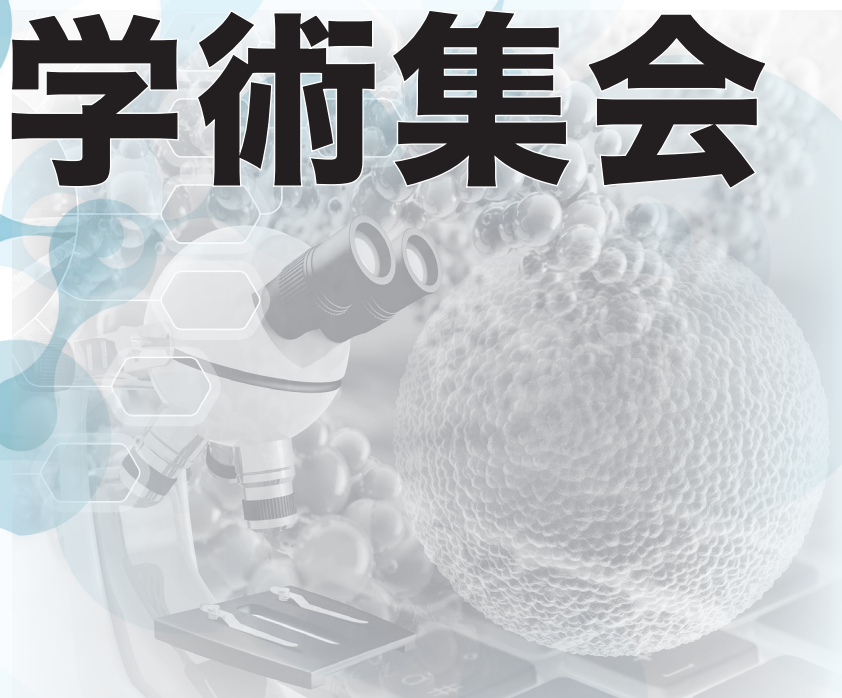
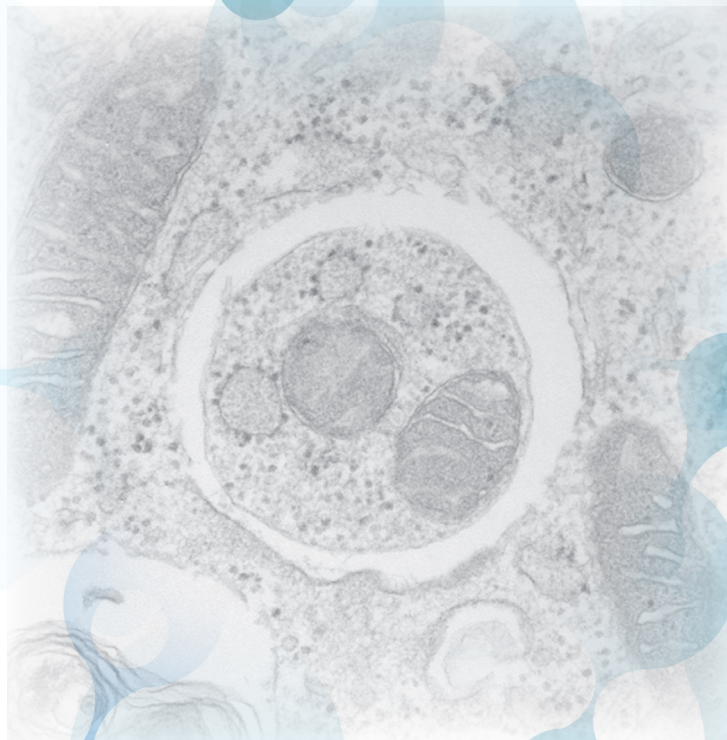


2019 金沢大学十全医学会 総会・学術集会



開催期日：6月27日（木曜日）

開催場所：金沢大学十全講堂



お問い合わせ

金沢大学十全医学会

TEL：076-265-2131 FAX：076-234-4208

E-mail：kenkyu@adm.kanazawa-u.ac.jp

Program

§ 総会

【議長：会長 土屋弘行】

12：40 - 13：00

- I. 会長挨拶
- II. 庶務報告 事業計画および報告
- III. 会計報告 1. 決算報告 2. 予算計画
- IV. 編集報告 優秀原著論文賞授賞式

§ 平成30年度(第15回)金沢大学十全医学賞受賞記念講演

【進行：集会理事 河崎洋志】

13：00 - 13：35

会長挨拶 金沢大学十全医学会 土屋 弘行

授与式

受賞講演

「ウイルスによる頭頸部癌発癌・転移機構の解明」

金沢大学医薬保健研究域医学系 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 講師 近藤 悟 先生

§ 学術集会 『細胞の品質管理』

【進行：集会理事 河崎洋志】

【開会挨拶・座長：金沢大学十全医学会集会理事 篁 俊成】

13：45 - 14：45

特別講演「小胞体の機能と制御のダイナミクス」

京都大学大学院理学研究科 生物物理学 教授 森 和俊 先生

【座長：金沢大学十全医学会集会理事 河崎洋志】

14：45 - 15：45

特別講演「オートファジー：細胞内の分解システム」

東京大学大学院医学系研究科 分子生物学 教授 水島 昇 先生

15：45 - 16：10 コーヒーブレイク

【座長・閉会挨拶：金沢大学十全医学会集会理事 華山力成】

16：10 - 16：45

「分子ナノゲート核膜孔複合体の動的構造と機能と病態」

金沢大学ナノ生命科学研究所 教授 Richard Wong 先生

16：45 - 17：45

特別講演「単一細胞計測のためのナノピペットバイオセンサーの開発」

Imperial College London／金沢大学ナノ生命科学研究所 教授 Yuri Korchev 先生

ウイルスによる頭頸部癌発癌・転移機構の解明

Analysis of cancer initiation and metastasis of viral carcinogenesis of head and neck cancer

金沢大学医薬保健研究域医学系耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

近 藤 悟



頭頸部癌は全癌の6%を占める悪性腫瘍である。その多くは、喫煙・飲酒など環境因子によって惹起されるが、ウイルスによって惹起されることがあるのも特徴的である。中咽頭に存在する口蓋扁桃、上咽頭に存在する咽頭扁桃はワルダイエル輪を構成し、免疫装置であると同時にウイルス発癌の母地としても知られる。代表的な悪性腫瘍として、エプスタインバーウイルス (EBV) に関連する上咽頭癌、ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) に関連する中咽頭癌が挙げられる。このような比較的狭い領域に全く異なったウイルスにより悪性腫瘍が発生することは不思議な現象であり、その全貌は分かっていない。我々は、これらのウイルス発癌機序の解明を目指し研究を行ってきた。

上咽頭癌は、EBVによって発癌する悪性腫瘍であり高転移性の癌である。我々は、EBVの主要な癌遺伝子で上咽頭癌に高発現する潜伏膜蛋白1 (LMP1) が高い転移能を誘導することを報告してきた(図)。特に、LMP1がヒ

トショウジョウバエ相同体Siah1という低酸素環境で高発現する分子を介し、血管新生を誘導し転移を誘導し、上咽頭癌組織における発現は予後不良因子であるということを発見した^{1),2)}。また、LMP1は転移だけでなく発癌においても重要であり、LMP1が近年提唱されてきた「癌幹細胞」性を誘導する上での必須因子であることを示した。癌においても正常の幹細胞と同じ性質を有した細胞集団「癌幹細胞」が存在し、この「癌幹細胞」が様々な性質の癌細胞を供給し階層性を有する腫瘍組織を構成する。我々はLMP1を導入した上皮細胞が「癌幹細胞」性を獲得し上皮間葉転換を起こすことを解明した³⁾。我々は、継続的に上咽頭癌の発癌・転移の研究を行い⁴⁾、今後は、LMP1を標的とした治療法の開発を目標にさらに研究を進めている。

一方で、先進国でHPVによる中咽頭癌の発症が急激に増加し問題となっている。ある試算では、2020年までに米国におけるHPV関連中咽頭癌の罹患率は、女性の悪性

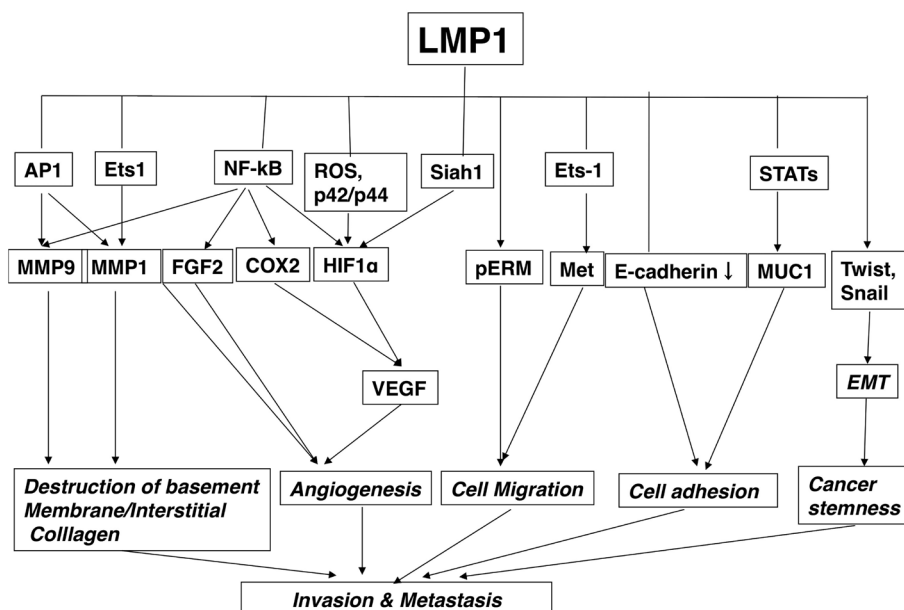


図. LMP1による浸潤・転移関連因子の発現調節と転移能亢進のメカニズム

腫瘍の上位を占める子宮頸癌の罹患率を上回ると考えられ、その病態解明は急務である。しかし、HPVによる中咽頭癌発癌機序は今のところ不明である。子宮頸癌においては、ウイルスゲノムが宿主ゲノムに組み込まれるインテグレーションという現象が、発癌段階で重要である。2007年に抗ウイルス作用を持つ内因性免疫のAPOBEC3 (A3) が、HPVのウイルスゲノムに変異を誘導蓄積し、子宮頸癌の前癌病変を形成するという報告がなされた。我々は、このA3とウイルス遺伝子のインテグレーション比を解析し、A3が発癌に関与するか検討した。中咽頭癌の生検組織中に、インテグレーション時には欠失する遺伝子のE2領域に、A3特異的な変異を認め、A3A発現がインテグレーション比と相関することが分かり、A3が発癌に関与する可能性が考えられた⁵⁾。この研究からこれまで分かっていたなかったHPVによる中咽頭癌発癌機構の一部が解明された。

同じワルダイエル輪という免疫装置にあり、対照的にEBVは上咽頭に、HPVは中咽頭に悪性腫瘍を惹起する。なぜ、二つの悪性腫瘍の母地が異なるのか理由は分かっていない。これらの疑問を解明すべく、我々はEBVと関連が深い上咽頭癌組織中のHPV陽性率を検討した。その結果、上咽頭癌組織でHPV陽性であったのは、僅か2例で、その2例もEBVとの重複感染例であった。このことから上咽頭癌の大部分の原因はEBVで惹起され、HPVとの関連性は低いことが分かった。また、我々は口蓋扁桃と咽頭扁桃におけるEBV感染率を成人と小児群に分け比較すると、小児でも成人でも、上咽頭に存在する咽

頭扁桃にEBV量が多く、EBVの咽頭扁桃への指向性が示唆された。

このようにウイルス発癌が特徴的な頭頸部領域であるが、その発癌転移機構はユニークなもので、そこから見つかった現象は頭頸部癌にだけ限定されず腫瘍学・ウイルス学全体の発展に寄与する。今後も継続して頭頸部癌の発癌機構を解明していきたい。

参 考 文 献

- 1) Kondo S, Seo SY, Yoshizaki T, et al.: EBV latent membrane protein 1 up-regulates hypoxia-inducible factor 1alpha through Siah1-mediated down-regulation of prolyl hydroxylases 1 and 3 in nasopharyngeal epithelial cells. *Cancer Research* 66, 9870-7, 2006
- 2) Kitagawa N, Kondo S, Wakisaka N, et al.: Expression of seven-in-absentia homologue 1 and hypoxia-inducible factor 1 alpha: novel prognostic factors of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer letters* 331:52-57, 2013
- 3) Kondo S, Wakisaka N, Muramatsu M, et al.: Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cancer stem/progenitor-like cells in nasopharyngeal epithelial cell lines. *Journal of virology* 85:11255-64, 2011
- 4) Yoshizaki T, Kondo S, Wakisaka N, et al.: Pathogenic role of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 in the development of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer letters* 337:1-73, 2013
- 5) Kondo S, Wakae K, Wakisaka N. et al.: APOBEC3A associates with human papillomavirus genome integration in oropharyngeal cancers. *Oncogene* 36:1687-1697, 2017

Profile

近藤 悟 (こんどう さとる)

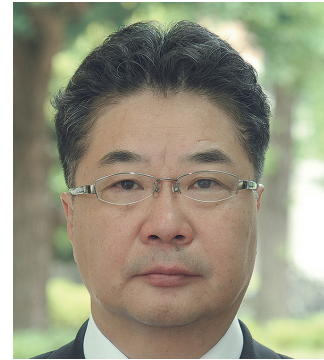
略歴

1999年03月	金沢大学医学部医学科卒業
1999年04月	金沢大学医学部附属病院耳鼻咽喉科入局
2003年03月	米国ノースカロライナ大学ラインバーガー癌研究所研究員
2007年04月	金沢大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科学助教
2011年04月	金沢大学附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科学助教
2016年11月	金沢大学附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講師

小胞体の機能と制御のダイナミクス

Dynamics of function and regulation of the endoplasmic reticulum

京都大学大学院理学研究科 生物科学専攻
生物物理学教室
森 和 俊

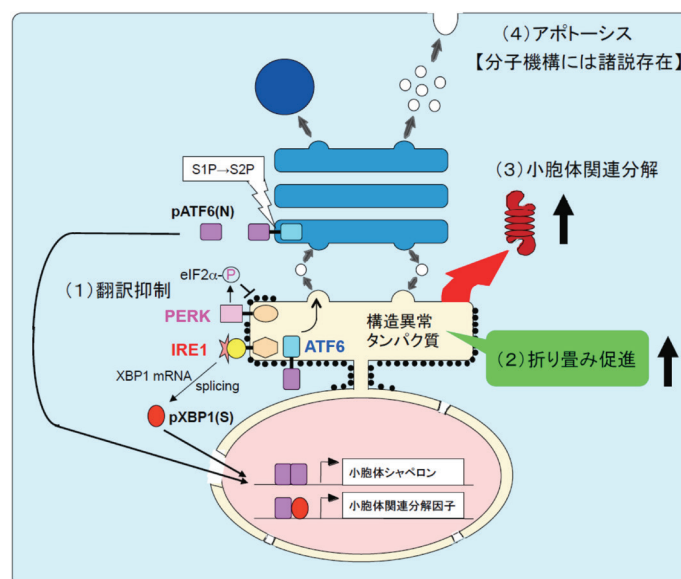


新規に合成された分泌タンパク質や膜タンパク質の高次構造形成が行なわれる小胞体は、これらのタンパク質が正しい立体構造をとっているかどうか峻別する能力を有し、タンパク質の品質を管理するオルガネラとして知られている。正しく折り畳まれたタンパク質はゴルジ装置以降の分泌過程に進むことが許され、折り畳まれていないタンパク質は小胞体に留められる。小胞体内には高次構造形成を介助・促進する分子シャペロンやフォールディング酵素（小胞体シャペロン）が多種多量に存在し、通常、新生タンパク質は効率よく折り畳まれている。一方、折り畳みに失敗したタンパク質は細胞質に引き出され、ユビキチン・プロテアソーム系により分解される。この廃棄システムは小胞体関連分解機構 Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation (ERAD) と呼ばれている。このように、折り畳みと分解という2つの相反する仕組みによって小胞体におけるタンパク質品質管理は成立している¹⁾。

しかしながら、いわゆる小胞体ストレスと総括されている状況下で、小胞体内に高次構造の異常なタンパク質が蓄積すると小胞体ストレス応答（英語ではUnfolded

Protein Response; UPR）が活性化される（図）。UPRは、小胞体ストレスを感知し小胞体膜を貫いたシグナル伝達を行うことができるセンサー兼トランスデューサーによって媒介され、哺乳動物では、PERK（小胞体膜貫通型リン酸化酵素）、ATF6（小胞体膜貫通型転写因子）、IRE1（小胞体膜貫通型リボヌクレアーゼ）というユビキタスに発現している3つのタンパク質が重要な役割を果たしている。これら3つの経路の活性化により、新規合成タンパク質がそれ以上小胞体内に送り込まれないように翻訳を抑制する小胞体の負荷軽減、小胞体シャペロンの転写誘導による折り畳み容量の増強、ERAD因子の転写誘導による分解システムの活性化の3つの対応がなされ、小胞体の恒常性は維持される。それでもなお小胞体ストレスが持続する場合は、細胞がアポトーシスを起こし排除される²⁾。

具体的には³⁾、活性化されたPERKは翻訳開始因子2の α サブユニット（eIF2 α ）をリン酸化して翻訳を全般的に抑制する（その間に既存の小胞体シャペロンが構造異常タンパク質の修復を行う）。小胞体ストレスが持続すれば、小胞体ストレスを感知してゴルジ装置へ移行した



ATF6がゴルジ局在性の2つのプロテアーゼ (S1PとS2P) による連続切断を受け、膜から遊離した転写因子領域 pATF6(N) が核へ移行して小胞体シャペロンの転写を活性化する。転写誘導された小胞体シャペロンは構造異常タンパク質を修復する。それでも小胞体ストレスが持続すれば、活性化されたIRE1が開始するXBP1 mRNAのスプライシング反応によって産生された活性型の転写因子 pXBP1(S) がpATF6(N) とヘテロダイマーを形成して ERAD 因子の転写を活性化する。転写誘導されたERAD 因子は構造異常タンパク質の分解を始める。このように小胞体は、時間依存的に対応を変化させながら小胞体ストレスを解消して恒常性を維持することができる⁴⁾。

本講演では、最先端の研究成果⁵⁾を交えながら、小胞体ストレス応答の分子機構、進化、生理的意義ならびに疾患への関与等についてお話ししたい。

参 考 文 献

1. B. Bukau, J. Weissman, A. Horwich, Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, 125, 443-451 (2006)
2. K. Mori, Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*, 101, 451-454 (2000)
3. K. Mori, Frame switch splicing and regulated intramembrane proteolysis: key words to understand the unfolded protein response. *Traffic*, 4, 519-528 (2003)
4. K. Mori, Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. *J. Biochem.*, 146, 743-750 (2009).
5. T. Ishikawa et al., UPR transducer BBF2H7 allows export of type II collagen in a cargo- and developmental stage-specific manner. *J. Cell Biol.*, 216, 1761-1774 (2017)

Profile

森 和俊 (もり かずとし)

略歴

学歴： 1981 年 京都大学薬学部卒業
 1983 年 同大学院修士課程修了
 1985 年 同大学院博士課程中退 (1987 年 京都大学薬学博士)
 岐阜薬科大学助手
 1989 年 米国テキサス大学博士研究員
 1993 年 株式会社エイチ・エス・ピー研究所副主任研究員
 1996 年 株式会社エイチ・エス・ピー研究所主任研究員
 1999 年 京都大学大学院生命科学研究科助教授
 2003 年 京都大学大学院理学研究科教授

賞罰： 1997 年 日本生化学会奨励賞	2014 年 倉敷市民栄誉賞
2005 年 第 4 回ワイリー賞	2015 年 国際細胞ストレス学会メダル
2006 年 日本生化学会第 1 回柿内三郎記念賞	2015 年 トムソン・ロイター引用栄誉賞
2008 年 第 26 回大阪科学賞	2015 年 京都大学孜孜賞
2009 年 カナダガードナー国際賞	2016 年 岡山県文化特別顕彰
2010 年 紫綬褒章	2016 年 恩賜賞・日本学士院賞
2012 年 平成 23 年度 上原賞	2017 年 日本内分泌学会マイスター賞
2014 年 平成 25 年度 朝日賞	2017 年 岡山県三木記念賞
2014 年 アルバート・ラスカー基礎医学研究賞	2017 年 2018 年 ブレークスルー賞生命科学分野
2014 年 ショウ賞生命科学医学分野	2018 年 文化功労者

オートファジー：細胞内の分解システム

Autophagy: an intracellular recycling system

東京大学大学院医学系研究科 分子生物学分野
水 島 昇



オートファジーとは

細胞内には2つの主要な分解システムがある。ひとつはユビキチン・プロテアソーム系で、不要あるいは不具合の生じたタンパク質を個々に分解するしくみである。ユビキチンが不良品の標識として働き、それをプロテアソームが分解する。ユビキチンの発見者らは2004年にノーベル化学賞を受賞している。プロテアソームは田中啓二博士(現・東京都医学総合研究所)によって全容が明らかにされた。

もうひとつの仕組みがオートファジーである。オートファジーはタンパク質を一つずつ分解するのではなく、細胞質の一部をまとめて分解する(図1)。まず、扁平な膜が曲がりながら細胞質の一部(サイトゾルだけではなく細胞内小器官も含むことができる)を取り囲み、オートファゴソームという直径約1ミクロンの小器官をつくる。次に、オートファゴソームがリソソームと融合すると、リソソーム内の多種類の分解酵素がオートファゴソーム内に注入され、内容物が分解される。分解産物のほとんどはアミノ酸であるため、それはリソソーム膜に存在するトランスポーターを通過して細胞質に戻り、タンパク質合成の材料などとして再利用される。リソソーム内部にある危険な分解酵素を細胞質全体に作用させるのではなく、あらかじめその作用範囲を区画化しておくのがオートファゴソームの役割である。通常の状態の細胞ではオートファゴソームはほとんど存在しないが、

栄養飢餓状態になるとオートファゴソームの数が急増し、細胞あたり100個を超えるようになる。つまり、外部に栄養がないことを察知すると、細胞は自分自身を過剰に分解して(自分を食べて)栄養源としているのである。

オートファジーの分子機構と役割

1990年代の大隅良典博士(現・東京工業大学、2016年ノーベル生理学・医学賞)による酵母を用いた遺伝学的研究がブレークスルーとなり、オートファジーに必要な遺伝子が次々と明らかにされた。私は1997年に大隅良典研究室に参画し、酵母オートファジーの研究を開始した。すぐに、これらの遺伝子は酵母だけに備わっているものではなく、動植物を含めた真核生物に広く保存されていることが明らかになった。

次に、これらの遺伝子を欠損したマウスなどを作製して解析することで、オートファジーの生理的役割が急速に明らかになった。オートファジーの役割は二つに大別して考えることができる。一つは、アミノ酸などの分解産物を調達するための栄養素のリサイクルで、この機能は飢餓時のアミノ酸プールの維持、初期胚発生などにおいて重要である。その制御にはインスリンとアミノ酸が特に重要である。二つ目の機能は細胞内の品質管理や浄化を目的としたもので、変性タンパク質や不良オルガネラの除去、細胞内侵入病原菌の除去などを行うものである。これらの機能は寿命の長い細胞で特に重要で

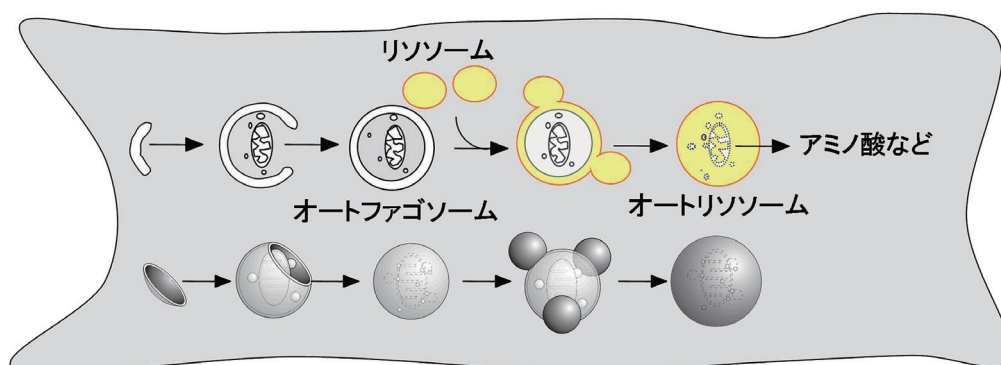


図1. オートファジーの模式図

あり、神経細胞変性や腫瘍を抑制する長期的作用をもつことが明らかになっている。

一方で、オートファジーの複雑な膜動態の分子機構の解明も進んでいる。これまではオートファゴソームの形成過程の研究が主体であったが、最近ではオートファゴソームの成熟過程やリソソームとの融合過程のメカニズムの研究も進展しており、全過程の理解へと向かっている。

オートファジーと疾患

最近、家族性パーキンソン病や鉄沈着を特徴とするヒト神経変性疾患SENDA/BPANにおいてオートファジー関連因子の変異が発見され、ヒト疾患との関係も注目されるようになった。また、オートファジーの創薬ターゲットとしての可能性も考えられている。特に、オートファジー依存性悪性腫瘍に対するオートファジー阻害剤や、細胞内に異常タンパク質が蓄積する神経変性疾患に対するオートファジー活性化剤の効果がモデル動物を中心に検討されており、一部はヒトでの臨床試験も始

まっている。しかし、臨床への応用を考えると、ヒトでのオートファジーの評価方法の確立など、まだ多くの課題が残っているのが現状である。

参 考 文 献

1. Mizushima. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat. Cell Biol.* 20:521-527 (2018)
2. Tsuboyama et al. The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science* 354:1036-1041 (2016)
3. Itakura et al. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* 151: 1256-1269 (2012)
4. Mizushima et al. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147:728-41 (2011)
5. Hara et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885-889 (2006)
6. Kuma et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*. 432:1032(2004)

Profile

水島 昇 (みずしま のぼる)

略歴

1991年	東京医科歯科大学医学部医学科卒業
1996年	東京医科歯科大学大学院医学研究科修了 博士(医学)
1997年	基礎生物学研究所(大隅良典研究室)にてポスドク、助手など
2004年	(財)東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 室長
2006年	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 細胞生理学分野 教授
2012年	東京大学大学院医学系研究科 分子生物学分野 教授

専門分野

細胞生物学、生化学

主な学会活動

日本生化学会 (前会長)、日本分子生物学会 (前理事)、日本細胞生物学会 (理事)

分子ナノゲート核膜孔複合体の動的構造と機能と病態

A brief overview of
nuclear pore complex dynamic structures and diverse function

金沢大学ナノ生命科学研究所
Richard Wong



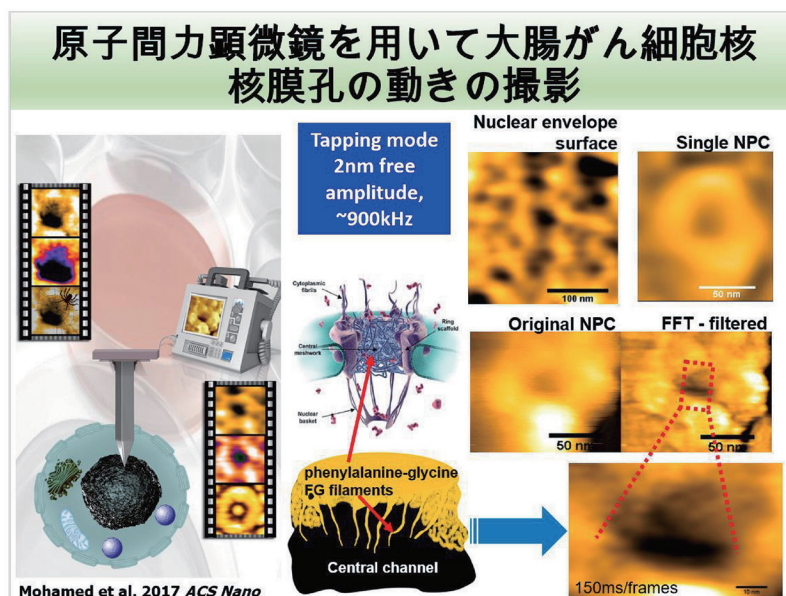
細胞は生物を構成する最小単位であり、ヒトは様々な形質をもつ細胞から成り立ちます。細胞の中には、脂質膜により覆われ隔てられた空間（核）が存在します。この核の中には、DNAと呼ばれる『生命の設計図』が格納されており、これらの情報は細胞の生命活動に欠かせないものです。一つの細胞を国家に例えると、核は政府のような役割を果たします。政府の行政命令で社会活動が行われるように、核の命令の伝達で細胞の活動が制御されます。核膜孔複合体(NPCs)は核の門番として、核へアクセスする分子をチェックしています。東京の霞ヶ関駅と中央省庁の出入り口(核膜孔)でICカード(核内外搬出シグナル)を持つ官僚職員(転写因子)をチェックすることで、核へのアクセスを常に監視しています。

このように、NPCsは細胞質と細胞核との間の物質輸送における唯一の通り道であり、生命現象に関わる膨大な情報を監視しながら、選択的に情報交換を制御するタンパク質複合体です。がん細胞内ではがんの増殖・転移に関わるシグナル伝達を制御するなど、生命現象に欠かせない役割を果たします。また、幹細胞が適切に性質を維持し、機能するためには、核膜孔複合体による分子輸

送が秩序立って進められることが重要です。このように、核膜孔複合体は遺伝子発現やDNAを継承する細胞分裂過程にも関与することがわかりはじめ、核への輸送制御からDNA情報の管理まで幅広い役割を担い、生命現象を制御する重要な因子として注目されています。

しかし、ヌクレオポリンがどのように連携し役割を果たすのかはわかっていません。著者らの研究室では、NPCsの構造動態や機能が制御される分子メカニズムの解明、ならびにこれらの異常がどのように病態と関与するのかについて解析を進めています。

著者らの最近の研究から、NPCsはがん病態特有の機能や構造・動態を獲得することが分かってきました。がん細胞で過剰に発現するNPC分子、NUP62はがん細胞の発症・悪性を誘導する転写因子p63の核への移行を制御していることを明らかにしました。その過程で、NUP62に存在するフェニルアラニン-グリシン (FG) 領域が介在していること、上皮分化を誘導することで知られるROCKキナーゼによってFG領域のリン酸化を受けたNUP62は、p63を核内輸送する能力が減少することを見いだしました。これらにより、NPCは細胞内環境に



じて変化し、効率良く細胞の運命を方向づける分子ナノゲートとして機能することが分かりました (Hazawa et al., EMBO Rep., 2018)。

また、ヒト大腸がん細胞から核膜を単離し、高速原子力顕微鏡で観察することで、がん細胞におけるNPCsの構造や動態を初めて明らかにしました。さらに、抗がん剤投与によってがん細胞が死ぬときに起こる特徴的な変形の様子を明らかにしました(Mahmoud et al., ACS Nano, 2017)。

今後、これまでの知見をさらに発展させるべく、NPCの病態特有ナノ構造の解明、病態特有輸送システムの解明、さらにはクロマチン時空間配置制御機構の解明に向け、NPC研究を推進していく予定です。現段階では核膜だけでの観察に限られていますが、技術革新によって生きた細胞そのものを観察できるSPMを開発できれば、細胞内外の分子同士の相互作用の中でNPCsの機能や動態の解明が可能になると考えられます。細胞生物学での機能理解、高速AFMによる構造解明、臨床での病態解明の3つが融合することで、人工NPCsの開発など、あらゆる生命現象の異常をナノレベルで制御できる治療技術につながると期待されます。

参 考 文 献

1. Lim SK and Wong RW (2018) Targeting nucleoporin POM121-importin β axis in prostate cancer. Cell Chem. Biol. 25(9):1056-1058.
2. Hazawa M, Lin D, Kobayashi A, Jiang YY, Dewi FRP, Mohamed MS, Hartono H, Nakada S, Meguro-Horike M, Horike S, Koeffler HP and Wong RW (2018) ROCK-dependent phosphorylation of NUP62 regulates p63 nuclear transport and squamous cell carcinoma proliferation EMBO Rep. 2018 Jan;19(1):73-88.
3. Hazawa M, Kobayashi A, and Wong RW (2018) NPCs in Mitosis and Chromosome Segregation Springer Book Chap. 10 p219-240. ISBN 978-3-319-71612-1
4. Mohamed MS, Kobayashi A, Taoka A, Watanabe-Nakayama T, Kikuchi Y, Hazawa M, Minamoto T, Fukumori Y, Kodera N, Uchihashi T, Ando T, Wong RW (2017) High-Speed Atomic Force Microscopy Reveals Loss of Nuclear Pore Resilience as a Dying Code in Colorectal Cancer Cells. ACS Nano. 11 (6), pp 5567–5578.

Profile

Richard Wong (リチャード ウォング)

略歴

2004 年	東京大学 大学院医学系研究科博士課程 修了 博士 (医学)
2005 年	米国 The Rockefeller University HHMI Research Associate
2008 年	金沢大学フロンティアサイエンス機構 特任准教授
2012 年	金沢大学 理工研究域自然システム学系 教授
2015 年	金沢大学 理工研究域バイオ AFM 先端研究センター分子細胞研究部門長
2015 年	金沢大学 新学術創成研究機構 セルバイオノミクスユニットユニットリーダー / 教授
2017 年	金沢大学 ナノ生命科学研究所 - 文部科学省「世界トップレベル研究拠点プログラム」教授・主任研究者

単一細胞計測のための ナノピペットバイオセンサーの開発 Nanopipette biosensors for single-cell analysis

Imperial College London, Division of Medicine, London W12 0NN, UK
WPI Nano Life Science Institute (NanoLSI), Kanazawa University, Japan
Yuri Korchev



Molecular Biology has advanced we know much about the individual molecular components that make up living cells down to the level of the individual atoms. The challenge, however, is to fully understand the functional integration of these components. This requires determining how the molecular machines that make up a living cell are organized and interact together not at the atomic length scale but on a nm scale. To do this we need to develop and applying nanoscale techniques for the visualization and quantification of cell machinery in real-time and on living cells. This will lead to detailed, quantitative models of sub-cellular structures and molecular complexes under different conditions for both normal and diseased cells.

This approach ultimately requires the development of novel biophysical methods. We have recently pioneered the development of an array of new and powerful biophysical tools based on Scanning Ion Conductance Microscopy that allow quantitative measurements and non-invasive functional imaging of single protein molecules in living cells (Fig. 1)

Scanning ion conductance microscopy and a battery of associated innovative methods are unique among current imaging techniques, not only in spatial resolution of living and functioning cells, but also in the rich combination of imaging with other functional and dynamical interrogation methods (Fig. 2) [1]. There are significant advances to deliver nanotechnological solutions to biosensing that are affordable, integrated, fast, capable of multiplexed detection and monitoring, and crucially to offer high selectivity for the specific detection of trace levels of analyte in biological fluids. Herein, we design a new class of nanometric field-effect-transistor (FET) sensors [2] and dubbed nexFET (nanopore extended Field Effect Transistor) [3] that combine the advantages of nanopore single molecule sensing, FETs and recognition chemistry.

Specifically, we report on a polypyrrole functionalized nexFET biosensor, with controllable gate voltage that can switch on/off, and slow down single molecule DNA actively transported through the nanopore. This strategy enables higher molecular throughput, enhanced signal-to-noise and even

heightened selectivity via functionalization of the nexFET with an embedded receptor. This is shown for sensitive and selective detection of an anti-insulin antibody in the presence of its IgG isotype as well as within complex mixtures such as blood serum Fig. 3.

Self-assembled nanoporous sensors at the tip of nanopipette can be used for simultaneous SICM imaging and chemical imaging and also can be combined with FET sensors.

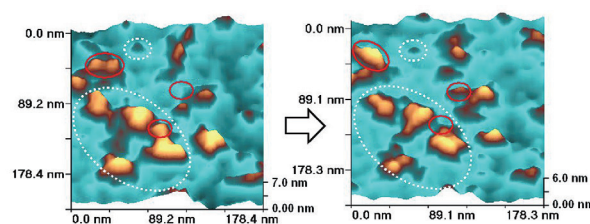


Figure 1. SICM imaging of protein complexes in live sperm.

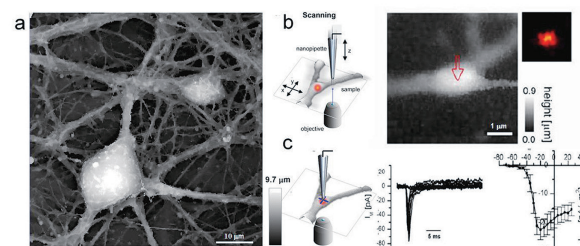


Figure 2. SICM image of live hippocampal neurons (a-b) and Nanoscale-targeted patch-clamp recordings of functional presynaptic ion channels (c)

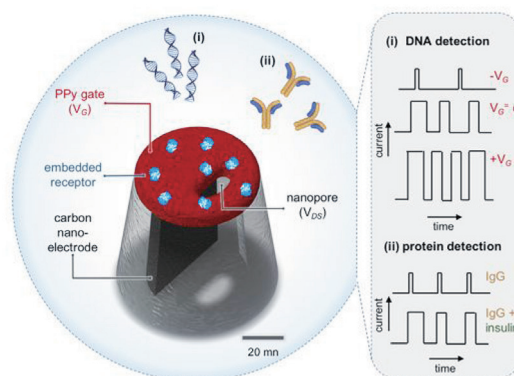


Figure 3. NexFET biosensor. Two strategies are explored for DNA detection and selective protein sensing

References:

1. A Leo-Macias et al. Nanoscale visualization of functional adhesion/excitability nodes at the intercalated disc. (2016). *Nature comm.* 7:10342. doi: 10.1038/ncomms10342
2. Y Zhang, et al. Spearhead Nanometric Field-Effect Transistor Sensors for Single-Cell Analysis. (2016). *ACS nano* 10, 3214-3221, DOI: 10.1021/acsnano.5b05211
3. R Ren, et al. Nanopore extended field-effect transistor for selective single-molecule biosensing. (2017) *Nature Com.* 8, DOI: 10.1038/s41467-017-00549-w

Profile

Yuri Korchev (ユリ コルチェフ)

Education:

- 1983 · B.Sc. in Biology & Physiology, University of St Petersburg
- 1984 · M.Sc. in Physiology, University of St Petersburg
- 1989 · Ph.D. in Biophysics and Cytology, Russian Academy of Sciences

Professional Career:

- 1984 - 1991 Research Scientist, Russian Academy of Sciences, St Petersburg, Russia
- 1991 - 1992 Wellcome Trust Research Fellow, St George's Hospital Medical School, UK
- 1992 - 1995 Post-Doctoral Research Fellow, St George's Hospital Medical School, London, UK
- 1995 - 1997 Post-Doctoral Research Fellow, Charing Cross & Westminster Medical School, UK
- 1997 - 2001 Lecturer, Faculty of Medicine, Imperial College London, UK
- 2001 - 2003 Senior Lecturer, Faculty of Medicine, Imperial College London, UK
- 2003 - 2005 Reader, Faculty of Medicine, Imperial College London, UK
- 2005 - present Professor, Faculty of Medicine, Imperial College London, UK
- 2017 - present Principal Investigator, WPI Nano Life Science Institute, Kanazawa University, Japan

Research Interests: *please write down your research interests within 5.*

Korchev's research span on development and applications of scanning ion conductance microscopy for biomedical research. We have developed a battery of associated innovative methods which are unique among current imaging techniques, not only in spatial resolution of living and functioning cells, but also in the rich combination of imaging with other functional and dynamical interrogation methods. Development of nano-FET and nanopore sensors for biomedical research

Publications:

1. Ren, R et al, (2017). Nanopore extended field-effect transistor for selective single-molecule biosensing. *Nature comm.* 8: 586 <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00549-w>.
2. U Vivekananda, et al. (2017) Kv1. 1 channelopathy abolishes presynaptic spike width modulation by subthreshold somatic depolarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 114 (9), 2395-2400
3. Y Zhang, et al. (2016). Spearhead Nanometric Field-Effect Transistor Sensors for Single-Cell Analysis. *ACS nano* 10, 3214-3221
4. A Leo-Macias, et al. (2016). Nanoscale visualization of functional adhesion/excitability nodes at the intercalated disc. *Nature comm.* 7:10342. doi: 10.1038/ncomms10342
5. AP Ivanov, et al. *ACS nano* 9, 3587-3595
6. Y Takahashi, et al. (2014) Corrigendum: Multifunctional Nanoprobes for Nanoscale Chemical Imaging and Localized Chemical Delivery at Surfaces and Interfaces. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 126, 7235-7235
7. Y. Takahashi, et al. (2014) Nanoscale visualisation of redox activity at Li ion battery cathodes. *Nature Com.* doi:10.1038/ncomms6450
8. Novak, P et al. (2014). Imaging single nanoparticle interactions with human lung cells using fast ion conductance microscopy. *Nano. Lett.* 14: 1202-1207
9. Actis, P. et al. (2013) Electrochemical Nanoprobes for Single-Cell Analysis. *Acs Nano* 8(1), 875-884.
10. P Novak, et al. (2013) Nanoscale-Targeted Patch-Clamp Recordings of Functional Presynaptic Ion Channels *Neuron*, 79 (6), 1067-1077
11. A. Shevchuk, et al. (2012) An alternative mechanism of clathrin-coated pit closure revealed by ion conductance microscopy. *J. Cell Biol.* 197 (4), 499-508
12. Y Takahashi, et al. (2012) Topographical and Electrochemical Nanoscale Imaging of Living Cells using Voltage Switching Mode Scanning Electrochemical Microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109 (29), 11540-11545
13. Y Takahashi, et al. (2011) Multifunctional Nanoprobes for Nanoscale Chemical Imaging and Localized Chemical Delivery at Surfaces and Interfaces. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 50:9638-9642
14. V Nikolaev, et al. (2010) Redistribution of β_2 adrenergic receptors leads to changes in camp compartmentation in heart failure. *Science* 327: 1653-1657.
15. J. Adler, et al. (2010) High Resolution Plasma Membrane Topography Imaging for Correct Interpretation of Single Particle Tracks. *Nature Meth.* 7: 170-171.
16. Alexander R. et al. (2009) Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106: 6854-6859
17. Pavel Novak, Chao Li, Andrew I. Shevchuk, Ruben Stepanyan, Matthew Caldwell, Simon Hughes, Trevor G. Smart, Julia Gorelik, Victor P. Ostanin, Max J. Lab, Guy W. J. Moss, Gregory I. Frolenkov, David Klenerman and Yuri E. Korchev. (2009) Nanoscale live cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy. *Nature Meth.* 6: 279-281

