

Institute for Innovative NanoBio  
Drug Discovery and Development



# 平成22年度 革新的ナノバイオ創薬研究拠点 活動報告書

革新的ナノバイオ創薬研究の推進  
— 国立 - 私立大学間 薬工連携プロジェクト —

京都大学大学院薬学研究科／ウイルス研究所・立命館大学理工学部

# 目 次

|    |                       |    |
|----|-----------------------|----|
| ■  | はじめに                  |    |
| ■  | 事業概要                  | 1  |
| ■  | 活動成果                  | 5  |
| 1. | 連携支援ユニット              | 7  |
| 2. | 先進ナノバイオ研究ユニット         | 10 |
| 3. | 薬物送達研究班               | 15 |
| 4. | 医薬創出研究班               | 23 |
| ■  | シンポジウム                | 31 |
|    | 『第2回 ナノバイオ創薬研究シンポジウム』 |    |



平成 22 年度

## 革新的ナノバイオ創薬研究拠点 活動報告書

### は じ め に

革新的ナノバイオ創薬研究拠点は、2 年目を無事終了致しました。本拠点は、京都大学-立命館大学の国立私立大学連携や薬工連携によるバイオテクノロジーとナノテクノロジーの融合などを基盤とした革新的創薬研究の推進を目的とし、本拠点到所属する京都大学薬学研究科、ウイルス研究所、立命館大学理工学部の3機関の研究者によって推進されています。



これまで、本拠点では、癌などの難治性疾患の克服を可能とする治療薬、治療システムの開発を目指して、学際融合的研究の推進と最先端創薬科学の研究・教育体制を確立すると共に、近未来の薬物療法を担う医薬品や医療機器の開発さらに次世代ナノバイオ研究を牽引する優れた人材の養成に取り組んでまいりました。特に、その活動の一環として、薬学研究科におきましては若手研究者を対象とした拠点研究推進のためのプロジェクトを選定して、革新的なナノバイオ創薬技術の開発にも取り組みました。また、研究活動と平行して、2 年目の研究活動を広く社会に発信する事を目的に、拠点主催の「第2回ナノバイオ創薬研究シンポジウム」を平成23年3月に開催致しました。

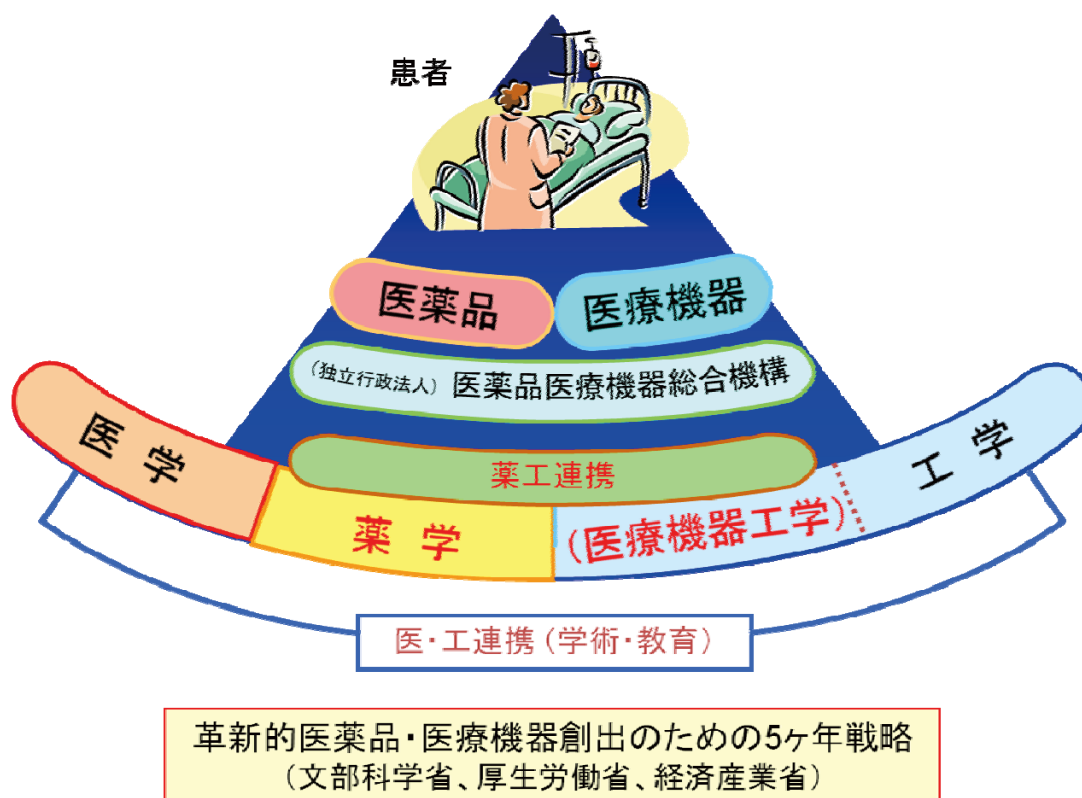
ここに平成 22 年度の活動状況と研究業績をまとめました。本拠点事業の運営に際し、お世話になりましたご関係の皆様には厚くお礼を申し上げますと共に、今後とも本拠点の発展にご支援を賜りますようお願い申し上げます。

革新的ナノバイオ創薬研究拠点 拠点長 佐治 英郎  
(京都大学大学院薬学研究科長)



### ■ 組織の構成

拠点の組織体制は大きく、薬工連携の推進を担当する教員と連携を側面より支援するシニア・リサーチ・フェローから構成される“連携支援ユニット”、新進気鋭の研究者を集め革新的な癌化学療法確立などを目指して遺伝子改変、有機合成化学、体内ロボット、ナノ素材などを駆使した創薬研究を推進する“先進ナノバイオ研究ユニット”、さらにそれぞれの連携機関の既設分野の教員が兼任で参加する“薬物送達研究班”と“医薬創出研究班”とから構成されます。



### ■ ユニット・研究班の役割

“連携支援ユニット”は、共同研究の推進とともに、戦略的な事業推進に向けて、大学間共同研究のマネジメント、産学連携、次世代ナノバイオ研究者の育成、革新的医薬品・医療機器の開発を担うグローバルリーダー養成教育などを担当します。また、拠点における研究成果を、企業参画により医薬品・医療機器の創出に迅速に展開する機能も担います。

“薬物送達研究班”と“医薬創出研究班”はそれぞれ主要課題として、立命館大学との連携による DDS 技術開発、また、ウイルス研究所や薬学研究科医薬創生情報科学専攻との連携による動物モデル評価系の構築や新規抗癌リード薬物の検索を担当します。

## ■ 運営体制

### 拠点長

佐治英郎（京都大学薬学研究科）

### 連携支援ユニット

土居孝行（京都大学大学院薬学研究科）

樋口ゆり子（京都大学大学院薬学研究科）

清水一憲（京都大学大学院薬学研究科）

### 先進ナノバイオ研究ユニット

高橋清大（京都大学大学院薬学研究科）

林 豊（京都大学大学院薬学研究科）

松尾雅博（京都大学大学院薬学研究科）

木村寛之（京都大学大学院薬学研究科）

武井義則（京都大学大学院薬学研究科）

MIYAZATO Paola（京都大学大学院薬学研究科）

### 薬物送達研究班

橋田 充（京都大学大学院薬学研究科）

山下富義（京都大学大学院薬学研究科）

高倉喜信（京都大学大学院薬学研究科）

西川元也（京都大学大学院薬学研究科）

牧川方昭（立命館大学理工学部）

小西 聡（立命館大学理工学部）

野方 誠（立命館大学理工学部）

### 医薬創出研究班

掛谷秀昭（京都大学大学院薬学研究科）

服部 明（京都大学大学院薬学研究科）

松岡雅雄（京都大学ウイルス研究所）

佐藤賢文（京都大学ウイルス研究所）

小柳義夫（京都大学ウイルス研究所）



## 京都大学と立命館大学との連携協力

京都を代表する国私2校による協力融合・相互連携により、2校の学術交流を促進し、研究・教育内容の充実と学術・文化の発展および科学技術の高度化を追求する

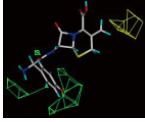


### 薬工連携によるバイオテクノロジーとナノテクノロジーの融合

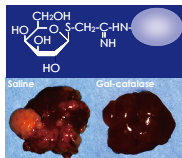
京都大学薬学研究所の保有するBT(バイオテクノロジー)



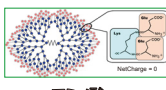
薬物体内動態の精密制御(DDS)



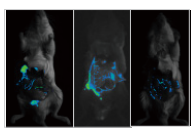
体内動態制御を  
目指した分子設計



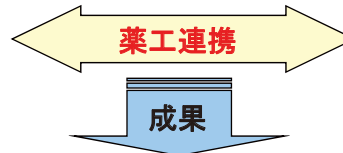
細胞特異的送達による  
がん転移抑制



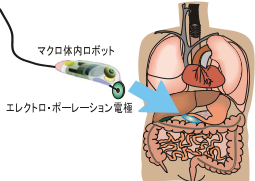
アミノ酸  
デンドリマー型キャリア



細胞特異的量子ドットによる  
癌イメージング

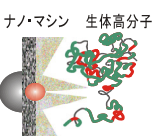


近未来



マクロ体内ロボット  
エレクトロ・ポレーション電極

マイクロ体内ロボットが高分子薬物を直接細胞内に送り込む(マイクロ体内ロボットによるDDS)



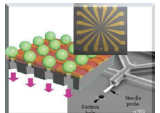
ナノ・マシン 生体高分子

ナノ・マシンによって、生体高分子を直接ナノ・オペレーションする(生体高分子のナノ・オペレーション)

立命館大学の保有するNT(ナノテクノロジー)



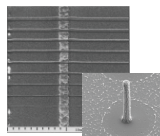
マイクロ体内ロボット  
本体(30\*15\*7mm)



細胞インターフェース



マイクロポンプ



医療用吸盤デバイスに  
設置したDDSデバイス



カーボンの各種  
微細構造の形成

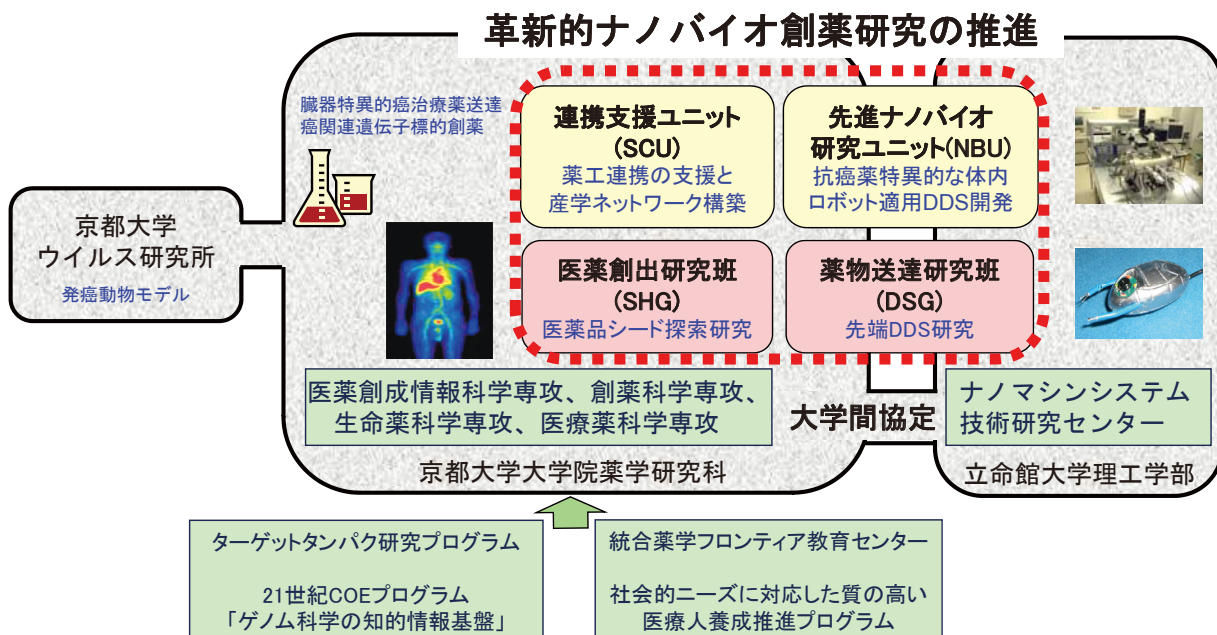


ナノマシンシステム  
技術研究センター



SRセンター

## 革新的ナノバイオ創薬研究拠点の組織と活動



また、本拠点の概要および成果などの公開を目的に、本拠点の webpage を立ち上げ、関連する組織にトップページをリンクさせている。具体的には、シンポジウムの案内や、業績の公開などを行っている。

革新的ナノバイオ創薬研究拠点ホームページ URL :

[http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/innovative\\_nanobio/](http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/innovative_nanobio/)

京都大学 | 京都大学大学院薬学研究科 | 京都大学ウイルス研究所 | 立命館大学 | 立命館大学理工学部 | [English](#)



京都大学大学院薬学研究科

革新的ナノバイオ創薬研究拠点



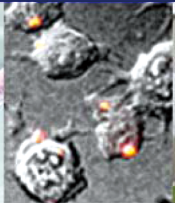
HOME

概要

メンバー

研究活動

お問い合わせ・アクセス



ごあいさつ

この度、京都大学大学院薬学研究科の附属施設として革新的ナノバイオ創薬研究拠点が新設されました。本拠点は、京都大学-立命館大学の国立私立大学連携や薬工連携によるバイオテクノロジーとナノテクノロジーの融合などを基盤とした革新的創薬研究の推進を目的として設置されたもので、癌などの難治性疾患の克服を可能とする治療薬、治療システムの開発を目指して、学際融合的研究の推進と最先端創薬科学の研究・教育体制の確立に取り組むと共に、近未来の薬物療法を担う医薬品や医療機器の開発さらに次世代ナノバイオ研究を牽引する優れた人材の養成を目指します。

京都大学大学院薬学研究科は、諸学問領域の統合と演繹を通じて創造的な薬学の“創”と“療”の拠点を構築し、先端創薬科学・医療薬学研究を遂行して人類の健康と社会の発展に貢献することをミッションとしています。本拠点形成は革新的なナノバイオ創薬技術の開発を推進し、わが国の創薬研究に大きく貢献するものと考えます。

ご関係の皆様には、今後とも本拠点の発展にご理解とご支援を賜りますようお願い申し上げます。

革新的ナノバイオ創薬研究拠点 拠点長  
佐治 英郎  
(京都大学大学院薬学研究科長)

Information

2011/06/24

メンバーを更新しました

2011/03/05

『[第二回ナノバイオ創薬研究シンポジウム](#)』を開催しました

2010/10/10

研究活動を更新しました

2010/06/18

清水助教が[第26回日本DDS学会にて優秀発表者賞を受賞](#)しました

2009/12/05

『[第一回ナノバイオ創薬研究シンポジウム](#)』を開催しました

2009/10/01

新メンバーを加えて組織が完成致しました

2009/06/18

ホームページを開設

2009/04/01

革新的ナノバイオ創薬研究拠点発足

Copyright (C) 2011 Institute for Innovative NanoBio Drug Discovery and Development, Graduate School of Pharmaceutical Sciences. All Rights Reserved.

4

### 1. 連携支援ユニット

|              |       |
|--------------|-------|
| 京都大学大学院薬学研究科 | 土居孝行  |
| 京都大学大学院薬学研究科 | 樋口ゆり子 |
| 京都大学大学院薬学研究科 | 清水一憲  |

### 2. 先進ナノバイオ研究ユニット

|              |      |
|--------------|------|
| 京都大学大学院薬学研究科 | 高橋清大 |
| 京都大学大学院薬学研究科 | 林 豊  |
| 京都大学大学院薬学研究科 | 松尾雅博 |
| 京都大学大学院薬学研究科 | 木村寛之 |
| 京都大学大学院薬学研究科 | 武井義則 |

### 3. 薬物送達研究班

|                |      |
|----------------|------|
| 京都大学大学院薬学研究科   | 橋田 充 |
| 京都大学大学院薬学研究科   | 高倉喜信 |
| 立命館大学総合理工学研究機構 | 牧川方昭 |
| 立命館大学理工学部      | 小西 聡 |
| 立命館大学理工学部      | 野方 誠 |

#### 拠点研究推進

|              |      |
|--------------|------|
| 京都大学大学院薬学研究科 | 加藤洋平 |
| 京都大学大学院薬学研究科 | 泉 安彦 |
| 京都大学大学院薬学研究科 | 白川久志 |
| 京都大学大学院薬学研究科 | 高橋有己 |
| 京都大学大学院薬学研究科 | 山内 肇 |
| 京都大学大学院薬学研究科 | 矢野義明 |

### 4. 医薬創出研究班

京都大学大学院薬学研究科 掛谷秀昭

京都大学ウイルス研究所 松岡雅雄

京都大学ウイルス研究所 小柳義夫

#### 拠点研究推進

京都大学大学院薬学研究科 伊藤美千穂

京都大学大学院薬学研究科 塚野千尋

京都大学大学院薬学研究科 中野 実

京都大学大学院薬学研究科 木村郁夫

京都大学大学院薬学研究科 中津 亨

京都大学大学院薬学研究科 山田健一

京都大学大学院薬学研究科 大野浩章

## 平成 22 年度 革新的ナノバイオ創薬研究拠点における 活動報告

京都大学大学院薬学研究科 革新的ナノバイオ創薬研究拠点

シニア・リサーチ・フェロー 土居孝行



平成 22 年度の成果について報告する。

革新的ナノバイオ創薬研究拠点のミッションの一つである次世代ナノバイオの研究者育成・教育体制の確立について以下の活動を行った。

神経薬理分野のセミナーに参加し、コメントやアドバイスするなどをした。2 回生と 3 回生を対象とする生理学に関する講義および、学部 1 回生、院 1 回生を対象にした企業における医薬品研究開発のプロセスの概要および製薬企業が抱えている研究開発の問題点についての講義を行った。また、3 回生を対象とする医薬品開発演習の企画・立案に参画するなどの教育活動も行った。

研究成果の産業界への技術移転について研究者と意見交換をおこない、企業からの情報収集にも努めた。

なお、先天性無痛病に関するミニレビューの投稿をした。(土居孝行、医学の歩み、234(3),231,2010)



## 幹細胞の蛍光標識法の開発と in vivo イメージングへの応用

京都大学大学院薬学研究科 革新的ナノバイオ創薬研究拠点

特定助教 樋口ゆり子



間葉系幹細胞、ES 細胞や iPS 細胞など多分化能を有する細胞を投与することにより、これまで治療困難であった難治性疾患の治療が可能になることが期待されている。しかしながら、治療メカニズムは未だ不明な点が多く、効果的な治療法を開発するためには、投与した細胞の挙動を内在性の細胞と区別して追跡・評価することが重要であると考えられる。

幹細胞の体内挙動を追跡する主な方法として、PET、MRI、蛍光・発光イメージングがある。それぞれ、固有の特長を有するが、我々は、1 個の細胞を可視化できる点、多色の組み合わせ標識が可能である点から、幹細胞を蛍光標識する方法を選択し、生きたマウス体内における幹細胞の挙動を蛍光リアルタイムイメージングにより可視化するための方法論の開発に関する研究を行っている。

本年度は、量子ドットを用いて幹細胞を標識できる時間の長期化に関する研究、および立命館大学小西研究室と共同で、生きたマウスの生体内における細胞挙動を蛍光リアルタイムイメージングで可視化する方法の基盤技術として、観察したい組織を対物レンズの視野内に固定するためのデバイス開発を行った。

量子ドットは励起光に対して極めて安定であり、強い蛍光を発光する点において *in vivo* イメージングに適している。移植後の間葉系幹細胞の追跡を行うには、*ex vivo* で蛍光標識が可能であるという利点があるが、間葉系幹細胞は微粒子の取り込み効率が極めて低いこと、さらに、エンドサイトーシスを介して細胞に取り込まれた後、エンドソーム、リソソームと pH の低い環境へ移行するにつれて蛍光が退色することが問題となる。そこで、我々は、アミノ基を多数有する PAMAM デンドリマーが、表

面に正電荷を有する事および酸性環境において buffering capacity を有する事に着目し、PAMAM デンドリマー修飾量子ドットを作成した。PAMAM デンドリマー修飾により、量子ドットに正電荷を付加することができ、負電荷を帯びた細胞膜に接着しやすくなり、細胞内への取り込みを促進することができた。また、PAMAM デンドリマー修飾量子ドットは、非修飾の量子ドットと比較し、エンドソームからサイトゾルへの移行が促進された。さらに、培養細胞の状態および蛍光標識された細胞がマウスへ移植された状態、いずれの場合においても量子ドットによる蛍光標識の観察可能な期間を延長することができた。

並行して、組織固定デバイスの開発を行った。横隔膜直下にある肝臓は、呼吸による動きの影響を直接受けるため、たとえ麻酔下のわずかな動きであっても顕微鏡下でのリアルタイム観察は不可能である。そこで、シリコンゴム製の臓器固定デバイスを作成し、これにより麻酔下のマウスの肝臓を対物レンズの視野内に固定することができた。肝臓を固定して、量子ドットを尾静脈内投与したところ、血管内の細胞の動きをビデオレートで撮影できた。

以上、本年は、幹細胞の効率的な蛍光標識を目的とした量子ドットの開発、並びに、生きたマウスの肝臓内を観察するための組織固定デバイスの開発を行った。

1. 樋口ゆり子「機能性量子ドットによる細胞の体内動態追跡」The review of laser engineering 38(6), 447-452 (2010)
2. Y. Higuchi, C. Wu, K.L. Chang, K. Irie, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida: Polyamidoamine dendrimer-conjugated quantum dots for efficient labeling of primary cultured mesenchymal stem cells. Biomaterials. in press.

## 生体組織核酸導入法への MEMS 技術の応用

京都大学大学院薬学研究科 革新的ナノバイオ創薬研究拠点  
特定助教 清水一憲



私は本拠点において、連携支援ユニットの一員として京都大学薬学研究科と立命館大学理工学部との連携研究を推進している。本稿では 2 年目の成果と 3 年目への展望を示す。

生体臓器・組織への核酸導入法は、難治性疾患の遺伝子治療や動物個体レベルでの遺伝子機能解析などに必要な技術である。我々は生体臓器・組織への核酸導入法である組織押圧核酸導入法（押圧法）[1]に MEMS 技術を応用した研究を進めている。

これまでマウス腎臓に押圧法を適用する場合、麻酔後開腹し目的組織を直接押圧するという手法が用いられてきた。このため一匹のマウスに対して繰り返し押圧法を行うのは、そのマウスの腹腔を何度も開ける必要があり、困難であった。そこで我々は体内完全埋め込み型組織押圧マイクロシステムを開発した（図 1）。これによりマイクロシステムを移植したマウスでは体の深部にある腎臓を開腹せずに押圧することが可能になった[2]。我々はこの成果により、日本 DDS 学会学術集会（大阪）において優秀発表者賞を受賞した。また MEMS 分野最高峰の学会である IEEE MEMS 2011（メキシコ）にて口頭発表を行った。本国際会議の採択率は 39%（口頭発表への採択率は 5%）であった。これらのことから本成果に対してある一定の評価を得られたと考えている。今後、開発したシステムを用いて繰り返し押圧法を行い、押圧法による核酸導入の長期的効果を明らかにしていきたい。また我々は臨床応用を目指した研究も進め、低侵襲な核酸導入手法の開発に成功している（特許出願済）。

我々は押圧法のメカニズム解明を目指し、培養細胞を用いた研究も行っている。押圧法では押圧した組織内の細胞に伸展刺激が加わって

いると考えられる。そこで培養細胞に対して様々な大きさの伸展刺激を与えられるマイクロデバイスの開発を行った[3]。今後は開発したデバイスを用いて押圧法のメカニズム解明を目指す。

その他にも動物代替創薬技術として、薬剤スクリーニングチップ、幹細胞分化培養チップなどの開発も行っている。3 年目となる 2011 年度は先に述べた課題とこれらの課題に取り組む予定である。

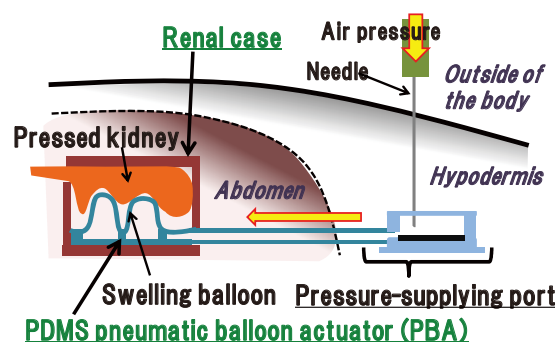


図 1、開発したマイクロシステムの概略図

1. Mukai H, Kawakami S, Hashida M. Renal press-mediated transfection method for plasmid DNA and siRNA to the kidney. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 372:383-387, 2008.
2. Shimizu K, Mori Y, Hayashi K, Shunori A, Kawakami S, Hashida M, Konishi S. Gene delivery in mice using an implanted pneumatically-actuated microsystem. *IEEE MEMS2011*, 181-184, 2011.
3. Shimizu, K., Shunori, A., Morimoto, K., Hashida, M., Konishi, S. Development of a Biochip with Serially Connected Pneumatic Balloons for Cell-stretching Culture, Sensors and Actuators B: Chemical, Accepted.

## 自然免疫におけるセンサータンパク質の研究とその応用

京都大学大学院薬学研究科 革新的ナノバイオ創薬研究拠点

特定助教 高橋清大



生体はウイルスや細菌の感染時、免疫機構を用いてこれら異物の排除を行う。これは自然免疫と呼ばれる免疫機構であり、幅広い種が生まれながらにして持つ。自然免疫はセンサータンパク質を用いて異物の大まかな構成成分を認識することで誘導される。本研究では、生体の持つセンサータンパク質がいかにより異物を認識するかの解明を目的としている。また、この異物に対する特異性の応用を模索する。2010年度は、以下の二つの研究について進捗があった。

## 1) RIG-I の活性化機構の解明

RIG-I (Retinoic acid-inducible gene-I) は我々の体におけるウイルスに対するセンサータンパク質であり、ウイルスにのみ見られる特殊な二次構造を持った RNA を認識する。本研究ではこのタンパク質がいかにより、ウイルス由来の RNA を認識するか。また、それによりいかにより、下流へとシグナルを伝達し、抗ウイルス作用を誘導するかについて研究を行っている。

2009 年度において、本研究では立体構造を元にした様々な変異体を RIG-I に導入しその影響を調べた。2010 年度では引き続き RIG-I における変異体の解析を行った。その結果、RIG-I における 30 アミノ酸からなる領域(自己阻害領域)が、活性化の調節を行っている事が明らかとなった。RIG-I はこの自己阻害領域を用いてタンパク質全体をコンパクトな構造にしており、RNA の結合とそれに続く ATP の分解を伴った構造変化が自己阻害領域をはがす事により、シグナル伝達可能な活性化型に移行することがわかった。現在はこの領域における知見を集め、RIG-I の活性化機構への詳細な知見を得るべく実験を行っている。

2)  $\beta$ GRP を用いた新規アフィニティータグの開発

$\beta$ GRP ( $\beta$ -1,3-glucan recognition protein)は昆虫に見られる真菌に対するセンサータンパク質である。このタンパク質は真菌の細胞壁に存在する $\beta$ グルカンの特異的に結合して初期の生体防御を誘導する。我々は $\beta$ GRP の立体構造を解き明かし、 $\beta$ グルカン結合メカニズムの解明を行った(1)。

2010 年度はこの知見を用い $\beta$ GRP を用いたアフィニティータグ(GRP タグ)の開発を行った。様々なタンパク質を $\beta$ GRP との融合タンパク質として大腸菌の系を用いて発現させ、ビーズ状にした固体の $\beta$ グルカンに結合させ、ビーズを緩衝液で洗うことで精製を行った。

タンパク質を用いたアフィニティータグとしては GST が有名である。GST タグと GRP タグを比較したところ、同じタンパク質にそれぞれのタグを付け発現精製した場合、ほぼ同等の精製度が得られた。また、GST タグに比べ GRP タグにおいて 2 倍以上の収量が得られた。これは GST に比べ GRP タグがより小さい分子量を持つためと考えられる。また、GST タグでは発現精製が不可能であった、上述の RIG-I を GRP タグを用いたところ、活性を持ったまま高い精製度で得ることができた。

以上から GRP タグは新規アフィニティータグとして有用であり、今後における様々な応用が期待できる。

(1) Takahasi, K., Ochiai, M., Horiuchi, M., Kumeta, H., Ogura, K., Ashida, M., and Inagaki, F. Proc. Natl. Acad. Sci.

## コンビナトリアル生合成を用いた新規創薬リード化合物の創製研究

京都大学大学院薬学研究科 革新的ナノバイオ創薬研究拠点

特定助教 林 豊



我々は、微生物が生産する二次代謝産物の生合成研究を基盤とした、新規有用活性物質の創製を目的に研究を行っている。これまでに、糸状菌 *Neosartorya* sp. から血管新生阻害化合物 (Azaspirene<sup>1</sup>) の推定生合成遺伝子群を取得している。そこで今回、Azaspirene 生合成経路の詳細な解析を試みた。また、さらなる遺伝子資源の取得を目的に、放線菌より新たな二次代謝産物の生合成遺伝子群の取得を行った。

## (1) Azaspirene 生合成経路の解析

これまでに、Azaspirene 生産菌 *Neosartorya* sp. から、20kbp にわたる 5 つの遺伝子から成る推定 Azaspirene 生合成遺伝子群を見出している。また、その生合成遺伝子群を構成する遺伝子の種類、染色体上での順序などは、*Aspergillus fumigatus* Af293 株の Pseurotin A 生合成遺伝子群と同じであった。そこで、Azaspirene の生合成経路の詳細を明らかにするため、遺伝子破壊株の作製と、異種宿主による推定遺伝子群の発現を試みた。糸状菌の形質転換は菌株の違いにより方法が異なるため、最適な条件を設定することが必要であった。そこで、*Neosartorya* sp. の形質転換法の確立を試みた。培養菌体を、ヤタラーゼと Lysing enzymes で処理し、プロトプラスト化を行い、PEG と Ca 存在下でハイグロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドを導入し、選択薬剤による形質転換体の選抜を行った。その結果、ハイグロマイシン含有培地に 100 株以上の耐性株が生育し、コロニーPCR によって形質転換を確認することが出来た。

現在、取得している推定 Azaspirene 生合成遺伝子群は大腸菌でのみ複製可能なプラスミドに導入されている。そこで、Azaspirene 非生産株での異種宿主発現を行うため、遺伝情報を基に、PCR や各種制限酵素を用いて遺伝子発現

ベクターの再構築を行った。作製した遺伝子発現ベクターを異種宿主である *A. oryzae* M-2-3 株へプロトプラスト・PEG 法で形質転換し、選択薬剤であるピリチアミンを用いて推定 Azaspirene 生合成遺伝子群を導入した形質転換体の取得に成功した。

## (2) RQN-18690A 生合成遺伝子群の取得

RQN-18690A<sup>2</sup>) は放線菌 *Streptomyces* sp. QN18690 株が生産する血管新生阻害化合物であり、テトラヒドロピラン環の側鎖上にエポキシ基、メチル基等を有するポリケタイド化合物である。そこで、まず始めに、RQN-18690A の生合成に関与する PKS 遺伝子を PCR によって取得した。次いで周辺領域の塩基配列を解析した結果、エポキシダーゼ遺伝子 (*S. avermitilis* と 51% の相同性) が存在し、メチル化に関与するメチルトランスフェラーゼ様遺伝子 (*S. lavendulae* と 48% の相同性)、水酸化に関与する p450 様遺伝子 (*S. coelicolor* と 47% の相同性) など、50kb にわたって 6 つの遺伝子から成る推定 RQN-18690A 生合成遺伝子群が見出された。

## References

1. Asami Y, Kakeya H, Onose R, Yoshida A, Matsuzaki H, Osada H. *Org. Lett.*, 4, 2845-2848, 2002
2. 長田裕之、掛谷秀昭、永井浩二、武田靖代、柴崎充至. 特開 2004-269456.

## 学会発表

1. 林 豊、中村拓朗、大島健志朗、服部正平、長田裕之、掛谷秀昭. 2010 年度 (第 25 回) 日本放線菌学会大会, 千葉, 9 月, 2010.

## 視交叉上核における、概日リズム調節因子解明による 創薬ターゲットの同定

京都大学大学院薬学研究科 革新的ナノバイオ創薬研究拠点  
特定助教 松尾雅博



体内時計の異常で生じる概日リズム睡眠障害は、社会のグローバル化・24 時間化に伴い増大しており、交通事故・原子力事故の原因となるなど社会的損失が大きい。さらに最近では概日リズム睡眠障害は、生活習慣病やうつ病などとの関連も明らかにされており、その病態解明・治療法開発は急務である。

生体時計の中心は視床下部の視交叉上核に存在しており、全身を調律している。視交叉上核は数千個の神経細胞で構成されており、その全細胞内に時計遺伝子群が構成する約 24 時間周期の転写・翻訳のフィードバックループ(コアループ)が存在すると言われている。

このコアループは刺激反応性を有しており、目から得られた光情報により一部の時計遺伝子発現が誘導される。これによりコアループの位相が変更され、時差などの光環境の変化に体内時計が適応する機構となっている。

さらに、コアループの時計遺伝子により転写が調律される一群の遺伝子が存在している。これらの遺伝子が体内時計の出力遺伝子として機能し、細胞生理機能が調節されると考えられている。

このように、コアループの遺伝子転写を中心とする細胞内イベントの解明は進んでいるが、残念ながら視交叉上核を構成する数千個の神経細胞個々の時計がどのように同期されるかは分かっていない。視交叉上核細胞個々の同調は視交叉上核がリズムセンターとして全身を制御するために必須である。どのような機構で神経細胞が視交叉上核内で連絡を取り合い同期し、強力なリズムを発振するのであろうか？どのような因子が視交叉上核から出て、全身のリズムを統合するのであろうか？睡眠障害の病理・治療法を確立するには、この機構の解明

を避けて通ることはできない。

以上のことを解明し、これらの分子機能に基づいた同調をするため、我々は様々なレベルで視交叉上核の機能解析を行った。

コアループを中心とした解析から、細胞生理機能調節・細胞間連絡など細胞レベル・組織レベルへと展開するためには、数千個に及ぶ視交叉上核細胞個々の細胞生理機能の可視化や、神経間連絡状況の記録など、ナノスケールでの機能解析が必要となる。

現在、我々は概日リズム睡眠障害治療薬の標的分子となり得る分子として、視交叉上核に存在する複数の細胞生理制御分子を新たに同定した。

これら分子の機能検索のため、視交叉上核での遺伝子経時的発現量の変化プロファイリングを行い、さらに電気生理学的手法を用いた細胞生理機能の実験を行った。また、微細ミセル化技術を用いた視交叉上核急性スライスへの蛍光色素投与を行った。ミセル化蛍光色素投与により、細胞内セカンドメッセンジャーの持続計測が可能となり、生体時計と細胞生理機能調節機構の関係が明らかにできると考えられた。

実際、同定した分子の欠損により視交叉上核神経細胞内で細胞内カルシウム濃度に代表されるセカンドメッセンジャー量に影響が出ることが確認され、さらにその結果として時計遺伝子の転写リズムが影響を受けることが示された。

## 分子イメージング法を用いた DDS への応用に関する研究

京都大学大学院薬学研究科 革新的ナノバイオ創薬研究拠点  
特定助教 木村寛之



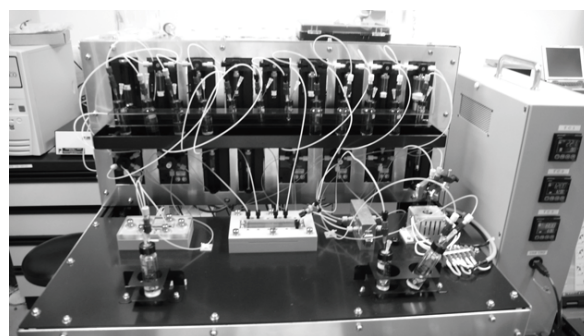
ナノテクノロジー領域から創出されたナノ材料を、DDS の分野に応用する試みが広く展開されている。すなわち、ナノ材料を薬物の徐放化・長寿命化・吸収促進・ターゲティングなどに活用し、薬物の機能や動態を精密に制御することを目的とした DDS 製剤の開発が精力的に行われている。この動態制御は特にがん治療の領域で大きく注目されており、薬物を効率的にがんへ送達するための手段の構築が非常に重要な研究テーマである。海外では、幾つかの DDS 製剤が認可され、さらにわが国でも高分子ミセル製剤の臨床試験が開始されるなど、DDS 製剤に対する期待が益々高まっている。

一方、分子イメージング技術は組織/細胞レベルにおいて生化学的・分子生物学的なプロセスの可視化を可能とし、基礎研究・臨床研究・創薬研究などへの応用が期待されている。その中でも陽電子断層撮像法 (PET) は、生体内の標的分子に特異的に結合する化合物を陽電子放出核種 (PET 核種) にて標識し、これを生体に投与後、撮像する非侵襲的分子イメージング技術である。PET の特長として高い定量性を有するため、目的の部位に到達した薬物量を *in vivo* にて評価できる。すなわち、DDS 製剤に PET 核種を導入し、その体内動態を *in vivo* で追跡、定量化することにより、開発のより初期段階における簡便な評価が可能となる。これは DDS 研究において PET が候補化合物の探索やリード化合物の最適化に非常に有益な情報を提供しうることを意味するものである。このように、分子イメージング技術と DDS 技術の融合が今後の医薬品開発において非常に有用であると考えられる。

そこで本研究では、DDS 製剤の  $^{18}\text{F}$  標識化を行う目的で、蛋白質、高分子などの標識試薬と

して広く用いられている  $^{18}\text{F}$ SFB (N-succinimidyl 4- $^{18}\text{F}$ fluorobenzoate) の短時間合成法の確立と自動合成化を検討した。放射性物質を扱う反応では、用いる溶液量が微量であることから通常のバッチ合成法では限界があると考え、ナノ・マイクロ加工技術に着目し、マイクロリアクターを利用した合成反応とナノデバイスの構築を行った。種々反応条件を検討した結果、従来法では 1 時間以上必要であった合成時間が、マイクロリアクターを用いた one-flow 合成法では、合成時間 7 分で目的の  $^{18}\text{F}$ SFB が得られ、短時間合成が可能であることが明らかとなった。マイクロリアクターを用いた one-flow 合成法の有効性が示されたことから、次にマイクロ合成技術を基盤とした  $^{18}\text{F}$ SFB 自動合成装置の開発を行った。

まず、装置を 4 つのユニット ( $^{18}\text{F}$  濃縮ユニット、 $^{18}\text{F}$ SFB 合成ユニット、 $^{18}\text{F}$ SFB 精製ユニット、蛋白質、高分子標識ユニット) に分割し、自動合成ユニット等基盤技術を確立した。最終的に、全てのユニットを組み合わせた自動合成装置トータルシステムを構築し、 $^{18}\text{F}$ SFB の高効率合成を達成した。本装置を用いることで、今後 DDS の PET-動態評価が加速することを期待する。



開発した自動合成装置

## 腎炎治療分指標的医薬の開発

京都大学大学院薬学研究科 革新的ナノバイオ創薬拠点  
特定助教 武井義則



我が国における慢性腎臓病患者は約1300万人にのぼると言われており、そのうち人工透析を必要とする患者がおよそ29万人を占めます。さらに毎年1万人以上の規模で透析治療を必要とする患者数が増加しております。腎炎は積極的な早期治療により腎不全への進展を遅延または抑止できることから、その早期発見・早期治療が最も重要ですが、現在腎炎の薬物治療は免疫抑制剤による炎症抑制が主であり、未だ根本的な治療法を欠いています。患者のQOL(Quality of Life)の観点から、また、現在1兆円を超える医療財政という観点からも効果的な腎炎治療法の開発が望まれています。

我々は、動物病態モデルの発現プロファイル解析に基づく多因子疾患の病態・治療関連遺伝子解析の手法を腎炎の創薬、新規治療法開発に応用し、蛋白質リン酸化酵素 CK2(カゼインキナーゼ 2)を腎炎治療標的分子として見いだしました。CK2 の発現量は、腎炎にともなう糸球体傷害と密接に関連して著しく増大しました。腎炎モデルラットを用いて天然物由来の CK2 阻害薬の投与を検討した所、腎機能、腎臓障害の改善がみられる一方で、精巣アポトーシス反応増強が観察されました。この副作用は、CK2 阻害薬が腎炎で誘導された CK2 活性サブユニット  $\alpha$  だけでなく、精巣に発現しているもう一つの CK2 活性サブユニット  $\alpha'$  をも阻害してしまう事で引き起こされる事を明らかにしました。

精巣毒性の回避を目的として、 $\alpha$ 、 $\alpha'$  の 2 種のアイソザイムの構造生物情報に基づき in silico で低分子化合物の分子設計、ドッキング実験、フォーカスライブラリー合成、HTS 活性評価系によるスクリーニングを行い、候補化合物の選択を行ってきました。その結果、これ

までに最も強力な合成 CK2 阻害薬、cc-4791 と同等程度の阻害活性を有する新規骨格化合物の同定に成功しました。しかし、この新規化合物はアイソザイム選択性を示しませんでした。今回得られた結果をインシリコスクリーニングに再び利用する事で、アイソザイム選択性を備えた CK2 阻害薬を開発できると考えられます。

また、 $\alpha$  型選択的阻害剤の開発と平行して、RNA 干渉を利用して、 $\alpha$  型 CK2 活性サブユニットを特異的に阻害する方法を検討しました。 $\alpha$ 、 $\alpha'$  二種のアイソザイムそれぞれ特異的に RNA 干渉を引き起こす短鎖 RNA を設計し、その RNA 干渉能を、腎臓細胞の初代培養系で検証しました。その短鎖 RNA を腎炎モデルラットに導入したところ、腎炎によって引き起こされた尿タンパク量の増大に改善がみられました。さらに副作用などを詳細に検討しているところです。これらの取り組みから、副作用の無い腎炎治療薬候補が近い将来開発できると期待しています。

Yamada M, Katsuma S, Adachi T, Hirasawa A, Shiojima S, Kadowaki T, Okuno Y, Koshimizu TA, Fujii S, Sekiya Y, Miyamoto Y, Tamura M, Yumura W, Nihei H, Kobayashi M, Tsujimoto G. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 102: 7736-41, 2005

## 薬工連携に基づく新規薬物および遺伝子デリバリーシステムの構築

京都大学大学院薬学研究科 薬品動態制御学分野  
教授 橋田 充

遺伝子治療は癌や先天性疾患、生活習慣病等、様々な疾患に対して将来有望な治療法である。プラスミド DNA を用いた遺伝子導入法は、比較的免疫応答が低く安全性が高いが、遺伝子治療法を確立するためには、生体内の標的細胞に対して選択的かつ高効率な遺伝子発現を実現するためのキャリア開発が重要である。近年、物理刺激を利用した遺伝子導入法として、血管造影剤として臨床応用されているマイクロバブル製剤と超音波照射に基づく細胞穿孔を利用し、核酸医薬品の細胞質内導入量の増大を可能にするソノポレーション法が開発された。我々は、これまで、レセプターによる認識を介して標的細胞選択的にプラスミド DNA を送達可能な糖修飾リポソームを開発してきた。そこで、本年度は、ソノポレーション法と糖修飾による標的細胞選択的送達を融合した新たな遺伝子導入法の開発を行い、がん治療を目的とした DNA ワクチンへの応用を検討した。

まず、プラスミドをマンノース修飾リポソーム複合体として投与し、別途、バブルリポソームを投与し、標的部位に超音波を照射する方法により in-vivo 遺伝子発現効率の増強を試みた。その結果、バブルリポソームだけを投与して、超音波を照射した場合と比較し、マンノース修飾リポソームとプラスミド DNA の複合体と組み合わせて投与した場合は、肝臓および脾臓において有意に高い遺伝子発現が認められた。次に、バブルの封入とプラスミド DNA の複合体形成を同時に行える、超音波応答性と標的指向性を併せ持つ超音波応答性マンノース修飾リポソーム/プラスミド複合体を新たに開発した。本複合体形成によりプラスミド DNA の血中安定性が改善され、さらに、前述したプラスミド DNA/マンノース修飾リポソーム複合体と別途

バブルリポソーム製剤を投与する場合と比較し、肝臓及び脾臓において有意に高い遺伝子発現を得ることができた。また、この遺伝子発現はマンノース受容体発現細胞である肝非実質細胞や脾臓の樹状細胞に選択的に認められ、本方法により細胞選択的かつ高効率な遺伝子発現が得られた。

超音波応答性マンノース修飾リポソームにより、癌免疫療法の標的細胞である樹状細胞へ選択的かつ高効率に遺伝子導入が可能であることを利用して、DNA ワクチンへの応用を試みた。癌特異抗原発現プラスミドを用いて作成した超音波応答性マンノース修飾リポソーム/プラスミド複合体を用いた DNA ワクチン効果の評価を行った。超音波応答性マンノース修飾リポソーム/プラスミド複合体と超音波照射の併用により免疫誘導を行った脾臓細胞においては、標的癌細胞特異的な細胞傷害性 T 細胞の誘導効果が認められ、さらに長期的な増殖抑制効果が固形腫瘍ならびに転移性腫瘍に対して示された。以上、超音波応答性マンノース修飾リポソーム/プラスミド複合体と超音波照射を利用した DNA ワクチンは、癌転移・再発に対する治療法になり得る可能性が示された。

## References

1. Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Enhanced transfection efficiency into macrophages and dendritic cells by a combination method using mannosylated lipoplexes and bubble liposomes with ultrasound exposure. Hum Gene Ther. 21(1):65-74 (2010)
2. Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Development of an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier for DNA vaccine therapy. Biomaterials. 31(30):7813-26 (2010)

# インターフェロン遺伝子治療を目指したナノメディシンの設計 及び治療戦略の確立

京都大学大学院薬学研究科 病態情報薬学分野  
教授 高倉喜信



インターフェロン (IFN)  $\gamma$  は、抗ウイルス作用や細胞増殖抑制作用、免疫調節作用などの生理活性を有することから、C 型肝炎や種々の癌、さらにはアレルギー疾患治療への適用が期待されている。IFN- $\gamma$  の血中半減期は短いことから、これら慢性疾患への適用には IFN- $\gamma$  を長期にわたって供給可能な投与方法・デバイスの開発が必須である。治療用タンパク質をコードした遺伝子を導入する遺伝子治療は持続的な治療効果が期待できる治療法であり、IFN- $\gamma$  の慢性疾患への適用を可能にする治療法として期待されている。我々はこれまでに、IFN- $\gamma$  をコードしたプラスミド DNA (pDNA) の遺伝子導入により結腸癌細胞の肺や肝臓への転移抑制が可能であることを明らかにしている (1)。また、pDNA 中に多数存在する CpG モチーフが遺伝子発現の持続化を妨げている要因であり、これを削減した pDNA に IFN- $\gamma$  を組み込むことで、IFN- $\gamma$  の大幅な持続化に成功している (2-3)。また、開発した持続型 IFN- $\gamma$  発現 pDNA は、従来の短期発現型 IFN- $\gamma$  による治療は困難であった、慢性疾患である皮膚炎モデルにおいても治療効果を得られることも報告している (4)。

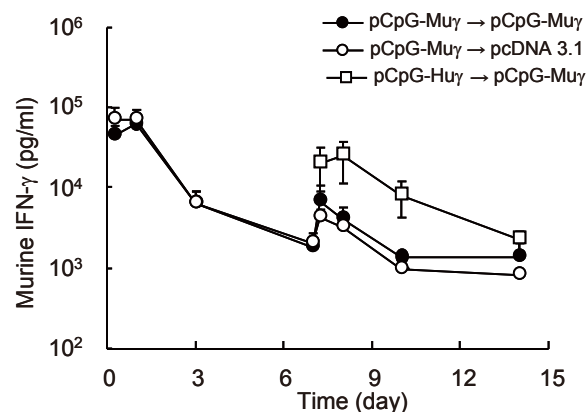
一方で、開発した持続型ベクターからの IFN- $\gamma$  の遺伝子発現も経時的に徐々に減少することから、長期にわたる治療には繰り返し投与も必要と考えられた。しかしながら、二度目に投与した IFN- $\gamma$  発現 pDNA からの遺伝子発現は著しく抑制されることが見出された (右図)。そこで、この IFN- $\gamma$  による遺伝子発現抑制機構を明らかにすることを試みた。IFN- $\gamma$  発現 pDNA を投与したマウスでは、その後に投与した pDNA からの遺伝子発現が顕著に抑制された一方、IFN- $\gamma$  発現 pDNA と同時または事前に

投与した pDNA からの遺伝子発現はほとんど抑制されなかった。

そこで IFN- $\gamma$  が pDNA の核デリバリー、転写、翻訳の過程に及ぼす影響を解析したところ、IFN- $\gamma$  によりレポーター pDNA の核移行量は mock 群の約 10%、mRNA とタンパク質量は約 1% にまで低下した。以上より、IFN- $\gamma$  は、外来性遺伝子の核へのデリバリーと転写を抑制すること、これが繰り返し投与したときの低い IFN- $\gamma$  発現の要因であることが推察された (5)。

## References

1. Kobayashi N, Kuramoto T, Chen S, Watanabe Y, Takakura Y. Mol Ther. 6(6):737-44, 2002.
2. Kawano H, Nishikawa M, Mitsui M, Takahashi Y, Kako K, Yamaoka K, Watanabe Y, Takakura Y. Int J Cancer 121(2):401-6, 2007.
3. Mitsui M, Nishikawa M, Zang L, Ando M, Hattori K, Takahashi Y, Watanabe Y, Takakura Y. J Gene Med. 11(5):435-43, 2009.
4. Hattori K, Nishikawa M, Watcharanurak K, Ikoma A, Kabashima K, Toyota H, Takahashi Y, Takahashi R, Watanabe Y, Takakura Y. J Immunol. 184(5):2729-35, 2010.
5. Zan L, Nishikawa M, Machida K, Ando M, Takahashi Y, Watanabe Y, Takakura Y. Gene Ther. in press.



# 生体内埋め込み型 DDS ロボットの開発研究 ーマルチ電極による深層筋の電気刺激ー

立命館大学理工学部 ロボティクス学科  
教授 牧川方昭



核酸医薬など、次世代薬剤といわれる薬剤は一般に分子量が大きく、そのままでは細胞は薬剤を吸収することができない。このような高分子薬剤の細胞への導入方法の1つとして“ハイパーポラリゼーション”と呼ばれる、電流で1時的に細胞膜を開く方法がある。ただ、この方法は、皮膚表面近くの細胞への薬剤導入には有効であるものの、肝臓細胞など、体幹深くに存在する細胞への導入は難しい状況にある。このような体幹深く存在する細胞への電流印加方法の開発の第1段階として、マルチ電極による深層筋の電気刺激を試みた。

図1にマルチ電極による深層筋の電気刺激の原理を示す。図1a)に示すように、前腕の周囲に8つの電極を配置し、図1b)に示すように、2組の電極を選び、同時に2つの刺激電流を流すと、その電流の交差位置の電流密度が上昇することを利用したものである。図に示されるように、前腕には手指の動きを司る筋が幾重にも重なっている。

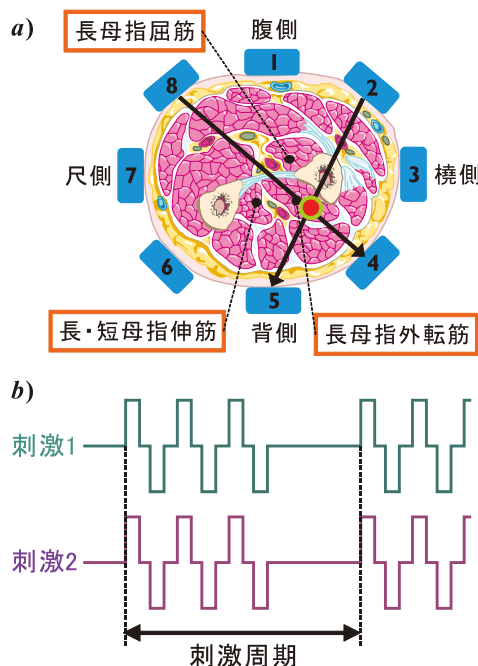


図1. マルチ電極による深層筋の電気刺激

この状態で、1組の電極を流れる電流ではいずれの筋も収縮を開始するには不十分な弱い電流を流し、2組の電極間の電流が重なる部位で電流が筋の収縮閾値を超すよう設定することで、深層の筋だけを選択的に電気刺激することができる。

図2は8つの電極を使った全ての2組の電極を使用することによって発生した手指の運動と、そのような手指運動に関係した筋の種類を推定した結果である。図3に、図2と対応させて示した実際の筋の構造を示すが、両者を比較して分かるように、ここに開発したマルチ電極による深層筋の選択的刺激が可能であることを示している。

更に刺激位置の精度、大きさのコントロール方法を開発予定である。

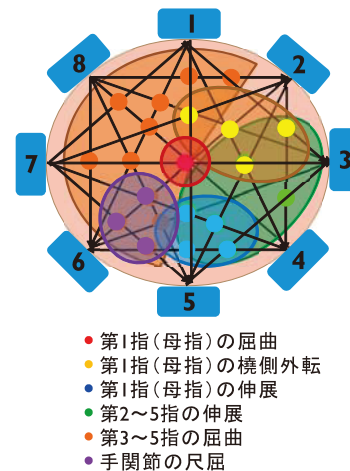


図2. 手指の反応運動と筋の推定分布

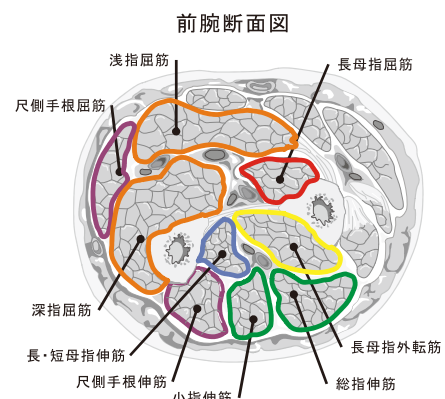


図3. 実際の前腕の筋の分布

## 薬学・工学連携を通じたマイクロマシン・MEMS の DDS 応用

立命館大学理工学部 マイクロ機械システム工学科  
教授 小西 聡



昨年に引き続き、革新的ナノバイオ創薬研究拠点において、京都大学・立命館大学双方の特徴を活かした薬工連携研究活動を推進している。立命館大学・小西研究室が推進するマイクロマシン、MEMS、さらには $\mu$ TASといった精密・微細な工学技術を薬学分野に適用し、薬工双方向の連携が生み出す効果を革新的な創薬研究につなげることを目指している。

我々が専門とするマイクロマシン・MEMSには、低侵襲な手術ツールへの応用にみられる比較的大きめのサイズのものから、バイオテクノロジー分野への適用を積極的に進めるマイクロチップ技術のような小さめのサイズのものまでさまざまな形態がみられる。立命館大学の我々の研究グループでは、立命館大学グローバルイノベーション研究機構（R-GIRO）により選定されたプロジェクト“MEMSとBMEのマルチスケールフュージョン研究”を推進し、マイクロマシン・MEMSが扱うことが期待されている様々なサイズのバイオメディカル分野の課題に対して取り組んできている。

本拠点における薬工連携では、R-GIROプロジェクトの研究活動をベースに、京都大学特定助教兼立命館大学 R-GIRO 客員研究員の清水氏を中心に、共同研究を開始した。二年目となった本年度は、マルチスケールの観点からは大きめのサイズとなる、生体臓器・組織への核酸導入法である組織押圧核酸導入法（押圧法）[1]へのマイクロマシン・MEMS技術の応用研究を重視して進めた。本年度は、体内完全埋め込み型組織押圧マイクロシステムを開発した。これによりマイクロシステムを移植したマウスでは体の深部にある腎臓を開腹せずに押圧することが可能になった[2]。この成果は、日本DDS学会学術集会（大阪）において優秀発表

者賞を受賞した。また MEMS 分野最高峰の学会である IEEE MEMS 2011（メキシコ）にて口頭発表を行った。当該研究では、我々が長年研究を進めてきた小さく、柔らかく、安全なマイクロバルーンアクチュエータ技術を利用しているおり、薬工連携の成果といえる。

さらに、我々は押圧法のメカニズム解明を薬物動態の観点から調べ、理解することを目指し、マイクロチップ上に細胞を培養したシステムに関する研究も行っている。押圧法を処方状態を再現すべく、培養細胞に対して様々な大きさの伸展刺激を与えられるマイクロデバイスの開発を行い、この成果も生化学チップ分野で最も権威ある学会の一つである $\mu$ TAS2010において発表する機会を得ている[3]。

本研究は、連携による新しい試みと方針が生み出されながら進んでおり、現在の研究内容をさらに深めながら、薬工連携の展開を目標に、今後も精力的に研究を推進していく。

1. Mukai H, Kawakami S, Hashida M. Renal press-mediated transfection method for plasmid DNA and siRNA to the kidney. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 372:383-387, 2008
2. Shimizu K, Mori Y, Hayashi K, Shunori A, Kawakami S, Hashida M, Konishi S. Gene delivery in mice using an implanted pneumatically-actuated microsystem. *IEEE MEMS2011*, 181-184, 2011
3. Shimizu, K., Shunori, A., Morimoto, K., Hashida, M., Konishi, S. Strain-gradation generator using serially connected microballoons for parallel testing of cell-stretching culture,  $\mu$ TAS2010, 1568-1570, 2010

## 診断治療用腹腔内ロボットによる臓器の硬さ計測

立命館大学総合理工学部 理工学部 ロボティクス学科  
准教授 野方 誠



現在、患者体内の診断、治療を低侵襲に行う医療装置として、体腔内に留置されているマイクロロボットを体外からの磁場印加により、自在に移動や回転をさせ、薬剤の注入、患部の切除や焼灼等の治療動作や検査動作を正確に実行することを目的として研究を進めている。

診断機能としてマイクロ体内ロボットを用いた臓器の硬さ情報の取得を目指し、硬さ計測方法の考案、機構の開発を通じ、硬さ情報の算出をいったので報告する。

硬さを計測する方法として、体内ロボットと硬さ測定対象である臓器を線形 1 自由度振動系のモデルで仮定し、図 1 に示す。運動方程式は、式(1)となる。

$$m\ddot{x} + c\dot{x} + kx = F_0 \sin \omega t \quad (1)$$

ここで、体内ロボットを外部磁場により外力を正弦波状とし、周波数帯域を変化させながら強制振動させる。臓器との接触状態において、図 2 に示す共振曲線が得られ、ここから共振周波数を計測し、得られた共振周波数の値と共振時における最大速度振幅の値とを式 (2) に代入し、硬さに相当する動的バネ定数  $k_d$  を算出する。

$$k_d = \frac{2\pi F_0 f_r^2}{\dot{x}_{\max}(f_2 - f_1)} \quad (2)$$

$F_0$  : 加振力,  $\dot{x}_{\max}$  : 最大速度振幅,

$f_r$  : 共振周波数,  $f_2 - f_1$  : 半値幅

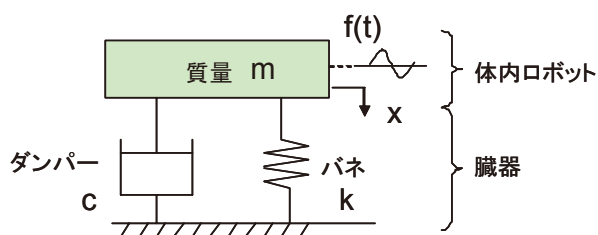


図 1 1 自由度系振動モデル

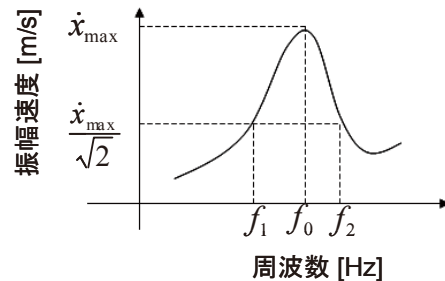


図 2 共振曲線

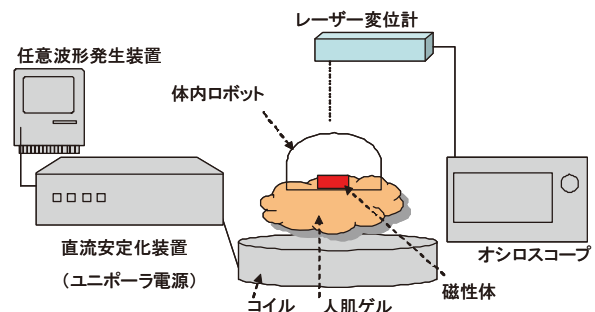


図 3 実験装置構成

臓器に見立てたシリコン材料 2 種 A,B を用いて、硬さ測定実験を行った。A について、共振周波数  $f_r$  は 5[Hz] である。共振周波数における最大速度  $\dot{x}_{\max}$  は、 $3.69 \times 10^{-2}$ [m/s] であった。半値幅  $f_1, f_2$  を算出し、3.6[Hz], 8.7[Hz] となった。B について、共振周波数  $f_r$  は 10[Hz] である。共振周波数における最大速度  $\dot{x}_{\max}$  は、 $2.0 \times 10^{-2}$ [m/s] であった。半値幅  $f_1, f_2$  を算出し、6.7[Hz], 17.1[Hz] となった。 $F_0 = 1.5$ [N] であるので、以上の値を式 (2) へ代入し A, B における動的バネ定数  $k_A, k_B$  を算出し、 $k_A = 1.25 \times 10^3$ [N/m],  $k_B = 4.51 \times 10^3$ [N/m] が得られ、硬さを絶対値によって算出可能となった。

#### References

市原健志, 野方 誠, 腹腔留置型診断治療マイクロロボットによる臓器の硬さ計測に関する研究, 日本機械学会第 22 回バイオエンジニアリング講演会, 317, 2010.

## メンブレントラフィックによる細胞分裂制御機構の解明

京都大学大学院薬学研究科 生体情報制御学分野  
助教 加藤洋平

細胞分裂時のリサイクリングエンドソームは中心体の周辺にクラスター構造を形成する。この構造のことを CRESCent (Cluster of Recycling Endosomes around Spindle Pole Centrosome) と呼んでいる。リサイクリングエンドソームは細胞膜を小胞として細胞内部に取り込んだり、再び放出したりすることで、分裂期における細胞膜の調節をしている可能性がある。本研究では細胞分裂期の細胞からリサイクリングエンドソームを単離精製し、そこに

含まれるタンパク質を網羅的に解析することで、その働きを明らかにすることを目的としている。

本年度はリサイクリングエンドソームに局在するタンパク質であるトランスフェリン受容体に MEF タグを融合させ、レンチウイルスを用いて導入し安定発現株を樹立した。その細胞から磁性ビーズを用いた TAP 法によるリサイクリングエンドソームの精製を行った。

## 神経投射再生を目指した神経変性疾患治療法に関する研究

京都大学大学院薬学研究科 薬品作用解析学分野  
助教 泉 安彦

パーキンソン病で失われた黒質一線条体ドパミン神経投射を再生するために、まず、線条体細胞に発現するドパミンニューロンの軸索伸張を促進するタンパクの同定を試みた。ドパミンニューロンによる線条体神経支配は細胞接着因子であるインテグリンの阻害薬により抑制された。さらに、インテグリンリガンドのコートティングによりフィブロネクチン結合型インテグリンの関与が示唆された。インテグリンは 19 種の  $\alpha$  鎖と 8 種の  $\beta$  鎖からなるヘテロ

二量体で少なくとも 25 種類の  $\alpha\beta$  二量体が存在している。そこで、インテグリンのサブタイプを同定するため、中和抗体および選択的ペプチド阻害薬を用いて検討したところ、ドパミン神経突起伸長に関与する有力なヘテロ二量体を見出した。現在、そのインテグリンリガントの同定を免疫沈降法により検討しており、今後、生体親和性ポリマーとの結合を試みる予定である。

## 脳腫瘍・astrogliosis におけるアストロサイトの異常活性化・増殖機構の解明～アストロサイトに発現する TRPC3 チャンネルを治療標的とした in vitro および in vivo 研究～

京都大学大学院薬学研究科 生体機能解析学分野  
助教 白川久志

固相化細胞膜を用い、起電性のトランスポーター電流応答をリアルタイムに測定できる Surfe2r One を用いたトランスポーター機能解析法の最適化を行うため、本年度は、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase、グルタミン酸トランスポーターEAAT2、尿酸を基質とすることが最近報告されたグルコーストランスポーターGLUT9 に対して検討を行った。まず、Caco2 細胞から種々の細胞膜調整法を検討し、最適な条件下で電極に固定した結果、ATP の適用により

native に発現する Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の電流応答が確認でき、阻害薬の orthovanadate で抑制された。同様に、EAAT2 を安定発現させた MDCK 細胞、および GLUT9 を安定発現させた CHO 細胞から調整した固相化細胞膜において、それぞれの基質であるグルタミン酸あるいは尿酸の適用により濃度依存的な電流応答を観察することができ、それぞれの阻害薬である TBOA あるいは benzbromarone の適用により消失することを確認した。

## アルブミン融合インターフェロン- $\gamma$ 遺伝子治療法の開発と癌標的治療への適用

京都大学大学院薬学研究科 病態情報薬学分野  
助教 高橋有己

本プロジェクトでは、一部が相補的な複数の DNA を用いて形成される Y 型や X 型構造の DNA ナノ粒子を設計・構築し、これを薬物やタンパク質、さらには細胞をデリバリーするための DDS としての開発を目指す。Toll-like receptor (TLR)-9 のリガンドである CpG モチーフを含む DNA 鎖を用いて DNA ナノ粒子を作製したところ、用いる DNA 鎖数の増加に伴い PAGE 上での泳動度が小さくなったことから、設計通りの多足型構造を形成する DNA が形成

されたものと推察された。そこで、TLR9 を発現する RAW264.7 細胞に各種 CpG DNA を添加したところ、CpG モチーフにより惹起される細胞からのサイトカイン産生量は DNA のナノ粒子化により有意に増大した。また、CpG DNA ナノ粒子で作製したハイドロゲルに、抗癌剤ドキソルビシン (DXR) をインターカレートさせた製剤は、DXR を徐放可能であり、担癌マウスにおいて高い抗腫瘍効果を示した。

## 神経堤細胞分化における Fgf シグナルの作用メカニズムの解明と疾患治療への応用

京都大学大学院薬学研究科 遺伝子薬学分野  
助教 山内 肇

神経堤細胞は胎生期神経管背側に発生し、末梢神経系、頭蓋顔面軟骨・骨、副腎髄質、平滑筋など多種多様な細胞に分化する。この機構を理解することは発生学的知見や神経変性疾患の発症機構の解明につながると考えられる。哺乳類において 22 種類存在する Fgf リガンドの中で、胎生期の機能が未詳であった Fgf20 のゼブラフィッシュ相同体の一つである Fgf20b について調べた。Fgf20b 機能阻害胚では、頭蓋顔面軟骨形成に異常が見られた。そこ

で、神経堤細胞分化と Fgf20b との関連性を詳細に調べた。Fgf20b は移動する神経堤細胞の頭蓋軟骨形成期に発現していた。また、Fgf20b 機能阻害胚の解析から神経堤細胞の増殖および生存維持に影響はなく、分化特異的に作用することを明らかにした。さらに、Fgf 受容体の一つである Fgfr1 も同様の発現を示し、機能阻害胚では同様の表現型を示すことから Fgf20b は Fgfr1 を介して作用することを明らかにした。

## 膜タンパク質構造研究のための新規ナノ粒子の創製

京都大学大学院薬学研究科 薬品機能解析学分野  
助教 矢野義明

GPCR をはじめとする膜タンパク質の単離・精製には界面活性剤がよく用いられるが、タンパク質が変性する場合も多い。本研究ではリン脂質をベースとした、生体膜環境と近い分子配向を持ち変性作用の少ない可溶化剤の創製を目指して、新規化合物のデザイン・合成を行なった。典型的なリン脂質であるフォスファチジルコリンのアシル鎖のうち一本を、炭素数 18 のアシル鎖と同程度の鎖長を持つポリエチレ

ングリコール(PEG)で置換した分子(PEG-PC1)をデザインした。リゾフォスファチジルコリン (lyso(18:1)PC) と、カルボキシル化 PEG ( $\text{CH}_3\text{-O-CH}_2(\text{CH}_2\text{-O-CH}_2)_4\text{-CH}_2\text{-COOH}$ )を縮合し目的物を得た。PEG-PC1 は水や PBS 中に分散し透明な溶液を得られることがわかった。また DPH 蛍光より求めた PBS 中での PEG-PC1 の臨界ミセル濃度は約 4  $\mu\text{M}$  であり、lyso(18:1)PC と同程度の値であった。

# タンパク質-タンパク質相互作用を標的とした 薬剤リード化合物探索系の開発

京都大学大学院薬学研究科 システムケモセラピー・制御分子学分野  
教授 掛谷秀昭



抗がん剤リード化合物の探索系として、昨年度に引き続き、低酸素誘導因子（Hypoxia-inducible factor: HIF）-1 の  $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニット間のタンパク質間相互作用を阻害する薬剤リード化合物の生細胞評価系の開発研究を行った。

HIF-1 各サブユニットの相互作用を特異的かつ定量的に測定する系として、サンゴ由来の蛍光タンパク質 Kusabira-Green (KG) を用いた蛍光タンパク質再構築系を利用した（図 1）。

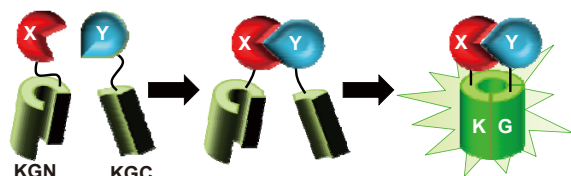


図 1 蛍光タンパク質再構築測定系の概念モデル

HIF-1 $\alpha$  および  $\beta$  の各 PAS ドメインと KG タンパク質の N 末端断片あるいは C 末端断片との様々な融合タンパク質発現プラスミドを作製し（図 2）、これらを CHO 細胞に導入後、相互

## HIF-1 $\alpha$ 融合タンパク質

1. KGN-1 $\alpha$
2. 1 $\alpha$ -KGN
3. KGC-1 $\alpha$
4. 1 $\alpha$ -KGC

## HIF-1 $\beta$ 融合タンパク質

5. KGN-1 $\beta$
6. 1 $\beta$ -KGN
7. KGC-1 $\beta$
8. 1 $\beta$ -KGC

図 2 作製した KG-HIF-1 $\alpha/\beta$  融合タンパク質

作用に起因する蛍光の回復を蛍光顕微鏡下で観察した。今回用いた HIF-1 $\alpha$  および 1 $\beta$  断片にはいずれも核移行シグナルが存在することから、再構築された KG の蛍光像は核内で観察されることが期待される。そこで、様々な組み合わせで遺伝子導入を行った結果、1 $\alpha$ -KGN と KGC-1 $\beta$  の組み合わせを発現している細胞でのみ期待通りの蛍光像が得られた（図 3）。また

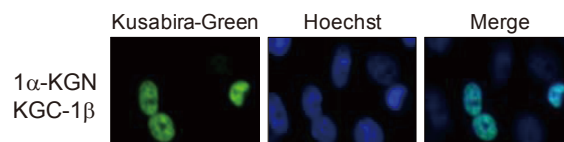


図 3 1 $\alpha$ -KGN-KGC-1 $\beta$  共発現による蛍光再構築

この時、1 $\alpha$ -KGN と KGC-1 $\beta$  が実際にヘテロ複合体を形成していることは、遺伝子導入後の細胞抽出液を用いた共免疫沈降実験によっても確認できた（図 4）。

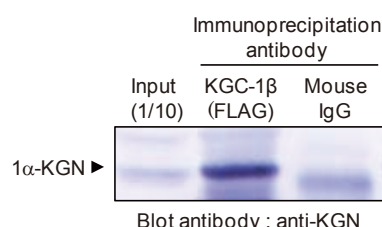


図 4 1 $\alpha$ -KGN-KGC-1 $\beta$ ヘテロ二量体形成の確認

一方、断片を融合していない KGN と KGC を発現させた細胞においても遺伝子導入後、24 時間を経過すると蛍光像が観察され、このことから過剰な外来性タンパク質の発現によって、バックグラウンドが生じることが明らかとなった。そこで、KG 融合タンパク質の発現制御を目指して、Doxycycline (Dox) を用いた転写調節システムの本系への導入を試みた。まず、Dox と結合すると不活性型へと変化する転写因子 tTA の発現ベクターを CHO-K1 細胞に導入し、Blasticidin S を用いた薬剤選択により tTA 安定発現 CHO-K1 細胞株を作製した。

今後は、Dox 制御によるバックグラウンド低減効果を確認した後、Dox 応答プロモーターの下流に各 KG 融合タンパク質コード遺伝子を持ち、それぞれ異なった薬剤選択マーカーを持った発現プラスミドを作製し、これらを安定に保持した薬剤スクリーニング用細胞株の作製を行う予定である。

1) 掛谷秀昭, 西村慎一. 有機合成化学協会誌. 68 (5): 490-500, 2010.

## ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の病原性発現機構

京都大学ウイルス研究所 附属ヒトレトロウイルス研究施設  
教授 松岡雅雄



ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) は長い潜伏期間の後に成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) を引き起こす。また HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1 associated myelopathy: HAM)、ぶどう膜炎などの炎症性疾患の原因ウイルスでもある。HTLV-1 がどのような機構で疾患を引き起こすかは不明なままであった。我々は HTLV-1 のマイナス鎖にコードされる HTLV-1 bZIP factor (HBZ) 遺伝子が全ての ATL 症例で発現しており、その増殖を促進することを報告してきた。HBZ の HTLV-1 の病原性発現における重要性を解析した。

### 1. HBZ による発がん

CD4 特異的プロモーター・エンハンサーにより CD4+T リンパ球特異的に HBZ を発現するトランスジェニックマウスを作製した。このトランスジェニックマウスでは生後 1 年以上経過して CD4+T リンパ腫を有意に多く発症した。悪性リンパ腫の約半数は Foxp3 を発現していた。Foxp3 は制御性 T リンパ球に発現し、その生物学的作用を制御している。ATL では半数以上が Foxp3 陽性であることが知られており、HBZ トランスジェニックマウスではヒト ATL と極めて類似したリンパ腫を起こすことが示された。

### 2. HBZ による制御性 T リンパ球誘導

HBZ トランスジェニックマウスの末梢リンパ球を解析したところ、effector/memory T cell, 制御性 T リンパ球の増加が認められた。制御性 T リンパ球増加の機序として HBZ は Foxp3 遺伝子のプロモーターに作用して、その転写を亢進することが示された。この亢進作用は TGF- $\beta$  の存在により増強された。

### 3. HBZ による炎症誘導作用

HBZ トランスジェニックマウスでは、高率に皮膚炎を発症した。組織では T リンパ球の浸潤を表皮・真皮に認めた。同様に肺胞中隔・腸にもリンパ球浸潤が認められた。このようなリンパ球の浸潤は HTLV-1 キャリアでも認めら

れており、類似した病態であることが予想された。HBZ トランスジェニックマウスの CD4+T リンパ球では LFA-1, ICAM-1 の発現上昇と接着能の亢進が確認された。また HBZ トランスジェニックマウスの CD4+T リンパ球ではインターフェロンガンマの産生増加が認められた。このようなインターフェロンガンマの産生増加は HTLV-1 キャリアでも報告されており、HBZ がヒト HTLV-1 感染症に極めて類似した病態を再現していることが予想される。

### 4. 結語

HBZ は ATL, HTLV-1 感染細胞で唯一、発現が保たれているウイルス遺伝子であり、in vivo での発現は、発がん・炎症という HTLV-1 感染によって引き起こされる疾患と極めて類似した病態を惹起した。このことから HBZ は HTLV-1 病原性発現において中心的な働きをしているウイルス遺伝子であると考えられる。

### References

1. Satou Y, Yasunaga J, Zhao T, Yoshida M, Miyazato P, Takai K, Shimizu K, Ohshima K, Green PL, Ohkura N, Yamaguchi T, Ono M, Sakaguchi S, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation *in vivo*. **PloS Pathog** 7: e1001274, 2011.
2. Fan J, Ma G, Nosaka K, Tanabe J, Satou Y, Koito A, Wain-Hobson S, Vartanian JP, Matsuoka M. APOBEC3G generates nonsense mutations in HTLV-1 proviral genomes *in vivo*. **J Virol** 84: 7278-7287, 2010.
3. Hagiya K, Yasunaga J, Satou Y, Ohshima K, Matsuoka M. ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. **Retrovirology** (in press)

## HIV 遊離抑制因子テザリンとその阻害ウイルス蛋白 Vpu の相互作用構造の解明

京都大学ウイルス研究所 ウイルス病態研究領域  
教授 小柳義夫



tetherin(別名 BST-2/CD317)は HIV-1 粒子の細胞外への放出を抑制する宿主因子として近年新たに同定され、注目されている。そして、HIV-1 はアクセサリ蛋白である Vpu が tetherin を拮抗することにより、効率良く複製増殖すると考えられている。しかしながら、Vpu がどのようなメカニズムにより tetherin の作用を拮抗するのか明らかになっていない。そこで、tetherin と Vpu の相互作用を明らかにし、そのドメインの解明のために bi-molecular fluorescent complementation(BiFC)法による Vpu とヒト tetherin(hu-tetherin)の相互作用定量検出系をまず構築した。Kusabira-Green(KG)配列を二分割し、N 端 KG タグ(KGN)を Vpu に、C 端 KG タグ(KGC)を hu-tetherin にそれぞれ付加した発現系により、これらの相互作用量に依存して発光する KG 蛋白質の蛍光強度が増加する検出系を確立した。これを用いた Vpu と結合能がないマウス tetherin と hu-tetherin のキメラ分子の相互作用解析実験から、hu-tetherin の膜貫通領域(TM)が Vpu との結合に唯一必須な領域であること、hu-tetherin TM アラニン置換変異体解析実験から、I34、L37 および L41 が必須なアミノ酸残基であることがわかった。次にこれらのアラニン置換変異体はいずれも Vpu によるウイルス放出促進作用に対して抵抗性を示した。すなわち、これらのアミノ酸が Vpu との相互作用だけでなくその反応性の決定基であることを見出した。興味あることに、これらの 3 つのアミノ酸残基は Vpu に拮抗されない非ヒト科霊長類の tetherin TM においても広く保存されているが、非ヒト科霊長類 tetherin では上流に 2 アミノ酸欠損がある。そこで、2 アミノ酸を挿入する変異体解析実験を

行ったしたところ Vpu との結合能が付与されることがわかった。次に、この種特異的な Vpu 反応性が、TM の構造的相違に起因する可能性を考え、脂質二重膜における hu-tetherin とアフリカミドリザル tetherin(agm-tetherin) TM の立体構造予測を分子動力学計算法により解析した。その結果、hu-tetherin TM の構造は、同定されたアミノ酸がひとつのヘリックス面に集約していた。一方、Vpu に反応性のない agm-tetherin の TM は、同定されたアミノ酸がヘリックス構造の多方面に散逸することが分かった。すなわち、同定された 3 つのアミノ酸は相互作用に重要であり、その立体的な配置が Vpu に対する相互作用および反応性を決定することが明らかとなった。

### References

1. Kobayashi T, Ode H, Yoshida T, Sato K, Gee P, Yamamoto SP, Ebina H, Strebel K, Sato, Koyanagi Y. Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. *J. Virol.* 85(2): 932-945, 2011
2. Sato K, Izumi T, Misawa N, Kobayashi T, Yamashita Y, Ohmichi M, Ito M, Takaori-Kondo A, Koyanagi Y. Remarkable lethal G-to-A mutations in vif-proficient HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in humanized mice. *J. Virol.* 84(18):9546-9556, 2010
3. 佐藤 佳、小柳義夫 HIV-1 のウイルス-宿主相互作用と新規治療薬の開発 実験医学 28(18):2961-2968, 2010

## 生物有機化学を基盤とした新規抗癌剤候補化合物の探索および生産研究

京都大学大学院薬学研究科 薬品資源学分野

准教授 伊藤美千穂

いわゆるハーブや薫香料として利用される植物の精油には、多様な構造をもったモノテルペン、セスキテルペン、フェニルプロペン化合物が含まれる。これらは総じて揮発性が高く、高濃度では抗菌活性や細胞毒性活性を示すが、希薄気体を吸入投与すると鎮静活性を示すものもある。本研究ではシソ精油に含まれる抗癌化合物のペリラルコールを中心に動物実験と生合成研究を行った。その結果、ペリラルコールは 0.001% (g/w) という極低濃度でマウ

スに鎮静活性を示し、その活性発現にはシクロヘキセン環構造が重要であること、また低級テルペノイドで環状構造を持たないものについては、鎖長が C6~C8 の時に最も活性が強くなることが示された。また、シソ属植物からの生合成関連酵素遺伝子のクローニングでは、ペリラルコールをペリラルデヒドに変換するアルドケトリダクテースをクローニングし、一連の酵素遺伝子配列を明らかにした。

## 海産アルカロイドからの新規抗癌剤シード化合物の創製

京都大学大学院薬学研究科 薬品分子化学分野

助教 塚野千尋

海産アルカロイド *communesin A* と *perophoramidine* は *in vitro* でリンパ腫細胞 (P388) や大腸癌細胞 (HMT116) 等に細胞毒性を示す。また、*perophoramidine* はポリ (アデノシン-5'-二リン酸リボース) ポリメレースの切断によりアポトーシスを引き起こすが報告されている。両化合物は抗癌剤のシード化合物となる可能性を秘めているにもかかわらず、天然からの供給が限られている点と複雑な構造を有している点が相まって抗癌

剤への応用は難しい。今回、我々はヨウ化サマリウムを用いた還元的環化反応を利用して、両天然物の五環性共通骨格の構築に成功した。さらに構造活性相関研究を視野に入れ、両化合物に特徴的なイミノインドリン構造を持つ種々の誘導体を合成した。この合成経路を応用することで自然界から得ることのできない骨格も合成可能となり、抗癌剤シード化合物探索を視野に入れた幅広い構造活性相関研究の展開が可能となった。

## 脂質／タンパク質複合体の安定性と物質輸送機能の解明

京都大学大学院薬学研究科 製剤機能解析学分野  
准教授 中野 実

アポリポタンパク質 A-I (apoA-I)と種々のリン脂質を用いてコール酸透析法により脂質ナノディスクを調製し、粒子の構造安定性と動的特性を評価した。不飽和リン脂質である POPC を用いてナノディスクを調製すると、脂質／タンパク質比に応じて直径 9.6 nm の平板状ディスクと 7.9 nm の鞍状ディスクが得られることをゲル濾過並びに蛍光分光法により明らかにした。また、鞍状ディスクは 25 °C 以下では安

定であるが、メチルβシクロデキストリン存在下あるいは 37 °C では一部が平板状ディスクへ変化することが判明した。一方、負の自発曲率を有する POPE を POPC と等量混合して調製したナノディスクでは逆に鞍状ディスクへのリモデリングが見られた。このように、平板状・鞍状ナノディスクの構造安定性には構成する膜の曲げ弾性エネルギーが寄与することが明らかとなった。

## 食物由来腸内細菌代謝産物を介した生体内エネルギー制御機構の解明

京都大学大学院薬学研究科 薬理ゲノミクス分野  
助教 木村郁夫

今回の研究により、腸内細菌代謝産物を認識する脂肪酸受容体 GPR41 が交感神経節特異的に発現しており、短鎖脂肪酸により活性化され、交感神経系を亢進することにより、エネルギー消費を高めることを明らかにした。また、ケトン体は逆に GPR41 の活性を阻害することにより、交感神経系を抑制し、エネルギー消費を減少させた。このことは、食事により生体内で腸内細菌により産生されるプロピオン酸をはじ

めとする短鎖脂肪酸を、また、絶食により糖に代わるエネルギー源として産生されるケトン体を GPR41 が体内栄養バランスとして認識し、生体内においてのエネルギーバランスを調節するという交感神経を介したエネルギー調節機構の存在を示唆する。したがって GPR41 を標的とすることで、エネルギー破綻が原因である、肥満や糖尿病に代表される生活習慣病等の治療薬への応用が期待される。

## 真核生物由来 ABCトランスポーターのX線結晶構造解析

京都大学大学院薬学研究科 構造生物薬学分野  
准教授 中津 亨

癌細胞が抗がん剤に対して多剤耐性を獲得する主原因は、様々な脂溶性化合物を基質とし細胞外へ排出する P 糖タンパク質によると考えられている。したがってヒト由来の P 糖タンパク質の様々な基質に対する認識および排出機構を明らかにすることができれば、癌細胞の多剤耐性化機構の解明に重要な知見を与える。そこでヒト由来 P 糖タンパク質の立体構造解明を目指しているものの、安定性が悪く、X線結晶構造解析に適した状態でサンプルを調製

することが現段階では非常に困難である。そこでヒト由来 P 糖タンパク質と相同性が約 40% である好熱性紅藻由来の ABC トランスポーターの X 線結晶構造解析を行った。その結果、大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL41XU にて X 線回折実験を行ったところ、open conformation の立体構造を 3.0 Å 分解能で決定することに成功し、基質認識および排出に関わるアミノ酸を推定することができた。

## タンデム型付加反応を利用する含窒素複素環骨格構築反応の開拓

京都大学大学院薬学研究科 薬品合成化学分野  
准教授 山田健一

当研究室では既に窒素アニオンのタンデム付加反応、および酸素官能基化された炭素ラジカルの付加反応を開発した。これらの反応をタンデム型付加反応へと応用すれば含窒素複素環の構築が可能であると期待した。本研究拠点の目的「新規抗癌剤候補化合物の探索」、および「抗癌医薬品シードの最適化」に貢献するべく、抗癌剤を始めとする多くの生理活性化合物に見いだされる含窒素複素環の新規構築法開発を行なった。リチウムアミドの連続環化反応

を用いる含窒素スピロ環合成を試みたところ、期待したスピロ環状化合物ではなく、予想外の二環縮環型化合物であるインドリジン誘導体が得られることを見いだした。また、これまでに開発した酸素官能基化された 1 炭素ラジカル発生活法を窒素官能基化された 1 炭素ラジカル発生活へと拡張することに成功し、 $\kappa$ -オピオイド受容体アゴニストの短段階合成へ応用可能な新規 1,2-ジアミン合成法を開発した。

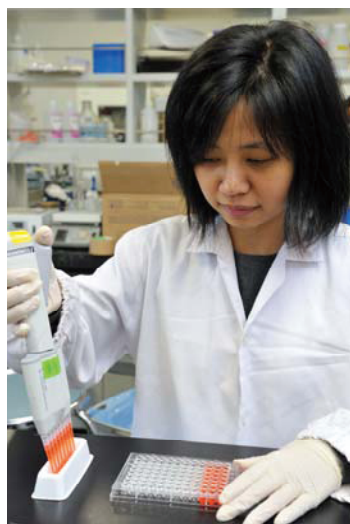
## 天然アルカロイドを基盤とする新規 Eg5 阻害剤の開発研究

京都大学大学院薬学研究科 薬品有機製造学分野  
准教授 大野浩章

キネシンモータータンパク質ファミリーの1つである EG5 は、新たな抗癌剤の分子標的として近年注目を集めている。報告者は「①新規抗癌剤候補化合物の探索研究」並びに「③抗癌医薬品シードの最適化のための研究」の一環として、縮環型インドールをはじめとする特徴的構造に着目したキネシン EG5 阻害剤の探索並びに抗癌剤としての応用研究を行った。

EG5 阻害活性を有する天然アルカロイドおよび既知のビフェニル型合成化合物の共通化学構造をもとに、縮環インドール構造を活性発

現の最小構造としてとらえて構造活性相関研究を行った。その結果、トリフルオロメチル基を有する B-カルボリン誘導体および縮環ラクタム環構造を有するカルバゾール誘導体が強力な EG5 阻害活性を示すことを見出した。本研究は、天然由来化合物から抗癌剤リードを効率的に創製するための有用な指針を与えるものである。

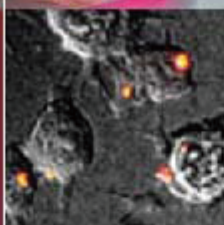






# 第2回 ナノバイオ創薬研究 シンポジウム

2011年3月5日(土)  
京都大学薬学部 記念講堂

## 第二回 ナノバイオ創薬研究シンポジウム

### プログラム

2011 年 3 月 5 日 (土)

京都大学薬学部記念講堂

#### ご挨拶

13:00~13:10 佐治英郎(京都大学大学院薬学研究科 研究科長)

#### 講演

座長 高倉喜信(京都大学大学院薬学研究科・教授)

13:10~13:40 細胞性 HIV 抑制因子

小柳義夫(京都大学ウイルス研究所 教授)

13:40~14:10 生体医工学の薬学応用について

牧川方昭(立命館大学理工学部 教授)

#### 研究報告

座長 西川元也(京都大学大学院薬学研究科・准教授)

14:10~14:25 マイクロマシンを用いた核酸デリバリー技術の開発

清水一憲(革新的ナノバイオ創薬研究拠点 特定助教)

14:25~14:40 カイコ  $\beta$  GRP の  $\beta$  1,3-グルカン認識機構の解明とその応用

高橋清大(革新的ナノバイオ創薬研究拠点 特定助教)

14:40~15:00 休憩

座長 山下富義(京都大学大学院薬学研究科・准教授)

15:00~15:15 腎炎治療分子標的医薬の開発

武井義則(革新的ナノバイオ創薬研究拠点 特定助教)

15:00~15:30 視交叉上核における、概日リズム調節因子解明による

創薬ターゲットの同定

松尾雅博(革新的ナノバイオ創薬研究拠点 特定助教)

15:30~15:45 有用化合物の創製を指向した微生物二次代謝産物の生合成研究

林 豊(革新的ナノバイオ創薬研究拠点 特定助教)

15:45~16:00 分子イメージング法を用いた DDS への応用に関する研究

木村寛之(革新的ナノバイオ創薬研究拠点 特定助教)

16:00~16:15 幹細胞の蛍光標識法の開発と in vivo イメージングへの応用

樋口ゆり子(革新的ナノバイオ創薬研究拠点 特定助教)

16:15~16:30 休憩

#### 特別講演

座長 橋田 充(京都大学大学院薬学研究科・教授)

16:30~17:10 移植幹細胞の生死と遊走を追跡するための水溶性 MRI 造影剤の開発

山岡哲二(国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部 部長)

---

懇親会 17:30~19:00 (京都大学薬学研究科 オープンカンファレンス)

---

主催: 京都大学大学院薬学研究科 革新的ナノバイオ創薬研究拠点

協賛: 立命館大学 立命館グローバル・イノベーション研究機構

## 第二回 ナノバイオ創薬研究シンポジウム

2011年3月5日、京都大学大学院薬学研究科記念講堂にて、「第2回ナノバイオ創薬研究シンポジウム」が開催された。このシンポジウムは京都大学大学院薬学研究科革新的ナノバイオ創薬研究拠点主催による第2回目のシンポジウムである。本拠点は、薬工連携によるバイオテクノロジーとナノテクノロジーの融合を基盤とした革新的創薬研究の推進を目的として2009年4月に京都大学大学院薬学研究科に設立された。この拠点は京都大学と立命館大学の学術交流の柱のひとつと位置付けられており、京都大学薬学研究科、ウイルス研究所、立命館大学理工学部が連携し研究を推進している。メンバーは、拠点プロジェクトを推進する専任若手教員7名、ポスドク研究員1名、シニアリサーチフェロー1名、およびそれぞれの連携機関から兼任で参加する教員12名で構成されている。

本シンポジウムでは、まず拠点長の佐治英郎教授(京都大学大学院薬学研究科長)より、本拠点2年目の総括を交えたあいさつがあった。続いて、本拠点を構成する京都大学、立命館大学より2名の教授による講演が行われた。小柳義夫教授(京都大学ウイルス研究所)からは「細胞性 HIV 抑制因子」と題して、ヒト細胞内に存在する HIV-1 に対して抑制的に働く分子である APOBEC3 と tetherin についての研究が紹介された。牧川方昭教授(立命館大学理工学部)からは「生体医工学の薬学応用について」と題して、薬工連携に資すると考えられる生体医工学技術として神経束の電気刺激技術、日常生活における生体信号・身体活動のモニタ技術の研究紹介が行われた。また、本拠点所属の若手教員7名がそれぞれ研究報告を行った。講演題目と報告者は次の通りである。「マイクロマシンを用いた核酸デリバリー技術の開発」(清水一憲助教)、「カイコ $\beta$ GRP の $\beta$ 1,3-グルカン認識機構の解明とその応用」(高橋清大助教)、「腎炎治療分子標的医薬の開発」(武井義則助教)、「視交叉上核における、概日リズム調製因子解明による創薬ターゲットの同



拠点長 佐治英郎 教授



小柳義夫 教授



牧川方昭 教授

定」(松尾雅博助教)、「有用化合物の創製を指向した微生物二次代謝産物の生合成研究」(林豊助教)、「分子イメージング法を用いた DDS への応用に関する研究」(木村寛之助教)、「幹細胞の蛍光標識法の開発と *in vivo* イメージングへの応用」(樋口ゆり子助教)。

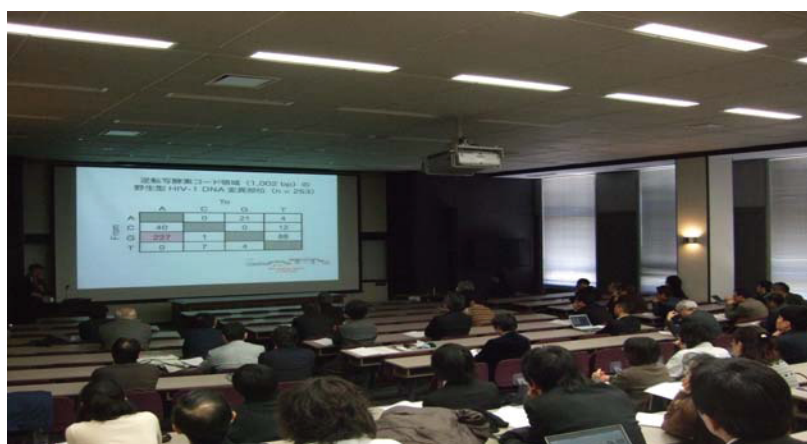
最後に、特別講演として山岡哲二先生(独立行政法人国立循環器病センター研究所生体医工学部長)が招待され、「移植幹細胞の生死と遊走を追跡するための水溶性 MRI 造影剤の開発」と題して、

幹細胞移植療法による組織再生や機能改善のメカニズム解明を目的とした、移植生体内生細胞の MRI トラッキング技術の開発に関する講演が行われた。講演には 100 名程が出席し活発な議論が行われた。引き続き行われた懇親会も参加者で会場が埋まり、盛会のうちに終了した。



特別講演 山岡哲二 先生

(革新的ナノバイオ創薬研究拠点 清水 一憲)



会場での研究報告の様子



〒606-8501

**京都大学大学院薬学研究科**

**革新的ナノバイオ創薬研究拠点**

京都市左京区吉田下阿達町 46-29

Tel: 075-753-9568

[http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/innovative\\_nanobio/index.html](http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/innovative_nanobio/index.html)