の解析における最大のネックは、その存在数の少なさにより、得られる情報が極めて限定的である点です。CTC の存在数はがん種や患者によってばらつきがあり、数百個回収できる場合と、数個しか回収できない場合があります。さらに CTC は血流による剪断応力に晒されていることもあり、例え単一細胞レベルで分離できたとしても、解析データが得られない場合があります。そのため、CTC が少ない症例などを解析対象とすることが困難であり、多くの CTC が回収できるがん種や症例に絞った解析が進められていました。CTC 研究初期に登場した CTC の回収装置である CellSearch System の技術仕様や採血管の規格など、様々な要因があるのですが、

現在普及している CTC の回収技術の多くは血液 7.5 mL 程度を対象として設計されています。そこで、著者らはより多くの血液から CTC を回収するために、体外循環式の血球分離システムであるアフエレーシスを用いた CTC の回収方法を確立しました。

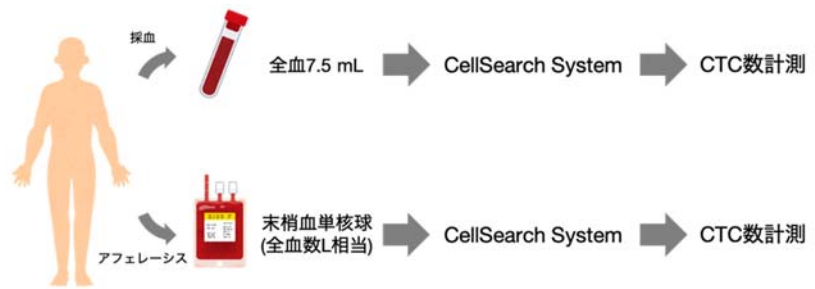


図 1. アフエレーシスと CellSearch System を併用した CTC 回収方法の性能評価試験のスキーム

アフエレーシスは患者と接続す

ることで血液中から血漿成分や血球成分を連続的に分離することができる装置であり、本論文では数リットルの血液から CTC を含む末梢血単核球を分離し、CellSearch System にて CTC を回収しています (図 1)。転移性去勢抵抗性前立腺がん患者 14 名を対象として CTC を回収したところ、CellSearch System 単独では平均 167 個の CTC が検出されましたが、アフエレーシスと CellSearch System を組み合わせることによって平均 12,546 個と、約 90 倍の CTC が検出されました。さらに、著者らは回収した CTC を Fluorescent activated cell sorting (FACS) にて単一細胞レベルで分離し、全ゲノム増幅を行なった上で Array CGH による網羅的なコピー数変動を解析しました。ここでは詳細は割愛しますが、全ての患者に対して CTC の Array CGH を行うことができおり、CTC は前立腺がん原発巣のコピー数変動を反映したゲノム構造を有していることを明らかにしています。CTC の解析結果についてはこれまでの研究でも議論されていた内容と重複する点が多く、全く新しいわけではないのですが、この論文で私が注目したポイントは、CTC の単一細胞レベルの分離に FACS を使用できた点です。一般的に CTC は数が非常に少ないため、単一細胞のロスを防ぐために分離にはマイクロマニピュレーションというガラスキャピラリーで細胞を分取する、労働集約的な手法が使用されています。そのため大学のような研究機関であればともかく、一般的な医療機関で日常的に実施するには技術的なハードルが高すぎるものが課題となっていました。本論文は、アフエレーシスを用いて数万個レベルの CTC を回収することで、FACS などのスタンダードな細胞分離装置 (原理的にある程度の細胞のロスを許容している装置) での単一細胞分離を可能としており、CTC 研究の技術的ハードルを下げた点に大きな意義を持っていると考えられます。もちろんアフエレーシスも FACS も、どこの病院にも置いてあるような装置ではありませんが、CTC 研究の次の展開を予感させるには十分なインパクトを感じました。

### Ultrahigh-throughput magnetic sorting of large blood volumes for epitope-agnostic isolation of circulating tumor cells

Mishra, A.; Dubash, T. D.; Edd, J. F.; Jewett, M. K.; Garre, S. G.; Karabacak, N. M.; Rabe, D. C.; Mutlu, B. R.; Walsh, J. R.; Kapur, R.; Stott, S. L.; Maheswaran, S.; Haber, D. A.; Toner, M., *PNAS* **117** (29), 16839-16847. (2020)

続いてはマサチューセッツ総合病院の研究グループから発表された論文です。研究グループを率いている Daniel Haber と Mehmet Toner は CTC 研究の黎明期から技術開発・応用研究を展開している古株で、非常に重要な論文を数多く発表しています。先程紹介した論文で使用されていた CellSearch System は CTC の表面抗原を標的とした技術であり、原理上回収不可能な CTC が存在する課題を持っていたのですが、著者らのグループでは白血球を認識する抗体を修飾した磁気ビーズを用いて白血球を除去し、CTC

を回収する”CTC-iChip”というデバイスを発表していました。こちらは原理上 CellSearch System が回収できない CTC も回収できますが、1回で処理できる血液量はやはり 10 mL 程度が上限でした。そこで、本論文ではアフレーションを用いて回収した末梢血単核球 (Leukapheresis product: LP) からの CTC 回収に向けたデバイスを開発しています。

LPCTC-iChip と名付けられた新型デバイスは、全血の十倍以上(約6億個)存在するLP中

の白血球を効率的に除去するために、流体中で細胞にかかる慣性を利用した赤血球・血小板の除去デバイスと、磁気分離デバイスを組み合わせた設計となっています (図 2)。これにより、LP から赤血球・血小板を除去した後、白血球を認識する抗体修飾磁気ビーズを混和することで、磁気分離による白血球の除去を可能としています。特に秀逸なのは磁気分離デバイスの設計です。デバイスの流路中央部に白血球誘導用の磁場を作成するために、流路の上下に永久磁石を設置しているのですが、流路側面に軟磁性の鉄粒子を封入することで、磁場の強度を通常の 35 倍まで増強させることに成功しています(図 2B のピンク部が該当)。具体的には、白血球に磁気ビーズが 1 個でも結合していれば分離できる程の強力な磁場を局所的に発生させることが可能となっており、LP 中から 99.9%以上の白血球を除去できることが示されています。この論文では実際のがん患者症例を対象とした実証試験は行われていませんが、CTC から樹立した細胞株を LP に添加した模擬サンプルでは 85%以上のがん細胞回収効率を示しており、実用に耐えられる性能を持っていると考えられます。最終的に回収される細胞懸濁液は  $10^6$  cells 程度となるので、FACS によるソーティングや、デジタル PCR、がんパネルシーケンス解析などによる変異検出、ドロップレットを利用した超並列単一細胞 RNA-seq などの幅広い応用が可能になると期待できます。現時点では製品化の予定は発表されていませんが、近い将来スタンダードな技術として普及し、CTC を用いた新たなアッセイや治療法の確立に貢献していく可能性を秘めていると考えられます。

今回は紙面の都合上 2 報のみを紹介しましたが、2018 年頃からアフレーションを利用して CTC を検出する試みが増加しています。従来の CTC 研究では、CTC の希少性故の問題ではありますが、解析装置を CTC 専用に必要な開発があり、医療現場が CTC 研究を望んでも踏み込みにくい状況でありました。アフレーションを利用した手法は、一般的な細胞解析装置を用いた CTC 研究を可能とする点で非常に強力な手段となると考えられ、一時の流行ではなく、新たなスタンダードとして定着する可能性を持つと期待できます。今後も研究の展開を注視していき、追従できるようなアプローチを考えていきたいと思っています。

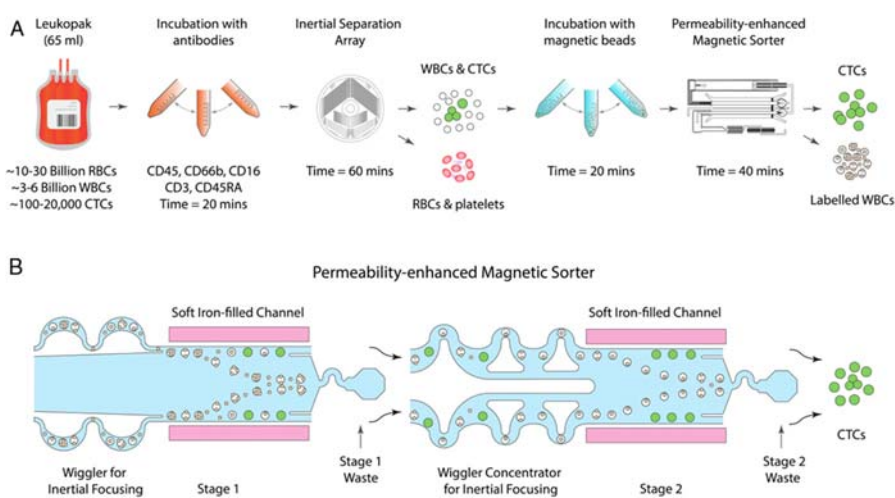


図 2. LPCTC-iChip による CTC 回収の流れ

A. LP からの CTC 回収スキーム。B. 軟磁性鉄粒子を利用した磁気分離デバイスによる白血球の磁気分離のイメージ。

## 気になった論文

呉 静 (ご せい)

静岡大学グリーン科学技術研究所 特任助教

wu.jing@shizuoka.ac.jp

この度は、生命化学研究レター「気になった論文」への執筆の機会をいただきまして、大神田淳子教授をはじめとする編集委員の先生方に深く感謝申し上げます。私は、静岡大学グリーン科学技術研究所河岸洋和教授の研究室で、高等菌類が産生する生体機能調節物質の生物有機化学的・生化学的研究を行っています。主にキノコの生活環を制御する分子(ホルモン)の探索、およびフェアリー化合物の科学とその応用展開に関する研究に携わっております。天然有機化合物は生物活性物質の宝庫です。現在、新規活性物質の探索研究は中国で非常に盛んに行われている一方で、日本での研究は衰退してきています。私は、天然物化学に関する研究の魅力をもっと日本中に普及していきたいと考えております。天然有機化合物の化学合成および生合成経路解明などの研究を行うことによって、自然現象の解明に繋がること、また、それらが農薬や医薬品へ有効利用されることが期待できます。今回気になった論文としては、糸状菌由来フェニルフロピリドン類の生合成経路、およびマジックマッシュルームが傷ついた時に産生する青色化合物の構造決定および生合成経路の解明に関する論文を紹介させていただきます。

## Concise Biosynthesis of Phenylfuopyridones in Fungi

Z. Zhang, T. Z. Qiao, K. Watanabe, and Y. Tang, *Angew. Chem. Int. Ed.* 59, 19889–19893 (2020).

大村智らが最初に糸状菌*Penicillium* FKI-1938から発見したシトリドンA (**1**)を含むフェニルフロピリドン類は、細胞毒性および抗菌活性を持ち、アズール系抗真菌薬の活性を増強させることが報告されている。**1**およびCJ-16173 (**2**)の化学合成も報告されている。本論文において、フェニルフロピリドン生合成遺伝子群の異種宿主発現系を構築して、**1**およびその類縁体の生合成経路が明らかにされ、特に、ピリドン環あるいはピリジン環を持つフェニルフロピリドン類化合物の四級炭素の形成メカニズムが解明された。

渡辺、Tangらは、産生菌である*Penicillium* FKI-1938のゲノム解析において、ポリケチド合成酵素-非リボソームペプチド合成酵素 (PKS-NRPS) および環拡大反応を触媒するシトクロムP450 (P450<sub>RE</sub>)の配列を基に、フェニルフロピリドン生合成に関与する5種類の遺伝子 *pfpABCDE*を予想し、*Aspergillus nidulans*における異種宿主発現系を再構築した。フェニルフロピリドン生合成酵素遺伝子の各サブユニットA, B, C, D, E遺伝子をそれぞれ共存可能なベクターにクローニングし、*A. nidulans*へ導入した。形質転換体を培養し、LC-MSを用いて産生物質を解析した(図1)。PKS-NRPSをコードしているPfpAにより、ディークマン環化反応が進行し、フェニ

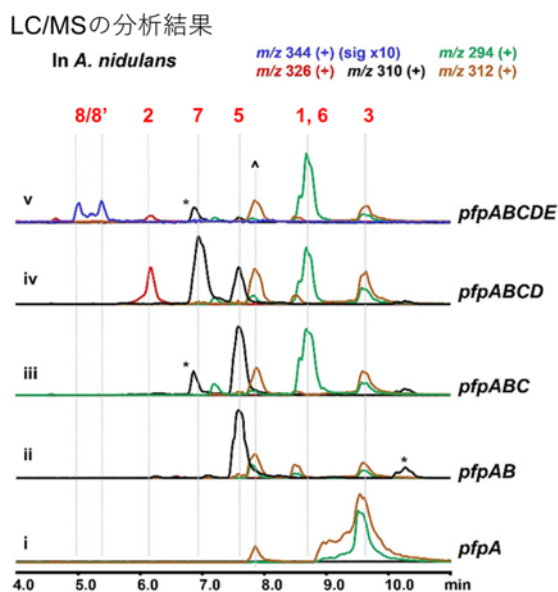


図1. 遺伝子による生産物への影響  
(論文より抜粋、一部改変)



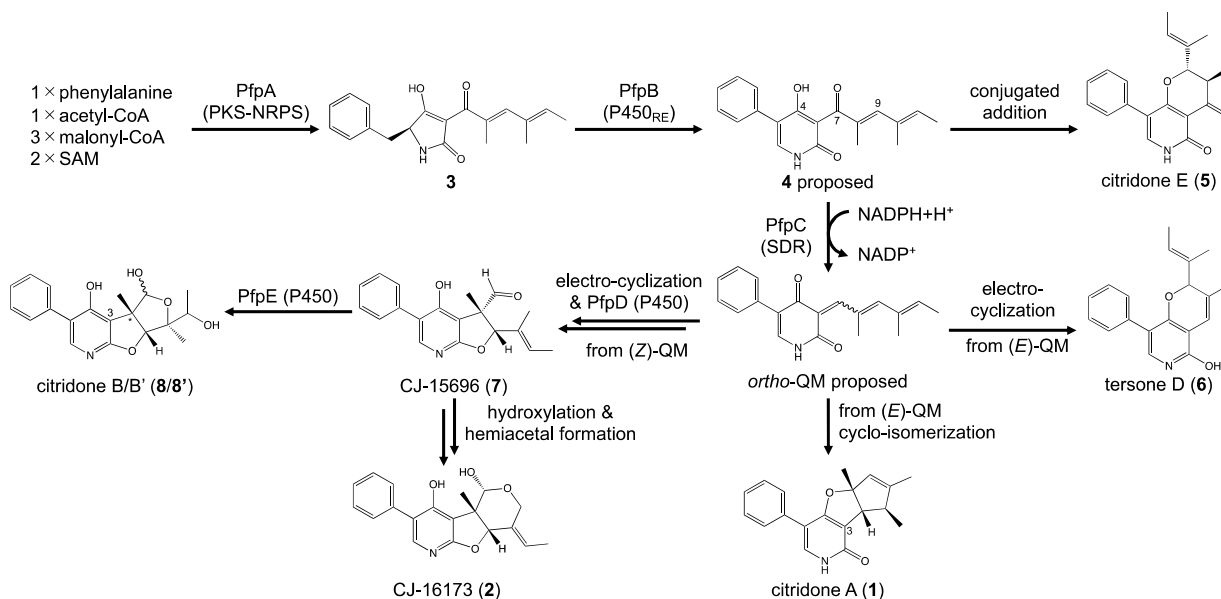


図2 *Aspergillus*属によるシトリドン関連化合物の予想される生合成経路（論文より抜粋，一部改変）

ルアラニン由来のテトラマト(3)が生成される(図1-i, 図2)。さらに, PfpABを共発現させた場合, シトクロムP450<sub>RE</sub>であるPfpBが働くことで, 2-ピリドン骨格を持つ中間体4のC-4位のヒドロキシ基とC-9位のオレフィンが1,4-共役付加反応を行い, シトリドンE(5)が生成する(図1-ii, 図2)。一方, PfpCは短鎖デヒドロゲナーゼ/レダクターゼ(SDR)ドメインから構成され, 化合物4はオルトキノンメチド中間体(*ortho*-QM)へ変換された。続いて, 高い反応性を持つオルトキノンメチド中間体である(*E*)-QMから電子環化反応, 異性化を伴う環化反応を経て, テルソンD(6)および1が生合成される(図1-iii, 図2)。さらに, 中間体(*Z*)-QMは電子環化反応およびシトクロムP450(PfpD)による共役付加反応を介して, CJ-15696(7)および2に変換される(図1-iv, 図2)。最後に, シトリドンB(8/8')の四級炭素はシトクロムP450(PfpE)によるエポキシ化, それに続く炭素骨格の転位反応によって形成される(図1-v, 図2)。

本論文では, 糸状菌*Penicillium* FKI-1938に由来する1の化学構造に含まれるフェニルフロピリドン骨格が, ポリケチド合成酵素とペプチド合成酵素のハイブリッド型巨大酵素によって生合成されることを明らかにした。今後, ピリドン環あるいはピリジン環を持つ天然には存在しない優れた生物活性を有する化合物の創製が期待される。

### Injury-Triggered Blueing Reactions of *Psilocybe* “Magic” Mushrooms

C. Lenz, J. Wick, D. Braga, M. G. Altares, G. Lackner, C. Hertweck, M. Gressler, and D. Hoffmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* 59, 1450–1454 (2020).

シビレタケ属であるマジックマッシュルームはトリプタミン系アルカロイドのシロシビン(*psilocybin*, 1)およびシロシン(*psilocin*, 2)を含む向精神性毒キノコである(図3A)。体内では1は脱リン酸化を起こし, 2が生成し, 2は5-ヒドロキシトリプタミン受容体のアゴニストとして働き, 幻覚作用を引き起こす。この

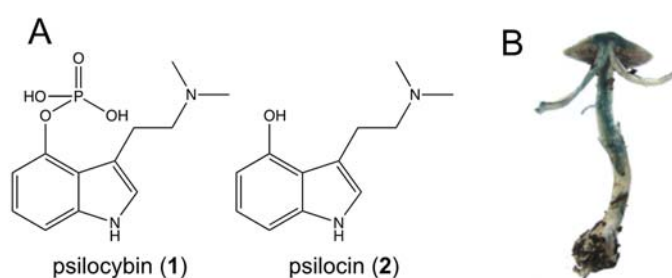


図3 (A) シロシビンとシロシンの構造 (B) 傷ついたミナミシビレタケ (論文より抜粋, 一部改変)

産生した**1**によって、菌食性昆虫の食害を回避できると言われている。マジックマッシュルームのもう一つの特徴は、傷をつけ、空気に触れさせると青色に変色する(図3B)。しかし、傷ついたマジックマッシュルームが青くなる原因物質およびそのメカニズムは不明なままであった。本論文では、ミナミシビレダケ(*Psilocybe cubensis*)由来の青色色素の構造決定および生合成経路を解明し、その関連酵素であるホスファターゼPsiPとオキシダーゼ(ラッカーゼ)PsiLの同定にも成功した。

Hoffmeisterらはミナミシビレダケの子実体から抽出したタンパク質をイオン交換クロマトグラフィーに供し、その後、疎水クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。精製したタンパク質はホスファターゼ活性と酸化

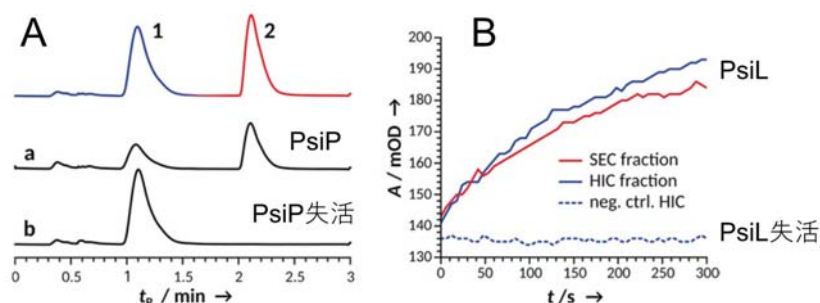


図4 *In vitro*酵素反応分析 (A) PsiP (B) PsiL (論文より抜粋、一部改変)

化活性試験の結果、およびペプチドマスフィンガープリンティング法により、ホスファターゼPsiPとラッカーゼPsiLが同定された。*In vitro*酵素反応のLC-MS解析により、**1**はホスファターゼPsiPによって、**2**に変換された(図4A)。さらに、**2**がラッカーゼPsiLと反応し、青色色素が生成した(図4B)。

続いて、青色色素の構造解析を行った。モデル反応として、**2**を塩化鉄(III)で酸化させ、MSおよびIRスペクトルにより、青色色素は**2**の二量体であると決定した。また、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)と反応させた**2**は、MALDI-MSと*in situ* <sup>13</sup>C NMRを測定した結果、主にC-5位の炭素が酸化的カップリングし、キノイド骨格を持つ青色二量体(**3**)に変換されることが明らかになった。しかし、この青色化合物は単一化合物ではなく、さらにオリゴマー化とポリマー化を経て、青色色素(**4**)の混合物質が生成した(図5)。

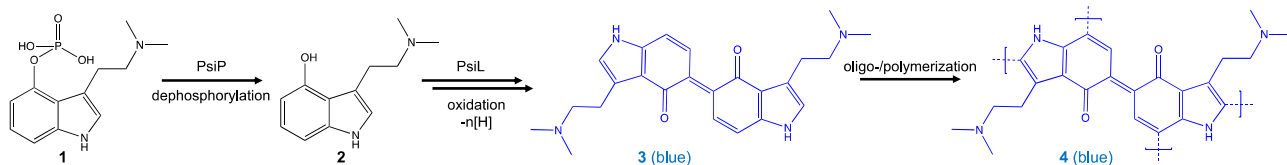


図5. 青色色素の生合成経路 (論文より抜粋)

本論文では、傷ついたマジックマッシュルームにおける青色への変化に関わる酵素ホスファターゼPsiPとラッカーゼPsiLを同定し、その青色色素の構造も明らかにされた。今後は、この青色混合物質の生物学的役割解明が期待される。

## 海外留学・海外就職

シンガポール工科デザイン大学

橋本道尚

[hashimoto@sutd.edu.sg](mailto:hashimoto@sutd.edu.sg)

Twitter: @66mh(個人)/ @SoftFluidics(研究室)



この度執筆の機会を頂きました橋本道尚と申します。現在はシンガポール工科デザイン大学 (Singapore University of Technology and Design, SUTD) の准教授として研究活動と教育活動に従事しています。日本の高校を卒業してからアメリカの大学の学部生として留学して以来、日本国外での生活が 20 年以上続いています。本稿では本日に至るキャリアの変遷と、特に principal investigator (PI, 研究室主宰者) になってからの経験を述べたいと思います。良いことを言おうとすると胡散臭くなるものですので、これから留学を考える学生さんや若い研究者の方に経験を共有するひとつのケーススタディと捉えて頂ければと思います。「留學生活・海外生活から何を得たか」というような問いについては、私自身が日本国内で学生生活、社会人生活を送っておらず、適切な指摘ができるかわかりません。新鮮な気分で始めた海外生活も、しばらくすれば生活の一部となり、おそらく 20 年の間に考え方も変わっているように思います。これまでに何度か留學経緯・経験などを書いたことがあり、文末にリンクを示しておきます。それぞれ執筆時点での率直な気持ちを書いたつもりです。ご興味があればご覧頂けたら幸いです。

**留學の経緯.** 海外生活を始めたのは 1999 年、日本で高校を卒業した直後でした。高校三年生の夏に受験勉強をしながら高校野球を見ていたら、同い歳の松坂大輔選手が大活躍していました。それに触発されて「俺も何かでかいことをして日本一になる」という思いがあり、大学はアメリカに行くことと決めたのが発端です。よく考えると、日本一になることとアメリカに行くことに論理的な繋がりはありません。誰かが同じようなことを言っていたら私は理解できないと思うのですが、自分がそうしたいと感じたことが大事でした。人と違うことをして秀でたいという考えと、10 代の若者特有の全能感や冒険心が絶妙に混ざった故の発想だったと思います。当時はインターネットがちょうど家庭に入ってきたような時期で、今のように留學生がブログを書いたり SNS で発信するようなこともありませんでした。自分の性格を考えると、誰かの合格体験記のようなものを読んでいたら、衝動的に自分を駆り立てるようなことはなかったと思います。情報に溢れていないことも良かったと思います。私は日本生まれ日本育ちで、留學のためにパスポートを取るような状況でしたが、選択を応援してくれた両親には感謝しています。今は私も親になりました。子どもが同じようなことを言い出したら応援できるでしょうか、私の度量が試されると思います。

高校生の頃は医師になりたいとぼんやりとっていました。松坂選手に影響されたこともあり、ア

アメリカの大リーグのチームドクターになることを目標に定めて、オレゴン州立大学のスポーツサイエンス学部に進学しました。留学当初は英語もわからず、現地の学生が難なくこなすようなインタビューの課題などが難しかったのを覚えています。「スポーツサイエンス基礎」のようなコースには全くついていけない一方で、必修として履修していた化学の授業は(英語があまり必要ないので)好成績を修められました。そんな中で有機化学の教授のラボの学部生インターンに誘ってもらったことが現在のキャリアを選ぶきっかけになりました。進路の変更は悩んだのですが、大学二年の途中で学科を変えて、その後に研究者としてのキャリアを意識して大学院進学を考えるようになりました。アメリカの大学院進学はある程度の準備が必要で、学部時代の指導教員である有機化学の David Horne 教授には大変お世話になりました。有機化学の研究自体は楽しいものでしたが、数理的・工学的な分野に興味をもつようになり、物理化学・化学工学分野で大学院に応募しました。余談ですが学科の変更は紙を一枚出すだけで受理されたのですが、この自由度は教育機関として望ましいものだと思います。高校生や大学生が描く未来は常に更新されていくので、制度として若者の不確実さを許容できると良いのではないのでしょうか。

**大学院・ポスドク.** 大学院はアメリカ・イギリスの大学院に応募して、ハーバード大学大学院の化学・生化学科に進学しました。George Whitesides 教授の研究室で microfluidics (マイクロ流体科学・工学)、特にマイクロ流路内での気泡・液滴の生成に関する研究に取り組みました。40 人以上の研究員が所属するいわゆるビッグラボで、振り返ると、研究テーマの発展のさせ方が独特だったと思います。化学という discipline (分野) を非常に大きく捉えており、黎明期にあるテーマを大きくする段階に関わり、そこから 10 年ほど経って世の中が注目する頃には手放して自分たちは新しいテーマに取り組むといったスタイルで研究に取り組んでいました。自分自身を振り返ると大学院生の頃は非常に苦勞した実感があります。ビッグラボではよくある話ですが、指導教員とやりとりできる時間も限られましたし、何もないところに新しい研究の潮流を生み出そうという方針は(それが知的に面白く、学術的にも意義があることなのは今になれば理解できるのですが)、研究を始めたばかりの大学院生は苦勞すると思います(私は苦勞しました)。一方で、異なる分野の知見を組み合わせ新しいものを生み出すことや、研究結果を文章化して説得力のあるビジョンを示して発表することなど、PI として研究室を運営する上で必要な能力の土台を作ったのはこの時期でした。大学院生の頃のトレーニングの真の価値を自分が理解したのは PI になってからでした。何事にも時間がかかりますね。

ところでアメリカ国内の博士課程では学生に学費や給料が出るし、結果が出なければ解雇もあり得るという前提で運営されることが多く、就職に近いと考えています。私自身も「大学院の博士課程研究員として就職する」という感覚で進学しました。5 年間で知識と技術を学び、卒業したら就職活動をして次の仕事を探すという感じで、終身雇用を期待しなければキャリアを構築する有益なトレーニングだと思います。博士課程自体は精神的にも大変で経験を消化(昇華)するのは時間がかかりましたが、自分の価値観を育むという意味で良い経験だったと考えています<sup>1,2</sup>。

大学院卒業後はポスドク研究員として、ハーバード大学医学部の Daniel Kohane 教授の研究室と、マサチューセッツ工科大学(MIT)の Robert Langer 教授の研究室に所属して、緑内障シャントと呼ばれるデバイスの開発に取り組みました。大学院での研究が基礎に近いものだったので、応用・実



用に近い部分での研究に携わりたいという動機がありました。工学部と病院の2つの研究室に所属できたことは、研究の視野を広げる機会になったと思います。Langer 研究室は MIT の中でもユニークな仕組みの研究室だったと思います。アメリカの大学では1人のPIが研究室を主宰することが多いのですが、Langer 研では研究室内にグループリーダーが複数人いて、学部生からポスドクまで合わせると100人を超えるメンバーが在籍していると言われていました（誰も数えていないと思います）。また研究室発の技術の社会実装に積極的に取り組んでおり、卒業生が研究室発のスタートアップに研究・開発の役割で就職するだけでなく、経営コンサルティング会社やベンチャーキャピタルなどに就職した学生が、後に研究室発のスタートアップの経営に関わるなど、多層なレベルでの人材の循環があるように見えました。アメリカの大学の研究室の中でも特殊な成功例だと思えますが、このような研究室で研究生活を過ごしたことで、長期的には自分も技術の社会実装に取り組みたいと思うようになりました。近くに実例が多くある環境に身を置くと、自分もできると思えるようになるのが良いと思います。

**就職活動.** 就職活動は大学院卒業時、ポスドク研究員の任期満了時の2回行いました。私は研究活動が好きなのですが、大学で研究を続けることには（昔も今も）必ずしも強いこだわりはありません。大学でのポジションは日本だけでなく世界的に数が限られていますし、それだけを目指すのは現実的でもありません。さらに言えば、色んなことに興味をもてる性格なのも幸いして、必ずしも研究職でなくとも自分を生かせる場所はあると思っていました。大学院を卒業した時には、場所にこだわらず（アメリカ、日本、ヨーロッパなど）、さまざまな業界・職種（大学、国立研究所、企業、コンサルティング会社、金融機関など）について調べて、就職を検討しました。ポスドクを終えるときも迷いはあり、大学、企業研究所の他にもベンチャーキャピタルなどの面接を受けました。どのような職種に就くのであれ、自分で調べること、他人と話すことは、自分の興味を明確に理解することにつながると思います。最終的には多国籍企業の研究所と、シンガポールにある現在の大学からオファーをもらい、今の大学でのテニュアトラックPIのポジションを選択しました。後述するように、現在の勤務先大学は10年前にMITのサポートを得て設立されたばかりの新設大学で、大学の立ち上げ教員（founding faculty member）としての着任でした。研究室の主宰者であるのに加え、スタートアップのように大学の文化を創っていく段階で教員として携われることが面白いと思ったことがオファーを受けた主な理由です。またその時点で既にアメリカに13年住んでいたの、別の国に行ってみたかったという理由もありました。

**サバティカル.** 大学院生の頃から考えていたのですが、キャリアの途中で時間を取り、色んな国を訪問したいと思っていました。学生の頃から貧乏旅行が好きだった延長ですが、しかし年齢を重ねると、ふらっとキャリアに穴をあけて旅行するような適当な感じを出しづらくなるものです。私の場合はポスドクと助教の間に国を移動することになりましたので、着任時期を相談して、9カ月間自分の時間を取って世界各国の研究所を回ることにしました。大学院やポスドク時代の同僚に連絡を取り（持つべきものは将来偉くなる立派な友人です）、サンパウロ大学（ブラジル）、国立清華大学（台湾）、東京大学（日本）、エネルギー関連企業（サウジアラビア）にて研究員として滞在しました。元同僚との再会だけでなく、PIとして独立した元同僚が研究室を運営するのを見ることは、これから独立する自分にとっても有意義な経験でした。厳密に言えば大学に属していたわけではないので、サバティカルというよりはギャップイヤーのような形ですが、この9カ月はこれまでのキ

キャリアの中でも本当に充実した期間でした<sup>3</sup>。余談ながら、サバティカルについては、20代の頃は研究や仕事に全く関係ないことをしたいと思っていたのですが、実際には研究関連の活動に時間を使うことになりました。もっと鷹揚に構えて、自分の行動に意味付けを求めなくても良かったのかもしれませんが。とくに学生さんが同じような機会を得られるのであれば、キャリアの穴や短期的な実利などは気にせずに、自分がやってみたいことに時間を使ってみるのが良いと思います。

**PI.** 2014年の春よりシンガポール工科大学 (SUTD) にテニュアトラック助教として着任しました<sup>4</sup>。前述のように SUTD は 2009 年に設立されたばかりの大学で、正式なキャンパスができたのは 2015 年でした。着任直後は引越しを控えていたため仮キャンパスに研究室は作らず、新しいキャンパスに移動したあとも内装・電気系統の整備などがあり、研究室が機能するのにさらに半年ほどかかりました。とりわけ実験系の教員にとっては立ち上がりが難しい状況で、最初の 1 年半ほどは文字通り何も実験ができませんでした。大学・研究所の基本的な機能 (例えば消耗品・備品の購入、ゴミの廃棄、配達物の受け取りなど) も着任時には不十分なこともあり、物事がスムーズに進まないことも少なくありませんでした。もちろん修士課程・博士課程すらも最初からあるわけではなく、定期的に大学院生が入学するのにも時間がかかりました。テニュアトラックの期間は決まっているので、この頃は非常に胃が痛い毎日でした。

どのテニュアトラック教員にとっても立ち上がりは難しいと思うのですが、大学自体が立ち上がる中で研究室の立ち上げを経験したことは独特な経験になりました。あえてこの時期の意味付けをするなら (自分の苦勞の正当化という人間らしい心の機序ですが)、自分の力ではどうにもならないことを受け入れ、大きく構える精神的な訓練になったかもしれません。また、研究活動に不可欠な仕組みが大学には多数存在しており、それらは誰かが作ったものであることを経験を通じて理解しました。新しい組織に就職を考えている方は、そのような点も意識してみると良いかもしれません。

もう 1 点、研究室の立ち上げで感じたことは、土地を大きく変えて研究室を立ち上げるときに起こるダウンタイム (稼働停止時間) についてです。着任後スムーズに研究を続けている同僚の間では、シンガポールの他大学の共同研究先のラボを間借りしているようなケースを散見しました。私の場合はアメリカからシンガポールへの異動でしたが、特に共同研究者や赴任先でのメンターがいたわけではありません。異動したときに何が起こるか想像できなかったのが率直な振り返りですが、この点はラボの立ち上げ時に研究が継続できるよう、戦略的に準備を進められたかもしれません。

PI の役割は研究室の運営ですが、論文発表、資金獲得、リクルーティング・人材育成などはとりわけ大事な仕事だと思います。通常どんな仕事をしているのかは以前に書いたことがあるのですが<sup>5</sup>、研究資金の獲得が全てに先立つものです。研究資金は内部資金と外部資金の競争的資金に分かれます。弊学では何もせずに支給される研究費は着任時を除いてありませんので、研究費を日々申請し続ける毎日です。外部資金の方が競争が激しく、また大学に間接経費をもたらしますので、人事評価や昇進などにおいては外部資金の獲得額が評価されます。相対的に通りやすい内部資金を足掛かりに、より大きな外部資金に応募していくのが通常の流れです。これは世界中の多くの大学と同じではないかと思います。

研究としては、着任して3年目の終わり頃、やっと自分たちの研究室から最初の論文を投稿することができました。論文を通すのも最初はなかなか難しく、自分がこれまで所属大学や指導教员のおかげでどれだけ下駄を履かせてもらったのか、遅まきながら理解しました。小さな内部資金で少しずつ立ち上げた研究テーマを元に外部資金を獲得して、自分たちの研究室の方向性を出すには5年程度かかったように思います。現在私たちの研究室では、デジタルファブリケーション（3Dプリンティング）技術とマイクロ流体技術を用いて、医用応用可能なデバイス・食品・生体模倣構造などを作製する研究に取り組んでいます。

テニユアトラックでは研究、教育、大学運営が評価項目になります。研究では研究費を安定的に獲得すること、分野で認められた論文誌に原著論文を定期的に発表することが評価され、教育では授業の学生評価、大学院生の指導が重要だといわれています。テニユアトラックの終盤では、新型コロナウイルスの感染拡大で大学が閉鎖されました。研究費申請、論文投稿は結果が出るまで時間がかかりますし、最後に追い込んでさほど変わりませんが、いつもに増して胃が痛い6年間のオチになりました。自分の貢献をまとめた dossier とよばれる 100 ページ以上の書類を提出し、10カ月にわたる国内外での審査があり、テニユアの授与と准教授への昇進が決まりました。私の分野では研究は1人ではできませんので、研究室のメンバーには（ミーティングでは詰めています）頭が上がりません。またこの長丁場をサポートしてくれた家族、同僚、友人に心より感謝しています。

**現在.** 2021年4月現在、15名のメンバー（修士学生2名、博士学生6名、ポスドク5名、リサーチアシスタント2名）と研究を進めています。これまでに2名の博士号取得者が研究室を卒業しました。チームメンバーの幅広い知識や経験のおかげで、私自身の研究の幅が広がり、チームとして成し遂げられることが広がっています。私自身の大学院・ポスドク時代の経験に基づき、専門性の異なるメンバーが集まることで新しいものを生み出せると考えていますし、土地柄もありますが、ラボメンバーの出身国が多岐にわたっていることも多様性があり嬉しいことです。日本からは過去に早稲田大学、慶應義塾大学、東京工業大学の大学院生が visiting student として滞在してくれました。日本の若い学生さんが経験を積む一助になれたことは光栄ですし、興味があれば気軽にご連絡頂けたらと思います<sup>6</sup>。私自身も17歳の頃の思いつきである「何かでかいことをして日本一になる」というのは忘れていませんし、今はでかいことをして世界一になりたいと思っています。

## References

1. 博士課程で学んで人生に役立っていること  
<http://www.michinao.com/blog/2015-10/4049>
2. 博士課程の話の続き  
<http://www.michinao.com/blog/2015-10/4084>
3. Self-produced Sabbatical  
<http://www.michinao.com/blog/2014-02/3362>
4. 何故シンガポールに来たのか  
<http://www.michinao.com/blog/2014-05/3532>
5. とある大学教員の仕事  
<http://www.michinao.com/blog/2019-02/4350>
6. グローバル化と研究者  
<http://www.michinao.com/blog/2013-02/2793>



写真：2020年4月 オンライングループミーティング（筆者最上段左から2番目）

# お知らせ



## 受賞

馬場 嘉信 (名古屋大学 未来社会創造機構)

第73回日本化学会賞

「ナノバイオデバイスによるバイオ計測化学・バイオ医工学の革新」

(2021年1月)

稲葉 央 (鳥取大学 学術研究院工学系部門)

Polymer Journal 論文賞－日本ゼオン賞

「Cyclic Tau-derived Peptides for Stabilization of Microtubules」

(2021年5月)

## 異動・昇任

稲葉 央 (鳥取大学 学術研究院工学系部門 准教授)

(2021年4月付)





【編集後記】

COVID-19に翻弄された2020年度は、当たり前のように感じていた多くのものごとが当たり前でなくなっただけでなく、現実を受け入れつつも、それぞれの立場で物事の新しい在り方を模索しながら前に進もうとした一年だったのではないのでしょうか。同時にこの一年ほど、世界の人々が生命科学研究の力を実感したことはなかったのではないかと思います。流行からわずか一年足らずという驚異的なスピードで人類はワクチンを手にし、ウイルスとの闘いに挑もうとしています。これにより多くの人命が救われ平穏な社会が取り戻されることを願ってやみません。

こうした状況下でありながら本号でも、国内外のボランティア執筆者の皆様のご尽力により生命科学の最新のトピックスをお届けできることになりました。お楽しみいただければ幸いです。

末筆ながら皆様のご健康をお祈りいたします。

2021年（令和3年）4月8日

大神田 淳子

生命化学研究レター編集委員

第62号編集担当：大神田 淳子  
信州大学、johkanda@shinshu-u.ac.jp

井原 敏博  
熊本大学、toshi@chem.kumamoto-u.ac.jp

松浦 和則

鳥取大学、ma2ra-k@tottori-u.ac.jp