

**京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書**

2019 年 7 月 25 日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団
会 長 藤 洋 作 様

所属部局・研究科 医学研究科

職 名・学 年 博士課程4年

氏 名 金城 智章

助 成 の 種 類	令和元年度 ・ 国際研究集会発表助成	
研 究 集 会 名	(和文)次世代タンパク質治療薬・バイオコンジュゲートサミット (英文) Next Generation Protein Therapeutics & Bioconjugates Summit	
発 表 形 式	<input type="checkbox"/> 招 待 ・ <input type="checkbox"/> 口 頭 ・ <input checked="" type="checkbox"/> ポスター ・ <input type="checkbox"/> その他()	
発 表 題 目	Förster resonance energy transfer-assisted photoactivation of CRY2 for the optical control of protein interactions by two-photon excitation microscopy	
開 催 場 所	米国・カリフォルニア州・サンフランシスコ・Park Central Hotel	
渡 航 期 間	2019 年 6 月 17 日 ~ 2019 年 6 月 23 日	
成 果 の 概 要	タイトルは「成果の概要／報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有()	
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	200,000円
	使用した助成金額	200,000円
	返納すべき助成金額	0円
	助 成 金 の 使 途 内 訳	航空券: 140,500円
		宿泊費: 105,350円
学会参加費: 89,674円		
(上記のうち200,000円分)		
当財団の助成について	<p>(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 採択から助成をいただくまで迅速に大変助かりました。 学会参加への負担が大きく軽減され、海外学会で多くのことを学ぶことができました。 この場を借りて厚く御礼申し上げます。 年度の後半に開催される学会ですと募集時期にはまだ参加が決定していないことも多々あるかと思っておりますので、助成の申し込みの時期については、もし可能であれば年間2回の募集になればより参加しやすい方が増えるかと存じます。</p>	

成果の概要/金城智章

この度、米国・カリフォルニア州・サンフランシスコで開催された Next Generation Protein Therapeutics & Bioconjugates Summit (次世代タンパク質治療薬・バイオコンジュゲートサミット)に参加させていただくことができたので概要を報告する。

本会議の主な目的は、タンパク質工学の最先端の技術を駆使して、革新的な生物製剤を設計し、次世代の医薬品の創造に貢献することである。製薬だけでなく、タンパク質の計算化学や、抗体のエンジニアリングなどを専門とする基礎研究者も多く参加しており、タンパク質工学の最先端を学べる会でもある。

今回は一番議論が盛り上がっていた技術として、bispecific T-cell engager (BiTE)の技術があった。様々な企業が本技術の開発にしのぎを削っており、がん免疫療法への期待感を感じさせた。その他にも、TIM バレルという酵素中で保存性の高い構造を用いて様々なタンパク質相互作用を認識するバイオセンサーの開発や、DARPin という人工ドメインでペプチドを認識するという研究も多く、抗体に代わる新たな医薬を開発使用という機運が感じられた。また、機械学習による抗体分子の設計など、計算機によるタンパク質設計の技術が大きく発展していることが感じさせる会であった。

私自身は、Förster resonance energy transfer-assisted photoactivation of CRY2 for the optical control of protein interactions by two-photon excitation microscopy というタイトルでポスター発表をさせていただいた。

近年、フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)を利用したバイオセンサーの発展により、細胞内シグナル伝達を、生体内で、高い時空間解像度で観察することが可能になってきた。しかし、観察を行うだけでは、観察しているシグナルと、結果としておこる表現型との間の因果関係を証明することは困難であった。この問題の解決策として、細胞内シグナル伝達系を光で操作可能な光誘導性二量体化システムが近年報告されている。しかし、本システムは培養細胞系ではよく使用されているものの、生体内での使用例はほとんどない。そこで、らは、生体内で使用可能な光遺伝学ツールの開発を目指した。そこで我々は、青色光依存性二量体化システムである CRY2(cryptochrome)-CIBN 系のマウス生体内への応用を試みたが、CRY2 は二光子励起効率が低く使用に耐えないことが判明した。その原因を検証した結果、CRY2 二光子吸収が、GFP などの蛍光タンパク質と比較して数十分の一程度と、非常に低いことが原因と考えられた。この問題を解決するため、私は青色蛍光タンパク質(BFP)からの FRET により CRY2 を活性化することを試みた。二光子蛍光寿命イメージング顕微鏡法を用いたスクリーニングの結果、BFP から FAD の間で FRET が起こることを確認した。また、構造モデルに基づき BFP を CRY2 内部に挿入して発色団間の距離を最適化することで、二光子励起効率の高い two-photon activatable CRY2 (2paCRY2)システムの開発に成功した。また本技術を、FRET-assisted photoactivation (FRAPA)と命名した。

本技術の有用性を示すため、2paCRY2 システムを用いて、細胞の増殖や、がん化に重

要な RAF/ERK 経路を活性化可能な 2paRAF システムを作成した。2paRAF システムを発現するイヌ腎臓尿細管上皮細胞株を用いて、マトリゲル上で三次元の管腔構造体を作成し、三次元構造内の単一細胞で ERK 活性を制御できること示した。同様に、2paRAF システムを発現する遺伝子改変マウスを作成し、マウスの小腸由来のオルガノイドを作成し、オルガノイドにおいても単一細胞で ERK 活性を制御できること示した。最後に、皮膚基底層で単一細胞の ERK 活性を制御できることを示した。更に、皮膚増殖促進時に、ERK 活性伝搬距離が延長することを見出した。

本研究のように、ドナー蛍光物質からの FRET により光遺伝学ツールの二光子励起効率を高めた研究は未だ報告がなく、当分野において非常に重要な研究として位置付けられる。また、本ツールにより生体組織の三次元構造中において、単一細胞レベルでの分子活性制御が可能となり、細胞生物学およびシグナル伝達研究においても重要なツールとなることが期待される。本研究は本年 7 月末に国際学術誌に受理された。

今回の学会会場でのポスター発表でも、タンパク質設計に携わる研究者と非常に濃密な議論を行うことができた。これにより、論文の revise の際に聞かれる内容を事前に予測して対策をねることができ、論文発表に大きく役立ったと考えられる。

【謝辞】

この度の国際研究集会への参加および発表を通じて、多くの研究者との議論、交流、情報交換をすることができ、大変貴重な経験になったかと存じます。また、会議での議論は論文発表にも少なからず寄与したと考えております。最後になりますが、このような機会を頂いた京都大学教育研究振興財団の皆様には、この場をかりて厚く御礼申し上げます。