

生命化学研究レター

(2022年4月)

2. 卷頭言

生命化学という研究会

東京工業大学生命理工学院 三原 久和

5. 研究紹介

5. 合理と非合理のあいだ ~知識は説明に、勇気を検証に~

慶應義塾大学理工学部 川上 了史

11. RNA を基盤としたバイオセンサー ~核酸機能の合理設計に向けて~

甲南大学先端生命工学研究所 遠藤 玉樹

17. タンパク質の化学的全合成とその先にあるもの

~タンパク質を超えるポリアミド分子の創成を目指して~

名古屋大学大学院工学研究科 林 剛介

23. 論文紹介「気になった論文」

信州大学大学院総合理工学研究科農学専攻 桐山 寛生

鳥取大学大学院工学研究科化学・生物応用工学専攻 古川 寛人

29. 留学体験記

UCSF 留学体験記

UCSF, Department of Cellular & Molecular Pharmacology 山田 俊理

33. お知らせ

受賞

編集後記

卷頭言

生命化学という研究会

東京工業大学生命理工学院 三原 久和

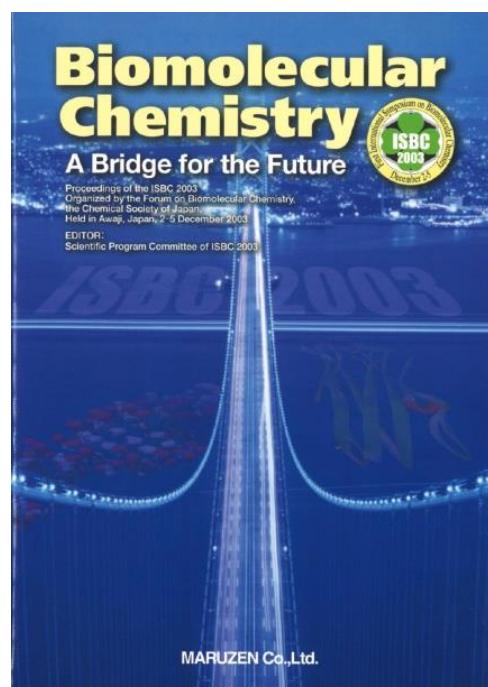
2021年12月の初め63歳の誕生日に編集委員の松浦さんから卷頭言を2015年から書いていないので、と依頼が来ました。快く受諾。現在の大学での職位柄、大学を取り巻く経営改革について固く書こうと思っていたが、年が明けて、どうしようかなと考えていると本生命化学研究レターのNo.63(2021年11月)号の卷頭言で”生命化学と私“と題して、二木さんが生命化学研究会の発足の発端となった熊本シンポジウムを振り返っていたので、別角度から研究会を思い起こしてみたいと考えました。当初から本レターは、できるだけやわらかい読み物にしようという主旨もあります。

まず、私事になりますが、1981年に修士課程に入学後、日本化学会に入会して40年も経過しました。九州大学理学部化学科生物化学講座というところで、卒研・修士・博士課程をペプチド中心に日夜過ごしました。1986年に博士課程修了後、米国ロックフェラーユニバーシティ(RU)のEmil Thomas Kaiser研究室に留学しました。多くの学生がアメリカを目指した時代です。米国での最低賃金に近い給料でNYCでの生活は楽ではありませんでしたが、RUは当時ノーベル賞をとりそうな教授ばかりが集まった総勢500人程度の研究所的大学で最高の環境でした。その中で10%の約50人が日本人の研究員と教員がいました。現役のノーベル賞受賞教授も、ペプチド固相合成法開発者のMerrifield教授を含めてたしか6名いたと思います。ここでは生物有機化学研究の他、最新の分子生物学研究に関して米国の最先端を目指していく科学文化に身を置くことができたのが貴重な体験だったことが今になってよくわかります。日本において論文を読むだけではわからない体験や感覚がたくさんあります。Kaiser研では約30名のポスドクがいて多くの友人ができたのも財産で、日本人も當時4~5名いました。その中に、現大阪府立大学の藤井さんがいたわけです。

Kaiser先生が他界したこともあり、1988年に九州工業大学に帰国後、工学部だったこともあり生体機能関連化学シンポジウムに初めて参加しました(理学部時代は工学部中心の部会と思っておりました。当時ペプチドに関する発表はわずかだったのを記憶しています)。また、助手時代の九州には、九大に浜地さん、熊本大に石田さん、鹿児島大に八島さん(現名古屋大学)がいたので、日本化学会や高分子学会等各九州支部の若手の会で頻繁に顔をあわせていたのもいろいろな考え方を学ぶいい機会でした。生体機能関連化学部会等の若手の会においても、佐藤さん、塩谷さん、杉本さん、竹中さん、馬場さん、深瀬さん、藤井さん、二木さん、和田さん他の生命化学研究会の発足時中心メンバーとも毎年2~3回は顔をあわせて議論を展開していました。1993年に長崎大学の工学部、その後1995年に東京工業大学生命理工学部に助教授として移動してから、米国の生物有機化学のゴードンカンファレンスに日本から数名で何度か出かけました。そこで若手を中心として活発にオーガナイズされた会と最先端を目指す研究討論に皆で非常に刺激を受けました。ここで当時米国にいた菅さんに初めて会ったと思います。1995年の頃、それぞれが30代真ん中程度で各大学の助教授になっていたので、±3~5歳で若手中心の研究会を作り、リラックスした環境で、とことん議論を行う会にしようということで始まったのが「生物分子化学研究フォーラム」です(詳

しくは、No.63(2021年11月)号の二木さんの巻頭言を参照ください)。熊本、箱根、徳島とこの前身の研究フォーラムを3年間行い、皆さんの仲間意識と会のポリシー・ビジョンを醸成した後、日本化学会の研究会制度に申請して1998年から「生命化学研究会」活動が始まりました。日本化学会の年会時に、浜地さんと一緒に（“小さな親切・大きなお世話”談話で有名な（？））甲南大学の杉本さん（当時40歳頃）に初代会長をお願いしに行つたのを覚えています。研究会ロゴも考えて（下図：6角形のベンゼン環と4つ葉のクローバーを重ねており、化学から生物学のイメージを表しています。名古屋大の田中健太郎さん（当時、東京大学）の草案だったということです。英語名は、まだChemical Biology分野が浸透しておらず、全身の生物分子化学が残っています。）。HPにある“生命化学研究”的文字（下図）は、馬場さんの奥様の達筆です。日本化学会の研究会組織になったので、会員以外も自由に参加できる「生命化学研究会シンポジウム」を泊りの生命化学研究会（会員用）の前日に開催していました。毎年1月初旬のシンポジウムと研究会以外にも数年に1回の国際会議を行おうと決め、第1回生命化学国際シンポジウムを淡路島で2003年に開催しました（第2回は甲南大学で2006年に開催）。招待した演者をみると、K. Shokat、C. Barbas、D. Hilvert、T. Muir等々同世代ではあるが錚々たる顔ぶれです。”Biomolecular Chemistry: A Bridge for the Future”と題す proceedingを丸善から成書として出版するという威勢も示しています（下図）。要旨集を見るとなんと80を超える企業や団体に協賛を得ており、若手の勢いの姿勢を感じます。その後、日本・スイスシンポジウム（3回）やアジアケミカルバイオロジーシンポジウム（4回）へと引き継ぎ、国際ネットワークをつなぐ、さまざまな国際会議を開催するに至っています。「生命化学研究会」では、各自の手弁当がモットーで、国際会議も皆の分担形式で開催してきています。オフィシャルな研究会の紹介は、月刊誌「化学」の“研究会へようこそ”第1回（2020年1月）をご覧ください。

先日ふと、20年前は何を考えていたかを掘り起こそうと、かつての「化学」への寄稿や座談会の原稿を探し出して読み直してみました。①「化学」座談会（2001年2月テラーメイド・バイオケミストリーが目指すもの）：（馬場）ゲノム創薬が進む。（三原）ゲノムワイドになり、莫大な化合物と情報を扱うことになる。（浜地）細胞内有機化学を扱うようになる。②「化学」（2006年4月特集：化学で今何が面白いか？）：（三原）ポストゲノム時代はケミカルライブラリーが活躍する。テラーメイドな生命化学が進む（上記同様、研究会の当時のテーマでした）；ペプチド・タンパク質、DNA・RNA、糖質、脂質いろいろなものが自在に合成できる>生



体のネットワークシステムの解明が重要になる>ケミカルライブラリーの重要性が増す>バイオ情報の取扱いが重要で情報産業の素材となる、等々を議論していたことがわかります。20年前の研究会初期のテーマであった2010～2020年を思い巡らせて発表・討論していたことを、各位が事実その通り実施しているようです。それで、③「CSJカレントレビュー39号(2021年8月生体分子と疾患)での座談会では、(藤井)強い意志でペプチドの中分子医薬の研究を始めた。(深瀬)自分が関わった化合物が疾患関連研究の鍵だった。(二木)動的な変化を可視化できれば新しい分野を切り拓くヒントになる。(三者)生体の中で何が起こっているか見極めることが重要、と言っている。まさに、これらは生命化学研究会が20年余り主題にしてきたものであると感じています。

平成時代が終わり、令和も4年目@2022年、予想もしていなかった新型コロナ感染症による状況が2年も続いて参っている面が多いですが、いろいろなことが変化し進展しました。「コロナ禍が世界を10年進めた」とか「急速な変化がニューノーマルだ」という話を最近耳にします。“脱昭和”と言われるのは寂しいですが、科学の分野でもより先を見据えたエコなシステムの構築が必要とされているのでしょう。これには国を超えた人のネットワークがさらに重要となるし、それを創る研究者の協調がますます重要になるのでしょう。デジタル社会の便利な道具も大いに利用したいし、外にも出ないといけない。2030年は覗けると思うが、2050年がどうなっているかも見てみたい！

雑文となってしましましたが、年齢いった人間の振り返りとご容赦いただきたい。各位を先生ではなく、“さん”だけで呼ぶのも、生命化学研究会の慣例です。違和感ある方も多いと思いますが、ご理解ください。



研究紹介

合理と非合理的あいだ ～知識は説明に、勇気を検証に～

慶應義塾大学理工学部

川上 了史

norikawakami@bio.keio.ac.jp



はじめに

もし、自分だけの“何か”をしたいという野望を持っているタイプの研究者(を目指す人)であれば、多少仮説に無理があるだろうと思っても、やってみたいという感覚が勝ればやってしまうものだということに共感いただけるのではないかと思います。一方で、現代では、説明責任、費用対効果、社会貢献など、合理性のある意見がバイアスとなり、客観的に評価できる事前計画こそ大切という価値観を強め、「やってみたい」では研究しにくくなっているように感じます。しかし、眼前の合理性を追い求め続けた結果、かえって全体の論文数が減るなどいわゆる合成の誤謬が科学研究分野でも多数生じているように思われます。

さて、簡単に自己紹介をします。私は山口県宇部工業高等専門学校の出身で、そこでは水圈環境科学の分野に触れました。その後、広島大学大学院に進学し、海洋生物のホヤのバナジウム濃縮を研究されている道端斎先生の研究室で学位を取得しました。学位取得後は名古屋大学の渡辺芳人先生のグループで博士研究員として採用され、そこでは渡辺先生と莊司長三先生から指導を受けつつ酵素機能改変技術に関するテーマに携わりました。幸運にも成果に恵まれた結果、現職の慶應義塾大学理工学部生命情報学科で仕事をする機会を得ることができました。全ては書きませんが、現職を含めると、私は国内で7つの研究室と分野を転がっています。研究者としての評価が合理的(と信じられている)指標で判断される現代においては、毎回ゼロからの出発になる私の選択は業績の蓄積が遅くなる非合理的な選択であったかもしれません。また、面白そうと思ったところを選んで飛び込んでただけなので、当然失敗したことたくさんありました。しかし、結果的には明らかに視野が広がったと感じています。

本稿では、この様な私でのこぼこな研究活動の過程について、慶應に着任後から現在までを中心に紹介できればと思います。大事なことを伝え忘れていましたが、本稿は化学の話より雑談のような話ばかりで、また科学的にも10–100 nmくらいの階層が好きな人が読んでくれることを想定しています。

3つの何とか

大体歴史的偉人や著名な方々は、目次や選択肢は3つくらいに絞らないとダメだと言っているような気がしたので、慶應に着任して最初に、3つの研究方針を作りました。ほんやりとですが、短期的(1-3年)に成果を出せそうなもの、中期的(3-10年)時間を使し、かつ個人的に面白そうなもの、長期的(10年以上)課題で分野横断的なものにしようと考えました。自分の経験から、ここに当てはめられそうなテーマを探して、短期なら酵素反応、中期ならタンパク質を使った分子デザインというのがすぐに思い浮かびました。長期的な研究は、さまざまなおとと議論をした結果、生物進化と元素の科学にしようと思い着任2年目からほんやりと開始しました。なお、着任当時の任期は上限3年です。

短期的研究:(計7回目の)ゼロからの出発

任期があれども短期間で成果を出すことが要求されてしまいます。そのため、この課題だけはやりたいことよりもできることを優先するという考えで計画をしました。博士研究員の時に学んだことは、酵素機能は意外にも反応に直接関係していない小分子化合物で大きく改変できるということでした[1-3]。こういった反応は混合するだけで実施できますし、これなら、まだ見ぬ組み合わせで面白い応答が出たりするんじゃないかと思い、研究を開始しました。初めに思いついたのは、混和性有機溶媒を入れた酵素反応です。混和性有機溶媒に着目した理由は、水にたくさん溶かせる分子ならば、多分たくさん酵素に結合して、思わぬ影響が出るんじやないかという精緻な設計によります。対象の酵素は、ちょうど研究室の冷凍庫に眠っていた耐熱性のアルコール脱水素酵素(ADH)にしました。ADHは補酵素NAD(P)Hの吸光度変化を追いかけることで活性を評価でき、手元の環境で一通りの実験が完結します。混和性の溶媒の中から反応に直接関与しにくそうなものとして、環状エーテル群を購入し、端から振りかけて活性を測定しました。すると、1,3-dioxolaneを添加したときに、活性が数倍に向上することを見出しました。同じ濃度でもTHFなどはむしろ阻害的に働くことも突き止めました。本研究成果は酵素反応の溶媒工学としてひっそりと発表しています[4, 5]。ちなみに、この研究を行おうと思った理由はもう一つあります。昔、別の研究で成果が出た時、「川上は考えもなくただ試薬を混ぜているだけで、あれは化学ではない」と揶揄されたことがあります。少しはオブラーントに包めよとは思いましたが、まあその通りでした。実際のところ、よく学び、そこから得た知識で研究が進むのであればそれは素晴らしいことだという認識は私も持ち合わせています。ただ、それでも私の言い分は、でも君は混ぜなかつたじやないか、ということです。豊富な知識が実験的検証を妨げることもある、と他人を介して学んだ瞬間でもありました。こうした経験が、一見非合理的な実験からも成果が生まれるという考えに自信を与えており、過去の成果が単なる偶然ではないということを示したかったという気持ちが多少はあったのだと思います。

さて、そうして、ようやくこの研究の立ち位置が定まり、興味が出始め、そのメカニズムに迫ろうとしていたころ、中期的研究と考えていた分子設計の研究に大きな動きがありました。

中期的研究: タンパク質超分子デザイン～丸パクリ?いやinspireされたのです～

分子設計はまったくの素人でしたが、何か特徴的なものができたらそれが自分の代名詞になるかもしれないという気持ちを抱えていたので、昔からやってみたいと思っていました。その一方で、知らない分野に飛び込む不安は強く、さらに学生と一緒に実験をやる必要があるため、説得できなければならぬというプレッシャーもありました。酵素反応の研究よりもしっかりと考へる必要があると思い、ついでに発表されている技術をあれこれ理屈をつけて導入したのですが、気がつくと設計は複雑化して、当初やってみたかったことからは離れた分子設計となっていました。それでもせっかく設計したのだからと、他大学の先生にお願いして、できた構造を観察しに学生と出張したのですが、やはり明瞭な構造を観察することはできませんでした[6]。着任直後から1年少々をかけた結果として、狙いが外れたことへの少々の落胆を学生には隠しつつ、帰りの新幹線では、いよいよ研究者人生も終わりかもな...と思っていました。しかし、新幹線が東京に近づくにつれて徐々に、どうせ最後なら好きなデザインをやって、ダメだったら研究者をやめよう、という気持ちが湧いてきました。そこから東京に着くまでは、着任当初から構想だけはあったサッカーボール型超分子を作りたいという案を、分析で疲れ、結果に落胆する学生にほぼ一方的に延々と話していました。

当時、私が個人的に最もかっこいい分子デザインだと憧れていたのが、Todd Yeates教授のグループが作っていた融合タンパク質デザインです。2量体タンパク質と3量体タンパク質を接続するだけで美しい多面体タンパク質超分子が自発的に組み上がるという、どうしても真似してみたくなるデザインでした[7]。こ

の仕組みでサッカーボールを作りたいと考えていたのです。私がサッカーボール型超分子にこだわったのはサッカーボール型の構造が、分子レベルではフラー・レンやウイルスの形など、日常のスケールでもある種の花や人工建造物まで含め、色々な階層で同様の形が認められるからです。すなわち、サッカーボールの形にはできやすい理由があると直感していたためでした。加えて、趣味が3D CG作成[8]であり、サッカーボール型多面体が球の表現にたびたび出ていたことも影響していたと思います。そこで、融合タンパク質+サッカーボールをキーワードに分子設計に再挑戦することにしました。

改めて説明するまでもないかもしれません、サッカーボールは5角形が12枚、6角形が20枚からなる多面体で表現されます。この形を作ろうと思うと、まず初めに思いつくのは、5角形と6角形のタンパク質を貼り合わせる、というデザインです。しかし、厄介なことに6角形は別の6角形と接する辺と5角形と接する辺があります。つまり、6角形分子には2つの異なる相互作用メカニズムが必要になるのです(図1左)。我々は一種類の融合タンパク質が自発的に組み上がる設計を考えていたため、複数の相互作用メカニズムを一分子に組み込むことは難しいと判断し、面を貼り合わせる設計は諦めることにしました。しかし、その検討中に、ひとつ気がつくことがありました。それは、6角形の分子はなくとも6角形ができるということです。具体的には、5角形の頂点同士を線分で結んでいくと、自然と6角形が現れることに気がつきました(図1右)。実際のサッカーボールの形を観察してみると、全ての6角形が12枚の5角形の頂点を接続するだけで描き出せることができます。どうしてそうなるのかなと調べていると、これがオイラーの多面体定理で説明できることにも気がつきました。人によつては子供のときから知っているような定理で、気がつくのが遅すぎたのですが、念の為紹介しておきますと、

$$\text{頂点数} - \text{辺数} + \text{面数} = 2$$

と言ったシンプルな定理です。この定理は条件を与える必要はあるものの、5角形と6角形で構成される多面体の場合、5角形は12枚になるという結論を与えます。すなわち、5角形の頂点同士を結ぶとサッカーボールになるということは、必然だったということです。これには大変勇気付けられました。というのも、自然界にあるタンパク質の種類を変えて融合しただけでは、いくらinspireされたと強弁しても、先行研究丸パクリでは?という気持ちを払拭できていなかったのです。しかし、この定理によれば、先行研究では多面体が複数できる設計になっているのに対して、我々の設計は原理的に单一の多面体を与える設計になっている点が新しいという視点を得ることができました(もっとも厳密には例外もあります。論文には正直に書いていますので、お許しください)。

以上の多面体の観察から、具体的な分子デザインとして、5角形のDNA/RNA結合タンパク質であるLSmタンパク質(LSm)をコイルドコイル構造(MyoX-Coil)で結合するデザインを実施しました(図2左側)。本当にできるかどうかは不安になりつつ、融合タンパク質を精製してNative-PAGE(電気泳動の一種で複合体タンパク質をそのままの形で分離できる手法)にかけたところ、一本のバンドが非常に巨大な複合体としてシャープに現れています。この結果を初めて見たときの衝撃は忘れられません。初期の分子デザインで同じ分析を行ったときにはあり得なかったパターンであり、この結果を見た瞬間にサッカーボールができたと確信しました。その後の解析でもありがたいことに、狙った通りにサッカーボール構造に組み上がることを支持する結果がたくさん出て、着任5年目にして、ようやくひとつ仕事がまとまったという手応えを得ました[9,10]。最近ではクライオ電子顕微鏡で構造も決定され、ほぼ設計通りに構造が形成されていることが改めて確認

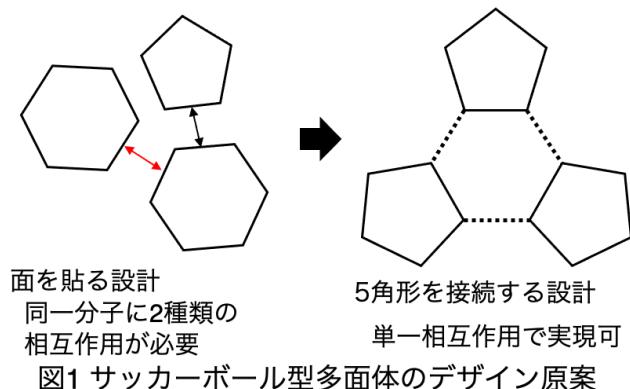


図1 サッカーボール型多面体のデザイン原案

されました(図2右)[11]。この形はサッカーボール型多面体の一般名称である切頂20面体が60分子からできるという意味の英語からTIP60と名付けています。本当はfullerinと命名していましたが、fullereneと発音を区別できる自信がなく、TIP60になったという経緯があります。

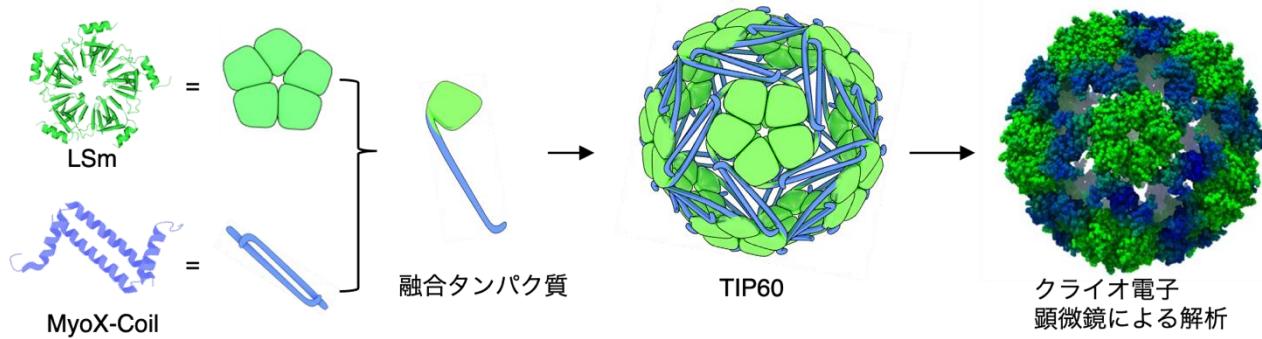


図2 TIP60のデザイン([10]より一部改変して抜粋)と実際(PDB: 7EQ9)

さて、TIP60の形をみると、6角形部分(構造上はねじれた繋がり方をしたため三角形に見える)に多数の孔が空いていることもわかります。そこで、この孔はフィルターとしての利用ができそうだなと思い、溶液中でどのくらいのサイズの分子が中に入るか、PEGを使った実験で検証することにしました。TIP60の内側表面にシステインを導入した変異体を、分子サイズの異なるマレイミド化されたPEGで修飾する実験を行いました。孔より大きなPEGは入らないだろうというシンプルな発想ですが、これが想像していたよりも綺麗な結果が得られ、孔のサイズ4 nmを超えるPEGはほとんど内部に入れないことがわかりました。そこで、外側表面にもシステインを導入し、外側を4 nm以上のPEGマレイミドで、内側のシステインを小分子マレイミドで、という2段階修飾を行ったところ、確かに両面を異なる分子で修飾できることを示すことができました(図3)[12]。

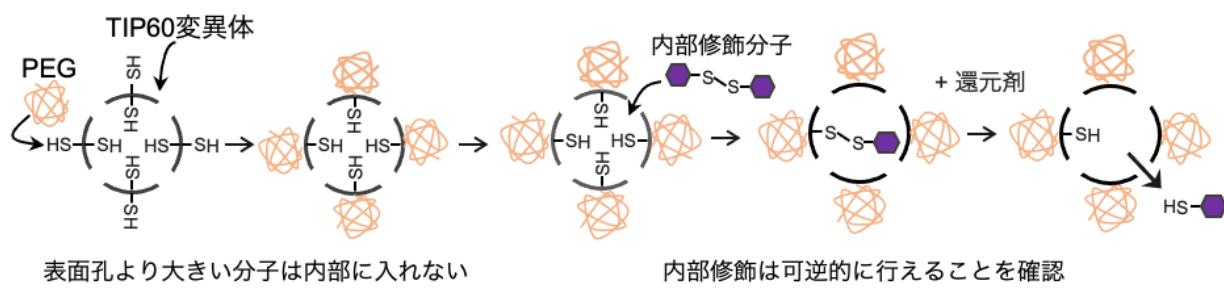


図3 TIP60内外表面のヘテロ分子修飾

TIP60の開発が終わってから振り返るとよくわかるのが、初期のデザインがうまくいかなかったのにもTIP60が上手くできたことにも理由があり、全て説明ができるということです。その説明に、特に先端的研究の知識が必要なわけでもありません。そのため合理的に解釈すれば、最初からTIP60の実験だけやっていればよかったですということになります。では、事前にそれぞれのデザインについて実験検証の必要性の有無を判断できたか?と問われると私にはできませんでした。今になって理由が説明できるのは、実験結果を確認できたからこそ、理論的な枠組みに当てはめて解釈できた、という感覚です。言い換えると、知識は明らかな結果(過去)に対しての説明に強力なツールですが、予想外の出来事(未来)に大変脆弱であることもあります。もちろん、予測の精度も知識で向上することは、近年の計算科学などから明らかであり、それを否定するつもりはありません。しかし、こと実験実施のハードルが低い分子科学分野においては、最後に検証しなかったのであれば、大事な成果も逃す可能性があるということを改めて感じられる成果でした。

現在では上記一連の成果をもとに、未発表ですが壊して戻せるTIP60の開発や、選択的小分子内包を実現するために内部空間を設計する研究、酵素内包技術の開発に加えて短期的な酵素化学関連課題との合わせ技的な研究、ゲル素材に利用する研究なども進めています。具体的な用途の開発にも、主に共同研究の形で徐々に進出し始めていますので、もしこの分子にご興味を持ってくださる方がいらっしゃればぜひお声がけください。

長期的研究: 生物と元素～原点回帰～

まだ論文も出ていない状態なので詳細をご紹介することができないのですが、長期的研究に据えた研究課題がどんなことに興味を持って始まったのかを少し紹介して終わりにしたいと思います。私の博士号の取得につながったのは、海洋生物のホヤが海水からバナジウムを濃縮するという現象について、分子レベルでの解析を行うといった課題でした[13, 14]。このような特殊な金属イオンの生物利用はホヤに限定されたことではなく、当時すでに、ある種の生命にはヒトにとって毒である重金属を利用するものがいるということが知られていました。これらの利用元素の多様性が進化によって生じたことは想像できますが、その直接的なメカニズムは未解明です(背景の詳細につきましては、最近、日本語にて一部をまとめておりますので、そちらをご覧いただければと思います[15])。そこで、生物進化を実験室で引き起こし、利用元素を多様化させられないかというアイディアで研究を始めることにしました。進化実験といつても、複雑な実験ではなく、普通は使わないと思われる元素を大腸菌に振りかけて、ひたすら培養するだけです。添加した金属を利用する新しい大腸菌が生まれるとすごいのですが、当然そんなに簡単に起こることではありません(実際には、先走って学会で発表するなど、大失敗もやらかしています)。現在、進化型大腸菌を用いてどのような表現をすればよいか、さまざまな解析手法を取り入れて試行錯誤をしているところです。特に、この研究は分子設計の研究以上に何も知らない状態から始めたため、非常に幅広い分野の先生方にお力添えをいただいている。おかげさまで、この培養群から不思議株(未発表につき詳細は割愛)が取れてきましたので、その解析結果について、近いうちに発表できればと考えています。

おわりに

科学的知識に基づく合理性が行動を縛る可能性については上記のとおりですが、同時に我々は社会における価値や判断基準にも縛られています。なんの役に立つのですか?という質問はまさに現代社会の基準での表現です。事実として役に立つことは、多くの人々に容易に説明ができ、承認されやすく、経済支援も受けやすいといった魅力があります。他方、私の活動指針は描きたい絵を追求したいという価値観に近いもので内的な動機によります。したがって、現代基準に照らせば非合理的な活動指針といえるでしょう。しかし、社会における価値や判断基準は時代とともに移り変わるもので、なんら絶対性を持つものではありません。たかだかこの数十年で形成された日本固有の社会的価値基準のみを重視し、それに最適化していくのが自然学者のあるべき姿だとは思えません。気に入らないものも含めてあらゆる価値観に対応可能な多様性を確保すべきだと考えます。私も若輩であり幸運に恵まれているだけの立場ですから、おこがましいのですが、さらに若い方々がもし現在の社会的価値に照らした合理性や、科学的知識に基づく合理性により、内的動機に基づく研究の実施に躊躇することがあるのであれば、どうかその迷いを払拭し、果敢に自らの信じる道を歩んでもらいたいと思います。

謝辞

研究テーマ提案と実施の自由を与えてくださった当研究室の宮本憲二教授に深く感謝申し上げます。ま

た、実験を担当してくれた研究室学生、OB、OGの皆様にも感謝いたします。共同研究では学会で初対面の私からの突然の構造解析依頼のお願いを聞いてくださった信州大学の新井亮一先生、クライオ電子顕微鏡の構造解析でお世話になりました東京大学の吉川雅英先生、包明久先生、また、研究開始当初のデータ収集でお世話になりました名古屋大学渡辺先生、莊司先生に感謝申し上げます。実際は、個々にお名前を挙げると書ききれないほど多くの方々にお世話になっており、お一人ずつにそれぞれお礼を申し上げたいのですが、紙面の制限もございます。もし、ご支援くださった方で上記課題に関連した成果を見かけられましたらその時はぜひ、川上はワシが育てた、とおっしゃっていただければと思います。

参考文献

1. N. Kawakami, O. Shoji, Y. Watanabe, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, 5315–5318, **2011**.
2. N. Kawakami, O. Shoji, Y. Watanabe, *ChemBioChem*, 13, 2045–2047, **2012**.
3. N. Kawakami, O. Shoji, Y. Watanabe, *Chem. Sci.*, 4, 2344–2348, **2013**.
4. N. Kawakami, Y. Hara, K. Miyamoto, *Catal. Sci. Technol.*, 5, 3922–3925, **2015**.
5. 川上了史、化学と生物 Vol.55 No.11 pp.735–737, **2017**.
6. N. Kawakami, H. Kondo, M. Muramatsu, K. Miyamoto, *Bioconjug. Chem.*, 28, 336–340, **2017**.
7. Lai Y.T., Reading, E., Hura, G. L., Tsai, K. L., Laganowsky, A., Asturias, F. J., Tainer J. A., Robinson, C. V., Yeates. T. O. *Nat. Chem.*, 6, 1065–1071, **2014**.
8. KachupaTube (https://www.youtube.com/channel/UCsX0pJ0tUa2MT43_112WBQw)
9. 川上了史、蛋白質科学会アーカイブ 10, eEssay 06, **2017**.
10. N. Kawakami, H. Kondo, Y. Matsuzawa, K. Hayasaka, E. Nasu, K. Sasahara, R. Arai, K. Miyamoto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57, 12400–12404, **2018**.
11. J. Obata, N. Kawakami, A. Tsutsumi, E. Nasu, K. Miyamoto, M. Kikkawa, R. Arai, *Chem. Commun.*, **2021**.
12. E. Nasu, N. Kawakami, K. Miyamoto, *ACS Appl. Nano Mater.*, 4, 2434–2439, **2021**.
13. N. Kawakami, T. Ueki, K. Matsuo, K. Gekko H. Michibata, *Biochim. Biophys. Acta*, 1760, 1096–1101, **2006**.
14. N. Kawakami, T. Ueki, Y. Amata, K. Kanamori, K. Matsuo, K. Gekko, H. Michibata, *Biochim. Biophys. Acta*, 1794, 674–679, **2009**.
15. 川上了史、宮本憲二、生命金属ダイナミクス(NTS、監修:城宣嗣・津本浩平), 107–112, **2021**.

研究紹介

RNA を基盤としたバイオセンサー

～核酸機能の合理設計に向けて～

甲南大学 先端生命工学研究所(FIBER)

遠藤 玉樹

(t-endoh@konan-u.ac.jp)



1. はじめに

私は、2009 年に甲南大学先端生命工学研究所(FIBER)に着任しました。そして、かれこれ 13 年が過ぎようとしています。この 13 年間、FIBER 所長の杉本直己先生のご指導、ご助言のもと研究に邁進してきました。残念ながら、と言いますか、なぜか、生命化学研究会のシンポジウムに参加する機会なく現在に至っています。にも関わらず、この度、生命化学研究レターへの執筆の機会を頂けましたこと、編集委員である松浦和則先生に感謝申し上げます。

私は、東京工業大学大学院生命理工学研究科で学位を取得しました。相澤益男先生、小畠英理先生のもとで、細胞工学、タンパク質工学の研究を行いました。その後、岡山大学の宍戸昌彦先生、大槻高史先生のもと、特任助教として NEDO の研究プロジェクトに従事しました。自分のアイデアを自由に反映できるアカデミアな環境を提供していただけたことで、研究者としての道を選び、楽しく研究活動を継続してこれました。主にタンパク質を扱っていた東工大、岡山大での研究から、FIBER では核酸を対象とし、細胞内で形成される非標準的な核酸構造の生理機能を解析する基礎研究を中心に進めています。一方で、特異的な分子認識によって引き起こされる生体分子の構造変化を活用し、新規な機能性分子を創出する研究も継続しています。「研究紹介」という場を頂けましたので、少し古い話も交えつつ、最近の研究成果を紹介させていただきたいと思います。

2. 標的分子に応答して会合する生体分子を利用した機能発現システム

久しぶりに自分の修士論文を読み返してみました。研究目的として、図 1 のイメージと共に、以下のような内容が書いてありました。

「本研究では、タンパク質工学を利用した新たな機能性タンパク質構築を目的とする。(中略)、抗体可変領域 $V_H \cdot V_L$ の抗原認識能と、抗原存在下での抗原・ $V_H \cdot V_L$ の会合体形成と可変領域連結タンパク質の相互作用を介した機能発現を利用し、細胞内環境の変化に応じて機能を発現できるタンパク質材料を構築する。」

「タンパク質」を「RNA」に、「抗体と抗原の会合」を「RNA と標的分子の会合」に読み替えると、現在の研究内容を表すような文章にもなります。細胞内の分子環境を自発的に認識して目的の機能を発揮する分子システムを構築したい、という研究嗜好が修士のころからあったことに改めて気付かされます。残念ながら、図 1 で示した機能発現システムを研究成果と

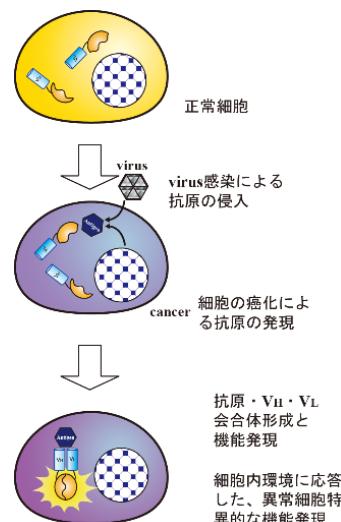


図 1. 細胞内環境に応じた機能発現の概念図
(修士論文 Fig. 1-5 より)

して学術雑誌に発表することはできませんでした。ただ、同様のコンセプトで提案した、RNA とタンパク質の会合体形成による、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) で任意 RNA を検出する実験系(図 2)がうまくいったことで、学位を得ることができました。¹ どちらの研究においても、内容を説明した際に「面白そだからやってみよう！」と小畠先生に仰っていただき、研究者としての第一歩を踏み出せたように思います。

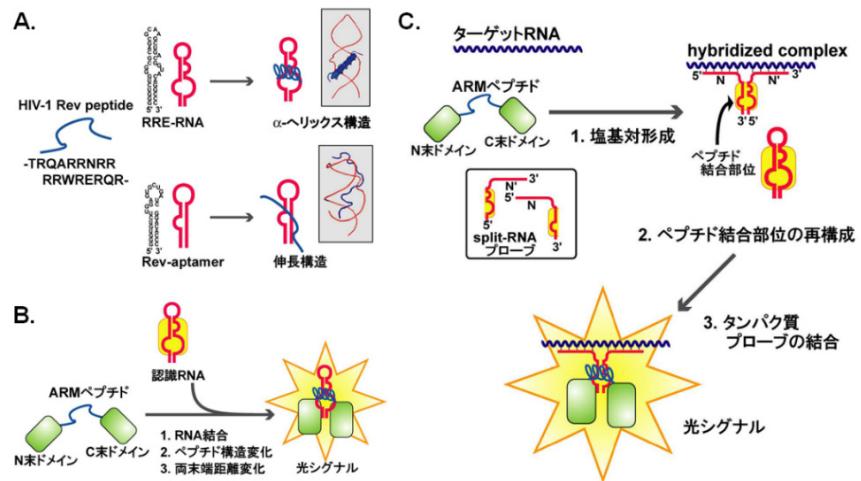


図 2. RNA とタンパク質の会合体形成を利用した任意 RNA の検出システム
 (A) RNA との結合により Rev ペプチドが示す構造変化。(B) ペプチドの構造変化を利用して光シグナルによる RNA 検出。(C) ターゲット RNA への split-RNA プローブの結合とタンパク質プローブの結合を介した任意 RNA の検出。
 (博士論文 Fig. 1-2 および 1-3 より)

3. RNA の構造変化を活用したバイオセンサー

学位を取得する研究のきっかけとなったのは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の Rev タンパク質に由来するペプチド(Rev ペプチド)の構造特性を知ったことになります。Rev ペプチドは、天然の標的 RNA(RRE-RNA)に結合した際には α ヘリックス様構造をとります。一方で、人工的に獲得された RNA アプタマーに結合した際には伸びた構造をとります(図 2A)。同じペプチドなのに、異なる RNA に対して異なる構造を形成して結合するという特性に興味を抱きました。そして、それぞれの状態で末端の距離が違うのであれば、蛍光タンパク質を融合しておけば FRET のシグナルに変化が出るのでは？という発想に至りました(図 2B)。

構造変化を伴って生体分子同士が相互作用する現象は induced-fit 型の相互作用として知られています。相互作用で得られるエネルギーが大きければ、劇的な構造変化を誘起することも可能です。例えればスイッチと呼ばれる天然の機能性 RNA は、代謝産物との相互作用で RNA の構造変化を起こして遺伝子発現を調整しています。² そこで、ペプチドではなく RNA 側の設計を工夫することで、特定の分子との相互作用で induced-fit 様の RNA 構造変化を誘起できると予測しました。そして、RNA の構造変化を起因とし、タンパク質やペプチドの付随的な相互作用を引き起こすことで、特定の分子を検出するバイオセンサーを構築できると考えました

(図 3)。具体的には、テオフィリンという低分子化合物に結合する RNA アプタマーを用いて、テオフィリンと結合して構造変化した際に RRE-RNA の構造が再構成される RNA を設計しました。そして、蛍光タンパク質を融合したペプチドを用いて、FRET シグナルでテオフィリンを検出する

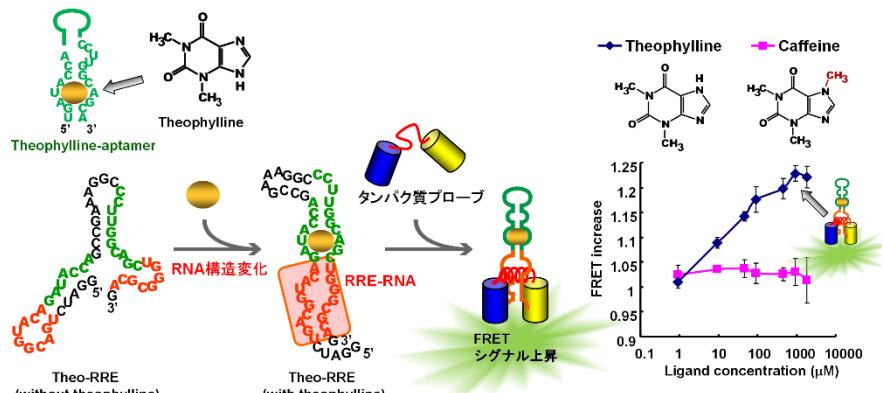


図 3. RNA 構造変化と付随的なタンパク質プローブの相互作用を利用した低分子化合物(テオフィリン)の検出システム
 (甲南大 FIBER、教員採用面接時のプレゼン資料より)

ことに成功しました。³ この研究については、岡山大学に所属していた当時に配属学生への研究テーマとして提案させていただきました。宍戸先生、大槻先生のおかげで学生の卒業研究にも携わることができ、教育者としての第一歩を踏み出せたように思います。

4. 合理的に設計された RNA の構造スイッチ

FIBER は、核酸の構造や機能に関して、物理化学的な解析を行う研究で様々な成果を報告しています。実験から得られるデータは、エネルギーレベルで化学的かつ定量的に議論することになっているのです。私も、相互作用エネルギーと構造変化を定量的に取り扱い、RNA に基づいたバイオセンサーを合理的に設計することを目指しました。まず、標的分子の結合で構造変化を起こし、アウトプットシグナルの引き金となるペプチドとの相互作用を誘起する RNA (RNA 構造スイッチ)をセレクションすることから始めました。ペプチドとしては、ウシ免疫不全ウイルス(BIV)の Tat タンパク質に由来するペプチド(Tat ペプチド)を用いました。Carboxytetramethylrhodamine を修飾した Tat ペプチド(TMR-Tat)が BIV に由来する RNA (TAR-RNA)と相互作用すると、その蛍光シグナルが変化するという結果が得られていました。詳細は割愛しますが、標的分子(テオフィリンおよびテトラサイクリン)に応答して TMR-Tat との結合定数を 10 倍以上上昇させる RNA 構造スイッチを獲得することができました。⁴

得られた RNA 構造スイッチは、標的分子の相互作用エネルギーを利用して効率よく構造変化を起こしていることが予測されます。そこで、想定される構造変化の前後における RNA 二次構造の安定性予測を行いました。その結果、構造変化の前後で約 5–7 kcal mol⁻¹ 程度の熱安定性の差($\Delta\Delta G^\circ$)が存在することが分かりました。RNA だけ見ると構造変化前の方が安定ではありますが、標的分子、および付随的に起こる TMR-Tat の相互作用エネルギーを得ることで、RNA/標的分子/TMR-Tat の三者複合体が最安定構造になったと考えられます。ネオマイシンに結合する RNA アプタマーを用いてセレクションを行った際にも同様

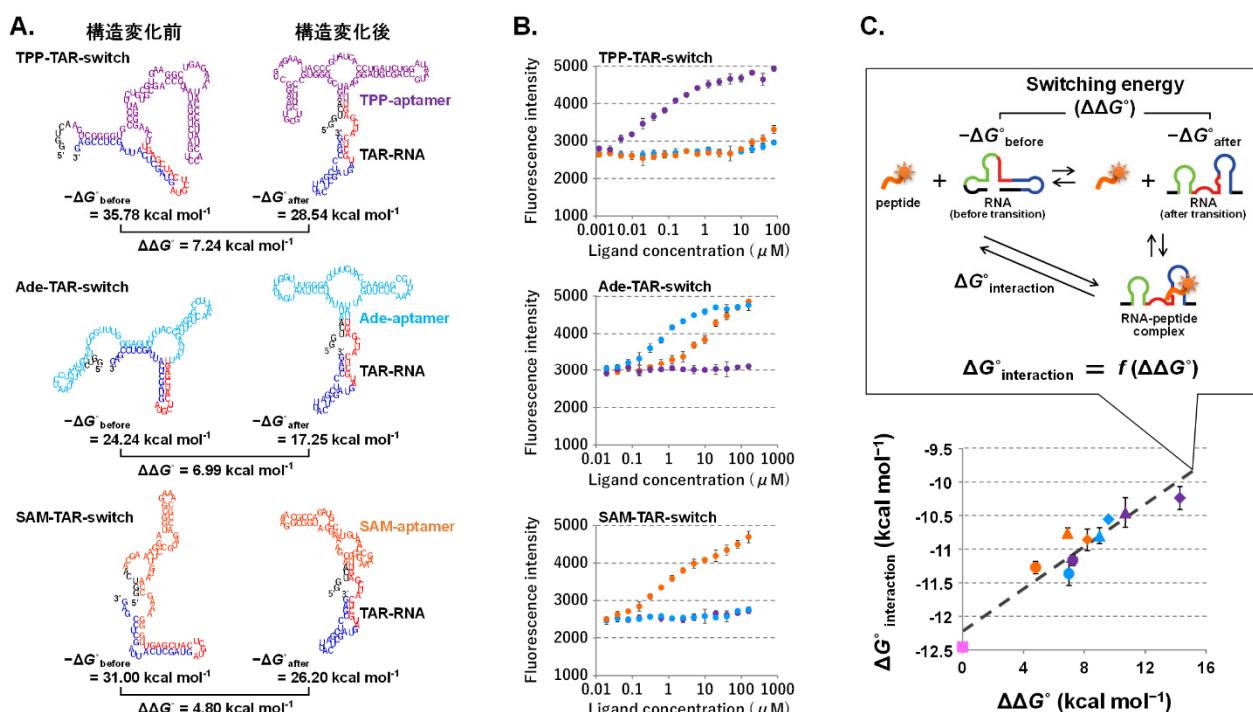


図 4. 合理設計された RNA 構造スイッチを用いた標的分子の特異的検出

(A) 構造変化の前後における熱安定性の差($\Delta\Delta G^\circ$)を指標とした TPP、Ade、SAM を検出する RNA の設計。 $\Delta\Delta G^\circ = (-\Delta G^\circ_{\text{before}}) - (-\Delta G^\circ_{\text{after}})$ として算出。(B) 蛍光シグナルによる TPP(紫)、Ade(青)、SAM(橙)の検出。(C) $\Delta\Delta G^\circ$ と $\Delta G^\circ_{\text{interaction}}$ の相関。

の結果が得られました。これらの結果に基づき、予測される RNA 構造変化の前後での $\Delta\Delta G^\circ$ が 5–7 kcal mol⁻¹ 程度となるように、異なる標的分子(具体的には、チアミンピロリン酸(TPP)、アデニン(Ade)、S-アデノシルメチオニン(SAM))を検出するための RNA 構造スイッチを設計しました(図 4A)。その結果、4.84 nM TPP、169 nM Ade、140 nM SAM の検出限界を示すバイオセンサーを構築することに成功しました(図 4B)。また、 $\Delta\Delta G^\circ$ の値と、RNA と TMR-Tat との相互作用エネルギー($\Delta G^\circ_{interaction}$)の相関も示すことができました(図 4C)。これらの成果に基づき、バイオセンサーとして機能する RNA 構造スイッチの合理的な設計が可能になりました。⁵

5. 効率的な RNA セレクションのための RNA キャプチャーミクロン

ここまででは、生体外で転写合成した RNA を用いて、バイオセンサーとしての機能を評価してきました。一方で、RNA は細胞内で持続的に生合成させることもできます。私の研究目的としては、標的分子や分子環境に応答して構造変化を示す RNA 構造スイッチを、細胞内でのセンサーとして活用することにあります。そこで、RNA の構造変化により付随的な蛍光分子((Z)-4-(3,5-difluoro-4-hydroxybenzylidene)-2-methyl-1-(2,2,2-trifluoroethyl)-1H-imidazol-5(4H)-one (DFHBI-1T))の相互作用を誘起するような RNA 構造スイッチを設計することを考えました。DFHBI-1T は、Spinach と呼ばれる RNA アプタマーと結合してその蛍光強度を劇的に増大させることが知られています。

これまでと同様、ランダムな配列を有するライプラリから、標的分子に応答して構造変化を起こし、DFHBI-1T と相互作用する RNA をセレクションすることから始めようと考えました。しかし、ペプチドとは異なり、低分子化合物である DFHBI-1T を担体等に化学修飾することは有機合成化学の知識と経験がない私には難しいです。そこで、最終的なアウトプットである蛍光シグナルを指標に RNA をセレクションできないかと考えました。そして、ライプラリ化した RNA 側を担体に固定化するという発想に至り、RNA キャプチャーミクロン(RNA-capturing microsphere particles: R-CAMPs)というものを考案しました。R-CAMPs は、ミクロン上で鋳型 DNA から RNA を転写合成しつつ、鋳型 DNA の末端に RNA を捕捉することで作製します(図 5)。最終的に、実験室レベルでは、数百万種類のミクロンを得ることができます。各ミクロンには異なる配列の DNA と RNA が固定化されています。一方で、1 つのミクロンには同じ配列の DNA と RNA が多コピー(数十万コピー以上)固定化されています(詳細は報告済みの論文を参照してください)。⁶

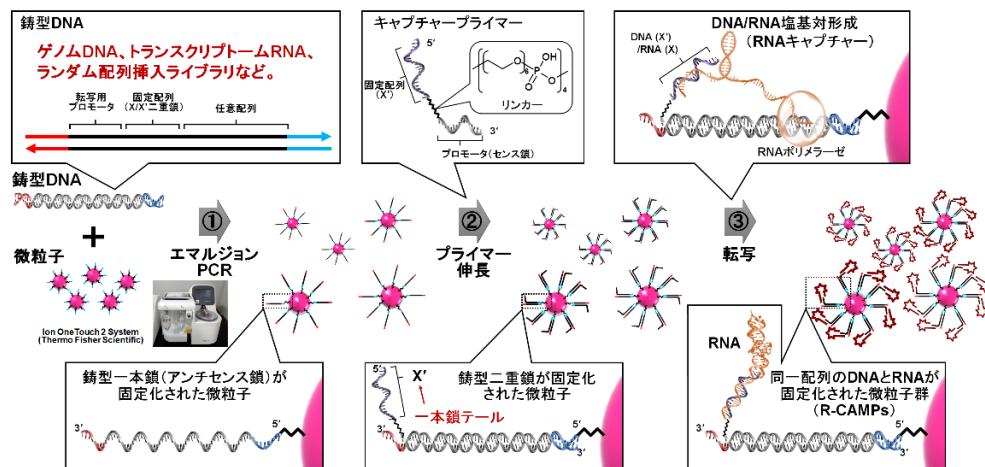


図 5. R-CAMPs の作製手順

- ①鋳型 DNA をエマルジョン PCR で増幅し、ミクロン上に一本鎖 DNA を固定する。
- ②キャプチャープライマーから DNA を伸長させ、ミクロン上に RNA 転写用の鋳型 DNA を合成する。
- ③RNA を転写しつつキャプチャープライマーの一本鎖テールに捕捉して RNA を固定化する。

R-CAMPs を用いてのセレクションには、FACS(Fluorescence-Activated Cell Scoring)と呼ばれる手法を用います。FACS は、主には細胞の選別に用いられます。我々は、ミクロン上の RNA に相互作用している

DFHBI-1T の蛍光シグナルを指標に、微粒子を選別しました。この手法の利点として、①一つの微粒子に多コピーの RNA が固定化されているため、蛍光シグナルを増強できる、②微粒子を一つずつ 96 ウェルプレートに回収できる、③微粒子に RNA と DNA が固定化されているため、PCR で增幅することで簡単にクローニングが完了する、といったことが挙げられます。そのため、R-CAMPs は蛍光標識した分子(タンパク質、ペプチド、低分子化合物など)と相互作用する RNA を選別する強力なツールになり得ます。例えは我々は、細胞から精製したトータル RNA をもとに R-CAMPs を調製し、天然のアルカロイド化合物であるベルベリン(RNA に結合することで蛍光シグナルを発する)に結合する RNA の選別を行いました。その結果、ベルベリンが 5'-UCG-3'/5'-UA-3' が形成するシトシンバルジを含む RNA 二重鎖領域に選択的に相互作用することを明らかにしました(図 6A)。その結合定数は 25 °C で $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 以上で、RNA を 2 kcal mol^{-1} ほど安定化することも明らかにしました。⁷ これにより、ベルベリンのようなファイトケミカルと呼ばれる天然の化合物が、核酸分子に結合してその生物活性を示している可能性を提案することができました。実は R-CAMPs ですが、研究所として特許申請や产学連携につながるような研究成果も求められるということで考案したという裏事情もあり、このような場ですので紹介させていただきました(松浦先生からは「堅苦しいものではなく楽しく読めるように」と言われています)。

細胞内での分子センサーとして機能する RNA 構造スイッチの選別に話を戻します。我々は、SAM に結合する RNA アプタマーと Spinach をランダムな配列でつないだライブラリを設計し、R-CAMPs を調製しました。そして、SAM が存在しない環境でも DFHBI-1T と相互作用して蛍光を発してしまう RNA を排除するネガティブセレクション、SAM が存在する環境に置き換えた際に DFHBI-1T と相互作用して蛍光を発する RNA を選別するポジティブセレクションを連続して行いました(図 6B)。R-CAMPs はマイクロメートルサイズの微粒子であるため、フィルターろ過で簡便に溶液を交換することができます。結果として、1 サイクルのセレクションのみで、20 万種類程度の多様性を有する RNA の中から、SAM に応答して DFHBI-1T との

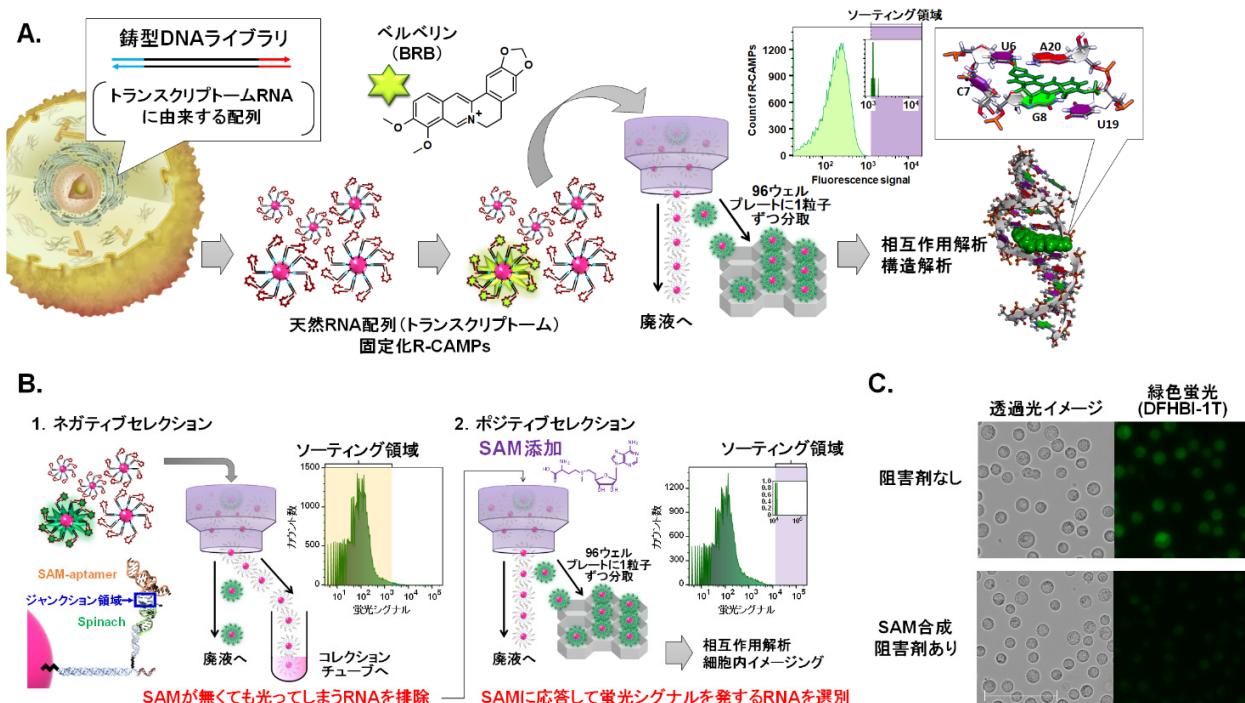


図 6. R-CAMPs を用いた機能性 RNA の選別

(A) ベルベリンと相互作用する RNA のトランск립トーム RNA ライブラリからの選別。(B) SAM に応答した変化により DFHBI-1T との相互作用を誘起して蛍光シグナルを発する RNA 構造スイッチの選別。(C) RNA 構造スイッチを用いての SAM の細胞内イメージング。

結合定数を 17.6 倍上昇させる RNA 構造スイッチの獲得に成功しました。そして、エレクトロポレーションで細胞内に RNA を導入し、SAM の濃度変化に応じた DFHBI-1T の蛍光シグナル変化(SAM の合成阻害による蛍光の減少)を観測することにも成功しました(図 6C)。⁸

現在は、細胞内で RNA を転写しつつ、SAM の濃度変化を経時的に検出することを試みています。SAM 以外の分子を細胞内で検出する RNA 構造スイッチの合理設計にも取り組んでいます。また、ここで紹介したセレクション手法を活用し、特定の分子というよりも、細胞内の環境(分子クラウディング環境など)に応答して構造変化を起こす RNA、あるいは DNA を選別することも視野に入れています。前述のように、FIBER では、細胞内で形成される非標準的な核酸構造の生理機能を解析する研究も進めています。細胞内環境の変化に応答する核酸を天然の配列から選別すれば、環境に応じて遺伝子発現などを調節する核酸構造の候補として基礎研究の解析対象になると思われます。また、人工的に設計した配列から選別すれば、細胞内環境をモニタリングするセンサー核酸として活用できると考えています。

6. さいごに

2022 年になり、オミクロン株の影響でまた家にいる時間が長くなりました。ちょうど研究者を志し始めた大学院生のころに読んでいた、塩野七生氏の著作である「ローマ人の物語」を読み返し始めました。文化や言語が異なる周辺部族を取り込みつつ、共存共栄のインフラを提供することで都市国家を発展させていった歴史は、学問の発展にも通じるものがあると感じました。いまや、フロンティア生命化学研究会を中心に様々な分野に学問の道が続いているのではないかと思っています。ローマでは、各主要都市に続く街道(ローマ街道)には、それを敷設した者の名前が付けられたとのことです。これまで、良き指導者のおかげで、研究者、教育者としての道を踏み出せました。今後は、開拓者として、後に自分の名前が付されるような道へと一步を踏み出せればと思っています。

謝辞

FIBER 所長の杉本直己先生はじめ、これまでの研究を遂行するうえでご指導、ご助言を賜りました先生方、研究の相談をさせていただいた FIBER の先生方に感謝いたします。本研究の一部は、JSPS 科研費(24750167、26350964、19K05723、21H05108 など)、甲南学園平生太郎基金科学研究奨励助成金、木下基礎科学研究基金などからの助成により実施されました。実質的な実験操作を担当していただいた FIBER の研究・開発スタッフの皆様にも感謝いたします。

参考文献

- 1 Endoh T., Funabashi H., Mie M., Kobatake E., *Anal. Chem.*, 77, 4308-4314 (2005).
- 2 Endoh T., Sugimoto N., *Chem. Rec.*, 17, 817-832 (2017).
- 3 Endoh T., Shintani R., Mie M., Kobatake E., Ohtsuki T., Sisido M., *Bioconjug. Chem.*, 20, 2242-2246 (2009).
- 4 Endoh T., Sugimoto N., *PLoS ONE*, 8, e60222 (2013).
- 5 Endoh T., Sugimoto N., *Anal. Chem.*, 87, 7628-7635 (2015).
- 6 Endoh T., Ohyama T., Sugimoto N., *Small*, 15, e1805062 (2019).
- 7 Satpathi S., Endoh T., Podbevsek P., Plavec J., Sugimoto N., *Nucleic Acids Res.*, 49, 8449-8461 (2021).
- 8 Endoh T., Sugimoto N., *Anal. Chem.*, 92, 7955-7963 (2020).

研究紹介

タンパク質の化学的全合成と その先にあるもの ～タンパク質を超える ポリアミド分子の創成を目指して～



名古屋大学大学院工学研究科

林 剛介

hayashi@chembio.nagoya-u.ac.jp

1. はじめに

タンパク質は20種類のアミノ酸が決まった配列で重合したポリアミド型のsequence-defined polymerであり、アミノ酸主鎖および側鎖の相互作用によって水中で特徴的な2次構造(α ヘリックスや β シートなど)を形成し、さらにはタンパク質それぞれが持つ個性的な3次構造へと折りたたまれる。何十億年という進化の過程を経て現存するタンパク質の精巧さや構造・機能の多様性は、研究者を魅了し、ケミストにとって分子認識や分子変換のお手本となっている。一方で「誰も作ったことのない分子を合成して社会に役立てる」というケミストの使命を考えた時、タンパク質分子は非の打ち所のない完全な分子なのだろうか?筆者の答えはノーである。タンパク質をポリアミド分子の1種として眺めた時、その構成要素を20種類のアミノ酸に限定する理由は何もなく、より多様な骨格・性質を持つアミノ酸を重合させた「人工ポリアミド分子」はタンパク質を凌駕する分子認識・変換を実現するかもしれない。まだまだ絵に描いた餅状態ではあるが、昨今の固相合成技術やペプチド連結技術、構造予測技術などの発展によって「タンパク質を超えるポリアミド分子の創成」は、現実味を帯びてきているように感じる。

筆者は、大学4年生時に齋藤烈研究室に配属され中谷和彦先生のもとで「鏡像異性体DNAの化学合成」という生体高分子の合成研究から研究キャリアをスタートした。核酸やタンパク質など生体高分子の分子進化や生合成に興味を持ち、博士号取得後に菅裕明先生およびJames J Collins先生のもとで研鑽を積んだ後、岡本晃充先生の研究室で「タンパク質化学合成研究」をスタートした。本稿では、これまでに筆者らが推進してきたタンパク質化学合成研究について、研究をスタートしたきっかけから最新の成果まで幅広く紹介したい。

2. タンパク質化学合成と研究スタートのきっかけ

タンパク質の活躍の場は、アカデミック研究だけでなく製薬企業による医薬品開発など多岐にわたるが、その生産はほぼ全て遺伝子組み換え技術を利用したバイオテクノロジーによって行われる。一方で、1990年代以降タンパク質を化学的に作製する「タンパク質化学合成法」が発展してきた。細胞内のタンパク質合成装置であるリボソーム翻訳系では使用するモノマー(アミノ酸)が20種類に規定されるのに対し、化学合成では多様な非天然アミノ酸の導入が可能となる。これは、アミノ酸を化学的にカップリングする「ペプチド固相合成」においてアミノ酸の構造や大きさの影響を受けにくいためである。しかしペプチド固相合成では、

長鎖ペプチド(例えば50アミノ酸以上)の合成は難しい。人間のタンパク質の平均アミノ酸数は400以上あるので、固相合成のみで作製できる

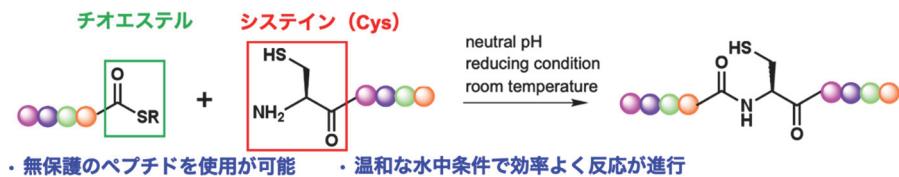


図1 タンパク質化学合成で最も利用される NCL 反応の概要

のは非常に限られた小型タンパク質だけになってしまふ。より大きなタンパク質を化学合成するには、固相合成で作製したペプチド同士を連結する「ペプチド連結反応」が不可欠となる。最もよく使われているペプチド連結反応は、NCL (Native Chemical Ligation)¹と呼ばれる反応で、C末端にチオエステルを持つペプチドとN末端にシステインを持つペプチドを温和な水性条件で効率よく連結することができる(図1)。これまで合成してきたタンパク質の実に90%以上がNCLを利用している²。

筆者は2012年に東京大学岡本晃充先生の研究室で助教として採用していただいた際に、新たな研究テーマを選定する機会を頂き、どうしようか思索に耽っていた。そこで目に止まったのが研究室の片隅で埃を被っていた(いや、光り輝いていた)「ペプチド自動合成機」であった。研究テーマを1から考えたことのある方には共感していただけると思うが、興味のあるテーマはたくさんあっても実際に推進できるかどうかは、研究室に備わっている設備に左右される。かねてよりタンパク質化学合成研究に興味があった(Tom Muirの論文を読んだり、阪大の相本先生の発表を聞いたりして)ことに加え、岡本研で推進されていたDNAのエピジェネティクス研究との相性も良さそうだと判断し、タンパク質化学合成に取り組むことにした。今思うと、ペプチド合成機が研究室に置かれていなければ、筆者がタンパク質合成研究をスタートすることはなかつたので、合成機を購入しておいてくださった?岡本先生には感謝してもしきれません。

3. 化学合成タンパク質を用いた翻訳後修飾研究

化学合成タンパク質は翻訳後修飾研究において重宝される。生化学解析や構造解析によって翻訳後修飾の機能を明らかにするためには、目的の修飾が正しい位置に導入された均一なタンパク質サンプルを作製する必要がある。修飾酵素を用いる方法では、修飾効率や位置選択性が低いことが多く、また酵素が同定されていない場合はそもそも利用することができない。最近では、遺伝暗号拡張法などの方法論によって翻訳後修飾アミノ酸をリボソームによって取り込むことも可能になっているが、修飾の種類ごとに系の最適化が必要であり、複数種類の同時導入は難しく、またユビキチン化などの大きな修飾の導入ができない、などの問題が残されている。一方で、タンパク質化学合成法は、これまでに同定してきたほぼ全ての翻訳後修飾の導入が可能であり、また複数種類の修飾を部位特異的に持つ均一なタンパク質サンプルの調製が可能である。

化学合成タンパク質による翻訳後修飾研究において重要な標的となってきたのが、エピジェネティクス研究の中心的存在を担うヒストンタンパク質である。ヒストンは、ヌクレオソームを構成するタンパク質であり、H2A、H2B、H3、H4という4種類のコアヒストンおよびH1と呼ばれるリンカーヒストンが存在する。それぞれのヒストンは、20種類以上の翻訳後修飾を受けることが知られており³、その修飾がドライビングフォースとなって転写や複製、DNA修復などゲノム上の重要な生命現象の制御に深く関わると考えられている。コアヒストンはいずれも100~150アミノ酸程度の比較的小さなタンパク質であり、今日までにそれぞれの化学合成が達成されているが⁴、その中でも筆者らのグループでは、ヒストンH2Aの化学合成ルートの開拓に成功しており⁵、その翻訳後修飾の研究を行ってきた。129アミノ酸からなるヒストンH2Aを3つのペプチド断片に分割し、それぞれの断片をペプチド固相合成によって作製後、NCLにより連結し、最後に脱硫反応⁶によりシステインをアラニンに変換することで全長H2Aを得た。化学合成H2Aが大腸菌発現H2Aと同様にヌクレオソ

ームを形成する機能を有することが明らかになつたため、次に翻訳後修飾が導入されたH2Aの合成に着手した。合成した2種類の修飾H2Aのうち、一つはN末端セリンのリン酸化(S1ph)および75残基目リシンのジメチル化(K75me2)、119残基目リシンのアセチル化(K119Ac)の3種類の修飾を持つもの(いずれの修飾も同定されてはいるものの、その生物学的意義は明らかになっていない)、もう一つが転写の調節に深く関わることが示されている57残基目チロシンのリン酸化(Y57ph)である。合成した修飾H2Aを用いてヌクレオソームを形成させて、熱安定性の評価を行つたところ、3種類の修飾を持つヌクレオソームは修飾なしのヌクレオソームと同等であった(図2A)のに対し、Y57ph修飾はヌクレオソームの熱安定性を大幅に低下させることが明らかとなつた(図2B)。57残基目のチロシンは、H2A-H2Bダイマーの相互作用面に位置しており、リン酸化による立体障害がダイマーの安定性を低下させることが予想された。本発見は、H2A-H2Bダイマーの安定性を低下させる初めての翻訳後修飾となつた⁷。H2A以外にも、H3のN末端アセチル化がクロマトソーム(ヌクレオソームとリンカーヒストンH1の複合体)の構造変化を誘起することを共同研究によって明らかにしている⁸。また、リンカーヒストンH1のシトルリン化がクロマトソームの安定性を低下させることや、ヒストンではないがヘテロクロマチンタンパク質HP1 α のリン酸化がDNAとの相互作用に及ぼす影響についても明らかにした⁹。ここで示したのは化学合成ヒストンを用いた翻訳後修飾研究のほんの一例に過ぎず、他にもすでに多くの修飾ヒストンが作製されエピジェネティクス研究の発展に貢献している¹⁰。

4. ジケトピペラジン形成を利用したペプチドチオエステル合成法

タンパク質化学合成においてNCLを用いたペプチド連結反応を行うには、C末端にチオエステルを有するペプチドの合成が必要不可欠である。しかし、一般的にFmocペプチド固相合成でペプチドチオエステルを直接合成することは困難である(Fmoc除去に使用するピペリジン処理でチオエステルが分解するため)。そのため「チオエステル前駆体」を固相合成で作った後、液相でチオエステルへ変換する手段がとられる。これまでに様々なチオエステル前駆体が開発されてきたが、筆者らはペプチドC末端にCys-Pro-イミド構造を持つ「CPIペプチド」の開発を行つてきた。CPIペプチドは、過去に大阪大学の相本先生・川上先生グループで開発されたCPEペプチド¹¹から着想を得たものであり、イミド部位が脱離基として働く。Cys残基はN-Sアシル転位の平衡が存在することが知られており、CPIペプチドはチオエステル体へ変換されると同時に露出したアミノ基が分子内でイミドのカルボニル基へ求核攻撃し、最終的にジケトピペラジン構造を形成する(図3A)。イミド構造は、固相上でペプチド主鎖と側鎖官能基

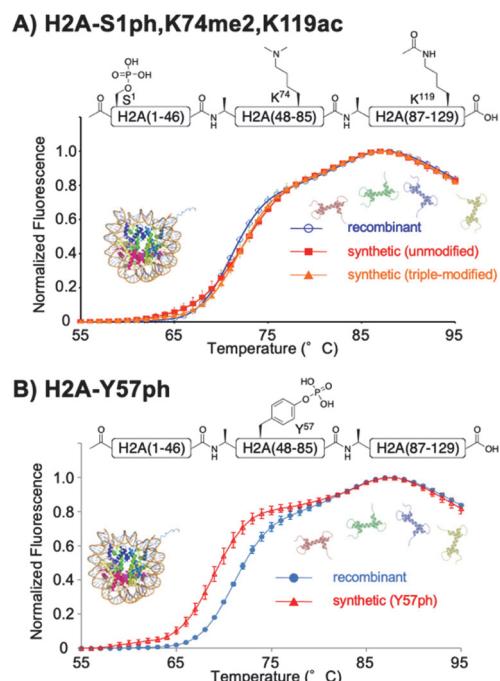


図2 翻訳後修飾含有ヒストンH2Aの熱安定性解析

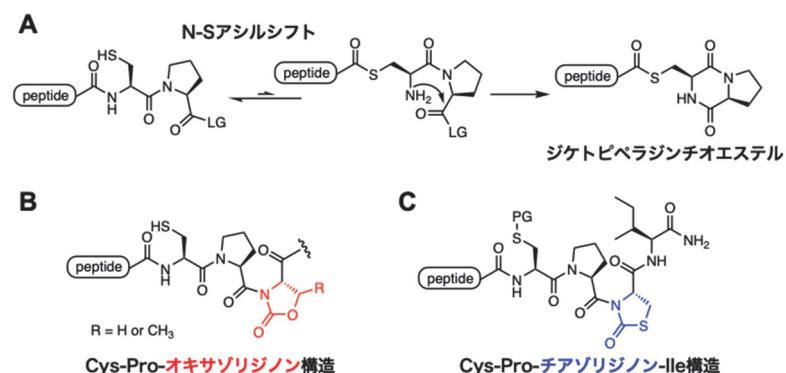


図3 CPIペプチドのチオエステル変換メカニズムと化学構造

を環化させることで定量的に誘導することができる。第1世代のCPIペプチドでは、SerやThr、Gluからイミド構造を合成し、チオエステルへの変換効率を調査したところ、Thrから誘導されるメチルオキサゾリジノン構造(図3B)が最も効率的に変換できることを明らかにした¹²。その後、イミドとしてCysから誘導されるチアゾリジノン構造(図3C)がメチルオキサゾリジノンよりも合成効率およびチオエステル変換効率が高いことが判明し、第2世代のCPIペプチドとなった。このCP-チアゾリジノンペプチドは、これまでに開発された様々なN-Sアシルシフト型チオエステル前駆体の中で最も迅速かつ高効率にチオエステルへの変換が可能である¹³。最新の研究成果としては、CP-チアゾリジノンペプチドのCys残基をSec(セレノシステイン)へ変換することで、セレノエステルの合成が可能となっており、チオエステルと比較して10倍以上ペプチド連結反応が加速することを見出している(論文投稿準備中)。

5. 高分子量タンパク質の合成を可能にするワンポットペプチド連結反応

ペプチド連結反応によって100アミノ酸以上のタンパク質合成が可能になったが、複数のペプチド断片を連続的に繋ぐ場合に「合成収率の低下」がしばしば問題となる。その主な要因は、ペプチド連結反応後に都度行われる精製・単離操作である。HPLCによる精製操作は、その操作自体によるロスが避けられず、連結するペプチド断片の数が多くなるほど精製操作の回数が増加し、収率が低下する(時間もかかる)。この問題にアプローチするために、複数のペプチド断片を精製することなく順次連結する「ワンポットペプチド連結反応」の概念が提唱され、近年盛んに研究されている(図4A)¹⁴。

連結するペプチド断片が3つ以上になる場合、中間断片(N末端とC末端以外の断片)のN末端Cysには副反応を抑えるための保護基が必要になる。効率の良いワンポットペプチド連結反応を開発するための鍵は「ペプチド連結反応系中でCys保護基の脱保護を定量的かつ選択的に行うこと」である。筆者らは、NCL反応溶液中でN末端Cysのアミノ基をアリルオキシカルボニル(Alloc)基で保護したペプチドをPd(0)錯体によって脱保護する系を用いることで、効率的なワンポット多段階ペプチド連結が可能になることを見出した¹⁵。この脱保護反応はNCL反応系中に含まれるチオール触媒MPAA(4-mercaptophenylacetic acid)によって加速され、また同時に終結させられる。つまり、MPAAはPd錯体による脱保護途中に生成するπアリルパラジウム錯体に対して辻・トロスト反応によるアリルスカベンジャーとして働く(図4B)とともに、リガンド交換によるPd錯体の不活化剤としても機能する(図4C)。このPd錯体によるAlloc脱保護反応とPd錯体の不活化反応は同時に進行するが、脱保護反応が不活化反応よりも早いことが重要なポイントである。その結果

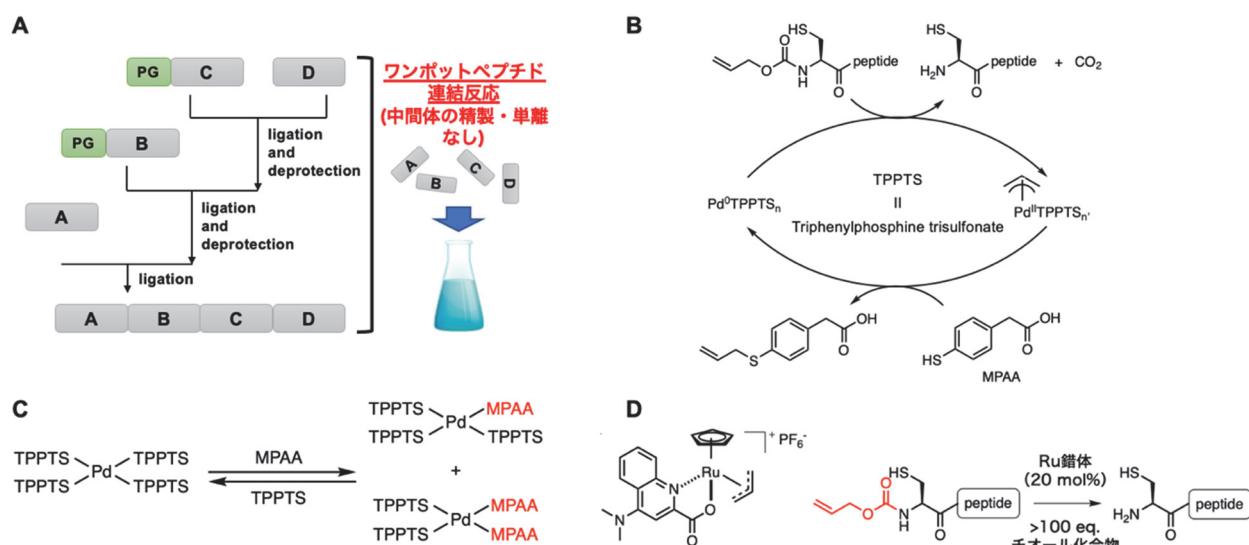


図4 ワンポットペプチド連結反応の概要および有機金属錯体によるAlloc脱保護反応

果反応系中にペプチド断片あるいはPd錯体を添加するだけで、NCL→Alloc脱保護→NCL→Alloc脱保護、、、の繰り返し反応が可能となり、効率的なワンポット多段階ペプチド連結が可能となった。この反応系を用いて5つのペプチド断片からヒストンH2A.Xのワンポット合成に成功した。5つのペプチド断片をワンポットで連結させた例は本研究が初めてであり、合成収率47%という値は過去のワンポットペプチド連結法と比べて優位に高い値であることから、現状最も効率の良いワンポットペプチド連結法の一つと言える。また、2種類のPd錯体(0価および2価の錯体)を使い分けることで、Cys残基を配列中に有するタンパク質をワンポットペプチド連結反応によって合成する方法論についても報告している¹⁶。一方、Pd錯体によるAlloc脱保護反応には、錯体をAlloc基に対して2当量以上加える必要があるが、過剰量の金属錯体はしばしばペプチドやタンパク質の沈殿を引き起こす。そこで筆者らはNCL反応系中において触媒量でAlloc基の定量的脱保護が可能な別の金属錯体の探索を行った。その結果、20 mol%程度の触媒量で脱保護可能なRu錯体を見出し(図4D)、このRu錯体を用いてヒストンH1やヘテロクロマチンタンパク質HP1 α のワンポット合成を達成している⁹。最新の研究成果としては、Alloc基の代わりにチアゾリジンをCys保護体として使用し、チアゾリジンから放出されるホルムアルデヒドを連続的に捕捉することで新たな原理で働くワンポットペプチド連結反応の開発に成功している¹⁷。

6. DNAを足場としたペプチド連結反応

タンパク質化学合成法の問題点として、多段階のペプチド断片連結による合成効率の低下に加えて、疎水性ペプチド断片の凝集や沈殿が挙げられる(水溶性が低いペプチドは連結反応に使えない)。筆者らはこれらの問題に一举にアプローチする方法として、DNAを足場に用いたペプチド連結反応の開発に着手した。この方法では、連結するペプチド断片に主鎖あるいは側鎖から一本鎖DNAがぶら下がったコンジュゲートを用いてペプチド連結反応を行う。DNA鎖の高い親水性によってペプチド断片の水溶性を担保し、またDNAの2本鎖系性能を利用することで近接効果によるペプチド連結反応の加速効果が期待できる。また、3つ以上のペプチド断片を部位特異的に同時に連結できる可能性も考えられた(図5)。ペプチドとDNAを繋ぐリンカーは、外部刺激によって切断可能なものを選択することで、ペプチド連結反応後に目的の連結産物を得ることができる。

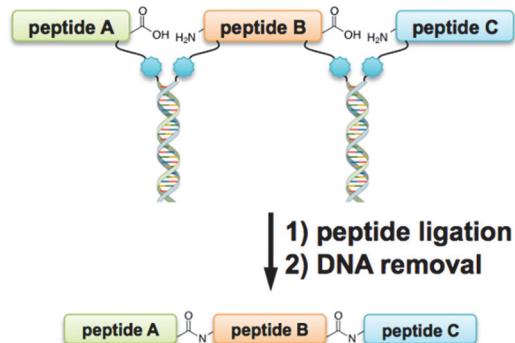


図5 DNA 足場上でのペプチドの同時連結反応

まず初めに、光照射によって切断可能なリンカーで繋がったペプチド-DNAコンジュゲートの合成を行った。具体的には、Lysの側鎖から光分解性のNvoc基と末端にアジド(あるいはアルキン)を持つ新規Fmoc-Lys誘導体を合成し、それを用いてFmoc固相合成でペプチドを合成した。クリック反応によって合成したペプチドと一本鎖DNAを連結することで目的のペプチド-DNAコンジュゲートを合成した。2種類のコンジュゲートを用いてペプチド連結反応を縮合剤であるEDCを用いて行ったところ、コンジュゲート間の連結反応が、ペプチドのみの反応と比べて1000倍以上加速されることが明らかとなった。また、本手法を用いることで水溶性の低いペプチド(飽和濃度が1 mM以下)のペプチド連結も可能であることを示せた。その後、3種類のペプチド-DNAコンジュゲートを用いて同時連結実験を行ったところ、3種類のペプチド断片が目的の順序で繋がった連結産物の生成が観察された。ただし、同時に末端ペプチド同士が連結した産物も同程度の効率で得られる結果となった。この原因として、ペプチドとDNAを繋ぐリンカーの長さが長すぎて、反応点同士の3次元的距離があまり変わらなかつたためだと考えている。しかし、本研究では3種類のペプチド断

片を目的の順序で同時に連結可能であることを示した初めての例である¹⁸。この第1世代法は、連結反応にカルボン酸活性化剤を用いていたため、1) 連結効率が低い(加水分解が顕著)、2) エピマー化などの副反応が目立つ、などの問題点があった。現在は、第2世代法として、DNA足場上でNCLによるペプチド連結反応が可能な系をすでに開発しており、疎水性の高い膜タンパク質などの実際のタンパク質を複数合成することに成功している(論文投稿準備中)。

7. おわりに

本稿では、筆者がタンパク質化学合成研究を志したモチベーションやきっかけと共に現在までに得られた成果についてダイジェスト形式で紹介させていただいた。翻訳後修飾が導入された天然タンパク質の化学合成を進める中で、その合成法がまだ未成熟であることを実感し、新たなチオエステル合成法やペプチド連結反応の開発に取り組んできた。そして現在、新たな方法論の開発とともに、本稿のタイトルにあるような「タンパク質を超える人工ポリアミド分子」の創成を目指して道を模索している。アカデミック研究は「今必要とされること」だけやれば良い訳ではなく、研究者が面白いと感じた、ある意味アート感覚で研究を推進することで、最終的に思いも寄らない成果を社会に還元できるのだと信じている。

(謝辞)

本稿で紹介した研究成果は、東京大学工学系研究科岡本晃充先生の研究室および名古屋大学工学研究科村上裕先生の研究室にて得られたものであり、貴重なご助言および素晴らしい研究環境を与えていただいたことに厚く御礼申し上げます。また、ともに研究を推進してくれた学生諸氏、特に博士課程へ進学して長期に渡り研究生生活を共にしてくれた数名の学生諸氏にはこの場を借りて心より感謝いたします。また、本稿の執筆機会を与えてくださった鳥取大学学術研究院 松浦和則先生に御礼申し上げます。

(参考文献)

1. Dawson P. E. et al., *Science* **1994**, 266, 776-779.
2. Agouridas V. et al., *Chem. Rev.* **2019**, 119, 7328-7443.
3. Huang H. et al., *Chem. Rev.* **2015**, 115, 2376-2418.
4. Sueoka T. et al., *Chem. Rec.* **2018**, 18, 1727-1744.
5. Hayashi G. et al., *Chem. Commun.* **2016**, 52, 4999-5002.
6. Wan Q. and Danishefsky S. J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 9248-9252.
7. Sueoka T. et al., *Biochemistry* **2017**, 56, 4767-4772.
8. Hao F. et al., *Nucleic Acids Res.* **2020**, 48, 11510-11520.
9. Kamo N. et al., *Chem. Sci.* **2021**, 12, 5926-5937.
10. Muller M. M. and Muir T. W., *Chem. Rev.* **2014**, 115, 2296-2349.
11. Kawakami T. and Aimoto S. *Chem. Lett.* **2007**, 36, 76-77.
12. Yanase M. et al., *Chem. Sci.* **2019**, 10, 5967-5975.
13. Nakatsu K. et al., *Org. Lett.* **2020**, 22, 4670-4674.
14. Zuo C. et al., *Org. Biomol. Chem.* **2019**, 17, 727-744.
15. Kamo, N. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 16533-16537.
16. Kamo, N. et al., *Org. Lett.* **2019**, 21, 8378-8382.
17. Nakatsu et al., *Chemrxiv*. **2021**, Preprint <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.14721477.v1>
18. Hayashi G. et al., *Biomacromolecules* **2019**, 20, 1246-1253.

気になった論文

桐山 寛生 (きりやま ひろなる)

信州大学大学院 総合理工学研究科 農学専攻 修士課程 1年

21as104c@shinshu-u.ac.jp

この度は、生命化学レター「気になった論文」への執筆の機会を頂き、ありがとうございます。私は、信州大学の大神田淳子教授が主催するケミカルバイオロジー研究室に所属しています。研究室に配属された学部3年後期から天然物フシクコクシンの植物成長促進効果の検証に取り組んでいます。

たんぱく質間相互作用 (PPIs)は細胞内プロセスにおける重要な制御機構です。近年、遺伝子発現やシグナル伝達などに関わるPPIsを操作するため、化合物とその受容体を用いたChemical Inducers of Proximity (CIPs)やChemically Induced Dimers (CIDs)がよく利用されています(図1)。今回は、化合物とその受容体を用いた特定のPPIの制御をテーマに、最新の論文を2報紹介いたします。

Mandipropamid as a chemical inducer of proximity for in vivo applications

M. J. Ziegler, K. Yserentant, V. Dunsing, V. Middel, A. J. Gralak, K. Pakari, J. Bargstedt, C. Kern, A. Petrich, S. Chiantia, U. Strähle, D. Herten and R. Wombacher, *Nat. Chem. Biol.*, **2022**, *18*, 64-69.

免疫抑制剤であるrapamycin (Rap)とその受容体 (FKBP12とFRB)を用いたCIPが細胞内PPIの操作を可能にしたことは周知のとおりである。しかし、Rapは内在性mTORに作用してしまうため、毒性が生じる他、特定のPPIだけを操作するのは困難であった。このことから、内在性の標的たんぱく質には作用しない化合物とその受容体をCIPに用いる必要があった。植物は、植物ホルモン受容体へのリガンド結合により惹起されるPPIを介して様々な生理応答を示す。そこで、植物ホルモン受容体が哺乳類細胞に発現しないことを活かし、植物ホルモンとその受容体を用いた哺乳類細胞内でのCIPの研究が行われてきた。この論文で筆者らは、2015年[1]に開発された殺菌剤 mandipropamid (Mandi)を受容し、本来のリガンドであるアブシジン酸 (ABA)を受容しなくなった6重変異体ABA受容体PYR1 (PYR^{Mandi})に着目した。高等生物にCIPを適応するには、化合物の優れた細胞膜透過性と低毒性が求められる。Mandiは農薬であることから、哺乳類細胞への毒性が低く、高い細胞膜透過性を示す。筆者らは、Mandiを用いれば、より理想的な *in vivo*でのCIPが可能であるのではないかと考え、MandiとPYR^{Mandi}の直交性ペアをレセプターとして用い哺乳類細胞COS-7でのCIPの評価を行った(図1)。

初めに、MandiとPYR^{Mandi}の直交性ペアがレシーバーabscisic acid insensitive (ABI)との細胞内CIPを可能とするのかを、2色の蛍光たんぱく質を融合したPYR^{Mandi}とABIがMandi添加時に共局在するか否かで評価した。Mandi添加時ののみ、細胞膜に局在するLYN-mCherry-PYR^{Mandi}とeGFP-ABI、また中間径フィラメントであるVimentin-mNeonGreen- PYR^{Mandi}とHalo Tag Ligand Silicon Rhodamine (HTL-SiR):Halo-ABIはとも

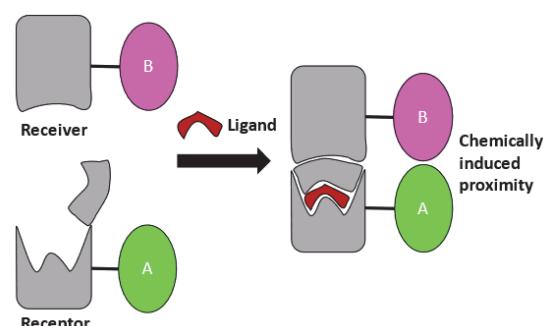


図 1 CIPs もしくは CIDs のイメージ図。

に共局在し、MandiとPYR^{Mandi}の直交性ペアが哺乳類細胞でのCIPに応用できることが示された。続いて、Mandi-PYR^{Mandi}ペアとこれまで開発してきた各種のCIPについて比較した(図2, A B)。まず、化合物添加後に各々のレシーバーが対応するレセプターに75%移行するまでの時間($t_{0.75}$)を調べた。5 μMのABA, および膜透過性を向上させたABA-AM (acetoxyethyl), GA₃-AMではそれぞ

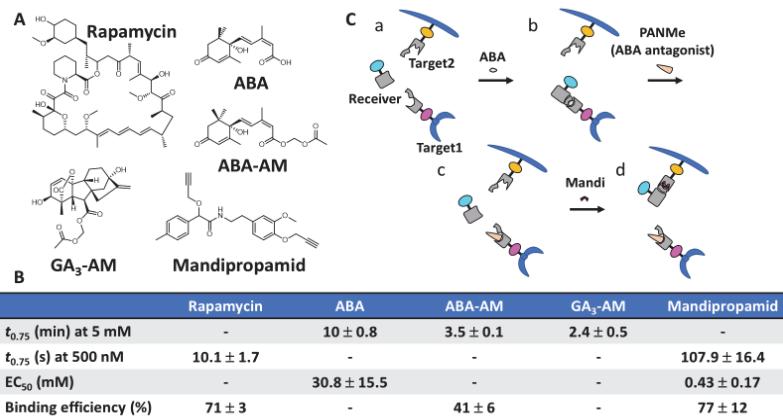


図2 A) 化合物の構造. B) CIPs の比較. C) レシーバーのたんぱく質間の移行.

れ10±0.8, 3.5±0.1, 2.4±0.5 minであったが、500 nM Mandi, Rapではそれぞれ10.1±1.7, 107.9±16.4 sと速やかに共局在が起きた。さらに、Mandiを用いたCIPの濃度依存性を評価するために、ルシフェラーゼを用いた遺伝子発現アッセイを行った。ABA ($EC_{50} = 30.8 \pm 15.5 \mu M$)と同様にMandi ($EC_{50} = 0.43 \pm 0.17 \mu M$)でも濃度依存的で、ABAよりも72倍効率的なCIPを確認した。また、細胞中に発現するレシーバー(ABI)がレセプター(PYR^{Mandi})にどの程度相互作用しているかを、raster image correlation spectroscopy (RICS)で検証した。ABA-AMでは41±6%であった一方、Mandiは77±12%、またRapは71±3%であった。以上より、MandiによるCIPが細胞内で効率的なPPIを誘導していることが明らかになった。次に、Mandiを用いたCIPが高等生物に応用可能か検証した。ゼブラフィッシュ胚にLYN (膜たんぱく質)-mCherry-PYR^{Mandi}もしくはTOM20 (ミトコンドリアのたんぱく質)-mCherry-PYR^{Mandi}とeGFP-ABIを共発現させ、Mandiを処理した時に、ひれ、表皮、筋細胞で共局在を観察した。ゼブラフィッシュ胚にMandiを処理した後、数分後に共局在を確認したことから、Mandiの優れた膜透過性が示された。また、5 μMのMandiで72h処理した時でも毒性は見られなかった。最後に、ABAとMandiによる2種類のCIPシステムを用い、同一のABIが2種のPPIを連続的に引き起こす系を構築した(図2, C)。この時間問題になるのは二つの化合物の同時処理では、レシーバー(ABI)が二つのレセプター(PYRとPYR^{Mandi})と相互作用してしまうことである。そこで、PYRの阻害剤であるPANMeを用いることで、この問題を解決しようとした。まず、ABAにより1回目のPYR-target1とABIのPPIを誘導した後、PANMeを添加することでこのPPIを解消する。その後、Mandiにより2回目のPYR^{Mandi}-target2とABIのPPIを誘導する作戦を実行した。ABA-AM→PANMe→Mandiの連続的な処理により、レシーバーであるHalo-ABIのTOM20 (ミトコンドリア)とVimentin (中間径フィラメント)間の効率的な移行が達成された。

以上のように、哺乳類細胞でMandiとPYR^{Mandi}の直交性ペアが特定のPPIを制御できることが明らかにされた。Mandiを用いたCIPは、細胞生物学におけるタンパク質の局在・相互作用の操作や、合成生物学における回路設計のためのツールとしての利用が期待される。

A rational blueprint for the design of chemically controlled protein switches

S. Shui, P. Gainza, L. Scheller, C. Yang, Y. Kurumida, S. Rosset, S. Georgeon, R. B. D. Roberto, R. Castellanos-Rueda, S. T. Reddy and B. E. Correia, *Nat. Commun.*, 2021, 12, 5754.

合成生物学では、化合物によるたんぱく質の制御によって、遺伝子発現やシグナル伝達のタイミング、局在、強度を自在に操作することが求められる。前項では、化合物によりたんぱく質の2量化を誘導する論文

を紹介した。化合物によりPPIsを自在に誘導・解除することができれば、合成生物学の発展に有用だと考えられる。先行研究[2]にて、筆者らは、Bcl-XL (B cell lymphoma extra-large) と BIM (Bcl-2-interacting mediator of cell death)-BH3 (Bcl-2 homology 3)の共結晶構造をもとに、Bcl-XLに結合するように設計された人工たんぱく質LD3から構成されるChemically Disruptable Heterodimer 1 (CDH1, Bcl-XL:LD3)を設計し、Bcl-XLと

LD3のPPIを阻害する薬剤A-1155463 (Drug-1)により、CDH1を導入したCAR-T細胞を自在に不活性化することに成功した。2報目の論文では、先行研究と同様の計算手法を用い、既存のPPI阻害剤でPPIを解除できるCDH2, 3を開発し、遺伝子発現とシグナル伝達のOFF/ONスイッチとして機能すること明らかにした。

まず、新たなCDHを作成する際、LD3がBcl-XLと近縁なBcl2と相互作用すること着目した。Veneroclax (Drug-2)はBcl2のPPI阻害剤であり、Bcl2のLD3複合体 (CDH2, Bcl2:LD3)のPPIを解除できると考えられる。Drug-2をCDH2に処理したところ、濃度依存的にCDH2のPPIは解除された。また、p53とmdm2のPPIについても数多くの阻害剤が開発されていることから、このPPIを組み込んだCDHの開発にも着手した。CDH1と同様の計算手法より、mdm2:p53の共結晶情報からp53の結合モチーフを収納できるたんぱく質を探査した。その結果、マウスのthioredoxinを基盤にデザインされたmdm2と相互作用するLD6が見出され、CDH3 (mdm2:LD6)が作成された。mdm2:LD6から構成されるCDH3はNVP-CGM097 (Drug-3)により濃度依存的にPPIが解除された。CDH3の結晶構造解析を行ったところ、計算モデルとほぼ一致した。このことは、この計算手法でCDHの立体構造を予測することができ、OFFスイッチとして機能する多くのCDHを開発できることを示している。次に、CDHが遺伝子発現・シグナル伝達のOFFスイッチとして機能するのかを検証した(図3, A)。遺伝子発現に関してはGal4/UAS系を用い、シグナル伝達に関してはgeneralizable extracellular molecule sensor (GEMS) platformを用い、化合物添加時にレポーター遺伝子の発現量が低下するかを評価した。Darg1-3処理時に、CDH1-3でレポーター遺伝子の発現量が低下し、その後Drugの除去により発現量が増加した。続いて、CDHを利用し、dubbed activation by inhibitor release (AIR)というONスイッチの開発に取り組んだ(図3, B)。AIRはCDH (レセプターとバインダー)に加え、Drug非感受性レセプターの3成分から成る。CDHの2成分をリンカーで連結し、Drug非存在下ではスイッチOFFの状態にする。Drug存在下でCDHのPPIが解除され、CDHバインダーの結合界面が露呈し、この結合界面にDrug非感受性CDHレセプターがPPIを引き起こすことで、スイッチがONになる仕組みである。Drug非感受性CDHレセプターはCDHレセプター中のDrugとの相互作用が喪失するアミノ酸残基とCDHバインダーとの相互作用が保持されるアミノ酸残基を計算でリストアップし、設計した。AIRがONスイッチとして機能するかをOFFスイッチと同様の実験を行ったところ、Drug処理時に、転写とシグナル伝達において、レポーター遺伝子の発現が誘導された。さらに、設計したON/OFFスイッチを複数使用し、多入力・多出力可能な細胞の作成にも成功した。

本論文では、計算により遺伝子発現やシグナル伝達のスイッチとして機能するCDHsとAIRsの創出に成功した。この手法は、生命現象を制御する新しいスイッチ作出の一般的なアプローチになると期待される。

References: [1] S. Y. Park *et al.*, *Nature* **2015**, 520, 545-548. [2] G. Gionrdano-Attianese *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **2020**, 38, 426-432.

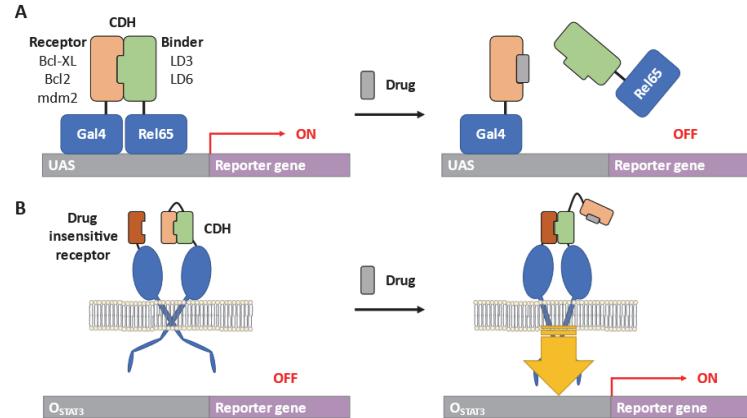


図 3 A) CDH による転写の OFF. B) AIR によるシグナル伝達 (CDH1, Bcl-XL:LD3)を設計し、Bcl-XLと

気になった論文

古川 寛人 (ふるかわ ひろと)

鳥取大学大学院工学研究科化学・生物応用工学専攻 博士後期課程 1 年

hiroto_8127@yahoo.co.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。私は鳥取大学大学院工学研究科化学・生物応用工学専攻で松浦和則教授のご指導のもと、ペプチドの自己集合による人工ウイルスキャップシドの構築の研究を行っています。近年、ウイルスキャップシドを模倣した材料開発の研究が盛んに行われています。本稿では、最近報告された、*De novo*タンパク質集合体及びDNA折り紙を利用したウイルスキャップシド模倣材料の構築と応用についての最新の研究を2報ご紹介します。

A COVID-19 vaccine candidate using SpyCatcher multimerization of the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain induces potent neutralising antibody responses

T. K. Tan, P. Rijal, R. Rahikainen, A. H. Keeble, L. Schimanski, S. Hussain, R. Harvey, J. W. P. Hayes, J. C. Edwards, R. K. McLaen, V. Martini, N. Thakur, C. Coneicao, I. Dietrich, H. Shelton, A. Ludi, G. Wilsden, C. Browning, A. K. Zagrajek, D. Bialy, S. Bhat, P. S-Leggett, P. Hollinghurst, M. Tully, K. Moffat, C. Chiu, R. Waters, A. Gray, M. Azhar, V. Mioulet, J. Newman, A. S. Asfor, A. Burman, S. Crossley, J. A. Hammond, E. Tchilian, B. Charleston, J. Huo, J. A. Tree, K. R. Buttigieg, R. J. Owens, M. W. Carroll, R. S. Daniels, J. W. McCauley, D. I. Stuart, K-Y. A. Huang, M. Howarth, and A. R. Townsend, *Nat. Commun.*, 12, 542 (2021).

近年、対称性を考慮して分子設計されたVirus like particle (VLP)表面に抗原タンパク質を提示させることで免疫を活性化させるワクチン材料としての応用が盛んに研究されています。筆者らは、より簡単に多量的に抗原を提示できる戦略としてSpyCatcher-tagを用いた提示を検討しました。SpyCatcher-tagはSpyCatcherとSpyTagの分割型のtagであり、それらのLysとAsp間でアミド結合を形成することで共有結合を形成します。Bakerらが開発した*De novo*タンパク質集合体 I3-01表面にSpyCatcherを導入したSpyVLPを構築し、SARS-CoV-2 spike proteinの一部である Receptor-binding domain (RBD)にSpyTagを導入したものとTBS buffer (pH 8.0)中で混合させることで抗原を提示したRBD-SpyVLPを作製しました(図1A)。DLS測定によりRBD提示に伴う粒径の増大が確認され、Cryo-EMにより、揺らぎが大きいもののVLP表面へのRBDの修飾が観察されました(図1B,C)。このRBD-Spy VLPはマウス及びブタに対して免疫活性を高め、天然SARS-CoV-2がRBD-SpyVLP投与によって産生された中和抗体により活性を失う中和活性も確認

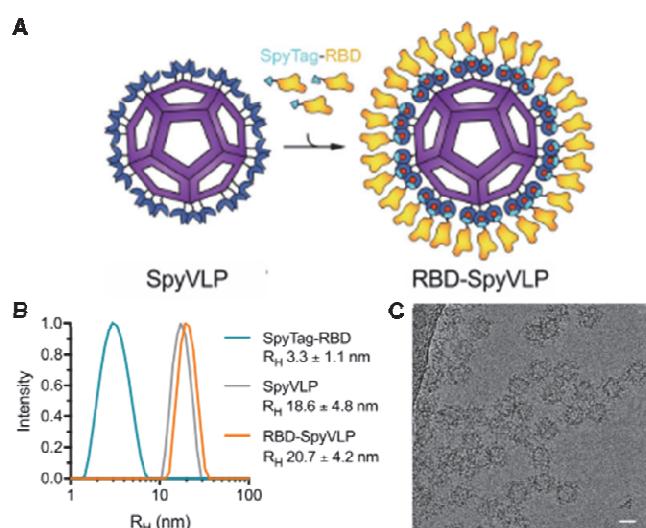


図 1. (A) RBD-SpyVLP の構築の模式図及び(B) DLS 測定、(C) Cryo-EM 像

されました。本研究では、簡単な操作で抗原を提示することができ、マウスやブタに対して免疫活性及び中和活性を高めることが確認され、新規ワクチン候補として有用であることが示されました。この論文では、現在使用されているmRNAワクチンなどとの比較がされていない点や、ヒトに対してはどのような活性を示すかが示されていない点から本当に有用かどうかは疑問に残りますが、今後VLPを利用したワクチン材料開発の研究がより発展していく期待を持てる論文でした。

Programmable icosahedral shell system for virus trapping

C. Sigl, E. M. Willner, W. Engelen, J. A. Kretzmann, K. Sachenbacher, A. Liedl, F. Kolbe, F. Wilsch, S. A. Aghvami, U. Protzer, M. F. Hagan, S. Fraden, and H. Dietz, *Nat. Mater.*, 20, 1281-1289 (2021).

近年ではDNA折り紙と呼ばれるDNAを自在に設計し精密なナノ構造体を構築する技術が発達しています。設計としては、大きなScaffold DNAに短いStaple DNAを加えることで構築したい形に折り疊ませる手法です。このDNA折り紙によって構築されたナノ構造体は様々な用途で応用され始めていますが、筆者らは、標的分子として天然ウイルスの捕捉に焦点をあて、より効率的にウイルスを捕捉できるDNAナノ構造体を構築するために、天然ウイルスキャプシドの立体規則性に着目しました。天然ウイルスキャプシドは規則正しい正20面体構造をとり、その規則性は $T = h^2 + hk + k^2$ という公式が成り立つことが知られています(図2)。このような規則性を利用して人工タンパク質集合体やDNAナノ構造体の構築の例はありましたが、より精密に設計した例はなく、さらにウイルス捕捉剤としてどれほどの効果を示すかは未開拓でした。そこで本研究では、ウイルスキャプシドの規則性を利用してウイルス捕捉型DNAシェルを精密に設計・構築し、ウイルス捕捉剤として応用可能かを検討しました。

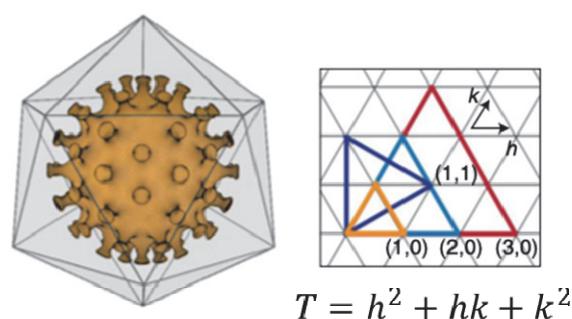


図2. 天然ウイルスキャプシドの規則性を示す公式及び定義

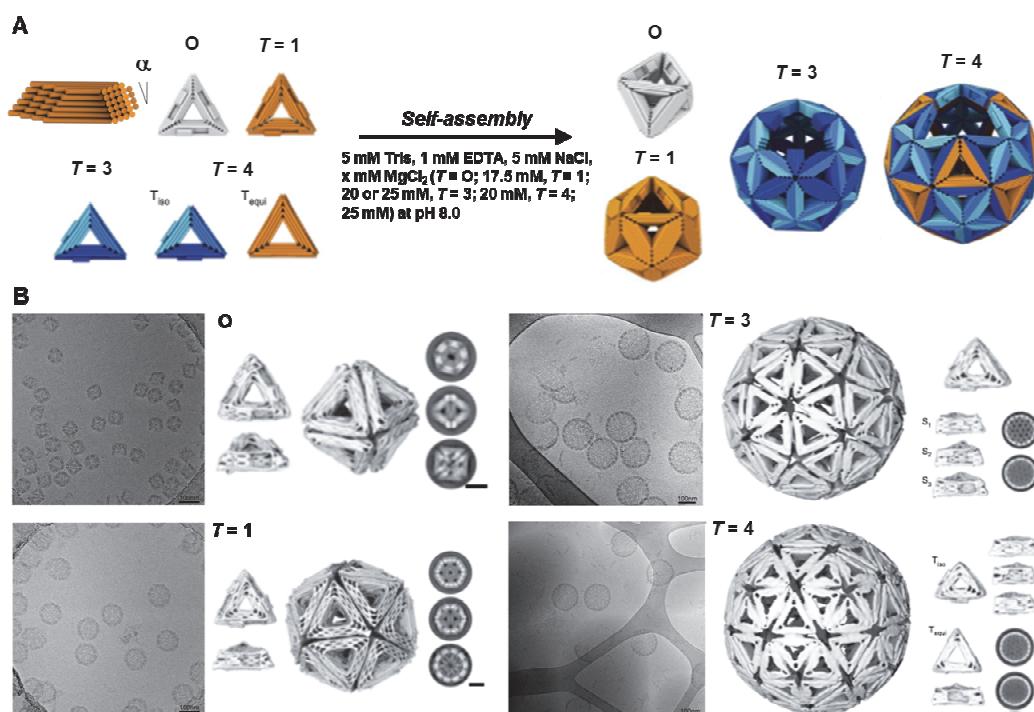


図3. (A) O, $T = 1-4$ の DNA シェルの構築の模式図及び(B) Cryo-EM 像と解析により得られた構造

まず、八面体構造O及び $T = 1\text{--}4$ に対応するDNAトライアングルを設計し、DNAトライアングル同士が相補的に二重鎖を形成する設計、さらにDNAトライアングル側面の角度 α を適切な角度に調整することでO, $T = 1, 3, 4$ のDNAシェルを設計しました。そして、構築したDNAトライアングルをMgCl₂存在下でアニーリングを行うことでDNAシェルを構築しました(図3A)。その結果、Cryo-EMにより設計通りの規則的なDNAナノ構造体の形成が確認されました(図3B)。

次に、ウイルス捕捉型DNAシェル内部にウイルスを捕捉できるよう、八面体DNAシェルの半分(half O shell)、 $T = 1$ のDNAシェルの半分(half $T = 1$ shell)を構築しました。構築したウイルス捕捉型DNAシェルが実際にウイルス粒子を捕捉できるかをB型肝炎ウイルス由来コア粒子(HBV)用いて評価しました。3種類のDNAシェル内部に抗HBV抗体を修飾することによりHVB捕捉能を付与し、その後、HVBを添加することで捕捉されるかを評価しました。その結果、half O shell及びhalf $T = 1$ shellにおいてCryo-EMによりDNAシェル内部にHBVが捕捉された像が観察されました(図4A)。最後に、HEK293T細胞存在下、PEGで表面修飾したhalf O shellを添加後、eGFP発現レポーター遺伝子内包アデノウイルスベクター(AAV2)を添加し静置後に細胞内で発現したeGFP由来の蛍光を蛍光顕微鏡により評価しました。その結果、half O shellで処理した場合において顕著に細胞内のeGFP由来の蛍光の減少が観察され、DNAシェルがウイルスベクターを捕捉することで効果的なウイルス中和作用を有することが示唆されました(図4B)。

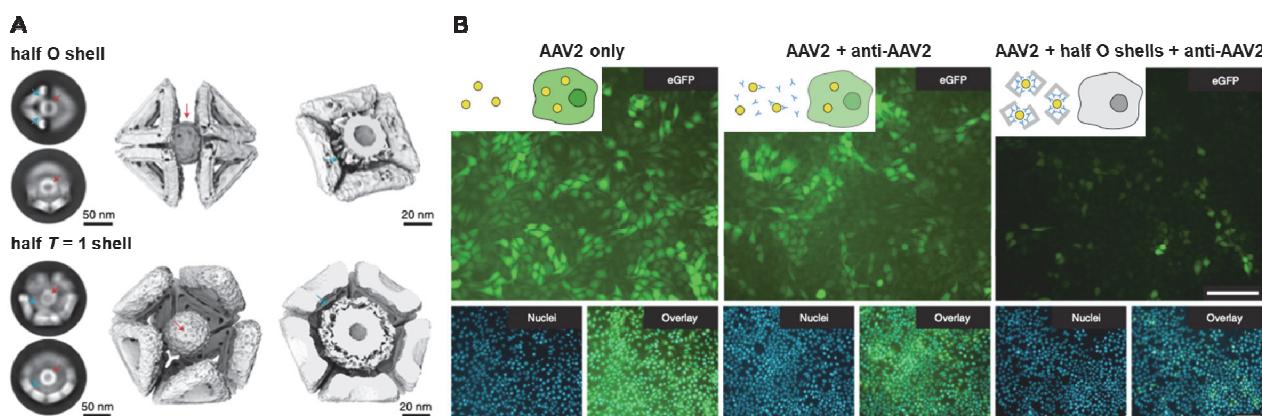


図4.(A) HBV を捕捉した half O/T=1 shell の Cryo-EM 像及び(B) AAV2 添加時の蛍光顕微鏡像

今回の研究で、ウイルスキャップシドの規則性を利用したウイルス捕獲型DNAシェルの構築に成功し、実際にウイルス捕捉材料として有用であることが示唆されました。私自身ペプチドの自己集合からなる人工ウイルスキャップシドを利用したコロナウイルスなどのエンベロープ型ウイルス模倣材料の開発を行っているため、DNA折り紙でウイルスの規則性考慮し精密なDNAナノ構造体を設計・構築し、さらに、ウイルス捕捉能の機能付与に成功した今回の論文を読んだ時は衝撃を受けました。

留学体験記

UCSF 留学体験記

UCSF, Department of Cellular &
Molecular Pharmacology
山田俊理
(toshimichi.yamada@ucsf.edu)



2020年4月よりカリフォルニア州立大学サンフランシスコ校(UCSF)のWendell Lim研究室にて博士研究員として勤務しております。本稿ではUCSFの研究環境やLim研究室の研究活動を紹介いたします。

留学に至る経緯

“世界一の環境で働くことは何事にも変えられない経験になる”。これはシリコンバレーで働いた方に頂いたアドバイスで、自分がアメリカで挑戦したいと思ったきっかけとなりました。そこで安直にも有名大学(Harvard, MIT, Stanford, UCSF)でCNSを量産している研究室を探してアプライしました。特に接点のない研究室ばかりだったのでほとんど断られましたが、UCSFのWendell Lim先生に受け入れて頂き、2020年4月よりLim研究室のポスドクとして研究しています。

ベイエリアの環境

日本ではシリコンバレーと言う名で知られていますが、現地では殆ど耳にすることはありません。むしろサンフランシスコ湾の周辺地域をベイエリアと呼ぶことが多いです。さてベイエリアにはいくつか特徴があり、まず気候に関しては四季がありません。12月から2月くらいまでは雨期ですが、週に1回降る程度でそれ以外の月は月に1回降る程度です。また年間を通して寒暖の差が10°Cほどしかなく、年中涼しいです。カリフォルニアというと暖かい印象があり半袖を多く持ってきたのですが、ベイエリアは特殊な湾岸地形のため夏でも気温が20-25°Cしか上がりません、年中長袖が必要となるのが想定外でした。またベイエリアはアジア人が多く住んでおり、日本の食材も豊富で、思っていた以上に何でも手に入ります。サンフランシスコ市内にはたくさんの公園がありますし、ビクトリア朝時代の建築が多いので、市内を散策するだけでも楽しいです。サンフランシスコは山手線の内側程度の広さで東京と比べるとこじんまりしていて娯楽は少ない印象ですが、スポーツは盛んです。市内にはNBAウォーリアーズやMLBジャイアンツの本拠地があります。渡米前は野球もバスケも興味がなかったのですが、ラボの同僚と話していく中で興味を持ち観戦しに行ったところ、どちらも凄く楽しくて、今年はほぼ毎試合をテレビで観戦するほどハマりました。



試合観戦の様子:

SF ジャイアンツの球場は遊園地のような作りになっていて、球場内を歩き回るのも面白いです。バスケットのアリーナは研究所の真横にあります！

ベイエリアに留学する場合、考慮にし

なくてはならないのは世界一高い生活コストです。例えば、四人家族で標準的な生活を営むのに必要な年収は3000万円ほどと言われています。当然ポスドクの給与は遙かに少なく(500-600万円ほど)、市内では貧困層に位置するので節約生活をおくことになります。幸いUCSFは寮があるので家賃は相場より安く済みますが、それでも夫婦二人狭いワンルームで月20万円支払っています。生活費が高い要因は明確で、ベイエリアがIT企業のメッカであることに起因します。サンフランシスコ市から南に1時間ほど行くと、Google, Facebook, Appleの本社があり、市内にもスタートアップの企業が密集しています。例えば、自分が研究しているキャンパスの隣にはUberとDropboxの本社があるように、こちらに生活しているとテックが身近にあることを実感します。そして、これらの企業は皆社員が若く、給与が信じられないくらい高いです。

そんなベイエリアで研究する意味はなんでしょうか？自分が思うに、ベイエリアは医学・生命系でも世界屈指の水準にあり、新しい分野や技術が次々と生み出されていく過程を体感できることにあると思います。まずアカデミアではStanford, UC Berkeley, UCSFがお互い近所にあり交流が盛んなこと。そしてそれらの大学から派生したバイオテックが数多く存在することです。実際自分が所属する研究室でも、半分以上はベイエリアの企業に就職します。私が日本で大学院に進学した際、バイオ系はお金にならないと良く言われたのですが、こちらでは稼げる職種であることに驚きました。アメリカもアカデミアに残るのは大変なので、それ以外の選択肢が多いことは良いことだと思います。

UCSFの研究環境

UCSFはカリフォルニア州立大学の一つですが、医歯薬学部しかない特殊な大学です。アメリカの場合、医学部は大学院から学部生がいないため普通の大学よりは研究所に近い雰囲気のように感じます。こう書くと小さい大学に感じるかもしれません、予算規模は8000億円程度あります。またキャンパス内の建物は全て寄付で建てられており、私の研究室があるGenentech Hallは製薬会社であるGenentechが寄付により建てられました。このGenentech Hallは自分が知っている中では随一の広い建物で、日本の建物と比べて廊下がやたら広いというのが最初に来た時の印象でした。またUCSFには日本人も多く在籍しています。昔に比べると大分減ったと聞きましたが、Mission bayキャンパス内で基礎研究に従事している方が10人くらいおり、時々会って飲み会をしたり、旅行に行ったりしています。

Lim研究室の雰囲気

UCSFは学生が少ないので、5人から10人程度の研究室がほとんどと聞きます。Lim研究室は例外的で29名います。内訳は、Lim先生、秘書1名、ラボマネージャー2名、ポスドク11名、大学院生4名、テクニシャン6名、SFSUからの修士の学生4名です。UCSFには修士の制度は無いのですが、近郊の大学から出向のような形でLim研に研究の手伝いをしてくれる学生がいます。私にも昨年の夏頃に修士の学生が一人つき実験の手伝いを色々とやってもらいつつ、英語の先生にもなってもらっています。アメリカの薬学部や医学部の大学院に入学するのは大変で、学部卒業後にバイオテックで働いたり、有名研究室でテクニシャンとして働くことで業績をあげたり、推薦書を入手する必要があるそうです。確かに大学院生は皆優秀で例え

ば、大学院に入学する前の研究でNature姉妹誌を持っていました、会社を経営したりと、自分の学生時代と比べると研究者としてすでに独立しているように感じました。また、アメリカの研究室は国籍が多様ということを良く見聞きするのですが、Lim研究室はほとんどが(移民二世など含め)アメリカ人です。ポスドクでは自分以外に韓国人、フランス人とメキシコ人がいますが、彼らもアメリカで大学院を卒業しており、実際アメリカ外でPhDを取得したポスドクは自分一人です。一方でポスドクの研究背景は本当にみんな多種多様です。電子顕微鏡でタンパク質の構造解析、エピジェネティックの研究、神経、幹細胞、などほぼ全員が大学院時代に違う研究をしています。そしてみんなLim研究室での研究はそれまでと全く違うことを始めます。新しいことに挑戦する、というのがこの国における研究の前提になっていると思います。

さて、Lim研究室の勤務体制ですが、定時に来て帰るということは一切なく、みんな実験など来る必要があるときだけ研究室にいます。これはコロナ禍で研究室に行けなくなり、研究室でslackとzoom(両方ともベイエリアの会社です)が導入されて、解析や書類書きは家ができる体制が整ったことが大きいと思います。自分もラボに滞在する時間が随分短くなりましたが、研究の進捗はあまり影響がないように感じます。

研究室のミーティングはグループごとで行うのが隔週に一回あるのと、週に一回ポスドクか大学院生1名が研究発表するroundtableの二種類があります。このroundtableは4ヶ月に一回ほどの頻度で回ってくるのですが、毎回質問が20-30個くらい出て、発表時間が90分ほどに及びます。ここで良い発表をするとみんな興味を持ち研究室内で自発的に共同研究が始まりたりするので、みんな真剣に臨みます。



研究室の集合写真(筆者はニューヨーク旅行中のため写っておりません…)

Lim研究室の研究内容

Lim研究室は、タンパク質を人工的に改変し、細胞の機能や挙動を制御する合成生物学的研究を進めています。シグナル伝達の新たな視点からの解析及び医学への応用を行っています。2015年までは主に酵母のシグナル伝達を研究していましたが、2016年にLim研究室で開発された人工受容体synNotchを契機として哺乳類細胞を扱うようになりました。受容体であるNotchはリガンドである膜タンパク質Deltaと結合すると細胞膜の近辺で切断され、細胞内ドメインが核へと移動し遺伝子の転写を誘導します。synNotchはNotch細胞外ドメインを他のリガンドを認識する配列に置き換え、さらに細胞内ドメインを特定の転写因子に置換することで、認識するリガンドと誘導する遺伝子を任意に設定できます。現在はこのsynNotchを用いて、CAR-T細胞のガン細胞に対する特異性を高め、誘導するサイトカインを制御するImmuno-Oncologyのプロジェクトがメインに行われています。このプロジェクトも成熟して来ており、現在は基礎的な研究よりも実際の臨床試験を開始する段階へと移行している印象です。

Lim研究室では新たな基礎研究としてエピゲノムの制御と幹細胞のテーマに取り組んでいます。どちらもまだ一報も論文になっておらず、始まったばかりのプロジェクトなのでポスドクが2名ずつくらいで取り組ん

であり、自分は後者のプロジェクトに携わっています。如何せん新しいプロジェクトなので、何事も手探りで進めています。ある程度研究室に入る際にLim先生から大まかな方向性は指示されましたが、基本的にどんな研究をしても良い自由が与えられています。自分の場合は、同じプロジェクトに関わっているポスドクと日々相談することで、徐々に具体的な研究の計画を練っていきました。そのような状態なので、まだ全体の目的もきちんと定まっていませんが、一応現状では、初期発生や臓器形成をin vitroで再構築することを目指しています。具体的には、分化を誘導するシグナル伝達分子であるモルフォゲンの幹細胞集団近傍における時間・空間分布を制御するシステムを確立することに取り組んでいます。例えば、細胞間の接着分子を制御することで、幹細胞の集合体に突起状の細胞集団が結合したような構造や、幹細胞集団を囲う殻のような構造を形成させたりしています。それらの構造体に様々なモルフォゲンを導入することで、幹細胞集団内で局所的な細胞分化を誘導することや特定の方向に伸長させることに成功しました。現状は単純な分化しか制御できていませんが、色々な条件を組み合わせることで本格的な発生や臓器形成を目指しています。

Lim研究室の中でも新しいテーマなので、五里霧中の状態で色々な可能性がある中で、自分で考えて研究する機会を得られたのは、将来に向けていい経験を積めているとポジティブに捉えています。特にLim先生が新しい分野に挑戦する際の姿勢は大きく参考になりました。例えば、仮説を立てるのでなく、体系的に、網羅的にデータを取得する実験系を組むこと(Let the nature surprise youというのが口癖です)、その中で論文の肝となる革新的な現象を見つけてそれに注力することなどです。また、Lim研究室でこのような研究を始める利点として、様々な技術を転用できる点です。自分の研究でもImmuno-Oncologyのプロジェクトのために開発された技術を応用して上手くいったという様なことがあるので、研究室内で全く異なるテーマがあると思わぬ相乗効果をうむことがあるのは新鮮な驚きでした。

最後に英語ですが、想像以上に苦労しています。特にネイティブの英語は初め聞いた時に別言語かと思うくらい聞き取れず、またこちらの英語も一切通じず非常に困りました。とにかくアメリカのドラマ、podcast、YouTubeを家で聞いてなるべく英語に慣れるようにしています。アメリカに来て2年たちましたが、まだ英語でのdiscussionや日常会話にはすごく苦労します。

まとめ・謝辞

アメリカに来て、キャリア・研究に対する考え方方が大きく変わったことを実感しており、研究者人生の中でも大きな転機となりました。コロナの影響もあり様々な苦労がありましたが、楽しく充実した日々を過ごせています。このような研究環境を用意して頂いたLim先生には大変感謝しております。同僚のCoralie, Iain, Petrには日々貴重なアドバイスを貰っていて、自分の研究が迷走せずに済んでいます。修士のAngelicaは毎日大量の細胞培養を手伝ってくれており、おかげさまで実験が随分捗りました。アメリカで新しい研究を始められたのは、多くの人の支えがあって初めて実現しました。何より資金面で援助して頂いた東洋紡バイオテクノロジー研究財団、上原記念生命科学財団の皆様に心より感謝申し上げます。また、留学体験を共有する機会を与えて下さった鳥取大学の松浦先生、東京大学の小澤先生に深く感謝しております。最後になりますが新生活最初の3ヶ月を狭い部屋に二人で過ごすことになつても一切文句を言わず、支えてくれた妻に感謝いたします。

お知らせ

受 賞

山東 信介（東京大学）

日本化学学術賞（2022年3月）

「生体応用を志向した核偏極NMR分子プローブの開拓」

稻葉 央（鳥取大学）

日本化学進歩賞（2022年3月）

「ペプチドを基盤とした動的バイオナノ構造体の創製」

稻葉 央（鳥取大学）

高分子研究奨励賞（2022年3月）

「ペプチド設計に基づく微小管内部の機能開拓と人工運動システム構築」

編集後記

今号のニュースレター編集担当の松浦です。COVID パンデミック、某国の軍事侵攻、地震など大変なことが続いている昨今ですが、皆様いかがお過ごしでしょうか。地震の被害に遭われた方々に、心よりお見舞い申し上げます。また、世界中が平和になる事を願っています。

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！ 三原さんにはお誕生日のお祝いメッセージのついでに巻頭言の執筆依頼をさせていただきました。お忙しいところご快諾いただき、どうもありがとうございます！

ニュースレター改善のために、みなさんからのご要望・ご意見をお待ちしております。下記の編集担当まで、ご連絡をいただければ幸いです。

2022年4月1日

松浦和則
鳥取大学学術研究院工学系部門
ma2ra-k@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)