

機関番号：14301

領域設定期間：平成29年度～令和3年度

領域番号：2904

研究領域名（和文）分子夾雑の生命化学

研究領域名（英文）Chemistry for Multimolecular Crowding Biosystems

領域代表者

浜地 格 (HAMACHI Itaru)

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：90202259

交付決定額（領域設定期間全体）：（直接経費）1,190,400,000円

研究成果の概要

本領域研究では、既存の学問分野の枠に収まらない新興・融合領域である分子夾雑化学の創成を目指して、A01からA03の3つの計画班を設定して、平成29年度から5年間にわたって研究を進めた。公募研究では、期間内で合計66件の研究課題を関連する幅広い分野から採択、分野横断的な領域体制を構築して分子夾雑化学の発展と概念の普及を目指した。

まず、計画班においても計画した各研究はいずれも、おおむね順調に進展し、その結果として、国内外で十分に高い評価を得る研究成果を残した。また、公募班においても活発な研究活動が展開され、優れた研究成果を輩出するグループも複数現れた。以上の研究活動により、世界トップレベルで高い評価を受け、関連分野において大きなインパクトを残す複数の研究成果が得られた。具体的には、原著論文583報（Impact Factor 10以上の論文誌47報、うちNature姉妹誌14報）、書籍出版43件、招待講演462件（うち海外基調講演20件）、一般講演455件などである。また、総括班内に設置した統合生命化学研究センター（CIBIC）による研究支援活動を通じて、領域内共同研究を積極的に推進し、分野融合型の研究成果を生み出すことにも成功した。具体的には、CIBICを通じて20以上もの領域内共同研究が実施され、この中から論文掲載に結びついた成果は10報に登る。さらに国際シンポジウム(ICBN2017, CMCB2017, CMCB2022)の開催、海外派遣活動、イギリス化学会誌 (*Chemical Communications*, *RSC Chemical Biology*)での「分子夾雑化学」のThemed collectionの特集を組む事などにより、本領域活動の国際的なアピールを継続して行ってきた。以上の活動を通じて、我が国独自の分子夾雑化学の国際的な認知度の向上が達成されたと考えている。これに加えて、学会横断型シンポジウムの開催（4回）や、他の新学術領域とのジョイントシンポジウムの開催（3回）によって、周辺関連分野との新たなネットワーク形成や研究成果の情報交換が図られた。また、総括班が主導するアウトリーチ活動として、領域ニュースレターの発行（年2回）、一般化学雑誌や学会誌に「分子夾雑の生命化学」に関する特集を行い、本領域研究の意義を国民や社会に向けて広く発信し普及に努めた。

研究分野：生命化学

キーワード：ケミカルバイオロジー、生命物理化学、ナノバイオサイエンス

1. 研究開始当初の背景

従来、タンパク質、核酸、脂質などの生体分子の構造・機能解析は、もっぱら、少数の精製された分子だけを含む希釈な試験管内で行われてきた。また、これらのイメージングや機能制御を可能とする人工分子の設計や評価も同様な希釈少数分子系で行われてきた。このため、合成された分子の大多数は、実際の細胞系や、さらに複雑な生体システムでは上手く機能せず、多くの試行錯誤を繰り返さざるを得なかった。これは、多様な生体分子が高濃度で混在する細胞における分子の振る舞いが、人工的な試験管内環境とは大きく異なっているためである。従来からの試行錯誤の壁を乗り越えるためには、分子夾雑とも呼ぶべき細胞内や組織環境での個々の分子の振る舞いを理論・物理化学的に正確に理解して記述し、それを基盤として真に有用な生体機能分子を合理的に設計合成し、これらを用いてさらに生体夾雑系の理解を進化させるとともに、医療診断や薬剤設計へと展望できる「分子夾雑」の化学の基盤構築と発展が必要不可欠であった。

2. 研究の目的

本申請の目的は、細胞や組織など分子夾雑な環境で生体分子の解析や制御を可能とする機能性分子の合理的な設計指針を確立し、これを基軸として創薬や生体イメージング基盤の革新を実現し、新しい疾病診断法や治療法の創出に繋がる新しい学術領域を形成することである。生体分子の機能を化学的に解析し、生命現象を明らかにする生命化学研究は、生物有機化学、生体関連化学、ケミカルバイオロジーといった研究分野において、過去 50 年にわたり世界中の研究者によりさかんに研究されてきた。現在、生命化学研究は、分子夾雑環境である細胞や組織、生物個体における、ありのままの生体分子の機能を捉えて解析する段階にある。しかし、従来からの化学的手法を生体複雑系に持ち込むことができない技術的制約や、分子夾雑環境としての細胞場の理解の欠如に阻まれ、生命化学研究の進歩は、試行錯誤を続けている状況にある。ここから脱却し、世界に先駆けて我が国の生命化学研究が飛躍的發展を遂げることは、各研究分野の散逸的な発展に頼るのみでは達成困難である。すなわち、“未成熟な分子夾雑の生命化学”という共通認識の下に、広範な化学関連分野の研究者が知識、発想、技術を持ち寄り、協働して生体機能の解明に挑む新たな領域の設定は、今日の生命化学研究の喫緊の課題である。そして、ここから生体反応のゆりかごとしての細胞システムの本質を知り、自在に制御し、医工学への応用を切り拓くことで、新時代の生命化学研究へのパラダイムシフトを引き起こすことができる。以上のことを理由として、本申請領域の立ち上げに至った。

3. 研究の方法

本領域では、異分野融合型の新しい化学領域 “分子夾雑の生命化学” の創成を目指し、以下の 3 つの項目からなる計画班を形成して総合的な生命化学研究を展開した。

研究項目 1：分子夾雑の合成化学-生体分子を機能解析する人工分子の創成

A01 班：浜地（京大工）、王子田（九大薬）、萩原（理研）

研究項目 2：分子夾雑の物理・計算化学-細胞場の定量解析技術の創成

A02 班：杉本（甲南大 FIBER）、後藤（阪大蛋白研）、田中（神戸大シス情）

研究項目 3：分子夾雑の分析・応用化学-細胞場の化学を取り入れたバイオデバイスの創成

A03 班：馬場（名大工）、田端（東大工）、夏目（名大医）



本申請研究は、合成化学としての「生体分子を機能解析する人工分子の創成」、物理・計算化学としての「夾雑環境にある細胞場の定量解析技術の創成」、分析・応用化学としての「生体場の化学を取り入れた新しいナノバイオデバイスの創成」を 3 つの項目を基軸として構成されている。この体制により、これまで精製された理想的な希釈溶液系で行われてきた生命化学研究を細胞夾雑環境へと一歩推し進め、生体分子システムの本質を化学的手法により理解し、それに基づいて、医療診断、一細胞解析などを可能とするデバイス技術の開発を行うことを目指した。また本領域では、公募研究班（第一期（H30-R1）32 件、第二期（R2-R3）34 件）を設置し、計画班の研究を補完し、研究の裾野を広げることを目指した。また、計画班員で構成する総括班

内に設置した統合生命化学研究センター（CIBIC）による研究支援活動を通じて、領域内共同研究を積極的に推進し、分野融合型の研究成果を生み出す事を目指した。そのほかにも総括班員によるシンポジウムの開催、ニュースレターの発行、雑誌における分子夾雑化学の特集を組むなど、領域研究のアウトリーチ活動を行った。

4. 研究の成果

A01 班（分子夾雑の合成化学）

研究目標：A01 班では、生きた細胞や組織中でタンパク質の構造ダイナミクスの可視化や制御を可能とする新しい人工プローブやケミカルツールを開発することを目指した。これらのツールを駆使するケミカルバイオロジー研究を進歩させ、これまで未知である細胞夾雑環境におけるタンパク質等の生体分子機能を解き明かす研究を展開した。一方で、生体機能の制御を目指して、細胞夾雑環境で機能するドラッグデザインに関する新たな指針を得ることにより創薬研究の進展に貢献することを目指した。また、植物のケミカルバイオロジー研究の確立を目指して、分子プローブを用いたライブイメージングや阻害剤スクリーニングにより、植物機能を解析・制御する人工分子を見出す事を目指した。

浜地計画班では、分子夾雑環境での有機化学の開拓を目指す当初の計画に沿って、細胞内で機能する新しい有機化学反応の探索を行い、その反応特性(反応速度論、官能基選択性)を明らかにする研究を実施した。具体的には、(1)新規リガンド指向性化学の開発と受容体タンパク質のラベル化やコバレントインヒビターへの応用(Nat. Commun. 2021, Nat. Commun. 2019, J. Am. Chem. Soc. 2021, Nat. Commun. 2018, Nat. Commun. 2017、他 15 報)、(2)細胞内環境や細胞内オルガネラ特異的に生体分子(タンパク質、脂質など)をラベル化可能な新反応系の開発と動態イメージング解析への適用(Nat. Chem. Biol. 2020, J. Am. Chem. Soc. 2020、他 5 報)を行った。加えて、(3)多成分複合型超分子自己集合体の利用により分子夾雑系を生体模倣的かつ人工的にデザインし構築し、超解像共焦点顕微鏡を用いてその場観察する技術や方法論の開発を行い、光照射制御による人工超分子材料上での非平衡パターン形成、タンパク質応答型タンパク質除去システムの開発など、多くの成果を挙げることができた(J. Am. Chem. Soc. 2021, Nat. Commun. 2020, Nat. Commun. 2020, Nat. Commun. 2020, Nat. Nanotechnol. 2018、他 6 報)。以上のように浜地らは、従来からの課題である分子夾雑環境で機能する有機化学手法や人工分子のデザインについて、複数の新たな指針を提示する成果を得た。

王子田計画班では、創薬有機化学の確立を目指す当初の計画に沿って、(1)ガンならびに感染症を標的とした CFA 基を有するコバレントドラッグの開発、(2)コバレントドラッグに適した新しい反応基の探索と創薬応用についての研究を実施した。(1)の研究においては、A01 浜地班との共同研究により α -クロロフルオロアセタミド(CFA)基を有するキナーゼ阻害剤の開発を進めた(Nature Chemical Biology 2019, ACS Med Chem Lett 2020)。本研究では、コバレントドラッグの細胞内での反応性を網羅的に評価するケミカルプロテオミクス解析を取り入れた。また、感染症に関するコバレントドラッグ開発については、COVID-19 のメインプロテアーゼ阻害剤の開発を進め、極めて高活性な阻害剤を得ることに成功した(Chem Sci 2022, 特願 2022)。(2)については、ビシクロブタン(BCB)の反応化学について検討を進めコバレントドラッグの反応基として有用であることを明らかとした(JACS2020)。

萩原計画班では、植物機能の理解と制御法の確立を目指す当初の計画に沿って、(1)植物オーキシン受容体の応答解析、(2)植物ストリゴラクトン受容体の機能制御について研究を実施した。(1)の研究においては、Bump-Hole 法によりオーキシン受容体にアミノ酸変異を加えることで特殊な人工オーキシンのみに応答する植物を作成できた(Nature Chemical Biology 2018 他 2 報)。この人工オーキシンと受容体のペアは、標的タンパク質を選択的に分解する手法へ応用可能で、培養細胞や植物個体で有用性の実証に成功した(Nucleic Acids Res 2020)。また、サイトカイニンやジベレリンなど、オーキシン以外の植物ホルモンについても Bump-Hole ペアの開発に成功している。(2)の研究においては、ストリゴラクトン受容体に結合して有害植物ストライガの発芽制御や通常植物の枝分かれ促進効果を有する人工分子の開発を行い、いずれも高活性な化合物を得ることに成功した(ACS Central Science 2018)。これらの植物ケミカルバイオロジーの成果は、食糧問題という医薬に匹敵する重要課題に対する答えを導き出すことから、社会的に重要な意義を持つ。

A02 班 (分子夾雑の理論・物理化学)

研究目標：A02 班では、細胞や細胞内小器官の分子環境を、物理化学的パラメーターに基づいて定量的に解析するとともに、分子夾雑環境における核酸やタンパク質の物性・構造・機能の定量的解釈の達成を目指した。具体的には、アミロイドの生体環境中における構造や凝集機構を解明し、アルツハイマーをはじめとするタンパク質凝集病の発生機序や診断法を提案することを目標とした。また、生体夾雑環境下での生体分子の挙動を解析できる計算シミュレーション法を確立する事を目指した。実験系と計算系の結果を比較検討することで、細胞機能と夾雑環境の関係性を世界に先駆けて提示する事を目標とする研究を進めた。

杉本計画班では、分子夾雑環境を生命物理化学の観点から理解する当初の計画に沿って(1)細胞内夾雑環境を物理化学的に解釈するための細胞模倣実験系の構築、(2)生体分子の定量的機能-環境定量相関(QFER)の解明を目指す研究に取り組んだ。(1)については、細胞小器官内部の分子環境を模倣した実験系を構築し、核酸の構造や機能を熱力学的・速度論的手法によって解析した。その結果、細胞夾雑環境が核酸の安定性や高次構造に与える影響について新しい知見を得た(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2017, Nucleic Acids Res. 2020, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2020, Chem. Commun. 2021 等)。(2)の QFER の解明については、分子夾雑環境が核酸構造と遺伝子発現に及ぼす影響について解析を行い、がんなどの疾患遺伝子中の四重らせん構造のトポロジー変化や安定性について新たな知見を得た(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2017, J. Am. Chem. Soc. 2018, Nat Struct Mol Biol., 2018 等)。また、QFER の情報を活用し、小分子や人工核酸などで、がん細胞中の四重らせん構造を安定化(または解離)し、特定のがん遺伝子の発現を抑制できる新しい技術の開発に成功した(J. Am. Chem. Soc. 2018, Nature Commun. 2018, J. Am. Chem. Soc. 2021, J. Am. Chem. Soc. 2022 等)。以上のように杉本班では、分子夾雑環境が生体分子の機能に与える役割について複数の新たな知見を見出す成果を得た。

後藤計画班では、細胞夾雑系における蛋白質の異常凝集の原理と制御を目指す当初の計画に沿って (1) 試験管内夾雑モデルにおける凝集機構、(2) アミロイド線維とアモルファス凝集の競争的形成、(3) 生体夾雑系におけるアミロイド形成の解明に取り組んだ。(1)については、透析アミロドーシスの原因となる $\beta 2$ ミクログロブリン($\beta 2M$)を用いて夾雑系モデルを構築した(Biochemistry 2018, 2019)。可逆的な熱変性(アンフィンゼンのドグマ)とアミロイド形成の関係を定式化すると共に一般性を検証した(J. Biol. Chem. 2018, 2019; Commun. Biol. 2021)。さまざまな添加剤の効果を明らかにした(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2019; J. Biol. Chem. 2019, 2021; Langmuir 2020; Protein Sci. 2021)。(2)については、 $\beta 2M$ や αSN を用いて、高温でアミロイドが効率的に形成されることを明らかにし、その機構を解析した(J. Biol. Chem. 2018; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2019)。(3)については、 $\beta 2M$ のアミロイド形成を、透析患者の血清を用いて調べた(Nature Commun. under revision; BioRxiv: doi.org/10.1101/2022.02.01.478730)。血清は夾雑系効果によってアミロイド形成を抑制したが、透析患者においては抑制効果が低下することを明らかにした。

田中計画班では、計算生物学の立場から分子夾雑系の役割の解釈を目指す当初の計画に沿って、水溶液中のATPによるタンパク質凝集の非特異的抑制の微視的メカニズムについて、アミロイド $\beta 42$ ($A\beta_{42}$)タンパク質をモデルとして検証した(J. Phys. Chem. B 2019)。また $A\beta_{42}$ 凝集体が一定のサイズになると解離経路の一部が抑制されて凝集体の形成が促進されうること明らかにした(Proteins 2022)。一方、生体内分子夾雑系において、化学反応による分子種の変化の効果を定量的に記述する手法(Phys. Chem. Chem. Phys. 2021)、多量体生体分子複合体が解体する順序を高精度で予測する手法(ACS Omega, 2021, Phys. Chem. Chem. Phys. 2022)を開発した。これらは分子夾雑系で同時多発的に進行する複雑な反応と拡散をシミュレーションで検証するための有効な方法論となりうる。また、細胞温度生物学への応用を念頭に置き、水を含む凝集系におけるナノスケールの温度緩和・熱伝導を定量的に記述する理論・シミュレーション手法の開発も進めた(J. Chem. Phys. 2020, Molecules 2020)。

A03 班 (分子夾雑の分析・応用化学)

研究目標: A03 班では、細胞場を人工的に再現するナノバイオデバイス工学に分子夾雑の要素を取り入れた微小環境計測デバイスを開発し、生体試料中の極微量成分・相互作用・薬物を高感度かつ迅速に検出することを目指した。特に生体試料中のがん細胞や細胞外小胞を解析できるデバイス開発と分子夾雑に対する多成分解析と機械学習を結びつけることで疾患分子診断 新たながんマーカー診断やIoTセンサー等の開発を目標として研究を進めた。一方で、分子夾雑の要素を取り入れた細胞融合デバイスを構築して細胞内で起こっている生命システムを人工的に再現する合成生物学研究を展開した。

馬場計画班では、ナノバイオデバイスによる生体微量成分の分離分析を目指す当初の計画に沿って、分子夾雑解析デバイスに関する研究を進め、(1) がん微小環境計測ガラスデバイスの開発、(2) 分子夾雑人工知能解析デバイスの開発を行った。研究項目(1)では、がん微小環境中の細胞外小胞や細胞を超高速・高感度に単離・センシングできるデバイスを開発した(J. Am. Chem. Soc. 2017, ACS Nano, 2019 他 6 報)。研究項目(2)では、分子夾雑系であるがんオルガノイドを患者腫瘍細胞から再構築することに成功するとともに、がんオルガノイドの分泌細胞外小胞と患者体液中から単離した細胞外小胞の超高性能解析可能なナノバイオ AI デバイスを開発した(Science Advances 2017, Biosens. Bioelec, 2021 他 2 報)。さらに、体液中のSARS-CoV-2等の超高速・超高感度解析とウイルス内ゲノムDNAの単一分子解析ナノバイオ AI デバイス開発(Science Advances 2022, Small Methods, 2021 他 2 報)に成功した。以上のように馬場班では、従来困難であった分子夾雑環境中にある微量生体成分を単離・解析できる複数の新しいナノバイオデバイスを開発する成果を得た。

田端計画班では合成生物学、分析化学的なアプローチを用いて細胞内夾雑環境の再構成と制御を目標に研究を行った。まずは細胞内夾雑環境をマイクロチャンバーデバイスの中に再構成するための手法を開発し、細胞質濃度とタンパク合成活性の間に相関がないことを見いだした(Scientific Reports 2018)。また、マイクロチャンバーに再構成した細胞内夾雑環境を連続的に変化させることを目的とした溶液交換系の開発し、1分子のタンパク質や1粒子のウイルスに対して連続的に溶液交換を行ってその活性などを測定することに成功している(Analytical Chemistry 2021)。一方これら成果から派生して、マイクロチャンバーデバイスへの1分子封入における新しい封入方法の開発にも成功した(Lab on a chip 2022)。さらに、油中液滴内に200kbのDNAを封入し、DNA複製を液滴内で生じさせることにも成功した(ACS Synthetic Biology 2021)。DNAのような高分子を微小空間内で増幅させ細胞内夾雑環境を変化させる手法へとつながっている。また、A02 杉本班との共同研究として、in vitro タンパク質転写翻訳系である pure system に対する分子夾雑環境模倣系の効果を明らかにすることが出来た(ACS Synthetic Biology 2019)。

夏目計画班では、脳腫瘍発症の新規メカニズムの解明とデバイス検出を目指す当初の計画に沿

って、(1) 細胞の夾雑環境下におけるスーパーエンハンサーDNA 配列の機能解明、(2) 脳腫瘍バイオマーカーの探索とイメージングを目指す研究を実施した。研究項目(1)については、テモゾロミド(TMZ)が効かない膠芽腫由来の複数の細胞系列においてHDACと相互作用するRET finger protein (RFP) の発現が有意に高くなっていることを新たに発見した(*Cell Reports* 2019)。次世代シーケンサーを用いた解析により、RFP 阻害による TMZ 抵抗性改善のメカニズムを検証したところ、RFP 阻害により広範なヒストン修飾 (H3K27ac) の変化が起き、それに伴って近傍の遺伝子発現も変化していることが明らかとなった。研究項目(2)については、A03 馬場班との共同研究により開発した ZnO ナノデバイスを用いて、尿中に含まれる脳腫瘍由来 microRNA を網羅的に解析し、予後不良因子である脳腫瘍の早期診断の開発を行った(*ACS Appl Mater Interfaces*. 2021)。

5. 主な発表論文等 (受賞等を含む)

● 発表論文 (主な原著論文 13 報、その他 570 報)

1. 浜地計画班：オルガネラ膜特異的なリン脂質ラベル化法の開発とライブイメージングによるリン脂質動態解析 *Nature Chemical Biology* 2020, 16, 1319–1323.
2. 萩原計画班：有機合成と合成生物学を駆使して植物ホルモンの作用をハイジャック (化学の力で見つけた植物の運動の謎に迫る) *Nature Chemical Biology*, 2018, 14, 299-305.
3. 王子田計画班：抗がん剤の機能を高める新しいドラッグデザイン (化学反応で標的タンパク質を高選択的に阻害) *Nature Chemical Biology*, 2019, 15, 250-258.
4. 杉本計画班：ヒトの染色体の四重らせん構造に結合し、がん細胞を撲滅する *J. Am. Chem. Soc.*, 2021, 143, 16458.
5. 後藤計画班：過飽和によるアミロイド線維形成の抑制を解明—アミロイド病の予防に貢献する新概念 *Communications Biology*, 2021, 4, 1-10.
6. 田中計画班：多量体タンパク質解離経路の高精度予測手法の開発 (巨大かつ不均一な生体分子複合体の機能発現メカニズム解明に向けた新規手法) *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2022, 24, 10575-10587.
7. 馬場計画班：ウイルス検出・無害化ナノポアデバイス開発 *Science Advances*, 2022, 8, eabl7002.
8. 田端計画班：無細胞タンパク質合成系における低分子クラウダーの効果 *ACS Synth. Biol.* 2019, 8, 3, 557–567
9. 夏目計画班：尿中マイクロ RNA で「脳腫瘍」を早期発見 *ACS Appl Mater Interfaces*. 2021 Apr 21;13(15):17316-17329.
10. A01 築地公募班：小分子や光に応答してタンパク質活性を隔離・放出する人工非膜オルガネラの開発 *J. Am. Chem. Soc.*, 2021, 143, 6434–6446.
11. 小松公募班：生きたがん細胞の代謝を制御する薬剤の探索技術の開発と抗がん剤の新たな作用メカニズムの解明 *Cell Reports*, 2021, 36, 109311.
12. 田中公募班：アミロイドの脱凝集メカニズムを解明 *Nat. Chem. Biol.*, 2022, 18, 321-331.
13. 加地公募班：細胞核・細胞質内分子夾雑系定量評価技術を開発 *Analytical Chemistry*, 2021, 93, 14409-14416.

● 論文発表の成果に結びついた領域内の共同研究：10 件

● 領域主催の学会：11 件 (このうち 2 回は国際学会)

● 受賞 (主なもの 8 件 その他、奨励賞、講演賞など 90 件)

1. 令和 3 年秋の褒章 紫綬褒章 (A03 馬場)
2. 第 73 回日本化学会賞 ナノバイオデバイスによるバイオ計測化学・バイオ医工学の革新 (A03 計画班 馬場)
3. 第 72 回日本化学会賞 分子クラウディング環境における非二重らせん核酸の化学 (A02 計画班 杉本)
4. 第 70 回日本化学会賞 細胞夾雑系有機化学の開拓 (A01 計画班 浜地)
5. The Imbach-Townsend Award (A02 計画班 杉本)
6. 2020 年度日本薬学会賞 (A01 公募班 二木)
7. 日本化学会 第 7 回女性化学者奨励賞 (A02 計画班 建石)
8. 日本化学会第 68 回進歩賞 (A03 計画班 安井)

ホームページ等

<http://www.bunshi-kyouzatsu.jp>