

# 生命化学研究レター

(2021年11月)

**2.** 巻頭言

生命化学と私

京大化学研究所 **二木 史朗**

**4.** 研究紹介

**4.** 核酸反応場を利用した特異な化学反応の開発

～速く、選択的に、かつユニークに～

東北大学 多元物質科学研究所 **鬼塚 和光**

**10.** 高反応性化学種による触媒の周辺環境でのタンパク質修飾

～チロシン残基修飾研究から発見したヒスチジン残基修飾法～

東北大学 学際科学フロンティア研究所 **佐藤 伸一**

**15.** ゲノム DNA・RNA 高次構造からなる脳の個性・病態を研究する

～ゲノムが個性を形成するのか？～

熊本大学 発生医学研究所ゲノム神経学分野 **塩田 倫史**

**20.** 論文紹介「気になった論文」

九州大学 システム生命科学府 博士後期課程1年 **田川 寛**

東京大学大学院 工学研究科化学生命工学専攻 博士後期課程1年 **田村 伊織**

**26.** 留学体験記

Münster 大学留学体験記

～繊細な光センサータンパク質との日々～

岐阜大学大学院 連合創薬医療情報研究科 特別研究協力員 **東 小百合**

**30.** シンポジウム等会告(今号は該当なし)

受賞、異動  
編集後記



# 巻頭言

## 生命化学と私

京都大学化学研究所 二木 史朗

生命化学研究会発足の発端とも言える下記のフォーラムが石田現会長(当時熊本大)により、オーガナイズされた。

高分子学会九州支部フォーラム(平成8年(1996年)1月19日(金曜日))

主題=バイオ高分子の新展開 –ペプチド・蛋白質・核酸の人工機能化–

演者:(蛋白工学研究所)藤井 郁雄、(東工大)三原 久和、(徳島大薬)二木 史朗、(京大院工)秋吉 一成、(分子研)塩谷 光彦、(甲南大理)杉本 直己

討論参加者:石田 斉(熊大工)、伊原 博隆(熊大工)、岸田 晶夫(鹿児島大)、菅本 和寛(宮崎大工)、竹中 繁織(九工大)、中 健介(鹿児島大)、中島 俊博(化血研)、西山 勝彦(熊大工)、新留 琢郎(長崎大)、浜地 格(九大工)、藤井 政幸(近畿大)

ロックフェラー大 E.T. Kaiser の研究室に留学していた藤井(郁雄)、三原両氏とともに、Kaiser のお亡くなりになった後にロックフェラーに留学した私も、演者として声をかけていただいた。私が最初に参加した生体機能関連化学シンポジウム(@同志社?)で、知り合いがいないのでどうしようと考えていたところ、一度話したらその人は友達と思っている(と当時の学生さんが評していた)親切な石田さんが、皆さんとの飲み会に連れて行ってくれ、生体関連の私に近い年齢の人達(今の生命化学のお歴々)と知り合いになれた。その後、藤井さんが九州の温泉に行きたいと叫び、フィクサー三原さんが単に遊びに行くのではなく明日につながる機会にしなくては・・・とつぶやき、回り回って石田さんが、核酸のオピニオンリーダーの杉本、塩谷、高分子・DDS+九州にもゆかりの深い秋吉の各氏も入ってもらった形での高分子学会九州支部主催(阿蘇での延泊付き)のフォーラムをオーガナイズしてくれた(多少の事実錯誤はあるかも知れないが、大体こんな感じの顛末)。動機は極めていい加減なところもあったけれども、結果オーライ、ディスカッションは本物であった。フォーラム自体はフォーマルなものであったけれども、次の日は全員トーク。質問がつきるまでエンドレスにディスカッションする企画で、通常の学会などでは聞けない本音の突っ込んだ討論が繰り広げられた。夜は夜で夜の更けるまで研究に限らぬ、さらに突っ込んだ議論。色々勉強になり、精神的にも励まされた。

あっという間に 25 年が流れた。さぼっている気は無いのだが、自己採点で言えばもう少し結果が出ていて欲しいなというのが正直な所である。ただ、色々迷走はしたものの、ペプチドと細胞膜

の相互作用という点からは、ここ数年、見えてきたものがあるように感じている。

一昔前は、ペプチドと膜の相互作用の解析と言えば、リポソームなどの人工膜を用いる方法が一般的であったと思う。それはそれで意味のあるアプローチではあるが、ペプチドとの相互作用をより詳細に検討しようとする、やはり膜を動的に捉えることが必要である。ペプチドとの相互作用による膜の変形に関しては分子相互作用による物理化学的な変形だけではなく、細胞膜の裏打ちタンパク質としてのアクチンの構造変化の誘起といった細胞側の生理的な要因による動的な膜変形が大きく関わってくる。膜脂質の構成成分や集合状態の不均一性は従来から考えられてきているが、膜構造が変われば、脂質パッキング状態に変化が生じ、典型的な脂質二重層とは異なるパッキング状態が一過的に生じうる。この一過的变化に呼応した刹那的な膜との相互作用が、膜の構造や細胞内への情報伝達に確実に影響を与える。これらは単にペプチドと膜との相互作用に留まらず、小分子や他の高分子などの膜との相互作用にも共有されるものである。このようなダイナミックな相互作用様式が分かれば、細胞操作や創薬・薬物送達に関わる次世代の革新的な概念・技術がここから生まれ、人類福祉にも大きく貢献する。これを可能とするには、細胞生物学、脂質生化学、可視化、情報解析などの周辺分野の一層の発展が必要となるものの、自分の出来る範囲で何かこれに貢献する仕事がしたい。現職における残された時間はそれほど長くなく、私にどれだけ出来るかどうか、それを可能とする運があるかどうかはわからないが、可能ならば更にもう一歩高みにのぼって、何が見えるかを見てみたいと思う。

スロースターター・マイペースの私がこれまで研究を進めてこられたのも、生命化学の皆さんのアクティブな姿に触れることができたためと思う。厚く御礼申し上げますとともに、今後ともよろしくお願ひ出来ればと願っている。



フォーラム後の討論写真

上段左から、古田、杉本、秋吉、浜地、和田、須賀、佐藤、三原  
 中段左から、塩谷、竹中、新留、中、菅本、中島  
 前列左から、石川、藤井政、岸田、石田、深瀬、藤井郁、二木(敬称略)

## 研究紹介

核酸反応場を利用した  
特異な化学反応の開発

～速く、選択的に、かつユニークに～

東北大学 多元物質科学研究所  
鬼塚 和光  
(onizuka@tohoku.ac.jp)

## 1. はじめに

核酸は生体内で遺伝情報を保存・伝達する重要な役割を果たしているためか、化学的反応性、特に求核性は低く、天然核酸を速く、選択的に化学修飾することは難しい。天然核酸の化学修飾は、シスプラチンやナイトロジェンマスタード系化合物による抗がん剤としての使用やマクサム・ギルバート法の修飾・分解によるDNAの塩基配列の決定などからその重要性が見出され、最近では次世代シーケンサーとの組み合わせにより、DMS (硫酸ジメチル) 法やSHAPE法といった高精度のRNA二次構造予測法のために必要不可欠な化学となっている。二本鎖形成による分子認識および近接効果を利用したオリゴ核酸による化学修飾も盛んに研究されており、遺伝子発現の制御、二本鎖形成部位特定プローブとしての利用から有機化学、ナノテクノロジー分野への応用まで幅広くその化学は使用されている。

筆者は学生時代、佐々木茂貴先生のご指導のもとで核酸の化学修飾に関する研究を行い、多くのことを学び、その面白さに魅了された。留学後、核酸のテンプレート反応を利用していた阿部洋先生のもとでさらに異なる手法、考え方を学び、2013年から現在までは、永次史先生のもと、ご指導を受けながらこれまでの経験を糧にした新しい核酸化学反応の開発に取り組んでいる。本稿では、筆者が開発してきた核酸反応場を利用した特異な化学反応に関して、その着想過程も含めて紹介する。

## 2. 化学反応を促進する様々な核酸反応場

核酸は二本鎖形成により反応点を近接させることで、様々な化学反応を促進させることが可能になる。核酸のテンプレート反応とも呼ばれるこの反応加速効果は、遺伝子発現制御やRNA修飾・検出などのケミカルバイオロジー的応用からDNAテンプレート合成などの有機化学的応用、DNAナノテクノロジー分野での応用まで、様々な用途に利用されている<sup>1</sup>。核酸のテンプレート反応は、①鎖間クロスリンク、②鎖間変換反応、③鎖連結、④テンプレート変換反応の四種類に分類できる。このうち本稿では、①～③の三種類の化学反応に関する研究例を3～5で紹介する。

また、核酸は二本鎖だけでなく、三重鎖、四重鎖、バルジ、ヘアピンなど様々な高次構造モチーフを形成することが可能で、これらは遺伝子発現の調整に重要な意味を持つと言われている。このような構造モチーフは、低分子化合物の良い結合・反応場となり、化学反応を促進することが可能になる。6ではこの反応場を利用したG四重鎖構造のアルキル化について紹介する。

## 3. RNAの部位特異的修飾能を持つ官能基転移性人工核酸の開発

RNAの人工的な修飾やラベル化には様々な手法が報告されている。DNA/RNA自動合成装置を用いて

化学的に合成するほか、酵素による連結反応により大きなRNAを構築していく手法が一般的に用いられている<sup>2</sup>。また、酵素を使わない方法として光反応による連結<sup>3</sup>、デオキシリボザイムを使った部位特異的修飾<sup>4</sup>なども報告されている。これらの手法は、修飾RNAをつくるためには優れているが、mRNAのような大きなRNAを小さな官能基で部位特異的に修飾することは困難である。

筆者は、九州大学薬学府での修士・博士課程時の研究で、RNAの部位特異的修飾能を持つ官能基転移性人工核酸の開発に取り組んだ(図1A)。この人工核酸は、標的RNAと二本鎖を形成することでシトシンアミノ基がβ-スルフィド-α, β不飽和ケトンヘマイケル付加し、引き続き脱離反応により転移反応が進行する可能性を考え設計された(図1B)。この反応は、上記に示した②鎖間変換反応に位置するテンプレート反応である。修士課程の間に、この提案してもらった分子および反応性を改善するために設計した誘導体をいくつか合成し、最終的にジカルボニル転移基を用いることで無事に最初の修飾反応を達成した<sup>5</sup>。この反応は二本鎖形成による近接効果を利用すると、μMの低濃度条件下、10時間ほどで50~60%の収率で目的物が得られたが、モノマーでは同程度の収率を得るまでに100 mMの高濃度で数日の時間を要し、近接効果による反応の加速を実感した。この反応開発の際、CだけでなくGに対する反応もわずかながら観測されていたため、その詳細を解析していたところ、塩基性条件にすることでG選択的かつ速い反応が進行することを発見した(図1C)<sup>6</sup>。この反応

の更なる加速は、塩基性にすることでGの構造が通常のケト型からエノレート型へ変化し、Gアミノ基の求核性が著しく増加したためであった。博士課程1年時に発見したこの加速効果は、後の遷移金属による反応の加速にもつながり<sup>7</sup>、今でも思い出深いものである。本技術は、著者が卒業後さらに発展し<sup>8-10</sup>、現在では恩師の佐々木先生がRINAT Imagingという会社を設立し、核酸医薬候補の正確な薬物動態解析を行っていると聞いており、学会などで進展を拝聴するのを楽しみにしている。

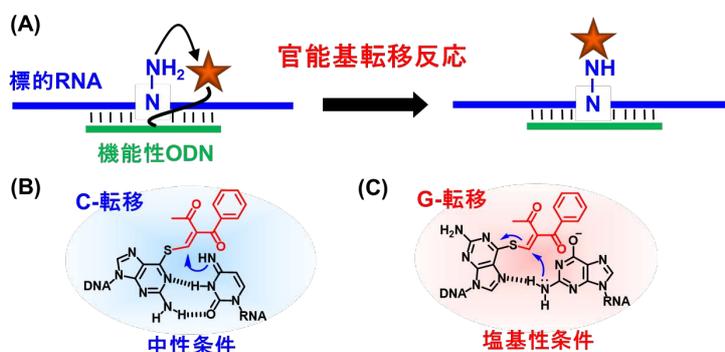


図 1. 官能基転移反応

(A) 官能基転移反応の概念図。二本鎖形成による近接効果により、機能性 ODN の官能基が、標的 RNA へ転移する。(B) 中性条件下におけるシトシン選択的な転移反応。(C) 塩基性条件下におけるグアニン選択的な転移反応。グアニンがエノレート型になることで求核性が上昇する。

#### 4. 非共有結合的に核酸を捉える擬ロタキサン形成核酸の開発

最初に述べたように、核酸の化学的な反応性は低く、直接求電子剤を反応させるためには高い反応性を持つ試薬を必要とする、もしくは前述したようなpH変化や遷移金属の添加、光照射が必要である。そこで、生理的条件下、温和な化学反応を利用し、ただ混ぜるだけで標的核酸を捕らえることのできる人工核酸はできないだろうか?と考えていた。当時所属していた理研での上司、阿部洋先生(現 名古屋大学教授)とのディスカッションの中で、問いに答えられる擬ロタキサン形成核酸創製のきっかけとなるアドバイスをいただいた。また、具体的な設計をする際には、関西大の葛谷教授、NY大のSeeman教授らの論文<sup>11</sup>を参考に、らせんの外側での連結により、貫通構造体を形成できるとの発想を得て、以下の一対の人工核酸prfODN (pseudorotaxane-forming oligo DNA)を設計した。設計したprfODN1と2は隣り合う標的部位で同時に二本鎖を形成し、末端同士でのS<sub>N</sub>2反応、らせんの外側でのクリック反応がそれぞれ促進され、二重らせん上での環状化により、標的鎖が貫通した擬ロタキサン構造が形成されることを期待した(図2A)。この擬ロタキサン形成は、上記に示した③鎖連結に位置する二種類のテンプレート反応を利用している。実際に、標的の

DNAやRNA存在下ではこの $S_N2$ 反応は10分以内で90%以上の収率で進行するのに対して、標的非存在下では1時間でも反応生成物はまったく観測されなかった。擬ロタキサン形成は、低温下での変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて確認することができた<sup>12</sup>。さらに、現所属の永次研で詳細に構造と反応性の相関を調査することで、標的DNA、RNAに対して、わずか5分でそれぞれ75%、85%の収率で擬ロタキサン構造体を形成することに成功した<sup>13</sup>。擬ロタキサン形成の収率と効率はクリック反応基の位置に依存しており、prfODN1は主溝側、prfODN2は副溝側に反応性基を修飾することで、反応性基同士がうまく接近できるようになり高い収率と効率を実現することができた(図2B)。この主溝-副溝の組み合わせは、学生が系統的に実験することで見出したものであり、効率的な鎖連結反応を生み出す新たな反応場を見つけることができた。

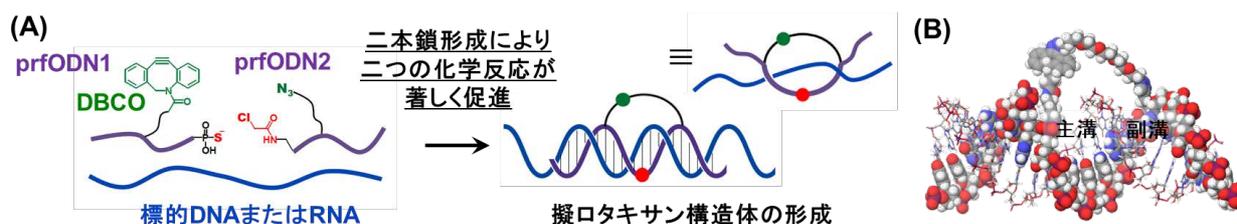


図 2. 擬ロタキサン形成反応

(A) 擬ロタキサン形成反応の概念図。prfODN1、2 が標的上で同時に二本鎖を形成することで、 $S_N2$  反応とクリック反応が促進され、擬ロタキサン構造体を形成する。(B) 擬ロタキサン構造体の分子モデル。prfODN1 は主溝側、prfODN2 は副溝側に反応性基を修飾することで、効率的にクリック反応が進行する。

## 5. 核酸塩基フリップアウト場を利用した特異な光クロスリンク反応の開発

生体内で核酸塩基に作用する酵素の多くは塩基をらせんの外側へフリップアウトさせ自身の活性中心へ引き込むことで特異な化学反応を実現している。例えば、標的塩基をフリップアウトすることでDNAメチル化酵素はシトシン5位のメチル化反応を、RNA編集酵素はアデニンからイノシンへの脱アミノ化反応をそれぞれ触媒する(図3A)<sup>14</sup>。また、人工核酸によるフリップアウトを利用した化学反応も報告されている。甲南大・杉本先生のグループはフェニルカルバモイル修飾dA(図3B)を用いて相補塩基をフリップアウトさせることで切断反応場を構築し、フリップアウト位置における選択的なRNA切断を報告している<sup>15</sup>。これらの例から、フリップアウトを誘起する人工核酸は、様々な化学反応に対する新しい反応場を作ることができるのではないかと考えた。例えば、前述のRNA切断反応に加え、反応剤をフリップアウト塩基に接近させることができれば選択的な塩基修飾も期待できる。本項では、テンプレート反応の中で①鎖間クロスリンクに位置するアルキン-アルキン光クロスリンク反応の開発について紹介する。

現所属で以前に筆者は、次項に関連するアルキル化分子の開発研究の中で、T-Tミスマッチ塩基対の一つのTがアルキル化されたT\*が相補塩基をフリップアウトできることを見出していた(図3C)<sup>16</sup>。この分子は機能化するには少し複雑であることから、この構造の3位修飾、二炭素分のリンカー長、芳香環修飾の三つの要素を重要視し、

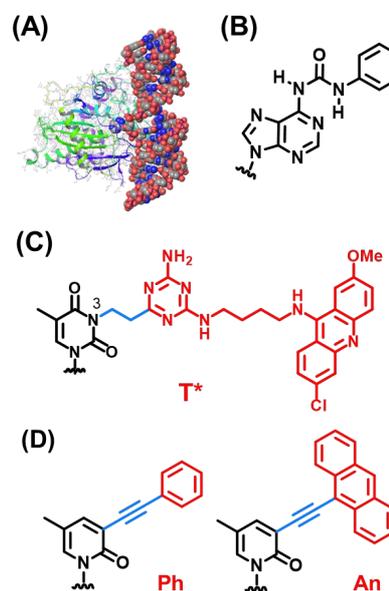


図 3. フリップアウト

(A) RNA 編集酵素 hADAR2 による核酸塩基のフリップアウト。(B) フェニルカルバモイル修飾 dA の構造。(C) T がアルキル化された T\* の構造。(D) アルキン型フリップアウト誘起塩基の構造。

フリップアウト能を示すシンプルな核酸塩基の開発に取り組んだ。合成の簡便さも考慮に入れたうえで、5-メチルピリドン基本骨格に、3位にリンカーを介して芳香族化合物を修飾した新規塩基Ph、Anを設計した(図3D)。C2リンカーとしてアルキン、芳香環としてフェニル(Ph)やアントラセニル(An)基を持つ設計した分子を合成し、機能評価したところ、これらの分子はフリップアウト能を有していることが分かった。ここで、アルキン型フリップアウト誘起塩基を交互に配置した二本鎖では、それぞれの相補塩基をフリップアウトさせることでアルキン同士が接近する光反応場を構築できるのではないかと考えた(図4A)。実際に、光照射により反応を行ったところ、確かに鎖間クロスリンク反応が進行することが分かった<sup>17</sup>。アルキン-アルキン間の光反応は通常、二つのアルキンと酸素による[2+2+2]光環化付加反応が光触媒存在下で進行する。本分子の興味深い点は、アルキン型フリップアウト誘起塩基自体が光触媒様に機能し、もう一方のアルキンを活性化できる点である。つまり、光照射により片方の塩基ともう一方のアルキンとの間で一電子移動(SET)が生じ、アルキンを活性化させることができる(図4B)。このSETにより生じたラジカルカチオン(I)はもう一方のアルキン(II)と反応、続くラジカルカチオン(III)と酸素との環化反応、(V)の開裂異性化を経て1,4-エンジオン生成物を与える、と考えている。本反応機構は、電子移動がより起きやすいPh体とAn体のヘテロの組み合わせ(1分の光照射で最大87%の収率)がPh-PhやAn-Anのホモの組み合わせ(20%弱の収率)より効率的に反応が進行することからも示唆された。またこのような光環化付加反応は、二本鎖形成によるテンプレート効果がない場合には、光触媒存在下40時間の光照射を必要とすることが報告されている<sup>18</sup>。この大きな違いはテンプレート効果が特にSET効率に大きく影響しているためだと考えている。最近、このアルキン-アルキンの反応だけでなく、アルケン-アルケンの反応も二本鎖形成で加速され、わずか10秒で最大83%の収率で[2+2]光環化付加物が得られることも確認している。これらの反応に加え、現在、フリップアウト場を利用した更なる特異反応の可能性を探索中である。

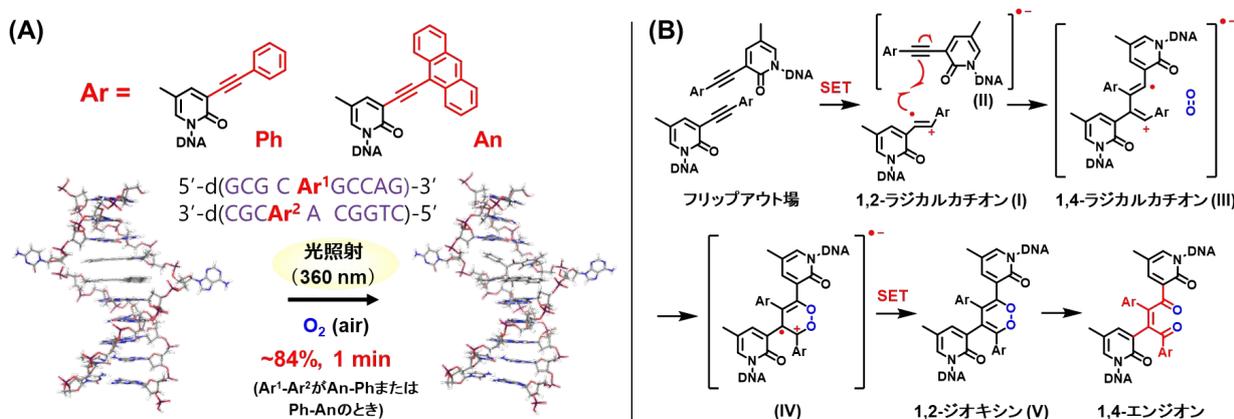


図4. フリップアウト場における[2+2+2]光環化付加反応

(A) フリップアウト場における[2+2+2]光環化付加反応の反応スキーム。(B) [2+2+2]光環化付加反応の予想反応機構。

## 6. 核酸高次構造化学修飾のための反応性OFF-ON型アルキル化素子の開発

核酸はオリゴ核酸のテンプレート効果を利用した反応場だけでなく、低分子の結合部位も特異な反応場になる。筆者は、狙った高次構造モチーフに対して反応性の高い分子を選択的に作用させるため、反応性OFF-ON型アルキル化素子の開発に取り組んでいる。具体的には、ビニルキノゾリノン(VQ)の高活性ビニル基を保護した安定前駆体(図5A)を設計した。これらの分子が標的の核酸に結合し、近傍の核酸による酸塩基効果(特異な核酸反応場)により脱離反応が促進され活性体となり、標的核酸のTまたはUと反応

することを狙った(図5B)。標的高次構造モチーフには、分子が結合することによる近接効果だけでなく、その周辺の核酸塩基やリン酸バックボーンによる反応の促進効果も持つことを期待した。

設計した反応が実現可能な脱離基Xとしてスルホキシド(SOR)、チオフェニル(SPh)、チオメチル(SMe)基を選択し、これらについてG四重鎖(G4)DNAに対する反応を検討したところ、すべての安定前駆体で反応が進行した(図5C)<sup>19</sup>。一方、一本鎖や二本鎖DNAにはほとんど反応せず、高いG4選択性をもつアルキル化剤であることを明らかにした(図5D, E)。この反応選択性はアクリジンの結合親和性およびTのN3位への接近度に依存するものである。これらのアルキル化剤の中で、SPh、SMe体は比較的安定であり、長期間の保存も可能であった。反応機構を詳細に調査したところ、SOR体は自発的に脱離反応が不可逆的に進行し反応活性種であるビニル体を与える一方で、SPh、SMe体は平衡反応系で反応活性種が保護されており、特にSMe体は標的周辺でのみで脱離反応が進行し、期待したように標的特異的にビニル体を与えることが明らかになった。開発した反

応素子は、標的となる高次構造に結合することで反応が加速することから、様々な高次構造結合性リガンドと組み合わせることで、高次構造選択的なアルキル化が可能となる。実際に、東京農工大の長澤和夫教授との共同研究で、G4特異的な結合分子である大環状ヘキサオキサゾールを結合分子としたVQコンジュゲート体を合成し、反応選択性を調査したところ、G4の中でも特に平行構造選択的なアルキル化に成功した<sup>20</sup>。この選択性は本リガンドがG4平行構造とのみ強く結合したことに起因している。最近では、さらにいい脱離基も見出せており、特異的アルキル化反応に基づく、強力な阻害剤の創製や特定のRNA高次構造の網羅的な検出などへの展開を試みている。

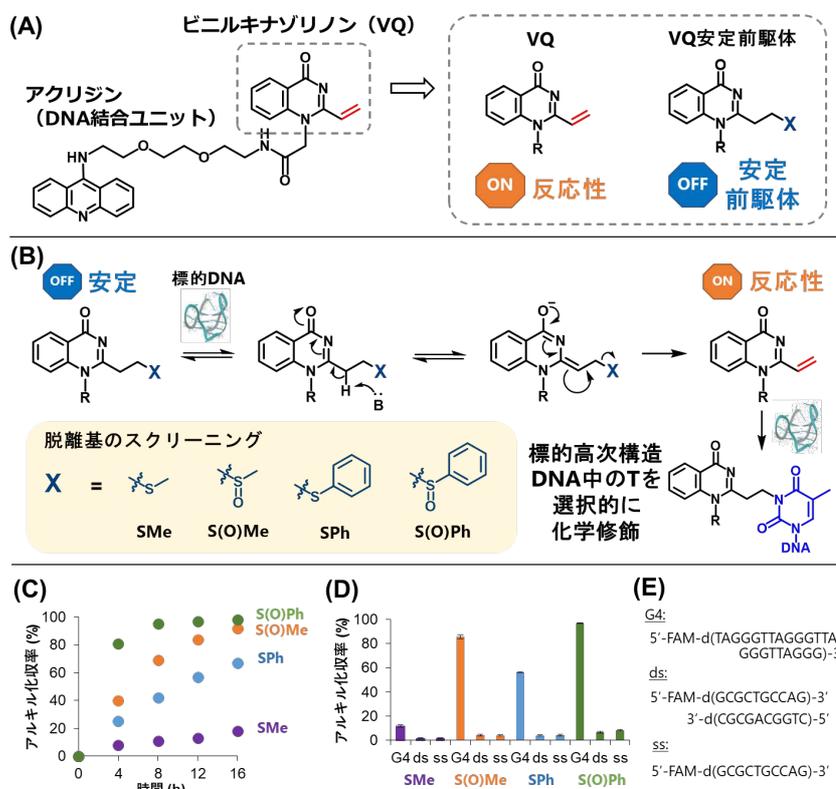


図 5. 反応性 OFF-ON 型アルキル化素子

(A) 反応性ビニルキノザリノン誘導体(VQ)とその安定前駆体の構造。(B) VQ安定前駆体の活性化機構。(C) VQ安定前駆体によるアルキル化反応収率の時間変化。(D) アルキル化反応の選択性評価。(E) 実験に用いたDNA配列。

## 7. おわりに

本稿では、これまで筆者が開発してきた核酸反応場を利用した特異な化学反応を紹介した。核酸は、配列設計による分子認識に加え、標的に反応性基を接近できるよう、うまく分子を設計することで様々なタイプの化学反応を加速できる。これまでにテンプレート効果を利用した研究は世界中で行われ、多くの報告がなされているが、その中でユニークな機能・構造の創出が今後より一層重要になってくると考えられる。有機化学的な観点からは、その反応場だからこそ起きるユニークな化学反応や、これまで作れなかった構

造体が今後も創出されていくことを個人的には楽しみにしている。自分でも更なる化学反応の開発、それを用いた新しい機能の創出を目指していきたい。

## 謝辞

本研究は、学生時代を過ごした九州大学薬学府・佐々木研究室、ポストク時代の理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室、現所属の東北大学多元物質科学研究所・永次研究室で実施したものです。これらの研究を支えてくれた多くの先生方、先輩・同期・後輩、共同研究者の皆様、そして日夜一緒に研究を進めてくれた学生の皆様に深く感謝致します。最後に、執筆の機会を与えてくださった井原敏博先生に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Gorska, K., *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6820-6843.
2. Sasaki, S., *et al.*, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5698-5706.
3. Yoshimura, Y., *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 139-142.
4. Baum, D. A., *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3502-3504.
5. Onizuka, K., *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 799-803.
6. Onizuka, K., *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 1760-1766.
7. Onizuka, K., *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1508-1512.
8. Onizuka, K., *et al.*, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5004-5006.
9. Jitsuzaki, D., *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 8808-8815.
10. Oshiro, I., *et al.*, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1199-1204.
11. Liu, Y., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10882-10883.
12. Onizuka, K., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7201-7204.
13. Onizuka, K., *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 8710-8719.
14. Matthews, M. M., *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 426-433.
15. Nakano, S., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 518-519.
16. Onizuka, K., *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 1059-1068.
17. Onizuka, K., *et al.*, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 2833-2837.
18. Wei, D., *et al.*, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 5860-5863.
19. Onizuka, K., *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 6578-6589.
20. Onizuka, K., *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 2891-2894.

## 研究紹介

高反応性化学種による触媒の周辺環境  
でのタンパク質修飾～チロシン残基修飾研究から発見した  
ヒスチジン残基修飾法～

東北大学学際科学フロンティア研究所

佐藤 伸一

shinihchi.sato.e3@tohoku.ac.jp



## 1. はじめに

タンパク質の化学修飾は近年注目されている抗体薬物複合体などのバイオ医薬創出や、タンパク質を基盤とするバイオマテリアル創出に必要不可欠な技術である。また、触媒的なタンパク質修飾においては、触媒の周辺環境で完結する反応を利用することで、タンパク質間相互作用、生物活性物質の標的同一、細胞間コミュニケーションを明らかにする新手法が近年続々と開発されている。そのような背景の中、最近我々は高反応性の活性酸素種である一重項酸素を利用したヒスチジン (His) 残基の修飾法を見出した。本稿では、His 修飾法の開発の経緯について、筆者が現在に至るまでどういう考えで研究を行ってきたかということ、手法開発の裏話を盛り込みながら(むしろメインに)筆者の研究を紹介したい。

筆者は博士課程の頃(指導教員:東大分生研(現・定量研) 橋本祐一先生、理研 袖岡幹子先生)より、タンパク質と合成小分子の間に共有結合を形成させることに興味を持ち、研究を行ってきた。近年になってアミノ酸残基選択的なタンパク質化学修飾法の開発は盛んに行われているが、筆者が博士号を取得する頃には、残基選択的修飾という観点では、求核性のリジン残基、システイン残基以外のアミノ酸残基を標的にした手法は数えるほどしか報告されていなかった。新しいタンパク質の修飾化学を開発したいと考えていた筆者はチロシン (Tyr) 残基選択的修飾を開発していた Scripps 研究所の故 Carlos F. Barbas 教授の研究室に留学することを決めた。Barbas 研では不斉反応の開発(2021年ノーベル化学賞に深く関係)、抗体修飾、ゲノム編集法の開発など、非常に多岐にわたる研究が行われている中、Tyr 残基修飾研究についても、最先端の応用が行われていた。Tyr 残基は様々な生命現象制御に重要な残基であるため、実用性の高いタンパク質修飾法、および Tyr 残基修飾法の拡充は、筆者にとって大変魅力的な研究対象であった。そこで、2012年4月に学習院大学理学部 中村浩之研の助教として帰国して、タンパク質 Tyr 残基修飾の研究を始めた。

## 2. 光レドックス触媒を使った Tyr 残基修飾

Tyr 残基修飾の新技术を見つけたいと考えてた筆者は、Tyr 残基が高いレドックス活性を持っていることに着目した。電子移動を制御するような反応系で Tyr 残基を修飾できないかと考え、一電子移動反応を媒介する触媒を種々検討した。なかでも、一電子移動反応を光刺激で駆動できる光触媒は魅力的であった。培養細胞レベルでは、光照射は容易に制御できる刺激であり、細胞内で Tyr 修飾反応を制御する場合にも適用可能な概念であると考えていた。とはいっても、Tyr 残基を修飾できる反応条件を見つけるためには、

①Tyr 残基を含む基質に対して、②修飾剤、③光触媒、④反応条件(照射光波長、バッファー、時間)を検討する必要があり、①と④はある程度条件を固定しても問題なさそうだが、②と③の2成分を掛け算的な組み合わせの条件を評価する必要があった。特に②はレドックス活性のある小分子として、どの様なものが機能するのか全く見当がつかず、道のりは困難であると感じていたが、中村研は反応開発を行っているため、試薬庫に多くの試薬が存在し、レドックス活性がありそうな化合物も多数あったので、ない頭なりに試薬を選んだり、単工程で誘導化できそうなものは誘導体を合成したりして、無謀な掛け算的な条件のスクリーニングを行った。スループットの高さは重要視すべきであったため、基質は Tyr を含むペプチドを用いて、MALDI-TOF MS で評価した(頑張れば1日 100 条件は検討できた)。幸運にも、いくつかのヒット条件があり、特にルテニウムトリスピリジル錯体(Ru 触媒)とフェニレンジアミンタイプ<sup>1</sup>の修飾剤を使った反応条件では良好な効率で Tyr 残基を標識できることが分かった(図1 上段)<sup>2</sup>。

また、バッファー中での一電子移動反応の距離は 1.4 nm 程度が限界であり、一電子移動反応により発生するラジカル種も短寿命であるために、ラジカル種を介した修飾反応は、触媒の近接空間で完結すると考えた。実際に、チロシン残基のミミックである tyramide のラジカル種による反応の近接性とプロテオミクスを組み合わせることで、ミトコンドリアに局在するタンパク質を網羅的に解析する APEX 法が、我々の論文と同年に Ting らによって、発表されていた<sup>3</sup>。筆者は生物活性分子の標的タンパク質同定に興味があり、低分子リガンドと触媒の連結分子を使って、リガンド結合を選択的に修飾できないかと考えた(図2)。

リガンド連結型の Ru 触媒を使うことで、フェニレンジアミンタイプの修飾剤によってもリガンド結合タンパク質をある程度の選択性で修飾することが可能であったが、選択性に関しては改善の余地があった。我々はこの原因はフェニレンジアミンが安定なラジカルを発生させること、それにより触媒周辺の広い範囲のチロシン残基を修飾してしまうことが原因と考え、より不安定なラジカル種を発生させ、触媒の近接空間を選択的に標識できる修飾剤を探索した。その結果、1-methyl-4-aryltriazole: MAUra (Ru 触媒の近接タンパク質を網羅的に同定したいという思いから、「モーラ」と命名)が見つかった(図1 下段、図2)<sup>4</sup>。

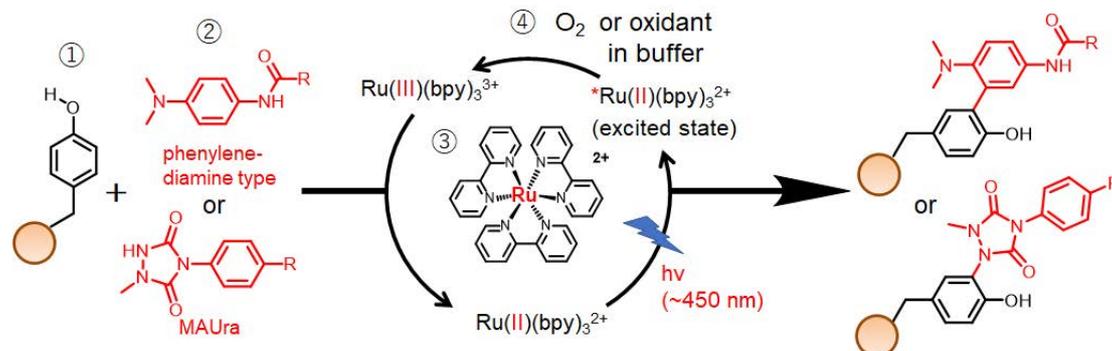


図1 Ru 触媒の一電子移動触媒能を利用した Tyr 残基修飾

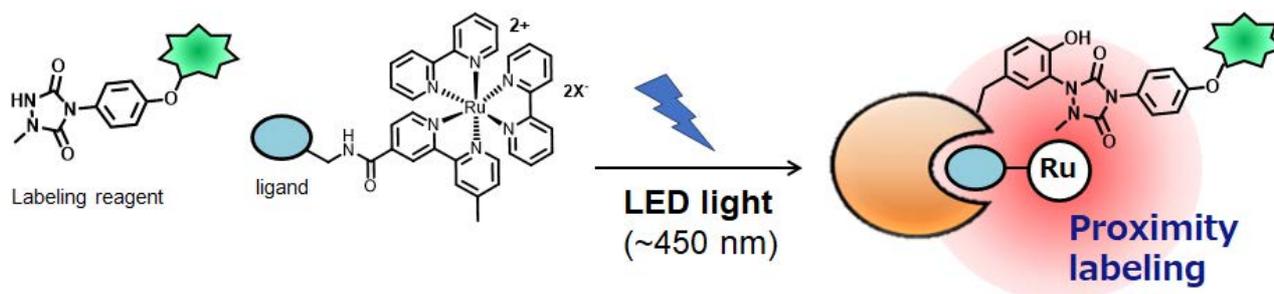


図2 リガンド連結型 Ru 触媒を用いたリガンド結合タンパク質の選択的修飾

### 3. Tyr 残基修飾から派生した His 残基修飾

当初、筆者はあるタンパク質を標的として、リガンドにより Ru 触媒に近接させて選択的に標識する研究を行っていた。修飾剤 MAUra の結合部位解析において、プロテオミクス研究者である東工大 田口研の丹羽先生との共同研究である。具体的には、リガンド結合タンパク質と MAUra との間に共有結合を形成し、得られた修飾タンパク質をトリプシン消化し、nanoLC-MS/MS によって修飾部位を決める実験を行っていた。修飾タンパク質のペプチド断片のサンプル測定をお願いしたところ、Tyr 残基を含まないペプチド断片や、MAUra に加えて酸素一原子(+O)付加分子量の大きいペプチド断片が含まれていること、さらに His 残基に MAUra が酸素原子と共に付加していることを、丹羽先生が明らかにしてくれた。プロテオミクス解析では非常に多くのピークを対象に解析するため、あらかじめ修飾様式を指定して検索を行う。よって、予想外な修飾が見つかるということは通常はないのだが、何かおかしいと感じて丹羽先生に、丁寧に生データを見て頂かなければ、以下説明する His 残基修飾反応は、見つかることのなかった反応であっただろう。担当してくれていた当時 D1 の中根君(東北大に異動する際についてきてくれた学生)の頑張りが実を結び最終的には、 $^1\text{O}_2$ による His 残基酸化を介した反応様式で修飾反応が進行していることがわかった。以下、反応様式を明らかにするまでの裏話を紹介したい。

### 4. His 残基修飾様式を明らかにするまでの苦難

His 残基が修飾されるということが最新鋭の高感度質量分析によって示唆されたが、この現象をタンパク質化学修飾の論文としてまとめるために、結合様式を明らかにしよう！ということになった。多くのタンパク質化学修飾研究では、上記のようなアプローチではなく、低分子基質を使った反応を探索し、それを生体に応用できる反応に磨きあげるといったアプローチがとられていると思う。しかし、前述の様に今回は全く逆の経緯で見つかった反応である(論文にはこのような経緯まで書いていないが)。生成物の NMR データを取得するため、スケールアップしなければならなかったが、触媒の局所環境でだけ選択的に進行する反応の生成物を数 mg(数  $\mu\text{mol}$ )の量を取得するのは、非常に大変であった(質量分析で見ているのはおそらく数十 fmol)。

粘り強さには自信があった中根君も幾度となく、スケールアップ条件の選定に失敗し、この難しさには心が折られたように見えた時期もあった。敗因は、 $^1\text{O}_2$ が不安定であったと考えている。触媒から 10 nm 程度の範囲で数  $\mu$  秒という短い寿命で生成する活性種を活用する反応であるため、反応系全体を平均化してみようと、わずかな量しか分子が変換されていないということが原因であった。最終的には、 $^1\text{O}_2$ の産生効率が高い触媒と、 $^1\text{O}_2$ を安定させる目的でアセトニトリルを 50%反応溶媒に添加するというモデル条件<sup>5</sup>によって、50%程度の収率で反応する条件を見つけ、NMR 解析によって結合様式を明らかにした(図 3)。

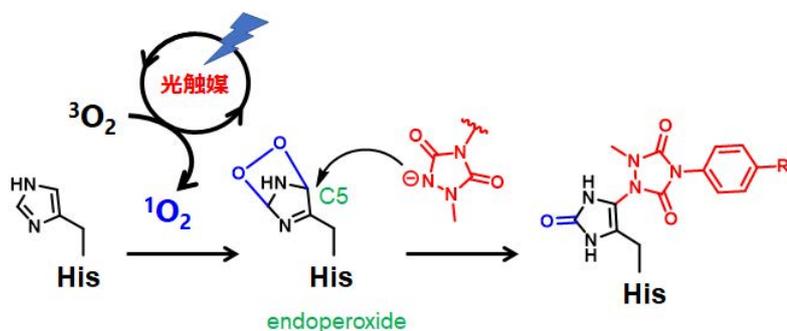


図 3 一重項酸素を利用したヒスチジン残基修飾

## 5. Ru 触媒の二面性と MAUra の反応網羅性

His 残基は  $^1\text{O}_2$  によって酸化され易い残基として知られており、触媒から発生する  $^1\text{O}_2$  との Diels-Alder 反応により His 残基は endoperoxide に変換される。MAUra の NH 基の pKa は 4.7 であり、中性の水溶液ではアニオンを形成することに加えて求核性の高いヒドラジド構造であるため、効率的に求電子性の高い endoperoxide 体 C5 位と反応したと考えられる(図 3)。 $^1\text{O}_2$  により酸化するペプチド/タンパク質を修飾することが知られている他の求核剤<sup>6,7</sup>に比べて、MAUra はより効率的に His 残基を修飾した。ここでいう触媒は「 $^1\text{O}_2$  の産生触媒」であり、rose bengal や methylene blue など様々なものを使用することができる。

前述の Tyr 残基修飾反応の説明では Ru 触媒を「一電子移動触媒」として議論したが、Ru 触媒には「 $^1\text{O}_2$  の産生触媒」という別の側面を持っている。MAUra を使った場合、「一電子移動触媒」能により Tyr 残基が、「 $^1\text{O}_2$  の産生触媒」能により His 残基が修飾できる。これは、MAUra が持つ①レドックス活性と②高い求核性によるものであり、①は Tyr 残基修飾に、②は His と  $^1\text{O}_2$  の反応により生成する求電子的な endoperoxide 中間体を捕捉するために効果的であると考察できる。すなわち、MAUra (モーラ) は芳香族アミノ酸残基の酸化的修飾における網羅性の高い分子であった(図 4)。

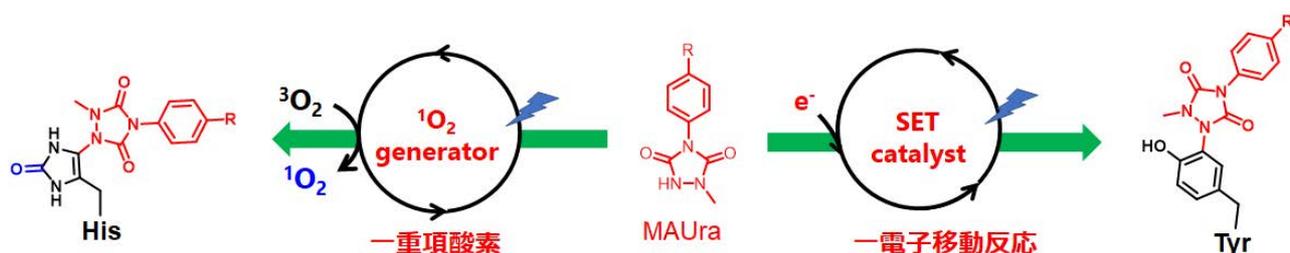


図 4 MAUra によるチロシン残基修飾とヒスチジン残基修飾

## 6. $^1\text{O}_2$ を活用するタンパク質修飾法の今後の応用

$^1\text{O}_2$  は短寿命性の高反応性化学種であり、「 $^1\text{O}_2$  の産生触媒」周辺で修飾反応は完結する。我々は  $^1\text{O}_2$  の局所的な修飾反応によって、ナノメートルオーダーで反応を制御することを試みた。抗体は大きさ約 10 nm のタンパク質であり、Fc 領域に結合する低分子リガンド ApA が報告されており、ApA を担持した固相は IgG 抗体精製に用いられている<sup>8</sup>。また、我々は Ru 触媒をアフィニティービーズ表面に担持することで、ビーズ表面に修飾したリガンドに相互作用するタンパク質を親和性の強弱に関わらず、選択的かつ不可逆的に標識することに成功していた<sup>9,10</sup>。そこで、ApA と Ru 触媒を同時に担持したビーズを作製し、抗体を標識したところ、Fc 領域選択的な標識に成功した(図 5)<sup>11</sup>。

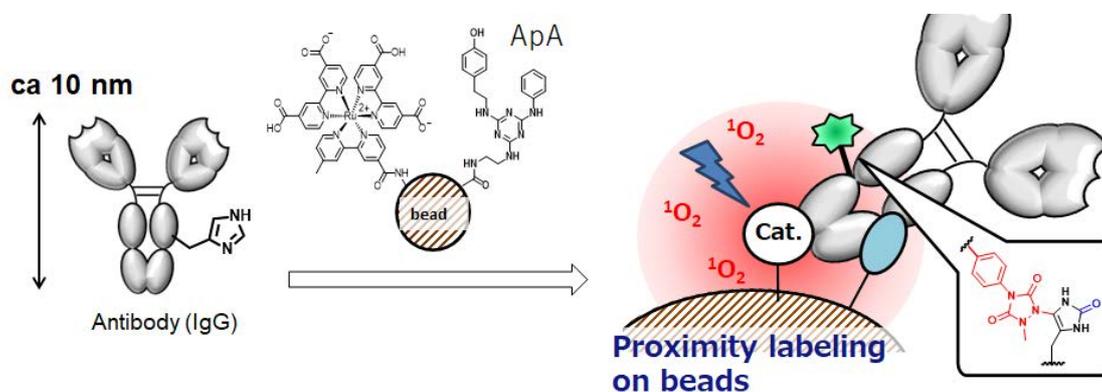


図 5 Ru 触媒担持ビーズ上での抗体 Fc 領域選択的なヒスチジン残基修飾

一重項酸素を活用した本修飾法の適用は上記のような *in vitro* の実験系に限定されず、細胞内外を問わず使用できる化学であると筆者は考えている。光刺激によって一重項酸素を産生する酵素性のタグや、細胞膜透過性と<sup>1</sup>O<sub>2</sub>の産生触媒機能を併せもつ分子はすでに報告されていることから、筆者は細胞内環境での反応制御を試みている。光照射した瞬間に細胞内の特定の標的と相互作用しているタンパク質を網羅的に標識することができれば、プロテオミクス解析によって未知のタンパク質間相互作用を明らかにできると期待される。

## 7. おわりに

本稿では、筆者がこれまでに行ってきたタンパク質修飾反応の開発についての裏話やどのような考えで研究を進めてきたのかを紹介させて頂いた。タンパク質化学修飾における独自の反応開発をメインでこれまで進めてきたが、将来的に生命科学研究に役立てたいという思いを常に持ちつつ手法論開発に取り組んでいる。最近の筆者の研究興味は、生物活性分子の標的特定や、細胞内でのタンパク質間相互作用の解明であり、独自手法を活用した研究や、共同研究を行っていきたい。筆者は昨年4月より、東北大学学際科学フロンティア研究所という組織で研究を行っている。助教のポストですが、独立ポスト(研究グループのHP: <https://www2.fris.tohoku.ac.jp/~sato/>) (メンター教員: 生命科学研究科 石川稔先生)であり、現在、一緒に研究をしてくれる大学院生、ポスドクを募集しています。本稿を読んで興味を持ってくれた方は気軽にご連絡頂けると幸いです。

## 謝辞

一連のタンパク質化学修飾の研究に関して、8年間の長きに渡り、ご指導、ご助力を頂いた中村浩之先生を始めとする共同研究者の先生方、特にヒスチジンの付加反応の発見には共同研究者の丹羽達也先生と、東北大 D2 の中根啓太君の貢献が大きく、厚く感謝申し上げます。また、本稿の執筆の機会を与えてくださった熊本大学の井原敏博先生に感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Seim, K. L. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**, 16970.
2. Sato, S. et al., *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2013, **52**, 8681.
3. Rhee, H.-W. et al., *Science* 2013, **339**, 1328.
4. Sato, S et al., *Chem. Commun.* 2018, **54**, 5871.
5. Li, R. et al., *Nat. Biotechnol.* 1998, **16**, 190.
6. Bregnhøj, M. et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016, **18**, 22946.
7. Li, Y. et al., *Biochemistry* 2018, **57**, 1577.
8. Tamura, T et al., *Chem. Lett.* 2020, **49**, 145.
9. Tsushima, M. et al., *Chem. Commun.* 2017, **53**, 4838.
10. Tsushima, M. et al., *Chem. Commun.* 2019, **55**, 13275.
11. Nakane, K. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2021, **143**, 7726.

研究  
紹介

ゲノム DNA・RNA 高次構造からなる

脳の個性・病態を研究する

～ゲノムが個性を形成するのか？～

熊本大学発生医学研究所 ゲノム神経学分野

塩田 倫史

(E-mail: shioda@kumamoto-u.ac.jp)



1. はじめに

現在、私は「ゲノムDNA・RNA高次構造と脳の個性・病態」に興味を持ち研究している。個体のゲノムDNAは自然に変異を蓄積し、これにより個体の多様化が起こる。環境に適応した個体が選択されると多様性は低下し、新しい性質が共通の性質になる。つまり、多様化の増減を繰り返す過程が「進化」である。全てのゲノム DNA は何十億年以上前の生命誕生まで遡ることができ、ゲノムDNAに蓄積された過去の記憶はゲノムの個性と言え。しかしながら、個体の全ゲノムDNAを解読したとしても全ての個性を同定できない。なぜならば、個体は様々な経験を通して、ゲノムでは決まらない個性を作り上げていくからである。言い換えると、「経験」が「記憶」され、その「記憶」が「個性」となる。記憶は記録された情報ではなく、経験→記録→呼び起こしという順序で進む一連の過程である。この時の脳における記憶媒体は、「ゲノムDNA・RNA高次構造」と「神経ネットワーク」の両方からできていると私は考えている。

神経細胞は、通常体細胞とは異なるレベルの情報システムを形成している。この情報システムは、神経細胞同士の階層的なネットワークや回路を基盤にしているが、ゲノムDNA・RNA高次構造と密接な相互依存関係にある。神経細胞以外の体細胞では、個々の細胞にランダムに蓄積した様々なゲノム DNA・RNA高次構造の変化が集合し、その記憶が個性(臓器や個体の機能)として表現される。しかしながら、この体細胞の個性は単なる「集合体」であり、「統合」されることはない。

一方で神経細胞においては、細胞レベルのゲノムDNA・RNA高次構造の変化に起因する個性が神経回路の「高い自立性」と「興奮伝達の共通原理」によりネットワークとして共有され、「統合」される。さらに、神経ネットワークを起点として他の多くの体細胞も統合される。また、神経ネットワークは、外部刺激によるシナプス結合の特異性や強さを変化させるためにゲノムDNA・RNA高次構造に依存したメカニズムを用いる。つまり、「経験」による神経細胞の「個性」がネットワーク全体の「個性」として「記憶」・「統合」されると考えている。そして、記憶媒体である「ゲノムDNA・RNA高次構造」と「神経ネットワーク」の破綻は神経疾患の発症に繋がると考えられる。本稿では、DNA・RNA高次構造のひとつである「グアニン四重鎖(G4; G-quadruplex)」構造に着目した神経病態メカニズムの解明と創薬研究を紹介する。

2. ゲノムDNA・RNA高次構造のひとつであるグアニン四重鎖

ゲノムDNA・RNA高次構造には多様性がある。DNAは、右巻き二重らせんであることがWatson博士とCrick博士によって1953年に発見された<sup>1</sup>。このDNAの基本的な構造は「B型DNA」と呼ばれている。実は、一般的に知られているこの右巻き二重らせん以外にも、左巻き(Z型)DNA、三重鎖(H型)DNAなど「非

B型DNA」と呼ばれる構造が発見されており、DNAはその配列の特徴や溶媒の環境により右巻き二重らせん以外の構造を形成する<sup>2</sup>。

グアニン四重鎖(G4; G-quadruplex)構造は、グアニンが豊富な配列領域で一本鎖DNA(G4DNA)もしくはRNA(G4RNA)で形成される(図1)。1910年に、グアニル酸の濃縮溶液がゲル状になることが初めて報告されたが<sup>3</sup>、この結果はグアニンリッチ核酸配列が高次構造を形成する可能性を示唆するものであった。その約50年後、グアニル酸の濃縮ゲルの特性がX線回折法により詳細に調べられ、各グアニンが2つ隣接するグアニンと水素結合し、4つのグアニン分子が正方形の平面配置をとることが明らかにされた<sup>4</sup>。この平面構造は現在「Gカルテット」と呼ばれている(図1A)。その後、生理的塩濃度の条件下で、グアニンリッチ一本鎖DNAがGカルテットを形成し、互いの上に積み重ねられてG4構造を形成することが示された<sup>5</sup>。G4構造は、少なくとも2つの隣接グアニンを有する4つのトラクトと3つのループ領域で形成される(図1B)。

G4構造の形成は、カチオンの結合・温度・配向・ループサイズなど、いくつかの要因により影響を受ける。G4DNAはGカルテットの中心に一価の陽イオンが結合することで安定化する。一般的には、 $K^+ > Na^+ > Li^+$ の順にG4DNAの安定化作用が強まる。ループ長および配列により様々なG4DNAが形成され、分子内構造、二分子構造、四分子構造、高次Gカルテット構造、ストランドが同一の配向をもつパラレル型、4本のうち1本だけ逆を向くハイブリッド型、配向が2本ずつ交互になるアンチパラレル型などが報告されている<sup>6</sup>。G4RNAも一価の陽イオンがGカルテットに結合することで安定化するが、G4RNAは様々なループ長のRNAオリゴヌクレオチド・ライブラリーを使用した実験の結果、ループ長には無関係にパラレル型を形成することが示されている<sup>7</sup>。一例として、テロメアの構造を 図1C に示した。テロメアは、(TTAGGG)<sub>4</sub>の配列でハイブリッド型G4DNAを形成し、(UUAGGG)<sub>4</sub>の配列でパラレル型G4RNAを形成する。重要な点として、上述のG4構造のトポロジー解析は全て*in vitro*による結果であり、この物理化学的性質が*in vivo*における生理的現象にどのように関与するのかは未解明である。

G4構造はその物理学的に高い熱安定性やゲノム上の領域特性から、生体内での機能に注目が集まっている。例えば、G4DNAは、テロメア・有糸分裂および減数分裂の二本鎖切断部位・転写開始部位・および複製起点において重要な役割を果たす可能性がある<sup>8</sup>。さらに、G4RNAは、RNAスプライシング・RNA輸送・mRNA翻訳などRNA代謝の多くの段階に関与することが示唆されている<sup>9</sup>。ここでは、G4構造と神経疾患との関与について自身の研究成果を交えながら述べる。

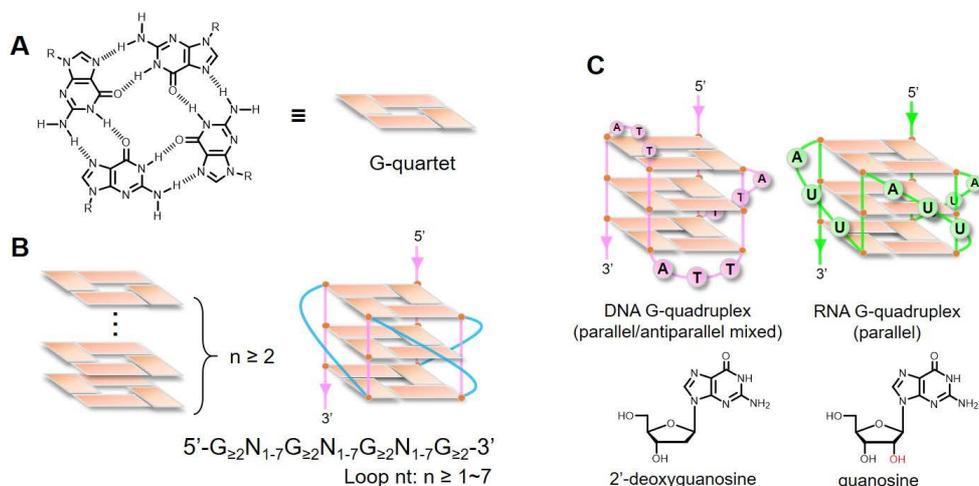


図1. グアニン四重鎖構造の基本概略図。(A) Gカルテットの化学構造。(B) グアニン四重鎖構造は、少なくとも2つまたは3つのGカルテットと、長さが異なる3つのループ(1~7ヌクレオチド)からなる。(C) テロメアDNAグアニン四重鎖およびテロメアRNAグアニン四重鎖(文献6より一部改変)

### 3. G4構造と神経疾患との関与について

これまでの研究により、グアニンリッチ配列の伸長によるリピート病においてG4構造の異常形成が神経疾患の発症に関与することが報告されている。例えば、*C9ORF72*遺伝子変異を起因とする筋萎縮性側索硬化症・前頭側頭葉変性症 (C9ALS/FTD) では、*C9ORF72*遺伝子非翻訳領域内にヘキサヌクレオチド GGGGCC (G4C2) リピート伸長が起こり、DNAおよびRNAでG4構造とヘアピン構造が混在した状態が形成される<sup>10,11</sup>。この核酸構造異常に起因した病態メカニズムがこれまでに4つ提唱されている<sup>12</sup>。①RNA毒性；DNAセンス鎖 G4C2リピートとアンチセンス鎖 G2C4リピートのRNA転写産物が核内にRNA凝集体を形成・蓄積し、その凝集体に多くのRNA結合タンパク質群を巻き込み、それらを機能不全にすることで神経変性を引き起こす。②repeat-associated non-AUG (RAN) 翻訳；リピート伸長RNAにおいて、全てのリーディングフレームでジペプチドリピートタンパク質が異常翻訳され、神経変性を引き起こす。③*C9ORF72*タンパク質ハプロ不全；G4DNA構造がRNAポリメラーゼを失速させ、*C9ORF72*タンパク質産生を抑制する。*C9ORF72*タンパク質の減少は、グルタミン酸受容体の凝集・機能不全を誘導し、RAN翻訳産物のクリアランス障害を介して神経変性を引き起こす。④内因性DNA損傷；G4DNAが二本鎖切断の形成を促進し、DNA修復経路の機能不全を引き起こす。

もう一つの神経変性疾患の例として、脆弱X随伴振戦/失調症候群 (Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome; FXTAS) がある。FXTASでは、*FMR1*遺伝子の5'非翻訳領域におけるCGGリピート伸長がみられる<sup>13</sup>。FXTASでは、C9ALS/FTDと同様にRNA毒性が観察され、RNA代謝に異常を引き起こす<sup>14</sup>。また、RNA毒性に加えて、RAN翻訳も見出されている<sup>15</sup>。伸長したCGGリピートRNAは、RAN翻訳を介して有毒なポリグリシン含有タンパク質 (FMRpolyG) を産生する<sup>15</sup>。

私達は、FMRpolyGに含まれるポリグリシン領域にプリオン様の性質があることに着目した。プリオン様領域を持つタンパク質は液-液相分離 (liquid-liquid phase separation; LLPS) により液滴を形成するが、FMRpolyGの液滴は、CGG99リピート (FXTAS発症リピート数) RNAと結合し、ゲル状の凝集体を形成した。RNAの物性解析を行ったところ、健常人のリピート数であるCGG17リピートRNAがヘアピン型であるのに対し、CGG99リピートRNAはG4を形成しており、FMRpolyGのポリグリシン領域と直接結合した。つまり、FMRpolyGはポリグリシン領域を介して、G4RNAと結合することで凝集することを明らかにした。次に、FMRpolyGに結合するタンパク質を網羅的に解析した。その結果、FMRpolyGは、神経変性疾患の発症に関与することが示されているRNA結合タンパク質群 (HNRNPA2/B1、FUS、SFPQ等) と結合することがわかった。また、FMRpolyGは細胞外小胞であるエクソソームに含まれるタンパク質群とも複合体を形成することを見出した。FXTASモデルマウスの脳由来エクソソームには FMRpolyG が高発現しており、野生型マウス神経細胞 (レシピエント細胞) にFXTASモデルマウス神経細胞 (ドナー細胞) 由来エクソソームを処置することによって、野生型マウス神経細胞にもFMRpolyGの発現が確認され、神経機能異常が見られた。つまり、FMRpolyGはエクソソームを介して細胞間に伝播し、神経機能異常を引き起こすプリオンイドタンパク質であることを解明した<sup>16</sup> (図2)。

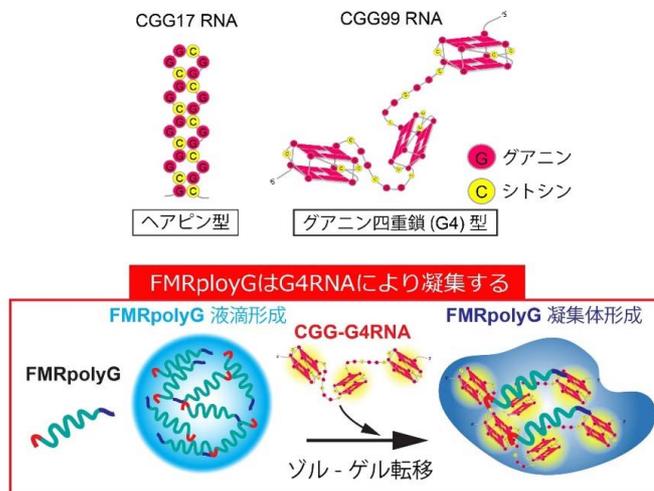


図2. FMRpolyG は G4RNA と結合し凝集体を形成する。

#### 4. G4結合タンパク質の遺伝子変異による神経病態

G4結合タンパク質はG4高次構造を変化させる機能を持つ。そのため、G4結合タンパク質の機能異常や変異がG4調節不全の一因となる。実際、TDP-43、FUS、hnRNPsのようなG4結合能を有するタンパク質の遺伝子変異は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)等の神経変性疾患を引き起こすことが知られている<sup>17</sup>。バイオインフォマティクス分析により、G4結合タンパク質は、連続したグリシンおよびアルギニン残基(RGRGR GRGGG SGGSG GRGRG)の20アミノ酸モチーフを共有することが報告されている<sup>18</sup>。このモチーフは、RNA結合タンパク質群の代表的なRNA結合モチーフであるRGGボックスと相同性が高い。さらに、G4結合タンパク質の遺伝子変異はLLPSを介したRNA顆粒の形成に影響を与え、神経細胞死を誘発することが示唆されている<sup>19</sup>。G4結合タンパク質を介したG4ホメオスタシスの異常はRNA代謝の異常をきたし神経障害を引き起こす可能性があるが、詳細な細胞内メカニズムは現在のところ不明である。

#### 5. 神経疾患における治療標的としてのG4構造

これまで、多種多様なG4構造結合リガンドが同定されており、がんを始めとした様々な疾患に対して治療薬となる可能性が報告されている<sup>20</sup>。G4C2リピートRNAを標的とするG4結合性小分子リガンドやアンチセンスオリゴヌクレオチドはRNA毒性を抑制しRAN翻訳を阻害することによって、C9ALS/FTDの神経症状を改善する<sup>21-23</sup>。私達も別の観点から、新規G4構造作用薬による脳機能の改善を試みている。これまでに、G4結合タンパク質のひとつであるATRXをコードするATRX遺伝子の変異マウス(Atrx マウス)では、認知機能障害がみられることを報告した<sup>24</sup>。さらに、ポルフィリン骨格がG4構造結合能を有する点に着目し、生体内ポルフィリンであるプロトポルフィリンIX (protoporphyrin IX; PPIX)とヘミンについて検討した。PPIXとヘミンは細胞内で5-アミノレブリン酸から産生される。5-アミノレブリン酸をAtrxマウスに経口投与したところ、認知機能障害が有意に改善した<sup>25</sup>。ヒトにおいて、ATRX遺伝子の変異はX連鎖 $\alpha$ サラセミア・精神遅滞症候群(ATR-X 症候群)の原因となる。ATR-X症候群患者では、5-アミノレブリン酸の服用により言語能力が劇的に改善することを見出した<sup>26</sup>。

近年、FXTASと同様の症状を呈するCGGRリピートに由来する疾患が多数報告されている<sup>27</sup>。また、アルツハイマー病やパーキンソン病等の神経変性疾患に、プリオノイドが関与することが示唆されている。これらの疾患に対する治療薬候補のひとつとして、5-アミノレブリン酸が挙げられる。5-アミノレブリン酸は安全性の高い既承認薬であることから、今後ドラッグ・リポジショニングによる治療薬開発が望まれる。また、上述したG4構造異常によるRNA凝集体の形成やRAN翻訳を5-アミノレブリン酸により抑制することができれば、グアニンリッチ配列の伸長によるリピート病に対しての適応拡大が期待できる<sup>28</sup>。実際に私達は、PPIXをFMRpolyGとG4RNAが結合した凝集体に処置することで、凝集体が劇的に縮小すること、さらに、5-アミノレブリン酸をFXTASモデルマウスに経口投与したところFMRpolyGの発現が抑制され、低下した神経可塑性・認知機能・運動機能を有意に改善できることを明らかにした<sup>16</sup>。

#### 6. 終わりに

神経発達障害・神経変性疾患を含め、脳の「個性」と「病態」におけるG4構造の機能的役割には多くの謎が残されている。細胞核内においては、G4DNAと転写修飾、テロメア維持、およびエピジェネティクス修飾との関連性について明らかにする必要がある。G4RNAも神経細胞の機能に重要な役割を担っており、軸索・樹状突起・スパインでのmRNA翻訳、シナプス可塑性、学習・記憶に関与している可能性がある。実際、神経細胞樹状突起mRNAの約30%にG4構造モチーフが含まれている。さらに、軸索と樹状突起にお

けるmRNA輸送は、G4RNA結合タンパク質によって制御される。また、G4構造はヒトゲノムだけでなく、他の生物種、例えばウイルスや原虫においても研究が進められており、本稿で述べた神経疾患の枠に留まらない。現在のG4研究は氷山の一角に過ぎず、今後のさらなる生物学的研究の展開が期待される。また、G4構造の研究を進める中で、ゲノムDNA・RNA高次構造と脳の個性・病態との関連性が見出されることを期待している。

**(謝辞)** この研究成果は、東北大学薬学研究科・岐阜薬科大学・熊本大学発生医学研究所で実施したものです。研究室メンバーをはじめ、国内海外の多数の共同研究者に、この場を借りて御礼を申し上げます。最後にこのような執筆の機会をくださいました井原敏博先生に御礼申し上げます。

### (参考文献)

- 1) Watson J.D., Crick F.H. *Nature* 171 (1953) 737–738.
- 2) Zhao J., et al. *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (2010) 43–62.
- 3) Bang I. *Biochem. Z.* 26 (1910) 293–231.
- 4) Gellert M., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 48 (1962) 2013–2018.
- 5) Sen D., Gilbert W. *Nature* 334 (1988) 364–366.
- 6) Asamitsu S., et al. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) E2884.
- 7) Zhang A.Y., et al. *Biochemistry* 50 (2011) 7251–7258.
- 8) Hänsel-Hertsch R., et al. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18 (2017) 279–284.
- 9) Fay M.M., et al. *J. Mol. Biol.* 429 (2017) 2127–2147.
- 10) DeJesus-Hernandez M., et al. *Neuron* 72 (2011) 245–256.
- 11) Renton A.E., et al. *Neuron* 72 (2011) 257–268.
- 12) Malik I., et al. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 22 (2021) 589–607.
- 13) Hagerman P.J., Hagerman R.J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1338 (2015) 58–70.
- 14) Iwahashi C.K., et al. *Brain* 129 (2006) 256–271.
- 15) Todd P.K., et al. *Neuron* 78 (2013) 440–455.
- 16) Asamitsu S., et al. *Sci Adv.* 7 (2021) eabd9440.
- 17) Harrison A.F., Shorter J. *Biochem J.* 474 (2017) 1417–1438.
- 18) Brázda V.J., et al. *Molecules* 23 (2018) E2341.
- 19) Wolozin B., Ivanov P. *Nat. Rev. Neurosci.* (2019) 1–18.
- 20) Asamitsu S., et al. *Molecules* 24 (2019) 429.
- 21) Lagier-Tourenne C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (2013) E4530–E4539.
- 22) Jiang J., et al. *Neuron* 90 (2016) 535–550.
- 23) Gendron T.F., et al., *Sci. Transl. Med.* 9 (2017) eaai7866.
- 24) Shioda N., et al. *J. Neurosci.* 31 (2011) 346–358.
- 25) Shioda N., et al., *Nat. Med.* 24 (2018) 802–813.
- 26) Wada T., et al. *Congenit Anom.* 60 (2020) 147–148.
- 27) Depienne C., Mandel J.L. *Am J Hum Genet.* 108 (2021) 764–785.
- 28) Asamitsu S., et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 531 (2020) 51–55.

## 気になった論文

田川 寛 (たがわ ひろし)

九州大学 システム生命科学府 博士1年

tagawa.hiroshi.851@s.kyushu-u.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、九州大学の片山佳樹教授の研究室に所属しています。

体内では、リガンドとレセプターが相互作用することで、様々な機能が生じます。これまで、人為的に両者の相互作用を調節して、治療に応用する試みが行われてきました。今回は、そのような研究例として、二重特異性分子を用いて2種類の分子間を架橋することで、がんを治療することを目的とした論文を2つ紹介します。

### Universal Endogenous Antibody Recruiting Nanobodies Capable of Triggering Immune Effectors for Targeted Cancer Immunotherapy

Haofei Hong, Chen Li, Liang Gong, Jinfeng Wang, Dan Li, Jie Shi, Zhifang Zhou, Zhaohui Huang, and Zhimeng Wu, *Chem. Sci.*, **12**, 4623-4630 (2021)

抗体医薬はその高い特異性と長い血中滞留性、そして作製法が確立されているなどの利点があるため、がんを始めとする様々な疾患の治療薬として盛んに開発が行われている。しかし、抗体医薬にも問題がある。製造コストが高く、抗体医薬品に対する抗体が出現することで、薬効が低下してしまうことである。

これらの問題を解決すべく、2012年に Spiegel らは、Antibody-recruiting molecules (ARMs) の概念を提唱した。ARM は、抗体に結合する領域 (ABT) と抗原に結合する領域 (TBT) をリンカーでつなげた二重特異性の分子であり、標的の細胞上の抗原を介して血中に存在する自然抗体 (例えば、抗  $\alpha$ -ガラクトシル抗体) をがん細胞に集積させることで、抗体由来のエフェクター能により、がん細胞を傷害するものである。

しかし、従来の ARM は、自然抗体のごく一部しか使えないという問題があった。また、ポリクローナルである点も問題であった。今回紹介する論文は、事実上すべての自然抗体を活用できる ARM を提案している。筆者らは、本分子を Universal endogenous antibody recruiting nanobodies (UEAR Nbs) と名付け、in vitro および in vivo において本分子の機能を評価した。UEAR Nbs は、ABT として抗体の定常領域に強く結合するプロテイン A 由来の Zドメインをタンデムに結合した ZZドメインを、TBT として EGFR に結合する低分子化抗体のナノボディをそれぞれ利用した(図 1)。

本分子のような一本鎖タンパク質は大腸菌で簡便に合成可能であり、また近年モノモディやアフィボディといった抗原に対して高い親和性をもち得るモダリティ分子の高速なスクリーニング手法が開発されているため、従来の ARM の課題を解決すると期待される。

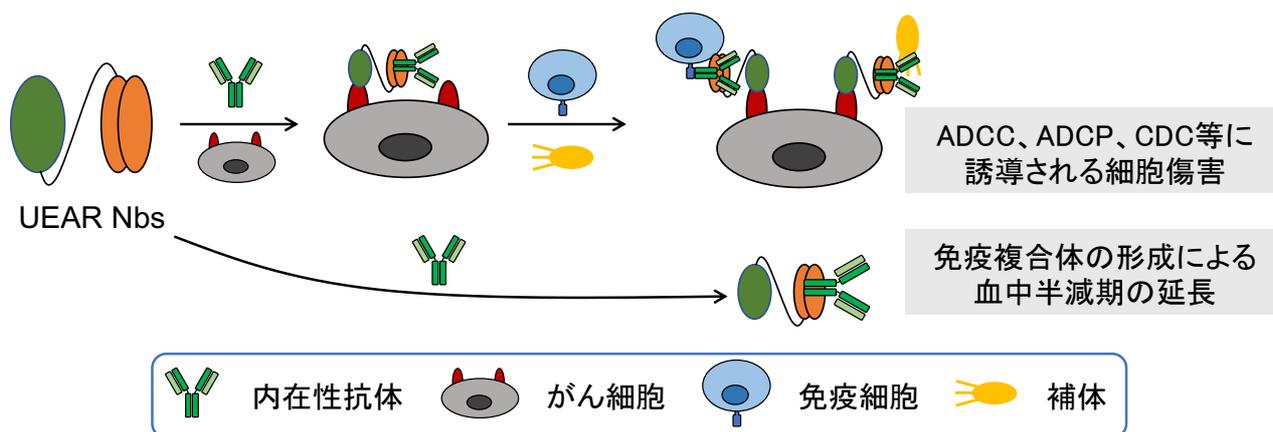


図 1. UEAR Nbs を用いたがん細胞傷害の流れ

筆者らはまず、UEAR Nbs の設計および大腸菌でのタンパク質発現後、抗体および抗原としての EGFR に対する親和性の評価、および UEAR Nbs を介した EGFR 発現細胞への抗体のリクルートを確認することで、本分子の機能の評価を行った。

続いて、従来の抗体医薬では標的抗原が発現していないために治療不可であるトリプルネガティブがん (TNBC) 細胞株を標的モデルとして、UEAR Nbs を介して集積した抗体によるがん細胞傷害能を評価しており、抗体依存性細胞傷害 (ADCC)、補体依存性細胞傷害 (CDC)、および抗体依存性細胞貪食 (ADCP) がそれぞれ UEAR Nbs と抗体の共存下のみで誘導されていることで本戦略の有効性を明らかにした。

最後にヌードマウスモデルを用いて UEAR Nbs の体内動態および抗腫瘍効果を評価した。ヒト TNBC 細胞株である MDA-MB-468 細胞を担がんしたヌードマウスに対し、UEAR Nbs を投与したところ、血中半減期が 26-30 時間と長い血中滞留性を示し、未治療群に対し有意に腫瘍の成長を抑制することが示された。筆者らは、この戦略は、今後、がんだけでなく様々な疾患へに対して、適用できると締めくくっている。

実は、私たちの研究グループでは、筆者らより先に同様の概念を提案している (*Chem. Sci.*, 11, 3208 (2020))。その際、Fc 結合性の環状ペプチドを TBT、葉酸を ABT に用いて、マウスで腫瘍の成長抑制ができることを示した。私も彼らと同様に、タンパク質で同様の研究を行っていた矢先に、先を越されてしまった。しかし、概念は、私たちが先なのでまあ良い。現在、彼らのずっと先を行くために、新しい戦略に取り組んでいる。

## Development of Antibody-Based PROTACs for the Degradation of the Cell-Surface Immune Checkpoint Protein PD-L1

Adam D. Cotton, Duy P. Nguyen, Josef A. Gramespacher, Ian B. Seiple, and James A. Wells, *J. Am. Chem. Soc.*, **143**, 593-598 (2021)

続いてはカリフォルニア大サンフランシスコ校の研究グループから発表された論文である。本論文では、標的の膜タンパク質を選択的に分解する戦略を提案している。

ヒト体内には10万種以上のタンパク質があり、このうち 8 割ほどのタンパク質は従来の低分子医薬や抗体医薬では活性の阻害および調節が難しい”undruggable”な標的であるといわれている。そこで近年、活性を抑えたいタンパク質を阻害ではなく、分解することで機能の発現を抑制するという戦略が提唱されてきた。その代表が、2001 年に Deshaies らにより報告された Protolysis Target Chimeras (PROTACs) という分子である。PROTACs は、細胞質内で標的のタンパク質とユビキチンリガーゼを架橋することで、任意のタンパク質

に対してユビキチンを付加し、ユビキチン-プロテアソームシステムを利用し、標的タンパク質の分解を誘導する。しかし、PROTACs では、標的の対象が細胞質内のタンパク質に限られること、タンパク質の標的化に必要な低分子リガンドが限られているという問題がある。筆者らはこの PROTACs の問題を、短期間で標的タンパク質に対し高い親和性および標的特異性を実現する抗体を利用することで解決できると考えた。筆者らはタンパク質の分解を誘導する分子として RNF43 というタンパク質に注目した。RNF 43 は、Wnt 共役受容体をユビキチン化し、エンドサイトーシスおよび分解を誘導する分子として知られている膜貫通型のユビキチンリガーゼである。筆者らは、RNF 43 と標的抗原を架橋することで選択的に分子の分解を誘導できると考え、RNF 43 と標的抗原に対し結合する二重特異性抗体を開発した(図 2)。

筆者らは、まず戦略を証明するモデルとして RNF 43 の細胞外領域の末端に Fab を導入し、標的の抗原と結合することでエンドサイトーシスおよび分解を誘導するかを評価した。標的抗原として GFP を用いた結果、リソソームを標識するマーカーと GFP に由来する蛍光が共局在したことから、GFP がリソソーム内に取り込まれることが示された。

そこで、次に、ファージディスプレイ法により、RNF 43 および PD-L1 に標的能をもつ抗体を取得し、knobs-into-holes 技術を利用してバイスペシフィック抗体(AbTAC)を作製した。これを、PD-L1 を発現している MDA-MB-231 細胞に添加したところ、ウェスタンブロッティングにより、PD-L1 が減少することを示された。CRISPR 干渉により RNF43 をノックアウトした細胞、およびリソソーム形成阻害剤を加えた系では PD-L1 の減少が見られなかったこと、さらには、リソソーム酸性化阻害剤を加えても PD-L1 が減少したことから、AbTAC によるタンパク質の分解は、オートファジーによる非選択的な分解ではなく、RNF 43 およびリソソーム依存的な選択的な分解であることが示唆された。

筆者らは、今後本研究をさらに発展させることで、学術的な意義だけではなくトランスレーショナルな応用にも期待されると締めくくっている。

今回は紙面の都合より 2 報のみの紹介となりましたが、近年これらの報告のように二価性の分子を用いた架橋により生体内のもともとの機能を調節するという報告が多くなされています。これまで薬剤は生体内のレセプターを標的とし、リガンドとして、またはその競合阻害剤として用いられることが一般的でしたが、今後、今回紹介したような、生体内で元々あるメカニズムを人為的に調節し、治療に利用するような手法が台頭してくると期待されます。

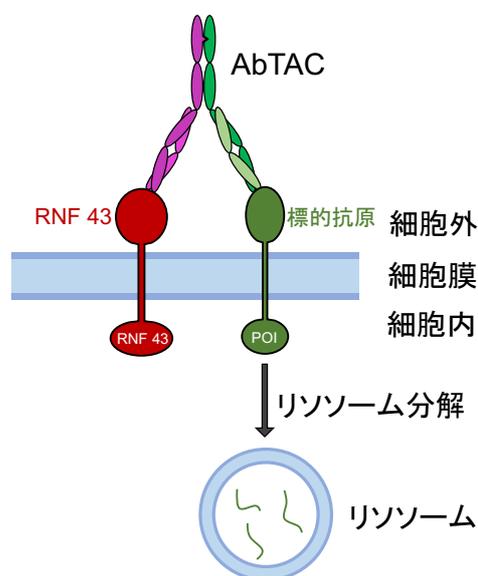


図 2. AbTAC による抗原の分解経路

## 気になった論文

田村 伊織 (たむら いおり)

東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻 博士後期課程 1年

tamura@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

この度は、生命科学研究レター「気になった論文」の執筆機会をいただき、ありがとうございます。私は東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻で山東信介教授のご指導のもと、クリックケミストリーを利用した生体イメージング法の開発に取り組んでおります。クリックケミストリーは、有機化学や材料化学における機能性分子の創製など様々な分野において活用されていますが、とりわけケミカルバイオロジーにおいては、生体分子を夾雑系で高選択的に修飾し、蛍光検出や精製を行う手法として非常に有用です。本稿では、最近報告された、クリックケミストリーを利用した生体分子標識の例を2つご紹介します。

### Bio-orthogonal Red and Far-Red Fluorogenic Probes for Wash-Free Live-Cell and Super-resolution Microscopy

P. Werther, K. Yserentant, F. Braun, K. Grubmayer, V. Navikas, M. Yu, Z. Zhang, M. J. Ziegler, C. Mayer, A. J. Gralak, M. Busch, W. Chi, F. Rominger, A. Radenovic, X. Liu, E. A. Lemke, T. Buckup, D.-P. Hertzen, and R. Wombacher, *ACS Cent. Sci.*, **7**, 1561–1571 (2021).

標的に結合することで蛍光強度が増大する蛍光色素は、未反応の色素を洗浄せずに標的の観察を行うことができるため、生細胞イメージングに有用です。クリック反応として知られる逆電子要請型 Diels–Alder 反応 (IEDDA) の反応基であるテトラジニル基は、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) のアクセプターとしてはたらくことが知られています。このため、テトラジニル基を付与した蛍光色素は IEDDA の進行に伴って FRET 効率が低下し蛍光が回復する、蛍光増大型の色素として用いることができます。一方、生細胞イメージングにおける蛍光色素には、蛍光輝度や光安定性、細胞膜透過性といった優れた物性が要求されます。

キサンテン骨格をもつローダミンやシリコンローダミンは、これらの要求を満たす蛍光色素として広く用いられています。テトラジニル基を付与したローダミン分子は、最大 76 倍の蛍光増大を示す蛍光色素として報告例があります。一方シリコンローダミンについては、テトラジニル基を付与しても生細胞イメージングに十分な蛍光増大を示さないことが問題となっていました。このような背景から著者らは、テトラジニル基付与型シリコンロー

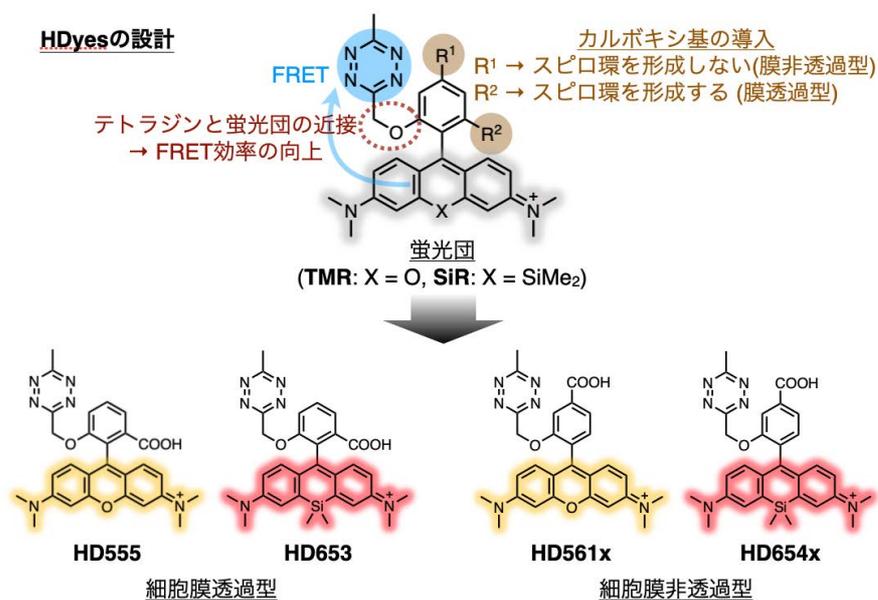


図1. HDyes の設計

ダミンの蛍光増大比を向上させるべく、FRET 効率を改善するための新たな分子設計戦略を考案し、HDyes と呼ばれる蛍光色素群を開発しました。

著者らは、蛍光団に結合しているベンゼン環のオルト位に、短く柔軟なオキシメチレンリンカーを介してテトラジンを結合させることで、テトラジニル基が蛍光団に近接して FRET による消光効率を向上させることができると考えました。また蛍光色素のバリエーションとして、ベンゼン環のカルボキシ基がオルト位にありスピロ環化平衡を示す細胞膜透過型と、パラ位にありスピロ環化平衡を示さない細胞膜非透過型、および蛍光波長の異なるテトラメチルローダミン (TMR) とシリコンローダミン (SiR) を選択し、計 4 種類の蛍光色素 (HDyes) を設計、合成しました (図 1)。これらの蛍光色素に対して、歪みアルキンの一種であるビスクロ [6,1,0] ノニン (BCN) との IEDDA 反応を行った結果、いずれも 30 倍以上の高い蛍光増大を示しました。なお、テトラジニル基をオルト位に結合させる本戦略が、テトラジンと蛍光団の近接や FRET 効率の上昇につながっていることは、DFT 計算や過渡吸収分光法によって裏付けられています。

次に著者らは、合成した蛍光分子のセットを用いて no-wash 生細胞イメージングを試みました。細胞外の標的としては膜外に存在するアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体 (ADORA2A)、細胞内の標的としては核内に存在するヒストン H2A を選択しました。それぞれの標的に HaloTag を介して BCN を結合させた細胞を用いて、合成した蛍光色素による IEDDA 標識を試みました。その結果、細胞膜透過性の HD555 および HD653 は ADORA2A および H2A の両方、細胞膜非透過性の HD561x および HD654x は ADORA2A のみを、no-wash で選択的に蛍光標識することに成功しました。また、HD654x を作用させた 30 分後に HD555 を作用させることで、ADORA2A と H2A を no-wash で多重標識することにも成功しています (図 2)。最後に著者

らは、HD653 を用いた誘導放出抑制顕微鏡法 (STED)、およびヒドロキシメチル基を有する sb-HD656 を用いた蛍光相関超解像法 (SOFI) による超解像イメージングを実施し、HDyes が高い光安定性および S/N 比を示すことを主張しています。

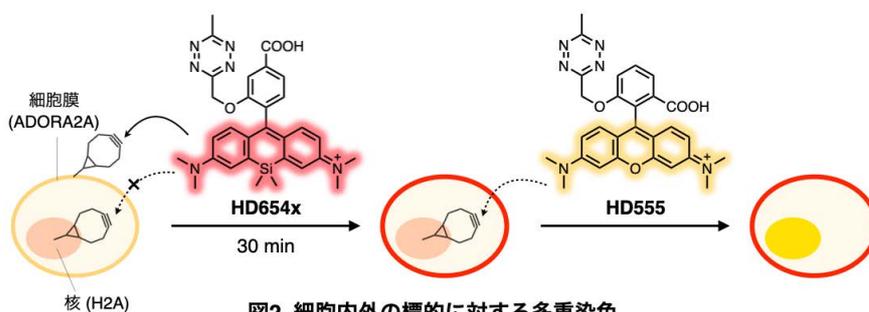


図2. 細胞内外の標的に対する多重染色

## Genetic Incorporation of Two Mutually Orthogonal Bioorthogonal Amino Acids That Enable Efficient Protein Dual-Labeling in Cells

R. M. Bednar, S. Jana, S. Kuppa, R. Franklin, J. Beckman, E. Antony, R. B. Cooley, and R. A. Mehl, *ACS Chem. Biol.*, **16**, 2612-2622 (2021).

クリック反応は、生体分子の蛍光標識や架橋といった化学修飾を可能にし、生体分子の挙動や機能を研究するツールとして非常に有用です。タンパク質に対しては、遺伝子工学的にクリック反応タグを有する非天然アミノ酸を導入することで、残基特異的に化学修飾を行うことが可能になっています。さらに、タンパク質の複数の部位に異なる化学修飾を選択的に行うことができれば、タンパク質の機能や構造をより自在に操作したり、詳細に解析したりすることができます。これまでに、IEDDA および末端アルキンとアジドとのヒュスゲン環化付加反応 (CuAAC) によるタンパク質の二重修飾は報告されていましたが、CuAAC に必要な銅触媒の毒性が問題となり、細胞内環境で標識を行うことはできていませんでした。このような背景から著者らは、CuAAC の代わりに銅触媒を要さない、歪みアルキンとアジドとのヒュスゲン環化付加反応 (SPAAC) を

用いることで、細胞内でタンパク質の二重修飾を可能にする DEAL と呼ばれるシステムを考案しました。

著者らは非天然アミノ酸として、SPAAC に対してはアジド基を有する pAzF、IEDDA に対してはテトラジン  
を有する Tet3.0 の 2 つのフェニルアラニン類縁体を選択しました。また、これら非天然アミノ酸をタンパク質  
に組み込むためのサプレッションシステムとして、アンバーコドン(UAG)に対する pAzFRS/tRNA<sub>CUA</sub> および  
オーカーコドン(UAA)に対する Tet3.0RS/tRNA<sub>UUA</sub> を選択した上で、大腸菌 BL21(DE3)株を用いた形質  
転換の条件を最適化しています。次に、SUMO-sfGFP または sfGFP タンパク質をコードするプラスミドの 2  
箇所に UAG および UAA を導入後、大腸菌に形質転換し pAzF および Tet3.0 を添加した条件で培養する  
ことで、sfGFP が発現し pAzF および Tet3.0 が一つのタンパク質分子に対して部位特異的に導入されてい  
ることを、sfGFP の蛍光強度および質量分析により確かめています。さらに、SPAAC のペアとして歪みアル  
ケンに有する DBCO-TAMRA、IEDDA のペアとして歪みアルケンに有する sTCO-PEG<sub>5000</sub> を *in vitro* で作  
用させると、pAzF および Tet3.0 の導入の有無によって、対応する蛍光または分子量増加が確認されました。  
また 2 つのクリック反応はほぼ直交的に進行し、pAzF および Tet3.0 両方を導入したタンパク質に対する二  
重修飾が可能であることも示しています。SPAAC および IEDDA によるこれらのタンパク質二重標識は、大  
腸菌細胞に直接蛍光分子を作用させた場合も効率的に行うことができました。以上の検証から、DEAL シ  
ステムによって、大腸菌細胞内でタンパク質の二重標識が可能であることを示しました。

次に筆者らは細胞内 DEAL システムを用いた、3 種類の応用実験を行っています。具体的には、Tet3.0  
が導入されるようコードした sfGFP と、pAzF が導入されるようコードした蛍光タンパク質 mTagBFP2 を用意し、  
(1) sTCO-DBCO クロスリンカーを介した sfGFP と mTagBFP2 の異種分子間架橋反応、(2)  
sTCO-PEG<sub>4</sub>-DBCO クロスリンカーを介した sfGFP-mTagBFP2 融合タンパク質の分子内架橋反応(ステー  
ブル化)、(3) 2 種の蛍光色素 sTCO-JF669 および DBCO-TAMRA による sfGFP-mTagBFP2 融合タンパク  
質の二重蛍光標識、の 3 つを全て大腸菌細胞内で行うことに成功しています(図 3)。また DEAL システム  
を用いたさらなる応用として、FRET による一本鎖 DNA 結合タンパク質(RPA)と一本鎖 DNA(ssDNA)との  
相互作用の測定を試みています。RPA は 5 つの ssDNA 結合ドメイン(DBD)と 2 つのタンパク質-タンパク  
質相互作用ドメイン(PID)から構成されており、ssDNA との結合に伴い構造が変化しますが、システインリッ  
チな構造であることから *in vitro* での再構成は難しいとされているため、細胞内での評価系が求められます。  
著者らは、DEAL システムによって 2 つの DBD にそれぞれ Cy3 と Cy5 を修飾し、この構造変化を FRET  
によって観測できるかを検証しました。その結果、ssDNA の濃度上昇に伴って FRET シグナルの低下が見  
られました。

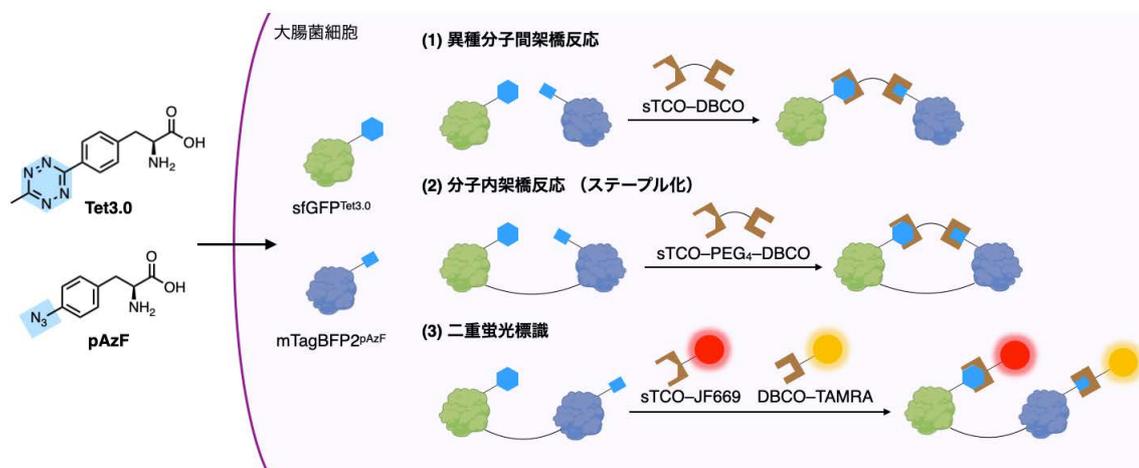


図3. DEALシステムの概要と応用  
図の一部はBioRender.comから引用。

# 留学体験記

## Münster 大学留学体験記

～繊細な光センサータンパク質との日々～

岐阜大学大学院 連合創薬医療情報研究科

東 小百合

(shigashi@gifu-u.ac.jp)



### はじめに

岐阜大学 池田研究室 特別研究協力員の東小百合と申します。私は今年2021年3月に池田将教授のご指導のもと博士号を取得し、6月よりドイツのミュンスター大学にて博士研究員として勤務しております。現在は合成生物学、特に光センサータンパク質を用いた人工細胞創製に取り組んでいます。本稿を通じて、留学の面白さや所属研究室の魅力が一人でも多くの方に伝われば幸いです。

### 留学に至った経緯

私がなぜ海外での博士研究員を決心したかということ、博士課程3年のある日のこと、実験合間に見つけてその後の実験予定を忘れてまで精読した一報の論文がきっかけです。その論文は正しく現在私が博士研究員として所属するドイツのミュンスター大学 Wegner研 (PI: Prof. Seraphine V. Wegner、以降Wegner先生) からChemistry-A European Journalに発表された“Turning Cell Adhesions ON or OFF with High Spatiotemporal Precision Using the Green Light Responsive Protein CarH” (Chem. Eur. J. 2020, 26, 9859 – 9863) です。内容は*Thermus thermophilus*由来の光受容転写因子: CarHの四量体 (暗所下、アデノシルコバラミン (AdoB<sub>12</sub>) との結合に由来) が光照射により単量体へ解離する現象を細胞-基質間相互作用の制御に応用したというものでした。細胞内で機能する分子 (CarH) を細胞外の現象 (細胞-細胞間または基質間相互作用など) に応用するという発想が私にとっては非常に印象的かつ、今後の展開を想像するのがとてもワクワクする研究に感じました。その後、間もなくしてWegner先生にメールアポイントを取る準備を開始しました。この時にWegner研にさらなる魅力を感じたことは、ラボのHPを見る限りWegner研は多国籍のラボである一方で日本人が1人も居なかったことです。英語力を改善したい私にとってはかなり理想的な環境に感じました。Wegner先生にカバーレターとCVを送付して翌日には返信が頂けました。そしてその返信を要約すると「翌日のこの時間にオンライン面接をしよう、15分ほどのプレゼンを用意してね」という少し急すぎる内容であり、睡眠2時間で面接に挑んだことが今ではいい思い出です。その準備はとてもハードでしたがWegner先生の優しい人柄に安心できた面接となりました。私は幸いなことに博士課程3年目から日本学術振興会 特別研究員 (DC2) に採用していただき、そのサポートのおかげもあり面接後はすぐにWegner先生から留学を承諾していただけました。面接の際に、ラボメンバーともお話ししたいとお願いしたらイタリア人の博士研究員とインド人の博士課程学生を紹介して下さい、1週間後に3人でオンライン会合を実現することができました。この会合で知った衝撃の事実は、Wegner先生が私の面接の数日後に出産し、しばらくの間は産休に入られたということでした。面接日の設定が急だった理由が分かったと同時に、むしろメールの

送信を数日でも躊躇していたらこの留学は実現していなかったかもしれないとも思いました。

### 留学開始！-超グローバルなラボ、それがWegner研-

ミュンスター大学 (正式名称: ヴェストファーレン・ヴィルヘルム大学(ドイツ語: Westfälische Wilhelms-Universität, WWU)は、ミュンスター・オスナブリュック空港 (FMO) からバスまたはタクシーで約20分ほどの場所に位置しています。ドイツのタクシーはクリーム色の「ベンツ」であり、乗車中は少し優越感に浸ることができました。ミュンスター大学は、ドイツ皇帝のヴィルヘルム2世がかつて生活していた城の跡地であり、大変立派な建物です。しかしながら、COVID-19パンデミック発生直後から現在も講義は行われずに大学職員の事務室としてだけ使用されているそうです。また、ミュンスター大学には15の学科を持っており、市内には学科ごとの研究棟が点在しています。そして私が所属するWegner研は、Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistryという研究棟内にあり、この建物は大学病院 (ドイツ語: Universitätsklinikum Münster, UKM) に属しています (図1)。Wegner研には現在、博士研究員4名、博士課程の学生10名、技術補佐員2名が在籍しており、この研究棟では最大規模です (図2)。

さて、私が所属するWegner研にはトルコ出身のWegner先生を含め17人が所属しており、ラボメンバーの出身国籍はアメリカ、イタリア、イラン、インド、エクアドル、ガーナ、中国、ドイツ、日本、フィンランド、メキシコと実に多様です。また、ラボメンバーの男女比はほぼ等しいです。なぜそこまで国際色が強いかと云う理由は、Wegner先生のこれまでのグローバルな経歴が理由だと私は考えています。Wegner先生は、博士課程からシカゴ大学 (アメリカ) で研究に従事し、その際の研究指導者でありRNA修飾研究の第一人者でもあるProf. Chuan Heの勧めで北京大学に1年の研究留学経験もあります。その後、ドイツのマックスプランクインテリジェントシステム研究所で3年間の博士研究員 (その際は現在のマックスプランク医学研究所のディレクターでもあるProf. Joachim P. Spatzが研究指導者) を経たのちに同研究所で独立した研究室を持った経歴があります。2019年よりミュンスター大学で教授として、また私生活では2児の母として活躍されています。ちなみにラボの女性陣に聞くと、このラボを希望した理由の一つにはやはり母でありながら第一線で活躍するという姿勢に憧れているという話にもよくなります。



図1 留学先の研究所



図2 Wegner 研の集合写真 (右端に映る Wegner 先生の隣に筆者)

ここからは恐らく「ドイツあるある」なお話を幾つか紹介します。まず、始業時間は大抵7時 (10月になると朝7時でも外は真っ暗なので少し始業時間も遅くなっているかもしれませんが) 終了は16時ごろで、金曜日は午前しか働かない人が多いです。この習慣はWegner研でもチラホラ見られ、遅起きだった私も最近では少なくとも8時には実験を始める日が多いです。次に、とにかくパンをよく食べます。しかもハード系のパン

生地であるにも関わらず、電子レンジで温めて柔らかくすることは決してしません。パンは安くて美味しいので私も毎日食べていますが、電子レンジで温めてから食べているのは研究所でも私と中国人の女学生だけです。そして、できる範囲で実験装置は手作りです。この研究所には地上フロア（日本でいう1階）に技術部門とIT部門などがあり、技術部門には例えばピペットマンの校正から器具の開発を依頼することができるそうです。実際にラボにあるアガロース電気泳動槽は技術部門のお手製です（図3）。番外編としては、ミュンスターは海外から学生が集まる学生街ということもあり、ドイツ人でも頼むと英語で話そうと努力してくれる人が多いです。ただ、研究所のIT部門のおじさんはドイツ語しか受け付けなくて有名です。パソコン関係でお世話にならざるを得ないのですが、ドイツ人のラボメンバーを連れて行かないと基本取り合ってくれません。そこで私は、日本のお菓子作戦を執行しました。最初の依頼とともに渡した抹茶キットカットとブラックサンダーは大のお気に入りになったようで、今ではWegner研でも「なぜかサユリのお願いだけはすぐに聞いてくれるよなあ」と不思議がられているほど私の依頼にはすぐに応えてくれます。最近では会うたびに”How are you doing?”と聞いてくれるので、日本のお菓자에感謝です。



図3 研究所技術スタッフお手製の  
アガロース電気泳動装置

### Wegner研での研究生活

次に、Wegner研での研究について書きたいと思います。Wegner研では、主に細胞生物学、生化学からなる2つのサブグループに分かれ人工細胞または新たな機能性材料の創製に取り組んでいます。どの研究テーマにも共通することは、光センサータンパク質を用いるという点です。冒頭でも少し触れたように、これまでにWegner研では特定波長の光照射により二量体化するタンパク質を細胞表面に修飾することで細胞-細胞間または細胞-基質間相互作用の可逆的かつ時空間制御に成功してきました。現在も上記の2つのサブグループに分かれて様々な研究が進められており、ラボメンバーと互いの研究内容やその進捗を話す時の最先端の研究に触れた感覚にはいつもワクワクします。私は、面接直後にオンライン会合したインド人の博士課程3年の女学生が進めている研究プロジェクトと、Wegner先生と話し合っ始めた研究プロジェクトを進めています。前者では人工細胞モデルとして様々な作製方法が確立されてきたGiant unilamellar vesicles (GUVs) の機能化を習得しながら研究目標に向けて取り組んでいます。後者では実験によって青色光と赤色光を使い分けて光センサータンパク質を操っているのですが、その繊細さ（反応の速さ）には悩まされています。また、インド人女学生は最初こそ口調も厳しく、何よりこの方の英語が本当に聞き取れませんでした。今では出会えて本当に良かったと思う日々を送っています。私がそう思う点は主に3つあります。まず、とにかく優秀なところ。頭の回転が速く記憶力も抜群で、なおかつ実験系を考える時に起こりうる問題とその対処法をすぐに列挙でき、実際にその助言に何度も救われています。次に、配慮に富んだ指導力です。ただ実験方法を教えるだけでなく、その後と一緒にデータを見てディスカッションするというのを必ずしてくれます。この時に貰えるフィードバックは毎回勉強になります。最後は、仕事効率の良さです。彼女は家から1時間かけてラボに来ているということもあり、その日のラボでの仕事は来る前に周到に計画されています。ラボでの時間を少しも無駄にしない姿勢は、当たり前のように結構難しいのではないのでしょうか。彼女はもう少しで卒業予定ですが、それまでの間にさらに彼女から多くのことを学ばせてもらおうと思っています（図4）。



図4 実験でお世話してくれているインド人学生とともに

さて、ここで「留学あるある」な悲しい話にも触れます。私は英語にかなりの苦手意識を持っています。こ

ここで研究をしてみたい一心で前向きに日々の英語生活を送ってきたつもりですが、留学5か月目の現在は自分の上達しない英語力に結構心が疲弊しています。リスニングとライティングは留学前より改善されていることを実感していますが、スピーキングはまだまだ改善に時間がかかりそうです。そして月一で行われるラボ全体の研究報告会で事件は起きました。自身の発表中にとあるラボメンバーがクスクスと笑っていたのです。話の導入部分でそれが起きたために自分の英語がおかしくて笑われていることがすぐに分かりました。さすがにその晩は枕濡らさずして就寝することはできませんでしたが、似た経験をされた方もいらっしゃるのではないのでしょうか。それでも、Wegner先生のフォローや他のラボメンバーの沢山の励ましの言葉により、現在は再びドイツの美味しいビールを飲んで健康に過ごせています。

Wegner研での催し物についても触れておきます。今年の夏は、ミュンスター観光やWegner先生のご自宅の庭でBBQをしました。BBQはそれぞれが一品ずつ手料理を持ちよるポトラックパーティーでもあり、私は焼きおにぎりを作っていました。皆正直なので賛否は分かれましたが、Wegner先生の1歳になる娘さんが誰よりも好んで焼きおにぎりを頬張っている姿がとても可愛らしかったです。また、COVID-19の影響でオクトーバーフェストの開催は中止されたようですが、クリスマスマーケットの開催は決定されています。12月初めにはラボメンバーでクリスマスマーケットに繰り出し、その後のクリスマスディナーではシークレットサンタの企画も予定されており今から楽しみです。またWegner研では、自身の祝い事には幸せのお裾分けということでラボにスイーツを持っていく習慣があります。アメリカ人の物静かかつ少し強面な博士研究員が誕生日に作ってきたケーキは非常に美味しく思わずレシピを聞くほどでした。

### ドイツ ミュンスターでの日々

最後は、研究以外の生活について書きます。まずは住居について、私はUKM関係者専用のアパートでシェアルームをしています。現在のルームメイトは、19歳のドイツ人女学生です。最近では毎日帰宅すると部屋にやってきて「どんな1日だった?」「ちょっとこの話聞いて」と声をかけてくれます。時間があつたときは、一緒に日本から持ってきたお茶や彼女が実家で入手してきたワインを飲みながら話すなど、何だかドイツで妹ができた気分です。また、アパートからは研究所に徒歩3分で着くことができます。その道中のパン屋さんに寄り、ここのお兄さんとドイツ語で少し挨拶するのが私の毎朝の日課です。次にミュンスターという街について、市街地の中央には立派な教会がそびえ立ちその付近では演奏したり、お花や絵画を売ったりと昼間は賑やかです。静かな夜の風景も見ごたえがあります。週末はよくラボメンバーと市街地に繰り出し、買い物やディナーを楽しんでいます。ラボ外でラボメンバーと会う時は、基本的にはラボの話はせずそれぞれの国の文化や言葉を教え合っています(図5)。平日は研究、休日はドイツ探検や異文化交流とせっかくの留學生活を今後も満喫していきたいと考えています。



図5 ラボメンバーと日本食レストランにて

### おわりに

最後になりましたが、このような貴重な機会を与えてくださった熊本大学の井原先生やFBCLを運営されている先生方に心より感謝いたします。また、研究の基礎を教えてくださいととも留学という新たな挑戦を勧め時折近況を尋ねて下さる池田先生、そして私を快く受け入れてくださったWegner先生に深く感謝しております。今後もWegner研での留学が続きます。ここでの研究成果を近い将来日本の皆様に発表できる日を夢見ながら、明日からも研究生活を楽しんでまいります。



## 受賞

**馬場嘉信** (名古屋大学 教授)

紫綬褒章

分析化学研究功績

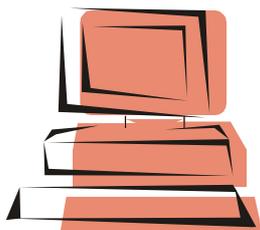
(令和3年秋)

**三原久和** (東京工業大学 教授)

2021年度日本ペプチド学会学会賞

「デノボデザインを基礎とする機能性ペプチドの創製」

(2021年8月)



## 編集後記

いま、新型コロナが謎の終息をみせています。画期的な mRNA ワクチンの効果+日本人の抑制的な行動様式の賜物でしょう。もちろん、これも一時的なもので、必ずいずれ第 6 波はやってくると思っています。私の大学では講義は対面中心のものにシフトさせています。食堂にできる長蛇の列を 2 年振りに見て、嬉しい感覚になったのが自分で面白かったです。一方、今後もずっとオンラインのままにして欲しい会議は少なくありません。コロナ禍で嫌というほどオンライン会議の訓練をしました。私たちは、移動にかかる時間、コストを削減するための素晴らしい選択肢を手に入れました。

今回も、充実した内容満載の秋号 (No. 63) をお届けすることができます。お忙しい中、素晴らしい内容の論文を執筆下さった皆さんには心からお礼を申し上げます。次号 (No. 64) は、松浦さんの担当により、2022 年 4 月頃の発行を予定しております。ニュースレター改善のため、皆さんからのご要望、ご意見等をお待ちしております。下記編集担当までご連絡をいただければ幸いです。

令和 3 年 11 月 26 日

井原 敏博  
熊本大学大学院 先端科学研究部  
(toshi@chem.kumamoto-u.ac.jp)

編集担当

大神田 淳子 (信州大学)  
松浦 和則 (鳥取大学)