Thu. Sep 9, 2021

Oral(second day)

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

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Takashi Ueno (Tokyo Institute of Tech.)

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

[2A-01] Evolutionary Engineering of a Rh(III)-incorporated Artificial Metalloenzyme with a Chimeric β-Barrel Protein Scaffold for C(sp^2)-H Bond Functionalization

*Shunsuke Kato[1], Akira Onoda[2], Ulrich Schwaneberg[3], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University, 3. Institute of Biotechnology, RWTH Aachen University)

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

[2A-02] Rational design of domain-swapped dimers with high stability and metal-binding ability in myoglobin

*Satosh Nagao[1,2], Ayaka Idomoto[2], Ayaka Suda[2], Hisashi Kobayashi[2], Naoki Shibata[1], Yoshiki Higuchi[1], Shun Hirota[2] (1. Graduate School of Science, University of Hyogo, 2. Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology)

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

[2A-03] Identification of serine kinases in hyperthermophilic archaea

*Takaaki Sato[1], Yuki Makino[1], Yasunobu Mori[1], Hiroki Kawamura[1], Shin-ichi Hachisuka[1], Takayuki Fujita[1], Ryo Takeno[1], Ryuhei Nagata[2], Masahiro Fujihashi[3], Kunio Miki[2], Tadayuki Imanaka[4], Haruyuki Atomi[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University, 2. Graduate School of Science, Kyoto University, 3. School of medicine, Osaka Medical and Pharmaceutical University, 4. Research Organization of Science and Technology, Ritsumeikan University)

Oral(second day)

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

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Hiroshi Ueda (Tokyo Institute of Tech.)

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

[2A-04] Construction of functional peptide interface for capturing migrasome

*Shogo Saito[1], Masayoshi Tanaka[1], Mina Ohkouchi[1] (1. School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology)

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

[2A-05] De novo peptide grafting to a self-assembling nanocapsule yields a hepatocyte growth factor receptor agonist

*Naohiro Terasaka[1], Yamato Komatsu[1], Katsuya Sakai[2,3], Emiko Mihara[4], Risa Wakabayashi[1], Kunio Matsumoto[2,3], Donald Hilvert[5], Junichi Takagi[4], Hiroaki Suga[1] (1. Department of Chemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 2. Division of Tumor Dynamics and Regulation, Cancer Research Institute, Kanazawa University, 3. WPI-Nano Life Science Institute, Kanazawa University, 4. Institute for Protein Research, Osaka University, 5. ETH Zurich)

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

[2A-06] Tubular Deformation Induced by Self-assembling Peptides onto Phospholipid Bilayer

*Anju Kawakita[1], Noriyuki Uchida[1], Takahiro Muraoka[1] (1. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

Oral(second day)

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

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Naohiro Terasaka (The University of Tokyo)

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

[2A-07] Artificial viral capsid which delivers biomacromolecules into cytosol.

*Kentarou Sakamoto[1,2], Hiroto Furukawa[2], Kazunori Matsuura[2], Shiroh Futaki[1] (1. Institute for Chemical Research, Kyoto University, 2. Graduate School of Engineering, Tottori University)

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

[2A-08] Synthetic peptide-guided protein delivery in plants via a macropinocytosis-like mechanism

*Takaaki Miyamoto[1], Kiminori Toyooka[2], Yumi Goto[2], Yutaka Kodama[1,3], Keiji Numata[1,4] (1. Biomacromolecules Research Team, RIKEN CSRS, 2. Mass Spectrometry and Microscopy Unit, RIKEN Center for Sustainable Resource Science, 3. Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University, 4. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

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

[2A-09] Solubilization and refolding of aggregated concanavalin A in hydrated ionic liquids

*Kyoko FUJITA[1], Roka Nakano[2], Ryota Fujii[1], Kimiyoshi Ichida[1], Nobuhumi Nakamura[2], Hiroyuki Ohno[2] (1. Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 2. Tokyo University of Agriculture and Technology)

Oral(second day)

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

Molecular recognition, Supramolecules, Model systems

Chair: Kohei Sato (Tokyo Institute of Tech.)

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

[2B-01] Formation of giant cyclic complexes from a flexible tripeptide

Yui Sato[2], Shoko Tanaka[2], *Ryosuke Miyake[1,2] (1. Ochanomizu University, 2. Ochanomizu University)

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

[2B-02] Photo-triggered spatially controlled out-of-equilibrium patterns of peptide nanofibers in a self-sorting supramolecular double network hydrogel

*Keisuke Nakamura[1], Wataru Tanaka[1], Kei Sada[1], Ryou Kubota[1], Itaru Hamachi[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University , 2. JST ERATO)

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

[2B-03] Dynamic protease activation on a hexameric protein scaffold via adaptable DNA-based recruitment domains

*Tsuyoshi Mashima[1,2], Takashi Hayashi[3], Luc Brunsveld[2] (1. Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology, 2. Department of Biomedical Engineering, Eindhoven University of Technology, 3. Graduate School of Engineering, Osaka University)

Oral(second day)

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

Molecular recognition, Supramolecules, Model systems / Sugars, Lipids

Chair: Ryou Kubota (Kyoto Univ.)

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

[2B-04] Development of novel higher-order structures based on the control of molecular assembly behavior associated with polyion complex formation using oligonucleotides

*Hiroshi Kamizawa[1], Tomoki Maruyama[1], Yiwei Liu[1], Teruki Nii[1,2], Kanjiro Miyata[3], Takeshi Mori[1,2], Yoshiki Katayama[1,2,4], Akihiro Kishimura[1,2,4] (1. Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University, 2. Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kyushu Univ., 3. Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo., 4. International Research Center for Molecular Systems, Kyushu University)

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

[2B-05] Domain formation affected by temperature and added polyamines in charged lipids-containing biomimetic membranes

*JINGYU GUO[1], Hiroaki Ito[2], Yuji Higuchi[3], Ryota Hidese [4], Shinsuke Fujiwara[5], Naofumi Shimokawa[1], Masahiro Takagi[1] (1. materials.JAIST, 2. Chiba University, 3. The University of Tokyo, 4. Kobe University, 5. Kwansei-Gakuin University)

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

[2B-06] Interaction of cell-sized lipid vesicles with key flavors in sake

*Tsuyoshi Yoda[1] (1. Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center, Hachinohe Industrial Research Institute)

Oral(second day)

1:20 PM - 2:00 PM JST | 4:20 AM - 5:00 AM UTC | Room B Zoom

Sugar, Lipids

Chair: Yoshiyuki Manabe (Osaka Univ.)

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

[2B-07] Interaction between membrane proteins and glycolipid MPIase (Membrane Protein Integrase)

*Shoko Mori[1,2], Kaoru Nomura[1], Kohki Fujikawa[1], Tsukiho Osawa[1], Ken-ichi Nishiyama[3], Keiko Shimamoto[1,2] (1. Suntory Foundation for Life Sciences, 2. Graduate School of Science, Osaka University, 3. Faculty of Agriculture, Iwate University)

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

[2B-08] Turn-on Fluorescent Imaging of Gangliosides Based on Dansyl Tri-arginine Peptide

*Kazunori Matsuura[1], Koichi Hisamoto[1], Tomoya Tanaka[1], Mizuki Okazaki[1], Hiroshi Inaba[1] (1. Graduate School of Eng., Tottori University)

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

Invited Lecture

4:50 PM - 5:40 PM JST | 7:50 AM - 8:40 AM UTC | Room A Zoom

Invited Lecture (Prof. Hiroyuki Asanuma)

Chair: Kazunori Matsuura (Tottori Univ.)

4:50 PM - 5:40 PM JST | 7:50 AM - 8:40 AM UTC

[2IL-01] Fantasizing the world before RNA

*Hiroyuki Asanuma[1] (1. Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.)

Invited Lecture

5:40 PM - 6:30 PM JST | 8:40 AM - 9:30 AM UTC | Room A Zoom

Invited Lecture (Prof. Yoshitsugu Shiro)

Chair: Shingo Nagano (Tottori Univ.)

5:40 PM - 6:30 PM JST | 8:40 AM - 9:30 AM UTC

[2IL-02] Molecular Structural and Functional Studies on Iron-Related Proteins

*Yoshitsugu Shiro[1] (1. Graduate School of Science, University of Hyogo)

Online Seminar

11:20 AM - 12:20 PM JST | 2:20 AM - 3:20 AM UTC | Room A Zoom

Life Science Solutions, Inc.

Chair: Noriho Kamiya (Kyushu Univ.)

11:20 AM - 12:20 PM JST | 2:20 AM - 3:20 AM UTC

[2A-OS] Evaluation of protein complex using Mass Photometry

*Kohei Shiba[1] (1. Life Science Solutions, Inc.)

Poster

2:40 PM - 3:40 PM JST | 5:40 AM - 6:40 AM UTC | First half number Zoom

Odd (2P-001~2P-047)

[2P-001] Development of biotinylated PYP-tag probes to elucidate mechanism of GLUT4 translocation

*Koichiro Terashita[1], Yuichiro Hori[1,2], Kazuya Kikuchi[1,2] (1. Division of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Immunology Frontier Research Center, Osaka University)

[2P-003] Structural study of a novel carbazole prenyltransferase that resembles squalene synthase

*Hironori Suemune[1], Ryuhei Nagata[2,3], Masaya Kobayashi[2], Tetsuro Shinada[4], Makoto Nishiyama[5,6], Tomohisa Kuzuyama[2,6], Yusuke Sato[1], Tomoya Hino[1], Shingo Nagano[1] (1. Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. GSALS, UTokyo, 3. JSPS Research Fellow PD, 4. Faculty of Science, Osaka City University, 5. BRC, UTokyo, 6. CRIIM, UTokyo)

[2P-005] Purification of monomeric form of Monobody that specifically binds to the artificial small molecule ligand HPPU

*Endo Koushirou[1], Tsuzuki Naruaki[2], Sato Yusuke[1], Murakami Hiroshi[2,3], Nagano Shingo[1], Hino Tomoya[1] (1. Graduate School of Sustainability Science, Tottori University, 2. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 3. Institute of Nano-Life-Systems, Nagoya University)

[2P-007] Selective Oxidation of B800 Bacteriochlorophyll *a* in LH2 Protein from the Purple Photosynthetic Bacterium *Thermochromatium tepidum*

*Haruna Hirao[1], Yukihiro Kimura[2], Wang-Otomo Zheng-Yu[3], Yoshitaka Saga[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Kindai University, 2. Graduate School of Agriculture, Kobe University, 3. Faculty of Science, Ibaraki University)

[2P-009] Highly efficient tyrosine-specific labeling using laccase

*Keita Nakane[1], Shogo Miyano[1], Shusuke Tomoshige[1], Minoru Ishikawa[1], Shinichi Sato[1,2] (1. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2. Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University)

[2P-011] Construction of RNase S modified artificial virus capsid by reconstruction and evaluation of the anticancer activity

*Yingbing LIANG[1], Junpei OTA[1], Hiroto FURUKAWA[1], Kentaro SAKAMOTO[1], Hiroshi INABA[1], Kazunori MATSUURA[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University)

[2P-013] Interaction analysis of an anti-rheumatic drug with macrophage migration inhibitory factor by precise crystal structure determination using neutron diffraction

*Toshinori Ezawa[1], Takuya Ishida[2], Mitsugu Yamada[2], Taro Tamada[3], Masafumi Odaka[1], Hideki Wakui[1], Hirotoshi Matsumura[1] (1. Graduate School of Engineering Science, Akita University, 2. JEM Utilization Center, JAXA, 3. Institute for Quantum Life Science, QST)

[2P-015] Unique protein assembly behavior by enzyme-catalyzed crosslinking reaction in molecular crowding solution

*Ryo Sato[1], Kosuke Minamihata[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1], Noriho Kamiya[1,2] (1. Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Division of Biotechnology, Center for Future Chemistry, Kyushu University)

[2P-017] Development of Membrane-Permeable PG-Surfactants with Cell Line-Selective Membrane Permeability

*Momoka Yamada[1], Toshihisa Mizuno[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

[2P-019] Hydroxylation of Non-native Substrates Catalyzed by Cytochrome P450BM3 with Aqueous/Ionic Liquid Biphasic System

*Yuki Sugai[1], Shinya Ariyasu[1], Yuya Yokoyama[1], Masayuki Karasawa[1], Yuichiro Aiba[1], Osami Shoji[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

[2P-021] Chemogenetic Regulation of Histamine Receptor Focusing on the Ligand Binding Kinetics

*Shuntaro Kashiwa[1], Tomohiro Doura[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[2P-023] Chemogenetic regulation of adenosine A_{2A} receptor using π-π interactions between receptor and ligands.

*Yuma Matsuoka[1], Takumitsu Syakuno[1], Tomohiro Doura[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Nagoya University)

[2P-025] A novel peptide selenoester synthesis method for efficient peptide ligation

*Masaya Hashimoto[1], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[2P-027] Efficient total chemical synthesis of artificial antibody (monobody) by utilizing Pd complex

*Eichi Ozawa[1], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1] (1. Nagoya University)

[2P-029] Effect of adjacent base of target cytosine in photochemical RNA editing using reversible RNA photo-cross-linking

*Syu Kawazoe[1], Kanako Ishino[1], Shigetaka Nakamura[1], Kenzo Fujimoto[1] (1. School of Materials Science ,School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[2P-031] Mechanism of iron removal from heme by *Vibrio cholerae* DyP-type peroxidase

*Sayaka Umetsu[1], Miho Sasaki[1], Koichiro Ishimori[1,2], Takeshi Uchida[1,2] (1. Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University, 2. Faculty of Science, Hokkaido University)

[2P-033] Important role of two-dimensional cationic cluster induced by protein folding in cellular uptake

*Mami Hamori[1], Chieri Kitada[1], Miku Kurehara[1], Nozomi Kuki[1], Nobuhito Shibata[1], Shigeru Negi[1] (1. Doshisha Women's College of Liberal Arts)

[2P-035] Rapid and efficient proximity labeling in living cells with engineered tyrosinase

*Yuna Matsuda[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[2P-037] Stability of Triple-chain Structure of Collagen Model Peptides Containing Carboxyl Groups

*Naoki Takemura[1], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Ryukoku University)

[2P-039] Synthesis of A Collagen Model Peptide for Enhanced Titanium-Cell Adhesion

*Shun Tanaka[1], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Ryukoku University)

[2P-041] Establishment of analysis method for the mechanical property of a fiber protein using AFM

*Kohei Suzuki[1], Shogo Yoshimoto[1], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[2P-043] Construction of a Photoredox Artificial Enzyme Consisting of an Organic Photosensitizer and Protein

*Yuki Uchida[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[2P-045] Specific Recognition of double-stranded DNA through photo-dimerization of anthracene-modified DNA conjugates

*Kento Nishimura[1], Yusuke Kitamura[1], Yousuke Katsuda[1], Toshihiro Ihara[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University)

[2P-047] Cancer specific assembly of nucleic acids induces cell death

*Hiraki Osumi[1], Kunihiko Morihiro[1], Akimitsu Okamoto[1,2] (1. Department of Chemistry and Biotechnology, School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo)

Poster

2:40 PM - 3:40 PM JST | 5:40 AM - 6:40 AM UTC | Second half number Zoom

Odd (2P-049~2P-093)

[2P-049] Development of universal mPEG carrier for mass synthesis of DNA liquid phase

*Tomoki Nishikawa[1], Akinori Kuzuya[1] (1. Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai Univ)

[2P-051] Quantitative PCR Descriminating Single Point Mutation Using Chemically Modified Primers

*Masayuki Fujii[1], Ryosuke Fujita[1], Maika Sonokawa[1], Masaaki Hisano[1] (1. Department of Biology and Chemistry, Kindai University)

[2P-053] Photo-cross-linking oligonucleotides with a photoresponsive α-bromoaldehyde moiety for regulation of mRNA point mutations

*Kentaro Kobata[1], Ivana Dvořáková[1], Ryo Ota[1], Soichi Tatsumi[1], Tomonori Waku[1], Akio Kobori[1] (1. Kyoto Institute of Technology)

[2P-055] Folding of the multimer RuBisCO on the DNA nanostructure scaffold

*Hiroaki Konishi[1], Huyen Dinh[2], Eiji Nakata[1,2], Haruyuki Atomi[3], Takashi Morii[1,2] (1. Graduate School of Energy Science, Kyoto University, 2. Institute of Advanced Energy, Kyoto University, 3. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[2P-057] Analysis for interactions between repeated RNAs and peptides involved in neurodegenerative diseases

*Hisae Tateishi-Karimata[1], Tatsuya Ohyama[1], Shigenori Tanaka[2], Naoki Sugimoto[1,3] (1. Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research (FIBER) Konan University, 2. Department of Computational Science, Graduate School of System Informatics, Kobe University, 3. Graduate School of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University)

[2P-059] Development of a new method using photolabile protective groups for synthesis of oligonucleotides on a porous glass contain an activator

*Saaya Akazawa[1], Yu Miyazaki[1], Koichiro Miyauchi[1], Yu Ito[1], Akihiro Ohkubo[1] (1. Life Science and Technology,Tokyo Institute of Technology)

[2P-061] Effect of cation cluster length on DNA condensation and in vitro transcription/translation

*SHIGERU NEGI[1], YAMANE Momona[1], YABUTA Megumi[1], KAMIYA Amon [1], HAMORI Mami[1], NAKAGAWA Yuka[2] (1. Doshisha Wemen's University, 2. University of Hyogo)

[2P-063] Photochemical 5-methycytosine to thymidine editing using ultrafast DNA photo-cross-linking

*Issei Shinozaki[1], Licheng WAN [1], Shigetaka Nakamura[1], Kenzo Fujimoto[1] (1. Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[2P-065] Regulation of liposome aggregation using ultrafast DNA photocrosslinking

*ZUMILA HAILILI[1], Masakatsu Ichikawa[1], Shigetaka Nakamura[1], Kenzo Fujimoto[1] (1. School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[2P-067] Prototype Screening of HaloTag-based Chemigenetic Indicators

*Dazhou CHENG[1], Wenchao ZHU[1], Takuya TERAI[1], Yusuke NASU[1], Robert Earl CAMPBELL[1,2] (1. Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo, 2. Department of Chemistry, University of Alberta)

[2P-069] Activatable ^{19}F MRI probes for in vivo Detection of α-Amylase as Infectious Disease Marker

*Yuya Otera[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[2P-071] A Screening System for Protein Enzymes by Encapsulating a Single Cell Recombinant *E. coli* into a Micro-droplet

*Kazuhiro Abe[1], Yoshiya Ikawa[2], Shigeyoshi Matsumura[2] (1. Graduate School of Science and Engineering, Toyama University, 2. Graduate School of Science and Engineering, Toyama University)

[2P-073] ALDH1A1-Responsive Turn-on Fluorescent Probe for High-Contrast Cancer Stem Cell Imaging

*Kanae Suzuki[1], Masahiro Oe[1], Koji Miki[1], Kouichi Ohe[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[2P-075] Cytokine Biosensing using Glycopolymer-brush Interface

*Yuhei Terada[1,2], Hyota Takamatsu[3], Masato Saito[1,2], Eiichi Tamiya[1,4] (1. Advanced Photonics and Biosensing Open Innovation Laboratory, AIST, 2. Department of Applied Physics, Graduate School of Engineering, Osaka Universit, 3. Department of Respiratory Medicine and Clinical Immunology, Graduate School of Medicine, Osaka University, 4. The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University)

[2P-077] Photo-click reaction by water-soluble single-chain nanoparticles containing photoredox catalysis

*Ken Nishioka[1], Mitsunobu Nakamura[1], Tadao Takada[1] (1. University of Hyogo)

[2P-079] Phase selectivity of hierarchical supramolecular polymers and control of enzymatic activity under liquid-liquid phase separation environment

*Hiroki Obayashi[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1,2], Noriho Kamiya[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyusyu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

[2P-081] Evaluation of pH- and Salt Concentration-Dependent Self-Assembly Behavior of an Amphiphilic 4-Aminoquinoline Derivative

*Fangzhou Cheng[1], Yosuke Hisamatsu[2], Katsuhiro Yamamoto[3], Hiroshi Takase[4], Naoki Umezawa[2], Tsunehiko Higuchi[2] (1. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 2. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, 4. Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University)

[2P-083] Oxidation Ability of Tetrahedral Cu(II) Complexes Having Labile Coordination Site Relevant to Biological Copper Reaction Centers

*Lan Yang[1], Yuma Morimoto[1], Hideki Sugimoto[1], Shinobu Itoh[1] (1. Osaka University)

[2P-085] Synthesis of anti-inflammatory fatty acid metabolite 17,18-EpETE analogues with improved biostability

*Mayuko Akita[1], Yutaro Saito[1], Azusa Saika[2], Takahiro Nagatake[2], Akiharu Uwamizu[3], Junken Aoki[3], Jun Kunisawa[2,4], Shinsuke Sando[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, 3. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 4. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University)

[2P-087] Synthesis of nata de coco carrying GM3- and Gg3-trisaccharides and their associations induced by carbohydrate-carbohydrate interactions

*Mizuki Tobito[1], Teruaki Hasegawa[2] (1. Graduate School of Life Sciences, Toyo University , 2. Faculty of Life Sciences, Toyo University)

[2P-089] Moment Analysis of Solute Permeation at the Interface of Liposomes by Capillary Electrophoresis

*Shunta Inaba[1], Kanji Miyabe[1] (1. Graduate School of Science, Rikkyo University)

[2P-091] Study on Cancer Peptide Vaccine Using Mesoporous Silica Nanoparticles

*Tomoya Ueno[1], Koichi Goto[1], Yoko Matsumoto[1] (1. Graduate School of Engineering, Sojo University)

[2P-093] Synthesis and evaluation of At-211 labeled functional gold nanoparticles for radionuclide therapy

*Xuhao Huang[1], Kazuya Kabayama[1,2,4], Yuichiro Kadonaga[2,4], Atsushi Shimoyama[1,2,4], Kazuhiro Ooe[3,4], Atsushi Toyoshima[2,4], Atsushi Shinohara[2,5], Koichi Fukase[1,2,4] (1. Graduate School of Science, Osaka University, 2. Institute for Radiation Sciences, Osaka University, 3. Graduate School of Medicine, Osaka University, 4. Project Research Center for Fundamental Sciences, Graduate School of Science, Osaka University, 5. Osaka Aoyama University)

Poster

3:40 PM - 4:40 PM JST | 6:40 AM - 7:40 AM UTC | First half number Zoom

Even (2P-002~2P-048)

[2P-002] Production of trichothecene-conjugated antibody as an anti-cancer agent.

*Kazushi Kusumoto[1], Yoshiaki Koizumi[1], Kazunori Kato[1], Naoko Takahashi-Ando[1] (1. Graduate School of Faculty of science & Engineering, Toyo University)

[2P-004] Structural basis for specific recognition of Lys63-linked polyubiquitin chains by the UBA domains RAD23A

*Yusuke Sato[1,2], Aya Urishima[2], Tomoya Hino[1,2], Shingo Nagano[1,2] (1. GSC center, Tottori University, 2. Department of Engineering, Tottori University)

[2P-006] Development of unmethylated CpG detection method using unmethylated CpG binding domain fused luciferase constructed by SnoopCatcher/SnoopTag system

*Takamichi Miyata[1], Hazuki Shimamura[1], Wataru Yoshida[1] (1. Graduate School of Bionics, Tokyo University of Technology)

[2P-008] Spectral Properties of Formylated Chlorophylls in Light-harvesting Protein LH2 from the Purple Photosynthetic Bacterium *Rhodoblastus acidophilus*

*Aiko Tanaka[1], Madoka Yamashita[1], Toshiyuki Shinoda[2], Tatsuya Tomo[2], Yukihiro Kimura[3], Yoshitaka Saga[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Kindai University, 2. Graduate School of Science, Tokyo University of Science, 3. Graduate School of Agriculture, Kobe University)

[2P-010] Development of thermo-responsive protein hydrogel for bone formation

*Kazumasa Iwamaru[1], Ryotaro Yamamoto[1], Yasumasa Mashimo[1], Mie Masayasu[1], Eiry Kobatake[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

[2P-012] Construction of artificial viral capsid modified with Cell-targeting DNA aptamer

*Kosuke Uchiyama[1], Hiroshi Inaba[1], Hiroto Furukawa[1], Matsuura Kazunori[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University)

[2P-014] The construction strategy of AFP-based biosensors using the putative structural change

*Shunsuke Tajima[1], Eiji Nakata[1], Reiko Sakaguchi[2], Masayuki Saimura[1], Yasuo Mori[3], Takashi Morii[1] (1. Institute of Advanced Energy, Kyoto University, 2. School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, 3. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[2P-016] Investigation on factors that affect post-modification of peptide amphiphile assemblies by enzymatic reaction.

*Ayato Higuchi[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1,2], Noriho Kamiya[1,2] (1. Graduate school for engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

[2P-018] Evaluation of the Method to Present Synthetic Polymers onto Mammalian Cell Membranes by using PG-surfactants

*Tatsuki Nakakubo[1], Toshihisa mizuno[1] (1. Life and Applied Sciences Program,Department of Engineering,Nagoya Institute of Technology Graduate School)

[2P-020] Targeted degradation of mutant huntingtin mediated by hydrophobic tag

*Keigo Hirai[1], Hiroko Yamashita[2], Shusuke Tomoshige[1], Yugo Mishima[1], Shinichi Sato[1,3], Yuichi Hashimoto[2], Minoru Ishikawa[1] (1. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2. IQB, University of Tokyo, 3. Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University)

[2P-022] cpHalo-tag labeling to quantify O_2-sensitive ion-channel TRPA1 trafficking

*Yutaro Sugihara[1], Kyohei Soga[1], Kento Ojima[1], Yasuo Mori[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate school of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate school of Engineering, Kyoto University)

[2P-024] Biofunctionalization of peptides by insertion of central alkylene chains

*Atsuya Yaguchi[1], Hirotsugu Hiramatsu[2], Itsuki Ajioka[3,4], Takahiro Muraoka[1,4] (1. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. National Yang Ming Chiao Tung University, 3. Center for Brain

Integration Research, Tokyo Medical and Dental University, 4. Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

[2P-026] Synthesis of dual-mono ubiquitinated PAF15 for elucidation of maintenance methylation mechanism

*Yuya Takahashi[1], Satomi Kori[2], Kyohei Arita[2], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University)

[2P-028] Development of artificial metalloenzymes for stereoselective Asymmetric transfer hydrogenation reaction

*Toshihiro Ishii[1], Saho Yoshioka[1], Ryusei Matsumoto[1], Tomohito Marumo[1], Nobutaka Fujieda[1] (1. Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University)

[2P-030] Trapping Proteins Using Peroxiredoxin Decamer Ring Structure

*Takumi Utsu[1], Koichiro Ishimori[1,2], Takeshi Uchida[1,2] (1. Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University, 2. Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University)

[2P-032] Intracellular delivery of extracellular vesicles using acylated macropinocytosis-inducing peptide

*Yuna Nakagawa[1], Jan Vincent V. Arafiles[1], Hisaaki Hirose[1], Shiro Futaki[1] (1. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

[2P-034] Exploring the mGlu1 ligand dynamics in mouse brain by fixation-driven chemical crosslinking.

*Takeharu Mino[1], Kazuma Amaike[1], Hiroshi Nonaka[1,2], Seiji Sakamoto[1], Itaru Hamachi[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University, 2. JST ERATO)

[2P-036] Synthetic evaluation of collagen model peptides with phosphate groups and cell recognition sites

*Garyu Hori[1] (1. Ryukoku University)

[2P-038] Secondary Structure and Intracellular Dynamics of Analogs of Mitochondrial-Localization Signals Peptide Derived from ALDH

*Kei Takayama[1], Masayuki Yamasaki[2], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Department of Materials Chemistry, Ryukoku University, 2. Department of Food Science and Human Nutrition)

[2P-040] Method for Multiple Exploration of Four-base Codons in a Reconstituted Cell-free Translation System

*Takayoshi Watanabe[1], Dian Novitasari[1], Takahiro Hohsaka[1] (1. School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[2P-042] Preparation of Amyloid Fibril Displaying a Norbornene Analog as a Substrate for Ring-opening Metathesis Polymerization

*Takanori Ueno[1] (1. Faculty of Engineering)

[2P-044] Promotion of translation initiation of mRNA by phosphorothioate modification

*Naoko Abe[1], Daisuke Kawaguchi[1], Ayumi Kodama[1], Fumitaka Hashiya[1], Fumiaki Tomoike[2], Yasuaki Kimura[1], Yoshihiro Shimizu[3], Hiroshi Abe[1,4,5] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. School of Science, Gakushuin University, 3. Center for Biosystems Dynamics Research, RIKEN, 4. JST-CREST, 5. iGCORE)

[2P-046] Biochemical analysis of the light-up RNA aptamer 17-3 to elucidate its active secondary structure.

*Shunsuke Abe[1], Takaki Koayama[1], Shigeyoshi Matsumura[1], Yoshiya Ikawa[1] (1. Graduate School of Science & Engineering, University of Toyama,)

[2P-048] Development of nucleic acid binding dye/protein hybrid probe

*Akari Matsuki[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

Poster

3:40 PM - 4:40 PM JST | 6:40 AM - 7:40 AM UTC | Second half number Zoom

Even (2P-050~2P-094)

[2P-050] Elucidation of the Mechanism of SNA-Anti-miRNA through Intracellular Imaging

*Zhu Hongyu[1], Kamiya yukiko[1], Asanuma Hiroyuki[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University.)

[2P-052] Design and synthesis of substituent-detachable unnatural nucleic acids toward *in vitro* selection of minor groove-modified aptamer

*Hidenori Okamura[1,2], Rina Ito[1,2], Kenta Sato[1,2], Fumi Nagatsugi[1,2] (1. Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, 2. Graduate School of Science, Tohoku University)

[2P-054] Development of SERS probes for solution-phase detection of nucleic acids

*Hidetoshi Nishikawa[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology)

[2P-056] Silencing Effect of 5'-Modified of siRNA

*Masayuki Fujii[1], Yasuo Shiohama[2], Maika Sonokawa[1], Masaaki Hisano[1], Yojiro Kotake[1] (1. Department of Biology and Chemistry, Kindai University, 2. Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus)

[2P-058] Regulation of DNA replication by topology-dependent ligand binding on guanine quadruplexes

*Shuntaro Takahashi[1], Hisae Tateishi-Karimata[1], Shinobu Sato[2], Shigeori Takenaka[2], Janez Plavec[3], Naoki Sugimoto[1,4] (1. FIBER, Konan University, 2. Kyushu Institute of Technology, 3. Slovenian NMR Centre, 4. FIRST, Konan University)

[2P-060] Analysis of inosine introduced aptamer against SARS-CoV-2 S1 protein RBD

*Wakana Hayashi[1], Kaori Tsukakoshi[1], Kazunori Ikebukuro[1] (1. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[2P-062] Evaluation of electron transfer through DNA crowded conditions under using hole-trapping nucleobases

*Yuki Taketomi[1], Yuki Yamaguchi[1], Shunsuke Sakurai[1], Makiko Tanaka[1] (1. Department of Engineering Science, The University of Electro-Communications)

[2P-064] Development of artificial peptides capable of photo-cross-linking to double-stranded DNA

*Hiroki Naito[1], Junichi Mihara[1], Zhiyong Qiu[1], Shigetaka Nakamura[1], Kenzo Fuzimoto[1] (1. School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and technology)

[2P-066] PCR analysis using DNA having cross-linking at terminal site as template

*Yuki Hirano[1] (1. Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[2P-068] Synthesis and environment sensitivity of novel quinolinium dyes

Toru Oba[1], *Aki Sugawara[1], Makoto Roppongi[2], Shingo Tamesue[1] (1. Graduate School of Regional Development and Creativity, Utsunomiya University, 2. Advanced Instrumental Analysis Department, Utsunomiya University)

[2P-070] Analysis for Lysozyme Aggregation in Droplet by Evanescent Light Excitation Scattering

*Hayato Kurumada[1] (1. National Institute of Technology, Ibaraki College, Advanced course)

[2P-072] A probe protein Coiled Q-probe that rapidly turns antibodies into a high-performance fluorescent immunosensor for various antigens

*Kana Sasamoto[1], Takanobu Yasuda[1], Tetsuya Kitaguchi[2], Hiroshi Ueda[2] (1. Graduate School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Laboratory for Chemistry and Life Science, Tokyo Institute of Technology)

[2P-074] Development of activatable photoacoustic contrast agents utilizing aggregation of metallo-phthalocyanines

*Kohei Nogita[1], Naoto Imaizumi[1], Koji Miki[1], Kouichi Ohe[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[2P-076] Single-cell level analysis of T cell antigen-recognition activity and expression genes by the microfluidic device for cell-cell interaction

*Hiroki Ide[1,2], Masato Saito[1,2], Taiki Aoshi[3], Hyota Takamatsu[4], Wilfred Villariza Espulgar[2], Masahito Hosokawa[5], Hiroko Matsunaga[5], Koji Arikawa[5], Haruko Takeyama[5,6,7], Eiichi Tamiya[2,8] (1. Graduate School of Engineering, Department of Applied Physics, Osaka University, 2. AIST-Osaka Univ. PhotoBIO-OIL, 3. Research Institute for Microbial Disease, Osaka Univ., 4. Graduate School of Medicine, Osaka Univ., 5. Research organization for nano and Life Innovation, Waseda Univ., 6. Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda Univ., 7. CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., 8. The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka Univ.)

[2P-078] Reaction Properties of Structual Conversion of Chlorophyll *b* in Oxygenic Photosynthesic Organisms

*Masayuki Tanaka[1], Yoshitaka Saga[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Kindai University)

[2P-080] Development of Dinuclear Nonheme Carboxamidoiron(III) Complexes with High Peroxidase Activity

*Yusuke Fukui[1], Masahito Kodera[1], Yutaka Hitomi[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University)

[2P-082] Control of Membrane Permeability by Metal Hybrid Channels

*Kosuke Komaki[1] (1. Graduate studies of Life Science, Ritsumeikan University)

[2P-084] Effect of supporting electrolyte on electrochemical glycosylation via dioxalenium ion intermediate

*Yui Ishisaka[1], Asuka Saito[1], Takehiro Kobayashi[2], Akito Shibuya[3], Toshiki Nokami[4] (1. Graduate School of Sustainability Science, Tottori University, 2. Faculty of Engineering, Tottori University, 3. Graduate School of Engineering, Tottori University, 4. GSC center, Faculty of Engineering, Tottori University)

[2P-086] Turn-On fluorescent imaging of sialic acids on cell membrane with Dansyl-triarginine peptide bearing alkyl chain

*Mizuki Okazaki[1], Hiroshi Inaba[1], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University)

[2P-088] Creation of a reconstituted liposome with regulated protein orientation

*Kosaku Noba[1], Shogo Yoshimoto[1], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya university)

[2P-090] Modulation of protein diffusion in lipidic cubic phase and transcutaneous penetration

*Shuto Kozaka[1], Rie Wakabayashi[1], Noriho Kamiya[1], Masahiro Goto[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University)

[2P-092] Complex of fluorescent carborane with hyaluronic acid for BNCT

*Riku Kawasaki[1], Keita Yamana[1], Yu Sanada[2], Shin-ichiro Masunaga[2], Minoru Suzuki[2], Yoshinori Sakurai[2], Kaori Bando[3], Anri Tabata[3], Kouhei Yoshikawa[3], Hideki Azuma[3], Kouta Sugikawa[3], Takeshi Nagasaki[3], Atsushi Ikeda[1] (1. Graduate School of Advanced Science and Engineering, Hiroshima University, 2. Institute for Integrated Radiation and Nuclear Science, Kyoto University, 3. Graduate School of Engineering, Osaka City University)

[2P-094] Degradation of carbon nanotubes by Fenton reaction induced by iron released by bacterial heme enzyme

*Seira Takahashi[1], Fumiko Taguchi[1], Junichi Kanie[2], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate school of engineering, Nagoya University, 2. Friend Microbe Inc.)

Online Mixer

6:40 PM - 8:40 PM JST | 9:40 AM - 11:40 AM UTC | Room A Zoom

Online mixer

[SG1-1] Online Mixer (SpatialChat)

Oral(second day)

Thu. Sep 9, 2021 9:00 AM - 10:00 AM JST | Thu. Sep 9, 2021 12:00 AM - 1:00 AM UTC | Room A Zoom

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Takashi Ueno (Tokyo Institute of Tech.)

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

[2A-01] Evolutionary Engineering of a Rh(III)-incorporated Artificial Metalloenzyme with a Chimeric β-Barrel Protein Scaffold for C(sp^2)-H Bond Functionalization

*Shunsuke Kato[1], Akira Onoda[2], Ulrich Schwaneberg[3], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University, 3. Institute of Biotechnology, RWTH Aachen University)

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

[2A-02] Rational design of domain-swapped dimers with high stability and metal-binding ability in myoglobin

*Satosh Nagao[1,2], Ayaka Idomoto[2], Ayaka Suda[2], Hisashi Kobayashi[2], Naoki Shibata[1], Yoshiki Higuchi[1], Shun Hirota[2] (1. Graduate School of Science, University of Hyogo, 2. Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology)

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

[2A-03] Identification of serine kinases in hyperthermophilic archaea

*Takaaki Sato[1], Yuki Makino[1], Yasunobu Mori[1], Hiroki Kawamura[1], Shin-ichi Hachisuka[1], Takayuki Fujita[1], Ryo Takeno[1], Ryuhei Nagata[2], Masahiro Fujihashi[3], Kunio Miki[2], Tadayuki Imanaka[4], Haruyuki Atomi[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University, 2. Graduate School of Science, Kyoto University, 3. School of medicine, Osaka Medical and Pharmaceutical University, 4. Research Organization of Science and Technology, Ritsumeikan University)

キメラ型 β-バレルタンパク質を基盤とするロジウム含有人工金属酵素の指向性進化：芳香族 C–H 結合官能基化反応への応用

○加藤 俊介[1]・小野田 晃[2]・Ulrich Schwaneberg[3]・林 高史[1]（[1]阪大院工、[2]北大院環境、[3]アーヘン工科大学バイオテクノロジー研究所）

Evolutionary Engineering of a Rh(III)-incorporated Artificial Metalloenzyme with a Chimeric β-Barrel Protein Scaffold for C(sp²)–H Bond Functionalization (Graduate School of Engineering, Osaka University[1], Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University[2], Institute of Biotechnology, RWTH Aachen University[3]) KATO, Shunsuke[1]; ONODA, Akira[2]; SCHWANEBERG, Ulrich[3]; HAYASHI, Takashi[1]

持続可能な社会の実現にむけて、酵素や微生物等の生体触媒を利用した物質変換が注目される昨今、生体触媒の有用性を非天然の化学反応に拡張する試みが精力的に進められている。そのアプローチの一つとして、非天然の遷移金属錯体を補因子としてタンパク質反応場と組み合わせた「人工金属酵素」の開発が挙げられる。我々はこれまでに、剛直な 10 本鎖 β-バレル構造を有するニトロバインディン（NB）をタンパク質反応場として利用し、Cp*Rh(III) 錯体を活性中心にもつ人工金属酵素（NB-Rh）を開発した[1]。NB-Rh とその変異体は、芳香族 C–H 結合活性化を経由するアセトフェノンオキシムとアルキンの付加環化反応において触媒活性を示すことが判明した[2]。本研究では、この人工金属酵素の更なる触媒活性の向上をめざし、指向性進化法（directed evolution）を駆使した NB のタンパク質反応場の改変に着手したので報告する。

まず初めに我々は、Cp*Rh(III) 錯体を包括する疎水的なタンパク質反応場を構築することを目的とし、NB の 10 本鎖 β-バレル構造に対して、脂肪酸結合タンパク質（FABP）の部分構造を遺伝子工学的に挿入したキメラ型人工金属酵素 NB^{HLH1}-Rh を調製した（Figure 1a）。NB と FABP との β-バレル構造の相同性を考慮し、アミノ酸配列を指向性進化法により最適化した結果、高い構造安定性を示す Y119A/G149P 変異体を獲得した。さらに、この NB^{HLH1}-Rh 変異体の疎水空孔内部を指向性進化法を用いて改変することで、上記の付加環化反応における触媒反応効率（k_{cat}/K_M）を 40 倍以上に向上させることに成功した（Figure 1b）。特に、空孔内部に芳香族系アミノ酸残基が多数導入された変異体では、基質であるアセトフェノンオキシムに対するミカエリス定数（K_M）が顕著に減少し、基質との有利な相互作用が生じていることが示唆された。本発表では、キメラ型人工金属酵素の遺伝子工学的設計を含めた指向性進化法の詳細と、得られた人工金属酵素変異体の反応速度論的解析について論述する。

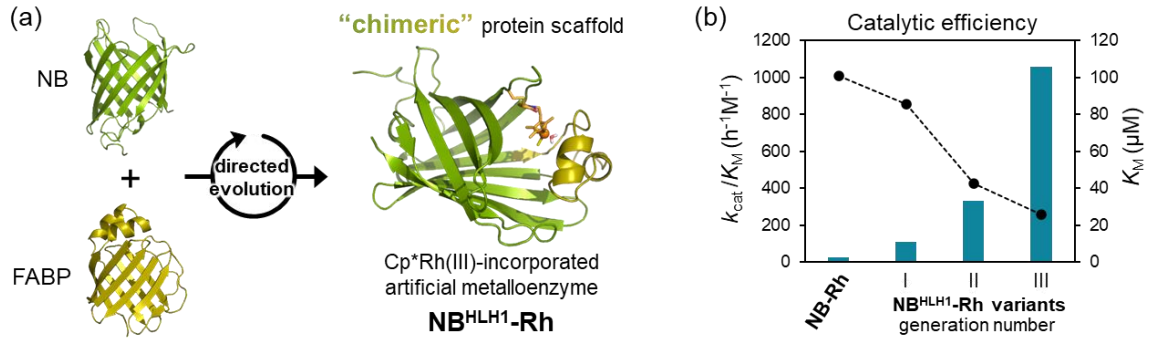


Figure 1. (a) Construction of a Cp*Rh(III)-linked artificial metalloenzyme with chimeric protein scaffold. (b) Michaelis-Menten parameters of evolved NB^{HLH1}-Rh variants for the cycloaddition reaction.

1) S. Kato, A. Onoda, A. R. Grimm, K. Tachikawa, U. Schwaneberg, T. Hayashi, *Inorg. Chem.* **2020**, *59*, 14457.
2) S. Kato, A. Onoda, N. Taniguchi, U. Schwaneberg, T. Hayashi, *ChemBioChem* **2021**, *22*, 679.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

ミオグロビンにおける安定性向上および金属結合性付与ドメインスワップ二量体の分子設計

○長尾聡[1,2]・井戸本彩花[2]・須田綾香[2]・小林紀[2]・柴田直樹[1]・樋口芳樹[1]・廣田俊[2]（[1]兵県大院理、[2]奈良先端大物質）

Rational design of domain-swapped dimers with high stability and metal-binding ability in myoglobin

(Graduate School of Science, University of Hyogo[1], Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology[2]) NAGAO, Satoshi[1,2]; IDOMOTO, Ayaka[2]; SUDA, Ayaka[2]; KOBAYASHI, Hisashi[2]; SHIBATA, Naoki[1]; HIGUCHI, Yoshiki[1]; HIROTA, Shun[2]

タンパク質はそのアミノ酸配列によって構造が一意に決まり、天然では最も安定な状態をとるようにフォールディングすると考えられている。近年その例外として、分子内での相互作用を分子間で置き換える部分構造交換により、最も安定な単量体以外に準安定な多量体状態をとるドメインスワップ現象が報告されている。例えば、生体内において酸素貯蔵の役割を担うミオグロビン(Mb)は天然では単量体として存在しているが、エタノールで処理することによりドメインスワップした二量体を形成する[1)]。Mb のドメインスワッピングでは、部分構造の交換だけでなく、ヒンジ領域がループからαヘリックスへと構造変化し、ヒンジ領域前後のヘリックスと一緒に長い 1 本のαヘリックスを形成する。本研究ではドメインスワッピングの際に二次構造変化を起こすヒンジ領域に着目し、ヒンジ領域におけるヘリックス形成能向上とアミノ酸側鎖配置を利用して、安定な Mb 二量体および金属結合性を有する Mb 二量体の分子設計を行った。

野生型ウマ Mb 二量体は 68℃で単量体へ解離するが[1)]、ヒンジ領域に位置する Gly80 をヘリックス形成能が高い Ala に置換すると（G80A Mb）、二量体が野生型よりも安定化された（変性温度：75℃）。Gly80 に加えて His81 と His82 も Ala に置換すると（G80A/H81A/H82A Mb）、G80A Mb よりもさらに二量体が安定化され（変性温度：78℃）、ヒンジ領域における複数残基の Ala 置換で二量体が安定化することが示された[2)]。次に、Mb 二量体の X 線結晶構造から Lys78 は側鎖を溶媒側に、Lys79 は側鎖を分子内部に向けているため、それぞれの Lys を His に置換すると His 導入部位周辺の空間の広さの違いにより異なる金属結合構造をもつと予想した。His 変異体には二量体の安定化のため 2 つの Ala 置換も併せて行った。作製した 2 種類の His 変異体においても二量体は野生型よりも安定化され（変性温度：77℃（K78H/G80A/H82A Mb）、74℃（K79H/G80A/H81A Mb））、ドメインスワップ構造をとっていた。さらに、His 変異体の二量体の結晶を金属イオン(Co^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+})を含む結晶化溶液にソーキングすると、K78H/G80A/H82A Mb では Co^{2+}と Ni^{2+}、K79H/G80A/H81A Mb では Co^{2+}と Zn^{2+}との結合型が形成した。金属結合部位は、Co^{2+}および Ni^{2+}結合型 K78H/G80A/H82A Mb では六配位八面体構造、Co^{2+}および Zn^{2+}結合型 K79H/G80A/H81A Mb では四配位四面体構造をとっており、His を導入する部位を変えると配位構造の異なる金属結合部位を構築できることが示された[3)]。以上の結果より、ドメインスワッピングにおけるヒンジ領域のアミノ酸配列をデザインすることでタンパク質の多量化状態や機能性を制御できることが示唆された。

1) S. Nagao, *et al.*, *Dalton Trans.* **2012**, 41, 11378.
2) S. Nagao, *et al.*, *Chem. Asian J.* **2020**, 15, 1743.
3) S. Nagao, *et al.*, *J. Inorg. Biochem.* **2021**, 217, 111374.

超好熱性アーキアにおける serine kinase の同定

○佐藤喬章[1]・牧野勇樹[1]・森康暢[1]・川村弘樹[1]・蜂須賀真一[1]・竹野領[1]・藤田嵩之[1]・永田隆平[2]・藤橋雅宏[3]・三木邦夫[2]・今中忠行[4]・跡見晴幸[1]（[1]京大院工、[2]京大院理、[3]大阪医薬大医、[4]立命館大総合科学技術研）

Identification of serine kinases in hyperthermophilic archaea (Graduate School of Engineering, Kyoto University[1], Graduate School of Science, Kyoto University[2], School of medicine, Osaka Medical and Pharmaceutical University[3], Research Organization of Science and Technology, Ritsumeikan University[4]) SATO, Takaaki[1]; MAKINO, Yuki[1]; MORI, Yasunobu[1]; KAWAMURA, Hiroki[1]; HACHISUKA, Shin-ichi[1]; TAKENO, Ryo[1]; FUJITA, Takayuki[1]; NAGATA, Ryuhei[2]; FUJIHASHI, Masahiro[3]; MIKI, Kunio[2]; IMANAKA, Tadayuki[4]; ATOMI, Haruyuki[2]

アーキアは真核生物や細菌とは異なる第三の生物ドメインを構成する微生物である。その特徴の一つとして他の 2 ドメインのものとは異なる特有の代謝が挙げられる。我々はアーキアの中でも 85℃を至適生育温度とする超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を研究対象とし、新規な酵素や代謝経路の同定を目指して研究を進めている。本菌はシステインを含まないアミノ酸を主栄養源とする培地で生育できることから、他のアミノ酸からシステインを生合成できることが分かっていた。しかし、ゲノム情報によると既知のシステイン生合成経路を構成する遺伝子はそろっておらず、新規生合成経路が存在する可能性が示唆された。そこで本研究ではまず *T. kodakarensis* におけるシステイン生合成経路の解明を目指した。

本菌のゲノム上には確かにシステイン生合成に関わると思われる遺伝子として唯一、cysteine synthase (CysK)とアノテートされていた TK1687 遺伝子が存在した。本遺伝子の破壊株を作製したところ、確かにシステイン要求性を示した。多くの細菌や植物などにおける CysK は *O*-アセチルセリンのアセチル基をチオール基に置換してシステインを生成するが、セリンをアセチル化する遺伝子が本菌のゲノム上には存在しなかった。一方、一部のアーキアや寄生原虫の CysK は 3-ホスホグリセリン酸から合成する *O*-ホスホセリンのリン酸基をチオール基に置換してシステインを生成する。本菌の CysK の配列を解析したところ、ホスホセリンを基質とする CysK に特徴的な挿入配列が見られ、*O*-ホスホセリンからシステインを生成している可能性が考えられた。しかし、本菌において 3-ホスホグリセリン酸からの *O*-ホスホセリン生成に関わる遺伝子を破壊したがシステイン要求性は示さなかった。そこで考えたのがセリンを直接リン酸化する serine kinase の存在である。本菌の無細胞抽出液中から serine kinase 活性を示すタンパク質を精製し、同定したところ chromosome partitioning protein ParB とアノテートされていた TK0378 が実は ADP をリン酸基供与体とする serine kinase であることが明らかになった（図 1）。タンパク質中のセリン残基をリン酸化する serine protein kinase は数多く同定・解析されていたが遊離のセリンをリン酸化する酵素は初の同定例であった（***Nat. Commun.*** **7**: 13446 [2016]）。

相同性の高さは様々であるが TK0378 と相同性を示すタンパク質は 3 ドメインいずれの生物にも分布していた。そこで、45%程度の比較的高い相同性を示す超好熱性アーキア *Staphylothermus marinus* 由来タンパク質（Smar_0555）を解析したところ、ADP ではなく ATP をリン酸基供与体とする serine kinase であることが明らかとなった（図 1）（***J. Bacteriol.*** **203**: e0002521 [2021]）。

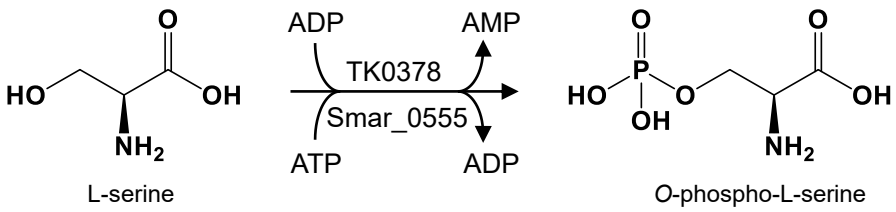


図 1. Serine kinase が触媒する反応

Oral(second day)

Thu. Sep 9, 2021 10:10 AM - 11:10 AM JST | Thu. Sep 9, 2021 1:10 AM - 2:10 AM UTC | Room A Zoom

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Hiroshi Ueda (Tokyo Institute of Tech.)

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

[2A-04] Construction of functional peptide interface for capturing migrasome

*Shogo Saito[1], Masayoshi Tanaka[1], Mina Ohkouchi[1] (1. School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology)

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

[2A-05] De novo peptide grafting to a self-assembling nanocapsule yields a hepatocyte growth factor receptor agonist

*Naohiro Terasaka[1], Yamato Komatsu[1], Katsuya Sakai[2,3], Emiko Mihara[4], Risa Wakabayashi[1], Kunio Matsumoto[2,3], Donald Hilvert[5], Junichi Takagi[4], Hiroaki Suga[1] (1. Department of Chemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 2. Division of Tumor Dynamics and Regulation, Cancer Research Institute, Kanazawa University, 3. WPI-Nano Life Science Institute, Kanazawa University, 4. Institute for Protein Research, Osaka University, 5. ETH Zurich)

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

[2A-06] Tubular Deformation Induced by Self-assembling Peptides onto Phospholipid Bilayer

*Anju Kawakita[1], Noriyuki Uchida[1], Takahiro Muraoka[1] (1. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

細胞外小胞ミグラソームを捕捉する機能性ペプチド界面の構築

〇齊藤彰吾・田中祐圭・大河内美奈（東京工業大学物質理工学院）

Title in English (Construction of functional peptide interface for capturing migrasome) Shogo, Saito; Masayoshi, Tanaka; Mina, Okochi. Tokyo Institute of technology, School of Material and Chemical Technology.

1. 緒言

近年、細胞が遊走する際に、その軌跡を残すように形成される新たな細胞外小胞ミグラソームが報告された[1]。このミグラソームは、細胞遊走後にリトラクションファイバーと呼ばれる線維状の構造上に形成される小胞である。ミグラソームは、形成後 4 時間程度で消失することや観察には蛍光染色が必要であることもあり、これまで注目されておらず詳細な観察や解析が進んでいない。本研究では、ミグラソーム形成を促進させ、安定した観察を可能にするために、細胞の培養基板上の界面に着目し、ミグラソームを効率的に捕捉できるナノ界面を構築することを目的とした。ここでは、インテグリンリガンドや細胞膜に相互作用をもつ細胞膜透過性ペプチド、細胞膜融合ペプチドに着目し脂質膜に対する結合性や細胞遊走距離の評価を行った。さらに、ミグラソーム形成能を評価し、ミグラソームの観察に最適な機能性ペプチド界面の設計を行った。

2. 実験方法

各ペプチドをセルロース膜上に Fmoc アミノ酸をスポット合成することでアレイ状に合成した。このペプチドアレイ上で細胞膜に対して結合評価を行うことにより、候補配列を選抜した。選抜されたペプチドを修飾した基板上にヒト皮膚線維芽細胞 NHDF を播種し、タイムラプス撮影することで細胞の遊走能を評価した。撮影は、倒立顕微鏡上に卓上インキュベーターを用意し、5% CO2, 37℃条件下で 24 時間行った。これらの画像より、細胞の遊走をトラッキングすることで遊走距離を算出した。さらに、ペプチド界面上でのミグラソーム形成能の評価を行った。ミグラソームは、ペプチド修飾基板上に播種した NHDF を一晩培養し、細胞をホルムアルデヒドで固定した後に Cell Mask Orange で膜染色し観察し、リトラクションファイバー上にあるミグラソームを計数することで評価した。また、細胞培養面からの細胞剥離については、インテグリンリガンドである RGD を異なる混合比で加えたペプチド液を調製し、基板に修飾した。細胞の剥離には、インテグリンの結合作用を阻害する EDTA を用い、10mM EDTA を含む PBS に 30 分浸漬することで細胞の剥離を行い、この剥離率を評価した。

3. 結果・考察

ペプチドアレイを用いた細胞結合性ペプチドの選抜により、細胞膜透過性ペプチド pVEC(LLIILRRRIRKQAHAHSK)が細胞膜に対し、強い結合能を有することが示された。さらに、NHDF の遊走評価により、他の候補配列や一般的に細胞接着分子として用いられるインテグリンリガンドおよびフィブロネクチンに比べて、pVEC を修飾した界面上では遊走距離が長くなることが示された。また、細胞遊走後に形成されたミグラソームを計数した結果、pVEC ペプチドがインテグリンリガンドやフィブロネクチンに比べ、多くのミグラソームを形成していることが観察された。これらの結果から、pVEC ペプチドを修飾した界面上では、細胞遊走能が向上するとともにミグラソーム形成が促進されることが示唆された。さらに、細胞膜に対し強く相互作用する特性により、ミグラソームの安定した捕捉効果が示唆された。混合ペプチド修飾面での細胞剥離評価の結果、RGD ペプチド濃度 95 %, pVEC ペプチド 5%の条件下で EDTA 処理により、細胞のみの剥離が確認され、ミグラソームは基板上に保持されていたことから、ミグラソームの分画法として利用できることが示唆された。今後このようなペプチド界面を利用することで、ミグラソームの長期観察が可能となるほか、より詳細な機能解析に関する研究が進展することが期待される。

[1] Ma et al., *Cell Res*., (25), 24-38, 2015

タンパク質カプセルへの環状ペプチド移植による肝細胞増殖因子受容体アゴニストの創成

○寺坂尚紘[1]・小松大和[1]・酒井克也[2,3]・三原恵美子[4]・若林里咲[1]・松本邦夫[2,3]・Hilvert Donald[5]・高木淳一[4]・菅裕明[1]（[1]東京大院理、[2]金沢大がん進展制御研究所、[3]金沢大 WPI-NanoLSI、[4]大阪大蛋白質研究所、[5]スイス連邦工科大学チューリッヒ校）

De novo peptide grafting to a self-assembling nanocapsule yields a hepatocyte growth factor receptor agonist

(Department of Chemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo[1], Division of Tumor Dynamics and Regulation, Cancer Research Institute, Kanazawa University [2], WPI-Nano Life Science Institute, Kanazawa University[3], Institute for Protein Research, Osaka University[4], ETH Zurich[5]) TERASAKA, Naohiro[1]; KOMATSU Yamato[1]; SAKAI Katsuya[2,3]; MIHARA Emiko[4]; WAKABAYASHI Risa[1]; MATSUMOTO Kunio[2,3]; HILVERT Donald[5]; TAKAGI Junichi[4]; SUGA Hiroaki[1]

Random Peptides Integrated Discovery (RaPID)システムは、遺伝暗号のリプログラミングと mRNA ディスプレイを組み合わせて、10^{12} 以上からなるランダム配列から、ターゲット特異的な高親和性 *de novo* 大環状ペプチドを取得することが可能である。当研究室では近年、RaPID システムで得られた大環状ペプチドの「ファーマコフォア」配列をタンパク質のループに導入することで、環状ペプチドの極めて高い特異性と親和性を、足場タンパク質に賦与する技術「ラッソ・グラフト法(Lasso-graft technology」を開発した[1]。本研究では 60 量体自己集合タンパク質である *Aquifex aeolicus* ルマジン合成酵素（AaLS）に、肝細胞増殖因子受容体（MET）に結合する環状ペプチド[2]のラッソ・グラフトを試みた。

AaLS の 119/120 位に新しい N/C 末端を導入し、元の N/C 末端を大環状ペプチド（aMD4, aMD5, aML5）のファーマコフォア配列で繋いだ循環置換変異体（$AaLS^{1::154}$）をデザインし、野生型 AaLS と共発現することで、環状ペプチドが約 30 個提示されたカプシドを調製した。この 3 種類のキメラカプシドの中で、$AaLS^{1:154}$-aMD4 のみが細胞表面の MET に結合して二量化を促進し、エンドサイトーシスを誘起した（Fig. 1）。さらにファーマコフォアと AaLS の間のリンカーにシステインを配置することで、MET 二量化活性を向上することに成功した。本手法は AaLS の他の変異体[3]や様々な自己集合タンパク質に適用可能であり、受容体のクラスタリングやドラッグデリバリーへの応用が期待できる。

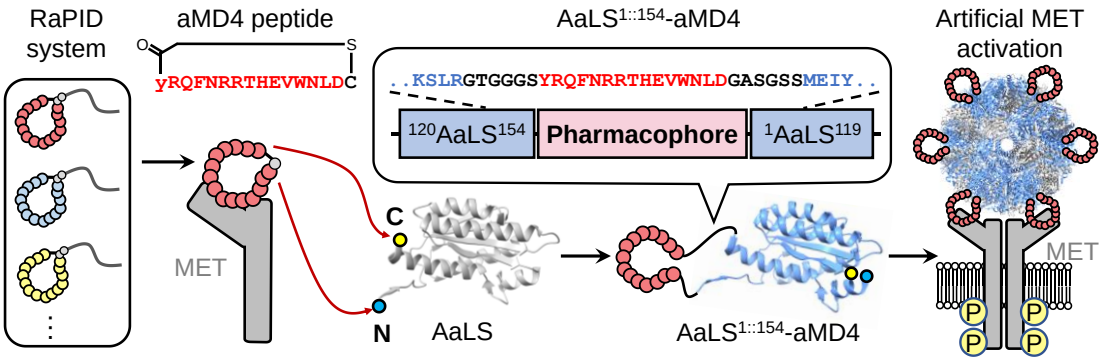


Fig 1. Schematic illustration of *de novo* peptide grafting to a *Aquifex aeolicus* Lumazine Synthase (AaLS) to produce a hepatocyte growth factor receptor (MET) agonist.

1) E. Mihara, S. Watanabe, N.K. Bashiruddin *et al.*, *Nat. Commun.* **12**, 1543 (2021)
2) K. Ito, K. Sakai, Y. Suzuki *et al., Nat. Commun.* **6**, 6373 (2015)
3) S. Tetter, N. Terasaka, A. Steinauer *et al.*, *Science* **372**, 1220 (2021)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

リン脂質膜上での分子集合によって誘導されるチューブ膜変形現象

○河北杏樹・内田紀之・村岡貴博（東京農工大院工）

Tubular Deformation Induced by Self-assembling Peptides onto Phospholipid Bilayer (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology) KAWAKITA, Anju; UCHIDA, Noriyuki; MURAOKA, Takahiro

リン脂質のチューブ状集合体は、神経細胞の樹状突起などを形成する重要な集合構造である。これまでに、光ピンセット[1]や電極[2]、シアフロー[3]を用いたチューブ状集合体の製法が開発されてきた。しかしながら、いずれの製法もトップダウン的でチューブ状集合体の安定性が低く、装置を必要とするため簡便性にかけるといった課題がある。そこで本研究では、自己集合性のある人工分子と脂質相分離性を利用して、等方的な球状のベシクルを異方的なチューブ状集合体に変形させる方法を考案した。はじめに、カチオン性の直鎖状オリゴリジンを含む両親媒性ペプチドレセプター(lnK4)を導入した、DOPC、DPPC、コレステロールの複合膜からなるベシクル(DOPC/DPPC/Cholesterol/lnK4 ベシクル)を作成した（図 A)。このベシクルにアニオン性のゲスト分子であるオリゴアスパラギン酸(D4)を添加し、ペプチドの自己集合を静電的に誘起したところ、ベシクルが平坦な構造体を経由してチューブ状集合体へと膜変形する現象を発見した（図 B)。このチューブ状集合体形成はゲスト分子を添加するという簡便な操作によって誘起できることに加え、ゲスト分子に対する選択性も有しており、アニオン性のアルブミンタンパク質には応答性を示さない一方、DNA を添加した場合には膜変形が誘導される。作製されたチューブ状集合体は安定性が高く、チューブ径も 1 μm 前後と均一性がある。また、このチューブ状集合体は顕微鏡での視認性と高曲率を併せ持つため、リアルタイムでの観察が可能な膜曲率認識タンパク質の足場材料として利用することができる。本発表ではチューブ状集合体への変形挙動の詳細な解析と、その応用について紹介する。

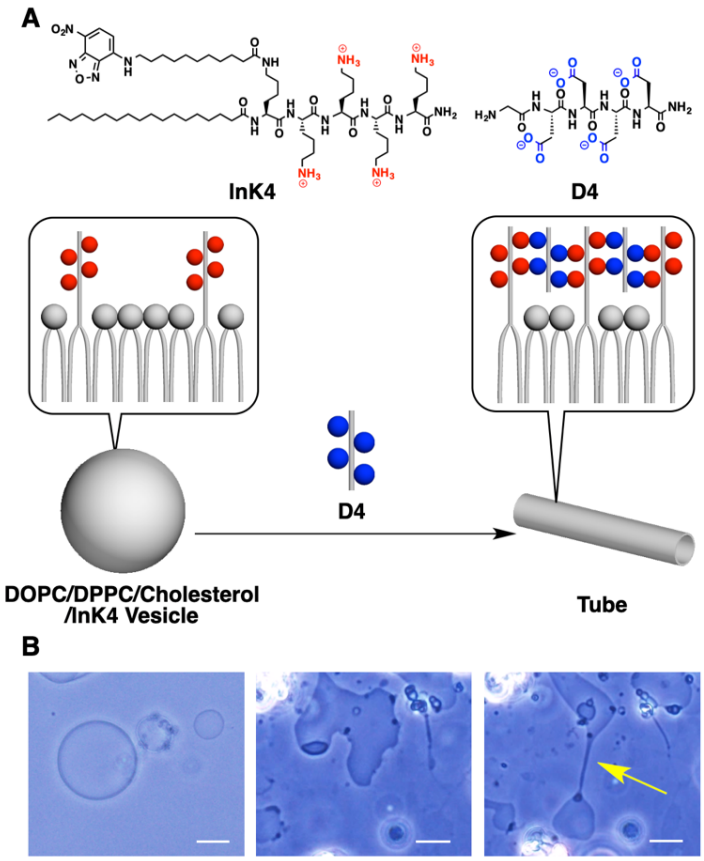


Figure. Schematic illustration (A) and micrographs (B) of the tube formation via the flattened object induced by self-assembly of the peptide receptor. Scale bars = 20 μm.

1) A. Roux, *Soft Matter,* **9**, 6726-6736 (2013)
2) C. Zhu, Y. Zhang, Y. Wang, Q. Li, W. Mu, and X. Han, *Chem. Eur. J.,* **22**, 2906-2909 (2016)
3) Y. Sekine, K. Abe, A. Shimizu, Y. Sasaki, S. Sawada, and K. Akiyoshi, *Rsc Adv.,* **2**, 2682-2684 (2012)

Oral(second day)

Thu. Sep 9, 2021 1:20 PM - 2:20 PM JST | Thu. Sep 9, 2021 4:20 AM - 5:20 AM UTC | Room A Zoom

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Naohiro Terasaka (The University of Tokyo)

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

[2A-07] Artificial viral capsid which delivers biomacromolecules into cytosol.

*Kentarou Sakamoto[1,2], Hiroto Furukawa[2], Kazunori Matsuura[2], Shiroh Futaki[1] (1. Institute for Chemical Research, Kyoto University, 2. Graduate School of Engineering, Tottori University)

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

[2A-08] Synthetic peptide-guided protein delivery in plants via a macropinocytosis-like mechanism

*Takaaki Miyamoto[1], Kiminori Toyooka[2], Yumi Goto[2], Yutaka Kodama[1,3], Keiji Numata[1,4] (1. Biomacromolecules Research Team, RIKEN CSRS, 2. Mass Spectrometry and Microscopy Unit, RIKEN Center for Sustainable Resource Science, 3. Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University, 4. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

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

[2A-09] Solubilization and refolding of aggregated concanavalin A in hydrated ionic liquids

*Kyoko FUJITA[1], Roka Nakano[2], Ryota Fujii[1], Kimiyoshi Ichida[1], Nobuhumi Nakamura[2], Hiroyuki Ohno[2] (1. Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 2. Tokyo University of Agriculture and Technology)

生体高分子をサイトゾルに送達する人工ウイルスキャプシド

○坂本健太郎[1,2]・古川寛人[2]・松浦和則[2]・二木史朗[1]（[1]京大化研、[2]鳥取大院工）

Artificial viral capsid which delivers biomacromolecules into cytosol. (Institute for Chemical Research, Kyoto University[1], Graduate School of Engineering, Tottori University [2]) SAKAMOTO, Kentarou[1,2]; FURUKAWA, Hiroto[2]; MATSUURA, Kazunori[2]; FUTAKI, Shiroh[1]

サイトゾルには多くの潜在的な治療標的が存在する。それらを認識できるタンパク質をサイトゾルに送達する技術が開発できれば、細胞機能制御およびそれに基づいた治療戦略の設計が可能になると考えられる。我々は抗体などの生体高分子をサイトゾルに送達できるペプチド「L17E」およびその活性向上体「HAad」に関して報告を行っている[1,2]。HAad はエンドサイトーシスに伴う pH の低下を感知してヘリックス構造をとり、エンドソーム膜を傷害して生体高分子をサイトゾルに送達すると考えられている。これらのペプチドによる生体高分子のサイトゾル送達はペプチドと生体高分子間の複合化または架橋を必要とせず、ただ両者を混合するだけで達成される。一方で、将来的な in vivo への応用を考えた場合、生体高分子は HAad と混合して投与されている本手法は、生体高分子と HAad の体内動態をコントロールできない点で不適切である。この問題の解決のため、HAad によって修飾された生体高分子内包ナノキャリアの創製を行った（図 1）。

ここでは、トマトブッシースタントウイルス由来の 24 残基からなるペプチドであり、溶液中で自発的に自己会合し「人工ウイルスキャプシド」と呼ばれるナノカプセルを形成するβ-annulus[3] をキャリア材料として用いた。β-annulus ペプチドは人工ウイルスキャプシドを形成する際、N 末端をキャプシド内部に、C 末端をキャプシド外に向ける。このため、β-annulus ペプチドの N 末端に生体高分子を、C 末端に HAad を担持させれば HAad によって修飾された生体高分子内包ナノキャリアが容易に形成できるのではないかと考えた。先行研究として、Ni-NTA タグを N 末端に有するβ-annulus ペプチドからなる人工ウイルスキャプシドに EGFP-His_6 を内包させた例[4]や、C 末端にペプチドを提示させた人工ウイルスキャプシドの創出例[5]があるが、β-annulus ペプチドの細胞導入への応用には更なる検討が必要と言える。本研究では人工ウイルスキャプシドを HAad で修飾し、さらに Ni-NTA タグを内包させることで、EGFP-His_6 を内包し HAad で修飾された人工ウイルスキャプシドを作製した。この人工ウイルスキャプシドを細胞に投与することで、内包された EGFP-His_6 やその改変タンパク質をサイトゾルへと送達することに成功した。本発表ではペプチドのデザイン、ナノキャリアの物性評価、細胞実験について詳細に述べたい。

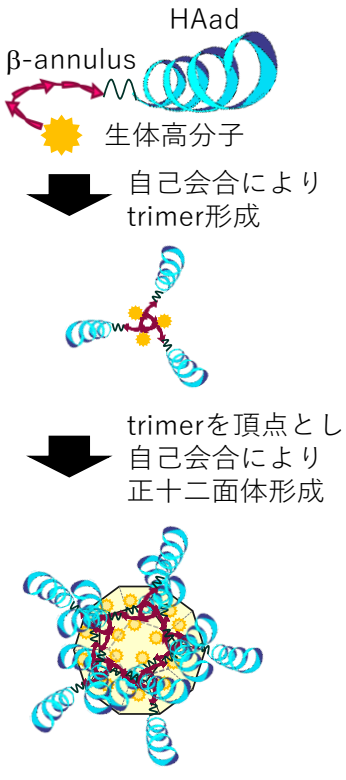


図 1 HAad 修飾／生体高分子内包ナノキャリアの構成。

1. Akishiba, M. *et al. Nat. Chem.,* 2017, **9**, 751.
2. Sakamoto, K., *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2020, **59**, 19990.
3. Matsuura, K., *Chem. Commun*., 2018, **54**, 8944.
4. Matsuura, K., *et al., Org. Biomol. Chem.,* 2016, **14**, 7869.
5. Fujita, S. and Matsuura, K., *Org. Biomol. Chem.*, 2017, **15**, 5070.

マクロピノサイトーシス様の取り込み機構を誘起する人工ペプチドを利用した植物へのタンパク質デリバリー

○宮本昂明[1]・豊岡公徳[2]・後藤友美[2]・児玉豊[1,3]・沼田圭司[1,4]（[1]理研バイオ高分子、[2]理研質量分析、[3]宇都宮大バイオ教育、[4]京大院工）

Synthetic peptide-guided protein delivery in plants via a macropinocytosis-like mechanism

(Biomacromolecules Research Team, RIKEN Center for Sustainable Resource Science[1], Mass Spectrometry and Microscopy Unit, RIKEN Center for Sustainable Resource Science[2], Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University[3], Graduate School of Engineering, Kyoto University[4]) MIYAMOTO, Takaaki[1]; TOYOOKA, Kiminori[2]; GOTO, Yumi[2]; KODAMA, Yutaka[1,3]; NUMATA, Keiji[1,4]

植物による物質生産や作物の増産を目的として、外来 DNA の導入により植物を改変する遺伝子組換え技術が汎用されている。しかし、遺伝子組換えには、外来 DNA が予期しない形でゲノムへ挿入される潜在的な問題が存在する。この問題を解決し得る植物の改変技術として、タンパク質を植物細胞内へ直接導入する手法が注目されている。多くのタンパク質は細胞膜を透過しないため、タンパク質を細胞内へ効率的に送達するツールが不可欠となる。我々は、膜透過性ペプチド (CPP) が植物への核酸・タンパク質の導入に有用であることを示してきた[1)]。しかし、CPP を利用した植物へのタンパク質導入には多くの課題が残されている。特に、タンパク質を活性な状態で植物の細胞質へ導入できる CPP が未開発であると共に、植物における CPP の細胞内移行機序が未解明であることは、CPP の利用を大きく制限している。本研究で我々は、D-アミノ酸から成るカチオン性ドメインとトリプトファンを含む疎水性ドメインがサルコシンリンカーにより融合された人工ペプチド (dTat-Sar-EED4: rrrqrrkkr-$(Sar)_6$-GWWG) を合成し[2)]、植物へのタンパク質導入と細胞内移行機序を詳細に検討した。

我々はまず、dTat-Sar-EED4 により β-glucuronidase (GUS) を種々のモデル植物 (タバコ培養細胞・シロイヌナズナの子葉・イネのカルス細胞) へ導入した後、蛍光基質により細胞内における GUS の酵素活性を評価した。その結果、いずれのモデル植物においても、dTat-Sar-EED4 により GUS は酵素活性を維持した状態で細胞質へ導入されることが明らかとなった。また、同様の評価系を用いて、dTat-Sar-EED4 と既存の CPP (dTat: rrrqrrkkr; R9: RRRRRRRRR; BP100: KKLFKKILKYL) の導入効率を定量的に比較した。dTat-Sar-EED4 による GUS 導入効率は、既存の CPP と比較して最大で 20 倍ほど高いことが分かった。次に我々は、dTat-Sar-EED4 の細胞内移行機序を明らかにするため、種々の阻害剤を処理したモデル植物 (シロイヌナズナの根) における GUS の導入効率を評価した。その結果、クラスリン依存エンドサイトーシスの阻害剤 (ES9-17) は dTat-Sar-EED4 による GUS の導入効率に影響を与えないことが明らかになった。一方、動物細胞でマクロピノサイトーシス阻害剤として汎用される wortmannin や cytochalasin D は、GUS の導入効率を有意に低減させることが分かった。動物細胞とは異なり、植物細胞においてマクロピノサイトーシスの存在はこれまで報告されていない。そこで、透過型電子顕微鏡を用い、マクロピノサイトーシスに特徴的な細胞膜の突出構造と直径 200 nm 以上の細胞内小胞が、植物細胞で見られるかを確認した。その結果、dTat-Sar-EED4 を処理したタバコ培養細胞とシロイヌナズナの子葉において、ペプチド未処理の対象群では見られなかった膜の突出構造と 200 nm 以上の細胞内小胞が観察された。以上の結果から、複数の植物種において dTat-Sar-EED4 が既存の CPP よりも高効率に活性型のタンパク質を導入できることが示された。さらに、dTat-Sar-EED4 は植物では未報告であるマクロピノサイトーシス様の機構を誘起することでカーゴタンパク質を細胞内へ導入していることが示唆された。

1) T. Miyamoto, K. Tsuchiya, K. Numata, *Nanoscale*, **13**, 5679 (2021)
2) T. Miyamoto, K. Tsuchiya, K. Numata, *Biomacromolecules*, **21**, 2735 (2020)

水和イオン液体を用いたConcanavalin A凝集体の溶解および糖鎖認識能の再生

○藤田恭子[1]・中野呂香[2]・藤井崚太[1]・市田公美[1]・中村暢文[2]・大野弘幸[2]（[1]東京薬科大薬、[2]東京農工大院工）

Solubilization and refolding of aggregated concanavalin A in hydrated ionic liquids (School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences[1], Department of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology[2]) Kyoko Fujita[1], Roka Nakano[2], Ryota Fujii[1], Kimiyoshi Ichida[1], Nobuhumi Nakamura[2], Hiroyuki Ohno[2]

タンパク質凝集体の一般的な再生法では、高濃度変性剤を用いて凝集体を可溶化し、変性剤を希釈や透析によって除々に取り除く過程でリフォールディングを誘起する。しかし、煩雑な操作と大量廃水を必要とし、さらに高い割合で再凝集が起こってしまう。本研究では、イオン液体（IL）の構成イオンを適切に選択し、少量の水を添加した水和イオン液体(HyILs)を溶媒としたタンパク質凝集体の再生を評価した。具体的には、糖鎖認識能を有し、免疫学試験などにも使用されるconcanavalin A（ConA）を用いて、凝集体の高濃度溶解と糖鎖認識能の再生に及ぼすイオン構造を検討した。また、市販の凍結乾燥ConAに含まれる糖鎖認識能の低いConAをHyILs処理により認識能が改善される可能性について検討した。

Fig.1に示すILsに対して水のモル比が1:3、1:7、1:15となるようHyILsを調整した。凝集ConAをHyILsに添加、混合後、遠心分離を行った上澄みの蛍光スペクトル解析により溶解性を検討した。蛍光測定後、各サンプルをリン酸bufferで希釈し、マンノースに対するCon Aの糖鎖認識能の再生をバイオレイヤー緩衝法により評価した。凍結乾燥ConAについても含水率の異なるHyIL中に溶解後、リン酸bufferで希釈し、糖鎖認識能を評価した。

凝集ConAの溶解性へのカチオンの影響を検討した結果、環構造や水酸基を有するカチオンからなるHyILs中への溶解性は低いことが明らかとなった。一方、ホスホニウム系及びアンモニウム系カチオンからなるHyILsは凝集ConAの高い溶解能を示した。また、dhpアニオンを成分にすると溶解度は向上した。さらに、アルキル鎖長及び含水率により溶解性は異なり、含水率が1:3でアルキル鎖長の総炭素数が16となる場合に良好な溶解度が観測された。HyILs中に溶解した凝集ConAをbufferで希釈後、糖鎖認識能を測定した結果、Hy[N8888][dhp]およびHy[P44412][dhp]に溶解後のConAは糖鎖認識能の再生が認められた[1]。凍結乾燥ConAでは、含水率1:3でdhpアニオンからなるHyILに溶解後、糖鎖認識能の向上が確認された[2]。

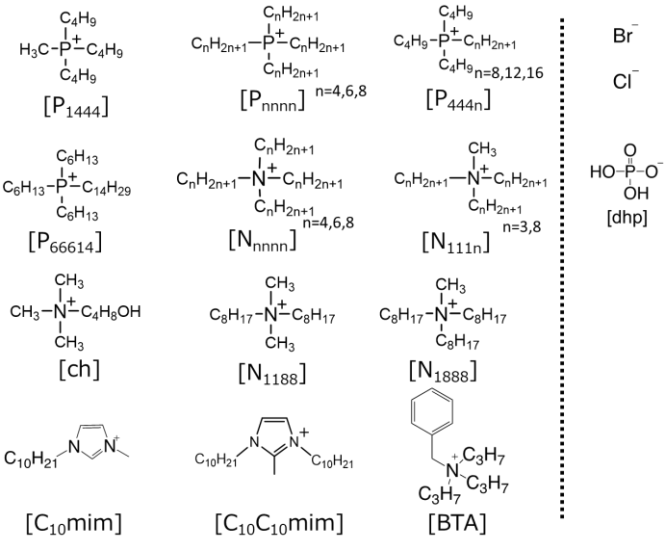


Fig. 1 Structure of component ions used in this study

References

1. K. Fujita, R. Nakano, R. Nakaba, N. Nakamura, H. Ohno, *Chem. Commun.*, **55**, 3563, 2019.
2. K. Fujita, R. Fujii, K. Ichida, *Appl. Sci.*, **11**, 57, 2021.

Oral(second day)

Thu. Sep 9, 2021 9:00 AM - 10:00 AM JST | Thu. Sep 9, 2021 12:00 AM - 1:00 AM UTC | Room B Zoom

Molecular recognition, Supramolecules, Model systems

Chair: Kohei Sato (Tokyo Institute of Tech.)

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

[2B-01] Formation of giant cyclic complexes from a flexible tripeptide

Yui Sato[2], Shoko Tanaka[2], *Ryosuke Miyake[1,2] (1. Ochanomizu University, 2. Ochanomizu University)

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

[2B-02] Photo-triggered spatially controlled out-of-equilibrium patterns of peptide nanofibers in a self-sorting supramolecular double network hydrogel

*Keisuke Nakamura[1], Wataru Tanaka[1], Kei Sada[1], Ryou Kubota[1], Itaru Hamachi[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University , 2. JST ERATO)

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

[2B-03] Dynamic protease activation on a hexameric protein scaffold via adaptable DNA-based recruitment domains

*Tsuyoshi Mashima[1,2], Takashi Hayashi[3], Luc Brunsveld[2] (1. Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology, 2. Department of Biomedical Engineering, Eindhoven University of Technology, 3. Graduate School of Engineering, Osaka University)

柔軟なトリペプチドが作り出す巨大環状錯体とその形成機構

佐藤優衣・田中頌子・○三宅亮介（お茶大院理）

Formation of giant cyclic complexes from a flexible tripeptide (Graduate School of Sciences and Humanities, Ochanomizu University) SATO, Yui; TANAKA Shoko；MIYAKE, Ryosuke

生体のように柔軟かつ巨大な空間を人工的に形成することは、複合機能創出に向けて重要な課題の一つである。最近、当研究室では、柔軟なトリペプチド配位子から直径約 2 nm の巨大な空間を持つ環状錯体の合成に成功した[1]。配位子 **1** は主鎖骨格にメチレン基を持ち非常に柔軟であるため、結晶化条件のわずかな差により、カテナン錯体（$[\mathbf{1}_{28}Ni_{28}]^{56+}$）、12 核環状錯体（$[\mathbf{1}_{12}Ni_{12}]^{24+}$）と 14 核環状錯体（$[\mathbf{1}_{14}Ni_{14}]^{28+}$）の３種類の構造が得られた（図１）。これらの作り分け過程を明らかにすることは、生体のように限られた構成要素から人工的に多様な機能を創出できるシステムの設計指針の獲得に向けて非常に重要である。本発表では、これら３種類の巨大環状錯体の構造および、溶液中での挙動について報告する。

まず、溶液中での巨大環状錯体の構造を、小角 X 線散乱 (SAXS)で調べ、３種類の巨大環状錯体の各溶液が、それぞれの結晶構造からの予測とよく一致する散乱パターンを示した。このことから、本来巨大環状錯体の結晶が得られない希薄条件でも、巨大環状錯体は少なくとも数時間以上は安定であることが示唆された。室温で数日以上経過すると、溶液の SAXS パターンが変化することから、これらの巨大構造の解離は活性化エネルギーが大きく、一度形成するとしばらく変化しないことがわかった。したがって、巨大環状錯体の作り分けは、速度論的に起きると考えられた。このことは、水溶液からしか得られないカテナン錯体の結晶を、水・アセトニトリル溶液から再結晶した場合に得られたことからも確認ができた。発表では、これらの構造の作り分け要因についても合わせて報告する。

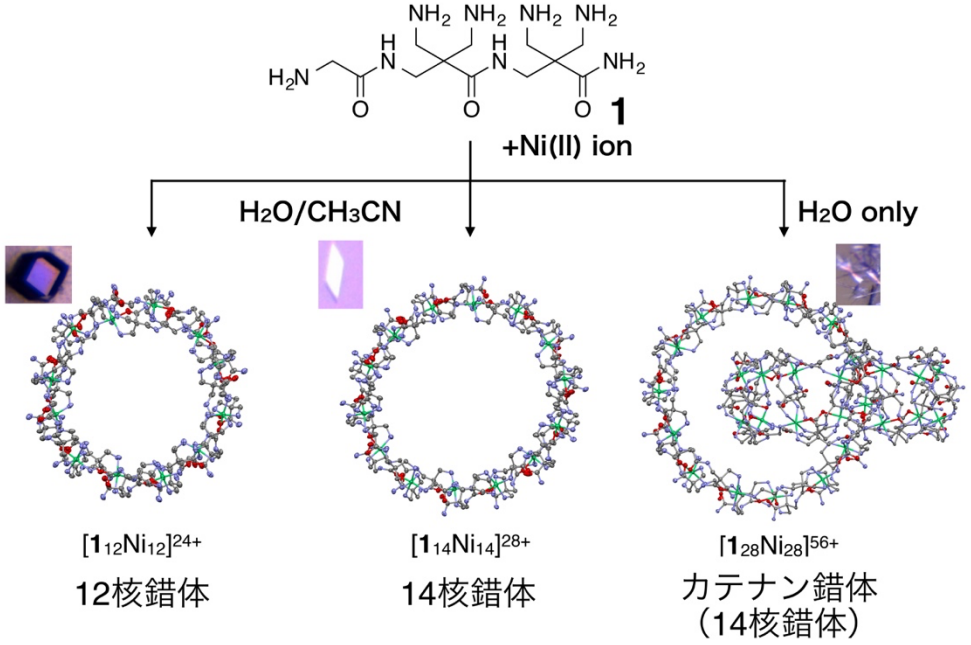


図 1. トリペプチド **1** から形成する３種類の巨大環状錯体の構造とその形成条件

1) Miyake, R.; Ando, A.; Ueno, M.; Muraoka, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 8675-8679.

謝辞：SAXS 測定は、高エネ研の清水伸隆教授、米澤健人博士に行っていただいた。この場をお借りして御礼申し上げます。

Self-sorting 型超分子ゲルにおける光駆動非平衡パターン形成

○中村圭佑[1]・田中 航[1]・佐田 圭[1]・窪田 亮[1]・浜地 格[1,2]（[1]京大院工、[2]JST ERATO）

Photo-triggered spatially controlled out-of-equilibrium patterns of peptide nanofibers in a self-sorting supramolecular double network hydrogels (Graduate School of Engineering, Kyoto University[1], JST ERATO [2]) NAKAMURA, Keisuke[1]; TANAKA, Wataru[1]; SADA, kei[1]; KUBOTA, Ryou[1]; HAMACHI, Itrau[1,2]

生物は、細胞間シグナル伝達から表皮模様形成に至るまで様々なスケールの空間パターンを形成する。こうしたパターンは、複数のシグナル分子の拡散とシグナル分子間の反応による非平衡な反応・拡散システムを介して自発的に形成される。生命の作り出す複雑な非平衡パターンを人工分子系で再現できれば、構造や機能が高次に制御された自己組織化材料の開発が可能となる。これまでに無機塩やナノ粒子などの拡散と沈殿形成を利用した非平衡パターンがいくつか報告されているものの、有機分子による例は特に限られており、それらを合理設計するための指針はない。また、非平衡パターン構造の精密制御は困難であり、光など外部刺激で操作可能な方法論が望まれる。

我々は、複数の有機小分子（ゲル化剤）が self-sorting（自己認識・他者排除）することで形成する Self-sorting double network (SDN) ヒドロゲルの機能開拓を行ってきた[1,2]。本研究では、可逆的な光応答性を付与した SDN ヒドロゲルが光照射に伴って非平衡パターンを形成することを見出した (*Fig.* A)。具体的には、光応答性のペプチド型ゲル化剤 BHz-F(F)F(F)と脂質型ゲル化剤 Phos-cycC$_6$ からなる SDN ヒドロゲルを設計した (*Fig.* B)。BHz-F(F)F(F)はアシルヒドラゾン構造を光・熱応答性部位として、325 nm の紫外光により *E*→*Z*、熱により *Z*→*E* と可逆的に異性化が進行する。この SDN ヒドロゲルのネットワーク構造を共焦点顕微鏡 (CLSM) で観察すると、紫外光照射によりペプチドファイバーが崩壊し、その後室温静置で再形成する事が確認された。

次に、SDN ヒドロゲルに対して線状のフォトマスクを用いて部分的な光照射を行った。光照射直後、照射部位でのみペプチドファイバーの崩壊が確認された。その後室温静置により、ペプチドファイバーの再形成が確認された。さらに時間経過観察を行うと、興味深いことに、ペプチドファイバーの蛍光が非照射部位で減少し光照射部位で上昇することで濃縮された線状パターンが形成されることを見出した (*Fig.* C)。詳細な解析から、光照射部位で熱力学的に安定な構造のペプチドファイバーが、非照射部位の準安定なペプチドファイバーからモノマーを供給されることによって再形成する非平衡なパターン形成現象である事が明らかとなった。

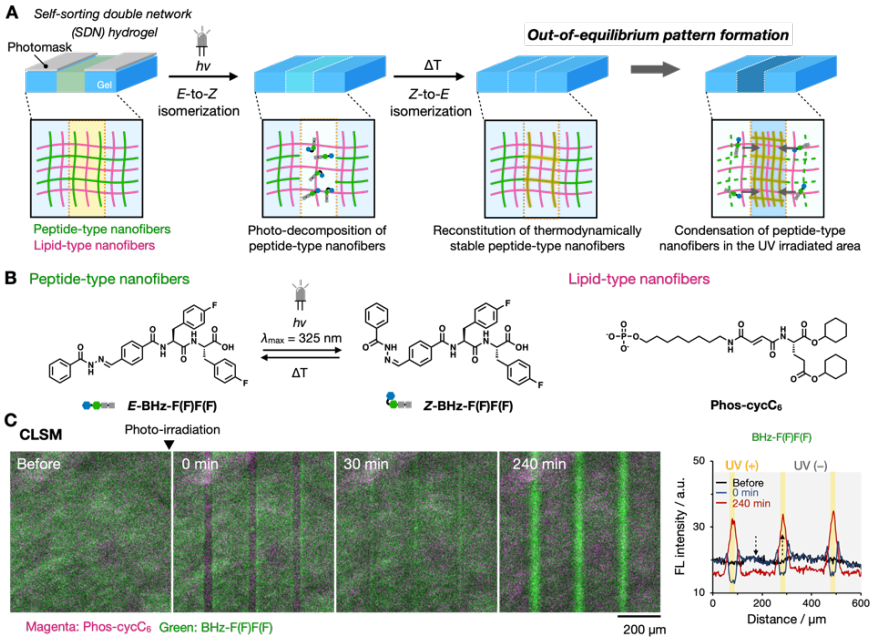


Fig. (**A**) Schematic illustration of this work (**B**) Chemical structures of the gelators (**C**) CLSM imaging of the out-of-equilibrium pattern formation

1) Onogi, S. *et al.*, *Nat. Chem.* 8, 743-752 (**2016**). 2) Shigemitsu, H. *et al.*, *Nat. Nanotechol.* 13, 165-172 (**2018**).

六量体タンパク質を基盤としたDNA相互作用によるカスパーゼ9の集合化と活性評価

○真島 剛史[1,2]・林 高史[3]・Luc Brunsveld[2] ([1]奈良先端大物質、[2]アイントホーフェン工科大、[3]阪大院工）

Dynamic protease activation on a hexameric protein scaffold via adaptable DNA-based recruitment domains (Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology[1], Department of Biomedical Engineering, Eindhoven University of Technology[2], Graduate School of Engineering, Osaka University[3]) MASHIMA, Tsuyoshi[1,2]; HAYASHI, Takashi[3]; BRUNSVELD, Luc[2]

カスパーゼ9は、細胞の自己死システムであるアポトーシスにおいて重要な役割を果たすタンパク質の一つであり、アポトソームと呼ばれるタンパク質集合体へと複数のカスパーゼ9が集合化され、近接効果により活性化される。本研究では、DNA相互作用を用いた6量体ヘムタンパク質(HTHP)上へカスパーゼ9を集合化することで近接効果によって活性化をおこない、アポトソームのモデルとなるタンパク質複合系の構築に取り組んだ(Figure 1)。

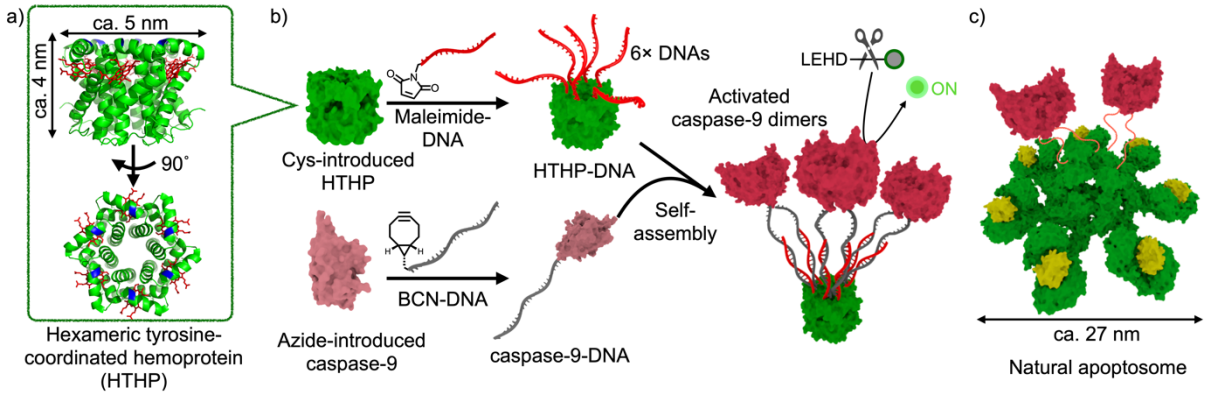


Figure 1. a) Crystal structure of HTHP (PBD ID: 2OYY), red molecules: heme b, blue parts: cysteine-introduced residue, V44. b) Schematic representation of preparation of ssDNA-introduced HTHP and Caspase-9 monomer (light red), and the assembled structure. Proximity-induced activity of caspase-9 dimers (deep red) is monitored using the Ac-LEHD-AFC substrate. c) Structure of the natural apoptosome that activates tethered caspase-9 via proximity-induced dimerization. Cytochrome *c* is indicated in yellow.

カスパーゼ9とHTHPへ共有結合的に一本鎖DNAを導入し、集合化の足場となるDNAが結合したHTHP(HTHP-DNA)存在化でのカスパーゼ9の活性を、蛍光性ペプチド基質(Ac-LEHD-AFC)を用いて評価した。対応するDNAをもつHTHP足場存在下でのみ、カスパーゼ9の活性向上が確認された。また、HTHP-DNAの濃度増加により、活性の低下が確認され、足場上でのカスパーゼ9の集合化と近接効果による活性化が示唆された。さらに、DNAの配列を変更することで結合強度を調整できることを利用し、外部から特定のssDNAを系中に添加することでカスパーゼの集合化状態を制御し、活性のスイッチングが可能であることを確かめた。さらに、活性阻害足場となるDNAが一つだけ結合されたHTHPを調製し、同様の足場上にありながらカスパーゼを孤立させることでの不活性化を達成し、本系が足場上での集合化数の制御と、それによる活性制御が可能であることを示した。

参考文献
T. Mashima *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*, 11262–11266.

Oral(second day)

Thu. Sep 9, 2021 10:10 AM - 11:10 AM JST | Thu. Sep 9, 2021 1:10 AM - 2:10 AM UTC | Room B Zoom

Molecular recognition, Supramolecules, Model systems / Sugars, Lipids

Chair: Ryou Kubota (Kyoto Univ.)

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

[2B-04] Development of novel higher-order structures based on the control of molecular assembly behavior associated with polyion complex formation using oligonucleotides

*Hiroshi Kamizawa[1], Tomoki Maruyama[1], Yiwei Liu[1], Teruki Nii[1,2], Kanjiro Miyata[3], Takeshi Mori[1,2], Yoshiki Katayama[1,2,4], Akihiro Kishimura[1,2,4] (1. Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University, 2. Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kyushu Univ., 3. Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo., 4. International Research Center for Molecular Systems, Kyushu University)

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

[2B-05] Domain formation affected by temperature and added polyamines in charged lipids-containing biomimetic membranes

*JINGYU GUO[1], Hiroaki Ito[2], Yuji Higuchi[3], Ryota Hidese [4], Shinsuke Fujiwara[5], Naofumi Shimokawa[1], Masahiro Takagi[1] (1. materials.JAIST, 2. Chiba University, 3. The University of Tokyo, 4. Kobe University, 5. Kwansei-Gakuin University)

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

[2B-06] Interaction of cell-sized lipid vesicles with key flavors in sake

*Tsuyoshi Yoda[1] (1. Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center, Hachinohe Industrial Research Institute)

ポリイオンコンプレックス形成に伴う分子集合挙動の制御に基づく新規オリゴ核酸高次構造体の構築

○神澤 大志[1]・丸山 朋輝[1]・劉 一イ[1]・新居 輝樹[1,2]・宮田 完二郎[3]・森 健[1,2]・片山 佳樹[1,2]・岸村 顕広[1,2]（[1]九大院システム生命、[2]九大院工、[3]東大院工）

Development of novel higher-order structures based on the control of molecular assembly behavior associated with polyion complex formation using oligonucleotides (Grad. Sch. Sys. Life Sci, Kyushu Univ[1], Dept. of Applied Chem., Fac. of Eng., Kyushu Univ[2], Dept. of Mater Eng., Grad. Sch. Eng., The Univ. of Tokyo[3]) KAMIZAWA, Hiroshi[1]; MARUYAMA, Tomoki[1]; LIU, Yiwei[1]; NII, Teruki[1,2]; MIYATA, Kanjiro[3]; MORI, Takeshi[1,2]; KATAYAMA, Yoshiki[1,2]; KISHIMURA, Akihiro[1,2]

ポリエチレングリコール（PEG）とフレキシブルなポリイオンからなるブロック共重合体型ポリアニオンとフレキシブルなポリカチオンを混合することでポリイオンコンプレックス（PIC）集合体を作製することができる。用いるポリイオンの荷電が中和される条件では、集合体全体に含まれる PEG の含有率（f_{PEG}）に依存して球状ミセルやベシクルなど生じるナノ構造の制御ができる。一方で、特徴ある形状を持つポリイオンを用いる場合、その特徴を反映した構造を得ることができる。さらに、PIC を形成する荷電性ポリマー同士の荷電比を調節することでも集合構造の制御が可能であり、また、集合化のダイナミクスも変化する。本研究では、個性の強い構成分子として医薬品としての活用も期待される miRNA（剛直円筒状構造で平滑末端を有する二本鎖オリゴ核酸, 23 bp）に注目し、これとホモ poly-L-lysine (PLL)との PIC 形成を起点とし、第三成分として PEG-ポリアスパラギン酸ブロック共重合体（PEG-PAsp）を用いることで、集合化挙動の制御を行うことを狙った。PLL と miRNA の混合では特定の構造を持つ会合体を形成することは期待できないが、この会合プロセスに PEG-PAsp を存在させた場合、静電相互作用に基づき構成成分が一旦まとめて集合化すると考えられる。その後、コンポーネント間のアフィニティの差により相分離を起こすことで、単純混合では得難い miRNA 集積構造の形成が期待できる(Fig. 1)。得られる集合体は f_{PEG} だけでなく、加える制御ポリマーやコンポーネントの構造の組み合わせを変えていくことで集合形態を制御可能と考えられる。本研究では、特に、ポリイオン、および miRNA 由来の総荷電が中和される条件を選び、PIC を調製した。加えて、実用条件（生理的条件）での潜在的有用性を評価するため、生理的条件の範囲で環境変化させた場合に起こる形態変化の解析を行った。

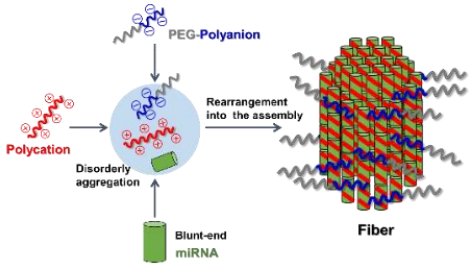


Fig. 1. Schematic Illustration of Fiber formation

PIC の調製は、異なる濃度の miRNA 溶液に対して PEG-ポリアニオン溶液を添加後、ホモポリカチオン溶液を混合することで行った。混合溶液内の総荷電が中和する混合条件では白色沈殿が生じ、走査型電子顕微鏡で観察したところ、長さが μm スケールのファイバー構造を確認できた (Fig. 2)。ファイバーは miRNA の末端同士のスタッキングに基づき一次元方向への成長が起こり、それを取り囲む PEG 鎖によりそのバンドル化が制御された集合体だと考えられる。さらに、温度をはじめとする外部環境を変化させた条件下でファイバーをインキュベートすると、環境応答的にファイバーが顆粒やテープ状構造体へと不可逆的な形態変化を示した (Fig. 2)。これはファイバーの構成要素が溶液内へ放出されるなどして生じた変化と考えられ、形態変化は分子集合体の準安定状態から安定状態への変化であると考えられる。

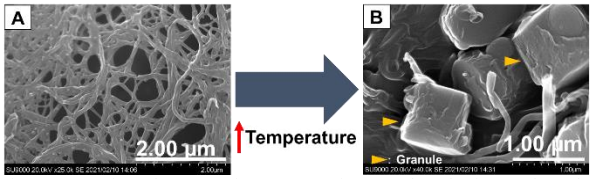


Fig. 2. Scanning electron microscopy micrographs of miRNA-based PICs: The fibrous structure (A) and granules (B).

荷電脂質含む生体模倣膜でのポリアミンによるドメイン形成と温度安定性

○郭ジンウ, 伊藤弘明[A], 樋口祐次[B], 秀瀬涼太[C], 藤原伸介[D], 下川直史, 高木昌宏
（北陸先端大マテリアル, 千葉大院理[A], 東大物性研[B], 神戸大院・科技イノベ[C],
関西学院大・生命環境[D]）

Domain formation affected by temperature and added polyamines in charged lipids-containing biomimetic membranes (JAIST, Chiba University [A], The University of Tokyo [B], Kobe University [C], Kwansei-Gakuin University [D]) J. Guo, H. Ito [A], Y. Higuchi [B], R. Hidese [C], S. Fujiwara [D], N. Shimokawa, M. Takagi,

【背景】リン脂質が水中で自発的に形成する二重膜が丸く閉じた構造はリポソームと呼ばれ、生体模倣膜と見なされている。多成分リポソームでは低温などの条件で組成の不均一な相分離構造が形成される。この相分離構造は、細胞膜面上の情報伝達において重要な役割を担っている脂質ラフトとの関係から広く注目されている。多くの相分離研究では電気的に中性な脂質が用いられてきた。しかし、生体膜に存在する電荷を持つリン脂質や、それと相互作用する細胞膜内外の金属イオン・アミン類分子の存在を考慮することは重要である。ポリアミンは生体に必須な生体分子とされており、核酸と相互作用し遺伝子発現を制御することや、DNA 立体構造を影響することなどの重要な役割を持つとされているが、その詳細な機序や生体膜・荷電脂質との関係は明らかになっていない[1]。したがって、静電相互作用、金属イオン・アミン類の存在も考慮する生体環境に近い条件下で相分離構造を制御することは重要である。先行研究では、荷電脂質を含む生体模倣膜での相分離ドメイン形成、金属イオンの添加による相分離の促進などが報告されている[2-4]。そこで、荷電脂質を含む生体模倣膜の相分離構造制御として、我々は荷電脂質を含む生体模倣膜にポリアミンを含む様々な塩を添加し、3 つの温度において相分離ドメインの観察を行った。

【実験方法】脂質は負電荷不飽和脂質 DOPS、中性飽和脂質 DPPC、コレステロール(Chol)を用いた。蛍光試薬としてローダミン DHPE と NBD-PE を用いた。リポソームは水和時に価数や構造の異なる１１種類の塩溶液をそれぞれ用いて作成した。相分離ドメインの観察では、室温、30℃、40℃の条件下で蛍光顕微鏡・共焦点レーザー顕微鏡により行った。

【結果・考察】リポソームは DOPS/DPPC/Chol=40/40/20 の組成比によって作成された。塩を加えていない場合、相分離は観察されず、これは DOPS 間で静電反発がドメインの形成を阻害したと考えた。一方、塩を加えると、すべての塩においても、濃度を上昇させるにつれて相分離ドメインの形成が促進された。同じ価数の塩でも、種類によって相分離を引き起こす濃度は大きく異なっていた。基本的な傾向として、温度が低いほど、価数が大きいほど、カチオンサイズが小さいほど相分離を引き起こす濃度が低いことを明らかにした。観察が行われた温度、添加された塩の価数、サイズ、分子構造が相分離ドメインに及ぼす影響を詳しく議論する。

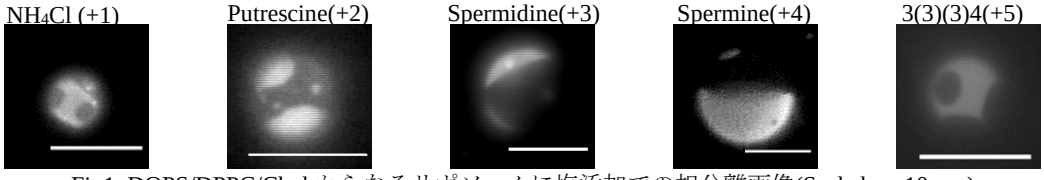


Fig1. DOPS/DPPC/Chol からなるリポソームに塩添加での相分離画像(Scale bar :10 μm)

【参考文献】

[1] R. Hidese, et al., *The FEBS journal*, **284(21)**: 3684-3701 (2017)
[2] N. Shimokawa, et al., *Chem. Phys. Lett.*, **496**, 59-63 (2010).
[3] H. Himeno, et al., *Soft Matter*, **10**, 7959-7967 (2014).
[4] J. Guo, et al., *Langmuir*, in press (2021).

酒の主要芳香成分と細胞サイズ脂質小胞の相互作用

○依田　毅[1]（[1]青森産技八工研）

Interaction of cell-sized lipid vesicles with key flavors in sake (Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center, Hachinohe Industrial Research Institute[1]) YODA, Tsuyoshi[1]

【背景・目的】

カプロン酸エチル(EC)と酢酸イソアミル(IA)は、酒の醸造過程において主要な吟醸香である。最近では、酒中の EC や IA などの香気成分の含有量を増やす取り組みが進んでいた。酵母細胞内で、EC はカプロン酸(CA)、IA はイソアミルアルコール(IAA)を主要な前駆体として産生される一方で、前駆体である CA や IAA は酒の品質に悪影響を与える匂いの物質としても知られていた。我々は、EC が脂質小胞に含まれている場合、小胞のサイズが濃度依存的に減少することを発見した[1]。EC および CA を含有させたときと同様に、IA もしくは IAA を含む脂質小胞を観察したところ、IA および IAA 含有脂質小胞においてもサイズの減少が観察された[2]。本発表では、これら吟醸香溶液を作製した不飽和脂質 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DOPC)からなる細胞サイズ脂質小胞と混合させ、位相差光学顕微鏡による直接観察を行うことで、吟醸香成分との相互作用を及ぼすかどうか調べた。

【結果・考察】

揺らいだ膜小胞の割合や膜の動的構造変化の様子が吟醸香や前駆体の成分ごとに異なったため、観察 10 分間以内でどのように変化するのかを溶媒をメタノール水の時と、清酒の成分で有るエタノール水の場合に分け、さらに詳細に観察した。

溶媒がメタノール水系の場合、EC では揺らいだだけのもの、外への小胞の吐き出し、ひもができる、チューブ状になる順で多かった。CA では揺らいだのみ、中へ陥入、ひもが出来る、チューブ状になる順で多かった。IA では揺らいだだけ、中に陥入、チューブ状になったものと、そとへ小胞をはき出したもの、という順に膜変形が起きた。IAA では揺らぎのみ、中への陥入、外への吐き出しの順であった。

溶媒がエタノール水系の場合、EC では揺らいだだけのもの、チューブ状になるとひもができるものが同率で二番目、以下、外への小胞の吐き出し、中に陥入、中に小胞ができる、の順であった。CA では外への小胞の吐き出し、チューブ状になると中に小胞ができるが同率で二番目、揺らいだのみとひもが出来るが同率で四番目、そして中へ陥入の順であった。IA ではひもが出来る、揺らいだだけ、中に陥入、チューブ状になったものと外へ小胞をはき出したものが同率、という順に膜変形の結果が多くなった。IAA ではひもが出来るが最も多く、次に中への陥入、以下チューブ状、外への吐き出しと揺らぎのみが同率、内部に小胞ができるの順で多くなった。

またいずれの条件でも、揺らがずにサイズが減少するのみの小胞も観察できた。

揺らぐダイナミクスの割合の大小や揺らがずにサイズが減少する小胞の割合での判別は難しい一方、各吟醸香成分や前駆体成分溶液での膜ダイナミクス発生頻度による特徴づけを行うことで、吟醸香成分が特定できる可能性が示唆された。今後はこの成果をもとに、相当経験を積んだ複数人による官能評価や分析機器を用いる現在の評価方法よりも簡単に飲料中の香り成分含有量を判別できる系の開発へ役立てたい。

【謝辞】

本研究は公益財団法人コニカミノルタ科学技術振興財団コニカミノルタ画像科学奨励賞、公益財団法人松籟科学技術振興財団第 39 回研究助成、公益財団法人インテリジェント・コスモス学術振興財団インテリジェント・コスモス奨励賞、科学研究費若手研究の助成によって行われた。深く謝意を表する。

【参考文献】1) Tsuyoshi Yoda, Akira Ogura, and Tomoaki Saito. *Biomimetics* (2020): 5(2), 16.

2) Tsuyoshi Yoda and Tomoaki Saito. *Membranes* (2020): 10(12), 440

Oral(second day)

Thu. Sep 9, 2021 1:20 PM - 2:00 PM JST | Thu. Sep 9, 2021 4:20 AM - 5:00 AM UTC | Room B Zoom

Sugar, Lipids

Chair: Yoshiyuki Manabe (Osaka Univ.)

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

[2B-07] Interaction between membrane proteins and glycolipid MPIase (Membrane Protein Integrase)

*Shoko Mori[1,2], Kaoru Nomura[1], Kohki Fujikawa[1], Tsukiho Osawa[1], Ken-ichi Nishiyama[3], Keiko Shimamoto[1,2] (1. Suntory Foundation for Life Sciences, 2. Graduate School of Science, Osaka University, 3. Faculty of Agriculture, Iwate University)

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

[2B-08] Turn-on Fluorescent Imaging of Gangliosides Based on Dansyl Tri-arginine Peptide

*Kazunori Matsuura[1], Koichi Hisamoto[1], Tomoya Tanaka[1], Mizuki Okazaki[1], Hiroshi Inaba[1] (1. Graduate School of Eng., Tottori University)

膜蛋白質膜挿入に関わる糖脂質因子と基質蛋白質の相互作用解析

○森祥子[1,2]・野村薫[1]・藤川紘樹[1]・大澤月穂[1]・西山賢一[3]・島本啓子[1,2]（[1]サントリー生科財団、[2]阪大院理、[3]岩手大農）

Interaction between membrane proteins and glycolipid MPIase (Membrane Protein Integrase) (Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for Life Sciences[1], Graduate School of Science, Osaka University[2], Faculty of Agriculture, Iwate University [3]) MORI, Shoko[1,2]; NOMURA, Kaoru[1]; FUJIKAWA, Kohki[1]; OSAWA, Tsukiho[1]; NISHIYAMA, Ken-ichi[3]; SHIMAMOTO, Keiko[1,2]

リボソームで合成された膜蛋白質の膜挿入には、Sec トランスロコンに代表される蛋白質性因子が関わるが、我々は、大腸菌膜中の微量糖脂質である MPIase（Membrane Protein Integrase）も膜挿入に必須であることを見出し[1]、MPIase 類縁体を有機合成し構造活性相関研究を進めている[2]。これまでに、脂質膜中に存在する MPIase がその膜物性を変化させることで膜蛋白質の膜挿入を制御することが示唆されたが[3]、MPIase と基質蛋白質の直接的な相互作用は証明されていなかった。

本研究では MPIase の作用機構を明らかにするため、モデル基質である Pf3 蛋白質との溶液中における分子間相互作用を主に物理化学的手法を用いて解析した。CD 測定により、Pf3 蛋白質の立体構造が MPIase 存在下で変化することが判った。SPR 測定では、MPIase 類縁体と Pf3 蛋白質との相互作用が観測されたが、ピロリン酸を除くと親和性は著しく低下した。また、長い糖鎖を有する天然体の MPIase と最小構造である３糖の mini-MPIase-3 の性質を比較すると、親和性に大きな違いはないものの、結合および解離速度定数が異なることが明らかとなった。さらに、３糖ユニットおよびリン酸基に着目し、ドッキングシミュレーションおよび STD-NMR による解析も実施した。本研究の結果、MPIase は長い糖鎖で基質蛋白質を捕捉して、その凝集を抑制するシャペロン様活性が実証できた。また、O アセチル基、リン酸基、長い糖鎖といった MPIase の部分構造が、分子間相互作用に寄与することが示された。

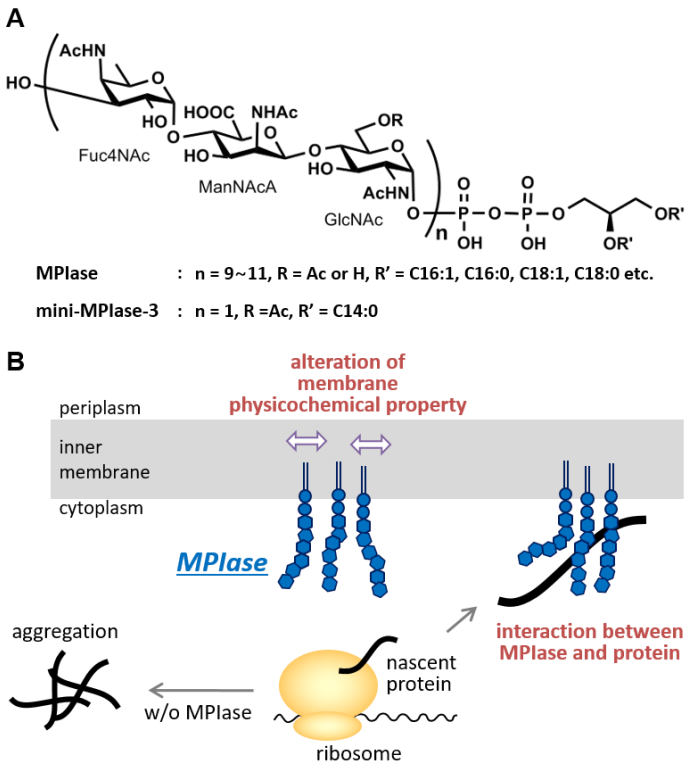


Fig 1. (A) Structure of MPIase and mini-MPIase-3. (B) Schematic illustration for the initial event of membrane protein integration in *E. coli* with MPIase. Glycans of MPIase capture nascent proteins and prevent them from aggregation.

1) K. Nishiyama, M. Maeda, K. Yanagisawa, R. Nagase, H. Komura, T. Iwashita, T. Yamagaki, S. Kusumoto, H. Tokuda, K. Shimamoto, *Nat. Commun.* **3**, 1260 (2012).
2) K. Fujikawa, S. Suzuki, R. Nagase, S. Ikeda, S. Mori, K. Nomura, K. Nishiyama, K. Shimamoto, *ACS Chem. Biol.* **13**, 2719–2727 (2018).
3) K. Nomura, T. Yamaguchi, S. Mori, K. Fujikawa, K. Nishiyama, T. Shimanouchi, Y. Tanimoto, K. Morigaki, K. Shimamoto, *Biophys. J.* **117**, 99–110 (2019).

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

ダンシルトリアルギニンペプチドによるガングリオシドの Turn-On 蛍光イメージング

○松浦和則・久本晃一・田中智也・岡崎瑞紀・稲葉 央（鳥取大院工）

Turn-on Fluorescent Imaging of Gangliosides Based on Dansyl Tri-arginine Peptide (Graduate School of Engineering, Tottori University) MATSUURA, Kazunori; HISAMOTO, Koichi; TANAKA, Tomoya; OKAZAKI, Mizuki; INABA, Hiroshi

シアル酸含有糖脂質ガングリオシド(GM1, GM2, GM3 など)は、細胞の分化・増殖・ウイルス感染などの様々な生命現象に関与しており、悪性腫瘍において過剰に発現していることから、癌バイオマーカーとしても注目されている。これまで、ガングリオシドを蛍光イメージングするプローブとして、蛍光ラベルした抗 GM1 抗体やレクチンが用いられているが、解析が容易である「Turn-On 型」低分子プローブの開発は未発達である。本研究では、ガングリオシドを認識する Turn-On 型低分子蛍光プローブとして、疎水性環境下で蛍光増大する Dansyl 基を有する Dansyl-$(Arg)_3$-OMe を開発し、ガングリオシドミセルへの結合挙動の評価、およびジャイアントリポソーム(GL)上でのガングリオシドの Turn-ON 蛍光イメージングを行った（Fig.1）[1]。

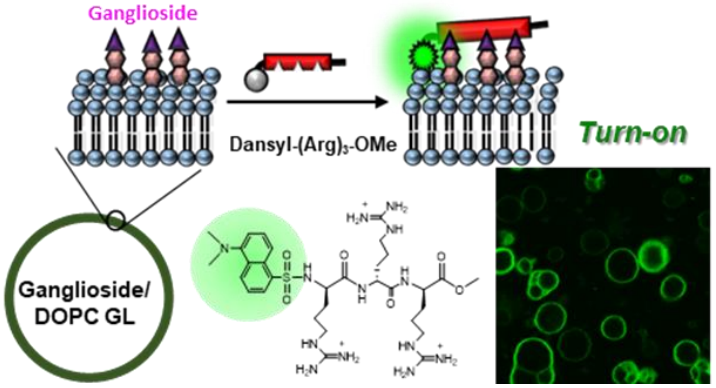


Figure 1. Illustration of fluorescence turn-on of Dansyl-$(Arg)_3$-OMe on giant liposome of DOPC containing gangliosides.

Dansyl-$(Arg)_3$-OMe は Fmoc 固相法で合成した。蛍光滴定実験から、このプローブは $10^5\ M^{-1}$ 程度の会合定数でガングリオシドや DOPG 等のアニオン性脂質のミセルに結合し、蛍光強度が 6~7 倍増大することがわかった。DOPC からなるジャイアントリポソーム(GL)上にこのプローブを添加して CLSM 観察したところ、ガングリオシドの含有量に応じて GL 表面での蛍光強度が増大することがわかった。一方、Sulfatide や DOPG を有する GL では、ガングリオシド含有 GL と比べて有意に蛍光強度が低く、両性イオン脂質 SM やシアル酸を有さない LacCer 含有 GL では殆ど蛍光を示さなかった（Fig.2）。これらのことから、GL 上のガングリオシドの Turn-on 蛍光イメージングに成功した [1]。

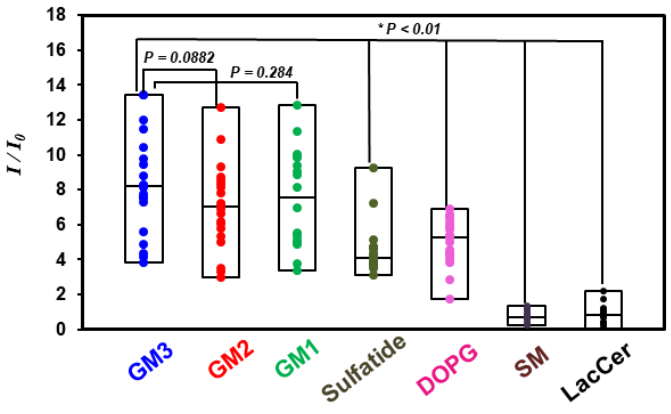


Figure 2. Box plot of fluorescence intensity distribution of 10 μM Dansyl-$(Arg)_3$-OMe on DOPC giant liposomes (N = 20 each) containing 40% gangliosides, sulfatide, DOPG, SM, or LacCer.

1) K. Matsuura, K. Hisamoto, T. Tanaka, R. Sakamoto, M. Okazaki, H. Inaba, ***ACS Org. Inorg. Au***, accepted.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

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

©Division of Biofunctional Chemistry, The Chemical Society of Japan, Biotechnology Subcommittee

Invited Lecture

Thu. Sep 9, 2021 4:50 PM - 5:40 PM JST | Thu. Sep 9, 2021 7:50 AM - 8:40 AM UTC | Room A Zoom

Invited Lecture (Prof. Hiroyuki Asanuma)

Chair: Kazunori Matsuura (Tottori Univ.)

4:50 PM - 5:40 PM JST | 7:50 AM - 8:40 AM UTC

[2IL-01] Fantasizing the world before RNA

*Hiroyuki Asanuma[1] (1. Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.)

RNA 以前の世界を妄想する

浅沼　浩之（名大院工）

Fantasizing the world before RNA

ASANUMA, Hiroyuki (Graduate School of Engineering, Nagoya University)

RNA のみで構成される初期生命が存在したという RNA ワールド仮説は広く受け入れられている。では**最初に出現した遺伝物質が RNA** だろうか（＝**RNA first 仮説**）？もしそうならば RNA は原始地球環境下で非酵素的に合成されなければならない。Prebiotic chemist は原始地球を模倣した環境下での RNA 合成と非酵素的鋳型合成を追及してきたが、ribonucleotide の化学合成は極めて困難な上、RNA オリゴマーの鋳型合成の効率も極めて低かった。RNA ワールド成立のためには多くの未解決の問題が山積しており、RNA first 仮説の検証は Prebiotic chemist にとって悪夢とさえ言われている [1]。そこで、構造が単純な Pre-RNA（≒人工核酸）が RNA 以前に存在し、その後に RNA への遺伝物質としての役割の委譲が行われたという、Pre-RNA ワールド仮説が唱えられた [1,2]。幻の Pre-RNA は、1) RNA より構造も合成も簡単で、2) RNA(DNA)と二重鎖形成可能であり、さらに 3) 鋳型依存的複製が非酵素的に十分な効率で起きる必要がある。これまで様々な非リボース骨格型人工核酸が合成され、その中で 1)と 2)を満たす人工核酸は見出されたが、3)の非酵素的な鋳型依存的自己複製が可能な人工核酸は未だに見つからず、Pre-RNA ワールド仮説は停滞していた。

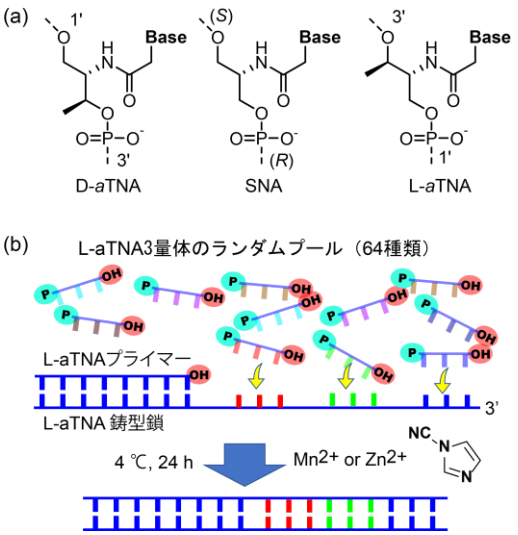


図 1 (a)非環状型人工核酸の構造と、(b) L-*a*TNA の擬似プライマー伸長反応の模式図

一方我々は、光応答性 DNA で長年使用してきた D-threoninol に核酸塩基を導入した人工核酸 acyclic D-Threoninol Nucleic Acid（D-*a*TNA:図 1a）を設計した。興味深いことに PNA を凌駕するほどの安定なホモ二重鎖を形成することが分かったが、残念ながら天然の DNA と RNA を認識できなかった [3]。そこで主鎖のメチル基を色々制御したところ、Serinol および L-threoninol を骨格とした SNA[4]と L-*a*TNA[5]が DNA と RNA を配列特異的に認識した。SNA と L-*a*TNA は骨格がリボースと大きく異なるため酵素の基質にはならないので、生体内で安定に使用できるという長所がある反面、リガーゼやポリメラーゼ等の有用な酵素の基質にもならない。そこで非酵素的ライゲーションを L-*a*TNA に対して試みたところ、天然のリガーゼを凌駕するほどの高活性で化学ライゲーションが進行した。さらに L-*a*TNA3 量体のランダムプールを使用して L-*a*TNA の擬似プライマー伸長反応を試したところ（図 1b）、天然のポリメラーゼの様に鋳型鎖が複製された [6]。すなわち L-*a*TNA は期せずして Pre-RNA の 3 つの条件を備えていた。では L-*a*TNA は Pre-RNA なのだろうか？だとすれば、なぜ L-*a*TNA から RNA へ”進化”したのか？とは言え、Pre-RNA ワールド仮説そのものが RNA first 仮説の困難さから苦し紛れに出てきたものであり、仮説そのものがまだ妄想の域を出ないが、本講演では（勝手ながら）私の妄想を披露させていただく。

参考文献
1) G.F. Joyce and L. E. Orgel, pp.23-56 in “The RNA World 3rd Ed.”, Cold Spring Harb. (2006). 2) 河合剛太、清澤秀孔編、“機能性 RNA の分子生物学” pp.23-40,クバプロ(2010), 3) H. Asanuma et al., *JACS*, **2010**, *132*, 14702. 4) H. Kashida et al., *ACIE*, **2011**, 50, 1285. 5) K. Murayama et al., *Chem. Commun*. **2015**, *51*, 6500. 6) K. Murayama and H. Okita et al., *Nat. Commun*. **2021**, *12*, 804.

Invited Lecture

Thu. Sep 9, 2021 5:40 PM - 6:30 PM JST | Thu. Sep 9, 2021 8:40 AM - 9:30 AM UTC | Room A Zoom

Invited Lecture (Prof. Yoshitsugu Shiro)

Chair: Shingo Nagano (Tottori Univ.)

5:40 PM - 6:30 PM JST | 8:40 AM - 9:30 AM UTC

[2IL-02] Molecular Structural and Functional Studies on Iron-Related Proteins

*Yoshitsugu Shiro[1] (1. Graduate School of Science, University of Hyogo)

分子構造を基盤にした鉄結合タンパク質の機能解明
～生命金属科学への展開をめざして～

○城　宜嗣（兵庫県立大院理）

Molecular Structural and Functional Studies on Iron-Related Proteins (Graduate School of Science, University of Hyogo) SHIRO, Yoshitsugu[1]

鉄 Fe はすべての生物にとって必須の金属元素である。鉄は、生体内での動態，すなわち生体による鉄の吸収，膜輸送，濃度感知，貯蔵をとおして，エネルギー・物質・情報変換系で重要な働きをする多くのタンパク質・酵素の活性中心として活用されている。本講演では、鉄結合酵素の分子科学研究の例として脱窒カビの一酸化窒素還元酵素 NOR（Nitric Oxide Reductases）の構造と機能の関連を明らかにした研究成果と、ヒトにおける鉄の生体内動態の研究の一旦を紹介したい。

・脱窒カビ NOR の構造を基盤にした酵素反応機構の解明

NOR は，カビや細菌などの微生物の嫌気呼吸である脱窒過程で中間生成物として産生される細胞毒性の高い一酸化窒素 NO を亜酸化窒素 N_2O に還元的に変換し（$2NO + 2H^+ + 2e^- \rightarrow N_2O + H_2O$）無毒化する鉄含有酵素である。脱窒カビの NOR の酵素反応中に現れる２つの短寿命反応中間体の Fe–NO 配位構造と電子状態を時間分解可視・赤外分光法と自由電子レーザーを活用した無損傷結晶構造解析法を活用して決定し、NO 還元反応の分子機構を提案した[1, 2]。この酵素反応の反応生成物である N_2O は温室効果ガスであり，成層圏のオゾン層破壊にも大きく関与することから、環境科学の分野にも貢献できる成果である。

・ヒトの鉄吸収に関わるタンパク質の構造と機能の解明

ヒトでは食餌中の鉄は、十二指腸上皮の腸管細胞で吸収される。その際、細胞膜上に存在する鉄還元酵素 Dcyt*b*（Duodenal Cytochrome *b*）が細胞内のアスコルビン酸を使って鉄を三価から二価に還元し、その二価鉄を膜輸送タンパク質 DMT1（Divalent Metal Transporter）が腸管細胞に吸収する。この鉄還元酵素の構造を世界で初めて明らかにし，細胞膜を横切るタンパク質分子内電子移動のメカニズムを議論した。腸管細胞内では、Dcyt*b* と DMT1 に加えて、PCBP2、フェリチン、フェロポーチンなどのタンパク質が鉄動態に関わっているが、それらの相互連関は大きな研究課題である。

・生命金属科学への展開

これらの鉄関連タンパク質の分子レベルの研究は、「これらのタンパク質分子は、細胞内でどのように機能しているのか？それらの分子機能は細胞・個体の機能とどう関連しているのか？」などの疑問に応えるための基盤になると考えられる。この疑問は、鉄だけでなく亜鉛・銅を初めとする生体内で重要な機能を果たしている金属元素、あるいは生体にとって有毒な金属元素にも適用される。これが新学術領域「生命金属科学」の考え方である[4]。講演では、この分野の将来の展望、特に化学への大きな期待についても述べたい。

1. T. Tosha, et al. *Nat. Commun.* **8**, 1585 (2017)
2. T. Nomura, et al. *Proc. Natl. Acd. Sci. USA* 118, e2101481118 (2021)
3. M. Ganasen, et al. *Commun. Biol.* 1: 120 (2018)
4. https://bio-metal.org/

Online Seminar

Thu. Sep 9, 2021 11:20 AM - 12:20 PM JST | Thu. Sep 9, 2021 2:20 AM - 3:20 AM UTC | Room A
Zoom

Life Science Solutions, Inc.

Chair: Noriho Kamiya (Kyushu Univ.)

11:20 AM - 12:20 PM JST | 2:20 AM - 3:20 AM UTC

[2A-OS] Evaluation of protein complex using Mass Photometry

*Kohei Shiba[1] (1. Life Science Solutions, Inc.)

オンラインセミナー

ライフサイエンスソリューションズ株式会社

タイトル：Mass Photometry法を用いた蛋白質の複合体評価

講師：志波公平 様（ライフサイエンスソリューションズ株式会社）

近年の蛋白質科学分野においては、より巨大な分子の成り立ちについての研究が盛んになってきており、一方で、抗体医薬をはじめとする医薬品への応用など、産業分野への展開もまた注目されています。その中において、溶液中における材料としての蛋白質の分布を知ることは重要な要素になってきます。

これまで、溶液中の蛋白質の分布を知る方法としてはクロマトグラフィーを使用する方法や光散乱法を用いた方法がよく知られてきました。しかしながらいずれの方法も分子形状に依存する手法であり、その点が課題とされてきました。

今回ご紹介するMass Photometry 法（MP 法）は、iSCAT 法および画像解析法の複合的手法で、超微量の試料で簡便に分子量分布を獲得できる手法として着目されています。本発表では、MP 法の原理および本手法を用いた英国Refeyn 社製RefeynTwoMP のご紹介、ならびに様々なタンパク質の複合体評価方法のご紹介を行います。

Poster

Thu. Sep 9, 2021 2:40 PM - 3:40 PM JST | Thu. Sep 9, 2021 5:40 AM - 6:40 AM UTC | First half number Zoom

Odd (2P-001~2P-047)

[2P-001] Development of biotinylated PYP-tag probes to elucidate mechanism of GLUT4 translocation

*Koichiro Terashita[1], Yuichiro Hori[1,2], Kazuya Kikuchi[1,2] (1. Division of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Immunology Frontier Research Center, Osaka University)

[2P-003] Structural study of a novel carbazole prenyltransferase that resembles squalene synthase

*Hironori Suemune[1], Ryuhei Nagata[2,3], Masaya Kobayashi[2], Tetsuro Shinada[4], Makoto Nishiyama[5,6], Tomohisa Kuzuyama[2,6], Yusuke Sato[1], Tomoya Hino[1], Shingo Nagano[1] (1. Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. GSALS, UTokyo, 3. JSPS Research Fellow PD, 4. Faculty of Science, Osaka City University, 5. BRC, UTokyo, 6. CRIIM, UTokyo)

[2P-005] Purification of monomeric form of Monobody that specifically binds to the artificial small molecule ligand HPPU

*Endo Koushirou[1], Tsuzuki Naruaki[2], Sato Yusuke[1], Murakami Hiroshi[2,3], Nagano Shingo[1], Hino Tomoya[1] (1. Graduate School of Sustainability Science, Tottori University, 2. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 3. Institute of Nano-Life-Systems, Nagoya University)

[2P-007] Selective Oxidation of B800 Bacteriochlorophyll *a* in LH2 Protein from the Purple Photosynthetic Bacterium *Thermochromatium tepidum*

*Haruna Hirao[1], Yukihiro Kimura[2], Wang-Otomo Zheng-Yu[3], Yoshitaka Saga[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Kindai University, 2. Graduate School of Agriculture, Kobe University, 3. Faculty of Science, Ibaraki University)

[2P-009] Highly efficient tyrosine-specific labeling using laccase

*Keita Nakane[1], Shogo Miyano[1], Shusuke Tomoshige[1], Minoru Ishikawa[1], Shinichi Sato[1,2] (1. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2. Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University)

[2P-011] Construction of RNase S modified artificial virus capsid by reconstruction and evaluation of the anticancer activity

*Yingbing LIANG[1], Junpei OTA[1], Hiroto FURUKAWA[1], Kentaro SAKAMOTO[1], Hiroshi INABA[1], Kazunori MATSUURA[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University)

[2P-013] Interaction analysis of an anti-rheumatic drug with macrophage migration inhibitory factor by precise crystal structure determination using neutron diffraction

*Toshinori Ezawa[1], Takuya Ishida[2], Mitsugu Yamada[2], Taro Tamada[3], Masafumi Odaka[1], Hideki Wakui[1], Hirotoshi Matsumura[1] (1. Graduate School of Engineering Science, Akita University, 2. JEM Utilization Center, JAXA, 3. Institute for Quantum Life Science, QST)

[2P-015] Unique protein assembly behavior by enzyme-catalyzed crosslinking reaction in molecular crowding solution

*Ryo Sato[1], Kosuke Minamihata[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1], Noriho Kamiya[1,2] (1. Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Division of Biotechnology, Center for Future Chemistry, Kyushu University)

[2P-017] Development of Membrane-Permeable PG-Surfactants with Cell Line-Selective Membrane Permeability

*Momoka Yamada[1], Toshihisa Mizuno[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

[2P-019] Hydroxylation of Non-native Substrates Catalyzed by Cytochrome P450BM3 with Aqueous/Ionic Liquid Biphasic System

*Yuki Sugai[1], Shinya Ariyasu[1], Yuya Yokoyama[1], Masayuki Karasawa[1], Yuichiro Aiba[1], Osami Shoji[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

[2P-021] Chemogenetic Regulation of Histamine Receptor Focusing on the Ligand Binding Kinetics

*Shuntaro Kashiwa[1], Tomohiro Doura[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[2P-023] Chemogenetic regulation of adenosine A_{2A} receptor using π-π interactions between receptor and ligands.

*Yuma Matsuoka[1], Takumitsu Syakuno[1], Tomohiro Doura[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Nagoya University)

[2P-025] A novel peptide selenoester synthesis method for efficient peptide ligation

*Masaya Hashimoto[1], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[2P-027] Efficient total chemical synthesis of artificial antibody (monobody) by utilizing Pd complex

*Eichi Ozawa[1], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1] (1. Nagoya University)

[2P-029] Effect of adjacent base of target cytosine in photochemical RNA editing using reversible RNA photo-cross-linking

*Syu Kawazoe[1], Kanako Ishino[1], Shigetaka Nakamura[1], Kenzo Fujimoto[1] (1. School of Materials Science ,School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[2P-031] Mechanism of iron removal from heme by *Vibrio cholerae* DyP-type peroxidase

*Sayaka Umetsu[1], Miho Sasaki[1], Koichiro Ishimori[1,2], Takeshi Uchida[1,2] (1. Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University, 2. Faculty of Science, Hokkaido University)

[2P-033] Important role of two-dimensional cationic cluster induced by protein folding in cellular uptake

*Mami Hamori[1], Chieri Kitada[1], Miku Kurehara[1], Nozomi Kuki[1], Nobuhito Shibata[1], Shigeru Negi[1] (1. Doshisha Women's College of Liberal Arts)

[2P-035] Rapid and efficient proximity labeling in living cells with engineered tyrosinase

*Yuna Matsuda[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[2P-037] Stability of Triple-chain Structure of Collagen Model Peptides Containing Carboxyl Groups

*Naoki Takemura[1], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Ryukoku University)

[2P-039] Synthesis of A Collagen Model Peptide for Enhanced Titanium-Cell Adhesion

*Shun Tanaka[1], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Ryukoku University)

[2P-041] Establishment of analysis method for the mechanical property of a fiber protein using AFM

*Kohei Suzuki[1], Shogo Yoshimoto[1], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[2P-043] Construction of a Photoredox Artificial Enzyme Consisting of an Organic Photosensitizer and Protein

*Yuki Uchida[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[2P-045] Specific Recognition of double-stranded DNA through photo-dimerization of anthracene-modified DNA conjugates

*Kento Nishimura[1], Yusuke Kitamura[1], Yousuke Katsuda[1], Toshihiro Ihara[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University)

[2P-047] Cancer specific assembly of nucleic acids induces cell death

*Hiraki Osumi[1], Kunihiko Morihiro[1], Akimitsu Okamoto[1,2] (1. Department of Chemistry and Biotechnology, School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo)

GLUT4 の動態制御機構の解明を目的とした PYP タグビオチン化プローブの開発

○寺下功一郎[1]・堀雄一郎[1,2]・菊地和也[1,2]（[1]大阪大学大学院工学研究科、[2]大阪大学免疫学フロンティア研究センター）

Development of biotinylated PYP-tag probes to elucidate mechanism of GLUT4 translocation

(Graduate School of Engineering, Osaka University[1], Immunology Frontier Research Center, Osaka University[2]) TERASHITA, Koichiro[1]; HORI, Yuichiro[1,2]; KIKUCHI Kazuya[1,2]

グルコース輸送体の一種である GLUT4 は、筋肉組織や脂肪組織に発現し、血中グルコースを細胞内に取り込むことで血糖値を下げる重要な役割を果たしている。GLUT4 は、インスリン非存在下では細胞内の貯蔵小胞(GLUT4 storage vesicle, GSV)もしくはエンドソームに存在し、インスリン存在下では細胞膜上へ移行し、グルコースを取り込む。この細胞内局在の変化により、GLUT4 はグルコースの細胞内取り込みを制御していることが知られている。一方、インスリン抵抗性の 2 型糖尿病患者では、GLUT4 の細胞膜への移行が何らかの原因により阻害され、グルコースを細胞内に効率的に取り込むことができない。このため GLUT4 の細胞内動態制御機構を解明することは、糖尿病の発症機構の解明や治療法の開発においてきわめて重要な課題といえる。

近年、GLUT4 の Asn57 に付加される糖鎖が、GLUT4 の細胞内動態に対してどのような役割を果たしているかに注目が集まっていた。その役割を調べるために演者らのグループは、PYP タグラベル化技術を応用し、GLUT4 の生細胞イメージングを行った。PYP は紅色硫黄細菌由来の小タンパク質(14 kDa)であり、桂皮酸誘導体やクマリン誘導体と共有結合することが知られている。GLUT4 の細胞膜外ループに PYP タグを融合し、インスリンで細胞膜上へ移行させたのちにプローブを添加することで、細胞膜移行した GLUT4 を選択的に検出し、移行した軌跡を調べた。その結果、GLUT4 の糖鎖は、GLUT4 を細胞膜上に引き留める役割を果たしていることを明らかにした[1)]。一方、糖鎖が GLUT4 を細胞膜上へ引き留める機構に関しては、未だ明らかになっていない。

この機構を解明するうえで、GLUT4 の糖鎖が何らかのタンパク質と細胞膜上で相互作用し、その動態を制御していると考えた。そこで本研究では、GLUT4 の糖鎖と相互作用するタンパク質を同定する技術の開発を目的とした。演者らは、PYP タグラベル化技術により細胞膜上の GLUT4 をビオチン化するプローブ PCAF-Biotin を開発した。本講演では、試験管及び生細胞における PYP タグ融合タンパク質の PCAF-Biotin によるラベル化反応及びイメージング実験の詳細を報告するとともに、このプローブを用いた GLUT4 の相互作用タンパク質の同定戦略について議論したい。

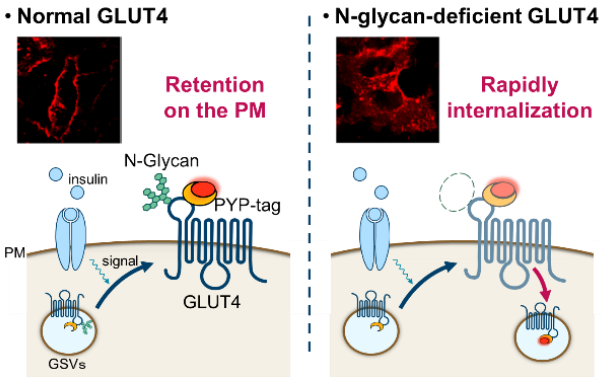


Fig 1. A role of GLUT4-N-Glycan[1)]

1) S. Hirayama, Y. Hori, Z. Benedek, T. Suzuki and K. Kikuchi, *Nat. Chem. Biol.*, **2016**, *12*, 853.

スクアレン合成酵素に類似した新規カルバゾールプレニル基転移酵素の結晶構造と反応メカニズム

○末宗周憲[1]・永田隆平[2、3]小林 正弥[2]・品田 哲郎[4]・西山 真[5,6]・葛山 智久[2,6]・佐藤裕介[1]・日野 智也[1]・永野 真吾[1]（[1]鳥取大院工、[2]東大・農生科、[3]日本学術振興会特別研究員 PD、[4]大阪市大・理、[5]東大・生物工学セ、[6]東大 CRIIM）

Structural study of a novel carbazole prenyltransferase that resembles squalene synthase (Grad. Sch. of Eng., Tottori Univ[1]., GSALS, UTokyo[2], JSPS Research Fellow PD[3], Faculty of Science, Osaka City Univ[4]., BRC, UTokyo[5], CRIIM, UTokyo[6]) SUEMUNE, Hironori[1]; RYUHEI, Nagata[2,3]; MASAYA Kobayashi[2]; TETSURO Shinada[4]; MAKOTO Nishiyama[5,6]; TOMOHISA Kuzuyama[2,6]; YUSUKE Sato[1]; TOMOYA Hino[1]; SHINGO Nagano[1]

最近、葛山らは放線菌が生産する強力な神経保護物質であるカルキノスタチン A の生合成経路を解明し、この生合成においてスクアレン合成酵素 (SQS) にアミノ酸配列が類似した CqsB4 がカルバゾール骨格をプレニル化することを見出した。SQS による芳香族プレニル化反応の報告例はこれまでになく、CqsB4 の構造機能相関に興味がもたれる。また、アミノ酸配列に基づく分子進化系統樹解析からも本酵素は芳香族プレニル基転移酵素であるにも関わらず SQS と同じグループに位置することが明らかとなっている。このため、CqsB4 は酵素の分子進化の履歴をたどる上で重要なターゲットであり、その基質結合様式や反応メカニズムを明らかにすることで、新奇化合物創出への知見や、芳香族プレニル基転移酵素の多様性や進化に対する知見が得られると期待される。そこで我々は X 線結晶構造解析を主な手法とし、新規カルバゾールプレニル基転移酵素の反応メカニズムの解明を目指した。

CqsB4 には約 70%の相同性を示すホモログである LvqB4 が存在する。当研究室ではこれら二つの酵素 CqsB4 では基質非結合型、LvqB4 ではプレニルドナー、プレニルアクセプターおよび補因子の Mg^{2+}が結合した基質結合型の結晶構造をそれぞれ 2.0 Å、1.7 Å で決定した。これらの酵素の全体構造は一般的な芳香族プレニル基転移酵素に見られるバレル構造ではなく、SQS と類似したヘリックスバンドル構造であった。CqsB4 においては意外なことに、アフィニティ精製用に付加した His-tag を切除するためのプロテアーゼ認識領域が非対称単位に存在する隣接分子の活性部位に入り込んだ構造であった(Fig. 1)。LvqB4 (Fig. 2) の基質結合型の構造では、プレニルドナーの二リン酸部位は金属イオンに配位しており、SQS に類似した結合様式が見られた。またプレニルアクセプターの直上にプレニルドナーが位置していることから、芳香族プレニル基転移酵素に類似したメカニズムでプレニル化が行われると推定される。よって本酵素は芳香族プレニル基転移酵素および SQS のハイブリッド酵素であることが提案できる。本発表では詳細な結晶構造や変異体解析などについて報告する。

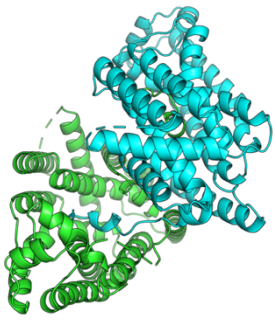


Fig 1. CqsB4 の全体構造

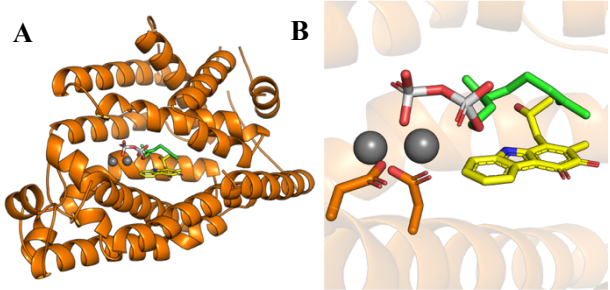


Fig 2. (A) LvqB4 の全体構造 (B)プレニルドナープレニルアクセプター結合様式

人工低分子リガンド HPPU と特異的に結合する 人工抗体 Monobody の複合体結晶化に向けた精製条件の検討

○遠藤鴻志郎[1]・都築成晃[2]・佐藤裕介[1]・村上裕[2,3]・永野真吾[1]・日野智也[1]
（[1]鳥取大院持続性社会, [2]名古屋大院工, [3]名大ナノライフ）

Purification of monomeric form of Monobody that specifically binds to the artificial small molecule ligand HPPU

(Grad. Schl. Sus. Sci., Tottori University[1], Grad. Schl. Eng., Nagoya University[2], Institute of Nano-Life-Systems, Nagoya University[3]) ENDO Koshiro[1]; TSUZUKI Naruaki[2]; SATO Yusuke[1]; MURAKAMI Hiroshi[2,3]; NAGANO Shingo[1]; HINO Tomoya[1]

低分子リガンドに特異的に結合するタンパク質はアフィニティ精製や生細胞内におけるタンパク質の選択的標識などの生化学的・分子生物学的な実験において非常に有用である。しかし、汎用的に用いられる低分子リガンドとそれに結合するタンパク質は双方が天然由来のものが多いため、生体内分子との意図しない結合により正確な結果が得られないことがある。このような生体内分子との干渉を回避するために、名古屋大学の村上裕教授らはフィブロネクチンⅢ型ドメインを鋳型とする約 90 アミノ酸からなる人工抗体骨格である Monobody を用い、人工低分子リガンドである 1-(4-ヒドロキシフェニル)-3-フェニルウレア（HPPU）に対して高い特異性、および様々な親和性を持つ複数種類の Monobody を創製することに成功した。これまでに、低分子量化合物を認識する Monobody についての報告はなく、一般的な抗体分子に比べて分子量の小さな Monobody（分子量：~10 kDa）が特異的かつ強い親和性で低分子両化合物を認識する機構は不明である。そこで、我々は Monobody と HPPU の複合体を X 線結晶構造解析により高分解能で立体構造決定することで、Monobody による低分子量化合物認識の分子メカニズム解明を目指す。

得られた Monobody のうち、HPPU に対する親和性が最も高い Mb19f（Kd=7.93 nM）の結晶化に向けた精製試料の調製を試みた。大腸菌による大量発現ののちに、Ni 担体を用いたアフィニティ精製を行った結果、SDS-PAGE により Mb19f を高純度に精製できていることがわかった。次に精製試料をゲルろ過クロマトグラフィーにより分析したところ、Mb19f は 100 kDa を超える複数の会合状態で存在することがわかった（図 1. 青）。そこで、リガンド結合による会合状態の変化を調べるために、Mb19f : HPPU＝1 : 4 のモル比で混合をした試料を同様に分析したところ、Mb19f のみに比べ多少オリゴマーが解消されていたが、依然として大部分がオリゴマー化しており多分散な状態であることが示唆された。一方で、界面活性剤であるドデシルマルトシドやデオキシコール酸（DOC）を用いた Native PAGE では Mb19f がモノマーとして泳動されていたことから、これらの界面活性剤存在下でのゲルろ過分析を行った結果、DOC が Mb19f のモノマー化に大きく寄与していることがわかった。これらの実験結果から 1% DOC および Mb19f : HPPU＝1 : 4 のモル比で試料を調製し、さらにゲルろ過バッファーに 0.5% DOC を加えることで、結晶化に適すると予測される Mb19f-HPPU 複合体のモノマーかつ単分散な試料を得ることに成功した。（図 1. 赤）

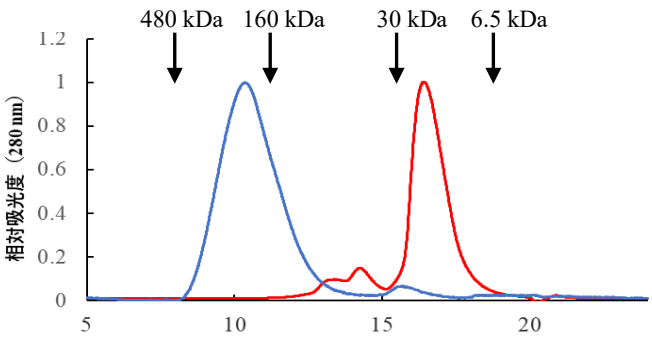


図 1 . HPPU と DOC 添加による Mb19f の会合状態変化のゲルろ過分析　青: 添加前、赤: 添加後

紅色光合成細菌 *Thermochromatium tepidum* の LH2 タンパク質に結合する B800 バクテリオクロロフィル *a* の選択的酸化

○平尾遥奈[1]・木村行宏[2]・大友征宇[3]・佐賀佳央[1]
（[1]近畿大院総合理工、[2]神戸大院農、茨城大理[3]）

Selective Oxidation of B800 Bacteriochlorophyll *a* in LH2 Protein from the Purple Photosynthetic Bacterium *Thermochromatium tepidum* (Graduate School of Science and Engineering, Kindai University[1], Graduate School of Agriculture, Kobe University[2], Faculty of Science, Ibaraki University[3]) HIRAO, Haruna[1]; KIMURA, Yukihiro[2]; WANG-OTOMO, Zheng-Yu[3]; SAGA, Yoshitaka[1]

紅色光合成細菌には、光捕集の役割を持つタンパク質として LH2 が存在する。LH2 タンパク質は BChl *a*（Fig.1）とカロテノイドが 2 種類のポリペプチドに保持され、環状に規則正しく配列した構造をとる。主要色素である BChl *a* は 2 種類の状態で存在しており、800 nm と 850 nm に Q_y 吸収帯を持つことから B800 BChl *a* と B850　BChl *a* と呼ばれている。紅色光合成細菌 *Thermochromatium tepidum* の LH2 タンパク質は B800 BChl *a* の Q_y 吸収帯には 2 種類のスペクトル成分が存在するが、そのメカニズムは未解明である。そこで本研究では、*Thermochromatium tepidum* の LH2 タンパク質に結合する B800 BChl *a* の結合状態に関する情報を得ることを目的とした。

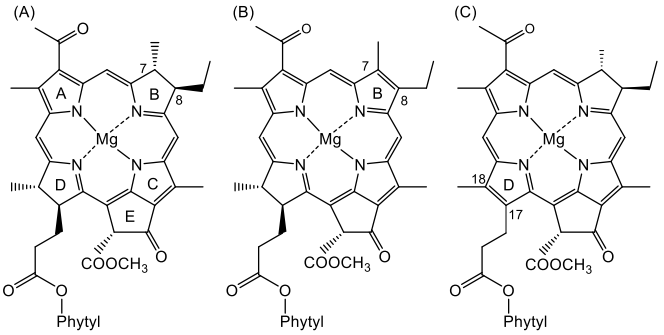


Fig.1: Molecular structures of BChl *a* (A), 3-acetyl-Chl *a* (B), and isomer of 3-acetyl-Chl *a* (C).

定常光照射下で培養した *Tch.tepidum* を破砕し、クロマトフォアを得た。そのクロマトフォアから *N,N*-ジメチルドデシルアミン-*N*-オキシド (LDAO) を用いて LH2 タンパク質の可溶化を行った。その後、ショ糖密度勾配遠心分離と陰イオン交換クロマトグラフィーにて精製を行い、LH2 タンパク質を得た。精製した LH2 タンパク質に 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) 溶液を加え、35 ℃でインキュベーションを行った後に、陰イオン交換クロマトグラフィーにて精製を行い酸化 LH2 を得た[1-3]。

天然 LH2 は、B800 BChl *a* と B850 BChl *a* の Q_y 吸収帯を 800 nm 付近と 850 nm 付近に示した。B800 BChl *a* を酸化した LH2 の電子吸収スペクトルを測定すると、800 nm 付近の Q_y 吸収帯が消滅し 700 nm に新たに酸化色素の Q_y 吸収帯が得られた（Fig.2）。それに対して、B850 BChl *a* の Q_y 吸収帯は若干の短波長シフトにとどまった。このシフトは、DDQ を溶解させている溶媒の影響であると考えられる。また、酸化 LH2 に含まれている色素 (Fig.1) の HPLC 分析を行った。

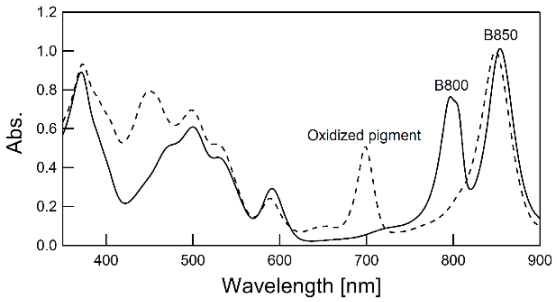


Fig.2: Electronic absorption spectra of native LH2 (solid curve) and oxidized LH2 (broken curve).

1) Y. Saga, S. Kawano, Y. Otsuka, M. Imanishi, Y. Kimura, S. Matsui, H. Asakawa, *Sci. Rep.* **9**, 3636 (2019).
2) Y. Saga, Y. Otsuka, D. Funakoshi, Y. Masaoka, Y. Kihara, T. Hidaka, H. Hatano, H. Asakawa, Y. Nagasawa, H. Tamiaki, *Sci. Rep.* **10**, 19383 (2020).
3) Y. Saga, Y. Otsuka, A. Tanaka, Y. Masaoka, T. Hidaka, Y. Nagasawa, *J. Phys. Chem. B* **125**, 6830 (2021).

酸化酵素 laccase を用いた高効率チロシン残基特異的修飾

○中根啓太[1]・宮野翔伍[1]・友重秀介[1]・石川稔[1]・佐藤伸一[1,2]

（[1]東北大院生命、[2]東北大学際研）

Highly efficient tyrosine-specific labeling using laccase (Graduate School of Life Sciences, Tohoku University[1], Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University[2]) NAKANE, Keita[1]; MIYANO, Shogo[1]; TOMOSHIGE, Shusuke[1]; ISHIKAWA, Minoru[1]; SATO, Shinichi[1, 2]

天然のアミノ酸残基を標的とした化学修飾法は、ペプチド・タンパク質と修飾剤分子を共有結合により連結する技術である。ペプチド・タンパク質に対して機能性分子を連結することで新たな機能の付与が可能であり、アミノ酸残基の化学修飾技術は広く生命科学研究に使用されている。一方で、チロシン残基は、リン酸化によるシグナル伝達に関与することや、タンパク質間相互作用、RNA–タンパク質間相互作用界面に多く存在することが知られており、生命現象解明の観点から、チロシン残基選択的かつ効率的な化学修飾反応の開発が望まれている。そのような背景の中、我々はこれまでに、酵素や光触媒による一電子移動（single electron-transfer, SET）を駆動力としたチロシン残基修飾反応を開発してきた[1, 2]。しかし、これまでの手法では過酸化水素による活性化を必要とする触媒や活性酸素種を生じる光触媒を用いるため、他のアミノ酸残基を酸化する恐れがあり、反応効率においても課題を有していた。

我々はまた、温和な反応条件による手法として、酸素分子を駆動力として、一電子酸化を触媒する酵素 laccase に注目し、チロシン残基修飾反応を開発した[3]。この手法は空気中の酸素分子を利用でき、弱酸性条件下で反応容器のふたを開けて振盪することにより、効率的かつ特異的にチロシン残基を修飾することが可能である。そこで、本研究では laccase 共存下、新たに修飾剤のスクリーニングを行い、1-methyl-4-aryl urazole (MAUra)[4] が定量的にチロシン残基を修飾することを見出した（図 1）。また、本研究において laccase は修飾剤である MAUra を選択的に一電子酸化することで、チロシン残基を高効率かつ特異的に修飾することを明らかにした。本法は現在報告されているチロシン残基修飾反応の中で、最も高効率にチロシン残基を修飾することを明らかにした（$k = 7.88 \times 10^4\ M^{-1} \cdot s^{-1}$）。さらに、本法を用いて機能性ペプチドおよびタンパク質の高効率かつチロシン残基特異的な機能化に成功した。本法を用いて修飾した炭酸脱水素酵素およびグルコースオキシダーゼの酵素活性を評価し、修飾反応後も機能が保持されることを明らかにした。

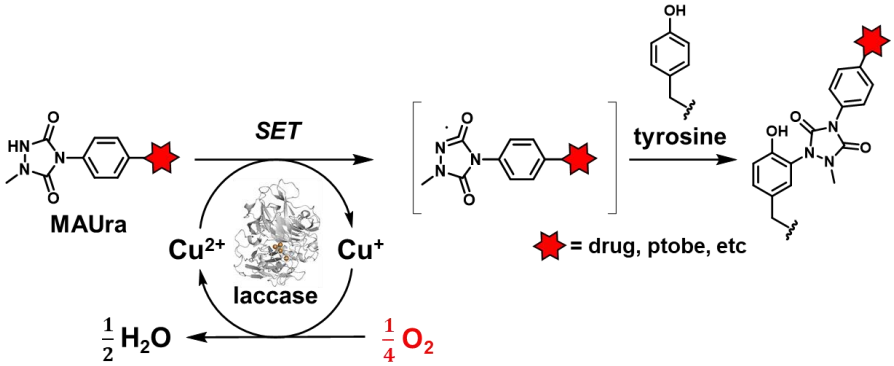


図 1.　laccase による高効率チロシン残基修飾反応

【参考文献】[1] Sato, S., Nakamura, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8681. [2] Sato, S., Nakamura, K., Nakamura, H. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2633. [3] Sato, S., Nakane, K., Nakamura, H. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 3664. [4] Sato, S., Hatano, K., Tsushima, M., Nakamura, H. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 5871.

RNase S 修飾人工ウイルスキャプシドの構築と抗がん活性評価

鳥大院工○梁応冰・太田純平・古川寛人・坂本健太郎・稲葉央・松浦和則

Construction of RNase S modified artificial virus capsid by reconstruction and evaluation of the anticancer activity（Graduate School of Engineering, Tottori University）LIANG, Yingbing; OTA, Junpei; FURUKAWA, Hiroto; SAKAMOTO, Kentaro; INABA, Hiroshi, MATSUURA, Kazunori

天然の球状ウイルスであるトマトブッシースタントウイルス(TBSV)は、タンパク質サブユニットが 180 個集合して 33 nm のキャプシドを形成する。我々はこれまで、TBSV の 24 残基 β-Annulus peptide (INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGS) の自己集合により、30-50 nm 程度の人工ウイルスキャプシドの構築、ならびに、その表面への金ナノ粒子やタンパク質などの修飾を報告している[1-3]。本研究では、人工ウイルスキャプシドの外部表面に配向するβ-Annulus peptide の C 末端側に S-peptide 配列を有するペプチドを合成した。それと S-protein を再構成させることで酵素活性を有する RNase S 修飾人工ウイルスキャプシドを構築し(Fig.1)、抗がん活性を評価した。

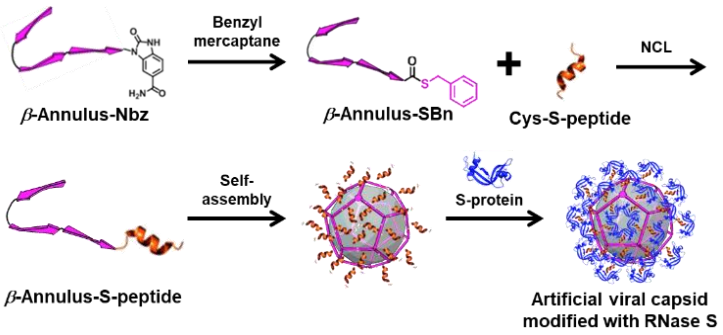


Fig. 1 Synthesis of β-annulus peptide with S-peptide sequence by native chemical ligation (NCL) and self-assembly of artificial viral capsid modified with ribonuclease S.

Native Chemical Ligation により β-Annulus-SBn と Cys-S-peptide を連結することでβ-annulus-S-peptide を合成した。それに S-protein を添加したところ、リン酸 buffer (pH7.4)中で粒径約 70 nm の球状集合体を形成することが DLS 及び TEM により確認され、RNase S 修飾キャプシドの構築が示唆された(Fig.2A)。また、WST-assay により Hela 細胞に対する細胞毒性を評価した結果、RNase S 修飾キャプシド添加後のがん細胞は 68%の細胞生存率であり、抗がん剤である Taxol 添加の場合(61%)と同程度の抗がん活性を有することが示唆された(Fig.2B)。

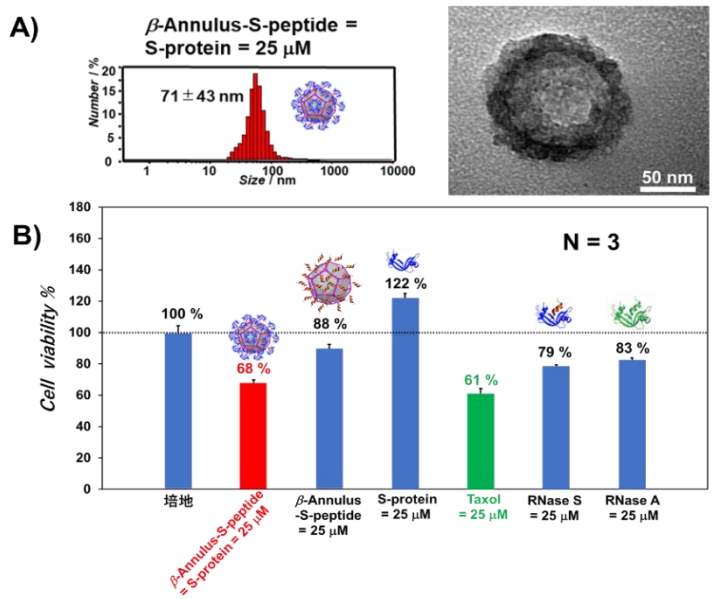


Fig. 2 A) DLS and TEM image of artificial viral capsid modified with RNase S at [β-annulus-S-peptide] = [S-protein] = 25 μM in phosphate buffer (pH 7.4). B) Cytotoxicity assessment by WST assay.

1）K. Matsuura, *Chem. Commun*., **54**, 8944 (2018)
2）K. Matsuura, J. Ota, S. Fujita, Y. Shiomi, H. Inaba. *J. Org. Chem*., **85**, 1668 (2020)
3）K. Matsuura, Y. Shiomi, T. Mizuta, H. Inaba. *Processes*, **8**, 1455 (2020)

中性子回折を用いた精密構造解析による抗リウマチ薬とマクロファージ遊走阻止因子との相互作用解析

○江澤理徳[1]・石田卓也[2]・山田貢[2]・玉田太郎[3]・尾高雅文[1]・涌井秀樹[1]・松村洋寿[1]（[1]秋大院理工、[2]JAXA 宇宙航空研きぼう利用セ、[3]QST・量子生命研）

Interaction analysis of an anti-rheumatic drug with macrophage migration inhibitory factor by precise crystal structure determination using neutron diffraction ([1]Graduate School of Engineering Science, Akita University, [2]JEM Utilization Center, JAXA, [3]Institute for Quantum Life Science, QST) EZAWA, Toshinori[1]; ISHIDA, Takuya[2]; YAMADA, Mitsugu[2]; TAMADA, Taro[3]; ODAKA, Masafumi[1]; WAKUI, Hideki[1]; MATSUMURA, Hirotoshi[1]

【目的】 メトトレキサート(MTX)は、悪性腫瘍の治療を目的としたジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)の拮抗阻害剤として開発されたが、1980 年代に自己免疫疾患治療の臨床的効果が確認され、現在、関節リウマチ(RA)治療の第一選択薬として広く利用されている。しかし、MTX の RA に対する臨床効果は、DHFR に対する阻害効果では説明することが難しく、MTX 使用による重篤な肺疾患の副作用の発生機序についても未解明である。そこで、我々は MTX の免疫系における作用機序解明を目的として、MTX の新規標的タンパク質の探索を行い、マクロファージ遊走阻止因子(MIF)を同定した。これまでに、MTX と MIF の相互作用解析、MTX-MIF 複合体の X 線結晶構造解析に成功している。MIF は多機能性を示すサイトカインであり、RA をはじめとする多くの自己免疫疾患や癌等に関与していることから、創薬標的として注目されている。創薬において、より強い薬剤–標的タンパク質間の相互作用を設計するためには、標的分子の水素原子およびプロトンを含む詳細な構造情報は重要である。そこで本研究では、水素原子およびプロトンの位置情報が得られる中性子構造解析法を用いて、MIF の精密構造を決定した。さらに、代表的な MIF 阻害剤 ISO-1–MIF 複合体または MTX–MIF 複合体の X 線結晶構造と MIF の精密構造を比較することで、薬剤–MIF 間の詳細な相互作用について議論する。

【実験方法】60 mg/mL MIF 溶液とリザーバー溶液(0.49 M NaD_2PO_4、0.91 M K_2DPO_4)を用いて、sitting drop 法により大型結晶を作成した。iBIX BL-03 (J-PARC)で、得られた結晶に対して室温で 7.5 日間中性子を照射し、中性子回折データを得た。また、Photon Factory BL-5A (KEK)で、同結晶に対して室温で X 線を照射し、X 線回折データを得た。これらの回折データを複合精密化し、MIF の構造を決定した。

【結果及び考察】得られた MIF の大型結晶を用いて、中性子および X 線回折実験を行ったところ、それぞれ分解能~1.8 Å および~1.6 Å の回折データが得られ精密化に成功した。MIF 精密構造において、水分子(DOD)を介した Pro1 のアミンから Met101 主鎖アミドまでの水素結合ネットワーク(network1)および Pro34 のアミドを介した Tyr95 側鎖から Tyr36 主鎖アミドまでの水素結合ネットワーク(network2)が観測された。次に、阻害剤–MIF 複合体の X 線結晶構造と MIF 精密構造を比較した。MTX–MIF 複合体と重ね合わせると、MTX は DOD と Tyr95 の間に位置していた(Fig. 1)。また、ISO-1–MIF 複合体と重ね合わせると、ISO-1 は DOD と同じ位置に存在した。以上の結果は、阻害剤は network1 と network2 を仲介するように結合し、阻害剤結合による MIF 内の水素結合ネットワーク伸長が、阻害剤の MIF への結合親和性に寄与することを示唆している。

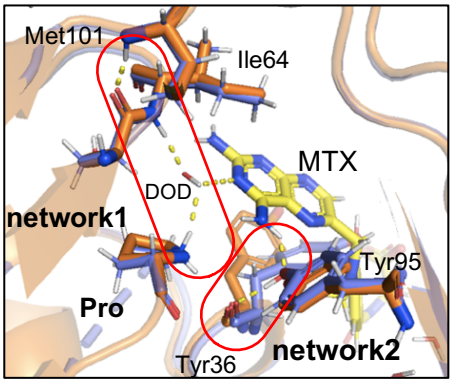


Fig. 1. Overlapped structure of MIF by neutron diffraction (orange) and MTX-MIF complex by X-ray diffraction (blue). The dotted line represents the predicted hydrogen bonding networks.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

架橋酵素による高分子水溶液中での特異なタンパク質集合化挙動

○佐藤 崚[1]・南畑 孝介[1]・若林 里衣[1]・後藤 雅宏[1]・神谷 典穂[1,2]
（[1]九州大学大学院工学研究院、[2]九州大学未来化学創造センター）

Unique protein assembly behavior by enzyme-catalyzed crosslinking reaction in molecular crowding solution

([1]Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University,
[2]Division of Biotechnology, Center for Future Chemistry, Kyushu University)
Sato, Ryo[1]; Minamihata, Kosuke[1]; Wakabayashi, Rie[1]; Goto, Masahiro[1]; Kamiya, Noriho[1,2]

【緒言】

生体内外におけるタンパク質の集合化挙動の制御は、高度な機能発現の実現に向けた戦略の１つと考えられる。タンパク質集合化の手段として、共有結合形成反応を触媒する架橋酵素の基質特異性を利用することで、タンパク質機能の維持や安定性の担保が期待される。

本研究では、共有結合型タンパク質集合体を調製するための酵素として微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) を選択した。MTG は特定のグルタミン (Q) 残基及びリジン (K) 残基側鎖間のアシル基転移反応を触媒する。これまでの研究において、MTG の架橋反応点 (K, Q) が共存するペプチドタグである PolyTag (HKRWRHYQRGG) を設計し、目的タンパク質の N もしくは C 末端に導入することで、MTG 触媒反応を介した多様なタンパク質集合体の調製に成功した [1]。しかしながら、何れのタンパク質集合体の調製においても、未反応の単量体の残存が確認された。そこで、タンパク質基質の見かけの濃度を向上させることで、PolyTag を介した集合化が促進されるのではないかと考え、分子クラウディングに注目した。分子クラウディング環境では、溶液中にクラウディング分子が高濃度に存在するため、解析対象となる分子の占有体積が減少し、見かけの濃度が向上すると考えられる [2]。これまでに、架橋酵素反応系に対してクラウディング環境が与える効果は報告されていない。そこで、デキストラン (Dex) を用いて分子クラウディング環境を構築し、MTG 架橋反応による PolyTag 融合タンパク質の集合化挙動の評価を実施した (Fig. 1)。

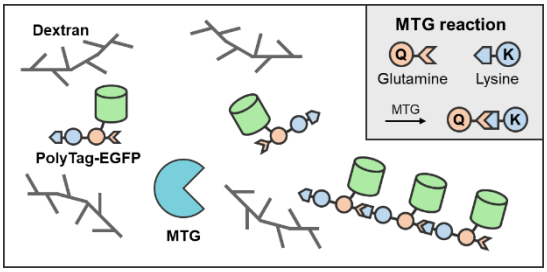


Fig. 1 Schematic illustration of this research.

【実験及び結果と考察】

遺伝子工学的手法により緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の N 末端に PolyTag を融合した PolyTag-EGFP を調製した。PolyTag-EGFP (10 μM) と MTG (0.5 U/mL) を、15 wt%の Dex 500k を含む PBS 溶液に添加し、1~60 分後に各水溶液中に生じた生成物に対して、SDS-PAGE による解析を行った。Dex 添加時において、Hexamer 以上の高分子量体の割合が増加したことから、クラウディング環境により架橋反応が促進され、集合体形成挙動が変化することが示唆された。

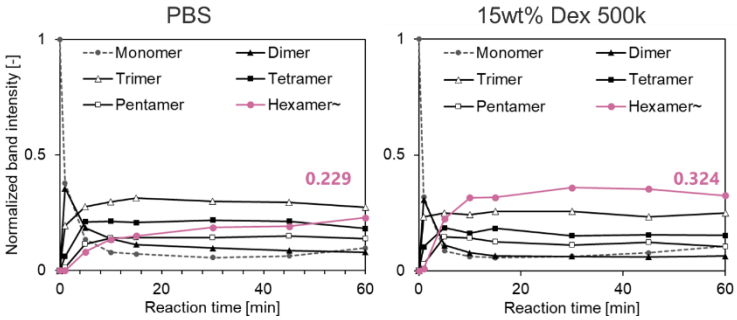


Fig. 2 Time course of product formation analyzed by SDS-PAGE band intensity measurements of the EGFP assembly catalyzed by MTG in PBS solution with or without Dex 500000.

【参考文献】

[1] R. Sato *et al.*, *Anal. Biochem.*, **600**, 11370 (2020), [2] Y. Hata *et al.*, *J. Mater. Chem. B.*, **6**, 6344 (2018)

細胞種選択的な膜透過性を持つ、細胞膜透過 PG-surfactant の開発

○山田桃果[1]・住藤夏美[1]・井上靖道[2]・梅澤直樹[2]・水野稔久*[1]

（[1]名工大院工、[2]名市大院薬）

Development of Membrane-Permeable PG-Surfactants with Cell Line-Selective Membrane Permeability

(Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology[1], Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University[2]) YAMADA, Momoka[1]; SUMITO, Natsumi[1]; INOUE, Yasumichi[2]; UMEZAWA, Naoki[2]; MIZUNO, Toshihisa*[1]

【緒言】近年、抗体などの蛋白質からなるバイオ医薬品の開発や利用が進められている。さらなるバイオ医薬品開発の進展において、細胞外の受容体などに作用させる従来のものとは異なり、細胞内分子に直接作用させる技術開発に注目が集まっており、これを可能とする細胞膜透過キャリアの開発が広く検討されている。また副作用を抑える観点からは、細胞内に導入される段階での細胞種選択性も重要である。一方近年我々の研究室では、リポペプチドであるペプチドジェミニ型界面活性剤（PG-surfactant）[1]からの機能分子開発に取り組んでおり、外来蛋白質に対して細胞膜透過キャリアとして機能する「細胞膜透過 PG-surfactant（cpPGs）」の開発に成功し報告している[2]。本研究では、この cpPGs に対する細胞種選択的な膜透過性付与を目指し、上皮細胞増殖因子受容体（EGFR）への高い親和性が知られる GE11 ペプチドとの複合化を検討している。

【実験結果】cpPGs は、内部に含むカチオン性、アニオン性残基の導入割合により、膜透過性を調節可能である(Fig. 1)[2]。これまでに $DKDKC_{12}$-D_3 に対して GE11 ペプチドを導入することで、EGFR 高発現株である A431 細胞、低発現株である NIH3T3 細胞への吸着過程において、A431 細胞への優先性が確認され報告している。しかし元々膜透過性の低い $DKDKC_{12}$-D_3 を cpPG として用いていたことから、その後の細胞内取り込みまでは観測されなかった。そこで本研究では、適度な膜透過性を持つ $DKDKC_{12}$-K_1 を cpPG として選択し、これに GE11 ペプチドを付与した GE11- $DKDKC_{12}$-K_1 についての、細胞取り込み過程の評価を行なった。

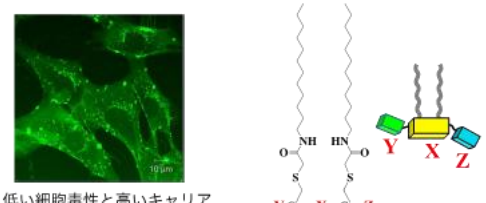


表　各cp-PGのX-, Y-, Z-部位のアミノ酸配列と膜透過性の比較

	膜透過性	X	Y	Z
$DKDKC_{12}$-K_3	○	-Asp-Lys-Asp-Lys-	Ac-	-$(Lys)_3$-NH_2
$DKDKC_{12}$-K_1	△			-$(Lys)_1$-NH_2
$DKDKC_{12}$-D_3	×			-$(Asp)_3$-NH_2

Fig. 1 Molecular structure of PG-surfactants (upper right) and comparison of the cell penetration properties of the series of cell penetration PGsurfactants (cp-PGs) (low table).

まず添加数分以内での GE11-$DKDKC_{12}$-K_1 の異種細胞間での吸着割合の比較を CLSM 測定により評価した。その結果 GE11-$DKDKC_{12}$-D_3 の場合と同様に A431 細胞に対する吸着優先性がみられた。さらに添加後 1、3、24 時間培養後の細胞内への取り込み過程までを CLSM、FACS 測定により評価を行なったところ、GE11-$DKDKC_{12}$-D_3 の場合と異なり十分な細胞内への取り込みが見られ、更に NIH3T3 細胞に対する A431 細胞への取り込み選択性が 5~6 倍程度見られることがわかった（Fig.2）。阻害剤を用いた輸送経路評価は当日発表予定であるが、これらの結果は、細胞膜抗原への親和性ペプチドとの単純な複合化により、cp-PG から様々な細胞に対する細胞種選択的なキャリア分子が開発可能となることを示唆している。

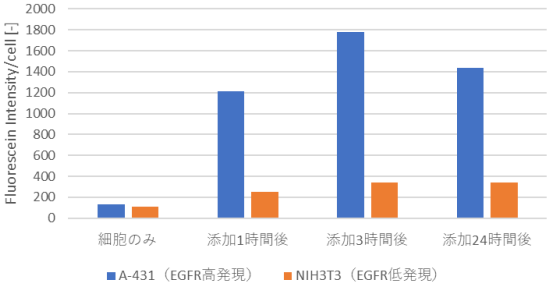


Fig.2 Comparison of the uptake amounts of FITC-labeled GE11-$DKDKC_{12}$-K_1 for A431 and NIH3T3 cells from FACS analysis.

[1] K. Umezaki & T. Mizuno, *Chem. Lett.* **41**, 1430-1432 (2012). [2] N. Sumito & T. Mizuno, *Bioconjugate Chem.* **31**,821-833(2020).

水/イオン液体二相系を用いたシトクロム P450BM3 の基質誤認識による非天然基質の水酸化

○須貝友紀・有安真也・横山侑弥・唐澤昌之・愛場雄一郎・荘司長三（名大院理）

Hydroxylation of Non-native Substrates Catalyzed by Cytochrome P450BM3 with Aqueous/Ionic Liquid Biphasic System (Graduate School of Science, Nagoya University) SUGAI, Yuki; ARIYASU, Shinya; YOKOYAMA, Yuya; KARASAWA, Masayuki; AIBA, Yuichiro; SHOJI, Osami

シトクロム P450BM3 (P450BM3) は、長鎖脂肪酸の亜末端部位の水酸化を触媒するヘムタンパク質であり、その高い触媒能からバイオ触媒への応用に向けた研究が盛んに行われている[1]。当研究室で開発された基質誤認識システムは、P450BM3 に脂肪酸の構造を模した擬似基質 (デコイ分子) を取りこませることで、ベンゼンなどの非天然基質の水酸化を可能にした[2]。さらに、このシステムを用いて、P450BM3 を発現させた大腸菌体内でのベンゼン水酸化にも成功している[3]。一方、この反応は水を溶媒とし、菌体が生存できる環境が必要であるため、水への溶解性や菌体への毒性によって利用できる基質が限られている。化学合成で用いられる分子は水溶性が低いことや毒性が強いことも多いため、工業的な利用を考えると、需要のある反応に対して十分な効果を発揮させるのは困難な場合が多い。

本研究では、基質の溶解性の向上や毒性の低減による反応効率の向上や基質適応範囲の拡大を目指し、イオン液体に基質、水溶液に菌体を存在させた水/イオン液体二相系の検討を行った。イオン液体は、常温付近に融点を持つ塩であり、分子設計によって基質、生成物の溶解性を調節可能である。二相系では、相間での基質、生成物の分配によって濃度の調整ができるため、水溶性の低い基質をイオン液体が溶解し、水相へ飽和濃度付近まで供給し続けることや、基質や生成物をイオン液体相へ抽出し菌体への毒性を和らげることが可能となる (Fig. 1)。イオン液体として $[P_{6,6,6,14}][NTf_2]$ を用いることで、ベンゼンの水酸化の収量が約 2 倍に向上した (Fig. 2)。反応系中に加えることが出来るベンゼンの総量が大幅に増加し、反応や揮発による基質の減少分がイオン液体からの供給によって補われるため、水相の基質濃度が一定に保たれたことで、酵素の活性が長時間維持されたと考えている。また、より毒性の高いクロロベンゼンにおいても、水槽の基質濃度を一定の低濃度に保ちながら長時間反応が進行し、収量の向上が見られた。現在、ガス状で水溶性の低いプロパンを基質として用いた検討を行い、本手法の基質適応範囲の拡大を行っている。

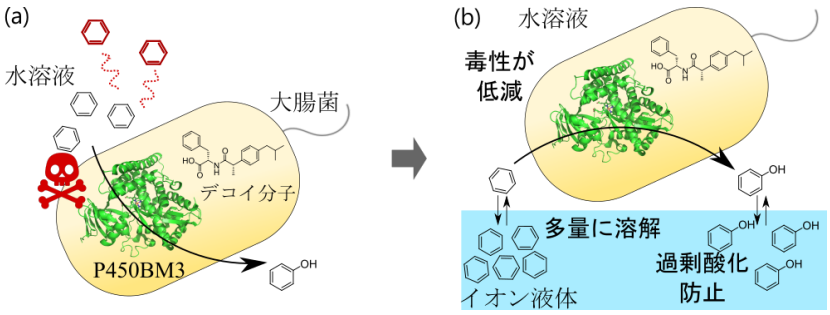


Fig 1.　(a)水溶液一相と(b)水/イオン液体二相でのベンゼン水酸化反応

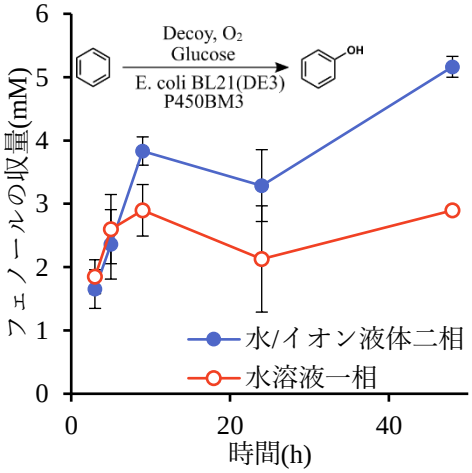


Fig 2.　イオン液体の有無による フェノール収量の変化

1）F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 14420–14426.
2）O. Shoji. *et al., Angew. Chem.Int. Ed.* **2017**, *56*, 10324-10329.
3）M. Karasawa. *et al., Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 12264-12269.

結合速度論に着目したヒスタミン受容体の化学遺伝学的制御

○柏 俊太朗・堂浦 智裕・清中 茂樹（名大院工）

Chemogenetic Regulation of Histamine Receptor Focusing on the Ligand Binding Kinetics (Graduate School of Engineering, Nagoya University,) KASHIWA, Shuntaro; DOURA, Tomohiro; KIYONAKA, Shigeki

細胞膜受容体とリガンドの結合を理解する際に、解離定数（K_d）が用いられる。平衡状態かつリガンド大過剰の条件下において、受容体分子の半分がリガンドと結合する濃度に等しく、簡便に用いられる。培養細胞を用いた評価では受容体とリガンドの平衡状態を作り出すことができるが、実際の生体内では血液中及び体液中のリガンド濃度は常に変動しており平衡状態が成り立たない。つまり、生体内での受容体とリガンドの結合について理解するには K_d だけでは不十分で、結合速度定数（k_{on}）、解離速度定数（k_{off}）をはじめとする結合速度論の観点からの理解が必要不可欠である。そこで、当研究室では細胞外シグナルを細胞内に伝達し、様々な生理的過程に関与する膜タンパク質である G タンパク質共役型受容体（GPCR）に対して速度論に着目した活性制御を目指している。本発表では GPCR の最大ファミリーである class A GPCR に属するヒスタミン H1 受容体（H1R）の化学遺伝学的なリガンドの結合速度の制御について報告する。Class A GPCR の内在リガンド結合部位は 7 回膜貫通（7TM）ドメインに存在するため、細胞外ループ（ECL）は内在性リガンドと直接的には相互作用していないことが多い。一方で、リガンドの入口近傍に位置する ECL の立体障害の違いは結合の速度論に影響すると考えられる。そこで我々は ECL に着目して様々なアミノ酸を変異導入することで、内在性リガンドとの結合親和性を保った変異体の作製と、H1R 選択的な阻害剤及びその誘導体を用いたスクリーニングを行った。その結果、野生型 H1R と変異型 H1R の間でリガンドの結合速度に差が生じることが示唆された。本手法は生体内での受容体とリガンドの結合について理解するうえで強力なツールとなることが期待される。

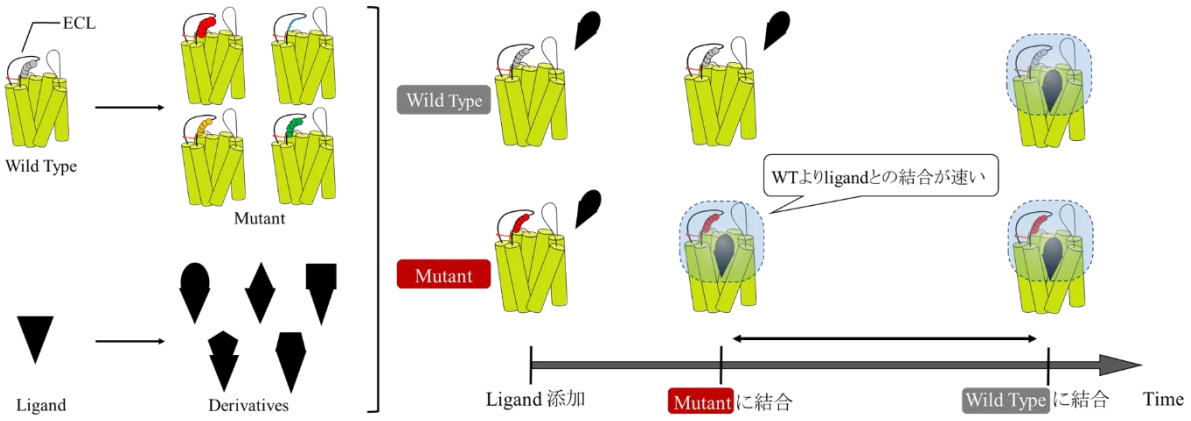


Fig. Overview of chemogenetic approach for regulating GPCR-ligand binding kinetics

π-π 相互作用を利用したアデノシン A_{2A} 受容体のケモジェネティックス制御

○松岡佑真・杓野拓光・堂浦智裕・清中茂樹（名大院工）

Chemogenetic regulation of adenosine A_{2A} receptor using π-π interactions between receptor and ligands.

(Graduate School of Engineering, Nagoya University) MATSUOKA, Yuma; SYAKUNO, Takumitsu; DOURA, Tomohiro; KIYONAKA, Shigeki

G タンパク質共役型受容体（GPCR）は、細胞膜を介したシグナル伝達により広範な生理的プロセスに関与し、創薬標的として注目される。同種の GPCR であっても発現する細胞種によって異なる生理学的機能に関与することが知られるが、細胞種選択的な GPCR の活性制御は困難であり、個々の GPCR の詳細な機能は未解明な部分が多い。

上記の背景から我々は細胞種選択的に GPCR の活性を制御するケモジェネティックスな手法として「細胞外ループ工学」を提唱している。これは、GPCR に保存される 7 回膜貫通(7TM)ドメインと細胞外ループ(ECL)という特徴的な構造に着目し、ECL にアミノ酸変異を加えることで内在リガンドとの親和性を維持しつつ、デザインした人工リガンドにより変異受容体の活性を選択的に制御する手法であり、当研究室では class C GPCR に属する代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)において変異受容体選択的な活性制御に成功している。

本発表では class A GPCR に属するアデノシン A_{2A} 受容体($A_{2A}R$)に着目し、細胞外ループ工学による $A_{2A}R$ の活性制御について報告する。$A_{2A}R$ と内在リガンドであるアデノシンのリガンド結合部位は 7TM 内部の深くに位置するため、リガンド結合部位上部にあたる ECL への変異導入によりアデノシンとの親和性を維持すると共に、$A_{2A}R$ 阻害剤の誘導体を用いて変異型 $A_{2A}R$ 選択的な活性制御を指向した。上記戦略に基づき π-π 相互作用が生じることを意図して、芳香族性アミノ酸を変異導入した変異型 $A_{2A}R$ および芳香環を持つ阻害剤のペアを作製した。HEK293 細胞でその機能評価を行ったところ、野生型 $A_{2A}R$ よりも強く活性が阻害されることを見出し、変異型 $A_{2A}R$ 選択的な活性制御に成功した。

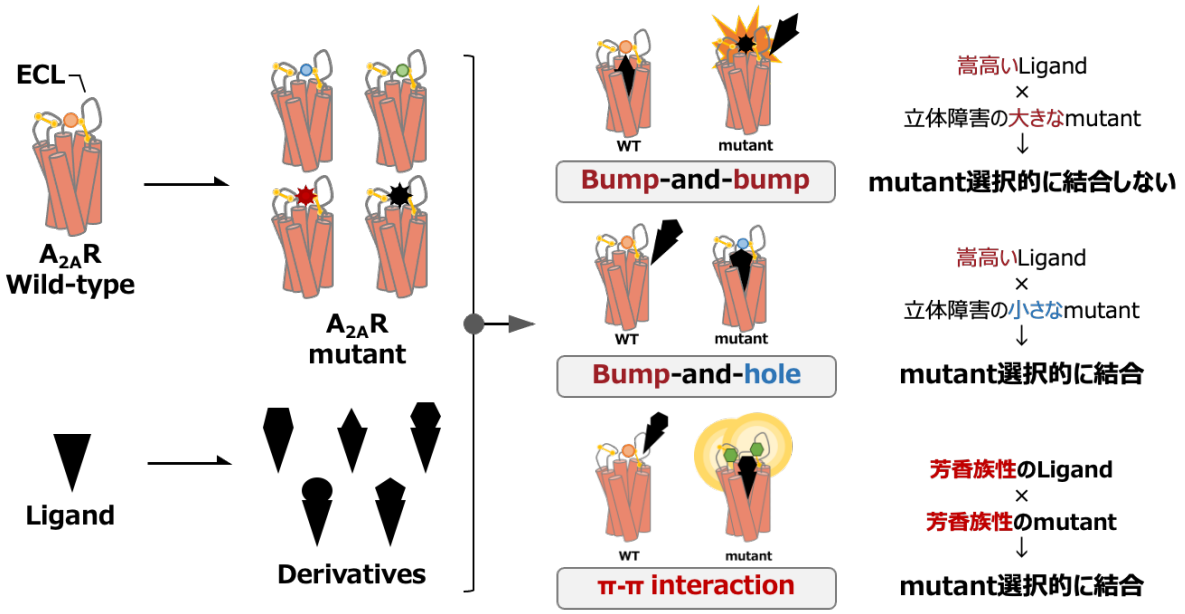


Fig. Outline of chemogenetic regulation of $A_{2A}R$ using ECL engineering

高効率ペプチドライゲーションのための新規セレノエステル合成法の開発

○橋本雅也[1]・林剛介[1]・村上裕[1]（[1]名大院工）

A novel peptide selenoester synthesis method for efficient peptide ligation (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1]) HASHIMOTO, Masaya[1]; HAYASHI, Gosuke[1]; MURAKAMI Hiroshi[1]

タンパク質を有機化学的に作製する「タンパク質化学合成法」は、他の方法では作製困難な修飾タンパク質や人工タンパク質の作製を可能にする。その合成では、ペプチド同士を繋ぎ合わせるペプチド連結反応が必要不可欠であり、最もよく用いられるのがネイティブケミカルライゲーション(NCL)と呼ばれる反応[3]である。NCL では C 末端にチオエステルを持つペプチドと N 末端にシステインを持つペプチドを反応させ、ペプチド間に新たなペプチド結合を生成させる。近年、NCL においてチオエステルより反応性が高いセレノエステルの利用が盛んに研究されるようになってきた。しかし、従来のセレノエステル合成法には煩雑な操作や、低収率といった課題があった。そこで我々は新たなセレノエステル等価体として、セレノシステイニルプロリルチアゾリジノン(U-P-Thd)構造を有するペプチドを開発した(Fig 1.)。UP-Thd ペプチドは、当研究室で以前開発したシステイニルプロリルチアゾリジノン(CP-Thd)型チオエステル等価体[1), 2)]のセレノシステイン 版であり、Fmoc 固相合成で容易に合成可能で、比較的温和な条件下で効率良くセレノエステエルへ変換することができる。

UP-Thd ペプチドの合成は、まず Fmoc 固相合成によりペプチド C 末端にセレノシステイン(U)、プロリン(P)、システイン(C)を持つペプチドを合成し、その後システインを選択的に環化させてチアゾリジノン(Thd)へと誘導することで目的のペプチドを得る。UP-Thd 構造は中性水溶液中で、N—Se アシルシフトと続くチアゾリジノンの脱離によって自発的にジケトピペラジンへと変換される。次に、合成したペプチドセレノエステルを用いてペプチド連結反応を検討した。セレノエステルペプチド 1 と N 末端にシステインを持つペプチド 2 を反応させたところ、反応開始 30 分以内に反応が完了したことが確認された(Fig 2A.)。また、チオエステルとの反応性を比較した結果、セレノエステルの反応速度は約 24 倍向上したことが確認された(Fig 2B.)。本研究で開発した簡便で効率的なセレノエステル合成法によってタンパク質化学合成がより効率化されると考えられる。

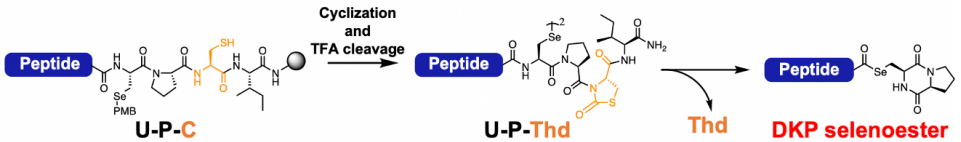


Fig 1. Scheme of peptide selenoester synthesis with diketopiperazine formation.

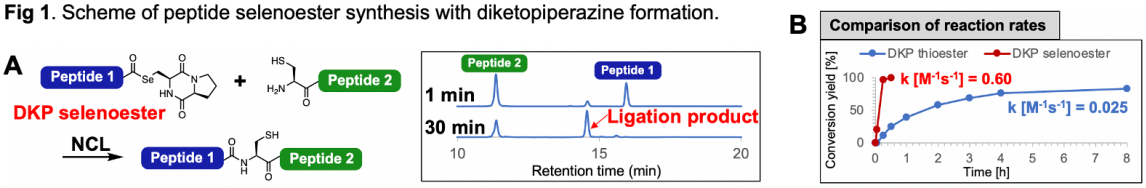


Fig 2. (A) Peptide ligation using peptide selenoester. (B) Kinetics studies of thioester and selenoester in NCL.

1) M. Yanase, K. Nakatsu, C. J. Cardos, Y. Konda, G. Hayashi, A. Okamoto, *Chem. Sci.*, **10**, 5967-5975 (2019)
2) K. Nakatsu, M. Yanase, G. Hayashi, A. Okamoto, *Org. Lett.*, **22**, 4670-4674 (2020)
3) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science.*, **266**, 776-779 (1994)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

パラジウム錯体を利用したコロナウイルス結合人工抗体の効率的全合成

○小澤英知[1]・林剛介[1]・村上裕[1]（[1]名大院工）

Efficient total chemical synthesis of artificial antibody (monobody) by utilizing Pd complex (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1]) Eichi Ozawa[1]; Gosuke Hayashi[1]; Hiroshi Murakami1[1]

人工抗体は、IgG 抗体のように特定のタンパク質に特異的に結合する人工タンパク質であり、IgG 抗体よりも分子サイズが 1/10 程度と小さいため、生体内において組織浸潤性が高い、試験管内分子進化法により取得が可能、大腸菌による発現が容易、化学的な改良がしやすい、といった利点を有する。現在、人工抗体は大腸菌発現によって作製されたものが実験に用いられているが、大腸菌発現では導入できるアミノ酸が 20 種類のアミノ酸に限定されるため、タンパク質の機能化を行う際に改良の範囲が制限されてしまう。そこで、我々の研究グループでは有機化学的にタンパク質を作製する「タンパク質化学合成法」を用いることで非天然アミノ酸を導入した高機能化人工抗体の創製を目指している。本発表では、当研究室で取得されたコロナウイルス S タンパク質結合人工抗体モノボディ[1)]の化学合成ルートを確立したので紹介する。タンパク質化学合成法は、固相合成で作製したペプチド断片を順次ペプチド連結反応によってつなぎ合わせることでタンパク質を得る方法であり、非天然アミノ酸を部位特異的に導入することができる。しかし、連結する断片の数が多くなるほど精製過程に由来する収率の低下が問題となる。そこで、我々の研究グループで開発した Pd 錯体を用いた効率的ペプチド連結反応[2,3)]を利用してモノボディの合成を行った。108 アミノ酸からなるモノボディを 3 つのペプチド断片に分け、それぞれ固相合成で作製した(Fig. 1)。ペプチド 1 の C 末端 Asp の側鎖カルボン酸およびペプチド 2 の N 末端アミノ基には、それぞれ Pd 錯体で脱保護可能な Allyl 基および Alloc 基を導入した。ペプチド 2 と 3 の連結反応の後に Pd 錯体を加えることで連結したペプチドの N 末端が脱保護され、次の反応点が形成される。その後、新たにペプチド断片を加えることで 3 断片を精製せずに連結させることに成功し、さらに Asp 側鎖の Allyl 基も Pd 錯体によりワンポットで脱保護反応を行った(Fig. 2)。その後、HPLC 精製を行ってから連結部位のシステインを脱硫反応によってアラニンに変換し、モノボディを単離することに成功した。

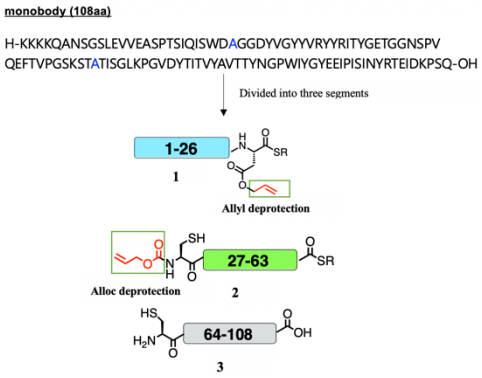


Fig 1. Monobody segment design

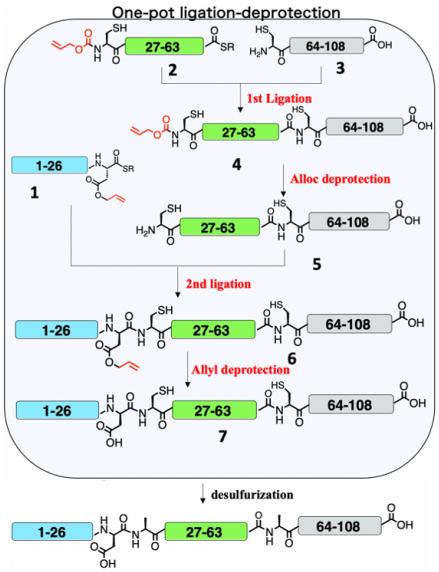


Fig 2. Peptide ligation scheme without purification

1) T. Kondo, Y. Iwatani, K. Matsuoka, T. Fujino, S. Umemoto, Y. Yokomaku, K. Ishizaki, S. Kito, T. Sezaki, G. Hayashi, H. Murakami. *Sci. Adv.* 2020**, 6**, eabd3916
2) N. Kamo, G. Hayashi, A. Okamoto; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018**, 57**, 16533
3) N. Kamo, G. Hayashi, A. Okamoto; *Chem. Commun.* 2018, **54**, 4337

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

標的シトシンの周辺塩基が可逆的 RNA 光架橋反応を用いた RNA 編集に与える影響

○川添秀・石野佳奈子・中村重孝・藤本健造（北陸先端大先端科学）

Effect of adjacent base of target cytosine in photochemical RNA editing using reversible RNA photo-cross-linking (School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology) KAWAZOE, Shu[1]; ISHINO Kanako;NAKAMURA Shigetaka; Fujimoto, Kenzo

核酸塩基編集法は一塩基変異などから生じる遺伝子疾患の治療に対する有用な方法である。化学物質を用いて DNA を修飾する化学的手法と酵素的核酸塩基編集法の CRISPR/Cas を使用したゲノム編集やアデノシンデアミナーゼを使用した RNA 編集は、遺伝子疾患の治療法として近年、注目を集めている[1,2]。生体内においてゲノム DNA はコピーが 1 対しか存在しない。そのためゲノム編集はオフターゲット効果のリスクが高いが、RNA は継続的に生成されるため、RNA 編集では DNA 編集と比較してそのリスクを減らすことが可能である。しかし、化学的手法では有害な化学物質を利用している点や酵素的手法においては配列選択性・編集効率が低く、細胞毒性があるという問題を抱えており、より利便性が高い編集法の開発が求められている。我々は、光により架橋と開裂が可能な光応答性人工核酸 3-cyanovinylcarbazole(^{cnv}K)を用いたシトシン(C)からウラシル(U)へのピンポイント編集法を開発している。また、細胞内 RNA に対する光架橋は、細胞内アンチセンス核酸の光制御などにより成功している。これまで、DNA を標的としてシトシンの周囲環境を変えると、生理的条件下で高い脱アミノ化効率を示すことを報告してきた[3]。本研究ではオフターゲット効果のリスクを軽減するために、細胞内に一本鎖で存在する RNA を標的とした光化学的核酸塩基編集を試み、脱アミノ化効率に対する標的シトシンの周囲環境の影響を明らかにしようと考えた。光架橋素子として ^{CNV}K 誘導体、対面塩基にグアニン(G)、イノシン(I)、シトシン(C)を用いてオリゴ DNA(ODN)を合成した。385nm の光照射により標的 RNA 鎖と相補鎖 ODN の光架橋体を作製し、37℃で脱アミノ化反応を行った。後に、312nm の光照射により光開裂させ UPLC 解析をし、ピーク面積から C から U への変換率を算出した。UPLC 解析結果より、すべてのプローブで C から U への変換が確認できた。光架橋素子に 3-carboxyvinylcarbazole(OHVK)、対合塩基にイノシンを用いた場合に最も変換率が高く、37℃で 7 日間反応後に約 70%の変換率を示した。変換効率の違いを議論するため、親水性の指標となる分配係数(LogP)測定を行った。その結果、C から U への変換速度と LogP には相関が見られ、親水性が高いほど変換速度が速いことを見出した。脱アミノ化時の水分子の求核置換反応を促進していると考えられ、標的 RNA 鎖中のシトシン周辺の親水性が RNA 編集(C→U)に大きな影響を及ぼしていることが示唆された。

Reference
1.L.Cong,A.Ran et al,*Science*,**2013**,*339*,819.
2.H.Ota,M.Sakurai et al.,*Cell*,**2013**,*153*,575.
3.S.Nakamura,K.Ishino,K.Fujimoto,*ChemBioChem*,**2020**,*21*,3067.

コレラ菌由来色素分解ペルオキシダーゼによるヘムを分解しない脱鉄機構

○梅津彩加[1]・佐々木美穂[1]・石森浩一郎[1,2]・内田毅[1,2]（[1]北大院総化、[2]北大院理）

Mechanism of iron removal from heme by *Vibrio cholerae* DyP-type peroxidase (Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University[1], Faculty of Science, Hokkaido University[2])
UMETSU, Sayaka[1]; SASAKI, Miho[1]; ISHIMORI, Koichiro[1,2]; UCHIDA, Takeshi[1,2]

鉄の獲得は細菌の増殖に必須であるため、多くの病原菌は、宿主であるヒトから取り込んだヘムを分解し、鉄を取り出す反応を触媒するヘム分解酵素を有している。コレラ菌においてもヘム分解酵素 HutZ が報告されており、分子状酸素を用いてポルフィリン環を開環させ、Fe^{2+}を遊離させる。このようなヘム分解による鉄の獲得機構の阻害は、コレラ菌の抗菌薬の開発の標的となることが期待されるが、近年、大腸菌由来の色素分解ペルオキシダーゼ(DyP)である YfeX が、このようなヘム分解反応を用いずに鉄を遊離することが報告された。これまでの報告では YfeX を過剰発現させた大腸菌の溶菌液にヘムを加えることで、ヘムから鉄が遊離したプロトポルフィリン IX (PPIX)の生成を確認したのみで、その詳細な反応機構は明らかとなっていない。コレラ菌も YfeX と 46%の高いアミノ酸配列同一性をもつ DyP (*Vc*DyP)を有していることから、ヘム分解を経由しない鉄獲得機構を有し、HutZ の機能阻害では十分な増殖阻害が期待できない可能性がある。そこで、本研究では *Vc*DyP におけるヘム分解を経ない脱鉄反応機構の解明を目指した。

我々の先行研究で *Vc*DyP による脱鉄反応が進行することを確認している嫌気、還元条件下で、蛍光分光法を用いて *Vc*DyP の脱鉄反応を PPIX の蛍光により追跡した。その結果 624 nm の蛍光強度が増加し(Fig. 1)、HPLC により生成物を同定したところ PPIX の生成が確認できた。ミオグロビンやヘムだけではこのような蛍光の増加は観測されなかったことから、*Vc*DyP に特有の反応であった。反応に関与するアミノ酸残基を推定するため *Vc*DyP による脱鉄反応の pH 依存性を測定した。その結果、pH 6.5–8 では蛍光強度が増大し、PPIX が生成したが、pH 6.2 以下では蛍光強度は増大せず、PPIX は生成しなかった (Fig. 2)。つまり、His のような pK_a が中性の残基がプロトン化されると反応が進行しないことがわかった。ヘムから PPIX を生成する脱鉄反応としては、塩酸処理が知られている。酸性条件下ではヘムのピロール環にプロトンが付加することでピロール窒素とヘム鉄の間の結合が切断され、その結果、鉄が遊離するが、*Vc*DyP による脱鉄反応では溶媒のプロトンがヘムのピロール環の窒素を直接攻撃するのではなく、His がピロール環へのプロトン付加に関与している可能性が考えられた。ヘムの周辺には軸配位子である His213 しか His は存在しないことから、今後はこの残基を中心にヘムの周辺のアミノ酸残基の寄与に注目して、*Vc*DyP におけるヘム分解を経ない脱鉄反応機構を検討する。

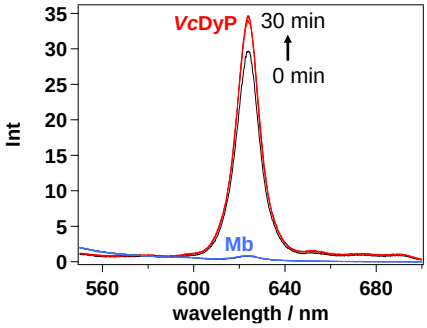


Fig. 1 PPIX generation by *Vc*DyP
black; before reaction, red or blue; after reaction

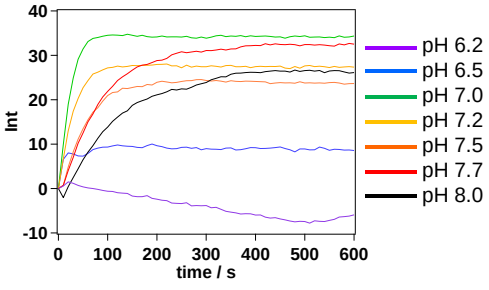


Fig. 2 Time course of intensity change in fluorescence from PPIX

細胞膜透過におけるフォールディング構造が形成する二次元カチオンクラスターの重要性

○羽森真美・北田千江梨・呉原美空・久木望・芝田信人・根木滋（同志社女大薬）

Important role of two-dimensional cationic cluster induced by protein folding in cellular uptake (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts) HAMORI, Mami; KITADA, Chieri; KUREHARA, Miku; KUKI, Nozomi; SHIBATA, Nobuhito; NEGI, Shigeru

近年、塩基性アミノ酸を用いた細胞膜透過性ペプチドに関する研究が数多くさなれている。McNaughton らは、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用いて、タンパク質表面のカチオン性を高めることで膜透過能を付与できることを見出し、タンパク質表面の二次元カチオンクラスターの重要性を示した[1]。そこで本研究では、Sp1 亜鉛フィンガータンパク質 (Sp1ZFP) およびその変異体を用いた細胞膜透過実験を行い、タンパク質表面の二次元カチオンクラスター構造が細胞内移行にどのような影響を与えるかについて検討を行った。ZFP は総電荷数を変化させることなく、Zn (II) 配位の有無のみで二次構造形成のコントロールが行えるため、二次構造形成時に誘起される二次元カチオンクラスターの膜透過への影響を評価するにあたり、最適なモデルタンパク質であると考えられる。

Sp1ZEP の各種フィンガードメイン (Fig. 1) の合成は、大腸菌を用いたタンパク質発現および Fmoc 固相ペプチド合成法を用いて行った。得られたタンパク質の C 末端に Cy5 蛍光ラベルの導入を行い、HeLa 細胞を用いた Sp1ZFP の細胞内分布を共焦点顕微鏡により観察し、細胞内移行量の測定を FACS を用いて行った。

共焦点顕微鏡により、全ての Sp1ZFP において細胞膜透過能が確認され、それぞれ核周辺に局在することが明らかとなった。また FACS による細胞内移行量の検討を行ったところ、各ドメインの細胞内移行量は概ね総電荷に依存したが、例外も認められた。この例外に対して、我々は総電荷数以外にタンパク質表面の二次元カチオンクラスター構造が細胞内移行に重要であると考えた。そこで、シングルフィンガー (1F1, 1F2 および 1F3) に対して、Zn (II) 配位能がなく二次構造誘起ができない Ala 変異体を作成し wt と比較検討を行い、タンパク質表面に形成されるカチオンクラスターの役割を検討した。その結果、いずれの場合も細胞内移行量は 1F-wt >1F-Ala となった。また、1F3 において、その配列中に存在するカチオンクラスターの欠損体を作成し細胞内移行に与える影響を検討したところ、欠損体は野生型と同様な二次構造が形成されているにも関わらず、カチオンクラスター欠損体では野生型と比較し細胞内移行量が明らかに減少することが確認された。以上の結果より、フォールディングによって形成されるフィンガードメイン表面の二次元カチオンクラスター構造は細胞内移行能に影響を与えることが明らかとなり、細胞膜表面との相互作用において重要な役割を果たすことが示唆された。



Fig. 1. Amino acid sequences of Sp1 zinc finger proteins.

1) B. R. McNaughton, J. J. Cronican, D. B. Thompson, D. R. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci*, **106**, 6111 (2009)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

チロシナーゼを用いた迅速かつ効率的な生細胞での近傍ラベリング

○松田侑奈[1]・朱 浩[1]・Jae Hoon Eric Oh[1,2]・中村秀樹[1,2]・辻川宗男[1,2]・田村朋則[1]・浜地格[1,2]（[1]京大院工、[2]JST ERATO）

Rapid and efficient proximity labeling in living cells with engineered tyrosinase (Graduate School of Engineering, Kyoto University[1], JST ERATO[2]) MATSUDA, Yuna[1]; HAO, Zhu[1], JAE Hoon Eric Oh[1,2], NAKAMURA Hideki[1,2], TSUJIKAWA Muneo[1,2], TAMURA Tomonori[1], HAMACHI Itaru[1,2]

近傍ラベリングはオルガネラや、標的タンパク質の周囲でタンパク質を無差別に標識する戦略であり、特定のオルガネラに局在するタンパク質やタンパク質間ネットワークの包括的な同定を可能にする。従来の酵素触媒の近傍ラベリング法ではペルオキシダーゼ (e.g. HRP, APEX) やビオチンリガーゼ (e.g. BioID, TurboID) 等が用いられる。しかしペルオキシダーゼの活性化には有毒な H_2O_2 が不可欠であり、細胞の代謝やタンパク質の翻訳後修飾に深刻な影響を与え、in vivo での適用が制限される。また、BioID 法ではラベリング速度が遅く (18-24 h) 、動的な観測が制限される。TurboID の効率の高さは速い近傍ラベリング (10 分) を可能にする一方、細胞毒性と強いバックグラウンドラベリングを引き起こす。

以上の背景を踏まえ、本研究ではチロシナーゼを用いた新規の近傍ラベリング戦略を報告する。本手法では、目的オルガネラに発現した細菌由来のチロシナーゼ (bmTYR) がフェノール基質を高反応性のキノンへと変換し、近傍タンパク質の求核性残基と反応することでラベル化が進行する (Fig.1) 。bmTYR は単量体でサイズが小さく (34 kDa) 、ジスルフィド結合を持たない。従来法に比べ、 (1) 有毒な H_2O_2 を必要としない (2) ラベル化速度が速い (≦60 分) (3) アフィニティータグとしてビオチンに加え、蛍光色素を含む多様なタグを利用できる (4) 修飾可能なアミノ酸の範囲が広い (Cys, Lys, His) ことが利点である。

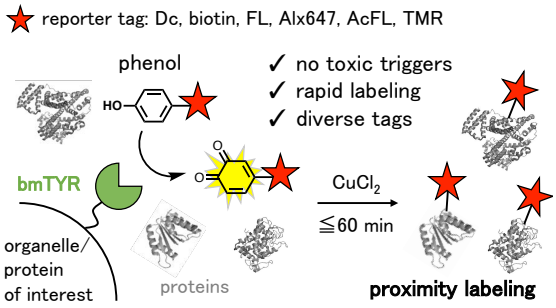


Fig 1. Schematic illustration of proximity labeling with tyrosinase

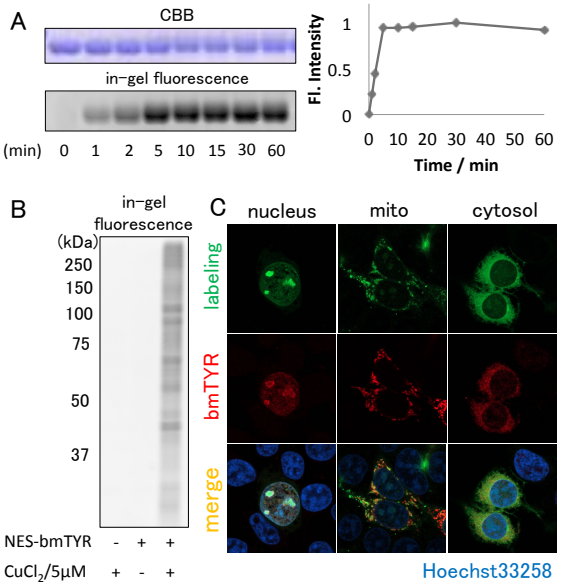


Fig 2. A) Time-dependent BSA labeling. B) and C) Proximity labeling in living cells with subcellular-localized bmTYR.

試験管内の実験において、5 分で顕著な BSA のラベル化が見られた (Fig. 2A) 。生きた細胞に核・ミトコンドリア・細胞質をターゲットした bmTYR を発現させ、プローブ、低濃度の Cu^{2+} (≦10 μM) を添加後 60 分インキュベートすると各細胞小器官で効率良くラベル化が起こった (Fig.2 B, C) 。以上の結果から、チロシナーゼを用いた近傍ラベリングに成功し、本手法がオルガネラレベルの解像度での in vivo プロテオミクスに有用であることが示唆された。

1) Rhee H *et al. Science* **339**, 1328–31 (2013).
2) Roux KJ *et al. J. Cell Biol.* **196**, 801–810 (2012).
3) Branon T *et al. Nat. Biotechnol.* **36,** 880–887 (2018).
4) Qin W *et al. Nat. Methods* **18,** 133–143 (2021).

カルボニル基含有コラーゲンモデルペプチドの三重鎖構造の安定性

○竹村 直記・富﨑 欣也（龍谷大理工）

Stability of Triple-chain Structure of Collagen Model Peptides Containing Carboxyl Groups (Department of Materials Chemistry, Ryukoku University) TAKEMURA, naoki TOMIZAKI, kin-ya

【緒言】病気や骨折などの外部からの強い刺激によって失われた骨を補填する方法として人工骨の利用が推進されている。現在では、構造及び組成の観点から天然の骨と似ているヒドロキシアパタイト（HA）が人工骨の材料として用いられている。しかし、HA 移植後自家骨置換に長時間を要することが知られている。そこで、コラーゲンなどの有機物で HA を被覆することによって骨の成長を促進することができるのではないかと考えた。しかし、天然のコラーゲン利用では一般的に機能制御が困難であること、陸生生物由来の人獣共通感染症のリスク低減や水生生物由来の低い変性温度の改善など解決すべき課題は多い。そこで、当研究室では、化学合成されたコラーゲンモデルペプチドを用いることで天然のコラーゲンの問題点を解決する方法に注目している。本研究では、カルシウムイオンに応答して集合体を形成し、HA 形成を促進することを期待して配列の中央部にアスパラギン酸を配置したコラーゲン分子（CMP-6, Fig.1, ）の合成を試みた。加えて、カルシウムイオンによる影響を考察するためカルボキシ基をもたない対照ペプチド（CMP-7, Fig.1, ）の合成も行った。

CMP-6 : Ac-$(GPO)_5$-GPD-$(GPO)_4$-G-NH_2
CMP-7 : Ac-$(GPO)_{10}$-G-NH_2 O = hydroxyproline

Fig.1. コラーゲンモデルペプチドのアミノ酸配列

【実験】液相合成法によりジペプチド (Fmoc-Gly-Pro-OH) を合成した。次に、固相合成法によりトリペプチド (Fmoc-Gly-Pro-Hyp(^{t}Bu)-OH) を合成した。得られたトリペプチドをビルディングブロックとして固相合成法により CMP-6 及び CMP-7 を合成し、逆相 HPLC 及び MALDI-TOF-MS で目的ペプチドを精製・同定した。また、二次構造及び熱変性温度を評価するため CD スペクトル測定を行った。

【結果と考察】HPLC および MALDI-TOF-MS の測定の結果、コラーゲン分子の中間部にアスパラギン酸による負の電荷を有する CMP-6 および対照コラーゲン分子 CMP-7 の合成に成功したと考えられる。CD スペクトル測定の結果、4℃では CMP-6, CMP-7 ともにトリプルヘリックス構造をとっていることが分かった。熱変性温度は CMP-6 が 60℃ (Fig.2) 、CMP-7 が 70℃ (Fig.3) となり差が現れた。よってカルボキシ基の存在が三重鎖構造を若干不安定することが分かった。

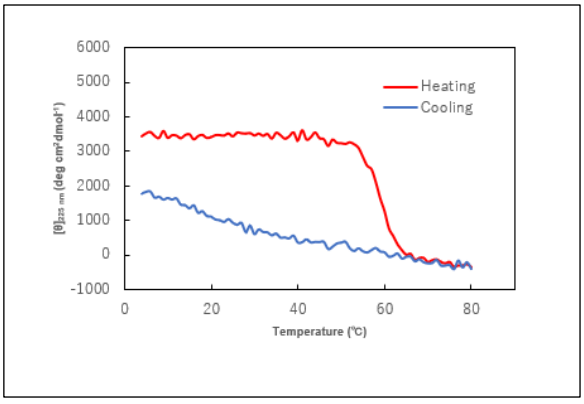


Fig.2. CMP-6 の熱変性温度測定結果

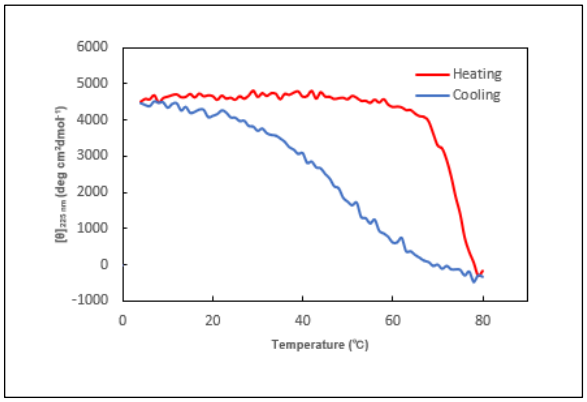


Fig.3. CMP-7 の熱変性温度測定結果

チタン–細胞間接着強化を指向したコラーゲンモデルペプチドの合成

○田中駿・富﨑欣也（龍谷大理工）

Synthesis of A Collagen Model Peptide for Enhanced Titanium-Cell Adhesion. (Department of Materials Chemistry, Ryukoku University) TANAKA, Shun; TOMIZAKI, Kin-ya

近年、世界的な高齢化によりインプラント療法の需要が増加しており、耐腐食性および生体適合性の観点から、インプラントの材料としてチタンが利用されている。しかし、未処理のチタンでは、初期細胞接着量が少ないことによる細菌感染のリスクが課題として挙げられる。その解決策として、チタン表面の化学エッチングや高分子修飾など種々取り組まれている。例えば、天然コラーゲンを用いてチタン表面を修飾する場合、機能制御が困難なこと、陸上生物由来の人獣共通感染症のリスク、水生生物由来の変性温度の低さ等が挙げられるなどの課題は多い。しかし、化学合成されたコラーゲンモデルペプチド (CMP) を用いることでこれらの問題点を改善できるのではないかと考える。そこで本研究では、チタンと特異的に結合するチタン表面認識配列であるヒスチジン、リシン、ヒスチジン (HKH) [1]と、細胞表面のインテグリンと特異的に結合する細胞接着配列であるグリシン、フェニルアラニン、ヒドロキシプロリン、グリシン、グルタミン酸、アルギニン (GFOGER) [2]の二種の配列を典型的なコラーゲン配列に取り込んだ CMP-8 を設計・合成した (Fig.1)。

CMP-8 : Ac-His-Lys-His-Ape(5)-(Gly-Pro-Hyp)$_4$-Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg-(Gly-Pro-Hyp)$_4$-Gly-NH_2

Fig. 1. CMP-8 のアミノ酸配列

まず、液相合成法によりジペプチド (Fmoc-Gly-Pro-OH) を合成し、次いで、固相合成法によりトリペプチド (Fmoc-Gly-Pro-Hyp(^{t}Bu) -OH) を合成した。得られたトリペプチドをビルディングブロックとして固相合成法により CMP-8 を合成した。得られたペプチドを 0.1 M Tris – HCl 溶液に溶解し、4 ℃で 24 時間集合化させ CD スペクトル測定により二次構造を評価した。その後、波長を 225 nm に固定し、温度変化を 1 K / min に設定し、熱変性温度の測定を行った(Fig.2)。

CD スペクトル測定の結果から、4 ℃ではトリプルヘリックス構造を形成し、80 ℃ではランダム構造へと転移したことが分かった。また、再度冷却するとトリプルヘリックス構造へと可逆的に構造転移した。このことから、構造の可逆的な転移が確認でき、熱変性温度を 48 ℃と決定した。

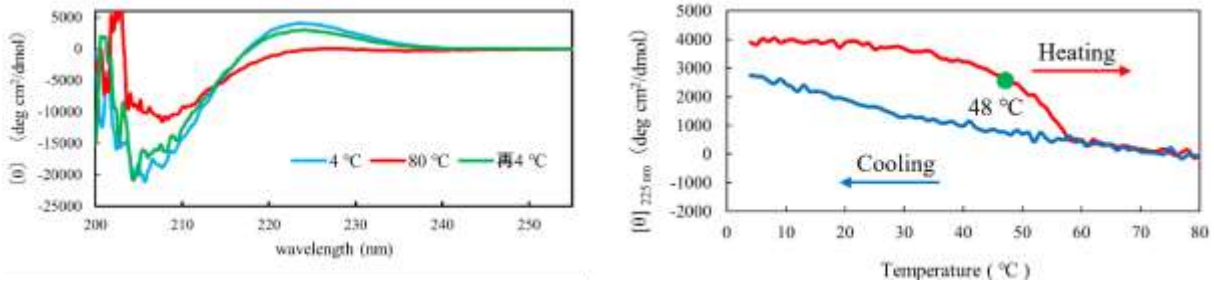


Fig. 2. CMP-8 の二次構造評価, [CMP-8] = 200 μM in 0.1 M Tris-HCl

[1] Kooh, X. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131* (31), pp 10992–10997.

[2] Khew S. T. and Tong Y. W. *Biomacromolecules* **2007,** *8*, 3153-3161

AFM を用いたファイバータンパク質 AtaA の力学特性解析法の確立

○鈴木浩平・吉本将悟・堀克敏（名大院工）

Establishment of analysis method for the mechanical property of a fiber protein using AFM (Graduate School of Engineering, Nagoya University) SUZUKI, Kohei; YOSHIMOTO, Shogo; HORI, Katsutoshi

アシネトバクター属細菌 Tol 5 は、細胞表面に存在する長さ 250 nm のファイバータンパク質 AtaA を介してプラスチックやガラス、金属など様々な材料表面に対して高い付着性を示す [1]。原子間力顕微鏡（AFM）を用いた解析により、AtaA の付着には材料表面との直接的な相互作用だけでなくファイバーのもつ粘弾性などの力学特性も重要な役割を果たすことが最近分かってきた。しかし AtaA ファイバーに力がかかった際にどのような力学特性を示すのか、そしてそれがどのようなメカニズムで発揮されるのかの詳細についてはほとんどわかっていない。そこで本研究では、SpyTag/SpyCatcher[2]を用いて AtaA をカンチレバープローブに共有結合で架橋することで、ファイバーの伸展に伴うフォースーディスタンス（FD）カーブを AFM で一分子測定する実験系の確立を目指した。

まず、SpyTag を付加した AtaA を発現する細胞の構築を試みた。AtaA の N 末端の球状ドメイン（Nhead）を欠損させ、代わりに SpyTag を付加した組換え AtaA (SpyTag-ΔNhead-AtaA) の発現プラスミドを構築した（Fig.1A）。これを Tol 5 の *ataA* 欠損株（Tol 5 Δ*ataA*）に導入して発現させ SDS-PAGE とフローサイトメトリーに供したところ、タンパク質の生産及び細胞表層への提示が検出された。SpyTag-ΔNhead-AtaA を発現させた Tol 5 Δ*ataA* を SpyCatcher と混合し SDS-PAGE に供したところ、 SpyTag/SpyCatcher 間での共有結合形成に伴う電気泳動移動度の減少が検出された。よって、SpyTag を付加した組換え AtaA が Tol 5 Δ*ataA* の細胞表層に適切に提示されていることが確認できた。

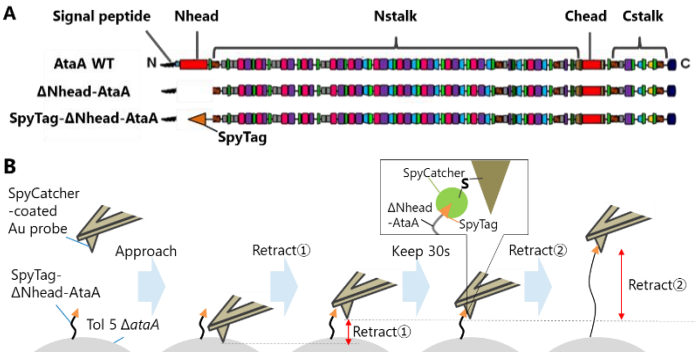


Fig. 1. (A) Schematic representation of AtaA, ΔNhead-AtaA and SpyTag-ΔNhead-AtaA. (B) The analytical method for the mechanical property of Spy-tagged AtaA using AFM.

続いて、SpyTag-SpyCatcher 結合を介して AtaA を AFM プローブに架橋し、ファイバーの伸展に伴う FD カーブの取得を試みた（Fig. 1B）。SpyTag-ΔNhead-AtaA と ΔNhead-AtaA をそれぞれ発現させた Tol 5 Δ*ataA* をガラス基盤に固定化し、Cys-SpyCatcher で修飾した金コートプローブを細胞膜から約 200 nm の高さで 30 秒間静止させることで SpyTag-SpyCatcher 結合を形成させた。その後 1 μm/s の速度で伸展させながら FD カーブを取得したところ、SpyTag の有無によって伸長距離と結合力に差が見られ、SpyTag-ΔNhead-AtaA では AtaA 全長を伸展していると考えられる FD カーブを一定の割合で取得することができた。

1) M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori, *PLOS ONE*, 7, e48830 (2012)
2) B. Zakeri, J. O. Fierer, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(12), E690-E697

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

有機光増感色素とタンパク質から構成される光レドックス人工酵素の開発

○内田裕貴・大洞光司・林 高史（阪大院工）

Construction of a Photoredox Artificial Enzyme Consisting of an Organic Photosensitizer and Protein (Graduate School of Engineering, Osaka University) UCHIDA, Yuki; OOHORA, Koji; HAYASHI, Takashi

光レドックス触媒は、光による励起エネルギーを利用することで、熱による活性化では困難な反応の進行が期待されるため、活発に研究が行われている。近年では、光レドックス触媒と生体触媒を組み合わせた反応系が注目されており、光レドックス触媒の反応の多様性と、生体触媒の基質特異性、立体・位置選択性を組み合わせ、温和な条件下での反応と立体選択性の発現を可能にしている。しかし、多くの研究は光レドックス触媒による反応と生体触媒による光学分割の２段階の反応により、立体選択性を発現させており、光レドックス触媒反応の立体選択性を直接的に制御する系は限られている。そこで我々は、タンパク質の反応場に光レドックス触媒を配置し、光反応の立体選択性の制御を可能にする光レドックス人工酵素の開発を試みた。本研究では、光レドックス触媒として、有機光増感色素フルオレセイン、エオシン Y、ローダミン B、ローズベンガルを選択し、タンパク質は、フルオレセインと結合した結晶構造が報告されているリポカリンを選択した [1]。本研究では、これら有機光増感色素とリポカリンを組み合わせ、常温・常圧・水中の温和な条件の下、直接エナンチオ選択的な光誘起イミン還元反応を実現する光レドックス人工酵素の構築を目指している(Fig. 1)。

まず、モデル反応として既報 [2] を参考に 3,4-ジヒドロイソキノリン誘導体のイミン還元反応を選択した(Fig. 1)。触媒としてフルオレセイン、エオシン Y、ローダミン B、ローズベンガルのいずれかを用いて、アスコルビン酸($AscH_2$)、3-メルカプトプロピオン酸(MPA)および 4-メルカプトフェニル酢酸(MPAA)の存在下で、青色 LED の照射によるイミン還元反応を評価した。その結果、すべての有機光増感色素において、光レドックス人工酵素の活性中心として働く可能性を示した。続いて、大腸菌を用いてリポカリンを発現し、フルオレセインに対するリポカリンの滴定実験から結合能を確認した。本発表では、有機光増感色素とリポカリンの複合体を触媒とするイミン還元反応の活性を報告する予定である。

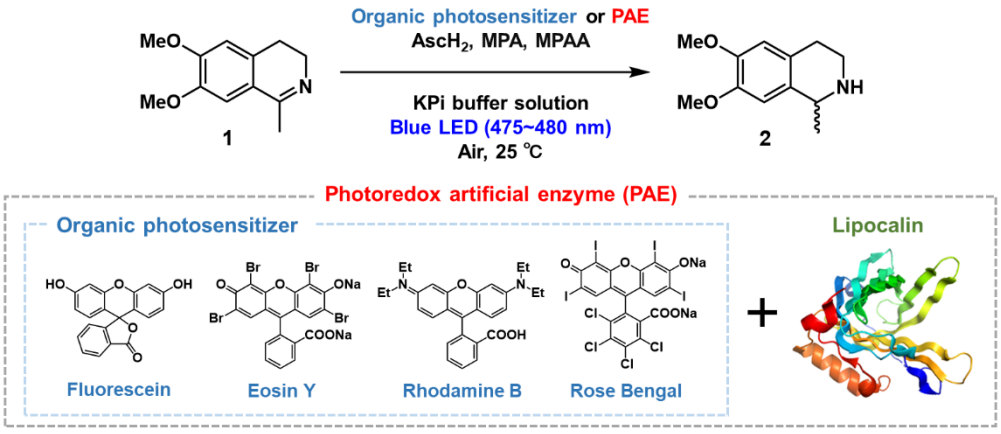


Fig 1. Imine reduction by each organic photosensitizer or photoredox artificial enzyme (PAE).

1) A. Skerra *et al*., *PROTEINS*, **2003**, *53*, 121-129.
2) O. S. Wenger *et al.*, *Chem. Sci.*, **2018**, *9,* 5052–5056.

DNA コンジュゲートの光二量化を利用した二本鎖 DNA の特異的認識

○西村健人・北村裕介・勝田陽介・井原敏博（熊本大院先端）

Specific Recognition of double-stranded DNA through photo-dimerization of anthracene-modified DNA conjugates. (Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University) NISHIMURA, Kento; KITAMURA, Yusuke; KATSUDA, Yousuke; IHARA, Toshihiro

当研究室における過去の研究によって、アントラセン修飾 DNA コンジュゲートと鋳型となる標的 DNA で形成したタンデム二本鎖複合体への光照射によって、境界で近接したアントラセン二分子の光二量化を介し、標的一本鎖 DNA を配列依存的に可逆的にラベル化することが可能であることがわかった [1]。この光反応は迅速かつ高収率に進行し生体直交的であることから、いわゆる「フォトクリック反応」といえる。これまでに様々なモチーフの核酸を鋳型とした検討を行っている。さらなる汎用性の向上を目指し、本研究では、長鎖の二本鎖を鋳型としたフォトクリック三本鎖形成による二本鎖 DNA の特異的な認識を試みる。三本鎖目のオリゴヌクレオチド（TFO）が結合可能な配列はホモプリン配列に限定されるが [2]、Fig. 1 に示すようにホモプリン鎖を乗り換えながら TFO を結合させることで、比較的長い二本鎖も標的とすることが可能になると考えた。また、Hoogsteen 型の塩基対を形成して結合する TFO はもとより結合安定性が低いが、TFO の末端にアントラセンを修飾しこれらを光化学的に連結することで、三本鎖構造の安定性向上が期待できる。

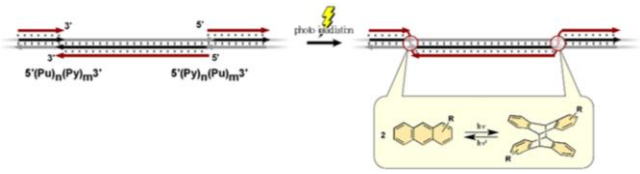


Fig. 1. Photo-induced triplex formation through the dimerization of anthracene-modified DNAs.

TFO がパラレル型のモチーフにて結合する三本鎖に関して検討を行った。鎖を乗り換えながらホモプリン配列を有する二本鎖をモデル標的として用いた。この場合、三本鎖目は逆向きの極性で結合するため、アントラセン修飾 DNA コンジュゲート（**AntDNA**）は 5'-5'、3'-3'間にて連結することになる。その際、アントラセンと DNA を繋ぐリンカーの長さが連結効率や速度に対して重要な要素となることが予想されるため、三種類（炭素数 3, 6, 8）のリンカー長のプローブを合成した。続いて、標的二本鎖に対して TFO となる **AntDNA** を添加し三本鎖を形成させた。0ºC にて 365 nm の LED 光（照射距離 1.5 cm, 300 mW）を 0～480 秒照射した後、逆相 HPLC により連結収率の確認を行い、同時に連結体を単離回収した。これを用いて融解実験を行い、光照射前後にて形成される三本鎖の安定性を評価した。

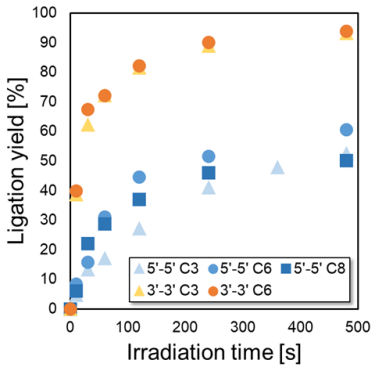


Fig. 2. Time course of the photo-dimerization.

Fig. 2 に示すとおり、3'-3'間での連結反応はリンカー長によらず、高い連結収率（90%以上）にて迅速に進行した。一方、5'-5'間ではどのリンカー長においても 50%程度しか進行しなかった。三本鎖形成時の末端間距離が構造上 3'-3'間より 5'-5'間の方が遠いことに加え、平面なアントラセンが DNA 二重鎖の塩基対間へインターカレートしていることが、連結収率低下の原因として予想される。今後は、嵩高いアントラセンを修飾したプローブを用い連結収率の改善を試みる。また、リンカー長に関わらず全てのプローブにおいて、光連結体は、未連結時より高い融解温度（T_m）を示すことが分かった。

1) T. Ihara et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *29*, 8880-8881.
2) S. M. Mirkin et al., *Nature*. **1987**, 330, 495.

がん選択的な核酸集合体構築による細胞死誘導

○大住拓輝[1]・森廣邦彦[1]・岡本晃充[1,2]（[1]東大院工、[2]東大先端研セ）

Cancer specific assembly of nucleic acids induces cell death (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo[1], Research Center for Advanced Science and Technology (RCAST), The University of Tokyo[2]) OSUMI, Hiraki[1]; MORIHIRO, Kunihiko[1]; OKAMOTO, Akimitsu[1,2]

核酸医薬は低分子医薬や抗体医薬では標的化が困難な分子を標的とすることができ、難治性疾患など従来では治療が難しかった分野への応用が期待されている。特に近年は核酸の化学修飾技術や標的部位への送達技術の進歩により核酸医薬品の認可が加速している。一方、核酸医薬の時空間的な機能制御を志向して核酸の保護基やプロドラッグの研究も行われているが、化学合成が簡便で、合成条件下でも血中でも安定であり、かつ細胞内環境に応じて選択的に脱保護される保護基の開発は困難を極めている。もし病変細胞内で選択的に核酸医薬を in situ 構築することができれば、そのプロドラッグ開発に大きなブレークスルーをもたらすことができる。

細胞内で構築する核酸医薬として、本研究では自然免疫を活性化する長鎖 DNA 二重鎖に着目した。長鎖 DNA 二重鎖は cGAS など細胞質中の DNA センサーに認識されることで I 型インターフェロンの発現を介して自然免疫を活性化し、細胞死を誘導する[1]。この機構のがん治療への応用が期待されているが、正常細胞への毒性や長い核酸分子をがん選択的に送達することの困難さが大きな障壁となっている。そこで、DNA ナノテクノロジーの一種である Hybridization Chain Reaction (HCR) により、短い DNA 分子から長鎖 DNA 二重鎖を細胞内で構築することを考えた。HCR とは、トリガー核酸を起点として二種類のヘアピン型 DNA 間で繰り返される鎖交換反応により長鎖 DNA 二重鎖が構築される反応であり、温度制御や特殊な酵素を必要としないため細胞内での利用に適している (Fig. 1A)[2]。がん細胞で過剰発現している miRNA をトリガー核酸として用いることで、がん細胞選択的に長鎖 DNA 二重鎖を構築して免疫を惹起し、副作用の低いがん治療法の開発を目指す (Fig. 1B)。

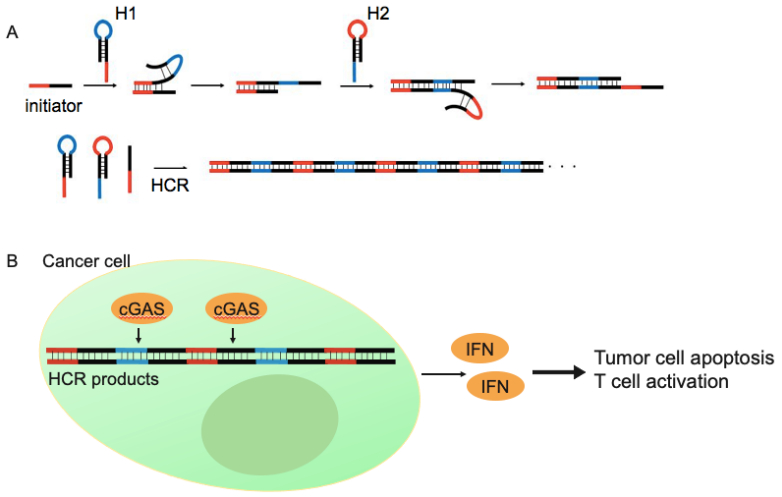


Fig 1. (A) Schematic illustration of HCR. (B) HCR products in cytoplasm induce immune stimulation and tumor cell death.

本研究では、試験管および細胞内において、二種のヘアピン型 DNA プローブが miRNA に応答して HCR を進行させることを確認した。また、代表的な細胞質中の DNA センサーである cGAS が HCR 産物に結合することも確認した。さらに、miRNA の発現量に応答した細胞死の評価も行なった。

1) Chen. *et al*., *Nat. Immunol.*, **2016**, *17*, 1142-1149
2) Pierce. *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2004**, *101*, *43*, 15275-15278

Poster

Thu. Sep 9, 2021 2:40 PM - 3:40 PM JST | Thu. Sep 9, 2021 5:40 AM - 6:40 AM UTC | Second half number Zoom

Odd (2P-049~2P-093)

[2P-049] Development of universal mPEG carrier for mass synthesis of DNA liquid phase

*Tomoki Nishikawa[1], Akinori Kuzuya[1] (1. Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai Univ)

[2P-051] Quantitative PCR Descriminating Single Point Mutation Using Chemically Modified Primers

*Masayuki Fujii[1], Ryosuke Fujita[1], Maika Sonokawa[1], Masaaki Hisano[1] (1. Department of Biology and Chemistry, Kindai University)

[2P-053] Photo-cross-linking oligonucleotides with a photoresponsive α-bromoaldehyde moiety for regulation of mRNA point mutations

*Kentaro Kobata[1], Ivana Dvořáková[1], Ryo Ota[1], Soichi Tatsumi[1], Tomonori Waku[1], Akio Kobori[1] (1. Kyoto Institute of Technology)

[2P-055] Folding of the multimer RuBisCO on the DNA nanostructure scaffold

*Hiroaki Konishi[1], Huyen Dinh[2], Eiji Nakata[1,2], Haruyuki Atomi[3], Takashi Morii[1,2] (1. Graduate School of Energy Science, Kyoto University, 2. Institute of Advanced Energy, Kyoto University, 3. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[2P-057] Analysis for interactions between repeated RNAs and peptides involved in neurodegenerative diseases

*Hisae Tateishi-Karimata[1], Tatsuya Ohyama[1], Shigenori Tanaka[2], Naoki Sugimoto[1,3] (1. Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research (FIBER) Konan University, 2. Department of Computational Science, Graduate School of System Informatics, Kobe University, 3. Graduate School of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University)

[2P-059] Development of a new method using photolabile protective groups for synthesis of oligonucleotides on a porous glass contain an activator

*Saaya Akazawa[1], Yu Miyazaki[1], Koichiro Miyauchi[1], Yu Ito[1], Akihiro Ohkubo[1] (1. Life Science and Technology,Tokyo Institute of Technology)

[2P-061] Effect of cation cluster length on DNA condensation and in vitro transcription/translation

*SHIGERU NEGI[1], YAMANE Momona[1], YABUTA Megumi[1], KAMIYA Amon [1], HAMORI Mami[1], NAKAGAWA Yuka[2] (1. Doshisha Wemen's University, 2. University of Hyogo)

[2P-063] Photochemical 5-methycytosine to thymidine editing using ultrafast DNA photo-cross-linking

*Issei Shinozaki[1], Licheng WAN [1], Shigetaka Nakamura[1], Kenzo Fujimoto[1] (1. Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[2P-065] Regulation of liposome aggregation using ultrafast DNA photocrosslinking

*ZUMILA HAILILI[1], Masakatsu Ichikawa[1], Shigetaka Nakamura[1], Kenzo Fujimoto[1] (1. School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[2P-067] Prototype Screening of HaloTag-based Chemigenetic Indicators

*Dazhou CHENG[1], Wenchao ZHU[1], Takuya TERAI[1], Yusuke NASU[1], Robert Earl CAMPBELL[1,2] (1. Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo, 2. Department of Chemistry, University of Alberta)

[2P-069] Activatable ^{19}F MRI probes for in vivo Detection of α-Amylase as Infectious Disease Marker

*Yuya Otera[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[2P-071] A Screening System for Protein Enzymes by Encapsulating a Single Cell Recombinant *E. coli* into a Micro-droplet

*Kazuhiro Abe[1], Yoshiya Ikawa[2], Shigeyoshi Matsumura[2] (1. Graduate School of Science and Engineering, Toyama University, 2. Graduate School of Science and Engineering, Toyama University)

[2P-073] ALDH1A1-Responsive Turn-on Fluorescent Probe for High-Contrast Cancer Stem Cell Imaging

*Kanae Suzuki[1], Masahiro Oe[1], Koji Miki[1], Kouichi Ohe[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[2P-075] Cytokine Biosensing using Glycopolymer-brush Interface

*Yuhei Terada[1,2], Hyota Takamatsu[3], Masato Saito[1,2], Eiichi Tamiya[1,4] (1. Advanced Photonics and Biosensing Open Innovation Laboratory, AIST, 2. Department of Applied Physics, Graduate School of Engineering, Osaka Universit, 3. Department of Respiratory Medicine and Clinical Immunology, Graduate School of Medicine, Osaka University, 4. The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University)

[2P-077] Photo-click reaction by water-soluble single-chain nanoparticles containing photoredox catalysis

*Ken Nishioka[1], Mitsunobu Nakamura[1], Tadao Takada[1] (1. University of Hyogo)

[2P-079] Phase selectivity of hierarchical supramolecular polymers and control of enzymatic activity under liquid-liquid phase separation environment

*Hiroki Obayashi[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1,2], Noriho Kamiya[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyusyu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

[2P-081] Evaluation of pH- and Salt Concentration-Dependent Self-Assembly Behavior of an Amphiphilic 4-Aminoquinoline Derivative

*Fangzhou Cheng[1], Yosuke Hisamatsu[2], Katsuhiro Yamamoto[3], Hiroshi Takase[4], Naoki Umezawa[2], Tsunehiko Higuchi[2] (1. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 2. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, 4. Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University)

[2P-083] Oxidation Ability of Tetrahedral Cu(II) Complexes Having Labile Coordination Site Relevant to Biological Copper Reaction Centers

*Lan Yang[1], Yuma Morimoto[1], Hideki Sugimoto[1], Shinobu Itoh[1] (1. Osaka University)

[2P-085] Synthesis of anti-inflammatory fatty acid metabolite 17,18-EpETE analogues with improved biostability

*Mayuko Akita[1], Yutaro Saito[1], Azusa Saika[2], Takahiro Nagatake[2], Akiharu Uwamizu[3], Junken Aoki[3], Jun Kunisawa[2,4], Shinsuke Sando[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, 3. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 4. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University)

[2P-087] Synthesis of nata de coco carrying GM3- and Gg3-trisaccharides and their associations induced by carbohydrate-carbohydrate interactions

*Mizuki Tobito[1], Teruaki Hasegawa[2] (1. Graduate School of Life Sciences, Toyo University , 2. Faculty of Life Sciences, Toyo University)

[2P-089] Moment Analysis of Solute Permeation at the Interface of Liposomes by Capillary Electrophoresis

*Shunta Inaba[1], Kanji Miyabe[1] (1. Graduate School of Science, Rikkyo University)

[2P-091] Study on Cancer Peptide Vaccine Using Mesoporous Silica Nanoparticles

*Tomoya Ueno[1], Koichi Goto[1], Yoko Matsumoto[1] (1. Graduate School of Engineering, Sojo University)

[2P-093] Synthesis and evaluation of At-211 labeled functional gold nanoparticles for radionuclide therapy

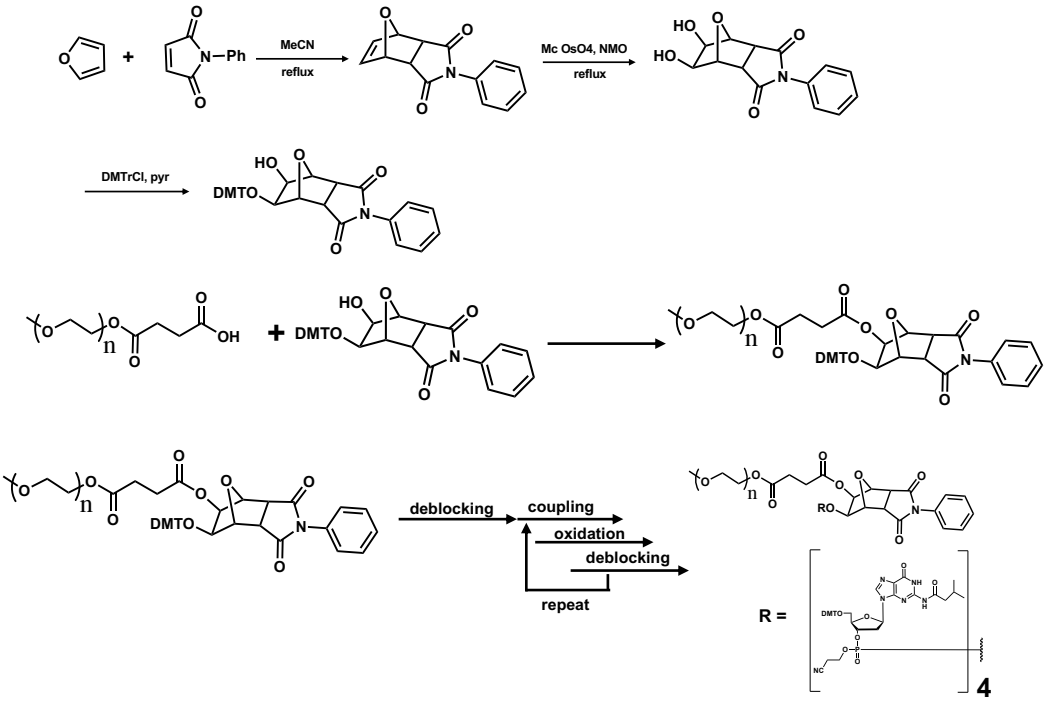
*Xuhao Huang[1], Kazuya Kabayama[1,2,4], Yuichiro Kadonaga[2,4], Atsushi Shimoyama[1,2,4], Kazuhiro Ooe[3,4], Atsushi Toyoshima[2,4], Atsushi Shinohara[2,5], Koichi Fukase[1,2,4] (1. Graduate School of Science, Osaka University, 2. Institute for Radiation Sciences, Osaka University, 3. Graduate School of Medicine, Osaka University, 4. Project Research Center for Fundamental Sciences, Graduate School of Science, Osaka University, 5. Osaka Aoyama University)

DNA 液相大量合成法のためのユニバーサル mPEG 担体の開発

○西川 智貴・葛谷 明紀（関西大化学生命工）

Development of universal mPEG carrier for mass synthesis of DNA liquid phase (Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai Univ.) Nishikawa Tomoki; Akinori Kuzuya.

核酸はナノテクノロジー分野での利用だけに留まらず，アプタマー[1]をはじめとするターゲット分子の検出分野や，アンチセンス試薬などの核酸医薬の分野でも利用されている。さらに近年，DNA の配列特異的な認識能や DNA への化学修飾が容易な点を利用することによる，DNA ヒドロゲルを開発する研究も盛んに行われている[2]。DNA ヒドロゲルは，組織再生用足場材料や細胞培養基材，DDS (Drug Delivery System) 用材料の様な医療材料や，マイクロ流路などのスイッチング剤としての利用が期待されている。しかしながら，DNA ヒドロゲルの実用化は，大量に合成することが難しいため容易では無い。当研究室は，mPEG を担体として用いる Bonora らの HELP 法[3]を活用し，PEG-DNA 間にエステル結合を有さない複合体の大量合成に成功している[4]。本研究では，DNA 自動合成法のためのユニバーサルサポートとして利用されている UnyLinker[5]を HELP 法に適用することで，個別の mPEG 担体の調製をすることなく DNA を大量に合成することを検討した。



Scheme 1. Synthesis of universal mPEG support.

Scheme 1 に示したように既法に従い UnyLinker を合成した。その後コハク酸で活性化されたメトキシ PEG とカップリングし，ユニバーサル mPEG 担体を合成した。この担体を用いてデオキシグアニンを四塩基伸長した。

1) Damm, K, Hemman, *et al., EMBO J.* **2001**, 20, 6958–68.
2) Nagahara, S, *et al., Polym. Gels Networks* **1996**, *4*, 111–127.
3) G. M. Bonora *et al*., *Biol. Proced. Online* **1998**, *44*, 60-69.
4) S. Tanaka, *et al., Chem. Asian J*. **2017,** *12*, 2388-2392.
5) Vasulinga T. Ravikumar, *et al., Chem. American S*. **2008,** *12*, 3, 399-410.

化学修飾プライマーを用いる一塩基変異識別定量 PCR

○藤田亮祐、園川舞華、久野雅明、藤井政幸（近畿大産理工）

Quantitative PCR　Descriminating Single Point Mutation Using Chemically Modified Primers (Department of Biological & Environmental Chemistry, Kindai University) FUJITA, Ryosuke; SONOKAWA, Maika; HISANO, Masaaki; FUJII, Masayuki

一塩基多型(SNPs)や癌ドライバー遺伝子における点変異の解析はゲノム医療の基盤技術として重要性を増している。PCR 技術は遺伝子解析を含めあらゆるバイオサイエンスの分野で汎用されている。しかしながら、野生型遺伝子と変異型遺伝子を同時に発現しているヘテロ型対立遺伝子を有する細胞内で両者を識別して定量解析することは困難である。

本研究では 3’-末端に 2’-OMe/LNA ホスホロチオエート骨格を導入した PCR プライマーを利用して $KRAS^{wt}$ と $KRAS^{G12D}$ を識別できる PCR 技術を開発することを目的として検討を行った。用いたテンプレート、プライマーは以下のとおりである。

T1 (227G)/ T2 (227A):

acttgtggtagttggagctg(g/a)tggcgtaggcaagagtgccttgacgatacagctaattca-gaatcatttgtggacgaatatgatccaa

Reverse: 5’-ttggatcatattcgtccacaa-3’

F-KRAS((227G): 5’-acttgtggtagttggagctg^G-3’

F-KRAS (227A): 5’-acttgtggtagttggagctg^A-3’

大文字 ＝2’-OMeRNA, LNA、小文字 ＝DNA、^＝ ホスホロチオエート

DNA ポリメラーゼには TaKaRa Taq™, TaKaRa EX Taq™, HiDi DNA Polymerase™ の 3 つを用いた。TaKaRa Taq™ と HiDi DNA Polymerase™ は 3’-エクソヌクレアーゼ活性を持たず、TaKaRa EX Taq™ は 3’-エクソヌクレアーゼ活性（プルーフリーディング活性）を持っている。一例としてホスホロチオエートプライマーと TaKaRa Taq™ を用いた結果を表に示す。テンプレートとプライマー3’-末端のミスマッチがある場合でも増幅反応が起こっていることがわかる。この場合、ミスマッチ塩基対のまま DNA 鎖を伸長したと考えられる。また、A-C ミスマッチでは増幅が遅かったが、G-T ゆらぎ塩基対ではかなり早い増幅が見られた。その他のポリメラーゼ、化学修飾プライマーの組み合わせについても考察する。

表．ホスホロチオエートプライマーと TaKaRa Taq™ を用いた $KRAS^{wt}$/$KRAS^{G12D}$ 遺伝子の定量解析

	T1 (227G)		T2 (227A)	
Primer	Product	Ct	Product	Ct
G1 (PO)	++	16.12	+ (G-T)	17.52
G2 (PS)	++	15.57	+ (G-T)	16.50
A1 (PO)	+ (A-C)	20.84	++	17.10
A2 (PS)	+ (A-C)	19.48	++	16.87

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

点変異 mRNA 選択的な遺伝子発現抑制を志向した光応答性 α-ブロモアルデヒド修飾核酸の開発

○小畑健太郎・Ivana Dvořáková・太田良・辰巳颯一・和久友則・小堀哲生（京工繊大院工芸）

Photo-cross-linking oligonucleotides with a photoresponsive α-bromoaldehyde moiety for regulation of mRNA point mutations. (Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology) Kentaro Kobata, Ivana Dvořáková, Ryo Ota, Soichi Tatsumi, Tomonori Waku, Akio Kobori

特定の遺伝子上に生じる一塩基の変異が細胞のガン化に関与することが明らかとなっている。GTP 結合タンパク質をコードする K-ras 遺伝子は、コドン 12 のグアニンが、ウラシルまたはアデニンへと変異することで細胞のガン化を誘導することが報告されている。また、同じく GTP 結合性遺伝子の一つである Rac 遺伝子の点変異も細胞のガン化を誘導することが報告されている。このような遺伝子上に生じる一塩基の違いを識別することは非常に困難であり、従来の抗がん剤では変異型の遺伝子だけでなく、正常な遺伝子の機能も抑制し、副作用を引き起こすという問題があった。そのため一塩基の差を正確に識別し、点変異をもつ遺伝子の選択的な翻訳抑制を可能とする新たな抗がん剤の開発が強く望まれている。

我々は、点変異を有する変異型 RNA とのみ反応する光架橋性核酸を利用することで、疾患関連タンパク質の選択的発現制御を可能とする薬剤の開発を目指している。当研究室ではこれまでに、光反応性基である光応答性α-クロロアルデヒドを有する光架橋性核酸 ^{pro}PCA-ODN[(1)]を開発しており、生理的条件下においてアデノシンおよびシトシンと選択的かつ高効率で架橋できることを報告している。また一方で、我々は細胞内で光架橋反応を利用した遺伝子発現抑制について評価しており、架橋効率だけでなく反応速度も重要であるという知見を得ている[(2)]。そこで本研究では、反応速度のさらなる向上を目指し、α-ハロアルデヒド部位の塩素を臭素へと変更した光架橋性核酸 ^{pro}PBA-ODN (**Figure 1a**) を新たに設計した。

合成した ^{pro}PBA-ODN と標的 RNA を用いて光架橋実験を行った。その結果、^{pro}PBA-ODN は点変異 RNA (ORN(A), □)と選択的に光架橋反応を起こした(**Figure 1b**)。また、その反応速度を ^{pro}PCA-ODN (□)と比較したところ、5.3 倍増加することが明らかとなり、架橋反応の反応速度を向上させることに成功した。本発表では、変異型 K-ras mRNA を発現する Panc-1 細胞内において、^{pro}PBA を導入した光架橋性核酸による遺伝子発現抑制効果を検討したことについても発表する。

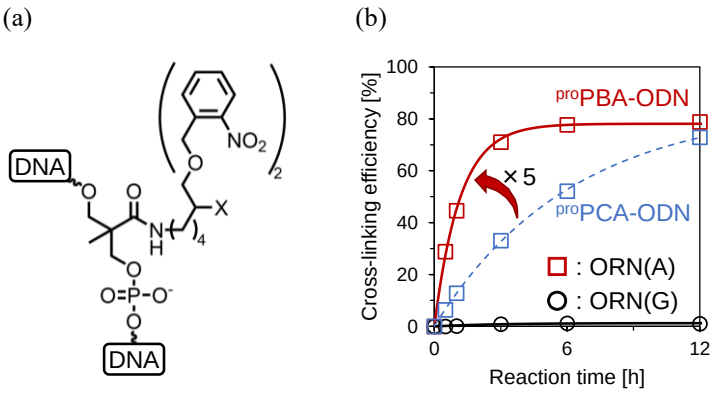


Figure 1. Photo-cross-linking studies on ODNs containing ^{pro}PBA. (a) Chemical structure of Photoresponsive ODNs. (^{pro}PCA-ODN:X=Cl, ^{pro}PBA-ODN:X=Br) (b) Time course of the photo-cross-linking reactions between ORNs and ^{pro}PXA-ODN.

(1) Y. Sugihara, *et al*., *J. Org. Chem.*, **2016**, *81*, 981-986.
(2) Y. Sugihara, *et al*., *Chem. Lett*., **2017**, *46*, 1265-1268.

DNA ナノ構造体を足場にした多量体 RuBisCO の構築

○小西宏明[1]・Dinh Huyen[2]・中田栄司[1,2]・跡見晴幸[3]・森井孝[1,2]（[1]京大院エネ、[2]京大エネ研、[3]京大院工）

Folding of the multimer RuBisCO on the DNA nanostructure scaffold (Graduate School of Energy Science, Kyoto University[1], Institute of Advanced Energy, Kyoto University[2], Graduate School of Engineering, Kyoto University[3]) KONISHI, Hiroaki[1]; HUYEN Dinh[2]; NAKATA, Eiji[1,2]; ATOMI, Haruyuki[3]; MORII, Takashi[1,2]

生体細胞内での酵素は、単一の酵素が多量体を構築したり、複数の酵素が区画内で連続して配置されることで、空間的に制限を受けていることが知られている。代謝に関わる酵素もこのような組織化によって、反応物や中間体の濃度を制御して酵素反応の効率化が実現されると考えられる。植物細胞や細菌中に存在する酵素 RuBisCO は炭酸固定化反応を担う酵素であり、多量体を構築することで活性を持ち、その多量体が集合した区画の中で高効率な反応を進める系も存在する[1)]。このような酵素複合体を試験管内で再現することで、生体内での高効率な代謝反応の機構を解析できる。本研究では、ホモ十量体からなる好熱性古細菌由来の RuBisCO (Tk-RuBisCO)[2)]に着目し、DNA オリガミ法[3)]で構築した DNA ナノ構造体上に集積させる方法を検討した。当研究室ではこれまでに、DNA 結合性タンパク質を介して、DNA ナノ構造体上の特定の位置に目的タンパク質を配列特異的に一分子ずつ配置する技術を開発してきた[4,5)]。この方法を用いることで、平面に 5 箇所の二量体タンパク質結合部位を有する DNA ナノ構造体が Tk-RuBisCO 十量体を配置する足場になると考えた。

Tk-RuBisCO に GCN4 ロイシンジッパーを融合したタンパク質 GCN4-Tk-RuBisCO (G-TkRBC) (Fig. (a))を合成し、その酵素活性をリブロース-1,5-ビスリン酸のカルボキシル化反応から評価した。その結果、元の Tk-RuBisCO に比べて低いものの活性が確認された。次に、GCN4 が結合する DNA 配列を含む DNA ナノ構造体 (Fig. (b))に G-TkRBC が結合することを原子間力顕微鏡 (AFM) 観察とアガロースゲル電気泳動によって確認した。また、この複合体の酵素活性を評価した結果、遊離状態の G-TkRBC よりも活性の増大が見られた。

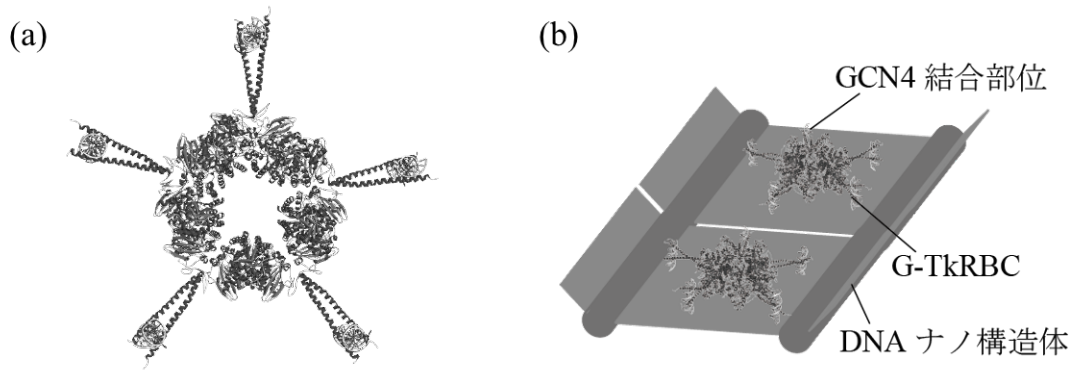


Figure. (a) 十量体 G-TkRBC および (b) GCN4 結合部位を含む DNA ナノ構造体との複合体の模式図

1) Bonacci, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012, **109**, 478-483.
2) Kitano K.; Maeda N.; Fukui T.; Atomi H.; Imanaka T.; Miki, K.; *Structure* 2001, **9,** 473-481.
3) P. W. K. Rothemund, *Nature* 2006, **440** , 297-302.
4) Ngo, T. A.; Nakata, E.; Saimura, M.; Kodaki, T.; Morii, T. *Methods* 2014, **67**, 142-150.
5) Ngo, T.; Dinh, H.; Nguyen, T.M.; Liew, F-F.; Nakata, E.; Morii, T. *Chem. Commun*. 2019, **55**, 12428-12446

神経変性疾患に関わるリピート RNA とペプチドの相互作用解析

○建石寿枝[1]•大山達也[1]•田中成典[2]•杉本直己[1,3]（[1]甲南大 FIBER、[2]神戸大院システム情報学、[3]甲南大 FIRST）

Analysis for interactions between repeated RNAs and peptides involved in neurodegenerative diseases

([1]Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research (FIBER), [2]Department of Computational Science, Graduate School of System Informatics, Kobe University, [3]Graduate School of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University) TATEISHI-KARIMATA, Hisae[1]; OHYAMA, Tatsuya [1]; TANAKA, Shigenori[2]; SUGIMOTO, Naoki[1,3]

神経変性疾患に関わるリピート配列をもつ RNA とペプチドの相互作用により形成される凝集体は、神経変性疾患細胞内において毒性を示すため、凝集体形成の詳細な機構を解明することが求められている (1)。本研究では、試験管内及び実細胞内において、神経変性疾患に関連するリピート RNA($r(GGGGCC)_8$ および $r(GGGUUA)_8$)を用いて、リピート RNA の構造やリピート RNA とペプチドの相互作用を解析した。まず、CD スペクトルおよび未変性ゲル電気泳動によってリピート RNA の構造を解析した結果、100 mM KCl を含む緩衝溶液中において $r(GGGGCC)_8$ と $r(GGGUUA)_8$ は四重らせん構造を形成することが示された (Figure 1)。さらに、これらのリピート RNA を含む溶液の 350 nm の紫外線散乱強度を測定した結果、四重らせん構造を形成するリピート RNA は液滴を形成することが示された (2)。さらに、四重らせん構造を形成するリピート RNA に、神経変性疾患細胞内で蓄積しているペプチド（GR リピートなど）を添加すると、RNA-ペプチドの凝集体が形成されることが明らかになった。神経変性疾患の細胞内環境は、正常細胞と大きく異なると推察され、また、これまでの研究成果によって、四重らせん構造の形成は、周辺環境の影響を顕著に受けることを我々は見出している (3)。講演では、細胞内の環境変化に応答したリピート RNA の構造や液滴形成についても解析し、化学的観点から液滴形成メカニズムを考察する。

【参考文献】

1) H. Tateishi-Karimata and N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.*, **2021**, *49*, in press.

2) H. Tateishi-Karimata*, Y. Teng*, and N. Sugimoto (*Equal contribution), *Biochemistry*, **2020**, *59*, 1961–2040.

3) H. Tateishi-Karimata, K. Kawauchi, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc*, **2018**, *140*, 642–651.

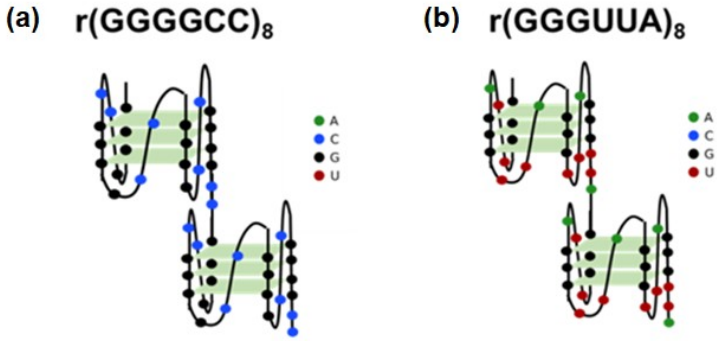


Figure 1. Expected structures of (a) $r(GGGGCC)_8$, and (b) $r(GGGUUA)_8$.

活性化剤内包型ポーラスガラス上での核酸合成法の開発と光制御

○赤澤紗彩・宮崎祐宇・宮内幸一郎・伊藤優・大窪章寛（東工大生命）

Development of a new method using photolabile protective groups for synthesis of oligonucleotides on a porous glass contain an activator (Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)
AKAZAWA, Saaya ; MIYAZAKI, Yu ; MIYAUCHI, Koichiro ; Ito, Yu ; OHKUBO, Akihiro

現在、汎用されている核酸合成では 100 nm 程度の細孔径を有するポーラスガラスを固相担体として用いる。このポーラスガラスは光透過性が低く、光分解性保護基を利用した核酸合成では使用できないと考えられてきた。そこで、今回、我々はポーラスガラスの光透過率の向上を目指して屈折率の違う様々な溶媒を使用し、それぞれの光透過性を詳細に検討した。その結果、トルエン-ジオキンサン、またはトルエン-ジクロロメタンを一定の割合で混合した溶媒を用いれば、大幅に光透過性が向上する（80%以上）ことがわかった。

ついで、この知見に基づき、図 1 のように、ポーラスガラスに担持したヌクレオシド 5’-水酸基に導入した光分解性保護基の脱保護実験を行ったところ、1mm 厚の板状ポーラスガラス上でも、迅速に保護基が分解することを見出した。

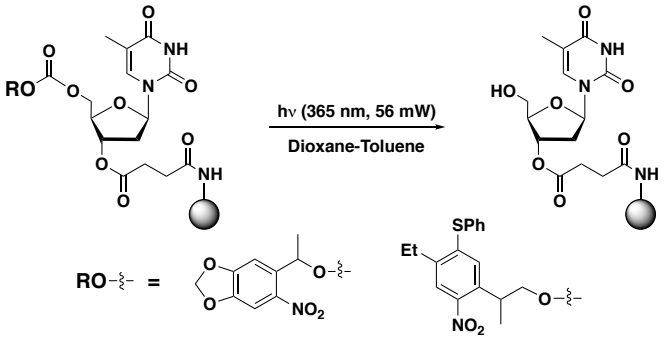


図 1

一方で、活性化剤を導入したポーラスガラスを用いれば、図 2 に示すように担体上に活性中間体を捕捉することができ、オリゴヌクレオチドの合成における縮合反応の効率が向上するということも見出している。そこで、さらなる合成効率の向上を期待し、様々なリンカーを介して HOBt 誘導体を導入した固相担体を合成し、この担体を用いたオリゴヌクレオチドの合成効率評価を行った。また、これらの反応を用いた核酸合成の光制御も行ったので、あわせて報告する。

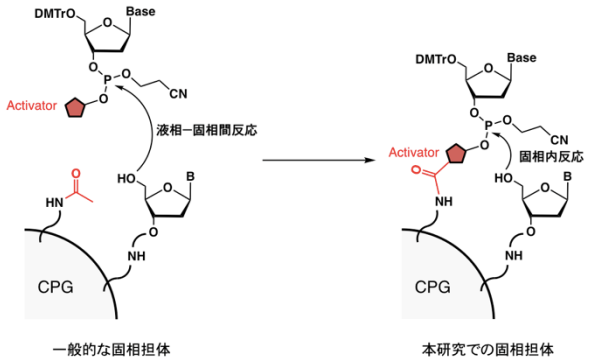


図 2

DNA 凝縮剤のカチオンクラスター長が DNA 凝縮および in vitro 転写・翻訳に及ぼす影響

○根木 滋[1]・山根李奈[1]・薮田 恵[1]・神谷亜門[1]・羽森真美[1]・中川由佳[2]
([1]同志社女子大学・薬、[2]兵庫県立大)

Effect of cation cluster length on DNA condensation and in vitro transcription/translation ([1]Doshisha Women's University, [2]University of Hyogo) NEGI, Shigeru[1]; YAMANE Momona[1]; YABUTA Megumi[1]; KAMIYA Amon [1]; HAMORI Mami [1]; NAKAGAWA Yuka[2]

ゲノム DNA は非常に長く負に帯電した生体高分子であり、細胞核やバクテリオファージのカプシドのような微小空間内に凝縮して収納されている。この過程にはヒストンタンパク質やポリアミンが関与している。また、ゲノム DNA は、凝縮・脱凝縮の大きなコンフォメーション変化を起こすことで、転写・翻訳に影響を与え、遺伝情報の伝達、細胞分裂や分化など、生体内でさまざまな生命現象の役割を担っている。このような背景を受けて、DNA の凝集過程のメカニズムに関する研究はこれまでに多くの研究者によってなされてきている。

そこで我々は、種々の鎖長を持つオリゴアルギニン Rn (n＝4,8,16)を合成し、それらとウシ胸腺由来 DNA (Calf Thymus DNA : CT DNA) との相互作用について様々な物理化学的手法（等温滴定型熱量測定(Isothermal Titration Calorimetry: ITC), 動的光散乱法(Dynamic Light Scattering: DLS), ゼータ電位, 原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscope: AFM)）を用いて検討を行った。さらに、T7 プラスミド DNA を用いて、Rn / T7 プラスミド DNA 複合体が *in vitro* 転写・翻訳活性へ及ぼす影響についても検討を行った。

ITC 測定では R4 において、一定発熱が生じた後、そのまま反応が終結し、発熱反応が見られなくなるという結果が得られた。一方 R8 および R16 では、連続した一定発熱後に、中和点付近で急激な発熱ピーク(maximum heat)が生じ、その後反応が終結し発熱が認められなかった。このことから、R8 および R16 では相状態が変化する 2 つの状態があることが考えられる。さらに、反応途中の段階を数点ピックアップし、DLS、AFM、ゼータ電位でさらに複合体の形態について検討した。DLS 測定では、R4 は最初の段階から大きな粒子径をもち、さらに滴下回数の増加に伴い粒子径が増大した。一方、R8, R16 では R4 と比較すると非常に小さな粒子径が形成され、maximum heat の段階で粒子径が増大した。また、PdI 値では、全ての Rn においてどの段階でも比較的均一な粒子径が形成された。特に R16 では、滴下回数の増加とともに均一性も増大した。AFM 観察では、R4 では不定形で大きな凝集塊が、R8 および R16 では小さな球形粒子や粒子同士が凝集している像が観察された。ゼータ電位測定では、R4 は中和点まではほぼ 0 に近い値を示した。一方 R8 および R16 では、最大発熱点まではゼータ電位は正の値となり、R8 と R16 を比較すると R16 の方が約＋10 mV 高い値を示した。 また、いずれの鎖長でも最終点においては DNA が過剰に入っていることからマイナスの値を示した。さらに、DNA の凝集状態と in vitro 転写・翻訳との関係性をルシフェラーゼアッセイより評価した。その結果、R4 は転写翻訳活性が 4 等量まではやや上昇もしくは変化が見られなかった。一方、R8 では DNA に対する R8 の割合が増加するに伴い活性が低下した。さらに、R16 では DNA に対し少量でも急激に転写翻訳活性が低下し、DNA よりも R16 の割合が多くなると活性が完全に転写翻訳が阻害された。

以上の結果より、オリゴアルギニンの総カチオン数を合わせた状態にも関わらず、カチオンクラスターの鎖長が異なることで、DNA 凝集過程に大きな違いがあることが分かり、CT DNA との凝集体形成がオリゴアルギニンの鎖長に大きく依存することが明らかとなった。さらに、R8, R16 では同じような複合体形成をとっていても、カチオンクラスターの鎖長や表面電荷が異なることで、転写翻訳機能にまで影響を与えるという興味深い結果が得られた。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

超高速光架橋反応を利用したメチルシトシンからチミンへの光化学的塩基編集

○篠崎一世・万李成・中村重孝・藤本健造（北陸先端大先端科学）

Photochemical 5-methycytosine to thymidine editing using ultrafast DNA photo-cross-linking(School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and technology)SHINOZAKI Issei; WAN Licheng; Nakamura Shigetaka; Fujimoto, Kenzo

遺伝子は、生物の設計図であり、タンパク質の形成に必要な情報を有している。この遺伝子に変異が生じることにより遺伝子疾患を引き起こす。遺伝子変異の一塩基置換はゲノム全体で 1000 万個以上あることが知られており、中にはアルツハイマー病や心臓疾患などと関連が指摘されているものもある。この様に一塩基置換に伴う疾患は生命活動に重大な影響を及ぼす。近年、化学的塩基編集法 [1]、人工 DNA 切断酵素である、TALEN や CRISPR/Cas9 を用いた方法 [2] やシトシンデアミナーゼ [3] を用いた核酸塩基編集は、遺伝子疾患の治療法として注目を集めている。

我々は、光により架橋・開裂可能な 3-Cyanovinylcarbazole(^{CNV}K)を用いた、シトシンからウラシルへのピンポイント光核酸塩基編集法を開発している [4]。また、標的シトシン周辺環境を変化させることにより、生理的条件下で脱アミノ化効率を誘起できることが報告されている [5]。これまでの光核酸塩基編集法では、RNA 鎖中のシトシンをウラシルへと変換してきた。一方、DNA 鎖中にはシトシン誘導体であるメチルシトシンが存在しており、脱アミノ化によりチミンへと変換される。本研究では、メチルシトシンからチミンへの脱アミノ化反応を光核酸塩基編集法により変換可能か検証した。また、メチルシトシンとシトシンの脱アミノ化反応に僅かな違いがあることから、シトシン 5 位の置換基が脱アミノ化効率に影響を与えているかシトシン誘導体を用いて評価した。

DNA 鎖中のメチルシトシンからチミンへの光核酸塩基編集の結果、90℃、3 時間で 80%程度の脱アミノ化反応の進行を確認した。また、シトシン誘導体の脱アミノ化反応を検証した結果、シトシン５位の置換基が脱アミノ化反応に影響を与えており、親水性が高いほど脱アミノ化効率が高いことを見出したので、詳細を報告する。

Reference

1) A. Chhibber, et. al., *Anal. Biochem*., **2008**, 377, 46.
2) L. Cong, A. Ran et al, *Science.*, **2013**, 339, 819.
3) P. Pham, R. Bransteitter, M. F. Goodman, *Nature.*, **2003**, 424, 103.
4) S. Sethi, S. Nakamura, K. Fujimoto, *Molecules*., **2018**, 23, 828.
5) S. Sethi, N. Honda, L. Wan, S. Nakamura, K. Fujimoto, *ChemBioChem*., **2018**, 19, 2257

超高速 DNA 光架橋を用いたリポソーム凝集の光制御

○ズミラ　ハリリ[1]・市川優勝[1]・中村重孝[1]・藤本健造[1]（[1]北陸先端大先端科学）

Regulation of liposome aggregation using ultrafast DNA photocrosslinking (School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology[1]) ZUMILA, Halili[1]; Ichikawa, Masakatsu[1]; Nakamura, Shigetaka[1]; Fujimoto, Kenzo[1]

リポソームは細胞膜のモデル系[1]として研究が進んでいる他、ドラックデリバリーのキャリア[2]としても注目されている。リポソーム表面には酵素や核酸など様々な生体分子を固定することが可能である。ポリエチレングリコールを表面に修飾することにより、血中滞留性が向上することも報告されている。これらリポソームの凝集・分散を制御することができれば、ドラックデリバリーとして使用した際の局所的な薬効の向上や副作用の低減などが期待できる。DNA を表面に修飾し、二本鎖形成に伴うリポソームの凝集に関する報告[3]がいくつかなされているが、凝集を制御することはできていない。

我々はこれまで光応答性人工核酸を用いた超高速 DNA 光架橋反応[4]を報告しており、3-cyanovinylcarbazole nucleoside(^{CNV}K)を含む DNA は数秒の光照射により相補鎖中のピリミジン塩基と光架橋することができる。また、細胞内アンチセンス効果の光制御やリポソーム表面での光誘導型 DNA ナノ構造形成に伴うリポソームの構造変化などを報告している。この超高速 DNA 光架橋反応は光照射のタイミングや照射エネルギーにより反応をリモートで制御できるという利点がある。そこで、DNA 修飾したリポソームに ^{CNV}K を含むリンカーDNA を添加し、光照射を行った。リポソームにはそれぞれ 5’-AAAAAAAAACCCAGGTTCTCT-3’を固定したリポソーム A と 5’-TCACAGATGCGTAAAAAAAAA-3’を固定したリポソーム B を準備し、それらを 5’- CA^{CNV}KCTGTGAAGAGAA^{CNV}KCT-3’で繋いだ。共焦点顕微鏡観察結果より、光照射によるリポソーム凝集を確認した。また、光照射のエネルギーによりリポソーム凝集を制御することに成功した。

1) Singer SJ, Nicolson GL, *Science*, **175**;720-31 (1972).
2) Bethany A, Okhil　KN, Katherine ER,　James BD, *Molecules*, **25**;5672 (2020).
3) Dave N, Liu J, *ACS Nano*, **5**;1304-12 (2011).
4) Fujimoto K, Yamada A, Yoshimura Y, Tsukaguchi T, Sakamoto T. *J. Am. Chem. Soc.*, **135**;16161-7 (2013).

Prototype Screening of HaloTag-based Chemigenetic Indicators

CHENG Dazhou[1]; ZHU Wenchao[1]; TERAI Takuya[1]; NASU Yusuke[1]; CAMPBELL Robert Earl[1,2] (Graduate School of Science, The University of Tokyo[1], Department of Chemistry, University of Alberta[2])

Functional imaging using protein-based fluorescent indicators is now a cornerstone of biology, allowing noninvasive measurement of cellular function by measuring the concentration related to the change in fluorescence[1]. Recently, hybrid ***chemigenetic*** indicators have emerged as a promising new design. In a chemigenetic indicator, the protein-based molecular recognition moiety is maintained, but a synthetic dye is used as a fluorophore to replace the protein fluorophore. In doing so, the fluorescence properties of the indicator can be greatly improved, while keeping the two main advantages of protein-based indicators - cell-specific expression and established molecular recognition motifs native to nature.

To date there are just two representative examples of this type of indicator, the HaloCaMP1 calcium ion (Ca^{2+}) indicator and the HASAP1 voltage indicator[2]. As of yet, this approach has not been shown to be broadly applicable to a wide range of analytes. Furthermore, optimization and improvement of the existing first generation chemigenetic indicators remain largely unexplored[2]. Here, we explore the versatility of a chemigenetic indicator design based on the self-labeling HaloTag protein, a fluorogenic rhodamine derivative dye[3], and a protein-based molecular recognition moiety. In principle, this design strategy should enable the versatile design of different indicators by simply changing the sensing domain of the protein framework (Fig. 1). So far, we have designed two kinds of chemigenetic indicators based on this framework: a Ca^{2+} indicator and an L-lactate indicator.

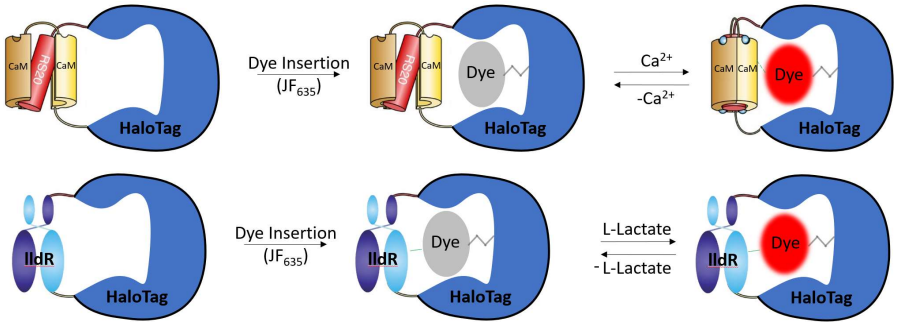


Fig. 1. Schematic illustration of our strategy for chemigenetic indicator development. A sensing domain protein is inserted into HaloTag such that after binding of JF_{635}-HTL, conformational change in the sensor protein domain alters fluorescence signal of the conjugated fluorophore.

In this design, we inserted the sensing domain (calmodulin-RS20 for Ca^{2+} indicator, and lldR for lactate indicator) onto different sites on the loop of the HaloTag protein from position 143 to 178, then fused the same synthetic fluorophore (JF_{635}-HTL, with chloroalkane linker[3]) onto the protein framework to test the efficacy of fluorescence change under the presence of Ca^{2+} and L-lactate, respectively. In total, 32 different insertion sites for each indicator design were tested. We found that inserting the sensing domain onto the loop around position 165-166 of HaloTag showed the highest fluorescence response for Ca^{2+} indicator (HaloCI) and L-lactate Indicator (HaloLI). Both showed similar λ_{ex} (~658 nm) when labeled with JF_{635}-HTL. Both HaloCI and HaloLI showed fluorescence intensity change in the presence of Ca^{2+} and L-lactate respectively, while HaloCI showed higher sensitivity and fluorescence change in the presence of Ca^{2+} (-94% for 39 μM of Ca^{2+}).

In summary, our results show the versatility of our designed framework, while further exploitation for indicators targeting different molecules is to be done, as well as optimizations on each indicator based on the framework.

1) Dana, H. *et al*, *Elife*, **5**, e12727 (2016)
2) Deo C, *et al*, *Nature Chemical Biology*, **17**, 718–723 (2021)
3) Grimm, J., Muthusamy, A., Liang, Y. *et al*, *Nat Methods*, **14,** 987–994 (2017)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

感染症マーカーとしてのα-アミラーゼを検出する ^{19}F MRI プローブの開発

○大寺雄也[1)]、杉原文徳[2、3)]、蓑島維文[1)]、菊地和也[1、2、4)]（[1)] 阪大院工、[2)] 阪大 IFReC、[3)] 阪大微研、[4)] 阪大 QIQB）

Activatable ^{19}F MRI probes for in vivo Detection of α-Amylase as Infectious Disease Marker (Graduate School of Engineering[1], Immunology Frontier Research Center[2], Research Institute for Microbial Diseases[3], Center for Quantum Information and Quantum Biology[4], Osaka University) OTERA Yuya[1]; SUGIHARA Fuminori[2, 3]; MINOSHIMA Masafumi[1]; KIKUCHI Kazuya[1, 2, 4]

病原性のバクテリアは様々な感染症の原因となっており、その治療や診断のために病原性バクテリアを生体内で検出する手法が求められている。我々は病原性バクテリアが持つ感染症マーカーとしてα-アミラーゼに着目した。いくつかの病原性バクテリアは α-アミラーゼを分泌するため、その感染部位周辺においてα-アミラーゼのレベルが増大することが報告されている[1]。このことから、本研究では生体内で α-アミラーゼ活性を検出するプローブの開発を目的とした。生体内で酵素活性を検出する方法として核磁気共鳴画像法である MRI は有用なツールである。中でも、^{19}F MRI は生体内にほとんど存在しない ^{19}F を観測核としているため、^{19}F MRI 造影剤由来のシグナルはバックグラウンドシグナルに妨害されることなく観測することができる。我々はこれまでに常磁性緩和促進効果（PRE 効果）を利用して酵素活性を検出する ^{19}F MRI プローブを開発してきた[2]。PRE 効果とは、常磁性種が持つ不対電子スピンの影響で、その近傍に存在する観測核の横緩和時間 T_2 が著しく減少する現象のことである。T_2 は、MRI シグナル強度と相関があるパラメーターであるため、T_2 を制御することで MRI シグナルの OFF/ON のスイッチングをすることができる。

本研究では、これまでに開発してきた ^{19}F MRI プローブの原理に基づいて、α-アミラーゼ活性を検出する ^{19}F MRI プローブをデザインした（図 1）。このプローブは α-アミラーゼの基質である糖鎖を隔てて、常磁性種である Gd^{3+}の錯体と観測核種の ^{19}F を同一分子内に修飾した構造をしている。そのため、α-アミラーゼ非存在下では PRE 効果により ^{19}F MRI シグナルは OFF になっているが、α-アミラーゼ存在下では糖鎖が切断されることで、PRE 効果が解消され、^{19}F MRI シグナルが ON になる。このシグナル増大型 ^{19}F MRI プローブを開発し、α-アミラーゼ活性の ^{19}F MR イメージングに成功したので本発表で報告する。

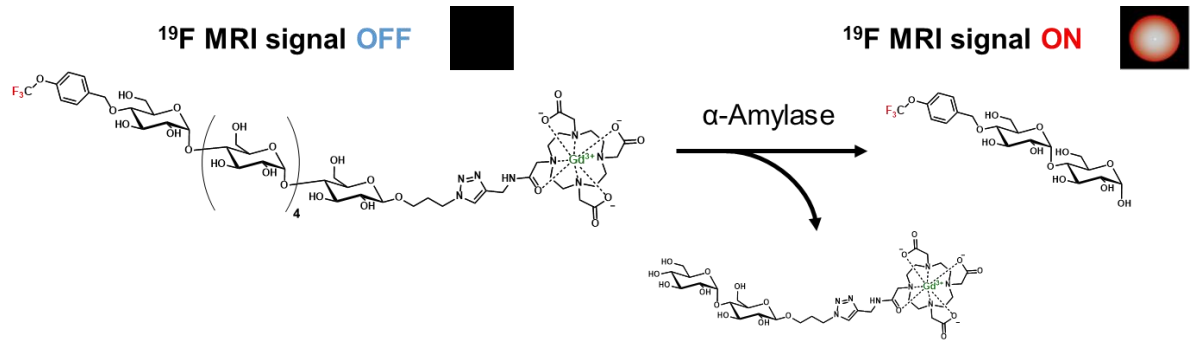


図 1. PRE 効果を利用した α-アミラーゼ活性検出 ^{19}F MRI プローブ

[1] E. Azzopardi, *et. al. Surgery* **2016**, *160*, 26-37.
[2] S. Mizukami, *et. al. J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 794–795.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

微小液滴への組換え体大腸菌１細胞の封入によるタンパク質酵素スクリーニング系の構築

○安部雄大・井川善也・松村茂祥（富山大院理工）

A Screening System for Protein Enzymes by Encapsulating a Single Cell Recombinant *E. coli* into a Micro-droplet (Graduate School of Science and Engineering, Toyama University) ABE, Kazuhiro; IKAWA, Yoshiya; MATSUMURA, Shigeyoshi

タンパク質酵素は一般に自由度の大きいポリマーからなる複合体であることから、その触媒機能を論理的に改変・改良することは大きな労力を必要とする。そのため、生体高分子を人為的に「進化」させる進化分子工学は、タンパク質酵素の機能改変のための強力な方法論である。近年、「液滴マイクロ流体システム」を用いた進化工学が発展しつつある。液滴マイクロ流体システムとは、ピコリットル（10^{-12} L）サイズの微小な液滴内にさまざまな物質を封入し（図 1）、またその液滴を高速で解析・分取（図 2）できる装置である。この装置を用いて、1 つの液滴内に 1 個の細胞を区画化し、その細胞が産生するタンパク質酵素の活性を解析・分取できれば、目的の活性をもつ酵素の遺伝子を有する細胞を、多数の細胞の中から選別することができる。すなわち、タンパク質酵素の遺伝子にランダムな変異を導入して細胞のスクリーニングを繰り返すことで、酵素活性の改変・向上が可能になる。ただし、多数の液滴に細胞を偏りなく封入し、その液滴内で酵素活性を解析するには、細胞を均一に分散させる菌懸濁液の組成、液滴間を基質・生成物が移動しない水相・油相の組成など、さまざまな条件の検討が必要である。

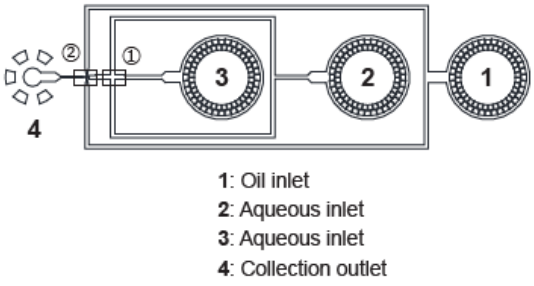


図 1. 微小液滴作製デバイスの概略図

1 のインレットからオイル、2 と 3 のインレットから反応試薬を送液し、4 のアウトレットから液滴を回収する。

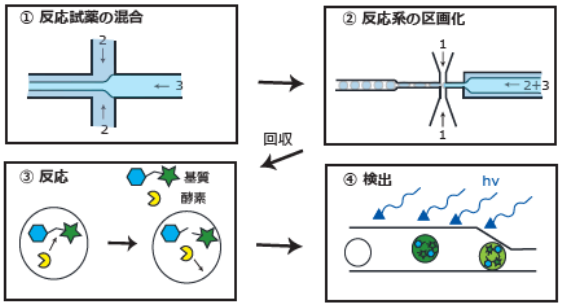


図 2. 酵素活性検出までの概略図

①2 と 3 のインレットから送液した反応試薬の混合、②混合液をオイルで区画化、③液滴をインキュベーション、④励起光を当て各液滴の蛍光強度測定。

本研究では、モデル実験として大腸菌（JM109 株）にβ-ガラクトシダーゼの遺伝子をもつプラスミド DNA（pUC18）を導入した大腸菌懸濁液を用いて、各液滴内での酵素活性の測定を目指し、条件検討を行った。酵素反応に伴い蛍光生成物を生じる基質を用いることで、液滴内の酵素活性を蛍光強度で測定することができるよう、系をデザインした。基質に Fluorescein di(β-D-galactopyranoside)（FDG）を用いることで、液滴間の生成物の移動を抑制でき、個々の液滴内での酵素活性を個別に検出することに成功した。

さらに、大腸菌が偏りなく均一に封入されているかを確認するため、複数の異なる菌体密度条件で大腸菌の封入実験を行い、細胞を含有する液滴の割合（占有率）がどのように変化するかを解析した。ポアソン分布から予想される占有率に極めて近い実測値が得られたことから、細胞を密度の偏りなく液滴に封入できたと考えられる。また、液滴の蛍光強度が酵素反応時間に比例して増大することも確認できた。さらに、大腸菌を培地とともに液滴に封入・保温して培養し、液滴内でのタンパク質発現量を増大させることにも成功した。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

高コントラストながん幹細胞イメージングを指向した ALDH1A1 応答性 turn-on 型蛍光プローブの開発

○鈴木叶瑛・麻植雅裕・三木康嗣・大江浩一（京大院工）

ALDH1A1-Responsive Turn-on Fluorescent Probe for High-Contrast Cancer Stem Cell Imaging (Graduate School of Engineering, Kyoto University) SUZUKI, Kanae; OE, Masahiro; MIKI, Koji; OHE, Kouichi

がん幹細胞（Cancer Stem Cell: CSC）は、がんの転移、増殖、治療抵抗性に関与することが知られており [1]、CSC を選択的に可視化する蛍光プローブは、CSC を標的とする治療に有効に働くと考えられる。当研究室ではこれまでに、CSC を標的とした近赤外蛍光イメージングプローブ **CyA4** を開発した（Figure 1a）。**CyA4** は、CSC のバイオマーカーとして知られるアルデヒド脱水素酵素（aldehyde dehydrogenase 1A1: ALDH1A1）に応答し発光するため、腫瘍中の CSC を可視化できる。しかし、**CyA4** は ALDH1A1 との反応前において、蛍光発光する開環体をわずかに含むことにより、完全に消光せず、CSC と通常のがん細胞（Normal Cancer Cell: NCC）との間のコントラストが低下する点を改善する必要があった。

本研究では、高コントラストな CSC イメージングを達成するため、新たに 2 つのプローブ ***β*-Me-CyA4** と ***o*-Me-CyA4** を合成した（Figure 1b, c）。これらは、それぞれ 1,3-チアジナン環上とベンゼン環上にメチル基を有する。メチル基の立体的な効果により、酵素反応前における開環体（蛍光 ON）と閉環体（蛍光 OFF）との平衡反応を閉環体側に偏らせ、バックグラウンド発光を抑制することを狙った分子設計である。***o*-Me-CyA4** に ALDH1A1 を作用させたところ、反応前後での蛍光強度比は 2.05 であった。一方、***β*-Me-CyA4** における蛍光強度比は 10.1 であり、これは **CyA4** の値を約 3 倍上回る値であった（Figure 2a）。さらに膵臓がん細胞（SUIT-2）を用いた場合の CSC と NCC との間の蛍光強度比は、**CyA4** が 3.7 であったのに対し、***β*-Me-CyA4** では 10.3 であった（Figure 2b）。このことから ***β*-Me-CyA4** は生体内においてもバックグラウンド発光を抑制し、**CyA4** より高コントラストに CSC を可視化できると期待される。

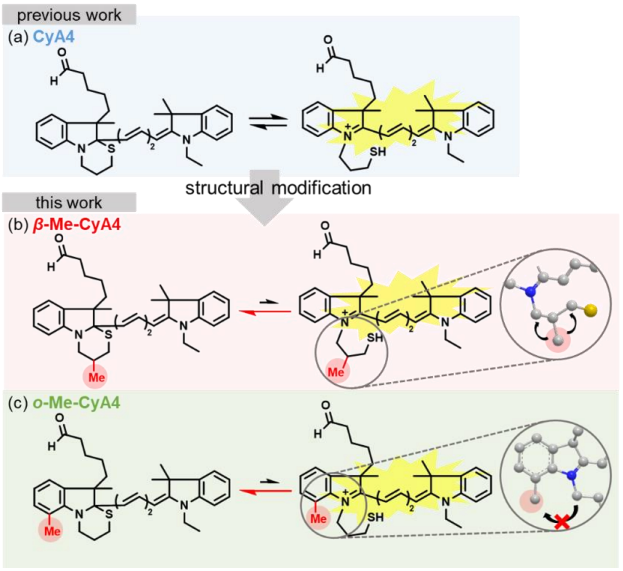


Figure 1. Equilibrium of (a) **CyA4**, (b) ***β*-Me-CyA4**, and (c) ***o*-Me-CyA4**.

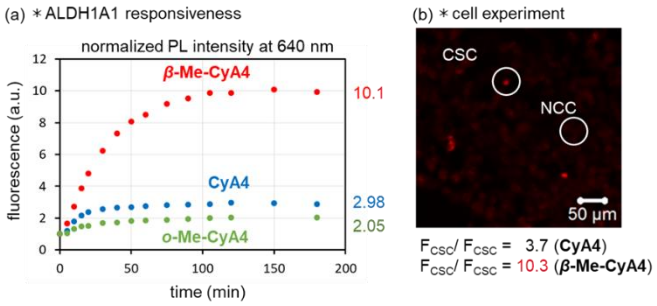


Figure 2. (a) Normalized fluorescence intensity of probes at 640 nm after treatment with ALDH1A1. (b) Representative confocal image of SUIT-2 cells incubated with 1.0 μM ***β*-Me-CyA4** ($\lambda_{ex}/\lambda_{det}$ = 633 nm/647−759 nm).

1) a) B. Beck, C. Blanpain, *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 727–738; b) D. Bonnet, J. E. Dick, *Nat. Med*. **1997**, *3*, 730−737.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

糖鎖高分子ブラシ界面を用いたサイトカインバイオセンシング

○寺田侑平[1,2]・高松漂太[3]・齋藤真人[1,2]・民谷栄一[1,4]（[1]産総研-先端フォトバイオ、[2]阪大院工、[3]阪大院医、[4]阪大産研）

Cytokine Biosensing using Glycopolymer-brush Interface

(AIST PhotoBIO-OIL [1], Graduate School of Engineering, Osaka University [2], Graduate School of Engineering, Osaka University [3], ISIR, Osaka University [4])
TERADA, Yuhei[1,2]; TAKAMATSU, Hyota[3]; SAITO, Masato[1,2]; TAMIYA, Eiichi[1,4]

表面プラズモン共鳴を利用したバイオセンサーは、金属の表面近傍における生体分子間相互作用によって生じる屈折率変化を、ラベルフリーかつリアルタイムで測定できる魅力的なデバイスである。特に、金属ナノ構造を用いた局在型表面プラズモン共鳴(Localized Surface Plasmon Resonance: LSPR)を用いたバイオセンサーは光学系がシンプルであることから、臨床現場即時診断の応用に向けて有用な手法として注目されている。我々の研究グループでは、ナノインプリントリソグラフィーおよび金のスパッタによって、金ナノピラー構造を有し LSPR を発揮する、大量生産可能かつシンプルな測定系での検出が可能なセンサーチップを開発した(M. Saito et al., *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5494-5500)。これらをマイクロ流路デバイスと組み合わせることで、単一細胞の分泌物解析に向けた応用が期待されている。しかしながら、水中における検出感度に未だ課題があり、さらに抗体の表面修飾に多段階の固定操作およびブロッキングを必要とするなどといった問題がある。また LSPR バイオセンサーでは金属表面に固定する分子認識界面の設計が感度および選択的検出に重要である。そこで、分子認識素子として糖鎖高分子という材料に着目した。糖鎖高分子は高分子の側鎖に糖鎖を提示した人工合成高分子で、糖脂質および糖タンパク質のように糖鎖が密集した集合体であり、多点的な相互作用によりタンパク質と特異的かつ強く結合する機能を有する。さらに近年の高分子合成技術の発展に伴って簡便な手法で様々な設計の糖鎖高分子が合成可能になり、ナノメートルオーダーでの精密な設計制御を行うことができる。本研究では可逆的付加開裂連鎖移動(Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer: RAFT)重合という合成方法を用いて、長さの制御された糖鎖高分子を合成し、金ナノピラーチップを用いた LSPR バイオセンサーに応用した。RAFT 重合で合成された糖鎖高分子は還元操作によってチオール基を末端に提示させることができ、金-チオール結合で金表面に直接固定することで糖鎖高分子ブラシ界面を形成させることができた。また、長さの異なる糖鎖高分子[GP20、GP100、GP200(数字は量体数を示す)]をそれぞれ固定した金ナノピラー上に、細胞分泌タンパク質であるサイトカインを加えた。その際、サイトカイン吸着に伴い生じる金表面近傍の屈折率変化を LSPR 吸収スペクトルのピークシフトによって検出した(図 1)。結果、短い糖鎖高分子を用いることで得られるピークシフト量が増加する、即ち検出感度の増加につながることが明らかになり、糖鎖高分子ブラシ界面の有用性が示唆された。

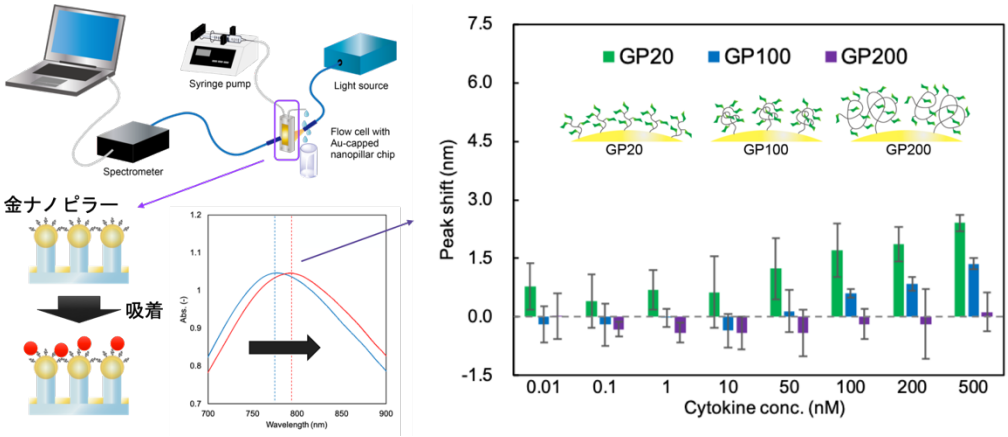


図 1. 糖鎖高分子固定化金ナノピラーを用いたサイトカインの LSPR バイオセンシング

光レドックス触媒を内部に有する水溶性ナノ粒子を用いた光クリック反応の開発

○西岡賢・中村光伸・高田忠雄（兵庫県立大院工）

Photo-click reaction by water-soluble single-chain nanoparticles containing photoredox catalysis (Graduate School of Engineering, University of Hyogo) NISHIOKA, Ken; NAKAMURA, Mitsunobu; TAKADA, Tadao

銅触媒を用いたアジド–アルキン環化付加反応はクリック反応と呼ばれ、基質選択性と反応性が高く、生体直交型反応として生体系における標的分子の標識や活性化法として広く研究されている(Fig.1a)。また、反応の時空間制御を可能とする光をトリガーとした新規クリック反応の開発とその生体反応への応用に関する研究が広く行われている [1]。本研究では、光レドックス触媒を内部に有する水溶性ナノ粒子を作製し[2]、水溶液中における光クリック反応の開発を行った(Fig.1b)。

可視光レドックス触媒として働くペリレンジイミド(PDI)と水溶性の PEG を側鎖に持つポリマーを合成し、疎水性 PDI の自己会合によって PDI をコアにもつ水溶性ナノ粒子(P-NP)を作製した(Fig.2a)。脱酸素条件下、P-NP 水溶液に電子供与犠牲剤を加え 480 nm の光を照射すると、PDI の一電子還元体($PDI^{\bullet-}$)が生じた(Fig.2b)。ここに Cu(II)を加えると $PDI^{\bullet-}$は消失し、Cu(I)を与えることが分かった。次に P-NP を触媒とした CuAAC 反応を行い、^{1}H NMR と HPLC を用いて反応解析を行った(Fig.2c)。アジドとアルキンの存在下、480 nm の可視光を照射し、その後 HPLC を用いて反応の進行を追跡した。その結果、光を照射したときに目的とする生成物が良好な収率で得られた(Fig.2d)。生体共役反応への応用を検討するため、エチニル基を 5 位に有するウリジンを基質として反応を行ったところ、同様に目的の付加生成物が観測された。以上のことから、P-NP が光クリック反応を誘起し、生体共役反応の触媒として働くことが示された。

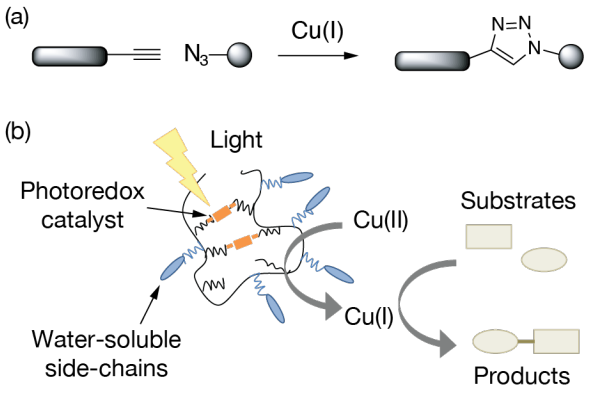


Fig 1. (a) Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) “click reaction”. (b) Water-soluble single-chain polymeric nanoparticles (SCNPs) with photoredox molecules catalyzing reduction of Cu(II) and the following click reaction.

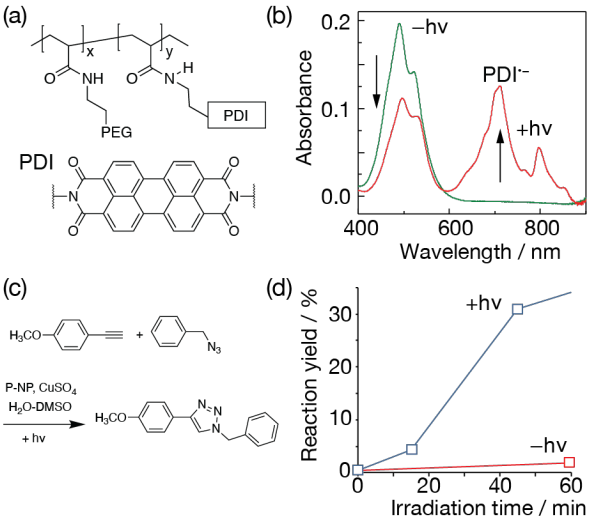


Fig 2. (a) Chemical structure of P-NP. (b) Photoreduction of P-NP. (c) Reaction scheme of photo-click reaction. (d) Reaction yield against the irradiation time.

1) Fairbanks, B. D.; Macdougall, L. J.; Mavila, S.; Sinha, J.; Kirkpatrick, B. E.; Anseth, K. S.; Bowman, C. N. *Chem. Rev.* **2021,** *121*, 6915.
2) Gonzalez-Burgos, M.; Latorre-Sanchez, A.; Pomposo, J. A. *Chem. Soc. Rev.* **2015,** *44*, 6122.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

液-液相分離環境下の超分子構造体の相選択性と酵素反応制御

○大林洋貴[1]・若林里衣[1]・後藤雅宏[1,2]・神谷典穂[1,2]（[1]九大院工、[2]九大未来化セ）

Phase selectivity of hierarchical supramolecular polymers and control of enzymatic activity under liquid-liquid phase separation environment (Graduate School of Engineering, Kyusyu University[1], Center for Future Chemistry, Kyushu University[2]) OBAYASHI, Hiroki[1]; WAKABAYASHI, Rie[1]; GOTO, Masahiro[1,2]; KAMIYA, Noriho[1,2]

液-液相分離 (liquid-liquid phase separation, LLPS) を通して形成される液滴 (ドロップレット) は、細胞内の夾雑な環境において、翻訳や代謝等の様々な反応を制御する区画化された場として重要な役割を果たしている [1]。また、アクチンに代表される細胞内の生体超分子構造体が、集合状態に応じたドロップレット選択性を有することが報告されている [2]。我々はこの現象が生体超分子に限定されず人工超分子にも現れるのではないかと考え、両親媒性ペプチド (PA) からなる超分子構造体のドロップレット選択性を調査した。また、PA 超分子構造体がタンパク質を非特異に物理的に吸着する性質 [3] を利用し、ドロップレット中の PA 超分子構造体への酵素集積化と連続酵素反応の制御を試みた。

超分子構造体として、相補的な水素結合ユニットであるシアヌル酸 (Cya) とメラミン (Mel) を PA と蛍光分子ニトロベンゾフラザン (NBD) とにそれぞれ導入した Cya-PA と Mel-NBD からなる共集合体 (Cya-PA/Mel-NBD) を利用した [4]。これは、天然の超分子構造体と類似した階層性を有する点、NBD 由来の蛍光によって直接的に構造体の観察が可能である点で有用である。Cya と PA とをつなぐ炭化水素リンカー長が長い Cya-PA-L と短い Cya-PA-S とを構築し、それぞれの集合挙動を評価した。また、ポリエチレングリコール (PEG) とデキストラン (DEX) からなる人工的な LLPS 環境下におけるドロップレット選択性を評価した。結果として、Cya-PA-L/Mel-NBD は Cya-PA-S/Mel-NBD と比較して大きく発達した共集合体を形成し、DEX-rich ドロップレットへの顕著な局在性を示した。また、この構造体はタンパク質の局在性にも影響を与え、元々PEG-rich 連続相、DEX-rich ドロップレット相にそれぞれ局在する二種類の酵素がいずれも DEX-rich ドロップレット相に局在を変化させることが示され、その結果、連続酵素反応を促進することが示唆された。

[1] M. K. Rosen *et al*., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 285−298 (2017). [2] K. Yoshikawa *et al*., *ChembioChem*, **19**, 1370–1374 (2018).
[3] S. Roy *et al., Biomacromolecules*, **21**, 4180-4193 (2020). [4] R. Wakabayashi *et al*., *Chem. Commun*, **55**, 6997–7000 (2019).

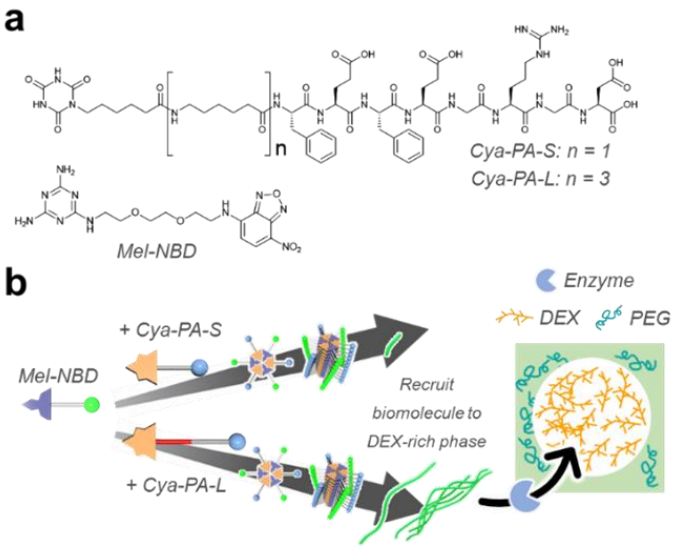


Fig. 1 (a) Molecular Structure (b) Schematic illustration.

両親媒性 4-アミノキノリン誘導体の pH および塩濃度依存的な自己集合挙動の評価

○程　方舟[1]・久松洋介[2]・山本勝宏[3]・高瀬弘嗣[4]・梅澤直樹[2]・樋口恒彦[2]

（[1]名市大薬、[2]名市大院薬、[3]名工大院工、[4]名市大院医）

Evaluation of pH- and Salt Concentration-Dependent Self-Assembly Behavior of an Amphiphilic 4-Aminoquinoline Derivative (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University[1], Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University[2], Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology[3], Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University[4]) CHENG, Fangzhou[1]; HISAMATSU, Yosuke[2]; YAMAMOTO, Katsuhiro[3]; TAKASE, Hiroshi[4]; UMEZAWA, Naoki[2]; HIGUCHI, Tsunehiko[2]

非共有結合性相互作用を利用して分子が自発的に集合すると、秩序のある分子集合体が得られる場合がある。例えば、適切に設計された両親媒性分子を用いれば水中で多彩な分子集合体を構築可能であり、それらは薬物送達キャリアや組織工学材料など超分子マテリアルとして応用が期待できる[1)]。

本研究では、刺激応答性分子集合体を水中で構築することを目的とし、新たなビルディングブロックの設計、合成に着手した。当研究室ではこれまでに、4-アミノキノリン部位のヘム結合親和性に着目した人工ヘムレセプターの開発に取り組んできた[2)]。今回、4-アミノキノリン部位の pH 応答性に着目し、両親媒性 4-アミノキノリン誘導体 TPE-4AQ-TeEG の設計、合成および水中での自己集合挙動について検討した (Fig. 1) 。また、自己集合を蛍光強度変化として評価するために、疎水性部分に凝集誘起発光性を有するテトラフェニルエチレン (TPE) を採用した。

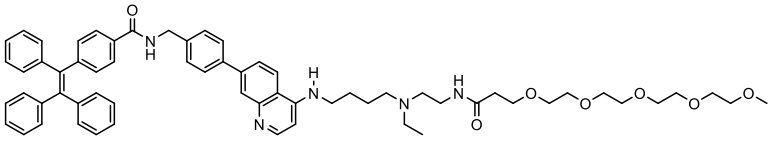


Fig. 1　TPE-4AQ-TeEG

合成した TPE-4AQ-TeEG は、DMSO 中では会合しないため凝集誘起発光は認められなかった。一方、水を 80%以上含む緩衝液中では、TPE 由来の 474 nm 付近の蛍光強度が顕著に増大したことから、集合体を形成することが示唆された。次に、TPE-4AQ-TeEG (10 μM) の pH 依存的な自己集合挙動について検討した (Fig. 2)。その結果、pH 5.5 では TPE-4AQ-TeEG の蛍光強度は非常に低く、中性やアルカリ性になるにつれ蛍光強度が大きく増大した。これは弱酸性条件では第三級アミン部位とキノリン環の窒素原子のプロトン化により自己集合が抑制され、中性からアルカリ性では脱プロトン化によって自己集合が促進されたためと考えられた。続いて、TPE-4AQ-TeEG の自己集合に対する塩濃度の影響を調べた。その結果、0.10 M NaCl 存在下では、pH 5.5 においても TPE-4AQ-TeEG は発光し、その蛍光強度は pH 7.4 よりも pH 5.5 の方が大きかった。TPE-4AQ-TeEG は pH 応答性に加えて塩濃度に応答した自己集合挙動を示すことが分かった。本発表では、これらの結果に加え、TPE-4AQ-TeEG の自己集合によって形成された分子集合体の透過型電子顕微鏡観察および小角 X 線散乱測定の結果についても併せて報告する。

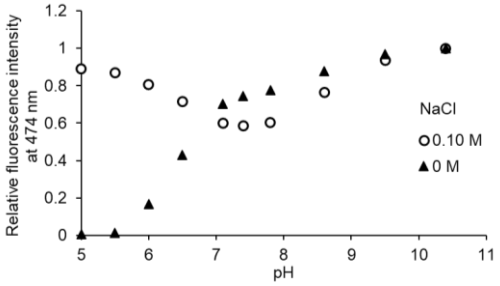


Fig. 2 pH-Dependent change in fluorescence intensity of TPE-4AQ-TeEG (10 μM) in 10 mM buffer (0.5% DMSO) containing 0 M or 0.10 M NaCl. λ_{ex} = 330 nm, 25 ºC.

1) E. Krieg, M. M. C. Bastings, P. Besenius, B. Rybtchinski, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2414-2477.
2) a) Y. Hisamatsu, N. Umezawa, H. Yagi, K. Kato, T. Higuchi, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 7455-7467. b) Y. Hisamatsu, K. Otani, H. Takase, N. Umezawa, T. Higuchi, *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 6489-6499.

銅酵素活性中心を模倣した配位活性四面体型 Cu(II)錯体の酸化機能

○楊　瀾・森本 祐麻・杉本 秀樹・伊東　忍（阪大院工）

Oxidation Ability of Tetrahedral Cu(II) Complexes Having Labile Coordination Site Relevant to Biological Copper Reaction Centers (Graduate School of Engineering, Osaka University) YANG, Lan; MORIMOTO, Yuma; SUGIMOTO, Hideki; ITOH, Shinobu

On the basis of the generally accessible I/II redox couple and bioavailability, copper containing enzymes play a wide variety of roles in biological systems. In order to get insights into the chemical properties of mononuclear copper reaction centers with a tetrahedral geometry in dopamine *β*-monooxygenases (D*β*M), peptidylglycine *α*-hydroxylating monooxygenase (PHM), and blue copper proteins,[1] model complexes having tetrahedral geometry are in great importance. In this study, we prepared a series of Cu(II) complexes with different external ligand $[Cu^{II}(TMG_3tach)(X)]^+$ (X = F^-, Cl^-, Br^-, AcO^-) by using a tridentate ligand TMG_3tach consisting with three TMG (tetramethylguanidine) donor groups and a rigid *cis*, *cis*-1, 3, 5-triaminocyclohexane (tach) framework.[2] In contrast to the biomimetic mononuclear tetrahedral Cu(II) complexes supported by well-known Tp (hydrotrispyrazolylborate) ligands which easily changed from tetrahedral geometry to square-pyramidal geometry upon addition of a slight amount of a coordinating solvent such as DMSO and DMF,[3] Cu(II) complexes supported by TMG_3tach undergo ligand exchange reaction with maintaining the tetrahedral geometry.[2]

In this study, we examined the reactivity of $[Cu^{II}(TMG_3tach)(X)]^+$ to find that the oxidation ability is largely influenced by the labile site ligands X. Mechanistic studies on the oxidation reaction were performed using substrates having weak C–H bond (1,4-cyclohexadiene) and O–H bond (phenol) to get insights into importance of the tetrahedral geometry and the labile ligands X.

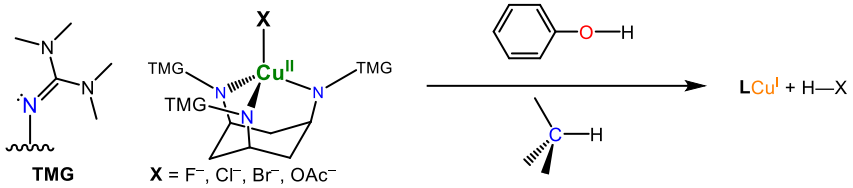


Figure 1. Oxidation reactions of $[Cu^{II}(TMG_3tach)(X)]^+$ (X = F^-, Cl^-, Br^-, AcO^-)

[Reference]

1) E. I. Solomon, *et al*., *Chem. Rev*. **2014**, *114* (7), 3659−3853.
2) S. Itoh, et al., *Inorg. Chem*., **2017**, *56*, 9634−9645.
3) N. Kitajima, *et. al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3210.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

抗炎症性脂肪酸代謝物 17,18-EpETE の生体安定性向上を志向した類縁体合成

○秋田真悠子[1]・齋藤雄太朗[1]・雑賀あずさ[2]・長竹貴広[2]・上水明治[3]・青木淳賢[3]・國澤純[2・4]・山東信介[1]（[1]東大院工、[2]国立医薬基盤・健康・栄養研究所、[3]東大院薬・[4]阪大院薬）

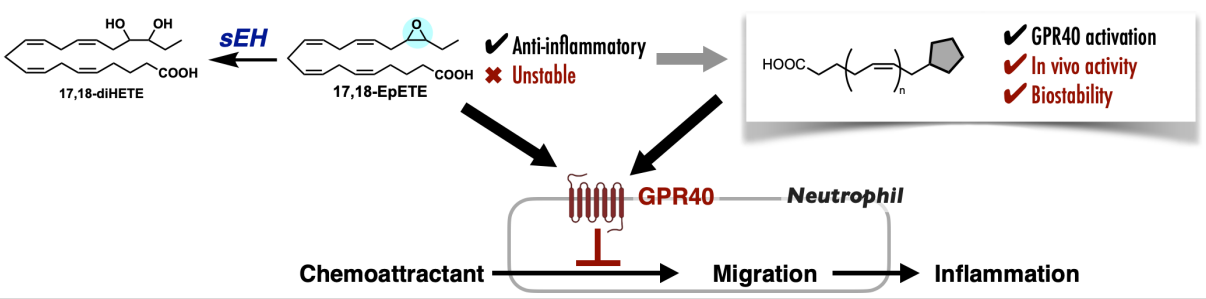
Synthesis of anti-inflammatory fatty acid metabolite 17,18-EpETE analogues with improved biostability

(Graduate School of Engineering, The University of Tokyo[1], National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition[2], Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo[3], Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University[4]) AKITA, Mayuko[1]; SAITO, Yutaro[1]; SAIKA, Azusa[2]; NAGATAKE, Takahiro[2]; UWAMIZU, Akiharu[3]; AOKI, Junken[3]; KUNISAWA, Jun[2,4]; SANDO, Shinsuke[1]

炎症は生命維持に欠かせない重要な生体防御機構であるが、多くの疾患に関与していることが知られている。炎症は、炎症性および炎症抑制性の脂質メディエーターの働きにより制御されているが、これらの働きが適切でなくなると、機能不全や疾患が引き起こされる。そのため、脂質メディエーターの働きを介して炎症を適切に制御することが健康維持において重要である。炎症制御には、炎症性メディエーターの機能抑制か、炎症抑制性メディエーターの機能増幅が考えられる。現在用いられている抗炎症薬の多くは、炎症性メディエーター生成酵素の阻害剤であり、免疫不全などの副作用が問題となっている。そこで、炎症抑制性メディエーターに着目した創薬が注目されている。

炎症抑制性メディエーターの一つである 17,18-Epoxyeicosatetraenoic acid (17,18-EpETE) は、抗炎症・抗アレルギー作用を有し、接触皮膚炎や腸管アレルギーに対する抑制効果が実証されている[1,2]。接触皮膚炎における抗炎症効果については、17,18-EpETE が好中球表面の G タンパク質共役受容体である GPR40/FFAR1 を活性化し、好中球の遊走を阻害する作用機序が示されている。一方で、17,18-EpETE は、生体内で可溶性エポキシド加水分解酵素 (sEH) により容易にジオール体である 17,18-diHETE へと変換される。17,18-diHETE は GPR40 活性化能および抗炎症活性を持たないことから、17,18-EpETE そのものを医薬として応用するのは困難である。

そこで本研究では 17,18-EpETE の生体安定性の向上を志向し、エポキシド部位や鎖長をより安定と考えられる構造に改変した化合物の設計・合成を行った。GPR40 活性化能を TGF-α切断アッセイ[3]により評価し、17,18-EpETE と同程度の GPR40 活性化能を有する化合物を見出した。さらに、細胞実験およびマウスモデルを用いた動物実験において、見出した化合物が 17,18-EpETE と同様の抗炎症作用を有することを確認した。本発表では、候補化合物群の合成および評価について報告する。



参考文献

1) T. Nagatake *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *142*, 470–484.
2) J. Kunisawa *et al.*, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9750.
3) A. Inoue *et al.*, *Cell* **2019**, *177*, 1933–1947.

GM3糖鎖およびGg3糖鎖で修飾したナタデココの合成と糖鎖間相互作用によって引き起こされる会合の評価

○飛渡瑞希[1]・長谷川輝明[2]（[1]東洋大院生命、[2]東洋生命）

Synthesis of nata de coco carrying GM3- and Gg3-trisaccharides and their associations induced by carbohydrate-carbohydrate interactions (Graduate School of Life Sciences, Toyo University[1], Faculty of Life Sciences, Toyo University[2]) TOBITO, Mizuki[1]; HASEGAWA, Teruaki[2]

隣り合う細胞表面のスフィンゴ糖脂質（GSLs）が糖鎖間相互作用（CCIs）することで、各種の細胞接着が誘導されている。しかしそのメカニズムや糖鎖選択性、イオン選択性などはあまり解明されていない。CCIs のメカニズム解析を目指した先行研究には、糖鎖高分子や糖修飾金ナノ粒子などを用いたモデル系が存在するが、これらの先行研究において CCIs による接着・会合を評価するためには、表面プラズモン共鳴装置（SPR）や透過型電子顕微鏡（TEM）などの高価かつ専門知識を要する測定機器の使用が必須であった。一方で CCIs による会合を目視にて評価できれば、高価な装置を使用することなく CCIs が解析でき、この分野の研究の進展に大きく寄与できると考えられる。このような考えのもと、本研究室ではバクテリアセルロースから構成された可視サイズのヒドロゲルであるナタデココ（NDC）を用いた CCIs の評価・検出方法の確立を目指して研究を行っている。[1)] 本研究ではこの手法を用い、ガン転移に深く関与している GM3-Gg3 間相互作用のメカニズム解明を目指して研究を行った。

市販の NDC を過ヨウ素酸化することで NDC にアルデヒド基を導入したのち、ジメチルスルホキシド中にてプロパルギルアミンを用いた還元アミノ化を行い、NDC に末端アルキンを導入した。その後、別途合成しておいたアジド化糖（$GM3N_3$ および $Gg3N_3$）をクリック反応にて NDC に導入し、GM3 修飾 NDC（NDC-GM3）および Gg3 修飾 NDC（NDC-Gg3）を合成した（Fig. 1）。ここでの GM3 および Gg3 とはそれぞれの糖脂質の糖鎖部位を表す。

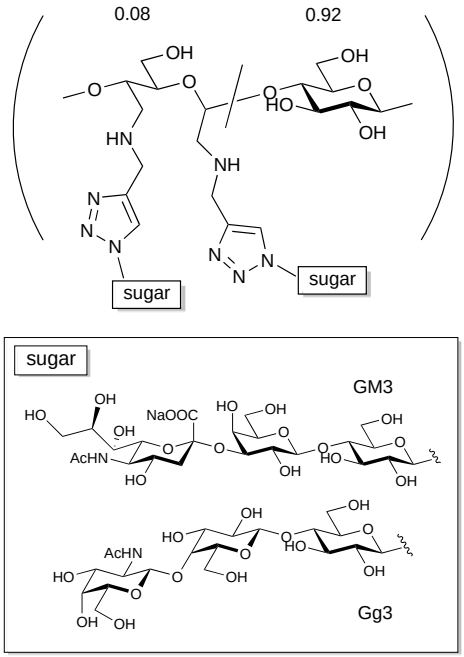


Fig 1. Structures of NDC-GM3 and NDC-Gg3.

次に NDC-GM3 同士、NDC-Gg3 同士の会合（homo-CCIs）を Ca^{2+}または Na^+を含む水溶液中にて評価した。NDC-GM3 と NDC-Gg3 のどちら関しても Ca^{2+}の方が Na^+よりも強く会合を誘導した。また、NDC-GM3 と NDC-Gg3 での異種 NDC 間の会合（hetero-CCIs）を Ca^{2+}または Na^+を含む水溶液中にて評価した。この場合もやはり、Ca^{2+}の方が Na^+よりも強く会合を誘導した。

以上により、糖修飾 NDC を利用することで、可視スケールでの CCIs の評価・検出が可能であることが分かった。また、GM3-GM3 相互作用と GM3-Gg3 相互作用のどちらも Ca^{2+}要求性ではあったが、後者の方が Ca^{2+}によってより強く誘導されることも明らかとなった。これはガン細胞同士の GM3-GM3 相互作用よりも、がん細胞と血管内皮細胞の GM3-Gg3 相互作用の方が強いことを示しており、これにより容易にガン転移が引き起こされていることが明らかになった。

1） K. Yoshida, M. Kaino, M. Sekiguchi, N. Chigira, Y. Amano, M. Inokuchi, Q. Li, T. Hasegawa, *Carbohydr. Polym.*, **223**, 1-8 (2019).

キャピラリー電気泳動法を用いたリポソーム界面における物質透過現象のモーメント解析

○稲葉隼汰・宮部寛志（立教大院理）

Moment Analysis of Solute Permeation at the Interface of Liposomes by Capillary Electrophoresis (Graduate School of Science, Rikkyo University) INABA, Shunta; MIYABE, Kanji

【緒言】薬物の過剰投与や副作用を抑制し、より安全かつ効率的に薬物投与を行なうため、ドラッグデリバリーシステム（DDS）が利用されている。リポソームを薬物キャリアとして使用するDDSは、例えばがん治療の分野における新たな薬物治療システムとして注目を集めている。リポソームの徐放機構を解明してより優れた薬物キャリアを開発するためには、リポソーム界面における物質移動現象をより詳しく究明する必要がある。そこで本研究ではキャピラリー電気泳動（CE）法を用いるモーメント解析法により、リポソーム界面における物質透過現象を速度論的に解析した。

【実験】本研究ではリポソームを擬似固定相として利用するリポソーム動電クロマトグラフィー（LEKC）を用いた。LEKCでは泳動液中のリポソームと泳動液との間における溶質の移動現象が無数に繰り返されるため、リポソーム界面における物質透過現象に関する情報を積算して増幅・検出することができる。リポソームは1-パルミトイル-2-オレイル-*sn*-グリセロ-3-フォスファチジルコリン（POPC）とフォスファチジルセリン（PS）を混合して調製し、両者の組成がPOPC/PS（80/20, 60/40 mol%）になるように2種類のリポソームを調製した。泳動液中のリン脂質濃度を2～10 mMの範囲で変化させた。注入試料にはモデル物質としてコルチゾン、また電気浸透流マーカーにはジメチルスルホキシド（DMSO）を用いた。LEKCによる実測溶出ピークの形状的特徴を解析し、リポソームへのコルチゾンの分配平衡定数（K_P）および界面透過速度定数（k_in：バルク相からリポソーム内部への透過、k_out：リポソーム内部からバルク相への透過）を求めた。なお、リポソーム界面における溶質の透過速度式は次のように仮定した[1]。

$$\frac{\partial C_\mathrm{X}}{\partial t} = \frac{3}{R_\mathrm{p}} k_\mathrm{in} C_\mathrm{S} - \frac{3}{R_\mathrm{p}} k_\mathrm{out} C_\mathrm{X} \quad (1)$$

ここでC_X、C_Sはリポソーム内およびバルク相内の溶質濃度、R_pはリポソームの半径である。

【結果・考察】Fig. 1にPOPC/PS（60/40 mol%）リポソームを擬似固定相とする際のエレクトロフェログラムを示す。DMSOとコルチゾンの溶出時間の差は脂質濃度の増加とともに増大しており、コルチゾンのリポソームへの分配およびリポソーム界面における透過現象が観測されていると考えられる。POPC/PS（80/20 mol%）リポソームを擬似固定相とする場合にも同様の結果が確認された。実測溶出ピークの溶出時間および分散を解析してK_P、k_inとk_out値を求め、リポソーム界面における物質透過現象を速度論的に解析する上でモーメント解析法が有用であることを実証した。

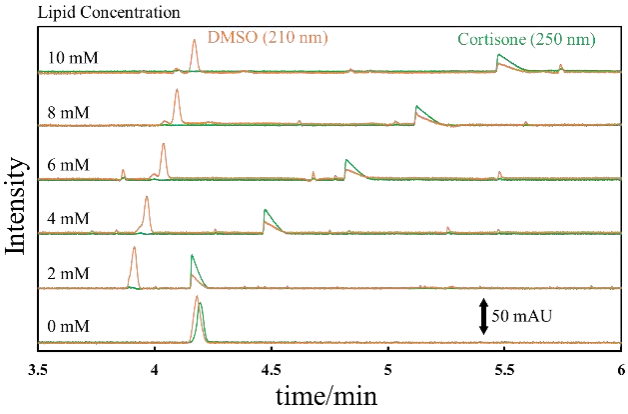


Fig.1 POPC/PS（60/40 mol%）リポソームを擬似固定相とする際のエレクトロフェログラム

【参考文献】

1） Miyabe, K.; Senoo, S.; Okayasu, N., *Electrophoresis*, **2019**, *40*, 2962-2970.

メソポーラスシリカナノ粒子用いたがんペプチドワクチンに関する研究

○上野朋哉・後藤浩一・松本陽子（崇城大院工）

Study on Cancer Peptide Vaccine Using Mesoporous Silica Nanoparticles (Graduate School of Engineering, Sojo University) UENO, Tomoya; GOTO, Koichi; MATSUMOTO, Yoko

現代のがん治療において、免疫機能を人為的に高めて治療に用いるがん免疫療法が盛んに研究されている。しかしながら、がん免疫療法の一種であるペプチドワクチン療法においては、がんの抗原ペプチドをそのまま投与しても、生体内で拡散・分解してしまう為、安定かつ充分な免疫応答を期待することは難しい。一方、メソポーラスシリカナノ粒子(Mesoporous Silica Nanoparticle、MSN)は数十～数百 nm の多孔質シリカであり、ナノメディシン分野において DDS の新しい素材として注目されている。本研究では、MSN を用いた新しいがんワクチンの開発を目的とし、抗原ペプチドを MSN に封入したワクチンのがん細胞に対する免疫誘導効果を検討した。

まず、蛍光剤 FITC で標識した MSN を調製し、マウス樹状細胞（DC2.4 細胞 [1]）による MSN の蓄積及び取り込みについて *in vitro* で検討した。フローサイトメトリーにより測定した結果、MSN は、培養時間 24 h 後、濃度依存的に DC2.4 細胞に蓄積することが明らかになった。また、DC2.4 細胞による FTTC 標識 MSN の取り込みについて、共焦点レーザー顕微鏡観察を行ったところ、MSN は DC2.4 細胞の細胞質に取り込まれることが示され(Fig.1)、抗原提示細胞に抗原物質を運ぶキャリアーとしての有用性が示唆された。

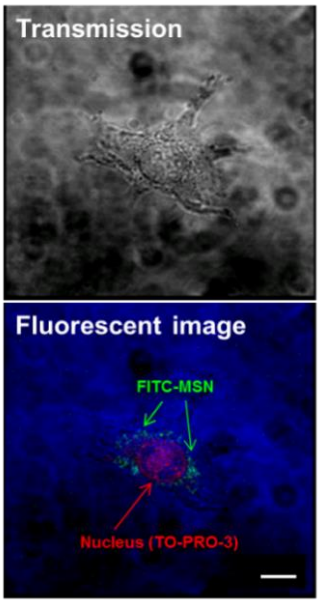


Fig 1. Fluorescent microscopic observation of DC2.4 cells after the incubation with FITC-MSN.

次に、ニワトリ卵白アルブミン(OVA)をがん抗原のモデルとする *in vivo* 実験を行った。ワクチンサンプルを皮下投与したマウスに OVA を発現するマウスリンパ腫細胞(E.G7-OVA 細胞)を腹腔内移植し、がん細胞に対する免疫誘導効果について検討した。Fig. 2 に示したように、Control 群、抗原ペプチドとオリゴヌクレオチドを投与した KHN 群、抗原ペプチドとオリゴヌクレオチドを MSN に封入して投与した KHN/MSN 群で比較した結果、Control 群の平均生存日数 32.7 日に対して、KHN/MSN 投与群の平均生存日数は 41.3 日となり、生存日数の増大が観測された。また、ワクチンサンプルの投与回数について検討したところ、1 回投与に比べて、3 回投与を行ったグループで高い延命効果が得られ、MSN ワクチンによる免疫誘導効果が示唆された。

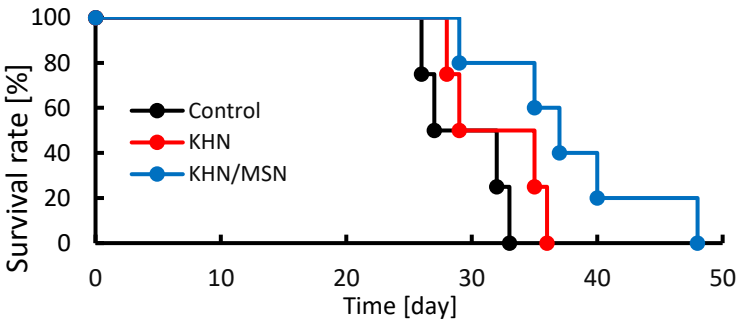


Fig 2. Survival curve of MSN-vaccined mice after the transplantation of E.G7-OVA cells.

1) Z. Shen, G. Reznikoff, G. Dranoff, K. L. Rock, *J. Immunol.*, **158**, 2723 (1997).

核医学治療法を目指した At-211 標識機能化金ナノ粒子創製と評価

○黄 栩昊[1]・樺山 一哉[1,2,4]・角永 悠一郎[2,4]・下山 敦史[1,2,4]・大江 一弘[3,4]・豊嶋 厚史[2,4]・篠原 厚[2,5]・深瀬 浩一[1,2,4]（[1]阪大院理、[2]阪大 IRS、[3]阪大院医、[4]阪大院理 PRC、[5]大阪青山大）

Synthesis and evaluation of At-211 labeled functional gold nanoparticles for radionuclide therapy

(Graduate School of Science, Osaka University[1], Institute for Radiation Sciences, Osaka University[2], Graduate School of Medicine, Osaka University[3], Project Research Center for Fundamental Sciences, Graduate School of Science, Osaka University[4], Osaka Aoyama University[5]) HUANG, Xuhao[1]; KABAYAMA, Kazuya[1,2,4]; KADONAGA, Yuichiro[2,4]; SHIMOYAMA, Atsushi[1,2,4]; Ooe, Kazuhiro[3,4]; TOYOSHIMA, Atsushi[2,4]; SHINOHARA, Atsushi[2,5]; FUKASE Koichi[1,2,4]

【目的】核医学治療は、放射線放出核種を投与・体内のがん細胞に集積させ、がんを殺傷する治療法である。α線は、高いがん殺傷効果を持つ。一方、飛程がヒト細胞数個分と短いため、周囲の正常細胞や臓器への侵襲が少ない。本研究では、α線放出核種を用いたα線核医学治療に取り組む。α線放出核種として、ハロゲン核種であるアスタチン-211 (^{211}At) を用いる。^{211}At は、半減期が 7.2 時間と短く、比較的早く体内から放射線が消失する。そのため、通院による治療が可能であり、がん患者の生活の質 (QOL) の向上が期待できる。本研究では、^{211}At が金と速やかに反応して安定な共有結合を形成することに着目し、金ナノ粒子 (AuNP)を運搬体に用いる新手法を開発することを目的とする。

【方法】^{211}At 標識 AuNP (^{211}At-AuNPs)の細胞内在化能の向上を狙い、表面修飾分子の検討を行った。AuNP に対し、高分子ポリ(エチレングリコール)メチルエーテルチオール (mPEG-SH)、チオール化ポリエチレンイミン (PEI-SH)あるいはペプチド (環状 RGD)を加え、室温下、2 時間振とうして表面修飾した後、限外ろ過して機能化 AuNPs を得た。続いて透過電子顕微鏡と動的光散乱法により、機能化 AuNPs のサイズと形を評価した。また、共焦点顕微鏡を用いてがん細胞内在化の評価も行った。続いて、合成した種々の機能化 AuNPs に対し、室温下、5 分間振とうし、^{211}At 標識化を行い、^{211}At-AuNPs を得た。標識化に用いた ^{211}At は、ビスマス-209 (^{209}Bi)にαビームを照射後、乾式蒸留して精製したものを用いた。標識化後は、WST-8 を用いて生細胞数を測定することで、細胞殺傷能を評価した。

【結果】合成した種々の機能化 AuNP の ^{211}At 標識化は、水溶媒中、混合・振とうのみで定量的に進行した。mPEG 修飾 AuNP は、細胞内在化がほとんど見られず、^{211}At 標識 mPEG 修飾 AuNP は細胞殺傷能がほとんど見られなかった。一方で、PEI あるいは環状 RGD 修飾 AuNP では、顕著な細胞内在化の促進が確認できたとともに、顕著な細胞殺傷能の亢進が見られた。以上の結果から、^{211}At-AuNPs の細胞内移行が細胞殺傷に重要であることが示唆された (Fig.1)。^{211}At-AuNPs に内在化能を付与した表面修飾を行うことで、細胞核に対して至近距離からより多くのα線を照射できるため、殺傷効果が高まったと考えられる。

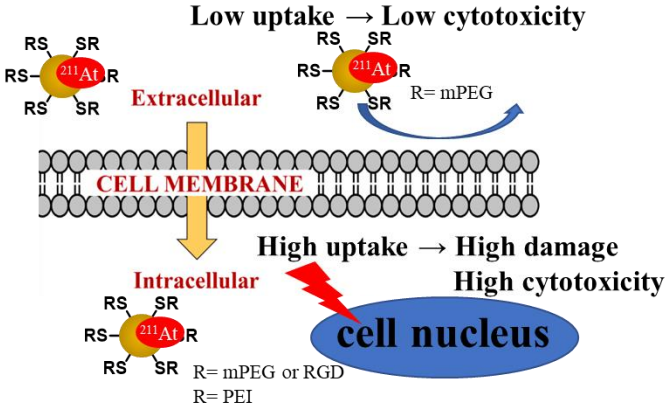


Fig.1 Schematic research concept

Poster

Thu. Sep 9, 2021 3:40 PM - 4:40 PM JST | Thu. Sep 9, 2021 6:40 AM - 7:40 AM UTC | First half number Zoom

Even (2P-002~2P-048)

[2P-002] Production of trichothecene-conjugated antibody as an anti-cancer agent.

*Kazushi Kusumoto[1], Yoshiaki Koizumi[1], Kazunori Kato[1], Naoko Takahashi-Ando[1] (1. Graduate School of Faculty of science & Engineering, Toyo University)

[2P-004] Structural basis for specific recognition of Lys63-linked polyubiquitin chains by the UBA domains RAD23A

*Yusuke Sato[1,2], Aya Urishima[2], Tomoya Hino[1,2], Shingo Nagano[1,2] (1. GSC center, Tottori University, 2. Department of Engineering, Tottori University)

[2P-006] Development of unmethylated CpG detection method using unmethylated CpG binding domain fused luciferase constructed by SnoopCatcher/SnoopTag system

*Takamichi Miyata[1], Hazuki Shimamura[1], Wataru Yoshida[1] (1. Graduate School of Bionics, Tokyo University of Technology)

[2P-008] Spectral Properties of Formylated Chlorophylls in Light-harvesting Protein LH2 from the Purple Photosynthetic Bacterium *Rhodoblastus acidophilus*

*Aiko Tanaka[1], Madoka Yamashita[1], Toshiyuki Shinoda[2], Tatsuya Tomo[2], Yukihiro Kimura[3], Yoshitaka Saga[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Kindai University, 2. Graduate School of Science, Tokyo University of Science, 3. Graduate School of Agriculture, Kobe University)

[2P-010] Development of thermo-responsive protein hydrogel for bone formation

*Kazumasa Iwamaru[1], Ryotaro Yamamoto[1], Yasumasa Mashimo[1], Mie Masayasu[1], Eiry Kobatake[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

[2P-012] Construction of artificial viral capsid modified with Cell-targeting DNA aptamer

*Kosuke Uchiyama[1], Hiroshi Inaba[1], Hiroto Furukawa[1], Matsuura Kazunori[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University)

[2P-014] The construction strategy of AFP-based biosensors using the putative structural change

*Shunsuke Tajima[1], Eiji Nakata[1], Reiko Sakaguchi[2], Masayuki Saimura[1], Yasuo Mori[3], Takashi Morii[1] (1. Institute of Advanced Energy, Kyoto University, 2. School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, 3. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[2P-016] Investigation on factors that affect post-modification of peptide amphiphile assemblies by enzymatic reaction.

*Ayato Higuchi[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1,2], Noriho Kamiya[1,2] (1. Graduate school for engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

[2P-018] Evaluation of the Method to Present Synthetic Polymers onto Mammalian Cell Membranes by using PG-surfactants

*Tatsuki Nakakubo[1], Toshihisa mizuno[1] (1. Life and Applied Sciences Program,Department of Engineering,Nagoya Institute of Technology Graduate School)

[2P-020] Targeted degradation of mutant huntingtin mediated by hydrophobic tag

*Keigo Hirai[1], Hiroko Yamashita[2], Shusuke Tomoshige[1], Yugo Mishima[1], Shinichi Sato[1,3], Yuichi Hashimoto[2], Minoru Ishikawa[1] (1. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2. IQB, University of Tokyo, 3. Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University)

[2P-022] cpHalo-tag labeling to quantify O_2-sensitive ion-channel TRPA1 trafficking

*Yutaro Sugihara[1], Kyohei Soga[1], Kento Ojima[1], Yasuo Mori[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate school of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate school of Engineering, Kyoto University)

[2P-024] Biofunctionalization of peptides by insertion of central alkylene chains

*Atsuya Yaguchi[1], Hirotsugu Hiramatsu[2], Itsuki Ajioka[3,4], Takahiro Muraoka[1,4] (1. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. National Yang Ming Chiao Tung University, 3. Center for Brain Integration Research, Tokyo Medical and Dental University, 4. Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

[2P-026] Synthesis of dual-mono ubiquitinated PAF15 for elucidation of maintenance methylation mechanism

*Yuya Takahashi[1], Satomi Kori[2], Kyohei Arita[2], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University)

[2P-028] Development of artificial metalloenzymes for stereoselective Asymmetric transfer hydrogenation reaction

*Toshihiro Ishii[1], Saho Yoshioka[1], Ryusei Matsumoto[1], Tomohito Marumo[1], Nobutaka Fujieda[1] (1. Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University)

[2P-030] Trapping Proteins Using Peroxiredoxin Decamer Ring Structure

*Takumi Utsu[1], Koichiro Ishimori[1,2], Takeshi Uchida[1,2] (1. Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University, 2. Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University)

[2P-032] Intracellular delivery of extracellular vesicles using acylated macropinocytosis-inducing peptide

*Yuna Nakagawa[1], Jan Vincent V. Arafiles[1], Hisaaki Hirose[1], Shiro Futaki[1] (1. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

[2P-034] Exploring the mGlu1 ligand dynamics in mouse brain by fixation-driven chemical crosslinking.

*Takeharu Mino[1], Kazuma Amaike[1], Hiroshi Nonaka[1,2], Seiji Sakamoto[1], Itaru Hamachi[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University, 2. JST ERATO)

[2P-036] Synthetic evaluation of collagen model peptides with phosphate groups and cell recognition sites

*Garyu Hori[1] (1. Ryukoku University)

[2P-038] Secondary Structure and Intracellular Dynamics of Analogs of Mitochondrial-Localization Signals Peptide Derived from ALDH

*Kei Takayama[1], Masayuki Yamasaki[2], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Department of Materials Chemistry, Ryukoku University, 2. Department of Food Science and Human Nutrition)

[2P-040] Method for Multiple Exploration of Four-base Codons in a Reconstituted Cell-free Translation System

*Takayoshi Watanabe[1], Dian Novitasari[1], Takahiro Hohsaka[1] (1. School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[2P-042] Preparation of Amyloid Fibril Displaying a Norbornene Analog as a Substrate for Ring-opening Metathesis Polymerization

*Takanori Ueno[1] (1. Faculty of Engineering)

[2P-044] Promotion of translation initiation of mRNA by phosphorothioate modification

*Naoko Abe[1], Daisuke Kawaguchi[1], Ayumi Kodama[1], Fumitaka Hashiya[1], Fumiaki Tomoike[2], Yasuaki Kimura[1], Yoshihiro Shimizu[3], Hiroshi Abe[1,4,5] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. School of Science, Gakushuin University, 3. Center for Biosystems Dynamics Research, RIKEN, 4. JST-CREST, 5. iGCORE)

[2P-046] Biochemical analysis of the light-up RNA aptamer 17-3 to elucidate its active secondary structure.

*Shunsuke Abe[1], Takaki Koayama[1], Shigeyoshi Matsumura[1], Yoshiya Ikawa[1] (1. Graduate School of Science & Engineering, University of Toyama,)

[2P-048] Development of nucleic acid binding dye/protein hybrid probe

*Akari Matsuki[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

トリコテセンを用いた抗体医薬作製の試み

○楠本和史・小泉慶明・加藤和則・安藤直子（東洋大院理工）

Production of trichothecene-conjugated antibody as an anti-cancer agent. (Faculty of Science & Engineering, Toyo University) KUSUMOTO, Kazushi; KOIZUMI, Yoshiaki; KATO, Kazunori; TAKAHASHI-ANDO, Naoko

トリコテセンとは *Fusarium* 属、*Myrothecium* 属などの糸状菌によって二次代謝産物として生産されるカビ毒の一群である [1)]。トリコテセンは細胞分裂の盛んな癌細胞に対して強い毒性を示し、またタンパク質や DNA の合成を阻害し、複数の経路でアポトーシスを誘導するため抗癌剤への応用利用が期待されている。トリコテセンは癌細胞のみならず正常細胞にも毒性を作用するが、抗体医薬の発展により、癌細胞に選択的にトリコテセンを運搬し細胞死を誘導することが可能となってきた。そこで本研究では、癌細胞の表面に多く発現している表面抗原を認識する抗体を利用して、トリコテセン類を抗体に結合させることで、癌細胞のみを攻撃する手法を目指すこととした [2)]。その際、癌関連抗原の中でも様々な癌細胞に発現している EpCAM と EphA2 に着目した。これらの抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体にトリコテセン類を付加させれば、癌細胞へ特異的にトリコテセンが導入され、細胞死させることが可能だと考えられる。

まず本研究では、抗体付加させるトリコテセン類の選抜を行うこととした。抗体を付加させるためには水酸基を有する必要がある。そこでトリコテセン類の中でも毒性が強く、また水酸基を有し、薬剤としても特に期待されている T-2 toxin、HT-2 toxin、4,15-diacetoxyscirpenol (DAS) 、Verrucarin A を抗体付加トリコテセン候補として選択した。これらのトリコテセンをヒト乳がん細胞 (MCF-7) に添加し、毒性を評価したところ、その毒性は Verrucarin A > T-2 toxin > HT-2 toxin > DAS の順となった。

次に抗体にトリコテセンを付加させるためには、リンカーが必要となる。そこで、有機化学的手法によりリンカーの作製を試みた [3)]。上記の 4 種のトリコテセンのうち、T-2 toxin を用いて抗体付加させるためのリンカー作製を行った。小分子を抗体に接続させるリンカーには多くの種類が存在するが、本実験では細胞内に取り込まれたトリコテセンが切り離されやすいリンカーを選択した。リンカー作製では 2 段階の工程があり、第 1 段階では T-2 toxin にグルタル酸無水物を反応させてできる T-2 toxin hemiglutarate (T-2 HG) への変換である。第 2 段階では作製した T-2 HG に N-ヒドロキシコハク酸イミドを反応させてできる T-2-G-O-Succinimide (T-2-G-OSu)への変換である。それぞれ反応させた後、HPLC または LC-MS/MS によって合成確認行った (Fig. 1) 。LC-MS/MS 解析の結果、T-2- G-OSu のアンモニウムイオン付加体の m/z である 695.3 Da にピークが確認できた。これは T-2 toxin と比較したときの差分がちょうどリンカー部分の m/z と一致しており、また MS/MS のフラグメントイオンも T-2 toxin と酷似しているため T-2- G-OSu が合成できたと確認できた。現在、作製した T-2- G-OSu と抗 EpCAM 抗体との結合を行い、培養ヒト癌細胞に対する殺細胞効果を検討している。

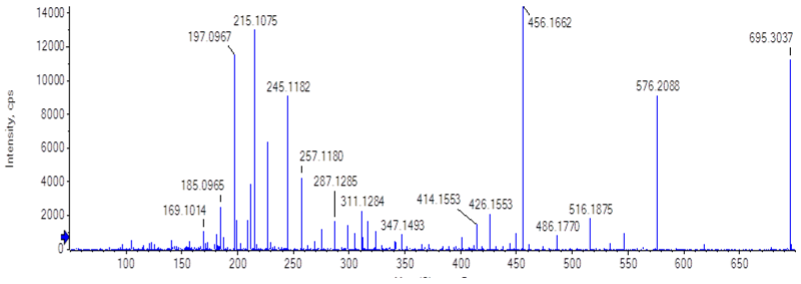


Fig. 1. T-2-G-OSu の LC-MS/MS 解

1) 安藤 直子、松井 宏介、 鈴木 将 他 (2020) JSM Mycotoxins, 70 (2), 67-74.
2) Wu, Q., Qang, X., *et al*. Arch. Toxicol. (2017) 91 (12), 3737-3785.
3）Kojima S., Nakamura N., Ueno Y. *et al*. (1993) Nat. Toxins. 1 (4), 209-215.

RAD23A-UBA2 による K48 鎖特異的認識機構の構造基盤

○佐藤裕介[1,2]・瓜島絢[2]・日野智也[1,2]・永野真吾[1,2]
（[1]鳥取大 GSC センター、[2]鳥取大工）

Structural basis for specific recognition of Lys63-linked polyubiquitin chains by the UBA domains RAD23A
(GSC center, Tottori University[1], Department of Engineering, Tottori University [2])
SATO Yusuke[1,2]; URISHIMA, Aya[2]; HINO Tomoya[1,2], NAGANO, Shingo[1,2]

ユビキチンは 76 残基からなる、真核生物に高度に保存されたタンパク質で、C 末端グリシン残基を用いて標的タンパク質のリジン残基と共有結合することで翻訳後修飾因子として振る舞い、その機能を様々に制御する。多くの場合ユビキチン自身のリジン残基（K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63）、もしくは N 末端メチオニン残基（M1）のアミノ基を用いてユビキチンが連続的に共有結合しユビキチン鎖を形成する。この結合に使われるアミノ基の違いによってユビキチン鎖は異なる構造と機能を持つ事が知られている。多様なユビキチン鎖の中でも、K48 で繋がったユビキチン鎖（K48 鎖）が細胞内で最も豊富に存在し、プロテアソームによる分解シグナルとして機能する。これまで、K48 鎖修飾を受けた基質タンパク質は一義的にプロテアソームによる分解を受けると考えられてきたが、近年プロテアソームと相互作用する様々なアクセサリータンパク質が同定され、これらアクセサリータンパク質によって基質タンパク質の運搬、認識、分解と言った各ステップが厳密に調節されている事がわかってきた。

アクセサリータンパク質の 1 つである RAD23B は、プロテアソームと結合する UBL ドメイン、ユビキチン鎖全般と結合する UBA1 ドメイン、そして K48 鎖特異的に結合する UBA2 ドメインを有し、K48 鎖修飾を受けた基質をプロテアソームへと運搬するシャトル分子として機能すると考えられてきた(Fig.1)。しかし最近、RAD23B は K48 鎖修飾を受けた基質やプロテアソームと相互作用することで液 - 液相分離による液滴を形成し、プロテアソームと分解するべき基質を集積させ、分解反応を促進させる働きがある事が報告された。つまり、RAD23B は単なるシャトル分子として働くだけではなく、プロテアソーム依存的な分解の場を形成するという機能を持つと考えられる。今回、我々は RAD23B と非常に相同性の高い RAD23A の UBA2 ドメイン（RAD23A-UBA2）と、K48 鎖との複合体の結晶構造を決定し、RAD23A-UBA2 による K48 鎖特異的な結合機構を解明した(Fig.2)。興味深いことに、RAD23A-UBA2 は溶液中では単量体として存在するが、結晶構造中では K48 鎖との結合によって 2 量体を形成していた。UBA2 の 2 量体化が溶液中でも起こるのか、2 量体化が溶液中で起こった場合細胞内での RAD23 の機能にどのような影響を及ぼすか、といった点は今後解析する。

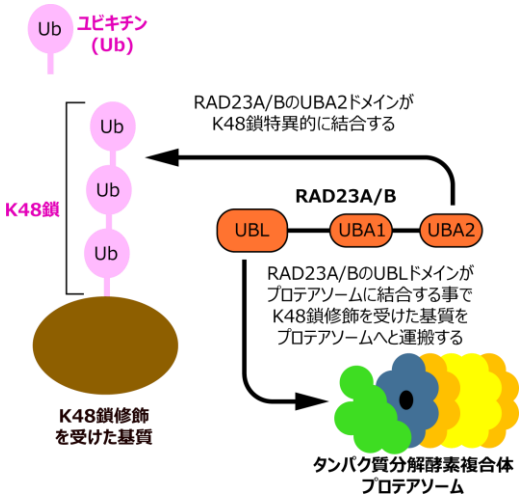


Fig.1 RAD23A/B の機能

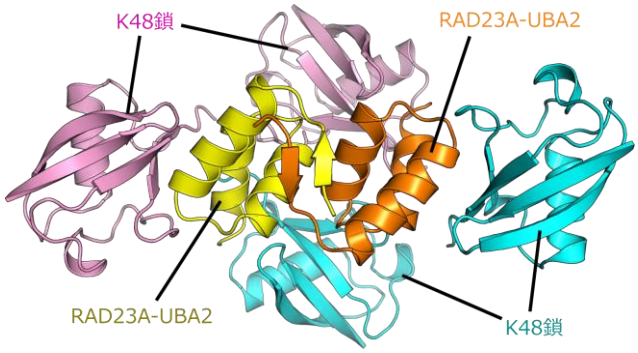


Fig.2 RAD23A-UBA2 と K48 鎖との複合体の結晶構造

SnoopCatcher/SnoopTag を用いた非メチル化 CpG 結合ドメイン融合ルシフェラーゼの構築と非メチル化 CpG 検出法の開発

○宮田 峻通・島村 葉月・吉田 亘（東京工科大院バイオニクス）

Development of unmethylated CpG detection method using unmethylated CpG binding domain fused luciferase constructed by SnoopCatcher/SnoopTag system (Graduate School of Bionics, Tokyo University of Technology) MIYATA, Takamichi; SHIMAMURA, Hazuki; YOSHIDA, Wataru

ヒトゲノム DNA には、5 メチルシトシンや N^6 メチルアデニンなど様々な修飾塩基が含まれる。本研究室では Methylated-CpG-binding domain (MBD)と Firefly luciferase (Fluc)を融合させた MBD-Fluc と、unmethylated-CpG-binding domain である Cys-X-X-Cys motif (CXXC)と Oplophorus luciferase (Oluc)を融合させた CXXC-Oluc を構築し、これらを用いたゲノム DNA メチル化レベル測定法を開発した [1]。これは Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)を利用し異なる波長の BRET シグルナルでゲノム DNA 中のメチル化 CpG 量と非メチル化 CpG 量を同時に定量する方法である。さらに、ヘミメチル化 CpG を認識する SET and RING-associated (SRA) domain と Fluc を融合した SRA-Fluc を構築し、同様の原理でヘミメチル化レベルを測定する方法も開発している [2]。これらの結果は修飾塩基認識タンパク質融合ルシフェラーゼを構築すれば､その標的修飾塩基を BRET により検出できることを示している。

そこで、本研究ではタンパク質ライゲーションシステム SnoopCatcher/SnoopTag を用いることで、任意の組み合わせの修飾塩基認識タンパク質融合ルシフェラーゼを構築する方法を確立することを目的とした。ライゲーションシステム SnoopCatcher/SnoopTag は肺炎球菌アドヘジン RrgA C-Terminal ドメインを分割することで作製されたタンパク質ライゲーションシステムである [3]。反応残基である SnoopTag のリシンと SnoopCatcher のアスパラギンとの間でイソペプチド結合が形成される。本研究では CXXC に SnoopTag (CXXC-SnoopTag)を、Oluc に SnoopCatcher (SnoopCatcher-Oluc)を付加した 2 種類のタンパク質を組換え生産し、これらのライゲーション産物を用いてゲノム DNA の非メチル化 CpG 量を定量できるか検討した。

pET30c-*streptagII-CXXC-SnoopTag* 発現ベクターと pET30c-*streptagII-SnoopCatcher-Oluc* 発現ベクターを構築し、大腸菌 BL21 (DE3)を形質転換した。形質転換した BE21 (DE3)を OD_{600} が 0.5–0.6 になるまで培養し、1.2 mM IPTG を添加して CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc の発現誘導を行った。CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc を Strep-Tactin カラムを用いて精製し､SDS-PAGE により CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc が精製されたことを確認した。次に、1×PBS buffer 内で CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc をインキュベートし、ライゲーションさせた。このライゲーション産物と DNA インターカレーターBOBO-1 を HeLa ゲノム DNA に加え、Oluc の発光により励起された BOBO-1 の蛍光スペクトルを測定した。その結果、485 nm における BOBO-1 の蛍光強度が HeLa ゲノム DNA の非メチル化 CpG レベルに依存して上昇した。つまり、CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc のライゲーション産物を用いることにより、ゲノム DNA の非メチル化 CpG 量を BRET により定量できることが示された。以上の結果より、ライゲーションシステム SnoopCatcher/SnoopTag を用いることで、BRET を用いてゲノム DNA 中の修飾塩基を検出できる修飾塩基認識タンパク質融合ルシフェラーゼを構築できることが示唆された。

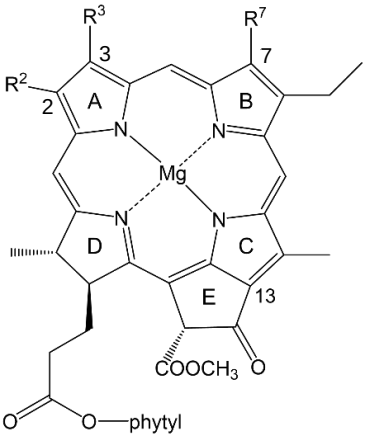
1) Y. Baba, K. Yamamoto, W. Yoshida, *Anal. Bioanal. Chem.*, **411**, 4765 (2019)
2) N. Taka, I. Karube, W. Yoshida, *Anal. Lett.*, **52**, 1258 (2019)
3) G. Veggiani, T. Nakamura, M. D. Brenner, R. V. Gayet, J. Yan, C. V. Robinson, M. Howarth, *PNAS*, **113**, 1202 (2016)

紅色光合成細菌の光捕集タンパク質 LH2 へ再構成したホルミル基含有クロロフィルのスペクトル特性

○田中 愛子[1]・山下 眞花[1]・篠田 稔行[2]・鞆 達也[2]・木村 行宏[3]・佐賀 佳央[1]
（[1]近畿大院総合理工、[2]東京理科大院理、[3]神戸大院農）

Spectral Properties of Formylated Chlorophylls in Light-harvesting Protein LH2 from the Purple Photosynthetic Bacterium *Rhodoblastus acidophilus* (Graduate School of Science and Engineering, Kindai University[1], Graduate School of Science, Tokyo University of Science[2], Graduate School of Agriculture, Kobe University[3]) TANAKA, Aiko[1]; YAMASHITA, Madoka[1]; SHINODA, Toshiyuki[2]; TOMO, Tatsuya[2]; KIMURA, Yukihiro[3]; SAGA, Yoshitaka[1]

光合成タンパク質中のバクテリオクロロフィル(BChl) *a* やクロロフィル(Chl)が持つカルボキシル基は、光合成機能において重要な役割を担っている。光捕集タンパク質 LH2 の B800 BChl *a* の場合では、3 位アセチル基と β-Arg20 が水素結合形成することで電子状態が制御されている。本研究では、LH2 タンパク質の B800 部位にホルミル基を有する酸素発生型光合成生物の Chl 色素を再構成することで、Chl 色素のホルミル基とタンパク質間の相互作用と吸収帯への影響を明らかにすることを目的とした。



Pigment	R²	R³	R⁷
Chl *a*	CH_3	$CHCH_2$	CH_3
Chl *b*	CH_3	$CHCH_2$	**CHO**
Chl *d*	CH_3	**CHO**	CH_3
Chl *f*	**CHO**	$CHCH_2$	CH_3

Fig. 1 Molecular structures of chlorophylls in oxygenic photosynthetic organisms.

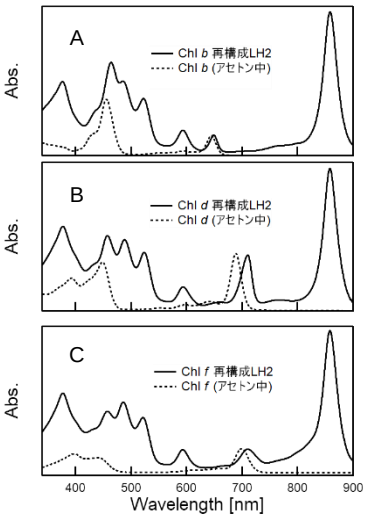


Fig. 2 Absorption spectra of reconstituted LH2 (solid curve) and chlorophylls in acetone (broken curve). A: Chl *b* B: Chl *d* C: Chl *f*.

培養した紅色光合成細菌 *Rhodoblastus acidophilus* から天然 LH2 を単離し、酸性条件でインキュベートすることで B800 BChl *a* を脱離させた。Chl *b*、Chl *d*、Chl *f* (図 1)をそれぞれホウレンソウ、およびシアノバクテリアである *Acaryochloris marina* と *Halomicronema hongdechloris* から抽出・精製した。得られた色素を B800 脱離 LH2 と中性条件でインキュベートし、再構成 LH2 を得た。

LH2 の B800 結合ポケットに再構成された色素の Q_y 吸収帯はいずれも 5 配位の単量体状態と比べて長波長シフトしたが、特に Chl *d* と Chl *f* は大きくシフトした。Chl *d* と Chl *f* を再構成した LH2 の共鳴ラマン測定において、A 環に存在するホルミル基の C=O 伸縮に由来するシグナルは水素結合形成によって低波数シフトした。また、LH2 タンパク質の構造から、これらのホルミル基と β-Arg20 との水素結合形成は可能であると推察された。したがって、 B800 結合ポケットに導入されたときの Chl *b* と Chl *d* / *f* の Q_y 吸収帯シフトの違いを生み出す要因として、Chl の A 環に存在するホルミル基とポリペプチド間での水素結合の形成が示唆された。

骨組織形成を指向した温度応答性タンパク質ハイドロゲルの構築

○岩丸和聖・山本遼太郎・眞下泰正・三重正和・小畠英理（東工大生命理工）

Development of thermo-responsive protein hydrogel for bone formation (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) IWAMARU, Kazumasa; YAMAMOTO, Ryotaro; MASHIMO, Yasumasa; MIE, Masayasu; KOBATAKE, Eiry

【緒言】現在、骨の外傷や骨疾患などに対する治療法として骨移植という手法が用いられている。しかし骨移植による治療には感染症のリスクや回復に要する期間の長さなどが課題として挙げられている。このような課題を克服できる骨の治療法として、組織工学の利用が注目されている。組織工学は細胞、シグナル分子、足場材料の 3 要素で構成されており、当研究室はその中でも組織再生に適切な足場材料の開発に取り組んできた。そして細胞の 3 次元組織形成の実現に向けて、温度に応答してハイドロゲル化する融合タンパク質である、$(AVGVP)_{42}$-D_{88}-CL（coiled-coil unit bound ELP; O-CUBE）を開発した。この O-CUBE は、温度に応答して疎水性相互作用により凝集するエラスチン由来の疎水性ポリペプチド(AVGVP)の 42 回くり返し配列 (ELP)、ELP の過剰な凝集を防ぐポリアスパラギン酸 D_{88}、融合タンパク質同士の架橋点となるアンチパラレルホモ四量体 coiled-coil 構造を形成する Coil-LL（CL）の 3 部分で構成されており、エラスチン由来の$(AVGVP)_{42}$ のはたらきにより、4℃付近ではゾル化、37℃付近ではゲル化し、可逆的な温度応答性を有する。またこのハイドロゲルは、生体適合性や生分解性に優れており、タンパク質濃度を調整することによりゲルの硬さを制御することができるため、組織工学の足場材料として使用することが期待できる。本研究では、この O-CUBE を基盤として、骨シアロタンパク質（BSP）由来の RGD 配列を挿入した$(AVGVP)_{42}$-D_{88}-bRGD-CL（bRGD-CUBE ; B-CUBE）を構築し、骨組織の形成を目的とした。ここでは、この B-CUBE を 3 次元組織形成の足場材料としてヒト間葉系幹細胞（hMSC）の骨芽細胞分化誘導評価を行った。

【実験】CUBE タンパク質は大腸菌発現系によって発現させ、エラスチン由来ポリペプチド特有の性質である温度応答性を利用した精製方法である、Inverse Transition Cycling（ITC）法により精製した。精製したタンパク質を PBS で希釈し、温度応答的にハイドロゲル化するタンパク質溶液を得た。温度変化に伴う濁度変化測定を行うことで、加温によるゲル化及び冷却によるゾル化の評価を行った。また、CUBE タンパク質をコートしたプレート上で、hMSC の細胞接着能や増殖能を評価した後、2 次元での骨分化誘導培地を用いた hMSC の骨芽細胞分化誘導を行い、骨芽細胞の初期分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ（ALP）活性を測定した。3 次元培養において骨芽細胞分化誘導を行う際には、B-CUBE 溶液内に hMSC を懸濁させてプレートに滴下することによりドロップレットを形成させ、37℃に加温することでハイドロゲルを作製した。ここに骨芽細胞分化誘導培地を加えることで、細胞の分化を誘導した。

【結果と考察】ITC 法によって精製したタンパク質溶液は、37℃に加温することによって、ハイドロゲル化した。O-CUBE と B-CUBE をプレートにコートし、その上で hMSC の 2 次元培養を行ったところ、RGD 配列が存在する B-CUBE 上でのみ細胞の接着、増殖が確認できた。B-CUBE 上での hMSC の骨分化誘導の実験では、分化マーカーである ALP 活性の上昇が見られた。次に、ハイドロゲル内にて細胞の培養を行ったところ、細胞の増殖が確認されたことからハイドロゲル内での 3 次元培養が可能であることが示され、構築したタンパク質ハイドロゲルを用いた骨組織の形成が可能あることが示唆された。

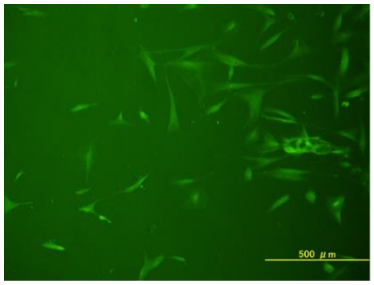


Fig 1. Morphological evaluation of hMSCs after 24 h of incubation on plates coated with B-CUBE. Scale bar = 500μm

細胞標的性 DNA アプタマー修飾人工ウイルスキャプシドの構築

○内山晃輔・稲葉央・古川寛人・松浦和則（鳥取大院工）

Construction of artificial viral capsid modified with Cell-targeting DNA aptamer

(Graduate School of Engineering, Tottori University) UCHIYAMA, Kosuke; INABA, Hiroshi; FURUKAWA, Hiroto; MATSUURA, Kazunori

近年、リガンド-レセプター間の相互作用を通して、標的細胞に選択的にデリバリーするナノ材料の創製が盛んに行われている。「アプタマー」は分子認識能を有する核酸分子であり、塩基配列によって特定の立体構造を形成して標的分子を認識することで、細胞標的能をナノ材料に付与することが可能である [1]。一方、当研究室では、トマトブッシースタントウイルス由来の 24 残基 β-Annulus peptide が水中で自己集合することで直径 30～50 nm の人工ウイルスキャプシドを形成し、内部に DNA やタンパク質・無機ナノ粒子などが内包可能であることを見出している [2]。また、C 末端側の化学修飾により、ヒト血清アルブミン(HSA)や、RNase S などのタンパク質を表面被覆した人工ウイルスキャプシドの構築にも成功している [3,4]。本研究では、リンパ腫細胞を認識する DNA アプタマーを表面修飾した人工ウイルスキャプシドを構築し、細胞標的性 DDS キャリアとして応用することを目指した（Fig.1）。

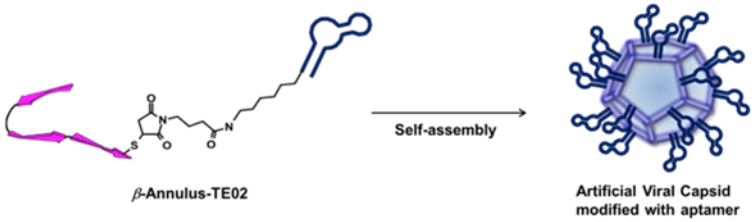


Fig.1 Schematic illustration of construction of artificial viral capsid modified with DNA aptamer.

Fmoc 固相合成法を用いて C 末端側に Cys を有する β-Annulus-GGGCG peptide (INHVGG TGGAIMAPVAVTRQLVGSGGGCG) を合成し、Sulfo-GMBS リンカーを介して、リンパ腫細胞特異的な DNA アプタマーTE02[5]を連結した。β-Annulus-TE02 (25 μM) は 10 mM phosphate buffer (pH 7.0) 中において、動的光散乱(DLS)測定により 55±16 nm の粒径分布を示し(Fig.2a)、TEM 観察により 60 nm 程度の球状集合体を形成していることが確認された(Fig.2b)。TE02 アプタマー修飾人工ウイルスキャプシドのリンパ腫 Daudi 細胞への取り込みを CLSM 観察により評価したところ、未修飾のキャプシドよりも約 2 倍取り込まれることがわかった(Fig.2c, d)。現在、TE02 アプタマー修飾キャプシドの細胞選択性を検討している。

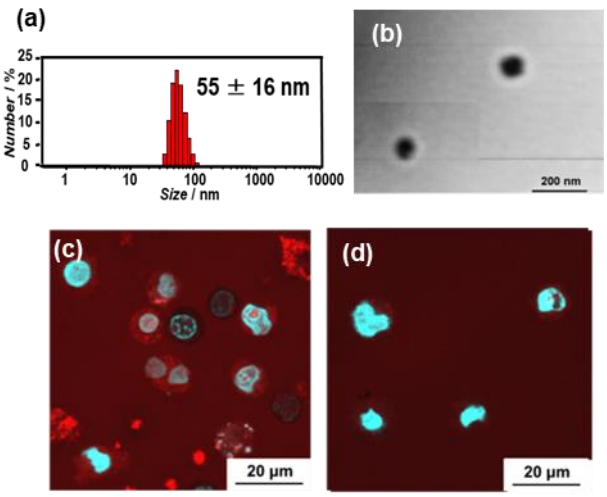


Fig.2 (a) DLS size distribution and (b) TEM image of artificial viral capsid modified with TE02 aptamer at 25 μM in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0). (c, d) CLSM images of Daudi cells in the presence of TAMRA-labeled artificial viral capsid with (c) or without (d) TE02 aptamer.

1) X. Fang and W. Tan, *Acc. Chem. Res.*, **43**, 48 (2010).
2) K. Matsuura, *Chem. Commun. (Feature Article)*, **54**, 8944 (2018)
3) K. Matsuura, T. Honjo, *Bioconj. Chem.*, **30**, 1636 (2019)
4) K. Matsuura, J. Ota, S. Fujita, Y. Shiomi, H. Inaba, *J. Org. Chem.*, **85**, 1668 (2020)
5) Z. Tang, D. Shangguan, K. Wang, H. Shi, K. Sefah, P. Mallikratchy, H. W. Chen, Y. Li and W. Tan, *Anal. Chem.*, **79**, 13, 4900 (2007)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

構造変化が不明なタンパク質に対する蛍光タンパク質を用いたバイオセンサーの設計戦略

○田嶋竣介[1]・中田栄司[1]・坂口怜子[2]・才村正幸[1]・森泰生[3]・森井孝[1]（[1]京大エネ研、[2]産医大医、[3]京大院工）

The construction strategy of AFP-based biosensors using the putative structural change (Institute of Advanced Energy, Kyoto University[1], School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health [2], Graduate School of Engineering, Kyoto University[3]) SHUNSUKE, Tajima[1]; Eiji, Nakata[1]; REIKO, Sakaguchi[2]; MASAYUKI, Saimura[1]; YASUO, Mori[3]; Takashi, Morii[1]

蛍光タンパク質を用いたバイオセンサーは、細胞内局在化の容易さや長時間測定への適性などから、生細胞内での生体分子の挙動解明のために広く使われている。検出原理としては、標的と反応・結合によるタンパク質機能構造の構造変化を融合した蛍光タンパク質の構造変化へと伝播させ、蛍光発光変化として検出する方法が一般的である。この際、構造解析等による構造変化の情報が、効率的な蛍光変化での検出のために使用される。しかしながら、より多くの標的に対するバイオセンサーを、蛍光タンパク質を用いて開発するためには、構造情報が得られていないタンパク質を用いて蛍光バイオセンサーを構築する設計法が必要である。

TRPC5 はカルシウム透過型イオンチャネルであり、Cys553 の NO によるニトロソ化および Cys558 とのジスルフィド結合形成に伴う構造変化により開口することが示唆されている[1]。しかしながら、ジスルフィド結合形成状態の構造情報しか得られておらず、ジスルフィド結合形成前後での構造変化は明らかになっていない (図 1)[2]。我々は、構造変化が微小なタンパク質機能構造でも、蛍光タンパク質の蛍光団の近傍に導入することによって、蛍光変化として検出できることを報告している[3]。また、TRPC5 の構造変化が予想される部位を、緑色蛍光タンパク質 (EGFP)に導入した EGFP-TRPC5 によって、ジスルフィド結合形成による構造変化を蛍光変化として検出している[4]。しかしながら、その蛍光強度変化は微小であるため、EGFP-TRPC5 を細胞内でセンサーとして使用するためには蛍光強度変化の増幅が必要である。

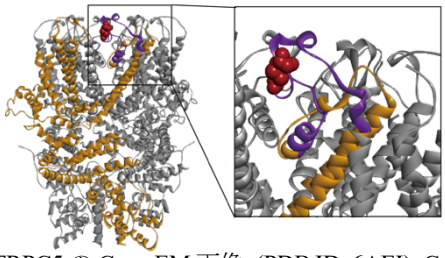


図 1. TRPC5 の Cryo-EM 画像 (PDB ID: 6AEI)。Cys553・Cys558 を CPK 表示で示した。

本研究では、EGFP-TRPC5 の蛍光強度変化を増幅するために、TRPC5 の構造変化部位を短くし、ジスルフィド結合形成部位を蛍光タンパク質に近づけて、より効率的に蛍光変化を誘起できる変異体を探索した (図 2)。*In silico* と *in vitro* による二段階のスクリーニングにより、EGFP-TRPC5[4]より大きな蛍光変化を示す 3 種類の変異体を得ることができた。スクリーニングの詳細およびその機能評価について発表する。

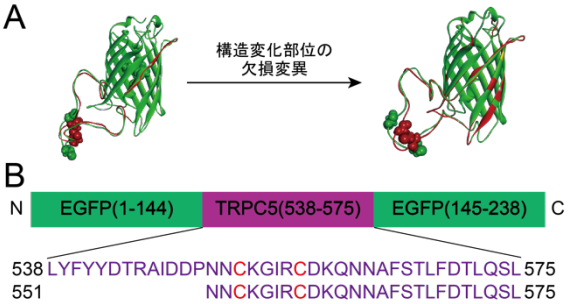


図 2. (A) 欠損変異のシミュレーション (B) EGFP-TRPC5 および欠損変異体の模式図および構造変化部位のアミノ酸配列

1) Yoshida T, Inoue R, Morii T, et al. Nat. Chem. Biol., 2006;2,596-607.
2) Duan J, Li J, Chen GL, Ge Y, et al. Sci. Adv. 2019;5:eaaw7935.
3) Sakaguchi R, Endoh T, Yamamoto S, et al. Bioorg. Med. Chem. 2009;17:7381-7386.
4) Tajima S, Nakata E, Sakaguchi R, et al. Bioorg. Med. Chem., 2020;28:115430.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

酵素反応を用いた両親媒性ペプチド集合体の事後修飾に及ぼす因子探索

○樋口 亜也斗[1]・若林 里衣[1]・後藤 雅宏[1,2]・神谷 典穂[1,2]（[1]九大院工、[2]九大未来化セ）

Investigation on factors that affect post-modification of peptide amphiphile assemblies by enzymatic reaction. ([1]Graduate School of Engineering, Kyusyu University, [2]Center for Future Chemistry, Kyushu University) HIGUCHI, Ayato[1]; WAKABAYASHI, Rie[1]; GOTO, Masahiro[1,2]; KAMIYA, Noriho[1,2]

生体内の超分子構造体を構造的・機能的に模倣可能な自己組織化材料への関心が近年高まっている。特に酵素反応性を利用した自己組織化や機能制御が精力的に研究されているが、構造体への事後修飾の方法は確立されていない。我々は、酵素反応を用いて両親媒性ペプチド (PA) が形成する自己組織化材料に様々な機能性分子を事後修飾可能な手法を報告した [1]。ここでは、酵素としてグルタミン (Gln) 残基とリジン (Lys) 残基もしくは一級アミン間を架橋する微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) を用い、MTG 反応性の Gln 残基を有する PA、Fmoc-L_nQG (n = 2, 3) を設計した。これまでにこれらの PA 集合体に対して MTG 反応により一級アミンを有する蛍光小分子や蛍光タンパク質を事後修飾できることを確認している。また、PA 自己組織化における pH 依存性に着目し、PA 集合体と PA 集合体への酵素反応性における pH の影響を明らかにした。ここでは、荷電状態による MTG と PA 集合体との接近性や PA 集合体上の酵素反応部位の密度が反応性に関与する可能性が示唆されている [2]。この PA 集合体に対する酵素反応性の違いを明らかにするために、今回は酵素反応部位密度に着目し、MTG 反応部位を持たない Fmoc-L_n (n = 2, 3) を Fmoc-L_nQG と混合させることで、PA 集合体中の酵素反応性 PA 間の距離を変化させ、事後修飾反応に与える影響を調査した **(Fig. 1)**。

これまでに Fmoc-L_2QG はファイバー状、Fmoc-L_3QG はテープ状の集合体を形成することが確認されている。Fmoc-L_n 単独では、Fmoc-L_2 はテープ状、Fmoc-L_3 はファイバー状の集合体を形成することが確認された。また、テープ状の集合体を形成する PA 同士である Fmoc-L_2 と Fmoc-L_3QG を混合し、一級アミンを有する機能性分子の事後修飾反応を行うと、Fmoc-L_3QG の酵素反応率が向上した。これに対し、集合体形態の異なる Fmoc-L_3 と Fmoc-L_3QG を混合すると、酵素反応率が減少した。これは、Fmoc-L_3QG が Fmoc-L_2 と共集合したことにより、酵素反応部位間にスペースが生まれ、酵素が認識しやすくなったことによるのではないかと考えている。

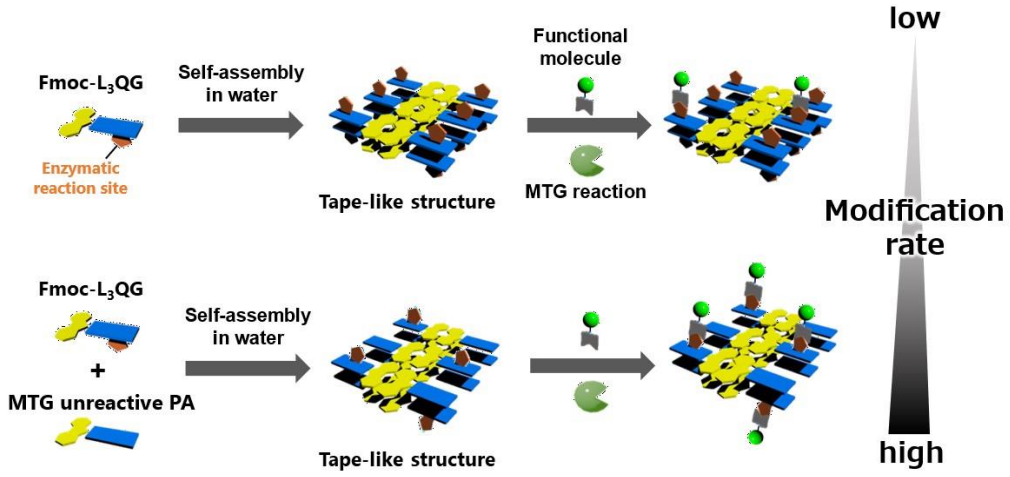


Fig. 1 Conceptual diagram of this study.

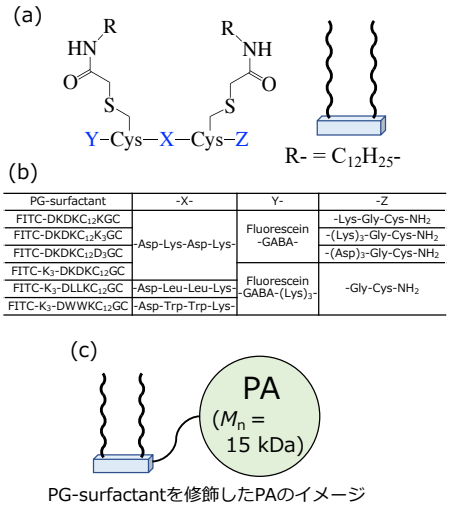
[1] R. Wakabayashi, *et. al*., *Chem. Commun*., **55**, 640-643 (2019)
[2] R. Wakabayashi, *et. al*., *Int. J. Mol. Sci*., **22**, 3459 (2021)

PG-Surfactant を用いた合成高分子の哺乳類細胞膜への提示法の検討

○中窪　樹・水野稔久*（名工大院工）

Evaluation of the Method to Present Synthetic Polymers onto Mammalian Cell Membranes by using PG-surfactants (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology) NAKAKUBO, Tatsuki; MIZUNO, Toshihisa*

＜緒言＞任意の合成高分子を細胞表面へ提示できる技術、あるいは細胞内部へ取り込ませる技術の開発は、ケミカルバイオロジー、創薬、DDS、細胞工学などの分野における、高分子化学の利用を広げる意味から興味深い。カチオン性の高分子を除き、一般に親水性合成高分子は細胞膜への相互作用は弱く、細胞内には自発的には取り込まれにくい。そこで細胞表面との相互作用を高めるためには、一般に疎水基やリガンド分子の導入、両親媒性を付与するなどの方法が取られるが、本研究では、近年我々の研究室で検討を進めている、長鎖疎水基を２本側鎖に含む両親媒性リポペプチド PG-surfactant（図１(a)）を親水性高分子に付与した場合の、細胞との相互作用、細胞膜・細胞内への分配挙動に関して評価を行っている。これまでに PG-surfactant 部分のペプチド配列として、細胞内への取り込みが比較的起こりにくい $DKDKC_{12}K$、ほとんど取り込まれない $DKDKC_{12}D_3$、一方で細胞内に取り込まれやすい $DKDKC_{12}K_3$ を採用し(図１(b))、これらの C 末端側に親水性高分子であるポリアクリルアミド（PA、M_n = 1.5 kDa）を修飾し（図１(c)）哺乳類細胞である NIH3T3 細胞に添加したところ、$DKDKC_{12}K$ 、$DKDKC_{12}K_3$ を用いた場合については、添加１時間以内であれば細胞表面への選択的な提示が可能であることがわかっている。そこで本発表では、さらなる提示能の向上を目指し、$DKDKC_{12}K_3$ におけるカチオン残基クラスター$(Lys)_3$ の位置を N 末端側に移動した場合の効果、さらにリンカー部位（X-部位）における-Asp-Lys-Asp-Lys-の配列への疎水残基の変異導入の効果を評価した。



PG-surfactant	-X-	Y-	-Z
FITC-$DKDKC_{12}KGC$	-Asp-Lys-Asp-Lys-	Fluorescein -GABA-	-Lys-Gly-Cys-NH_2
FITC-$DKDKC_{12}K_3GC$			-$(Lys)_3$-Gly-Cys-NH_2
FITC-$DKDKC_{12}D_3GC$			-$(Asp)_3$-Gly-Cys-NH_2
FITC-K_3-$DKDKC_{12}GC$		Fluorescein -GABA-$(Lys)_3$-	-Gly-Cys-NH_2
FITC-K_3-$DLLKC_{12}GC$	-Asp-Leu-Leu-Lys-		
FITC-K_3-$DWWKC_{12}GC$	-Asp-Trp-Trp-Lys-		

図1 PG-surfactant の基本構造(a)とポリアクリルアミド(PA)への修飾に用いた蛍光ラベル化した PG-surfactant 部分の配列一覧(b)、さらに PG-surfactant を修飾した PA のイメージ図(c)

＜実験と結果＞一連の PG-surfactant 修飾 PA の合成は、PG-surfactant 部分は Fmoc 固相合成法により行い、RAFT 重合により合成された末端にジチオピリジル基を導入した PA（M_n = 1.5 kDa）との S-S 結合を介した複合化後、逆相 HPLC を用いて単離精製を行なった。PG-surfactant 修飾 PA が細胞内外でどのように分配されるかは、NIH3T3 細胞を用いて、添加後 1h、24h における分配挙動を共焦点顕微鏡観察により行なった。その結果、以前に最も高い割合で細胞膜への分配が見られた $DKDKC_{12}K_3$ を用いた場合と比較し、K_3-$DKDKC_{12}$ ではより高い細胞膜への提示挙動が確認された（図２）。興味深い点としては、添加１時間、２４時間後において、過剰な試薬を除きさらに細胞表面を PBS バッファーにて洗浄を行なっても、細胞膜上に分配された分子がそのまま残留していたことから、安定な高分子の細胞膜上への提示が可能となることがわかった。また一部分子に関しては、添加２４時間後においては細胞内への導入も見られた。紙面の都合上、PG-surfactant 部分の疎水性を増やした K_3-$DWWKC_{12}$、K_3-$DWWKC_{12}$ を用いた場合の結果に関しては、当日発表にて報告を行う。

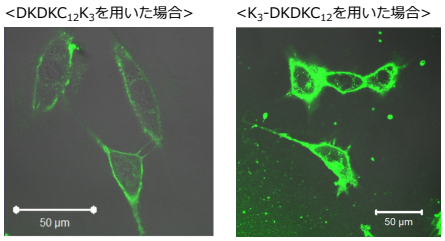


図２ PG-surfactant 修飾 PA の NIH3T3 細胞膜表面への分配挙動の評価（10 μM の濃度で添加１時間後に過剰な試薬を除いて、CLSM 測定した画像の比較）

疎水性タグ化合物による神経変性疾患関連タンパク質の分解誘導

○平井　景梧[1]、山下　博子[2]、友重　秀介[1]、三島　祐悟[1]、佐藤　伸一[1,3]、
橋本　祐一[2]、石川　稔[1]（[1]東北大院生命、[2]東大定量研、[3]東北大学際研）

Targeted degradation of mutant huntingtin mediated by hydrophobic tag (Graduate School of Life Sciences, Tohoku University[1], IQB, University of Tokyo[2], Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University[3]) Keigo, Hirai[1]; Hiroko, Yamashita[2]; Shusuke, Tomoshige[1]; Yugo, Mishima[1]; Shinichi, Sato[1,3]; Yuichi, Hashimoto[2]; Minoru Ishikawa[1].

一部の神経変性疾患では患者の脳組織において凝集性の変性タンパク質が認められ、これが発症原因と考えられている [1]。凝集タンパク質は従来の創薬手法では対応が難しいため根治療法が存在せず、これらに対して新しい創薬戦略が求められている。世界に先駆けた成果として、所属研究室では【凝集タンパク質のリガンド】と【ユビキチンリガーゼ（E3）のリガンド】を連結させた小分子 PROTACs が凝集タンパク質を分解へ導くことを過去に見出している [2]。一方で臨床での実用化を考えると、患者の脳に化合物を作用させるためには、化合物が血液脳関門（BBB）を透過しなければならない。PROTACs は分子量が大きく水素結合受容体／供与体の数も多いため、BBB 透過性が低いと予想される。【標的タンパク質のリガンド】と【疎水性構造】を連結させた疎水性タグ（HyT）は、標的タンパク質の表面に疎水性構造を人工的に露出させ、これをタンパク質の変性と認識したタンパク質品質管理機構によって分解させることができる [3]。そこで本研究では、水素結合受容体／供与体の数が少なく、低分子量の疎水性基を持つ HyT 化合物を創製し、より中枢薬らしい構造の凝集タンパク質分解薬への展開を目指す（図 1）。

凝集タンパク質のプローブと疎水性からなる HyT 化合物を 7 種類設計・合成した。凝集タンパク質としてハンチントン病の原因となる変異型ハンチンチンタンパク質（mHtt）を発現させた細胞に、合成した HyT 化合物を処理したところ、細胞中の mHtt の存在量を選択的に減少させた。特に HyT の疎水性構造が嵩高いほど強い活性が認められ、疎水性構造の嵩高さが mHtt 分解促進活性に影響するという新たな知見が得られた。また、BBB モデルとして固定化人工膜（IAM）カラムを用い、予備的な脳移行性の評価を行った。その結果、いずれの HyT 化合物も既存の PROTAC よりも脳移行性が高いことが示唆された。さらに、作用機序解析の結果、本研究により見出した HyT 化合物は、シャペロンタンパク質が関与するタンパク質品質管理機構を介してプロテアソームによる分解へと導くことが明らかになった。

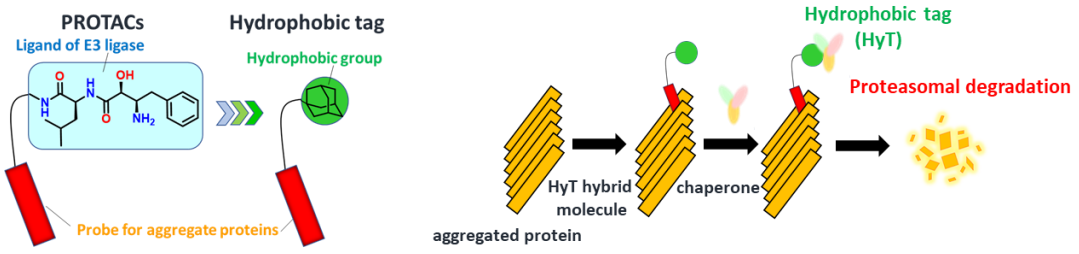


図１．疎水性タグ法による凝集タンパク質分解機構

【参考文献】[1] Gatchel JR,; Zoghbi HY. *Nat Rev Gene*. **2005**, *6*, 743-755. [2] Tomoshige, S.; Nomura, S.; Ohgane, K.; Hashimoto, Y.; Ishikawa, M. *Angew. Chemie - Int. Ed*. **2017**, *56*, 11530–11533. [3] Neklesa, T. K.; Tae, H. S.; Schneekloth, A. R.; Stulberg, M. J.; Corson, T. W.; Sundberg, T. B.; Raina, K.; Holley, S. A.; Crews, C. M. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 538–543.

酸素感受性イオンチャネル TRPA1 動態の定量解析に向けた cpHalo-tag 修飾

○杉原佑太朗[1]・曽我恭平[1]・小島憲人[1]・森泰生[2]・清中茂樹[1]（[1]名大院工、[2]京大院工）

cpHalo-tag labeling to quantify O_2-sensitive ion-channel TRPA1 trafficking. (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Engineering, Kyoto University[2]) SUGIHARA, Yutaro[1]; SOGA, Kyohei[1]; OJIMA Kento[1]; MORI, Yasuo[2]; KIYONAKA, Shigeki[1]

Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1)は酸素感受性のイオンチャネルであり、ガンの低酸素抵抗性との関連が示唆されている。TRPA1 の活性化と細胞内動態変化が関連するため、細胞表層に発現する TRPA1 を蛍光標識してその動態を定量解析することは、細胞のガン化メカニズムの解明に繋がると考えられる。Halo-tag などの self-labeling タンパク質を細胞外の末端に融合することで細胞膜表層のタンパク質を迅速に蛍光ラベル化することが可能であるが、TRPA1 のように両末端が細胞内に存在するタンパク質の細胞表層選択的なラベル化は困難であった。本研究では、TRPA1 の機能に摂動を与えずに細胞外ループへ Halo-tag を導入し、細胞表層選択的なラベル化法の開発に着手した。具体的には Halo-tag の本来の末端を人工のリンカーで繋ぎ、新たな末端を作り出す circular permutation を施した cpHalo-tag を TRPA1 の細胞外ループに融合した。cpHalo-tag に関しては、Halo-tag 本来の N, C 末端を繋ぐリンカー長及び、新たに作製した末端と TRPA1 を繋ぐリンカー長の最適化を行い、チャネル活性への影響を最小限に抑えた cpHalo-tag 融合 TRPA1 を作製した。この cpHalo-tag 融合 TRPA1 に細胞膜透過性を持たない親水的な Halo-tag ligand で蛍光標識を行ったところ、反応性が低く十分な蛍光強度が得られなかった。そこで第一段階目のラベル化で疎水的なトランスシクロオクテン (TCO)をもつ高反応性の Halo-tag ligand (HTL-TCO)を Halo-tag に修飾し、第二段階目のラベル化で TCO と細胞膜非透過性の蛍光標識テトラジン (Tz probe)との逆電子要請型 Diels-Alder 反応を用いる two-step labeling により細胞膜表層 TRPA1 の迅速な蛍光ラベル化に成功した。

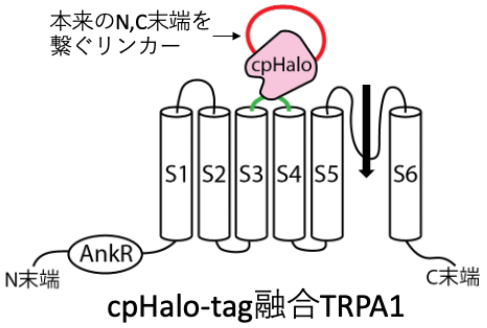


Fig. 1 Design of cpHalo-tag fused TRPA1 (cpHalo-TRPA1).

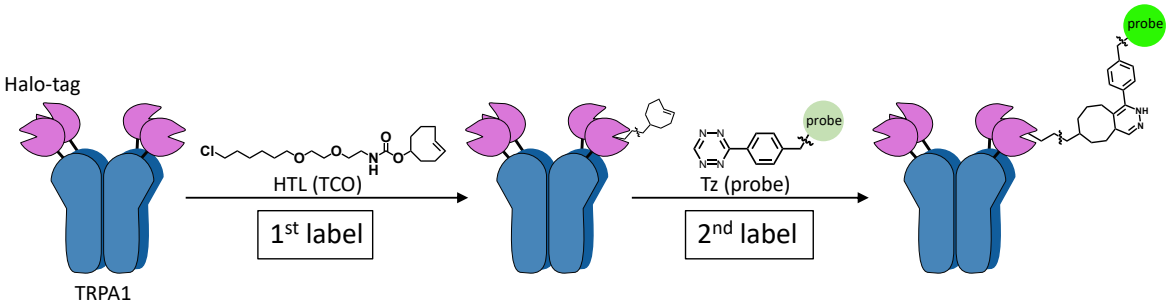


Fig. 2 Schematic illustration of bioorthogonal two-step labeling to cpHalo-TRPA1.

分子中央部へのアルキレン鎖導入によるペプチド集積化と生物学的機能化

○矢口敦也[1]・平松弘嗣[2]・味岡逸樹[3,4]・村岡貴博[1,4]（[1]東京農工大院工、[2]國立陽明交通大、[3]東京医歯大 CBIR、[4]KISTEC）

Biofunctionalization of peptides by insertion of central alkylene chains (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology[1], National Yang Ming Chiao Tung University[2], Center for Brain Integration Research, Tokyo Medical and Dental University[3], Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology[4]) YAGUCHI, Atsuya[1]; HIRAMATSU, Hirotsugu[2]; AJIOKA, Itsuki[3,4]; MURAOKA, Takahiro[1,4]

疎水性相互作用は、水中における集合体構造と特性を制御する主要な非共有結合である。蛋白質では、疎水性アミノ酸残基間の疎水性相互作用が、フォールディングの駆動力として働く。この時、疎水性ドメインは分子内部に配置される。ここで蛋白質の疎水性ドメインは、一部露出し、基質分子や補因子の取り込み機能を担う[1]。このような集合体形成や機能発現に重要な役割を持つ疎水性相互作用は、人工超分子材料でも積極的に組み込まれ、活用されている。例えば、片末端にアルキル基を結合させたペプチド(PA)は、アルキルテールの疎水性により自己集合する。アルキル基の長さに応じ、PA はシリンダー型ミセルや球状ミセルなど、多様な集合構造を形成する[2]。一方で、蛋白質とは異なり、疎水的なドメインは分子集合体内部に局在し、従って PA 集合体の特性は、主として表面に露出したペプチド部分の親水的なアミノ酸配列により調節される。疎水性相互作用を、分子集合体の形体制御と、表面への露出による機能発現の両方に利用することは、蛋白質に見られる多用かつ高度な分子機能の発現に繋がると考えられるが、それを実現させる分子設計指針については十分には確立されていない。

そこで我々は、疎水性相互作用による集合体形成と機能発現の両立を目指すアプローチとして、アルキレン鎖を自己集合性ペプチドの中央へと導入することを着想した(Fig. 1)。直線状に伸びたコンフォメーションの分子が、一次元的に集合することでナノファイバーを構築し、アルキレン鎖部分が一部表面部へ露出すると考えられる。Arg-Ala-Asp-Ala が 4 回繰り返された配列からなるナノファイバー形成両親媒性ペプチド RADA16 の、分子中央部（8 位）の Ala 残基を長さ C2、C3、C4 のアルキレン鎖に置換した A8βAla、A8Abu、A8Ape を開発した[3]。電子顕微鏡観察から、いずれも水中で超分子ナノファイバーの形成が示された(Fig. 2)。X 線回折測定から、いずれのアルキレン鎖導入ペプチドも、RADA16 と同様の直鎖状コンフォメーションを形成していることが示された。興味深いことに、C2 以上のアルキレン鎖を導入することで、超分子ファイバーの表面疎水性が著しく向上し、細胞接着性が大幅に低下する特徴的な生物学的機能が見られた(Fig. 3)。ペプチド中央部へのアルキレン鎖導入が、集合構造形体を保持したまま、超分子ナノファイバーの表面特性と生物学的機能の制御に有効であることが示された。

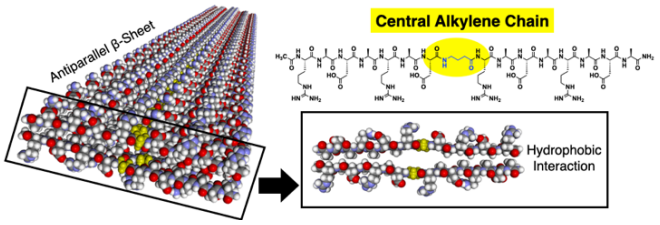


Fig. 1 A schematic image of packing structure of **A8Abu**.

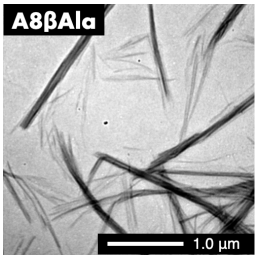


Fig. 2 A transmission electron micrograph of **A8βAla**.

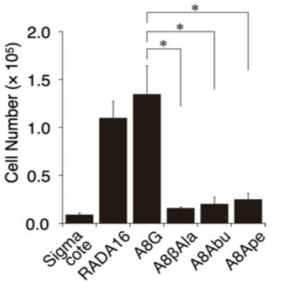


Fig. 3 A histogram displaying the number of fibroblasts attached on glass surfaces coated with Sigmacote and peptides.

1) H. A. Scheraga *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13057–13061.
2) M. P. Hendricks *et al. Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 2440–2448.
3) A. Yaguchi *et al. Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 9295–9301.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

維持メチル化機構解明を指向したジユビキチン化 PAF15 タンパク質の化学合成

○高橋侑也[1]・郡聡実[2]・有田恭平[2]・林剛介[1]・村上裕[1]（[1]名大院工, [2]横市大院医）

Synthesis of dual-mono ubiquitinated PAF15 for elucidation of maintenance methylation mechanism

(Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University[2]) TAKAHASHI, Yuya[1]; KORI, Satomi[2]; ARITA, Kyohei[2]; HAYASHI, Gosuke[1]; MURAKAMI, Hiroshi[1]

DNA メチル化は遺伝子発現の制御に必須の修飾であり、複製後に新生 DNA 鎖にメチル化を付与するのが維持メチル化機構である。近年、ジユビキチン化された PAF15 タンパク質を介した維持メチル化複合体の存在が生化学実験から推測された [1)]。この複合体の構造をクライオ電子顕微鏡観察等の構造解析で解析するためには、ユビキチンが 2 箇所に入ったジユビキチン化 PAF15(PAF15Ub2)の調製が必要となるが、通常の遺伝子工学的手法でユビキチン化されたタンパク質の作製は困難である。そこで、本研究ではタンパク質を有機化学的に作製する「タンパク質化学合成法」を用いて PAF15Ub2 の作製を試みた。タンパク質化学合成法はペプチド固相合成とペプチド連結反応からなり、ペプチド固相合成法で翻訳後修飾を位置選択的に導入できる。ペプチド連結反応で最もよく用いられるものが NCL(Native Chemical Ligation)[2)]であり(Fig. 1)、これまでに 200 種類を超えるタンパク質が化学合成されている。ユビキチンのようなタンパク質性の翻訳後修飾の場合も分岐ペプチドを用いることで作製が可能となる。PAF15 は 110 残基、ユビキチンは 76 残基からなるタンパクで、PAF15 の N 末端から 14 番目と 23 番目のリシンの側鎖にアミド結合を介してユビキチン C 末端が修飾される。全長 PAF15Ub2 をいくつのペプチド断片に分割するか、について実際にペプチド断片を合成することで検証した結果、全体を計 5 つの断片に分けて合成を行うこととした(Fig. 2A)。分岐ペプチドは側鎖を Alloc 保護したリシンを導入し、主鎖の合成後に Pd 触媒による選択的な脱保護とそれに続くペプチド固相合成法によって作製を行なった。また、NCL でチオエステルとして反応させる断片は C 末端をチオエステル前駆体であるヒドラジドとして合成し、断片 3 の主鎖の C 末端は NCL 後にワンポットで脱保護が可能なシステインの保護体チアゾリジンを導入した。NCL の順序としてはまずユビキチン断片を繋いだのち、N 末端側から C 末端側に向けて、途中脱硫反応を途中に挟んで順に連結した。そして最終的に得られた生成物を SDS-PAGE によって確認すると、純度は高くないものの生成物のバンドが確認された(Fig. 2B)。以上より、5 種類のペプチド断片を、N 末端側から順次に連結させることで、262 アミノ酸からなる PAF15Ub2 の合成ルートを達成した。

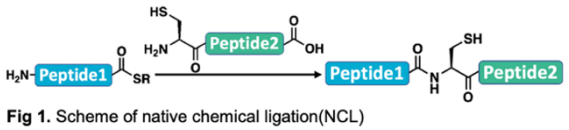


Fig 1. Scheme of native chemical ligation(NCL)

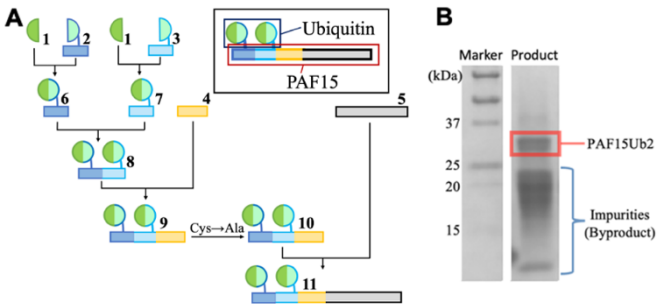


Fig 2. Synthesis of PAF15Ub2. (A) Ligation scheme of PAF15Ub2. (B) Result for SDS-PAGE analysis.

1) A. Nishiyama, D. B. Mulholland, S. Bultmann, S. Kori, A. Endo, Y. Saeki, W. Qin, C. Trummer, Y. Chiba, H. Yokoyama, S. Kumamoto, T. Kawakami, H. Hojo, G. Nagae, H. Aburatani, K. Tanaka, K. Arita, H. Leonhardt, M. Nakanishi, *Nat. Commun.*, **11**, 1222 (2020)
2) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science*, **266**, 776 (1994)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

ケトンの不斉水素化反応を触媒する人工金属酵素の開発

○石井俊宏・吉岡紗穂・松本隆聖・丸毛智史・藤枝伸宇（阪府大院生環）

Development of artificial metalloenzymes for stereoselective Asymmetric transfer hydrogenation reaction

(Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University) ISHII, Toshihiro; YOSHIOKA, Saho; MATSUMOTO, Ryusei; MARUMO, Tomohito; FUJIEDA, Nobutaka

近年、タンパク質に金属錯体を結合させたハイブリッド触媒である人工金属酵素 [1] の構築が注目を集めている。これは遷移金属の反応性に加えてタンパク質を反応場として用いることで、高効率で、高立体選択的な反応を実現することができると期待されている。当研究室では超好熱菌由来の TM1459 タンパク質 [2] を土台タンパク質として用いて（図 1）、このタンパク質が持つ４つのヒスチジン残基 (His52, His54, His58, His92) からなる金属結合部位に直接金属イオンを結合させることで、より簡便に人工金属酵素を構築する手法を開発してきた。本研究では、活性点のさらなる多様化を目指して、有機金属錯体を直接ヒスチジン残基に結合させる。第一配位圏にある４つのヒスチジン残基のうち 3 つをアラニンに変異させた変異体 (H52A/H54A/H58A, H52A/H54A/H92A, H52A/H58A/H92A, H54A/H58A/H92A) を構築し、3 種類の有機金属錯体 (Ru(p-cymene), RhCp*, IrCp*) を導入することでエナンチオ選択的な不斉水素化反応のスクリーニングを行なった。

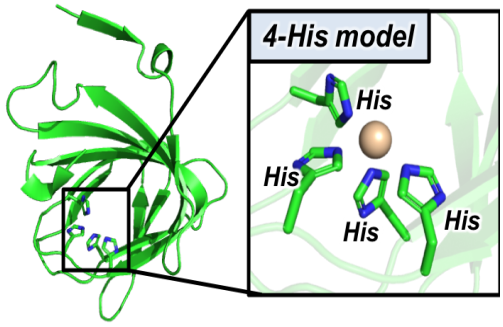


Fig 1. Cupin-type protein (TM1459)

基質としてトリフルオロアセトフェノン、還元剤としてギ酸ナトリウムを用いてケトンの不斉還元を行った（図 2）。有機金属錯体のみを用いた場合には反応がほとんど見られなかったのに対し、構築した変異体を用いたところ、Ru(p-cymene)を結合させた H52A/H54A/H92A では鏡像体過剰率 68%で *S* 体、Ru(p-cymene)を結合させた H54A/H58A/H92A ではエナンチオ選択性が反転し、鏡像体過剰率 84%で R 体を優先的に生成することが確認できた。また、金属中心近傍にはシステイン残基が存在したため、導入した有機金属錯体の非特異的な結合を防ぐため、このシステインをアラニンに変異させた変異体でも検討を行った。本発表ではこれらの詳細に加え、さらなる変異導入による選択性の向上について議論する。

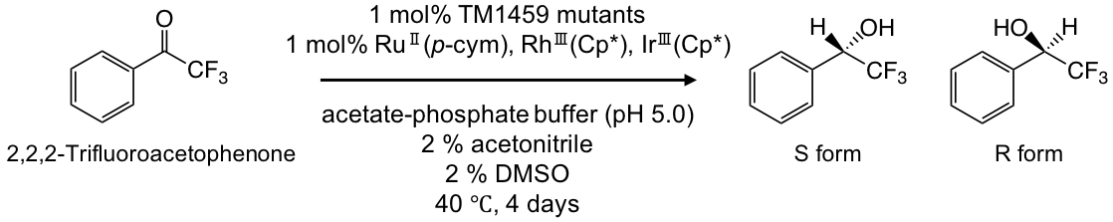


Fig 2. Model reaction employed in this study

1) (a) Schwizer, F.; Ward, T. R. et al., Chem. Rev. 2018, 118 (1), 142–231. (b) Hoarau, M.; Faller, P. et al., *Coord. Chem. Rev.* **2016**, 308, 445–459. (c) Rioz-Martínez, A.; Roelfes, G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, 25, 80–87.
2) (a) Fujieda, N.; Itoh, S. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, 139, 5149. (a) Fujieda, N.; Itoh, S. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59, 7717.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

ペルオキシレドキシン十量体リング構造を用いた蛋白質の捕捉

○宇津拓実[1]・石森浩一郎[1]・内田毅[1,2]（[1]北大院総化、[2]北大院理）

Trapping Proteins Using Peroxiredoxin Decamer Ring Structure (Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University[1], Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University[2]) UTSU, Takumi[1]; ISHIMORI, Koichiro[1,2]; UCHIDA, Takeshi[1,2]

ペルオキシレドキシン(Prx)は、細胞毒である過酸化水素をチオレドキシン依存的に分解する抗酸化蛋白質である。PRX1 の十量体は 5 つの二量体からなる特徴的なリング構造を示すことから(Fig. 1)、その中央の細孔を利用した物質輸送が期待される。そこで本研究では、PRX1 による蛋白質の捕捉の制御を試みた。

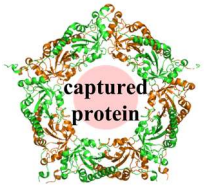


Fig 1. PRX1 and captured protein.

捕捉される蛋白質には、PRX1 の細孔（直径約 64 Å）よりも小さなシトクロム c_{552} (Cyt c_{552})（分子直径約 28 Å）とミオグロビン(Mb)（分子直径約 43 Å）を用いた。捕捉による分子量の増加を蛍光異方性の変化として追跡するため、蛍光色素である 1,5-IAEDANS でそれぞれ標識した。ヘムと共有結合を形成できない変異体 Cyt c_{552} を利用することで、ヘムとの結合による、細孔への捕捉の制御を試みた。

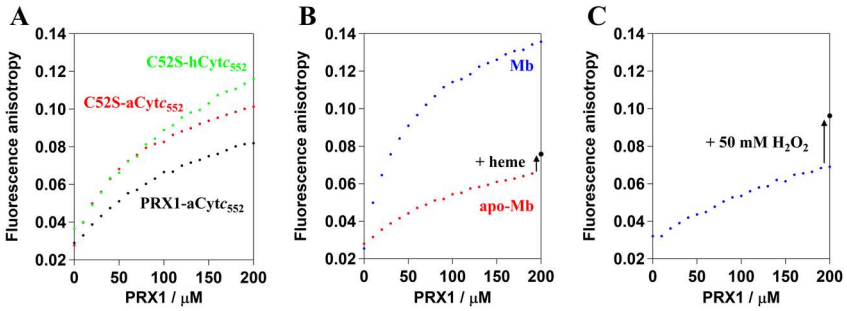


Fig 2. (A) PRX1 (wild-type or C52S)-induced fluorescence anisotropy change of cytochrome c_{552}. **(B)** PRX1 (C52S)-induced fluorescence anisotropy change of Mb in the absence and presence of heme **(C)** PRX1-induced fluorescence anisotropy change of Mb in the absence and presence of H_2O_2

まず、ヘムが結合していない 1 μM apo-Cyt c_{552}(aCyt c_{552})に PRX1 を滴下し、蛍光異方性を測定したところ、異方性の値が増大した。見かけの分子量が大きくなったことから、aCyt c_{552} の PRX1 への捕捉が確認できた(Fig. 2A 黒)。しかし、20 当量の PRX1 を加えても異方性の値が飽和しなかったことから、その捕捉能は低いと考えられた。そこで、細孔構造の変化により捕捉能を変化させるため、PRX1 の二量体内の単量体間に位置する Cys52 を Ser に置換した変異体(C52S)を作成した。この C52S 変異体では、異方性の値は野生型より大きくなり、捕捉能が上昇した (Fig. 2A 赤)。この C52S 変異体を用いて、aCyt c_{552} のヘム結合による PRX1 との捕捉能の変化を検討するため、holo-Cyt c_{552} (hCyt c_{552})についても同様に検討したところ、aCyt c_{552} と同程度の異方性の値であり、aCyt c_{552} のヘムの結合に伴う構造変化は捕捉能に影響を与えなかった (Fig. 2A 緑)。一方、より分子直径の大きな Mb に C52S 変異体を加えたところ、Cyt c_{552} より異方性の値が大きかった(Fig. 2B 青)。しかし、ヘムを結合していない apo-Mb の異方性の値は小さく、ヘムの結合による捕捉能の違いが顕著であった。そこで、apo-Mb にヘムを添加したところ、異方性値が増大したことから(Fig. 2B 赤、黒)、ヘムの結合により、PRX1 への捕捉の制御が可能になることがわかった。

さらに、Prx の中には過酸化水素との反応により十量体リングが積層した筒状構造を形成することが知られていることから、リング構造の三次元形状の変化により、捕捉の制御が可能か検討した。PRX1 を DTT で還元すると異方性の値は大きく減少したが(Fig. 2C 青)、過酸化水素を添加したところ、異方性の値が増大し、捕捉能が上昇した(Fig. 2C 黒)。

以上の結果から、PRX1 は、ヘムの添加による捕捉蛋白質の構造変化、あるいは PRX1 のリング構造の変化によって蛋白質の捕捉能が制御可能であり、今後は捕捉能の向上やより精密な制御を試みる。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

アシル化マクロピノサイトーシス誘導ペプチドによる細胞外小胞の細胞内送達

○中川優奈[1]・Jan Vincent V. Arafiles[1]・広瀬久昭[1]・二木史朗[1]（[1]京大化研）

Intracellular delivery of extracellular vesicles using acylated macropinocytosis-inducing peptide (Institute for Chemical Research, Kyoto University[1]) Yuna Nakagawa[1]; Jan Vincent V. Arafiles[1]; Hisaaki Hirose[1]; Shiroh Futaki[1]

マクロピノサイトーシスはエンドサイトーシスの一種で、外的刺激により誘起される細胞骨格タンパク質アクチンの重合と細胞膜の波打ち状態に引き続いて起こる大規模な液相の取り込みである。マクロピノサイトーシスは他のエンドサイトーシスに較べて、大きな分子を細胞内に取り込むことができるため、これを誘導することで効率的な細胞内送達が行える。我々は以前にマクロピノサイトーシス誘導ペプチド P4A（YRCACRFF-amide）の細胞内送達における有用性を示している[1)]。P4A は強力なマクロピノサイトーシス誘導能を持つが、その活性は血清を含む培地中でほとんどなくなることが課題であった。血清タンパク質の存在下では、P4A が細胞膜と相互作用しにくくなることがこの原因であると考え、本研究では、P4A のN末端をアシル化することで、細胞膜との相互作用を高めることにより、血清存在下においてもマクロピノサイトーシスによる取込が誘起できるかに関しての検討を行った。また、近年、薬物送達キャリアとして注目されている細胞外小胞（EVs）の細胞内送達促進効果に関しても評価した。

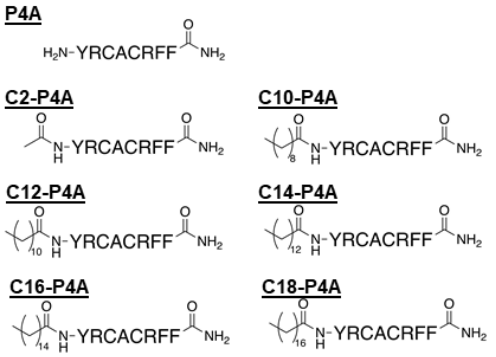


Fig. 1. Peptide sequences

炭素数 2〜18 の長さの異なる飽和脂肪酸で P4A をアシル化し(Fig 1)、血清を含む培地中においてマクロピノサイトーシスのマーカータンパク質である 70kDa デキストランの取り込みを評価することでスクリーニングを行った。その結果、炭素鎖が長いほどより高い活性を示し、C18-P4A で最も高い活性を示すことが明らかになった(Fig 2)。また P4A に含まれる 2 つのシステインが分子内架橋された oxP4A が活性本態であることが報告されており[1)]、C18-P4A においても酸化型のほうが高い活性を示した。この C18-oxP4A 存在下に、EVs を細胞に投与すると、より効率的に細胞内に送達できることが明らかになった。

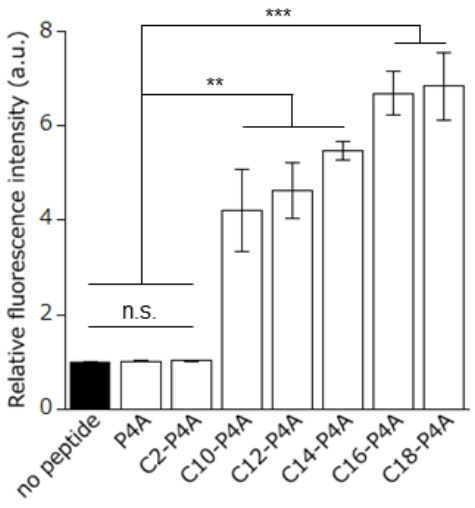


Fig 2. 70 kDa dextran uptake in the presence of serum.

1) Arafiles *et al. Angew. Chem. Int. Ed.,* 60, 11928 (2021)

固定化駆動法によるマウス脳内での mGlu1 リガンドの動態解析

○美野　丈晴[1]・天池　一真[1]・野中　洋[1,2]・坂本　清志[1]・浜地　格[1,2]（[1]京大院工、[2]JST ERATO）

Exploring the mGlu1 ligand dynamics in mouse brain by fixation-driven chemical crosslinking. (Graduate School of Engineering, Kyoto University[1], JST ERATO[2]) MINO, Takeharu[1]; AMAIKE Kazuma[1]; NONAKA Hiroshi[1,2]; SAKAMOTO Seiji[1]; HAMACHI Itaru[1,2].

我々動物の組織は、タンパク質や核酸、脂質、糖鎖など様々な生体分子によって構成され、それらの発現や分布が三次元的に厳密に制御されることで、創発的な高次機能を発現している。したがって、組織中に存在する生体分子の三次元分布を、生きた状態のまま維持し解析できる技術は、生物学や医学分野のみならず、創薬や農学、化学分野においても有用である。近年開発された CLARITY、Scale、CUBIC に代表される透明化技術では、組織中に形成されるヒドロゲル網目構造を足場とし、タンパク質や RNA といった生体高分子の組織内分布情報を固定することで、生体高分子の三次元イメージングを可能としている。これら組織透明化技術は強力なツールであるが、ヒドロゲル網目に小分子化合物を固定することが困難なため、薬剤や分子プローブなどの解析に用いられた報告例は無い。

以上の背景をふまえ、当研究室では小分子の生体組織内分布を可視化するための新規ケミカルバイオロジー手法として、パラホルムアルデヒド（PFA）組織固定法を発展させた固定化駆動法 (fixation-driven chemical crosslinking: FdCC) の開発を行っている。本手法では、小分子リガンドに、PFA ポリマーと反応可能なアミノ基を修飾した固定化駆動化学プローブを動物個体に投与した後、PFA 処理を施す。プローブ上のアミノ基が PFA ポリマーと迅速に共有結合形成し、リガンド-タンパク質間相互作用に基づいた組織内分布が固定される **(Fig. a)** 。この原理で、タンパク質と相互作用した小分子リガンドの生きた状態の組織内分布を解析できると期待される。本研究では、代謝型グルタミン酸受容体 (mGlu1) のリガンドである CNITM を標的とした固定化駆動化学プローブの設計と合成を行い、培養細胞に強制発現させた mGlu1 およびマウス小脳内在性 mGlu1 と CNITM との相互作用を固定化駆動法の原理で可視化できることを明らかにした。さらにマウス全脳における CNITM の三次元分布イメージングと、時間依存的な動態の解析に成功した **(Fig. b)** 。講演では以上の詳細について報告する。

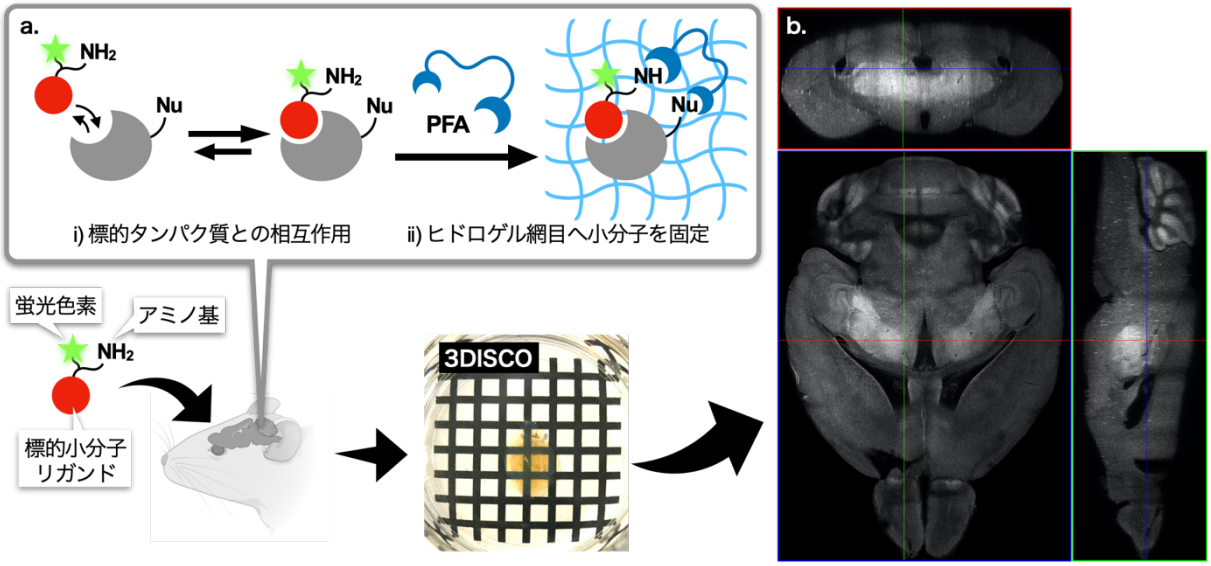


Fig. (**a**) Strategy of fixation-driven chemical crosslinking. (**b**) 3D CLSM imaging of mGlu1 ligand distribution in mouse whole brain.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

リン酸基および細胞認識部位を有するコラーゲンモデルペプチドの合成評価

○堀　雅竜・富﨑 欣也（龍大院理）

Synthesis of Collagen Model Peptides with Phosphate Groups and Cell Recognition Sites.

（Department of Materials Chemistry, Ryukoku University ）○HORI, Garyu; TOMIZAKI, Kin-ya

【緒言】病気や外部からの強い刺激によって骨が欠損した場合の主な治療法として投薬治療、自家骨移植、人工骨の利用がある。人工骨の利用において人工骨の主成分であるヒドロキシアパタイトは高い骨親和性と吸着力をもっている。しかし、ヒドロキシアパタイト (HA) は無機物ゆえに硬く脆いため骨の組織になじみにくいといった課題が挙げられる。そのため、ヒドロキシアパタイトとコラーゲンを複合化することで、強度の増加や骨再生能力の向上を図る研究が行われている。しかし、天然コラーゲンを用いる場合、陸生生物由来の人獣共通感染症のリスクや水生生物由来の変性温度が低いといった課題があり、それらを改善するために感染症のリスクが少なく変性温度にすぐれ機能制御が容易な化学合成されたコラーゲンモデルペプチド (CMP) の利用が効果的と考える。本研究では、HA との親和性をもつリン酸化セリンを N 末端に有する CMP-2 及び C 末端付近に細胞認識部位 (GFOGER)[1] N 末端付近にリン酸化セリンを配置した CMP-3 をそれぞれ合成した。

CMP - 2 : Ac-S($OPO(OH)_2$)-Ape(5)-$(GPO)_{10}$- G-NH_2

CMP - 3 : Ac-S($OPO(OH)_2$)-Ape(5)-$(GPO)_8$-GFOGER-G-NH_2

Ape(5) = 5-aminopentanoic acid　　O = hydroxyproline

Fig 1. Amino acid sequences of CMPs

【実験】まず、液相合成法によりジペプチド (Fmoc-Gly-Pro-OH) を合成した。次に、固相合成法によりトリペプチド (Fmoc-Gly-Pro-Hyp(^{t}Bu)-OH) を合成した。得られたトリペプチドをビルディングブロックとして固相合成法により CMP-2 及び CMP - 3 を合成し、逆相 HPLC により生成物の分離、得られた画分を MALDI-TOF-MS で同定した。そして、CD スペクトル測定を用いて CMP のトリプルヘリックス構造安定性を評価した。

【結果と考察】HPLC および MALDI-TOF-MS の測定の結果、CMP-2 については 3058 (calc. 3055) 、 CMP-3 については 3182 (calc. 3180)の分子イオンピークが確認されたので、リン酸化セリンのみを有する CMP-2 (Fig. 2) および末端に細胞認識部位とリン酸化セリンを有する CMP - 3 (Fig. 3) の合成に成功したと考えられる。CD スペクトル測定から CMP は安定したトリプルヘリックス構造であることが確認された。

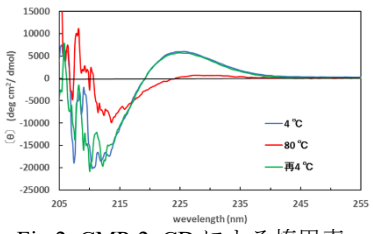


Fig 2. CMP-2 CD による楕円率

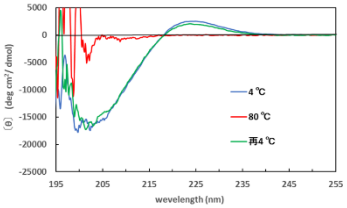


Fig 3. CMP-3 CD による楕円率

[1] Khew S. T. and Tong Y. W. *Biomacromolecules* **2007,** *8*, 3153-3161

[2] Xiang Gao.et.al.*ACS Appl.Mater. Interfaces* **2016**, 8, 27594 - 27610

ALDH 由来ミトコンドリア移行シグナルを有するペプチド誘導体の二次構造と細胞内動態評価

○髙山 啓[1]・山﨑 正幸[2]・富﨑 欣也[1]（[1]龍谷大理工、[2]龍谷大農学）

Secondary Structure and Intracellular Dynamics of Analoges of Mitochondrial-Localization Signals Peptide Derived from ALDH (Department of Materials Chemistry[1], Department of Food Science and Human Nutrition[2], Ryukoku University) TAKAYAMA, Kei[1]; YAMASAKI, Masayuki[2], TOMIZAKI, Kin-ya[1]

ミトコンドリアは、ATP の産生や細胞自死に関与している細胞小器官であり、近年では、ミトコンドリアを標的化したドラッグデリバリーシステムの開発が盛んに行われている。当研究室では、ミトコンドリアへ輸送されるアルデヒド脱水素酵素(ALDH)を由来としたミトコンドリア移行シグナルを有するペプチドを用いて、ドラッグキャリアの細胞内局在について研究を進めている。MTS はカチオン性のペプチドで、中央部のグリシン-プロリン (G-P) 配列部で両端のヘリックスが折れ曲がり、ヘリックス - ヒンジ - ヘリックス構造を形成していると考えられる。本研究では、塩橋形成によるヘリックス安定化、カチオン性を下げることによる細胞毒性の低減、エンドソーム膜破壊を指向して N 末端から 4 残基目のロイシンから 13 残基目のアルギニンを 1 残基ずつグルタミン酸に置換したペプチド誘導体を合成し、ペプチドの二次構造及び細胞内局在について評価した。MTS ペプチド誘導体として 10 種類のペプチドを設計した。オリジナルペプチド (F-MTS) の N 末端から 4 残基目のロイシンをグルタミン酸に置換したペプチド (F-MTS-L4E) 、5 残基目のアルギニンをグルタミン酸に置換したペプチド (F-MTS-R5E) から 13 残基目のアルギニンまでグルタミン酸に置換したペプチド (F-MTS-R13E) をそれぞれ設計した。さらに、すべてのペプチドの N 末端にフルオレセインを用いて蛍光標識した (Fig.1) 。ペプチド濃度を 50 μM とし、PBS 緩衝液 (pH7.4) 、トリフルオロエタノール (TFE) 、10 mM SDS 含有 PBS 緩衝液の 3 種の溶媒を用いて CD スペクトルによる二次構造評価を行なった。また、ペプチド濃度を 20 μM に調製し、HeLa 細胞を用いて共焦点レーザー顕微鏡による細胞内局在性を評価した。CD スペクトルの結果、PBS 中ではすべてのペプチドで α-ヘリックス構造特有のピークが確認された。(Fig.1) また、TFE 中及び 10 mM SDS 含有 PBS 中では、すべてのペプチドで α-ヘリックス構造を形成すると考えられる。これらのペプチドを HeLa 細胞に添加したところ、すべてのペプチドにおいてミトコンドリアとリソソームへの局在が確認された。今後は、詳細なペプチドの細胞内局在性と細胞毒性、ペプチドの相電荷について関係を明らかにする予定である。本研究の一部は、2020 年度龍谷大学科学技術共同研究センタープロジェクトの支援を受けたものである。

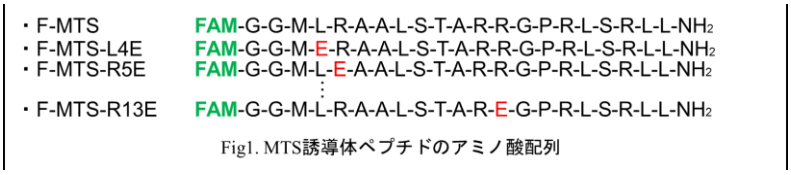


Fig1. MTS誘導体ペプチドのアミノ酸配列

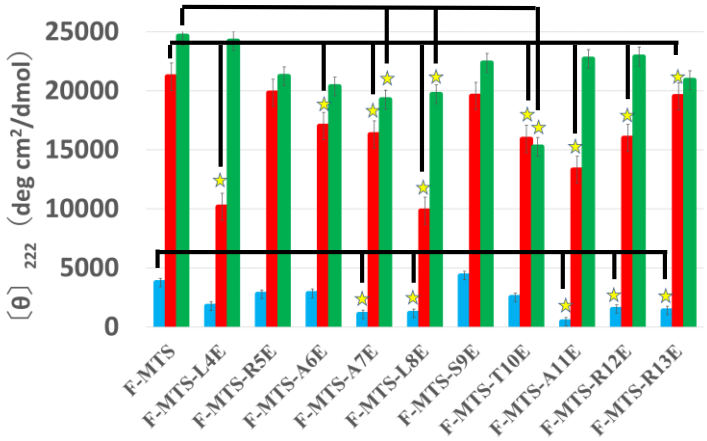


Fig2. MTS 誘導体ペプチドの 222 nm の残基楕円率。青 ; PBS, 赤 ; 10 mM SDSPBS 緑 ; TFE 星印は、それぞれ F-MTS を基準として P<0.01 を表している

再構成無細胞翻訳系における４塩基コドンの多重探索法の開発

○渡邉 貴嘉・Novitasari Dian・芳坂 貴弘（北陸先端大マテリアル）

Method for Multiple Exploration of Four-base Codons in a Reconstituted Cell-free Translation System

(School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology) WATANABE, Takayoshi; NOVITASARI, Dian; HOHSAKA, Takahiro

非天然アミノ酸のタンパク質への導入技術によって、タンパク質に様々な人工機能を付与することが可能となっている。これまでに、通常の３塩基からなるコドンに１塩基を付加した４塩基コドンに対して非天然アミノ酸を割り当てる４塩基コドン法を用いることで、複数種類の非天然アミノ酸をタンパク質の特定部位に同時に導入することを可能にしてきた。しかし、細胞内タンパク質発現系あるいは細胞抽出液由来の無細胞翻訳系では、３塩基による天然アミノ酸への翻訳と競合するため、使用頻度の低いコドン由来の４塩基コドンのみが利用されてきた。そこで本研究では、天然アミノ酸を欠如させた再構成無細胞翻訳系（PUREsystem）の使用により、３塩基による天然アミノ酸の翻訳を回避することで、非天然アミノ酸導入に利用可能な４塩基コドンの種類を大きく向上させることを目指した。また、４塩基コドンによる非天然アミノ酸の導入の可否を、質量分析により迅速に多重探索できる手法の構築を行った。

まず、開始コドン-His タグ-４塩基コドン-終止コドンからなる mRNA と、対応する４塩基アンチコドンを有する tRNA を T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写により作製した。続いて、それぞれの tRNA に対して化学的アミノアシル化法により異なる種類の非天然アミノ酸を結合させた後に混合し、対応する mRNA 混合物とともにアミノ酸を欠如させた再構成無細胞翻訳系に添加した。その後、翻訳産物を精製し MALDI TOF-MS による質量分析を行うことで、それぞれの非天然アミノ酸導入ペプチドの質量ピークの有無から、翻訳可能な４塩基コドンを特定した（図１）。

はじめに、４種類の４塩基コドンについて同時に探索したところ、いずれも非天然アミノ酸の導入を確認することができた。さらに、８種類の４塩基コドンの同時探索も行ったところ、今回調べた８種類の４塩基コドンいずれも非天然アミノ酸の導入が確認された。

本手法により、さらに多くの種類の４塩基コドンについて非天然アミノ酸導入の可否を迅速に評価可能になると期待される。

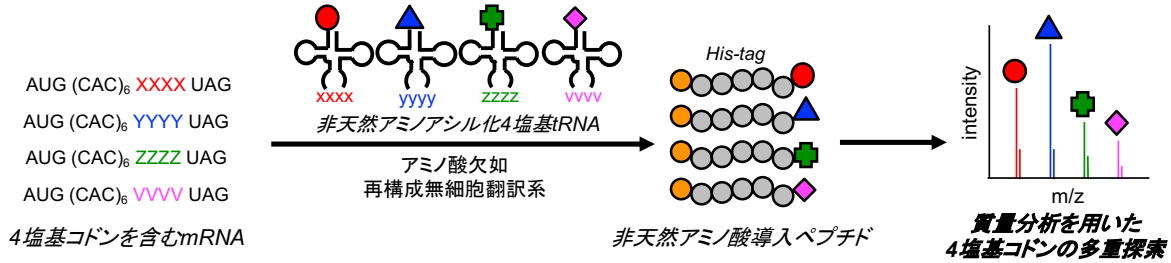


図１．翻訳可能な４塩基コドンの多重探索法

開環メタセシス重合の基質となるノルボルネン類縁体を提示したアミロイド線維の調製

○植野喬成・大洞光司・林 高史（阪大院工）

Preparation of Amyloid Fibril Displaying a Norbornene Analog as a Substrate for Ring-opening Metathesis Polymerization (Graduate School of Engineering, Osaka University) UENO, Takanori; OOHORA, Koji; HAYASHI, Takashi

分子モーターは生体内のシステムに用いられ、化学反応を巧みに制御し、物質輸送などの重要な役割を担っている。生体内の分子モータータンパク質として知られるキネシンやミオシンなどは、ATP の加水分解によるエネルギーを利用して、移動の土台となる微小管上を直線状に移動するため、特にリニア分子モーターと呼ばれている。近年、pH 変化や酸化還元反応等を駆動とするリニア分子モーターを人工的に構築する試みが報告されている[1]。これらの系には、軸分子が環状分子の輪の中を通っているロタキサンが利用されることが多いが、分子モーターに相当する環状分子の移動の土台となる軸分子を合成により長くする必要があり、長い距離を移動するリニア分子モーターの構築は困難である。我々は、移動の土台となる分子として、自己集合体の形成により自発的に繊維状になるアミロイド線維に注目した。またリニア分子モーターの駆動力となる化学反応として、Grubbs-Hoveyda II 触媒を用いた開環メタセシス重合 (ROMP) に着目した。オレフィンメタセシス反応は平衡反応であるが、ROMP に対して二重結合を有する歪んだ環状アルケンを基質として用いると、Grubbs-Hoveyda II 触媒を成長末端としてリビング重合が不可逆的に進行することが知られている。本研究では、アミロイド線維を形成するペプチドに ROMP の基質であるノルボルネン類縁体を修飾し、 自己集合によりリニア分子モーターの移動の土台となる分子を新規に設計した (Fig. 1)。この土台分子に ROMP の触媒である Grubbs-Hoveyda II 触媒を反応させることで、リニア分子モーター系が構築可能であると考えた。

本研究で用いるペプチドは既報[2]を参考にして設計し、次のように合成した。まず、ノルボルネン類縁体をリジン残基の側鎖に化学修飾した非天然アミノ酸 X を合成し、次にこの残基を含む合計 22 残基のペプチド (KVKVXVKVKT^{L}P^{D}PVKVKVXVKVK) を Fmoc-固相合成法により調製した。得られたペプチドを HPLC により精製し、凍結乾燥させ、150 mM NaCl を含む pH 7.0 の 100 mM リン酸カリウム緩衝液に溶かし、37 ℃で一晩静置した。円二色性スペクトル、動的光散乱法により、ノルボルネン類縁体修飾ペプチドが β-sheet を形成し、1 μm に達する自己集合体を形成していることを確認した。また、原子間力顕微鏡を用いて、大気中で測定したところ約 1 μm の長さの繊維状構造体が直接的観察された。

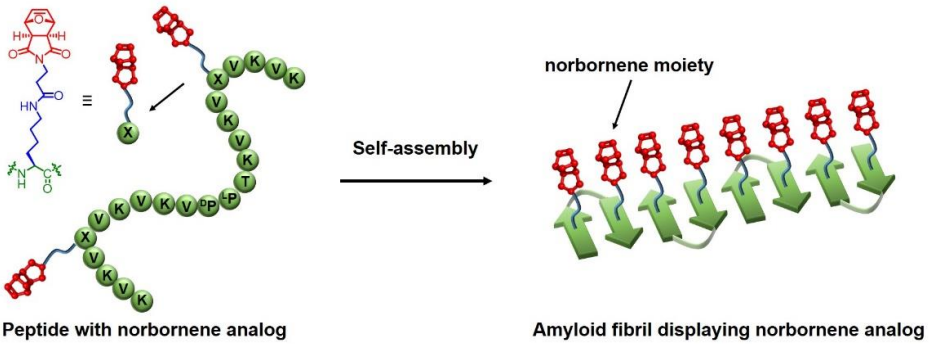


Fig. 1. Schematic representation of preparation for amyloid fibril displaying a norbornene analog.

1) J. F. Stoddart *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135,* 18609-18620.
2) J. P. Schneider *et al.*, Macromolecules, **2010**, *43*, 7924-7930.

メッセンジャーRNA のチオ修飾による翻訳開始反応の促進

○阿部奈保子[1]・川口大輔[1]・児玉亜有実[1]・橋谷文貴[1]・友池史明[2]・木村康明[1]・清水義宏[3]・阿部洋[1,4,5] ([1] 名大院理、 [2] 学習院大理、 [3] 理研、 [4] JST-CREST、[5] iGCORE)

Promotion of translation initiation of mRNA by phosphorothioate modification (Graduate School of Science, Nagoya University[1], School of Science, Gakushuin University[2], Center for Biosystems Dynamics Research, RIKEN[3], JST-CREST[4], Institute of Glyco-core Research, iGCORE[5]) ABE, Naoko[1]; KAWAGUCHI, Daisuke[1]; KODAMA, Ayumi[1]; HASHIYA, Fumitaka[1]; TOMOIKE, Fumiaki[3]; KIMURA Yasuaki[1]; SHIMIZU Yoshihiro[3]; ABE, Hiroshi[1,4,5]

メッセンジャーRNA (mRNA) を細胞内に導入すると、タンパク質生合成反応が引き起こされる。これに基づき、mRNA を医薬品として用いることが出来る。実際に、現在、新型コロナウイルス感染症に対する mRNA ワクチンが全世界的に使用されている。しかしながら、mRNA 医薬品には、①mRNA が核酸分解酵素で容易に分解され、生体内では非常に不安定である、②タンパク質発現量が不十分である、という 2 つの課題がある。一般に、核酸に化学修飾を導入することで、生体内安定性を向上させることが出来る。しかし、多くの場合、mRNA への化学修飾の導入はリボソームをはじめとした種々のタンパク性翻訳因子の認識や働きを阻害してしまい、その結果、タンパク質合成効率を低下させてしまう。我々はタンパク質合成効率を低下させることなく mRNA の安定性を向上させる化学修飾の開発を模索し、リン酸部位の酸素原子を硫黄原子に置換したホスホロチオエート修飾（PS 修飾）に着目した（図 1）。PS 修飾を導入した mRNA を、α位をチオ修飾したヌクレオチドトリリン酸（NTPαS）を基質とし T7 RNA ポリメラーゼを用いて酵素的に合成した。これら得られた PS 修飾 mRNA に関し、再構成型大腸菌無細胞タンパク質合成系を用いてその翻訳効率を評価したところ、未修飾のものと比較し、翻訳産物量の増加が観察された。翻訳反応のシングルターンオーバー条件を作成し、速度論解析実験を実施した結果、PS 修飾 mRNA では未修飾 mRNA に比べて翻訳反応の開始反応が促進されていることが示された。本結果から 5′ 非翻訳領域部分にのみ PS 修飾を導入した mRNA の設計・合成を行った。これら位置特異的に PS 修飾を導入した mRNA は約 20 倍のタンパク質合成効率を示した。本実験結果は mRNA に位置特異的に化学修飾を導入することで mRNA の機能を向上させうることを示すものである。

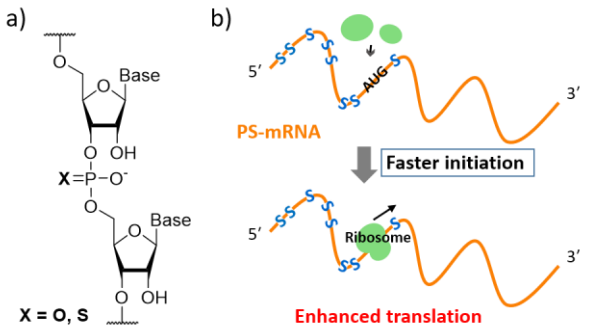


図 1. (a) ホスホロチオエート修飾を含む RNA 鎖の化学構造。(b) 本研究の概要。

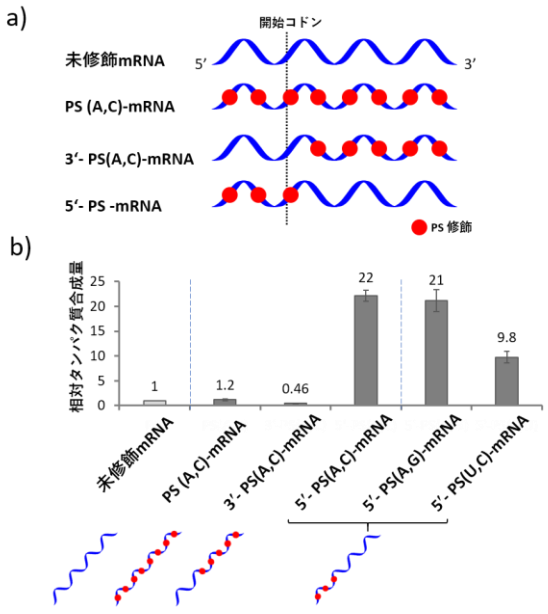


図 2 (a) PS 修飾を持つキメラ mRNA の設計。(b) 5′ 非翻訳領域のみに PS 修飾した mRNA (5′ -PS-mRNA)が高い翻訳効率を示した。

蛍光 RNA アプタマー17-3 の 2 次構造解明を目指した生化学解析

○安部 俊輔[1]、小山 孝紀[1]、松村 茂祥[1,2]、井川 善也[1,2]（富山大院理工）

Biochemical analysis of the light-up RNA aptamer 17-3 to elucidate its active secondary structure.

([1] Graduate School of Science & Engineering, University of Toyama,[2] Graduate School of Innovative Life Science, University of Toyama.) ABE, Shunsuke [1] ; KOYAMA, Takaki [1] ; MATSUMURA, Shigeyoshi [1,2] ; IKAWA, Yoshiya [1,2]

蛍光 RNA アプタマーは、単体では蛍光能の低い色素分子と相互作用することで、その蛍光発光を強く増強する RNA アプタマーの総称である。蛍光 RNA アプタマー17-3（ Fig.1 ）は、GFP の発色団 HBI を改変した DMHBI（ Fig.2 ）と結合し、その蛍光を増強することが報告されているが、構造面の知見はない[1]。本研究では、1)17-3 RNA の 2 次構造解析を目的とした化学修飾法、2)蛍光能を維持した、もしくは向上した変異体の獲得を目指した進化分子工学、3)多数の変異体の次世代シーケンス（ NGS ）による配列解析などの手法を用いて 17-3 RNA の 2 次構造の解析を試みた。

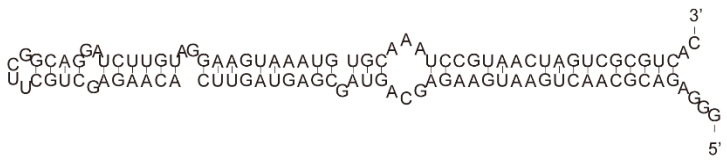


Fig.1 : RNA 構造予測プログラムによる 17-3 RNA の 2 次構造モデルの一例

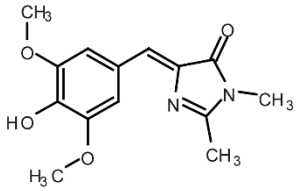
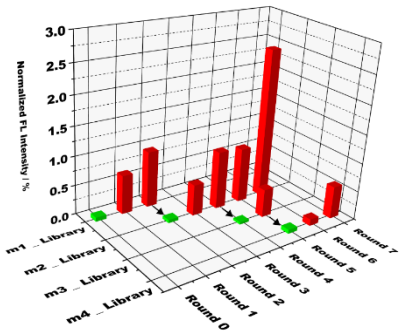


Fig.2 : DMHBI 構造式

化学修飾法により、17-3 RNA の修飾部位の同定ができ、NGS による活性変異体の配列解析を総合して、構造形成に関与する塩基が推定できた。進化分子工学から得られた変異体の中には、オリジナルの 17-3 RNA よりも高い蛍光を示したものも存在した（Fig.3,4）。現在は、活性の高い RNA 集団がもつ共通の配列を同定し、化学修飾法の結果と照合することで、17-3 RNA の 2 次構造をより高精度で予測するために、進化実験と NGS 解析を継続中である。



緑 : Error-Prone PCR 赤 : Standard PCR

Fig.3 : 各ライブラリーにおける蛍光活性比較

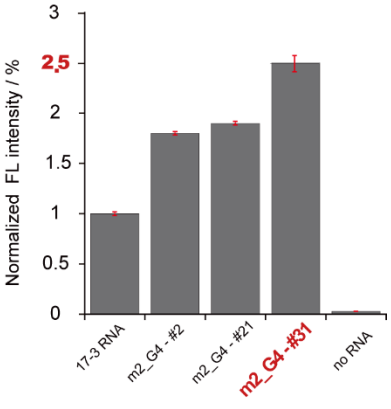


Fig.4 : 単離した 17-3 RNA 変異体蛍光活性比較

Reference

[1] J. S. Paige., K.Y. Wu., S. R. Jaffrey, *Science*, **333**, 642-646 (2011)

PCAF 型 PYP タグリガンドを用いた核酸結合色素/タンパク質ハイブリッドプローブの開発

○松木星[1]・堀雄一郎[1,2]・菊地和也[1,2]（[1]大阪大学大学院工学研究科、[2]大阪大学免疫学フロンティア研究センター）

Development of nucleic acid binding dye/protein hybrid probe (Graduate School of Engineering, Osaka University[1], Immunology Frontier Research Center, Osaka University[2]) MATSUKI, Akari[1]; HORI, Yuichiro[1,2]; KIKUCHI, Kazuya[1,2]

核酸の機能は、多種の化学修飾によって制御されており、その化学修飾の異常は、神経疾患や免疫疾患、ガンなどの様々な疾患の原因となることが知られている。このため、核酸の化学修飾のメカニズムを解明することは医学・創薬の分野において重要であり、生細胞レベルで検出する技術の開発は、極めて有用である。

生細胞で核酸の化学修飾を検出する既存の技術として、蛍光タンパク質を用いた手法が報告されている。この手法では、修飾核酸を認識し結合するタンパク質と蛍光タンパク質からなる融合タンパク質の局在を可視化するが、標的の修飾核酸に結合していない遊離のタンパク質プローブからも蛍光が観察されることが問題であった。演者らは、この問題を解決するために、核酸結合色素と修飾核酸結合タンパク質を連結したハイブリッドプローブを用いて、生細胞内で修飾核酸を検出する技術の開発に取り組んできた。このハイブリッドプローブを生細胞内で構築するキーとなる技術が、演者らのグループで開発したタンパク質ラベル化法である。この技術を用いることで、Photoactive Yellow Protein（PYP）をタグタンパク質として融合した標的タンパク質と蛍光色素を生細胞内で特異的に連結できる。PYP は紅色硫黄細菌由来の 125 アミノ酸残基からなる小さなタンパク質であり、その 69 番目のシステインが桂皮酸誘導体を天然リガンドとして特異的に共有結合することが知られている (Fig. 1)。これまでの研究で、PYP ラベル化法とメチル化 DNA 結合タンパク質である MBD を利用し、メチル化 DNA に結合することで蛍光強度を上昇させる核酸結合色素/タンパク質ハイブリッドプローブを開発した [1]。一方、このとき、PYP リガンドである桂皮酸誘導体を核酸結合色素に繋いだラベル化分子を用いラベル化反応を行ったが、細胞内ラベル化能が低く、その性能の向上が課題となった。

この課題を解決するために、最近になり演者らのグループで開発した高効率 PYP タグラベル化リガンド PCAF に着目した。PCAF はクロロアセチル基を有し、S_N2 反応により PYP の 69 番目のシステインとチオエーテルを形成する(Fig. 1)。そこで、PCAF 型リガンドと核酸結合色素を連結した新規 PYP ラベル化分子を開発した。このラベル化分子は、従来の桂皮酸型ラベル化分子と比べ、優れた細胞内ラベル化能を有することが分かった。本発表では、新規機能性分子によるタンパク質ラベル化反応、及び生細胞イメージング実験の詳細について報告する。

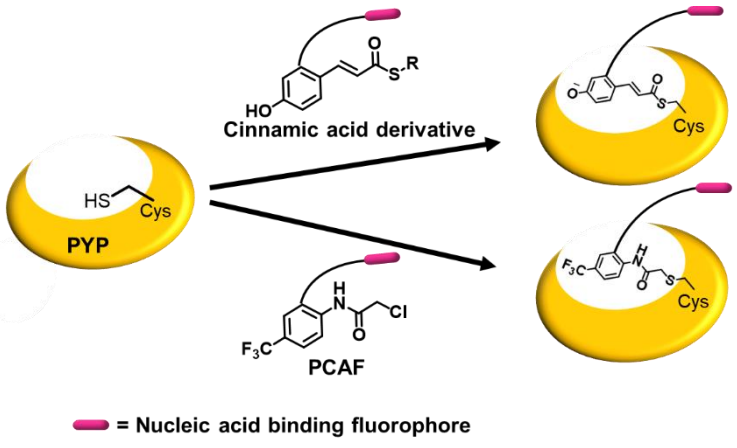


Fig 1. Labeling reaction of PYP with natural and designed ligands

1) Hori, Y., Otomura, N., Nishida, A., Nishiura, M., Umeno, M., Suetake, I., Kikuchi, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*, 1686.

Poster

Thu. Sep 9, 2021 3:40 PM - 4:40 PM JST | Thu. Sep 9, 2021 6:40 AM - 7:40 AM UTC | Second half number Zoom

Even (2P-050~2P-094)

[2P-050] Elucidation of the Mechanism of SNA-Anti-miRNA through Intracellular Imaging

*Zhu Hongyu[1], Kamiya yukiko[1], Asanuma Hiroyuki[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University.)

[2P-052] Design and synthesis of substituent-detachable unnatural nucleic acids toward *in vitro* selection of minor groove-modified aptamer

*Hidenori Okamura[1,2], Rina Ito[1,2], Kenta Sato[1,2], Fumi Nagatsugi[1,2] (1. Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, 2. Graduate School of Science, Tohoku University)

[2P-054] Development of SERS probes for solution-phase detection of nucleic acids

*Hidetoshi Nishikawa[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology)

[2P-056] Silencing Effect of 5'-Modified of siRNA

*Masayuki Fujii[1], Yasuo Shiohama[2], Maika Sonokawa[1], Masaaki Hisano[1], Yojiro Kotake[1] (1. Department of Biology and Chemistry, Kindai University, 2. Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus)

[2P-058] Regulation of DNA replication by topology-dependent ligand binding on guanine quadruplexes

*Shuntaro Takahashi[1], Hisae Tateishi-Karimata[1], Shinobu Sato[2], Shigeori Takenaka[2], Janez Plavec[3], Naoki Sugimoto[1,4] (1. FIBER, Konan University, 2. Kyushu Institute of Technology, 3. Slovenian NMR Centre, 4. FIRST, Konan University)

[2P-060] Analysis of inosine introduced aptamer against SARS-CoV-2 S1 protein RBD

*Wakana Hayashi[1], Kaori Tsukakoshi[1], Kazunori Ikebukuro[1] (1. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[2P-062] Evaluation of electron transfer through DNA crowded conditions under using hole-trapping nucleobases

*Yuki Taketomi[1], Yuki Yamaguchi[1], Shunsuke Sakurai[1], Makiko Tanaka[1] (1. Department of Engineering Science, The University of Electro-Communications)

[2P-064] Development of artificial peptides capable of photo-cross-linking to double-stranded DNA

*Hiroki Naito[1], Junichi Mihara[1], Zhiyong Qiu[1], Shigetaka Nakamura[1], Kenzo Fuzimoto[1] (1. School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and technology)

[2P-066] PCR analysis using DNA having cross-linking at terminal site as template

*Yuki Hirano[1] (1. Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[2P-068] Synthesis and environment sensitivity of novel quinolinium dyes

Toru Oba[1], *Aki Sugawara[1], Makoto Roppongi[2], Shingo Tamesue[1] (1. Graduate School of Regional Development and Creativity, Utsunomiya University, 2. Advanced Instrumental Analysis Department, Utsunomiya University)

[2P-070] Analysis for Lysozyme Aggregation in Droplet by Evanescent Light Excitation Scattering

*Hayato Kurumada[1] (1. National Institute of Technology, Ibaraki College, Advanced course)

[2P-072] A probe protein Coiled Q-probe that rapidly turns antibodies into a high-performance fluorescent immunosensor for various antigens

*Kana Sasamoto[1], Takanobu Yasuda[1], Tetsuya Kitaguchi[2], Hiroshi Ueda[2] (1. Graduate School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Laboratory for Chemistry and Life Science, Tokyo Institute of Technology)

[2P-074] Development of activatable photoacoustic contrast agents utilizing aggregation of metallo-phthalocyanines

*Kohei Nogita[1], Naoto Imaizumi[1], Koji Miki[1], Kouichi Ohe[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[2P-076] Single-cell level analysis of T cell antigen-recognition activity and expression genes by the microfluidic device for cell-cell interaction

*Hiroki Ide[1,2], Masato Saito[1,2], Taiki Aoshi[3], Hyota Takamatsu[4], Wilfred Villariza Espulgar[2], Masahito Hosokawa[5], Hiroko Matsunaga[5], Koji Arikawa[5], Haruko Takeyama[5,6,7], Eiichi Tamiya[2,8] (1. Graduate School of Engineering, Department of Applied Physics, Osaka University, 2. AIST-Osaka Univ. PhotoBIO-OIL, 3. Research Institute for Microbial Disease, Osaka Univ., 4. Graduate School of Medicine, Osaka Univ., 5. Research organization for nano and Life Innovation, Waseda Univ., 6. Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda Univ., 7. CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., 8. The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka Univ.)

[2P-078] Reaction Properties of Structual Conversion of Chlorophyll *b* in Oxygenic Photosynthesic Organisms

*Masayuki Tanaka[1], Yoshitaka Saga[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Kindai University)

[2P-080] Development of Dinuclear Nonheme Carboxamidoiron(III) Complexes with High Peroxidase Activity

*Yusuke Fukui[1], Masahito Kodera[1], Yutaka Hitomi[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University)

[2P-082] Control of Membrane Permeability by Metal Hybrid Channels

*Kosuke Komaki[1] (1. Graduate studies of Life Science, Ritsumeikan University)

[2P-084] Effect of supporting electrolyte on electrochemical glycosylation via dioxalenium ion intermediate

*Yui Ishisaka[1], Asuka Saito[1], Takehiro Kobayashi[2], Akito Shibuya[3], Toshiki Nokami[4] (1. Graduate School of Sustainability Science, Tottori University, 2. Faculty of Engineering, Tottori University, 3. Graduate School of Engineering, Tottori University, 4. GSC center, Faculty of Engineering, Tottori University)

[2P-086] Turn-On fluorescent imaging of sialic acids on cell membrane with Dansyl-triarginine peptide bearing alkyl chain

*Mizuki Okazaki[1], Hiroshi Inaba[1], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University)

[2P-088] Creation of a reconstituted liposome with regulated protein orientation

*Kosaku Noba[1], Shogo Yoshimoto[1], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya university)

[2P-090] Modulation of protein diffusion in lipidic cubic phase and transcutaneous penetration

*Shuto Kozaka[1], Rie Wakabayashi[1], Noriho Kamiya[1], Masahiro Goto[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University)

[2P-092] Complex of fluorescent carborane with hyaluronic acid for BNCT

*Riku Kawasaki[1], Keita Yamana[1], Yu Sanada[2], Shin-ichiro Masunaga[2], Minoru Suzuki[2], Yoshinori Sakurai[2], Kaori Bando[3], Anri Tabata[3], Kouhei Yoshikawa[3], Hideki Azuma[3], Kouta Sugikawa[3], Takeshi Nagasaki[3], Atsushi Ikeda[1] (1. Graduate School of Advanced Science and Engineering, Hiroshima University, 2. Institute for Integrated Radiation and Nuclear Science, Kyoto University, 3. Graduate School of Engineering, Osaka City University)

[2P-094] Degradation of carbon nanotubes by Fenton reaction induced by iron released by bacterial heme enzyme

*Seira Takahashi[1], Fumiko Taguchi[1], Junichi Kanie[2], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate school of engineering, Nagoya University, 2. Friend Microbe Inc.)

SNA 型抗 miRNA アンチセンス核酸の作用機序解明に向けたイメージング解析

○朱紅宇・神谷由紀子・浅沼浩之(名大院工)

Elucidation of the Mechanism of SNA-Anti-miRNA through Intracellular Imaging (Graduate School of Engineering, Nagoya University.) Hongyu Zhu, Yukiko Kamiya, Hiroyuki Asanuma

microRNA (miRNA) は遺伝子発現を抑制する Non-coding RNA の一種である。miRNA は AGO2 タンパク質と RISC (RNA-induced silencing complex)と呼ばれるリボヌクレオプロテインを形成して初めて遺伝子発現抑制能を獲得する。近年、miRNA の発現異常ががんをはじめとした様々な疾患の要因の 1 つであることが示されている。miRNA の機能を特異的に抑制する抗 miRNA アンチセンス核酸(AMO)は新たな核酸医薬として期待されている。当研究室では、非環状人工核酸 Serinol nucleic acid (SNA)(Fig. 1)と修飾塩基を組み合わせ、高酵素耐性・高活性な anti-miR21 核酸(SNA-AMO)を開発することに成功している[1]。しかしながら、SNA-AMO がどのような仕組みで miRNA を阻害しているのかは明らかとなっていない。特に、AMO が RISC を形成している miRNA に作用するのか、遊離の miRNA と結合するのかを明らかにすることは、AMO デザインにおいて非常に重要な知見となる。そこで、本研究では、開発した SNA-AMO の miRNA 阻害メカニズムを明らかにする事を目指し、細胞内における SNA-AMO と RISC の挙動を可視化解析により解明することを試みた。

miRNA と AMO の相互作用は FRET により可視化することとした。そのため、色素を導入した miRNA と AMO の開発を行なった。具体的には、標的 miRNA の前駆体 miRNA/miRNA*に蛍光基-消光剤ペアである BO とメチルレッド(MR)を、miRNA の活性を妨げない最適な部位[2]に導入し、miRNA/miRNA*から解離した miRNA を可視化できるように設計した。さらに AMO には BO のアクセプターとなる Cy3 を導入することで、miRNA/AMO の結合により FRET が観測できる設計とした。これらの機能性核酸を合成し細胞内に導入することで、細胞内挙動の蛍光観察を行った。その結果、miRNA/miRNA*から解離した miRNA の発光、さらに、miRNA/AMO の複合体由来の FRET を観察することに成功した。また、これらの蛍光シグナルと RISC タンパク質である AGO2 を同時に可視化したところ、miRNA/AMO の複合体由来の FRET と、AGO2 由来の蛍光シグナルの共局在、すなわち、SNA-AMO と RISC が共局在している様子が観察された(Fig.1)。以上のことから、細胞内蛍光イメージング解析によって SNA−AMO は RISC に作用すると明らかにすることができた。

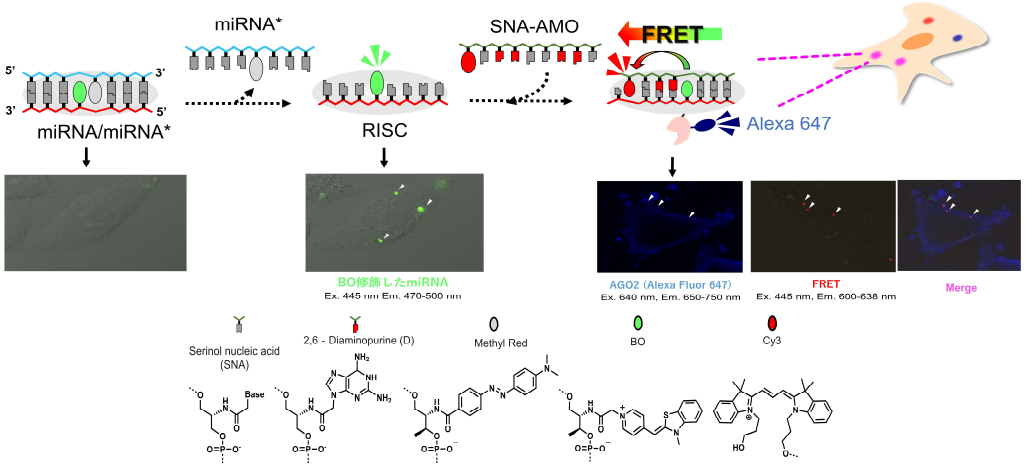


Fig. 1 SNA-AMO 作用機序可視化解析の設計と導入した色素

[1] Kamiya, et al., ChemBioChem. 2017, 18, 1917-192 [2] Kamiya, et al., Chemical Science. 2013, 4, 4016-4021.

副溝修飾アプタマーの探索を指向した置換基着脱型人工核酸の創製

○岡村秀紀[1,2]、伊藤理奈[1,2]、佐藤健太[1,2]、永次史[1,2]（[1]東北大多元研、[2]東北大院理）

Design and synthesis of substituent-detachable unnatural nucleic acids toward *in vitro* selection of minor groove-modified aptamer ([1]Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, [2]Graduate School of Science, Tohoku University) OKAMURA, Hidenori[1,2]; ITO, Rina[1,2]; SATO, Kenta[1,2]; NAGATSUGI, Fumi[1,2]

DNA アプタマーは、標的分子に対して選択的かつ高い親和性で結合できる DNA 分子である。その最大の特徴は、DNA のランダムライブラリーから標的結合配列の選別・増幅を繰り返す進化分子工学的手法（SELEX 法）により簡便に獲得できることにあり、抗体に代わる次世代の分子標的技術としての応用が注目を集めている。しかし、4 種類の核酸塩基（A, G, C, T）のみで構成される DNA アプタマーは化学的・構造的多様性に乏しいため、抗体を凌駕する性能を得られていないのが現状である。このような背景のもと、高性能な核酸アプタマーを開発する方法として、化学修飾した人工ヌクレオシドの利用が検討されている。これまでに、主溝側を化学修飾した核酸塩基を用いて DNA アプタマーを探索する方法論が多数報告されている[1)]。一方、核酸塩基の副溝側を修飾した人工核酸は、ポリメラーゼ伸長反応を阻害するため、PCR を用いる SELEX 法への適用は困難であり、その有用性は未開拓である。そこで本研究では、副溝修飾アプタマーの有用性を明らかとするために、SELEX 法に適用可能な副溝修飾ヌクレオシドの開発を目的とした。

副溝修飾アプタマーを SELEX 法によって獲得するには、核酸塩基の副溝側に導入した置換基が PCR を阻害するという本質的な課題を克服する必要がある。本研究ではこの課題を解決する方法として、PCR を阻害する置換基を除去可能な新規修飾ヌクレオシドを用いることを計画し、DNA 上のマイナーグルーブ側に置換基を導入可能なチミジンアナログ（S）を設計した（図 1）。本分子に光切断性置換基を導入し、標的親和性に基づく選別を行った後、置換基を切断することで PCR による増幅が実現できると期待した。設計したチミジンアナログを導入したオリゴヌクレオチドを合成し、光切断可能な置換基の導入および置換基の光除去を検討した結果、それぞれの反応が効率良く進行する反応条件を見出した。さらに、置換基の光除去後に得られるヌクレオシド構造が、DNA ポリメラーゼ伸長反応においてチミジン等価体として認識されることを明らかにした。また、チミジンアナログ（S）の三リン酸体が、ポリメラーゼ反応においてアデノシンの相補的塩基として取り込まれることも明らかにした。これらの結果は、図 1 に示したサイクルによる人工核酸を用いた副溝修飾アプタマー探索法が機能することを示唆しており、SELEX 法を用いたアプタマーの探索への応用が期待される。ポスターでは、分子設計、置換基着脱反応及び酵素反応について発表する。

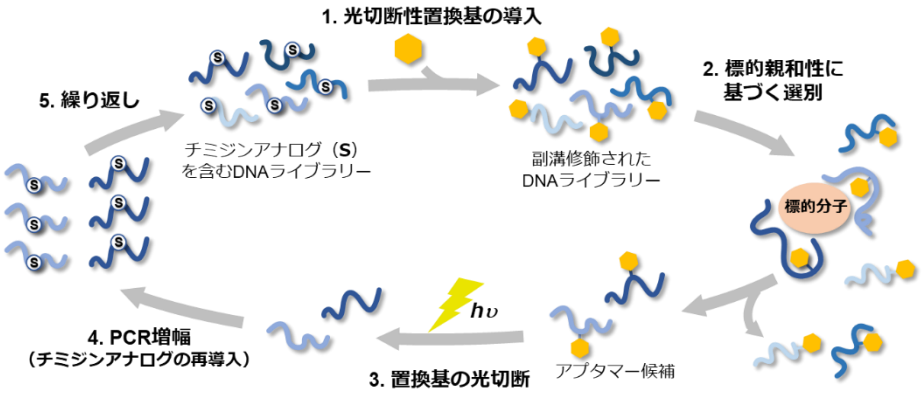


図 1. 置換基着脱可能な人工ヌクレオシドによる副溝修飾アプタマー探索法の設計概念

1) Vaught, J. D. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 4141; Imaizumi, Y. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 9412.

溶液測定に利用可能な SERS プローブの開発

○西川英寿・太田良・和久友則・小堀哲生（京工繊大院工芸）

Development of SERS probes for solution-phase detection of nucleic acids (Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology) ○NISHIKAWA, Hidetoshi; OTA, Ryo; WAKU, Tomonori; KOBORI, Akio

近年、がんやエイズなどの重篤疾患の発症に伴い、体液に含まれる核酸の発現量が特異的に変化することが明らかとなった。そのため、体液中の核酸は、低侵襲な疾患診断法であるリキッドバイオプシーに利用可能なバイオマーカーとして注目を浴びている。現在、核酸の定量法として利用されている定量 PCR 法は、高感度に核酸を定量できるという利点を持つが、測定試料中の夾雑物の除去や核酸増幅に時間がかかるという欠点を持つため、疾患診断法として汎用されていない。そこで我々は、単分子検出にも利用されるほどの高感度な技術である表面増強ラマン散乱 (SERS) に着目した。SERS は金属ナノ構造体に吸着した分子のラマン散乱光を 10^8-10^{10} 倍に増幅することが可能である。しかし、レーザーを当てた金ナノ構造体は発熱することが報告されており(1)、レーザー照射時には金ナノ粒子近傍は高い温度になるため、核酸検出で重要な二重鎖形成が不安定化されることが予想される。そのため、溶液試料の SERS 測定による核酸定量分析はほとんど報告されていない。そこで、我々は溶液試料の SERS 測定を可能にするため、二重鎖の安定化を目指し、チミンと選択的に光架橋することが知られているトリオキサレン(2) を鎖中に導入した SERS プローブ S1, P2 を開発した。

S1, P2 には、生体分子のシグナルが観測されないサイレント領域にシグナルを有する 2 種類の生体直交型ラマンレポーター (EP: ● , PEP: ●) を導入した。また、S1, P2 に導入する光架橋性核酸は標的核酸を介して複合体を形成するように設計し、UV 照射後はこの複合体が安定化されるため、PEP のシグナルが観測される。

S1, P2 を用いて核酸検出を行ったところ、標的核酸存在下、UV 照射時のみ PEP のシグナルが観測された。また、PEP のピーク面積を EP のピーク面積で規格化すると、標的核酸存在下、UV 照射時の PEP のピーク面積が、他の条件に比べて最大 9.7 倍増加していることが明らかとなり、光架橋させることで熱による解離が抑制され、ラマンシグナルが増強されることが示唆された。

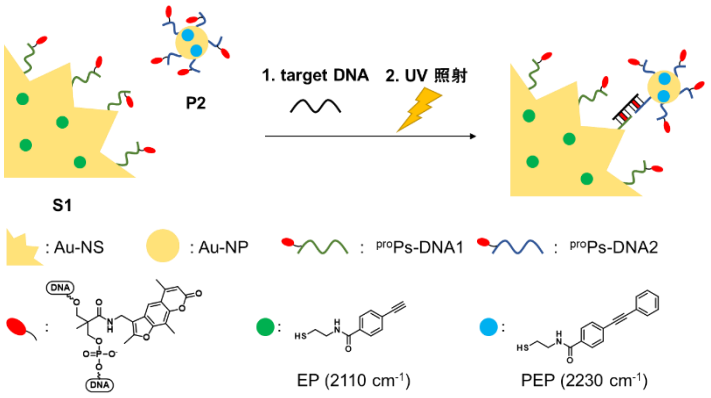


Fig 1. Procedure for detecting target DNA using S1 and P2.

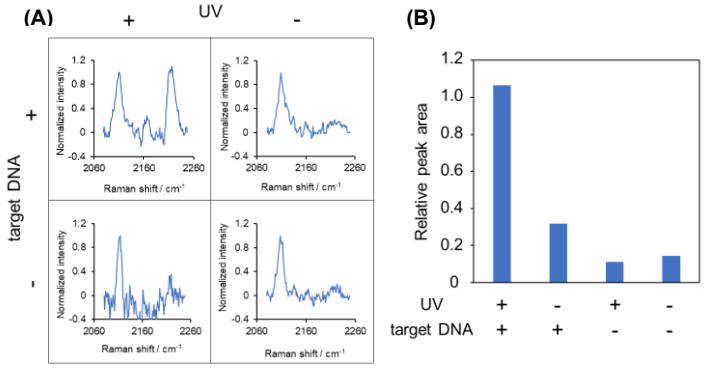


Fig 2. (A) Raman spectra of ratiometric SERS assay with different conditions. (B) Relative peak area of PEP in the different conditions.

(1) G. Maltzahn, *et al.*, *Cancer Res*, **2009**, *69,* 3892–3900.
(2) A. Kobori, *et al.*, *Chemistry Letters.*, **2009**, *38,* 272–273.

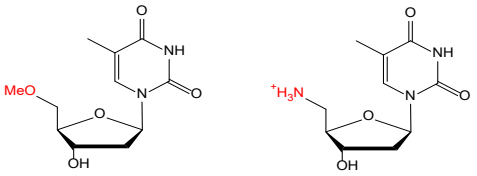
5’-末端化学修飾 siRNA のサイレンシング効果

○藤井政幸[1]・塩浜康夫[2]・園川舞華[1]・久野雅明[1]・神武洋二郎[1]（[1]近畿大産業理工、[2]琉球大学）

Silencing Effect of 5’-Modified of siRNA (Department of Biological & Environmental Chemistry, Kindai University[2], Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus[2]) FUJII, Masayuki[1]; SHIOHAMA, Yasuo[2]; SONOKAWA, Maika[1]; HISANO, Masaaki[1]; Kotake, Yojiro[1]

2012 年に RISC の中核をなすヒトアルゴノート 2（hAgo2）の X 線結晶構造が解明され、合理的な分子デザインに基づく化学修飾が可能になった[1)]。その中で、リン酸化されたガイド鎖 5’-末端が hAgo2 の MID ドメインのカチオンポケットに取り込まれて安定化されていることが明らかとなった。

本研究では、センス鎖、アンチセンス鎖の 5’-末端に 5’-O-メチル-5’-デオキシチミジン(X) および 5’-アミノ-5’-デオキシチミジン(Z)をそれぞれ導入した siRNA を合成し、そのサイレンシング効果への影響を評価した。



sense strand	antisense strand
RNA1; 5’-UACGGCAAGCUGACCCUGAag-3’	RNA2; 5’-UCAGGGUCAGCUUGCCGUAgg-3’
RNA3; 5’-TACGGCAAGCUGACCCUGAag-3’	RNA4; 5’-TCAGGGUCAGCUUGCCGUAgg-3’
RNA5; 5’-XACGGCAAGCUGACCCUGAag-3’	RNA6; 5’-XCAGGGUCAGCUUGCCGUAgg-3’
RNA7; 5’-ZACGGCAAGCUGACCCUGAag-3’	RNA8; 5’-ZCAGGGUCAGCUUGCCGUAgg-3’

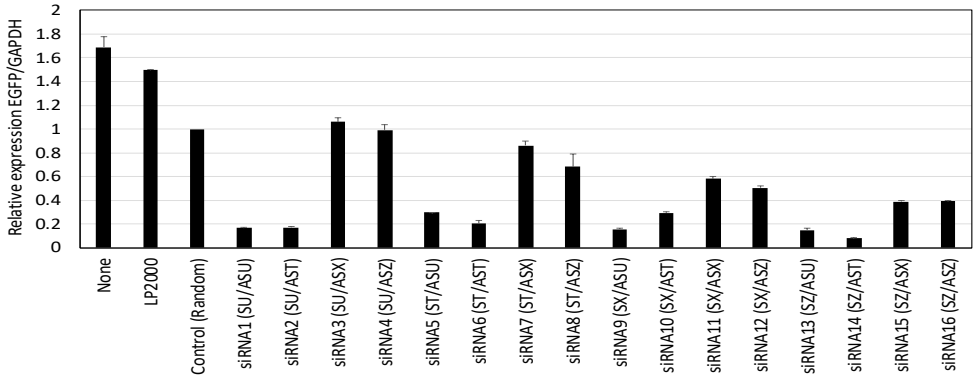


Figure 1. Silencing EGFP mRNA by 5’-Modified siRNA
[siRNA] = 100 nM, transfected by Lipofectamine 2000 HeLa(5 x 10^4 cells /well, 10 % FCS/MEM), 5% CO_2, 37°C, 24h

5’-末端のアミノ基やメトキシ基は DICER/TRBP の結合、RISC ローディングコンプレックスの形成、RISC への積み込み過程で、siRNA の非対称性認識および鎖選択に大きく影響し、一方の 5’-末端を X または Z に置換した siRNA ではもう一方の鎖がガイド鎖として選択される確率が大きく向上した。同時に、5’- X または Z は hAgo2 の MID ドメインカチオンポケット中のアミノ酸残基による安定化を受けないため、1 本鎖化後に RISC を不安定化し、サイレンシング効果を低下させた。その結果、アンチセンス鎖 5’-末端を X または Z に置換した siRNA3, 4 はセンス鎖 U が 100%ガイド鎖として選択され、全くサイレンシング効果を示さなかった。したがって、センス鎖 5’-末端に X または Z を導入することにより、センス鎖がガイド鎖として選択されず、センス鎖の off-target 効果は回避できると言える。

1) MacRae, IJ. *et al.*, The crystal structure of human argonaute2. *Science*, 2012, 336 (6084) 1037–1040.

トポロジー依存的なリガンド結合でグアニン四重鎖の DNA 複製を制御する

○高橋 俊太郎[1]・建石 寿枝[1]・佐藤 しのぶ[2]・竹中 繁織[2]・PLAVEC Janez[3]・杉本 直己[1,4]（[1]甲南大 FIBER、[2]九工大院物質工、[3]Slovenian NMR Centre、[4]甲南大 FIRST）

Regulation of DNA replication by topology-dependent ligand binding on guanine quadruplexes ([1]Konan University, FIBER, [2]Kyushu Institute of Technology, [3]Slovenian NMR Centre, [4]Konan University, FIRST) TAKAHASHI, Shuntaro[1]; TATEISHI-KARIMATA, Hisae[1]; SATO, Shinobu[2]; TAKENAKA Shigeori[2]; PLAVEC, Janez[3]; SUGIMOTO Naoki[1,4]

核酸の機能メカニズムの解明や、核酸を用いた機能性マテリアルの設計には、熱力学に基づいた物理化学的アプローチが非常に有効である（1）。核酸構造の中でも非二重らせん構造は、遺伝子発現を調節する働きを有することから、細胞内での非二重らせん構造形成の化学的制御に注目が集まっている（2）。例えば、非二重らせん構造の一つであるグアニン四重鎖（G4）構造に結合して安定化させ、DNA 複製を制御するリガンドは、がんや神経変性疾患の治療薬として期待されている。G4 構造にはいくつかのトポロジーがあり（Figure 1）、その役割として遺伝子発現調節への影響が注目されている（3, 4）。そのため、特定のトポロジーを有する G4 に結合するリガンドは、特定の遺伝子の複製を優先的に制御する能力を持つと考えられる。本研究では、特定のトポロジーを有する G4 配列に結合するリガンドによる、DNA 複製制御を定量的に解析した。ヒトテロメア由来の G4 DNA に対し、化学修飾の異なる様々なナフタレンジイミド誘導体を用いた結果、G4 構造の安定化は同程度でも複製阻害効果が異なる結果が得られた。NMR 解析により、ナフタレンジイミド誘導体は G4 の G カルテットに結合するだけでなく、リガンドとヒトテロメア由来のハイブリッド G4 型のループ領域との間に付加的な相互作用が観察された。したがって、リガンドによる G4 DNA 複製の抑制効果は構造安定性に依存するだけでなく、G4 とリガンド分子の相互作用様式にも依存することが明らかになった。本研究では、複製速度と G4 の安定性の相関関係を定量的に評価するために、「トポロジー依存的な複製反応の定量的研究（Quantitative Study of Topology-dependent Replication; QSTR）」と呼ぶ独自の手法を開発した。QSTR によって、トポロジー依存的な結合に基づいて複製反応を制御する、様々なリガンド分子を系統的に分類できることが見出された。本解析法を用いることで、遺伝子発現の G4 トポロジー依存的に制御できる新しい分子の設計を促進することが期待される。

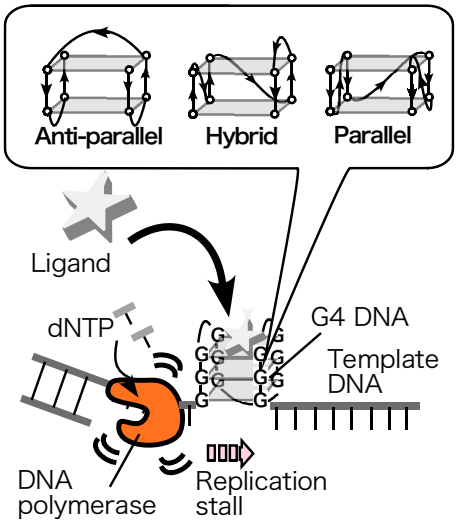


Figure 1 Schematic illustration of replication of G4 DNA having different topologies controlled by the binding of a G4 ligand.

[参考文献]
(1) S. Takahashi and N. Sugimoto, *Chem. Soc. Rev.*, 49, 8393 (2020).
(2) S. Takahashi and N. Sugimoto, *Acc. Chem. Res.*, 54, 2110 (2021).
(3) S. Takahashi, J. A. Brazier, and N. Sugimoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 114, 9605 (2017).
(4) S. Takahashi, K. T. Kim, P. Podbevsek, J. Plavec, B. H. Kim, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, 140, 5774 (2018).

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

SARS-CoV-2 の S1 タンパク質 RBD 結合アプタマーの イノシン導入効果の解析

○林 和佳奈[1]・塚越 かおり[1]・池袋 一典[1]（[1]東京農工大院工）

Analysis of inosine introduced aptamer against SARS-CoV-2 S1 protein RBD ([1]Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology) HAYASHI, Wakana[1]; TSUKAKOSHI, Kaori,[1]; IKEBUKURO, Kazunori[1]

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は SARS-CoV-2 というコロナウイルスの一種が引き起こす肺炎を伴う感染症であり、世界中に影響を与えている。このような感染症の流行を抑止するためには、迅速で正確な診断に基づく患者の隔離が有効であり、費用対効果の高い迅速で正確な診断技術の開発が求められている[1]。アプタマーは標的に対して高い結合親和性と特異性を有するため、検出への応用が期待される分子認識素子である。そこで当研究室では SARS-CoV-2 の検出を目的として、コロナウイルスの主要な抗原として知られているウイルス表面上に露出したスパイクタンパク質の受容体結合ドメイン (RBD) に結合するアプタマーの獲得を試みた。本研究ではアプタマーの標的に対する結合親和性の向上を目指し、アデニンの 6 位の炭素が脱アミノ化されている第五の塩基であるイノシンを導入することで、DNA とタンパク質間の疎水性相互作用の増強を期待した。

当研究室ではこれまでに、Yanling Song らによって獲得された RBD 標的アプタマー「CoV2-RBD-4C」[2]の二次構造に着目した配列改良によって、結合能が向上した RBD-46 というアプタマーを獲得している。そこでまず、RBD-46 を複数の構造単位を設定し、その構造単位ごとに配列をシャッフルして新たな配列を複数作成し、これらを合成して、アプタマーブロッティングによって結合能を評価した。その結果、結合能の向上がわずかに確認できた 4 配列をイノシン導入のための親鎖とした。これら 4 配列と RBD-46 に対してイノシンをランダムに導入した 40 配列を作成し、20 配列ずつアプタマーブロッティングで結合能を評価した。その結果、多くの配列で親配列である RBD-46 と比較して結合シグナルの増強が確認された (Fig.1 yellow and blue)。

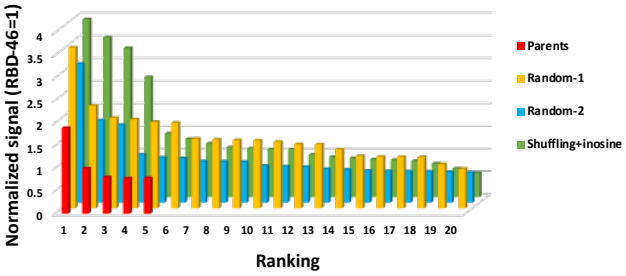


Fig.1 Binding ability of aptamer candidates against RBD. Dot intensity of RBD immobilized region was calculated using ImageJ and normalized as "the dot intensity of RBD-46 = 1". Ranking indicates that the sequences are ranked in order of the intensity of the normalized signal.

続いてさらなる結合親和性の向上を目的として、前述したように、これまでの評価で得られた結合能の向上が示唆された配列である CoV2-1R-02, CoV2-2R-01, CoV2-3R-02 を親配列として複数の構造単位を設定し、その構造単位ごとに配列をシャッフルして新たな配列を複数作成し、突然変異としてイノシンを導入することで新たな 20 配列を作成した。これらを合成してアプタマーブロッティングにより結合能を評価した結果、いくつかの配列で結合シグナルの増強が観察された (Fig.1 green)。以上の結果から、今後もイノシンを導入したアプタマーの改良を進めることで更なる結合能の増強が期待できると考える。

[1] Bruce J. Tromberg, P.D.; Tara A. Schwetz, P.D.; Eliseo J. Pérez-Stable, M.D.; Richard J. Hodes, M.D.; Richard P. Woychik, P.D.; Rick A. Bright, P.D.; Rachael L. Fleurence, P.D.; Francis S. Collins, M.D., P.D., *N Engl J Med*, **383**, 1071 (2020)

[2] Song, Y.; Song, J.; Wei, X.; Huang, M.; Sun, M.; Zhu, L.; Lin, B.; Shen, H.; Zhu, Z.; Yang, C., *Anal. Chem.*, **92**, 9895 (2020)

ホールトラップ核酸塩基を用いた分子混雑環境における DNA 内電子移動効率の評価

○武富祐樹・山口湧暉・櫻井俊亮・田仲真紀子（電通大院情報）

Evaluation of electron transfer through DNA crowded conditions under using hole-trapping nucleobases(The University of Electro-Communications); Taketomi, Yuki; Yamaguchi, Yuki; Sakurai, Shunsuke; Tanaka, Makiko

DNA 内では核酸塩基対間のπ–πスタッキングを介した電子移動が起こることが知られている。DNA 内電子移動は生体内の酵素間のシグナル伝達に関与している可能性など、生体内での働きも着目されている。DNA 内の電子移動特性はこれまで主に希薄水溶液中の DNA を用いて研究されてきた。しかし、DNA が機能する生体内は実際には分子混雑環境にあり、DNA が凝縮構造をとることもある。当研究グループのこれまでの研究により、希薄水溶液中と共存分子が高密度で存在する条件では、DNA 内電子移動の挙動は大きく異なることが確認されている [1]。また、高濃度のポリマーと塩によって形成される液晶 Ψ 型 DNA 内では、電子移動によって誘発されるグアニン塩基の損傷の効率が大幅に増大することが明らかになった [2]。しかし、このような電子移動特性の研究は未だ未解明な点が多く、詳細についてはさらなる検討が必要である。電子移動酸化の生成物として損傷グアニンがあるが、一電子酸化を受けたグアニンが生成物を与える反応は比較的遅く、さらに段階的に酸化損傷物を生成してしまうことから、グアニンの損傷量から正確な電子移動効率を見積もることはできない。

そこで本研究では、シクロプロパン環を有するグアニン（以下、^{cp}G）を、DNA 内のホール捕捉塩基として使用した [3]。^{cp}G は酸化損傷物がグアニン上に発生すると、非常に速い開環反応をおこしてホールを捉え、ホール移動を強制的に止めることができるため、^{cp}G の分解量は DNA 内の電子移動効率の指標となる。液晶 Ψ 型 DNA と均一な希薄水溶液中の B 型 DNA を比較し、DNA 内電子移動効率を調べた。^{cp}G を含む DNA 鎖は、前駆体を含むオリゴヌクレオチドから固相合成し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による 2 回の精製後、マススペクトル測定及び HPLC 分析によって同定した。相補鎖には光増感剤を含むオリゴヌクレオチドを使用し二本鎖（42mer）とし、ポリエチレングリコール（PEG1540）を添加することで分子混雑環境を作製した。DNA の構造は CD スペクトルや UV-vis 吸収スペクトル、共焦点蛍光顕微鏡によって確認した。PEG 濃度の異なる DNA 溶液に光照射を行い、酵素分解処理後、HPLC によって核酸塩基の損傷量を定量した。光照射後の ^{cp}G の損傷率を Fig. 1a に示す。PEG 濃度の上昇に伴い、^{cp}G の損傷率が増加することがわかった。また、PEG1540 40wt%、 NaCl 100mM を含む条件では、DNA は Ψ 型の液晶を形成し（Fig. 2b）、凝集のない条件よりも ^{cp}G の損傷率を高める結果となった。分子混雑環境での誘電率の変化および、液晶状態での DNA 間のスタッキングが高効率の DNA 内電子移動を誘発したことが考えられる。

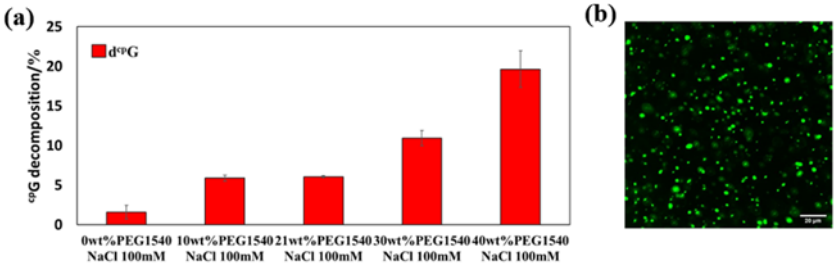


Fig. 1 (a) ^{cp}G decomposition percentages of pyrene-modified oligonucleotides (b) Flourescence images of liquid crystalline Ψ-DNA with intercalated SYBR Green I (scale bar 20 μm)

1) M. Tanaka, T. Matsumoto, H. Iida, *Org. Biomol. Chem*. **2018**, *16*, 6695.
2) S. Sakurai, M. Esumi and M. Tanaka, *Chem. Commun*. **2019**, *55*, 7695.
3) K. Nakatani, C. Dohno and I. Saito, *J. Am. Chem. Soc*. **2001**, *123*, 9681.

DNA２本鎖に光架橋可能な人工ペプチド開発

○内藤大暉・三原純一・QIU Zhiyong・中村重孝・藤本健造（北陸先端大先端科学）

Development of artificial peptides capable of photo-cross-linking to double-stranded DNA (School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and technology) NAITO, Hiroki; MIHARA, Junichi; QIU, Zhiyong; NAKAMURA, Shigetaka; FUJIMOTO, Kenzo

近年の核酸医薬研究では、生体内に存在する mRNA に対して作用するアンチセンス法や RNAi 法などが報告されている。しかし標的 mRNA の翻訳をブロックしても、対応する遺伝子から常に mRNA が転写されるため、RNA を標的とした際には持続的な治療が必要となる。一方、ゲノム DNA を標的とした遺伝子発現抑制では、一度の治療で効率的かつ長期間の遺伝子発現抑制が可能である[1]。しかし、ゲノム DNA は生体内において二本鎖状態で存在しており、ヒストンに巻きつき、クロマチン構造を形成しているため、核酸医薬の標的とした際には、効率的にゲノム DNA にアクセスし、ハイブリダイゼーションする方法が求められる。これまで triplex forming oligonucleotide(TFO)[2] や double duple invasion(DDI)法[3] などが報告されているが、標的にできる配列の制限や効率の面で課題も多い。

当研究室では 3-シアノビニルカルバゾール骨格を有する ^{CNV}K や ^{CNV}D などの光応答性人工核酸を含む DNA が数秒の光照射により相補的な DNA もしくは RNA のピリミジン塩基と光架橋できることを報告している。これまで細胞内アンチセンス効果の光制御や好感度検出に成功している。しかし、この ^{CNV}K を含むオリゴ DNA を用いた DNA 二本鎖への光架橋を評価したが、高効率で光架橋することは難しい。一方、生体内ではゲノム DNA に対しては酵素が作用しており、複製や転写を行っている。これはタンパク質がゲノム DNA にアクセスできることを示している。そこで、これらタンパク質に核酸に対する光架橋能を付与できれば、二本鎖 DNA に対して光架橋し、転写を阻害できるのではないかと考えた。

本研究では核酸に対して光架橋可能な光応答性アミノ酸として 3-cyanovinylcarbazole amino acid(^{CNV}A)を合成した。このアミノ酸を核酸結合性の GCN4 peptide の部分配列(Ac-DPAALKRARN TEAARR**^{CNV}A** RARKLQGGC-$CONH_2$)に組み込み、CRE14 DNA との光架橋を評価した。その結果、DNA 二本鎖と光架橋性ペプチドの光架橋反応が確認されたので報告する[4]。

1) D. Praseuth, et.al., *BBA - Gene Structure and Expression*, **1999**, 1489, 181.
2) Frank-Kamenetskii MD, et.al., *Annu Rev Biochem*, **1995**, 64, 65 - 95
3) Jesper Lohse, et.al., *PNAS*, **1999**, 96, 11804 - 11808
4) Zhiyong Qiu, et.al., *Organic &Biomolecular Chemistry*, **2019**, 17, 6277 - 6283

末端に架橋構造を有するDNAを鋳型としたPCR解析

○平野佑樹・WANG, Chen・中村重孝・藤本健造　(北陸先端大先端科学)

PCR analysis using DNA having cross-linking at terminal site as template (School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology) HIRANO, Yuki; WANG, Chen; NAKAMURA. Shigetaka; FUJIMOTO, Kenzo

昨今の新型コロナウイルスの流行に伴い、「PCR」という言葉を耳にすることが多くなっている。PCR(Polymerase chain rection)とはごく微量のDNAから目的となる遺伝子断片を増幅させる技術であり、分子生物学において最も知られている技術の1つである。ヒトのゲノムのような巨大なDNA分子の中から特定のDNA断片だけを短時間に正確に大量増幅でき、酵素を用いた遺伝子操作法の中で最も使用されている手法である。このPCRを用いた創薬研究の1つにDNA Encoded Library(DEL)がある。DELはDNAでラベルされた低分子化合物ライブラリーからヒット化合物をスクリーニングし、PCRと配列解析技術を用いたHigh-Throughputな手法である。しかし、DNAタグにはライブラリー構築過程でも乖離しない(誤解析を防ぐ)、高い安定性が求められる。そのため、DNAをリンカーで繋げたDNAタグが報告されているが、PCR効率に悪影響を与えるため、より最適なDNAタグが求められている。

本研究室ではこれまでに光応答性人工核酸を用いたDNA操作法を確立しており、それらを用いた様々なアプリケーションを報告している。一例として、本研究室で開発された光応答性人口核酸N^3-methyl-5-cyanovinyldeoxyuridine(^{MCV}U)を利用して、強い熱安定性及び酵素安定性を有するDNA end capping構造のようなユニークな構造を有するDNAが報告されている。また、光可逆的操作が可能な3-cyanovintclarbazol(^{CNV}K)なども報告している。^{CNV}Kを含むオリゴDNAは366 nmの光照射により相補鎖中のピリミジン塩基と光架橋し、その後、312nmの光照射を行うことにより光開裂する。そのため標的核酸の高感度検出や生体内でのアンチセンス効果の光制御などに利用されている。本研究では、PCRを阻害しないDNAタグの開発を目指し、可逆的DNA光架橋反応を用いたDNA end capping構造を有するDNA断片を作成し、ligation反応及びPCRに与える影響を調べた。

1) Y. Yoshimura and K. Fujimoto, *Org. Lett*., **2008**, 10, 3227.
2) S. Brenner, R. A. Lerner, P*roceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **1992**, 89, 5381.
3) S. Nakamura, H. Hashimoto, S. Kobayashi, K. Fujimoto, *ChemBioChem*, **2017**, 18, 1984.
4) S. Nakamura, K. Fujimoto, *J. Chem. Technol. Biotechnol.,* **2014**, 89, 1086.
5) Y. Yoshimura, H. Okada, K. Fujimoto, *Org. Biomol. Chem*., **2010**, 8, 1523.

キノリニウム型蛍光色素の合成および環境応答性

大庭亨[1]・○菅原亜季[1]・六本木誠[2]・為末真吾[1]（[1]宇都宮大院工農総合科学専攻、[2]宇都宮大先端計測分析部門）

Synthesis and environment sensitivity of novel quinolinium dyes (Graduate School of Regional Development and Creativity, Utsunomiya University[1], Advanced Instrumental Analysis Department, Utsunomiya University [2]) OBA, Toru[1]; SUGAWARA, Aki[1]; ROPPONGI, Makoto[2]; TAMESUE, Shingo[1]

脳の高次機能の解明のために、多数の神経細胞の活動を同時に、高い時間分解能で測定できる膜電位感受性色素 (VSD) の開発が求められている。我々はその候補として、キノリンを電子アクセプターとした新規な分子内電荷移動型蛍光色素を合成し、その電位応答を報告してきた。本研究では、より電子アクセプター性を高めたキノリニウム部位を持つ新規な蛍光プローブを合成し、その環境応答性を検討することを目的とした (**Figure 1**)。

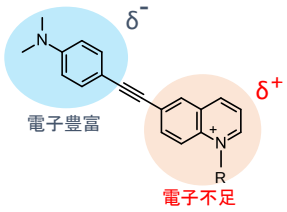


Figure 1. 新規なキノリニウム型蛍光色素の基本構造.

Pfizinger キノリン合成をかぎ反応として 5-ブロモキノリン誘導体を合成し、続いて 4-エチニル-*N*,*N*-ジメチルアニリンとの薗頭カップリングから **1** を得た (**Figure 2**)。さらに、キノリン環の *N*-オキシド化によってキノリニウム誘導体 **2** を得た。これらの色素を 1 wt% SDS 水溶液中に分散し、電解質 (10 wt% Na_2HPO_4 aq.) を滴下したところ、**1**、**2** ともにやや短波長シフトしながら蛍光強度が増加した (**Figure 3**)。**2** の蛍光強度の増加率 (6.4 倍) は、**1** や別途合成した **3**、市販の VSD (**4**) のいずれよりも大きく、**2** はミセル表面の電気的環境に強く応答することが示唆された。

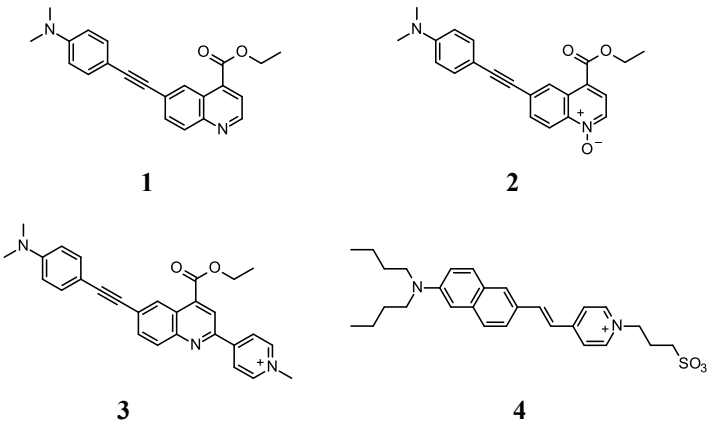


Figure 2. 各化合物の構造.

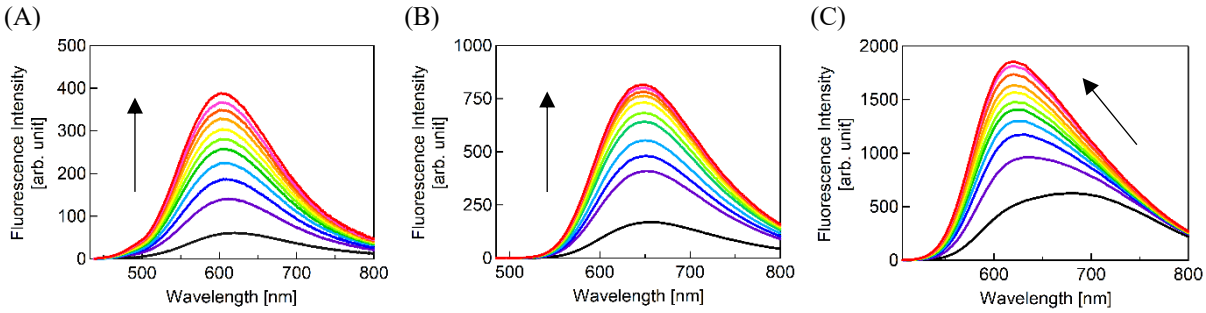


Figure 3. 各色素の 1 wt% SDS 水溶液に 10 wt% Na_2HPO_4 aq.を添加した時の蛍光発光スペクトル変化. (A) 化合物 **2**, λ_{ex} 423 nm; (B) 化合物 **3**, λ_{ex} 475 nm; (C) 化合物 **4**, λ_{ex} 496 nm. いずれも色素濃度は 10 μM, Na_2HPO_4 濃度は 0.5 wt%→3.3 wt%, 室温で測定.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

エバネッセント光励起散乱による液滴中のリゾチーム凝集化分析

○車田颯人[1]・鯉渕翔[1]・田中大輔[2]・尾形慎[3]・植英規[4]・若松孝[1]（[1]茨城高専、[2]大分高専、[3]福島大学、[4]福島高専）

Analysis for Lysozyme Aggregation in Droplet by Evanescent Light Excitation Scattering (Ibaraki KOSEN[1], Oita KOSEN[2], Fukushima University[3], Fukushima KOSEN[4]) KURUMADA, Hayato[1]; KOIBUCHI, Kakeru[1]; TANAKA, Daisuke[2]; OGATA, Makoto[3]; UE, Hidenori[4] ;WAKAMATSU, Takashi[1]

医薬品や機能性食品の研究開発では、タンパク質の構造解析が重要であるが、必要となるタンパク質の結晶作製は、試行錯誤で行われており、ボトルネックである。タンパク質の結晶化では、液滴によるハンギングドロップ蒸気拡散法が広く用いられている。本研究では、液滴中における結晶化前のタンパク質凝集化をリアルタイムで分析するために、全反射エバネッセント光励起の動的光散乱(DLS)測定システムを構築し、代表的なモデルタンパク質のリゾチームの凝集化を分析した。

正三角柱ガラスプリズムにニワトリ卵白リゾチーム(HEWL)の結晶化溶液の液滴(～30 μL)を付着させ、プリズム／水の全反射臨界角（61.3°）以上の入射角で細いレーザ光(ビーム径約 1 mmφ, 波長 532 nm, 出力 25 mW)を入射させる(Fig. 1)。液滴中に発生するエバネッセント光によるタンパク質凝集体の微弱な散乱光を液滴側から二重絞りを介して光電子増倍管(PMT)で検出した。エバネッセント光の液中への侵入長は、波長程度であり、界面近傍領域の凝集体からの散乱光を高感度に測定できる。液滴サンプルをガラスセルで封止して、液滴の蒸発を防いだ。今回はリザーバーなしで測定した。オシロスコープで測定した DLS 信号を高速フーリエ変換(FFT)し、周波数パワースペクトルの経時変化を評価した。ここでは、酢酸−酢酸 Na(pH 4.53)バッファーに溶解した 30 mg/mL の HEWL に対し、結晶化剤 NaCl の 濃度 2% と 4%(wt/v)について HEWL の凝集化を比較した。なお、HEWL 溶液に結晶化剤の添加・混合後直ぐに、プリズムに液滴サンプルを付着させ、DLS 測定を行った。DLS データの解析では、測定データの間隔を 30 秒とし、20 個のデータ群を用いた。

NaCl の初期濃度 4%(wt/v)のサンプル液滴の FFT パワースペクトルは、経過時間と伴に 10 Hz 以下の低周波で大きくなった(Fig.2)。

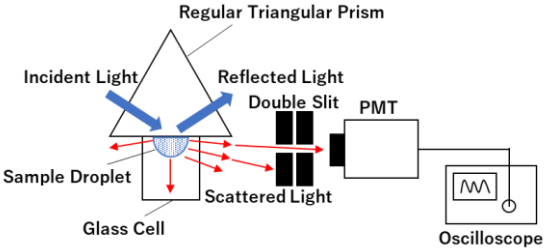


Fig.1 Measurement system for evanescent light excitation scattering.

これは添加 NaCl の凝集効果と溶媒蒸発による液滴濃度の上昇の結果、形成 HEWL 凝集体のサイズが大きくなり、ブラウン運動が穏やかになったことによる。一方、NaCl 初期濃度 2%(wt/v)の液滴サンプルでも同様に、時間経過に伴い低周波域でパワースペクトルが顕著になったが、4%(wt/v)NaCl に比べ、この現象は約 20 分遅れて発生した。

構築したエバネッセント光励起の動的光散乱(DLS)測定システムは、タンパク質液滴を使用するハンギングドロップ蒸気拡散法における結晶化前のタンパク質凝集化分析に適する。

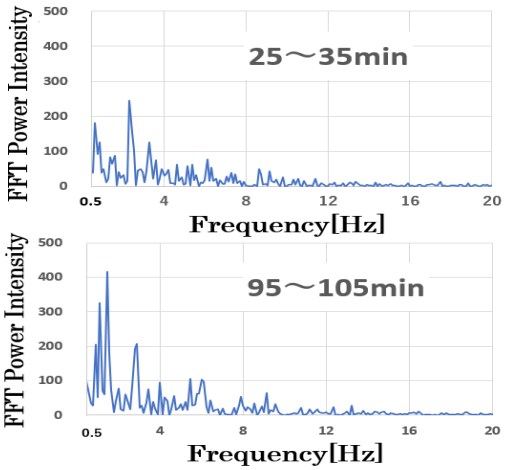


Fig.2 FFT Power spectra for HEWL solution with 4%(wt/v) NaCl.

抗体を迅速に高性能蛍光免疫センサー化可能なプローブタンパク質 Coiled Q-probe による各種抗原の検出

○笹本佳那[1]・安田貴信[1]・北口哲也[2]・上田 宏[2]（[1]東工大院生命理工、[2]東工大研究院化生研）

A probe protein Coiled Q-probe that rapidly turns antibodies into a high-performance fluorescent immunosensor for various antigens ([1]Graduate School of Life Science and Technology, and [2]Laboratory for Chemistry and Life Science, Tokyo Institute of Technology) SASAMOTO, Kana[1]; YASUDA, Takanobu[1]; KITAGUCHI, Tetsuya[2]; UEDA, Hiroshi[2]

背景　臨床診断や環境分析において微量分子の迅速かつ簡便な検出が求められている。抗体を部位特異的に蛍光色素修飾した蛍光免疫センサーQuecnhbody (Q-body)は抗体内の Trp 残基により蛍光消光（クエンチ）し、抗原濃度依存的に蛍光が回復 (脱クエンチ)するため、迅速・簡便に抗原を検出できる [1)]。一方、Q-body に適した抗体の選抜、蛍光色素-抗体間のリンカーの最適化には遺伝子操作が必要であり、新規 Q-body 構築には時間と労力が必要だった。当研究室では以前、抗体結合タンパク質 ProteinM (PM) の C 末端側を蛍光色素修飾した Quenchprobe (Q-probe)を開発した [2)]。Q-probe は抗体と混合するだけで抗体を Q-body 化可能であるため、遺伝子操作なしに迅速に Q-body に適した抗体を選抜可能である。一方で Q-probe の脱クエンチ効率は 2 倍程度であり、Q-probe を Q-body に適した抗体の選抜ではなく、任意の抗体の蛍光免疫センサーとして使用するには蛍光応答が少ないという課題があった。

目的　本研究の目的は Q-probe の蛍光応答の向上である。そのために E4(EIAALEK)$_4$ ペプチドと K4 (KIAALKE)$_4$ ペプチドのコイルドコイル構造形成 [3)]を利用した PM の蛍光色素標識法による迅速なリンカー最適化法の開発を試みた。

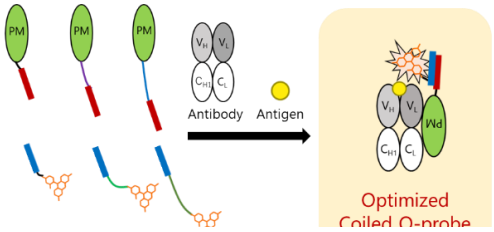


Fig 1. The strategy of rapid linker optimization

方法　Protein M（熱安定化変異体）の C 末端に 3 種類の長さの異なるリンカーを介して E4 配列を付加した Protein M を発現、精製した (PM-E4)。これらに対して 3 種類の長さのリンカーを介して蛍光色素が結合した K4 ペプチドを様々なペアで結合させ、多種類の Coiled Q-probe を作製した（Fig. 1）。これらに抗体を加え蛍光強度を測定しクエンチ効率を調べた後、抗原を添加し脱クエンチ効率を評価した。

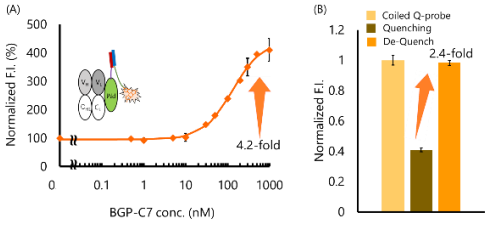


Fig. 2. (A) De-quenching of anti-BGP Fab by BGP-C7 epitope peptide (B) Quenching of anti-cortisol (CS) IgG and De-quenching by CS.

結果・考察　数種類の Coiled Q-probe で抗オステオカルシン(BGP)抗体の Fab 断片を評価した結果、PM-E4 間、蛍光色素-K4 間両方のリンカーが長いペアで作製した Coiled Q-probe が最も高い脱クエンチ効率を示し、従来の Q-probe より応答を向上させることに成功した(1.9 倍→4.2 倍) (Fig. 2A)。一方抗コルチゾール(CS) IgG 抗体では長い PM-E4 間リンカーと短い蛍光色素-K4 間リンカーのペアで作製した Coiled Q-probe が最も高い脱クエンチ効率を示し、こちらも従来の Q-probe より応答を向上させることに成功した(2.2 倍→2.4 倍) (Fig. 2B)。以上のことから Coiled Q-probe を用いた迅速なリンカー最適化手法は Q-body における蛍光応答の向上に有用なことが示唆された。今後更なる PM-E4 間リンカー、蛍光色素-K4 間リンカーの最適化を行うことにより、より多くの抗体を蛍光免疫センサー化できると考えられる。

1) Abe, R. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **133** 17388-17394 (2011)
2) Dong, J. *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, **165**, 112425 (2020)
3) J. R. Litowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **277**, 37272–37279 (2002)

金属フタロシアニン類の凝集を利用したアクティベータブル光音響造影剤の開発

○野北康平・今泉直人・三木康嗣・大江浩一（京大院工）

Development of activatable photoacoustic contrast agents utilizing aggregation of metallo-phthalocyanines

(Graduate School of Engineering, Kyoto University) NOGITA, Kohei; IMAIZUMI, Naoto; MIKI, Koji; OHE, Kouichi

光音響（PA）イメージングは、生体内の深部組織の情報を高い分解能で可視化できる非侵襲的な手法として近年注目されている。金属フタロシアニン（MPc）類および金属ナフタロシアニン（MNc）類は光照射に対し安定な色素であり、吸収した近赤外光のエネルギーを効率的に熱エネルギーに変換することで強い PA 信号を発することができるため、PA イメージング用造影剤への応用が期待されている。本研究では、近赤外光照射に応答して PA 信号が増大する MPc、および癌の転移や血管新生に関わる酵素である MMP-2 に応答して PA 信号が増大する MNc を開発した。

軸配位子に平均分子量 2000 のポリエチレングリコール（PEG）を結合させた両親媒性 AlPc 誘導体 **AlPcPEG**（Figure 1a）は水中でベシクルを形成した。**AlPcPEG** のベシクルに近赤外光（λ＝730 nm）を照射すると **AlPcPEG** の軸配位子が切断され、水溶性を失った AlPc が凝集することにより、結果として PA 信号強度が増大した（Figure 1b）。

次に、プロテアーゼの一つである MMP-2 が切断するペプチド配列 PLGLAG を PEG と MNc の間に持つ両親媒性 AlNc 誘導体 **AlNc-*pep*-PEG**（Figure 1a）を合成した。MMP-2 を作用させると **AlNc-*pep*-PEG** のペプチド鎖が切断されて軸配位子が短くなり、水溶性を失った AlNc が凝集することで、PA 信号強度 PA_{680}（励起波長：680 nm）が増大した。一方、この時 PA 信号強度 PA_{760}（励起波長：760 nm）は減少した（Figure 1c）。さらに、MMP-2 が過剰発現した腫瘍細胞 HT-1080 を移植したマウスに **AlNc-*pep*-PEG** を投与した後、腫瘍部位での PA 信号強度を測定した。投与後 1 時間で **AlNc-*pep*-PEG** の各励起波長での PA 信号強度比($PA_{680,vivo}/PA_{760,vivo}$)は約 2.5 倍に増大し、6 時間後まで維持された（Figure 1d）。

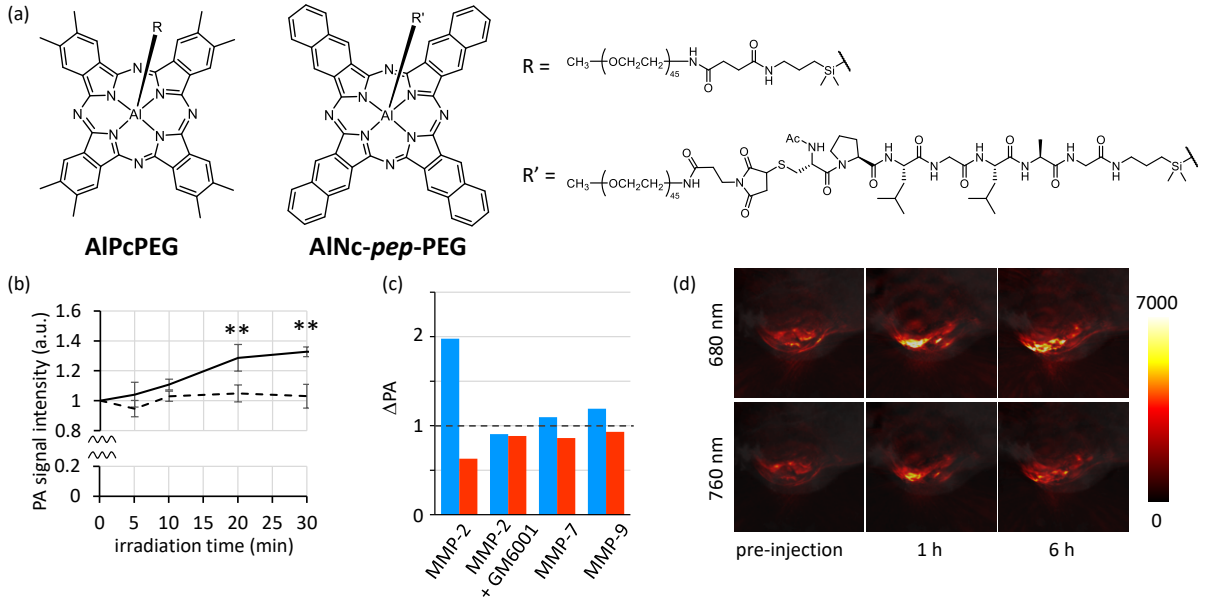


Figure 1. (a) Structure of **AlPcPEG** and **AlNc-*pep*-PEG**. (b) Time-dependent PA signal intensity change of **AlPcPEG** under photoirradiation at 730 nm (For PA signal generation: λ_{ex} = 680 nm). Vesicles (solid) or aggregates (dashed) of **AlPcPEG**. (c) PA signal intensity increment (ΔPA) of **AlNc-*pep*-PEG** (30 μM, pH = 7.2) at 680 nm (blue) and 760 nm (red) after incubation with enzyme for 2 h. GM6001: inhibitor of MMP-2. (d) Representative *in vivo* PA images of HT-1080-bearing mice after *i.v.* injection of **AlNc-*pep*-PEG**.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

2 細胞間相互作用解析デバイスによる T 細胞の抗原認識活性評価および発現遺伝子解析

○井手大輝[1,2]・齋藤真人[1,2]・青枝大貴[3]・高松漂太[4]・Wilfred Villariza Espulgar[1,2]・細川正人[5]・松永浩子[5]・鈴木直子[5]・有川浩司[5]・竹山春子[5,6,7]・民谷栄一[2,8]（[1]阪大院工、[2]産総研・阪大先端フォトバイオ、[3]阪大微研、[4]阪大院医、[5]早大ナノライフ創新研、[6]早大院先進理工、[7]産総研-早大 CBBD-OIL、[8]阪大産研）

Single-cell level analysis of T cell antigen-recognition activity and expression genes by the microfluidic device for cell-cell interaction (Graduate School of Engineering, Osaka Univ.[1], AIST-Osaka Univ. PhotoBIO-OIL[2], Research Institute for Microbial Disease, Osaka Univ.[3], Graduate School of Medicine, Osaka Univ.[4], Research organization for nano and Life Innovation, Waseda Univ.[5], Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda Univ.[6], CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ.[7], and The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka Univ.[8]) Hiroki Ide[1,2], Masato Saito[1,2], Taiki Aoshi[3], Hyota Takamatsu[4], Wilfred Villariza Espulgar[1,2], Masahito Hosokawa[5], Hiroko Matsunaga[5], Naoko Suzuki[5], Koji Arikawa[5], Haruko Takeyama[5,6,7] and Eiichi Tamiya[2,8].

病原体の情報である抗原を提示する抗原提示細胞（APC）と T 細胞受容体（TCR）による抗原特異的な細胞間相互作用は、免疫応答を惹起する生体防御の要となっている。近年、T 細胞と APC の抗原特異性を応用したがん治療法が報告されており[1]、新規治療法の開発に向けて T 細胞の解析が重要視されている。しかし、あらゆる抗原に対応するために T 細胞は各々で異なっており[2]、免疫応答を惹起する抗原特異的 T 細胞の検出手法は未だ確立されていない。そこで本研究では、独自に開発したマイクロ流体デバイスを用いて T 細胞／APC の細胞間相互作用について 1 細胞毎に解析した[3]。APC との相互作用に伴う T 細胞内 Ca^{2+}濃度変化を 1 細胞毎に測定することで T 細胞活性を評価した。T 細胞／APC の相互作用解析後、デバイス中央部の開口部(ϕ=5 mm)から任意の T 細胞を回収し遺伝子解析することで、T 細胞内 Ca^{2+}と遺伝子発現の相関性の紐づけを試みた。

フォトリソグラフィ技術によりサブミクロンオーダーでデバイスの設計製作し、生体適合性が高く自家蛍光の少ない PDMS を材料にスライドガラス上にデバイスを作製した。アレイ状に配置した微細構造部に APC を 1 細胞補足し、T 細胞を灌流させ APC に接触させることで T 細胞と APC の相互作用を促した。実験では、モデル系として一律な TCR を発現する遺伝子改変マウス及び野生型マウス由来の T 細胞、APC を用いて抗原特異／非特異ペアでの比較を行った。T 細胞が APC に接触した時点で相互作用が開始したと仮定し、Ca^{2+}蛍光インジケーターである Fluo-4 により T 細胞内 Ca^{2+}変化を経時的に蛍光測定した。得られた蛍光強度を正規化し、蛍光強度変化を指標に T 細胞活性を評価した。特異ペアの T 細胞では、持続的に高い蛍光強度が測定された一方、非特異ペアでは一時的な蛍光強度ピークを示すだけであった。T 細胞内 Ca^{2+}が免疫機能活性のメッセンジャーとして働く[3]ことを意味する結果と考えられる。相互作用測定から 3 時間のインキュベート後、マイクロマニピュレーターを用いてデバイスから任意の T 細胞を 1 細胞毎に回収し、RNA-Seq を行った。R/Bioconductor パッケージの edgeR により特異／非特異ペア間で発現変動遺伝子を検出解析したところ、TCR 抗原認識の下流における遺伝子群が確認された。以上より、デバイス上で生体同様の T 細胞／APC 相互作用が確認され、活性化 T 細胞における表現型と遺伝子型の相関性を紐づけ可能であることが示唆される結果を得た。

[1] A. Minervina, *et al.*, *Transpl. Int*, 32, 1111-1123 (2019). [2] H. Ide, et al., *Sens. Actuators B Chem*, 330, 129306 (2021). [3] A. Casrouge, *et al.*, *J. Immunol*, 164 (11), 5782-5787 (2000).

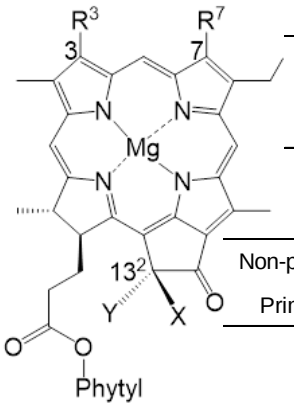
酸素発生型光合成生物のクロロフィル *b* の構造変換反応特性

○田中雅之・佐賀佳央（近畿大院総合理工）

Reaction Properties of Structural Conversion of Chlorophyll *b* in Oxygenic Photosynthesic Organisms

(Graduate School of Science and Engineering, Kindai University) TANAKA Masayuki; SAGA yoshitaka

酸素発生型光合成においてクロロフィルは光エネルギーを化学エネルギーに変えるための重要な色素である。特に、光化学系 I の反応中心タンパク質に存在するクロロフィルとその異性体であるクロロフィルエピマーからなるクロロフィル二量体（スペシャルペア）は初期電荷分離反応を担っている。このクロロフィルエピマーの生合成メカニズムや生合成を触媒する酵素の存在が明らかになっていない。クロロフィルの環骨格に直結した置換基はクロロフィルの化学反応特性に影響を及ぼすことが明らかになっていることから、Chl *a* 、*b* 、*d* (Fig. 1)のエピマー化反応を比較分析し置換基効果の影響を明らかにすることを本研究の第一の目的とした。また、緑色植物で光エネルギーの捕捉と伝達を行う LHC II タンパク質に結合した状態の Chl *b* のホルミル基の還元反応特性とタンパク質への影響を調べることを第二の目的とした。



Pigment	R^3	R^7
Chl *a*	$CH=CH_2$	CH_3
Chl *b*	$CH=CH_2$	CHO
Chl *d*	CHO	CH_3

	X	Y
Non-primed	H	$COOCH_3$
Primed	$COOCH_3$	H

Fig. 1. Molecular structures of three chlorophyllous pigments used in this study.

Chl *a* 、*b* 、*d* をそれぞれ *Spirulina* 、ほうれん草、*Acaryochloris marina* から抽出し、トリエチルアミンを用いて 20 ℃ 、ジエチルエーテル溶液中でエピマー化反応の経時変化を追跡した。トリエチルアミン濃度を 0.05 M から 0.3 M に変化させて分析を行った結果、どの濃度においても Chl *b* の反応速度が最も大きく Chl *a* の反応速度が最も小さいことが明らかになった（Fig. 2）。エピマー化反応では Chl 分子の 13^2 位炭素に結合するプロトンが引き抜かれることで反応中間体としてエノラートアニオンが生成する。電子吸引性基であるホルミル基は、環全体の電子密度を低下させエピマー化反応中間体を安定化させる。これよりホルミル基を持つクロロフィルのエピマー化反応の反応速度は大きくなると考えられる。さらにホルミル基を持つ Chl *b* と Chl *d* のエピマー化反応速度の違いをハメットの σ 値を用いて検証すると、Chl 分子 のエピマー化反応には 3 位と 7 位置換基の誘起効果の足し合わせがはたらき、それにより Chl *b* の反応速度は Chl *d* の反応速度よりも大きくなったと考えられる。

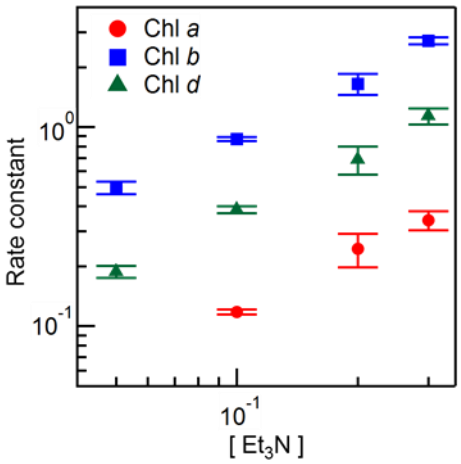


Fig. 2. The epimerization rate constants of three Chl pigments.

また、ほうれん草から単離し可溶化した LHC II タンパク質にテトラヒドロホウ酸ナトリウムを加えることによる LHC II に結合した状態の Chl *b* の側鎖の還元反応を試みた。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

高いペルオキシダーゼ活性を示す二核非ヘム鉄アミドアニオン配位錯体の開発

○福井悠介・小寺政人・人見穣（同志社大院理工）

Development of Dinuclear Nonheme Carboxamidoiron(III) Complexes with High Peroxidase Activity

(Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University) FUKUI, Yusuke; KODERA, Masahito; HITOMI, Yutaka

西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）は，過酸化水素（H_2O_2）を酸化剤としてフェノール類をはじめとする様々な基質を一電子酸化するヘム酵素であり，電気化学センサー，免疫組織化学，ELISA など幅広い用途に用いられる．しかし，酵素である HRP は高温・酸性条件では不安定であり，その活性が実験結果に影響を及ぼす．ペルオキシダーゼ機能を備えた金属錯体やナノ粒子は，HRP の有する問題を解決し高い再現性，定量性を与える有用な試薬となると期待されている[1]．これまでに我々は，アミドアニオン配位単核非ヘム鉄錯体(Fe^{III}mpaq)が他の単核非ヘム鉄錯体よりも高いペルオキシダーゼ活性を示すことを報告している（Chart 1, left）[2]．しかし，酵素である HRP と比べると，Fe^{III}mpaq のペルオキシダーゼ活性は著しく低い．Fe^{III}mpaq は H_2O_2 と反応し,中間体として hydroperoxo 種を生成するのに対し、2 核鉄(III)錯体は，μ--1,2-peroxo 種の様な過酸が架橋された 2 核鉄(III)中間体を生成することが出来るため，単核鉄(III)錯体と比べて安定なペルオキシド付加体形成が促進され H_2O_2 親和性が向上すると期待した．本研究では，2 つの H-mpaq を長さの異なる 3 種類のメチレンリンカーで連結した二核化配位子とその鉄錯体 $Fe_2(C_n\text{mpaq}_2)$（n = 2, 3, and 4）を合成した（Chart 1, right）．

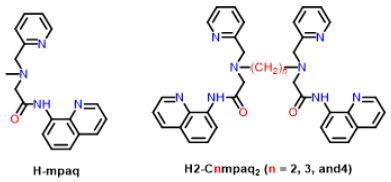


Chart 1. Structure of the ligands

二核鉄(III)錯体のペルオキシダーゼ活性は, ABTS を基質とし stopped-flow 装置を用いて評価した. ABTS の 1 電子酸化体である ABTS cation radical の有する 414 nm の吸収強度の増加を利用し初速度 v_o（M sec^{-1}）を算出した．比較的高い濃度の ABTS を含む溶液を用いて，反応させる H_2O_2 濃度を変化させることで，H_2O_2 親和性と活性種の生成速度を評価した．この条件では，律速段階は酸化活性種の生成であると考えられるため，初速度 v_0 は $v_0 = 2k_2[H_2O_2][\text{cat}]/([K_m + [H_2O_2])$で表される．ここで，$k_2$ は酸化活性種の生成に関する速度定数，K_m はミカエリス定数である．新規に合成した 2 核鉄(III)錯体はいずれも，H_2O_2 との二次反応速度定数，k_2/K_m が単核の Fe^{III}mpaq よりも高いことが判明した．また，その反応性はリンカーの長さに強く依存し，C3＞C2≒C4 の順であることが分かった（Fig. 1）．

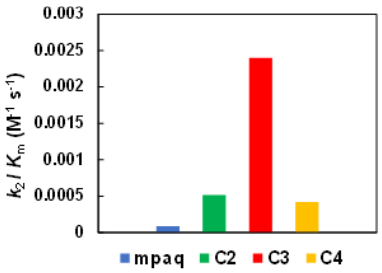


Figure 1. Second order rates for the reaction with hydrogen peroxide.

また、H_2O_2 との反応により生成する中間体を特定するために HEPES 緩衝液（2 mM，pH 7.2）中，4℃で $Fe_2(C_3\text{mpaq}_2)$錯体と 20 当量の H_2O_2 を反応させ，電子吸収スペクトルの変化を追跡した．その結果, H_2O_2 添加後，580 nm 付近の吸収の増大が観測され，新しい錯種が生成していることが示唆された．さらに CH_3CN 中，−40℃で 10 当量の H_2O_2 と反応させて，CSI-MS スペクトルを測定した結果，$Fe_2(C_3\text{mpaq}_2)$錯体の μ-1,2-peroxo 種（$[Fe_2(O)(OO)(C_3\text{mpaq}_2)]+H^+$）に相当する m/z = 783 に分子イオンピークが観測された．

[1] A. D. Ryabov, T. J. Collins, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 45, 15116.
[2] Y. Hitomi *et al.*, *Dalton Trans*. **2013**, *42*, 12878.

金属ハイブリッドチャネルによる膜透過能制御

○小牧航輔・越山友美（立命館大院生）

Control of Membrane Permeability by Metal Hybrid Channels (Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University) KOMAKI, Kosuke; KOSHIYAMA, Tomomi

チャネルタンパク質による膜を介したイオン輸送は、細胞の浸透圧調節や神経細胞での電気シグナルの伝達など、細胞活動において重要な役割を果たしている。このような生体内において重要な機能を担うイオンチャネルの動作メカニズムの解明が進められる一方で、天然のイオンチャネルの機能を環状ペプチドや高分子などの合成分子で再現した人工チャネルが多数報告されている。人工チャネルの多くは、分子間の水素結合や π スタッキングなどにより脂質膜上で自己集積することでイオンチャネルを形成する。また、金属配位結合を利用した人工チャネルもいくつか報告されている。金属イオンと配位子の種類により配位構造が規定できるため、チャネル分子の自己集積の制御において配位結合は有用であると考えられる。当研究室では、金属配位を利用したイオンチャネルの透過能制御に取り組んでおり、先行研究で、天然のチャネル分子であるアンフォテリシン B (AmB) に金属結合部位として 2,2'-bipyridine (bpy) 配位子を修飾した bpy-AmB を設計・合成し (Fig 1)、銅イオンなどの金属イオンの配位に伴いイオンチャネルが形成することを見出している [1]。pH と金属イオンの種類により bpy-AmB チャネルの膜透過能を制御できることを報告したものの、イオン選択性等の詳細は分かっていない。そこで本研究では、アルカリ金属イオンの透過能について評価し、bpy-AmB チャネルのイオン透過能のさらなる解明を目指した。

bpy-AmB チャネルのアルカリ金属イオンの透過能の評価は、pH に依存して発光が変化する 8-Hydroxypyrene-1,3,6-Trisulfonate (HPTS) を内包したリポソーム (HPTS@Lipo) を用いて行った (Fig 2)。リン脂質は、疎水基部分の脂肪酸の構造が異なる 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine (POPC)、または 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) を用いた。HPTS@Lipo へ MOH (M = Li, Na, K, Rb, Cs)、bpy-AmB、$M'Cl_2$ (M' = Cu, Co, Ni) を順次添加し、イオン透過に伴う HPTS 由来の 510 nm の蛍光強度の変化を時間追跡した。アルカリ金属イオンの種類により透過能に違いが見られた。また、添加する金属イオンによる透過能の違いも見られ、Ni^{2+} と Co^{2+} と比べて Cu^{2+} は、より高い透過能を示した。現在、透過能の評価に加え、吸収スペクトルや CD スペクトル測定による bpy-AmB の膜中での集積状態変化の解析も進めている。

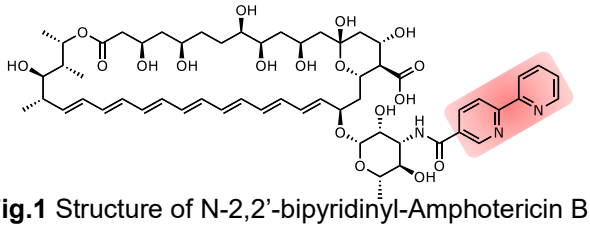


Fig.1 Structure of N-2,2'-bipyridinyl-Amphotericin B (bpy-AmB).

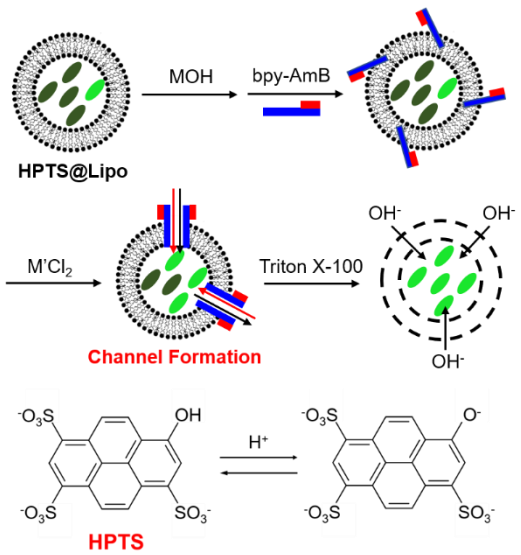


Fig.2 Schematic representation of the HPTS assay.

1) T. Koshiyama, Y. Inoue, S. Asada, K. Kawahara, S. Ide, K. Yasuhara, M. Ohba, *Chem.Comun*., **57**, 2895-2898 (2021).

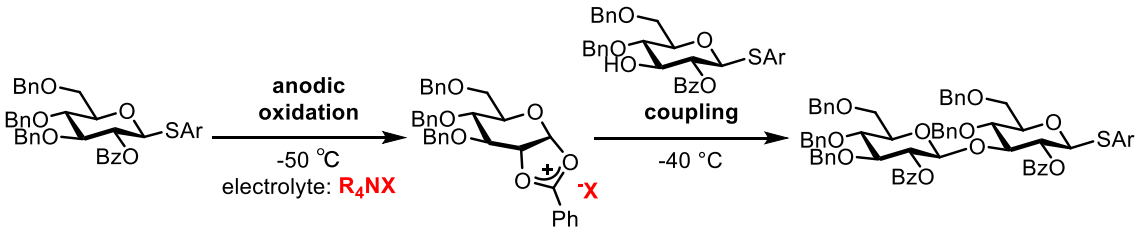
ジオキサレニウムイオン中間体を経由する電解グリコシル化反応における支持電解質の効果

○石坂優依[1]・齋藤阿須香[1]・小林丈泰[2]・渋谷章人[3]・野上敏材[4]（[1]鳥取大院持続性社会創生、[2]鳥取大工、[3]鳥取大院工、[4]鳥取大工 GSC センター）

Effect of supporting electrolyte on electrochemical glycosylation via dioxalenium ion intermediate (Graduate School of Sustainability Science, Tottori University[1], Faculty of Engineering, Tottori University[2] Graduate School of Engineering, Tottori University[3] GSC center, Faculty of Engineering, Tottori University[4]) ISHISAKA, Yui[1]; SAITO, Asuka[1]; KOBAYASHI, Takehiro[2]; SHIBUYA, Akito[3]; NOKAMI, Toshiki[1]

合成ターゲットの環状β-グルカン 13 糖は根粒菌に分類される Bradyrhizobium 属の細菌から産出され，抗酸化作用などの生物活性を有する[1]。これまでの研究で環状部分の 12 糖の半分の構造である鎖状β-グルカン 6 糖の合成を達成している[2]。しかし，全合成の達成に向けて環状 12 糖に含まれるβ-1,3-グリコシド結合をより効率的に構築する必要がある。本研究ではβ-1,3-グリコシド結合の合成効率化を目指し、電解グリコシル化の反応条件最適化を支持電解質の検討を中心に検討した。

まず、支持電解質のカチオンをテトラブチルアンモニウムイオン（Bu_4N^+）に固定して、アニオンの影響を調べた（entries 1-5）。その結果、Bu_4NOTf（entry 5）を用いた場合に最も高い収率で目的の 2 糖が得られた。Bu_4NOTf を支持電解質に用いて、電解酸化によって生じるグリコシル化反応の低温 NMR を測定したところ、グリコシル化反応中間体としてジオキサレニウムイオン中間体が確認された。従って、ジオキサレニウムイオン中間体の安定性に支持電解質のアニオンが大きく関与していると考えられる。続いて、カチオン構造の異なる 3 種類の支持電解質、Et_4NOTf、1-Butyl-3-methylimidazolium triflate [Bmim][OTf]、1-Butyl-1-methylpyrrolidinium triflate [Bmpy][OTf]を検討した（entries 6-8）。その結果、イオン液体である[Bmpy][OTf]（entry 8）を用いた際に、最も高い収率で目的の 2 糖が得られた。これは支持電解質のアニオンだけでなく、カチオン構造もジオキサレニウムイオン中間体の安定性あるいは反応性に寄与していることを示す興味深い結果である。ポスター発表では 3 糖以上のオリゴ糖合成の結果についても議論する。



entry	electrolyte	NMR yield	entry	electrolyte	NMR yield
1	Bu_4NBF_4	59	5	**Bu_4NOTf**	89
2	Bu_4NOTs	0	6	**Et_4N**OTf	61
3	$Bu_4NB(C_6F_5)_4$	15	7	**[Bmin]**[OTf]	70
4	Bu_4NClO_4	39	8	**[Bmpy]**[OTf]	97

1) Nair, A. V.; Gummadi, S. N.; Doble, M. *Biotechnol. Lett.* **2016**, *38*, 1519.
2) Manmode, S.; Kato, M.; Ichiyanagi, T.; Nokami, T.; Itoh, T. *Asian J. Org. Chem.* **2018**, *7*, 1802.

アルキル鎖を有するダンシルトリアルギニンペプチドによる細胞膜上のシアル酸の Turn-On 型蛍光イメージング

○岡﨑瑞紀・稲葉央・松浦和則（鳥取大院工）

Turn-On fluorescent imaging of sialic acids on cell membrane with Dansyl-triarginine peptide bearing alkyl chain (Graduate School of Engineering, Tottori University) OKAZAKI, Mizuki; INABA, Hiroshi; MATSUURA, Kazunori

細胞膜表面に存在するシアル酸含有糖脂質ガングリオシド(GM1, GM2, GM3 など)は、細胞の分化、増殖、ウイルス感染などの様々な生命現象に関与している。ガングリオシドは悪性腫瘍において過剰に発現していることから、癌バイオマーカーとしても注目されている。これまで、ガングリオシドを蛍光イメージングするプローブとして、蛍光ラベルした抗 GM1 抗体やレクチンなどが報告されている[1]。また、ファージディスプレイ法によりガングリオシドを認識する人工ペプチドレセプターも開発されているが[2]、解析が容易である「Turn-On 型」低分子プローブの開発は未発達である。我々は、ガングリオシドを認識する Turn-On 型低分子蛍光プローブとして、疎水性環境下で蛍光増大する Dansyl 基を有する Dansyl-$(Arg)_3$-OMe を開発し、ガングリオシドミセルに対して会合定数 10^5 M^{-1} オーダーで結合して蛍光強度が約 6 倍増大することを見出している。また、共焦点レーザー走査型顕微鏡(CLSM)観察により、ガングリオシド含有ジャイアントリポソーム(GL)の蛍光イメージングに成功している[3]。しかし、ガングリオシドを発現しているヒト肝臓癌由来 HepG2 細胞の蛍光イメージングでは、細胞内で蛍光像が確認されたことから、Dansyl-$(Arg)_3$-OMe が細胞内に取り込まれてしまうことが示唆された。

本研究では、細胞膜表面上のガングリオシドの特異的なイメージングを指向し、細胞膜表面と疎水性相互作用により結合する膜結合アンカーとしてアルキル鎖を導入した新規プローブ Dansyl-$(Arg)_3$-Lys(Octanoyl)-NH_2 を合成した(Fig 1a)。新規プローブによる HepG2 細胞上のガングリオシドの蛍光イメージングを検討したところ、HepG2 細胞表面で蛍光像を確認した(Fig 1b)。また、HepG2 細胞表面のシアル酸をシアリダーゼで除去した後に Dansyl-$(Arg)_3$-Lys(Octanoyl)-NH_2 を添加して CLSM 観察したところ、細胞膜表面上の蛍光像は減少した。さらに、シアル酸認識レクチン(WGA)を先に添加することにより、Dansyl-$(Arg)_3$-Lys(Octanoyl)-NH_2 のシアル酸への結合阻害が見られた。これらのことから、新規プローブ Dansyl-$(Arg)_3$-Lys(Octanoyl)-NH_2 は HepG2 細胞表面上のガングリオシドのシアル酸を認識していることが示唆された。

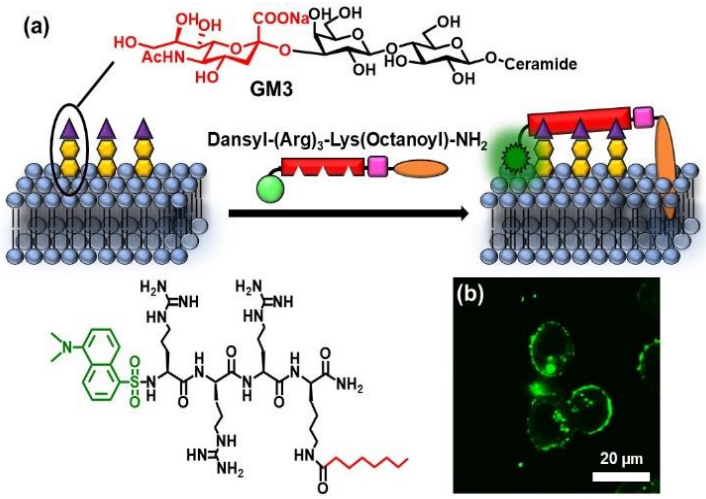


Fig 1. (a) Dansyl-$(Arg)_3$-Lys(Octanoyl)-NH_2 によるガングリオシドの蛍光イメージング (b) 20 μM Dansyl-$(Arg)_3$-Lys(Octanoyl)-NH_2 を添加した HepG2 細胞の CLSM 像 (Ex: 400 nm, Em: 524 nm)

1) J. Whited, X. Zhang, H. Nie, D. Wang, Y. Li, X. -L. Sun, *ACS Chem. Biol*., 1**3**, 2364 (2018)
2) T. Matsubara, M. Sumi, H. Kubota, T. Taki, Y. Okahata, T. Sato, *J. Med. Chem*., **52**, 4247 (2009)
3) K.Matsuura, K. Hisamoto, T. Tanaka, R. Sakamoto, M. Okazaki, H. Inaba, *ACS Org. Inorg. Au*, accepted.

タンパク質の配向を制御した再構成型リポソームの作製

○野場 考策・吉本 将悟・堀 克敏（名大院工）

Creation of a reconstituted liposome with regulated protein orientation

(Graduate School of Engineering, Nagoya University) NOBA, Kosaku; YOSHIMOTO, Shogo; HORI, Katsutoshi

細胞膜の外葉と内葉では、それぞれ異なる膜タンパク質で構成されている。膜内外における膜タンパク質組成や配向性の違いは、細胞のシグナル伝達や膜分裂、細胞内外への分子輸送、ウイルスの形成や出芽などに必須の役割を果たしている。近年、このような複雑な細胞機能を合成生物学的に理解することを目的として、脂質膜上での膜タンパク質の配向性をボトムアップ的に制御したリポソームを構築する試みがなされている。このようなリポソームを調製する方法として、Water in Oil emulsion (W/O)界面通過法がよく知られている。この方法ではリポソームを構成する脂質に官能基を持つ脂質を混ぜ込むことで、脂質膜の外葉、内葉、またはその両方にタンパク質が配向した 30 μm 前後の巨大なリポソームを作ることができる [1]。ウイルスやバクテリアに近いサブミクロンサイズのリポソームを作製する方法としては Extruder などの流体デバイスを用いた方法 [2] があるが、官能基を持つ脂質が膜の内外にランダムに配向してしまうため、タンパク質を膜内葉に配向させることは出来なかった。そこで我々は、膜内葉にタンパク質が配向したサブミクロンサイズのリポソーム創出を目的として、W/O 界面通過法と extruder 法の組み合わせを検討した。

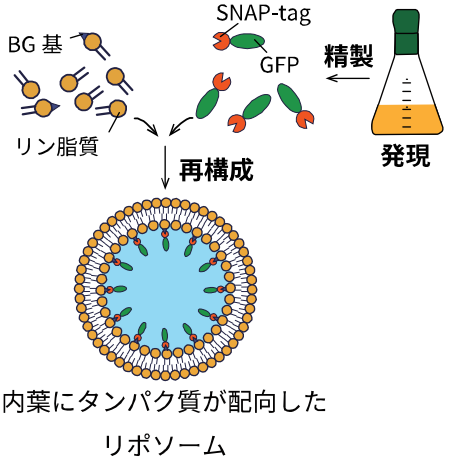


Fig. 1 Schematic illustration of the creation of the liposome with a regulated protein orientation.

タンパク質を膜内葉に配向させるため、Benzylguanine 基が修飾された脂質 (BG 脂質)を用いて SNAP タグ融合 GFP (SNAP-GFP)を封入したリポソームを W/O 界面通過法で作製し、extruder 法で 1 μm 以下に調製したところ、目的サイズのリポソームが得られた（図 1)。得られたリポソームの内部に SNAP-GFP が封入できているかを調べるため、リポソームをプロテイナーゼ K (ProK)で処理し、GFP の蛍光強度をプレートリーダーで測定した。その結果、本手法で作製したリポソームは ProK 処理の前後で蛍光強度がほとんど減少せず、SNAP-GFP がリポソーム内部に封入できていることが確認できた。続いて、封入した SNAP-GFP が BG 基と共有結合で連結しているかを調べるため、SDS-PAGE によりタンパク質を分子量に従って分離し、抗 GFP 抗体を用いた Western blotting で検出した。BG 脂質を含むリポソームに封入した SNAP-GFP は、BG 脂質を含まないリポソームに封入した SNAP-GFP よりも高分子量側にシグナルが検出され、BG 脂質と SNAP-GFP の間で共有結合が形成されていることが確認できた。これらの結果は、W/O 界面通過法と extruder 法の組み合わせにより、膜内葉にタンパク質が配向したサブミクロンサイズのリポソームが作製できることを示唆している。本手法は、ウイルスやバクテリアの脂質膜内葉のボトムアップ的再構成に応用できることが期待される。

1) Uyeda, A.; Watanabe, T.; Hohsaka, T.; Matsuura, T., Different protein localizations on the inner and outer leaflet of cell-sized liposomes using cell-free protein synthesis. *Synthetic Biology* 2018, 3(1): ysy007.
2) Ong, S. G.; Chitneni, M.; Lee, K. S.; Ming, L. C.; Yuen, K. H., Evaluation of Extrusion Technique for Nanosizing Liposomes. *Pharmaceutics* 2016, 8(4): 36.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

Lipidic cubic phase 中でのタンパク質拡散制御と経皮薬物送達への応用

○小坂秀斗[1]・若林里衣[1]・神谷典穂[1]・後藤雅宏[1]（[1]九大院工）

Modulation of protein diffusion in lipidic cubic phase and transcutaneous penetration (Graduate School of Engineering, Kyushu University[1]) KOZAKA, Shuto[1]; WAKABAYASHI, Rie[1]; KAMIYA, Noriho[1]; GOTO, Masahiro[1]

皮膚を介して薬物を投与する経皮投与法は、近年の発展が顕著な中・高分子医薬品の非侵襲的な薬物投与法として注目を集めている。ところが皮膚最外層の角層の働きにより、500 Da 以上の中・高分子量薬物を経皮浸透させることは困難である。そこで我々は脂質キュービック相 (lipidic cubic phase; LCP) に注目し、経皮浸透促進技術の開発に取り組んできた。LCP とは両親媒性分子と親水性溶媒中からなる自己集合体であり、高い安定性やゲル様の粘弾性など経皮製剤に適した物理化学的特性を有する。最大で分子量 13.3 kDa までの中分子量薬物では LCP 内に封入することで経皮浸透性が向上する一方[1]、タンパク質などの高分子量薬物は液晶中に存在する微細孔からの放出が著しく遅く、経皮浸透が制限されることが課題であった。そこで本研究では *N*-octyl-β-D-glucoside (OG)の添加によって微細孔径 (R_w) を膨潤させた swollen LCP (SLCP) を調製し、LCP 中の物質拡散性および経皮浸透性の向上を試みたのでこれを報告する (Fig. 1)。

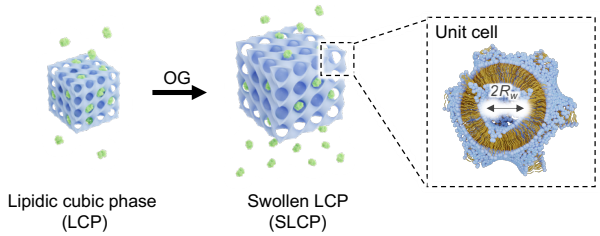


Fig. 1 Schematic illustration of this study

Glyceryl monooleate (GMO) と水からなる LCP に対して OG を添加し、R_w が 18.6 Å から 32.8 Å に増大した SLCP を調製した。ここに分子量の異なる種々のペプチドとタンパク質を内包し、超純水に接触させた際の薬物放出量を経時的に測定した。Fickian-diffusion モデルを用いて拡散係数（D）を算出したところ、内包物の分子量が大きくなるに従って D が低下したことから、LCP 中での物質拡散は内包物の分子サイズに依存する可能性が示唆された (Fig. 2)。R_w と内包物の断面回転半径 (R_g) の比 (r) と log D に負の直線関係が見られたことから (Log D = -4.22r - 5.77, R^2 = 0.9415) 、R_w を膨潤させることで、LCP 中の物質拡散を促進できると考えられる。続いて種々のタンパク質を内包した LCP および SLCP をマウス皮膚に 6 時間塗布し、浸透量を測定することで、LCP 中の物質拡散と経皮浸透性の相関を調査した。D に対して各タンパク質の経皮浸透量をプロットしたところ、正の相関が見られた (Fig. 3)。特に分子量 42.7 kDa の ovalbumin では LCP による経皮浸透促進が見られなかった一方、SCLP において 4 倍程度の浸透量向上が認められた。以上のことから、R_w 膨潤によって LCP 中での物質拡散ならびに皮膚に塗布した際の経皮浸透性を向上できることが判明した。

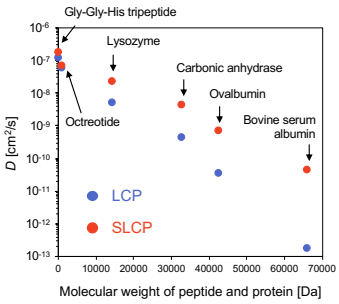


Fig. 2 Relation between D and molecular weight of peptides and proteins

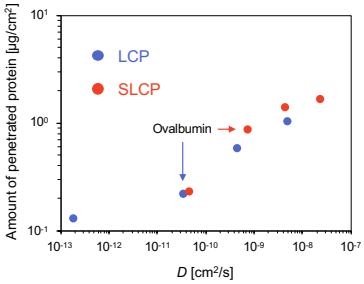


Fig. 3 Relation between skin penetration and D

1) M. Kawai, *et al.*, *Mol. Pharm.*, 18, 1038-1048, (2021).

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

ヒアルロン酸-蛍光性カルボラン複合体による BNCT

○河﨑陸[1]・山名啓太[1]・真田悠生[2]・増永慎一郎[2]・鈴木実[2]・櫻井良憲[2]・坂東香里[3]・田畑杏梨[3]・吉川浩平[3]・東秀紀[3]・杉川幸太[1]・長﨑健[3]・池田篤志[1]（[1]広大院先進理工、[2]京大複合原子研・[3]阪市大院工）

Complex of fluorescent carborane with hyaluronic acid for BNCT (Graduate School of Advanced Science and Engineering, Hiroshima University[1], Institute for Integrated Radiation and Nuclear Science, Kyoto University[2], Graduate School of Engineering, Osaka City University) KAWASAKI, Riku[1]; KEITA, Yamana[1]; SANADA, Yu[2]; MASUNAGA, Shin-ichiro[2]; SUZUKI, Minoru[2]; SAKURAI, Yoshinori[2]; BANDO, Kaori[3]; YOSHIKAWA, Kohei[3]; AZUMA, Hideki[3]; SUGIKAWA, Kouta[1]; NAGASAKI, Takeshi[3]; IKEDA, Atsushi[1]

近年の医療技術や科学技術の進展に伴って、がんの治療成績は向上してきた。それに伴って、患者の臓器を温存した低侵襲な治療法の開発が健康長寿社会の実現において求められている。そのような治療法の一つとして、ホウ素中性子捕捉療法（BNCT）が挙げられる。BNCT は我が国が世界を大きく牽引するがん放射線療法である。BNCT はホウ素と中性子の間で起こる核反応によって生じる粒子線のエネルギーを利用して遂行される。この粒子線のエネルギーの有効範囲が細胞の大きさ一つ分に相当することから、ホウ素薬剤をがん細胞選択的に送達することでがん細胞選択的に殺傷することができる。すなわち、本治療法の成否はがん細胞への選択的なホウ素薬剤の送達にある。現在、臨床にはアミノ酸誘導体である L-BPA や水溶性ホウ素クラスターである BSH がホウ素薬剤として用いられているものの、水溶性や腫瘍選択性など、送達上の課題が残されている。一方で、疎水性ホウ素クラスターであるカルボランもその分子内に多くホウ素原子を含むことや高い安定性から、BNCT 用ホウ素薬剤としての応用が期待されてきたが、その疎水性の高さから、臨床への応用は制限されてきた。

そこで本研究では、がん細胞表面に過剰発現している CD44 を介した効率的な取込みが知られているヒアルロン酸を用いることで蛍光性カルボラン [1)]を水溶化させ、その蛍光イメージング能を有するホウ素薬剤としての機能について評価を行った結果について報告する [2)]。

ヒアルロン酸と蛍光性カルボランをボールミルによりエネルギーを印加し、水で抽出することでヒアルロン酸-蛍光性カルボラン複合体を得た。複合体からなる分散液の紫外可視吸光スペクトル測定の結果から、蛍光性カルボランに由来するピークが観測され、その濃度が 730 μM（ホウ素濃度、7300 ppm）であることや蛍光イメージングに用いるのに十分な発光強度を示すことが明らかとなった。さらに、動的光散乱測定の結果から、その粒子径が EPR 効果に適した 200 nm 程度であることが確認された。

ここでヒアルロン酸-蛍光性カルボラン複合体をマウス結腸がん細胞との相互作用を確認したところ、細胞内に蛍光性カルボランに由来する蛍光シグナルが観測され、確かに送達されたホウ素の細胞内動態の観察に有用であることが明らかとなった。さらには、ヒアルロン酸を過剰に添加することで複合体の取込みが阻害されたことからも、本システムが CD44 を介して取り込まれていることが明らかとなった。また、マウスマクロファージ細胞との共培養系において、がん細胞への選択的な取込みが確認されたことから、本システムのがん細胞選択的なホウ素薬剤としての機能が示された。最後に、がん細胞内へと導入後、中性子線照射を行うことで BNCT による治療効果を検討した結果、臨床薬である L-BPA-フルクトース錯体よりも高い抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。以上のことから、本システムはホウ素の細胞内イメージングを可能にするホウ素薬剤として期待できる。

参考文献
1) K. Nishino, *et. al.*, *Org. Lett.*, **18**, 4064. (2016). 2) K. Yamana, *et. al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **559**, 210, (2021).

細菌のヘム酵素が引き起こすフェントン反応によるカーボンナノチューブの分解

○高橋慧良[1]・田口冨美子[1]・蟹江純一[2]・堀克敏[1]（[1]名大院工、[2](株)フレンドマイクローブ）

Degradation of carbon nanotubes by Fenton reaction induced by bacterial heme enzyme (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Friend Microbe Inc.[2]) TAKAHASHI, Seira[1]; TAGUCHI, Fumiko[1]; KANIE, Juichi[2]; HORI, Katsutoshi[1]

カーボンナノチューブ（CNT）は、その優れた特性から様々な用途への応用が期待されている。一方で、CNT の長期的な安全性はまだ不明であり、CNT の生分解性や環境中での運命を探ることは喫緊の課題となっている。環境中での長期的な安全性を議論するためには、CNT の生分解特性と環境運命を明らかにする必要がある。現在までにいくつかの動植物や真菌の酵素による CNT の分解が報告されているが、それらの生物の分布域や生息条件は限られている [1)]。本研究では、より幅広い環境における CNT の環境運命を探るために、細菌の酵素による CNT 分解の可能性を調査した。一般的な土壌細菌であり高いリグニン分解能力を持つことが知られる *Pseudomonas putida* mt-2 [2)]の色素脱色ペルオキシダーゼ（DyP）組換えタンパク質を，H_2O_2 存在下で CNT とインキュベートし、CNT の分解を 750 nm における吸光度（A_{750}）およびラマンスペクトルの測定により確認した。インキュベート中の DyP の酵素活性は 2,2'-azino-bis(3-ethylthiazoline-6-sulfonate)(ABTS) の酸化により測定した。30 日後、CNT 懸濁液は透明に変化し(Fig. 1)、A_{750} の減少が確認された。また、インキュベート前の CNT のラマンスペクトルに見られた D-band および G-band は 30 日後に消失し、CNT の分解が確認された。しかし，DyP はインキュベート開始後 1 時間で失活しており、CNT の分解は DyP の酵素活性によるものではない事が示唆された(Fig. 2A)。ヘム酵素は H_2O_2 存在下でヘムの崩壊により鉄を放出し失活することが知られており、インキュベート中の CNT 懸濁液の遊離鉄濃度を測定したところ、鉄濃度の増加が確認された(Fig. 2B)。キレート剤であるジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）の存在下では DyP とのインキュベートによる CNT の分解は大幅に抑制された。同じくヘム系酵素であるシトクロム P450 の組換えタンパク質を用いて実験を行ったところ、DyP と同様の結果が得られた。これらの結果から，ヘム酵素の失活により放出された鉄によるフェントン反応によって CNT が分解されることが明らかとなった。ヘム酵素は全ての細菌が分泌するものであり、細菌の細胞外 H_2O_2 濃度は CNT 存在下で上昇する事が知られているため、この現象は幅広い環境中で生じる可能性があり、CNT の環境運命を探る上で重要な知見である。

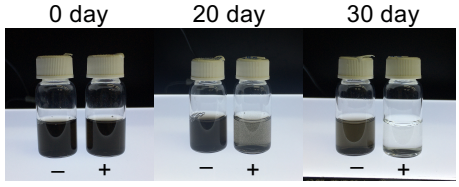


Fig. 1. Photographs of samples at different incubation times.

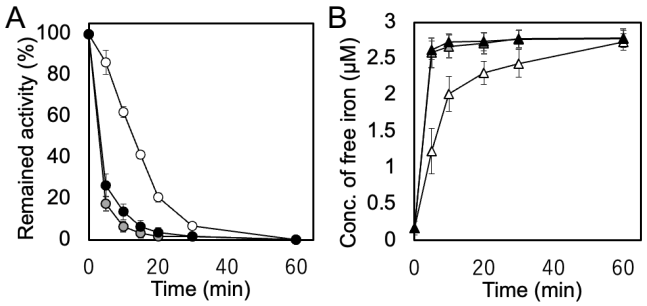


Fig. 2. Time course of enzyme activity of mt2DyP during incubation with CNTs. (B) Time course of free iron concentration in samples during incubation. The color of the marker indicates the concentration of H_2O_2: 1 mM (white), 10 mM (gray), 100 mM (black).

1) M. Chen, X. Qin, G. Zeng, *Trends Biotechnol.*, **35**, 836-846 (2017)
2) T.D.H. Bugg, M. Ahmad, E.M. Hardiman, R. Singh, *Curr. Opin. Biotech.*, **22**, 394-400 (2011)

Online Mixer

Thu. Sep 9, 2021 6:40 PM - 8:40 PM JST | Thu. Sep 9, 2021 9:40 AM - 11:40 AM UTC | Room A Zoom

Online mixer

[SG1-1] Online Mixer (SpatialChat)

懇親会 | Online Mixer

Online mixer

Thu. Sep 9, 2021 6:40 PM - 8:40 PM Room A (Zoom)

[SG1-1]Online Mixer (SpatialChat)

Please join from the following (you can enter from 6:30 pm)
https://spatial.chat/s/biosympo2021

©Division of Biofunctional Chemistry, The Chemical Society of Japan, Biotechnology Subcommittee