

Wed. Sep 8, 2021

Oral(first day)

9:00 AM - 10:00 AM JST | 12:00 AM - 1:00 AM UTC | Room A Zoom

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Tomomi Koshiyama (Ritshumeikan University)

9:00 AM - 9:20 AM JST | 12:00 AM - 12:20 AM UTC

[1A-01] Detection of Synthetic Compound-Protein Interactions Using Artificial Split Intein and b-Lactamase

hiroaki hagiwara¹, *Taisei Iwabuchi¹, eriho fujii², tsuyoshi takahashi¹ (1. Graduate School of Science and Technology, Gunma University), 2. Science and Technology, Gunma University)

9:20 AM - 9:40 AM JST | 12:20 AM - 12:40 AM UTC

[1A-02] Structural control of microtubules by protein encapsulation using Tau-derived peptide

*Hiroshi Inaba¹, Yurina Sueki¹, Takashi Iwasaki², Arif Md. Rashedul Kabir³, Akira Kakugo³, Kazuki Sada³, Kazunori Matsuura¹ (1. Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori University, 3. Graduate School of Science, Hokkaido University)

9:40 AM - 10:00 AM JST | 12:40 AM - 1:00 AM UTC

[1A-03] Construction of highly-ordered protein structures by using amphiphilic peptides in living cells

*Takayuki Miki¹, Masahiro Hashimoto¹, Hiroki Takahashi¹, Keigo Kajiwar¹, Sae Nakayama¹, Taichi Nakai¹, Hisakazu Mihara¹ (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

Oral(first day)

10:10 AM - 11:10 AM JST | 1:10 AM - 2:10 AM UTC | Room A Zoom

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Hiroshi Tsutsumi (Tokyo Institute of Tech.)

10:10 AM - 10:30 AM JST | 1:10 AM - 1:30 AM UTC

[1A-04] Post-modification of folded proteins onto supramolecular peptidic fibers and vaccine application

*Rie Wakabayashi¹, Ghazian Dzaky Syahid Fathullah¹, Ayato Higuchi¹, Noriho Kamiya^{1,2}, Masahiro Goto^{1,2} (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

10:30 AM - 10:50 AM JST | 1:30 AM - 1:50 AM UTC

[1A-05] Histidine Chemical Modification Using Singlet Oxyge

*Shinichi Sato¹, Keita Nakane², Tatsuya Niwa³, Michihiko Tsushima⁴, Hideki Taguchi³, Hiroyuki Nakamura⁴, Shusuke Tomoshige², Minoru Ishikawa² (1. Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University, 2. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 3. Cell Biology Center, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, 4. Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology)

10:50 AM - 11:10 AM JST | 1:50 AM - 2:10 AM UTC

[1A-06] Quantitative adhesion analysis of a highly sticky bacterium

*Shogo Yoshimoto¹, Katsutoshi Hori¹ (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

Oral(first day)

1:20 PM - 2:20 PM JST | 4:20 AM - 5:20 AM UTC | Room A Zoom

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Osami Shoji (Nagoya Univ.)

1:20 PM - 1:40 PM JST | 4:20 AM - 4:40 AM UTC

[1A-07] Rapid Protein Crystallization in Cell for the Submicron Crystal Structure Analysis

*Satoshi Abe¹, Junko Tanaka¹, Takafumi Ueno¹ (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

1:40 PM - 2:00 PM JST | 4:40 AM - 5:00 AM UTC

[1A-08] Control of Fluorescent Molecular Properties by Aromatic Clusters in Protein Cages

*Yuki Hishikawa¹, Basudev Maity¹, Michito Yoshizawa², Masakazu Morimoto³, Satoshi Abe¹, Takafumi Ueno¹ (1. School of Life Science & Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Laboratory for Chemistry & Life Science, Tokyo Institute of Technology, 3. Department of Chemistry, Rikkyo University)

2:00 PM - 2:20 PM JST | 5:00 AM - 5:20 AM UTC

[1A-09] Excitation Energy Transfer in Photosynthetic Light-harvesting Protein LH2 with Modification of Energy-donating Pigments

*Yoshitaka Saga¹, Madoka Yamashita¹, Aiko Tanaka¹, Yuji Otsuka¹, Yuto Masaoka², Tsubasa Hidaka², Yutaka Nagasawa² (1. Faculty of Science and Engineering, Kindai University, 2. Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University)

Oral(first day)

2:30 PM - 3:30 PM JST | 5:30 AM - 6:30 AM UTC | Room A Zoom

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Kenjiro Hanaoka (Keio University)

2:30 PM - 2:50 PM JST | 5:30 AM - 5:50 AM UTC

[1A-10] Development of small-molecule fluorescent probes for quantification of labile Zn²⁺ concentration and monitoring of Zn²⁺ dynamics in organelles

*Toshiyuki Kowada^{1,2,3}, Rong Liu², Yuyin Du³, Toshiyuki Matsui^{1,2,3}, Shin Mizukami^{1,2,3} (1. Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, 2. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 3. Faculty of Science, Tohoku University)

2:50 PM - 3:10 PM JST | 5:50 AM - 6:10 AM UTC

[1A-11] Development of the photopharmacological technique to control chromosome movements and positioning using visible light stimulus

*Kazuya Matsuo¹, Ryota Uehara², Takashi Kikukawa², Nobuyuki Tamaoki¹ (1. Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University, 2. Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University)

3:10 PM - 3:30 PM JST | 6:10 AM - 6:30 AM UTC

[1A-12] Development of Visible-light Responsive Caged Compounds based on Asymmetrical Cyanine

*Masafumi Minoshima¹, Ryu Hashimoto¹, Souhei Sakata², Fumihito Ono², Kazuya Kikuchi^{1,3,4} (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Osaka Medical and Pharmaceutical University, 3. Immunology Frontier Research Center, Osaka University, 4. Center for Quantum Information and Quantum Biology, Osaka University)

Oral(first day)

3:40 PM - 4:40 PM JST | 6:40 AM - 7:40 AM UTC | Room A Zoom

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Shinobu Ito (Osaka Univ.)

3:40 PM - 4:00 PM JST | 6:40 AM - 7:00 AM UTC

[1A-13] Chemical Modification of Biomacromolecules through Ru-Olefin Specific Interaction

*Takashi Matsuo¹, Naoki Akiyama¹, Catur Jatmika¹, Ibuki Nakamura¹, Shun Hirota¹, Hiroyasu Yamaguchi² (1. Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology, 2. Graduate School of Science, Osaka University)

4:00 PM - 4:20 PM JST | 7:00 AM - 7:20 AM UTC

[1A-14] Selective N-terminal modification of peptides and proteins via copper(II)-mediated aldol reaction

*Kengo HANAYA¹, Kaho YAMOTO¹, Shuhei HIGASHIBAYASHI¹, Takeshi SUGAI¹ (1. Faculty of Pharmacy, Keio University)

4:20 PM - 4:40 PM JST | 7:20 AM - 7:40 AM UTC

[1A-15] Chemoproteomics profiling of nonribosomal peptide synthetases in living bacterial cells

*Fumihiro Ishikawa¹, Sho Konno², Chiharu Uchida¹, Takehiro Suzuki³, Katsuki Takashima¹, Naoshi Dohmae³, Hideaki Kakeya², Genzoh Tanabe¹ (1. Faculty of Pharmacy, Kindai University, 2. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 3. Biomolecular Characterization Unit, RIKEN Center for Sustainable Resource Science)

Oral(first day)

10:10 AM - 11:10 AM JST | 1:10 AM - 2:10 AM UTC | Room B Zoom

Nucleic acids

Chair: Yoshiya Ikawa (Toyama Univ.)

10:10 AM - 10:30 AM JST | 1:10 AM - 1:30 AM UTC

[1B-04] Orthogonal Photoregulation of Artificial Nucleic Acid via Irradiation with Different Wavelength of Light

*Keiji Murayama¹, Yuuhei Yamano², Hiroyuki Asanuma¹ (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. The Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University)

10:30 AM - 10:50 AM JST | 1:30 AM - 1:50 AM UTC

[1B-05] Development of fluorescent barcode to enable labeling of multiple biomolecules

*Koki MAKINO¹, Hiroyuki ASANUMA¹, Hiromu KASHIDA¹ (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

10:50 AM - 11:10 AM JST | 1:50 AM - 2:10 AM UTC

[1B-06] Base-pair Switching of 5-Carboxyuracil Nucleobases Driven by Metal Coordination

*Yusuke Takezawa¹, Hanci Zhang¹, Akira Suzuki¹, Keita Mori¹, Lingyun Hu¹, Mitsuhiko Shionoya¹ (1. Graduate School of Science, The University of Tokyo)

Oral(first day)

1:20 PM - 2:20 PM JST | 4:20 AM - 5:20 AM UTC | Room B Zoom

Nucleic acids

Chair: Tamaki Endo (Konan Univ.)

1:20 PM - 1:40 PM JST | 4:20 AM - 4:40 AM UTC

[1B-07] Development of large-scale analytical system for RNA binding and alkylation reactivity

*Kazumitsu Onizuka^{1,2}, Kaoru R Komatsu³, Ryosuke Nagasawa^{1,2}, Yutong Chen^{1,2}, Emi Miyashita³, Shunya Ishikawa^{1,2}, Kanna Ojima^{1,2}, Hiroataka Murase¹, Mamiko Ozawa¹, Hirohide Saito³, Fumi Nagatsugi^{1,2} (1. IMRAM, Tohoku University, 2. Graduate school of science, Tohoku University, 3. CiRA, Kyoto University)

1:40 PM - 2:00 PM JST | 4:40 AM - 5:00 AM UTC

[1B-08] Functional Oligonucleotide Encoding the Metabolite Information

*Tatsuya Nishihara¹, Yuto Motohashi¹, Shuhei Moritani¹, Momoka Yajima¹, Kazuhito Tanabe¹ (1. Aoyama Gakuin University)

2:00 PM - 2:20 PM JST | 5:00 AM - 5:20 AM UTC

[1B-09] Discovery of orthogonal RNA-RBP pairs through library-vs-library *in vitro* selection

*Keisuke Fukunaga¹, Yohei Yokobayashi¹ (1. OIST)

Oral(first day)

2:30 PM - 3:30 PM JST | 5:30 AM - 6:30 AM UTC | Room B Zoom

Nucleic acids

Chair: Hiromu Kashida (Nagoya Univ.)

2:30 PM - 2:50 PM JST | 5:30 AM - 5:50 AM UTC

[1B-10] Sequence-selective recognition of double-stranded DNA by using PNAs with natural nucleobases

*Yuichiro Aiba¹, Masanari Shibata¹, Kota Ito¹, Masaki Hibino¹, Shinya Ariyasu¹, Osami Shoji¹ (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

2:50 PM - 3:10 PM JST | 5:50 AM - 6:10 AM UTC

[1B-11] Intracellular Reconstruction of Viral Infection Response Field by Nucleic Acid Nanotechnology and Its Application to Selective Cancer Immunotherapy

*Kunihiko Morihiro¹, Shunto Morita¹, Akimitsu Okamoto^{1,2} (1. Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Research Center for Advanced Science and Technology (RCAST), The University of Tokyo)

3:10 PM - 3:30 PM JST | 6:10 AM - 6:30 AM UTC

[1B-12] Enzyme cascade reactions on a dynamic DNA scaffold

*Peng Lin¹, Huyen Dinh¹, Eiji Nakata¹, Takashi Morii¹ (1. Institute of Advanced Energy, Kyoto University)

Oral(first day)

3:40 PM - 4:20 PM JST | 6:40 AM - 7:20 AM UTC | Room B Zoom

Nucleic acids

Chair: Kunihiko Morihiro (The University of Tokyo)

3:40 PM - 4:00 PM JST | 6:40 AM - 7:00 AM UTC

[1B-13] Development of selective DNA aptamer for Amyloid beta 42 variants using SELCOS

*Radhika Biyani¹, Masahiro Takagi¹, Manish Biyani (1. School of material Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

4:00 PM - 4:20 PM JST | 7:00 AM - 7:20 AM UTC

[1B-14] Design and preparation of photocrosslinkable probe-modified magnetic particles (PPMP) to improve PCR test accuracy

*Maho Koda¹, Ayako Koto^{2,3}, Shuto Yajima³, Hiroaki Sakamoto³, Eiichiro Takamura³, Shin-ichiro Suye³ (1. Faculty of Engineering, University of Fukui, 2. NICCA CHEMICAL CO.,LTD, 3. Graduate School of Engineering, University of Fukui)

Oral(first day)

10:10 AM - 11:10 AM JST | 1:10 AM - 2:10 AM UTC | Room C Zoom

Analysis, Measurement, Sensor devices

Chair: Ikuhiko Nakase (Osaka Prefecture University)

10:10 AM - 10:30 AM JST | 1:10 AM - 1:30 AM UTC

[1C-04] Development of novel chemi-genetic fluorescent calcium sensors using directed evolution

*Takuya Terai¹, Wenchao Zhu¹, Dazhou Cheng¹, Yusuke Nasu¹, Robert E. Campbell^{1,2} (1. Graduate School of Science, The University of Tokyo, 2. Department of Chemistry, University of Alberta)

10:30 AM - 10:50 AM JST | 1:30 AM - 1:50 AM UTC

[1C-05] Evaluation of cancer cell invasiveness by measuring chloride ion efflux ability

*Ayana Yamagishi¹, Akane Nagata², Chikashi Nakamura^{1,2} (1. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

10:50 AM - 11:10 AM JST | 1:50 AM - 2:10 AM UTC

[1C-06] Extrusion of extracellular vesicles (EVs) containing a specific secondary metabolite by penicillium chrysogenum

*Ashok Zachariah Samuel¹, Horii Shumpei^{2,3}, Takuji Nakashima¹, Masahiro Ando¹, Naoko Shibata¹, Haruko Takeyama^{1,3,4,5} (1. Research organization for nano and life innovation, Waseda University, 2. Department of Advanced Science and Engineering, Waseda University, 3. CBBD-OIL, AIST-Waseda University, 4. Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda University, 5. Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University)

Oral(first day)

1:20 PM - 2:20 PM JST | 4:20 AM - 5:20 AM UTC | Room C Zoom

Analysis, Measurement, Sensor devices

Chair: Masumi Taki (The University of Electro-Communications)

1:20 PM - 1:40 PM JST | 4:20 AM - 4:40 AM UTC

[1C-07] Moment Analysis Method for Determination of Solute Permeation Kinetics at Lipid Bilayer of Liposomes

*Kanji Miyabe^{1,2}, Momoko Umeda¹, Shunta Inaba² (1. College of Science, Rikkyo University, 2. Graduate School of Science, Rikkyo University)

1:40 PM - 2:00 PM JST | 4:40 AM - 5:00 AM UTC

[1C-08] Measurement of microbial degradation of biodegradable polymer by QCM and electrochemistry

*Takuma Otsuki¹, Yasumasa Takenaka², Tomohiro Hiraishi², Hideki Abe², Noriyuki Asakura¹ (1. Graduate School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. RIKEN CSRS)

2:00 PM - 2:20 PM JST | 5:00 AM - 5:20 AM UTC

[1C-09] Detection of circulating tumor cells by the successive strand exchange of nucleic acids

*Yusuke Kitamura¹, Shunpei Sakamoto¹, Yuta Nakashima¹, Masaaki Iwatsuki², Yasuda Keihiro³, Seitaro Kumamoto^{1,3}, Yousuke Katsuda¹, Hideo Baba², Yoshitaka Nakanishi¹, Toshihiro Ihara¹ (1. Faculty of Advanced Science and Technology, 2. Faculty of Life Sciences, 3. OGIC technologies Co., Ltd.)

Oral(first day)

2:30 PM - 3:30 PM JST | 5:30 AM - 6:30 AM UTC | Room C Zoom

Analysis, Measurement, Sensor devices/ DDS

Chair; Noriyuki Asakura (Tokyo Institute of Tech.)

2:30 PM - 2:50 PM JST | 5:30 AM - 5:50 AM UTC

[1C-10] Research of fatty acid beta oxidation inhibitor using a fluorescent probe

*Kazuya Inoue¹, Yin Ruikang¹, Shohei Uchinomiya¹, Akio Ojida¹ (1. Faculty of pharmacy, Kyushu University)

2:50 PM - 3:10 PM JST | 5:50 AM - 6:10 AM UTC

[1C-11] Cancer treatment using alpha-ray emitters based on the reaction with acrolein

*Yudai Ode¹, Peni Ahmadi², Yang Wang³, Xiaojie Yin³, Nozomi Sato³, Hiromitsu Haba³, Ambara R. Pradipta^{1,2}, Katsunori Tanaka^{1,2,4} (1. Department of Chemical Science and Engineering, School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, Cluster for Pioneering Research, RIKEN, 3. RI Application Research Group, Nishina Center for Accelerator-Based Science, RIKEN, 4. Biofunctional Chemistry Laboratory, Alexander Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University)

3:10 PM - 3:30 PM JST | 6:10 AM - 6:30 AM UTC

[1C-12] Enhanced cytosolic delivery system based on light-induced condensation of cell-penetrating peptides

*Ikuhiko Nakase^{1,2}, Moe Miyai^{1,2}, Kosuke Noguchi^{1,2}, Shiho Tokonami^{2,3}, Takuya Iida^{1,2} (1. Graduate School of Science, Osaka Prefecture University, 2. Research Institute for Light-induced Acceleration System (RILACS), Osaka Prefecture University, 3. Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University)

Oral(first day)

3:40 PM - 4:40 PM JST | 6:40 AM - 7:40 AM UTC | Room C Zoom

Sugar, Lipids/Medical biology

Chair: Yusuke Kitamura (Kumamoto Univ.)

3:40 PM - 4:00 PM JST | 6:40 AM - 7:00 AM UTC

[1C-13] Chemical biology study on core fucose-containing *N*-glycan*Yoshiyuki Manabe^{1,2}, Marchetti Roberta³, Tomoyuki Takebe¹, Satomi Kasahara¹, Yohei Takakura¹, Wataru Nihei¹, Katsunori Tanaka^{4,5}, Kazuya Kabayama^{1,2}, Alba Silipo³, Antonio Molinaro³, Koichi Fukase^{1,2} (1. Graduate School of Science, Osaka University, 2. Project Research Center for Fundamental Sciences, Osaka University, 3. Department of Chemical Sciences, University of Naples Federico II, 4. Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, RIKEN, 5. Department of Chemical Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology)

4:00 PM - 4:20 PM JST | 7:00 AM - 7:20 AM UTC

[1C-14] Oxygen Concentration Imaging in 3T3-L1 Adipocytes Using Phosphorescent Mesoporous Silica Nanoparticles Modified with Platinum Porphyrin

*Hidehiro ITO¹, Arisa Yamauchi¹, Shunsuke Odai¹, Masaki Okamoto², Toshiaki Kamachi¹ (1. Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Faculty of Letters, Keio University)

4:20 PM - 4:40 PM JST | 7:20 AM - 7:40 AM UTC

[1C-15] Middle-biologics as covalent drugs

*Yudai Tabuchi¹, Masumi Taki¹ (1. Graduate School of Informatics and Engineering, The University of Electro-Communications)

Thu. Sep 9, 2021

Oral(first day)

2:00 PM - 2:20 PM JST | 5:00 AM - 5:20 AM UTC | Room B Zoom

Sugar, Lipids/Medical biology

2:00 PM - 2:20 PM JST | 5:00 AM - 5:20 AM UTC

[1C-15] Middle-biologics as covalent drugs

Oral(first day)

📅 Wed. Sep 8, 2021 9:00 AM - 10:00 AM JST | Wed. Sep 8, 2021 12:00 AM - 1:00 AM UTC | 🏠 Room A
Zoom

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Tomomi Koshiyama (Ritshumeikan University)

9:00 AM - 9:20 AM JST | 12:00 AM - 12:20 AM UTC

[1A-01] Detection of Synthetic Compound-Protein Interactions Using Artificial Split Intein and b-Lactamase

hiroaki hagiwara¹, *Taisei Iwabuchi¹, eriho fujii², tsuyoshi takahashi¹ (1. Graduate School of Science and Technology, Gunma University), 2. Science and Technology, Gunma University)

9:20 AM - 9:40 AM JST | 12:20 AM - 12:40 AM UTC

[1A-02] Structural control of microtubules by protein encapsulation using Tau-derived peptide

*Hiroshi Inaba¹, Yurina Sueki¹, Takashi Iwasaki², Arif Md. Rashedul Kabir³, Akira Kakugo³, Kazuki Sada³, Kazunori Matsuura¹ (1. Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori University, 3. Graduate School of Science, Hokkaido University)

9:40 AM - 10:00 AM JST | 12:40 AM - 1:00 AM UTC

[1A-03] Construction of highly-ordered protein structures by using amphiphilic peptides in living cells

*Takayuki Miki¹, Masahiro Hashimoto¹, Hiroki Takahashi¹, Keigo Kajiwara¹, Sae Nakayama¹, Taichi Nakai¹, Hisakazu Mihara¹ (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

人工分割インテインと β ラクタマーゼを用いた合成化合物-タンパク質間相互作用の検出

萩原弘顕¹・〇岩渕泰世¹・藤井絵里帆²・高橋剛¹ (¹群馬大院理工、²群馬大理工)

Detection of Synthetic Compound-Protein Interactions Using Artificial Split Intein and β -Lactamase
(Graduate School of Science and Technology, Gunma University¹, Science and Technology, Gunma University²) HAGIWARA Hiroaki¹; IWABUCHI, Taisei¹; FUJII, Eriho²; TAKAHASHI, Tsuyoshi¹

薬剤などの合成化合物とタンパク質間の相互作用を検出する手法の開発は、薬剤候補化合物や、オフターゲットの同定などにおいて重要である。相互作用を簡便かつ高感度に検出するために、蛍光タンパク質やルシフェラーゼなどのレポータータンパク質を利用する方法が開発されている。一方当研究室ではこれまでに、タンパク質トランススプライシング (PTS) 反応を自己触媒する分割インテインを用い、PTS 反応を介して活性型の酵素 (HIV-1 プロテアーゼ、NanoLuc ルシフェラーゼ) が生成する系を開発してきた¹⁾。また、*Npu* DnaE インテインの改良についても試みてきた。本研究では、当研究室で開発した *Npu* DnaE 変異体を用いて、合成化合物とタンパク質の相互作用に依存してタンパク質スプライシング反応が進行し、活性型 β ラクタマーゼが生成する系の構築を試みた。*Npu* DnaE インテインの分割位置を変更して PTS 活性を大きく低下させ、それぞれの分割体に合成化合物および標的タンパク質を担持することで、合成化合物-標的タンパク質間の相互作用による近接効果により、PTS 反応が進行すると期待した。

Npu DnaE インテインは、1-131 と 132-137 の位置で分割し、インテインの C 末端 6 アミノ酸と TEM-1 β ラクタマーゼの C 末端 2 残基に対応する Cys-Trp 配列を複合化したペプチドを設計した^{2,3)}。このペプチドの N 末端側にリン酸化チロシン含有ペプチド (pYEEI) や atorvastatin、imatinib などの合成化合物を導入した (図 B)。また、 β ラクタマーゼの N 側断片と N インテインの融合体の C 末端側に Src SH2、PDE6D、NQO2 などの標的タンパク質を配置した。pYEEI 複合化ペプチドと Src SH2 複合化タンパク質を混合し、相互作用に依存した PTS 反応および β ラクタマーゼ活性について検討したところ、相互作用に依存した PTS 反応の進行およびそれに伴う β ラクタマーゼ活性の発現が確認された (図 C)。また、atorvastatin と PDE6D との相互作用についても同様に、 β ラクタマーゼ活性を指標として検出できることが分かった。

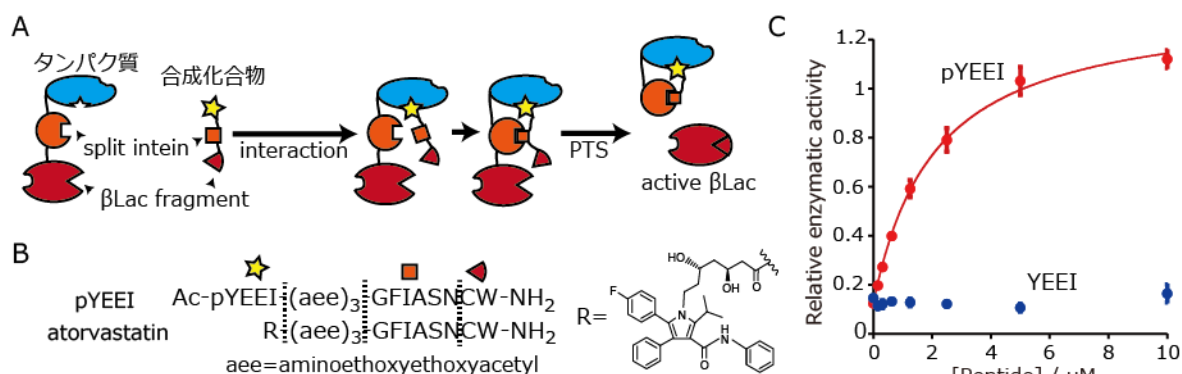


図. (A) 分割型 β Lac とインテインを用いた相互作用検出の模式図. (B) 設計した合成化合物融合体. (C) ペプチド濃度に依存した β Lac 活性の発現.

1) M. Kawase, M. Fujioka, T. Takahashi, *ChembioChem*, **22**, 577-584 (2021)

2) A. S. Aranko *et al.*, *Mol. BioSyst.*, **10**, 1023-1034 (2014)

3) J. Hecky, K. M. Müller, *Biochemistry*, **44**, 12640-12654 (2005)

Tau 由来ペプチドを介したタンパク質内包による微小管の構造制御

○稲葉央¹・末岐優里菜¹・岩崎崇²・Arif Md. Rashedul Kabir³・角五彰³・佐田和己³・松浦和則¹ (¹鳥取大院工・²鳥取大院農・³北大院理)

Structural control of microtubules by protein encapsulation using Tau-derived peptide (Graduate School of Engineering, Tottori University¹, Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori University², Graduate School of Science, Hokkaido University³) INABA, Hiroshi¹; SUEKI, Yurina¹; IWASAKI, Takashi²; KABIR, Arif Md. Rashedul³; KAKUGO, Akira³; SADA, Kazuki³; MATSUURA, Kazunori¹

微小管はチューブリンからなる内径 15 nm のチューブ状タンパク質集合体であり、細胞骨格としての機能やナノ材料の部品として着目されている。これまで、その内部空間は注目されてこなかったが、近年微小管内部に結合するタンパク質が発見され、微小管構造への寄与が示唆されている¹。内部への人工的な分子導入により微小管の構造や機能を制御できる可能性があるものの、その方法論は未開拓であった。我々は微小管内部に結合する Tau 由来ペプチド TP を開発し、TP を用いることで様々なナノ構造体の微小管への内包に成功している²。特に、TP 連結 GFP (TP-GFP) の内包により微小管の長さ、剛直性、キネシン基板上の運動速度が増大し、抗がん剤 Taxol と同程度に微小管を安定化することを見出している³。

本研究では、4 量体蛍光タンパク質である Azami Green (AG) の各サブユニット C 末端に TP を連結した TP-AG を微小管に内包することで、多価結合による微小管の構造制御を試みた (Fig. 1a)。TP-AG の TP 間距離 (4.0 nm) は微小管内の TP 結合部位間の距離 (4.3 nm) に近いので、多点で結合して微小管の大きな構造変化を誘起すると期待される。TP-AG とチューブリンを複合化後、GTP アナログである GMPCPP を加え重合したところ、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) により TP-AG の微小管への結合が確認された (Fig. 1a)。抗 AG 抗体や消光剤を用いた解析により、TP-AG の微小管内部への導入が示唆された。濁度測定で微小管の形成量を評価したところ、**TP-AG により微小管形成が大幅に促進され、Taxol や TP-GFP を凌駕する微小管安定化能を有することが明らかとなった** (Fig. 1b)。TP を持たない AG や、単量体 AG に TP を連結した TP-mAG では微小管形成が阻害されたことから、複数の TP を有する TP-AG により微小管が大きく安定化されたといえる。また、GTP で作製した一般的に不安定な微小管も TP-AG により安定化され、脱重合条件下においても微小管構造が保持された。現在はキネシン基板上における微小管の運動・物性解析を進めている。

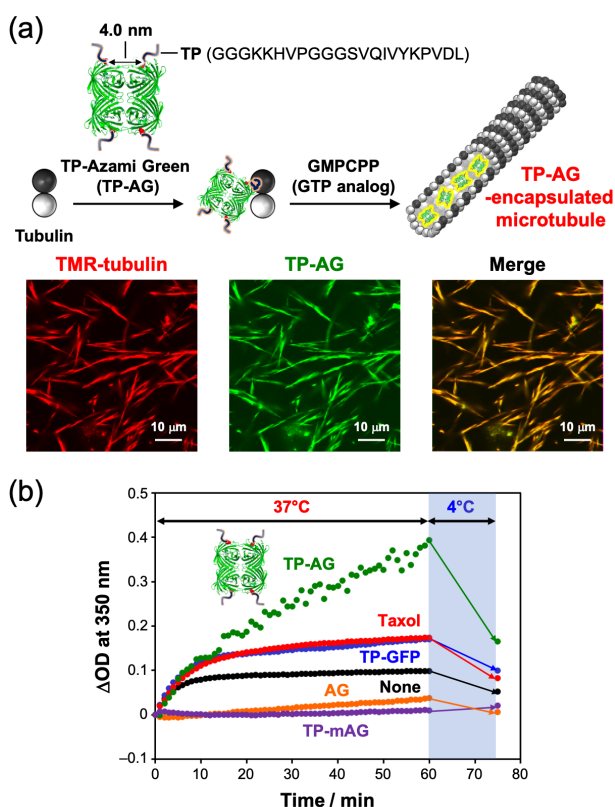


Fig. 1. (a) Encapsulation of TP-conjugated Azami Green (TP-AG) in microtubule and the CLSM images. (b) Effects on changes in turbidity over time caused by tubulin polymerization.

- 1) M. Ma, M. Stoyanova, G. Rademacher, S. K. Dutcher, A. Brown, R. Zhang, *Cell*, **2019**, 179, 909.
- 2) H. Inaba, K. Matsuura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2021**, DOI: 10.1246/bcsj.20210202 (Account).
- 3) H. Inaba, T. Yamamoto, T. Iwasaki, A. M. R. Kabir, A. Kakugo, K. Sada, K. Matsuura, *Chem. Commun.*, **2019**, 55, 9072.

両親媒性ペプチドによる細胞内での蛋白質高次構造体の形成

○三木 卓幸・橋本 匡浩・高橋 広樹・梶原 圭悟・中山 彩恵・中井 太一・
三原 久和（東工大生命理工）

Construction of highly-ordered protein structures by using amphiphilic peptides in living cells (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) MIKI, Takayuki; HASHIMOTO, Masahiro; TAKAHASHI, Hiroki; KAJIWARA, Keigo; NAKAYAMA, Sae; NAKAI, Taichi; MIHARA, Hisakazu

細胞内の様々なイベントにおいて蛋白質間相互作用が関与する。そのため、蛋白質間相互作用の制御は、細胞機能メカニズム解析や改変に応用される重要な基盤技術である。その主な手法として、FKBP や SH3 ドメインなどの蛋白質工学による方法が汎用的に用いられる。これに対して、蛋白質間相互作用のエッセンスを抽出した設計ペプチドもミニマムな相互作用モチーフとして近年開発されており、coiled-coil ペプチドペアは蛋白質二量体を形成するタグとして細胞内でも用いられる。一方で、oligomeric な相互作用をペプチドレベルの小さなモチーフで実現する手法は十分に開発されていない。

その足掛かりとして、これまで我々は疎水性残基 Tyr と親水性残基 Glu/Lys を繰り返した両親媒性 Y15 ペプチド(YEYKYEYKYEYKYEY)を開発した¹。Y15 ペプチドは水溶液中で β -sheet 構造により自己集合し、Y15 ペプチドを融合した蛍光蛋白質(Y15-sfGFP)も同様にファイバー状に集積した。細胞内でも Y15-sfGFP は自己集合化し、蛍光顆粒として観察された。更に、四量体を形成する蛍光蛋白質 AzamiGreen (AG)に Y15 ペプチド融合した Y15-AG は、 μm スケールのサイズの大きい高次構造体となることを見出し、これを細胞内の人工構造体のスキャホールドとして利用できることを示した。

そこで本研究で、我々は Y15 融合蛋白質を基本構造とし、(1)細胞内で自己集合する両親媒性ペプチドの設計指針の確立、(2)光応答的な自己集合性システムの開発、を目指した。

(1) 細胞内で自己集合する両親媒性ペプチドの設計指針の確立

自己集合性ペプチドは、主鎖の水素結合・疎水性相互作用・静電相互作用を考慮して設計される。そこで、まずは疎水性アミノ酸残基の検討を行なった。その結果、疎水性の高いアミノ酸(Phe や Ile)で構成されるペプチドタグは、高い自己集合性を示して短い鎖長でも集積したが、同時に、融合した蛋白質の変性への影響が大きいこともわかった。このトレードオフの関係の中でも、極性原子を有する Tyr や Trp を含むペプチドは変性の影響が少なく、強く自己集合した。更に、Tyr からなる Y15 ペプチドと、Trp からなる W13 ペプチドは細胞内で直交的に独立して自己集合することがわかった。

また、親水性残基を全て Lys 残基とした YK11 ペプチド(YKYKYKYKYKY)は、細胞内で流動性をもつ人工的な液-液相分離構造を形成することが判明した。更に、試験管内で精製した YK11-sfGFP は、ATP やリン酸イオン存在下で、低温で相分離し高温で溶解する UCST 型の相分離を形成することが判明した。このように、ペプチドの疎水性残基や親水性残基を変えることで、自在に、自己集合性や集合体の物性を変えられることが判明し、人工的に液-液相分離を構築することができた。

(2)光応答的な自己集合性システムの開発

これまでの検討で、自己集合性ペプチドの相互作用と蛋白質間相互作用が協奏した多価相互作用が高次構造体形成に重要であることを見出した。そこで、W13 ペプチドに対して、光照射に応じてオリゴマーを形成する Cry2 蛋白質を融合することで、光刺激応答的に高次構造体を作成できると期待した。その結果、W13-mCherry-Cry2 は光照射に応じて μm スケールの構造体を構築した。加えて、W13 融合蛋白質を同時に共発現すると、光照射に伴って複数種類の蛋白質が共集合した。このように、遺伝学的に導入が容易なミニマムなサイズのペプチドタグを融合することで、マルチコンポーネントな構造体を形成できた。

1) T. Miki, T. Nakai, M. Hashimoto, K. Kajiwara, H. Tsutsumi & H. Mihara, *Nat. Commun.* **12**, 3412 (2021)

Oral(first day)

📅 Wed. Sep 8, 2021 10:10 AM - 11:10 AM JST | Wed. Sep 8, 2021 1:10 AM - 2:10 AM UTC | 🏠 Room A
Zoom

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Hiroshi Tsutsumi (Tokyo Institute of Tech.)

10:10 AM - 10:30 AM JST | 1:10 AM - 1:30 AM UTC

[1A-04] Post-modification of folded proteins onto supramolecular peptidic fibers and vaccine application

*Rie Wakabayashi¹, Ghazian Dzaky Syahid Fathullah¹, Ayato Higuchi¹, Noriho Kamiya^{1,2}, Masahiro Goto^{1,2}
(1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

10:30 AM - 10:50 AM JST | 1:30 AM - 1:50 AM UTC

[1A-05] Histidine Chemical Modification Using Singlet Oxyge

*Shinichi Sato¹, Keita Nakane², Tatsuya Niwa³, Michihiko Tsushima⁴, Hideki Taguchi³, Hiroyuki Nakamura⁴, Shusuke Tomoshige², Minoru Ishikawa² (1. Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University, 2. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 3. Cell Biology Center, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, 4. Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology)

10:50 AM - 11:10 AM JST | 1:50 AM - 2:10 AM UTC

[1A-06] Quantitative adhesion analysis of a highly sticky bacterium

*Shogo Yoshimoto¹, Katsutoshi Hori¹ (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

自己組織化ペプチドファイバーへのタンパク質修飾とワクチン応用

○若林里衣¹・Syahid Fathullah Ghazian Dzaky¹・樋口亜也斗¹・神谷典穂^{1,2}・後藤雅宏^{1,2}(¹ 九大院工、² 九大未来化セ)

Post-modification of folded proteins onto supramolecular peptidic fibers and vaccine application

(Graduate School of Engineering, Kyushu University¹, Center for Future Chemistry, Kyushu University²)WAKABAYASHI, Rie¹; SYAHID FATHULLAH, Ghazian Dzaky¹; HIGUCHI, Ayato¹; KAMIYA, Noriho^{1,2}; GOTO, Masahiro^{1,2}

ワクチンは現在世界的に猛威を振るう COVID-19 のような感染症に対する最も効果的な予防法であり、細菌やウイルス由来の抗原を投与することで、抗原特異的な免疫を誘導する。ワクチンによる高い免疫効果を得るためには、抗原を免疫細胞に効率的にデリバリーするとともに、抗原性を高めるアジュバントの同時投与が重要である [1]。最近、自己組織化部位と抗原エピトープ部位を併せ持つ自己組織化エピトープペプチドが形成する超分子構造体がアジュバント効果を示すことが報告されており、その構造や物性が免疫効果に与える影響が精力的に研究されている [2]。我々はこれまでに microbial transglutaminase (MTG) 酵素反応部位を持つ自己組織化ペプチドを開発し、これが形成する超分子構造体上に MTG 反応によりタンパク質を事後修飾できることを報告している [3]。タンパク質は構造中に複数のエピトープ配列を持ち、ペプチドと比較して免疫原性が高いことから、この超分子構造体を抗原タンパク質のデリバリーキャリアとして用いることで、高いアジュバント効果を持つワクチンに繋がるのではないかと期待した。

自己組織化部位として Pyrenyl 基と疎水性アミノ酸 Leu 残基を、MTG 反応性部位として Leu-Gln-Gly (LQG) 配列を持つ自己組織化ペプチド、Pyr-LnQG (n = 2, 3) を合成した。これらのペプチドは水中で Pyrenyl 基同士の π - π スタッキングとペプチド間の水素結合によりファイバー状構造に自己組織化した。抗原モデルタンパク質として MTG 反応性の Lys 残基を持つ緑色蛍光タンパク質、Ktag-EGFP を用い、ペプチドファイバーを形成後に MTG 反応を行うと、80%以上の反応率でファイバー上に Ktag-EGFP が導入された。また、マウス由来樹状細胞 DC2.4 細胞を用いた細胞内へのタンパク質デリバリーを評価したところ、ファイバー上に導入された Ktag-EGFP は、タンパク質単体と比較して有意に高い細胞内移行性を示した。またこの細胞内移行性は、タンパク質を修飾するペプチドファイバーの種類にも依存することが確認された (図 1)。講演では本タンパク質導入ペプチドファイバーを用いたワクチン効果およびワクチン効果を更に高めるための製剤化の検討に関しても併せて報告する。

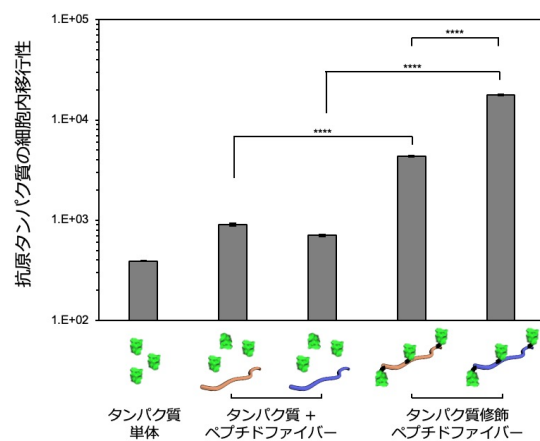


図 1. ペプチドファイバーを用いた抗原タンパク質の細胞内デリバリー。N = 3 wells, mean $\pm$ SD, **** p < 0.0001.

References

- [1] O'Hagan *et al.*, *J. Controlled Release*, **190**, 563-579, 2014.
- [2] C. L. O'Neill *et al.*, *Acta Biomaterialia*, DOI: 10.1016/j.actbio.2021.05.003.
- [3] R. Wakabayashi, *et. al.*, *Chem. Commun.*, **55**, 640-643, 2019; *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 3459, 2021.

一重項酸素を活用したヒスチジン残基化学修飾

○佐藤伸一¹・中根啓太²・丹羽達也³・對馬理彦⁴・田口英樹³・中村浩之⁴・友重秀介²・石川稔² (¹東北大学際研、²東北大院生命、³東工大細胞制御工学研究センター、⁴東工大化生研)

Histidine Chemical Modification Using Singlet Oxygen (Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University¹, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University², Cell Biology Center, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology³, Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology⁴) SATO, Shinichi¹; NAKANE, Keita²; NIWA, Tatsuya³; TSUSHIMA, Michihiko⁴; TAGUCHI, Hideki³; NAKAMURA, Hiroyuki⁴; TOMOSHIGE, Shusuke²; ISHIKAWA, Minoru²

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な不可欠な技術である。しかし、水中で使用できる化学反応のバリエーションが乏しく、効率的に修飾できるアミノ酸残基の種類は大きく限定されている。ヒスチジン残基 (His) は酵素活性中心のプロトン移動の触媒、金属原子へのキレート、化学的に不安定なリン酸化 His によるシグナル伝達等に関わっている。しかし、His への残基選択的修飾法は困難であり、新規手法の開発が求められている。従来の His 修飾法は求電子的な試薬を用いて、求核性の His を修飾するという手法が開発されているが¹、他の求核性アミノ酸残基との直交性の確立が課題である。一方で、ヒスチジン残基は一重項酸素 (¹O₂) との反応性が高く、Diels-Alder 反応により求電子性の高反応性中間体 (**1**) が形成される²。本研究では、**1** を求核性の高い 1-methyl-4-arylurazole (MAUra; **2**) で捕捉する極性転換反応により His 選択的修飾を達成した (図 1 上)。

本反応で使用する ¹O₂ はマイクロ秒スケールの寿命を持つ高反応性であるため、¹O₂ 発生源となる光増感剤の近傍空間で選択的にヒスチジンの酸化反応と **2** による求核的付加反応が瞬時に完結すると考えた。近接依存性標識の有用性を応用すべく、抗体 (大きさ約 10 nm) の Fc 領域選択的な修飾に本反応を活用した。磁気ビーズ表面上に、抗体 Fc 領域に対するリガンド分子と光増感剤³を同時に担持した反応場を構築し、本ヒスチジン修飾反応をタンパク質部位選択的に制御した (図 1 下)。LC-MS 解析の結果、Fc 領域のヒスチジン残基を選択的に標識できることを明らかにした⁴。

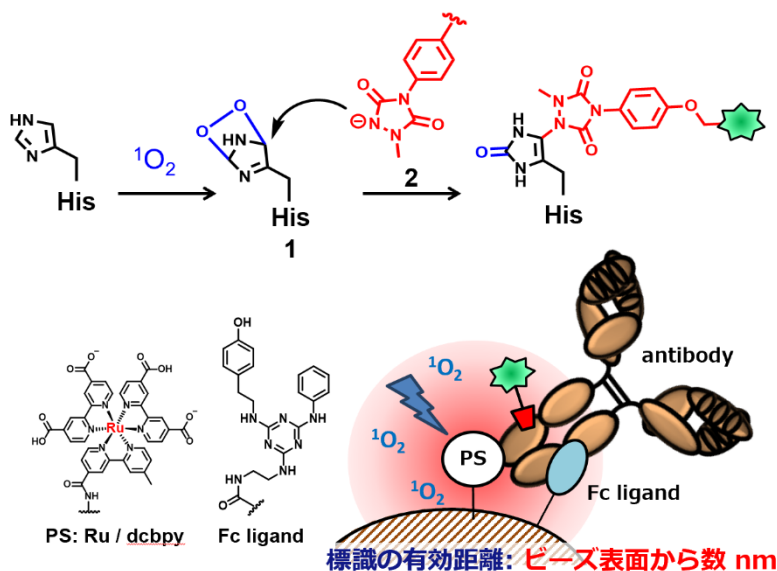


図 1 ヒスチジン修飾反応と抗体 Fc 領域部位選択的修飾

【参考文献】[1] Jia, S., He, D., Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 7294. [2] Liu, M., Zhang, Z., Cheetham, J., Zhou, Z. S. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 4940. [3] Tsushima, M., Sato, S., Nakamura, H. *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 4838. [4] Nakane, K., Sato, S., Niwa, T., Tsushima, M., Tomoshige, S., Taguchi, H., Ishikawa, M., Nakamura, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 7726.

高付着性細菌の定量的付着力解析

○吉本将悟・堀克敏（名大院工）

Quantitative adhesion analysis of a highly sticky bacterium (Graduate School of Engineering, Nagoya University) YOSHIMOTO, Shogo; HORI, Katsutoshi

微生物付着はバイオフィーム形成の第一段階であり¹⁾、医療や衛生分野においては感染やコンタミネーションの原因となる厄介なものである。一方、排水処理やバイオプロセスにおいては反応効率の向上や分離プロセスの簡便化などを可能とするため有益なものである。そのため、微生物の付着現象の理解と制御は様々な領域において重要な課題である。

アシネトバクター属細菌 Tol 5 はプラスチックからガラス、金属など様々な材料表面に対して高い付着性を示す²⁾。このユニークな付着性は、Tol 5 が細胞表層に持つ長さ 250 nm のファイバー状タンパク質 AtaA によるものである。*ataA* 遺伝子を他の細菌で発現させることで付着性を付与し担体に固定化できるため、新規の全細胞触媒固定化方法として期待されている。しかしこれまでの Tol 5 の付着性評価は、染色法や顕微鏡観察による付着細胞量の測定に留まっていた。そこで本研究では、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた単細胞・単分子付着力解析³⁾により、Tol 5 とその付着因子である AtaA の付着力と材料特異性を定量的に評価することを目的とした。

まず、グルタルアルデヒドで活性化したポリイミン修飾ガラスボトムディッシュに細菌懸濁液を滴下し室温で 30 分間静置した。この方法により、細菌細胞の底面側がガラスボトムディッシュ表面のポリイミンと共有結合で架橋される。固定化した細胞に、材質の異なる直径 2 μm のコロイドが先端についたコロイダルプローブをリン酸緩衝液中で 1 秒間押しつけ、1 $\mu\text{m/s}$ で引き離す際に細菌細胞-プローブ間に働く力を AFM で測定した(Fig. 1A)。それぞれの材質に対する、AtaA に起因した Tol 5 細胞の強い

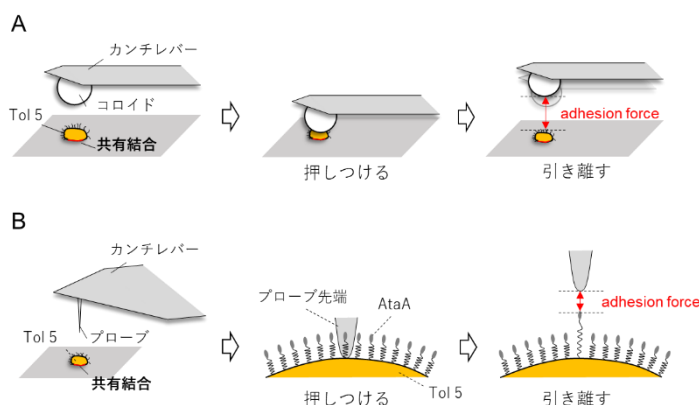


Fig. 1. AFM を用いた単細胞・単分子付着力解析の模式図.

付着力が検出された。続いて、AtaA 一分子の付着力を測定するために、アラビノース濃度で *ataA* 遺伝子の発現量を制御可能な Tol 5 由来の変異株を用いて、細胞表層に AtaA をわずかに提示した細胞を調製した。この細胞をガラスボトムディッシュ表面に固定化し、先端曲率半径が 30 nm 以下のシャープなシリコン製プローブまたは電荷や疎水性の異なるアルカンチオール自己組織化単分子膜で修飾したプローブをリン酸緩衝液中で 1 秒間押しつけ、1 $\mu\text{m/s}$ で引き離す際に AtaA-プローブ間に働く力を AFM で測定した(Fig. 1B)。全てのプローブで AtaA 一分子の強い付着力を測定することに成功した。これらの結果は、Tol 5 とその付着因子である AtaA の付着が材料非特異的であることを示している。

- 1) R. D. Monds, G. A. O'Toole, *Trends in Microbiology*, 17(2):73-87 (2017)
- 2) M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori, *PLOS ONE*, 7, e48830 (2012)
- 3) D. Alsteens, H. E. Gaub et. al., *Nature Reviews Materials*, 2, 17008 (2017)

Oral(first day)

📅 Wed. Sep 8, 2021 1:20 PM - 2:20 PM JST | Wed. Sep 8, 2021 4:20 AM - 5:20 AM UTC | 🏠 Room A Zoom

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Osami Shoji (Nagoya Univ.)

1:20 PM - 1:40 PM JST | 4:20 AM - 4:40 AM UTC

[1A-07] Rapid Protein Crystallization in Cell for the Submicron Crystal Structure Analysis

*Satoshi Abe¹, Junko Tanaka¹, Takafumi Ueno¹ (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

1:40 PM - 2:00 PM JST | 4:40 AM - 5:00 AM UTC

[1A-08] Control of Fluorescent Molecular Properties by Aromatic Clusters in Protein Cages

*Yuki Hishikawa¹, Basudev Maity¹, Michito Yoshizawa², Masakazu Morimoto³, Satoshi Abe¹, Takafumi Ueno¹ (1. School of Life Science & Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Laboratory for Chemistry & Life Science, Tokyo Institute of Technology, 3. Department of Chemistry, Rikkyo University)

2:00 PM - 2:20 PM JST | 5:00 AM - 5:20 AM UTC

[1A-09] Excitation Energy Transfer in Photosynthetic Light-harvesting Protein LH2 with Modification of Energy-donating Pigments

*Yoshitaka Saga¹, Madoka Yamashita¹, Aiko Tanaka¹, Yuji Otsuka¹, Yuto Masaoka², Tsubasa Hidaka², Yutaka Nagasawa² (1. Faculty of Science and Engineering, Kindai University, 2. Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University)

迅速タンパク質結晶化とサブミクロン結晶構造解析

○安部 聡・田中潤子・上野隆史（東工大生命理工）

Rapid Protein Crystallization in Cell for the Submicron Crystal Structure Analysis (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) ABE, Satoshi; TANAKA, Junko; UENO Takafumi

【序論】

近年、タンパク質結晶工学は、材料科学、構造生物学から医療応用まで様々な研究分野で注目を集めており、多孔性タンパク質結晶の合成や酵素とのハイブリッド化など、機能化方法が報告されている¹。したがって、煩雑なタンパク質の精製や結晶化プロセスを必要としない迅速かつ、大量に合成可能な細胞内タンパク質結晶化法は、様々な分野での応用が期待される。我々は、これまで昆虫細胞で形成される「多角体」結晶を用い、結晶エンジニアリングによる酵素を内包した不均一触媒の合成やタンパク質集合体の構築を進めてきた²。一方で、X線自由電子レーザーやマイクロフォーカスビームラインの開発により、細胞内タンパク質結晶の構造が報告されてきている。しかしながら、これらの構造解析に必要な結晶の質や量に関する問題は、多くの細胞内結晶が真核細胞を用いているため、高品質結晶を短時間で得ることは依然として困難である。そこで、本研究では、短時間で大量のタンパク質発現が可能な大腸菌を用いた、サブマイクロサイズのタンパク質結晶化と構造解析を試みた(図1)。

【実験】

昆虫細胞で結晶化する多角体タンパク質を大腸菌内で発現する系を構築し、時間や温度など、発現と結晶化の検討を行なった。発現、結晶形成の確認は、SDS-PAGE、MALDI-TOF MS、SEM により行い、SPRING-8 BL32XU にて X 線結晶構造解析を行なった。

【結果】

大腸菌内で多角体タンパク質を発現した結果、16 時間後には、細胞内で結晶が形成されることを見出した。細胞から精製した結晶の SEM 観察の結果、0.6 μm サイズの超微小結晶が観察された(図 1b, c)。結晶の SDS PAGE や MALDI TOF MS により、多角体のタンパク質の分子量に一致するバンドやピークが観測されたことから、結晶は多角体タンパク質により形成されていることを明らかにした。大腸菌内での結晶化の時間追跡を行なった結果、発現開始 1 時間で大腸菌内に結晶集合体が観察された。SPRING-8 BL32XU でのマイクロ X 線ビームによる構造解析では、4 時間培養した結晶から、X 線構造解析が可能なデータを収集することができた。その平均サイズは 0.35 μm であり、超微小結晶からの構造解析に成功したことを示している。これらの結果は、細胞内タンパク質結晶化と構造解析が大腸菌で応用可能なことを示しただけでなく、様々なタンパク質の結晶工学やサブミクロン結晶による構造決定につながると期待できる。

【参考文献】

- (1) R. Schonherr *et al. Biol. Chem.* **2018**, 399, 751., C. N. Mudogo *et al. Traffic.* **2020**, 21, 220.
- (2) T. Nguyen *et al. ACS Appl. Nano Mater.* **2021**, 4, 1672. S. Abe *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 12341.

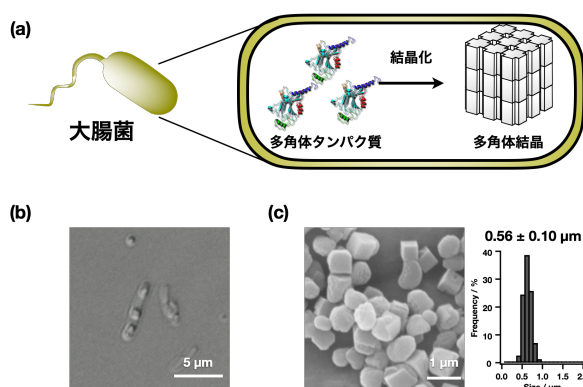


図 1. (a), (b) 大腸菌内でのタンパク質結晶化、(c) 精製した多角体結晶の SEM 像

タンパク質ケージ内芳香族クラスターによる蛍光分子特性制御

○菱川湧輝¹・MAITY Basudev¹・吉沢道人²・森本正和³・安部聡¹・上野隆史¹ (¹東工大生命理工、²東工大化学生命科学研、³立教大理)

Control of Fluorescent Molecular Properties by Aromatic Clusters in Protein Cages (Sch. of Life Sci. & Technol., Tokyo Inst. of Technol.¹; Lab. for Chem. & Life Sci., Tokyo Inst. of Technol.²; Dept. of Chem., Rikkyo Univ.³) Hishikawa, Yuki¹; MAITY, Basudev¹; YOSHIZAWA, Michito²; MORIMOTO, Masakazu³; ABE, Satoshi¹; UENO, Takafumi¹

【背景・目的】

芳香族アミノ酸は密集することでクラスターを形成し¹⁾、その環反転や側鎖の配向角変化といった挙動は、分子認識やフォールディング、チャンネル開閉制御、電子伝達において重要である²⁾。しかしながら、芳香族残基の特異な動的挙動の原子レベルでの直接観察、およびタンパク質設計への応用は困難である。そこで本研究では、大規模な変異導入に対して安定であるフェリチンケージを利用し³⁾、ケージ内部表面を芳香族残基に置換することで、芳香族クラスターの構築を試みた。また、蛍光分子のケージ内包、芳香族クラスターによる蛍光特性制御、芳香環配向変化の直接観察を目指した。

【方法】

フェリチン単量体あたり 1, 2, 6 残基のフェニルアラニンを 2 回対称界面(Fig 1a)に導入し、**Fr-F1**, **Fr-F2**, **Fr-F6** を設計した。比較のため、**Fr-F6** の Phe59 を Ala または Leu に置換した **Fr-F5A** および **Fr-F5L** を設計した(Fig 1b)。変異体フェリチンケージは、大腸菌による発現・カラム精製を経て、MALDI-TOF-MS および DLS により同定した。芳香族側鎖のコンフォメーション変化を誘起するため、芳香族蛍光分子および光異性化分子をフェリチンケージに内包させた(Fig 1c)。X 線結晶構造解析により構造変化を追跡し、蛍光量子収率・蛍光寿命測定により蛍光分子特性を評価した。

【結果・考察】

UV-vis スペクトルから、設計したいずれの変異体においても、ナイルレッド(NR)のケージ内包が示唆された。X 線結晶構造解析において、**Fr-F1**, **Fr-F2**, **Fr-F6** では NR の電子密度と、NR-Phe59 間での π -スタッキング相互作用が確認された。**Fr-F6** では NR 結合に伴い、複数の Phe 側鎖のコンフォメーションが協働的に変化した。NR の蛍光量子収率・蛍光寿命は、**Fr-F5A**, **Fr-F5L** ケージ内よりも **Fr-F1**, **Fr-F2**, **Fr-F6** の方が向上した。以上より、本研究は、芳香族クラスターの協働的配向変化を原子レベルで明らかにし、芳香族クラスター環境が蛍光分子特性を制御できることを示した。

- 1) K. M. Makwana *et al.*, *Protein Sci.*, 24, 1920 (2015). 2) J. K. Williams *et al.*, *Biophys. J.*, 104, 1698 (2013).
3) Y. Hishikawa *et al.*, *Chem. Lett.*, 49, 840 (2020).

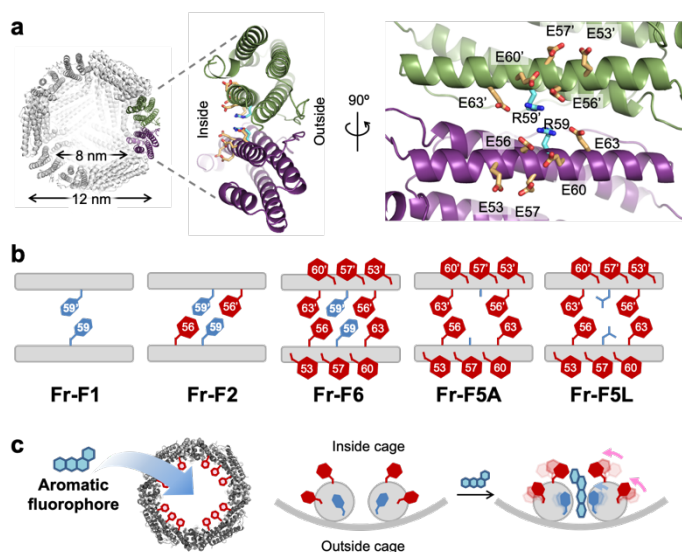


Fig 1. (a) The structure of a ferritin cage and the two-fold symmetric inter-subunit interface (PDB ID: 1DAT). (b) Design of mutants with aromatic clusters at the two-fold interface. (c) Cartoon representation for incorporation of aromatic fluorophore into the cage and concept of dynamic conformational control of aromatic sidechains induced by fluorophore binding.

エネルギードナー色素を改変した光合成タンパク質 LH2 の 励起エネルギー移動

○佐賀 佳央¹・山下 眞花¹・田中 愛子¹・大塚 悠史¹・政岡 宥人²・日高 翼²・
長澤 裕² (¹近畿大理工、²立命館大院生命科学)

Excitation Energy Transfer in Photosynthetic Light-harvesting Protein LH2 with Modification of Energy-donating Pigments (Faculty of Science and Engineering, Kindai University¹, Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University²) SAGA, Yoshitaka¹; YAMASHITA, Madoka¹; TANAKA, Aiko¹; OTSUKA, Yuji¹; MASAOKA, Yuto²; HIDAKA, Tsubasa²; NAGASAWA, Yutaka²

光合成の初期過程における、光捕集タンパク質の効率よい光吸収と励起エネルギー移動の機構解明は光生命科学の重要課題であるとともに、新たな光機能タンパク質の創成に有用な情報を与える。このような課題に取り組むために、我々は、紅色光合成細菌の光捕集タンパク質 LH2 の主要色素・バクテリオクロロフィル (BChl) *a* を別種の色素に改変し光機能を制御する研究を推進している。

LH2 タンパク質では、膜貫通ペプチドが環状に配列した状態で BChl *a* を保持している (Fig. 1)。この BChl *a* は、最長波長吸収帯 (Q_y 吸収帯) の位置によって、B800 BChl *a* と B850 BChl *a* に分類される。B800 BChl *a* はエネルギードナーとして機能し、アクセプターである B850 BChl *a* へ室温で 1 ピコ秒以内で効率よくエネルギーを受け渡す。この LH2 タンパク質の励起エネルギー移動において、エネルギードナーとアクセプターの機能的関係性は重要である。そこで本研究では、LH2 タンパク質内のエネルギードナー色素である B800 BChl *a* を、色素再構成法または直接的な分子構造変換によって改変し、励起エネルギー移動ダイナミクスへの影響を明らかにすることを目的とした。

まず、BChl *a* よりも長波長側に Q_y 吸収帯を有する BChl *b* をエネルギードナーとして機能させ、LH2 タンパク質の励起エネルギー移動への影響を調べた。紅色光合成細菌 *Rhodoblastus (Rbl.) acidophilus* の LH2 タンパク質から B800 BChl *a* を選択的に脱離¹させた後に、BChl *b* とインキュベーションし精製することで、BChl *b* を B800 結合部位に再構成した LH2 タンパク質を得た。この BChl *b* 再構成 LH2 タンパク質では、エネルギードナーである BChl *b* の Q_y 吸収帯が、天然 LH2 の B800 BChl *a* と比べて 29 nm 長波長シフトし、B850 BChl *a* とのスペクトルの重なりが増大した。BChl *b* 再構成 LH2 タンパク質の励起エネルギー移動を過渡吸収分光法によって調べたところ、BChl *b* から B850 BChl *a* へのエネルギー移動速度は、天然 LH2 タンパク質における B800 BChl *a* から B850 へ同様にあった²。

また、LH2 タンパク質に結合した状態の B800 BChl *a* を直接的に構造変換することで、LH2 タンパク質内に 3-アセチルクロロフィル (AcChl) *a* と BChl *a* の 2 種類のエネルギードナーを簡便に共存させることに成功した。この 2 種類のエネルギードナーが共存する改変 LH2 タンパク質では、最も短波長側に Q_y 吸収帯を有する AcChl *a* は B850 BChl *a* に励起エネルギーを直接伝達し、共存する B800 BChl *a* を経由した励起エネルギー移動は観測されなかった³。

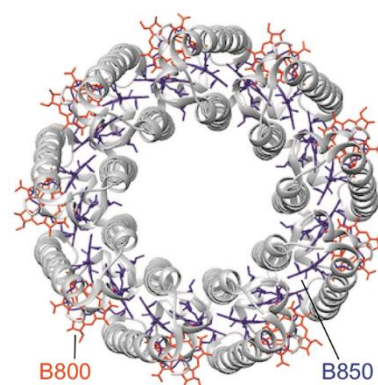


Fig. 1. Top-view structure of LH2 protein from *Rbl. acidophilus*.

1. Y. Saga, K. Hirota, H. Asakawa, K. Takao, T. Fukuma, *Biochemistry*, **56**, 3484-3491 (2017).
2. Y. Saga, M. Yamashita, Y. Masaoka, T. Hidaka, Y. Nagasawa, *J. Phys. Chem. B*, **125**, 2009-2017 (2021).
3. Y. Saga, Y. Otsuka, A. Tanaka, Y. Masaoka, T. Hidaka, Y. Nagasawa, *J. Phys. Chem. B*, **125**, 6830-6836 (2021).

Oral(first day)

📅 Wed. Sep 8, 2021 2:30 PM - 3:30 PM JST | Wed. Sep 8, 2021 5:30 AM - 6:30 AM UTC | 🏠 Room A Zoom

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Kenjiro Hanaoka (Keio University)

2:30 PM - 2:50 PM JST | 5:30 AM - 5:50 AM UTC

[1A-10] Development of small-molecule fluorescent probes for quantification of labile Zn^{2+} concentration and monitoring of Zn^{2+} dynamics in organelles

*Toshiyuki Kowada^{1,2,3}, Rong Liu², Yuyin Du³, Toshitaka Matsui^{1,2,3}, Shin Mizukami^{1,2,3} (1. Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, 2. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 3. Faculty of Science, Tohoku University)

2:50 PM - 3:10 PM JST | 5:50 AM - 6:10 AM UTC

[1A-11] Development of the photopharmacological technique to control chromosome movements and positioning using visible light stimulus

*Kazuya Matsuo¹, Ryota Uehara², Takashi Kikukawa², Nobuyuki Tamaoki¹ (1. Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University, 2. Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University)

3:10 PM - 3:30 PM JST | 6:10 AM - 6:30 AM UTC

[1A-12] Development of Visible-light Responsive Caged Compounds based on Asymmetrical Cyanine

*Masafumi Minoshima¹, Ryu Hashimoto¹, Souhei Sakata², Fumihito Ono², Kazuya Kikuchi^{1,3,4} (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Osaka Medical and Pharmaceutical University, 3. Immunology Frontier Research Center, Osaka University, 4. Center for Quantum Information and Quantum Biology, Osaka University)

細胞小器官内遊離 Zn^{2+} の濃度定量と動態観察を可能とする小分子 蛍光プローブの開発

○小和田俊行^{1,2,3}・劉 熔²・杜 雨音³・松井敏高^{1,2,3}・水上 進^{1,2,3} (¹ 東北大多元研、² 東北大院生命、³ 東北大理)

Development of small-molecule fluorescent probes for quantification of labile Zn^{2+} concentration and monitoring of Zn^{2+} dynamics in organelles (Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University¹, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University², Faculty of Science, Tohoku University³) KOWADA, Toshiyuki^{1,2,3}; LIU, Rong²; DU, Yuyin³; MATSUI, Toshitaka^{1,2,3}; MIZUKAMI, Shin^{1,2,3}

亜鉛は必須微量元素のひとつであり、細胞内で蛋白質の構造安定化・酵素補因子・シグナル因子として機能している。近年、細胞内で微量 (pM~nM) に存在する遊離 Zn^{2+} のシグナル因子としての役割に注目が集まっており、細胞小器官レベルでの Zn^{2+} 動態可視化の重要性が増している。現在までに様々な亜鉛検出用蛍光プローブが開発されており、特に蛍光蛋白質型プローブを用いて細胞内 Zn^{2+} 濃度の定量解析がなされている。しかし、蛍光蛋白質型プローブの Zn^{2+} 親和性や蛍光特性は細胞小器官特有の環境 (酸化環境や酸性 pH) に影響を受けやすい。例えば小胞体では、用いるプローブの種類によって 0.20 pM もしくは 49 pM という約 250 倍異なる遊離 Zn^{2+} 濃度の値が報告されており、一貫性のある結果が得られていない。この問題に取り組むために我々はごく最近、pH 変化の影響を受けにくく、なおかつ HaloTag を介した細胞小器官内局在性を有する Zn^{2+} 検出用蛍光プローブ ZnDA-1H ($K_d = 0.24 \mu\text{M}$) を開発し、弱酸性の細胞小器官であるゴルジ体内の遊離 Zn^{2+} 濃度の定量 (25 nM) に成功している (図 1)^{1,2)}。

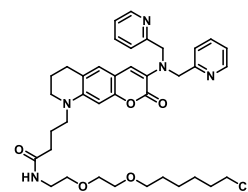


図 1. ZnDA-1H の構造.

本研究では、様々な細胞小器官内の遊離 Zn^{2+} 濃度の定量解析と動態観察を実現するために、高い Zn^{2+} 親和性を有する蛍光プローブ ZnDA-2H ($K_d = 5.0 \text{ nM}$) と ZnDA-3H ($K_d = 0.16 \text{ nM}$) を開発した。どちらのプローブも Zn^{2+} 非存在下では蛍光は弱く、 Zn^{2+} 添加により蛍光強度が 5.6–40 倍増大した ($\lambda_{em} = 506 \text{ nm}$)。また、生理的 pH 条件下 (pH 5.5–8.0) ではプローブの蛍光強度は pH に非依存的であったことから、細胞内 pH 変化に影響を受けずに Zn^{2+} 濃度変動のみを可視化できると期待される。細胞質・核・小胞体・ミトコンドリアに HaloTag を発現させた HeLa 細胞に対してプローブを添加し共焦点蛍光顕微鏡観察を行ったところ、細胞小器官選択的に ZnDA-2H もしくは ZnDA-3H の蛍光が観察された (図 2)。遊離 Zn^{2+} 濃度の定量解析を検討したところ、ZnDA-3H がいずれの細胞小器官に対しても適切な Zn^{2+} 親和性を有していることが明らかとなり、生細胞内の遊離 Zn^{2+} 濃度の序列を次の通り決めることができた: 細胞質 (0.13 nM) $\approx$ 核 (0.11 nM) > ミトコンドリア (54 pM) > 小胞体 (14 pM)。さらに、細胞機能に摂動を与えた際の Zn^{2+} 動態を観察するために、小胞体から細胞質への Zn^{2+} 輸送を担っている亜鉛トランスポーターの阻害剤を添加したところ、小胞体内に局在させた ZnDA-3H の蛍光シグナルが速やかに上昇した。以上より、ZnDA-3H は細胞内 Zn^{2+} 動態を細胞小器官レベルで解析するために有用な蛍光プローブであると考えられる。

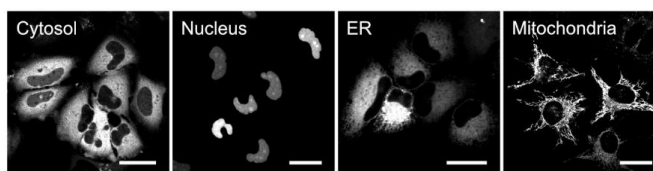


図 2. HeLa 細胞に発現させた HaloTag を介して細胞小器官に局在する ZnDA-3H の共焦点蛍光顕微鏡画像.

- (1) T. Kowada, T. Watanabe, Y. Amagai, R. Liu, M. Yamada, H. Takahashi, T. Matsui, K. Inaba, M. Shin *Cell Chem. Biol.* **2020**, 27, 1521–1531.
- (2) T. Kowada, T. Watanabe, R. Liu, S. Mizukami *STAR Protoc.* **2021**, 2, 100395.

可視光による分裂期染色体の光操作法

○松尾和哉^{1,2}・上原亮太²・菊川峰志²・玉置信之^{1,2} (¹ 北大電子研、² 北大院生命)

Development of the photopharmacological technique to control chromosome movements and positioning using visible light stimulus (Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University¹, Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University²) MATSUO, Kazuya¹; UEHARA, Ryota²; KIKUKAWA, Takashi²; TAMAOKI, Nobuyuki¹

細胞が分裂する際、遺伝情報の詰まった染色体が複製され、それが赤道面と呼ばれる細胞中央に一列に並ぶ。すべての染色体が整列した後、姉妹染色体が分離し、等分配されることで、2つの娘細胞へと遺伝情報を正確に伝播する。しかし、染色体の整列や分離に異常が生じると、染色体の数が過不足した異数性細胞が発生し、細胞運命は劇的に変化する。

細胞分裂において、倍加した染色体を赤道面へと整列させるモータータンパク質が centromere-associated protein E (CENP-E) である。CENP-E は ATP を加水分解することで得られた化学エネルギーを、機械的な「動き」へと変換する。この動きを利用して、染色体は紡錘体極から赤道面へと一方向に運搬される。

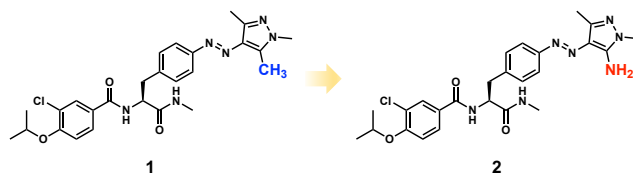


Figure 1. 光制御型 CENP-E 阻害剤 **1** および可視光制御型 CENP-E 阻害剤 **2**

これまでに、我々は CENP-E の活性を可逆的に光制御できる阻害剤 **1**⁽¹⁾ を報告した (Figure 1)。CENP-E の阻害剤骨格と定量的な *trans-cis* 光異性化反応を示す arylazopyrazole 誘導体から成る光制御型 CENP-E 阻害剤 **1** を用いることで、365 nm の紫外光照射による *cis* 体リッチな光定常状態と 510 nm の可視光照射による *trans* 体リッチな光定常状態において、10 倍程度の CENP-E 阻害能の差を誘起できる。この CENP-E 阻害能の差を利用し、CENP-E が駆動する分裂期染色体の動きを光操作できた。

しかし、**1** を制御するためには、2 つの異なる波長の光源が必要であるため、光学系が複雑になるだけでなく、例えば、一細胞内のごく一部の染色体のみを狙って、光操作することは困難である。さらに、使用する光源のうち、1 つは紫外光であり、細胞障害性も危惧される。

そこで、本研究では、一波長の可視光のみで CENP-E 活性を制御できる阻害剤を開発することで、一細胞内のごく一部の染色体だけをピンポイントに光操作するシステムの確立を目指した。一波長の可視光で CENP-E 活性を制御するため、光制御型 CENP-E 阻害剤 **1** の pyrazole 部位に mesomeric な電子供与基であるアミノ基を導入した化合物 **2** (Figure 1) を設計・合成した。**2** は、アミノ基の導入により、可視光領域に吸収帯を有し、*cis* 体が不安定になると考えられる。実際、レーザーフラッシュフォトリシスにより、**2** の *cis* 体の寿命を測定すると、μsec オーダーであった。したがって、可視光照射している部分だけで *cis* 体を形成し、光照射を停止すると速やかに *trans* 体へと熱異性化すると考えられるため、一波長の可視光照射だけで CENP-E の活性を制御できる。実際に、**2** を用い、*in vitro* ATPase assay や細胞内の CENP-E の局在を精査することで、**2** が可視光制御型 CENP-E 阻害剤として機能することを確認した。さらに、分裂期細胞内のごく一部の染色体のみを狙って、可視光照射することで光操作し、左右非対称に染色体を分布することに成功した。

本発表では、可視光制御型 CENP-E 阻害剤 **2** の開発とそれを用い、分裂期染色体を可視光でピンポイントに操作する技術に関して、議論する。

[References]

1. Mafy, N. N.; Matsuo, K.; Hiruma, S.; Uehara, R.; Tamaoki, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 1763–1767.

非対称シアニン色素を用いた可視光応答型ケージド化合物の開発

○ 菱島 維文¹・橋本 龍¹・坂田 宗平²・小野 富三人²・菊地 和也^{1,3,4} (¹ 阪大院工、
² 大阪医薬大、³ 阪大免フロ、⁴ 阪大 QIQB)

Development of Visible-light Responsive Caged Compounds based on Asymmetrical Cyanine. (Graduate School of Engineering, Osaka University¹, Faculty of Medicine, Osaka Medical and Pharmaceutical University², Immunology Frontier Research Center, Osaka University³, Center for Quantum Information and Quantum Biology, Osaka University⁴) MINOSHIMA, Masafumi¹; HASHIMOTO, Ryu¹; SAKATA, Souhei²; ONO Fumihito²; KIKUCHI, Kazuya^{3,4}

ケージド化合物は生理活性物質が光分解性の保護基 (Photoresponsive protecting group: PPG) で保護された化合物であり、生理機能を時空間的に制御するためのツールとして、神経科学、生命科学の分野で利用されている¹⁾。o-ニトロベンジル基、クマリン誘導体である Bhc 基などは代表的な PPG として使われており、神経伝達物質、ヌクレオチド、転写制御剤などのケージド化合物がこれまでに開発されている。しかしながらこれらの PPG を含むケージド化合物は UV 光を吸収して応答するものであり、UV 光の生体組織透過性の低さや光毒性が問題となる。近年、可視光に応答する PPG が BODIPY 色素などを基にして開発されているが^{2,3)}、分解効率の低さ、水溶性の低さといった点で生体応用に向けては課題があり、新たな分子骨格に基づく可視光応答型ケージド化合物の開発が求められる。

新たな可視光応答型ケージド化合物の設計にあたり、非対称シアニン色素、チアゾールオレンジ (TO) に着目した。TO は 500 nm 付近の可視光領域に吸収を持ち、核酸に結合・染色する色素として利用されている。TO の部分構造である N-メチルキノリニウムの 7-ヒドロキシ誘導体は分解効率の良い PPG としてはたらくことが報告されている⁴⁾。われわれはこの N-メチルキノリニウム誘導体を TO の構造に導入することで可視光に応答する PPG になるのではないかと考え、本研究ではこの TO 誘導体 (HTO) を PPG とするケージド化合物の開発を行った (Fig 1)。

最初に脱離基として酢酸を有するケージド化合物、HTO-OAc を合成し、その光分解特性を評価した。HTO-OAc は暗所では分解することなく安定であったが、緑色光を照射すると速やかに分解が見られた (Fig 2)。また、酢酸の放出も確認された。次に、神経伝達物質であるグルタミン酸のケージド化合物、Sul-HTO-Glu を合成し、同様に光分解特性を評価した。その結果、Sul-HTO-Glu においても緑色光の照射によりグルタミン酸が放出されていくことを確認した。これらのケージド化合物の光分解効率を算出したところ、既報の緑色光に応答する PPG よりも高く、優れた光分解特性を有することが分かった。さらに、グルタミン酸のケージド化合物、Sul-HTO-Glu を用いてイオンチャネル共役型受容体の一つであるグルタミン酸受容体における陽イオン透過能の可視光制御を行った。緑色光照射のタイミングで陽イオン透過能の上昇が観察され、可視光照射によりイオンチャネル機能の制御ができることを示した。

1) P. Klán, *et al.*, *Chem. Rev.* **2013**, 113, 119. 2) N. Umeda, *et al.*, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 2242.

3) P. P. Goswami, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 3783. 4) T. Narumi, *et al.*, *Org. Lett.* **2018**, 20, 4178.

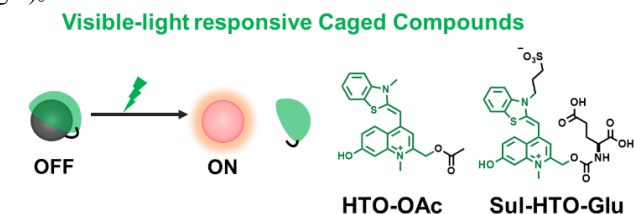


Fig 1. Chemical structure of HTO-based caged compounds

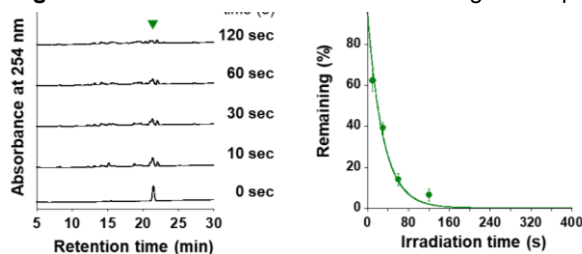


Fig 2. (left) HPLC chart of HTO-OAc photolysis. (right) Time course of photolysis of HTO-OAc. Light illumination: $\lambda = 490 \pm 5$ nm (10 mW/cm²)

Oral(first day)

📅 Wed. Sep 8, 2021 3:40 PM - 4:40 PM JST | Wed. Sep 8, 2021 6:40 AM - 7:40 AM UTC | 🏠 Room A Zoom

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Shinobu Ito (Osaka Univ.)

3:40 PM - 4:00 PM JST | 6:40 AM - 7:00 AM UTC

[1A-13] Chemical Modification of Biomacromolecules through Ru-Olefin Specific Interaction

*Takashi Matsuo¹, Naoki Akiyama¹, Catur Jatmika¹, Ibuki Nakamura¹, Shun Hirota¹, Hiroyasu Yamaguchi²
(1. Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology, 2. Graduate School of Science, Osaka University)

4:00 PM - 4:20 PM JST | 7:00 AM - 7:20 AM UTC

[1A-14] Selective N-terminal modification of peptides and proteins via copper(II)-mediated aldol reaction

*Kengo HANAYA¹, Kaho YAMOTO¹, Shuhei HIGASHIBAYASHI¹, Takeshi SUGAI¹ (1. Faculty of Pharmacy, Keio University)

4:20 PM - 4:40 PM JST | 7:20 AM - 7:40 AM UTC

[1A-15] Chemoproteomics profiling of nonribosomal peptide synthetases in living bacterial cells

*Fumihiro Ishikawa¹, Sho Konno², Chiharu Uchida¹, Takehiro Suzuki³, Katsuki Takashima¹, Naoshi Dohmae³, Hideaki Kakeya², Genzoh Tanabe¹ (1. Faculty of Pharmacy, Kindai University, 2. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 3. Biomolecular Characterization Unit, RIKEN Center for Sustainable Resource Science)

ルテニウム-オレフィン相互作用を用いた生体分子の化学修飾

○松尾貴史¹・秋山直生¹・Catur Jatmika¹・中村伊武輝¹・廣田 俊¹・山口浩靖²

Chemical Modification of Biomacromolecules through Ru-Olefin Specific Interaction (Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology¹, Graduate School of Science, Osaka University²) MATSUO, Takashi¹; AKIYAMA, Naoki; JATMIKA, Catur; NAKAMURA, Ibuki; HIROTA, Shun; YAMAGUCHI, Hiroyasu²

生体分子の化学修飾は、プローブ分子によるラベル化や、合成分子との複合分子の創成、抗体作成のためのキャリアタンパク質の調製の際に行われ、求核性側鎖をもつシステインを介した方法や、アジド基を介したクリック反応等が頻繁に用いられている、しかし、金属錯体を生体分子上に固定化する際は、システインチオール求核性やクリック反応は錯体の分解を誘発することがあり、新たな化学修飾法が求められる。一方、遷移金属であるルテニウムは、生体分子内に存在するアミド、エステル、ヒドロキシ基よりもオレフィンに対して強い相互作用を示し、ルテニウム-オレフィンの強い相互作用は、新たな生体分子の化学修飾法にも適用できると予想される。我々は以前、ホベイダ-グラブス第2世代触媒 **[Ru]-II** に対して、フェノキシ末端にアミド基を導入した配位子が、効率よく配位子交換反応をおこすことを明らかにした¹⁾。そこで、ルテニウム-アルケンの相互作用によって、ルテニウム錯体を生体分子に固定化できるかどうかを検証するために、配位子交換に基づくルテニウム錯体移動反応をモデルペプチドおよびタンパク質によって検証した²⁾。

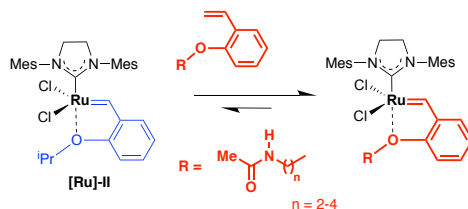


Fig. 1. Ligand exchange on Hoveyda-Grubbs second generation complex (**[Ru]-II**)

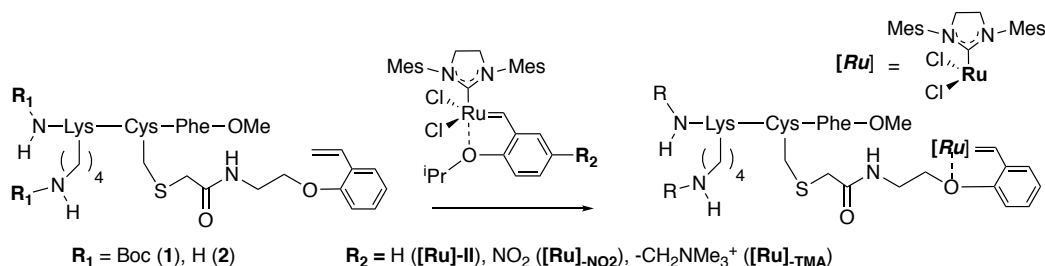


Fig. 2. Immobilization of Ru complex moiety on model tripeptides with a benzylidene moiety

ベンジリデン配位子を導入したトリペプチド Boc-Lys(Boc)-Cys-Phe-OMe (**1**) に対してホベイダ-グラブス型錯体 **[Ru]-II** をルテニウム錯体ドナーとして CHCl_3 中で反応させたところ、70%の反応率でルテニウム錯体移動反応が起こり、ルテニウム錯体の固定化が確認できた。電子求引的な性質をもつ **[Ru]-NO₂** もしくは **[Ru]-TMA** を錯体ドナーに用いた場合、錯体固定化効率が上昇した。**[Ru]-TMA** を用いた錯体移動反応は、 CD_3OD 中においても 86%の反応率で進行した。さらに、脱 Boc トリペプチド **2** と錯体 **[Ru]-TMA** との反応を $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 中で行ったところ、ルテニウム錯体移動反応が 70%の反応率でおこり、本手法は水溶液中でも適用可能であることが確認できた。そこで、本手法をタンパク質に拡張すべく、モデルタンパク質としてベンジリデン配位子を導入したアデニル酸キナーゼ三変異体 (A55C/C77S/V169C) に対して **[Ru]-TMA** を作用させたところ、タンパク質上にルテニウム錯体が固定化された。一方、ベンジリデン配位子を導入しなかった場合、錯体の固定化は起こらなかった。以上のことから、様々な官能基を有する生体分子に対しても、ルテニウム-アルケン相互作用は特異的に機能し、生体分子の新たな化学修飾の戦略として有効であると考えられる。

1) T. Matsuo, et al., *Dalton Trans.* **49**, 11618 (2020) ; 2) T. Matsuo, et al., *Chem. Lett.* **49**, 1490 (2020).

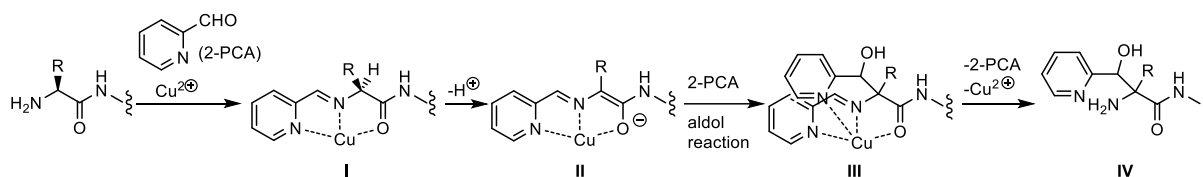
銅(II)イオンを用いたアルドール反応による N 末端アミノ酸選択的 化学修飾法の開発

○花屋賢悟・八本果歩・東林修平・須貝威（慶大薬）

Selective N-terminal modification of peptides and proteins via copper(II)-mediated aldol reaction (Faculty of Pharmacy, Keio University)) HANAYA, Kengo; YAMOTO, Kaho; HIGASHINAYASHI, Shuhei; SUGAI, Takeshi

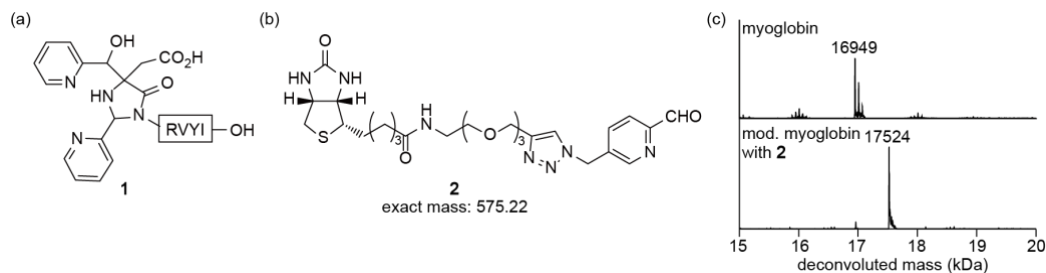
薬物や蛍光分子などの人工分子をタンパク質上の狙った場所に導入する反応（化学修飾法）は、バイオ医薬品創薬やケミカルバイオロジーの基礎研究において欠かせない。N 末端アミノ酸はタンパク質に必ず 1 箇所存在するので、これを標的にすれば人工分子を特定の位置に導入することができる。

我々はこれまで、金属イオンとアミノ酸の相互作用を活用したシステインまたはピログルタミン酸-ヒスチジン配列選択的な化学修飾法を報告した^{1,2)}。今回、銅(II)イオンのルイス酸性を利用したアルドール反応による、N 末端アミノ酸の化学修飾法の開発に取り組んだ。ポリペプチドに金属配位能を有する芳香族アルデヒドと銅(II)イオンを添加すると、N 末端アミノ酸上でシッフ塩基の銅錯体 **I** が形成される。これにより α 炭素上のプロトンの酸性度が上昇すると、中性条件下エノラート **II** が生じ、もう一分子の芳香族アルデヒドとアルドール反応し **III** を経由して **IV** が生成すると期待した。



アンジオテンシン II (H-DRVYIHPF-OH) に対し、pH 7.5 のリン酸緩衝液中、銅(II)イオンと種々の芳香族アルデヒドを作用させた。2-ピリジンカルボキシアルデヒド (2-PCA) を用いた場合に、2-PCA が 2 分子結合したペプチドが生成した。ペンタペプチド (H-DRVYI-OH) を同様の条件で反応させ、生成物の構造を LC-MS/MS および NMR で分析し **1** と同定した。アルドール反応が進行した (**II** → **III**) 後、**III** の主鎖アミドがシッフ塩基に対し分子内求核付加し、イミダゾリジノン環が形成したと考えられる。本反応は、N 末端を他のアミノ酸に変えたペプチドでも進行した。

本反応を分子量 17 kDa のミオグロビンの N 末端グリシンの化学修飾に適用した。銅イオン存在化、ビオチンを結合した 2-PCA 誘導体 **2** を pH 6.5 で 3 時間反応させると、ESI-MS においてミオグロビンのピーク (16949 Da) は消失し、**2** が 1 分子のみ結合した **IV** に相当するミオグロビンのピーク (17524 Da) が観測された。



1) Hanaya, K.; Ball, Z. T. *et al. Chem. Commun.* **2019**, 55, 2841. 2) Hanaya, K.; Ball, Z. T. *et al. Org. Lett.* **2019**, 21, 2445.

細胞内での非リボソームペプチド合成酵素の選択的ケミカルラベリング

○石川文洋¹・今野翔²・内田千晴¹・鈴木健裕³・高島克輝¹・堂前直³・掛谷秀昭²・田邊元三¹ (¹近畿大薬、²京大院薬、³理研 CSRS)

Chemoproteomics profiling of nonribosomal peptide synthetases in living bacterial cells (Faculty of Pharmacy, Kindai University¹, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University², Biomolecular Characterization Unit, RIKEN Center for Sustainable Resource Science³) ISHIKAWA, Fumihiro¹; KONNO, Sho²; UCHIDA, Chiharu¹; SUZUKI, Takehiro³; TAKASHIMA, Katsuki¹; DOHMAE, Naoshi³; KAKEYA, Hideaki²; TANABE, Genzoh²

微生物が生産するペプチド系天然物 (バンコマイシン、ダプトマイシンなど) の多くは、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPSs) により生合成される。微生物による物質生産を制御できれば、有用物質の生産増大や安定供給が可能となるため、二次代謝制御に関する研究は盛んに行われている¹⁾。すなわち、微生物二次代謝を制御する分子メカニズムの解明は、微生物のシグナル経路に関する基礎的情報のみならず、有用物質の効率的生産など多くの恩恵をもたらす。細胞内において、NRPS の発現・活性は複雑かつ厳密に制御されており、その制御機構の全容は明らかになっていない。また、NRPS は巨大蛋白質であり、遺伝子工学的手法により、活性型として発現・精製し、さらに機能解析することは困難なことも多い。当研究室では、光親和性標識法を基盤に NRPS のアデニル化酵素をラベル化する手法の開発を行ってきた (*Activity-based protein profiling-NRPSs*)。2) そこで本研究では、分子夾雑環境である生体へ適応する *in vivo* ABPP-NRPSs を開発し、細胞内での NRPS の動態を解析することにした。

NRPS の基本構成単位の一つであるアデニル化酵素は、厳密な基質特異性を持ち、基質アミノ酸を特異的にアミノアシル-AMP に活性化する。すなわち、アデニル化酵素はペプチド系天然物生合成において、アミノ酸を選択する “gatekeeper” としての役割を担っている。より標的特異性の向上した NRPS ラベル化剤を設計するため、アデニル化酵素のアミノ酸認識機構を精査した。基質 Asp や Glu は活性部位の Lys や Arg 残基と、基質 Lys や Arg は活性部位の Asp や Glu 残基と塩橋を形成している。そのため、塩橋の形成を利用することで、より標的特異性の向上した NRPS ラベル化剤が創製できると期待した。本研究では、Asp 組込型 NRPS ラベル化剤を創製することで、生体環境へ適応する *in vivo* ABPP-NRPSs 法の開発に成功した (Fig. 1)。3) Asp 組込型 NRPS ラベル化剤は、サーファクチン (Srf) 生産菌 *Bacillus subtilis* ATCC 21332 プロテオームにおける SrfAB-NRPS のラベル化だけでなく、細胞内における SrfAB-NRPS のラベル化、イメージングを可能にした (Fig. 1)。また、細胞内での SrfAB-NRPS の動態解析および LC-MS/MS 解析により、SrfAB-NRPS は C 末端側から分解されることが判明した (Fig. 1)。これにより、微生物二次代謝の新しい制御機構の一端が明らかになった。

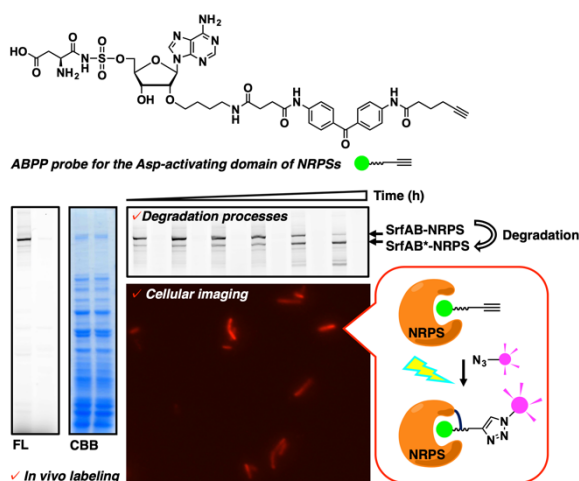


Figure 1. Chemoproteomics profiling of surfactin-producing NRPSs in living bacterial cells.

References: 1) Zhang, B. *et al.* *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 1732; 2) Konno, S., Ishikawa, F. *et al.* *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 2262; 3) Ishikawa, F. *et al.* *Cell Chem. Biol.* **2021**, DOI: 10.1016/j.chembiol.2021.05014.

Oral(first day)

📅 Wed. Sep 8, 2021 10:10 AM - 11:10 AM JST | Wed. Sep 8, 2021 1:10 AM - 2:10 AM UTC | 🏠 Room B
Zoom

Nucleic acids

Chair: Yoshiya Ikawa (Toyama Univ.)

10:10 AM - 10:30 AM JST | 1:10 AM - 1:30 AM UTC

[1B-04] Orthogonal Photoregulation of Artificial Nucleic Acid via Irradiation with Different Wavelength of Light

*Keiji Murayama¹, Yuuhei Yamano², Hiroyuki Asanuma¹ (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. The Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University)

10:30 AM - 10:50 AM JST | 1:30 AM - 1:50 AM UTC

[1B-05] Development of fluorescent barcode to enable labeling of multiple biomolecules

*Koki MAKINO¹, Hiroyuki ASANUMA¹, Hiromu KASHIDA¹ (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

10:50 AM - 11:10 AM JST | 1:50 AM - 2:10 AM UTC

[1B-06] Base-pair Switching of 5-Carboxyuracil Nucleobases Driven by Metal Coordination

*Yusuke Takezawa¹, Hanci Zhang¹, Akira Suzuki¹, Keita Mori¹, Lingyun Hu¹, Mitsuhiko Shionoya¹ (1. Graduate School of Science, The University of Tokyo)

異なる波長で独立に制御可能な光応答性人工核酸の開発

○村山恵司¹・山野雄平²・浅沼浩之¹ (¹ 名大院工、² 東北大多元研)

Orthogonal Photoregulation of Artificial Nucleic Acid via Irradiation with Different Wavelength of Light
 (Graduate School of Engineering, Nagoya University¹, The Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University²) MURAYAMA, Keiji¹; YAMANO, Yuuhei²; ASANUMA, Hiroyuki¹

二重鎖形成能を有する骨格改変型人工核酸 (XNA) は、分解酵素耐性を持つことから様々な生物学的応用が期待される。我々はこれまでに、新規非環状型 XNA として SNA (Serinol Nucleic Acid) 及び L-*a*TNA (acyclic L-Threoninol Nucleic Acid) の開発に成功しており、これらが DNA や RNA と配列特異的に二重鎖形成することを見出した^[1,2]。この非環状型 XNA と天然核酸との二重鎖形成を光照射によって制御することができれば、XNA を用いた種々の生物学的ツールの時空間的な制御が実現できる。

本研究では、SNA に光架橋性修飾核酸塩基 ^{PV}A (8-pyrenylvinyl adenine) を導入することで SNA/RNA 二重鎖形成解離の可逆的光制御を目指した (Fig. 1)。更に、異なる波長域の光に応答する ^{NV}A (8-naphthylvinyl adenine) を新たに開発し、^{PV}A と組み合わせることで2種類の二重鎖を独立に光制御することを試みた。

^{PV}A を連続で2残基導入した SNA 鎖と相補的な RNA 鎖との二重鎖に光照射を行い、吸収スペクトル、融解温度測定及び HPLC で解析を行った。その結果、465 nm の光照射により鎖内で ^{PV}A 同士の架橋反応が進行すると同時に二重鎖が解離したのに対し、340 nm の光照射によって逆反応である光開裂反応が進行し、再度二重鎖を形成することが示された。以上から SNA/RNA 二重鎖の可逆的な光制御が可能であることが確認された^[3]。更に、^{NV}A を連続で2残基導入した SNA 鎖は、より短波長の 405 nm の光照射で架橋と二重鎖解離が進行し、300 nm の光で光開裂と二重鎖形成を誘起できることを明らかにした。^{PV}A 導入 SNA (SPN) と ^{NV}A 導入 SNA (SNN) が共存する条件下で光照射を行い HPLC で解析した結果、照射する光の波長に応じて、それぞれの二重鎖の形成と解離を独立に制御することに成功した (Fig. 2)^[4]。

[1] Kashida, H., Murayama, K., Toda, T., Asanuma, H., (2011) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 1285-1288.

[2] Murayama, K., Kashida, H., Asanuma, H., (2015) *Chem. Commun.*, **51**, 6500-6503.

[3] Murayama K., Yamano Y., Asanuma H., (2019) *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 9485-9489.

[4] Yamano Y., Murayama K., Asanuma H., (2021) *Chem. Eur. J.*, **27**, 4599-4604.

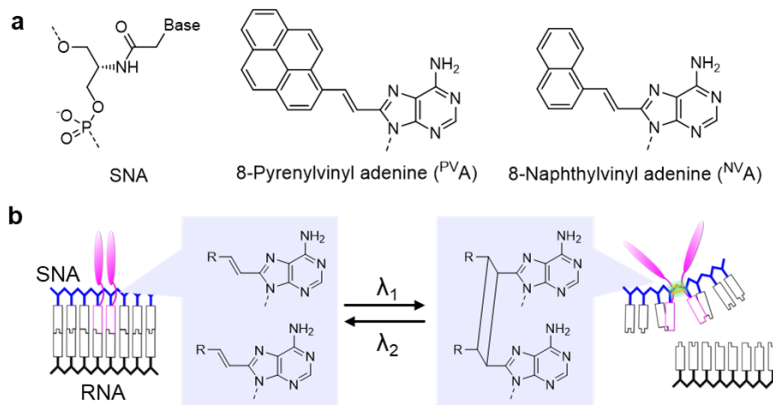


Fig. 1. (a) Chemical structures of SNA, 8-pyrenylvinyl adenine (^{PV}A), and 8-naphthylvinyl adenine (^{NV}A). (b) Scheme and illustration of reversible photo-regulation of SNA/RNA duplex formation.

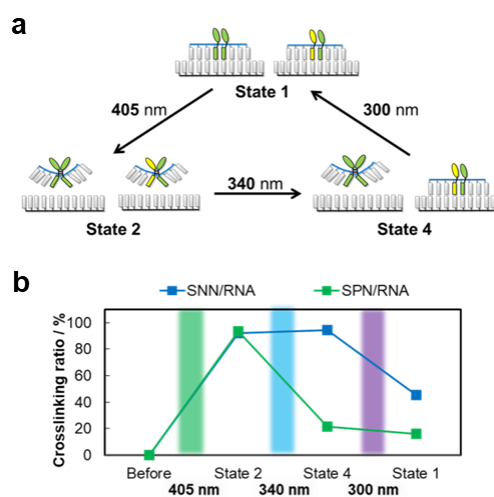


Fig. 2. (a) Scheme of orthogonal photo-regulation of SNA/RNA duplexes. (b) Crosslinking ratio of two duplexes after irradiation.

生体分子のマルチラベリングを可能とする蛍光バーコードの開発

○牧野 航海・浅沼 浩之・樫田 啓（名大院工）

Development of fluorescent barcode to enable labeling of multiple biomolecules (Graduate School of Engineering, Nagoya University) MAKINO, Koki; ASANUMA, Hiroyuki; KASHIDA, Hiromu

蛍光分子を利用したイメージングは高感度かつ汎用性が高く、バイオテクノロジーの分野において必要不可欠な技術である。しかしながら、蛍光分子は励起波長・蛍光波長がオーバーラップしてしまうことから、通常 5 種類程度までしか同時に使用することができない。従って、同時にラベリング可能な標的分子の種類に制限があり、蛍光を利用した網羅的な解析への応用は困難であった。

そこで本研究では、生体分子のマルチラベリングを可能とする蛍光バーコードの開発を行った。具体的には、核酸の鎖交換反応を利用して蛍光色が任意の順番に変化する設計を考案した(Fig. 1)。蛍光バーコードは、核酸鎖の両末端に蛍光色素と消光剤を導入した配列(F 鎖)から形成される核酸二重鎖で生体分子のラベリングを行う。続いて、相補的な消光剤導入配列(Q 鎖)で鎖交換反応を引き起こすことで解読を行い、多数の生体分子の同時検出を可能とする。二重鎖を形成している F 鎖は、初期状態では近接する消光剤によって、蛍光色素は消光され末端の蛍光色素の発光のみが観察される。ここに Q 鎖を一本ずつ添加することで、F 鎖が順番に解離し、発光する蛍光色素を予め並べた順番に変化させることが出来る。このような設計で 4 種類の蛍光色素を 3 回蛍光変化させることで、 $4^3 = 256$ 種類の蛍光バーコードの調製が可能である。この蛍光バーコードを免疫染色や FISH に応用することで、これまでにない膨大な種類のタンパク質や核酸の同時検出が可能になることが期待できる。

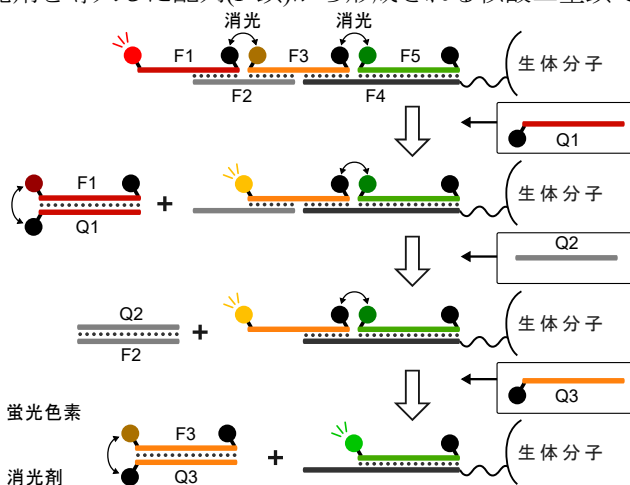


Fig. 1 Schematic illustration of fluorescent barcode approach based on strand displacement reaction.

蛍光色素に Cy5、Cy3、FAM の 3 色を導入した蛍光バーコードを人工核酸 D-αTNA で合成した。二重鎖形成させた F 鎖に対して Q 鎖を添加した際の蛍光変化を分光蛍光光度計で測定したところ、設計通りに蛍光変化することが確認された。さらに、蛍光バーコードを抗体に結合させ免疫染色への応用を試みた(Fig. 2)。固定化 HeLa 細胞内の 3 種類のタンパク質を標的に蛍光バーコードでイメージングしたところ、それぞれ予め定めた蛍光変化が観察された。以上の結果から、蛍光バーコードによって生体分子のマルチラベリングが可能であることが示された。

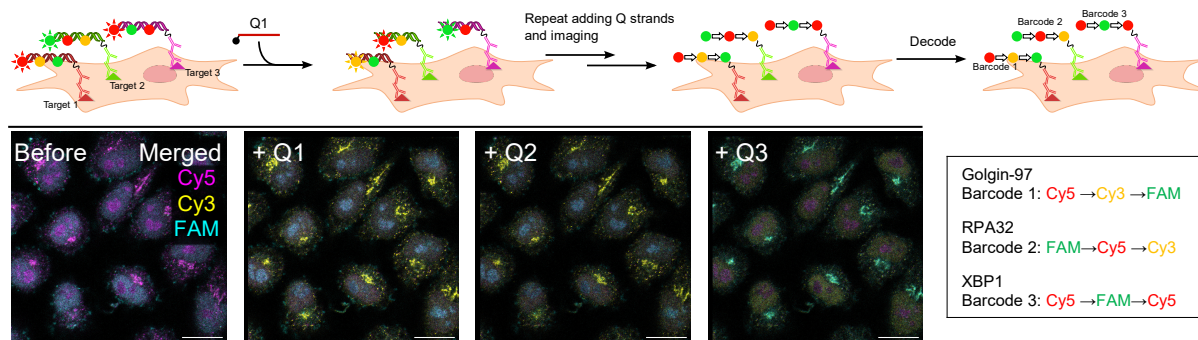


Fig. 2 Multiplex labeling of three proteins in fixed HeLa cells with fluorescent barcodes.

金属配位に基づく 5-カルボキシウラシルの塩基対スイッチング

○竹澤悠典¹・張晗辞¹・鈴木暁¹・森圭太¹・胡凌雲¹・塩谷光彦¹ (¹ 東大院理)

Base-pair Switching of 5-Carboxyuracil Nucleobases Driven by Metal Coordination (Graduate School of Science, The University of Tokyo¹) TAKEZAWA, Yusuke¹; ZHANG, Hanci¹; SUZUKI, Akira¹; MORI, Keita¹; HU, Lingyun¹; SHIONOYA, Mitsuhiro¹

我々は、金属イオンの配位により構造や機能が制御できる DNA 超分子の開発を行っており、金属錯体形成を駆動力とした DNA 高次構造変換^[1]や DNAzyme の活性制御^[2]を報告してきた。最近、5 位に配位性のカルボキシ基を有する 5-カルボキシウラシル(caU)が、水素結合型塩基対 caU-A に加え、Cu^{II} イオン存在下で配位結合を介した金属錯体型塩基対 caU-Cu^{II}-caU を形成することを見出した (図 1a) ^[3]。そこで、Cu^{II} イオンの配位により「水素結合型 ⇌ 金属錯体型」の塩基対形成をスイッチし、DNA の構造・機能変換を誘起することを目指して研究を行った。

はじめに、caU の塩基対形成挙動を評価するために、3 対の caU-caU 対を含む 15 mer の DNA 二重鎖 1・2 と、3 対の caU-A 塩基対を含む二重鎖 1・2A の融解温度(T_m)を比較した。Cu^{II} 非存在下では、水素結合型塩基対を形成する二重鎖 1・2A ($T_m = 41.2$ °C)の方が、二重鎖 1・2 (17.7 °C)よりも安定であった。6 当量の Cu^{II} イオンを加えたところ、caU-Cu^{II}-caU 塩基対の形成により二重鎖 1・2 (47.0 °C)が大きく安定化した。一方で caU-A 塩基対を含む 1・2A (33.9 °C)は不安定化し、両者の熱的安定性は逆転した。このことから、Cu^{II} イオンの配位により caU がペアを作る相手が変わり、「caU-A 塩基対 ⇌ caU-Cu^{II}-caU 塩基対」のスイッチングができることが示された。

そこで「caU-A ⇌ caU-Cu^{II}-caU」の塩基対スイッチングを利用して、金属配位に応答して活性化されるアロステリック DNAzyme の開発を試みた (図 1b)。既報の RNA 切断活性 DNAzyme (NaA43)^[4]の配列を基に、ステム部分に 3 対の caU-caU 塩基対を導入した。Cu^{II} イオンを加えないときは caU-A 塩基対を含む不活性構造を形成し、Cu^{II} イオン存在下では caU-Cu^{II}-caU 塩基対形成により元の活性構造が回復するように配列を設計した。10 当量の基質鎖を加えて RNA 切断反応を行ったところ、Cu^{II} 非存在下の caU 修飾 DNAzyme の活性($k_{\text{obs}} = 5.3 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$)は、元の NaA43 DNAzyme ($4.2 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$)と比べ大きく低下した。一方、6 当量の Cu^{II} イオンを加えると、活性は約 20 倍($1.1 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$)に上昇した。caU の代わりに T 塩基を導入した DNAzyme では、Cu^{II} 添加による活性上昇は見られなかった。以上より、設計通り caU の塩基対スイッチングにより DNAzyme が活性化されたと考えられる。

本研究で用いた caU と同様に、金属配位性の 5 位修飾ピリミジン塩基^[5]は「水素結合型 ⇌ 金属錯体型」の塩基対スイッチングが可能であると考えられ、金属配位により駆動する DNA 分子機械や DNA 情報伝達回路のビルディングブロックとしての活用が期待される。

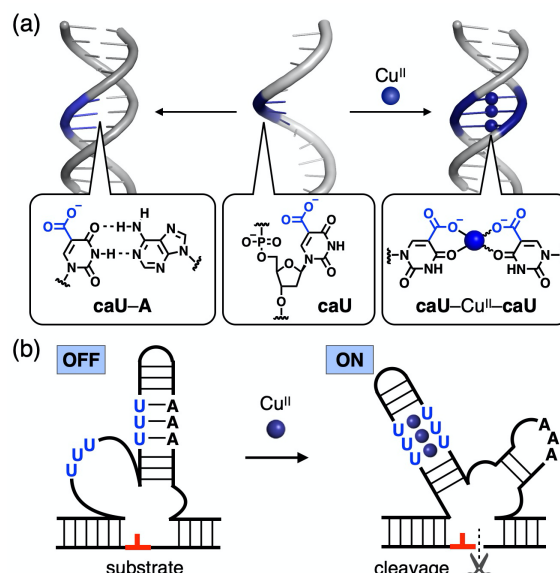


図 1 (a) 5-カルボキシウラシル(caU)が形成する水素結合型塩基対(caU-A)と金属錯体型塩基対(caU-Cu^{II}-caU)。 (b) Cu^{II} イオン添加により活性化されるアロステリック DNAzyme の模式図。"U"は caU 塩基を表す。

[1] T. Takezawa, M. Shionoya, *Front. Chem.*, **2020**, 7, 925 (mini review). [2] (a) Y. Takezawa, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, 141, 19342. (b) T. Nakama et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142, 10153. (c) Y. Takezawa et al., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2020**, 59, 21488. (d) T. Nakama et al., *Chem. Commun.*, **2021**, 57, 1392. [3] Y. Takezawa et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142, 21640. [4] S.-F. Torabi, Y. Lu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2015**, 112, 5903. [5] (a) Y. Takezawa et al., *Chem. Eur. J.*, **2015**, 21, 14713. (b) K. Nishiyama et al., *Chem. Commun.*, **2021**, 57, 2487.

Oral(first day)

📅 Wed. Sep 8, 2021 1:20 PM - 2:20 PM JST | Wed. Sep 8, 2021 4:20 AM - 5:20 AM UTC | 🏠 Room B Zoom

Nucleic acids

Chair: Tamaki Endo (Konan Univ.)

1:20 PM - 1:40 PM JST | 4:20 AM - 4:40 AM UTC

[1B-07] Development of large-scale analytical system for RNA binding and alkylation reactivity

*Kazumitsu Onizuka^{1,2}, Kaoru R Komatsu³, Ryosuke Nagasawa^{1,2}, Yutong Chen^{1,2}, Emi Miyashita³, Shunya Ishikawa^{1,2}, Kanna Ojima^{1,2}, Hirotaka Murase¹, Mamiko Ozawa¹, Hirohide Saito³, Fumi Nagatsugi^{1,2} (1. IMRAM, Tohoku University, 2. Graduate school of science, Tohoku University, 3. CiRA, Kyoto University)

1:40 PM - 2:00 PM JST | 4:40 AM - 5:00 AM UTC

[1B-08] Functional Oligonucleotide Encoding the Metabolite Information

*Tatsuya Nishihara¹, Yuto Motohashi¹, Shuhei Moritani¹, Momoka Yajima¹, Kazuhito Tanabe¹ (1. Aoyama Gakuin University)

2:00 PM - 2:20 PM JST | 5:00 AM - 5:20 AM UTC

[1B-09] Discovery of orthogonal RNA-RBP pairs through library-vs-library *in vitro* selection

*Keisuke Fukunaga¹, Yohei Yokobayashi¹ (1. OIST)

RNA 結合性・アルキル化反応性の大規模解析技術開発

○鬼塚和光^{1,2}、小松リチャード馨³、長澤瞭佑^{1,2}、Yutong Chen^{1,2}、宮下映見³、石川竣也^{1,2}、小嶋かんな^{1,2}、村瀬裕貴¹、小澤眞美子¹、齊藤博英³、永次史^{1,2} (¹東北大多元研、²東北大院理、³京大 CiRA)

Development of large-scale analytical system for RNA binding and alkylation reactivity (Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University¹, Graduate School of Science, Tohoku University², CiRA, Kyoto University³) ONIZUKA, Kazumitsu^{1,2}; KOMATSU, Kaoru R.³; NAGASAWA, Ryosuke^{1,2}; CHEN, Yutong^{1,2}; MIYASHITA, Emi³; ISHIKAWA, Shunya^{1,2}; OJIMA, Kanna^{1,2}; MURASE, Hirota¹; OZAWA Mamiko¹; SAITO, Hirohide³; NAGATSUGI, Fumi^{1,2}

RNA 標的創薬は近年、オリゴ核酸に加え、経口投与可能な小・中分子でも効果を期待できる標的が増え、開発が飛躍的に進展している。RNA 標的医薬の中には、重篤な遺伝性疾患に対して治療効果が期待できるものもあり、遺伝性・難治性疾患に対する新しい治療法として期待されている。RNA は様々な分子内相互作用により、様々な高次構造を形成することが知られている。創薬標的として、このような高次構造モチーフを小・中分子で狙う場合、多くの類似した構造から標的のみを選択的に認識し、強く結合する必要があるため、高い結合性と選択性を併せ持つ優れた RNA 結合分子の開発は容易ではない。そのため、標的特異的結合分子を創出する優れた評価法・探索法の開発が強く望まれている。

我々は、今回 DNA マイクロアレイを用いる大規模解析法¹⁾により、小分子の RNA 結合性を大規模に解析する手法の開発、すなわち、意味のある RNA 配列に対する結合強度のランク化を可能にする手法の開発を行った (Fig. 1)。これらは一度の測定で数千~数万の RNA との結合や反応を原理的に調査できることから、化合物ごとの真の選択性を評価することができ、さらに予期せぬ結合・反応の発見も期待できる。発表では、G-clamp を用いた本法の妥当性の実証結果に関して報告する。

一方、独自に開発したビニルキナゾリノン (VQ) ユニットは、その安定前駆体である SPh 体と平衡状態で存在しており、近傍に T や U が存在すると速やかに反応する (Fig. 2)。また S(O)Me 体は自発的な脱離反応の後、アルキル化を引き起こすことも明らかにしている²⁾。本研究では、この VQ ユニットをマイクロアレイ法に適用させ、アルキル化反応効率の大規模解析を行った。

具体的には、VQ ユニットを核酸結合分子であるアクリジンにコンジュゲートし、さらに評価のためのアジド基を修飾したアクリジン-VQ-S(O)Me-N₃ を合成した (Fig. 2)。次に、マイクロアレイ法に付すことでアルキル化効率のランク化を試みた。得られた結果を実際に検証したところ、精度よくランク化できていることが分かった。本発表では、VQ アルキル化の化学およびマイクロアレイ法に関して詳しく報告する予定である。

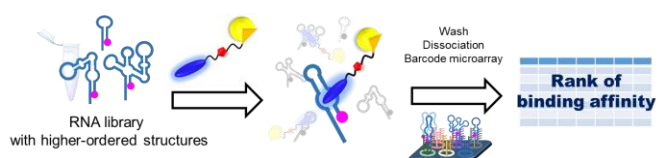


Fig. 1 RNA 結合性の大規模解析

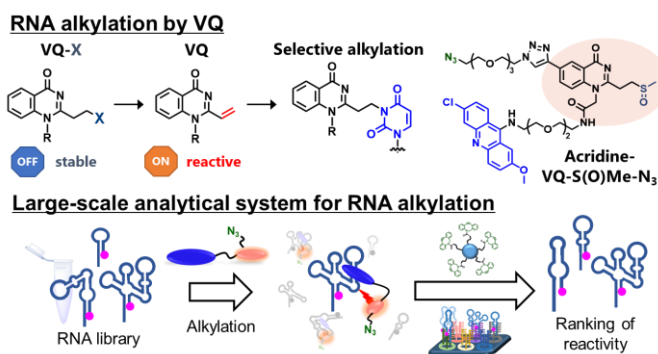


Fig. 2 VQ のアルキル化とマイクロアレイ法

1) Komatsu, K.R., *et al.*, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 6275. 2) a) Onizuka, K., *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 6578-6589. b) Onizuka, K., *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 2891-2894.

代謝物情報をコード可能にする機能性核酸の開発

○西原達哉・本橋優人・盛谷周平・矢島百華・田邊一仁（青山学院大院理工）

Functional Oligonucleotide Encoding the Metabolite Information (Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University) NISHIHARA, Tatsuya; MOTOHASHI, Yuto; MORITANI, Shuhei; YAJIMA, Momoka; TANABE, Kazuhito

生体内で産生される代謝物は、疾病との関連性が見出されており、近年、診断マーカーへの活用が盛んになされている。現在、代謝物の解析手法として用いられている液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS) は網羅的な代謝物解析を可能とするため、非常に有用性が高い手法であることが知られている。その一方で、LC-MS は検出器として用いる質量分析計の導入コストが高く、代謝物解析の障壁は高い。また検体中に含まれる代謝物の分離作業を前提としているため、解析可能な検体数に制限が生じることも課題として挙げられる。

以上を踏まえ、本研究では、代謝物情報を核酸にコードするという新たなコンセプトを用いることで、上記の二つ課題をそれぞれ克服することを目指した。

まず初めに、標的代謝物量をコード可能な機能性人工核酸の開発し、定量 PCR 法を用いた新たな代謝物解析手法の確立を目指した。汎用されている定量 PCR を用いることで、質量分析計を用いることなく、標的代謝物を超高感度に検出することを目的とした。具体的には、標的代謝物との反応部位 (マレイミド基) を 3'末端に導入した人工核酸を設計した。人工核酸による代謝物解析手法は、以下の 3 ステップとなる。まず初めに、人工核酸と目的代謝物との間で選択的に反応を進行させる。次に、液体クロマトグラフィーにより生成物を単離する。最後に、得られた人工核酸を定量 PCR により定量することで、超高感度に標的代謝物を解析・検出する。実際に、グルタチオン (GSH) を標的分子とし、GSH が付加した機能性人工核酸を単離、定量することで、高感度に GSH を検出可能であることを明らかにした。

次に、代謝物との反応に応じ機能性核酸が遊離するシステムを設計し、標的代謝物量を DNA ヘコード可能にする分子システムの構築を試みた。具体的には、機能性 DNA として、3'末端にジスルフィド結合を介してビオチンを修飾した DNA を設計、合成した。得られた人工核酸をストレプトアビジン修飾磁性ビーズにビオチンアビジン相互作用により担持させた。続いて、GSH を加え反応させることで、遊離した DNA を定量 PCR にて確認した。以上により、分離操作を経ずに、代謝物量をコードした機能性核酸を回収可能となることを見出すことに成功した。本システムは、検体情報と検出する DNA 配列を紐づけ、得られる DNA の配列情報、及び量を次世代シーケンサー等により一斉解析することで多検体解析への応用展開も期待される。

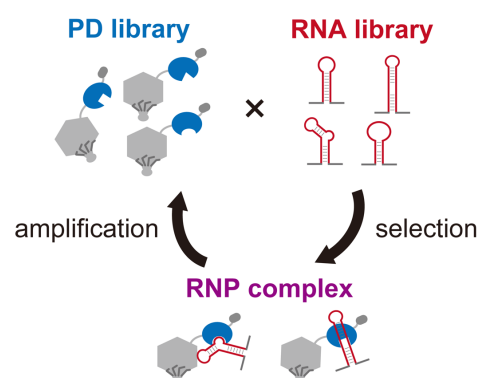
以上をまとめると、本研究では、標的代謝物量をコード可能な機能性人工核酸の開発を通じ、質量分析計を用いることなく超高感度な代謝物解析・検出が可能であることを明らかにした。また、代謝物存在量に応じ、機能性核酸が遊離する分子システムを確立することで、検体中に含まれる標的代謝物量を分離操作なしに解析可能であることを確かめた。核酸の分子特性を活用したこれらの方法論は、従来の代謝物解析で用いられていた LC-MS の本質的な課題克服が可能であるため、代謝物研究への貢献が期待される。

ライブラリー vs. ライブラリーの試験管内選択を通じた直交性 RNA-RBP ペアの発見

○福永 圭佑・横林 洋平（沖縄科学技術大学院大学）

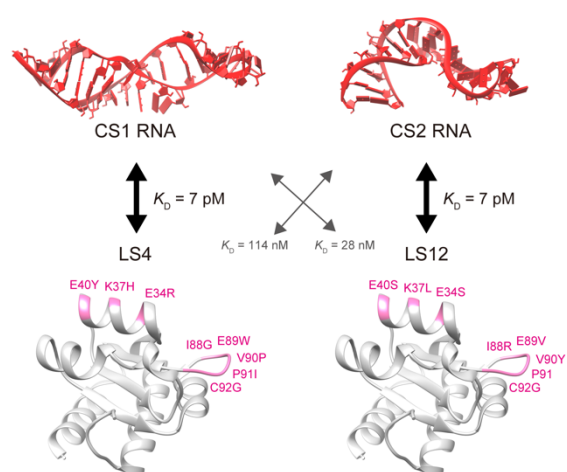
Discovery of orthogonal RNA-RBP pairs through library-vs-library *in vitro* selection (Nucleic Acid Chemistry and Engineering Unit, Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University (OIST))
FUKUNAGA, Keisuke; YOKOBAYASHI, Yohei

ウィルスや古細菌由来の RNA-RNA 結合タンパク質 (RBP) ペアはケミカルバイオロジー研究や合成生物学研究において目的の RNA とタンパク質を繋ぐアダプター分子として有用である一方、哺乳動物細胞において機能することが知られている RNA-RBP ペアの数に限られている。このような分子パーツの種類を増やすためには、機能する事が予め分かっている既存の RNA-RBP ペアを元に塩基置換・アミノ酸置換を行い、直交性を持つ新規 RNA-RBP ペアを創製することが有効な戦略となる。



発表者らは最近、バクテリオファージに提示させた RBP 変異体ライブラリーと RNA ライブラリーを試験管内で共進化させる新たな手法: PD-SELEX 法の開発に成功した (上図)¹。古細菌由来のリボソームタンパク質である L7Ae を RBP スキャフォールドとして選択し、RNA 結合面に位置するアミノ酸 8 残基をランダム化したファージディスプレイ (PD) ライブラリーを構築した。また、20 塩基をランダム化した RNA ライブラリーも構築した。 4.0×10^8 の多様性の PD ライブラリーと 1.1×10^{12} の多様性の RNA ライブラリーを初期ライブラリーとして用い、ライブラリー vs. ライブラリーのセレクションを 6 ラウンド行った後、次世代シーケンシングで RNA・PD 各ライブラリーで配列が濃縮されていることを確認した。

次に、どのタンパク質とどの RNA が結合するペアなのかを決定するため、濃縮された RBP の配列上位 20 種類をリコンビナントタンパク質として個別に調製した。また、6 ラウンド後の RNA 上位配列を含む小規模の多様性の第 2 世代 RNA ライブラリーを作製し、個々のリコンビナント RBP に対してセレクション (従来の SELEX 実験) を行い、次世代シーケンシングで結合のトレンドを明らかにした。最終的に表面プラズモン共鳴法を用いた結合解析から、非常に強い結合親和性 (K_D 値 = 約 7 pM)、および高い特異性 (S/N 比 = 4000 以上) を持つ RNA-RBP ペア (CS1 RNA - LS4、及び CS2 RNA - LS12) を同定することに成功した (右図)。



1) K. Fukunaga and Y. Yokobayashi, *Nucleic Acids Res.* **2021**, in press [NAR Breakthrough Article] DOI: 10.1093/nar/gkab527

Oral(first day)

📅 Wed. Sep 8, 2021 2:30 PM - 3:30 PM JST | Wed. Sep 8, 2021 5:30 AM - 6:30 AM UTC | 🏠 Room B Zoom

Nucleic acids

Chair: Hiromu Kashida (Nagoya Univ.)

2:30 PM - 2:50 PM JST | 5:30 AM - 5:50 AM UTC

[1B-10] Sequence-selective recognition of double-stranded DNA by using PNAs with natural nucleobases

*Yuichiro Aiba¹, Masanari Shibata¹, Kota Ito¹, Masaki Hibino¹, Shinya Ariyasu¹, Osami Shoji¹ (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

2:50 PM - 3:10 PM JST | 5:50 AM - 6:10 AM UTC

[1B-11] Intracellular Reconstruction of Viral Infection Response Field by Nucleic Acid Nanotechnology and Its Application to Selective Cancer Immunotherapy

*Kunihiko Morihiko¹, Shunto Morita¹, Akimitsu Okamoto^{1,2} (1. Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Research Center for Advanced Science and Technology (RCAST), The University of Tokyo)

3:10 PM - 3:30 PM JST | 6:10 AM - 6:30 AM UTC

[1B-12] Enzyme cascade reactions on a dynamic DNA scaffold

*Peng Lin¹, Huyen Dinh¹, Eiji Nakata¹, Takashi Morii¹ (1. Institute of Advanced Energy, Kyoto University)

天然核酸塩基からなるペプチド核酸 (PNA) による配列特異的な 2 本鎖 DNA 認識

○愛場雄一郎¹・柴田将成¹・伊藤公太¹・日比野 柁¹・有安真也¹・荘司長三¹
(¹ 名大院理)

Sequence-selective recognition of double-stranded DNA by using PNAs with natural nucleobases (Graduate School of Science, Nagoya University¹) AIBA, Yuichiro¹; SHIBATA, Masanari¹; ITO, Kota¹; HIBINO, Masaki¹; ARIYASU, Shinya¹; SHOJI, Osami¹

ペプチド核酸 (Peptide Nucleic Acid; PNA) は、DNA のリボース・リン酸骨格を *N*-(2-aminoethyl) glycine 骨格に置き換えた構造を持つ人工核酸である¹⁾。このリン酸基を持たない特徴的な骨格により、PNA は相補的な DNA と、非常に安定な 2 本鎖を形成することが可能である。さらに、この高い DNA 結合力から、相補的な 2 本鎖 DNA 中に侵入して複合体を形成するインベージョンという現象が報告されている (Fig. 1)。このインベージョン

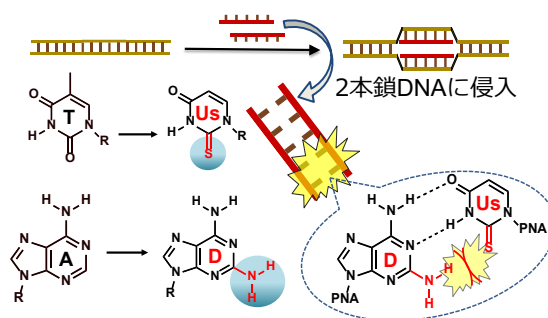


Fig. 1 PNA によるインベージョン

では、事前の変性操作などを必要とせず、2 本鎖状態の DNA を直接認識可能なことから、ゲノム DNA などを標的とした生体内応用などが期待されている。ここで、インベージョンに用いる 1 組の PNA は原則的に相補的であるため、インベージョンを進行させるにはより安定に形成する PNA/PNA の 2 本鎖形成を抑制する必要がある。そのため、特殊な化学修飾核酸塩基^{2,3)}が効率的なインベージョンには必要不可欠とされてきた (Fig. 1)。一方で、複雑なモノマー合成の手間や、合成時の試薬⁴⁾の問題から自動合成化が困難なことが、PNA を応用展開する妨げとなっていた。

そこで本研究では、複雑な化学修飾を必要としない新たな PNA インベージョン法の構築を目指した。そこで、PNA 間の相互作用を抑制するために PNA の配向に着目し、parallel 型の PNA を採用した (Fig. 2)。このような設計を施すことで、これまでインベージョンに不可欠であった化学修飾核酸塩基を用いることなく、合成の簡便な未修飾 PNA でのインベージョンを達成した⁵⁾。こ

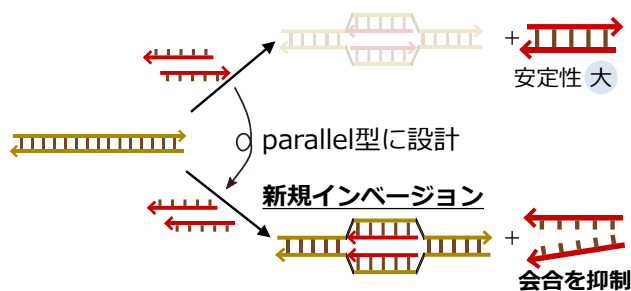


Fig. 2 PNA の配向に着目した新規インベージョン法

の新規 PNA インベージョン手法では、市販の安価な Fmoc-PNA モノマーが使用可能であり、ペプチド自動合成機を用いた多検体同時合成やスケールアップも容易となる。本手法により、様々な PNA 配列によるスクリーニングなど、従来は検討が困難であった PNA インベージョンの広範な応用が可能となる。本発表では、parallel 型 PNA の特性に加え、PNA 設計の最適化や、インベージョン効率の向上に対する取り組みについて報告する。

- 1) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **254**, 1497-1500 (1991).
- 2) G. Haaima, H. F. Hansen, L. Christensen, O. Dahl, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **25**, 4639-4643 (1997).
- 3) J. Lohse, O. Dahl, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 11804-11808 (1999).
- 4) M. Komiyama, Y. Aiba, T. Ishizuka, J. Sumaoka, *Nat. Protoc.* **3**, 646-654 (2008).
- 5) M. Shibata, Y. Aiba, M. Hibino, O. Shoji, *submitted*.

核酸ナノ技術によるウイルス感染応答場の細胞内再構築と選択的がん免疫療法への応用

○森廣邦彦¹・森田駿人¹・岡本晃充^{1,2} (¹東大院工、²東大先端研セ)

Intracellular Reconstruction of Viral Infection Response Field by Nucleic Acid Nanotechnology and Its Application to Selective Cancer Immunotherapy (Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo¹, Research Center for Advanced Science and Technology (RCAST), The University of Tokyo²) MORIHIRO, Kunihiro¹; MORITA, Shunto¹; OKAMOTO, Akimitsu^{1,2}

細胞外から導入された核酸分子はウイルス病原体として認識され、様々な免疫応答を引き起こす。例えば、長い RNA 二重鎖は細胞質に存在するヘリカーゼの 1 種である MDA5 によって認識され、下流にシグナルを伝達することで主に 2 つの経路によって免疫応答を惹起する。一方はミトコンドリア膜上に存在するタンパク質 Bax からのシトクロム C 放出を促進し、カスパーゼ経路を活性化することでアポトーシスを誘導する。他方はキナーゼ TBK1 の活性化を介して転写因子 IRF3 がリン酸化され、I 型インターフェロンの転写を促進することで免疫が活性化される経路である。これら免疫応答を誘導する長鎖核酸二重鎖はがん免疫療法への展開が期待されており、例えば長い人工 RNA 二重鎖である poly(I:C) は強い抗腫瘍効果をもつことが明らかになっている。しかし、がん細胞選択的に免疫を惹起することができず強い全身免疫毒性を併発するため、その臨床応用は断念されている²⁾。

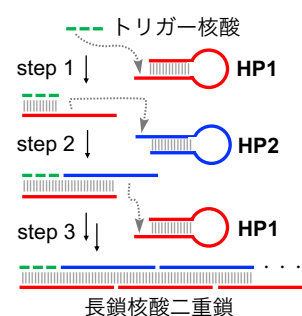


図 1. HCR の概要

本研究では、核酸ナノ技術の 1 種である Hybridization Chain Reaction (HCR) を利用することで細胞内で長鎖 RNA 二重鎖を in situ 構築し、ウイルス感染応答場を再現する技術を開発する。HCR は 2 種類のヘアピン型核酸の連続する鎖置換反応であり、生成物としてニックの入った長い核酸二重鎖を与えることができる (図 1)³⁾。HCR の開始を代表的ながん関連マイクロ RNA (miRNA) である miR-21 によって制御することで、がん細胞選択的に細胞死を引き起こす免疫

(1) 短鎖ヘアピン型 RNA プローブの設計と化学合成

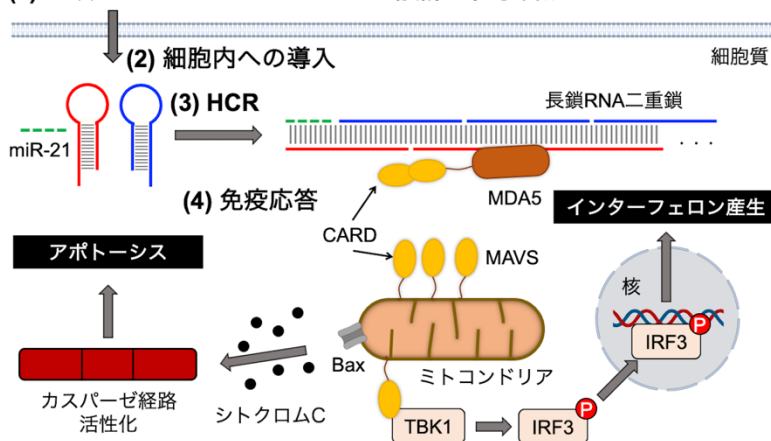


図 2. 本研究で開発するウイルス感染応答場再構築技術の概要

療法に応用する。本技術は、(1) 短鎖ヘアピン型 RNA プローブの設計と化学合成 (2) プローブの細胞内導入 (3) 細胞内 miR-21 をトリガーとした HCR (4) がん細胞選択的な免疫応答から構成される (図 2)。本シンポジウムでは設計した技術の試験管内、細胞内及び動物個体内での評価について議論したい。

- 1) J. Maelfait, L. Liverpool, J. Rehwinkel, *J. Mol. Biol.*, **432**, 552 (2020)
- 2) A. S. Levine, M. Sivulich, P. H. Wiernik, H. B. Levy, *Cancer Res.*, **39**, 1645 (1979)
- 3) S. Bi, S. Yue, S. Zhang, *Chem. Soc. Rev.*, **46**, 4281 (2017)

動的 DNA 足場に構築した酵素カスケード反応

OLin Peng・Dinh Huyen・中田栄司・森井 孝（京大エネルギー理工学研究所）

Enzyme cascade reactions on a dynamic DNA scaffold (Institute of Advanced Energy, Kyoto University) LIN, Peng; DINH, Huyen; NAKATA, Eiji; MORII, Takashi

Structural programmability and accurate addressability of DNA nanostructures are ideal characteristics for the platform of arranging enzymes with the nanoscale precision.¹ In this study, a three-dimensional DNA scaffold² was designed to enable a dynamic shape transition from an open plate-like structure to its closed state of a hexagonal prism structure. The two domains in the open state were folded together to transform to the closed state by hybridization of complementary short DNA closing keys at both facing edges in over 90% yield.³ The shape transformation of the DNA scaffold was quantitatively studied by means of the fluorescence energy transfer measurement, atomic force microscope images and agarose gel electrophoretic analyses.

In our recent study, xylitol dehydrogenase (XDH) or xylose reductase (XR) individually scaffolded on the open state showed higher activity than the respective free enzyme, which was contributed by the synergetic effect of the enhanced enzyme stability, reduced adsorption and ordered hydration layer of DNA scaffold.⁴ In this study, an enzyme cascade consisting of XDH and xylulose kinase (XK), both of which were derived from the xylose metabolic pathway, was constructed on the reconfigurable DNA scaffold. Cascade enzymes were assembled at each plate in the open state to provide an inter-enzyme distance of 60 nm. Transformation of the scaffold to the closed state implemented the inter-enzyme distance of 20 nm with quantitatively keeping the number of assembled enzyme molecules (Fig. 1). The sequential reaction efficiency of xylitol metabolism through the transport of intermediate xylulose from XDH to XK in the open and closed states will be discussed.

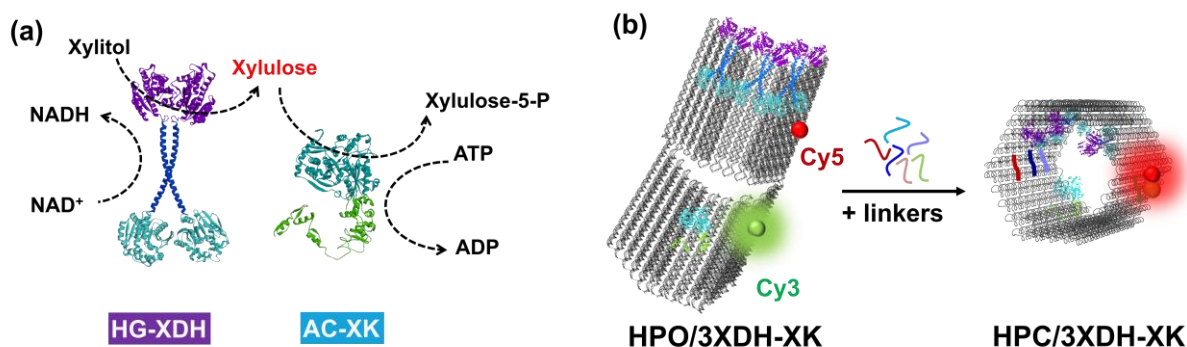


Fig 1. (a) A scheme shows cascade reaction of HG-XDH (modular adaptor fused XDH)⁴ and AC-XK (modular adaptor fused XK).⁵ (b) A scheme represents the shape transformation of enzyme loaded DNA scaffold in the open state (HPO/3XDH-XK) to its closed state (HPC/3XDH-XK) by the hybridization of DNA linkers. A pair of Cy3 and Cy5 was introduced on each dish of DNA scaffold to monitor the closing process by FRET.

- 1) P. W. K. Rothmund, *Nature*, **440**, 297 (2006)
- 2) S. M. Douglas, I. Bachelet, G. M. Church, *Science*, **335**, 831 (2012)
- 3) P. Lin, H. Dinh, E. Nakata, T. Morii, *Front. Chem.*, **9**, 697857 (2021)
- 4) P. Lin, H. Dinh, Y. Morita, Z. Zhang, E. Nakata, M. Kinoshita, T. Morii, *Chem. Commun.*, **57**, 3925 (2021)
- 5) T. M. Nguyen, E. Nakata, M. Saimura, H. Dinh, T. Morii, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 8487 (2017)

Oral(first day)

📅 Wed. Sep 8, 2021 3:40 PM - 4:20 PM JST | Wed. Sep 8, 2021 6:40 AM - 7:20 AM UTC | 🏠 Room B Zoom

Nucleic acids

Chair: Kunihiro Morihiro (The University of Tokyo)

3:40 PM - 4:00 PM JST | 6:40 AM - 7:00 AM UTC

[1B-13] Development of selective DNA aptamer for Amyloid beta 42 variants using SELCOS

*Radhika Biyani¹, Masahiro Takagi¹, Manish Biyani (1. School of material Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

4:00 PM - 4:20 PM JST | 7:00 AM - 7:20 AM UTC

[1B-14] Design and preparation of photocrosslinkable probe-modified magnetic particles (PPMP) to improve PCR test accuracy

*Maho Koda¹, Ayako Koto^{2,3}, Shuto Yajima³, Hiroaki Sakamoto³, Eiichiro Takamura³, Shin-ichiro Suye³
(1. Faculty of Engineering, University of Fukui, 2. NICCA CHEMICAL CO.,LTD, 3. Graduate School of Engineering, University of Fukui)

Development of selective DNA aptamer for Amyloid beta 42 variants using SELCOS

(Graduate School of Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST)¹, BioSeeds Corporation²) Radhika Biyani¹; Manish Biyani²; Masahiro Takagi¹

Amyloid beta 42 (A β 42) is the main cause of neuronal death in the brains of patients with Alzheimer's disease (AD). The social and economic burden of this disease is very high because neither a specific therapy that can cause a delay in AD progression is offered, nor a specific test that can make early-diagnosis possible is offered. A β 42 is a 42 amino-acid chain small-peptide and a key biomarker for the pathogenesis of AD. Early diagnosis of A β 42 thus can be particularly important for prognosis and treatment.

Recently, a variant form of A β 42, i.e., E22P (Glutamic acid at 22 position changes to Proline) with a turn at Glu22 and Asp23, has been described and differentiated with the wild-type A β 42 (E22) which has a turn at Gly25 and Ser26 [1]. This artificial mutation triggers the beta-sheet formation due to the turn making the aggregation more prone. Thus, highly specific bio-probes that recognize the variants of A β 42 holds great promise for AD diagnosis and therapy. Antibodies are ideal choice for biomarkers, however, not fit for a small sized target like A β 42. Aptamers have emerged as new smart class of biomolecules that can be used for molecular recognition of targets for diagnostic and therapeutic applications. With limited applications of aptamers in the field of A β 42 research, it can be encouraging to develop DNA Aptamer that can selectively recognize to the variants of A β 42. To perform screening for highly similar targets (E22 and E22P), a modified strategy of conventional SELEX, termed as SELCOS (Systematic Evolution of Ligands by COMpetitive Selection) [2] can be utilized.

In this study, we employed SELCOS to screen highly selective 70-mer DNA aptamer, named Apt-8, that specifically binds to E22-type A β 42. The electrochemical binding assay indicated that Apt-8 had capability to bind to A β 42 monomers strongly and specifically. Although further characterization needs to be done, the current evidence supports the proposition that Apt-8 could be further applied to a wide-range of affinity assays for both diagnosis and treatment.

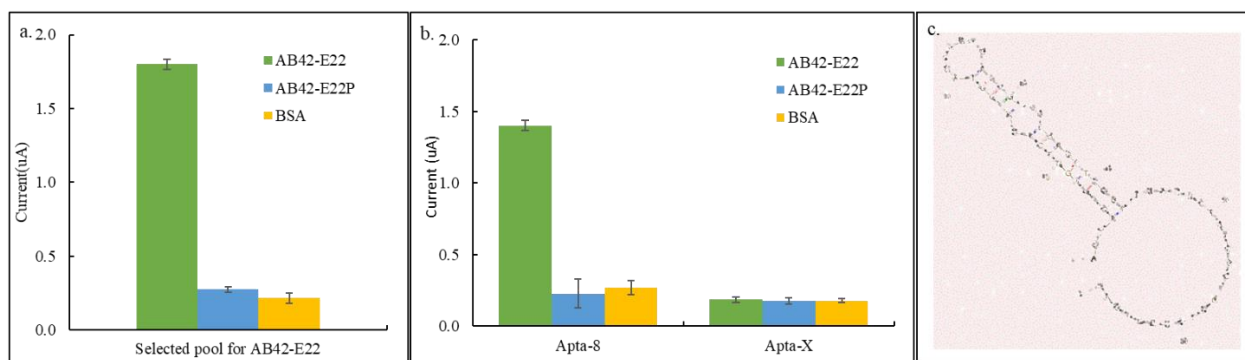


Figure 1: (a) Binding affinity of Selected Pool after selection to E22- and E22P type A β 42 and BSA(control). (b) Binding affinity of Apt-8 and Apt-X (negative control) to E22- and E22P- type A β 42 and BSA. (c) Secondary structure of Apt-8

Reference:

- 1) Murakami, K., Tokuda, M., Suzuki, T., Irie, Y., Hanaki, M., Izuo, N., & Tokuda, T. (2016). Monoclonal antibody with conformational specificity for a toxic conformer of amyloid β 42 and its application toward the Alzheimer's disease diagnosis. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
- 2) Kushwaha, A., Takamura, Y., Nishigaki, K., & Biyani, M. (2019). Competitive non-SELEX for the selective and rapid enrichment of DNA aptamers and its use in electrochemical aptasensor. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.

PCR 検査精度向上のための光架橋性プローブ修飾磁気粒子(PPMP)の開発

○神田真穂¹・向當綾子^{2,3}・矢嶋修登³・坂元博昭³・高村映一郎³・末信一郎³(福井大工¹、日華化学株式会社²、福井大院工³)**Design and preparation of photocrosslinkable probe-modified magnetic particles (PPMP) to improve PCR test accuracy** (Faculty of Engineering, University of Fukui¹, NICCA CHEMICAL CO.,LTD.², Graduate School of Engineering, University of Fukui³)KODA, Maho¹; KOTO, Ayako^{2,3}; YAJIMA, Shuto³; SAKAMOTO, Hiroaki³; TAKAMURA, Eiichiro³; SUYE, Shin-ichiro³

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) などの感染検査に PCR 法が用いられる。PCR は選択性と感度が高いが、検査結果において偽陰性が生じることが問題となっている。それは、検体採取の不備や、核酸抽出過程において核酸分解酵素がコンタミし、核酸が分解されることで標的核酸の収量および純度が低下することが原因として挙げられる。そこで、標的核酸のみを正確に捉え、回収量を向上させることが必要である。

本研究では、光架橋性プローブ修飾磁気粒子 (PPMP) を用いた標的核酸の回収方法を提案する (Fig. 1)。光架橋性人工核酸は、核酸二重鎖において 366 nm の光を照射することで、対応するピリミジン塩基に対して架橋 (共有結合) する。配列中に光架橋性人工核酸を挿入した光架橋性プローブは、標的核酸とのハイブリダイゼーション後、光照射で標的核酸と架橋する。水素結合が解消される程に強力な洗浄工程を実施しても、プローブは共有結合によって標的核酸を捕捉し続ける。PPMP を用いると夾雑物混在下においても標的核酸のより強固な捕捉が可能となり、標的核酸の回収量向上が期待される。

PPMP の性能を評価するため、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の N2 遺伝子に由来する

配列の RNA 断片 (1260 bp) を標的とした回収実験を行った。標的 RNA と末端がビオチン修飾されたプローブ (5'-GGTAXT TCT ACT ACC TGG GC-biotin-3', X: 光架橋性人工核酸) をハイブリダイゼーションした後に光照射を行い (Fig. 1)、架橋した標的 RNA とプローブの複合体を直径 2.8 μm のストレプトアビジン修飾磁気ビーズと混合しアフィニティ結合させた。その後、非特異的吸着を脱離させるために 6 M 尿素と洗浄バッファーを用いて洗浄を行い、磁気分離により標的 RNA を捕捉した PPMP を回収した。回収 PPMP を用いた RT-PCR を実施し、N2 遺伝子増幅後の電気泳動の結果を Fig. 2 に示す。標的 RNA を単に増幅させた場合 (a) と標的 RNA を捕捉した回収 PPMP (b) は、同じサイズの濃い単一バンドが確認された。一方、ハイブリダイゼーション後に光照射を行わずに回収した PPMP (c) ではバンドは著しく薄くなった。光架橋しない場合、PPMP の洗浄工程でプローブと標的 RNA との水素結合が解離し、標的 RNA が PPMP から脱離したと考えられる。さらにプローブを用いない場合 (d) は標的 RNA のバンドは検出されなかった。以上の結果より、PPMP による標的 RNA の回収が可能であること、光架橋を行うことによって回収量が向上することが示唆された。

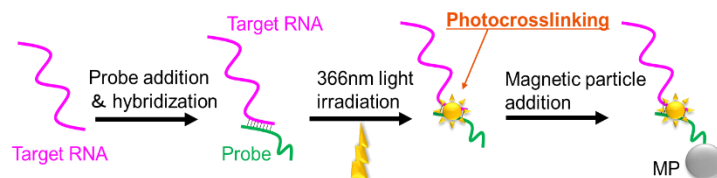


Fig. 1 Schematic illustration of capture of target RNA by PPMP.

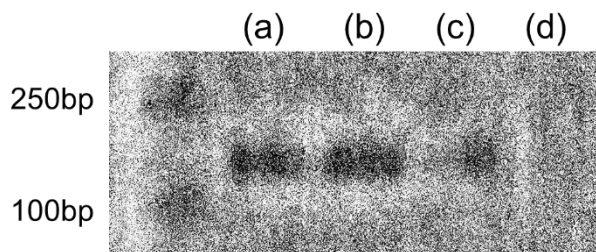


Fig. 2 RT-PCR result. (a) Target RNA (b) PPMP (c) PPMP without light irradiation (d) magnetic particles

Oral(first day)

📅 Wed. Sep 8, 2021 10:10 AM - 11:10 AM JST | Wed. Sep 8, 2021 1:10 AM - 2:10 AM UTC | 🏠 Room C
Zoom

Analysis, Measurement, Sensor devices

Chair: Ikuhiko Nakase (Osaka Prefecture University)

10:10 AM - 10:30 AM JST | 1:10 AM - 1:30 AM UTC

[1C-04] Development of novel chemi-genetic fluorescent calcium sensors using directed evolution

*Takuya Terai¹, Wenchao Zhu¹, Dazhou Cheng¹, Yusuke Nasu¹, Robert E. Campbell^{1,2} (1. Graduate School of Science, The University of Tokyo, 2. Department of Chemistry, University of Alberta)

10:30 AM - 10:50 AM JST | 1:30 AM - 1:50 AM UTC

[1C-05] Evaluation of cancer cell invasiveness by measuring chloride ion efflux ability

*Ayana Yamagishi¹, Akane Nagata², Chikashi Nakamura^{1,2} (1. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

10:50 AM - 11:10 AM JST | 1:50 AM - 2:10 AM UTC

[1C-06] Extrusion of extracellular vesicles (EVs) containing a specific secondary metabolite by penicillium chrysogenum

*Ashok Zachariah Samuel¹, Horii Shumpei^{2,3}, Takuji Nakashima¹, Masahiro Ando¹, Naoko Shibata¹, Haruko Takeyama^{1,3,4,5} (1. Research organization for nano and life innovation, Waseda University, 2. Department of Advanced Science and Engineering, Waseda University, 3. CBBDOIL, AIST-Waseda University, 4. Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda University, 5. Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University)

指向性進化を活用した新規 chemi-genetic カルシウム蛍光センサーの開発

○寺井琢也¹・朱文超¹・程大洲¹・那須雄介¹・Robert E. Campbell^{1,2} (¹ 東大院理、² アルバータ大化学)

Development of novel chemi-genetic fluorescent calcium sensors using directed evolution (Graduate School of Science, The University of Tokyo¹, Department of Chemistry, University of Alberta, Canada²) TERAI, Takuya¹; ZHU, Wenchao¹; CHENG, Dazhou¹; NASU, Yusuke¹; CAMPBELL, Robert E.^{1,2}

標的物質との反応によって蛍光特性が変化する蛍光センサーは、カルシウム (Ca^{2+}) を始めとする標的の動的挙動を高感度に可視化解析できることから生物学研究において汎用されている。現在までに、合成蛍光色素を基盤とする低分子センサーと、緑色蛍光タンパク質 (GFP) などを改変した遺伝子コード型センサーの2種類が主に研究されているが、前者においては細胞種選択性や細胞内局在など、後者においては波長や応答速度などが課題として指摘されている。そこで最近では、タンパク質と低分子の複合体である chemi-genetic センサーによって上記の課題を克服しようとする試みも行われている^{1,2)}。しかし既存の chemi-genetic センサーは、標的結合タンパク質を途中に挿入した HaloTag タンパク質 (=chloroalkane を持つ化合物と選択的に共有結合を形成する人工改変タンパク質)³⁾等に対して低分子の環境感受性蛍光色素を共有結合させる、という画一的な分子設計に留まっている上、タンパク質配列の最適化も十分には試みられていない。そこで今回我々は、標的結合部位として低分子リガンド、環境感受性蛍光分子として蛍光タンパク質を用いる新たな chemi-genetic センサーの設計指針を実証するとともに、タンパク質の指向性進化 (directed evolution) を活用することで高機能な新規 Ca^{2+} 検出 chemi-genetic センサー (Fig. 1) を開発した。

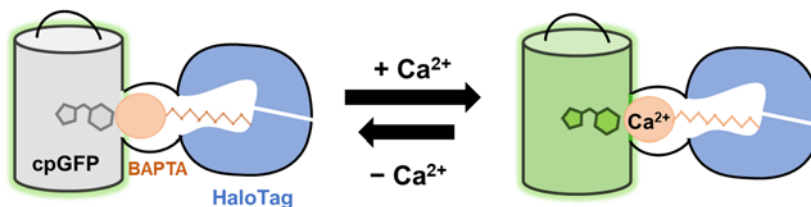


Fig. 1. Schematic illustration of our chemi-genetic Ca^{2+} indicator

まず Ca^{2+} と結合するキレート剤として BAPTA⁴⁾ を選択し、PEG リンカーを介して chloroalkane と連結させた化合物を合計 10 種類合成した。また HaloTag タンパク質のリガンド結合ポケット近傍に circularly permuted GFP (cpGFP) を挿入した変異体を約 30 種類作製した。これらの組合せを網羅的に評価し、 Ca^{2+} への応答が見られたものに対して立体構造に基づく合理的変異導入を行った。さらにタンパク質全長へのランダムな変異導入を繰り返して指向性進化を進めたところ、 Ca^{2+} の有無で蛍光レシオ値 (Ex. 500 nm/Ex. 400 nm) が約 20 倍変化する高性能 chemi-genetic センサーの開発に成功した。また本センサーはリガンドの acetoxymethyl ester (AM) 体を用いることで生細胞でも機能する事が確かめられた。

本研究の分子設計は、天然に適切な標的結合タンパク質が存在しない場合に特に有用性を発揮すると期待される他、GFP 以外の β バレル型蛍光タンパク質にも適用可能と考えられる。我々はまた、標的結合タンパク質と低分子蛍光色素を組合せた従来型の chemi-genetic 蛍光センサーについても変異体ライブラリーの作製と評価に取り組んでおり、これについても簡単に報告する。

1) Deo, C. et al., *Nat. Chem. Biol.*, **17**, 718–723 (2021). 2) Wang, L. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **59**, 21880–21884 (2020). 3) Los, G. V. et al., *ACS Chem. Biol.*, **3**, 373–382 (2008). 4) Tsien, R. Y. *Biochemistry*, **19**, 2396–2404 (1980).

塩化物イオン排出能の測定によるがん細胞の浸潤性評価

○山岸彩奈¹・長田 あかね²・中村 史^{1,2} (1 産総研細胞分子工学、² 農工大理工)

Evaluation of cancer cell invasiveness by measuring chloride ion efflux ability (Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST¹, Grad. Sch. Eng., TUAT²) Yamagishi, Ayana¹; NAGATA, Akane²; NAKAMURA, Chikashi^{1,2}

これまでに我々は、高転移性マウス乳がん細胞 FP10SC2 (SC2) 株を用いて、中間径フィラメントネスチンを欠損した株 (NKO) を作製し、そのキャラクターゼーションを行ってきた。NKO 株の浸潤能は、SC2 細胞と比較して低く、さらに NKO 株は SC2 細胞よりも弾性率が高いことから、細胞体が固くなることで浸潤能が低下したことが示唆されている。この NKO 株の RNA-seq 解析を行ったところ、KO 株で発現量が低下した遺伝子群において変動率上位 10 個の遺伝子に、塩化物イオンチャネルの一種である *Clic1* が含まれていた。*Clic1* は細胞容積調節機構 (Regulatory Volume Decrease: RVD) に関与することが報告されている。この機構において、低張刺激により水分子が流入することで膨張した細胞は、カリウムイオンや塩化物イオンを排出することで水分子の排出を促進させる。これにより、膨張した細胞の体積は膨張前の体積に回復する。また、*Clic1* の発現抑制によりがん浸潤能が低下することから、がん浸潤に関与していると考えられているが、その詳細な機構は不明である。がん細胞は、浸潤過程において細胞間の間隙や結合組織を移動する際に機械的ストレスに晒されることから、浸潤能の高いがん細胞は、このような刺激に対して頻繁に応答している可能性がある。我々は、がん細胞の RVD は、低浸透圧刺激ではなく、浸潤過程における機械的刺激によって誘発されるのではないかと考えた。つまり、浸潤によって生じる機械的刺激が細胞膜を伸展させることで *Clic1* が開口し、塩化物イオンを排出することで細胞容積が減少し、がん細胞の狭い空間での移動を促進すると推察した。また、このような機構が存在するのであれば、がん細胞に機械的刺激を加えるだけで塩化物イオンが排出されると予想した。

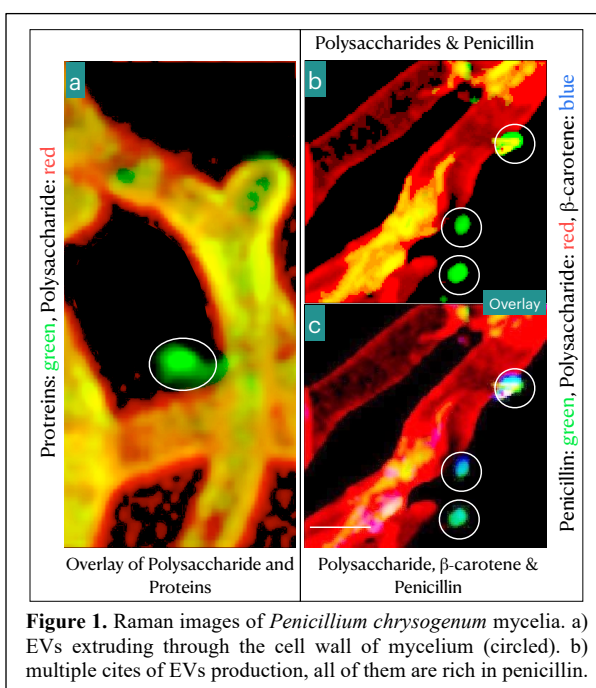
実際に *Clic1* タンパク質発現量を評価したところ、SC2 株と比較して NKO 株における *Clic1* 発現量は約 30%減少していた。そこで、塩化物イオンと結合することで消光する細胞膜透過性の蛍光試薬 MQAE を SC2 株に導入し、塩化物イオンの排出を観察した。MQAE 添加培地中で 1 時間静置することで細胞に MQAE を導入し、PBS で洗浄することで細胞外の MQAE を除去した。その後、PBS 溶液中の MQAE 導入細胞に対して、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて直径 10 μm のポリスチレン粒子を取り付けたカンチレバーを圧入した。その結果、圧入直後に細胞内 MQAE 蛍光強度の上昇が確認されたことから、機械的刺激を印加するだけで塩化物イオンの排出を誘起可能であることが明らかとなった。そこで、浸潤性の異なる二種類のマウス乳がん細胞 (SC2、NKO) とヒト乳がん細胞 (MDA-MB-231、MCF-7) に対して機械的刺激を加え、塩化物イオンの排出能を評価した。10 分間力を印加した際の細胞内 MQAE 蛍光強度の経時変化から、高浸潤性の SC2 及び MDA-MB-231 株は、低浸潤性の NKO 株及び MCF-7 と比較して、有意に蛍光強度が上昇しており、塩化物イオン排出能が高いことが示された¹。塩化物イオン排出能とがん細胞の浸潤能には相関があると考えており、この手法は、生検で得られたがん細胞の浸潤能評価にも適用できる可能性があると考えている。

1 A. Yamagishi, et al., Anal. Chem. 93, 26, 9032–9035 (2021)

Extrusion of extracellular vesicles (EVs) containing a specific secondary metabolite by *Penicillium chrysogenum*

○ SAMUEL, Ashok Zachariah¹; SHUMPEI, Horii;^{2,3} NAKASHIMA, Takuji;¹ ANDO, Masahiro;¹ SHIBATA, Naoko;¹ TAKEYAMA, Haruko^{1,3,4,5} (Research organization for Nano and Life Innovation, Waseda University,¹ Department of Advanced Science and Engineering, Waseda University,² CBBDOIL, AIST-Waseda University,³ Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda University,⁴ Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University⁵)

Extracellular vesicles (EVs) play a major in cellular communication and also in survival of microorganisms. However, it is unclear whether EVs play a crucial role in the release of secondary metabolites from fungi. We have investigated the role of EVs in penicillin release from *Penicillium chrysogenum* using Raman imaging^{1,2} technique. Our study clearly shows that EVs containing penicillin are released from the fungus. We have successfully imaged the contents of these EVs using Raman microspectroscopy. We show that penicillin is one of the major constituents of the EVs in addition to proteins and carotenoids. During the release of vesicles, certain protrusions lacking polysaccharides were formed at different locations of the mycelia (Figure 1). High concentrations of penicillin, compared to the other regions of the cell body, were observed in these locations. Formation of these protrusions could be one of the major steps in the biogenesis of EVs. We also support these findings with additional evidence from LC-MS, SEM, and TEM results. Methodological details and the potential of Raman imaging technique¹ in biomedical research will be discussed in detail.



- 1) Samuel, A. Z., Miyaoka, R., Ando, M., Gaebler, A., Thiele, C., Takeyama, H. *Commun. Biol.* 3, 372 (2020).
- 2) Horii, S., Ando, M., Samuel, A. Z., Take, A., Nakashima, T., Matsumoto, A., Takahashi, Y., Takeyama, H. *J. Nat. Prod.* 83, 3223 (2020).

Oral(first day)

📅 Wed. Sep 8, 2021 1:20 PM - 2:20 PM JST | Wed. Sep 8, 2021 4:20 AM - 5:20 AM UTC | 🏠 Room C Zoom

Analysis, Measurement, Sensor devices

Chair: Masumi Taki (The University of Electro-Communications)

1:20 PM - 1:40 PM JST | 4:20 AM - 4:40 AM UTC

[1C-07] Moment Analysis Method for Determination of Solute Permeation Kinetics at Lipid Bilayer of Liposomes

*Kanji Miyabe^{1,2}, Momoko Umeda¹, Shunta Inaba² (1. College of Science, Rikkyo University, 2. Graduate School of Science, Rikkyo University)

1:40 PM - 2:00 PM JST | 4:40 AM - 5:00 AM UTC

[1C-08] Measurement of microbial degradation of biodegradable polymer by QCM and electrochemistry

*Takuma Otsuki¹, Yasumasa Takenaka², Tomohiro Hiraishi², Hideki Abe², Noriyuki Asakura¹ (1. Graduate School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. RIKEN CSRS)

2:00 PM - 2:20 PM JST | 5:00 AM - 5:20 AM UTC

[1C-09] Detection of circulating tumor cells by the successive strand exchange of nucleic acids

*Yusuke Kitamura¹, Shunpei Sakamoto¹, Yuta Nakashima¹, Masaaki Iwatsuki², Yasuda Keihiro³, Seitaro Kumamoto^{1,3}, Yousuke Katsuda¹, Hideo Baba², Yoshitaka Nakanishi¹, Toshihiro Ihara¹ (1. Faculty of Advanced Science and Technology, 2. Faculty of Life Sciences, 3. OGIC technologies Co., Ltd.)

リポソーム脂質二分子膜における溶質透過速度のモーメント解析

○宮部寛志^{1,2}・梅田萌々子¹・稲葉隼汰² (¹立教大理、²立教大院理)

Moment Analysis Method for Determination of Solute Permeation Kinetics at Lipid Bilayer of Liposomes
(College of Science, Rikkyo University¹, Graduate School of Science, Rikkyo University²) MIYABE, Kanji^{1,2};
UMEDA, Momoko¹; INABA, Shunta²

【緒言】薬物の効率的な投与技術として薬物輸送システム(DDS)が注目されている。リポソームは、薬物の化学的安定性の向上や徐放性制御等の目的で、薬物輸送担体として利用されている。その薬物徐放機構を解明すると共に薬物輸送担体としての性能を評価するためには、リポソーム内への薬物の分配平衡や、リポソーム界面における薬物の透過速度を定量的に解析する必要がある。

そこで本研究では、リポソーム自体を擬似固定相として使用するリポソーム導電クロマトグラフィー(LEKC)実験とモーメント理論を組み合わせ、球状リポソーム内への物質の分配平衡およびリポソーム界面における物質透過速度の定量的な解析法を開発した。まず、LEKC実験データを解析する際の理論基盤となるモーメント式を開発した。次に、本解析法をモデル実験系に適用して試料物質のリポソームへの分配平衡定数(K_p)および界面における透過速度定数(k_{in} : 外部バルク相→リポソーム内部 および k_{out} : リポソーム内部→外部バルク相)を測定して本法の有用性を実証した。

【モーメント解析法と実験】モーメント解析法の概要を Fig. 1 に示す。リポソームを含む泳動液をキャピラリー内に充填し、試料溶液を注入して電気泳動(LEKC)実験を行う。溶質はリポソームとの相互作用を自動的かつ無数に繰り返しながらキャピラリー出口方向に移動して検出され、溶出ピークが記録される。リポソーム界面における溶質透過現象に関する化学情報は LEKC 系内で増幅・検出され、溶出ピークの形状的特徴として表わされる。そこで、溶出ピークの一次絶対モーメント(μ_{1A})と二次中央モーメント(μ_{2C})を解析して、 K_p , k_{in} および k_{out} を求める。

リン脂質として 1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DLPC) と phosphatidyl serine (PS) を使用し、膜を用いる押し出し法によりリポソーム DLPC/PS (80/20 mol%) を調製した(粒子径約 144 nm)。2-シクロヘキシルアミノエタンスルホン酸 (50 mM) 緩衝溶液 (pH = 9.0) にリポソームを溶解し(リン脂質濃度として 0~10 mM)、泳動液を調製した。緩衝溶液に試料物質としてコルチゾン(副腎皮質ステロイド)、電気浸透流(EOF) マーカーとしてジメチルスルホキシド(DMSO)を溶解して混合試料溶液を調製した。溶融シリカキャピラリー(内径 75 μm 、有効長

45.4 cm) に泳動液を満たし、混合試料溶液を微量注入して電気泳動実験を行った。また、リン脂質として 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) と PS を使用してリポソーム DMPC/PS (80/20 mol%) を調製し(粒子径約 162 nm)、同様に電気泳動実験を行った。

【結果】DLPC/PS リポソームを使用する LEKC 実験における実測溶出曲線を Fig. 2 に示す。リン脂質濃度(C_M)の増加と共に DMSO とコルチゾンのピークの溶出位置の差が増大しており、Fig. 2 の結果はコルチゾンがリポソームと相互作用していることを示唆している。DMSO ピークの溶出位置の変動は LEKC 系の実験条件の変動に因るものと考えられるため、それを補正した上で C_M の各値におけるコルチゾンピークの μ_{1A} および μ_{2C} を解析し、 K_p , k_{in} と k_{out} を決定した。

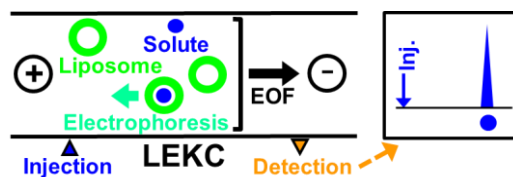


Fig. 1. Schematic illustration of LEKC system.

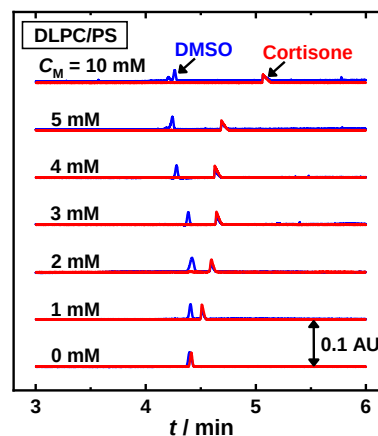


Fig. 2. Electropherograms in the LEKC system using DLPC/PS liposomes.

QCM と電気化学測定を用いた生分解性ポリマーの分解過程の解析

○大槻拓馬¹・竹中康将²・平石知裕²・阿部英喜²・朝倉則行¹ (¹ 東工大生命理工、² 理研 CSRS)

Measurement of microbial degradation of biodegradable polymer by QCM and electrochemistry (Graduate School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology¹, RIKEN CSRS²)

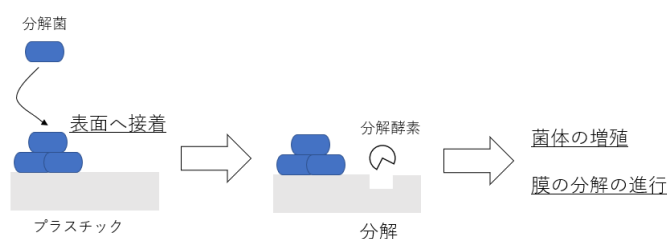
OTSUKI, Takuma¹; TAKENAKA, Yasumasa²; HIRAISHI, Tomohiro²; ABE, Hideki²; ASAKURA, Noriyuki¹

生分解性プラスチックは持続可能な循環型高分子材料として注目を集めている。さらに、機能や製造コストの問題を解決し、石油由来プラスチックの代替となることが期待されている。機能における問題として、海水や土壌など環境の違いによって分解される場合とされない場合があることが知られており、特定の環境下において分解が誘発されるプラスチックの開発が必要である。これら問題の解決のためには、生分解のメカニズムを明らかにすることが重要である。現在、分解過程の観測に広く利用されている BOD 試験では、分解量の測定が可能であるが、分解過程のメカニズムを調べることはできない。

そこで、本研究では、プラスチックの重量変化を QCM (水晶振動子マイクロバランス) 法で測定し、それと同時に電気化学測定を行うことより分解のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

プラスチックの生分解は、Scheme 1 に示すように、分解菌のプラスチック表面への接着、分解酵素の分泌を経て進行すると考えられる。QCM と電気化学の測定では、菌体の接着過程を測定し、分解初期の解析を行った。生分解性ポリマーとして PHBH (ヒドロキシブタン酸とヒドロキシヘキサン酸を共重合したポリマー) を用いた。PHBH 膜を水晶振動子の金表面に作製した。これを無機培地中に静置し、分解菌 *Comamonas testosteroni* を添加後、24 時間の QCM 測定を行った。測定結果を Fig.1 に示す。添加後 5 時間では振動数の減少がみられた。これは、金表面上の重量が増加していることを示しており、菌体が金表面上の PHBH 膜に接着したことがわかる。5 時間以降では、振動数の増加がみられたことから、PHBH 膜の分解により、重量が減少したことがわかった。

しかし、菌体の接着による重量増加と PHBH 膜の分解による重量減少は同時に進行するので、重量の増減からこれらを区別することは困難である。そこで、電気化学測定により、膜厚の変化を測定した。Fig.2 の青は菌体接着前、赤は菌体を添加して 24 時間後のサイクリックボルタモグラムの CV である。これらを比較すると、添加後の CV においてアノード、カソードともに電流の増加が見られた。このことから、金表面が一部露出したことがわかり、PHBH 膜が局所的に分解されたことが明らかとなった。



Scheme 1 Microbial degradation process

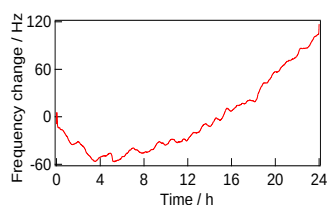


Fig.1 Time dependence of QCM response.

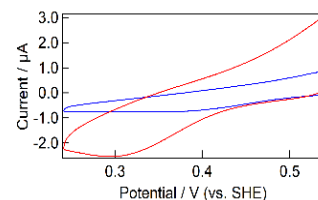


Fig.2 Cyclic Voltammograms of Quartz Crystal electrode before (blue) / after (red) PHBH biodegradation.

核酸の連鎖的鎖交換反応を利用した血中循環腫瘍細胞の検出

○北村裕介¹・阪元駿平¹・中島雄太¹・岩槻政晃²・安田敬一郎³・熊本清太郎^{1,3}・
勝田陽介¹・馬場秀夫²・中西義孝¹・井原敏博¹ (¹熊本大院先端、²熊本大院生命、
³(株)オジックテクノロジーズ)

Detection of circulating tumor cells by the successive strand exchange of nucleic acids (Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University¹, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University², OGIC technologies Co., Ltd.³) KITAMURA, Yusuke¹; SAKAMOTO, Shunpei¹; NAKASHIMA, Yuta¹; IWATSUKI, Masaaki²; YASUDA, Keiichi³; KUMAMOTO, Seitaro^{1,3}; KATSUDA, Yousuke¹; BABA, Hideo²; NAKANISHI, Yoshitaka¹; IHARA, Toshihiro¹

原発腫瘍細胞組織から一部の腫瘍細胞が剥離し、血液やリンパ液の流れに乗り、体内の別の臓器に移動することでがんの転移が起こっている。このように血流に乗って体内を循環している腫瘍細胞は、血中循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell: CTC) と呼ばれている。CT 像には映らないような微小がんや、CEA 等の腫瘍マーカーでは捉えるのが難しいとされる初期フェーズのがん患者においても CTC が確認されており、有用な診断マーカーとして着目されている。血液 1 mL 中に約 50 億個の血球細胞が存在するのに対し、CTC はわずか数個～数十個しか存在しない。現在、その検出には、免疫染色を行ない、蛍光顕微鏡を用いて 1 細胞ずつ識別するといった原始的な手法が用いられている。本研究では視点を変え、腫瘍細胞をきっかけとして開始される DNA の連鎖的な鎖交換反応を利用し、溶液全体が発光するような仕組みの構築を試みた。

多くの固形腫瘍は細胞膜上に EpCAM (上皮細胞接着分子) という膜タンパクを高発現している (1 細胞あたり約 40 万個以上)。EpCAM を認識する DNA 素子として抗 EpCAM アプタマーを利用し、腫瘍細胞に結合した同アプタマーをきっかけとしてシグナル増幅反応を動作させれば、高感度腫瘍細胞検出システムを構築できると考えた。

図 1a に示すように、特定の塩基配列をいわゆる「タグ」として付与した EpCAM アプタマーを腫瘍細胞上の EpCAM に結合させる。そこにマスク鎖、トリガー鎖からなる二本鎖を加えるとタグ部位との鎖交換反応によってトリガー鎖が遊離するよう設計した。図 1b に示すとおり、このトリガー鎖が触媒となり、等温下で自発的核酸の連鎖的鎖交換反応 (DNA サーキット) が進行し、シグナルが増幅される設計とした。まずは、模擬的なトリガーを用い、利用する DNA サーキットに応じて、シグナルの単調増幅や指数関数的な増幅が可能であることを確認した。

続いて培養細胞を用い、緩衝液中で諸条件を最適化した。最後に、がん患者 (右副腎への再発が CT 像にて確認済、CEA 陽性) の血液中から採取された腫瘍細胞 (別途採取した同量の血液サンプルから免疫染色によって 6 個を確認) を用いたところ、目視にて確認可能な発光を得ることができた。その後、同患者において化学療法による治療が実施された結果、2 ヶ月後に CEA 値の顕著な減少が確認され、CT 像においても、腫瘍の縮小が確認された。再度、血液中から採取された腫瘍細胞を用い (同様な操作により 2 個の腫瘍細胞を確認)、DNA サーキット実験を行ったところ、得られる発光強度も化学療法による治療前の数値から大きく減少することがわかった。

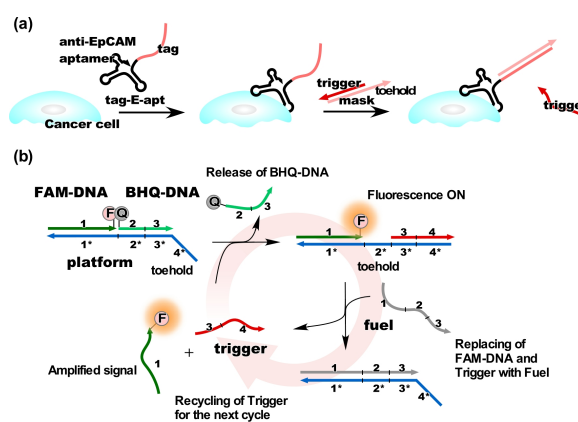


Fig. 1. (a) Tag-tethered anti-EpCAM aptamer-mediated strand exchange on cancer cells and resulting trigger release. (b) Fluorescence signal amplification based on entropy-driven catalysis (DNA circuit) initiated by the trigger.

Oral(first day)

📅 Wed. Sep 8, 2021 2:30 PM - 3:30 PM JST | Wed. Sep 8, 2021 5:30 AM - 6:30 AM UTC | 🏠 Room C Zoom

Analysis, Measurement, Sensor devices/ DDS

Chair; Noriyuki Asakura (Tokyo Institute of Tech.)

2:30 PM - 2:50 PM JST | 5:30 AM - 5:50 AM UTC

[1C-10] Research of fatty acid beta oxidation inhibitor using a fluorescent probe

*Kazuya Inoue¹, Yin Ruikang¹, Shohei Uchinomiya¹, Akio Ojida¹ (1. Faculty of pharmacy, Kyushu University)

2:50 PM - 3:10 PM JST | 5:50 AM - 6:10 AM UTC

[1C-11] Cancer treatment using alpha-ray emitters based on the reaction with acrolein

*Yudai Ode¹, Peni Ahmadi², Yang Wang³, Xiaojie Yin³, Nozomi Sato³, Hiromitsu Haba³, Ambara R. Pradipta^{1,2}, Katsunori Tanaka^{1,2,4} (1. Department of Chemical Science and Engineering, School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, Cluster for Pioneering Research, RIKEN, 3. RI Application Research Group, Nishina Center for Accelerator-Based Science, RIKEN, 4. Biofunctional Chemistry Laboratory, Alexander Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University)

3:10 PM - 3:30 PM JST | 6:10 AM - 6:30 AM UTC

[1C-12] Enhanced cytosolic delivery system based on light-induced condensation of cell-penetrating peptides

*Ikuhiko Nakase^{1,2}, Moe Miyai^{1,2}, Kosuke Noguchi^{1,2}, Shiho Tokonami^{2,3}, Takuya Iida^{1,2} (1. Graduate School of Science, Osaka Prefecture University, 2. Research Institute for Light-induced Acceleration System (RILACS), Osaka Prefecture University, 3. Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University)

蛍光プローブを用いた脂肪酸 β 酸化阻害剤の探索

○井上 和哉・Yin Ruikang・内之宮祥平・王子田彰夫(九大院薬)

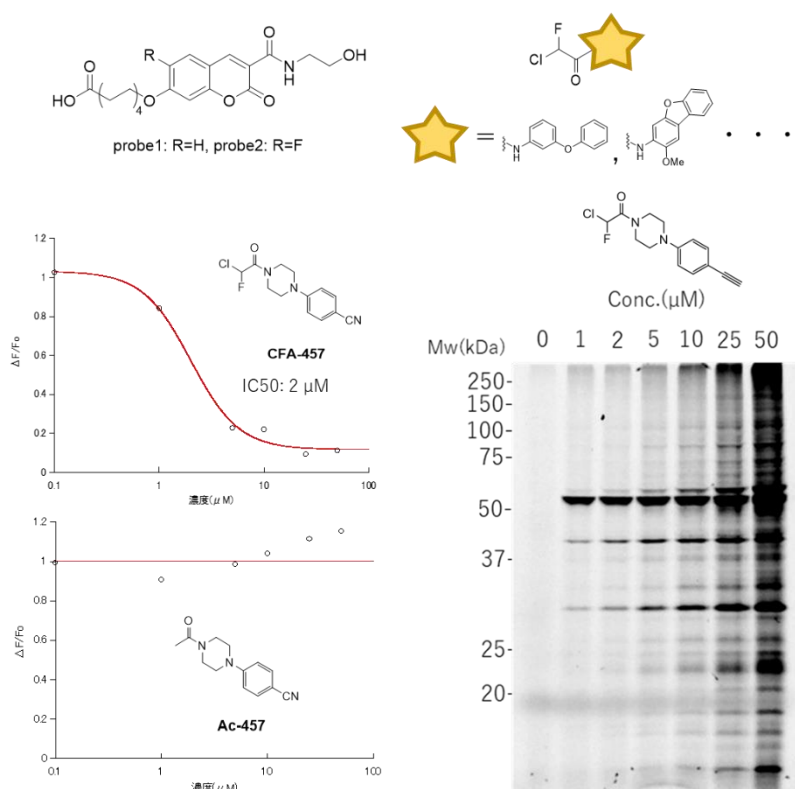
Research of fatty acid β oxidation inhibitor using a fluorescent probe. (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University) INOUE, Kazuya; YIN Ruikang; UCHINOMIYA, Shohei; OJIDA, Akio

代謝とはヒトの生命活動において重要な役割を担っている化学反応の総称である。これら代謝活性は、正常細胞と癌細胞で大きく異なっているため、代謝活性の検出法の開発は疾病メカニズムの変化の理解や創薬に重要である。従来は、安定同位体標識化合物の代謝挙動を質量分析などで追跡する方法が主に用いられてきたが、全細胞の平均化された代謝の情報しか得られず、代謝不均一性を検出できないことが問題点であった。

我々はケミカルバイオロジー的な手法を用いて様々な代謝経路の活性を検出可能な新しいケミカルプローブを目指しており、代謝経路の一つである脂肪酸 β 酸化を検出するための蛍光プローブを開発した。脂肪酸 β 酸化はミトコンドリアやペルオキシソームなどで脂肪酸を分解する重要なエネルギー産生経路であり、酸化・水和・酸化・開裂の各反応を経て2炭素ずつ分解する。これまで、蛍光色素のヒドロキシ基に基質部位として脂肪酸を導入した蛍光プローブを開発することで、生細胞での脂肪酸 β 酸化の検出に成功した¹⁾。そこで本研究では、蛍光イメージングとFBDD(Fragment-based Drug Discovery)を組み合わせた新規 β 酸化阻害剤の探索を生細胞で行った。当研究室ではコバレントドラッグのための反応基開発を行っており、システインを標的としたCFA(chlorofluoroacetoamide)基の開発に成功している。そこで、CFA基を芳香族アミンに導入した共有結合型のフラグメント阻害剤ライブラリー約150種類を合成した。続いてスクリーニングのための蛍光プローブの改良を行った。従来の蛍光プローブ **1** は蛍光強度が低く、プレートリーダーでの蛍光検出が困難である。そこでクマリンの6位にフルオロ基を導入したプローブ **2** を評価したところ、プローブ **1** として蛍光強度を増加させることに成功した。

反応性フラグメントライブラリーをHepG2細胞に添加した後、プローブ **2** を加えプレートリーダーを用いて蛍光強度を算出した。その結果、プローブ **2** の蛍光を減少させるCFA-457を見出した(IC₅₀=2 μ M)。反応基部位をCFA基からアセチル基に変更したところ阻害活性を示さなかったことから、CFA-457は何らかのタンパク質と共有結合を形成することで β 酸化活性を阻害していると示唆される。続いてCFA-457にアルキンを導入した阻害剤を合成し、ABPPによる細胞内タンパク質のラベル化挙動の解析を行ったところ、化合物が特異的にタンパク質をラベル化することが分かった。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を用いてこの化合物の局在を調べたところ、化合物がミトコンドリアに集積している結果が得られた。

1) S. Uchinomiya et al, *Chem. Commun.*, **56**, 3023-3026(2020)



アクロレインとの反応に基づく α 線放出核種を用いたがん治療

○大出雄大¹・Peni Ahmadi²・Yang Wang³・Xiaojie Yin³・佐藤望³・羽場宏光³・
Ambara R. Pradipta^{1,2}・田中克典^{1,2,4} (¹東工大物質理工・²理研開拓研究本部田中
生体研・³理研仁科加速器科学研究センターRI 応用研・⁴カザン大 A.ブトレーロ
フ研生体研)

Cancer treatment using alpha-ray emitters based on the reaction with acrolein (Department of Chemical Science and Engineering, School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology¹, Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, Cluster for Pioneering Research, RIKEN², RI Application Research Group, Nishina Center for Accelerator-Based Science, RIKEN³, Biofunctional Chemistry Laboratory, Alexander Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University⁴) Ode Yudai¹; Peni Ahmadi²; Yang Wang³; Xiaojie Yin³; Nozomi Sato³; Hiromitsu Haba³; Ambara R. Pradipta^{1,2}; Tanaka Katsunori^{1,2,4}

がん治療分子の開発において、副作用の問題を避けるため、標的がん細胞のみを攻撃する分子標的治療（ミサイル療法）の研究が盛んである。この一つとして、放射性治療分子を投与して、がん組織近傍から放射線治療を行う RI 内用療法が挙げられる。今回我々は、この RI 内用療法の新候補として、がん細胞内の有機合成化学反応と α 線放出放射性物質である²¹¹Atの化学を融合させた方法を考案した。

これまでに我々の研究室では、がん細胞内でアクロレインが大量に発生していることを発見した。さらにアジド分子ががんから産生されるアクロレインと選択的に反応することにより、アジド由来分子ががん細胞内に効果的に留まる現象を見出している。これはがん患者のサンプルでも効果的に起こり、ヒトにも一般的な現象である。そこで、アジド分子に対してアスタチン-211 (²¹¹At) で標識した新規分子をデザインし、がん細胞内での生体内合成反応による集積効果と α 線放出核種を用いた分子によるがん殺傷効果を期待した。本研究では、放射性前駆体分子の合成、²¹¹At による標識効率の検討、さらに動物実験による腫瘍増加の抑制評価と生体内分布の評価を行なったので、これらの経緯について報告する。

光濃縮を基盤とした膜透過性ペプチドのサイトゾル導入促進

○中瀬生彦^{1,2}・宮井萌^{1,2}・野口公輔^{1,2}・床波志保^{2,3}・飯田琢也^{1,2} (¹ 阪府大院理、
² 阪府大 LAC-SYS 研、³ 阪府大院工)

Enhanced cytosolic delivery system based on light-induced condensation of cell-penetrating peptides
(Graduate School of Science, Osaka Prefecture University¹, Research Institute for Light-induced Acceleration System (RILACS), Osaka Prefecture University², Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University³)
NAKASE, Ikuhiko^{1,2}; MIYAI, Moe^{1,2}; NOGUCHI, Kosuke^{1,2}; TOKONAMI, Shiho^{2,3}; IIDA, Takuya^{1,2}

本研究では、生細胞内への薬物送達法として、新たに光を用いた局所的な薬物濃縮と、それに伴う高効率な細胞内導入を可能とする技術構築を目的としている。狙った細胞表面で薬物を高密度集積するための技術として、自己組織化法で集積した金ナノ粒子集合体中の、電子の協力的量子効果で増強された光誘起対流[1, 2]を利用し、局所に薬剤を集積化する。高密度な金ナノ粒子へのレーザー照射による局所的、且つ高効率な発熱効果が誘起する対流により目的薬剤を濃縮し、照射点周辺の細胞への薬物集積と細胞内移行の促進を行う。

金ナノ粒子薄膜を細胞培養用ディッシュに形成後、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞を培養した。最初に、細胞膜を通過しミトコンドリアへ集積する MitoTracker (MT) 蛍光分子について検討を行った。ミトコンドリア染色において MT は通常 500 nM 以上の濃度が必要だが、5 nM といった低濃度の MT を細胞培養液に添加後、波長 1064 nm のレーザー照射下での光誘起対流を生じさせた。その結果、レーザー照射点において分子集積を加速し、細胞表面での MT 濃縮による効率的な細胞膜透過後に、ミトコンドリアが MT によって蛍光染色されることが確認された。

さらに本研究では、光濃縮を用いた膜透過性ペプチド (cell-penetrating peptides, CPPs) [3]の薬物送達への応用も検討している。現在、臨床研究も含め CPPs を用いた薬物送達技術の開発が世界的に進められている。しかし、サイトゾルへの移行を達成するには、数十 μM 程度のペプチド濃度が *in vitro* 実験において必要になる。本研究では光濃縮技術を用いることで、最終濃度 50 nM の蛍光標識オクタアルギニン (R8) を細胞培養液に添加後、レーザー照射によって狙った細胞周辺で R8 が高濃度になり、サイトゾル移行が促進されることが示された。加えて、ミトコンドリア集積後にアポトーシスを誘導する pro-apoptotic domain を R8 配列に繋げたペプチド (R8-PAD) に関して同様に実験を行った結果、50 nM の低濃度において光誘起流体効果による細胞内移行が促進され、結果として生理活性を上昇する結果が得られた。このように我々は、狙った生細胞内に薬物を高効率に導入する光濃縮を用いた新しい基盤技術の構築に成功しており、今後、さらなる疾患診断や治療に貢献できる細胞内イベントの可視化や細胞機能制御への応用研究に展開させたい。

<参考文献>

- [1] Iida, T. *J. Phys. Chem. Lett.* **3**, 332 (2012)
- [2] Iida, T. Tokonami, S. *et al.*, *Sci. Rep.* **6**, 37768 (2016)
- [3] Futaki, S., Nakase, I. *Acc. Chem. Res.* **50**, 2449 (2017)

Oral(first day)

📅 Wed. Sep 8, 2021 3:40 PM - 4:40 PM JST | Wed. Sep 8, 2021 6:40 AM - 7:40 AM UTC | 🏠 Room C Zoom

Sugar, Lipids/Medical biology

Chair: Yusuke Kitamura (Kumamoto Univ.)

3:40 PM - 4:00 PM JST | 6:40 AM - 7:00 AM UTC

[1C-13] Chemical biology study on core fucose-containing *N*-glycan

*Yoshiyuki Manabe^{1,2}, Marchetti Roberta³, Tomoyuki Takebe¹, Satomi Kasahara¹, Yohei Takakura¹, Wataru Nihei¹, Katsunori Tanaka^{4,5}, Kazuya Kabayama^{1,2}, Alba Silipo³, Antonio Molinaro³, Koichi Fukase^{1,2} (1. Graduate School of Science, Osaka University, 2. Project Research Center for Fundamental Sciences, Osaka University, 3. Department of Chemical Sciences, University of Naples Federico II, 4. Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, RIKEN, 5. Department of Chemical Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology)

4:00 PM - 4:20 PM JST | 7:00 AM - 7:20 AM UTC

[1C-14] Oxygen Concentration Imaging in 3T3-L1 Adipocytes Using Phosphorescent Mesoporous Silica Nanoparticles Modified with Platinum Porphyrin

*Hidehiro ITO¹, Arisa Yamauchi¹, Shunsuke Odai¹, Masaki Okamoto², Toshiaki Kamachi¹ (1. Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Faculty of Letters, Keio University)

4:20 PM - 4:40 PM JST | 7:20 AM - 7:40 AM UTC

[1C-15] Middle-biologics as covalent drugs

*Yudai Tabuchi¹, Masumi Taki¹ (1. Graduate School of Informatics and Engineering, The University of Electro-Communications)

コアフコース含有 N-グリカンの機能解明・制御を目指したケミカルバイオロジー研究

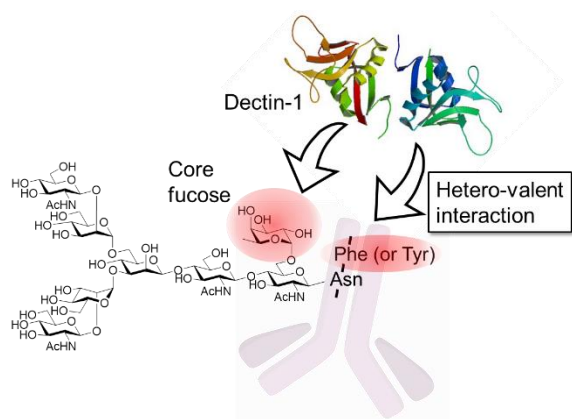
○真鍋良幸^{1,2}・Roberta Marchetti³・武部智之¹・笠原里実¹・高倉陽平¹・二瓶渉¹・田中克典^{4,5}・樺山一哉^{1,2}・Alba Silipo³・Antonio Molinaro³・深瀬 浩一^{1,2} (1 阪大院理, 2 阪大基礎理学プロジェクトセンター, 3 フェデリコ 2 世ナポリ大学, 4 理研, 5 東工大物質理工)

Chemical biology study on core fucose-containing N-glycan (Graduate School of Science, Osaka University¹, Project Research Center for Fundamental Sciences, Osaka University², Department of Chemical Sciences, University of Naples Federico II³, Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, RIKEN⁴, Department of Chemical Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology⁵) MANABE, Yoshiyuki^{1,2}; MARCHETTI, Roberta³; TAKEBE, Tomoyuki¹; KASAHARA, Satomi¹; TAKAKURA, Yohei¹; NIHEI, Wataru¹; TANAKA, Katsunori^{4,5}; KABAYAMA, Kazuya^{1,2}; SILIPO, Alba³; MOLINARO, Antonio³; FUKASE, Koichi^{1,2}

N-結合型糖鎖 (N-グリカン) はタンパク質のアスパラギン残基に対する修飾糖鎖で、コアフコースは N-グリカンの還元末端の N-アセチルグルコサミンに付加したフコースで、 $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) により形成される。コアフコースは、がんや免疫調節をはじめとするさまざまな生命現象に関与する。本研究では、コアフコース認識レクチンを発見した。また、コアフコースの活性制御を目指し、FUT8 阻害剤の開発も検討した。

1. コアフコース認識レクチンの探索

まず、Fut8 ノックアウトしたマウスから採取した IgG (Fut8 KO IgG) と野生型マウスの IgG (WT IgG) の *in vivo* イメージングの結果から、免疫細胞上にコアフコース認識レクチンが存在することを示唆する結果を得た。続いて、SPR を用いた相互作用解析により、真菌の β -グリカン認識する自然免疫受容体の Dectin-1 が IgG 抗体上のコアフコースを認識することを見出した。これは内因性のコアフコース認識レクチンの初の報告である。加えて、STD-NMR を用いた解析の結果、



Dectin-1 はコアフコースに加え、グリコシル化部位に隣接する芳香族アミノ酸を合わせて多点認識するユニークな結合様式を持つことを明らかにした。

2. FUT8 阻害剤の開発

約 30000 個の化合物ライブラリを用いたハイスループットスクリーニングにより、FUT8 阻害剤のファーマコフォアを発見した。この構造をもとに構造展開し、IC₅₀ が 10 μ M 程度の FUT8 阻害剤を創製した。開発した阻害剤の作用機構を精査したところ、本化合物は FUT8 に結合したのちに分解し、生じた活性中間体が共有結合阻害剤として機能していることが分かった。さらに、この阻害剤をプロドラッグ化することで、安定性の問題を解決し、細胞系で機能する世界初の FUT8 選択的阻害剤の創製に至った。

1) The core fucose on an IgG antibody is an endogenous ligand of Dectin-1. Y. Manabe, Y. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 18697.

白金ポルフィリン修飾リン光性メソポーラスシリカナノ粒子を用いた 3T3-L1 脂肪細胞内酸素濃度イメージング

○伊藤栄紘¹・山内杏里彩¹・尾台俊亮¹・岡本昌樹²・蒲池利章¹ (¹東工大生命理工、²慶應大文)

Oxygen Concentration Imaging in 3T3-L1 Adipocytes Using Phosphorescent Mesoporous Silica Nanoparticles Modified with Platinum Porphyrin (Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology¹, Faculty of Letters, Keio University²) ITO, Hidehiro¹; YAMAUCHI, Arisa¹; ODAI, Shunsuke¹; OKAMOTO, Masaki²; KAMACHI, Toshiaki¹

世界中で増加している肥満症において、脂肪細胞における酸化ストレスが悪性原因の一つとして考えられている。細胞内における酸化ストレスは酸素代謝の過程で発生する活性酸素種 (ROS) が大きく関与するため、脂肪細胞における酸素動態が注目されている。例えば、細胞内の主な酸素消費器官であるミトコンドリアの機能障害が肥満を引き起こすという報告がある。これまでに当研究室では、共焦点顕微鏡により細胞内に取り込ませたリン光性白金ポルフィリンのリン光寿命を測定することで、高解像度かつ経時的な細胞内酸素濃度イメージングシステムを開発した¹⁾。この測定法を用いて脂肪細胞へ分化させたマウス線維芽細胞 3T3-L1 を観察したところ、通常では脂肪分解促進剤添加により観察される脂肪滴分解が、細胞内酸素濃度イメージングで観察した範囲の細胞で起こらない結果が得られた。細胞内 ROS 検出色素の顕微鏡観察結果から、酸素濃度イメージング範囲の細胞では局所的に ROS 濃度が高かった。これは酸素による白金ポルフィリンの消光現象で発生する一重項酸素によるものと考えられた。従って、脂肪代謝における正しい細胞内酸素濃度イメージングには、一重項酸素の影響が抑制された新たな酸素プローブが必要であった。

本研究では、細胞への一重項酸素の影響を与えないメソポーラスシリカナノ粒子 (MSN) を用いたプローブ^{2,3)}を参考にして、MSN 細孔内に白金ポルフィリンを修飾したリン光性プローブ PtP@MSN を新たに開発した (Fig. 1)。合成した PtP@MSN は外部表面を PEG 修飾することで暗所毒性なく細胞に取込まれ、これまでと同様にリン光寿命測定による細胞内酸素濃度イメージングに使用できた。また、従来使用していた水溶性白金ポルフィリン PtTCPP と PtP@MSN のそれぞれで細胞内酸素濃度イメージング後の細胞内の ROS を検出した (Fig. 2)。PtTCPP の場合は酸素濃度イメージング範囲の細胞内では ROS が増加したが、PtP@MSN の場合は細胞内の ROS はほとんど増加しなかった。さらに、脂肪分解促進剤を添加後に経時的な細胞内酸素濃度イメージングと脂肪滴の同時観察を行った。その結果、PtTCPP の場合は起こらなかった脂肪滴の消失が、PtP@MSN の場合では確認された。したがって、PtP@MSN を用いた細胞内酸素濃度イメージングでは一重項酸素による細胞障害の抑制が示された。

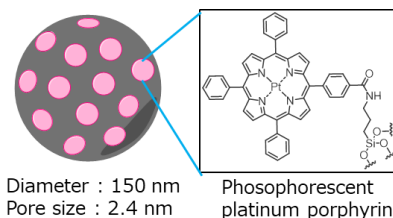


Fig. 1 Schematic of PtP@MSN.

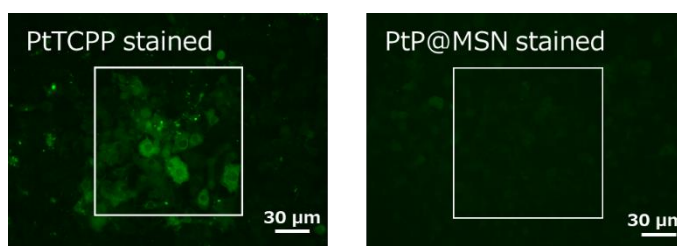


Fig. 2 Intracellular ROS levels determined using an H₂DCFDA in 3T3-L1 adipocyte cells staining PtTCPP (left) and PtP@MSN (right) after intracellular oxygen concentration imaging.

- 1) Kurokawa, H; Ito, H; Inoue, M; Tabata, K; Sato, Y; Yamagata, K; Kizaka-Kondoh, S; Kadonosono, T; Yano, S; Inoue, M; Kamachi, T, *Scientific Reports*, **2015**, 5:10657
- 2) Kitajima, N.; Umehara, Y.; Son, A.; Kondo, T.; Tanabe, K. *Bioconjugate Chem.* **2018**, 29, 4168-4175.
- 3) Umehara, Y.; Kimura, Y.; Kleitz, F.; Nishihara, T.; Kondo, T.; Tanabe, K. *RSC Adv.*, **2021**, 11, 5865-5873.

中分子バイオリジクス型共有結合性薬剤

○田淵雄大¹・瀧真清¹ (¹電気通信大学大学院)

Middle-biologics as covalent drugs (Graduate School of Informatics and Engineering, The University of Electro-Communications¹) TABUCHI, Yudai¹; TAKI, Masumi¹

近年、標的蛋白質に対して特異的に共有結合を形成し半永久的な薬剤効果を発揮する共有結合性薬剤 (Targeted Covalent Inhibitor; TCI)の開発が脚光を浴びている。TCIは標的以外に不可逆的に結合することで長期的な副作用を引き起こすリスクがあるため、反応特異性の高さが重要となる。そのため、近年では、標的蛋白質に対する高い特異性を持つペプチドや蛋白質などのバイオリジクスに反応基 (warhead)を導入することで高い反応特異性を持つ TCI の開発が行われ始めている。ここでは、① 拡張ファージディスプレイ法による標的的特異的なペプチド型 TCI の獲得と、② 世界で初となる薬効の中和が可能な核酸アプタマー型 TCI について当日詳細な発表を行う。上記両者の概要は以下に記述する。

①: バイオリジクス型 TCI の開発は合理的設計手法に基づくものがほとんどであり、コンビナトリアル手法により開発されたものは極めて少ない。同手法が立ち遅れたのは、ライブラリーの構築・セレクション操作中の warhead の反応性制御が困難であり、バイオリジクス間の非特異的な共有結合の形成を制御できなかったためである。本研究では、標的蛋白質に適切に配向された場合にのみその反応性を活性化するイオウ-フッ素交換反応 (SuFEx)型 warhead に着目し、厳密な warhead の反応性制御を行った。これにより T7 ファージ上に warhead 構造を含む共有結合性ペプチドライブラリーを構築し、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)を標的としてセレクションを行うことで (図 1A)、非特異的な共有結合を引き起こすことなく、GST 特異的に共有結合を形成するペプチド型 TCI の獲得を行った (図 1B) ¹⁾。

②: TCIは投与後に予期せず副作用が起きた場合に、不可逆的な結合であるがゆえに薬効の中和が困難であり、重症化してしまうリスクを抱えている。そこで我々は①で述べたようなペプチド型 TCI だけでなく、共有結合後に薬効の中和を可能とすべく、核酸アプタマー型の TCI 開発を並行して進めている。核酸アプタマーは一本鎖核酸オリゴマーからなる分子であり、相補鎖を加えて二本鎖を形成させることでその薬効を中和することが可能である。我々はこの特性を利用することで、標的蛋白質を共有結合的に阻害した後でも、相補鎖を加えることでその半永久的な薬効を中和できるのではないかと考えた。本研究では、thrombin に結合する thrombin binding aptamer (TBA)にリンカーを介して warhead を導入し、TBA の thrombin 阻害部位から離れたサイトに共有結合を形成させた。これにより、thrombin 活性を共有結合的に不活性化した後でも、相補鎖を加えることで TBA の薬効を中和し、thrombin を再活性化することを可能とした (図 2) ²⁾。

1) Y. Tabuchi, T. Watanabe, R. Katsuki, Y. Ito, M. Taki, *Chem. Commun.* (HOT and cover article), **57**, 5378 (2021).

2) Y. Tabuchi, J. Yang, M. Taki, *Chem. Commun.* (cover article), **57**, 2483 (2021).

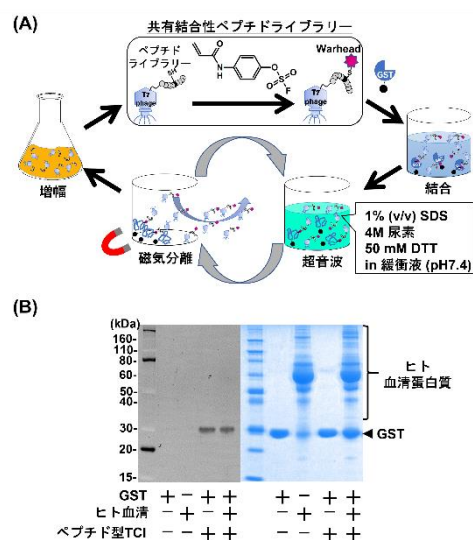


図 1. (A) 共有結合性ペプチドライブラリーを用いたセレクション, (B) ペプチド型 TCI (蛍光標識済)の標的的特異性



図 2. 核酸アプタマー型 TCI の反応様式及び相補鎖による薬効の中和

Oral(first day)

📅 Thu. Sep 9, 2021 2:00 PM - 2:20 PM JST | Thu. Sep 9, 2021 5:00 AM - 5:20 AM UTC | 🏢 Room B Zoom

Sugar, Lipids/Medical biology

2:00 PM - 2:20 PM JST | 5:00 AM - 5:20 AM UTC

[1C-15] Middle-biologics as covalent drugs

一般口頭発表 | Medical biology

Sugar, Lipids/Medical biology

[1C-15] 中分子バイオロジクス型共有結合性薬剤

Thu. Sep 9, 2021 2:00 PM - 2:20 PM Room B (Zoom)

2:00 PM - 2:20 PM

[1C-15]Middle-biologics as covalent drugs